تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۷ شماره ۴، زمستان ۹۳

جداسازی باکتری آزوسپریلوم و بررسی تأثیر چهار جدایه برتر روی جوانه‌زنی بذور کلزا

نگار قادری[۱]*، محسن علمائی[۲]، محمد حسین ارزانش[۳]، یونس محمدنژاد[۴] و علی‌رضا ربیع‌زاده[۵]

۱*- نویسنده مسوول: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(ghaderi.n61@gmail.com)

۲- استادیار پژوهشی گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

۴- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

۵- کارشناس آزمایشگاه خاکشناسی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۴

چکیده

باکتری جنس *Azospirillum* از باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌باشد که در ریزوسفر و فضای بین سلولی ریشه غلات و سایر گیاهان وجود دارند. یکی از ویژگی‌های این باکتری که در تحقیق حاضر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است تاثیر این باکتری روی توان جوانه‌زنی بذرهای تلقیح شده است. در این تحقیق از ۳۸ نمونه خاک و ریزوسفر ریشه گیاه کلزا از مناطق مختلف استان گلستان، ۵۸ جدایه *Azospirillum* جداسازی و ضمن مقایسه ویژگی‌های محرک رشد، جدایه‌های برتر انتخاب شدند. سپس تأثیر تلقیح ٤ جدایه برتر به همراه شاهد (تلقیح نشده) روی برخی از شاخص‌های جوانه‌زنی بذور کلزا (رقم هایولا ٤٠١) در قالب طرح بلوک کامل تصادفی و در ۸ تکرار بررسی گردید. نتایج حاصله نشان داد که بین جدایه‌های مختلف از نظر درصد جوانه‌زنی، میانگین مدت و سرعت جوانه‌زنی در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در اثر تلقیح بذرهای کلزا درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی کاهش و مدت زمان جوانه‌زنی نسبت به تیمار تلقیح نشده افزایش یافته است. جدایه AC34-III در مقایسه با سایر جدایه¬ها دارای حداقل میزان تولید اکسین بود که در نتیجه کمترین درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی را به خود اختصاص داد. همچنین جدایه مولد هورمون اکسین بالاتر (AC43-III)، بیشترین درصد جوانه‌زنی را نشان داد که به‌عنوان بهترین تیمار معرفی شد.

کلید واژه‌ها: باکتری Azospirillum، کلزا، جوانه‌زنی

مقدمه

کشاورزی ارگانیک[1] شیوه‌ای از کشت و کار کشاورزی است که بر مبانی و اصول بوم شناختی (اکولوژیک) استوار می‌باشد. در کشت و کار ارگانیک، هدف استقرار نظام کشت پایدار است. (قلی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۵). در دهه‌های اخیر سیستم‌های کشاورزی پایدار، حفاظت جامعه موجودات زنده خاکزی و تلاش برای استفاده از راه حل‌های بیولوژیک جهت تغذیه گیاه و تأمین سلامتی جامعه مورد توجه قرار گرفته است (صالح راستین، ۱۳۸۰).

باکتری‌های محرک رشد گیاه[2] از جمله باکتری‌های ریزوسفری هستند که می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی در افزایش راندمان کود و آب و در نهایت روی عملکرد محصولات زراعی اثرات مثبتی داشته باشند. این دسته از موجودات خاکزی می‌توانند علاوه بر کاهش و به حداقل

1- Organic Farming

2- Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

رساندن آلودگی‌های زیست محیطی، در تأمین برخی از عناصر (بالاخص نیتروژن و در آزادسازی عناصر دیگر مثل فسفر و آهن از اشکال کم محلول یا نامحلول) نقش مهمی داشته باشند.

باکتری جنس *Azospirillum* سال‌هاست که به‌عنوان عامل محرک رشد گیاه شناخته شده است (اوکان و لابانـدرا-گـونزالز[1]، ۱۹۹۴) و در ریزوسـفر غـلات و اطراف ریشه آنها قادر بـه تشـکیل پرگنـه و ایجـاد رابطـه همیاری می‌باشد. از ویژگی‌های مفید این باکتری می‌توان به تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه و در نتیجـه بهبـود جـذب آب و عناصـر غـذایی، افـزایش حلالیت فسفات‌های نـامحلول، تولیـد سـیدروفور، تولیـد ویتامین‌ها، کنترل عوامل بیماری‌زا، رابطـه سینرژیسـتی بـا سایر باکتری‌های مفید خاکزی، تولیـد نیتریـت، زیسـت-پالایی فاضلاب و تجزیه بقایای سمی اشاره کرد (دوبرینر و دی[2]، ۱۹۷۶).

تـأثیر مثبـت تلقـیح بـذر گیاهـان مختلـف بـا توانـایی تحریک کنندگی بر جنبه‌های مختلف رشد و نمو آنها از جمله قابلیت جوانه‌زنی بذر و بنیه گیاهچه بررسی و مورد تأییـد قـرار گرفتـه اسـت (بیسـواس و همکـاران[3]، ۲۰۰۰؛ رامامورثی و همکاران[4]، ۲۰۰۰). ترکیبـات کینـونی نقـش تحریـک کننـدگی بـر روی بهبـود جوانـه‌زنـی و ظهـور گیاهک در دانه گیاهانی مانند سویا و کلزا دارند (کلـوپر و همکاران[5]، ۱۹۸۸).

اشـرف‌الزمـان و همکـاران[6] (۲۰۰۹) در بررسـی‌هـای خود بر روی اثر جدایه‌های مختلف *Azospirillum* بر روی جوانه‌زنی بذور برنج مشاهده نمودند که این جدایه-ها باعث افزایش جوانه‌زنی از ۲/۳ تا ۱۴/۷ درصـد نسـبت به شاهد شدند. آنها بیان کردند که افزایش رشد گیاهچه-های بـرنج بـا تلقـیح بـاکتری شـاید بـه‌دلیـل القـاء تولیـد هورمون اکسین[7] و حلالیت فسفر باشد.

