

تحليل الجينوم الكامل *in silico* لسلالة من البكتيريا الجذرية بحثاً عن خصائصها المعززة لنمو النبات.

in silico Whole Genome Analysis of Rhizobacterial Strain for Plant Growth-Promoting Traits

ضيف القندوز¹، مكات عتيقة²، زيتوني عبد الغني³

¹ قسم العلوم الطبيعية، المدرسة العليا للأساتذة -الأغواط - (الجزائر)، g.dif@ens-lagh.dz

² المدرسة العليا للأساتذة - القبة (الجزائر)، atika.meklat@g.ens-kouba.dz، مخبر بيولوجيا الأنظمة الميكروبية

³ المدرسة العليا للأساتذة-القبة (الجزائر)، zitouni_abdelghani@yahoo.fr

تاريخ النشر: ديسمبر/2024

تاريخ القبول: 2024/11/27

تاريخ الإرسال: 2024/10/14

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى إجراء تحليل جينومي شامل لسلالة بكتيرية جذرية للكشف عن الجينات التي تسهم في تعزيز نمو النبات وتفعيل المكافحة البيولوجية ضد مسببات الأمراض التي تمثل تهديداً كبيراً للأمن الغذائي العالمي. تم في هذه الدراسة استخدام سلالة البكتيريا (S1) التي عُولت من جذور نبات الطماطم. أثبتت التحليلات التصنيفية الجزيئية باستخدام منصة TYGS التقارب الوراثي لهذه السلالة مع نوع *Pseudomonas putida*. تم لاحقاً تحليل جينوم السلالة S1 عبر عدة أدوات بيو-معلوماتية، حيث استخدم خادم RAST لدراسة الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG)، وبرنامج Prokka لتحديد الجينات المسؤولة عن آليات تعزيز النمو والمكافحة البيولوجية، كما تم استخدام أداة antiSMASH لاستكشاف المجموعات الجينية المسؤولة عن نواتج الأيض الثانوية. كشفت نتائج التحليل الجيني للسلالة S1 عن وجود جينات بتكرار ملحوظ مرتبطة بالاستجابة للإجهاد، واستقلاب الفوسفور، واكتساب الحديد، كما أظهرت الدراسة وجود جينات مسؤولة عن الحركة وتحديد الاتجاه الكيميائي (Motility and chemotaxis). بالإضافة إلى ذلك، تم اكتشاف جينات تُشفر لتثبيت الأزوت بواسطة إنزيم النيتروجيناز، وجينات أخرى تسهم في إذابة الفوسفور غير العضوي. وُجدت أيضاً جينات لتركيبة لواقط الحديد (Siderophore) والمركبات العضوية الطيارة (VOCs) التي تحفز تكوين الجذور وزيادة مقاومة النبات للأمراض وتحمل الجفاف. ومن خلال التحليل الجيني، تم تحديد جينات مهمة لتحمل الإجهادات، مثل bet A و bet B الضرورية لتخليق مركب glycine-betaine، بالإضافة إلى جينات تُشفر لإنتاج إنزيمات مضادة للأكسدة مثل SOD (Superoxide dismutase)، البيروكسيداز (POXs)، والكاتلاز (CAT). كما تم

الكشف عن عدة مجموعات جينية مسؤولة عن إنتاج مركبات أيضية ثانوية تلعب دوراً مهماً في المقاومة البيولوجية كمضادات حيوية ضد الممرضات، وأهمها NRPS و Bacteriocin. تؤكد هذه النتائج على الإمكانيات الواعدة للسلسلة S1 كمرشح لتعزيز نمو النبات بطرق بيولوجية.

الكلمات المفتاحية: التحليل الجينومي، تعزيز نمو النبات، المقاومة البيولوجية، *Pseudomonas*

Abstract

This study aims to conduct a comprehensive genomic analysis of a rhizobacterium to identify genes associated with plant growth promotion and biological control of pathogens, which are major contributors to global food security challenges. In this study, a bacterial strain, designated S1 and isolated from the roots of tomato plants, was analyzed. Molecular taxonomic evaluation through the TYGS platform established the genetic proximity of strain S1 to *Pseudomonas putida*. The subsequent genomic analysis of S1 was performed through multi-level bioinformatics approaches. Initially, gene functions were categorized using RAST-Server to study clusters of orthologous groups (COG), followed by detailed gene annotation via Prokka to identify genes involved in plant growth and pathogen resistance. The antiSMASH tool was further employed to identify gene clusters related to secondary metabolite biosynthesis. The genomic data revealed a relatively high frequency of genes involved in stress response, phosphorus metabolism, and iron acquisition, along with genes controlling motility and chemotaxis. Nitrogen fixation genes encoding nitrogenase were also present, alongside genes associated with inorganic phosphorus solubilization. Additionally, siderophore-related genes and genes encoding for volatile organic compounds (VOCs) were identified, which play crucial roles in root development, enhanced disease resistance, and improved drought tolerance. Stress tolerance genes, such as bet A and bet B, essential for synthesizing glycine-betaine, and antioxidant enzyme genes like superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX), and catalase (CAT), were also detected, highlighting their importance in mitigating plant oxidative stress. Furthermore, gene clusters responsible for secondary metabolite production, including non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) and bacteriocins, were identified, underscoring their potential antimicrobial properties against plant pathogens. These findings collectively emphasize the promising role of strain S1 in promoting plant growth and resilience against environmental stressors and pathogens.

Keywords: Genomic analysis, Plant growth promotion, Biological resistance, *Pseudomonas*

1. المدخل Introduction :

مع تزايد الطلب العالمي على الغذاء بسبب ارتفاع عدد السكان، تبرز الحاجة إلى اعتماد تقنيات زراعية جديدة صديقة للبيئة. ورغم أن الأسمدة الكيميائية تسهم في زيادة الإنتاج الزراعي، فإنها تؤدي تدريجياً إلى تدهور خصوبة التربة لذلك، يُعتبر استخدام الأسمدة الحيوية بديلاً بيئياً واعداً، حيث تتألف هذه الأسمدة من سلالات بكتيرية مفيدة تُعرف بالبكتيريا المعززة لنمو النبات (PGPR) تمثل هذه الكائنات الدقيقة مجالاً بحثياً واسعاً، حيث تدرس منذ أكثر من 30 عاماً لفهم آلياتها في دعم النمو النباتي (Goswami et al., 2016).

