جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

قسم علوم الحياة

عزل ودراسة جزيئية للبكتريا المتعايشة في أوراق وبذور نبات *Ardisia crenata* ودورها في البناء الحيوي لمركب Cyclic depsipeptide

جيهان خليل خضر أحمد الجرجري

رسالة ماجستير

علوم الحياة / علم النبات

إشراف

الأستاذ الدكتور

أمجد عبد الهادي محمد علي

1445هـ

2024 م

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن المحتوى البكتيري في العقد الورقية والثمار الحمراء لنبات *Ardisia crenata*. حيث أظهرت النتائج نمو نوعين بكتيريين بعد التحضين بدرجة 28 سيليزية لمدة 24 ساعة على وسط Nutrient agar (NA) وقد ظهرت المستعمرات لهما باللون الأصفر الفاتح واخذت الشكل الدائري المحدب قليلاً. وكانت كلتا العزلتين موجبتين لجميع الأختبارات والتي تضمنت صبغة كرام، اختبار الكاتاليز والأوكسديز. واظهرت البكتريا المعزولة من عقد الأوراق تحسسها لجميع المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة اما البكتريا المعزولة من بذور الثمار أظهرت مقاومتها للمضادين Cefotaxime و Ceftriaxone بتركيز 10 مايكروغرام/ قرص لكل منهما وتحسسها لباقي المضادات الحيوية.

شخصت العزلات جزيئياً بأستخدام تحليل التتابع الوراثي للجين 16SrRNA وأضهرت النتائج عائدية العزلتين الى جنس *Bacillus*. ومن ثمَّ تسجيل العزلات في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI) كسلالات جديدة بأسم *Bacillus* sp. strain JA Leaves وأعطيت الرمز PP213275.1 والأخرى بأسم *Bacillus* sp. strain JA seed وأعطيت الرمز PP215359.1 على التوالي.

كذلك أشارت النتائج الى كفاءة تقانة الاقتران في التحول الوراثي لبكتريا *Acinetobacter* sp. strain AZS1 وانتقال صفة المقاومة للمضادات الحيوية وصفة تثبيت النيتروجين الجوي من البكتريتين المعزولتين ومن بكتريا *Acinetobacter* sp. strain AZS1 إلى البكتريا المقترنة *Acinetobacter* ونمو الأخيرة على الوسط الصلب الخالي من النيتروجين Nitrogen- free medium (NF) والحاوي على المضاد الحيوي Gentamicin بتركيز 10 مايكروغرام/ مل.

وأكدت الدراسة وجود جين *nif* H في بلازميدات الأنواع البكتيرية قيد الدراسة في ضوء قراءات الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR للحمض DNA البلازميدي المضخم والمستخلص منهم باستخدام بادئ متخصص بالجين *nif* H.

وقد نجحت الدراسة أيضاً في تكوين العقد الجذرية على المجموع الجذري لبادرات نبات البرسيم *Trifolium* spp. بعد معاملتها بالأنواع البكتيرية *Acinetobacter baumannii* strain JA

Conj.L المقترنة، *Acinetobacter baumannii* strain JA Conj.S المقترنة و *Acinetobacter* sp.strain AZS1 بعد 15،12 و18 يوماً وبنسب مختلفة بلغت 78،86 و66% وبمعدل تكوين للعقد بلغت 1.7،2.0 و1.3 عقدة/نبات على التوالي. واثبتت مدة التلقيح 30 دقيقة تفوقها على الفترات الأخرى المستخدمة، وكذلك نجاح معاملة بذور نبات البرسيم بالانواع البكتيرية المذكورة سابقا ولمدة 20 دقيقة بناءً على تكوين العقد الجذرية على المجموع الجذري للبادرات الناتجة من معاملة البذور بعد 25،23 و29 يوماً وبنسب بلغت 84، 76 و64% على التوالي، فضلاً عن ما تميزت بها الدراسة وهو نجاح البكتريتين المقترنتين في احداث تشوهات على المجموع الخضري للبادرات الناتجة من البذور المعاملة وكانت التشوهات شبيهة بالعقد على طول الساق وبعضها قرب الأوراق.

