دراسة العوامل المؤثرة في انتاج منظم النمو حامض الاندول خليك من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum*F2

Optimal conditions for production of Indole Acetic Acid (IAA) from local *Fusarium oxysporum* F2

عصام فاضل الجميلي ، نجوى شهاب احمد السامرائي

معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا- جامعة بغداد

Essam F. Al-Jumaily , Najwa S. A. Al-Samaraai

Biotechnology Dept. Genetic Engineering and Biotechnology Institute – Baghdad University

المستخلص:

أنتخبت العزلة المحلية(F_2) *Fusarium oxysporum* بكونها العزلة الاكثر انتاجاً لمنظم النمو IAA واستخدمت في هذه الدراسة . حددت الظروف المثلى لانتاج منظم النمو IAA من العزلة المنتجة باستخدام الوسط الزرعي المكون من سكروز 4.5% ومستخلص الخميرة 0.6% و 0.3 غرام من فوسفات احادي البوتاسيوم KH_2PO_4 و0.05 غرام كبريتات المغنسيوم $MgSO_4$ و3 ملي مولر تربتوفان وتلقيح الوسط بـ 1×10^6 بوغ / مللتر عند رقم هيدروجيني ابتدائي مقداره 8.5 بعد حضن لمدة 10 ايام في الظلام وعلى درجة حرارة(2 ± 28) م بالحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/ دقيقة .

Abstract :

The isolate *Fusarium oxysporum* F2 was selected based on its high production of growth regulator IAA and used in the present study. The optimal condition for the production of plant hormone (IAA) by using cultural medium composed of 4.5% sucrose, 0.6% yeast extract, 0.3g KH_2PO_4 , 0.05g $MgSO_4$, 3mM Tryptophane and optimum inocula size was 1×10^6 spore/ ml and the initial pH was 8.5 the incubation period was 10 day at 28^o C in dark by using shaker incubator at 120 rpm.

المقدمة :

يعد (IAA) من منظمات النمو الطبيعية التي تصنع من قبل النبات [1] متألفة من حلقة الاندول الاروماتية مع سلسلة جانبية من حامض الخليك $CH_3 - COOH$ [2] . وهناك دور رئيسي لحامض الاندول خليك (IAA) في المجال الزراعي كزيادة المحاصيل الزراعية والحصول على المحاصيل في غير موسمها ودورها في منع التزريع ومنع سقوط الاوراق والثمار [3] ، كما لها دور في المكافحة الاحيائية باستخدام الفطريات التي لها القابلية على انتاج (IAA) في مكافحة بعض الافات الزراعية الضارة [4] . للاوساط الزرعية ومكوناتها تأثيرا كبيراً في انتاج المواد الايضية (الانزيمات والمنظمات) وتبعاً لذلك استخدمت العديد من الاوساط الزرعية المختلفة لتنمية الاحياء المجهرية (البكتريا ، الفطريات) وانتاج المواد الايضية المختلفة فقد تكون الاوساط الزرعية المستخدمة طبيعية والتي تحتوي على مواد بروتينية من مصادر طبيعية منها فول الصويا ومحلول نقيع الذرة [5] ومنها مايكون تركيبياً (Synthetic) والذي يحتوي على مصادر كربونية ونتروجينية معينة لدعم النمو وانتاج المواد الايضية [6] . اشارت الدراسات المختلفة الى

ان فطريات *Fusarium* تنمو في مديات مختلفة من درجات الحرارة التي تتراوح بين(20 – 30) م وان درجة الحرارة المثلى للنمو هي 25 م [7] ، اذ اشار [8] الى ان انتاج منظم النمو IAA من الفطر *Ustilage esculenta* عند درجة حرارة 25 م اعطى اعلى انتاجية بلغت 1 مايكروغرام/ مللتر في الوسط الانتاجي بينما اعطت انتاجية اقل عند درجة حرارة 30 م وعلى الوسط الانتاجي نفسه ، واشار كلاً [4 ، 9] الى تنمية العزلة الفطرية *Fusarium* في درجة حرارة 28 م لانتاج منظم النمو IAA . أشارت معظم الدراسات التي اهتمت في انتاج منظم النمو IAA بأن الارقام الهيدروجينية للاوساط الزرعية تتراوح بين(4.5 – 6.5) اذ اوضح [10] بأن الرقم الهيدروجيني 4.5 قد اعطى اعلى انتاجية للمنظم النمو IAA عند انتاجيه من الفطر *Phanerochaeta chrysosporiuw* في الوسط الزرعي *Stock basal mineral* . بينما استخدم الرقم الهيدروجيني 6.5 في تنمية الفطر *Ustilago esculenta* لانتاج منظم النمو IAA [8] . اشار [11] الى استخدام الرقم الهيدروجيني 5 في وسط MMN لانتاج منظم النمو IAA من الفطريات . تهدف الدراسة الحالية الى انتاج حامض الاندول الخليك من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum* وتاثير الظروف المثلى على الانتاج .

