جامعة غرداية

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض

قسم البيولوجيا


مذكرة مقدمة لاستكمال متطلبات شهادة ماستر أكاديمي

الميدان: علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض

الشعبة :بيولوجيا

التخصص :بيوكيمياء تطبيقية

بعنوان:

# تحليل الجينوم الكامل لبعض سلالات البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات

**(Klebsiella sp. S1 و Pseudomonas sp. S2)**

Whole genome analysis of some strains of Plant growth-promoting rhizobacteria

(Klebsiella sp. S1 and Pseudomonas sp. S2)


من إعداد الطالبين:

حاج إسماعيل إبراهيم

قطاف أحمد


نوقشت وأجيزت بتاريخ :03 أكتوبر 2020م

أمام لجنة المكونة من السادة:

| الاسم واللقب | الرتبة العلمية | الجامعة الأصلية | الصفة |
|---|---|---|---|
| أ.بكلي عيسى | أستاذ محاضر أ | جامعة غرداية | رئيسا |
| أ.قندوز ضيف | أستاذ محاضر أ | جامعة غرداية | مشرفا ومقررا |
| أ.جليد يوسف | أستاذ محاضر أ | جامعة غرداية | مناقشا |

السنة الجامعية : 2019-2020

# ملخص


تهدف هذه الدراسة إلى تحليل جينومي لبكتيريا جذرية (PGPRs) لمحاولة فهم جدوى استعمالها كعوامل في تعزيز نمو النباتات وكذا في المكافحة البيولوجية ضد الفطريات المتسببة في أمراض تكبد الإنسانية خسائر فادحة في الأمن الغذائي مثل مرض تخميد الشتلات (seeding damping off disease).

سمحت هذه الدراسة بفهم أعمق لبعض العزلات المميزة على المستوى الجيني. في هذه الدراسة تم استخدام نموذجين من البكتيريا الجذرية ، االسلالة S1 و S2، مكنت الدراسة الجينية بالتحليل الجزيئي للقطعة "ADNr 16S" ودراسة النسالة (phylogénie) من إثبات تقارب العزلة S1 من النوع *Klebsiella africana* $Kp7^T$ بنسبة تشابه قدرها 99.57% وتقارب العزلة S2 من النوع *Pseudomonas juntendi* بنسبة تشابه قدرها 99.64%. تمت الدراسة الجينومية للعزلتين من البكتيريا الجذرية S1وS2 كدراسة الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG) من خلال عملية التحليل الجيني (Annotation) بواسطة خادمRAST ثم التحديد الجيني بإستخدام برنامج Prokka قصد اكتشاف والتعرف على الجينات المتعلقة بآليات تعزيز نمو النبات والتحكم البيولوجي وأخيرا دراسة المجموعات الجينية المسؤولة عن الأيض الثانوي بواسطة أداة التحليل البرمجية antiSMASH. يمكن تلخيص نتائج التحليل الجيني للسلالتين في مايلي:

وجود تواتر جيني هام نسبيا في ما يخص الجينات المتعلقة بتثبيت واستقلاب الآزوت (Nitrogen metabolism)، بالاستجابة للإجهاد (Stress Reponse)، إستقلاب الفوسفور (Phosphorus metabolism)، ولواقط الحديد ( Iron Acquisition and metabolism) كما لوحظ غياب الجينات المسؤولة عن الحركة (Motility and chemotaxis) في السلالة S1 ووجودها في السلالة S2.

كما سمح التحديد الجيني باكتشاف الجينات المتعلقة بإنتاج الهرمونات النباتية حيث تم تحديد وجود جينات متدخلة في إنتاج الاوكسين (IAA) ضمن جينوم السلالة S1 الهام في تحفيز النبات كما لوحظ غياب هاته الجينات في السلالة S2. في ما يخص ثبيت الأزوت تم الكشف في السلالتين S2،S1 عن وجود الجينات المشفرة لأنزيم النيتروجيناز Nitrogenase المثبت للأزوت الجوي ، أما الجينات المساهمة في إذابة الفسفور اللاعضوي فقد تم تحديد العديد منها في كلا السلالتين S1 وS2 مثل الجينات التي تشفر لعدة إنزيمات تلعب دورا هاما في في تصنيع مركبات تعمل على إذابة الفوسفات المعدني مثل حمض غليكونيك (GA). كذالك تم تحديد في السلالتين S2،S1 جينات ترمز لتخليق لواقط الحديد Siderophore والمركبات العضوية الطيارة (VOCs) وهي مركبات تحفز تكوين الجذور وزيادة مقاومة الأمراض وتحمل الجفاف. كذلك، تم العثور في السلالتين S1 وS2 على الجينات المساهمة في تحمل الإجهادات مثل *betA* و *betB* الهامة لتخليق glycine-betaine والجينات المشفرة لإنتاج الأنزيمات المضادة للأكسدة والجذور الحرة المجهدة للنبات و أهمها : SOD: Superoxide dismutase، البيروكسيداز (POXs) وكاتلاز (CAT). تم كذلك تحديد وجود عدة مجموعات جينية (Clusters) مسؤولة عن إنتاج المركبات الأيضية الثانوية لها دور في المقاومة البيولوجية وتعمل كمضادات حيوية للممرضات في السلالتين S1وS2 أهمها NRPS و Bacteriocin.

تتضح من خلال مجمل النتائج المحصل عليها، أهمية السلالتين S1 وS2 في تعزيز نمو النبات بتوفير المغذيات ومقاومة الإجهاد و المكافحة البيولوجية ضد الممرضات. لذا فإن إمكانية تجريب استعمالها كلقاحات حيوية منفردة أومركبة جد مشجعة لاستكمال الدراسة التطبيقية لها في الميدان الزراعي.



**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا PGPR، *Pseudomonas* sp، *Klebsiella* sp، المكافحة البيولوجية، مقاومة الإجهاد، تحليل الجينوم.

***ABSTRACT***

This study aims at genomic analysis of PGPRs in an attempt to understand the feasibility of using them as agents in promoting plant growth as well as in biocontrol against fungi that cause severe losses in food security such as Seeding damping off disease. This study allowed a deeper understanding of some characteristic isolates at the genetic level.
In this study, two samples of rhizobacterial strain S1 and S2 were used. The genetic study by molecular analysis of the segment "ADNr 16S" and the phylogeny study made it possible to demonstrate the affinity of the S1 isolate of Klebsiella africana Kp7T with a similarity of 99.57% and the affinity for the S2 isolate of the type Pseudomonas. juntendi with a similarity of 99.64%.The genomic study of the rhizobacterial strain S1 and S2 was carried out as a study of genes associated with functional groups (COG) through the process of genetic analysis (Annotation) by the RAST server, then genetic identification using the Prokka program in order to discover and identify the genes related to the promoting plant growth mechanism , biocontrol and finally studying the genetic groups responsible for Secondary metabolism by the ANTISMASH software analysis tool. The results of the genetic analysis of the this isolats can be summarized as follows :
The presence of a relatively important genetic frequency with regard to genes related to nitrogen metabolism, stress response, phosphorus metabolism, and iron acquisition and metabolism. The absence of genes responsible for motility and chemotaxis was also noted in strain S1 and its presence in strain S2.The genetic identification also allowed the discovery of genes related to the production of phytohormons, as the presence of genes involved in the production of auxin (IAA) was identified within the genome of the S1 strain important in phytostimulation, and the absence of these genes was observed in the S2 strain. Regarding nitrogen fixation, presence of genes encoding for nitrogenase enzyme which fixes atmospheric nitrogene , was detected in S1 and S2 strains .

As for the genes that contribute to the dissolution of inorganic phosphorous, many of them have been identified in both strains S1 and S2, such as the genes that encode several enzymes that play an important role in the manufacture of compounds that dissolve mineral phosphates, such as glycolic acid (GA). Likewise, genes encoding the synthesis of siderophore and volatile organic compounds (VOCs) have been identified in the two strains S1 and S2, which are compounds that stimulate root formation and increase disease resistance and drought tolerance. Also, in the S1 and S2 strains, genes that contribute to stress tolerance such as betA and betB were found important one such as glycine-betaine synthesis and genes encoded for the production of antioxidant enzymes and free radical stresses against in plants, the most important of which are: SOD: Superoxide dismutase, peroxidase (POXs) and catalase (CAT). Several gene groups (Clusters) responsible for the production of secondary metabolic compounds have also been identified that play a role in biological resistance and act as antibiosis for pathogens in the S1 and S2 strains, the most important of which are NRPS and Bacteriocin.

The overall results obtained show the importance of the S1 and S2 strains in promoting plant growth by providing nutrients, stress resistance and biocontrol against pathogens. Therefore, the possibility of testing their use as individual or combined biological inoculates is very encouraging to complete the applied study in the agricultural field.

**Key words**: PGPRs bacteria, Pseudomonas sp, Klebsiella sp Biocontrol, Stress Resistance, genomic analysis

# الفهرس

شكر وعرفان
الإهداء

قائمة المختصرات

قائمة الجداول

قائمة الأشكال

المقدمة.....01

***الجـزء النظري***

**الفصل الأول: التأثير الإيجابي للميكروبات في تعزيز نمو النبات**

**I.عموميات**.....04

**II. التعزيز المباشر للنمو النباتي من طرف البكتيريا**.....05

1- تثبيت النتروجين .....06

2- الهرمونات النباتية .....08

2 -1- L'AIA (Acide Indole-3-Acétique) .....09

2-2- السيتوكينات .....10

2-3-الجبريلينات .....11

2-4-الإثيلين .....11

3- اذابة الفوسفات.....14

3-1 إذابة الفوسفور المعدني .....15

3-2- معدنة الفوسفور العضوي .....16

4–التقاط الحديد .....17

5– إنتاج الـ(ACC desaminase 1-aminocyclopropane-1-carboxylate).....19

**II. التعزيز غير المباشر للنمو النباتي من طرف الأكتينوبكتيريا**.....21

1– إنتاج المضادات الحيوية .....21

2– إنتاج الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية .....24

3– إنتاج المواد الطيارة (HCN) .....26

4– المنافسة على المغذيات .....26

5– المقاومة الجهازية المستحثة .....27

**الفصل الثاني: مقاومة الإجهاد النباتي باستخدام البكتيريا**

**I.** مقاومة الإجهاد الحيوي للنبات بواسطة البكتيريا .....30

**II.** مقاومة الإجهاد اللاحيوي للنبات بواسطة البكتيريا .....30

## الفصل الثالث: التحليل الجينومي

1. لمحة تاريخية .....32
2. تعريف علم الجينوم .....33

**الجزء التطبيقي**

**الفصل الرابع: وسائل وطرائق العمل**

I. Used tools .....35

I.1. PROKKA,Version1.13: ..... 35

I.2. ROARY, Version3.12.0: .....35

I.3. NCBI: ……………………………………………………………………………………...36

I.4. BLAST: …………………………………………………………………………………36

I.5. RAST, Version2:……………………………………………………………………………36

I.6. antiSMASHVersion4.1:………………………………………………………………………38

I.7. BioEdit: ………………………………………………………………………………………38

I.8. MEGA version 7: ……………………………………………………………………………..38

II. Methods ………………………………………………………………………………………39

II.1. Annotation and mining …………………………………………………………...……39

## الفصل الخامس: النتائج والمناقشة

I. النموذج الأول: السلالة S1……………………………………………………………41

I.1. الدراسة التصنيفية الجزيئية للسلالة S1 :……………………………………………41

I.2. الملامح العامة للجينوم *Klebsiella* sp S1 ……………………………………………42

I.2.الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG)……………………………………………44

I.3. الجينات المرتبطة بتعزيز نمو النبات و المكافحة الحيوية في جينوم *Klebsiella* sp. S1……45

I.3.1. الجينات المشاركة في إنتاج الهرمونات النباتية:……………………………………45

I.3.2. الجينات المسؤولة عن تثبيت الآزوت:…………………………………………………46

I.3.3. الجينات المسؤولة عن إذابة الفوسفات:………………………………………………46

I.3.3. الجينات المساهمة في خصائص أخرى متعلقة بتعزيز نمو النباتات :……………………46

I.3.4. الجينات المشاركة في تحمل الملوحة:…………………………………………………47

4.I. المجموعات الجينية المسؤولة عن الآيض الثانوي.....47

II. النموذج الثاني: السلالة S2.....49

1.I. الدراسة التصنيفية الجزيئية للسلالة S2 :.....49

1.II. الملامح العامة للجينوم *Pseudomonas sp .S2* .....49

2.II. الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG).....52

3.II. الجينات المرتبطة بتعزيز نمو النبات و المكافحة الحيوية في جينوم . *Pseudomonas sp .S2*
.....53

1.3.II. الجينات المشاركة في تحمل الإجهاد:.....53

2.3.II. الجينات المسؤولة عن إذابة الفوسفات غير العضوي:.....54

3.3.II. الجينات المشاركة في إنتاج الهرمونات النباتية:.....55

4.3.II. الجينات المتدخلة في اقتناء الحديد:.....56

4.3.II. الجينات المتدخلة في المراقبة البيولوجية:.....56

4.I. المجموعات الجينية المسؤولة عن الآيض الثانوي.....57

III. مناقشة النتائج:.....58

الخاتمة .....62

المراجع

# شكر وعرفان

نشكر الله تعالى الذي أسبغ علينا نعمه الظاهرة والباطنة، وأمدنا بالصبر لتذلل الصعوبات أمامنا وأعاننا على هذا العمل المتواضع.

لا يسعنا إلا أن نتقدم بأسمى آيات الشكر والعرفان وعظيم الامتنان إلى معلمنا وأستاذنا **الدكتور / ضيف القندوز**، والذي علمنا حب الإكتشاف والمعرفة والصبروالمثابرة في ظل الظروف الصعبة وتداعيات الوباء على الدراسة الجامعية ، وكانت لتوجيهاته ونصائحه أكبر الأثر لكي يخرج هذا البحث في أفضل صورة أسلوباً ومضموناً .

ونشكر كل من ساهم وبذل جهدا ولو بالقليل في إنجاز هذه المذكرة، كما نشكر الأساتذة الكرام أعضاء لجنة المناقشة على تفضلهم بقبول المناقشة.

# الإهداء

**إبراهيم ...**

إلى روح أبي الطاهرة رحمة الله عليه

إلى أمي الغالية

إلى زوجتي وأبنائي أحبتي و قرة عيني

إلى أخي العزيز وأخواتي الكريمات

إلى أهلي وأحبابي وأصدقائي

إلى صرح دار العلم ملتقى الباحثين و العاكفين

إلى كل من قدم لي نصحا وارشادا وكلمة طيبة

**أحمد ...**

إلي كل من أضاء بعلمه عقل غيره
أو هدى بالجواب الصحيح حيرة سائليه
فأظهر بسماحته تواضع العلماء
وبرحابته سماحة العارفين

# قائمة المختصرات

**PGPR**: (plant growth promoting rhizobacteria) البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات

**ISR :** Induced Systemic Resistance خصائص قدرة المقاومة الجهازية الطبيعية للنبات

**HCN:** hydrogen cyanate حمض سيان الماء أو حمض الهيدروسيانيك

ACC desaminase: (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase) إنزيم 1-أمينو سيكلوبروبان -1-كربوكسيلات

**NCBI:** (National Center for Biotechnology Information) المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية

**(COG):** الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية

**RAST: (Rapid Annotations using Subsystems Technology) خادم لترميز الجينوم**

**Prokka: أداة برمجية لترميز السريع للجينوم**

**antiSMAS**: أداة برمجية تكشف عن المجموعات الجينية المسؤولة عن الآيض الثانوي

$NO^-_3$ : نترات

**+NH4:** الامونيوم

(BNF): Biological nitrogen fixation التثبيت الحيوي للنتروجين

**L'AIA** : Acide Indole-3-Acétique اندول حمض الخليك (هرمون الأكسين)

**L'AIB**: (Acide Indole-3-butyric) حمض الإندول -3 بوتيريك مادة صلبة بلورية بيضاء إلى صفراء فاتحة

**L'AIP**: (Acide Indole-3-pyruvic) إندول -3-بيروفات

**Met:** حمض أميني ميثيونين

**SAM:** S- adenosyl methionine S−أدينوسيل الميثيونين

**ACC**: 1-aminocyclopropane-1-carboxylat -1حمض أمينو سيكلوبروبان -1- كربوكسيليك

**ABA:** Abscisic acid حمض الأبسيسيك ABA أو هرمون الإجهاد و التساقط

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة

**SAR**: Systemic Aquired Resistance المقاومة الجهازية المكتسبة

**JA**: Jasmonic *acid* حمض الجسمونيك

**SA**: salicylic *acid* حمض الساليسيليك

**ET:** L'éthylène الإيثيلين

# فهرس الجداول


| الجدول | العنوان | الصفحة |
|---|---|---|
| الجدول (1) | الهرمونات النباتية المنتجة أو المعدلة بواسطة بعض الأجناس البكتيرية | 14 |
| الجدول (2) | مختلف أنواع الأكتينوبكتيريا القادرة على إنتاج المضادات الحيوية | 22 |
| الجدول (3) | أمثلة لبعض الأكتينوبكتيريا المضادة للكائنات الممرضة | 23 |
| الجدول (4) | الإنزيمات المحللة للجذر الخلوية المنتجة من قبل السلالات العدائية من الأكتينوبكتيريا لقمع العوامل الممرضة للنبات | 25 |
| الجدول (5) | الملامح العامة لـ جينوم *Klebsiella* sp. S1 | 42 |
| الجدول (6) | الملامح العامة لـ جينوم *Pseudomonas* sp. S2 | 50 |

# فهرس الأشكال


| الشكل | العنوان | الصفحة |
|---|---|---|
| الشكل (1) | طرق عمل بكتيريا PGPRS في تحفيز نمو النبات | 05 |
| الشكل (2) | تمثيل التفاعلات الكيميائية والاستقلابية في البكتيريا PGPR في تثبيت النتروجين | 08 |
| الشكل (3) | دور L'AIA في تحسين النمو النباتي | 10 |
| الشكل (4) | رسم تخطيطي أهمية بكتيريا PGPR في انتاج الهرمونات النباتية | 12 |
| الشكل (5) | رسم تخطيطي لدورة الخلية النباتية والإجراءات التنظيمية للهرمونات النباتية | 13 |
| الشكل (6) | أليات عمل بكتيريا PGPRS في إذابة الفسفور وأنتاج الحمض العضوي | 16 |
| الشكل (7) | التركيبات الجزئية المختلفة للواقط الحديد Siderophore و بنيتها الوظيفية | 18 |
| الشكل (8) | البنية الكيميائية للـ ACC | 20 |
| الشكل(9) | نموذج يشرح كيفية عمل الـ ACC desaminase | 20 |
| الشكل(10) | أليات بكتيريا PGPRS في تحفيز المقاومة الجهازية المستحثة (ISR) عند النبات | 29 |
| الشكل (11) | أليات عمل تحفيز بكتيريا PGPRS في مقاومة الإجهاد الحيوي و اللاحيوي عند النبات | 31 |
| الشكل(12) | شجرة التقارب الوراثي على أساس تحليل تتابع الجين المشفر للرنا الريبوزومي rRNA16S لسلالة S1 | 41 |
| الشكل(13) | تمثيل دائري لجينوم .Klebsiella sp. | 43 |
| الشكل(14) | : تمثيل الجينات حسب الفئات الوظيفية (الأنظمة الفرعية) الناتجة عن التحديد الجيني على الخادم RAST لجينومKlebsiella sp S1 | 44 |
| الشكل(15) | نظرة عامة تخطيطية لمسارات التمثيل الغذائي وأنظمة النقل .Klebsiella sp D5A | 45 |
| الشكل(16) | الكشف عن جميع المجموعات الجينية التي ترمز للمستقلبات الثانوية داخل جينوم Klebsiella sp. S1 بواسطة أداة antiSMASH | 48 |
| الشكل(17) | شجرة التقارب الوراثي على أساس تحليل تتابع الجين المشفر للرنا الريبوزومي rRNA16S لسلالة S2 | 49 |
| الشكل(18) | تمثيل دائري لجينوم Pseudomonas sp .S2 بواسطة أداة DNA Plotter | 51 |
| الشكل(19) | تمثيل الجينات حسب الفئات الوظيفية (الأنظمة الفرعية) الناتجة عن التحديد الجيني على الخادم RAST لجينوم Pseudomonas sp. S2 | 52 |
| الشكل(20) | الكشف عن جميع المجموعات الجينية التي ترمز للمستقلبات الثانوية داخل جينوم Pseudomonas sp. S2 بواسطة أداة antiSMASH. | 57 |

## المقدمة

يواجه النظام الزراعي العالمي في القرن الحادي والعشرين المزيد من التحديات، تتمثل في انخفاض الإنتاجية وتدهور استدامة النظم الإيكولوجية الزراعية، بسبب التلوث البيئي والجفاف و نقص الأرضي الزراعية الخصبة، يتوقع أن يصل عدد السكان الأرض إلى 9 مليار نسمة بحلول عام 2050(Wood, 2001) وبالتالي ستكون هناك زيادة مستمرة في الطلب على الغذاء بنسبة 70٪ وفقا لتقرير منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (FAO,2009) (Alexandratos and Bruinsma, 2012 ; Kumar et al., 2017a )

نظرا للغزو العمراني و تمدد ملوحة التربة أصبح إيجاد الأراضي الزراعية ذات التربة الخصبة أمر شبه مستحيل، ويقوم الباحثون والعلماء بتركيز انتباههم بحثًا عن وسيلة أكثر أمانًا وإنتاجية للممارسات الزراعية ، لذلك اكتشاف الوسائل غير التقليدية و الموارد المستدامة أصبح حاجة ملحة ليس فقط للتخفيف من الطلب على الزيادة السكانية المستمرة ولكن أيضًا أبعد من ذلك للحفاظ على نظامنا البيئي من التدهور المستمر، حيث لا يمكن تحقيق الاستدامة في الإنتاج الزراعي حاليا بدون معرفة دقيقة لميكروبيولوجيا التربة في ظل الظروف الحالية (Patil et al., 2014 ;Vaxevanidou et al., 2015 ) من بين هذه الكائنات الحية الدقيقة، البكتيريا المعروفة باسم البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) التي يسلط عليها الباحثون الكثير من الأبحاث و التجارب، و يمكن استخدام PGPR لتحسين صحة النبات وتعزيز معدل نمو النبات دون تلوث بيئي (Calvo et al., 2014; Fernando deAraujo, 2008; Singh et al., 2017).

يمكن أن تؤثر البكتريا PGPR إيجابا في نمو النبات بآليات مختلفة مباشرة وغير مباشرة (Gupta et al،2002). مثلا تحفز نمو النبات من خلال تسهيل حصول النبات المضيف على العناصر الغذائية الموجودة في التربة، إنتاج العديد من منظمات نمو النبات، وحماية النباتات من مسببات الأمراض النباتية عن طريق التحكم فيها أو تثبيطها، كما يمكن أن

تحسين بنية التربة والمعالجة الحيوية للتربة الملوثة عن طريق عزل المعادن الثقيلة السامة بأنواعها والمركبات الكيميائية الغريبة xenobiotic مثل المبيدات الزراعية (Ahemad, 2012; Ahemad and Malik, 2011; Hayat et al., 2010; Rajkumar et al., 2010 و أخرون )

في هذا السياق، هناك بحث مستمر لاستكشاف مجموعة واسعة من البكتيريا الجذرية PGPR التي تمتلك سمات مميزة مثل: إمكانات إزالة السموم و المعادن الثقيلة (Ma et al., 2011; Waniand Khan, 2010) تفكيك المبيدات و تحملها (Ahemad and Khan, 2012) ، تحمل الملوحة (Tank and Saraf, 2010; Mayak et al., 2004)، المكافحة البيولوجية لمسببات الأمراض النباتية والحشرات (Hynes et al. ، 2008 ؛ Russo et al.، 2008) جنبًا إلى جنب مع تعزيز خصائص قدرة المقاومة الجهازية الطبيعية للنبات (IRS) مثل ، الهرمونات النباتية (Tank and Saraf, 2010) (Ahemad and Khan, 2012)، قابضات الحديد ( Jahanian et al., 2012; Tian et al., 2009 ) Sedirophore ، ومقاومة الإجهاد، إنتاج hydrogen cyanate (HCN) ، ونشاط إنزيم ACC desaminase، تثبيت الآزوت الجوي وإنتاج الأمونيا ونشاط النيتروجيناز (Glick, 2012; Khan, 2005) ، إذابة الفوسفات ، إذابة البوتاسيوم (Ahemad and Khan, 2012)، إلخ.

ومن ثمة، فإن عدة بكتيريا جذرية تكافلية (Rhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobiumو غير تكافلية (Pseudomonas, Bacillus, Klebsiella, Azomonas ,Azotobacter, Azospirillum, , يتم الآن استخدامها في الأبحاث الميدانية كلقاحات بيولوجية لتعزيز نمو المحاصيل وحمايتها من مسببات الأمراض النباتية.

وبالتالي، بناءً على أنشطتها يمكن تصنيف PGPR على أنها محفزات نباتية ومبيدات بيولوجية لها تطبيقات واعدة في عدة مجالات زراعية وصناعية (Somers وآخرون.، 2004) .

لذلك نحاول في هذه الدراسة تحقيق تحليل جينومي لسلالتين من البكتيريا الجذرية:

- ***Klebsiella* sp S1**
- ***Pseudomonas* sp S2**

نستهدف تحديدا الجينات التي لها دور في خصائص PGPR من خلال تحليل برمجي للجينوم والتعرف على الملامح والمعطيات العامة لجينوم البكتيريا المتحصل عليه من منصة NCBI للسلالات البكتيريا وتحديد الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG) في الجينوم بواسطة برنامج RAST والجينات المرتبطة بتعزيز نمو النبات والمكافحة الحيوية في الجينوم بواسطة أداة Prokka والكشف عن المجموعات الجينية المسؤولة عن الآيض الثانوي بواسطة أداة antiSMASH.

سوف نتطرق في دراستنا هذه إلى دور البكتريا في تعزيز النمو النباتي من خلال 3 أجزاء:

الجزء 1: يعنى بعموميات حول PGPR: يتناول تعريف PGPR، خصائصها، تصنيفها، أقسامها، أماكن تواجدها وأهميتها.

الجزء 2: يتضمن الوسائل والطرائق البرمجية في تحليل الجينوم البكتيري لكلا السلالتين محل الدراسة.

الجزء 3: يحتوي على أهم النتائج المتحصل عليها ومناقشتها.

