جداسازی و بررسی صفات محرک رشد گیاهی(PGP)[1] برخی از سودوموناس های فلورسنت بومی خاکهای ایران

علی اشرف سلطانی طولارود،[2*] ناهید صالح راستین، کاظم خاوازی، هادی اسدی رحمانی و پیمان عباس زاده دهجی

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی دانشگاه تهران؛ ali_soltani_t@yahoo.com
دانشیار گروه خاکشناسی دانشگاه تهران
استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب؛ kkhavazi@yahoo.com
استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب؛ asadi_1999@yahoo.com
دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی دانشگاه تهران

چکیده

در این تحقیق به منظور اطلاع از صفات محرک رشد گیاهی سودوموناس‌های فلورسنت بومی خاک‌های ایران، از تعداد 40 خاک ریزوسفری گندم تعداد 25 جدایه *سودوموناس فلورسنت* جداسازی و صفات محرک رشد گیاهی آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که کلیه جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید اکسین را داشتند. متوسط میزان تولید 2/44 و دامنه آن از 1/3 تا 4/5 میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. همچنین جدایه‌های مورد مطالعه از توانایی حل‌کنندگی فسفات نامحلول معدنی برخوردار بودند که این توانایی در بین جدایه‌های مختلف متفاوت بود. متوسط میزان انحلال فسفر نامحلول 287/5 و دامنه آن از 129/9 تا 386/1 میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. از نظر توانایی جدایه‌ها در استفاده از ACC (1-آمینوسیکوپرویان کربوکسیلات) به عنوان منبع نیتروژن و یا کربنی نیز تفاوت‌های زیادی بین باکتری‌ها وجود داشت بطوری که از کل 25 جدایه فقط تعداد 9 جدایه قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن و یا کربن بودند. با وجود توانایی تولید سیدروفور توسط همه جدایه‌ها، میزان این توانایی در سویه‌های مختلف متفاوت بود و در روشCAS-Agar، قطر هاله به کلنی تشکیل شده 0/74 و دامنه آن از 0/34 تا حداکثر 1/21 متغیر بود. توانایی تولید سیدروفور با استفاده از روش CASAD نیز بررسی گردید که از نظر توانایی تولید سیدروفور نتایج قبلی را تأیید کرد ولی میزان تولید آن با یکدیگر تناقض داشت. متوسط میزان سیدروفور تولید شده در این روش 0/21 و دامنه آن از حداقل 0/072 تا حداکثر 0/459 میلی‌مولار دفروکسامین مسیلات (Deferoxamine mesylate) متغیر بود. همچنین هیچ کدام از باکتری‌های مورد مطالعه قادر به تولید آنزیم کیتیناز نبودند. از نظر تولید اسید سالیسیلیک نیز فقط 11 جدایه قادر به تولید آن بودند که متوسط آن 2/48 و دامنه آن از صفر تا 10/91 میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. نتایج مربوط به بررسی باکتری‌ها از نظر توانایی تولید سیانیدهیدروژن نیز نشان داد که باکتری‌ها توانایی‌های متفاوتی از نظر تولید سیانیدهیدروژن داشتند که در گروه‌های با توانایی خیلی زیاد، زیاد، متوسط و کم طبقه‌بندی شدند.

واژه های کلیدی: باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، گندم، سودوموناس‌های فلورسنت، اکسین، سیدروفور، آنزیم ACC-deaminase .

مقدمه

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR; Plant Growth Promoting Rhizobacteria) به گروه نامتجانسی از باکتری های ریزوسفری مفید اطلاق می شوند که قادرند در شرایط معین با استفاده از یک یا چند مکانیسم خاص رشد گیاه را افزایش دهند.

1- Plant Growth Promoting

2 – نویسنده مسئول: کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران- دانشکده مهندسی آب و خاک گروه مهندس علوم خاک

* دریافت: 85/9/26 و پذیرش: 86/6/4

این باکتری‌ها می‌توانند بطور مستقیم یا غیرمستقیم موجب افزایش یا تحریک رشد گیاه شوند (Glick *et al*., 1995). تحریک غیرمستقیم رشد گیاه زمانی اتفاق می‌افتد که این باکتری ها اثرات زیان‌آور یک یا تعدادی از بیمارگرهای گیاهی را تعدیل یا خنثی کنند (Schippers *et al*.,1987). این پدیده که به کنترل زیستی موسوم است به دو طریق اتفاق می افتد؛ در یک روش باکتری با تولید آنتی‌بیوتیک (Kaaijmakers and Weller, 2001)، ترشح سیدروفور (O'Sullivan and O'Gara,1992)، تولید متابولیت‌هایی با وزن مولکولی کم از قبیل HCN (Bagnasco *et al*., 1998)، ترشح آنزیم‌های برون سلولی مانند Chitinase، (Nagarajkumar *et al*., 2004)، Protease و (Chet and Inbar, 1994) ß-1, 3 glucanase Lipase، رقابت برای مواد غذایی و اشغال جایگاه‌های میکروبی در ریزوسفر، فعالیت بیمارگر را محدود و یا متوقف می سازد. در روش دیگر کنترل زیستی، بین بیمارگر و باکتری محرک رشد گیاه تماسی وجود ندارد. بدین ترتیب که این باکتری ها از طریق فعال سازی یک مکانیسم مقاومت در گیاه به نام مقاومت سیستمیک القایی (Induced systemic resistance,ISR) همانند مقاومت سیستمیک اکتسابی ناشی از وجود بیمارگر (Systemic resistance acquired,SAR) بخش های غیر آلوده گیاه را در مقابل طیف گسترده ای از بیمارگرها مقاومتر می کنند(Bakker *et al*,2003). در این راستا اسید سالیسیلیک (Salycilic acid , SA)، سیدروفورها و لیپوپلی ساکارید ها از ویژگی های تأثیر گذار باکتری ها در ایجاد مقاومت سیستمیک القایی محسوب می شوند. تثبیت نیتروژن (Dobbelaere *et al*., 2003)، تولید هورمون‌های گیاهی(Glick , 1995) ،افزایش قابلیت فراهمی عناصر معدنی نامحلول مثل فسفر (Rodrigues and Fraga,1999)وتولید آنزیم‌هایی چون آنزیم ACC-deaminase (Glick *et al*., 1994) که می‌توانند رشد گیاه را تنظیم کنند نیز از مکانیسم های مستقیم مورد استفاده توسط این باکتری ها محسوب می شود.

