



بررسی اثر فرم نیتروژن بر عکس العمل لوبیا سبز (*Phaseolous vulgaris* cv. Alpha) نسبت به تیمار NaHCO_3 در کشت هیدروپونیک

نجمه رسولی^۱ - حمیدرضا روستا^{*} - محمدحسین شمشیری^۲

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۷

چکیده

با توجه به اینکه نیتروژن، یکی از اصلی‌ترین عناصر مورد نیاز گیاه‌می‌باشد که چگونگی رشد و بازدهی گیاهان به آن بستگی دارد و از طرفی نیز بیشتر منابع آب و خاک ایران آهکی هستند، این پژوهش به منظور بررسی اثر متقابل غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم و نوع نیتروژن در لوبیا سبز در سیستم آبکشت در قالب آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور، یکی غلظت بی‌کربنات سدیم (۱۰، ۵ و ۱۵ میلی‌مولا) و دیگری دو فرم نیتروژن (آمونیوم و نیترات) انجام گرفت. نتایج نشان داد که آمونیوم در مقایسه با نیترات رشد رویشی را کاهش داد از طرفی بی‌کربنات سبب تشدید اثر سمیت آمونیوم و کاهش رشد رویشی شد. آمونیوم همچنین میزان گلدهی و تولید نیام را نسبت به نیترات افزایش داد. در محلول غذایی حاوی نیترات اضافه شدن بی‌کربنات باعث کاهش رشد زایشی گیاهان لوبیا سبز شد که می‌تواند به دلیل اثر تجمعی بی‌کربنات و نیترات بر روی افزایش pH محلول غذایی باشد.

واژه‌های کلیدی: آمونیوم، بیکربنات، تغذیه گیاه، قلاییست، نیترات

مقدمه

و ورود آن‌ها به درون اسیدهای آمینه، آمیدها و رهاشدن هم زمان پروتون‌ها به محیط ریشه برای جبران بار الکتریکی است. آمونیاک جذب شده به صورت اسیدهای آمینه، آمیدها و ترکیبات همانند، به شاخه‌ها انتقال می‌پارد (۱۲ و ۱۵). آسیمیلاسیون آمونیوم در ریشه‌ها به علت نیاز به اسکلت‌های کربنی، برای ساختن اسیدهای آمینه و آمیدها، به میزان بالایی فند نیاز دارد. جایه‌جایی آمونیاک جذب شده در موادآلی از ریشه‌ها به ساقه‌ها، به طور عمده و یا تنها در درون آوند چوبی انجام می‌گیرد (۱۱).

سمیت آمونیاک ممکن است مربوط به نفوذ سریع آن به درون غشاهای زنده باشد. نیترات در آوند چوبی حرکت می‌کند و برای این که به ساختمان‌های آلی وارد شود و نقش اساسی خود را، به عنوان ماده غذایی گیاه باری کند، باید به آمونیاک احیاء شود (۱۱). گیاهانی که با خاک‌های با pH بالا و آهکی سازگار شده‌اند، جذب نیترات را در اولویت قرار می‌دهند. آمونیوم نسبت به نیترات، سریع‌تر جذب می‌شود و انرژی کمتری برای آسیمیلاسیون در گیاه نیاز دارد. کاربرد توأم آمونیوم و نیترات می‌تواند سمیت آمونیوم را همانند کاربرد کودهای پتابیمی کاهش دهد (۴ و ۱۶).

کربنات‌ها و بی‌کربنات‌ها عمومی‌ترین و مهم‌ترین ترکیبات قلایی هستند. بی‌کربنات یونی است که به صورت فراوان در خاک‌های

نیترات و آمونیوم، منابع عمده‌ی نیتروژن معدنی هستند که به وسیله ریشه‌های گیاهان عالی جذب می‌شوند (۵). گیاهان می‌توانند یون‌های نیترات و آمونیوم را جذب کنند اما، بسیاری از گونه‌ها قادر نیستند با آمونیوم به عنوان تنها منبع نیتروژن رشد بهینه‌ای داشته باشند (۷ و ۱۶). در ریشه‌ها، پخش زیادی از آمونیوم باید وارد ترکیبات آلی شوند. زیرا آمونیوم و به ویژه ماده تعادلی آن، یعنی آمونیاک، در غلظت‌های اندک سمی هستند. تشکیل اسیدهای آمینه، آمیدها و ترکیباتی از این گونه مسیری عمده در از میان بردن سمیت یون‌های آمونیومی هستند که به وسیله‌ی ریشه جذب شده‌اند و یا از احیاء نیترات و تثبیت گاز ازت بوجود آمده‌اند (۳). با وارد شدن ملکول آمونیوم در ساختمان مواد آلی، این ماده از شکل سمی خارج شده و در نتیجه سمیت آن از بین می‌رود (۱۶). مراحل عمده‌ی مصرف یون‌های آمونیومی که به ریشه‌ها داده شده‌اند، جذب به درون سلول‌های ریشه

۱،۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران گروه علوم باگبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان
(Email: roosta_h@yahoo.com)
*- نویسنده مسئول:

لیتری مجهر به سیستم هوادهی انتقال داده شدند. درون هر گلدان چهار گیاه قرار گرفت و به گلدان‌ها عناصر پر مصرف شامل مونو پتاسیم فسفات (۲/۰ میلی‌مولار)، سولفات پتاسیم (۱/۰ میلی‌مولار)، سولفات منیزیم (۳/۰ میلی‌مولار) و کلرید سدیم (۱/۰ میلی‌مولار) اضافه شد. عناصر کم‌صرف نیز به صورت کلات آهن (۲۰ میکرومولار، Fe-EDDHA)، سولفات منگنز (۷ میکرومولار)، کلریدروی (۷/۰ میکرومولار)، سولفات مس (۸/۰ میکرومولار)، اسیدبوریک (۲ میکرومولار)، مولیدات سدیم (۸/۰ میکرومولار) بکار رفت (۱۶). بسته به تیمار مورد استفاده، نیتروژن به دو صورت سولفات آمونیوم (۵ میلی‌مولار)، یا نیترات کلسیم (۵ میلی‌مولار) افزوده شد. محلول غذایی درون گلدان‌ها به صورت دوره‌ای هر هفته عوض شد. پس از اتمام تولید گل و نیام برداشت گیاهان به صورت کامل انجام شد.

