

## بررسی تأثیر تاریخ کاشت و مصرف جنیستین بر محتوی نیترژن و گره‌زایی سه گونه یونجه یکساله

مجید امینی دهقی<sup>۱\*</sup> و خسرو عزیزی<sup>۲</sup>

۱، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد، ۲، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان

(تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۲۷ - تاریخ تصویب: ۸۸/۱۱/۱۱)

### چکیده

به منظور بررسی تأثیر تاریخ کاشت و جنیستین بر مقدار نیترژن و گره‌زایی سه گونه یونجه یکساله، آزمایشی در شرایط مزرعه‌ای به صورت فاریاب در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد در سال‌های ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵ انجام گرفت. آزمایش در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی به صورت کرت‌های دو بار خرد شده در چهار تکرار انجام شد. تاریخ‌های کاشت (اول، دهم و بیستم اسفند) در کرت‌های اصلی و گونه‌های یونجه یکساله (*Medicago polymorpha* cv. Santiago, *M. rigidula* cv. Rigidula, *M. radiata* cv. Radiata) در کرت‌های فرعی و غلظت‌های مختلف جنیستین (۰ و ۲۰ میکرومول بر لیتر) در کرت‌های فرعی فرعی قرار گرفتند. محتوی نیترژن گیاه، گره‌زایی و سایر صفات در گونه‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری داشتند. گونه *M. polymorpha* در تاریخ کاشت سوم (بیستم اسفند) نسبت به گونه‌های دیگر از نظر وزن خشک گره، تعداد گره، تعداد گره در هر کلون و تعداد دسته گره و قطر گره برتر بود. گونه *M. rigidula* نسبت به سایر گونه‌ها مقاومت بیشتری به سرما در تاریخ اول کاشت نشان داد، همچنین ۲۰ میکرومول در لیتر جنیستین تأثیر افزایش‌دهنده‌ای بر گره‌زایی و محتوی نیترژن در تمامی گونه‌های یونجه یکساله داشت. جنیستین در تاریخ کشت اول در تمام گونه‌ها باعث افزایش گره‌زایی و محتوی نیترژن گیاه شد که این امر مؤید تأثیر این ماده در بهبود گره‌زایی و افزایش محتوی نیترژن یونجه‌های یکساله در شرایط مزرعه می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تاریخ کاشت، میزان نیترژن، جنیستین، گره‌زایی، یونجه یکساله.

### مقدمه

و دارای سازگاری وسیع با شرایط آب و هوایی مختلف هستند، گونه‌های *M. rotata*, *M. polymorpha*, *M. rigidula* از امید بخش‌ترین گونه‌ها در نواحی سرد ایران به شمار می‌آیند. در آب و هوای مناطقی با زمستان‌های ملایم، گونه‌های *M. rigidula*, *M. truncatula* و *M. polymorpha* از وضعیت بهتری

نظر به وسعت زیاد مزارع در نواحی سرد ایران (بالغ بر ۴ میلیون هکتار) انتخاب گونه‌های مقاوم در برابر سرما ضروری است. یونجه‌های یکساله از جهاتی نسبت به گونه‌های چند ساله برتری دارند. بیشتر گونه‌های یونجه یکساله سریع‌تر از یونجه‌های چند ساله رشد کرده

می‌شود و عفونت تارهای کشنده را بیشتر از آغاز گره‌بندی، رشد گره‌ها و یا ترکیب نیتروژنی به تأخیر می‌اندازد (Walsh & Layzel, 1986). مبادلهٔ سیگنال‌های مولکولی بین ریزوبیومها و گیاهان میزبان برای رشد گره در ریشهٔ لگوم ضروری می‌باشد (Verma, 1992).

ایزوفلاون دیازین<sup>۱</sup> و جنیستئین اجزای اصلی عصارهٔ ریشهٔ سویا بوده که مسئول القاء ژن‌های گره برای ریزوبیوم می‌باشند (Kosslak et al., 1987). در مناطقی با رطوبت نسبی پائین، عامل اصلی محدود کنندهٔ رشد و تثبیت نیتروژن درجهٔ حرارت پائین فصل رشد می‌باشد (Whigham & Minor, 1978). سیگنال‌های ملکولی بین گیاه و باکتری، نظیر جنیستئین ممکن است عامل مهم محدود کنندهٔ تشکیل گره در گیاهان لگوم در دمای پائین منطقهٔ ریشه باشد (Zhang et al., 1996). جنیستئین تولید الیگوساکارید را تحریک کرده و فاصلهٔ زمانی بین تلقیح و ایجاد پیچیدگی تارهای کشندهٔ ریشه را یک تا دو روز کوتاهتر نمود (Zhang & Smith, 1995). جنستین می‌تواند سرعت آلودگی را به وسیلهٔ *Bradyrhizobium japonicum* افزایش داده و در نتیجه گره‌زایی و تثبیت نیتروژن را بیشتر نماید (Zhang et al., 1996). مقدار جنستین بالای ریشه در دماهای پائین منطقهٔ ریشه منجر به افزایش رشد ریشه گیاه شده و این فاکتور ممکن است نقش مهمی در افزایش گره‌زایی و گسترش زود هنگام گره در دمای منطقهٔ ریشه زیر حد متعادل نسبت به دمای مناسب آن داشته باشد (Zhang et al., 1996). میزان فلاونوئیدها در گیاهان میزبان همزیست میزان تحت تأثیر قرار گرفتن گره‌زایی لگوم‌ها و تثبیت مستقیم نیتروژن را بوسیلهٔ آنها نشان می‌دهد (Appelbaum, 1990). کاهش سیگنال‌های ملکولی بین گیاه و باکتری نظیر جنستین ممکن است عامل مهم محدود کنندهٔ تشکیل گره در گیاهان لگوم در دمای پائین منطقهٔ ریشه باشد. جنستین موجب کاهش اثر جلوگیری کنندهٔ دمای پائین منطقهٔ ریشه شده و گره‌زایی و تثبیت نیتروژن را در سویا افزایش می‌دهد. هنگامیکه در مزرعه به منطقهٔ ریشه (ریزوسفر) جنستین اضافه گردید، اثر جلوگیری کنندهٔ دمای سرد بهارهٔ خاک

برخوردار بوده و موفقیت نسبی آنها به سیستم مدیریت صحیح منوط می‌گردد. گونهٔ *Medicago polymorpha* نسبت به سایر یونجه‌های یکساله بیشترین سطح پراکنش را در ایران دارد و در ارتفاع کمتر از ۲۰۰۰ متر در انواع خاک‌ها دیده می‌شود (Sanadghole & Malakpoure, 1994). تحمل در برابر سرمای گونه‌های *M. rigidula* و *M. polymorpha* مورد تأیید قرار گرفته است (Cocks & Ehrman, 1987).