پژوهش¬های غلامـی و همکـاران[8] (۲۰۰۹) بـر روی اثر سویه¬های مختلف از بـاکتری¬هـای محـرک رشـد (*P. putida*، *P. fluorescens*، *A. lipoferum* و *A. brasilense*) روی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه ذرت حاکی از افزایش معنی دار در جوانـه‌زنـی دانـه و قـدرت گیاهچه‌های ذرت بود.

در مطالعه دیگر راویکومار و همکاران[9] (۲۰۰۲) بیـان نمودند کـه بـه ترتیـب ۴۰ و ۷۰ درصـد از بـذور بـرنج و باقلای سیاه تلقیح شده با *A. brasilense* قادر به رشـد بودند. همچنین این باکتری درصد بالاتری از جوانـه‌زنـی را در مورد برنج و باقلای سیاه به همراه داشت. این مسئله می‌تواند به‌دلیل فشار عظیمی باشد که داخل دانه‌ها توسعه می‌یابد و مسئول شکسته شدن سـریع پوشـش دانـه اسـت (سیفتون[10]، ۱۹۵۹). این فشار احتمالاً توسط فیتوهورمون-ها به‌ویژه اکسین، ایندول استیک اسید، سیتوکینین و اسید جیبرلیک ترشح شده توسـط *Azospirillum* تحریـک می‌شود (اوکان، ۱۹۸۵؛ اوکان و کاپولنیک[11]، ۱۹۸۶).

بـا ایـن وجـود مطالعـات انجـام شـده توسـط برخـی محققین نشـان داده اسـت کـه بـاکتری *Azospirillum* همیشه اثر مثبت بر روی فاکتورهای رشدی گیـاه نداشـته است و در برخی موارد اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تلقیح شده و شاهد مشاهده نمی‌شود (الـیس و روبرتـز[12]، ۱۹۸۱).

دانه‌های روغنی بعد از غـلات بـه‌عنـوان دومـین منبـع تولید انـرژی در تغذیـه انسـان مطـرح هسـتند و از طرفـی کنجاله حاصل از فرآیند صنعتی آنها نیز به‌لحـاظ سرشـار بودن از پروتئین یکی از اقلام مهم در تغذیه دام، طیـور و آبزیان به‌شمار مـی‌رود. کلـزا از جملـه دانـه‌هـای روغنـی

1- Okon & Labandera-Gonzalez
2- Dobereiner & Day
3- Biswas *et al.*
4- Ramamoorthy *et al.*
5- Kloepper *et al.*
6- Ashrafuzzaman *et al.*
7- Indol-3-Acetic Acid (IAA)
8- Gholami *et al.*
9- Ravikumar *et al.*
10- Sifton
11-OKan & Kapulnik
12- Ellis & Roberts

مورد توجه در ایران است که دو فراورده حاصله از آن، روغن و کنجاله می‌باشد (شهیدی و فروزان، ۱۳۷۶).

حدود ۳۳۰۰۰ هکتار از اراضی استان گلستان به منظور استحصال روغن به کشت کلزا اختصاص یافته است (بی‌نام، ۱۳۸۷). بالا بودن واکنش خاک یا pH غالب خاک‌های استان و در نتیجه کاهش عناصر غیر متحرک از جمله آهن، روی و منگنز و نیز کمبود یا تثبیت برخی عناصر معدنی همچون فسفر و پتاسیم باعث شده تا راندمان مصرف کود شیمیایی پایین باشد (رجب-زاده، ۱۳۸۸). لذا با فرض اینکه باکتری *Azospirillum* می‌تواند با اثر بر روی سیستم‌های مختلف گیاهی، سیستم ریشه‌ای را توسعه ببخشد و از طرفی با تولید اسیدهای آلی و برخی از ترکیبات کلات کننده آهن (سیدروفور[1]) در محیط رشد خود باعث کاهش واکنش خاک یا pH در ناحیه ریزوسفر و به تبع آن افزایش میزان جذب عناصر غیر متحرک توسط گیاه شود، مقاله حاضر به بررسی اثر باکتری *Azospirillum* بر روی برخی شاخص‌های جوانه‌زنی بذور کلزا از جمله درصد جوانه-زنی، میانگین مدت جوانه‌زنی و میانگین سرعت جوانه-زنی در شرایط درون شیشه‌ای می‌پردازد.

اهداف این تحقیق عبارتند از:

۱. مقایسه خصوصیات محرک رشدی در جدایه‌های *Azospirillum*
۲. پیشنهاد و معرفی جدایه‌های مؤثر برای استفاده از آن در تولید مایه تلقیح مناسب
۳. بررسی میزان اثربخشی آن بر روی برخی شاخص-های جوانه‌زنی بذور کلزا

مواد و روش‌ها

۱- جداسازی و گروه‌بندی جدایه‌های بومی *Azospirillum*

در این تحقیق ۳۸ نمونه خاک و ریزوسفر ریشه گیاه کلزا از مناطق مختلف استان گلستان در سال ۱۳۸۸ جهت جداسازی باکتری *Azospirillum* جمع‌آوری شد. کلیه آزمایشات مربوطه، در بخش آب و خاک مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان انجام گردید.