این باکتری‌ها شامل جنس های مختلفی از قبیل *Azotobacter*، *Acetobacter*، *Azospirillum*، *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Burkholderia* می‌باشند (Brown,1974;Elmerich,1984;Kloepper *et al*.,1988;kloepper *et al*.,1989;Okon and Labandera-Gonzalez,1994;Bashan and Levanony,1990). در این میان باکتری‌های جنس *Pseudomonas* به دلیل توزیع گسترده آنها در خاک، توانایی کلونیزاسیون ریزوسفر بسیاری از گیاهان و تولید طیف متنوعی از متابولیت ها از اهمیت ویژه ای برخوردارند. این باکتری‌ها دارای طیف گسترده‌ای از صفات محرک رشد گیاهی مانند تولید اکسین (Patten and Glick,2002)، تولید *آنزیم* ACC-deaminase (Penrose *et al*.,2003)، حل کنندگی فسفات (Rashid *etal*.,2004)، تولید سیدروفور (Meyer,2000)، سالیسیلیک اسید (Maurhofer *et al*., 1998)، کیتیناز (*et al*.,2006 Ajit) و سیانید هیدروژن (Schippers *et al*.,1990) می‌باشند که بطور مستقیم یا غیرمستقیم باعث افزایش رشد گیاه می‌گردند.

به منظور استفاده از پتانسیل این باکتری ها در افزایش رشد گیاه، متناسب با هدف مورد نظر باکتری های *سودوموناس فلورسنت* جداسازی و پس از غربال گری آنها از نظر هفت صفت، کارایی آنها در افزایش رشد گیاهان مختلف مورد بررسی قرار می گیرد. کارهای اندک صورت گرفته در ایران در خصوص *سودوموناس های فلورسنت* فقط محدود به اندازه گیری یک صفت محرک رشد گیاهی مانند سیدروفور (رسولی و همکاران،1384)، اکسین (عطایی، 1384) بوده است و در مورد صفاتی چون تولید آنزیم ACC-deaminase، سیانید هیدروژن، سالیسیلیک اسید و کیتیناز توسط سویه های بومی *سودوموناس فلورسنت* اطلاعاتی وجود ندارد. لذا با توجه به اطلاعات اندک موجود در مورد صفات محرک رشدی باکتری های *سودوموناس فلورسنت* بومی ایران، در این تحقیق سعی گردید تا ضمن جداسازی این باکتری ها، مهم ترین صفات فوق نیز تعیین، تا از محدوده صفات مذکور در جدایه های مربوط به خاک های ایران اطلاع حاصل نموده و از این پتانسیل در تحقیقات بعدی نیز استفاده گردد. بنابراین هدف اصلی این تحقیق اطلاع از صفات محرک رشد گیاهی سودوموناس های فلورسنت بومی ایران، مقایسه آنها با اطلاعات منتشر شده و انتخاب آنها برای کارهای تحقیقاتی بعدی بوده است.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی

به منظور جداسازی باکتری‌های *سودوموناس فلورسنت*، تعداد 40 نمونه خاک (شامل ریشه‌های کامل گندم) از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری گردید. این مناطق شامل استان های اردبیل، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، همدان، تهران، زنجان و کردستان بود. سپس ده گرم از خاک ریزوسفری از نمونه‌ها جدا و آنگاه با استفاده از سرم فیزیولوژیک (9 گرم در لیتر NaCl) سری های رقت 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه شد. رقت‌های مختلف بر روی محیط کشت King B (شامل 20 گرم در لیتر Proteose peptone، 1/5 گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، 1/5 گرم در لیتر K_2HPO_4

10 میلی لیتر در لیترگلیسرول و 16 گرم در لیتر آگار) پخش شد. سپس پلیت‌ها به مدت 48 الی 72 ساعت در دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت زمان مذکور پلیت‌ها با استفاده از لامپ U.V از نظر وجود کلونی‌های با خاصیت فلورسنس بررسی و پس از خالص سازی، کلونی‌های با خاصیت مذکور به عنوان جدایه‌های *سودوموناس فلورسنت* جدا گردیدند. به منظور اطمینان بیشتر، جدایه‌های مذکور از نظر شکل ظاهری، تحرک در محیط نیمه جامد و آزمون گرام نیز مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه های سودوموناس فلورسنت منتخب، برای آزمایشات بعدی روی محیط کشت شیب‌دار Nutrient Agar (شامل 5 گرم در لیتر عصاره مخمر، 1/5 گرم در لیترعصاره گوشت، 1/5 گرم در لیتر کلرید سدیم، 5 گرم در لیتر Peptic Digest of Animal Tissue باpH 7/2) و در یخچال با دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

ب) اندازه‌گیری صفات PGP باکتری‌ها

1ـ اکسین(مواد شبه IAA)[1]

به منظور بررسی توان تولید اکسین، ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط کشت TSB[2] (شامل 2/5 گرم در لیتر دکستروز، 2/5 گرم در لیتر دی پتاسیم هیدروژن فسفات، 5 گرم در لیتر کلرید سدیم، 3 گرم در لیتر پپتون سویا، 17 گرم در لیتر تریپتون و pH 7/2) کشت داده شدند. سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط TSB حاوی 50 میکروگرم در میلی لیتر L-tryptophane منتقل گردید. بعد از 48 ساعت، سوسپانسیون باکتری با دور 10000g و دمای آزمایشگاه سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با 4 میلی‌لیتر معرف Salkowski (شامل 150 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، 250 میلی‌لیتر آب مقطر و 7/5 میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_20$ 0/5 مولار) مخلوط گردید. سپس به مدت 20 دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و بلافاصله با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در 535 نانومتر قرائت گردید (Patten and Glick ,2002). مقدار تولید اکسین با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید محاسبه شد.

2- فسفر

به منظور بررسی توان حلالیت فسفر معدنی نامحلول باکتری‌ها، از روش اسپربر (Sperber, 1985) استفاده گردید. در این روش ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط TSB کشت داده شدند. سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط اسپربر مایع (شامل 10 گرم در لیتر گلوکز، 0/5 گرم در لیتر عصاره مخمر، 0/32 گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، 0/14 گرم در لیتر $CaCl_2$، 2/5 گرم در لیتر $Ca_3(PO_4)_2$ و 2/ 7 pH)منتقل گردید. سپس نمونه ها برای مدت 120 ساعت بر روی شیکر با دوران 125 دور در دقیقه و دمای 28 درجه سانتی‌گراد تکان داده شدند. پس از آنpH نمونه ها قرائت شد. همزمان با این عملیات سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با 3 میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات ـ وانادات مخلوط گردید. بعد از گذشت 20 دقیقه از زمان انکوباسیون نمونه ها در دمای آزمایشگاه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در 470 نانومتر قرائت شد. میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده از KH_2PO_4 محاسبه شد.

