

اثر نسبت آمونیوم به نیترات بر رشد و جذب نیتروژن و نسبت پتاسیم به سدیم در دو رقم زیتون در شرایط شور

Effect of Amonium : Nitrate Ratio on Growth and Nitrogen Uptake and Potassium : Sodium Ratio in Two Olive Varieties in Saline Conditions

فاطمه بهبهانی مطلق^۱، ولی ربیعی^۲، مهدی طاهری^۳، علی‌رضا واعظی^۴ و رحیم خادمی^۵

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه زنجان، زنجان (نگارنده مسئول)

۲ و ۴- عضو هیأت علمی دانشگاه زنجان، زنجان

۳- عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، زنجان

۵- عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان بوشهر، بوشهر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۳۰

چکیده

بهبهانی مطلق، ف.، ربیعی، و.، طاهری، م.، واعظی، ع. ر. و خادمی، ر. ۱۳۹۱. اثر نسبت آمونیوم به نیترات بر رشد و جذب نیتروژن و نسبت پتاسیم به سدیم در دو رقم زیتون در شرایط شور. مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۲۸ (۳): ۳۲۹-۳۱۳.

به منظور بررسی برهمکنش شوری و نسبت آمونیوم به نیترات در نهال‌های زیتون ارقام زرد و آربکین آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه ایستگاه تحقیقات زیتون طارم زنجان انجام شد. در این آزمایش چهار سطح شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم) و چهار نسبت مختلف آمونیوم به نیترات شامل N_0 : محلول بدون آمونیوم + ۱۴ میلی‌اکی والان بر لیتر نیترات؛ N_2 : محلول حاوی ۲ آمونیوم + ۱۲ میلی‌اکی والان بر لیتر نیترات؛ N_4 : محلول حاوی ۴ آمونیوم + ۱۰ میلی‌اکی والان بر لیتر نیترات؛ N_6 : محلول حاوی ۶ آمونیوم + ۸ میلی‌اکی والان نیترات بر روی نهال‌های یک ساله زیتون ارقام زرد و آربکین کاشته شده در بستر پرلیت و شن به نسبت ۱:۱ استفاده گردید. نتایج نشان داد که افزایش شوری اثر معنی‌داری بر کاهش سطح برگ، میزان ماده خشک، رشد رویشی (ارتفاع نهال)، تغییر ارتفاع نهال و مقادیر نیتروژن و نسبت پتاسیم به سدیم و افزایش ریزش برگ داشت. در بررسی اثر نسبت‌های آمونیوم به نیترات مشاهده شد که افزایش آمونیوم در محلول غذایی با کاهش شاخص‌های رشد سال جاری و افزایش نسبت $K:Na$ و متابولیسم نیتروژن در برگ، موجب کاهش جذب سدیم و ریزش برگ شد. همچنین مشاهده شد که غلظت‌های بالای شوری و آمونیوم تشدید کننده آثار منفی یکدیگر بودند.

واژه‌های کلیدی: زیتون، شوری، نسبت آمونیوم به نیترات، رشد، نسبت $K:Na$ و نیتروژن.

مقدمه

(Saber *et al.*, 2003; Ferreira-Silva *et al.*, 2008).

سازوکارهای تحمل در زیتون با پتاسیم درگیر می‌باشد چون که تبادل سدیم-پتاسیم در پلاسما، انتقال سدیم را تنظیم می‌کند (Chartzoulakis, 2005). حفظ بالای محتوای پتاسیم در ارقام متحمل به شوری ممکن است یک صفت با اهمیت و یا یکی از سازوکارهای ایجادکننده تحمل به شوری در این گیاهان باشد (Rameeh *et al.*, 2004; El-hendawy *et al.*, 2005).

نیترژن از عناصر پرمصرفی است که نقش بسیار مهمی در تغذیه گیاه دارد و کاهش جذب آن در اثر شوری از عوامل مهم کاهش رشد گیاه در این شرایط محسوب می‌شود (Durey and Pessaraki, 1995). این عنصر به دو صورت نترات و آمونیوم جذب گیاه می‌شود اگرچه نترات پس از جذب توسط گیاه و قبل از ورود به ترکیبات آلی به آمونیوم احیا می‌شود ولی تحقیقات فراوانی از اثر متفاوت نسبت‌های آمونیوم به نترات بر مؤلفه‌های فیزیولوژیکی، محتوی عناصر، رشد، عملکرد و کیفیت محصولات مختلف در شرایط شور و غیر شور وجود دارد. البته نتایج بدست آمده متفاوت است.

بابالار و احمدی (Babalar and Ahmadi, 1997) در پژوهشی روی سیب مشاهده کردند که نسبت‌های بالای آمونیوم به نترات باعث کاهش رشد نهال می‌شود. نتایج مشابهی توسط دلشاد و همکاران (Delshad *et al.*, 2000) در گوجه‌فرنگی

در ایران بیش از نیمی از اراضی قابل کشت با مشکل افزایش شوری مواجه هستند (Abdolzadeh *et al.*, 1998). کاتیون‌های که موجب شوری می‌شوند شامل سدیم، کلسیم، منیزیم و آمیون‌ها شامل کلراید، سولفات و بی‌کربنات می‌باشند (Kafi *et al.*, 2009). در نمونه‌های برگ‌گی تهیه شده از زیتون در تیر ماه غلظت بیشتر از ۰/۲ درصد برای سدیم و ۰/۵ درصد برای کلر ایجاد سمیت می‌کند (Bernstein, 1975). بنابراین می‌توان گفت جذب و انتقال کلر معمولاً نسبت به سدیم پایین‌تر است (Guuci and Tattini, 1997).

علاوه بر این نشانه‌های شوری و شدت آنها اغلب به غلظت سدیم بافت‌ها وابسته می‌باشد نه غلظت کلر (Aragues *et al.*, 2005). رشد گیاهان فرایند پیچیده‌ای است که با فتوسنتز، تغذیه و پتانسیل آب در درون گیاه مرتبط است (Munns, 1988). غلظت بالای املاح در خاک یا محیط ریشه گیاه علاوه بر کاهش میزان آب قابل استفاده، به علت حضور بالای یون‌های سدیم و کلر در محلول این خاک‌ها از جذب بسیاری از عناصر غذایی از جمله K^+ ، Ca^{2+} و Mg^{2+} کاسته می‌شود (Bohera and Doerffling, 1993). کاهش جذب و غلظت پتاسیم در بافت گیاه توسط سدیم توسط محققان زیادی گزارش شده است (Khoshgftar Manesh and Siadat, 2002; Siadat, 2002).

