جمع‌آوری وشناسایی جدایه‌های ریزوبیوم بومی وارزیابی همزیستی آنان با لاین‌های پیشرفته شبدر ایرانی

محمد شاهوردی[۱]، بهرام میر شکاری*[۲] هادی اسدی رحمانی[۳]، محمدرضا اردکانی[۴]، ورهرام رشیدی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۲

۱ –دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۲– دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۳- دانشیار، بخش تحقیقات بیولوژی خاک، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، کرج، ایران
٤ – دانشیار، گروه زراعت واصلاح نباتات،دانشکده کشاورزی،دانشگاه آزاداسلامی، تبریز، ایران
٥ – استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
*مسئول مکاتبه E-mail: mirshekari@iaut.ac.ir

چکیده

به منظور معرفی پتانسیل‌های ژنتیکی برتر گیاه – جدایه بومی (رقم اکولوژیک–ریزوبیوم بومی) در شبدر ایرانی، این تحقیقات از سال ۹۰- ۱۳۸۱ به اجراء درآمدند. سال ۸۱ ۱۳با جمع‌آوری توده‌های بومی از استان لرستان شروع و طی آزمایشات انجام شده تعداد ۱۵ لاین امیدبخش انتخاب شدند. سال ۸۹ ۱۳تعداد ۱۵ جدایه ریزوبیوم بومی از سطح مزارع شبدر کاری استان جمع آوری و شناسایی شدند. سال ۱۳۸۹ آزمایش فاکتوریل گلخانه‌ای بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و ۲٤۰ تیمار (۱۵ لاین×۱٦جدایه) در ایستگاه تحقیقات کشاورزی بروجرد اجرا شد. صفات شاخص همزیستی، وزن خشک ریشه و اندام های هوایی، نسبت ریشه به ساقه، ارتفاع ساقه، تعداد گرهک روی ریشه و درصد نیتروژن بافت گیاهی ارزیابی شدند. گروه بندی لاین‌ها و جدایه‌ها با استفاده از تجزیه کلاستر به روش وارد انجام شد. بر اساس نتایج حاصله اثر متقابل لاین × جدایه در مورد کلیه صفات مورد ارزیابی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.تجزیه تابع تشخیص گروه بندی‌های انجام شده رامورد تأیید قرار داد.با استفاده از نتایج تجزیه کلاستر لاین شماره ۱۳ با جدایه RTB_2 به عنوان گروه و ترکیب برتر از نظر شاخص‌های همزیستی وصفات مورد نظر انتخاب شدند.

واژه‌های کلیدی: رقم اکولوژیک، ریزوبیوم بومی، شبدر ایرانی، نیتروژن، همزیستی

Collection and Identification of Native Rhizobium Strains and Assessment of their Symbiosis with Progressive Persian Clover Lines

Mohammad Shahverdi[1], Bahram Mirshekari[1], Hadi Asadi Rahmani[3], Mohammad Reza Ardakani[4] Varhram Rashidi[5]

Received: June 2, 2016 Accepted: January 2, 2018

1-PhD. Student, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Assoc. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- Assoc. Prof., Dept. of Soil and Water Research Institute, Karaj, Iran.
4- Prof., Dept. of Agronomy and Crop Breeding, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University of Karaj Branch, Karaj, Iran.
5- Assist. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding Author: E-mail: mirshekari@iaut.ac.ir

Abstract

In order to introducing efficient ecological genotype and native rhizobium strains in persian clover (*Trifolium resupinatum* L.) this study was conducted during 2003-2011. Since 2003, native persian clover populations were collected in Lorestan province, Iran, and after different studies15 promising lines were selected.Then, 15 native *Rhizobium legominosarum* bv. *trifollii* strains were collected and identified from the same area. In 2010, a greenhouse factorial experiment based on randomized complete design in three replications was conducted with 240 treatments (15 line × 16 strain) in research station of Borujerd. In this study symbiosis index, root and above-ground dry matters, root:shoot proportion, stem height, nodule number and nitrogen content of plant tissue were assessed. Grouping lines and strains was performed by cluster analysis under Ward method. Results showed that interaction of line × strain were significant ($p<0.01$) on all of studied traits. Canonical discriminate analysis was useful in describing the variation among genotypes and strains. Cluster analysis was successful in differentiating the varieties into similar sub-groups based on the measured traits. Regarding to cluster analysis the RTB_2 and line No.13 were determined as a better selection with view to studied traits.

Keywords: Ecological Genotype, Native Rhizobium, Nitrogen, Persian Clover, Symbiosis

مقدمه

استفاده بی رویه از کودهای شیمیایی در کشاورزی به‌ویژه نیتروژن علاوه بر تحمیل هزینه بر تولید، سلامت و امنیت غذایی انسان، دام، محیط زیست و بوم نظام کشاورزی به‌ویژه آب و خاک را نیز تهدید نموده است. با وجود اینکه برفراز هر هکتار زمین حدود ۷۸۰۰۰ تن نیتروژن مولکولی (N_2) وجود دارد، ولی همچنان بعد از آب، نیتروژن مهم‌ترین عامل محدود کننده تولید محصول در دنیا به شمار می رود. مصرف کودهای شیمیایی نیتروژنی یکی از راه‌های معمول

برطرف کننده این محدودیت می‌باشد که از یک سو مهم‌ترین نهاده کشاورزی مؤثر در افزایش تولید بوده و از سویی دیگر از پتانسیل آلوده سازی بالایی برخوردار است (اسدی رحمانی و همکاران ۲۰۰۷).

