



به زراعی کشاورزی

دوره ۱۶ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۹۱۰-۸۹۷

بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تجمع یون‌های فلزی در کلزای تلقیح‌شده با باکتری *P. fluorescens* FY32 تحت تنش شوری

مرتضی بازاریار^۱، علی بنده‌حقی^{۲*} و داود فرج‌زاده^۳

۱. کارشناس ارشد اصلاح نباتات، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲. دانشیار گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳. استادیار گروه زیست‌شناسی - سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۱/۲۰

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۸/۰۱

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی اثر تلقیح بذر کلزا با باکتری *P. fluorescens* FY32 بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تجمع یون‌های فلزی در شرایط تنش شوری در پاییز سال ۱۳۹۱ در گلخانه تحقیقاتی گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام گرفت. آزمایش به صورت کرت‌های دو بار خردشده با سه فاکتور (تنش شوری، تلقیح با باکتری و رقم) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار در سیستم کشت هیدروپونیک انجام گرفت. سطوح تنش شوری شامل ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم همراه با سطح بدون شوری به عنوان شاهد بود. دو رقم مورد بررسی کلزا، 'ساریگول' و 'هایولا ۳۰۸' بودند. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنول‌اکسیداز) در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با باکتری کاهش معناداری نسبت به گیاهچه‌های تلقیح‌نشده در سطوح مختلف تنش شوری داشت. تجمع یون‌های سدیم و کلراید با افزایش شوری در گیاهان بیشتر شد، ولی یون پتاسیم کاهش معنادار داشت. تجمع یون سدیم و کلراید در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با باکتری تحت تنش شوری کاهش و مقدار پتاسیم افزایش داشت. رقم 'هایولا ۳۰۸' تحت تنش شوری کمترین کاهش در مقدار تولید ماده خشک را داشت و مقاوم‌تر از 'ساریگول' بود. این رقم مقاوم در حالت تلقیح با باکتری و در سطوح مختلف شوری دارای کمترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تجمع یون‌های سدیم و کلراید و بیشترین غلظت یون پتاسیم بود.

کلیدواژه‌ها: باکتری‌های محرک رشد، پتاسیم، پراکسیداز، کاتالاز، کلرورسدیم.

۱. مقدمه

هوایی هر شش گونه (از جمله گونه *B. napus*) با افزایش غلظت نمک کلرورسدیم محیط، افزایش یافته و روند افزایشی در بافت‌های ریشه نیز وجود داشته است [۱۵]. غلظت یون کلر در بخش‌های هوایی و ریشه‌ها تغییرات یکنواختی نداشته است، به طوری که غلظت Cl^- در بخش هوایی *B. napus* کمترین، و در ریشه همین گونه بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است. بنابراین، الگوی تجمع یون Cl^- نمی‌تواند معیار گزینش بین گونه‌ای باشد. در گونه‌های آمفی‌دیپلوئید کلزا، غلظت یون Na^+ در بخش هوایی کمتر از سه گونه دیپلوئید گزارش شده است [۱۴].

یکی از دلایل اصلی خسارت تنش‌های محیطی نظیر شوری، تولید گونه‌های فعال اکسیژن است. حضور این گونه‌های فعال اکسیژن در محیط سلولی سبب تخریب ماکرومولکول‌های عمده سلولی نظیر DNA، RNA و آنزیم‌های حیاتی می‌شود که این خسارت را خسارت اکسیداتیو گویند [۱۲]. شوری تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن را القا می‌کند که در غلظت‌های زیاد برای سلول زیان‌آور است. تولید این ترکیبات نظیر گونه سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و گونه هیدروکسیل (OH^-) سبب تخریب غشاهای سلولی می‌شود. این گونه‌های فعال اکسیژن توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر پلی‌فنول‌اکسیداز (PPO)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) حذف و غیرفعال می‌شود [۱۶]. نتایج بسیاری از تحقیقات نیز نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم‌ها در برگ‌های ارقام حساس و مقاوم به تنش شوری بسیاری از گونه‌های گیاهی افزایش می‌یابد. این افزایش فعالیت آنزیمی در ارقام متحمل به شوری بیشتر از ارقام حساس گزارش شده است [۱۹، ۲۳، ۳۷].

توانایی میکروارگانسیم‌ها در تولید و رهاسازی متابولیت‌های مختلف مؤثر بر رشد و سلامت گیاه، از

مشکلات متعددی در افزایش تولید محصولات زراعی وجود دارد که مهم‌ترین آنها تنش‌های زیستی و غیرزیستی است که رشد و عملکرد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد و اختلاف چشمگیری بین عملکرد واقعی و عملکرد بالقوه محصولات زراعی به وجود می‌آورد [۷]. کلزا از گیاهان نیمه‌متحمل به شوری به‌شمار می‌رود [۱۳]. برخی از محققان حد آستانه تحمل شوری کلزا را در آزمایش مزرعه‌ای ۹ دسی‌زیمنس بر متر به دست آوردند که در این صورت جزء گیاهان متحمل محسوب می‌شود [۲۶]. تحمل نسبی این گیاه سبب شده است این گیاه پس از اصلاح بیولوژیکی اراضی شور در آنها کاشته شود.

غلظت عناصر P، N، S، B، Zn و Mn تقریباً تحت تأثیر تنش شوری قرار نمی‌گیرد یا به ندرت با کاهش رشد ارتباط دارد و برعکس غلظت عناصر Na، K، Ca، Mg و Cl و تأثیرات متقابل آنها، معمول‌ترین و مؤثرترین عامل‌های یونی در محدود کردن رشد گونه‌های براسیکا هستند. یون‌های K و Na و مجموع غلظت‌های آنها معیاری از قدرت یونی کل بوده و تعادل بار آنها با آنیون‌ها، قابل مطالعه و بررسی است و هرچه تعادل بار کمتر شود، تأثیرات بازدارندگی شوری نیز بیشتر خواهد بود. نکته جالب توجه وجود پدیده آنتاگونیستی بین جذب Na^+ و K^+ است [۳۰]. یون سدیم که یون غالب شوری است (به دلیل غالبیت نمک کلرورسدیم در زمینه شوری) به همراه یون کلر همبستگی منفی با میزان رشد دارد و هرچه گیاه در دفع آن فعال‌تر باشد، متحمل‌تر خواهد بود. مطالعه روابط و الگوهای تجمع یون‌های سمی در بخش‌های مختلف یک گونه برای پی بردن به نوع سازوکار (دفع یا جذب) تحمل ضروری است. در مطالعه اثر تنش شوری بر شش گونه سرده *Brassica* (سه گونه دیپلوئید و سه گونه آمفی‌دیپلوئید) گزارش شد که مقدار یون سدیم در بخش

هدف از اجرای پژوهش حاضر، ارزیابی تلقیح با باکتری سودوموناس فلورسنس بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و مقدار انباشتگی برخی از یون‌ها در کلزا تحت تنش شوری بود.

