

## The growth promoting effect of native cyanobacterial strains on rice germination, as well as a *In silico* analysis of ammonium transporter (*OsAMT*) gene family

Ali Akbar Babajanpour Bora<sup>1</sup>, Gholam Ali Ranjbar<sup>2</sup>, Seyed Hamid Reza Hashemipetroudi<sup>3</sup>(ORCID: 0000000208701691), Ghorban Ali Nematzadeh<sup>2</sup>, Hamid Reza Najafi Zarrini<sup>4</sup>

1. Ph.D. Student in Genetic and Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran.

2. Professor, Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran.

3. Assistant Professor, Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Iran.

4. Associated Professor, Department of Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

Correspondence:  
Seyed Hamid Reza Hashemipetroudi  
Email: [shr.hashemi@sanru.ac.ir](mailto:shr.hashemi@sanru.ac.ir)

Received: 10, Mar. 2024

Accepted: 18, Aug. 2024

**How to cite:**

Babajanpour Bora, A. A., Ranjbar, Gh. A., Hashemipetroudi, S. H. R., Nematzadeh, Gh. A., & Najafi Zarrini, H. R. (2024). The growth promoting effect of native cyanobacterial strains on rice germination, as well as a *In silico* analysis of ammonium transporter (*OsAMT*) gene family. *Crop Biotechnology*, 14 (1), 45-65.  
(DOI: [10.30473/cb.2024.70775.1961](https://doi.org/10.30473/cb.2024.70775.1961))

### ABSTRACT

Cyanobacteria improve soil fertility and organic product productivity by synthesizing growth-promoting substances, phosphate solubilization, and biological nitrogen fixation. We investigated the effect of eight various cyanobacterial strains on the germination-stage development of three different rice varieties namely Fajr, Roshan, and Tarem. The ammonium transporter (AMT) gene family was studied because ammonium is the most favored form of nitrogen that flooded rice can absorb. The majority of the experimental parameters were considerably impacted by cyanobacteria. In contrast to the qualitative cultivar Tarem Hashemi, germination characteristics were considerably enhanced when eight cyanobacteria strains were co-cultivated with two high-yielding cultivars, Roshan and Fajr. The amounts of nitrate and ammonium were highest in strain 7, with concentrations of 0.08 µg/ml and 0.010 µg/ml, respectively, out of the eight strains tested for nitrogen excretion. *In silico* analysis discovered 12 gene loci and 15 *OsAMT* isoforms in the rice genome. Examining the *OsAMT* gene family members in protein domain-specific databases revealed that all of the examined genes (excluding *OsAMT3;4*) include an ammonium-transporting protein domain. Three groups of *OsAMTs* were identified based on their gene structures and evolutionary relationships; each group shared common motif patterns and exon/intron order. The identification of active and inactive *OsAMT* genes in bioinformatic analysis could bring new insights into functional genomics studies of the rice ammonium transporter gene family, particularly in co-cultivation with cyanobacteria.

### KEY WORDS

Ammonium transporter proteins (AMTs), co-culture, cyanobacteria, nitrogen fixation, *Oryza sativa*.



© 2024, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/>

## «مقاله پژوهشی»

### اثر محرک رشدی سویه‌های بومی سیانوباکتری بر جوانه‌زنی برنج همراه با تحلیل بیوانفورماتیکی خانواده ژنی آمونیوم ترانسپورتر (OsAMTs)

علی اکبر باباجانپوربورا<sup>۱</sup>، غلامعلی رنجبر<sup>۲</sup>، سید حمیدرضا هاشمی پطروودی<sup>۳</sup> (از کد: ۱۶۹۱-۰۸۷۰-۰۰۰۰۰۰۰۰)، قربانلی نعمتزاده<sup>۲</sup>، حمیدرضا نجفی زرینی<sup>۲</sup>

#### چکیده

سیانوباکتری‌ها به دلیل ثبت بیولوژیکی نیتروژن، محلول‌سازی فسفات و تولید مواد تقویت‌کننده رشد نقش مهمی در بهبود حاصلخیزی خاک و افزایش بهره‌وری محصولات ارگانیک دارند. این تحقیق تأثیر سویه‌های مختلف سیانوباکتری (هشت سویه) بر رشد سه رقم برنج (فجر، روشن و طارم) در مرحله جوانه‌زنی، بررسی شد. با توجه به فرم ترجیحی جذب نیتروژن در برنج‌های غرقاب (آمونیوم)، مطالعه خانواده ژنی انتقال دهنده‌های آمونیوم (AMT) مدنظر قرار گرفت. در این آزمایش اثر سیانوباکتری بر صفت‌های درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه، وزن خشک تک بوته و وزن تر تک بوته مورد مطالعه معنی دار بود. بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی در همکشی دو رقم پرمحصول روشن و فجر با هشت سویه سیانوباکتر، نسبت به رقم کیفی طارم هاشمی معنی دار بود. میزان برونو ریزش ازت در هر هشت سویه متفاوت بوده و بالاترین میزان برونو ریزش نیترات و آمونیوم در سویه شماره ۷ به ترتیب به مقدار ۰/۰۸ میکروگرم بر میلی لیتر و ۰/۰۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. در بررسی بیوانفورماتیکی، ۱۲ مکان ژنی و ۱۵ ایزوفرم OsAMT در ژنوم گیاه برنج شناسایی شد. بررسی اعضای خانواده ژنی OsAMT در پایگاه‌های اختصاصی دمین نشان داد که همه ژن‌های مورد بررسی (جز ۳.۴ OsAMT) دارای دمین پروتئینی انتقال دهنده آمونیوم می‌باشند. بررسی ساختار ژنی و روابط تکاملی OsAMT‌ها نشان داد، همه OsAMT‌ها در سه گروه طبقه‌بندی شده که هر گروه از الگوهای متیف و ساختارهای اگزون/اینtron مشابه برخوردارند. شناسایی ژن‌های فعل و غیرفعال OsAMT در آنالیز این سیلیکو می‌تواند در مطالعات بررسی ژنومیکس عملکردی خانواده ژنی انتقال دهنده آمونیوم برنج خصوصاً در شرایط همکشی با سویه‌های سیانوباکتر راه‌گشا باشد.

#### واژه‌های کلیدی

انتقال دهنده آمونیوم، ثبت نیتروژن، جوانه‌زنی، خانواده ژنی، همکشی سیانوباکتر، *Oryza sativa*

۱. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۲. گروه ژنتیک و بهنژادی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۳. گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و

زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و

منابع طبیعی ساری، ایران.

نویسنده مسئول:

سید حمیدرضا هاشمی پطروودی  
رایانه‌ام: [shr.hashemi@sanru.ac.ir](mailto:shr.hashemi@sanru.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۸

استناد به این مقاله:

باباجانپوربورا، علی‌اکبر؛ رنجبر، غلامعلی؛ هاشمی پطروودی، سید حمیدرضا؛ نعمتزاده، قربانلی و نجفی زرینی، حمیدرضا (۱۴۰۳). اثر محرک رشدی سویه‌های بومی سیانوباکتری بر جوانه‌زنی برنج همراه با تحلیل بیوانفورماتیکی خانواده ژنی آمونیوم ترانسپورتر (OsAMTs)، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۱)، ۶۵-۶۵.

(DOI: [10.30473/cb.2024.70775.1961](https://doi.org/10.30473/cb.2024.70775.1961))



حق انتشار این مستند، متعلق به نویسنده‌گان آن است. ©. ناشر این مقاله، دانشگاه پیام نور است.

این مقاله تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) منتشر شده و استفاده از آن با ارجاع صحیح مجاز است.

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

<https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/>

Rai and Shukla, 2020) و تولید محصولات را افزایش می‌دهند (Mikroorganismهایی که بیشتر به عنوان کود زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از: ثبیت کننده‌های نیتروژن، ریزوباکتری‌های محرک رشد (PGPR) مانند آرتوپاباکتر، آزوسپیریلوم و باکتری‌های حل کننده فسفر (PSB) نظیر باسیلوس و سیانووباکتری‌ها و سایر موجودات مفید میکروسکوپی (Adhikari *et al.*, 2021).

امروزه ثبیت نیتروژن به روش همزیستی در غلات، برای پایه‌گذاری روش‌های نوین کشاورزی پایدار بسیار حائز اهمیت بوده که به نوبه خود منجر به تعدیل تبعات نامطلوب زیست محیطی ناشی از مصرف کودهای مصنوعی می‌شود (Tesi *et al.*, 2020). گیاهان نیتروژن را ترجیحاً به صورت آمونیوم و نیترات جذب می‌کنند. ضمن اینکه در شرایط بی‌هوایی، آمونیوم شکل اصلی نیتروژن موجود در گیاهان است (Wang *et al.*, 2023). سیانووباکتری‌ها به دلیل توانایی همزیستی و امکان تعامل با گیاهان آوندی/غیر آوندی از یکسو و تولید مواد تقویت کننده رشد نظیر برخی از هورمون‌های گیاهی، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی از سوی دیگر شناخته شده‌اند (Yanti and Hamid, 2021). بررسی‌ها نشان می‌دهد سیانووباکتری‌ها یکی از عوامل مهم زیستی در بسیاری از خاک‌های کشاورزی خصوصاً در برنج بوده که با تشکیل کلونی‌هایی در ریشه در ثبیت بیولوژیکی نیتروژن، محلول‌سازی فسفات و آزادسازی مواد معدنی مشارکت دارند (Yanti and Hamid, 2021). در کشور هند، بخش اعظمی از نیاز نیتروژن مزارع شالیزار با عملکرد سیانووباکتری‌های ثبیت کننده نیتروژن مانند Tolypothrix و Aulosira، Anabaena تأمین می‌شود که افزایش ۳۰ درصدی بهره‌وری محصول را در پی دارد (Patel *et al.*, 2021). لازم بذکر است سیانووباکتری‌ها به دلیل ویژگی‌های امکان بقا در شرایط نوسان محیطی، قادرند در شرایط بسیار

## مقدمه

توسعه ابزارهای زیستفناوری امکانات جدیدی برای جهت تولید دائمی وسیعی از محصولات مختلف را فراهم آورده است. از جانداران مفید و مهم خاک می‌توان به سیانووباکترها اشاره نمود که امروزه در زیستفناوری میکروبی مطرح‌اند. سیانووباکترها، از لحاظ مورفو‌لولژیک و اکولوژیک، طیف وسیع و متنوعی از باکتری‌های اکسیژنیک و فتوتروفیک را شامل شده، ضمن اینکه از قرابت دوری با باکتری‌های گرم مثبت نیز برخوردارند. نیتروژن (N) یک عنصر ضروری برای گیاهان بوده و که تامین آن برای بهره‌وری محصول و کیفیت دانه غلات بسیار حائز اهمیت است (Theerawitaya *et al.*, 2023). راهبردهای سنتی مدیریت خاک عمدتاً به استفاده از کودهای شیمیایی-معدنی توسط کشاورزان وابسته بوده که نقش مهمی در افزایش تولید محصولات کشاورزی تاکنون ایفا نموده است. با این وجود به دلیل مصرف بی‌رویه این کودهای شیمیایی، ضمن ایجاد آلودگی در خاک و منابع آب زیرزمینی، تخریب اکوسیستم خاک را در پی داشته که به نوبه خود در دراز مدت تهدیدی جدی برای سلامتی انسان و محیط زیست تلقی می‌شود. بنابراین تغییر نگرش در روش‌های کشاورزی به سمت کشاورزی ارگانیک که شامل استفاده از کودهای بیولوژیک بوده امری اجتناب‌ناپذیر بنظر می‌رسد (Bargaz *et al.*, 2018). بطوری که در حال حاضر بهره‌برداری از میکرواگانیسم‌های مفید به عنوان کود بیولوژیک به دلیل نقش بالقوه آن‌ها در فراهم آوردن مواد غذایی سالم و تولید پایدار محصولات زراعی و باعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Sofo *et al.*, 2020). امروزه کودهای زیستی به عنوان گزینه‌ای جایگزین برای کودهای شیمیایی مطرح شده، زیرا مواد سازگار با محیط زیست بوده، بر محیط زیست و سلامت انسان تأثیر نگذاشته و هیچ تأثیر مخربی بر خصوصیات خاک و عملکرد اقتصادی آن ندارند. میکرواگانیسم‌های مفید موجود در خاک، مواد معدنی را به کودهای زیستی و عناصر غذایی قابل استفاده برای گیاهان تبدیل کرده

دیگر، از جمله برنج، را می‌توان به AMT2 و AMT4-AMT3 مختلف در تجزیه و تحلیل فیلوزتیک تقسیم نمود (Li *et al.*, 2009). اسامیعیل‌زاده و همکاران در تحقیقی عنوان نموده‌اند که انتقال دهنده‌های آمونیوم (AMTs) ژن‌های کلیدی در جذب و انتقال نیتروژن می‌باشند (Esmaeilzadeh-Salestani *et al.*, 2023). نتایج چنین و همکاران نشان داد که PGPRs می‌توانند جذب نیتروژن را از طریق تنظیم سیگنال دهی درون گیاه و مسیرهای انتقال نیتروژن تقویت نمایند (Chen *et al.*, 2024).

