تأثیر تاریخ‌های مختلف کاشت و کاربرد جنیستئین بر مقدار نیتروژن و گره‌زایی سه گونه یونجه یک‌ساله

مجید امینی دهقی، سید علی محمد مدرس ثانوی* و فرهاد فتاحی نیسیانی[۱]

(تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۸/۱۴)

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر تاریخ کاشت و جنیستئین(Genistein) بر مقدار نیتروژن و گره‌زایی سه گونه یونجه یک‌ساله، آزمایشی در شرایط مزرعه‌ای به‌صورت فاریاب در سال‌های ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس (طول ۵۱ درجه و ۸ دقیقه و عرض ۳۵ درجه و۴۲ دقیقه) انجام گرفت. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی به‌صورت 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 جنیستئین (۰ و ۲۰ میکرومول بر لیتر) در کرت‌های فرعی فرعی قرار گرفتند. محتوی نیتروژن گیاه، گره‌زایی و سایر صفات در گونه‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری داشتند و 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 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 جنیستئین تأثیر افزاینده‌ای بر گره‌زایی و محتوی نیتروژن در تمامی گونه‌های یونجه یک‌ساله داشت. جنیستئین در تاریخ کشت اول در تمام گونه‌ها باعث افزایش گره‌زایی و محتوی نیتروژن گیاه شد که این امر مؤید تأثیر این ماده در بهبود گره‌زایی و افزایش محتوی نیتروژن یونجه‌های یک‌ساله در شرایط مزرعه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تاریخ کاشت، محتوی نیتروژن، جنیستئین، گره‌زایی، یونجه یک‌ساله

مقدمه

نظر به وسعت زیاد مزارع در نواحی سرد ایران (بالغ بر ۴ میلیون هکتار) انتخاب گونه‌های مقاوم در برابر سرما امری ضروری است. یونجه‌های یک‌ساله از جهاتی نسبت به گونه‌های چند ساله برتری دارند. بیشتر گونه‌های یونجه یک‌ساله، سریع‌تر از یونجه‌های چند ساله رشد کرده 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 وهوای مناطقی با زمستان‌های ملایم، گونه‌های *M. truncatula*، *M. rigidula*، *M. scutellata* و *M. polymorpha* از وضعیت بهتری برخوردار بوده و موفقیت نسبی آنها به سیستم مدیریت صحیح منوط می‌گردد. گونه *M. polymorpha* نسبت به سایر یونجه‌های یک ساله بیشترین سطح پراکنش را در ایران دارد و در ارتفاع کمتر

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Modaresa@modares.ac.ir

از ۲۰۰۰ متر در انواع خاک‌ها دیده می‌شود (۱). تحمل در برابر سرمای گونه‌های *M. polymorpha* و *M. rigidula* مورد تأئید قرار گرفته است(۴).

