مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

بهبود خصوصیات ریزموجودات مفید کشاورزی با استفاده از پرتو تابی هسته ای

نجات پیرولی بیرانوند*[۱]، احمدعلی پوربابایی[۲]

۲- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه تهران و عضو هیئت علمی پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج- ایران، **npirvali@nrcam.org**

۳- عضو هیئت علمی گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران

چکیده: یکی از روش های بهبود خصوصیات ریزموجودات کاربرد جهش با استفاده از موتاژن‌های فیزیکی نظیر امواج الکترومغناطیس UV، ایکس، گاما و یا استفاده از موتاژن‌های شیمیایی مانند اتیل متان سولفونات است می‌باشد. از آنجائیکه فراوانی جهشِ طبیعی نادر است، اصول ایجاد جهش وارد چرخه حیات شده و به این ترتیب تنوع ژنتیکی و سازگاری ژنوتیپی به منظور گسترش دامنه گزینش مؤثر افزایش یافته است. مواد جهش‌زا امکانات لازم به منظور ایجاد جهش و تغییرات ژنتیکی را فراهم می‌آورند. جهش منبع نامحدود برای ایجاد تنوع در میکروارگانیسم ها است. امروزه در کشورهای مختلف دنیا از منابع جهش زا به خصوص پرتو های هسته ای برای تولید موتانت های برتر ریزموجودات مفید کشاورزی استفاده می شود. در این مقاله به طور اجمال به برخی از استفاده های منابع جهش زا در تولید ریزموجودات جهش یافته مفید در کشاورزی اشاره شده است.

واژه‌های کلیدی: پرتوهای هسته ای، جهش، ریزموجودات مفید، کشاورزی

Improvement of beneficial agriculture microorganism by using nuclear irradiation

Nejat Pirvali Beiranvand[1], Ahmad Ali Pourbabaei[2]

[1] Ph. D student of Tehran University and Scientific member of nuclear agriculture Research School, Nuclear Science & Technology Research Institute (NSTRI), Iran; E-mail:npirvali@nrcam.org

[2]Assistant Prof., Dept. of Soil Sciences, University of Tehran, Karaj, Iran

Abstract: One of the methods for producing better microorganisms in agriculture area is using of physical mutagenic such as UV, X, Gamma rays and or chemical ones like Ethel methane Sulfunate. Since the abundance of natural mutation is rare, researchers usually induce artificial mutation to increase genetic diversity of microorganism. Nowadays, many researcher all around the world use mutant microorganisms or their products for crop improvement. In this review paper, a number of such microorganism mutant and or their products which researchers are working on by using artificial mutagenic, are presented and discussed briefly.

Keywords: nuclear rays, mutation, beneficial microorganism, agriculture

مقدمه

سابقه کاربرد روش های هسته ای در تحقیقات کشاورزی در کشورهای پیشرفته به دهه ۱۹۳۰ می رسد. در این راستا، سازمان خواروبار کشاورزی (FAO) و آژانس بین المللی انرژی اتمی (IAEA) در اکتبر ۱۹۶۴ در رابطه با کاربرد روش های هسته

ای در کشاورزی و فرآورده‌های غذایی پیمانی را امضاء نمودند تا بتوانند از فناوری هسته ای به نحو شایسته ای برای حل مسائل کشاورزی و بهبود تولیدات آن در سطح جهان بالاخص در کشورهای در حال توسعه استفاده نمایند. در این راه پرتوهای یونساز، ایزوتوپ ها و رادیوایزوتوپ ها در مطالعات کشاورزی استفاده و باعث تحول عظیمی در کشاورزی شده اند به طوری که بر اساس منابع اطلاعاتی موجود در سایت اینترنتی آژانس بین المللی انرژی اتمی (IAEA) تاکنون با استفاده از جهش القایی (بالاخص بوسیله منابع پرتو زای هسته ای) در اصلاح نباتات زراعی، باغی و زینتی حدود ۳۰۰۰ رقم اصلاح شده در کشورهای مختلف دنیا حاصل و در تولید غذا به کار گرفته شده است [۱ و ۲].

