مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

شناسایی باکتری‌های اندوفیت گیاه برنج رقم چمپا و بررسی تاثیر آن‌ها بر خصوصیات رشد گیاه میزبان

سیدمنصور سیدنژاد[1*]، حسین معتمدی[2,3]، آسیه سلیمانی[4]

[1] استاد بخش فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

[2] استاد بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

[3] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی ،دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

[4] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰٤/۲۹

چکیده

اندوفیت‌های آپوپلاست یا سیم‌پلاست گیاهان موجب تحریک رشد گیاه، افزایش مقاومت به آفات و تنش‌ها و بهبود شرایط رشدی گیاه می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر شناسایی اندوفیت‌های موجود در شش رقم برنج استان خوزستان و بررسی تاثیر آن‌ها در خصوصیات رشد گیاه میزبان می‌باشد. برای این منظور سوسپانسیونی از بذرهای استریل شده تهیه و با تلقیح به محیط LB اندوفیت‌های موجود در آن‌ها جداسازی و تعیین هویت شدند. توانایی این جدایه‌ها در تثبیت ازت، تولید اکسین و حل کردن فسفات سنجیده شد. اثر تیمار بذرهای رقم چمپا با اندوفیت‌های جداسازی شده از آن بر شاخص‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک ارزیابی شد. در نتیجه این تحقیق هفت اندوفیت از جنس‌های باسیلوس، استافیلوکوکوس و اروینیا از شش رقم برنج جداسازی شد. باکتری اروینیا قادر به تثبیت نیتروژن و انحلال فسفات و بیشترین تولید اکسین بود. تیمار گیاه با اروینیا به طور معنی‌داری موجب افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، طول اندام هوایی و افزایش تراکم تارهای کشنده گردید. همچنین میزان اکسین اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان داد. تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در میزان کلروفیل a و همچنین کلروفیل b مشاهده نشد و تیمار فاقد اندوفیت میزان کلروفیل a و کلروفیل b بیشتری نسبت به تیمارهای دارای اندوفیت تولید کرده بودند. در حالی‌که تیمار فاقد اندوفیت بیشترین میزان کاروتنوئید را نسبت به سایر تیمارها تولید کرد. در نهایت می‌توان بر اساس نتایج این تحقیق پیشنهاد داد که باکتری اروینیا به عنوان یک اندوفیت تاثیر قابل توجهی در افزایش عملکرد گیاه برنج رقم چمپا دارد و باعث بهبود خصوصیات اساسی این گیاه می‌شود.

واژه های کلیدی: *اندوفیت، اکسین، برنج چمپا، پروتئین، رنگدانه، کربوهیدرات.*

---

* نویسنده مسئول: **سیدمنصور سیدنژاد** تلفن: ۰۹۱٦۳۱۳۰۸۳٦ Email:sm.seyyednejad@gmail.com

مقدمه

باکتری‌های محرک رشد گیاه (Plant growth promoting bacteria: PGFR) گروه وسیعی از باکتری‌هایی هستند که در ریزوسفر گیاهان حضور دارند و از راه‌های مختلف سبب افزایش و تحریک رشد گیاه می‌شوند. گروهی از این‌ها به نام اندوفیت‌ها وارد گیاه می‌شوند (Rosenblueth and Martinez- Romero, 2006). این میکروارگانیسم‌ها بدون ایجاد آسیب-های ظاهری و آشکار، در فضای آپوپلاست یا سیم پلاست گیاهان رشد می‌کنند (Gimenz *et al*., 2007). باکتری‌های همزیست فوق فواید مختلفی از قبیل افزایش مقاومت به تنش‌ها و بهبود شرایط رشدی گیاه را بوجود می‌آورند (Hallmann *et al*., 1997). این رابطه زندگی متعادلی را بین گیاه و اندوفیت فراهم می‌کند ولی اگر شرایط محیطی به گونه‌ای به نفع اندوفیت تغییر کند، اندوفیت حالت پاتوژن به خود گرفته و وضعیت تعادل به هم می خورد (Aly *et al*., 2010). باکتری‌های اندوفیت بر خلاف باکتری-های موجود در ریزوسفر به دلیل سکونت در بافت گیاه میزبان در برابر عوامل تنش‌زای زیستی و غیر زیستی مورد حمایت قرار می گیرند (Rosenblueth and Martinez- Romero, 2006). البته تنوع باکتری‌های اندوفیت بسیار کمتر از باکتری‌های ریزوسفر می‌باشد (Mano and Morisaki, 2008). اندوفیت‌ها به واسطه تولید ترکیبات آلکالوئیدی و نیز ترکیبات ضدباکتریایی می‌توانند موجب تحریک رشد گیاه و افزایش میزان محصول (Gao *et al*., 2010، Rosenblueth and Martinez- Romero, 2006 ; Gimenz *et al*., 2007)، افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌ها به دلیل مواد طبیعی تولیدی توسط اندوفیت‌ها (Rasmussen *et al*., 2008; Varma *et al*., 2003) مقابله با عوامل بیماری‌زا و آفات گیاه (Hinsvark *et al*., 1953; Gao *et al*., 2010) شوند. قابلیت تحریک رشد گیاه میزبان از دو طریق توسط اندوفیت‌ها امکان‌پذیر است. این باکتری‌ها از طریق افزایش قابلیت دسترسی گیاه میزبان به منابع غذایی(Gao *et al*., 2010)، تثبیت نیتروژن، انحلال برخی عناصر ضروری غیرقابل دسترس برای میزبان مثل فسفات (Rosenblueth and Martinez- Romero, 2006) و یا تولید سیدروفورها به منظور بالاتر بردن جذب آهن عمل می‌کنند. از سوی دیگر قادر به تولید برخی فیتوهورمون‌ها به ویژه اکسین هستند (Rodrigues *et al*., 2000) و به این صورت موجب تحریک رشد گیاه همزیست می‌شوند. اندوفیت‌های تثبیت کننده نیتروژن بخش کوچکی از کل جمعیت اندوفیت‌ها را تشکیل می‌دهند و افزایش جمعیت آن‌ها در گیاهان جهت تثبیت نیتروژن مورد توجه قرار گرفته است. در گیاه برنج اندوفیت‌های تثبیت کننده نیتروژن در بذر، ساقه و ریشه برخی از ارقام برنج یافت شده است (Mano and Morisaki, 2008). باکتری‌های حل کننده فسفات

از طریق تولید اسیدهای آلی گوناگون فسفات غیر محلول را به شکل محلول تبدیل می‌کنند (Kim *et al*., 1998)؛ به همین دلیل از این باکتری‌ها به عنوان کودهای زیستی استفاده می‌شود (Mehta and Nautiyal, 2001). تحقیقات نشان داده است که تلقیح بذرهای برنج با باکتری‌های حل کننده فسفات سبب افزایش غلظت فسفات، طول ریشه و وزن خشک اندام هوایی این گیاه شده است (Amou Aghaee and Mostaajeran, 2007).