فاکتورهای رویشی و زایشی مورد نظر برای اندازه‌گیری شامل: تعیین ارتفاع ساقه و طول ریشه که هر یک از موارد فوق با خط‌کش اندازه‌گیری شد و ثبت گردید. برای اندازه‌گیری سطح برگ؛ برگ را با استفاده از دستگاه سنجش سطح برگ مدل CI-202 ساخت کشور آمریکا اسکن کرده و سطح برگ بر اساس سانتی‌متر مربع به دست آمد. تعداد برگ کل نیز در زمان برداشت شمارش و یادداشت شد. تعداد گل و نیام در گیاهان در سه مرحله گیاهان ۴۵ روزه، ۴۸ روزه و ۶۲ روزه، شمارش شد. نیام‌های قابل برداشت پس از برداشت توزین و خشک شده و برای انجام آزمایشات و مراحل دیگر طرح، نگهداری می‌شدند. برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک اندام‌های گیاه؛ در پایان آزمایش اندام‌های گیاه برداشت و توزین شدند. سپس نمونه‌ها درون آون در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، برای مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد و وزن خشک آن‌ها تعیین گردید. آنالیز داده‌های آماری حاصل از این آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام گرفت و مقایسه میانگین‌تیمارها توسط آزمون دانکن و در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج

وزن تر و خشک گیاه

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر بی‌کربنات و برهمکنش آن با نوع نیتروژن بر وزن تر و خشک اندام هوایی، ریشه و نیام، سطح برگ و تعداد میانگره از نظر آماری در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. در صورتیکه اثر نیتروژن فقط بر وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، سطح برگ و تعداد میانگره معنی‌دار شد. مقایسه میانگین‌های وزن تر اندام هوایی نشان می‌دهد که میزان وزن تر اندام

۱- به استثنای کودهای نیتروژنه که غلظت بر اساس عنصر نیتروژن می‌باشد، بقیه ارقام داخل پرانتز مربوط به غلظت کودها می‌باشد.

آهکی یافت می‌شود و یک فاکتور تحریک کننده اصلی کمبود آهن است که در سیاری از محیط‌های کشت اتفاق می‌افتد (۲۱). میزان کمبود ریز‌مقداری‌ها مخصوصاً آهن در برگ‌ها در خاک‌های قلیایی مسأله‌ای جهانی در تولید محصولات کشاورزی است (۱۱). به طور کلی عامل عدمه بروز عالمی کمبود آهن (کلروز)، مصرف نامتعادل کودها، نبود تهويه مناسب، کیفیت پائین آب آبیاری، عدم رعایت مصرف بهینه کود و آب، حضور یون‌های کربنات و بی‌کربنات و آهک فراوان می‌باشد (۱ و ۶). قلیائیت آب مصرفی برای آبیاری محصولات گلخانه‌ای یک نگرانی عمدی ایجاد کرده، زیرا تاثیر زیان‌آوری بر روی تغذیه و رشد گیاهان دارد. بی‌کربنات اثرات مضاری بر ظرفیت احیاء-Fe آهن دارد و در آپوپلاست ریشه با تحت تأثیر قرار دادن فعالیت-ریدوکتاز، بازدارنده احیاء آهن می‌باشد (۲۷ و ۲۸). در پژوهشی که توسط یانگ و همکاران (۲۶) صورت گرفت، افزایش غلظت بی‌کربنات تا ۱۶۰ میلی‌مولار در گیاه هالوفیت *Chloris virgata* سبب کاهش پارامترهای فتوسنتزی (فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنده‌ای) نشد ولی با افزایش غلظت بی‌کربنات از ۱۶۰ میلی‌مولار پارامترهای فتوسنتزی شروع به کاهش کرد. با استفاده از کودهای آمونیومی برای تامین نیتروژن گیاه، امکان اسیدی کردن pH محیط رشد وجود دارد (۱۴). آمونیوم با دو مکانیسم سبب اسیدی شدن محیط ریشه می‌شود. در یک مکانیسم گیاه یون آمونیوم را جذب کرده و پروتون را به ریزوسفر رها می‌کند. مکانیسم دیگر تبدیل یون آمونیوم به یون نیترات به وسیله باکتری‌های خاکزی است که باعث اسیدی شدن می‌شوند. البته باید توجه داشت که یون آمونیوم بیش از اندازه در کودهای شیمیایی مورد استفاده نیز می‌تواند سمی باشد، که این سمیت بوسیله اسیدی کردن بیش از اندازه یا افزایش فرم سمی آمونیاک (NH_3) در اثر pH بالای محیط ریشه ایجاد می‌شود (۱۳ و ۱۶). با توجه به آهکی بودن سیاری از خاک‌ها و قلیائیت منابع آبی کشور و تأثیر آن بر رشد گیاهان و همچنین با توجه به اثر متفاوت آمونیوم و نیترات بر pH محیط کشت گیاه پژوهش زیر چهت بررسی برهمکنش بین منابع نیتروژن و بی‌کربنات انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر متقابل غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم و نوع نیتروژن در لوبيا سبز در سیستم آبکشت آزمایشی در قالب فاکتوریل با دو فاکتور، یکی غلظت بی‌کربنات سدیم (۱، ۰، ۵ و ۱۵ میلی‌مولار) و دیگری دو فرم نیتروژن (آمونیوم و نیترات) و طرح پایه کاملاً تصادفی در گلخانه هیدروپونیک دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر رفسنجان انجام گرفت. بذرهای لوبيا سبز رقم آلفا ابتدا درون گلدان‌های یونولیتی حاوی پرلایت کاشته شدند و پس از دو هفته محلول‌دهی نشاء‌های یکنواخت انتخاب و به گلدان‌های چهار

سطح برگ نشان می‌دهد. بیشترین میزان سطح برگ متعلق به تیمار صفر بی‌کربنات در نیتروژن نیتراتی و کمترین میزان سطح برگ در تیمار ۱۵ میلی‌مولار بی‌کربنات در نیتروژن آمونیومی است. نتایج موجود در جدول ۱، نشان دهنده این موضوع می‌باشد که در هر دو تیمار نیتروژن با افزودن غلظت یک میلی‌مولار بی‌کربنات، تعداد میان‌گره افزایش یافته، اما با اضافه کردن غلظت‌های بیشتر تعداد میان‌گره افزایش یافته، اما با اضافه کردن غلظت‌های بیشتر تعداد میان‌گره شروع به کاهش می‌کند. هر چند که اختلاف‌های کمی در بین دو تیمار نیتروژن دیده می‌شود و با توجه به جدول مشخص است که تعداد میان‌گره‌ها در تمام غلظت‌ها به جز یک میلی‌مولار بی‌کربنات تیمار نیترات بیشتر از نیتروژن آمونیومی است، و بیشترین تعداد میان‌گره در غلظت یک میلی‌مولار در هر دو نوع تیمار نیتروژن مشترک است و کمترین تعداد میان‌گره در تیمار آمونیوم و با غلظت ۱۵ میلی‌مولار بی‌کربنات مشاهده می‌شود.

