

Study of promising Iranian *Punica granatum* L. genotypes based on morphological and pomological characteristics

Maryam Farsi¹, Mansoor Kalantar¹, Mehrshad Zeinalabedini^{2*}(ORCID: 0000000234364334), Mohammad Reza Vazifeshenas³, Reyhaneh Asgarpour⁴

1. Department of Plant Breeding, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

2. Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3. Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Yazd, Iran.

4. Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Correspondence:

Mehrshad Zeinalabedini

Email: m.zeinolabedini@abrii.ac.ir

Received: 16, May 2024

Accepted: 21, Aug. 2024

How to cite:

Farsi, M., Kalantar, M., Zeinalabedini, M., Reza Vazifeshenas, M., & Asgarpour, R. (2024). Study of promising Iranian *Punica granatum* L. genotypes based on morphological and pomological characteristics. *Crop Biotechnology*, 14 (3), 1-14. (DOI: [10.30473/cb.2024.71803.1974](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71803.1974))

ABSTRACT

Punica granatum L. is a valuable fruit tree that exhibits favorable genetic diversity in Iran. The investigation of genetic diversity is the basis of plant breeding and is of particular importance. For this purpose, 38 morphological and pomological traits of 30 pomegranate genotypes were evaluated over two consecutive years. The results indicated that the genotypes displayed a high diversity in the studied traits, with the exception of the presence of anthocyanin in the branch of this year, aril color, fruit size, fruitful flower size, and intermediate cut of the leaf. The physiological disorder of fruit skin sensitivity to bursting had a positive correlation with fruit skin sensitivity to sunburn, but it showed a negative relationship with fruit skin thickness and tree mean yield. A positive correlation was observed between fruit size and fruitful flower size, and between fruitful flower percentage and flower position. The results of the principle component analysis revealed that the characteristics of fruit skin sensitivity to bursting, tree mean yield, fruit skin thickness, flower position, and fruit shape were the most key traits in determining the diversity between the studied genotypes. Based on the results of cluster analysis, the genotypes were divided into three groups, and the first group included genotypes with the lowest fruit skin sensitivity to bursting and sunburn. Among the cultivars studied, Rabab Malas Fars, Garch-shahvar, Shahvar-ghasdasht, and Malas-Yazdi could be considered superior and desirable cultivars due to their low sensitivity to bursting and sunburn, as well as their high fruit number and tree yield. The results of this study indicated that utilizing morphological and pomological traits through detailed statistical analyses can aid in the identification and selection of superior pomegranate genotypes. This approach can facilitate the improvement of breeding programs and enhance the productivity of this valuable crop.

KEY WORDS

Punica granatum, multivariate analyses, genetic diversity, functional traits.



«مقاله پژوهشی»

راهبردهای انتخاب ژنوتیپ‌های امیدبخش گونه *Punica granatum L.* با استفاده از صفات مورفولوژیک و پومولوژیک

مریم فارسی^۱، منصور کلانتر چاهوکی^۱، مهرشاد زین‌العابدینی^{۲*} (ارکید: ۰۰۰۰۰۰۰۲۳۴۳۶۳۳۴)، محمدرضا وظیفه‌شناس^۳، ریحانه عسگرپور^۴

چکیده

گیاه *Punica granatum L.* از گیاهان ارزشمند و دارای تنوع ژرم‌پلا سم مطلوب در ایران است. بر سی تنوع ژنتیکی اساس اصلاح گیاهان بوده و از اهمیت خاصی برخوردار است. بدین منظور، ۳۸ صفت مورفولوژیک و پومولوژیک ۳۰ ژنوتیپ امیدبخش انار طی چهار سال متوالی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که به استثنای برخی از ویژگی‌ها مانند وجود میزان آنتوسیانین بر روی شاخه سال جاری، رنگ حبه، اندازه میوه، اندازه گل بارور و بریدگی میانی برگ، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از تنوع بالایی در سایر صفات برخوردار بودند. عارضه فیزیولوژیک حساسیت پوست میوه به ترکیب‌های دارای همبستگی مثبت با حساسیت پوست میوه به آفتاب سوختگی بود، ولی ارتباط منفی با ضخامت پوست میوه و میانگین عملکرد میوه نشان داد. همبستگی مثبت بین اندازه میوه با اندازه گل مثر و در صد گل بارور با موقعیت گل مشاهده شد. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که صفات حساسیت پوست میوه به ترکیب‌های، میانگین عملکرد درخت، ضخامت پوست میوه، موقعیت گل و شکل میوه، کلیدی‌ترین صفات در تعیین تنوع بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی بودند. بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها در سه گروه تقسیم شدند که در گروه اول ژنوتیپ‌هایی قرار گرفتند که پایین‌ترین حساسیت پوست میوه به ترکیب‌های و آفتاب سوختگی را داشتند. از میان ارقام مورد مطالعه، ارقام رباب، ملس فارس، شهوار قصر دشت، شهوار، گرچ شهوار و ملس یزدی، را می‌توان به دلیل داشتن حساسیت پایین میوه به ترکیب‌های و آفتاب سوختگی و نیز تعداد میوه و عملکرد درخت بالا به عنوان ارقام و ژنوتیپ‌های برتر و امیدبخش معرفی کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک و پومولوژیک از طریق انجام تجزیه تحلیل‌های دقیق آماری می‌تواند به شناسایی و انتخاب ژنوتیپ‌های برتر انار کمک کرده و بهبود برنامه‌های اصلاحی و افزایش بهره‌وری تولید این میوه ارزشمند را تسهیل کند.

واژه‌های کلیدی

Punica granatum L.، تجزیه‌های چند متغیره، تنوع ژنتیکی، صفات عملکردی.

۱. گروه مهندسی کشاورزی واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.
۲. گروه زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۳. گروه تحقیقات علوم زراعی و باغبانی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی، یزد، ایران.
۴. گروه زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

نویسنده مسئول:

مهرشاد زین‌العابدینی

رایانامه: m.zeinolabedini@abrii.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۳۱

استناد به این مقاله:

فارسی، مریم؛ کلانتر چاهوکی، منصور؛ زین‌العابدینی، مهرشاد؛ وظیفه‌شناس، محمدرضا و عسگرپور، ریحانه (۱۴۰۳). راهبردهای انتخاب ژنوتیپ‌های امیدبخش گونه *Punica granatum L.* با استفاده از صفات مورفولوژیک و پومولوژیک. فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۱)، ۱۴-۱۴.

(DOI: [10.30473/cb.2024.71803.1974](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71803.1974))

مقدمه

Punica granatum L. گیاهی بومی آسیای مرکزی، به‌ویژه ایران بوده که در دیگر نقاط جهان نیز پراکنده است (Verma *et al.*, 2010). کشت گسترده انار در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری در شرایط تغییر اقلیم بیانگر سازگاری و انعطاف‌پذیری بالای این گونه گیاهی است (Da Silva *et al.*, 2013). ایران با تولید سالانه بیش از یک میلیون تن و سطح زیر کشت بالغ بر ۸۹۴۰۰ هکتار، یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان انار در دنیا به‌شمار می‌رود (FAO, 2022). براساس آمارهای موجود، در بین کشورهای تولیدکننده انار در جهان، ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان این محصول است، و به‌دلیل وجود تنوع بالایی از نظر ویژگی‌های ژنوتیپی، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مراکز ذخایر ژنتیکی شناخته می‌شود. ایستگاه تحقیقات منابع ژنتیکی گاریگالا در کشور ترکمنستان با گردآوری ۱۱۱۷ ژنوتیپ در رتبه اول قرار دارد. پس از آن، کلکسیون مؤسسه تحقیقات گیاهی واولوف در سن پترزبورگ روسیه با ۸۰۰ ژنوتیپ در مقام دوم و کلکسیون ایستگاه تحقیقات انار یزد با مجموع ۷۶۲ ژنوتیپ در مقام سوم جهان قرار دارد (Holland *et al.*, 2009).

استفاده از ارقام گیاهی اصلاح شده با عملکرد کمی و کیفی بالا و سازگارتر با عوامل محدود کننده زیستی و غیر زیستی، مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین راهکار برای افزایش عملکرد در واحد سطح می‌باشد (Eiadathong *et al.*, 2000). از اقدامات اساسی که قبل از انجام هر برنامه اصلاحی باید مورد توجه قرار گیرد، دستیابی به تنوع ژنتیکی موجود برای صفات مورد نظر است تا به‌نژادگر به نحو مطلوبی به خصوصیات ذخایر ژنتیکی آگاهی کامل حاصل نماید. در واقع، تنوع ژنتیکی اساس اصلاح گیاهان بوده و از اجزای مهم پایداری نظام‌های زیستی به‌شمار می‌آید. از این‌رو، بررسی آن از اهمیت خاصی برخوردار است (Mohammadi and Prasanna, 2003). از تنوع ژنتیکی همراه با اطلاعات مختلف از ژرم پلاسما، می‌توان در انتخاب ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان مختلف و حفاظت از منابع ژنتیکی استفاده کرد (Zarkti *et al.*, 2010).

یکی از مفیدترین روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی، بررسی تنوع و تعیین قرابت ژنتیکی بین ارقام و توده‌ها، به‌وسیله شاخص‌های مورفولوژیک است. بررسی صفات متمایز و مشخص برای شناسایی، تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی مجموعه ژرم پلاسما بسیار مفید و ضروری است (Martinez-Nicolas *et al.*, 2016). نشانگرهای مورفولوژیک، حاصل جهش‌ها و تنوع قابل رؤیت در مورفولوژی گیاه بوده و از جمله نخستین نشانگرهای مورد استفاده در برنامه‌های به‌نژادی به‌شمار می‌آیند که از زمان‌های بسیار دور مورد استفاده قرار گرفته‌اند؛ البته صفات مهم و اقتصادی گیاهان باغی عمدتاً توسط چند ژن کنترل می‌شوند و تحت تأثیر محیط قرار دارند (Alsaed *et al.*, 2009). خصوصیات کیفی چهار رقم انار ر شد یافته در عمان را مورد بررسی قرار داده‌اند. تفاوت معنی داری در بین ارقام از نظر اندازه میوه، رنگ پوست میوه، اندازه آریل، اسیدیته قابل تیتراسیون و مقدار آب میوه مشاهده گردید، به‌خصوص آب میوه واریته‌های وحشی حدود ۸ برابر اسیدی‌تر از دیگر ارقام مورد مطالعه بود. با بررسی ۱۷ رقم انار از منطقه بتلیس، تنوع قابل توجهی در وزن میوه، طول میوه و عرض میوه گزارش نمودند (Volkan *et al.*, 2015). همچنین، میر و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی ده رقم انار از لحاظ ویژگی‌های مختلف فیزیکی میوه گزارش نمودند که صفات وزن میوه، قطر میوه و حجم میوه ضریب تغییرات بیشتری را نسبت به سایر صفات داشتند. March and Marrakech (1991) نیز با انجام برخی مطالعات براساس مقایسات مورفولوژیک به‌منظور مشخص نمودن چند شکلی درون ذخایر بومی انار، تنوع فنوتیپی قابل توجهی را در میان ژنوتیپ‌ها گزارش نمودند. صفات مورفولوژیک ۱۱۷ ژنوتیپ انار در استان یزد نشان داد که شکل پایین میوه و شکل میوه بر پایه شاخص شانون از تنوع بالایی برخوردار است (Zahravi and Vazifeshenas, 2017). روی ۲۱ صفت میوه از ۱۸ ژنوتیپ انار در جنوب جالیسکو، مکزیک مطالعه کرده و دریافتند که اندازه و وزن میوه مهم‌ترین متغیرها هستند. Tapia Campos *et al.* (2021) نیز تنوع بالایی (CV=30.5%) بین ژنوتیپ‌های انار مورد مطالعه از نظر وزن میوه مشاهده کردند (Karap Tsi *et al.*, 2021). تشخیص دقیق ژنوتیپ‌ها برای پرورش و تجارت ارقام انار و به‌منظور

کشاورزی و باغبانی شود. این مطالعه به دنبال فراهم کردن اطلاعات پایه‌ای و کاربردی جهت بهبود برنام‌های اصلاحی، افزایش بهره‌وری تولید انار و معرفی ارقام جدید در آینده انجام شده است.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تنوع کلکسیون انار در کشور، تعداد ۳۰ ژنوتیپ امیدبخش موجود در کلکسیون انار استان یزد و اصفهان براساس مطالعات قبلی انجام شده (Farsi et al., 2023) انتخاب گردید (جدول ۱) و خصوصیات مورفولوژیک و پومولوژیک آنها طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۷ مورد ارزیابی قرار گرفت.

مدیریت کارآمد برنامه‌های به‌نژادی آینده، امری حیاتی است (Sarkhosh et al., 2011). هرچند تعداد گونه‌های جنس *Punica* بسیار کم است، اما به‌علت تاریخچه طولانی کشت انار در ایران، تنوع مورفولوژیک بسیار بالایی در داخل ارقام و ژنوتیپ‌های موجود در کشور مشاهده می‌شود، ولی مستندات قوی مبتنی بر تفاوت بین این نمونه‌ها وجود ندارد.

هدف از این مطالعه، ارزیابی دقیق ویژگی‌ها و معرفی ژنوتیپ‌های امیدبخش انار از طریق تجزیه و تحلیل صفات مورفولوژیک است. با توجه به تنوع ژنتیکی موجود در کلکسیون انار کشور و مطالعات قبلی انجام شده در آن و نیز اهمیت اقتصادی- تغذیه‌ای این محصول، بررسی و ارزیابی صفات مختلف در ژنوتیپ‌های امیدبخش می‌تواند منجر به شناسایی و انتخاب ژنوتیپ‌های برتر با خصوصیات مطلوب

جدول ۱. اطلاعات ژنوتیپ‌های انار مورد بررسی

Pomegranate, multivariate analyses, genetic diversity, functional traits. Information of the studied pomegranate genotypes

نام ژنوتیپ Genotype Name.	کد ژنوتیپ Genotype Code.	شماره No.	نام ژنوتیپ Genotype Name.	کد ژنوتیپ Genotype Code.	شماره No.
Siahnar-Behshahr	9-141	۱۶	Robab-malas-Kazeron	3-119	۱
سیاهنار بهشهر Babolsar	9-165	۱۷	رباب ملس کازرون Bihasteh-Jahrom	3-215	۲
بابلسر Ghermez-Gorgan	9-166	۱۸	بی هسته جهرم Sabz-Ghasrdasht	3-229	۳
قرمز گرگان Yek-Kiluei	11-224	۱۹	سبز قصرالدشت Tashtoo-Estahban	3-255	۴
یک کیلویی Eikhosh-Lariz-sistan	11-334	۲۰	تشتو استهبان Esfahani-malas	3-271	۵
ایخوش لاریز سیستان Toughi-Varamin	12-139	۲۱	اصفحانی ملس Oud-Neiriz	3-287	۶
طوقی ورامین Vahshi-Kan	12-160	۲۲	عود نیریز Robab-Torsh	3-297	۷
وحشی کن Shahpar-Pishva	12-170	۲۳	رباب ترش Gelobarike-Isfahan	3-301	۸
شهر پیشوا Shahpar-Varamin	12-181	۲۴	گلوباریک اصفهان Khajei-Ghasrdasht	3-319	۹
شهر ورامین Garch-Shahvar	14-110	۲۵	خاچه ای قصردشت Shahvar-Ghsrdasht	3-320	۱۰
قرچ شهوار Shirin-Shahvar	14-121	۲۶	شهوار قصرالدشت Robab-malas-Fars	3-323	۱۱
شیرین شهوار Malas-Yazdi	14-125	۲۷	رباب ملس فارس Asali-Sarvestan	3-333	۱۲
ملس یزدی Aban-Mahi	14-144	۲۸	عسلی سروستان Farugh-Neiriz	3-339	۱۳
آبان ماهی Abarnadabad	14-233	۲۹	فروغ نی ریز Sorkh-Torsh-Shahreza	5-190	۱۴
آبرنادآباد Tablarz-Yazd	14-342	۳۰	سرخ ترش شهررضا Ardestani-Ghermez	5-248	۱۵
تب لرز یزد			اردستانی قرمز		

پاجوش، میزان خار بر روی شاخه چوبی بالغ، سطح شاخه چوبی و میزان آنتوسیانین در شاخه سال جاری؛ ۲- صفات زایشی: اندازه گل مثمر، قطر جام، رنگ گلبرگ، درصد گل‌های مثمر، عادت گل‌دهی، محل تشکیل گل و موقعیت گل؛ ۳- صفات پومولوژیک: اندازه و شکل میوه، ضخامت پوست، طعم، رنگ پوست، شکل تحتانی، شکل پاشنه، شکل تاج، تقارن میوه، حساسیت پوست میوه به آفتاب سوختگی و ترکیب‌گی، زمان رسیدن میوه، رنگ پیه، رنگ حبه، اندازه و رنگ دانه و ۴- ارزیابی برخی از صفات فیزیولوژیکی و عملکردی میوه: تعداد میوه‌های درخت، وزن متوسط میوه و عملکرد متوسط درخت (جدول ۲).

در این پژوهش، تعداد ۳۸ صفت مورفولوژیکی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت که شامل صفات رویشی، زایشی، پومولوژیکی و برخی از ویژگی‌های عملکردی بود. صفات مورد ارزیابی در این تحقیق کیفی بوده و در ابتدا به منظور انجام هرگونه آنالیز، داده‌های کیفی اندازه‌گیری شده براساس دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری انار به امتیازهای کمی تبدیل شدند. صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده به صورت زیر دسته بندی شدند: ۱- صفات رویشی: شکل نوک برگ، حاشیه برگ، نسبت طول به عرض برگ، نسبت طول دمبرگ به رگبرگ اصلی، بریدگی میانی برگ، وجود غده جانبی برگ، شکل تاج و قدرت رشدی درخت، میزان

جدول ۲. لیست صفات اندازه‌گیری در پژوهش حاضر به همراه علائم اختصاری

Table 2. The list of measured attributes in the present study along with abbreviations

Code. کد	Adjective. نام صفت	No. شماره	Code. کد	Adjective. نام صفت	No. شماره
FS	Fruit Size سایز میوه	۲۰	TCS	Tree Crown Shape شکل تاج درخت	۱
FST	Fruit Skin thickness ضخامت پوست میوه	۲۱	TGP	Tree Growth Power قدرت رشد درخت	۲
SAS	Stick Arils to Skin and Albedo نسبت آریل به پوست و آلبیدو (مزوکارپ)	۲۲	SU	Sucker مکنده	۳
FSSB	Fruity Skin Sensitivity to Burst حساسیت پوست میوه به ترکیدن	۲۳	WSWB	Wood Surface of Wooden Branch سطح چوب شاخه چوبی	۴
FSSS	Fruit Skin Sensitivity to Sunburn حساسیت پوست میوه به آفتاب سوختگی	۲۴	TMB	Thorn in Mature wood Branch خار شاخه چوب	۵
FF	Fruit Flavor طعم میوه	۲۵	ABTY	Anthocyanin on Branch of This year آنتوسیانین در شاخه امسال	۶
FRT	Fruit Ripening Time زمان رسیدن میوه	۲۶	ICL	Intermediate Cuts of Leaves برش میانی برگ	۷
FSC	Fruit Skin Color رنگ پوست میوه	۲۷	LTS	Leaf Tip Shape شکل نوک برگ	۸
FRS	Fruit Shape شکل میوه	۲۸	LM	Leaf Margin حاشیه برگ	۹
FBS	Fruit Bottom Shape شکل پایین میوه	۲۹	PC	Petiole Color رنگ دمبرگ	۱۰
FCS	Fruit Crown Shape شکل تاج میوه	۳۰	LLG	Leaf Lateral Gland غده جانبی برگ	۱۱
FSY	Fruit symmetry تقارن میوه	۳۱	LWLR	Length-to-width Leaf Ratio نسبت طول به عرض برگ	۱۲
FHS	Fruit Heel Shape شکل پاشنه میوه	۳۲	PMVR	Petiole to Middle Vein Ratio نسبت دمبرگ به رگ میانی	۱۳
AC	Aril Color رنگ آریل	۳۳	FP	Flower Position موقعیت گل	۱۴
SS	Seed Size اندازه بذر	۳۴	FFS	Flower Formation Site محل تشکیل گل	۱۵
SC	Seed Color رنگ دانه	۳۵	DFH	Dominant Flowering Habit عادت غالب گلدهی	۱۶
NFT	Number of Fruits in Tree تعداد میوه در درخت	۳۶	FFP	Fruitful Flowers Percentage درصد گل‌های مثمر	۱۷
FMW	Fruit Mean Weight (g) میانگین وزن میوه (گرم)	۳۷	FCD	Flower Cup Diameter قطر فنجان گل	۱۸
TMY	Tree Mean Yield (kg) میانگین عملکرد درخت (کیلوگرم)	۳۸	FRFS	Fruitful Flower Size اندازه گل مثمر	۱۹

ژنوتیپ‌های برتر استفاده نمود. براساس توزیع فراوانی، تنوع بالایی بین ژنوتیپ‌ها از نظر صفات از جمله شکل تحتانی میوه (FBS)، شکل پاشنه میوه (FHS)، رنگ بذر (SC)، تعداد پاجوش (SU)، تعداد خار بر روی شاخه چوبی بالغ (TMB) و قدرت رشد درخت (TGP) مشاهده شد، ولی شاخصی از نظر صفات اندازه میوه (FS)، رنگ آریل (AC) و اندازه گل مثرم (FRFS) بین ژنوتیپ‌ها وجود نداشت (شکل ۱).

در مطالعات مختلف که برای بررسی تنوع ژرم پلاسم انار انجام شده است، تنوع بسیار زیادی در خصوصیات مورفولوژیک میوه و خصوصیات بیوشیمیایی آب میوه انار در میان ژنوتیپ‌های کشور ترکیه (Caliskan and Bayazit, 2013) و ایران (Akbarpour *et al.*, 2009) و تنوع مورفولوژی یک گسترده‌ای برای ژرم پلاسم انار در اردن (Awamleh *et al.*, 2009) و مراکش (Haddioui, 2012) گزارش شده است. Karaptesis *et al.* (2021) نیز در مطالعه ۲۶ ژنوتیپ انار از کلکسیون مصر گزارش کردند که ژنوتیپ‌ها از نظر وزن میوه از تنوع مطلوبی برخوردار بودند. Welkan *et al.* (2015) با بررسی ۱۷ رقم انار از منطقه بتلیس تنوع قابل توجهی در وزن میوه، طول میوه و عرض میوه گزارش نمودند. صفات مورفولوژیک ۱۱۷ ژنوتیپ انار در استان یزد نشان داد که شکل پایین میوه و شکل میوه بر اساس شاخص شانون از تنوع بالایی برخوردار است (Zahravi and Vazifeshenas, 2017). با مطالعه ۲۱ صفت میوه از ۱۸ ژنوتیپ انار در جنوب جالیسکو دریافتند که اندازه و وزن میوه مهم‌ترین متغیرها هستند.

Tapia Campus *et al.* (2021) در بررسی صفات تنوع پومولوژیک و شیمیایی ۴۹ نمونه انار از کشورهای اروپای جنوبی نیز تنوع بالایی در صفات مورد مطالعه از جمله وزن میوه و صد دانه، ضخامت و رنگ پوست میوه مشاهده شد (Bartual *et al.*, 2022). هشت صفت مورفولوژیک و پومولوژیک حائز اهمیت برای پرورش انار در ۹۴ نمونه از ژرم پلاسم انار اسپانیا مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که صفات زمان رسیدن میوه، رنگ پوست میوه و سختی دانه از تنوع بالایی بین نمونه‌ها برخوردار بودند (Zuriaga *et al.*, 2024).

به‌منظور اندازه‌گیری صفات پومولوژیک، نمونه‌برداری میوه همزمان با رسیدن آن‌ها آغاز گردید و خصوصیات مورفولوژیک و صفات رشدی درخت برای هر یک از ارقام بر اساس مقالات موجود و تو صیف نامه انار اندازه‌گیری شد. برای هر صفت پومولوژیک از هر ژنوتیپ حداقل هشت نمونه جهت مطالعه و اندازه‌گیری صفات به آزمایشگاه منتقل و برای هر صفت میانگین هشت نمونه در نظر گرفته شد. به‌منظور افزایش دقت در تجزیه و تحلیل اطلاعات مورفولوژیک، این طرح به‌صورت تکرار دار طی چهار سال انجام شد و در نهایت برای آنالیزهای آماری از میانگین داده‌ها استفاده گردید.

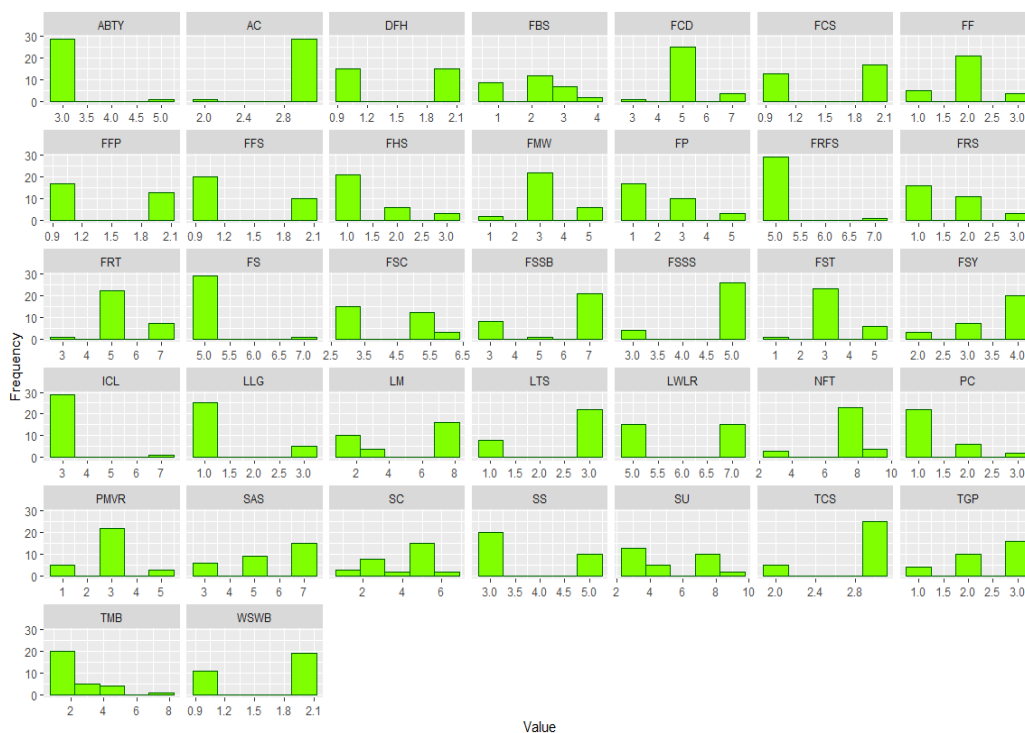
تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تعیین همبستگی بین ویژگی‌های مورد ارزیابی، از همبستگی اسپیرمن با استفاده از بسته "corrplot" در نرم‌افزار R استفاده شد. داده‌های مورفولوژی یک و پومولوژی یک با استفاده از تحلیل خوشه‌ای بر اساس فاصله اقلیدسی و روش وارد تحلیل شده و به‌صورت نقشه حرارتی نیز نمایش داده شدند. علاوه بر این، ساختار جمعیتی ژنوتیپ‌های انار مورد استفاده در این مطالعه از طریق الگوریتم خوشه‌بندی بیزی با استفاده از بسته "apcluster" در نرم‌افزار R ارزیابی شد. تعداد بهینه زیرجمعیت‌ها (K) با استفاده از معیار کالینسکی-هاراباش (CHC) برای خوشه‌بندی K-means تعیین گردید.

برای شناسایی صفاتی که بیشترین تغییرپذیری را در گروهی از ژنوتیپ‌ها ایجاد می‌کنند، تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر روی تمام متغیرها به‌طور همزمان انجام شد. تمامی تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزار R انجام شدند.

نتایج و بحث

نتایج بررسی تنوع صفات اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های مورد بررسی به کمک نمودارهای فراوانی نشان داد که تنوع مطلوبی بین ۳۰ ژنوتیپ مورد بررسی انار وجود دارد. بسیاری از صفات مهم اقتصادی مانند طعم میوه (FF)، وزن میوه (FMW) و زمان رسیدگی میوه (FRT)، دارای ژنوتیپ‌های با دو حد آستانه‌ای بودند (شکل ۱) که می‌توان از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی و یا طرح‌های تلاقی جهت دستیابی به



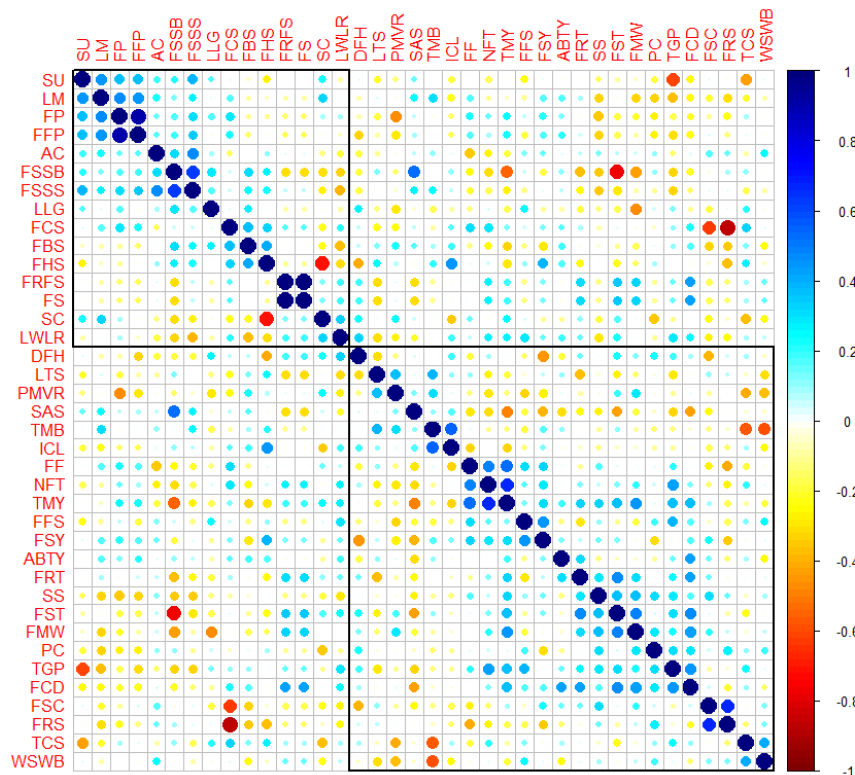
شکل ۱. فراوانی صفات اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های مختلف کلکسیون انار

Figure 1. Frequency of traits measured in different genotypes of pomegranate collection

انار از جمله مهم‌ترین مشکلات تولید انار در دنیا به‌خصوص در مناطق گرم و خشک است که کاشت آن را با محدودیت مواجه می‌کند. این دو عارضه فیزیولوژیک قبل از برداشت، کیفیت و قابلیت انبارداری میوه را به‌طور جدی کاهش می‌دهد. اثر تشدیدکننده آفتاب سوختگی بر ترکیب میوه در پژوهش‌های پیشین گزارش شده‌است که به‌دلیل خشکی پوست در میوه‌های آفتاب‌سوخته، ترک‌خوردن میوه نیز مشاهده می‌شود. سوی دیگر، حساسیت پوست میوه به ترکیب میوه با ضخامت پوست میوه (FST) داشت (Yazici and Kaynak, 2009; Shakeri and Sadat) (akhavi, 2003; Hepaksoy *et al.*, 2000) (شکل ۲). ارقام دارای میوه‌هایی با پوست ضخیم، احتمال ترکیب پوست در آنها کمتر خواهد بود. ارقامی مانند رباب ملس فارس، رباب ملس کازرون و خواجه قصر دشت دارای پوستی ضخیم‌تر از بقیه ارقام مورد مطالعه بوده و حساسیت آنها به ترکیب نیز پایین بود. در بررسی تنوع مورفولوژیک و پومولوژیک ۲۲۱ ژنوتیپ انار نیز چنین نتیجه‌ای را مشاهده کردند (Razi *et al.*, 2021).

نتایج تجزیه همبستگی ساده صفات وجود همبستگی‌های منفی و مثبت معنی‌دار بین برخی صفات مهم را نشان داد. از جمله اندازه میوه (FS) با اندازه گل متمر (FRFS) همبستگی بالا و معنی‌داری با همدیگر داشتند (شکل ۲). با مطالعه همبستگی بین ۲۸ صفت کمی و کیفی میوه ۲۴ ژنوتیپ انار مشاهده کردند که صفات مورد بررسی دارای همبستگی معنی‌دار هستند که نشان‌دهنده تنوع و ارتباط بین صفات می‌باشد (Sarkhosh *et al.*, 2005).

نتایج همبستگی صفات مورد بررسی ژنوتیپ‌های انار نشان داد که حساسیت پوست میوه به آفتاب‌سوختگی (FSSB) با حساسیت میوه به ترکیب (FSSS) همبستگی مثبت معنی‌داری داشتند که این امر نشان می‌دهد هرچه میزان حساسیت پوست میوه به آفتاب سوختگی بیشتر باشد، به همان میزان میوه دچار ترکیب خواهد شد که می‌تواند به این علت باشد که پوست آسیب دیده در اثر آفتاب، یکپارچگی چربی‌های سلولی، پروتئین‌ها و غشاء خود را از دست داده و در نتیجه دچار ترک‌خوردگی می‌گردد. دو عارضه آفتاب‌سوختگی و ترکیب پوست میوه



شکل ۲. تجزیه همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده کلکسیون انار

Figure 2. Correlation analysis between measured traits of pomegranate collection

میانگین عملکرد درخت دارای ارتباط منفی با حساسیت پوست میوه به ترکیدگی بود. اثر منفی ترکیدگی پوست میوه انار بر عملکرد توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (Chandra *et al.*, 2011). پدیده نامطلوب ترکیدگی پوست میوه می‌تواند تا ۶۵ درصد باعث کاهش عملکرد شود (Singh *et al.*, 2020) که این میزان در میان ارقام، متفاوت است. طیف وسیعی از تنوع (۱۸/۳-۶۲/۶ درصد) را در ترک‌خوردگی میوه در ارقام مختلف انار در منطقه خشک مشاهده کردند (Sing *et al.*, 2014).

اندازه گل بارور (FRFS) همبستگی مثبت با اندازه میوه (FS)، میانگین وزن میوه (FMW)، ضخامت پوست میوه (FST) و زمان رسیدن میوه (FRT) داشت (شکل ۲). رقم رباب ملس فارس دارای بزرگ‌ترین اندازه میوه بود که بزرگ‌ترین اندازه گل بارور نیز به همین رقم تعلق داشت. در واقع، هرچه اندازه گل بارور بزرگ‌تر باشد، در نتیجه تعداد تخمک موجود در آن افزایش یافته و نهایتاً میزان کیفیت تشکیل میوه نیز بالا رفته و طبیعتاً با افزایش تعداد

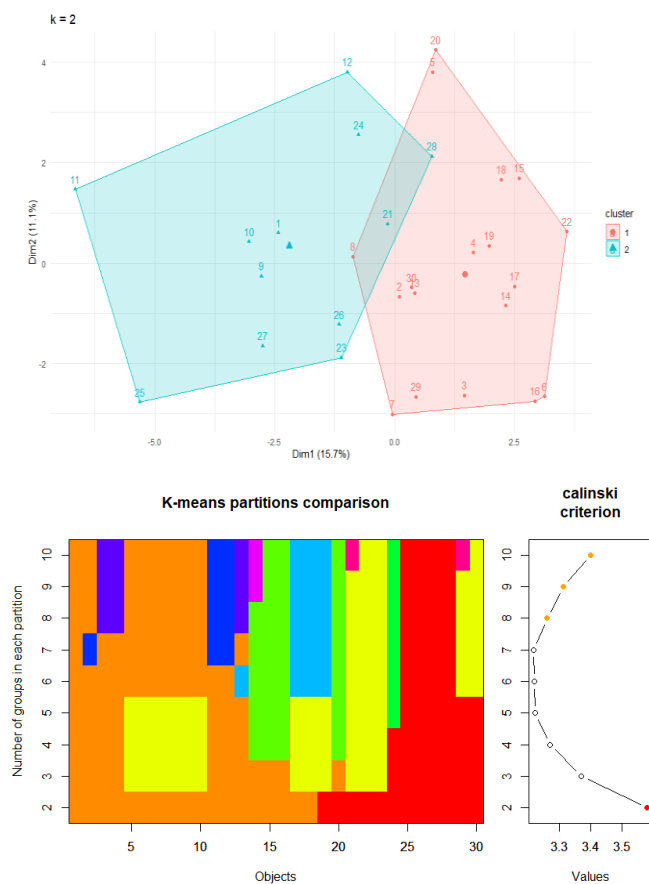
صفت نسبت طول به عرض برگ (LWLR) رابطه منفی با حساسیت پوست میوه به آفتاب‌سوختگی و ترکیدگی داشت (شکل ۲) که بیانگر این موضوع است که هرچه سطح برگ بالاتر باشد، محافظت بیشتری از میوه‌ها در برابر تشعشعات خورشید فراهم می‌شود. بنابراین، در مناطقی که دارای میزان تابش بالای خورشید هستند، انتخاب ارقام با سطح برگ بیشتر می‌تواند به کاهش خسارت آفتاب‌سوختگی و ترکیدگی کمک کند.

میانگین محصول درخت (TMY) با تعداد میوه‌های موجود در درخت (NFT) همبستگی مثبت بالاتری نسبت به میانگین وزن میوه (FMW) نشان داد (شکل ۲). از این رو می‌توان چنین استنباط کرد که میزان عملکرد کلی درخت بیشتر از آنکه به وزن میوه‌ها وابسته باشد، تحت تأثیر تعداد میوه تولید شده روی درخت قرار می‌گیرد. با بررسی ۳۳ رقم انار نشان دادند که بین صفات تعداد میوه هر درخت، عملکرد هر درخت و عملکرد بهره‌وری همبستگی مثبت بالایی وجود دارد (Vani *et al.*, 2012).

ارتباط مثبتی بین قطر جام گل (FCD) با قدرت رشد درخت، اندازه گل مثمر، اندازه میوه، میانگین وزن میوه، میانگین عملکرد درخت، ضخامت پوست میوه و زمان رسیدن میوه داشت (شکل ۲). در پژوهش‌های مختلف بر روی محصولات مختلف از جمله زغال‌اخته (Johnson *et al.*, 2011) و زیتون (Rosati *et al.*, 2009) اثرگذاری و همبستگی میان اندازه گل یا تخمدان بر اندازه نهایی میوه گزارش شده‌است.

در تجزیه ساختار جمعیت براساس صفات مورفولوژیک و با استفاده از مدل بی‌زین و مقادیر معیار Calinski-Harabasz (CHC)، دو زیر جمعیت شناسایی گردید، به طوری که گروه اول شامل ۱۸ ژنوتیپ بود و بقیه ژنوتیپ‌ها در گروه دوم قرار گرفتند (شکل ۳). ارقام واقع در گروه دوم شامل ارقامی بود که دارای بالاترین میانگین عملکرد درخت و حساسیت پایین‌تر پوست میوه به ترکیب‌گی بود.

حبه تشکیل شده، اندازه میوه نیز افزایش می‌یابد. درصد تشکیل میوه در گل‌های درشت بیش از ۹۵ درصد و در گل‌های کوچک کمتر از ۲۰ درصد بود و میانگین وزن میوه به‌طور معنی‌داری با افزایش اندازه گل، افزایش یافت که این امر مؤید همبستگی به‌دست آمده در این پژوهش می‌باشد (Wetzstein *et al.*, 2013). میوه درشت‌انار دارای بیش از ۱۰۰۰ حبه در هر میوه است که هر حبه حاصل بارور شدن مستقل یک تخمک بوده؛ بنابراین تولید میوه‌های درشت‌تر نیازمند بارور شدن هزاران تخمک است. به‌طور کلی، کیفیت گل نقش مهمی در تولید میوه ایفا می‌کند (Wetzstein *et al.*, 2011). از آنجا که وزن میوه یکی از مهم‌ترین معیارهای اقتصادی مهم در تولید صنعتی انار می‌باشد (Maestre *et al.*, 2000)، می‌توان ارقام را در مرحله گل با استفاده از این موضوع انتخاب کرد.



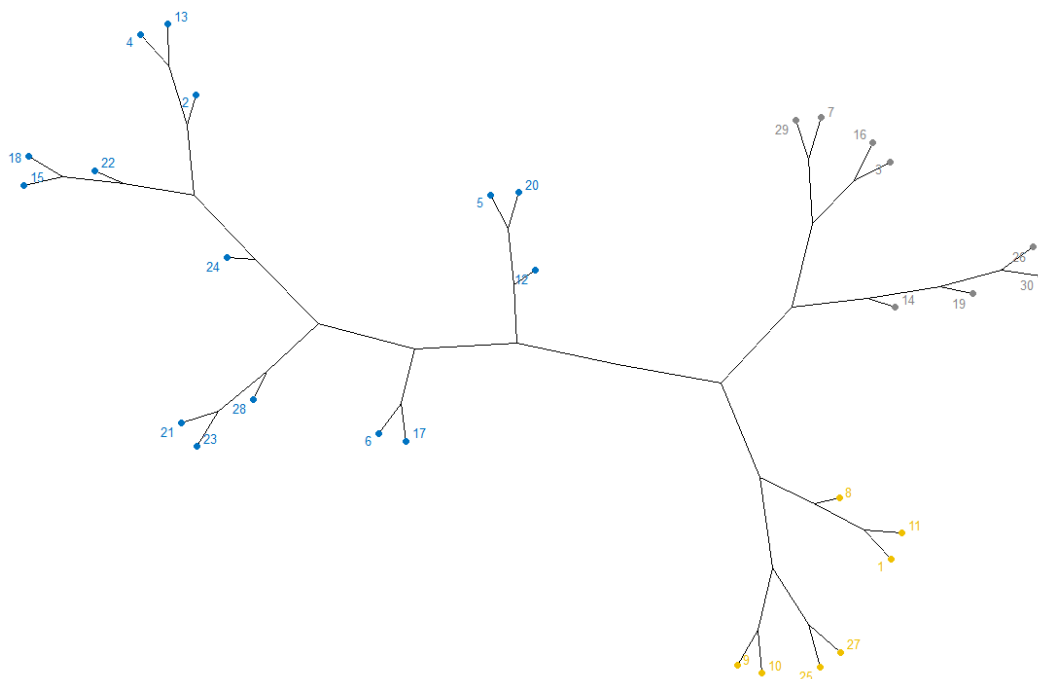
شکل ۳. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های انار بر اساس صفات مورفولوژی مبتنی بر مدل Bayesian

Figure 3. Grouping of pomegranate genotypes based on morphological traits based on the Bayesian model

باشد (Ghorbani *et al.*, 2013). در مطالعه تنوع ۴۹ نمونه انار از کشورهای اروپای جنوبی گزارش کردند که نمونه‌ها براساس تجزیه خوشه‌ای در سه گروه تقسیم شدند (Bartual *et al.*, 2022).

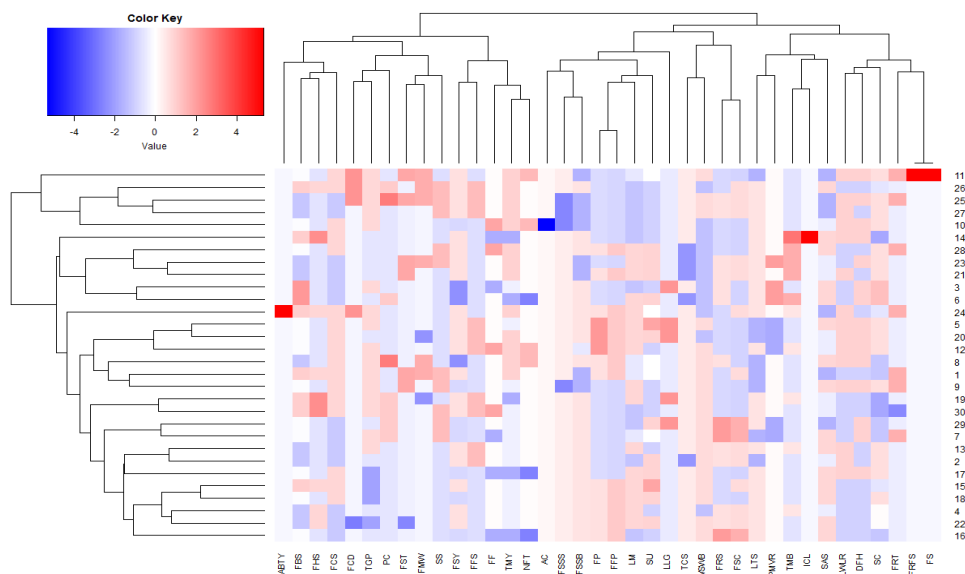
نقشه حرارتی ژنوتیپ‌ها براساس صفات نشان داد که صفات و ژنوتیپ‌ها در دو گروه اصلی قرار گرفتند و هر گروه به دو زیرگروه تقسیم شد (شکل ۵). در گروه اول، ژنوتیپ ۱۱ (Robab-malas-Fars) با کد ۳-۳۲۳ از نظر اندازه میوه و اندازه گل مؤثر دارای اختلاف زیادی با دیگر ژنوتیپ‌ها بود و در یک گروه مجزا قرار گرفت و زیرگروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۱۰، ۲۵، ۲۶ و ۲۷ بود که دارای کمترین حساسیت میوه به آفتاب‌سوختگی و ترکیبگی و بیشترین نسبت طول به عرض برگ بودند. همچنین، ژنوتیپ‌های واقع در این گروه میانگین عملکرد درخت بالایی داشتند. ژنوتیپ‌های ۳، ۶، ۱۴، ۲۱، ۲۳ و ۲۸ در اولین زیرگروه در گروه دوم قرار گرفتند که از نظر شکل تاج درخت (TCS)، فرم افراشته، سطح پوست شاخه چوبی (WSWB) صاف و میزان خار روی شاخه چوبی بالغ (TMB)، متوسط بودند (شکل ۵).

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها براساس صفات اندازه‌گیری شده، ژنوتیپ‌ها را به سه گروه اصلی تقسیم کرد (شکل ۴). گروه اول شامل ژنوتیپ‌های ۱، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۲۵ و ۲۷ بود که دارای حساسیت پایین پوست میوه به ترکیبگی و آفتاب‌سوختگی بوده و میانگین وزن میوه، تعداد میوه در درخت و متوسط عملکرد درخت بالایی داشتند. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۳، ۷، ۱۴، ۱۶، ۱۹، ۲۶، ۲۹ و ۳۰ بود. در گروه سوم ژنوتیپ‌های ۲، ۴، ۵، ۶، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و ۲۴ قرار گرفتند که دارای پاجوش فراوان و گل‌هایی با موقعیت جانبی و انتهایی یا فقط انتهایی بودند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس صفات مختلف می‌تواند روش مفیدی در مشخص شدن رابطه ژنوتیپ‌ها و تعیین فاصله خویشاوندی آن‌ها باشد. با بررسی تنوع ژنتیکی ۴۴ ژنوتیپ انار با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس خصوصیات مورفولوژیک، ژنوتیپ‌ها در چهار گروه مختلف قرار گرفتند، اما تقسیم‌بندی مورفولوژیک نمونه‌ها با دسته‌بندی جغرافیایی آن‌ها تطابق چندانی نداشت که می‌تواند نشان دهنده عدم تأثیر شرایط محیطی بر صفات مورفولوژیک مورد بررسی یا انتقال ژنوتیپ‌ها از منطقه‌ای به منطقه دیگر



شکل ۴. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های انار مورد ارزیابی بر اساس صفات مورفولوژیک و پومولوژیک

Figure 4. Cluster analysis of evaluated pomegranate genotypes based on morphological and pomological traits



شکل ۵. نقشه حرارتی گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و صفات اندازه‌گیری شده انار

Figure 5. Heat map of the grouping of pomegranate genotypes and measured traits

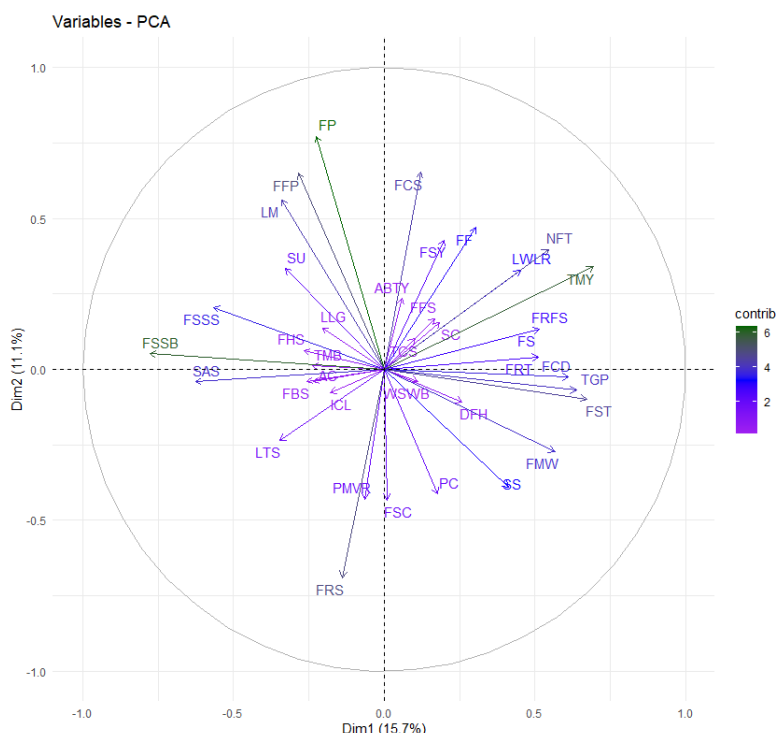
اول به ترتیب وزن میوه، طول و قطر میوه و حبه بوده و در این عامل صفات مربوط به برگ و گل از اهمیت کمتری برخوردارند. ایشان نشان دادند که PC1 اساساً ژنوتیپ‌ها را براساس شکل و اندازه میوه و حبه جدا کرد (Martinez *et al.*, 2016).

در مطالعات دیگری نیز گزارش شده‌است که در PC1، وزن و شکل میوه از مهم‌ترین متغیرهایی هستند که ژنوتیپ‌های انار را از یکدیگر متمایز می‌کنند (Caliskan and Bayazit, 2013; Radunic *et al.*, 2015). نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی روی ۷۸ توده انار لبنان با استفاده از ۳۸ صفت مورفولوژیک و شیمیایی نشان داد که سه عامل اول، ۴۱/۴۹ درصد از واریانس کل را تبیین کرده و نسبت قند / اسید، وزن و اندازه میوه مهم‌ترین صفات در تمایز توده‌های مورد مطالعه بود (Dandanchi *et al.*, 2017). در پژوهش دیگری، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۲۵ صفت مورفولوژیک روی ۲۲۱ ژنوتیپ انار ایرانی، صفات را در هفت گروه اصلی طبقه‌بندی کرد که سه مؤلفه اصلی اول، حدود ۴۸/۵۸ درصد از واریانس جمعی را تبیین کردند. از بین صفات مورد استفاده در آن مطالعه، رنگ پوست میوه، شکل میوه، موقعیت گل و درصد گل میوه به‌عنوان بهترین صفات برای تمایز ژنوتیپ‌های انار بیان شد (Razi *et al.*, 2021).

از داده‌های حاصل از ارزیابی ۳۸ صفت اندازه‌گیری شده، برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. نتایج نشان داد که ۵۳ درصد از تنوع کل در بین ۳۰ ژنوتیپ انار توسط پنج جزء اصلی اول توضیح داده شده‌است. در مؤلفه اول که ۱۵/۷ درصد تغییرات را شرح داد، صفاتی نظیر حساسیت پوست میوه به ترکیدگی، میانگین عملکرد میوه و ضخامت پوست میوه از صفات مهم و کلیدی بودند. مؤلفه دوم، ۱۱/۱ درصد از تنوع بین ژنوتیپ‌ها را نشان داد و صفاتی که بیشترین تأثیر را در این مؤلفه داشتند عبارتند از موقعیت گل، شکل میوه، شکل تاج میوه و درصد گل‌های بارور (شکل ۶).

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، امکان شناسایی صفاتی را که بیشترین تنوع را در یک گروه از ژنوتیپ‌ها داشتند، فراهم می‌سازد و کاربرد عملی در انتخاب ژنوتیپ‌های والدینی برای اهداف اصلاحی دارد (Ahmadizadeh and Falanji, 2011). با بررسی تنوع مورفولوژیک ۱۰۳ ژنوتیپ انار وحشی گزارش کردند که ۹۵/۴ درصد از واریانس توسط ده مؤلفه اول تبیین شد و وزن میوه و وزن کل حبه، وزن پوست و طول و قطر میوه در تعیین تفاوت بین ژنوتیپ‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بودند (Ashrafi *et al.*, 2023).

در بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما انار کشور اسپانیا گزارش کردند که مهم‌ترین متغیرهای تأثیرگذار در PC



شکل ۶. نمودار دو بعدی دو بعدی دو مؤلفه اصلی اول برای ۳۸ صفت مورد مطالعه بر روی ۳۰ ژنوتیپ تجاری انار
Figure 6. Two-dimensional diagram of the first two principal components for the 38 traits studied on 30 commercial pomegranate genotypes

بازار پسندی محصول همچون میانگین وزن میوه، شکل و طعم میوه از تنوع بالایی برخوردار بوده و نتیجتاً وجود این تنوع و نیز ویژگی‌های باغی برتر، علاوه بر امکان معرفی ژنوتیپ‌های امیدبخش جدید، در انجام کارهای اصلاحی در آینده نیز بسیار مفید خواهد بود و با اطمینان زیادی می‌توان این صفات شناسایی شده را جهت مطالعه ویژگی‌های ژنتیکی و پیشبرد برنامه‌های اصلاحی ژرم پلاسم انار پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به دلیل حمایت‌های مالی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

REFERENCES

Ahmadizadeh, M., & Felenji, H. (2011). Evaluation diversity among potato cultivars using agromorphological and yield components in fall cultivation of Jiroft area. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 11(5), 655-662.

نتیجه‌گیری
 در پژوهش حاضر، تنوع ۳۸ ویژگی مورفولوژیک و پومولوژیک ۳۰ ژنوتیپ امیدبخش انار از کلکسیون انار کشور مورد بررسی قرار گرفت. در بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، ژنوتیپ‌هایی که دارای حساسیت پایینی به دو عارضه مهم حساسیت به آفتاب‌سوختگی و ترکیدگی مشاهده شد که از این میان می‌توان به ارقام رباب ملس فارس، گرچ شهوار، شهوار قصر دشت و ملس یزدی اشاره کرد که برای کشت در مناطق گرم و خشک و استفاده در برنامه‌های اصلاحی می‌توانند مورد توجه قرار بگیرند. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش و مقایسه صفات مختلف، ارقام از نظر صفات مهم تأثیرگذار در میزان

Akbarpour, V., Hemmati, K., & Sharifani, M. (2009). Physical and chemical properties of pomegranate (*Punica granatum* L.). fruit in maturation stage. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 6 (4), 411-416.

- Al-Said, F.A., Opara, L.U., & Al-Yahyai, R.A. (2009). Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering*, 90, 129-134
- Ashrafi, S. H., Bodaghi, H., & Rezaei, M. (2023). Morphological diversity of indigenous wildpomegranate (*Punica granatum* L. var. *spinosa*). accessions from northeast of Iran. *Food Science & Nutrition*, 11, 1001-1012. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3135>
- Awamleh, H., Hassawi, D., Migdadi, H., & Brake, M. (2009). Molecular characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.). landraces grown in Jordan using amplified fragment length polymorphism markers. *Biotechnology*, 83, 316-322.
- Bartual, J., Zuriaga, E., Koka, T., Navarro, M.J., Ortiz, M., & Badenes, M.L. (2022). Pomological and chemical diversity in a pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm collection from Southern European countries. *Acta Horticulturae*, 1349 (0567-7572), 1-7.
- Caliskan, O., & Bayazit, O. (2013). Morpho-pomological and chemical diversity of pomegranate accessions grown in Eastern Mediterranean region of Turkey. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 1449-1460.
- Chandra, R., Suroshe, S., Sharma, J., Marathe, R.A., & Meshram, D.T. (2011). Pomegranate growing manual. NRC on Pomegranate, Solapur. pp. 1-58.
- Da Silva, J.A.T.; Rana, T.S.; Narzary, D., & Verma, N. (2013). Meshram, D.T.; Ranade, S.A. Pomegranate biology and biotechnology, A review. *Scientia Horticulturae*, 160, 85-107.
- Dandachi, F., Hamadeh, B., Youssef, H., Chahine, H., & Chalak, L. (2017). Diversity assessment of the Lebanese germplasm of pomegranate (*Punica granatum* L.). by morphological and chemical traits. *Annals of Agricultural Science*, 62, 89-98.
- Eiadhong, W., Nakatsubo, F., Utsunomiya, N., & Subahadrandhu, S. (2000). Studies on some *Mangifera* species. *Acta Horticulturae*, 509, 143-151.
- Ehteshami, S., Sarikhani, H., & Ershadi, A. (2011). Effect of Kaolin and Gibberellic Acid Application on Some Qualitative Characteristics and Reducing the Sunburn in Pomegranate Fruits (*Punica granatum*). cv. 'Rabab Neiriz'. *Plant Production Technology*, 3, 15-24 (in Persian)
- FAO (2022). FAOSTAT, <https://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- Farsi, M., Kalantar, M., Zeinalabedini, M., & Vazifeshena, M.R. (2023). First assessment of Iranian pomegranate germplasm using targeted metabolites and morphological traits to develop the core collection and modeling of the current and future spatial distribution under climate change conditions. *PLoS ONE*, 18(2), e0265977.
- Ghariesheikhbayat, R. (2006). Anatomical study of fruit cracking in pomegranate cv. Malas-e-torsh. *Pajouhesh-va-Sazandegi*, 18 (69 in Agronomy & Horticulture), 10-14. (in Persian)
- Ghorbani, T., Cheghamirza, K., & Arji, E. (2013). Evaluation of genetic diversity in pomegranate using morphological traits and molecular markers. *Agricultural Biotechnology Journal*, 5, 111-128. (in Persian)
- Haddioui, A. (2012). La culture du grenadier (*Punica granatum* L.) au Maroc. In, Melgarejo, P., Valero, D. (Eds.), II International Symposium on the Pomegranate, vol. 103. CIHEAM/Universidad Miguel Hernández, Zaragoza, pp. 79-81.
- Hepaksoy, S.; Aksoy, U.; Can, H.Z.; & Ui, M.A. (2000). Determination of relationship between fruit cracking and some physiological responses, leaf characteristics and nutritional status of some pomegranate varieties. *Options Méditerranéennes*, 87-92, Ege University, 35100 Bornova-Izmir, Turkey.
- Holland, D., Hatib, K., & Bar-Ya'akov, I. (2009). Pomegranate, Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews*, 35, 127-191.
- Johnson, L.K., Malladi, A. and NeSmith, D.S. (2011). Differences in cell number facilitate fruit size variation in rabbit eye blueberry genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(1), pp.10-15.
- Maestre, J., Melgarejo, P., Tomas-Barberan, F., & Garcia-Viguera, C. (2000). New food products derived from pomegranate. In, Production, processing and marketing of pomegranate in the mediter-ranean region, *Advances in research and technology*, 243-245. CIHEAM
- Martinez-Nicolas, J.J., Melgarejo, P., Legua, P., Garcia-Sanchez, F., & Hernández, F. (2016). Genetic diversity of pomegranate germplasm collection from Spain determined by fruit, seed, leaf and flower characteristics. *PeerJ*, 4, p.e2214.
- Mir M.M., Sofi, A.A., Singh, D.B., & Khan, F.U. (2007). Evaluation of pomegranate cultivars under temperate conditions of Kashmir Valley. *Indian Journal Horticulture*, 64, 150-154.
- Mohammadi, S.A., & Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 1235-1248.

