تأثير المستخلصات المائية لأوراق وثمار نبات التين *Ficus carica* على نمو بكتريا Rhizobia التعايشية وإنتاجها من عديد السكريات الدهنية

عمر عبد العزيز الزهيري
قسم علوم الحياة / كلية التربية
جامعة الموصل

الاستلام	القبول
٢٢ / ٠٣ / ٢٠٠٩	١٥ / ٠٧ / ٢٠٠٩

Abstract

The study aims to determine the effect of aqueous extracts of leaves and fruits of the fig plant *Ficus carica* after and before ripping period when adding it to YEM media on rhizobia bacteria growth, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* ANU 536, *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium parasponia* CP283 and *Bradyrhizobium sp*. 101/U and their production of Lipopolysaccharides (LPS),as an indirect indication of influence of fig plant remains on the plant that have symbiosis relationship with the studied bacteria when planting these plants abreastly.

The result showed the positive effect for aqueous extract of ripping fruits at concentration of 25 mg/ml on the growth of different bacteria and their production of LPS. The concentrations 25,50 and 100 mg/ ml of the extract after ripping period inhibit growth of bacteria, while the other concentrations varied positively and negatively according to their effect on bacteria growth and their production of LPS.

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد تأثير المستخلصات المائية لأوراق وثمار التين *Ficus carica* قبل وبعد فترة النضج والمضافة إلى وسط YEM السائل في نمو بكتريا الرايزوبيا *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* ANU 536، *Sinorhizobium*

Bradyrhizobium sp. ،*Bradyrhizobium parasponia* CP283،*meliloti* 101/U،وإنتاجها من عديد السكريات الدهنية (LPS) Lipopolysaccharides كإشارة غير مباشرة لتأثير مخلفات نبات التين على النباتات المتعايشة مع السلالات البكتيرية المدروسة في هذا البحث عند زراعة هذه النباتات جنبا إلى جنب.

أظهرت النتائج التأثير الايجابي للمستخلص المائي للثمار الناضجة بتركيز ٢٥ ملغم /مل على نمو البكتريا بمختلف أنواعها وإنتاجها من عديد السكريات الدهنية ، في حين ثبطت التراكيز ٢٥ و٥٠ و١٠٠ملغم/ مل من مستخلصات قبل النضج نمو هذه البكتريا، وتباينت التراكيز الأخرى سلبا وإيجابا من حيث تأثيرها على نمو البكتريا وإنتاجها من عديد السكريات الدهنية مع اختلاف نوع البكتريا.

المقدمة

يمكن إدراك سبب زيادة الدراسات والبحوث وإنشاء المؤسسات والمعاهد المتخصصة بدراسة تثبيت النيتروجين حين نعلم أن ٧٨% من الغلاف الجوي المحيط بنا يتكون من غاز النيتروجين N_2 (١)، إذ يعد عنصر النتروجين من العناصر الغذائية الهامة والأساسية لجميع الكائنات الحية على حد سواء (2)، إذ تحتاجه النباتات بكميات كبيرة تفوق حاجتها من العناصر المغذية الأخرى وتأتي هذه الأهمية لدخوله في تركيب الأحماض النووية RNA،DNA والأحماض الأمينة. فضلا عن احتواء الكلوروفيل على أربع ذرات منه، إذ أن ٧٠% من نتروجين الأوراق يدخل في صبغات التمثيل الضوئي Photosynthesis (٣)، وهو من العوامل المغذية الاكثر تحديدا لانتاج المحاصيل (٤).

تعد علاقة بكتريا الرايزوبيوم بالنباتات البقولية من الاهمية بمكانة حيث تمثل المصدر الوحيد لإمداد النبات بالنيتروجين في حالة خلو المحيط الجذري للنبات من النيتروجين(5)، كما إن لعوامل تكوين العقد Nodulation(Nod)factors المعروفة باسم Lipo-oligosaccharides LOS (٦) أو Lipo-chito-oligosaccharides LCO (٧) أو LPS (8) Lipopolysaccharides دور أساسي فهي احد العناصر الرئيسية الداخلة في تركيب الغشاء الخارجي لبكتريا الرايبوزيوم ومن الدلائل الجزيئية المشاركة والمتخصصة في جميع المراحل المبكرة او المتاخرة من عملية تكوين العقد الجذرية أثناء العلاقة التعايشية بين بكتريا الرايزوبيوم والنباتات البقولية (9)، حيث يكثر وجود LPS بشكل عام في البكتريا السالبة لصبغة كرام و يختلف تركيبه باختلاف نوع البكتريا (10).