3ـ آنزیم ACC -deaminase

به منظور بررسی باکتری های مورد مطالعه در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن، باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط کشت TSB کشت داده شدند. سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری به 20 میلی‌لیتر از محیط های DF شامل4 گرم در لیتر KH_2PO_4، 6 گرم در لیتر Na_2HPO_4، 0/2 گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، 2 گرم در لیتر گلوکز، 2 گرم در لیتر گلوکونیک اسید، 2 گرم در لیتر سیتریک اسید و همچنین عناصر میکرو شامل: 1میلی گرم در لیتر $FeSO_4.7H_2O$، 10میکروگرم در لیتر H_3BO_3، 10 میکروگرم در لیتر $MnSO_4.7H_2O$، 124/6 میکروگرم در لیتر $ZnSO_4.7H_2O$، 78/22 میکروگرم در لیتر $CuSO_4.7H_2O$ و 10 میکروگرم در لیتر MoO_3 و pH 7/2) حاوی 3 میلی‌مولار ACC، محیط DF حاوی 2 گرم در لیتر سولفات آمونیوم و محیط DF فاقد ACC و سولفات آمونیوم (A.S.) تلقیح گردید. بعد از 48 ساعت با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در 405 نانومتر برای هر سه محیط قرائت شد(Amico *et al*, 2005, modified).

4ـ سیدروفور

برای تشخیص توان تولید سیدروفور جدایه‌ها از روش های CAS[3] و CASAD [4] استفاده گردید.

الف) روش عمومی CAS

در این روش برای تشخیص نیمه کمی توان تولید سیدروفور، 12 میکرولیتر سوسپانسیون تازه باکتری با روش لکه‌گذاری[5] روی پلیت‌های حاوی محیط جامد CAS (Alexander and Zuberer , 1991) کشت داده شد.

1- IAA- Like substances
2- Tryptone Soy Broth

3- Chrome Azurols Sulfonate (CAS)
4- CAS Agar Diffusion
5- Spot Inoculation

پلیت‌های تلقیح شده در دمای 28 درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف کلنی باکتری‌ها، در فواصل زمانی 24، 48 و72 ساعت ارزیابی گردید.

ب) روش CASAD

در این روش ابتدا پلیت‌های حاوی محیط CAS اصلاح شده (Sung Heui Shin *et al.* ,2001) تهیه گردید. سپس با استفاده از پیپت پاستور استریل، بر روی محیط مذکور چاله‌هایی به قطر 5 میلی‌متر ایجاد شد. پس از این مرحله، جدایه‌های باکتری به مدت 48 ساعت در محیط BHI[1] مایع (شامل 17/5گرم در لیترعصاره قلب و مغز حیوانات، 10گرم در لیترتریپتون، 2گرم در لیتر گلوکز، 5 گرم در لیتر کلریدسدیم، 2/5 گرم در لیتر دی هیدروژن فسفات و pH 7/2) رشد داده شدند. سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط BHI عاری از آهن شده (Leong and Neilands,1982) تلقیح گردید. بعد از 48 ساعت سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ و 35 میکرولیتر از محلول رویی به هر یک از چاله‌های ایجاد شده روی پلیت‌ها اضافه شد. پس از انتشار محلول فوق، مجددا 35 میکرولیتر از محلول رویی به چاله‌ها اضافه شد. پلیت‌ها در دمای 37̊C نگه داری و قطر هاله‌های ایجاد شده در اطراف چاله‌ها در زمان های 4 و 8 ساعت پس از تلقیح اندازه گیری شد. همزمان با این کار غلظت‌های مختلفی از نمک دفروکسامین مسیلات[2] در محیط BHI عاری از آهن تهیه گردید و دقیقاً همانند محلول رویی سوسپانسیون باکتری‌های سانتریفیوژ شده، غلظت‌های مختلفی از دفروکسامین مسیلات به پلیت‌های مربوطه اضافه شد. پس از انکوباسیون پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های ایجاد شده در زمان های 4 و 8 ساعت پس از تلقیح اندازه گیری شد. با توجه به غلظت و قطر هاله منحنی استاندارد و خط رگرسیون برای دفروکسامین مسیلات رسم گردید. میزان سیدروفور تولیدی توسط جدایه‌ها با مقایسه قطر هاله‌ها با منحنی استاندارد تهیه شده از دفروکسامین مسیلات محاسبه شد (Sung Heui Shin *et al.* , 2001)

5ـ سالیسیلیک اسید

برای اندازه‌گیری سالیسیلیک اسید، جدایه‌های باکتری برای مدت 48 ساعت در درون ارلن‌های حاوی 50 میلی‌لیتر محیط سوکسینات،[3] شامل 4 گرم در لیتر سوکسینیک اسید، 6 گرم در لیتر K_2HPO_4، 3 گرم در لیتر KH_2PO_4، 1 گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$، 0/2 گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$ و pH7) و بر روی شیکر با سرعت 120 دور در دقیقه و دمای 28 درجه سانتی گراد رشد داده شدند. سپس سوسپانسیون باکتری برای 20 دقیقه با دور 10000g سانتریفیوژ گردید. متعاقباً 4 میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته شد و به کمک HCl نرمال، pH آن روی 2 تنظیم گردید. سپس با اضافه کردن کلروفرم (نسبت 1:1)، سالیسیلیک اسید عصاره‌گیری شد. به عصاره حاصله 4 میلی‌لیتر آب مقطر و 5 میکرولیتر کلرید آهن (III) 2 مولار اضافه و با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در 527 نانومتر قرائت شد. مقدار تولید اسید سالیسیلیک با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده از سالیسیلک اسید محاسبه شد (Meyer *et al.*,1992).

6ـ آنزیم کیتیناز

برای ارزیابی توانایی تولید آنزیم کیتیناز از روش غربال گری روی پلیت استفاده شد. بدین منظور 12 میکرولیتر سوسپانسیون تازه باکتری با روش لکه‌گذاری روی پلیت‌های حاوی محیط Nutrient Agar و کیتین کلوئیدی[4] 0/1 درصد کشت داده شدند (Roberts *et al.* 1988)., پلیت‌های تلقیح شده برای مدت 120 ساعت در دمای 28 درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند. توانایی تولید آنزیم کیتیناز با تشکیل هاله‌های شفاف در اطراف کلنی باکتری‌ها ارزیابی گردید. به منظور اطمینان از مناسب بودن محیط برای ایجاد هاله، از یک خاک زراعی رقت های 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه و بر روی محیط مذکور پخش گردید.

