

## اثر باکتری *سینوریزوبیوم ملیوتی* و فسفر بر شاخص کلروفیل برگ، غلظت نیتروژن و فسفر ریشه و بخش هوایی یونجه در شرایط تنش خشکی

شاکه مارکاریان<sup>۱</sup>، نصرت اله نجفی<sup>۲\*</sup>، ناصر علی اصغرزاد<sup>۳</sup>، شاهین اوستان<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۲

<sup>۱</sup> - دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

<sup>۲</sup> - دانشیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

<sup>۳</sup> - استاد، گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: n-najafi@tabrizu.ac.ir

### چکیده

آب و عناصر غذایی خاک از عامل‌های مهم کنترل‌کننده رشد گیاهان هستند. مایه‌زنی لگوم‌ها با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و مصرف کود فسفر می‌تواند رشد گیاهان را در شرایط تنش خشکی بهبود بخشد. در یک آزمایش گلخانه‌ای، تأثیر سطوح رطوبت خاک، فسفر و مایه‌زنی باکتری *سینوریزوبیوم ملیوتی* بر شاخص کلروفیل برگ و غلظت برخی عناصر پرمصرف ریشه و بخش هوایی یونجه (*Medicago sativa* L.) رقم قره‌یونجه در یک خاک لوم رسی بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، شامل رطوبت خاک در سه سطح (0.9FC-FC)، فسفات به ترتیب معادل صفر، ۶۰ و ۱۲۰ کیلوگرم فسفر در هکتار) و باکتری در دو سطح (با و بدون مایه‌زنی با *سینوریزوبیوم ملیوتی*) و در سه تکرار انجام شد. شاخص کلروفیل برگ در طول دوره رشد اندازه‌گیری شد. پس از برداشت، غلظت فسفر و نیتروژن بخش هوایی و ریشه یونجه تعیین گردید. نتایج نشان داد که با کاهش رطوبت خاک از 0.9FC-FC به 0.5FC-0.6FC (اعمال تنش کمبود آب)، شاخص کلروفیل برگ و غلظت نیتروژن بخش هوایی یونجه به‌طور معنی‌داری افزایش و غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه آن به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0.01$ ). درحالی‌که غلظت نیتروژن ریشه تغییر معنی‌داری نکرد. مصرف کود فسفر شاخص کلروفیل برگ، غلظت فسفر و نیتروژن بخش هوایی و ریشه یونجه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ( $p < 0.01$ ). مایه‌زنی باکتری شاخص کلروفیل برگ، غلظت فسفر بخش هوایی و غلظت نیتروژن بخش هوایی و ریشه یونجه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ولی بر غلظت فسفر ریشه اثر معنی‌داری نداشت. مصرف فسفر و مایه‌زنی باکتری تحمل گیاه یونجه را در برابر تنش خشکی بهبود بخشید. به‌طور کلی، برای بهبود تغذیه نیتروژن و فسفر و رشد گیاه یونجه و افزایش تحمل آن در برابر تنش خشکی، مصرف ۳۰ یا ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک به‌همراه مایه‌زنی باکتری *سینوریزوبیوم* در شرایط با و بدون تنش خشکی می‌تواند توصیه شود.

واژه‌های کلیدی: خشکی، *سینوریزوبیوم ملیوتی*، فسفر، نیتروژن، یونجه

## Effects of *Sinorhizobium meliloti* Bacterium and Phosphorus on Leaf Chlorophyll Index, Nitrogen and Phosphorus Concentrations in Alfalfa Shoot and Root under Drought Stress Conditions

Sh<sup>1</sup> Markarian, N Najafi<sup>2\*</sup>, N Aliasghar zad<sup>3</sup>, Sh Oustan<sup>2</sup>

Received: 16 September 2014

Accepted: 1 February 2015

<sup>1</sup>M. Sci. Student, Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran

<sup>2</sup> Assoc. Prof., Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran

<sup>3</sup> Prof., Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran

\*Corresponding Author, Email: n-najafi@tabrizu.ac.ir

### Abstract

Soil water and nutrients are important factors controlling plants growth. Legumes inoculation with nitrogen fixing bacteria and phosphorus (P) fertilization can improve plants growth in drought stress conditions. The effects of *Sinorhizobium meliloti* inoculation, soil water and P levels on leaf chlorophyll index, nitrogen (N) and P concentrations in alfalfa (*Medicago sativa* cv. Ghareyonjeh) shoot and root were studied by conducting an experiment under greenhouse conditions in a clay loam soil. The study was performed as a factorial experiment based on a randomized complete blocks design including soil water conditions at three levels (0.5FC-0.6FC, 0.7FC-0.8FC and 0.9FC-FC), P at three levels (0, 30 and 60 mg P kg<sup>-1</sup> soil equal to 0, 60 and 120 kg P ha<sup>-1</sup> as Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, respectively) and bacterium inoculation at two levels (with and without *S. meliloti* inoculation), with three replications. The leaf chlorophyll index was measured during the growth period. After harvesting, concentrations of N and P in the alfalfa shoot and root were measured. The results indicated that the leaf chlorophyll index and shoot N concentration were significantly increased by decreasing soil moisture content from 0.9FC-FC to 0.5FC-0.6FC (water deficit stress) and shoot and root P concentrations were significantly decreased ( $p < 0.01$ ), while the root N concentration was not change significantly. The P fertilization caused increment of the leaf chlorophyll index, shoot and root N and P concentrations ( $p < 0.01$ ). The leaf chlorophyll index, shoot and root N and shoot P concentrations were increased by *S. meliloti* inoculation but the root P concentration was not change significantly. Application of P and *S. meliloti* inoculation improved the drought stress tolerance of alfalfa. In general, in order to improve nutrition and growth of alfalfa and its drought stress tolerance, application of 30 or 60 mg P kg<sup>-1</sup> soil and *S. meliloti* inoculation can be recommended under with and without drought stress conditions.

**Keywords:** Alfalfa, Drought, Nitrogen, Phosphorus, *Sinorhizobium meliloti*

### مقدمه

سرعت عرضه عناصر غذایی به ریشه از طریق انتشار و جریان توده‌ای و در نتیجه فراهمی عناصر غذایی کاهش می‌یابد (علیزاده ۱۳۷۴، مارشنر ۱۹۹۵، هاولین و همکاران ۲۰۰۴). بنابراین، مدیریت تغذیه گیاه در شرایط تنش یکی از راهبردهای مهم در تولید محصولات کشاورزی بوده (محمدخانی و حیدری ۲۰۰۷) و گیاهی که خوب تغذیه شده باشد، در برابر خشکی مقاومت بهتری خواهد داشت (لال و همکاران ۱۹۹۳).

تنش‌های محیطی سبب کاهش تولید محصولات کشاورزی در سطح جهان می‌شوند. در میان تنش‌های محیطی، خشکی مهم‌ترین عامل محدودکننده رشد و تولید گیاهان زراعی در ایران و جهان هست (کیوان ۲۰۱۰). یکی از اثرهای زیان‌بار تنش خشکی مختل شدن جذب عناصر غذایی به‌وسیله گیاه است که علاوه بر هدر رفت کود، باعث بروز تنش کمبود عناصر غذایی در گیاه و کاهش رشد گیاه می‌شود. با کاهش رطوبت خاک

زیستی و زیان اقتصادی ایجاد کرده است (رای ۲۰۰۵). همزیستی بین گیاهان خانواده لگوم به‌ویژه یونجه با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن یکی از روابط بسیار سودمند بوده که نه‌تنها مشکلات مذکور را ندارد بلکه سبب افزایش عملکرد یونجه و حاصلخیزی خاک نیز می‌شود (پناه پور ۱۳۸۶). در لگوم‌ها، تنش خشکی نه‌تنها عامل محدودکننده عملکرد گیاه است، بلکه باعث اختلال در عملکرد گره‌ها نیز می‌شود (اشرف و ایرام ۲۰۰۵). در حقیقت فرآیند تثبیت نیتروژن توسط باکتری‌ها در گره‌های موجود در ریشه گیاهان لگوم حساسیت بیشتری به تنش کمبود آب دارد (سراج و همکاران ۱۹۹۹، سینکر و همکاران ۲۰۰۱). اسپرنت و زهران (۱۹۸۸) و بوردلیو و پرووست (۱۹۹۴) گزارش کردند که بر اثر کمبود آب در خاک تثبیت نیتروژن در گیاهان لگوم (باقلا) کاهش‌یافته و بر اثر آن عملکرد نیز کاهش یافت. با این حال، گیاهان لگوم مایه‌زنی شده با باکتری‌های سینوریزوبیوم در برابر خشکی، تحمل چشمگیری داشتند زیرا نیتروژن با تأثیر بر انباشت متابولیت‌ها در شرایط خشکی احتمالاً به تنظیم اسمزی کمک می‌کند (زراعتکار و همکاران ۱۳۸۹).

