

## بررسی عملکرد و خصوصیات رشدی اکوتیپ‌های یونجه در شرایط شوری خاک با تلقیح سویه‌های مقاوم به شوری باکتری سینوریزوبیوم ملیوتی

علیرضا توسلی<sup>۱\*</sup>، کاظم خاوازی<sup>۲</sup>، حسن منیری‌فر<sup>۳</sup>، حسین بشارتی<sup>۴</sup>، نادر میرفخرایی<sup>۵</sup>، مهدیه شمشیری‌پور<sup>۶</sup>، صدقلی زمانی<sup>۷</sup>

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۳

- ۱- بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران
  - ۲- مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
  - ۳- بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران
  - ۴- مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
  - ۵- بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران
  - ۶- مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
  - ۷- بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران
- \*مسئول مکاتبه: Email: ar.tavasolee@yahoo.ca

### چکیده

به منظور بررسی اثر تلقیح سویه‌های مقاوم به شوری باکتری سینوریزوبیوم ملیوتی بر عملکرد و اجزای عملکرد سه اکوتیپ یونجه آزمایشی به صورت اسپلیت پلات در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی در سال ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۳ اجرا شد. فاکتور اصلی شامل سه سویه باکتری سینوریزوبیوم ملیوتی بود که بر اساس تست مقاومت به شوری در شرایط آزمایشگاهی و همچنین ارزیابی گلخانه‌ای انتخاب گردیدند. فاکتور فرعی سه اکوتیپ یونجه شامل قره یونجه، همدانی و ملک‌کندی بودند. سویه‌های منتخب باکتری با بذر سه اکوتیپ یونجه تلقیح و در شرایط مزرعه در خاکی با EC برابر ۷/۳ دسی‌زیمنس بر متر کشت شدند و اثر آنها بر صفات تعداد ساقه در مترمربع، ارتفاع گیاه و عملکرد علوفه تر و خشک بررسی گردید. نتایج نشان داد اثر متقابل اکوتیپ یونجه و سویه باکتری بر صفات تعداد ساقه در مترمربع، عملکرد علوفه تر و خشک معنی‌دار است. بیشترین تعداد ساقه در مترمربع (۳۷۷ عدد) مربوط به اکوتیپ ملک‌کندی و در شرایط بدون تلقیح با باکتری بود. ترکیب تیماری اکوتیپ همدانی تلقیح شده با سویه شماره ۷ و اکوتیپ ملک‌کندی تلقیح شده با سویه‌های شماره ۱۰ و ۵ به ترتیب با ۵/۵۲، ۵/۰۵ و ۵/۰۲ تن در هکتار، بیشترین علوفه خشک را تولید نمودند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد تلقیح اکوتیپ یونجه با سویه ریزوبیومی که همزیستی خوبی با آن داشته باشد، رشد بهتر و افزایش تولید علوفه در شرایط شور را موجب گردیده و حفظ حاصلخیزی خاک و رسیدن به پایداری در کشاورزی را به دنبال خواهد داشت.

واژه‌های کلیدی: خاک شور، عملکرد، قره‌یونجه، ملک‌کندی، همدانی، همزیستی ریزوبیومی

## Assessing the Yield and Growth Characteristics of Alfalfa Ecotypes in Soil Salinity Condition by Inoculation of *Sinorhizobium Meliloti* Salt Resistant Strains

Alireza Tavasolee<sup>1\*</sup>, Kazem Khavazi<sup>2</sup>, Hasan Monirifar<sup>3</sup>, Hossein Besharati<sup>4</sup>, Nader Mirfakhraei<sup>5</sup>, Mahdieh Shamshirpour<sup>6</sup>, Sedgali Zamani<sup>7</sup>

Accepted: April 26, 2016 Received: August 24, 2016

1-Soil and Water Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran.

2-Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3-Seed and Plant Improvement Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran.

4-Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

5-Seed and Plant Improvement Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran.

6-Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

7-Soil and Water Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran.

Corresponding Author: E- mail: ar.tavasolee@yahoo.ca

### Abstract

This experiment was conducted in a split plot design in order to evaluate the effect of three ecotypes of alfalfa inoculated with *Sinorhizobium meliloti* strains resistant to salinity on yield and yield components in the East Azarbaigan agricultural research and natural resources center during the years 2011-2014. Three strains of *Sinorhizobium meliloti* were the main factor that selected based on the in-vitro salt tolerance testing and greenhouse evaluation. Three ecotypes of alfalfa including Garayonje, Hamedani and Malekkandy were subplotted. Selected strains of rhizobium inoculated with three ecotypes of alfalfa'seed and cultivated in a soil with  $EC= 7.3 \text{ dS.m}^{-1}$  and their effects were investigated on the number of stem per square meter, plant height and fresh and dry matter yield. The results showed that, interaction between rhizobia strains and alfalfa ecotypes was meaningful on the number of stem per square meter, fresh and dry forage yield. The highest number of stems per square meter (377) achieved with non inoculated Malekkandy ecotype. The highest dry matter achieved by Hamadani ecotype that inoculated with the strain No. 7 and Malekkandy ecotype inoculated with strains No. 10 and 5, that these strains produced forage 5.52, 5.05 and 5.02 tons per hectare, respectively. The results show that rhizobium strains that have well symbiosis with alfalfa ecotype may have better plant growth and increase feed production, maintaining soil fertility and achieve sustainability in agriculture in areas with salinity strsses.

**Keywords:** Garayonje, Hamedani, Malekkandy, Rhizobium Symbiosis, Soil Salinity, Yield

## مقدمه

یونجه یک نیام‌دار چند ساله است که با زمستان‌های سرد و تابستان‌های گرم و خشک سازگار است و به صورت مرتعی و یا علوفه‌ای کشت می‌شود (پنگ و همکاران ۲۰۰۸). سطح زیرکشت یونجه در دنیا حدود ۳۰ میلیون هکتار است (مونز ۲۰۰۲) و در میان کشورهای تولید کننده یونجه، ایران در رده هشتم جهانی قرار دارد و متوسط سطح زیرکشت آن در دهه گذشته بیش از ۶۰۰ هزار هکتار بوده، که تولیدی معادل ۴/۳ میلیون تن یونجه خشک را داشته است (یوگائو و کش ۲۰۰۹ و بی‌نام ۲۰۱۳). این محصول با ارزش‌ترین گیاه از خانواده لگوم‌ها بوده و مصرف آن برای تغذیه دام از سایر علوفه‌های سبز کاشته شده متداول‌تر است. گیاهان خانواده لگومینوز به دلیل نقش مهمی که در تبدیل نیتروژن اتمسفر به فرم تثبیت شده آن (آمونیم و نیتروژن آلی) دارند، از نظر اکولوژیک و کشاورزی بسیار مهم هستند (بروکول و همکاران ۱۹۹۵ و لوتنبرگ و کامیلوا ۲۰۰۹). تثبیت بیولوژیک نیتروژن فرایندی است که در طی آن نیتروژن اتمسفری در حضور آنزیم نیتروژناز به آمونیم تبدیل می‌شود (لوتنبرگ و کامیلوا ۲۰۰۹). این آنزیم یک کاتالیزور زیستی است که در یک سری از میکروارگانیسم‌ها نظیر ریزوبیوم و *ازتوباکترها* یافت می‌شود. تثبیت نیتروژن به دو صورت آزاد و همزیستی توسط میکروارگانیسم-های آزاد خاکزی و توسط میکروارگانیسم‌هایی که همزیستی سیمبیوتیک با گیاهان عالی دارند انجام می‌شود (وانگ ۲۰۱۲).