در استرالیا با استفاده از یونجه‌های یک‌ساله حدود ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن به خاک اضافه می‌شود (۱۰). یونجه‌های یک‌ساله علاوه بر ازدیاد نیتروژن آلی خاک، در افزایش کربن آلی خاک نیز تأثیر دارند (۵). حضور و فراوانی یونجه‌های یک‌ساله در هر محیطی می‌تواند مبنای انتخاب گونه‌های سازگار با آن محیط باشد (۶). زمان کاشت در یونجه‌های یک‌ساله حتی هنگامی‌که به‌صورت مخلوط کاشته شوند در عملکرد آنها تأثیر زیادی دارد، به طوری‌که کاشت زودتر این گونه‌ها موجب افزایش عملکرد، طول دوره رشد و ماده خشک آنها می‌گردد (۷). 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 (۱). حرارت کمتر از ۳ درجه سانتی‌گراد خاک سبب توقف فعالیت باکتری‌ها می‌شود. به‌علاوه باعث تأخیر نفوذ باکتری به ریشه گیاه و کاهش فعالیت نیتروژناز می‌گردد. حرارت ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای فعالیت باکتری‌های ریزوبیوم مناسب است (۳). اولین اثر دماهای پایین روی گیاهان، کاهش در سرعت رشد و متابولیسم می‌باشد. دمای پایین، رشد گیاهان تثبیت کننده نیتروژن را بیشتر از گیاهانی که از ترکیبات نیتروژنه استفاده کرده، محدود می‌کند (۹). تمامی مراحل هم‌زیستی (پیچیدگی- تارهای کشنده ریشه، رشته سرایت کننده، شکل‌گیری و نفوذ آنها، رشد گره و عملکرد آنها) نشان داده‌اند که تحت تأثیر دماهای پایین منطقه ریشه متوقف می‌شود و عفونت تارهای کشنده را بیشتر از آغاز گره‌بندی، رشد گره‌ها و یا ترکیب نیتروژنی به تأخیر می‌اندازد (۱۵). مبادله سیگنال‌های مولکولی بین ریزوبیوم‌ها و گیاهان میزبان برای رشد گره در ریشه لگوم ضروری است (۱۴). ایزوفلاون دیازین (Isoflavones daidzein) و جنیستئین اجزای اصلی عصاره ریشه سویا بوده که مسئول القای ژن‌های گره برای ریزوبیوم می‌باشند (۸). در مناطقی با رطوبت نسبی پایین، عامل اصلی محدود کننده رشد و تثبیت نیتروژن درجه حرارت پایین فصل رشد می‌باشد (۱۷). سیگنال‌های ملکولی بین گیاه و باکتری، نظیر جنیستئین ممکن است عامل مهم محدود کننده تشکیل گره در گیاهان لگوم در دمای پایین منطقه ریشه باشد (۱۹). جنیستئین تولید الیگوساکارید را تحریک کرده و فاصله زمانی بین تلقیح و ایجاد پیچیدگی تارهای کشنده ریشه را یک تا دو روز کوتاه‌تر نمود (۲۰). جنیستئین می‌تواند سرعت آلودگی را به‌وسیله *B. japonicum* افزایش داده و در نتیجه گره‌زایی و تثبیت نیتروژن را بیشتر نماید(۱۹). مقدار جنیستئین بالای ریشه در دماهای پایین منطقه 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 منطقه ریشه زیر حد متعادل نسبت به دمای مناسب آن داشته باشد (۱۹). مقادیر فلاونوئیدها در گیاهان میزبان هم‌زیست میزان تحت تأثیر قرارگرفتن گره‌زایی لگوم‌ها و تثبیت مستقیم نیتروژن را به‌وسیله آنها نشان می‌دهد(۲). کاهش سیگنال‌های ملکولی بین گیاه و باکتری مانند جنیستئین ممکن است عامل مهم محدود کننده تشکیل گره در گیاهان لگوم در دمای پایین منطقه ریشه باشد. جنیستئین موجب کاهش اثر جلوگیری کننده دمای پایین منطقه ریشه شده و گره‌زایی و تثبیت نیتروژن را در سویا افزایش می‌دهد. هنگامی‌که در مزرعه به منطقه ریشه (ریزوسفر) جنیستئین اضافه گردید، اثر جلوگیری کننده دمای سرد بهاره خاک را روی تشکیل گره و تثبیت نیتروژن کاهش داد (۱۹).

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

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر تاریخ کشت و جنیستئین بر گره‌زایی،

محتوی نیتروژن گیاه و سایر صفات سه گونه یونجه یک‌ساله، آزمایشی در شرایط مزرعه‌ای به‌صورت فاریاب در سال‌های ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس (طول ۵۱ درجه و ۸ دقیقه و عرض ۳۵ درجه و۴۲ دقیقه) 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 به‌صورت کرت‌های دو بار خرد شده در چهار تکرار انجام شد. تاریخ کشت‌های اول، دهم و بیستم اسفندماه در کرت‌های اصلی و گونه‌های یونجه یک‌ساله به‌عنوان کرت‌های فرعی و جنیستئین در دو سطح ۰ و ۲۰ میکرومول در لیتر (μ mol l^{-1}) در کرت های فرعی فرعی قرار گرفتند. در فصل پاییز برای آماده سازی 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 پایین بودن ظرفیت نگه‌داری آب خاک، زمین مورد نظر هر سه روز در میان آبیاری می‌شد. به‌دلیل پایین بودن حاصل‌خیزی خاک، کود اوره به میزان ۱۲/۵ کیلوگرم در هکتار به‌عنوان استارتر 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 تراکم برای همه واریته‌های یونجه یکسان و به مقدار ۲۰ کیلوگرم در هکتار در نظر گرفته شد. در طی دوره رشد عملیات وجین توسط کارگر به دقت صورت گرفت.