یونجه (*Medicago sativa* L.) یک محصول اساسی است که در مناطق خشک و نیمه‌خشک رشد می‌کند. به دلیل ریشه‌های مستقیم و عمق نفوذ آن‌ها، این گیاه قادر است آب را حتی از عمق حدود ۵ متری و بیشتر جذب کند. این مزیت موجب استمرار زندگی گیاه در شرایط خشکی می‌شود. کمبود آب مهم‌ترین عامل طبیعی است که بر رشد یونجه اثر می‌گذارد و تولید آن را محدود می‌کند (حمیدی و صفرنژاد ۲۰۱۰). با توجه به شرایط اقلیمی و خاکی کشور و لزوم استفاده از کودهای زیستی برای تحقق کشاورزی پایدار، در این تحقیق، اثر سطوح رطوبت خاک و فسفر بر شاخص کلروفیل برگ‌ها، غلظت نیتروژن و فسفر ریشه و بخش هوایی یونجه با و بدون مایه‌زنی با سینوریزوبیوم ملیوتی بررسی شد.

در تغذیه گیاهان، فسفر یکی از عناصر غذایی پرمصرف بوده و کمبود آن در گیاهان دومین مشکل عمده حاصلخیزی خاک در سراسر دنیا هست (لیندزی و همکاران ۱۹۸۹). مصرف کود فسفر می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی رشد گیاهان را در شرایط تنش خشکی بهبود دهد. این تأثیر مثبت فسفر بر افزایش رشد گیاهان در شرایط کمبود آب به علت افزایش کارایی مصرف آب، هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز، پایداری بالای دیواره سلولی و تأثیر آن در روابط آبی گیاه هست (یونکای و شمیت‌هالتر ۲۰۰۵). ساردانز و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که با کاهش میزان رطوبت خاک، غلظت فسفر در گیاهان مرتعی مورد مطالعه کاهش یافت. آنان این کاهش را به کاهش فعالیت آنزیم فسفاتاز در خاک، کاهش رشد ریشه و کاهش ظرفیت فتوسنتز گیاه نسبت دادند. مصرف کود فسفر در شرایط تنش کمبود آب، سبب افزایش کارایی مصرف آب گیاه ارزن (پاین و همکاران ۱۹۹۲) و افزایش تحمل شبدر در برابر خشکی (سینگ و سیل ۲۰۰۰) شده است. اسلاتون و همکاران (۲۰۰۷) گزارش دادند که مصرف کود فسفر نه‌تنها عملکرد و کیفیت دانه گندم را افزایش می‌دهد بلکه مقاومت گندم به خشکی را نیز از طریق افزایش رشد ریشه آن بهبود می‌بخشد. مطلبی‌فرد و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده کردند که کمبود فسفر در خاک می‌تواند هدایت روزنه‌ای برگ‌های سیب‌زمینی را به مقدار زیادی کاهش دهد. به نظر آنان این پدیده ممکن است ناشی از افزایش حساسیت روزنه‌ها به اسید آبسزیک در شرایط کمبود فسفر باشد.

نیتروژن یکی از عناصر غذایی پرمصرف در تغذیه گیاه است که کمبود آن در گیاهان بیشترین گسترش را داشته و کودهای شیمیایی نیتروژن بیشترین مصرف را در جهان و ایران دارند (هاولین و همکاران ۲۰۰۴). کودهای شیمیایی نیتروژن دارای حل‌پذیری زیادی بوده و به دلیل هدررفت زیاد از طریق نیترات‌زدایی، تصعید و آبشویی، کارایی مصرف آن‌ها نیز کم بوده (کندی ۲۰۰۴) و مصرف زیاد آن‌ها مشکلات زیست‌محیطی مختلفی مانند کاهش کیفیت خاک، آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی، کاهش تنوع

## مواد و روش‌ها

شیمیایی وجود داشته باشد، از 0.9FC-FC به‌عنوان بدون تنش خشکی، 0.7FC-0.8FC به‌عنوان تنش خشکی کم و 0.5FC-0.6FC به‌عنوان تنش خشکی متوسط استفاده شد. دامنه رطوبت هم به این دلیل در نظر گرفته شد که در طول شب و روز نمی‌توان رطوبت خاک گلدان‌ها را در یک مقدار مشخص ثابت نگه داشت. انتخاب سطوح فسفر با توجه به تخمین میزان جذب فسفر به‌وسیله گیاه یونجه در طی دوره رشد و با توجه به نتایج بررسی‌های رودریگوز و گودریان (۱۹۹۵) و جین و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. مقدار سه کیلوگرم از خاک مورد آزمایش برای هر گلدان توزین سپس بر اساس نتایج آزمون خاک، نتایج آزمایش‌های قبلی و غلظت مطلوب عناصر غذایی در گیاه یونجه (ملکوتی و غیبی ۱۳۷۹)، ۷/۵ میلی‌گرم آهن از منبع سولفات آهن ( $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) و ۶/۰ میلی‌گرم روی از منبع سولفات روی ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) تولیدشده به‌وسیله شرکت AppliChem به‌صورت محلول به خاک هر گلدان افزوده و خوب مخلوط شد. در تیمارهای دارای فسفر، فسفر از منبع مونوکلسیم فسفات ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) تولیدشده به‌وسیله شرکت SIGMA-ALDRICH و به‌صورت محلول به خاک افزوده و خوب مخلوط شد. برای آماده‌سازی بذرهای یونجه (*Medicago sativa* L.) رقم قره‌یونجه، ابتدا بذرهای سالم یونجه به‌وسیله محلول کلرید سدیم (پنج درصد) از بذرهای ناسالم جدا شدند. پس از شستشوی بذر با آب معمولی و با آب مقطر و ضدعفونی کردن با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، بذرهای لای پارچه متقالی تمیز و مرطوب قرار داده و به مدت سه روز در دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا جوانه بزنند. به‌منظور تلقیح بذور جوانه‌دار شده، از سوسپانسیون باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی دارای کارایی همزیستی و صفات محرک رشدی بالا با رقم قره‌یونجه (اسفندیاری ۱۳۸۲، اصغری و علی‌اصغرزاد ۱۳۸۳) و تهیه‌شده از آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه تبریز استفاده گردید. باکتری در محیط کشت YMA<sup>۲</sup> با pH = ۶/۸ تکثیر شد تا کنی‌های شیرین‌رنگ بر روی محیط کشت مذکور ظاهر شوند.

این پژوهش در سال ۱۳۹۱ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز و در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. خاکی با بافت لوم رسی شنی از مزرعه‌ای در اطراف روستای اسپیران در شمال غرب تبریز با طول جغرافیایی ۳۳° ۱۹' ۴۶" شرقی و عرض جغرافیایی ۵۷° ۱۵' ۲۸" شمالی انتخاب و از عمق صفر تا ۲۵ سانتی‌متری نمونه‌برداری شد و بعد از هوا خشک شدن، کوبیده و از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. علت انتخاب خاکی با بافت لوم رسی این بود که گیاه یونجه در خاک‌هایی با بافت متوسط تا سنگین و pH خنثی تا قلیایی به‌خوبی رشد می‌کند (کریمی ۱۳۶۹). سپس ویژگی‌های مهم خاک شامل بافت (کلوته ۱۹۸۶)، pH و EC (مکالین ۱۹۸۲)، درصد رطوبت اشباع، کربنات کلسیم معادل (ریچاردز ۱۹۶۹)، درصد کربن آلی (نلسون و سامرز ۱۹۸۲)، نیتروژن کل (برمنز و مولوانی ۱۹۸۲)، فسفر قابل‌جذب (کیو<sup>۱</sup> ۱۹۹۶)، سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم قابل‌جذب (جونز ۲۰۰۱) و آهن، منگنز، روی و مس قابل‌جذب (لیندزی و نورول ۱۹۷۸) اندازه‌گیری گردید. پس از انجام مراحل بالا، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، شامل شرایط رطوبتی خاک در سه سطح (0.9FC-FC، 0.7FC-0.8FC و 0.5FC-0.6FC)، فسفر در سه سطح (صفر، ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک) و مایه‌زنی باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی در دو سطح (با و بدون مایه‌زنی) و در سه تکرار اجرا شد. انتخاب سطوح رطوبت خاک بر اساس نتایج بوردلئو و پرووست (۱۹۹۴) و سامارا (۲۰۰۵) صورت گرفت. بوردلئو و پرووست (۱۹۹۴) اعلام کردند که کاهش رطوبت خاک از ۶۰ تا ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای سبب کاهش تعداد و دوام گره‌ها در ریشه یونجه و کاهش تثبیت زیستی نیتروژن می‌شود. سامارا (۲۰۰۵) رطوبت FC را به‌عنوان سطح بدون تنش خشکی، رطوبت 0.5FC-0.6FC را تنش متوسط و رطوبت 0.2FC را تنش شدید در نظر گرفت. در این پژوهش نیز برای اینکه گیاهان از بین نروند و ماده خشک کافی برای انجام تجزیه‌های

<sup>۱</sup> -Kuo

(۱۹۹۴). تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شد.