ابتدا آزمایشات اولیه شناسایی جنس شامل توان تشکیل هاله در محیط کشت فاقد نیتروژن[2] نیمه جامد (دوبرینر و دی، ۱۹۷۶)، تولید پرگنه قرمز و صورتی رنگ روی محیط کشت آر- سی[3] (کاسرس[4]، ۱۹۸۲) و تولید پرگنه صورتی رنگ روی محیط کشت سیب-زمینی[5] (دوبرینر، ۱۹۹۲)، تست گرم، تست اکسیداز و کاتالاز (دابی و ماهشواری[6]، ۲۰۰۵) و سپس آزمایشات تکمیلی شناسایی گونه شامل توانایی رشد در محیط کشت فاقد نیتروژن نیمه‌جامد حاوی ۳ درصد کلرید سدیم، نیازمندی به بیوتین و توان استفاده از قند گلوکز (تارند و همکاران[7]، ۱۹۷۸) و همچنین آزمایشات محرک رشد (توان حلالیت فسفات معدنی نامحلول، توان تولید هورمون رشد و توان تثبیت نیتروژن) بر روی جدایه‌های *Azospirillum* جداسازی شده انجام گردید.

1- Siderophore

2- Nitrogen Free Blue (NFb): Dl-Malic acid, 5g/L; K2HPO4, 0.5g/L; MgSO4.7H2O, 0.2g/L; NaCl, 0.1g/L; CaCl2.2H2O, 0.02g/L; Micro Elements solu., 2ml/L; Vitamin solu., 1ml/L; Bromthymol blue solu. 0.5% in 0.2 N KOH, 2ml/L; Fe-EDTA (1.64%), 4ml/L; KOH, 4.8g/L; Agar-Agar, 1.75g/L.

3- Congo Red (RC): Dl-Malic acid, 5g/L; K2HPO4, 0.5g/L; MgSO4.7H2O, 0.2g/L; NaCl, 0.1g/L; CaCl2.2H2O, 0.02g/L; Congo Red (1:400), 15ml/L; KOH, 4.8g/L; NH4Cl, 0.5g/L; Yeast Extract, 0.5g/L; Agar-Agar, 15-20g/L.

4- Caceres

5- Potatoes Dextrose Agar (PDA): Dl-Malic acid, 2.5g/L; Micro Elements solu., 1ml/L; Vitamin solu., 1ml/L; Bromthymol blue solu. 0.5% in 0.2 N KOH, 2ml/L; KOH, 2g/L; Froctose or Sucrose, 2.5g/L; Fresh potato is peeled and cooked, 200g/L; Agar-Agar, 15-20g/L.

7- Dubey & Maheshwari

8- Tarrand *et al.*

۲- آزمون کمی توان تولید اکسین

در بررسی توان تولید اکسین از روش بریک و همکاران[1] (۱۹۹۱) استفاده شد. برای این منظور، مقداری از پرگنه هر جدایه از سطح محیط کشت ناس[2] برداشته شده و به ارلن حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع فاقد نیتروژن (بدون آگار و معرف برموتیمول بلو) به‌علاوه ۱ گرم در لیتر کلرور آمونیوم انتقال یافتند. ارلن‌های تلقیح شده سپس به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با دوران ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به ارلن‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت فوق (فاقد آگار و معرف برموتیمول بلو) به‌علاوه ۱ گرم در لیتر کلرور آمونیوم منتقل گردید. نیمی از این ارلن‌ها حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ال- تریپتوفان[3] بود. ارلن‌های تلقیح شده به‌مدت ۱۲۰ ساعت دردمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با دوران ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به‌مدت ۱۰ دقیقه در دوران ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول روئی با ۲ میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی (شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ نیم مولار) مخلوط شد. با اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار اکسین تولیدی با مقایسه شدت جذب[4] با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های مختلف ایندول استیک اسید محاسبه گردید.

۳- آزمون کمی توان حل فسفات معدنی نامحلول

جدایه‌های *Azospirillum* به ارلن‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت ان- بی- اس[5] تلقیح و در دوران ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. طبق روش لین و همکاران[6] (۱۹۸۳)، جمعیت باکتری در همه ارلن‌ها یکسان در نظر گرفته شد (2×10^8 پرگنه در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون). صد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع رودریگوئز[7] (۲۰۰۴) منتقل گردید. ارلن‌های تلقیح شده با جدایه‌های *Azospirillum* به‌مدت ۱۲۰ ساعت بر روی شیکر با دوران ۱۲۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس در دوره‌های زمانی ۰، ۴۸ و ۱۲۰ ساعت، واکنش نمونه‌ها توسط دستگاه pH متر قرائت شد. همزمان با آن، ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به‌مدت ۱۰ دقیقه در دوران ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با یک میلی‌لیتر معرف آمونیم مولیبدات- وانادات و ۳ میلی‌لیتر محیط کشت رودریگوئز (فاقد تری‌کلسیم فسفات) مخلوط و میزان جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 محاسبه گردید (ارزانش، ۱۳۸۷؛ رجب‌زاده، ۱۳۸۸).