- Radunić, M., Špika, M.J., Ban, S.G., Gadže, J., Díaz-Pérez, J.C., & MacLean, D. (2015). Physical and chemical properties of pomegranate fruit accessions from Croatia. *Food chemistry*, 177, 53-60.
- Razi, S., Soleimani, A., Zeinalabedini, M., Vazifeshenas, M. R., Martínez-Gómez, P., Martínez-García, P. J., Mohsenzade Kermani, A., Raiszadeh, A. R., & Tayari, M. (2021). Development of a Multipurpose Core Collection of New Promising Iranian Pomegranate (*Punica granatum* L.). Genotypes Based on Morphological and Pomological Traits. *Horticulturae*, 7, 350.
- Rosati, A., Zipančić, M., Caporali, S., & Padula, G. (2009). Fruit weight is related to ovary weight in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia horticulturae*, 122(3), 399-403.
- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Hassani, M., Wiedow, C., Buck, E., & Gardiner S. (2011). Genetic diversity of Iranian soft-seed pomegranate genotypes as revealed by fluorescent-AFLP markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17, 305-311.
- Shakeri, M., & Sadat Akhavi, Y. (2003). Pests and Diseases of Pomegranate. Tasbih Publication.
- Singh, A., Burman, U., Santra, P., & Morwal, B.R. (2014). Fruit cracking of pomegranate and its relationship with temperature and plant water status in hot arid region of India. *Journal of Agrometeorology*, 16 (Special Issue-I), 24-29.
- Singh, A., Shukla, A.K., & Meghwal, P.R. (2020). Fruit cracking in pomegranate, extent, cause, and management—A Review. *International Journal of Fruit Science*, 20, S1234-S1253.
- Tapia-Campos, E., Ramírez-Anaya, J.d.P., Cavazos-Garduño, A., Serrano-Niño, J.C., Fragoso-Jiménez, J.C., & Castañeda-Saucedo, M.C. (2021). Morphological Characterization of Southern Jalisco, Mexico, Pomegranate Genotypes Using AFLP Markers. *Agronomy*, 11, 1449.
- Verma, N., & Mohanty, A. (2010). Lal, A. Pomegranate genetic resources and germplasm conservation, A review. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 4, 120-125.
- Volkan O., Akca Y., Ercisli S., & Gozlekci, S. (2015). Genotype selection for physico-chemical fruit traits in pomegranate (*Punica granatum* L.). In Turkey. *Acta Science*, 14(2), 123-132.
- Wani, I., Bhat, M.Y., Banday, F.A., Khan, I.A., Hassan, G.I., Lone, A., et al. (2012). Correlation studies of morphological and economic traits in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Plant Arch.*;12, 943-946.
- Wetzstein, H.Y., Yi, W., Porter, J.A., & Ravid, N. (2013). Flower position and size impact ovule number per flower, fruitset, and fruit size in pomegranate. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 159-166.
- Wetzstein, H.Y., N. Ravid, E. Wilkins, & A.P. Martinelli. (2011). A morphological and histological characterization of bisexual and male flower types in pomegranate *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136, 83-92.
- Yazici, K., & Kaynak, L. (2009). Effects of air temperature, relative humidity and solar radiation on fruit surface temperatures and sunburn damage in pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Hicaznar). *Acta Horticulturae*, 818, 181-186.
- Zahravi, M., & Vazifeshenas, M.R. (2017). Study of genetic diversity in pomegranate germplasm of Yazd province of Iran. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 6, 20-35.
- Zarkti, H., Ouabbou, H., Hilali, A., & Udupa, S.M. (2010). Detection of genetic diversity in Moroccan durum wheat accessions using agromorphological traits and microsatellite markers. *African Journal of Agricultural Research*, 5(14), 1837-1844.
- Zuriaga E., Pintová J., Bartual, J., & Badenes M.L. (2022). Characterization of the Spanish Pomegranate Germplasm Collection Maintained at the Agricultural Experiment Station of Elche to Identify Promising Breeding Materials. *Plants*, 11, 1257.

The effect of 24-epibrassinolide (24-EBL) on physiological and biochemical pathways of *Lactuca sativa* L. under drought stress conditions

Zeinab Chaghakaboodi¹(ORCID: 0000000170548803), Seyyed Hassan Mousavi², Mahdi Kakaei³

1. Department of Plant Production Engineering and Genetics, Campus of Agriculture and Natural Resources, Faculty of agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

2. Greenhouse and Controlled Environments Research Center, Department of Post Harvest Physiology and Technology, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

3. Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Correspondence:

Zeinab Chaghakaboodi

Email:

z.chaghakaboodi@razi.ac.ir

Received: 06, Apr. 2024

Accepted: 28, Aug. 2024

How to cite:

Chaghakaboodi, Z., Mousavi, S. H., & Kakaei, M. (2024). The effect of 24-epibrassinolide (24-EBL) on physiological and biochemical pathways of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under drought stress conditions. *Crop Biotechnology*, 14 (1), 15-28. (DOI: [10.30473/cb.2024.70956.1964](https://doi.org/10.30473/cb.2024.70956.1964))

ABSTRACT

Brassinosteroids are steroid hormones that are essential for the growth and development of plants and play a significant role in plant responses to stress. This study delves into examining how 24-epibrassinolide influences seedling indices, physiological and biochemical traits in specific lettuce genotypes under drought stress. The factorial experiment was conducted using a completely randomized statistical design with four replicates at the research laboratory of plant physiology, Faculty of Agriculture, Agriculture and Natural Resources Campus, Razi University, Kermanshah, Iran in 2023. The experiment included two selected lettuce genotypes, namely Icy and Romaine, as the first factor. The second factor comprised seed pretreatment at four levels of priming with 24-epibrassinolide (0, 50, 100, and 150 μM), while the third factor consisted of drought stress at four levels (0%, 10%, 20%, and 30%) induced by mannitol. The assessed traits encompassed germination rate, root length, stem length, Relative Water Content (RWC), total sugar content, total phenol content, and flavonoid content. Comparative analysis of average traits revealed that the levels of biochemical traits, specifically total sugar (0.480 mg/l), phenol (460.83 mg/l), and flavonoid (1.047 $\mu\text{g/l}$), escalated with higher levels of drought stress. Principal component analysis indicated that the first two components elucidated 64% of the variations. The findings suggest that priming with 150 μM of 24-epibrassinolide hormone is advisable to attain the highest seedling indices in lettuce. According to the results obtained in this research, the Romaine line is introduced as the best line in drought stress conditions.

KEYWORDS

Lactuca sativa, Mannitol, Total phenol content, Total sugar content.



«مقاله پژوهشی»

اثر ۲۴-اپی بر اسینولید بر مسیرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه *Lactuca sativa* L. تحت شرایط تنش خشکی

زینب چقاکبودی^۱ (ارکید: ۰۰۰۰۰۰۱۷۰۵۴۸۸۰۳)، سید حسن موسوی^۲، مهدی کاکائی^۳

چکیده

براسینواستروئیدها هورمون‌های استروئیدی هستند که برای رشد و نمو گیاه ضروری‌اند و نقش مهمی در پاسخ به تنش در گیاهان دارند. در این تحقیق اثر ۲۴-اپی براسینولید بر روی شاخص‌های گیاهیچه و صفات بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های انتخابی گیاه کاهو تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی در سال ۱۴۰۲ اجرا گردید. در این آزمایش فاکتور اول شامل دو لاین انتخابی کاهو شامل (یخی و رومن) بود. فاکتور دوم شامل پیش تیمار بذر در چهار سطح پرایمینگ با ۲۴-اپی براسینولید (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) و فاکتور سوم شامل تنش خشکی در چهار سطح (صفر، ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪) با مانیتول بود. صفات مورد اندازه گیری شامل سرعت جوانه زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، محتوای آب نسبی، محتوای قند کل، محتوای فنل کل و محتوای فلاوونوئید بود. مقایسه میانگین اثرات متقابل سه گانه نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی محتوای صفات بیوشیمیایی شامل قند کل (۰/۴۸۰ میلی گرم در لیتر)، فنل (۴۶۰/۸۳ میلی گرم در لیتر) و فلاوونوئید (۱/۰۴۷ میکروگرم در لیتر) افزایش یافتند. تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز نشان داد که دو مولفه اول ۶۴ درصد از تغییرات را توجیه کردند. نتایج نشان داد که پرایمینگ با ۱۵۰ میکرومولار هورمون ۲۴-اپی براسینولید برای دستیابی به بیشترین مقدار شاخص‌های گیاهیچه گیاه کاهو توصیه می‌گردد. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق لاین رومن به عنوان لاین برتر در شرایط تنش خشکی معرفی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی

Lactuca sativa، مانیتول، محتوای کل فنل، محتوای قند کل.

۱. گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۲. پژوهشکده گلخانه و محیط های کنترل شده، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۳. گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

زینب چقاکبودی

رایانامه: z.chaghakaboodi@razi.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۷

استناد به این مقاله:

چقاکبودی، زینب؛ موسوی، سیدحسن و کاکائی، مهدی (۱۴۰۳). اثر ۲۴-اپی براسینولید بر مسیرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.) تحت شرایط تنش خشکی، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۱)، ۱۵-۲۸.

(DOI: [10.30473/cb.2024.70956.1964](https://doi.org/10.30473/cb.2024.70956.1964))



مقدمه

Lactuca sativa یکی از مهمترین گیاهان برگی است که عمدتاً برای مصارف تازه خوری و سالادی استفاده می‌شود. در کشور ما نیز، کاهو یکی از معروف‌ترین و متداول‌ترین سبزی‌های برگی به شمار می‌رود که تقریباً در تمامی مناطق مستعد در شهرها و روستاهای ایران تولید می‌شود. کاهو به تنهایی به صورت تازه در تهیه سالاد یا همراه با سایر سبزی‌های سالادی بصورت خام مورد استفاده قرار می‌گیرد. در برخی از کشورها ساقه کاهو را بصورت پخته مصرف می‌کنند (Jafari et al., 2021). کاهو سرشار از ویتامین‌ها و مواد ضروری برای سلامتی انسان است. وجود مقادیر فراوانی از آهن، منگنز، فسفر، پتاسیم، بتا کاروتن، ویتامین‌های C و B9 در برگ‌های کاهو، ارزش غذایی این سبزی را ارتقا بخشیده است. کاهو با نام علمی (*Lactuca sativa* L. یک سبزی برگی یکساله، خودگشن، دیپلوئید ($2n=2x=18$)) محصول فصل خنک از تیره کلاه‌پرکها^۱ از زیرتیره شیکوریده^۲ و از دولپه‌ای‌ها بوده و عمدتاً در مناطق معتدله بخاطر برگ‌های خوراکی مورد کشت و کار قرار می‌گیرد. مرکز اصلی و مبدا اولیه کاهو در نواحی مدیترانه و جنوب غرب آسیا است (Mohebi and Mousavi, 2019). کشت آن معمولاً شامل تکثیر محصول منحصراً از طریق بذر است که سپس برای رشد گیاهچه برای کاشت استفاده می‌شود (Chadha and Florentine, 2021).

کیفیت بذر نقش مهمی در توسعه موفق محصولات زراعی تکثیر شده با بذر مانند کاهو دارد. کیفیت بذر کاهو ارتباط تنگاتنگی با استقرار و رشد نهال دارد. بذور با بنیه کم یا کیفیت پایین ممکن است منجر به نهال‌هایی شود که نسبت به شرایط محیطی نامطلوب حساس‌تر هستند (Gallegos-Cedillo et al., 2017; Govindaraj et al., 2024). شرایط نامطلوب می‌تواند شامل عواملی مانند دمای زیاد، سطوح رطوبت ناکافی، کمبود مواد مغذی، یا قرار گرفتن در معرض آفات و بیماری‌ها باشد. نهال‌هایی که از دانه‌های با کیفیت پایین به دست می‌آیند ممکن است برای مقابله با این شرایط تلاش کنند که منجر به

کاهش بنیه، رشد کندتر و افزایش آسیب‌پذیری در برابر عوامل استرس‌زا می‌شود (Gallegos-Cedillo et al., 2024). برای اطمینان از استقرار بهینه گیاهچه، استفاده از بذرهایی با کیفیت بالا مهم است. کیفیت بذر توسط عوامل مختلفی از جمله صفات ژنتیکی، بلوغ بذر، شرایط نگهداری و تیمار بذر تعیین می‌شود. بذر کاهو با کیفیت بالا معمولاً دارای ویژگی‌هایی مانند سرعت جوانه زنی بالا، یکنواختی، قدرت و مقاومت در برابر بیماری‌ها است. با انتخاب و استفاده از بذر کاهو با کیفیت بالا، پرورش دهندگان می‌توانند شانس دستیابی به گیاهچه‌های سالم و قوی را افزایش دهند. این به نوبه خود به موفقیت کلی کشت کاهو کمک می‌کند و محصول قوی‌تری را تضمین می‌کند که می‌تواند بهتر در شرایط محیطی غیربهرینه مقاومت کند.

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که هر ساله تلفات زیادی را به همراه دارد (Wang et al., 2024). عملکرد و بقاء گیاهان همیشه به‌واسطه تنش‌های مختلف محیطی در معرض تهدید می‌باشد و به همین علت تحقیقات زیادی در ارتباط با بررسی پاسخ گیاهان از نقطه نظر ژنتیکی و فیزیولوژیکی جهت شناسایی سازوکارهای تحمل به تنش انجام شده است. اما این مهم، هنوز نیازمند درک عمیق‌تر از سازوکارهای سلولی و مولکولی پاسخ به تنش و تحمل آن در گیاه است. امروزه بیشترین توجه محققین به استفاده از مقاومت ژنتیکی که اقتصادی‌ترین و کم‌خطرترین روش از نظر زیست محیطی برای مقاوم‌سازی می‌باشد، معطوف گردیده است. لذا تحقیقاتی که منجر به درک عمیق اساس ژنتیک مقاومت و حساسیت می‌شوند از اولویت برخوردار بوده و به همین دلیل شناخت مکانیسم فیزیولوژیکی و مولکولی ایجاد تحمل و نحوه پاسخ گیاه در ارقام حساس و مقاوم از ضروری‌ترین موضوعات تحقیقاتی می‌باشد. لذا اجرای راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی نیازمند تحقیقات گسترده در شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به تنش‌ها و عوامل تنظیم‌کننده می‌باشد. عوامل اکولوژیکی و ژنتیکی زیادی رشد و نمو گیاهان و بیوسنتز ترکیبات اولیه و ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. اگر چه این ترکیبات اساساً با

1. Asteraceae
2. Chicorideae

در حال مرگ را سرعت می‌بخشد. کمبود براسینواستروئید، یا عدم توانایی جذب آن موجب کاهش جوانه زنی بذر، تأخیر در گل‌دهی، پیری، کوتولگی و کاهش باروری می‌شود. از طرفی، بیان بیش از حد ژن‌های بیوسنتز براسینواستروئید، موجب افزایش سطح درونی این هورمون، در نتیجه افزایش عملکرد و تحمل تنش می‌شود (Sirohi and Kapoor, 2020). براسینواستروئیدها با شرکت در سنتز سلولز موجب حفظ و تشکیل ساختار دیواره سلولی می‌شوند بنابراین مانع آسیب سلول‌های گیاهی به علت نوسانات یونی شده و اولین خط دفاعی در برابر فشار محیطی هستند. این هورمون‌ها در تنظیم چرخه سلول، تکثیر و تمایز سلول نقش دارند. علاوه بر این با فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی در پاسخ به تنش‌های محیطی نقش دارند (Bartwal and Arora, 2020). در مطالعه‌ای که بر روی کاربرد ۲۴-اپی براسینولید بر پارامترهای فیزیولوژیکی، خصوصیات بیوشیمیایی و عملکرد گیاه بالنگوی شهری تحت شرایط تنش خشکی انجام شد نتایج نشان داد که استفاده از ۲۴-اپی براسینولید به مقدار یک میکرومول اثرات تنش خشکی بر محتوای کل کلروفیل، قند محلول و محتوای پروتئین را کاهش داد (Naservafaei et al., 2023). در مطالعه‌ای که بر روی استفاده از ۲۴-اپی براسینولید بر فعالیت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی گیاه کالاندولا انجام شد نتایج نشان داد که کاربرد ۰/۱ و ۰/۱ میکرومولار از هورمون باعث افزایش هورمون سوپراکسیداز دسموتاز، کاتالاز، پرولین و محتوای کل پروتئین تحت تنش خشکی شد (Hosseinpour et al., 2019). در بررسی بر روی مکانسیم فیزیولوژیکی و مولکولی براسینواستروئید در پاسخ به تنش نشان دادند که این هورمون باعث افزایش محتوای کلروفیل، ظرفیت فتوسنتزی، افزایش تحمل به تنش‌های مختلف در گیاهان می‌شوند (Anwar et al., 2018). در مطالعه‌ای که به بررسی اثرات ۲۴-اپی براسینولید بر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی نخود فرنگی پرداختند نتایج نشان داد که کاربرد این هورمون سبب افزایش عملکرد دانه (۰/۱۸)، وزن غلاف (۰/۱۶)، تعداد غلاف در بوته (۰/۱۸)، محتوای کلروفیل کل (۰/۱۰) و کاهش محتوای

هدایت فرآیندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند، اما تاثیر محیط با توجه به مسیر بیوسنتزی متابولیت مورد نظر می‌تواند کم و یا بسیار شدید باشد. کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانویه، اسیدهای چرب و خصوصیات تغذیه‌ای در تنش‌های زیستی و غیرزیستی تغییر می‌یابد (Shiade et al., 2024).

براسینواستروئیدها، گروهی از هورمون‌های استروئیدی هستند که در بسیاری از پدیده‌های نموی در گیاهان از قبیل تقسیم و طویل شدن سلولی ساقه و ریشه، اندام‌زایی، پیری برگ و پاسخ به تنش‌ها نقش دارند. نقش اپی براسینواستروئید در رشد و نمو کالوس و رشد و نمو جنین در بسیاری از گیاهان به اثبات رسیده است. همچنین وجود آثار متقابل این هورمون با اکسین و جیبرلین در بسیاری از آزمایش‌ها مشاهده شده است (Hassanuzzaman et al., 2015). براسینواستروئیدها، تنها دسته مشخصی از هورمون‌های استروئیدی در گیاهان هستند. آن‌ها به صورت گسترده در گیاهان وجود داشته و در غلظت‌های خیلی کم نیز فعال هستند. براسینواستروئیدها تحمل به تنش غیرزیستی و رشد را ارتقاء داده و مسیره‌های پیام‌رسانی آنها دارای آثار متقابلی با آبسزیک اسید، اکسین، سیتوکینین، اتیلن، جیبرلین، جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید هستند. آبسزیک اسید و براسینواستروئیدها بسته شدن روزنه را از طریق نیتریک اکسید و تحمل به خشکی افزایش می‌دهند. در حالی‌که براسینواستروئیدها، بیوسنتز آبسزیک اسید را ارتقاء می‌دهند، براسینواستروئید و آبسزیک اسید به صورت مشترک تعدادی از ژن‌ها را تنظیم کرده، آبسزیک اسید به صورت منفی اجزاء مسیره‌های پیام‌رسانی اپی براسینواستروئید را تنظیم می‌نماید (Planas-Riverona et al., 2019). براسینواستروئیدها علاوه بر افزایش رشد و تقسیم سلولی، رشد و تمایز آوند چوبی، تشکیل لوله کرده و رشد طولی آن، تمایز عروقی، فوتومورفوژنز، بزرگ شدن مریستم، افزایش میزان دریافت CO₂ و سرعت کربوکسیلاسیون توسط آنزیم روبیسکو، افزایش فتوسنتز و چرخه کالوین و تولید مثل گیاهان و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی را تنظیم می‌کنند. براسینواستروئیدها همچنین پیری را به تأخیر انداخته، اما پیر شدن در بافت

بذور در اتاقک رشد استخراج عصاره طبق روش (Sepehrifar *et al.*, 2010) انجام شد. صفات بیوشیمیایی شامل میزان قند محلول (بر اساس روش Shlegl, 1986)، محتوای فنول کل (بر اساس روش Pandjaiton *et al.*, 2005) و میزان فلاونوئید (بر اساس روش Chang *et al.*, 2002) اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس، مقایسه میانگین اثرات متقابل و تجزیه همبستگی صفات با استفاده از نرم افزار R انجام شد. جهت تهیه نقشه حرارتی و گروه بندی لاین‌های انتخابی بر اساس صفات مورد مطالعه و همچنین تجزیه به مولفه‌های اصلی از نرم افزار Clustvis استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات در مرحله گیاهچه و صفات بیوشیمیایی در لاین‌های انتخابی کاهو نشان داد که در بین تمام لاین‌ها از نظر صفات سرعت جوانه زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، محتوای آب نسبی برگ و فنل کل در سطح آماری یک درصد اختلاف بسیار معنی‌داری مشاهده گردید (جدول ۱). که این اختلاف معنی‌دار حکایت از وجود تنوع قابل قبول بین لاین‌ها از نظر صفات مورد بررسی و پاسخ لاین‌ها به تغییرات محیطی مانند شرایط تنش خشکی می‌باشد. همچنین بین سطوح مختلف خشکی از نظر تمامی صفات مورد مطالعه به غیر از وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول در سطح آماری یک درصد اختلاف بسیار معنی‌داری مشاهده گردید. بین سطوح مختلف هورمون ۲۴-اپی براسینولید نیز برای تمامی صفات مورد مطالعه به غیر از وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح آماری یک درصد مشاهده گردید. همچنین برای اثرات متقابل دوگانه بین ژنوتیپ و سطوح هورمون ۲۴-اپی براسینولید برای تمامی صفت سرعت جوانه زنی اختلاف معنی‌داری در سطح آماری پنج درصد، و برای بقیه صفات به غیر از وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول در سطح آماری یک درصد اختلاف بسیار معنی‌داری مشاهده شد.

مالون دی آلدئید (۰/۴۵) نسبت به گیاهانی که با ۲۴-اپی براسینولید تیمار نشده بودند شدند (Gholami *et al.*, 2023). در بررسی اثر اسپری پاشی ۲۴-اپی براسینولید بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه سوسن تحت تنش خشکی نشان دادند که محتوای پرولین (۱۱۵/۷۸٪) و کارابی مصرف آب (۱۳۵/۵۹٪) افزایش یافت (Omidian *et al.*, 2022). با توجه به اهمیت کاهو به عنوان یک محصول مهم کشاورزی و باغی و با توجه به اینکه مطالعات درحوزه‌ی بررسی وضعیت رشد گیاهچه در شرایط محیطی نامناسب مانند تنش‌های خشکی و شوری بر روی لاین‌های انتخابی صورت نگرفته است این مطالعه می‌تواند بعنوان مطالعه پایه و کاربردی در این زمینه باشد و لذا این تحقیق با این هدف انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه در سال ۱۴۰۲ انجام شد. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. فاکتور اول سطوح مختلف هورمون ۲۴-اپی براسینولید (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار)، فاکتور دوم سطوح مختلف خشکی با مانیتول (صفر، ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪) و فاکتور سوم شامل لاین‌های یخی^۱ و رومن^۲ شماره هفت کاهو بود. در این تحقیق ابتدا بذور کاهو (ده عدد) با غلظت‌های مختلف ۲۴-اپی براسینولید (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) به مدت یک شبانه روز تیمار شدند. بعد از خشک شدن در دمای محیط در داخل پتری دیش با غلظت‌های مختلف محلول مانیتول (صفر، ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪) در چهار تکرار در اتاقک رشد با دمای بیست درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. صفات جوانه زنی شامل سرعت جوانه زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر، وزن خشک و محتوای آب نسبی بود. بعد از گذشت دو هفته از کشت

1. Ice
2. Roman

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات گیاهچه‌ای و بیوشیمیایی در لاین‌های انتخابی کاهو تحت شرایط تنش خشکی

Table 1. Analysis of Variance of Seedling and Biochemical Traits in Selected Lettuce Lines Under Drought Stress Conditions

میانگین مربعات									درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V
فلاونوئید (میکروگرم در لیتر) Flavonoid (µg/L)	فنل کل (میلی گرم در لیتر) Total phenol(mg/L)	قند محلول (میلی گرم در لیتر) Soluble Sugar(mg/L)	محتوای آب نسبی (درصد) Relative Water Content (%)	وزن خشک (میلی گرم) Dry weight (mg)	وزن تر (میلی گرم) Feresh weight (mg)	طول ساقه چه (میلی متر) Shoot length (mm)	طول ریشه چه (میلی متر) Root length (mm)	سرعت جوانه زنی (درصد) Seed germination rate (%)		
0.004 ^{ns}	9558.692 ^{**}	0.003 ^{ns}	134.480 ^{**}	1.32 ^{ns}	0.001 ^{ns}	1392.402 ^{**}	8445.613 ^{**}	825.724 ^{**}	1	ژنوتیپ Genotype
0.221 ^{**}	7847.792 ^{**}	0.003 ^{ns}	2018.756 ^{**}	1.47 ^{ns}	0.001 ^{ns}	107.704 ^{**}	2472.901 ^{**}	199.078 ^{**}	3	۲۴- اپی براسینولید 24-epibrasinolide
0.075 ^{**}	10974.735 ^{**}	0.008 ^{ns}	2153.664 ^{**}	5.70 ^{ns}	0.001 ^{ns}	332.712 ^{**}	324.986 ^{**}	27.535 ^{**}	3	سطوح مانیتول Manitol
0.037 ^{**}	21711.886 ^{**}	0.006 ^{ns}	387.851 ^{**}	6.33 ^{ns}	0.001 ^{ns}	425.841 ^{**}	616.297 ^{**}	105.865 [*]	3	ژنوتیپ × ۲۴- اپی براسینولید Genotype×24-epibrasinolide
0.152 ^{**}	33767.468 ^{**}	0.003 ^{ns}	686.976 ^{**}	3.07 ^{ns}	0	16.587 ^{**}	630.661 ^{**}	20.648 ^{**}	3	ژنوتیپ × مانیتول Genotype×Manitol
0.114 ^{**}	18659.577 ^{**}	0.003 ^{ns}	191.337 ^{**}	1.15 ^{ns}	0.001 ^{ns}	124.608 ^{**}	518.312 ^{**}	7.443 ^{ns}	9	۲۴- اپی براسینولید × مانیتول 24-epibrasinolide×Manitol
0.050 ^{**}	12713.829 ^{**}	0.002 ^{ns}	301.844 ^{**}	8.55 ^{ns}	0.001 ^{ns}	114.060 ^{**}	449.182 ^{**}	19.358 ^{ns}	9	ژنوتیپ × براسینولید × مانیتول Genotype×brasinolide×Manitol
0.004	735.516	0.004	15.077	9.71	0.001	3.588	20.347	9.922	96	اشتباه آزمایشی Error
									127	کل Total
10.04	10.58	77.36	77.36	1997.47	126.49	9.43	9.52	8.039		ضریب تغییرات (%) Coefficient of Variation (%)

*، **، و ns به ترتیب معنی دار در سطح پنج درصد، یک درصد و غیر معنی دار.

*، **، and ns indicate significance at the 5% level, 1% level, and non-significant, respectively.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و لاین‌های انتخابی (شکل ۱) نشان داد که با افزایش سطوح تنش خشکی صفات گیاهچه‌ای مانند سرعت جوانه زنی کاهش یافت. با افزایش سطوح تنش خشکی صفات طول ریشه چه و ساقه چه افزایش یافت. با توجه به نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و لاین‌های انتخابی، مشاهده شد که افزایش سطوح تنش خشکی به طور معمول باعث کاهش صفات گیاهچه‌ای مانند سرعت جوانه زنی می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که گیاهان در شرایط تنش خشکی تمایل دارند تا فرآیند جوانه زنی خود را کاهش دهند، که این ممکن است به منظور حفظ آب و انرژی باشد. در عین حال، با افزایش سطوح تنش خشکی، صفات طول ریشه و ساقه افزایش می‌یابند. که این نشان دهنده یک پاسخ فیزیولوژیکی به تنش خشکی، به منظور افزایش قدرت جذب آب و مواد مغذی از خاک توسط گیاه می‌باشد. افزایش طول ریشه و ساقه می‌تواند به گیاهان

اثر متقابل دو گانه بین ژنوتیپ و سطوح مختلف مانیتول برای تمامی صفات به غیر از وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول در سطح آماری یک درصد اختلاف بسیار معنی‌داری مشاهده گردید. بین سطوح مختلف هورمون ۲۴- اپی براسینولید و سطوح مختلف مانیتول برای تمامی صفات مورد مطالعه به غیر از سرعت جوانه زنی، وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح آماری یک درصد مشاهده گردید. اثر متقابل سه گانه بین ژنوتیپ، سطوح مختلف هورمون ۲۴- اپی براسینولید و سطوح مختلف مانیتول نیز برای تمامی صفات مورد مطالعه به غیر از سرعت جوانه زنی، وزن تر، وزن خشک و محتوای قند محلول اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح آماری یک درصد مشاهده گردید. نتایج میانگین اثرات متقابل سه گانه برای صفات مورد بررسی با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری پنج درصد در شکل ۱ آورده شده است.

شوند. این امکان به گیاهان کمک می‌کند که سریع‌تر جوانه بزنند و به رشد سریع‌تری دست یابند. این بدان معنا است که پیش تیمار ۱۵۰ میکرومولار هورمون بخوبی توانسته است اثرات ناشی از تنش خشکی را کاهش دهد. این نتایج با نتایج Anwar et al. (2018) مطابقت داشت. مقایسه میانگین اثرات متقابل برای صفت طول ریشه‌چه (شکل ۱-ب) نشان داد که بیشترین مقدار طول ریشه‌چه (۷۳/۷۵ میلی‌متر) در سطوح تنش ۳۰ درصد و پیش تیمار ۱۵۰ میکرومولار بدست آمد. این ممکن است به دلیل تحریک فعالیت سلول‌های ریشه‌ای، افزایش تقسیم سلولی، و بهبود جذب آب و مواد معدنی باشد. تحقیقات نشان داده‌اند که استفاده از EBR ممکن است به گیاهان کمک کند تا مقاومت به تنش‌های مختلف، از جمله تنش خشکی، را افزایش دهند. این مقاومت ممکن است با افزایش طول ریشه و بهبود ساختار جذبی آب و مواد معدنی مرتبط باشد (Bajguz and Hayat, 2009).

در پیش تیمار با ۱۵۰ میکرومولار هورمون ۲۴-اپی براسینولید بیشترین طول ساقه‌چه (۳۳/۷۵ میلی‌متر) در بالاترین سطح تنش خشکی بدست آمد (شکل ۱-پ). این اثر به دلیل تحریک تقسیم و افزایش سلول‌های ساقه، و همچنین افزایش فعالیت سلول‌های کمربندی (فعالیت کامبیوم) می‌باشد. اپی براسینولید می‌تواند به تنظیم فعالیت آنزیم‌های مرتبط با رشد، نظیر آلفا-آمیلاز، پروتئین‌های رشد، و هورمون‌های دیگر، کمک کند. این تنظیمات می‌توانند به رشد ساقه‌ها و افزایش طول آنها کمک کنند. همچنین می‌تواند در افزایش مقاومت ساقه‌ها به تنش‌های مختلف، از جمله تنش‌های محیطی، نقش داشته باشد. این ممکن است به افزایش رشد و توسعه ساقه‌ها به نحوی که گیاهان با تنش‌های مختلف بهتر سازگار شوند، منجر شود. استفاده از هورمون ۲۴-اپی براسینولید منجر به افزایش محتوای آب نسبی گیاهان می‌شود. این افزایش ممکن است بهبود جذب و نگهداری آب در سلول‌های گیاهی را نشان دهد. همچنین، این هورمون ممکن است در تنظیم باز کردن و بسته شدن گیاهان به آب کمک کند. EBR می‌تواند در تنظیم فعالیت استوماها نقش داشته باشد. استوماها مسئول کنترل تراز آب و گازها در گیاهان

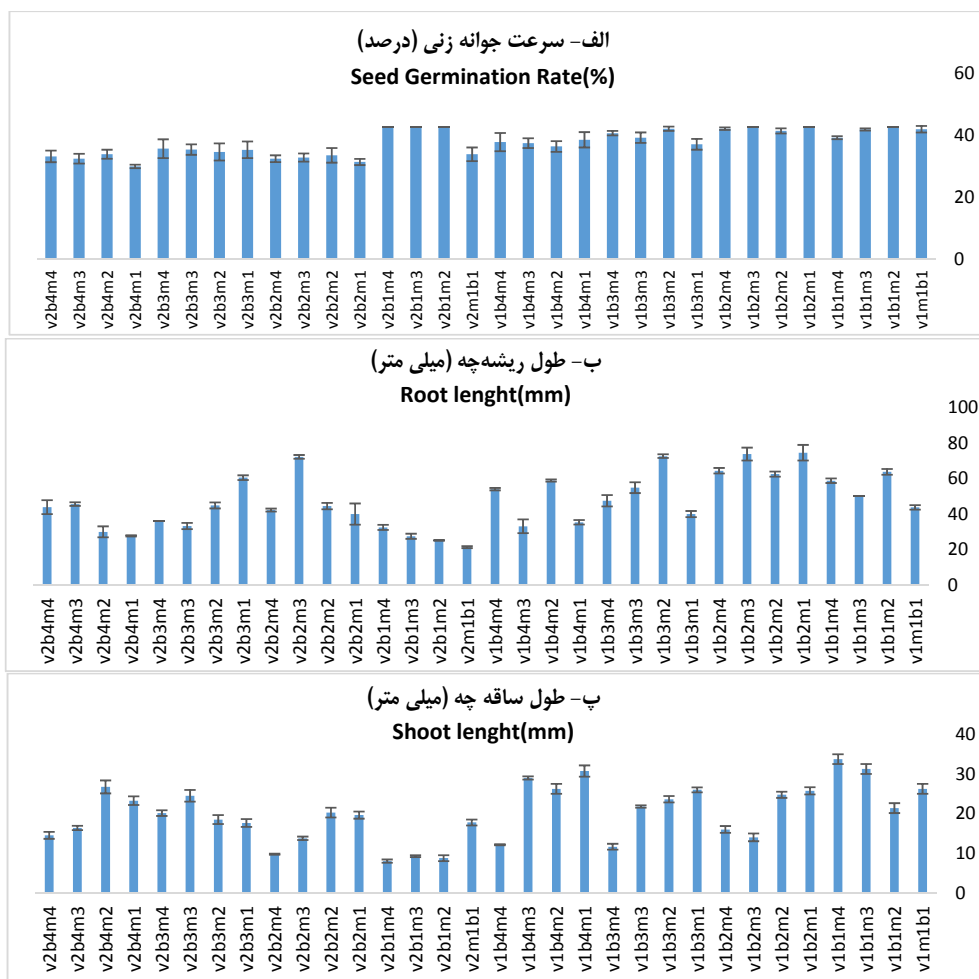
کمک کند تا با شرایط تنش خشکی بهتر برخورد کنند و بهبود یابند. در کل، این نتایج نشان می‌دهد که گیاهان تحت تنش خشکی تغییراتی در صفات جوانه زنی، طول ریشه و ساقه را تجربه می‌کنند که ممکن است به تنظیم مناسبتر به شرایط محیطی خاص کمک کند. این نتایج می‌تواند در برنامه‌ریزی مناسب برای افزایش تحمل گیاهان به تنش خشکی و بهبود عملکرد کشاورزی در شرایط محیطی متغیر مفید باشد.

همچنین صفات بیوشیمیایی مانند محتوای قند محلول، فنل کل و فلاونوئید با افزایش سطوح تنش خشکی نیز افزایش یافتند. از جمله نتایج جالب مشاهده شده در مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و لاین‌های انتخابی، افزایش در صفات بیوشیمیایی مانند محتوای قند محلول، فنل کل و فلاونوئید با افزایش سطوح تنش خشکی است. این نتایج نشان می‌دهد که گیاهان تحت تنش خشکی تمایل دارند تا تغییراتی در محتوای مواد شیمیایی خود اعمال کنند تا با شرایط محیطی متغیر بهتری برخورد کنند. افزایش محتوای قند محلول در گیاهان تحت تنش خشکی ممکن است نشان دهنده تلاش گیاه برای تنظیم تعادل آب و استفاده بهینه از قند در فعالیتهای متابولیک باشد. این تغییرات ممکن است به گیاه کمک کند تا در مقابل کمبود آب مقاوم‌تر باشد. افزایش فنل کل و فلاونوئید نیز نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها در گیاهان است. این مواد ممکن است به عنوان دفاع از گیاه در برابر استرس‌های اکسیداتیو عمل کنند و در مقابل تنش خشکی واکنش نشان دهند. به طور کلی، این تغییرات در صفات بیوشیمیایی نشانگر توانایی گیاهان برای اعمال تنظیمات فیزیولوژیکی به منظور مقابله با تنش خشکی می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل (شکل ۱-الف) نشان داد که پیش تیمار با ۱۵۰ میکرومولار هورمون ۲۴-اپی براسینولید دارای بیشترین سرعت جوانه زنی (۴۲/۸۶) بود. یکی از اثرات استفاده از این هورمون به عنوان یکی از جنبه‌های مهم فیزیولوژیکی در افزایش سرعت جوانه زنی و در شرایط تنش از جمله تنش خشکی می‌باشد که به گیاهان کمک کند تا با شرایط سخت‌تر محیطی سازگارتر

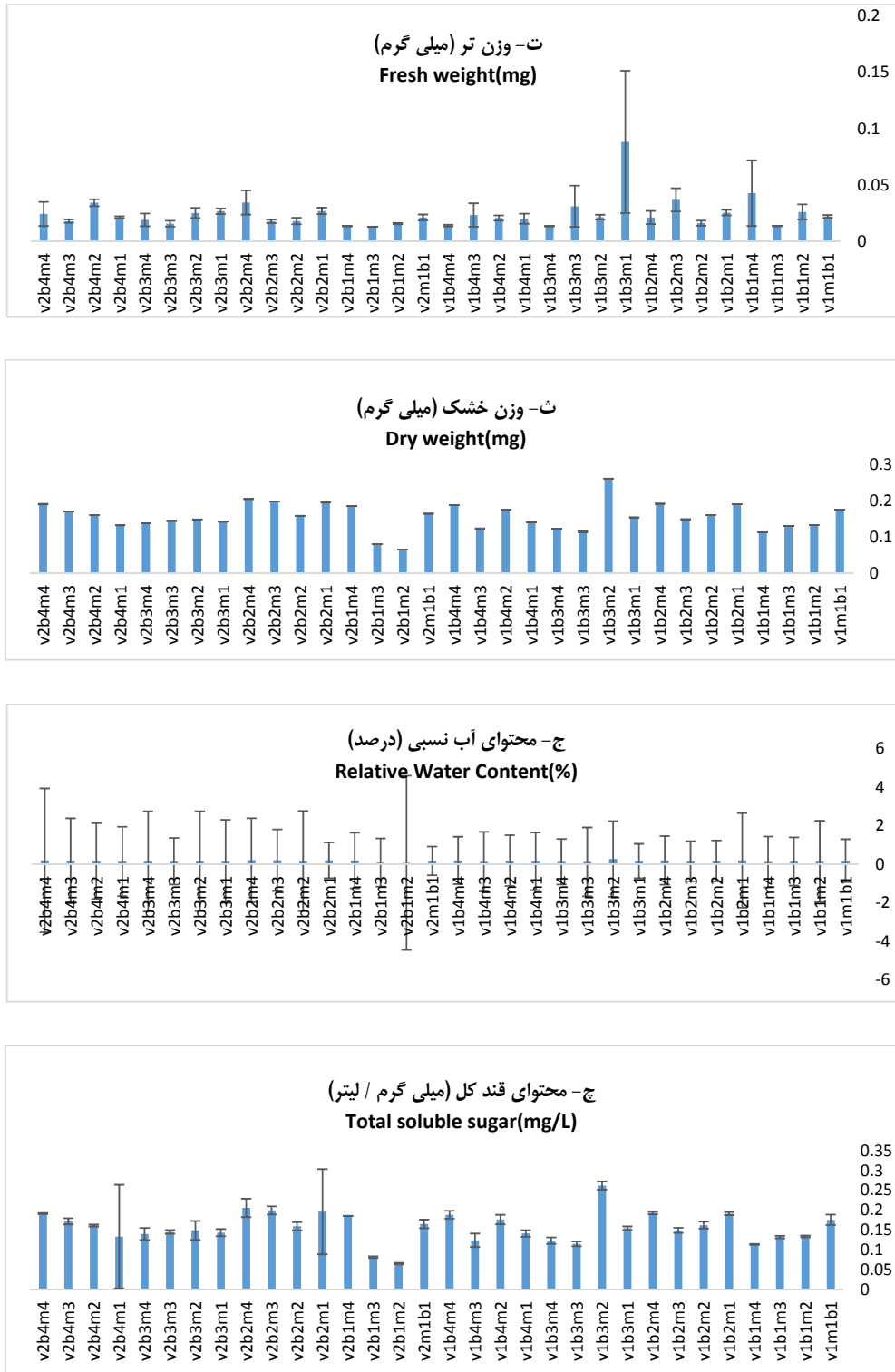
میکرومولار هورمون ۲۴- اپی براسینولید در بالاترین سطح تنش خشکی به دست آمد. که این واقعیت بیانگر تاثیر مثبت و معنی دار پیش تیمار با هورمون ۲۴- اپی براسینولید در جهت کاهش اثرات تنش بر صفات گیاهچه‌ای، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تحت شرایط تنش خشکی می‌باشد. این نتایج با نتایج *Naservafaei et al. (2023)*، *Sheikhi et al. (2021)*، *Mohammadi et al. (2020)* و *Li et al. (2012)* مطابقت دارد. با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده از هورمون ۲۴- اپی براسینولید به عنوان یک پیش تیمار موثر برای افزایش تحمل گیاهان کاهو به شرایط تنش خشکی می‌باشد. این یافته‌ها می‌توانند به بهبود بهره‌وری کشاورزی و مدیریت بهینه منابع آب کمک کنند.

هستند. افزایش فعالیت استوماها ممکن است باعث افزایش تراز آب در گیاه شود. همچنین این هورمون اثرات خود را از طریق تنظیم فعالیت آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم آب و تعادل آبی گیاهان اعمال می‌کند. این تأثیرات ممکن است به کنترل تراز آب نسبی در گیاهان کمک کنند. همچنین بیشترین مقدار وزن تر (شکل ۱- ت) (۰/۰۳۸ میلی گرم)، وزن خشک (شکل ۱- ث) (۰/۰۳۸ میلی گرم)، محتوای آب نسبی (شکل ۱- ج) (۹۷/۲۵ درصد)، محتوای قند محلول (شکل ۱- چ) (۰/۴۸۰ میلی گرم در لیتر)، محتوای کل فنل (شکل ۱- ح) (۴۶۰/۸۳ میلی گرم در لیتر) و فلاوونوئید (شکل ۱- خ) (۱/۰۴۷ میکروگرم در لیتر) نیز در پیش تیمار با ۱۵۰

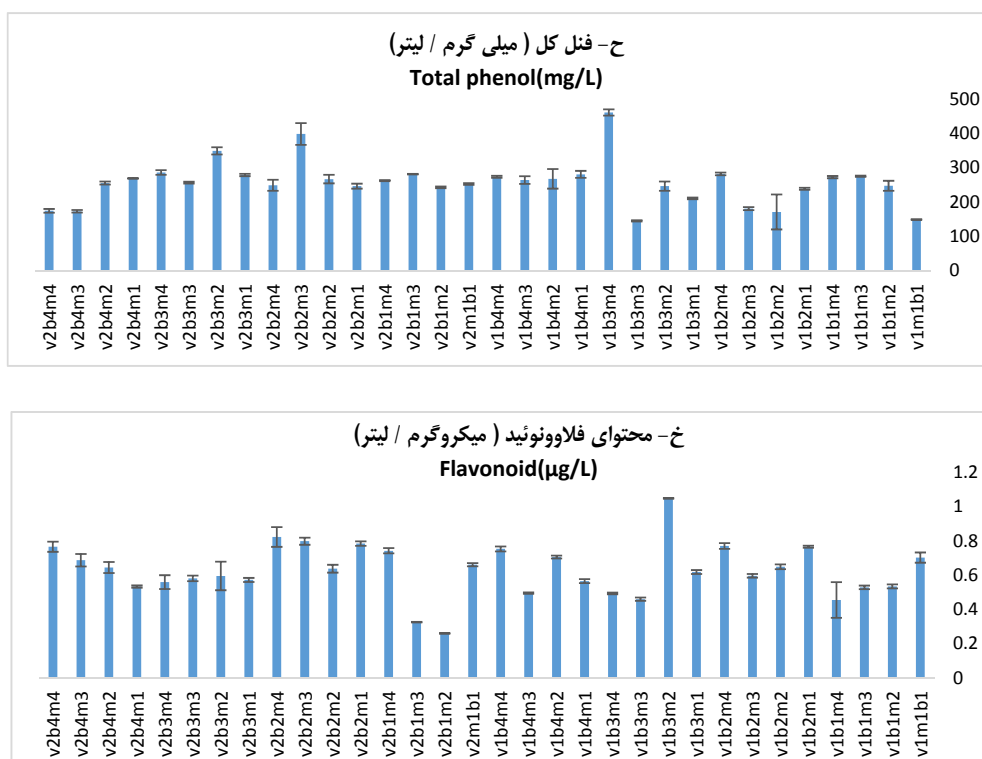


شکل ۱. نمودار اثرات متقابل سه گانه برای صفات مورد بررسی در لاین های انتخابی کاهو تحت شرایط تنش خشکی

Figure 1. Triple interaction effects diagram for the traits studied in selected lettuce lines under drought stress conditions



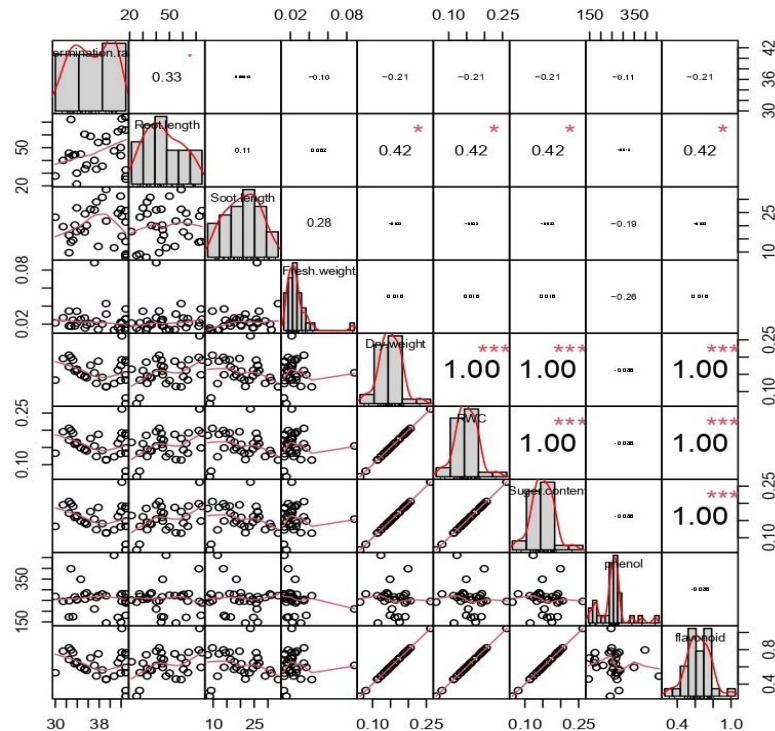
ادامه شکل ۱. نمودار اثرات متقابل سه گانه برای صفات مورد بررسی در لاین های انتخابی کاهو تحت شرایط تنش خشکی
Continue the Figure 1. Triple interaction effects diagram for the traits studied in selected lettuce lines under drought stress conditions.



ادامه شکل ۱. نمودار اثرات متقابل سه گانه برای صفات مورد بررسی در لاین های انتخابی کاهو تحت شرایط تنش خشکی
Continue the Figure 1. Triple interaction effects diagram for the traits studied in selected lettuce lines under drought stress conditions.

بر روی وزن اثرگذار است. همبستگی مثبت میان محتوای آب نسبی و طول ریشه نشان می‌دهد که گیاهان با طول ریشه بیشتر ممکن است توانمندی بیشتری در حفظ آب داشته باشند. ریشه‌های بلندتر می‌توانند منجر به افزایش سطح جذب آب و کاهش تبخیر باشند. همبستگی بین قند محلول و طول ریشه‌چه نیز نشان می‌دهد که گیاهانی که دارای ریشه‌های بلندتر هستند، ممکن است محتوای بیشتری از قندهای محلول را در خود نگه دارند. که این ممکن است به دلیل عملکرد فتوسنتز بیشتر و متابولیسم قندهای محلول بیشتر مرتبط باشد. همبستگی مثبت میان فلاونوئید و طول ریشه نشان می‌دهد که گیاهان با طول ریشه بیشتر ممکن است فعالیت بیشتری در تولید فلاونوئیدها داشته باشند. این ممکن است به این معنا باشد که فعالیت فنلی گیاهان در مقابل استرس‌های محیطی افزایش یافته است. این نتایج با نتایج *Naservafaei et al.* (2023) و *Anjum et al.* (2011) مطابقت داشت.

نتایج همبستگی بین صفات مورد مطالعه (شکل ۲) نشان داد که بین صفات وزن خشک و طول ریشه ($0/419^*$)، محتوای آب نسبی و طول ریشه‌چه ($0/419^*$)، محتوای قند محلول و طول ریشه‌چه ($0/419^*$) و فلاونوئید و طول ریشه ($0/419^*$) همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده گردید. بین صفات محتوای آب نسبی و وزن خشک ($0/100^{**}$)، محتوای قند محلول و وزن خشک ($0/100^{**}$) و فلاونوئید و وزن خشک ($0/100^{**}$) همبستگی مثبت و بسیار معنی‌داری مشاهده شد. همچنین بین محتوای قند محلول و محتوای آب نسبی ($0/100^{**}$) و فلاونوئید و محتوای آب نسبی ($0/100^{**}$) همبستگی مثبت و بسیار معنی‌داری مشاهده گردید. این همبستگی مثبت بین وزن خشک و طول ریشه‌چه نشان می‌دهد که گیاهانی که دارای ریشه‌های بلندتر هستند، ممکن است دارای وزن خشک بیشتری نیز باشند. این ممکن است به این دلیل باشد که گیاهان با ریشه‌های بلندتر، دسترسی به منابع آب و مواد معدنی بیشتری دارند در نتیجه



شکل ۲. همبستگی صفات گیاهچه‌ای، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در لاین‌های انتخابی کاهو (صفات شامل: ستون ۱: سرعت جوانه زنی، ستون ۲: طول ریشه‌چه، ستون ۳: طول ساقه‌چه، ستون ۴: وزن تر، ستون ۵: وزن خشک، ستون ۶: محتوای آب نسبی، ستون ۷: محتوای قند کل، ستون ۸: محتوای کل فنل و ستون ۹: محتوای فلاونوئید).

Figure 2. Correlation of seedling, physiological, and biochemical traits in selected lettuce lines (Traits include: Column 1: Seed germination rate, Column 2: Root length, Column 3: Shoot length, Column 4: Fresh weight, Column 5: Dry weight, Column 6: Relative water content, Column 7: Total sugar content, Column 8: Total phenol content, and Column 9: Flavonoid content)

* و *** به ترتیب معنی دار در سطح پنج درصد و یک درصد.

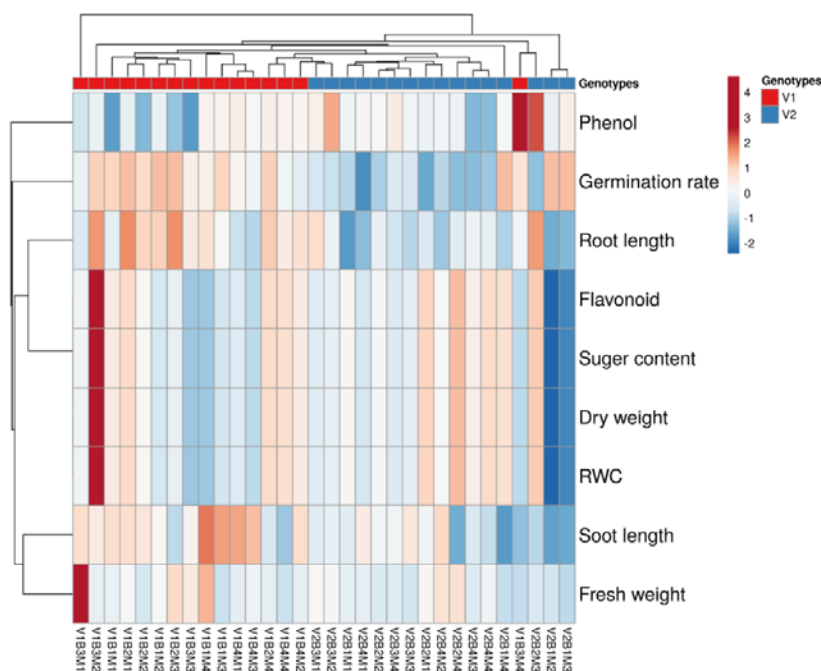
* and *** indicate significance at the 5% level and 1% level, respectively.

آنها به اجزای اصلی با حفظ حداکثر اطلاعات ممکن استفاده می‌شود. در اینجا، تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) به تحلیل داده‌های حاصل از آزمایشات انجام شده برای ارتباط میان صفات مختلف گیاه کاهو (مانند محتوای آب نسبی، محتوای قند محلول، فلاونوئید و وزن خشک) نشان داده شده در شکل ۴ اشاره دارد. در نتیجه این تجزیه، دو مولفه اول ۶۴٪ از تغییرات کل را توجیه می‌کنند. همچنین، مشخص شده است که صفات محتوای آب نسبی، محتوای قند محلول، فلاونوئید و وزن خشک از اهمیت بیشتری در این بررسی برخوردار بودند. این نتایج نشان می‌دهند که این صفات دارای بیشترین تنوع و اثر معنی‌دار در شرایط تنش خشکی می‌باشند. بنابراین،

گروه بندی لاین‌های انتخابی بر اساس صفات مورد بررسی نیز با استفاده از نقشه حرارتی انجام شد (شکل ۳) و نتایج نشان داد که لاین‌های انتخابی بر اساس صفات مورد بررسی در دو گروه جداگانه قرار گرفتند. گروه اول شامل لاین رومن بود که حاوی مقادیر بالایی از نظر محتوای آب نسبی، محتوای قند محلول، فنل کل و فلاونوئید بودند و گروه دوم نیز شامل لاین انتخابی یخی بود که از نظر صفات سرعت جوانه زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر و وزن خشک حاوی مقادیر کمتر بودند.

تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) یک روش آماری است که برای کاهش ابعاد داده‌های چندمتغیره و تجزیه

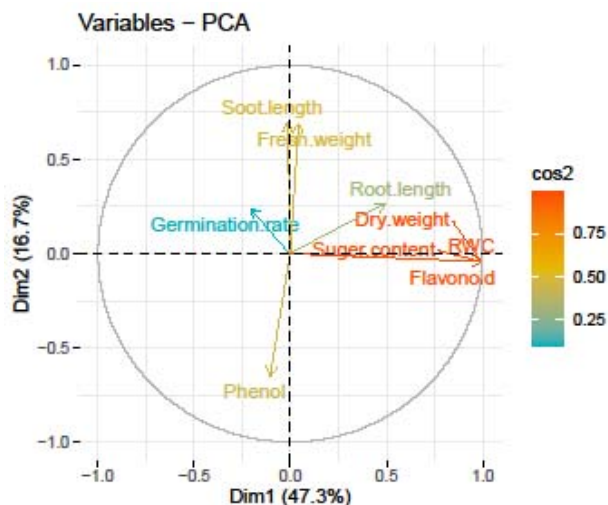
توصیه می‌شود که در مطالعات آینده از این صفات به منظور بررسی و توجیه تنوع حاصل از شرایط تنش خشکی استفاده شود. استفاده از این صفات می‌تواند به درک بهتری از پاسخ گیاهان به شرایط تنش خشکی کمک کرده و در طراحی استراتژی‌های بهبود مقاومت گیاهان در برابر این شرایط مؤثر باشد.



شکل ۳. آنالیز خوشه‌ای همراه با نقشه حرارتی لاین‌های انتخابی بر اساس صفات اندازه‌گیری شده

V1: لاین یخی، V2: لاین رومن، B: سطوح مختلف هورمون ۲۴-اپی‌براسینولید، M: سطوح مختلف مانیتول

Figure 3. Cluster analysis with a heatmap of selected lines based on measured traits. V1= Iceberg line, V2= Romaine line, B= Different levels of 24-epibrassinolide hormone, M= Different levels of mannitol



شکل ۴. تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس صفات مورد مطالعه در لاین‌های انتخابی کاهو

Figure 4. Principal component analysis based on the studied traits in selected lettuce lines

REFERENCES

- Anjum, S. A., Wang, L. C., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L. L., & Zou, C. M. (2011). Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(3), 177-185. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2010.00459.x>
- Anwar, A., Liu, Y., Dong, R., Bai, L., Yu, X., & Li, Y. (2018). The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: a review. *Biological Research*, 51. <http://dx.doi.org/10.1186/s40659-018-0195-2>
- Bajguz, A., & Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and biochemistry*, 47(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002>
- Bartwal, A., & Arora, S. 2020. Brassinosteroids: molecules with myriad roles. *Co-Evolution of Secondary Metabolites*, 869-895.
- Chadha, A., & Florentine, S. (2021). Biology, ecology, distribution and control of the invasive weed, *Lactuca serriola* L. (wild lettuce): a global review. *Plants*, 10(10), 2157. <https://doi.org/10.3390/plants10102157>
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 3. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Gallegos-Cedillo, V. M., Nájera, C., Signore, A., Ochoa, J., Gallegos, J., Egea-Gilabert, C., ... & Fernández, J. A. (2024). Analysis of global research on vegetable seedlings and transplants and their impacts on product quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13309>
- Gholami, F., Amerian, M. R., Asghari, H. R., & Ebrahimi, A. (2023). Assessing the effects of 24-epibrassinolide and yeast extract at various levels on cowpea's morphophysiological and biochemical responses under water deficit stress. *BMC Plant Biology*, 23(1), 593.
- Govindaraj, M., Masilamani, P., Albert, V. A., & Bhaskaran, M. (2017). Effect of physical seed treatment on yield and quality of crops: A review. *Agricultural Reviews*, 38(1), 1-14.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Ahmad, S., & Fujita, M. (2015). Exogenous application of phytoprotectants in legumes against environmental stress. *Legumes under environmental stress: Yield, improvement and Adaptations*, 161-197. <https://doi.org/10.1002/9781118917091.ch11>
- Hosseinpour, M., Ebadi, A., Habibi, H., Nabizadeh, E., & Jahanbakhsh, S. (2020). Enhancing enzymatic and nonenzymatic response of *Echinacea purpurea* by exogenous 24-epibrassinolide under drought stress. *Industrial crops and products*, 146, 112045. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112045>
- Jafari, M. S., Noory, H., Liaghat, A. M., & Ebrahimian, H. (2021). Effect of Different Levels of Irrigation and Fertilizer on Water and Nitrogen Productivity in Lettuce. *Journal of Water Research in Agriculture*, 35(1), 19-34(In Persian). <https://doi.org/10.22092/jwra.2021.123732>
- Li, Y. H., Liu, Y. J., Xu, X. L., Jin, M., An, L. Z., & Zhang, H. (2012). Effect of 24-epibrassinolide on drought stress-induced changes in *Chorispora bungeana*. *Biologia Plantarum*, 56, 192-196.
- Mohammadi, M., Tavakoli, A., Pouryousef, M., & Mohseni Fard, E. (2020). Study the effect of 24-epibrassinolide application on the Cu/Zn-SOD expression and tolerance to drought stress in common bean. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 459-474.
- Mohebi, A.H. and Mousavi, S. H. 2019. Nutrition management in the production of commercial varieties of lettuce. Publication of agricultural education. 138 p.
- Naservafaei, S., Sohrabi, Y., & Moradi, P. (2023). Effects of Exogenous Application of 24-Epibrassinolide on Photosynthesis Parameters, Grain Yield, and Protein of Dragon's Head (*Lallemantia iberica*) Under Drought Stress Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-13.
- Omidian, M., Rooin, Z., & Shiri, M. A. (2022). Effect of Foliar Application of 24-Epibrassinolide on Water Use Efficiency and Morpho-Physiological Characteristics of *Lilium* LA Hybrid under Deficit Irrigation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(4), 1547-1560.
- Pandjaitan, N., Howard, L. R., Morelock, T., & Gil, M. I. (2005). Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8618-8623. <https://doi.org/10.1021/jf052077i>
- Planas-Riverola, A., Gupta, A., Betegón-Putze, I., Bosch, N., Ibañes, M., & Caño-Delgado, A. I. (2019). Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development*, 146(5), dev151894. <https://doi.org/10.1242/dev.151894>
- Sephehrifar, Roshank, & Hassanlou. (2010). Investigating polyphenol compounds, anthocyanins and total flavonoids and antioxidant properties of the medicinal plant of

- Qaraqat (*Vaccinium arctostaphylos* L.) collected from four different regions of Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 9(33), 66-74.
- Sheikhi, S., Ebrahimi, A., Heidari, P., Amerian, M., & Moradi Sarabsheli, A. (2021). Evaluation of 24-Epi-brassinosteroid effects on some properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) under high temperature stress. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 52(3), 219-233. [10.22059/ijfcs.2020.302070.654719](https://doi.org/10.22059/ijfcs.2020.302070.654719)
- Shlegl, H. G., (1986). Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. *Plant Sciences*. 41, 47-51.
- Shiade, S. R. G., Zand-Silakhoor, A., Fathi, A., Rahimi, R., Minkina, T., Rajput, V. D., ... & Chaudhary, T. (2024). Plant Metabolites and Signaling Pathways in Response to Biotic and Abiotic Stresses: Exploring Bio Stimulant Applications. *Plant Stress*, 100454. <https://doi.org/10.1016/j.j.stress.2024.100454>
- Sirohi, G., & Kapoor, M. (2020). Brassinosteroids in Lowering Abiotic Stress-mediated Damages. Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: *Biochemical and Molecular Perspectives*, 318-326. <https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch15>
- Wang, X., Li, X., Zhao, W., Hou, X., & Dong, S. (2024). Current views of drought research: experimental methods, adaptation mechanisms and regulatory strategies. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1371895. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1371895>

Identification of functional pathways and key genes effective in response to nitrogen deficiency stress in rice

Shayan Kazemi-Lifshagerd¹, Atefeh Sabouri^{1*}(ORCID: 0000-0002-5831-768X), Zahra Pezeshkian^{2,3}, Mohammad Mehdi Sohani⁴

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Department of Animal Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. BioGenTAC Inc., Technology Incubator of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-North Branch (ABRII), Rasht, Iran.

4. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

Correspondence:

Atefeh Sabouri

Email: a.sabouri@guilan.ac.ir

Received: 07, Jun. 2024

Accepted: 06, Sep. 2024

How to cite:

Kazemi-Lifshagerd, Sh., Sabouri, A., Pezeshkian, Z., & Sohani, M. M. (2024). Identification of functional pathways and key genes effective in response to nitrogen deficiency stress in rice. *Crop Biotechnology*, 14 (1), 29-43. (DOI: [10.30473/cb.2024.71521.1971](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71521.1971))

ABSTRACT

Rice, as the primary food source for a large portion of the global population, holds significant strategic importance worldwide. Variations in the availability of elements such as nitrogen can greatly impact rice production. Nitrogen is crucial for rice growth, development, and performance by influencing various physiological and biochemical processes in plant cells. Considering the importance of the role of nitrogen, the aim of this research was to identify key genes, study biological pathways, and analyze important protein-protein interactions in rice under nitrogen deficiency stress. In this regard microarray expression data sets were extracted from the NCBI database, and differentially expressed genes between control and stress conditions were identified. Using DAVID online tools, the molecular functions, pathways, and biological processes related to these genes were investigated. Cytoscape software was used to construct a gene network, and ten key genes were identified. The study revealed that signaling pathways and amino acid production are prominently activated in the initial hours of nitrogen stress. Under nitrogen deficiency, the expression of genes involved in iron ion transport and amino acid biosynthesis significantly increases. The synthesis of iron ion transporters is crucial for photosynthesis in plant leaves, contributing to the balance and stability of photosynthetic products and leading to changes in the plant's morphological characteristics and performance. It is expected that these key genes can be used in breeding programs to deal with nitrogen deficiency stress.

KEY WORDS

Bioinformatics analysis, Gene expression, Iron ion transporter, Microarray, Protein-protein network.



مقدمه

با افزایش سریع جمعیت کره زمین، نیاز به تأمین غذا نیز بیشتر می‌شود و کارشناسان افزایش بازده کشاورزی را تنها راه حل این مشکل می‌دانند. گروهی از افراد بر این عقیده‌اند که نقش برنامه‌های کنترل جمعیت مؤثرتر باشد اما برای جلوگیری از گسترش سوءتغذیه لازم است برنامه‌های افزایش تولید غذا و کنترل جمعیت به طور توأم اجرا شوند (امام، ۱۳۹۰). در بین محصولات گیاهی، غلات، به‌عنوان یک گروه مهم از گیاهان زراعی تا ۷۰ درصد غذای مردم دنیا را تأمین می‌کنند. در بین غلات نیز برنج پس از گندم، مهم‌ترین ماده غذایی دنیاست و غذای عمده‌ی بیش از نیمی از جمعیت کره زمین را تشکیل می‌دهد (امام، ۱۳۹۰؛ خدابنده، ۱۳۷۴). تقریباً ۹۵ درصد کشت برنج در جهان به قاره آسیا اختصاص دارد که دارای دوزیرگونه اصلی ایندیکا و ژاپونیکا می‌باشد. این دو زیرگونه در کارایی جذب نیتروژن تفاوت‌هایی با یکدیگر دارند (Li *et al.*, 2022).

عملکرد در گیاهان به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم به تأمین عناصر مهم و حیاتی از جمله نیتروژن، فسفر و پتاسیم وابسته است. کمبود نیتروژن منجر به تغییرات مورفولوژیکی اندام هوایی مانند شکل برگ و تغییر در میزان غلظت مواد در سلول‌ها می‌شود. در صورت تداوم این تنش، فرآیند پیری سرعت یافته و مرگ سلولی را سرعت می‌بخشد (Zakari *et al.*, 2020).

حدود ۸۰ درصد ماده خشک گیاهان توسط فتوسنتز تأمین می‌شود و در حقیقت فتوسنتز وظیفه دریافت، تولید انرژی و تبدیل آن به حالت قابل‌استفاده برای گیاه را بر عهده دارد (صبوری و حسینی، ۱۳۹۶). نتایج پژوهشی با اعمال تنش هم‌زمان دو عنصر نیتروژن و پتاسیم و بررسی اثرات آن بر فتوسنتز نشان داد که فرآوری کربن دی‌اکسید به‌وسیله فرآیندهای بیوشیمیایی خاصی محدود و کنترل می‌شود و فعالیت‌های روزنه‌ای، مزوفیلی و بیوشیمیایی به‌وسیله تغذیه عناصر نیتروژن و فسفر تنظیم می‌شوند (Hou *et al.*, 2018).

بررسی این تغییرات از دیدگاه مولکولی نشان می‌دهد که همه این فعالیت‌ها توسط بیان مجموعه‌ای از ژن‌ها در زمان، بافت و مقدار بیان مناسب آنها کنترل می‌شود. علیرغم گسترش سریع دانش در طول سال‌های گذشته در برنج که یک گیاه مدل در تحقیقات ژنومی غلات است، داده‌های پروفایل رونوشت ژن‌های مرتبط با فرآیندهای رشد و نمو همچنان ناکافی است (Wang *et al.*, 2010). گیاهان همواره برای مقابله با تنش‌های زنده و غیر زنده از روش تغییر میزان بیان ژن‌ها استفاده می‌کنند. سطوح مختلف بیان ژن، اساس تفاوت در فنوتیپ‌های یک موجود است که تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد (Groen *et al.*, 2020). در این راستا دو فرآیند مهم برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین (PPIs) و برهمکنش‌های رونویسی-تنظیمی (TRIs) ساختار کلی شبکه برهمکنش ترکیبی مولکول‌ها را تشکیل می‌دهند. ژن‌ها و پروتئین‌ها با ایجاد چرخه‌های مولکولی، سلول را برای پردازش اطلاعات و پاسخ به تنش‌های محیطی توانا می‌سازند. از این رو شناسایی الگوهای مشخص در این شبکه‌های برهمکنش همواره یک چالش بزرگ محسوب می‌شود که می‌تواند برخی مکانیسم‌های اساسی سلولی را آشکار سازد (Yeger-Lotem *et al.*, 2004).

در کشاورزی پایدار، توسعه ارقام برنج به همراه افزایش کارایی استفاده از نیتروژن مطرح می‌شود که در این راستا مطالعه چگونگی پاسخ برنج به کمبود نیتروژن در خاک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Li *et al.*, 2022).

باوجود اینکه نواحی تنظیمی ژن‌های گیاهی در مقایسه با ژن‌های جانوری کوچکتر هستند اما گیاهان واجد تعداد مساوی یا بیشتری از فاکتورهای رونویسی هستند. این فراوانی فاکتورهای رونویسی در گیاهان فرصت ارزشمندی را برای کشف چگونگی کنترل شبکه‌های پیچیده تنظیم ژن در توسعه موجودات چند سلولی فراهم می‌کند (Schmid *et al.*, 2005). در دهه‌های اخیر تکنولوژی ریزآرایه امکان بررسی بیان ژن با دقت بالا را فراهم ساخته است و یک راهکار مهم برای بررسی الگوی بیان ژن گسترده در ژنوم است (Cao *et al.*, 2012). استفاده از

² Transcription–regulation interaction

¹ Protein–protein interaction

فعالیت‌های متابولیکی مربوط به قند، آمینواسید و فنیل پروپانویید شرکت دارند. همچنین در ریشه، فاکتور رونویسی *OSJAZ9* بارزترین فاکتور القا شده در شرایط کمبود آمونیوم بود و در پاسخ به وفور آمونیوم، فاکتورهای *JAZ9* بیش از حد بیان داشتند. همچنین گزارش شد *OsCOII* باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت‌های متابولیکی ریشه، جذب آمونیوم، آمینواسید و قند می‌شود (Sun et al., 2020). ساختار ریشه به وسیله سیستم‌های مورفولوژیکی تنظیم می‌شود که به دسترس بودن مواد مغذی مانند نیتروژن حساس است. در شرایط تنش نیتروژن، نتایج تحقیقات نشان داده است که تعداد ۳۹۰۸ ژن اختلاف بیان معنی‌دار داشتند که از این میان، پروتئین سنتزکننده گلوتامین (*GS2*)، پروتئین فرآوری آمونیوم کلروپلاستی، پروتئین شناخته‌شده‌ای بود که افزایش بیان معنی‌داری نشان داد. تمرکز غیر منتظره *GS2* از اندام هوایی به ریشه در شرایط کمبود نیتروژن، می‌تواند بیانگر یک مسیر فرآوری نیتروژن به‌وسیله فعالیت *GS2* باشد. علاوه بر آن، مشاهده شد در صورت تداوم تنش کمبود نیتروژن، انتقال دهنده‌های نیتروژن و عوامل فرآوری نیتروژن افزایش بیان معنی‌داری نشان دادند (Liang et al., 2021).

جذب نیتروژن به حالت نیترات یا آمونیوم به وضعیت خاک، ناقلان نیترات (*NRTs*) و ناقلان آمونیوم (*AMTs*) بستگی دارد. *NRT1* (یا *NPF*) و *NRT2* از مهم‌ترین خانواده‌های ژنی مسئول انتقال نیترات در برنج هستند. این انتقال دهنده‌ها به منظور جذب نیترات، به طور معنی‌داری در بیرونی‌ترین سلول‌های ریشه و همچنین در ریشه‌های موتی، بیان می‌شوند. بیان *OsNPF2.2* نیز به‌وسیله نیترات، کنترل می‌شود و به عواملی مانند pH و تمایل پایین ناقلان بستگی دارد. ناقل *OsNPF2.2* در غشای پلاسمایی تعبیه شده و بیان آن عمدتاً در سلول‌های آوند چوبی شناسایی شده است. همچنین در آوند‌های آبکش و چوبی نیز بیان نمونه‌های دیگری از این ناقل ریشه شناسایی شده است (Nazish et al., 2021).

Huang et al. (2021) نشان دادند تغییرات نیتروژن با تغییرات میزان انتقال ساکارز در برنج همراه است. در گیاهانی که ژن مسئول انتقال ساکارز (*OsDOF11*) دچار خاموشی شده باشد، میزان جذب نیتروژن نیز کاهش

داده‌های موجود در پایگاه‌های داده و بررسی آن‌ها می‌تواند به‌عنوان روشی برای شناسایی مسیرهای بیولوژیکی، مورد استفاده قرار گیرد و ضمن صرفه‌جویی در زمان با صرف حداقل هزینه، نتایج دقیقی را ارائه نماید.

پیشینه پژوهش

افزودن کود نیتروژن در سطوح مختلف باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در فاکتورهای رشدی، اجزای عملکرد و نیتروژن دانه می‌شود. به عبارت دیگر استفاده از کودهای شیمیایی در مراحل مختلف رشد اثرات معنی‌داری روی رشد گیاه دارد (Chaturvedi, 2005). طول ریشه و زیست‌توده آن در شرایط کمبود نیتروژن افزایش می‌یابد ولی در مقابل، طول اندام هوایی و زیست‌توده آن کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد افزایش طول ریشه یکی از واکنش‌های سازگاری گیاه نسبت به کمبود نیتروژن برای افزایش جذب باشد و در عین حال زمانی که نیتروژن بیش از حد مورد نیاز باشد، رشد ریشه و اندام هوایی هر دو باهم محدود می‌شوند (Wang et al., 2020).

به منظور افزایش کارایی استفاده از کود نیتروژن، عوامل رونویسی به‌عنوان اهداف بالقوه شناخته می‌شوند. اگرچه تعداد فاکتورهای رونویسی بسیاری در برنج شناسایی شده‌اند که مرتبط با تنش کمبود نیتروژن هستند، اما عملکرد آنها به طور ضعیفی مورد بررسی قرار گرفته است (Wang et al., 2020).

مصرف نیتروژن در برنج از طریق جذب آمونیوم (NH_4^+) و فرآوری آن در ریشه، فرآیند پیچیده‌ای است که در طول مراحل مختلف رشد و نمو به عوامل متعددی از جمله تعامل نیتروژن با کربن و انرژی سایر فعالیت‌های متابولیکی وابسته است. گزارش شده است ژن‌های *GSI* و *NADH* در فرآیند انتقال نیتروژن در دوره پیری گیاه مؤثر هستند (Tabuchi et al., 2007). محدودیت آمونیوم، باعث به وجود آمدن مجموعه‌ای از واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی می‌شود که به برنج در جذب بهینه نیتروژن کمک می‌کند. در تحقیقی که به منظور بررسی رونوشت ژن‌های برنج تحت تنش کمبود نیتروژن صورت گرفت مشخص شد ژن‌هایی که افزایش بیان داشته‌اند در

متفاوت از ابزار برخط GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>) استفاده شد. معیار انتخاب ژن‌های با بیان متفاوت (DEG) عبارت از $|\log_{2}FC| \geq 1$ و $P\text{-value} < 0.05$ بود. سپس نمودارهای جعبه‌ای و آتشفشانی مربوط به ژن‌ها بررسی شد.

بررسی هستی‌شناسی ژن‌های منتخب

با توجه به اینکه مجموعه داده‌های در مقیاس ژنوم (بزرگ) به‌ویژه داده‌های ریزآرایه و مطالعات پروتئومی، دانش بیولوژیکی گسترده دارند، تفسیر آن‌ها تبدیل به یک چالش بزرگ شده است. ابزار DAVID^۵ (<https://david.ncifcrf.gov>) به صورت یک برنامه تحت وب می‌تواند داده‌های ژنومی را به همراه خلاصه گرافیکی آن ادغام و ذخیره کند. علاوه بر آن فهرست ژن‌ها یا پروتئین‌ها به سرعت بررسی شده و با توجه به ماهیت داده برای دسته‌های هستی‌شناسی ژن، دامنه پروتئین و مسیرهای بیوشیمیایی طبقه‌بندی می‌شوند (Dennis *et al.*, 2003)، که در مطالعه حاضر به منظور شناسایی مسیرهای مهم زیستی و همین‌طور هستی‌شناسی ژن‌های DEG که شامل بخش‌های فرآیند بیولوژیکی (BP)، عملکرد مولکولی (MF) و اجزای سلولی (CC) است، از ابزار برخط DAVID استفاده شد.

بررسی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین و شناسایی ژن‌های منتخب

برای آنالیز و بررسی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین از نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.10.0 و برای یافتن ژن‌های کلیدی از افزونه cytoHubba در نرم‌افزار Cytoscape و روش MCC (Maximal Clique Centrality) استفاده شد. تعداد ۱۰ ژن مهم و کلیدی که در شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین اهمیت داشتند، انتخاب و گزارش شدند. نرم‌افزار Cytoscape، یک نرم‌افزار منبع باز برای به

می‌یابد. در بررسی آن‌ها ۳۳ درصد از ژن‌هایی که بیان بالایی داشتند در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و ۲۰ درصد آن‌ها در مسیرهای متابولیکی نقش داشتند.

اگرچه گیاهان همواره، تنش‌های زیستی و غیر زیستی متنوعی را تجربه می‌کنند، و در پاسخ به آن‌ها به روش‌های متفاوت و بر اساس مکانیسم‌های مولکولی مختلف عمل می‌کنند، اما هنوز شناخت کامل این روش‌های مولکولی میسر نشده است و نیازمند بررسی‌های فراوانی است. در این راستا مطالعات بیوانفورماتیکی و DNA نو ترکیب ابزارهای مؤثری را برای شناسایی بیشتر فرآیندهای پیچیده مولکولی فراهم آورده‌اند (Durrani *et al.*, 2020). با توجه به اهمیت نیتروژن در عملکرد برنج، بررسی نحوه تغییر بیان ژن‌ها و عملکرد بیولوژیکی دخیل در پاسخ گیاه به کمبود نیتروژن، می‌تواند موجب شناسایی ژن‌های کلیدی، عوامل تنظیمی مؤثر و مسیرهای مولکولی مهم درگیر در این فرآیند شود. بر همین اساس، پژوهش حاضر به منظور شناسایی بیشتر ژن‌ها، فرآیندهای زیستی و نحوه عملکرد برنج در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن و بررسی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین، طراحی شد.

روش‌شناسی پژوهش

انتخاب مجموعه داده

در این بررسی ابتدا با استفاده از کلیدواژه‌های تنش، کمبود نیتروژن و برنج جستجو در پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) انجام شد. با توجه به میزان ارتباط مجموعه‌های داده با موضوع مورد نظر، نوع مطالعه، بافت مورد نظر و حداقل تکرار مورد نیاز در تیمار و کنترل، مجموعه داده ریزآرایه با شناسه GSE73772 انتخاب شد. این مجموعه داده مربوط به دو گروه کنترل و تیمار بود که هر کدام متشکل از سه تکرار بودند و نمونه‌گیری از گروه تیمار، شش ساعت پس از اعمال تنش کمبود نیتروژن بر ریشه گیاه برنج انجام شده بود. برای بررسی ژن‌های با بیان

⁵ Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

⁶ Biological Process

⁷ Molecular Function

⁸ Cellular Component

¹ The National Center for Biotechnology Information

² Differentially Expressed Genes

³ Box plot

⁴ Volcano plot

treatment samples (six hours after Nitrogen deficiency stress shown in green including three samples with accession numbers GSM1902498, GSM1902499, and GSM1902500) in rice

در بررسی نتایج، ژن‌های با $\text{adj P-value} < 0.05$

به‌عنوان ژن‌های با تفاوت بیان معنی‌دار شناسایی شدند (شکل ۲). در شکل نمودار آتشفشانی (شکل ۲)، ژن‌هایی که به رنگ قرمز مشخص شده‌اند، نسبت به حالت کنترل یا شاهد افزایش بیان و ژن‌هایی که به رنگ آبی مشخص شده‌اند نسبت به حالت کنترل کاهش بیان داشتند. نقاط با رنگ مشکی نیز مربوط به ژن‌هایی است که نسبت به حالت کنترل در شرایط تنش تغییر بیانی نداشتند. به عبارت دیگر، ژن‌های با رنگ آبی در شرایط کمبود نیتروژن نسبت به حالت کنترل، کمتر بیان شدند.

بیشترین افزایش بیان که با رنگ قرمز نشان داده شده و بالاترین نقطه نمودار است، مربوط به ژن Os03G0254200 با $\log_{2}FC$ برابر با ۳/۷۸۷ و بیشترین کاهش بیان مربوط به ژن Os07g0142100 با $\log_{2}FC$ برابر با -۴/۰۰۱ می‌باشد.



شکل ۲. نمودار آتشفشانی مربوط به ژن‌های بیان شده در شش ساعت پس از اعمال تنش کمبود نیتروژن در برنج. ژن‌هایی که به رنگ قرمز مشخص شده‌اند، نسبت به حالت کنترل افزایش بیان و ژن‌هایی که به رنگ آبی مشخص شده‌اند نسبت به حالت کنترل کاهش بیان داشتند. نقاط با رنگ مشکی نیز مربوط به ژن‌هایی است که نسبت به حالت کنترل در شرایط تنش تغییر بیانی نداشتند.

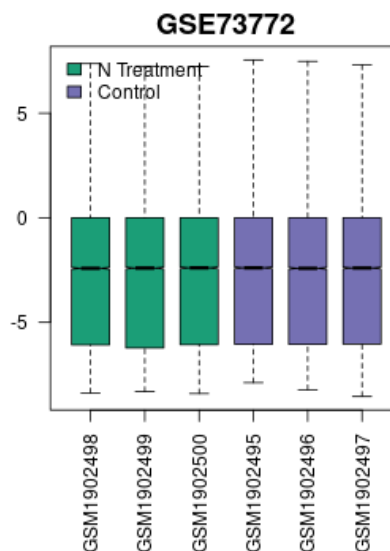
Figure 2. Volcano plot of expressed genes in six hours after nitrogen deficiency stress in rice. The genes marked in red increased and the genes marked in blue had a decreased expression compared to the control samples. The points with black color also correspond to the genes that had no change in expression compared to the control samples under stress conditions.

نمایش درآوردن شبکه‌های تعامل مولکولی و مسیره‌های زیستی و ادغام این شبکه‌ها می‌باشد. اگرچه Cytoscape خصوصاً برای تحقیقات زیستی طراحی شده است، اما به‌عنوان یک پلتفرم عمومی برای بررسی شبکه‌های پیچیده و تصویرسازی آن‌ها نیز می‌باشد (Saito *et al.*, 2012).

یافته‌های پژوهش

نتایج بررسی تفاوت بیان ژن‌ها

سه تکرار کنترل با سه تکرار تیمار تنش کمبود نیتروژن با استفاده از ابزار GEO2R مورد بررسی قرار گرفتند. پس از نرمال‌سازی اولیه داده‌ها، آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها انجام شد و سپس نمودار جعبه‌ای ترسیم شد (شکل ۱). این نمودار که تیمارها را با رنگ سبز و کنترل را با رنگ بنفش نشان می‌دهد، حاکی از مشابه بودن میانه‌ها و چارک‌های مختلف نمونه‌ها است که قابل مقایسه بودن این دیتاها را میسر می‌نماید.



شکل ۱. نمودار جعبه‌ای توزیع نمونه‌های شاهد (رنگ بنفش شامل سه نمونه با کدهای دسترسی GSM1902495، GSM1902496 و GSM1902497) و تیمار شده (شش ساعت پس از اعمال تنش کمبود نیتروژن و به رنگ سبز شامل سه نمونه با کدهای دسترسی GSM1902498، GSM1902499 و GSM1902500) در برنج

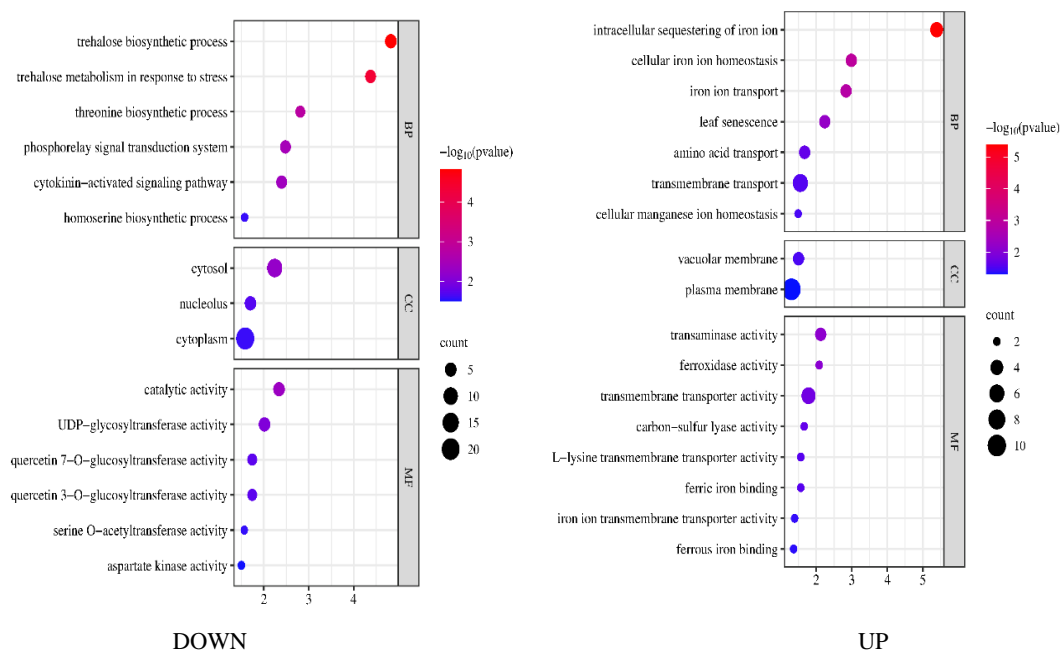
Figure 1. Box plot distribution of control (shown in purple including three samples with accession numbers GSM1902495, GSM1902496, and GSM1902497) and

فعال تری داشتند. همچنین بیان این ژن‌ها مرتبط با اجزای سلولی "غشای واکولار" و "غشای پلاسمایی" بود. عملکردهای مولکولی ژن‌های بیش بیان بیشتر مرتبط با "فعالیت ترانس آمیناز"، "فعالیت انتقال بین غشایی"، "فعالیت فرواکسیداز" و به‌طور کلی انتقال یون آهن بود. ژن‌هایی که کاهش بیان داشتند نیز در بخش فرآیند بیولوژیکی "بیوسنتز ترهالوز" و "متابولیسم ترهالوز در پاسخ به تنش نقش فعال تری از خود نشان دادند. سیتوزول معنی‌دارترین جز سلولی در بخش اجزای سلولی مرتبط با ژن‌هایی که کاهش بیان داشتند بود. همچنین این بررسی نشان داد ژن‌های با کاهش بیان، به‌طور معنی‌داری با بخش عملکردهای مولکولی، فعالیت کاتالیتیکی و به‌طور کلی فعالیت‌های گلیکوزیل ترانسفراز و گلوکوزیل ترانسفراز مرتبط بودند.

از میان ژن‌های بیان شده، ژن‌هایی که دارای خصوصیات $|\log FC| \geq 1$ و $P\text{-value} < 0.05$ بودند، به‌عنوان ژن‌های با بیان متفاوت (DEG) معنی‌دار انتخاب شدند. با توجه به نتایج، در مجموع تعداد ۳۹۵ ژن بیان متفاوت و معنی‌دار داشتند به طوری که در نمونه‌های تیمار نسبت به کنترل، ۱۲۱ ژن افزایش بیان (یا بیش بیان)^۱ و ۲۷۴ ژن کاهش بیان (یا کم بیان)^۲ از خود نشان دادند.

بررسی هستی‌شناسی ژن‌ها و مسیرهای بیولوژیکی

هستی‌شناسی و مسیرهای عملکردی ژن‌های با بیان متفاوت معنی‌دار مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). بر اساس نتایج، ژن‌هایی که افزایش بیان داشتند به‌طور معنی‌داری در فرآیندهای بیولوژیکی "جداسازی داخل سلولی یون آهن"^۳، "پایداری یون آهن سلولی" و "انتقال یون آهن" نقش



شکل ۳. نمودار حبابی هستی‌شناسی ژن‌های کاهش بیان یافته (سمت چپ) و نمودار حبابی هستی‌شناسی ژن‌های افزایش بیان یافته (سمت راست). ژن‌هایی که کاهش بیان داشتند بیشتر در فرآیند بیوسنتز ترهالوز و ژن‌هایی که افزایش بیان داشتند بیشتر در انتقال، پایداری و جداسازی سلولی یون آهن فعالیت دارند.

Figure 3. Ontology bubble chart DEGs of Down-regulated (left) and Up-regulated genes (right). Down-regulated genes had activity in trehalose biosynthetic process and Up-regulated genes had activity in intracellular sequestering, homeostasis and transport of iron ion

¹ Up-regulated

² Down-regulated

³ Intracellular sequestering of iron ion

سرعت بخشیده و موجب کاهش کارایی دوره فرآوری کربن هر برگ و در نهایت کاهش انباشت محصولات فتوسنتزی می‌شود (Hou *et al.*, 2018).

نسبت متابولیسم‌های کربوهیدراتی به متابولیسم‌های نیتروژن در سلول، برای تنظیم رشد، نمو و عملکرد مهم می‌باشد. یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2015) نشان دادند در شرایط فراوانی آمونیم در ریشه، ژن‌های مرتبط با متابولیسم‌های آمینو اسید و کربوهیدرات کاهش بیان و در برگ افزایش بیان معنی‌دار داشتند. در شرایط نبود نیتروژن در ریشه، در مسیرها و متابولیسم‌های آمینواسیدی و کربوهیدرات، ژن‌ها کاهش بیان معنی‌داری از خود نشان دادند که در برگ‌ها و بخش هوایی گیاه منجر به کاهش متابولیسم‌های کربوهیدرات و نیتروژن شد. در شرایط کمبود نیتروژن، جذب آمونیم مورد نیاز به درستی انجام نمی‌شود و در نتیجه با محدود شدن آن به عنوان یک پیش ماده، موجب کاهش تولید گلوتامین و سایر اسیدآمینه‌های مرتبط با آن می‌شود (Yang *et al.*, 2015).

اهمیت نیتروژن در متابولیسم گیاه، در مطالعات مختلفی نشان داده شده است. مطابق گزارش Ueda *et al.* (2020) از جمله ژن‌های شناخته شده‌ای که در پاسخ به سطوح نیتروژن تنظیم می‌شوند ژن ساکارز سنتاز (*OsSUS1*) و (*Os03g0401300*) و (*Os06g0194900*) *OsSUS2* و همچنین ژن کدکننده فاکتور رونویسی ماریچ-حلقه-ماریچ قلیایی^۲ درگیر در سیگنالینگ آهن (*OsIRO2*) (*Os01g0952800*) هستند که به نوبه خود بر متابولیسم کربوهیدرات و آهن در گیاهان تأثیر می‌گذارند.

نتایج ارائه شده در شکل ۳ نشان داد ژن‌های با افزایش بیان بیشتر تحت تنش کمبود نیتروژن، در مسیر انتقال یون آهن فعال هستند و در فرآیند پیری نقش دارند. تسریع فرآیند پیری سلولی و برگ‌ها در اثر تغییر میزان نیتروژن توسط توبوچی و همکاران (Tabuchi *et al.*, 2007)، هو و همکاران (Hou *et al.*, 2018)، و ذاکری و همکاران (Zakari *et al.*, 2020) گزارش شده است.

با بررسی مسیرهای مهم مرتبط با DEG‌ها که با استفاده از DAVID و در بخش KEGG انجام شد، در ژن‌های بیش‌بیین مسیر معنی‌داری یافت نشد. اما نتایج حاصل از بررسی مسیرهای ژنی نشان داد، در شرایط کمبود نیتروژن بیشتر ژن‌های کم بیان، در فعالیت‌های بیوسنتز آمینواسیدها و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نقش داشتند (شکل ۴). در حقیقت با اعمال تنش کمبود نیتروژن، کاهش معنی‌دار در بیان ژن‌های مسیرهای بیوسنتز مشاهده شد.

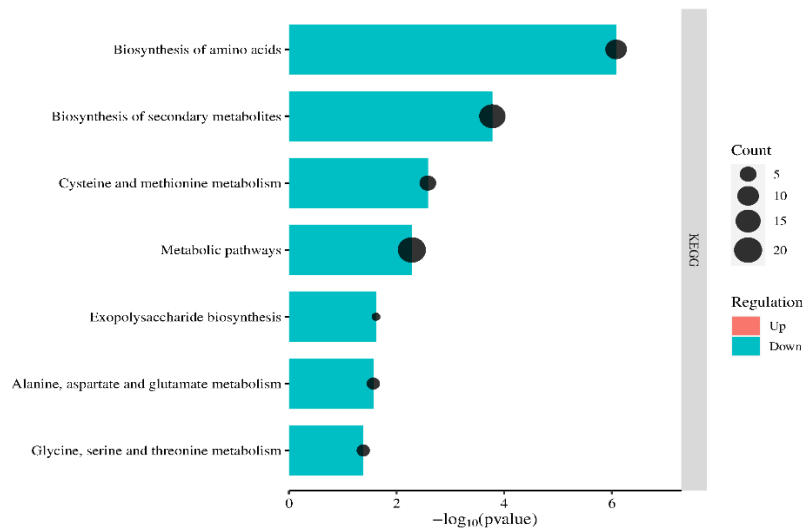
شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین

شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape رسم شد (شکل ۵). سپس تعداد ۱۰ ژن با استفاده از الگوریتم MCC انتخاب و به عنوان ژن‌های کلیدی در این شبکه معرفی شدند (شکل ۶). مهم‌ترین این ژن‌ها شامل *IRO2*، *IRT2* و *NRAMP1* بودند.

پیرامون ارتباط بین نیتروژن و فتوسنتز نشان داده شده است که بیش از نیمی از محتوای نیتروژن برگ به دستگاه فتوسنتزی اختصاص دارد. بررسی ضرایب همبستگی صفات مختلف، ارتباط خطی، مثبت و معنی‌دار بین هدایت روزنه‌ای، هدایت مزوفیلی و نرخ حداکثر انتقال الکترون و حداکثر فعالیت کربوکسیلازی رویسکو با فرآوری کربن دی‌اکسید را نشان می‌دهد. مطالعه سازوکار اثر عناصر پر مصرف مانند نیتروژن و اثرات آن بر غلظت دیگر عناصر، واکنش گیاهان در مواجهه با تنش را تسهیل می‌کند. علاوه بر آن، تمام محدودیت‌های فتوسنتز به دلیل محدودیت‌های روزنه‌ای، مزوفیلی و بیوشیمیایی می‌باشد که تمامی این موارد به طور معنی‌داری تحت تأثیر کودهای نیتروژن و پتاسیم هستند. نیتروژن برای تولید پروتئین و تنظیم فعالیت آنزیمی ضروری است. در پژوهش حاضر نیز مشخص شد در اثر کمبود تأمین نیتروژن مورد نیاز گیاه، فعالیت یا مسیرهای بیوسنتزی مرتبط با تولید آمینواسیدها کاهش بیان داشتند. در نتیجه کمبود نیتروژن سبب کاهش فعالیت تثبیت کربن دی‌اکسید به وسیله آنزیم رویسکو می‌شود. علاوه بر آن، کمبود نیتروژن فرآیند پیری برگ را

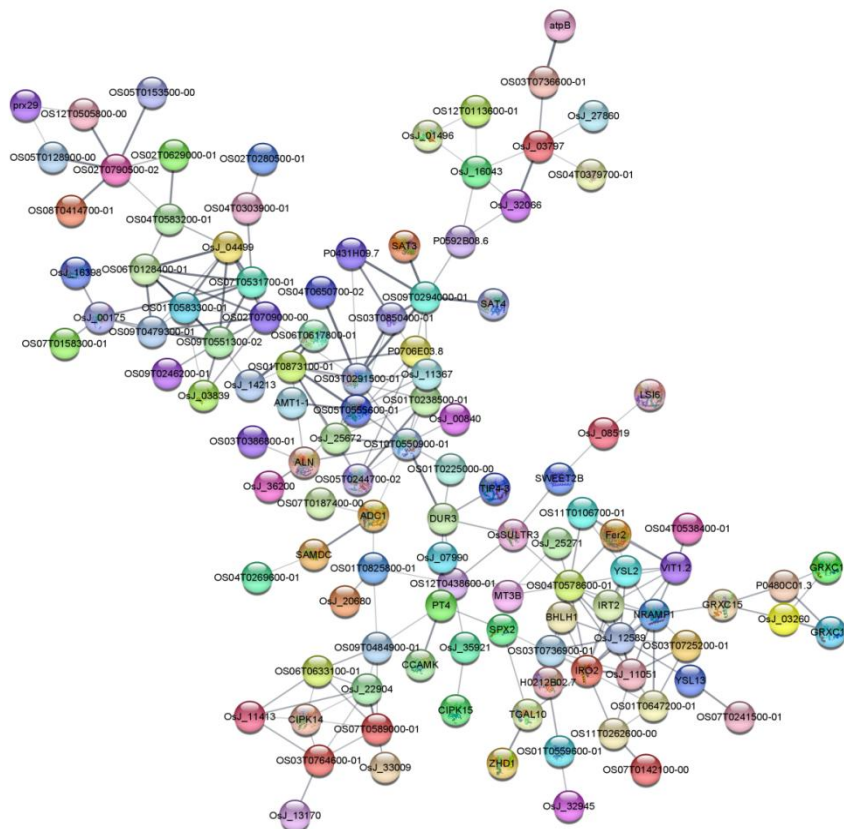
² Basic helix-loop-helix

¹ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes



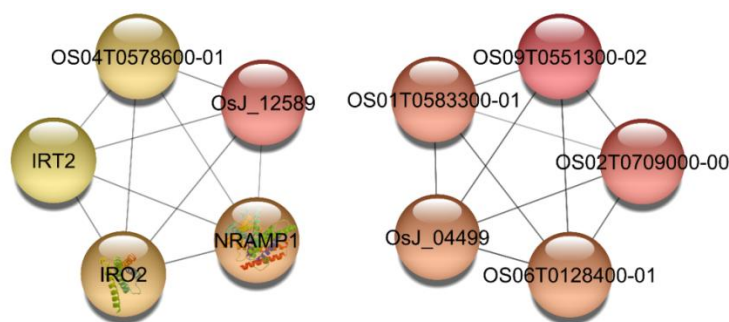
شکل ۴. مسیر های متابولیکی مربوط به ژن های کم بیان شش ساعت بعد از شروع تنش کمبود نیتروژن در برنج. بیشترین فعالیت متابولیکی مربوط به بیوسنتز آمینواسیدها می باشد

Figure 4. Metabolic pathways for down-regulated genes six hours after the beginning of nitrogen deficiency stress in rice. The highest metabolic activity is associated with amino acids biosynthesis



شکل ۵. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین ژن های DEG در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن برنج پس از شش ساعت

Figure 5. Protein-Protein interaction network DEGs in response to nitrogen deficiency stress in rice after 6 hours



شکل ۶. ده هاب ژن با بیان معنی‌دار در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن برنج پس از شش ساعت
Figure 6. Ten hub-genes in response to nitrogen deficiency stress in rice after 6 hours

شناسایی شده است. در گیاهان موتانت آرآییدوپسیس که این ژن به صورت خاموش بوده، اثرات شدید کاستی رشد در ریشه مشاهده شده که منجر به مرگ شده است. ریشه‌هایی که در *IRT1* موتاسیون دارند، در جذب آهن ضعف داشته و توانایی انباشت روی، کادمیوم و منگنز را در شرایط تنش آهن ندارند. در شرایط تنش کمبود آهن، فعالیت ژن‌های *IRT1*، *LeIRT1* و *LeIRT2* در گوجه‌فرنگی منجر به بازگرداندن و بهبود کاهش رشد می‌شوند.

علاوه بر آن، *IRT2* سیستم انتقالی دیگری می‌باشد که در فرآیند انتقال آهن نقش مهمی ایفا می‌کند که مانند *IRT1* کد کننده پروتئینی است که قادر به انتقال آهن و روی می‌باشد ولی توانایی انتقال کادمیوم و منگنز را ندارد. حوزه فعالیت *IRT2* همانند *IRT1* در ریشه بوده و میزان بیان آن ۲۰ مرتبه کمتر از *IRT1* می‌باشد. این ژن در حالت موتانت *IRT1* نمی‌تواند گیاه را از مرگ و کاهش شدید رشدی نجات دهد. همچنین جهش در *IRT1* منجر به کاهش معنی‌دار پارامترهای فتوسنتزی می‌شود و محصول آن به‌عنوان یک ترکیب پلی‌پپتیدی در دستگاه فتوسنتزی نقش دارد. مکانیسم گیاهان دانه‌ای در مواجهه با کمبود آهن به این گونه است که تولید ترکیبات کوچکی به نام فیتوسیدروفورها^۲ در گیاه افزایش می‌یابد. این ترکیب مسئول افزایش حلالیت پذیری آهن فریک می‌باشد. نشان داده شده که آنزیم‌های حاضر در مسیر بیوسنتزی این آنزیم به کمبود آهن حساس بوده و فعالیت آن‌ها افزایش

پایداری (هومئوستازی) آهن سلولی و تمام ارگانسیم‌های موجود، به منظور تأمین آهن کافی برای متابولیسم‌ها و جلوگیری از سطوح سمی آن، باید پایدار و متعادل باشد. برای دریافت آهن از محیط اطراف، این فلز باید از مسیرهای غشایی مختلف، مسیرهای درون سلولی عبور کرده و در ارگان‌ها و بافت‌های مختلف توزیع شود. چون حالت فریک آهن حلالیت بسیار پایینی دارد، دریافت و انتقال آهن نیازمند فرآیندهای به خصوصی (مانند عملیات کلاته کننده و احیا) می‌باشد. به دلیل پرسلولی بودن و تمایز یافته بودن بافت‌ها در گیاهان، فرآیندهای پیچیده‌ای به منظور پایداری آهن در گیاه رخ می‌دهد (Curie and Briat, 2003).

در شرایطی که کمبود آهن وجود دارد، فعالیت و بیان ژن‌های موجود در ریشه افزایش می‌یابد تا بتوانند آهن را از آهن فریک به فرو تبدیل کرده و جذب کنند. دلیل اسیدی شدن خاک نیز حاصل همین فعالیت می‌باشد و در پژوهش وایریچ و همکاران (Wairich et al., 2019) به‌عنوان استراتژی شماره یک گیاهان یعنی استراتژی کاهش (به جز گیاهان خانواده گرامینه) از آن یاد شده است. بررسی‌های بیان ژن‌ها در آرآییدوپسیس منجر به شناسایی انتقال دهنده آهن فرو به نام *IRT1* شد. این ناقل که یک پلی‌پپتید ۳۴۷ آمینواسیدی با هشت لایه غشا فرضی بوده و در غشای پلاسمایی اپیدرم ریشه فعالیت می‌کند، یک کلاس جدیدی از ناقلان یون آهن در یوکاریوت‌ها است که مرتبط با خانواده ZIP بوده و در برنج، مخمر و نماتدها

² Phytosiderophores

¹ Reduction strategy

به طوری که در صورت کاربرد مقدار کم نیتروژن، غلظت آهن موجود در بافت در بیشترین مقدار بود. به عبارت دیگر هرچه غلظت نیتروژن موجود در خاک بیشتر باشد مقدار محتوای آهن بافت گیاه کمتر خواهد بود (Ethan *et al.*, 2011).

نیتروژن می‌تواند با سخ فتو سنتز گیاه به تابش را تحت تأثیر قرار دهد (Sun *et al.*, 2016). همچنین کمبود نیتروژن به طور معناداری باعث کاهش بازده کوانتومی فوتوشیمیایی مؤثر و حداکثر بازده کوانتومی فوتوشیمیایی می‌شود (Tantray *et al.*, 2020).

Wen *et al.* (2019) نشان دادند با گذشت ۱۴ روز از اعمال تنش، بیان ژن‌های مهم و فعالیت آنزیمی افزایش یافته و فرآیندهای فرآوری نیتروژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. افزون بر آن، کمبود نیتروژن مانع انتقال ۵- آمینوبیلینیک اسید به پروفوبیلیوزن شده و سنتز پیش ساز کلروفیل را مهار می‌کند که فتوسنتز را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد (Wen *et al.*, 2019).

انتقال و جذب نیتروژن، چه به صورت نیترات یا آمونیوم، بر تعادل بار کلی و تعداد پروتون‌های درون سلول‌های گیاهی تأثیر می‌گذارد. این به این دلیل است که این فرآیندها یا پروتون‌ها را مصرف می‌کنند یا آزاد می‌کنند که منجر به تغییر در بار خالص سلول می‌شود. حفظ پایداری pH داخلی، که تحت تأثیر فرآیندهای مرتبط با نیتروژن است، برای توانایی گیاه در جذب و استفاده مؤثر نیتروژن بسیار مهم است. علاوه بر این، حفظ این تعادل به گیاهان کمک می‌کند تا در برابر تنش‌های غیر زنده مانند دماهای شدید، شوری و خشکی متحمل‌تر شوند (Feng *et al.*, 2020).

در خانواده گرامینه استراتژی شماره دو گیاهان (استراتژی کلاته‌کنندگی)^۲ جهت مقابله با کمبود آهن به فعالیت و آزاد شدن فیتو سیدروفورها در ریزو سفر وابسته است. این ترکیب از فعالیت آمینواسیدهای تغییر یافته خانواده MAS^۳ به دست می‌آید و در پژوهش کوری و همکاران (Curie *et al.*, 2003) نیز به آن اشاره شده

می‌یابد. به نظر می‌رسد پس از انتقال آهن از ریشه و آوندهای چوبی، واکوئل‌ها و میتوکندری‌های گیاهی مسئول نگهداری و انتقال آن به سایر نقاط مورد نیاز است. همچنین فعالیت *NRAMP* و نیکوتین آمید در غشای این اندامک‌ها جهت انتقال آهن و سایر عناصر مشاهده و گزارش شده است (Curie and Briat, 2003).

علاوه بر این، همکاری مشترک در جذب و استفاده از فسفر و نیتروژن در محصولات زراعی برای به دست آوردن تعادل مواد غذایی و رشد بهینه ضروری است. کمبود هم‌زمان نیتروژن و فسفر منجر به محدود شدن رشد و جذب سایر مواد مغذی می‌شود. علاوه بر آن، این کمبود توأم، یکسری واکنش‌های فیزیولوژیکی متفاوت و همچنین برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی مشابه را تحریک می‌کند. با تمرکز بر ژن دخیل در عامل رونویسی (*NIGTI*) مشخص شده است که پروتئین بیان شده، یک تنظیم‌کننده مثبت برای هومئوستازی فسفر و تنظیم‌کننده منفی جذب نیتروژن در برنج است. این ژن باعث القا جذب فسفر و محدودیت در جذب نیتروژن شده و منجر به القای بیان ژن‌های مسئول فسفر و نیتروژن مانند *PTI*, *SPXI*, *NLP1* و *NRT2.1* می‌شود. همچنین کمبود نیتروژن رشد گیاه را شدیدتر از کمبود فسفر محدود و کنترل می‌کند (Wang *et al.*, 2023).

چرخه آهن از مهم‌ترین عوامل کنترل میزان دسترسی آن برای فرآیندهای زیستی محسوب می‌شود. Chen *et al.* (2008) گزارش کردند در شرایطی که غلظت نیتروژن زیاد است، مقدار پلاک آهن روی ریشه نسبت به حالتی که مقدار آمونیاک طبیعی است، به طور معنی‌داری کمتر از ۵۰ درصد است. غلظت آر سنیک در ریشه و برگ‌های برنج همبستگی بالایی با مقدار پلاک آهن نشان داد. پژوهش آنها نشان داد چرخه آهن-نیتروژن در خاک شالیزار تأثیر زیادی بر تعادل میان آرسنیک و آهن در خاک دارد و متعاقباً میزان جذب آن‌ها توسط گیاه را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد. در حقیقت، مدیریت نیتروژن به‌طور قابل‌توجهی بر محتوای آهن بافت گیاهی تأثیر می‌گذارد.

³ Mugineic acid

¹ Bioavailability

² Chelation strategy

مورفولوژیکی افزایش نشان داد. گزارش شده است که کمبود نیتروژن از طریق ارتباط با متابولیسم‌های کربن، بر روی سنتز گلو تامات و گلو تامات دهیدروژناز، بر روی فعالیت فرآوری کربن و فعالیت فتوسنتزی برگ‌ها اثر معنی‌داری می‌گذارد. در بررسی شائو و همکاران (Shao *et al.*, 2020) نشان داده شد که با گذشت چهار هفته از اعمال تنش کمبود نیتروژن، برگ‌های پایینی گیاه برنج شروع به زرد شدن و کلروزه کرده و میزان وزن خشک گیاه کاهش و نسبت ریشه به برگ نیز افزایش یافت. بر اساس یافته‌های آن‌ها با اندازه‌گیری تبادلات گازی و کلروفیل a مشخص شد کاهش نیتروژن، فرآوری (اسیمیلاسیون) کربن‌دی‌اکسید را کاهش می‌دهد اما غلظت بین سلولی آن را افزایش می‌دهد. همچنین کمبود نیتروژن محتوای نشاسته، ساکارز و فروکتوز را افزایش، اما محتوای کل پروتئین محلول در برگ را تغییر نمی‌دهد.

بر اساس نتایج مندرج در شکل ۳، در پاسخ به تنش، ژن‌های مرتبط با بیوسنتز و تولید ترهالوز و ژن‌های دخیل در متابولیک ترهالوز کاهش بیان داشتند.

پژوهش وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2021) نیز نشان داد تحت شرایط کمبود نیتروژن، بیان ژن‌های دخیل در فرآیندهای سنتز کلروفیل، نمو کلروپلاست و واکنش در یافت نوری و انتقال الکترون در فوتوسیستم تغییر می‌یابند. همچنین با بیان معنی‌دار برخی ژن‌ها، سنتز آمینو اسیدها و انتقال پروتئین محدود شده و باعث کاهش میزان اورنیتین، سیتئین و تایروزین متابولوم‌ها می‌شوند. علاوه بر آن بررسی پروفایل آنالیز رونوشت‌ها (RNA-seq) نیز نشان داد، تحت کمبود نیتروژن، دانه گندم با افزایش مقدار آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، گالاکتوز و گلوکوز می‌تواند توانایی ویرایش DNA، جذب آهن، مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده و تنش‌های اکسیداتیو را افزایش دهد.

پژوهش بورگس و همکاران (Burgos *et al.*, 2014) به بررسی نحوه سازگاری نوع خاصی از برنج با تنش نیتروژن پرداخت. نتایج نشان داد که ژن‌های کلیدی دخیل

است. فعالیت Mas منجر به تولید NAs¹ می‌شود که به‌وسیله انتقال گروه‌های آمینواسیدی نیکوتین آمین (NAAT) به 3-keto میانه تبدیل می‌شوند. همچنین، در شرایط کمبود آهن فاکتور رونویسی IRO2 به مقدار زیاد بیان می‌شود تا با افزایش ناقلان آهن در گیاه، عمل انتقال آهن به سرعت انجام شود. با افزایش بیان IRO2 و سایر فاکتورهای رونویسی، بیان ژن‌های مسئول انتقال آهن مانند IRT2، IRT1، YSL9 و NRAMP1 نیز افزایش می‌یابد (Wairich *et al.*, 2019).

در پژوهشی که به منظور بررسی کاربرد یون آهن در کارایی فتوسنتز انجام شد مشخص شد، با ایجاد تغییر در توالی ژن IRT1 سطوح رنگ‌دانه برگ و پروتئین‌های حاضر در غشای تیلاکوئید دچار تغییر شدند که منجر به تغییر در غلظت کل کلروفیل و ایجاد زردی رنگ برگ شد. همچنین علاوه بر آن، اندازه‌گیری نرخ شارش یا جریان فتوسنتزی در گیاهانی که واجد ژن IRT1 جهش‌یافته بودند، اختلال شدید در انتقال الکترون در فوتوسیستم دو را نشان داد (Varotto *et al.*, 2002). در برنج، عوا مل رونویسی IDEF2، IDEF1 و OsiIRO2 به‌طور مثبت و جزئی ژن‌های القا کننده کمبود آهن فریک، جذب آهن فرو و انتقال متقابل آهن را تنظیم می‌کنند (Kobayashi *et al.*, 2019).

در پژوهش حاضر، با توجه به اینکه داده‌ها مربوط به نمونه‌برداری در ساعات‌های اولیه تنش نیتروژن صورت گرفته بود، آنالیز داده‌ها، ژن‌ها و مسیرهای متابولیکی و انتقال یون‌ها را نشان دادند. در مطالعه‌ی کائی و همکاران (Cai *et al.*, 2012)، به منظور بررسی رونوشت‌های برنج در پاسخ به کمبود نیتروژن، ۱۰/۸۸ درصد از کل ژنوم بیان ژن داشتند که بیشتر در مسیرهای متابولیک سلولی، متابولیک‌های اولیه و ثانویه و همچنین انتقال مولکولی نقش داشتند. بر اساس نتایج، در ساعات‌های اولیه تنش نیتروژن، ابتدا ژن‌های مرتبط با عوامل رونویسی، کینازها و مسیرهای انتقال سیگنال افزایش بیان داشته و با افزایش مدت زمان تنش، بیان ژن‌های مرتبط با فرآیندهای متابولیکی، مسیرهای فیزیولوژیکی مرتبط با تغییرات

² Nicotianamine aminotransferase

¹ Nicotianamine synthase

شرایط خاک بر در دسترس بودن و شکل عناصری که گیاهان می‌توانند جذب کنند تأثیر می‌گذارد. تنش کمبود نیتروژن، با تغییر جذب آهن، به طور غیرمستقیم بر فتوسنتز و سایر پارامترهای فیزیولوژیکی تأثیر می‌گذارد. در نتیجه، گیاهان مسیرهایی را برای اطمینان از پایداری سلولی برای واکنش‌های بیوشیمیایی فعال می‌کنند و فعالیت و بیان ژن‌های مربوط به انتقال یون‌های فلزی و الکترون را افزایش می‌دهند. بدیهی است درک نقش عناصر مختلف و مسیرهای بیوسنتزی مرتبط با آن‌ها در شرایط تنش، بینش ارزشمندی را در مورد فیزیولوژی گیاه و در نهایت کشف راهکارهای مولکولی برای مقابله با آن ارائه می‌دهد. همچنین ژن‌های کلیدی معرفی شده در این پژوهش نقش مهمی در پاسخ گیاه به تنش کمبود نیتروژن دارد و می‌تواند در تبیین استراتژی‌های به‌نژادی به‌عنوان نشانگرهای زیستی در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن در گیاه برنج مورد استفاده قرار گیرد.

REFERENCES

- Burgos, N., Sales, M., Song, J., Ren, Y., & de los Reyes, B. (2014). N-starvation and supplementation in weedy red rice. *BioStudies, E-GEOD-59438*. Retrieved from <https://www.ebi.ac.uk/biostudies/arrayexpress/studies/E-GEOD-59438>.
- Cai, H., Lu, Y., Xie, W., Zhu, T., & Lian, X. (2012). Transcriptome response to nitrogen starvation in rice. *Journal of Biosciences*, 37, 731-747. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9242-2>
- Cao, P., Jung, K. H., Choi, D., Hwang, D., Zhu, J., & Ronald, P. C. (2012). The rice oligonucleotide array database: an atlas of rice gene expression. *Rice*, 5, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-5-17>
- Chaturvedi, I. (2005). Effect of nitrogen fertilizers on growth, yield and quality of hybrid rice (*Oryza sativa*). *Journal of Central European Agriculture*, 6(4), 611-618. <https://hrcak.srce.hr/17330>
- Chen, X. P., Zhu, Y. G., Hong, M. N., Kappler, A., & Xu, Y. X. (2008). Effects of different forms of nitrogen fertilizers on arsenic uptake by rice plants. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(4), 881-887. <https://doi.org/10.1897/07-368.1>
- Curie, C., & Briat, J. F. (2003). Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 183-206. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.135018>
- Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2003). DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biology*, 4, 1-11. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-r60>
- Durrani, I. S., Jan, A., Shah, S., Iqbal, A., Ahmad, D., Khan, H., & Naqvi, S. M. S. (2020). Bioinformatics studies of OSGLP8-12 gene from *oryza sativa* (japonica) reveal its role in conferring resistance against disease and stresses. *Pakistan Journal of Botany*, 52(2), 461-467. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-2\(23](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-2(23)
- Ethan, S., Odunze, A. C., Abu, S. T., & Iwuafor, E. N. O. (2011). Effect of water management and nitrogen rates on iron concentration and yield in lowland rice. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(4), 622-629. [10.5251/abjna.2011.2.4.622.629](https://doi.org/10.5251/abjna.2011.2.4.622.629)
- Feng, H., Fan, X., Miller, A. J., & Xu, G. (2020). Plant nitrogen uptake and

در سازگاری به تنش نیتروژن، در جذب نیترات و سنتز ترهالوز نقش داشتند. آنالیز ترانسکریپتوم ریشه برنج تحت تنش کمبود نیتروژن توسط هشیه و همکاران (Hsieh et al., 2018) انجام شد. نتایج نشان داد که ژن‌های کلیدی دخیل در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن بیشتر در مسیرهای مرتبط با متابولیسم، انتقال سیگنال هورمون گیاهی، و پاسخ‌های اکسیداتیو درگیر هستند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

یافته‌های این پژوهش نشان داد که تنش کمبود نیتروژن، موجب تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با جذب و استفاده از عناصر کم مصرف مانند آهن می‌شود. این نتایج بیانگر این است که انتقال یون آهن نقش مهمی در حفظ ثبات برنج هنگام تنش کمبود نیتروژن ایفا می‌کند. همچنین تغییرات در

- assimilation: regulation of cellular pH homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 71(15), 4380-4392. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa150>
- Groen, S. C., Čalić, I., Joly-Lopez, Z., Platts, A. E., Choi, J. Y., Natividad, M., ... & Purugganan, M. D. (2020). The strength and pattern of natural selection on gene expression in rice. *Nature*, 578(7796), 572-576. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1997-2>
- Hsieh., P. H., Kan., C. C., Wu., H. U., Yang., H. C., & Hsieh M. H. (2018). Early molecular events associated with nitrogen deficiency in rice seedling roots.. *Scientific Reports*, 8(1), 12207-12207. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-30632-1>
- Hou, W., Yan, J., Jákli, B., Lu, J., Ren, T., Cong, R., & Li, X. (2018). Synergistic effects of nitrogen and potassium on quantitative limitations to photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(20), 5125-5132. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01135>
- Huang, X., Zhang, Y., Wang, L., Dong, X., Hu, W., Jiang, M., ... & Wu, Y. (2021). OsDOF11 affects nitrogen metabolism by sucrose transport signaling in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 12, 703034. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.703034>
- Imam, Y. (2017). Cereal Production. Shiraz, Shiraz University Press. (in Persian)
- Kobayashi, T., Nozoye, T., & Nishizawa, N. K. (2019). Iron transport and its regulation in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439>
- Li, Q., Lu, X., Wang, C., Shen, L., Dai, L., He, J., ... & Zeng, D. (2022). Genome-wide association study and transcriptome analysis reveal new QTL and candidate genes for nitrogen-deficiency tolerance in rice. *The Crop Journal*, 10(4), 942-951. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.12.006>
- Liang, T., Yuan, Z., Fu, L., Zhu, M., Luo, X., Xu, W., ... & Wu, X. (2021). Integrative transcriptomic and proteomic analysis reveals an alternative molecular network of glutamine synthetase 2 corresponding to nitrogen deficiency in rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7674. <https://doi.org/10.3390/ijms22147674>
- Nazish, T., Arshad, M., Jan, S. U., Javaid, A., Khan, M. H., Naeem, M. A., ... & Ali, M. (2021). Transporters and transcription factors gene families involved in improving nitrogen use efficiency (NUE) and assimilation in rice (*Oryza sativa* L.). *Transgenic Research*, 1-20. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00284-5>
- Sabouri, H. S. M. Hosseini. (2017). Rice. Gonbad Kavous. Gonbad Kavous University Press and Noruzi. (in Persian)
- Saito, R., Smoot, M. E., Ono, K., Ruschinski, J., Wang, P. L., Lotia, S., ... & Ideker, T. (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. *Nature Methods*, 9(11), 1069-1076. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2212>
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., ... & Lohmann, J. U. (2005). A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature Genetics*, 37(5), 501-506. <https://doi.org/10.1038/ng1543>
- Shao, C.-H., Qiu, C.-F., Qian, Y.-F., & Liu, G.-R. (2020). Nitrate deficiency decreased photosynthesis and oxidation-reduction processes, but increased cellular transport, lignin biosynthesis and flavonoid metabolism revealed by RNA-Seq in *Oryza sativa* leaves. *PLoS One*, 15(7), e0235975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235975>
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., ... & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216-W221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>
- Sun, J., Ye, M., Peng, S., & Li, Y. (2016). Nitrogen can improve the rapid response of photosynthesis to changing irradiance in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Scientific Reports*, 6(1), 31305. <https://doi.org/10.1038/srep31305>
- Sun, L., Di, D. W., Li, G., Li, Y., Kronzucker, H. J., & Shi, W. (2020). Transcriptome analysis of rice (*Oryza sativa* L.) in response to ammonium resupply reveals the involvement of phytohormone signaling

- and the transcription factor OsJAZ9 in reprogramming of nitrogen uptake and metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 246, 153137. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153137>
- Tabuchi, M., Abiko, T., & Yamaya, T. (2007). Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2319-2327. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm016>
- Tantray, A. Y., Bashir, S. S., & Ahmad, A. (2020). Low nitrogen stress regulates chlorophyll fluorescence in coordination with photosynthesis and Rubisco efficiency of rice. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 83-94. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00721-0>
- Ueda, Y., Ohtsuki, N., Kadota, K., Tezuka, A., Nagano, A. J., Kadowaki, T., ... & Yanagisawa, S. (2020). Gene regulatory network and its constituent transcription factors that control nitrogen-deficiency responses in rice. *New Phytologist*, 227(5), 1434-1452. <https://doi.org/10.1111/nph.16627>
- Varotto, C., Maiwald, D., Pesaresi, P., Jahns, P., Salamini, F., & Leister, D. (2002). The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 31(5), 589-599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01381.x>
- Wairich, A., de Oliveira, B. H. N., Arend, E. B., Duarte, G. L., Ponte, L. R., Sperotto, R. A., ... & Fett, J. P. (2019). The combined strategy for iron uptake is not exclusive to domesticated rice (*Oryza sativa*). *Scientific Reports*, 9(1), 16144. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52502-0>
- Wang, D., Xu, T., Yin, Z., Wu, W., Geng, H., Li, L., ... & Lian, X. (2020). Overexpression of *OsMYB305* in rice enhances the nitrogen uptake under low-nitrogen condition. *Frontiers in plant science*, 11, 369. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00369>
- Wang, F., Wang, Y., Ying, L., Lu, H., Liu, Y., Liu, Y., ... & Mao, C. (2023). Integrated transcriptomic analysis identifies coordinated responses to nitrogen and phosphate deficiency in rice. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1164441. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1164441>
- Wang, L., Xie, W., Chen, Y., Tang, W., Yang, J., Ye, R., ... & Zhang, Q. (2010). A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice. *The Plant Journal*, 61(5), 752-766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04100.x>
- Wang, Y., Wang, D., Tao, Z., Yang, Y., Gao, Z., Zhao, G., & Chang, X. (2021). Impacts of nitrogen deficiency on wheat (*Triticum aestivum* L.) grain during the medium filling stage: transcriptomic and metabolomic comparisons. *Frontiers in Plant Science*, 12, 674433. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.674433>
- Wang, Y., Zhang, P., Li, M., Guo, Z., Ullah, S., Rui, Y., & Lynch, I. (2020). Alleviation of nitrogen stress in rice (*Oryza sativa*) by ceria nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 7(10), 2930-2940. <https://doi.org/10.1039/D0EN00757A>
- Wen, B., Li, C., Fu, X., Li, D., Li, L., Chen, X., ... & Gao, D. (2019). Effects of nitrate deficiency on nitrate assimilation and chlorophyll synthesis of detached apple leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 363-371. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.007>
- Yang, S. Y., Hao, D. L., Song, Z. Z., Yang, G. Z., Wang, L., & Su, Y. H. (2015). RNA-Seq analysis of differentially expressed genes in rice under varied nitrogen supplies. *Gene*, 555(2), 305-317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.11.021>
- Yeger-Lotem, E., Sattath, S., Kashtan, N., Itzkovitz, S., Milo, R., Pinter, R. Y., ... & Margalit, H. (2004). Network motifs in integrated cellular networks of transcription-regulation and protein-protein interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), 5934-5939. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306752101>
- Zakari, S. A., Asad, M. A. U., Han, Z., Zhao, Q., & Cheng, F. (2020). Relationship of nitrogen deficiency-induced leaf senescence with ROS generation and ABA concentration in rice flag leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 1503-1517. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10128-x>

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 Bora¹, Gholam Ali Ranjbar², Seyed Hamid Reza Hashemipetroudi³(ORCID: 000000208701691), Ghorban Ali Nematzadeh², Hamid Reza Najafi Zarrini⁴

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

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*.