در استرالیا با استفاده از یونجه‌های یکساله حدود ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن به خاک اضافه می‌شود (Materon & Cocks, 1988). یونجه‌های یکساله علاوه بر ازدیاد نیتروژن آلی خاک، در افزایش کربن آلی خاک نیز تأثیر دارند (Dalal et al., 1995). حضور و فراوانی یونجه‌های یکساله در هر محیطی می‌تواند مبنای انتخاب گونه‌های سازگار با آن محیط باشد (Ehrman & Cocks, 1990). زمان کاشت در یونجه‌های یکساله حتی هنگامیکه به صورت مخلوط کاشته شوند در عملکرد آنها تأثیر زیادی دارد، به طوری که کاشت زودتر این گونه‌ها موجب افزایش عملکرد، طول دورهٔ رشد و مادهٔ خشک آنها می‌گردد (Jeranyma, et al., 1998). در نواحی دارای زمستان سرد، خروج جوانه‌ها از خاک، زنده ماندن بوته‌ها، رشد زودرس و تولید بذر معمولاً در یونجه‌های یکساله زود کشت شده که به اندازه کافی از بارندگی‌های اول فصل استفاده کرده‌اند، بهتر انجام می‌گیرد (Sanadghole & Malakpoure, 1994). حرارت کمتر از ۳ درجهٔ سانتی‌گراد خاک سبب توقف فعالیت باکتریها می‌شود. درجه حرارت پائین خاک به علاوه باعث تأخیر نفوذ باکتری به ریشهٔ گیاه و کاهش فعالیت نیتروژناز می‌گردد. حرارت ۲۰ تا ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد برای فعالیت باکتری‌های ریزوبیوم مناسب است (Russel & Clarkson, 1979). اولین اثر دماهای پایین روی گیاهان، کاهش در سرعت رشد و متابولیسم می‌باشد. دمای پائین رشد گیاهان تثبیت کنندهٔ نیتروژن را بیشتر از گیاهانی که از ترکیبات نیتروژنه استفاده کرده محدود می‌کند (Legros & Smith, 1994). نشان داده‌اند که تحت تأثیر دماهای پائین منطقهٔ ریشه تمامی مراحل همزیستی (پیچیدگی - تارهای کشندهٔ ریشه، رشته سرایت کننده، شکل‌گیری و نفوذ آنها، رشد گره و عملکرد آنها) متوقف

1. Isoflavones daidzein

کشت شده در محیط استریل بدون آگار استفاده شد. برای تهیه باکتری، گره‌های فعال از ریشه جدا و پس از شستشو استریل شده (به مدت سه دقیقه در محلول هیپوکلریت ۳ درصد) به محیط کشت بدون آگار که در دمای  $120^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو ضد عفونی شده بود اضافه گردیدند (Somasegaren & Hoben, 1994). برای تکثیر سریع باکتری محیط کشت به مدت ۴ روز در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. پس از سپری شدن این مدت از آنها جهت تلقیح استفاده گردید. قبل از کاشت، بذور با باکتری و جنیستئین تلقیح شدند. جنیستئین (Trihydroxyisoflavon) -7,5,4 با خلوص ۹۹٪ (Acros, New Jersey USA) به میزان  $1-1 \mu\text{mol}$  به سوسپانسیون ضد عفونی شده باکتری اضافه گردید. تلقیح بذور در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. با توجه به این که در آزمایشات قبلی مشاهده شده بود که اضافه نمودن جنیستئین به خاک مزرعه باعث افزایش عملکرد سویا در شرایط دمای پائین منطقه ریشه می‌گردد بنابراین در تمام تیمارهای دارای جنیستئین محلول  $20 \mu\text{mol l}^{-1}$  جنیستئین همراه با آب مقطر روی بذور کشت شده در داخل شیارها پاشیده شد (Willemot, 1975). در مرحله ۱۰٪ گلدهی اقدام به نمونه‌برداری در سطح  $0/5$  مترمربع از کرت‌های آزمایشی گردید. عوامل مورد بررسی و اندازه‌گیری عبارتند بودند از: میزان ماده خشک گره، ریشه و گیاه (به صورت مجزا اندازه‌گیری شدند)، طول ریشه (پس از شستشوی ریشه و با استفاده از خط‌کش)، تعداد گره و کلون (دسته گره) در ریشه، قطر گره و دسته گره، مقدار نیتروژن گیاه (به روش کجلدال). تجزیه و تحلیل داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SAS انجام گرفت (SAS, 1997)، و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح ۵ درصد، صورت پذیرفت.

### نتایج و بحث

به دلیل معنی‌دار شدن عامل سال در تعدادی از صفات اندازه‌گیری شده، با استفاده از واریانس خطای آزمایشی صفات مذکور در دو سال آزمایش، آزمون بارتلت به عمل آمده و در ۴ مورد از صفات (ماده خشک بخش هوایی، ماده خشک گره، تعداد دسته گره و ماده

را روی تشکیل گره و تثبیت نیتروژن کاهش یافت (Zhang et al., 1996).

این تحقیق به منظور انتخاب گونه‌های مناسب و سازگار به دمای پایین هوا و خاک در اوایل فصل و افزایش محصول و همچنین افزایش حاصلخیزی خاک با افزایش تثبیت نیتروژن در دیمزارها و مراتع و تولید علوفه مورد نیاز، انجام شد.

