Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 50, No 3, Autumn 2019 (135-148)
DOI: 10.22059/ijfcs.2018.241539.654376

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۳، پائیز ۱۳۹۸ (ص۱۴۸-۱۳۵)

افزایش کارائی زیستی نیتروژن گیاه سویا با جهش در باکتری *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* همزیست آن

جواد پیرولی بیرانوند[۱]، احمد علی پوربابایی[۲]*، حسینعلی علیخانی[۲]، سید پژمان شیرمردی[۱]، علیرضا عباسی[۳] و بابک متشرع زاده[۲]

۱. گروه کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران. ۲. گروه خاکشناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. ۳. گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۲۳)

چکیده

برای افزایش کارائی زیستی نیتروژن گیاه سویا، از ۴ سویه باکتری *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* همزیست آن، سویه بومی RS117 بر اساس آزمایشات میکروسکوپی، تلقیح با گیاه و تعیین توالی ژن *16S rRNA* انتخاب شدند. سپس این سویه به شکل محلول در محیط YMB با دزهای ۰ تا ۵۰۰۰ گری با فاصله ۵۰۰ گری (Gray) اشعه گاما پرتوتابی شدند و حدود ۸۰۰ جدایه موتانت آن، از دزهای ۱۰۰ تا ۲۵۰۰ گری جمع‌آوری شد. جدایه‌های مذکور بر اساس تغییر رنگ محیط GMGT، ارزیابی و ۱۱ جدایه برتر انتخاب شد. در آزمون کارایی همزیستی، ۱۱ جدایه منتخب با گیاه سویا در شرایط گلخانه در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار، ۳ جدایه برتر موتانت شماره ۳، ۸ و ۹ مقدار قابل‌توجه ۵۶ تا ۸۱ درصد، افزایش توان تثبیت زیستی نسبت به سویه مادری RS 117 نشان دادند. ارزیابی بیان نسبی ژن‌های *nodA* و *nifK2* در ریشه گیاهان تلقیح‌شده با جدایه موتانت شماره ۹ و سویه وحشی به‌روش Real Time PCR بیانگر افزایش و کاهش آنها در جدایه موتانت نسبت به سویه مادری است. نتایج حاصل بیانگر آن است که سویه های موتاسیون یافته در اثر تابش پرتوهای گاما، توانسته اند به مقدار قابل توجهی تثبیت زیستی نیتروژن را در گیاه سویا افزایش دهند.

واژه‌های کلیدی: تثبیت زیستی نیتروژن، بیان نسبی ژن، اشعه گاما، *nodA* و *nifK2* .

Increasing symbiotic nitrogen fixation in soybean by using mutation in microsymbiont *Bradyrhizobium japonicum*

Javad Pirvali Beiranvand[1], Ahmad Ali Pourbabaee [2*], Hossein Ali Alikhani[2], Sayed Pejman Shirmardi[1], Alireza Abbassi[3], Babak Motesharezadeh[2]

1. Nuclear Science and Technology Reseach Institute, Atomic Energy Organization of Iran. 2. Dept. of Soil Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. 3. Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran

(Received: September 17, 2017 - Accepted: August 14, 2018)

ABSTRACT

To increase the symbiotic nitrogen fixation in soybean, a native *Bradyrhizobium japonicum* strain RS 117 was selected from four strains via infectiveness, symbiotic effectiveness and sequancing *16S rRNA* gene. Then, mentioned strain in the form of YMB inoculum was irradiated by gamma rays dosages 0-5000 Gray with a 500 Gray interval dosage. About 800 mutant isolates were collected on YMA from different doses. 11 isolates in efficiency point of view changing the GMGT media colour were selected as the best isolates for further study. These isolates were tested for their symbiotic effectiveness (SE) under proper greenhouse condition with a randomized complete block design in 3 replications; and 3 more efficient isolates No. 3, 8 and 9 increased 56- 81 percent SE more than wild strain. At last, relative gene expersion *nodA*, *nifK2* in mutant and wild strain bacteria approved mollacular differences between both of them by indicating Increase and decrease in amount, in mutant isolate number 9 in comparison with the wild *Bradyrhizobium japonicum* strain RS 117. The results indicate that gamma-irradiated mutations in *Bradyrhizobium japonicum* strains have significantly increased the biological fixation of nitrogen in soybean plants

Keywords: symbiotic nitrogen fixation, gamma irradiation, *nodA*, *nifK2*, relative gene experssion.

*** Corresponding author E-mail: pourbabaei@ut.ac.ir**

مقدمه

تثبیت زیستی نیتروژن (**Biological Nitrogen Fixation**) بهترین و مهم‌ترین راهی است که به کمک آن خاک به‌طور طبیعی از نیتروژن غنی می‌شود. در طی این فرآیند که توسط تعدادی از میکروارگانیسم-های پروکاریوت و به کمک آنزیم نیتروژناز صورت‌می‌گیرد، نیتروژن اتمسفری به فرم قابل‌جذب گیاه تبدیل می‌گردد. این پدیده کاملاً مفید، علاوه بر اینکه سالانه به‌طور طبیعی حدود۲۰۰ میلیون تن نیتروژن اتمسفری را به اکوسیستم‌های طبیعی وارد می‌نماید، هیچ‌یک از مشکلات اقتصادی و زیست-محیطی ناشی از مصرف کودهای شیمیائی نیتروژنه را به‌همراه ندارد **(Beck *et al*., 1993; Herridge & Danso, 1995; Biswas & Gresshoff, 2014)**. از جمله سیستم‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی، سیستم همزیستی لگوم - *ریزوبیوم* می‌باشد که حدوداً ۵۰ درصد کل تثبیت نیتروژن را در جهان به خود اختصاص می‌دهد. ارزش اقتصادی ناشی از این موهبت الهی را سالانه بالغ بر ۸۵ میلیارد دلار تخمین زده‌اند. سویا از جمله لگومی است که به‌لحاظ همزیستی با *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* (***Bradyrhizobium japonicum***) از توان تثبیت نیتروژن نسبتاً بالائی برخوردار است. به‌علاوه به‌دلیل ارزش غذائی زیاد (دانهٔ آن محتوی ۲۰٪ چربی و ۴۰٪ پروتئین می‌باشد به-طوری‌که حدود ۲ برابر گوشت قرمز، پنیر و ۱۰ برابر شیر پروتئین دارد) و نیز استفاده‌های داروئی و صنعتی فراوان (حدود ۷۵ نوع ماده مختلف از دانه سویا استحصال می‌شود) مورد توجه خاص محققین مختلف می‌باشد. از طرف دیگر به‌عنوان گیاهی درآمدزا مطرح است، چرا که می‌توان آن را به‌عنوان کشت دوم بعد از برداشت محصولاتی از قبیل غلات، باقلا، سیب‌زمینی و.... کشت نمود که عملاً ۸۰ درصد زراعت سویا در ایران به این صورت می‌باشد **(Pirvali Beiranvand, 1999)**. از نقطه نظر زراعی، سویا یکی از سرشارترین منابع پروتئین و روغن گیاهی است که بیشترین سطح زیرکشت دانه‌های روغنی را در دنیا (حدود ۱۱۷/۵ میلیون هکتار) و ایران (بعد از پنبه با حدود ۶۱ هزار هکتار) به خود اختصاص داده است **(Ahmadi *et al*., 2016؛ FAO, 2014)**. مطالعات انجام‌گرفته بیانگر آن است که پتانسیل تثبیت نیتروژن مولکولی در گیاهان خانواده لگوم از جمله سویا، علاوه بر عوامل محیطی مانند ویژگی‌های خاک، اقلیم و مدیریت زراعی، به‌مقداری زیاد تحت تأثیر دو عامل سویه باکتری و رقم گیاه قرار دارد؛ چنانچه این دو عامل مهم به‌گونه‌ای مناسب انتخاب شده و به‌کار روند، سیستم همزیستی سویا-باکتری ریزوبیومی، توان زیادی برای تثبیت نیتروژن مورد نیاز گیاه و تأمین آن خواهد داشت **(Hardarson & Danso, 1993; FAO, 1984; Peoples *et al*., 1995; Hardarson *et al*., 1993; Pirvali Beiranvand *et al*., 2003)** گیاه سویا مانند دیگر بقولات تثبیت کننده نیتروژن مولکولی، نیتروژن مورد نیاز سوخت و ساز خود را از دو منبع خاک و همزیستی تأمین می‌کند. علاوه بر این، از جمله گیاهانی است که برای تولید محصول احتیاج به مقدار زیادی نیتروژن دارد؛ به‌طوری که برای هر تن محصول در حدود ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار نیاز دارد. در صورتی که سیستم همزیستی در این گیاه دارای کارایی بالایی باشد، گیاه سویا از جمله لگومی است که به کود نیتروژنه پاسخ مثبت نمی‌دهد. به‌عبارت دیگر این توانایی را دارد که تمام نیتروژن مورد نیاز خود را از راه تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی هوا تأمین کند **(Keyser & Li, 1992)**. در برخی مطالعات، توانایی این همزیستی در تثبیت نیتروژن و تأمین نیتروژن مورد نیاز گیاه سویا به‌ترتیب تا ۴۵۰ کیلوگرم در هکتار و ۹۵ درصد مورد نیاز گیاه گزارش شده است **(Peoples *et al*., 1989; Herridge & Danso, 1995; Wani *et al*., 1995)**. گزارش‌های موجود در کشور، بیانگر استفاده سالانه از مقادیر متنابهی کود نیتروژنه در زراعت بقولات، به‌ویژه سویا می‌باشد که تداوم آن، به‌سبب عدم مطابقت با اصول کشاورزی پایدار، لازم است با بالا بردن کارایی سیستم همزیستی مذکور، از طریق شناخت و رفع تنگناهای آن، متوقف گردد. سابقه استفاده از موتاسیون در بهبود فرآورده‌های میکروبی به دهه