اثر متقابل نوع نیتروژن و بی‌کربنات بر تخصیص مواد به اندام‌های لویا سبز

در شکل ۱ درصد وزن خشک ریشه، اندام هوایی و نیام از کل گیاه در محلول‌های غذایی مختلف دیده می‌شود. همان‌طور که مشاهده می‌شود در تیمار آمونیوم با افزایش غلظت بی‌کربنات وزن خشک نیام درصد بیشتری از وزن خشک کل گیاه را تشکیل می‌دهد و این نشان دهنده کاهش شدید رشد رویشی اندام هوایی و همچنین ریشه گیاهان پرورش یافته در تیمار آمونیوم می‌باشد و این مطلب بیشتر از بقیه در تیمار ۱۵ میلی‌مولار بی‌کربنات و کود آمونیوم دیده می‌شود. در مورد نسبت وزن خشک قسمت‌های مختلف گیاهان تیمار شده با نیتروژن نیتراتی همان‌طور که دیده می‌شود با افزایش غلظت بی‌کربنات به ۱۵ میلی‌مولار درصد وزن خشک ریشه به درصد وزن خشک کل گیاه ۲۰ درصد افزایش یافته و بیشترین درصد کاهش را در وزن خشک اندام هوایی می‌بینیم. وزن خشک نیام نیز کاهش دارد که این کاهش از تیمار ۵ میلی‌مولار بی‌کربنات شروع شد. در مقایسه کل بین دو تیمار نیتروژنی می‌بینیم که در غلظت صفر میلی‌مولار بی‌کربنات وزن خشک ریشه در هر دو تیمار تقریباً برابر است و تفاوت اصلی بین درصد وزن خشک اندام هوایی و نیام می‌باشد، که نیتروژن نیتراتی باعث شده تا وزن خشک اندام هوایی نسبت به نیتروژن آمونیومی بیشتر باشد. در صورتی که در نیتروژن آمونیومی وزن خشک نیام نسبت به نیتروژن نیتراتی بیشتر است.

در مورد غلظت‌های ۱ میلی‌مولار بی‌کربنات نیز تقریباً شرایط مشابه با غلظت صفر بی‌کربنات است و تنها تفاوت در افزایش نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه در تیمار نیتروژن نیتراتی است.

هوایی در هر دو تیمار نیترات و آمونیوم با افزایش میزان بی‌کربنات کاهش یافته یعنی هر چه غلظت بی‌کربنات موجود در محلول بیشتر شده میزان وزن اندام هوایی کاهش بیشتری داشته به این صورت که کمترین وزن اندام هوایی در دو تیمار نیترات و آمونیوم مربوط به بی‌کربنات ۱۵ و بعد ۵ میلی‌مولار می‌باشد که این اختلاف‌ها معنی‌دار بودند (جدول ۱). از طرفی بیشترین وزن تر اندام هوایی در گیاهان تیمار شده با نیترات متعلق به بی‌کربنات صفر می‌باشد، در صورتی که در گیاهان تیمار شده با آمونیوم بیشترین وزن تر اندام هوایی مربوط به بی‌کربنات یک میلی‌مولار است. از طرفی همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، وزن تر اندام هوایی در تیمار نیترات به میزان چشمگیری بیشتر از تیمار آمونیوم می‌باشد. در مورد وزن خشک اندام هوایی با توجه به داده‌های به دست آمده در جدول ۱ همان‌روند کلی کاهش در وزن تر را در وزن خشک اندام هوایی نیز مشاهده می‌کنیم. با توجه به نتایج موجود در جدول ۱ اختلاف معنی‌داری بین وزن تر ریشه در گیاهان تیمار شده با نیترات و گیاهان تیمار شده با آمونیوم وجود داشت. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان وزن تر ریشه در گیاهان تیمار شده با نیتروژن نیتراتی بیشتر از گیاهان تیمار شده با نیتروژن آمونیومی است. همچنین با افزایش غلظت بی‌کربنات در هر دو نوع تیمار نیتروژنی یک روند کلی در کاهش وزن تر ریشه مشاهده شد و تنها مورد استثناء در مورد غلظت یک میلی‌مولار بی‌کربنات در تیمار آمونیوم بود که افزایش وزن تر را نسبت به تیمار ۱۵ میلی‌مولار بی‌کربنات در تیمار آمونیوم و وزن تر نیام همان‌گونه آمد (جدول ۱). نتایج تجزیه و تحلیل آماری وزن تر نیام کاهش تولید نیام که در جدول ۱ مشاهده می‌شود نشان دهنده کاهش تولید نیام با افزایش غلظت بی‌کربنات می‌باشد، هر چند در تیمار آمونیوم اختلاف فقط در غلظت ۱۵ میلی‌مولار بی‌کربنات معنی‌دار شده که کمترین میزان تولید نیام در هر دو تیمار نیترات و آمونیوم است و بقیه داده‌ها تقریباً با اختلافات خیلی کم در یک محدوده می‌باشند. در مورد تیمار نیترات در ابتدا افزایشی در تیمار یک میلی‌مولار بی‌کربنات دیده شد و در ادامه با افزایش غلظت، کاهش محصول را داشتیم که البته بیشترین وزن تر نیام نیز در این تیمار و در غلظت یک میلی‌مولار بی‌کربنات وجود داشت. در مورد وزن خشک نیام نیز نتایج تقریباً مشابهی بدست آمد (جدول ۱).