مشاهده شد. در زیتون طاهری و همکاران (Taheri *et al.*, 2009) گزارش کردند که نسبت‌های پایین‌تر آمونیم به نترات مناسب می‌باشد. در کلزا بایبوردی و همکاران (Bybordi *et al.*, 2010) نسبت مساوی آمونیم به نترات را توصیه کردند.

با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد زیتون مانند نیاز به آهک، مقاومت در برابر خشکی و تحمل متوسط در مقابل شوری خاک می‌توان نتیجه گرفت که بسیاری از نقاط کشور برای توسعه زیتون مناسب می‌باشد (Sadeghi, 2002). با توجه به اهمیت درخت زیتون، نقش مهم عنصر نیتروژن در تغذیه گیاهی و محدود شدن جذب آن در شرایط شور این مطالعه روی نهال‌های یک ساله زیتون انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه پژوهشی ایستگاه تحقیقات زیتون مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان و آزمایشگاه آن مرکز انجام شد. فاکتورها شامل: فاکتور اول نسبت‌های مختلف آمونیم به نترات در چهار سطح تهیه گردید. به این صورت که مقدار نیتروژن برای تمام محلول‌های غذایی مورد استفاده ۱۴ میلی‌اکی‌والان بر لیتر بود با این تفاوت که در محلول N_0 ، نترات به میزان ۱۴ میلی‌اکی‌والان بر لیتر استفاده شد و در

دیگر محلول‌ها آمونیم به تدریج تا سقف ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر جایگزین نترات گردید. نامگذاری محلول‌ها به صورت N_2 ، N_4 ، N_6 و N_0 بود و عدد همراه نیتروژن مقدار اکی‌والان بر لیتر آمونیم را نشان می‌دهد. فاکتور دوم عامل شوری در چهار سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر کلرید سدیم) و عامل سوم ارقام زیتون (رقم زرد و رقم آربکین) بود. قبل از اعمال تیمارها نهال‌ها به گلدان‌های پلاستیکی دو لیتری با بستر پرلیت: شن به نسبت مساوی منتقل شد و پس از مستقر شدن نهال‌ها، تیمارهای فوق اعمال گردید.

در ابتدا نهال‌ها به مدت دو ماه به وسیله محلول غذایی نیمه هوگلند تغذیه شدند و بعد از عادت‌دهی نهال‌ها به شرایط جدید به مدت یک ماه محلول‌های غذایی اصلی با نسبت‌های مختلف نیتروژن اعمال شد و بعد از آن به مدت ۷۵ روز تیمارهای شوری همراه با محلول‌های غذایی اصلی استفاده شد. برای تهیه محلول‌های کلرید سدیم سه گرم در لیتر برای تیمار ۵۰ میلی‌مول، ۶ گرم برای تیمار ۱۰۰ میلی‌مول و ۹ گرم برای تیمار ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر بکار رفت. محلول‌ها در آب معمولی که دارای هدایت الکتریکی حدود ۰/۴ ds/m بود تهیه شدند. pH محلول‌های غذایی با افزودن اسید نیتریک روی ۷-۶/۵ تنظیم شد. برای جلوگیری از تجمع نمک در گلدان‌ها در طول مدت آزمایش در دو مرحله گلدان‌ها به فاصله ۳۰ روز یکبار با آب خالص آبیاری شدند. آبیاری

نهال‌ها هر سه روز یک بار صورت گرفت که هر بار ۳۰۰ میلی لیتر محلول به هر گلدان اضافه شد.

۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

در طول مدت آزمایش هر ماه یک بار ارتفاع نهال‌ها اندازه‌گیری شد. در پایان آزمایش تعداد برگ‌های ریزش کرده، سطح برگ، میزان ماده خشک و تغییر ارتفاع نهال اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری سطح برگ از دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (مدل VM-900 E/K) استفاده شد. جهت تعیین وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۷۵ سانتی‌گراد خشک شدند و درصد ماده خشک محاسبه شد.

اثر تیمارهای تغذیه‌ای، شوری و رقم بر کلیه صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود (جدول ۱). افزایش شوری در محلول غذایی باعث کاهش جذب عناصر نیتروژن، پتاسیم و فسفر و نیز کاهش نسبت پتاسیم به سدیم و افزایش جذب عنصر سدیم شد (جدول ۲). منبع و نسبت نیتروژن به کار رفته در محلول غذایی تاثیر معنی‌داری بر مقدار عنصر نیتروژن و نسبت پتاسیم به سدیم داشت (جدول ۱). به طوری که با ورود آمونیوم در محلول غذایی مقدار این دو پارامتر کاهش و با افزایش مقدار آمونیوم در محلول غذایی افزایش یافت. در حالی که سدیم رفتار کاملاً برعکسی در جذب نشان داد (جدول ۴).

در پایان آزمایش برای تعیین مقدار عناصر نیتروژن، فسفر، پتاسیم و سدیم موجود در برگ، پس از شستن و خشک کردن در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت هضم نمونه‌ها به روش اکسیداسیون تر با استفاده از اسیدسولفوریک ۹۶ درصد، اسید سالیسیلیک، آب اکسیژنه و سلنیم انجام گرفت (Emami, 1996). بعد از کامل شدن عمل هضم اندازه‌گیری نیتروژن با روش کجلدال و اندازه‌گیری پتاسیم و سدیم با روش شعله‌سنجی و با دستگاه فلیم فتومتر و فسفر به روش رنگ‌سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت.