۲. مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر تلقیح باکتری سودوموناس فلورسنس^۴ بر برخی خصوصیات ارقام کلزا در شرایط تنش شوری، این پژوهش در پاییز سال ۱۳۹۱ در گلخانه تحقیقاتی گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز و در قالب طرح کرت‌های دوبار خردشده با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. فاکتور اصلی تنش شوری در دو سطح (۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم) به‌همراه شاهد، فاکتور فرعی تلقیح با باکتری (سویه سودوموناس فلورسنس و تیمار شاهد) و فاکتور فرعی رقم کلزا در دو سطح (‘هایولا ۳۰۸’^۵ و ‘ساریگول’^۶) بود.

آزمایش در سیستم هیدروپونیک انجام گرفت. محلول غذایی مورد استفاده هوگلند تغییر یافته بود که با کمی تغییر برای گیاه کلزا استفاده شد [۱۷]. بذر ارقام کلزا قبل از کشت در ظروف مخصوص کشت، ضدعفونی شد. یک هفته بعد از کشت بذرها، گیاهچه‌ها در بستر کشت نشا شدند. یک روز بعد از نشای گیاهچه‌ها، باکتری سودوموناس فلورسنس سویه FY32 برای تلقیح با ریشه گیاهچه‌ها در محلول غذایی تزریق شد. مایه تلقیح باکتری با جمعیت تقریبی 10^7 (cfu/ml)^۵ به هر مخزن اضافه شد. برای بررسی صحت تلقیح گیاهچه‌ها با باکتری موردنظر یک هفته بعد از تلقیح باکتری به سیستم کشت، نمونه‌گیری‌هایی به‌صورت تصادفی از ریشه گیاهچه‌ها

مهم‌ترین عوامل در حاصلخیزی خاک در نظر گرفته می‌شود [۳۴]. بنابراین یکی از راهکارهای مقابله با شوری که چندی است مورد توجه قرار گرفته، تلقیح گیاهان زراعی با انواع مختلفی از باکتری‌ها و قارچ‌های مفید خاک‌زی است. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه^۱ (PGPR)، گروهی از باکتری‌های ریزوسفری مفیدند که می‌توانند با سازوکارهای مستقیم (همانند تثبیت نیتروژن، تولید مواد تنظیم‌کننده رشد گیاه و افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی مختلف برای گیاه)، یا غیرمستقیم (همانند تولید آنتی‌بیوتیک، تخلیه ریزوسفر از آهن و رقابت با گونه‌های مضر برای اشغال ریشه) موجب افزایش رشد گیاه شوند [۲۷].

باکتری‌های محرک رشد از طریق افزایش برخی آنزیم‌ها مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کاهش خسارت‌های ناشی از گونه‌های فعال و تنش اکسیداتیو در گیاهان تحت تنش شوری مؤثرند [۴۱]. یکی از سازوکارهای اصلی باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه برای تحریک رشد گیاهان از طریق فعالیت آنزیم ACC (۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک‌اسید)^۲ دآمیناز است. باکتری‌های حاوی این آنزیم با تجزیه پیش-ماده اتیلن SAM (اس‌آدنوزیل متیونین)^۳ به ACC، غلظت اتیلن را در گیاه تحت تنش کاهش می‌دهند و در نتیجه گیاه را در مقابل تأثیرات مضر ناشی از سطوح بالای اتیلن (اتیلن تنشی) حفظ می‌کنند [۲۵]. بنابراین یکی از راه‌های مقابله با تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش شوری، اصلاح گیاهان برای تحمل بیشتر از طریق تلقیح با باکتری‌های PGPR است. همچنین بررسی روند تغییر صفات مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در اثر تلقیح با این باکتری می‌تواند در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی حائز اهمیت باشد.

4. *P. fluorescens* FY32
5. Colony forming units

1. Plant growth promoting rhizobacteria
2. Aminocyclopropane-1-carboxylate
3. S-Adenosyl Methionine

و پس از قرار دادن در بن‌ماری با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد [۳۹].

برای اندازه‌گیری غلظت یون سدیم و پتاسیم از ماده خشک ریشه گیاه استفاده شد و غلظت این یون‌ها به وسیله دستگاه فلیم فتومتر اندازه‌گیری شد [۱۵]. برای اندازه‌گیری یون کلراید ۰/۰۵ گرم بافت خشک ریشه پودر شده در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به خوبی ساییده شد و ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت و عصاره حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد تا کاملاً صاف شود. به ۵ میلی‌لیتر به دست آمده، ۲ میلی‌لیتر محلول نترات آهن و ۲ میلی‌لیتر محلول اشباع تیوسیانات جیوه اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه میزان جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۶۰ نانومتر قرائت شد [۲۴]. تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS و MSTAT-C انجام گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد.

۳. نتایج و بحث

وزن خشک بافت‌های گیاهی یکی از مهم‌ترین معیارهای سنجش مقاومت به تنش‌های غیرزیستی است. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سطوح مختلف تنش شوری و باکتری برای صفات وزن خشک بخش هوایی، ریشه و کل بوته در سطح ۱ درصد معنادار بود و بین دو رقم برای صفات مذکور اختلاف معنادار وجود داشت (جدول ۱). براساس مقایسه میانگین بین سطوح مختلف تنش برای صفت وزن خشک بخش هوایی، ریشه و کل بیشترین وزن مربوط به سطح شاهد و کمترین به تنش شدید تعلق داشت (جدول ۲). همچنین بوته‌های تلقیح شده با باکتری بیشترین وزن خشک را نسبت به گیاهان تلقیح نشده داشتند. بیشترین وزن خشک بخش هوایی، ریشه و کل مربوط به ۴ اهیولا ۳۰۸ بود.

صورت گرفت و بعد از آزمایش‌های مختلف، تلقیح باکتری مورد نظر با ریشه گیاهان نشاشده تأیید شد. تنش شوری پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها اعمال شد. برای اندازه‌گیری صفات مختلف (وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه‌ها، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و غلظت یون‌های فلزی) برداشت نمونه‌های گیاهی ۳۰ روز بعد از اعمال تنش صورت گرفت (اواخر دوره رویشی).

