

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). بطوری که 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*، 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*، *Tolypothrix* و *Aulosira* 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 Magnakinetifex</i>	GABIT327	Strain3	
MF115982/1	<i>Neowestieuoopsis 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 سی‌سی 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 سی‌سی 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 سی‌سی 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 سی‌سی از آن به حجم ۱ لیتر رسانده شد. پس از همگن نمودن سو سپانسیون سلولی سویه‌ها، ۱۰ سی‌سی از نمونه هموزن شده به مدت ۱۵ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. به ۱۰ سی‌سی 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 ساقه‌چه در جدول تجزیه واریانس معنی‌دار نشده و این بدین معنی است که در فاز جوانه‌زنی برای صفت طول ساقه‌چه در ارقام و همچنین اثر متقابل سویه در ارقام معنی‌دار نبود. عبارت دیگر سویه‌های مختلف بکار گرفته شده در این تحقیق اثر یکسانی را بر روی صفت طولی شدن ساقه‌چه در ارقام برنج طارم، فجر و روشن نشان دادند (شکل ۲-پ). در بررسی صفت طول ریشه‌چه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده شد که در رقم فجر در حضور سویه ۶ با ۶۹/۳۳ میلی‌متر بیشترین و شاهد با ۳۹/۳۳ میلی‌متر کمترین طول ریشه‌چه را داشته‌اند. در رقم روشن نیز سویه شماره ۱ با ۹۲ میلی‌متر 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 ساقه‌چه در سطح احتمال ۱ درصد نیز اثر ارقام و سویه و اثر متقابل سویه در رقم معنی‌دار بوده که در رقم فجر و با بکارگیری سویه شماره ۶ با نسبت ۱/۱۱ بیشترین و سویه شماره ۴ با نسبت ۰/۲۵ کمترین نسبت را به خود اختصاص داد. در رقم روشن نیز سویه شماره ۱ با نسبت ۱/۵۷ و سویه شماره ۴ با نسبت ۰/۲۲ به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند. در رقم طارم نیز سویه‌های شماره ۸ و شماره ۱

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 خالص‌سازی 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

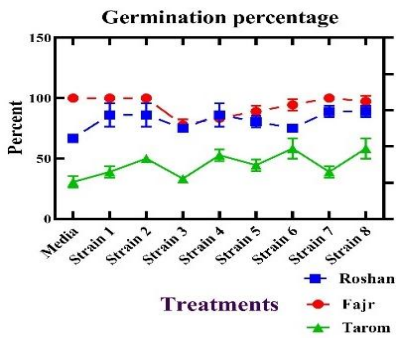
** : احتمال معنی داری در سطح ۱ درصد و ns : عدم معنی‌داری.

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

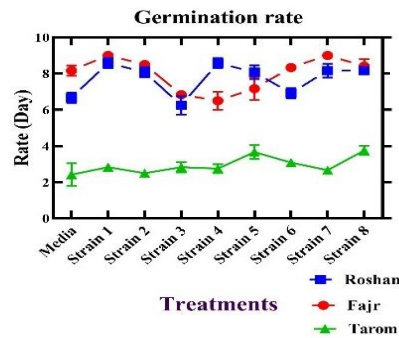
در برر سی اثر سویه‌ها بر صفت بیوماس ارقام، وزن تر و وزن خشک تیمارها نیز محاسبه شد و مطابق جدول تجزیه واریانس در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌داری بوده که در رقم فجر با همکشتی با سویه شماره ۶ به وزن ۰/۰۲۴ میلی‌گرم بیشترین و سویه شماره ۲ و ۵ با ۰/۰۰۷ میلی‌گرم کمترین وزن خشک را در مقایسه با

