التباين الوراثي بين العزلة البرية وعزلات طافرات العوز الغذائي في بكتيريا *Sinorhizobium meliloti* بأعتماد تقانة RAPD-PCR

إحسان عرفان حسين
سلوى علي غانم
قسم علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة – أبن الهيثم/ جامعة بغداد

استلم البحث في :1/ايلول /2014/ ، قبل البحث في : 24/تشرين الثاني /2014

الخلاصة

عزلت عزلة برية SGI2 لبكتيريا *Sinorhizobium meliloti* من نبات الجت(alfalfa) *Medicago sativa* الذي حصلنا عليه من منطقة الطارمية / محافظة بغداد، وتم الحصول على 9 طافرات عوز غذائي من العزلة البرية SGI2 بالتطفير مع حامض النيتروز Nitrous acid. امتلكت جميع العزلات البرية والطافرة بلازميدين كبيرين هما pSymA وpSymB ولم يظهر الترحيل الكهربائي لهما أي تغيرات نتيجة التطفير بحامض النيتروز. أظهرت التباينات الوراثية بأعتماد تقانة RAPD-PCR بين العزلة البرية وعزلات طافرات العوز الغذائي وجود حزمة واحدة في العزلة SGI6 بحجم أكبر من 1.5 كيلو قاعدة عند أستعمال البادئ OPY-04، وعند أستعمال البادئ OPB7 أظهر تباينات كبيرة بين العزلة البرية وعزلات طافرات العوز الغذائي. تم مشاهدة حزمتين في العزلة البرية SGI2 بحجم 800 قاعدة و1.5 كيلو قاعدة وعدم ظهورها في العزلات الطافرة الأخرى. أظهرت الحزمة التي بحجم 800 قاعدة في العزلة الطافرة SGI10 فحسب، في حين أظهرت بقية العزلات الطافرة حزماً تباين حجمها من 200 قاعدة إلى أكثر من 1.5 كيلو قاعدة كما في العزلة SGI6. ولم تظهر أي حزم عند أستعمال هذا البادئ في العزلات SGI8، SGI9 و SGI12. إن ظهور هذه الحزم يوضح مدى التباين الوراثي على المستوى الجيني للجينوم الكلي وليس على مستوى البلازميد نتيجة التطفير الكيمياوي بأستعمال حامض النيتروز.

الكلمات المفتاحية: Genetic variation ، *Sinorhizobium meliloti* ، RAPD , Nitrous acid

المقدمة

يشير التثبيت الحيوي للنيتروجين Biological nitrogen fixation إلى العمليات التي تقوم بها الأحياء الدقيقة المثبتة للنيتروجين الجوي داخل العقد الجذرية للنباتات التي تساعد على جعل النيتروجين متاحاً لغرض استغلاله من قبل تلك النباتات [1]. يؤدي التثبيت الحيوي للنيتروجين بواسطة العلاقة بين بكتيريا الرايزوبيوم والنباتات البقولية دوراً مهماً في زيادة إنتاج المحاصيل والمحافظة على خصوبة التربة [2]. وتتم عملية تثبيت النيتروجين بطريقتين: إحدهما بصورة حرة Free nitrogen fixation، وهذه الطريقة تقوم بها عدد من الأحياء المجهرية وهي بكتيريا الـ *Azotobacter* وقسم من الطحالب الخضر المزرقة *Cyanobacteria*. والأخرى: بصورة تكافلية Symbiotic nitrogen fixation أو بصورة غير حرة، وهذه الطريقة يقوم بها جنس خاص من البكتيريا تسمى بكتيريا العقد الجذرية أو الـ*Rhizobium* ، إذ تمثل علاقة تكافلية بين بكتيريا الـ *Rhizobium* والنباتات البقولية Legumes مثل البرسيم, والجت، والفاصوليا, وفول الصويا، وهي أحد أشهر الأمثلة للعلاقات البيئية بين الميكروبات وبين الكائنات الراقية إذ إن هذه البكتيريا تكون عقداً جذرية على جذور النباتات البقولية Legume plants، وفي هذه العلاقة نجد كلا الكائنين يفيد من الآخر، إذ يقوم النبات بإمداد البكتيريا بالمصدر الكاربوني (السكر) ومصادر الطاقة والأحماض العضوية وغير العضوية [3], في حين تقوم البكتيريا بعملية تثبيت النيتروجين الجوي وتحويله الى صورة يمكن للنبات أن يفيد منه كتحويله إلى أحماض أمينية مثل Asparagine وGlutamic. تقدر نسبة النيتروجين المثبت حيوياً بنحو 85%، وإن التثبيت الحيوي للنيتروجين من الجو يُعد من المصادر الرئيسة لمجموع النيتروجين الذي يحسن التربة الزراعية [4]، وتقدر كمية النيتروجين التي يثبتها الجت Alfalfa في التربة بنحو 125-335 كغم N/هكتار سنوياً [5]. ولأن الأسمدة الكيمياوية والعضوية لا تلبي إلا جزءاً من حاجات الزراعة من مركبات النيتروجين لذلك فأن تلك الحاجات يجب أستيفاؤها من مخزون التربة من هذه المركبات وكذلك عن طريق تثيت النيتروجين تكافلياً [6].