المواد وطرائق العمل :

أستخدم الوسط الزرعي Glucose Mineral والحاوي على سكروز بتركيز 4.5% كمصدر للكاربون ومستخلص الخميرة بتركيز 0.6% كمصدر نايتروجيني وفق للدراسة [12] . اما بقية المكونات فقد تم تحديدها وفق الخطوات الاتية:-

- حضرالعالق البوغي للعزلات الفطرية وفقاً لما ذكره [13] ، اذ زرعت الفطريات على وسط PDA وحضنت بدرجة حرارة 28 م لمدة(3-5) ايام ، تم حساب عدد الابواغ بواسطة شريحة عد كريات الدم تحت قوه 40X بالمجهر الضوئي . بعد زرع الفطريات على وسط PDA تم وضع قطعة من النمو الفطري بقطر 7ملم في انبوبة حاوية 2مللتر محلول ملح فسلجي ثم مزج بالمازج وتم التخلص من الخيوط الفطرية والوسط الصلب بالترشيح وتم عدّ الابواغ بالطريقة السابقة [14] .

تحديد تركيز اللقاح الامثل للانتاج

نميت العزلة المنتخبة في وسط PDA وحضنت بدرجة 28م لمدة 10 ايام ثم اخذ قرص بقطر 7 ملم من نمو الفطر وحسبت عدد الابواغ في المللتر الواحد ، ثم حضر اللقاح الفطري بتراكيز مختلفة (4×10^6 ، 3×10^6 ، 2×10^6 ، 1×10^6، 5×10^5، 4×10^5 ، 2×10^5) بوغ /مللتر ولقح وسط الانتاج المنتخب باضافة 1 مللتر من كل تركيز وحضنت بدرجة 28م في الظلام لمدة 10 ايام ثم قدرت الانتاجية .

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل للانتاج

استخدم الوسط السائل المكون من (4.5غرام سكروز و0.6 غرام مستخلص الخميرة و0.3 غرام فوسفات البوتاسيوم (KH_2PO_4) و0.05 غرام كبريتات المغنيسيوم ($MgSO_4$) وسطاً لانتاج في هذه الدراسة ، اذ حضر الوسط بأرقام هيدروجينية مختلفة تراوحت ما بين 2-9 وبفارق نصف درجة من وسط لاخر لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج منظم النمو ولقحت الاوساط الزرعية بواقع (1×10^6 بوغ /مللتر) وحضنت بدرجة حرارة 28 م في الظلام لفترة 10 ايام وتم التقدير الكمي لانتاج IAA .

تعيين درجة الحرارة المثلى للانتاج

حضن وسط الانتاج المنتخب والملقح بالعزلة الفطرية المحلية المنتخبة بواقع (1×10^6 بوغ /مليلتر) بدرجات حرارية مختلفة شملت 25 و 28 و32 و35 م لتحديد درجة الحرارة المثلى للانتاج منظم النمو ولفترة 10 ايام في الظلام وتم التقدير الكمي لانتاج IAA .

تحديد زمن الحضن الامثل للانتاج

لقح وسط الانتاج بالعزلة المحلية *F. oxysporum* F2 بأضافة 1 مللتر لكل 50 مللتر من وسط الانتاج وبتركيز(1×10^6 بوغ /مللتر) وحضنت الاوساط الملقحة بدرجة بحرارة 28 م في الظلام لفترات زمنية مختلفة والتي شملت 5 و8 و10 و12 و15 يوم لتحديد زمن الحضن الامثل للانتاج IAA مع ثبات العوامل الاخرى .

