



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

سیدمنصور سیدنژاد^{۱*}، حسین معتمدی^{۲،۳}، آسیه سلیمانی^۴

^۱ استاد بخش فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

^۲ استاد بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

^۳ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

^۴ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

DOI: 10.22103/jab.2017.1667

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۲۹

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 سوسپانسیون‌های 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 سنجد شده. 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.

ضدباکتریایی می‌توانند موجب تحریک رشد گیاه و افزایش میزان محصول (Gao *et al.*, 2010, Rosenblueth and Gimenez *et al.*, 2007, Martinez- Romero, 2006)، 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 میزان از دو طریق توسط اندوفیت‌ها امکان‌پذیر است. این باکتری‌ها از طریق افزایش قابلیت دسترسی گیاه میزان به منابع غذایی (Gao *et al.*, 2010)، تثبیت نیتروژن، انحلال برخی عناصر ضروری غیرقابل دسترس برای میزان 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

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 آسیب‌های ظاهری و آشکار، در فضای آپوپلاست یا سیم پلاست گیاهان رشد می‌کنند (Gimenez *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 می‌خورد (Aly *et al.*, 2010). باکتری‌های اندوفیت بر خلاف باکتری‌های موجود در ریزوسفر به دلیل سکونت در بافت گیاه میزان در برابر عوامل تنش‌زای زیستی و غیر زیستی مورد حمایت قرار می‌گیرند (Rosenblueth and Martinez- Romero, 2006). البته تنوع باکتری‌های اندوفیت بسیار کمتر از باکتری‌های ریزوسفر می‌باشد (Mano and Morisaki, 2008). اندوفیت‌ها به واسطه تولید ترکیبات آکالوئیدی و نیز ترکیبات

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 نشان‌دهنده 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 می‌باشد و عمدتاً در نواحی کوهستانی و شمال شرقی استان به روش کشت نشایی کشت می‌شود. این رقم از نظر مورفولوژیکی از ارقام پابلند و کم‌سنبله می‌باشد

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 بذرها با باکتری‌های حل‌کننده فسفات سبب افزایش غلظت فسفات، طول ریشه و وزن خشک اندام هوایی این گیاه شده است (Amou Aghaee and Mostajjeran, 2007).

اندوفیت‌ها با تولید هورمون‌های گیاهی محرک رشد مثل ایندول استیک اسید و یا ممانعت از تولید هورمون‌های گیاهی ممانعت‌کننده 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 تارکشنده، توسعه و رشد ساقه (Vessey, 2003)، اشغال نیج اکولوژیکی، برقراری رابطه فوق‌انگلی و مقاومت گیاه در برابر پاتوژن‌ها به طور مستقیم (با تولید

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

مواد و روش ها

شش رقم برنج موجود در خوزستان شامل چمپا، عنبری 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., 2008; Rasmussen et al., 1991) 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 نوتریت آگار کشت انجام شد و مجدداً 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، واکنش‌های بیوشیمیایی شامل تست O/F، تست اوره‌آز، تست سترات، احیاء نترات، 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 ۴۸-۲۴ 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-

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 ۴۸ 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 نهایتاً با آب دیونیزه استریل شش مرتبه شستشو انجام شد (Varma *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2006).

ب- تیمار بذرها با استریل با اندوفیت‌ها.

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 $10^5 \times 1/5$ CFU/ml انکوبه شدند. بذرها استریل شده چهار قسمت شدند و در هر کدام از ارلن‌ها یک قسمت تلقیح شد. در یک ارلن هم بذرها با رقم چمپا بدون حضور باکتری تلقیح شد.

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 $10^8 \times 5$ CFU/ml، پنج میکرولیتر از محیط کشت در مرکز پلیت LBT قرار داده شد و کاغذ نیتروسولوز استریل بر آن قرار داده شد. پلیت‌ها تا رسیدن قطر کلنی‌ها به ۲ میلی‌متر انکوبه شدند. سپس کاغذ نیتروسولوز برداشته و با معرف سالکوفسکی آغشته شد. ایجاد هاله صورتی نشان‌دهنده تولید اکسین است که شدت رنگ با میزان تولید ارتباط مستقیم دارد (Rajaei *et al.*, 2007). سنجش کمی اکسین نیز با استفاده از واکنش یک میلی‌لیتر مایع رویی کشت ۱۴۴ ساعته باکتری در محیط LBT با ۲ میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی و اندازه‌گیری جذب آن در ۵۳۰ نانومتر انجام شد (Bric *et al.*, 1991).