گیاه یونجه نیتروژن اتمسفری را از طریق یک ریزوبیوم اختصاصی به نام *میلیوتی* تثبیت می‌کند، این باکتری در گره‌های تشکیل شده بر روی ریشه به نام نودول زندگی کرده و انرژی خود را از طریق گیاه میزبان دریافت کرده و در مقابل گیاه نیز نیتروژن تولید شده در گره‌ها را به مصرف سوخت و برای تولید شاخ و برگ مورد استفاده قرار می‌دهد (وانگ ۲۰۱۲). کلا"

به ازای هر گرم نیتروژن تثبیت شده در ریزوبیوم، گیاه می‌تواند معادل ۱ الی ۲۰ گرم کربن از طریق فتوسنتز تثبیت کند و انرژی مازاد حاصل از این تثبیت می‌تواند برای رشد و توسعه یونجه مفید باشد (لوتنبرگ و کامیلوا ۲۰۰۹). علاوه بر اثرات اقتصادی، تثبیت نیتروژن به طریق همزیستی می‌تواند اثرات سوء زیست محیطی کاربرد کودهای شیمیایی نیتروژنه را کاهش دهد (پریوست و برومفیلد ۲۰۰۳). جمعیت ریزوبیوم‌ها در خاک، وابسته به حضور محصولات لگوم در مزرعه می‌باشد (شراز و همکاران ۲۰۱۰). گزارش شده در غیاب لگوم‌ها، جمعیت ریزوبیوم‌ها در خاک کاهش می‌یابد. هر لگوم به گونه و سویه خاصی از ریزوبیوم‌ها جهت تشکیل گره‌های کارا و موثر نیاز دارد. خیلی از لگوم‌ها ممکن است بوسیله سویه‌های مختلفی از ریزوبیوم گره‌دار شوند، اما رشد گیاه فقط وقتی افزایش می‌یابد که گره‌ها بوسیله سویه‌های موثری از ریزوبیوم‌ها ایجاد شوند (عبدالغنی و همکاران ۲۰۱۳). شوری خاک یک مشکل جدی بوده و بطور پیوسته و بخصوص در مناطق خشک و نیمه خشک در قسمت‌های مختلف دنیا در حال افزایش است (اولین و همکاران ۲۰۰۹). سرزمین پهناور ایران منابع آبی و خاکی فراوانی را در خود جای داده است که بخش وسیعی از خاک‌ها و حجم چشمگیری از منابع آب کشور به درجات مختلف مبتلا به شوری هستند (پذیرا و همایی ۲۰۰۳). در ایران مساحت خاک‌هایی که به نوعی تحت تأثیر شوری قرار دارند، بالغ بر ۳۲ میلیون هکتار است که نزدیک به ۳۰٪ از سطح کل کشور و ۵۵٪ از اراضی قابل کشت را شامل می‌شود (بی‌نام ۲۰۱۳). گیاه یونجه تحمل کمتری نسبت به تنش شوری در مقایسه با ریزوبیوم همزیست خود دارد (زهران ۱۹۹۹). آستانه تحمل به شوری یونجه ۲ دسی‌زیمنس بر متر (معادل ۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) گزارش شده است (شانون ۱۹۸۴)، ولی باکتری *سینوریزوبیوم میلیوتی* شوری ۳۰ تا ۷۰ دسی‌زیمنس بر متر (معادل ۳۰۰ تا ۷۰۰ میلی

عملکرد دانه)، شاخص سطح برگ و گره‌زایی شد (کریشناردی و اهلاوات ۲۰۰۸). عبدالحسنی و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که مقاومت به شوری و خشکی در بین ایزوله‌های باکتری *سینوریزوبیوم ملیوتی* متفاوت بود. آنها همبستگی معنی‌دار مثبتی بین مقاومت به شوری و تحمل سویه‌های ریزوبیومی به شرایط قلیایی مشاهده نمودند. میرانصاری و اسمیت (۲۰۰۹) مشاهده کردند افزایش شوری خاک از ۳/۶ تا ۶/۱ میلی موس بر سانتیمتر اثر منفی در مراحل اولیه برقراری همزیستی در گیاه داشته است. بیشتر این بازدارندگی‌ها با مواردی همچون مورفولوژی و فیزیولوژی تارکشنده شامل رشد طولی، قطر، ساختمان و پیچش آن در ارتباط می‌باشند، همچنین تنش شوری انتقال مواد فتوسنتزی به ریشه‌ها را محدود کرده و بنابراین گره‌زایی و رشد گیاه و صفات مربوط به رشد کاهش می‌یابد (میرانصاری و اسمیت ۲۰۰۷).

سویه‌های مختلف باکتری در شرایط مختلف محیطی و اقلیمی توانایی متفاوتی در برقراری همزیستی و تثبیت نیتروژن دارند (شمس الدین ۲۰۰۵ و جبرا و همکاران ۲۰۰۰)، در نتیجه میزان تاثیر شوری بر همزیستی می‌تواند تحت تاثیر سویه باکتری و رقم یونجه قرار بگیرد. ساده‌ترین راه برای افزایش تثبیت نیتروژن در شرایطی که خاک دارای جمعیت ریزوبیوم بومی است، انتخاب گونه‌هایی از بقولات است که بطور موثری با جمعیت بومی گره‌دار شوند (هوویسون و مکاین ۲۰۰۱). بنابراین با توجه به اینکه رقابت برای ایجاد گره یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین کننده در ترکیب سویه‌ای جوامع ریزوبیومی است (پرو اورو و وروبه او ۱۹۹۸)، انتخاب سویه‌های موثر که در شرایط منطقه مورد نظر از رقابت بالایی برخوردار باشند، بهترین راه برای معرفی مایه تلقیح‌های موفق در حضور جمعیت‌های بومی ریزوبیوم است. بنابراین ضروری است با توجه به شرایط خاص هر منطقه و همچنین ارقام گیاهی مورد کشت در آن، سویه و سویه‌های مناسب معرفی

مولار کلرید سدیم) را تحمل می‌کند (امبالوماتیس و همکاران ۱۹۹۴).

توانایی سویه‌های ریزوبیوم برای ایجاد گره و تثبیت نیتروژن در شرایط شور و خشک بسیار متفاوت گزارش شده است (زهران ۱۹۹۲). فضائی و بشارتی (۲۰۱۲) گزارش نمودند در شرایط گلخانه و با افزایش شوری خاک تا ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، گیاهان یونجه تلقیح شده با باکتری از رشد بهتر و درصد نیتروژن و پروتئین کل بیشتری نسبت به گیاهان شاهد بدون تلقیح برخوردار بودند و پیشنهاد نمودند برای کسب نتیجه بهتر از تلقیح می‌بایست سویه مناسب انتخاب شود. تجرا و همکاران (۲۰۰۶) اظهار داشتند افزایش شوری تا ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، محتوای لگ هموگلوبین در گره نخود را کاهش می‌دهد و سبز شدن گره را تسریع می‌کند که به عنوان شاخصی از پیری گره محسوب می‌گردد. زهران (۱۹۹۹) اظهار داشت که گره‌ها بیشترین تاثیر را از شوری می‌پذیرند، به طوری که در اثر شوری، تعداد و فعالیت آنها کاهش می‌یابد. تغییر شکل در ساختار گره و کوچک شدن آن در اثر تنش شوری می‌تواند از دلایل کاهش سرعت تثبیت نیتروژن در لگوم‌های تحت تنش شوری باشد. به طور کلی رشد گیاه، جذب عناصر غذایی، سوخت و ساز و تولید پروتئین به میزان زیادی تحت تاثیر شوری قرار می‌گیرد (کردویلا و همکاران ۲۰۰۳). در یک آزمایش ۲ ساله در مصر روی باقلا، کاربرد توام باکتری حل‌کننده فسفات *باسیلیوس مگاتریوم* و فسفات معدنی به طور معنی‌داری باعث افزایش ارتفاع گیاه، تعداد شاخه‌های جانبی، تعداد غلاف در بوته، وزن صد دانه، درصد پروتئین، عملکرد بذر و عملکرد فیزیولوژیک گردیدند (الغیاضوی و همکاران ۲۰۰۹). در یک مطالعه مزرعه‌ای در هندوستان پاسخ ارقام عدس به کودهای زیستی ارزیابی و چنین نتیجه‌گیری شد که کاربرد کودهای زیستی باعث افزایش قابل ملاحظه در عملکرد و اجزای عملکرد (تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف،

مورد نظر برای تلقیح با اکوتیپ‌های یونجه انجام گردید. سه اکوتیپ یونجه شامل قره یونجه، همدانی و ملک‌کندی در این آزمایش استفاده شد. این اکوتیپ‌ها مختص مناطق سرد بوده و از بخش تحقیقات نهال و بذر مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی تهیه گردید. طرح بصورت فاکتوریل با دو فاکتور سویه باکتری (۱۰ سطح) و اکوتیپ یونجه (سه سطح) و با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار انجام شد. بذور یونجه در گلدانهای دو کیلوگرمی (یک کیلوگرم از خاک محل آزمایش + یک کیلوگرم ماسه شسته شده) کشت گردیدند. از سویه‌های باکتری مایه تلقیح تهیه و به هر گلدان در هنگام کاشت پنج میلی‌لیتر از مایه تلقیح سویه‌های باکتری (با جمعیت  $10^8$  CFU/ml) اضافه گردید. در طول آزمایش گلخانه‌ای، گلدانها با آب شور با EC حدود پنج دسی‌زیمنس بر متر آبیاری گردیده و پس از حدود دو ماه و در هنگام گلدهی گیاهان برداشت شده و درجه گره‌بندی باکتری‌ها در ریشه (جدول ۱) تعیین گردید. با توجه به اینکه در هر گلدان ۱۰ بوته یونجه وجود داشت، درجه گره‌بندی برای تک تک بوته‌ها تعیین و سپس میانگین درجه گره-بندی برای هر واحد آزمایشی (گلدان) تعیین گردید. بر اساس نتایج بدست آمده از بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، سه سویه باکتری شماره‌های ۵، ۷ و ۱۰ جهت کشت مزرعه‌ای انتخاب و از آنها مایه تلقیح تهیه گردید.