تعيش بكتيريا الرايزوبيوم بصورة حرة في التربة ولها القدرة على إصابة نباتات بقولية معينة محدثة العقد الجذرية، ولكل نبات بقولي أو مجموعة من النباتات البقولية نوع أو سلالة معينة من بكتيريا الرايزوبيا تستطيع أن تكون عليها العقد، في حين لا تستطيع ذلك سلالة أخرى. تعيش بكتيريا الرايزوبيوم في التربة لذلك فأن الظروف البيئية من درجة حرارة ورطوبة وملوحة ودرجة الحامضية تؤثر في نموها وكفاءتها في تثبيت النيتروجين [7]، وتسعى الأبحاث العلمية إلى أستعمال بكتيريا الرايزوبيوم في المجال الزراعي لما لها من أهمية في زيادة وتحسين الإنتاج الزراعي للنباتات البقولية. إن بكتيريا *Sinorhizobium meliloti* سالبة لملون كرام، ولها المقدرة على تكوين العقد الجذرية على نباتات الجت Alfalfa والبرسيم الحلو Sweet clover ونبات الحلبة Trigonella. تحدث الاصابة البكتيرية عند الشعيرات الجذرية للنبات المضيف بالاشتراك مع تبادل الإشارات بين البكتيريا والنبات [9 , 8]. تشارك بكتيريا الرايزوبيوم في تثبيت النيتروجين مع النباتات البقولية التي تحمل كروموسوماً أضافياً بصورة بلازميد Plasmid. أعتمدت تقانة التطفير باستعمال المواد الكيمياوية أو باستعمال الترانسبوزن Transposon لتعيين جينات الرايزوبيا Rhizobial genes التي لها أهمية في العلاقة التكافلية. واعتمدت تقانة التطفير الكيمياوي باستعمال حامض النيتروز Nitrous acid (HNO_2) لعزل طافرات العوز الغذائي والطافرات التي تفشل في إقامة العلاقة التكافلية مع النبات العائل. الرايزوبيا Rhizobia تحتاج إلى وجود 20 حامضاً أمينياً لتقيم علاقة تكافلية فعالة مع النباتات البقولية، تصنع بعض هذه الأحماض الأمينية بواسطة الرايزوبيوم في حين يزود بعضها الآخر من قبل النبات [3]. تعتمد البصمة الوراثية Fingerprint باعتماد تقانة Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) على استعمال بادئات Primers قصيرة والتي تهجن Hybridize مع كمية كافية من تسلسلات الدنا الكروموسومي على أن يكون ارتباط هذه البادئات تحت درجات حرارية واطئة بطريقة يمكنها البدء بتضخيم تلك القطعة من دنا الجينوم البكتيري [10]. تكون التقانات الجزيئية التي تعتمد على طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)، سهلة في دراسة التشخيص والتنوع الوراثي Genetic diversity لأنها سريعة وبسيطة ومميزة. إن التباينات في الصفات المظهرية والوراثية لبعض أنواع الرايزوبيا موجودة [13 , 12 , 11], وتعد تقانة الـ PCR من التقانات المفيدة في التشخيص وإيجاد الفروق بين سلالات الرايزوبيوم باستعمال بادئات غنية بالقواعد النيكلوتيدية الكوانين والسايتوسين GC-rich oligonucleotide primers [14].

تركز هذه الدراسة على الحصول على طافرات العوز الغذائي باستعمال حامض النيتروز(Nitrous acid (HNO_2 كمادة مطفرة في بكتيريا *S. meliloti*. وعزل البلازميدات الكبيرة Megaplasmids باعتماد طريقة الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis. كما تم اعتماد طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) لغرض أيجاد التباينات الوراثية بين السلالة البرية وطافرات العوز الغذائي باعتماد تقانة التضخيم العشوائي للدنا متعدد الأشكال Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR).

المواد وطرائق العمل

العزلات البكتيرية المستعملة

عزلت عزلة محلية واحدة من بكتيريا *S. meliloti* من العقد الجذرية لنبات الجت *Medicago sativa* (alfalfa) الذي جمع من منطقة الطارمية / محافظة بغداد بحسب طريقة [16 , 15]، فضلاً عن (9) طافرات عوز غذائي

تم الحصول عليها من العزلة البرية SGI2 بطريقة التطفير باستعمال حامض النيتروز Nitrous acid (HNO_2). أديمت العزلات البكتيرية وحفظت بالثلاجة تحت حرارة 4 م ° لمدة شهر واحد ومن ثم أديمت مرة أخرى.

النبات العائل المستعمل

استعملت بذور نبات الجت (alfalfa) *M. sativa* لصنف واحد تم الحصول عليه من قسم المحاصيل الزراعية / كلية الزراعة / جامعة بغداد لغرض التأكد من العزلة البرية وإصابتها لنبات الجت وتكوينها للعقد الجذرية وبحسب طريقة [15].

الأوساط الزرعية المستعملة

1. استعمل الوسط الغذائي الكامل Mannitol salt extract (MSY) medium عند عزل البكتيريا من العقد الجذرية من نبات الجت الذي حضر بحسب طريقة [17] الذي يتكون من إذابة 10 غم من Mannitol, 0.2 غم من Yeast extract، 0.2 غم من K_2HPO_4، 0.2 غم من KH_2PO_4، 0.1 غم من $MgSO_4.7H_2O$ و 0.05 غم من $CaCl_2.2H_2O$ في لتر واحد من الماء المقطر، وأضيف الأكار Agar بتركيز 1.5-2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على أوساط غذائية صلبة، ومن ثم عقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت حرارة 121 م° لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.
2. استعمل الوسط الغذائي الكامل Tryptone-yeast extract (TY) medium في تجارب التطفير، عزل البلازميدات ودراسات التباين الوراثي باعتماد تقانة RAPD-PCR بحسب طريقة [18] الذي يتكون من إذابة 5 غم من Tryptone، 3 غم من Yeast extract و 0.12 غم من $CaCl_2.2H_2O$ في لتر واحد من الماء المقطر، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة.
3. استعمل الوسط الغذائي الرايزوبي الناقص Rhizobial minimal medium (RMM) في تجارب التطفير وبحسب طريقة [19] الذي تكون من محلولين. المحلول الأول A الذي تكون من 0.45 غم من $Na_2HPO_4.12H_2O$، 2 غم من $(NH_4)_2SO_4$، 0.002 غم من $FeCl_3$، 0.1 غم من $MgSO_4.7H_2O$ و 0.040 غم من $CaCl_2.2H_2O$ في لتر واحد من الماء المقطر، ومن ثم عقم الوسط الغذائي بالمؤصدة. تكون المحلول B من 20% من محلول الكلوكوز الذي يعقم بواسطة المرشح، ولتحضير 1 لتر من الوسط الغذائي الناقص تم إضافة 10 مل من المحلول B إلى 990 مل من المحلول A.
4. استعمل الوسط الغذائي الفقير السائل Liquid nutrient poor medium في تجارب عزل البلازميدات بحسب طريقة [20] الذي تكون من أذابة 0.4 غم Peptone، 0.05 غم من Yeast extract، 0.05 غم من Tryptone، 0.02 غم من $MgSO_4$ و0.02 غم من $CaCl_2$ في 100 مليلتر من الماء المقطر.
5. استعمل الوسط الغذائي الخالي من النيتروجين Nitrogen free plant growth medium المطلوب لنمو النباتات البقولية في المختبر بحسب طريقة [21].

