مجلة العلوم البحثة والتطبيقية
Journal of Pure & Applied Sciences
www.Suj.sebhau.edu.ly ISSN 2521-9200
Received 06/11/2017 Revised 28/1/2018 Published online 30/06/2018

انتقـــاء عـــزلات ريزوبيـــة متحمـــلة للملوحـــة من نباتات بقولية برية و مزروعة في المنطقة الجافة من ليبيا (فزان)

*صالح حسن محمد و نجية زيدان برطاطة و مسعودة عمر خليفة

قسم علم النبات– كلية العلوم– جامعة سبها، ليبيا

*للمراسلة: sal.eltaher@sebhau.edu.ly

الملخص اربعة وثمانون عزلة ريزوبية عزلت من نباتات بقولية مختلفة (Pisum sativa, Vicia faba, Cicer arietinum, Medicago sativa, Trigonella foenumgraecum, Lotus halophils, Astragalus fructicus, Hippocarpis, Viciae rvilla, V. narbonensis, Medicago polymorph and M. littoralis)، مزروعة أو برية في مواقع مختلفة من المنطقة الجافة من ليبيا (فزان)، هذه العزلات اختبرت لقدرتها على تحمل املاح كلوريد الصوديوم، البوتاسيوم و الماغنيسيوم على وسط مستخلص الخميرة والمانيتول، بعض العزلات الريزوبية من نبات الحلبة (Trigonella foenumgraecum) تم اختبارها على نبات البرسيم الحجازي (Medicago sativa) وذلك لتحديد مستوى ملح كلوريد الصوديوم الذي يسمح بتكوين التكافل وتثبيت النتروجين، نتائج اختبار الملوحة على الوسط الصلب عرضت للتحليل العددي (Numerical taxonomy)، حيث تكونت ثلاثة مجاميع، أغلب عزلات المجموعة الاولى كانت مقاومة لجميع الاملاح المختبرة، حيث نمت في مستوى ملوحة ما بين 8.5– 9.5 %، عزلات المجموعة الثانية كانت حساسة لملحي كلوريد الصوديوم و الماغنيسيوم واقل مقاومة لملح البوتاسيوم، عزلات المجموعة الثالثة كانت مختلفة في استجابتها للأملاح المختبرة، نتائج اختبار نمو بعض العزلات المقاومة للملوحة في الوسط السائل كانت مشابهة لنموها على وسط الاجار، حيث تراوح التركيز الذي يسمح بنموها ما بين 5 – 8 % من كلوريد الصوديوم وان التركيز المانع لنموها كان ما بين 6 – 9 %، نتائج اختبار تأثير ملح كلوريد الصوديوم على التكافل بين نبات البرسيم الحجازي وبعض العزلات (T3 و T5) من نبات الحلبة أظهرت ان اقصى تركيز يسمح بتكوين التكافل كان ما بين 0.8 و 1 % من كلوريد الصوديوم وانه كلما زاد تركيز الملح قل عدد العقد المتكونة، وان المستوى 1.5 % كان مثبطاً لعملية التكافل.

الكلمات المفتاحية: عزلة، نباتات بقولية، فزان، كلوريد الصوديوم، البرسيم الحجازي، التكافل.

Selection of salinity tolerant rhizobial isolates from wild and cultivated legumes in arid region of Libya (Fezzan)

*Salah H. Mohamed , Najia Z. Bertata , Massoudah O. Khalifa

Department of Botany, Faculty of Science , Sebha University, Libya

*Corresponding Author: sal.eltaher@sebhau.edu.ly

Abstract Eighty-four isolates were isolated from different legumes (*Pisum sativa*, *Vicia faba*, *Cicer arietinum*, *Medicago sativa*, *Trigonella foenumgraecum*, *Lotus halophils*, *Astragalus fructicus*, *Hippocarpis*, *Viciae rvilla*, *V. narbonensis*, *Medicago polymorph* and *M. littoralis*) Planted or wild in different locations of the dry zone of Libya (Fezzan) These isolates were tested for their ability to tolerate the salts of sodium, potassium and magnesium chloride on yeast extract and menthol, some rhizobia isolates of the fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) It was tested on alfalfa plant (*Medicago sativa*) This is to determine the level of sodium chloride salt which allows the formation of Symbiosis and nitrogen fixation, results of the salinity test on the steel medium were subjected to numerical analysis (Numerical Taxonomy), where three groups were formed. Three groups were formed. Most of the isolates of the first group were resistant to all tested salts. They grew at a salinity level of 8.5 to 9.5%. The isolates of the second group were sensitive to sodium and magnesium chloride salts and less resistant to potassium salt. Group III isolates were different in their response to salts tested, the results of the test of the growth of some saline resistant isolates in the liquid medium were similar to their growth on the middle of the agar, where the concentration allowed growing between 5-8% of sodium chloride, the growth-inhibiting focus was between 6-9%, effect of sodium chloride salt on the symbiosis between alfalfa plant and some isolates (T3 and T5) from the fenugreek showed that the maximum concentration allowed for the formation of Symbiosis was between 0.8 and 1% of chloride Sodium, the higher the concentration of salt, the smaller the number of nodes formed, and the 1.5% level was a disincentive to the Symbiosis process.

Keywords: Isolate, Legumes Plant, Fezzan, Sodium Chloride, *Medicago sativa*, Symbiosis.