آزمایش مزرعه‌ای به صورت اسپلیت پلات (سویه باکتری فاکتور اصلی و اکوتیپ یونجه فاکتور فرعی) با سه تکرار و با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در ایستگاه خسروشاه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی اجرا شد. ارتفاع منطقه از سطح دریا ۱۳۴۹ متر، طول جغرافیایی آن  $46^\circ$  و  $45'$  طول شرقی و عرض جغرافیایی  $38^\circ$  و  $15'$  عرض شمالی است. حداکثر و حداقل مطلق دما به ترتیب  $32/5$  و  $-7/7$  درجه‌ی سلسیوس و متوسط بارندگی منطقه

گردند. این آزمایش با هدف بررسی تاثیر تلقیح سویه‌های مقاوم به شوری باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی بر عملکرد و اجزای عملکرد سه اکوتیپ یونجه مورد کاشت در منطقه و تعیین مناسب ترین سویه یا سویه‌های باکتری در شرایط شوری خاک در دشت تبریز اجرا گردید.

### مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش از سویه‌های باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی که در آزمایشات قبلی برتری خود را در گره بندی در ریشه یونجه نشان داده بودند و در بانک ریزجانداران مفید خاکزی موسسه تحقیقات خاک و آب نگهداری می‌شوند، استفاده به عمل آمد (خاوازی و همکاران ۲۰۰۵). ابتدا تست مقاومت به شوری آنها در محیط آزمایشگاهی انجام و میزان رشد آنها بررسی گردید. برای تعیین مقاومت به شوری سویه‌ها، از محیط YMA<sup>۱</sup> حاوی مقادیر مختلف کلرید سدیم استفاده به عمل آمد. محیط YMA حاوی مقادیر مختلف کلرور سدیم (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) تهیه و محلول پس از استریل کردن توسط اتوکلاو، در پلیت‌ها توزیع شد. باکتری‌های مورد نظر بر روی محیط کشت‌های حاوی مقادیر مختلف کلرید سدیم در ۳ تکرار به صورت لکه گذاری کشت شده و در دمای مناسب (۳۰-۲۸ درجه سانتیگراد) انکوباسیون شدند. پس از گذشت ۵ روز قطر کلنی‌های رشد کرده در پلیت‌ها اندازه‌گیری و با قطر کلنی‌های شاهد (محیط بدون کلرید سدیم) مقایسه شدند و به صورت با رشد خوب (رشد باکتریها برابر با تیمار شاهد)، رشد متوسط (رشد باکتریها حدود نصف رشد شاهد) و رشد کم (رشد باکتریها کمتر از نصف رشد شاهد) گروه‌بندی شدند (آپونو و همکاران ۲۰۰۷).

پس از انجام آزمایش مقاومت به شوری در شرایط آزمایشگاه، آزمون گلخانه‌ای جهت انتخاب سویه‌های

<sup>1</sup> Yeast Manitol Agar

سه لیتر مایه تلقیح برای هر هکتار) تلقیح شد و به روش خطی در داخل کرت‌ها کشت گردیدند. در سال دوم اجرای طرح، بر اساس ۱۰ لیتر در هکتار از هر کدام از سویه‌های باکتری (با جمعیت  $10^8$  باکتری در هر میلی-لیتر از مایه تلقیح) به هنگام بهار و در آب آبیاری به هر کدام از تیمارهای مربوطه داده شد. سال اول کشت به عنوان سال استقرار یونجه در نظر گرفته شد و در سال دوم و سوم (سالهای ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳) صفات مورد نظر در سه چین (نیمه دوم خرداد، نیمه دوم شهریور و نیمه اول آذر) اندازه‌گیری شدند. صفات مورد نظر شامل ارتفاع بوته بر حسب سانتی‌متر، تعداد ساقه در مترمربع و عملکرد علوفه تر و خشک بر حسب تن در هکتار محاسبه گردید. انجام آزمون F منابع تغییر در تجزیه واریانس، با لحاظ امید ریاضی آنها صورت پذیرفت. قبل از انجام این تجزیه‌ها، فرض‌های یکنواختی واریانس‌ها، نرمال بودن خطاها و اثر افزایشی بلوک با تیمار، مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل‌های آماری از نرم افزارهای SPSS و Excel استفاده شد و مقایسات میانگین با آزمون LSD انجام شد.

۳۰۰ میلی متر می‌باشد. فاکتور اصلی سه سویه باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی بودند که بر اساس تست مقاومت به شوری در شرایط آزمایشگاه و ارزیابی گلخانه‌ای از بین ۱۰ سویه (سویه‌های شماره ۵، ۷ و ۱۰) انتخاب شدند. فاکتور فرعی نیز سه اکوتیپ یونجه شامل قره یونجه، همدانی و ملک‌کندی بود.

برای کشت بذور در مزرعه ابتدا از خاک محل آزمایش نمونه مرکب تهیه و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن تعیین گردید (جدول ۲). سپس زمین مورد نظر در پاییز شخم و دیسک زده شد و کرت‌بندی لازم با توجه به قالب طرح انجام گردید. با توجه به آزمون خاک، توصیه کودی لازم (ملکوتی و غیبی ۱۹۹۷) صورت گرفته و برای تمام کرت‌ها کود فسفاته و پتاسه مورد نیاز داده شد. در هنگام کشت ۲۰ کیلوگرم در هکتار اوره به عنوان استارتر مصرف گردید. کاشت در تاریخ ۲۰ فروردین ۱۳۹۱ انجام و میزان بذر بر اساس ۲۵ کیلوگرم در هکتار در نظر گرفته شد. به هنگام کاشت، بذور با باکتری‌های مورد نظر بصورت بذر مال یعنی آغشته کردن بذر یونجه با مایه تلقیح باکتری (با جمعیت  $10^8$  CFU/ml باکتری در هر میلی‌لیتر و به میزان

جدول ۱- درجه‌بندی گره‌های ریزوبیومی در ریشه لگوم‌ها (وینسنت ۱۹۷۰)

درجه گره بندی	توزیع و تعداد گره‌های موثر	
	تاج ریشه	جاهای دیگر ریشه
۰	۰	۰
۰/۵	۰	۴-۱
۱	۰	۹-۵
۱-۰/۵	۰	> ۱۰
۲	کم	۰
۲-۲/۵	کم	کم
۳	زیاد	۰
۴	زیاد	زیاد
۵	زیاد	زیاد

جدول ۲ - خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

کلاس بافت خاک	مقدار قابل جذب (میلی‌گرم در کیلوگرم)						کربن آلی (درصد)	درصد مواد خنثی شونده	اسیدیته گل اشباع	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)	خاک محل آزمایش
	فسفر	پتاسیم	مس	منگنز	آهن	روی					
لومی رسی شنی	۳/۹۴	۲۳۵	۰/۹	۳/۵	۱/۷	۰/۶	۰/۳۵	۳/۸	۷/۹	۷/۳۴	