۱۹۴۰، زمان تولید صنعتی پنی‌سیلین از قارچ *پنی‌سیلیوم* می‌رسد که محققان با استفاده از موتاژن‌های شیمیایی موفق به تولید سلسله‌وار سویه‌های موتانتی شدند که توانسته‌اند تولید را از ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ۴۰ گرم در میلی‌لیتر برسانند (**Naqavi *et al.*, 2012**). منابع علمی موجود بیانگر آن است که از موتاسیون جهت افزایش توان آنتاگونیست‌های جنس‌های مختلف قارچ (مثل *فوزاریوم*، *آسپرزیلوس*، *تریکودرما*) و باکتری (مانند *باسیلوس*، *پسودوموناس* و *ریزوبیوم*) برای تولید موتانت‌های برتر جهت کاهش خسارت عوامل بیماری‌زا به گیاه زنده و یا افزایش ماندگاری محصولات زراعی، همچنین بهبود توان رشد گیاه از طریق افزایش توان تولید نیازهای غذایی گیاهان لگوم مثل افزایش غده‌بندی و توان تثبیت زیستی نیتروژن؛ در کشورهای مختلف از قبیل آمریکا، چین، هند، مصر، ژاپن، استرالیا، عربستان‌سعودی، تایلند، اتیوپی و ایران در سالیان گذشته تا به حال استفاده شده است (**Ahari Mostafavi *et al.*, 2012; Shahbazi *et al.*, 2013; Mouradi *et al.*, 2013**). نکته قابل‌توجه آن است که تاکنون هیچ‌گونه گزارش مبنی بر ایجاد سویه‌ای موتانت بیماری‌زا و خطرناک برای انسان و یا سایر موجودات گزارش نشده است (**Ahari Mostafavi & Safaei, 2012**). از آنجائی‌که افزایش توان تثبیت زیستی نیتروژن از طریق اصلاح و بهبود این فرآیند موجب افزایش عملکرد و گامی مؤثر در جهت کشاورزی پایدار و صرفه‌جوئی در نهاده‌های کشاورزی می‌باشد. تحقیق حاضر برای اولین بار در کشور در راستای ایجاد جهش در باکتری بردی‌*ریزوبیوم ژاپنیکوم* به‌منظور افزایش توان تثبیت زیستی در گیاه سویا انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام این تحقیق، ابتدا بررسی‌های مقدماتی مطالعه خلوص کشت بر روی محیط کشت نسبتاً اختصاصی **YMA**، نحوه تغییر **pH** محیط کشت با استفاده از برم‌تیمول آبی و برم‌کرزول ارغوانی، مشاهدات میکروسکپی و توان برقراری همزیستی، یعنی ایجاد گره در سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان (**Plant Infection Test**) ۴ جدایه از باکتری‌های ریزوبیومی همزیست گیاه سویا (**Beck *et al.*, 1993; Somasegaran *et al.*, 1994**)، تهیه‌شده از موسسات تحقیقاتی و خصوصی داخل کشور انجام شد. نتایج حاکی از همزیست‌بودن باکتری‌های مذکور با گیاه سویا بود.

شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتری همزیست

برای شناسایی جدایه‌های همزیست به‌روش ژنتیکی (***16S rRNA***)، استخراج **DNA** از محلول مایع جدایه‌ها در محیط **YMB** انجام شد. به این منظور از لیزوزیم با **STE** و پروتئیناز **K** برای تخریب دیواره باکتری‌ها استفاده شد (**Sambrook & Russell, 2006**). ابتدا با به‌کارگیری بافر لیزکننده مانند **EDTA**، **SDS** ۱۰ درصد، پروتئیناز **K**، سلول (جدا شده توسط سانتریفیوژ کشت مایع) شکسته شده و پس از تغییر ماهیت دادن پروتئین آن با استفاده از فنل و کلروفرم، تمام اجزاء غیر از اسیدهای نوکلئیک رسوب داده شدند (**Sambrook & Green, 2017**). در پایان، با استفاده از اتانول ۹۶ درصد سرد و ایزوآمیل الکل، **DNA** موجود در محلول استخراج گردید. آنگاه واکنش **PCR** با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (**PCR**) با شرایط تکثیر استاندارد انجام و محصول حاصل از **PCR** در ژل آگارز ۱ درصد درون تانک الکتروفورز بارگذاری شد. در این پژوهش، برای تکثیر ژن ***16SrRNA*** جدایه برگزیده از پرایمرهای **27F (TACGGYTACCTTGTTACGACTT)** و **1492R (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)** بهره‌گیری شد. بعد از مشاهده باند مشخص مورد نظر (۱۵۰۰ **bp**) روی ژل مربوط، با توجه به راهنما، نمونه ژل بریده و برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. نتایج تعیین توالی‌ها توسط نرم‌افزارهای **BLAST** بررسی و با توجه به میزان قرابت‌ها، جنس و گونه هر باکتری تعیین شد.

انتخاب جدایه بومی مناسب باکتری همزیست

جهت ایجاد جهش

برای انتخاب جدایه همزیست با گیاه، نیاز است که توان همزیستی آن در تثبیت نیتروژن مولکولی هوا اندازه‌گیری شود. لذا کشت گلخانه‌ای ۴ سویه مختلف باکتری *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* در تثبیت نیتروژن مولکولی در تلقیح با رقم سویا **L17** نسبت به تیمارهای ۰، ۳۵ و ۷۰ پی‌پی‌ام نیتروژن در ظروف شیشه‌ای خاصی به‌نام جارلئونارد در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار به‌مدت ۷۰ روز با شرایط مناسب انجام گرفت. پس از آماده‌شدن ظروف لئونارد محتوی بستر ماسه، با قطر کمتر از ۸۴۱ میکرون (الک شمارهٔ ۲۰) و محلول غذایی فاقد نیتروژن استریل، ۵ عدد بذر جوانه‌دار شده در بالای ظرف به فواصل مساوی داخل‌ماسه کشت گردید. سپس بذرهای کشت شده با ۱ میلی‌لیتر مایه تلقیح تهیه‌شده با غلظتی معادل استاندارد شماره ۳ محلول‌های مک‌فارلند (۹۰۰ میلیون باکتری در میلی‌لیتر) تلقیح گردیدند. در تعدادی از جارهای لئونارد حاوی گیاهچه‌های کشت-شده جهت اعمال تیمارهای ۰، ۳۵ و ۷۰ پی‌پی‌ام (**PPM**) نیتروژن در محلول غذائی، هیچ‌گونه تلقیح باکتریایی صورت نپذیرفت. بعد از اعمال تیمارهای مورد نظر، ظروف مذکور به گلخانه با مشخصات مناسب (دورهٔ روشنائی ۱۶-۱۲ساعت، دمای حداکثر روزانه ۲۸ و حداقل شبانه ۱۸ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰-۶۵ درصد و شدت نور حداقل ۳۰ تا ۳۵ هزار لوکس (**Lux**)) انتقال داده شدند. با گذشت ۱۰ روز از آغاز کشت، تعداد گیاهچه‌ها به ۳ عدد تقلیل داده شد و تا پایان مدت آزمایش، به همین تعداد باقی ماند. سپس سطح ماسه داخل جارها با سنگریزه استریل (دارای قطر ۴-۲ میلی‌متر)، به‌منظور کاهش تبخیر محلول غذائی و همچنین کاهش شیوع آلودگی بین ظروف مجاور هم، پوشانده شدند. در طی دورهٔ رشد، گیاهان با محلول‌های غذائی فاقد نیتروژن **Bradton & Dilworth (1974)** استریل، از ناحیه میانی جارها (محل اتصال دو قسمت ظرف به هم) تغذیه می‌شدند. در پایان دوره رویشی (۵۰٪ گلدهی) گیاهان مربوط به هر جار از محل طوقه قطع شدند و پس از قرار دادن آنها درون پاکت‌های کاغذی، در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت، تا رسیدن به وزن ثابت، خشک گردیدند. سپس وزن خشک و درصد نیتروژن و کل نیتروژن اندام‌های هوائی آنها تعیین شد. همچنین سیستم‌های ریشه‌ای نیز به-طور کامل و با دقت زیاد از ماسه جدا شده و پس از خشک‌نمودن در شرایط ذکر شده در بالا، وزن خشک آنها تعیین گردید. در نهایت برای تمامی تیمارهای تلقیح‌شده با سویه‌های باکتری، شاخص راندمان یا کارائی همزیستی (**SE**) در تثبیت نیتروژن به‌روش زیر تعیین گردید **(Beck *et al.*, 1993; Somasegaran *et al.*, 1994)**