نتایج (جدول ۱) نشان می‌دهد به طور کلی سطح برگ گیاهان پرورش یافته در نیتروژن نیتراتی، در همه غلظت‌های مختلف تیمار بی‌کربنات، بیشتر از غلظت‌های مشابه بی‌کربنات در گیاهان پرورش یافته در نیتروژن آمونیومی است و در هر دو تیمار آمونیوم و نیترات یک روند کاهش سطح برگ را با افزایش غلظت بی‌کربنات مشاهده می‌کنیم که تنها مورد استثناء آن غلظت یک میلی‌مولار بی‌کربنات نیتروژن آمونیومی می‌باشد که نسبت به غلظت صفر افزایش کمی در

جدول ۱- اثر مغایر نوع نیتروژن و می کربنات بر دشودیتی و زایسی در گیاه لوپیا سبز

میانگینه	تعداد	سطح برق (ساناتریت مواد)	وزن خشک نیام	وزن خشک اندام	وزن تردیام	وزن تردیشہ	وزن اندام	وزن هوایی (گرم)	وزن هوایی (گرم)	وزن تردیام	وزن تردیشہ	وزن هوایی (گرم)	وزن هوایی (گرم)	می کربنات mM	نوع نیتروژن (mM)	
۹/۳۳±۰/۳۳ ^b	۲۶/۳۲±۰/۳۱ ^c	۲/۱۹±۰/۱۷ ^c	۲/۱۴۲±۰/۰۸ ^b	۲/۱۹±۰/۰۸ ^b	۱/۱۷/۰/۰۷ ^b	۱/۱۷/۰/۰۷ ^b	۱/۱۷/۰/۰۷ ^b	۱/۹/۹۴±۰/۹۴ ^{bc}	۱/۹/۹۴±۰/۹۴ ^{bc}	۲۳/۰/۵۵±۲/۳۹ ^c	۲۳/۰/۵۵±۲/۳۹ ^c	۲۱/۴۴±۰/۴۴ ^{bc}	۲۱/۴۴±۰/۴۴ ^{bc}	-	آمونیوم	
۱/۰/۰±۰/۰ ^a	۳۹/۰/۸±۰/۱۸ ^b	۳۲/۰/۸±۰/۱۸ ^b	۲/۱۲۵±۰/۱۰ ^b	۲/۱۲۵±۰/۱۰ ^b	۹/۰/۵۱±۰/۰۵ ^b	۹/۰/۵۱±۰/۰۵ ^b	۹/۰/۵۱±۰/۰۵ ^b	۱/۹/۰۰±۰/۰۸ ^c	۱/۹/۰۰±۰/۰۸ ^c	۱/۶/۰/۰۰±۰/۱۸ ^c	۱/۶/۰/۰۰±۰/۱۸ ^c	۱/۶/۰/۰۰±۰/۱۸ ^c	۱/۶/۰/۰۰±۰/۱۸ ^c	-	ترات	
۷/۵۷±۰/۳۳ ^c	۱۶/۹/۹±۰/۰۵ ^d	۹/۹/۹±۰/۰۳ ^b	۲/۱۲۳±۰/۰۲ ^b	۲/۱۲۳±۰/۰۲ ^b	۵/۰/۴۳±۰/۰۱ ^c	۵/۰/۴۳±۰/۰۱ ^c	۵/۰/۴۳±۰/۰۱ ^c	۱/۹/۰۰±۰/۰۷ ^c	۱/۹/۰۰±۰/۰۷ ^c	۱/۶/۰/۰۰±۰/۱۸ ^c	۱/۶/۰/۰۰±۰/۱۸ ^c	۱/۶/۰/۰۰±۰/۱۸ ^c	۱/۶/۰/۰۰±۰/۱۸ ^c	۵	خطا	
۰/۰/۰±۰/۰ ^c	۵/۰/۵۵±۰/۰۲ ^c	۱/۰/۲۵±۰/۰۱ ^c	۰/۰/۲۱±۰/۰۰ ^c	۰/۰/۲۱±۰/۰۰ ^c	۰/۰/۰/۷۰ ^c	۰/۰/۰/۷۰ ^c	۰/۰/۰/۷۰ ^c	۱/۷/۰/۷۰±۰/۰۵ ^b	۵	خطا						
۱/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	۵/۷/۳/۰±۰/۰/۰ ^a	۳/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	۲/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	۲/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	۱/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	-	خطا									
۱/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	۴/۹/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	۳/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	۲/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	۲/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	۱/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^a	-	خطا									
۸/۵۰±۰/۰/۰ ^b	۳/۹/۰/۰±۰/۰/۰ ^b	۱/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^b	۰/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^b	-	خطا											
۶/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^d	۲/۹/۰/۰±۰/۰/۰ ^c	۰/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^c	-	خطا												
میانگین مردمات																
۲/۱۷ ^{**}	۲/۱۰/۰/۷۴ ^{**}	۰/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^c	۱/۱۷/۰/۸ ^{**}	۱	N											
۳/۳/۰/۵ ^{**}	۱/۱/۰/۰/۳۲ ^{**}	۰/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^c	۱/۱۷/۰/۷۲ ^{**}	۳	B											
۸/۰/۰/۰ ^{**}	۰/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^c	۱/۱۷/۰/۷۲ ^{**}	۳	N*B												
۰/۱/۰/۰ [*]	۰/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^c	۱۶	خطا													
۴/۷۷ [*]	۰/۰/۰/۰±۰/۰/۰ ^c	۲۴/۰/۵	%CV													

وزن خشک اندام هوایی کاهش دارد، در صورتی که در نیتروژن آمونیومی مشاهده شود، با افزایش درصد وزن خشک اندام هوایی و کاهش وزن غیرمعنی دار بودن در سطح اختصار ۵٪ و ۱٪ و غیر معنی دار بودن باشد.

میانگین هایی که در هر سنتون طرای حروف مشترک می باشند از نظر آزمون دانکن در سطح اختصار ۵٪ درصد اختلاف معنی داری ندارند.

B = بیکربنات، N = نیتروژن

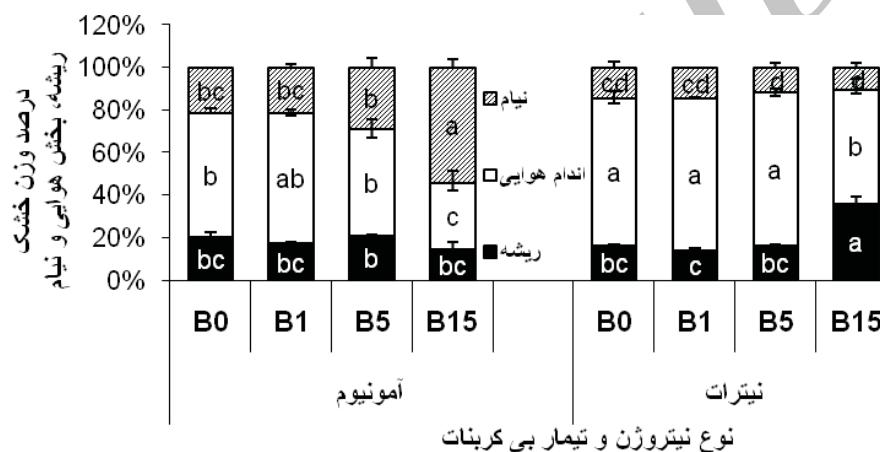
در مورد غلظت ۵ میلی مولار بی کربنات در نیتروژن آمونیومی مشاهده شود، که با افزایش درصد وزن خشک ریشه و نیام درصد