تحديد التركيز الامثل لمادة التربتوفان Tryptophane لانتاج IAA

اختبرت تراكيز مختلفة من التربتوفان Tryptophane كمادة محفزة للانتاج IAA في وسط الانتاج وتضمنت (0 و 1 و 2 و 3 و 5 و 10 و 20 و 25) ملي مولار ولقحت الاوساط الزرعية بواقع (1×10^6 بوغ /مللتر) وحضنت الاوساط الملقحة بدرجة حرارة 28 م في الظلام لفترة 10 ايام وتم التقدير الكمي لانتاج IAA.اعتماداً على التقدير الكمي لانتاج حامض الاندول خليك IAA (Indole acetic acid) بأستخدام كاشف سالكاوسكي اللوني أذ اضيف 1 مليلتر من العالق البوغي (2×10^6 بوغ /مللتر) الى 50 مللتر من وسط PDB المضاف له 0.1 غرام من تربتوفان

Tryptophane كمادة محفزة لانتاج IAA و حضنت لمدة 10 ايام في حاضنة هزازة وبدرجة حرارة 28 م وبسرعة 120 دورة / دقيقة . أخذ 1مليلتر من الوسط الزرعي بعد ازالة الخيوط الفطرية ويضاف لها 2مللتر من الكاشف سالكاوسكي ليتم الكشف الكمي عن انتاج IAA ، بعدها ترك المزيج 30 دقيقة ليتم قراءة الامتصاصية على الطول الموجي 530 نانوميتر مع عمل مكرر لكل نموذج وتم تحديد العزلة الاكفأعلى الانتاج بالرجوع الى المنحنى القياسي حامض الاندول خليك [16,15] .

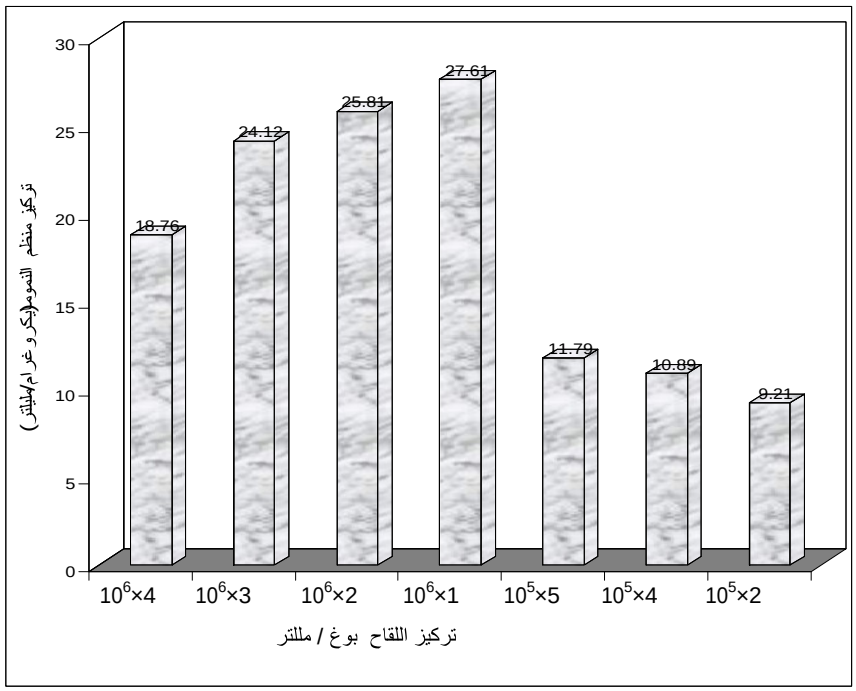
تقدير تركيز حامض الاندول خليك (منظم النمو) Indole Acetic Acid بالطريقة اللونية :

أتبعت طريقة [17] وذلك باستخدام كاشف سالكاوسكي لتقدير تركيزIAA من خلال المنحني القياسي وذلك باستخدام تراكيز من (IAA) القياسي وتراوحت (10-100) مايكروغرام /مللتر وتم قياس الامتصاصية عند الطول الموجي 530 نانوميتر .

-اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [18] لتقيد ابواغ الفطرللعزلة الفطرية المنتخبة *F. oxysporum* مع اجراء بعض التحويرات اذ تمت الاستعاضة عن مكعبات مادة الفلين Polyurethane faom المستخدمة في الطريقة اعلاه بقطع من مادة الاسفنج الصناعي بأبعاد (1سم × 1سم × 0.5 سم) كمادة ساندة اثناء عملية التقييد اذ عقمت قطع الاسفنج بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز 0.3% لمده 15 دقيقه ثم غسلت بالماء المقطرعده مرات للتخلص من بقايا القاصر ثم اضيف عالق الابواغ (1×10^6 بوغ/ مللتر) الى قطع الاسفنج وتركت لتتشبع بالعالق الكونيدي ، ثم اضيفت قطع الاسفنج المحملة بالكونيدات الى الوسط الزرعي وبالظروف المثلى نفسها ولمدة 10 ايام في الظلام بدون هزاز .

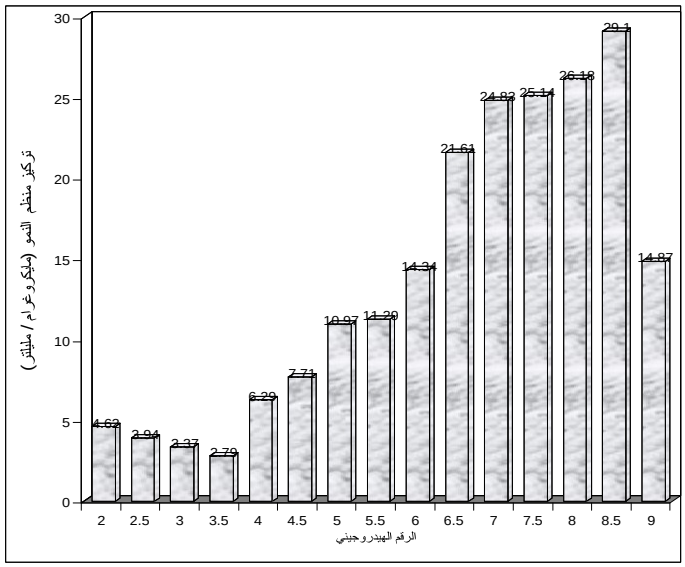
النتائج والمناقشة :

اظهرت النتائج (الشكل -1) بأن انتاجية العزلة المحلية F2 *F. oxysporum* من منظم النمو حامض الاندول الخليك تزداد مع انخفاض تركيز اللقاح الفطري بدأت من تركيز اللقاح1× 10^6 بوغ / مللتـــــر والتي بلغت عنده الانتاجية 27.61 مايكروغرام / مللتر ووصولاً الى التركيز 4×10^6 بوغ / مللتر والذي وصـــــلت عنده الانتاجية اوطئ درجاتها أذ بلغت عندها الانتاجية 18.76 مايكروغرام / مللتر ، ثم بدات الانتاجية بانخفاض ملحوظ عند تركيز اللقاح (2× 10^5 و4× 10^5 و5× 10^5) بوغ / مللتر إذ بلغت حوالي (9.21 و10.89 و 11.79 مايكروغرام / مللتر) على التوالي لذا استخدم تركيز اللقاح (1× 10^6 بوغ / مللتر) في التجارب اللاحقة .



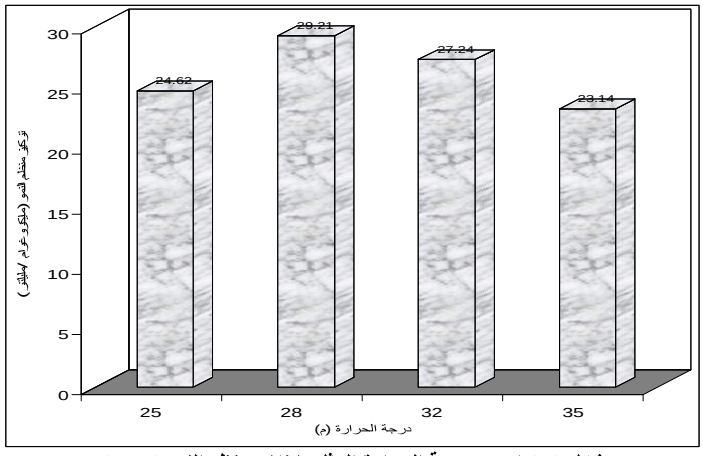
شكل (1) تحديد تركيز اللقاح الامثل في انتاج منظم النمو (IAA) من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum* (F2)