7ـ سیانید هیدروژن

برای اندازه‌گیری سیانید هیدروژن ابتدا جدایه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط TSA[5](15گرم کازئین هیدرولیز هیدرولیز شده به طریقه آنزیمی، 5 گرم آرد سویای هضم شده به وسیله آنزیم پپسین، 5 گرم کلرید سدیم، 15 گرم آگار و 1000 میلی لیتر آب مقطر) غنی شده با گلایسین (4/4 gr/L) کشت داده شدند. سپس کاغذ صافی‌های خیسانده شده در پیکرات سدیم (پیکریک اسید 0/5% و کربنات سدیم 2%) در قسمت داخلی درب پلیت گذاشته شد. پلیت‌ها به مدت 120 ساعت در دمای 28 درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند. توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی تغییر رنگ کاغذ صافی ارزیابی گردید (Donate-correa *et al* , 2004). تغییر رنگ کاغذ صافی ها به ترتیب از کرم (تولید HCN کم)، قهوه ای روشن (تولید HCN متوسط)، قهوه ای تیره (تولید HCN زیاد)، تا آجری (تولید

1- Brain Heart Infusion
2- Deferoxamine mesylate salt
3- Succinate Medium
4- Colloidal Chitin
5- Soyabean Casein Digest Agar

HCN خیلی زیاد) متغییر بود.که به ترتیب با درجه بندی 1 تا 4 مشخص شد.

در این تحقیق برای آنالیز داده ها از نرم افزارهای MSTATC و SPSS استفاده گردید.

نتایج

تولید اکسین

نتایج حاصل از بررسی توان تولید اکسین جدایه‌های سودوموناس فلورسنت نشان داد که همه جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید اکسین را داشتند. متوسط میزان تولید 2/44 µg/ml و دامنه آن از 1/3 تا 4/5 µg/ml متغییر بود. بیشترین میزان تولید مربوط به جدایه PA10 (4/5µg/ml) و کمترین مقدار نیز مربوط به جدایه PA3 (1/3µg/ml) بود.

انحلال فسفات معدنی

نتایج حاصل از ارزیابی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول توسط باکتری‌ها نشان داد که همه جدایه‌های مورد مطالعه از توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول برخوردار بودند. بیشترین مقدار انحلال مربوط به جدایه PA20 (386/16 µg/ml) و کمترین مقدار متعلق به جدایه PA9 (129/94µg/ml) بود. تغییرات pH محیط کشت نیز در سطح 1 درصد معنی دار بود. کمترین pH قرائت شده (3/02)مربوط به جدایه PA3 و بیشترین (3/88) متعلق به جدایه PA9 بود. این در حالی بود که pHقرائت شده در تیمار شاهد 5/6 بود. متوسط میزان کاهش pH 3/5 و دامنه آن از 3/02 تا 3/88 متغیر بود. متوسط میزان انحلال فسفر معدنی نا محلول 287/5 µg/ml و دامنه آن از 129/94 تا 386/16 میکروگرم فسفر بر میلی لیتر متغیر بود. همچنین همبستگی منفی معنی‌داری (r= -0/716**) بین انحلال تری‌کلسیم فسفات و pH مشاهده گردید (شکل1).

آنزیم ACC دآمیناز

در ارزیابی توانایی باکتری برای استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن مشاهده شد که فقط تعداد 9 جدایه از 25 جدایه مورد مطالعه توانایی استفاده از ACC را داشتند. این جدایه ها شامل A1 ,PA2 ,PA5 ,PA7 ,PA8 PA23, PA11, PA9, و PA25 بودند (جدول1).

سیدروفور

نتایج حاصل از ارزیابی توان تولید سیدروفور جدایه‌های سودوموناس نشان داد که در محیط CAS همه جدایه‌ها قادر به رشد و ترشح سیدروفور بودند. تولید سیدروفور به شکل هاله‌ای نارنجی تا زرد پررنگ در اطراف کلنی باکتری های مورد مطالعه مشاهده شد. هاله تشکیل شده در بیشتر باکتری‌ها با حاشیه‌ای کاملاً واضح بود. متوسط نسبت قطر هاله به کلنی (متوسط سه روز)0/74 و دامنه آن از حداقل 0/34 تا حداکثر 1/21 متغیر بود.

توان تولید سیدروفور جدایه‌ها با روش CASAD نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. بین نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله پس از گذشت زمان 4 ساعت و گذشت زمان 8 ساعت اختلاف بسیار ناچیزی وجود داشت. متوسط میزان تولید سیدروفور جدایه‌ها در این روش 0/21و دامنه آن از حداقل 0/072 تا حداکثر 0/459 میلی‌مولار متغیر بود.

سالیسیلیک اسید

نتایج حاصل از ارزیابی تولید سالیسیلیک اسید توسط جدایه‌های سودوموناس نشان داد که هفت جدایه از سودوموناس های مورد مطالعه به شماره های PA5 ,PA8 PA25, PA23, PA19, PA16, PA13, توانایی رشد در محیط سوکسینات را نداشتند. تعداد 7 جدایه شامل PA1 PA12, PA11, PA9, PA4, PA2, و PA17 اسید سالیسیلیک تولید نکردند. 11 جدایه دیگر توانایی تولید مقادیر مختلفی از سالیسیلیک اسید را داشتند. دامنه تولید اسید سالیسیلیک توسط این باکتری ها از صفرتا 10/91 میکروگرم بر میلی لیتر و متوسط میزان تولید 2/48 میکرو گرم بر میلی لیتر متغیر بود.

آنزیم کیتیناز

نتایج حاصل از ارزیابی توان تولید آنزیم کیتیناز نشان داد که هیچ کدام از جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید این آنزیم را نداشتند. این در حالی بود که محیط کشت برای ایجاد هاله ناشی از تولید آنزیم کیتیناز مناسب بود و بعضی از باکتری های خاک هاله ای را اطراف کلنی خود ایجاد کرده بودند.

سیانید هیدروژن

نتایج حاصل از این ارزیابی نشان داد که میزان توان تولید سیانید هیدروژن چهار جدایه (PA11، PA14، PA18 و PA25) از جدایه های مورد مطالعه خیلی زیاد، چهار جدایه (PA2، PA5، PA8 و PA19) در حد زیاد، سه جدایه (PA10، PA20 و PA23) در حد متوسط و بقیه در حد کم بود.