### نتایج و بحث

برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود خاک مذکور دارای بافت لوم رسی و با کربنات کلسیم معادل نسبتاً زیاد، دارای ماده آلی کم و بدون مشکل شوری یا قلیائیت و مقدار رطوبت FC آن ۱۸/۵٪ بود. همچنین مقدار فسفر و روی قابل‌جذب آن کمتر از سطح بحرانی مورد نیاز بسیاری از گیاهان زراعی بود (جونز ۲۰۰۱، هزلتون و مورفی ۲۰۰۷).

**شاخص کلروفیل برگ:** تجزیه واریانس نشان داد که اثرهای اصلی رطوبت خاک، فسفر و باکتری سینوریزوبیوم و اثر متقابل رطوبت خاک × فسفر بر شاخص کلروفیل برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار، ولی اثرهای متقابل رطوبت خاک × مایه‌زنی باکتری، فسفر × مایه‌زنی باکتری و رطوبت خاک × فسفر × مایه‌زنی باکتری غیر معنی‌دار بودند (جدول ۲). مقایسه میانگین‌های شاخص کلروفیل برگ برای اثر اصلی رطوبت خاک در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که شاخص کلروفیل برگ در شرایط رطوبت خاک 0.5FC-0.6FC، ۲/۴ درصد و در 0.7FC-0.8FC، ۲/۱ درصد بیشتر از 0.9FC-FC بود. شاخص کلروفیل برگ در شرایط رطوبت خاک 0.7FC-0.8FC با 0.5FC-0.6FC تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳). این نتایج با گزارش بری‌دمایر (۲۰۰۵) در گیاهان گندم و ذرت مطابقت داشت. وی بیان داشت که شاخص کلروفیل برگ (عدد دستگاه کلروفیل‌سنج) گندم و ذرت در شرایط تنش خشکی نسبت به شاهد (آبیاری مطلوب) بیشتر بود؛ وی دلیل افزایش شاخص کلروفیل برگ در شرایط تنش خشکی را به بیشتر بودن سرعت تشکیل کلروفیل از سرعت رشد گیاه نسبت داد.

برای تهیه تعلیق باکتری، از محیط کشت مایع YMB<sub>3</sub> با pH=۶/۸ استفاده شد. محیط مذکور پس از تلقیح با سویه خالص‌شده در داخل شیکر انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سلسیوس با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد (اصغری و علی‌اصغرزاد ۱۳۸۳). بذرهاى جوانه‌دار شده در تیمارهای مایه‌زنی با سینوریزوبیوم ملیوتی با تعلیق باکتری و در تیمارهای بدون مایه‌زنی با محیط کشت استریل YMB عاری از باکتری آغشته شدند. تعداد ۲۰ بذر یونجه جوانه‌دار شده انتخاب و در خاک هر گلدان با رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای کاشته شد. رطوبت تمام گلدان‌ها تا استقرار کامل گیاهان از طریق توزین گلدان‌ها و افزودن روزانه آب در حدود ظرفیت مزرعه‌ای نگهداری شد. بعد از اطمینان از استقرار گیاهچه‌ها (زمانی که به مرحله ۳ برگی رسیدند)، گیاهان به تعداد ۱۰ عدد در هر گلدان تنک شدند. سطوح مختلف رطوبت خاک در مرحله ۸ برگی گیاه اعمال شد. میزان دقیق نوسان رطوبت از ظرفیت مزرعه، از طریق توزین روزانه گلدان‌ها (یک تا دو بار در روز) و محاسبه میزان کاهش وزن آن‌ها بر اثر تبخیر و تعرق محاسبه شد. وقتی حدود ۱۰ درصد گیاهان به گل رفتند، اندام‌های هوایی از محل طوقه قطع شدند و وزن‌تر آن‌ها با استفاده از ترازوی ۰/۰۱± گرم تعیین و سپس با آب معمولی و آب مقطر شسته شدند. ریشه نیز پس از برداشت و جداسازی از خاک، ابتدا با آب معمولی و سپس با آب مقطر شسته شده و در دستگاه خشک‌کن نمونه‌های گیاهی (آون فن‌دار) منتقل و در دمای ۷۵ درجه سلسیوس تا زمان خشک شدن کامل و رسیدن به وزن ثابت (۷۲ ساعت)، نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از توزین با استفاده از آسیاب دارای تیغه استیل پودر شده و از الک ۰/۵ میلی‌متری عبور داده شدند. هضم نمونه‌های گیاهی به‌روش اکسایش تر (والینگ و همکاران ۱۹۸۹) انجام شد. در عصاره‌های گیاه، غلظت فسفر به‌روش وانادومولیدو فسفریک اسید و با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل PD-303 ساخت شرکت Apel ژاپن تعیین شد. نیتروژن با استفاده از روش کج‌لادل اندازه‌گیری شد که شامل مراحل هضم، تقطیر و تیتر کردن بود (والینگ و همکاران ۱۹۸۹، راول

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش گلخانه‌ای.

گروه بافت	شن (%)	سیلت (%)	رس (%)	کربنات کلسیم معادل (%)	SP (%)	pH <sub>(۰.۱)</sub>	EC(dS m <sup>-1</sup> ) <sub>(۰.۱)</sub>
لوم رسی شنی	۴۷	۲۳	۳۰	۱۵/۲۵	۴۴/۴	۸	۰/۴۷

ادامه جدول ۱										
Cu	Zn	Mn	Fe	Mg	Ca	Na	K	P	N کل	کربن آلی
قابل استفاده (mg kg <sup>-1</sup> )										(%)
۲/۲	۰/۵۲	۷/۰۱	۳/۹۸	۷۹۷/۸	۷۲۳۴/۷	۳۲۵/۷	۵۵۶/۴	۸/۷	۰/۰۲	۰/۵۸

را تنش متوسط و رطوبت 0.2FC را تنش شدید در نظر گرفته است، در پژوهش ما نیز با توجه به سطوح رطوبت خاک، تنش خشکی متوسط بر گیاه یونجه اعمال شده است و به همین دلیل، نتایج ما با گزارش نونامی و همکاران (۱۹۹۷) مطابقت دارد.