كما إن للوسط المحيط بالبكتريا ومكوناته دورا مهما في نشوء عوامل تكوين العقد وكميته ا (١١)، وكثيرا ما تزرع النباتات البقولية متداخلة مع غيرها من النباتات أو مجاورة لها كالتين والتوت، والحمضيات وغيرها من الأشجار والنباتات.

تعتبر شجرة التين *Ficus carica* من أشجار الفواكه ذات القيمة الغذائية العالية فله أهمية كبيرة لما يحتويه من عناصر ومركبات عديدة فالثمار تحوي على البروتينات والألياف و البروفيتامين والفيتامينات مثل A,B,C,B_1,B_2,B_6 والعديد من العناصر المعدنية مثل الصوديوم والكالسيوم والفسفور والمنغنيز و المغنيسيوم والحديد والنحاس والسيلنيوم والزنك والكربوهيدرات بنسبة ٧٨%-٩٠% والألياف بنسبة ٥-٩%، كما تحوي الثمار على كلوروفيل A وB والكثير من الحوامض العضوية (13,12)، كما تحتوي الأوراق على عنصر البوتاسيوم والكالسيوم (14) والكثير من المواد والمركبات المذكورة أعلاه ضرورية لنمو وتكاثر بكتريا الرايزوبيا (١٦,١٥)، فضلا عن احتواء النبات على العديد من مضادات الأكسدة Antioxidant والمركبات العضوية كالكومارين Coumarins والروتن Rutin ذات التأثير التثبيطي لنمو عدد من الأحياء المجهرية (١٧,١٤) وقد خص بالعديد من الدراسات وللمهتمين بهذا النبات هيئة استشارية خاصة في أمريكا تدعى (هيئة تين كاليفورنيا) وقد تناولت دراسات تأثيره على الإنسان (١٩,١٨)، و تأثير مستخلصات أوراقة على اللشمانيا (٢٠)، إن شجرة التين *Ficus carica* من الأشجار المعمرة غير دائمة الخضرة أي التي تتساقط أوراقها في فصل الخريف (الأشجار النفضية deciduous) ونظراً لندرة أو انعدام الدراسات حول تأثيره على النبات جاءت هذه الدراسة لمعرفة تأثير المستخلصات المائية لأوراق وثمار التين على نمو البكتريا وإنتاجها من عديد السكريات الدهنية كإشارة غير مباشرة لتأثير هذه المستخلصات على النباتات البقولية المتعايشة مع الأصناف البكتيرية المدروسة من بكتريا الرايزوبيا المثبتة للنيتروجين.

المواد وطرائق العمل

١- جمع وتهيئة أوراق وثمار نبات التين *Ficus caric*.

جمعت أوراق وثمار نبات التين من أشجار التين من إحدى المزارع غرب مدينة الموصل حي ١٧-تموز خلال فترتين الأولى بعد اكتمال نموها مبلشرة وهي خضراء براقة، والثانية في فترة وصول الورقة إلى مرحلة النضج المتأخر (قبل سقوط الأوراق)، وكذا الحال مع الثمار حيث جمعت وهي ما تزال خضراء غير ناضجة كما تم جمعها بعد اكتمال نضجها ، نظفت الأوراق من الشوائب والأتربة و تركت لتجف في درجة حرارة المختبر بعيدا عن ضوء الشمس مع التقليب كل يوم، وبالنسبة للثمار فقد قسمت لنصفين كي تجف بسرعة.

٢- بكتريا الرايزوبيا ومصدرها.

استخدمت البكتريا *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* ANU536، *Bradyrhizobium parasponia* CP283، *Bradyrhizobium sp*101U، والتي تم الحصول عليها من مركز تثبيت النتروجين الجوي- جامعة نوتنكهام- المملكة المتحدة وبكتريا *Sinorhizobium meliloti* كعزلة محلية عزلت من جذور نباتات ألجت من نفس

مكان جمع أوراق وثمار التين ، حيث تصنف البكتريا الأولى والرابعة من السلالات السريعة النمو على الأوساط الغذائية والثانية والثالثة من بكتريا الرايزوبيا بطيئة النمو (٢٢,21).