المقدمة

تتوقع منظمة الغذاء والزراعة العالمية الفاو [1]، أن يتزايد عدد السكان في العالم إلى 8 بليون نسمة في العام 2025 م و أن يقفز هذا الرقم إلى 8.5 بليون في العام 2050 م بمعدل زيادة سنوية تقدر بـــــ 80 مليون نسمة، كما يُتوقع أيضاً أن 97 % من هذه الزيادة في عدد السكان تكون على حساب تطور الدول والأراضي المزروعة؛ وعليه فإن هذه الزيادة تتطلب إنتاج مضاعف من الغذاء، لكن المشاكل الكبرى التي تواجه كثير من دول العالم خاصة النامية منها اتساع رُقعـــــــة الأراضي الغير صالحـــــــة للزراعة الناتجة من عوامل التصحر المختلفة و المتمثلة في الجفاف، ارتفاع درجـــــــة الحرارة و الملوحـــــــة [2]. تقدر المنظمة العالمية للأغذية و الزراعة (FAO) أن 6.5 % من مجمل الأراضي في العالم متأثرة بالملوحة، وان هذه الرقعة من الأراضـــي الملحيـــة آخذة فـــي الزيادة كـــل سنـــة [3]. تتفاوت الأسباب المسئولة عن ملوحة التربة لكنها ربما تنجُم عن واحدٍ من الأسباب التالية: مستويات عالية للملح في التربة، خصائص الأرض التي تسمح للملح بالتحرك (حركة المياه الجوفية)، الاتجاهات المناخية التي تسمح بتراكم الملح، الأنشطة البشرية كتجريد الأراضي من الأشجار التي تساعد في امتصاص الأملاح من التربة، يمكن أن تتملح ترب الاراضي الزراعية بسبب الاستخدام المفرط للأسمدة المعدنية أو الري بمياه رديئة الجودة أو زيادة نسبة التبخر؛ بسبب ارتفاع درجة حرارة الأرض و ارتفاع المياه الجوفية بالخاصية الشعرية [4]. تعد الملوحة من عوامل الإجهاد الفيزيائية الأكثر دماراً و تأثيراً على النباتات، حيث تحد إلى حدٍ كبير من معدل إنتاج المحاصيل؛ بسبب جفاف الأوراق و احتراق حوافها، إضافة إلى تقزم النبات ونقص الانتاج كماً ونوعاً، هذا و تزداد نسبة الضرر بزيادة مدة التعرض للملوحة [5]. معظم المحاصيل لا تنمو جيداً في الترب المحتوية على الأملاح، حيث أن الأخيرة عادة ما تكون سامة على النباتات خاصة عند تواجدها بتركيزات عالية [6]. فوصـــول الملوحـــــة إلـــــى تركيـــز يعـــــادل ضغط اسمـــــوزي (Osmotic pressure) يصل إلى 4 بار يعني ذلك تضرر النبات و دخوله مرحلة الذبول الدائم (Permanent wilting) مقللاً بذلك من نموه [7]. تتفاوت النباتات في درجة تحملها للملوحة و ذلك حسب فسيولوجية النبات، فمثلاً النباتات الغير بقوليـــــــــــة تنمو على الشواطئ و الصحاري الجافة مثل نباتي الأثل (*Tamarix*) و القطف (*Atriplex*) من أكثر النباتات تحملاً للملوحة، النباتات البقولية بصفة عامة تعد من النباتات الحساسة للملوحة، فزيادة الملح يؤثر سلباً في المحصول من حيث عدد و أوزان القرنات و البذور، النباتات البقولية ذات القيمة الغذائية تلعب دوراً مهماً في تأمين الغذاء لكثير من الدول النامية خاصةً في أفريقيا، آسيا ودول أمريكيا اللاتينية و تحسين خواص الترب الزراعية وزيادة خصوبتها وذلك بإمدادها بالسماد النيتروجيني عند تكافلها مع بكتيريا العقد الجذرية (Rhizobia)، هذه الأخيرة عبارة عن بكتيريا عصوية متحركة سالبة لصبغة جرام، غير مكونة للأبواغ تنتمي إلى طائفتي alpha and beta proteobacteria [8، 9]. تعيش في التربة و تنمو جيداً في المختبر على بيئة مستخلص الخميرة و المانيتول، وبحسب زمنها الجيلي تقسم إلى قسمين سريعة النمو وبطيئة النمو [10]. التكافل بين الريزوبيا والنباتات البقولية عملية حساسة للعوامل البيئية خاصة الإجهاد الملحي، حيث يمنع الإجهاد الملحي الخطوة الأولى من عملية التكافل [11]. فمثـــلاً الريزوبيا البطيئة النمو عند 0.10 % مـــن كلوريد الصـــوديوم تنخفض عندهـــــــــا تكـــوين العقـــــــــد علـــى النبات و يتـــوقف تكوينهـــا تمامـــاً عنـــد تركيـــز 1 % مـــن الملـــــح [12]. الريزوبيا يمكنها تحمل الملوحة أكثر مما يتحمله النبات العائل وتختلف فيما بينها في درجة تحملها، فالسلالات الريزوبية السريعة النمو أكثر تحملاً من البطيئة [13، 14]. تلقيح النباتات البقولية بسلالات ريزوبية مقاومـــــــة للملوحـــــــة قـــــد تساعـــد النبات العائل علـــــى مقاومته للملوحـــــــة [15]. عليه تهدف هذه الدراسة إلى: البحث عن عزلات ريزوبية متحملة للملوحة والمتكافلة مع البقوليات النامية في المناطق الجافة وشبه الجافة من ليبيا، و اختيار عزلات ريزوبية متحملة للملوحة لها القدرة على تحسين التكافل وتثبيت النتروجين في الأراضي الملحية.

المواد وطرق العمل

موقع الدراسة Experimental site شملت الدراسة مواقع مختلفة من ليبيا متنوعة المناخ، مناطق جافة وشبه جافة، بحيث شملت مناطق في الشمال الغربي (مزده، القريات، نالوت) وفى الجنوب (فزان) شملت جبل الحساونة، وادي الشاطئ، سبها و تساوه بوادي عتبة (شكل 1).