کاربرد روش های هسته ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی عمدتاً به دو روش پرتوتابی و ردیابی می باشد. در روش پرتو تابی می توان با جهش در ماده ژنتیکی گیاهان و میکروارگانیسم های مفید خاک، شکست کروموزومی حاصل نموده و کارائی های مفید آنها را افزایش داد. به عنوان مثال با ایجاد جهش در باکتری های *ریزوبیومی* همزیست گیاه، توان تثبیت زیستی نیتروژن آنها را افزایش داد. در روش ردیابی که بیشتر در حفاظت و تعیین وضعیت حاصلخیزی خاک و تغذیه گیاه و دام و آبزیان و ردیابی های حشرات کاربرد دارد، اولین استفاده از ایزوتوپ ها به دهه ۱۹۴۰ بر می گردد. تقریباً برای تمام عناصر مورد نیاز گیاه ایزوتوپ های رادیو اکتیو و یا پایدار به عنوان ردیاب وجود دارد [۱].

بهبود خصوصیات ریزسازواره های مفید کشاورزی با استفاده از موتاسیون

یکی از روشهای اصلاح گیاهان و میکرو ارگانیسم ها کاربرد جهش با بکارگیری موتاژن‌های فیزیکی نظیر امواج الکترومغناطیس UV، ایکس، گاما و یا استفاده از موتاژن‌های شیمیایی مانند اتیل متان سولفونات است می‌باشد [۱، ۳، ۴ و ۵ و ۶]. جهش یک تغییر ناگهانی در ماده ارثی یک سلول است [۴]. از آنجائیکه فراوانی جهشِ طبیعی نادر است($۱۰^{-۶} - ۱۰^{-۸}$)، اصول ایجاد جهش وارد چرخه حیات شده و به این ترتیب تنوع ژنتیکی و سازگاری ژنوتیپی به منظور گسترش دامنه گزینش مؤثر افزایش یافته است. مواد جهش‌زا امکانات لازم به منظور ایجاد جهش و تغییرات ژنتیکی را فراهم می‌آورند. جهش منبع نامحدود برای تنوع در برنامه‌های اصلاح نباتات ومیکروارگانیسم ها است. تنوع حاصل از جهش القایی الزاماً با تنوع حاصل از جهش طبیعی یا خودبه‌خودی متفاوت نیست و اصول استفاده ازآنها نیز همسان است [۱ و ۶].

جهش ژنی شامل حذف و یا تغییرات مولکولی داخل محدوده یک ژن و جهش کروموزومی شامل تغییرات در ساختمان کروموزوم مثل از دست رفتن یا مضاعف شدن قطعه ای از یک کروموزم است. اغلب موتاسیون ها مضر و زیان بار و بسیاری از آن ها کشنده می باشد. تنوع ژنتیکی ایجاد شده در اثر موتاسیون مصنوعی ظاهراً دارای کیفیتی معادل موتاسیون‌های طبیعی می باشد [۱ و ۷]. اصول بنیادی استفاده از ایجاد جهش ژنتیکی مصنوعی همان اصولی است که در طبیعت طی دوره تکاملی به وقوع می پیوند [۷].

سابقه استفاده از موتاسیون در بهبود فرآورده های میکروبی به دهه ۱۹۲۰، زمان تولید صنعتی پنی سیلین از قارچ *پنی سیلیوم* بر میگردد که محققان با استفاده از موتاژن های شیمیایی موفق به تولید سلسله وار سویه های موتانت شدند که توانسته اند تولید را