٣- تحضير المستخلصات المائية

اعتمدت طريقة Riose وجماعته (٢٣)، في تحضير المستخلصات المائية حيث سحقت النماذج النباتية بوساطة طاحونة كهربائية، مزج بعد ذلك ٤٠ غم من كل نموذج نباتي مع ١٦٠ مل من الماء المقطر المعقم بنسبة ١:٤ وزن: حجم. سحق النموذج باستخدام جهاز السحق Blender داخل حمام ثلجي مع تحريك المزيج بوساطة المحرك الكهربائ ي لمدة ساعة واحدة وذلك لتفجير جدران الخلايا النباتية ثم ترك في الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة لغرض النقع، رشح المزيج بعد ذلك بوساطة قمع وباستخدام ورق الترشيح Whatmann No.1 مع التفريغ لغرض التخلص من الأجزاء غير المسحوقة والألياف. ثم جفف المستخلص الناتج بالتجميد تحت ض غط مخلخل بوساطة جهاز التجفيد Lyophilizer المجهز من شركة Edwards ثم حفظت العينات بعد جفافها في قناني زجاجية ذات غطاء محكم وفي ظروف خالية من الرطوبة إذ حفظت المستخلصات النباتية بالتجميد لحين الاستخدام.

٤- تعقيم المستخلصات المائية.

اخذ غرام واحد من المستخل ص النباتي الجاف وأذيب في ٥ مل من الماء المقطر المعقم، وبذلك يكون لدينا مستخلص بنسبة ٢٠٠ ملغم /مل كتركيز قياسي، عقم هذا المستخلص باستخدام المرشحات الغشائية membrane filter 0.22m لمنع مرور الجراثيم من خلاله وعد هذا المركز القياسي مصدرا لتحضير التخافيف اللاحقة المستخدمة في البحث (٢٤).

٥- طريقة اختبار الحساسية (الانتشار بالأقراص).

تم تحضير معلق بكتيري لكل عزلة و اخذ منه ٠.١ مل ونشر على سطح طبق يحتوي على وسط YEM الصلب باستعمال مسحة قطنية معقمة Cotton swab، ثم تركت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠دقيقة، ولدراسة الفعالية المضادة للمستخلصات النباتية على نمو البكتريا فقد حضرت أقراص من ورق الترشيح Whatmman No.1 بواسطة ثاقبة يدوية بقطر ٦ ملم، وشبعت بتراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية المراد اختبارها وذلك باضافة ١مل من كل تركيز من المستخلص النباتي الى قنينة حاوية على ١٠٠ قرص معقم (٢٥).

تم تثبيت الأقراص بوساطة ملقط معقم عل سطح وسط YEM الصلب (٢٦) الملقح بالبكتريا بعمر ٢٤ ساعة قيد الدراسة وحضنت بدرجة حرارة ٢٨م° لمدة ٣ أيام للبكتريا سريعة النمو و ٤ أيام للبكتريا بطيئة النمو، بعدها تم قياس مناطق التثبيط إن وجدت (27).

٦- إضافة المستخلصات المائية إلى وسط YEM السائل على إنتاج عديد السكريات الدهنية من قبل بكتريا الرايزوبيا

أضيفت المستخلصات المائية لكل من الثمار والأوراق والمعقمة بالترشيح وحسب التراكيز التالية ٠.٠،12.5،٢٥،٥٠،١٠٠ ملغم/مل إلى وسط YEM السائل المعقم، لقحت هذه الأوساط بنقل مستعمرتين من بكتريا الرايزوبيا قيد الدراسة (*R. l.* bv. *trifolii* ANU536 و *B. sp* 101U. و *B. parasponia* CP283 و *Sinorhizobium meliloti*)، إلى دوارق سعة ٢٥٠ مل تحتوي على ١٠٠ مل من وسط YEM السائل وضعت هذه الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة بدرجة ٢٨+٢°م ولمدة ٣ أيام للبكتريا سريعة النمو و ٤ أيام للبكتريا بطيئة النمو وفي ظروف الظلام التام.

٧- عزل وتقدير كمية عديد السكريات الدهنية Lipopolysaccharides (LPS) من بكتريا الرايزوبيا

