



ليبيا

وزارة التعليم

جامعة سبها

كلية العلوم

قسم علم النبات

قُدم هذا البحث استكمالاً لمتطلبات الاجازة الجامعية البكالوريوس بعنوان:

دراسة الخواص الفسيولوجية للريزوبيا المعزولة من نبات الحندقوق (*Melilotus officianalis* L.) النامي في الترب الجافة من ليبيا (فزان)

A study of Physiological characteristics of rhizobia isolated from *Melilotus officianalis* L. growing in arid soil of Libya (Fezzan)

اعداد:

الهام حسين عبدالصمد حسين

أريج فرحات ابراهيم محمد

خديجة سعيد الأمين محمد

إشراف

أ. فادية جمعة محمد إشعيوي و أ. مسعودة عمر ابوالقاسم خليفة

الربيع 2019م



كلية: العلوم

قسم: علم النبات

إقرار من مشرف مشروع تخرج للمرحلة الجامعية بتسليمه للمناقشة

عنوان مشروع التخرج لنيل درجة: البكالوريوس

دراسة الخواص الفسيولوجية للريزوبيا المعزولة من نبات الحندقوق (*Melilotus*

officinalis L.) النامي في الترب الجافة من ليبيا (فزان)

اسم الطالب: أريج فرحات ابراهيم محمد رقمه الدراسي: 2150278

اسم الطالب: الهام حسين عبدالصمد حسين رقمه الدراسي: 2150256

اسم الطالب: خديجة سعيد الأمين محمد رقمه الدراسي: 2150400

اسم المشرف: فادية جمعة محمد إشعوي و مسعودة عمر ابوالقاسم خليفة

اقرانا مشرف البحث المذكور أعلاه بان البحث مطابق لمواصفات البحوث الجامعية بجامعة سبها علمياً ولغوياً

وشروط الكتابة المعتمدة

توقيع المشرف:----- التاريخ:

يعتمد

توقيعه:-----

رئيس القسم: د. هدى سالم الرويق

الربيع 2019م



كلية: العلوم

قسم: علم النبات

تفويض

أنا..... و..... أفوض جامعة سيها بتزويد نسخ من

بحثي

للمكتبات أو المؤسسات أو الهيئات أو الأشخاص عند طلبهم حسب الأنظمة واللوائح التنظيمية في الجامعة.
للبحث

المقدم لمتطلبات الإجازة الجامعية بقسم علم النبات كلية العلوم جامعة سيها بعنوان:

دراسة الخواص الفسيولوجية للريزوبيا المعزولة من نبات الحندقوق (*Melilotus officianalis L.*)
النامي في الترب الجافة من ليبيا (فزان)

اعداد

اسم الطالب: أريج فرحات ابراهيم محمد	رقمه الدراسي: 2150278	توقيعه
اسم الطالب: الهام حسين عبدالصمد حسين	رقمه الدراسي: 2150256	توقيعه
اسم الطالب: خديجة سعيد الأمين محمد	رقمه الدراسي: 2150400	توقيعه

تحت إشراف

فادية جمعة محمد إشعيوي توقيع:-----

درجة العلمية للمشرف: مساعد محاضر

مسعودة عمر خليفة توقيع:-----

درجة العلمية للمشرف: محاضر

الربيع 2019م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ﴾

اللَّهُ
صَادِقٌ
الْعَظِيمُ

الإهداء

الحمد لله وحده لا شريك له، له الملك و له الحمد و هو على كل شيء قدير. بداية تُهدي عملنا هذا إلى منارة العلم و العالمين الأُمي الذي علّم المتعلمين خاتم الانبياء والمرسلين محمد بن عبد الله عليه أفضل الصلاة و اتم التسليم.

