

# 인삼토양으로부터 옥신 생성 식물생장촉진세균의 분리 및 특성

박해성<sup>1</sup> · 정영필<sup>1</sup> · 윤민호<sup>1\*</sup>

## Isolation and Characterization of the Auxin producing Plant Growth Promoting Rhizobacterium from Soil in a Ginseng Field

Hae-Sung Bak<sup>1</sup> · Young-Pil Jung<sup>1</sup> · Min-Ho Yoon<sup>1\*</sup>

### ABSTRACT

An auxin-producing bacterium (AMT-54) was isolated from ginseng cultivating soil of Geumsan area. The isolate AMT-54 was confirmed to produce indole-3-acetic acid (IAA) which is one of auxin hormone by TLC analysis. When the concentration of IAA was assessed by performing HPLC quantitative analysis, the maximal 457ppm of IAA was detected from the culture filtrate after culturing in R2A broth containing 0.1% tryptophan for 24h at 35°C. The molecular weight of the main peak obtained by LC-mass analysis was correspondent well to 175, that of IAA. The strain AMT-54 was identified as a novel species belongs to *Klebsiella mobilis* by a chemotaxonomic and phylogenetic analysis. To investigate the growth promoting effect of crop, when the culture broth of *K. mobilis* AMT-54 was infected onto seed pot of mung bean, the adventitious root induction and root growth of mung bean were 3.3times higher than control.

**Key words:** Auxin, *Klebsiella mobilis*, Plant growth promoting rhizobacteria

### 1. 서론

화학비료 및 농약의 과다사용으로 생태계 교란은 물론, 토양양분의 불균형이 초래되어 수질오염 및 농산물의 안전성이 문제시 되고 있어 국제적으로도 Rio 선언 이후 유기농산물에 대한 새로운 기준이 제정되었고, OECD에서도 농업환경지표를 제정하여 그 이행압력이 가중되면서 친환경 농업에 대한 관심이 대내외적으로 집중되고 있다. 최근 들어 지속 가능한 친환경농업에 대한 관심이 집중되면서 정부에서도 친환경농업 육성법을 제정하여 환경과 농업을 조화시켜 경제성 확보뿐 아니라 환경보전 및 생산된 농작물의 안전성을 동시에 추구하기 위해 노력하고 있으며 그 일환으로 유용미생물을 이용한 친환경 유기농자재를 활용하여 작물생육촉진 및 병해충발생억제 등 생태계보존을 하기 위한 노력이 확산되고 있다.

일찍이 (Kloepper 등, 1980)은 식물의 생장을 촉진시키는 PGPR(plant growth promoting rhizobacteria) 미생물들의 존재를 발표한 이래 포장시험에서 작물의 수확량 증대 및 토양 병을 방제할 수 있다고 보고하였다. 미생물에 의한 식

물생장촉진 기작으로는 질소 고정균과 식물 호르몬인 지베렐린 및 옥신 생산균에 의한 생육촉진 기능(Karadeniz 등, 2006),  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, cellulase와 같은 식물병원성 진균의 외벽을 가수분해 할 수 있는 효소를 생산하는 길항미생물들에 의한 병해억제 기능(Pozem 등, 1999, Jung 등, 2007)과, 식물병원성 진균의 포자발아를 억제하는 철( $Fe^{3+}$ ) 이온을 특이적으로 결합하는 siderophore생산(Kloepper 등, 1980, Gamalero 등, 2003) 미생물, 그리고 lipopolysaccharide, salicylic acid, cyclo-deptide 등의 유도저항성물질을 생성하는 미생물(Wei 등, 1996, Ramamoorthy 등, 2001)들이 보고되고 있다.

*Rhizobium* 균에 의해 식물의 세포신장, 발아, 기관의 분화, 개화 등에 관여하는 식물호르몬 auxin이 유도 될 수 있다는 것을 보고 한 이후 *Aeromonas veronii*(Mehnaz 등, 2001), *Alcaligenes piechaudii*,(Barazani 등, 1999), *Azospirillum* sp.(Zimmer 등, 1998), *Azotobacter* sp.(Joshi 등, 2006), *Bacillus* sp.(Jung 등, 2006), *Bradyrhizobium* sp.(Anroun 등, 1998) 등 많은 미생물들이 auxin을 생산할 수 있다고 보고하였다.

