

양송이 수확 후 배지로부터 식물생장촉진세균의 분리 및 생육특성

정영필 · 경기천¹ · 장갑열² · 윤민호*

충남대학교 생물환경화학과, ¹충남농업기술원 태안백합시험장, ²국립원예특작과학원 버섯과

Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Waste Mushroom bed from *Agaricus bisporus*

Young-Pil Jung, Ki-Cheon Kyung¹, Kab-Yeul Jang², and Min-Ho Yoon*

Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Lifesciences, Chungnam National University, 220 Gung-Dong, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Korea.

¹Taeon Lily Experiment Station, Chungcheongnam-do Agricultural Research and Extension Services, Taeon 357-952, Korea.

²Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea.

An auxin-producing bacteria (3YN11-02) was isolated from waste mushroom bed from *Agaricus bisporus* of Chungnam Buyeo-Gun area. The strain 3YN11-02 was identified as a novel species belongs to *Rahnella aquatica* by a chemotaxonomic and phylogenetic analysis. The isolate was confirmed to produce indole-3-acetic acid (IAA) which is one of auxin hormone by TLC and HPLC analysis. When the concentration of IAA was assessed by performing HPLC quantity analysis, the maximal 290 mg L⁻¹ of IAA detected in ether fraction extracted from the culture filtrate which was cultured in R2A broth containing 0.1% tryptophan for 24 h at 35°C. The molecular weight of the main peak obtained by LC-mass analysis was correspondent well to 175, that of IAA. To investigate the growth promoting effect of crop, when the culture broth of *R. aquatica* 3YN11-02 was infected onto water culture and seed pot of mung bean, the adventitious root induction and root growth of mung bean were 2.0 times higher than control.

Key words: *Rahnella aquatica*, Plant growth promoting rhizobacteria, Auxin

서 언

국제적으로 리우선언 이후 유기농산물에 대한 새로운 기준이 제정되었고, OECD에서도 농업환경지표 제정하여 이행을 촉구하는 등 친환경농업에 대한 관심이 대내외적으로 집중되고 있다. 또한, 세계화에 따른 FTA 체결로 인해 우리 농산물의 경쟁력을 가지려면 농산물의 품질과 안전성이 중요시 되고, 국민들의 건강을 보호하기 위해 친환경농업에 대한 관심이 집중되면서 정부에서도 친환경농업 육성법을 제정하여 환경과 농업을 조화시켜 경제성 확보뿐 아니라 환경보전 및 생산된 농작물의 안정성을 동시에 추구하기 위해 노력하고 있으며 그 일환으로 유용미생물을 이용한 친환경 유기농자재를 활용하여 작물생육촉진 및 병해충발생억제 등 생태계보존을 하기 위한 노력이 확산되고 있다.

Kloepper et al. (1980)은 식물의 성장을 촉진시키는 PGPR

(plant growth promoting rhizobacteria) 미생물들의 존재를 발표한 이래, 포장시험을 통해 이들 PGPR에 의해 작물의 수확량이 증대 되고 토양 병을 방제할 수 있다는 연구 결과들이 보고되어 이들 미생물에 대한 관심이 높아졌다. 미생물에 의한 식물생장촉진 기작으로는 β -1,3-glucanase, chitinase, cellulase와 같은 식물병원성 진균의 외벽을 가수분해 할 수 있는 효소를 생산하는 길항미생물들에 의한 병해역제 기능 (Jung et al., 2007; Pozem et al., 1999)과, 식물병원성 진균의 포자발아를 억제하는 철 (Fe³⁺) 이온을 특이적으로 결합하는 siderophore 생산 (Gamalero et al., 2003; Kloepper et al., 1980) 미생물, 그리고 lipopolysaccharide, salicylic acid, cyclo-dipeptide 등의 유도저항성물질을 생성하는 미생물 (Ramamoorthy et al., 2001; Wei et al., 1996) 등이 보고되고 있다. 또한, *Rhizobium* 균에 의해 식물의 세 포신장, 발아, 기관의 분화, 개화 등에 관여하는 식물호르몬 auxin이 유도 될 수 있다는 것을 보고 한 이후 *Aeromonas veronii* (Mehnaz et al., 2001), *Alcaligenes piechaudii* (Barazani et al., 1999), *Azospirillum* sp. (Zimmer et al., 1998), *Azotobacter* sp. (Joshi et al., 2006), *Bacillus* sp.