بحث

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که 80 درصد میکروارگانیسم‌های جدا شده از ریزوسفر گیاهان مختلف توانایی تولید اکسین‌ها به عنوان یک متابولیت ثانویه را دارند (Kampert *et al.*,1975; Lopper and

Schroth,1986). Patten و Glick (1996) گزارش کردند که یکی از باکتری‌های PGPR ترشح‌کننده اکسین باکتری‌های متعلق به جنس *سودوموناس* بود. Ahmad و همکاران (2005) نشان دادند که 11 جدایه از سودوموناس‌های فلورسنت توانایی تولید مقادیر مختلفی از IAA را در حضور غلظت‌های مختلف تریپتوفان و عدم حضور آن داشتند. در بررسی انجام شده توسط Bent و همکاران (2001) نیز مشخص شد که *سودوموناس فلورسنس* سویه M20 توانایی تولید مقادیر مختلف اکسین را در حضور غلظت‌های مختلف تریپتوفان و عدم حضور آن داشت. Patten و همکاران (2002) نیز نشان دادند که *سودوموناس پوتیدا* توانایی تولید IAA را در حضور غلظت‌های مختلف تریپتوفان و عدم حضور آن نشان داد. همه سویه های سودوموناس های فلورسنت مورد مطالعه در تحقیق حاضر نیز توانایی تولید مقادیر مختلفی از اکسین در غلظت 50 میکروگرم بر میلی لیتر تریپتوفان را داشتند نتایج حاصل از بررسی توان تولید IAA 11 جدایه سودوموناس توسط Ahmad و همکاران (2005) نشان داد که دامنه تولید IAA توسط باکتری ها بین 5/34 تا 53/2 میکروگرم بر میلی لیتر در غلظت های مختلف تریپتوفان متغیر بود. در بررسی انجام شده توسط Bent و همکاران (2001) میزان تولید IAA توسط سودوموناس فلورسنس سویه M20 در محیط کشت 48 ساعته بین 5/1 تا 96 میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود. در تحقیق حاضر نیز دامنه تولید اکسین در دامنه 1/3 تا 4/5 میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردید.

نتایج حاصل از ارزیابی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول توسط باکتری‌ها در محیط مایع اسپربر نشان داد که همه جدایه‌های مورد مطالعه دارای توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول با ظرفیت‌های مختلف می‌باشند که بیشترین مقدار مربوط به جدایه PA20 (386/16µg/ml) و کمترین مقدار متعلق به جدایه PA9 (129/94µg/ml) بود. این نتیجه با مشاهدات Rashid و همکاران (2004) که توانایی 10 سویه باکتریایی در حل نمودن تری کلسیم فسفات را در محیط مایع پیکووسکایا[1] نشان دادند تأیید می‌شود. در این تحقیق کاهش معنی‌دار pH محیط‌های باکتریایی (3/02-3/88) در مقایسه با شاهد (بدون باکتری و pH؛ 5/5) مشاهده گردید. کاهش pH در محیط‌های مایع حاوی باکتری‌های حل‌کننده فسفات توسط محققین مختلفی گزارش شده است (Cunnhngham and Kuiack, 1992; Motsara, 1995; Illmer *et al*., 1995; Bar *et al*.,1999). همچنین در این تحقیق همبستگی منفی معنی‌داری بین انحلال تری‌کلسیم فسفات و pH مشاهده گردید (r= -0/716**). Venkateswarlu و همکاران (1984) نیز همبستگی منفی و معنی‌داری (r= -0/93) بین انحلال فسفات و pH مشاهده نمودند. همچنین در تحقیق دیگری Rashid و همکاران (2004) نیز همبستگی منفی (r= -0/4) را بین pH و انحلال فسفات بدست آوردند.

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تعدادی از سودوموناس‌های خاک دارای آنزیم ACC دِآمیناز می‌باشند (Klee *et al*., 1991). در یک آزمایش Jacobson (1993) ثابت نمود که *سودوموناس پوتیدا* سویه GR12-2 دارای فعالیت ACC دِآمیناز می‌باشد. در ارزیابی توانایی تولید آنزیم ACC دِآمیناز باکتری ها مشاهده گردید که محیط رشد 48 ساعته ACC+DF تلقیح شده با 9 جدایه (PA7، PA25، PA23، PA11، PA2، PA8، PA5، PA1 و PA9) همانند محیط رشد 48 ساعته DF + سولفات آمونیوم این جدایه‌ها از لحاظ ظاهری بسیار کدر بود. نتایج حاصل از قرائت میزان جذب نور در 405 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نشان داد که محیط 48 ساعته ACC+DF این 9 جدایه دارای میزان جذب نور بالایی بود. این نتایج توانایی رشد این 9 جدایه در محیط ACC+DF را تأیید می‌کند. پس می‌توان نتیجه گرفت که این 9 جدایه به دلیل دارا بودن آنزیم ACC دِآمیناز قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن بوده‌اند. محیط رشد ACC+DF 16 جدایه باقیمانده برخلاف محیط N+DF این جدایه‌ها همانند شاهد (ACC+DF فاقد باکتری) و شاهد منفی (DF دارای باکتری) شفاف بود. این مطلب نشان می‌دهد که این 16 جدایه به دلیل دارا نبودن آنزیم ACC دآمیناز قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن نبوده‌اند.

O'Sullivan و O'Gara (1992) گزارش کردند که بسیاری از سویه‌های *سودوموناس فلورسنس* توانایی تولید سیدروفور را دارند. تحقیقات دیگر نیز نشان می‌دهد که سودوموناس‌های فلورسنس توانایی تولید چندین سیدروفور از قبیل پایوردین، پایوکلین و سالیسیلیک اسید را دارند (Demeyer and Hofte, 1997; Dave and Dube, 2000). در این تحقیق نتایج حاصل از ارزیابی توان تولید سیدروفور جدایه‌های *سودوموناس* نشان داد که همه جدایه‌ها قادر به رشد و ترشح سیدروفور به شکل هاله‌ای نارنجی تا زرد پررنگ در اطراف کلنی در محیط CAS- آگار بودند. هاله تشکیل شده در بیشتر باکتری‌ها با حاشیه‌ای کاملاً واضح بود. رسولی و همکاران (1384) نیز گزارش کردند که 201 جدایه *سودوموناس* بومی خاک‌های ایران توانایی تولید سیدروفور در محیط CAS- آگار را

1 -Pikovskaya

دارند. در این تحقیق میزان تولید سیدروفور با اندازه‌گیری نسبت قطر هاله به قطر کلنی در مدت 72 ساعت ارزیابی گردید. نسبت قطر هاله به کلونی جدایه‌ها از 0/34 تا 1/21 متغیر بود. رسولی و همکاران (1384)گزارش کردند که نسبت قطر هاله به کلونی در جدایه های مورد مطالعه از 2/21 تا 3/96 متغیر بود. مقایسه این نتایج با نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که جدایه‌های مورد تحقیق از نظر تولید سیدروفور نسبتاً ضعیف می‌باشند.

همچنین در این تحقیق توان تولید سیدروفور جدایه‌ها با روش CASAD نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. بین نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله پس از گذشت زمان 4 ساعت و گذشت زمان 8 ساعت اختلاف بسیار ناچیزی وجود داشت. میزان تولید سیدروفور جدایه‌ها در این روش بین 0/459 تا 0/072 میلی‌مولار متغیر بود.