ونجحت الدراســـة أيضـــا في نقل البلازميد الحامل للجينات المســـؤولة عن انتاج مركب Cyclic depsipeptide،FR90035 من البكتريتين المعزولتين الى *Acinetobacter* sp.strain AZS اثناء عملية الاقتران وذلك بناءً على الكشف عن وجود هذا المركب في عينات مستخلصات المجموع الخضري لنبات البرسيم الملقح مجموعها الجذري وبذورها بالبكتريتين المقترنتين كل منها على حدى باستخدام تقانة كروماتوكرافيا السائل العالي الأداء واعطاء قيم مميزة للمركب تفوق تلك المتواجدة في النبات البري.

Abstract

The current study aimed to investigate the bacterial content in leaf nodules and red fruits of the plant, *Ardisia crenata*. The results showed the growth of two bacterial species after incubation at 28°C for 24 hours on nutrient agar. Their colonies appeared circular, slightly convex shaped light yellow in color. Both isolates were Gram positive and reacted positive to catalase and oxidase tests. The bacteria isolated from leaf nodules showed sensitivity to all antibiotics used in this study, while bacteria isolated from seeds showed resistance to cefotaxime and ceftriaxone at a concentration of 10 micrograms/ disk, and sensitive to the rest of the antibiotics.

The isolates were identified through genetic sequence analysis of the 16S rRNA gene, and the results showed that the two isolates belonged to the genus *Bacillus*. The isolates were then submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) as new strains under the strain names *Bacillus* sp. strain JA Leaves and was given the accession number PP213275.1 while the other was named *Bacillus* sp. strain JA seed and given the accession number PP215359.1, respectively.

The results also indicated the efficiency of conjugation technology in genetic transformation of *Acinetobacter* sp. strain AZS1 and the transmission of antibiotic resistance and atmospheric nitrogen fixation from the two isolated bacteria and from *Acinetobacter* sp. strain AZS1 to the associated bacteria *Acinetobacter* and the latter grew on nitrogen-free medium (NF) containing the antibiotic gentamicin at a concentration of 10 µg/ml.

The study confirmed the presence of the *nif* H gene in the plasmids of the bacterial species understudy as confirmed by electrophoresis readings of the PCR reaction products of plasmid DNA extracted from them using a primer specialized for the *nif* H gene.

The study also succeeded in forming root nodules on *Trifolium* spp. seedlings roots after treatment with the bacterial species: conjugated *Acinetobacter baumannii* strain JA Conj.L, conjugated *Acinetobacter baumannii* strain JA Conj.S and *Acinetobacter* sp.strain AZS1 after 12, 15 and 18 days with different percentages reaching 86, 78 and 66% and with a rate nodules formation which reached 2.0, 1.7 and 1.3 nodules /plant, respectively. The inoculation period of 30 minutes proved superior to other periods used, as well as the success of treating *Trifolium* spp. seeds with the previously mentioned bacterial species for a period of 20 minutes through the formed of root nodules on seedlings roots resulting from seed treatment after 23, 25 and 29 days, with rates reaching 84,76 and 64%, respectively, in addition to the success of the two conjugated bacteria in causing deformities on the shoots of seedlings resulting from the treated seeds, the deformities were similar to nodules along the stem and some near the leaves.

The study also succeeded in transferring a plasmid carrying the genes responsible for producing the cyclic depsipeptide compound, FR90035, from the two isolated bacteria to *Acinetobacter* sp. strain AZS during the conjugation process, based on the detection of the presence of this compound in samples of extracts from the shoot system of clover plants inoculated with the root system and seeds with the two conjugated bacteria separately, by using high-performance liquid chromatography technology giving distinctive values for the compound that exceed those found in the wild plant.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Mosul
College of Science
Dept. of Biology

Isolation and molecular study of symbiotic bacteria in *Ardisia crenata* leaves, seeds and their role in the biosynthesis of Cyclic depsipeptide

Jihan Khalil Khuder Ahmad AL Jarjary

M.Sc. Thesis

Biology /Botany

Supervised By

Professor Dr. Amjad Abdul-Hadi Mohammed Ali

1445 A.H. **2024 A.D.**