본 실험에서는 인삼밭 토양으로부터 식물의 생장을 촉진시키는 PGPR 관련 미생물 중 식물생장촉진물질인 auxin의 생산능력이 우수한 균주를 분리한 후 분리균의 동정 및 배양조건별 auxin 생산성을 조사하였고, 또한 bio assay 실험법을 이용한 재배실험을 통해 분리균에 의한 작물의 생육효과를 검토함으로써 새로운 미생물자원을 선별하기 위한 목적으로 실험을 수행하였다.

<sup>1</sup> 충남대학교 생물환경화학과(Dept. of Bio-Environmental Chemistry, Chungnam National University, 220 Gung-Dong, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Korea)

\* Corresponding author: 윤민호(Min-Ho Yoon)

Tel.: +82-42-821-6733 Fax: +82-42-823-9241

E-mail: mhyoon@cnu.ac.kr

2010년 10월 21일 투고

2010년 11월 13일 심사완료

2010년 12월 13일 게재확정

## II. 재료 및 방법

### 1. 균주의 분리

다기능성 PGPR 균의 분리를 위해 충남 금산지역의 4년 근 인삼재배 경작지의 근권 토양을 채취하였다. 채취한 토양 10g을 멸균 생리식염수 90ml에 첨가하여 진탕 배양기에서 170rpm으로 30분간 진탕한 후 단계적 희석평판법에 의해 각 희석액을 Nutrient broth(NB) 고체 배지 또는 auxin 생산균 분리용 배지인 0.1% L-tryptophan이 첨가된 R2A 고체배지에 도말하여 30°C에서 배양하였다. 고체배지에서 순수분리된 colony를 auxin 기본배지에 tooth-picking 한 후 Salkowski 시약을 분산시켜 외관상 colony 주변에 분홍색을 띠는 균주들을 auxin 생산균주로 1차 선별하였다.

### 2. Auxin 생산균주의 선별

1차 선별된 균주를 0.1% L-tryptophan이 첨가된 R2A broth 배지(pH 7.0)에 접종하여 30°C, 170rpm에서 24시간 이상 진탕 배양한 배양액을 4°C, 4000rpm, 15분간 원심분리하여 균체를 침강시킨 후 상등액을 회수하였다. 배양 상등액과 Salkowski 시약을 1:2의 비율로 혼합하여 30분간 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 535nm에서 흡광도를 측정하여 선별균들의 auxin 생성능을 확인하였다. 표준곡선의 작성은 Sigma사(U.S.A.)의 indole-3-acetic acid(IAA)를 10, 30, 50, 70, 100ppm 농도로 R2A broth 배지에 첨가 후 535nm에서 측정하였다. 또한 선별균의 배양조건과 auxin 생산능을 비교하기 위하여 35°C에서 24시간 배양하면서 배양기간에 따른 균주의 생장, IAA 생성 유도 전구물질인 L-tryptophan의 최적농도, IAA 생성 및 최종 pH를 측정하였다.

### 3. TLC를 통한 IAA의 확인

선별된 균주들의 auxin 생성능을 TLC 분석을 통해 확인하기 위하여 배양 상등액을 인산으로 pH 2.8까지 산성화시킨 후, 두배의 cold ether로 분획추출 하였다. 수용액 층은 버리고 회수한 ether층을 질소가스로 충전시켜 날려버려 얻어진 잔사를 methanol 5ml에 녹여 TLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. TLC의 전개용매로는 1-propanol: NH<sub>4</sub>OH: H<sub>2</sub>O(6:3:1) 혼합액을 하여 사용 하였으며(Lowell 등, 1954), 발색시약은 증류수 100ml, 농 염산 150ml, p-dimethylaminobenzaldehyde 0.7g을 용해한 Ehrlich 시약(Lim 등, 1995)을 사용하였다.

### 4. HPLC를 통한 IAA의 정량분석

추출한 ether층 methanol 수용액내의 IAA함량을 HPLC 정량분석을 통해 확인하였다. 사용한 분석기기는 JASCO

사(Japan)의 PU 980이고, UV detector는 JASCO사의 PU 975로 285nm에서 측정하였고, 컬럼은 Luna 5U C18(250 × 4.60mm)를, 이동상은 MeOH:H<sub>2</sub>O(5:5)를 사용하였으며, 용출속도는 1ml/min이었다. 또한 TLC 및 HPLC 분석을 통해 확인된 활성peak의 물질이 IAA인지를 확인하기 위하여 Mocromass사(England)의 Micromass QTOF2모델을 이용한 LC-mass 분석을 통해 분자량 측정을 하였다.