تستطيع البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات تحسين نمو النباتات عبر آليات متعددة، مثل إذابة الفوسفات، وإنتاج لواقط الحديد، وتثبيت النيتروجين البيولوجي، إلى جانب إنتاج 1-أمينوسكلوبروبان-1-كاربوكسيلات (ACC) ديميناز، والهرمونات النباتية، والنشاط المضاد للفطريات، والمركبات العضوية المتطايرة (VOCs)، وتحفيز المقاومة الجهازية، وتعزيز التعايش الميكروبي المفيد. ومع التقدم المستمر في فهم تنوع هذه البكتيريا وآليات عملها، أصبحت PGPR توفر وسيلة فعالة لتحسين الزراعة وإدارة الأنظمة الزراعية المستدامة (Basu et al., 2021).

يستخدم الباحثون العديد من البكتيريا الجذرية التكافلية مثل *Rhizobium* ، *Bradyrhizobium* و *Mesorhizobium* وغير التكافلية مثل *Azospirillum* ، *Azotobacter* ، *Klebsiella* ، *Bacillus* ، *Pseudomonas* و *Azomonas* كملقحات حيوية في الدراسات الحقلية لتحفيز نمو المحاصيل وحمايتها من الأمراض النباتية.

تؤثر العوامل الحيوية وغير الحيوية تأثيراً كبيراً على إنتاجية المحاصيل عالمياً، وتشهد الأبحاث اهتماماً متزايداً باستخدام البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات PGPR لتحسين تحمل النباتات لهذه الضغوط وتعزيز الإنتاج المستدام. تلعب PGPR دوراً مباشراً في دعم صحة النباتات عبر تثبيت النيتروجين، وإذابة الفوسفات، وإنتاج الهرمونات النباتية، وكذلك بشكل غير مباشر عبر إنتاج حاملات الحديد، والمضادات الحيوية، ونشاط ACC ديميناز، وتفعيل المقاومة الجهازية المستحثة. كما تسهم هذه الميكروبات في تعزيز مقاومة النباتات للإجهاد بفضل نشاط مضادات الأكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية . (Kumar et al., 2020)

تستهدف هذه الدراسة إجراء تحليل جينومي لبكتيريا جذرية، بهدف تحديد الجينات المرتبطة بخصائص PGPR وتحمل الاجهادات الحيوية واللاحيوية، باستخدام أدوات برمجية حاسوبية موثوقة ومعتمدة أكاديمياً لتحليل الجينوم.

2. المواد والطرائق Materials and methods

1.2. الأدوات المستخدمة

الموقع الإلكتروني (NCBI (National Center for Biotechnology Information) :

هو موقع تابع للمعهد الوطني الأمريكي للمعلومات البيولوجية الجزيئية، ويُمكّن الوصول إليه عبر الرابط التالي : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> ، يعد الموقع قاعدة بيانات مركزية تتيح للباحثين في مجال البيولوجيا الجزيئية الوصول إلى معلومات جينية شاملة ، حيث يتم تخزين المعلومات الجينومية من جميع أنحاء العالم، مما يسهل على الباحثين تحليل البيانات الجينية ومشاركتها.

منصة TYGS:

هي منصة Type Strain Genome Server (<http://tygs.dsmz.de>)، وتعتبر أداة تصنيفية متقدمة تُستخدم للتعرف على بدائيات النوى وتصنيفها بناءً على تتابعات الجين المشفر لـ 16S rRNA أو تسلسل الجينوم الكامل (Meier-Kolthoff and Göker, 2019). تعتمد المنصة على أداة البحث BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)، التي تتيح إجراء بحث ومقارنة بين التسلسلات النيوكليوتيدية لتحديد مدى التشابه بين الأنواع المختلفة.

الخادم المعلوماتي RAST-Server :

هو خادم ويب (<https://rast.nmpdr.org>) متخصص في تحليل الجينومات البكتيرية، حيث يقدم خدمة مؤتمتة بالكامل لتحديد الجينات وتصنيفها ضمن مجموعات وظيفية تُعرف بالنظم الفرعية الوظيفية، أو مجموعات البروتينات المتشابهة وظيفيًا (Clusters of Orthologous Groups of proteins) COG (Aziz et al., 2008).

برنامج Prokka :

هو برنامج دقيق ضمن منصة Galaxy (<https://usegalaxy.eu>) مخصص للتعرف الدقيق على الجينات في الجينوم البكتيريوي. يُستخدم بشكل أساسي في إعداد الجينوم وتحليل تركيبته الجينية (Seemann, 2014).

الخادم المعلوماتي antiSMASH :

هو خادم ويب (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) قائم بذاته، مصمم للتعرف بمجموعات الجينات التي تساهم في إنتاج المركبات الأيضية الثانوية في الجينومات البكتيرية (Weber et al., 2015). يوفر antiSMASH البحث عن مركبات الأيض الثانوية التي قد تكون ذات قيمة بيولوجية وصناعية عالية.

2.2. طريقة العمل

تمّ تنزيل تتابع جينوم السلالة S1 من قاعدة بيانات الموقع NCBI بصيغة FASTA ثم أجريت عليه مجموعة من المعالجات المعلوماتية الحيوية (Dif and Zitouni, 2023) .

1. الدراسة التصنيفية الجزيئية للسلسلة **S1**: تضمنت هذه الخطوة رفع جينوم السلسلة S1 إلى قاعدة بيانات TYGS لإجراء الدراسة التصنيفية الجينية (Molecular Identification) عبر تقنية BLAST، التي تعتمد على تتابع القواعد الأزوتية للجينوم الكامل لتحديد النوع البكتيري الأقرب إلى السلسلة المدروسة.