قبل از سنجش فعالیت آنزیم‌های ابتدا عصاره آنزیمی تهیه شد. برای این منظور، یک گرم نمونه برگ‌ها (از برگ‌های توسعه یافته) با چهار میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری (شامل ۱/۲ گرم تریس، دو گرم اسید آسکوربیک، ۳/۸ گرم بوراکس، ۵۰ گرم پلی‌اتیلن گلیکول و رساندن به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر با آب مقطر با pH=۶/۵) به مدت ۳۰ دقیقه همگن شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با ۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز ترکیبی از ۱۵ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی برداشته و با استفاده از محلول ۰/۱ مولار بافر فسفات پتاسیم با pH=۷، حجم محلول به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس فعالیت آنزیم کاتالاز برحسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین در طول موج ۲۴۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد [۲۰]. برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز دو میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار با pH = ۵، ۰/۴ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر بنزیدین ۰/۰۱ مولار محلول در الکل ۵۰ درصد با هم مخلوط شدند، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به مخلوط اضافه گردید و جذب نوری محلول توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد [۳۲]. برای اندازه‌گیری آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار با pH=۶/۸ و ۲۰۰ میکرولیتر پیروگال ۰/۰۲ مولار به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی اضافه شد

بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تجمع یون‌های فلزی در کلزای تلقیح‌شده با باکتری *P. fluorescens* FY32 تحت تنش شوری

جدول ۱. تجزیه واریانس غلظت یونی ریشه آرقام کلزای تلقیح‌شده با باکتری *P. fluorescens* FY32 در شرایط تنش شوری

یون کلراید ریشه	یون پتاسیم ریشه	یون سدیم ریشه	یون فنول آکسیداز	پراکسیداز	کاتالاز	وزن خشک کل	وزن خشک ریشه	وزن خشک بخش هوایی	درجه آزادی	تیمار
۲۷۰۲/۲۱**	۲۰۱۲/۹۳۳**	۳۱۵۶/۱۴۷**	۰/۲۸۹**	۱۲۹/۰۵۲**	۱۳۶/۰۸۳**	۰/۰۵۳**	۲/۹۸۲**	۱/۳۸۸**	۲	شوری
۶۲/۰۴۰	۲۰/۹۵۷	۳۷/۱۳۴	۰/۰۰۴	۱/۲۹۰	۲۰/۹۸۵	۰/۰۰۲	۰/۰۳۰	۰/۰۳۲	۶	خطای اصلی
۲۸۳/۸۰۵**	۴۱/۱۱۲**	۱۵۸/۱۳۵**	۰/۱۵۰**	۲۰/۱۲۵**	۳۳/۳۸۰**	۰/۰۲۰**	۰/۶۵۴**	۰/۱۳۴**	۱	باکتری
۱۲/۶۶۹**	۱۲/۱۹۹**	۲۶/۰۱۸*	۰/۰۲۱*	۵۳/۵۳۴**	۱۹۸۶/۴۳۰**	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۷	۲	شوری × باکتری
۴/۱۶۹	۱/۰۴۹	۰/۸۳۹	۰/۰۰۳	۰/۰۳۶	۲/۲۱۷	۰/۰۰۱	۰/۰۳۲	۰/۰۱۴	۶	خطای فرعی
۴۱۰۶/۴۳۹**	۸۳/۵۰۶**	۲۲۳/۴۱۲**	۰/۰۰۵**	۳/۹۰۷**	۹۷/۱۴۴**	۰/۰۰۵**	۰/۳۳۷**	۰/۱۸۱**	۱	رقم
۱۲۶۹/۰۵۵**	۳۴۵/۴۱۵**	۸۱۳/۵۲۶**	۰/۰۰۹**	۰/۵۵۶**	۷/۶۴۰**	۰/۰۰۲	۰/۰۲۷	۰/۰۲۵	۲	شوری × رقم
۲۴/۵۹۷	۱/۰۵۴	۱۲/۸۱۴	۰/۰۱۲**	۰/۱۸۵*	۶/۴۸۸**	۰/۰۰۱	۰/۰۱۱	۰/۰۱۱	۱	باکتری × رقم
۸/۸۱۹	۱/۷۵۸	۵/۴۹۳	۰/۰۱۴**	۰/۲۲۴*	۷/۶۰۶**	۰/۰۰۲	۰/۰۴۳	۰/۰۳۸	۲	شوری × باکتری × رقم
۱۲/۴۱۹	۱/۰۷۹	۳/۷۴۱	۰/۰۰۱	۰/۰۳۸	۰/۰۴۱	۰/۰۰۲	۰/۰۷۰	۰/۰۴۱	۱۲	خطای فرعی فرعی
۹/۷۶	۵/۸۲	۵/۵۵	۴/۴۵	۲/۷۶	۰/۶۶	۲۶/۲۸	۱۳/۰۶	۳۷/۹۶	-	ضریب تغییرات خطای فرعی (%)

* و **: معناداری در سطح ۱ و ۵ درصد

جدول ۲. میانگین وزن خشک در اندام‌های مختلف دو رقم کلزای تلقیح‌شده با باکتری *P. fluorescens FY32* در شرایط تنش شوری

وزن خشک کل (g/plant)	وزن خشک ریشه (g/plant)	وزن خشک بخش هوایی (g/plant)	تیمارها
			سطوح تنش (mM NaCl)
۱/۳۰۴ ^a	۰/۱۵۸ ^a	۰/۹۱۹ ^a	۰ (شاهد)
۰/۹۹۱ ^b	۰/۱۴۸ ^b	۰/۷۱۴ ^b	۱۵۰
(-۷۶)	(-۹۴)	(-۷۸)	
۰/۷۲۹ ^c	۰/۰۸۸ ^c	۰/۵۲۶ ^c	۳۰۰
(-۵۶)	(-۵۶)	(-۵۷)	
			باکتری
۰/۹۳۰ ^b	۰/۱۱۸ ^b	۰/۶۷۳ ^b	بدون تلقیح
۱/۰۸۶ ^a	۰/۱۴۵ ^a	۰/۷۶۶ ^a	تلقیح‌شده
(+۱۱۷)	(+۱۲۳)	(+۱۱۴)	
			ارقام کلزا
۰/۸۶۹ ^b	۰/۱۲۳ ^b	۰/۶۷۴ ^b	'ساریگول'
۱/۱۰۷ ^a	۰/۱۵۴ ^a	۰/۷۸۸ ^a	'هایولا ۳۰۸'

- اعداد داخل پرانتز درصد نسبی صفات رشدی (نسبت به شاهد) است. علامت‌های مثبت و منفی به ترتیب بیانگر افزایش و کاهش نسبت به شاهد است.