### 5. Bio assay를 통한 식물생장 실험

#### 가. 녹두발근생검법(수경법)

선발된 auxin 생성균주의 생육촉진효과를 검토하기 위하여 auxin 생산검정방법으로 많이 활용되고 있는 녹두발근검정법(mungbean adventitious root induction method)을 이용하여 auxin 호르몬의 주요기능 중 하나인 뿌리발근 촉진효과를 조사하였다. 녹두품종은 선화를 사용하였으며, 녹두종자를 0.3% sodium hypochloride 용액에 3분간 침지하여 소독한 후 흐르는 물에 24시간 침종하고, 무균토양에 파종하여 28°C, 5000Lux 광원하의 배양실에서 7일간 배양한 후 제 1본엽이 전개되고 첫 3소엽의 엽아가 다소 부풀어 있는 상태에서 녹두묘를 깨냈다. 균일한 크기로 선별된 녹두묘로부터 자엽을 제거하고 자엽 밑으로 하배축을 3cm 남기고 소독된 예리한 칼로 절단한 후 Salkowski test에서 auxin 생산성이 높게 나타난 균주의 배양 상등액 50μl와 멸균증류수 5ml가 첨가된 vial에 절단한 유묘3개씩을 넣고 24시간 마다 용액의 수분을 멸균증류수로 일정수준까지 보충하여 동일한 환경조건하에서 연속조명으로 10일간 발근시킨 후 1mm이상의 발근수를 계수하였고, 뿌리길이를 측정하여 합산하였다.

#### 나. 녹두발근생검법(Pot실험)

Auxin 생성능 확인시험으로 pot 재배를 통한 녹두발근검정법을 병행 수행하였다. 상기 5.1항의 방법에 따라 얻어진 녹두 자엽의 하배축을 멸균된 상토(발효:버미큘라이트:상토 = 2:1:1)에 선별균주의 배양 상등액을 100배 희석하여 3일에 한번 씩 20일 동안 관주한 후 형성된 발근수와 발근 길이를 측정하여 뿌리발근 효과를 조사하였다.

### 6. 분리 균주의 동정

본 균주의 생리학적 특성은 그람음성 세균의 동정에 사용되는 API 20NE kit(Bio Merieux)를 제조회사의 권장방법에 따라 분석하였다. DNA-DNA hybridization 실험은 photobiotin-labelled DNA probe와 micro-dilution wells을 이용하여 (Ezaki 등, 1989)에 의해 기술된 방법에 의해 수행하였다. 또한 16S rRNA 염기서열 해석 및 계통수 작성을 위하여 16S rRNA의 부분서열의 상동성은 DDBJ/EMBL/

GenBank database의 Blast program을 이용하여 분석하였으며, 각 염기서열의 alignment는 Cluster X program package (version 1.8)를 이용하여 정렬하였고, 계통도의 작성은 근린결합법에 의거하여 결정되었다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 균주의 분리

충남 금산지역 인삼재배지의 근권 토양으로부터 희석평판법에 의해 순수 분리된 각 균주들을 0.1% L-tryptophan이 첨가된 R2A agar 배지와 Salkowski법을 사용하여 colony 주변에 붉은색을 형성하는 100여 개의 균을 1차 선발하였다. 고체배지 상에서 양성반응을 보인 1차 선발균주들을 0.1% L-tryptophan이 첨가된 R2A broth 배지(pH 7.0)에 접종하여 30°C, 24시간 진탕배양 한 배양액을 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 배양 상등액과 Salkowski 시약을 1:2의 비율로 혼합하여 30분간 반응시킨 후 형성된 붉은색의 유무를 통해 선발균들의 auxin 생성능을 확인한 결과, 균주 AMT-28, AMT-54 및 AMT-92 등이 상대적으로 붉은색이 짙게 나타남으로써 IAA 생성능이 높음을 육안으로 확인할 수 있었다(Fig. 1).