접수 : 2011. 9. 23 수리 : 2011. 10. 6

*연락처 : Phone: +82428216733

E-mail: mhyoon@cnu.ac.kr

(Jung et al., 2006), *Bradyrhizobium* sp. (Anroun et al., 1998) 및 *Klebsiella mobilis* (Bak et al., 2010) 등 많은 미생물들이 auxin을 생산할 수 있다고 보고하였고, Pishchik et al. (2002)은 카드뮴 오염토양에서 보리의 생장을 촉진하는 미생물로 *R. aquatica*를 사용하여 indole-3-acetic acid (IAA)를 126–330 nmol mg⁻¹ 농도로 생산함은 물론 보리의 수확량도 증가하였다고 보고하였다.

본 실험에서는 양송이 수확 후 배지로부터 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 생육 효과를 검토함으로써 새로운 미생물자원을 선별하기 위한 목적으로 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 다기능성 PGPR 생성균의 분리를 위해 충남 부여군 석성면 양송이 재배농가에서 수확 후 배지를 채취하였다. 채취한 양송이 수확 후 배지 10 g을 멸균 생리식염수 90 mL에 첨가하여 진탕 배양기에서 170 rpm으로 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 toothpicking 한 후 Salkowski 시약을 분산시켜 외관상 colony 주변에 분홍색을 띠는 균주들을 auxin 생산균주로 1차 선별 하였다.

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

TLC에 의한 IAA의 확인 선별된 균주들의 auxin 생성능을 TLC 분석을 통해 확인하기 위하여 배양 상등액을

인산으로 pH 2.8까지 산성화 시킨 후, 두배의 cold ether로 분획추출 하였다. 수용액 층은 버리고 회수한 ether층을 질소가스로 증진시켜 날려버려 얻어진 잔사를 methanol 5 mL에 녹여 TLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. TLC의 전개 용매로는 1-propanol: NH₄OH: H₂O (6:3:1) 혼합액을 하여 사용 하였으며, 발색시약은 증류수 100 ml, 농 염산 150 ml, p-dimethylaminobenzaldehyde 0.7 g을 용해한 Ehrlich 시약 (Lim et al., 1995)을 사용하였다.

HPLC를 통한 IAA의 정량분석 추출한 ether층 methanol 수용액내의 IAA함량을 HPLC 정량분석을 통해 확인하였다. 사용한 분석기기는 JASCO사의 PU 980이고, UV detector는 JASCO사의 PU 975로 285 nm에서 측정하였고, 컬럼은 Luna 5U C18 (250×4,60 mm)를, 이동상은 MeOH:H₂O (5:5)를 사용하였으며, 용출속도는 1 ml/min이었다. 또한 TLC 및 HPLC 분석을 통해 확인된 활성 peak의 물질이 IAA인지를 확인하기 위하여 Mocrmass사의 Mocrmass QTOF2모형을 이용한 LC-mass 분석을 통해 분자량 측정을 하였다.

Bio assay를 통한 식물생장 실험

녹두발근생검법 (수경법) 선별된 auxin 생성균주의 생육촉진효과를 검토하기 위하여 auxin 생산검정방법으로 많이 활용되고 있는 녹두발근검정법 (mungbean adventitious root induction method)을 이용하여 auxin 호르몬의 주요 기능 중 하나인 뿌리발근 촉진효과를 조사하였다. 녹두품종은 선화녹두종자를 사용하였으며, 녹두종자를 0.3% sodium hypochloride 용액에 3분간 침지하여 소독한 후 흐르는 물에 24시간 침종하고, 무균토양에 파종하여 28°C, 5000 Lux 광원하의 배양실에서 7일간 배양한 후 제1 본엽이 전개되고 첫 3소엽의 엽아가 다소 부풀어 있는 상태에서 녹두묘를 캐냈다. 균일한 크기로 선별된 녹두묘로부터 자엽을 제거하고 자엽 밑으로 하배축을 3 cm 남기고 소독된 예리한 칼로 절단한 후 Salkowski test에서 auxin생산성이 높게 나타난 균주의 배양 상등액 50 µL와 멸균증류수 5 mL가 첨가된 vial에 절단한 유묘3개씩을 넣고 24시간 마다 용액의 수분을 멸균증류수로 일정수준까지 보충하여 동일한 환경조건하에서 연속조명으로 10일간 발근시킨 후 1 mm이상의 발근수를 계수하였고, 뿌리길이를 측정하여 합산하였다.