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

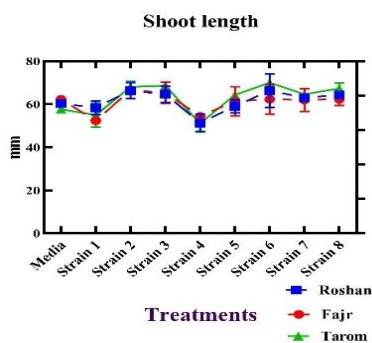
سویه شماره ۵ با ۰/۰۲۶ میلی‌گرم بیشترین وزن خشک و سویه شماره ۷ و ۲ کمترین وزن خشک را در مقابل تیمار



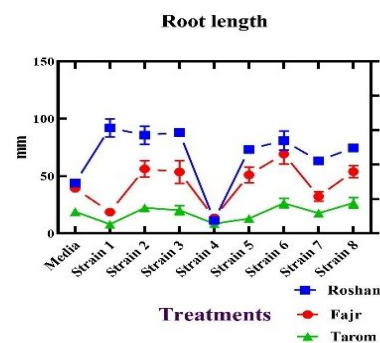
الف



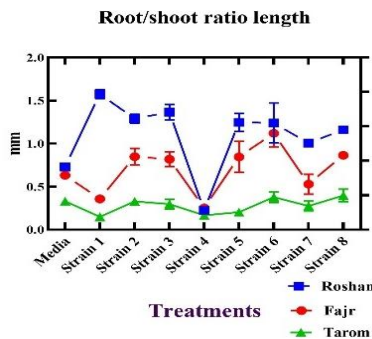
ب



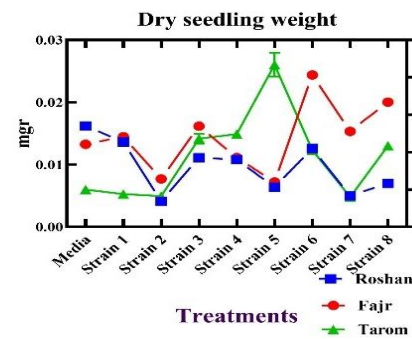
پ



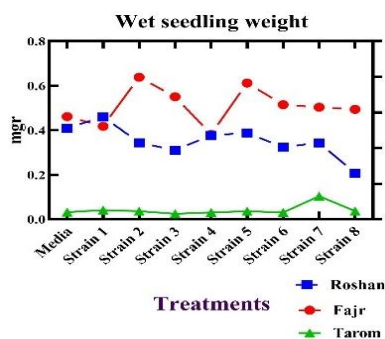
ت



ث



ج



ح

شکل ۲. اندازه‌گیری پارامترهای جوانه‌زنی الف: درصد جوانه‌زنی، ب: سرعت جوانه‌زنی پ: طول ساقچه ت: طول ریشه چه ت: نسبت طول ریشه چه به ساقچه، ج: وزن خشک چه: 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 سویه‌های 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*