به منظور تلقیح گیاهان از باکتری *Rhizobium meliloti* کشت شده در محیط سترون بدون آگار استفاده شد. برای تهیه باکتری، گره‌های فعال از ریشه جدا و پس از شستشو سترون شده (به مدت سه دقیقه در محلول هیپوکلریت ۳ درصد) به محیط کشت بدون آگار که در دمای $120^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو ضدعفونی شده بود اضافه گردیدند (۱۳). برای تکثیر سریع باکتری محیط کشت به مدت ۴ روز در دمای $25^{\circ}C$ قرار داده شد. پس از سپری شدن این مدت جهت تلقیح از آنها استفاده گردید. قبل از کاشت، بذور با باکتری و جنیستئین تلقیح شدند. جنیستئین (7,5,4– Trihydroxyisoflavon با خلوص ۹۹٪ Acros, New Jersey USA) به میزان ۲۰ μ mol l^{-1} به سوسپانسیون ضد عفونی شده باکتری اضافه گردید. تلقیح بذور در دمای $20^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. با توجه به این که در آزمایش‌های قبلی مشاهده شده بود که اضافه نمودن جنیستئین به خاک مزرعه باعث افزایش عملکرد سویا در شرایط دمای پایین منطقه ریشه می‌گردد بنابراین در تمام تیمارهای دارای جنیستئین محلول ۲۰ μ mol l^{-1} جنیستئین همراه با آب مقطر روی بذور کشت شده در داخل شیارها پاشیده شد (۱۸). در مرحله ۱۰٪ گل‌دهی اقدام به نمونه‌برداری در سطح ۰/۵ مترمربع از کرت های آزمایشی گردید. عوامل مورد بررسی و اندازه‌گیری عبارت از: میزان ماده خشک گره، ریشه و گیاه، تعداد گره و کلون (دسته گره) در ریشه، قطر گره و دسته گره و مقدار نیتروژن گیاه بودند. تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SAS انجام گرفت (۱۱)، و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح ۵ درصد، صورت پذیرفت.

نتایج وبحث

به‌دلیل 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 خشک ریشه) χ^2 معنی‌دار شد (جدول ۱)، لذا تجزیه واریانس این صفات به‌صورت سالیانه انجام گرفت. اثر تاریخ کاشت، گونه و جنیستئین و آثار متقابل آنها روی چهار صفت مورد بررسی (به‌جز اثر متقابل گونه در جنیستئن 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) χ^2 معنی‌دار نشد (جدول ۱). بنابراین بررسی نتایج مربوط به این ۵ صفت بر اساس تجزیه مرکب داده‌ها صورت پذیرفت (جدول۳). اثرات سال، تاریخ کاشت، گونه‌های

جدول۱. تعیین همگونی واریانس خطاهای مختلف آزمایش برای صفات مورد بررسی

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

یونجه یک‌ساله و هم‌چنین اثرات متقابل گونه × تاریخ کشت، تاریخ کشت × جنیستئین، گونه‌ها × جنیستئین و گونه × تاریخ کشت × جنیستئین روی اکثر صفات تأثیر معنی‌داری داشته (P<۰/۰۱)، اثرات متقابل سال× گونه × تاریخ کشت × جنیستئین در تمام صفات معنی‌دار نبودند. ضمناً غلظت‌های مختلف جنیستئین فقط بر تعداد گره در ریشه معنی‌دار بود (P<۰/۰۱)، (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 دوسال باشد. در سال اول با توجه به مناسب‌تر بودن شرایط دمایی 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 ۶).

در هر دوسال آزمایش مصرف جنیستئین در گونه پلی‌مورفا باعث افزایش ماده خشک گره نسبت به عدم مصرف آن شد ولی در دو گونه دیگر مصرف یا عدم مصرف جنیستئین تأثیر معنی‌داری در اکثر موارد نداشت، در کل بیشترین ماده خشک گره در هر دوسال در گونه *M. polymorpha* با غلظت ۲۰ میکرومول در لیتر جنیستئین در تاریخ کشت سوم حاصل گردید (جدول ۴). نتایج حاصل با نتایج سایر محققین در رابطه با تأثیر افزایشی جنیستئین بر مقدار ماده خشک گره مشابه می‌باشد. استفاده از جنیستئین 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 (۱۹).

در هر دو سال مصرف جنیستئین بر مقدار ماده خشک بخش هوایی هر سه گونه مورد بررسی در تاریخ کاشت سوم تأثیر معنی‌داری داشت و باعث افزایش مقدار آن نسبت به عدم کاربرد آن در همان تاریخ کاشت شد (جدول ۴). دماهای پایین در تاریخ کشت اول، ممکن است به‌دلیل 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 (۱۲). در هر دو سال گونه ریجیدولا در تاریخ کاشت سوم همراه با تلقیح بذر آن با جنیستئین مقدار ماده خشک بیشتری تولید نمود اما ماده خشک ریشه آن در این تاریخ کاشت کمتر از رادیاتا بود و برعکس

جدول۲. تجزیه واریانس سالانه آثار تاریخ کشت روی صفات مختلف گونه‌های یونجه یک‌ساله تحت تأثیر غلظت‌های مختلف جنیستئین