مقدمه

توسعه ابزارهای زیست‌فناوری امکانات جدیدی برای جهت تولید دامنه وسیعی از محصولات مختلف را فراهم آورده است. از جانداران مفید و مهم خاک می‌توان به سیانوباکترها اشاره نمود که امروزه در زیست‌فناوری میکروبی مطرح‌اند. سیانوباکترها، از لحاظ مورفولوژیک 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). بطوری‌که در حال حاضر بهره‌برداری از میکروارگانیسم‌های مفید به عنوان کود بیولوژیک به دلیل نقش بالقوه آن‌ها در فراهم آوردن مواد غذایی سالم و تولید پایدار محصولات زراعی و باغی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Sofa *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. میکروارگانیسم‌های مفید موجود در خاک، مواد معدنی را به کودهای زیستی و عناصر غذایی قابل استفاده برای گیاهان تبدیل کرده و تولید محصولات را افزایش می‌دهند

(Rai and Shukla, 2020). میکروارگانیسم‌هایی که بیشتر به عنوان کود زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از: تثبیت‌کننده‌های نیتروژن، ریزوباکتری‌های محرک رشد (PGPR) مانند آزوتوباکتر، آزوسپیریلوم و باکتری‌های حل‌کننده فسفر (PSB) نظیر باسیلوس و زئودوموناس، قارچ‌های *ecto* و *endo* mycorrhizal. سیانوباکتری‌ها و سایر موجودات مفید میکروسکوپی (Adhikari *et al.*, 2021).

امروزه تثبیت نیتروژن به روش همزیستی در غلات، برای پایه‌گذاری روش‌های نوین کشاورزی پایدار بسیار حایز 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 بی‌هوازی، آمونیوم شکل اصلی نیتروژن موجود در گیاهان است (Wang *et al.*, 2023). سیانوباکتری‌ها به دلیل توانایی همزیستی و امکان تعامل با گیاهان آوندی/غیر آوندی از یک سو و تولید مواد تقویت‌کننده رشد نظیر برخی از هورمون‌های گیاهی، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی از سوی دیگر شناخته شده‌اند (Yanti and Hamid, 2021). بررسی‌ها نشان می‌دهد سیانوباکتری‌ها یکی از عوامل مهم زیستی در بسیاری از خاک‌های کشاورزی خصوصاً در برنج بوده که با تشکیل کلونی‌هایی در ریشه در تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، محلول‌سازی فسفات و آزادسازی مواد معدنی برای بهبود حاصلخیزی خاک و بهره‌وری محصول مشارکت دارند (Yanti and Hamid, 2021). در کشور هند، بخش اعظمی از نیاز نیتروژن مزارع شالیزار با عملکرد سیانوباکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مانند *Nostoc*, *Anabaena* و *Aulosira Tolypothrix* تأمین می‌شود که افزایش ۳۰ درصدی بهره‌وری محصول را در پی دارد (Patel *et al.*, 2021). لازم بذکر است سیانوباکتری‌ها به دلیل ویژگی‌های امکان بقا در شرایط نوسان محیطی، قادرند در شرایط بسیار نامطلوب نوری، pH، دما و عدم دسترسی به مواد مغذی زنده بمانند (Kirrolia *et al.*,

فیلوژنتیک تقسیم نمود (LI *et al.*, 2009). اسماعیل‌زاده و همکاران در تحقیقی عنوان نموده‌اند که انتقال دهنده های آمونیوم (AMTs) ژن‌های کلیدی در جذب و انتقال نیتروژن می‌باشند (Esmaeilzadeh-Salestani *et al.*, 2023). نتایج چن و همکاران نشان داد که PGPRs می‌توانند جذب نیتروژن را از طریق تنظیم سیگنال‌دهی درون گیاه و مسیرهای انتقال نیتروژن تقویت نمایند (Chen *et al.*, 2024).

در این تحقیق نسبت به اندازه‌گیری برون‌ریزش مواد نیتروژنه و خوشه‌بندی 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 معرفی سویه‌های برتر و کاندید در مرحله جوانه‌زنی 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 طارم‌ها شمی و دو رقم پرمحصول 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 نیتروژنه و فیکوبیلی پروتئین‌ها، و همچنین مشخصات جغرافیایی و اسیدیته خاک متفاوت بودند، تهیه شد (Kabirnataj *et al.*, 2018). نمونه‌های سیانوباکتری در محیط کشت BG-110 با pH تقریبی ۷/۲ و در دمای ۲۷°C و شرایط نوری ۵ میکرومول بر متر مربع در ثانیه و ۱۴ ساعت روشنایی به مدت سه هفته کشت شدند (Kabirnataj *et al.*, 2019).

2012). بررسی منابع علمی نشان می‌دهد که با توجه به خصوصیت اکولوژیکی و میکروبی و زیستی هر منطقه، استفاده از ریز جانداران 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 تاثیر 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 (AMTs) یکی از ژن‌های کلیدی در تنظیم آمونیوم در گیاهان هستند (Yang *et al.*, 2023). پروتئین‌های AMT توسط یک خانواده چندژنی کدگذاری شده، که در جذب و انتقال آمونیوم نقش مهمی ایفا می‌کنند. با توجه به توالی و روابط فیلوژنتیک، پروتئین‌های AMT در سلول‌های گیاهی را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: AMT1 و AMT2 (Loqué and von Wirén, 2004). AMT1ها در 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* تنها شامل یک عضو (AtAMT2.1) بوده (Yuan *et al.*, 2007) در حالی که *AtAMT2* در بسیاری از گیاهان دیگر، از جمله برنج، را می‌توان به AMT2، AMT3، AMT4 و گروه‌های دیگر با توجه به کلاس‌های مختلف در تجزیه و تحلیل

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.

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

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

SHIMADZU صورت گرفته و در نهایت میزان مواد

نیتروزنه با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$\text{amo exc } \mu\text{g/ml} = (\text{OD}630 \text{ nm}^* \text{ رابطه ۱}) / \text{OD}630 \text{ nm standard}$$

$$\text{nitro exc } \mu\text{g/ml} = (\text{OD} 630^* 0/5) / \text{OD} \text{ رابطه ۲} / \text{OD} 630 \text{ nm standard}$$

آماده سازی بذر برنج و همکشتی و آزمون جوانه‌زنی بذر

در این تحقیق از سه رقم برنج 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 عفونی 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 پتری‌دیش‌های ۹ سانتی‌متری و در حضور سو سپانسیون سیانوباکتریایی 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 سو سپانسیون سلولی همگن شده از سویه‌های سیانوباکتری ۳۰ روزه (حداکثر فاز رویشی) به

اندازه‌گیری برون‌ریزش نیترات و آمونیوم

در این تحقیق اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن کل جدایه‌های سیانوباکتری به روش کجلدال صورت گرفت (Kabirnataj *et al.*, 2018). اندازه‌گیری میزان برون‌ریزش آمونیوم و نیترات با استفاده از روش فئات انجام پذیرفت، بدین صورت که تشکیل ترکیب آبی رنگ اندوفنول که در اثر واکنش آمونیاک، هیپوکلریت و فنول با نمک منگنز حاصل می‌شود نشان‌دهنده آزاد شدن آمونیاک است و مقدار آن به روش اسپکتوفتومتری 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 وایتکس اضافه شد. به منظور تهیه معرف فئات، 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 سو سپانسیون سلولی سویه‌ها، ۱۰ سی سی از نمونه هموزن 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 فئات اضافه شد. قرائت نمونه‌ها در دستگاه اسپکتوفتومتری مدل UV-1800

شناسایی موتیف‌ها و ساختار اگزون-اینترن موتیف‌های حفاظت‌شده در برنامه MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme/>) با پارامترهای پیش‌فرض (شامل انتخاب موتیف‌ها بدون توجه به دفعات تکرار، شناسایی حداکثر 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). هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی AMT با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام و درخت فیلوژنتیک آن‌ها بر اساس روش اتصال همسایه در MEGA 6.0 ترسیم شد (Tamura *et al.*, 2013). شناسایی ساختار ژنی با استفاده از برنامه GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) انجام گرفت (Hu *et al.*, 2014). ساختار دمین با استفاده از Expasy-Prosit شناسایی و ترسیم شد (Sigrist *et al.*, 2012).

آنالیز بیان ژن‌های انتقال دهنده‌های آمونوم با استفاده از داده‌های RNA-seq

به منظور شناسایی ژن‌های فعال انتقال دهنده آمونوم، از آنالیز الگو بیان ترانسکریپتوم برنج (داده‌های RNA-seq) مربوط به مراحل مختلف نمو (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 تعریف شد. در حالی که آنالیز تفاوت بیان ژن‌ها به صورت Log2FC در شرایط کمبود ازت و فسفر نسبت به شرایط کنترل با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (version 6.5.1) بررسی گردید (Workbench, 2019). بدین ترتیب که پس از تشکیل ماتریس بیان ژن که حاوی ژن‌ها و سطح بیان آن‌ها می‌باشد، بیان ژن‌های کاندید، مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت نتایج حاصله در نمودار Heatmap ترسیم شده

پتری‌دیش‌های 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 جوانه‌زده در نظر گرفته می‌شدند که طول ریشه‌چه آنها ۲ میلی‌متر یا بیشتر باشد. در روز چهاردهم تعداد گیاهچه‌های 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 داده‌ها از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ و اکسل استفاده شد.

شناسایی ژن‌های انتقال دهنده‌های آمونوم با استفاده از پروفایل HMM دامنه‌های انتقال دهنده‌های آمونوم (AMT)، شناسایی ژن‌های AMT در پایگاه داده Pfam (<http://pfam.xfam.org>) و با ابزار جستجوی HMMER3.0 با احتمال E^{-10} در ژنوم *O. sativa* انجام شد (Finn *et al.*, 2013). پروتئین‌های AMT شناسایی شده جهت بررسی بیشتر در برنامه SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/webcite>) پایگاه داده Ensembl (<http://plants.ensembl.org>) برای شناسایی توالی‌های DNA مربوطه و مکان‌های کروموزومی ژن‌ها استفاده شد (Bolser *et al.*, 2017).

پایش خصوصیات فیزیوشیمیایی پروتئین‌ها با استفاده از ابزار ProtParam در سایت Expasy خواص فیزیوشیمیایی پروتئین‌های AMT مانند تعداد اسید آمینه، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک (<https://web.expasy.org/protparam/>) محاسبه شد (Gasteiger *et al.*, 2005b). همچنین جایگاه سلولی پروتئین‌ها با استفاده از برنامه WoLFPSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) پیش‌بینی شد (Gasteiger *et al.*, 2005a) (Horton *et al.*, 2007b).

در رقم شماره ۳ (طارم) با بکارگیری سویه شماره ۸ و ۲، به ترتیب بیشترین و کمترین در صد جوانه‌زنی مشاهده شد. این موضوع بیانگر تنوع تاثیر 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 محرک رشد، افزایش شاخص‌های 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 ساقچه‌چه در جدول تجزیه واریانس معنی‌دار نشده و این بدین معنی است که در فاز جوانه‌زنی برای صفت طول ساقچه‌چه در ارقام و همچنین اثر متقابل سویه در ارقام معنی‌دار نبود. عبارت دیگر سویه‌های مختلف بکار گرفته شده در این تحقیق اثر یکسانی را بر روی صفت طولی شدن ساقچه‌چه 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 بیشترین و سویه شماره ۴ با ۱۱/۳۳ میلی‌متر کمترین طول ریشه‌چه را نشان داد. در رقم طارم نیز سویه‌های شماره ۶ و ۸ با ۲۶/۶۶ میلی‌متر بیشترین و سویه‌های شماره ۱ و ۴ با طول ۸ و ۸/۶۴ میلی‌متر کمترین طول ریشه‌چه را داشتند (شکل ۲-ت). در بررسی نسبت طول ریشه‌چه به ساقچه‌چه 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

توسط نرم‌افزار CIMminer ارائه شد (Scherf et al., 2000).

نتایج و بحث

بررسی اثر سویه‌های مختلف سیانوباکتری بر خصوصیات جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس (جدول شماره ۲) نشان داد که در بررسی خصوصیات جوانه‌زنی بذور، اثر ارقام و سیانوباکتری‌های مختلف و اثر متقابل رقم در سیانوباکتری 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 سیانوباکتری 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 (۳۳/۳۳ درصد) مشاهده شد که این موضوع بیانگر تاثیر متفاوت سویه‌های مختلف بر درصد جوانه‌زنی بوده به تحوی 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.

به ترتیب با نسبت ۰/۳۹۷ و ۱/۱۴۷ بیشترین و کمترین مقدار را داشتند (شکل ۲ - ث).



شکل ۱. مراحل خلص‌سازی اولیه سیانوباکتری در بانک میکروبی پژوهشکده ژنتیک 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 سیانو باکتری در ارقام برنج.

Table 2. Analysis of variance Cyanobacteria in rice cultivars.

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

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

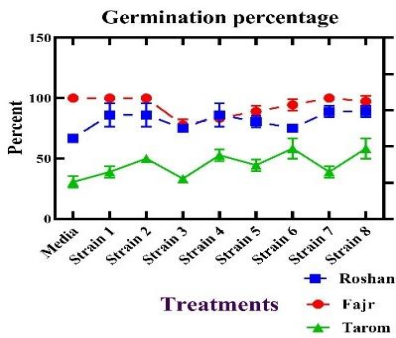
** : احتمال معنی داری در سطح ۱ درصد و ns : عدم معنی‌داری.

تیمار شاهد که برابر ۰/۰۱۳ میلی‌گرم بوده است نشان دادند. در رقم روشن نیز بیشترین و کمترین بیوماس به ترتیب در همکشتی با سویه شماره ۱ و کمتر از مقدار تیمار شاهد خود برابر با ۰/۰۱۳ میلی‌گرم و کمترین وزن خشک مربوط به همکشتی با سویه شماره ۷ به مقدار ۰/۰۰۵ میلی‌گرم محاسبه شد. در رقم طارم نیز در همکشتی با

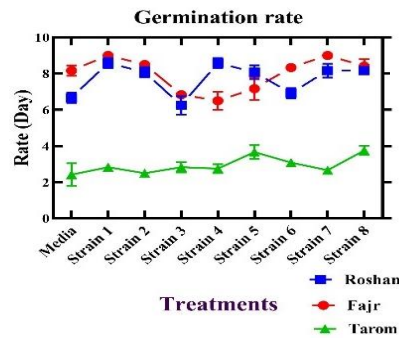
در برر سی اثر سویه‌ها بر صفت بیوماس ارقام، وزن تر و وزن خشک تیمارها نیز محاسبه شد و مطابق جدول تجزیه واریانس در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌داری بوده که در رقم فجر با همکشتی با سویه شماره ۶ به وزن ۰/۰۲۴ میلی‌گرم بیشترین و سویه شماره ۲ و ۵ با ۰/۰۰۷ میلی‌گرم کمترین وزن خشک را در مقایسه با

شاهد خود با وزن ۰/۰۰۶ میلی‌گرم محاسبه شد (شکل ۲-ج).

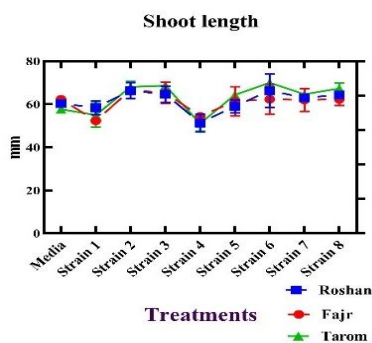
سویه شماره ۵ با ۰/۰۲۶ میلی‌گرم بیشترین وزن خشک و سویه شماره ۷ و ۲ کمترین وزن خشک را در مقابل تیمار



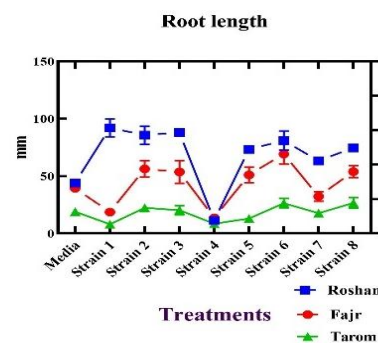
الف



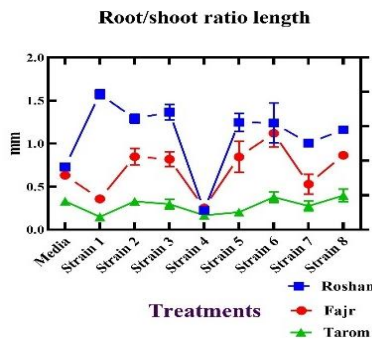
ب



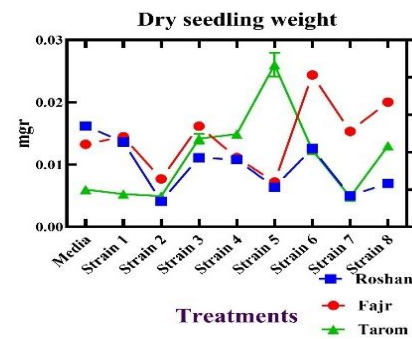
پ



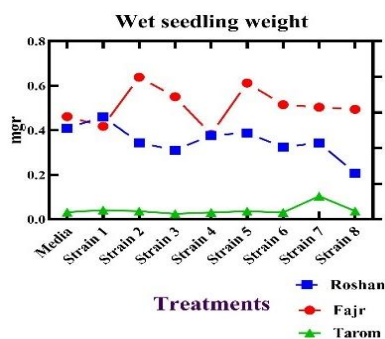
ت



ث



ج



ح

شکل ۲. اندازه‌گیری پارامترهای جوانه‌زنی الف: درصد جوانه‌زنی، ب: سرعت جوانه‌زنی پ: طول ساقه‌چه ت: طول ریشه‌چه ث: نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه، ج: وزن خشک چ: 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

وزن تر تک بوته Fresh weight of single plant	وزن خشک تک بوته Dry weight of a single plant	نسبت طول ریشه به ساقه Root to stem length ratio	طول ریشه root length	سرعت جوانه‌زنی Germination speed	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	سویه strain
0.46g ^(D)	0.013hij ^(F)	0.63gh ^(C)	39.33ij ^(C)	8.16b ^(B)	100.0a ^(A)	کنترل
0.41h ^(H)	0.014efg ^(E)	0.35jkl ^(DE)	18.66mp ^(D)	9a ^(A)	100.0a ^(A)	سویه ۱
0.63a ^(A)	0.007m ^(H)	0.84f ^(B)	56.33fg ^(B)	8.5ab ^(A)	100.0a ^(A)	سویه ۲
0.55c ^(C)	0.016d ^(C)	0.81f ^(B)	53.66g ^(B)	6.8cd ^(CD)	77.77ef ^(E)	سویه ۳
0.38jk ^(I)	0.011l ^(G)	0.25k-o ^(E)	13.60pq ^(D)	6.5de ^(D)	83.33cde ^(D)	سویه ۴
0.61b ^(B)	0.0072mn ^(H)	0.84f ^(B)	51.00gh ^(B)	7.2c ^(C)	88.89bc ^(C)	سویه ۵
0.51d ^(D)	0.024b ^(A)	1.11de ^(A)	69.33de ^(A)	8.33b ^(C)	94.44ab ^(B)	سویه ۶
0.50e ^(E)	0.015de ^(D)	0.52hi ^(DC)	32.33jk ^(C)	9a ^(A)	100.00a ^(A)	سویه ۷
0.49f ^(F)	0.020c ^(B)	0.86f ^(B)	53.86g ^(B)	8.41b ^(B)	97.22a ^(AB)	سویه ۸
0.408i ^(B)	0.016d ^(A)	0.72Fg ^(E)	44.00hif ^(E)	6.66cde ^(BC)	66.67g ^(C)	کنترل
0.460g ^(A)	0.013ghi ^(B)	1.57a ^(A)	92.00a ^(A)	8.58ab ^(A)	86.11cd ^(A)	سویه ۱
0.344i ^(E)	0.004r ^(G)	1.28bc ^(BC)	85.66ab ^(AB)	8.08b ^(A)	86.11cd ^(A)	سویه ۲
0.310n ^(G)	0.011l ^(D)	1.36b ^(B)	88.00ab ^(AB)	6.25e ^(C)	75.00f ^(BC)	سویه ۳
0.377k ^(D)	0.010l ^(D)	0.22i-o ^(F)	11.33pq ^(F)	8.58ab ^(A)	86.11cd ^(A)	سویه ۴
0.387j ^(C)	0.006no ^(E)	1.24bcd ^(BC)	73.33cd ^(C)	8.08b ^(A)	80.55def ^(AB)	سویه ۵
0.323m ^(F)	0.012jk ^(E)	1.23bcd ^(BC)	81.00Bcb ^(C)	6.91cd ^(B)	75.00f ^(BC)	سویه ۶
0.343l ^(E)	0.005qr ^(F)	1.00e ^(D)	63.33ef ^(D)	8.16b ^(A)	88.89bc ^(A)	سویه ۷
0.207o ^(H)	0.007mn ^(E)	1.16cd ^(CD)	74.66cd ^(C)	8.16b ^(A)	88.89bc ^(A)	سویه ۸
0.0322rs ^(D)	0.0060op ^(E)	0.329j-m ^(ABC)	19.00l-p ^(B)	2.41h ^(C)	30.55m ^(D)	کنترل
0.0414q ^(B)	0.0052pq ^(E)	0.147o ^(E)	8.00q ^(D)	2.83gh ^(BC)	38.89kl ^(CD)	سویه ۱
0.0365qrs ^(C)	0.0049qr ^(E)	0.328j-m ^(ABC)	22.33lmn ^(AB)	2.5h ^(C)	50.00ij ^(AB)	سویه ۲
0.0249t ^(F)	0.0141fgh ^(BC)	0.29j-n ^(BC)	20.33l-o ^(B)	2.83gh ^(BC)	33.33ml ^(D)	سویه ۳
0.0309st ^(DE)	0.0149ef ^(B)	0.166no ^(E)	8.46q ^(D)	2.75gh ^(BC)	52.77hi ^(AB)	سویه ۴
0.0365qrs ^(C)	0.0260a ^(A)	0.202mno ^(DE)	13.00opq ^(CD)	3.66f ^(A)	44.44jk ^(BC)	سویه ۵
0.0306st ^(E)	0.0123k ^(D)	0.376jk ^(AB)	26.33klm ^(A)	3.08g ^(B)	58.33h ^(A)	سویه ۶
0.1038p9 ^(A)	0.0048qr ^(E)	0.273j-o ^(CD)	17.66nop ^(BC)	2.66gh ^(BC)	38.89kl ^(CD)	سویه ۷
0.0373qr ^(C)	0.0130ijk ^(CD)	0.397ij ^(A)	26.66kl ^(A)	3.75f ^(A)	58.33h ^(A)	سویه ۸

رقم ۱: فجر رقم ۲: روشن رقم ۳: طارم هاشمی *حروف کوچک: مقایسه میانگین اثر متقابل قبل از برش‌دهی *حروف بزرگ (توانی): مقایسه میانگین سویه‌های مختلف سیانوباکتر پس از برش‌دهی 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.

تحریک رشد گیاه و افزایش عملکرد گیاه شده است (Kiliai *et al.*, 2018). بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول شماره ۳) تأثیر سیانوباکتری‌های محرک رشد در سطح احتمال یک درصد بر وزن خشک ریشه معنی‌دار 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، ۷ و ۸ بیشترین درصد جوانه‌زنی و برابر تیمار شاهد و کمترین آن در رقم طارم با سویه های ۱ و ۷ در بین ارقام برنج ثبت

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 ۰/۴۶۰ 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 - چ). در تحقیقی بر روی دو سویه باکتری حل‌کننده فسفات گزارش شد، اگر چه سویه ۱۶۸ دارای اثر آنتاگونیستی بوده، ولی تلقیح بذرها با هر یک از آنها به دلیل ترشح متابولیت‌های ثانویه سبب

(گیلان، مازنداران 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). بررسی میزان برون‌ریزش نیترات در ۸ سویه مورد بررسی در شکل ۳-پ موید 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 موید 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 ۰/۰۳ 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 موید 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. خوشه‌بندی و مقایسه سویه‌های مدنظر (شکل ۴) بر مبنای صفات و پارامترهای ازتی اندازه‌گیری 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 از ته و کارکردی در گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفته‌اند. همچنین در بین تعدادی از سویه‌های مختلف باکتری، اثر معنی‌داری منفی بر صفات‌های مورد ارزیابی داشت. همچنین در تحقیقی میزان برون‌ریزش آمونیوم در ۴۲/۱۰ درصد از سویه‌ها در دامنه ۰/۰۲ تا ۰/۰۴، در ۵/۲۶ درصد در دامنه ۰/۰۴ تا ۰/۰۸، در ۵/۲۶ 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 (Kiliai *et al.*,

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 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 همکشتی 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. بنظر می‌رسد 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 بزرگی 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 بیولوژیکی نیتروژن وجود دارد که عمدتاً شامل بکارگیری نیتروژن نشاندار، سنجش احیا استیلن و روش اختلاف نیتروژن می‌باشد. در این تحقیق میزان تثبیت نیتروژن کل تعدادی از جدایه سیانوباکتری به روش کجلدال مورد آزمایش قرار گرفت (Kiliai *et al.*, 2018). جدایه‌های خالص‌شده مربوط به راسته‌های *Stigonematales*، *Nostocales* و *Rivulariaceae* بوده است. خانواده *Nostocaceae* یکی از متنوع‌ترین خانواده‌های سیانوباکتری دارای هتروسیست در شالیزارهای شمال کشور می‌باشد که پراکنش گسترده‌ای در خاک‌های شالیزاری سه استان شمالی

پایش ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پروتئین‌ها در

خانواده ژنی *OsAMT*

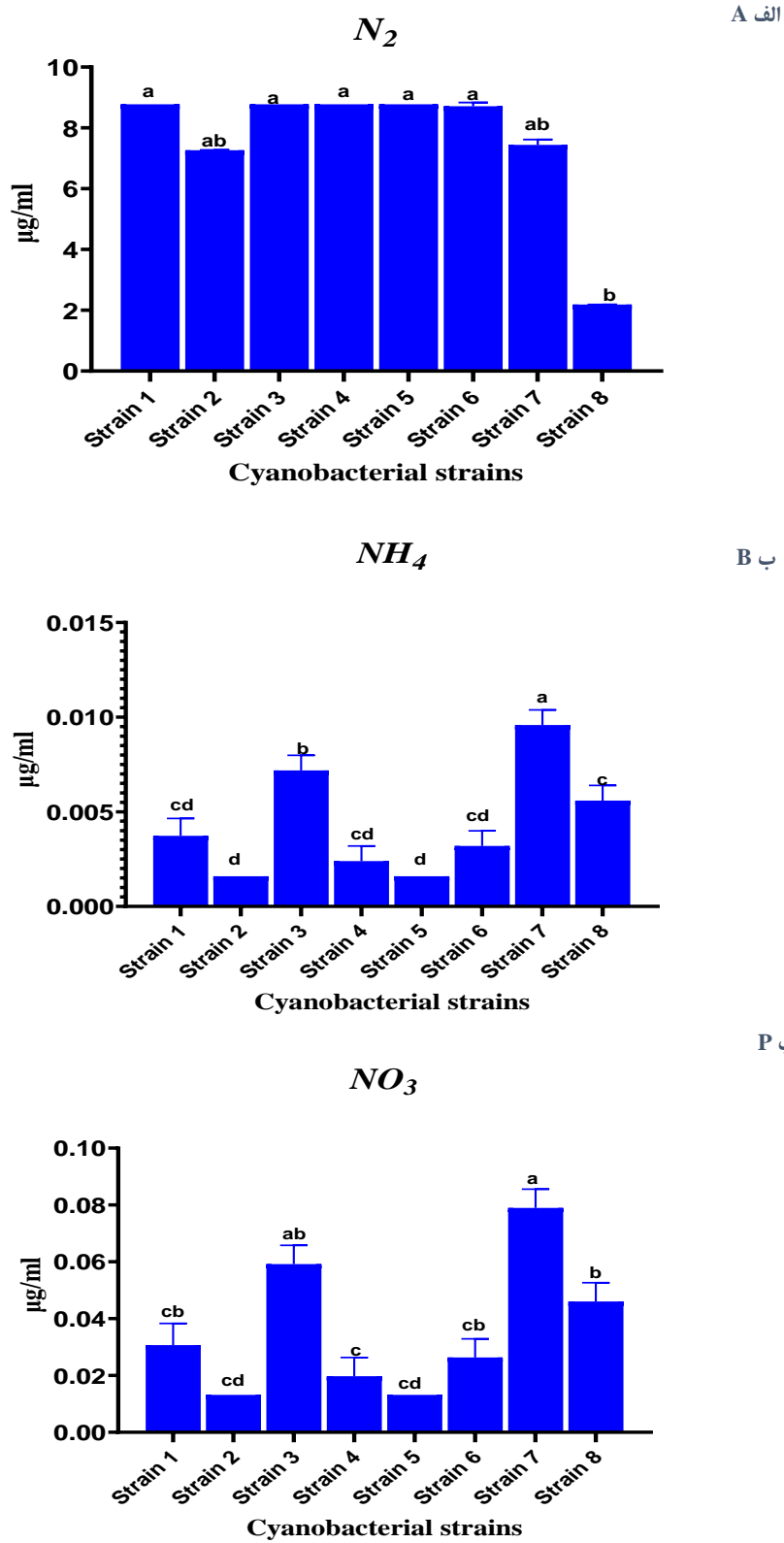
در این تحقیق، ۱۵ ژن *OsAMT* که متعلق به ۱۲ مکان ژنی بودند در ژنوم برنج شنا سایی شد. پایش ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پروتئین‌ها می‌تواند در تعیین فرایندهای بیولوژیکی، کارکرد مولکولی و مکان‌نمایی^۱ آن‌ها در سلول تأثیرگذار باشد. همان‌طور که در جدول شماره ۴ دیده می‌شود ارزیابی ویژگی‌های فیزیوشیمیایی در پروتئین‌های خانواده ژنی *OsAMT* به آشکار سازی وزن مولکولی متغیر در محدوده^۲ ۳۳/۱ الی ۵۳/۷ کیلو دالتون، محدوده^۳ pH ایزوالکتریک از ۶/۰۶ الی ۸/۶۳ و شاخص آلیفاتیک ۷۶ تا ۱۰۵ منجر شد. پروتئین خانواده‌های ژنی *OsAMT3:1* و *OsAMT3-1-like 1* و *OsAMT3-1-like 2* دارای ۴۹۸ اسید آمینه 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 آلیفاتیک به ترتیب به *OsAMT2:1* و *OsAMT3:4* تعلق داشت (جدول ۴).

(2018). یافته‌های این تحقیق نشان داد که سویه‌های مختلف سیانوباکتری‌های تلقیح شده در ارقام مختلف شرایط رشدی متفاوتی را ایجاد می‌کند و حتی در بعضی از موارد می‌تواند سو به 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 در شرایط نوری قابل دسترس، گونه‌های مختلف از سیانوباکتری‌ها تنوع بالایی از برون ریزش ازت را در جهت بهینه‌سازی توانایی دریافت نور برای فتوسنتز بکار می‌گیرند. در مطالعه‌ای عنوان شد که ریزوباکترهای محرک رشد گیاه (PGPRs) می‌توانند کارایی مصرف نیتروژن گیاهی را از طریق تثبیت نیتروژن و کانی‌سازی نیتروژن آلی افزایش دهند. بعنوان مثال بکارگیری سویه SQR9 VCs ضمن افزایش تجمع نیتروژن در برنج و آراییدوپسیس، موجب افزایش جذب نترات و آمونیوم نیز گردید (Chen *et al.*, 2024).

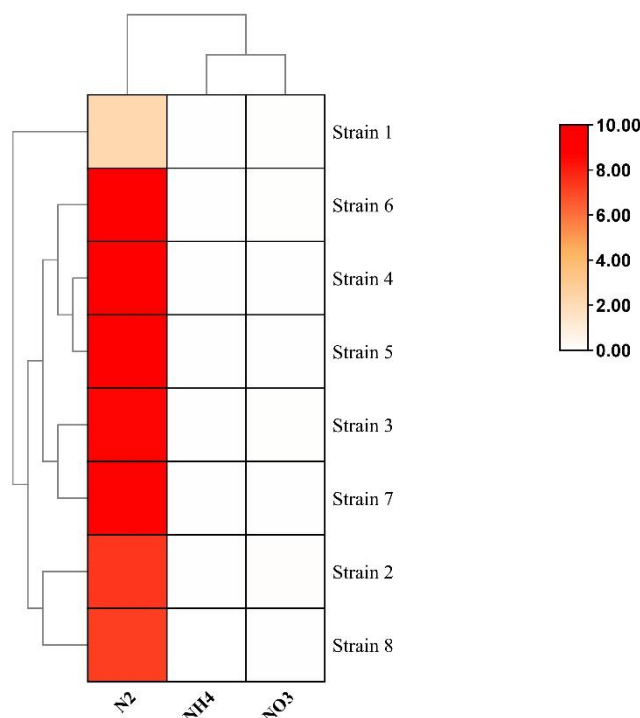
جدول ۴. ویژگی‌های فیزیوشیمیایی خانواده ژنی *OsAMT*.Table 4. Physicochemical characteristics of *OsAMT* gene family.

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

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 نیتروژنه.

Figure 4. Dendrogram of cyanobacteria based on nitrogen parameters.

اینترن و ۲۶/۶ درصد دارای ۲ اینترن و حدود ۱۳/۴ درصد ژن‌ها دارای ۳ اینترن، و حدود ۲۰ درصد ژن‌ها دارای ۷ و ۹ اینترن هستند. ژن‌های *OsAMT 3;1-1*، *OsAMT 1;3*، *OsAMT 3;1-like3* و *dlike 4* *OsAMT 1;1* و *OsAMT 1;2* دارای یک اگزون و ژن‌های *OsAMT 3;4* دارای ۹ اگزون می‌باشند. ژن‌های *OsAMT 3;1-1*، *OsAMT 1;3*، *OsAMT 3;1-1 like 4* و *OsAMT 1;1 dlike3* بدون اینترن بوده و ژن‌های *OsAMT 4;1* دارای یک اینترن و ژن‌های *OsAMT 2;1*، *OsAMT 2;2*، *OsAMT 3;2*، *OsAMT 2;3* دارای ۲ اینترن و ژن‌های *OsAMT 3;3* و *OsAMT 3;1-like 2* دارای ۳ اینترن و ژن‌های *OsAMT 3;1-like 1* دارای ۷ اینترن و ژن‌های *OsAMT 3;4* دارای ۹ اینترن می‌باشند. موتیف شماره یک در همه پروتئین‌ها بجز *OsAMT 3;4* و موتیف شماره ۵ در همه پروتئین‌ها بجز *OsAMT 4;1* و موتیف شماره ۱۲ فقط در پروتئین‌های *OsAMT 3;1-like3*، *OsAMT 3;1* و *OsAMT 3;1-like2* مشاهده شد و

شاخص آلفاتیک در واقع حجم نسبی زنجیره آلفاتیک یعنی آمینو اسیدهای آلانین، لو سین و گلین 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.

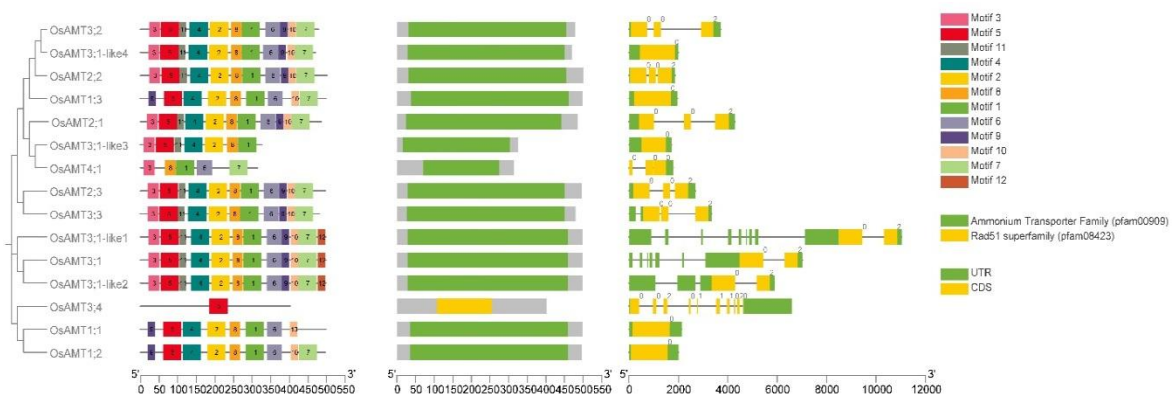
شناسایی ساختار ژنی و روابط فیلوژنتیکی

بر مبنای ترسیم درخت فیلوژنتیکی 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 فاقد اینترن یا دارای یک اینترن می‌باشند در گروه اول قرار گرفتند. در حالی که همه *OsAMT*‌هایی که دارای بیش از سه اینترن بودند در گروه دوم جا گرفتند (شکل ۵). بررسی ساختار اگزون-اینترونی خانواده ژنی *OsAMT* نشان می‌دهد که ۴۰ درصد ژن‌های *OsAMT* برنج بدون اینترن یا دارای یک

شده‌اند. در میان زیرخانواده‌های AMT برنج، اعضای *OsAMT1* به‌عنوان انتقال‌دهنده HATS شناخته شده‌اند، در حالی که سایر زیرخانواده‌ها فقط حاوی ناقل‌های LATS هستند (Sonoda *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2017). *OsAMT1.1* و *AtAMT1.1* از توانایی جذب آمونیوم برخوردار بوده بطوریکه با حذف ژن *OsAMT1.1* ظرفیت جذب آمونیوم برنج کاهش حدوداً ۲۵ تا ۳۰ درصدی مشاهده شد. این ژن عمدتاً در ریشه، دسته‌های آوندی ریشه و اندام هوایی و سلول‌های مزوفیل برگ بیان می‌شود. حذف ژن *OsAMT1.1* منجر به توزیع بیشتر نیتروژن در ریشه در شرایط کمبود آمونیوم شده که نشان‌دهنده نقش *OsAMT1.1* در انتقال آمونیوم ریشه به ساقه می‌باشد (Li *et al.*, 2016). بررسی‌های اخیر نشان داده است که حذف *OsAMT1.1*، *OsAMT1.2* و *OsAMT1.3* منجر به 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 (NH_4^+) هستند (Konishi and Ma, 2021). بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد در برنج دست‌کم ۱۲ ژن *AMT* شناسایی شده که به چهار زیر خانواده *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 *OsAMT 3;4* فقط از موتیف شماره ۵ و دمین پروتئینی Rad51 SuperFamily و فاقد دمین پروتئینی انتقال‌دهنده آمونیوم بوده و مابقی ژن‌ها دارای دمین پروتئینی انتقال‌دهنده آمونیوم با طول متفاوت تشکیل شده‌اند. بنظر می‌رسد پروتئین‌هایی که از ترکیب موتیف مشابهی برخوردارند احتمالاً عملکردهای 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 نشان‌دهنده عملکردهای ویژه این پروتئین‌ها می‌باشد (Heidari *et al.*, 2019). بررسی تکاملی پروتئین‌های AMT نشان داد که هر سه خوشه شناسایی شده از الگوهای موتیف مشابه و دمین‌های خاص در هر گروه برخوردارند به عنوان مثال، بیشتر پروتئین‌های خوشه‌بندی شده در گروه یک دارای انتقال‌دهنده آمونیوم و موتیف ۱، ۳، ۶، ۷، ۸ و ۱۱ در ساختار خود بودند، در حالی که ژن *OsAMT 3;4* دارای Rad51 SuperFamily و یک موتیف شماره ۵ است.

اگرچه ساختار آگزون/اینترون در زیر خانواده‌های *OsAMT* محافظت شده می‌باشد، ولی با این وجود تفاوت در موقعیت و تعداد اینترون‌ها در زیرخانواده‌ها مشاهده شد. تفاوت در تعداد آگزون‌ها/اینترون‌ها بین گروه‌های خانواده *OsAMT* ممکن است مربوط به تنظیمات ژنی متفاوتی باشد که هر یک از این زیرگروه‌ها در طول تکامل متحمل

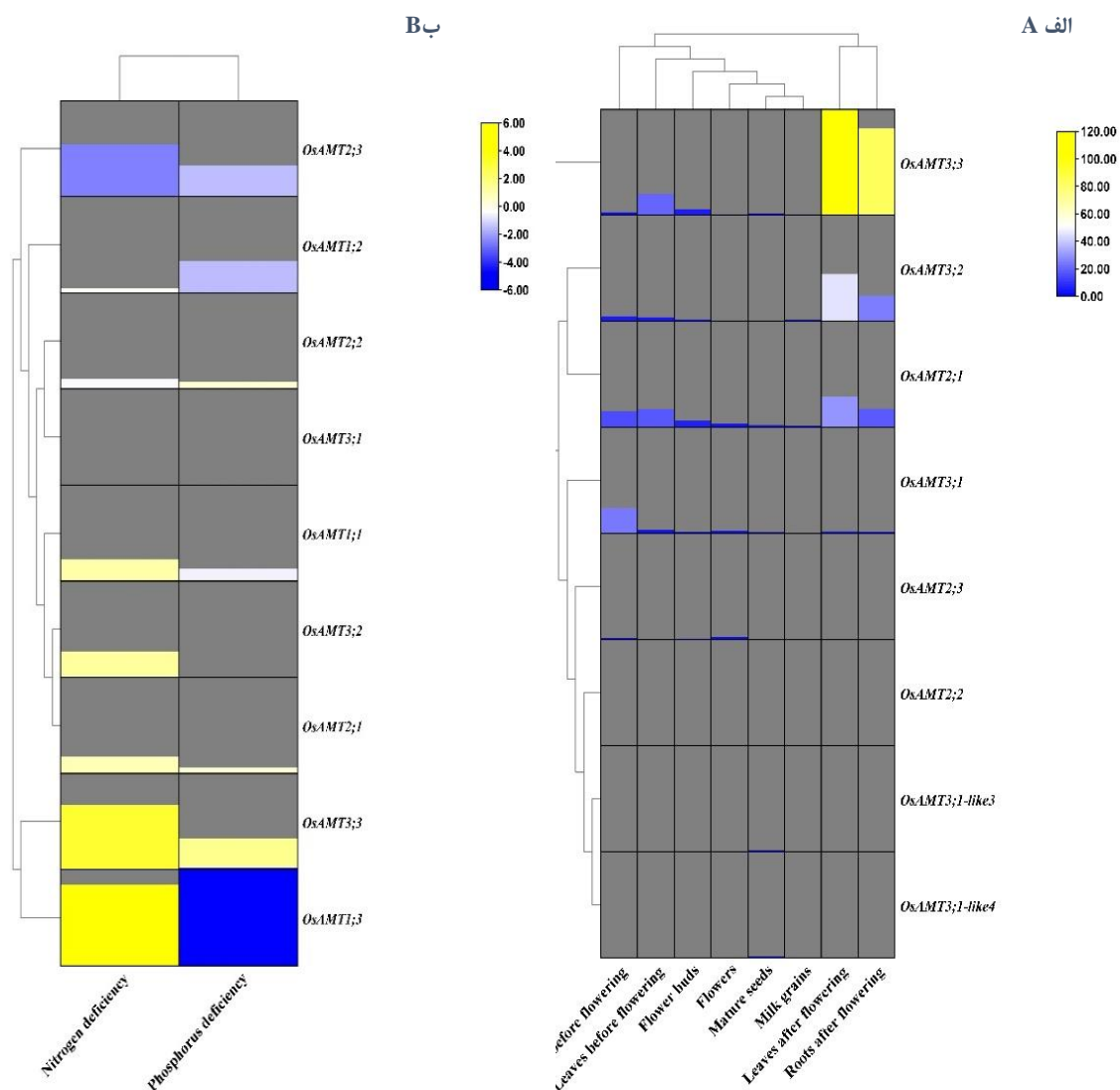


شکل ۵. آنالیز ساختار ژنی و درخت فیلوژنتیکی اعضای خانواده *OsAMT*. خانه‌های رنگی مختلف نشان‌دهنده وجود موتیف‌های مختلف و موقعیت آنها در هر پروتئین می‌باشد. نواحی سبز نشان‌دهنده آگزون‌ها بوده در حالی که خطوط سیاه نشان‌دهنده جایگاه اینترون‌ها است.

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.

با این حال، تا به امروز، شناسایی کامل سیستماتیک و تجزیه و تحلیل بیان اعضای خانواده ژن *OsAMT* برای برنج گزارش نشده که در این مطالعه، 15 ژن *OsAMT* مورد شناسایی و مطالعه قرار گرفتند. تنش‌های محیطی و فشارهای انتخابی، تکامل مکانیسم‌های پیچیده در گیاهان را برای مقابله با تنش‌ها تسریع 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).

بنظر می‌رسد که خانواده *AMT* نتیجه تکرار ژن بوده که الگوی بیان آن ژن‌ها تحت تیمار تنش 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 تنش‌های 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., 2009).



شکل ۶. پروفایل بیان ترانسکریپتوم (*RNA-seq*) اعضای خانواده ژنی *OsAMT* در مراحل مختلف نمو (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.

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 گزینه جهت شناسایی مکانیسم‌های دخیل در تنظیم بیان انتقال‌دهنده‌های آمونیوم می‌باشند. 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 بیوماس و وزن گیاه، رشد طولی و محتوای آبی گیاه می‌باشند و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی در شرایط گلخانه‌ای و در حضور سویه‌های تثبیت‌کننده نیتروژن افزایش یافته است. نتایج نشان می‌دهد که همزیستی برنج با سویه‌های *Aliinostoc sp* و *Desmonostoc Aliinostoc 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) بیشترین درصد جوانه‌زنی را داشته است. در رقم روشن سویه‌های *Aliinostoc sp* و *Desmonostoc 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 صفت طول ریشه

آنالیز بیان ژن‌های انتقال‌دهنده‌های آمونیوم

تجزیه و تحلیل پرو فایل 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 انتقال‌دهنده‌های 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 نمو (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 پلتفرم RNA-seq دارای الگوی بیان بودند. در بررسی پرو فایل بیان در مراحل مختلف نمو، میزان بیان (*RPKM*) برای ۴ ژن *OsAMT2;2*، *OsAMT3;1-like3*، *OsAMT3;1* و *OsAMT3;1-like4* اندک بوده در حالی که برای چهار ژن دیگر یعنی *OsAMT2;1*، *OsAMT3;2*، *OsAMT3;3* و *OsAMT3;2* 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 بعبارت دیگر میزان بیان پس از گلدهی برای سه ژن *OsAMT2;1*، *OsAMT3;2* و *OsAMT3;3* بسیار بیشتر از میزان بیان قبل از گلدهی بود. این حالت برای ژن *OsAMT2;1* برعکس بوده و میزان بیان قبل از گلدهی بسیار بیشتر از بیان بعد از زمان گلدهی بود. لازم بذکر است میزان بیان در بافت‌های دیگر مورد بررسی گرفته شده نیز نسبت به دو بافت ریشه و برگ تقریباً محسوس نبود. در بررسی پرو فایل بیان در شرایط کمبود ازت/فسفر نیز بیشترین میزان تغییر بیان نسبت به کنترل، در سه ژن *OsAMT2;1*، *OsAMT3;2* و *OsAMT3;3* به همراه دو

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 فیزیکی شیمیایی و روابط فیلوژنتیکی 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 همکشتی با سیانوباکترها خصوصاً پاسخ‌های مرتبط با جذب نیتروژن فراهم آورد. مطالعات تکمیلی خصوصاً در مراحل مختلف رشد و نمو به منظور بررسی بیان ژن‌های منتخب خانواده ژنی انتقال‌دهنده آمونیوم به روش RT-qPCR می‌تواند در درک مکانیسم تنظیمات بیان ژن‌های مرتبط با انتقال/جذب آمونیوم در گیاه برنج مفید باشد.

در رقم فجر سویه شماره ۶ *Desmonostoc Persicum* با ۶۹/۳۳ میلی‌متر بیشترین طول ریشه‌چه را داشته و در رقم روشن نیز سویه *Aliinostoc sp* با ۹۲ میلی‌متر بیشترین طول و در رقم طارم نیز سویه *Desmonostoc Persicum* با ۲۶/۶۶ میلی‌متر بیشترین طول ریشه‌چه را ایجاد نمودند. مقایسه سویه‌های مختلف درون یک جنس نظیر جنس *Desmonostoc* و یا *Aliinostoc* 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 می‌تواند نقش بسزایی در افزایش ریشه‌دهی داشته باشد ضمن اینکه پاسخ متفاوت هر رقم به سویه‌های مختلف، مزیت بکارگیری سویه‌های اختصاصی برای هر رقم به منظور افزایش کارایی گیاه در جذب مواد نیتروژنه و

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.
- 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*, eae125.
- 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.
- Esmailzadeh-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.
- 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., Ahmadzadeh, 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-Mashadrizheh, 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.
- Kiliai, 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 NH₄⁺ 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., Ohyama, 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 lncRNAs 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 solanaceae* 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.

Gene and regulatory network modeling of transcriptomic patterns in defense priming of rapeseed against *Sclerotinia sclerotiorum* infection

Hengameh Taheri¹ (ORCID: 0000000205918019), Mohamad Hamed Ghodoum Parizipour²

1. Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

Correspondence:

Hengameh Taheri

Email: Taheri@asnrkh.ac.ir

Received: 15, Jul. 2024

Accepted: 30, Sep. 2024

How to cite:

Taher, H., & Ghodoum Parizipour, M. H. (2024). Gene and regulatory network modeling of transcriptomic patterns in defense priming of rapeseed against *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Crop Biotechnology*, 14 (1), 67-86. (DOI: 10.30473/cb.2024.71791.1973)

ABSTRACT

Sclerotinia stem rot (SSR), caused by the soil-borne fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, adversely impacts seed quality in rapeseed (*Brassica napus*) causing a 10-20% reduction in crop yield. The biological control agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 can protect rapeseed from the deleterious effects of the hemibiotrophic fungus *S. sclerotiorum* by inducing systemic resistance. However, little is known about the molecular mechanisms underlying defense priming and its regulatory processes. In this study, we aimed to identify the protein-protein interaction (PPI) networks, with a particular focus on potential hub genes, gene ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), and regulatory network analysis including hub genes promoter analysis and miRNA prediction in canola plants pre-treated by PA23 in the presence of *S. sclerotiorum* using transcriptome data. Using the computational algorithms of the CytoHubba plugin in the Cytoscape platform, nodes with the highest interactions within the gene network were identified as hub genes, which are mainly involved in the maintenance and retrieval of metabolic pathways and photosynthetic activities, controlling cellular oxidation/reduction (redox) status, biosynthesis of aromatic amino acids and plant hormones, activation of MAPK-mediated defense signals, regulation of sulfur assimilation and cysteine biosynthesis. Using clustering analysis based on the IPCA algorithm in the Cytocluster plugin, functional modules effective in defense priming against SSR infection were identified. These modules were primarily involved in the biosynthesis of aromatic amino acids and the production of defensive metabolites in the shikimate pathway. The promoter analysis of 5'UTR region of hub genes identified various cis-regulatory elements (CREs), such as auxin signaling-responsive motifs involved in regulating defense responses against *S. sclerotiorum* infection. Prediction of miRNAs targeting hub genes, using the web-based psRNATarget program, revealed that miRNAs belonging to the families miR172, miR395, miR6028, miR6029, miR6032, miR6035, miR166, miR156, miR396 and miR824 play key roles as regulatory elements in the gene expression network of hub genes. These findings can aid in establishing biological control systems for plant disease management and protection of agricultural systems, as well as in advancing the fundamental mechanisms for developing disease-tolerant varieties.

KEY WORDS

Biological control, canola, differentially expressed genes, microRNAs, protein interaction networks, RNA sequencing, Sclerotinia stem rot.



مقدمه

کلزا، *Brassica napus*، به عنوان سومین گیاه روغنی، ۱۳ درصد از تولید روغن گیاهی جهان را به خود اختصاص داده است (Hajduch et al., 2006). کانادا، چین و هند از تولیدکنندگان اصلی این دانه روغنی هستند (FAO, 2022). این محصول زراعی علاوه بر پتانسیل عملکرد بالا، درصد روغن دانه بالاتری (۴۰ تا ۴۵ درصد) در مقایسه با سایر دانه‌های روغنی دارد. ارزش غذایی این محصول و سازگاری به شرایط آب و هوایی مختلف سبب شده است که افزایش سطح زیرکشت این محصول در ایران به عنوان محور برنامه‌های افزایش تولید دانه‌های روغنی مورد توجه قرار گیرد (Zomorodian et al., 2011). با این حال، با وجود تلاش‌ها برای اصلاح ارقام مقاوم، این گیاه همچنان به طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا حساس است. یکی از مخرب‌ترین عوامل بیماری‌زای کلزا، قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary می‌باشد که به عنوان عامل پوسیدگی ساقه اسکروتینیا (SSR)، علاوه بر کاهش عملکرد محصول، کمیت و کیفیت روغن آن را بطور چشمگیری تحت تاثیر قرار می‌دهد (Aggarwal et al., 1997; Saharan and Mehta, 2008). از اصطلاحات متفاوتی نظیر کپک سفید، پوسیدگی پنبه‌ای، پوسیدگی ساقه و پوسیدگی طوقه برای بیان بیماری ناشی از این بیمارگر قارچی استفاده شده است (Jahan et al., 2022) که از این میان، کپک سفید متداول‌تر است. دامنه میزبانی خاصی برای این بیمارگر تعریف نشده است و قادر است بیش از صد گونه گیاهی تک‌لپه و دولپه را آلوده کند. از عوامل موثر بر خاصیت بیماریزایی این قارچ می‌توان به توانایی آن در تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، اگزالیک اسید و پروتئین‌های افکتور اشاره کرد. هر چند که توالی یابی جامع ژنوم این بیمارگر، اطلاعات زیادی در خصوص چگونگی سازماندهی ژنوم و عوامل موثر بر رشد و بیماریزایی آن ارائه داده است، با این حال اساس ملکولی بیماری‌زایی آن هنوز به طور کامل مشخص نشده است (مقاله مروری Hossain et al., 2023). این قارچ علاوه

بر توانایی انگلی بسیار بالا، قادر است به صورت اندوفیت در تک‌لپه‌هایی نظیر برنج، گندم، جو و ذرت نیز رشد کند (Tian et al., 2020) و از آن‌جا که بافت‌های پیر را برای شروع آلودگی کلونیزه می‌کند، خاصیت نکروتروفی منحصر بفردی دارد (مقاله مروری Hossain et al., 2023). با این حال، وجود یک فاز بیوتروفیک جزئی در چرخه آلودگی این قارچ مشاهده شده است. از این رو این بیمارگر را به صورت دقیق‌تر می‌توان جزء همی‌بیوتروف‌ها طبقه‌بندی کرد (Kabbage et al., 2015). ایجاد توده‌های ریشه‌ای سختینه‌آویزگی مشترک همه اعضای Sclerotiniaceae می‌باشد (Bolton et al., 2006). سختینه در پایان چرخه عفونت ایجاد می‌شود و ممکن است برای چندین سال نیز زنده بماند (Khangura et al., 2015). از این رو امکان بقای بیمارگر را برای دوره‌های طولانی افزایش می‌دهد. این امر باعث کاهش اثربخشی کشت تناوبی به عنوان یک روش کنترل زراعی می‌شود (Derbyshire and Denton-Giles, 2016). از سوی دیگر به دلیل دامنه میزبانی وسیع بیمارگر، کنترل بیماری با استفاده از شیوه‌های زراعی بسیار سخت و چالش‌برانگیز است (Wu et al., 2016). کشت انواع کلزا مقاوم به بیماری، کارآمدترین و مقرون به صرفه‌ترین راه برای پیشگیری و کنترل SSR است (Wu et al., 2013; Barbetti et al., 2014; Bastien et al., 2014). این‌حال، عدم وجود ژرم پلاسما مقاوم در ارقام کلزای کشت شده و خوی‌شاوندان نزدیک (Li et al., 2006; Wu et al., 2016; Wu et al., 2013)، اصلاح ملکولی آن را با محدودیت مواجه ساخته است. دامنه گستره میزبانی وسیع این قارچ منجر به وابستگی شدید به قارچ‌کش‌ها برای مدیریت بیماری شده است. با این حال، به دلیل اثرات ناخواسته این مواد بر محیط زیست و نگرانی‌های زیست محیطی، کنترل بیولوژیکی به عنوان جایگزینی مطلوب برای حفاظت از محصولات کشاورزی مطرح شده است (Duke et al., 2017). بدین ترتیب که میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا با ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاهان، مکانیسم‌های دفاعی میزبان را

طریق شناسایی الگوهای ملکولی مرتبط با میکروب‌ها یا عوامل بیماری‌زا^۴ (MAMPs/PAMPs) یا مولکول‌های افکتور^۵ (Jones and Dangl, 2006; Muthamilarasan and Prasad, 2013) و به واسطه شبکه‌های پیام‌رسان هورمونی کنترل می‌شوند (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011a).

در برهم‌کنش گیاه کلزا و قارچ *S. sclerotiorum* اهمیت برخی عوامل موثر در بیماری‌زایی نظیر مسیره‌های وابسته به پروکسیزوم همراه با تجزیه دیواره سلولی و سم‌زدایی متابولیت‌های میزبان تایید شد (Chittem *et al.*, 2020). در خصوص سازوکارهای پاسخ‌های دفاعی ذاتی گیاه کلزا در برابر آلودگی SSR، مشخص شده است که شبکه‌های متابولیکی که به واسطه پیام‌رسان‌های هورمونی خصوصاً اسید سالیسیلیک (SA) تنظیم می‌شوند، در القاء مقاومت گیاه بر علیه این آلودگی نقش دارند (Xu *et al.*, 2021). همچنین مشخص شده است که بیش بیان ژن لیپاز *AtGDSL1* در گیاه کلزا، مقاومت به این قارچ را با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، افزایش محتوای SA و کاهش میزان جاسمونات القاء می‌کند (Ding *et al.*, 2020).

هنگامی که گیاهان در معرض میکروارگانیزم‌های غیربیماری‌زا قرار می‌گیرند، این عوامل کنترل زیستی قادرند علاوه بر آنتی‌بیوز مستقیم بی‌مارگر، مقاومت سیستمیک بواسطه القاء سامانه دفاعی را در گیاه فعال کنند. چنین میکروارگانیزم‌هایی نامزدهای خوبی برای جایگزینی مواد شیمیایی هستند (Pal and McSpadden-Gardene, 2006). *Pseudomonas chlororaphis* PA23 یک عامل کنترل زیستی است که قادر به جلوگیری از رشد *S. sclerotiorum* در گونه‌های حساس *B. napus* است (Fernando *et al.*, 2007). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که PA23 به طور مستقیم، *S. sclerotiorum* را از طریق ترشح متابولیت‌های ضد قارچی مورد حمله قرار می‌دهد (Poritsanos *et al.*,

تقویت می‌کنند و با "القای سامانه دفاعی" منجر به واکنش‌های قوی‌تر و سریع‌تر گیاه به حملات بعدی بیمارگر می‌شوند (Pieterse *et al.*, 2014).