٤- آزمون توان تثبیت بیولوژیک نیتروژن مولکولی

در این آزمون میزان فعالیت نیتروژنازی در جدایه‌های بومی *Azospirillum* به روش احیای استیلن[8] توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی[9] مورد بررسی قرار گرفت. لوله‌های آزمایش کوچک به حجم ۱۳ میلی‌لیتر انتخاب و به میزان ۵ میلی‌لیتر محیط کشت فاقد نیتروژن به‌علاوه نیم گرم در لیتر آگار به هر لوله منتقل گردید. پس از استریل شدن در اتوکلاو (به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد)، محیط کشتهای فاقد

1- Bric *et al.*
2- Nutrient Agar + 10g/L Sucrose (NAS)
3- L-Tryptophan
4- Optical Density (OD)
5- Nutrient Broth + 10g/L Sucrose (NBS)
6- Lin *et al.*
7- Rodriguez medium: KOH, 4.8g/L; Bromthymol blue solu. 0.5% in 0.2N KOH, 2ml/L; $Ca_3(PO_4)_2$, 0.7g/L; $FeCl_3.6H_2O$, 0.003g/L; NaCl, 0.2g/L; KCl, 0.295g/L; $MgSO_4.7H_2O$, 0.2g/L; NH_4NO_3, 0.373g/L; Fructose, 10g/L; Glucose, 10g/L.
8- Acetylene Reduction Assay (ARA)
9- Gas Chromatography (GC)

نیتروژن نیمه‌جامد توسط پرگنه‌های خالص *Azospirillum* تلقیح و در دمای ۳۲ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۷۲ ساعت درپوش‌های پنبه‌ای لوله‌ها با درپوش‌های لاستیکی استریل تعویض شدند. سپس ۱۰ درصد حجم باقی‌مانده از لوله (۰/۷ میلی‌لیتر با احتساب حجم لاستیک) به‌وسیله سرنگ، خالی و به همان میزان گاز استیلن تزریق گردید. درزهای درپوش‌های لاستیکی با پارافیلم پوشانده شد و مجدداً لوله‌ها به انکوباتور انتقال یافتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت مقدار ۰/۷ میلی‌لیتر از هوای داخل هر لوله توسط سرنگ هامیلتون کشیده شد و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید. ۵/۱۷ تا ۵/۷۴ دقیقه پس از تزریق، پیک مربوط به گاز اتیلن و ۵/۲۸ تا ۶/۶۸ دقیقه پس از تزریق، پیک مربوط به گاز استیلن مشاهده می‌شود. غلظت اتیلن تولید شده توسط هر جدایه با مقایسه سطح زیر پیک ایجاد شده توسط استاندارد تهیه شده از گاز اتیلن خالص محاسبه گردید (تارنر و گیبسون[1]، ۱۹۸۰).

۵- انتخاب جدایه‌های برتر بومی

طبق نتایج حاصله از آزمون‌های ویژگی‌های محرک رشد، ۴ جدایه *Azospirillum* که از لحاظ حلالیت فسفات معدنی نامحلول، توان تولید هورمون رشد و توان تثبیت نیتروژن، بالاتر از سایر جدایه‌ها بودند جهت این مطالعه انتخاب شدند.

٦- ضدعفونی و تلقیح بذرها

طبق روش اصلاح شده وینسنت[2] (۱۹۷۰) از ۴ جدایه بومی باکتری *Azospirillum* در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت ناس، کشت تراکمی تهیه گردید. بعد از ۴۸ ساعت از هر جدایه به مقدار یکسان (یک لوپ پر) توسط حلقه پلاتینی به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع مغذی[3] منتقل شد (تیمار شاهد، فاقد باکتری و تنها شامل محیط کشت مایع مغذی بود). ارلن‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با دوران ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند.

بذرهای سالم کلزا (رقم هایولا ۴۰۱) با محلول ۱ درصد هیپوکلرید سدیم، استریل سطحی شده و در نهایت بعداز ۱۰ مرحله شستشو با آب معمولی استریل، ۱۰۰ دانه از آنها به تشتک‌های پتری با قطر ۸/۵ سانتیمتر انتقال یافتند (لیفشتیز و همکاران[4]، ۱۹۸۷) در ادامه هر پتری با ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری (با متوسط جمعیت ۲×۱۰^{۸} پرگنه در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون) تلقیح شد. بذرهای تلقیح شده به‌مدت ۳-۱ ساعت در سوسپانسیون غوطه‌ور و سوسپانسیون اضافی خالی گردید. سپس ۵۰ عدد بذر تلقیح شده، به داخل تشتک‌های پتری جدید با قطر ۸/۵ سانتی‌متر که کف آن‌ها با یک برگ کاغذ صافی واتمن شماره ۲ استریل پوشیده شده بود، قرار گرفتند (در ۸ تکرار) و روی بذرها نیز توسط یک برگ کاغذ صافی پوشیده شد. پس از مرطوب کردن کاغذهای صافی، تشتک‌های پتری حاوی بذر به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار گرفتند (بک و همکاران[5]، ۱۹۹۳).

۷- اندازه‌گیری برخی از شاخص‌های جوانه‌زنی

۴۸ ساعت پس از انکوباسیون شاخص‌های درصد جوانه‌زنی، میانگین مدت جوانه‌زنی ($\overline{D}$) و میانگین سرعت جوانه‌زنی ($\overline{R}$) اندازه گیری و محاسبه شدند. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۵ تیمار تلقیحی (چهارجدایه بومی *Azospirillum* به همراه شاهد) در ۸ تکرار اجرا گردید. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

میانگین مدت جوانه‌زنی که شاخص خوبی از سرعت جوانه‌زنی است، از طریق معادله الیس و روبرتز (۱۹۸۱) محاسبه گردید.