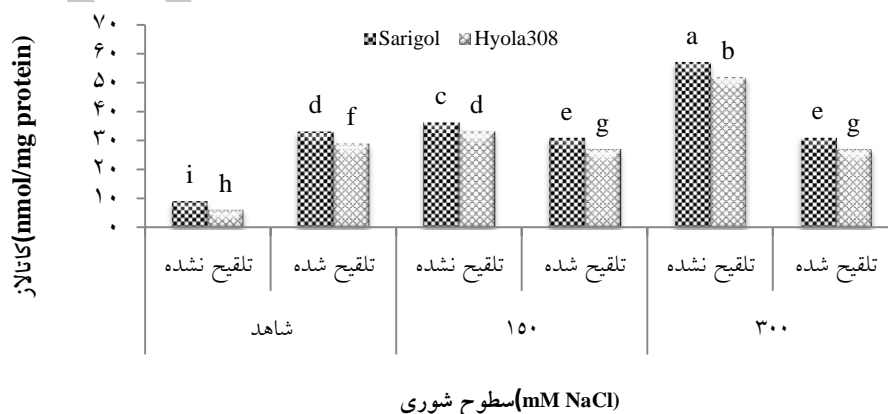
- میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد است.

کاهش رشد و وزن خشک در شرایط شوری می‌تواند بر اثر تغییر در انتقال فراورده‌های فتوسنتزی به ریشه‌ها، بسته شدن جزئی یا کلی روزنه‌ها و نیز عدم توازن یونی در گیاهان باشد [۳]. از دلایل دیگر این کاهش می‌توان به تأثیرات منفی پتانسیل اسمزی بالای محلول خاک اشاره کرد که جذب آب و عناصر غذایی را کاهش می‌دهد و در نهایت سبب کاهش رشد ریشه و بخش هوایی می‌شود [۸]. نتایج دیگر تحقیقات وجود رابطه منفی بین تنش شوری و وزن تر و خشک بوته را تأیید می‌کنند [۳۳، ۱۱]. تیمارهای مختلف شوری در ارقام کلزا سبب کاهش معنادار وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه شده است [۴].

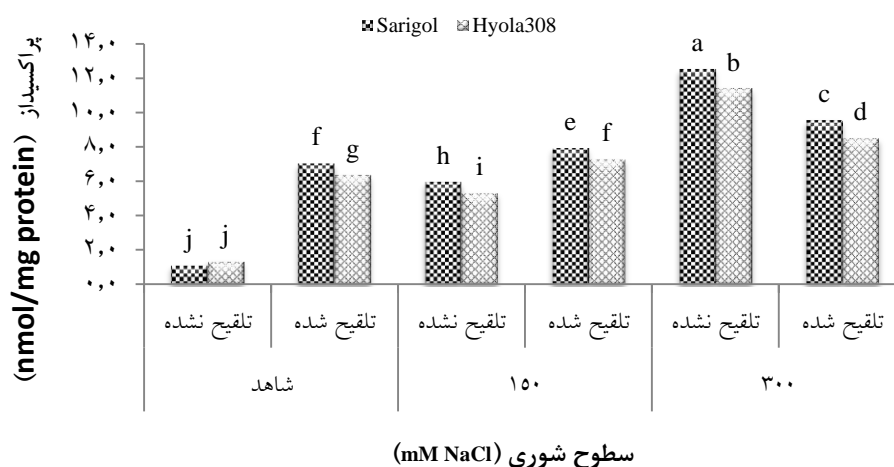
تجزیه واریانس درصد نسبی (نسبت به شاهد) وزن خشک در دو رقم کلزا تحت تنش شوری در هر دو سطح تیمار باکتریایی نشان داد که بین ارقام اختلاف معنادار وجود دارد (داده‌های تجزیه واریانس نشان داده نشده است). در سطوح تنش، کاهش این صفات در بوته‌های تلقیح‌شده با باکتری کمتر از سطح تلقیح‌نشده بود. در وضعیت عدم تلقیح با باکتری در سطوح شوری ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بیشترین وزن خشک بخش هوایی، ریشه و کل بوته به رقم 'هایولا ۳۰۸' تعلق داشت. در حالت تلقیح‌شده رقم 'ساریگول' کمترین وزن خشک را به خود اختصاص داد.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مانند کاتالاز و پراکسیداز) را در برگ‌های گیاه کاهو در مقایسه با تیمار شاهد بدون تنش بالا برد، ولی تلقیح گیاه با سویه‌هایی از باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) با کاهش خسارت اکسیداتیو، فعالیت آنزیمی را نسبت به حالت بدون تلقیح کاهش داد [۲۹]. رقم 'ساریگول' در سه سطح شوری و دو حالت تلقیح و عدم تلقیح با باکتری دارای بیشترین فعالیت کاتالاز بود که نشان‌دهنده حساسیت بیشتر این رقم نسبت به رقم 'هایولا ۳۰۸' به تنش شوری است (شکل ۱). شوری همانند دیگر تنش‌های محیطی می‌تواند سبب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و به دنبال آن خسارت اکسیداتیو در گیاهان شود [۱۰]. گیاهان برای مقابله و کاهش آثار گونه‌های آزاد از یک سیستم آنزیمی پیچیده استفاده می‌کنند که شامل آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی فنول اکسیداز و دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است و فعالیت این آنزیم‌ها بسته به گونه گیاهی و شدت تنش تغییر می‌کند [۱۰]. تحقیقی روی کلزا نشان داد که تفاوت معناداری بین ارقام، سطوح شوری و تیمارهای باکتریایی از لحاظ فعالیت آنزیم کاتالاز وجود داشت و با افزایش شوری، بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه افزوده شد و حضور باکتری نیاز به فعالیت آنزیم کاتالاز را کاهش داد [۱۸].

باکتری‌های PGPR از طریق سازوکارهایی مانند تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه که نتیجه آن بهبود جذب آب و عناصر غذایی توسط گیاه، تأثیر بر بهبود جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه، تولید برخی از ترکیبات آنتی‌بیوتیک، حذف عوامل بیماری‌زا و القای ژن‌های دفاعی گیاه است، سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند [۴۲]. تلقیح سویه‌های مختلفی از باکتری‌های محرک رشد گیاه با دو رقم کلزا می‌تواند اثر تنش شوری بر وزن تر و خشک بخش هوایی و ساقه گیاه را به طور معناداری کاهش دهد [۱]. در بررسی اثر باکتری سودوموناس بر رشد ذرت مشاهده شد که تلقیح گیاه با این باکتری سبب افزایش وزن خشک نسبت به تیمار شاهد می‌شود [۴۳]. تلقیح گیاه با باکتری سودوموناس فلورسنس سویه FY32 که مولد برخی آنزیم‌ها در گیاهان است، موجب کاهش اثر شوری در سطوح مختلف تنش می‌شود. تجزیه واریانس نشان داد که اثر شوری و باکتری بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود (جدول ۱). شوری، باکتری و رقم نیز با هم اثر متقابل داشتند. میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش شوری نسبت به سطح بدون تنش (شاهد) در دو رقم کلزا افزایش داشت، درحالی که در سطوح مختلف شوری ارقام تلقیح‌شده با باکتری دارای فعالیت آنزیم کاتالاز کمتری بودند. افزایش شدت تنش شوری به طور معناداری فعالیت