اندوفیت ها با تولید هورمون‌های گیاهی محرک رشد مثل ایندول استیک اسید و یا ممانعت از تولید هورمون‌های گیاهی ممانعت کننده از رشد مثل اتیلن موجب رشد گیاه میزبان می‌شوند (Vessey, 2003). اثبات شده است که باکتری‌های ریزوسفر و همزیست با گیاهان نسبت به سایر باکتری‌ها تمایل بیشتری برای تولید اکسین نشان می‌دهند که علت عمده‌ی آن ترشح سوبسترای مناسب این هورمون‌ها از ریشه گیاه میزبان می‌باشد (Shahab *et al*., 2009). حتی برخی از باکتری‌ها قادر به تولید چندین نوع هورمون در گیاه میزبان هستند (Feng *et al*., 2006). در مطالعات نشان داده شده است که اندوفیت‌ها اثرات مستقیمی بر خصوصیات مورفولوژیک گیاه میزبان دارند؛ از جمله موجب افزایش وزن ریشه، طول ریشه، میزان تار کشنده، توسعه و رشد ساقه (Vessey, 2003)، اشغال نیج اکولوژیکی، برقراری رابطه فوق انگلی و مقاومت گیاه در برابر پاتوژن‌ها به طور مستقیم (با تولید آنتی بیوتیک‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، ترکیبات آروماتیک، پلی پپتیدی و تولید آنزیم‌های لیزکننده پاتوژن‌ها) و غیر مستقیم (از طریق تحریک گیاه برای سنتز متابولیت‌های دارای خاصیت ضد پاتوژنی) می‌شوند (Gao *et al*., 2010). تاکنون اکثر مطالعات روی اندوفیت‌ها بیشتر بر روی گیاهان مناطق معتدل متمرکز شده است. مطالعاتی که روی گیاهان گرمسیری انجام شده نشان‌داده است که اندوفیت‌های این گیاهان نسبت به مناطق معتدل غنی‌تر هستند اما نسبت به میزبان خود کمتر اختصاصی عمل می‌کنند (Gimenez *et al*., 2007). در حال حاضر محققین در تلاش هستند اندوفیت‌هایی را شناسایی کنند که علاوه بر سازگار بودن با گیاه مورد نظر بتوانند برتری‌های زیستی نظیر مقاومت به پاتوژنها یا افزایش قابلیت جذب نیتروژن و فسفر را باعث شوند. به این ترتیب میزان استفاده از سموم و کودهای شیمیایی که مصرف آن‌ها با اشکالاتی همراه است کاهش خواهد یافت. استان خوزستان یکی از مناطق گرمسیری است که رقم‌های مختلف برنج در آن کشت می‌شود. هدف از مطالعه حاضر شناسایی اندوفیت‌های موجود در شش رقم برنج استان خوزستان و بررسی تاثیر آن‌ها در خصوصیات رشد برنج رقم چمپا می‌باشد. رقم چمپا از ارقام کیفی استان خوزستان می باشد و عمدتا در نواحی کوهستانی و شمال شرقی استان به روش کشت نشایی کشت می‌شود. این رقم از نظر مورفولوژیکی از ارقام پا بلند و کم سنبله می باشد

و از کودپذیری کم برخوردار است و از نظر طول دانه جزء ارقام دانه متوسط می باشد و هر ساله در سطح ۸۰۰۰– ۷۵۰۰ هکتار کشت می‌شود.

مواد و روش ها

شش رقم برنج موجود در خوزستان شامل چمپا، عنبوری قرمز، دانیال، هویزه، حمر و گرده رامهرمز از بخش تحقیقات برنج مرکز تحقیقات کشاورزی استان خوزستان تهیه و. سلامت بذرها توسط مرکز فوق تایید شد. به منظور جداسازی اندوفیت‌ها ابتدا استریلیزاسیون سطح بذرها به روش زیر انجام شد. شلتوک برنج به گونه‌ای که به جنین آن آسیبی نرسد جداسازی شد. پس بذرها ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده و چند مرتبه با آب مقطر استریل شستشو و در مرحله بعد بذرها ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد غوطه‌ور شدند. سه مرتبه شستشوی بذرها با آب مقطر استریل انجام و آب حاصل از شستشوی سوم جمع آوری شد. بذرها داخل هاون چینی استریل خرد شده (Bric *et al*., 1991; Rasmusse*n et al*., 2008) و در محیط کشت مایع لوریا برتانی (LB) تلقیح شد. همزمان از آب حاصل از مرحله سوم شستشو نیز روی محیط LB آگار کشت تهیه شد. هر دو محیط کشت پنج شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از انکوباسیون و منفی شدن رشد باکتری در محیط کشت جامد، از باکتری‌های رشد کرده در محیط مایع LB روی محیط جامد نوترنیت آگار کشت انجام شد و مجددا انکوباسیون صورت گرفت (Feng *et al*., 2006). باکتری‌های رشد کرده روی محیط نوتریت آگار خالص سازی شدند و با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی اسپور، شکل کلنی، رنگ کلنی، خصوصیات سطحی کلنی، تست کاتالاز، تست اکسیداز، تست اسنات، واکنش های بیوشیمیایی شامل تست O/F، تست اوره‌آز، تست سیترات، احیاء نیترات، تست TSI، تولید اندول، حرکت، هیدرولیز ژلاتین، تولید اسید از قندها، رشد در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، رشد در نمک NaCl ۱۰ درصد ، همولیز و رشد در محیط مک-کانکی آگار و طبق جداول استاندارد ارائه شده در کتاب طبقه‌بندی باکتری‌های برجی شناسایی و تعیین هویت گردیدند. به منظور بررسی توانمندی باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده تست‌های زیر انجام شد (Garrity *et al*., 2005).