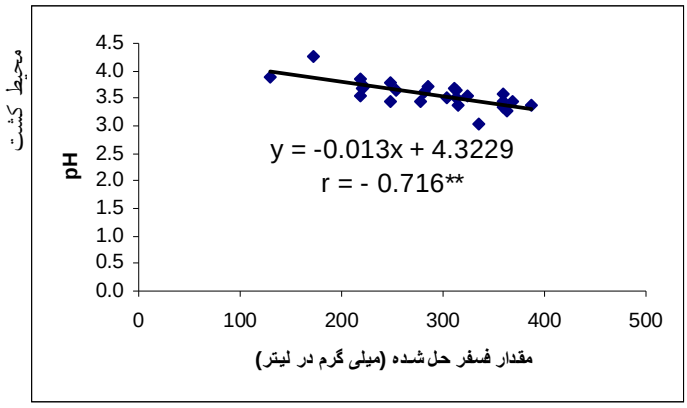
نتایج حاصل از ارزیابی تولید سالیسیلیک اسید توسط جدایه‌های *سودوموناس* نشان داد که هفت جدایه *سودوموناس* مورد مطالعه توانایی رشد در محیط سوکسینات را نداشتند. دلیل عدم رشد را می‌توان حداقل بودن محیط سوکسینات ذکر نمود. از 18 جدایه رشد کرده، 7 جدایه قادر به ترشح سالیسیلیک اسید نبودند. عدم تولید سالیسیلیک اسید توسط بعضی از سویه‌های *سودوموناس فلورسنس* گزارش شده است. تحقیقات انجام شده توسط محققین نشان داد که *سودوموناس فلورسنس* سویه P_3 توانایی تولید سالیسیلیک اسید را ندارد (Mourhofer *et al*., 1994; Voiard *et al*., 1989). یازده جدایه توانایی تولید مقادیر مختلفی از سالیسیلیک اسید را داشتند. میزان تولید از 10/91µg/ml در جدایه PA22 تا 0/31 µg/ml در جدایه PA24 متغیر بود. NagaraJkumar و همکاران (2004) گزارش کردند که 14 سویه *سودوموناس* مورد مطالعه توانایی تولید سالیسیلیک اسید را داشتند که میزان تولید از حدود 2µg/ml تا حدود 16 µg/ml متغیر بود. تولید سالیسیلیک اسید توسط سویه‌های *سودوموناس فلورسنس* WCS374، WCS417r (Leeman *et al*., 1996) CHAO (Maurhofer *et al*.,1994) و *سودوموناس آئروژینوزا* سویه 7NSK2 (Demeyer and Hofte, 1997) گزارش شده است.

تحقیقات انجام شده توسط محققین مختلف نشان می‌دهد که *سودوموناس‌های فلورسنس* توانایی تولید آنزیم کیتیناز را دارند (Nagarajikuma *et al*., 2004; Ajit *et al*., 2006; Saikiar *et al*.,2005) اما عدم توانایی *سودوموناس‌های فلورسنس* در تولید آنزیم کیتیناز نیز گزارش شده است. O'Brien و همکاران (1987) گزارش کردند که *سودوموناس پوتیدا* و *آئروژینوزا* توانایی تولید آنزیم کیتیناز را ندارند. در این تحقیق نتایج حاصل از ارزیابی توان تولید آنزیم کیتیناز نشان داد که هیچ کدام از جدایه‌ها توانایی تولید این آنزیم را ندارند.

بعضی *سودوموناس‌های فلورسنت* HCN تولید می‌کنند که به خنثی نمودن پوسیدگی سیاه تنباکو (Voisard *et al*., 1989) و خنثی نمودن پاتوژن‌های گندم (Flashman *et al*., 1996) کمک می‌کنند. Nagarajkumar و همکاران (2004) گزارش کردند که *سویه‌های سودوموناس* مورد مطالعه توانایی تولید HCN را داشتند. سویه های *سودوموناس فلورسنت* مورد مطالعه در این تحقیق نیز توانایی تولید سیانیدهیدروژن در دامنه خیلی زیاد تا خیلی کم را داشتند.

نتیجه گیری

مجموع نتایج نشان داد که سودوموناس‌های فلورسنت بومی خاک‌های ایران از توانایی قابل ملاحظه‌ای برای بهره برداری آنها به عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاهی برخوردار می‌باشند و نیاز است تا این توانایی‌ها با اثرات محرک رشدی آنها بر گیاهان مختلف مورد بررسی قرار گیرد.



شکل 1- رابطه بین میزان انحلال فسفات معدنی و تغییرات pH محیط کشت توسط ایزوله های باکتریایی

جدول1- مقایسه جدایه های مورد مطالعه از نظر رشد در محیط های DF، DF حاوی ACC و DF

شماره جدایه	میزان جذب قرائت شده در طول موج 405 نانومتر			DF+ACC
	DF	DF+ACC	DF+A.S.	DF+A.S.
PA1	0/30	1/77	2/65	0/67
PA2	0/38	2/16	2/74	0/79
PA3	0/23	0/22	2/68	0/08
PA4	0/34	0/30	2/81	0/11
PA5	0/26	1/80	2/73	0/66
PA6	0/28	0/23	2/66	0/08
PA7	0/38	2/42	2/73	0/89
PA8	0/30	2/08	2/80	0/74
PA9	0/22	1/22	2/77	0/44
PA10	0/32	0/29	2/80	0/10
PA11	0/26	2/19	2/74	0/80
PA12	0/28	0/27	2/62	0/10
PA13	0/25	0/24	2/88	0/08
PA14	0/27	0/25	2/57	0/10
PA15	0/30	0/28	2/70	0/11
PA16	0/35	0/29	2/63	0/11
PA17	0/35	0/28	2/85	0/10
PA18	0/24	0/24	2/50	0/10
PA19	0/28	0/21	2/81	0/07
PA20	0/24	0/21	2/68	0/08
PA21	0/26	0/20	2/68	0/08
PA22	0/22	0/17	2/57	0/07
PA23	0/29	2/22	2/84	0/78
PA24	0/36	0/32	2/66	0/12
PA25	0/28	2/23	2/72	0/82
میانگین	0/22	0/64	1/99	0/29
دامنه	0/004-0/384	0/016-2/416	0/147-2/88	0/066-0/88