### مواد و روش

به منظور بررسی تأثیر تاریخ کشت و جنیستئین بر گره‌زایی، محتوی نیتروژن گیاه و سایر صفات سه گونه یونجه یکساله، آزمایشی به صورت فاریاب در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد در سال‌های ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ انجام گرفت. در این آزمایش از سه گونه یونجه یکساله *Medicago polymorpha* cv. Santiago, *M. rigidula* cv. Rigidula, *M. radiata* cv. Radiata که با مناطق سرد و معتدله سازگاری دارند استفاده شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی به صورت کرت‌های دو بار خرد شده در چهار تکرار انجام شد. تاریخ کشت‌های اول، دهم و بیستم اسفند ماه در کرت‌های اصلی و گونه‌های یونجه یکساله به عنوان کرت‌های فرعی و جنیستئین در دو سطح صفر و ۲۰ میکرومول در لیتر ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) در کرت‌های فرعی قرار گرفتند. در فصل پائیز برای آماده‌سازی زمین یک شخم به عمق ۲۵ سانتی‌متر زده شد سپس جهت خرد شدن کلوخه‌ها و مسطح شدن زمین یک نوبت دیسک زده و بعد کود فسفات آمونیوم به میزان ۷۰ کیلوگرم در هکتار پخش گردید. در این تحقیق به علت پائین بودن ظرفیت نگهداری آب خاک، زمین مورد نظر هر سه روز در میان آبیاری می‌شد. به دلیل پائین بودن حاصلخیزی خاک، کود اوره به میزان ۱۲/۵ کیلوگرم در هکتار به عنوان محرک اولیه به زمین داده شد. هر کرت متشکل از شش خط ۱۲۰ سانتی‌متری بود که فواصل خطوط از یکدیگر ۵۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. میزان بذر برای همه واریته‌های یونجه یکساله و به مقدار ۲۰ کیلوگرم در هکتار در نظر گرفته شد. در طی دوره رشد عملیات وجین توسط کارگر به دقت صورت گرفت.

جهت تلقیح گیاهان از باکتری *Rhizobium meliloti*

معنی‌داری داشته ( $P < 0/01$ )، اما اثرات متقابل سال  $\times$  گونه‌ها  $\times$  تاریخ کشت  $\times$  جنس‌تین در تمام صفات معنی‌دار نبودند. ضمناً غلظت‌های مختلف جنس‌تین فقط بر تعداد گره در ریشه معنی‌دار بود ( $P < 0/01$ )، (جدول ۳). همچنین باید خاطر نشان کرد که معنی‌دار شدن آزمون بارتلت در مورد بعضی صفات می‌تواند مربوط به اختلاف دما در اوایل فصل رشد در دو سال باشد. در سال اول با توجه به مناسب‌تر بودن شرایط دمائی در آغاز فصل رشد (میانگین دمایی در دو ماه اول فصل رشد در سال اول ۱۶ و در سال دوم ۱۳/۱ درجه سانتی‌گراد)، گونه‌های یونجه یکساله رشد و نمو و گره‌زایی بهتر و بیشتری نسبت به سال دوم که در ابتدای فصل رشد دمای نامناسب در مدت طولانی‌تری حاکم بوده، داشته است (جدول ۴).

خشک ریشه)  $\chi^2$  معنی‌دار شد (جدول ۱)، لذا تجزیه واریانس این صفات به صورت سالانه انجام گرفت. اثر تاریخ کشت، گونه و جنس‌تین و اثرات متقابل آنها روی چهار صفت مورد بررسی (به جز اثر متقابل گونه در جنس‌تین بر صفت ماده خشک ریشه) در دو سال متوالی معنی‌دار بود (جدول ۲). در مورد ۵ صفت دیگر (طول ریشه، قطر گره، مقدار نیتروژن، تعداد گره ریشه، تعداد گره در هر کلون ریشه)  $\chi^2$  معنی‌دار نشد (جدول ۱). بنابراین بررسی نتایج مربوط به این ۵ صفت بر اساس تجزیه مرکب داده‌ها صورت پذیرفت (جدول ۳). اثرات سال، تاریخ کاشت، گونه‌های یونجه یکساله و همچنین اثرات متقابل گونه‌ها  $\times$  تاریخ کشت، تاریخ کشت  $\times$  جنس‌تین، گونه‌ها  $\times$  جنس‌تین و گونه‌ها  $\times$  تاریخ کشت  $\times$  جنس‌تین روی اکثر صفات تأثیر

جدول ۱- تعیین همگونی واریانس خطاهای مختلف آزمایش برای صفات مورد بررسی در گونه‌های یونجه

نتیجه نهایی	$\chi^2$ برای خطای کرت فرعی فرعی			صفات اندازه‌گیری شده
	CHISQ	CHISQ	CHISQ	
ناهمگون	۶/۶۰۶۷	۶/۱۱۸۰	۱۵/۴۳۸۸	مقدار ماده خشک گره ریشه هر گیاه
همگون	۰/۳۳۹۸	۰/۰۶۹۴	۰/۰۱۸۴	تعداد گره در ریشه
همگون	۰/۶۴۰۶	۰/۳۷۲۵	۰/۱۰۱۲	تعداد گره در کلون ریشه
ناهمگون	۷/۰۵۵۱**	۰/۹۹۹۳	۷/۷۹۱۹**	تعداد دسته گره در ریشه
همگون	۱/۶۳۰۱	۳/۷۴۲۳	۱/۴۸۸۵	مقدار نیتروژن
همگون	۰/۰۲۹۲	۰/۸۰۹۷	۰/۲۱۵۳	قطر گره
ناهمگون	۰/۱۲۱۰	۷/۷۹۷۲**	۸/۸۱۶۰**	مقدار ماده خشک ریشه هر گیاه
همگون	۰/۳۹۹۶**	۰/۰۰۰۹	۰/۳۵۲۲	طول ریشه
ناهمگون	۱۴/۰۳۶۵	۰/۳۸۶۳	۵/۵۰۰۲*	مقدار ماده خشک

\*، \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرات تاریخ کشت بر روی صفات مختلف گونه‌های یونجه یکساله تحت تأثیر غلظت‌های مختلف جنس‌تین