گیاهان علوفه‌ای به‌ویژه لگوم‌ها به‌دلیل توان همزیستی با میکروارگانیسم‌ها، تثبیت نیتروژن هوا و حل کردن عناصر تثبیت شده‌ای چون فسفر و پتاسیم جایگاه ویژه‌ای در پایداری کشاورزی و سلامت بوم نظام های زراعی دارند. شبدر ایرانی یکی از گیاهان علوفه‌ای بومی افغانستان، ایران، ترکیه و عراق است که به دلیل دارا بودن تعادل نسبی علوفه از نظر صفات کمی وکیفی در بین سایر بقولات علوفه‌ای یکساله گیاهی ممتاز محسوب می شود (اریک وترسز ۱۹۸۷، گوتو و مینسون ۱۹۷۷، ویلسون ۱۹۹٤). سطح کشت آن در ایران حدود ٤۲۰۰۰ هکتار بوده که بیشترین آن مربوط به استان لرستان می‌باشد (شاهوردی و زمانیان ۲۰۰۹). مقدار تثبیت نیتروژن در شبدرها تا ۲۹۰ کیلوگرم و تولید سیدروفور و ریزوبیوتوکسین (مانع بیماری‌های قارچی) تا ۱۷۰ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است. مقدار تثبیت نیتروژن مولکولی با توجه به نوع سویه همزیست، جمعیت باکتری‌های همزیست بومی، میزان کود مصرفی، رقم و به طورکلی شرایط خاکی و اقلیمی بسیار متفاوت می‌باشد(اسدی رحمانی و از نظر سازگاری و میزان تثبیت نیتروژن می‌توانند به لحاظ کاهش مصرف کودهای شیمیایی از نظر اقتصادی به صرفه و از نظر سلامت محیط زیست مؤثرتر باشند (قلی‌پور وهمکاران ۲۰۰۷). همچنین اثر مثبت کودهای زیستی به صورت منفردو تلفیقی برکیفیت گیاهان علوفه‌ای گزارش شده است (پانوار۱۹۹۱). نتایج مطالعه اثر چند نوع مایه تلقیح ریزوبیوم روی باقلا در خوزستان نشان داد که عملکرد تیمارهای تلقیحی بین ۳۵ تا ٦۹ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (خسروی و همکاران ۲۰۰۱). افزایش رشد گیاه به‌دلیل نقش هورمون های گیاهی تحریک کننده رشد از قبیل اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و سیتوکنین‌ها در افزایش تقسیم سلولی و افزایش طول سلول‌ها به وسیله باکتری افزاینده رشد گیاه (زهیرو همکاران ۲۰۰٤)، تحریک رشد کولئوپتیل ذرت در اثر تولید ایندول استیک (هگاو همکاران ۱۹۹۸)، افزایش طول ساقه اولیه برنج در اثر تلقیح بذر به‌وسیله باکتری ریزوبیوم (بیسواز و همکاران۲۰۰۰)، افزایش تعداد غلاف و وزن خشک گیاه و عملکرد دانه ونیز درصد و میزان نیتروژن کل دانه در سویا وبهبود گره بندی در ریشه(اکرک و همکاران ۲۰۰۰) به این فعالیت‌های همزیستی نسبت داده شده است.

در صورت عدم وجود ریزوبیوم اختصاصی گیاه به دلیل کشت گونه یا واریته جدید (غیر بومی) وهمچنین کمبود تعداد ریزوبیوم اختصاصی به دلیل تنش های محیطی و در آخر فراوانی نسبی ریزوبیوم های کم تأثیر و یا بی تأثیردر منطقه استفاده از مایه تلقیح ریزوبیوم ضرورت پیدا می کند . کریمر(۲۰۰۱) پیشنهاد کردکه توانایی تولید HCN توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه یک قابلیت بالقوه و مکانیسمی مناسب برای کنترل بیولوژیک علف‌های هرز می باشد که باید به عنوان یک جنبه جدید در روش های تقویت و تحریک رشد گیاه و افزایش عملکرد محصول مورد توجه بیشتر قرار گیرد. آنتون و همکاران (۲۰۰۲) برخی از سویه های ریزوبیومی را نیز به عنوان باکتری‌های مولد سیانید معرفی نموده اند. باگناسکو (۱۹۹۸) پیشنهاد نمود که سویه های مولد HCN می توانند به صورت مطمئن در کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای خاکزی مورد استفاده قرار گیرند. زیرا بر دیگر جوامع میکروبی خاک و یا بر رشد گیاهان تأثیر سوء ندارند.همچنین گزارش شده است که افزایش شدید تولید اتیلن در ریشه های گیاه یونجه بلافاصله پس از تلقیح با باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی(*Sinorhizobium meliloti*) باید نشانه ای از پاسخ دفاعی گیاه لگوم در مقابله با

تهاجم باکتری به سلول‌های ریشه گیاه باشد (لیجرو و همکاران ۱۹۸٦). هدف از انجام این پژوهش، شناسایی سویه های بومی موثر ریزوبیوم شبدر ایرانی در استان لرستان به عنوان قطب تولید این محصول و یافتن ترکیبی موثر از سویه – لاین برتراز نظر شاخص های همزیستی به‌ویژه مقدار تثبیت نیتروژن، عملکرد علوفه ودر نهایت حرکت به سمت کشاورزی پایدار کم‌نهاده می‌باشد.

مواد و روش ها

الف:جمع آوری جدایه های بومی

از سال ۱۳۸۱ برای تهیه جدایه های بومی به روش پیمایشی از کل مناطق زیر کشت شبدر ایرانی استان لرستان (٤٦درجه و۵۱ دقیقه الی ۵۰درجه و۲۲ دقیقه طول شرقی و ۳۲ درجه و۳۸ دقیقه الی ۳٤ درجه و۲۲ دقیقه عرض شمالی) به مساحت تقریبی ۱٦۰۰۰ هکتار به ازای هر ۷۰۰ هکتار یک نمونه به‌طور تصادفی از مزارع هر منطقه انتخاب شد (شکل ۱).در هر نمونه تعدادی شبدر با ریشه از عمق صفر تا ۵۰ سانتیمتری برداشت و پس از شستشو با آب و خشک کردن در دمای معمولی اتاق، به بخش بیولوژی موسسه تحقیقات آب و خاک ارسال شدند. پس از جداسازی (بیک و همکاران ۱۹۹۳) گروه بندی جدایه ها بر اساس آزمون گره زایی در گیاه میزبان تعداد ۱۵ جدایه شناسایی شدند (جدول ۱).

شکل۱- مناطق عمده کشت شبدر ایرانی (هاشور خورده) در استان لرستان

جدول ۱- لیست جدایه های باکتری ریزوبیوم جدا شده از نمونه های جمع آوری شده بومی لرستان

ردیف	نام نمونه	نام ایزوله	ردیف	نام نمونه	نام ایزوله	ردیف	نام نمونه	نام ایزوله
۱	بروجرد	RTB	٦	ایستگاه تحقیقات II	RTE_2	۱۱	سیلاخور	RTC
۲	بروجردI	RTB_1	۷	الشتر I	RTA_1	۱۲	دورود I	RTD_1
۳	بروجردII	RTB_2	۸	الشتر II	RTA_2	۱۳	دورود II	RTD_2
٤	بروجردIII	RTB_3	۹	الشتر III	RTA_3	۱٤	خرم‌آباد	RTK_3
۵	ایستگاه تحقیقات I	RTE_1	۱۰	الشتر IV	RTA_3	۱۵	نورآباد	RTN_1

ب:آزمایش گلخانه‌ای

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۹ در گلخانه ایستگاه تحقیقات کشاورزی بروجرد اجرا شد.در این آزمایش گلدان‌های به حجم ۷۵۰ گرم از ماسه بادی شسته پر شده و در هر گلدان۱۰ عدد بذر شبدر آغشته شده به باکتری (جمعیت باکتری‌های به‌کار رفته ۵×۱۰^{۸} cFu/ml) کاشته شد. تعداد لاین‌های مورد استفاده در این آزمایش ۱۵ عددبودند.این لاینها حاصل نتایج آزمایشات جمع آوری توده های بومی از سال ۱۳۸۱بودند که طی یکسری آزمایشات منجر به انتخاب

لاین‌های برتردر سال ۱۳۹۰ گردید (شاهوردی و همکاران ۲۰۰۷، ۲۰۰۹ و ۲۰۱۲).