# الجـزء الأول

# الفصل الأول

## التأثير الإيجابي للميكروبات في تعزيز نمو النبات (PGPRs)

# الفصل الأول: التأثير الإيجابي للميكروبات في تعزيز نمو النبات (PGPRs)

## I – عموميات

PGPR أو "البكتريا الجذرية المعززة لنمو النبات" هي بكتيريا تتطور في منطقة الجذور، ولها تأثير إيجابي على النبات. تُستخدم هذه البكتيريا في الزراعة للتخصيب الحيوي للتربة، المكافحة الحيوية وإنتاج مركبات نافعة للنبات، من بين الأمثلة الهامة تثبيت النيتروجين من الغلاف الجوي والذي يمكن استخدامه بعد ذلك بواسطة النباتات، مما يؤدي إلى تحسين نموها خاصة عندما يكون نيتروجين التربة محدودًا (BENMATI ,2014). ولذلك، فهي بكتيريا مفيدة للنبات وتتفاعل مع النبات في شكل تكافلي أو غير تكافلي، أي تفاعل اختياري، دون عملية تمايز شكلي بينهما ( النبات و البكتيريا ). موطنهم المفضل هو منطقة الجذور، على الرغم من أن بعض السلالات قادرة على احتلال مواقع داخل النباتات

الآثار المفيدة للبكتيريا الجذرية على نمو النبات ناتجة عن اختلاف الآليات التي تمارسها PGPRs التي تكون أساليب عملها بطرق مباشرة أو غير مباشرة الفرق بين الاثنين ليس دائما واضحا. لتداخل بينهما في الوظائف البيوكيميائية الحيوية الحاصلة داخل وخارج النبات .

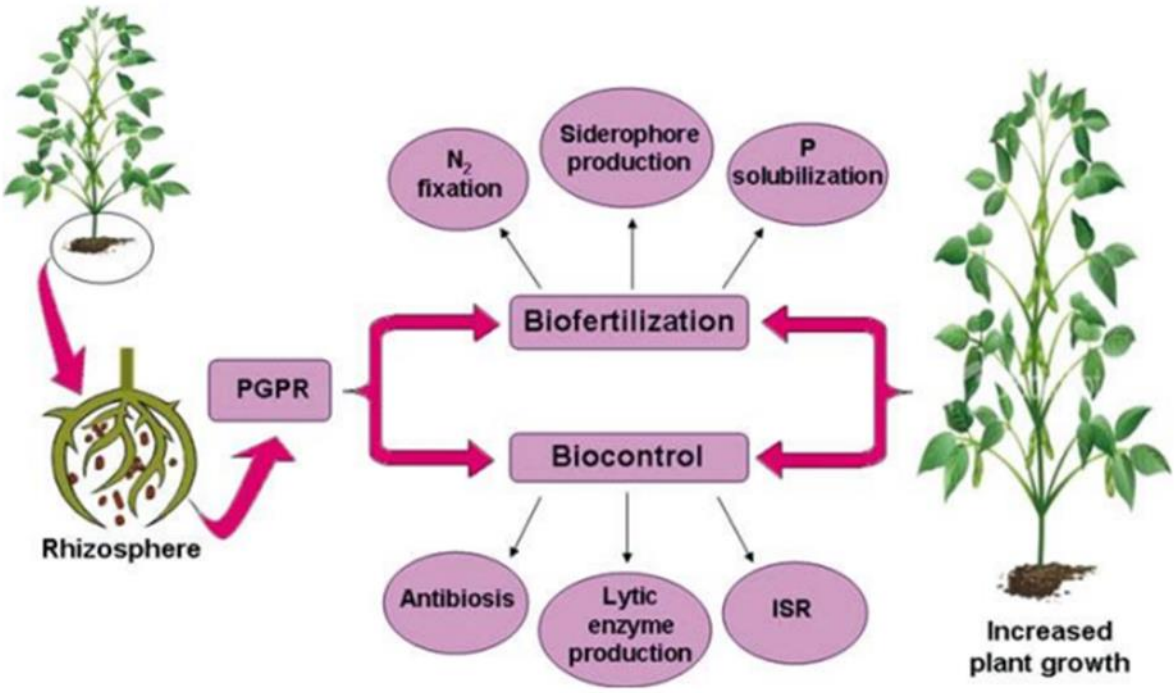
الآليات غير المباشرة ، هي عامة ، تلك التي تحدث خارج النبات ، بينما الآليات المباشرة هي تلك التي تحدث داخل النبات وتؤثر بشكل مباشر على عملية التمثيل الغذائي. هذه الآليات (**الشكل 1** ) التي يمكن أن تكون نشطة بشكل متزامن أو متتابع في مختلفة مراحل نمو النبات هي:

1– إذابة الفوسفات وتثبيت النيتروجين والمعادن المغذية ، ما يجعها متاحة للا متصاص من للنبات.

2– إنتاج الهرمونات النباتية مثل الإندول –3 حمض الخليك (IAA)

3– المقاومة البيولوجية للكائنات المجهرية المسببة للأمراض في التربة (عن طريق إنتاج السيانيد الهيدروجين (HCN)، لواقط الحديد sidérophores ، المضادات الحيوية ، و / أو المنافسة على المغذيات (Gupta et al., 2000) بالإضافة إلى ذلك ، يمكن أن تساهم PGPRs في تحسين مقاومة النبات للضغوط الحيوية واللاحيوية (الملوحة والجفاف وسمية المعادن الثقيلة)

بناءً على أنشطتهم ، (Somers وآخرون.، 2004). صنفوا بكتيريا PGPRs كأسمدة حيوية biofertilizant (زيادة توفير العناصر الغذائية للنباتات) ، محفزات نباتية phytostimulators (تحسين نمو النبات ، عادة من خلال إنتاج الهرمونات النباتية) ،معالجات جذريةrhizoremédiators (تحلل الملوثات العضوية) والمبيدات الحيوية biopesticides (مكافحة الأمراض ، بشكل رئيسي عن طريق إنتاج مستقلبات المضادات الحيوية ومضادات الفطريات).




**الشكل 1** : طرق عمل بكتيريا PGPRS في تحفيز نمو النبات (Khan et al., 2009)

## II. التعزيز المباشر للنمو النباتي من طرف البكتيريا

لكثير من أنواع البكتيريا القدرة على تعزيز النمو النباتي مباشرة عن طريق تسهيل الحصول على المغذيات من قبل النباتات وتوفير المواد الأساسية للنمو ويتضمن التعزيز المباشر للنمو النباتي: تثبيت النتروجين، إنتاج أو تعديلا لهرمونات النباتية، إذابة الفوسفات، إكتساب الحديد وإنتاج ACC deaminase (Subramaniam وآخرون.، 2016).

## 1.II. تثبيت النتروجين

النتروجين عنصر أساسي لتغذية النبات، يمثل حوالي 2% من إجمالي المادة الجافة النباتية التي تدخل في السلسلة الغذائية. لا يمكن للنباتات الوصول مباشرة إلى غاز ثنائي النتروجين $N_2$ والذي يشكل حوالي 80% من الغلاف الجوي حيث تستخدم النباتات النتروجين في شكل نترات $NO_3$ وأمونيا $NH_4^+$. أدى احتياج النبات للنتروجين في نموه إلى استخدام الأسمدة النتروجينية وتسهم هذه الأخيرة في تلوث التربة والمياه الجوفية مما يؤدي إلى مخاطر صحية وأضرار بالزراعة المستدامة. للكائنات الحية الدقيقة القدرة على تثبيت النتروجين الجوي من خلال عملية تعرف باسم التثبيت الحيوي للنتروجين (BNF) حيث تحول هذه الكائنات $N_2$ إلى $NH_3$ وهو النموذج الذي يمكن إستخدامه من قبل النباتات (Santi وآخرون.، 2013)، وتسمى البكتيريا المسؤولة عن تثبيت النتروجين بـ Diazotrophs وهي قادرة على تثبيت النتروجين إما في ظل ظروف المعيشة الحرة أو في إرتباط تكافلي مع النباتات. من بين هذه الكائنات الحية الدقيقة أثبتت الدراسات قدرة البكتيريا على التثبيت الحيوي للنتروجين بصورة علاقة غير تكافلية غالبا تنتمي للأجناس البكتيريا التالية: *Acetobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Azospirillum, Azotobacter, Azomonas, Bacillus, Beijerinckia, Clostridium, Corynebacterium, Derxia, Enterobacter, Herba spirillum, Klebsiella, Pseudomonas, Rhodospirillum, Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*. (Tilak وآخرون.، 2005; Hassen وآخرون., 2007), أو علاقة تكافلية مثل جنس *Frankia* (تنتمي إلى الأكتينوبكتيريا) حيث تشكل علاقة تكافلية مع نباتات Actinorhizal حيث توفر *Frankia* النتروجين لهذه النباتات في مقابل حصولها على الكربون منها. حوالي 15% من النتروجين في العالم مثبت بفضل العلاقات التكافلية بين *Frankia* ونباتات Actinorhizal (Subramaniam وآخرون.، 2016). تصيب *Frankia* خلايا الجذر من نباتات Actinorhizal عن طرق آليتين: العدوى بين خلايا الشعيرات الجذرية أو الغزو بين خلايا الجذر. في الآلية الأولى: تخترق خيوط *Frankia* الشعيرات

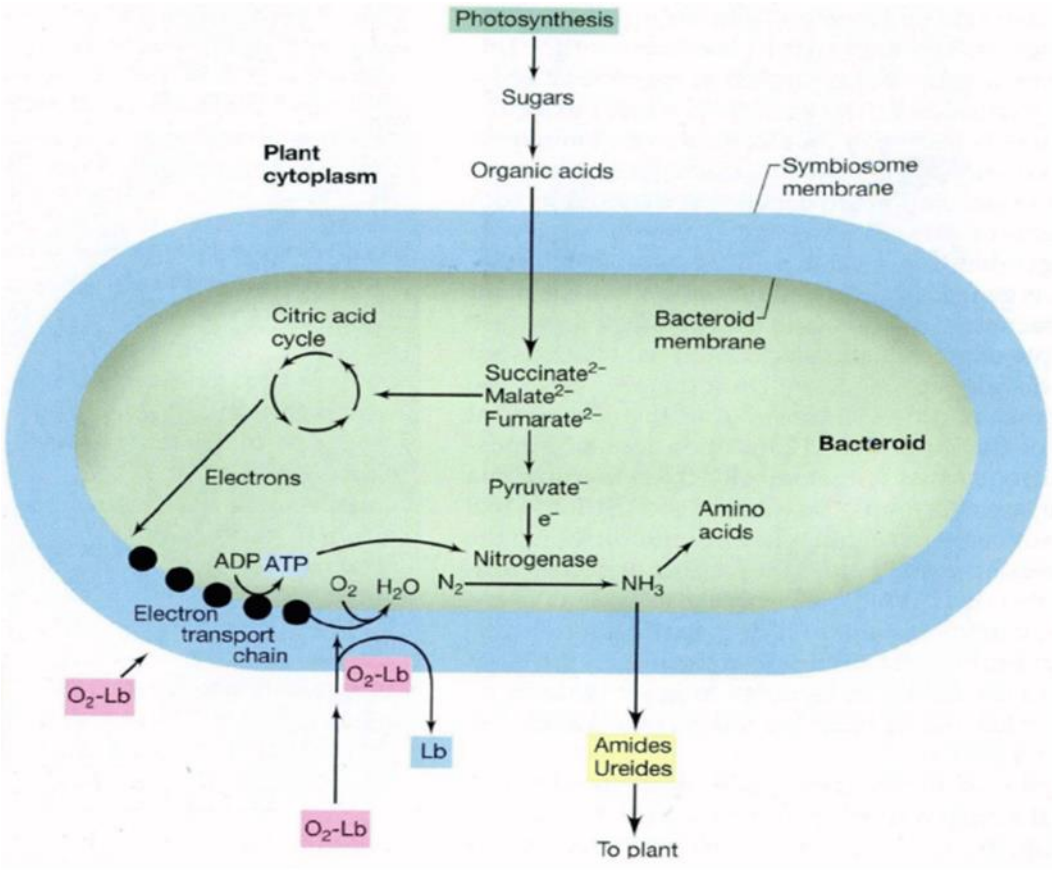
الجذرية أين يتم إعادة توجيه نمو الشعيرات الجذرية لتصبح منحنية مما يؤدي إلى تشكيل عقد أولية وهي بنية تكافلية بدائية ويستمر غزو الخلايا وصولا إلى الخلايا القشرية ثم إلى الطبقة المحيطية بالجذر حيث تتشكل Primordium من الإنقسامات الخلوية التي تحدث في خلايا الطبقة المحيطية وفي الأخير تتشكل عقيدات جذرية ناضجة. أما في الآلية الأخرى لا تخترق خيوط *Frankia* الشعيرات الجذرية وإنما تخترق الصفيحة الوسطى بين الخلايا المجاورة لبشرة الجذر ثم تغزو الخلايا القشرية ثم الطبقة المحيطة حيث تتشكل في الأخير عقيدات جذرية ناضجة. تساهم الإفرازات الجذرية مثل الفلافونويدات في تشكيل العقيدات الجذرية حيث تؤدي هذه الإفرازات إلى الجذب الكيميائي للأكتينوبكتيريا نحو الجذر (Hong، 1992 ).

*Casuarinagluca* نوع استوائي خشبي ذو نمو سريع، متأقلم جيدا مع الجفاف وله القدرة على إعادة تأهيل الأراضي المتدهورة، هذه الشجرة لها القدرة في مستوى الجذور على التعايش مع *Frankia* المثبتة للآزوت. ينتج عن هذا النظام التعايشي تكوين عقد أو actinorhizes والتي في مستواها تقوم *Frankia* بتحويل الآزوت الجوي إلى أمونياك يمكن إستعماله من قبل النبات العائل (Benabdoun واخرون.، 2012)،

يحدث تثبيت النتروجين على مستوى العقيدات الجذرية تحت تحفيز إنزيم النتروجيناز وهو إنزيم معقد يتكون من تحت وحدتين، الأولى تحتوي على الحديد والموليبدنوم والأخرى تحتوي على الحديد فقط (Benmati، 2014).

يتم تحويل $N_2$ إلى $NH_3$ وفق المعادلة التالية:

$$N_2 + 8Fd_{red} + 8H^+ + 16\ ATP \longrightarrow NH_3 + H_2 + 8Fd_{ox} + 16\ ADP + 16\ Pi$$




**الشكل 2:** تمثيل التفاعلات الكيميائية والاستقلابية في البكتيريا PGPR في تثبيت النتروجين

(Madigan et al. 2000)

### 2.II. الهرمونات النباتية

الهرمونات النباتية عبارة عن مواد عضوية تنتج في خلايا محددة بتراكيز ضعيفة ويتم تأثيرها في نقاط بعيدة من مناطق تكوينها، غير نوعية التأثير، طبيعية التكوين وعندما يتم تصنيعها كيميائيا تسمى منظمات نمو النبات (kaya واخرون.، 2009) ومنه فإن ما نلاحظه من مظاهر النمو قد يكون محصلة لتأثير الهرمونات المختلفة (Nizar، 1999).

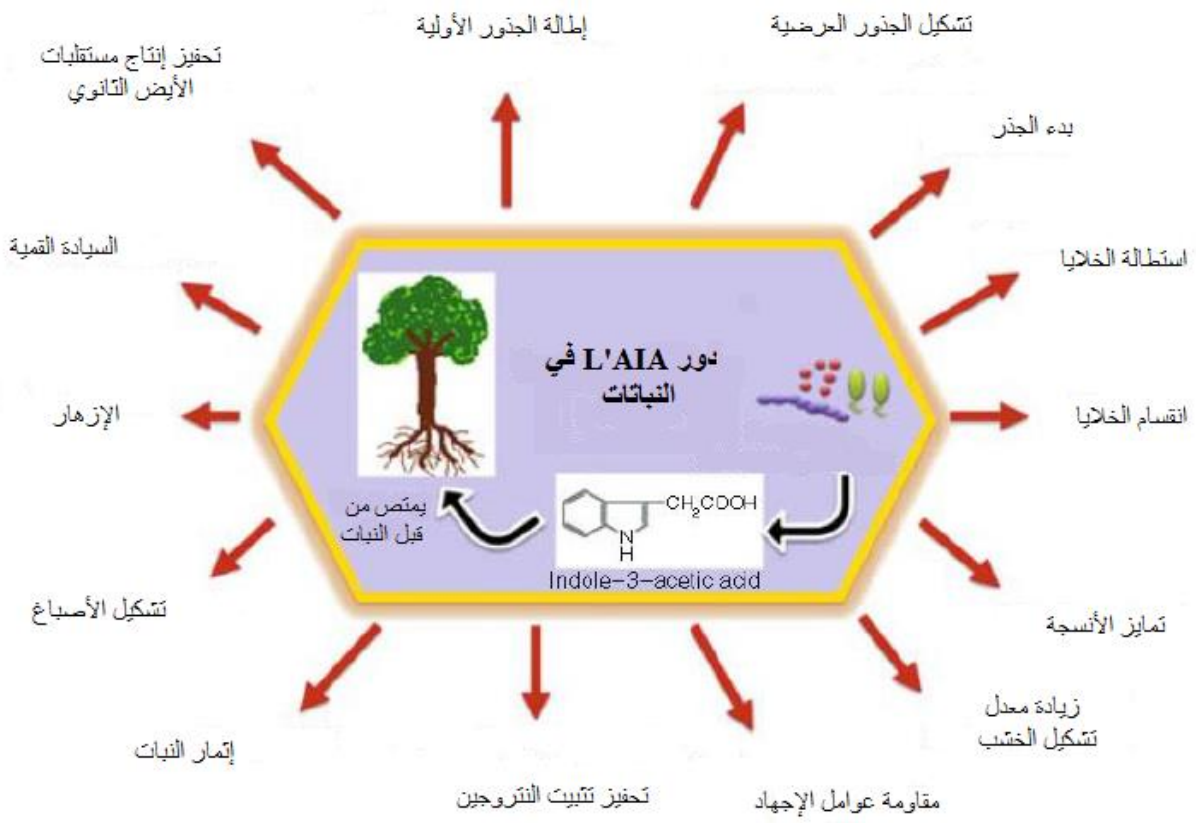
الهرمونات النباتية هي جزيئات صغيرة تنظم نمو النبات مثل: إنقسام وإستطالة الخلايا، تحفيز تكوين الجذور، تمايز الأنسجة.، الخ.، كما أنها تلعب دورا هاما في استجابة النبات للإجهادات الحيوية واللاحيوية (Kerbab، 2012). ومن المثير للإهتمام أن الهرمونات النباتية لا يتم تركيبها من قبل النباتات فقط ولكن أيضا من قبل الكائنات الدقيقة بما في ذلك الفطريات والبكتيريا (Solans وآخرون.، 2011). لقد أظهرت العديد من الدراسات قدرة الأكتينوبكتيريا على إنتاج أو تعديل الهرمونات النباتية مثل: الأوكسينات، السيتوكينات، الجبريلينات، حمض الأبسيسيك والإثيلين (Sathya وآخرون.، 2017).

لهذه الهرمونات تأثير على العمليات الفيزيولوجية والمورفولوجية للنباتات ولكل هرمون تأثيرات متعددة حسب تركيزه، موقع عمله ومرحلة نمو للنبات (Subramaniam وآخرون.، 2016). تؤثر الهرمونات النباتية المنتجة من قبل الأكتينوبكتيريا بتراكيز منخفضة جدا وهي كيميائيا متطابقة أو مماثلة للهرمونات النباتية المنتجة من قبل النباتات (Benmati ،2014).

من امثلة البكتيريا: *Azospirillum* نوع *lipoferum* تؤثر نمو وتثبيت النتروجين الجوي لصنفين من نبات القمح (جيزة 167، صنف محلي) ، حيث أدى التلقيح ببكتيريا *Azospirillum* إلى زيادة النتروجين المثبت من الهواء الجوي (Bashan واخرون.،2004).

## II. 2. 1. L'AIA (Acide Indole-3-Acétique)

تنتج كثير من الأنواع البكتيرية L'AIA إنطلاقا من التمثيل الغذائي لـL-tryptophan (Kebab،2012)، وهو الأوكسين الأكثر نشاطا من الناحية الفيزيولوجية في النباتات والأكثر إنتاجا من بين الأوكسينات الأخرى التي تنتجها البكتيريا مثل: L'AIB (Acide Indole-3-butyric) وL'AIP (Acide Indole-3-pyruvic) (Solans وآخرون.، 2011). يعزز L'AIA النمو النباتي من خلال تأثيره على إنقسام و إستطالة الخلايا، تمايز الأنسجة، إنبات الدرنات، مراقبة عملية النمو الخضري، بدء تشكيل الجذور، الإنتحاء الضوئي والأرضي، تشكيل الأصبغة، عملية التركيب الضوئي، نضج الفاكهة ( Subramaniam وآخرون.، 2016)، السيادة القمية، تطور البراعم الجانبية، تحفيز إنتاج الإثيلين، تطور الجذر مما يؤدي إلى تحسين إمتصاص المياه والمغذيات من قبل النباتات (Ameur، 2014) وتنظيم الجينات (Cherif، 2014). بالإضافة إلى تعزيز النمو النباتيلL'AIA له القدرة على تحفيز إنبات الأبواغ وتحفيز إنتاج مستقلبات الأيض الثانوي لدى الأكتينوبكتيريا. هناك 4 سلالات من الأكتينوبكتيريا بارزة في إنتاج L'AIA وهي: *Streptomyces* sp. GB09-03، *Streptomyces* sp. DF09-05، *Streptomyces*sp. HW05-10 و*Micrococcus* (Subramaniam وآخرون.، 2016)، *Azotobacter*، *A. chroococcum* ( Miraza واخرون .، 2001).




**الشكل 3:** دور L'AIA في تحسين النمو النباتي (Saghir; Khan وآخرون.، 2014).

### II .2. 2. السيتوكينات

السيتوكينات من مشتقات الأدنين (Subhash وآخرون.، 2010). للبكتيريا القدرة على إنتاج السيتوكينات حيث أن لهذه الأخيرة دورا هاما في تعزيز النمو النباتي فهي تؤثر على إنقسام الخلايا، زيادة مساحة سطح الجذر، إنتشار الجذور(Subramaniam وآخرون.، 2016)، تفعيل إنبات البذور، تراكم الكلوروفيل وتأخير شيخوخة النبات. بالإضافة إلى ذلك للسيتوكينات القدرة على تحفيز التعبير عن بعض الجينات النباتية بما في ذلك الجين الذي يعبر عن بروتين التوسع الذي يعمل على تخفيف جدران الخلية النباتية وتسهيل التوسع في الخلية النباتية وهذا له تأثير على حجم وشكل الخلايا (Cherif،2014)، كما أنها تزيد من مقاومة النبات للحشرات والفيروسات والبكتيريا من خلال تحفيز التعبير عن الجينات الدفاعية (Stephen وآخرون.، 2005). **(شكل 4،5)**

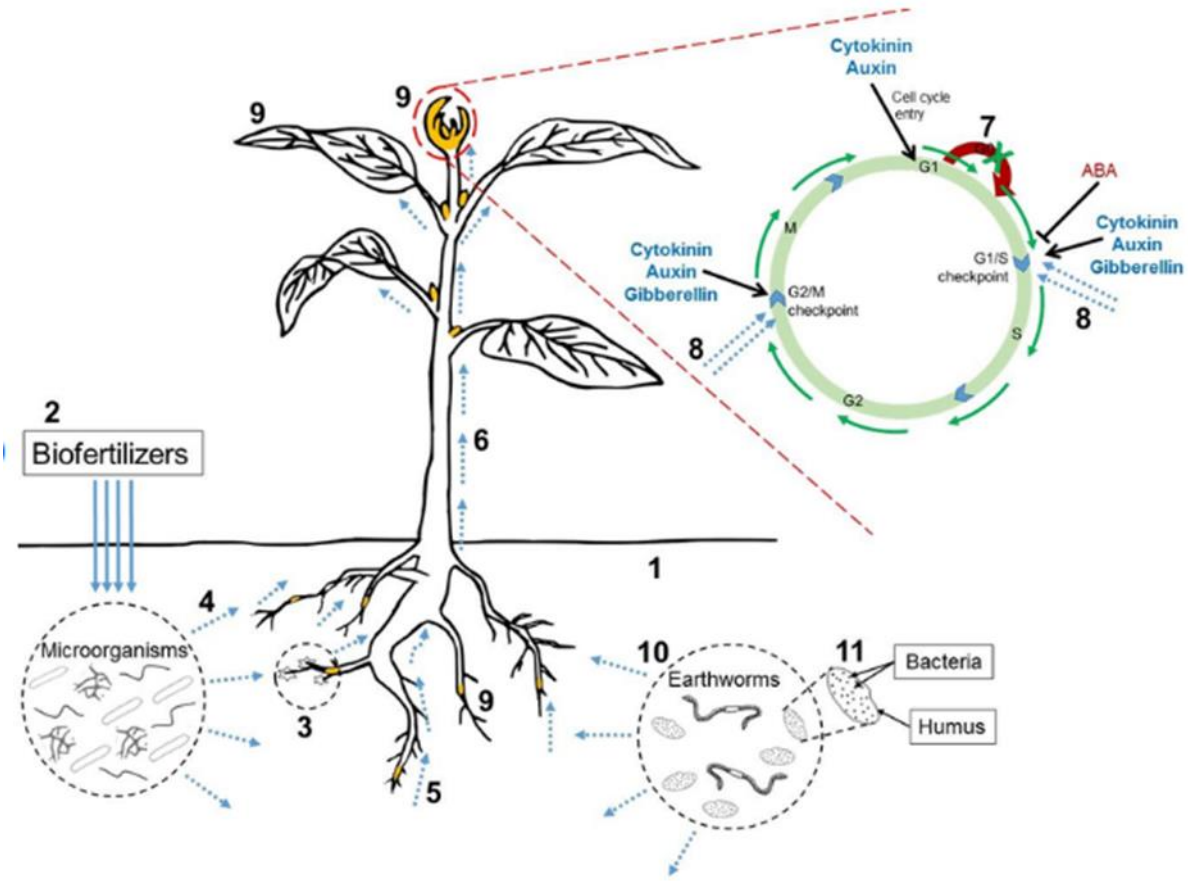
### II.2. 3. الجبريلينات

مصطلح الجبريلينات مشتق من الاسم العلمي لفطر *Gibberellafujikuroi* الذي يصيب بادرات الأرز بعملقة في سلاميات الساق (kurosawa، 1926).