که مشاهده می‌شود، در تیمار آمونیوم بیشترین تعداد گل مربوط به غلظت ۱ میلی‌مولار بی‌کربنات می‌باشد و با افزایش غلظت بی‌کربنات تعداد گل‌ها نیز کاهش پیدا کرده، بنابراین ۱ میلی‌مولار بی‌کربنات در تیمار آمونیوم می‌تواند باعث بهبود گل‌دهی شود (شکل ۲). کمترین گل‌دهی مربوط به غلظت ۱۵ میلی‌مولار بی‌کربنات است. همچنین بیشترین تعداد گل را در مرحله زمانی اول یعنی گیاهان ۴۵ روزه می‌بینیم و با گذشت زمان همرا با تشکیل نیام‌ها از تعداد گل‌ها کاسته می‌شود و در مورد نیتروژن نیتراتی همان طور که دیده می‌شود، بیشترین گل‌دهی مربوط به غلظت صفر بی‌کربنات است و با افزایش غلظت بی‌کربنات میزان گل‌دهی در سه مرحله زمانی مختلف تقریباً به یک اندازه کاهش یافته و در نهایت در غلظت ۱۵ میلی‌مولار بی‌کربنات کمترین میزان گل‌دهی را در هر سه مرحله زمانی داریم.

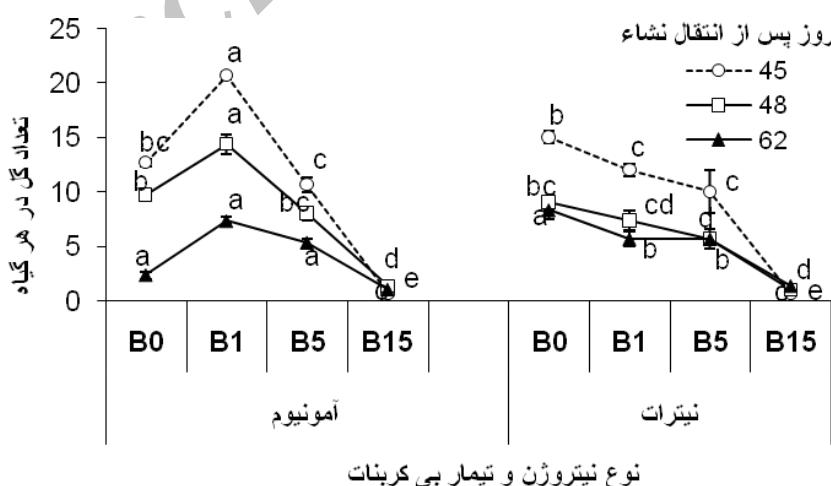
خشک نیام مواجه می‌شویم. تفاوت‌ها در نسبت بین درصد وزن خشک قسمت‌های مختلف گیاهان در غلظت ۱۵ میلی‌مولار بی‌کربنات بهتر دیده می‌شود. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در تیمار نیتروژن آمونیومی درصد وزن خشک ریشه و اندام هوایی به شدت کاهش یافته و درصد وزن خشک نیام به درصد وزن خشک کل گیاه افزایش چشمگیری دارد، در صورتی که در نیتروژن نیتراتی درصد وزن خشک ریشه نسبت بیشتری از درصد وزن خشک کل گیاه را در بر دارد و درصد وزن خشک اندام هوایی و نیام کاهش یافته است.

اثر متقابل نوع نیتروژن و بی‌کربنات بر تعداد گل در گیاه لوبيا سبز

تعداد گل در گیاهان در سه مرحله گیاهان ۴۵ روزه، ۴۸ روزه و ۶۲ روزه، شمارش شده و نتایج به دست آمده به قرار زیر است. همان‌طور



شکل ۱- اثر متقابل نوع نیتروژن (۵ میلی‌مولار) و بی‌کربنات (۰، ۱، ۵ و ۱۵ میلی‌مولار) بر وزن خشک ریشه، بخش هوایی و نیام لوبيا سبز. حروف متفاوت بین تیمارها (در داده‌های مربوط به اندام گیاهی مشابه) نشانه اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۲- اثر متقابل نوع نیتروژن (۵ میلی‌مولار) و بی‌کربنات (۰، ۱، ۵ و ۱۵ میلی‌مولار) بر تعداد گل در گیاه لوبيا سبز. حروف متفاوت بین تیمارها (در داده‌های مربوط به روز شمارش گل مشابه) نشانه اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

اثر متقابل نوع نیتروژن و بی کربنات بر تعداد نیام در گیاه لوبيا سبز

اثر نوع نیتروژن و غلظت بی کربنات بر تعداد نیام در سه فاصله زمانی مشخص در شکل ۳ دیده می شود. در نیتروژن آمونیومی بیشترین تولید نیام را در غلظت ۱ میلی مولار بی کربنات و در گیاهان ۶۲ روزه و بعد گیاهان ۴۸ روزه و در نهایت در گیاهان ۴۵ روزه داریم و بعد از آن در هر سه مرحله زمانی با کاهش تولید نیام مواجه شده تا اینکه در غلظت ۱۵ میلی مولار بی کربنات کمترین تولید نیام را در هر سه مرحله داریم. در مورد نیتروژن نیتراتی نیز در آخرین مرحله شمارش یعنی گیاهان ۶۲ روزه در همه غلظت‌ها تعداد نیام بیشتری داریم و بعد گیاهان ۴۸ روزه و در نهایت کمترین تعداد نیام متعلق به گیاهان ۴۵ روزه است. اما در این گیاهان که با نیتروژن نیتراتی تعذیب شده‌اند، بیشترین تولید نیام در گیاهان ۶۲ روزه متعلق به غلظت صفر بی کربنات است. که با افزایش غلظت بی کربنات تعداد گل‌ها در این دوره زمانی کاهش یافته اما در ۴۵ روزه بیشترین تولید نیام مربوط به غلظت ۱ میلی مولار بی کربنات است. به عبارت دیگر در این مرحله زمانی با افزایش قلیائیت محلول، تولید نیام افزایش و سپس با افزایش بیشتر غلظت بی کربنات با کاهش تولید نیام رو به رو می‌شویم و در نهایت در غلظت ۱۵ میلی مولار بی کربنات میزان تولید نیام در هر سه مرحله شمارش نیام‌ها تقریباً به هم نزدیک بوده و کمترین تعداد نیام‌ها را نیز نشان می‌دهد.