الف– تثبیت ازت: برای این منظور از روش تغییر داده شده Dobereiner *et al*. (1972) و محیط کشت فاقد نیتروژن Dobereiner استفاده شد. اندوفیت‌های خالص شده در این محیط تلقیح و به مدت ٤٨–٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در صورت رشد باکتری-ها در این محیط و داشتن فعالیت اسیدی، رنگ محیط از سبز به زرد تغییر خواهد کرد.

ب– تولید هورمون اکسین: برای این منظور از روش Bric *et al*., 1991 و معرف سالکوفکی استفاده شد. باکتری‌ها در محیط LBT (L-

tryptophan Luria –Beetani) کشت داده شدند (Bric *et al*., 1991)؛ به این صورت که پس از رشد باکتری در محیط LB مایع و رسیدن به غلظت ۵×۱۰^{۸} CFU/ml، پنج میکرولیتر از محیط کشت در مرکز پلیت LBT قرار داده شد و کاغذ نیتروسلولز استریل بر آن قرار داده شد. پلیت‌ها تا رسیدن قطر کلنی‌ها به ۲ میلی‌متر انکوبه شدند. سپس کاغذ نیتروسلولز برداشته و با معرف سالکوفسکی آغشته شد. ایجاد هاله صورتی نشان‌دهنده تولید اکسین است که شدت رنگ با میزان تولید ارتباط مستقیم دارد (Rajaee *et al*., 2007). سنجش کمی اکسین نیز با استفاده از واکنش یک میلی لیتر مایع رویی کشت ۱٤٤ ساعته باکتری در محیط LBT با ۲ میلی لیتر معرف سالکوفسکی و اندازه گیری جذب آن در ۵۳۰ نانومتر انجام شد (Bric *et al*., 1991).

ج- حل کردن فسفات: از محیط کشت Seperb با pH = ۷/۲ که دارای فسفات کلسیم به عنوان منبع فسفات معدنی غیر محلول است برای این تست استفاده شد. توانایی رشد باکتری و ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی نشان‌دهنده توانایی انحلال فسفات کلسیم توسط باکتری است (Teimouri *et al*., 2004). پس از شناسایی باکتری‌های اندوفیت و بررسی توانمندی‌های آن-ها، با توجه به نتایج بدست آمده برنج رقم چمپا که دارای دو نوع اندوفیت توانمند بود جهت بررسی تاثیر اندوفیت‌ها بر بذرها و خصوصیات رشدی آن انتخاب شد. برای این هدف مراحل زیر انجام شد:

الف- آماده‌سازی بذر برنج چمپا با باکتری‌های اندوفیت. در ابتدا استریلیزاسیون کامل بذرها با روش تغییر یافته‌ای از روش‌های ارائه شده توسط Feng *et al*. (2006) و Varma *et al*., (2003) انجام شد. شلتوک برنج بدون آسیب رساندن به جنین پوست کنی شد و بذرها ٤۸ ساعت در آب دیونیزه قرار گرفتند و سپس ۵ دقیقه در اتانول ۷۵ درصد و ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۲ درصد $HgCl_2$ تیمار شدند. در ادامه بذرها ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد قرار گرفتند و نهایتا با آب دیونیزه استریل شش مرتبه شستشو انجام شد (Varma *et al*., 2003; Feng *et al*., 2006).

ب-تیمار بذرهای استریل با اندوفیت ها. سه ارلن حاوی محیط مایع LB آماده شد و هر کدام از دو اندوفیت جدا شده از برنج رقم چمپا در ارلن‌های مجزا و در ارلن سوم به صورت مخلوط تلقیح شدند. محیط‌های کشت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به غلظت $۱/۵\times ۱۰^{۷}$ CFU/ml انکوبه شدند. بذرهای استریل شده چهار قسمت شدند و در هر کدام از ارلن‌ها یک قسمت تلقیح شد. در یک ارلن هم بذرهای رقم چمپا بدون حضور باکتری تلقیح شد.

ج- کشت بذرها. بذرهای تیمار شده در محیط کشت گیاهی استریل RCV کشت داده شدند. این محیط در لوله های ۲۵۰× ۲۰۰ میلی-متری به میزان ۳۰ میلی‌لیتر توزیع و اتوکلاو شد. بذرهای تیمار شده در مرحله قبل به این لوله‌ها تلقیح شد. تعداد بذر در هر لوله و نیز تعداد تکرار کشت در هر بخش بسته به مدت زمان کشت و میزان نمونه مورد نیاز انتخاب شد (Feng *et al*., 2006).

د- بررسی خصوصیات رشد گیاه. صفات مورفووژیکی و فیزیولوژی گیاه برنج چمپا پس از کشت بذرها در لوله آزمایش به شرح زیر اندازه گیری شد: برای تعیین وزن خشک و تر اندام هوایی و زمینی بیست عدد گیاهچه ۲۱ روزه استفاده و جهت خشک کردن اندام‌های هوایی و زمینی نمونه‌ها ۳-۲ روز در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. به منظور اندازه‌گیری طول اندام هوایی و ریشه از ۲۰ نهال ۲۱ روزه در این مرحله استفاده شد و میانگین طول اندام هوایی و ریشه این نمونه‌ها ثبت شد. نمونه‌های گیاهی در ٤ تیمار به مدت ٦ روز در ۳٤-۳۲ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از این زمان ۱ گرم از نمونه تر انتخاب و ۱۵ میلی لیتر دی‌اتیل اتر به آن اضافه شد. نمونه‌ها در ظرف شیشه‌ای کاملا استریل و در دمای ۲ درجه سانتی-گراد به مدت ٤ روز نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی از محلول جداسازی شدند و جهت استخراج کامل اکسین، نمونه‌های باقی مانده روی کاغذ صافی با دو مرتبه تکرار با ۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر شستشو و مایع حاصل از فیلتراسیون قبلی اضافه شد. مایع حاصل از فیلتراسیون جهت تبخیر دی‌اتیل اتر مدت کوتاهی در بن ماری قرار داده شد تا حجم محلول‌ها به یک میلی‌لیتر رسید. پس به نسبت ۱ به ۲ با معرف سالکوفسکی مخلوط، ۲۰ دقیقه در ۵۰-٤۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و میزان اکسین با استفاده از قرائت جذب در ۵۳۰ نانومتر با استفاده از معادله استاندارد اکسین محاسبه شد (Thimann and Skoog, 1940; Abrishamchi, 2007).