تحضير حامض النيتروز Nitrous acid (HNO_2)

حضر حامض النيتروز Nitrous acid (HNO_2) في المختبر قبل البدء بعملية التطفير بحسب طريقة [22] وذلك بإذابة 0.035 غم من نترات الصوديوم Sodium nitrite ($NaNO_2$) في 5 مل من دارئ أستيت الصوديوم Sodium acetate buffer بتركيز 0.1 (pH4.6) مولاري. كما يتم تحضر دارئ أستيت الصوديوم Sodium acetate buffer بتركيز 0.1 مولاري في دورق حجمي بحجم 100 مل وذلك بخلط 25.5 مل من حامض الأسيتك Acetic acid بتركيز 0.2 مولاري مع 24.5 مل من الصوديوم أستيت Sodium acetate بتركيز 0.2 مولاري. يكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر ومن ثم يعقم بالمؤصدة.

تطفير بكتيريا الرايزوبيوم باستعمال حامض النيتروز Nitrous acid (HNO_2)

تم تطفير بكتيريا الرايزوبيوم بحامض النيتروز بحسب طريقة [22]. وضع 10 مل من الوسط الغذائي السائل TY المزروع ببكتيريا الرايزوبيوم في حاضنة هزازة لمدة 24 ساعة وأخذ منه بعد ذلك 0.1 مل وعمل له تخافيف متسلسلة ونمي على وسط غذائي صلب لغرض حساب عدد المستعمرات النامية Colony forming unit (CFU). أخذ 1.5 مل أيضاً من نفس الوسط الغذائي المزروع ببكتيريا الرايزوبيوم نفسه ونقل إلى أنبوبة Eppendorf وتم ترسيب الخلايا بواسطة النبذ المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، ومن ثم تم التخلص من الجزء الطافي وعلق الراسب باستعمال Vortex بدارئ Sodium acetate buffer بتركيز 0.1 مولاري. رسبت الخلايا مرة أخرى باعتماد النبذ المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، وتم التخلص من الجزء الذي طفا، وعلق راسب الخلايا البكتيرية بـ 1 مل من حامض النيتروز Nitrous acid المحضر حديثاً تحت حرارة 5 م°. سحب من العينة بعد 10 و 15 و 20 دقيقة من بعد البدء بعملية التطفير وغسل بالمحلول الفسلجي (0.85% NaCl) لإزالة حامض النيتروز الباقي ومن ثم زرعت الخلايا في الوسط الغذائي TY السائل، وحضنت لمدة 8 ساعات لغرض عزل الطفرات الراجعة. غسلت الخلايا بعد ذلك بالمحلول الفسلجي (0.85% NaCl) ونميت الخلايا لمدة 6 ساعات على الوسط الغائي السائل الناقص RMM. أضيف Penicillin

G بتركيز 300 مايكروغرام/مل إلى الوسط الغذائي السائل الناقص RMM وحضنت لمدة ساعتين لغرض قتل الخلايا التي لا تحتوى على طافرات العوز الغذائي. غسلت الخلايا مرتين بالمحلول الفسلجي (0.85% NaCl) وعمل لها تخافيف متسلسلة وزرعت بين الوسط الغذائي TY الصلب وحضنت في الحاضنة الكهربائية لمدة 24-48 ساعة وبدرجة حرارة 28±2 م^{o} وبعد ذلك حسب عدد المستعمرات النامية، ومن ثم خضعت لاختبارات الكشف عن طافرات العوز الغذائي. تم حساب النسبة المئوية لعدد المستعمرات الباقية وذلك بحسب المعادلة الآتية:

$$\text{نسبة القتل } (\%) = \frac{\text{عدد الخلايا البكتيرية الحية قبل التطفير / مل} - \text{عدد الخلايا الحية بعد التطفير / مل}}{\text{عدد الخلايا البكتيرية الحية قبل التطفير / مل}} \times 100$$

الكشف عن طافرات العوز الغذائي

بعد انتهاء عملية التطفير الكيمياوي باستعمال حامض النيتروز Nitrous acid تم الكشف عن طافرات العوز الغذائي بزراعة الخلايا البكتيرية الناتجة من عملية التطفير في أطباق الوسط الغذائي الناقص RMM وأطباق الوسط الغذائي TY الصلبة، وحضنت في الحاضنة الكهربائية تحت حرارة 28±2 م^{o} لمدة من 24-48 ساعة. في حالة مشاهدة النمو في أطباق الوسط الغذائي TY وعدم حصوله في أطباق الوسط الغذائي الناقص RMM فهذا يعني أنها طافرة عوز غذائي. أخذت المستعمرات التي نمت في أطباق الأوساط الغذائية TY ونقيت وحفظت بدرجة حرارة 4 م^{o} لغرض الخزن وإجراء الفحص الأخير عليها، بعد ذلك لغرض معرفة نوع طفرة العوز الغذائي. لمعرفة نوع طفرة العوز الغذائي اتبعت طريقة [23] بأخذ ملء عروة Loopful من طافرة العوز الغذائي وعلقت في قطرة من المحلول الفسلجي على شريحة زجاجية، وبواسطة عيدان تنظيف الأسنان المعقمة تم أخذ كمية صغيرة جداً من القطرة التي فيها عالق الخلايا البكتيرية وزرع العالق في أطباق مجمع هوليدي (Holliday pools). تتكون أطباق مجمع هوليدي من 11 طبقاً من الوسط الغذائي الناقص RMM فضلاً عن أنها مزودة بالأحماض الأمينية والقواعد النيتروجينية والفيتامينات بتراكيز 50 و 30 و 10 مايكروغرام/مل على التوالي. بعد حدوث النمو على طبقين مثل الطبق Poo1 2 والطبق Pool 9، فهذا يعني أن الطافرة تكون في الجين المسؤول عن إنتاج الحامض الأميني Asparagine وهكذا بالنسبة إلى بقية طافرات العوز الغذائي (جدول 1).