녹두발근생검법 (Pot실험) Auxin 생성능 확인시험으로 pot 재배를 통한 녹두발근검정법을 병행 수행하였다. 상기의 기술한 수경법에 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.

분리 균주의 동정 본 균주의 생리학적 특성은 그람 음성 세균의 동정에 사용되는 API 20NE kit (Bio Merieux) 를 제조회사의 시행방법에 따라 사용하였다. DNA-DNA hybridization 실험은 photobiotin-labelled DNA probe와 micro-dilution wells을 이용하여 (Ezaki et al., 1989)에 의해 기술된 방법에 의해 수행하였다. 또한 16S rRNA 염기서열 해석 및 계통수 작성을 위하여 16S rRNA의 부분 서열의 상동성은 DDBJ/EMBL/GenBank database의 Blast program을 이용하여 분석 하였으며, 각 염기서열의 alignment는 Cluster X program package (version 1.8)를 이용하여 정렬하였고, 계통도의 작성은 근린결합법에 의거하여 결정되었다.

결과 및 고찰

균주의 분리 충남 부여군 석성면 지역 양송이 재배 단지의 양송이 수확 후 배지로 부터 희석평판법에 의해 순수 분리된 각 균주들을 auxin 생성균 분리용 배지인 0.1% L-tryptophan이 첨가된 R2A agar 배지에 toothpicking하여 Salkowski시약과 반응시켜 colony 주변에 붉은색을 형성하는 80여 개의 균을 1차 선발하였다. 고체 배지 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 분광광도계를 이용하여 선발균들의 auxin 생성능을 확인한 결과, 선발균주 중 흡광도가 높은 3YN10-36, 3YN10-39, 3YN11-01 및 3YN11-02 등이 상대적으로 붉은색이 짙게 나타남으로써 IAA 생성능이 높음을 육안으로 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

Auxin 물질의 확인 및 생산능 비교 선발균주들이 생산하는 auxin물질을 TLC를 이용하여 확인 한 결과, 표준시약으로 사용한 IAA의 R_F값 0.75와 일치 함으로서 IAA 계 auxin 물질임을 확인 할 수 있었다. 또한, 비색법에 의해 auxin 생성능이 우수한 선발균주들의 auxin 생성능을 정량적으로 비교하기 위하여 각 배양액으로부터 추출한 ether 분획의 HPLC 분석을 통해서 선발균주들이 생산하는 IAA 함량을 정량적으로 확인 한 실험 결과에서도 모든 배양 농축물의 IAA peak가 RT 57~59초 사이에 검출되었고 (Fig. 2), 각 균주별 농도는 3YN11-02가 290 mg L⁻¹으로 가장 높게 나타났으며, 3YN10-39는 132 mg L⁻¹, 3YN10-36은 120 mg L⁻¹, 3YN11-01은 112 mg L⁻¹ 순으로 검출됨 으로서 비색법의 결과와 비슷한 경향을 보였다 (Table 1). 이 결과는 Lim et al. (2002)이 보고한 논 토양과 밭 토양에서 분리한 호

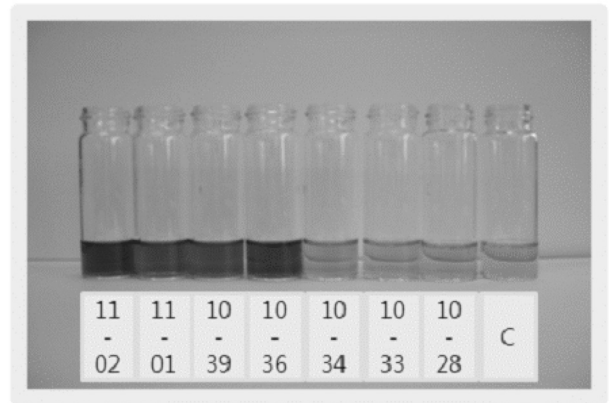


Fig. 1. Isolation of auxin-producing strains using Salkowski-R2A broth.