اندازه گیری میزان پروتئین های کل سیتوپلاسمی

برگ‌های فریز شده به نسبت ۰/۱ گرم با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (۷/٤ = pH) در هاون چینی همگن شدند. پس از سانتریفیوژ (۱۵۰۰ rpm، ٤ °C) محلول شفاف رویی جهت سنجش پروتئین برداشت شد. سنجش پروتئین با استفاده از روش تغییر یافته لوری انجام شد (Lowry *et al*., 1951). به دلیل این‌که میزان پروتئین سنتز شده در گیاه رشد کرده در شرایط آزمایشگاه نسبت به نمونه‌های مزرعه کمتر است، از عصاره بدست آمده در مرحله قبل بدون رقیق‌سازی جهت سنجش پروتئین استفاده شد. نمونه‌ها در ۳ تکرار اندازه‌گیری شدند.

اندازه گیری میزان کل قند محلول در بافت گیاه

میزان ۰/۱ گرم برگ خشک برنج با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ مخلوط و به مدت ۵۰ ثانیه ورتکس شد. سپس در rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی به منظور سنجش میزان قند برداشت گردید. این فرآیند سه بار تکرار شد. سنجش میزان قند محلول با استفاده از روش فنل – اسید سولفوریک انجام شد. در این روش به دو میلی‌لیتر عصاره بدست آمده ۱ یک میلی لیتر فنل ۵ درصد افزوده شد و سپس ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه جذب نمونه در طول موج ٤۸۵ نانو قرائت گردید (Helle Bust & Graigie, 1978).

اندازه گیری رنگیزه‌های اصلی (کلروفیلa) و کمکی (کلروفیلb و کاروتنوئید)

از روش Arnon (1949) جهت سنجش رنگیزه‌ها استفاده شد. نمونه‌های تازه نهال ۱۵ روزه، به وزن ۲۰۰ میلی‌گرم در هاون چینی با افزودن ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد کاملا سائیده شدند تا مخلوط یکنواختی بدست آید. عصاره با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد. نمونه موجود در روی کاغذ صافی مجددا با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد شستشو داده شد و به محلول قبلی اضافه گردید. حجم کل محلول با استفاده از استون ۸۰ درصد به ۱۵ میلی‌لیتر رسانده شد. تمامی مراحل در تاریکی انجام گرفت. غلظت کلروفیل a، b و کاروتنوئید به ترتیب با قرائت جذب در طول موج‌های ٦۳۳/۲، ٦٤٦/۸، ٤۷۰ و ۵۷۰ نانومتر و با استفاده از فرمول مرتبط محاسبه گردید.

نتایج

از شش رقم برنج خوزستان که در این بررسی استفاده شد، هفت باکتری اندوفیت بدست آمد. از برنج رقم چمپا دو نوع اندوفیت و از بقیه یک نوع اندوفیت جداسازی شد. بر اساس نتایج بدست آمده از تست‌های تشخیصی، باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده از ارقام حمر، دانیال، عنبوری قرمز، هویزه و گرده رامهرمز، متعلق به جنس باسیلوس، اندوفیت شماره یک برنج رقم چمپا متعلق به جنس اروینیا و اندوفیت شماره دو متعلق به جنس استافیلوکوکوس تشخیص داده شد. از کشت مایع حاصل از شستشوی مرحله سوم بذرهایی که سطح آن‌ها استریل شده بود هیچ‌گونه باکتری جداسازی نشد. نتیجه بررسی تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات و تولید اکسین توسط جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است. از بین هفت اندوفیت جداسازی شده فقط اندوفیت شماره یک چمپا قادر به تثبیت نیتروژن و انحلال فسفات بود و بیشترین میزان اکسین را نیز تولید کرد.

جدول ۱- مقایسه میانگین تولید اکسین در اندوفیت‌های جدا شده از شش رقم برنج بومی خوزستان با استفاده از حداقل میانگین معنی دار (LSD).

Table 1- Comparison of auxin production between endophytes isolated from 6 native rice cultivars in Khouzestan.

اندوفیت Endophyte شاخص	اندوفیت ۱ چمپا Endophyte) (Champa 1	اندوفیت ۲ چمپا Endophyte) (Champa 2	اندوفیت هویزه Endophyte) (Hoveyzeh	اندوفیت دانیال Endophyte) (Danial	اندوفیت گرده رامهرمز Endophyte) (Ramhormoz	اندوفیت حمر Endophyte) (Hamar	اندوفیت عنبوری قرمز Endophyte) (Anburi
میزان تولید اکسین Auxin	17.49^{a}	8.69^{b}	8.06^{b}	10.35^{b}	9.39^{b}	8.54^{b}	8.46^{b}
تثبیت نیتروژن N_2 fixation	+	–	–	–	–	–	–
انحلال فسفات Phosphate solublization	+	–	–	–	–	–	–

با توجه به نتایج بدست آمده در ادامه تحقیق برنج رقم چمپا انتخاب شد و مطابق روش ذکر شده در قسمت روش کار، تیمار آن با دو اندوفیت جدا شده از این رقم انجام شد و خصوصیات رشدی و فیزیولوژیک گیاه تیمار شده بررسی گردید. جدول ۲، نتیجه تغییرات رشدی برنج در اثر تیمار با اندوفیت‌های خالص و مخلوط را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج بدست آمده میانگین وزن خشک اندام هوایی بذرهای تیمار شده با دو اندوفیت نسبت به سایر تیمارها دارای اختلاف معنی دار است (P< ۰/۰۰۱). همچنین این شاخص بین بذر تیمار شده با باکتری *Erwinia* sp. نسبت به نمونه شاهد دارای اختلاف معنی دار است(P< ۰/۰۱). وزن خشک اندام هوایی بذر تیمار شده با دو اندوفیت نیز با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار نشان داد (P< ۰/۰۰۱). این فاکتور در نمونه تیمار شده با *Erwinia* sp. نیز با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نشان داد. وزن خشک و تر اندام هوایی در تیمار انجام شده با باکتری *Staphylococcus* sp. تفاوت معنی داری با سایر گروه ها نشان نداد. تفاوت معنی-داری در وزن خشک و تر ریشه گیاهان تیمار شده با هر دو اندوفیت نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵).