جدایه‌ها شامل ۱۵ جدایه باکتری ریزوبیوم شناسایی شده در بخش پیمایشی به همراه شاهد بود. تغذیه گلدان‌ها با استفاده از محلول بدون نیتروژن (دلورث ۱۹۷۰)هر هفته ۲۰میلی لیتر در هر گلدان انجام شد (یادگاری و همکاران ۱۳۸۳). پس از رشد کافی بوته‌ها و تشکیل گرهک روی ریشه صفات زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تعداد گرهک روی ریشه بوته‌های شبدرپس از خارج کردن از گلدان و شستشو در آب تشت به دقت بررسی شده و تعداد گرهک‌ها مورد شمارش قرار گرفتند.طول ساقه در زمان برداشت از سطح گلدان اندازه گیری شد.

وزن خشک اندام هوایی و ریشه بعد از خشک کردن در آون در دمای C ° ۷۲ به‌مدت ۲٤ ساعت محاسبه شدند.

شاخص همزیستی یا سودمندی نسبی یا وابستگی نسبی همزیستی لاین – ریزوبیوم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (داعی و همکاران ۲۰۰۹).

Rhizobium benefit on shoot dry weight= (W_c-W_i)/ Wc*100

W_i: وزن خشک اندام هوایی در حالت همزیستی،**W_c**: وزن خشک اندام هوایی در حالت بدون همزیستی (شاهد)

برای مقایسه جدایه ها از نظر مقدار تثبیت نیتروژن، درصد نیتروژن بافت گیاهی برای توده بومی به روش کجلدال انجام شد.جهت کلاستر بندی دقیق تر لاین‌ها از صفات عملکرد علوفه تر و خشک، نسبت برگ به ساقه، درصد پروتیین و سرعت رشد مجدد حاصل از نتایج آزمایشات مزرعه ای (شاهوردی ۲۰۱۲) استفاده گردید.

در این مطالعه برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از روش کلموگراف–اسمیرنوف استفاده شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش توکی انجام شد. گروه بندی لاین‌ها وجدایه ها بر اساس تجزیه خوشه‌ای به روش Ward پس از استاندارد کردن داده ها انجام شدند.برای بررسی صحت گروه بندی از روش تابع تشخیص استفاده شد. محاسبات بااستفاده از نرم افزار آماری **SAS ver.9** انجام شد. رسم نمودارها با نرم افزار**SPSS ver.13** انجام شد.

نتایج وبحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل لاین در جدایه روی صفات تعداد کل گره روی ریشه، ارتفاع گیاه، نسبت بخش هوایی به ریشه، وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی و شاخص همزیستی معنی‌دار بود (جدول ۲).

به دلیل حجم بالای مقایسات میانگین، نتایج مقایسه میانگین ۳۰ ترکیب برتر لاین ×جدایه در جدول ۳ آمده است. مقایسه میانگین ها نشان می دهد که ترکیب S15-L5 و L6-S6 با شاخص همزیستی ۱/۹۷ درصد بالاترین مقدار کارایی را نشان دادند که در مقایسه با شاهد ۲٦/۷ درصد برتری داشت. در مطالعه انجام شده روی کارایی همزیستی توسط باکتری‌های *Rhizobium leguminosarum* sp.bv viciae جدا شده از دو منطقه گرگان و نیشابور در شرایط آزمایشگاهی، نتایج حاکی از تفاوت بین جدایه‌های ریزوبیوم مورد بررسی بود. به‌طوری که کارایی همزیستی بین ۵۰۰–۵ درصد در بین جدایه‌های گرگان و نیشابور مشاهده شد. در این آزمایشات با توجه به نتایج توان حل فسفات معدنی و آلی بالاترین کارایی همزیستی جدایه‌های R65G و R59G از گرگان و R30N از نیشابور به عنوان جدایه‌های برتر انتخاب شدند. در غربالگری ۲۸۵ سویه بومی ریزوبیوم شبدر سفید در مقایسه با یک سوش استاندارد بین سه تا ۱۷۰ درصد برتری کارآیی نشان دادند. این جدایه‌ها روی درصد جوانه‌زنی، تعداد گره، مقدار تثبیت نیتروژن، وزن

جدول ۲-نتایج تجزیه واریانس تعداد کل گره روی ریشه، ارتفاع گیاه، نسبت بخش هوایی به ریشه، وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی و شاخص همزیستی

		میانگین مربعات					
منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد کل گره روی ریشه	ارتفاع ساقه	نسبت بخش هوایی به ریشه	وزن خشک ریشه	وزن خشک اندام هوایی	شاخص همزیستی
لاین	۱٤	۸٤۰/۳٦**	۳۷۲/۹۰**	٤/٦٦**	۱۳۳/۸۰**	٦۷٤/٤۸**	۰/۵۵**
جدایه	۱۵	۲۹۳/۰۳**	٤۱/۹۳**	۰/۳۰**	٦/۹۹**	۲۵/۸٤**	۱/۲۸**
جدایه×لاین	۲۱۰	۱۲۰/۵۸**	۲٤/۹۳**	۰/۳۸**	۵/۲۲**	۲۲/٦۰**	۰/۸۳**
خطا	٤۸۰	۲/٤٦	۱/۷۰	۰/۰۰۰٤	۰/۰۲٤	۱/۳۳	۰/۰۲
ضریب تغییرات (٪)		۹/٦۰	٦/۸۰	۳/۹۹	۵/۳۰	۱۵/۸۰	۱۲/۱٤

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می باشد.

گیاهچه، رشد گیاه و محتوای نیتروژن در گیاه مؤثر بودند (اکبری و همکاران۲۰۱۲).

بیشترین مقدار تولید ماده خشک در هر گلدان مربوط به ترکیب تیماری L1 -S13 با ۲٦/۲۷ گرم بود که در مقایسه با شاهد (۸/٦۵ گرم) ۳۹/۷ درصد برتری نشان دادند. در یک آزمایش مزرعه‌ای که توسط هوفلیچ و همکاران (۱۹۹٤) انجام شد، مشخص گردید که تلقیح با *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae سویه R39 باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی باقلا گردید. خسروی و همکاران (۱۳۸۰) چند مایه تلقیح حاوی باکتری های بومی ریزوبیوم را بر رشد و عملکرد باقلا در مناطق مختلف عمده تحت کشت این محصول بررسی و نتیجه گیری کردند که در مناطق مختلف بین ۱۰ تا ٦۹ درصد و در کل کشور به‌طور میانگین ۲۰ درصد افزایش عملکرد باقلا در اثر تلقیح حاصل شد. گونزالس لوپز و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کرده اند *Azotobacter chroococcum* می‌تواند جیبرلین، اکسین و سیتوکنین تولید کند. در گزارش دیگری تلقیح توام باکتری *Bradyrhizobium japonicum* و *Azotobacter chroococcum* باعث افزایش وزن بخش هوایی سویا گردید (وسی ۲۰۰۳).