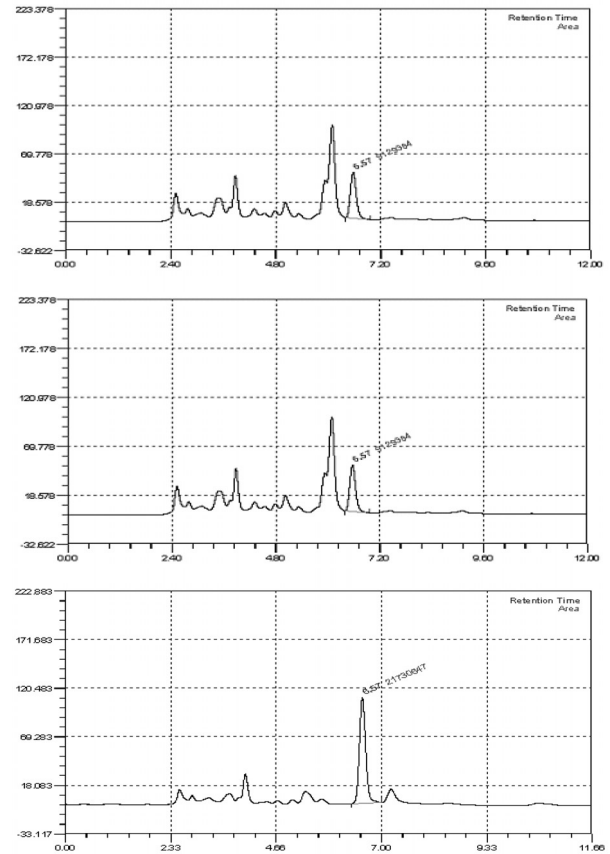


Fig. 2. HPLC chromatogram of auxin extracted from the strains 3YN10-36 (upper), 3YN10-39 (middle), and 3YN11-02 (lower).

기성균인 *Pseudomonas fluorescens* 와 Jung et al. (2006) 이 보고한 *Bacillus subtilis*가 생산한 IAA 농도보다 2배 이상 높은 수치이었다. 또한, HPLC 분석을 통해 검출된 3YN11-02 번 균주의 IAA peak (RT 5.58)의 분자 확인을 위하여 LC-Mass를 통해 분자량을 확인 한 결과 분자량 175인 IAA peak가 M+H인 176에서 검출됨으로써 생성된 물질이 IAA임이 최종 확인되었다 (data not shown).

Table 1. Estimation of IAA produced from the isolates by HPLC.

Strain No.	RT	Area	Height	IAA
				mg mL ⁻¹
Control	6.517	456854	2843	6
10-28	6.501	1961862	10348	35
10-33	6.577	4528381	25835	62
10-34	6.582	6898725	34605	94
10-36	6.587	8888699	47722	120
10-39	6.575	9129384	48569	132
11-01	6.492	7010718	37369	113
11-02	6.57	21730647	111286	290

Table 2. Growth effect of mung bean infected with auxin-producing bacterium in water culture and seed pot culture.

Strain No.	Uprooting No.		Uprooting length	
	Water culture	Pot culture	Water culture	Pot culture
			----- mm -----	
Control	13.2	16.3	120.5	142.8
10-28	16.5	17.9	150.5	174.7
10-33	19.3	19.5	178.2	192.3
10-34	20.1	21.4	195.3	217.6
10-36	22.8	22.3	210.4	225.0
10-39	24.4	23.6	224.3	243.3
11-01	20.5	20.7	202.7	223.5
11-02	28.5	27.8	235.5	272.3

Bio assay를 통한 식물생장 실험 Auxin 생성균이 작물의 뿌리 생육에 미치는 효과를 검토하기 위하여 녹두 묘를 공시작물로 이용하여 수경법과 pot 재배실험을 통한 선발균의 배양액 공급효과를 확인하였다.