مقایسه میانگین‌های شاخص کلروفیل برگ برای اثر اصلی فسفر در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که شاخص کلروفیل برگ با مصرف ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک ۱/۹ درصد بیشتر از سطح بدون کود فسفر (شاهد) و ۲/۷ درصد بیشتر از سطح ۳۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که شاخص کلروفیل برگ در سطح ۳۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک با سطح بدون کود فسفر (شاهد) تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳). افزایش این شاخص با مصرف کود فسفر را می‌توان به نقش فسفر در ذخیره و انتقال انرژی (مارشسر ۱۹۹۵) نسبت داد که همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود غلظت نیتروژن بخش هوایی یونجه با مصرف کود فسفر در خاک به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. با توجه به نقش نیتروژن در تشکیل کلروفیل، به‌نظر می‌رسد کود فسفر از طریق افزایش غلظت نیتروژن باعث افزایش شاخص کلروفیل برگ شده است. با توجه به رابطه مثبت میان شدت فتوسنتز و غلظت کلروفیل (چانگو و مکوتی ۲۰۰۱) و رابطه مثبت میان شدت فتوسنتز و رشد گیاه (نجفی و همکاران ۱۳۸۹)، با افزایش غلظت کلروفیل، محصولات فتوسنتزی زیاد شده و در نتیجه رشد گیاه در حضور کود فسفر بهبود می‌یابد.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود غلظت نیتروژن بخش هوایی یونجه با اعمال تنش کمبود آب در خاک افزایش یافت. احتمالاً این افزایش بر اثر وقوع پدیده اثر تغلیظ (مارشسر ۱۹۹۵) انجام شده است. با توجه به نقش نیتروژن در تشکیل کلروفیل و وجود چهار اتم نیتروژن در ساختمان کلروفیل (مارشسر ۱۹۹۵)، به نظر می‌رسد تنش کمبود آب از طریق افزایش غلظت نیتروژن باعث افزایش شاخص کلروفیل برگ شده است. همچنین، با توجه به اینکه توسعه سطح برگ‌ها حساسیت زیادی به تنش کمبود آب دارد و کاهش سطح برگ‌ها یکی از نخستین نشانه‌های تنش کمبود آب در گیاه می‌باشد (بوم و توماس ۱۹۹۸)، به نظر می‌رسد بر اثر کاهش سطح برگ، تعداد مولکول‌های کلروفیل در واحد سطح برگ بر اثر پدیده تغلیظ (مارشسر ۱۹۹۵) افزایش یافته و شاخص کلروفیل برگ زیاد شده است. با این حال، آنتولین و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند که با افزایش تنش خشکی، میزان کلروفیل برگ کاهش ولی نسبت کلروفیل a به کلروفیل b افزایش یافت زیرا تنش خشکی غلظت کلروفیل b را بیشتر از کلروفیل a کاهش داد و افزایش این نسبت سبب تیره شدن برگ‌ها و افزایش شاخص کلروفیل شد. میهالوویچ و لازاروویچ (۱۹۷۷) کاهش غلظت کلروفیل برگ در شرایط تنش خشکی را به افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز نسبت دادند که سبب تجزیه کلروفیل می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که در تنش خشکی ملایم، به‌دلیل وجود سلول‌های بیشتر در واحد وزن برگ، میزان کلروفیل برگ افزایش می‌یابد (نونامی و همکاران ۱۹۹۷). با توجه به اینکه سامارا (۲۰۰۵) رطوبت FC را به‌عنوان سطح بدون تنش خشکی، رطوبت 0.5FC-0.6FC

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر رطوبت خاک، فسفر و مایه زنی با سینوریزوبیوم ملیوتی بر شاخص کلروفیل برگ و غلظت نیتروژن و فسفر ریشه و بخش هوایی یونجه.

میانگین مربعات					درجه آزادی	منبع تغییر
غلظت فسفر ریشه	غلظت فسفر بخش هوایی	غلظت نیتروژن ریشه	غلظت نیتروژن بخش هوایی	شاخص کلروفیل برگ		
۰/۰۲۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۳ <sup>ns</sup>	۲/۸۲۷ <sup>ns</sup>	۰/۱۶۶ <sup>ns</sup>	۱/۳۲ <sup>ns</sup>	۲	بلوک
۱/۰۰۵ <sup>**</sup>	۰/۲۵۲ <sup>**</sup>	۱۱/۰۵ <sup>*</sup>	۳۱/۸۸ <sup>*</sup>	۱۲/۸۵ <sup>**</sup>	۲	رطوبت خاک
۵/۲۶۳ <sup>**</sup>	۱/۳۸۳ <sup>**</sup>	۳۶/۱۱ <sup>**</sup>	۲۹/۰۹ <sup>ns</sup>	۱۴/۴۶ <sup>**</sup>	۲	فسفر
۰/۰۰۰۰۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۷۶۵ <sup>**</sup>	۶۲۳/۷۸ <sup>**</sup>	۴۲۳/۷۰ <sup>**</sup>	۱۲/۸۱ <sup>**</sup>	۱	باکتری
۰/۰۸۴ <sup>**</sup>	۰/۰۳۴ <sup>ns</sup>	۱۱/۲۷ <sup>*</sup>	۱۴/۲۵ <sup>ns</sup>	۹/۴۵ <sup>**</sup>	۴	رطوبت × فسفر
۰/۵۰۸ <sup>**</sup>	۰/۰۵۶ <sup>ns</sup>	۱۷/۶۱ <sup>**</sup>	۹/۵۵ <sup>ns</sup>	۰/۵۳۴ <sup>ns</sup>	۲	رطوبت × باکتری
۱/۱۰ <sup>**</sup>	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۱۴/۹۱ <sup>*</sup>	۵/۴۵ <sup>ns</sup>	۱/۱۳۷ <sup>ns</sup>	۲	فسفر × باکتری
۰/۰۸۷ <sup>**</sup>	۰/۰۱۲ <sup>ns</sup>	۷/۱۶ <sup>ns</sup>	۱۲/۹۱ <sup>ns</sup>	۱/۵۰۹ <sup>ns</sup>	۴	رطوبت × فسفر × باکتری
۰/۰۱۶	۰/۰۲۳	۳/۳۱	۹/۳۳	۰/۵۹۲	۳۴	خطای آزمایشی
۴/۷۳	۴/۰۸	۴/۴۰	۴/۹۲	۱/۲۰		ضریب تغییرات (%)

ns، \* و \*\* به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

(۲۰۰۱) و رابطه مثبت میان شدت فتوسنتز و رشد گیاه (نجفی و همکاران ۱۳۸۹)، با افزایش غلظت کلروفیل، رشد گیاه مایه زنی شده بهبود یافته است (باشان و دباشان ۲۰۰۵). افزایش غلظت کلروفیل برگ در تیمارهای مایه زنی شده با ریزوبیوم نسبت به تیمارهای شاهد (بدون مایه زنی) در مطالعات ماتوس و شرودر (۱۹۸۹) و یامان و جینسوی (۱۹۹۶) نیز گزارش شده است.

مقایسه میانگین های شاخص کلروفیل برگ برای اثر متقابل رطوبت خاک و فسفر نشان داد که اثر رطوبت خاک بر شاخص کلروفیل برگ به سطح فسفر مصرفی بستگی داشت. کمترین شاخص کلروفیل برگ در سطوح صفر و ۶۰ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، در رطوبت خاک 0.9FC-FC و در ۳۰ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، در رطوبت خاک 0.5FC-0.6FC مشاهده شد. در هر سه سطح رطوبت خاک، بیشترین شاخص کلروفیل برگ با مصرف ۶۰ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک به دست آمد (شکل ۱). شکل ۱ نشان می دهد که در سطح ۳۰ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، با کاهش رطوبت خاک به 0.5FC-0.6FC (اعمال تنش خشکی) شاخص کلروفیل برگ به طور معنی داری کاهش یافت. یکی از نشانه های سریع اثر تنش کم آبی بر باکتری های

مقایسه میانگین های شاخص کلروفیل برگ برای اثر اصلی مایه زنی باکتری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که شاخص کلروفیل برگ گیاه بر اثر مایه زنی باکتری سینوریزوبیوم ۱/۴ درصد نسبت به بدون مایه زنی باکتری افزایش یافت (جدول ۳). همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود مایه زنی باکتری سینوریزوبیوم غلظت نیتروژن علوفه یونجه را به طور معنی داری افزایش داد که نشان می دهد باکتری سینوریزوبیوم با تثبیت نیتروژن سبب بهبود تغذیه نیتروژن گیاه یونجه می شود. با توجه به نقش نیتروژن در تشکیل کلروفیل (مارشدر ۱۹۹۵)، به نظر می رسد که مایه زنی باکتری سینوریزوبیوم از طریق افزایش غلظت نیتروژن باعث افزایش شاخص کلروفیل برگ شده است. بررسی نشان می دهد که مایه زنی باکتری سینوریزوبیوم باعث بهبود جذب عناصر غذایی مختلف از جمله عناصر غذایی کم مصرف می شود (راشی پور ۱۳۸۱). به نظر می رسد مایه زنی باکتری از این طریق هم باعث افزایش میزان تشکیل کلروفیل در گیاه می شود زیرا برخی عناصر کم مصرف باعث فعال سازی آنزیم هایی می شوند که در فرآیندهای تشکیل کلروفیل شرکت دارند (مارشدر ۱۹۹۵). با توجه به رابطه مثبت میان شدت فتوسنتز و غلظت کلروفیل (چانگو و مکوتی

مایه‌زنی باکتری سبب افزایش شاخص کلروفیل برگ در تمام سطوح رطوبت خاک شد (شکل ۲). با توجه به شکل ۵، این افزایش را می‌توان به بهبود تغذیه نیتروژن گیاه یونجه در شرایط مایه‌زنی باکتری نسبت داد. مقایسه میانگین‌های شاخص کلروفیل برگ برای اثر متقابل فسفر و مایه‌زنی باکتری نشان داد که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش شاخص کلروفیل برگ در تمام سطوح فسفر شد. بیشترین شاخص کلروفیل برگ با مصرف ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک و با مایه‌زنی باکتری به دست آمد (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که مایه‌زنی باکتری و مصرف کود فسفر سبب کاهش اثرهای منفی تنش خشکی متوسط بر رشد گیاه می‌شود.