از ۲۵ میلی گرم در لیتر به ۴۰ گرم در لیتر برسانند [۸ و ۹]. منابع علمی موجود بیانگر آن است که از موتاسیون جهت افزایش توان آنتاگونیست های جنس های مختلف قارچ (مثل*فوزاریوم، آسپرزیلوس، تریکودرما*) و باکتری (مانند *باسیلوس، پسودوموناس و ریزوبیوم*) برای تولید موتانت های برتر جهت کاهش خسارت عوامل بیماری زا به گیاه زنده و یا افزایش ماندگاری محصولات زراعی، همچنین بهبود توان رشد گیاه از طریق افزایش توان تولید نیازهای غذایی گیاه مثل افزایش غده بندی و توان تثبیت زیستی نیتروژن در کشورهای مختلف از قبیل آمریکا، چین، هند، مصر، ژاپن، استرالیا، عربستان سعودی، تایلند، اتیوپی و ایران در سالیان گذشته تا به حال استفاده شده است [۱۰-۲۲]. نکته قابل توجه آن است که تاکنون هیچگونه گزارش مبنی بر ایجاد سویه ای موتانت بیماری زا و خطرناک برای انسان و یا سایر موجودات گزارش نشده است [۱۱].

اهری مصطفوی و همکاران (۱۳۸۸) با پرتو تابی گاما با دز ۱۳۰ گری موتانت هایی غیر بیماری زا از قارچ *فوزاریوم سولانی* ایجاد نموده اند که توانسته اند بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا را به طور حتمی کنترل نمایند. در این مطالعه مقایسه مولکولی موتانت های غیر بیماری زا و جدایه مادری وحشی با استفاده از ۱۰ اغاز گر تصادفی نشان داد که موتانت های غیر بیماری زای M22 و M23 به ترتیب ۷۳ و ۵۰ درصد با جدایه مادری تشابه دارند [۱۰]. ادامه این ارزیابی در مطالعات مزرعه ای (۲۰۱۲) بیانگر آن است که موتانت ۲۳ محصول گیاه لوبیا را به طور معنی داری نسبت به گونه وحشی (مادری) افزایش داده است [۱۴].

قارچ *تریکودرما* به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک موفق و با کنترل دامنه وسیعی از قارچهای پاتوژن گیاهی بالاترین میزان تولید آنزیمهای تجزیه کننده دیواره (کیتیناز و گلوکاناز) را در بین میکروارگانیسمها به خود اختصاص داده است . کیتینازها نقش مؤثری در فرآیند مایکوپارازیتیسم قارچهای بیمارگر گیاهی دارند. کاربرد روش های مهندسی ژنتیک و ایجاد موتاسیون مستقیم در ژنوم قارچ به منظور افزایش پتانسیل آنتاگونیستی *Tricoderma harzianum* از طریق افزایش فعالیت کیتینازها نتایج مثبتی داشته است. شهبازی و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه القای جهش با دز ۲۵۰ گری در این قارچ به منظور افزایش فعالیت کیتینازی موفق به تولید ۲۰ جدایه موتانت شدند که در مقایسه با جدایه وحشی دو جدایه فعالیت بیشتر آنزیمی نشان داد. این محققان القای موتاسیون در افزایش پتانسیل آنتاگونیستی جدایه های بومی قارچ *تریکودرما* در ایران را به منظور دست یابی به منابع بیوکنترل مؤثر و کارا توصیه نمودند [۱۲].

مرادی و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه دیگری در همین راستا تأثیر اشعه گاما بر رشد ریسه، قارچ *تریکودرما* با دزهای ۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰۰ گری مورد بررسی قرار داد. نتایج حاصل نشان داد که پرتوتابی در محدوده دز ۴۵۰ گری به طور کامل مانع جوانه زنی اسپور قارچ میشود و دز ۲۵۰ گری به عنوان دامنه دز اپتیمم برای القای جهش در *تریکودرما* انتخاب شد .همچنین پرتو گاما باعث تنوع در خصوصیات مورفولوژیکی قارچ *تریکودرما* از جمله شکل، رنگ، اسپوردهی و سرعت رشد ریسه شد. نتایج آزمون آنتاگونیستی نشان داد پتانسیل کنترل کنندگی جدایه های جهش یافته در مقایسه با جدایه مادری شاهد در برابر قارچ پاتوژن *R. solani* به طور معنی داری افزایش یافته است [۱۳].