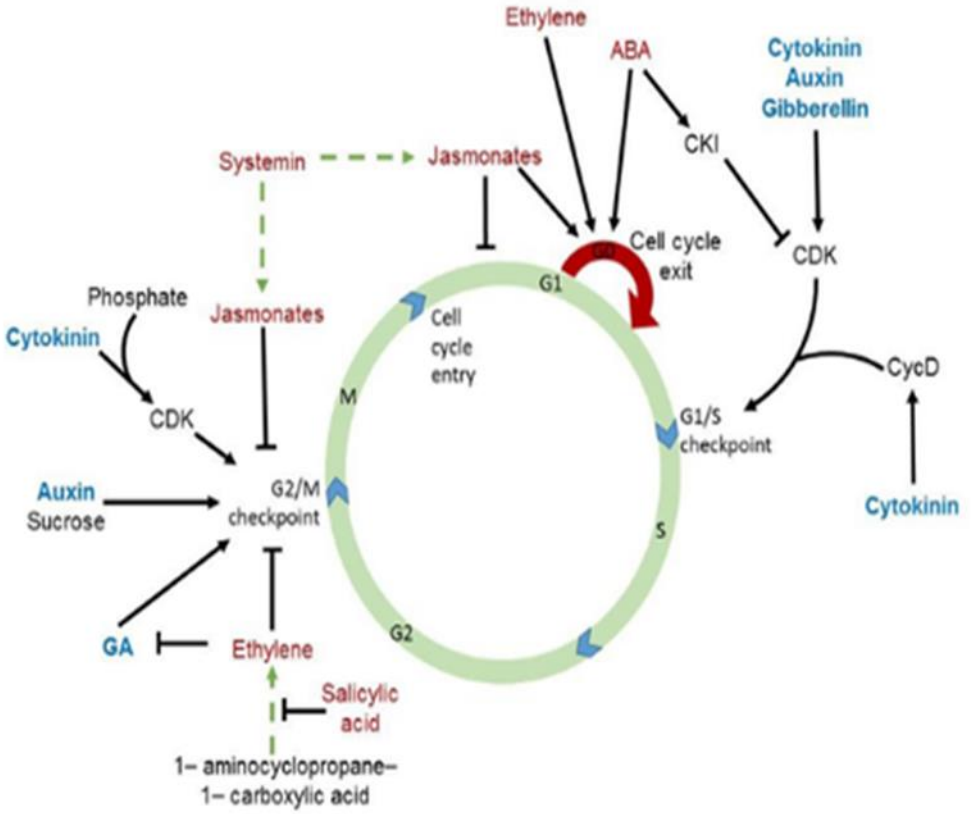
الجبريلينات هي عبارة عن أحماض Diterpénoiques تتكون من بقايا Isoprèniques (Cherif، 2014)، وقد ذكرت العديد من الدراسات قدرة الأكتينوبكتيريا على إنتاج الجبريلين حيث يؤثر على إنقسام وإستطالة الخلايا، الإثمار، تأخير شيخوخة العديد من النباتات (Zamoum،2016)، تمديد الأنسجة الجذعية، إستطالة الساق، إنبات البذور، الإزهار (Stephen وآخرون.، 2005). **(شكل 4،5)**

### II. 2. 4. الإثيلين

يتم تركيب الإثيلين انطلاقا من الحمض الأميني ميثيونين Met حيث يتحول الميثيونين إلى S− adenosyl methionine (SAM) بواسطة إنزيم SAM synthase و SAM يتحول إلى 1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC) بواسطة إنزيم ACC synthaze وأخيرا يتم تحويل ACC إلى الإثيلين من قبل إنزيم ACCoxidase. وتنتج النباتات مستويات عالية من الإثيلين إستجابة للعديد من الضغوطات الحيوية واللاحيوية مثل: الملوحة العالية، درجات الحرارة القصوى، المعادن الثقيلة، الجفاف ومسببات الأمراض النباتية، إلا أن التراكيز العالية للإثيلين تؤثر سلبا على نمو النبات حيث يمنع إستطالة جذر النبات، تثبيط تشكيل العقيدات الجذرية وقد يؤدي إلى الشيخوخة المبكرة للنباتات أو حتى موتها وهذا ما يسمى "بإجهاد الإثيلين". لقد ذكرت العديد من الدراسات دور بعض البكتيريا في مساعدة النبات على تحمل إجهاد الإثيلين من خلال إنتاج إنزيم ACC deaminase الذي يعمل على تحويل ACC (طليعة الإثيلين) إلى أمونيا وα-Ketobturyrate وبالتالي خفض مستويات الإثيلين التي ينتجها النبات ما يؤدي إلى تعزيز إستطالة جذر النبات وإعادة تشكيل العقيدات الجذرية (Subramaniam وآخرون.، 2016).




**شكل 4 :** رسم تخطيطي أهمية بكتيريا PGPR في انتاج الهرمونات النباتية .**(1)** : توفر التربة.**(2)**: إدخال الأسمدة الحيو .**(3)** :التعايش مع النباتات (في الجذور) – **(4)** :انتاج إنزيمات و الهرمونات النباتية الأولية (السيتوكينين والأوكسينات بشكل رئيسي) . **(5)** : الهرمونات النباتية ، يتم امتصاصها بواسطة النبات ، عبر الجذور ، و **(6)** : يتم نقلها إلى / أو بالقرب من مواقع النمو النشط ، أي النتوءات ، من خلال نسيج الخشب .**(7)** :.تساعد الهرمونات النباتية الخلايا على تجاوز مرحلة G0 و **(8)**. : تحفيز الهرمونات لإنقسامات خلوية نشطة ، وإنتاج المزيد من الخلايا ، ونمو النبات .**(9)** : تنظم الهرمونات النباتية المنقولة إلى الأجزاء الأخرى من النباتات أيضًا العديد من العمليات البيولوجية مثل فتح الثغور ، وإنتاج البلاستيدات الخضراء ، وتطور الأزهار ، وتطور الجذور .**(10)** :تنتج ديدان الأرض السماد الدودي الذي يحتوي على الهرمونات النباتية (من خلال الأنشطة الميكروبية المعوية لديدان الأرض) التي يتم إطلاقها في التربة .**(11)** :يحتوي السماد الدودي أيضًا على الدبال الذي يسمح للبكتيريا المفيدة بالتكاثر




**شكل 5 :** رسم تخطيطي لدورة الخلية النباتية والإجراءات التنظيمية للهرمونات النباتية .يتم تنظيم دورة الخلية النباتية في الغالب بواسطة الهرمونات النباتية بينما تمارس العوامل الأخرى درجات متفاوتة من الضوابط في ظل ظروف بيئية (غير حيوية) وأحيائية مختلفة يتعرض فيها النبات بالكامل .بشكل عام ، تلعب الأكسينات والسيتوكينين والجبريلين أدوارًا تحفيزية ؛ بينما حمض الأبسيسيك (ABA) والإيثيلين والجاسمونيت يمنعان تطور .

**الجدول1.** الهرمونات النباتية المنتجة أو المعدلة بواسطة بعض الأجناس البكتيرية (Subramaniam وأخرون.، 2016).

| الهرمون النباتي | الجنس البكتيري | وظيفته في النبات |
|---|---|---|
| حمض-3-اندول أسيتيك | *Pseudomonas Stenotrophomonas Streptomyces Frankia* | تحفيز نمو البذور والدرنات، تشكيل الجذور العرضية وتحفيز إنتاج مستقلبات الأيض الثانوي. |
| البراسينولايد | *Pseudomonas Streptomyces* | زيادة محتوى الكلوروفيل، تحفيز بناء البروتينات، تنشيط بعض الإنزيمات وتنظيم التمايز الخلوي. |
| حمض السالسليك | *Pseudomonas Streptomyces* | تثبيط التركيب الحيوي للإثيلينوتسهيل تلقيح بعض النباتات. |
| سيتوكينين | *Pseudomonas Stenotrophomonas Micromonospora Streptomyces Actinoplanes* | تأخير شيخوخة النبات ودور فيمقاومة النبات للعوامل الممرضة. |
| حمض جاسمونيك | *Streptomycs* | نضج الثمار، تشكيل الثمار وتشكيل الأصباغ. |
| جبريلين | *Pseudomonas Stenotrophomonas Micromonospora Frankia Actinoplanes Streptomyces* | نحفيز استطالة الساق من خلالتحفيز استطالة وانقسام الخلايا والإزهار. |
| سيروتينين | *Streptomyces* | إنتاج AIA. |
| حمض الأبسيسيك | *Streptomyces* | إغلاق الثغور. |

### II. 3. إذابة الفوسفات

الفوسفور هو العنصر الرئيسي الأكثر أهمية في تغذية النبات بعد النتروجين ويمثل حوالي 0.2-0.8% من وزن المادة الجافة النباتية و يلعب دورا هاما في جميع عمليات البناء الحيوية الرئيسية في النبات تقريبا بما في ذلك التركيب الضوئي، نقل الطاقة (ATP، ADP)، البناء الحيوي للأحماض النووية (ADN، ARN، $ARN_t$) والتنفس. على الرغم من وفرة الفوسفور في التربة في الأشكال العضوية وغير العضوية على حد سواء إلا أن معظم هذا الفوسفور غير ميسر للنبات. 1% فقط من

فوسفور التربة قابل للإمتصاص من قبل النباتات بسبب قلة ذوبانه في التربة. لتلبية احتياج النبات للفوسفور عادة ما تضاف الأسمدة الفوسفاتية القابلة للذوبان إلى التربة، إلا أن هذه الأسمدة سرعان ما تتحول إلى أشكال غير قابلة للذوبان حيث ترتبط مع أيونات الكالسيوم $Ca^{+2}$ في الترب القاعدية ومع أيونات الحديد $Fe^{+2}$ وأيونات الألمنيوم $Al^{+3}$ في الترب الحامضية (Sharma وآخرون.، 2013).

ذكرت العديد من الدراسات قدرة عديد من البكتيريا على تحويل الفوسفور غير القابل للذوبان إلى فوسفور قابل للذوبان ($H_2PO_4^-$ أو $HPO_4^{-2}$) وهي الأشكال التي يمكن إمتصاصها من قبل النبات. توفر الأكتينوبكتيريا أيونات الفوسفور للنبات إما بإذابة الفوسفور المعدني أو معدنة الفوسفور العضوي (Subramaniam وآخرون.، 2016).

هناك أنواع من البكتيريا ذات الكفاءة على اذابة الفوسفات المعدني من خلال إنتاجها للأحماض العضوية ذات أوزان جزئية منخفضة مثل: حمض الفورميك ، حمض الأوكزالك ، فيتك، حمض اللاكتيك ، الببروبيونيك والتي سوف تساعد من خلال مجاميع الهيدروكسيل والكربوكسيل على تحرير حامض الفسفوريك $H_2PO_4$ من المجاميع العضوية (Rodrigues و Farga،1999) مثل : *Azotobacter chroococcum* و *A. vinelandii* و *A. beijerinckii* (Dashti،2001؛ Paul و Sinha ، 2013).

### II. 3. 1. إذابة الفوسفور المعدني

يتواجد الفوسفور المعدني على شكل فوسفات الحديد ($FePO_4$)، فوسفات الألمنيوم ($AlPO_4$) وفوسفات المنغنيز ($MnPO_4$) في الترب الحامضية وعلى شكل فوسفات ثلاثي الكالسيوم $Ca_3(PO_4)_2$ في الترب القاعدية (ميلاد، 2012).

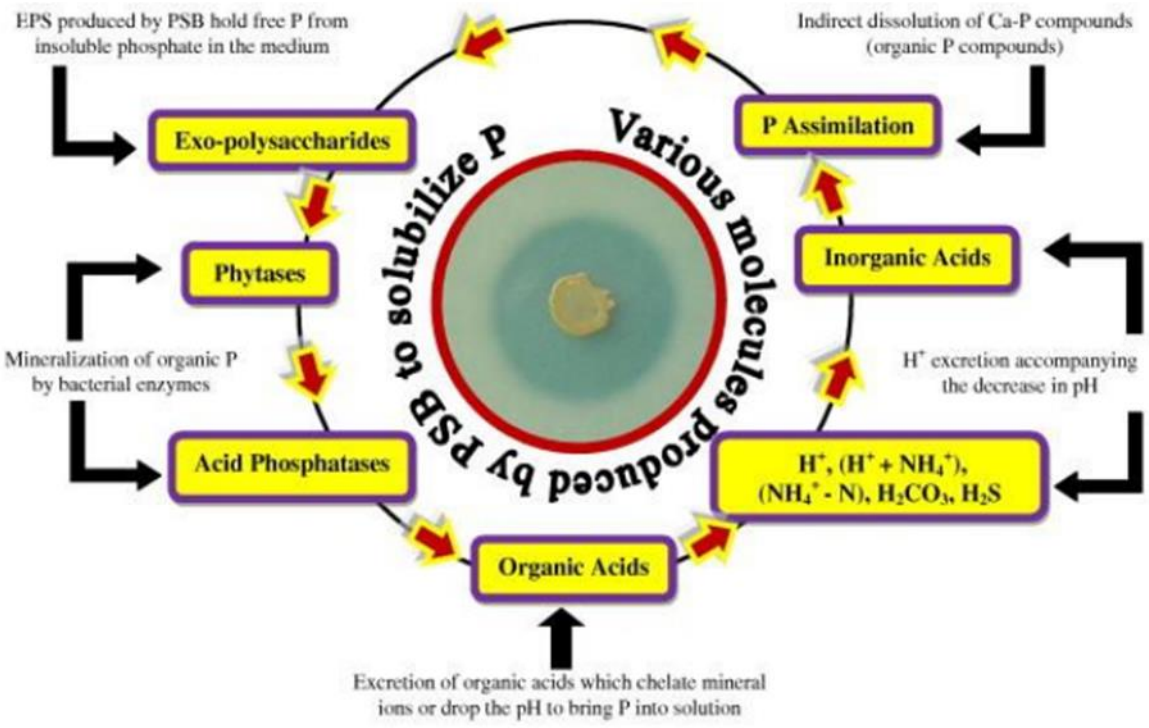
تقوم البكتيريا المذيبة للفوسفور بإذابة الفوسفور المعدني وتحفيز نمو وإنتاجية النبات من خلال إفراز الأحماض العضوية ذات الوزن الجزيئي الصغير مثل: حمض الغلوكونيك، حمض الستريك، حمض اللبن، حمض الماليك، حمض الأكساليك، حمض البيروفات.، الخ. تؤدي هذه الأحماض إلى تحمض التربة مما يؤدي في نهاية المطاف إلى الإفراج عن أيونات الفوسفور وذلك بإستبدال الكاتيونات المرتبطة بالفوسفور ($Fe^{+2}$، $Al^{+3}$، $Ca^{+2}$) بـ $H^+$. وبالتالي توفير أيونات الفوسفور للنبات (Subramaniam وآخرون.، 2016).

### II. 3. 2. معدنة الفوسفور العضوي

يشكل الفوسفور العضوي 20-80% من الفوسفور الكلي للتربة ويوجد على شكل أحماض نووية، فوسفوليبدات، فوسفات أحادي الأستر وفوسفات متعددة الأستر. الفوسفور العضوي غير ميسر للنبات لأنه غير قابل للإمتصاص (Ali Majed، 2016).

يمكن لأنواع من البكتيريا تحويل الفوسفور العضوي إلى فوسفور معدني قابل للذوبان عن طريق عملية تسمى "بمعدنة الفوسفور العضوي" وذلك بإنتاج إنزيمات الفوسفتاز وتنقسم هذه الإنزيمات إلى إنزيمات الفوسفتاز الحامضية وإنزيمات الفوسفتاز القاعدية وكلاهما يمكن أن تنتجهما الأكتينوبكتيريا اعتمادا على الظروف الخارجية حيث تسود الفوسفتاز الحامضية في التربة الحامضية في حين أن الفوسفتاز القاعدية تكون أكثر وفرة في التربة المتعادلة والقاعدية. تفرز الأكتينوبكتيريا إنزيم الفوسفتاز خارج الخلية ليعمل على تحلل المادة العضوية وتحرير أيونات الفوسفور لتصبح ميسرة للنبات (Sharma وآخرون.، 2013). من بين أمثلة البكتيريا المسؤولة عن معدنة الفسفات العضوي

*Azospirillum*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces* spp.




**شكل6** : أليات عمل بكتيريا PGPRS في إذابة الفسفور وأنتاج الحمض العضوي (Khan et al., 2009)

### II. 4. التقاط الحديد

الحديد عنصر أساسي لنمو كل من النباتات والكائنات الحية الدقيقة، يوجد بتراكيز قليلة في الريزوسفير، ويكون غير ميسر للإستعمال من قبل النباتات والكائنات الحية الدقيقة حيث يكون معظمه على شكل هيدروكسيد وأوكسي هيدروكسيد غير القابل للذوبان. لبعض البكتيريا القدرة على عزل واكتساب الحديد من محلول التربة وتوفيره للنباتات والكائنات الحية الدقيقة عن طريق تركيب قابضات الحديدSiderophores (Subramaniam وآخرون.، 2016).

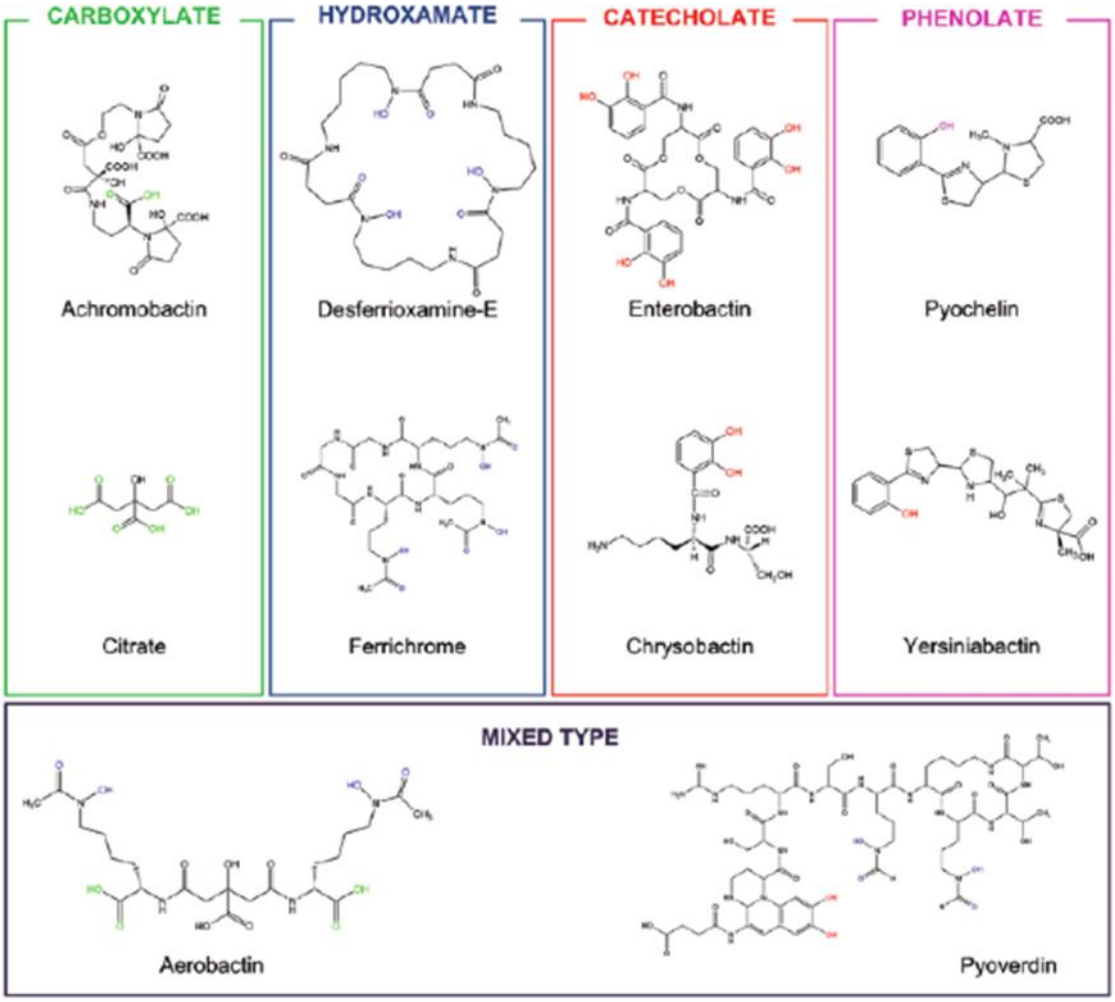
يعتبر الجنس *Pseudomonas* من أهم الكائنات الحية الدقيقة القادرة على إكتساب الحديد وإنتاج قابضات الحديد (Marcela و Vanessa، 2016). كلمة Siderophores مشتقة من كلمتين إغريقيتين: Sidêros التي تعني حديد و Phore التي تعني حامل أي حاملة الحديد وهي من النظم الأكثر كفاءة لإكتساب الحديد (Mezaache، 2012).

مخلبيات الحديد مركبات ذات وزن جزيئي منخفض من 200 إلى 2000 دالتون، لها قدرة عالية على جذب الحديد، هذه المركبات الحديدية قادرة على إكتساب جزيئات $Fe^{3+}$ بواسطة الأكتينوبكتيريا بإستعمال مستقبلات خاصة وتجعلها متاحة للنبات، ويحدث إنتاجها حتى في تراكيز منخفضة للحديد (Marcela و Vanessa، 2016)، حيث يؤدي ذلك إلى إلى طرح المنافسة الغذائية على الكائنات المسببة للأمراض على مستوى الجذور وبالتالي تمنع نموها، بالإضافة إلى المنافسة الغذائية تساهم المنافسة على المكان أيضا في الحد من الإلتهابات الجذرية التي تسببها العوامل الممرضة للنبات (Zamoum،2016)، كما أن قابضات الحديد قادرة على توفير آليات المقاومة في النبات العائل، كذلك لها القدرة على تعزيز النمو النباتي عن طريق الوقاية من الآثار الضارة للكائنات الحية الممرضة للنبات، كما لها القدرة على تشكيل مركبات مع معادن ثقيلة أخرى في الريزوسفير وتقلل من الآثار السامة لأيونات هذه المعادن، فهي تعتبر وسيلة فعالة لمكافحة الكائنات المسببة للأمراض النباتية وبشكل خاص الكائنات التي تنتج قابضات ذات قدرة منخفضة على جذب الحديد (Subramaniam وآخرون.، 2016).

عرفت العديد من سلالات البكتيريا *Agrobacterium, Bacillus, Escherichiai, Pseudomonas, Rhizobium* على أنها منتجة لقابضات الحديد، وهي مصنفة على أساس مجموعتها الوظيفية الكاتيكول والهيدروكزامات. كذلك تعتبر العديد من سلالات *Streptomyces* spp منتجة لمخلبيات الحديد مثل *S. pilosus*، *S .lydicus*، *S. violaceusniger* (Subramaniam وآخرون.، 2016).

تنتج سلالات من *Pseudomonas* أنواع متعددة من قابضات الحديد منها Heterobactin المنتجة من طرف *Rhodococcus* و*Nocardia*، Des ferrioxamines وCoelichelin المنتجة من طرف الجنس *Streptomyces* (Sathya وآخرون.، 2017)، وكذا Mycobactin المنتجة من طرف Mycobacteria (Wenfengوآخرون.، 2014).

بإمكان الأكتينوبكتيريا القادرة على إنتاج قابضات الحديد ( شكل 7) منع نمو *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*، *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* التي تهاجم الطماطم (Zamoum،2016)، كما أن مخلبيات الحديد المنتجة من طرف الجنس *Streptomyces* لها القدرة على السيطرة على *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* الممرضة للحمص (Sathya وآخرون.، 2017).




**شكل 7 :** التركيبات الجزئية المختلفة للواقط الحديد Siderophore و بنيتها الوظيفية

### II. 5. إنتاج الـ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC desaminase)

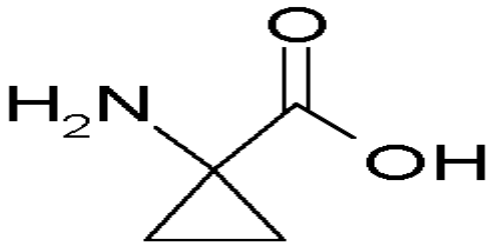
الإيثيلين هو هرمون النبات الذى ينظم في ظل الظروف العادية العديد من العمليات الفيزيولوجية مثل إنبات البذور، تشكيل الجذور وإستطالتها، نضج الفاكهة، تشكيل العقيدات، كما يتحكم في العديد من آليات الدفاع ضد الممرضات النباتية.

يعتبر الإيثيلين أيضا هرمون الإجهاد، يركب في النبات وتزداد كميته في عدد من الضغوط الحيوية واللاحيوية.في التراكيز العالية. يمنع الإيثيلين نمو وتطور النباتات، كما يمنع إنغلاق الثغور مما يزيد من معدل النتح وذلك عن طريق تثبيط حمض الأبسيسيك (ABA)(Saghir , Khanوآخرون.، 2014؛Benmati، 2014).