1- Turner & Gibson
2- Vincent
3- Nutrient Broth (NB)
4- Lifshtiz *et al.*
5- Beck *et al.*

$$\overline{D} = \frac{\sum Dn}{\sum n} \qquad (۱)$$

که در آن n تعداد بذور جوانه‌زده در روز D و پارامتر D تعداد روزها پس از شروع آزمون جوانه‌زنی است. همچنین میانگین سرعت جوانه‌زنی عکس میانگین مدت جوانه‌زنی می‌باشد که از طریق معادله الیس و روبرتز (۱۹۸۱) محاسبه گردید.

$$\overline{R} = \frac{1}{\overline{D}} \qquad (۲)$$

نتایج و بحث

۱- جداسازی و گروه‌بندی جدایه‌های بومی *Azospirillum*

در این تحقیق از ۳۸ نمونه خاک و ریشه گیاه کلزا از مناطق مختلف استان گلستان، ۵۸ جدایه[1] *Azospirillum* جداسازی شدند. نتایج جداسازی باکتری *Azospirillum* نشان داد که ۵۸ جدایه مذکور توانایی تشکیل هاله در محیط کشت فاقد نیتروژن نیمه-جامد، تولید پرگنه قرمز و صورتی رنگ روی محیط کشت آر- سی و تولید پرگنه صورتی رنگ روی محیط کشت سیب‌زمینی را داشتند. تمامی جدایه‌ها گرم منفی، ویبروئیدی شکل، کاتالاز و اکسیداز مثبت بودند. جدایه-های مذکور براساس آزمون‌های تکمیلی شامل توانایی رشد در دو محیط کشت فاقد نیتروژن جامد و نیمه‌جامد حاوی ۳ درصد کلرید سدیم، نیازمندی به بیوتین و توان استفاده از قند گلوکز به سه گونه[2] منسوب به *A. brasilense*، *A. lipoferum* و *A. irakense* تفکیک شدند (کریگ و دوبرینر[3]، ۱۹۸۶؛ تارند و همکاران، ۱۹۷۸).

۲- انتخاب ٤ جدایه‌برتر *Azospirillum* در آزمون‌های ویژگی‌های محرک رشدی

براساس نتایج حاصله از آزمون‌های ویژگی‌های محرک رشدی، ۴ جدایه *Azospirillum* در سه آزمون توان حل فسفات معدنی نامحلول (جدایه AC34-III)، توان تولید هورمون رشد (جدایه‌های AC43-III و AC39-I) و توان تثبیت نیتروژن (جدایه AC49-VII)، به‌عنوان برترین جدایه‌ها انتخاب شدند (جدول ۱).

۳- نتایج تأثیر ٤ جدایه برتر *Azospirillum* بر روی شاخص‌های جوانه‌زنی

تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های بومی *Azospirillum* بر روی شاخص‌های جوانه‌زنی نشان می‌دهد که بین جدایه‌های مختلف از نظر درصد جوانه-زنی، میانگین مدت جوانه‌زنی و میانگین سرعت جوانه-زنی در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کمترین درصد جوانه‌زنی مربوط به جدایه AC34-III بود و تفاوت معنی‌داری بین سه تیمار تلقیح شده با باکتری *Azospirillum* با تیمار شاهد در درصد جوانه‌زنی مشاهده نشد (شکل ۱).

با توجه به نتایج حاصله از آزمون توان تولید اکسین در جدول ۱، جدایه AC34-III در مقایسه با سایر جدایه‌ها دارای کمترین میزان تولید اکسین بوده است. بنابراین مشاهده حداقل درصد جوانه‌زنی برای این باکتری، دور از انتظار نمی‌باشد.

---

۱. «جدایه» به باکتری جداسازی شده که آزمایشات اولیه شناسایی جنس بر روی آن انجام گرفته و یا به باکتری شناسایی شده بعنوان گونه که به صورت حرف یا شماره مشخص شود، اطلاق می‌گردد.

۲. «گونه» یکی از واحدهای اصلی در طبقه‌بندی بیولوژیکی بوده و به باکتری جداسازی شده اطلاق می‌شود که آزمایشات تکمیلی شناسایی گونه بر روی آن انجام گرفته است.

3- Krieg & Dobereiner

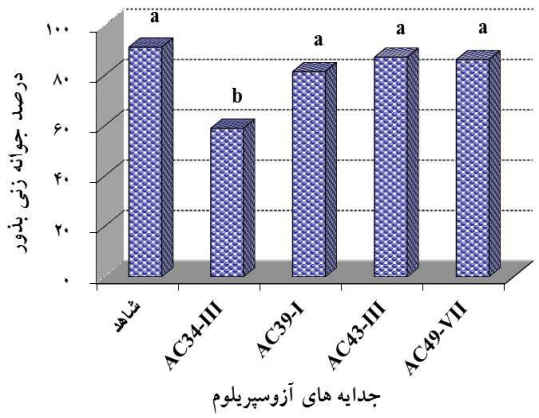
جدول ۱- گونه‌های منسوب و مشخصات مربوط به نوع گیاه میزبان و مکان نمونه‌برداری ٤ جدایه انتخابی باکتری *Azospirillum*

شماره جدایه	گونه منسوب	ناحیه جداسازی از گیاه	مکان نمونه‌برداری	تثبیت نیتروژن (نانومول در ساعت در میلی لیتر)	حلالیت فسفات (میلی گرم در لیتر)	تولید اکسین (میلی گرم در لیتر)
AC34-III	*A. irakense*	ریزوسفر کلزا	گلستان- شمال روستای شجاع‌آباد- علی‌آباد	۰	۳۰/۶۸	۱/۷۱۷
AC39-I	*A. brasilense*	ریزوسفر کلزا	گلستان- پلیس‌راه آزادشهر	۰	۰	۲۹/۲۹۷
AC43-III	*A. irakense*	ریزوسفر کلزا	گلستان- شرق دلند	۰	۰	۳۹/۷۹۹
AC49-VII	*A. irakense*	ریزوسفر کلزا	گلستان- غرب دلند	۶۰/۶۴	۱۹/۱۹	۹/۲۵۱

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های بومی *Azospirillum* بر روی شاخص‌های جوانه‌زنی در بذور کلزا پس از ٤۸ ساعت