ج- حل کردن فسفات: از محیط کشت

Seperb با $pH = 7/2$ 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 آن‌ها، با توجه به نتایج بدست آمده برنج رقم چمپا که دارای دو نوع اندوفیت توانمند بود جهت بررسی تاثیر اندوفیت‌ها بر بذرها و خصوصیات

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 ۵۰-۴۰ 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).

اندازه‌گیری میزان پروتئین های کل سیتوپلاسمی

برگ‌های فریز شده به نسبت ۰/۱ گرم با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (۷/۴ = pH) در هاون چینی همگن شدند. پس از سانتریفیوژ (۱۵۰۰ rpm، ۴ °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.

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 مورفولوژیکی و فیزیولوژی گیاه برنج چمپا پس از کشت بذرها در لوله آزمایش به شرح زیر اندازه‌گیری 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 ۲-۳ 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 ۴ تیمار به مدت ۶ روز در ۳۴-۳۲ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از این زمان ۱ گرم از نمونه تر انتخاب و ۱۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر به آن اضافه شد. نمونه‌ها در ظرف شیشه‌ای کاملاً استریل و در دمای ۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۴ روز نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی از محلول جداسازی شدند و جهت استخراج کامل اکسین،

رسانده شد. تمامی مراحل در تاریکی انجام گرفت. غلظت کلروفیل a، b و کاروتنوئید به ترتیب با قرائت جذب در طول موج‌های ۶۳۳/۲، ۶۴۶/۸، ۴۷۰ 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، عنبروری 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.

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 ۳۰۰۰ rpm 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 میلی‌لیتر فنل ۵ درصد افزوده شد و سپس ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه جذب نمونه در طول موج ۴۸۵ نانو قرائت گردید (Helle Bust & Graigie, 1978).

اندازه گیری رنگیزه‌های اصلی (کلروفیل a) و کمکی (کلروفیل b 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 کاملاً سائیده شدند تا مخلوط یکنواختی بدست آید. عصاره با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد. نمونه موجود در روی کاغذ صافی مجدداً 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

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 Khuzestan.

اندوفیت Endophyte	اندوفیت ۱ چمپا Endophyte) (Champa 1	اندوفیت ۲ چمپا Endophyte) (Champa 2	اندوفیت هویره Endophyte) (Hoveyzeh	اندوفیت دانیال Endophyte) (Danial	اندوفیت گرده رامهرمز Endophyte) (Ramhormoz	اندوفیت حمر Endophyte) (Hamar	اندوفیت عنبری 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	+	-	-	-	-	-	-

باکتری *Erwinia sp.* نسبت به نمونه شاهد دارای اختلاف معنی دار است ($P < 0/01$). وزن خشک اندام هوایی بذر تیمار شده با دو اندوفیت نیز با سایر تیمارها تفاوت معنی دار نشان داد ($P < 0/001$). این فاکتور در نمونه تیمار شده با *Erwinia sp.* نیز با گروه شاهد تفاوت معنی دار نشان داد. وزن خشک و تر اندام هوایی در تیمار انجام شده با باکتری *Staphylococcus sp.* تفاوت معنی داری با سایر گروه‌ها نشان نداد. تفاوت معنی داری در وزن خشک و تر ریشه گیاهان تیمار شده با هر دو اندوفیت نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$).

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 ($P < 0/001$). همچنین این شاخص بین بذر تیمار شده با

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.

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

باکتری *Erwinia* sp. به تنهایی اختلاف معنی-داری را در متوسط طول اندام هوایی نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($P < 0/01$). 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

همچنین گیاه تیمار شده با باکتری *Erwinia* sp. تفاوت معنی‌داری را در وزن تر ریشه ($P < 0/05$) و وزن خشک ریشه ($P < 0/01$) با گروه شاهد نشان داد. وزن تر و خشک ریشه در تیمار با *Staphylococcus* sp. تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. در بررسی طول اندام هوایی، گروه‌های تیمار شده با هر دو باکتری و

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 ($P < 0.05$). بیشترین میزان اکسین استخراج شده مربوط به گروه تیمار شده با دو باکتری اندوفیت بود (جدول ۳).