امروزه به واسطه پیشرفت فناوری توالی‌یابی نسل بعد، از روش‌های تراز سکریتومیکس برای درک مکانیسم‌های ملکولی برهم‌کنش‌های گیاه میزبان با بیمارگرها استفاده می‌شود (Xu *et al.*, 2021). برای اجرای موفقیت آمیز عوامل کنترل بیولوژیک در القاء مقاومت سیستمیک بر علیه قارچ *S. sclerotiorum*، درک کامل تعاملات سیستم‌های کنترل زیستی، از جمله تأثیر آن‌ها روی گیاهان میزبان و همچنین درک مکانیسم‌های ملکولی برهم‌کنش‌های *S. sclerotiorum* و *B. napus* جهت ایجاد منابع جدید کلزای مقاوم به بیماری ضروری است. رویکرد زیست‌شناسی سامانه‌ای با ادغام داده‌های Omics نظیر داده‌های حاصل از رونویسی، پروتئوم و متابولوم می‌تواند با پیش‌بینی عملکردهای سلولی و مدل‌سازی پاسخ‌های گیاه به عوامل تنش‌زای مختلف، ابزار قدرتمندی برای درک بهتر نحوه واکنش گیاهان ارائه دهد (Pazhamala *et al.*, 2021). از این رو در مطالعه حاضر، از این رویکرد برای بررسی اثر عامل بیولوژیکی *Pseudomonas chlororaphis* PA23 بر روی پاسخ دفاعی گیاه کلزا در برابر قارچ *S. sclerotiorum* استفاده شد. این مطالعه با بررسی اثرات عامل کنترل زیستی بر گیاه کلزا و شناسایی برهم‌کنش‌های پروتئینی می‌تواند گام مهمی در توسعه سیستم‌های کنترل زیستی به عنوان جایگزینی برای آفت‌کش‌های شیمیایی و استفاده از رویکردهای پایدار مدیریت بیماری‌های گیاهی به شمار آید.

پیشینه پژوهش

یکی از سازوکارهای دفاعی در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاهان، ایجاد موانع ریخت‌شناختی و ساختاری مانند کوتیکول، موم و دیواره سلولی می‌باشد (Atkinson and Urwin 2012; Muthamilarasan and Prasad 2013). از سوی دیگر فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی از

^۴Microbial- or pathogen-associated molecular patterns

^۵Effector molecules

1Defense priming

2Biocontrol agents (BCAs)

3System biology

sclerotiorum و مدیریت این بیماری در کلزا و سایر گیاهان در اختیار به‌نژادگران قرار دهد.

روش‌شناسی پژوهش

در ابتدا ژن‌هایی که در گیاه کلزا به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 در طول آلودگی *S. sclerotiorum* بیان متمایزی ($|\log_2FC| > 1$) داشتند (Duke et al., 2017)، شناسایی شدند. سپس این لیست ژنی برای ارزیابی برهم‌کنش بین ژن‌های انتخاب شده، به برنامه مبتنی بر وب STRING به آدرس <http://string-db.org> بر خط وارد شد و لیست برهم‌کنش پروتئینی (PPI) ایجاد شد. در مرحله بعد برای ترسیم شبکه برهم‌کنشی، لیست PPI به Cytoscape (نسخه ۳/۱۰/۱) وارد شد. جهت شناسایی رتبه‌بندی ژن‌های کلیدی از افزونه CytoHubba در Cytoscape استفاده شد. این افزونه قادر است با استفاده از الگوریتم‌های محاسباتی مختلف به رتبه‌بندی و شناسایی ژن‌های کلیدی بپردازد (Chin et al., 2014). در مطالعه حاضر ژن‌های کلیدی بر اساس بررسی حاصل از چهار الگوریتم محاسبه‌بندی CytoHubba از جمله MCC، DEGREE، DMNC و MNC شناسایی شدند و در نهایت برهم‌کنش‌های آن‌ها با سایر گره‌ها در یک زیرشبکه هششان داده شد. از پایگاه KEGG برای آنالیز مسیرهای بیوشیمیایی زیر شبکه استفاده شد و از برنامه مبتنی بر وب STRING برای هستی‌شناسی ژن‌های کلیدی که مشتمل بر عملکرد ملکولی (MF)^۶، اجزای سلولی (CC)^۷ و فرآیند بیولوژیکی (BP)^۸ است، استفاده شد. برای خوشه‌بندی ژن‌های زیر شبکه از افزونه CytoCluster در Cytoscape استفاده شد که با استفاده از الگوریتم‌های مختلف، گره‌های زیر شبکه را خوشه‌بندی می‌کند (Li et al., 2017). در مطالعه حاضر از الگوریتم IPCA برای گروه‌بندی گره‌های موجود در زیر شبکه

و Duke (2006; Zhang et al., 2006). در مطالعه همکاران (۲۰۱۷)، بیان ژن‌ها در پاسخ به PA23 در حضور و عدم حضور *S. sclerotiorum* در بافت‌های برگ *B. napus* با استفاده از توالی‌یابی RNA (RNA-seq) مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که حضور PA23، مسیرهای دفاعی القاء شده توسط *S. sclerotiorum* از جمله تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و القای مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) را کاهش داد. با این حال، این عامل کنترل زیستی توانست علاوه بر تقابل مستقیم با *S. sclerotiorum*، با آماده‌سازی شبکه‌های دفاعی میزبان، اثر حفاظتی خود را اعمال کند. هرچند که در این پژوهش، ژن‌هایی با بیان متمایز در پاسخ به آلودگی SAR در گیاهان پرایم شده با PA23 شناسایی شدند، اما این مطالعه اطلاعاتی در خصوص ژن‌های محوری، عملکرد و چگونگی تقابل آن با سایر ژن‌های بیان شده ارائه نداد. لذا در مطالعه کنونی ابتدا بر اساس ژن‌های شناسایی شده با بیان متمایز که در مطالعه قبلی (Duke et al., 2017) در پاسخ به آلودگی SAR به دنبال القای سامانه دفاعی PA23 با استفاده از تکنیک RNA-seq شناسایی شده بود، شبکه برهم‌کنش پروتئینی (PPI) ترسیم شد. سپس ژن‌های محوری که بیشترین تعامل را با سایر اعضای شبکه داشتند، شناسایی شدند. پس از شناسایی ژن‌های کلیدی، عملکرد این ژن‌ها در تعامل با سایر ژن‌ها و نقش عملکردی آن‌ها در مسیرهای بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز پروموتور این ژن‌ها نیز اطلاعات مفیدی در خصوص عناصر تنظیمی (CREs) ژن‌های محوری مرتبط با پاسخ‌های دفاعی ارائه داد. همچنین میکروRNA^۴ های مهمی که با ژن‌های محوری در پاسخ به بیماری برهم‌کنش دارند، شناسایی شدند. در مجموع نتایج ملکولی القای سامانه دفاعی در برهم‌کنش گیاه-بیمارگر می‌تواند اطلاعات مفیدی جهت توسعه محصولات تراریخته مقاوم به آلودگی *S.*

6Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
7Molecular function
8Cellular component
9Biological process
10Identifying Protein Complex Algorithm

1Hub genes
2Protein-Protein interaction
3Cis-regulatory elements
4MicroRNAs
5Subnetwork

سامانه دفاعی PA23 در گیاه کلزا افزایش یا کاهش بیان داشته‌اند را نشان می‌دهد. با استفاده از چهار الگوریتم ذکر شده در مواد و روش‌ها، پروتئین‌های کلیدی با بیشترین برهم‌کنش از بین تمامی برهم‌کنش‌های پروتئینی موجود در شبکه شنا سایی شدند. لیست پروتئین‌های کلیدی و مشخصات آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. برهم‌کنش ژن‌های کلیدی شناسایی شده با سایر DEGها در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی بیان این ژن‌ها بر اساس لیست ژنی تهیه شده از مطالعه Duke و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که ژن‌های کلیدی شناسایی شده تغییرات بیانشان نسبت به گیاهان شاهد مثبت بوده و تقریباً نزدیک ۲ بود. این یافته‌ها بیانگر این نکته است که ژن‌های بزرگ اثر با درجه بالای تعامل با سایر ژن‌ها، الزاماً تغییرات بیانشان در پاسخ به آلودگی بالا نیست و اثرات برهم‌کنشی آن‌ها با سایر ژن‌ها، در بروز پاسخ‌های دفاعی تأثیرگذارتر است.

بر اساس جدول ۱، یکی از ژن‌های کلیدی شنا سایی شده، *BnaC04g26180D* می‌باشد که آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز^۲ (GR) را کد می‌کند. این آنزیم سبب تولید فرم احیا شده گلوکاتایون در سلول می‌شود که نقش کلیدی در کنترل سلولی گونه‌های فعال اکسیژن و کنترل وضعیت اکسیداسیون/احیای سلولی (redox) بر عهده دارد (مقاله مروری *Couto et al., 2016*). مطالعات گسترده‌ای در خصوص نقش گلوکاتایون در پیام‌رسانی دفاعی و القاء مقاومت به بیمارگرهای مختلف صورت گرفته است (*Ghanta et al., 2011; Cheng et al., 2015; Künstler et al., 2019*). عملکرد آنزیم GR در تبدیل GSSG به GSH برای محافظت از سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو و افزایش مقاومت اکتسابی سیستمیک از طریق فعال‌سازی ژن‌های *PR* به واسطه *SA* ضروری است (*Chen et al., 2007*).

BnaA03g57920D و *BnaC03g44420D* پروتئینی را کد می‌کنند که حامل دومین TIM barrel می‌باشد (جدول ۱). پروتئین‌های خانواده آلدولاز نوع TIM-barrel نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های فتوسنتزی و متابولیکی

استفاده شد. سپس ژن‌های هر خوشه در نسخه STRING برای یافتن مسیرهای KEGG بررسی شدند.

جهت شناسایی موتیف‌های پروموتری ژن‌های کلیدی، ابتدا با استفاده از سرویس مبتنی بر وب Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org>)، توالی 1Kb از ناحیه غیر قابل ترجمه 5'UTR ژن‌های شناسایی شده، استخراج شد. از ابزار Tomtom به آدرس <http://meme-suite.org/tools/tomtom> برای شناسایی CREهای شناخته شده استفاده شد. (*Gupta et al., 2007*). این ابزار، لیستی از موتیف‌های احتمالی را بر اساس ارزیابی پایگاه داده JASPAR CORE 2022 ارائه داد که از آن میان، موتیف‌هایی با آستانه مقادیر P و E به ترتیب <0.01 و <0.1 انتخاب شدند. سپس جهت شناسایی نقش احتمالی موتیف‌های انتخاب شده، از ابزار GoMo به آدرس <http://meme-suite.org/tools/gomo> استفاده شد (*Buske et al., 2010*).

برای شناسایی miRNAهای احتمالی، ابتدا توالی ژن‌های کلیدی با استفاده از سرویس مبتنی بر وب Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org>) استخراج شد. miRNAهای شناخته شده کلزا نیز از سرور miRbase (<https://www.mirbase.org/>) استخراج شدند. سپس، مقایسه توالی ژن‌های کلیدی با miRNAهای شناخته شده کلزا با استفاده از سرور psRNATarget (<http://lantgrn.noble.org/psRNATarget/>) نشان داد که کدام miRNAها با ژن‌های هدف برهم‌کنش دارند. این لیست جهت ترسیم شبکه به نرم افزار Cytoscape وارد شد.

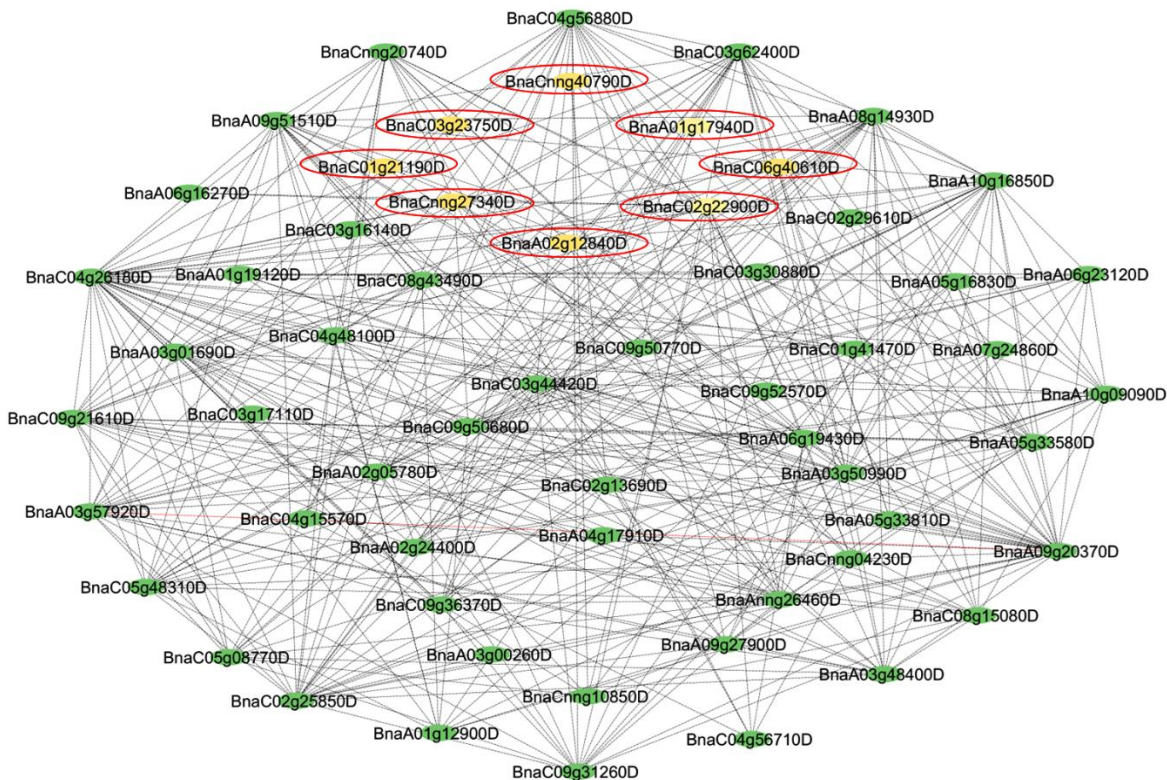
یافته‌های پژوهش

شبکه PPI و شناسایی قطب‌های ژنی

شبکه برهم‌کنشی پروتئینی (PPI) بر اساس لیست ژن‌هایی با بیان متمایز و با استفاده از STRING و Cytoscape ترسیم شد (شکل ۱). این شبکه برهم‌کنش ژن‌هایی که در پاسخ به آلودگی SSR به دنبال القای

گوجه‌فرنگی وحشی *Solanum habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner یافت شد و بعدها از آن به طور گسترده در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی برای محافظت از آن‌ها در برابر عفونت ToMV استفاده شد (Pelham, 1966; Spooner *et al.*, 2010; Ishibashi *et al.*, 2007). همچنین مشخص شده است که پروتئین‌های خانواده TIM-barrel ممکن است نقش عمده‌ای در پاسخ به ویروس موزائیک شلغم (TuMV) نیز داشته باشند (Rubio *et al.*, 2019). از این رو این ژن می‌تواند به عنوان یک منبع جدیدی از مقاومت در پاسخ به آلودگی‌های میکروبی به کار گرفته شود.

گیاهان در مواجهه با تنش‌های مختلف از جمله تنش‌های غرقابی و اکسیداتیو دارند. تحت تنش غرقابی، تلاش گیاه برای بازیابی پروتئین‌های خانواده آلدولاز نوع TIM-barrel نشان‌دهنده اهمیت این پروتئین‌ها در حفظ و بازیابی مسیرهای متابولیکی و فعالیت فتوسنتزی است (Kazemi Oskuei *et al.*, 2017). بر اساس مطالعات قبلی مشخص شده است که پروتئین Tm-1 در C-ترمینال خود دارای دومین TIM-barrel می‌باشد. این پروتئین از طریق اتصال به آنزیم‌های همانندساز ویروس موزائیک گوجه‌فرنگی (ToMV)، مانع همانندسازی ژنوم این ویروس می‌شود. این ژن برای اولین بار در گونه



شکل ۱. شبکه PPI ژن‌هایی با افزایش (سبز رنگ) و کاهش بیان (قرمز رنگ) در پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape. (تعداد گره: ۵۹، تعداد یال: ۳۶۳، میانگین تعداد همسایگان: ۱۲/۸۹۳، طول مسیر مشخصه: ۱/۹۸، ضریب خوشه بندی: ۰/۵۷۷، تراکم شبکه: ۰/۲۳۴).

Figure 1. PPI network of up-regulated (green) and down-regulated (red) genes in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming, using Cytoscape software. Network details: Number of Nodes: 59; Number of Edges: 363; Average Number of Neighbors: 12.89; Characteristic Path Length: 1.98; Clustering Coefficient: 0.577; Network Density: 0.234.

سبب تولید سیستئین می شود (Kopriva, 2006). سیستئین اولین ترکیب آلی حاوی S برای سنتز سایر ترکیبات مانند متیونین، سولفولیپیدها، ویتامین ها، کوآنزیمها و گروههای پروستتیک به کار گرفته می شود (Nakai and Maruyama-Nakashita 2020; Li et al., 2020).

BnaC02g25850D یکی دیگر از ژن های کلیدی شناسایی شده می باشد (جدول ۱) که آنزیم گلیسرالدهید-۳-فسفات دهیدروژناز^۹ (GAPDH) را کد می کند که در چرخه کالوین-بنسون^{۱۰} (C3)، فرایند تبدیل ۳-۱ بیس فسفو گلیسرات به گلیسرالدهید-۳-فسفات (GAP) را کاتالیز می کند (Cséke and Buchanan 1986). مطالعات اخیر نشان داد که گلیسرالدهید-۳-فسفات (GAP) با فعال سازی پیام رسانی های دفاعی وابسته به MAPK و القاء شبکه رونویسی، دفاع سیستماتیک علیه طیف وسیعی از بیماریها را ایجاد می کند. با این حال ابهامات زیادی در خصوص فعال سازی این سیستم دفاعی به واسطه GAP در سیتوزول وجود دارد که نیاز به مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی تکمیلی تر دارد (Zuo et al., 2024).

یکی دیگر از ژن های کلیدی در فعال سازی سامانه دفاعی توسط PA23 در برابر آلودگی *Sclerotium sclerotiorum* *BnaA03g01690D* می باشد (جدول ۱) که زیرواحد آلفای آنترانیلات سنتاز^{۱۱} را کد می کند که به عنوان یکی از آنزیمهای محدودکننده سرعت در سنتز تربیتوفان مطرح می باشد. مطالعات قبلی نقش ژن های موثر در مسیر شیکیمیک اسید (نظیر ژن آنترانیلات سنتاز) که منجر به بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک می شوند را در مقاومت گیاه جو در برابر نفوذ قارچ *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*، عامل بیماری سفیدک پودری تأیید کرده بودند (Hu et al., 2009).

BnaC03g62400D که آنزیم فسفوسرین آمینوترانسفراز^{۱۲} (PSAT) را کد می کند، یکی از ژن های

BnaC04g56880D یکی دیگر از ژن های کلیدی شناخته شده در پاسخ دفاعی بر علیه آلودگی SSR است (جدول ۱) که با کد کردن آنزیم ۳-فسفوشیکیمات-۱-کربوکسی وینیل ترانسفراز^{۱۳} (که همان ۵-انول پیروویل شیکیمات-۳-فسفات (EPSP) سینتاز است)، نقش مهمی در تولید اسیدهای آمینه آروماتیک نظیر فنیل آلانین، تیروزین و تربیتوفان دارد. این آنزیم، یک آنزیم کلیدی در مسیر اسید شیکیمیک^{۱۴} است که به طور گسترده در گیاهان عالی و میکروارگانیسمها (باکتریها و قارچها) یافت می شود و نقش مهمی در بیوسنتز کوریزمات و اسیدهای آمینه آروماتیک ایفاء می کند (Stallings et al., 1991; Santos-Sánchez et al., 2019). بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک و ترکیبات معطر از طریق مسیر شیکیمیک اسید به عنوان یکی از اجزای بقای گیاه و میکروارگانیسم ضروری است (Parthasarathy et al., 2018). همچنین این آنزیم می تواند در بیوسنتز هورمونها و سایر متابولیت های مهم گیاهی نظیر کینین های رشد، لیگنین، فلاونوئیدها، فنلها، SA و سایر متابولیت های ثانویه موثر در دفاع گیاه نقش داشته باشد (Priestman et al., 2005; Achary et al., 2020).

BnaA09g20370D یکی دیگر از ژن های کلیدی شناسایی شده در این مطالعه (جدول ۱)، آنزیم APS ردوکتاز^{۱۵} را کد می کند که به عنوان یکی از آنزیم های کلیدی اسیمیلاسیون سولفات^{۱۶} مطرح است. گوگرد (S) یک عنصر ضروری است که در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف نقش حیاتی دارد. گوگرد پس از جذب از خاک به شکل سولفات توسط آنزیم ATP سولفوریلاز^{۱۷} به آدنوزین ۵-فسفو سولفات^{۱۸} (APS) تبدیل می شود (Prioretti et al., 2014). APS توسط APS ردوکتاز به سولفیت احیا شده و سپس توسط سولفیت ردوکتاز^{۱۹} (SIR) به سولفید احیاء می شود. سولفید از طریق فعالیت آنزیمهای خاص به اسکلت کربنی O-S (ستیل سرین OAS) وارد می شود و

7 Adenosine 5'-phosphosulfate (APS)

8 Sulfite reductase (SIR)

9 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

10 Calvin-Benson cycle (C3)

11 Anthranilate synthase alpha subunit 1

12 Phosphoserine aminotransferase

13-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase

25-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase

3 Shikimic acid

4 APS reductase

5 sulfate assimilation

6 ATP sulfurylase

ملکولی (MF) اغلب شامل فعالیت‌های کاتالیتیکی، اتصال یون‌ها، اتصال مولکول‌های کوچک، اکسیدو ردوکتاز، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها، فعالیت گلوکوتایون ترانسفراز، اتصال گلوکوتایون و فعالیت پراکسیداز می‌باشد (شکل ۳). این یافته‌ها نشان داد که پاسخ عملکردی گیاه کلزا در القای سامانه دفاعی PA23 در برابر آلودگی SSR با تقویت واکنش‌های دفاعی، اتصال و تنظیم یون‌های فلزی ضروری، کاهش تنش اکسیداتیو و سم‌زدایی سلولی همراه است. غالب اصطلاحات GO برای اجزای سلولی (CC) شامل سیتوپلاسم، اندامک‌های سلولی نظیر پلاستیدها و کلروپلاست، تیلاکوئیدها، غشای تیلاکوئید و استرومای کلروپلاست می‌باشد (شکل ۳) که نشان می‌دهد عمده فعالیت‌های متابولیکی و دفاعی در پاسخ به القای سامانه دفاعی PA23 در برابر آلودگی SSR در گیاه کلزا در این مکان‌های سلولی اتفاق افتاده است.

برای دستیابی به اطلاعات مسیرهای موثر در پاسخ گیاه کلزا به آلودگی SSR بواسطه PA23، از بررسی غنی‌سازی مسیرهای KEGG برای ژن‌های زیرشبکه استفاده شد. KEGG یک پایگاه داده برای تخصیص مسیرهای بیولوژیکی خاص به گروه‌هایی از ژن‌های متفاوت بیان شده (DEGs) است که با ارتباط دادن داده‌های omics به داده‌های عملکردی، ارتباط بین تغییرات بیان ژن‌ها و تغییرات در عملکردهای سلولی و پاسخ‌های بیولوژیکی را مشخص می‌کند (Kanehisa and Goto, 2000). بر این اساس، نتایج بررسی غنی‌سازی KEGG (شکل ۳) نشان داد که مسیرهای متابولیکی مرتبط با متابولیسم اسیدهای آمینه (گلیسین، سرین، ترئونین، سیستئین، متیونین)، متابولیسم گلوکوتایون و سولفور، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و متابولیسم کربن به عنوان مسیرهای کلیدی پاسخ دفاعی گیاه کلزا به دنبال القاء پاسخ دفاعی PA23 در برابر بیماری SSR شناخته شده‌اند.

محوری در این مطالعه شناخته شده است (جدول ۱). این آنزیم که واکنش ترانس آمیناسیون قابل برگشت ۳- فسفوهیدروکسی پیرووات (3-PHP) به ۳-فسفوسرین^۲ (PSer) را در حضور L-گلوتامات (Glu) کاتالیز می‌کند، جزئی از مسیر فسفریلاسیون بیوسنتز سرین^۳ (PPSB) است که در پلاستیدهای گیاهی صورت می‌گیرد (Sekula *et al.*, 2018). مطالعات قبلی نشان داده است که مسیر PPSB پس از آلودگی گیاهان توسط عوامل بیماریزا فعال می‌شود (Benstein *et al.*, 2013). به علاوه در گیاهانی که این مسیر در آن‌ها غیرفعال بود، اثرات مثبت قارچ *Colletotrichum tofieldiae* در رشد گیاه مشاهده نشد (Zimmermann *et al.*, 2021).

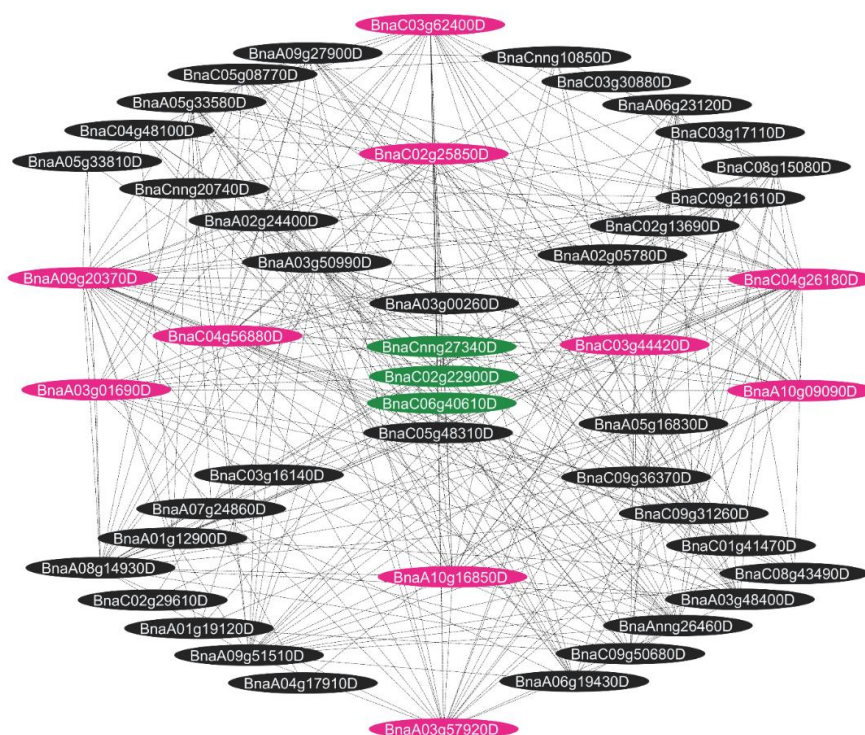
BnaA10g09090D و *BnaA10g16850D* از ژن‌های کلیدی شناسایی شده در پاسخ دفاعی حاصل از سامانه القایی PA23 می‌باشند (جدول ۱) که در مسیر بیوسنتزی تریپتوفان نقش دارند. در گیاهان، اسید آمینه آروماتیک تریپتوفان سنتز پروتئین ضروری است و پیش‌ساز هورمون‌های رشد اکسین، آلکالوئیدها، نیاسین (ویتامین B3) و متابولیت‌های دفاعی نظیر ایندول گلوکوزینولات‌ها است (Howe and Jander, 2008; Tzin and Galili, 2010; Sønderby *et al.*, 2010; Maeda and Dudareva, 2012; Zhou *et al.*, 2018). از این رو، مسیر تریپتوفان با تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه نقش محوری در بروز پاسخ‌های دفاعی علیه بیمارگرها در سلسله گیاهان بر عهده دارد.

بررسی هستی‌شناسی و غنی‌سازی مسیرهای بیوشیمیایی ژن‌های کلیدی

بررسی هستی‌شناسی شبکه تعامل قطب‌های ژنی با سایر ژن‌ها با استفاده از ابزار String نشان داد که در ارتباط با فرایند بیولوژیکی (BP)، مجموعه‌ای از فرآیندهای مختلف متابولیک و بیوسنتزی، به ویژه آن‌هایی که مربوط به سنتز ترکیبات آروماتیک، نیتروژنی و سولفور هستند در پاسخ به القای سامانه دفاعی PA23 در برابر آلودگی SSR فعال شده‌اند (شکل ۳). اصطلاحات غالب در GO برای عملکرد

3Phosphorylated pathway of serine biosynthesis (PPSB)

13-phosphohydroxypyruvate
23-phosphoserine



شکل ۲. زیر شبکه ای از ژن های کلیدی و برهم کنش آن ها با سایر ژن ها در پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 با استفاده از افزونه CytoHubba (سرخابی: ژن های کلیدی، مشکی: ژن هایی با افزایش بیان، سبز: ژن هایی با کاهش بیان). (تعداد گره: ۴۸، تعداد یال: ۳۳۷، میانگین تعداد همسایگان: ۱۴/۰۴۲، طول مسیر مشخصه: ۱/۷۴۷، ضریب خوشه بندی: ۰/۶۲۳، تراکم شبکه: ۰/۲۹۹)

Figure 2. A subnetwork of hub genes and their interactions with other genes in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming using the CytoHubba plugin. (magenta: hub genes, black: up-regulated genes, and green: down-regulated genes). Network details: Number of Nodes: 48; Number of Edges: 337; Average Number of Neighbors: 14.042; Characteristic Path Length: 1.747; Clustering Coefficient: 0.623; Network Density: 0.299.

جدول ۱. رتبه بندی ژن های کلیدی شناسایی شده در پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 در کلزا با استفاده از افزونه CytoHubba

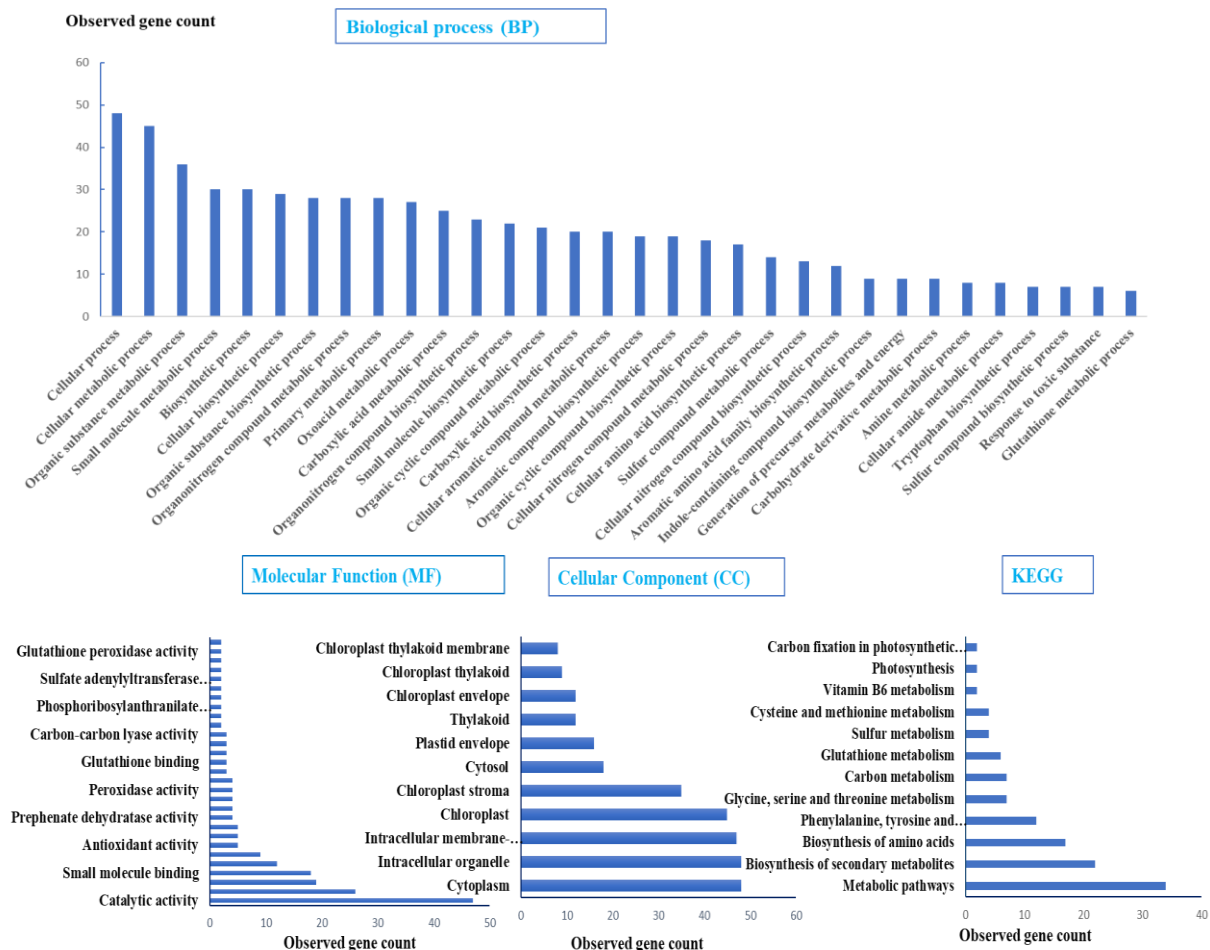
Table 1. Ranking of identified hub genes in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming in rapeseed using CytoHubba plugin

عملکرد ژن، نام ژن Gene Description and Gene name	الگوریتم رتبه بندی Ranking Method	شناسه ژن Gene ID	رتبه Rank
Glutathione reductase (EMB2360, GR, ATGR2)	DMNC, MCC	<i>BnaC04g26180D</i>	1
Aldolase-type TIM barrel family protein	DMNC, MCC	<i>BnaC03g44420D</i>	1,2
Aldolase-type TIM barrel family protein	MCC, DMNC	<i>BnaA03g57920D</i>	1,2
3-phosphoshikimate 1- carboxyvinyl transferase (Belongs to the EPSP synthase family)	DMNC, MCC	<i>BnaC04g56880D</i>	1,4
APS reductase 1 (APR1, APR, PRH19, ATAPR1)	MNC, Degree	<i>BnaA09g20370D</i>	2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plastid 2 (GAPCP-2)	MNC, Degree	<i>BnaC02g25850D</i>	3
tryptophan biosynthesis 1 (TRP1, PAT1)	MCC, MNC, Degree	<i>BnaA10g16850D</i>	3,4
Anthranilate synthase alpha subunit 1 (ASA1, TRP5, AMT1, WEI2, JDL1)	MCC, DMNC	<i>BnaA03g01690D</i>	3,5
Phosphoserine aminotransferase (PSAT)	Degree, MNC	<i>BnaC03g62400D</i>	5
tryptophan synthase beta subunit 1 (TSB1, TRPB, TRP2, ATTBS1)	DMNC	<i>BnaA10g09090D</i>	5

هم‌پوشانی بین مسیرهای متابولیکی شناسایی شده در KEGG و مازول‌های عملکردی شناسایی شده در آنالیز خوشه‌بندی تایید کرد که این مسیرها به عنوان مسیرهای اصلی حاصل از کنترل زیستی PA23 در برابر آلودگی SSR در گیاه کلزا مطرح می‌باشند. همان‌طور که در قسمت بالا نیز اشاره شد بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک و متابولیت‌های ثانویه مشتق شده از آنها از طریق مسیر شیکیمیک اسید و کوریزمات نقش مهمی در پاسخ به عوامل بیماری‌زا در گیاهان دارند. از این رو، دستکاری این مسیر می‌تواند به بهبود حفاظت گیاه در برابر بیماری‌های گیاهی کمک شایانی کند.

بررسی خوشه‌بندی شبکه

اطلاعات حاصل از خوشه‌بندی گروه‌های ژنی با استفاده از الگوریتم ICA افزونه Cytocluster در جدول ۲ آورده شده است. این گروه‌بندی نشان داد که همگی خوشه‌ها بدست آمده در رتبه بندی ۱ تا ۴ در مسیرهای مربوط به بیوسنتز اسیدهای آمینه تریپتوفان، فیل‌آلانین و تیروزین، متابولیسم ویتامین B6، متابولیسم سرین، گلاسین و ترئونین و بیوسنتز اسیدهای آمینه مشترک بودند. با این حال، تثبیت کربن فقط در خوشه‌هایی با رتبه ۱ و ۲ و متابولیسم سیستئین و متیونین و متابولیسم گوگرد نیز به ترتیب فقط در خوشه‌هایی با رتبه ۳ و ۴ مشاهده شدند.



شکل ۳. بررسی غنی‌سازی Gene Ontology و مسیرهای KEGG ژن‌های کلیدی با استفاده از STRING در پاسخ به آلودگی

S. sclerotiorum به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 در گیاه کلزا

Figure 3. Gene ontology enrichment and KEGG pathways of hub genes using STRING in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming in rapeseed

بررسی موتیف پروموتری ژن های کلیدی

برای شناسایی موتیف های حفاظت شده و عناصر تنظیمی Cis ژن های کلیدی شناسایی شده در این مطالعه، توالی یک کیلوباز (1Kb) از ناحیه 5'UTR این ژن ها از سرویس مبتنی بر وب Ensemble Plant بازیابی و با استفاده از ابزار MEME، موتیف های کلیدی با طول ۱۵-۳۹ جفت باز در ناحیه پروموتری این ژن ها شناسایی شدند. چندین عملکرد بیولوژیکی برای موتیف های شناسایی شده با استفاده از ابزار GOMO بدست آمد که مشخصات جزئی تر آن ها در جدول ۳ نشان داده شده است. مسیرهای پیام رسان وابسته به اکسین به عنوان یکی از عملکردهای ملکولی (MF) موتیف های موجود در ناحیه پروموتری ژن های کلیدی شناسایی شده در این مطالعه معرفی شد. مشخص شده است که اکسین در گیاه میزبان به عنوان یک مولکول پیام رسان میکروبی، بیان ژن های بیماریزایی را در باکتری تنظیم می کند و نقش مهمی در تنظیم پاسخ های دفاعی گیاه در طول فرایند بیماریزایی عوامل میکروبی دارد (Djami-Tchatchou et al., 2020).

فعالیت سودوویروئین سینتاز نیز یکی دیگر از عملکردهای ملکولی موتیف های شناسایی شده در مطالعه اخیر است که اطلاعات چندانی از عملکرد این آنزیم در گیاهان در دست نیست. اخیراً مشخص شده است که برخی از اعضای این خانواده ژنی در پاسخ به تنش های غیر زنده نظیر خشکی، شوری و گرما القاء می شوند (Dhingra et al., 2023). همچنین نقش آن در کنترل آلودگی و ویروس موزا ئیک برآو یز (BMV) در *Nicotiana benthamiana* از طریق اتصال آن به رشته مثبت RNA ویروسی و اختلال در کپسوله شدن ویروس و انتشار سیستمیک آن تأیید شده است (Garcia-Ruiz, 2019).

بر اساس جدول ۳، برخی فاکتورهای رونویسی از خانواده انگشت روی (Dof) در ناحیه پروموتری ژن های کلیدی شناسایی شدند. در تحقیقات قبلی نقش این عوامل در القاء مقاومت در برابر بیماریگرهای گیاهی تأیید شده بود (Sasaki et al., 2015; Yu et al., 2019).

از فاکتورهای شناخته شده در ناحیه CRE ژن های هدف مورد مطالعه، AP2/EREBP می باشد. فاکتورهای AP2 نقش مهمی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش های زنده و غیر زنده دارند. در مطالعه ای خاموشی ژن کد کننده این فاکتور رونویسی توسط ویروس موزا ئیک نواری جو (خاموشی ژن بواسطه ویروس) حساسیت گندم به *Puccinia striiformis f. sp. Tritici* را افزایش داد (Hawku et al., 2021). همچنین مشخص شده است که فاکتورهای AP2/ERF از طریق تأثیر بر مسیر MAPK، تنظیم بیان ژن های مرتبط با مسیرهای پیام رسان هورمونی و بیوسنتز متابولیت های ثانویه، در بروز پاسخ های ایمنی در برابر بیمارگرهای گیاهی نقش دارند (Ma et al., 2024). یکی دیگر از خانواده های ژنی شناخته شده که با توالی های CRE در ناحیه پروموتری ژن های کلیدی برهم کنش دارند، MADS-box ها هستند (جدول ۳). این خانواده ژنی به عنوان مهمترین عوامل موثر در رشد و نمو گیاه، عملکردشان در پاسخ به تنش های محیطی نظیر شوری، خشکی (Li et al., 2021) و سرما (Yan et al., 2021) تأیید شده است. با این حال اطلاعات اندکی در خصوص پاسخ آن ها به محرک های زیستی گزارش شده است. اخیراً نقش یکی از اعضای این خانواده ژنی در *Citrus sinensis* در برابر آلودگی باکتری های بیماریزا تأیید شده است (Yang et al., 2024). HD-ZIP که منحصرأ متعلق به سلسله گیاهان هستند، یکی دیگر از فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در این مطالعه است. این فاکتورها علاوه بر عملکردشان در فرایندهای مختلف سلولی نظیر تمایز، تنظیم بیوسنتز لیپیدها و انتقال آن ها، در پاسخ به تنش های زیستی نیز نقش دارند (Chew et al., 2013; Wang et al., 2015).

جدول ۲. آنالیز خوشه‌بندی زیر شبکه‌ای از ژن‌های کلیدی بیان شده در پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 در گیاه کلزا با استفاده از الگوریتم IPCA در افزونه CytoCluster

Table 2. Clustering analysis of subnetwork of expressed hub genes in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming in rapeseed using the IPCA algorithm in the CytoCluster Plugin

عملکرد Function	تعداد حاشیه‌ها Edges	تعداد گره‌ها Nodes	رتبه‌بندی کلاستر Cluster Rank
بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متابولیسم ویتامین B6، بیوسنتز آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متابولیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism تثبیت کربن Carbon fixation	506	24	1
بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متابولیسم ویتامین B6، بیوسنتز آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متابولیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism تثبیت کربن Carbon fixation	487	22	2
بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متابولیسم ویتامین B6، بیوسنتز آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متابولیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism متابولیسم سیستئین و متیونین Cysteine and methionine metabolism	377	20	3
بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متابولیسم ویتامین B6، بیوسنتز آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متابولیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism متابولیسم سولفور Sulfur metabolism	376	20	4

جدول ۳. موتیف های حفاظت شده در پرموتور قطب های ژنی با استفاده از ابزار MEME

Table 3. Conserved motifs identified in the promoter region of hub genes using MEME tool

عملکرد (Function)	توالی لوگو (عناصر سیس) (Cis-elements)	فاکتور رونویسی (Transcription factor)	موتیف (Motif)
MF transcription factor activity CC endomembrane system BP regulation of transcription		SEP1 (MADS box)	MA0584.1
MF transcription factor activity CC endomembrane system		ATHB-40 (HD-ZIP)	MA1214
CC chloroplast		RAP2-9 (ERF/DREB)	MA1251.1
CC chloroplast		DREB2A (ERF/DREB)	MA1258.1
MF transcription factor activity CC nucleus CC plasmamembrane BP regulation of transcription		DOF5.8 (zinc finger-type factors)	MA1267.1
MF transcription factor activity CC nucleus CC plasma membrane BP regulation of transcription		DOF5.1 (zinc finger-type factors)	MA1281.1
CC chloroplast		DEAR3 (AP2/EREBP)	MA1376.1
MF transcription factor activity CC endomembrane system MF pseudouridine synthase activity BP auxin mediated signaling pathway		SOL1 (CPP)	MA1379.1
MF transcription factor activity CC plasmamembrane		Hox1 (Homeo domain factors)	MA1883.1

این (and Ganem, 2005; Navarro *et al.*, 2006) ریز RNA ها با تنظیم بیان ژن هایی که در پاسخ های دفاعی نقش دارند، به تقویت مقاومت گیاه در برابر بیمارگرها کمک می کنند. به عنوان مثال در *Arabidopsis thaliana* miR393 و miR396 به ترتیب در پاسخ دفاعی به *Pst* tomato و *Pseudomonas syringae* pv نقش دارند (Navarro *et al.*, 2006; Hewezi *et al.*, 2012). در پاسخ به آلودگی *Pst*، miR393 با تنظیم پیام رسانی اکسین و تنظیم مسیر گلوکوزینولات در واکنش

شناسایی miRNA های ژن های کلیدی

miRNA ها به عنوان RNA های غیر کدکننده، با اتصال به مناطق غیر قابل ترجمه mRNA (3'UTR) (Tarver *et al.*, 2013)، نقش های کلیدی در فرآیندهای بیولوژیکی متنوع نظیر رشد، اندام زایی، انتقال پیام و پاسخ به تنش های محیطی ایفاء می کنند (Achard *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Jian *et al.*, 2016). علاوه بر این، چندین مطالعه نشان داده اند که miRNA ها نقش کلیدی در پاسخ به آلودگی های میکروبی در گیاهان ایفاء می کنند (Sullivan

بیانش توسط دسته‌ای از miRNAهای خانواده miR6028، miR6032 و miR172 a/d تنظیم می‌شود (شکل ۴). بر اساس بررسی مطالعات قبلی مشخص شد که از بین miRNAهای با بیان متمایز آذر پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* بیان miR6028 و miR395 d/e/f در واریته مقاوم نسبت به واریته حساس کلزا کاهش یافت (Xie et al., 2023). همچنین در مطالعه دیگری میزان بیان miR6028 ۴۸ ساعت پس از تلقیح گیاه کلزا با *S. sclerotiorum* بطور معنی‌داری کاهش یافت (Jian et al., 2018). با توجه به نقش منفی miRNAها در تنظیم بیان ژن‌های هدف در مرحله رونویسی یا بعد آن، کاهش بیان این ریزRNAها می‌تواند در تقویت بیان ژن‌های هدف و تقویت پاسخ‌های دفاعی علیه بیماری SSR در کلزا نقش مثبتی داشته باشد. در پیش‌بینی برهم‌کنش miRNA و ژن‌های کلیدی مورد مطالعه مشخص شد بیان ژن *BnaA10g09090D* توسط اعضای خانواده miR156 (شکل ۴). ژن *BnaA10g09090D* یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی اسیدآمینو تریتوفان است که تنظیم بیان آن با توجه به نقش کلیدی آن در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نظیر IGAها و بروز پاسخ‌های ایمنی در برابر آلودگی‌های میکروبی بسیار حائز اهمیت است. miR156 به عنوان یکی از فراوان‌ترین miRNAها در گیاهان شناخته شده است که نقش آن در تنظیم پاسخ‌های دفاعی علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی مختلف از جمله *S. sclerotiorum* تأیید شده است (Jian et al., 2018; Yin et al., 2019; Zhang et al., 2020; Sun et al., 2022; Xie et al., 2023).

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه پوسیدگی ساقه اسکروتینیا هر ساله خسارات سنگینی به مزارع کلزا وارد می‌کند، لذا بررسی سازوکارهای مولکولی مقاومت به بیمارگر *S. sclerotiorum* توسط PA23 به توسعه استراتژی‌های جدید برای کنترل بیماری و ایجاد ارقام متحمل کمک می‌کند. یافته‌های مطالعه اخیر نشان داد که ژن‌های

گیاهان به بیمارگرها مشارکت دارند (Navarro et al., 2011b; Robert-Seilaniantz et al., 2006). شناسایی miRNAهای پاسخ‌دهنده به عوامل میکروبی و ژن‌های هدف آن‌ها می‌تواند در شناخت بیشتر شبکه‌های تنظیمی پاسخ گیاه به آلودگی SSR کمک کند. با این حال اطلاعات اندکی در خصوص چگونگی تنظیم مقاومت به آلودگی SSR در گیاه کلزا بواسطه ریزRNAها در دسترس است (Xie et al., 2023).

در مطالعه حاضر جهت پیش‌بینی miRNAهایی که با ژن‌های کلیدی برهم‌کنش دارند، از برنامه وب محور psRNA Target استفاده شد. شکل ۴ برهم‌کنش این miRNAها با ژن‌های کلیدی شناخته شده در این مطالعه را نشان می‌دهد. در مجموع ۲۵ miRNA شناسایی شد که متعلق به ده خانواده حفاظت شده miR172، miR395، miR6028، miR6029، miR6032، miR6035، miR166، miR156، miR396، miR824 و miR824 بودند که بیان ژن‌های *BnaC04g56880D*، *BnaC02g25850D*، *BnaC03g62400D*، *BnaA10g09090D*، *BnaA03g57920D*، *BnaC04g26180D*، *BnaA03g01690D* و *BnaC03g44420D* را در سطح رونویسی و بعد آن تنظیم می‌کنند (شکل ۴). در مطالعات پیش‌بینی، نقش miRNAهای miR172، miR395، miR166، miR6028 و miR156 در پاسخ گیاه کلزا به بیماری SSR با استفاده از مطالعه گسترده ژنوم و روش‌های توالی‌یابی توان بالایی تأیید شده بود (Xie et al., 2023; Jian et al., 2018). بر اساس پیشگویی برهم‌کنش mRNA/miRNA از بین ژن‌های کلیدی شناسایی شده، بیشترین برهم‌کنش را با miRNAها *BnaC04g56880D* نشان داد (شکل ۴). این ژن که یکی از ژن‌های کلیدی در بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک مسیر شیکیمیات می‌باشد، توسط miRNAهای miR166، miR395 a/b/c/d/e/f، miR824 و miR396a، miR156 a/d/e/f، a/b/c/d/e مورد هدف قرار می‌گیرد (شکل ۴). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد *BnaC02g25850D* که در بیوسنتز GAP و فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی وابسته به MAPK نقش دارد،

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح پژوهشی به شماره ۱۴۰۲/۳۶ مصوب دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان می‌باشد.

References

- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D. C., & Harberd, N. P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, 131, 3357-3365.
- Achary, V. M. M., Sheri, V., Manna, M., Panditi, V., Borphukan, B., Ram, B., ... & Reddy, M. K. (2020). Overexpression of improved EPSPS gene results in field level glyphosate tolerance and higher grain yield in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 18(12), 2504-2519.
- Aggarwal, R. A. K., Kumar, A., & Thakur, H. L. (1997). Effect of Sclerotinia rot on oil quality in low erucic acid cultivars of rapeseed. *Cruciferae Newsletter*, 19, 103-104.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523-3543.
- Barbetti, M. J., Banga, S. K., Fu, T. D., Li, Y. C., Singh, D., Liu, S. Y., ... & Banga, S. S. (2014). Comparative genotype reactions to *Sclerotinia sclerotiorum* within breeding populations of *Brassica napus* and *B. juncea* from India and China. *Euphytica*, 197, 47-59.
- Bastien, M., Sonah, H., & Belzile, F. (2014). Genome wide association mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in soybean with a genotyping-by-sequencing approach. *The Plant Genome*, 7(1), 1-13.
- Benstein, R. M., Ludewig, K., Wulfert, S., Wittek, S., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., ... & Krueger, S. (2013). Arabidopsis phosphoglycerate dehydrogenase1 of the phosphoserine pathway is essential for development and required for ammonium assimilation and tryptophan biosynthesis. *The Plant Cell*, 25(12), 5011-5029.
- Bolton, M. D., Thomma, B. P., & Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7(1), 1-16.
- Buske, F. A., Bodén, M., Bauer, D. C., & Bailey, T.L. (2010). Assigning roles to DNA regulatory motifs using comparative genomics. *Bioinformatics*, 26(7), 860-866.
- Chen, Y. P., Xing, L. P., Wu, G. J., Wang, H. Z., Wang, X. E., Cao, A. Z., & Chen, P. D. (2007). Plastidial glutathione reductase from *Haynaldia villosa* is an enhancer of powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum*). *Plant and Cell Physiology*, 48(12), 1702-1712.
- Cheng, M. C., Ko, K., Chang, W. L., Kuo, W. C., Chen, G. H., & Lin, T. P. (2015). Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 83(5), 926-939.
- Chew, W., Hrmova, M., & Lopato, S. (2013). Role of homeodomain leucine zipper (HD-Zip) IV transcription factors in plant development and plant protection from deleterious environmental factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 8122-8147.
- Chin, C. H., Chen, S. H., Wu, H. H., Ho, C. W., Ko, M.T., & Lin, C.Y. (2014). CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*, 8, 1-7.
- Chittem, K., Yajima, W. R., Goswami, R. S., & del Río Mendoza, L. E. (2020). Transcriptome analysis of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* interaction with resistant and susceptible canola (*Brassica napus*) lines. *PLoS One*, 15(3), e0229844.
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95: 27-42.
- Cséke, C., & Buchanan, B. B. (1986). Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, 853(1), 43-63.
- Derbyshire, M. C., & Denton-Giles, M. (2016). The control of sclerotinia stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*), current practices and future opportunities. *Plant Pathology*, 65(6), 859-877.
- Dhingra, Y., Lahiri, M., Bhandari, N., Kaur, I., Gupta, S., Agarwal, M., & Katiyar-Agarwal, S. (2023). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis unveil the roles of pseudouridine synthase (PUS) family proteins in rice development and stress response. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 29(12), 1981-2004.
- Ding, L. N., Li, M., Guo, X. J., Tang, M. Q., Cao, J., Wang, Z., ... & Tan, X. L. (2020). Arabidopsis *GDSL1* overexpression enhances rapeseed *Sclerotinia sclerotiorum* resistance and the functional identification of its homolog in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal*, 18(5), 1255-1270.
- Djami-Tchatchou, A. T., Harrison, G. A., Harper, C. P., Wang, R., Prigge, M. J., Estelle, M., & Kunkel, B. N. (2020). Dual role of auxin in regulating plant defense and bacterial virulence gene expression during *Pseudomonas syringae* PtoDC3000 pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(8), 1059-1071.
- Duke, K. A., Becker, M. G., Girard, I. J., Millar, J. L., Dilantha Fernando, W. G., Belmonte, M. F., & de Kievit, T. R. (2017). The biocontrol agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 primes *Brassica napus* defenses through distinct gene networks. *BMC Genomics*, 18, 1-16.

- FAO. (2022). Agricultural production statistics 2000-2020. *FAOSTAT analytical brief series no. 41*.
- Fernando, W. G. D., Nakkeeran, S., Zhang, Y., & Savchuk, S. (2007). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*, 26(2), 100-107.
- Garcia-Ruiz, H. (2019). Host factors against plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, 20(11), 1588-1601.
- Ghanta, S., Bhattacharyya, D., Sinha, R., Banerjee, A., & Chattopadhyay, S. (2011). *Nicotiana tabacum* overexpressing γ -ECS exhibits biotic stress tolerance likely through NPR1-dependent salicylic acid-mediated pathway. *Planta*, 233: 895-910.
- Guo, H. S., Xie, Q., Fei, J. F., & Chua, N. H. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *The Plant Cell*, 17(5), 1376-1386.
- Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Bailey, T. L., & Noble, W. S. (2007). Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*, 8, 1-9.
- Hajduch, M., Casteel, J. E., Hurrelmeyer, K. E., Song, Z., Agrawal, G. K., & Thelen, J. J. (2006). Proteomic analysis of seed filling in *Brassica napus*. Developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, 141(1), 32-46.
- Hawku, M. D., Goher, F., Islam, M. A., Guo, J., He, F., Bai, X., ... & Guo, J. (2021). TaAP2-15, an AP2/ERF transcription factor, is positively involved in wheat resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2080.
- Hewezi, T., Maier, T. R., Nettleton, D., & Baum, T. J. (2012). The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant Physiology*, 159(1), 321-335.
- Hossain, M. M., Sultana, F., Li, W., Tran, L. S. P., & Mostofa, M. G. (2023). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the pathogenomic features of a global pathogen. *Cells*, 12(7), 1063.
- Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 41-66.
- Hu, P., Meng, Y., & Wise, R. P. (2009). Functional contribution of chorismate synthase, anthranilate synthase, and chorismate mutase to penetration resistance in barley-powdery mildew interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(3), 311-320.
- Ishibashi, K., Masuda, K., Naito, S., Meshi, T., & Ishikawa, M. (2007). An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13833-13838.
- Jahan, R., Siddique, S. S., Jannat, R., & Hossain, M. M. (2022). Cosmos white rot: First characterization, physiology, host range, disease resistance, and chemical control. *Journal of Basic Microbiology*, 62(8), 911-929.
- Jian, H., Ma, J., Wei, L., Liu, P., Zhang, A., Yang, B., ... & Liu, L. (2018). Integrated reveal mRNA, sRNA, and degradome sequencing reveal oilseed rape complex responses to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) infection. *Scientific Reports*, 8(1), 10987.
- Jian, H., Wang, J., Wang, T., Wei, L., Li, J., & Liu, L. (2016). Identification of rapeseed microRNAs involved in early stage seed germination under salt and drought stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 658.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Kabbage, M., Yarden, O., & Dickman, M. B. (2015). Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. *Plant Science*, 233, 53-60.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30.
- Kazemi Oskuei, B. K., Yin, X., Hashiguchi, A., Bandehagh, A., & Komatsu, S. (2017). Proteomic analysis of soybean seedling leaf under waterlogging stress in a time-dependent manner. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1865(9), 1167-1177.
- Khangura, R., Beard, C., & Hills, A. (2015). Managing sclerotinia stem rot in canola. *Department of Agriculture and Food. Australian Government*.
- Kopriva, S. (2006). Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. *Annals of Botany*, 97(4), 479-495.
- Künstler, A., Király, L., Kátay, G., Enyedi, A. J., & Gullner, G. (2019). Glutathione can compensate for salicylic acid deficiency in tobacco to maintain resistance to tobacco mosaic virus. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1115.
- Li, C. X., Li, H., Sivasithamparan, K., Fu, T. D., Li, Y. C., Liu, S. Y., & Barbetti, M. J. (2006). Expression of field resistance under Western Australian conditions to *Sclerotinia sclerotiorum* in Chinese and Australian *Brassica napus* and *Brassica juncea* germplasm and its relation with stem diameter. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(10), 1131-1135.
- Li, M., Li, D., Tang, Y., Wu, F., & Wang, J. (2017). CytoCluster: a cytoscape plugin for cluster analysis and visualization of biological networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1880.
- Li, Q., Gao, Y., & Yang, A. (2020). Sulfur homeostasis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 8926.

- Li, X., Yu, B., Wu, Q., Min, Q., Zeng, R., Xie, Z., & Huang, J. (2021). OsMADS23 phosphorylated by SAPK9 confers drought and salt tolerance by regulating ABA biosynthesis in rice. *PLoS Genetics*, 17(8), e1009699.
- Liu, Q., Zhang, Y. C., Wang, C. Y., Luo, Y. C., Huang, Q. J., Chen, S. Y., ... & Chen, Y. Q. (2009). Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Letters*, 583(4), 723-728.
- Ma, N., Sun, P., Li, Z. Y., Zhang, F. J., Wang, X. F., You, C. X., ... & Zhang, Z. (2024). Plant disease resistance outputs regulated by AP2/ERF transcription factor family. *Stress Biology*, 4(1), 2.
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 73-105.
- Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, 38, 433-449.
- Nakai, Y., & Maruyama-Nakashita, A. (2020). Biosynthesis of sulfur-containing small biomolecules in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3470.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., ... & Jones, J. D. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772), 436-439.
- Pal, K. K., & McSpadden Gardene, B. (2006). Biological control of plant pathogens. *The plant Health Instructor*, 2(5), 1117-1142.
- Parthasarathy, A., Cross, P. J., Dobson, R. C., Adams, L. E., Savka, M. A., & Hudson, A. O. (2018). A three-ring circus: metabolism of the three proteogenic aromatic amino acids and their role in the health of plants and animals. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 29.
- Pazhamala, L. T., Kudapa, H., Weckwerth, W., Millar, A. H., & Varshney, R. K. (2021). Systems biology for crop improvement. *The Plant Genome*, 14(2), e20098.
- Pelham, J. (1966). Resistance in tomato to tobacco mosaic virus. *Euphytica*, 15(2), 258-267.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347-375.
- Poritsanos, N., Selin, C., Fernando, W. G., Nakkeeran, S., & Kievit, T. D. (2006). A GacS deficiency does not affect *Pseudomonas chlororaphis* PA23 fitness when growing on canola, in aged batch culture or as a biofilm. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(12), 1177-1188.
- Priestman, M. A., Healy, M. L., Funke, T., Becker, A., & Schönbrunn, E. (2005). Molecular basis for the glyphosate-insensitivity of the reaction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase with shikimate. *FEBS Letters*, 579(25), 5773-5780.
- Prioretti, L., Gontero, B., Hell, R., & Giordano, M. (2014). Diversity and regulation of ATP sulfurylase in photosynthetic organisms. *Frontiers in Plant Science*, 5, 597.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. (2011a). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 317-343.
- Robert-Seilaniantz, A., MacLean, D., Jikumaru, Y., Hill, L., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., & Jones, J. D. (2011b). The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *The Plant Journal*, 67(2), 218-231.
- Rubio, B., Cosson, P., Caballero, M., Revers, F., Bergelson, J., Roux, F., & Schurdi-Levraud, V. (2019). Genome-wide association study reveals new loci involved in *Arabidopsis thaliana* and Turnip mosaic virus (Tu MV) interactions in the field. *New Phytologist*, 221(4), 2026-2038.
- Saharan, G. S., & Mehta, N. (2008). Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. *Springer Science & Business Media*.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., & Villanueva-Cañongo, C. (2019). Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*, 1, 1-15.
- Sasaki, N., Matsumaru, M., Odaira, S., Nakata, A., Nakata, K., Nakayama, I., ... & Nyunoya, H. (2015). Transient expression of tobacco BBF1-related Dof proteins, BBF2 and BBF3, upregulates genes involved in virus resistance and pathogen defense. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 89: 70-77.
- Sekula, B., Ruszkowski, M., & Dauter, Z. (2018). Structural analysis of phosphoserine aminotransferase (Isoform 1) from *Arabidopsis thaliana*—the enzyme involved in the phosphorylated pathway of serine biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 876.
- Sønderby, I. E., Geu-Flores, F., & Halkier, B. A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15(5), 283-290.
- Spooner, D. M., Gavrilenko, T., Jansky, S. H., Ovchinnikova, A., Krylova, E., Knapp, S., & Simon, R. (2010). Ecogeography of ploidy variation in cultivated potato (*Solanum* sect. *Petota*). *American Journal of Botany*, 97(12), 2049-2060.