إلى الذي وهبني كل ما يملك حتى أحقق أماله، الى من كان يدفعني قدماً نحو الامام لنيل المبتغى، إلى الانسان الذي امتلك الانسانية بكل قوة، إلى الذي سهر على تعليمي بتضحيات جسام مترجمة في تقديمه للعلم، الى مدرستي الاولى في الحياة و قدوتي. "أبي الغالي"

إلى التي وهبت فلذة كبدها كل الحنان و العطاء، الى التي صبرت على كل شيء، إلى التي رعنتني حق رعاية وكانت سندي في الشدائد، و كانت دعواتها لي بالتوفيق تتبعمني خطوة بخطوة في عملي، إلى من ارتحت كلما تذكرت ابتسامتها في وجهي. "أمي الغالية"

إلى سندي في هذه الحياة بعد الله سبحانه و تعالى، إلى من تدوقت معهم أجمل اللحظات، إلى القلوب الطاهرة الرقيقة و النفوس البريئة إلى رياحين حياتي. اهدى هذا العمل المتواضع لكى ادخل على قلوبهم شيئاً من السعادة. "اخوتي و اخواتي"

كلمة الشكر

لابد لنا و نحن نخطو خطواتنا الأخيرة في الحياة الجامعية من وقفة نعود إلى أعوام قضيناها في رحاب الجامعة مع اساتذتنا الكرام الذين قدموا لنا الكثير باذلين جهوداً كبيرة في بناء جيل الغد لتبعث الأمة من جديد و قبل أن نمضي نقدم أسمى آيات الشكر و الامتنان و التقدير و المحبة، إلى الذين حملوا أقدس رسالة في الحياة، إلى جميع أساتذتنا الأفاضل الذين أشرفوا على تعليمنا "كن عالماً فإن لم تستطيع فكن متعلماً، فإن لم تستطيع فأحب العلماء، فإن لم تستطيع فلا تبغضهم"

بعد رحلة بحث و جهد و اجتهاد تكمل بإنجاز هذا البحث. نحمد الله عز و جل على نعمه التي منّ بها علينا فهو العلي القدير، كما لا يسعنا إلا ان نخص بأسمى عبارات الشكر و التقدير الاستاذة "مسعودة عمر خليفة" لما قدمته لنا من جهد و نصح و معرفة طيلة انجاز هذا البحث. الشكر كل الشكر للأستاذة "فادية جمعة إشعويي" لمساعدتها لنا لإكمال بحثنا هذا، فلها منّا كل التقدير والثناء وجزاها الله عنا كل خير.

شكرنا موصول إلى كل من مد لنا يد العون و ساعدنا في اكمال هذا البحث فلکم منّا همسة شكر من صميم القلب.

شكرنا يمتد إلى كل من قدم لنا مساعدة أو نصيحة كان لها الاثر الملموس في نجاح هذا العمل، وكانوا عوناً لنا في بحثنا هذا و نورٌ يضيئ الظلمة التي كانت تقف أحياناً في طريقنا. كما لا يفوتنا أن نشكر افراد أسرنا اللذين لم يبخلوا علينا لا بغالي و لا نفيس في طيلة مشوارنا التعليمي.

فلکم منا جميعاً كل الشكر و الثناء.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
مُعْتَدِلَاتُ الْبَحْرِ
مُعْتَدِلَاتُ الْبَحْرِ

فهرس المحتويات

.....	الاقرار .
.....	التقويض .
.....	الآية القرآنية .
.....	الإهداء .
.....	كلمة الشكر .
.....	فهرس المحتويات .
.....	فهرس الاشكال .
.....	فهرس الجداول .
.....	الملخص .
.....	I. الفصل الاول .
.....	1.1 المقدمة .
.....	2.1 نبات الحندقوق .
.....	3.1 بكتيريا العقد الجذرية .
.....	1.3.1 تصنيف بكتيريا العقد الجذرية .
.....	1.4.1 العوامل المؤثرة على الريزوبيا و التكافل و تكوين العقد .
.....	1.5.1 التصنيف العددي .
.....	1.6.1 الهدف من البحث .
.....	II. الفصل الثاني .
.....	2. المواد وطرق العمل .
.....	2.1 المزارع البكتيرية .
.....	2.2 تحليل التربة .
.....	2.2.1 تحليل الاس الهيدروجيني للتربة .
.....	2.2.2 تحليل الأملاح الكلية الذائبة .
.....	2.3.1 وسط النمو .
.....	2.4.1 الاختبارات الفسيولوجية .
.....	2.4.1.1 تحمل الملوحة .
.....	2.4.2 تحمل الحموضة .
.....	2.4.3 مقاومة المعادن الثقيلة .
.....	2.4.4 تحمل الحرارة .