شكل 1. خريطة تبين مواقع جمع العينات من بعض المناطق في ليبيا.

جمع البذور Seeds collection جُمعت بذور النباتات المزروعة المستهدفة للدراسة من منطقة وادي عتبة، مرزق و الشاطئ، وجُمعت بذور النباتات البرية من جبل الحساونة والقريات ومزده ووادي مرسيل و نالوت (أماكن جمع العقد الجذرية).

وسط النمو Growth medium استخدم لعزل الريزوبيا و حفظها الوسط القياسي، وسط آجار مستخلص الخميرة و المانيتول Yeast Extract Mannitol Agar [16]، و الذي يحتوي على المركبات التالية في اللتر: سكر مانيتول Mannitol (10 g)، مستخلص خميرة Yeast extract (1 g)، كلوريد الصوديوم NaCl (0.1 g)، كبريتات الماغنيسيوم المائية $MgSO_4$ $7H_2O$ (0.2 g)، فوسفات البوتاسيوم المائية $K_2HPO.$ $3H_2O$ (0.46 g)، فوسفات البوتاسيوم اللاّ مائية K_2HPO (0.12 g)، آجار Agar (15 g) و pH 7.2.

عزل البكتيريا العقدية Isolation of rhizobia from nodules

عزل البكتيريا من العقد الجذرية كان كما وصف من قبل [16]، حيث غُسلت العقد بماء الحنفية لإزالة الأتربة، ثم غُمرت في الكحول الإيثيلي (97 %) لثوان، بعدها طُهرت بمحلول كلوريد الزئبق الحامضي (0.1 %)، ثم غُسلت العقد بالماء المقطر المعقم عدة مرات، ثم وضعت في أطباق بتري معقمة محتوية على 1 مل ماء مقطر و معقم و سُحقت بساق زجاجية معقمة، بإبرة تلقيح معقمة أُخذ ملء عبوتها من عصير كل عقدة و وضعت في أطباق بتري معقمة و مُزجت بالوسط المغذي المنصهر و المبرد لدرجة 42ْم و تُركت الأطباق حتى تصلب الوسط، ثم حُضنت على درجة حرارة 28ْم لمدة سبعة أيام، بعد مرور فترة التحضين فُحصت الأطباق و اختيرت المستعمرات التي أعطت صفات الريزوبيا و المتمثلة في إنتاج مواد مخاطية وذات حواف مستقيمة [17]، ثم خُططت على أطباق بتري حاوية على وسط آجار المانيتول المغذي لعدة مرات بقصد الحصول على مزارع نقية، هذا و اُختبرت كل العزلات على عائلها الأصلي أو عوائل ذات علاقة تقع ضمن مجموعة تلقيح تبادلية واحدة في اصص بلاستيكية تحتوي على تربة معقمة؛ و ذلك بقصد التحقق من هويتها بكونها ريزوبيا.

اختبار تحمل الملوحة Salinity tolerance اجريت دراسة مسحية لكل العزلات وذلك من اجل اختبار تحملها لبعض الاملاح (كلوريد الصوديوم، كلوريد البوتاسيوم و كلوريد الماغنيسيوم) على وسط مستخلص الخميرة و المانيتول المتصلب، بعض العزلات تم اختبارها في الوسط السائل.

اختبار العزلات الريزوبية لتحملها للملوحة في وسط مستخلص الخميرة و المانيتول المتصلب تم إجراء هذا الاختبار باستخدام الاملاح الثلاثة المذكورة آنفاً، بحيث أضيف كل ملح لآجار مستخلص الخميرة و المانيتول قبل التعقيم بواقع ثمانية عشر تركيزاً لكل ملح (1 – 10 %)، زرعت العزلات الريزوبية في أنابيب اختبار تحتوى على حساء مستخلص الخميرة و المانيتول ورجت في درجة حرارة الغرفة إلى أن وصل نموها إلى الطور النشط (اللوغاريتمي)، أخذ من كل مزرعة بكتيرية 5 ميكروليتر (تحتوى تقريباً على 10^6 خلية/مل) ووضعت في كل طبق بعد إن قسم إلى أربعة أجزاء وبواقع أربعة تكرارات لكل عزلة، حضنت الأطباق على درجة 28ْم لمدة سبعة أيام، بعد مرور فترة التحضين فحصت الأطباق للكشف عن ظهور أو عدم ظهور مستعمرات ريزوبية؛ ظهور مستعمرات على سطح الاجار سجل على أن العزلة مقاومه للملح المختبر وعدم ظهورها سجل على أنها كانت حساسة للملح، بعض العزلات التي أظهرت تحملاً عالياً لملح كلوريد الصوديوم تم اختبارها في وسط مستخلص الخميرة و المانيتول السائل. اختبار العزلات الريزوبية لتحملها للملوحة في وسط مستخلص الخميرة و المانيتول السائل زرعت المزارع البكتيرية الأم في أنابيب اختبار تحتوى على وسط مستخلص الخميرة و المانيتول السائل، وحضنت في درجة حرارة الغرفة على رجاج سرعته 60 دورة بالدقيقة حتى وصل نموها إلى مليون (O.D 0.1) وحده بكتيرية بالمليمتر، ثم نقلت كمية مقدارها 0.1 مل من كل مزرعة إلى أنابيب اختبار تحتوى على 10 مل من نفس الوسط والمحتوى على تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (1ـــــ 10 %)، استخدمت ثلاثة تكرارات لكل تركيز ووضعت الأنابيب المحتوية على مزارع الاختبار في حضانة