جدول ۲- نتایج اندازه‌گیری شاخص‌های رشدی گیاه برنج چمپا تیمار شده با باکتری‌های *Erwinia* sp. و *Staphylococcus* sp.

Table 2– Growth parameters of Champa rice treated with *Erwinia* sp. and *Staphylococcus* sp.

شاخص Parameter تیمار Treatment	متوسط وزن تر اندام هوایی (گرم) Mean of wet weight of aerial part(gr)	متوسط وزن خشک اندام هوایی (گرم) Mean of dry weight of aerial part(gr)	متوسط وزن تر ریشه (گرم) Mean of fresh weight of petiole(gr)	متوسط وزن خشک ریشه(گرم) Mean of dry weight of petiole (gr)	متوسط طول اندام هوایی (سانتی متر) Mean of aerial part length(cm)	متوسط طول ریشه (سانتی متر) Mean of petiole length(cm)
چمپا فاقد اندوفیت Endophyte free champa	0.0167[b]	0.01[b]	0.0159[b]	0.0125[b]	18.0643[b]	5.7143[b]
چمپا تیمار شده با *Erwinia* sp. Champa treated with *Erwinia* sp.	0.0458[a]	0.0267[a]	0.0259[a]	0.0238[a]	23.6429[a]	7.0714[b]
چمپا تیمار شده با *Staphylococcus* sp. Champa treated with *Staphylococcus* sp.	0.02[b]	0.0134[b]	0.02[b]	0.0159[b]	21.1429[b]	10.25[a]
چمپا تیمار شده با *Erwinia* sp. و *Staphylococcus* sp. به طور همزمان Simultaneous treatment of champa with *Erwinia* sp. and *Staphylococcus* sp.	0.05[b]	0.0275[a]	0.025[a]	0.0221[a]	23.5714[a]	5.2143[b]

همچنین گیاه تیمار شده با باکتری *Erwinia* sp. تفاوت معنی‌داری را در وزن تر ریشه (P<۰/۰۵) و وزن خشک ریشه (P< ۰/۰۱) با گروه شاهد نشان داد. وزن تر و خشک ریشه در تیمار با *Staphylococcus* sp. تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت. در بررسی طول اندام هوایی، گروه های تیمار شده با هر دو باکتری و باکتری *Erwinia* sp. به تنهایی اختلاف معنی-داری را در متوسط طول اندام هوایی نسبت به گروه شاهد نشان دادند (P< ۰/۰۱). متوسط طول ریشه در تیمار با باکتری *Staphylococcus* sp. اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد؛ ولی سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را از این نظر نشان ندادند. با این‌که طول ریشه در گروه

تیمار شده با *Staphylococcus* sp. بیشتر بود ولی تعداد ریشه‌های فرعی و تارهای کشنده در گروه تیمار شده با *Erwinia* sp. بیشتر بود و بیشترین تراکم تارهای کشنده در این گروه مشاهده شد و در مرتبه بعدی در گروه تیمار شده با دو باکتری اندوفیت بیشترین تراکم ریشه مشاهده شد (نتایج در اینجا ارائه نشده است). در بررسی خصوصیات فیزیولوژیک گیاه تیمار شده محتوی اکسین، مقدار پروتئین کل، کربوهیدرات‌های محلول و مقدار رنگیزه‌های اصلی گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ارزیابی اکسین تفاوت معنی‌دار در میزان اکسین استخراج شده از گیاه تیمار شده با *Erwinia* sp. در مقایسه با گروه شاهد را نشان داد ($P<۰/۰۵$). بیشترین میزان اکسین استخراج شده مربوط به گروه تیمار شده با دو باکتری اندوفیت بود (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج تغییرات برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه برنج رقم چمپای تیمار شده با باکتری-های اندوفیت.

Table 3- Physiologic parameters of endophyte treated Champa cultivar.

شاخص Parameter / تیمار Treatment	میانگین اکسین Auxin (µg/ ml)	پروتئین کل Total protein (mg/ g)	کربوهیدرات کل Total carbohydrate (mg/g)	کلروفیل A Chlorophyll A	کلروفیل B Chlorophyll b (mg/g)	کلروفیل A+B Chlorophyll a + b (mg/g)	کارتنوئید Carotenoid (mg/g)
چمپا فاقد اندوفیت Untreated champa	8.0351[b]	6.12[a]	52.59[a]	0.63[a]	0.27[a]	1.8775[a]	0.57[a]
چمپا تیمار شده با *Erwinia* sp. *Erwinia* sp. treatment	9.5150[a]	6.85[a]	62.49[a]	0.6[a]	0.26[a]	1.7845[a]	0.38[b]
چمپا تیمار شده با *Staphylcoccus* sp. *Staphylcoccus* sp treatment	8.0350[b]	6.55[a]	57.54[a]	0.53[a]	0.25[a]	1.6045[a]	0.29[b]
چمپا تیمار شده با باکتری *Erwinia* sp. و *Staphylcoccus* sp. Treatment with *Erwinia* sp. and *Staphylcoccus* sp.	9.5450[a]	6.8[a]	30.33[b]	0.5[a]	0.235[a]	1.5866[a]	0.295[b]

مطابق با جدول ۳، با این‌که بیشترین میزان پروتئین کل مربوط به گیاه تیمار شده با اندوفیت *Erwinia* sp. بود ولی از این نظر بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت(۰/۰۵ >P). میزان کربوهیدرات محلول کل در گروه تیمار شده با دو اندوفیت *Erwinia* sp. و *Staphylococcus* sp. تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (۰/۰۵ >P). در بررسی رنگیزه های گیاه مشاهده شد که تفاوت معنی-داری بین تیمارهای مختلف در میزان کلروفیل a و همچنین کلروفیل b وجود ندارد (۰/۰۵ >P) و تیمار فاقد اندوفیت میزان کلروفیل a و کلروفیل b بیشتری نسبت به تیمارهای دارای اندوفیت تولید کرده بودند. پس تغییرات میانگین کلروفیل کل در بین تیمارها معنی‌دار نبود (۰/۰۵ >P)؛ در حالی که میزان کاروتنوئید در سه تیمار تفاوت معنی داری با تیمار فاقد اندوفیت نشان داد (۰/۰۱ >P) به طوری‌که تیمار فاقد اندوفیت بیشترین میزان کاروتنوئید را نسبت به سایر تیمارها تولید کرد.

