الخلاصة

تمكنت الدراسة الحالية من عزل البكتريا المكونة للعقد الجذرية في نباتات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. المزروعة في الحديقة المنزلية في حي النجار/ الموصل، وتشخيصها مظهريا وجزيئياً.

وأظهرت النتائج نمواً جيداً لمستعمرات البكتريا المعزولة على وسط Yeast Extract Medium الصلب بعد 48 ساعة واتصفت بلونها الابيض ثم تحولت إلى اللون الأصفر بعد استمرار تحضينها لمدة 72 ساعة، وأبدت الشكل الدائري المحدب قليلاً. وكانت البكتريا موجبة لكل من صبغة كرام واختبارات الكتاليز والأوكسديز. فضلا عن مقاومتها للمضادات الحيوية 30 مايكروغرام مل$^{-1}$ Amoxillin، 30 مايكروغرام مل$^{-1}$ Aztreonam و5 مايكروغرام مل$^{-1}$ Cefixime.

وحققت الدراسة عزل الحامض النووي الكروموسومي Deoxyribonucleic acid (DNA) من البكتريا المعزولة وبلغ تركيزه 244 نانوغرام مايكروليتر $^{-1}$ ونقاوته 1.7. وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للحامض المعزول والمضخم بالتفاعل التسلسلي البوليميرازي Polymerase chain reaction (PCR) باستخدام بادئ متخصص لجين 16s rRNA على هلام الاكاروز وجود حزمة واحدة حجمها 585 زوج قاعدة وهو نفس حجم البادئ المتخصص المستخدم. وأعطت بيانات تحليل القواعد النيتروجينية للحزمة المعزولة من قطعة الهلامة باستخدام تقانة (DNA sequencing) ومقارنة النتائج ببرنامج BLAST وجود تطابق نسبته 99% مع السلالات البكتيرية التابعة للجنس *Microbacterium* الموجودة في بنك الجينات التابعة للمركز الوطني لمعلومات التكنلوجيا الحيوية National Centre for Biotechnology Information (NCBI)، وبذلك سجلت العزلة المحلية لهذه الدراسة لأول مرة كسلالة جديدة في بنك الجينات باسم *Microbacterium* sp. AJ-Z وأعطيت الرمز LC623951.1.

وأوضحت النتائج كفاءة تقانة الاقتران في احداث التحول الوراثي لبكتريا *Escherichia.coli* (DH5-Alpha) و *Agrobcterium. tumefaciens* بنجاح الانتقال الأفقي لبلازميدات *Microbacterium* sp. AJ-Z إليهم بدلالة نمو *E.coli* المقترنة على وسط Nutrient Agar الصلب الحاوي على المضادين الحيويين 30 مايكروغرام مل$^{-1}$ Amoxillin و50 مايكروغرام مل$^{-1}$ Kanamycin ونمو *A.tumefaciens* المقترنة على وسط NA الصلب الحاوي على المضادين الحيويين 30 مايكروغرام مل$^{-1}$ Amoxillin و 20 مايكروغرام مل$^{-1}$ Gentamicin، وهي المضادات الحيوية التي تقاومها كل من الخلية الواهبة والمستلمة على التوالي.

وقد نجحت الدراسة في تكوين العقد الجذرية على المجموع الجذري لبادرات نبات الحلبة بعد معاملتها بالأنواع البكتيرية *Microbacterium* sp. AJ-Z، *E.coli* المقترنة و *A.tumefaciens* المقترنة بعد 12، 14 و15 يوماً بنسبة 70%، 52.5% و 42.5% وبمعدل تكوين للعقد بلغت 2.9، 2.8 و2.4 على التوالي. واثبتت مدة التلقيح 30 دقيقة تفوقها على باقي المدد الاخرى المستخدمة فضلا عن كفاءة وسط Nitrogen Free الصلب في تشجيعهما تكوين النسبة الأعلى من العقد الجذرية ونجاح العلاقة التكافلية بعد وضع البادرات الملقحة عليه.

ومن النتائج البارزة المتحققة في هذه الدراسة تكوين العقد الجذرية على المجموع الجذري لنبات البرسيم *Trifolium* spp. بعد تلقيحها ببكتريا *E.coli* و *A.tumefaciens* المقترنتين لمدة 30 دقيقة بعد 20 و23 يوم والتي بلغت نسبة البادرات المستجيبة فيها 60% و45% وبمعدل تكوين للعقد بلغت 1.8 و 1.7 على التوالي وفشل بكتريا *Microbacterium* sp. AJ-Z في تحفيزها. وبذلك فإن هذه المقترنات تمنح افاقاً مميزة لإمكانية تطور العلاقة التكافلية مع أنواع نباتية مختلفة ضمن العائلة البقولية.