- Stallings, W. C., Abdel-Meguid, S. S., Lim, L. W., Shieh, H. S., Dayringer, H. E., Leimgruber, N. K., ... & Kishore, G. M. (1991). Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), 5046-5050.
- Sullivan, C. S., & Ganem, D. (2005). MicroRNAs and viral infection. *Molecular Cell*, 20(1), 3-7.
- Sun, T., Zhou, Q., Zhou, Z., Song, Y., Li, Y., Wang, H. B., & Liu, B. (2022). SQUINT Positively Regulates Resistance to the Pathogen *Botrytis cinerea* via miR156-SPL9 Module in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 63(10), 1414-1432.
- Tarver, J. E., Sperling, E. A., Nailor, A., Heimberg, A. M., Robinson, J. M., King, B. L., ... & Peterson, K. J. (2013). miRNAs: small genes with big potential in metazoan phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2369-2382.
- Tian, B., Xie, J., Fu, Y., Cheng, J., Li, B. O., Chen, T., ... & Jiang, D. (2020). A cosmopolitan fungal pathogen of dicots adopts an endophytic lifestyle on cereal crops and protects them from major fungal diseases. *The ISME Journal*, 14(12), 3120-3135.
- Tzin, V., & Galili, G. (2010). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 8, e0132.
- Wang, H., Lin, J., Li, X. G., & Chang, Y. (2015). Genome-wide identification of pear HD-Zip gene family and expression patterns under stress induced by drought, salinity, and pathogen. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(9), 189.
- Wu, J., Cai, G., Tu, J., Li, L., Liu, S., Luo, X., ... & Zhou, Y. (2013). Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia* stem rot and BnaC.IGMT5. a as a candidate gene of the major resistant QTL SRC6 in *Brassica napus*. *PLoS One*, 8(7), e67740.
- Wu, J., Zhao, Q., Yang, Q., Liu, H., Li, Q., Yi, X., ... & Zhou, Y. (2016). Comparative transcriptomic analysis uncovers the complex genetic network for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Scientific Reports*, 6(1), 19007.
- Xie, L., Jian, H., Dai, H., Yang, Y., Liu, Y., Wei, L., ... & Liu, L. (2023). Screening of microRNAs and target genes involved in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) infection in *Brassica napus* L. *BMC Plant Biology*, 23(1), 479.
- Xu, B., Gong, X., Chen, S., Hu, M., Zhang, J., & Peng, Q. (2021). Transcriptome analysis reveals the complex molecular mechanisms of *Brassica napus*-*Sclerotinia sclerotiorum* interactions. *Frontiers in Plant Science*, 12, 716935.
- Yan, L. Y., Zhang, H. J., Zheng, Y. Q., Cong, Y. Q., Liu, C. T., Fan, F., ... & Duan, M. J. (2021). Transcription factor OsMADS25 improves rice tolerance to cold stress. *Yi Chuan= Hereditas*, 43(11), 1078-1087.
- Yang, X., Zhang, M., Xi, D., Yin, T., Zhu, L., Yang, X., ... & Liu, X. (2024). Genome-wide identification and expression analysis of the MADS gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*) infested with pathogenic bacteria. *Peer J*, 12, e17001.
- Yin, H., Hong, G., Li, L., Zhang, X., Kong, Y., Sun, Z., ... & He, Y. (2019). miR156/SPL9 regulates reactive oxygen species accumulation and immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, 109(4), 632-642.
- Yu, Y. H., Bian, L., Wan, Y. T., Jiao, Z. L., Yu, K. K., Zhang, G. H., & Guo, D. L. (2019). Grape (*Vitis vinifera*) VvDOF3 functions as a transcription activator and enhances powdery mildew resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 143, 183-189.
- Zhang, L. L., Li, Y., Zheng, Y. P., Wang, H., Yang, X., Chen, J. F., ... & Wang, W. M. (2020). Expressing a target mimic of miR156fhl-3p enhances rice blast disease resistance without yield penalty by improving SPL14 expression. *Frontiers in Genetics*, 11, 327.
- Zhang, Y., Fernando, W. G., Kievit, T. R. D., Berry, C., Daayf, F., & Paulitz, T. C. (2006). Detection of antibiotic-related genes from bacterial biocontrol agents with polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(5), 476-481.
- Zhou, S., Richter, A., & Jander, G. (2018). Beyond defense: multiple functions of benzoxazinoids in maize metabolism. *Plant and Cell Physiology*, 59(8), 1528-1537.
- Zimmermann, S. E., Blau, S., Frerigmann, H., & Krueger, S. (2021). The phosphorylated pathway of serine biosynthesis is crucial for indolic glucosinolate biosynthesis and plant growth promotion conferred by the root endophyte *Colletotrichum tofieldiae*. *Plant Molecular Biology*, 107(1), 85-100.
- Zomorodian, A., Kavooosi, Z., & Momenzadeh, L. (2011). Determination of EMC isotherms and appropriate mathematical models for canola. *Food and Bioprocess Processing*, 89(4), 407-413.
- Zuo, D. P., Wang, B., Liu, Y. Z., Chen, Z. S., Hu, R. J., He, M. J., ... & Han, C. G. (2024). The triose phosphate/phosphate translocator exports photosynthetic glyceraldehyde 3-phosphate from chloroplasts to trigger antimicrobial immunity in plants. *bioRxiv*, 2024-01.

Identification of *FAD* family genes in the genome of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) microalgae and investigation of cellular functions in response to abiotic stresses

Sahar Faraji¹, Ghorbanali Nematzadeh^{1,2}, Seyed Kamal Kazemitabar¹,
Ali Pakdin-Parizi^{3*}(ORCID: 0000-0003-4570-8021)

1. Department of Plant Breeding, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

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

3. Department of Citrus and Medicinal Plants, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

Correspondence:

Ali Pakdin-Parizi

Email: a.pakdin@sanru.ac.ir

Received: 16, Mar. 2024

Accepted: 21, Jun. 2024

How to cite:

Faraji, S., Nematzadeh, Gh., Kazemitabar, S. K., & Pakdin-Parizi, A. (2024). Identification of *FAD* family genes in the genome of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) microalgae and investigation of cellular functions in response to abiotic stresses. *Crop Biotechnology*, 14(1), 87-106.
(DOI: [10.30473/cb.2024.70853.1963](https://doi.org/10.30473/cb.2024.70853.1963))

ABSTRACT

Arthrospira platensis (Spirulina) is a valuable photosynthesizing prokaryote with numerous industrial and food applications. Fatty acid desaturase enzymes (FADs) are responsible for the production of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. In the present study, the genome of *A. platensis* C1 was investigated using bioinformatics methods in order to identify *ApFAD* genes family. A total of 8 *ApFAD* genes were identified in *Spirulina* genome and classified into Omega, Sphingolipid, CrtR_beta-carotene-hydroxylase and Acyl-CoA groups. Four conserved histidine motifs that are essential for binding to the di-iron structures and catalytic activities were identified. Investigation of post-translational modifications of *ApFAD* proteins revealed a wide range of glycosylation and phosphorylation changes. Evaluation of *FAD* gene promoter regions revealed different types of *cis*-regulatory elements responsive to phytohormones and stress conditions, especially in Omega (*ApFAD-6*) and Acyl-lipid (*ApFAD-3*) desaturases. Also, protein-protein interaction networks showed the relations between *ApFADs* and genes involved in dealing with stresses through the biosynthetic process of secondary metabolites and electron transfer. Analysis of RNA-seq data of orthologous genes in *Arabidopsis* showed the potential of Omega and Acyl-lipid genes, such as *ApFAD-3*, *ApFAD-6* and *ApFAD-7*, in response to various environmental stresses. In general, the results of this study can contribute to a more complete understanding of the function of *FAD* genes in *Spirulina* and lay the basis for the transgenic study of these genes with the aim of increasing the content of unsaturated fatty acids, improving the nutritional value of oils, as well as promoting the stress tolerance of plants.

KEYWORDS

Arthrospira platensis, Bioinformatic analysis, Fatty acid desaturase, Genome analysis, Stress dealing.



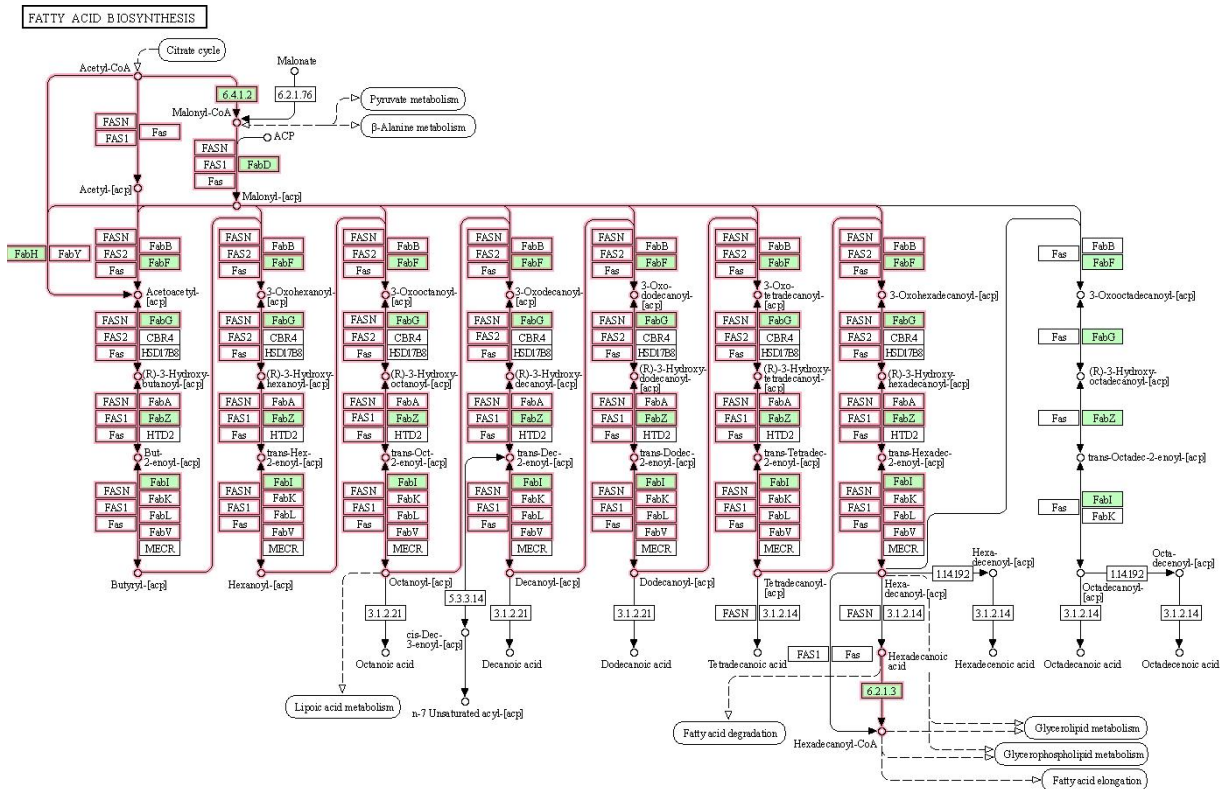
مقدمه

سیانوباکتری‌ها، ریزجانداران پروکاریوتی فتوسنتز کننده هستند که گروه بزرگی از باکتری‌های حقیقی را تشکیل می‌دهند. این ریزجانداران از نظر مورفولوژیکی تک سلولی یا رشته‌ای بوده و به لحاظ عملکردی به دو گروه تثبیت کننده نیتروژن (هتروسیست‌دار) و غیرتثبیت کننده نیتروژن تقسیم می‌شوند (Hoiczyk, 2000). اسپیرولینا (*Arthrospira platensis*) یک سیانوباکتری با خصوصیات تغذیه‌ای و سلامتی بخش متعدد می‌باشد (Van Tuerenhout, 2005). این ریز جلبک یک منبع غنی پروتئین (۷۰ درصد وزن خشک) حاوی همه اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین‌های گروه B و ویتامین C، مواد معدنی، اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع ضروری و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل کاروتنوئیدها، فیکوسیانین‌ها و کلروفیل می‌باشد. محتوای بالای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در اسپیرولینا سبب خواص ضدالتهابی، ضدسرطانی و تقویت سیستم ایمنی می‌شود (Wan et al., 2021). اسیدهای چرب (FAs) بلوک‌های سازنده آسیل-لیپیدها هستند که عموماً شامل لیپیدهای غشایی قطبی و چربی‌های ذخیره‌ای خنثی می‌باشند. لیپیدهای غشایی قطبی، که به عنوان مرزهای حفاظت سلولی عمل می‌کنند، نه تنها یکپارچگی بخش‌های درون سلولی را حفظ می‌کنند، بلکه در آغاز سیگنال‌های درون سلولی طی فرآیندهای مختلف رشد و مقابله با تنش‌های گوناگون نیز نقش بسیار مهمی دارند (Li-Beisson et al., 2013; Lu et al., 2020). از سوی دیگر، لیپیدهای ذخیره‌ای خنثی نیز، به عنوان گروه چربی‌های چگال انرژی‌زا، به عنوان منابع مهمی برای ذخیره کربن و انرژی هستند. میزان و کارایی غیراشباع سازی اسیدهای چرب، که با عملکرد اسید چرب دسچورازها (FADs)^۲ تعیین می‌شود، در جانداران مختلف، تفاوت داشته و به تنش‌های غیرزیستی و زیستی پاسخ می‌دهد (Tang et al., 2018; Wu et al., 2021).

در طی بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFAها) در سلول‌ها، مراحل مختلف اشباع و طویل شدن به عنوان بخشی از یک مسیر پیچیده رخ می‌دهد (شکل ۱). وارد کردن پیوند دوگانه به زنجیره هیدروکربنی اسیدهای چرب اشباع و تبدیل آنها به نوع غیراشباع یکی از این مراحل است که توسط

^۱ Fatty acids^۲ Fatty acid desaturases^۳ Polyunsaturated fatty acids

آنزیم‌های اسید چرب دسچوراز تنظیم می‌شود (Lee et al., 2016). مهمترین اسیدچرب دسچورازهای گیاهی شامل دسچورازهای آسیل-لیپید، دسچورازهای محلول و دسچورازهای امگا-۳ و امگا-۶ هستند (Li-Beisson et al., 2013). قارچ‌ها و باکتری‌ها نیز دارای اسیدچرب دسچورازهای متعددی می‌باشند که ممکن است نقش متفاوتی نسبت به دسچورازهای گیاهی داشته باشند (Lu et al., 2020; Racine & Deckerbaum, 2007). اسیدهای چرب غیراشباع سنتز شده توسط این دسچورازها در ساختار غشا، سیالیت و سایر عملکردهای سلولی این جانداران دخالت دارند. تنظیم و تغییر لیپیدهای غشایی توسط دسچورازهای متصل به غشا، از جمله اسید آسیل لیپید D9-دسچوراز (ADS) و اسفنگولیپیدهای D4-دسچوراز (DES) انجام می‌شود (Li-Beisson et al., 2013). یک ویژگی مشترک در ساختار همه پروتئین‌های دسچوراز حضور موتیف‌های هیستیدین حفاظت شده می‌باشد. این موتیف حاوی یک ناحیه اتصال دای-آهن است که پیوند C-H را برای تولید آب طی فرآیند غیراشباع‌سازی جدا می‌کند (Alonso et al., 2003; Díaz et al., 2018). تقریباً ۶۰٪ مختلف، از جمله ژن‌های کدکننده اسیدهای چرب دسچوراز، در مسیر سازمان‌دهی ساختارهای متنوع آسیل-لیپیدی در *Arabidopsis thaliana* نقش دارند (Li-Beisson et al., 2013). از کاربردهای دستوری اسیدچرب دسچورازها می‌توان به افزایش محتوای اسیدهای چرب غیراشباع و بهبود ارزش تغذیه‌ای روغن‌های گیاهی، تغییر ترکیب و پروفایل اسیدهای چرب، افزایش تحمل به تنش‌های محیطی مانند دمای بیش از حد، خشکی و حمله عوامل بیماری‌گر، مهندسی متابولیک، تولید سوخت زیستی و نیز تولید مکمل‌های رژیمی، ترکیبات دارویی و تغذیه‌ای اشاره کرد. مهندسی ژنتیک اسیدچرب دسچورازهای گیاهان و ریزجانداران نیازمند شناخت ساختار، عملکرد و نقش‌های فیزیولوژیکی این ترکیبات می‌باشد. برای دستیابی به این منظور، در مطالعه حاضر، توالی ژنوم کامل *A. platensis* C1 با ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف مورد جستجو قرار گرفته و ژن‌های اسیدچرب دسچوراز شناسایی و برای ارزیابی خصوصیات مختلف ساختاری و عملکردی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج این تحقیق یک تصویر کامل از اسیدچرب دسچورازهای سیانوباکتریایی ارائه می‌کند که می‌تواند در برنامه‌های دستوری مسیر سنتز اسیدهای چرب غیراشباع مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱. مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه در ریزجلیک اسپیرولینا، به دست آمده از پایگاه KEGG (Kanehisa, 2002)

پیشینه پژوهش

مزایای سلامتی بخش اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه با زنجیره بسیار بلند (VLC-PUFAs) مانند اسید آراشیدونیک (ARA؛ ۲۰:۴ω۶)، ایکوزاپنتانویک اسید (EPA؛ ۲۰:۵ω۳) و اسید دوکوزاهگزانویک (DHA؛ ۲۲:۶ω۳)، توجه بسیاری را به خود معطوف کرده است (Connor et al., 2007; Zárate et al., 2017). این ترکیبات از اجزای ساختاری فسفولیپیدهای غشایی بوده و از طرفی به عنوان پیش سازهای خانواده ایکوزانویدهای مولکول‌های سیگنال دهنده، از جمله پروستاگلاندین‌ها، ترومبوکسان‌ها و لکوترین‌ها، نقش ایفا می‌کنند (Abedi & Sahari, 2014). علاوه بر کنترل اثرات تنظیمی و فعالیت‌های فیزیولوژیکی درون سلول، VLC-PUFAها نقش مهمی در تغذیه کودکان دارند (Kaur et al., 2010; Schuchardt et al., 2014).

ماهیان و روغن‌های خوراکی حاصل از آن‌ها منابع غذایی اصلی حاوی VLC-PUFAها می‌باشند، اما با توجه به کاهش جمعیت ماهیان وحشی و همچنین آلودگی روزافزون دریاها و اقیانوس‌ها، به منابع پایدار جایگزین برای این امر نیاز می‌باشد

(Racine & Deckelbaum, 2007). ریزجانداران به دلیل توانایی بالای تولید ترکیبات مختلف، نرخ رشد بالا در محیط‌های غیرپيچیده و سهولت دست‌ورزی ژنتیکی یک منبع بسیار ارزنده برای استحصال لیپیدها می‌باشند. برخی از مخمرها و کپک‌ها به عنوان ریزجانداران روغنی شناخته می‌شوند. سطوح بالایی از تری‌اسیل گلیسرول‌ها در این موجودات انباشته می‌شود که ممکن است حتی تا ۷۰ درصد وزن زیست توده را تشکیل دهد (Kumar et al., 2021; Ratledge & Wynn, 2002).

ریزجلیک *Arthrospira platensis* توانایی بالای تولید متابولیت‌های زیست فعال را دارد (Khan et al., 2005; Mazo et al., 2004). محتوای پروتئین این گونه بیش از ۶۰ درصد توده خشک را تشکیل داده و منبع غنی پروتئین است، حاوی مقادیر قابل توجهی از لیپید (۷/۲ درصد وزنی)، کربوهیدرات (۱۰/۳ درصد وزنی بر وزن)، فیبر خام (۸/۵ درصد) و مواد معدنی (۶/۹ درصد وزنی بر وزن) می‌باشد (Ciferri & Tiboni, 1985). برخی از محققان گزارش کرده‌اند که *A. platensis* منبع غنی اسیدهای آمینه ضروری، اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه، اسید γ-لینولنیک (GLA) و استرول‌ها است

گزارش شده است (Kargiotidou *et al.*, 2008). علاوه بر این، با خاموش کردن سه ایزوفرم *GmFAD3* در گیاه سویا، مقاومت در برابر ویروس لکه‌ای غلاف لوبیا در نهال‌ها کاهش یافته است (Singh *et al.*, 2011). کیفیت روغن‌های خوراکی نیز به محتوای FADs که سطح اسیدهای چرب غیراشباع را تنظیم می‌کنند، بستگی دارد (Zárate *et al.*, 2017). همچنین، ژن‌های *FAD* می‌توانند توانایی مقابله با تنش‌های مختلف، مانند شوری، خشکی، سرما، گرما و عوامل بیماری‌زا را به‌طور قابل توجهی در گونه‌های مختلف تنظیم کنند (Domínguez *et al.*, 2010; Hajiahmadi *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2011). بنابراین، ژن‌های *FAD* در مسیرهای حیاتی مختلف وظایف مهمی را برای تولید PUFAها ایفا می‌کنند. در این راستا، بررسی خصوصیات مختلف ساختاری و عملکردی این ژن‌ها و پروتئین‌ها، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، در *Arthrospira platensis* می‌تواند مسیر را برای درک دقیق مکانیسم عمل *FAD*ها در سلول و همچنین کاندید کردن ژن‌ها به منظور مطالعات انتقال ژن و بیش‌بیان، برای بهبود تولید متابولیت‌های ارزشمند در گونه‌های مختلف، هموار کند.

روش شناسی پژوهش

شناسایی ژن‌های خانواده *FAD* در ژنوم *A. platensis* تا کنون جدایه‌های مختلفی از *A. platensis* از جمله NIES-39، C1، NIES-46، PCC، KCTC و غیره، در نقاط مختلف دنیا جداسازی و شناسایی شده است. اطلاعات ژنومیکی برخی از این جدایه‌ها در پایگاه‌های داده ثبت و در دسترس می‌باشد. در مطالعه حاضر ژنوم ریزجلبک *A. platensis* C1 که توالی کامل آن با طول تقریبی ۶/۴ میلیون جفت باز و با کد دسترسی CP019998.1 منتشر شده، مورد ارزیابی قرار گرفته است. توالی کامل ژنوم جدایه C1 از پایگاه داده NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج و با استفاده از پایگاه GeneMarkS (http://exon.gatech.edu/genemark/genemarks.cgi) (Lomsadze *et al.*, 2018)، همه پروتئین‌های کد شده توسط این ژنوم شناسایی شدند. در مرحله بعد برای استخراج تمامی اعضای خانواده *FAD*، با استفاده از ابزارهای پلتفرم Galaxy (https://usegalaxy.org)، پایگاه داده اختصاصی برای ژنوم C1 ساخته شد و توالی حفاظت شده دمین عملکردی خانواده *FAD* (PF00487) و *FA_desaturase* (PF10520) (PF03405) در پروتئین‌های این پایگاه داده با آستانه E^{-10} ، مورد جستجو قرار گرفت. علاوه بر این تمامی

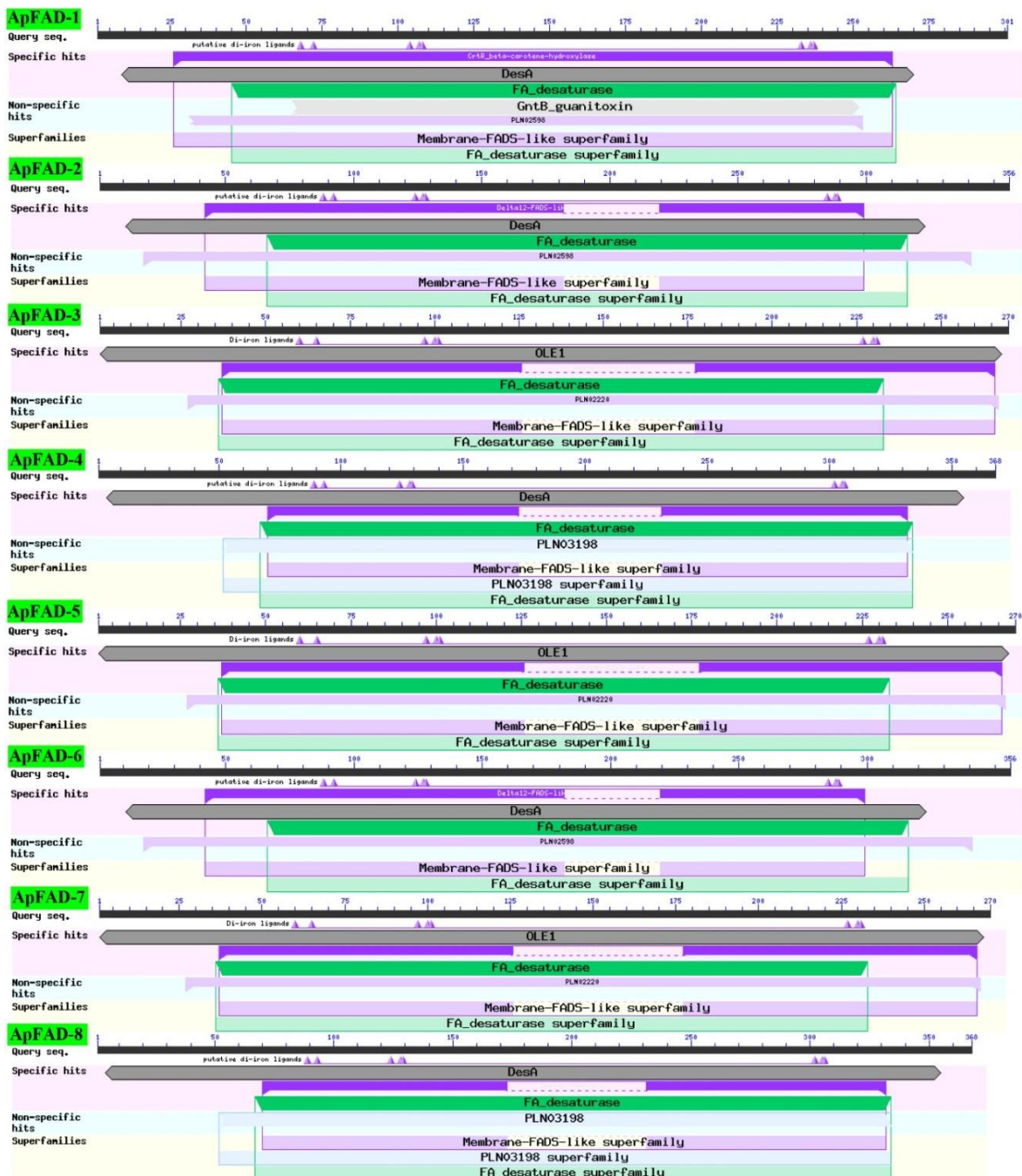
(Connor *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2014) بر اساس نتایج حاصل از مطالعه (Lupatini *et al.*, 2017)، *A. platensis* غنی از ویتامین‌ها و دارای بالاترین محتوای نیاسین B3 (۱۴ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) و ویتامین B6 (۰/۸ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) و ویتامین B12 (۰/۳۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) و ویتامین K (۲/۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) است. بسته به منطقه جغرافیایی، فصل برداشت و روش خشک کردن، تغییرات قابل توجهی در محتوای بتاکاروتن در *Arthrospira* (از ۳۳/۵ تا ۲۳۱/۶ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) مشاهده شده است (BATIONO *et al.*, 2015). ترکیب اسیدهای چرب موجود در لیپیدهای جلبکی عمدتاً شامل اسید پالمیتیک (C16: 0، ۴۶٪) و اسید لینولئیک (C18: 2n-6، ۱۷/۴٪) و به همراه محتوای کمتری از اسید گاما-لینولئیک (C18: 3n-6)، اسید پالمیتولئیک (C16: 1n-7)، اسید اولئیک (C18: 1n-9) و اسید میریستیک (C14: 0) می‌باشد (Diraman *et al.*, 2009). تجزیه و تحلیل ترکیب اسیدهای آمینه نشان داده که اسپیرولینا حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای آمینه گلوتامات (۸/۱۵٪)، آسپاراتات (۵/۳۴٪)، آلانین (۴/۵۴٪)، لوسین (۴/۸۴٪) آرژنین (۳/۹۶٪) والین (۳/۳۴٪)، گلیسین (۰/۳٪)، تیروزین (۲/۵۸٪) و پرولین (۲/۱۵٪) می‌باشد (Khan *et al.*, 2005; Mazo *et al.*, 2004).

مطالعات بسیاری اثبات کرده‌اند که سطوح اسیدهای چرب غیراشباع تک و چندگانه برای خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لیپیدهای غشاء حیاتی بوده و حفظ عملکرد مناسب غشاهای بیولوژیکی به وضعیت فیزیولوژیکی لیپیدهای این غشاها بستگی دارد (Alonso *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2016). این بدان معناست که تنظیم فرآیند غیراشباع سازی در پاسخ به تغییرات محیطی، به‌ویژه در شرایط تنش دمایی، رخ می‌دهد، بنابراین حفظ عملکرد مناسب غشاهای بیولوژیکی و در نتیجه بقای سلول‌ها، امری حیاتی است.

طیف گسترده‌ای از عملکردها، از پاسخ به محرک‌های مختلف زیستی و غیرزیستی تا تنظیم سیستم‌های سیگنال‌دهی هورمونی، توسط پروتئین‌های *FAD* انجام می‌پذیرد (Chi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2011). به عنوان مثال، گیاهان گوجه‌فرنگی با بیش بیان ژن *FAD3* مقاومت قابل توجهی را پس از قرار گرفتن در معرض تنش سرما نشان داده‌اند (Domínguez *et al.*, 2010). بیان القایی دو ژن *FAD2-3* و *FAD2-4* در شرایط تنش‌های سرما و نور در گیاهچه‌های پنبه

Schultz) (<http://smart.embl-heidelberg.de>) SMART خانواده ژنی تایید شد (شکل ۲). توالی‌های DNA و مکان کروموزومی مربوط به این ژن‌ها از ژنوم کامل جدایه C1 استخراج شد و ژن‌ها بر اساس ترتیب قرارگیری در ژنوم اسپیرولینا نام‌گذاری شدند. خصوصیات فیزیوشیمیایی پروتئین‌های ApFAD با استفاده از برنامه ProtParam در پایگاه ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam>) (Gasteiger *et al.*, 2005) پیش‌بینی شدند.

پروتئین‌های FAD در *Arabidopsis thaliana* نیز از پایگاه داده TAIR (<https://www.arabidopsis.org>) (Garcia- Hernandez *et al.*, 2002) استخراج و به عنوان الگو برای انجام جستجوهای BLASTp در برابر ژنوم اسپیرولینا با مقدار $E < 10^{-10}$ مورد جستجو قرار گرفت. پروتئین‌های FAD شناسایی شده با هر دو روش ادغام شدند و توالی‌های تکراری و یا فاقد دامین اختصاصی کامل به صورت دستی حذف شدند. در نهایت تعداد ۸ توالی کامل و غیر تکراری تایید و با استفاده از برنامه‌های Pfam (<http://pfam.xfam.org>) (Bateman *et al.*, 2004) و



شکل ۲. بررسی حضور و موقعیت دامین‌های عملکردی اختصاصی در اعضای خانواده پروتئین‌های ApFAD

بررسی حضور عناصر تنظیمی سیس در ناحیه پروموتور ژن‌های خانواده ApFAD و سنجش روابط تعاملی در شبکه پروتئینی

ناحیه پروموتوری مربوط به هر یک از ژن‌های کاندید در سیانوباکتری با استفاده از برنامه CNNPromoter_b (softberry.com/berry.phtml?topic=cnnpromoter_b) (Umarov & Solovyev, 2017) مورد شناسایی قرار گرفت و سپس عناصر تنظیمی عملکردی سیس در نواحی پروموتور ژن‌های ApFAD، با در نظر گرفتن ناحیه بالادستی ۱۰۰۰ جفت باز، به کمک برنامه PePPER (pepper.molgenrug.nl) (de Jong *et al.*, 2012) شناسایی شدند. بر اساس نتایج حاصل از آنالیزهایی چون هستی‌شناسی ژنی و پروموتور، یکی از ژن‌های کلیدی ApFAD در فرآیندهای متابولیسمی لیپید کاندید و شبکه تعامل پروتئین-پروتئین با برنامه STRING v12.0 (string-db.org) (Szkarczyk *et al.*, 2016) و بر اساس اطلاعات پروتئومیکس ثبت شده در اسپیرولینا پیش‌بینی شد.

شبیه‌سازی پروفایل بیانی ژن‌های ApFAD بر اساس داده‌های RNA-seq

در مطالعه حاضر با توجه به عدم وجود داده‌های RNA-seq برای تمامی ژن‌های اسپیرولینا در شرایط تنش مختلف، از الگوی بیان نزدیک‌ترین ارتولوگ برای هر ژن ApFAD در *Arabidopsis* استفاده شد. پروفایل بیانی ژن‌های FAD کاندید در شرایط تنش‌های محیطی شوری، خشکی، اکسیداتیو، سرما و اسموتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور مقادیر FPKM مربوط به بیان هر ژن در شرایط بیولوژیکی مختلف، از پلتفرم Expression Atlas در پایگاه داده ELIXIR در EMBL-EBI (ebi.ac.uk/gxa/experiments) (Moreno *et al.*, 2022) استخراج شد. در مرحله نهایی مقادیر FPKM^۴ هر ژن به مقادیر log₂ تبدیل شده و برای ترسیم نقشه حرارتی مربوط به بیان این خانواده ژنی از نرم‌افزار TBtools استفاده شد (Chen *et al.*, 2020).

نتایج و بحث

روابط فیلوژنتیکی و موتیف‌های حفاظت شده پروتئین‌های ApFAD

توالی‌های پروتئینی خانواده FAD که در اسپیرولینا شناسایی شدند به همراه اعضای این خانواده ژنی در آرکیدوپسیس برای ارزیابی روابط فیلوژنتیکی بر اساس روش نزدیکترین همسایگی (NJ) با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ از طریق نرم افزار MEGAX (Kumar *et al.*, 2018) استفاده شدند. برای شناسایی موتیف‌های پروتئینی حفاظت شده در ApFADها نیز، برنامه MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) (Bailey *et al.*, 2009) مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی هستی‌شناسی ژنی و تغییرات پس از ترجمه در اعضای خانواده ApFAD

ارزیابی هستی‌شناسی ژنی پروتئین‌های ApFAD، عملکردهای مولکولی، فرآیندهای بیولوژیکی و مکان‌های زیر سلولی پروتئین‌های ApFAD، از طریق برنامه CELLO2GO (cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/) (Yu *et al.*, 2014) برخی از تغییرات مهم پس از ترجمه در توالی پروتئین‌های ApFAD، مانند فسفوریلاسیون^۱، نیتروزیللاسیون^۲، سومویلاسیون^۳ و N-گلیکوزیللاسیون^۴ به ترتیب از طریق سرویس services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhosBac-1.0/ (Miller *et al.*, 2009) با مقدار پتانسیل < 0.5، (PredNTS (kurata14.bio.kyutech.ac.jp/PredNTS/index.php) (Nilamyani *et al.*, 2021) GPS-SUMO (Zhao *et al.*, 2014) (sumo.biocuckoo.cn/index.php) و برنامه ProGlycProt (proglycprot.org) (Choudhary *et al.*, 2019) پیش‌بینی شد.

۱ Neighbor joining

۲ Phosphorylation

۳ N-nitrosylation

۴ Sumoylation

۵ N-glycosylation

۴ Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads

می‌باشد. همچنین، پارامترهای شاخص آلیفاتیک و میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY) پروتئین‌های ApFAD به ترتیب در محدوده ۸۹/۴۹ (در ApFAD-2) تا ۱۰۱/۳ (در ApFAD-1) و ۰/۴۶- (در ApFAD-2) تا ۰/۲۲۲ (در ApFAD-5) پیش‌بینی شدند، که حاکی از آب‌گریز بودن این پروتئین‌ها و همچنین پتانسیل آنها در پاسخگویی به تنش‌های محیطی (Rao et al., 2008) می‌باشد.

روابط فیلوژنتیکی و طبقه‌بندی پروتئین‌های ApFAD

مطالعه روابط تکاملی پروتئین‌های ApFAD آنها را به چهار دسته اصلی Omega (با ۲ پروتئین امگا-۶) در گروه I، CrtR-بتاکاروتن هیدروکسیلاز (FAB2، با ۱ پروتئین) در گروه II، اسفنگولیپید (با ۲ پروتئین) در گروه III و آسیل-لیپید دسچوراز (First، شامل ۳ پروتئین) در گروه IV، طبقه‌بندی کرد، که پروتئین‌های حاضر در هر خوشه فیلوژنتیکی الگوهای موتیف مشابهی را نشان دادند (شکل ۳ الف و ب). همه پروتئین‌های مربوط به دسته First حاوی الگوی حفاظت شده‌ای از موتیف‌های ۳، ۲ و ۱ در ساختار خود بودند، در حالی که ApFAD‌های مربوط به گروه اسفنگولیپید تنها موتیف‌های ۳، ۴ و ۶ را در ساختار خود دارند (شکل ۳ الف و ب و جدول ۳). در هر دو پروتئین امگای شناسایی شده ترکیب و ترتیب موتیف‌ها به صورت موتیف‌های ۳، ۵، ۴ و ۶ بود. همچنین، در تنها عضو پروتئین دسچوراز از گروه CrtR-بتاکاروتن هیدروکسیلاز نیز، علیرغم شباهت ساختاری آن با پروتئین‌های اسفنگولیپید، تنها دارای موتیف‌های شماره ۳ و ۶ در الگوی موتیف خود بود (شکل ۳ الف و ب). موتیف شماره ۳، Histidin Box 1، که سازنده یکی از بخش‌های عملکردی کلیدی در همه پروتئین‌های ApFAD است در همه اعضای خانواده ApFAD حضور داشت.

به‌طور کلی، چهار جعبه هیستیدین عملکردی بسیار حفاظت شده، سه مورد در قسمت انتهای آمینی و یک مورد در ناحیه انتهای کربوکسیلی، در تمام پروتئین‌های ApFAD شناسایی شدند (جدول ۴ و شکل ۳ ج).

شناسایی اعضای خانواده ژنی ApFAD در ژنوم *A. platensis*

و ارزیابی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی

ارزیابی سیستماتیک خانواده ژنی FAD در مقیاس ژنومی، می‌تواند یک اساس مولکولی قابل اتکا به منظور افزایش کیفیت روغن‌های خوراکی از طریق مهندسی متابولیک مسیر سنتز اسیدهای چرب غیراشباع فراهم کند. مطالعه ژنومی این خانواده در گونه‌های مختلف گیاهی و ریزجانداران، از قبیل *Arabidopsis* (Michaelson et al., 2009)، سویا (Chi et al., 2011)، گندم (Hajiahmadi et al., 2020)، برنج (Chen et al., 2019)، ریزجلبک‌های *Thalassiosira pseudonana* (Tonon et al., 2005)، *Schizochytrium* sp. (Jia et al., 2022) و گونه‌های مختلف قارچ *Aspergillus* (Tang et al., 2018)، صورت گرفته است. با توجه به اهمیت فراوان ریزجلبک اسپیرولینا در زمینه‌های مختلف صنعتی، تغذیه و دارویی، در مطالعه حاضر ژنوم کامل این ریزجلبک، به منظور جستجوی اعضای خانواده ژنی FAD که نقش بسزایی در تامین مواد مغذی و همچنین ایجاد مقاومت به تنش‌های مختلف دارند، مورد بررسی قرار گرفت. پس از حذف توالی‌های تکراری و نیز موارد فاقد دمین اختصاصی کامل، تعداد ۸ پروتئین غیر تکراری بالقوه ApFAD در ژنوم *A. platensis* C1 شناسایی شدند (جدول ۱).

مطابق نتایج پیش‌بینی شده در این مطالعه، چهار نوع پروتئین ApFAD شامل، Omega (FAD2) Acyl-CoA desaturase، (First) CrtR_beta-carotene-hydroxylase (FAB2) و Sphingolipid desaturase، بر اساس توزیع دمین اختصاصی پروتئین در اسپیرولینا شناسایی شدند (جدول ۲). خواص فیزیکیوشیمیایی متنوعی در پروتئین‌های ApFAD پیش‌بینی شد وزن مولکولی پروتئین‌ها از ۳۱/۳۷ (در ApFAD-5) تا ۴۲/۱۵ کیلو دالتون (در ApFAD-4) متغیر بود. مقادیر نقطه ایزوالکتریک (pI) در پروتئین‌های ApFAD از ۶/۲۹ (در ApFAD-8) تا ۸/۹ (در ApFAD-1) متغیر بود، با این حال، اکثر پروتئین‌های شناسایی شده (~۶۲٪) مقادیر pI بیش از ۷ را نشان دادند، که ماهیت قلیایی اکثر این پروتئین‌ها را نشان می‌دهد (جدول ۲). مقادیر شاخص ناپایداری (II) در ~۶۲،۵٪ از ApFAD‌های شناسایی شده بیشتر از ۴۰ پیش‌بینی شد که نشان دهنده ناپایدار بودن این پروتئین‌ها

جدول ۱. لیست ژن‌های FAD شناسایی شده در ژنوم ریزجلبک اسپیرولینا و مشخصات ژنتیکی آنها

توصیف ژن	موقعیت ژنومی	اندازه DNA	نام ژن	شناسه دسترسی در NCBI
Gene description	Genomic position	DNA length (bp)	Gene symbol	NCBI locus ID
fatty acid desaturase; CrtR_beta-carotene-hydroxylase	304166..305071	906	ApFAD-1	AFXD01000010.1
Delta-12 acyl-phospholipid desaturase; OMEGA-6 FATTY ACID DESATURASE	600352..601422	1071	ApFAD-2	APLC1_0651
delta-9 desaturase, desC; Stearoyl-CoA desaturase (Delta-	788338..789801	1464	ApFAD-3	AJ002065.1

9 desaturase								
delta-6 desaturase (D6d)	833310..834461	1151	<i>ApFAD-4</i>	FJ752023.1				
delta 9 fatty acid desaturase, acyl-lipid desaturase	1138073..1138438	813	<i>ApFAD-5</i>	AF002252.1				
delta-12 desaturase; desA; OMEGA-6 FATTY ACID DESATURASE	1432941..1434223	1282	<i>ApFAD-6</i>	X86736.1				
stearoyl-CoA desaturase (delta-9 desaturase)	2236276..2237088	813	<i>ApFAD-7</i>	APLC1_2346				
Delta6 Fatty Acid Desaturase (Delta6-FADS)-like	2397108..2398214	1107	<i>ApFAD-8</i>	APLC1_2499				

جدول ۲. خصوصیات فیزیوشیمیایی پروتئین‌های ApFAD شناسایی شده در ژنوم ریزجلبک اسپرولینا

نام ژن Gene symbol	شناسه پروتئین Protein id	طول پروتئین Protein length (aa)	وزن مولکولی MW (Da)	نقطه ایزوالکتریک pI	شاخص ناپایداری Instability index	شاخص آلیفاتیک Aliphatic index	متوسط هیدروپاتی کل GRAVY	نوع پروتئین Protein type	دامین عملکردی Domain
<i>ApFAD-1</i>	EKD10288.1	301	34889.59	8.9	43.74	101.73	0.151	CrtR_beta-carotene-hydroxylase; FAB2	FA_desaturase_2 (PF03405)
<i>ApFAD-2</i>	UWU45967.1	356	41842	6.56	42.28	89.49	-0.046	Omega 6; FAD2	FA_desaturase (PF00487)
<i>ApFAD-3</i>	CAA05166.1	270	31406.51	7.27	27.78	96.37	0.208	Acyl-CoA desaturase; First	FA_desaturase (PF00487), Lipid_DES (PF08557)
<i>ApFAD-4</i>	ACN65115.1	368	42154.73	6.48	40.69	98.26	0.181	Sphingolipid desaturase; FAB2	FA_desaturase_2 (PF03405)
<i>ApFAD-5</i>	AAD00996.1	270	31376.48	7.27	28.41	96.74	0.222	Acyl-CoA desaturase; First	FA_desaturase (PF00487), Lipid_DES (PF08557)
<i>ApFAD-6</i>	CAA60415.1	351	40928.39	7.8	42.05	91.03	0.063	Omega 6; FAD2	FA_desaturase (PF00487)
<i>ApFAD-7</i>	UWU47577.1	270	31406.51	7.27	27.78	96.37	0.208	Acyl-CoA desaturase; First	FA_desaturase (PF00487), Lipid_DES (PF08557)
<i>ApFAD-8</i>	UWU47727.1	368	42057.52	6.29	41.15	97.99	0.191	Sphingolipid desaturase; FAB2	FA_desaturase_2 (PF03405)

جدول ۳. مشخصات و الگوی موتیف‌های حفاظت شده پیش‌بینی شده در پروتئین‌های ApFAD

شماره موتیف Motifs No.	E-value	Sites	طول Width	توالی Sequence	مستندسازی Annotation
1	1.50E-06	3	50	RIVVVFHCTWFVNSATHKFGYQTYQSNDSKNCWWVALVTYGEGWHNNHH	C-terminal His-Box III
2	3.00E-06	3	50	WSHMGWMLREIPADADVPRFTKDINEDPVYLFQNYFIPIQVALGVVLYL	-
3	2.10E-02	7	21	HDITHRSFSRNKWNVNYLLGHT	N-terminal His-Box I
4	4.30E-03	4	41	WKFHRHTLLHHTYADIPGRDPEQWGDELVRLSPSVEYRWY	-
5	3.30E-03	2	50	SWRIGHNQHHKYTNRMELDNAWQPWRKEEYQNAGKFMQVTYDLFRGRAWW	His-Box II
6	3.40E-02	5	41	NWLVGGJNYHIVHHLFPAIPWYNYRKAAPILAEEVCEEYGY	His-Box IV

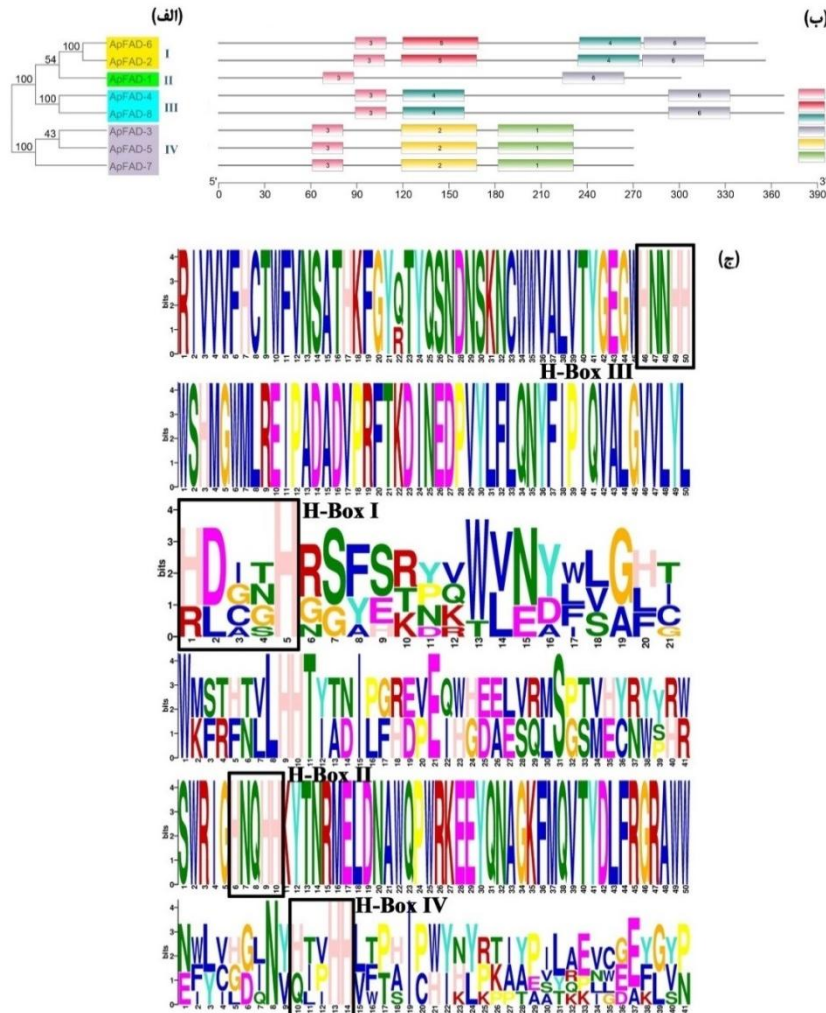
کربوکسیلی پروتئین‌های مرتبط با گروه آسیل-لیپید دساچوراز (*ApFAD-3*، *ApFAD-5* و *ApFAD-7*) پیش‌بینی شد، در حالی که جعبه هیستیدین ۴ (موتیف ۶) در گروه‌های Omega-CrtR، بتاکاروتن هیدروکسیلاز (*ApFAD-1*) و اسفنگولیپید (*ApFAD-4* و *ApFAD-8*) شناسایی شد. موتیف‌های هیستیدینی موجود در FADهای غشائی، معمولاً با الگوهای H(X)2-3HH، H(X)3-4H و H(X)2-3HH، گزارش شده‌اند و فعالیت کاتالیزوری این پروتئین‌ها

در واقع این ساختارهای هیستیدینی حفاظت شده که در پروتئین‌های FAD موجودات مختلف یافت می‌شود، موجب تنظیم عملکرد سلولی این پروتئین‌ها به ویژه در شرایط تنش محیطی می‌شوند (Díaz et al., 2018). جعبه هیستیدین ۱ (موتیف ۳) در تمام پروتئین‌های *ApFAD*، شناسایی شد، در حالی که جعبه هیستیدین ۲ (موتیف ۵) تنها در پروتئین‌های *ApFAD-2* و *ApFAD-6* (پیش‌بینی شد (جدول ۳). همچنین، جعبه هیستیدین ۳ (موتیف ۱) فقط در ناحیه انتهای

می‌شود، بنابراین بررسی روابط تکاملی بین گونه‌ها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در رابطه با عملکردهای ژنی و پروتئینی فراهم کند.

به‌واسطه اتصال به ساختارهای دای-آهن از طریق همین نواحی حفاظت شده صورت می‌گیرد (Alonso *et al.*, 2003).

در مطالعه روابط تکاملی گونه‌های مختلف، رویدادهایی نظیر مضاعف‌شدگی ژنی و حتی ژنومی، بسیار مشاهده



شکل ۳. روابط فیلوژنتیکی، الگوی موتیف‌های پروتئینی و لوگوی ساختاری مربوطه در پروتئین‌های ApFAD. (الف) بررسی روابط فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGAX و ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ بر مبنای روش نزدیکترین همسایگی (NJ) پروتئین‌های FAD در ژنوم اسپیرولینا را به چهار گروه اصلی تقسیم کرد. (ب) الگوی موتیف‌های پروتئینی در هر کلاستر منحصریفرود بود و موتیف شماره ۳ به‌عنوان His-Box 1 پایه در همه پروتئین‌ها پیش‌بینی شد. (ج) بررسی لوگوهای پیش‌بینی شده برای هر موتیف وجود چهار ناحیه حفاظت شده His-Box را در پروتئین‌های ApFAD مشخص ساخت، که محور عمودی بیانگر میزان حفاظت شدگی اسیدهای آمینه و محور افقی نیز نشان دهنده تنوع و تعداد آن‌ها است.

جدول ۴. نواحی جعبه هیستیدین عملکردی و حفاظت شده در ساختار پروتئین‌های ApFAD در اسپیرولینا

شناسه ژن Gene ID	Box 1		Box 2		Box 3		Box 4	
	توالی Sequence	موقعیت Position	توالی Sequence	موقعیت Position	توالی Sequence	موقعیت Position	توالی Sequence	موقعیت Position
<i>ApFAD-1</i>	HDASH	68-88	-	-	-	-	HLIHH	224-264
<i>ApFAD-2</i>	HDCGH	88-108	HNQHH	119-168	-	-	HIPHH	276-316
<i>ApFAD-3</i>	RLITH	61-81	-	-	HNNHH	182-231	-	-
<i>ApFAD-4</i>	HDGNH	89-109	-	-	-	-	HTVHH	293-333
<i>ApFAD-5</i>	RLITH	61-81	-	-	HNNHH	91-140	-	-
<i>ApFAD-6</i>	HDCGH	89-109	HNQHH	120-169	-	-	HIPHH	277-317
<i>ApFAD-7</i>	RLITH	61-81	-	-	HNNHH	182-231	-	-
<i>ApFAD-8</i>	HDGNH	89-109	-	-	-	-	QTVHH	293-333

اکسیداسیون اکسیژن مولکولی و تبدیل آن به دو مولکول آب، نقش دارند. علاوه بر این، ۱۷ درصد از ApFADها دارای این پتانسیل بودند که به عنوان مولکول تنظیم کننده در اتصال پروتئین‌ها به یون‌های آهن عمل کنند. علاوه بر این، ۱۱، ۱۱ و ۵ درصد از ژن‌های ApFAD، به ترتیب به عنوان آنزیم‌های دساچوراز تنظیم کننده اصلی در فعالیت مولکولی اسیدهای چرب پالمیتوئیک، استئارویل-CoA و لینئول-CoA نقش دارند (شکل ۵). نتایج حاصل از بررسی فرآیندهای بیولوژیکی نشان داد که بیشتر ژن‌های ApFAD در فرآیند بیوسنتزی اسیدهای چرب (۳۷٪) و فرآیند متابولیسم لیپید (۳۱٪) ایفای نقش می‌کنند (شکل ۵). علاوه بر این، ۱۶ و ۱۱٪ از ApFADها، به ترتیب، دارای پتانسیل کنترل گلیکوزیلاسیون لیپیدها و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه بودند، که به نوبه خود بیانگر نقش پر اهمیت این پروتئین‌ها در اسپیرولینا به دنبال قرارگیری در شرایط دارای تنش می‌باشد (Lu et al., 2020). علاوه بر این، برخی از ژن‌های ApFAD احتمالاً در تنظیم فرآیند متابولیسم اسید کربوکسیلیک (۵٪)، نقش دارند، که می‌تواند دخالت گسترده ژن‌های ApFAD را در فرآیندهای سلولی مختلف در طول چرخه زندگی اسپیرولینا نشان دهد (Offermanns, 2017).

تغییرات پس از ترجمه، که اثرات مهمی بر تنظیم واکنش‌های ناشی از محرک‌ها در موجودات زنده دارند (Hashiguchi & Komatsu, 2016)، نواحی دارای تغییرات فسفوریلاسیون، N-نیتروزیلاسیون، سومیلیشن و N-گلیکوزیلاسیون در پروتئین‌های ApFAD پیش‌بینی شدند. به جز یکی از پروتئین‌های ApFAD متعلق به گروه Omega 6، (ApFAD-2)، سایر پروتئین‌های ApFAD پتانسیل گلیکوزیله شدن اتم نیترژن در یکی از اسید آمینه‌های آسپاراژین (N) خود را دارا بودند، که در این میان پروتئین‌های ApFAD-4 و ApFAD-8 متعلق به کلاس اسفنگولیپیدها، بالاترین پتانسیل را نشان دادند (شکل ۶ الف). نتایج بررسی تغییرات سومیلیشن در پروتئین‌های ApFAD بیانگر وجود حداقل یک تغییر در هر پروتئین بود؛ به طوری که بیش‌ترین اسید آمینه‌های تغییر یافته در پروتئین‌های ApFAD-1، ApFAD-2، ApFAD-8، (به ترتیب از دسته بتاکاروتن هیدروکسیلاز، امگا ۶ و اسفنگولیپید) یافت شدند (شکل ۶ ب). علاوه بر این، همه ApFADهای متعلق به کلاس آسیل-لیپید دساچوراز و همچنین ApFAD-6 از گروه Omega 6، دارای تغییرات قابل توجهی در اسید آمینه لیزین (K) خود بودند (شکل ۶ ب و جدول S1).

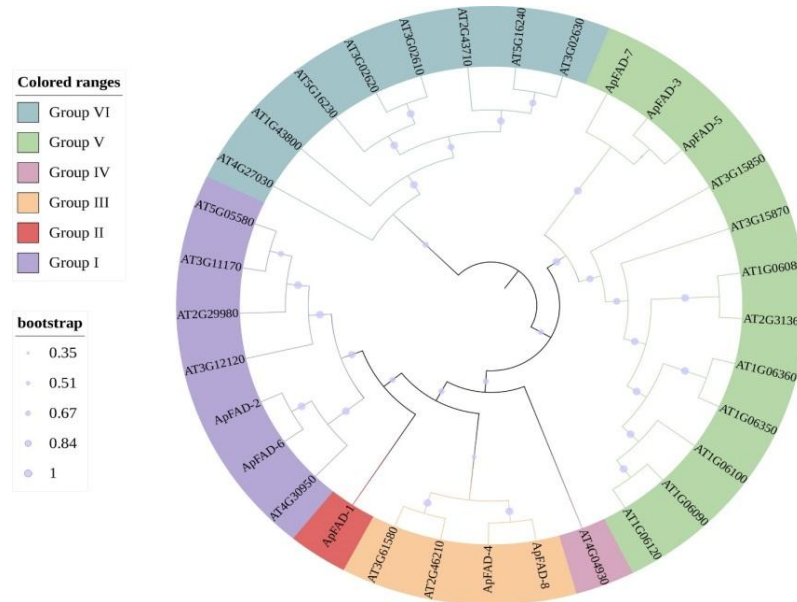
برای ارزیابی بیشتر روابط تکاملی ژن‌های FAD، یک درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی‌های اسید آمینه پروتئین‌های FAD در *A. platensis* و *Arabidopsis thaliana* به عنوان یک موجود مدل تأیید شده، ترسیم شد. بر اساس نتایج بدست آمده، پروتئین‌های FAD در شش گروه مختلف دسته‌بندی شدند (شکل ۴). FADهای مربوط به کلاس امگا در این گونه‌ها در گروه I طبقه‌بندی شدند، در حالی که گروه II تنها پروتئین مربوط به گروه CrtR-بتاکاروتن هیدروکسیلاز را در خانواده ژنی FAD در اسپیرولینا در بر می‌گیرد. همچنین، اعضای مرتبط با خوشه‌های اسفنگولیپید در کلاس‌های III و IV گروه بندی شدند (شکل ۴). گروه V با ۱۲ عضو به عنوان بزرگترین کلاس در این درخت فیلوژنتیکی و به عنوان پروتئین‌های حاوی دمین‌های اختصاصی (PF00487) FA_desaturase و Lipid_DES (PF08557)، تحت عنوان گروه‌های آسیل-لیپید دساچوراز، شناسایی شد. گروه VI نیز با هشت عضو به عنوان گروه بزرگ دیگر، دربرگیرنده پروتئین‌های FAD4، پیش‌بینی شدند. علاوه بر این، با توجه به تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، ApFADها در همه گروه‌ها بجز گروه VI وجود داشتند که بیانگر فقدان پروتئین‌های کلاس FAD4 در ژنوم اسپیرولینا می‌باشد، که این موضوع می‌تواند بیانگر امکان رخداد موتاسیون‌هایی در جهت حذف یا تغییر نوع فعالیت کاتالیزوری این پروتئین‌ها باشد (Lee et al., 2016). بر اساس نتایج مطالعه حاضر، می‌توان پیشنهاد کرد که منشأ تکاملی مشابهی ممکن است برای برخی از ژن‌های خوشه‌بندی شده وجود داشته باشد، که پتانسیل ایجاد عملکردهای مشابهی را در سلول‌ها فراهم می‌سازد.