$$\text{Symbiotic Effectiveness (SE)} = \frac{\text{T b} - \text{N0T}}{\text{N2T} - \text{N0T}}$$

T b= کل نیتروژن جذب‌شده در اندام‌های هوائی گیاه تلقیح‌شده با سویه باکتری و تغذیه‌شده با محلول غذائی فاقد نیتروژن

N2T = کل نیتروژن جذب‌شده در اندام‌های هوائی گیاه تلقیح‌نشده با باکتری و تغذیه‌شده با محلول‌غذائی ۷۰ پی‌پی‌ام نیتروژن

N0T= کل نیتروژن جذب‌شده در اندام‌های هوائی گیاه تلقیح‌نشده با باکتری و تغذیه‌شده با محلول غذائی فاقد نیتروژن

پس از این آزمایش، همان‌طور که جدول ۱ نشان می‌دهد به‌ترتیب جدایه‌های **USDA 110** ، **Biosoy** ، **RS 117** و **Br-41** بیشترین کارایی را نشان دادند.

ایجاد جهش در جدایه خالص باکتری همزیست گیاه سویا با اشعه گاما

جهت تابش اشعه گاما نیاز است که باکتری ریزوبیومی مورد نظر با غلظت و مقدار یکسان در میکروتیوب‌های یک میلی‌لیتری آماده شود. به این منظور در ابتدا از سویه بومی باکتری *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* منتخب (**RS117** =**B9**) به محیط **YMB** استریل در مقدار کافی تلقیح نموده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با حرکات دورانی (۱۵۰**RPM**) قرار

داده شد تا غلظت باکتری آن مشابه غلظت شمارهٔ ۳ استانداردهای مک‌فارلند (۹۰۰ میلیون باکتری در میلی‌لیتر) گردید. سپس در میکروتیوب‌های استریل محتوی ۳۰ میکرولیتر گلیسرول، ۷۰ میکرولیتر از محلول باکتری اضافه شد و در دمای ۲۰- درجه منجمد شد. پس از آن، جهت سنجش جمعیت میکروتیوب‌ها، با استفاده از سرم فیزلوژی (۸/۵ گرم کلرورسدیم در لیتر) استریل، سری‌های رقت دهدهی در زیر لامینار تهیه و اقدام به پخش در سطح محیط **YMA** با میله‌خمیده استریل گردید. پس از رشد باکتری روی پلیت‌ها، جمعیت باکتری در میکروتیوب-ها جهت اشعه‌دهی محاسبه شد **(Pirvali Beiranvand *et al*., 2010)**.

انجام تیمارهای اشعه به باکتری *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکم* جهت تولید جدایه‌های موتانت

جدایه بومی باکتری *ریزوبیومی* همزیست با گیاه سویا (**B9**= **RS117**) با دزهای ۰ تا ۵۰۰۰ گری (به-استثنای دز ۱۰۰ گری) با فاصله دز ۵۰۰ گری اشعه داده شد. برای این کار، در هر دز از اشعه چهار میکروتیوب محتوی ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری و گلیسرول پرتوتابی گردید. سپس با تهیه سری‌های رقت دهدهی سرم فیزیولوژی میکروتیوب‌ها، اقدام به پخش در سطح محیط **YMA** با میله‌خمیده استریل گردید.

نتایج رشد سری‌های رقت باکتری در سطح محیط **YMA** بیانگر کاهش جمعیت باکتری به صفر در تیمار ۳۰۰۰ گری نسبت به شاهد بود. در نهایت اقدام به جداسازی حدود ۸۰۰ جدایه شامل ۲۷، ۱۷۱، ۳۵۵، ۲۳۳، ۹ و ۸ جدایه از تیمارهای رشد یافته باکتری به‌ترتیب در دزهای ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، و ۲۵۰۰ گری بر سطح محیط **YMA** شد.

انتخاب موتانت‌های برتر باکتری ریزوبیومی همزیست

با توجه به اینکه هدف تولید جدایه‌های موتانتی است که به لحاظ تثبیت زیستی نیتروژن توان بیشتری داشته باشند. تنها راه دقیق تعیین این مهم، انجام آزمایش توان کارایی جذب با گیاه همزیست است؛ اما از آنجائی‌که انجام این آزمایش به لحاظ وسعت انجام کار مقدور نیست، در بررسی مطالب مرجع سیستماتیک باکتری‌شناسی **(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)** برای کارهای مشابه نتایج کارهای کانشیرو **(TsuneoKaneshiro)** و همکارانش در استفاده از محیط کشت‌های **glutamate-mannitol-gluconate (GMG)** و **glutamate-mannitol-gluconate-tryptophan (GMGT)** جهت انتخاب موتانت‌های باکتری‌های ریزوبیوم با توان احیای استیلن بیشتر (توان تثبیت-زیستی نیتروژن بیشتر) مورد توجه قرار گرفت **(Kaneshiro & Kurtzman, 1982; Kaneshiro et al., 1983; Garrity *et al.*, 2009)**. لذا اقدام به کشت حدود ۸۰۰ جدایه موتانت در این محیط‌ها جهت انتخاب جدایه‌های با توان تثبیت‌زیستی بیشتر نیتروژن که رنگ محیط دوم **(GMGT)** را بیشتر به نارنجی تبدیل می‌کردند، گردید. در نهایت، بر همین اساس، تعداد ۱۱ جدایه موتانت جهت ارزیابی نهایی در ارتباط با گیاه سویا انتخاب شد.

آزمون کارایی همزیستی جدایه‌های منتخب موتانت با گیاه سویا

از دو شاهد غیر موتانت و ۱۱ جدایه برتر موتانت انتخاب‌شده از دزهای مختلف اشعه که در مرحله قبل توان تثبیت‌زیستی نیتروژن بیشتری نشان دادند و رنگ محیط **GMGT** را از لحاظ کمی به مقدار بیشتری به نارنجی تبدیل نمودند (به‌ترتیب ۳، ۳، ۲، ۱، ۱، ۱ جدایه از جدایه‌های دزهای با اشعه گاما؛ ۲۵۰۰، ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰ گری انتخاب شد) در محیط **YMB** تلقیح و زاد مایه به مانند آنچه در قسمت‌های قبلی ذکر شد، تهیه شد. علاوه بر این، تمامی مراحل همان‌طور که در قسمت اول (انتخاب جدایه بومی مناسب باکتری همزیست جهت ایجاد جهش) ذکر شده از قبیل آماده‌سازی ظروف شیشه‌ای برای کشت گیاه، کشت گیاه، تلقیح

بذور و انجام مراقبت‌های گلخانه‌ای و برداشت گیاهان و اندازه‌گیری شاخص‌های وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه، تعداد و وزن خشک غده‌های ریشه‌ای، درصد و مقدار کل نیتروژن اندام هوائی (حاصل‌ضرب مقدار نیتروژن در وزن خشک اندام هوایی)، وزن خشک ریشه و کل سیستم ریشه‌ای (ریشه + غده)، کل وزن خشک گیاه و کارایی همزیستی تثبیت نیتروژن مولکولی پس از پایان دوره رویشی ۵۰٪ گلدهی انجام شد **(Fehr *et al.*, 1971)**. در پایان تجزیه و تحلیل آماری با برنامه **SPSS 16** و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن صورت پذیرفت.