رقم زرد کارایی جذب پتاسیم، نسبت پتاسیم به سدیم و رقم آربکین کارایی جذب نیتروژن و سدیم بالاتری داشت (جدول ۳). احتمالاً این تفاوت در کارایی جذب عناصر مربوط به سیستم ریشه‌ای این دو رقم است. رقم زرد دارای ریشه‌های نازک و موئین فراوان و رقم آربکین دارای ریشه‌های ضخیم با تعداد کم می‌باشد. که با یافته‌های طاهری و همکاران (Taheri et al., 2009) مطابقت داشت. پاسخ ارقام به نسبت‌های مختلف آمونیوم به نترات این بود که افزایش این نسبت در محلول غذایی موجب افزایش نسبت پتاسیم به سدیم در

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال

جدول ۱- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه نهال‌های زیتون
Table 1. Analysis of variance of measured characteristics in olive saplings

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات MS									
			تغییر ارتفاع نهال	رشد طولی نهال	ریزش برگ	ماده خشک برگ	سطح برگ کل	سطح برگ جدید	نیتروژن	پتاسیم	سدیم	نسبت پتاسیم : سدیم K : Na ratio
		df	Plant height change	Length growth	Leaf abscission	Leaf dry matter	Total leaf area	New leaf area	Nitrogen	Potassium	Sodium	K : Na ratio
NH4 : NO3 Ratio (N)	نسبت آمونیوم : نترات	3	0.00*	48.21**	373.23**	2.23 ^{ns}	134747.00**	137.70*	0.81**	0.19**	1.25**	2.41**
Salinity (S)	شوری	3	0.02**	259.59**	6110.67**	149.28**	32539.92**	3468.20**	3.13**	0.24**	8.11**	20.62**
N × S	نسبت آمونیوم : نترات × شوری	9	0.00 ^{ns}	3.42 ^{ns}	195.78**	5.65 ^{ns}	1034.78**	156.1**	0.31**	0.01 ^{ns}	0.26**	1.25**
Cultivar (C)	رقم	1	0.12**	14.65 ^{ns}	1811.34**	36.77**	37683.38**	12765.9**	10.26**	3.06**	0.67**	19.50**
N × C	نسبت آمونیوم : نترات × رقم	3	0.00 ^{ns}	7.66 ^{ns}	13.21 ^{ns}	38.22**	3678.63**	195.01**	0.10 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.64**
S × C	شوری × رقم	3	0.01**	75.90**	721.37**	5.98 ^{ns}	1058.68**	121.57*	0.33*	0.06**	0.35**	5.86**
N × S × C	نسبت آمونیوم : نترات × شوری × رقم	9	0.00 ^{ns}	8.21 ^{ns}	100.17**	3.74 ^{ns}	1957.71**	144.78**	0.21*	0.10**	0.04**	0.42**
Error	خطا	64	0.00	5.58	12.03	3.76	219.63	35.83	0.08	0.01	0.01	0.03
C.V. (%)	ضریب تغییرات (%)		13.68	8.91	11.52	4.27	8.65	10.12	9.17	10.80	8.69	15.05

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

* and **: Significant at the 5% and 1% probability levels, respectively.
ns: Not significant.

ns: غیر معنی‌دار.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف شوری بر شاخص‌های رشد و مقدار عناصر پر مصرف برگ نهال‌های زیتون
Table 2. Effect of salinity levels on growth parameters and leaf macronutrients of olive saplings

شوری (میلی مول در لیتر)	تغییر ارتفاع نهال (%)	رشد طولی نهال (سانتیمتر)	ریزش برگ (%)	ماده خشک برگ (%)	سطح برگ کل (سانتی مترمربع)	سطح برگ جدید (سانتی مترمربع)	نیترژن (%)	پتاسیم (%)	سدیم (%)	نسبت پتاسیم : سدیم K : Na ratio
Salinity (mM ⁻¹ NaCl)	Plant height change (%)	Length growth (cm)	Leaf abscission (%)	Leaf dry matter (%)	Total leaf area (cm ²)	New leaf area (cm ²)	N (%)	K (%)	Na (%)	K : Na ratio
0	150.41a	30.79a	8.89d	48.58a	212.79a	73.29a	3.63a	1.14a	0.59d	2.51a
50	143.29b	26.92b	27.65c	46.14b	185.96b	60.75b	3.22b	1.04b	1.14c	1.11b
100	141.45b	25.35c	38.40b	44.32c	159.83c	58.71b	3.04c	0.99b	1.74b	0.59c
150	137.04c	22.96d	45.56a	42.79c	126.58d	43.96c	2.77d	0.91c	1.85a	0.51c

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حرف مشابه می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار دارند.

Means, in each column, followed by similar letter are not significantly different at the 5 % level of probability- Using Duncan's Multiple Range Test.

جدول ۳- شاخص‌های رشد و مقدار عناصر پر مصرف برگ نهال‌های ارقام زیتون
Table 3. Growth parameters and leaf macronutrients of saplings in olive cultivars

رقم Cultivar	تغییر ارتفاع نهال (%)	ریزش برگ (%)	ماده خشک برگ (%)	سطح برگ کل (سانتی مترمربع)	سطح برگ جدید (سانتی مترمربع)	نیترژن (%)	پتاسیم (%)	سدیم (%)	نسبت پتاسیم : سدیم K : Na ratio
Cultivar	Plant height change (%)	Leaf abscission (%)	Leaf dry matter (%)	Total leaf area (cm ²)	New leaf area (cm ²)	N (%)	K (%)	Na (%)	K : Na ratio
Arbequina	149.15a	25.78b	44.83b	151.48b	47.65b	3.50a	0.85b	1.41a	0.73b
Zard	136.94b	34.47a	46.07a	191.10a	70.71a	2.84b	1.20a	1.25b	1.63a

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حرف مشابه می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار دارند.

Means, in each column, followed by similar letter are not significantly different at the 5 % level of probability- Using Duncan's Multiple Range Test.

جدول ۴- اثر نسبت آمونیم : نیترات بر شاخص های رشد و مقدار عناصر پر مصرف برگ نهال های زیتون
 Table 4. Effect of NH₄ : NO₃ Ratio on growth parameters and leaf mineral concentration of olive saplings

نسبت آمونیم : نیترات NH ₄ : NO ₃ Ratio	تغییر ارتفاع نهال (%) Plant height change (%)	رشد طولی نهال (سانتیمتر) Length growth (cm)	ریزش برگ (%) Leaf abscission (%)	سطح برگ کل (سانتی مترمربع) Total leaf area (cm ²)	سطح برگ جدید (سانتی مترمربع) New leaf area (cm ²)	نیترژن (%) N (%)	پتاسیم (%) K (%)	سدیم (%) Na (%)	نسبت پتاسیم : سدیم K : Na ratio
0 : 14	145.44a	27.98a	28.63a	171.71a	59.63ab	3.36a	1.10a	1.19c	1.12c
2 : 12	144.23ab	27.29ab	35.30b	160.88b	61.83a	2.95b	0.90c	1.59a	0.76d
4 : 10	142.64ab	25.96bc	30.62a	174.08a	59.21ab	3.10b	1.08a	1.44b	1.37b
6 : 8	139.87b	24.79c	25.95c	178.50a	56.04b	3.28a	1.01b	1.09d	1.47a

میانگین هایی، در هر ستون، که دارای حرف مشابه می باشند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی دار دارند.