در این تحقیق نسبت به اندازه‌گیری برون‌ریزش مواد نیتروژن و خوشبندی تعدادی از سویه‌های سیانوباکتری هتروسیستدار مزارع شالیزاری و همکشتی با برنج، و تاثیر آنها بر خصوصیات مهم جوانه‌زنی در سه رقم برنج فجر، روشن و طارم و معروفی سویه‌های برتر و کاندید در مرحله جوانه ژنی و گیاه‌چهای اندازه‌گیری شد، همچنین شناسایی بیوانفورماتیکی خانواده ژنی آمونیوم ترانسپورتر (OsAMTs) جهت شناسایی ژن‌های کاندید، مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و سویه‌های سیانوباکتر

سه رقم بذر برنج شامل رقم کیفی طارم‌هاشمی و دو رقم پرمحصلو روشن و فجر در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. هشت سویه مختلف سیانوباکترهای هتروسیستدار (جدول ۱) جمع‌آوری شده از مناطق مختلف شالیزاری استان مازندران (شکل ۱) که از نظر رنگ کلونی، فرم رویشی، خصوصیات برون‌ریزش مواد نیتروژن و فیکوبیلی پروتئین‌ها، و همچنین مشخصات جغرافیایی و اسیدیته خاک متفاوت بودند، تهیه شد (Kabirnataj *et al.*, 2018). نمونه‌های سیانوباکتری در محیط کشت BG-5 میکرومول بر متر مربع در ثانیه و ۱۴ ساعت روشنایی به مدت سه هفته کشت شدند (Kabirnataj *et al.*, 2019).

نامطلوب نوری، pH، دما و عدم دسترسی به مواد مغذی زنده بمانند (Kirrolia *et al.*, 2012). بررسی منابع علمی نشان می‌دهد که با توجه به خصوصیت اکولوژیکی و میکروبی و زیستی هر منطقه، استفاده از ریزجاذاران بومی هر منطقه جهت تهیه کودهای زیستی از سودمندی بیشتری برخوردارند. نیترات و آمونیوم از منابع اصلی نیتروژن گیاه محسوب می‌شوند. کمبود نیتروژن بر سنتز مواد آلی در گیاهان تأثیر گذاشته و در نتیجه باعث کندی رشد، زرد شدن برگ‌ها و کاهش عملکرد می‌شود (Tabata *et al.*, 2014). گیاهان در حالت کمبود نیتروژن، به دلیل صرف انرژی کمتر جذب و انتقال آمونیوم نسبت به نیترات، جذب آمونیوم را به نیترات ترجیح می‌دهند (Gazzarrini *et al.*, 1999; Xuan *et al.*, 2013). هرچند که جذب بیش از حد آمونیوم برای گیاهان نیز سمی بوده، که این امر تنظیم فرایند جذب و انتقال آن را اجتناب‌ناپذیر می‌نماید. در برنج به دلیل هوادهی ضعیف در کشت غرقابی، آمونیوم شکل اصلی و ترجیحی جذب نیتروژن می‌باشد (Kumar *et al.*, 2003; Horton *et al.*, 2007a).

پروتئین‌های انتقال دهنده آمونیوم<sup>1</sup> (AMTs) یکی از ژن‌های کلیدی در تنظیم آمونیوم در گیاهان هستند (Yang *et al.*, 2023). پروتئین‌های AMT توسط یک خانواده چندزنی کدگذاری شده، که در جذب و انتقال آمونیوم نقش مهمی ایفا می‌کنند. با توجه به توالی و روابط فیلوزتیک، پروتئین‌های AMT در سلول‌های گیاهی را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: AMT1 و AMT2 (Loqué and von Wirén, 2004). بسیاری از گیاهان گزارش شده‌اند بررسی‌ها نشان می‌دهد این پروتئین‌ها به عنوان ناقل آمونیوم با میل ترکیبی بالا عمل می‌نمایند (Li *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2021). خانواده AMT2 در *Arabidopsis thaliana* (AtAMT2.1) بوده (Yuan *et al.*, 2007) تنها شامل یک عضو (AtAMT2.1) است که در حالی در بسیاری از گیاهان

1. Ammonium transporter (AMT) proteins

**جدول ۱.** کد دسترسی سویه‌های سیانو باکتری در بانک میکروبی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

**Table 1.** Access code of cyanobacterial strains in the microbial bank of Tabaristan Genetics and Biotechnology Research Institute, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

ردیف row	اسم سویه strain name	کد در بانک جلبک Code in algae bank *GABIT	اسم علمی scientific name	کد دسترسی در NCBI Access code at NCBI
	Strain1	GABIT397	<i>Fischerella thermalis</i>	NR112178/1
	Strain2	GABIT293-1	<i>Aliinostoc sp</i>	MK967404/1
	Strain3	GABIT327	<i>Aliinostoc Magnakinetifex</i>	MK503791/2
	Strain4	GABIT391	<i>Neowestieupopsis Persica</i>	MF115982/1
	Strain5	GABIT310	<i>Desmonostoc sp</i>	MF631198/1
	Strain6	GABIT281	<i>Desmonostoc persicum</i>	NR_172577/1
	Strain7	GABIT393	<i>Aliinostoc sp</i>	MK967413/1
	Strain8	GABIT384	<i>Desmonostoc Persicum</i>	MF678820/1

\*: [Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan \(GABIT\), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University \(SANRU\)](#)

مدل UV-1800 SHIMADZU صورت گرفته و در نهایت میزان مواد نیتروژن با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$\text{amo exc } \mu\text{g/ml} = (\text{OD}_{630 \text{ nm}} * 0/0607) / \text{OD}_{630 \text{ nm estandard}} \quad (1)$$

$$\text{nitro exc } \mu\text{g/ml} = (\text{OD}_{630 * 0/5}) / \text{OD}_{630 \text{ nm estandard}} \quad (2)$$

### آماده سازی بذر برنج و همکشتی و آزمون جوانه‌زنی بذر

در این تحقیق از سه روش روشن، فجر و طارم محلی که به ترتیب رقم اصلاح شده، رقم وارداتی و رقم بومی معطر استفاده شد. حذف بذور پوک و علفهای هرز در آب نمک (۱۰ درصد) صورت گرفت و در ادامه طی چندین مرحله شستشو با آب معمولی اثر نمک رفع شد. جهت ضد عفنی سطحی، بذور در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شد. بذور پس از شستشو در آب مقطر سترون شده، جهت تحریک جوانه‌زنی به مدت بیست و چهار ساعت در آب سترون نگهداری شدند. جوانه‌زنی بذور برنج (سی عدد) در پتری دیش‌های ۹ سانتی‌متری و در حضور سوسپانسیون سیانو باکتریایی در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۸ سویه به همراه تیمار شاهد (آب مقطر) و در سه تکرار اجرا شد. بدین صورت که ۱۰ سی سی از سوسپانسیون سلولی همگن شده از سویه‌های

اندازه‌گیری برون‌ریزش نیترات و آمونیوم در این تحقیق اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن کل جدایه‌های سیانو باکتری به روش کجلدال صورت گرفت (Kabrnataj *et al.*, 2018). اندازه‌گیری میزان برون‌ریزش آمونیوم و نیترات با استفاده از روش فنات انجام پذیرفت، بدین صورت که تشکیل ترکیب آبی رنگ آنوفنول که در اثر واکنش آمونیاک، هیپوکلریت و فنول با نمک منگنز حاصل می‌شود نشان‌دهنده آزاد شدن آمونیاک است و مقدار آن به روش اسپکتوفوتومتری در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت و طبق روش Austin *et al.* (۱۹۹۷) صورت گرفت. بدین ترتیب که برای تهیه محلول سولفات منگنز، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از آن را در ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل نموده و در ادامه به آن ۰/۵ میلی‌لیتر (۵۰۰ میکرولیتر) محلول واکتس اضافه شد. به منظور تهیه معرف فنات، ۲/۵ گرم سود به همراه ۱۰ گرم فنول در ۱۰۰ سی سی آب حل شد. در نهایت از آب بدون آمونیاک یا دیانوزه به عنوان محلول شاهد استفاده شد. جهت تهیه محلول استاندارد نیز، ۳۸۱/۹ میلی‌گرم کلرید آمونیوم را در یک لیتر آب مقطر حل نموده، در ادامه ۵ سی سی از آن به حجم ۱ لیتر رسانده شد. پس از همگن نمودن سوسپانسیون سلولی سویه‌ها، ۱۰ سی سی از نمونه هموژن شده به مدت ۱۵ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. به ۱۰ سی سی از رویی بدست آمده یک قطره از محلول سولفات منیزیم و در ادامه یک قطره معرف فنات اضافه شد. قرائت نمونه‌ها در دستگاه اسپکتوفوتومتری

شناسایی موتیفها و ساختار اگزون-اینترون MEME موتیفهای حفاظت شده در برنامه (<http://suite.org/tools/meme/>) با پارامترهای پیش فرض (شامل انتخاب موتیفها بدون توجه به دفعات تکرار، شناسایی حداقل ۱۰ موتیف، E-value، کمتر از ۰/۰۰۰۱ و کمترین و بیشترین طول موتیفها به ترتیب ۲۴ و ۵۰ اسید آمینه) شناسایی شد (Bailey *et al.*, 2009). هم ریفی تووالی های پروتئینی AMT با استفاده از نرم افزار ClustalW انجام و درخت فیلوزتیک آنها بر اساس روش اتصال همسایه در MEGA 6.0 ترسیم شد (Tamura *et al.*, 2013). شناسایی ساختار ژنی با GSDS استفاده از برنامه Hu *et al.* (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) انجام گرفت (Expasy-Prosite *et al.*, 2014). شناسایی و ترسیم شد (Sigrist *et al.*, 2012).

آنالیز بیان ژن های انتقال دهنده های آمونیوم با RNA-seq استفاده از داده های آنالیز الگو بیان ترانسکریپتوم برنج (داده های RNA-seq (Wang *et al.*, 2015) و مربوط به مراحل مختلف نموی (Wang *et al.*, 2015) و کمبود ازت/فسفر موجود در پایگاه داده GEO (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds) استفاده شد. سطح بیان ژن بر اساس مقدار بیان نرمال شده، یعنی خواندن در هر کیلو باز در میلیون (RPKM) برای هر بافت تعريف شد. در حالی که آنالیز تفاوت بیان ژن ها به صورت Log2FC در شرایط کمبود ازت و فسفر نسبت به شرایط کنترل با استفاده از نرم افزار CLC Genomics (version 6.5.1) Workbench (Workbench, 2019). بدین ترتیب که پس از تشکیل ماتریس بیان ژن که حاوی ژن ها و سطح بیان آنها می باشد، بیان ژن های کاندید، مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت نتایج حاصله در نمودار Heatmap ترسیم شده توسط نرم افزار CIMminer (Scherf *et al.*, 2000) ارائه شد.