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		سال اول				سال دوم			
		ماده خشک گره (mg/plant)	ماده خشک بخش هوایی (kg/ha)	تعداد دسته گره ریشه	ماده خشک ریشه (g/plant)	ماده خشک گره (mg/plant)	ماده خشک بخش هوایی (kg/ha)	تعداد دسته گره ریشه	ماده خشک ریشه (g/plant)
تکرار	۳	۱/۸۷۴	۱۸۶۰۰	۰/۲۹۰	۰/۰۰۱۳	۵/۶۹۶	۷۹۲۵/۷	۱/۸۰۰	۰/۰۰۱۱
تاریخ کشت	۲	۴۸۸/۸**	۴۳۸۱۷۰۴**	۲۹/۴۱**	۰/۰۳۸۰**	۷۰۱/۲**	۸۱۶۷۷۰۷**	۳۷/۱۰**	۰/۰۴۹۸**
خطای اول	۶	۲/۴۹۷	۷۴۷۰۶	۰/۶۱۰	۰/۰۰۱۴	۲۴/۹۰**	۴۳۹۱۴*	۱/۴۴۵	۰/۰۰۰۵
گونه	۲	۲۹۴۴**	۶۳۱۷۵۷۷۴**	۵۰/۳۲**	۰/۱۱۴۵**	۳۴۳۹^{xx}	۴۰۸۶۰۳۸۲**	۶۹/۶۱**	۰/۰۶۰۱**
گونه× تاریخ کشت	۴	۴۰۴/۰**	۱۸۱۶۵۶۵**	۱۸/۴۴**	۰/۰۰۷۵**	۵۴۹/۲**	۱۱۱۸۹۷۳*	۲۲/۲۲**	۰/۰۰۴۰*
خطای دوم	۱۸	۲/۳۳۳	۳۱۶۹۳	۰/۴۸۹	۰/۰۰۱۸	۱۷/۵۶**	۱۰۰۳۱	۱/۹۵۲*	۰/۰۰۱۹
جنستین	۱	۱۳۸۴**	۲۰۳۱۷۹۲**	۳۴/۷۲**	۰/۰۳۵۵**	۱۲۸۲**	۲۱۳۸۳۱۲**	۳۱/۸۶**	۰/۰۳۸۷**
جنستین× تاریخ کشت	۲	۱۸۰/۱**	۴۵۳۴۰۶۵**	۱۰/۴۳**	۰/۰۰۸۱**	۲۰۰/۴**	۳۶۳۱۰۶۵**	۱۱/۳۳**	۰/۰۰۶۴**
گونه× جنستین	۲	۱۰۰۱**	۷۷۷۵۸۶**	۵/۸۸۲**	۰/۰۰۲۱	۹۴۴/۹**	۸۸۲۹۶۵**	۵/۹۸۳**	۰/۰۰۲۰
گونه× تاریخ کشت × سال	۴	۱۹۰/۴**	۵۸۷۰۳۱**	۴/۲۹۳**	۰/۰۰۴۴*	۱۹۸/۴*	۳۷۸۵۱۹**	۴/۰۵۱**	۰/۰۰۳۸*
خطای آزمایش	۲۷	۲/۰۵۵۶	۶۰۲۲۵	۰/۲۵۸۱	۰/۰۰۱۲	۵/۶۹۶	۱۳۱۶۷/۸	۰/۷۴۱۲	۰/۰۰۱۰

بدون علامت: معنی‌دار نیست

*: معنی‌دار درسطح ۵٪

**: معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول۳. تجزیه واریانس مرکب اثرات سال و تاریخ کشت بر صفات مختلف گونه‌های یونجه یک‌ساله تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت جنیستئین