بحث

اندوفیت های گیاهی با توجه به اثراتی که در تحریک رشد گیاه، فراهم کردن عناصر ضروری آن‌ها و حذف پاتوژن‌های گیاهی دارند می‌توانند به عنوان عوامل محرک رشد گیاه و عوامل بیوکنترل استفاده شوند. از این رو تحقیق و شناسایی این باکتری‌ها در مورد ارقام برنج هر منطقه ضروری به نظر می‌رسد. از این رو محققین در نقاط مختلف دنیا اقدام به شناسایی این باکتری‌ها کرده‌اند. از این جمله می‌توان به Stoltzfus *et al.* (1997)، An *et al.* (1999) و Shen *et al.* (2000) اشاره کرد.

در این مطالعه برای اولین بار اندوفیت‌های شش رقم برنج موجود در خوزستان مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه‌ی آن هفت باکتری اندوفیت متعلق به جنس‌های Bacillus، Erwinia و Staphylococcus جداسازی شد. از بین این جدایه ها فقط *Erwinia* sp. قادر به تثبیت نیتروژن بود و بیشترین میزان اکسین را نیز تولید نمود. در تحقیق Hung & Annapurna (2004) نیز از بین ٦٥ اندوفیت جدا شده فقط ۱۵ جدایه قادر به تولید اکسین بودند که بیشترین میزان تولید آن ۲۵ $^{\mu g}/_{ml}$ بوده است. Feng *et al.*, (2006)، تولید $^{mg}/_{L}$ ۲٤۳ اکسین و Yasmin *et al.*, (2004) بیشترین میزان تولید اکسین را $^{mg}/_{L}$ ۹۰/۸ گزارش کرده اند. در مقایسه با نتایج ذکر شده *Erwinia* sp. جدا شده از رقم برنج چمپا در این تحقیق میزان بالایی از اکسین را تولید کرد. این جدایه قادر به انحلال فسفات نیز بود. این باکتری در مطالعات دیگران نیز در کنار باکتری-های جنس باسیلوس، ازوتوباکتر، سودوموناس و آزوسپیریلیوم به عنوان حل کننده فسفات گزارش شده است (Hung & Annapurna, 2004; Rokhzadi *et al.*, 2008).

با توجه به ویژگی‌های فوق تاثیر اندوفیت-های گیاه چمپا بر برخی خصوصیات رشدی و فیزیولوژیک این گیاه بررسی شد. لازم به ذکر است که تاکنون در تحقیقات اندکی به این موضوع پرداخته شده است. همان‌گونه که در نتایج مشاهده شد باکتری *Erwinia* sp. تاثیر معنی‌داری در افزایش طول اندام هوایی در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد و باکتری *Staphylococcus* sp. با اختلاف معنی داری باعث افزایش طول ریشه در مقایسه با سایر تیمارها شد. تاثیر اندوفیت‌ها بر مورفولوژی ساقه به واسطه تولید هورمون‌هایی نظیر اکسین، ژیبرلین و غیره می باشد (Shahab *et al*. 2009). برخی از فیتوهورمون‌هایی که توسط اندوفیت‌ها تولید و ترشح می‌شوند باعث تغییر در مورفولوژی ریشه می‌گردد. بعنوان مثال اکسین باعث افزایش طول سلول‌ها، تحریک ریشه‌دهی و تحریک تقسیم سلول‌ها می‌شود. در پژوهشی Fallik *et al*., (1994) نشان دادند که تلقیح ذرت با باکتری *آزواسپریلیوم برزیلینس* باعث افزایش قابل توجه در تارهای کشنده ذرت می-گردد. در مطالعه Shahb *et al*., (2009) نیز افزایش معنی‌داری در طول ریشه و ساقه گیاه تیمار شده با اندوفیت مشاهده شد.

در پژوهشی دیگر Thimann (1997) نشان داد که اکسین محرک ایجاد ریشه جانبی در اطراف ریشه اصلی می‌شود و همچنین از طویل شدن ریشه ممانعت بعمل می‌آورد. این نتیجه با نتیجه بدست آمده در این تحقیق که باکتری *Erwinia* sp. با وجود تولید اکسین بیشتر نسبت به باکتری *Staphylococcus* sp. طول ریشه کمتری را در گیاه چمپا تیمار شده ایجاد کرد ولی تراکم ریشه‌های تولید شده بیشتر بود مطابقت داشت.

پژوهشگران دیگر Mano & Morisaki, (2008) و Glick et al., (1986) نیز در تیمار گیاه با باکتری‌های اندوفیت افزایش طول ریشه و نیز تعداد تارهای کشنده را گزارش کرده‌اند. وزن خشک و تر گیاه تیمار شده با هر دو اندوفیت به صورت مخلوط یا باکتری *Erwinia* sp. به تنهایی بیش از سایر تیمارها و با اختلاف معنی‌دار بدست آمد. همچنین Barea & Brown (1974) در گیاه گوجه فرنگی و Mrkovacki & Milic (2001) در گیاهان گوجه فرنگی و خیار نشان دادند که تلقیح بذر گیاه با اندوفیت‌ها موجب افزایش وزن خشک ریشه و برگ‌ها می شود. البته Gholami et al. (2009) افزایش وزن خشک ساقه، ریشه و محصول را در گیاه ذرت تیمار شده با اندوفیت‌ها نشان دادند.