سیانوباكتری ۳۰ روزه (حداکثر فاز رویشی) به پتری دیش-های حاوی بذر برنج اضافه شد. خصوصیات جوانهزنی بذرها به صورت روزانه در یک ساعت معین تا روز چهاردهم شمارش شد. هنگام شمارش، بذوری بعنوان بذور جوانه زده در نظر گرفته می شدند که طول ریشه چه آنها ۲ میلی متر یا بیشتر باشد. در روز چهاردهم تعداد گیاهچه های طبیعی و درصد جوانهزنی نهایی در نظر گرفته شد. سرعت جوانهزنی بذور به روش (Maguire, 1962) محاسبه شد و برای محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ و اکسل استفاده شد.

شناسایی ژن های انتقال دهنده های آمونیوم با استفاده از پروفایل HMM دامنه های انتقال دهنده های آمونیوم (AMT)، شناسایی ژن های AMT در پایگاه داده (<http://pfam.xfam.org>) Pfam HMMER3.0 با احتمال  $O. sativa$   $E^{-10}$  انجام شد (Finn *et al.*, 2013). پروتئین های AMT شناسایی شده جهت بررسی بیشتر در برنامه SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/webcite>) بررسی شدند Ensembl (Schultz *et al.*, 2000) پایگاه داده Ensembl (http://plants.ensembl.org) برای شناسایی تووالی های مربوطه و مکان های کروموزومی ژن ها استفاده شد (Bolser *et al.*, 2017).

پایش خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین ها با استفاده از ابزار ProtParam در سایت Expasy (Gasteiger *et al.*, 2005b) فیزیکوشیمیایی پروتئین های AMT مانند تعداد اسید آمینه، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک (expasy.org/protparam/https://web) (Horton *et al.*, 2007b) (Gasteiger *et al.*, 2005a) پروتئین ها با استفاده از برنامه WolFSORT (hgc.jp/https://wolfsort) پیش بینی شد.

سویه‌های مختلف بر روی سرعت جوانه‌زنی بوده است (شکل ۲-ب). در مطالعه لوکاس (۲۰۰۹) و لوسی (۲۰۰۴) بر روی تلقیح گیاهان زراعی برنج، گندم و ارزن با باکتری‌های محرك رشد، افزایش ساخته‌های متعددی مانند سرعت جوانه‌زنی، رشد ریشه، میزان تولید در واحد سطح، کنترل عوامل بیماری‌زا، سطح برگ، محتوای کلروفیل، مقاومت به خشکی، مقاومت به بیماری بلاست، وزن ریشه و اندام هوایی گزارش شد (Lucy *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2009). صفت طول ساقه‌چه در جدول تجزیه واریانس معنی‌دار نشده و این بدین معنی است که در فاز جوانه‌زنی برای صفت طول ساقه‌چه در ارقام و همچنین اثر متقابل سویه در ارقام معنی‌دار نبود. بعارت دیگر سویه‌های مختلف بکار گرفته شده در این تحقیق اثر یکسانی را بر روی صفت طویل شدن ساقه‌چه در ارقام برنج طارم، فجر و روشن نشان دادند (شکل ۲-پ). در بررسی صفت طول ریشه‌چه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده شد که در رقم فجر در حضور سویه ۶ با ۶۹/۳۳ میلی‌متر بیشترین و شاهد با ۳۹/۳۳ میلی‌متر کمترین طول ریشه‌چه را داشته‌اند. در رقم روشن نیز سویه شماره ۱ با ۹۲ میلی‌متر کمترین طول ریشه‌چه را نشان داد. با ۱۱/۳۳ میلی‌متر کمترین طول ریشه‌چه را داشتند (شکل ۲-ت). در بررسی نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه در سطح احتمال ۱ درصد نیز اثر ارقام و سویه و اثر متقابل سویه در رقم معنی‌دار بوده که در رقم فجر و با بکارگیری سویه شماره ۶ با نسبت ۱/۱۱ بیشترین و سویه شماره ۴ با نسبت ۰/۲۵ کمترین نسبت را به خود اختصاص داد. در رقم روشن نیز سویه شماره ۱ با نسبت ۱/۵۷ و سویه شماره ۴ با نسبت ۰/۲۲ به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند. در رقم طارم نیز سویه‌های شماره ۸ و شماره ۱ به ترتیب با نسبت ۰/۳۹۷ و ۱/۱۴۷ بیشترین و کمترین مقدار را داشتند (شکل ۲-ث).

## نتایج و بحث

### بررسی اثر سویه‌های مختلف سیانوباكتری بر خصوصیات جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس (جدول شماره ۲) نشان داد که در بررسی خصوصیات جوانه‌زنی بذور، اثر ارقام و سیانوباكتری‌های مختلف و اثر متقابل رقم در سیانوباكتری در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. درصد جوانه‌زنی بین همه ارقام برنج، سویه‌ها و اثر متقابل سویه در ارقام برنج، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد (جدول شماره ۲ و شکل شماره ۲). در مقایسه صفت جوانه‌زنی در همکشتی رقم فجر با سویه سیانوباكتری شماره ۱ و ۲، مقدار جوانه‌زنی ۱۰۰ درصد همانند تیمار شاهد مشاهده شد در حالی که کمترین درصد جوانه‌زنی مربوط به سویه شماره ۳ با ۷۷/۷۷ درصد بود. در رقم روشن سویه‌های ۷ و ۸ با ۸۸/۸۹ درصد بیشترین درصد جوانه‌زنی و کمترین آن در سویه شماره ۳ و ۶ با ۷۵ درصد مشاهده شد. در رقم طارم بیشترین و کمترین درصد جوانه‌زنی به ترتیب در همکشتی سویه ۶ و ۸ (با ۵۸/۳۳ درصد) و سویه ۳ (درصد) مشاهده شد که این موضوع بیانگر تاثیر متفاوت سویه‌های مختلف بر درصد جوانه‌زنی بوده به تحویل که سویه‌های مختلف در ارقام مختلف منجر به بروز پاسخ متفاوت می‌شوند (شکل ۲-الف). در صفت سرعت جوانه‌زنی همه رقم‌ها و سویه‌ها و اثر متقابل سویه در رقم (جدول ۳) در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد بطوری که در رقم شماره یک (فجر) با همکشتی سویه‌های ۱ و ۷، سرعت جوانه‌زنی بیشتری نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. در حالی که کمترین سرعت جوانه‌زنی هم مربوط به سویه ۴ برای رقم فجر ثبت شد. در رقم شماره ۲ (روشن) سویه‌های شماره ۱ و ۴ منجر به مشاهده بیشترین درصد جوانه‌زنی شده در حالی که کمترین میزان آن برای سویه شماره ۲ و ۵ محاسبه شد. در رقم شماره ۳ (طارم) با بکارگیری سویه شماره ۸ و ۲، به ترتیب بیشترین و کمترین درصد جوانه‌زنی مشاهده شد. این موضوع بیانگر تنوع تاثیر



شکل ۱. مراحل خالص سازی اولیه سیانوبکتری در بانک میکروبی پژوهشکده زنگیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

Figure 1. Primary purification steps of cyanobacteria in the microbial bank of Tabaristan Agricultural Biotechnology and Genetics Research Institute, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

جدول ۲. تجزیه واریانس سیانوبکتری در ارقام برنج.

Table 2. Analysis of variance Cyanobacteria in rice cultivars.

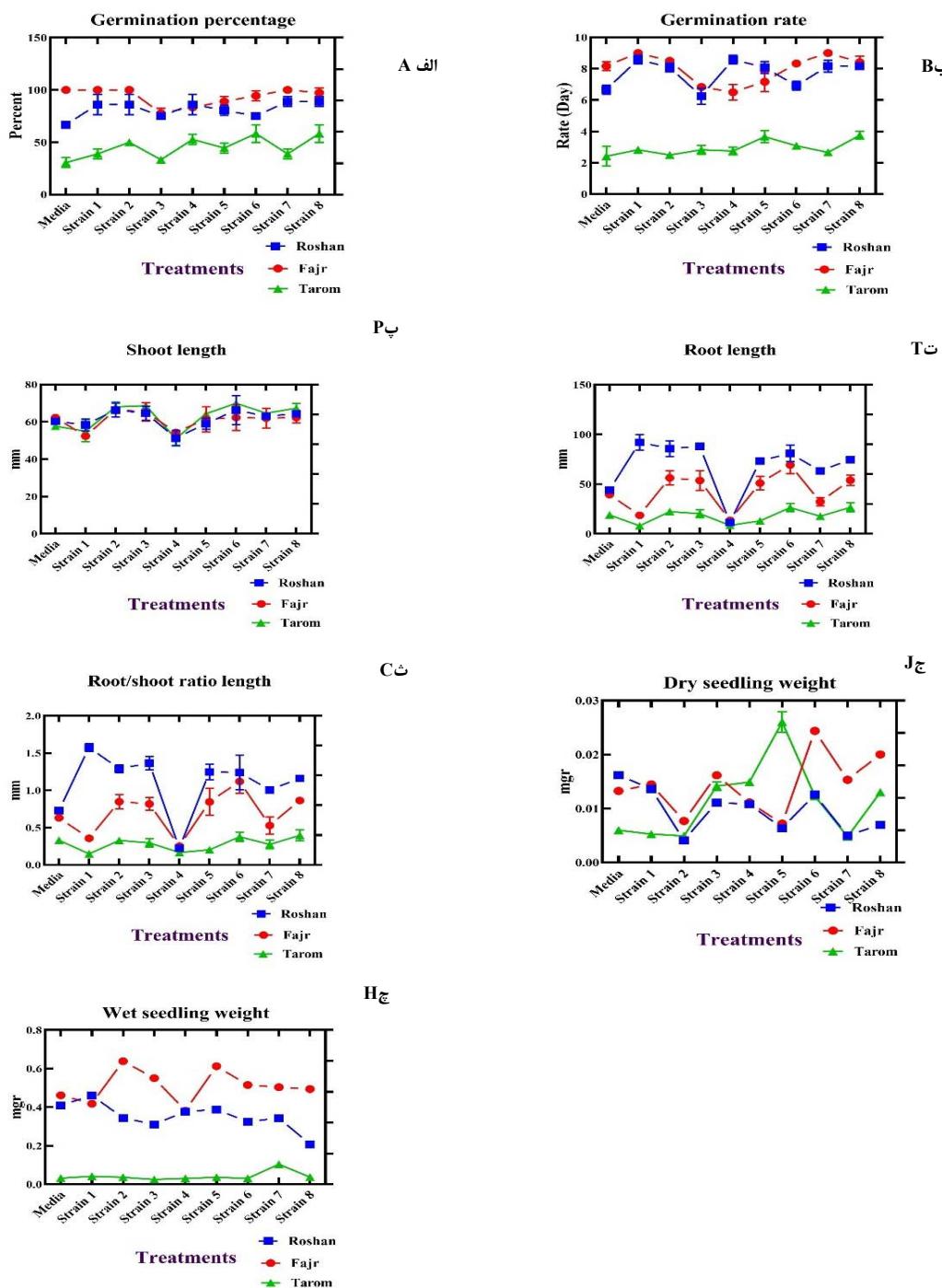
منابع تغییرات Sources of change	درجه آزادی degree of freedom	درصد جوانهزنی Germination percentage	سرعت جوانهزنی Germination speed	طول ساقچه Root length	طول ریشه Root length	طول به ساقچه Root to stem length ratio	وزن خشک تک بوته Dry weight of a single plant	وزن تر تک بوته Fresh weight of single plant
رقم	2	17187.50**	217.63**	28.43 ns	16990.24**	4.45**	0.00015**	1.523**
سویه	8	339.14**	2.22**	240.31**	1944.34**	0.39**	0.000091**	0.0093**
اثر رقم در سویه Effect of cultivar on strain	16	185.72**	1.65**	16.44 ns	616.16**	0.16**	0.000099**	0.0142**
ضریب تغییرات coefficient of variation	-	6.91	5.09	5.84	11.22	12.38	4.92	1.29

\*\*: Significant at 5% and 1% probability levels ,ns: Not significant

\*\*: احتمال معنی داری در سطح ۱ درصد و ns: عدم معنی داری.