Means, in each column, followed by similar letter are not significantly different at the 5 % level of probability- Using Duncan's Multiple Rang Test.

برگ‌های رقم زرد می‌شود. رقم آربکین پاسخ معنی‌داری به این نسبت در محلول غذایی نشان نداد (شکل ۱).

تأثیر نسبت‌های مختلف نیترات به آمونیوم به همراه سطوح مختلف شوری بر محتوی نیتروژن هر دو رقم زرد و آربکین معنی‌دار شد (جدول ۵). در شرایط بدون شوری، رقم آربکین بیشترین مقدار نیتروژن را از تغذیه نیتراتی جذب کرد. در حالی که در شرایط شور، مقدار جذب نیتروژن همین رقم در تغذیه‌های دارای مقادیر کمتر آمونیوم (تغذیه نیتراتی و تغذیه دارای ۲ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیوم) با افزایش شوری کاهش یافت. ولی در تغذیه‌های دارای ۴ و ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیوم، افزایش شوری تا سطح ۱۰۰ میلی‌مول تأثیری بر کاهش مقدار جذب نیتروژن این رقم نداشت. روند کاهش جذب نیتروژن با افزایش شوری در رقم زرد نیز مشاهده شد.

در مجموع می‌توان گفت جذب نیتروژن در تغذیه‌های دارای مقادیر کم‌تر آمونیوم، بیشتر تحت تأثیر اثر سوء شوری‌های شدید قرار گرفت. کانت و همکاران (Kant et al., 2007) گزارش کردند که اثر سوء شوری روی رشد گیاهان می‌تواند به وسیله جایگزینی نسبی نیترات با آمونیوم در محلول غذایی کاهش یابد. این اثر می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم‌های آسمیلاسیون نیتروژن به خصوص مسیر آسمیلاسیون آمونیوم و افزایش نیتروژن کل برگ و ریشه مرتبط باشد. مقاومت پایین‌تر

تغذیه‌های دارای مقادیر کمتر آمونیوم در برابر کاهش نیتروژن در شرایط شور شاید مربوط به اثر آنتاگونیسمی بین کلرید و نیترات باشد. گزارش شده است که در محیط شور جذب و مصرف یون نیترات به دلیل تداخل یونی در سراسر دیواره سلولی ریشه به کندی صورت می‌گیرد (Sotiropoulos et al., 2006; Bybordi et al., 2010). اثر آنتاگونیسمی یون کلرید با نیترات احتمالاً به دلیل آن است که هر دو یون توسط حامل‌های مشابهی از عرض غشای پلاسمایی انتقال داده می‌شوند (Lambrz et al., 2007).

اثر منابع و نسبت‌های مختلف نیتروژن بر نسبت پتاسیم به سدیم برگی رقم زرد نشان داد که بالاترین این نسبت در شرایط شور، در تغذیه دارای ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیوم به همراه شوری ملایم (۵۰ میلی‌مول در لیتر) حاصل شد (جدول ۵). در شرایط غیر شور هم بالاترین نسبت پتاسیم به سدیم این رقم در تغذیه دارای ۴ و ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیوم دیده شد. در رقم آربکین در شرایط شور تفاوت معنی‌داری بین نسبت پتاسیم به سدیم در هر ۴ تیمار تغذیه‌ای مشاهده نشد (جدول ۵). در همین رقم در شرایط غیر شور، بالاترین این نسبت در تغذیه دارای ۴ و ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیوم دیده شد. احتمالاً وجود مقدار مناسب آمونیوم در تغذیه دارای ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیوم با اثر آنتاگونیستی مانع از جذب زیاد سدیم شد (Babalar, and Ahmadi, 1997).

جدول ۵- اثر متقابل منابع نیتروژن × شوری × رقم بر مؤلفه‌های رشدی و مقدار عناصر پر مصرف برگ نهال‌های زیتون

Table 5. Effect of nitrogen sources × salinity × cultivar on growth parameters and leaf macronutrients of olive saplings

نسبت آمونیم : نترات	شوری (میلی مول در لیتر)	رقم	ریزش برگ (%)	سطح برگ کل (سانتی مترمربع)	سطح برگ جدید (سانتی مترمربع)	نیتروژن (%)	پتاسیم (%)	سدیم (%)	نسبت پتاسیم : سدیم
NH ₄ : NO ₃ ratio	Salinity (mM NaCl)	Cultivar	Leaf abscission (%)	Total leaf area (cm ²)	New leaf area (cm ²)	N (%)	K (%)	Na (%)	K : Na ratio
0 : 14	0	Arbiquina	14.11j	198.33bcd	58.33fgh	4.32a	0.96efghi	0.91hi	0.89hi
		Zard	4.95lm	222.00b	87.00a	3.33cdefg	1.62a	0.53k	3.08c
	50	Arbiquina	16.03j	173.00defghi	57.00fgh	3.79abc	0.94fghij	1.32g	0.72ijkl
		Zard	36.50efgh	189.33cdefg	63.33efg	3.09efghi	1.35b	0.86ij	1.58f
	100	Arbiquina	30.90hi	157.67hijk	62.33efg	3.48bcde	0.94fghij	1.48efg	0.64ijklm
		Zard	42.04de	164.00ghij	65.67defg	2.71hijk	1.06defgh	1.48efg	0.71ijklm
150	Arbiquina	35.60fgh	120.00mn	28.00mn	3.40cdef	0.83ij	1.54def	0.54klmn	
	Zard	48.89bc	149.33ijkl	55.33ghi	2.75hij	1.13cdef	1.44efg	0.79hijk	
2 : 12	0	Arbiquina	11.34jk	204.33bc	76.67abcd	3.81abc	0.89hij	0.86ij	1.05gh
		Zard	5.22klm	193.00cdef	84.00ab	3.75bcd	1.06defgh	0.50k	2.12e
	50	Arbiquina	30.71hi	165.33fghij	57.00fgh	3.44bcde	0.74jk	1.50efg	0.49jklmn
		Zard	41.26defg	183.67cdefgh	71.33cde	2.39jk	1.16bcde	1.42efg	0.83hij
	100	Arbiquina	35.29gh	130.00klmn	40.00jkl	2.87fghij	0.53l	2.15ab	0.25n
		Zard	53.75ab	155.00ijkl	70.00cde	2.45jk	1.21bcd	2.20ab	0.55ijklmn
150	Arbiquina	49.85bc	105.00n	32.33lm	2.74hij	0.57kl	2.05b	0.28n	
	Zard	54.97ab	150.67ijkl	63.33efg	2.17k	1.07defgh	2.04b	0.52jklmn	
4 : 10	0	Arbiquina	12.19j	172.67defghi	57.67fgh	3.62bcde	1.12cdef	0.76ij	1.98e
		Zard	4.61m	270.67a	85.67ab	2.88fghij	1.30bc	0.27l	5.06a
	50	Arbiquina	26.60i	157.67hijk	48.67hijk	3.54bcde	0.76ij	1.34fg	0.57ijklmn
		Zard	44.79cd	188.00cdefg	67.67def	2.74hij	1.37b	1.10h	1.25g
	100	Arbiquina	30.22hi	152.33ijkl	39.00kl	3.51bcde	0.93fghij	1.78c	0.53jklmn
		Zard	41.65def	197.00bcde	72.33cde	2.66hijk	1.18bcd	1.73cd	0.68ijklm
150	Arbiquina	32.36hi	111.67n	40.00jkl	3.22defgh	0.90ghij	2.31a	0.39lmn	
	Zard	52.56.00ab	142.67jklm	62.67efg	2.59ijk	1.07defgh	2.27a	0.47klmn	
6 : 8	0	Arbiquina	12.95j	169.00efghij	56.33fghi	3.88abc	1.13cdef	0.67jk	1.56f
		Zard	5.76klm	272.33a	80.67abc	3.49bcde	1.11cdefg	0.26l	4.35b
	50	Arbiquina	14.31j	151.67ijkl	45.67ijk	3.98ab	0.84ij	1.08h	0.78hijk
		Zard	10.98jkl	279.00a	75.33bcd	2.85ghij	1.23bcd	0.51k	2.69d
	100	Arbiquina	27.45i	148.67ijkl	43.67jk	3.86abc	0.96efghi	1.50efg	0.64ijklm
		Zard	45.94cd	174.00defghi	76.67abcd	2.84ghij	1.11cdefg	1.58cde	0.71ijklm
150	Zard	32.61hi	106.33n	19.67n	2.51jk	0.50l	1.37efg	0.37mn	
	Arbiquina	57.64a	1271.00mn	50.33hij	2.81ghij	1.22bcd	1.75c	0.70ijklm	