2.	5. التصنيف العددي.
III.	الفصل الثالث.
3.	النتائج و المناقشة.
IV.	الفصل الرابع.
4.	الاستنتاج.
5.	التوصيات.
6.	المراجع العربية.
7.	المراجع الأجنبية.
8.	الملاحق.
8.1.	نبات الحندقوق و العقد المتكونة عليه.
8.2.	الفصائل و الاجناس و الانواع الموصفة حتى الان.

فهرس الأشكال

الصفحة	الشكل
.....	1. مخطط شجري Dendrogram يبين علاقة العزلات الريزوبية ببعضها البعض.
.....	2. نمو العزلة R2 في تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم.
.....	3. نمو العزلة R2 في درجات من الحموضة و القلوية.

فهرس الجداول

الصفحة	الجدول
.....	1. العزلات الريزوبية، عائلها النباتي و أماكن جمعها.
.....	2. نتائج التحليل الروتيني للتربة.
.....	3. نتائج الاختبارات الفسيولوجية للمجاميع المتكونة بالتصنيف العددي.

المخلص

تمت دراسة التباين المظهري Phenotypic diversity لاثنتي عشرة عزلة ريزوبية معزولة من نبات الحندقوق *Melilotus officianalis*، اضافة إلى سلالة المرجعية *Ensifer meliloti* باستخدام التصنيف العددي Numerical taxonomy. التصنيف العددي للعزلات الريزوبية بين أنه تم الحصول على مجموعتين عند مستوى تشابه 81%. نتائج الخواص الفسيولوجية اظهرت تباين بين العزلات المكونة للمجاميع. تحمل العزلات الريزوبية لملاح كلوريد الصوديوم كانت مختلفة ما بين حساسة لا تنمو في تركيز 1% إلى متحملة للملوحة الشديدة والتي تصل حتى 5%. اغلب العزلات تنمو في درجات حرارة أعلى من 44م، ومتحملة للحموضة والقلوية العاليتين. كلوريد النحاس، الالومنيوم و الخارصين كانت أكثر الأملاح سميةً و تأثيراً على العزلات، بينما العناصر الأخرى ككلوريد الزئبق، الكاديوم و خلات الرصاص كانت الأقل في التأثير.

الكلمات المفتاحية: التباين المظهري، عزلة ريزوبية، نبات الحندقوق، التصنيف العددي، الخواص الفسيولوجية.

Abstract

.....The phenotypic diversity of twelve rhizobial isolates obtained from the root nodes of the *Melilotus officianalis* as well as the reference strain *Ensifer meliloti* was investigated using numerical taxonomy. Numerical taxonomy of isolates showed that two groups were obtained at a similarity level of 81%. The results of the Physiological characteristics showed difference between the groups of the isolates. Tolerance of rhizobial isolates to NaCl was different between sensitive unable to grow at 1 % NaCl to extreme tolerant, grew up to 5 %. Most of them grew at temperatures higher than 44°C and tolerated high acidity and alkalinity. Copper, aluminum and zinc chlorides were more salts toxicity and effect on the isolates, while other elements (mercuric chloride, cadmium and lead acetate) were less effect.

Key words: Phenotypic diversity, rhizobial isolation, *Melilotus officianalis*, Numerical taxonomy, Physiological characteristics.