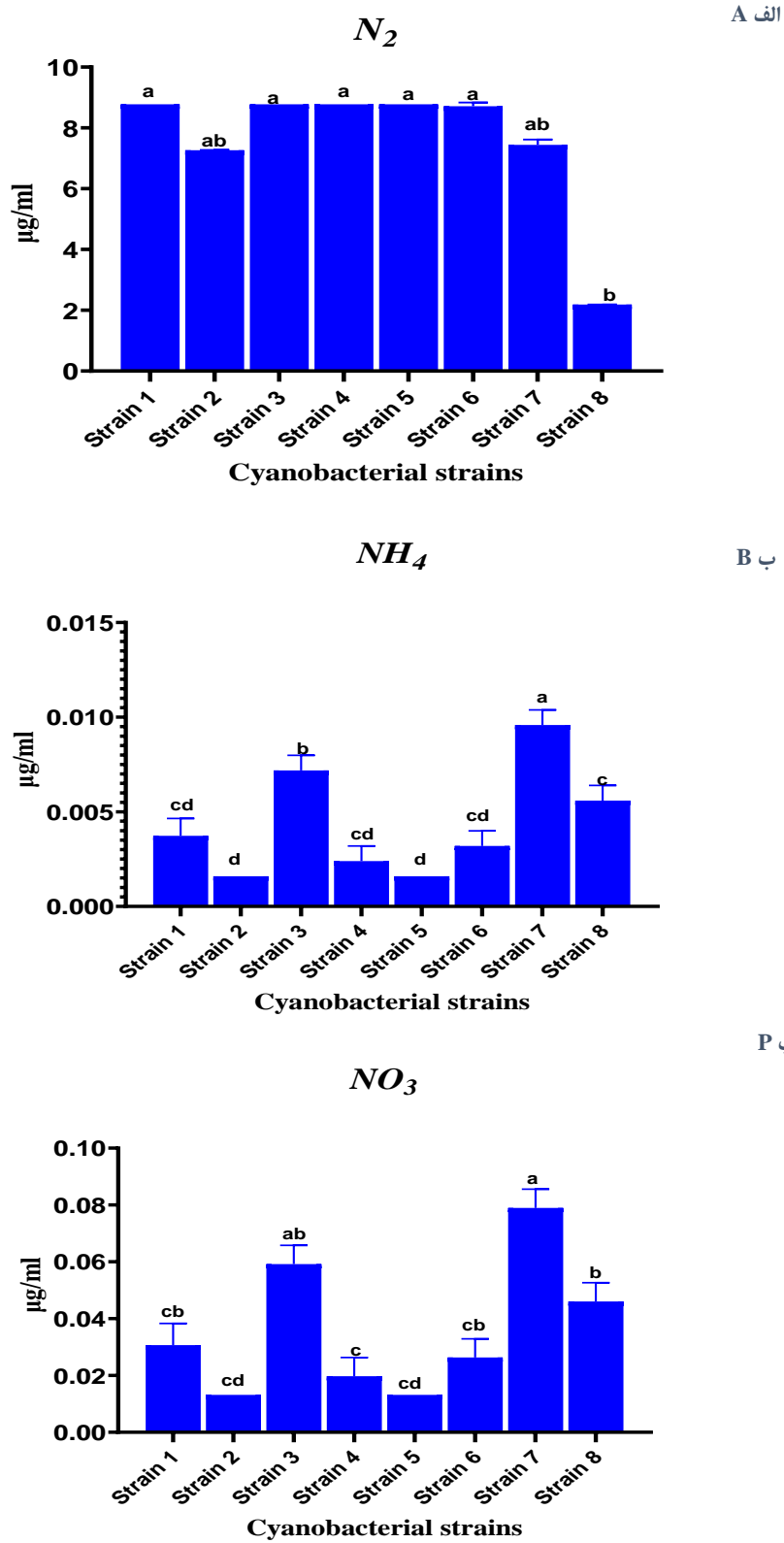
در این تحقیق، ۱۵ ژن *OsAMT* که متعلق به ۱۲ مکان ژنی بودند در ژنوم برنج شناسایی شد. پایش ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پروتئین‌ها می‌تواند در تعیین فرایندهای بیولوژیکی، کارکرد مولکولی و مکان‌نمایی^۱ آن‌ها در سلول تأثیرگذار باشد. همان‌طور که در جدول شماره ۴ دیده می‌شود ارزیابی ویژگی‌های فیزیوشیمیایی در پروتئین‌های 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 ۰/۴۲ 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).