تعداد گره از صفاتی است که همبستگی زیادی با میزان تثبیت نیتروژن در گیاهان مختلف دارد. از نظر تعداد گره برترین لاین-جدایه به ترتیب مربوط به ترکیب تیماری L13 -S10 و L11 -S15 با ٤۱ و۳۷ گره بود که در مقایسه با شاهد(۱۰/۹۵) ۲۷/۳۷ درصد برتری نشان دادند.بررسی‌های اکرک و همکاران (۲۰۰۰) مشخص ساخت که تلقیح بذر سویا با باکتری *Bradyrhizobium japonicum* قبل از کاشت سبب افزایش تعداد غلاف و وزن خشک گیاه و عملکرد دانه گردید. همچنین در این گزارش افزایش درصد و میزان نیتروژن کل دانه به افزایش گره‌بندی ریشه ناشی از تلقیح نسبت داده شده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری مربوط به لاین های شبدر ایرانی وجدایه های ریزوبیوم بومی (۵۰ ترکیب برتر بر حسب صفات مختلف)

ردیف	لاین-جدایه	شاخص همزیستی	لاین- جدایه	وزن خشک هر گلدان (گرم)	لاین- جدایه	وزن ریشه (گرم)	لاین- جدایه	نسبت ریشه به بخش هوایی	لاین- جدایه	ارتفاع (سانتیمتر)	لاین- جدایه	تعداد گره
۱	۱۵-۵	۱/۹۷^{a}	۱۳-۱	۲۶-۶۶^{a}	۹-۶	۱۱/۰۸^{a}	۱-۱۴	۳/۲۳^{a}	۱۳-۱	۳۲/۳۳^{a}	۱۰-۱۳	۴۱/۰۰^{a}
۲	۶-۶	۱/۹۶^{a}	۹-۶	۲۱/۹۳^{b}	۱۳-۱	۱۰/۸۰^{a}	۹-۱۴	۳/۰۵^{b}	۷-۶	۳۰/۶۷^{ab}	۱۵/۱۱	۳۷/۰۰^{b}
۳	۱۲-۲	۱/۹۵^{ab}	۴-۶	۱۹/۵۹$^{b-c}$	۱۲-۱	۹/۵۸^{b}	۸-۱۱	۲/۶۲^{c}	۱۵-۱۵	۲۸/۳۳$^{a-c}$	۲-۵	۳۵/۳۳^{bc}
۴	۲-۷	۱/۹۵^{ab}	۸-۶	۱۸/۶۷$^{b-d}$	۱۲-۶	۹/۲۳^{b}	۱۴-۱۱	۲/۲۶^{d}	۵-۷	۲۸/۳۳$^{b-d}$	۱۳-۸	۳۵/۰۰^{bc}
۵	۱۵-۱۳	۱/۹۳^{ab}	۷-۶	۱۸/۴۹$^{b-e}$	۸-۶	۹/۱۵^{c}	۷-۱۴	۲/۲۵^{d}	۱۱-۱	۲۷/۰۰$^{b-e}$	۵-۱۳	۳۴/۳۳^{cd}
۶	۱۴-۶	۱/۹۳^{ab}	۱۳-۶	۱۸/۱۷$^{b-f}$	۳-۶	۸/۴۱^{c}	۴-۱۰	۲/۲۰^{e}	۵-۱۳	۲۶/۶۷$^{b-f}$	۱۳-۹	۳۴/۳۳^{d}
۷	۷-۵	۱/۹۳^{ab}	۷-۱	۱۷/۲۷$^{c-g}$	۵-۱۳	۸/۳۰^{c}	۸-۱۴	۲/۰۳^{f}	۳-۱	۲۶/۳۳$^{b-f}$	۲-۱۳	۳۴/۰۰^{de}
۸	۸-۵	۱/۹۳^{ab}	۱۲-۱	۱۷/۰۴$^{C-h}$	۱۱-۱	۸/۲۹^{c}	۵-۱۱	۲/۰۰^{f}	۷-۱۲	۲۶/۳۳$^{b-g}$	۱-۸	۳۳/۵۰^{de}
۹	۷-۹	۱/۹۳^{ab}	۱-۱۳	۱۶/۹۷$^{c-h}$	۱۳-۶	۸/۰۷^{cd}	۶-۱۰	۱/۶۸^{g}	۴-۱۳	۲۶/۳۳$^{b-g}$	۸-۵	۳۳/۳۳$^{d-f}$
۱۰	۷-۱۴	۱/۹۲^{ab}	۵-۶	۱۶/۸۵$^{c-j}$	۲-۶	۷/۵۴^{cd}	۱۳-۱۴	۱/۶۰^{h}	۱۱-۱۳	۲۶/۰۰$^{c-i}$	۳-۱۳	۳۲/۶۷$^{d-g}$
۱۱	۸-۶	۱/۹۲$^{a-c}$	۵-۱۳	۱۶/۴۰$^{c-j}$	۳-۲	۷/۲۹^{e}	۳-۱۴	۱/۵۶^{i}	۱۰-۱	۲۵/۶۷$^{c-i}$	۳-۵	۳۰/۶۷$^{d-h}$
۱۲	۲-۱۳	۱/۹۱$^{a-d}$	۱-۶	۱۶/۳۳$^{c-j}$	۱-۶	۷/۱۰^{ef}	۴-۱۴	۱/۴۱^{j}	۶-۲	۲۵/۵۰$^{c-j}$	۷-۱۳	۳۰/۳۳$^{d-i}$
۱۳	۶-۳	۱/۹۱$^{a-d}$	۲-۶	۱۶/۱۴$^{c-j}$	۱۱-۶	۷/۱۰^{ef}	۸-۱۰	۱/۳۶^{k}	۹-۱	۲۵/۳۳$^{c-k}$	۱۵-۵	۳۰/۳۳$^{d-i}$
۱۴	۱۰-۳	۱/۹۱$^{a-d}$	۱۴-۱	۱۶/۰۶$^{c-j}$	۷-۱	۷/۰۴^{ef}	۵-۱۴	۱/۲۸^{l}	۶-۱۳	۲۵/۰۰$^{c-k}$	۱۳-۱۰	۲۸/۶۷$^{e-j}$
۱۵	۲-۱	۱/۹۱$^{a-d}$	۱۲-۶	۱۵/۵۲$^{c-k}$	۶-۶	۷/۰۳^{ef}	۶-۱۴	۱/۱۹^{m}	۱۵-۱	۲۴/۶۷$^{c-k}$	۱-۱۳	۲۷/۶۷$^{f-k}$
۱۶	۱۲-۱	۱/۹۱$^{a-d}$	۳-۲	۱۵/۲۷$^{c-i}$	۸-۱۴	۶/۶۰^{fg}	۱۰-۱۴	۱/۱۴^{n}	۶-۱۲	۲۴/۶۷$^{c-k}$	۸-۱۳	۲۷/۶۷$^{f-k}$
۱۷	۱۵-۱۱	۱/۹۰$^{a-d}$	۳-۶	۱۵/۱۶$^{c-m}$	۷-۶	۶/۵۷^{fg}	۱-۱۰	۱/۰۸^{o}	۲-۱۲	۲۴/۳۳$^{c-k}$	۱۴-۵	۲۷/۳۳$^{g-l}$
۱۸	۱۵-۱۴	۱/۹۰$^{a-d}$	۱۴-۶	۱۵/۱۵$^{c-m}$	۹-۱	۶/۴۳^{fg}	۵-۸	۱/۰۸^{o}	۱۶-۵	۲۴/۳۳$^{c-k}$	۱۳-۱	۲۷/۱۷$^{g-m}$