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		تعداد گره در ریشه	تعداد گره در کلون ریشه	مقدار نیتروژن	قطر گره	طول ریشه
سال	۱	۱۸۵/۹**	۱/۲**	۱۵۱/۷**	۰/۲**	۲۳/۴**
خطای اول	۶	۳/۰۸۶۹	۰/۰۱۸۴	۲/۲۳۷۶	۰/۰۴۹۵	۱۵/۴۰۳۰
تاریخ کشت	۲	۴۵۸۳/۵**	۳/۳**	۲۶/۹**	۰/۰۹**	۷۵/۵**
سال× تاریخ کشت	۲	۱۹۷/۹	۰/۹**	۱۶/۸**	۰/۰۷**	۲
خطای دوم	۱۲	۸۴/۰	۰/۰۹	۲/۹	۰/۰۰۷	۹/۲
گونه	۲	۷۳۱۹۷/۶**	۲۳/۲**	۵۰/۲**	۳/۳**	۹/۵
سال × گونه	۲	۶۰/۸	۰/۴	۱/۱	۰/۰۹	۴/۲
گونه × تاریخ کشت	۴	۶۳۴۴/۲**	۱/۴*	۳/۰	۰/۱**	۴۷/۴**
گونه × تاریخ کشت × سال	۴	۲۷/۵	۰/۲	۱۳/۲**	۰/۰۳	۲/۴
خطای سوم	۳۶	۱۳۸/۱	۰/۵۴	۱/۶	۰/۰۴	۱۳/۳
جنیستئین	۱	۱۴۵۶۰/۴**	۰/۷	۱/۶	۰/۰۹	۱۹/۱
سال × جنیستئین	۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۲	۰/۰۰۳	۲/۶
جنیستئین × تاریخ کشت	۲	۱۸۸۱/۹**	۰/۰۵	۰/۳	۰/۲**	۱۴/۶
گونه × جنیستئین	۲	۸۳۲۶/۹**	۰/۴	۲/۷*	۰/۱**	۶۷/۰**
جنیستئین × تاریخ کشت × سال	۲	۳/۷	۰/۰۱	۲/۶*	۰/۰۰۰۶	۰/۸
جنیستئین × سال × گونه	۲	۶/۰	۰/۰۰۴	۰/۷	۰/۰۰۰۸	۱/۷
جنیستئین × تاریخ کشت × گونه	۴	۶۵۰/۱**	۰/۹**	۲/۱*	۰/۰۷*	۲۳/۳*
جنیستئین × سال × گونه × تاریخ کشت	۴	۱۳/۲	۰/۰۲	۱/۸	۰/۰۰۰۲	۳/۶
خطای آزمایش	۵۴	۶۵/۸	۰/۲۴	۰/۸	۰/۰۲	۷/۶

**: معنی‌در درسطح ۱٪

*: معنی‌دار درسطح ۵٪

بدون علامت: معنی‌دار نیست.

جدول۴. مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل جنیستئین، تاریخ کاشت و گونه بر صفات مختلف گونه‌های یونجه‌ی یک‌ساله

مقایسه میانگین‌ها	جنیستئین µmol/lit	ماده خشک گره (mg/plant)			ماده خشک بخش هوایی (kg/ha)			ماده خشک ریشه (g/plant)			تعداد دسته گره ریشه		
		تاریخ کاشت			تاریخ کاشت			تاریخ کاشت			تاریخ کاشت		
		اول	دوم	سوم	اول	دوم	سوم	اول	دوم	سوم	اول	دوم	سوم
سال اول													
M. polymorpha	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	۶/۵۰ b	۱۰/۱۰ a
M. radiata	۲۰	۳/۸۲ hijk	۱/۶۰ kl	۴/۲۵ ghij	۱۲۸۹ k	۱۳۴۸ kj	۳۲۵۳ d	۰/۱۵۰۰ gfe	۰/۲۴۵۰ c	۰/۳۵۵۰ a	۳/۰۰ fg	۱/۳۷ j	۳/۶۷ fe
M. rigidula	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	۲/۱۲ hji	۵/۶۲ c
M. polymorpha	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	۵/۴۷ c	۴/۴۰ de
M. radiata	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 hji	۱/۵۰ ji	۲/۹۲ fg
M. rigidula	۰	۶/۰۲ fgh	۲/۳۵ jkl	۵/۲۵ figh	۵۰۸۸ b	۴۲۵۹ c	۳۹۸۶ c	۰/۱۶۷۵ de	۰/۲۱۰۰ cd	۰/۱۹۵۰ dce	۳/۴۷ f	۲/۳۷ hg	۳/۶۲ f
سال دوم													
M. polymorpha	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	۷/۰۵ b	۱۰/۳۵ a
M. radiata	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	۲/۵۵ fghei	۱/۱۲ j	۳/۴۰ edf
M. rigidula	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	۱/۷۲ hij	۵/۴۵ c
M. polymorpha	۰	۷/۵۰ fe	۱۰/۵۰ e	۱۹/۷۵ c	۱۷۲۳ h	۲۸۷۷ d	۲۳۵۲ f	۰/۰۴۷۵ g	۰/۰۹۵۰ gf	۰/۱۳۰۰ dfe	۱/۹۵ ghij	۵/۹۷ bc	۴/۶۷ cd
M. radiata	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	۱/۵۰ hji	۱/۲۵ ji	۲/۶۵ fghei
M. rigidula	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	۲/۰۲ fghei	۳/۲۷ egf

اعداد با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (۰/۰۵ ≥P) اختلاف معنی‌داری ندارند.