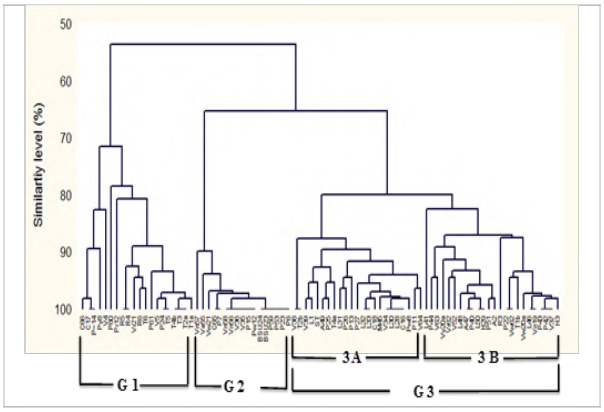
درجة حرارتها 28ْم لمدة سبعة أيام، معدل نمو كل عزلة ريزوبية في كل تركيز من ملح كلوريد الصوديوم تم اختباره بقياس الكثـــافة الضوئية عنـــد بداية ونهايـــة الاختبـــار باستـــخدام جهـــاز Digital Colorimeter (philipharris) على طول موجي 600 نانومتر، لاختبار تأثير الملح على حياة الريزوبيا اختبرت الأنابيب التي لم يسجل بها نمو وخططت على أطباق تحتوى على وسط مستخلص الخميرة والمانيتول المتصلب وحضنت لمدة أسبوع، ظهور مستعمرات ريزوبية سجل على أن تركيز الملح كان مانعاً للنمو (Bacteriostatic) وعدم ظهورها اعتبر دليلاً على أن التركيز كان له تأثيراً قاتلاً (Bactericidal) على العزلة الريزوبية.

اختبار تأثير الملوحة على تكوين العقد وتثبيت النتروجين مع نبات البرسيم الملقح بعزلات من نبات الحلبة اجرى هذا الاختبار على نبات البرسيم الحجازي (*Medicago sativa*)؛ وذلك لسرعة نموه و وقوعه في مجموعة تلقيح متبادلة واحدة مع نبات الحلبة (*Trigonella foenumgraecum*)، اختيرت بعض العزلات الأكثر تحملاً للملوحة لاختبارها على مدى قدرتها على تكوين العقد و تثبيت النتروجين عند تعرضها لمستويات مختلفة من الملوحة في التربة، اجري هذا الاختبار في أصص بلاستيكية تحتوى على تربة معقمة، حيث عقمت بذور البرسيم بكلوريد الزئبق لمدة 4 دقائق وغسلت بالماء المقطر المعقم 6 مرات، ثم خلطت البذور مع المزرعة البكتيرية التي كانت في الطور اللوغاريتمي من النمو، ثم وضعت 5 بذرات في كل أصيص وتركت حتى الإنبات ووضع نفس العدد من البذور في ثلاثة أصص ولكن بدون بكتيريا؛ وذلك لاستخدامها كشاهد (Control)، بعد الإنبات تم ريها بمحلول جنسن [16]، المحتوى على تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم، بينما تم ري الشاهد بمحلول جنسن بدون ملح، كل الاصص وضعت في غرفة الإنبات لمدة ثلاثة أشهر، عند انتهاء التجربة تم ملاحظة المظهر العام للنبات وتسجيل الوزنين الرطب والجاف، إضافة إلى عدد العقد المتكونة على النبات النامي في كل تركيز من الملح.

التصنيف العددي Numerical taxonomy نتائج العلاقة بين العزلات الريزوبية لتحملها للملوحة تم تحديده باستخدام البرنامج الإحصائي STATISTICA [18].

التحليل الإحصائي استخدم تحليل التباين الاحادي (One way Analysis of variance (ANOVAs لدراسة الفروق بين أوزان النبات والعقد البكتيرية عند احتمالية (0.05).

النتائج أربعة وثمانون عزلة ريزوبية تم الحصول عليها من نباتات مزروعة (*Pisum sativa, Vicia faba, Cicer arietinum, Medicago sativa* & *Trigonella foenumgraecum*) و نباتات برية (*Lotus halophils, Astragalus fructicus, Hippocarpis, Vicia ervilla, V. narbonensis, Medicago polymorpha* & *M. littoralis*). من مناطق و مواقع مختلفة من ليبيا، تم إجراء دراسة مسحية لتحملها لأملاح كلوريد الصوديوم، البوتاسيوم و كلوريد الماغنيسيوم على وسط مستخلص الخميرة و المانيتول، نتائج هذه الدراسة استخدمت لتصنيف العزلات إلى مجاميع على حسب تحملها للملوحة باستخدام التصنيف العددي وذلك بهدف تسهيل مناقشتها نتائج هذا التصنيف وضحت في الشكل الشجيري الـــــــــــــ Dendrogram (شكل 2، جدول 1)، نتائج التصنيف العددي يبين تكوين ثلاثة مجاميع ذلك عند مستوى تشابه 75 % و المجموعة الثالثة قسمت إلى تحت مجموعتين هما تحت مجموعة A3 و تحت مجموعة B3 وذلك عند مستوى تشابه 82 %.



شكل 2. مخطط شجيري يبين علاقة العزلات الريزوبية ببعضها والمجاميع المتكونة على حسب اختبار الملوحة.

جدول 1. نتائج اختبارات الملوحة للمجاميع المتكونة بالتصنيف العددي.

الأملاح	والمجاميع الريزوبية وتفاعلاتها			
تراكيزها	المجموعة	1المجموعة	2المجموعة 3	
	*(n= 20)	(n=17)	A3 (n= 23)	B3 (n= 24)
(%) $NaCl_2$				
1	+**	[1]***	[21]	[21]
1.5	+	–	[21]	[21]
2	+	–	[21]	[21]

–	[4]	–	[17]	6	
–	–	–	[17]	6.5	
–	–	–	[12]	7	
–	–	–	[12]	7.5	
–	–	–	[12]	8	
–	–	–	[6]	8.5	
–	–	–	[5]	9	
–	–	–	[2]	9.5	
-	-	-	-	10	

				(%) **$MgCl.\ 6H_2O$**	
[23]	[22]	[10]	[19]	1	
[23]	[22]	[2]	[19]	1.5	
[23]	[22]	[1]	[19]	2	
[23]	[22]	[1]	[19]	2.5	
[18]	[22]	[1]	[19]	3	
[10]	[22]	[1]	[19]		3.5
[8]	[17]	[1]	[19]	4	
[4]	[15]	[1]	[19]		4.5

تابع الجدول 1.