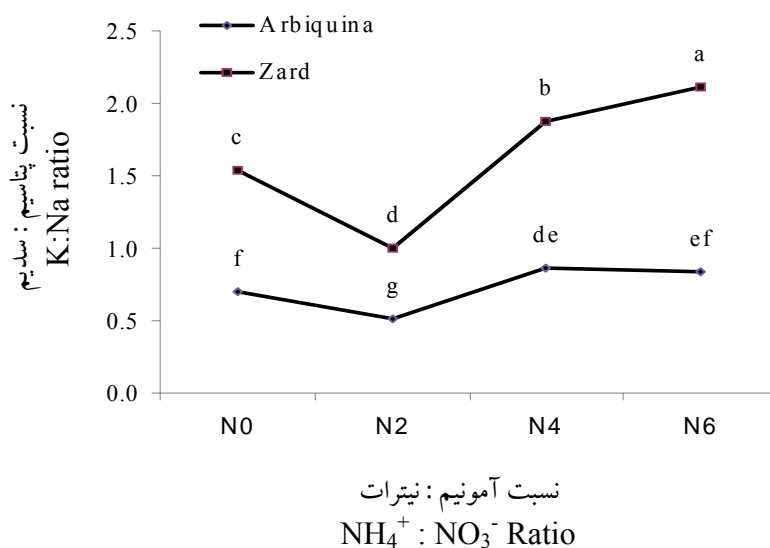
میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حرف مشابه می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار دارند.

Means, in each column, followed by similar letter are not significantly different at the 5% level of probability- Using Duncan's Multiple Range Test.

آثار سوء جذب سدیم در امان باشد. در شرایط شور نسبت بالای پتاسیم به سدیم پایداری گیاهان را بهبود می‌بخشد (Yunca et al., 2005). مقدار بالای این نسبت که در سازوکارهای تحمل به نمک دخالت دارند، نشان دهنده تلاش برای افزایش تحمل به

رقابت بین سدیم و آمونیم برای جایگاه‌های جذب ریشه، جذب و انتقال سدیم را کم و در نتیجه تجمع سدیم در برگ‌ها را کاهش می‌دهد (Sagi et al., 1997).

گیاه با حفظ بالای نسبت پتاسیم به سدیم می‌تواند از مزایای جذب پتاسیم بهره‌بردار و از



شکل ۱- اثر نسبت آمونیوم : نترات و رقم بر نسبت پتاسیم به سدیم زیتون
 Fig. 1. Effect of NH₄:NO₃ ratio and cultivar on olive leaf K:Na ratio

اثر بین یون آمونیوم، نترات، پتاسیم و سدیم بود.

خصوصیات رشد

نتایج نشان داد که افزایش شوری در هر یک از سطوح تغذیه باعث کاهش شاخص‌های رشدی از قبیل سطح برگ نهایی، ماده خشک برگ، مقدار رشد رویشی (رشد طولی) نهال، درصد تغییر ارتفاع نهال و افزایش ریزش برگ در هر دو رقم زیتون می‌شود (جدول ۲) نمک در محیط خاک به دو دلیل عمده مانع رشد گیاه می‌شود:

۱- کاهش جذب در اثر پائین رفتن پتانسیل اسمزی محیط ریشه که در نتیجه میزان جذب آب تقلیل پیدا می‌کند. این اثر اسمزی یا خشکی فیزیولوژیکی شوری نامیده می‌شود (Alizadeh, 2004).