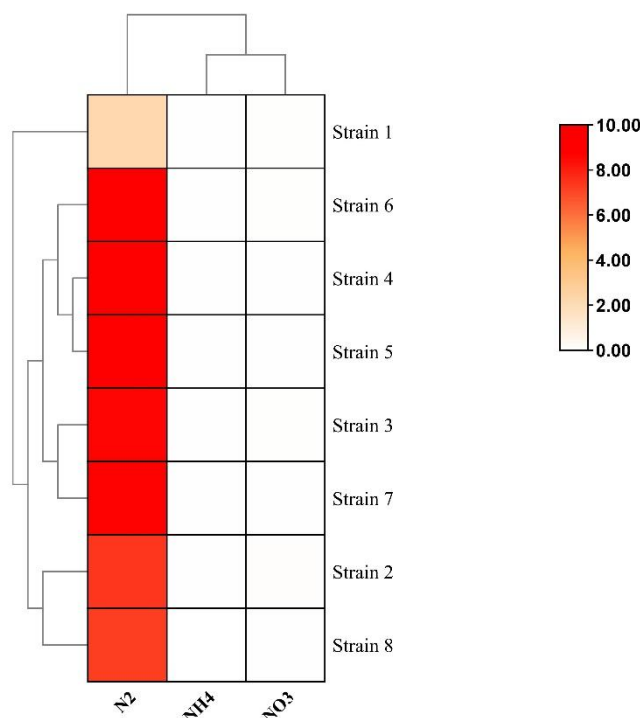
جدول ۴. ویژگی‌های فیزیوشیمیایی خانواده ژنی *OsAMT*.Table 4. Physicochemical characteristics of *OsAMT* gene family.

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* و *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;1-1like 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* و *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.