المجاميع الريزوبية وتفاعلاتها					
الأملاح تراكيزها	والمجموعة *(n= 20)	1المجموعة (n=17)	2المجموعة 3 A3 (n= 23)	B3 (n= 24)	
5	[19]	[1]	[14]	[3]	
	[15]	–	[3]	[1]	5.5
6	[15]	–	[2]	[1]	
6.5	[15]	–	[2]	–	
7	[15]	–	–	–	
7.5	[15]	–	–	–	
8	[15]	–	–	–	
8.5	[15]	–	–	–	
9	[15]	–	–	–	

[15]	[21]	–	+	2.5	
[13]	[21]	-	+	3	
[8]	[20]	–	+	3.5	
[3]	[16]	–	[19]	4	
[1]	[14]	–	[19]	4.5	
–	[5]	–	[18]	5	
–	[1]	–	[15]		5.5
–	–	–	[11]	6	
–	–	–	[3]	6.5	
–	–	–	[1]	7	
–	–	–	[1]	7.5	
–	–	–	[1]	8	
–	–	–	[1]	8.5	
–	–	–	–	9	
–	–	–	–	9.5	
-	-	-	-	10	

				(%) **KCl_2**
[23]	[22]	[4]	+	1
[23]	[22]	[2]	+	1.5
[23]	[22]	[1]	+	2

تابع الجدول 1.

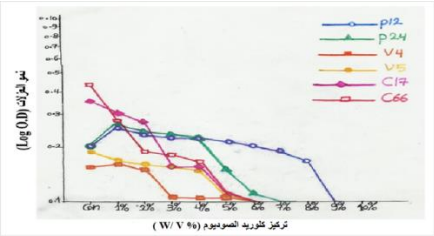
المجاميع الريزوبية وتفاعلاتها				
الأملاح تراكيزها	والمجموعة *(n= 20)	1المجموعة (n=17)	2المجموعة 3 A3 (n= 23)	B3 (n= 24)
2.5	+	[1]	[22]	[23]
3	+	[1]	[22]	[18]
3.5	+	–	[22]	[11]
4	+	–	[22]	[4]
4.5	+	–	[22]	[4]
5	+	–	[21]	[2]
5.5	[19]	–	[5]	–

9.5	[14]	–	–	–
10	-	-	-	-

* (n) عدد العزلات الريزوبية المكونة للمجموعة، (+) نمو العزلات الريزوبية ، (–) عدم نموها، [ ] الرقم بين القوسين يدل على عدد العزلات التي استطاعت النمو.

اغلب عزلات المجموعة الأولى و عزلات المجموعة الثالثة تنمو في تراكيز ما بين 1– 3 % من ملح كلوريد الصوديوم، بينما أفراد المجموعة الثانية كانت حساسة لهذا الملح، لا تنمو حتى في تركيز 1 %، واختلفت اغلب العزلات في تحملها لهذا الملح عند زيادة التركيز إلى مستوى أعلى من 4 %، تميزت عزلات المجموعة الأولى بمقاومتها للملوحة، حيث نمى بعضها حتى في تركيز 8.5 %، بينما كان الحد الأقصى للعزلات تحت المجموعة 3A وB 3 هو 4.5 و 5.5 % ، مثل كلوريد الصوديوم أغلب العزلات المكونة للمجموعة الأولى كانت مقاومة لملح كلوريد البوتاسيوم تنمو حتى تركيز 9.5 %، بينما عزلات المجموعة الثالثة كانت اقل مقاومة تنمو في تركيز يتراوح ما بين 1– 6 % فقط، عزلات المجموعة الثانية كانت اقل مقاومة لملح كلوريد البوتاسيوم، عزلة واحدة من هذه المجموعة كانت مقاومة تنمو حتى تركيز 3 %، مثل استجابة العزلات الريزوبية لملحي كلوريد الصوديوم والبوتاسيوم، أغلب العزلات المكونة للمجموعة الثانية كانت حساسة لملح كلوريد الماغنيسيوم، عزلة واحدة فقط كان لها القدرة على النمو في تركيز يتراوح ما بين 2– 5 %، عزلات المجموعة الأولى كانت أكثر مقاومة لهذا الملح، حيث نمت حتى تركيز 9.5 %، بينما كان الحد الأقصى لنمو بعض عزلات المجموعة الثالثة 6.5 %.

نتائج بعض العزلات التي أظهرت مقاومة للملوحة على وسط الآجار تم اختبارها في الوسط السائل، حيث اختيرت العزلات P12 و P24 من نبات البازلاء (*Pisum sativum*) و V4 و V5 من الفول البلدي (*Vicia faba*) و العزلتان C17 و C66 من نبات الحمص (*Cicer arietinum*)، نتائج هذا الاختبار كانت مشابهة لاختبارها على وسط الآجار (شكل 3).



شكل 4. تأثير ملح كلوريد الصوديوم على نمو بعض العزلات الريزوبية في وسط حساء مستخلص الخميرة و المانيتول.