عزل بلازميدات بكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

عزلت بلازميدات بكتيريا الرايزوبيوم بحسب طريقة [20]، وهي طريقة محورة قليلاً عن طريقة [24]. أخذت مستعمرات خلايا بكتيريا الرايزوبيوم وزرعت في 10 مل من الوسط الغذائي الفقير Nutrient poor medium. وضعت الأوساط الغذائية السائلة والمزروعة ببكتيريا الرايزوبيوم في حاضنة هزازة Shaker incubator بسرعة 130 دورة/دقيقة لمدة 24 ساعة وتحت حرارة 28±2 م^{o}. خفف المزروع بعد ذلك بـ 2 مل من الوسط الزرعي TY السائل وحضنت لمدة ساعتين. أخذ 0.25 مل من الوسط الغذائي المزروع ونقل إلى أنبوبة Eppendorf وأضيف إليه 0.5 مل من محلول SDS بتركيز 10%. جمعت الخلايا البكتيرية بنبذها مركزياً لمدة 5 دقائق بسرعة 13000 دورة/دقيقة. تم التخلص من الجزء الذ طفا، وعلق الراسب (خلايا البكتيريا) بإضافة 25 مايكروملليلتراً من محلول يحتوي على RNase بتركيز 10 مايكروغرامات/مل و 100 مايكروغرام/مل من الـ Lysozyme و 10% من محلول السكروز Sucrose التي تكون مذابة في محلول Tris-borate buffer الذي حضر بحسب طريقة [25] من أذابة 10 غم من Tris base، 0.93 غم من مادة Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) و 5.5 غم من Boric acid ويكمل الحجم إلى لتر واحد من الماء المقطر ويعدل الأس الهايدروجيني pH إلى 8.3. حملت العينة في فتحات المشط الصغير في هلام الآكاروز الذي يكون بتركيز 0.65%، والذي حضر في محلول Tris-borate buffer. استعمل نوعان من الأمشاط أحدهما بقياس 3X5 ملم والآخر بقياس 1.5X5 ملم، وتم وضعهما الواحد بجنب الآخر مع ترك مسافة ضيقة بينهما. فتحات المشط الكبير تملأ بالمحلول الحاوي على (1 % SDS, 0.5% agarose, 0.05% bromophenol blue), أما فتحات المشط الصغير فملأ بالعينة التي حضرت سابقاً. رحلت العينات باستعمال دارئ TBE الذي حضر من إذابة 108 غم من مادة Tris base و55 غم من حامض البوريك Boric acid و40 مل من مادة EDTA بتركيز 0.5 مولاري. أظيف الماء المقطر المعقم وصولاً إلى لتر واحد مع تعديل الأس الهايدروجيني (pH) إلى 8. رحلت العينات من القطب الأسود السالب بإتجاه القطب الأحمر الموجب بجهد فولتية 10-5 فولت لمدة 30 دقيقة أو لغاية حصول تحليل الخلايا البكتيرية، وبعد ذلك ولمدة ثلاث ساعات بجهد فولتية 100 فولت. جهد الفولتية الواطئ يساعد الـ SDS بالرحيل بإتجاه العينة الموجودة في المشط الصغير.
بعد توقف عملية الترحيل الكهربائي صبغ الهلام باستعمال الأيثيديوم بروومايد Ethidium bromide (EtBr) بتركيز 0.5 مايكروغرام/مل لمدة 15 دقيقة ومن ثم أظهر الدنا الموجود في الهلام على جهاز الـ U.V، وصور بعد ذلك باستعمال جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

استخلاص الدنا الكلي من بكتيريا *Sinorhizobium meliloti*

عزل الدنا البكتيري بحسب طريقة [26]. نميت بكتيريا *S. meliloti* على الوسط الغذائي TY الصلب لمدة يومين بدرجة حرارة 28ºC. أخذت كمية من المزروع البكتيري بواسطة الـ Loop وعلقت هذه الكمية بـإضافة 25 مايكروmليلتراً من الماء المقطر المعقم في أنبوبة Eppendorf. أضيف بعد ذلك 25 مايكروملیلتراً من دارئ التحلل Lysis buffer المحضر حديثاً من SDS بتركيز 0.5% الذي حضر في 0.1 عياري من NaOH. وضعت أنابيب الـ Eppendorf الحاوية على الخليط في حمام مائي لمدة 15 دقيقة. أضيف 200 مايكروملیلتر من دارئ TE الذي يتكون من 0.1 ملي مولار من مادة EDTA و 10 ملي مولارات من مادة Tris-HCl والأس الهايدروجيني لهذا الدارئ pH 8. نبذت العينة مركزياً لمدة 15 دقيقة بسرعة 13000 دورة/دقيقة. نقل الجزء الطافي المتكون بعد ذلك والحاوي على الدنا إلى أنبوبة Eppendorf جديدة ومعقمة. عين تركيز ونقاوة الدنا باستعمال الـ Nanodrop باعتماد طول موجي 260 نانوميتراً وأن قيمة تركيز الدنا النقي هي 0.1±1.8 مايكروغرام/مايكروليتر [27]. حفظت العينة بحرارة 20- مº لحين الاستعمال. استعمل 100 نانوغرام من الدنا كقالب لغرض إجراء أختبارات الـ RAPD-PCR.