2. المعالجة باستخدام الخادم **RAST-Server**: تم في هذه المرحلة تصنيف جينات الجينوم وظيفياً ضمن أنظمة فرعية وظيفية COG، مع تحديد تواتر الجينات في كل نظام فرعي وظيفي، مما يتيح فهماً أعمق لوظائف الجينات في الجينوم محل الدراسة.

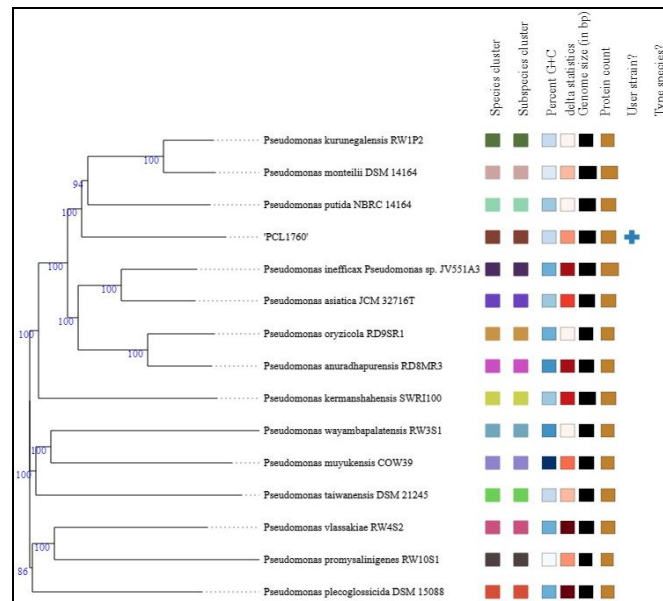
3. المعالجة باستخدام برنامج **Prokka**: تمت معالجة البيانات باستخدام برنامج Prokka، مما سمح بالتعرف العميق على الجينات المكونة للجينوم وتحديد الجينات الرئيسية والواحدة المتعلقة بتعزيز نمو النبات وحمايته من الأمراض.

4. المعالجة باستخدام الأداة **antiSMASH**: تهدف هذه المعالجة إلى تحديد المجموعات الجينية (Clusters) في الجينوم المسؤولة عن نواتج الأيض الثانوي المحتملة، والتي قد تلعب دوراً هاماً في البيولوجيا التطبيقية.

3. النتائج Results

1.3 الدراسة التصنيفية الجزيئية للسلسلة S1

مكنت الدراسة الجينية ودراسة النسالة (Phylogeny) بتحقيق الـ BLAST على قاعدة البيانات TYGS من إثبات تقارب السلسلة S1 للنوع البكتيري *Pseudomonas putida* NBRC 14164، كما هو موضح في شجرة التصنيف الوراثي (الشكل 1).



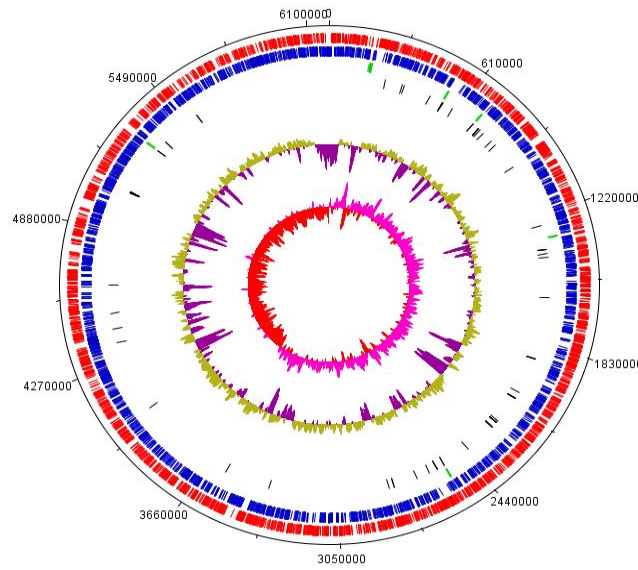
الشكل 1. شجرة التقارب الوراثي على أساس تحليل تتابع الجينوم الكامل للسلسلة S1 على المنصة المعلوماتية TYGS

2.3. الملامح العامة للجينوم S1

جينوم السلسلة S1 يتألف من 6,002,785 زوجاً من القواعد الأزوتية، مع متوسط محتوى G+C يصل إلى 61.8%. يحتوي الجينوم على 5,325 تسلسلاً مشفراً (CDS)، بالإضافة إلى تحديد 23 جيناً يشفر للأحماض النووية الريبية الريبوزومية (rRNA) و 79 جيناً يشفر للأحماض النووية الريبية الناقلة (tRNA)، التي تغطي 37 نوعاً من الأحماض الأمينية. يُظهر الجينوم محل الدراسة معدل فراغات قدره 0.0% وحد أقصى لعدد N50، مما يشير إلى جودة عالية للتتابع النيكلوتيدي لهذا الجينوم. كما لم يُعثر على بلازميدات ضمن محتويات هذه السلسلة (جدول 1) (شكل 2).

الجدول (1). الملامح العامة لجينوم السلسلة S1.