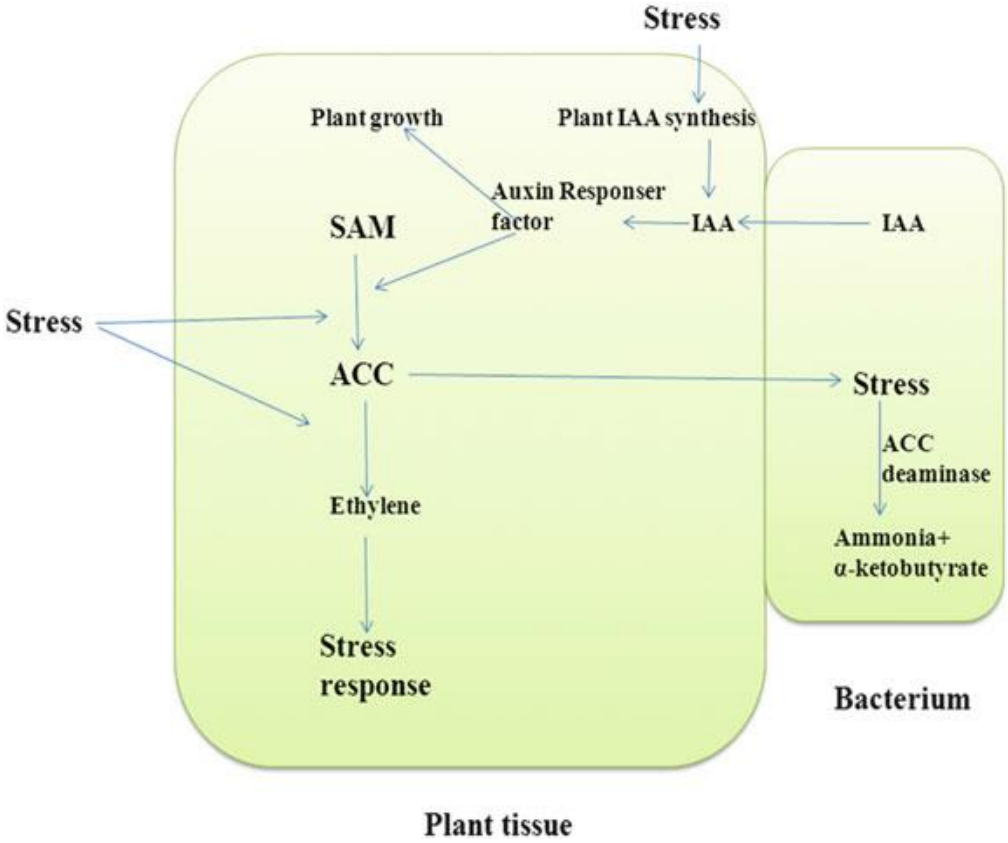
من المحتمل أن تسبب عوامل الإجهاد اللاحيوية مثل درجات الحرارة القصوى، الجفاف، الفيضانات، الملوحة، الإجهاد المعدني، الإجهاد الغذائي أثارا خطيرة على إنتاجية المحاصيل وتفرض ضغوطا شديدة على التربة وموارد المياه. وفقا لتقديرات منظمة الغذاء والزراعة (FAO). تسبب عوامل الإجهاد اللاحيوية تدهور 30% من الأراضي في السنوات الـ 25 المقبلة، وتصل إلى 50% بحلول عام 2050 إذا لم تتخذ تدابير وقائية.

هناك العديد من البكتيريا مثل *Alcaligenes* spp., *Bacilluspumilus, Burkholderiacepacia, Enterobactercloacae, Methylobacterium fujisawaense, Ralstonia solanacearum, Pseudomonas* spp تستطيع تحفيز نمو النبات عن طريق الحد من مستويات الإيثيلين في النباتات خصوصا الموجودة تحت الضغوط الحيوية واللاحيوية ويعزى ذلك إلى إنتاجها لـ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate desaminase الذى يحلل ACC (المركب الذى يشارك في تكوين الإيثيلين لدى النباتات)، نتائج هذا التحلل ammonium و/أو α- cétobutyrate التي يمكن أن تستعملهما البكتيريا كمصدر للأزوت و/أو للكربون. ينتج عن بعد نشاط إزالة الإيثيلين تغيرات مورفولوجية كبيرة في الأنسجة الجذرية مثل التغيرات في طول الجذور والزيادة في كتلتها يرافقه فيما بعد تحسين امتصاص المغذيات (Sathya وآخرون.، 2017؛ Saghir Khan وآخرون.، 2014).

لاحظ Palaniyandi وآخرون تعزيز الكتلة الحية والجذور الجانبية لشتلات الـ *Arabidopsis* تحت ظروف المخبر في mol1 من الـNaCl بعد التلقيح بـ *Streptomyces* sp. (Subramaniam وآخرون.،2017).




**الشكل 8** : البنية الكيميائية للـ ACC (Benmati، 2014).




**الشكل 9:** نموذج يشرح كيفية عمل الـ ACC desaminase(Sghir Khan وآخرون.، 2014).

## III. التعزيز غير المباشر للنمو النباتي من طرف البكتيريا.

تؤثر البكتيريا بشكل غير مباشر على نمو النبات عن طريق التحكم والتقليل من الآثار الضارة للضغوط الخارجية الحيوية واللاحيوية من خلال مايلي: إنتاج المضادات الحيوية، الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية، إنتاج المواد الطيارة (HCN)، المنافسة على المغذيات، المقاومة الجهازية المستحثة.، إلخ. (Subramaniam وآخرون.، 2017؛ Zamoum، 2016).

### III. 1. إنتاج المضادات الحيوية

التضاد الحيوي Antibiosis هو تثبيط العامل الممرض للنبات عن طريق إنتاج مستقلبات ثانوية من قبل كائنات دقيقة أخرى تسمى هذه المواد المضادات الحيوية.

عموما، المضادات الحيوية مواد أيض ثانوية ذات وزن جزيئي منخفض تكون مضادة للفطريات و/أو للبكتيريا، لها دور هام في تثبيط العوامل الممرضة للنبات واستعمار منطقة الجذور للنباتات (Zamoum، 2016)، بالإضافة إلى نشاطها ضد البكتيريا والفطريات فإن هذه الجزيئات قد تختص في أنشطة بيولوجية أخرى مثلا: مثبطة للإنزيمات، مضادة للأورام، مبيدة للحشرات ومبيدة للأعشاب الضارة (Lahoum، 2017).

لقد كان العصر الذهبي لإكتشاف المضادات الحيوية في الفترة 1940–1960 بجهود العالم Waksmanحيث قام مع زملائه بعزل العديد من المضادات الحيوية المنتجة من طرف الأكتينوبكتيريا (Belyagoubi، 2014)، كما شهدت السنوات الأخيرة تقدما جيدا في عزل هذه المضادات الحيوية وذلك بسبب التطورات التكنولوجية في: سهولة العزل، التقدم في تقنيات التخمير، زيادة فهم التعامل بين النباتات والكائنات الحية الدقيقة والحشرات، تطور طرق فحص الكائنات الدقيقة، وجود تقنيات جديدة للكشف عن المركبات النشطة بيولوجيا من الكائنات الحية الدقيقة (Subramaniam وآخرون.، 2016).

حاليا، حوالي 45% من المضادات الحيوية المستخدمة تأتي من الأكتينوبكتيريا، حتى الآن تم الكشف عن 33500 من نواتج الأيض النشطة بيولوجيا منها13700منتجة من طرف الأكتينوبكتيريا (Subramaniam وآخرون.، 2016)، ومن بين عدة أنواع من الأكتينوبكتيريا تساهم *Streptomyces* بإنتاج 7600 مضاد حيوي وهذا ما يعادل 36% من جميع الجزيئات المنتجة من طرف الميكروبات، و80% من الجزيئات المنتجة من طرف الأكتينوبكتيريا (Lahoum،2017)، وقد كانت المضادات الأولى المعروفة للسيطرة على الأمراض النباتية *Cycloheximide*و*Streptomycine* التي تم الحصول عليها من *Streptomyces griseus* (Subramaniamوآخرون.، 2016).

يتأثر إنتاج المضادات الحيوية بعوامل غير حيوية (الأكسجين، درجة الحرارة، الرطوبة، درجة الحموضة) وحيوية (النبات المضيف، العامل الممرض، ميكروفلورا التربة وكثافة السلالة المضادة) (Goudjal، 2014).

تنتج الأكتينوبكتيريا مجموعة متنوعة من المضادات الحيوية ذات بنى كيميائية متنوعة مثل: البيبتيدات، البوليكيتيدات، التتراسيكلينات، الانتراسيكلينات، الأمينوغليكوسيدات، الفوسفوميسينات (Boughachiche، 2012).

يوجد العديد من المضادات الحيوية المنتجة من طرف الأكتينوبكتيريا نذكر منها: *Kasugamycin* المنتج من طرف *Streptomyces kasugaensis* و*Rhizofit* المنتج من طرف *Streptomyces rimosus* .، إلخ. (Subramaniam وآخرون.، 2016).

**الجدول2.** مختلف أنواع الأكتينوبكتيريا القادرة على إنتاج المضادات الحيوية (Subramaniam وآخرون.، 2016).

| أنواع الأكتينوبكتيريا | المضادات الحيوية |
|---|---|
| *Streptomyces sp.*<br>*S. alboniger*<br>*S. padanus* | Alnumycin, coronamycins, fungichromin, goadsporin, kakadumycins, pamamycin-607, rhodomycin |
| *Actinoplanes*<br>*Teichomyceticus* | Teichomycins, teicoplanin |
| *Actinoplanes* | Lipiarmycin |
| *A. utahensis* | Echinocandin |
| *Actinomadura sp.* | Cationomycin, chandrananimycins, Oxanthromicin |
| *Actinomadura spiralis* | Pyralomicins |
| *Microbispora sp.* | Cochinmicins, glucosylquestiomycin |
| *Micromonospora inyoensis* | Sisomicin |
| *Micromonospora carbonacea* | Everninomicin |
| *Nocardia spp.* | Nocathiacins |

أكدت العديد من الأعمال فعالية الأكتينوبكتيريا في تثبيط العوامل الممرضة للنبات، على سبيل المثال *Nocardiopsis dassonvillei* ضد *Fusarium oxysporumf* f. sp. *albedinis*، وكذلك *Streptomyces higroscopicus* var. *geldanus*، *S. rochei* و *S .padanus* ضد *Rhizoctoniasolani*. العديد من أنواع الجنس *Streptomyces* ذات فعالية في المكافحة البيولوجية لعدة أشكال خاصة لـ *Fusarium oxysporum*(Zamoum، 2016).

**الجدول3** .أمثلة لبعض الأكتينوبكتيريا المضادة للكائنات الممرضة (Subramaniam وآخرون.، 2016).

| الأكتينوبكتيريا | العوامل الممرضة |
|---|---|
| *Streptomyces spp.* | *Phoma medicaginis var. medicaginis* |
| *Streptomyces hygroscopicus* | *Bipolaris sorokiniana homeocarpaSclerotinia* |
| *Streptomyces spp.* | *Streptomyces scabies* |
| *Streptomyces spp.* | *Phytophthora medicaginis Phytophthora sojae* |
| *Streptomyces spp.* | *Phytophthora erythroseptica* |
| | *Pythium ultimum، S. sclerotiorum, R. Solani Mycosphaerella fijiensis* |
| *S. rochei* | *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* |
| *Streptomyces aureofaciens* | *Colletotrichum musae, f. sp. Oxysporum* |
| *Streptomyces ACTA1557 وACTA1383* | *R. solani* |
| *Streptomyces sp.* | *Colletotrichum orbiculare* |
| *Actinopoymorpha spp.* | *R. solani* |
| *S. rochei* | *S. sclerotiorum* |
| *Nocardioides spp. Streptomyces، Microbispora* | *Gaeumannomyces graminis var. tritici R. solani* |
| *Streptomyces albovinaceus, Streptomyces griseus Streptomyces virginiae* | *Moniliophthora perniciosa* |

لقد تم العثور على مستقلبات ثانوية منتجة من طرف الأكتينوبكتيريا سامة للكثير من الحشرات هي: tetranectin، avermectin، faerifungin، macrotetralides و flavonoids. Avermectins وهي مركبات تنتجها نوع جديد *Streptomycesavermitilis* معزولة من التربة، في البداية لوحظ كمركب فعال مضاد للديدان ولكن في وقت لاحق وجد أنه مبيد فعال للحشرات والقراد والنيماتيد (Subramaniam وآخرون.، 2016).

السبينوزين عائلة مميزة من المبيدات الحشرية معزولة من نوعين من *Saccharopolysporaspinosa*. تخمر *S. spinosa* ينتج العديد من مواد الأيض تسمى Spinosyn A وSpinosyn D، وهي إنتقائية جدا تجاه الحشرات المستهدفة مثل قشريات الجناح وذوات الجناحين وتكون أقل خصوصية ضد العديد من الحشرات المفيدة والأنواع غير المستهدفة. أهم ميزة لـ Spinosad الذي هو خليط محدد من SpinosynA وSpinosynD أنه أقل سمية تجاه الثديات والطيور والكائنات المائية مقارنة بالمبيدات الحشرية الأخرى مما يجعلها أكثر أمانا للإستخدام (Subramaniam وآخرون.، 2016).

كما يتم تسويق المركبات التجارية للمضادات الحيوية المنتجة من طرف الأكتينوبكتيريا من أجل مكافحة الأمراضالنباتية منها: Actinovate®، Actino-Iron®المنتجة من طرف *Streptomyces lydicus* WYEC 108، Mycostop® المنتجة من طرف *Streptomyces griseoviridis* K61 .،إلخ. (Subramaniam وآخرون.، 2016).

### III. 2. إنتاج الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية

الفطريات مسؤلة عن العديد من الخسائر الاقتصادية في المنتجات الزراعية خاصة البقوليات والحبوب مثل: الحمص، البازلاء، القمح .، الخ. وقد ذكرت العديد من الدراسات قدرة الأكتينوبكتيريا على تثبيط نمو الفطريات المسببة للأمراض النباتية مثل:*Phytophthora parasitiea*، *Rhizoctonia solani*، *Aspergillus flavus*، *A. niger*، *Fusarium oxysporum*، *Glomerella cingulata*، *Sclerotium rolfsii* و*Pythium ultimum*. من خلال إنتاج الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية مثل: الكيتيناز، بيروكسيداز، البروتياز، بكتاز، سليلاز، β-1,3-glucanases، الأميلاز، الليباز، فوسفوليباز .،إلخ. لهذه الإنزيمات القدرة على تحليل مكونات الجدار الخلوي للفطريات وبالتالي تسبب تحلل الخلايا الفطرية حيث يتكون الجدار الخلوي لمعظم مسببات الأمراض الفطرية من البوليمرات مثل: الكيتين، الغلوكوز، السليلوز، البروتينات والدهون (Subramaniam وآخرون.، 2016).

**الجدول 4.** الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية المنتجة من قبل السلالات العدائية من البكتيريا لمكافحة العوامل الممرضة للنبات (Palaniyandi وآخرون.، 2013).

| الإنزيمات المحللة | السلالة العدائية | العوامل الممرضة |
|---|---|---|
| كيتيناز وغلوكوناز | *S. cavourensis* SY224 | *C. gloeosporioides* |
| كيتيناز،غوكوناز وبروتياز | *Streptomyces* sp. 80 | *Sclerotinia sclerotiorum* |
| الكيتيناز الداخلية | *S. violaceusniger* XL-2 | *Phanerochaete chrysosporium*<br>*Postia placenta*<br>*Coriolus versicolor*<br>*Gloeophyllum trabeum* |
| β-glucanase | *Actinoplanes campanulatus* | *P. aphanidermatum* |
| كيتيناز | *S. halstedii* AJ-7 | *F. oxysporium* |
| β-glucanase | *S. violaceusniger strain* YCED-9 | *P. infestans* |
| β-1,3-glucanase | *M. carbonacea* | *Sclerotinia minor* |
| كيتيناز | *A. missouriensis* | *Plectosporium tabacinum* |
| سليلاز | *M. carbonacea* | *P. cinnamomi* |

### 3.III. إنتاج المواد الطيارة (HCN)

المواد الطيارة عبارة عن مركبات عضوية أو غير عضوية محبة للدهون ذات وزن جزيئي منخفض وضغط بخاري عال. تعرف جذور النباتات بإنتاج نواتج الأيض الطيارة والأكثر شيوعا هو حمض الهيدروسيانيك HCN، بعض الأحماض، الكحول، الكيتونات، الألدهيدات، الكبريتيدات (Maheshwari، 2010؛ Subramaniam وآخرون.، 2016).

تستطيع العديد من البكتيريا بما في ذلك الأكتينوبكتيريا إنتاج مركبات طيارة، بعض هذه المركبات تعتبر من آليات المراقبة الحيوية ضد العوامل الممرضة للنباتات (Maheshwari، 2010). HCN مركب طيار له تأثير سام مباشر ضد العوامل الممرضة للنباتات، يمنع السيتوكروم اوكسيداز C وبالتالي يمنع التنفس لدى العوامل الممرضة.

تستخدم بعض أنواع الجنس *Streptomyces* في المكافحة البيولوجية ضد العديد من الأمراض الفطرية التي تصيب النباتات بإنتاجها كميات كبيرة من HCN التي تعمل على تثبيط نمو العوامل الممرضة للنباتات وهذا بالعمل مع آليات أخرى مثل: إنتاج الكيتيناز، الغلوكاناز، السيليلاز.، إلخ. (Zamoum،2016).

### 4 .III . المنافسة على المغذيات

تؤثر إفرازات جذور النبات بشكل مباشر على المجتمع الميكروبي الموجود ضمن حدود الريزوسفير من خلال توفير ركائز النمو مثل: السكريات، الأحماض الأمينية، الأحماض العضوية، الأحماض الدهنية، النكليوتيدات، الستيرولات، الفيتامينات ومركبات أخرى تؤثر على نمو البكتيريا والفطريات. تتأثر كذلك النباتات بنشاطات الكائنات الحية الدقيقة المتواجدة في الريزوسفير (Subramaniam وآخرون.، 2016).

تشير الدلائل إلى أن البكتيريا ذات أهمية نوعية وكمية في الريزوسفير، حيث أنها تؤثر على نمو النبات وحماية جذوره ضد الفطريات المسببة للأمراض الجذرية.إن نقص المواد الغذائية يمكن أن يؤدي تلقائيا إلى موت العامل الممرض للنبات وهذا يجعل المنافسة الغذائية آلية هامة في المكافحة البيولوجية (Dolumbou وآخرون.، 2017؛ Zamoum، 2016).

*Streptomyces griseovidis* هو مثال جيد لإستعمار منطقة الريزوسفير بواسطة البكتيريا الذي يعتبر فعال في المراقبة الحيوية لأمراض النبات مثل ذبول القرنفل الفيزاريومي (Dolumbou وآخرون.، 2017).

### III. 5. المقاومة الجهازية المستحثة (ISR)

عرف مفهوم استحثاث المقاومة في النبات في بداية القرن العشرين وأول من وصفه هما العالمين مولر وبورغر عام 1940في استحثاث المقاومة الموضعية (Induced local resistance) في تجارب البطاطا ضد مرض اللفحة المتأخرة *Phytophthora infestans* عند استخدامه لفطريات ممرضة واخرى غير ممرضة ، وتم ايضاح في دراسات لاحقة مفهوم الدفاع الفعال للنبات والذي سمي بالمقاومة النباتية وكشف أساس استجابة النبات بعد الاصابة لمركبات كيميائية سميت بالفايتواليكسينات . وعرفت المقاومة الجهازية المستحثة في النبات لأول مرة عام 1959 عن طريق العالم Ku´c . و اشارت دراسات الى استحثاث المقاومة في عدد من النباتات ولكن بدأت بالتفصيل العلمي ضد مرض جرب التفاح *Venturia inaequalis* عن طريق معاملة الاوراق السفلية بالمركبين D–phenyl– alanine و D–alanine aminoisobutyric acid الا ان تراكيز مختلفة من هذه الاحماض الامينية لم تثبط نمو مسببات الامراض مختبريا . وبعدها بدأت دراسات تسعى الى تعزيز المقاومة الجهازية في النبات وخصوصا ضد فايروسات النبات عند تلقيح الاوراق السفلية للتبغ بسلالات محلية من فايروس تبرقش التبغ TMV (http://agri-palm.com).

المقاومة هي واحدة من أفضل الآليات التي تتبعها النباتات للوقاية من مسببات الأمراض والآفات التي تصيبها (Subramaniam وآخرون.، 2016). المقاومة عموما طبقا لتعريف اجريوس1988 هي مقدرة النبات على منع أو التغلب الكامل أو بعض منه على تأثير المسبب المرضي .هناك نوعان من أنظمة الدفاع غير المخصصة في النبات: مقاومة جهازية مستحثة تحدثها الميكروبات المفيدة(ISR) Benificial microbe-induced systemic resistance، ومقاومة مكتسبة تحدثها العوامل الممرضة Systemic Aquired Resistance (SAR)، في كل من النوعين يتم منح الحماية لكل أجزاء النبات حتى غير المصابة (Sathya وآخرون.، 2017)( شكل 9)

بشكل عام، تتم أنظمة الدفاع عن طريق جزيئات مثل حمض الجسمونيك JA، حمض الساليسيليك SA، الإيثيلين ET. ينشط حمض الجسمونيك الجينات ذات الصلة بالدفاع: definsines، thionines

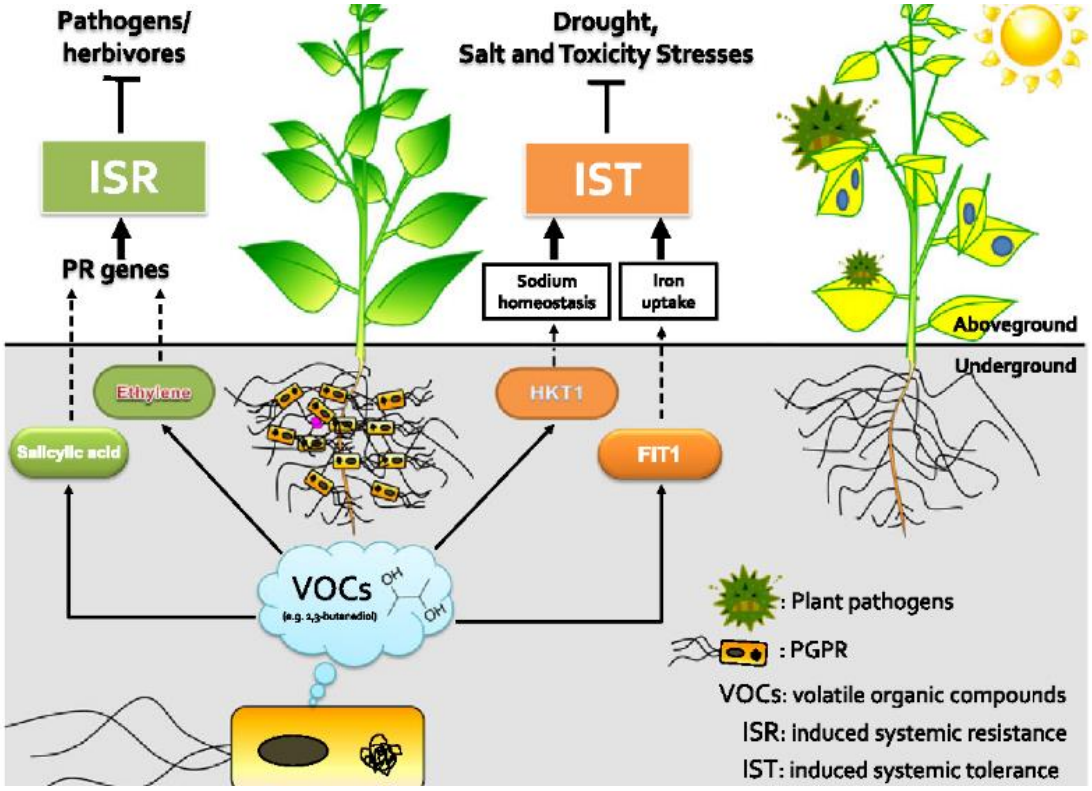
pectinases inhibitores، حمض الساليسيليك يحفز الجينات التي ترمز للبروتينات المرتبطة بالإصابة (PRs) مثل chitinase، β-1,3glucanases، TLPthaumatin such as (proteins) و peroxidases.

تستخدم البكتيريا المفيدة في استحثاث المقاومة الجهازية بتحفيز النبات على إنتاج مركبات الإيثيلين وحامض الجاسمونيك أو على إنتاج حامض الساليسيليك، كما قد تحفز المقاومة الجهازية ISR بواسطة مكونات مشتقة من جدارها مثل O-antigen of lipopolyasacharides (AL-Korany و Faiadh، 2011).

تعد كثير من أنواع الأكتينوبكتيريا وبعض الأجناس الميكروبية مثل *Pseudomonas* و *Bacillus* من الميكروبات المفيدة التي تحرض التحصين النباتي (ISR) ضد مسببات الأمراض المختلفة مثل: *Rhizoctonia*، *Fusarium*، *Pythium*، *Phytophthora*، *Colletotrichum*. تستطيع الأكتينوبكتيريا الداخلية *Streptomyces* sp السيطرة على مرض تآكل القمح وجرب البطاطا في ظروف الحقل. لاحظ Conn وآخرون (2008) أن *Streptomyces*.sp. EN27 و *Micromonospora* sp. EN4 الداخلية يمكنها إستحثاث المقاومة في *Arabidopsisthaliana* عن طريق تنشيط الجينات المنظمة المشاركة في الـ SAR.مؤخرا، عدة دراسات على *Streptomyces* التي تستحث مقاومة النبات المضيف استغلت في مجموعة من المحاصيل تتضمن محاصيل العلف، الخضروات، والأنواع الخشبية ذات الأهمية الإقتصادية مثل الشعير، البطاطا، البلوط..، إلخ. (Sathya وآخرون.، 2017).