### نتایج و بحث

#### انتخاب سویه های مناسب باکتری از آزمایش گلخانه‌ای

میزان رشد باکتری‌ها در محیط کشت با شوری‌های مختلف نشان دهنده اولیه توانایی باکتری برای تحمل شرایط مذکور می‌باشد. بدین خاطر در مرحله اول این آزمایش تست مقاومت به شوری بر روی سویه مختلف باکتری که قبلاً تهیه شده بودند انجام پذیرفت (خاوازی و همکاران ۲۰۰۵). نتایج این تست آزمایشگاهی نشان داد، با افزایش شوری محیط کشت میزان رشد باکتریها کاهش می‌یابد (جدول ۳). از آنجائیکه نتایج این تست به تنهایی جهت انتخاب سویه‌های مناسب باکتری همزیست یونجه برای بررسی‌های مزرعه‌ای کفایت نمی‌نماید، لذا آزمایش گلخانه‌ای نیز جهت ارزیابی میزان برقراری همزیستی سویه‌های باکتری با اکوتیپ‌های مورد نظر انجام پذیرفت. با توجه به اینکه هدف از آزمایش گلخانه‌ای انتخاب سویه‌های مناسب جهت کاشت در مزرعه و توصیه به منطقه آزمایش بود، لذا در کشت گلخانه‌ای از خاک محل اجرای طرح نیز استفاده به عمل آمد. نتایج حاصل از آزمایش گلخانه‌ای (جدول تجزیه واریانس آورده نشده است) نشان داد اختلاف معنی‌داری بین سویه‌های باکتری در درجه گره‌بندی باکتری و تعداد گره در ریشه در سطح پنج درصد وجود دارد و همچنین تعداد گره نیز دارای اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد در بین اکوتیپ‌ها می‌باشد. نتایج نشان داد میانگین درجه گره‌بندی باکتری در ریشه در سویه‌های شماره ۵، ۷، ۱۰ و ۳ به ترتیب برابر ۲/۷، ۲/۳، ۲/۲ و ۲/۱ و بیشتر از بقیه سویه‌ها بود. همچنین تعداد گره

نیز در سویه‌های شماره ۱، ۳، ۷ و ۱۰ به ترتیب برابر ۸۳/۳، ۷۶/۴، ۷۵/۱ و ۷۳/۹ عدد و بیشتر از بقیه سویه‌ها بود (جدول ۴).

نتایج به‌دست آمده با نتایج سایر محققان به شرح ذیل نیز مطابقت نشان داد. علیخانی و صالح راستین (۲۰۰۲) نشان دادند که تفاوت زیادی بین سویه‌های مختلف باکتری سینوریزوبیوم *ملیلوتی* در مقاومت به شوری وجود دارد و می‌توان آنها را از حساس تا مقاوم کلاس بندی نمود. آنها همچنین نشان دادند که تلقیح یونجه با سویه باکتری مقاوم به شوری می‌تواند منجر به موثر بودن همزیستی ریزوبیومی و افزایش عملکرد گیاه در شرایط گلخانه گردد. قاسم و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که گیاهان یونجه تلقیح شده با سینوریزوبیوم *ملیلوتی* تحت شرایط شوری خاک در گلخانه، تعداد گره در ریشه و وزن خشک اندام هوایی و ریشه بیشتری نسبت به گیاه تلقیح نشده داشتند. اگرچه شوری باعث کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم نیتروژناز در دو رقم یونجه یزدی و همدانی شده بود ولی در شرایط شوری فعالیت آنزیم نیتروژناز در رقم یزدی بیشتر از همدانی بود، به عبارت دیگر همزیستی ریزوبیومی در رقم همدانی بیشتر تحت تاثیر شوری قرار گرفته بود (قاسم و همکاران ۲۰۱۲).

ممکن است پایین بودن درجه کلاس گره‌بندی در آزمایش گلخانه‌ای بخشی مربوط به شور بودن خاک و آب در آزمایش باشد و از طرفی دوره رشد کوتاه (دو ماهه) و شرایط نوری گلخانه و میزان فتوسنتز گیاه نیز در این امر تاثیر گذار است. میرانصاری و اسمیت (۲۰۰۹) اظهار کردند که شوری می‌تواند اثر منفی در

## جدول ۳ - میزان رشد باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف کلرور سدیم

سطح شوری (میلی مولار کلرید سدیم)					
شماره باکتری	۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰
۱	رشد خوب	رشد خوب	رشد خوب	رشد متوسط	رشد متوسط
۲	رشد خوب	رشد خوب	رشد خوب	رشد متوسط	رشد متوسط
۳	رشد خوب	رشد خوب	رشد خوب	رشد متوسط	رشد متوسط
۴	رشد خوب	رشد خوب	رشد خوب	رشد متوسط	رشد متوسط
۵	رشد خوب	رشد خوب	رشد خوب	رشد متوسط	رشد متوسط
۶	رشد خوب	رشد خوب	رشد خوب	رشد متوسط	رشد متوسط
۷	رشد خوب	رشد خوب	رشد خوب	رشد متوسط	رشد متوسط
۸	رشد خوب	رشد خوب	رشد متوسط	رشد متوسط	رشد متوسط
۹	رشد خوب	رشد خوب	رشد خوب	رشد متوسط	رشد متوسط
۱۰	رشد خوب	رشد خوب	رشد خوب	رشد متوسط	رشد متوسط

مراحل اولیه برقراری همزیستی در گیاه داشته باشد و همچنین تنش شوری انتقال مواد فتوسنتزی به ریشه‌ها را محدود کرده، بنابراین گره‌زایی و رشد گیاه کاهش می‌یابد. آنتراپر و دوبریس (۲۰۰۳) نشان دادند که تنش شوری باعث توقف رشد گیاه، کاهش فتوسنتز و کاهش گره‌زایی می‌شود. همچنین نتایج ارزیابی‌های گلخانه‌ای نشان داد تعداد گره باکتری در ریشه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری در بین اکوتیپ‌ها دارد و اکوتیپ قره‌یونجه بیشترین تعداد گره را نسبت به دو اکوتیپ دیگر ملک-کندی و همدانی داشت. از نظر کلاس گره‌بندی باکتری در ریشه در بین اکوتیپ‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ولی درجه آن در اکوتیپ قره‌یونجه بالاتر از دو اکوتیپ دیگر بود. پریوست و آنتون (۲۰۰۶) اظهار کردند که درجه کلاس گره‌بندی باکتری در ریشه معیار مهمتری برای انتخاب سویه، نسبت به تعداد آن می‌باشد اگرچه تعداد گره نیز فاکتور مهمی می‌باشد. محققان گزارش نموده‌اند گیاهان میزبان نسبت به باکتریهای همزیست حساسیت بیشتری نسبت به شوری دارند و عدم موفقیت در همزیستی عمدتاً به دلیل اثرات بد شوری روی گیاهان همچون کاهش در درصد سبز شدن، کاهش تعداد ریشه‌های مویین و آلودگی آنها،

کاهش موسیلاژ (ترشحات ریشه) در اطراف ریشه و سرانجام به علت کاهش در میزان فتوسنتز گیاهان می‌باشد (زهران ۱۹۹۹ و میرانصاری و اسمیت ۲۰۰۷). قاسم و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند کارآیی همزیستی همبستگی زیادی با وزن خشک شاخساره، تعداد و وزن خشک گره در یونجه داشت و این امر نشان دهنده اهمیت صفات تعداد گره و وزن خشک شاخساره در ارزیابی تلقیح موفق و تثبیت نیتروژن در گیاه یونجه است. آنها اظهار کردند ارزیابی گلخانه‌ای برای سنجش بهبود عملکرد یونجه به وسیله تلقیح با سویه‌های مقاوم تحت شرایط شوری کارساز است ولی تکرار چنین آزمایش‌هایی تحت شرایط مزرعه‌ای نیز لازم است. بنابراین بر اساس نتایج به‌دست آمده سه سویه شماره ۱۰، ۷ و ۵ که بالاترین کلاس گره‌بندی باکتری در ریشه را داشته و همچنین از لحاظ تعداد گره در گلدان و وزن خشک ریشه نیز مقادیر بالاتری را نسبت به بقیه سویه‌ها داشتند، انتخاب و برای آزمایش مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.