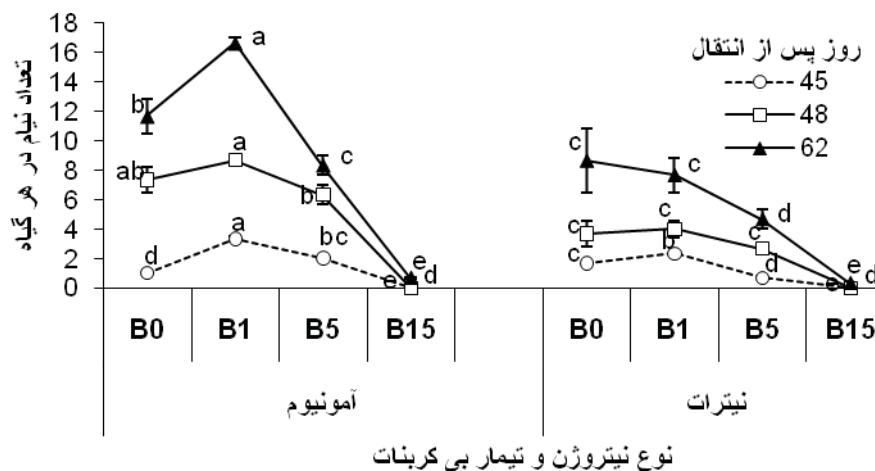
بحث

رشد رویشی

همان‌گونه که در جدول ۱ دیده می‌شود، آمونیوم وزن‌تر اندام هوایی، وزن‌تر ریشه، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه را کاهش داده است که کاهش رشد رویشی توسط آزمیزی سفوفانول پیرووات کربوکسیلاز موجود در ریشه چهت اسیمیلاسیون آمونیوم، مربوط دانست. اما این اثر مثبت بی کربنات در غلظت‌های بالاتر از بین رفت و فاکتورهای رویشی شروع به کاهش کردند. در صورتی که در محلول غذایی روشی نیترات اضافه شدن بی کربنات از همان ابتدا باعث کاهش رشد رویشی گیاهان لوبيا سبز شد که می‌تواند به دلیل اثر تجمعی بی کربنات و نیترات بر روی افزایش pH محلول غذایی باشد. بی کربنات از طریق کاهش حلالیت مواد غذایی بر رشد گیاه اثر می‌گذارد. افزایش pH باعث کاهش انتقال بسیاری از عناصر غذایی بخصوص ریزمندی‌ها به گیاهان شده و در نتیجه علائم کمبود در آن‌ها مشاهده می‌گردد. به طور مثال در pH بالای ۸/۵ میزان قابلیت حلالیت عناصر مانند آهن، منگنز، مس و روی کاهش می‌یابد. آپوپلاست برگ یک فاکتور خیلی مهم در کنترل قابلیت در دسترس بودن عناصری از قبیل آهن، منگنز، مس و روی در برگ است. بی کربنات نیز نقش مهمی در تغییر pH آپوپلاست برگ دارد.

روستا و شاقینگ (۱۶) در بررسی پاسخ خیار به آمونیوم به تتابع مشاهی دست یافتند. آن‌ها مشاهده کردند که آمونیوم جذب آئیون‌ها را تحریک می‌کند ولی جذب کاتیون‌ها را می‌کاهد که معمولاً نتیجه‌ای است که از تبدیل تعادل کاتیون - آئیون در پاسخ به افزایش در جذب آمونیوم که یک کاتیون است بوجود می‌آید.

از طرفی اضافه شدن بی کربنات به محلول غذایی حاوی آمونیوم در ابتدا و در غلظت ۱ میلی مولار باعث افزایش رشد رویشی گیاهان لوبيا سبز شده است. که این موضوع را می‌توان با اثر بی کربنات بر روی تنظیم pH، کاهش سمیت آمونیاک سمی (NH_3) ناشی از pH بالا و همچنین فراهم شدن مقدار بیشتری اسکلت کربنی از تثبیت کربن موجود در بی کربنات توسط آنزیم سفوفانول پیرووات کربوکسیلاز موجود در ریشه چهت اسیمیلاسیون آمونیوم، مربوط دانست. اما این اثر مثبت بی کربنات در غلظت‌های بالاتر از بین رفت و فاکتورهای رویشی شروع به کاهش کردند. در صورتی که در محلول غذایی روشی نیترات اضافه شدن بی کربنات از همان ابتدا باعث کاهش رشد رویشی گیاهان لوبيا سبز شد که می‌تواند به دلیل اثر تجمعی بی کربنات و نیترات بر روی افزایش pH محلول غذایی باشد. بی کربنات از طریق کاهش حلالیت مواد غذایی بر رشد گیاه اثر می‌گذارد. افزایش pH باعث کاهش انتقال بسیاری از عناصر غذایی بخصوص ریزمندی‌ها به گیاهان شده و در نتیجه علائم کمبود در آن‌ها مشاهده می‌گردد. به طور مثال در pH بالای ۸/۵ میزان قابلیت حلالیت عناصر مانند آهن، منگنز، مس و روی کاهش می‌یابد. آپوپلاست برگ یک فاکتور خیلی مهم در کنترل قابلیت در دسترس بودن عناصری از قبیل آهن، منگنز، مس و روی در برگ است. بی کربنات نیز نقش مهمی در تغییر pH آپوپلاست برگ دارد.