تحفز مسببات الأمراض النبات النبات المضيف على تنشيط الاستجابات الدفاعية ضد الغزاة ، لكن رد الفعل الدفاعي الضعيف هذا لن يحد من انتشار العامل الممرض في النبات المضيف (Thordal-Christensen، 2003). ومع ذلك ، يمكن تعزيز الاستجابات الدفاعية عن طريق تشغيل النبات قبل هجوم الممرض. ثبت أن تفاعل بعض البكتيريا الجذرية مع جذور النبات يزيد من مقاومة النبات لبعض البكتيريا والفطريات والفيروسات المسببة للأمراض. تسمى هذه الظاهرة بـ ISR (Lugtenberg and Kamilova، 2009). تطبيق الكائنات الدقيقة للسيطرة على الأمراض ، وهو شكل من أشكال المكافحة البيولوجية ، هو نهج صديق للبيئة ( Lugtenberg and Kamilova، 2009). تتضمن الآلية المباشرة لـ PGPR في المكافحة الحيوية العداء لمسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق التربة (صحيفة البيانات التكميلية 1) وتعتمد الآلية غير المباشرة على تحريض المقاومة النظامية ( Choudhary، 2011 ؛

Glick، 2012). بشكل عام ، تعتبر المنافسة على العناصر الغذائية ، والاستبعاد المتخصص ، و ISR ، وإنتاج المستقلبات المضادة للفطريات بعضًا من الأنماط الرئيسية لنشاط المكافحة الحيوية في PGPR (Lugtenberg and Kamilova، 2009). تم الإبلاغ عن العديد من البكتيريا الجذرية لإنتاج مستقلبات مضادة للفطريات مثل سيانيد الهيدروجين (HCN) ، الفينازينات ، بيرولنترين ، 2 ، 4- ثنائي أسيتيل فلوروجلوسينول ، بيولوتورين ، فيسكوسيناميد ، وتنسين ( Bhattacharyya and Jha، 2012). في عام 2009 ، صاغ De Vleesschauwer و 2009Höfte ) مصطلح ISR للمقاومة التي يسببها PGPR والذي وجد أنه مستقل عن المسار المعني




**شكل 10 : أليات بكتيريا PGPRs في تحفيز المقاومة الجهازية المستحثة (ISR) عند النبات**

# الفصل الثانـي

## مقاومة الإجهاد النباتي بإستخدام البكتيريا

## الفصل الثاني: مقاومة الإجهاد النباتي بإستخدام البكتيريا

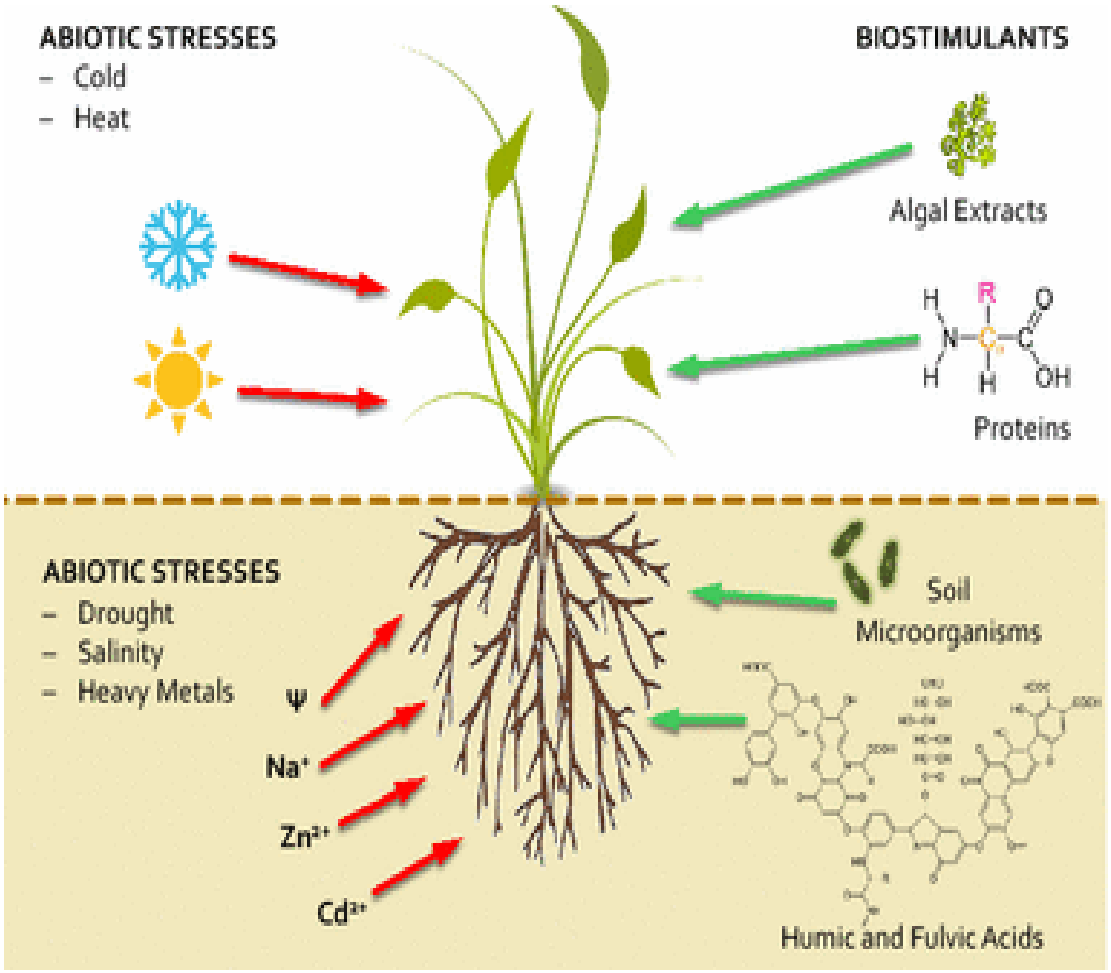
### I. مقاومة الإجهاد الحيوي للنبات بواسطة البكتيريا ( Biotic stresses)

مسببات الأمراض النباتية والآفات الحشرية هي العقبة الرئيسة في تعزيز النمو النباتي. الإستخدام المتكرر للمبيدات الإصطناعية يؤدي إلى زيادة مقاومة مسببات الأمراض والآفات الحشرية، الآثار السلبية على الأعداء الطبيعية وتلوث البيئة مما يؤدي إلى اختلال في التوازن البيئي بالإضافة إلى الأخطار التي قد تمس صحة الإنسان. تستعمل الكثير من الأنواع البكتيرية في مكافحة مسببات الأمراض النباتية والآفات الحشرية فهي معروفة جيدا بإنتاج مجموعة واسعة من المركبات النشطة ضد مجموعة متنوعة من مسببات الأمراض والآفات الحشرية مما يسهم في تقليل الخسائر الزراعية و البيئية ويعزز الأمن الغذائي(Subramaniam وآخرون.، 2016).( شكل 11 )

### II. مقاومة الإجهاد اللاحيوي للنبات بواسطة البكتيريا (Abiotic stresses)

ترتبط كثير من البكتيريا بالنبات ارتباطا وثيقا وتكون إما في الريزوسفير أو داخل النبات. وفي الآونة الأخيرة جذبت انتباه الباحثين لدورها في تخفيف الإجهاد اللاحيوي في النباتات كالملوحة والجفاف والمعادن الثقيلة والحرارة المرتفعة وغيرها وتحسين الإنتاجية الزراعية.

فالإجهاد اللاحيوي يؤدي إلى خسارة الإنتاج وتقليل إجمالي الأراضي الصالحة للزراعة ومثال ذلك البازلاء التي تتأثر بشكل كبير بسبب الإجهاد اللاحيوي على عكس الإجهاد الحيوي، وتكون استجابة النبات لظروف الإجهاد بتغيرات فيزيولوجية خلوية وجزيئية (Subramaniam وآخرون.، 2016).( شكل 11 )




**شكل 11** . أليات عمل تحفيز بكتيريا **PGPRs** في مقاومة الإجهاد الحيوي واللاحيوي عند النبات

# الفصل الثالث

## التحليل الجينومي

# الفصل الثالث: التحليل الجينومي

## I. لمحة تاريخية

علم الجينوم هو أحد فروع علم الوراثة المتعلق بدراسة الجينوم، أي كامل المادة الوراثية داخل مختلف الكائنات الحية. يتضمن المجال جهودا مكثفة لتحديد تسلسل الحمض النووي بشكل كامل ورسم الخرائط الدقيقة للجينوم. كما يشتمل هذا التخصص على دراسة عدد من الظواهر التي تحدث داخل الجينوم مثل الهجين heterosis ، القشوة epistasis و pleiotropy غيرها من التفاعلات بين المواضع المختلفة والأليلات داخل الجينوم .وفي المقابل، عندما يتم دراسة عدد محدود من الجينات (وليس كل الجينات(يطلق عليها الأحياء الجزيئية molecular biology أو علم الوراثة الجزيئيgenetics ، وهو موضوع عادة ما ينتشر في البحوث الطبية البيولوجية. ان اجراء البحوث على جين واحد (أو عدد محدود من الجينات) لا يندرج ضمن تعريف علم الجينوم مالم يكن الهدف من هذا البحث هو دراسة تأثير الجين على كامل الشبكات داخل الجينوم بأكمله. الجينوم وهو مجموع الجينات كائن الفرد بأكلمها. وبالتالي، فعلم الجينوم هو دراسة الجينات في الخلية، أو النسيج، على مستوى الحمض النووي.

في عام 1995 ، بدأت "الثورة الجينية" بإكمال التسلسل الأول للجينوم الميكروبي (Fleischmann et al., 1995). لأول مرة ، تم تمييز الأساس الجيني للعزلة البكتيرية بشكل كامل. نظرًا لأن تقنيات التسلسل الجديدة يتم تطويرها لتسهيل الوصول إلى المعلومات حول تسلسل الجينوم ، فمن المتوقع أن تستمر الثورة الجينية المستمرة في إحداث تأثير تحويلي وتؤثر على العديد من جوانب حياتنا (Florian et al., 2011).

يهدف البحث الجينومي إلى الكشف عن المعلومات المتضمنة في تسلسل الحمض النووي منقوص الأكسجين DNA والحمض النووي الريبي RNA وتحليلها. يتم تعريف كل كائن حي على وجه الأرض من خلال التسلسل الجيني الخاص به. يعتبر التوقيع الجينومي أو البصمة الوراثية هو الأكثر تحديدًا الذي يمكنه تحديد معظم الكائنات على وجه الأرض بشكل لا لبس فيه. يمكن أن يساعد في

التمييز بين الكائنات الحية وثيقة الصلة، أي تلك التي لها أنماط ظاهرية متطابقة. على سبيل المثال ، مع معرفة تسلسل الجينوم الكامل، أصبح من الممكن الآن التمييز بين سلالتين من البكتيريا مرتبطة بنفس تفشي الأمراض المنقولة عن طريق الأغذية. علاوة على ذلك، يمكن تصنيف هاتين العزلتين وتخصيصهما لشجرة تطورية توضح علاقتهما. حتى الآن، حالت تكاليف التسلسل المرتفعة دون تطبيق تحليل الجينوم الكامل كأداة للطب الشرعي (Florian et al., 2011). ومع ذلك ، يستمر تطوير تقنيات التسلسل الجديدة التي توفر إنتاجًا متزايدًا لبيانات التسلسل بتخفيض التكاليف لكل دورة، متجاوزًا قانون مور كما هو مطبق على نمو موارد الحوسبة (Moore, 1965).نتيجة لذلك، أصبح علم الجينوم هو المعيار ليس فقط في مجال البحث، ولكن أيضًا للصحة العامة والطب الشرعي ومجال الدراسات الميكروبية. بمعنى أخر علم الجينوم ليس مجالًا بحثيًا بحد ذاته، ولكنه الآن أداة معملية عالمية. على هذا النحو، بمجرد التحقق من صحتها، سيتم دمجها بشكل متزايد في مجموعة أدوات محقق علم الأحياء الدقيقة (Florian et al., 2011).

## II. تعريف علم الجينوم

علم الجينوم هو دراسة الجينوم من مختلف النواحي. يتعلق الأمر بتسلسل الشفرة الجينية الكاملة (DNA) للكائنات الحية. إنه علم يفحص كيفية تفاعل الجينوم بأكمله مع البيئة. يتضمن علم الجينوم تسلسل كميات كبيرة من الحمض النووي وبالتالي ينتج كمية هائلة من البيانات التي يمكن تخزينها وتنظيمها والوصول إليها. لعبت التطورات في علم الجينوم دورًا كبيرًا في نمو المجال التقني للمعلوماتية الحيوية ، والذي يتكون من تطبيق علوم وتكنولوجيا الكمبيوتر على إدارة المعلومات البيولوجية (lien : www.explorecuriocite.org © Parlons sciences, 2013).

مكن تطوير الكثير من البرامج الحاسوبية من معالجة وتحليل تتابع DNA والتعرف على مختلف الجينات الموجودة في جينوم كائن معين، وبالتالي فهم أو التنبأ بالقدرات الوظيفية لهذا الكائن، إن تحليل جينوم سلالة بكتيريا ما إذا نتج عنه وجود جينات تتعلق بتعزيز نمو النباتات أو جينات تتعلق بإنتاج مركبات ذات فاعلية ضد مسببات الأمراض النباتية، هذا يعطينا فكرة عن أهمية هاته السلالة كمرشح بيولوجي للاستخدامات الزراعية.

# الجـزء الثانـي

# الفصل الرابع

## وسائل و طرائق العمل

**وسائل وطرائق العمل:**

نظرا لتضمن هذا الجزء لعدد كبير من المصطلحات التقنية الغير موجودة لحد اللحظة في قاموس اللغة العربية فقد لجأنا إلى اللغة الانجليزية.

## Genomic analysis

### I. Used tools

Genome annotation is the process of identifying and labeling all the relevant features on a genome sequence (Richardson and Watson, 2013). At minimum, this should include coordinates of predicted coding regions and their putative products, but it is desirable to go beyond this to non-coding RNAs, signal peptides and so on.

### I.1. PROKKA,Version1.13:

Prokka a command line software tool that can be installed on any Unix system. Prokka coordinates a suite of existing software tools to achieve a rich and reliable annotation of genomic bacterial sequences. Where possible, it will exploit multiple processing cores, and a typical bacterial genome can be annotated in ~10 min on a quad core desktop computer. It is well suited to iterative models of sequence analysis and integration into genomic software pipelines. The Rapid Annotation of Prokaryotic Genomes or PROKKA is a program for the rapid annotation of prokaryotic genomes. A typical 4 Mbps genome can be fully annotated in less than 20 minutes. For rRNA prediction, this app currently uses Barrnap (written by the author of PROKKA and recommended in case of speed preference over absolute accuracy) (Seemann, 2014).

### I.2. ROARY, Version3.12.0:

Roary is a high speed stand alone pan genome pipeline, which takes annotated assemblies in GFF3 format (produced by Prokka) and calculates the pan genome. Using a standard desktop PC, it can analyse datasets with thousands of samples, something which is computationally infeasible with existing methods, without compromising the quality of the results. 128 samples can be analysed in under 1 hour using 1 GB of RAM and a single processor. To perform this analysis using existing methods would take weeks and hundreds

of GB of RAM. The rapid large-scale prokaryote pan genome analysis or ROARY is a tool that rapidly constructs large-scale pan genomes, identifying essential and accessory genes. ROARY enables pan genome construction of thousands of prokaryotic samples on a standard desktop without compromising the accuracy of results (Page *et al*., 2015).

**I.3. NCBI:**

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) is part of the United States National Library of Medicine (NLM), a branch of the National Institutes of Health (NIH). The NCBI is located in Bethesda, Maryland and was founded in 1988 through legislation sponsored by Senator Claude Pepper. The NCBI houses a series of databases relevant to biotechnology and biomedicine and is an important resource for bioinformatics tools and services. Major databases include GenBank for DNA sequences and PubMed, a bibliographic database for biomedical literature. Other databases include the NCBI Epigenomics database. All these databases are available online through the Entrez search engine. NCBI was directed by David Lipman, one of the original authors of the BLAST sequence alignment program and a widely respected figure in bioinformatics. He also led an intramural research program, including groups led by Stephen Altschul (another BLAST co-author), David Landsman, Eugene Koonin, John Wilbur, Teresa Przytycka, and Zhiyong Lu. David Lipman stood down from his post in May 2017. (https://en.wikipedia.org/wiki/National_Center_for_Biotechnology_Information)(https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

**I.4. BLAST:**

The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) finds regions of local similarity between sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance of matches. BLAST can be used to infer functional and evolutionary relationships between sequences as well as help identify members of gene families.

**I.5. RAST, Version2:**

In 1995 the first complete genome became available. Since then, hundreds more have been sequenced, and it has become clear that thousands will follow shortly. This has led to the obvious conclusion that most of the annotations that will be associated with these newly-sequenced genomes will be provided through technologies that are largely automated, and a

growing number of efforts focusing on different aspects of automated annotation have emerged. In this paper we describe the RAST Server, a fully automated annotation service for complete, or near-complete, archaeal and bacterial genomes. The service seeks to rapidly produce high-quality assessments of gene functions and an initial metabolic reconstruction. Initially the server was planned for use by the National Microbial Pathogen Data Resource (NMPDR) community, but very quickly the global utility of such a service became apparent. Users of the facility upload a genome as a set of contigs in FASTA format, and they receive access to an annotated genome in an environment that supports comparison with an integration of hundreds of existing genomes. The complete annotation is normally produced within 12–24 hours, and the existing implementation can support a throughput of 50–100 genomes per day. However, it is important to note that speed is not the central requirement for such a system; accuracy, completeness and consistency will ultimately be the criteria used to evaluate the success or failure of a service such as the one described. To date, the server has been used by over 120 external users to annotate over 350 genomes. RAST bases its attempts to achieve accuracy, consistency, and completeness on the use of a growing library of subsystems that are manually curated, and on protein families largely derived from the subsystems (FIGfams). In the sections below we describe the steps the RAST server implements to automatically produce two classes of asserted gene functions: subsystem-based assertions are based on recognition of functional variants of subsystems, while nonsubsystem-based assertions are filled in using more common approaches based on integration of evidence from a number of tools. The fact that RAST distinguishes these two classes of annotation and uses the relatively reliable subsystem-based assertions as the basis for a detailed metabolic reconstruction makes the RAST annotations an exceptionally good starting point for a more comprehensive annotation effort. Briefly, the Rapid Annotations using Subsystems Technology or RAST is a fully automated service for the annotation of bacterial and Archean genomes. It identifies sequences encoding proteins, rRNA and tRNA genes. It also assigns functions to genes and predicts the subsystems represented in the genome and uses this information to reconstruct the metabolic network (Aziz et al., 2008). (http://rast.nmpdr.org/).

**I.6. antiSMASHVersion4.1:**

antiSMASH allows the rapid genome-wide identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genomes. It integrates and cross-links with a large number of *in silico* secondary metabolite analysis tools that have been published earlier. Is a web server and stand-alone software for predicting secondary metabolite gene clusters in bacterial genomes (http://antismash.secondarymetabolites.org) (Weber *et al*., 2015).

**I.7. BioEdit:**

BioEdit is one of the most common program used in molecular biology studies. It was developed initially as a biological sequence alignment editor written for Windows only. It contains many features for sequence alignments modes of easy hand alignment, Split window view, user defined color, information based shading and auto integration with other programs such as Clustal*W* and Blast. However, in the last few years it was developed dramatically to integrate many other features and functions and useful molecular tools for molecular biologist such as several modes of hand alignment, plasmid drawing and annotation, restriction mapping and much more. It became one of the widely used programs in molecular biology with its multipurpose toolsin molecular biology. The freeware license and its efficient up to date modules beside its quick ability to produce results make it one of the most popular programs for molecular biologist nowadays. (Hall et *al*., 2011) (https://perl.developpez.com/telecharger/detail/id/1909/BioEdit).

**I.8. MEGA version 7:**

The molecular evolutionary genetics analysis (Mega) software implements many analytical methods and tools for phylogenomics and phylomedicine. Here, we report a transformation of Mega to enable cross-platform use on Microsoft Windows and Linux operating systems. Mega X does not require virtualization or emulation software and provides a uniform user experience across platforms. Mega X has additionally been upgraded to use multiple computing cores for many molecular evolutionary analyses. Mega X is available in two interfaces (graphical and command line) and can be downloaded from www.megasoftware.net free of charge (Kumar et al., 2018).

## II. Methods

### II.1. Annotation and mining

So at this point we have our High Quality Draft Genome, which is ready for the next step: deciphering that genome or annotation. Annotating a genome involves analyzing the nucleotide sequence that constitutes the raw information to extract biological information. This analysis pursues two successive objectives, the first is to locate genes and coding regions and the second is, once these genes are located, to identify or predict their biological function. These two stages are initially based on the use of sophisticated algorithmic tools, the development of which is one of the fields of bioinformatics.

There are several bioinformatic tools for genome annotation, all of which are based on the same principles: that is,

* By comparing the sequences with respect to genes present in genomic databases (eg: GenBank);

* By analyzing molecular signatures indicating precise biological structures and functions (this is called ab initio annotation).

The tools that we will use for our genome are:

* Russian annotator (yes, again) PROKKA;

* The annotator included in the NCBI server, the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (this annotation will be done when submitting the genome to the GenBank database);

* The RAST annotator (online);

* The AntiSMASH annotator (dedicated to secondary metabolism).

As for the PROKKA tool, it is considered to be the most precise, and the most revealing. The “the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline” tool is considered to be the most universal (available when submitting genomic sequences to the GenBank database).

The RAST tool is surely the best organized (because it will give us results organized in subsystems of genes, so we can go directly to see families of genes according to their biological role. Before being able to use it, we must have a account at the level of its site (because it is an online application; rast.nmpdr.org/).

And finally, antiSMASH (Medema et al., 2011; Weber et al., 2015) is undoubtedly the software that has come, in recent years, to revolutionize the prediction of secondary metabolites from DNA. The antiSMASH, is dedicated to clusters of secondary metabolite genes, so for studies on antibiotics and non-ribosomal peptides (NRPs) for example, it will be especially the prediction/annotation results provided by this tool that will be the most interesting. One of the advantages of antiSMASH is its ease of use. Available online, it allows genomes or protein sequences to be sent for analysis on dedicated servers.

# الجزء الثالث

# الفصل الخامس

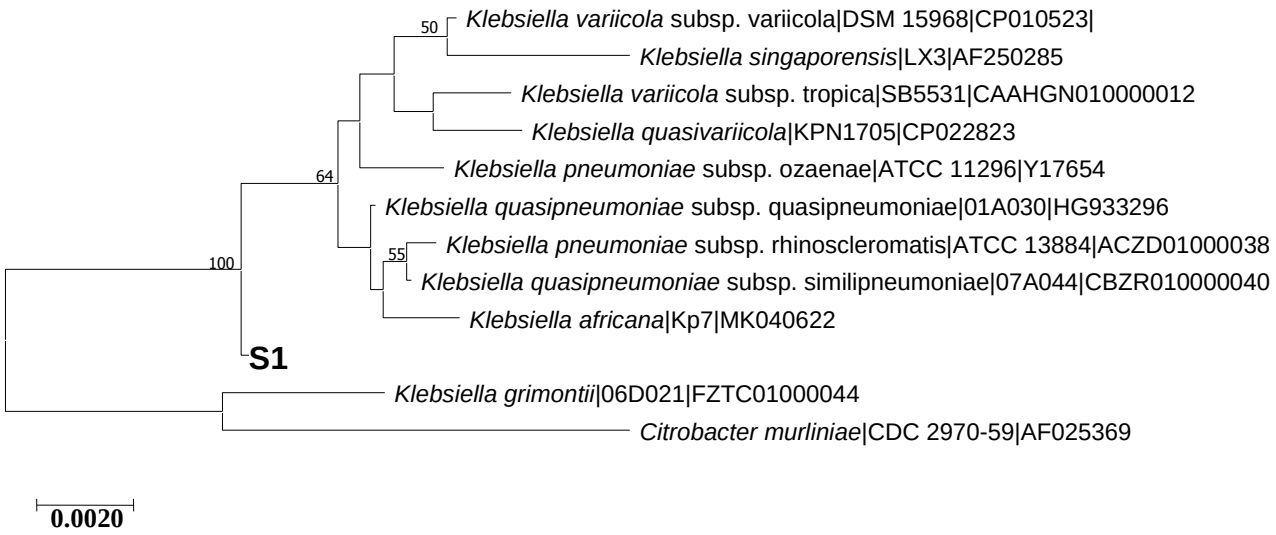
## النتائج والمناقشة

## I. النموذج الأول: السلالة S1

### 1.I. الدراسة التصنيفية الجزيئية للسلالة S1 :

مكنت الدراسة الجينية بالتحليل الجزيئي للقطعة "ADNr 16S" ودراسة النسالة (Phylogénie) من إثبات تقارب العزلة S1 من الأنواع المنتمية للجنس *Klebsiella*، النوع الأقرب هو *Klebsiella africana* Kp7$^T$ بنسبة تشابه قدرها 99.64% ثم *Klebsiella variicola* subsp. DSM 15968$^T$

بنسبة تشابه قدرها 99.57%.



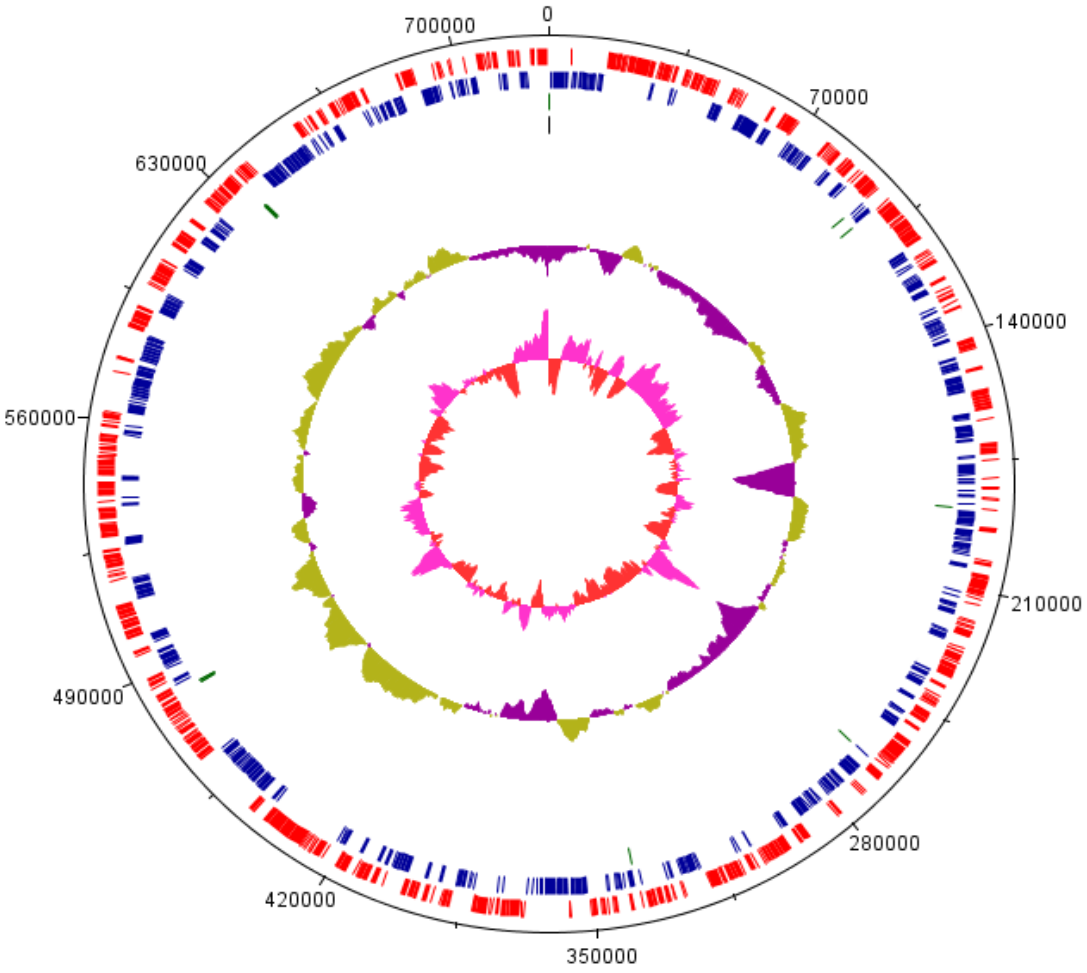

**الشكل 12:** شجرة التقارب الوراثي على أساس تحليل تتابع الجين المشفر للرنا الريبوزومي rRNA 16S، والتي تبين العلاقة بين العزلة S1 والأنواع الأقرب وراثيا من جنس *Klebsiella*. يتم عرض قيم bootstrap (≤50٪) بناءً على 1000 تحليل. تم استخدام النوع *Citrobacter murliniae*|CDC 2970-59|AF025369 كنوع خارج المجموعة. تم تحديد شفرات السلالات النموذجية متبوعة بالحرف T (مرتفع)، في أقصى اليمين توجد أرقام التسلسل.