جدول ۴ - میانگین صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش گلخانه‌ای تعیین سویه مناسب باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی

جهت کشت مزرعه‌ای			
وزن خشک ریشه در گلدان (گرم)	تعداد گره در گلدان	کلاس گره‌بندی باکتری در ریشه	تیمار
۲/۱	۸۳/۳	۱/۹	۱
۱/۷	۶۱/۹	۱/۳	۲
۱/۸	۷۶/۴	۲/۱	۳
۱/۶	۵۸/۶	۱/۷	۴
۱/۶	۵۷/۷	۲/۷	۵
۱/۵	۶۲/۱	۱/۲	۶
۱/۸	۷۵/۱	۲/۳	۷
۱/۸	۶۶/۶	۲/۰	۸
۱/۵	۵۱/۶	۱/۵	۹
۱/۹	۷۳/۹	۲/۲	۱۰
-	۲۲/۴۶ (p<۰/۰۵)	۱/۰۷ (p<۰/۰۵)	LSD
۱/۹	۸۵/۹	۲/۰	قره یونجه
۱/۶	۵۸/۶	۱/۹	همدانی
۱/۷	۵۵/۷	۱/۷	ملک کندی
-	۱۶/۳۷ (p<۰/۰۱)	-	LSD

#### تعداد ساقه در مترمربع و ارتفاع گیاه

نتایج تجزیه مرکب (جدول ۵) نشان داد که اثر سال بر تعداد ساقه در مترمربع و ارتفاع گیاه یونجه در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری است. تعداد ساقه در مترمربع در سال دوم (۳۶۶ عدد) بیشتر از سال سوم (۳۰۱ عدد) بود. همچنین میانگین ارتفاع بوته در سال دوم ۶۴/۹ سانتیمتر بطور معنی‌داری بیشتر از ارتفاع بوته در سال سوم ۵۷/۳۴ سانتیمتر بود.

این نتیجه نشان دهنده این است که رشد یونجه چندساله در سال‌های ابتدایی بیشتر بوده و جهت بهره‌برداری مطلوب از چین‌های آن در سال‌های بعد بایستی نسبت به تغذیه گیاه توجه خاصی مبذول داشت. اثر باکتری بر تعداد ساقه غیر معنی‌دار بود ولی اثر متقابل باکتری در اکوتیپ یونجه تاثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر تعداد ساقه در مترمربع داشت که می‌تواند حاکی از تاثیرات متفاوت سویه‌های باکتری با اکوتیپ‌های یونجه باشد. اکوتیپ قره‌یونجه تلقیح شده با

سویه شماره ۱۰ (۳۷۳ عدد بوته)، اکوتیپ همدانی با سویه شماره ۷ (۳۷۵ عدد بوته)، اکوتیپ ملک‌کندی بدون تلقیح با باکتری (در حقیقت سویه‌های بومی خود خاک) و سویه‌های شماره ۱۰ و ۵ (به ترتیب ۳۷۷، ۳۵۵ و ۳۵۲ عدد بوته) تعداد ساقه بیشتری از سایر ترکیبات تیماری داشتند. از آنجائی‌که تعداد ساقه در مترمربع یک صفت کمی مرتبط با عملکرد گیاه می‌باشد، لذا به‌نظر می‌رسد سویه‌های مختلف باکتری تحت تاثیر خصوصیات اکوتیپ و همچنین خصوصیات خاک محل (شور بودن خاک) تاثیرات متفاوتی در افزایش تعداد ساقه در مترمربع یونجه دارند. در همین رابطه ویسمن و میاموتو (۱۹۸۷) نیز اظهار داشتند که درجه حساسیت بین ارقام یونجه نسبت به شوری یکسان نیست و این بخصوص در مراحل جوانه‌زنی و سبز شدن آنها تاثیر گذار است. لذا درجه مقاومت به شوری گیاه میزبان فاکتور تعیین کننده‌ای در قابلیت آنها برای زندگی همزیستی با ریزوبیومها تحت شرایط شوری

خشک به ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل اکوتیپ در سال معنی‌دار نشد که می‌تواند نشان دهنده پایداری تولید علوفه در اکوتیپ‌ها باشد. اثر متقابل اکوتیپ و سویه باکتری سینوریزوبیوم *ملیلوتی* بر عملکرد علوفه تر و خشک در سطح یک درصد معنی‌دار بود. با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل اکوتیپ و باکتری، لذا اثرات جداگانه بررسی نشده و مقایسات میانگین اثرات متقابل ارائه شد.

میانگین عملکرد علوفه تر اکوتیپ ملک‌کندی در تیمار شاهد بدون تلقیح (۱۴/۲۹ تن در هکتار) بیشتر از عملکرد علوفه تر اکوتیپ قره‌یونجه (۱۲/۸۸ تن در هکتار) و همدانی (۱۰/۸۴ تن در هکتار) بود (شکل ۱- الف) و این نشان می‌دهد که دو اکوتیپ ملک‌کندی و قره‌یونجه که بومی منطقه آذربایجان می‌باشند، عملکرد و سازگاری بیشتری با باکتریهای بومی منطقه نسبت به اکوتیپ همدانی دارند. منیری‌فر و مفیدیان (۲۰۰۸) گزارش نمودند اکوتیپ‌های گله‌بانی و ملک‌کندی به

می‌باشد. همچنین اسمیث و هامل (۲۰۰۵) اعتقاد دارند که عملکرد یونجه بستگی به سه فاکتور تعداد گیاه در واحد سطح، تعداد ساقه در گیاه و عملکرد ساقه‌های جداگانه دارد. ونس و همکاران (۱۹۸۷) و پیتر و همکاران (۱۹۸۸) نیز گزارش نمودند که عملکرد علوفه یونجه تابع سه عامل تعداد بوته در واحد سطح، تعداد ساقه در بوته و عملکرد تک ساقه می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت سویه‌های باکتری سینوریزوبیوم *ملیلوتی* با تاثیر بر صفات رشدی گیاه از جمله تعداد ساقه در واحد سطح می‌توانند بر تولید علوفه یونجه بخصوص در وضعیت شوری خاک محل تاثیر گذار باشند.

#### عملکرد علوفه تر و خشک

براساس نتایج تجزیه مرکب (جدول ۵) ملاحظه شد که اثر سال بر عملکرد علوفه تر و خشک تولیدی تاثیر معنی‌داری در سطح یک درصد دارد و میانگین سال دوم بطور معنی‌داری بیشتر از سال سوم بود (جدول ۶). اثر اکوتیپ یونجه بر عملکرد علوفه تر و علوفه

جدول ۶ - میانگین صفات اندازه‌گیری شده در مجموع دو سال و سه چین

تیمار	میانگین ارتفاع گیاه (سانتیمتر)	تعداد ساقه در مترمربع	عملکرد علوفه تر (تن در هکتار)	عملکرد علوفه خشک (تن در هکتار)
شاهد بدون باکتری	۵۸/۰۱	۳۲۶/۳۳	۱۲/۶۷	۴/۳۰
سینوریزوبیوم <i>ملیلوتی</i>	۶۱/۵۷	۳۳۱/۹۲	۱۲/۲۵	۴/۲۵
سویه ۷	۶۴/۰۶	۳۳۳/۷۲	۱۴/۱۶	۴/۷۴
سویه ۵	۶۰/۸۳	۳۴۳/۳۵	۱۳/۴۱	۴/۶۳
قره یونجه	۶۰/۱۱	۳۲۶/۷۷	۱۲/۴۵	۴/۲۳
اکوتیپ یونجه همدانی	۶۰/۵۸	۳۲۳/۲۱	۱۲/۶۶	۴/۳۳
ملک‌کندی	۶۲/۶۷	۳۵۱/۵۱	۱۴/۲۶	۴/۸۸
دوم	۶۴/۹۰	۳۶۶/۴۸	۱۶/۲۶	۵/۵۷
سال سوم	۵۷/۳۴	۳۰۱/۱۸	۹/۹۸	۳/۳۹

با توجه به معنی‌دار شدن اثرات متقابل باکتری و اکوتیپ یونجه در برخی فاکتورهای اندازه‌گیری شده لذا اثرات اصلی آنها بررسی نگردیده و اثرات متقابل بررسی شدند.

یونجه را در مقایسه با تیمار شاهد (بدون تلقیح با باکتری) و تیمار تلقیح با باکتری حساس به شوری، به طور معنی‌داری افزایش داد. ابوالحسنی و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده نمودند که همبستگی بالایی بین سویه‌های مقاوم به شوری و مقاوم به خشکی باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی وجود داشته و سویه‌های مقاوم سازگاری مناسبی با شرایط قلیایی دارند. تنظیم اسمزی با تجمع متابولیت‌های سازگار یکی از مکانیسم‌های کارآمد سازگاری نسبت به تنش خشکی است که موجب حفظ آماس سلول در شرایط کم‌آبی می‌شود. ایشان نشان دادند که تلقیح گیاه یونجه با باکتری سینوریزوبیوم مقاوم به خشکی نسبت به جدایه‌های حساس بطور معنی‌داری غلظت پرولین برگ و میزان قندهای احیاء‌کننده ریشه افزایش پیدا کرد و این امر در شرایط خشکی احتمالاً به تنظیم اسمزی کمک می‌کند (ابوالحسنی و همکاران ۲۰۰۹).