مقایسه میزان بیان نسبی ژن‌های *nod A* و *nif K2* جدایه موتانت باکتری *بردی‌ریزوبیوم* و سویه مادری

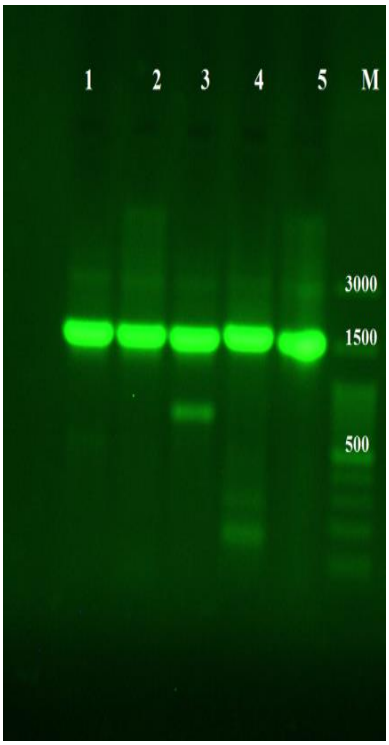
برای این کار، گیاه سویا مادری رقم **L17** تلقیح‌شده با سویه برتر (حاصل از آزمایش قبلی کارایی همزیستی جدایه‌های موتانت) و همچنین سویه مادری پس از پایان دوره گلدهی (شروع غلاف‌دهی)، در سه تکرار برداشت و هر گیاه به دو قسمت اندام‌های هوایی و سیستم ریشه‌ای (شسته‌شده از ماسه) تقسیم و با نیتروژن مایع بلافاصله منجمد و به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.

برای ارزیابی الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه ژن-های ***nodA*** و ***nifK2*** در جدایه برتر موتانت و وحشی (مادری) از نمونه‌های سیستم ریشه‌ای منجمد شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استخراج **RNA** کل استفاده شد. پس از استخراج **RNA** ، به‌روش مبتنی بر محلول **CTAB** و رسوب الکلی با استفاده از لیتیم-کلراید، و تبدیل آن به **cDNA** مقدار بیان ژن‌های مذکور در حضور ژن کنترل (**16S** که قبلاً آغازگرهای آنها طراحی، ساخت و در نمونه شاهد بیان شد) به-روش **Real Time PCR** در سه تکرار دستگاهی مورد آزمون قرار گرفت. تمام مراحل این آزمون با رعایت نکات ایمنی و در محیط عاری از آنزیم **RNase** انجام گرفت. برای از بین بردن **RNase** روی سطوح شیشه-ایی از اعمال تیمار دمایی ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت و در شرایط استریل استفاده شد. برای غیرفعال کردن آنزیم **RNase** محلول‌های مورد استفاده از آب دو بار تقطیر تیمار شده به **DEPC** ۰/۱ درصد به طول یک شبانه‌روز و اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. در نهایت داده‌های به‌دست آمده از آنالیز بیان ژن با استفاده از مدل دلتا **Ct** (**ΔΔCt**) تصحیح‌شده با بازده تکثیر **(Schmittgen & Livak, 2001; Livak & Schmittgen, 2008)** مورد ارزیابی و محاسبه قرار گرفتند، سپس به کمک نرم‌افزار **Excell 2007** نمودارهای آنها ترسیم شدند.

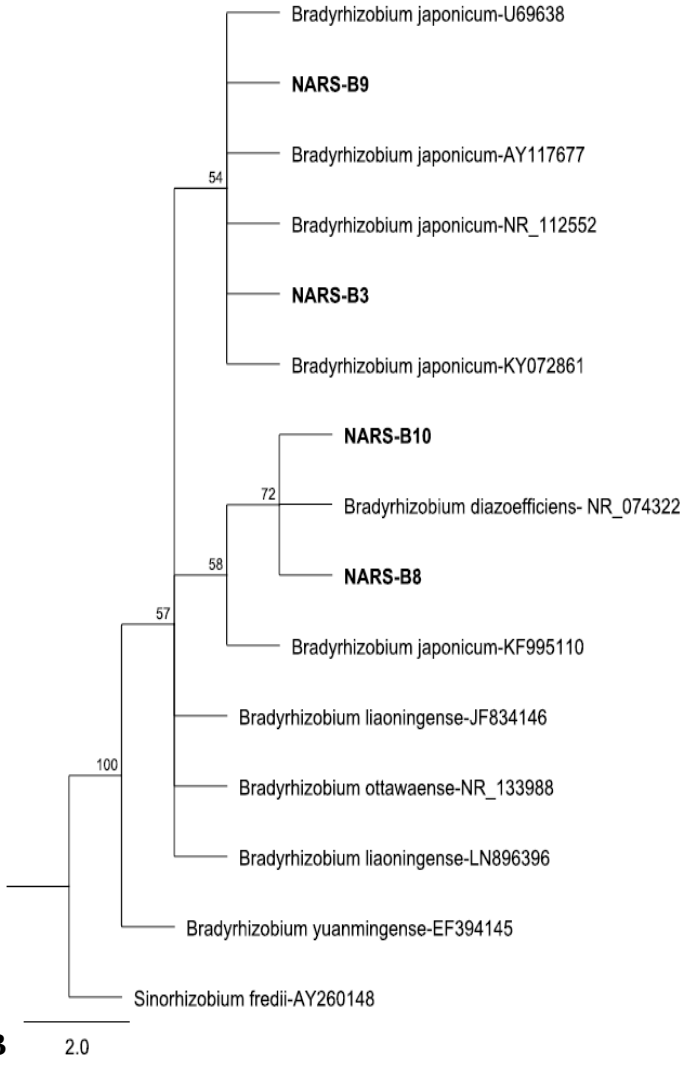
نتایج و بحث

پس از انجام مراحل شناسایی ژنتیکی ۴ جدایه باکتریایی (**B3: Br-41**؛ **B8: Biosoy**؛ **B9: RS 117** ؛ **B10: RS 152**)، نتایج تعیین توالی‌ها، به‌وسیله نرم-افزارهای **Blast** بررسی شد و با توجه به میزان قرابت-ها، مشخص شد که به احتمال ۹۹ درصد چهار جدایه باکتری (**B3**؛ **B8**؛ **B9** و **B10**)، متعلق به گونه بردی-ریزوبیوم ژاپنیکوم می‌باشد. باندهای الکتروفورز و درخت فیلوژنی در شکل ۱ نشان داده شده است. علاوه بر این، توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین‌شده در این مطالعه به بانک اطلاعات ژن بانک **(NCBI)** ارایه شد و به‌ترتیب برای سویه‌های **NARS-B10**، **NARS-B9**، **NARS-B8**، **NARS-B3**، شماره ثبت **MF817964-MF817963** به آنها اختصاص یافت. نتایج آزمایش بررسی توان همزیستی ۴ سویه مختلف باکتری *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* در مقایسه با تیمارهای نیتروژن معدنی در شرایط گلخانه (جدول ۱) نشان داد که تمامی جدایه‌ها نسبت به تیمارهای نیتروژن معدنی در شاخص مقدار جذب نیتروژن گیاه به‌طور معنی‌داری کاراتر هستند. علاوه بر این معلوم شد که تفاوت جدایه‌ها، برخلاف تعداد و وزن خشک غده‌های سیستم ریشه‌ای گیاه همزیست با آنها، از لحاظ توان تثبیت زیستی نیتروژن مولکولی هوا معنی‌دار است. جدایه **USDA 110** نسبت به دیگر جدایه‌ها توان تثبیت زیستی نیتروژن بیشتری نشان

داد که این‌هم در قیاس با جدایه **Br-41** معنی‌دار است. به‌طور کلی این مطالعه نشان داد که تعداد و وزن غده‌های ریشه‌ای گیاه همزیست، شاخص‌های مطلوبی جهت ارزیابی توان همزیستی نمی‌باشند و لازم است در این گونه مطالعات، شاخص‌های مقدار نیتروژن جذب‌شده و توان (راندمان) همزیستی نیتروژن مولکولی در نظر قرار گیرند.