منابع تغییرات		میانگین مربعات		
	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	میانگین مدت جوانه‌زنی	میانگین سرعت جوانه‌زنی
بلوک	۷	۱۴۴/۴۴۳ ns	۰/۰۲۴ ns	۰/۰۰۳ ns
جدایه‌های *Azospirillum*	۴	۱۳۱۱/۸۵ **	۰/۱۸۳ **	۰/۰۳۳ **
خطا	۲۸	۱۵۳/۰۵	۰/۰۱۵	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات		۱۵/۲۶۴	۷/۵۱۸	۸/۴۲

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار



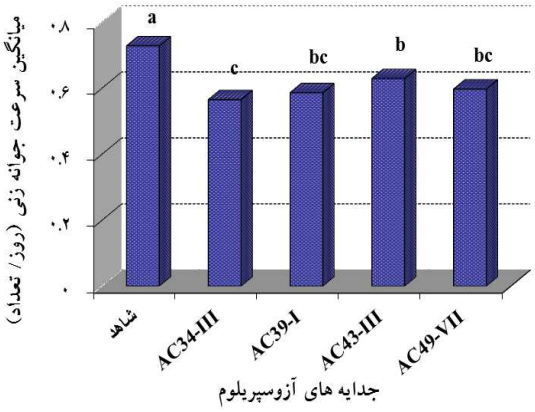
شکل ۱- تأثیر جدایه‌های مختلف باکتری *Azospirillum* بر روی درصد جوانه‌زنی بذور کلزا

در مطالعه‌ای که توسط کروس و همکاران[1] (۱۹۹۶) انجام گرفت بذرهای گندم تلقیح شده با *Azospirillum* هیچ اختلاف معنی‌داری را در درصد جوانه‌زنی در مقایسه با شاهد تلقیح نشده نشان ندادند. این مسئله ممکن است به‌دلیل محدودیت‌های تحمیل شده توسط ممانعت‌های باکتری در زمین مانند بقاء (سیفتون، ۱۹۵۹)، تحرک (باشان و لوانونی[2]، ۱۹۸۷)، جذب به ذرات خاک و رقابت با میکروارگانیسم‌های بومی باشد (باشان و همکاران، ۱۹۸۷). کاسان و همکاران (۲۰۰۹) دانه‌های ذرت و سویا را با سویه‌های Az39 *Azospirillum brasilense* و E109 *Bradyrhizobium japonicum* تلقیح و جهت بررسی جوانه‌زنی در اتاقک رشد قرار دادند. Az39 و E109 به تنهایی یا در

1- Creus
2- Bashan & Levanony

ترکیب با هم باعث افزایش جوانه‌زنی دانه ذرت و سویا شدند. آنها مشاهده کردند که مقادیر درصد جوانه‌زنی نهایی اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نداشت. بنابراین فرض شد که اثر افزایش در مراحل اولیه رشد ممکن است وابسته به باکتری نبوده بلکه شامل حضور ترکیبات تنظیم کننده رشد منتشر شده از باکتری در محیط کشت باشد. نتایج مشابهی نیز در مطالعات جهانیان و همکاران[1] (۲۰۱۲) بر روی دانه تلقیح شده کنگر فرنگی با *Azospirillum* و *Pseudomonas putida* حاصل شد که هیچ اختلاف معنی‌داری در درصد جوانه‌زنی بین تیمارها مشاهده نشد.

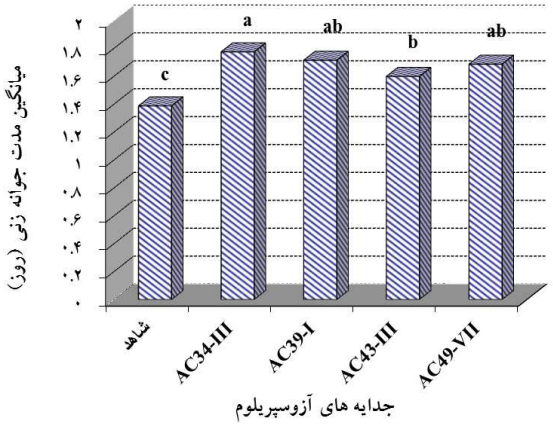
سرعت جوانه زنی نیز در اثر تلقیح با باکتری *Azospirillum* کاهش یافت، به‌طوری که کمترین سرعت جوانه‌زنی مربوط به جدایه AC34-III بود که با تیمار تلقیح نشده اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۲).



شکل ۲- تأثیر جدایه‌های مختلف باکتری *Azospirillum* بر روی میانگین سرعت جوانه‌زنی بذور کلزا

شاخص مدت جوانه‌زنی که دارای رابطه عکس با سرعت جوانه‌زنی می‌باشد نیز نشان داد که تیمار شاهد دارای حداقل مدت جوانه‌زنی بود (شکل ۳).

1- Jahanian *et al.*



شکل ۳- تأثیر جدایه‌های مختلف باکتری *Azospirillum* بر روی میانگین مدت جوانه‌زنی بذور کلزا