میانگین مربعات								درجه آزادی	منابع تغییر
سال دوم				سال اول					
ماده خشک ریشه	تعداد دسته گره ریشه	ماده خشک بخش هوایی	ماده خشک گره	ماده خشک ریشه	تعداد دسته گره ریشه	ماده خشک بخش هوایی	ماده خشک گره		
۰/۰۰۱۱	۱/۸۰۰	۷۹۲۵/۷	۵/۶۹۶	۰/۰۰۱۳	۰/۲۹۰	۱۸۶۰۰	۱/۸۷۴	۳	تکرار
۰/۰۴۹۸**	۳۷/۱۰**	۸۱۶۷۷۰۷**	۷۰/۱۲**	۰/۰۳۸۰**	۲۹/۴۱**	۴۳۸۱۷۰۴**	۴۸۸/۸**	۲	تاریخ کشت
۰/۰۰۰۵	۱/۴۴۵	۴۳۹۱۴*	۲۴/۹۰**	۰/۰۰۱۴	۰/۶۱۰	۷۴۷۰۶	۲/۴۹۷	۶	خطای اول
۰/۰۰۶۰۱**	۶۹/۶۱**	۴۰۸۶۰۳۸۲**	۳۴۳۹**	۰/۱۱۴۵**	۵۰/۳۲**	۶۳۱۷۵۷۷۴**	۲۹۴۴**	۲	گونه
۰/۰۰۴۰*	۲۲/۲۲**	۱۱۱۸۹۷۳*	۵۴۹/۲**	۰/۰۰۷۵**	۱۸/۴۴**	۱۸۱۶۵۵۵**	۴۰۴/۰**	۴	گونه $\times$ تاریخ کشت
۰/۰۰۱۹	۱/۹۵۲*	۱۰۰۳۱	۱۷/۵۶**	۰/۰۰۱۸	۰/۴۸۹	۳۱۶۹۳	۲/۳۳۳	۱۸	خطای دوم
۰/۰۳۸۷**	۳۱/۸۶**	۲۱۳۸۳۱۲**	۱۲۸۲**	۰/۰۳۵۵**	۳۴/۷۲**	۲۰۳۱۷۹۲**	۱۳۸۲**	۱	جنس‌تین
۰/۰۰۶۴**	۱۱/۳۳**	۳۶۳۱۰۶۵**	۲۰۰/۴**	۰/۰۰۸۱**	۱۰/۴۳**	۴۵۳۴۰۶۵**	۱۸۰/۱**	۲	جنس‌تین $\times$ تاریخ کشت
۰/۰۰۲۰	۵/۹۸۳**	۸۸۲۹۶۵**	۹۴۴/۹**	۰/۰۰۲۱	۵/۸۸۲**	۷۷۷۵۸۶**	۱۰۰/۱**	۲	گونه $\times$ جنس‌تین
۰/۰۰۳۸*	۴/۰۵۱**	۳۷۸۵۱۹**	۱۹۸/۴*	۰/۰۰۴۴*	۴/۲۹۳**	۵۸۷۰۳۱**	۱۹۰/۴**	۴	گونه $\times$ تاریخ کشت $\times$ سال
۰/۰۰۱۰	۰/۷۴۱۲	۱۳۱۶۷/۸	۵/۶۹۶	۰/۰۰۱۲	۰/۲۵۸۱	۶۰۲۲۵	۲/۰۵۵۶	۲۷	خطای آزمایش

\*، \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثرات سال و تاریخ کشت و جنیستئین بر صفات مختلف گونه‌های یونجه یکساله

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		تعداد گره در کلون ریشه	تعداد گره در نیتروژن	مقدار قطر گره	طول ریشه
سال	۱	۱۸۵/۹**	۱/۲**	۱۵۱/۷**	۲۳/۴**
خطای اول	۶	۳/۰۸۶۹	۰/۰۱۸۴	۲/۲۳۷۶	۱۵/۴۰۳۰
تاریخ کشت	۲	۴۵۸۳/۵**	۳/۳**	۲۶/۹**	۷۵/۵**
سال × تاریخ کشت	۲	۱۹۷/۹	۰/۹**	۱۶/۸**	۲
خطای دوم	۱۲	۸۴/۰	۰/۰۹	۲/۹	۹/۲
گونه	۲	۷۳۱۹۷/۶**	۲۳/۲**	۵۰/۲**	۹/۵
سال × گونه	۲	۶۰/۸	۰/۴	۱/۱	۴/۲
گونه × تاریخ کشت	۴	۶۳۴۴/۲**	۱/۴*	۳/۰	۴۷/۴**
گونه × تاریخ کشت × سال	۴	۲۷/۵	۰/۲	۱۳/۲**	۲/۴
خطای سوم	۳۶	۱۳۸/۱	۰/۵۴	۱/۶	۱۳/۳
جنیستئین	۱	۱۴۵۶۰/۴**	۰/۷	۱/۶	۱۹/۱
سال × جنیستئین	۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۲	۲/۶
جنیستئین × تاریخ کشت	۲	۱۸۸۱/۹**	۰/۰۵	۰/۳	۱۴/۶
گونه × جنیستئین	۲	۸۳۲۶/۹**	۰/۴	۲/۷*	۶۷/۰**
جنیستئین × تاریخ کشت × سال	۲	۳/۷	۰/۰۱	۲/۶*	۰/۸
جنیستئین × سال × گونه	۲	۶/۰	۰/۰۰۴	۰/۷	۱/۷
جنیستئین × تاریخ کشت × گونه	۴	۶۵۰/۱**	۰/۹**	۲/۱*	۲۳/۳*
جنیستئین × سال × گونه × تاریخ کشت	۴	۱۳/۲	۰/۰۲	۱/۸	۳/۶
خطای آزمایش	۵۴	۶۵/۸	۰/۲۴	۰/۸	۷/۶

\*، \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل جنیستئین و تاریخ کاشت و گونه بر صفات مختلف گونه‌ها یونجه‌های یکساله در هر سال