شوری از طریق افزایش پتاسیم می‌باشد (Chartzoulakis, 2005). این نسبت که به وسیله ریشه‌ها نگهداری می‌شود نشان دهنده به‌گزینی پتاسیم بیشتر از سدیم و بارگیری ترجیحی بیشتر پتاسیم نسبت به سدیم در آوندهای چوبی است (Yunca *et al.*, 2005). در نهایت هم جهت بودن یون‌ها در جذب و یا عمل متقابل آن‌ها در محدوده محلول‌های غذایی و یا محلول خاک عامل متعادل‌کننده جذب عناصر است (Babalar and Ahmadi, 1997). می‌توان نتیجه گرفت که آمونیوم، نترات، سدیم و پتاسیم متعادل‌کننده مقدار جذب پتاسیم و سدیم می‌باشند. به عبارت دیگر جذب مناسب یون پتاسیم و جذب کم سدیم در تیمار تغذیه دارای ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیوم نتیجه مشترک

۲- دیگر اینکه شاید وارد جریان تعرقی گیاه شده و از این طریق به سلول برگ‌های در حال تعرق خسارت وارد نماید و در نتیجه رشد بیشتر کاهش پیدا می‌کند. این قسمت از کاهش رشد در نتیجه اثر ویژه نمک و یا اثر یون زیاد خواهد بود (Munns, 2005). ریزش برگ‌ها شاخص‌ترین علامت قابل مشاهده بعنوان پاسخ گیاه به تجمع نمک است (Noble *et al.*, 1984). کاهش رشد هم به علت کاهش تعداد سلول‌ها (کاهش تقسیم سلولی) و هم به دلیل کاهش اندازه سلول‌ها (کاهش فشار تورژسانس) می‌باشد. به نظر می‌رسد که کاهش سطح برگ در محیط‌های شور به طور عمده به دلیل کاهش اندازه سلول‌هاست (Curtis and Lauchli, 1987).

از نظر سطح برگ نهایی، درصد ماده خشک و ریزش برگ رقم زرد برتر بود در حالیکه تغییر ارتفاع نهال در رقم آربکین بیشتر بود (جدول ۳). به نظر می‌رسد رقم زرد با افزایش سطح برگ در دسترس فتوسنتز باعث افزایش ماده خشک شد.

نتایج نشان داد که افزایش مقدار آمونیم در محلول غذایی با کاهش سطح برگ جدید، رشد ارتفاع نهال در سال جاری و تغییر ارتفاع نهال نسبت به ارتفاع اولیه، باعث کاهش رشد سال جاری نهال‌ها (رشد جدید) و کاهش جذب سدیم شد (جدول ۴). این کاهش‌ها در تغذیه دارای ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیم به بالاترین مقدار خود رسید ولی همین تغذیه با

کاهش ریزش برگ باعث افزایش سطح برگ قدیمی نهال شد و در نهایت سطح برگ نهایی بالایی ایجاد کرد (جدول ۴). در پژوهش حاضر نهال‌ها مقدار زیادی نیتروژن در تغذیه دارای ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیم جذب کردند که احتمالاً مقدار بیش تر نیتروژن جذب شده از منبع آمونیومی بود، چون در حالتی که هر دو فرم نیتروژن باهم در محیط وجود داشته باشند، آمونیم جذب نترات را کاهش می‌دهد (Errebi and Wilcox, 1990). نه تنها کمیت بلکه نوع نیتروژن به کار رفته باعث ایجاد تفاوت در رشد درختان می‌شود.

آمونیم می‌تواند بسته به نسبت آمونیم: نترات و نوع گیاه باعث افزایش و یا کاهش تولید زیست توده شود (Flores *et al.*, 2001). مارشنر (Marschner, 1995) بیان کرد که آمونیم می‌تواند رشد درخت را به طور موقت کند نماید. کاهش رشد با افزایش مقدار آمونیم توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است (Talaie, 1998; Ben-Oliel *et al.*, 2005). این کاهش رشد ایجاد شده توسط آمونیم می‌تواند به نفع ریزش کمتر یون سدیم در شاخ و برگ و قسمت‌های جوان و حساس نهال‌های زیتون عمل کند. چون پژوهشگران زیادی اشاره کردند که زیتون می‌تواند همانند دیگر گونه‌های چوبی دفع کننده نمک از طریق کاهش جریان توده‌ای آب و سرعت پایین رشد نسبی، ریزش یون‌های سمی به شاخه‌های در حال رشد فعال و به خصوص

که تغذیه‌ها بدون تیمار شوری اعمال شدند بیشترین سطح برگ را در تغذیه محتوی صفر و ۲ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیوم داشت (جدول ۵).

با توجه به نتایج حاصل، تغذیه دارای ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیوم با کاهش جذب سدیم در سطح شوری ملایم باعث کاهش ریزش برگ و در نهایت افزایش سطح برگ در این تیمار شد (جدول ۵). مارش‌نر (Marshner, 1995) نیز گزارش کرد که در گیاهان تغذیه شده با آمونیوم، pH محیط و شیره سلول‌های ریشه کاهش می‌یابد. افزایش مقدار پوترسین (دی‌آمینسی است که از اسید آمینه آرژنین ساخته می‌شود) در این گیاهان می‌تواند جزیی از مکانیزم تنظیم pH سلول به وسیله ساخت این ترکیبات بازی باشد. پلی‌آمین‌های پوترسین و اسپرمیدین به اندازه سایتوکینین‌ها در به تاخیر انداختن پیری موثر هستند. در سطوح بالاتر شوری در هر چهار تیمار تغذیه اعمال شده افزایش جذب سدیم باعث بروز اثر سمی نمک شد.

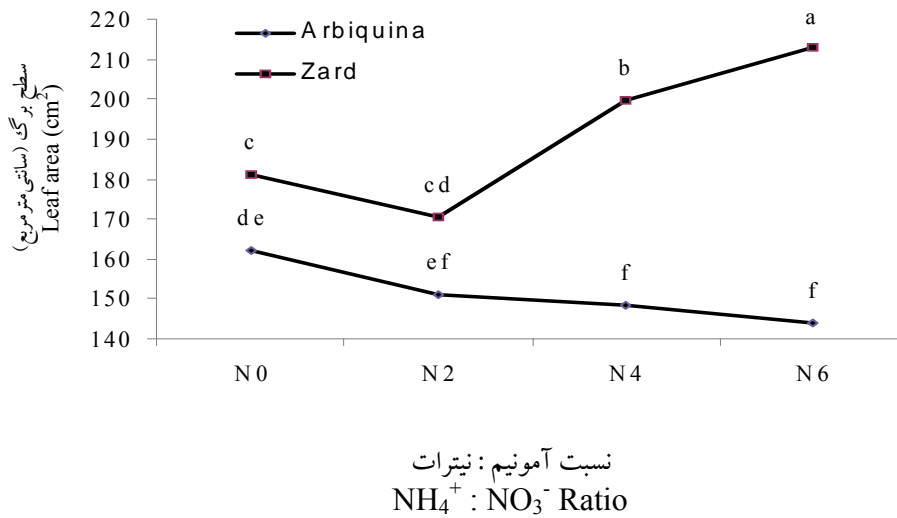
زیتون گیاهی نیمه متحمل به شوری می‌باشد و با سازوکارهای تحمل به شوری از ورود زیاد سدیم به قسمت‌های هوایی گیاه ممانعت می‌کند و باعث بقاء بیشتر آن در شرایط شور می‌شود. به نظر می‌رسد مقدار مناسب آمونیوم در محلول غذایی با اثر آنتاگونیسمی بر جذب سدیم، کاهش رشد رویشی سال جاری و افزایش متابولیسم نیتروژن و تنظیم اسمزی با نسبت‌های

