دراسات على كفاءة تثبيت النيتروجين لبعض أنواع الرايزوبيا بطرق وراثية جزيئية

إعداد

تركي مسعود الأحمدي

بحث مقدم كجزء من متطلبات الحصول على درجة الماجستير في العلوم

(أحياء – أحياء دقيقة)

اشراف

د. صلاح الدين محمد أبو عبا
د. محمد بن حامد زيني

المستخلص

تصل كمية النيتروجين المثبت بيولوجيا الى 2، 17 × 10 ^{7} طن سنويا. وتتم أبحاث تثبيت النيتروجين بيولوجيا من خلال تربية الكائن الدقيق العالى الكفاءة فى تثبيت النيتروجين مع عائله النباتى وعزل احسن التوليفات بين العائل النباتى والكائن الدقيق بالاضافة الى تحسين اللقاحات المستخدمة.تحصل النباتات البقولية على احتياجاتها من النيتروجين الغازى المتوفر بالهواء. فهى تجمع وتستخدم هذا النيتروجين عن طريق عملية تبادل المنفعة مع بكتيريا الريزوبيا فى عقد موجودة على جذورها. كما تترك النباتات البقولية بعض من هذا النيتروجين بالتربة لتستفيد منه المحاصيل الاخرى ولذلك فهى تعتبر مصدر اساسى للنيتروجين العضوى فى دورة النيتروجين فى الطبيعة.ظهرت في السنوات الاخيره مشكلة نقص كفاءة نظام تبادل المنفعة بين البرسيم والرايزوبياحيث أضطر المزارعون إلي الاعتماد على التسميد النيتروجيني للحصول على محصول مناسب ونظرا للعوامل العديدة البيئية والبيولوجية التي تؤثر بشده على علاقة تبادل المنفعة فان زيادة كفاءتها تحتاج للدراسة والبحث في هذه العوامل.استهدفت هذه الدراسة عزل وتعريف ووصف لبعض سلالات رايزوبيا البرسيم من مناطق مختلفة من المملكة العربية السعودية والتي تمتاز عادة بأنها أكثر تأقلما عن سلالات اللقاح المستخدمة وذلك نتيجة للانتخاب الطبيعي البيئي وأيضا دراسة بعض الصفات التي تؤثر على مقدرتها على التنافس في التربة مثل تحملها للمضادات الحيوية التي تفرزها ميكروبات التربة الأخرى وكذلك بينها وبين بعض العوامل البيئية المؤثرة عليها كتحملها للملوحة والنمو على درجات مختلفة من الحرارة وانتخاب أفضل السلالات في الظروف البيئية السابقة.كان الهدف من الدراسة أيضا عمل البصمة الوراثية لتلك السلالات عن طريق التقنيات الوراثية المختلفة.وكانت أهم النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة موجزه في النقاط التالية:تم اختبار كفاءة تكوين العقد الجذرية لكل السلالات ووجد اختلاف في كفاءة تكوين العقد الجذرية بين السلالات المستخدمة.تم دراسة تحمل السلالات للمضادات الحيوية بطريقة الأقراص وقد وجد اختلاف بين جميع هذه السلالات في تحملها للمضادات الحيوية المشبع بها القرص.تم انتخاب عزلات مقاومة للمضادات الحيوية المختلفة لسلالات الرايزوبيا تحت الدراسة. تمت دراسة تحمل السلالات للملوحة الناتجة عن كلوريد الصوديوم وذلك بإضافة تركيزات مختلفة منه في البيئة السائله وتراوحت النسبة مابين 0.5 الى 4% كلوريد الصوديوم ولقد وجد أن سلالات الرايزوبيا تحت الدراسة قد تحملت الملوحة إلى نسبة 4% في البيئة السائلة. تم دراسة نمو السلالات تحت الدراسة على درجات مختلفة من الحرارة وذلك بتنمية السلالات تحت الدراسة فى درجات مختلفة من الحرارة تراوحت من 30م^{o} الى 60م^{o} ووجد أن كل السلالات قادرة على النمو حتى50م^{o} وأحد السلالات نمت حتى 55م^{o} . أثبت تحليل تشابه البلازميدات لسلالات الرايزوبيا أن هناك تشابه في نماذج البلازميدات بينها مما يدل على التشابهات الوراثية بينهم وقد ثبت أن كل من البلازميدات ذات اوزان جزيئية متشابهة .تم عمل البصمة الوراثية للسلالات محل الدراسة باستخدام تقنية الـ RAPD_PCR ووجد اختلاف بين السلالات محل الدراسة فى ال bandsالناتجة مما يدلل على الاختلاف الوراثى فيما بينها.كما تم دراسة تقطيع السلالات محل الدراسة باستخدام انزيمات القطع المختلفة .

Studies on nitrogen fixation efficiency of some *Rhizobium spp*. using molecular genetics techniques

BY

Torki Masoud AL-Ahmadi

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements of the Degree of Master of Science in Microbiology

Supervised By

Dr. Salah El-Dien Abou - Aba

Dr. Mohammed Hamed Zainy Mutwakil

Abstract

About 17.2 X 10^7 tons of nitrogen is biologically fixed annually all over the world.Research to improve biological nitrogen fixation (BNF) is progressing through the breading of efficient N_2- fixing organisms and host plants, selection of the best combination of the host plant and microsym biont, and by improvement of inoculation techniques and field management. Leguminous plants can obtain most of the nitrogen they need from the vast supply of gaseous nitrogen in the air. They gather and use this nitrogen by working symbiotically with special rhizobia in nodules on their roots. Legumes also leave some of the fixed nitrogen in the soil. They are by far the largest source of organic nitrogen in the global nitrogen cycle. Different ecological factors are dramatically affecting the legume/rhizobia symbiosis. Therefore, enhancing the BNF requires the investigation of some of the factors involved in this relation. Salt and heat tolerant is a growing problem in arid countries such as in KSA. Several reports indicated this problem in soil. Many bacterial strains contain genetic determinants of resistance to antibiotic, salt, heat and genes essential on these resistance are often found on plasmids. This study aim to isolate and characterize new *Rhizobium* strains more competitive than usually in use inoculants, and to study some characters related to competition ability between the same species or other related microorganisms by study their resistance to antibiotics produced by other related microorganisms or some other important ecological factors, e.g., salt , heat, Also study some genetic characters of isolated strains such as plasmid profile and fingerprinting of strains using different methods of RAPD-PCR and restriction enzyme fingerprinting. The main results obtained in this study are summarized in the following points: Nodulation efficiency was studied on all Strains and there were different levels of nodulation efficiency between studied strains. Antibiotic resistance was also studied using antibiotic disks and results have showed different resistance in studied *Rhizobium* strains to antibiotics. *Rhizobium* strains were studied for salt-tolerance by adding different concentrations of sodium chloride in a liquid media .The ratio ranged was between 0.5 to 4% sodium chloride and it was found that *Rhizobium* strains under study have tolerated salinity to 3.5% in the liquid media and one strain was able to grow in 4% concentration. Studying the growth of strains under different temperatures ranging from 30^{o}C to 60^{o}C resulted that all strains are capable of growth up to 45^{o}C and one strain was able to grow up to 55^{o}C. Plasmids analysis of studied strains proved that there are similarities in the number, size and patterns, which shows similarities on the plasmid level. Fingerprinting of strains under study using the technique of RAPD_PCR showed difference between the strains in their amplified bands which represents the genetic difference among them. Genomic DNA was cut using restriction Enzymes.