سال اول											
مقایسه میانگین‌ها	جنیستئین $\mu\text{mol/lit}$	ماده خشک گره (mg/plant)			ماده خشک بخش هوایی (kg/ha)			ماده خشک دسته گره ریشه (g/plant)			
		اول	دوم	سوم	اول	دوم	سوم	اول	دوم	سوم	
<i>M. polymorpha</i>	۲۰	۲۰/۲۵ c	۲۶/۰۰ b	۵۹/۰۰ a	۱۷۱۷ hij	۲۲۲۴ fg	۲۶۶۷ e	۰/۰۸۲۵ h	۰/۰۹۷۵ gh	۰/۱۴۷۵ gfe	۲/۹۷ fg
<i>M. radiata</i>	۲۰	۳/۱۲hijkl	۱/۶۰ kl	۴/۲۵ghij	۱۲۸۹ k	۱۳۴۸ kj	۲۲۵۳ d	۰/۱۵۰۰ gfe	۰/۲۴۵۰ c	۰/۳۵۵۰ a	۳/۰۰ fg
<i>M. rigidula</i>	۲۰	۵/۷۵ fgh	۷/۵۰ ef	۶/۲۵ fg	۴۸۱۳ b	۴۳۴۹ b	۶۴۲۵ a	۰/۱۷۰۰ de	۰/۳۰۰۰ b	۰/۲۴۰۰ c	۴/۹۲ dc
<i>M. polymorpha</i>	۰	۸/۵۰ e	۹/۲۵ e	۱۶/۵۰ d	۱۷۸۰ hi	۲۵۶۳ fe	۱۹۴۰ hg	۰/۰۶۰۰ h	۰/۰۸۲۵ h	۰/۱۱۰۰ fgh	۲/۲۰ hgi
<i>M. radiata</i>	۰	۲/۹۵ ijkl	۱/۳۵ l	۳/۲۵ ijkl	۱۴۱۴ kij	۱۶۳۰ hijk	۲۴۰۰ fe	۰/۱۶۲۵ dfe	۰/۱۹۲۵ dce	۰/۲۰۷۵ dc	۱/۸۲ hij
<i>M. rigidula</i>	۰	۶/۰۲ fgh	۲/۳۵ijkl	۵/۲۵ fgh	۵۰۸۸ b	۴۲۵۹ c	۳۹۸۶ c	۰/۱۶۷۵ de	۰/۲۱۰۰ cd	۰/۱۹۵۰ dce	۳/۴۷ f
سال دوم											
<i>M. polymorpha</i>	۲۰	۱۵/۷۵ d	۲۹/۲۵ b	۶۱/۵۰ a	۱۶۵۰ h	۲۵۶۷ e	۳۰۴۵ d	۰/۰۷۰۰ g	۰/۱۲۰۰ fe	۰/۱۷۰۰ dce	۲/۵۷ fghei
<i>M. radiata</i>	۲۰	۳/۲۵ igh	۱/۴۲ i	۳/۶۷ figh	۱۰۶۴ j	۱۱۵۴ j	۳۰۱۱ d	۰/۱۳۷۵ dfe	۰/۲۲۰۰ c	۰/۳۲۲۵ a	۱/۱۲ j
<i>M. rigidula</i>	۲۰	۳/۵۰ igh	۶/۳۲ fg	۵/۶۲ fgh	۳۷۵۵ c	۴۰۷۹ b	۵۹۳۹ a	۰/۱۴۵۰ dfe	۰/۲۷۲۵ b	۰/۲۲۰۰ c	۳/۹۵ ed
<i>M. polymorpha</i>	۰	۷/۵۰ fe	۱۰/۵۰ e	۱۹/۷۵ c	۱۷۲۳ h	۲۸۷۷ d	۲۲۵۲ f	۰/۰۴۷۵ g	۰/۰۹۵۰ gf	۰/۱۳۰۰ dfe	۱/۹۵ ghij
<i>M. radiata</i>	۰	۲/۴۰ igh	۱/۲۰ i	۲/۹۲ igh	۱۲۲۷ j	۱۴۰۲ i	۲۱۶۸ g	۰/۱۳۲۵ dfe	۰/۱۷۰۰ dce	۰/۱۸۰۰ dc	۱/۲۵ ji
<i>M. rigidula</i>	۰	۳/۵۰ igh	۲/۰۲ hi	۴/۵۲ figh	۳۹۴۲ b	۳۷۲۲ c	۳۷۴۹ c	۰/۱۴۲۵ dfe	۰/۱۸۰۰ dc	۰/۱۸۲۵ cd	۲/۹۰ fghe

اعداد با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ( $P \leq 0.05$ ) اختلاف معنی‌داری ندارد.

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل جنسیتین، تاریخ کاشت و گونه بر صفات مختلف گونه‌ها یونجه‌های یکساله در دو سال

مقایسه میانگین‌ها	جنسیتین μmol/lit	تعداد گره ریشه			تعداد گره در هر کلون ریشه			قطر گره (mm)	
		تاریخ کاشت			تاریخ کاشت			تاریخ کاشت	
		اول	دوم	سوم	اول	دوم	سوم	اول	دوم
<i>M. polymorpha</i>	۲۰	۱۳۹/۱ a	۱۳۹/۱ a	۱۳۹/۱ a	۲/۷ bc	۳/۱ b	۴/۲ a	۱/۰۸ b	۱/۰۸ b
<i>M. radiata</i>	۲۰	۱۹/۵ g	۱۰/۴ hi	۲۴/۳ g	۱/۹ efgh	۱/۸ fgh	۱/۸ fgh	۰/۴۲ g	۰/۵۷ fg
<i>M. rigidula</i>	۲۰	۳۷/۶ f	۲۳/۱ g	۶۲ d	۲/۲ cdefg	۲ defgh	۲/۴ cde	۰/۵۵ fg	۰/۷۰ f
<i>M. polymorpha</i>	۰	۴۸/۳ e	۸۸/۷ b	۶۳/۳ d	۲/۷ bc	۳/۱ b	۳/۲ b	۱/۰۳ bc	۱/۰۵ bc
<i>M. radiata</i>	۰	۱۶/۴ gh	۶/۷ i	۱۹/۹ g	۱/۷ gh	۱/۸ Fgh	۲/۱ defgh	۰/۵۸ fg	۰/۶۶ f
<i>M. rigidula</i>	۰	۴۱/۳ ef	۱۹/۲ g	۴۳/۸ ef	۲/۳ cdef	۱/۶ h	۲/۵ cd	۰/۶۳ f	۰/۶۰ f
		مقدار نیتروژن گونه‌ها (mg/g)			طول ریشه (cm)				
		اول	دوم	سوم	اول	دوم	سوم		
<i>M. polymorpha</i>	۲۰	۳۱/۶ ef	۳۲/۱ de	۳۲/۳ de	۲۲/۱ bcdef	۲۵/۳ ab	۱۹/۱ f		
<i>M. radiata</i>	۲۰	۳۳/۰ cd	۳۴/۱ ab	۳۴/۱ ab	۲۰/۲ def	۲۴/۵ ab	۲۷ a		
<i>M. rigidula</i>	۲۰	۳۲/۳ de	۳۴/۱ ab	۳۴/۱ ab	۲۰/۵ def	۲۲/۵ bcd	۲۲/۳ bcdef		
<i>M. polymorpha</i>	۰	۳۱/۱ f	۳۱/۷ ef	۳۱/۹ ef	۲۰/۱ ef	۲۴ abc	۱۹/۹ ef		
<i>M. radiata</i>	۰	۳۲/۴ de	۳۳/۸ bc	۳۳/۹ abc	۲۰/۷ def	۲۱/۱ cdef	۲۰/۸ cdef		
<i>M. rigidula</i>	۰	۳۲/۲ de	۳۴/۹ a	۳۴/۵ ab	۲۳/۴ bcd	۲۴/۳ ab	۲۲/۶ bcde		

اعداد با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) اختلاف معنی داری ندارد.