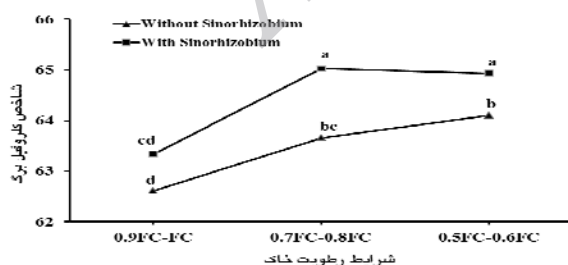
ریزوبیومی تغییرات مورفولوژیکی شامل نامنظم شدن شکل و افزایش طول سلول‌های باکتری هست (بوس و بوتوملی ۱۹۸۹). این تغییرات سبب کاهش گره‌زایی در ریشه لگوم می‌شود (ورال و راگلی ۱۹۷۶). در نتیجه، تثبیت نیتروژن و به دنبال آن جذب نیتروژن در گیاه کاهش یافته و در نتیجه، شاخص کلروفیل برگ نیز کاهش می‌یابد (شکل ۱). با توجه به اینکه غلظت کلروفیل برگ شاخص مستقیم سلامتی گیاه و وضعیت رشد آن است (نجفی و همکاران ۱۳۸۹)، این نتایج نشان می‌دهد که مصرف کود فسفر سبب افزایش تحمل گیاه در برابر تنش خشکی متوسط (کاهش اثرهای منفی تنش خشکی) می‌شود.

مقایسه میانگین‌های شاخص کلروفیل برگ برای اثر متقابل رطوبت خاک و مایه‌زنی باکتری نشان داد که

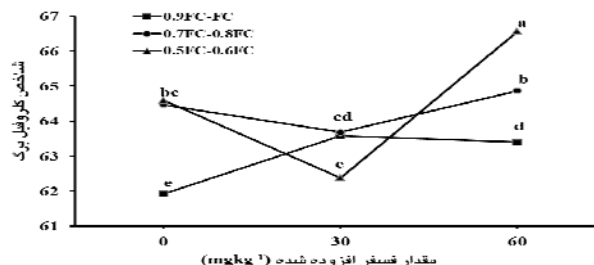
جدول ۳- مقایسه میانگین‌های شاخص کلروفیل و غلظت نیتروژن و فسفر ریشه و بخش هوایی یونجه برای اثر اصلی رطوبت خاک، فسفر و مایه‌زنی با سینوریزوبیوم.

عامل	سطوح	شاخص کلروفیل برگ	غلظت N بخش هوایی	غلظت N ریشه	غلظت P بخش هوایی	غلظت P ریشه
(mg g <sup>-1</sup> dw)						
رطوبت	0.9FC-FC	۶۳/۰ <sup>b</sup>	۶۰/۶ <sup>b</sup>	۴۱/۱ <sup>ab</sup>	۳/۸۷ <sup>a</sup>	۲/۹۰ <sup>a</sup>
	0.7FC-0.8FC	۶۴/۳ <sup>a</sup>	۶۲/۵ <sup>ab</sup>	۴۰/۶ <sup>b</sup>	۳/۷۴ <sup>b</sup>	۲/۷۵ <sup>b</sup>
	0.5FC-0.6FC	۶۴/۵ <sup>a</sup>	۶۳/۱ <sup>a</sup>	۴۲/۳ <sup>a</sup>	۳/۶۳ <sup>c</sup>	۲/۴۴ <sup>c</sup>
فسفر (mg kg <sup>-1</sup> )	۰	۶۳/۷ <sup>b</sup>	۶۰/۷ <sup>b</sup>	۳۹/۷ <sup>b</sup>	۳/۴۶ <sup>c</sup>	۲/۱۵ <sup>c</sup>
	۳۰	۶۳/۲ <sup>b</sup>	۶۲/۳ <sup>a</sup>	۴۲/۳ <sup>a</sup>	۳/۷۶ <sup>b</sup>	۲/۷۰ <sup>b</sup>
	۶۰	۶۴/۹ <sup>a</sup>	۶۳/۲ <sup>a</sup>	۴۲/۱ <sup>a</sup>	۴/۰۲ <sup>a</sup>	۳/۲۳ <sup>a</sup>
مایه‌زنی باکتری	بدون مایه‌زنی	۶۳/۵ <sup>b</sup>	۵۹/۳ <sup>b</sup>	۳۷/۹ <sup>b</sup>	۳/۶۳ <sup>b</sup>	۲/۷۰ <sup>a</sup>
	با مایه‌زنی	۶۴/۴ <sup>a</sup>	۶۴/۹ <sup>a</sup>	۴۴/۷ <sup>a</sup>	۳/۸۷ <sup>a</sup>	۲/۷۰ <sup>a</sup>

در هر ستون، میانگین‌های دارای کمینه یک حرف لاتین مشترک، در سطح احتمال پنج درصد با آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.



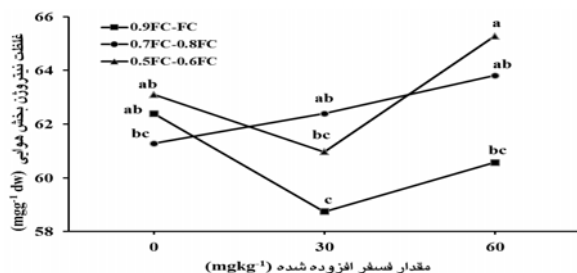
شکل ۲- اثر متقابل رطوبت خاک و باکتری بر شاخص کلروفیل برگ.



شکل ۱- اثر متقابل رطوبت خاک و فسفر بر شاخص کلروفیل برگ.



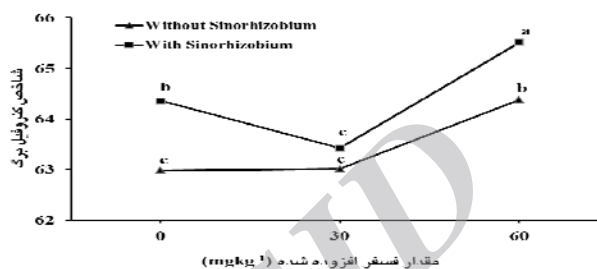
فسفر بر کیلوگرم خاک، رطوبت 0.5FC-0.6FC و با مایه‌زنی باکتری و کمترین شاخص کلروفیل برگ (۶۰/۹) در تیمار بدون کود فسفر (شاهد)، رطوبت 0.9FC-FC و بدون مایه‌زنی باکتری بود (جدول ۴).



شکل ۴- اثر متقابل رطوبت و فسفر بر غلظت نیتروژن بخش هوایی یونجه.

مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن بخش هوایی برای اثر اصلی فسفر در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت نیتروژن بخش هوایی با مصرف ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک به ترتیب ۲/۶ و ۴/۱ درصد نسبت به سطح بدون کود فسفر (شاهد) افزایش یافت. غلظت نیتروژن بخش هوایی در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک تفاوت معنی‌داری با سطح ۳۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک نداشت (جدول ۳). علیزاده و نمازی (۲۰۱۱) گزارش کردند که با افزایش فسفر مقدار نیتروژن در گیاه نرت افزایش یافت. برخی پژوهش‌ها نشان داده است که کمبود فسفر قابل‌جذب گیاه در خاک، سبب کاهش اندازه گره، تثبیت  $N_2$  و عملکرد دانه گیاه لگوم می‌شود (پریرا و بلیس ۱۹۸۹، ایسرائیل ۱۹۹۳، آنکوماه و همکاران ۱۹۹۵). این اثر فسفر را می‌توان به نقش‌های مهم فسفر از جمله در ذخیره و انتقال انرژی، شرکت در ساختمان بسیاری از ترکیب‌های آلی و رابطه هم‌افزایی آن با نیتروژن نسبت داد (مارشور ۱۹۹۵، هاولین و همکاران ۲۰۰۴). اسمیت و کراو (۱۹۹۰) بیان داشتند که با افزایش فسفر قابل‌جذب گیاه در خاک، غلظت نیتروژن برگ گیاهان خانواده لگوم افزایش یافت. ایسرائیل (۱۹۹۳) گزارش داد که با مصرف کود فسفر در خاک، رشد چندگونه لگوم از جمله سویا و غلظت نیتروژن آن‌ها افزایش یافت.

مقایسه میانگین‌های شاخص کلروفیل برگ برای اثر متقابل سه‌جانبه مایه‌زنی باکتری × فسفر × رطوبت خاک در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که بیشترین شاخص کلروفیل برگ (۶۷/۴) در تیمار ۶۰ میلی‌گرم



شکل ۳- اثر متقابل فسفر و باکتری بر شاخص کلروفیل برگ.