برگ‌ها را محدود کند و به این صورت از مزایای کاهش رشد به‌رمنند، و به شوری موجود در ناحیه ریشه سازگار شود (Loreto *et al.*, 2003; Munns, 2005; Remorini *et al.*, 2009, Cimato *et al.*, 2010)

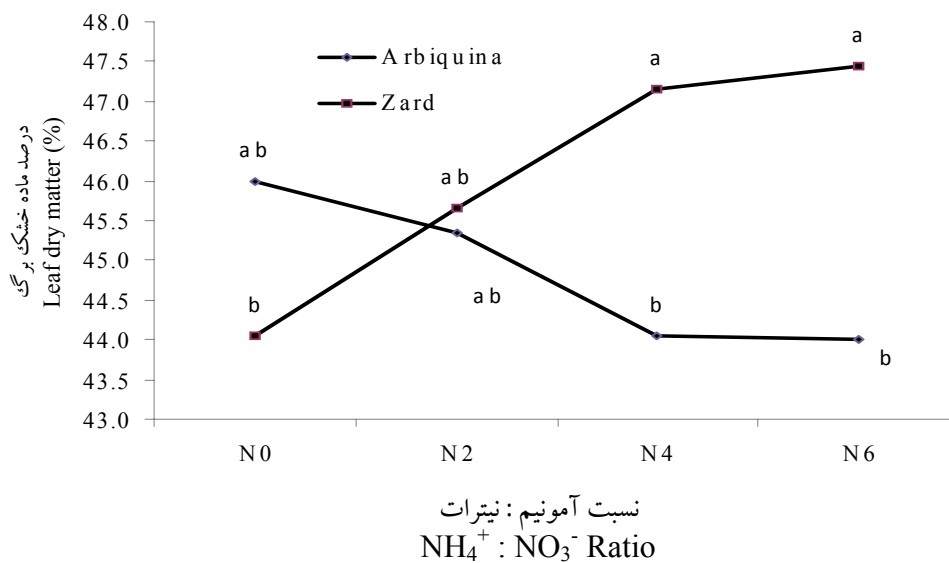
ارقام مورد آزمایش رفتار کاملاً متفاوتی نسبت به هم در هر یک از سطوح تغذیه‌ای داشتند. با افزایش آمونیوم در محلول غذایی سطح برگ نهایی و ماده خشک رقم زرد افزایش یافت. در حالی که رقم آربکین برای این مؤلفه‌ها رفتار کاملاً متفاوت نسبت به رقم زرد در مقابل افزایش آمونیوم در محلول غذایی نشان داد (شکل‌های ۲ و ۳).

اثر متقابل سه گانه نشان داد که در هر دو رقم در هر یک از سطوح تغذیه‌ای افزایش شوری موجب افزایش ریزش برگ و کاهش سطح برگ شد (جدول ۵) نحوه تاثیر شوری بر روند کاهش سطح برگ و افزایش ریزش برگ کاملاً وابسته به رقم و تغذیه اعمال شده بود. رقم زرد رشد یافته در تغذیه دارای ۶ میلی‌اکی‌والان بر لیتر آمونیوم تحمل خوبی تا شوری سطح ۵۰ میلی‌مول بر لیتر در برابر کاهش سطح برگ نهایی نشان داد (جدول ۵). در این تیمار ریزش برگی نیز خیلی کم و در حد سطح صفر شوری رخ داد. غلظت‌های بالاتر شوری با افزایش ریزش برگ موجب کاهش سطح برگ نهایی نهال‌ها در همه تغذیه‌ها شدند. سطح برگ نهایی رقم آربکین هم در هر چهار سطح تغذیه با افزایش شوری کاهش یافت. این رقم زمانی

اثر نسبت آمونیم به نیترات بر رشد...



شکل ۲- اثر نسبت آمونیم : نیترات و رقم بر سطح برگ زیتون
Fig. 2. Effect of NH4 : NO3 ratio and cultivar on olive leaf area



شکل ۳- اثر نسبت آمونیم : نیترات و رقم بر ماده خشک برگ زیتون
Fig. 3. Effect of NH4 : NO3 ratio and cultivar on olive leaf dry matter

تحمل به شوری و کاهش ورود سدیم به اندام‌های هوایی می‌شود و به این صورت منجر

بالا تر پتاسیم به سدیم به جای تولید پرولین، باعث کاهش انرژی‌های لازم برای سازوکارهای

مصطفوی، نوری‌زاده، عبدالهی، سهرابی، امینی، رویگری و خانم قربانلو و از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان برای تامین اعتبار لازم برای اجرای این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

به تعدیل آثار سوء شوری در سطوح شوری ملایم می‌شود. غلظت‌های بالای شوری و آمونیوم نیز تشدیدکننده آثار سوء یکدیگر شدند.

سیاسگزاری

در پایان از زحمات بی دریغ جناب آقایان

References

- Abdolzadeh, A., Kazuto, S., and Chiba, K. 1998.** Effect of salinity on growth and ion content in *Lolium multiflorum*, *L. perenne* and *Festuca arundinacea*. Journal of the Japanese Society of Revegetation Technology 23 (3): 161-169.
- Alizadeh, A. 2004.** Soil, water and plant relationship. 5th Edition. Imam Reza University Press. Mashhad, Iran. 470 pp. (In Persian).
- Aragues, R., Puy, J., Royo, A., and Espada, J. L. 2005.** Three-year field response of young olive trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) to soil salinity: Trunk growth and leaf ion accumulation. Plant Soil 271: 265-273.
- Babalar, M., and Ahmadi, A. 1997.** Effect of fertigation N-NO₃ and N-NH₄ ratio on growth and macro elements content of apples trees cv. Golden grafted on the M9 rootstock. Iranian Journal of Agriculture Science 28 (4): 41-31 (In Persian).
- Ben-Oliel, G., Kant, S., Naim, M., Rabinowitch, H. D., Takeoka, G. R., Buttery, R. G., and Kafkafi, U. 2005.** Effects of ammonium to nitrate ratio and salinity on yield and fruit quality of large and small tomato fruit hybrids. Journal of Plant Nutrition 27 (10): 1795-1812.
- Bernstein, L. 1975.** Effect of salinity and sodicity on plant growth. Annual Review of Phytopathology 13: 295-312
- Bohera, J. S., and Doerffling, K. 1993.** Potassium nutrition of rice varieties under NaCl salinity. Plant Soil 152: 299-303.
- Bybordi, A., Tabatabaei, J., and Ahmadov, A. 2010.** Effect of different ratios of nitrate to ammonium on photosynthesis, respiration and antioxidant enzymes activity in canola (*Brassica napus* L.) in saline conditions. Iranian Journal of Field