اعتمدت طريقة Ervin and Hubbell(٢٨)، في عزل LPS من هذه البكتريا م ع إجراء تحوير عليها، بإضافة ١% من مادة Na_2-EDTA إلى المزرعة النامية وأعيدت إلى الحاضنة الهزازة وتركت فيها لمدة نصف ساعة، ثم نبذت الأوساط الزرعية بجهاز الطرد المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق. تم استخلاص عديد السكريات الدهنية LPS من الجزء الرائق ا لذي نقل إلى دورق نظيف وأضيف إليه الايثانول المبرد بنسبة ١: ٣، حجم: حجم، مع التحريك المستمر باستخدام قضيب زجاجي لغاية تجمع LPS بشكل كتلة مخاطية القوام . ثم نقل إلى طبق بتري ووضع في الفرن بدرجة ٦٠°م لمدة ١٢ ساعة،أذيب LPSبالماء المقطر و اجري له فرز غشائي بأكيا س الديلزة Dialysis Sac ضد الماء المقطر لمدة ٧٢ ساعة مع استبدال الماء المقطر كل ٣ ساعات. و نقل LPS من أكياس الديلزة إلى أطباق معلومة الوزن وضعت في الفرن الكهربائي عند درجة ٦٠ °م لمدة ٢٤ ساعة، وتم حساب وزن LPS الجاف بفارق الوزنين.

النتائج والمناقشة

١- تأثير المستخلص المائي للأوراق والثمار في نمو بكتريا الرايزوبيا على وسط YEM الصلب.

أظهرت نتائج دراسة استخدام التراكيز المختلفة للمست خلصات المائية لأوراق وثمار نبات التين (الجدول ١) تباينات كبيرة وخاصة بين المستخلصات لفترة النضج وما قبله ا، فبالنسبة لمستخلصات ما قبل النضج فقد أظهرت بكتريا *S.meliloti* /*على* استجابة من حيث تأثرها

حيث بلغ متوسط أقطار منطقة التثبيط ١١.٠ و١٤.٥ ملم لمستخلصات الأوراق والثمار على التوالي عند التركيز ١٠٠ملغم/مل . في حين تباينت التأثيرات التثبيطية للنمو بين مستخلص الأوراق والثمار فبالنسبة لمستخلص الأوراق كان اعلي استجابة مسجلة بعد بكتريا *S. meliloti* هي لبكتريا *R. l.* bv. *trifolii* ANU536، *B. parasponia* CP283 ، بلغت ٩.٠، ٨.٠ ملم وعلى التعاقب في حين كانت بكتريا *B. sp.* 101/U أقل تاثرا حيث بلغ قطر منطقة التثبيط ٦.٠ ملم عند التركيز ذاته والبالغ ١٠٠ ملغم/مل يمكن تفسير ذلك إلى اختلاف تركيبها الجيني والذي يمكنها من إصابة عدد كبير من النباتات البقولية والتعايش مع أنسجة نباتية تحتوي عدد كبير من المواد والمركبات الفعالة والتي قد تتشابه مع تلك الموجودة في نبات التين (١٧و٢٩)، أما مستخلصات الثمار لما قبل النضج فقد كانت ذات تأثير تثبيطي اكبر من الأوراق،ربما يعزى ذلك الى احتوائها على كميات اكبر من الحليب النباتي latex والعناصر المعدنية الأخرى وذلك من خلال تأثيره على تركيب البروتين في الخلية البكتيرية (٣٠) حيث بلغ أعلى قطر لمنطقة التثبيط ١٤.٥ ملم مع بكتريا *S.meliloti*.

الجدول (١): تأثير المستخلص المائي للأوراق والثمار الغير ناضجة بتراكيز مختلفة في نمو بكتريا الرايزوبيا.

البكتريا	متوسط أقطار مناطق التثبيط (ملم) لمستخلصات الأوراق للتراكيز (ملغم/مل)				متوسط أقطار مناطق التثبيط (ملم) لمستخلصات الثمار للتراكيز (ملغم/مل)			
	12.5	25	50	100	12.5	25	50	100
R. l. bv. *trifolii* ANU536	0.0	3,0	4.5	9.0	0.0	0.0	4.0	8.0
S. meliloti	1.0	2.5	5.5	11.0	0.0	2.0	11.5	14.5
B. parasponia CP283	2.0	3.5	4.0	8.0	2.0	3.5	10.0	14.0
B. sp. 101/U	0.0	0.0	2.5	6.0	2.5	4.5	8.0	9.0

القيم الواردة في الجدول تمثل معدل ٣ مكررات/معاملة/بكتريا.

(قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم مطروح منها ٦ ملم قطر قرص ورق الترشيح)

وفيما يخص مستخلص مابعد النضج فقد اظهرت النتائج (الجدول ٢) صورة معاكسة لما سبق إذ أظهرت مستخلصات الأوراق تأثيرا تثبيطيا على نمو البكتريا أعلى من الثمار وكان أكثرها تثبيطا عند التركيز ١٠٠ ملغم/مل وسجلت كذلك مع بكتريا *S. meliloti* وكان اقلها تأثراً هي بكتريا *B. sp.* 101/U ٧.٠ ملم و يعزى ذلك الى احتواء الأوراق الناضجة على الكثير من المركبات السامة والتراكمات الايضية التي أخلت في تركيب وسط نمو البكتريا وم كوناته (31) ولم تظهر عينات المقارنة المستخدمة و الخالية من أي تركيز من المستخلص النباتي (للعينات المأخوذة قبل النضج وبعده) تأثيرا تثبيطيا على نمو مختلف أنواع البكتريا قيد الدراسة.

الجدول (٢): تأثير المستخلص المائي للأوراق والثمار الناضجة بتراكيز مختلفة في نمو بكتريا الرايزوبيا

البكتريا	متوسط أقطار مناطق التثبيط (ملم) لمستخلصات الأوراق للتراكيز (ملغم/مل)				متوسط أقطار مناطق التثبيط (ملم) لمستخلصات الثمار للتراكيز(ملغم/مل)			
	12.5	25	50	100	12.5	25	50	100
R. l. bv. *trifolii* ANU536	1.0	3.0	9.5	12,0	0.0	0.0	0.0	1.0
S. meliloti	2.0	2.5	6,0	12,5	0.0	0.0	1.5	2.0
B. parasponia CP283	2.5	3.5	5.5	9.0	0.0	0.0	1.0	1.5
B. sp. 101/U	0.0	2.0	3.5	7.0	1.0	0.0	0.0	0.0

القيم الواردة في الجدول تمثل معدل ٣ مكررات/معاملة/بكتريا.

(قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم مطروح منها ٦ ملم قطر قرص ورق الترشيح)

٢- تأثير إضافة مستخلصات الأوراق والثمار إلى وسط YEM السائل على إنتاج عديد السكريات الدهنية (LPS) من بكتريا الرايزوبيا.

وبالنسبة لتأثير المستخلصات على إنتاج عديد السكريات الدهنية في وسط YEM السائل فكذلك كان هناك تفاوتا بين مستخلصات قبل النضج ومستخلصات مابعد النضج ، ففيما يخص الأولى (الجدول ٣) فقد أثر التركيز ١٠٠ ملغم/مل على بكتريا *R. l.* bv. *trifolii* ANU536 وبكتريا *S. meliloti* وبذلك انعدم انتاج البكتريا من عديد السكريات الدهنية LPS كما ان التركيز ذاته أثر في بكتريا *B.parasponia* CP283 و *B. sp.* 101/U وذلك انعكس ذلك على إنتاجهما من عديد السكريات الدهنية حيث بلغ ٠.٦٠ و ٠.٣١ غم/لتر على التعاقب.

وأظهرت التراكيز الأخرى لمستخلصات الأوراق تأثيرا على إنتاج بكتريا *B. parasponia* CP283 و *B. sp.* 101/U من عديد السكريات الدهنية حيث اخذ هذا التأثير بالانخفاض بصورة طردية مع انخفاض تركيز المستخلص حيث بلغ ١.٦٠ ملغ م/لتر لبكتريا *B. parasponia* CP283 و ١.٤٠ ملغم/لتر لبكتريا *B. sp.* 101/U عند التركيز ١٢.٥ ملغم/مل مع الأخذ بنظر الاعتبار عينات المقارنة لكل بكتريا.

في حين تأثرت بكتريا *S.meliloti* وارتفع إنتاجها من عديد السكريات بنسبة زيادة عن عينة المقارنة بلغت ١٢% عند التركيز ١٢.٥ ملغم/مل وبلغ ١.٦٤ غم/لتر، وكذلك تأثرت بكتريا *R. l.* bv. *trifolii* ANU536 وارتفع إنتاجها من عديد السكريات الدهنية بنسبة زيادة بلغت ٧% عند التركيز ذاته لمستخلصات الأوراق بلغ ١.٤٢ غم/لتر عن عينة المقارنة، و كان للتركيز ٥٠ ملغم/مل من مستخلص الأوراق تأثير محفز اكبر لإنتاج بكتريا *B. sp.* 101/U من عديد السكريات الدهنية يمكن تعليل هذه الزيادة إلى استفادة البكتريا من المواد المساعدة للنمو كبعض

العناصر و الفلافونيد وعدم تأثرها بالمواد المثبطة الأخرى مثل الك ومارين عند التركيز ذاته (١٧,١٢) الجدول ٣.