수경법에 의한 녹두발근력 확인 실험 Table 2에서 보는 바와 같이 대조구의 발근수가 13.2개인 반면 100배 희석한 3YN11-02번 균주의 배양상등액 첨가 시 발근수는 무려 28.5개 이었으며, 3YN10-39번 균주는 24.4개로 나타났다. 길이도 두 균주 모두 각각 224.3 mm와 235.5 mm로 대조구에 비해 약2배의 신장효과를 보였으며, 또한, 두 균주의 총 발근수와 발근길이의 평균값을 백분율로 비교한 결과 대조구에 비해 3YN11-01이 184%, 3YN11-02 균주가 215%로 나타나 각각 1.8배와 2.2배까지 높게 나타나는 것으로 확인되었다.

Pot실험에 의한 녹두발근 생검법 Pot 실험을 통한 결과에서도 3YN11-01과 3YN11-02 균주의 발근효과가 가장 높게 나타나 3YN11-01번 균주의 발근수는 23.6개, 발근길이는 243.3 mm, 그리고 3YN11-02 균주는 발근수 27.8개, 발근길이 272.3 mm로 확인되어 총 발근수와 발근길

이의 평균값을 비교한 결과, 수경법의 결과 보다는 다소 낮지만 대조구에 비해 각각 1.7배와 1.9배까지 높게 나타났다 (Table 2). 이상의 수경법과 Pot 실험의 결과를 통해 선발균주 중 3YN11-02 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 3YN11-02 균주를 auxin 생성 PGPR균으로 최종 선발하였다.

분리균의 동정 Auxin 생성능이 가장 우수한 3YN11-02 균주의 16S rRNA 염기서열을 결정하여 BLAST 프로그램 이용하여 근린 결합법에 의거 하여 계통학적 위치를 검토한 결과, 3YN11-02 균주는 *Rahnella aquatica*와 98%, *Ewingella americana* NCPPB3905와는 97%의 유사성을 보였으나, DNA-DNA relatedness 실험에서 *Rahnella aquatica* AJ233426와 84.7%의 상동성을 나타냄으로서 *Rahnella aquatica* 로 동정되었다 (Fig. 3).

배양조건별 Auxin 생산능 비교 최종선발균 3YN11-02를 0.1% L-tryptophan이 함유된 R2A broth (pH 7)배지에 배양하면서 auxin 생성을 위한 최적 배양조건을 검토하였

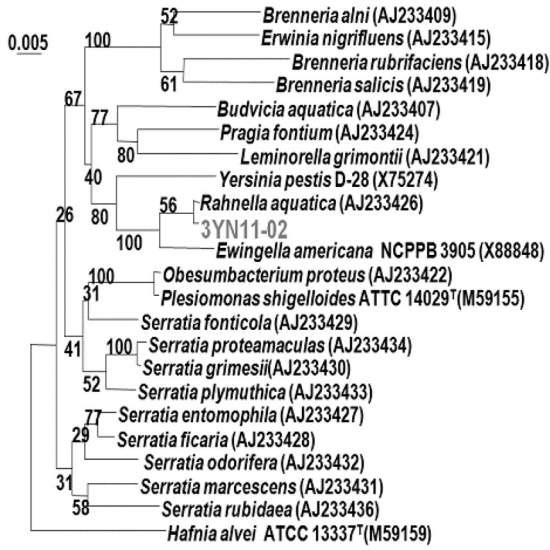


Fig. 3. Phylogenetic trees of strain 3YN 11-02 estimated from 16S rRNA sequence.