A



B

شکل ۱- باندهای الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن ***16S rRNA*** باکتری *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* روی ژل آگارز ۱ درصد ((**A**) **M**: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱، ۲، ۳ و ۴ سویه‌های باکتری *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* (**B**): درخت فیلوژنی بر اساس توالی ژن ***16S rRNA*** باکتری *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* (رسم شده با کمک نرم‌افزار **Paup** و بر مبنای الگوریتم حداکثر احتمال)

Figure 1. Electrophoresis bands related to *16S rRNA* Gene of *Bradyrhizobium japonicum* on Agaros jel 1% ((A)M: Lader100 base pairs,1, 2. 3 and 4 are *Bradyrhizobium japonicum* strains (B): Phylogenic tree based on *16S rRNA* gene sequence of *Bradyrhizobium japonicum* (plotted using Paup software based on maximum likelihood)

جدول۱. اثر نیتروژن و تلقیح با سویه‌های مختلف باکتری *بردی‌ریزوبیوم* ژاپنیکوم بر شاخص‌های رشدی سویا

Table1. Effect of nitrogen and inoculation with different strains of *Bradyrhizobium japonicum* on parameters in soybean

Treatment	Nodule Dry Matter gr/plant	Nodule Number / plant	Shoot Dry Matter Yield gr/plant	N-Uptake mgr/plant	Total Dry Matter gr/plant	Symbiotic Effectiveness (SE)%
N0	-	-	0.66 d	4.48 e	0.9 d	-
N1	-	-	1.20 c	11.19 e	1.53 c	-
N2	-	-	2.25 a	26.96 d	2.81 a	-
Br-41	0.168 a	52.33 a	1.80 a	40.46 c	2.30 b	1.69 b
Biosoy	0.145 a	39.25 b	2.25 a	50.29 b	2.79 a	2.17 ab
RS 117	0.145 a	44.00 ab	2.06 ab	50.44 b	2.53 ab	2.10 ab
USDA 110	0.170 a	42.34 ab	2.39 a	63.72 a	2.93 a	2.68 a

میانگین‌های با حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (بر پایهٔ آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵).

N0، N1 و N2 به ترتیب تیمارهای نیتروژن با مقادیر ۰، ۳۵ و ۷۰ میلی گرم در کیلوگرم هستند که باگیاهان آن ها با باکتری نیز تلقیح نشده اند.

- : بدون تولید

Means followed by similar letters are not significantly different at the 95%confidence level.
N0, N1 and N2 are 0, 35 and 70 mg/kg N with no *rhizobia* inoculation, respectively.
- No production

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر جدایه موتانت و غیرموتانت بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده گیاه سویا

Table 2. Analysis variance of mutant isolates and wild strains on measured parameters in soybean

		Mean Square- Value								
S. O. V.	df	Nitrogen Percent (%/plant)	Shoot Dry Matter Yield (mgr./plant)	N yield (mgr./plant)	Symbiotic Effectiveness (SE) %	Root Dry Matter (mgr./plant)	Nodule Dry Matter (mgr./plant)	Nodule Number (number / plant)	Root+ nodule Dry Matter (mgr./plant)	Total Plant Dry Matter (mgr./plant)
Block	2	0.214 ns	125508.6 ns	310.412 ns	1505.129 ns	2031.741 ns	599.383 ns	132.035 ns	4474.576 ns	82598.666 ns
Mutant and wild strain	12	0.359 **	821048.196 **	1123.942 **	8074.785 **	14855.496 **	7941.208 **	808.961 **	42503.299 **	1217739.078 **
Error	24	0.103	175065.634	230.562	1652.502	4396.691	1186.876	173.237	9363.875	258670.631
CV (%)		4.97	5.17	5.34	4.65	5.13	4.73	4.98	4.85	11.73

ns و ****** به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد.

**** and ns: are significant at 1% level and non significant, respectively.**

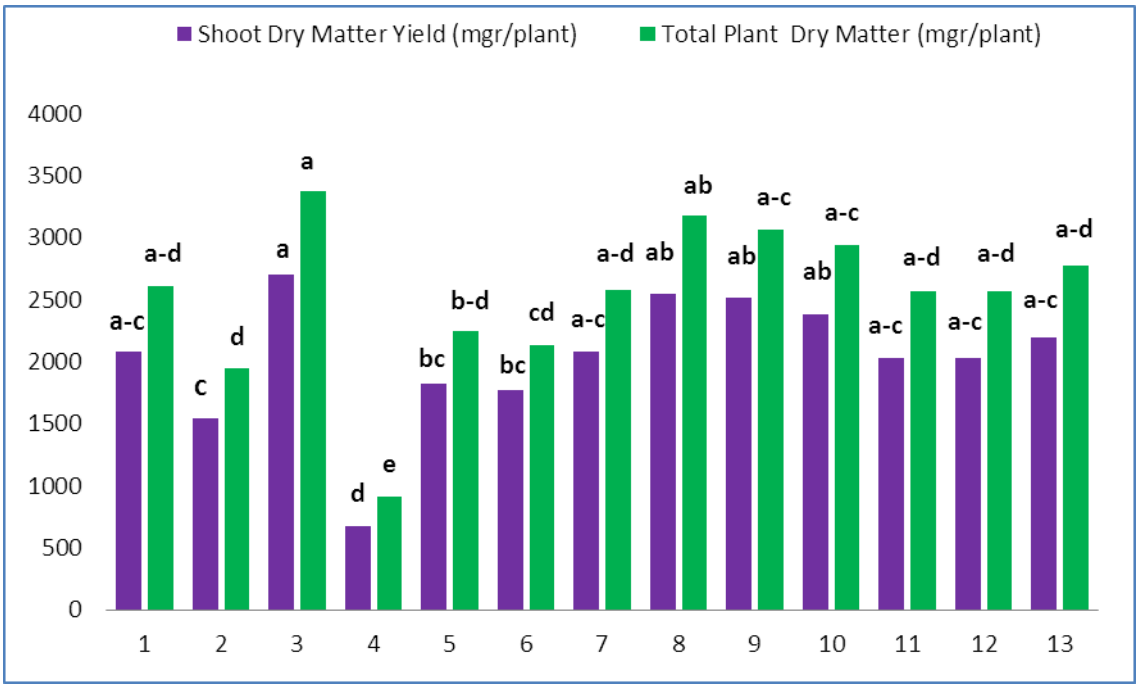
تاثیر تیمارهای مختلف بر وزن خشک اندام‌های هوائی و کل وزن خشک گیاه

همان‌طور که جدول تجزیه واریانس (۲) نشان می‌دهد اختلاف میانگین وزن خشک اندام هوایی و همچنین کل وزن خشک گیاه در تلقیح با جدایه‌های موتانت و غیرموتانت در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. این اختلاف در برخی جدایه‌های موتانت نسبت به شاهد تلقیح‌شده با سویه مادری بیشتر و معنی‌دار است. در اثر تلقیح با جدایه موتانت شماره ۳، وزن خشک اندام هوایی و همچنین کل وزن خشک گیاه سویا به‌ترتیب حدود ۳۰ و ۷۵ درصد از تلقیح با سویه مادری **RS 117** و غیر موتانت **USDA 110** بیشتر شده است (شکل ۲).