### 2.I. الملامح العامة للجينوم *Klebsiella* sp S1

يحتوي جينوم ***Klebsiella* sp. S1** على إجمالي 50540095 bp بمتوسط محتوى G+C يبلغ 57.15٪ (**الجدول 5**). يحتوي الجينوم على 4999 CDS (تسلسل تشفير) متنبأ به بمتوسط طول 944 bp. تم تعيين الأدوار البيولوجية لـ 4129 (82.6٪) جينة من CDS المتوقعة بناءً على عمليات البحث عن التشابه مع قاعدة بيانات. تم تصنيف 870 (17.4٪) تسلسل الترميز المتبقية على أنها بروتينات ذات وظيفة غير معروفة أو افتراضية. تم تحديد ما مجموعه أربعة rRNAs تشتمل على اثنين من الرنا الريبوزومي 5S، و واحد 16S rRNA، و واحد 23S rRNA مع 73 جينة tRNA تمثل 37 من الأحماض الأمينية.

**الجدول**( 5) الملامح العامة لـ جينوم *Klebsiella* sp.

| خاصية | كروموسوم ***Klebsiella* sp. S1** |
|---|---|
| **Size** | 5,540,009 pb |
| **GC Content** | 57.15% |
| **N50** | 101794 |
| **L50** | 16 |
| **Number of Contigs (with PEGs)** | 888 |
| **Number of Subsystems** | 304 |
| **Number of Coding Sequences** | 4532 |
| **Number of RNAs** | 86 |



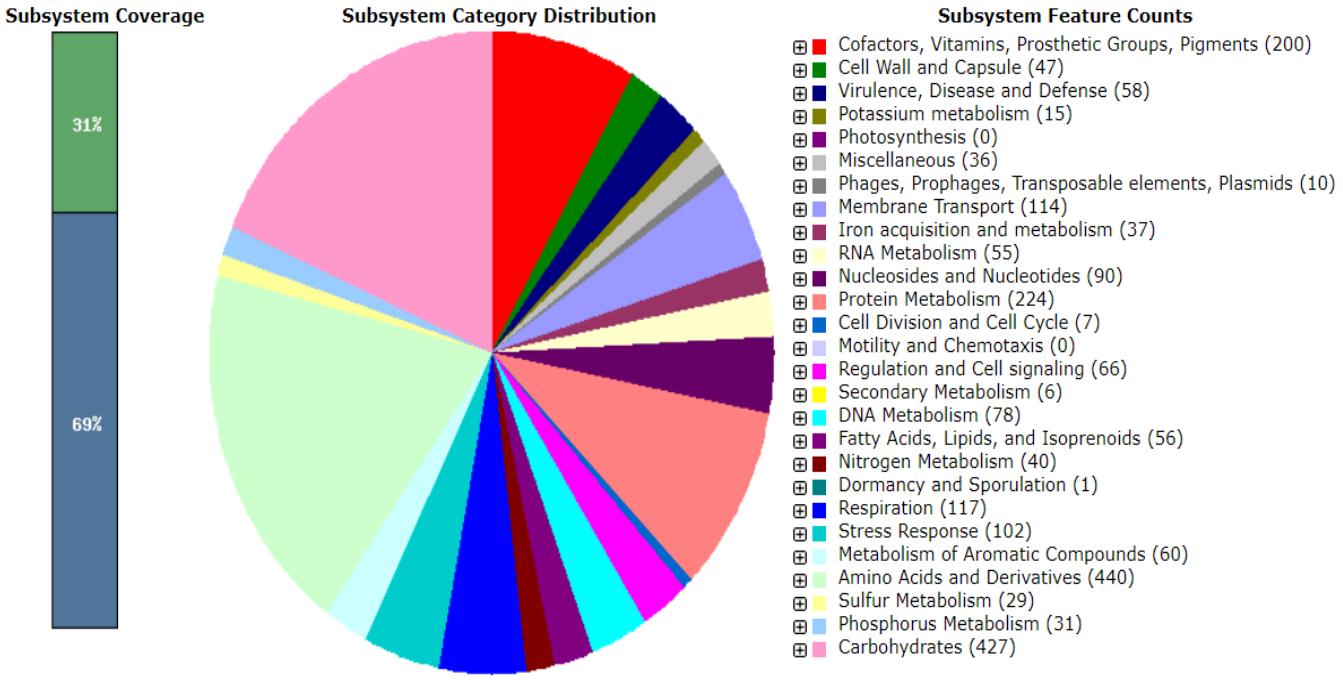

**الشكل13: تمثيل** دائري لجينوم *Klebsiella* sp.S1. من الدائرة الخارجية إلى الدائرة الداخلية، توجد دائرة 1: CDS على الشريط الأمامي (أحمر) ؛ الدائرة 2: CDS على الشريط العكسي (أزرق) ؛ الدائرة 3: الرنا الريبوزومي: (أخضر) ؛ الدائرة 4: الحمض الريبي النووي النقال (أسود) ؛ الدائرة 5: محتوى GC (نيلي / بنفسجي) ؛ الدائرة 6: توزع GC (برتقالي / وردي). تم استخدام برنامج DNAPlotter لتحقيق هذه الخريطة.

توضح الخريطة الموضحة في الشكل السابق توزع متساوي إلى حد كبير للجينات في الاتجاهين 5'—3' و 3'—5'

## I.2.الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG)

يظهر **(الشكل 14)** الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG) في جينوم *Klebsiella* sp. S1 فمن خلال عملية التحليل الجيني (Annotation) بواسطة خادم RAST، تم العثور على 25 فئة وظيفية (أنظمة فرعية) **(الشكل14)**.

نلاحظ من خلال **الشكل (14)** وجود تواتر جيني كبير نسبيا في ما يخص الجينات المتعلقة بميتابوليزم الآزوت (Nitrogen metabolism) كذلك بالنسبة للجينات المتعلقة بالإجهاد (Stress Reponse) وميتابوليزم الفوسفور(Phosphorus metabolism), كما نلاحظ غياب الجينات المسؤولة عن الحركة (Motility and chemotaxis ) مما يشير لفقدان هذه السلالة لخاصية الحركة.




**الشكل 14 :** تمثيل الجينات حسب الفئات الوظيفية (الأنظمة الفرعية) الناتجة عن التحديد الجيني على الخادم RAST لجينوم *Klebsiella* sp.S1.

## 3.I. الجينات المرتبطة بتعزيز نمو النبات و المكافحة الحيوية في جينوم *Klebsiella* sp. S1

سمح التحديد الجيني بإستخدام برنامج Prokka لجينوم *Klebsiella* sp. S1 باكتشاف الجينات المتعلقة بآليات تعزيز نمو النبات والتحكم البيولوجي المذكورة أدناه.

### 1.3.I. الجينات المشاركة في إنتاج الهرمونات النباتية:

تم تحديد الكثير من الجينات في جينوم *Klebsiella* sp. S1 المسؤولة على إنتاج هرمون الأوكسين IAA الهام جدا للنمو النباتي كما تم التطرق اليه بالتفصيل في الجزء النظري.

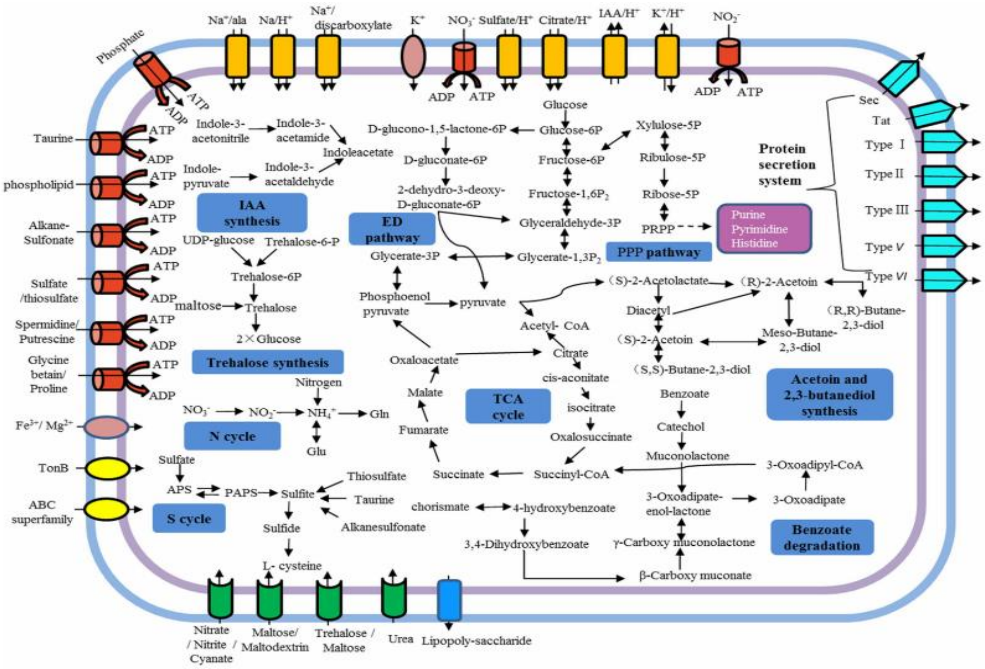
تم تحديد مسارين **(الشكل 15)** مقترحين للتخليق الحيوي لهرمون IAA في جينوم *Klebsiella* sp.:

- مسارين 1: إندول -3-أسيتونيتريل (IAN)، في هذ المسار اكتشف وجود جينين:

يتم تحويل indole-3-pyruvate (IPyA) إلى indole-3-acetaldehyde (IAAld) بواسطة الأنزيم indolepyruvate decarboxylase المشفر من الجين 1 ثم إلى IAA بواسطة الأنزيم: aldehyde dehydrogenase المشفر من الجين 2.

- مسارين 2: إندول-3-بيروفات IPyA وقد تشارك أربعة جينات:

يمكن أولاً تحويل IAN إلى indole-3-acetamide (IAM) بواسطة الأنزيم nitrile hydratase المشفر من الجين 1 ثم يتم تحويل IAM إلى IAA بواسطة amidase المشفر من الجين 2.




**الشكل 15 :** نظرة عامة تخطيطية لمسارات التمثيل الغذائي وأنظمة النقل **S1** *Klebsiella* sp.

(Liu et al., 2016)

### I.2.3. الجينات المسؤولة عن تثبيت الآزوت:

تشير دراسات سابقة *Klebsiella* sp. S1 إلى قدرتها على النمو في وسط خالٍ من النيتروجين وهذا يشير إلى أن السلالة قادرة على تثبيت النيتروجين من الغلاف الجوي. النيتروجيناز Nitrogenase هو الإنزيم المركزي لتثبيت النيتروجين ويتكون من بروتين الحديد المشفر بواسطة *nifH* و MoFe-protein المشفر بواسطة *nifDK*. يحتاج التجميع الكامل لمركب النيتروجيننياز إلى منتجات لا تقل عن اثني عشر جينًا من نوع *nif*، خاصةً لمعالجة الثبات التحفيزي والنيتروجينيز المعدني (من بينها *nifMZ* و *nifUS* و *nifW*) ولتركيب عامل مساعد موليبدينوم (FeMo-co). يحتوي جينوم D5A على جميع الجينات *nif* المذكورة أعلاه مع جينات *NifA* و *NifL* التي تعد البروتينات التنظيمية الإيجابية/السلبية للجينات المسؤول عن تثبيت الآزوت. كما تم العثور على أوبرون rnfABCDEG الذي يشفر مركبًا بروتينيًا مرتبطًا بغشاء متعلق بنقل الإلكترون إلى النيتروجيناز في جينوم *Klebsiella* sp. وهذا يسهم في التثبيت الحيوي للآزوت الجوي.

### I.3.3. الجينات المسؤولة عن إذابة الفوسفات:

يُعرف حمض الجلوكونيك (GA) بأنه أحد الأحماض العضوية الرئيسية في معظم البكتيريا المسؤولة عن إذابة الفوسفات المعدني. يتم تحفيز تخليق GA بواسطة إنزيمات نازعات هيدروجين الجلوكوز (GDH) و مساعد الإنزيم PQQ (pyrrolo-quinolone quinine). يمتلك جينوم D5A جينات ترميز نشاط GDH ويحمل جينات العامل المساعد PQQ بما في ذلك pqqBCDEF.

بالإضافة إلى وجود عدة جينات تشفر لعدة إنزيمات تلعب دورا هاما في إذابة الفوسفات المعدني مثل: Inorganic triphosphatas.

### I.3.3. الجينات المساهمة في خصائص أخرى متعلقة بتعزيز نمو النباتات :

جينوم *Klebsiella* sp. S1 يحمل جينات ترمز لتخليق لواقط الحديد مثل:

- Ferrochelatase
- Ferrous iron permease EfeU
- Iron uptake system component EfeO
- Ferrienterobactin receptor

بالإضافة إلى سمات PGP المذكورة أعلاه، تم الإبلاغ عن اثنين من المركبات العضوية الطيارة (VOCs) المعززة للنمو النباتي acetoin و2,3-butanediol, عن طريق تحفيز تكوين الجذور وزيادة مقاومة الأمراض وتحمل الجفاف.

### I.4.3. الجينات المشاركة في تحمل الملوحة:

كشف تحليل الجينوم أن السلالة *Klebsiella* sp. S1 لها عدد من الجينات المتعلقة بتحمل الملوحة. على سبيل المثال تم العثور على الجينات الرئيسية *betA* و *betB* لتخليق D5A glycine-betaine. تعتبر هذه الجينات الأكثر فاعلية في تحمل الإجهاد الملحي. بالاظافة الى تضمن الجينوم لعدد معتبر من الجينات المشفرة للإنزيمات المضادة للأكسدة، مثل:

- Superoxide dismutase Mn
- Superoxide dismutase [Fe
- Catalas
- Thioredoxin/glutathione peroxidase BtuE
- Peroxiredoxin Bcp
- Glutathione S-transferase.
- Glutathione synthetase.

### I.4. المجموعات الجينية المسؤولة عن الآيض الثانوي

أظهرت النتائج الموضحة في **الشكل(16)** تحليل الأداة البرمجية antiSMASH لجينوم السلالة *Klebsiella* sp. S1 وجود عدة مجموعات جينية (Clusters) قد تكون مسؤولة عن إنتاج المركبات الأيضية الثانوية التالية:

- NRPS

البيتيدات اللاريبوزومية هي مجموعة متنوعة للغاية من المنتجات الطبيعية مع مجموعة واسعة للغاية من الأنشطة البيولوجية والخصائص الدوائية. غالبًا ما تكون ذات فاعلية مضادة للبكتيريا الممرضة. تستخدم غالبا كمضادات الحيوية، ومضادات التجلط الخلوي، وقد تستخدم كذلك كمثبطات المناعة للاستخدام التجاري.

- Thiopeptide

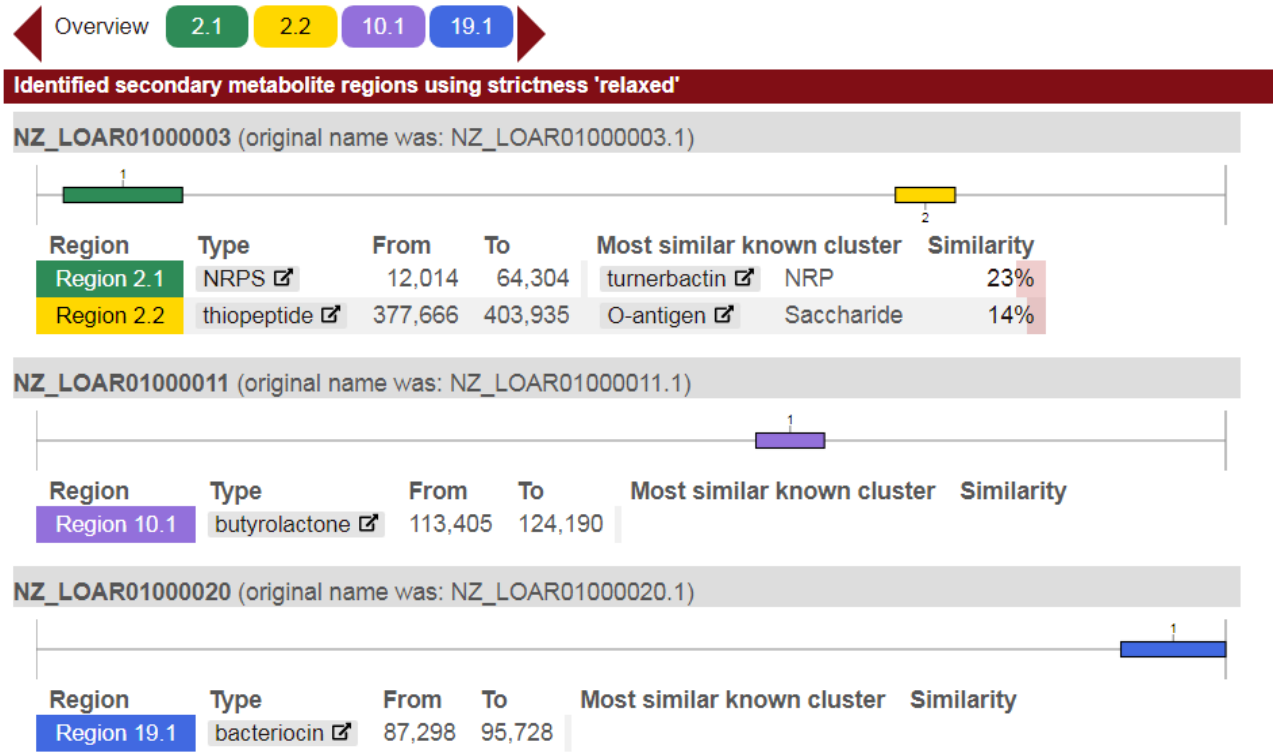
الثيوببتيدات هي فئة من المضادات الحيوية الببتيدية التي تنتجها البكتيريا. لديها نشاط مضاد حيوي ضد البكتيريا موجبة الجرام، ولكن نشاط ضئيل أو معدوم ضد البكتيريا سالبة الجرام. يُظهر العديد من أعضاء هذه الفئة نشاطًا ضد *Staphylococcus aureus* المقاومة للميثيسيلين ( MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) وبالتالي فهاته الفئة محل اهتمام بحثي.

- Butyrolactone

- Bacteriocin

البكتريوسينات هي عائلة من الببتيدات التي تصنعها بكتيريا معينة بشكل طبيعي. يتكون البكتريوسين بشكل عام من مركب ببتيدي يتكون من 20 إلى 60 حمض أميني.

لا تعتبر البكتريوسينات مضادات حيوية لكن لها خصائص المضادات الحيوية حيث يمكن أن تكون مبيد للجراثيم أي القضاء على بعض الكائنات الحية الدقيقة الممرضة. كما يمكن أن تمنع نمو بعض الكائنات الحية الدقيقة. لوحظ أن النشاط المبيد للجراثيم يكون موجه غالبا ضد أنواع معينة قريبة من السلالة المنتجة.

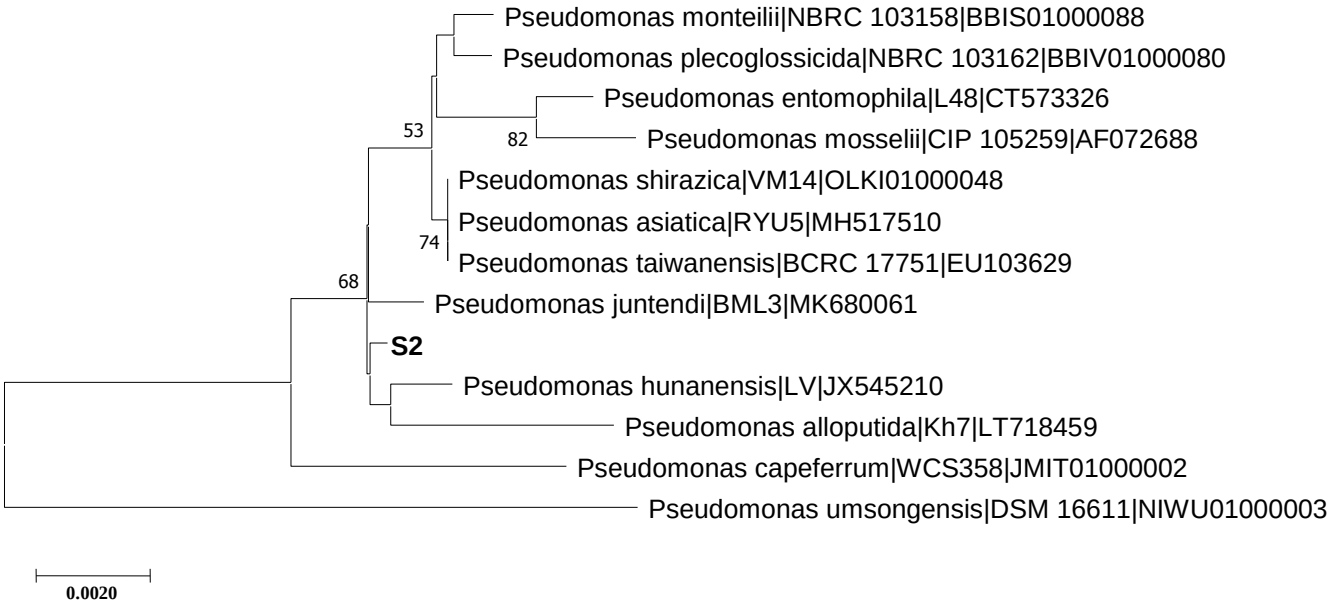



**الشكل16 :** الكشف عن جميع المجموعات الجينية التي ترمز للمستقلبات الثانوية داخل جينوم *Klebsiella* sp. S1 بواسطة أداة antiSMASH.

## II. النموذج الثاني: السلالة S2

### 1.I. الدراسة التصنيفية الجزيئية للسلالة S2 :

مكنت الدراسة الجينية بالتحليل الجزيئي للقطعة "ADNr 16S" ودراسة النسالة (phylogénie) من إثبات تقارب العزلة S2 من الأنواع المنتمية للجنس *Pseudomonas*، النوع الأقرب هو *Pseudomonas juntendi|BML3|MK680061* بنسبة تشابه قدرها 99.64% .




**الشكل(17)**. شجرة التقارب الوراثي على أساس تحليل تتابع الجين المشفر للرنا الريبوزومي rRNA 16S، والتي تبين العلاقة بين العزلة S1 والأنواع الأقرب وراثيا من جنس *Pseudomonas*. يتم عرض قيم bootstrap (≤50٪) بناءً على 1000 تحليل. تم استخدام النوع Pseudomonas juntendi |CDC 2970-59|AF025369 كنوع خارج المجموعة. تم تحديد شفرات السلالات النموذجية متبوعة بالحرف T (مرتفع)، في أقصى اليمين توجد أرقام التسلسل.

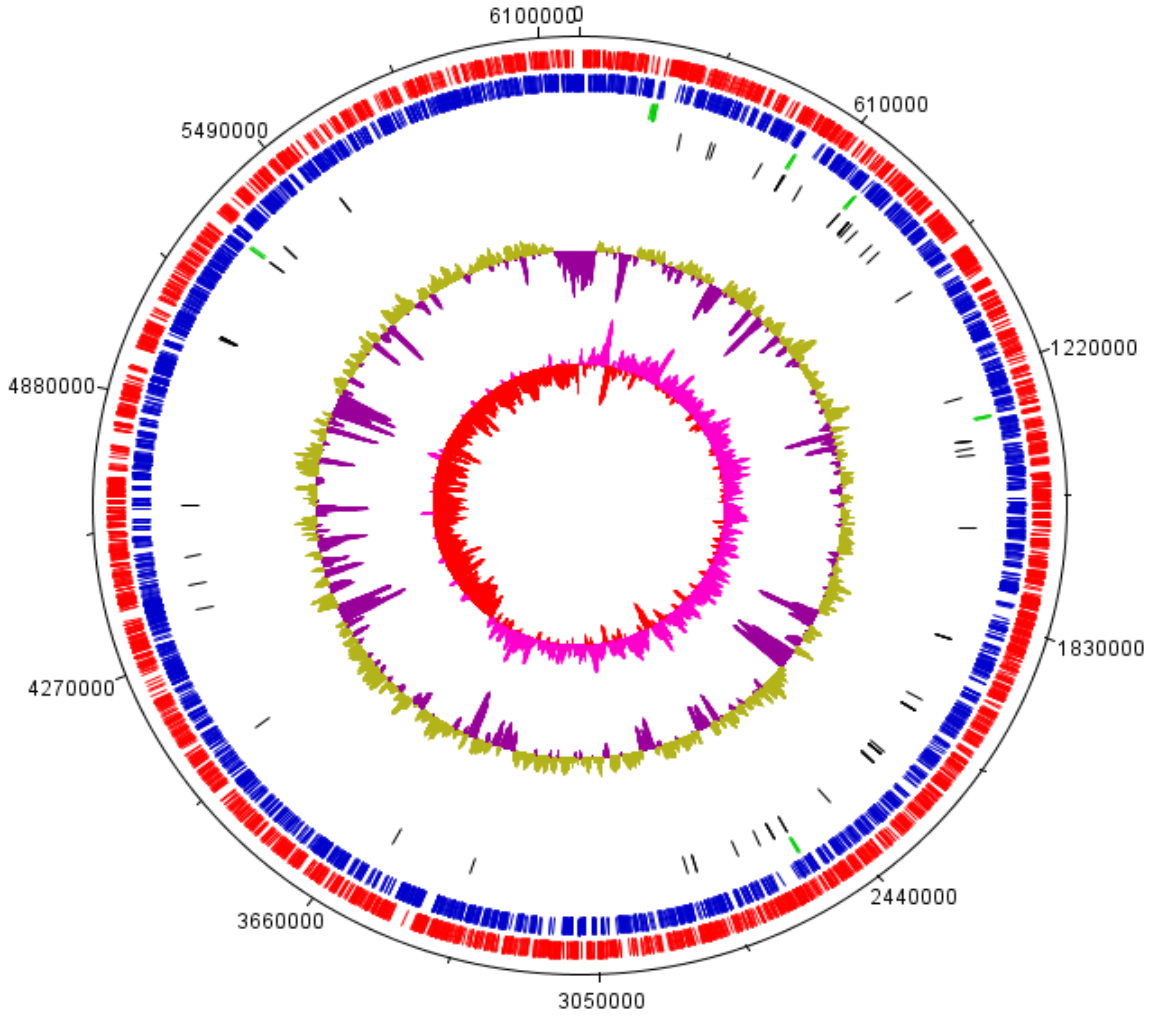
### 1.II. الملامح العامة للجينوم *Pseudomonas sp. S2*

يحتوي جينوم ***Pseudomonas sp.* S2** على إجمالي 6,181,873 bp بمتوسط محتوى G+C يبلغ 61.5% (**الجدول 6**). يحتوي الجينوم على 5715 CDS (تسلسل تشفير) متنبأ به بمتوسط طول 1081 bp. تم تعيين الأدوار البيولوجية لـ 4201 (73.52%) جينا من CDS المتوقعة بناءً على عمليات البحث عن التشابه مع قاعدة البيانات. تم تصنيف 1514 (26.48%) تسلسل الترميز المتبقية

على أنها بروتينات ذات وظيفة غير معروفة أو افتراضية. تم تحديد ما مجموعه 22 rRNAs 23 مع 80 جينة tRNA تمثل 37 من الأحماض الأمينية.