다. 분리균 1% seed 접종 후 35°C에서 배양 시 약 18시간에 대수기 후기에 도달하는 빠른 성장을 보였으나 IAA의 생성량은 10 mg L⁻¹ 이하의 낮은 수준을 유지하였다. 그러나 생육이 최대인 배양 24시간에는 IAA가 100 mg L⁻¹ 이상으로 급격히 증가 하였으며, 또한, pH 변화는 배양 18시간까지 pH 7.0 수준에서 24시간에 pH 5.4 이하로 낮아지는 결과를 나타냄으로 IAA 생성과 pH 변화와의 관련성을 예측하게 하였다 (Fig. 4). 최적배양 온도 및 pH 확인 실험에서는 35°C와 pH 7.0에서 배양 시 배양 24시간 후 균의 생육 및 IAA 생성양도 90 mg L⁻¹으로 가장 높게 나타났으며, 최종 pH가 5.7로 급격히 떨어지는 결과를 보여 IAA 생성량과 pH 변화에는 부의 상관성이 있는 것으로 관측되었다 (data not shown). 또한, IAA 생성을 위한 전구 물질로 알려진 L-tryptophane이 분리균의 IAA 생성에 미치는 영향을 확인한 한 결과, Fig. 5와 같이 분리균은 무첨가 배지에서는 IAA를 거의 생산하지 않았으며, 0.1% 첨가 시 균의 생육과 IAA 함량이 최대이었고, pH의 경우 초기 pH 7.0에서 4.7수준으로 낮아지는 비슷한 경향을 보였다. 그러나 0.2% 첨가 시에는 균의 생장이나 IAA농도가 크게 감소하므로 고농도의 L-tryptophane 배지에서는 오히려 IAA의 생성에 저해 됨을 확인 할 수 있었다.

이상의 결과를 통해 양송이 수확 후 배지로부터 분리한 auxin 생성균 *Rahnella aquatica* 3YN11-02는 장내세균속 (genus) 이면서도 IAA 생성능이 290ppm 으로 대표적인 PGPR균인 *Bacillus*속 (Jung et al., 2006) 및 *Pseudomonas*속 (Ouzari et al., 2008)과 다른 장내세균인 *Enterobacter*속 (Mirza et al., 2001)과 비슷한 수준을 보였다.

또한, IAA생성을 위한 최적 배양조건은 0.1% tryptophane 이 함유된 R2A broth 배지에서 pH 7.0, 배양온도 35°C에

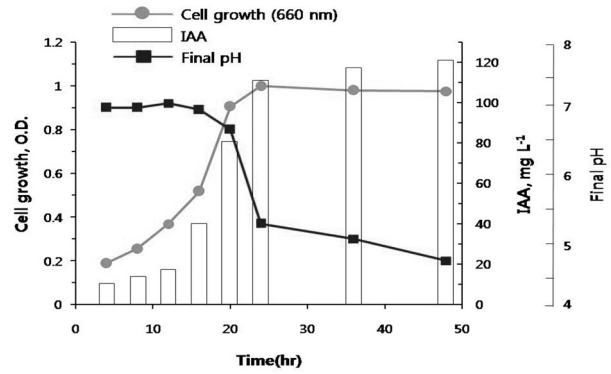


Fig. 4. The profile of IAA production and viable cells of *Rahnella aquatica* 3YN 11-02 based on incubation time.

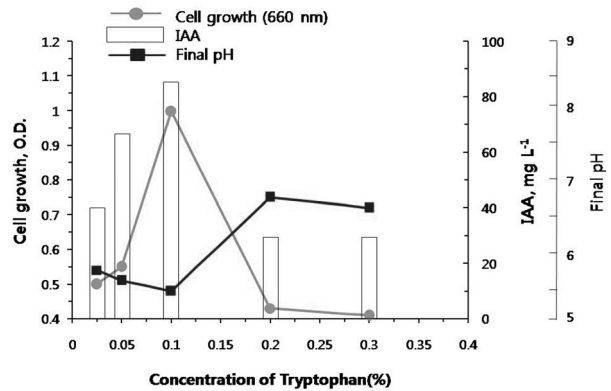


Fig. 5. The effect of concentration of L-tryptophan (%) on IAA production from *Rahnella aquatica* 3YN11-02.