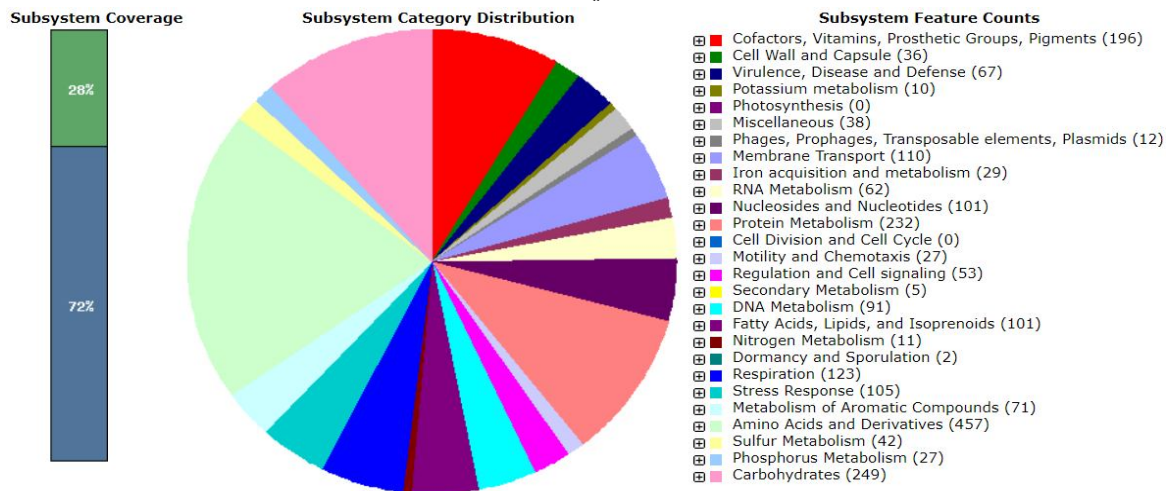
الخاصية	جينوم السلسلة S1
الحجم	6,002,785 زوج قاعدة أزوتية
معدل GC	61.8%
عدد التنبعات المشفرة	5,325
عدد جينات tRNA	79
عدد جينات rRNA	23
نسبة الفجوات (Gap Ratio)	0.0%
N50	6,002,785



الشكل 2. تمثيل دائري لجينوم S1. من الدائرة الخارجية إلى الدائرة الداخلية، توجد دائرة 1: CDS على الشريط الأمامي (أحمر)؛ الدائرة 2: CDS على الشريط العكسي (أزرق)؛ الدائرة 3: الحمض النووي الريبوزومي (أخضر)؛ الدائرة 4: الحمض النووي الريبوزومي الناقل (أسود)؛ الدائرة 5: محتوى GC (نيلي / بنفسجي)؛ الدائرة 6: توزيع GC (برتقالي / وردي). تم استخدام برنامج DNAPlotter لتحقيق هذه الخريطة.

3.3 الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG)

يوضح الشكل (3) توزيع الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG) في جينوم السلالة S1. ومن خلال عملية التحليل الجيني (Annotation) باستخدام خادم RAST، تم تحديد 27 فئة وظيفية أو أنظمة فرعية وظيفية. يظهر في الشكل (3) أن هناك تواتراً جينياً ملحوظاً بالنسبة للجينات المرتبطة بميتابوليزم الآزوت (Nitrogen metabolism)، وكذلك للجينات المتعلقة بالاستجابة للإجهاد (Stress Response) وميتابوليزم الفوسفور (Phosphorus metabolism). كما تشير النتائج إلى وجود جينات مسؤولة عن الحركة والكيمائية (Motility and chemotaxis)، مما يوحي بقدرة السلالة على الحركة.



الشكل (03). تمثيل الجينات حسب الفئات الوظيفية (الأنظمة الفرعية) الناتجة عن التحديد الجيني على الخادم RAST لجينوم S1.

4.3. الجينات المرتبطة بتعزيز نمو النباتات وتحمل الإجهاد في جينوم S1

أتاح التحليل الجيني لجينوم السلالة S1 باستخدام برنامج Prokka الكشف عن مجموعة من الجينات المرتبطة بآليات تعزيز نمو النبات وتحمل الإجهاد. نورد فيما يلي أبرز هذه الجينات:

1.4.3 الجينات المشاركة في تحمل الإجهاد

أظهر التحليل الجينومي لجينوم السلالة S1 باستخدام برنامج Prokka وجود عدد كبير من الجينات الهامة التي تشفر لإنزيمات وبروتينات تسهم بشكل كبير في تعزيز قدرة النباتات على تحمل الإجهادات الحيوية واللاحوية. من أبرز هذه الجينات:

- **إنزيم حمض 1-أمينوسيكلوبروبان-1-كربوكسيليك (ACC) ديأميناز** : يلعب هذا الإنزيم دوراً أساسياً في تقليل تراكم هرمون الإيثيلين، الذي يرتفع تركيزه في النباتات عند تعرضها للإجهاد. تقوم بعض الكائنات الحية الدقيقة في التربة بإنتاج إنزيم ACC deaminase الذي يحلل طليعة الإيثيلين (ACC)، مما يؤدي إلى تخفيف حدة الإجهاد لدى النباتات. إن وجود الجين المشفر لإنزيم ACC deaminase في جينوم السلالة S1 يشير إلى إمكانياتها الواعدة في دعم تحمل النباتات للإجهادات.

- **الجينات المرتبطة بتحمل الملوحة** : كشف تحليل الجينوم عن عدة جينات رئيسية تعزز تحمل الملوحة لدى النباتات، ومنها:

- o betA و betB لتصنيع مركب Glycine-betaine.
- o Glycine betaine transporter.
- o Proline/betaine transporter.
- o Trehalase.
- o Osmoregulated proline transporter OpuE.
- o Proline iminopeptidase.
- o Proline-specific permease.

- **الجينات المضادة لمركبات الأكسجين التفاعلية (ROS)** : تنشأ مركبات الأكسجين التفاعلية نتيجة الإجهادات الحيوية واللاحوية، وتعتبر ضارة لخلايا النبات بسبب نشاطها الكيميائي الناتج عن الإلكترونات الحرة. وقد تم الكشف عن عدة جينات في السلالة S1 تشفر لإنزيمات تساعد في التخلص من هذه المركبات الضارة، وأهمها:

- o Catalase
- o Catalase-related peroxidase
- o Catalase-peroxidase
- o Superoxide dismutase [Fe]
- o Superoxide dismutase [Mn/Fe]
- o Peroxide stress resistance protein YaaA
- o Alkyl hydroperoxide reductase AhpD

إن وجود هذه الجينات في السلالة S1 يؤكد دورها الفعال في حماية النباتات من تأثيرات الإجهاد المختلفة وتعزيز قدرتها على التكيف.