نتائج اختبار تأثير الملوحة على التكافل بين نبات البرسيم الحجازي (*M. sativa*) و العزلتان T3 و T5 ، أظهرت أن أقصى تركيز لملح كلوريد الصوديوم (NaCl) الذي يسمح بتكوين التكافل بين العزلة T3 وهذا النبات كان 0.8 % وان أعلى من 1 % من كلوريد الصوديوم كان مثبطاً لتكوين العقد (جدول 2) ، بينما كان التركيز الذي يسمح بتكوين التكافل بين العزلة T5 و هذا النبات هو 1 % و ان التركيز 1.5 % هو المثبط للتكافل (جدول 3). يلاحظ في تكافل العزلة T3 مع النبات بأن عدد العقد كان أكثر عند التركيزين 0.4 % و 0.6 % من التركيز 0.2 % عدد العقد و وزنها الرطب والجاف كان أكثر عند التراكيز 0.4 % و 0.6 %، كذلك أوزان النبات الرطب والجاف زادت معنوياً عن وزن النبات الشاهد عند هذه التراكيز، العقد المتكونة مع العزلة T5 قل بزيادة تركيز الملح؛ ولكن لوحظ زيادة في أوزان العقد الجافة والرطبة عند تركيز 0.6 %، بينما زاد الوزن الرطب والوزن الجاف للنبات معنوياً مقارنة بالشاهد عند تركيز 0.4 % ثم تناقصت الأوزان كلما زاد التركيز.

جدول 2. تأثير الملوحة على التكافل وتثبيت النتروجين للعزلة T3.

تركيز ملح NaCl (%)	متوسط عدد العقد	متوسط الوزن الرطب للعقد (جم)	متوسط الوزن الجاف للعقد (جم)	متوسط الوزن الرطب للنبات(جم)	متوسط الوزن الجاف للنبات (جم)
Con	–	–	–	2.20a*	0.27a*
0.2	2b	7.00 b	3.00b	4.70cb	0.50b
0.4	5c	13.30C	4.00c	6.40c	0.50b
0.6	4c	13.30C	3.30b	3.70ba	2.70c
0.8	1b	7.00 b	1.00ab	1.70a	0.07a
1	0a	0a	0a	1.30a	0.07a

0a	0a	0a	0a	0a	1.5
0.17	**2.10**	**3.8**	**3.60**	**1.8**	LSD 0.05=α

* المتوسطات التي لها نفس الحروف لا توجد فروق معنوية بينها عند مستوى (α=0.05).

جدول 3. تأثير الملوحة على التكافل وتثبيت النتروجين للعزلة T5.

تركيز ملح NaCl (%)	متوسط عدد العقد	متوسط الوزن الرطب للعقد (جم)	متوسط الوزن الجاف للعقد (جم)	متوسط الوزن الرطب للنبات(جم)	متوسط الوزن الجاف للنبات (جم)
Con	–	–	–	7.30ba	0.50b
0.2	3b	14.00c	3.00b	8.00b*	0.50b*
0.4	4bc	9.00b	3.00b	8.30cb	0.63c
0.6	3b	12.00c	4.00bc	6.00a	0.13a
0.8	2ab	7.00b	2.00b	3.60a	0.17a
1	1ab	5.00b	2.00b	3.60a	0.17a
1.5	0a	0a	0a	0a	0a
LSD 0.05=α	**1.9**	**4.70**	**1.40**	**5.40**	**0.16**

* المتوسطات التي لها نفس الحروف لا توجد فروق معنوية بينها عند مستوى (α=0.05).

المناقشة تختلف الريزوبيا لاستجابتها للأملاح، سريعة النمو اكثر تحملاً من بطيئة النمو ولكن السلالات المتحملة من كلا النوعين قد تم توثيقها من قبل عدة باحثين، تحمل الملوحة يعتمد على الـ pH، درجة الحرارة، مصدر الكربون و وجود بعض المواد المقاومة للأسموزية (Osmoprotictant solutes)، لتأثير الضار للملوحة في الريزوبيا يعزى الى وجود ايونات معينة بدل التأثير الاسموزي [19]. في هذه الدراسة تم مسح عدة نباتات عن وجود تكافل وتحمل العزلات لبعض الاملاح خاصة ملح كلوريد الصوديوم NaCl الاكثر انتشاراً وشيوعاً في المناطق الجافة وشبه الجافة، تبين الدراسة وجود عزلات ريزوبية من نباتات مختلفة ذات اهمية اقتصادية ورعوية لها خواص فسيولوجية مختلفة، نتائج هذه الدراسة بينت ايضا وجود اختلاف في تحمل العزلات للملوحة، حيث تكونت ثلاثة مجاميع بغض النظر عن مواقع عزلها والترب التي عزلت منها، هذا يفسر وجود عزلات ريزوبية يمكن ان تلائم مختلف الترب والظروف المناخية السائدة في المنطقة، الدراسات القديمة تبين ان الريزوبيا الحساسة للملوحة لا تنمو حتى في 2 % من ملح كلوريد الصوديوم [20]. لكن التوسع في الدراسات الريزوبية من مناطق جغرافية مختلفة بينت وجود عزلات مختلفة في تحملها للملوحة بعضها حساس لا ينمو حتى في 1 % من ملح NaCl [21]. والبعض الآخر متحمل للملوحة بدرجة عالية، عزلات المجموعة الثانية كانت حساسة وبذلك تشبه الريزوبيا البطيئة النمو من نباتات الأكاسيا [22]. واللوبيا [12]. افراد المجموعة الاولى كانت مقاومة للملوحة تنمو في تراكيز عالية من ملح NaCl هذه العزلات تشبه الريزوبيا من نباتات الترمس [23]. واشجار الأكاسيا [22، 24]. هذه العزلات كانت من ترب غير ملحية، العزلات الريزوبية من مواقع ملحية (بعض افراد المجموعة الثانية) لم تكن مقاومة اكثر من تلك العزلات من مواقع غير ملحية، هذا يفسر بأن تحمل العزلات الريزوبية للملوحة ليس له علاقة بموقع العزل او النبات وانما يعتبر صفة خاصة بالعزلة الريزوبية (Strain Specific)، هذه النتيجة تختلف عن ما وجده بعض الباحثين الذين افادوا وجود بعض العزلات الريزوبية المقاومة للملوحة عادة ما تكون من اراضي ملحية [25]. تحمل الملوحة يمكن ان يعطي العزلات الريزوبية ميزة التوطن والتكاثر في الترب الملحية ولكن تكوين العقد وتثبيت النتروجين يعتمد على نوع النبات البقولي [22]. النبات البقولي الاكثر تحملاً للملوحة هو اكثر قدرة على الدخول في التكافل مع الريزوبيا وتثبيت النتروجين [26]. افراد المجموعة الثالثة يمكن ان تكون مرشحة لتلقيح البقوليات في الاراضي الملحية في حالة ثبوت قدرتها على تثبيت النتروجين تحت الاجهاد الملحي وتطوير نباتات متحملة للملوحة. تائج تحمل العزلات الريزوبية لأملاح كلوريد البوتاسيوم KCl_2 وكلوريد الماغنيسيوم $MgCl_2$ تبدو انها مشابهة لملح كلوريد الصوديوم، هذا يعني ان العزلات الريزوبية تبدو انها متكيفة مع هذه الاملاح في التربة و التي عادة ما تكون شائعة في الترب الزراعية بسبب اضافتها الى التربة مع الاسمدة الزراعية . نتائج اختبارات بعض العزلات الريزوبية في الاوساط السائلة تبين ان بعض العزلات P12, P24 & V4 زاد نموهما عن الشاهد عند تركيز 1 % من ملح NaCl، هذه النتيجة قد تفيد بأن تراكيز