تفسیر نتایج هستی‌شناسی ژنی و تغییرات پس از ترجمه در خانواده ApFAD

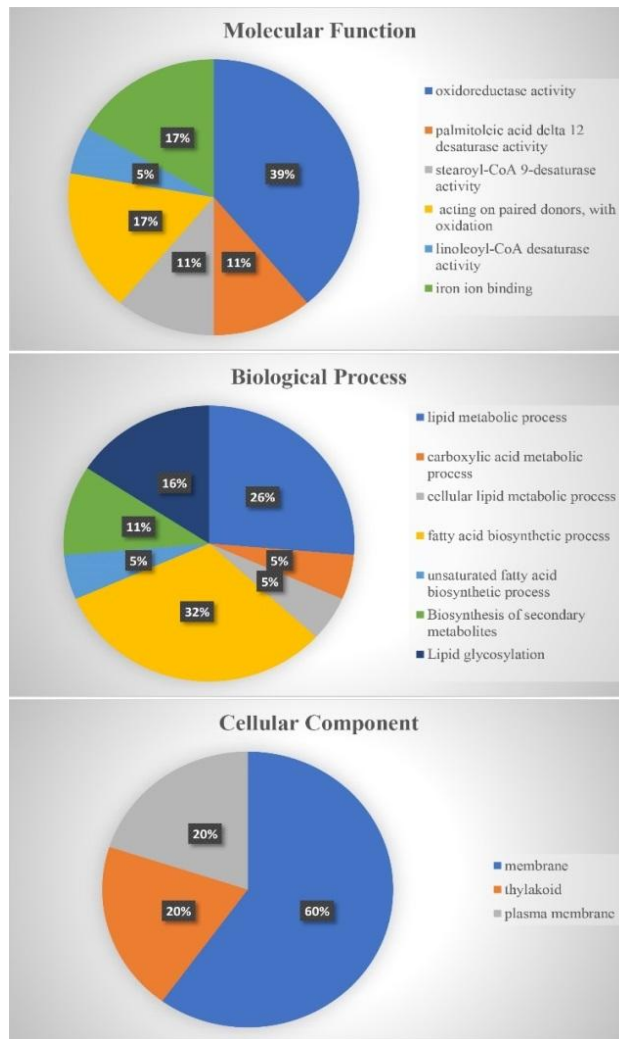
بر اساس نتایج هستی‌شناسی ژن، فرآیندهای بیولوژیکی تنظیم شده توسط ژن‌های خانواده ApFAD، مشارکت قابل توجه آنها را در فرآیندهای متابولیسم لیپید، فرآیندهای بیوسنتزی اسیدهای چرب و فرآیندهای اکسیداسیون-کاهش نشان داد. با توجه به تجزیه و تحلیل نتایج، بیشتر پروتئین‌های ApFAD در اسپیرولینا در غشای سلولی (۶۰٪)، غشای پلاسمایی (۲۰٪) و تیلاکوئید در کلروپلاست (۲۰٪) قرار گرفته‌اند (شکل ۵). پیش‌بینی عملکرد مولکولی ژن‌های ApFAD نشان داد که ۳۹ و ۱۷ درصد از آنها، به ترتیب در فعالیت اکسیدوردوکتازی و

سیستئین نیتروزیله شده قابل توجهی را داشتند (جدول S1). محل‌های فسفوریلاسیون پس از ترجمه پروتئین‌های ApFAD طیف گسترده‌ای از باقی‌مانده‌های سرین فسفریله شده (S) همراه با برخی از مکان‌های تغییر یافته ترئونین (T) را نشان دادند (شکل ۶ د).

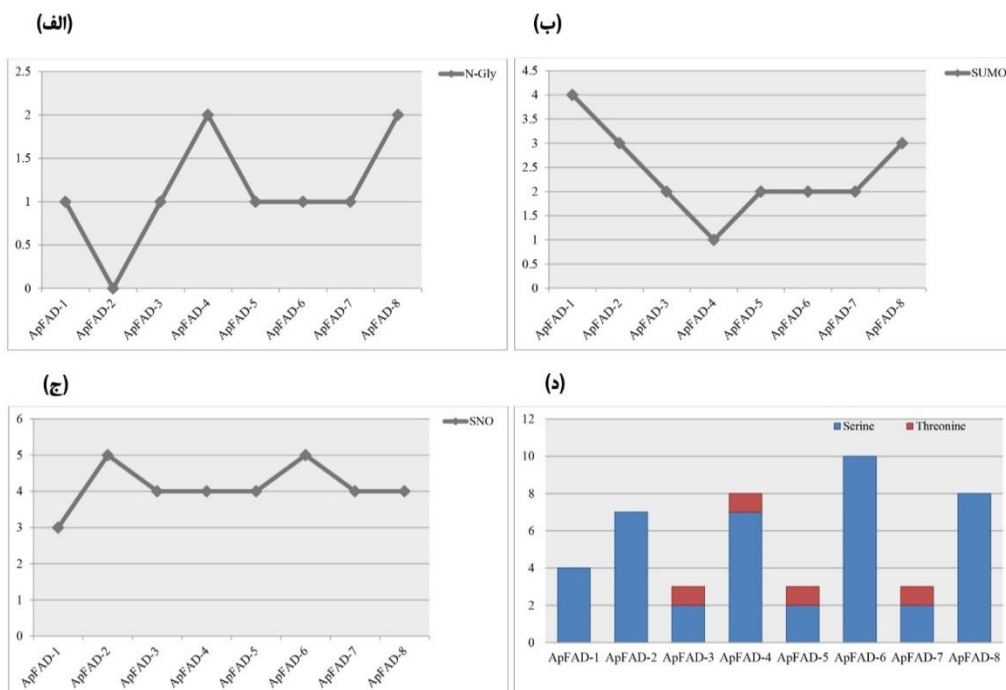
تمامی پروتئین‌های ApFAD دارای نواحی گسترده‌ای از تغییرات نیتروزیلایسیون در اسید آمینه‌های سیستئین (C) خود بودند، که بالاترین میزان آن‌ها در پروتئین‌های گروه Omega 6 اسپیرولینا یافت شد (شکل ۵ ج). همچنین، پروتئین‌های گروه اسفنگولیپیدها و آسیل-لیپید دساجورازها نیز اسید آمینه‌های



شکل ۴. بررسی روابط تکاملی بین پروتئین‌های خانواده FAD در ریز جلیک اسپیرولینا و گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* آن‌ها را در شش کلاستر مختلف دسته‌بندی کرد، که هر گروه نمایانگر کلاستر عملکردی ویژه‌ای از پروتئین‌های FAD می‌باشد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGAX و با تکرار ۱۰۰۰ بوت استرپ بر مبنای روش نزدیکترین همسایگی (NJ) ترسیم شد.



شکل ۵. نتایج حاصل از آنالیز هستی‌شناسی ژن (Gene Ontology) پروتئین‌های ApFAD در ریزجلبک اسپیرولینا و عملکردهای مختلف سلولی در مسیرهای متنوع عملکرد مولکولی، فعالیت بیولوژیکی و اجزای زیر سلولی.



شکل ۶. نتایج حاصل از بررسی تغییرات پس از ترجمه در پروتئین‌های ApFAD. (الف) بالاترین میزان تغییرات N-گلیکوزیلاسیون در پروتئین‌های گروه اسفنگولیپید یافت شد. (ب) بیشترین و کمترین میزان تغییرات سومویلاسیون به ترتیب در تنها پروتئین گروه بتاکاروتن هیدروکسیلاز و ApFAD-4 از دسته اسفنگولیپید بود. (ج) تغییرات نیتروزیلاسیون دارای روند هماهنگی در پروتئین‌های ApFAD، با بالاترین میزان در گروه Omegaها بود. (د) نیمی از پروتئین‌های ApFAD تنها در اسید آمینه سرین و نیمی دیگر علاوه بر آن در اسید آمینه ترئونین نیز متحمل تغییرات فسفریلاسیون شدند. محور افقی نشانگر نام پروتئین و محور عمودی حاکی از تعداد اسید آمینه تغییر یافته پس از ترجمه در هر پروتئین است.

هورمون‌های مختلف و شرایط محرک، در ناحیه بالادست ژن‌های ApFAD پیش‌بینی شدند (شکل ۷).

عناصر مشترک سیس در پروموتور، مانند عنصر هسته CAAT-box و TATA-box، در تمام ژن‌های ApFAD پیش‌بینی شدند، که تعداد این عناصر در ژن‌های ApFAD-6، ApFAD-7 و ApFAD-4 به ترتیب متعلق به کلاسترهای امگا، آسیل-لیپید و اسفنگولیپید، بیشتر بود که می‌تواند بیانگر پتانسیل بالای این ژن‌ها در تنظیم کارایی و صحت انجام رونویسی باشد (Tora & Timmers, 2010). عناصر مرتبط با هورمون‌ها، مانند ABRE (پاسخ‌دهی به اسید آبسزیک)، CGTCA (عنصر پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات) و TCA-element (عنصر پاسخ‌دهنده به اسید سالیسیلیک)، تقریباً در همه پروموتورها شناسایی شدند. تعدد و فراوانی تقریباً مشابه این عناصر پاسخگو به هورمون‌ها، در واقع بیانگر نقش مهم این ژن‌ها در تنظیم مراحل مختلف رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش‌های محیطی در ریزجلیک اسپیرولینا می‌باشد؛ به طور مثال، تمامی ژن‌های پیش‌بینی شده در کلاستر آسیل-لیپیدها در اسپیرولینا دارای عناصر سیس پاسخگو به هورمون‌هایی نظیر متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک، اکسین و جیبرلین بودند، که می‌تواند نشانگر اهمیت این ژن‌ها در مسیرهای سلولی مختلفی چون تنظیم رشد و ایجاد پاسخ مقاومتی در برابر تنش‌های محیطی باشد (Verma et al., 2016).

علاوه بر این، عناصر پاسخ‌دهنده به هورمون‌های جیبرلین (P-box) در ApFAD-5 و اکسین (AuxRR-core) و TGA-element در ApFAD-3 و ApFAD-4 نیز پیش‌بینی شدند، که پتانسیل این ژن‌ها را در تعدیل جنبه‌های مختلف رشد و نمو در اسپیرولینا آشکار می‌سازد (Soria-García et al., 2019).

عناصر پاسخگو به نور Box_4، G-Box و GATA-motif در همه ژن‌های ApFAD یافت شدند، که احتمالاً به پتانسیل بالای این ژن‌ها در زمینه تولید متابولیت‌هایی مانند فلاونوئیدها، اشاره دارد. فاکتورهای سیس مختلفی، از قبیل LTR (دخیل در پاسخگویی به دماهای پایین)، MYB (دخیل در پاسخگویی به تنش‌های

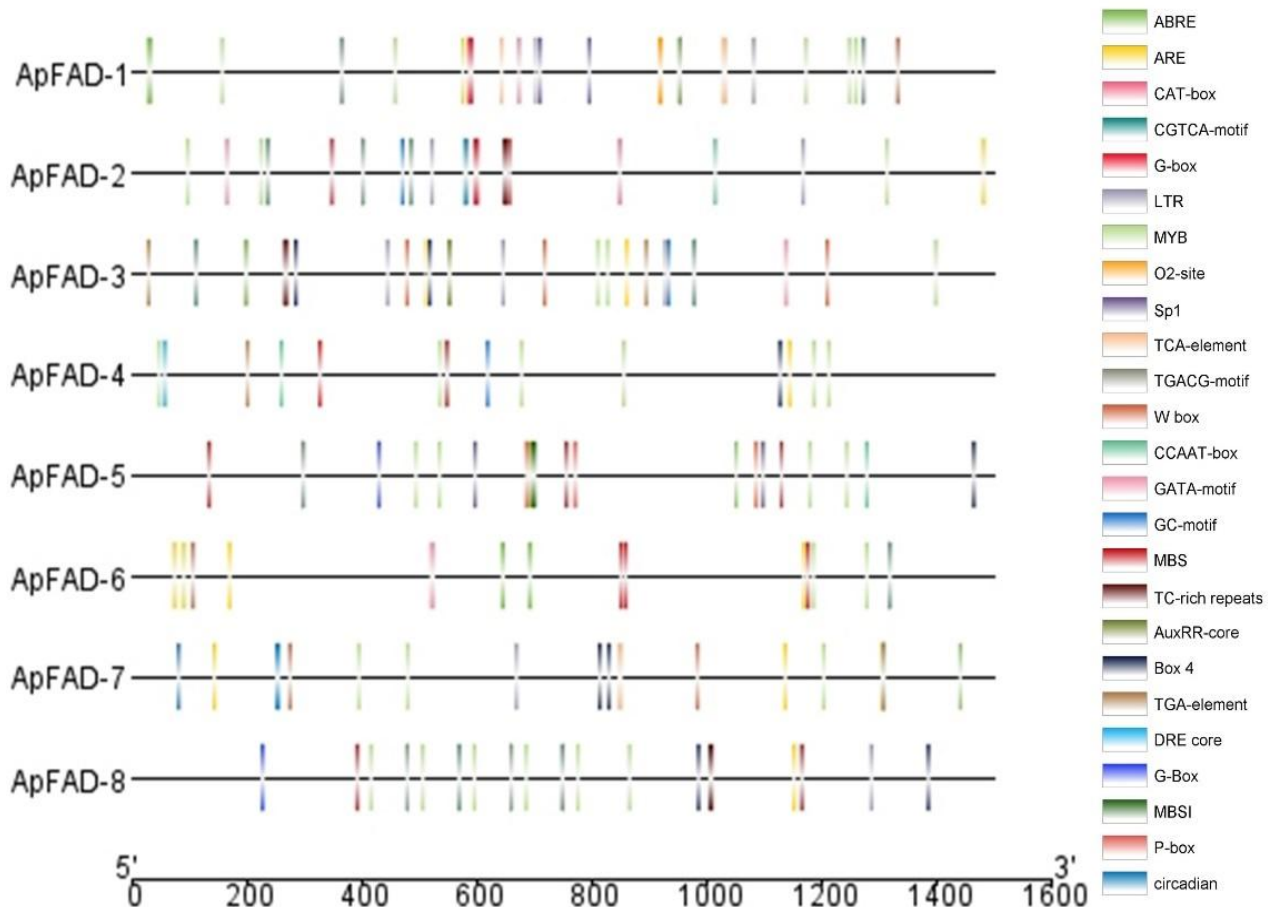
مطابق نتایج بدست آمده، پروتئین‌های متعلق به گروه Omega 6، شامل ApFAD-2 و ApFAD-6، در اسپیرولینا، تنها در محل اسید آمینه سرین در ساختار خود متحمل تغییرات فسفریلاسیون شدند. پروتئین ApFAD-1، به عنوان تنها عضو متعلق به کلاس بتاکاروتن هیدروکسیلاز، نیز دارای ۴ ناحیه فسفریله شده در اسید آمینه سرین در ساختار خود بود. این در حالیست که، تمامی پروتئین‌های متعلق به گروه آسیل-لیپید دساجوراز به همراه تنها یک عضو از پروتئین‌های اسفنگولیپید (ApFAD-4)، هم در اسید آمینه‌های سرین و هم ترئونین در ساختار خود، متحمل تغییرات فسفریلاسیون شده بودند (جدول S1). بطور کلی، پروتئین‌های ApFAD متعلق به گروه‌های Omega 6 (ApFAD-2 و ApFAD-6) و اسفنگولیپید (ApFAD-4 و ApFAD-8) دارای بیشترین فسفریلاسیون در ساختار قابل ترجمه خود بودند، که این موضوع می‌تواند نقش این پروتئین‌ها را در ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی برجسته سازد (Kazanecki et al., 2007). این تغییرات پس از ترجمه در ساختار پروتئین‌ها رویدادهای پردازش کووالانسی هستند که خواص بیوفیزیکی یک پروتئین را از طریق افزودن یک گروه اصلاح‌کننده به یک یا چند اسید آمینه تغییر داده (Yan et al., 2023) و به عنوان مکانیسم‌های تنظیمی کلیدی در طیف وسیعی از پروتئوم‌ها عمل می‌کنند (Ramazi & Zahiri, 2021).

پیش‌بینی عناصر تنظیمی سیس در نواحی پروموتوری ژن‌های ApFAD

شناسایی عناصر تنظیم‌کننده سیس در نواحی پروموتوری می‌تواند به درک عملکرد دقیق ژن‌ها کمک کرده و شبکه‌های تعاملی بین آن‌ها را نشان دهد؛ به طوری که پروتئین‌های مختلف در مواجهه با تنش‌های غیرزیستی، از طریق اتصال به عناصر عملکردی موجود در پروموتور ژن‌های هدف، آن‌ها را تنظیم می‌کنند (Cao et al., 2016). در مطالعه حاضر، نواحی پروموتوری مربوط به ژن‌های ApFAD در ژنوم اسپیرولینا برای یافتن عناصر تنظیم‌کننده سیس مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق نتایج حاصل، انواع مختلفی از عناصر سیس برای مقابله با

پاسخگویی به تنش خشکی)، به عنوان عناصر تنظیمی دفاعی و دارای اهمیت فراوان، در ناحیه پرموتری تمامی ژن‌های *ApFAD* پیش‌بینی شدند (شکل ۷).

محیطی)، W-box (متصل شونده به پروتئین‌های WRKY در راستای پاسخگویی به تنش‌های غیرزیستی)، TC-rich (دخیل در مکانیسم دفاعی و پاسخگویی به تنش‌ها) و MBS (دخیل در القای بیوستنز فلاونوئیدها و محل اتصال پروتئین‌های MYB در جریان



شکل ۷. عناصر سیس موجود در نواحی پرموتری ژن‌های *ApFAD* در اسپیرولینا.

طریق تحریک بیان ژن‌هایی چون اسفنگولیپید دسچورازها، قادر است شرایط تنش را تحمل کند. علاوه بر این، ژن‌های *ApFAD-5* (از کلاس آسیل-لیپید دسچوراز) و *ApFAD-6* (متعلق به گروه Omega 6)، نیز دارای تعداد قابل توجهی از عناصر تنظیمی MBS در نواحی پرموتری خود بودند، که نشان دهنده پتانسیل این ژن‌ها در تولید متابولیت‌های فلاونوئیدی و در نتیجه نقش پررنگ آن‌ها در ایجاد ارزش غذایی بالا در اسپیرولینا می‌باشد (Kargiotidou *et al.*, 2008; Li-Beisson *et al.*, 2013). در واقع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مختلف موجود در گیاهان و ریزجلبک‌های سبز خوراکی نقش ارزشمندی را در راستای کاهش یا جلوگیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، مانند رادیکال‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و گونه‌های رادیکال غیرآزاد مانند پراکسید هیدروژن، که می‌توانند باعث آسیب

ژن‌های متعلق به گروه آسیل-لیپید دسچورازها، علاوه بر فاکتورهای پاسخگو به تنش‌های مختلف، دارای عناصر سیس پاسخگو به هورمون‌های متعدد و متفاوتی چون اسید سالیسیلیک، جیبرلین و اکسین، در ناحیه پرموتری خود بودند، که وجه تمایز آن‌ها در مقایسه با سایر گروه‌های طبقه‌بندی بود و می‌تواند بیانگر پتانسیل قابل توجه این ژن‌ها در تنظیم مراحل مختلف رشد و نمو و نیز تحریک تولید متابولیت‌های مغذی در اسپیرولینا باشد (Lu *et al.*, 2020). همچنین، مطابق نتایج بدست آمده مشخص شد که ژن‌های *ApFAD* متعلق به کلاس اسفنگولیپیدها، علاوه بر تعداد قابل توجهی از عناصر تنظیم کننده پاسخ به محرک‌ها، دارای عناصر تنظیمی موثر در تحریک بیوستنز فلاونوئیدها در سلول بودند؛ در واقع زمانی که اسپیرولینا در شرایط محیطی تنش‌زا قرار می‌گیرد، به واسطه دارا بودن پتانسیل تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف، از

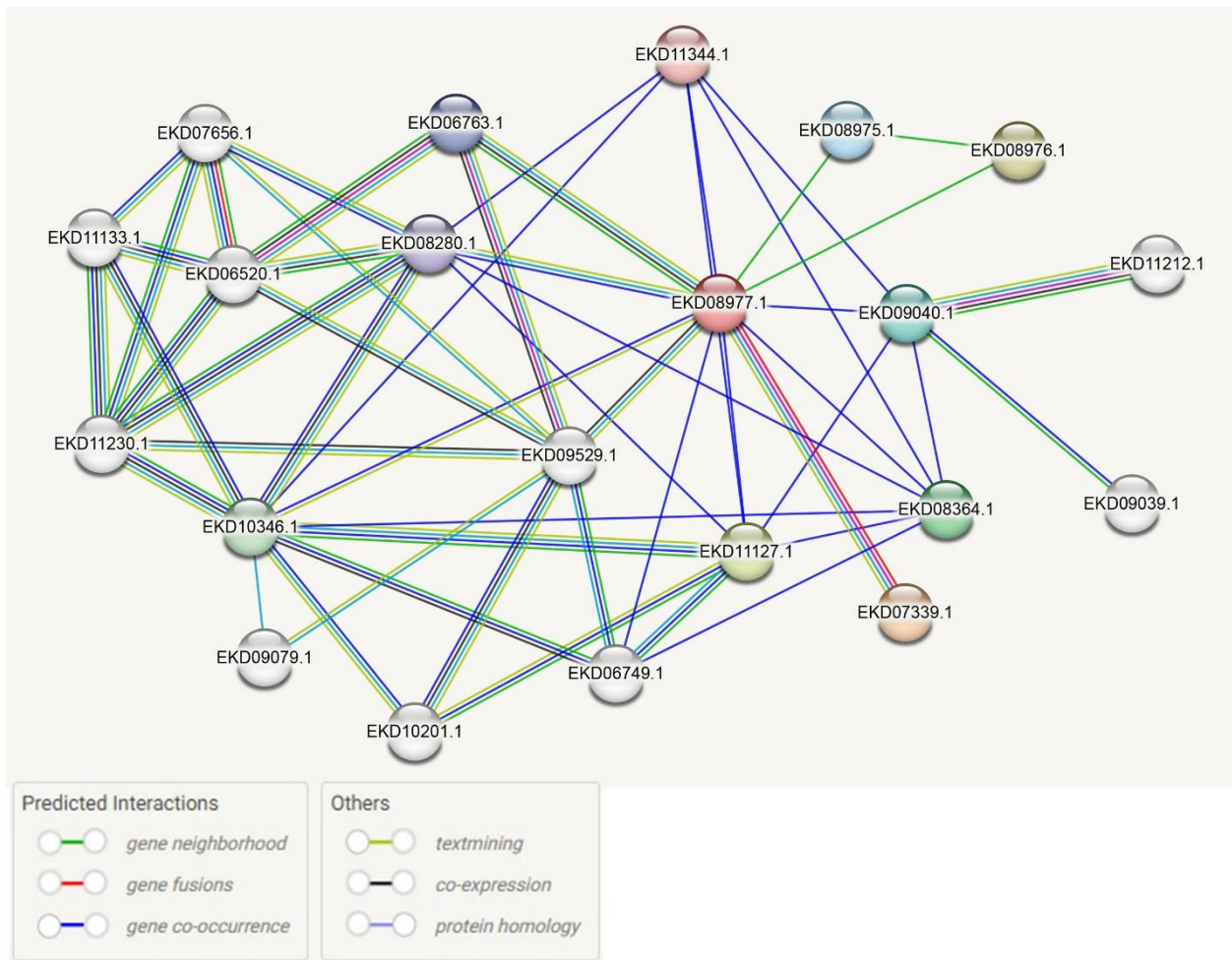
می‌باشد (شکل ۸ و جدول S2). در واقع، تفسیر نتایج حاصل از آنالیز هستی‌شناسی ژنی این پروتئین‌های FAD در تعامل با یکدیگر، نقش مهم این برهم‌کنش‌ها را در توسعه فرآیند بیوسنتزی اسیدهای چرب نشان می‌دهد (Kaur *et al.*, 2014). از دیگر پروتئین‌های دارای تعامل نزدیک با پروتئین FAD کاندید، می‌توان به Tic22-like (EKD11344.1)، Lycopene cyclase (EKD08280.1)، Ubiquinone biosynthesis hydroxylase (EKD09529.1) و UbiA prenyltransferase (EKD10346.1) اشاره داشت، که به ترتیب در فرآیندهای انتقال پروتئین‌ها درون سلول، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و تولید انرژی، تسهیل اتصال به دای‌نوکلئوتیدهای فلاوین آدنین و بیوسنتز یوبیکوئینون، فعالیت پرینیل ترانسفراز و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه توکوفرول، نقش دارند.

در شبکه پروتئینی پیش‌بینی شده برای پروتئین FAD کاندید، ژن‌هایی چون hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EKD10201.1) و Molybdopterin oxidoreductase (EKD11212.1)، که به واسطه فعالیت اکسیدوردوکتازی خود به ساختارهای حاوی یون فلزی متصل شده و در تنظیم فرآیندهای متابولیسمی اسید آمینه‌های آروماتیک و جذب نیترات نقش دارند، نیز پیش‌بینی شده است (شکل ۸ و جدول S2). علاوه بر این، پروتئینی از گروه Geranylgeranyl reductase (EKD11133.1) نیز دارای تعامل با پروتئین ApFAD-6 بود، که به نظر می‌رسد در فرآیند بیوسنتز کلروفیل و انتقال الکترون حین انجام فتوسنتز در اسپیرولینا دخیل باشد، که در نهایت می‌تواند رشد و بهره‌وری این ریزجلبک را تحت تاثیر قرار دهد (Wang *et al.*, 2014).

سلولی یا متابولیسمی، تسریع پیری و یا حتی ایجاد سرطان شوند، ایفا می‌کنند. به عنوان یک منبع پروتئینی کامل، اسپیرولینا و ویژگی‌های آن بر جنبه‌های مختلف سلامت انسان، از سوء‌تغذیه گرفته تا پتانسیل آنتی‌اکسیدانی تأثیر مثبت دارد (Kumar *et al.*, 2021; Maddaly, 2010). تنها عضو شناسایی شده از گروه بتاکاروتن هیدروکسیلاز در ژنوم اسپیرولینا نیز دارای فاکتورهای تنظیمی مختلفی هم در راستای تعدیل رشد و نمو و هم در جهت تنظیم پاسخگویی به محرک‌های محیطی بود، که نشان‌دهنده دخالت بالقوه این ژن‌ها در جنبه‌های مختلف چرخه زندگی این ریزجلبک می‌باشد (شکل ۷).

بررسی شبکه‌های تعامل پروتئین-پروتئین برای ژن کاندید از خانواده ApFAD در اسپیرولینا

به دنبال استخراج اطلاعات کامل پروتئوم در *A. platensis* و با توجه به مشخصه‌های ساختاری و فیزیولوژیکی پیش‌بینی شده قابل توجه در توالی مربوط به ژن ApFAD-6 در این مطالعه، پروتئین رمز شده توسط ژن مذکور به عنوان کاندیدی مناسب برای پیش‌بینی برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین در خانواده ژنی اسیدهای چرب دساجوراز در ریزجلبک اسپیرولینا، در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج حاصل، پروتئین ApFAD-6 (EKD08977.1) در شبکه پیش‌بینی شده، دارای تعامل نزدیکی با سایر پروتئین‌های اسید چرب دساجوراز، از قبیل EKD07339.1، EKD09040.1، EKD08976.1، EKD08975.1 و EKD06763.1 می‌باشد، که این تعامل دارای پتانسیل تنظیم فعالیت‌های اکسیدوردوکتازی، اتصال به یون‌های آهن، بیوسنتز لیپید و گلیکوزیلاسیون لیپیدها در سلول‌های اسپیرولینا



شکل ۸. شبکه پروتئین-پروتئین پیش‌بینی شده بر اساس داده‌های پروتئومیکس ریزجلبک اسپیرولینا با استفاده از برنامه STRING.

ژن‌های *FAD* را در کنترل پاسخ به تنش‌های مختلف را نمایان سازد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های *FAD* ارتولوگ بر اساس داده‌های RNA-seq

در مطالعه حاضر، با توجه به عدم ثبت داده‌های RNA-seq برای بیان تمامی ژن‌های اسپیرولینا در شرایط تنش‌های مختلف، از الگوی بیان نزدیک‌ترین ارتولوگ برای هر ژن *ApFAD* در *Arabidopsis* به عنوان جاندار مدل، استفاده شد و پروفایل بیانی ژن‌های *FAD* کاندید در شرایط تنش‌های مختلف شوری، خشکی، اکسیداتیو، سرما و اسموتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، تمامی ژن‌های *FAD* در پاسخ به شرایط محرک دارای تغییرات واکنشی قابل توجهی در میزان بیان خود بودند (شکل ۹). بر اساس مقادیر FPKM استخراج شده، ژن‌های *AT4G30950* (نزدیکترین ارتولوگ برای *ApFAD-6*) از گروه 6 Omega و *AT1G06080* (نزدیکترین ارتولوگ برای *ApFAD-3*) متعلق

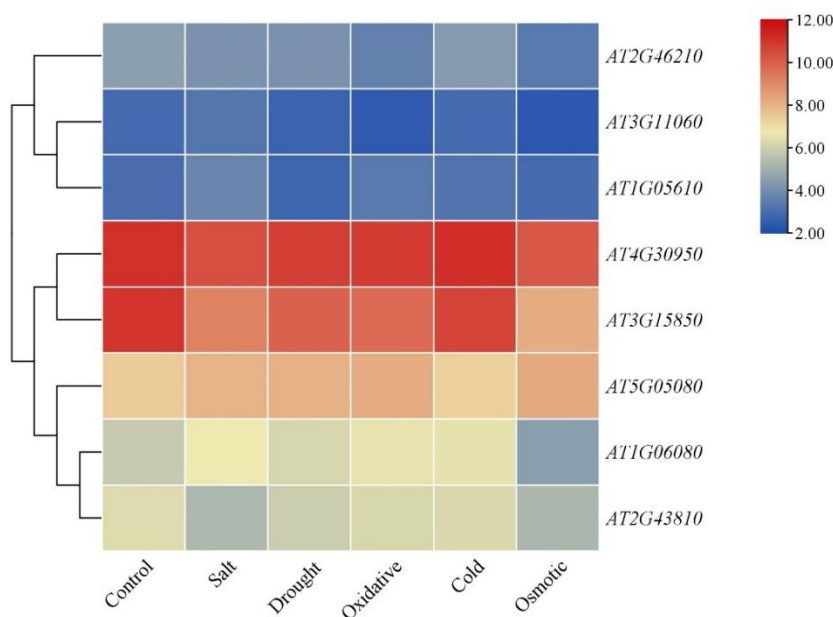
شایان توجه است که، تعداد زیادی از پروتئین‌های دارای برهم‌کنش با *ApFAD-6*، از قبیل Carotene 78- Phytoene synthase (EKD07656.1) desaturase Carotene isomerase و (EKD06520.1) نیز با فعالیت در مسیرهای کاتالیزوری و اکسیدوردوکنزازی به بیوسنتز متابولیت‌های ارزشمندی چون کاروتنوئیدها در شبکه دساچورازی اسپیرولینا کمک می‌کنند؛ در واقع این پروتئین‌ها علاوه بر نقش آفرینی در مسیر تولید مواد مغذی ارزشمند در اسپیرولینا، توانایی مقابله این ریزجلبک با عوامل متعدد محیطی را نیز تحت تاثیر مثبت قرار می‌دهند (Lee et al., 2016; Li-Beisson et al., 2013). همچنین، حضور پروتئین‌های Tocopherol O-methyltransferase (EKD06749.1) و Methyltransferase type 11 (EKD09079.1) در شبکه پروتئینی مربوط به *ApFAD-6*، که وظیفه کنترل فرآیند متیل ترانسفراز و در نهایت متیلاسیون پروتئین‌ها را بر عهده دارند، می‌تواند نقش برجسته شبکه‌های مرتبط با

(به ترتیب به عنوان نزدیکترین ارتولوگ‌ها برای ژن‌های *Ap-* *FAD-4* و *ApFAD-8* از گروه اسفنگولیپیدها) و *AT3G15850* (نزدیکترین ارتولوگ برای ژن *ApFAD-5* از گروه آسیل-لیپید دساجورازها)، در مقایسه با شرایط کنترل، در شرایط تنش مختلف تغییری مشاهده نشد که می‌تواند نشان دهنده نقش تنظیم‌کنندگی عملکردهای سلولی این ژن‌ها در اسپیرولینا باشد.

در تحقیق دیگر نیز با وجود افزایش سطح بیان ژن *Δ9ACPCiFAD* در پاسخ به شرایط تنش در ریزجلبک *Chlamydomonas sp.* میزان رونوشت ژن‌های *Δ12CiFAD* و *ω3CiFAD2* طی ساعات اولیه اعمال تنش تغییری نشان نداد (An *et al.*, 2013). در واقع، ریزجلبک‌ها با تنظیم مسیر بیوسنتز لیپیدها، به تنش‌های مختلف پاسخ می‌دهند؛ تغییر در بیان ژن‌های *FAD* و تولید ترکیبات مختلف اسیدهای چرب در پاسخ به تنش‌های محیطی گزارش شده است (Liu *et al.*, 2011). بر اساس یافته‌های حاصل از این مطالعه، دو ژن *ApFAD-3* و *ApFAD-6* به ترتیب از گروه‌های مربوط به Omega 6 و آسیل-لیپید دساجورازها، با توجه به مقادیر قابل توجه رونوشت آن‌ها و نیز در تکمیل نتایج حاصل از سایر آنالیزهای انجام شده در این مطالعه، از جمله بررسی تغییرات پس از ترجمه و نواحی پروموتری، می‌توانند به عنوان کاندیدهایی مناسب برای ارزیابی بیشتر پتانسیل آن‌ها در طول چرخه زندگی اسپیرولینا در نظر گرفته شوند.

به کلاستر آسیل-لیپید دساجوراز، دارای بالاترین میزان رونویسی در شرایط تنش‌های مختلف بودند. شایان ذکر است که، بیان ژن‌های فوق‌الذکر تنها در شرایط تنش اسمزی (برای ژن *AT1G06080*) و سرما (برای ژن *AT4G30950*)، در مقایسه با شرایط کنترل، پایین‌تر بود، که این نتایج با گزارشات سایر محققان مطابقت داشت (Liu *et al.*, 2015). به‌علاوه، میزان رونویسی ژن *AT5G05080* (نزدیکترین ارتولوگ برای *ApFAD-2*)، به عنوان یکی دیگر از ژن‌های *Omega* در این مطالعه، نیز دارای مقادیر قابل توجهی تحت تنش‌های مختلف به جز تنش سرما، در مقایسه با شرایط کنترل بود. در واقع، اسیدهای چرب دی‌نوئیک معمولاً توسط اسیدهای چرب Omega به اسیدهای چرب تری‌نوئیک تبدیل می‌شوند و در نهایت اسید جاسمونیک (JA) تولید شده و تجمع آن در سلول‌ها می‌تواند سبب تحریک پاسخ موجود به شرایط تنش گردد (Im *et al.*, 2002). همچنین، یکی دیگر از ژن‌های مربوط به گروه آسیل-لیپید دساجورازها، *AT1G05610* (نزدیکترین ارتولوگ برای *ApFAD-7*)، در پاسخ به تنش‌های شوری و اکسیداتیو، دارای مقادیر بیان بالاتر از نمونه کنترل بود، که با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان مطابقت داشت (Tang *et al.*, 2018).

بر اساس نتایج بدست آمده، در سطوح بیان ژن‌های *AT3G11060* (نزدیکترین ارتولوگ برای ژن بتا-کاروتن هیدروکسیلاز *ApFAD-1*)، *AT2G46210* و *AT2G43810*



شکل ۹. نتایج حاصل از بررسی الگوی بیان نزدیک‌ترین ارتولوگ‌ها برای هر ژن *ApFAD* در *Arabidopsis* به عنوان جاندار مدل، در شرایط تنش‌های مختلف شوری، خشکی، اکسیداتیو، سرما و اسموتیک، در مقایسه با شرایط کنترل. در محور افقی تنش‌های محیطی و در محور عمودی کد دسترسی ژن‌های ارتولوگ آورده شده است.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج این مطالعه در زمینه بررسی ژن‌های خانواده *FAD* در ژنوم اسپیرولینا، می‌تواند به حصول درک صحیحی از مکانیسم‌های تنظیمی مولکولی مسیر غیراشباع‌سازی اسیدهای چرب در این ریزجلبک و همچنین سایر محصولات روغنی دارای اهمیت تجاری، نظیر گیاهان روغنی، کمک کند. این مطالعه می‌تواند نقش کلیدی ژن‌های *FAD* را در رشد و نمو، تولید لیپیدها و متابولیت‌های مغذی و همچنین تحمل در برابر تنش‌های مختلف زیستی/ غیرزیستی، در ریزجانداران و نیز گونه‌های ارزشمند گیاهی آشکار سازد. در ارزیابی‌های بیشتر، انجام مطالعات بیانی و بیش‌بین هر یک از ژن‌های *FAD*، به‌ویژه از گروه Omega، می‌تواند مسیر را برای شناسایی عملکردهای خاص و همچنین تنوع فعالیت کاتالیزوری با هدف افزایش میزان تولید اسیدهای چرب ارزشمند و نیز ارتقای مقاومت به تنش‌ها در *A. platensis* و حتی گیاهان روغنی تجاری، هموار سازد.

این نتایج نشان می‌دهد که ژن‌های دساچوراز ممکن است در مسیرهای سیگنالی‌نگ تنش‌های شوری، خشکی و اکسیداتیو نقش داشته باشند و به واسطه تغییر نسبت محتوای اسیدهای چرب مختلف، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های مذکور ایفا کنند (Zhiguo *et al.*, 2019). تجمع مقادیر بالای لیپید در گونه‌های مختلف ریزجلبک *Chlorella*، *C. zofingiensis*، *C. vulgaris* و *C. protothecoides*، در شرایط تنش مختلف گزارش شده است. در واقع افزایش بیان ژن‌های *FAD* در کنار بیوسنتز متابولیت‌هایی مانند کاروتنوئیدها سبب افزایش توانایی موجود برای مقابله با شرایط تنش می‌گردد (Li *et al.*, 2011). ارزیابی بیشتر ویژگی‌های عملکردی این ژن‌ها، به واسطه آزمایش‌هایی چون سنجش میزان بیان در شرایط محیطی مختلف و نیز آزمون‌های انتقال و بیش‌بین ژنی، قابل دستیابی می‌باشد.

References

- Abedi, E., & Sahari, M. A. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food science & nutrition*, 2(5), 443-463.
- Alonso, D. L., Garcia-Maroto, F., Rodriguez-Ruiz, J., Garrido, J., & Vilches, M. (2003). Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases. *Biochemical systematics and ecology*, 31(10), 1111-1124.
- An, M., Mou, S., Zhang, X., Zheng, Z., Ye, N., Wang, D., Zhang, W., & Miao, J. (2013). Expression of fatty acid desaturase genes and fatty acid accumulation in *Chlamydomonas* sp. ICE-L under salt stress. *Bioresource Technology*, 149, 77-83.
- 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 research*, 37(suppl_2), W202-W208.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., & Sonnhammer, E. L. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 32(suppl_1), D138-D141.
- Bationo, F., Savadogo, A., Kabore, D., Ouattara, L., Ouedraogo, H. G., Savadogo, B., & Traore, A. (2015). Storage influence on beta-carotene and alpha-tocopherol contents of solar-dried *Spirulina platensis* (Spirulina). *African journal of food Science*, 9(12), 546-554.
- Cao, J., Li, M., Chen, J., Liu, P., & Li, Z. (2016). Effects of MeJA on *Arabidopsis* metabolome under endogenous JA deficiency. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, 13(8), 1194-1202.
- Chen, C., Yang, J., Tong, H., Li, T., Wang, L., & Chen, H. (2019). Genome-wide analysis of fatty acid desaturase genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Chi, X., Yang, Q., Lu, Y., Wang, J., Zhang, Q., Pan, L., Chen, M., He, Y., & Yu, S. (2011). Genome-wide analysis of fatty acid desaturases in soybean (*Glycine max*). *Plant molecular biology reporter*, 29(4), 769-783.
- Choudhary, P., Nagar, R., Singh, V., Bhat, A. H., Sharma, Y., & Rao, A. (2019). ProGlycProt V2. 0, a repository of experimentally validated glycoproteins and protein glycosyltransferases of prokaryotes. *Glycobiology*, 29(6), 461-468.
- Ciferri, O., & Tiboni, O. (1985). The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annual review of microbiology*, 39(1), 503-526.
- Connor, K. M., SanGiovanni, J. P., Lofqvist, C., Aderman, C. M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E. A., Majchrzak, S., & Carper, D. (2007). Increased dietary intake of ω -3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nature medicine*, 13(7), 868-873.
- de Jong, A., Pietersma, H., Cordes, M., Kuipers, O. P., & Kok, J. (2012). PePPER: a webserver for prediction of prokaryote promoter elements and regulons. *BMC genomics*, 13, 1-10.
- Díaz, M. L., Cuppari, S., Soresi, D., & Carrera, A. (2018). In silico analysis of fatty acid desaturase genes and proteins in grasses. *Applied biochemistry and biotechnology*, 184(2), 484-499.
- Diraman, H., Koru, E., & Dibeklioglu, H. (2009). Fatty acid profile of *Spirulina platensis* used as a food supplement.

- Domínguez, T., Hernández, M. L., Pennycooke, J. C., Jiménez, P., Martínez-Rivas, J. M., Sanz, C., Stockinger, E. J., Sánchez-Serrano, J. J., & Sanmartín, M. (2010). Increasing ω -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress. *Plant physiology*, 153(2), 655-665.
- The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. (2022). *Nucleic acids research*, 50(W1), W345-W351.
- Garcia-Hernandez, M., Berardini, T., Chen, G., Crist, D., Doyle, A., Huala, E., Knee, E., Lambrecht, M., Miller, N., & Mueller, L. A. (2002). TAIR: a resource for integrated Arabidopsis data. *Functional & integrative genomics*, 2, 239-253.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. e., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. Springer.
- Hajiahmadi, Z., Abedi, A., Wei, H., Sun, W., Ruan, H., Zhuge, Q., & Movahedi, A. (2020). Identification, evolution, expression, and docking studies of fatty acid desaturase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genomics*, 21(1), 1-20.
- Hashiguchi, A., & Komatsu, S. (2016). Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress. *Proteomes*, 4(4), 42.
- Hoiczky, E. (2000). Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations. *Archives of microbiology*, 174, 11-17.
- Im, Y. J., Han, O., Chung, G. C., & Cho, B. H. (2002). Antisense expression of an Arabidopsis omega-3 fatty acid desaturase gene reduces salt/drought tolerance in transgenic tobacco plants. *Molecules and cells*, 13(2), 264-271.
- Jia, Y.-L., Wang, Y.-Z., Nong, F.-T., Ma, W., Huang, P.-W., & Sun, X.-M. (2022). Identification and characterization of fatty acid desaturases in *Schizochytrium* sp. HX-308. *Algal Research*, 67, 102861.
- Kanehisa, M. (2002). The KEGG database. 'In silico' simulation of biological processes: Novartis Foundation Symposium 247,
- Kargiotidou, A., Deli, D., Galanopoulou, D., Tsaftaris, A., & Farmaki, T. (2008). Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of experimental botany*, 59(8), 2043-2056.
- Kaur, N., Chugh, V., & Gupta, A. K. (2014). Essential fatty acids as functional components of foods-a review. *Journal of food science and technology*, 51(10), 2289-2303.
- Kazanecki, C. C., Uzwiak, D. J., & Denhardt, D. T. (2007). Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *Journal of cellular biochemistry*, 102(4), 912-924.
- Khan, Z., Bhadouria, P., & Bisen, P. (2005). Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Current pharmaceutical biotechnology*, 6(5), 373-379.
- 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.
- Kumar, V., Jaiswal, K. K., Tomar, M. S., Rajput, V., Upadhyay, S., Nanda, M., Vlaskin, M. S., Kumar, S., & Kurbatova, A. (2021). Production of high value-added biomolecules by microalgae cultivation in wastewater from anaerobic digestates of food waste: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-18.
- Lee, J. M., Lee, H., Kang, S., & Park, W. J. (2016). Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8(1), 23.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., & Durrett, T. P. (2013). Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 11.
- Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*, 102(1), 123-129.
- Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y., & Chen, F. (2011). Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 106-110.
- Liu, W., Li, W., He, Q., Daud, M. K., Chen, J., & Zhu, S. (2015). Characterization of 19 genes encoding membrane-bound fatty acid desaturases and their expression profiles in *Gossypium raimondii* under low temperature. *PloS one*, 10(4), e0123281.
- Lomsadze, A., Gemayel, K., Tang, S., & Borodovsky, M. (2018). Modeling leaderless transcription and atypical genes results in more accurate gene prediction in prokaryotes. *Genome research*, 28(7), 1079-1089.
- Lu, J., Xu, Y., Wang, J., Singer, S. D., & Chen, G. (2020). The Role of Triacylglycerol in Plant Stress Response. *Plants (Basel)*, 9(4).
- Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 724-732.
- Maddaly, R. (2010). The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutr. Diet. Suppl.* 73. In.
- Mazo, V., Gmoshinskiĭ, I., & Zilova, I. (2004). Microalgae *Spirulina* in human nutrition. *Voprosy pitaniia*, 73(1), 45-53.
- Michaelson, L. V., Zauner, S., Markham, J. E., Haslam, R. P., Desikan, R., Mugford, S., Albrecht, S., Warnecke, D., Sperling, P., & Heinz, E. (2009). Functional characterization of a higher plant sphingolipid Δ 4-desaturase: defining the role of sphingosine and sphingosine-1-phosphate in Arabidopsis. *Plant physiology*, 149(1), 487-498.
- Miller, M. L., Soufi, B., Jers, C., Blom, N., Macek, B., & Mijakovic, I. (2009). NetPhosBac—a predictor for Ser/Thr phosphorylation sites in bacterial proteins. *Proteomics*, 9(1), 116-125.

- Moreno, P., Fexova, S., George, N., Manning, J. R., Miao, Z., Mohammed, S., Muñoz-Pomer, A., Fullgrabe, A., Bi, Y., & Bush, N. (2022). Expression Atlas update: gene and protein expression in multiple species. *Nucleic acids research*, 50(D1), D129-D140.
- Nilamyani, A. N., Auliah, F. N., Moni, M. A., Shoombuatong, W., Hasan, M. M., & Kurata, H. (2021). PredNTS: improved and robust prediction of nitrotyrosine sites by integrating multiple sequence features. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2704.
- Offermanns, S. (2017). Hydroxy-carboxylic acid receptor actions in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(3), 227-236.
- Racine, R. A., & Deckelbaum, R. J. (2007). Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 10(2), 123-128.
- Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021, baab012.
- Rao, P. K., Roxas, B. A., & Li, Q. (2008). Determination of global protein turnover in stressed mycobacterium cells using hybrid-linear ion trap-fourier transform mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 80(2), 396-406.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology*, 51, 1-52.
- Schuchardt, J. P., Huss, M., Stauss-Grabo, M., & Hahn, A. (2010). Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *European journal of pediatrics*, 169, 149-164.
- 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.
- Singh, A. K., Fu, D.-Q., El-Habbak, M., Navarre, D., Ghabrial, S., & Kachroo, A. (2011). Silencing genes encoding omega-3 fatty acid desaturase alters seed size and accumulation of Bean pod mottle virus in soybean. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(4), 506-515.
- Soria-García, Á., Rubio, M. C., Lagunas, B., López-Gomollón, S., Luján, M. d. I. Á., Díaz-Guerra, R., Picorel, R., & Alfonso, M. (2019). Tissue distribution and specific contribution of Arabidopsis FAD7 and FAD8 plastid desaturases to the JA-and ABA-mediated cold stress or defense responses. *Plant and Cell Physiology*, 60(5), 1025-1040.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., & Bork, P. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research*, gkw937.
- Tang, W., Ouyang, C., Liu, L., Li, H., Zeng, C., Wang, J., Fu, L., Wu, Q., Zeng, B., & He, B. (2018). Genome-wide identification of the fatty acid desaturases gene family in four *Aspergillus* species and their expression profile in *Aspergillus oryzae*. *AMB Express*, 8(1), 169.
- Tanon, T., Sayanova, O., Michaelson, L. V., Qing, R., Harvey, D., Larson, T. R., Li, Y., Napier, J. A., & Graham, I. A. (2005). Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana*. *The FEBS journal*, 272(13), 3401-3412.
- Tora, L., & Timmers, H. T. M. (2010). The TATA box regulates TATA-binding protein (TBP) dynamics in vivo. *Trends in biochemical sciences*, 35(6), 309-314.
- Umarov, R. K., & Solovyev, V. V. (2017). Recognition of prokaryotic and eukaryotic promoters using convolutional deep learning neural networks. *PLoS one*, 12(2), e0171410.
- Van Tuerenhout, D. R. (2005). *The Aztecs: new perspectives*. Bloomsbury Publishing USA.
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16, 1-10.
- Wan, D., Wu, Q., & Kuča, K. (2021). Spirulina. In *Nutraceuticals* (pp. 959-974). Elsevier.
- Wang, P., Li, C., Wang, Y., Huang, R., Sun, C., Xu, Z., Zhu, J., Gao, X., Deng, X., & Wang, P. (2014). Identification of a geranylgeranyl reductase gene for chlorophyll synthesis in rice. *Springerplus*, 3, 1-9.
- Wu, T., Yu, L., Zhang, Y., & Liu, J. (2021). Characterization of fatty acid desaturases reveals stress-induced synthesis of C18 unsaturated fatty acids enriched in triacylglycerol in the oleaginous alga *Chromochloris zofingiensis*. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 184.
- Yan, Y., Jiang, J.-Y., Fu, M., Wang, D., Pelletier, A. R., Sigdel, D., Ng, D. C. M., Wang, W., & Ping, P. (2023). MIND-S is a deep-learning prediction model for elucidating protein post-translational modifications in human diseases. *Cell Reports Methods*, 3(3), 100430.
- Yu, C.-S., Cheng, C.-W., Su, W.-C., Chang, K.-C., Huang, S.-W., Hwang, J.-K., & Lu, C.-H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOCALization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS one*, 9(6), e99368.
- Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and translational medicine*, 6, 1-19.
- Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., Liu, Z., Zhao, Y., Xue, Y., & Ren, J. (2014). GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic acids research*, 42(W1), W325-W330.
- Zhiguo, E., Chen, C., Yang, J., Tong, H., Li, T., Wang, L., & Chen, H. (2019). Genome-wide analysis of fatty acid desaturase genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientific reports*, 9(1), 19445.

Algae-based biofertilizers: applications and challenges

Seyed Majid Azizi^{1*}(ORCID:0000000336293055), Saeed Soheilivand¹

¹Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Correspondence

Seyed Majid Azizi
Email: m.azizi@abrii.ac.ir

Received: 16/Apr/2024

Accepted: 22/Jun/2024

How to cite

Azizi, S.M., & Soheilivand, S. (2024). Algae-based biofertilizers: applications and challenges. *Crop Biotechnology*, 14(1), 107-121.

(DOI: [10.30473/cb.2024.71040.1965](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71040.1965))

ABSTRACT

The global algae market was valued at USD 19.8 Billion in the year 2021 and it is expected to reach USD 36 Billion in 2028 by Compound Annual Growth Rate (CAGR) of 10.5%. Eukaryotic green algae and Gram-negative prokaryotic cyanobacteria are widely used in pharmaceutical, food, cosmetic, aquaculture, poultry and biofuel industries. Algae are also used in agriculture based on sustainable development by facilitating increased access to nutrients, maintaining organic carbon and soil fertility, increasing plant growth and crop yield, and stimulating soil microbial activity. Heterocyte-forming cyanobacteria, which have acclimated to diverse environmental conditions, represent a unique subset of photosynthetic prokaryotes capable of nitrogen fixation via the nitrogenase enzyme system. In addition, green algae and cyanobacteria by producing metabolites such as growth hormones, extracellular polymeric substances and antimicrobial compounds play an important role in their colonization in the phyllosphere and rhizosphere of plants and the proliferation of microbial and eukaryotic communities in the soil. Currently, the development of the consortium of cyanobacteria with bacteria or fungi or microalgae and biofilms based on them has expanded the scope of using algae. This review focuses on the application of algae in the production of crops and the protection and management of natural resources, the challenges of using algae and their commercial aspects in agriculture.

KEYWORDS

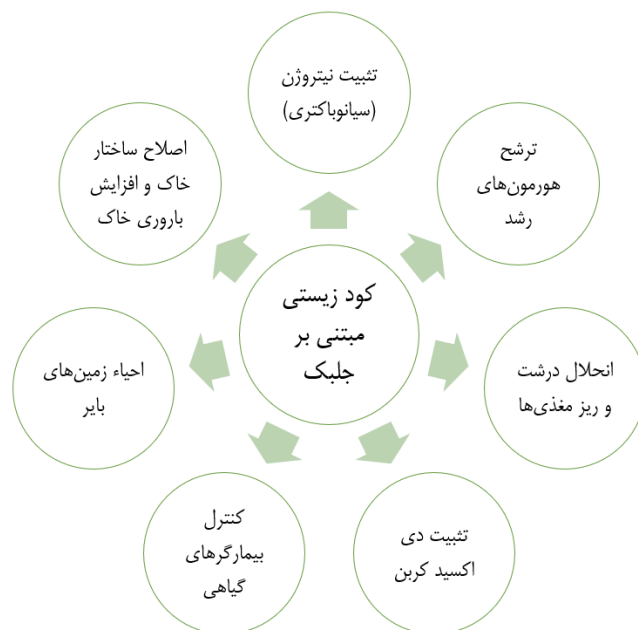
Biofilm; Bio-fertilizer; Cyanobacteria; Consortium; Microalgae.



مقدمه

داشته و ۵۰ درصد از کل فتوستنتز کره زمین توسط جلبک‌ها انجام می‌شود (Dawiec-Liśniewska *et al.*, 2022). مشارکت جلبک‌ها در کانی‌سازی، تجمع مواد آلی، درشت و ریز مغذی‌ها و تولید ترکیبات زیست‌فعال مانند پلیمرهای خارج سلولی، پلی‌ساکاریدها، هورمون‌های رشد و ترکیبات ضد میکروبی؛ رشد گیاه را بهبود بخشیده و کاندید مناسبی برای تولید کودهای زیستی می‌باشند (Gayathri *et al.*, 2015). جلبک‌ها نقشی کلیدی در حفظ بهره‌وری اکوسیستم‌های آبی و خشکی از طریق فتوستنتز، تثبیت نیتروژن و در دسترس قرار دادن مواد مغذی دارند (Prasanna *et al.*, 2016). همچنین، جلبک‌ها نقشی کلیدی در کنترل بیمارگرهای گیاهی (مانند باکتری، قارچ و نماتد) با تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک، بنزوئیک اسید و ماژوسکولونیک اسید دارند (Braun and Colla, 2023). این ترکیبات ضد میکروبی با اختلال در غشاء سیتوپلاسمی و مهار سنتز پروتئین، میکروب‌های بیماریزا را سرکوب می‌کنند. سیانوباکتری‌ها برای کلونیزه شدن در ریزوسفر و اجزاء گیاه؛ به عنوان یک عامل آنتاگونیستی علیه بیمارگرها و آفات گیاهی، فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاه را با تولید و انتشار آنزیم‌های هیدرولیتیک، متابولیت‌های ضد میکروبی، ترانسپورترها و عوامل شلاته‌کننده تحریک می‌کنند (Swain *et al.*, 2017).

کودهای زیستی به دلیل افزایش بهره‌وری تولید محصولات، کاهش اثرات آلاینده‌گی کودهای شیمیایی و مقرون به صرفه بودن اهمیت قابل توجهی در کشاورزی مبتنی بر توسعه پایدار دارند (Singh *et al.*, 2011). تجارت جهانی کودهای شیمیایی و کودهای زیستی، به ترتیب ۱۹۳ و ۲/۸ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۱ بوده و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۲۸ با نرخ رشد مرکب سالانه ۴/۱ و ۱۰/۹ درصد به ۲۴۰ و ۵/۲ میلیارد دلار برسد (https://www.grandviewresearch.com). در میان انواع مختلف کودهای زیستی، فرمولاسیون‌های مبتنی بر ارگانوسم‌های فتوستنتزی مانند ریزجلبک‌های یوکاریوتی، سیانوباکتری‌های پروکاریوتی و درشت جلبک‌ها به دلیل افزایش نرخ تثبیت نیتروژن، ترشح هورمون‌های رشد، انحلال درشت و ریز مغذی‌ها، تثبیت دی‌اکسید کربن، کنترل بیمارگرهای گیاهی، احیاء زمین‌های بایر، اصلاح ساختار خاک و افزایش باروری خاک (شکل ۱) از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Li *et al.*, 2017). تجارت جهانی کودهای زیستی جلبکی، ۱/۰۶ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۱ بوده و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۲۸ با نرخ رشد مرکب سالانه ۱۰/۱ درصد به ۲/۰۲ میلیارد دلار برسد (https://www.grandviewresearch.com). درشت جلبک‌ها و ریز جلبک‌ها نقش ویژه‌ای در ترسیب زیستی دی‌اکسید کربن



شکل ۱. مزایای کاربرد کودهای زیستی مبتنی بر جلبک در کشاورزی پایدار.

ارزش غذایی محصول نقش دارند (Priya et al., 2015a). توانایی تثبیت نیتروژن توسط سیانوباکتری‌ها به خوبی شناخته شده است. با این حال، جلبک‌ها می‌توانند در معدنی سازی مواد مغذی، تولید هورمون‌های رشد، کنترل زیستی، احیاء زمین‌های بایر، بهبود مکانیسم دفاعی گیاه و غیره مفید باشند (Nanjappan et al., 2007). صفات مختلف مرتبط با سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌های سبز که آن‌ها را به عنوان گزینه‌ای امیدوارکننده در کشاورزی مدرن تبدیل می‌کند، در بخش‌های ذیل به تفصیل مورد بحث قرار می‌گیرد.

تثبیت نیتروژن توسط سیانوباکتری‌ها

سیانوباکتری‌ها، به دلیل دارا بودن سلول‌های تخصصی به نام هتروسیست، قادر به تثبیت نیتروژن اتمسفری می‌باشند. سیانوباکتری‌ها برای تامین نیتروژن خود با گیاهان رقابت نمی‌کنند بلکه در دسترس بودن نیتروژن خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهند. مطالعات اخیر، افزایش قابل توجهی در محتوای نیتروژن خاک پس از تلقیح سیانوباکتری‌ها یا کنسرسیون آن‌ها در محصولات کشاورزی را نشان داده است. تلقیح سیانوباکتری‌ها در بخش کشاورزی می‌تواند به صرفه جویی ۲۵ تا ۴۰ درصدی کودهای شیمیایی نیتروژن دار کمک کند (Prasanna et al., 2017). تلقیح سیانوباکتری‌های رشته‌ای تثبیت کننده نیتروژن در مزرعه برنج منجر به کاهش مصرف ۵۰ درصدی کودهای شیمیایی نیتروژن دار با عملکرد و کیفیت مشابه دانه می‌شود (Prasanna et al., 2017). همچنین، گزارش‌های اخیر دامنه استفاده از سیانوباکتری‌های هتروسیست برای تثبیت نیتروژن را در طیف گسترده‌ای از سبزیجات، پنبه و محصولات غذایی نشان داده است. سوارنا لاکشمی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که تلقیح خاک مزارع گندم با بیوفیلیم سیانوباکتری هتروسیست جنس Anabaena باعث افزایش ۵۷ و ۴۰ درصدی نیتروژن خاک به ترتیب نسبت به دوز توصیه شده کود شیمیایی نیتروژن دار به میزان ۵۰ و ۱۰۰ درصد می‌شود (Swarnalakshmi et al., 2013). عثمان و همکاران (۲۰۱۰) پتانسیل دو سیانوباکتری *Nostoc entophyllum* و *Oscillatoria augustissima* را به عنوان کودهای زیستی در گیاه زراعی نخود ارزیابی کردند. مطالعه آن‌ها نشان داد که تلقیح سیانوباکتری‌ها منجر به صرفه‌جویی ۵۰ درصدی در مصرف کودهای شیمیایی نیتروژن دار ضمن افزایش ارزش غذایی دانه نخود می‌شود (Osman et al., 2010). جهان و پرساد (۲۰۰۶) با تلقیح سویه‌های سیانوباکتری تثبیت کننده نیتروژن در مزارع برنج، ضمن صرفه جویی ۲۵ درصدی در

تحریک فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاه با افزایش ایمنی در برابر عوامل بیماری‌گر، افزایش رشد و عملکرد محصول همراه می‌باشد. استقرار سیانوباکتری‌ها در خاک به دلیل قابلیت‌های آن‌ها به منظور افزایش رشد گیاه و عملکرد محصول، تعدیل فعالیت میکروبی خاک و اصلاح مواد مغذی خاک به خوبی مستند شده است (Chabili et al., 2024). علاوه بر این، استفاده از کود زیستی جلبک برای افزایش حاصلخیزی خاک، رشد گیاه، کیفیت و ویژگی‌های تغذیه‌ای میوه و عملکرد دانه مفید می‌باشد. همچنین تلقیح سیانوباکتری‌ها در خاک، در دسترس بودن میکرو مغذی‌ها (روی، مس، آهن و غیره) و درشت مغذی‌ها (کربن، نیتروژن، فسفر و پتاسیم) و انتقال آن‌ها به گیاهان را فراهم می‌نماید (Coppens et al., 2016). گزارشات متعددی در خصوص استفاده از سیانوباکتری‌ها به ویژه سویه‌های هتروسیست (تثبیت کننده نیتروژن) به عنوان کودهای زیستی در مزارع برنج منتشر شده است. از سوی دیگر گزارشات متعددی در خصوص امکان کاربرد سویه‌های هتروسیست و غیر هتروسیست و کنسرسیون آن‌ها با جلبک‌های سبز، باکتری‌ها و قارچ‌ها به عنوان کودهای زیستی منتشر شده است (Ng et al., 2024). تلقیح سیانوباکتری‌ها در خاک و یا به عنوان پوشش بذر یا پخش در مزارع؛ باعث افزایش سرعت جوانه زنی، رشد گیاه و عملکرد در غلات، محصولات باغبانی و سبزیجات می‌شود (Ammar et al., 2022). بررسی حاضر، سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های سبز را به عنوان گزینه‌ای مناسب برای استفاده در کودهای زیستی، عاملی برای بهبود ساختار و عملکرد خاک و افزایش رشد و عملکرد گیاه برجسته می‌کند. همچنین، پیشرفت‌های اخیر و مزایای زیست محیطی جلبک‌ها و مداخلات آبی مورد نیاز مبتنی بر یک راه حل پایدار و مؤثر در کشاورزی مدرن مورد بحث قرار می‌گیرد.