اختبرت قابلية العزلة المحلية (F2) *Fusarium oxysporum* على انتاج منظم النمو(IAA) بأستخدام وسط الانتاج (4.5غرام سكروز و0.6 غرام مستخلص الخميرة و0.3 غرام فوسفـات ثنائي البوتاسيوم (KH_2PO_4) و0.05 غرام كبريتات المغنـيسيوم ($MgSO_4$) بأرقام هيدروجينية تراوحت بين 2-9 وبفارق نصف درجة بين قراءة و اخرى ، اظهرت النتائج المبينة في الشكل (2) انخفاض انتاج منظم النمو(IAA) عند الاوساط الزرعية ذات الارقام الهيدروجينية الحامضية اذ بلغت عند الرقم الهيدروجيني (2 و 3 و 4) حوالي (4.62 و3.37 و6.29) مايكروغرام / مللتر على التوالي وأزدادت الانتاجية مع ارتفاع قيم الارقام الهيدروجينية للوسط الانتاجي وصولاً الى الارقام الهيدروجينية المتعادلة و القاعدية اذ بلغت الانتاجية عند الرقم الهيدروجيني 8.5 حوالي 29.1 مايكروغرام / مللتر وانخفضت الانتاجية عند الرقم الهيدروجيني 9 وكانت الانتاجية حوالي 14.87 مايكروغرام / مللتر.



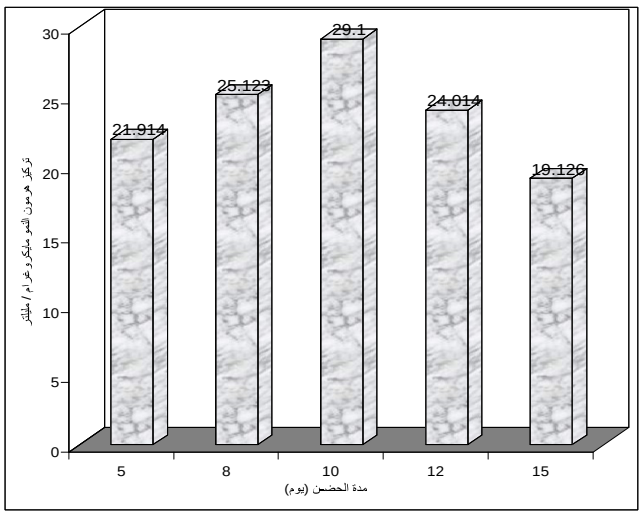
شكل (2) تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل في انتاج منظم النمو(IAA) من العزلة المحلية (F2) *Fusarium oxysporum*

نميت العزلة المحلية المنتخبة (F2) *Fusarium oxysporum* على درجات حرارة مختلفة تضمنت (25و28و32 و35) م لانتاج منظم النمو(IAA) واظهرت النتائج المبينة في الشكل (3) ان اعلى انتاجية لمنظم النمو كانت عند درجة حرارة 28 م اذ بلغت الانتاجية 29.21 مايكروغرام / مللتر و انخفضت الانتاجية عند زيادة درجة الحرارة اذ بلغت الانتاجية عند درجة الحرارة 35 م حوالي 23.14 مايكروغرام / مللتر اما بقية الدرجات الحرارية (25 و32) م فقد كانت الانتاجية 24.62 و 27.24 مايكروغرام / ميلتر على التوالي وهذا يتفق مع ما اشارت اليه العديد من الدراسات حول استخدام درجة الحرارة 28 م لتنمية العزلات الفطرية اثناء انتاج منظم النمو(IAA) [19 ، 4] . وقد اشار[20] الى انتاج منظم النمو من العزلات الفطرية *Fusarium oxysporum* و *Aspergillus brassiciola* عند تنميتها على درجة حرارة 25 م . وقد يعود سبب عدم ملائمة درجات الحرارة العالية لنمو الفطر وانتاج منظم النمو الى هو ان درجة الحرارة لها تأثير مهما في انتاج الانزيمات من خلال تأثيره في اذابة الاوكسجين بالوسط الزرعي وتأثيرها على الطاقة الحركية للجزيئات وسرعة التفاعلات الانزيمية في الخلية أذ ينعكس ذلك سلبا او ايجابا (حسب العزلة المنتخبة) في انتاج (IAA) الذي يصنع بعد سلسلة من التفاعلات الانزيمية [14].