التباين الوراثي لبكتيريا *Sinorhizobium meliloti* باعتماد طريقة RAPD-PCR

درس التباين الوراثي لعزلة بكتيريا *S. meliloti* وطافرات العوز الغذائي باعتماد تقانة Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). حضر الخليط الأساسي Master Mix للبادئ OPY-04 (5´- AAGGCTCGAC-3´) بحسب طريقة [28] وللبادئ OPB7 (5´-GGTGACGCAG-3´) بحسب طريقة [29] تحت ظروف مبردة مع بعض التحويرات. استعمل Go Taq® Green Master Mix المزود من شركة Promega الأميركية بحجم 12.5 مايكروملیلتر وبتركيز 1X والبادئ Primer بحجم 2.5 مايكروملیلتر وبتركيز 1 مايكرومولر وقالب الدنا DNA template بحجم 2 مايكروملیلتراً وبتركيز 100 نانوغرام وكان الحجم الكلي للتفاعل 25 مايكروملیلتراً. وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف التفاعل للبادئ OPY-04 كانت لدنترة القالب Denature template بدرجة حرارة 94 مº ولمدة 3 دقائق والدنترة الابتدائية Initial denaturation بدرجة حرارة 94 مº لمدة دقيقة واحدة وأرتباط البادئ Annealing بدرجة حرارة 38.6 مº ولمدة دقيقة واحدة والأستطالة Extension بدرجة حرارة 72 مº لمدة دقيقتين والأستطالة النهائية Final Extension بدرجة حرارة 72 مº لمدة 6 دقائق. مراحل الدنترة الابتدائية وأرتباط البادئ والاستطالة كانت لـ 30 دورة. وظروف التفاعل للبادئ OPB7 لدنترة القالب Denature template بدرجة حرارة 95 مº لمدة 30 ثانية والدنترة الابتدائية Initial denaturation بدرجة حرارة 95 مº لمدة 30 ثانية وارتباط البادئ Annealing بدرجة حرارة 42.7 مº لمدة دقيقة واحدة والاستطالة Extension بدرجة حرارة 72 مº لمدة دقيقتين والاستطالة النهائية Final Extension بدرجة حرارة 72 مº لمدة 10 دقائق. مراحل الدنترة الابتدائية وارتباط البادئ والأستطالة كانت لـ 45 دورة. حملت نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البادئين أعلاه لعزلة بكتيريا *S. meliloti* وطافرات العوز الغذائي في المكان المخصص لها في هلام الآكاروز الذي كان بتركيز 1.5%، كما وضع الواصم الجزيئي الوراثي بحسب النشرة المرفقة معه الذي كان بحجم 1.5 كيلو قاعدة. حملت صبغة التحميل البروموفينول الأزرق Bromophenol blue في كل عينة بحجم 2 مايكروملیلتر ورحلت العينات كهربائياً من القطب الأسود السالب باتجاه القطب الأحمر الموجب تحت جهد كهربائي 60 فولتاً ولمدة من 3-4 ساعات. صبغ هلام الآكاروز بصبغة الأثيديوم برومايد Ethidium bromide (EtBr) لمدة 15 دقيقة، وشوهدت وصورت قطع الدنا المتضخمة بواسطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص بكتيريا *Sinorhizobium meliloti*

عزلت عزلة محلية من بكتيريا *S. meliloti* من نبات الجت (Alfalfa) *M. sativa* وجمع من منطقة الطارمية/محافظة بغداد كما في الجدول (2). ظهرت البكتيريا بعد عزلها وزرعها على الوسط الغذائي الكامل الصلب (MSY) بصورة مستعمرات بيضاء اللون، مخاطية القوام. نقيت البكتيريا بطريقتي التخطيط والتخافيف المتسلسلة باستعمال الوسط الغذائي الكامل MSY. تأكد من العزلة البكتيرية بعد اصابتها مختبرياً مع نبات الجت المحلي (Alfalfa) بحسب طريقة [15]. ظهرت العقد الجذرية بعد مرور ثلاثة أسابيع من بداية الزرع.

عزل طافرات العوز الغذائي

عزلت طافرات العوز الغذائي من العزلة البرية (SGI2) لبكتيريا *S. meliloti* بعد أن طفرت باستعمال حامض النيتروز Nitrous acid بحسب طريقة [17] . اختبرت 1690 عزلة بكتيرية على أوساط غذائية كاملة (TY) وأوساط

غذائية ناقصة (RMM) وشخصت الطافرات بأستعمال مجمع هوليدي [23]. تأكد من الطافرات بعد تنميتها على الأوساط الغذائية الكاملة (TY) والأوساط الغذائية الناقصة (RMM) والأوساط الغذائية الناقصة والمزودة بالحامض الأميني أو القاعدة النيتروجينية أو الفيتامين المطلوب لنموها. كان معدل نسبة القتل المتحصل عليها باستعمال حامض النيتروز كمادة مطفرة هي 86%، كما تحصل على تسع طافرات عوز غذائي واستعملت في هذه الدراسة وكما في الجدول (3).

عزل البلازميدات الكبيرة من بكتيريا *Sinorhizobium meliloti*

أوضحت نتائج الترحيل الكهربائي للبلازميدات في عزلة بكتيريا *S. meliloti* البرية وطافرات العوز الغذائي لهذه البكتيريا بوجود بلازميدين كبيرين لكل عزلة وطافرة، ولم يتأثر عدد هذه البلازميدات بعملية التطفير بحامض النيتروز، مما يدل على أن التطفير كان على المستوى الجيني للجينات المسؤولة عن الإنتاج الحياتي للأحماض الأمينية التي تقع على هذه البلازميدات. وجد عدد من الباحثين[30،31] جينات مسؤولة لعدد كبير لأنظمة نقل المواد الذائبة وكذلك لها دور أساسي في التصنيع الحياتي للسكريات المتعددة الخارجية EPS والسكريات المتعددة الدهنية LPS، كذلك وجود الجينات التي لها علاقة بالتصنيع والهدم الحياتي للأحماض الأمينية أو المركبات التي يمكن أن توجد في بيئة التربة، كما أوضحوا بأن الجينات الأساسية لنمو البكتيريا قد تم تشخيصها أيضاً في البلازميد الكبير pSymB. لم يتم التعرف على أحجام هذه البلازميدات لعدم ترحيل الدلائل الجزيئية (Genetic markers) التي يجب أن تكون بحجم كبير لعدم توفرها في السوق المحلية العراقية علماً بأن استيرادها من الخارج يتطلب وقتاً ولضيق وقت إنجاز الدراسة رحلت العينات من دون هذه الدلائل الجزيئية كما في الصورة رقم (1). هناك دراسات أوضحت بأن بكتيريا *S. meliloti* تمتلك بلازميداً واحداً بحجم 1.5 ميكا قاعدة وحتى أكبر من ذلك [32]، في حين بين هاينس وآخرون [33] بأن هناك بلازميدين كبيرين في بكتيريا *S. meliloti* وهما pSymA بحجم 1.4 ميكا قاعدة والآخر pSymB بحجم 1.7 ميكا قاعدة. تتفق هذه الدراسة مع دراسات أورسنك وآخرين [34] الذين أظهروا بأن بكتيريا *S. melilti* تمتلك بلازميدين كبيرين وتقريباً بحجم 1.4 ميكا قاعدة و1.6 ميكا قاعدة. وتتطابق مع دراسات كلبرت وآخرين [35] الذين بينوا بأن *S. meliloti* تمتلك بلازميدين كبيرين بأحجام جزيئية 1.65 ميكا قاعدة والآخر 1.35 ميكا قاعدة، كما تتفق مع الدراسة التي قام بها الكناني وآخرون [36] لعزلات بكتيريا *S. meliloti* من محافظة البصرة / العراق الذين وجدوا أيضاً بلازميدين كبيرين أحدهما بحجم 1.6 ميكا قاعدة والآخر 1.3 ميكا قاعدة.