به ترتیب در همکشتی با سویه شماره ۱ و کمتر از مقدار تیمار شاهد خود برابر با  $0/0\cdot13$  میلی گرم و کمترین وزن خشک مربوط به همکشتی با سویه شماره ۷ به مقدار  $0/0\cdot05$  میلی گرم محاسبه شد. در رقیم طارم نیز در همکشتی با سویه شماره ۵ با  $0/0\cdot26$  میلی گرم بیشترین وزن خشک و سویه شماره ۷ و ۲ کمترین وزن خشک را در مقابل تیمار شاهد خود با وزن  $0/0\cdot06$  میلی گرم محاسبه شد (شکل ۲-ج).

در بررسی اثر سویهها بر صفت بیوماس ارقام، وزن تر و وزن خشک تیمارها نیز محاسبه شد و مطابق جدول تجزیه واریانس در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی داری بوده که در رقم فجر با همکشتی با سویه شماره ۶ به وزن  $0/0\cdot24$  میلی گرم بیشترین و سویه شماره ۲ و ۵ با  $0/0\cdot07$  میلی گرم کمترین وزن خشک را در مقایسه با تیمار شاهد که برابر  $0/0\cdot13$  میلی گرم بوده است نشان دادند. در رقم روشن نیز بیشترین و کمترین بیوماس



شکل ۲. اندازه‌گیری پارامترهای جوانه‌زنی االف: درصد جوانه‌زنی، ب: سرعت جوانه‌زنی، پ: طول ریشه‌چه‌ت: نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه، ج: وزن خشک، ج: وزن تر.

**Figure 2.** Measurement of germination parameters A: Germination percentage B: Germination rate P: Stem length T: Root length C: Root to stem length ratio J: Dry weight H: Fresh weight.

### جدول ۳. اثرات متقابل سویه و ارقام بر پارامترهای جوانه‌زنی

**Table 3.** Interaction effects Strain and cultivars on germination parameters

سویه	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	وزن تر تک بوته	وزن خشک تک بوته	نسبت طول ریشه
------	----------------	----------------	----------------	-----------------	---------------

Fresh weight of single plant	Dry weight of a single plant	به ساقه Root to stem length ratio	root length	Germination speed	Germination percentage	strain
0.46g <sup>(D)</sup>	0.013hj <sup>(F)</sup>	0.63gh <sup>(C)</sup>	39.33ij <sup>(C)</sup>	8.16b <sup>(B)</sup>	100.0a <sup>(A)</sup>	Control
0.41h <sup>(H)</sup>	0.014efg <sup>(E)</sup>	0.35jkl <sup>(DE)</sup>	18.66mp <sup>(D)</sup>	9a <sup>(A)</sup>	100.0a <sup>(A)</sup>	Strain ۱ سویه
0.63a <sup>(A)</sup>	0.007m <sup>(H)</sup>	0.84f <sup>(B)</sup>	56.33fg <sup>(B)</sup>	8.5ab <sup>(A)</sup>	100.0a <sup>(A)</sup>	Strain ۲ سویه
0.55c <sup>(C)</sup>	0.016d <sup>(C)</sup>	0.81f <sup>(B)</sup>	53.66g <sup>(B)</sup>	6.8cd <sup>(CD)</sup>	77.77ef <sup>(E)</sup>	Strain ۳ سویه
0.38jk <sup>(I)</sup>	0.011l <sup>(G)</sup>	0.25k-o <sup>(E)</sup>	13.6Opq <sup>(D)</sup>	6.5de <sup>(D)</sup>	83.33cde <sup>(D)</sup>	Strain ۴ سویه
0.61b <sup>(B)</sup>	0.0072mn <sup>(H)</sup>	0.84f <sup>(B)</sup>	51.00gh <sup>(B)</sup>	7.2c <sup>(C)</sup>	88.89bc <sup>(C)</sup>	Strain ۵ سویه
0.51d <sup>(D)</sup>	0.024b <sup>(A)</sup>	1.11de <sup>(A)</sup>	69.33de <sup>(A)</sup>	8.33b <sup>(C)</sup>	94.44ab <sup>(B)</sup>	Strain ۶ سویه
0.50e <sup>(E)</sup>	0.015de <sup>(D)</sup>	0.52hi <sup>(DC)</sup>	32.33jk <sup>(C)</sup>	9a <sup>(A)</sup>	100.00a <sup>(A)</sup>	Strain ۷ سویه
0.49f <sup>(F)</sup>	0.020c <sup>(B)</sup>	0.86f <sup>(B)</sup>	53.86g <sup>(B)</sup>	8.41b <sup>(B)</sup>	97.22a <sup>(AB)</sup>	Strain ۸ سویه
Cultivar ۱ رقم						
0.408i <sup>(B)</sup>	0.016d <sup>(A)</sup>	0.72Fg <sup>(E)</sup>	44.00hif <sup>(E)</sup>	6.66cd <sup>(BC)</sup>	66.67g <sup>(C)</sup>	Control
0.460g <sup>(A)</sup>	0.013ghi <sup>(B)</sup>	1.57a <sup>(A)</sup>	92.00a <sup>(A)</sup>	8.58ab <sup>(A)</sup>	86.11cd <sup>(A)</sup>	Strain ۱ سویه
0.344l <sup>(E)</sup>	0.004r <sup>(G)</sup>	1.28bc <sup>(BC)</sup>	85.66ab <sup>(AB)</sup>	8.08b <sup>(A)</sup>	86.11cd <sup>(A)</sup>	Strain ۲ سویه
0.310n <sup>(G)</sup>	0.011l <sup>(D)</sup>	1.36b <sup>(B)</sup>	88.00ab <sup>(AB)</sup>	6.25e <sup>(C)</sup>	75.00f <sup>(BC)</sup>	Strain ۳ سویه
0.377k <sup>(D)</sup>	0.010l <sup>(D)</sup>	0.22l-o <sup>(F)</sup>	11.33pq <sup>(F)</sup>	8.58ab <sup>(A)</sup>	86.11cd <sup>(A)</sup>	Strain ۴ سویه
0.387j <sup>(C)</sup>	0.006no <sup>(E)</sup>	1.24bcd <sup>(BC)</sup>	73.33cd <sup>(C)</sup>	8.08b <sup>(A)</sup>	80.55def <sup>(AB)</sup>	Strain ۵ سویه
0.323m <sup>(F)</sup>	0.012jk <sup>(E)</sup>	1.23bcd <sup>(BC)</sup>	81.00Bcb <sup>(C)</sup>	6.91cd <sup>(B)</sup>	75.00f <sup>(BC)</sup>	Strain ۶ سویه
0.343l <sup>(E)</sup>	0.005qr <sup>(F)</sup>	1.00e <sup>(D)</sup>	63.33ef <sup>(D)</sup>	8.16b <sup>(A)</sup>	88.89bc <sup>(A)</sup>	Strain ۷ سویه
0.207o <sup>(H)</sup>	0.007mn <sup>(E)</sup>	1.16cd <sup>(CD)</sup>	74.66cd <sup>(C)</sup>	8.16b <sup>(A)</sup>	88.89bc <sup>(A)</sup>	Strain ۸ سویه
Cultivar ۲ رقم						
0.0322rs <sup>(D)</sup>	0.0060op <sup>(E)</sup>	0.329j-m <sup>(ABC)</sup>	19.00l-p <sup>(B)</sup>	2.41h <sup>(C)</sup>	30.55m <sup>(D)</sup>	Control
0.0414q <sup>(B)</sup>	0.0052pq <sup>(E)</sup>	0.147o <sup>(E)</sup>	8.00q <sup>(D)</sup>	2.83gh <sup>(BC)</sup>	38.89kl <sup>(CD)</sup>	Strain ۱ سویه
0.0365qrs <sup>(C)</sup>	0.0049qr <sup>(E)</sup>	0.328j-m <sup>(ABC)</sup>	22.33lmn <sup>(AB)</sup>	2.5h <sup>(C)</sup>	50.00ij <sup>(AB)</sup>	Strain ۲ سویه
0.0249t <sup>(F)</sup>	0.0141fgh <sup>(BC)</sup>	0.29j-n <sup>(BC)</sup>	20.33l-o <sup>(B)</sup>	2.83gh <sup>(BC)</sup>	33.33ml <sup>(D)</sup>	Strain ۳ سویه
0.0309st <sup>(DE)</sup>	0.0149ef <sup>(B)</sup>	0.166no <sup>(E)</sup>	8.46q <sup>(D)</sup>	2.75gh <sup>(BC)</sup>	52.77hi <sup>(AB)</sup>	Strain ۴ سویه
0.0365qrs <sup>(C)</sup>	0.0260a <sup>(A)</sup>	0.202mnno <sup>(DE)</sup>	13.000opq <sup>(CD)</sup>	3.66f <sup>(A)</sup>	44.44jk <sup>(BC)</sup>	Strain ۵ سویه
0.0306st <sup>(E)</sup>	0.0123k <sup>(D)</sup>	0.376jk <sup>(AB)</sup>	26.33klm <sup>(A)</sup>	3.08g <sup>(B)</sup>	58.33h <sup>(A)</sup>	Strain ۶ سویه
0.1038p9 <sup>(A)</sup>	0.0048qr <sup>(E)</sup>	0.273j-o <sup>(CD)</sup>	17.66nop <sup>(BC)</sup>	2.66gh <sup>(BC)</sup>	38.89kl <sup>(CD)</sup>	Strain ۷ سویه
0.0373qr <sup>(C)</sup>	0.0130ijk <sup>(CD)</sup>	0.397ij <sup>(A)</sup>	26.66kl <sup>(A)</sup>	3.75i <sup>(A)</sup>	58.33h <sup>(A)</sup>	Strain ۸ سویه
Cultivar ۳ رقم						

رقم ۱: فجر رقم ۲: روشن رقم ۳: طارم هاشمی \* حروف کوچک: مقایسه میانگین اثر متقابل قل از برش دهنده \*حروف بزرگ (توانی): مقایسه میانگین سویه‌های مختلف سیانوباکتر پس از برش دهنده در سطح هر رقم.

1: Cultivar Fajr 2: Cultivar Roshan 3: Cultivar Tarem Hashemi \*Lower-case letters: comparison of the average interaction effect before cutting \*Capital letters (power): comparison of the average of different cyanobacteria strains after cutting at the level of each cultivar.

تجزیه واریانس (جدول شماره ۳) تأثیر سیانوباکتری‌های محرك رشد در سطح احتمال یک درصد بر وزن خشک ریشه معنی دار بود. وزن ریشه بیانگر توسعه بیشتر ریشه بوده که افزایش توان جذب آب و عناصر غذایی بیشتر را در حجمی از خاک امکان‌پذیر می‌سازد. مقایسه اثرات متقابل سویه‌ها در رقم‌های برنج نشان داده است که رقم فجر با تلقیح سویه‌های شماره ۱، ۲، ۳ و ۸ بیشترین درصد جوانه‌زنی و برابر تیمار شاهد و کمترین آن در رقم طارم با سویه‌های ۱ و ۷ درین ارقام برنج ثبت شد. بیشترین سرعت جوانه‌زنی در رقم فجر با حضور سویه شماره ۱ و ۷ و کمترین سرعت جوانه‌زنی در رقم طارم با سویه شماره ۲ ثبت شد. بیشترین طول ریشه در رقم روشن با طول ۹۲ میلی‌متر و کمترین آن هم در رقم طارم

در بررسی وزن تر، رقم فجر بیشترین وزن مربوط به سویه شماره ۲ و کمترین هم مربوط به سویه شماره ۱ به ترتیب با ۰/۶۳ و ۰/۴۱ میلی‌گرم بوده است و همینطور در رقم روشن سویه شماره ۱ با ۰/۴۶ و کمترین در سویه شماره ۸ با ۰/۲۰۷ میلی‌گرم کمترین وزن تر را داشته‌اند. در رقم طارم نیز بیشترین وزن تر در سویه شماره ۷ و کمترین در سویه شماره ۳ به ترتیب با ۰/۱۰۳۸ و ۰/۰۲۴۹ میلی‌گرم محاسبه شده است (شکل ۲ - ج). در تحقیقی بر روی دو سویه باکتری حل‌کننده فسفات گزارش شد، اگرچه سویه ۱۶۸ دارای اثر آنتاگونیستی بوده، ولی تلقیح بذر با هر یک از آنها به دلیل ترشح متابولیت‌های ثانویه سبب تحریک رشد گیاه و افزایش عملکرد گیاه شده است (Kiliai et al., 2018).