شكل (3) تعيين درجة الحرارة المثلى لانتاج منظم النمو(IAA)
من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum* (F2)

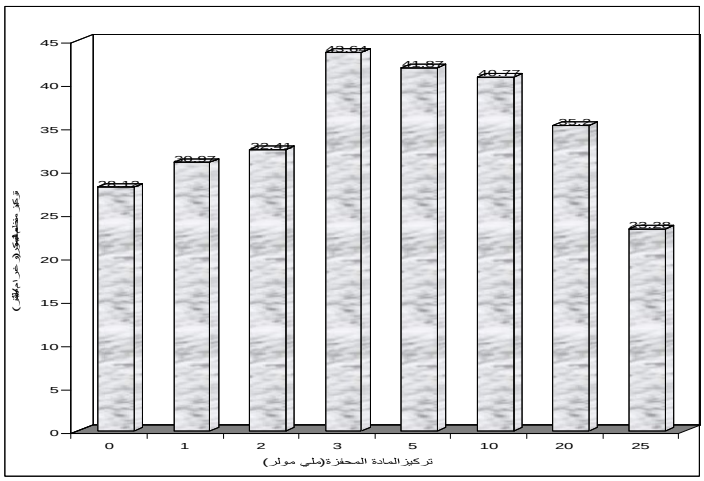
تم متابعة انتاج منظم النمو من العزلة المحلية (F2) *Fusarium oxysporum* من خلال تنمية العزلة وحضنها بفترات زمنية مختلفة (5 – 15 يوم) وقد ظهرت النتائج المبينة في الشكل (4) ان هناك زيادة متدرجة في انتاج منظم النمو (IAA) بزيادة مدة الحضن اذ وصلت اقصاها عند مدة حضن (10) ايام والتي بلغت عندها الانتاجية (29. 1 مايكروغرام / مللتر) بعدها انخفضت الانتاجية بزيادة مدة الحضن الى ان وصلت الى 19.12 مايكروغرام / مللتر بعد مدة حضن 15 يوم .



شكل (4): تعيين مدة الحضن الامثل لانتاج منظم النمو (IAA)
من العزلة المحلية *Fusarium oxysporum* (F2)

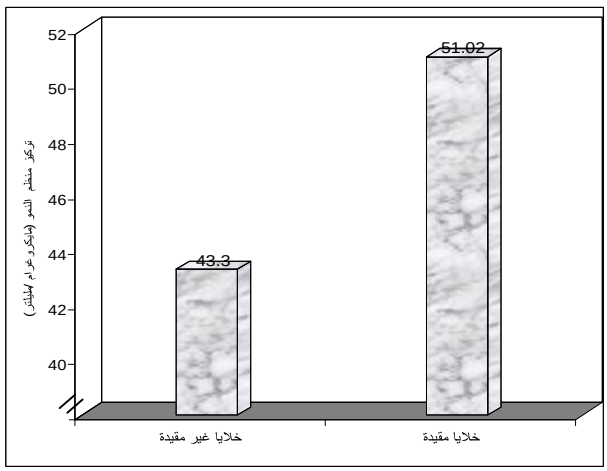
اشار[19] الى انخفاض تركيز (IAA) بعد مرور 60 ساعة من نمو الفطر *Colletrichum* وذلك بسبب تحول منظم النمو (IAA) الى Tryptophol من قبل الفطر وبالتالي يقل تركيزة في الوسط ، او قد يعود الى نفاذ المادة الغذائية من الوسط الزرعي او ربما يدخل الفطر في طور الثبات ثم طور الموت اذ تتحلل الخلايا وتطلق مجموعة من المركبات التي تؤثر في فعالية الانزيمات المسؤولة عن تصنيع (IAA) وهذا يفسر انخفاض انتاجية (IAA) بعد 10 ايام من الحضن . إذ اشار [16] الى ان بكتريا *Pseudomonas putida* تستخدم IAA كمصدر كاربوني ويتحرر النايتروجين منها عند تنميتها على اوساط غير حاوية على المصدرين وحاوية على IAA . اظهرت النتائج المبينة في الشكل (5) زيادة انتاجية منظم النمو (IAA) عند تركيز3 ملي مولار/ تربتوفان مادة محفزة ، اذ بلغت الانتاجية 43.64مايكروغرام / مللتر . وكانت هناك زيادة تدريجية في انتاج منظم النمو وزيادة تركيز المادة المحفزة تربتوفان Tryptophane ثم بدأت بالانخفاض عند زيادة تركيز المادة المحفزة . اشار [19] ان تركيز 5ملي مولار من المادة المحفزة تربتوفان هو الافضل في انتاج منظم النمو (IAA) عندما استخدمت تراكيز مختلفة منه (0 و 1 و 2 و5) ملي مولار عند تنمية العزلة الفطرية *Colletotrichum glucose porides* لغرض انتاج منظم النمو . بينما وجد