التباينات الوراثية بين العزلة البرية وطافرات العوز الغذائي باعتماد تقانة التضخيم العشوائي للدنا متعدد الأشكال (RAPD-PCR)

استعمل نوعان من البادئات لغرض دراسة التباينات الوراثية بين العزلة البرية وطافرات العوز الغذائي باعتماد تقانة التضخيم العشوائي للدنا متعدد الأشكال RAPD-PCR. الصورة (2) توضح التباينات الوراثية لعزلة طافرة العوز الغذائي SGI6 بالمقارنة مع العزلة البرية SGI2 وعزلات طافرات العوز الغذائي الأخرى باستعمال البادئ OPY-04. إن ظهور حزمة واحدة بحجم أكبر من 1.5 كيلو قاعدة في الترحيل الكهربائي لناتج التضخيم العشوائي للدنا متعدد الأشكال RAPD-PCR يؤكد وجود بعض التباينات الوراثية لهذه العزلة وأن هناك تغيراً في التسلسل النيكلوتيدي للدنا الكلي لها نتيجة التطفير العشوائي له. وبالنظر لظهور اختلاف فقط في هذه العزلة SGI6 قمنا باستعمال بادئ آخر وهو OPB7 باعتماد تقانة نفسها. الصورة (3) توضح نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم العشوائي للدنا متعدد الأشكال RAPD-PCR الذي يؤكد وجود تباينات كبيرة بين العزلة البرية وعزلات طافرات العوز الغذائي. إن ظهور حزمتين لعينة العزلة البرية SGI2 بحجم 800 قاعدة و 1.5 كيلو قاعدة وعدم ظهورها في العزلات الطافرة الأخرى يوضح مدى التباين الوراثي نتيجة التطفير الكيمياوي باستعمال حامض النيتروز. الحزمة التي بحجم 1.5 كيلو قاعدة لم تظهر في بقية عزلات طافرات العوز الغذائي في حين الحزمة التي بحجم 800 قاعدة قد ظهرت في عزلة الطافرة SGI10 فحسب. بقية العزلات الطافرة قد أظهرت حزماً يتباين حجمها من 200 قاعدة إلى أكثر من 1.5 كيلو قاعدة كما في العزلة SGI6، ما عدا العزلات SGI8، SGI9 و SGI12 التي لم تظهر أي حزم لعدم توافق تسلسلات النيكلوتيدات بين البادئ المستعمل مع تسلسلات النيكلوتيدات لدنا هذه العزلات.

إن وجود هذه التباينات نتيجة استعمال مادة مطفرة قد فتح الباب لدراسات أخرى لها في المستقبل وذلك بعزل تلك الحزم الجديدة وإجراء دراسات التسلسل التتابعي للدنا DNA sequencing ومن ثم مقارنة هذه التسلسلات مع الجينوم الكامل لبكتيريا *S. meliloti* 1021 الموجود في الموقع الرسمي لجينوم بكتيريا الرايزوبيوم [37] لغرض تحديد مكان الضرر في دنا تلك البكتيريا وتحديد نوعية الطفرات الأخرى فضلاً عن طفرة العوز الغذائي الموجودة فيها مما قد يسهم في دراسة التعبير الجيني للجينات الطافرة الأخرى جنباً إلى جنب طفرة العوز الغذائي.

المصادر

1. Hajare, B. and Ade, A. (2012). Confirming location of nitrogen fixing genes on plasmids in *Rhizobium* isolated from *Pisum sativum*. Biosci. Discovery. 3(2):160-164.
2. Sharma, P. and Yadav, S. (2012). Symbiotic characterization of mutants defective in proline dehydrogenase in *Rhizobium* sp. *Cajanus* under drought stress condition. European J. Exp. Biol., 2(1):206-216.

3. Randhawa, G. S. and Hassani, R. (2002). Role of rhizobial biosynthetic pathways of amino acids, nucleotide bases and vitamins in symbiosis. Indian J. Exp. Biol., 40(7):755-764.

4. Bradic, M. ; Sikora, S. ; Redžepović, S. and Štafa, Z. (2003). Genetic identification and symbiotic efficiency of an indigenous *Sinorhizobium meliloti* field population. Food Technol. Biotechnol. 41(1):69-75.

5. قاسم، غياث محمد وعلي، مضر عبد الستار.(1989). علم أحياء التربة المجهرية. كلية العلوم. جامعة الموصل، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، الموصل-العراق.

6. الكسندر, مارتن.(1988). مقدمة في مايكروبيولوجيا التربة. جامعة كورنيل.

7. Bayoumi, H. E. ; Biro, B. and Kecskes, M. (1995). Some environmental factors in fencing the survival of *Rhizobium legumeinosarum* bv. *viceae*. Acta. Biol. Hungary, 46(1):17-30.

8. Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobia. Annu. Rev. Microbiol. 54257-54288.

9. Barnett, M. J. and Fisher, R. F. (2006). Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. Symbiosis. 421-424.

10. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res.18: 6531–6535.

11. Vinuesa, P., Rademaker, J. L. W., de Bruijin, F. J. and Werner, D. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. Appl. Environ. Microbiol.64:2096-2104.

12. Wei, G. H., Zhang, Z. X., Chen, C., Chen, W. M. and Ju, W. T. (2006). Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Edysarum* in northwestern China. Microbiol. Res. 163(6):651-662.

13. Silva C., Kan, F. L. and Martínez-Romero, E. (2007). Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago* spp. in Mexico. FEMS Microbiol. Ecol.60:477-489.

14. Sajjad, M., Malik, T. A., Arshad, M., Zahir, Z. A., Yusuf, F. and Rahman, S. U. (2008). PCR studies on genetic diversity of rhizobial strains. Int. J. Agric. Biol. 10:505-510.

15. Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. I. B. P. Handbook No. Blackwell ScientificPublication Ltd., Oxford, U. S. A., Pp.164.

16. Vincent, J. M. (1982). Nitrogen fixation in Legumes. Academic Press Sydney, New York, London.

17. Khanuja, S.P. S. and Kumar, S. (1989). Symbiotic and galactose utilization properties of phage RMP64-resistant mutants affecting three complementation groups in *Rhizobium meliloti*. J. Genet. 68(2):93-108.

18. Khanuja, S.P. S. and Kumar, S. (1988). Isolation of phages for *Rhizobium meliloti* AK631. Indian J. Exp. Biol. 26:665-667.