جدول ۶- مقایسه میانگین‌های اثرات اصلی سال بر صفات مختلف گونه‌ها یونجه‌های یکساله در دو سال

سال	ماده خشک گره (mg/plant)	ماده خشک بخش هوایی (kg/ha)	ماده خشک ریشه (g/plant)	تعداد دسته گره ریشه (g/plant)	تعداد گره ریشه (g/plant)	تعداد گره در هر کلون ریشه (g/plant)	تعداد گره (g/plant)	قطر گره (mm)	مقدار نیتروژن گونه‌ها (mg/g)	طول ریشه (cm)
سال اول	۱۰/۵۵ a	۲۹۵۲ a	۰/۱۷۶۳ a	۳/۷۸۳ a	۴۹/۸۰ a	۲/۴۸۳ a	۰/۸۱۲۵ a	۳۳/۹۷ a	۲۲/۶۳ a	
سال دوم	۱۰/۲۵ a	۲۷۴۶ b	۰/۱۶۳۱ a	۳/۵۷۶ a	۴۷/۵۳ b	۲/۳۰۴ b	۰/۷۴۳۰ a	۳۱/۹۲ b	۲۱/۸۲ a	

اعداد با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) اختلاف معنی داری ندارد.

آن نسبت به عدم کاربرد آن در همان تاریخ کشت شد (جدول ۴). دماهای پائین در تاریخ کشت اول، ممکن است بدلیل تأثیر منفی بر مقدار فتوسنتز و انتقال مواد، باعث کاهش ماده خشک بخش هوایی شده باشد. این نکته توسط محققین دیگر مبنی بر تأثیر دمای پایین بر فتوسنتز نیز گزارش شده است (Sloger et al., 1975). در هر دو سال گونه ریجیدولا در تاریخ کاشت سوم همراه با تلقیح بذر آن با جنسیتین مقدار ماده خشک بیشتری تولید نمود اما ماده خشک ریشه آن در این تاریخ کاشت کمتر از رادیاتا بود و برعکس رادیاتا ماده خشک اندام هوایی آن در همین تاریخ کاشت کمتر از ریجیدولا بوده است، ریجیدولا حداکثر ماده خشک اندام هوایی را در تاریخ کاشت سوم تولید نموده است، همچنین در تاریخ‌های کشت دیگر نیز میزان عملکرد علوفه آن بیش از دو گونه دیگر بود، لذا با توجه به این صفت گیاه مذکور مقاوم‌ترین یونجه یکساله بین این سه

در هر دو سال آزمایش مصرف جنسیتین در گونه پلی‌مورفا باعث افزایش ماده خشک گره نسبت به عدم مصرف آن شد ولی در دو گونه دیگر مصرف یا عدم مصرف جنسیتین تأثیر معنی‌داری در اکثر موارد نداشت، در کل بیشترین ماده خشک گره در هر دو سال در گونه *M. polymorpha* با غلظت ۲۰ میکرومول در لیتر جنسیتین در تاریخ کشت سوم حاصل گردید (جدول ۴). نتایج حاصل با نتایج سایر محققین در رابطه با تأثیر افزایشی جنسیتین بر مقدار ماده خشک گره مشابه می‌باشد. استفاده از جنسیتین تعداد گره و ماده خشک گره را در گیاه افزایش داده و زمان شروع تثبیت نیتروژن را در سویا در طول فصل رشد و زمانی که خاک هنوز سرد است جلو می‌اندازد (Zhang et al., 1996).

در هر دو سال مصرف جنسیتین بر مقدار ماده خشک بخش هوایی هر سه گونه مورد بررسی در تاریخ کشت سوم تأثیر معنی‌داری داشت و باعث افزایش مقدار

جنسیتین مشاهده گردید (جدول ۵)، که حاکی از تأثیر دما بر رشد و توسعه گره‌ها در این گونه می‌باشد. یکی از مهمترین دلایل برای کاهش گره‌زایی، دمای کم منطقه ریشه است (Zhang & Smith, 1995). کاهش درجه حرارت منطقه ریشه، اثر معکوس و شدیدی بر گره‌زایی لگومها و تثبیت نیتروژن می‌گذارد (Jeranyma et al., 1998). اثرات درجه حرارت پایین روی عمل فرآیند تثبیت نیتروژن در گره‌های ریشه همچنین ممکن است به علت تغییر در نفوذپذیری غشا نسبت به اکسیژن باشد (Weisz & Sinclair, 1988). نتایج دیگر محققین نیز بر تأثیر مثبت جنسیتین بر گره‌زایی تأکید دارد. استفاده از جنسیتین در دوره پیش از جوانه‌زنی یا کاربرد مستقیم جنسیتین، بر روی محیط ریشه گیاه، گره‌زایی سویا را افزایش می‌دهد (Zhang et al., 1996).