از دلایل دیگر عدم جوانه‌زنی دانه‌های غلات و حبوبات، دورمانسی[2] (خواب) می‌باشد. دورمانسی خارجی دانه زمانی رخ می‌دهد که آب و هوا اجازه ورود به دانه را نداشته و دانه موفق به جذب آب نشده و نهایتاً باعث کاهش جوانه‌زنی دانه می‌شود (بیولی[3]، ۱۹۸۲). از آنجایی که یک دانه دورمانت ممکن است به‌طور بالقوه به تمام مراحل متابولیکی مورد نیاز جهت تکمیل جوانه-زنی دست یابد ولی هنوز به برخی دلایل ناشناخته، محور طولی ریشه‌چه برای توسعه و امتداد یافتن با شکست مواجه می‌شود. مطالعه جوانه‌زنی مشکل است، زیرا دانه‌ها پروسه جوانه‌زنی را به‌طور همزمان کامل نمی‌کنند. بنابراین رهایی از دورمانسی می‌تواند بسیار نامنظم باشد، چون آستانه تحریک مورد نیاز برای افزایش جوانه‌زنی به‌طور گسترده بین هر دانه متغیر است (بردفورد[4]، ۱۹۹۶). همچنین اتفاقات ضروری برای رهایی از دورمانسی و تکمیل جوانه‌زنی ممکن است تنها در تعدادی از سلولهای مرتبط با محور طولی ریشه‌چه رخ دهد. به‌عنوان مثال تراکم اسید آبسیزیک در دانه‌های در حال توسعه در طول مراحل اولیه رشد پایین است و در مراحل میانی رشد، وقتی که ذخایر دانه در حال سنتز شدن بوده و

2- Dormancy
3- Bewley
4- Bradford

کاهش می‌یابند، بالاترین مقدار را دارد. ممانعت از جوانه‌زنی در مدت زمان رشد و توسعه دانه ممکن است به‌دلیل محتوای اسید آبسیزیک داخل دانه، محیط اسمزی احاطه کننده دانه یا هر دو باشد (بری و بیولی[1]، ۱۹۹۲). حقیقتاً اسید آبسیزیک از توسعه ریشه‌چه در جنینهای *Brassica napus* جلوگیری می‌کند. بنابراین مانع تکمیل جوانه‌زنی آنها می‌شود (اسکاپفر و پلسی[2]، ۱۹۸۵). به‌علاوه آنالیز روابط آب محور طولی جنینی نشان می‌دهد که نه پتانسیل اسمزی آنها و نه توانایی آنها برای جذب آب، در حضور اسید آبسیزیک مؤثر نمی-شود. اما از شل شدن نسبی دیواره سلولی که مرتبط با توسعه ریشه‌چه است، جلوگیری می‌شود. چگونگی رخ دادن این پدیده ناشناخته می‌باشد. لازم است توجه شود که دانه‌های کلزا غیر دورمانت هستند و ممانعت از جوانه‌زنی آنها تنها در نتیجه حضور اسید آبسیزیک رخ می‌دهد (لیپیج- دگیوری و گارلو[3]، ۱۹۹۲).

در تحقیق حاضر با توجه به نتایج مطالعات سایر محققین، علت کاهش شاخص‌های جوانه‌زنی در تیمارهای تلقیح شده را می‌توان به قرارگیری بذرها در محلول سوسپانسیون باکتری‌ها ارتباط داد. در واقع محیط کشت مایع مغذی مورد استفاده برای تهیه سوسپانسیون باکتری بدلیل دارا بودن هدایت الکتریکی[4]، باعث ایجاد پتانسیل اسمزی پیرامون دانه شده، در نتیجه آب کمتری به بذرها در مقایسه با شاهد رسیده است. بنابراین جهت کسب نتایج مطلوب، پیشنهاد می‌شود که زمان بیشتری برای جوانه‌زنی بذرها در نظر گرفته شود. همچنین مقایسه نتایج جدول ۱ و نتایج حاصله از شاخص‌های جوانه زنی نشان می‌دهد که جدایه مولد هورمون اکسین بالاتر، بیشترین درصد جوانه‌زنی را به خود اختصاص داده است. بنابراین می‌توان جدایه AC43-III را به‌عنوان بهترین تیمار معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

از کارکنان محترم آزمایشگاه‌های بیولوژی و شیمی خاک در بخش آب و خاک مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان به‌ویژه خانم مهندس مریم غزائیان، خانم مهندس مریم سبطی، خانم مهندس یغمایی، خانم مسگر و خانم عبداللهی در اجرای این تحقیق کمال تشکر را دارم.

1- Berry & Bewley
2- Schopfer & Placy
3- LePage-Degivry & Garello
4- Electrical conductivity (EC)

منابع

۱. ارزانش، م.ح. ۱۳۸۷. بررسی پتانسیل کاربرد برخی از جدایه‌های آزوسپیریلومی محرک رشد گیاه بر عملکرد گندم (*Triticum aestivum* L.) در سطوح مختلف خشکی. رساله دکتری تخصصی. دانشکده مهندسی آب و خاک، گروه مهندسی علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ۲۰۸ ص.

۲. بی‌نام. ۱۳۸۷. آمارنامه کشاورزی. دفتر آمار و فناوری اطلاعات. معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی. وزارت کشاورزی. ۴۵ ص.

۳. رجب‌زاده، ف. ۱۳۸۸. جداسازی، شناسایی و به‌کارگیری باکتری *Azospirillum* spp. از باکتری‌های PGPR در افزایش رشد برنج در شرایط گلخانه‌ای. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۴۲ ص.

۴. شهیدی، ا. و فروزان، ک. ۱۳۷۶. کلزا. نشر شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی. چاپ اول. تهران، ۵۱ ص.

۵. صالح راستین، ن. ۱۳۸۰. کودهای بیولوژیک و نقش آنها در راستای نیل به کشاورزی پایدار. ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور (مجموعه مقالات). وزارت جهاد کشاورزی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، صص: ۱-۵۵.

۶. قلی‌نژاد، ا.، پناهیان کیوی، م. و حسن‌زاده، ع. ۱۳۸۵. کشاورزی ارگانیک. فصل‌نامه نظام مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی، ۳ (۱۱): ۸۰-۸۴.

7. Ashrafuzzaman, M., Akhtar Hossen, F., Razi Ismail, M., Anamul Hoque, Md., Zahurul Islam, M., Shahidullah, S.M., and Meon, S. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. African Journal of Biotechnology, 8(7): 1247-1252.