ادامه جدول ۳

ردیف	لاین- جدایه	تعداد گره	لاین- جدایه	ارتفاع (سانتیمتر)	لاین- جدایه	نسبت ریشه به بخش هوایی	لاین- جدایه	وزن ریشه (گرم)	لاین- جدایه	وزن خشک هر گلدان (گرم)	شاخص همزیستی	لاین- جدایه
۱۹	٤-۱۵	g-/۰۰^{m}	۸-۱۲	۲٤/۰۰$^{c-k}$	۱۲-۷	۱/۰۵^{o}	۱٤-٦	٦/۰۸$^{g-i}$	۷-۱۳	۵/۱۵$^{c-n}$	۲-۱۱	۱/۸۹$^{a-f}$
۲۰	۵-۱۱	h-۲٦/٦۷^{n}	۷-۱۳	۲٤/۰۰$^{c-k}$	۱۳-۱۱	۰/۹۷^{p}	۷-۱٤	۵/۹۷$^{h-i}$	۸-۱۳	۱٤/۹۷$^{d-o}$	۷-۱۳	۱/۸۹$^{a-f}$
۲۱	۸-۸	n-۲٦/۳۳^{o}	۸-۱۳	۲٤/۰۰$^{c-k}$	۱٦-۱۱	۰/۹٦^{p}	۸-۱	۵/۸۸$^{h-j}$	۹-۱	۱٤/٤۰$^{d-p}$	۱-۹	۱/۸۷$^{a-g}$
۲۲	۹-۵	h-۲۵/٦۷^{o}	۱٦-۱۳	۲٤/۰۰$^{c-k}$	۳-۱۰	۰/۹۳^{pq}	٤-۱	۵/۸۷$^{h-j}$	٦-٦	۱٤/۳۹$^{d-p}$	۱۵-٦	۱/۸٦$^{a-h}$
۲۳	۳-۸	n-۲۵/٦۷^{o}	۲-۵	۲٤/۰۰$^{c-k}$	۱۰-۱۱	۰/۹۲^{gr}	۱۵-٦	۵/۷٦$^{j-k}$	۲-۱۲	۱٤/۲۵$^{d-q}$	۱۱-۱۱	۱/۸٤$^{a-i}$
۲٤	۷-۱۵	h-۲۵/۳۳^{p}	۹-۲	۲۳/۸۳$^{c-k}$	۱۲-۱۱	۰/۸۹^{rs}	۱٦-۱	۵/۷٦$^{i-k}$	٤-۱۲	۱٤/۰۰$^{e-r}$	۱-۲	۱/۸٤$^{a-i}$
۲۵	۳-٤	h-۲۵/۳۳^{p}	۱۰-۲	۲۳/۷۵$^{c-k}$	۲-۱۰	۰/۸۸^{s}	۷-۲	۵/۷۱$^{i-m}$	۱۱-۱	۱۳/۷۱$^{f-s}$	۱۱-۸	۱/۸٤$^{a-i}$
۲٦	۸-۹	n-۲۵/۳۳^{p}	۷-۱	۲۳/٦۷$^{c-k}$	۲-۱۱	۰/۸٦st	۳-۱٤	۵/۷۱$^{i-m}$	٦-۱۳	۱۳/٤۹$^{g-t}$	۱۲-۸	۱/۸٤$^{a-i}$
۲۷	۱-۱۰	h-۲۵/۰۰^{p}	۳-۱۳	۲۳/٦۷$^{c-k}$	۱۵-۱٤	۰/۸٤^{t}	۱۰-٦	۵/۵۹$^{j-n}$	۷-۱۲	۱۳/٤۲$^{g-u}$	۵-۲	۱/۸۳$^{a-i}$
۲۸	۱۰-۱۵	n-۲۵/۰۰^{p}	۱٦-۸	۲۳/٦۷$^{c-k}$	۱۳-۸	۰/۸۳^{t}	۱۲-۷	۵/۵۲$^{j-n}$	۱۱-٦	۱۳/۳۲$^{g-v}$	۷-۲	۱/۸۳$^{a-i}$
۲۹	۱۱-۱۵	h-۲۵/۰۰^{p}	۱۱-۱۵	۲۳/۵۰$^{c-k}$	٤-۱۱	۰/۷۸^{u}	٦-۸	۵/۳٤$^{j-o}$	٦-۸	۱۲/۹۰$^{g-w}$	۹-۳	۱/۸۳$^{a-i}$
	٤-۵	n-۲۵/۰۰^{p}	۱۲-۲		۹-۱۱		۷-۷		٦-۱۲		۱۵-۱	
۳۰				۲۳/۵۰$^{c-k}$		۰/۷۷^{uw}		۵/۲۰$^{k-p}$		۱۲/۸۳$^{g-x}$		۱/۸۳$^{a-i}$

ریزوبیوم‌ها عامل‌های گره زا مانند لیپوکیتو- الیگوساکارید آزاد می کنند که به عنوان تحریک کننده جوانه زنی طیف وسیعی از گونه های گیاهی شناخته شده اند. اما هنوز مکانیسم عمل آن شناخته نشده است. کانشیرو و کولک (۱۹۸۵) گزارش نمودند که تلقیح سویا با *Brady rhizobium japonicum* جهش یافته که ایندول استیک اسید تولید می کند، باعث افزایش گره بندی در ریشه گردید. کمبود *Brady rhizobium alkani* جهش یافته در تولید بیشتر ایندول استیک اسید موثر بوده و در نتیجه تعداد گره در ریشه ها افزایش یافت. تلقیح با سویه های برادی ریزوبیوم باعث بهبود گره زایی، رشد رویشی و جذب نیتروژن در سویا می شود (مقوانسی ومهنا ۲۰۰۵).

