بناء مكتبة ترانسبوسون شاملة لبكتريا *Enterobacter* sp. SA187 المحفزة لنمو النبات

عبد الرحمن عبد الرشيد هاشم

إشراف

أ.د. رشاد رزق الهندي

المستخلص

يُعتقد أن النباتات النامية تحت الظروف غير المواتية تستعين في نموها على الكائنات الدقيقة المتعايشة معها والتي تسمى البكتريا المحفزة لنمو النبات. وتعتبر *Enterobacter* sp. SA187 مثال جيد لهذه لبكتريا والتي تم عزلها من العقد الجذرية لنبات *Indigofera argentea* من منطقة جيزان في المملكة العربية السعودية. أظهرت بكتريا SA187 عدة سمات تتصف بها البكتريا المحفزة لنمو النبات مثل استحواذها للغذاء وانتاج الهرمونات، بالإضافة الى تحسين نمو نباتات المحاصيل التي تعاني من العوامل البيئية المجهدة لنموها. أظهر التسلسل الجينومي الكامل لبكتريا SA187 قدرات أيضية مختلفة من ٤٣٤٧ جين مشفرة لبروتينات متوقعة من خلال أكواد لتسلسلات.DNA اشتملت المكتبة المبنية نظريا طفرات جينية شاملة، لجينوم SA187 تحتوي على حوالي ١٦٠٠٠ طفرة من البكتريا للتعرف على الجينات الضرورية/ المسارات المسؤولة عن هذه التأثيرات الإيجابية التي تقوم بها هذه البكتريا مع النباتات التي تتعايش معها، ولربط الأنماط المختلفة والوظائف مع مساراتها وتسلسلاتها الجينية، اكتسبت جميع الطفرات التي تم الحصول عليها على مقاومة للمضاد الحيوي كانااميسين كمؤشر. تم بناء هذه المكتبة بواسطة نظام Tn5 ترانسبوسون، وتم التعرف على موقع حدوث الطفرة في الجينوم لهذه الطفرات من خلال قراءة تسلسل DNA بواسطة تقنية سانجر باستخدام برايمرات عكسية تقرأ تسلسل DNA في الاتجاه المعاكس لمكان حصول الطفرة في الجينوم، والتي تبدأ القراءة من أطراف DNA الغريب التي تم إدخالها في الجينوم البكتيري. تم التعرف على عدد من الجينات التي تم تحورها (إبطال عملها)، منها جينات مسؤولة عن الحركة، وأخرى مسؤولة عن أيض الكربوهيدرات، وجين مسؤول عن الزوائد السطحية، بالإضافة إلى بروتينات غير معروفة الوظيفة، لكن أهمهم كانت طفرة TrpCF المسؤولة عن البناء الحيوي للتربتوفان والذي يساهم لاحقا في بناء إندول حمض الخليك. ستزودنا مكتبة الطفرات هذه بالأدوات المناسبة للبحث عن الجينات الضرورية في بكتريا SA187 المسؤولة عن تحفيز نمو النبات تحت الظروف البيئية الصعبة، إما في صورتها المتعايشة مع النبات العائل، أو في ظروف حياتها حرة بعيداً عن النبات.

Constructing a comprehensive transposon library of the plant growth promoting bacterium *Enterobacter* sp. SA187

Abdulrahman Abdulrashid Hashim

Supervised by

Prof. Dr. Rashad Rizq Al-Hindi

Abstract

Plants surviving under stressed conditions are believed to benefit from associated microorganisms named plant growth promoting bacteria (PGPB). *Enterobacter* sp. SA187 is a model PGPB that was isolated from the root nodules of *Indigofera argentea*, Jazan region, Kingdom of Saudi Arabia. SA187 showed several PGPB traits for nutrient acquisition, hormone production, as well as enhancing the growth of crop plants under different abiotic stresses. A complete genome sequence of the SA187 showed different metabolic capacity with 4,347 predicted protein-coding DNA sequences (CDS). To identify the essential genes/ pathways involved in the beneficial SA187/ plant interaction and to correlate different phenotypes and functions to their genomic sequences and pathways, we constructed a saturated mutant library using Tn5 random mutagenesis. The generated library theoretically covered all the genome of SA187 with approximately 16,000 generated clones, all obtained mutants acquired the resistance to the antibiotic Kanamycin as a marker. The Tn5 insertion SA187 library was mapped using Sanger sequencing with specific primers designed for amplification of the flanking region of transposon sequence. Large number of genes were identified including genes involved in mobility, carbohydrates metabolism, surface appendages as well as protein with unknown function, but most importantly, the TrpCF mutant responsible for tryptophan biosynthesis, which eventually contributes to the synthesis of indole3-acetic acid (IAA). Overall, the generated mutagenesis library provides a toolbox to screen and identify the essential genes involved in the SA187 lifestyle as a free-living soil bacterium and as an endophytic bacterium within its host plant.