وقد أظهرت مستخلصات الثمار غير الناضجة تأثيرا تثبيطيا كليا عند التركيز ١٠٠ ملغم/ملم لكل من بكتريا *R. l.* bv.*trifolii* ANU536 و *S. meliloti* في حين تفاوتت التراكيز الأخرى من حيث تأثيرها على البكتريا (الجدول ٣)، ويمكن تفسير التباين بين نتائج تأثر البكتريا إلى التفاوت في تركيبها الجيني و سرعة نموها حيث تصنف بكتريا *R. l.* bv. *trifolii* ANU536 و *S. meliloti* ضمن البكتريا سريعة النمو والصنفين الأخيرين من الأصناف البطيئة (٣٢,٢٢,٢١)، وتعد البكتريا البطيئة النمو ذات مدى أوسع من حيث إصابتها لعدد اكبر من النباتات البقولية وخاصة بكتريا *B. sp.* 101/U (٢٩) لذا قد يفسر عدم تأثرها بالمواد والمركبات المثبطة لنبات التين إلى تشابهها مع المواد والمركبات الموجودة في النباتات التي لها القابلية على إصابتها (٣٣,١٧).

وفيما يخص تأثير مستخلصات أوراق وثمار التين الناضجة على نمو البكتريا وإنتاجها من عديد السكريات الدهنية فقد أضعفت مستخلصات الأوراق وبشكل واضح إنتاج البكتريا من عديد السكريات الدهنية وكان لبعض التراكيز المرتفعة تأثيرا تثبيطيا كليا على الإنتاج (الجدول ٤)، وفي ما عدا بكتريا *B. sp.* 101/U والتي لم تتأثر عند التركيز ١٢.٥ ملغم/مل وارتفع بشكل يسير انتاجها من عديد السكريات الدهنية وقد يعزى ذلك الى استفادة هذة البكتريا من بعض المركبات البروتينية اكثر من تأثرها بالمركبات الأخرى، وحيث ان المحفز لل *nod* gene فيها هو Isoflavones وليس flavones والموجود في التين (٢٩) أما بالنسبة لمستخلصات الثمار الناضجة فقد كانت التراكيز المنخفضة ٢٥،١٢.٥ (ملغم/مل) تأثيرا ايجابيا على إنتاج البكتريا من عديد السكريات الدهنية بنسبة زيادة ٥٠% لبكتريا *B. sp.* 101/U عند التركيز ١٢.٥ ملغم/مل حيث بلغت كمية LPS ٢.٤٠ غم/لتر، قد يفسر ذلك باستفادة البكتريا من المركبات البروتينات والسكريات المرتفعة التركيز في ثمار التين الناضجة، عند التراكيز المنخفضة من المستخلصات وتأثرها عند ارتفاع هذه التراكيز فضلا على احتوائها على المركب العضوي rutin والايسوفلافونويد isoflavonoids والتي لها دور مهم بتراكيز معينة في نمو البكتريا وإنتاجها من عديد السكريات الدهنية (٣٤).

إن التباينات الملاحظة في نتائج مستخلصات ما قبل النضج و بعدها قد تفسر الى احتمال اكتمال تكوين بعض المواد أو استخدامها من قبل النبات وانتقال مواد اخرى من الورقة قبل او عند وصولها الى مرحلة السقوط كالبروتينات والأملاح وغيرها(٣٥) فضلا عن عامل الوقت والتأثير البيئي لكل فترة وانعكاسها على النبات ومكوناته

وقد يعزى السبب في تباين بعض النتائج إلى احتمال زيادة تركيز المواد المحفزة للنمو وإنتاج عديد السكريات الدهنية عند تركيز معين مما يودي إلى تقليل د ور المواد المثبطة فتصبح فعالية التحفيز أعلى من فعالية التثبيط فتنمو البكتريا ويقل تأثير المواد المثبطة أو يحدث العكس، مع

الأخذ بالحسبان التباين في التركيب الجيني لكل بكتريا ومدى تأثره بالمواد والمركبات الموجودة بالمستخلص النباتي(١٥ و١٧ و٣٣).

إن أهمية هذه ا لدراسة تكمن في كونها الرائدة إن لم تكن الأولى التي ميزت بين مراحل النم و المبكر ومرحلة النضج في النبات للحصول على مستخلص متباين من حيث التركيب والمكونات بدلالة النتائج المحصلة من خلال هذه الدراسة.

الجدول (٣): تأثير إضافة مستخلصات الأوراق والثمار غير الناضجة إلى وسط YEM السائل على إنتاج عديد السكريات الدهنية (LPS) من بكتريا الرايزوبيا.