شکل ۳- اثر متقابل نوع نیتروژن (۵ میلی‌مولار) بر تعداد نیام (۱، ۵ و ۱۵ میلی‌مولار) و بیکربنات (۴۵، ۴۸ و ۶۲ روز پس از انتقال) در گیاه لوپیا سبز. حروف متفاوت بین تیمارها (در داده‌های مربوط به روز شمارش نیام مشابه) نشانه اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

آمونیوم رشد و نمو گیاهان را تعییر می‌دهد. به عنوان مثال نسبت ریشه به ساقه و اندازه برگ را کاهش می‌دهد. این تغییرات مورفوژوئیکی بعضی وقت‌ها خیلی سریع هستند (در کمتر از ۲۴ ساعت). تجمع غلظت بعضی هورمون‌ها مثل اکسین، سایتوکینین و اتیلن با مصرف آمونیوم تعییر می‌کند. ۶۰ درصد سایتوکینین (زائین + زائین ریبوزید) در شیره چوب گیاه تنباقو که با آمونیوم تقدیم شده تنها بعد از گذشت ۲۴ ساعت از بین می‌رود. کاهش در تعداد و اندازه سلول در برگ‌های گیاه تنباقوی که با آمونیوم تقدیم شده بود نیز توسط سچرر (۲۰) گزارش شده است. اگرچه کاهش سایتوکینین رشد گیاه را کاهش می‌دهد ولی این دلیل خوبی برای سمتیت آمونیوم نمی‌تواند باشد. به نظر می‌رسد که حضور نیترات مورد نیاز برای برقراری بیوسنتز یا انتقال سایتوکینین از ریشه به ساقه‌ها در یک سطحی که برای مورفوژنز طبیعی برگ کافی باشد، وجود دارد (۲۰). وان ویرن (۲۴) مشاهده کرد که میزان تولید و انتقال سایتوکینین به برگ‌ها در اثر آمونیوم کاهش می‌یابد که می‌تواند به علت نقش مهم سایتوکینین در توسعه برگ‌ها در کاهش رشد برگ نقش داشته باشد. در بررسی که لو و همکارانش (۱۰) بر روی تنباقو انجام دادند مشاهده کردند که گیاهانی که با آمونیوم تقدیم شده بودند سرعت تعرق کمتری داشتند که علت آن را به کاهش سطح برگ نسبت دادند. کلاسون و لنز (۵) نیز در آزمایشی که بر روی زغال اخته، تمشک و توت فرنگی انجام دادند مشاهده کردند که آمونیوم منجر به کاهش سطح برگ شد و متعاقب آن میزان فتوسنتز کاهش یافت. از طرفی اضافه کردن بیکربنات به محلول غذایی موجب افزایش قلیائیت محلول می‌شود در نتیجه آمونیوم در pH بالا تبدیل به گاز آمونیاک شده و ریشه‌های گیاهان لوپیا سبز را از بین می‌برد و جذب آب و محلول غذایی کم می‌شود. در کل بیکربنات سبب تشدید اثر سمتیت

کاهش در غلظت عناصر غذایی تحت بیکربنات می‌تواند به علت اثرات بازدارنده بیکربنات بر فعالیت‌های متابولیکی، اختلال در فعالیت pH (۲۵)، کاهش در دسترس بودن عناصر غذایی در خاک‌های با pH بالا (۲)، و افزایش در خروج یا انتشار مواد غذایی (۱) باشد. در آزمایشی که بر روی گیاهان شده، در گیاهان شاهد نسبت به گیاهان تیمار شده با بیکربنات غلظت مواد غذایی اندام‌های هوایی بیشتر بود، اما وقتی گیاهان بوسیله بیکربنات تیمار شدند گرایش قابل توجهی به افزایش تجمع مواد غذایی در ریشه‌ها نشان دادند، با این وجود رشد اندام هوایی شدیداً بوسیله قلیائیت آسید دید (۱۷). برخی پژوهشگران نشان دادند که pH بالای ایجاد شده توسط قلیائیت، اثرات بازدارنده‌گی مستقیم بر رشد برخی گونه‌های حساس از قبیل نخدود فرنگی دارد. اگرچه در برخی موارد pH بالا نیست اما افزایش غلظت بیکربنات یک فاکتور اصلی در بازدارنده‌گی رشد گیاه به علت اثرات سمتی آن است (۲۲). به طور کلی اغلب اثرات قلیائیت بر رشد گیاه از طریق کاهش در قابلیت حل عناصر توسط افزایش pH که به علت یون بیکربنات است ایجاد می‌شود (۹).

در نتایج (جدول، ۱-۴) مشاهده شد آمونیوم، سطح برگ را نسبت به تیمار نیترات کاهش داده است. کاهش سطح برگ ممکن است به علت زردی زودرس برگ‌ها و ریزش آن‌ها در نتیجه تنفس باشد. این تنفس می‌تواند در اثر سمتیت ایجاد شده توسط آمونیوم و کاهش جذب آب باشد. کمبود آب موجب کاهش تورگر سلولی و افزایش سنتر آبسیزیک اسید می‌شود، در نتیجه میزان تقسیم و توسعه سلولی کاهش یافته و کاهش تعداد برگ و رشد گیاه را در پی دارد. تنفس آبی باعث کاهش سطح برگ و میزان فتوسنتز گردیده که پیامد آن کم شدن ذخیره دی‌اسید کربن و کاهش عملکرد ماده‌ی خشک می‌باشد.

گلدهی و تولید نیام را در برداشت اما در ادامه با افزودن مقدار بیشتری بی کربنات با یک سیر نزولی در گلدهی و تولید نیام رو به رو می شویم. این موضوع را نیز مانند رشد رویشی می توان با اثر بی کربنات بر روی تنظیم pH، کاهش سمیت آمونیوم و همچنین فراهم شدن مقدار بیشتری اسکلت کربنی مورد نیاز برای تولید نیام گیاهان، مربوط دانست (۱۶). در صورتی که در محلول غذایی حاوی نیترات اضافه شدن بی کربنات از همان ابتدا باعث کاهش رشد زایشی گیاهان لوبيا سبز شد که می تواند به دلیل اثر تجمعی بی کربنات و نیترات بر روی افزایش pH محلول غذایی باشد و این که در حقیقت با اضافه شدن بی کربنات به محلول غذایی حاوی نیتروژن نیتراتی این دو اثر یکدیگر را در افزایش pH محلول غذایی تقویت می کنند. زیرا رفتار نیترات مشابه رفتار بی کربنات یا بعضی بافرهای بیولوژیکی است که از حضور اسید در محیط ریشه جلوگیری می کند. از طرفی تیمار آمونیوم به همراه بی کربنات موجب افزایش نسبت وزن خشک نیام به ریشه و اندام هوایی در گیاهان لوبيا سبز شد، در حالی که تیمار نیترات به همراه بی کربنات وزن خشک ریشه را نسبت به وزن خشک اندام هوایی و نیام افزایش داد که این موضوع می تواند به غیر متحرک شدن عناصر غذایی و تجمع آنها در ریشه گیاهان در pH بالا مربوط باشد.