شکل ۱. میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در دو رقم کلزا در سطوح مختلف تنش شوری و تلقیح با باکتری *P. fluorescens* FY32 (مقایسه میانگین به روش دانکن در سطح ۵ درصد)



شکل ۲. میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز دو رقم کلزا در سطوح مختلف تنش شوری و تلقیح با باکتری *P. fluorescens* FY32 (مقایسه میانگین به روش دانکن در سطح ۵ درصد)

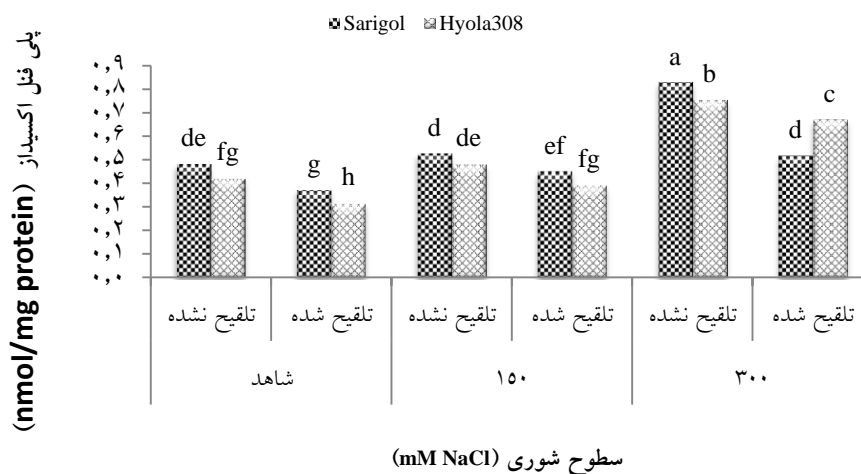
تنش در گیاهچه‌های کلزا افزایش یافت، ولی تلقیح گیاهچه‌ها با باکتری *سودوموناس فلورسنس* مولد آنزیم ACC-دآمیناز تجزیه‌کننده پیش‌ماده تولید اتیلن در گیاه سبب کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز شد که مانند نتایج به‌دست‌آمده از آنزیم کاتالاز و پراکسیداز یک راهکار مثبت برای کاهش آثار شوری می‌تواند در نظر گرفته شود. رقم 'ساریگول' در هر دو تیمار باکتری دارای فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز بیشتری نسبت به رقم 'هایولا ۳۰۸' در سطوح مختلف تنش شوری بود (شکل ۳).

تنش شوری تجمع گونه‌های فعال اکسیژن را القا می‌کند و افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یک راهبرد مهم در از بین بردن این گونه‌ها و افزایش تحمل گیاه به استرس‌های محیطی از جمله شوری است [۲۲]. تنش شوری سبب افزایش چشمگیر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه ذرت شد، ولی استفاده از باکتری‌های PGPR در تلقیح با گیاهان سبب کاهش خسارت‌های اکسیداتیو حاصل از تنش شوری در گیاه ذرت تلقیحی نسبت به گیاهان تلقیح‌نشده شد [۳۱].

تجزیه واریانس نشان داد که اثر شوری، رقم و باکتری، بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه کلزا معنادار است (جدول ۱). در سطح بدون تنش (شاهد) و بدون باکتری (شاهد) اختلافی بین دو رقم 'هایولا ۳۰۸' و 'ساریگول' مشاهده نشد، ولی در سطوح شوری ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم رقم 'ساریگول' در دو حالت تلقیح و عدم تلقیح با باکتری بیشترین فعالیت پراکسیداز را نسبت به رقم 'هایولا ۳۰۸' داشت (شکل ۲). فعالیت آنزیم پراکسیداز عاملی کلیدی برای حفاظت گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی عنوان شد [۳۶]. تنش شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ کلزا و کاهش آثار نامطلوب تنش شوری می‌شود [۱۲]. تلقیح گیاه سویا با باکتری PGPR در شرایط تنش شوری سبب کاهش معنادار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نسبت به گیاهان شاهد شد [۲۸].

پلی‌فنول‌اکسیداز تحت تنش شوری در دو رقم کلزا در حالت تلقیح و عدم تلقیح گیاهچه‌ها با باکتری افزایش داشت. فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز بر اثر افزایش تنش شوری و افزایش خسارت اکسیداتیو و تولید اتیلن ناشی از

بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تجمع یون‌های فلزی در کلزای تلقیح‌شده با باکتری *P. fluorescens* FY32 تحت تنش شوری