افشارمنش و همکاران (۲۰۱۴) اثر پرتو تابی گاما (دزهای ۱ تا ۳ کیلو گری) بر روی افزایش خاصیت انتاگونیسمی باکتری *با سیلوس سابتیلیس* UTB1 برای کنترل رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاوس* را مثبت گزارش نموده است. در این مطالعه اثر دو تا از

سویه های موتانت M419 و M464 در کاهش تولید افلاتوکسین نسبت به سویه وحشی معنی دار و بیشتر گزارش شده است [۲۳].

سینگ دوهان (۲۰۱۴) با استفاده از ترنسپوزون Tn5 موتانت هایی از *ریزوبیوم* ایجاد نموده است که توانسته اند سیدروفور بیشتری نسبت به گونه وحشی در محیط کاز اگار تولید نمایند. تلقیح گیاه با این سویه های موتانت موجب تولید سیدروفور و تثبیت نیتروژن بیشتری در لپه هندی نشان داد [۲۰].

داداروال و همکاران (۱۹۸۱) در موتاسیون *ریزوبیوم* همزیست با گیاه ماش با اتیدیوم بروماید سویه های موتانت را گزارش نموده اند که در شرایط ازمایشگاهی و مزرعه ای نسبت به سویه وحشی دارای فعالیت نیتروژناز بیشتری بوده اند [۱۷]. زلالم و همکاران (۲۰۱۴) در موتاسیون *ریزوبیوم* همزیست با باقلا با موتاژن های شیمیایی سدیم ازید و هیدروکسیل امین هیدروکلراید سویه های موتانتی ایجاد نموده است که توانسته اند مقادیر بالایی تثبیت زیستی نیتروژن برای گیاه باقلا در شرایط قلیایی فراهم نمایند [۲۲].

بوبوی و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از موتاژن اتیل متان سولفونات در *ریزوبیوم* گونه CWP G34A همزیست با لوبیای چشم بلبلی، سویه هایی موتانت گزارش کرده اند که نسبت به گونه وحشی تحمل به گرما و درجه حرارت بیشتری دارند [۱۵].

حسن و ایسسا (۲۰۱۳) دربررسی خصوصیات مقاومت به شوری و کارایی همزیستی سویه‌های *ریزوبیوم* موتانت گزارش کرده اند، ۴۰ کیلو راد بالاترین دُز پرتوی گاما موثر بوده است. در این مطالعه کلون‌های پرتودهی شده در ۵۰ کیلو راد دارای بیشترین تحمل به شوری در مقایسه با سویه کنترل نشان دادند، این یافته نشان می دهد پرتودهی گاما در تغییر خصوصیات فیزیولوژیکی و فنوتیپی از طریق موتاسیون تصادفی موثر می‌باشد. نتایج بدست آمده نشان داد که به طور کلی سلول‌های باقیمانده با افزایش دز پرتو گاما کاهش می‌یابد. تلقیح با جدایه موتانت باعث محتوای نیتروژن کل تثبیت شده بالاتر نسبت به سویه‌های والد در گیاه باقلا گردید. بر طبق نتایج این مطالعه می‌توان توصیه کرد که تلقیح باقلا با سویه‌های موثر و کارآمد *ریزوبیوم* می‌تواند نتیجتاً به دلیل توانایی در تثبیت نیتروژن بالاتر باعث افزایش معنی‌داری در عملکرد گردد. در این مطالعه سویه‌های مادری *ریزوبیوم* در مرکز ملی تحقیقات و تکنولوژی پرتودهی در سازمان انرژی اتمی با دزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ کیلو راد با استفاده از گاماسل هندی با نرخ دز (۱/۰۸۷۶ کیلو گری در ساعت کبالت ۶۰) برای تولید موتانت‌های مقاوم به شوری پرتودهی شده بودند. علاوه بر این روش RAPID برای پیدا کردن مارکرهای ژنی برای *ریزوبیوم*‌های پرتودهی شده انجام شد. سه پرایمر OP-A22، CC1 و PRIM239 الگوی باندی مختلفی را نشان دادند که این باندها می‌توانند به عنوان مارکرهای منفی یا مثبت برای آسیب DNA به وسیله پرتو گاما استفاده شوند [۱۸].