منخفضة من ملح كلوريد الصوديوم يشجع نمو بعض العزلات الريزوبية، مثل هذه الظاهرة قد سجلت لبعض العزلات الريزوبية عند نموها في الوسط السائل [22]. تائج تأثير الملوحة على التكافل وتثبيت النتروجين للعزلتين T3 و T5 عند اختبارها على نبات البرسيم الحجازي (*Medicago sativa*) في التربة في المختبر تبين وجود فروق معنوية بين عدد العقد ومتوسط الوزنين الرطب والجاف للعقد والنبات، يلاحظ من النتائج ان تحمل العزلات للملوحة هو أعلى من تلك الذى يسمح بتكوين التكافل وهذا قد يرجع الى ان عملية التكافل عملية حساسة للملوحة، حيث ان الاملاح قد تؤثر على الشعيرات الجذرية للنبات [11]. كما يلاحظ من النتائج ان عدد العقد المتكونة كانت قليلة تتراوح بين 2– 5 عقد، هذا قد يرجع الى الظروف البيئية التي اختبرت فيها غير مثالية او يرجع ذلك الى تأثير الملح، ولكن الاحتمال الاخير هو الارجح؛ وذلك لان الملوحة تؤثر على عدد العقد المتكونة او على النبات العائل او تؤثر على تثبيت النتروجين [27]. كما يلاحظ من النتائج ان التركيز 0.4 % من ملح كلوريد الصوديوم اعطى أعلى عدد للعقد لكلا العزلتين، كما ان التحليل الاحصائي يبين وجود فروق بين الاوزان الرطبة والجافة والشاهد؛ الامر الذي يفسر بأن هاتان العزلتان لهما القدرة على تثبيت النتروجين، هذه النتيجة تعتبر شبيهة بتلك التي لوحظت من قبل باحثين آخرين [28]، حيث وجد ان تلقيح البقوليات ببعض سلالات *R. leguminosarum* bv. trifolii و *R. meliloti* زاد من تكوين العقد ومحتوى النبات من النتروجين عند مستوى 1 % من ملح كلوريد الصوديوم، تظهر النتائج ان هناك تطابق بين عدد العقد المتكونة و وزنها الرطب والجاف و اوزان النبات الرطب والجاف للعزلة T3، بينما لم يسجل هذا التطابق في نتائج العزلة T5، ولهذا هذه النتائج المسجلة للعزلة T3 شبيهة بتلك التي لوحظت من قبل بعض الباحثين في مناطق جغرافية اخرى [29]. لقد اوضح بعض الباحثين ان الوزن الجاف للنبات يتطابق مع كمية الهيموجلوبين بالعقد وليس مع عدد العقد و وزنها الجاف [30].

شكر وتقديرنتقدم بخالص الشكر إلى كل من ساعدنا في اكمال هذه الدراسة ونخص بالذكر سالمة زيدان برطاطة، غزالة عمر ابوالقاسم، يونس الخيالي، و الحاج عمر ابوالقاسم خليفة و اسرته، فلكم منا جميعا كل الشكر والثناء.

المراجع

[1]- FAO 2006. World agriculture: Towards 2030 / 20510. Prospect for Food, nutrition agriculture and major commodity groups. Global perspective studies unit Food and Agriculture Organization of the united Nations, Rome, Italy.

[2]- Ashraf, M. and Harris, P. J. C. 2005. A biotic stresses plant resistance Through Breeding and Molecular Approaches Haworth press, New York.

[3]- FAO 2008. Land and plant nutrition managem-ent service. htpp:// www.fao.org/agl/agll/spush.

[4]- Carter, O. L. 1975. Problems of salinity in agriculture. P. 25- 39. In A. Poljakoff- Mayber and J Gale (ed.) Plants in saline environments. Springer- Verlag, New York.

[5]- Munns, R. 2002b. Salinity growth and phytohormones. In Lauchli A, Luttge U (eds) Salinity: environment- plants- molecules. Kluwer, The Netherlands, pp 271- 290.