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 کاشت دیگر نیز میزان عملکرد علوفه آن بیش از دو گونه دیگر بود، لذا با توجه به این صفت گیاه مذکور مقاوم‌ترین یونجه یک ساله بین این سه گونه به سرما بوده و می‌تواند حداکثر تولید اندام هوایی را در تاریخ کاشت سوم داشته باشد و بعد از آن رادیاتا 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. به‌نظر می‌رسد که گونه پلی‌مورفا بیشترین توان خود را صرف گسترش واحدهای مربوط به تثبیت نیتروژن می‌نماید هم‌چنین ممکن است، گره‌های تشکیل شده روی ریشه گونه‌های ریجیدولا و رادیاتا 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 کاشت دوم و سوم مصرف جنیستئین نسبت به عدم مصرف آن باعث افزایش تعداد دسته گره‌ها شد، که احتمالاً می‌تواند نشان دهنده اثر مثبت جنیستئین در افزایش تعداد دسته گره‌ها باشد، هم‌چنین بیشترین تعداد دسته گره در گونه *M. polymorpha* در تاریخ کشت سوم و غلظت $20\ \mu mol\ l^{-1}$ در لیتر جنیستئین حاصل شد (جدول ۴).

مصرف جنیستئین 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 جنیستئین در تاریخ کاشت دوم و سوم تعداد گره بیشتری نسبت به تاریخ کاشت اول تولید کرد. در تاریخ‌های کاشت اول و دوم در گونه‌های رادیاتا و ریجیدولا کاربرد جنیستئین اثر معنی‌داری بر تعداد گره ها نداشت. هم‌چنین بیشترین تعداد گره در گونه *M. polymorpha* در غلظت $20\ \mu mol\ l^{-1}$ جنیستئین و در تاریخ کشت‌های دوم و سوم و کمترین آن در گونه *M. radiata* در تاریخ کشت دوم و در غلظت‌های $0\ \mu mol\ l^{-1}$ و ۲۰ جنیستئین حاصل شد (جدول ۵). کاربرد جنیستئین 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 کاشت، گونه و غلظت $20\ \mu mol\ l^{-1}$ جنیستئین 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 (۲۰). کاهش درجه حرارت منطقه ریشه، اثر معکوس و شدیدی بر گره‌زایی لگوم‌ها و تثبیت نیتروژن می‌گذارد (۷). اثرات درجه حرارت پایین روی عمل فرایند تثبیت نیتروژن در گره‌های ریشه هم‌چنین ممکن است به علت تغییر در نفوذپذیری غشا نسبت به اکسیژن باشد (۱۶). نتایج دیگر محققین نیز بر تأثیر مثبت جنیستئین بر گره‌زایی تأکید دارد. استفاده از جنیستئین در دوره پیش از جوانه‌زنی یا کاربرد مستقیم جنیستئین روی محیط ریشه گیاه، گره‌زایی سویا را افزایش می‌دهد (۱۹).

مصرف جنیستئین در گونه پلی‌مورفا در تاریخ کاشت سوم باعث افزایش قطر گره نسبت به عدم مصرف آن شد. هم‌چنین در شرایط عدم مصرف جنیستئین 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 $20\mu\ mol\ l^{-1}$ جنیستئین به‌دست آمد. به‌نظر می‌رسد که استفاده از جنیستئین سرعت تشکیل گره را در دمای پایین افزایش داده، لذا گره‌ها زودتر تشکیل شده و رشد بیشتری نموده و فعال‌تر هستند (جدول ۵). این امر احتمالاً می‌تواند نشان دهنده تأثیر جنیستئین در بهبود گره‌زایی گونه‌های یونجه یک‌ساله در شرایط مزرعه باشد و نتایج حاصل با نتایج سایر محققین در رابطه با تأثیر افزایشی جنیستئین بر گره‌زایی مشابه است. سطح فلاونوئیدها تأثیر مستقیم برگره‌زایی ریشه گیاه داشته و مقدار فلاونوئیدها در گیاهان میزبان هم‌زیست، میزان تحت تأثیر قرار گرفتن گره‌زایی لگوم‌ها را نشان می‌دهد (۲۰).

جدول۵. مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل جنیستئین و تاریخ کاشت و گونه بر صفات مختلف گونه‌ها یونجه‌های یک‌ساله در دو سال