[21] ان انتاج (IAA) من بكتريا *Pseudomonas putidae* تزداد حوالي 12 مرة عند اضافة 5ملي مولار من المادة المحفزة تربتوفان وتزداد الانتاجية 37 مرة من بكتريا *Enterobacter cloacae* عند اضافة نفس الكمية من التربتوفان . ووجد أن افضل تركيز للمادة المحفزة التربتوفان لزيادة انتاج (IAA) كان 5 مايكروغرام / مللتربالمقارنة مع سلسلة من التراكيز المختلفة و التي اضيفت الى وسط نمو العزلات , *Azotobacter pseudomonas fluoresence* [22] . اشار [23] ان الحامض الاميني التربتوفان هو المادة الاساس التي يبنى منها منظم النمو IAA وهذا يفسر زيادة انتاجية IAA في الوسط الزرعي الحاوي على التربتوفان بالمقارنة مع الوسط الخالي منه بحوالي 1.672 مرة . في الدراسه الحاليه .



شكل (5): تحديد تركيز المادة المحفزة تربتوفان Tryptophane المثلى في انتاج منظم النمو (IAA) من العزلة المحلية (F2) *Fusarium oxysporum*

أظهرت النتائج المبينة في الشكل (6) زيادة انتاجية منظم النمو (IAA) عند تقييد الكونيدات الفطرية وعند تركيز(1×10^6) بوغ / مللتر بعد مرور 10 ايام من الحضن وبدرجة حرارة 28 م وبدون استخدام الحاضنة الهزاز اذ بلغت الانتاجية لمنظم النمو (IAA) حوالي 51.02 مايكروغرام / مللتر بالمقارنة مع الخلايا غير المقيدة والتي بلغت الانتاجية عندها 43.30 مايكروغرام / مللتر وجاءت النتائج مطابقة الى ما توصل اليه [24] بالحصول على زيادة في انتاجية (IAA) والتي بلغت 76.07مايكروغرام / مللتر للخلايا المقيدة بقطع الفلين Polyurethane بالمقارنة مع الخلايا غير المقيدة والتي بلغت الانتاجية فيها حوالي 55.91 مايكروغرام / مللتر وان سبب الانتاجية العالية بأستعمال هذه الطريقة (المحورة) هو تحديد حركة الكونيدات داخل الوسط بوجود مواد ساندة و التي تعمل على امتزاز الكونيدات على سطوحها الداخلية و التي ستعمل على اقتناص الكونيدات و تحديد حركتها و بالتالي ضمان وصول المواد الغذائية بشكل كامل وكافي للكونيدات مما سيعطي انتاجية عالية [14] ، وهذا يفسر زيادة انتاجية IAA في الوسط الزرعي ذو الخلايا المقيدة بالمقارنة مع الوسط الزرعي ذو الخلايا غير المقيدة منه بحوالي 1.128 مرة في الدراسه الحاليه.



شكل (6): تقييد الكونيدات الفطرية بواسطة قطع من الاسفنج المصنع محليا في انتاج منظم النمو (IAA) من العزلة المحلية (F2) *Fusarium oxysporum*

المصادر :