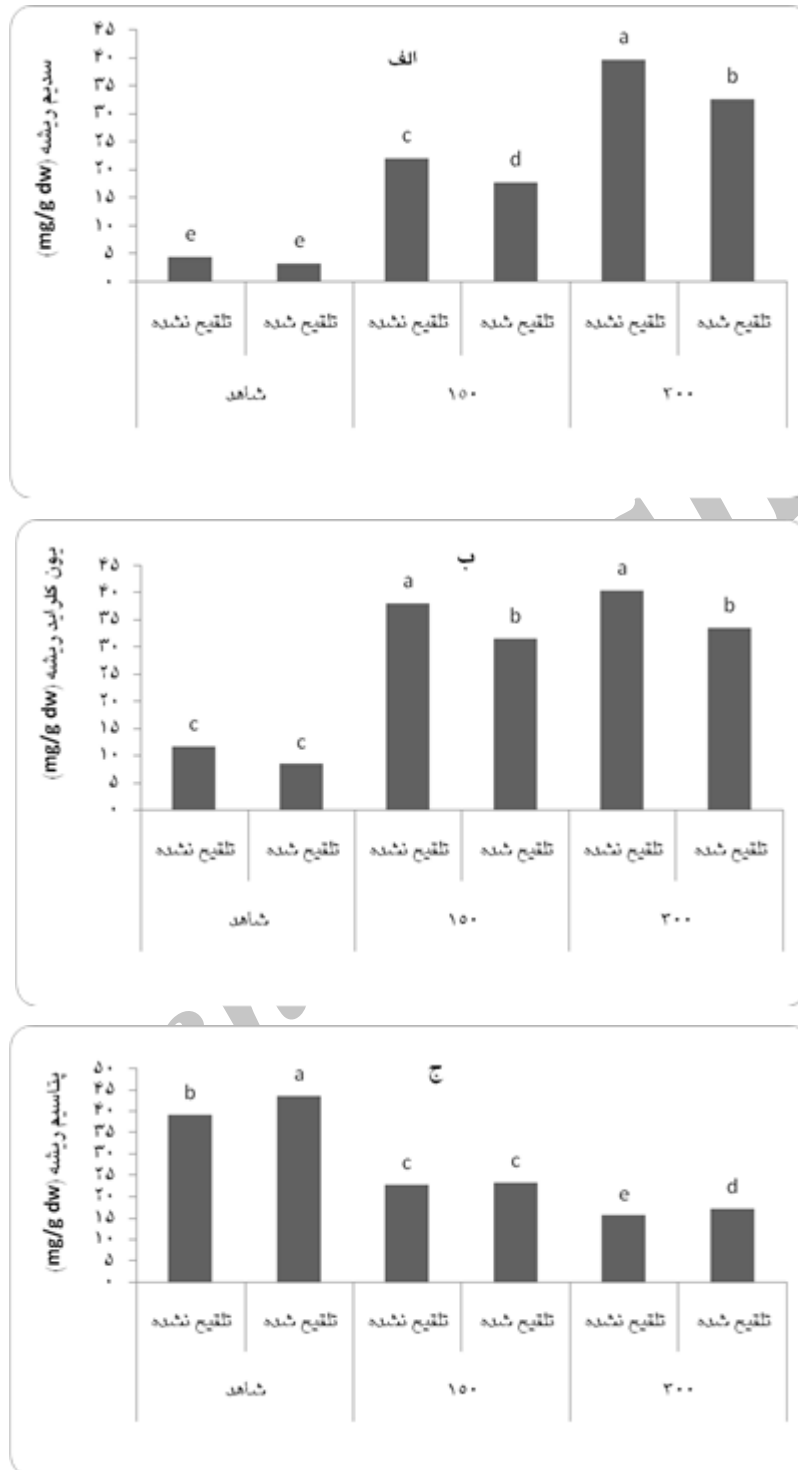
شکل ۳. میانگین آنزیم پلی‌فنول اکسیداز دو رقم کلزا در سطوح مختلف تنش شوری و تلقیح با باکتری *P. fluorescens* FY32 (مقایسه میانگین به‌روش دانکن در سطح ۵ درصد)

گیاهان متحمل به شوری، این یون‌ها در واکنش‌ها انباشته می‌شوند و توازن اسمزی واکوئل، سیتوسول و آپوپلاست با جمع شدن یون پتاسیم و برخی از اسمولیت‌های سازگار نظیر پرولین در سیتوسول انجام می‌گیرد [۳۸]. تحقیق روی گیاه کلزا نشان داد که تنش شوری سبب افزایش معنادار در سطح احتمال ۱ درصد در مقدار سدیم و کلراید گیاه کلزا شد [۶]. در آزمایشی تلقیح گیاه سویا با باکتری PGPR سبب کاهش جذب یون‌های سدیم و کلراید در شرایط تنش شوری شد [۲۸]. مطالعه تأثیر باکتری *Pseudomonas putida* RS-198 بر رشد و جذب عناصر غذایی در پنبه در شرایط تنش شوری نشان داد که با کاربرد مایه تلقیح باکتری، جذب سدیم کاهش داشت [۳۵].

تجزیه داده‌ها برای غلظت پتاسیم ریشه نشان داد که اثر متقابل شوری و باکتری *Sودوموناس فلورسنس* در سطح ۱ درصد اختلاف معناداری دارند (جدول ۱). برعکس غلظت سدیم ریشه که در سطوح مختلف شوری افزایش نشان داشت، محتوای پتاسیم کاهش نشان داد و این کاهش در ریشه گیاهچه‌های تلقیح‌شده با باکتری در حالت تنش شدید به‌طور معناداری کمتر از گیاهچه‌های شاهد بود (شکل ۴).

براساس تجزیه واریانس شوری، باکتری و اثر متقابل تنش شوری و باکتری برای یون‌های سدیم و کلراید ریشه کلزا معنادار بود (جدول ۱). با توجه به مقایسه میانگین سدیم و کلراید ریشه با افزایش شوری در همه تیمارها افزایش یافت، ولی این افزایش هم در سطح تنش متوسط (۱۵۰ میلی‌مولار) و هم در سطح تنش شدید (۳۰۰ میلی‌مولار) در گیاهان تلقیح‌شده کاهش معناداری نسبت به گیاهان تلقیح‌نشده داشت که نشان‌دهنده تأثیر مثبت تلقیح باکتری با کلزا در کاهش اثر منفی تنش شوری است (شکل ۴). اثر متقابل شوری و دو رقم کلزا نیز برای این یون‌ها معنادار بود (جدول ۱). با اینکه افزایش شوری در افزایش غلظت سدیم و کلراید ریشه دو رقم کلزا مؤثر بود، رقم 'ساریگول' هم در سطح تنش متوسط و هم در سطح تنش شدید دارای بیشترین مقدار جذب سدیم و کلراید بود که تحمل کمتر رقم 'ساریگول' به تنش شوری و تجمع بیشتر این یون‌ها در این رقم را در مقایسه با رقم 'هایولا ۳۰۸' نشان می‌دهد (شکل ۵).