مقایسه میانگین‌ها	جنیستئین 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	سوم
M. polymorpha	۲۰	۷۲/۹ c	۱۳۹/۱ a	۱۳۹/۷ a	۲/۷ bc	۳/۱ b	۴/۲ a	۱/۰۸ b	۱/۰۸ b	۱/۳ a
M. radiate	۲۰	۱۹/۵ g	۱۰/۴ hi	۲۴/۳ g	۱/۹ efgh	۱/۸ fgh	۱/۸ fgh	۰/۸۶ de	۰/۴۲ g	۰/۵۷ fg
M. rigidula	۲۰	۳۷/۶ f	۲۳/۱ g	۶۲ d	۲/۲ cdefg	۲ Defgh	۲/۴ cde	۰/۶۳ f	۰/۵۵ fg	۰/۷۰ f
M. polymorpha	۰	۴۸/۳ e	۸۸/۷ b	۶۳/۳ d	۲/۷ bc	۳/۱ b	۳/۲ b	۰/۹۱ dc	۱/۰۳ bc	۱/۰۵ bc
M. radiata	۰	۱۶/۴ gh	۶/۷ i	۱۹/۹ g	۱/۷ gh	۱/۸ Fgh	۲/۱ defgh	۰/۵۸ fg	۰/۵۶ fg	۰/۶۶ f
M. rigidula	۰	۴۱/۳ ef	۱۹/۲ g	۴۳/۸ ef	۲/۳ cdef	۱/۶ h	۲/۵ cd	۰/۶۳ f	۰/۷۲ fe	۰/۶۰ f
		مقدار نیتروژن گونه‌ها (mg/g)			طول ریشه (cm)					
M. polymorpha	۲۰	۳۱/۶ ef	۳۲/۱ de	۳۲/۳ de	۲۲/۱ bcdef	۲۵/۳ ab	۱۹/۱ f			
M. radiata	۲۰	۳۳/۰ cd	۳۴/۱ ab	۳۴/۱ ab	۲۰/۲ def	۲۴/۵ ab	۲۷ a			
M. rigidula	۲۰	۳۲/۳ de	۳۴/۱ ab	۳۴/۱ ab	۲۰/۵ def	۲۲/۵ Bcd	۲۲/۳ bcdef			
M. polymorpha	۰	۳۱/۱ f	۳۱/۷ ef	۳۱/۹ ef	۲۰/۱ ef	۲۴ abc	۱۹/۹ ef			
M. radiate	۰	۳۲/۴ de	۳۳/۸ bc	۳۳/۹ abc	۲۰/۷ def	۲۱/۱ cdef	۲۰/۸ cdef			
M. rigidula	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≤ ۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری ندارد.

جدول۶. مقایسه میانگین‌های اثرات اصلی سال بر صفات مختلف گونه‌ها یونجه‌های یک‌ساله در دو سال

	ماده خشک گره (mg/plant)	ماده خشک بخش هوایی (kg/ha)	ماده خشک ریشه (g/plant)	تعداد دسته گره ریشه	تعداد گره ریشه	تعداد گره در هر کلون ریشه	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	۲/۴۸۳a	۰/۸۱۲۵a	۳۳/۹۷a	۲۲/۶۳a
سال دوم	۱۰/۲۵a	۲۷۴۶b	۰/۱۶۳۱a	۳/۵۷۶ a	۴۷/۵۳b	۲/۳۰۴b	۰/۷۴۳۰a	۳۱/۹۲b	۲۱/۸۲a

اعداد با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون دانکن (P≤ ۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری ندارد.

در سطح غشا زمانی که سلول‌های مجزا شده گیاهان برای اولین بار با شرایط دمای پایین رو به رو می‌شوند، انعطاف‌پذیری غشا و عمل آن کاهش می‌یابد. انعطاف‌پذیری سطح غشا در ابتدا به‌وسیله دمای پایین منطقه ریشه، کاهش می‌یابد و این منجر به کاهش سرعت برون تراوایی جنیستئین می‌گردد (۱۹).

کاربرد جنیستئین در تاریخ‌های مختلف کاشت در هر سه گونه تأثیری بر مقدار نیتروژن نداشت. گونه‌های رادیاتا و ریجیدولا با مصرف جنیستئین در تاریخ‌های کاشت دوم و سوم نسبت به تاریخ کاشت اول مقدار نیتروژن بیشتری در اندام‌های هوایی ذخیره کردند (جدول ۵). ضمناً دو گونه رادیاتا و ریجیدولا از گونه پلی‌مورفا مقدار نیتروژن بیشتری جذب نموده‌اند که این وضعیت می‌تواند احتمالاً به‌دلیل 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 روی ریشه و جذب نیتروژن دارند.

به‌نظر می‌رسد که افزایش تعداد گره، دسته و قطر گره تشکیل شده در اثر تلقیح گیاه با جنیستئین 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 به‌دلیل فعال نبودن گره‌ها یا کوتاه‌تر بودن طول دوره رشد، این گیاه نسبت به سایر گونه‌ها، تولید 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 جنیستئین در گونه رادیاتا در تاریخ‌های کاشت دوم و سوم باعث افزایش طول ریشه شد. در اکثر موارد جنیستئین بر طول ریشه اثری نداشت و گونه‌ها نیز طول ریشه یکسانی داشتند. تغییرات زیادی در طول ریشه در بین تیمارها به چشم نمی‌خورد و احتمالاً طول ریشه تابع عوامل دیگری به غیر از تیمارهای مورد کاربرد در این آزمایش می‌باشد (جدول ۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده 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 پایین 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 *Medicago 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 پایین، تلقیح بذور آنها با جنیستئین 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 مانند *M. rigidula* در مناطقی که در فصل رویش دمای هوا و خاک پایین بوده به شرط تلقیح آنها با جنیستئین، بسیار مناسب بوده زیرا رشد اندام هوایی مناسبی در صورت فراهم بودن سایر شرایط خواهد داشت.