#### 2. Auxin 생산능 비교

1차 선발된 54개 균주의 auxin 생성능을 정량적으로 비교하기 위하여 각 배양 상등액과 Salkowski 시약을 동일 방법으로 반응시켜 분광광도계를 이용하여 535nm에서 선발균들의 auxin 생성능을 확인하여 흡광도가 높은 AMT-54, AMT-27, AMT-50 균주를 2차 선발하였다. 이중 AMT-54 균주의 IAA 생성능은 335ppm으로 166ppm의 AMT-27 과 152ppm의 AMT-50 보다도 월등히 높았으며, 이 결과는 Lim 등(2002)이 보고한 논토양과 밭토양에서 분리한 호기성균인 *Pseudomonas fluorescens*와 Jung 등(2006)이 보고한 *Bacillus subtilis*가 생산한 IAA 농도보다 2배 이상 높은 수치이었다(Table 1).

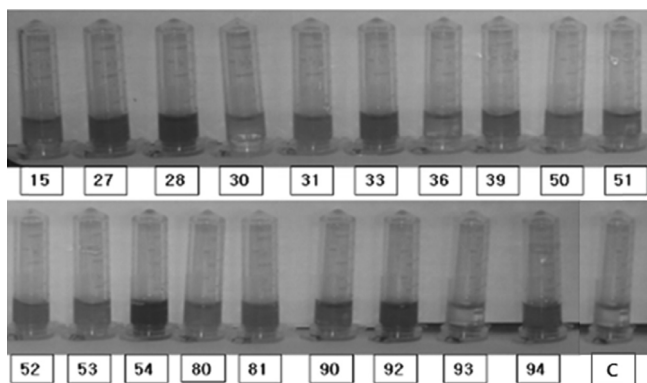


Fig. 1. Isolation of auxin-producing strains using Salkowski-R2A broth.

Table 1. The IAA concentrations produced from the strains determined with spectrophotometer (535nm)

AMT strain No.	A535 (O.D)	IAA (ppm)	AMT strain No.	A535 (O.D)	IAA (ppm)
54	2.812	335	42	0.081	12
27	0.879	166	2	0.071	10
50	0.628	152	38	0.071	10
33	0.59	133	93	0.07	10
28	0.453	126	17	0.067	10
94	0.42	113	21	0.066	10
77	0.413	89	16	0.062	9
39	0.404	81	20	0.062	9
34	0.383	76	3	0.06	9
51	0.263	65	47	0.06	9
36	0.262	59	8	0.058	9
99	0.261	50	45	0.057	9
35	0.188	38	5	0.057	9
19	0.14	35	10	0.055	8
58	0.108	15	44	0.052	8
7	0.107	15	25	0.05	8
24	0.102	15	9	0.047	7
6	0.1	14	14	0.045	7
23	0.098	14	13	0.039	6
22	0.097	14	15	0.039	6
31	0.096	14	1	0.037	6
41	0.094	14	11	0.037	6
40	0.089	13	29	0.035	6
26	0.085	12	32	0.035	6
30	0.083	12	37	0.032	5
43	0.083	12	46	0.025	4
57	0.082	12	12	0.014	3

#### 3. Auxin물질의 확인

선발균주들이 생산하는 auxin물질을 TLC를 이용하여 확인한 결과, 표준시약으로 사용한 IAA의 RF값 0.75와 일치함으로써 IAA계 auxin 물질임을 확인할 수 있었다. 또한 HPLC 분석을 통해서 선발균주들이 생산하는 IAA 함량을 정량적으로 확인한 실험결과에서도 모든 배양농축물의 IAA peak가 RT 57~59초 사이에 검출되었고 AMT-54는 457ppm으로 가장 높게 나타났으며, AMT-27 281ppm, AMT-50 182ppm 순으로 검출됨으로서 비색법의 검출 결과보다는 높게 나왔으나 균주별로 비슷한 경향을 보였다(Fig. 2). 또한 HPLC 분석을 통해 검출된 AMT-54번 균주의 IAA peak (RT 5.58)의 분자 확인을 위하여 LC-Mass를 통해 분자량을 확인한 결과 분자량 175인 IAA peak가 M+H인 176에서 검출됨으로써 생성된 물질이 IAA임이 최종 확인되었다 (data not shown).

4. Bio assay를 통한 식물생장 실험

Auxin 생성균이 작물의 뿌리 생육에 미치는 효과를 검토하기 위하여 녹두묘를 공시작물로 이용하여 수경법과 pot 재배실험을 통한 선발균의 배양액 공급효과를 확인하였다.