با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات سایر محققین می‌توان بیان داشت که احتمالا حضور اکسین بالا در باکتری *Erwinia* sp. سبب افزایش قابل توجه در وزن خشک و تر ریشه و اندام های هوایی برنج شده است.

رنگیزه‌های برنج چمپا تیمار شده با اندوفیت‌ها نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا کرده

بود که این کاهش در مورد کاروتنوئید معنی‌دار بود. Rodrigues Costapinto *et al*., (2000) متوجه شدند که میزان کلروفیل گیاه ذرت تیمار شده با اندوفیت ۵۰ درصد کمتر از گیاه تیمار نشده است؛ در حالی‌که همین محققین در موز تفاوت چندانی را در میزان کلروفیل b مشاهده نکردند.

تیمار برنج چمپا با باکتری باعث افزایش معنی‌دار میزان کربوهیدرات کل محلول در گیاه شد. در پژوهشی Rasmussen et al. (2008) افزایش کربوهیدرات‌های محلول در آب، لیپیدها و برخی از اسیدهای آلی را در گیاه *Lolium perenne* تیمار شده با اندوفیت مشاهده کردند. احتمالا افزایش میزان کربوهیدرات در گیاه آلوده به اندوفیت به این دلیل است که گیاه کمتر از اسکلت کربنی برای سنتز آمینواسیدها استفاده می-کند و سنتز پروتئین کاهش پیدا خواهد کرد. از طرف دیگر در مطالعه Rasmussen et al., (2008) میزان فیبر گیاه آلوده به اندوفیت کاهش یافت. پس اسکلت‌های کربن موجود در گیاه وارد ساختمان دیواره شده است و به صورت کربوهیدرات‌های محلول در آب درآمده است.

در تحقیق حاضر میزان کربوهیدرات گیاه تیمار شده با دو اندوفیت به صورت همزمان کاهش پیدا کرد. این امر می‌تواند به دلیل انحراف بیش از حد کربوهیدرات از گیاه میزبان به سمت باکتری های همزیست باشد. بعلاوه در این تیمار به دلیل تجمع دو اندوفیت به طور همزمان در گیاه احتمالا غلظت اکسین بیش از حد بهینه بوده است که موجب کاهش تراکم تارهای کشنده و کاهش سطح جذب ترکیبات توسط ریشه گیاه و در نتیجه کاهش کربوهیدرات کل شده است.

در مورد میزان پروتئین کل گیاه، گیاه تیمار شده با *Erwinia* sp. بیشترین میزان پروتئین را نسبت به سایر تیمارها نشان داد. البته این تغییر معنی‌دار نبود که احتمالا می‌تواند به دلیل کافی نبودن دوره رشد نهال‌های مورد آزمایش، عدم دسترسی گیاه به نیتروژن تثبیت شده توسط باکتری، بهینه نبودن شرایط تلقیح و یا کشت گیاه و ورود آمینواسیدهای سنتز شده یا پیش‌سازهای آن به مسیرهای متابولیکی دیگر باشد (Feng *et al*., 2005; Rasmusse*n et al*. 20008; Hurek & Hurek 1998; James, 2000). میزان اکسین در اندام هوایی نهال‌های تیمار شده به طور همزمان با دو اندوفیت بیش از سایر تیمارها بود که این افزایش احتمالا به سنتز اکسین توسط اندوفیت‌ها مربوط است. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان بیان کرد که باکتری-های اندوفیت با چند مکانیسم به گیاه میزبان خود کمک می‌کنند و چندین نقش را در ارتباط با گیاه به‌عهده دارد. نتایج مطالعات Bashan & Holguin (1998) و Rokhzadi *et al*. (2008) نیز تایید کننده این یافته است. در نهایت می‌توان بر اساس نتایج این تحقیق پیشنهاد داد که باکتری *Erwinia* sp. به عنوان یک اندوفیت تاثیر قابل توجهی در افزایش برخی ویژگی‌های مرتبط با

عملکرد گیاه برنج رقم چمپا دارد و باعث بهبود خصوصیات اساسی این گیاه می‌شود. بر این اساس تحقیق در مورد اندوفیت‌های سایر ارقام برنج خوزستان و تاثیر آن‌ها بر رشد و عملکرد این ارقام و نیز ارقام برنج سایر نواحی برنج خیز کشور توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین هزینه-های پژوهشی این تحقیق اعلام می‌دارند. بعلاوه از آقای دکتر گیلانی به لحاظ فراهم کردن ارقام برنج مورد تحقیق تشکر و قدردانی می شود.

منابع

Abrishamchi P (2007). Study on flower growth metabolism in cultured Saffron. Ph.D Thesis, Tehran University, Iran.

Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P (2010). Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. Fungal diversity 41: 1- 16.

Amou Aghaee R, Mostaajeran A (2007). Symbiosis. Vol 3: Plant- bacteria mutualism. 1st ed. Isfahan University press, Iran.

An QL, Kuang BJ, Mu XJ (1999). N_2 fixing *Klebsiella oxytoca* SA_2 colonized in rice roots and the expression of nitrogenase activity (In Chinese). Progress in Natural sciences 9: 113-119.

Arnon DL (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in Beta vulgaris. Plant physiology 24: 1-15.

Barea JM, Brown ME (1974). Effects on plant growth by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant growth regulating substances. Journal of Applied Bacteriology 37: 583-593.

Bashan Y, Holguin G (1998). Proposal for the division of plant growth promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biology and Biochemistry 30: 1225–1228.

Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose Membrane. Applied and Environmental Microbiology 57: 535- 538.

Dobereiner J, Day M, Dart PJ (1972). Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalurn notatum- Azotobacter paspali* association. Journal of General Microbiology 71: 103-116.

Fallik E, Sarig S, Okon Y (1994). Morphology and physiology of plant associated with Azospirillum. In Okon Y (Ed.), Azospirillum- plant associations. CRC Press Boca Raton, FL, USA, Pp: 77-86.

Feng Y, Shen D, Song W (2006). Rice endophyte *Pantoca agglomerans* YS19 Promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. Journal of Applied Microbiology 100: 938-945.

Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (2005). Bergey´s manual of systematic bacteriology, 2nd edition. Vol 2, part B. Springer, USA.