تاثیر تیمارهای مختلف بر درصد کل نیتروژن اندام‌های هوائی

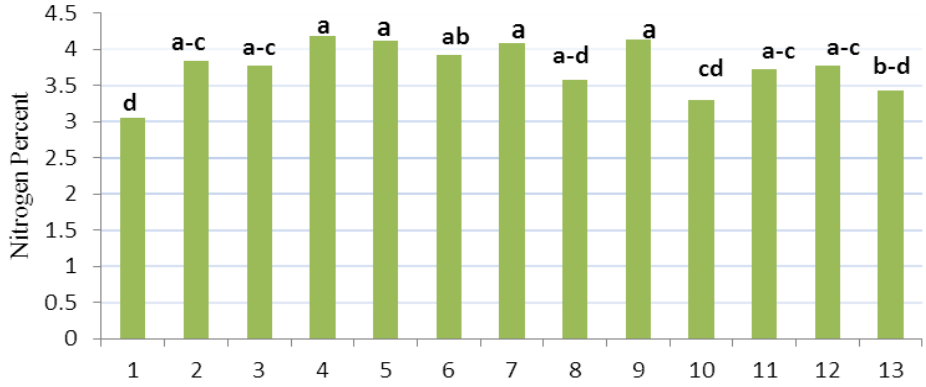
اختلاف درصد نیتروژن اندام‌های هوایی گیاه نیز در اثر تلقیح با جدایه‌های موتانت و شاهد مادری **L17** متفاوت و در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۲). در این شاخص تلقیح با برخی جدایه‌ها

میزان کمتری نشان داده و در برخی دیگر از جمله ۳ جدایه برتر، موتانت‌های شماره ۴، ۵ و ۹ حدود ۳۰ درصد این شاخص در گیاه افزایش یافته است (شکل ۳).



شکل ۲. تاثیر تلقیح با جدایه‌های موتانت و سویه‌های غیر موتانت بر وزن خشک اندام هوایی و کل گیاه سویا (۱ و ۲ به‌ترتیب سویه‌های غیر موتانت **USDA 110** و مادری **RS 117**، بقیه جدایه های موتانت *بردی‌ریزوبیومی* هستند)

Figure 2. Effect of inoculation with mutant isolates and wild strains on soybean shoot dry matter and whole dry matter (1 and 2 are wild strains USDA 110, RS 117; and the rest are mutant *Bradyrhizobium* isolates)



شکل ۳. تاثیر تلقیح با جدایه‌های موتانت و سویه‌های غیر موتانت بر درصد نیتروژن اندام هوایی گیاه سویا (۱ و ۲ به‌ترتیب سویه‌های غیر موتانت **USDA 110** و مادری **RS 117**، بقیه جدایه‌های موتانت *بردی‌ریزوبیومی* هستند)

Figure 3. Effect of inoculation with mutant isolates and wild strains on soybean shoot nitrogen percent (1 and 2 are wild strains USDA 110, RS 117; and the rest are mutant *Bradyrhizobium* isolates)

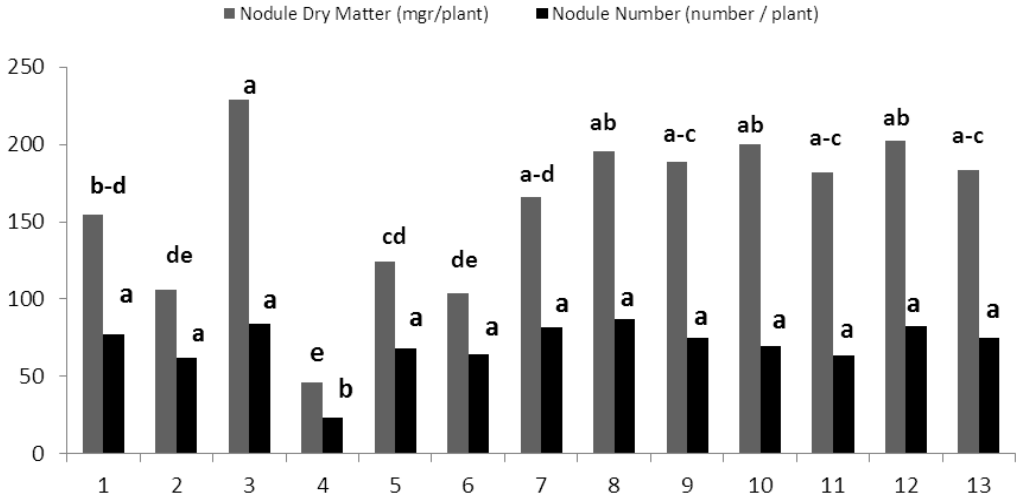
تاثیر تیمارهای مختلف بر وزن خشک و تعداد غده‌های ریشه‌ای گیاه سویا

نتایج تجزیه واریانس (جدول۲) نشان داد که تفاوت تعداد و وزن خشک غده‌های ریشه‌ای تشکیل‌شده در اثر تلقیح با برخی جدایه‌های موتانت نسبت به تلقیح با شاهد مادری معنی‌دار شده است. همان‌طور که شکل

۴ نشان می‌دهد علی‌رغم اینکه این شاخص‌ها در تلقیح با برخی جدایه‌های موتانت کمتر شده است در برخی از جدایه‌ها از جمله شماره ۳؛ ۴۸ و ۱۱۶درصد وزن خشک غده‌های ریشه‌ای نسبت به تلقیح با سویه‌های غیر موتانت **USDA 110** و مادری**RS 117** افزایش یافته است. همچنین جدایه شماره ۸؛ ۱۳ و ۴۰،درصد تعداد غده‌های ریشه‌ای را نسبت به تلقیح با سویه‌های غیر موتانت **USDA 110** و مادری**RS 117** افزایش داده است (شکل ۴).

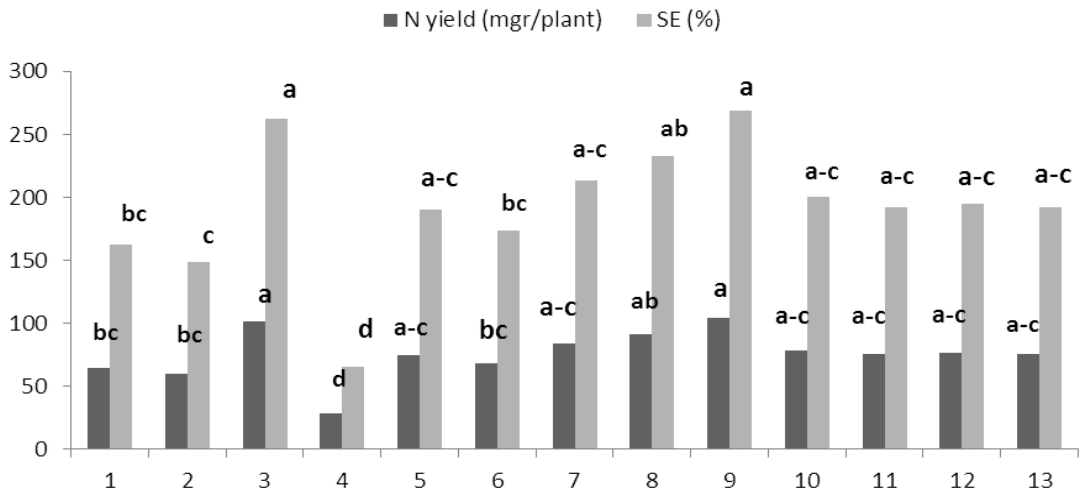
تاثیر تیمارهای مختلف بر کل نیتروژن جذب‌شده در اندام‌های هوائی و کارایی همزیستی گیاه سویا

در این شاخص‌ها نیز اختلاف میانگین‌ها در اثر تلقیح با جدایه‌های موتانت نسبت به هم و همچنین شاهد مادری در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است (جدول۲). به‌علاوه همان‌طورکه شکل ۵ نشان می‌دهد در اثر تلقیح با ۲ جدایه شماره ۳ و ۹ مقدار قابل‌توجه ۴۰ تا ۶۱ و ۵۳ تا ۷۵ درصدی مقدار کل نیتروژن جذب‌شده در اندام هوایی نسبت به سویه‌های غیر موتانت **USDA 110** و مادری **RS 117** در گیاه سویا افزایش یافته است. همچنین در تلقیح گیاه با خیلی از جدایه‌ها، از جمله شماره ۳، ۸ و ۹ مقدار قابل‌توجه ۴۳ تا ۶۵ و ۵۶ تا ۸۱ درصد، کارایی همزیستی نسبت به سویه‌های غیر موتانت **USDA 110** و مادری**RS 117** افزایش یافته است (شکل ۵). **Singh Duhan (2013)** با استفاده از ترنسپوزون **Tn5** موتانت‌هایی از *ریزوبیوم* برای لپه هندی ایجاد نموده است و گزارش کرده که تلقیح گیاه با این سویه‌های موتانت، موجب تولید سیدروفور و تثبیت نیتروژن بیشتری شده است. **Dadarwal *et al.* (1981)** در موتاسیون *ریزوبیوم* همزیست با گیاه ماش با اتیدیوم‌بروماید سویه‌هایی موتانت را گزارش نموده‌اند که در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه‌ای نسبت به سویه وحشی دارای فعالیت نیتروژناز بیشتری بوده‌اند. **Zelalem *et al.* (2014)** در موتاسیون *ریزوبیوم* همزیست با باقلا با موتاژن‌های شیمیایی سدیم ازید و هیدروکسیل امین هیدروکلراید سویه‌های موتانتی ایجاد نموده است که توانسته‌اند مقادیر بالایی تثبیت زیستی نیتروژن برای گیاه باقلا در شرایط قلیایی فراهم نمایند. **Hassan& Eissa (2013)** در بررسی خصوصیات مقاومت به شوری و کارایی همزیستی سویه‌های *ریزوبیوم* موتانت با گیاه باقلا گزارش کرده‌اند، تلقیح با جدایه موتانت باعث افزایش کل محتوای نیتروژن تثبیت‌شده نسبت به سویه‌های والد شد.