19. Singh, A., Ram, J., Sikka, V. K. and Kumar, S. (1984). Derivation of marked strains in *Rhizobium legumeinosarum* R1d1 by nitrosoguanidine and transposon mutageneasis. Indian J. Exp. Biol. 22:239-247.

20. Hynes, M. F., Simon, R. and PÜhler, A. (1985). The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAtC58. Plasmid. 13:99-105.
21. Engelke, T. H., Jagadish, M. N. and Pühler, A. (1987). Biochemical and genetical analysis of *Rhizobium meliloti* mutants defective in C4-dicarboxylate transport. J. Gen. Microbiol. 133:3019-3029.
22. Kerppola, T. K. and Kahn, M. K. J. (1988). Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104A14. J. Gen. Microbiol. 134:913-919.
23. Holliday, R. (1956). A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms. Nature. 178:987-990.
24. Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid. 1:584-588.
25. Hirsch, P. R., Van Montagu, M., Johnston, A. W. B., Brewin, N. J. and Schell, J. (1980). Physical identification of Bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium legumeinosarum*. J. Gen. Microbiol. 120:403-412.
26. Sambrook, J. ; Fritsh, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring. Harbor Laboratory. Press Cold Spring Harbor. New York. USA.
27. Clark, M. S. (1997). In: Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual, pp. 305-328, Springer-Verlog Berlin Heidelberg, New York.
28. Elboutahiri, N., Thami-Alami., I., Zaïd, E. and Udupa, S. (2009). Genotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium* sullae by REP-PCR, RAPD and ARDRA analyses. African J. Biotech. 8(6):979-985.
29. Carelli, M., Gnocchi, S., Fancelli, S., Mengoni, A., Paffetti, D., Scotti, C. and Bazzicalupo, M. (2000). Genetic diversity and Dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soils. Appl. Environ. Microbiol. 66(11):4785-4789.
30. Keller, M., Müller, P., Simon, R. and Pühler, A. (1988). *Rhizobium meliloti* genes for Exopolysaccharides synthesis and nodule infection located on megaplasmid 2 are activity transcribed during symbiosis. Mol. Plant-Microbe Interact. 1(7):267-274.
31. Finan, T. M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorholter, F. J., Hernández-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B. and Pühler, A. (2001). The complete sequence of the 1,683 kb pSymB megaplasmid from the N_2-fixing endosymbiont *S. meliloti*. Proc. Nati. Acad. Sci. USA.98:9889-9894.
32. Burkardt, B. and Burkardt, H.J. (1984).Visualization and exact molecular weight determination of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid. J. Mol. Biol. 175:213-218.
33. Hynes, M. F., Simon, R., Muller, P., Niehaus, K., Labes, M. and Pühler, A. (1986). The two megaplasmids of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa .Mol. Gen .Genet. 202:356-362 .
34. Oresnik, I. J., Liu, S. L., Yost, C. K. and Hynes, M. F. (2000). Megaplasmid pRme2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. J. Bacteriol. 182:3582-3586.
35. Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L.,

Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D,, Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C., Batut, J. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science. 668-672.

36. Al-Kanaany, G. F., Al-Yassri, H. F. and Al-Mousawi, A. A. (2012). Plasmid profile of two isolates of *Sinorhizobium meliloti* isolated from different soil areas in Basrah/ Iraq. Basrah J. Agric. Sci. 25(1):13-18.

37. https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/rhime.cgi.

جدول رقم (1): مجمع هوليدي Holliday's pool

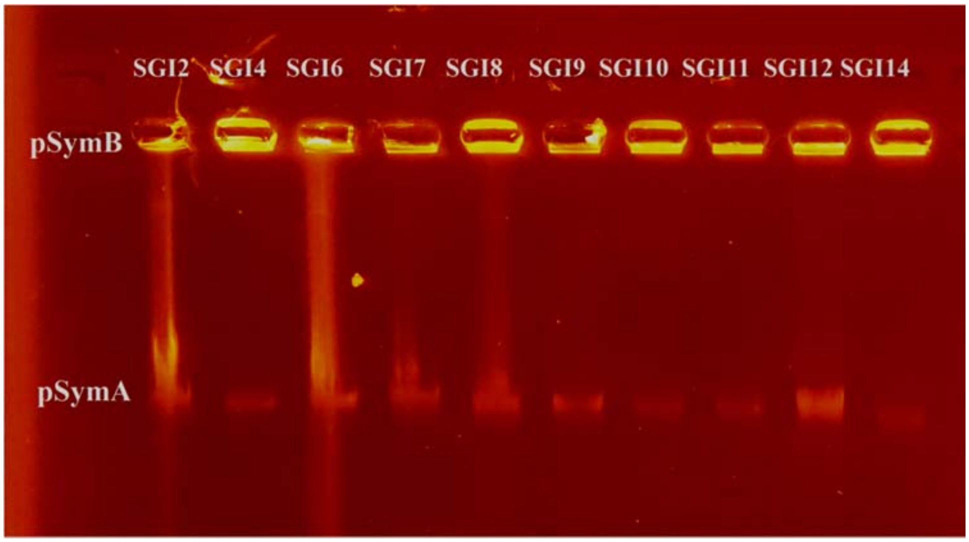
Pools	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5
Pool 6	Adenine	Guanine	Cysteine	Methionine	Thiamine
Pool 7	Histidine	Leucine	Isoleucine	Lysine	Valine
Pool 8	Phenylalanine	Tyrosine	Tryptophan	Threonine	Proline
Pool 9	Glutamine	Asparagine	Uracil	Aspartic acid	Arginine
Pool 10	Thymine	Serine	Glutamate	Alanine	Glycine
Pool 11	Pantothenic acid	Riboflavin	Biotin	Cobalamine	