**الجدول(6)**. الملامح العامة لـ جينوم *Pseudomonas sp .S2*.

| خاصية | كروموسوم*Pseudomonas sp .S2* |
|---|---|
| 6,181,873 pb | **Size** |
| 61.5 % | **GC Content** |
| 101794 | **N50** |
| 16 | **L50** |
| 1 | **Number of Contigs (with PEGs)** |
| 372 | **Number of Subsystems** |
| 5715 | **Number of Coding Sequences** |
| 96 | **Number of RNAs** |



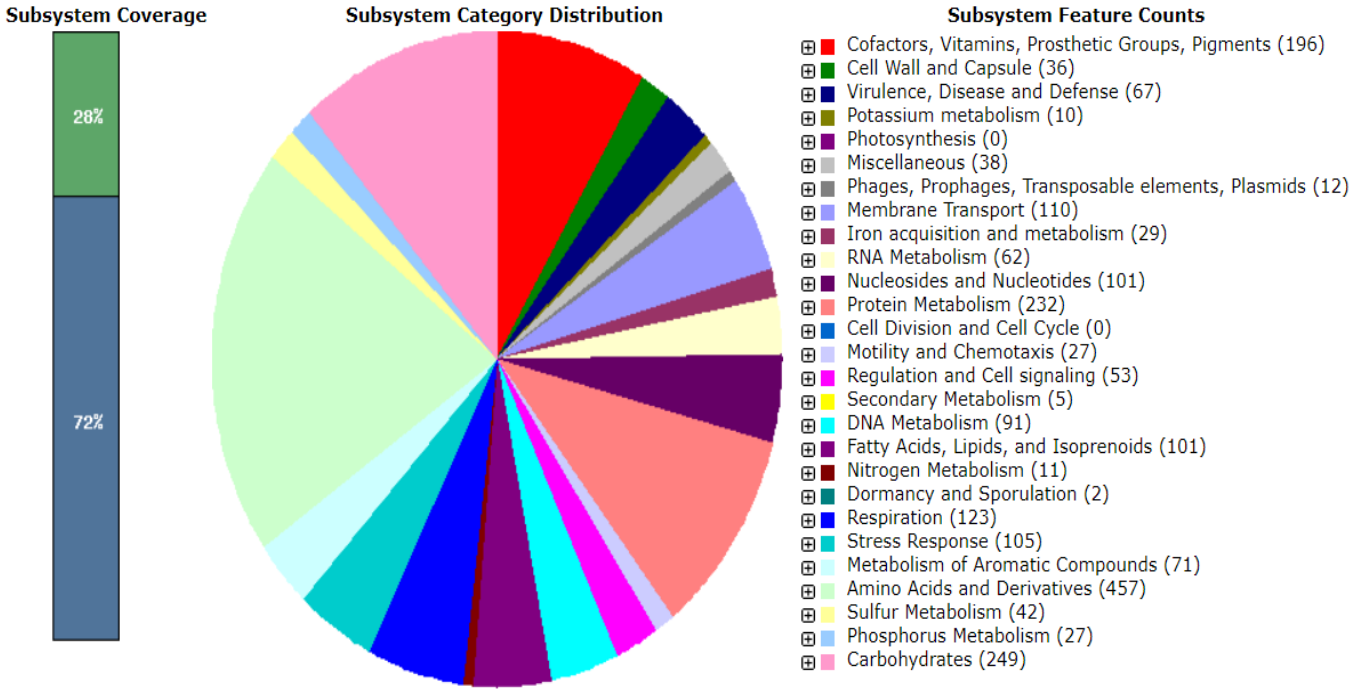

**الشكل (18)**. تمثيل دائري لجينوم *Pseudomonas sp .S2*. من الدائرة الخارجية إلى الدائرة الداخلية، توجد دائرة 1: CDS على الشريط الأمامي (أحمر) ؛ الدائرة 2: CDS على الشريط العكسي (أزرق) ؛ الدائرة 3: الرنا الريبوزومي: (أخضر) ؛ الدائرة 4: الحمض الريبي النووي النقال (أسود) ؛ الدائرة 5: محتوى GC (نيلي / بنفسجي) ؛ الدائرة 6: توزع GC (برتقالي / وردي). تم استخدام برنامج DNAPlotter لتحقيق هذه الخريطة.

توضح الخريطة الموضحة في الشكل السابق توزع متساوي إلى حد كبير للجينات في الاتجاهين 5'—3' و 3'—5' في جينوم *Pseudomonas sp. S2*.

### 2.II. الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG)

يظهر (**الشكل 19**) الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG) في جينوم *Pseudomonas sp. S2* فمن خلال عملية التحليل الجيني (Annotation) بواسطة خادمRAST، تم العثور على 27 فئة وظيفية (أنظمة فرعية) (**الشكل 19**).

نلاحظ من خلال الشكل (**19**) وجود تواتر جيني كبير نسبيا في ما يخص الجينات المتعلقة بميتابوليزم الآزوت (Nitrogen metabolism) كذلك بالنسبة للجينات المتعلقة بالإجهاد (Stress Reponse) وميتابوليزم الفوسفور(Phosphorus metabolism), كما نلاحظ وجود الجينات المسؤولة عن الحركة (Motility and chemotaxis) مما يشير لإمتلاك هذه السلالة لخاصية الحركة.




**الشكل (19)** تمثيل الجينات حسب الفئات الوظيفية (الأنظمة الفرعية) الناتجة عن التحديد الجيني على الخادم RAST لجينوم *Pseudomonas* sp. S2.

### 3.II. الجينات المرتبطة بتعزيز نمو النبات و المكافحة الحيوية في جينوم *Pseudomonas sp .S2*

سمح التحديد الجيني بإستخدام برنامج Prokka لجينوم *Pseudomonas sp .S2* باكتشاف الجينات المتعلقة بآليات تعزيز نمو النبات والمراقبة البيولوجية المذكورة أدناه.

#### 1.3.II. الجينات المشاركة في تحمل الإجهاد:

أسفر التحليل الجينومي لجينوم *Pseudomonas sp. S2* بإستخدام برنامج Prokka عن وجود عدد كبير من الجينات الهامة التي تشفر لإنزيمات وبروتينات تلعب دورا هاما تحمل الإجهادات الحيوية واللاحيوية. أهم هاته الجينات:

- 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase

حمض 1-أمينوسيكلوبروبان-1-كربوكسيليك (ACC) هو طليعة الإيثيلين الذي يرتفع تركيزه في النبات المعرض للإجهاد الحيوي وغير الحيوي. تم الإبلاغ عن العديد من الكائنات الحية الدقيقة في التربة لإنتاج ACC deaminase الذي يحلل الطليعة ACC مما يؤدي تقليل تركيز الإيثيلين وبالتالي تخفيف حدة الإجهاد في النباتات المضيفة. وجود الجين المنتج لإنزيم ACC deaminase في جينوم السلالة *Pseudomonas sp .S2* يدل على أهمية هاته السلالة في مكافحة الإجهادات النباتية.

كما كشف تحليل الجينوم أن السلالة *Pseudomonas sp .S2* لها عدد من الجينات المتعلقة بتحمل الملوحة. على سبيل المثال تم العثور على الجينات الرئيسية:

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

ينتج عن الإجهادات الحيوية واللاحيوية لدى النبات ارتفاع بعض تركيز بعض المركبات الضارة للخلية مثل: مركبات الأكسجين التفاعلية (Reactive oxygen species or ROS) وهي مركبات كيميائية أكسجينية مثل الجذور الحرة لأيونات الأكسجين والبيروكسيدات، تسمى"تفاعلية " نظرا لنشاطها الكيميائي؛ وهذا النشاط الكيميائي الذي تختص به يكمن في وجود إلكترونات تكافؤ مفردة على تلك الجذور الحرة، هذه الجذور الحرة ضارة لخلايا النبات، بواسطة التحليل الجيني توصلنا للكشف عن عدة جينات تشفر لإنزيمات تقصي هاته الجذور الحرة أهمها:

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

**2.3.II. الجينات المسؤولة عن إذابة الفوسفات غير العضوي:**

حمض الجلوكونيك (GA: Gluconic acid) هو حمض عضوي مسؤول بشكل كبير عن إذابة الفوسفات المعدني. يتم تخليق GA الحيوي بواسطة الجلوكوز -1 ديهيدروجينيز (*gcd*) جنبًا إلى جنب مع العامل المساعد pyrrolo-quinolone quinine (PQQ). أشار التحديد الجيني بإستخدام برنامج Prokka لجينوم *Pseudomonas sp. S2* إلى امتلاك العديد من الجينات المتعلقة بالتخليق الحيوي لحمض الغلوكونيك وجينات العامل المساعد (PQQ).

حمض عضوي آخر تم تحديده الجينات المسؤولة عن انتاجه في جينوم السلالة *Pseudomonas sp. S2* *بإستخدام له* صلة بخاصية إذابة الفوسفات اللاعضوي هو حمض 2-كيتوجلوكونيك (ketogluconic acid-2)، والذي يتم إنتاجه بواسطة الجينات الآتي ذكرها في مايلي:

- Phosphogluconate dehydratase
- 2- ketogluconate reductase

كما تم الكشف عن وجود جينات أخرى ضمن جينوم *Pseudomonas sp .S2* تشفر لإنزيمات تساعد على إذابة الفوسفات اللاعضوي من بينها:

**- Protein phosphatase *CheZ***

يلعب دورًا مهمًا في مسار الانجذاب الكيميائي البكتيري عن طريق تسريع عملية نزع الفسفرة من *CheY* ((CheY−P)).

**- Exopolyphosphatase**

له دور في تحليل متعدد الفوسفات غير العضوي (polyP).

### II.3.3. الجينات المشاركة في إنتاج الهرمونات النباتية:

كشفنا عن عدد من الجينات في جينوم *Pseudomonas sp .S2* المنسوبة إلى إنتاج IAA (Indole-3-acetic acid) من بينها:

- Tryptophan synthase alpha chain and beta chain

- Indole-3-glycerol phosphate synthase

- Aldehyde dehydrogenase.

يلعب IAA دورًا مهمًا في تأثير تعزيز نمو النبات لبعض البكتيريا المفيدة للنبات. عادةً ما تحفز الأكسينات التي تنتجها البكتيريا المرتبطة بالنبات تفرع الجذر واستطالة في النبات المضيف.

كما يتضمن جينوم *Pseudomonas sp .S2* جينات قد تساهم في إنتاج هرمونات أخرى على غرار الجينات المشفرة للبروتينات:

- Isochorismate pyruvate lyase

هذا الإنزيم يساهم في إنتاج هرمون حمض الساليسيليك (Salicylic acid)، حمض الساليسيليك هو هرمون نباتي له أدوار معروفة في نمو النبات وتطوره، والتمثيل الضوئي، والنتح، وامتصاص الأيونات، ونقلها. كما يشارك حمض الساليسيليك في إرسال الإشارات الذاتية ، كما يلعب دور محوري في دفاع النبات ضد مسببات الأمراض.

- Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase

إنزيم تنشيط السيتوكينين يعمل في مسار التنشيط المباشر. يتحكم في نشاط النسيج الإنشائي.

### II.4.3. الجينات المتدخلة في اقتناء الحديد:

على غرار الفسفور، يتوفر الحديد بكثرة في التربة وهو أساسًا في شكل غير متوفر بيولوجيًا. يعمل الحديد كعامل مساعد ومتقبل للإلكترون في العديد من الإنزيمات الأساسية والبروتينات وهو عنصر غذائي مهم للعضوية.

التحليل الجيني لجينوم *Pseudomonas* sp. S2 كشف عن وجود عدد لا بأس به من الجينات التي لها علاقة بإلتقاط الحديد، على سبيل المثال:

- Ferrous-iron efflux pump *FieF*
- Iron-utilization periplasmic protein
- periplasmic iron-binding protein
- Ferripyoverdine receptor
- Bacterioferritin
- Ferri-bacillibactin
- Ferric-pseudobactin
- Ferrochelatase
- Ferredoxin

العدد الكبير من هاته الجينات يؤهل هذه السلالة لتكون عامل ممتاز لتوفير الحديد للنبات المضيف مما ينعكس بشكل واضح على تعزيز نمو النبات.

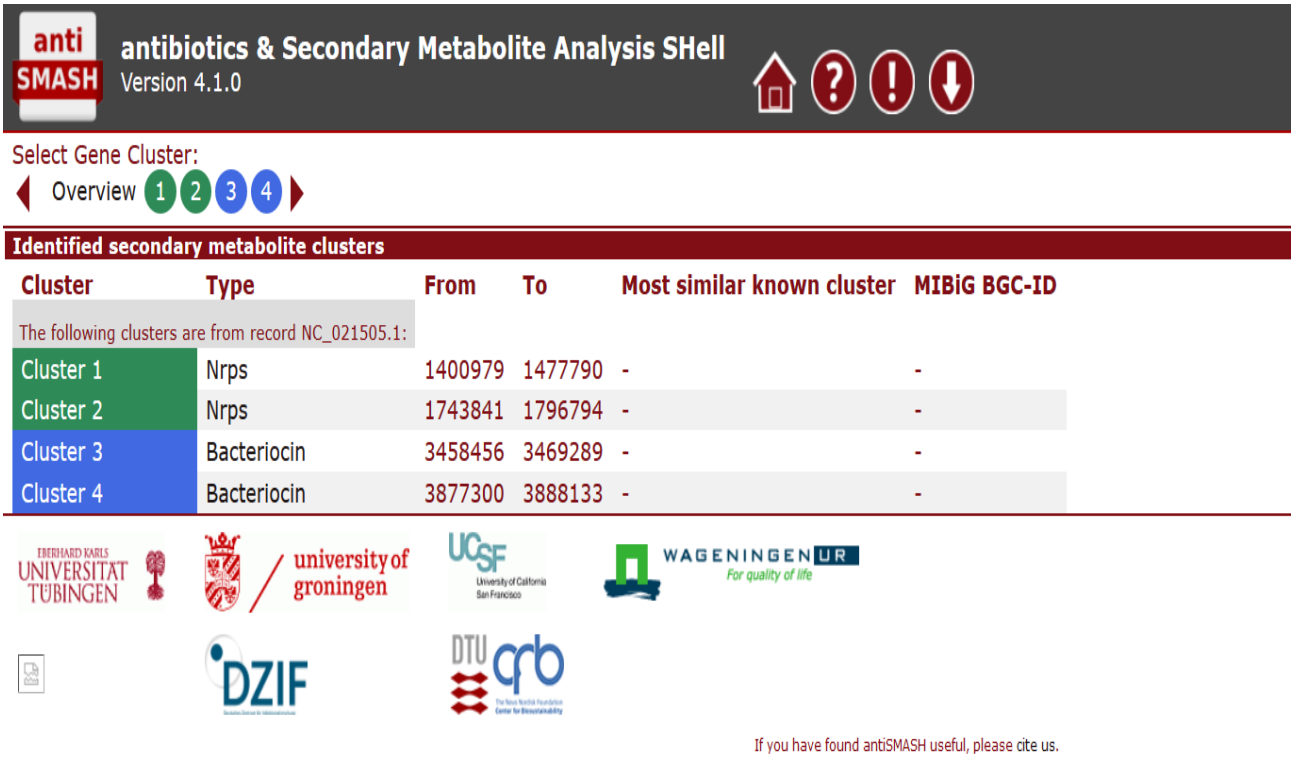
### II.4.3. الجينات المتدخلة في المراقبة البيولوجية:

تنتج البكتيريا الجذرية التي تعزز نمو النبات مركبات كيميائية ذات فوائد مختلفة للنبات من بينها مركبات ذات فاعلية ضد مسببات الأمراض النباتية، تم التعرف على مستوى جينوم *Pseudomonas* sp. S2 على عدة جينات تشفر لمركبات هامة في المكافحة الحيوية.

- Hydrogen cyanide synthase.
- Chitinase.
- Protease.

## 4.I. المجموعات الجينية المسؤولة عن الآيض الثانوي

تحليل الأداة البرمجية antiSMASH لجينوم السلالة *Pseudomonas sp .S2* كشف عن وجود عدة مجموعات جينية (Clusters) الموضحة في **الشكل20** التي قد تكون مسؤولة عن إنتاج مركبات أيضية ثانوية مهمة.




**الشكل(20)**. الكشف عن جميع المجموعات الجينية التي ترمز للمستقلبات الثانوية داخل جينوم *Pseudomonas* sp. S1 بواسطة أداة antiSMASH.

يظهر **الشكل(20)** وجود المجموعات الجينية التي قد تساهم في انتاج المركبات الأيضية الثانوية التالية:

- NRPS.
- Bacteriocin.

## مناقشة النتائج:

الآمن الغذائي عالي الجودة وبأسعار معقولة لعدد متزايد من السكان هو الهدف الزراعي الرئيسي لأي بلد. يتم استخدام تقنيات عديدة لزراعة المحاصيل المختلفة، بما في ذلك استخدام الكيماويات والأسمدة الزراعية على نطاق واسع كإستراتيجية للحد من الخسائر التي تسببها مسببات الإجهادات والأمراض. في العقود القليلة الماضية أثبت الباحثون أن PGPRs لها تأثيرات مفيدة على نمو المحاصيل وكذلك ضد العديد من مسببات الأمراض النباتية ( Pieterse et al., 2003; Van der Ent et al., 2009; Egamberdieva et al., 2011).

تم الكشف عن العديد من الآليات التي تشرح كيف تحفز PGPRs نمو النبات و تشمل:

(1) القدرة على إنتاج أو تعديل الهرمونات النباتية مثل: IAA، حمض الجبريليك، والسيتوكينينات، والإيثيلين ، والمركبات المتطايرة.

(2) التضاد والعداء ضد الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض النباتية عن طريق إنتاج المضادات الحيوية، الإنزيمات الحالة للمكونات الفطرية (الكيتيناز و1-3 جلوكاناز)، HCN ولواقط الحديد (Siderophores).

(3) تثبيت النيتروجين الجوي.

(4) إذابة الفوسفات المعدني والمغذيات الأخرى.

(5) تعديل الإجهادات الحيوية واللاحيوية.

إنزيم ACC deaminase هو إنزيم بكتيري موجود في العديد من بكتيريا المعززة لنمو النبات (PGP) بما في ذلك *Bacillus* و *Pseudomonas* (Saleem et al., 2018; Toklikishvili et al.,2010) تسهم هاته البكتيريا في تحسين تحمل إجهاد النباتات تحت وقع الجفاف ونقص الغذاء والملوحة ومسببات الأمراض النباتية. ومن المثير للاهتمام، أن إنتاج إنزيم ACC deaminase عن طريق تعبير الجين المشفر له في بكتيريا PGP يسهّل بشكل ملحوظ النمو ويخفف من الضغوط البيئية للنباتات المعالجة بهاته البكتيريا أكثر من النباتات غير المعالجة ( Grichko et al. 2001; Tavares et al.2018. نتائج التحليل الجيني أظهرت أن السلالة *Klebsiella* sp. S1 تفتقد للجين المشفر لهذا الإنزيم هذه النتيجة مطابقة لما توصل اليه (Liu et al., 2016)، بينما السلالة

*Pseudomonas* sp. S2 تمتلك الجين المشفر لهذا الإنزيم وهذا يتوافق تماما مع نتائج (Arshad et al., 2008; Ali et al. 2014 ).

النباتات قادرة على حماية نفسها من العوامل المسببة للإجهادات والأمراض النباتية من خلال نظام دفاعي يسمى النظام المضادة للأكسدة المحدد لإنتاج الجذور الحرة تحت ظروف الإجهاد حيث يتم إنتاج مجموعة واسعة من الإنزيمات والمركبات والتي من بينها إنزيمات مضادة للأكسدة ذات الصلة بالدفاع الخلوي، مثل: سيبار أوكسيد ديسمتاز(SOD: Superoxide dismutase), البيروكسيداز (POXs)، كاتلاز (CAT)، البوليفينول أوكسيديز (PPOs)، المتدخلة في الحماية الخلوية ومقاومة الأمراض (Amil-Ruiz et al., 2011; Thakker et al., 2013).

يتم إنتاج الأكسيد الفائق Superoxide $O_2^-$ كمنتج ثانوي لعملية التمثيل الغذائي للأكسجين، وإذا لم يتم تنظيمه فإنه يتسبب في العديد من أنواع تلف الخلايا. كما أن بيروكسيد الهيدروجين ($H_2O_2$) ضار أيضًا ويتحلل بفعل إنزيمات أخرى مثل الكاتلاز (CAT) (Hayyan et al., 2016). وبالتالي فإن SOD و CAT نظام دفاع مهم مضاد للأكسدة في جميع الخلايا الحية المعرضة للأكسجين تقريبًا. كشف التحليل الجيني أن السلالتين *Klebsiella* sp. S1 و*Pseudomonas* sp. S2 أنهما يمتلكان الجينات المشفرة لهذا النظام الهام.

بيروكسيداز (Peroxidase: POX) هو إنزيم رئيسي في التخليق الحيوي لمادة اللجنين (Lignin)، يشارك في تحلل المستويات السامة من بيروكسيد الهيدروجين المتولد في الأنسجة النباتية نتيجة لهجوم العوامل الممرضة (Thakker et al., 2013). من جهة أخرى يحفز إنزيم بولي فينول أكسيداز (PPO: Polyphenol oxidase) أكسدة المركبات الفينولية إلى كينونات (Quinones) والتي تلعب دورًا مهمًا في مقاومة أمراض النبات (Richter et al., 2012). كثيرًا ما تم الإشارة لمشاركة PPOs في الدفاع عن النبات ضد الآفات ومسببات الأمراض (Richter et al., 2012). في دراستنا ، أظهر جينوما السلالتان *Klebsiella* sp. S1 و *Pseudomonas* sp. S2 وجود عدة جينات تشفر لـ Peroxidase و Polyphenol oxidase، مما يشير إلى أهمية هاتين السلالتين في مقاومة موت الخلايا النباتية تحت وقع الإجهادات.

يعد إنتاج الهرمونات النباتية آلية أخرى يمكن من خلالها للبكتيريا الجذرية تعزيز نمو النبات وتحسين إنبات البذور واستطالة الجذور (Goudjal et al., 2013; Khamna et al., 2010).

حمض الإندول-3-أسيتيك (IAA) هو أوكسين طبيعي شائع وهو ناتج استقلاب L-tryptophan في الكائنات الحية الدقيقة (Ruanpanun et al. 2010 ؛ Sapak et al. 2008). العديد من أنواع البكتيريا مثل Streptomyces لديها القدرة على إنتاج IAA وتحسين نمو النبات عن طريق زيادة إنبات البذور واستطالة الجذر والوزن الجاف للجذر (Aldesuquy et al.1998؛ Tokala et al.2002؛ El-Tarabily et al.2008؛ Khamna et al. 2010). في النتائج التي توصلنا إليها، تم العثور على أن السلالتين *Klebsiella* sp. S1 و *Pseudomonas* sp. S2 تمتلك عدة جينات مشفرة لإنزيمات متدخلة في إنتاج IAA.

عدة أبحاث وصفت أهمية وجود لواقط الحديد و HCN و Chitinase و glucanase في سلالات PGPRs حيث تلعب هذه المركبات دورًا رئيسيًا ضد مسببات الأمراض النباتية المختلفة من خلال وبالتالي المساهمة في المكافحة الحيوية و تعزيز نمو النبات.

تم الإبلاغ عن بعض أنواع البكتيريا الجذرية الداخلية لإنتاج سيانيد الهيدروجان Hydrogen cyanide HCN، وهو مركب متطاير مضاد للفطريات، والذي يساهم في قمع العديد من مسببات الأمراض النباتية مثل *Fusarium* (Passari et al., 2015; Aydi Benabdallah et al., 2016). هنا، كشفنا عن امتلاك السلالتان *Klebsiella* sp. S1 الجين Hydrogen cyanide synthase المتدخل المباشر في إنتاج HCN. علاوة على ذلك، تم الإشارة على أن إنتاج HCN هو آلية المكافحة الحيوية الرئيسية لـ *Pseudomonas fluorescens* (Shimizu, 2011). هذه النتائج متوافقة تماما مع نتائج (Liu et al., 2016) ونتائج (Gamalero et al., 2010) .

إنتاج لواقط الحديد Siderophore هو سمة أخرى من سمات المكافحة الحيوية لأنواع PGPRs. يلعب إنتاج لواقط الحديد دورًا مهمًا في أنشطة مقاومة عوامل الإمراض النباتية. قد تساعد البكتيريا الجذرية المنتجة لل Siderophore النبات على امتصاص الحديد من التربة ( Sadeghi et al., 2012 ;Verma et al., 2011). من خلال نتائج التحليل الجيني تم الكشف عن وجود الجينات المشفرة لل Siderophore في كلا السلالتين S1 و S2.

تم العثور على مجموعات الجينات المركبة للببتيدات غير الريبوزومية (NRPs) لتخليق مجموعة متنوعة من الببتيدات غير الريبوزومية النشطة بيولوجيًا، بما في ذلك المضادات الحيوية ( Cane et al. 1998). غالبًا ما تكون الببتيدات غير الريبوزومية معقدة جدًا في التركيب ويصعب تركيبها. إن منتجي

البتيدات غير الريبوزومية هم في الغالب كائنات دقيقة تعيش في التربة، مثل الأكتينوبكتريا والعصيات (Cheng et al. 2002; Horwood et al. 2004). ولكن، تظهر الدراسات الحديثة أن الكائنات الحية الدقيقة البحرية والجذرية قد ظهرت أيضًا كمصادر مهمة للببتيدات غير الريبوزومية (Blunt et al. 2007, 2008).