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

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 ($\mu\text{g/ml}$)	پروتئین کل Total protein (mg/g)	کربوهیدرات کل Total carbohydrate (mg/g)	کلروفیل A Chlorophyll A	کلروفیل B Chlorophyll b	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 <i>Erwinia sp.</i> <i>Erwinia sp.</i> 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 <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> 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 <i>Erwinia sp.</i> و <i>Staphylococcus sp.</i> Treatment with <i>Erwinia sp.</i> and <i>Staphylococcus sp.</i>	9.5450 ^a	6.8 ^a	30.33 ^b	0.5 ^a	0.235 ^a	1.5866 ^a	0.295 ^b

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 *Erwinia*، *Bacillus* و *Staphylococcus* جداسازی شد. از بین این جدایه‌ها فقط *Erwinia sp.* قادر به تثبیت نیتروژن بود و بیشترین میزان اکسین را نیز تولید نمود. در تحقیق *Hung & Annapurna* (2004) نیز از بین ۶۵ اندوفیت جدا شده فقط ۱۵ جدایه قادر به تولید اکسین بودند که بیشترین میزان تولید آن $25 \mu\text{g/ml}$ بوده است. *Feng et al.* (2006)، تولید 243 mg/L اکسین و *Yasmin et al.* (2004) بیشترین میزان تولید اکسین را mg/L گزارش کرده‌اند. 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 باکتری‌های جنس *Basillus*، *ازوتوباکتر*، *سودوموناس* و *آزوسپیریلیوم* به عنوان حل‌کننده فسفات گزارش شده است (*Hung & Annapurna*, 2004; *Rokhzadi et al.*, 2008).

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 ($P < 0/05$). میزان کربوهیدرات محلول کل در گروه تیمار شده با دو اندوفیت *Erwinia sp.* و *Staphylococcus sp.* تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0/05$). در بررسی رنگیزه‌های گیاه مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در میزان کلروفیل *a* و همچنین کلروفیل *b* وجود ندارد ($P < 0/05$) 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 ($P < 0/05$)؛ در حالی که میزان کاروتنوئید در سه تیمار تفاوت معنی‌داری با تیمار فاقد اندوفیت نشان داد ($P < 0/01$) به طوری‌که تیمار فاقد اندوفیت بیشترین میزان کاروتنوئید را نسبت به سایر تیمارها تولید کرد.

بحث

اندوفیت‌های 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 بیوکنترول استفاده شوند. از این رو تحقیق و شناسایی این باکتری‌ها در مورد ارقام برنج هر

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 می‌شود. 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 احتمالاً حضور اکسین بالا در باکتری *Erwinia sp.* سبب افزایش قابل توجه در وزن خشک و تر ریشه و اندام‌های هوایی برنج شده است.

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

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 معنی‌داری باعث افزایش طول ریشه در مقایسه با سایر تیمارها شد. تاثیر اندوفیت‌ها بر مورفولوژی ساقه به واسطه تولید هورمون‌هایی نظیر اکسین، ژیرلین و غیره می‌باشد (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 می‌گردد. 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

گیاه احتمالاً 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 معنی دار نبود که احتمالاً 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; Rasmussen *et al.* 2008). میزان اکسین در اندام هوایی نهال‌های تیمار شده به طور همزمان با دو اندوفیت بیش از سایر تیمارها بود که این افزایش احتمالاً 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

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. احتمالاً افزایش میزان کربوهیدرات در گیاه آلوده به اندوفیت به این دلیل است که گیاه کمتر از اسکلت کربنی برای سنتز آمینواسیدها استفاده می‌کند 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 باکتری‌های همزیست باشد. بعلاوه در این تیمار به دلیل تجمع دو اندوفیت به طور همزمان در

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 می‌شود.

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.

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, Mostaaajeran A (2007). Symbiosis. Vol 3: Plant- bacteria mutualism. 1st ed. Isfahan University press, Iran.
- An QL, Kuang BJ, Mu XJ (1999). N₂ fixing *Klebsiella oxytoca* SA₂ 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 *Paspalum 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 vinelandi*. *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*. Cambridge 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, Rosebriugh NJ, Randal RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biology and Chemistry* 193: 265-275.
- Mano H, Morisaki H (2008). Endophytic 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 chroococcum* as potential useful in agricultural application. *Annals of Microbiology* 51: 145-158.
- Rajae 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 arietinum 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 agglomerans* isolated from rice plant (in chinese). *Progress in Natural Sciences* 10: 949-952.
- Stoltzfus JR, Malarvithi PP, Ladha JK, Buriijn 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 solubilizing 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

¹Professor of Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

²Professor of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

³Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴MSc. 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 N₂, 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 *Erwinia* 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