جدول2- نتایج حاصل از ارزیابی صفات PGP جدایه‌های مورد مطالعه

شماره سویه	اکسین	حل کنندگی فسفات (µg/mL)	DF+ACC / DF+AS.	سیدروفور به روش CAS	سیدروفور به روش CASAD	سالیسیلیک اسید	آنزیم کیتیناز	سیانید هیدروژن
	(µg/mL)	pH و		(قطر هاله به کلنی)	(mM)	(µg/mL)		
PA1	1/8 IJ	@315/4 (3/39) CD	0/67C	0/97BC	0/23DEF	0L	-	1
PA2	1/56 JKL	247/5 (3/79)G	0/79B	0/47HIJK	0/17GHI	0L	-	3
PA3	1/3 L	334/9 (3/02)C	0/08E	0/96BC	0/31C	3/22E	-	1
PA4	2/63 DEF	218/7 (3/54)H	0/11E	0/34K	0/25CDE	0L	-	1
PA5	2/03 HI	359/4(3/58)B	0/66C	0/64FGHIJ	0/09K	*L	-	3
PA6	1/36 KL	249/0 (3/43)G	0/08E	1/06AB	0/24DE	1/64H	-	1
PA7	3/36 C	171/8(3/28)I	0/89A	0/56GHIJ	0/11JK	1/37I	-	1
PA8	1/8 IJ	220/8(3/69)H	0/74B	0/73DEFG	0/19EFGH	*L	-	3
PA9	2/03 HI	129/9 (3/88)J	0/44D	0/47IJK	0/27CD	0L	-	1
PA10	4/5 A	253/3(3/65)G	0/10E	0/72DEFG	0/46A	0/84J	-	2
PA11	2/6 DEF	313/8 (3/69)CD	0/80B	0/68EFG	0/25CDE	0L	-	4
PA12	1/63 JK	221/6 (3/7)1H	0/10E	0/89BCDE	0/07K	0L	-	1
PA13	2/3 FGH	313/2 (3/66)CD	0/08E	0/89BCDE	0/23DEF	*L	-	1
PA14	2/46 EFG	362/3 (3/26)AB	0/10E	0/92BCD	0/18FGHI	9/05B	-	4
PA15	2/56 DEF	303/8 (3/52)DE	0/11E	0/78CDEF	0/21DEFGH	4/02D	-	1
PA16	2/86 D	218/7 (3/86)H	0/11E	0/67FGHI	0/08K	*L	-	1
PA17	3/83 B	312/5 (3/5)CD	0/10E	0/10E	0/10E	0L	-	1
PA18	3/9 B	358/7 (3/36)B	0/10E	0/76DEFG	0/19EFGH	8/52C	-	4
PA19	2/1 HI	285/1 (3/72)EF	0/07E	0/68FGH	0/12IJK	*L	-	3
PA20	2/46 EFG	386/1 (3/39)A	0/08E	0/71DEFG	0/39B	2/69F	-	2
PA21	2/63 DEF	324/0 (3/54)C	0/08E	0/96BC	0/24DE	2/16G	-	1
PA22	2/46 EFG	360/1 (3/46)B	0/07E	0/69EFG	0/25CDE	10/91A	-	1
PA23	2/16 GH	275/6 (3/43)F	0/78B	0/58FGHIJ	0/31C	*L	-	2
PA24	2/03 HI	280/7 (3/61)EF	0/12E	1/21A	0/22DEFG	0/31K	-	1
PA25	2/66 DE	368/8 (3/45)AB	0/82B	0/71DEFG	0/27CD	*L	-	4
دامنه	1/3-4/5	129/9-386/1, 3.02-3/88	۰/۲۹	۰/34-1/21	/07-/4۶	0-10/91	-	4-1
متوسط	2/44	287/5 , 3/57	۰/۰۷-۰/۸۸	0/74	0/2۲	2/4۹	-	

* عدم رشد باکتری - عدم تولید آنزیم کیتیناز

@- عدد اول حل‌کنندگی فسفات و اعداد داخل پرانتز pH محیط کشت

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف یکسان اختلاف معنی داری ندارند

فهرست منابع:

1. عطایی، نازنین.1384.جداسازی سودوموناس های فلورسنت تولید کننده هورمون اکسین و بررسی تأثیر آنها بر رشد گندم، پایان نامه دانشجویی، دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم پایه، 134صفحه.

2. رسولی صدقیانی، ح.، ک. خاوازی.، ح. رحیمیان.، م. ج. ملکوتی و هـ. اسدی رحمانی. 1384. ارزیابی توان سویه های بومی سودوموناس های فلورسنت ریزوسفر گندم برای تولید سیدروفور. مجله خاک و آب. جلد 20، شماره 1، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران.

3. Ahmad, F., Ahmad, L. and M. Saghir. 2005. Indol acetic acid production by the indogenous isolate of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence and absence of Tryptophan. Turk. J. Biol. 29: 29-34.
4. Ajit,N.S.,Verma, R. and V. Shanmugan. 2006. Extracellular chitinase of fluorescent *pseudomonas* antifungal to *fusarium oxysporum* f.sp.dianti causing carnation wilt. Current Microbiology .52:310-316.
5. Alexander, D. B. and D. A. Zuberer. 1991. Use of Chrome Azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol. Fertil. Soils. 12: 39-45.
6. Amico, E.D., Cavalca, L., and V. Andreoni. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-risistant, potentially plant growth-promoting bacteria. FEMS Microbiology Ecology. 52: 153-162
7. Bagnasco, P., Delafuente, L., Gualtieri, G., Noya, F. and A. Anas. 1998. *Fluorescent pseudomonas* spp. As biocontrol agent against forage legume root pathogenic fungi. Soil. Biol. Biochem. 30: 1317-1322.
8. Bakker, P.A.H.M., Ran, L.X., Pieterse, C.M.J. and L.C. Van loon. 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant disease. Can. J. Plant Pathol.25:5-9
9. Bar-Yosef, B., Rogers, R. D., Wolfram, J. H.and E. Richman. 1999. *Pseudomonas cepecia*- mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. Soil Sci. Soc. J.of America. 63: 1703-1708.
10. Bashman, Y. and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillium* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-608.
11. Bent, E., Tuzum, S., Chanway, C. P. and S. Enebak. 2001. Alterations in Plant growth and root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 47: 793-800.
12. Brown, M. E. 1974. Seed and root bacterization. Annu. Rev. Phytopathol. 12: 181-197.
13. Chet, I. and J. Inbar. 1994. Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol. 48: 37-43.
14. Cunningham, J. E. and C. Kuiack. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii.* Appl. Environ. Microbiol. 58: 1451-1458.
15. Dave, B. P. and H.C. Dube. 2000. Detection and chemical characterization of siderophore of rhizobacterial *Fluorescent pseudomonas.* Indian Phytopathol. 53: 97-98.
16. De Meyer, G. and M. Hofte. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NKS2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis conerea* on bean. Phytopathol. 87: 588-593.
17. Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M. and R. Perez-Galdona. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proligerus*, a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. Plant Soil. 266: 261-272.
18. Elmerich, C. 1984. Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. Biotech. 2: 967-978.
19. Flashman, M. A., Eyaliz, A., Voisard, C. and D. Hass. 1996. Supperssion of *Septuria tritici* bloth and leaf of wheat by recombinant cyanid-producing strains of *Pseudomonas putida* MC. Plant-Microbe. Interact. 9: 642-645.