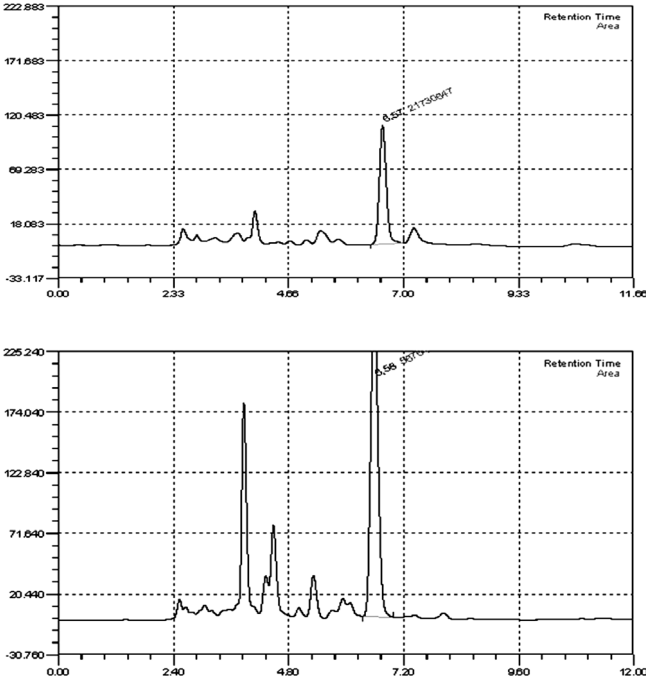


Fig. 2. HPLC chromatogram of auxin extracted from strain AMT-27(upper) and AMT-54(lower).

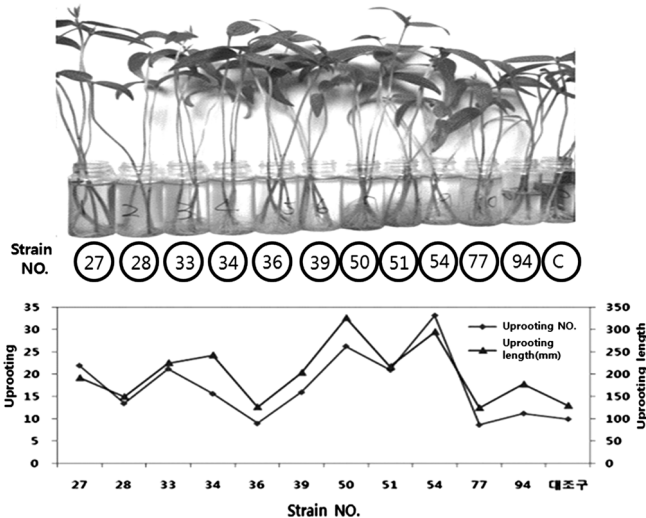


Fig. 3. In vitro test of auxin-producing bacterium with mung beans in water culture.

가. 수경법에 의한 녹두발근력 확인 실험

Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조구의 발근수가 10개인 반면 100배 희석한 AMT-54번 균주의 배양상등액 첨가시 발근수는 무려 33.2개 이었으며, AMT-50번 균주는 26.3개로 나타났다. 길어도 대조구에 비해 두 균주 모두 2배 이상의 신장효과를 보였으며, Fig. 3의 결과에서처럼 분리균주의 총 발근수와 발근길이의 평균값을 백분율로 비교한 결과 대조구에 비해 AMT-50이 260%, AMT-54 균주가 330%로 나타나 각각 2.6배와 3.3배까지 높게 나타나는 것으로 확인되었다.

나. Pot실험에 의한 녹두발근생검법

Pot 실험을 통한 결과에서도 AMT-54와 AMT-50 균주의 발근효과가 가장 높게 나타나 54번 균주의 발근수는 32.3개, 발근길이는 372.3mm, 50번 균주는 발근수 28개, 발근길이 412.5mm로 확인되어 총 발근수와 발근길이의 평균값을 비교한 결과, 수경법의 결과 보다는 다소 낮지만 AMT-54와 AMT-50 균주가 대조구에 비해 각각 2.6배와 2.1배까지 높게 나타났다(Table 2). 이상의 수경법과 Pot 실험의 결과를 통해 선발균주 중 AMT-54 균주가 가장 높은 뿌리 생육촉진 효과를 나타냈으며, 비색법 및 HPLC 분석을 통한 IAA 생성량 조사에서도 타 균주들에 비해 월등히 높은 IAA 생성능을 나타낸 결과와도 일치하므로 AMT-54 균주를 auxin생성 PGPR균으로 최종 선발하였다.