آمونیوم و کاهش سطح برگ می شود.

رشد زایشی

همان طور که در نتایج (جدول ۱؛ شکل های ۲ و ۳) مشاهده شد آمونیوم میزان گلدهی و تولید نیام را نسبت به نیترات افزایش داده است. زمانی که از آمونیوم برای تقدیمه گیاه استفاده می شود به دلیل سرعت جذب بالا بایستی این نوع نیتروژن بلا فاصله بعد از جذب از محلول غذایی سمیت زدایی شود، که این عمل منجر به افزایش سنتز ترکیبات نیتروژن آلی می شود که ممکن است به ارتقاء تشکیل گل و نیام منجر شود (۵).

کلاسن و لنز (۵) در آزمایشی بر روی بادمجان اثرات نیترات و آمونیوم را بر محصول کل بررسی کردند و مشاهده کردند که با افزایش آمونیوم در محیط کشت میزان محصول کل افزایش می یابد ولی نیامها کوچکتر می شوند. سرنا و همکاران (۱۹) با آزمایش های خود بر روی مرکبات دریافتند با کاربرد آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن میزان محصول (تعداد میوه های تولید شده در درخت) نسبت به نیترات و مخلوط نیترات و آمونیوم افزایش می یابد.

همان طور که در شکل های ۲ و ۳ دیده می شود، در تیمار حاوی نیتروژن آمونیومی افزایش غلاظت ۱ میلی مولار بی کربنات، افزایش

منابع

- 1- Alhendawi R.A., Romheld V., Kirkby E.A., and Marschner H. 1997. Influence of increasing bicarbonate concentrations on plant growth, organic acid accumulation in roots and iron uptake by barley, sorghum, and maize. *Journal of Plant Nutrition*, 20: 1731-1735.
- 2- Alcantara E., Romera F.J., and Canete M. 2000. Effects of bicarbonate and iron supply on Fe(III) reducing capacity of roots and leaf chlorosis of the susceptible peach rootstock Nemaguard, *Journal of Plant Nutrition*, 23:1607-1617.
- 3- Britto D.T., and Kronzucker H.J. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 159:567-584.
- 4- Britto D.T., and Kronzucker H.J. 2005. Bioengineering N acquisition in rice: Can novel initiatives in rice genomics and physiology contribute to global food security? *Bio Essays*, 26:683-692.
- 5- Claussen W., and Lenz F. 1999. Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant Soil*, 208:95-102.
- 6- Fernandez V., Ebert G., and Winkelmann G. 2005. The use of microbial siderophores for foliar iron application studies. *Plant and Soil*, 272, 245-252.
- 7- Gerandas J., Zhu Z.J., Ratcliffe R.G., and Sattelmacher B. 1997. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Zeit. Pflanze. Bod.* 160:239-251.
- 8- Kirkby E.A., and Mengel K. 1967. Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea or ammonium nutrition. *Plant Physiology*, 42:6-14.
- 9- Lindsay W.L., and Thorpe D.W. 1954. Bicarbonate and oxygen as related to chlorosis. *Soil Science*, 77:271-279.
- 10-Lu Y.X., Li C.J., and Zhang F.S. 2005. Transpiration, potassium uptake and flow in tobacco as affected by nitrogen forms and nutrient levels. *Annals of Botany*, 95:991-998.
- 11-Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd edn. Cambridge, UK: Academic Press.
- 12-Martin P. 1982. Stem xylemas possible pathway for mineral retranslocation from senescing leaves to the ear in wheat. *Aust. Journal of Plant Physiology*, 9:197-207.
- 13-Mengel K., and Kirkby E.A. 2001. *Principles of Plant Nutrition*. 5th edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 14-Nelson P.V. 1998. *Greenhouse Operation and Management*. Prentice Hall, Upple Saddle River, NJ.
- 15-Raven J.A. 1983. The transport and function of silicon in plants. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.*, 58:179-207.

- 16-Roosta H.R., and Schjoerring J.K. 2007. Effects of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber plants. *Journal of Plant Nutrition*, 30:1933-1951.
- 17-Roosta H.R. 2010. Interaction between water alkalinity and nutrient solution pH on the vegetative growth, chlorophyll fluorescence and leaf Mg, Fe, Mn and Zn concentrations in lettuce. *Journal of Plant Nutrition*, 34:717-731.
- 18-Rudolph H., and Voigt J.U. 1986. Effects of NH_4^+ -N and NO_3^- -N on growth and metabolism of *Sphagnum magellanicum*. *Physiologia Plantarum*, 66: 339-34.
- 19-Serna M.D., Borras R., Legaz F., and Primo-millo E. 1992. The influence of nitrogen concentration and ammonium/nitrate ratio on N-uptake, mineral composition and yield of citrus. *Plant Soil*, 147:13-23.
- 20-Scherer H.W., Mackown C.T., and Leggett J.E. 1984. Potassium–ammonium uptake interactions in tobacco seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 156, 1060–1070.
- 21-Strasser O., Kohi K., and Romheld V. 1999. Overestimation of apoplastic Fe in root of soil grown plants. *Plant soil*, 210:179-187.
- 22-Tang C., and Thomson B.D. 1996. Effects of solution pH and bicarbonate on the growth and nodulation of a range of grain legume species. *Plant and soil*, 186:321-330.
- 23-Uehlein N., Filesch K., Eckert M., and Bienert G.P. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry*, 68, 122–129.
- 24-Van Wieren N. 2000. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion in Plant Biology*, 3:254-261.
- 25-Yang X., Romheld V., and Marschner H. 1993. Effect of bicarbonate and root zone temperature on uptake of Zn, Fe, Mn and Cu by different rice cultivars (*Oryza Sativa L.*) grown in calcareous soil. *Plant and soil*, 156:441-444.
- 26-Yang C.W., Jianae A., Li. C.Y., Shi D.C., and Wang D.L. 2008. Comparison of the effects of salt-stress and alkaline-stress on photosynthesis and energy storage of an alkaline-resistant halophyte *Chloris virgata*. *Photosynthetica*. 46: 273-278.
- 27-Zribi K., and Gharsalli M. 2002. Effect of bicarbonate on growth and iron nutrition of pea. *Journal of Plant Nutrition*. P: 2143-2149.
- 28-Zhou Y., Ren L., Zhang F., and Jiang R.F. 2007. Bicarbonate concentration as affected by soil water content controls iron nutrition of peanut plants in a calcareous. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 45: 357-364.