المراجع References

1. المراجع العربية

- ادھام، العسافي على و ياس خضير حمزة و دنيا ثامر حمودي (2010). تأثير الملوحة في نمو بعض صفات *Bradyrhizobium japonicum*، مجلة الانبار للعلوم الزراعية المجلد 8: العدد (4) - كلية الزراعة جامعة الانبار/ العراق.
- البركة، فهد ناصر و أحمد ابراهيم التركي و سمير حماد سالم و علي محمد حجو (2002). تقييم كفاءة سلالات الريزوبيوم المتداولة في المملكة في تثبيت النيتروجين الجوي تكافلياً مع البرسيم الحجازي، جامعة الملك سعود- الرياض / العربية السعودية.
- السحار، قاسم فؤاد (1987). مقدمة في علم تقسيم النبات، دار البحر الابيض المتوسط للنشر - القاهرة / مصر.
- السنوسي، مها مختار زيدان و غالية احمد عمر قضاوار و اخلاص عبد القادر احمد عزاققة و مبروكة مختار زيدان السنوسي و مسعودة عمر ابوالقاسم خليفة. "الخواص البيوكيميائية للريزوبيا المعزولة من نبات الحندقوق (*Melilotus officianalis* L.) النامي في الترب الجافة من ليبيا (فزان)". جامعة سبها - كلية العلوم - سبها / ليبيا. (2018).
- الصغبر، خيرى (1971). محاصيل العلف، مؤسسة فؤاد بعينو للتجليد - بيروت / لبنان.
- القاضي، عبد الله عبد الحكيم (1989). استعمالات بعض النباتات في الطب الشعبي الليبي الجزء الثاني. قطاع الورق و الطباعة، مطابع الثورة العربية - طرابلس / ليبيا.
- برطاطة، نجية زيدان و مسعودة عمر خليفة و صالح حسن محمد (2018). انتقاء عزلات ريزوبية متحملة للملوحة من نباتات بقولية برية و مزروعة في المنطقة الجافة من ليبيا. المؤتمر الدولي الاول للعلوم والتكنولوجيا (1-ICST 2017)، تحت شعار "من اجل تطبيق امثل للعلوم والتكنولوجيا" - في الفترة من 12 الى 14 فبراير 2018م سبها / ليبيا.
- خليفة، مسعودة عمر ابوالقاسم و صالح حسن محمد "التباين المظهري في الريزوبيا المتكافلة مع بعض النباتات البقولية البرية النامية في ليبيا". جامعة سبها - كلية العلوم - سبها / ليبيا. (2013).
- دوابشة، محمود عبد اللطيف محمود (2011). الرعي في المراعي المفتوحة "الأغنام و الماعز" في محافظة أريحا، أطروحة قدمت للحصول على درجة الماجستير في الجغرافيا، كلية الدراسات العليا - جامعة النجاح الوطنية - نابلس / فلسطين.
- شعيب، فرج محمد و أحمد عبدالسلام حسن عيسى (2014). مقدمة في علم البكتيريا، منشورات جامعة عمر المختار - البيضاء / ليبيا.

- مبارك، محمد الصاوي محمد و عبد الوهاب محمد عبد الحافظ و راوية فتحي جمال (2005). عالم البكتيريا، مكتبة أوزوريس - القاهرة /مصر.

2. المراجع الأجنبية

- Abdelnaby, M., Elnesairy, N. N. B., Mohamed, S. H., and Alkhayali, Y. A. A. (2015). Symbiotic 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.
- Alexander, M. (1977). Introduction to Soil Microbiology, 2nd Ed. John Wiley and Sons. Inc., New York
- Alexandre, A. and Oliveira, S. (2013). Response to Temperature Stress in Rhizobia. *Critical Reviews in Microbiology*, 39, 219-228.
- Dangeard, P. A. (1926). Recherches sur les tubercles radicaux des legumineuses. *Le Botaniste* 13, 1- 275.
- Day, D. A. and Copeland, L. (1991). Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen fixing legume nodules. *Plant physiol Biochem* 29, 185- 201.
- El Hilali, I., Brhada, F., Thami Alami, I. and Filali- Maltouf, A. (2007). Evidence of the presence of genetically different rhizobial strains in a single cluster of a lupinoid nodule, the case of *Lupinus luteus*. *J Agric Enviro* 5 (1), 352- 359.
- Gao, J. L., Sun, J. G., Li, Y., Wang, E. T. and Chen, W. X. (1994). Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan Province, China. *Int J Syst Bacteriol* 44, 151- 158.
- Gauril,. Singh, A. K., Bhatt, R. P. and Pant, S. (2012). Effects of zinc on cell viability and cell surface components of *Rhizobium* sp isolated from root nodules of *Trifolium alexanderinum*. *J Agri Techno* 8(3), 941- 959.
- Giller, K. W., Witter, E. and McGrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* 30, 1389- 1414.