- Crops Research 8 (6): 975-982 (In Persian).
- Chartzoulakis, K. 2005.** Salinity and olive: growth, salt tolerance, photosynthesis and yield. Agriculture Water Management 78: 108–121.
- Cimato, A., Castelli, S., Tattini, M., and Traversi, M. L. 2010.** An ecophysiological analysis of salinity tolerance in olive. Environmental and Experimental Botany 68 (2): 214-221.
- Curtis, D. S., and Lauchli, A. 1987.** The effect of moderate salt stress on leaf anatomy in *Hibiscus cannabinus* (kenaf) and its relation to leaf area. American Journal of Botany 74 (4): 538-542.
- Delshad, M., Babalar, M., and Kashi, A. 2000.** Effects of nitrogen index of nutrition solution in mineral fertigation of greenhouse tomato cultivars in hydroponic culture. Iranian Journal of Agricultural Science 31 (3): 613-625. (In Persian).
- Durey, R. S., and Pessaraki, M. 1995.** Physiological mechanism of nitrogen absorption and assimilation in plant under stress conditions. Pp. 605-625. In: Pessaraki, M. (ed.) Handbook of plant and crop physiology. Macel Dekker Inc: New York.
- El-hendawy, S. E., Hu, Y., and Schmidhalter, U. 2005.** Growth, ion content, gas exchange and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerance. Australian Journal of Agriculture Research 56: 123-134.
- Emami, A. 1996.** Methods of plant analysis. Technical Bulletin No. 982. Soil and Water Research Institute. Tehran, Iran. (In Persian).
- Errebi, M., and Wilcox, G. F. 1990.** Plant species response to ammonium-nitrate concentration ratios. Plant Nutrition 13 (8): 1021-1029.
- Faust, M. 1989.** Physiology of temperate zone fruit trees. Wiley Interscience. NewYork. 338 pp.
- Ferreira-Silva, S. L., Silveira, J., Voigt, E., Soares, L., and Viegas, R. 2008.** Changes in physiological indicators associated with salt tolerance in two contrasting cashew rootstocks. Brazil Journal of Plant Physiology 20 (1): 51-59.
- Flores, P., Carvajal, M., Cerda, A., and Martinez, V. 2001.** Salinity and ammonium × nitrate interactions on tomato plant development, nutrition, and metabolites. Plant Nutrition 24:(10) 1561-1573.
- Gucci, R., and Tattini, M. 1997.** Salinity tolerance in olive. Horticultural Reviews 21:

177-214.

- Kafi, M., Borzoei, A., Salehi, M., Kamand, A., Masoomi, A., and Nabati, J. 2009.** Environmental stress physiology in plants. Jihad-e-Daneshgahi Mashhad Press. Mashhad, Iran. 502 pp. (In Persian).
- Kant, S., Kant, P., Lips, H., and Barak, S. 2007.** Partial substitution of NO₃ by NH₄ fertilization increases ammonium assimilating enzyme activities and reduces the deleterious effects of salinity on the growth of barley. *Journal of Plant Physiology* 164: 303-311
- Khoshgftar Manesh, A., and Siadat, H. 2002.** Mineral nutrition of vegetables and horticultural crops in saline conditions. Ministry of Jihad-e-Agriculture. Nashr-e-Amouzesheh. Karaj, Iran. 86 pp. (In Persian).
- Lambers, H., Chapin III, F. S., and Pons, T. L. 2008.** Plant physiological ecology. 2nd Edition Springer, New York. 610 pp.
- Loreto, F., Centritto, M., and Chartzoulakis, K. 2003.** Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant Cell Environment* 26: 595-601.
- Marschner, H. 1995.** Mineral nutrition of higher plant. Academic press. London. 889 pp.
- Munns, R. 1988.** Causes of varietal differences in salt tolerance. Pp. 960-968. In: Proceedings of International Congress of Plant Physiology.
- Munns, R. 2005.** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytology* 167: 645-663.
- Noble, C. L., Halloran, G. M., and West, D. W. 1984.** Identification and selection for salt tolerance in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* 35: 239-252.
- Rameeh, S., Rezai, A., and Saeidi, G. 2004.** Study of salinity tolerance in rapeseed. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35 (19 and 20): 2849-2866.
- Remorini, D., Melgar, J. C., Guidi, L., DeglInnocenti, E., Castelli, S., Traversi, M. L., Massai, R., and Tattini, M. 2009.** Interaction of root zone salinity and solar irradiance on the physiology and biochemistry of *Olea europaea*. *Environmental and Experimental Botany* 65: 210-219.
- Saberi, M. H., Rashed Mohasel, M. H., and Kafi, M. 2003.** Salinity effects on growth

- indicators and accumulation of cation in eight wheat cultivars. Iranian Journal of Field Crops Research 1: 80-91. (In Persian).
- Sadeghi, H. 2002.** Planting and harvesting of olive. Nashr-e-Amouzesh. Karaj, Iran. 420 pp. (In Persian).
- Sagi, M., Dovrat, A., Kipnis, T., and Lips, S. H. 1997.** Ionic balance and the production of biomass and organic nitrogen as affected by salinity and N source in annual ryegrass (*Lolium multiflorum* L.). Journal of Plant Nutrition 20: 1291 –316.
- Sotiropoulos, T. E., Therios, I. N., Almaliotis, D., Papadakis, I., and Dimassi, K. N. 2006.** Response of cherry rootstocks to boron and salinity. Journal of Plant Nutrition 29: 1691-1698.
- Taheri, M., Talaei, A., Babalar, M., Taghavi, T., and Ebadi, A. 2009.** Effect of nitrogen source, planting time on photosynthesis rate, growth and macro in two varieties of olive sapling. Journal of Horticultural Science and Technology 10 (1): 29-42. (In Persian).
- Yuncaı, H., and Schmidhalter, U. 2005.** Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. Plant Nutrition and Soil Science 168: 541–549.