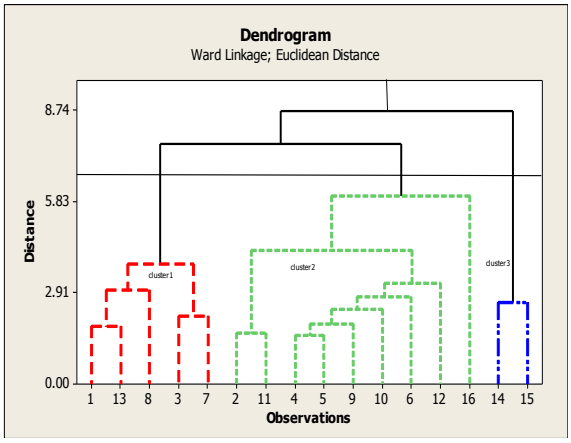
بالاترین ارتفاع (۳۲/۳۳ سانتی متر) در ترکیب تیماری L1-S13 مشاهده شد که نسبت به شاهد ۳۰/۳۸درصد برتری نشان داد. به عقیده داکورا (۲۰۰۲)، لومیکروم[3] و لیپوکیتوالیگوساکاریدها که توسط ریزوبیوم آزاد می شوند باعث تحریک رشد گیاهان می شود. هنگامی که لومیکروم در غلظت ۵۰ نانو مول در ژنوتیپ های سورگوم، سویا، باقلا و لوبیا چشم بلبلی استفاده شد، افزایش زیادی در ارتفاع و رشد گیاه مشاهده شد. ریزوبیوم‌ها با تولید ترکیبات مختلفی مانند اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها، ریبوفلاوین‌ها و ویتامین‌ها و با نفوذ در ریشه گیاهان لگوم و غیرلگوم باعث بهبود رشد می شوند. بیسواز و همکاران (۲۰۰۰) افزایش طول گیاهچه حاصل از بذرهای تلقیح شده با باکتری ریزوبیوم را مشاهده کردند. با توجه به نقش هورمون های گیاهی تحریک کننده رشد از قبیل اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و سیتوکنین‌ها در افزایش تقسیم سلولی و

3-Lomicrom

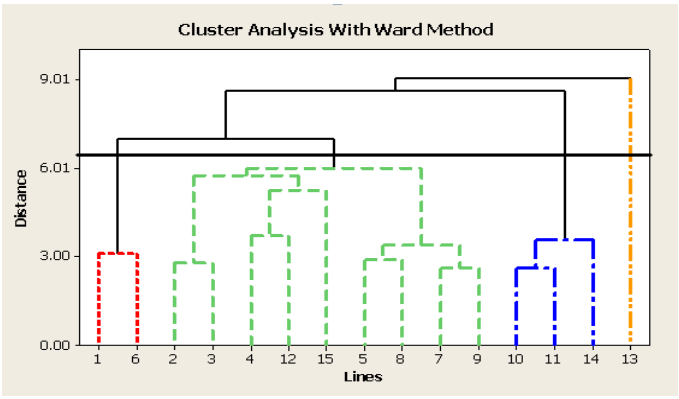
افزایش طول سلول‌ها، ترشح این هورمون ها به‌وسیله باکتری یکی از مهم‌ترین سازوکارهای افزاینده رشد گیاهچه می‌باشد(زهیرو همکاران ۲۰۰٤). یکی از آشکارترین اثرات هورمون های گیاهی تحریک کننده رشد به صورت تحریک رشد کولئوپتیل ذرت در اثر تولید ایندول استیک اسید گزارش شده است (هگاو همکاران ۱۹۹۸). طول ریشه و ساقه گیاه سویا تلقیح شده با سویه‌های مختلف *Brady rhizobium japonicum* تحت تأثیر قرار گرفت. همچنین با آغشته سازی سویا توسط باکتری مشابه افزایش معنی داری بیش از شاهد در محتوای نیتروژن بخش هوایی مشاهده شد. کابوت (۱۹۹٦) ثابت کرد که توانایی حل فسفات در باکتریه‌های ریزوبیومی مهم‌ترین مکانیسم تحریک رشد گیاه در خاک‌هایی با حاصلخیزی متوسط تا زیاد می باشد. از نظر وزن خشک ریشه ونسبت ریشه به بخش هوایی بالاترین وزن خشک ریشه مربوط به ترکیب S9-L6و بیشترین نسبت ریشه به بخش هوایی مربوط به S1-L14 بود.

گروه بندی ها

گروه بندی جدایه ها و لاین ها با استفاده ازداده های استاندارد شده به روش WARD انجام شد که در نهایت به ترتیب به سه وچهار گروه بر اساس دندروگرام‌های حاصل تقسیم شدند(شکل‌های ۳و۲). برای گروه بندی لاین ها بر خلاف جدایه ها (که صرفاً بر اساس صفات اندازه گیری شده گلخانه ای بودند) بر اساس صفات اندازه گیری شده در مزرعه(شاهوردی و همکاران ۲۰۱۲) نیز بودند(جدول های٦و۷). تجزیه تابع تشخیص نیز گروه بندی های انجام شده رامورد تایید قرار دادند(جدول های ٤ و٥).



شکل۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای بر اساس صفات اندازه گیری شده در شرایط گلخانه در جدایه های بومی



شکل۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای بر اساس صفات اندازه گیری شده در شرایط گلخانه وبرخی صفات مزرعه‌ای در لاین های امید بخش شبدر ایرانی

جدول ۴-تابع تشخیص کانونیک برای تعیین محل برش دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای در جدایه ها

آزمون تابع	درجه آزادی	کای اسکویر	ضریب لامبدا	درصد واریانس تجمعی	درصد واریانس نسبی تجمعی	مقادیر ویژه	سطح معنی داری
تابع ۱	۱٤	٤۰/٥۹	۰/۱۷	٥٥/٦	٥٥/٦	۷/۳۹	۰۰۰۰
تابع ۲	٦	۱۹/۳۱	۰/۱٤٥	۱۰۰	٤٦/٤	٥/۸۹	۰/۰۰٤

جدول ٥- تابع تشخیص کانونیک برای تعیین محل برش دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای در لاین ها

آزمون تابع	درجه آزادی	کای اسکور	ضریب لامبدا	درصد واریانس تجمعی	درصد واریانس نسبی تجمعی	مقادیر ویژه	سطح معنی داری
تابع ۱	٤۰	٦۳/۹۷	۰/۰۰۰۰	۸۳/٦	۸۳/٦	۸۳/٥۷	۰/۰۰۹
تابع۲	۲۷	۳۲/۱۳	۰/۰۰٤	۹۲/۱	۸/٥	۸/٤۸	۰/۱۳٦
تابع ۳	۱٦	۲۰/٥	۰/۰٤۳	۹۷	٤/۸	٤/۸۳	۰/۱۹۸
تابع ٤	۷	۹/۰٤	۰/۲٤	۱۰۰	۳	۳/۰۱	۰/۳٥

میانگین ودرصد انحراف از میانگین کل لاین‌ها وجدایه ها برای هر یک از خوشه ها در جداول ٥و٦ آورده شده اند.