서 24시간 배양시 균의 생장뿐 아니라 IAA의 생산이 최대이었으나, 배지내 IAA의 농도와 pH변화는 부의 상관성을 보였는데 이러한 결과는 IAA의 농도증가가 배지의 pH를 산성화시키는 원인 것으로 확인되었다. 수경법과 Pot 실험을 통한 녹두묘를 이용한 배양액의 식물생장효과를 확인한 실험에서도 선발균주 중 3YN11-02 균주가 가장 높은 뿌리 생육촉진 효과를 나타냈었으며, 실제로 auxin 식물호르몬이 작물에 직접 시비했을 때 발근 효과를 나타내는 농도는 5~10 mg L⁻¹ 수준이면 충분하기 때문에 3YN11-02가 생성하는 IAA 농도는 작물 적용 시 뿌리 및 생장촉진을 유도할 수 있는 PGPR 미생물제로서 사용이 가능하다고 판단되었다.

결론

충남 부여군 석성면 지역에서 채취한 양송이 수확 후 배지로부터 auxin생성능이 뛰어난 세균 3YN11-02 균주를 분리하여 TLC 및 HPLC 분석을 통해 확인한 결과, IAA 생산농도는 290 mg L⁻¹이었으며 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 약 2배의 뿌리 신장효과를 보였다. 생리적 특성 및 계통학적 특성분석을 통해 분리균은 Gram 음성 간균인 *Rahnella aquatica* 3YN 11-02로 동정되었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 Agenda 원예·특용작물 경쟁력 제고 기술개발사업 (2011년)의 연구지원으로 수행한 것임.

인 용 문 헌

- Anroun H., C.J. Beauchamp, N. Goussard, R. Chabot, and 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.
- Bak, H.S., Y.P. Jung, and M.H. Yoon. 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria from soil in a ginseng field. *J. Agr. Sci.* 37(3):377-382
- Barazani, O. and J. Friedman. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. *J. Chem. Ecol.* 25:2397-2406.
- Ezaki, T., Y. Hashimoto, and E. Yabuuchi. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in micro-dilution 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.
- Gamalero, E., M. Fracchia, J. Cavaletto, P. Garbaye, G. Frey-Klett, C. Varese, and M.G. Martinotti. 2003. Characterization of functional traits of two fluorescent *Pseudomonas* isolated from basidiomycetes of ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 35:55-63.
- Joshi, K.K., V. Kumer, R.C. Dubey, D.K. Masheshwari, V.K. Bajapai, and S.C. Kang. 2006. Effect of chemical fertilizer-adaptive variants, *Pseudomonas aeruginosa* GRC2 and *Azotobacter chroococcum* ACI, on macrophominia paseolina causing charcoal rot of brassica Juncea. *Korean J. Environ. Agric.* 25:228-235.
- Jung, H.K., J.R. Kim, S.M. Woo, and S.C. Kim. 2006. An auxin producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* AH18 which has siderophore-producing biocontrol activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34:94-100.
- Jung, H.K., J.R. Kim, S.M. Woo, and 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.
- Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze, and M.N. Schroth. 1980. Enhancement plant growth by siderophore produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885-886.
- Lim, H.S., J.M. Lee, and 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. Mirobiol. Biotechnol.* 12:249-257.
- Mehnaz, S., M.S. Mirza, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, A. Bano, and K.A. Malik. 2001. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacterium from the rhizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.* 47:110-117.
- Mirza, M.S., W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, and K.A. Malik. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil* 237:47-54.
- 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.
- Pishchik, V.N., N.I. Vorobyev, I.I. Chernaeva, A.P. Kozhemyakov, Y.V. Alexeev and S.M. Lukin. 2002. Experimental and mathematical simulation of plant growth promoting rhizobacteria and plant interaction under cadmium stress. *Plant Soil* 243:173-186.
- Pozem, M.J., C. Azcon-Aguilar, C. Dumas-Gaudot, and 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.
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, Raguchander, V. Prakasam, and R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection.* 20:1-11.
- Wei, G., J.W. Kleoppper, and S. Tuzun. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases plant growth by plant promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology.* 86:221-224.
- Zimmer, W., M. Wesche, and L. Timmermans. 1998. Identification and isolation of indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azopirillum brasilense*, sequencing and funtional analysis of gene locus gene. *Curr. Mcibiol.* 36:327-331.