چتیخانوک و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از موتاژن های اشعه گاما، اتیل متان سولفونات و اتیدیوم برماید توانسته اند ۱۰ سویه موتانت *ریزوبیوم* ایجاد کنند که در تولید ویتامین B6 نسبت به سویه وحشی مقادیر بیشتر و معنی داری تولید کرده اند [۱۶].

روش های استفاده شده برای ایجاد جهش در ریزموجودات

بر اساس منابع موجود، از آنجاییکه اغلب جهش ها در موجودات کشنده هستند، هرچه شدت حذف یا عدم رشد در قیاس با نمونه شاهد بیشتر باشد احتمال ایجاد جهش در ریزموجود مورد نظر افزایش می یابد. به عبارت دیگر در روش پرتوتابی با افزایش میزان پرتو هسته ای می توان بقای ریزموجود مورد نظر را کاهش و در نتیجه امکان افزایش احتمال جهش را افزایش داد[۱ و ۲۳]. در برخی منابع به مانند روش ایجاد جهش در گیاهان، معیار ایجاد جهش یا دز بهینه را بر اساس رشد نیمی از ریزموجودات پرتوتابی شده مشخص می نمایند. بر این اساس، ابتدا با دزهای مورد نظر حداقل در ۳ تکرار پرتوتابی انجام و پس از تعیین دز بهینه (۵۰ درصد رشد) در مقایسه با شاهد، در ادامه انتخاب ریزموجود جهش یافته برای صفت مورد نظر تعیین می شود[۱ و ۷].

نتیجه گیری

از آنجاییکه جهش به عنوان منبع بسیار مهم ایجاد تنوع زیستی در ریزموجودات در طبیعت مطرح است. اما به علت مقدار فراوانی تصادفی پایین آن در طبیعت ($۱۰^{-۶}$ – $۱۰^{-۸}$) در ریزموجودات چندان اثر گذار نمی باشد. معهذا با استفاده از منابع جهش زا بالاخص پرتوهای هسته ای می توان مقدار فراوانی آن را به شکل تصنعی افزایش داده و با ایجاد جهش مصنوعی مقدار فراوانی جهش و در نتیجه افزایش تنوع زیستی را به منظور انتخاب ریزموجودات برتر در راستای تامین نیازهای کشاورزی از قبیل ریزموجودات با کارایی بالاتر در تامین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، افزایش سلامت گیاه در مقابله با عوامل بیماریزا و..... بهره مند شد.

فهرست منابع

۱- پیرولی بیرانوند ن. م. ا. موسوی شلمانی، ح. اهری مصطفوی، ب. ناصریان خیابانی، غ. شاه حسینی و پ. شورنگ. ۱۳۸۹. کاربرد فناوری هسته ای در کشاورزی فصل ۱۲ از کتاب فناوری هسته ای (جلد دوم صفحه۱۰۹۷_۱۲۶۷). نشر پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، تهران ، ایران.

2- http://mvgs.iaea.org/Search.aspx.

3- Hafiz Khan M., S. Dutt Tyagi. 2013. A review on induced mutagenesis in soybean. Journal of Cereals and Oilseeds. Vol. 4(2), pp. 19-25.

4- Shilpi M. and T. Narendra. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of biochemistry and biophysics. 444: 139–158.

5- Shu Q. Y. 2009. Induced plant mutations in the genomics era. Joint FAO and IAEA. 441 Pages.

۶- کاظمی نژاد س. و ز. پوررمضان. ۱۳۹۱. ژنتیک مولکولی باکتریها. ۵۵۱ صفحه.

۷- ناصریان خیابانی، ب.، ح. اهری مصطفوی، ه. فتح اللهی، س. ودادی، م. ا. موسوی شلمانی (۱۳۸۶). تعیین دز مناسب گاما به منظور ایجاد تنوع ژنتیکی در نخود سفید، مجله علوم و فنون هسته ای، شماره ۴۲، ۱۹- ۲۵. انتشارات سازمان انرژی اتمی ایران.