نتایج این آزمایش نشان داد اکوتیپ همدانی به سویه شماره ۷ باکتری واکنش پذیری بیشتری نشان داده (شکل ۱- پ) و در اثر تلقیح عملکرد علوفه‌تر آن از سایر تیمارها بیشتر شده است. در حالیکه در اکوتیپ ملک‌کندی و قره‌یونجه اختلاف معنی‌داری بین شاهد و سویه‌های باکتری مشاهده نگردید. لذا می‌توان نتیجه گرفت که انتخاب سویه مناسب باکتری از ضروریات بوده و منجر به افزایش عملکرد علوفه می‌گردد و در مناطقی که شرایط خاصی بخصوص از بابت شوری خاک وجود دارد، انتخاب سویه‌های مناسب باکتری همزیست یونجه و اکوتیپ‌های مناسب آن برای بهبود عملکرد یونجه لازم می‌باشد. همچنین اکوتیپی که بومی منطقه نبوده و عملکرد پایین‌تری نسبت به اکوتیپ‌های رایج دارد (شکل ۱- الف) در صورتی که با سویه مناسب باکتری همزیست تلقیح شود، می‌تواند تولید علوفه را افزایش دهد (شکل ۱- ب، پ، ت). به نظر می‌رسد یکی از دلایلی که اکوتیپ‌های بومی واکنشی به تلقیح نشان نداده‌اند سازگاری بیشتر آنها با باکتریهای بومی منطقه باشد. در مناطقی که دارای جمعیت بومی ریزوبیوم در

ترتیب با ۲۸/۴ و ۲۷/۳ تن در هکتار در سال دارای بیشترین عملکرد علوفه تر و اکوتیپ کورزه (همدانی) با ۱۵/۶ تن در هکتار، کمترین عملکرد علوفه تر را در بین اکوتیپ‌ها داشتند، همچنین بیشترین و کمترین عملکرد علوفه خشک به ترتیب با ۷/۲ و ۴/۸ تن در سال در هکتار متعلق به اکوتیپ‌های ملک‌کندی و کورزه بود. عموآقایی و نیک‌اندیش (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که یونجه رقم همدانی نسبت به یزدی به شوری حساس تر می‌باشد. از طرفی بحرانی و ایزدی فر (۱۹۹۸) در بررسی هشت رقم یونجه حداکثر عملکرد علوفه را به ترتیب در ارقام بمی، همدانی و زمرد شیراز بدست آورده و پایداری بهتری را در عملکرد بمی گزارش نمودند. معمارزاده (۱۹۸۸) طی یک بررسی چهار ساله در تبریز روی ده رقم ایرانی و خارجی یونجه، به این نتیجه رسید که اکوتیپ عموزین الدین رقم قره یونجه دارای بیشترین عملکرد علوفه ی تر و خشک نسبت به بقیه‌ی ارقام بود. این نتایج نشانگر این موضوع است که متوسط عملکرد علوفه تر و خشک اکوتیپ‌های مورد بررسی در کل مناطق و سال‌های مورد آزمایش تفاوت معنی دار با هم دارند. از این جهت باید برای هر منطقه اکوتیپ مناسب آن منطقه مشخص شود (مفیدیان و همکاران ۲۰۱۲).

بررسی اثرات متقابل (جدول ۶) نشان داد که سویه‌های باکتری و اکوتیپ‌های یونجه دارای تاثیرات متفاوتی با همدیگر در تولید علوفه می‌باشند. عملکرد علوفه‌تر در اکوتیپ همدانی و تلقیح شده با سویه ۷ با مقدار ۱۶/۳۲ تن در هکتار بیشترین مقدار را در مقایسه با سایر اکوتیپ‌ها و سویه‌ها داشت. فضائی و بشارتی (۲۰۱۲) در یک آزمایش گلخانه‌ای نشان دادند تلقیح باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی مقاوم به شوری موجب افزایش معنی‌دار وزن خشک ریشه، اندام هوایی، تعداد گره‌های فعال و غلظت نیتروژن در گیاه شد. همچنین در شرایط شور، سویه باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی مقاوم به شوری، اکثر شاخص‌های رشد و عملکرد

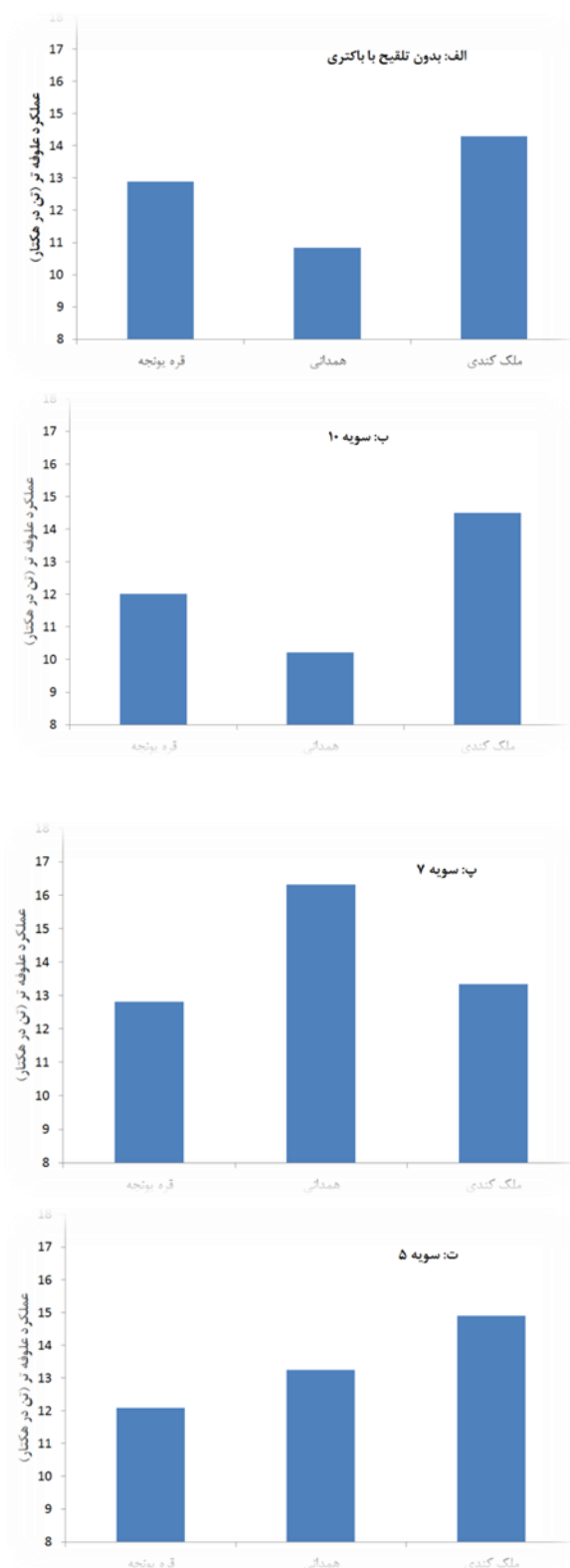
های بومی از گردهای پیر و در حال متلاشی شدن باشد (باتوملی و دوقری ۱۹۸۹، تایز و همکاران ۱۹۹۵ و اوکازاکی و همکاران ۲۰۰۴).

درخصوص علوفه خشک تولیدی نیز نتایج مشابه مشاهده گردید. اکوتیپ همدانی در تلقیح با سویه شماره ۷ با مقدار ۵/۵۲ تن در هکتار بیشترین عملکرد را تولید نمود. بر اساس نتایج بدست آمده و گزارشات محققین مختلف (عموآقایی و نیک اندیش ۲۰۱۵، فضائلی و بشارتی ۲۰۱۲ و علیخانی و صالح راستین ۲۰۰۲)، می-توان نتیجه گرفت استفاده از مایه تلقیح‌های ریزوبیومی مقاوم به شوری برای کاشت یونجه در مناطق شور و خشک به جهت بهبود حاصلخیزی خاک و دستیابی به عملکرد مطلوب از ضروریات توسعه پایدار کشاورزی می‌باشد.