نوع بكتريا الرايزوبيا	تركيز مستخلص الأوراق ملغم/مل	عديد السكريات الدهنية (غم/لتر)	تركيز مستخلص الثمار ملغم/مل	عديد السكريات الدهنية (غم/لتر)
R. l. bv. *trifolii* ANU536	**0.0**	1.32	**0.0**	1.32
	12.5	1.42	12.5	1.20
	25	0.92	25	0.86
	50	0.62	50	0.35
	100	0.00	100	0.00
S. meliloti	**0.0**	1.45	**0.0**	1.45
	12.5	1.64	12.5	1.12
	25	1.20	25	0.33
	50	0.28	50	0.26
	100	0.00	100	0.00
B.parasponia CP283	**0.0**	1.78	**0.0**	1.78
	12.5	1.60	12.5	1.22
	25	1.46	25	0.78
	50	1.10	50	0.33
	100	0.60	100	0.26
B. sp. 101/U	**0.0**	1.70	**0.0**	1.70
	12.5	1.40	12.5	0.73
	25	1.33	25	0.59
	50	1.48	50	0.36
	100	0.31	100	0.13

القيم الواردة في الجدول تمثل معدل ٣ مكررات/معاملة/بكتريا.

LPS: Lipopolysaccharides، **0.0**: المقارنة.

الجدول (٤): تأثير إضافة مستخلصات الأوراق والثمار الناضجة إلى وسط YEM السائل على إنتاج عديد السكريات الدهنية (LPS) من بكتريا الرايزوبيا.

نوع بكتريا الرايزوبيا	تركيز مستخلص الأوراق ملغم/مل	عديد السكريات الدهنية (غم/لتر)	تركيز مستخلص الثمار ملغم/مل	عديد السكريات الدهنية (غم/لتر)
R. l. bv. *trifolii* ANU536	**0.0**	1.32	**0.0**	1.32
	12.5	0.46	12.5	1.81
	25	0.22	25	1.40
	50	0.00	50	0.71
	100	0.00	100	0.39
S. meliloti	**0.0**	1.45	**0.0**	1.45
	12.5	0.93	12.5	1.77

1.46	25	0.31	25	
0.77	50	0.00	50	
0.36	100	0.00	100	
1.78	**0.0**	1.78	**0.0**	*B.parasponia* CP283
2.12	12.5	1.20	12.5	
1.88	25	0.68	25	
1.82	50	0.10	50	
1.30	100	0.00	100	
1.70	**0.0**	1.70	**0.0**	*B. sp.* 101/U
2.40	12.5	1.78	12.5	
1.89	25	0.97	25	
1.36	50	0.35	50	
1.21	100	0.00	100	

القيم الواردة في الجدول تمثل معدل ٣ مكررات/معاملة/بكتريا.

LPS: Lipo-polysaccharides، **0.0**: المقارنة.

الاستنتاجات والتوصيات

١) تظهر الدراسة أهمية عامل العمر للجزء النباتي المستخدم للحصول على مستخلص يختلف من حيث مكوناته بدلالة النتائج المبينة في الدراسة.

٢) أهمية دراسة تأثير المستخلصا ت على البكتريا كطريقة غير مباشرة وسريعة خاصة للنباتات البقولية التي تقيم علاقة تعايشية مع البكتريا التكافلية.

المصادر

1) Ladha J. K. and Reddy P. M., The Quest for Nitrogen Fixation in Rice, International Rice Research Institute, Makati City, Philippines (2000).

2) FAO., Legume inoculants and their use a pocket manual jointly prepared by Niftal Project (1984).

٣) الصحاف، فاضل حسين ، أنظمة الزراعة بدون استخدام التربة ، دار الحكمة للطباعة والنشر– جامعة بغداد، بغداد العراق (١٩٨٩).

4) Dylan T., Helinski D. R. and Ditta G. S., J. Bacteriol. 172:1400-1408 (1990).

5) Gressent F., Mantegazza N., Cullimore J., Driguez H., Ranjeva Rand Bono, J. Mol.Plant-Microbe Interact., 15:834-839 (2002).

6) Spaink H. P., Sheeley D. M., Van Brussel A. A. N., Glushka J., York W. S., Tak T., Geiger O., Kennedy E. P., Reinhold V. N. and Lugtenberg J. J., Nature, 354:125-130 (1991).

7) Daiz C. L., Spaink H. P. and Kijne J. W., Mol.Plant-Microbe Interact.13:268- 276 (2000).