۸- نقوی م ، م. حلاجیان، ف. ابوئی مهریزی. ۱۳۹۱. مقدمه ای بر زیست فناوری (بیوتکنولوژی). انتشارات دانشگاه تهران. ۳۴۴ ص.

9- Dubey R. C. and D. K. Maheswari. 2004. A text book of microbiology. 682P.

۱۰- اهری مصطفوی، ح.، م. ر. لک، ب. ناصریان، ه. فتح اللهی، ن. صفایی، م. بابایی، و ح. دری. ۱۳۸۸. بررسی امکان کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا با استفاده از موتانت‌های غیر بیماری زای جدایه Fusarium solani. Sp. Phaseol ، پژوهش‌های تولید گیاهی، جلد ۱۶ (شماره۳)، صفحات ۱۳۵ تا ۱۴۹.

۱۱- اهری مصطفوی، ح. و ن. صفایی. ۱۳۸۷. کاربرد فناوری هسته ای در گیاهپزشکی. ۱۲۲ صفحه.

۱۲- شهبازی س.، ح. اهری مصطفوی ،م. ابراهیمی، ح. عسکری ، س. م. میرمجلسی و م. کریمی. ۱۳۹۲. افزایش فعالیت ژن کیتیناز قارچ *Trichoderma harzianu*m با استفاده از جهش القایی ناشی از پرتو گاما. مجله علمی پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی، سال سوم، ج. ۵، ۳۳- ۴۰.

۱۳- مرادی ر.، س. شهبازی ، ح. اهری مصطفوی، م. ابراهیمی ، ح. عسکری و س. م. میرمجلسی. ۱۳۹۲. بررسی تأثیرات پرتو گاما بر خصوصیات مورفولوژیکی و آنتاگونیستی قارچ *Trichoderma harzianum* . مجله علمی پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی. ش. ۴، ۱۰۹- ۱۱۷.

14- Ahari Mostafavi, H., S. M. Mirmajlessi, N. Safaie, V. Minassyan, H. Fathollahi, H. R. Dorri, and S. M. Mansouripour. 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. J. Agr. Sci. Tech. Vol. 14: 1415-1423.

15- Boboye B. E., B. A. Ogundeji, H. Evbohoin. 2011. Mutational search for high temperature (60°C) tolerant variant of *Rhizobium* species CWP G34A- Mutation generates high temperature variant of *Rhizobium* species Cwp G34A. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2011, 2, 255-262.

16- Chitchanok A., P. Rattasaritt, S. Suthatip, P. Suphaporn, P. Nattayana and T. Yanee. 2011. Improvement of Vitamin B6 Production from *Rhizobium* sp. 6-1C1 by Random Mutation. KKU Res J.; 16(8): 911-918.

17- Dadarwal K. R., B. S. Kundu and P. Tauro. 1981. *In vitro* and *in vivo* nitrogenase activity of *Rhizobium* mutants and their symbiotic effectivity.J. Biosci., Vol. 3 Number 2, pp. 117-124.

18- Hassan M. M. and R. A. Eissa. 2013. Molecular Characterization of Salt Tolerant *Rhizobial* Strains Induced by Gamma Rays Using RAPD Markers. New York Science Journal; 6(4): 36-41.

19- Iftikhari T., M. Niazi, Y. Hussaini, S. Q Abbas, I. Ashraf and M. Anjum Zia. 2010. Improvement of Selected Strains Through Gamma Irradiation For Enhanced Lipolytic Potential. *Pak. J. Bot*., 42(4): 2257-2267.

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

21- West T. P. 2002. Isolation of a mutant strain of *Pseudomonas sp*. ATCC 31461 exhibiting elevated polysaccharide production. Journal of industrial microbiology and biotechnology. 29, 185- 188.

22- Zelalem A., A. Kebede and M. Muthuswamy. 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. Vol. 6, Issue, 01, pp.4733-4738.

23- Afsharmanesh H., M. Ahmadzadeh, M. Javan-Nikkhah,K. Behboudi. 2014. Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation. Crop Protection, 60: 83-92.