مصرف جنسیتین در گونه پلی‌مورفا در تاریخ کاشت سوم باعث افزایش قطر گره نسبت به عدم مصرف آن شد همچنین در شرایط عدم مصرف جنسیتین در هر سه گونه، اختلافی بین تاریخ‌های مختلف کشت از نظر قطر گره حاصل نشد و بیشترین قطر گره در گونه *M. polymorpha* در تاریخ کشت سوم و غلظت  $20 \mu \text{mol l}^{-1}$  جنسیتین بدست آمد. به نظر می‌رسد که استفاده از جنسیتین سرعت تشکیل گره را در دمای پائین افزایش داده، لذا گره‌ها زودتر تشکیل شده و رشد بیشتری نموده و فعال‌تر هستند (جدول ۵). این امر احتمالاً می‌تواند نشان دهنده تأثیر جنسیتین در بهبود گره‌زایی گونه‌های یونجه یکساله در شرایط مزرعه باشد. نتایج حاصل با نتایج سایر محققین در رابطه با تأثیر افزایشی جنسیتین بر گره‌زایی مشابه است. سطح فلاونوئیدها تأثیر مستقیم برگره‌زایی ریشه گیاه داشته و این سطح در گیاهان میزبان، میزان تحت تأثیر قرار گرفتن گره‌زایی لگومها را نشان می‌دهد (Zhang & Smith, 1995). در سطح غشاء زمانی که سلول‌های مجزا شده گیاهان برای اولین بار با شرایط دمای پایین روبرو می‌شوند، انعطاف‌پذیری غشاء کاهش می‌یابد. انعطاف‌پذیری سطح غشاء در ابتدا به وسیله دمای پایین منطقه ریشه، کاهش می‌یابد و این منجر به کاهش سرعت برون‌تراوایی جنسیتین می‌گردد (Zhang et al., 1996).

کاربرد جنسیتین در تاریخ‌های مختلف کشت در هر

گونه به سرما بوده و می‌تواند حداکثر تولید اندام هوایی را در تاریخ کاشت سوم داشته باشد و بعد از آن رادياتا قرار دارد و در انتها پلی‌مورفا حداقل ماده خشک بخش هوایی را تولید کرد (جدول ۴). اگرچه گونه پلی‌مورفا دارای حداکثر تعداد گره، تعداد دسته گره و ماده خشک گره در هر دو سال بود، ولی ماده خشک ریشه و ساقه در این گونه نسبت به دو گونه دیگر کاهش یافته است. به نظر می‌رسد که گونه پلی‌مورفا بیشترین توان خود را صرف گسترش واحدهای مربوط به تثبیت نیتروژن می‌نماید همچنین ممکن است، گره‌های تشکیل شده بر روی ریشه گونه‌های ریجیدولا و رادياتا فعال باشند ولی با اینکه تعداد گره‌ها در گونه پلی‌مورفا نسبت به دو گونه دیگر بیشتر است این گره‌ها فعالیت چندانی از نظر تثبیت نیتروژن نداشته باشند (جدول ۴ و ۵).

در گونه پلی‌مورفا در هر دو سال آزمایش، در تاریخ‌های کشت دوم و سوم مصرف جنسیتین نسبت به عدم مصرف آن باعث افزایش تعداد دسته‌های گره شد، که احتمالاً می‌تواند نشان‌دهنده اثر مثبت جنسیتین در افزایش تعداد دسته‌های گره باشد، همچنین بیشترین تعداد دسته گره در گونه *M. polymorpha* در تاریخ کشت سوم و غلظت  $20 \mu \text{mol l}^{-1}$  در لیتر جنسیتین حاصل شد (جدول ۴).

مصرف جنسیتین در هر سه تاریخ کاشت در گونه پلی‌مورفا باعث افزایش معنی‌دار تعداد گره شد (جدول ۵)، همچنین در همین گونه دیده شد که در شرایط مصرف جنسیتین در تاریخ کاشت دوم و سوم تعداد گره بیشتری نسبت به تاریخ کشت اول تولید کرد. در تاریخ‌های کشت اول و دوم در گونه‌های رادياتا و ریجیدولا کاربرد جنسیتین اثر معنی‌داری بر تعداد گره‌ها نداشت. همچنین بیشترین تعداد گره در گونه *M. polymorpha* در غلظت  $20 \mu \text{mol l}^{-1}$  جنسیتین و در تاریخ کشت‌های دوم و سوم و کمترین آن در گونه *M. radiata* در تاریخ کشت دوم و در غلظت‌های  $0$  و  $20 \mu \text{mol l}^{-1}$  جنسیتین حاصل شد (جدول ۵). کاربرد جنسیتین تنها در گونه پلی‌مورفا در تاریخ کاشت سوم باعث افزایش تعداد گره در هر کلون نسبت به عدم مصرف آن شد همچنین بیشترین تعداد گره در هر کلون در همین تاریخ کشت، گونه و غلظت  $20 \mu \text{mol l}^{-1}$

احتمالاً طول ریشه تابع عوامل دیگری به غیر از تیمارهای مورد کاربرد در این آزمایش می‌باشد (جدول ۵).

#### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصله در این آزمایش، گونه *M. rigidula* نسبت به سایر گونه‌ها مقاومت بیشتری به سرما نشان داده و عملکرد علوفه و مقدار نیتروژن اندام هوایی بیشتری نسبت به گونه *M. polymorpha* تولید کرد. پس می‌توان از گونه *M. rigidula* در شرایط دمایی نامناسب و پائین که رشد و نمو سایر گونه‌ها مناسب نمی‌باشد، استفاده نمود. استفاده از گونه *M. polymorpha* و *M. radiate* در مناطق معتدل توصیه می‌شود زیرا از نظر مقاومت به سرما بعد از گونه *M. rigidula* قرار می‌گیرد. با توجه به نتایج آزمایش‌های انجام شده در شرایط مزرعه‌ای، می‌توان از گونه‌های پرمحصولی مثل گونه *M. rigidula* که مقاومت خوبی به سرما هم داشته باشند، برای کشت زودتر در مناطق سرد استفاده نمود و برای تقویت و تشدید گره‌زایی در دماهای پائین، تلقیح بذور آنها با جنس‌تین قبل از کشت لازم بوده که می‌تواند موجب تسریع در آغاز آلودگی و گره‌زایی و در نتیجه افزایش مقدار نیتروژن گیاه شود. این عمل در نهایت منجر به افزایش عملکرد علوفه در واحد سطح خواهد شد. بنابراین استفاده از یونجه‌های یکساله نظیر *M. rigidula* در مناطقی که در فصل رویش دمای هوا و خاک پائین بوده به شرط تلقیح آنها با جنس‌تین، بسیار مناسب بوده زیرا رشد اندام هوایی مناسبی در صورت فراهم بودن سایر شرایط خواهد داشت.