میزان برون‌ریزش نیترات در ۸ سویه مورد بررسی در شکل ۳-پ مovid آن است که بالاترین میزان برون‌ریزش نیترات در سویه ۷ با مقدار ۰،۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد و همچنین سویه شماره ۲ و ۵ با میزان ۰/۱۴۴۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کمترین میزان برون‌ریزش نیترات نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار بود. بررسی میزان برون‌ریزش آمونیوم در ۸ سویه مورد بررسی در شکل ۳-ب مovid آن است که بالاترین میزان برون‌ریزش آمونیوم در سویه شماره ۷ با میزان ۰/۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد و همچنین سویه ۲ و ۵ با میزان ۰/۰۰۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از برون‌ریزش کمتری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار بود.

#### ارزیابی میزان برون‌ریزش نیتروژن

در بررسی میزان برون‌ریزش نیتروژن در ۸ سویه مورد بررسی در شکل ۳-الف مovid آن است که بالاترین میزان برون‌ریزش نیتروژن در ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ سویه به ترتیب با میزان ۷/۳ و ۸/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. کمترین میزان برون‌ریزش نیتروژن در سویه شماره ۸ با میزان ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. خوشبندی و مقایسه سویه‌های مدنظر (شکل ۴) بر مبنای صفات و پارامترهای ازتی اندازه گیری شده نشان می‌دهد که به سه گروه تقسیم شده که سویه شماره ۲ و ۸ در یک کلاستر و سویه ۷، ۳، ۵، ۴ و ۶ در یک خانواده و سویه شماره ۱ در کلاستر ۳ قرار گرفته و از نظر شباهت و نزدیکی برون‌ریزش مواد ازته و کارکردی در گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفته‌اند. همچنین در بین تعدادی از سویه‌های مختلف باکتری، اثر معنی‌داری منفی بر صفت‌های مورد ارزیابی داشت. همچنین در تحقیقی میزان برون‌ریزش آمونیوم در ۰/۱۰ درصد از سویه‌ها در دامنه ۰/۰۲ تا ۰/۰۴، در ۵/۲۶ درصد در دامنه ۰/۰۴ تا ۰/۰۸ در ۰/۲۶ درصد در دامنه ۰/۰۸ تا ۰/۱۲ و در ۱۰/۵۲ درصد در دامنه ۰/۱۲ تا ۰/۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد که سویه‌های مختلف سیانوباکتری‌های تلقیح شده در ارقام مختلف شرایط رشدی متفاوتی را ایجاد می‌کند و حتی در

با طول ۸ میلی‌متر محاسبه شد. همچنین در صفت وزن خشک تک بوته در رقم طارم با بکارگیری سویه شماره ۵ بیشترین وزن خشک به مقدار ۰/۰۲۶ میلی‌گرم و در رقم روشن با بکارگیری سویه شماره ۲ کمترین وزن خشک به مقدار ۰/۰۰۴ میلی‌گرم ثبت شد. با مقایسه سایر صفات نیز ارقام برنج در همکنشتی با سویه‌های مختلف عملکرد متفاوتی را نشان دادند و صفات جوانهزنی در ارقام با حضور سویه‌های سیانوباکتری تاثیر متفاوتی بر خصوصیات جوانهزنی داشته و رقم برنج فجر بیشترین و رقم طارم کمترین تغییرات را داشته‌اند. بنظرمی‌رسد با کاربرد بعضی از سویه‌ها در این آزمایش و افزایش حجم ریشه، توان و کارایی جذب و مصرف آب و عناصر افزایش یافته و در نتیجه رشد و نمو بهبود یافته است. در بررسی برجی و همکاران (Banerjee *et al.*, 2006) بیان داشتند که باکتری‌های محرک رشد موجب افزایش سطح ریشه گیاه شده و افزایش سطح ریشه را عامل اصلی افزایش دسترسی به آب و عناصر غذایی و بهبود رشد گیاه معرفی نمودند.

#### اندازه‌گیری برون‌ریزش نیتروژن، نیترات و آمونیوم

##### بررسی خصوصیات ازتی

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری تثبیت بیولوژیک نیتروژن وجود دارد که عمدها شامل بکارگیری نیتروژن نشاندار، سنجش احیا استیلن و روش اختلاف نیتروژن می‌باشد. در این تحقیق میزان تثبیت نیتروژن کل تعدادی از جایه سیانوباکتری به روش کحدال مورد آزمایش قرار گرفت (Kiliai *et al.*, 2018). جایه‌های خالص شده مربوط به راسته‌های *Stigonematales*, *Nostocales* و *Nostocaceae Rivulariaceae* بوده است. خانواده *Rivulariaceae* یکی از متنوع‌ترین خانواده‌های سیانوباکتری دارای هتروسیست در شالیزارهای شمال کشور می‌باشد که پراکنش گستردگی در خاکهای شالیزاری سه استان شمالی (گیلان، مازندران و گلستان) دارد. خانواده *Nostocaceae* به عنوان یکی از متنوع‌ترین گروه‌های سیانوباکتر دارای هتروسیست، در مزارع برنج شمال کشور گزارش شده است (Kabirnataj *et al.*, 2018).

### پایش ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها در خانواده ژنی *OsAMT*

در این تحقیق، ۱۵ ژن *OsAMT* که متعلق به ۱۲ مکان ژنی بودند در ژنوم برنج شناسایی شد. پایش ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها می‌تواند در تعیین فرایندهای بیولوژیکی، کارکرد مولکولی و مکان نمایی<sup>۱</sup> آن‌ها در سلول تأثیرگذار باشد. همان‌طور که در جدول شماره ۴ دیده می‌شود ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی در پروتئین‌های خانواده ژنی *OsAMT* به آشکارسازی وزن مولکولی متغیر در محدوده ۳۳/۱ الی ۵۳/۷ کیلو دالتون، محدوده pH ایزوالکتریک از ۶/۰۶ الی ۸/۶۳ و شاخص آلفاتیک ۷۶ تا ۱۰۵ منجر شد. پروتئین خانواده‌ای ژنی *OsAMT3-1-like* و *OsAMT3-1-like 2* دارای ۴۹۸ اسید امینه با ۵۷/۷ کیلو دالتون بیشترین وزن مولکولی و با بار الکتریکی ۰/۴۲۰ و *OsAMT4-1* با ۳۳/۱ کیلو دالتون کمترین وزن مولکولی و با بار الکتریکی ۰/۴۲۲۳ تعیین شدند. بیشترین و کمترین شاخص آلفاتیک به ترتیب به *OsAMT2;1* و *OsAMT3:4* تعلق داشت (جدول ۴).

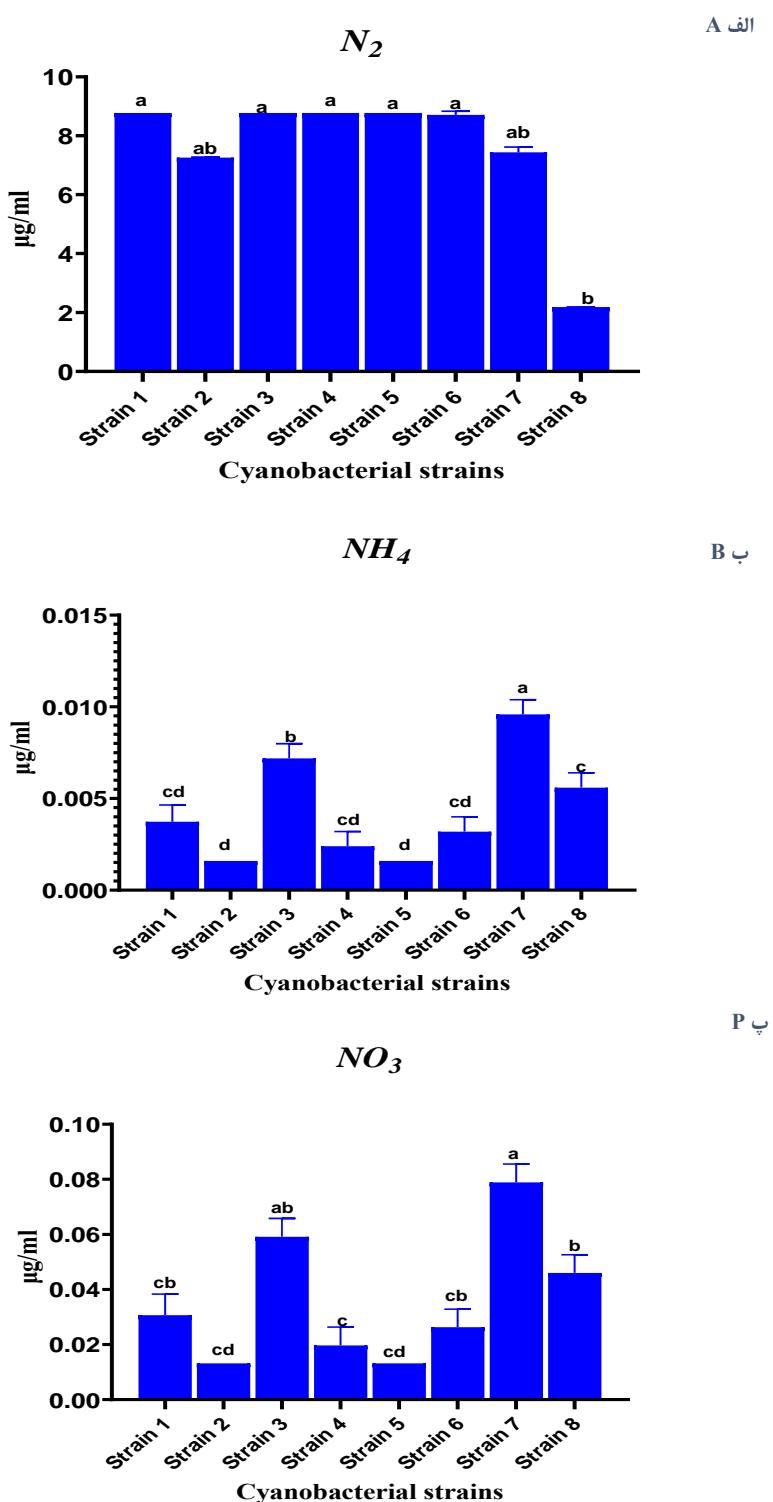
بعضی از موارد می‌تواند سویه برتر با رقم مورد نظر به طور اختصاصی و با محرک رشد به دلیل تأثیر بر افزایش رشد و جذب عناصر غذایی به ویژه ازت و نیز افزایش حلالیت یون‌ها از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌ها و افزایش تولید هورمون‌های رشد منجر به افزایش عملکرد گیاه شوند. نتایج نشان داد که به دلیل سازش سویه به شرایط نوری قابل دسترس، گونه‌های مختلف از سیانوباکتری‌ها تنوع بالایی از برونو ریزش ازت را در جهت بهینه‌سازی توانایی دریافت نور برای فتوسنتز بکار می‌گیرند. در مطالعه‌ای عنوان شد که ریزوپاکترهای محرک رشد گیاه (PGPRs) می‌توانند کارایی مصرف نیتروژن گیاهی را از طریق تثبیت نیتروژن و کانی‌سازی نیتروژن الی افزایش تجمع مثال بکارگیری سویه SQR9 VCs ضمن افزایش جذب نیتروژن در برنج و آرایدوسیس، موجب افزایش جذب نیترات و آمونیوم نیز گردید (Chen et al., 2024).

### جدول ۴. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خانواده ژنی *OsAMT*

Table 4. Physicochemical characteristics of *OsAMT* gene family.