جلبک‌ها به عنوان کودهای زیستی، محرک‌های رشد گیاهان و عامل افزایش باروری خاک

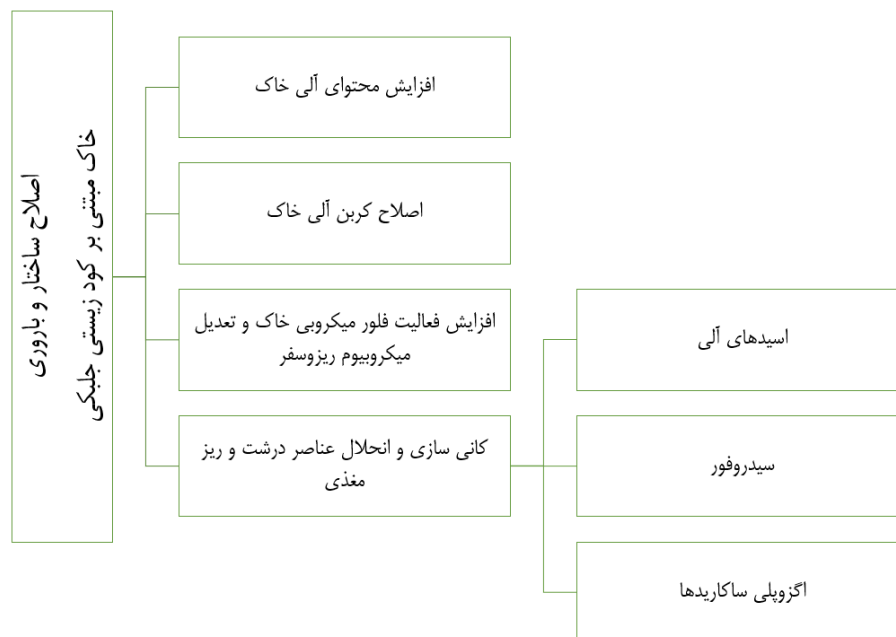
جلبک‌ها در اکوسیستم‌های متنوعی مانند بیابان‌های سرد و گرم، پوسته خاک، در شکاف سنگ‌ها یا در اعماق اقیانوس‌ها یافت می‌شوند. ریزجلبک‌ها در این زیستگاه‌ها عمدتاً دارای اشکال تک سلولی بوده و بخش قابل توجهی از ترسیب زیستی کربن توسط این موجودات انجام می‌شود (Osorio-Reyes et al., 2023). جلبک‌ها همچنین اثرات مثبتی بر کیفیت و باروری خاک، جامعه میکروبی خاک و تسهیل فعل و انفعالات میکروبی خاک دارند. همچنین ریزجلبک‌های سبز به عنوان کود زیستی در بهبود حاصلخیزی خاک، افزایش جوانه زنی بذر، رشد گیاه، عملکرد و

کود برای جامعه کشاورز را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهند (Liu et al., 2024).

مواد آلی خاک، کانی‌سازی و انحلال مواد مغذی ماکرو/میکرو توسط جلبک‌ها

خاک‌ورزی بیش از حد و استفاده مکرر از ماشین‌آلات سنگین؛ ثبات ساختاری خاک، نفوذ آب و توانایی تجمع مواد مغذی را تغییر می‌دهد. حفظ سطوح کافی از مواد آلی خاک و ساختار مناسب خاک برای کشاورزی پایدار ضروری است. سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌های سبز به دلیل جذب دی‌اکسید کربن اتمسفر از طریق فتوسنتز منبع مهمی از مواد آلی در بخش کشاورزی هستند. سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌های سبز همچنین به واسطه دفع کربن (اگزوپلی ساکاریدها) در خاک، مخزن کربن آلی خاک را بهبود و رشد سایر میکروارگانیسم‌ها و جانوران را افزایش می‌دهند (Renuka et al., 2016). علاوه بر این، سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌های سبز از طریق تغذیه و تجزیه زیست توده جلبکی، محتوای آلی خاک را افزایش می‌دهند. تلقیح جلبک‌های سبز و سیانوباکتری‌ها در مزارع مختلف منجر به افزایش فعالیت فلور میکروبی خاک و کربن آلی کل خاک می‌شوند (Renuka et al., 2016) (شکل ۲).

مصرف کودهای شیمیایی نیتروژن دار عملکرد کاه و دانه را به میزان قابل توجهی افزایش دادند (Jha and Prasad 2006). اینوک و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که تلقیح سیانوباکتری رشته‌ای هتروسیست جنس *Nostoc* در مزارع برنج منجر به عملکرد محصول مشابه با کودهای شیمیایی نیتروژن دار می‌شود (Innok et al., 2009). سینگ و داتا (۲۰۰۷) گزارش نمودند که تلقیح سیانوباکتری *Anabaena variabilis* به عنوان تثبیت کننده نیتروژن، رشد و عملکرد برنج را در مقایسه با کود شیمیایی نیتروژن دار در شرایط مزرعه افزایش می‌دهد (Singh and Datta, 2007). ممکن است نگرانی‌های زیست‌محیطی در مورد شتشی بیش از حد نیتروژن تثبیت شده در خاک به دلیل استفاده از سیانوباکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن وجود داشته باشد، با این حال، میزان آن در مقایسه با شتشی ناشی از کودهای شیمیایی می‌تواند بسیار کم باشد. سیانوباکتری‌های مولد اگزوپلی ساکارید، پوسته‌های زیستی خاک را تشکیل می‌دهند و ضمن تثبیت نیتروژن از شسته شدن نیتروژن خاک جلوگیری می‌نمایند (Mager and Thomas, 2011). به طور کلی سیانوباکتری‌ها با فراهم نمودن ۲۵ تا ۴۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، هزینه تامین



شکل ۲. مزایای کاربرد کودهای زیستی مبتنی بر جلبک در اصلاح ساختار و باروری خاک.

در مورد غنی‌سازی ریزمغذی‌هایی مانند آهن، منگنز، مس و روی با هدف افزایش کیفی و کمی عملکرد غلات مبتنی بر کنسرسیون‌های سیانوباکتری و جلبک‌های سبز منتشر شده است. با این حال، مطالعات عمیقی در خصوص مکانیسم‌های دخیل در انتقال آن‌ها از خاک به ریشه و اندام‌های هوایی گیاه باید انجام شود. همچنین، تلقیح سیانوباکتری‌ها ضمن تعدیل میکروبیوم ریزوسفر منجر به تغییر ساختار و فراوانی جوامع میکروبی درگیر در کانی‌سازی و حل شدن مواد مغذی می‌شود. تلقیح سیانوباکتری *Calothrix elenkinii* تغییرات مفیدی در میکروبیوم گیاه و ریزوسفر ایجاد می‌نماید (Manjunath et al., 2016). تولید و ترشح اگزوپلی ساکاریدها، یکی از مکانیسم‌های اصلی تعدیل و بهبود فعالیت میکروبی خاک به واسطه تلقیح سیانوباکتری‌ها می‌باشد. اگزوپلی ساکاریدهای ترشح شده توسط سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های سبز با تشکیل بیوفیلم‌های مفید در ریزوسفر گیاه، کربن آلی برای رشد میکروبیوم مفید کشاورزی را فراهم می‌نمایند. این بیوفیلم‌ها متشکل از سیانوباکتری‌های فوتوتروف هوازی، جلبک‌های سبز، دیاتوم‌ها و باکتری‌های فوتوتروف بی‌هوازی و به دنبال آن باکتری‌ها و قارچ‌های هتروتروف می‌باشند (Chabili et al., 2024). ترشح اگزوپلی ساکاریدها به صورت ماتریکس هیدراته توسط ارگانیسم‌های فوتوتروف و هتروتروف به نگه داشتن سلول‌ها در کنار هم، ثبات مکانیکی سلول‌ها و به تشکیل میکروکلونی‌ها کمک می‌کنند. همچنین اگزوپلی ساکاریدها ضمن محافظت سلول‌ها از خوردگان جلبکی، جریان مواد مغذی را تسهیل می‌بخشند. اگزوپلی ساکاریدها متشکل از ترکیبات آلی (پلی ساکاریدهای خارج سلولی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و غیره) و ترکیبات معدنی (کربنات، سیلیس، و غیره) بوده و منبع اصلی کربن آلی خاک می‌باشند. اگزوپلی ساکاریدها همچنین به انتقال نور به مناطق عمیق‌تر بیوفیلم کمک می‌کنند (Bondoc et al., 2016). سیانوباکتری‌های فوتوتروف و جلبک‌های سبز در چنین بیوفیلم‌هایی، کربن و اکسیژن آلی را به واسطه فتوسنتز و نیتروژن را از طریق تثبیت بیولوژیکی نیتروژن فراهم می‌کنند. ارگانیسم‌های فوتوتروفیک، کربن و نیتروژن آلی را به ارگانیسم‌های هتروتروفیک در بیوفیلم‌ها به واسطه محصولات جانبی فتوسنتز و لیز سلولی ارائه می‌دهند (Ng et al., 2024). در ادامه ارگانیسم‌های هتروتروفیک به طور متوالی به بازیافت و بازسازی مواد مغذی کمک می‌کنند. ارتباط بیوفیلم‌ها با عناصر خاک به واسطه اگزوپلی ساکاریدها، آنزیم‌ها و اسیدهای آلی به

ایلماز و سونمز (۲۰۱۷) آزمایش‌های گلدانی را در شرایط گلخانه‌ای برای ارزیابی پتانسیل کودهای زیستی مختلف بر روی کربن آلی خاک انجام دادند. یافته‌های آن‌ها نشان داد، کود زیستی مبتنی بر سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌های سبز به طور قابل توجهی کربن آلی خاک را در مقایسه با سایر تیمارها افزایش می‌دهد (Yilmaz and Sönmez, 2017). سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌های سبز علاوه بر اصلاح کربن آلی خاک، به کانی‌سازی و حل شدن عناصر ماکرو و ریز مغذی اولیه در خاک نیز کمک می‌کنند. فرآیندی که در آن موجودات زنده به تجمع و ترکیب با ترکیبات معدنی آلی یا معدنی کمک می‌کنند، زیست کانی‌سازی اطلاق می‌شود. کانی‌سازی سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌های سبز با تولید اسیدهای آلی، سیدروفور و اگزوپلی ساکاریدها همراه می‌باشد (شکل ۲) (Braun and Colla, 2023). اسیدهای آلی مانند اسید هیومیک، در فرآیند هوازدگی مواد معدنی نقش حیاتی ایفا می‌کنند. سیانوباکتری‌ها موادی شبیه اسید هیومیک ترشح می‌کنند که از اهمیت کشاورزی برخوردار می‌باشد. اگزوپلی ساکاریدهای ترشح شده از سیانوباکتری *Microcystis aeruginosa* به عنوان پمپ‌های بیولوژیکی عمل نموده و جذب زیستی فنانترن را تسهیل می‌بخشند (Bai et al., 2016). یانديگري و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که سیانوباکتری‌های *Anabaena variabilis* و *Westiellopsis prolifica* می‌توانند کلسیم فسفات نامحلول خارج سلولی و سنگ فسفات *Mussorie* را به فرم محلول تبدیل نمایند (Yandigeri, 2010). پاور و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که سیانوباکتری‌ها می‌توانند کربنات منیزیم خاک تالاب را به فرم محلول تبدیل نمایند. مطالعه آن‌ها نشان داد که انحلال کربنات منیزیم توسط سیانوباکتری‌ها نقش مهمی در تشکیل کربنات منیزیم طبیعی در تالاب‌های قلیایی آمریکا و کانادا دارد (Power et al., 2007). سیدروفورها ترکیبات آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها هستند که به شلاته کردن آهن فریک در شرایط کمبود آهن کمک نموده و آن‌ها را در دسترس میکروبیوم گیاهان قرار می‌دهند. سیانوباکتری‌هایی مانند *Anabaena flosaquae* و *Anabaena cylindrica* توانایی تولید سیدروفور برای شلاته نمودن ریزمغذی‌هایی مانند آهن، مس و غیره را دارند (Bibi et al., 2024). مطالعات محدودی نیز در خصوص توانایی جلبک‌های سبز *Scenedesmus* و *Chlorella* به منظور تشکیل سیدروفورهای آهن از طریق آزادسازی شلاته کننده‌های آهن انجام شده است (Benderliev et al., 2003). چندین گزارش

موجب برانگیختن سیستم دفاعی گیاه، تقویت تثبیت نیتروژن و افزایش رشد گیاهان می‌شود (Karthikeyan et al., 2009). پریا و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که سیانوباکتری *Calothrix elenkinii* می‌تواند در بافت‌های ریشه و اندام هوایی گیاه برنج کلونیزه شده و جمعیت میکروبی تثبیت‌کننده‌های نیتروژن و حل‌کننده فسفر را تحریک کند (Priya et al., 2015b). تلقیح سیانوباکتری‌ها عملکرد همزیستی نخود را بهبود بخشید و تغییرات مفیدی در پروفایل جامعه میکروبی خاک و گره‌های ریزوسفر ایجاد کرد (Ramakrishnan et al., 2017). بنابراین، تجزیه و تحلیل عمیق تنوع سیانوباکتری‌ها در روابط همزیستی با گیاهان در کشاورزی پایدار سودمند خواهد بود.

تولید هورمون‌های رشد توسط جلبک‌ها

فیتوهورمون‌ها نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان دارند. افزودن هورمون‌های گیاهی (مصنوعی یا طبیعی) در کشاورزی برای افزایش بهره‌وری و عملکرد محصول و کنترل علف‌های هرز گزارش شده است. با این حال، خطر بالقوه انتقال هورمون‌های گیاهی در مناطق مجاور و منابع آبی یک نگرانی زیست محیطی است. جلبک‌ها در تولید هورمون‌های رشد مانند اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، اسید جاسمونیک و غیره نقش دارند که می‌توانند به عنوان محرک‌های زیستی در کشاورزی مورد استفاده قرار گیرند (Chabili et al., 2024). بسیاری از ریزجلبک‌های سبز و سوبه‌های سیانوباکتری هورمون‌های داخل سلولی دارند، در حالی که در برخی جنس‌ها، هورمون‌ها در محیط رشد و محیط اطراف تولید یا ترشح می‌شوند (Santi et al., 2013). استیرک و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که ریزجلبک‌های Chlorophyta و Cyanophyta هورمون‌های سیتوکینین و اکسین تولید می‌کنند. با این حال، سطوح تولیدی هورمون‌ها با قابلیت کاربرد در کشاورزی بسیار پایین بود. اما گزارش‌هایی در مورد استفاده از هورمون‌های سیانوباکتری برای رشد در شرایط آزمایشگاهی گیاهان ارزشمند منتشر شده است (Stirk et al., 2002). تلقیح زیست توده ریزجلبک سبز و زیست توده سیانوباکتری باعث بهبود پاسخ آندروژنی در کشت بساک و مطالعات باززایی ذرت شد. هورمون‌های رشد به‌دست‌آمده از *Phormidium foveolarum* که یک سیانوباکتری رایج در شالیزارها است، جوانه‌زنی و رشد نشاء برنج را تسریع می‌کند (Hussain and Hasnain, 2011). حسین و حسنین (۲۰۱۱) پتانسیل هورمون‌های (سیتوکینین و

حل شدن مواد مغذی خاک کمک می‌کند. کانی سازی خاک با تغییر در شرایطی مانند پتانسیل ردوکس، pH و غیره از طریق فعالیت میکروبی در بیوفیلیم‌ها و افزایش زیست فراهمی مواد مغذی تسهیل می‌شود (Roeselers et al., 2008). ژن‌ها و مکانیسم‌های مولکولی مختلفی که در عملکرد چنین بیوفیلیم‌هایی دخیل هستند، توسط بهارتی و همکاران (۲۰۱۷) بررسی شده‌اند. بیان متفاوت ژن‌ها در فاز پلانکتونیک بیوفیلیم و انتقال ژن بین اعضاء متشکل بیوفیلیم‌ها گزارش شد. با این حال، اطلاعات کمی در خصوص بیوفیلیم‌های فوتوتروفیک منتشر شده است. شناسایی ژن‌های مسئول تشکیل بیوفیلیم و شناخت مکانیسم‌های مولکولی درگیر در سیگنال‌دهی بین شرکاء مختلف، درک ما را از شکل‌گیری و توسعه بیوفیلیم‌های مبتنی بر ریزجلبک‌ها در بخش کشاورزی افزایش می‌دهد (Bharti et al., 2017).

کلونیزاسیون جلبک‌ها در ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان

سیانوباکتری‌ها به طور موفقیت‌آمیزی در خاک مستقر شده و در بخش‌های مختلف گیاه کلونیزه می‌شوند. انواع مختلفی از همزیستی سیانوباکتری‌ها با سایر جلبک‌ها، قارچ‌ها، ژیمنوسپرم‌ها، پتریدوفیت‌ها و گیاهان آوندی گزارش شده است (Ng et al., 2024). مطالعه‌ای توسط کرینگز و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که سیانوباکتری‌ها توانایی ورود از طریق روزنه‌ها و کلونیزه شدن در اتاقک‌های زیر روزنه‌ای، فضاهای بین سلولی، سلول‌های پارانشیم و منطقه آربوسکول میکوریزی دارند (Krings et al., 2009). گانتز و همکاران (۱۹۹۳) توانایی سیانوباکتری *Nostoc* برای ایجاد ارتباط با ریشه‌های گیاه گندم با استفاده از نیتروژن نشان‌دار را گزارش کردند. در حالی که سیانوباکتری *Anabaena* توانایی کلونیزاسیون نداشت. سیانوباکتری *Nostoc* در فضاهای بین سلولی، سلول‌های اپیدرمی و کورتکس گیاه گندم به شکل رشته‌های متحرک سلولی کلنیزه شده و سونیکاسیون ملایم یا آسیب مکانیکی به بافت‌های ریشه گندم در افزایش کلونیزاسیون سیانوباکتری مفید می‌باشد (Gantar et al., 1993). کارتیکیان و همکاران (۲۰۰۹) رشته‌های سیانوباکتری را در داخل ریشه‌های موئین و در ناحیه کورتکس گیاه برنج و گندم مشاهده کردند که همراه با افزایش رشد، تثبیت نیتروژن و تولید IAA بود. همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی و ابزار انگشت‌نگاری DNA توانایی سیانوباکترها برای کلونیزه شدن در بخش‌های مختلف گیاه برنج و گندم ارزیابی و گزارش شد کلونیزاسیون

بر فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاه گندم مطالعه و گزارش کردند. بیشترین فعالیت پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیاک لیاز در تیمارهای تلقیح شده با *Anabaena* به دست آمد (Babu *et al.*, 2015). گرزیک و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که تلقیح جلبک سبز همچنین می‌تواند پاسخ دفاعی گیاه را با افزایش فعالیت RNA در گیاه بهبود بخشد. آن‌ها همچنین گزارش کردند که استفاده از کودهای زیستی مبتنی بر جلبک باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های جذب کننده مواد مغذی مانند دهیدروژناز، نیترات ردوکتاز و اسید یا آلکالین فسفاتاز در برگ *Salix viminalis* می‌شود. با این حال، مکانیسم‌های واقعی درگیر در تعامل جلبک و گیاه در افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی به بررسی‌های جامع نیاز دارند (Grzesik *et al.*, 2017). سیانوباکتری‌های هتروسیست با تثبیت نیتروژن و کانی‌سازی به غنی‌سازی مواد مغذی کمک می‌کنند، در حالی که جلبک‌های سبز و سیانوباکتری‌های غیرهتروسیست عمدتاً از طریق آزادسازی مواد مغذی نامحلول به غنی‌سازی مواد مغذی کمک می‌کنند. توانایی فتوسنتزی ریزجلبک‌ها و کاربرد آن‌ها در خاک منجر به غنی‌سازی کربن خاک، بهبود مواد آلی خاک، تسهیل فرآیندهای کانی‌سازی می‌شود و دسترسی به عناصر درشت و ریز مغذی را در خاک و ریزوسفر افزایش می‌دهد (Renuka *et al.*, 2018). همچنین ریزجلبک‌ها با تولید متابولیت‌های ارزشمند مانند هورمون‌ها، پلی ساکاریدها و غیره بهره‌وری تولید محصولات کشاورزی را افزایش می‌دهند. همچنین، برخی از گونه‌ها توانایی حل کردن درشت/ریز مغذی‌ها را دارند. ریزجلبک‌ها ممکن است مواد مغذی را به روش محلول پاشی نیز فراهم کنند. در این خصوص، گونه‌هایی که می‌توانند کلونیزه شوند، دارای رنگدانه‌ها یا متابولیت‌هایی هستند تا محیط خشن حاکم بر فیلوسفر را تحمل کنند (Osorio-Reyes *et al.*, 2023). فعل و انفعالات میکروجلبک / سیانوباکتری به طور مستقیم و غیرمستقیم به بهبود ایمنی و استحکام گیاه در مواجهه با تنش‌های غیرزیستی / زیستی کمک می‌کند. بنابراین، شناسایی گونه‌های ریزجلبکی رویکردی کارآمد در کشاورزی پایدار می‌باشد (Renuka *et al.*, 2018).

مدیریت آفات و بیماری‌های گیاهی مبتنی بر جلبک‌ها

استفاده از سموم شیمیایی علیه پاتوژن‌ها و آفات، برای پایداری اکوسیستم‌های کشاورزی خطرناک است. این امر منجر به کشف رویکردهای پایدار برای کنترل پاتوژن‌ها و آفات شده است.

اکسین) ترشح شده توسط سوبه‌های سیانوباکتری را برای تحریک رشد در شرایط کنترل شده و مزرعه مورد مطالعه قرار دادند. مطالعه آن‌ها همبستگی مثبت بین هورمون‌های سیانوباکتری (سیتوکینین و اکسین) و پارامترهای رشد گیاه مانند طول ساقه، طول ریشه، طول سنبله و وزن دانه‌ها را نشان داد. افزایش سطح فیتوهورمون در گیاه را می‌توان به تعامل سیانوباکتری-گیاه در ریزوسفر نسبت داد (Hussain and Hasnain, 2011). مظهر و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که در حضور سیانوباکتری‌ها، افزایشی در سطح هورمون‌های اکسین درون‌زا و برون‌زا در گیاه گندم مشاهده می‌شود که تحت تاثیر سیگنال دهی بین گیاه و سیانوباکتری‌ها می‌باشد (Mazha *et al.*, 2013). گایاتری و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که اثر هورمون‌های خارج سلولی *Aphanothece* sp. MBDU 515 مشابه هورمون‌های مصنوعی (IAA and IBA) به منظور ریزازدیادی *Arachis Moringa oleifera hypogaea* می‌باشد. استفاده از هورمون‌های سیانوباکتری نیز باعث کاهش تجمع ترکیبات فنولی در *A. hypogaea* شد (Gayathri *et al.*, 2015). بنابراین، استفاده از پتانسیل هورمون‌های سیانوباکتری‌ها در زراعت گیاهان می‌تواند یک رویکرد سازگار با محیط زیست برای تحریک رشد گیاه باشد (Osorio-Reyes *et al.*, 2023). با این حال، تحقیقات در زمینه ارزیابی کاربرد هورمون‌های جلبکی در عرصه کمتر انجام شده است و نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

برانگیختن مکانیسم‌های دفاعی گیاهان توسط جلبک‌ها

سیانوباکتری‌ها با برانگیختن فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و مرتبط با بیماری‌زایی گیاه مانند β -۱ و ۳ اندوگلوکاناز، کیتیناز، کاتالاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیاک لیاز و غیره مکانیسم‌های دفاعی گیاهان را تعدیل می‌کنند. پریا و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که تلقیح سیانوباکتری *Calothrix elenkinii* به طور قابل توجهی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاه مانند پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیاک لیاز در ریشه و اندام هوایی در گیاه برنج می‌شود (Priya *et al.*, 2015b). کومار و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که تلقیح سوبه‌های سیانوباکتری، به میزان قابل توجهی فعالیت β -۱ و ۳ اندوگلوکاناز را در ریشه و اندام هوایی بذور گیاهان ادویه‌ای افزایش می‌دهد (Kumar *et al.*, 2013). بابو و همکاران (۲۰۱۵) اثر تلقیح سیانوباکتری‌های *Anabaena* و *Calothrix* را

روش‌های استفاده از کود زیستی، از پیش نیازهای مهم برای استفاده اقتصادی از کود در بخش کشاورزی محسوب می‌شود. نحوه تلقیح جلبک‌های سبز و سیانوباکتری‌ها شامل تلقیح مستقیم در خاک به‌عنوان زیست توده خشک (قرص، گرانول، پودر و غیره) یا کشت مایع و فرمولاسیون آن‌ها با حامل‌های مناسب مانند کودهای شیمیایی / آفت‌کش‌ها و کاربرد به روش پخش سطحی، نواری یا ردیفی و محلول پاشی می‌باشد (شکل ۳).

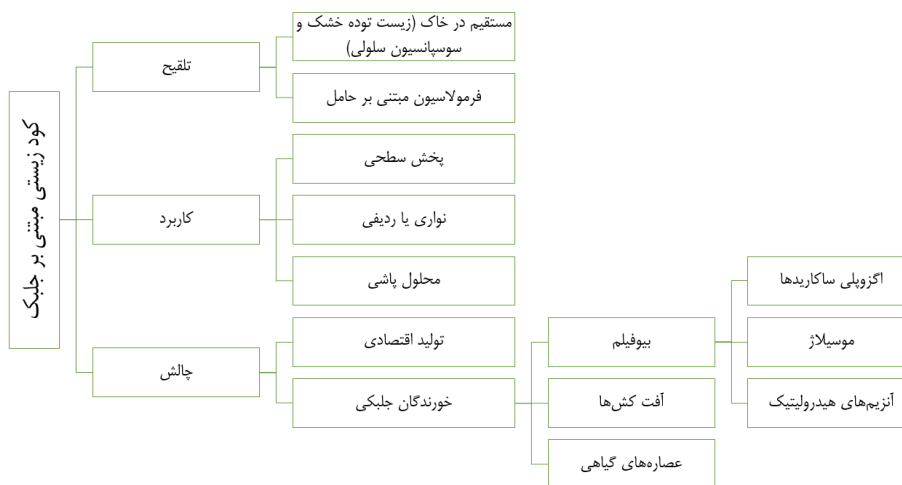
زیست توده ریز جلبک‌ها را می‌توان مستقیماً به‌عنوان زیست توده خشک یا به صورت کشت مایع در خاک استفاده کرد. هر دو روش در افزایش حاصلخیزی خاک و بهره‌وری محصول موثر می‌باشند (Xiao and Zheng, 2016).

روش‌های پخش سطحی، نواری یا ردیفی را می‌توان با استفاده از گرانول و فرمولاسیون مبتنی بر حامل‌هایی مانند ترکیب با کود یا سایر حامل‌های مناسب انجام داد. محلول پاشی روش دیگری برای کاربرد کود زیستی ریز جلبکی است. محلول پاشی را می‌توان با استفاده از مایع رویی کشت یا سوسپانسیون سلولی تهیه و با رویکردهای کوددهی (افزودن جلبک کود در سیستم‌های آبیاری)، خاک‌پاشی، سمپاشی هوایی و سمپاش خودکشی در عرصه استفاده نمود. در مناطق دیم، استفاده از سمپاشی هوایی و سمپاش خودکشی به دلیل بهبود کارایی مصرف مواد مغذی مفید می‌باشد. گزارشات متعددی اثربخشی این روش‌ها را برای استفاده موفقیت آمیز از سیانوباکتری‌ها/ ریزجلبک‌های سبز به‌عنوان کودهای زیستی نشان داده است (Renuka et al., 2018).

باکتری‌ها و قارچ‌ها ارگانسیم‌های کارآمدی برای کنترل زیستی پاتوژن‌ها می‌باشند. در چند دهه گذشته، ریزجلبک‌ها، عمدتاً سیانوباکتری‌ها، نیز به‌عنوان ارگانسیم‌های بالقوه برای کنترل بیولوژیکی پاتوژن‌ها معرفی شده‌اند (Ng et al., 2024). سیانوباکتری‌ها علاوه بر کاهش استفاده از مواد شیمیایی مضر برای محیط زیست، به بهبود مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و افزایش عملکرد محصول منجر می‌شوند (Renuka et al., 2018). همچنین گزارش شده است که ریزجلبک‌های سبز و عصاره درشت جلبک‌های سبز دارای خواص آنتی‌بیوتیکی علیه باکتری‌ها و قارچ‌های بیمارگر گیاهی می‌باشند (Mashjoor et al., 2016). با این حال، بر اساس بررسی منابع انجام شده گزارشی در مورد استفاده از ریزجلبک سبز در کنترل بیولوژیکی آفات گیاهی منتشر نشده است.

روش‌های کاربرد کودهای زیستی مبتنی بر جلبک

کنسرسیون و بیوفیلیم‌های سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های سبز از رویکردهای کارآمد برای دستیابی به بیشینه کلونیزاسیون و اثر بخشی کودهای زیستی جلبکی می‌باشند. کنسرسیون سیانوباکتری‌ها و جلبک‌های سبز با افزایش نرخ تثبیت نیتروژن، ترشح سیدروفور، خواص آنتی‌بیوتیکی و تولید فیتوهورمون‌ها اثر بخشی کودهای زیستی جلبکی را افزایش می‌دهند. همچنین بیوفیلیم‌ها با افزایش فعالیت میکروبی و حاصلخیزی خاک، رشد گیاه را بهبود می‌بخشند (Renuka et al., 2018). توسعه



شکل ۳. رویکردهای تلقیح جلبک، کاربرد و چالش‌های استفاده از جلبک در کشاورزی پایدار.

و ارزان قیمت می‌باشد. با این حال، تخریب ضایعات لیگنوسولوزی کشاورزی و صنعتی از چالش‌های این رویکرد می‌باشد. وان و همکاران (۲۰۱۶) کارایی ضایعات مختلف کشاورزی و صنعتی مانند باگاس نیشکر، کاه گندم، سبوس گندم و ذغال سنگ نارس را به عنوان حامل سیانوباکتری‌ها ارزیابی کردند. بیشینه میزان بقای جلبک‌ها و فعالیت آنزیم نیتروژناز در ذغال سنگ نارس و سپس در کاه گندم و باگاس نیشکر مشاهده شد. ضایعات کشاورزی و صنعتی به عنوان حامل ارزان قیمت، برای تلقیح جلبک و کمک به بازیافت مواد مغذی در کشاورزی کارآمد می‌باشند (Wan *et al.*, 2016). یکی دیگر از حامل‌های مناسب برای تکثیر سیانوباکتری‌ها، خاک رس می‌باشد که دارای سطح و ظرفیت نگهداری آب بالایی است. وان و همکاران (۲۰۱۶) پتانسیل فرمولاسیون‌های مختلف مبتنی بر حامل سیانوباکتری‌ها مانند خاک، کاه گندم و خاک رس در کشت برنج را ارزیابی کردند. آن‌ها گزارش کردند که بالاترین عملکرد دانه با استفاده از خاک رس و کاه گندم با ۷۵ درصد مکمل کود شیمیایی نیتروژن به دست آمد. این در حالیست که بیشینه عملکرد گیاه با فرمولاسیون مبتنی بر حامل خاک، با افزودن دوز کامل کود نیتروژن به دست آمد. بنابراین، کاه گندم و حامل‌های مبتنی بر خاک رس منجر به صرفه‌جویی در مصرف کود شیمیایی نیتروژن می‌شوند (Wan *et al.*, 2016). مطالعه‌ای توسط پراسانا و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که ورمی کمپوست می‌تواند به عنوان یک حامل موثر برای تکثیر سیانوباکتری در مزارع برنج استفاده شود. آن‌ها استقرار موفقیت آمیز تلقیح سیانوباکتری در مزارع برنج با استفاده از تکنیک‌های مولکولی و بهبود فعالیت میکروبی خاک را گزارش کردند (Prasanna *et al.*, 2013). رنوکا و همکاران (۲۰۱۷) از حامل مخلوط ورمیکولیت و کمپوست برای ریزجلبک‌های سبز و سیانوباکتری‌ها به عنوان کودهای زیستی استفاده کردند (Renuka *et al.*, 2017). استفاده از فضولات دامی به عنوان حامل کودهای زیستی ریزجلبک می‌تواند کاربرد ریزجلبک‌ها را بسیار مقرون به صرفه کند. به طور کلی، فضولات دامی سرشار از مواد آلی، ریز مغذی‌ها و درشت مغذی‌ها هستند. مواد مغذی فضولات دامی، می‌تواند رشد ریزجلبک‌ها را تحریک کند. با این حال، چالش اصلی استفاده از فضولات دامی وجود آنتی‌بیوتیک‌ها و داروها و بوی نامطبوع می‌باشد. در کاربرد فضولات دامی در مزارع کشاورزی، انباشتگی مواد دارویی و آنتی‌بیوتیک‌ها در گیاه گزارش شده است. در این خصوص، تلقیح ریزجلبک‌ها با فضولات دامی به دلیل توانایی ریزجلبک‌های سبز

چگونگی استفاده از کودهای زیستی جلبکی به نیاز گیاه به مکمل‌های غذایی، کنترل زیستی پاتوژن‌های گیاهی و نوع محصول (بذر یا نشاء) بستگی دارد. گارسیا و سومرفلد (۲۰۱۶) گزارش کردند که تیمار بذرها با مایع رویی کشت یا سوسپانسیون سلولی جلبک اثرات مثبتی بر جوانه زنی بذر و رشد گیاه دارد (Garcia *et al.*, 2016). کانی سازی زیست توده جلبکی می‌تواند در یک دوره ۲۰ تا ۳۰ روزه انجام شود و مواد مغذی را در دسترس گیاه قرار دهد (Coppens *et al.*, 2016). با این وجود، استانداردهای و بهینه‌سازی میزان زیست توده مورد استفاده قبل از کاربرد آن‌ها در عرصه ضروری است. مطالعاتی در خصوص بهینه سازی غلظت زیست توده جلبکی برای دستیابی به بیشینه عملکرد کودهای زیستی انجام شده است. با این حال، بسته به ترکیب مواد مغذی خاک، نوع ریزجلبک‌ها / سیانوباکتری‌ها و ویژگی‌های زیست توده می‌تواند متفاوت باشد. استفاده از کود جلبکی از طریق محلول پاشی می‌تواند رویکردی مفید باشد، زیرا اثرات مستقیمی بر روی گیاه دارد، به ویژه اگر عصاره آن غنی از هورمون‌های گیاهی باشد. گزارش‌های مختلف مزایای رویکرد فوق را در افزایش رشد گیاه، عملکرد، فیزیولوژی، کلروفیل، فتوسنتز، ماندگاری غشاء سلولی و کنترل زیستی پاتوژن‌های گیاهی اثبات کرده‌اند. محلول پاشی عصاره‌های ریزجلبک نیز برای بهبود کارایی مصرف آب و عملکرد روزه در گیاهان گزارش شده است. با این حال، مکانیسم عمل آن‌ها رمزگشایی نشده است و نیاز به مطالعات بیشتر دارد (Renuka *et al.*, 2018). استفاده از فرمولاسیون سلول‌های زنده سیانوباکتری‌ها و ریزجلبک‌ها با حامل‌های مناسب، مهم‌ترین روش کاربرد آن‌ها در بخش کشاورزی است (Ammar *et al.*, 2022). مقرون به صرفه ترین رویکرد برای کاربرد سیانوباکتری‌ها، استفاده از خاک به عنوان حامل می‌باشد. با این حال محدودیت اصلی در استفاده از خاک، آلودگی خاک و هوا می‌باشد، که کاربرد آن را محدود کند. این امر منجر به جستجوی سایر حامل‌های مناسب و مقرون به صرفه به عنوان حامل‌های سیانوباکتریایی و ریز جلبکی مانند کاه گندم، کمپوست کاه شلتوک، ورمیکولیت، خاک رس، فضولات حیوانی و ضایعات کشاورزی و غیره شده است. این حامل‌ها برای رشد و استقرار سیانوباکتری‌ها و رشد ریزجلبک‌ها مناسب هستند و استقرار موفق آن‌ها در عرصه در مطالعات مختلف گزارش شده است (Renuka *et al.*, 2018). از چالش‌های اصلی در فرمولاسیون حامل‌های جلبکی در دسترس بودن و مقرون به صرفه بودن می‌باشد. استفاده از پسماندهای کشاورزی و صنعتی گزینه‌ای مفید

بسیار گران قیمت‌تر از کود شیمیایی بسته به عواملی که باید مورد استفاده قرار می‌گیرد متفاوت است. به عنوان مثال، محلول پاشی، که ممکن است به تجهیزات پیچیده نیاز داشته باشد، می‌تواند تا حد زیادی هزینه کاربرد کودهای زیستی جلبکی را افزایش دهد. روش‌های پخش سطحی و نواری یا ردیفی مبتنی بر استفاده از گرانول‌های کود زیستی جلبکی نیز می‌تواند هزینه کاربرد کودهای زیستی جلبکی را تا حد زیادی افزایش دهد (Renuka *et al.*, 2018). همچنین، استفاده از فرمولاسیون جلبک مبتنی بر حامل، به دلیل حجم بیشتر مورد نیاز در مزرعه، یک چالش است. در این صورت، تیمار بذر با سوسپانسیون ریزجلبک روشی اقتصادی برای کاربرد کودهای زیستی جلبکی در مزرعه می‌باشد که تأثیر مستقیمی بر رشد و عملکرد گیاه دارد. به طور کلی، اکثر این فرمولاسیون‌ها با افزایش ۱۰ تا ۱۲ درصدی عملکرد محصول و بهبود نیتروژن و کربن خاک، مصرف نیتروژن را به میزان ۲۰ تا ۲۵ کیلوگرم در هکتار کاهش می‌دهند. با تعمیم این موضوع به کشور هند، می‌توان حدس زد که کاربرد کودهای زیستی جلبکی در ۹ تا ۹/۵ میلیون هکتار مزرعه کشت برنج در دشت‌های هندو گنگ (که در آن حداقل ۱۲۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار استفاده می‌شود)، می‌توان صرفه جویی خالص بیش از ۳۱ تا ۳۸ میلیون دلاری را ضمن ارتقاء سلامت خاک و بهره‌وری تولید محصول فراهم نمود (Ammar *et al.*, 2022).

تجاری‌سازی کودهای زیستی مبتنی بر جلبک

تجارت جهانی کودهای زیستی مبتنی بر ریزجلبک، سیانوباکتری و درشت جلبک‌ها، به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۸۲ و ۰/۱۳ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۱ بوده است و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۲۸ با نرخ رشد مرکب سالانه ۹/۷۵، ۱۲/۶ و ۸ درصد به ۰/۲۲، ۱/۵ و ۰/۳۰ میلیارد دلار برسد (https://www.grandviewresearch.com). کود شیمیایی آمونیاک بی‌آب، محتوی ۸۲ درصد نیتروژن می‌باشد. در حالی که زیست توده ریز جلبکی از ۱ تا ۱۰ درصد نیتروژن تشکیل شده است. بنابراین برای رسیدن به سطح مشابهی از کود زیستی، به ۱۵ برابر عوامل ریزجلبکی نسبت به کود شیمیایی آمونیاک بی‌آب نیاز است (Cabanelas *et al.*, 2013). برای تولید ذرت، ۲۰۸ کیلوگرم در هکتار نیتروژن توصیه می‌شود، بنابراین، برای رسیدن به این سطح از نیتروژن، ۳/۱ تن زیست توده ریز جلبک در هکتار مورد نیاز خواهد بود (Engin *et al.*, 2005). ریزجلبک‌ها و

در تخریب ترکیبات دارویی می‌تواند مفید باشد (Renuka *et al.*, 2017). استفاده از پسماندهای شهری مانند لجن خشک شده به عنوان حامل کودهای زیستی ریزجلبک می‌تواند کاربرد ریزجلبک‌ها را به دلیل دارا بودن بالای مواد مغذی مقرون‌به‌صرفه کند (Wang *et al.*, 2024). از معایب استفاده از حامل پسماندهای شهری وجود ترکیبات دارویی، فلزات سنگین و باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد. با این حال، ریزجلبک‌ها در کاهش جذب فلزات سنگین توسط گیاه می‌توانند مفید باشند. توانایی ریزجلبک‌ها در تخریب ترکیبات دارویی و کاهش قابل توجه بار میکروبی مبنایی برای استفاده از حامل پسماندهای شهری برای کاربرد ریزجلبک‌ها به عنوان کودهای زیستی فراهم می‌کند (Yu *et al.*, 2017). تلقیح مبتنی بر حامل ریزجلبک‌های سبز در خاک به مطالعات بیشتری نیاز دارد. محدودیت اصلی برای موفقیت کودهای زیستی مبتنی بر ریزجلبک/سیانوباکتری، حضور خورندگان ریزجلبک در مزارع کشاورزی است که تأثیر منفی بر کارایی این موجودات به عنوان کودهای زیستی دارد. خورندگان، تا حد زیادی بر بهره‌وری جلبک‌ها در اکوسیستم‌های آبی - خاکی تأثیر می‌گذارند. این خورندگان شامل ریز سخت پوستان، تک یاخته‌ها، آمیب‌ها، حلزون‌ها و نماتدها و غیره هستند. اگرچه استفاده از آفت کش‌ها برای کنترل آن‌ها توصیه می‌شود (شکل ۳)، اما گزینه سازگار با محیط زیست نیست. اخیراً از عصاره‌های گیاهی زیتون تلخ، تنباکو، نسترن و غیره در کنترل خورندگان ریزجلبک‌های سبز و سیانوباکتری‌ها استفاده شده است (Renuka *et al.*, 2018). عصاره‌های گیاهی به عنوان حامل ریزجلبک‌ها، برای کنترل زیستی خورندگان ریزجلبک در مزرعه برنج استفاده شده است. این حامل‌های گیاهی، پتانسیل رشد و تثبیت نیتروژن سیانوباکتری‌های تلقیح شده را افزایش دادند (Ma *et al.*, 2017). در این زمینه، استفاده از کودهای زیستی بیوفیلیم شده به دلیل تولید اگزوپولی ساکارید و موسیلاژ، نویدبخش کنترل خورندگان جلبک‌ها است (شکل ۳). موسیلاژ از سیانوباکتری‌ها در برابر خورندگان محافظت می‌کند. همچنین ارتباط باکتری/قارچ در بیوفیلیم‌ها باعث تولید ترکیبات بازدارنده از جمله آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌شود که به کنترل خورندگان کمک می‌کند (Day *et al.*, 2017). تولید کودهای شیمیایی یک صنعت انرژی بر بوده و حمل و نقل و استفاده از آن‌ها به سوخت و انرژی زیادی نیاز دارد. با این حال، هزینه تولید کودهای زیستی جلبکی، چالش استفاده از آن‌ها می‌باشد. هزینه کاربرد آن‌ها می‌تواند از ارزان تا

سال‌های اخیر، پیشرفت‌های زیادی در زمینه استفاده تجاری از جلبک‌ها به عنوان کودهای زیستی صورت گرفته است (Ammar *et al.*, 2022). آزمایشات میدانی با کودهای زیستی جلبکی در ایالات متحده آمریکا- صحرای آریزونا توسط کمپانی Del Monte Fresh Produce Inc انجام و گزارشات مثبتی در خصوص افزایش نرخ بهره‌وری تولید محصول، احیاء زمین‌های بایر و حاصلخیزی خاک منتشر شده است (Renuka *et al.*, 2018). آگاهی بیشتر در مورد استفاده از کود زیستی جلبکی و مزایای آن در حال افزایش است و بازار پتانسیل مناسبی برای استفاده از کودهای زیستی مبتنی بر جلبک دارد. با این حال، چالش‌های مربوط به تجاری سازی باید با تحقیقات گسترده در مقیاس میدانی و توسعه فناوری‌های تولید کود مقرون به صرفه جلبکی مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه گیری و پیشنهادها

استفاده از کنسرسیوم‌ها / بیوفیلیم‌های جلبک سبز و سیانوباکتری‌ها با میکروبه‌های مفید کشاورزی، رویکردی امیدوارکننده برای افزایش بهره‌وری محصولات زراعی و کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای می‌باشد. با این حال موفقیت کودهای زیستی جلبک در عرصه، به تولید اقتصادی زیست توده جلبک‌ها و چگونگی کاربرد آن‌ها بستگی دارد. استفاده از پسماندهای کشاورزی - صنعتی برای کشت جلبک‌ها، رویکردی اقتصادی در مقیاس صنعتی می‌باشد. پالایش کودهای زیستی جلبکی و تجاری سازی آن‌ها، تمرکز بر خورندگان جلبکی، مطالعات بر روی ترکیبات زیست فعال سیانوباکتری‌ها و اثرات آن‌ها بر سلامت خاک/گیاه حوزه‌هایی هستند که نیاز به توجه دارند. به منظور درک مکانیسم‌های دخیل در تعاملات هم‌افزایی درگیر در کنسرسیوم‌های جلبکی با گیاه / خاک مطالعات متازنومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس پیشنهاد می‌شود.

سیانوباکتری‌ها مواد مغذی و ترکیبات ارزشمندی برای گیاه فراهم می‌کنند. بنابراین ارزیابی ریزجلبک‌ها، به‌ویژه سیانوباکتری‌ها از نظر محتوای مواد مغذی زیست توده در مزرعه، تصویر واقعی نسبت به زیست توده مورد نیاز جلبکی ارائه نمی‌دهد (Renuka *et al.*, 2018). استفاده از ریزجلبک‌های زنده علاوه بر جلوگیری از فرسایش خاک، جلوگیری از شسته شدن عناصر غذایی و حفظ ساختار خاک مزایای مانند در دسترس بودن مداوم مواد مغذی در طول مراحل رشد گیاه دارند (Osorio-Reyes *et al.*, 2023). سیانوباکتری‌ها به عنوان سلول‌های در حال رشد در عرصه، رشد گیاه را با صرفه جویی ۲۵ تا ۷۵ درصدی در مصرف کود نیتروژن، تامین سایر عناصر ضروری (درشت و ریزمغذی‌ها) و تولید متابولیت‌های مفید بهبود می‌بخشند. علاوه بر این، زیست توده ریز جلبک‌ها همچنین حاوی ۴۰ تا ۶۰ درصد کربن، ۱ تا ۴ درصد فسفر و سایر عناصر ضروری است. مهمترین ویژگی مفید کودهای زیستی میکروجلبکی، بهبود کربن آلی خاک است که با استفاده از کودهای شیمیایی نمی‌توان به آن دست یافت (Ammar *et al.*, 2022). به استثناء منبع نیتروژن در کشت سیانوباکتری‌های هتروسیست، کشت جلبک به مقادیر زیادی مواد مغذی نیاز دارد. استفاده از پساب‌های کشاورزی و صنعتی می‌تواند رویکردی مقرون به صرفه برای این نگرانی ارائه کند. تجاری سازی زیست توده جلبکی تولید شده مبتنی بر پساب صنایع به دلیل وجود مواد ناخواسته مانند فلزات سنگین و عوامل بیماری‌زا نیز یک چالش است. بنابراین، ارائه رویکردهای نوینی برای کاهش هزینه‌های کشت جلبک ضروری به نظر می‌رسد (Renuka *et al.*, 2018). یکی دیگر از چالش‌های مرتبط با کودهای زیستی ریزجلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها، اطلاعات ناکافی در مورد دوز و روش کاربرد آن‌ها است. همچنین گونه‌های جلبکی که می‌توانند در مقیاس مزرعه در محیط‌های جغرافیایی و انواع خاک‌های متنوع کلونیزه شوند باید شناسایی شوند. با این حال، در

References

- Ammar, E. E., Aioub, A. A., Elesawy, A. E., Karkour, A. M., Mouhamed, M. S., Amer, A. A., & El-Shershaby, N. A. (2022). Algae as Bio-fertilizers: Between current situation and future prospective. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(5), 3083-3096.
- Babu, S., Bidyarani, N., Chopra, P., Monga, D., Kumar, R., Prasanna, R., ... & Saxena, A. K. (2015). Evaluating microbe-plant interactions and varietal differences for enhancing biocontrol efficacy in root rot disease challenged cotton crop. *European journal of plant pathology*, 142, 345-362.
- Bai, L., Xu, H., Wang, C., Deng, J., & Jiang, H. (2016). Extracellular polymeric substances facilitate the biosorption of phenanthrene on cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Chemosphere*, 162, 172-180.
- Benderliev, K. M., Ivanova, N. I., & Pilarski, P. S. (2003). Singlet oxygen and other reactive oxygen species are involved in regulation of release of iron-

- binding chelators from *Scenedesmus* cells. *Biologia plantarum*, 47, 523-526.
- Bharti, A., Velmourougane, K., & Prasanna, R. (2017). Phototrophic biofilms: diversity, ecology and applications. *Journal of applied phycology*, 29, 2729-2744.
- Bibi, S., Saadaoui, I., Bibi, A., Al-Ghouti, M., & Dieyeh, M. H. A. (2024). Applications, advancements, and challenges of cyanobacteria-based biofertilizers for sustainable agro and ecosystems in arid climates. *Bioresource Technology Reports*, 101789.
- Bondoc, K. G. V., Heuschele, J., Gillard, J., Vyverman, W., & Pohnert, G. (2016). Selective silicate-directed motility in diatoms. *Nature Communications*, 7(1), 10540.
- Braun, J. C., & Colla, L. M. (2023). Use of Microalgae for the Development of Biofertilizers and Biostimulants. *BioEnergy Research*, 16(1), 289-310.
- Cabanelas, I. T. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Chinalia, F. A., Garrido-Pérez, C., Rogalla, F., ... & Perales, J. A. (2013). Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal. *Bioresource technology*, 131, 429-436.
- Chabili, A., Minaoui, F., Hakkoum, Z., Douma, M., Meddich, A., & Loudiki, M. (2024). A comprehensive review of microalgae and cyanobacteria-based biostimulants for agriculture uses. *Plants*, 13(2), 159.
- Coppens, J., Grunert, O., Van Den Hende, S., Vanhoutte, I., Boon, N., Haesaert, G., & De Gelder, L. (2016). The use of microalgae as a high-value organic slow-release fertilizer results in tomatoes with increased carotenoid and sugar levels. *Journal of applied phycology*, 28, 2367-2377.
- Dawiec-Liśniewska, A., Podstawczyk, D., Bastrzyk, A., Czuba, K., Pacyna-Iwanicka, K., Okoro, O. V., & Shavandi, A. (2022). New trends in biotechnological applications of photosynthetic microorganisms. *Biotechnology advances*, 59, 107988.
- Day, J. G., Gong, Y., & Hu, Q. (2017). Microzooplanktonic grazers—A potentially devastating threat to the commercial success of microalgal mass culture. *Algal Research*, 27, 356-365.
- Duffy, M., & Holste, A. (2005). Estimated returns to Iowa farmland. *Journal of ASFMRA*, 102-109.
- Gantar, M., Kerby, N. W., & Rowell, P. (1993). Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria: III. The role of a hormogonia-promoting factor. *New Phytologist*, 124(3), 505-513.
- Garcia-Gonzalez, J., & Sommerfeld, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Journal of applied phycology*, 28, 1051-1061.
- Gayathri, M., Kumar, P. S., Prabha, A. M. L., & Muralitharan, G. (2015). In vitro regeneration of *Arachis hypogaea* L. and *Moringa oleifera* Lam. using extracellular phytohormones from *Aphanothece* sp. MBDU 515. *Algal Research*, 7, 100-105.
- Grzesik, M., Romanowska-Duda, Z., & Kalaji, H. M. (2017). Effectiveness of cyanobacteria and green algae in enhancing the photosynthetic performance and growth of willow (*Salix viminalis* L.) plants under limited synthetic fertilizers application. *Photosynthetica*, 55, 510-521.
- Hussain, A., & Hasnain, S. (2011). Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 85-92.
- Innok, S., Chunleuchanon, S., Boonkerd, N., & Teaumroong, N. (2009). Cyanobacterial akinete induction and its application as biofertilizer for rice cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 21, 737-744.
- Jha, M. N., & Prasad, A. N. (2006). Efficacy of new inexpensive cyanobacterial biofertilizer including its shelf-life. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 73-79.
- Karthikeyan, N., Prasanna, R., Sood, A., Jaiswal, P., Nayak, S., & Kaushik, B. D. (2009). Physiological characterization and electron microscopic investigation of cyanobacteria associated with wheat rhizosphere. *Folia Microbiologica*, 54, 43-51.
- Karthikeyan, N., Prasanna, R., Nain, L., & Kaushik, B. D. (2007). Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat. *European Journal of Soil Biology*, 43(1), 23-30.
- Krings, M., Hass, H., Kerp, H., Taylor, T. N., Agerer, R., & Dotzler, N. (2009). Endophytic cyanobacteria in a 400-million-yr-old land plant: A scenario for the origin of a symbiosis?. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 153(1-2), 62-69.
- Kumar, M., Prasanna, R., Bidiarani, N., Babu, S., Mishra, B. K., Kumar, A., ... & Saxena, A. K. (2013). Evaluating the plant growth promoting ability of thermotolerant bacteria and cyanobacteria and their interactions with seed spice crops. *Scientia Horticulturae*, 164, 94-101.
- Li, R., Tao, R., Ling, N., & Chu, G. (2017). Chemical, organic and bio-fertilizer management practices effect on soil physicochemical property and antagonistic bacteria abundance of a cotton field: implications for soil biological quality. *Soil and Tillage Research*, 167, 30-38.
- Ma, A. T., Beld, J., & Brahmasha, B. (2017). An amoebal grazer of cyanobacteria requires cobalamin produced by heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(10), e00035-17.
- Mager, D. M., & Thomas, A. D. (2011). Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: a review of their role in dryland soil processes. *Journal of Arid Environments*, 75(2), 91-97.
- Manjunath, M., Kanchan, A., Ranjan, K., Venkatachalam, S., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., ... & Singh, B. (2016). Beneficial cyanobacteria and

- eubacteria synergistically enhance bioavailability of soil nutrients and yield of okra. *Heliyon*, 2(2).
- Mashjoor, S., Yousefzadi, M., Esmaeili, M. A., & Rafiee, R. (2016). Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine macro algae (Dictyotaceae and Ulvaceae) from the Persian Gulf. *Cytotechnology*, 68, 1717-1726.
- Mazhar, S., Cohen, J. D., & Hasnain, S. (2013). Auxin producing non-heterocystous Cyanobacteria and their impact on the growth and endogenous auxin homeostasis of wheat. *Journal of Basic Microbiology*, 53(12), 996-1003.
- Ng, Z. Y., Ajeng, A. A., Cheah, W. Y., Ng, E. P., Abdullah, R., & Ling, T. C. (2024). Towards circular economy: Potential of microalgae-bacterial-based biofertilizer on plants. *Journal of Environmental Management*, 349, 119445.
- Osman, M. E. H., El-Sheekh, M. M., El-Naggar, A. H., & Gheda, S. F. (2010). Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biology and fertility of soils*, 46, 861-875.
- Osorio-Reyes, J. G., Valenzuela-Amaro, H. M., Pizaña-Aranda, J. J. P., Ramírez-Gamboa, D., Meléndez-Sánchez, E. R., López-Arellanes, M. E., ... & Martínez-Ruiz, M. (2023). Microalgae-based biotechnology as alternative biofertilizers for soil enhancement and carbon footprint reduction: Advantages and implications. *Marine Drugs*, 21(2), 93.
- Power, I. M., Wilson, S. A., Thom, J. M., Dipple, G. M., & Southam, G. (2007). Biologically induced mineralization of dypingite by cyanobacteria from an alkaline wetland near Atlin, British Columbia, Canada. *Geochemical Transactions*, 8, 1-16.
- Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Ranjan, K., Venkatachalam, S., Kanchan, A., Solanki, P., ... & Kranthi, S. (2016). Microbial inoculants with multifaceted traits suppress Rhizoctonia populations and promote plant growth in cotton. *Journal of Phytopathology*, 164(11-12), 1030-1042.
- Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Simranjit, K., Ranjan, K., Kanchan, A., Hossain, F., & Nain, L. (2017). Cyanobacterial and rhizobial inoculation modulates the plant physiological attributes and nodule microbial communities of chickpea. *Archives of Microbiology*, 199, 1311-1323.
- Prasanna, R., Sharma, E., Sharma, P., Kumar, A., Kumar, R., Gupta, V., ... & Nain, L. (2013). Soil fertility and establishment potential of inoculated cyanobacteria in rice crop grown under non-flooded conditions. *Paddy and Water Environment*, 11, 175-183.
- Priya, H., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Bidyarani, N., Babu, S., Thapa, S., & Renuka, N. (2015). Influence of cyanobacterial inoculation on the culturable microbiome and growth of rice. *Microbiological Research*, 171, 78-89.
- Ramakrishnan, B., Kaur, S., Prasanna, R., Ranjan, K., Kanchan, A., Hossain, F., ... & Nain, L. (2017). Microbial inoculation of seeds characteristically shapes the rhizosphere microbiome in desi and kabuli chickpea types. *Journal of Soils and Sediments*, 17, 2040-2053.
- Renuka, N., Guldhe, A., Prasanna, R., Singh, P., & Bux, F. (2018). Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnology advances*, 36(4), 1255-1273.
- Renuka, N., Prasanna, R., Sood, A., Ahluwalia, A. S., Bansal, R., Babu, S., ... & Nain, L. (2016). Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat. *Environmental science and pollution research*, 23, 6608-6620.
- Renuka, N., Prasanna, R., Sood, A., Bansal, R., Bidyarani, N., Singh, R., ... & Ahluwalia, A. S. (2017). Wastewater grown microalgal biomass as inoculants for improving micronutrient availability in wheat. *Rhizosphere*, 3, 150-159.
- Roesslers, G., Loosdrecht, M. V., & Muyzer, G. (2008). Phototrophic biofilms and their potential applications. *Journal of applied phycology*, 20, 227-235.
- Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany*, 111(5), 743-767.
- Singh, D. P., Prabha, R., Yandigeri, M. S., & Arora, D. K. (2011). Cyanobacteria-mediated phenylpropanoids and phytohormones in rice (*Oryza sativa*) enhance plant growth and stress tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 557-568.
- Singh, S., & Datta, P. (2007). Outdoor evaluation of herbicide resistant strains of *Anabaena variabilis* as biofertilizer for rice plants. *Plant and soil*, 296, 95-102.
- Stirk, W. A., Ördög, V., Van Staden, J., & Jäger, K. (2002). Cytokinin-and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *Journal of Applied phycology*, 14, 215-221.
- Swain, S. S., Paidesetty, S. K., & Padhy, R. N. (2017). Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90, 760-776.
- Swarnalakshmi, K., Prasanna, R., Kumar, A., Pattnaik, S., Chakravarty, K., Shivay, Y. S., ... & Saxena, A. K. (2013). Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. *European Journal of Soil Biology*, 55, 107-116.
- Wan, J., Liu, X., Kerr, P. G., Wu, C., & Wu, Y. (2016). Comparison of the properties of periphyton attached to modified agro-waste carriers. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 3718-3726.
- Wang, X., Wang, Q., Hong, Y., & Wang, Z. (2024). A whole process study of dual microalgal cultivation

- coupled to domestic wastewater treatment and wheat growth. *Environmental Research*, 254, 119168.
- Xiao, R., & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology advances*, 34(7), 1225-1244.
- Yandigeri, M. S., Yadav, A. K., Meena, K. K., & Pabbi, S. (2010). Effect of mineral phosphates on growth and nitrogen fixation of diazotrophic cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Westiellopsis prolifica*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97, 297-306.
- Yilmaz, E., & Sönmez, M. (2017). The role of organic/bio-fertilizer amendment on aggregate stability and organic carbon content in different aggregate scales. *Soil and Tillage Research*, 168, 118-124.
- Yu, Y., Zhou, Y., Wang, Z., Torres, O. L., Guo, R., & Chen, J. (2017). Investigation of the removal mechanism of antibiotic ceftazidime by green algae and subsequent microbic impact assessment. *Scientific reports*, 7(1), 4168.
- Zhang, Z., Xu, M., Fan, Y., Zhang, L., & Wang, H. (2024). Using microalgae to reduce the use of conventional fertilizers in hydroponics and soil-based cultivation. *Science of The Total Environment*, 912, 169424.