شکل ۴. تاثیر تلقیح با جدایه‌های موتانت و سویه‌های غیر موتانت بر وزن خشک و تعداد غده‌های ریشه‌ای گیاه سویا (۱ و ۲ به‌ترتیب سویه-های غیر موتانت **USDA 110** و مادری**RS 117**، بقیه جدایه‌های موتانت *بردی‌ریزوبیومی* هستند)

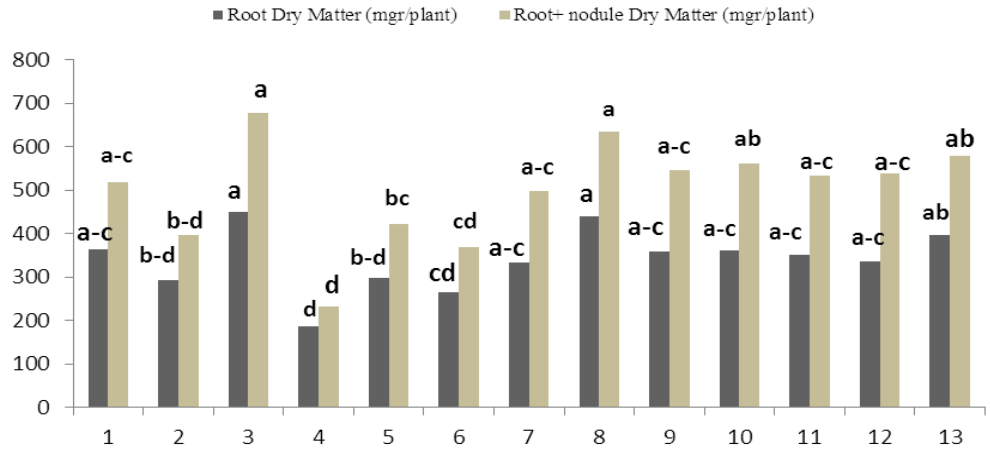
Figure 4. Effect of inoculation with mutant isolates and wild strains on soybean nodule number and nodule dry matter (1 and 2 are wild strains USDA 110, RS 117; and the rest are mutant *Bradyrhizobium* isolates)



شکل ۵. تاثیر تلقیح با جدایه‌های موتانت و سویه‌های غیر موتانت بر کارایی همزیستی و عملکرد نیتروژن گیاه سویا

(۱ و ۲ به‌ترتیب سویه‌های غیر موتانت **USDA 110** و مادری**RS 117**، بقیه جدایه‌های موتانت *بردی‌ریزوبیومی* هستند)

Figure 5. Effect of inoculation with mutant isolates and wild strains on soybean N-uptake ans symbiotic effectiveness (1 and 2 are wild strains USDA 110, RS 117; and the rest are mutant *Bradyrhizobium* isolates)



شکل ۶. تاثیر تلقیح با جدایه‌های موتانت و سویه‌های غیر موتانت بر وزن خشک ریشه و ریشه +غده گیاه سویا

(۱ و ۲ به‌ترتیب سویه‌های غیر موتانت **USDA 110** و مادری**RS 117**، بقیه جدایه های موتانت *بردی‌ریزوبیومی* هستند)

Figure 6. Effect of inoculation with mutant isolates and wild strains on soybean root and root+ nodule dry matter (1 and 2 are wild strains USDA 110, RS 117; and the rest are mutant *Bradyrhizobium* isolates)

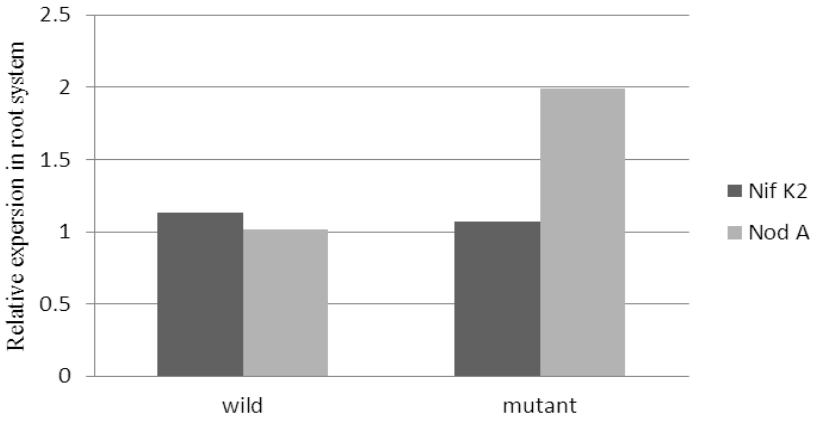
تاثیر تیمارهای مختلف بر وزن خشک ریشه و کل وزن خشک سیستم ریشه‌ای

همان‌طور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود، از لحاظ این شاخص‌ها هم، تفاوت میان جدایه‌های موتانت و همچنین شاهد مادری معنی‌دار شده است. شکل ۶ بیانگر آن است که موتاسیون با اشعه گاما توانسته تنوع زیادی از نظر این شاخص‌ها در جدایه‌های موتانت نسبت به سویه مادری ایجاد کند. همان‌طورکه شکل ۶ نشان می‌دهد در اثر تلقیح با ۲ جدایه شماره ۳ و ۸ مقدار قابل‌توجه ۲۱ تا ۲۴ و ۵۰ تا ۵۴ درصدی مقدار وزن خشک ریشه در گیاه سویا نسبت به تلقیح با سویه‌های غیر موتانت **USDA 110** و مادری **RS 117**، افزایش یافته است. همچنین در تلقیح با خیلی از موتانت‌ها، از جمله ۲ جدایه شماره ۳ و ۸ مقدار قابل-

توجه ۲۲ تا ۳۱ و۶۰ تا ۷۱ درصد، میزان وزن خشک ریشه+ غده نسبت به تلقیح با سویه‌های غیر موتانت **USDA 110**و مادری **RS 117** افزایش یافته است (شکل ۶).

مقایسه میزان بیان نسبی ژن‌های *nodA* و *nif K2* جدایه موتانت باکتری بردی‌ریزوبیوم و سویه مادری

بیان ژن***nodA*** در جدایه شماره ۹ در مقایسه با سویه مادری، افزایش حدود۵۰ درصد نشان می‌دهد (شکل۷). *اما بیان ژن* ***nifK2*** کاهش داشته است. این تغییرات در بیان ژن‌های اندازه‌گیری شده می‌تواند در ارتباط با تغییرات مثبت در شاخص‌های مرتبط با تثبیت زیستی نیتروژن که در بخش‌های قبلی برای جدایه موتانت اندازه‌گیری شد، باشد. بدیهی است که برای روشن‌شدن نقش هر یک از این تغییرات در جدایه موتانت، نیاز به بررسی‌های بسیار بیشتر در آینده است.