2.4.3 الجينات المسؤولة عن إذابة الفوسفات غير العضوي

أظهر التحليل الجينومي لجينوم السلالة S1 وجود عدد من الجينات التي تشفر لإنزيمات متخصصة في إذابة الفوسفات اللاعضوي ، مما يساهم في تزويد النبات بالعناصر الغذائية اللازمة. من بين هذه الإنزيمات:

- **Protein phosphatase Chez**: يعد هذا الإنزيم مهماً في مسار الانجذاب الكيميائي البكتيري، حيث يعمل على تسريع عملية نزع الفسفرة من البروتين (CheY-P) ، وهو خطوة أساسية في تحكم الخلية بحركتها تجاه العناصر الغذائية.
- **Exopolyphosphatase**: يلعب هذا الإنزيم دوراً رئيسياً في تحليل متعدد الفوسفات اللاعضوي (polyP)، مما يتيح للنبات الاستفادة من الفوسفات الذي يصعب عليه امتصاصه مباشرة.

يساهم وجود هذه الجينات في جينوم السلالة S1 في تحسين توافر الفوسفات اللاعضوي للنباتات، مما يعزز نموها ويزيد من قدرتها على تحمل ظروف التربة الفقيرة بالعناصر الغذائية.

3.4.3 الجينات المشاركة في إنتاج الهرمونات النباتية:

أظهر التحليل الجيني لجينوم السلالة S1 وجود عدة جينات مرتبطة بإنتاج هرمون الأوكسين النباتي (IAA - Indole-3-acetic acid)، والتي تساهم في تعزيز نمو النبات وتطوره. تشمل هذه الجينات:

- **Tryptophan synthase alpha chain and beta chain**: تشارك هذه البروتينات في مسار تخليق التربتوفان، الذي يعتبر طليعة لإنتاج IAA.
- **Indole-3-glycerol phosphate synthase**: يساهم هذا الإنزيم في تكوين مركب الإندول، وهو مكون أساسي في مسار تخليق IAA.
- **Aldehyde dehydrogenase**: يلعب دوراً في عملية الأكسدة اللازمة لتحويل المركبات الوسيطة إلى IAA.

بالإضافة إلى ذلك، يتضمن جينوم السلالة S1 جينات قد تساهم في إنتاج هرمونات نباتية أخرى مثل:

- **Isochorismate pyruvate lyase**: يساهم هذا الإنزيم في إنتاج حمض الساليسيليك (Salicylic acid)، الذي يلعب دوراً هاماً في نمو النبات، التمثيل الضوئي، امتصاص الأيونات، وأيضاً في إرسال الإشارات الدفاعية للنبات ضد الأمراض.

- **Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase**: إنزيم

يحفز إنتاج السيبتوكينين، وهو هرمون يعزز نشاط النسيج الإنشائي ويدعم النمو الخلوي في النبات.

تدل هذه الجينات في مجملها على إمكانات السلالة S1 في تحسين صحة النبات وتعزيز مقاومته للإجهادات البيئية.

4.4.3 الجينات المتدخلة في اقتناء الحديد:

يعتبر الحديد من العناصر الغذائية الأساسية للنبات، حيث يلعب دوراً مهماً كعامل مساعد ومستقبل للإلكترونات في العديد من البروتينات والإنزيمات الحيوية. ومع أن الحديد متوفر بكثرة في التربة، إلا أنه غالباً ما يكون في شكل غير متاح بيولوجياً للنبات. وقد كشف التحليل الجيني لجينوم السلالة S1 عن مجموعة من الجينات المرتبطة بآليات التقاط الحديد وتوفير احتياجات النبات منه، ومن بين هذه الجينات:

- **Ferrous-iron efflux pump FieF**: يعمل على تنظيم مستويات الحديد داخل الخلية.
 - **Iron-utilization periplasmic protein**: يساهم في تيسير الحديد داخل الحيز المحيط بالغشاء.
 - **Periplasmic iron-binding protein**: يساعد في ربط وتخزين الحديد.
 - **Ferripyoverdine receptor**: يلعب دوراً في نقل مركبات الحديد عبر الغشاء الخلوي.
 - **Bacterioferritin**: يشارك في تخزين الحديد داخل الخلية.
 - **Ferri-bacillibactin** و **Ferric-pseudobactin**: من مستقبلات الحديد المتخصصة.
 - **Ferrochelataase**: يساهم في تخليق الهيم.
 - **Ferredoxin**: يعمل كناقل للإلكترونات في عملية التمثيل الضوئي وغيرها من العمليات الأيضية.
- تشير وفرة هذه الجينات في جينوم السلالة S1 إلى إمكاناتها القوية في التقاط وتوفير الحديد للنبات المضيف، مما يعزز من نمو النبات ويسهم في صحة النظام البيئي المحيط.

5.4.3 الجينات المتدخلة في المراقبة البيولوجية

تنتج البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات مركبات كيميائية متعددة الفوائد، ومنها تلك التي تسهم في مقاومة مسببات الأمراض النباتية. وقد تم تحديد عدة جينات في جينوم السلالة S1 ترتبط بإنتاج مركبات هامة في مجال مكافحة البيولوجية، من أبرزها:

- **Hydrogen cyanide synthase**: يساهم في إنتاج سيانيد الهيدروجين، وهو مركب طبيعي مضاد للفطريات يمكن أن يمنع نمو مسببات الأمراض في البيئة المحيطة بالنبات.
- **Chitinase**: يعمل على تحلل الكيتين، أحد مكونات جدران الخلايا الفطرية، مما يساعد في مكافحة الفطريات الممرضة.
- **Protease**: إنزيم يساهم في تحلل البروتينات، مما يعزز من دفاعات النبات ضد مسببات الأمراض عن طريق تحليل بروتيناتها الأساسية.