#### غلظت نیتروژن بخش هوایی: نتایج حاصل از

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی باکتری سینوریزوبیوم در سطح احتمال یک درصد و اثر اصلی رطوبت خاک در سطح احتمال پنج درصد بر غلظت نیتروژن بخش هوایی معنی‌دار ولی اثر اصلی فسفر و اثرهای متقابل رطوبت خاک × فسفر، رطوبت خاک × مایه‌زنی باکتری، فسفر × مایه‌زنی باکتری و رطوبت خاک × فسفر × مایه‌زنی باکتری غیر معنی‌دار بودند (جدول ۲). مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن بخش هوایی برای اثر اصلی رطوبت خاک در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت نیتروژن بخش هوایی در شرایط رطوبت خاک 0.5FC-0.6FC، ۴/۱ درصد بیشتر از 0.9FC-FC بود. افزایش غلظت نیتروژن بخش هوایی با کاهش رطوبت خاک را می‌توان به اثر تغلیظ نسبت داد یعنی سرعت رشد بخش هوایی گیاه با کاهش رطوبت خاک به 0.5FC-0.6FC بیشتر از سرعت جذب نیتروژن کاهش یافت (مارشور ۱۹۹۵). برخی پژوهش‌گران گزارش داده‌اند که بر اثر کم‌آبی غلظت نیتروژن در برگ‌های گیاه زیاد می‌شود (مجیدیان و همکاران ۱۳۸۷، ایگیلا و همکاران ۲۰۰۱، نصری و همکاران ۲۰۰۸، عبداللطیف و همکاران ۲۰۱۱). غلظت نیتروژن بخش هوایی در شرایط رطوبت خاک 0.7FC-0.8FC، تفاوت معنی‌داری با 0.5FC-0.6FC و 0.9FC-FC نداشت (جدول ۳).

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های شاخص کلروفیل برگ‌ها و غلظت نیتروژن و فسفر ریشه و بخش هوایی یونجه برای اثر متقابل رطوبت خاک × فسفر × مایه‌زنی باکتری سینوریزوبیوم.

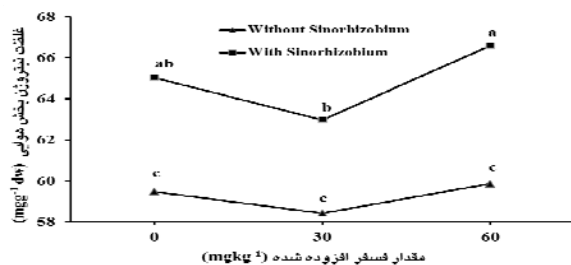
رطوبت	فسفر (mg kg <sup>-1</sup> )	مایه‌زنی باکتری	شاخص کلروفیل	غلظت نیتروژن بخش هوایی	غلظت نیتروژن ریشه	غلظت فسفر بخش هوایی	غلظت فسفر ریشه	
0.9FC- FC	۳۰	بدون مایه‌زنی	۶۰/۹ <sup>l</sup>	۵۸/۱ <sup>ef</sup>	۳۴/۲ <sup>gh</sup>	۳/۵ <sup>jk</sup>	۱/۹ <sup>j</sup>	
		با مایه‌زنی	۶۳/۰ <sup>ghi</sup>	۶۶/۷ <sup>ab</sup>	۴۵/۵ <sup>abc</sup>	۳/۸ <sup>d-h</sup>	۲/۷ <sup>ef</sup>	
		بدون مایه‌زنی	۶۳/۹ <sup>d-h</sup>	۵۷/۲ <sup>ef</sup>	۳۹/۲ <sup>ef</sup>	۳/۷ <sup>e-i</sup>	۲/۸ <sup>e</sup>	
	0.7FC-0.8FC	۳۰	با مایه‌زنی	۶۳/۳ <sup>f-i</sup>	۶۰/۳ <sup>def</sup>	۴۲/۵ <sup>bc</sup>	۳/۹ <sup>b-e</sup>	۳/۳ <sup>cd</sup>
			بدون مایه‌زنی	۶۳/۰ <sup>ghi</sup>	۵۶/۸ <sup>f</sup>	۳۸/۸ <sup>ef</sup>	۴/۰ <sup>bcd</sup>	۳/۵ <sup>ab</sup>
			با مایه‌زنی	۶۳/۸ <sup>e-h</sup>	۶۴/۳ <sup>bcd</sup>	۴۵/۵ <sup>abc</sup>	۴/۳ <sup>a</sup>	۳/۳ <sup>bc</sup>
0.5FC- 0.6FC		۳۰	بدون مایه‌زنی	۶۳/۹ <sup>d-h</sup>	۵۸/۷ <sup>ef</sup>	۳۲/۵ <sup>h</sup>	۳/۳ <sup>kl</sup>	۲/۲ <sup>i</sup>
			با مایه‌زنی	۶۵/۱ <sup>bcd</sup>	۶۳/۹ <sup>bcd</sup>	۴۲/۴ <sup>bcd</sup>	۳/۵ <sup>jk</sup>	۲/۱ <sup>i</sup>
			بدون مایه‌زنی	۶۲/۷ <sup>hi</sup>	۶۰/۹ <sup>c-f</sup>	۴۰/۰ <sup>e</sup>	۳/۶ <sup>f-j</sup>	۲/۸ <sup>e</sup>
	۶۰	۳۰	با مایه‌زنی	۶۴/۶ <sup>b-e</sup>	۶۳/۹ <sup>bcd</sup>	۴۶/۵ <sup>a</sup>	۳/۸ <sup>c-f</sup>	۲/۶ <sup>fg</sup>
			بدون مایه‌زنی	۶۴/۴ <sup>c-f</sup>	۶۲/۱ <sup>b-e</sup>	۳۶/۸ <sup>fg</sup>	۴/۱ <sup>abc</sup>	۳/۷ <sup>a</sup>
			با مایه‌زنی	۶۵/۴ <sup>bc</sup>	۶۵/۴ <sup>abc</sup>	۴۴/۶ <sup>abc</sup>	۴/۱ <sup>ab</sup>	۳/۱ <sup>d</sup>
۰		۳۰	بدون مایه‌زنی	۶۴/۲ <sup>c-g</sup>	۶۱/۷ <sup>b-f</sup>	۳۹/۴ <sup>ef</sup>	۳/۲ <sup>l</sup>	۱/۷ <sup>j</sup>
			با مایه‌زنی	۶۵/۰ <sup>b-e</sup>	۶۴/۷ <sup>bcd</sup>	۴۳/۱ <sup>cd</sup>	۳/۶ <sup>h-k</sup>	۲/۳ <sup>hi</sup>
			بدون مایه‌زنی	۶۲/۴ <sup>i</sup>	۵۷/۲ <sup>ef</sup>	۳۹/۷ <sup>ef</sup>	۳/۶ <sup>z</sup>	۲/۴ <sup>gh</sup>
۳۰	۳۰	با مایه‌زنی	۶۲/۴ <sup>i</sup>	۶۴/۷ <sup>bcd</sup>	۴۴/۰ <sup>abc</sup>	۳/۸ <sup>d-g</sup>	۲/۳ <sup>hi</sup>	
		بدون مایه‌زنی	۶۵/۷ <sup>b</sup>	۶۰/۷ <sup>c-f</sup>	۴۰/۵ <sup>de</sup>	۳/۶ <sup>f-j</sup>	۳/۳ <sup>bc</sup>	
۶۰	۶۰	با مایه‌زنی	۶۷/۴ <sup>a</sup>	۶۹/۹ <sup>a</sup>	۴۶/۳ <sup>ab</sup>	۴/۰ <sup>bcd</sup>	۲/۵ <sup>fgh</sup>	

در هر ستون، میانگین‌های دارای کمینه یک حرف لاتین مشترک، در سطح احتمال پنج درصد با آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.

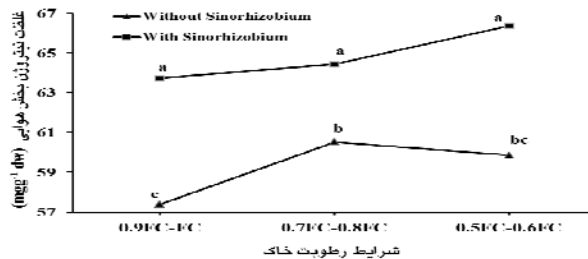
۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۴). مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن بخش هوایی برای اثر متقابل رطوبت خاک و مایه‌زنی باکتری نشان داد که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش غلظت نیتروژن بخش هوایی در تمام سطوح رطوبت خاک شد (شکل ۵).

مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن بخش هوایی برای اثر متقابل فسفر × مایه‌زنی باکتری نشان داد که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش غلظت نیتروژن بخش هوایی در تمام سطوح فسفر شد و غلظت نیتروژن بخش هوایی در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک و با مایه‌زنی باکتری بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۶). پاین و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کردند که با مصرف کود فسفر جذب نیتروژن به‌وسیله گیاه افزایش یافت.

مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن بخش هوایی برای اثر اصلی مایه‌زنی باکتری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت نیتروژن بخش هوایی در مایه‌زنی باکتری ۹/۴ درصد بیشتر از بدون مایه‌زنی باکتری بود (جدول ۳). افزایش غلظت نیتروژن بخش هوایی در تیمار مایه‌زنی باکتری نشان‌دهنده اثربخشی مایه‌زنی باکتری در تثبیت بیولوژیک نیتروژن هوا و انتقال آن به بخش‌های هوایی گیاه است. راثی‌پور (۱۳۸۱) گزارش کرد که مایه‌زنی باکتری برای ریزوبیوم ژاپونیکوم، غلظت نیتروژن بخش هوایی گیاه سویا را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن بخش هوایی برای اثر متقابل رطوبت خاک × فسفر نشان داد که غلظت نیتروژن بخش هوایی در شرایط رطوبت خاک 0.7FC-0.8FC و



شکل ۶- اثر متقابل فسفر و باکتری بر غلظت نیتروژن بخش هوایی یونجه.



شکل ۵- اثر متقابل رطوبت و باکتری بر غلظت نیتروژن بخش هوایی یونجه.

خاک را می‌توان به اثر تغلیظ نسبت داد یعنی سرعت رشد ریشه گیاه با کاهش رطوبت خاک به 0.5FC-0.6FC بیشتر از سرعت جذب نیتروژن کاهش یافت (مارشدر ۱۹۹۵). غلظت نیتروژن ریشه در شرایط رطوبت خاک 0.9FC-FC، تفاوت معنی‌داری با 0.5FC-0.6FC و 0.8FC-FC نداشت (جدول ۳).

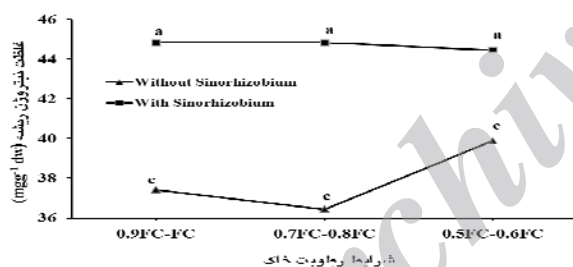
مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن ریشه برای اثر اصلی فسفر در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت نیتروژن ریشه با مصرف ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک به ترتیب ۶/۳ و ۶/۰ درصد نسبت به سطح بدون کود فسفر (شاهد) افزایش یافت. غلظت نیتروژن ریشه در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک تفاوت معنی‌داری با سطح ۳۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک نداشت (جدول ۳). اثر هم‌افزایی می‌تواند به دلیل نقش فسفر در تشکیل گره و تثبیت نیتروژن گیاهان تیره لگوم باشد، جذب فسفر گیاه نقش مهمی را در تأمین نیاز فسفوری باکتری جهت رشد و تثبیت بیولوژیک نیتروژن ایفا می‌کند.

مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن ریشه برای اثر اصلی مایه‌زنی باکتری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت نیتروژن ریشه در مایه‌زنی باکتری ۱۷/۹ درصد بیشتر از بدون مایه‌زنی باکتری بود (جدول ۳). افزایش غلظت نیتروژن ریشه در تیمار مایه‌زنی باکتری نشان‌دهنده اثر بخشی مایه‌زنی باکتری در تثبیت بیولوژیک نیتروژن هوا است. مقایسه غلظت نیتروژن بخش هوایی و غلظت نیتروژن ریشه یونجه نشان داد که مایه‌زنی باکتری غلظت نیتروژن بخش

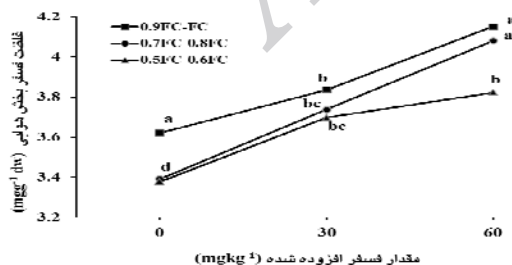
تستکوا و گیورگیو (۲۰۰۳) بیان داشتند که در شرایط کمبود فسفر، وضعیت انرژی سلول‌های ریشه سویا، اندازه گره‌های موجود در ریشه آن و فعالیت آنزیم نیتروژناز در گره‌ها کاهش یافته و ظرفیت گره برای تثبیت N<sub>2</sub> کاهش می‌یابد. مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن بخش هوایی برای اثر متقابل سه‌جانبه مایه‌زنی باکتری، فسفر و رطوبت خاک در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که بیشترین غلظت نیتروژن بخش هوایی (۶۹/۹ mg g<sup>-1</sup> dw) در تیمار ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، رطوبت خاک 0.5FC-0.6FC و با مایه‌زنی باکتری و کمترین غلظت نیتروژن بخش هوایی (۵۶/۸ mg g<sup>-1</sup> dw) در تیمار ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، رطوبت خاک 0.9FC-FC و بدون مایه‌زنی باکتری بود (جدول ۴). غلظت نیتروژن علوفه یونجه در حد مطلوب تا زیاد بود (ملکوتی و غیبی ۱۳۷۹).

**غلظت نیتروژن ریشه:** تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی فسفر و باکتری سینوریزوبیوم و اثر متقابل رطوبت خاک × مایه‌زنی باکتری در سطح احتمال یک درصد و اثرهای متقابل رطوبت خاک × فسفر و فسفر × مایه‌زنی باکتری در سطح احتمال پنج درصد بر غلظت نیتروژن ریشه معنی‌دار بودند، ولی اثر متقابل رطوبت خاک × فسفر × مایه‌زنی باکتری غیر معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن ریشه برای اثر اصلی رطوبت خاک در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت نیتروژن ریشه در شرایط رطوبت خاک 0.5FC-0.6FC، ۳/۹ درصد بیشتر از 0.7FC-0.8FC بود. افزایش غلظت نیتروژن ریشه با کاهش رطوبت

مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن ریشه برای اثر متقابل فسفر × مایه‌زنی باکتری نشان داد که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش غلظت نیتروژن ریشه در تمام سطوح فسفر شد ولی غلظت نیتروژن ریشه در سطح مایه‌زنی با باکتری، با مصرف فسفر تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (شکل ۹). شکل ۹ نشان می‌دهد که نوع اثر متقابل فسفر × مایه‌زنی باکتری به سطح فسفر قابل‌جذب گیاه در خاک بستگی دارد. مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن ریشه برای اثر متقابل سه‌جانبه مایه‌زنی باکتری، فسفر و رطوبت خاک در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که بیشترین غلظت نیتروژن ریشه ( $46 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ ) در تیمار ۳۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک، رطوبت خاک ۰.۷FC-۰.۸FC و مایه‌زنی باکتری و کمترین غلظت نیتروژن ریشه ( $36 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ ) در تیمار بدون کود فسفر (شاهد)، رطوبت خاک ۰.۷FC-۰.۸FC و بدون مایه‌زنی باکتری بود (جدول ۴).



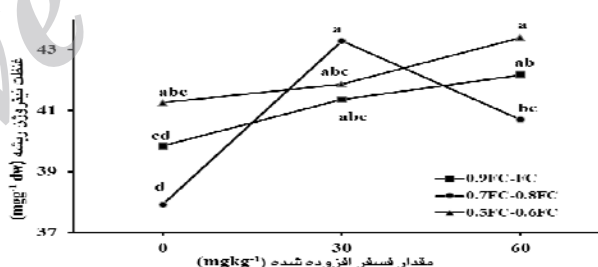
شکل ۸- اثر متقابل رطوبت و باکتری بر غلظت نیتروژن ریشه یونجه.