# الخاتمة

إن استخدام أنواع خاصة من البكتيريا المفيدة و المحفزة للنمو النبات المسماة :البكتيريا الجذرية المعززة للنمو النباتي (PGPRs) كلقاح بيولوجي يعتبر تكنولوجيا فعالة ،نامية، مناسبة ايكولوجيا و أمنة للإستعمال كبديل للمعالجة الكيميائية والإفراط في المبيدات ) (Phytoremediation) في مختلف الميادين الزراعية خاصة على مستوى المحاصيل الزراعية الحساسة والضرورية في توفير أمن غدائي مستديم، وبهدف دراسة آليات البكتيريا في تعزيز وتحفيز نمو النبات و أهميتها في التحكم البيولوجي ( Phytostimulation )بأشكال عدة: توفير المغديات، تثبيت الأزوت و إذابة الفسفور ،إلتقاط الحديد ، انتاج الهرمونات النباتية و المركبات الأيضية الثانوية و المقاومة ضد مسببات الأمراض و تحمل الإجهادات الحيوية واللاحيوية.

أجريت هذه الدراسة لمعرفة الجينات الوظيفية المحددة لصفات PGPRs و أدوارها ومدى أهميتها في إكساب البكتيريا ميزات محفزة لنمو النبات PGPR و مقاومة لعوامل الإجهاد الحيوية و اللاحيوية ، تم التطرق لدراسة تحليلية لجينوم سلالتين من البكتيريا *Klebsiella* sp (S1) و sp (S2) *Pseudomonas*، وتم التطرق في البحث إلى الدراسة التصنيفية الجزيئية للبكتيريا و تحديد نسبة تقارب كل سلالة إلى نوع الجنس المنتمي إليها من خلال تحليل جيني لبيانات الجين ADNr 16S و دراسة النسالة (Phylogeny)، أجريت دراسة تحليلية لبيانات الجينوم الخاصة للعزلتين من البكتيريا PGPRs الأكثر تواجد في التربة من شعبة proteobacteria باستعمال منصة NCBI، دراسة الصفات العامة لجينوم السلالة و ترجمة البيانات الخاصة به بعرض خريطة توضيحية للجينوم باستخدام برنامج DNAPlotter ، دراسة الجينات المرتبطة بالفئات الوظيفية (COG) في جينوم *Pseudomonas* sp (S2) و *Klebsiella* sp. (S1) من خلال عملية التحليل الجيني (Annotation)بواسطة خادمRAST ، وسمح التحديد الجيني بإستخدام برنامج Prokka لجينوم العزلتين باكتشاف و التعرف على الجينات المتعلقة بآليات تعزيز نمو النبات والتحكم البيولوجي ودراسة المجموعات الجينية المسؤولة عن الآيض الثانوي بواسطة أداة التحليل البرمجية antiSMASH، يمكن الإشارة لأهم النتائج المتحصل عليها مايلي:

- مكنت الدراسة الجينية بالتحليل الجزيئي للقطعة "ADNr 16S" ودراسة النسالة (phylogénie) من إثبات تقارب السلالة S1 من النوع *Klebsiella africana* Kp7T بنسبة

تشابه قدرها 99.57% وتقارب السلالة S2من النوع *Pseudomonas juntendi* بنسبة تشابه قدرها 99.64%.

- وجود تواتر جيني هام نسبيا في ما يخص الجينات المتعلقة باستقلاب الآزوت ( Nitrogen metabolism)، بالإجهاد (Stress Reponse)، إستقلاب الفوسفور( Phosphorus) metabolism، وإستقلاب ولواقط الحديد (Iron Acquisition and metabolism ) كما لوحظ غياب الجينات المسؤولة عن الحركة (Motility and chemotaxis ) في السلالة S1 ووجودها في العزلة S2.

سمح التحديد الجيني (Annotation) باكتشاف الجينات المتعلقة بآليات تعزيز نمو النبات والتحكم البيولوجي و أهمها :

- الهرمونات النباتية: تم تحديد وجود في السلالة S1 (IAA) indole-3-acetic acid-1،الاوكسين الهام في تحفيز النبات و الجينات المشفرة الأنزيمات المساعدة في تخليقه و غياب هذا الهرمون في السلالة S2
- ثبيت الأزوت: تم تحديد في السلالتين S1 وS2 وجود جين المشفر لأنزيم النيتروجيناز Nitrogenase المثبت للأزوت الجوي و جينات من نوع *nif* المشفرة للوحدات المكونه له.
- إذابة الفسفوراللاعضوي: تم تحديد أيضا في السلالتين S1 و S2 جينات تشفر لعدة إنزيمات تلعب دورا هاما في إذابة الفوسفات المعدني وتخليق حمض غليكوليك (GA) وأهمها : أنزيم GDHو PQQ
- لواقط الحديد: كذالك تم تحديد في السلالتين S1 وS2 جينات ترمز لتخليق لواقط الحديد Siderophore أهمها :Ferrochelatase ، Iron uptake system component
- المركبات العضوية الطيارة (VOCs): acetoin و2,3-butanediol مركبات تحفيز تكوين الجذور وزيادة مقاومة الأمراض وتحمل الجفاف تم تحديدها في السلالتين S1وS2
- تحمل الملوحة: تم العثور في السلالتين S1 وS2 على الجينات الرئيسية *betA* و *betB* لتخليق glycine-betaine والأنزيمات المضادة للأكسدة والجذور الحرة المجهدة للنبات و أهمها : SOD: Superoxide dismutase ، البيروكسيداز (POXs)، كاتلاز (CAT).

- تحمل الإجهاد : تم تحديد وجود عدد كبير من الجينات الهامة التي تشفر لإنزيمات تحمل الإجهادات الحيوية واللاحيوية في السلالة S2 وغيابها في السلالة S1 و في طليعتهم أنزيم ACC deaminase

المركبات الأيضية الثانوية : تم تحيد وجود عدة مجموعات جينية (Clusters) مسؤولة عن إنتاج المركبات الأيضية الثانوية لها دور في المقاومة البيولوجية وتعمل كمضادات حيوية للممرضات في السلالتين S1وS2 أهمها NRPS ، Bacteriocin

تتضح من خلال مجمل النتائج المحصل عليها، أهمية السلالتين S1 وS2 في تعزيز نمو النبات بتوفير المغذيات و مقاومة الإجهاد الحيوي واللاحيوي والمكافحة البيولوجية ضد الممرضات وتحمل الاجهادات الناجمة عن الجفاف و ملوحة التربة. لذا، فان إمكانية استعمال هذه السلالات كلقاحات للتسميد الحيوي مركبة أو منفردة لها آفاق جد مشجعة في الميدان التطبيقي الفلاحي وإمكانية العمل بها في نطاق واسع لتعزيز المردودية في المحاصيل الزراعية الأساسية وللحد من التكاليف الباهضة ماديا وبيئيا للمعالجة الكيميائية بالمبيدات الحشرية للمحاصيل و بالتالي الحد من تلوث التربة و المياه الجوفية جراء الاستعمال المفرط لها، ومن جهة أخرى، في سياق ما تسعى إليه الدراسات والأبحاث المخبرية الحالية و تناقشه الملتقيات العالمية لدراسة سبل توفير حلول مستدامة للتغييرات المناخية القاسية جراء الإحتباس الحراري خاصة في المناطق الجافة و الشبه الجافة من القارة كتعزيز قدرة النبات على التأقلم و تحمل عوامل الإجهاد لتوفير أمثل لمصادر العيش و الاستقرار الغذائي.

# المراجع

**Ahemad, M., Khan, M.S., 2012**. Comparative toxicity of selected insecticides to pea plants and growth promotion in response to insecticide-tolerant and plant growth promoting Rhizobium leguminosarum. Crop Protection 29 (4), 325_329.

**Ahemad, M., 2012**. Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review. Journal of Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology (IIOAB) 3 (3), 39_46

**Ahemad, M., Malik, A., 2011**. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. Bacteriol J 2, 12_21.

**Ait Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y. & Wezel, G. P. van. (2016)**. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 80: 1–43.

**Ali, S. Z., Sandhya, V., & Rao, L. V. (2014).** Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent Pseudomonas sp. Annals of microbiology, 64(2), 493-502.

**Arshad, M., Shaharoona, B., & Mahmood, T. (2008)**. Inoculation with Pseudomonas spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (Pisum sativum L.). Pedosphere, 18(5), 611-620.

**Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... & Meyer, F. (2008)**. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC genomics, 9(1), 1-15.

**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

**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.

**Ait-Ameur , Y ., Gibson, J. P., Méry , D (2014).** On implicit and explicit semantics integration issues in proof-based development of systems. In: Margaria ,T., Steffen,B.(eds.) Isola LNCS,vol.8803,pp 604-618.

**Alexandratos, N. and Bruinsma, J. (2012) .**World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision (No. 12-03, p. 4) Rome, FAO: ESAWorking paper.

**Ameur LH, Ghoul M (2014).** Effect of salinity stress, Streptomyces sp. SF5 and Salsola vermiculata on germination of Triticum durum.

**Bashan,Y.,G. Holguin .(2004)**.Azospirillum-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). Can. J. Microbiol., 50: 521-577.

**Becker B., Lechevalier M. P. and Lechevalier H. A. (1965)**. - Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol., 13:236-242.

**Benabdoun F.M., (2012)**. Étude moléculaire des étapes précoces de la symbiose actinorhizienne Casuarina-Frankia : analyse fonctionnelle des gènes de la plante hôte contrôlant l'infection. Doctorat Biotechnologie et Génomique Végétales, Université Mentouri Constantine.

**Benmati mahbouba, Le Roux christine, Belbekri nadir, Ykhlef nadia and Djekoun abdelhamid, (2014).** Phenotypic and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from the rhizosphere of wheat (Triticum durum Desf ) in Algeria.

**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology2nd Edition. Volume 4(2004).** - Taxonomic outline of the procaryotes. Editors: Garrity GM, Bell J. A, Lilburn T. G. Springer-Verlag, New York. 401 p.

**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology2nd Edition. Volume 5(2012).** - The Actinobacteria. Editors: Whitman W. B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M. E., Ludwig W. Suzuki K.-I., Parte A. 1750 p.

**Boughachiche F., Reghioua S., Zerizer H., Boulahrouf A. (2012).** Antibacterial activity of rare Streptomyces species against clinical resistant bacteria. Ann Biol Clin., 70:169–74.

**Cane DE, Walsh CT, Khosla C (1998)** Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. Science 282:63–68.

**Chang Z, Flatt P, Gerwick WH, Nguyen VA, Willis CL, Sherman DH (2002)** The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed

polyketide synthase (PKS)-nonribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit. Gene 296:235–247.

**Chapman ,G.A. (1975),** Toxicity of copper , cadmium and zinc to pacific Northwest salmonids.U.S.EPA. Corvallis, Oregon .

**Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W., 2014**. Agricultural uses of plant biostimulants. Plant Soil 383 (1_2), 3_41.

**Coombs J. T. and Franco C. M. M. (2003).** Isolation and identification of actinobacteria from surfacesterilized wheat roots. Appl. Environ. Microbiol.,69: 5603-5608.

**Dashti, A.M.K. (2011)**. Isolation and characterization of Azotobacter spp. in Erbil soils and the effect of biofertilizers (Azotobacterchroococcum and traansconjugant lactobacillus plantaruum) on nutrient uptake by wheat. Ph.D. thesis. College of Agriculture. University of Salahaddin–Erbil.

**Elyagoubi Larbi. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, P 143.

**El-Tarabily KA (2008)** Promotion of tomato (Lycopersicon esculen-tum Mill) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. Plant Soil 308:161–174.

**Egamberdieva, D., Kucharova, Z., Davranov, K., Berg, G., Makarova, N., Azarova, T., ... & Lugtenberg, B. (2011)**. Bacteria able to control foot and root rot and to promote growth of cucumber in salinated soils. Biology and fertility of soils, 47(2), 197-205. .

**Fernando deAraujo, F., 2008.** Inoculac¸a˜o de sementes com Bacillus subtilis, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algoda˜o. Cieˆncia e Agrotecnologia 32 (2), 456_462.

**Grichko, V. P. & Glick, B. R( 2000) .** Amelioration of fooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. Plant Physiol Biochem. 39, 11–17 (2001).

**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.

**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.

**Garcia C. L., Martínez-Molina E. and Trujillo M. E. (2010**). Micromonospora pisi sp. nov., isolated from root nodules of Pisum sativum. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,60: 331-337.

**Genilloud, O., González, I., Salazar, O., Martín, J., Tormo, J. R. & Vicente, F. (2011).** Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.,38: 375–389.

**Glick, B.R., 2012.** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications.

Scientifica 2012, Article ID963401.

**George, M., Anjumol, A., George, G. & Mohamed Hatha, A. A. (2012).** Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. Afr. J. Microbiol. Res., 6.

**Goodfellow M., Mordarski M. and Williams S. T. (1988)**. The biology of the actinomycetes. Academic Presss, London. pp. 7-164.

**Goodfellow M., Simpson K. E. (1987).** Ecology of streptomycetes. Frontiers Appl. Microbiol., 2: 97-125.

**Goudjal Y., Toumatia O., Yekkour A., Sabaou N., Mathieu F. and Zitouni A. (2014).** Biocontrol of Rhizoctoniasolani damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plantsof Algerian Sahara. Microbiol. Res., 169: 59-65.

**Gupta, A., Meyer, J.M., Goel, R., 2002.** Development of heavy metal-resistant mutants of phosphate solubilizing Pseudomonas sp. NBRI 4014 and their characterization. Curr. Microbiol. 45 (5), 323_327.

**Gupta R. S. (2011)**. - Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. Antonie van Leeuwenhoek, 100: 171-182.

**Hynes, R.K., Leung, G.C., Hirkala, D.L., Nelson, L.M., 2008**. Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western Canada. Can. J. Microbiol. 54 (4), 248_258.

**Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F. and Kloepper J. W. (1997).** Bacterial endophytes in agricultural, crops. Can. J. Microbiol., 43: 895-914.

**Hassen, A. A., Xu, J., & Yang, J. (2007).** Growth conditions of associative nitrogen-fixing bacteria Enterobacter cloace in rice plants. Agric. J., 2, 672-675.

**Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. (2011).** BioEdit: an important software for molecular biology. GERF Bull Biosci, 2(1), 60-61.

**Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016).** Superoxide ion: generation and chemical implications. Chemical reviews, 116(5), 3029-3085.

**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.

**Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I., 2010**. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Annals of Microbiology 60 (4), 579_598.

**Jahanian, A., Chaichi, M.R., Rezaei, K., Rezayazdi, K., Khavazi, K., 2012**. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and primary growth of artichoke (Cynara scolymus). Journal of Crop Science and Biotechnology 4, 923_929.

**Jensen PR, Dwight RY, Fenical W(1991)**. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. Appl Environ Microbiol.;57(4):1102-1108.

**Kaya A. (2009).** Identification of a novel system for boron transport: Atr1 is a main boron exporter in yeast. Mol Cell Biol 29(13):3665-74.

**Kerkab,S (2010),** Les actinomycètes d'un sol salé:rôle des osmoprotecteurs naturels.memoire de magistere :génie microiologique . sétif : Université Ferhat Abbas,pp :116.

**Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C. & Chun, J. (2014**). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,64: 346–351.

**Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E. and Goodfellow M. (1990).** Taxonomic revision of the actinomycete genera Actinomadura and Microtetraspora. Syst. Appl. Microbiol.13:148-160.

**Kumar D , Palaniyandi K ,Challu VK , Kumar P , Narayanan S (2013).**PKnE , a serine / threonine protein kinase from Mycobacterium tuberculosis has a role in adaptive responses . ArchMicrobiol195:75-80.

**Kumar, S., Pandey, J. P., and Sinha, A. K. (2015)**. Systematic Study of Iron Removal from Water by Traditional Method", Physical and Environmental Science Bulletin, Vol 3, Issue 1 & 2, 19-23, published by PESB Journals, NOIDA, Uttar Pradesh.

**Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018)**. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution, 35(6), 1547-1549.

**Kumar, A., Verma, H., Singh, V.K., Singh, P.P., Singh, S.K., Ansari, W.A., et al., 2017** Role of Pseudomonas sp. in Sustainable Agriculture andDisease Management. Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture. Springer, Singapore, pp. 195_215.

**Khan, A.G., 2005**. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. J. Trace Elem. Med. Biol. 18 (4), 355_364.

**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.

**Lahoum, A. (2017).** Souches d'actinobactéries mycéliennes des sols sahariens : mise en évidence de nouvelles espèces et de nouveaux antibiotiques et réduction de la concentration en aflatoxine B1. Thèse de doctorat. École Normale Supérieure (ENS) de Kouba,Alger. 269p

**Lahoum, A., Verheecke-Vaessen, C., Bouras, N., Sabaou, N. & Mathieu, F. (2017).** Taxonomy of mycelial actinobacteria isolated from Saharan soils and their efficiency to reduce aflatoxin B1 content in a solid-based medium. Ann. Microbiol., 67: 231–237.

**Lechevalier M. P. (1989)**. Actinomycetes in agriculture and forestry. In: Goodfellow M., Williams S. T., Williams M. M. (eds) Actinomycetes in biotechnology. Academic, New York, NY, pp 327-358.

**Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., ... & Breitling, R. (2011)**. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. Nucleic acids research, 39(suppl_2), W339-W346

**Ma, Y., Rajkumar, M., Luo, Y., Freitas, H., 2011**. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants-effects on plant growth and Ni uptake. J. Hazard. Mater. 195, 230_237.

**Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B.R., 2004**. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiol. Biochem. 42 (6), 565_572.

**Maheshwari V,. (2010)** Ion mediated monolayer deposition of gold nanoparticles on microorganisms: discrimination by age. Langmuir 26(1):371-7.

**Manikkam R., Venugopal G., Ramasamy B. and Kumar V. (2015).** - Effect of critical medium components and culture conditions on antitubercular pigment production from novel Streptomyces sp. D25 isolated from Thar desert, Rajasthan. J. Appl. Pharma. Sci., 5: 15-19.

**Mezaache S, (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de Pseudomonas isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de Doctorat. Université de Ferhat Abbas Sétif, Algérie.

**Mirza, M.S.; Ahmed, W.; Latif, F.; Haurat, J.; Bally, R.; Normand, P. and Malik, K.A. (2001).**Isolation partial characterization and the effect of plant growth– promoting bacteria (PGPB) on micro–propagated sugarcane in vitro. Plant and soil, 237: 47–54

**Munns R , Tester M (2008)** .Mechanisms of salinity. Annu Rev plant boil 59:651-681.

**Okazaki T. (2003)**. Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. In: Kurtbooke I (ed) Selective isolation of rare actinomycetes. National Library of Australia, Canberra, pp. 102-122.

**Pieterse, C. M., van Pelt, J. A., Verhagen, B. W., Ton, J. U. R. R. I. A. A. N., van Wees, S. C., Léon-Kloosterziel, K. M., & Van Loon, L. C. (2003).** Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. Symbiosis, 35, 39-54.

**Paul, D. and Sinha, S.N. (2013).** Phosphate solubilizing activity of some bacterial strains isolated form Jute mill effluent exposed water of River ganga. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences ISSN: 2231–6345.

**Patil, S.S., Adetutu, E.M., Rochow, J., Mitchell, J.G., Ball, A.S., 2014**. Sustainable remediation: electrochemically assisted microbial dechlorination of tetrachloroethene-contaminated groundwater. Microbial Biotechnology 7 (1), 54_63.

**Rickes EL, Brink NG, Koniuszy FR, Wood TR, Folkers K(1948**). Crystalline vitamin B12. Sci. 107(2781):396-397.

**Rizvi A , Khan MS , Ahmad E (2014).** Inoculation impact of phosphate-solubilizing microorganisms on growth and development of vegetable crops, Springer International Publishing , Switzerland , pp 287-297.

**Rodriguez, H. and Fraga, R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17: 319–339.

**Russo, A., Vettori, L., Felici, C., Fiaschi, G., Morini, S., Toffanin, A., 2008**. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of Azospirillum brasilense Sp245 on Prunus cerasifera L. clone Mr. S 2/5 plants. J. Biotechnol. 134 (3), 312_319.

**Rajkumar, M., Freitas, H., 2008**. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of Ricinus communis in soil contaminated with heavy metals. Chemosphere 71 (5), 834_842.

**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.

**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.

**Richardson, E. J., & Watson, M. (2013)**. The automatic annotation of bacterial genomes. Briefings in bioinformatics, 14(1), 1-12.

**Sabaou, N. (1988)**. Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes : systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger.192 p.

**Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L., Bennadji, H., Lefèbvre, G. & Germain, P. (1998)**.les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. Sécheresse, 9: 147–153.

**Santi C., Bogusz D and Franche C., (2013).** Biological nitrogen fixation in non-Legume plants, Annals of Botany 111 : 743-767.

**Sardi P., Saracchi M., Quaroni S., Petrolini B., Borgonovi G. and Merli S. (1992)**. Isolation of endophytic Streptomyces strains from surface-sterilized roots. Appl. Environ. Microbiol.,58: 2691-2693.

**Sathya ,A. ; Vijayabharathi,R. ;Gopalakrishnan 2017**,S.Plant growth-promoting actinobacteria :A new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes .3 Bioteclt,7, 102

**Sayar , K . (2010)**. Sufi psychology .6th Edition .Istanbul : Timas.

**Schatz A, Bugie E, Waksman SA, Hanssen AD, Patel R, Osmon DR(2005).** The classic: streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Clin Orthop Relat Res.; 437:3-6.

**Sharma SB , Sayyed RZ , Trivedi MH, Gobi TA (2013) .** Phosphate solubilizing microbes : sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus 2:587.

**Saleem, A. R. et al.(2018)** Drought response of Mucuna pruriens (L.) DC. inoculated with ACC deaminase and IAA producing rhizobacteria. PLoS One 13, e0191218 (2018).

**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.

**Solans M., Vobis G., Cassan F., Luna V. and Wall L. G. (2011**). Production of phytohormones by root-associated saprophytic actinomycetes isolated from the actinorhizal plant Ochetophila trinervis. World J. Microbiol.Biotechnol.,27: 2195-2202.

**Solecka, J., Zajko, J., Postek, M. & Rajnisz, A. (2012).** Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. Open Life Sci., 7.

**Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M., 2004.** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. Crit. Rev. Microbiol. 30 (4), 205_240.

**Stackebrandt E. and Goebel B. M. (1994).** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol., 44: 846-849.

**Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,47: 479–491.

**Stephen, P.et G. Klobus (2005).** Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. Physiol. Plant.: 125, 31-40.

**Subramaniam, Gopalakrishnan, Arumugam, Sathya, Rajendran,(2016).**general assembly of the UN recently declared the "International Year of Pulses.

**Singh, V.K., Singh, A.K., Kumar, A., 2017**. Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. 3 Biotech 7 (4), 255.

**Tank, N., Saraf, M., 2010**. Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. J. Plant Interact. 5 (1), 51_58.

**Toklikishvili, N. et al.(2010)** Inhibitory efect of ACC deaminase-producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by Agrobacterium tumefaciensor A. vitis. Plant Pathol. 59, 1023–1030 .

**Tavares, M. J., Nascimento, F. X., Glick, B. R. & Rossi, M. J (2018).** The expression of an exogenous ACC deaminase by the endophyte Serratia grimesiiBXF1 promotes the early nodulation and growth of common bean. Lett. Appl. Microbiol. 66, 252–259 (2018).

**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.

**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.

**Tiwari, K. & Gupta, R. K. (2013).** Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. Crit. Rev. Microbiol., 39: 256–294.

**Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Yao, L., Du, B., 2009**. Genetic diversity of siderophoreproducing bacteria of tobacco rhizosphere. Brazil. Journ. Micro. 40 (2), 276_284.

**Tilak, K.V.B.R., Ranganayakil, N., Pal, K. K., De, R., Saxena, A.K., Nautiyal, C.S., Shilpi, M., Tripathi, A. K. & Johri, B. N. (2005)**. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Curr. Sci., 89, 136-150.

**Vaxevanidou, K., Christou, C., Kremmydas, G.F., Georgakopoulos, D.G., Papassiopi, N.,2015**. Role of indigenous arsenate and iron (III) Respiring microorganisms in controlling the mobilization of arsenic in a contaminated soil Sample. Bull. Environ.Contam. Toxicol. 94 (3), 282_288.

**Van der Ent, S., Van Wees, S. C., & Pieterse, C. M. (2009).** Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. Phytochemistry, 70(13-14), 1581-1588.

**Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Bruccoleri, R., ... & Breitling, R. (2015).** antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. Nucleic acids research, 43(W1), W237-W243.

**Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, Rge. & other authors. (1987).** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,37: 463–464.

**Wenfeng Wang, Hongming Tan (2014)** , Lixiang Cao ... Endophytic non- filamentous actinobacteria had been isolated from ... Applied Microbiology and Biotechnology; 98: 6375-6385.

**Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M., Ludwig, W. & Suzuki, K. (2012)**. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. Springer Science & Business Media.

**Wood, N.T., 2001.** Nodulation by numbers: the role of ethylene in symbiotic nitrogen fixation. Trends Plant Sci. 6 (11), 501_502.

**Wani, P.A., Khan, M.S., 2010**. Bacillus species enhance growth parameters of chickpea (Cicer arietinum L.) in chromium stressed soils. Food Chem. Toxicol. 48 (11),3262_3267.

**Zamoum M.(2016).** - Actinobactéries endophytes des écosystèmes sahariens: isolement, caractérisation et biocontrôle de Fusariumoxysporum f. sp. radicislycopersici, agent causal de la pourriture racinaire et du collet de la tomate (Solanumlycopersicum L.). Thèse de Doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 161 p.

**Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2004)**. Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from Saccharothrix sp. SA 103. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. J. Antibiot. (Tokyo), 57, 367-372.

**Zitouni, A., Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. & Labeda, D. P. (2004).** Saccharothrixalgeriensis sp. nov., isolated from Saharan soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,54: 1377–1381.

**محمد محمد و أخرون.(2000)** : زراعة القمح ، منشأة المعارف ،الإسكندرية ، القاهرة ،جمهورية مصر العربية.

نزار .م.(1999): الهرمونات النباتية و استخدامها و اثارها على صحة الاسنان.مجلة القافلة48 (1) 48-44، المملكة العربية السعودية.