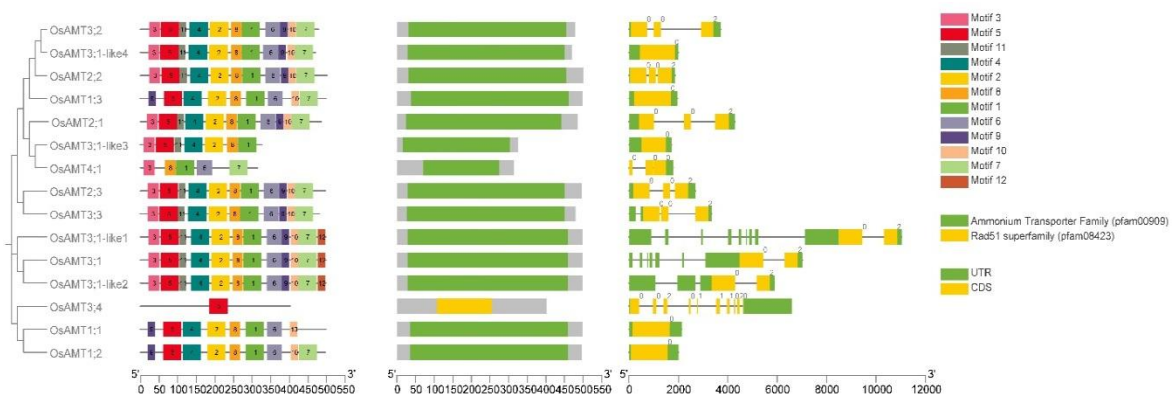
شناسایی ساختار ژنی و روابط فیلوژنتیکی

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

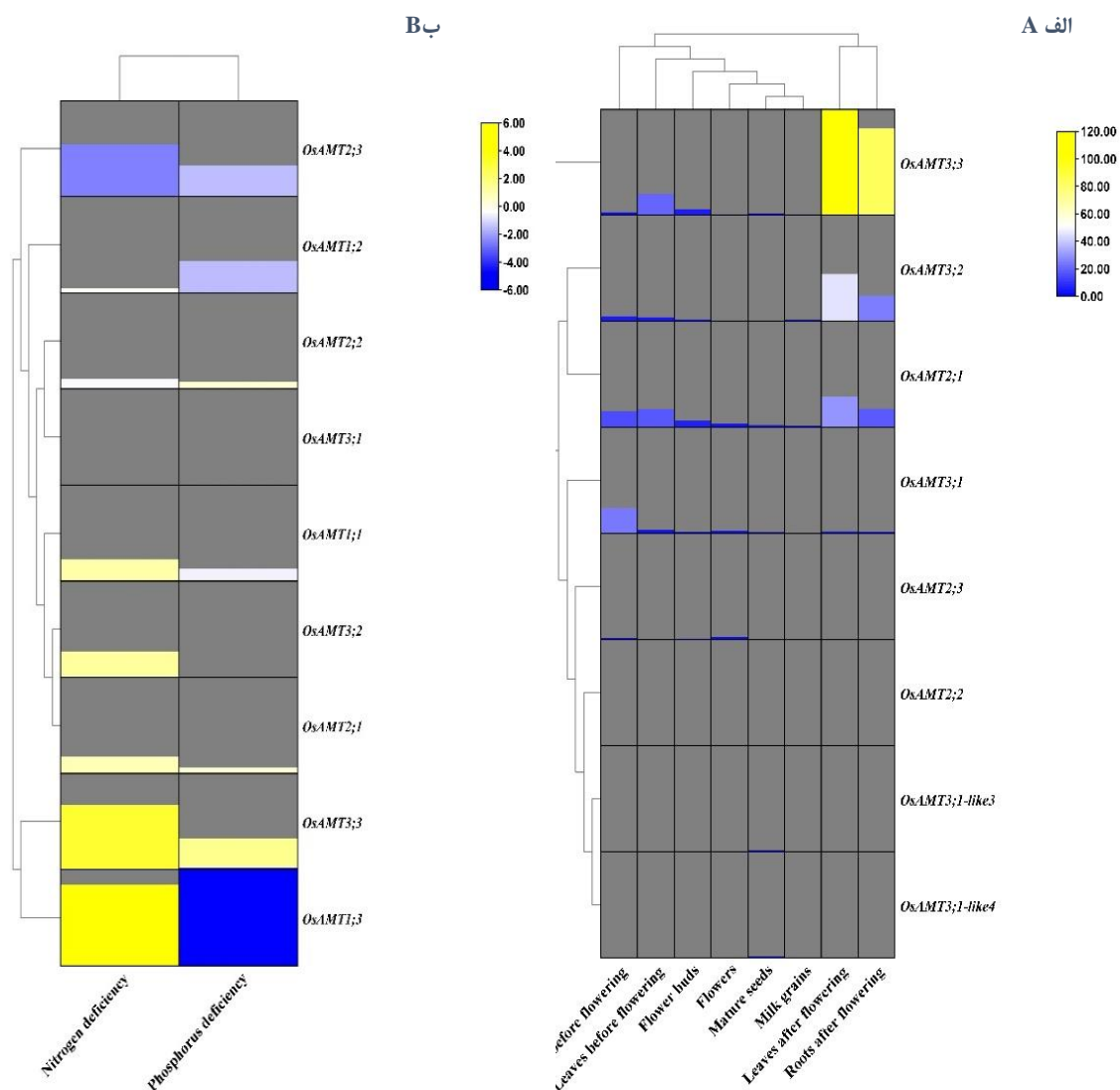


شکل ۵. آنالیز ساختار ژنی و درخت فیلوژنتیکی اعضای خانواده *OsAMT*. خانه‌های رنگی مختلف نشان‌دهنده وجود موتیف‌های مختلف و موقعیت آنها در هر پروتئین می‌باشد. نواحی سبز نشان‌دهنده آگزون‌ها بوده در حالی که خطوط سیاه نشان‌دهنده جایگاه اینترون‌ها است.

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-Mashadrizeh, A., Makhdoumi, A., & Housaindokht, M.R. (2019). Biocomputational Investigations of Structural and Functional Properties of Cry Proteins for Malaria Biocontrol. *Biological Journal of Microorganism* 8(29), 25-40.
- Kabirnataj, S., Nematzadeh, G.A., Talebi, A.F., Tabatabaei, M., & Singh, P. (2018). Neowestiellopsis gen. nov, a new genus of true branched cyanobacteria with the description of Neowestiellopsis persica sp. nov. and Neowestiellopsis bilateralis sp. nov., isolated from Iran. *Plant Systematics and Evolution* 304, 501-510.
- Kabirnataj, S., Nematzadeh, G.A., Talebi, A.F., Tabatabaei, M., & Singh, P. (2019). Identification of some heterocystous cyanobacteria isolated from rice fields of Mazandaran province with emphasis on multi-genic approach. *Journal of Microbial World* 12(3), 213-228.
- 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.