1. Davies,P.J.(1995): Plant Hormones :Physiology. Biochemist and Mol Biol. Dordrecht :Kluwer.
2. 2.Cohen,J.D. and Bandurski, R.S.(1982) : Chemistry and physiology of the bound Auxin. Annial, Review of plant physiology 33:403-454.
3. Richard , D. F. and Clive , G. J. (2004): The Evolution of Plant Biochemistry and the implications for physiology. In " The Evolution of plant Physiology" A. R. Hemsley , and I. Poole , Eds. The Linnaean society of London . Ch.4 . pp. 68-83 .
4. Cohen,B.A.; Amsellem,Z.; Maor,R.; Sharon,A. and Gressel,J.(2002): Transgenically Enhanced Expression of indole-3- acetic acid confers by per virulence to plant pat hogens .Phytopathology 92:590-596.
5. Aunstrup,; Anderson ,O.;Falch,E.A. and Nielson, T.K.(1979): Production of microbial enzyme . In Microbial Technology ,Ed. Rose ,A.H. Academic Press .Inc. New York.
6. Mashaly ,R. I. ; Ramadan , B. I. ; Tahovn, M. K. and Ismail . A. A. (1981) :Milk clotting protease from *Mucor Mucedo* .Factors effecting enzyme production . Quoted From FSTA-(14):1130.
7. Roy,K.W.(1997): *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of caused a gents of sudden death syndrome and identity and velerance of *F.solani* from B . Plant Dis . 81:255-266.
8. Chung,K.R.and Tzeng,D.D.(2004):Biosynthesis of Indole 3-Acetic Acid by the gall-inducing fungus *Ustilago esculenta*. J.Biol Sciences.4:744- 750.
9. Hasan,H.(2002): Gibberellin and Auxin production by plant root fungi and their biosynthesis under Salinity-calcium interaction .Rostlinna vyrobh 48(3):101-106.
10. Unyayar,S.(2002):Changes in abscisic acid and Indole 3-Acetic Acid concentration in *funalia trogii* (Berk) Bondortser,singer and phanerochaete chrysosporium Burds.ME 446 subjected to salt strss.Turk .J.Bot . 27:1-4.
11. Ek,M.,lyungauist,P.O. and stenstrom,E.(1983): Indole-3-a acetic acid production by *mycorrhiza* fungi determined by gas chromatography mass spectrometry. New phyto. l94:401-407.
12. السامرائي ، نجوى شهاب أحمد. (2006) : استخلاص وتنقية منظم النمو حامض الاندول خليك المنتج من العزلة المحلية *F. oxysporum* F2 ودراسة الظروف المثلى للانتاج . رسالة ماجستير . معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا .جامعة بغداد.
13. Norris ,H.A. Elewski, B.E. and Ghannoum,M.A. (1999): Optimal growth condition for the determination of the anti fungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a micro dilution method . J. Amer. Acad. Dermatal.. 40(60):509-513.
14. الخفاجي،زهرة محمود (1990):التقنية الحيوية.مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر،جامعة بغداد.
15. Glickmann, E.,and Dessaux,Y.(1995): A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria-applied and environmental microbiology 61:793-796.
16. Leveau,J.H. and Lindow,S.E.(2005): Utilization of the plant hormone indole -3 acetic a cid for growth by *pseudomonas sputida* strain 1290.Applied and environmental microbiology 11 : 2365-2371.
17. Gordon,S.A.and Weber,R.P.(1950): colorimetric estimation of indole acetic a cid. Plant physiology 26:192-195.
18. Unyayar , S. and Ali,U. (2000): Production of auxin and abscisis acid by phanerochaeta chrysosporium ME446 immobilized on poly urethane foam . Turk. J. Biol. 24:769-774.
19. Robinson,M.;Riov,J.; and Sharon,A.(1998): Indole-3 –acetic acid biosynthesis in *colletotrichum gloeosporioides f.sp.aezschynomene*. Applied and Environmental Microbiology 64:5030-5032.
20. Somers,E.,ptacek,D.,Gysegom,P.,Srinivasan, M. and Vanderlegden, J.(2005): *Azopirillum brasilense* produces the auxin- like phenyacelic acid by using the key

enzyme for indole-3-a acetic a cid biosynthesis. Applied and environmental microbiology,71:1803-1810.
21. Patten,C.L.and Glick,B.R.(1998): Isolation and characterization of indole acetic acid bio synthesis genes from plant growth –promoting Bacteria .Plant Physiology 24:124-129.
22. Ahmad , F.,Ahmad,I. and Khan, M.S. (2005): Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *zotobacter* and Fluorescent *pseudomonas* in the presence and a bsence of tryptophane Turk J Biol. 29:29-34.
23. Bialek.K.; Michalczuk.L. and Cohen,J.D.(1992): Auxin biosynthesis during seed germination in *phaseolus Vulgaris.* Plant Physiol.100:507-517.
24. Unyayar , S. and Ali,U. (2000): Production of auxin and abscisis acid by phanerochaeta chrysosporium ME446 immobilized on poly urethane foam . Turk. J. Biol. 24:769-774.