20. Glick, B. R. 1995. The enhacement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41: 109-117.
21. Glick, B. R., Jacobson, C. B., Schwarze, M. M. K. and J. J. Pasternak. 1994. 1-aminocyclopropane-1-carboxylix acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 donot stimulate canola root elongation. Can. J. Microbiol. 40: 911-915.
22. Illmer, P., Barbato, A. and F. Schinner. 1995. Solubilization of hardly soluble AIP04 with P-Solubilizing Microorganism. Soil. Biol. Biochem. 27: 260-270.
23. Jacobsin, C. B. 1993. Isolation and characterization of ACC-deaminase from *Pseudomonas putida* GR12-2 M. Sc. Thesis, Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo antario, Canada.
24. Kaaijmakers, J. M. and D. M. Weller. 2001. Exploiting genotypic diversity of 2,4-Diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas* spp: Characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. Appl. Environ.Microbiol. 2545-2554.
25. Kampert, M., Strzelczyk, E. and A. Pokojska. 1975. Production of Auxin by bacteria isolated from the roots of pine seedlings *Pinus silvestris* L. and from soil. Act. Microbiol. Pol. 7: 135-143.
26. Klee, H. J., Hayford, M. B., Kretzmer, K. A., Barry, G. F. and G. M. Kishore. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. Plant Cell. 3: 1187-1193.
27. Kloepper, J. W., Lifshitz, R. and M. N. Schroth. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. Plant Sci. 60-64.
28. Kloepper, J. W., Lifshitz, R. and R. M. Zablotwicz. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol. 7: 39-43.
29. Leeman, M., Den ouden, F. M., Van Pelt, J. A., Dirkx, F. P. M., Steijl. H., Bakker, P. A. H. M. and B. Schippers. 1996. Iron availibility affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens.* Phytopathol. 86: 149-155.
30. Leong, S. and J. B. Neilands. 1982. Siderophore production by phytopathogenic microbial species. Arrch. Biochem. Biophys. 218: 351-359.
31. Lifshtiz, R., Kloepper, J. W. E., Kozlowski, M., Simonson, C., Carlson, J., Tipping, E. M. and I. Zaleska. 1987. Growth promotion of Canola seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic & conditions. Can. J. Microbiol. 33: 309-395.
32. Loper, J. E. and M. N. Schroth. 1986. Influence of bacterial sources of indole-2-acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathol. 76: 386-389.
33. Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J. P.and G. Defago. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizeing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the gacA gene and of pyoverdine production. Phytopathol. 88: 139-146.
34. Maurhofer, M., Reimmann, C., Schmidli-sacherer, P., Heeb, S., Haas, D. and G. Defago. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of system resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. Phytopathol. 88: 678-684.
35. Meyer, J. M., Azelvander, P.and C. Georges. 1992. Iron metabolism in *Pseudomonas*. Salicylic acid, a sidrophore of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. Biofactors. 4: 23-27.
36. Meyer,D.M. 2000. Pyoverdins:Pigments siderophores and potential taxanomic markers of fluorescent *pseudomonas* species.Arch. Microbiol.174;135-142.
37. Motsara, M. R., Bhattacharyya, P. B.and B. Srivastava. 1995. Biofertilizers their description and characteristics in: Biofertilizer Technology, Marketing and usage, A sourcebook-cum-Glossary. Fertilizer Corner,1-2 Pamposh Enclave, New Dehli, 110048, India.pp: 9-18.

38. Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R.and R. Velazhahan. 2004. Involvement of secondary metaboloties and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice, sheath blight pathogen. Microbiol. Res. 159: 73-81.
39. Neilands, J. B. 1981a. Iron absorption and transport in microorganisms. Annu. Rev. Nut. 1: 27-46.
40. O'Brien, M. and R. Colwell. 1987. A Rapid Test for Chitinase Activity that uses 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminide. Appl. Environ. Microbiol. 1718-1720.
41. O'Sullivan, D. J. and F. O'Gara. 1992. Traits of *Pseudomonas fluorescens* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol. Rev. 56: 662-676.
42. Okon, Y. and C. A. Labandera-Gonzalez. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*. In improvong plant productivity with rhizosphere bacteria. Edited by M. H. Ryder. P. M. Stephens. and G. D. Bowen. Common wealth Scientific and Industrial Research. Organisation, Adelaide, Australia. 274-278.
43. Patten, C. and B. R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indole acetic Acid in Development of the Host plant Root System. Appl. Environ. Microbiol. 3795-3801.
44. Patten, C. and B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can. J. Microbiol. 42: 207-220.
45. Patten, C. L. and B. R. Glick. 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and stationary-phase sigma factor Rpos. Can. J. Microbiol. 48: 635-642.
46. Penrose, M.and R. B. Glick. 2003. Methods for isolating and characterizing Acc deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant 118: 10-15.
47. Raju, R. A. and M. N. Reddy. 1999. Effect of rock phosphate amended with phosphate solubilizing bacteria and farmyard manure in wetland (*Oryza sativa)*. Ind.J. Agri. Sci. 69: 451-453.
48. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and F. Latif. 2004. Organic acids productions solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. Pak. J. Biol. Sci. 7: 187-196.
49. Roberts, W. K. and C. P. Selitrennikoff. 1988. plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. J. Gen. Microbiol. 134: 169-176.
50. Rodriguez, H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech.Adv. 17;319
51. Saikiar, R., Singh, B., Kumar, R. and D. Arora. 2005. Detection of pathogenesis-related proteins-chitinase and β-1,3-glucanse in induced chickpea curr. sci. 89: 659-663.
52. Schippers, B., Bakker, A.W. and P.A.H.M. Bakker. 1987. Interaction of deleterious and beneficial rhizosphere microorganism and the effect of cropping practices. Annu. Rev. Phytopathol.25:339-358
53. Schippers, B., Bakker, A.W., Bakker, P.A.H.M., and R. Vanpeer 1990. Beneficial and deleterious effects of HCN-production pseudomonads on rhizosphere interaction. Plant Soil.129: 75-83
54. Shin, S., Lim. Y., Lee. S., Yang, N.and J. Rhee. 2001. Cas agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. J. Microbiol. Methods 44: 89-95.
55. Sperber, J. I. 1958. The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere. Aust. J. Agr. Res. 9: 778-781.
56. Sung, H.S., Yong,L., Shee, E. and W.Y. Nam. 2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids.J.Microbiol. Methods 44:89-95
57. Tang, W. H. 1994. Yield-increasing bacteria and biocontrol of sheath blight of rice. Organisation, Adelaide, Australia. 267-278.

58. Venkateswarlu, B., Rao, A. V., Raina, P.and N. Ahmad. 1984. Evaluation of Phosphate solubilization by microorganisms isolated from aridisols. J. Indian. Soc. Soil Sci. 32: 273-277.
59. Voisard, C., Keel, C., Hass, D. and G. Defago. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. EMBO. J. 8: 351-358.