Goa F, Dai C, Liu X (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. African journal of Microbiology Research 4: 1346-1351.

Gimenez C, Cabrera R, Reina M, Gonzalez- Coloma A (2007). Fungal endophytes and their role in plant protection. Current Organic Chemistry 11: 707-720.

Glick BR, Brooks HE, Pasternak JJ (1986). Physiological effects of plasmid DNA transformation of *Azotobacter vinelendi*. Canadian Journal of Microbiology 32: 145-148.

Gholami A, Shahsavani S, Nezarat S. (2009).The effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of Maize. World Academy of Science, Engineering and Technology 49: 19-24.

Hallmann J, Hallmann AQ, Mahaffe WF, Kloepper JW (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43: 895- 914.

Helle Bust JA, Graigie JS (1978). Hand book of physiological methods. Cabmridge University press, New York.

Hinsvark ON, Houff WMH, Witwer SH, Sell HM (1954). The extraction and colorimetric estimation of Indole-3- acetic acid and its esters in developing corn kernels. Plant physiology 29: 107-108.

Hung PQ, Annapurna K (2004). Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (Glycine sp.). Omonrice 12: 92-101.

Hurek BR, Hurek T (1998). Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends in Microbiology 6: 139-144.

James EK (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field crops Research 65: 197-209.

Kim KY, Jordan D, McDonald GA (1998). Effect of phosphate- solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Biology and Fertility of Soils 26: 79-87.

Lowry OH, Rosebroiugh NJ, Randal RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Biology and Chemistry 193: 265-275.

Mano H, Morisaki H (2008). Endophbytic bacteria in the rice plant. Microbes and Environments 23: 109-117.

Mehta S, Nautiyal CS (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate – solubilizing bacteria. Current Microbiology 43: 51-56.

Mrkovacki N, Milic V (2001). Use of *Azotobacter chrooccocum* as potential useful in agricultural application. Annals of Microbilogy 51: 145-158.

Rajaee S, Reisee F, Alikhani H (2007). Evaluation of the potential of some *Azotobacter chroococcum* isolates from native soils of Chahar Mahal and Bakhtiari in production of plant growth promoting substances. Scientific Journal of Agriculture of Shahid Chamran University 30: 33- 47.

Rasmussen S, Parsons AJ, Fraser K, Xue H, Newman JA (2008). Metabolic profiles of *Lolium perenne* are differentially affected by nitrogen supply, carbohydrate content, and fungal endophyte Infection. Plant Physiology 146: 1440-1453.

Rodrigues Costapinto LS, Azevedo JL, Pereira JO, Carneiro Viera ML, Labate CA (2000). Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. New Phytology 147: 609-615.

Rokhzadi A, Asgharzadeh A, Darvish F, Nour- Mohammadi G, Majidi E (2008). Influence of plant Growth – promoting rhizobacteria on dry matter accumulation and yield of chickpea (Cicer arietnum L.) under field conditions. American- Eurasian journal of Agricultural & Environmental Science 3: 253-257.

Rosenblueth M, and Martinez- Romero E (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant- Microbe Interactions 19: 827-837.

Shahab S, Ahmed N, Khan NS (2009). Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. African Journal of Agricultural research 4: 1312-1316.

Shen DL, Song W, Dong XZ (2000). Identification and phylogeny analysis of the predominant endophytic bacteria *Enterobacter agglomernas* isolated from rice plant (in chinese). Progress in Natural Sciences 10: 949-952.

Stoltzfus JR, Malarvithi PP, Ladha JK, Burijn FJ (1997). Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. Plant and Soil 194: 25-36.

Teimouri M, Ali Ahmadi Koruri S, Matini Zadeh M, Khoshnevis M (2004). Isolation and identification of phosphate solublizing bacteria from soils of Vaz forest. Pajouhesh& Sazandegi 65: 57- 64.

Thimann KV (1977). Hormone action in the whole life of plants. 1st edition. University of Massachusetts press. USA.

Thimann KV, Skoog F (1940). The extraction of auxin from plant Tissues. American Journal of Botany 27: 951-960.

Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R (2003). Plant surface microbiology. New York, USA.

Vessey JK (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and soil 255: 571-586.

Yasmin S, Rahman Bakar MA, Malik KA, Hafeez FY(2004).Isolation, characterization and beneficial effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanzibar soils. Journal of Basic Microbiology 44: 241-52.

Identification of bacterial endophytes from champa rice cultivar and study of their effects on growth properties of host plant

Seyyednegad M.[1*], Motamedi H.[2, 3], Soleimani A.[4]

[1]Professor of Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
[2]Professor of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
[3]Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4]MSc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Abstract

Endophytes are symbiont microorganisms within apoplast or symplast of plants that promote growth, control phytopathogens, increase plant resistance to stress and improve plant growth conditions. The aim of this study was identification of endophytes from six rice cultivars in Khouzestan province and assessment of their effects on growth of the host plant. For this purpose, a suspension was prepared from sterilized seeds, and their endophytes were isolated in LB broth. The ability of isolates in nitrogen fixation, auxin production and phosphate solubilizing was discovered. The seeds of Champa cultivar were then infected by endophytes and growth and physiologic outcomes of this treatment were studied. As a result of this study six endophytes belong to Bacillus, Staphylococcus and Erwinia genus were isolated from them only the *Erwinia* sp. was able to fix N_2, dissolve phosphate and produced auxin more than others. Treatment with *Erwinia* sp. significantly increased the fresh and dry weight of aerial parts and root and aerial part length and density of hair roots. The auxin and carbohydrate content of treated rice with *Erwinia* sp. had significant difference than control. No significant difference was observed for chlorophyll a and b chlorophylls in different treatments and untreated plants produced more a and b chlorophylls. While there was significant difference for carotenoid between endophyte treated samples and untreated ones. Finally based on the obtained results it can be suggested that *Erwini*a sp. as an endophyte has significant effect on increasing of Champa cultivar performance and improvement main characteristics of this cultivar.

Key words: ***Endophyte, auxin, Champa cultivar, protein, pigment, carbohydrate.***

* Corresponding Author: Seyyednegad.S.M Tel: +98-611-3331045 Email: sm.seyyednejad@gmail.com