- Gouffi, K., Bernard, T. and Blanco, C. (2000). Osmoadaptation by pipecolic acid in *Sinorhizobium meliloti*: specific effects of D and L isomers. *Appl Environ Microbiol* 66, 2358– 2364.
- Graham, P.H. (1992). Stress Tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and Nodulation under Adverse Soil Conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 475– 484.
- Hardarson, G. (1993). Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant and Soil* 152, 1– 7.
- Howieson, J. G. and Dilworth, M. J. (2016). Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra.
- Hungria, M. and Vargas, M. A. (2000). Environmental Factors Affecting N₂ Fixation in Grain Legumes in the Tropics, with an Emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65, 151–164.
- Jafri, S. M. H. (1980). Fabaceae no. 86. In: Jafri & A.EL– Gadi (editors). Flora of Libya, AL Faateh University Faculty of Science Department of Botany.
- Jordan, D. C. (1984). Family III. Rhizobaceae Conn 1938. In Bergy' s manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Edited by N. R. Krieg and J. G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. pp. 234– 244.
- Khalifa, M. O. A., Babiker, N. N. and Mohamed, S. H. (2014). Physiological characteristics of rhizobia isolated from *Retama raetam* (Forsk) and *Lupinus varius* (L.) indigenous to Libyan desert. *J Enviro Sci Engine* 246– 255.
- Khalifa, M. O., Mohamed, S. H., Ahmadi, I. M., Abuzeid, M. I., Basher, A. O., Zadan, H. S., Ali, K. M. and Omar, M. F. (2017). Effect of Hydrogen Ions and Aluminum Chloride on Isolated Rhizobia from *Medicago sativa* L. *ContROL* 2017; 1:0003. DOI: <https://dx.doi.org/10.28915/control.0003.1>.
- Lindström, K. and Lehtomäki, S. (1988). Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (Galegae) compared with other fast-growing rhizobia. *FEMS Microbiol lett* 50, 277– 287.

- Maatallah, J., Berraho, E., J. Sanjuan, and Lluch, C. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*, 22, 321–329.
- 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.
- Mohamed, S. H., Khalifa, M. O. A., Babiker, N. N. (2018). Physiological and symbiotic characteristics of rhizobia isolated from *Medicago polymorpha* L. and *Trigonella stellata* L. growing in semi–arid regions of Libya. *Advances in Bioscience and Bioengineering* 6(4), 34– 41.
- Paudyal, S. P., Aryal, R. R., Chauhan, S. V. S. and Maheshwari, D. K. (2007). Effect of heavy metals on growth of *Rhizobium* strains and symbiotic efficiency of two species of tropical legumes. *Sci World* 5, 27– 32.
- 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.
- Terpolilli, J., Rui, T., Yates, R., Howieson, J., Poole, P., Munk, C., Tapia, R., Han, C., Markowitz, V., Tatiparthi, R., Mavrommatis, K., Ivanova, N., Pati, A., Goodwin, L., Woyke, T., Kyrpides, N. and Reeve, W. (2013). Genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii strain WSM1689, the microsymbiont of the one flowered clover *Trifolium uniflorum*. *Standards in Genomic Sciences* 9, 527–539.
- Torrey, J. G. and Tjepkema, J. D. (1979). Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete–nodulated plants. *Bot Gaz* 140 (suppl.), 1– 11.
- 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 Publication Ltd, pp. 73– 97.
- Zahran, H. H. 1999. Rhizobium– legume symbiosis and nitrogen fixation under severe condition and in arid climate. *Microbiol Mol Biol Rew* 63, 968– 989
- Zahran, H. H. (2001) Rhizobia from Wild Legumes: Diversity, Taxonomy, Ecology, Nitrogen Fixation and Biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 91, 143–153.

- Zahran, H. H., Abdel-Fattah, M., Yasser, M. M., Mahmoud, A. M. and Bedmar, E. J. (2012). Diversity and Environmental Stress Responses of Rhizobial Bacteria from Egyptian Grain Legumes. *Australian Journal of Basic & Applied Sciences*, 6, 571–583.
- Zhang, X., Harper, R., Karsisto, M., and Lindström, K. (1991). “Diversity of Rhizobium bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees” *Int J Syst Bacteriol* 53, 104–113
- Yao, Z. Y., Kan, F. L., Wang, E. T. and Chen, W. X. (2002). Characterization of rhizobia that nodulate legume species within the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 2219– 2230.
- Young, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In *Biological Nitrogen Fixation* (Stacey, G. et al., ed- s), 43– 86, Chapman and Hall.