جدول ۶- میانگین گروه ها و درصد انحراف از میانگین کل درجدایه های ریزوبیوم بومی شبدر ایرانی

خوشه	جدایه		شاخص همزیستی	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	ارتفاع	نسبت ریشه به ساقه	تعداد کل گره روی ریشه	درصد نیتروژن (N%)
۱	۱،۳،۷،۸،۱۳	میانگین	۱/۲۹	۷/۸	۳/۲۲	۱۹/۲۷	۰/٥٦	۱۸/٥٥	۰/۰۳۷
		درصد انحراف از میانگین کل	۱۰/٦۰	۸/٦٥	۸/۲۳	۲/۲٥	۹/٦	۱۳/٥۱	-۲/٦۳
۲	۲،٤،٥،٦،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱٦	میانگین	۱/۰٦	۷/۰۷	۳/۰۸	۱۸/۷۷	۰/٥۳	۱٤/٤۱	۰/۰٤٥
		درصد انحراف از میانگین کل	-۰/۳۲	-۱/٤٤	۳/۷٦	-۰/٤	۲/٤٥	-۱۱/۷۷	۱٥/٥٥
۳	۱٤،۱٥	میانگین	۱/۱٥	۷/٤۹	۲/۸	۱۹/۲۸	۰/٤	۱۷/۰۸	۰/۰۳۷
		درصد انحراف از میانگین کل	-۱/۸	٤/۳۸	-٥/۸۹	۲/۲۹	-۲۲/۸	٤/٥٦	-۰/٦۳
		میانگین کل	۱/۱۷	۷/۱۷	۲/۹۷	۱۸/۸٥	۰/٥۱	۱٦/۳٤	۰/۰۳۸

جدول۷- میانگین گروه‌ها و درصد انحراف از میانگین کل در لاین‌های شبدر ایرانی

خوشه	لاین		عملکرد علوفه تر (تن در هکتار)	نسبت ریشه به بخش هوایی	درصد پروتئین علوفه (در مزرعه)	نسبت برگ به ساقه (در مزرعه)	وزن ریشه (گلدان)	سرعت رشد مجدد(در مزرعه)	عملکرد علوفه خشک در مزرعه(تن در هکتار)	ارتفاع (سانتیمتر)	تعداد کل گره روی ریشه	وزن خشک اندام هوایی (گلدان)	شاخص همزیستی
۱	۱،٦	میانگین درصد انحراف از میانگین کل	٦٨/٩٦	۰/٤۳	۲۰/۳	۰/۷۱	٦/۳۸	۳٦/٦۱	۱۱/۵٦	۱۳/۷۸	۲۲/۲٦	۱٤/۳	۱/۲٤
	۱،٦		-۰/٦۱	-۱۵/٦۸	-۱/۳٦	۱/٤۲	۱۰۹/۸٦	-۰/۱٦	۰/۵۲	۲٦/۸۵	٦٦/۹۹	۹۹/٤	۵/۰۸
۲	۱۵، ۹، ۸، ۷، ۵، ٤، ۳، ۲	میانگین درصد انحراف از میانگین کل	٦۸/۹۷	۰/۳۷	۲۰/٤	۰/٦۹	۲/٤	۳۷/٦٦	۱۱/۵۱	۱٦/۲٤	۱۸/۷	٦/۷۸	۱/۱٦
			-۰/٦	-۲۷/٤۵	-۰/۸۷	-۱/٤۲	-۲۱/۰۵	۲/٦۹	۰/۰۸٦	-۱۳/۸	٤۰/۲۸	-۵/٤۳	-۰/٦۸
۳	۱٤، ۱۱ ، ۱۰	میانگین درصد انحراف از میانگین کل	٦۷/۷۹	۱/۰۵	۲۱/٤	۰/٦۹	۲/٤	۳۷/۵۷	۱۱/۲۹	۱۵/۲۸	۱۵/٤٤	۲/۵۷	۱/۲۳
			-۲/۳	۱۰۵/۸۸	۳/۹۸	-۱/٤٤	-۲۱/۰۵	۲/٤۵	-۱/۸۲	۱۸/۸۹	۱۵/۸۲	-٤٦٤/۱۵	٤/۲۳
٤	۱۳	میانگین درصد انحراف از میانگین کل	۷۸/۷۸	۰/۳۱	۲۱/۲	۰/۷	۲/۹۲	٤۰/۰۵	۱۱/۹۸	۲۵/۱۵	۲۳/۱٤	۱۰/۲٤	۱/۱۸
			۱۳/۵۳	-۳۹/۲۱	۳/۰۱	۰	-۳/۹٤	۹/۲۱	٤/۱۷	۳۳/٤۹	۷۳/۵۹	٤۲/۸۱	۱/۷۲
		میانگین کل	٦۹/۳۹	۰/۵۱	۲۰/۵۸	۰/۷	۳/۰٤	۳۷/٦۷	۱۱/۵۰	۱۸/۸٤	۱٦/۳۳	۷/۱۷	۱/۱٦۸

برای جدایه ها خوشه اول شامل جدایه های ۷، ۳، ۱، ۸ و ۱۳ بوده که از نظر میانگین کل صفات مورد ارزیابی به‌جز درصد نیتروژن بافت گیاهی ارزش بیشتری از میانگین کل نشان دادند.این گروه از نظر کارایی همزیستی وکاهش وابستگی گیاه به کودهای شیمیایی می تواند در برنامه های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد. گروه دوم در صفات درصد نیتروژن بافت گیاهی، وزن خشک ریشه ونسبت ریشه به بخش هوایی وگروه سوم نیز در صفات تعداد کل گره روی ریشه،ارتفاع ووزن خشک اندام هوایی از میانکین کل ارزش بیشتری داشتند.

برای لاین‌ها خوشه چهارم شامل تک لاین شماره ۱۳ از نظر میانگین کل صفات مورد ارزیابی به‌جز وزن خشک ریشه ونسبت ریشه به بخش هوایی ارزش بیشتری از میانگین کل نشان دادند.این لاین از آن‌جایی که از نظر شاخص‌های مزرعه‌ای نظیر عملکرد علوفه تر وخشک در هکتار، سرعت رشد مجددو به‌ویژه از نظر کیفیت علوفه تولیدی (درصد پروتیین) و شاخص‌های گلخانه‌ای از جمله تعداد گره روی ریشه و شاخص

همزیستی با ارزش بالاتر از میانگین کل می توان آنرا به عنوان خوشه برتر و به عنوان یک لاین با پتانسیل تولیدوکیفیت علوفه بالا ونیز قابلیت همزیستی برتر در راستای اهداف اکولوژیک به‌ویژه کشاورزی کم نهاده پایدار در برنامه های اصلاحی مورد استفاده قرارداد.گروه های اول، سوم ودوم در رتبه های بعدی قرار دارند.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج تحقیق لاین شماره ۱۳ با جدایه بومی RTB_2 به عنوان گروه و ترکیب برتر از نظر شاخص‌های همزیستی و صفات مورد نظر انتخاب شدند. این لاین به عنوان یک لاین اکولوژیک در همزیستی با جدایه بومی RTB_2 قادر خواهد بود ضمن تولید پایدار علوفه از تثبیت نیتروژن بیشتری در مقایسه با سایر لاین‌ها و توده های بومی برخوردار باشد. به کارگیری این ترکیب در مناطق شبدر کاری کشور می-تواند سالانه به کاهش قابل توجه مصرف کودهای نیتروژنه منجر گردد و این گامی مهم در حرکت به سوی اهداف کشاورزی پایدار کم نهاده، سلامت محیط زیست و تولید محصول سالم تلقی می گردد.