تدل هذه الجينات على قدرة السلالة S1 على توفير الحماية للنبات المضيف ضد الأمراض، مما يجعلها مرشحاً ممتازاً للاستخدام في برامج مكافحة البيولوجية الزراعية.

5.3. المجموعات الجينية المسؤولة عن الأيض الثانوي في جينوم S1

كشفت الأداة المعلوماتية **antiSMASH** وجود عدة مجموعات جينية (Clusters) في جينوم السلالة S1 ، كما هو موضح في الشكل (4). تشير هذه المجموعات الجينية إلى إمكانية إنتاج مركبات أيضية ثانوية مهمة، مما يعزز من قدرة هذه السلالة على المساهمة في التطبيقات البيولوجية، مثل مكافحة البيولوجية وتحسين صحة النباتات.



Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBiG BGC-ID
The following clusters are from record NC_021505.1:					
Cluster 1	Nrps	1400979	1477790	-	-
Cluster 2	Nrps	1743841	1796794	-	-
Cluster 3	Bacteriocin	3458456	3469289	-	-
Cluster 4	Bacteriocin	3877300	3888133	-	-

الشكل (4). الكشف عن المجموعات الجينية التي ترمز للمستقلبات الثانوية داخل جينوم S1 بواسطة أداة antiSMASH. يظهر الشكل (4) وجود مجموعات جينية ضمن جينوم السلالة S1 قد تسهم في إنتاج مركبات أيضية ثانوية هامة، مثل:

- **الببتيدات الماربيوزومية (NRPs)** وهي مجموعة متنوعة للغاية من المنتجات الطبيعية التي تمتلك أنشطة بيولوجية متعددة، من أبرزها الفاعلية المضادة لمسببات الأمراض النباتية، مما يعزز من دورها كمركبات داعمة للصحة النباتية.
 - **البكتيريوسينات (Bacteriocins)** تعد هذه المركبات من عائلة الببتيدات التي تنتجها بعض الأنواع البكتيرية بشكل طبيعي. تتكون البكتيريوسينات عموماً من مركبات ببتيدية تحتوي على 20 إلى 60 حمضاً أمينياً، وتتميز بقدرتها على القضاء على بعض الكائنات الدقيقة الممرضة.
- يشير وجود هذه المجموعات الجينية إلى إمكانيات السلالة S1 في إنتاج مركبات مهمة في مكافحة البيولوجية، مما يعزز استخدامها كعوامل مساعدة في الحماية النباتية.

4. مناقشة النتائج: Discussion

يعتبر الأمن الغذائي والزراعي من الجوانب الحيوية التي تضمن تلبية احتياجات السكان الغذائية عالمياً. يشير الأمن الغذائي إلى توفر كميات كافية ومستدامة من الغذاء للجميع، بينما يرتبط الأمن الزراعي بتحقيق إنتاج زراعي فعال ومستدام. إن تحقيق هذين الهدفين أمر أساسي لمواجهة التحديات الناتجة عن الزيادة السكانية المستمرة، والتغيرات المناخية، وتدهور البيئة.

تلعب البكتيريا المعززة لنمو النباتات (PGPR) دوراً محورياً في تعزيز الأمن الزراعي من خلال الفوائد العديدة التي تقدمها للنباتات والبيئة الزراعية. وقد تم التعرف على عدة آليات تفسر كيفية تحفيز PGPR

لنمو النبات، منها: (1) إنتاج أو تعديل الهرمونات النباتية مثل حمض الإندول-3-أسيتيك (IAA) ، والجبريلينات، والسيتوكينينات، والإيثيلين، والمركبات المتطايرة؛ (2) مقاومة الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض النباتية عن طريق إنتاج المضادات الحيوية، والإنزيمات التي تحلل مكونات الفطريات (مثل الكيتيناز و1-3 جلوكاناز)، والهيدروجين سيانيد (HCN) ، واللواقط الحديدية؛ (3) تثبيت النيتروجين الجوي؛ (4) إذابة الفوسفات المعدني والمغذيات الأخرى؛ (5) تخفيف الضغوط الحيوية واللاحيوية (Dif et al., 2021).

يتواجد إنزيم ACC deaminase في العديد من البكتيريا المعززة لنمو النبات، وخاصة المنتمية إلى جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* (Toklikishvili et al., 2010; Saleem et al., 2018). تسهم هذه البكتيريا في تحسين قدرة النباتات على تحمل الضغوط الناتجة عن الجفاف، ونقص العناصر الغذائية، والملوحة، ومسببات الأمراض النباتية. ومن المثير للاهتمام، أن إنتاج إنزيم ACC deaminase عبر التعبير عن الجين المسؤول في البكتيريا المعززة للنمو يساهم بشكل كبير في تخفيف الضغوط البيئية على النباتات المعالجة مقارنة بتلك غير المعالجة (Grichko et al., 2001; Tavares et al., 2018) ، وقد أظهرت التحليلات الجينية أن السلالة S1 تحتوي على الجين المسؤول عن إنتاج هذا الإنزيم، مما يتماشى مع نتائج Ali et al. (2014) .