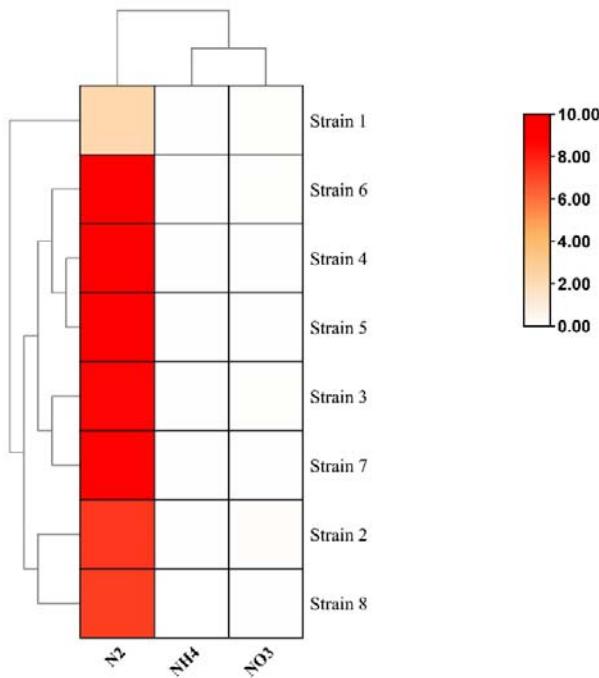
نام ژن	مکان ژنی	تعداد آمینواسید	وزن مولکولی	نقشه ایزوالکتریک	شاخص الیاتیک	شاخص هیدروپاتی	GRAVY
<i>OsAMT 1;1</i>	LOC4336365	498	52649.55	6.82	91.99	93.73	0.481
<i>OsAMT 1;2</i>	LOC4330008	496	52287.21	6.88	93.73	93.73	0.539
<i>OsAMT 1;3</i>	LOC4330007	498	53163.20	7.58	89.60	89.60	0.444
<i>OsAMT 2;1</i>	LOC4339064	486	51411.15	8.63	105.66	105.66	0.569
<i>OsAMT 2;2</i>	LOC4327434	501	53739.83	6.45	98.36	98.36	0.490
<i>OsAMT 2;3</i>	LOC4327433	497	52765.58	7.74	101.93	101.93	0.519
<i>OsAMT 3;1</i>	LOC4324937	498	53794.49	7.61	94.38	94.38	0.420
<i>OsAMT 3;2</i>	LOC4334717	479	50853.46	6.69	105.47	105.47	0.649
<i>OsAMT 3;3</i>	LOC4329628	480	51660.19	6.18	102.06	102.06	0.557
<i>OsAMT 3;4</i>	LOC4324937	402	44460.60	6.56	76.00	76.00	-0.369
<i>OsAMT 3;1-like 1</i>	LOC4324937	498	53794.49	7.61	94.38	94.38	0.420
<i>OsAMT 3;1-like 2</i>	LOC4324937	498	53794.49	7.61	94.38	94.38	0.420
<i>OsAMT 3;1-like3</i>	LOC107277383	326	34717.40	6.06	93.99	93.99	0.546
<i>OsAMT 3;1-like 4</i>	LOC107278274	470	49473.64	6.66	97.17	97.17	0.586
<i>OsAMT 4;1</i>	LOC107276876	315	33109.42	6.15	104.98	104.98	0.423

1. Sub-cellular localization



شکل ۳. ارزیابی میزان برون ریزش نیتروژن، نیترات و آمونیوم شامل اندازه‌گیری؛ (الف) نیتروژن، (ب) آمونیوم، (پ) نیترات.

Figure 3. Evaluation of the amount of nitrogen, nitrate and ammonium excretion including the measurement of A) nitrogen, B) ammonium, P) nitrate.



شکل ۴. دندروگرام سیانو باکتری براساس پارامترهای نیتروژن.

Figure 4. Dendrogram of cyanobacteria based on nitrogen parameters.

ایترنون و ۲۶/۶ درصد دارای ۲ ایترنون و حدود ۱۳/۴ درصد ژن‌ها دارای ۳ ایترنون، و حدود ۲۰ درصد ژن‌ها دارای ۷ و ۹ ایترنون هستند. ژن‌های *OsAMT 3;1*-*OsAMT 1;3*, *OsAMT 3;1-like3*, *llike 4* و *OsAMT 1;2* و *OsAMT 1;1* دارای ۹ آگزون می‌باشد. ژن‌های *OsAMT 3;1*-*OsAMT 1;3*, *OsAMT 3;1-l like 4* و *OsAMT 1;2* و *OsAMT 1;1-like3* بوده و ژن *OsAMT 4;1* دارای یک ایترنون و ژن‌های *OsAMT 2;1*, *OsAMT 2;2*, *OsAMT 3;2* و *OsAMT 3;3* دارای ۲ ایترنون و ژن‌های *OsAMT 2;3* و *OsAMT 3;1-like 2* دارای ۳ ایترنون و ژن‌های *OsAMT 3;1-like 1* و *OsAMT 3;1-like 3* دارای ۷ ایترنون و ژن‌های *OsAMT 3;4* دارای ۹ ایترنون می‌باشند. موتیف شماره یک در همه پروتئین‌ها بجز ۳;۴ و *OsAMT 4;1* و موتیف شماره ۵ در همه پروتئین‌ها بجز ۱;۴ و *OsAMT 4;1* و موتیف شماره ۱۲ فقط در پروتئین‌های *OsAMT 3;1-like3*, *OsAMT 3;1-like2* و *OsAMT 3;1-like1* مشاهده شد و

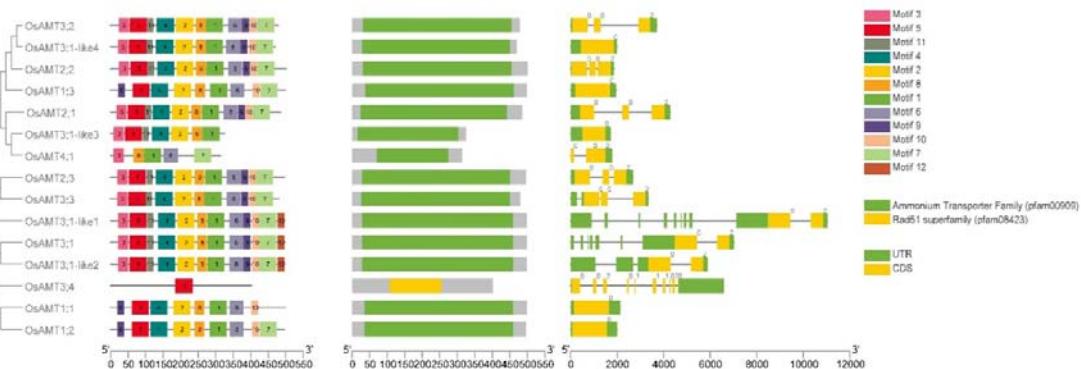
شاخص آلیاتیک در واقع حجم نسبی زنجیره آلیاتیک یعنی آمینواسیدهای آلانین، لوسین و گلیسین پروتئین بوده که اثر مثبتی بر افزایش مقاومت حرارتی پروتئین‌های کروی دارد (Jalili-Manesh et al., 2019). طول پروتئین‌های این خانواده از ۳۱۵ اسید آمینه در ژن (*OsAMT4;1*) الی ۵۰۱ اسید آمینه در ژن (*OsAMT2;2*) متغیر بوده و PI اکثر پروتئین‌ها در دامنه ۶/۰۶ الی ۸/۶۳ قرار داشتند.

شناسایی ساختار ژنی و روابط فیلوجنتیکی بر مبنای ترسیم درخت فیلوجنتیکی با استفاده از برنامه MEGA6 به روش اتصال همسایه، *OsAMT* ها به سه خوشه بزرگ طبقه‌بندی شده به نحوی که تقریباً تمام *OsAMT*‌هایی که قادر ایترنون یا دارای یک ایترنون می‌باشند در گروه اول قرار گرفتند. در حالی که همه گروه دوم جا گرفتند (**شکل ۵**). بررسی ساختار آگزون-ایترنونی خانواده ژنی *OsAMT* نشان می‌دهد که درصد ژن‌های *OsAMT* برنج بدون ایترنون یا دارای یک

شده‌اند. در میان زیرخانواده‌های AMT برنج، اعضای *OsAMTI* به عنوان انتقال‌دهنده HATS شناخته شده‌اند، LATS در حالی که سایر زیرخانواده‌ها فقط حاوی ناقل‌های (Sonoda *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2017) هستند. *OsAMTI.1* و *AtAMT1.1* از *OsAMTI.1* جذب آمونیوم برخوردار بوده بطوریکه با حذف ژن *OsAMTI.1* جذب آمونیوم برنج کاهش حدوداً ۲۵ تا ۳۰ درصدی مشاهده شد. این ژن عمدتاً در ریشه، دسته‌های آوندی ریشه و اندام هوایی و سلول‌های مزوپلیت برگ بیان می‌شود. حذف ژن *OsAMTI.1* منجر به توزیع بیشتر نیتروژن در ریشه در شرایط کمبود آمونیوم شده که نشان‌دهنده نقش *Li* در انتقال آمونیوم ریشه به ساقه می‌باشد (Li *et al.*, 2016). بررسی‌های اخیر نشان داده است که حذف ژن *OsAMTI.1* در *OsAMTI.3* و *OsAMTI.2* کاهش ۹۵ درصدی در جذب آمونیوم می‌شود، که این امر حاکی از این بوده که این سه ژن به طور مشترک مسئول جذب آمونیوم تحت شرایط کمبود آمونیوم ( $\text{NH}_4^+$ ) هستند (Konishi and Ma, 2021). بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد در برنج دست‌کم ۱۲ ژن *AMT* شناسایی شده که به چهار زیرخانواده *OsAMT1*, *OsAMT2*, *OsAMT3* و *OsAMT4* دسته‌بندی می‌شوند که از بیان اختصاصی در بافت ریشه برخوردار می‌باشند (Kumar *et al.*, 2003; Horton *et al.*, 2007a).

پروتئین ۳;۴ *OsAMT* فقط از موتیف شماره ۵ و دمین پروتئینی *Rad51* SuperFamily و فاقد دمین پروتئینی انتقال دهنده آمونیوم بوده و مابقی ژن‌ها دارای دمین پروتئینی انتقال دهنده آمونیوم با طول متفاوت تشکیل شده‌اند. بنظر می‌رسد پروتئین‌هایی که از ترکیب موتیف مشابه‌ای برخوردارند احتمالاً عملکرددهای مشابه‌ی را بروز دهند (El-Gebali *et al.*, 2019). همچنین در تحقیقی برخی از موتیف‌ها در خارج از ناحیه فعال پروتئینی مشاهده شد که وجود آنها نشان دهنده عملکرددهای ویژه این پروتئین‌ها می‌باشد (Heidari *et al.*, 2019). بررسی تکاملی پروتئین‌های *AMT* نشان داد که هر سه خوش‌شناسایی شده از الگوهای موتیف مشابه و دمین‌های خاص در هر گروه برخوردارند به عنوان مثال، بیشتر پروتئین‌های خوش‌بندی شده در گروه یک دارای انتقال دهنده آمونیوم و موتیف ۱، ۳، ۶، ۸، ۷ و ۱۱ در ساختار خود بودند، در حالی که ژن ۳;۴ *OsAMT* دارای *Rad51*SuperFamily دمین شماره ۵ است.