سه گونه تأثیری بر مقدار نیتروژن نداشت. گونه‌های رادپاتا و ریجیدولا با مصرف جنس‌تین در تاریخ‌های کشت دوم و سوم نسبت به تاریخ کشت اول مقدار نیتروژن بیشتری در اندام‌های هوایی ذخیره کردند (جدول ۵). ضمناً دو گونه رادپاتا و ریجیدولا از گونه پلی‌مورفا مقدار نیتروژن بیشتری جذب نموده‌اند که این وضعیت می‌تواند احتمالاً به دلیل مقاومت بیشتر این گونه‌ها به سرما و در نتیجه تولید بیشتر اندام هوایی و تقاضای بیشتر برای نیتروژن باشد. گونه‌های مختلف یونجه یکساله توان متفاوتی در تشکیل گره بر روی ریشه و جذب نیتروژن دارند.

به نظر می‌رسد که افزایش تعداد گره، دسته و قطر گره تشکیل شده در اثر تلقیح گیاه با جنس‌تین در دمای پایین منطقه ریشه جهت افزایش مقدار نیتروژن اندام هوایی گیاه ناکارآمد باشد. از آنجایی که گونه *M. polymorpha* مقاومت کمی به سرما نسبت به سایر گونه‌ها دارد لذا باید در تاریخ کاشت سوم که هوا گرمتر است کاشته شود. احتمالاً به دلیل فعال نبودن گره‌ها یا کوتاه‌تر بودن طول دوره رشد، این گیاه نسبت به سایر گونه‌ها، ماده خشک کمتری تولید کرده و در نتیجه جذب نیتروژن توسط گیاه از خاک کمتر خواهد بود، که نتایج این آزمایش نیز همین مورد را تأیید می‌کنند (جدول ۴ و ۵). مصرف جنس‌تین در گونه رادپاتا در تاریخ‌های کشت دوم و سوم باعث افزایش طول ریشه شد. در اکثر موارد جنس‌تین بر طول ریشه اثری نداشت و گونه‌ها نیز طول ریشه یکسانی داشتند. تغییرات زیادی در طول ریشه در بین تیمارها به چشم نمی‌خورد و

## REFERENCES

1. Appelbaum, E. (1990). The Rhizobium/ Bradyrhizobium – legume symbiosis. In P.M. Gresshof, ed., *Molecular Biology of symbiotic Nitrogen Fixation*, (pp. 131-158). CRC press, Boca Raton, FL.
2. Clarkson, N. M. & Russel, J. S. S. (1979). Effect of temperature on the development of two annual medics. *Australian Journal of Agriculture Research*, 30, 909-916.
3. Cocks, P. S. & Ehrman, T. A. M. (1987). The effects of geographic origin on frost tolerance of pasture legumes in Syria. *Journal of Application Ecology*, 24, 673- 683.
4. Dalal, R. C., Strong, W. M., Weston, E. J., Cooper, J. E., Lahance, K. J., King, A. J. & Chiken, C. J. (1995). Sustaining productivity of a Vertisol at Wara, Queensland with fertilisers, no-tilage, or legumes 1. Organic matter status. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 35, 903-913.
5. Ehrman, T. A. M. & Cocks, P. S. (1990). Ecogeography of annual legumes in dryland. *Agronomy Journal*, 63, 359-362.
6. Jeranyma, P., Hesterman, O. B. & Sheafer, C. C. (1998). Planting date effect on dry matter and nitrogen accumulation when clear seeded or intercropping with corn. *Agronomy Journal*, 90, 616 – 622.



7. Kosslak, R. M., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H. & Appelbaum, E. R. (1987). Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc National Acadamy Scinces, USA*, 84, 7428-7432.
8. Legros, P. & Smith, D. L. (1994). Root zone temperature sensitivity of nitrogen fixing and nitrate supplied soybean [*Glycin max* (L.) Merr. Cv. Maple Arrow] and lupin (*Lupinus albus* L. cv. Illtra). *Plants Environment Experimental Botany*, 34, 117-784.
9. Materon, L. A. & Cocks, P. S. (1988). Constrains to biological nitrogen fixation in ley – farming systems designed for west Asia. In Murrel, W. G., and Kennedy, I. R. *Microboiology in Letchworth Hertfordshire*, Engeland: Research studies press LTD: 93: 205 P.
10. Sanadghole, E. & Malakpoure, B. (1994). Review on studied annual medics in Iran. *Institute of Research Forest and Rang*, 22, 103. (In Farsi).
11. SAS Institute Inc. (1997). *SAS User's Guide*. Statistical Analysis Institiute Inc. Cary, North Carolina.
12. Sloger, C., Bezdicek, D., Milberg, R. & Boonkerd, N. (1975). Seasonal and diurnal variation in N<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)-fixing activity in field soybean. In W. D. P. Steward, ed., *Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms*, (pp. 271-284). Cambridge University Press, London.
13. Somasegaren, P. & Hoben, H. J. (1994). *Handbook for rhizobia (Method in Legume- Rhizobium Technology) springer rerlag*. New York Inc. 45 pp.
14. Verma, D. P. S. (1992). Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of rhizobium. *Plant Cell*, 4, 372-382.
15. Walsh, K. B., & D. B. L.Layzel. (1986). Carbon and nitrogen assimilation and partitioning in soybeans exposed to low root temperatures. *Plant Physiology*. 80: 249-255.
16. Weisz, P. R. & Sinclair, T. R. (1988). Soybean nodoule gas permeability, nitrogen fixation and diurnal cycles in soil temperature. *Plant Soil*, 109, 227-234.
17. Whigham, D. K. & Minor, H. C. (1978). Agronomic characteristics and environmental stress. In G. A. Norman, ed., *Soybean Physiology, Agronomy, and Utilization*, (pp. 77-118). Academic Press, New York, NY.
18. Willemot, C. (1975). Stimulation of phospholipid biosynthesis during frost hardening of winter wheat. *Plant Physiology*, 55, 356-359.
19. Zhang, F., Dashti, N., Hynes, R. K. & Smith, D. L. (1996). Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycin max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root temperatures. *Annal Botany*, 35, 279-285.
20. Zhang, F. & Smith, D. L. (1995). Preincubation of *Bradyrhizobium japonicum* with genistein accelerates nodule development of soybean [*Glycin max* (L) Merr.] at suboptimal root zone temperatures. *Plant Physiology*, 108, 961-968.