يشكل الإجهاد النباتي تحدياً كبيراً نتيجة للتغيرات البيئية، مثل درجات الحرارة المرتفعة أو المنخفضة، ونقص المياه، وتلوث التربة. ينتج هذا الإجهاد تفاعلات ضارة داخل النبات تُعرف بعمليات التأكسد، مما يؤدي إلى تكوين الجذور الحرة، وهي جزيئات ذات وزن جزيئي منخفض تحتوي على إلكترونات غير مقترنة. تتشكل هذه الجذور الحرة طبيعياً خلال العمليات الأيضية، لكن تكوينها الزائد نتيجة للضغوط البيئية يمكن أن يسبب تلفاً خلوياً وأمراضاً (Sachdev et al., 2020). في محاولة للتكيف مع هذه التحديات، طورت النباتات آليات داخلية لمكافحة الإجهاد والحد من الأضرار الناتجة عن الجذور الحرة، بما في ذلك إنتاج مضادات الأكسدة التي تقاوم الجذور الحرة وتخفف من آثارها الضارة. يشمل ذلك نظام دفاعي يُعرف بالنظام المضاد للأكسدة، حيث يتم إنتاج مجموعة متنوعة من الإنزيمات والمركبات، من بينها إنزيمات مضادة للأكسدة، مثل سوبر أوكسيد ديسموتاز (SOD) ، والبيروكسيداز (POXs)، وكاتلاز (CAT) ، والبوليفينول أوكسيداز (PPOS) ، التي تلعب دوراً في حماية الخلايا (Amil-Ruiz et al., 2011; Thakker et al., 2013). وقد كشفت التحليلات الجينية أن السلالة S1 تحتوي على المورثات التي تشفر العديد من الإنزيمات والمركبات المضادة للأكسدة، مما يشير إلى أهميتها في مقاومة موت الخلايا النباتية تحت تأثير الضغوط.

يعتبر إنتاج الهرمونات النباتية آلية فعّالة من خلالها يمكن للبكتيريا الجذرية تعزيز نمو النبات وتحسين عمليات إنبات البذور واستطالة الجذور (Khamna et al., 2009; Goudjal et al., 2013) . يعتبر حمض الإندول-3-أسيتيك (IAA) واحداً من الأوكسينات الطبيعية الشائعة، وينتج نتيجة لاستقلاب L-tryptophan

في الكائنات الحية الدقيقة (Ruanpanun et al., 2010). تُظهر العديد من أنواع البكتيريا، مثل *Streptomyces*، القدرة على إنتاج IAA، مما يعزز نمو النبات عن طريق تحسين إنبات البذور، وزيادة طول الجذور، وزيادة وزن الجذر الجاف (Aldesuquy et al., 1998; Tokala et al., 2002; El-Tarabily et al., 2008). وقد تم اكتشاف أن السلسلة S1 تحتوي على عدة جينات تشفر إنزيمات تشارك في إنتاج IAA.

وصف عدد من الأبحاث أهمية وجود الهيدروجين سيانيد (HCN)، واللواقط الحديدية، والإنزيمات مثل الكيتيناز والغلوكوزاناز في سلالات PGPR، حيث تلعب هذه المركبات دورًا رئيسيًا في مكافحة مسببات الأمراض النباتية المختلفة، مما يساهم في تعزيز النمو ومكافحة الأمراض. وقد تم الإبلاغ عن بعض أنواع البكتيريا الجذرية كمنتجين لمركب HCN، الذي يُعد مركبًا متطابقًا مضادًا للفطريات، والذي يساهم في تثبيط العديد من مسببات الأمراض النباتية مثل *Fusarium* (Passari et al., 2018; Abdallah et al., 2016). كشفت دراستنا عن امتلاك السلسلة S1 للجين المسؤول عن إنتاج الهيدروجين سيانيد، والذي يُعتبر آلية رئيسية للمكافحة الحيوية عند *Pseudomonas fluorescens* (Michelsen, 2012). تتوافق هذه النتائج تمامًا مع نتائج Liu et al. (2016) و Gamalero et al. (2010).

تلعب اللواقط الحديدية دورًا حاسمًا في مقاومة مسببات الأمراض النباتية، حيث تساعد البكتيريا الجذرية المنتجة للواقط الحديدية النباتات على استحصال الحديد من التربة (Verma et al., 2011; Sadeghi et al., 2012). من خلال نتائج التحليلات الجينية، تم الكشف عن وجود الجينات المسؤولة عن إنتاج اللواقط الحديدية في السلسلة S1.

كما تم تحديد مجموعات جينية مسؤولة عن تخليق مجموعة متنوعة من الببتيدات غير الريبوزومية (NRPs) النشطة بيولوجيًا، خاصة كمضادات للفطريات الممرضة (Cane et al., 1999). غالبًا ما تكون الببتيدات غير الريبوزومية معقدة في تركيبها ويصعب تصنيعها. وفي الغالب، تُنتج هذه الببتيدات من قبل كائنات دقيقة تعيش في التربة، مثل الأكتينوبكتيريا والعصيات (Cheng et al., 2002; Horwood et al., 2004). كما تظهر الدراسات أن الكائنات الحية الدقيقة البحرية والجذرية تُعتبر أيضًا مصادر هامة للببتيدات غير الريبوزومية (Blunt et al., 2007, 2008)، وهو ما يتماشى مع ما توصلنا إليه في هذه الدراسة بشأن السلسلة S1 التي تحتوي جينوماتها على مجموعات جينية تشارك في تخليق الببتيدات غير الريبوزومية (NRPs).

الخلاصة: Conclusion

تظهر النتائج امتلاك السلسلة S1 للعديد من الجينات التي تساهم في تعزيز نمو النبات، بتوفير المغذيات، ومقاومة الإجهادات غير الحيوية مثل الجفاف وملوحة التربة، بالإضافة إلى القدرة على تثبيط ومكافحة الممرضات النباتية. لذا يمكن استخدام هذه السلسلة كسماد حيوي واعد في مجال الزراعة بتطبيقه على نطاق واسع لتعزيز إنتاجية المحاصيل الزراعية الرئيسية وتقليل التكاليف المالية والبيئية لاستخدام المعالجات الكيميائية مثل المبيدات الحشرية، خاصة في المناطق الجافة والشبه الجافة.