اگرچه ساختار اگزون/اینtron در زیرخانواده‌های *OsAMT* محافظت شده می‌باشد، ولی با این وجود تفاوت در موقعیت و تعداد اگزون‌ها در زیرخانواده‌ها مشاهده شد. تفاوت در تعداد اگزون‌ها/اینtron‌ها بین گروه‌های خانواده *OsAMT* ممکن است مربوط به تنظیمات ژنی متفاوتی باشد که هر یک از این زیرگروه‌ها در طول تکامل متتحمل

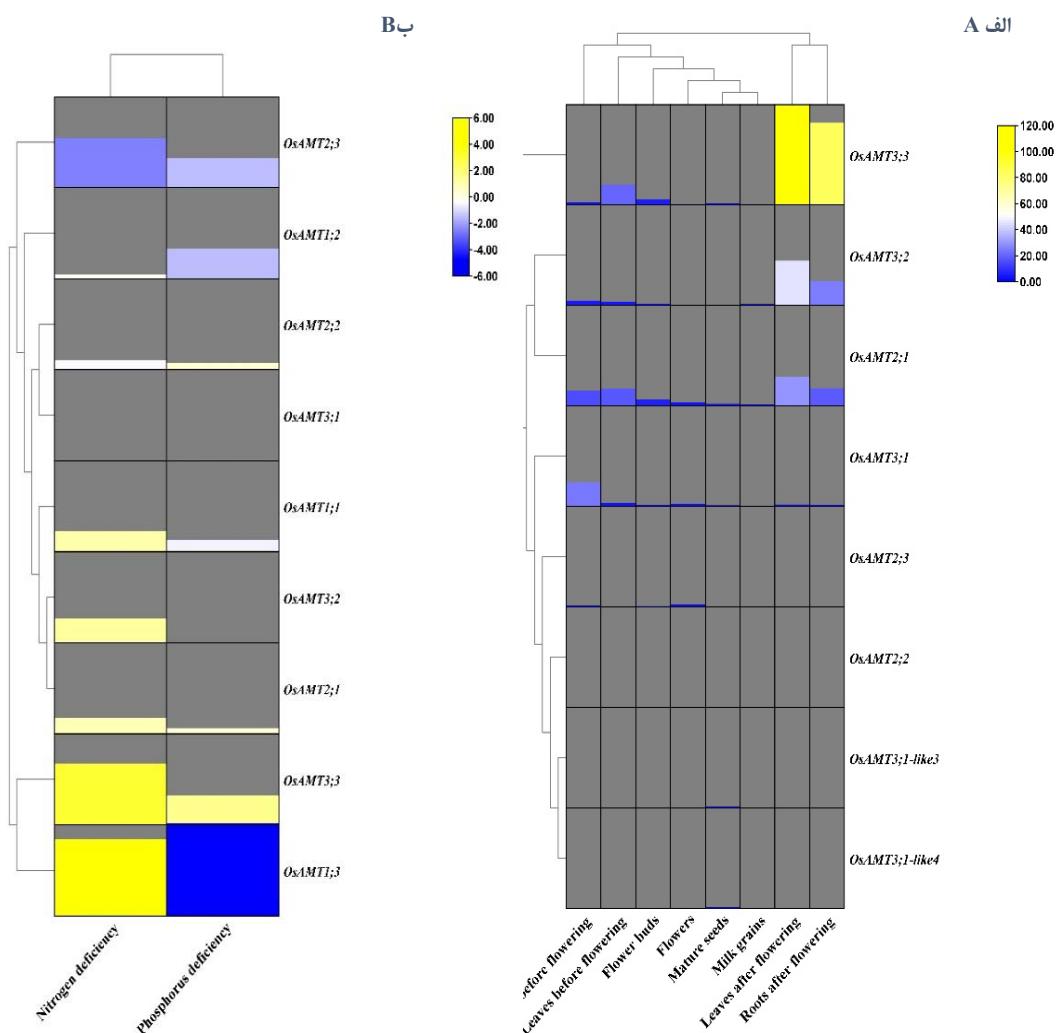


شکل ۵. آنالیز ساختار ژنی و درخت فیلوجنتیکی اعضای خانواده *OsAMT*. خانه‌های رنگی مختلف نشان‌دهنده وجود موتیف‌های مختلف و موقعیت آنها در هر پروتئین می‌باشد. نواحی سیز نشان‌دهنده اگزون‌ها بوده در حالی که خطوط سیاه نشان‌دهنده جایگاه اینtron‌ها است.

**Figure 5.** Gene structure analysis and phylogenetic tree of *OsAMT* family members. Different colored areas indicate the existence of different motifs and their positions in each protein. Green areas indicate exons, while black lines indicate the location of introns.

al., 2009). بنظر می‌رسد که خانواده AMT نتیجه تکرار ژن بوده که الگوی بیان آن ژن‌ها تحت تیمار تنفس زیستی و غیرزیستی بیان متفاوتی را نشان می‌دهد، که نشانگر بروز عملکردی جدید با ایجاد ژن‌های تکراری در برنج می‌باشد که به آن توان بیشتری برای پاسخ به تنفس‌های محیطی در طول تکامل بخشیده است. به طور کلی، تکثیر ژن‌ها راهبردی قدرتمند برای سازگاری گیاهان با محیط‌های مختلف در طول رشد و نمو می‌باشد (Li et al., 2015).

با این حال، تا به امروز، شناسایی کامل سیستماتیک و تجزیه و تحلیل بیان اعضای خانواده ژن *OsAMT* برای *OsAMT* برنج گزارش نشده که در این مطالعه، 15 ژن *OsAMT* مورد شناسایی و مطالعه گرفتند. تنفس‌های محیطی و فشارهای انتخابی، تکامل مکانیسم‌های پیچیده در گیاهان را برای مقابله با تنفس‌ها تسريع می‌بخشد. با توجه به شرایط محیطی بسیار متغیر، یکی از راههای مؤثر پاسخگویی به شرایط محیطی، بازآرایی‌های ژنی در فرایند تکامل بوده که بصورت تکرار ژنی بروز می‌نماید (Zou et al., 2015).



شکل ۶. پروفایل بیان ترانسکریپتوم (RNA-seq) اعضای خانواده ژنی *OsAMT* در مراحل مختلف نموی (الف) و کمبود ازت/فسفر (ب). کاهش بیان با رنگ زرد و افزایش بیان با رنگ آبی نشان داده شده است.

**Figure 6.** Transcriptome expression profile (RNA-seq) of *OsAMT* gene family members in different developmental stages (A) and nitrogen/phosphorus deficiency (B). Decreased expression is shown in yellow and increased expression is shown in blue.

به همراه دو ژن *OsAMT1;1* و *OsAMT1;3* مشاهده شد. با توجه به تغییرات بیان مشاهده شده در اعضای خانواده ژنی *OsAMT* که در دو تیمار مستقل مورد ارزیابی قرار گرفتند ۵ ژنی که بیشترین بیان یا نوسانات بیان را در بررسی این سیلیکو نشان دادند بهترین گرینه جهت شناسایی مکانیسم‌های دخیل در تنظیم بیان انتقال‌دهنده‌های آمونیوم می‌باشدند. در تحقیقات پیشین نیز کارکرد ویژه زیرخانواده *OsAMT1* در برنج گزارش شده که حذف آنها سبب تقلیل جذب نیتروژن در گیاه برنج همزیست با سویه‌های PGPRs شده است (Chen et al., 2024).

### نتیجه‌گیری

بررسی مکانیسم‌های جذب نیتروژن و ژن‌های موثر در این مکانیسم‌ها، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به اینکه آمونیوم منبع اصلی نیتروژن برای گیاهان بوده در مطالعه حاضر، مطالعه همکشتی سویه‌های سیانوباکتر با گیاه برنج و تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک خانواده ژنی انتقال‌دهنده آمونیوم مدنظر قرار گرفت. در مجموع تلقیح ارقام برنج با تمامی سویه‌های تثبیت‌کننده نیتروژن با دارا بودن توانایی تولید آمونیوم و نیترات در محیط کشت، قادر به بهبود رشد و ویژگی‌های ریختی گیاه شامل تولید بیomas و وزن گیاه، رشد طولی و محتوای آبی گیاه می‌باشد و محتوای رنگیزه‌های فتوستزی و غیرفوستزی در شرایط گلخانه‌ای و در حضور سویه‌های تثبیت‌کننده نیتروژن افزایش یافته است. نتایج نشان می‌دهد که همزیستی برنج با سویه‌های *Aliinostoc sp* و *Desmonostoc magnakineticifex* به ترتیب با شماره‌های ۲، ۳ و ۸ بیشترین میزان رشد را در سه رقم فجر، روشن، و طارم موجب می‌شود. در رقم فجر با بکارگیری سویه (شماره ۱ و ۲) درصد جوانه‌زنی را داشته است. در رقم روشن *Aliinostoc sp* و *Fischerella thermalis* سویه‌های *Persicum* با ۸۸/۸۹ بیشترین درصد جوانه‌زنی و در رقم طارم نیز سویه *Desmonostoc persicum* با ۵۸/۳۳ درصد موجب افزایش درصد جوانه‌زنی شد. در بررسی

آنالیز بیان ژن‌های انتقال دهنده‌های آمونیوم تجزیه و تحلیل پروفایل بیانی خانواده ژنی می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد عملکرد آن‌ها فراهم آورد (Mao and Chen, 2012). تکنیک RNA-seq ضمن ارائه همزمان توالی و کمیت ژن هدف از اختصاصیت و حساسیت بالایی در شناسایی ایزوفرم‌های مختلف یک ژن برخوردار بوده که امکان بررسی و مطالعه اطلاعات بیانی ژن‌ها را در گستره ژنومی فراهم می‌نماید (VanGuilder et al., 2008; Fassbinder-Orth, 2014). یکی از اهداف این پژوهش شناسایی ژن‌های فعال در خانواده ژنی انتقال دهنده‌های آمونیوم بوده که با انتخاب ژن‌های کلیدی در آنالیز این سیلیکو، بتوان فرایند بررسی ژن‌های منتخب این خانواده را در آنالیزهای پایین‌دستی نظیر Real-time PCR تسهیل نمود. بدین منظور بیان ژن‌های این خانواده در دو شرایط متفاوت یعنی مراحل مختلف نموی (شکل ۵-الف) و کمبود ازت/فسفر (شکل ۵-ب) مورد بررسی قرار گرفت که از ۱۵ ژن مورد بررسی، به ترتیب تنها ۸ ژن و ۹ ژن در پلتغورم RNA-seq دارای مختلف نموی، میزان بیان (RPKM) برای ۴ ژن *OsAMT3;1-like3*, *OsAMT2;3*, *OsAMT 2;2* و *OsAMT3;1-like4* اندک بوده در حالی که برای چهار ژن دیگر یعنی *OsAMT3;1*, *OsAMT2;1*, *OsAMT3;3* و *OsAMT3;2* خصوصاً در دو بافت برگ و ریشه بیان ژن قابل ملاحظه بود. ضمن اینکه تفاوت بیان در دو بافت برگ و ریشه در قبل و بعد از گلدهی محسوس بود عبارت دیگر میزان بیان پس از گلدهی برای *OsAMT3;3*, *OsAMT2;1* و *OsAMT3;2* بسیار بیشتر از میزان بیان قبل از گلدهی بود. این حالت برای ژن *OsAMT2;1* بر عکس بوده و میزان بیان قبل از گلدهی بسیار بیشتر از میزان بیان بعد از گلدهی بود. لازم ذکر است میزان بیان در بافت‌های دیگر مورد بررسی گرفته شده نیز نسبت به دو بافت ریشه و برگ تقریباً محسوس نبود. در بررسی پروفایل بیان در شرایط کمبود ازت/فسفر نیز بیشترین میزان تغییر بیان نسبت به کنترل، در سه ژن *OsAMT3;2*, *OsAMT2;1* و *OsAMT3;3* در سه رقم

افزایش کارایی گیاه در جذب مواد نیتروژن و بهبود رشد و متابولیسم را ارائه می‌نماید. سویه‌های منتخب معرفی شده در این تحقیق را می‌توان در تهیه کودهای بیولوژیکی خصوصاً کودهای اختصاصی مرحله جوانه‌زنی برنج مدنظر قرار داد. در این تحقیق ضمن شناسایی ۱۲ ژن *OsAMT* و ۱۵ ایزوفرم آن، موتیفها و دمین‌های پروتئینی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و روابط فیلوزنیکی این ژن‌ها، نیز بررسی شد. ژن‌های *OsAMT* گزارش شده در این تحقیق ضمن ارائه اطلاعات اولیه، می‌تواند زمینه‌ای برای تحقیقات آتی و شناسایی عملکردها و سازوکارهای پاسخ به گیاه برنج به همکشی با سیانوباکترها خصوصاً پاسخ‌های مرتبط با جذب نیتروژن فراهم آورد. مطالعات تكمیلی خصوصاً در مراحل مختلف رشد و نموی به منظور بررسی بیان ژن‌های منتخب خانواده ژنی انتقال دهنده آمونیوم به روش RT-qPCR می‌تواند در درک مکانیسم تنظیمات بیان ژن‌های مرتبط با انتقال/جذب آمونیوم در گیاه برنج مفید باشد.