شکل ۷. بیان نسبی ژن های ***nifK2*** و ***nodA*** در جدایه موتانت شماره ۹ و سویه مادری *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* **RS 117**

Figure 7. Relative expersion of *nif K2* and *nodA* genes in mutant isolate number 9 and and wild strain *Bradyrhizobium Japonicum* RS 117

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش بیانگر آن بود که تعداد قابل‌توجهی از جدایه‌های موتانت‌های حاصل از جهش در سویه بومی *بردی‌ریزوبیوم ژاپنیکوم* **RS 117** توانایی افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشدی گیاه سویا را نسبت به سویه مادری داشتند؛ به‌طوری که در تثبیت زیستی نیتروژن در بهترین سویه موتانت حاصل، تلقیح توانست بیش از ۸۰ درصد توان همزیستی را نسبت به سویه مادری افزایش دهد. لذا علی‌رغم مشاهده جهش-های بعضاً نامطلوب در مواد زیستی کشاورزی از قبیل کاهش راندمان برخی باکتری‌های مفید، در عرصه تحقیقات، کاربرد این موضوع می‌تواند نوید کاربرد روش هسته‌ای پرتوتابی و تحقیقات بیشتر در این زمینه به امید اصلاح توان تغذیه نیتروژنه گیاه سویا باشد. بنابراین کاربرد این موتانت‌ها با تحقیقات بیشتر می‌تواند زمینه بهبود رشد و عملکرد سویا و در نهایت کاهش کاربرد کودهای شیمیایی و هزینه‌های کشت آن در راستای توسعه سطح کشت گیاه روغنی سویا برای کاهش وارادت روغن به کشور باشد.

REFERENCES

1. **Ahari Mostafavi, H., Safaie, N., Naserian, B., Fathollahi, H., Dorri, H., Lak M., & Babaie, M. (2009) Possibility of biological control of bean root rot disease, using of avirulent mutants of *Fusarium solani f. sp. Phaseoli* isolate. *Journal of Plant Production*, 16(3), 135-149 (In Farsi).**
2. **Ahari Mostafavi, H., & Safai, V. N. (2008) *Application of nuclear technology in plant protection*. 122 pages (In Farsi).**
3. **Ahari Mostafavi, H., Mirmajlessi, S. M., Safaie, N., Minassyan, V., Fathollahi, H., Dorri, H. R., & Mansouripour, S. M. (2012) The Use of a Gamma-irradiated Mutants of *F. solani f. sp. phaseoli* with reduced pathogenicity for the biological control of Fusarium root rot of bean (*Phaseolus vulgaris*) in field conditions. *Journal of Agricultural Science Technology*. 14: 1415-1423 (In Farsi).**
4. **Ahmadi, K., Gholizadeh, H., Ebadzadeh, H., Hatami, F., Fazli Estebarak, M., Hosseinpour, R., Kazemian, A., & Rafiei, M. (2016) No. 85.09. *Agriculture Statistics. Department of Agricultural, Crop Years 1393- 94*. Deputy Director of Planning and Economics, ICT Center, Ministry of Jihad-e-Agriculture. 163 pages (In Farsi).**
5. **Beck, D.P., Materon, L.A., & Afandi, F. (1993) *Practical rhizobium legume technology, Manual no. 19* ICARDA, Syria, 389 P.**
6. **Biswas, B., & Gresshoff, P.M. (2014). The role of symbiotic nitrogen fixation in sustainable production of biofuels. *International Journal of Molecular science.* 2014, 15, 7380-7397; doi:10.3390/ijms15057380.**
7. **Dadarwal K. R., Kundu B. S., & Tauro P. (1981) In vitro and in vivo nitrogenase activity of Rhizobium mutants and their symbiotic effectivity. *Journal of Bioscience*, 3, 2, 117-124.**
8. **FAO (2014) http://faostat.fao.org/.**
9. **FAO, (1984). *Legume inoculation and their use*, Rome, 110p.**
10. **Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T., Pennington, J., S. (1971) State of development descreptions for soybeans, *Crop Science*, 11, 929-31.**
11. **Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N. R., Staley J. T. (2009). *Bergay's manual of systematic bacteriology*, Second Edition, Volume 2, The Proteobacteria, Part A, Introductory Essays, 328 P.**
12. **Hardarson G., Blis, F. A., Cigales-Rivero, M. R., Henson, R. A., Kipe-Nolt, J. A., Longeri, L., Manrique, A., Pena-Cabriales, J. J., Pereira, P. A. A., Sanabria, C. A., Tsai, S. M. (1993). Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean, *Plant & Soil*, 152(1), 59-70.**
13. **Hardarson G., Golbs, M., Danso, S. K. A. (1989). Nitrogen fixation in soybean as affected by nodulation pattern, *Soil Biology &. Biochemistry*, 21, 783-7.**
14. **Hassan M. M., & Eissa. R. A. (2013) Molecular characterization of salt tolerant rhizobial strains induced by gamma rays using RAPD markers. *New York Science Journal*; 6(4): 36-41.**
15. **Kaneshiro T. & Kurtzman, M. A. (1982) Glutamate as a differential nitrogen source for the characterization of acetylene-reducing Rhizobium strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 52, 201-207.**
16. **Kaneshiro T., Slodki M. E., & Plattner, R. D. (1983) Tryptophan catabolism to indolepyruvic and indoleacetic acids by *Rhizobiun japonicum* L-259 Mutants. *Current Microbiology*, 8, pp. 301-306.**
17. **Keyser H. H., & Li, F. (1992) Potential for increasing biological nitrogen fixation in soybean, *Plant and Soil*, 141, 119- 35.**
18. **Livak K. J., & Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-8.**
19. **Moradi R., Shahbazi, S., Ahari Mostafavi, H., Ebrahimi, M., Askari H., & Miramjesli S. M. (2013). Study of gamma-ray effects on morphological and antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* fungi. *Scientific Journal of Biotechnology of Plants*. 4, 109-117**

(In Farsi).

20. Naqavi, M. Halaajian, M., Abouei Mehrizi F. (2012) *Introduction to Biotechnology*, Tehran University Press. 344 p. (In Farsi).

21. Peoples M. B., Herridge, D. F., Ladha, J. K. (1995). Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production, *Plant & Soil*, 174, 3-28.

22. Pirvali Beiranvand, J. (1999) *A study on soybean cultivar and rhizobium strain interaction related to biological nitrogen fixation in different soils*. Master Thesis of Soil Science, Kara, University of Tehran. 154 pages (In Farsi).

23. Pirvali Beiranvand, J., Moosavi Shalmani, M., Ahari Mostafavi, H., Nasserian Khiabani, B., Shahhosseini G., & Showrang, P. (2010). *Application of nuclear technology in agriculture*. Chapter 12 of the *Nuclear Technology Book* (2, 1097, 1267). Publication of the Institute of Nuclear Science and Technology, Tehran, Iran (In Farsi).

24. Pirvali Beiranvand, J., Salehrastin, N., Afarideh. H. & Sagheb, N. (2003). An evaluation of the N- fixation capacity of some *Bradyrhizobium japonicum* strains for soybean cultivars. *Iranian, Journal of Agricultural Science*. Vol.34, No.1, 97-104 (In Farsi).

25. Pirvali Beiranvand, J., Salehrastin, N., Mousavi Shalmani, M. (2006). The study of the molecular nitrogen fixation ability of three main soybean cultivars in co-existence with *Bradyrhizobium japonicum* using isotropic Nitrogen-15 ratio in Iran. *Journal of Nuclear Science and Technology*, No. 36, p. 6-1 (In Farsi).

26. Sambrook J. & Green. R. (2017). Isolation of high-molecular-weight DNA using organic solvents. *Cold Spring Harb Protocol*;doi:10.1101/pdb.prot093450.

27. Sambrook J. & Russell D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocol*. 2006 Jun 1; 2006(1). pii: pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455.

28. Schmittgen. T. D, & Livak. K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*. 3(6):1101-8.

29. Shahbazi S., Ahari Mostafavi, H., Ebrahimi, M., Askari, H. Miramjesli S. M., & Karimi, M. (2013). Increase of *Trichoderma harzianum* fungus gene chitinase activity by radio-gamma induced mutation. *Journal of Crop Biotechnology*, Third Year, J. 5, 33-40 (In Farsi).

30. Singh Duhan J., 2013. Tn5 siderophore producing mutants of Rhizobium and its role in nitrogen fixation and iron uptake in pigeonpea. *African Journal of Microbiology Research*, 7(16), 1459-1464.

31. Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994) *HandBook for Rhizobia, methods in legume rhizobium technology*, laboratory manual. 450 pages.

32. Wani S. P., Ruple, O. P., Lee, K. K. (1995) Sustainable agriculture in the semi- arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes, *Plant & Soil*, 174, 29-49.

33. Zelalem A., Kebede, A. & Muthuswamy. M. (2014) Effect of chemical mutation on improvement of rhizobial isolate, s tolerance to acid and alkaline soil condition in Ethiopia. *International Journal of Current Research*. 6, 01, 4733-4738.