منابع مورد استفاده

۱. سندگل، ع. و ب. ملک‌پور. ۱۳۷۳. مروری بر تحقیقات انجام شده و در حال اجرا در رابطه با یونجه‌های یک‌ساله در ایران و تدوین برنامه کاری آینده. نشریه مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران.

2. Appelbaum, E. 1990. The *Rhizobium/ Bradyrhizobium* – legume symbiosis. PP. 131-158. *In*: P.M. Gresshof. (Ed.), Molecular Biology of symbiotic Nit rogen Fixation. CRC Press, Boca Raton, FL.
3. Clarkson, N. M. and J. S. S. Russel. 1979. Effect of temperature on the development of two annual medics. Aust. J. Agric. Res. 30: 909-916.
4. Cocks, P. S. and T. A. M. Ehrman, 1987. The effects of geographic origin on frost tolerance of pasture legumes in Syria. J. Appl. Ecol. 24: 673- 683.
5. Dalal, R. C., W. M. Strong, E. J. Weston, J. E. Cooper, K. J. Lahance, A. J. King and C. J. Chiken. 1995. Sustaining productivity of a Vertisol at Wara, Queensland with fertilisers, no-tilage, or legumes 1. Organic matter status. Aust. J. Experim. Agric. 35: 903-913.
6. Ehrman, T. A. M. and P.S. Cocks. 1990. Ecogeography of annual legumes in dryland. Agron. J. 63: 359-362.
7. Jeranyma, P., O. B. Hesterman and C. C. Sheafer. 1998. Planting date effect or dry matter and nitrogen accumulation when clear seeded or intercropping with corn. Agron. J. 90: 616 – 622.
8. Kosslak, R.M., R. Bookland, J. Barkei, H. Paaren and E. R. Appelbaum. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 7428-7432.
9. Legros, P. and D. L. Smith. 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. Environ. Exp. Bot. 34: 117-784.
10. Materon, L. A. and P. S. Cocks. 1988. Constrains to biological nitrogen fixation in ley – farming systems designed for west Asia. *In*: Murrel, W. G. and I. R. Kennedy (Eds.), Microboilogy in Letchworth Hertfordshire. Research studies Press LTD Engeland.
11. SAS Institute Inc. 1997. SAS User's Guide. Statistical Analysis Institiute Inc. Cary, North Carolina.
12. Sloger, C., D. Bezdicek, R. Milberg and N. Boonkerd. 1975. Seasonal and diurnal variation in N_2 (C_2H_2)-fixing activity in field soybean. PP. 271-284. *In*: W. D. P. Steward (Ed.), Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms Cambridge University Press, London.
13. Somasegaren, P. H., J. Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia (Method in Legume- Rhizobium Technology). Springer Verlag. Pub., New York.
14. Verma, D. P. S. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of rhizobium. Plant Cell 4: 372-382.
15. Walsh, K. B. and D. B. L. Layzel. 1986. Carbon and nitrogen assimilation and partitioning in soybeans exposed to low root temperatures. Plant Physiol. 80: 249-255.
16. Weisz, P.R. and T. R. Sinclair. 1988. Soybean nodoule gas permeability, nitrogen fixation and diurnal cycles in soil temperature. Plant Soil. 109: 227-234.
17. Whigham, D. K. and H. C. Minor. 1978. Agronomic characteristics and environmental stree. PP. 77-118. In: G. A. Norman (Ed.), Soybean Physiology, Agronomy, and Utilization, Academic Press, New York.
18. Willemot, C. 1975. Stimulation of phospholipid biosynthesis during frost hardening of winter wheat. Plant Physiol. 55:356-359.
19. Zhang, F., N. Dashti, R. K. Hynes and D. L. Smith. 1996. Plant growth promoting rhiobacteria and soybeab [*Glycin max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root temperatures. Ann. Bot. 35:279-285.
20. Zhang, F. and D. L. Smith. 1995. Preincubation of Bradyrhizobium japonicum with genistein accelerates nodule development of soybean [*Glycin max* (L.) Merr.] at suboptimal root zone temperatures. Plant Physiol. 108:961-968.