## REFERENCES

- Adhikari, K., Bhandari, S., & Acharya, S. (2021). An overview of azolla in rice production, A Review. *Reviews in Food and Agriculture* 2(1), 04-08.
- Austin, M., Brewbaker, J., Wheeler, R., & Fownes, J. (1997). Short-rotation biomass trial of mixed and pure stands of nitrogen-fixing trees and *Eucalyptus grandis*. *Australian Forestry* 60(3), 161-168.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., & Noble, W.S. (2009). MEME SUITE, tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37, 202-208.
- Banerjee, M.R., Yesmin, L., Vessey, J.K., & Rai, M. (2006). Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. *Handbook of microbial biofertilizers*. Food Products Press, New York, 137-18.<sup>1</sup>
- Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y., & Dhiba, D. (2018). Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Frontiers in microbiology* 9, 1606.
- Bolser, D.M., Staines, D.M., Perry, E., & Kersey, P.J. (2017). "Ensembl plants, integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomic data," in *Plant Genomics Databases*. Springer), 1-31.
- Chen, Y., Li, Y., Fu, Y., Jia, L., Li, L., Xu, Z., Zhang, N., Liu, Y., Fan, X., & Xuan, W. (2024). The beneficial rhizobacterium *Bacillus velezensis* SQR9 regulates plant nitrogen uptake via an endogenous signaling pathway. *Journal of Experimental Botany*, erae125.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., Qureshi, M., Richardson, L.J., Salazar, G.A., & Smart, A. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research* 47(D1), D427-D432.
- Esmaeilzadeh-Salestani, K., Samandari\_Bahraseman, M.R., Tohidfar, M., Khaleghdoust, B., Keres, I., Möttus, A., & Loit, E. (2023). Expression of AMT1; 1 and AMT2; 1 is stimulated by mineral nitrogen and reproductive growth stage in barley under field conditions. *Journal of Plant Nutrition* 46(7), 1246-1258.
- Fassbinder-Orth, C.A. (2014). Methods for quantifying gene expression in ecoimmunology, from qPCR to RNA-Seq. *Integrative and Comparative Biology* 54(3), 396-406.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., & Mistry, J. (2013). Pfam, the protein families database. *Nucleic acids research* 42(D1), D222-D230.
- صفت طول ریشه در رقم فجر سویه شماره ۶ طول ریشه‌چه را داشته و در رقم روشن نیز سویه *Desmonostoc Persicum* با ۶۹/۳۳ میلی‌متر بیشترین طول ریشه‌چه را ایجاد کرده است. *Aliinostoc sp* با ۹۲ میلی‌متر بیشترین طول ریشه‌چه را در رقم ۲۶/۶۶ با *Desmonostoc Persicum* میلی‌متر بیشترین طول ریشه‌چه را ایجاد نمودند. مقایسه سویه‌های مختلف درون یک جنس نظیر جنس *Aliinostoc* و یا *Desmonostoc* در ارقام طارم، روشن و فجر نشان می‌دهد گونه‌های متفاوت یک جنس از تاثیرهای متفاوتی بر خصوصیات جوانه‌زنی برخوردارند. با توجه به اینکه در مرحله ابتدایی رشد برنج ریشه‌دهی و استقرار آن جهت ادامه رشد و افزایش سطح جذب مواد غذایی مهم می‌باشد لذا این سویه‌ها در این ارقام می‌توانند نقش بسزایی در افزایش ریشه‌دهی داشته باشند. اینکه پاسخ متفاوت هر رقم به سویه‌های مختلف، مزیت بکارگیری سویه‌های اختصاصی برای هر رقم به منظور

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D., & Bairoch, A. (2005a). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. Springer.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M.R., Appel, R.D., & Bairoch, A. (2005b). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. in *The proteomics protocols handbook*, ed. J.M. Walker. (New York City ,New York, United States, Humana Press), 571-607.
- Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W.B., & von Wirén, N. (1999). Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* 11(5), 937-947.
- Heidari, P., Ahmadizadeh, M., Izanlo, F., & Nussbaumer, T. (2019). In silico study of the CESA and CSL gene family in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*, Focus on post-translation modifications. *Plant Gene* 19, 100189.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C., & Nakai, K. (2007a). WoLF PSORT, protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* 35, 585-587.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C., & Nakai, K. (2007b). WoLF PSORT, protein localization predictor. *Nucleic acids research* 35(suppl\_2), W585-W587.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2014). GSDS 2.0, an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31(8), 1296-1297.
- Jalili-Manesh, M., Haddad-Mashadrizeh, A., Makhdoumi, A., & Housaindokht, M.R. (2019). Biocomputational Investigations of Structural and Functional Properties of Cry Proteins for Malaria Biocontrol. *Biological Journal of Microorganism* 8(29), 25-40.
- Kabirnataj, S., Nematzadeh, G.A., Talebi, A.F., Tabatabaei, M., & Singh, P. (2018). Neowestiellopsis gen. nov, a new genus of true branched cyanobacteria with the description of *Neowestiellopsis persica* sp.nov. and *Neowestiellopsis bilateralis* sp. nov., isolated from Iran. *Plant Systematics and Evolution* 304, 501-510.
- Kabirnataj, S., Nematzadeh, G.A., Talebi, A.F., Tabatabaei, M., & Singh, P. (2019). Identification of some heterocystous cyanobacteria isolated from rice fields of Mazandaran province with emphasis on multi-genic approach. *Journal of Microbial World* 12(3), 213-228.
- Kilai, A.A., Nematzadeh, G., Soltani, N., & Shokravi, S. (2018). The investigation of phycobiliproteins in isolated heterocystous cyanobacteria from western Mazandaran. *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research* 13(49), 91-103.
- Kirrolia, A., Bishnoi, N., & Singh, R. (2012). Effect of shaking, incubation temperature, salinity and media composition on growth traits of green microalgae *Chlorococcum* sp. *Journal of Algal Biomass Utilization* 3(3), 46-53.
- Konishi, N., & Ma, J.F. (2021). Three polarly localized ammonium transporter 1 members are cooperatively responsible for ammonium uptake in rice under low ammonium condition. *New Phytologist* 232(4), 1778-1792.
- Kumar, A., Silim, S., Okamoto, M., Siddiqi, M., & Glass, A. (2003). Differential expression of three members of the AMT1 gene family encoding putative high- affinity NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica. *Plant, cell & environment* 26(6), 907-914.
- Li, B.-z., Merrick, M., Li, S.-m., Li, H.-y., ZHU, S.-w., SHI, W.-m., & SU, Y.-h. (2009). Molecular basis and regulation of ammonium transporter in rice. *Rice Science* 16(4), 314-322.
- Li, C., Tang, Z., Wei, J., Qu, H., Xie, Y., & Xu, G. (2016). The OsAMT1. 1 gene functions in ammonium uptake and ammonium–potassium homeostasis over low and high ammonium concentration ranges. *Journal of Genetics and Genomics* 43(11), 639-649.
- Li, H., Cong, Y., Lin, J., & Chang, Y.H. (2015). Molecular cloning and identification of an ammonium transporter gene from pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 120, 441-451.
- Loqué, D., & von Wirén, N. (2004). Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *Journal of experimental botany* 55(401), 1293-1305.
- Lucas, J., Solano, B.R., Montes, F., Ojeda, J., Megias, M., & Mañero, F.G. (2009). Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *Field Crops Research* 114(3), 404-410.
- Lucy, M., Reed, E., & Glick, B.R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van leeuwenhoek* 86, 1-25.
- Maguire, J.D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2, 176-177.
- Mao, D., & Chen, C. (2012). Colinearity and similar expression pattern of rice DREB1s reveal their functional conservation in the cold-responsive pathway. *PloS one* 7(10), e47275.

- Patel, A., Tiwari, S., & Prasad, S.M. (2021). Effect of time interval on arsenic toxicity to paddy field cyanobacteria as evident by nitrogen metabolism, biochemical constituent, and exopolysaccharide content. *Biological Trace Element Research* 199(5), 2031-2046.
- Rai, S., & Shukla, N. (2020). Biofertilizer, An alternative of synthetic fertilizers. *J. Plant Arch* 20, 1374-1379.
- Scherf, U., Ross, D.T., Waltham, M., Smith, L.H., Lee, J.K., Tanabe, L., Kohn, K.W., Reinhold, W.C., Myers, T.G., & Andrews, D.T. (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature genetics* 24(3), 236.
- Schultz, J., Copley, R.R., Doerks, T., Ponting, C.P., & Bork, P. (2000). SMART, a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic acids research* 28(1), 231-234.
- Sigrist, C.J., De Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B.A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., & Xenarios, I. (2012). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res* 41(D1), D344-D347.
- Sofo, A., Mininni, A.N., & Ricciuti, P. (2020). Soil macrofauna, A key factor for increasing soil fertility and promoting sustainable soil use in fruit orchard agrosystems. *Agronomy* 10(4), 456.
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., Wirén, N.v., Yamaya, T., & Yamaguchi, J. (2003). Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1; 1-1; 3) in rice. *Plant and Cell Physiology* 44(7), 726-734.
- Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohya, K., Shinohara, H., & Matsubayashi, Y. (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* 346(6207), 343-346.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6, molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30(12), 2725-2729.
- Tesi, M., Pfau, T., Mengoni, A., & Fondi, M. (2020). Genome-scale metabolic reconstruction of the symbiosis between a leguminous plant and a nitrogen-fixing bacterium. *Nature communications* 11(1), 1-11.
- Theerawitaya, C., Supaibulwatana, K., Tisarum, R., Samphumphuang, T., Chungloo, D., Singh, H.P., & Cha-Um, S. (2023). Expression levels of nitrogen assimilation-related genes, physiological responses, and morphological adaptations of three indica rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) genotypes subjected to nitrogen starvation conditions. *Protoplasma* 260(3), 691-705.
- VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., & Freeman, W.M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44(5), 619-626.
- Wang, H., Niu, Q.W., Wu, H.W., Liu, J., Ye, J., Yu, N., & Chua, N.H. (2015). Analysis of non-coding transcriptome in rice and maize uncovers roles of conserved lnc RNA's associated with agriculture traits. *The Plant Journal* 84(2), 404-416.
- Wang, W., Xin, W., Chen, N., Yang, F., Li, J., Qu, G., Jiang, X., Xu, L., Zhao, S., & Liu, H. (2023). Transcriptome and Co-Expression Network Analysis Reveals the Molecular Mechanism of Rice Root Systems in Response to Low-Nitrogen Conditions. *International Journal of Molecular Sciences* 24(6), 5290.
- Workbench, C.G. (2019). Version 6.5. 1. *CLC bio A/S science park aarhus finlandsgade*, 10-12.
- Wu, Y., Yang, W., Wei, J., Yoon, H., & An, G. (2017). Transcription factor OsDOF18 controls ammonium uptake by inducing ammonium transporters in rice roots. *Molecules and Cells* 40(3), 178.
- Xuan, Y.H., Hu, Y.B., Chen, L.-Q., Sosso, D., Ducat, D.C., Hou, B.-H., & Frommer, W.B. (2013). Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(39), E3685-E3694.
- Yang, S., Yuan, D., Zhang, Y., Sun, Q., & Xuan, Y.H. (2021). BZR1 regulates brassinosteroid-mediated activation of AMT1; 2 in rice. *Frontiers in plant science* 12, 665883.
- Yang, W., Dong, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Li, X., & Wang, Y. (2023). Genome-wide identification and expression analysis of the ammonium transporter family genes in soybean. *International Journal of Molecular Sciences* 24(4), 3991.
- Yanti, Y., & Hamid, H. (Year). "Development of the PGPR and Cyanobacteria Consortium for Growth Promotion and Control Ralstonia syzigi subsp. indonesiensis of Tomato", in, *IOP Conference Series, Earth and Environmental Science*, IOP Publishing), 012085.
- Yuan, L., Loqué, D., Kojima, S., Rauch, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Takahashi, H., & von Wirén, N. (2007). The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *The Plant Cell* 19(8), 2636-2652.
- Zou, C., Lehti-Shiu, M.D., Thomashow, M., & Shiu, S.-H. (2009). Evolution of stress-regulated gene expression in duplicate genes of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* 5(7), e1000581.