8. Bashan, Y., and Levanony, H.J. 1987. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. Journal of General Microbiology, 133: 3473-3480.

9. Bashan, Y., Levanony, H., and Ziv-Vecht, O. 1987. The fate of field-inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in wheat rhizosphere during the growing season. Canadian Journal of Microbiology, 33: 1074-1079.

10. Beck, D.P., Materon, L.A., and Afandi, F. 1993. Practical Rhizobium-Legume technology manual. Technical manual No. 19. International center for agricultural research in the dry areas (ICARDA) box 5466, Aleppo, Syria. pp: 75-103.

11. Berry, T.A., and Bewley, J.D. 1992. A role for the surrounding fruit tissues in preventing germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. A consideration of the osmotic environment and abscisic acid. Plant Physiology, 100: 951-957.

12. Bewley, J.D. 1982. Protein and nucleic acid synthesis during ger-mination and early seedling growth. In Encyclopaedia of Plant Physiology, Vol. 14A, Boulter, D. and Parthier, B. (eds). New York: Springer-Verlag. pp :61-81.

13. Biswas, J.C., Ladha, J.K., Dazzo, F.B., Yanni, Y.G., and Rolfe, B.G. 2000. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. Agronomy Journal, 92: 880-886.

14. Bradford, K.J. 1996. Population-based models describing seed dormancy behaviour: lmplications for experimental design and interpretation. In Plant Dormancy, Lang, G.A. (ed). Oxford, UK: CAB International. pp. 313-339.

15. Bric, J.M., Bostock, R.M., and Silverstone, S.E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Applied and Environmental Microbiology, 57: 535-538.

16. Caceres, E.A.R. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Applied and Environmental Microbiology, 44: 990-991.

17. Cassan, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., and Luna, V. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). Europian Journal of Soil Biology, 45: 28-35.

18. Creus, C.M., Sueldo, R.J., and Barass, C.A. 1996. *Azospirillum* inoculation in pregerminating wheat seeds. Canadian Journal of Microbiology, 42: 83-86.

19. Dobereiner, J. 1992. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum* in the Prokaryotes. In Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harger W., Schleifer, K-H. (eds). Springer Verlag, New York. pp: 2236-2253.

20. Dobereiner, J., and Day, J.M. 1976. Associative symbiosis and free-living systems. In Newton, W.E., Nyman, C.J. (eds.) Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press, Pullman. pp: 518-538.

21. Dubey, R.C., and Maheshwari, D.K. 2005. Practical Microbiology. S. Chand and Company Ltd. pp: 52-171.

22. Ellis, R.H., and Roberts, E.H. 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. Seed Science and Technology, 9: 377-409.

23. Gholami, A., Shahsavani, S., and Nezarat, S. 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. World Academy of Science, Engineering and Technology, 49: 19-24.

24. Jahanian, A., Chaichi, M.R., Rezaei, K., Rezayazdi, K., and Khavazi, K. 2012. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and primary growth of artichoke (*Cynara scolymus*). International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 4:14. 923-929.

25. Kloepper, J.W., Hume, D.J., Scher, F.M., Singleton, C., Tipping, B., Laliberté, M., Frauley, K., Kutchaw, T., Simonson, C., Lifshitz, R., Zaleska, I., and Lee, L. 1988. Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (Rapeseed). Plant Disease, 72: 42-45.

26. Krieg, N.R., and Dobereiner, J. 1986. The genus *Azospirillum*. In: Krieg, N. R., Holt, J.G. (eds). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol I. Williams and Wilkins, Baltimore. pp: 96-104.

27. LePage-Degivry, M.T., and Garello, G. 1992. *ln situ* abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annus.* Plant Physiology, 98: 1386-1390.

28. Lifshtiz, R., Kloepper, J.W.E., Kozlowski, M., Simonson, C., Carlson, J., Tipping, E.M., and Zaleska, I. 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. Canadian Journal of Microbiology, 33: 309-395.

29. Lin, W., Okon, Y., and Hardy, R. 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Applied and Environmental Microbiology, 45: 1775-1779.

30. Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. Trends in Biotechnology, 3: 223-228.

31. Okon, Y. and Kapulnik, Y. 1986. Development and function of *Azospirillum* inoculated roots. Plant and Soil, 90: 3-16.

32. Okon, Y., and Labandera-Gonzalez, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem, 26: 1591-1601.

33. Ramamoorthy, K., Natarajan, N., and Lakshmanan, A. 2000. Seed biofortification with *Azospirillum* spp. for improvement of seedling vigour and productivity in rice (*Oryza sativa* L.). Seed Science and Technology, 28: 809-815.

34. Ravikumar, S., Ramanathan, G., Suba, N., and Jeyaseeli, L. 2002. Quantification of halophilic *Azospirillum* from mangroves. Indian Journal of Marine Sciences, 31(2): 157-160.

35. Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., and Bashan, Y. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. Naturwissenschaften, 91: 552-555.

36. Schopfer, P., and Placy, C. 1985. Control of seed germination by abscisic acid. III. Effect of embryo growth potential (minimum turgor pressure) and growth coefficient (cell wall extensibility) in *Brassica napus* L. Plant Physiology, 77: 676-686.

37. Sifton, H.B. 1959. The germination of light sensitive seeds of *Typha angustata*. Canadian Journal of Botany, 37: 719-741.

38. Tarrand, J.J., Krieg, N.R., and Dobereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology, 24: 967-980.

39. Turner, G.L., and Gibson, A.H. 1980. Measurements of nitrogen fixation by indirect means. In Methods for evaluating biological nitrogen fixation, F.J. Bergerson (ed). John Wiley and Sons. New York. pp: 111-138.

40. Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.