خاک هستند دلایل موفق نبودن تلاشها برای افزایش تثبیت نیتروژن از طریق تلقیح به خوبی شناخته شده است (بروکول و همکاران ۱۹۹۵ و کلادین و همکاران ۲۰۰۹). در سال اول کشت محصول، به دلیل تراکم نسبتاً کم جمعیت بومی و تعداد بیشتر سویه‌های تلقیح شده بر روی بذرها و در نقطه خروج ریشه چه، بخش عمده‌ای از گردها توسط سویه‌های تلقیح شده اشغال می‌شود ولی در سالهای بعدی یک روند کاهش در درصد اشغال گردها توسط سویه تلقیح شده ملاحظه می‌گردد (جانسنون رنس‌بورگ و استری جدم ۱۹۸۵). این امر می‌تواند به دلیل دوام بهتر سویه‌های بومی سازگار یافته در محیط خاک، تکثیر سویه‌های بومی در ریزوسفر گیاه میزبان، توان رقابت بیشتر سویه‌های بومی برای گردهزایی و آزاد شدن تعداد زیادی از سویه-

جدول ۷ - مقایسه میانگین ترکیبات تیماری برای صفات اندازه‌گیری شده

نوع اکوتیپ یونجه	تیمار باکتری سیوریزوبیوم ملیلوتی	تعداد ساقه در مترمربع	عملکرد علوفه تر (تن در هکتار)	عملکرد علوفه خشک (تن در هکتار)
قره یونجه	شاهد بدون تلقیح	۲۹۷/۰۸	۱۲/۸۸	۴/۳۴
	سویه ۱۰	۳۷۳/۹۴	۱۲/۰۲	۴/۰۷
	سویه ۷	۳۰۵/۹۴	۱۲/۸۲	۴/۱۱
	سویه ۵	۳۳۰/۱۱	۱۲/۰۸	۴/۴۱
همدانی	شاهد بدون تلقیح	۳۰۳/۹۵	۱۰/۸۴	۳/۷۱
	سویه ۱۰	۲۶۶/۷۸	۱۰/۲۲	۳/۶۴
	سویه ۷	۳۷۵/۰۵	۱۶/۳۲	۵/۵۲
	سویه ۵	۳۴۷/۰۵	۱۳/۲۵	۴/۴۴
ملک کندی	شاهد بدون تلقیح	۳۷۷/۹۴	۱۴/۲۹	۴/۸۷
	سویه ۱۰	۳۵۵/۰۵	۱۴/۵۱	۵/۰۲
	سویه ۷	۳۲۰/۱۶	۱۳/۳۴	۴/۵۹
	سویه ۵	۳۵۲/۸۹	۱۴/۹۰	۵/۰۵
LSD		۸۲/۹۴ (p<۰/۰۱)	۳/۶۳ (p<۰/۰۱)	۱/۱۵ (p<۰/۰۱)



شکل ۱- مقایسه عملکرد علوفه تر تولیدی در سویه‌های تلقیح شده با باکتری سینوریزوبیوم ملیوتی برای سه اکوتیپ یونجه در مجموع دو سال

(الف: بدون تلقیح با باکتری، ب: تلقیح با سویه شماره ۱۰، تلقیح با سویه شماره ۷ و تلقیح با سویه شماره ۵)

## نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از اجرای آزمایش ملاحظه گردید که تنها بر اساس تست‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نمی‌توان سویه‌های مناسب را برای منطقه و نوع رقم توصیه نمود و آزمایشات مزرعه‌ای نیز جهت تکمیل نتایج تحقیقات لازم می‌باشد. اثر سال در میزان علوفه تولیدی اکوتیپ‌های یونجه معنی‌دار شد و در سال دوم میزان عملکرد و تولید علوفه بیشتر از سال سوم بود، بنابراین لازم است از سال دوم نسبت به تغذیه مزرعه علوفه توجه ویژه صورت پذیرد. اکوتیپ‌های یونجه در تلقیح با باکتری سینوریزوبیوم *ملیلوتی* واکنش متفاوتی نشان دادند و اکوتیپ همدانی (غیر بومی منطقه) واکنش بیشتری نسبت به تلقیح با باکتری

نشان داد و اینطور می‌توان نتیجه گرفت در صورت معرفی اکوتیپ‌های جدید یونجه برای کاشت می‌بایست نسبت به انتخاب سویه مناسب باکتری برای آن نیز اقدام شود. در شرایط عدم تلقیح با باکتری، اکوتیپ‌های بومی ملک‌کندی و قره‌یونجه عملکرد بیشتری نسبت به اکوتیپ همدانی داشتند ولی تلقیح با باکتری عملکرد علوفه تر و خشک اکوتیپ همدانی را بیش‌تر از دو اکوتیپ دیگر افزایش داد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، برای حفظ حاصلخیزی خاک و حصول عملکرد بیشتر در کشت یونجه در اراضی شور دشت تبریز نیاز به تلقیح با باکتری از ضروریات نیل به کشاورزی پایدار بوده و در صورت کشت اکوتیپ‌های غیر بومی، این نیاز به تلقیح بیشتر است.

## منابع مورد استفاده

- Abdel Ghany TM, Alawlaqi MM and Al-Abboud MA, 2013. Role of biofertilizers in agriculture: a brief review, *Mycopath*, 11(2): 95-101.
- Abolhasani M, Tajabadipor A, Lakzian A and Mohammadi H. 2009. Study compatible solute accumulation in alfalfa inoculated with bacteria strains resistant to drought water stress conditions in a greenhouse. *Proceedings of the 11th Congress of Soil Science Iran, Gorgan*. (In Persian).
- Abolhasani M, Lakzian A, Tajabadipour A and Haghnia G, 2010. The study salt and drought tolerance of *Sinorhizobium* bacteria to the adaptation to alkaline condition. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(5): 882-886.
- Alikhani HA and Saleh-Rastin N, 2002. Symbiotical characteristics of indigenous *sinorhizobium meliloti* strains from some Iranian soils and their variations in the different levels of salinity. 17<sup>th</sup> WCSS, 14-21 August 2002, Thailand, Paper no1518: 1-9.
- Amooghaie R and Nikandish F. 2015. Effect of root inoculation of two alfalfa cultivars with strains of *Bacillus* and *Sinorhizobium* species on growth, chlorophyll content and cell membrane stability under salinity stress. *Journal of Plant Resarchers*, 28(1): 140- 152. (In Persian).
- Anthraper A and Dubois JD, 2003. The effect of NaCl on growth, N fixation (acetylene reduction), and percentage of total nitrogen in *Leucaena leucocephala* (Leguminosae) Var. K. 81. *Journal Botany*, 90(5): 683-692.
- Appunu C, Sen D, Singh M and Dhar K, 2007. Variation in symbiotic performance of *Bradyrhizobium japonicum* strains and soybean cultivars under field conditions. *Journal of Central European Agriculture*, 9: 185-190.
- Binam. 2013. Statistics report of Ministry of Agriculture- jahad. Volume I: crops. Publication of Department of Planning and Economy Center for Information and Communication Technology. (In Persian).
- Bohrani J and Eizadfar R. 1998. Total dry matter protein and leaf yields of different alfalfa cultivars at Bajgah. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 1(2): 22-30. (In Persian).