8) Vandenplas M. L., Carlson R. W., Jeyaretnam B. S., McNeill B., Barton M. H., Norton N., Murray T. F. and Moore J. N., J. Biol. Chem., 277: 41811- 41816(2002).

9) Campbell R. O., Reuhs B. L. and Walker C. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,99: 3938-3943(2002).

١٠) الخفاجي، زهرة محمود، التقنية الحيوية الميكروبية (توجهات جزيئية) وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية، جامعة بغداد، العراق (٢٠٠٨).

١١) الزهيري، عمر عبد العزيز احمد ، دلائل التخصص العائلي والتحول الوراثي، بين نباتات البرسيم الابيض وبكتريا Rhizobia التعايشية و *Agrobacterium* المهندسة وراثياً . رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، العراق (٢٠٠٢).

١٢) المنظمة العربية للتنمية الزراعية ، النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي ، الخرطوم، السودان (١٩٨٨).

13) Rizk A. M. and AL-Nowaihi A. S., The phytochemstry of horticultural plant of Qatar. Alden press Ltd, Oxford, U. K.(1989).

14) Rizk A. M, El-ghazaly G. A., Miedicinal and Poisonous Plant of Qatar. Scientific and Applied research centre University of Qatar, the Doha modern printing, Doha, Qatar(1995).

١٥) الكسندر، مارتن، مقدمة في مايكرو بيولوجيا التربة. مترجم، دار النشر. جون ويلي وأولاده نيويورك، الولايات المتحدة الأمريكية (١٩٨٨).

16) Hubbell D. H., Morales V. M. and Vmail-Garcia M., Appl. Environ. Microbiol., 35: 210-213(1978).

17) Adriana B., Sergio S., Vivienne S., Maurizio B., Antonella M., Nicoletta F. and Sergio R., Molecules, 14: 939-952 (2009).

18) De feo D. F., Indian Drugs 2005, 42:167(1992).

19) Kirlikar R. H, and Basu R. N., Indian J. Exp. Biol. 2005, 43:445-449 (1984).

20) Al-Mawla O. G., Al-Ani A. J., Al-Hadithi, I., J. of Basra Researches. 33:89 - 92(2007).

21) Allen O. N. and Jordan A. J., Genus II. *Agrobacterium*. In Bergery's Manual of determinative Bacteriology. 8th Edition (Eds., R. E. Buchanan, and N. E. Gibbons)The Williams and Wilkins Company Baltimore, USA.pp. 264-267(1974).

22) Trinick M. J., Nature, 244:459-460(1973).

23) Riose L., Recio M. C. and Villar A., J. Ethnopharmacol., 21: 139-152 (1987).

٢٤) النعمان ، اديبة يونس شريف ، التاثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام . رسالة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل، الموصل، العراق (١٩٩٨).

25) Merius D. J., Veldman K. T., Vanderpal R. H. M. and Zijderveld F. G., Veterinary Quarterly. 21: 99-104(1999).

26) Vincent J. M., A Manul For The Practical Study of Root Nodule Bactria. IBP Handbook No. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Oxford. U. K. pp.113-131(1970).

27) Vandepitte J., Engback K., Piote P. and Heuk C., Basic Laboratory procedures in clinical Bacteriology. World Health Organization, Geneva.Switzerland(1991).

28) Ervin S. E. and Hubbell D. H., Appl. Environ. Microbiol, 49: 61-68 (1985).

29) Hirsch A. M., Developmental biology of legume nodulation. New Phytol., 122: 211- 237(1992).

30) Alwan A. H. and Al-bayati Z. A. F., Int.J. Crude Drug Res., 26, 209-213 (1988).

٣١) محمد، عبد العظيم كاظم ، علم فسلجة النبات، الجزء الثالث، وزارة التعل يم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، كلية الزراعة، مديرية مطبعة جامعة الموصل، الموصل، العراق (١٩٨٥).

32) Petit A., Stougaard J., Kuhle A., Marcker K. A. and Tempe J., Mol. Gen. Genet., 207: 245-250(1987).

33) Ng T. B., Julia M. L. Ling, Zheng-Tao W., Jin Na C. and Guo J. X., General Pharmacology, 27:1237-1240(1996).

34) Long S., Plant Cell, 8:1885-1898 (1996).

٣٥) محمد، عبد المطلب سيد، نمو النبات. مترجم، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، مديرية مطبعة جامعة الموصل، العراق (١٩٨٠).