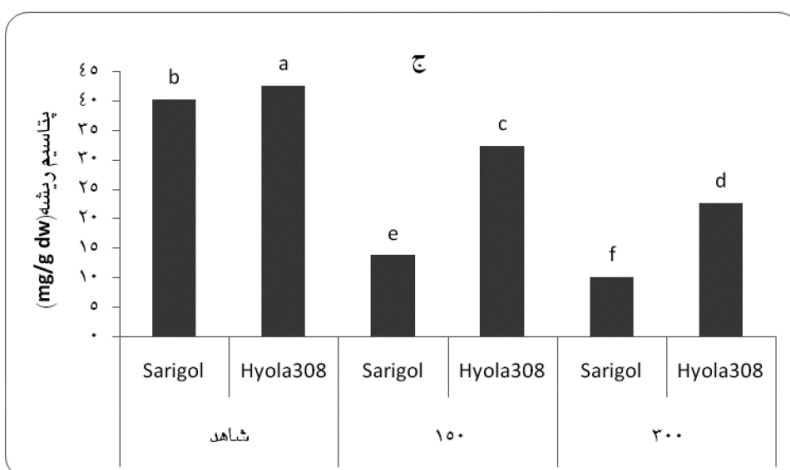
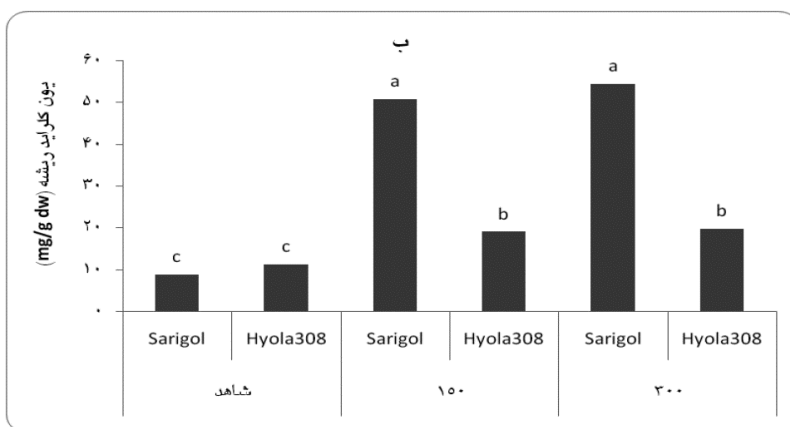
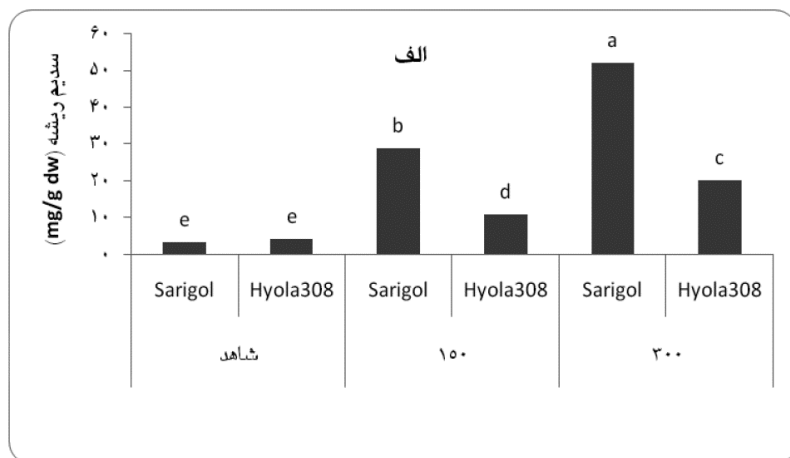
کاهش ورود یون‌های سمی (سدیم و کلراید) به جریان تعرق از طریق سلول‌های ریشه یکی از راهکارهای حفظ رشد و عملکرد گیاهان تحت تنش شوری است [۲۱]. در



سطوح شوری (mM NaCl)

شکل ۴. میانگین غلظت یون‌های فلزی ریشه (الف: سدیم، ب: کلراید و ج: پتاسیم) دو رقم کلزا در سطوح مختلف تنش شوری و تلقیح با باکتری *P. fluorescens* FY32 (مقایسه میانگین به روش دانکن در سطح ۵ درصد)

بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تجمع یون‌های فلزی در کلزای تلقیح‌شده با باکتری *P. fluorescens* FY32 تحت تنش شوری



سطوح شوری (mM NaCl)

شکل ۵. میانگین غلظت یون‌های فلزی ریشه (الف: سدیم، ب: کلراید و ج: پتاسیم) در سطوح مختلف تنش شوری در دو رقم کلزا (مقایسه میانگین به‌روش دانکن در سطح ۵ درصد)

به‌زراعی کشاورزی

دوره ۱۶ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۳

۹۰۷

www.SID.ir

منابع

۱. ارزانش م ح، بن یعقیل ن، قربانلی ه و شهبازی م (۱۳۹۱) تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر پارامترهای رشدی و غلظت عناصر کم‌مصرف در دو رقم کلزا تحت تنش شوری. مدیریت خاک و تولید پایدار. ۲(۲): ۱۵۳-۱۶۳.
۲. حسینی ی، همایی م، کریمی‌ان ن و سعادت س (۱۳۸۷) اثرات فسفر و شوری بر رشد، غلظت عناصر غذایی و کارایی مصرف آب در کلزا (*Brassica napus* L.). پژوهش کشاورزی. ۸(۴): ۱-۱۸.
۳. حیدری شریف‌آباد ح (۱۳۸۰) گیاه و شوری. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهران. ۱۹۰ ص.
۴. ده‌شیری ع، مدرس ثانوی س م ع، رضایی ح و شیرانی‌راد ا ح (۱۳۹۱) اثر افزایش غلظت دی-اکسیدکربن هوا بر برخی صفات سه رقم کلزا (*Brassica napus* L.) در شرایط شور. به‌زراعی نهال و بذر. ۲(۱): ۳۵-۵۲.
۵. رحیمی‌اگره س، رمضان‌پور م ر، محمودی م و مهدی‌پور آ (۱۳۸۹) بررسی کارایی باکتری *Pseudomonas* sp. بر میزان جذب عناصر غذایی تحت شرایط آبیاری با آب شور در برنج. مجموعه مقالات پنجمین همایش ایده‌های نو در کشاورزی: ۱-۴.
۶. سلطانی س، موسوی س ف و مصطفی‌زاده فرد ب (۱۳۸۷) اثر توأم کم‌آبیاری و شوری بر میزان عناصر غذایی و ماده خشک کلزا و پروفیل شوری خاک تحت شرایط گلخانه‌ای. پژوهش آب ایران. ۲(۳): ۶۵-۷۶.
۷. کافی م، باقری ع ر، نباتی ج، زارع مهرجردی م و معصومی ع (۱۳۸۹) بررسی تأثیر تنش شوری بر برخی متغیرهای فیزیولوژیک ۱۱ ژنوتیپ نخود در محیط هیدروپونیک. علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای. ۱(۴): ۵۵-۶۹.

با توجه به تجزیه واریانس داده‌ها اثر متقابل شوری و رقم نیز در صفت پتاسیم ریشه معنادار بود (جدول ۱). در همه سطوح شوری (صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) رقم 'هایولا ۳۰۸' دارای بیشترین غلظت پتاسیم ریشه بود که نشان‌دهنده مقاومت بیشتر این رقم نسبت به رقم 'ساریگول' در سطوح مختلف شوری است (شکل ۵). افزایش شوری موجب کاهش غلظت پتاسیم در گیاه کلزا می‌شود [۲]. در ارقام گندم متحمل به شوری سطح پایین‌تری از سدیم را نسبت به ارقام حساس به شوری در بافت‌ها نگه می‌دارند [۴۰]. با افزایش شوری، مقدار پتاسیم برنج کاهش یافت، در صورتی که با کاربرد باکتری، مقدار این عنصر در برنج افزایش معناداری نسبت به گیاه شاهد داشت [۵].