[6]- Brouwer, C., Goffeau, A. and Heibloem, M. 1985. Irrigation water management: training manual No. 1- Introduction to irrigation. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome, Italy.

[7]- إبراهيم، عبد الباسط عودة 2011. الإجهاد الملحي. www.Iraqi-datepalms.net.

[8]- Young, J. M. 2003. The genus name Ensifer Casida 1982 takes priority over *Sinorhi-zobium* Chen et al. 1988, and Sinorhizobium morelense Wang et al. 2002 is a later Syno-nym of n *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination *Sinorhizobium adhaerens* (Casida1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an opinion Int J Syst Evol Microbiol 53: 2107- 2110.

[9]- Weir, B. S. 2006. The current taxonomy of rhizobia, New Zealand rhizobia website, http:// www. rhizobia. Co. nz/ taxonomy/ rhizobia. html Regularly updated.

Abdelmoumen, H. and El Idrissi, M. M. 2009. Germination, growth and nodulation of *Trigonella foenum graecum* (Fenu Greek) under salt stress. Afr J Bio. Vol 11: 2489 -2496. [15]

Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root- nodule bacteria. In: International Biological program me, Handbook no. 15. Oxford, Blackwell Scientific Publicat-ion Ltd, pp. 73- 97. [16]

Aneja, K. 2003. Experiments in Microbiology plant pathology and Biotechnology. 4th Ed, New Age International Publishers, New Delhi, India. [17]

Sneath, P. H. A. and Sokal, R. B. 1973. Numerical Taxonomy: the principles and practices of Numerical classification,. Freeman. W. H. and Co., San Francisco, USA. [18]

Elsheikh, E. A. E. 1998. Effects of salt on rhizobia and *Bradyrhizobia*. Ann. App. Biol, 132: 507- 524. [19]

Jordan, D. C. 1984. Family III. Rhizobaceae Conn 1938. In Bergy' s manual of syste-matic bacteriology. Vol. 1. Edited by N. R. Krieg and J. G. [20]

Holt. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. pp. 234- 244. [21]

Abdel-salam, M. S., Ibrahim, S. A., .Abd EL – Halim, M . M., Badawy, F. M. and Aba, S . E . M. 2010. Phenotypic characterization of indigenous Egyptian Rhizobial strains for abiotic stresses performance. J American Sci . 6 (9). [22]

Mohamed, S. H., Smouni, A., Neyra, M., Kharchaf, D. and Filali-Maltouf, A. 2000. Phenotypic characteristics of root nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. growing in Libya. Plant and Soil 224: 171- 183. [23]

Khalifa, M. O. A., Babiker, N. N. and Mohamed, S. H. 2014. Physiological characte-ristics of rhizobia isolated from *Retama raetam* (Forsk) and *Lupinus various* (L.) indigenous to Libyan desert. J Enviro Sci Engine 246- 255. [24]

El Sadi, S. M. A. 2004. Characteristics of root- nodulation bacteria isolated from Acacia karroo in Fezzan region of Libya. MSc. Thesis, Faculty of Sciencs, Sebha University, Sebha Libya. [25]

Maatallah, J., Berraho, E., J. Sanjuan, and Lluch, C. 2002. Phenotypic characterizati-on of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. Agronomie, 22: 321-329. [26]

Craig, G. F., Atkins, C. A. and Bell, D. T. 1991. Effect of salinity on growth of *Rhizo-bium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. Plant soil 133: 253 – 262. [27]

Shereen, A., Ansari, R., Naqvi, S. S.] M. and Soomro, A. Q. 1998. Effect of salinity on *Rhizobium* species nodulation and growth of Soybean (*Glycine max* L.). University of sind, Pakistan, 30 (1): 75- 81 [28]

EL- Mokadem, M. T., Helemish, F. A., Abdel-Wahab, S. M. and Abou-El –Nour, M. M. 1991. Salt response of clover and alfalfa inoculated with [29]

Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen- fixing organisms. In Biological Nitrogen Fixation (Stacey, G.et al., eds), Pp 43- 86, Chapman and Hall. [10]

Zahran, H. H. 1991. Conditions for successful Rhizobium-legume symbiosis in saline environments. Biol Fertil Soil 12: 73- 80. [11]

Abdelnaby, M., Elnesairy, N. N. B., Mohamed, S. H., and Alkhayali, Y. A. A. 2015. S-ymbiotic and Phenotypic Characteristics of Rhizobia Nodulating Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Grown in Arid Region of Libya (Fezzan). J Enviro Sci and Engine 227- 239. [12]

Zahran, H. H. 1999. Rhizobium- legume symbiosis and nitrogen fixation under severe condition and in arid climate. Microbiol Mol Biol Rew 63: 968- 989 [13]

[14]- ادهام، العسافي على؛ حمزة، ياس خضير؛ حمودي، دنيا ثامر 2010. تأثير الملوحة في نمو بعض صفات*Bradyrhizobium japonicum* ، مجلة الانبار للعلوم الزراعية المجلد :8 العدد (4)– كلية الزراعة جامعة الانبار/ العراق.

30 October, ISSN 1996- 0808@ 2011 Academic Journals Addis Ababa University, Ethiopia

−[31] Dudeja, S. S., Khurana, A. L. and Kundu, B. S. 1981. Effect of *Rhizobium* and phos-phomicroorganisms on yield and nutrient uptake in chickpea, Curr. Sci. 50: 503- 505.

salt tolerant strains of *Rhizobi-um*. Ani Shams Sci Bull 28B: 441- 468.

−[30] Jida, M. and Assefa, F. 2011. Phenotypic and plant growth promoting Characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. Vicia from Lentil growing areas of Ethiopia. African Journal of microbiology Research vol. 5(24): pp. 4133- 4142,