منابع مورد استفاده

Akbari G, Allahdadi A, Dashti Sh and Aghaalikhani H, 2012. Soil Microbiology (Microorganisms and plant growth). Publication of Tehran University. (In Persian).

Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R and Lalande R, 2002. Potential of *Rhizobium* and *Brady Rhizobium* species as plant growth promoting Rhizo-bacteria on non-legumes: effect on radish (*Raphanus sativus* L.). Plant and Soil, 204: 57-67.

Asadi Rahmani H., Asgharzadeh A, Khavarzi K and Savagebi G, 2007. Biological productivity of soil. Publication of Jehad e Daneshgahi, (In Persian).

Bagnasco P, 1998. *Fluorescent pseudomonas*: as a bio-control agents against forage legume root pathogenic fungi, Soil Biology and Biochemistry, 30: 1317-1322.

Beck DP, Materon LA and Afandi F, 1993. Practical Rhizobium-Legume technology manual. Technical manual. 19: ICARDA, Alepo, Syria.

Biswas JC, Ladha JK, Dazzo FB, Yanni YG and Rolfe BG, 2000. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. Agronomy Journal, 92: 880-886.

Chabot R, Antoun H and Cescas M, 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*. Plant and Soil, 184: 311-321.

Daei D, Ardakani MR, Regali F and Teimori S, 2009. Alleviation of salinity stress on wheat yield and nutrient uptake using AM fugi under field condition. Journal of Plant Physiology, 166: 617-625.

Dakora FD, 2003. Defining new roles for plant and Rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic Legumes. New Phytology, 157: 39-49.

Dakora FD, Matiru VN, King M and Phillips DA, 2002. Plant growth promotion in legumes and cereals by lumichrome, a rhizobial signal metabolite. Publication of Wallingford UK: CABI.

Erice W and Terses BM, 1987.Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodlutaion competitiveness by *Rhizobium legominosarum*bv.*trifollii* strain T_{24} on clover. Plant Physiology, 85: 335-342.

Golipour H, Nabizadeh A and Nasrollahzadeh A, 2007. Study of nitrogen fixation among native Rhizobium lines in annual lucernes. Iranian Journal of Field Crop Research, 2(2): 78-83. (In Persian).

Gonzalez-Lopez J, Martinez-Toledo MV, Rodelas B, Pozo C and Salmeron V, 1995. Production of aminoacids by free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria. Journal of Plant Physiology, 124: 15-21.

Goto I and Minson DJ, 1977. Prediction of the dry matter digestibility of tropical grasses using a Pepsin cellulase assay. Animal Feed Science and Technology, 2: 247-253.

Hega K and Lino M, 1998. Auxin-growth relationships in maize coleoptiles and pea internodes and control by auxin of the tissue sensitivity to auxin. Plant Physiology, 117: 1473-1486.

Hoflich G, Wiehe W and Kihn G, 1994, Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere micro-organisms. Experimentia, 50: 897-905.

Kaneshiro T, and Kwoleck W, 1985. Stimulated nodulation of soybean by *Rhizobium japonicum* mutant (B-14075) that catabolizes the convection of tryptophan to indol-acetic acid. Plant Science, 42: 141-146.

Khosravi H, Khavarzi K and Mirzashahi K, 2001. Application of inoculum instead of urea fertilizer in Vicia faba in Safiabad of Dezful. Journal of Soil and Water, 12: 244-261. (In Persian).

Kremer R, and Souissi T, 2001.Cyanide production by Rhizo-bacteria and potential for suppression of weed seedling growth. Microbiology, 43: 182-186.

Ligero F, Caba JM, Lluch C and Olivares J, 1986. Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium meliloti*. Plant Physiology, 125: 361-365.

Meghvansi MK, Kamal P and Mahna SK, 2005. Identification of PH tolerant *Brady Rhizobium Japonicum* strains and their symbiotie effectiveness in soybean [*Glycine max* (L.) Merr] in low nutrient soil. African Journal of Biotechnology, 4: 633-666.

Noel T, Shen C, Yost CK, Pharis RP and Hynes MF, 1996. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth promoting Rhizo-bacterium: Direct growth promotion of canola and lettuce. Microbiology, 42: 279-283.

Okereke GR, Onochie CC, Onvkwo AU, Onyeagba E and Ekejindu GD, 2000. Response of introduced *Brady Rhizobium* strains infecting a promiscuous soybean cultivar. World Journal of Microbiology and Biotechnology,16: 43-48.

Shahverdi M and Zamanian M, 2007. Evaluation of forage yield in late ripening of Iranian clover. Publication of Institute of Seed and Plant improvement of Karaj. (In Persian).

Shahverdi M and Zamanian M, 2009. Evaluation of forage yield and other characteristics in late ripening of Iranian clover. Publication of Institute of Seed and Plant improvement of Karaj. (In Persian).

Shahverdi M, Mirshekari B, Asadi Rahman, H., Rashidi V and Ardakani MR, 2012. Effect of biological and reduced rates of chemical fertilizers on forage yield (quantity and quality) in Persian clover. Journal of Beh-Zeraei Keshavarzi, 16(2): 271-287.(In Persian).

Shahverdi M, Zamanian M and Soleymanpour SH, 2009. Evaluation of forage yield and its sustainability in late ripening of Iranian clover. Publication of Institute of Seed and Plant improvement of Karaj. (In Persian).

Wilson JR, 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. Journal of Agricultural Science, 122: 173-182.

Yadgari M, Akbari G and Asadi Rahmani H, 2004. Effect of soybean seed inoculation with different strains of bacteria on nodulation and nitrogen fixation. Iranian Journal of Agronomy Sciences, 6 (1): 35-52. (In Persian).

Zahir AZ, Abbas SA, Khalid A and Arshad M, 2000. Substrate dependence microbial derived plant hormones for improving growth of maize seedlings. Pakistan Journal of Biological Sciences, 3: 289-291.

Zamanian M, 2002. Persian Clover. Publication of Seed and Plant Improvement Institute of Karaj. (In Persian).