جدول رقم(2): العزلات البكتيرية المستعملة في هذه الدراسة

أسم العزلة	الصفات المظهرية والوراثية	المصدر
SGI2	عزلة محلية برية, Nod^+ ، pSymA ، pSymB	منطقة الطارمية/ بغداد
SGI4	طافرة عوز غذائي, Ade^- ، pSymA ، pSymB	هذه الدراسة
SGI6	طافرة عوز غذائي، Cys^- ، pSymA ، pSymB	هذه الدراسة
SGI7	طافرة عوز غذائي، Gly^- ، pSymA ، pSymB	هذه الدراسة
SGI8	طافرة عوز غذائي، Met^- ، pSymA ، pSymB	هذه الدراسة
SGI9	طافرة عوز غذائي, Try^- ، pSymA ، pSymB	هذه الدراسة
SGI10	طافرة عوز غذائي، Ala^- ، pSymA ، pSymB	هذه الدراسة
SGI11	طافرة عوز غذائي، Asp^- ، pSymA ، pSymB	هذه الدراسة
SGI12	طافرة عوز غذائي، Try^- ، pSymA ، pSymB	هذه الدراسة
SGI14	طافرة عوز غذائي، Lys^- ، pSymA ، pSymB	هذه الدراسة

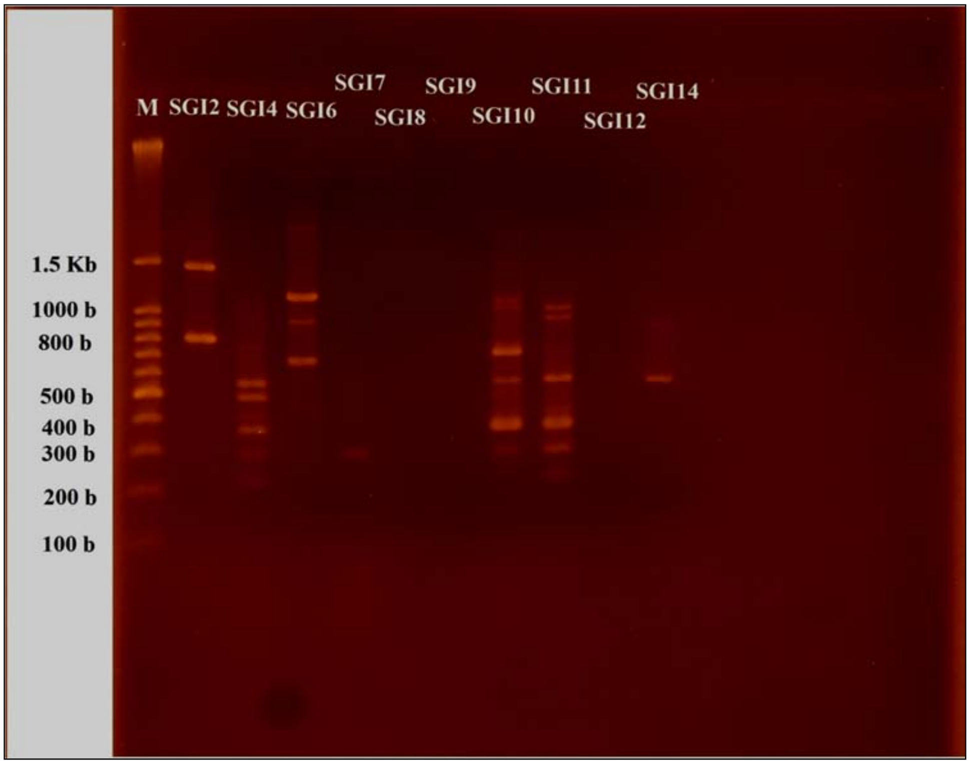
جدول رقم (3): طافرات العوز الغذائي التي تم الحصول عليها من العزلة البرية SGI2 لبكتيريا *Sinorhizobium meliloti*

العزلة	نوع الطفرة في الحامض الأميني / القاعدة النيتروجينية / الفيتامين
SGI4	Adenine (Ade^-)
SGI6	Cysteine (Cys^-)
SGI7	Glycine (Gly^-)
SGI8	Methionine (Met^-)
SGI9	Tryptophan (Try^-)
SGI10	Alanine (Ala^-)
SGI11	Aspartic acid (Asp^-)
SGI12	Tryptophan (Try^-)
SGI14	Lysine (Lys^-)



صورة رقم (1): البلازميدات الكبيرة Megaplasmids في عزلة بكتيريا *Sinorhizobium meliloti* وطافرات العوز الغذائي

صورة رقم (2): هلام الترحيل الكهربائي لدنا عزلات بكتيريا *Sinorhizobium meliloti* البرية وطافرات العوز الغذائي باستعمال البادئ OPY-04 وتقانة التضخيم العشوائي للدنا متعدد الأشكال RAPD-PCR



صورة رقم (3): هلام الترحيل الكهربائي لدنا عزلات بكتيريا *Sinorhizobium meliloti* البرية وطافرات العوز الغذائي باستعمال البادئ OPB7 وتقانة التضخيم العشوائي للدنا متعدد الأشكال RAPD-PCR

Genetic variation between wild type and auxotrophic mutant isolates of *Sinorhizobium meliloti* by using RAPD-PCR technique

Ihsan A. Hussein
Salwa A. Ganim
Dpet . of Biology/College of Education for Pure Science –(IbAl-Haithim) /University of Baghdad

Receivd in:1/Septemper/2014, Accepted in :24/ November /2014

Abstract

SGI2 wild type isolate of *Sinorhizobium meliloti* was isolated from *Medicago sativa* (alfalfa) plant which was obtained from Al-Tarmiaa region / Baghdad. Nine auxotrophic mutants were obtained from the SGI2 wild type isolate by mutagenesis with Nitrous acid (HNO_2). The SGI2 wild type and the all auxotrophic mutant isolates had two Megaplasmids; pSymA and pSymB. No genetic variations in plasmid number and size were detected when gel electrophoresis was done for plasmid profile detection. Genetic variations by using RAPD-PCR technique were obtained between wild type and auxotrophic mutant isolates. One band was detected in SGI6 gel profile with 1.5 Kb size when OPY-04 primer was used. Using OPB7 primer by using RAPD-PCR technique showed large variation between all the isolates. Two bands were obtained from the SGI2 wild type isolate with 800 bases and 1.5 Kb in size. These bands were absent from the auxotrophic mutant isolates. The band with 800 bases was also found in SGI10 isolate. The other auxotrophic mutant isolates have different bands with size ranging from 200 bases and more than 1.5 Kb for the SGI6 isolate. No bands were detected in SGI8, SGI9 and SG12 isolates. The large differences in bands number and size suggested that the variation is clear at the genes level of the total genome and not at plasmid level as a result after nitrous acid mutagenesis.

Keywords: Genetic variation, *Sinorhizobium meliloti,* RAPD, Nitrous acid