5. 분리균의 동정

Auxin 생성능이 가장 우수한 AMT-54 균주의 16S rRNA 염기서열을 결정하여 BLAST 프로그램 이용하여 근린 결합법에 의거 하여 계통학적 위치를 검토한 결과, AMT-54 균주는 *Klebsiella mobilis*와 97%의 유사성을 보였고 또한 DNA-DNA relatedness 실험에서도 *Klebsiella mobilis* JCM1235T와 86%의 상동성을 나타냄으로서 *Klebsiella mobilis*로 동정되었다(Fig. 4).

6. 배양조건별 Auxin 생산능 비교

최종선발균 AMT-54를 0.1% L-tryptophan이 함유된 R2A broth(pH 7)배지에 배양하면서 auxin 생성을 위한 최적 배양조건을 검토하였다. 분리균 1% seed 접종 후 35°C에서 배양 시 약 18시간에 대수기 후기에 도달하는 빠른 성장을 보였으나 IAA의 생성량은 10ppm 이하의 낮은 수준을 유

Table 2. Growth effect of mung bean pot infected with auxin-producing bacterium

Strain No.	27	28	33	34	36	39	50	51	54	77	94	Control
uprooting No.	27.3	20	27	25.3	26.3	26.3	28	26.7	32.3	11.7	19	12.3
uprooting length (mm)	345	344.7	366.7	332.7	125.0	303.3	412.5	423.3	372.3	199.0	362.3	180.0

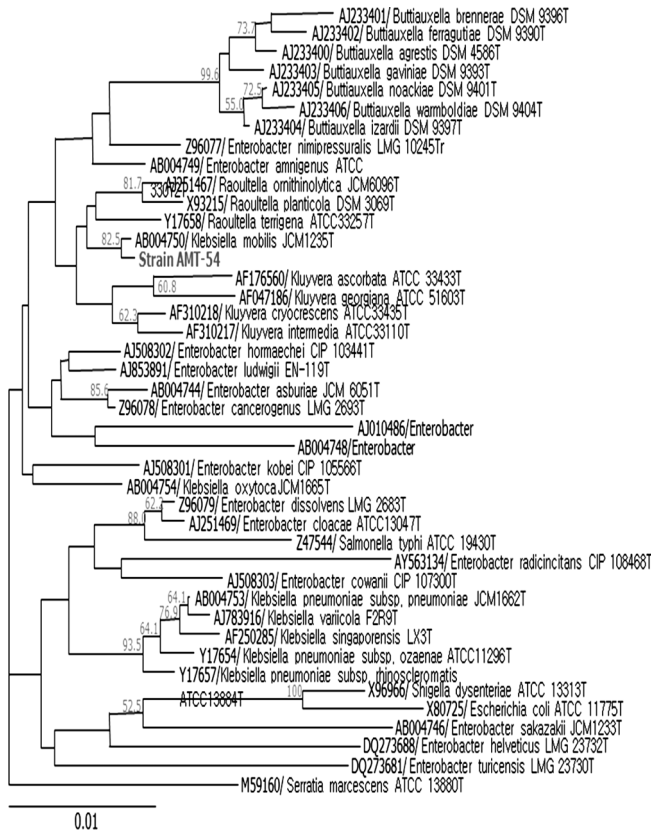


Fig. 4. Phylogenetic trees of the strain AMT-54 estimated from 16S rRNA sequence.

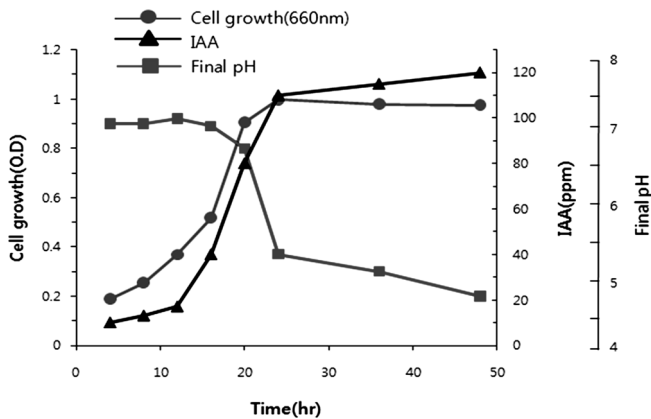


Fig. 5. The profile of IAA production and viable cells of *K. mobilis* AMT-54 based on incubation time.