۴. نتیجه‌گیری

بین سطوح مختلف شوری و باکتری برای وزن خشک بخش‌های مختلف، غلظت یون‌های فلزی (سدیم، پتاسیم و کلراید) و فعالیت آنزیمی (کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنول‌اکسیداز) اختلاف معنادار مشاهده شد که نشان‌دهنده تأثیر شوری و اثر تلقیح با باکتری *P. fluorescens* FY32 بر این صفات است. نتایج نشان داد که مقاومت رقم 'هایولا ۳۰۸' که دارای کمترین کاهش در تولید ماده خشک بوده و مقاوم‌تر از رقم دیگر است، در حضور باکتری تقویت می‌شود. پاسخ به تلقیح با باکتری در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس ('ساریگول') بود و این پاسخ در مورد صفاتی همانند محتوای یون‌های فلزی (کاهش یون‌های سدیم و کلراید و افزایش پتاسیم در رقم مقاوم) و فعالیت آنزیمی مشهود بود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور قدردانی می‌شود. (شماره طرح: ۸۶۱۲۱۱۰۶)

8. Ahmadi A and Ceiocemardeh A (2004) Effect of drought stress on soluble carbohydrate, chlorophyll and proline in four adopted wheat cultivars with various climate of Iran. *Journal of Agricultural Science*. 35: 753-763.
9. Alscher RG, Donahus JR and Cramer CL (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. *Physiologia Plantarum*. 100: 224-233.
10. Appel K and Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Plant Biology*. 55: 373-399.
11. Ashraf M and Ahmad S (2000) Influence of sodium chloride on ion accumulation, yield components and fibre characteristics in salt-tolerant and salt-sensitive lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Field Crop Research*. 66: 115-127.
12. Ashraf M and Ali Q (2008) Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola. *Environmental and Experimental Botany*. 63: 266-273.
13. Ashraf M and McNeilly T (1990) Responses of four Brassica species to sodium chloride. *Environmental and Experimental Botany*. 30: 475-487.
14. Ashraf M and McNeilly T (2004) Salinity tolerance in Brassica oilseeds. *Critical Reviews in Plant Science*. 23: 157-214.
15. Ashraf M, Nazir N and Mc Neilly T (2001) Comparative salt tolerances of amphidiploid and diploid *Brassica species*. *Plant Science*. 160: 683-689.
16. Bailly C (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*. 14: 93-107.
17. Bandeh-Hagh A, Toorchi M, Mohammadi A, Chaparzadeh N, Hosseini- Salekdeh GH and Kazemnia H (2008) Growth and osmotic adjustment of canola genotypes in response to salinity. *Food Agriculture and Environment*. 6: 201-208.
18. Baniaghil N, Arzanesh MH, Ghorbanli M and Shahbazi M (2013) The effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth parameters, antioxidant enzymes and microelements of canola under salt stress. *Biological and Environmental Science*. 3: 17-27.
19. Bhattacharjee S and Mukherjee AK (2002) Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. *Seed Science and Technology*. 30: 279 -288.
20. Chance B and Maehly AC (1995) Assay of catalase and peroxidase. In: S.P, Colowick. and N.O, Kaplan, (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press. NewYork. Pp. 764 -775.
21. Chinnusamy V, Jagendorf A and Zhu JK (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*. 45: 437-448.
22. Chinnusamy V, Zhu J and Zhu JK (2006) Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. *Genetic Engineering*. 27: 141-177.
23. Demirel T and Turkan I (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 53: 247-257.
24. Diatloff E and Rengl Z (2001) Compilation of simple spectrophotometric techniques for the determination of element in nutrient solutions. *Plant Nutrition*. 24: 75-86.
25. Farajzadeh D, Yakhchali B, Aliasgharzad N, Sokhandan-Bashir N and Farajzadeh M (2011) Plant indigenous *Azotobacteria* isolated from soils in Iran. *Current Microbiology*. 64: 397-403.
26. Francois LE (1994) Growth, seed yield, and oil content of canola grown under saline conditions. *Agronomy*. 86: 233-237.
27. Glick BR, Karaturovic DM and Newell PC (1995) A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *Pseudomonas*. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 533-536.

28. Han HS and Lee KD (2005a) Physiological Responses of Soybean - Inoculation of Bradyrhizobium japonicum with PGPR in Saline Soil Conditions. Agricultural and Biological Sciences. 1: 216-221.
29. Han HS and Lee KD (2005b) Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. Journal of Agricultural Biological Science. 1: 210-215.
30. He T and Cramer GR (1992) Growth and mineral nutrition of six rapid-cycling Brassica species in response to seawater salinity. Plant and Soil. 139: 285-294.
31. Kaya C, Ydemir S, Sonmes O, Ashraf M and Dikilitas M (2013) Regulation of growth and some key physiological processes in salt-stressed maize (*Zea mays* L.) plants by exogenous application of asparagine and glycerol. Acta Botanica Croatica. 72: 157-168.
32. Koroï SA (1989) Gel elektrophoresis und spectrophotometrische Untersuchung der Temperatur- und Strukturabhängigkeit der Peroxidase Isoenzyme. Crop Physiology. 20: 15-22.
33. Leidi EO and Saiz JF (1997) Is salinity tolerance related to Na accumulation in upland cotton (*Gossypium hirsutum*) seedlings. Plant Soil. 190: 67-75.
34. Lifshitz R, Klopper JW, Kozłowski M, Simonson C, Carlson J, Tipping EM and Zaleska I (1987) Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. Canadian Journal of Microbiology. 33: 390-395.
35. Lixia Y, Zhansheng W, Yuanyuan Z, Imdad K and Chun L (2010) Growth promoting and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. European. Soil Biology. 46: 49-54.
36. Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA and Cambraia J (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. Environmental and Experimental Botany. 49: 69-76.
37. Moradi F and Abdelbaghi MI (2007) Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. Annales of Botany. 99: 1161-1173.
38. Munns R (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. Plant, Cell and Environment. 16: 15-24.
39. Nicoli MC, Elizalde BE, Pitotte A and Leric CR (1991) Effect of sugars and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. Journal of Food Biochemistry. 15: 169-184.
40. Rivelli AR, James RA, Munns R and Condon AG (2002) Effect of salinity on water relations and growth of wheat genotypes with contrasting sodium uptake. Functional Plant Biology. 29: 1065-1074.
41. Saravanakumar D, Kavino M, Raguchander T, Subbian P and Samiyappan R (2010) Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. Plant Physiology. 33: 203-209.
42. Valverde A, Burgos A, Fiscella T, Rivas R, Velazquez E, Rodriguez-Barrueco C, Cervantes E, Chamber M, and Igual JM (2006) Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. Plant and Soil. 287: 43-50.
43. Van VT, Berge O, Ngoke S, Balandreau J and Heulin T (2000) Repeated beneficial effect of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in lowfertility sulphate acid soil of Vietnam. Plant and Soil. 218: 273-284.