- Bottomley PJ and Dughri MH, 1989. Population size and distribution of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* in relation to total soil bacteria and soil depth. Applied and Environmental Microbiology, 55:959-964.
- Brewin NJ, 1991. Development of the root nodule. Annual Review of Cell Biology, 44: 363-368.
- Brockwel J, Bottomley PJ and Thies JE, 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant and Soil, 174: 143-180.
- Claudine F, Kristina L and Claudine E, 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil, 321:35-59.
- Cordovilla MDP, Ocana A, Ligerio F and Luch C, 2003. Salinity effects on growth analysis and nutrient composition in four grain legumes-rhizobium symbiosis. Journal Plant Nutrition, 18: 1595-1609.
- El-gizawy NKHB and Mehasen SAS, 2009. Response of faba bean to biomineral phosphorus fertilizers and foliar application with zinc. World Applied Sciences Journal, 6(10): 1359-1365.
- Embalomatis A, Papacosta DK and KatinaKis P, 1994. Evaluation of *Rhizobium meliloti* strains isolated from indigenous populations in northern Greece. Journal of Agriculture and Crop Sciences, 172: 73-80.
- Evelin H, Kapoor R and Giri B, 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress. A review, Annals of Botany, 104: 1263-1280.
- Fazaeli A and Besharati H. 2012. Effect of salinity on some growth indices and total protein content of alfalfa genotypes inoculated with *Sinorhizobium meliloti* strains under greenhouse conditions. Journal Science and Technology Greenhouse Culture, 3(9): 25- 38. (In Persian).
- Fougere F, Rudulier DL and Streeter JG, 1991. Effect of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Journal Plant Physiology, 96: 1228-1236.
- Jebera M, Elarbi M, Ridha Mhamfi A, Ghirir R and Mars M, 2000. Effect of salt on *sinorhizobium sp.* isolates from Tunisia in vitro or in association with *Medicago sp.* Agriculture, 9(2): 99-102.
- Ghasem F, Poustini K, Besharati H, Mohammadi VA, Abooei Mehrizi F and Goettfert M, 2012. Pre-incubation of *Sinorhizobium meliloti* with Luteolin, Methyl jasmonate and Genistein Affecting Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Growth Nodulation and Nitrogen Fixation under Salt Stress Conditions. Journal Agriculture Science Technology, 14: 1255-1264.
- Ghasem F, Pustini K, Besharati H and Mohammadi V. 2010. Symbiotic Effectiveness and Salt Tolerance of Indigenous Populations of *Medicago sativa* Rhizobia from Tehran and Zanjan Soils. Iranian Journal of Field Crop Science, 41(1): 141-153. (In Persian).
- Gomaa AM and Magda HM, 2007. Application of bio organic agriculture and its effect on Guar (*Cyamopsis tetragonoloba*). World Journal of Agricultural Science, 3(1):91-96.
- Homae M, Feddes RA and Dirksen C, 2002. A macroscopic water extraction model for non uniform transient salinity and water stress. Soil Science Society America Journal, 66: 1764-1772.
- Howieson JG and McInnes A, 2001. The legume-rhizobia symbiosis. Does it vary for the tropics relative to the Mediterranean basin? Proceedings of the XIX International Grasslands congress, Brazilian Journal of Animal Gaide, WRS Matto and SC da Silva (eds.). pp. 585-590.
- Jansen van Rensburg H and Strijdom BW, 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. Applied and Environmental Microbiology, 49: 127- 131.
- Kavazi K, Rahimian H, Malakouti MJ and Salehrastin N. 2005. Check range of micronutrients in alfalfa fields in Hamedan province. Pp: 134- 144. In: Kavazi K, Asadi H and Malakouti MJ (eds). Necessity for the production of biofertilizers in iran. Publication of Soil and Water Research Institute. (In Persian).
- Krishnareddy SV and Ahlawat IPS, 2008. Growth and yield responses of lentil cultivars to phosphorus, zinc and biofertilizers. Journal of Agriculture and Crop Science, 177(1):49-59.

- Lugtenberg B and Kamilova F, 2009. Plant growth promoting rhizobacteria. Annual Review of Microbiology, 63: 541-556.
- Malakouti MJ and Geibi M. 1997. Determination of critical levels of strategic plants and advice the proper nutrient fertilizers in iran. Publication of Soil and Water Research Institute. (In Persian).
- Memarzadeh M. 1988. Compare the performance of 10 Iranian and foreign alfalfa cultivars under irrigated conditions. Publication of Agriculture and Natural Resources Research Center of East Azarbaijan province. (In Persian).
- Miransari M and Smith DL, 2007. Overcoming the Stress ful Effects of Salinity and Acidity on Soybean [*Glycine max* (L.)Merr.] Nodulation and Yields Using Signal Molecule Genistein under Field Conditions. Journal Plant Nutrition, 30: 1967–1992.
- Miransari M and Smith DL, 2009. Alleviating Salt Stress on Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)-*Bradyrhizobium japonicum* Symbiosis, Using Signal Molecule Genistein. European Journal of Soil Biology, 45: 146-152.
- Mofidian M, Mokhtarzadeh A, Monirifar H, Beheshti A and Sori J. 2012. Determination of forage productivity potential of cold- region alfalfa ecotypes in cold and mild – cold areas. Agronomy Journal (Pajouhesh and Sazandegi), 94: 50-59. (In Persian).
- Monirifar H and Mofidian M. 2008. Evaluation of cold regions alfalfa ecotypes. Journal of Agricultural Sciences Islamic Azad University of Tabriz, 7(2): 63- 74. (In Persian).
- Munns R, 2002. Utilizing genetic resources to enhance productivity of salt-prone land. Nutrition and Natural Resources, 2: 1-11.
- Okazaki S, Nukui N, Sagawara M and Minamisawa K, 2004. Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: Rhizobiotoxin and 1-aminocyclopropane 1- carboxylate Deaminase. Microbes Environment, 19(2): 99-111.
- Pazira E and Homae M, 2003. Salt affected resources in Iranian extension and reclamation. Journal of Experimental Botany, 54- 59.
- Peng Y, Gao Z, Gao Y, Liu G, Sheng L and Wang D, 2008. Ecophysiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt alkaline stresses. Journal of Integrative Plant Biology, 50: 29-39.
- Peoples MB, Faizah AW, Rerkasem B and Herridge DF, 1989. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Australian Center for International Agricultural Research.
- Prevost D and Antoun H, 2007. Root nodule bacteria and symbiotic nitrogen fixation. Pp. 379-398. In: Carter MR Gregorich EG (eds). Soil sampling and methods of analysis. CRC Press, Florida.
- Prevost O and Bromfield ESP, 2003. Diversity of symbiotic rhizobia resident in Canadian soils. Canadian Journal of Soil Science, 83: 311-319.
- Povorov NA and Vorobev NI, 1998. The role of interstrain competition in the evolution of genetically polymorphic populations of nodule bacteria. Genetika, 34: 1712-1719.
- Peter J, Cerny V and Hruska L, 1988. Yield formation in the main field crop. Publishing House Czechoslovakia, 380-390.
- Shannon M, 1984. Breeding selection and genetics of salt tolerance. PP. 300-308. In: Staples RC and Toenniessen GH (Eds.), Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement, Wiley, New York.
- Shamseldin A, 2005. Improvement of common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodulation by selected rhizobial strains from Egyptian soils through genotypic characterization, symbiotic effectiveness and competitiveness under salt stress conditions. Thesis for degree of PhD.



- Sheraz MS, Hassan GI, Samoon SA, Rather HA, Dar SA and Zehra B, 2010. Bio-fertilizers in organic agriculture. *Journal Phytology*, 2:42-54.
- Smith DL and Hamel C, 2005. *Crops yield, physiology and processes*. Springer-verlag, Berlin, Germany.
- Somasegaran PO and Hoben HY, 1994. *Handbook for rhizobia: Method in legume Rhizobium technology*. Springer-Verlag, New York.
- Tejera NA, Soussi M and Lluch C, 2006. Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. *Environmental Experiment Botany*, 58: 17-24.
- Thies JE, Singleton PW and Bohlool BB, 1991. Influence of size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field grown legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 19-28.
- Thies JE, Woomer PL and Singleton PW, 1995. Enrichment of *bradyrhizobium spp.* Populations in soil due to cropping of the homologous host legume. *Soil Biology and Biochemistry*, 27: 633-636.
- Vincent JM, 1970. *A manual for the practical study of root- nodule bacteria*. I.B.P. Handbook, No.15. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Volence JJ, Cherny JH and Johnson KD, 1987. Yield components, plant morphology, and forage quality of alfalfa as influenced by plant population. *Crop Science*, 27: 321-326
- Waissmann Assdian N and Miyamoto S, 1987. Salt effects on alfalfa Seedling emergence. *Agronomy Journal*, 79: 710-714.
- Wang D, Yang S, Tang F and Zhu H, 2012. Symbiosis specificity in the legume – rhizobial Mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3): 334–342.
- Yuegao H and Cash D, 2009. Global status and development trends of alfalfa. P: 1-15. In Cash, D. (ed.) *Alfalfa management guide for Ningxia*. FAO, Yinchuan, Ningxia, People’s Republic of China.
- Zahran HH and Sprent JI, 1986. Effect of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta*, 167: 303-309.
- Zahran HM, 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbial and Molecular Biology Reviews*, 968-989.
- Zahran HH, 1992. Conditions for successful rhizobium legume symbiosis in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, 12: 73-80.
- Zhao-Hai Z, Wen-Xin C, Yue-Gao H, Xin-Hua S and Dan-Ming C, 2007. Screening for highly effective *Sinorhizobium meliloti* strains for vector alfalfa and testing of its competitive nodulation ability in the field. *Pedosphere*, 17: 219- 228.