وأثبتت قراءات الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR للحامض DNA البلازميدي المضخم والمعزول من الأنواع البكتيرية قيد الدراسة في 1% من هلام الأكاروز باستخدام بادئ متخصص بجين *nif* H (أحد مكونات انزيم النيتروجينيز المسؤول عن عملية تثبيت النيتروجين الجوي N_2 إلى أمونيا NH_3) ظهور حزمة واحدة لكل نوع من البلازميدات تماثل في حجمها 370 زوج قاعدة حجم البادئ المتخصص المستخدم. هذا النتائج تبرهن وجود انزيم النيتروجينيز، وهذا يؤكد وبالدليل القاطع قدرة الأنواع البكتيرية المدروسة على تثبيت النيتروجين الجوي في العقد الجذرية المكونة لها في نباتي الحلبة والبرسيم والذي انعكس على زيادة تراكيز البروتين في بادراتها.

Abstract

The present study was capable to isolate root nodules forming bacteria in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) plants which were cultured in home garden in Hay Al- Najar/ Mosul and it's diagnosed morphologicly and at the molecular level.

The results showed a good growth of colonies of isolated bacteria on the solid Yeast Extract medium after 48 hours and they were characterized by it's white colour then turn to yellow after continuous incubation for 72 hours and tack the form of a circle slightly curved. The bacteria were positive for Gram stain, Catalase and Oxidase tests as well as its resistance to antibiotics 30 $\mu g\ ml^{-1}$ Amoxillin, 30 $\mu g\ ml^{-1}$ Aztreonam and 5 $\mu g\ ml^{-1}$ Cefixime .

The study achieved the isolation of the Deoxyribonucleic acid (DNA) from the isolated bacteria with concentration reached 244 ng. μl^{-1} and purity 1.7. amplified through the polymerase chain reaction (PCR) using a specific primer for 16s rRNA gene on gel agarose showed existence of one band which size was 585 base pair which is the same molecular weight for the used specific primer. The data analysis of the nitrogenous bases sequences of band isolated from a gel piece used DNA sequencing technology and comparing the results with BLAST program gave a maching percentage (99%) with the bacterial strains of *Microbacterium* existed in the gene bank of the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) , and thus the local strain of this study for the first time was recorded as new strain in the gene bank in the name *Microbacterium* sp. AJ-Z with symbol LC623951.1.

The results proved the efficiency of the conjugation technique of the genes in succeed of the genetic transformation for the bacteria *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* by transfered plasmids of *Microbacterium* sp. AJ-Z to them which indicated by the growth of conjugated *E.coli* on the solid Nutrient Agar medium containing the antibiotics 30 $\mu g\ ml^{-1}$ Amoxillin, 50 $\mu g\ ml^{-1}$ Kanamycin and the growth of conjugated A.tumefaciens on NA medium

containing 30 μg ml^{-1} Amoxillin, 20 μg ml^{-1} Gentamicin which are the antibiotics that both the donor and recipient cells are resistant to, respectively.

The study succeed in formin the root nodules on the fenugreek seedlings roots after inoculated them by *Microbacterium* sp. AJ-Z , conjugated *E.coli* and conjugated *A.tumefaciens* after 12, 14 and 15 days in percentage 70%, 52.5% and 42.5% with a rate nodules formation which reached 2.9, 2.8 and 2.4 respectively. The inoculation period of 30 minute proved to be superior to the other periods used, as well as the efficiency of the solid Nitrogen Free medium, in encouraging the formation of the highest percentage of the root nodules and the success of symbiotic relationship.

One of the prominent results achieved in this study is the forming of the root nodules on the root of *Trifolium* spp. plant after inoculated by both conjugated *E.coli* and *A.tumefaciens* for 30 minute, after 20 and 23 days with a percentage of 60% and 45% and a rate nodules formation which reached 1.8 and 1.7 respectively , while *Microbacterium* sp.AJ-Z failed to stimulate them. Thus these conjugated bacteria offer distinctive horizons for the possibility of the development of the symbiotic relationship with different types of plants within legume family.

Electrophoresis readings of the PCR products of plasmid DNA in 1% of the agarose gel isolated from the bacteria types under consideration by using a specific primer for *nif* H gene (one of the component of the *nitrogenase* enzyme responsible atmospheric nitrogen fixation N_2 to ammonia NH_3) proved the appearance of one band for each kind of plasmids whose size 370 base pair is similar to the size of the specific primer used. These results prove the existence of the *nitrogenase* enzyme. Thus, all kinds of studied bacteria have the ability to fix atmospheric nitrogen in the root nodules that forming them in *Trigonella foenum-graecum* L. and *Trifolium* spp. which reflected on the increase of the protein concentration in their seedling.

University of Mosul

College of Science

Molecular study of *Microbacterium* sp. bacteria isolated from the root nodules of fenugreek plant and transfer their plasmids to *E. coli* and *A. tumefaciens* and investigation of their efficiency to form the symbiotic relationship with clover

Zaid Tahseen Ali Qaddawi

M.Sc. Thesis

Biology /Botany

Supervised By

Professor Dr. Amjad Abdul-Hadi Mohammed

1443 A.H. **2021 A.D.**