지하였다. 그러나 생육이 최대인 배양 24시간에는 IAA가 100ppm 이상으로 급격히 증가 하였으며, 또한 pH 변화는 배양 18시간 까지 pH 7.0 수준에서 24시간에 pH 6.0 이하로 낮아지는 결과를 나타냄으로서 IAA 생성과 pH 변화와의 관련성을 예측하게 하였다(Fig. 5). 최적배양 온도 및 pH 확인 실험에서는 35°C와 pH 7.0에서 배양 시 배양 24시간 후 균의 생육 및 IAA 생성양도 90ppm으로 가장 높게 나타났으며, 최종 pH가 5.7로 급격히 떨어지는 결과를 보여 IAA 생성량과 pH 변화에는 부의 상관성이 있는 것으로 관

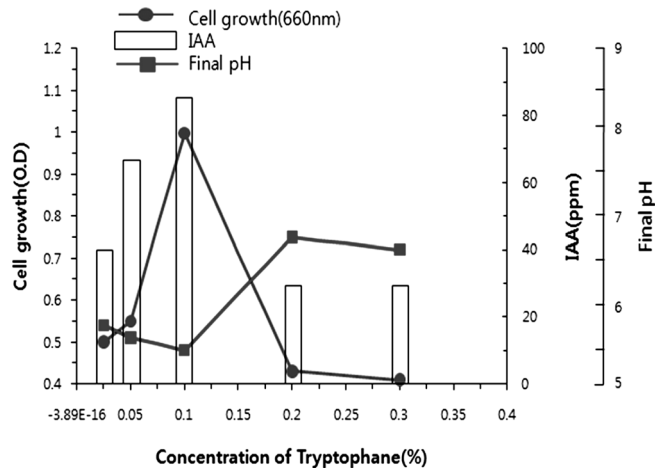


Fig. 6. The effect of concentration of L-tryptophan(%) on IAA production from *K. mobilis* AMT-54.

측되었다(data not shown).

또한 IAA 생성을 위한 전구물질로 알려진 L-tryptophan 이 분리균의 IAA 생성에 미치는 영향을 확인한 한 결과, 분리균은 무 첨가 배지에서는 IAA를 거의 생산하지 않았으며, 0.1% 첨가 시 균의 생육과 IAA 함량이 최대이었고, pH의 경우 초기 pH 7.0에서 5.4수준으로 낮아지는 비슷한 경향을 보였다. 그러나 0.2% 첨가 시에는 균의 생장이나 IAA 농도가 크게 감소하므로서 고농도의 L-tryptophan 배지에서는 오히려 IAA의 생성에 저해 됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 6).

이상의 결과를 통해 인삼경작토양으로부터 분리한 auxin 생성균 *Klebsiella mobilis* AMT-54은 장내세균 속(genus) 이면서도 IAA 생성능이 457ppm으로 대표적인 PGPR균인 *Bacillus* 속 (Jung 등, 2006) 및 *Pseudomonas* 속 (Ouzari 등, 2008)과 다른 장내세균인 *Enterobacter* 속 (Mirza 등, 2001) 보다 2배 이상 높았다. 또한 IAA 생성을 위한 최적 배양조건은 0.1% tryptophan이 함유된 R2A broth 배지에서 pH 7.0, 배양온도 35°C에서 24시간 배양시 균의 생장 뿐 아니라 IAA의 생산이 최대이었으나, 배지내 IAA의 농도와 pH변화는 부의 상관성을 보였는데 이러한 결과는 IAA의 농도증가가 배지의 pH를 산성화시키는 원인인 것으로 확인되었다. 수경법과 Pot 실험을 통한 녹두묘를 이용한 배양액의 식물생장효과를 확인한 실험에서도 선발균주 중 AMT-54 균주가 가장 높은 뿌리 생육촉진 효과를 나타냈었다. 실제로 auxin 식물호르몬이 작물에 직접 시비했을 때 발근 효과를 나타내는 농도는 1~10ppm수준이면 충분하기 때문에 AMT-54가 생성하는 IAA 농도는 작물 적용 시 뿌리 및 생장촉진을 유도할 수 있는 PGPR 미생물체로서 사용이 가능하다고 판단되었다.