المراجع: Références

1. Abdallah, R. A. B., Mokni-Tlili, S., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddine, H., & Daami-Remadi, M. (2016). Biocontrol of *Fusarium* wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. *Biological control*, 97, 80-88.
2. Aldesuquy HS, Mansour FA, Abo-Hamed SA (1998). Effect of the culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. *Folia Microbiol* 43:465–470.
3. Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160-167.
4. Amil-Ruiz, F., Blanco-Portales, R., Munoz-Blanco, J., & Caballero, J. L. (2011). The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. *Plant and Cell Physiology*, 52(11), 1873-1903.
5. Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... & Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1), 1-15.
6. Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & El Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 13(3), 1140.
7. Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W. P., Munro, M. H., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2007). Marine natural products. *Natural product reports*, 24(1), 31-86.
8. Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W. P., Munro, M. H., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2008). Marine natural products. *Natural product reports*, 25(1), 35-94.
9. Cane, D. E., & Walsh, C. T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology*, 6(12), R319-R325.
10. Cheng, Y. Q., Tang, G. L., & Shen, B. (2002). Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. *Journal of bacteriology*, 184(24), 7013-7024.
11. Dif, G., Belaouni, H. A., Goudjal, Y., Yekkour, A., Djemouai, N., & Zitouni, A. (2021). Potential for plant growth promotion of *Kocuria arsenatis* Strain ST19 on tomato under salt stress conditions. *South African Journal of Botany*, 138, 94-104.
12. Dif, G., Belaouni, H. A., Yekkour, A., Goudjal, Y., Djemouai, N., Peñázová, E., ... & Zitouni, A. (2022). Performance of halotolerant bacteria associated with Sahara-inhabiting halophytes *Atriplex halimus* L. and *Lygeum spartum* L. ameliorate tomato plant growth and tolerance to saline stress: from selective isolation to genomic analysis of potential determinants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 16.
13. Dif, G. and Zitouni, A. (2023). Revealing of potential plant growth-enhancing traits through *in silico* genomic analysis of *Bacillus rhizoplanae* CIP111899. *The Scientific Journal of King Faisal University: Basic and Applied Sciences*, 24(1), 34–40.
14. El-Tarabily KA (2008) Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil* 308:161–174.

15. Gamalero, E., Berta, G., Massa, N., Glick, B. R., & Lingua, G. (2010). Interactions between *Pseudomonas putida* UW4 and *Gigaspora rosea* BEG9 and their consequences for the growth of cucumber under salt-stress conditions. *Journal of applied microbiology*, 108(1), 236-245.
16. Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1127500.
17. Goudjal, Y., Toumatia, O., Sabaou, N., Barakate, M., Mathieu, F., & Zitouni, A. (2013). Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: Indole-3-acetic acid production and tomato plants-growth-promoting activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1821–1829.
18. Grichko, V. P., & Glick, B. R. (2001). Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(1), 11-17.
19. Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chemical reviews*, 116(5), 3029-3085.
20. Horwood PF, Burgess GW, Oakey HJ (2004) Evidence for nonribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 236:319–324.
21. Khamna, S., Yokota, A., & Lumyong, S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 649-655.
22. Kumar, A., Kumar, R., Kumari, M., & Goldar, S. (2020). Enhancement of plant growth by using PGPR for a sustainable agriculture: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 9, 152-165.
23. Liu, W., Wang, Q., Hou, J., Tu, C., Luo, Y., & Christie, P. (2016). Whole genome analysis of halotolerant and alkalotolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Klebsiella* sp. D5A. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
24. Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications*, 10(1), 2182.
25. Michelsen, C. F., & Stougaard, P. (2012). Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(4), 381-390.
26. Passari, A. K., Lalsiamthari, P. C., Leo, V. V., Mishra, V. K., Yadav, M. K., Gupta, V. K., & Singh, B. P. (2018). Biocontrol of *Fusarium* wilt of *Capsicum annuum* by rhizospheric bacteria isolated from turmeric endowed with plant growth promotion and disease suppression potential. *European Journal of Plant Pathology*, 150(4), 831-846.
27. Richter, C., Dirks, M. E., Gronover, C. S., Prüfer, D., & Moerschbacher, B. M. (2012). Silencing and heterologous expression of ppo-2 indicate a specific function of a single polyphenol oxidase isoform in resistance of dandelion (*Taraxacum*

- officinale) against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Molecular plant-microbe interactions, 25(2), 200-210.
28. Ruanpanun P, Tangchitsomkid N, Hyde KD, Lumyong S (2010). Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. World J Microbiol Biotechnol 26:1569–1578.
 29. Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2021). Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. Antioxidants, 10(2), 277.
 30. Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(4), 1503-1509.
 31. Saleem, A. R., Brunetti, C., Khalid, A., Della Rocca, G., Raio, A., Emiliani, G., ... & Centritto, M. (2018). Drought response of *Mucuna pruriens* (L.) DC. inoculated with ACC deaminase and IAA producing rhizobacteria. PLoS One, 13(2), e0191218.
 32. Sapak Z, Meon S, Zam A (2008). Effect of endophytic bacteria on growth and suppression of Ganoderma infection in oil palm. Int J Agric Biol 10:127–132.
 33. Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics, 30(14), 2068-2069.
 34. Tavares, M. J., Nascimento, F. X., Glick, B. R., & Rossi, M. J. (2018). The expression of an exogenous ACC deaminase by the endophyte *Serratia grimesii* BXF 1 promotes the early nodulation and growth of common bean. Letters in applied microbiology, 66(3), 252-259.
 35. Thakker, J. N., Patel, S., & Dhandhukia, P. C. (2013). Induction of defense-related enzymes in banana plants: Effect of live and dead pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. International Scholarly Research Notices, 2013.
 36. Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ (2002). Novel plant–microbe rhizo-sphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). App Environ Microbiol 68:2161–2171.
 37. Toklikishvili, N., Dandurishvili, N., Vainstein, A., Tediashvili, M., Giorgobiani, N., Lurie, S., ... & Chernin, L. (2010). Inhibitory effect of ACC deaminase-producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by *Agrobacterium tumefaciens* or *A. vitis*. Plant Pathology, 59(6), 1023-1030.
 38. Verma, V. C., Singh, S. K., & Prakash, S. (2011). Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. Journal of basic microbiology, 51(5), 550-556.
 39. Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Brucoleri, R., ... & Medema, M. H. (2015). antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. Nucleic acids research, 43(W1), W237-W243.