#### IV. 결론

인삼경작 토양으로부터 auxin 생성능이 뛰어난 세균 AMT-

54 균주를 분리하여 TLC 및 HPLC 분석을 통해 확인한 결과, IAA 생산농도는 457ppm이었으며 LC-Mass분석에 의하여 생성된 물질은 분자량이 175인 IAA로 확인되었다. 분리균에 의한 IAA 생산을 위한 최적조건을 실험한 결과, 0.1% L-tryptophan를 함유한 pH 7.0의 R2A broth배지에 35°C, 24시간 배양 시 최대 이었다. 녹두발근 생검법과 pot 재배를 통한 식물생육효과 실험에서 분리균 배양액의 첨가는 대조구에 비해 발근수와 뿌리길이에서 3.3배의 뿌리신장효과를 보였다. 생리적 특성 및 계통학적 특성분석을 통해 분리균은 Gram 음성 간균인 *Klebsiella mobilis* AMT-54로 동정되었다.

본 연구는 2009년도 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

### 참고문헌

1. Anroun H, C.J. Beauchamp, N. Goussard, R. Chabot, R. Lalande. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.) Plant Soil 204: 57-67.
2. Barazani O., J. Friedman. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. J. Chem. Ecol. 25: 2397-2406.
3. Ezaki, T., Y. Hashimoto, E. Yabuuchi. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int J Syst Bacteriol. 39: 224-229.
4. Gamalero, E., M. Fracchia, J. Cavaletto, P. Garbaye, G. Frey-Klett, C. Varese, M.G. Martinotti. 2003. Characterization of functional traits of two fluorescent *Pseudomonas* isolated from basidiomycetes of ectomycorrhizal fungi. Soil Biology & Biochemistry 35: 55-63.
5. Joshi, K.K., V. Kumer, R.C. Dubey, D.K. Masheshwari, V.K. Bajapai, S.C. Kang. 2006. Effect of chemical fertilizer-adaptive variants, *Pseudomonas aeruginosa* GRC2 and *Azotobacter chroococcum* ACI, on macrophomia paseolina causing charcoal rot of brassica Juncea. Korean J. of Envir. Agri. 25: 228-235.
6. Jung, H.K., J.R. Kim, S.M. Woo, S.C. Kim. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. Korea. Microbiol. Biotechnol. 34: 94-100.
7. Jung, H.K., J.R. Kim, S.M. Woo, S.D. Kim. 2007. Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 50(1): 23-28.
8. Kaushik. R., A.K. Saxena, K.V.B.R. Tilak. 2000. Selection of Tns::lacZ mutants isogenic to wild type *Azopirillum* brasilense strains capable of growing at sub-optimal temperature. World J. Microbiol. Biotechnol. 16: 567-570.
9. Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze, M.N. Schroth. 1980. Enhancement plant growth by siderophore produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature. 286: 885-886.
10. Lim, H.S., J.M. Lee, S.D. Kim. 2002. A plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* GL20: Mechanism for disease suppression, outer membrane receptor for ferric siderophore, and genetic improvement for incresed biocontrol efficacy. J. Mcrobiol. Biotechnol. 12: 249-257.
11. Mehnaz, S., M.S. Mirza, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, A. Bano, K.A. Malik. 2001. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacterium from the rhizosphere of rice. Can. J. Microbiol. 472: 110-117.
12. Mirza, M.S, W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, K.A. Malik. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bactria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. Plant Soil 237: 47-54.
13. Ouzari, H., A. Khsairi, N. Raddadi, A. Hassen, M. Zarrouk, D. Daffonchio, A. Boudabous. 2008. Diversity of auxin-producing bacteria associated to *Pseudomonas savastanoi*-induced olive knots. J. Basic Microb. 48(5): 370-377.
14. Pozem, M. J., C. Azcon-Aguilar, C. Dumas-Gaudot, J. M. Barea. 1999. 1,3-β-Glucanase activities in tamato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bio protection. Plant Sci. 141: 149-157.
15. Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam, R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protection 20: 1-11.
16. Wei, G., J. W. Kleopper, S. Tuzun. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases plant growth by plant promoting rhizobacteria under field conditions. Phytopathology 86: 221-224.
17. Zimmer, W., M. Wesche, L. Timmermans. 1998. Identification and isolation of indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azopirillum brasilense*, sequencing and funtional analysis of gene locus gene. Curr. Microbiol. 36: 327-331.