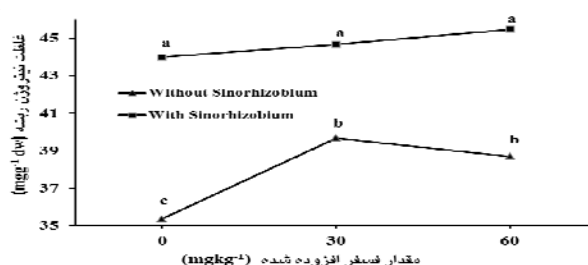
شکل ۱۰- اثر متقابل رطوبت و فسفر بر غلظت فسفر بخش هوایی یونجه.

هوایی را کمتر از غلظت نیتروژن ریشه یونجه افزایش داد (جدول ۳).

مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن ریشه برای اثر متقابل رطوبت خاک × فسفر نشان داد که افزایش فسفر در سطوح ۰.۹FC-FC و ۰.۵FC-۰.۶FC سبب افزایش غلظت نیتروژن ریشه شد (شکل ۷). شکل ۷ نشان می‌دهد که نوع اثر متقابل رطوبت خاک × فسفر به سطوح رطوبت و فسفر بستگی دارد. مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن ریشه برای اثر متقابل رطوبت خاک و مایه‌زنی باکتری نشان داد که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش غلظت نیتروژن ریشه در تمام سطوح رطوبت خاک شد، ولی غلظت نیتروژن ریشه در سطح مایه‌زنی با باکتری، با تغییر رطوبت خاک تغییر معنی‌داری نکرد (شکل ۸). شکل ۸ نشان می‌دهد که نوع اثر متقابل رطوبت خاک × مایه‌زنی باکتری از نظر اثر بر غلظت نیتروژن ریشه به سطح رطوبت خاک بستگی داشت.



شکل ۷- اثر متقابل رطوبت و فسفر بر غلظت نیتروژن ریشه یونجه.



شکل ۹- اثر متقابل فسفر و باکتری بر غلظت نیتروژن ریشه یونجه.

فسفر بر کیلوگرم خاک ۶/۹ درصد بیشتر از سطح ۳۰ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک بود (جدول ۳). این نتایج با گزارش‌های هیرپارا و همکاران (۱۹۹۲) و ایوریو و همکاران (۱۹۹۶) مطابقت داشت. افزایش غلظت فسفر بخش هوایی یونجه بر اثر مصرف کود فسفر را می‌توان به افزایش فراهمی فسفر در خاک و بیشتر بودن سرعت جذب فسفر از سرعت رشد گیاه نسبت داد.

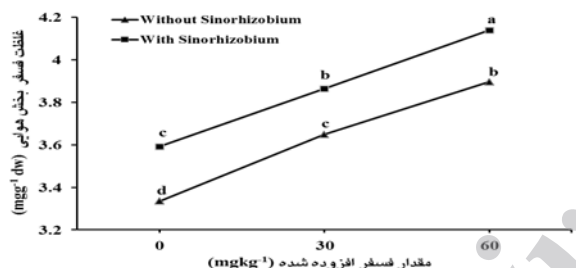
مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر بخش هوایی برای اثر اصلی مایه‌زنی باکتری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت فسفر بخش هوایی در شرایط مایه‌زنی باکتری، ۶/۶ درصد بیشتر از شرایط بدون مایه‌زنی باکتری بود. به عبارت دیگر، مایه‌زنی باکتری سینوریزوبیوم غلظت فسفر بخش هوایی یونجه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (جدول ۳) که با نتایج راثی‌پور (۱۳۸۱) مطابقت داشت. احتمالاً دلیل آن را بتوان تأثیر تغذیه‌ای نیتروژن بر تقویت رشد گیاه و متعاقب آن جذب فسفر و برخی عناصر بیان کرد. برخی پژوهش‌گران اعلام کرده‌اند که باکتری‌های ریزوبیوم به‌عنوان حل‌کننده فسفات نیز عمل می‌کنند و فراهمی فسفر را در خاک افزایش می‌دهند (آسیمی و همکاران ۱۹۸۰).

مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر بخش هوایی برای اثر متقابل رطوبت خاک و فسفر نشان داد که افزایش رطوبت و فسفر خاک سبب افزایش غلظت فسفر بخش هوایی شد و میان آن دو از نظر اثر بر غلظت فسفر بخش هوایی رابطه هم‌افزایی (سینرژستی) وجود داشت (شکل ۱۰). بوم و توماس (۱۹۹۸) گزارش کردند که توانایی گیاهان مورد مطالعه در مقابله با تنش‌های متوسط خشکی به‌وسیله تغذیه کافی فسفر افزایش یافت. مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر بخش هوایی برای اثر متقابل رطوبت خاک و مایه‌زنی باکتری نشان داد که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش غلظت فسفر بخش هوایی در تمام سطوح رطوبت خاک شد و غلظت فسفر بخش هوایی در شرایط رطوبت خاک ۰.۹FC-FC و مایه‌زنی باکتری بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱۱). شکل ۱۱ نشان می‌دهد که نوع اثر متقابل رطوبت خاک و

**غلظت فسفر بخش هوایی:** تجزیه واریانس نشان داد که اثرهای اصلی رطوبت خاک، فسفر و مایه‌زنی باکتری و اثر متقابل رطوبت خاک × فسفر بر غلظت فسفر بخش هوایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار، ولی اثرهای متقابل رطوبت خاک × مایه‌زنی باکتری، فسفر × مایه‌زنی باکتری و رطوبت خاک × فسفر × مایه‌زنی باکتری غیر معنی‌دار بودند (جدول ۲). مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر بخش هوایی برای اثر اصلی رطوبت خاک در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت فسفر بخش هوایی در شرایط رطوبت خاک ۰.۹FC-FC، ۳/۵ درصد بیشتر از ۰.۷FC-۰.۸FC و ۶/۶ درصد بیشتر از ۰.۵FC-۰.۶FC بود. همچنین، غلظت فسفر بخش هوایی در شرایط رطوبت خاک ۰.۷FC-۰.۸FC، ۳/۰ درصد بیشتر از ۰.۵FC-۰.۶FC بود (جدول ۳). به عبارت دیگر، با کاهش رطوبت خاک و وقوع تنش خشکی، غلظت فسفر بخش هوایی یونجه کاهش یافت که با نتایج یاسین اشرف و همکاران (۱۹۹۸) و رضایی و همکاران (۲۰۱۰) در گندم و ریفیعی و همکاران (۱۳۸۳) در ذرت مطابقت داشت. با این حال، کیدمبی و همکاران (۱۹۹۰) گزارش دادند که غلظت فسفر برگ یونجه و اسپرس تحت تأثیر معنی‌دار تنش کمبود آب قرار نگرفت. به نظر می‌رسد بر اثر کاهش رطوبت خاک، حل‌پذیری ترکیب‌های فسفوری و میزان عرضه فسفر به سطح ریشه گیاه از طریق سازوکارهای انتشار و جریان توده‌ای کاهش می‌یابد؛ در نتیجه، سرعت جذب فسفر کاهش یافته و غلظت فسفر در بخش هوایی یونجه نیز کم می‌شود (گراهام و وب ۱۹۹۱، مارشنر ۱۹۹۵). به نظر می‌رسد در شرایط کمبود آب در خاک، سرعت رشد گیاه بیشتر از سرعت جذب فسفر بوده است؛ در نتیجه، غلظت فسفر بخش هوایی یونجه بر اثر رقیق شدن کاهش یافته است (مارشنر ۱۹۹۵).

مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر بخش هوایی برای اثر اصلی فسفر در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت فسفر بخش هوایی با مصرف ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک به ترتیب ۸/۷ و ۱۶/۲ درصد نسبت به سطح بدون کود فسفر (شاهد) افزایش یافت. غلظت فسفر بخش هوایی در سطح ۶۰ میلی‌گرم

سبب افزایش فسفر محلول و قابل جذب گیاهان می‌شوند (باشان و دباشان ۲۰۰۵). مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر بخش هوایی برای اثر متقابل سه‌جانبه مایه‌زنی باکتری × فسفر × رطوبت خاک در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که بیشترین غلظت فسفر بخش هوایی ( $dw^{-1}$ )  $4/3 \text{ mg g}^{-1}$  در تیمار  $0.9FC-FC$  و با مایه‌زنی باکتری و کمترین غلظت فسفر بخش هوایی ( $3/2 \text{ mg g}^{-1}$ ) در تیمار بدون کود فسفر (شاهد)، رطوبت  $0.5FC-0.6FC$  و بدون مایه‌زنی باکتری بود (جدول ۴). غلظت فسفر علوفه یونجه با توجه به گستره مطلوب  $2/6$  تا  $7/0 \text{ mg g}^{-1}$  در حد گزارش‌شده توسط ملکوتی و غیبی (۱۳۷۹)، در حد مطلوب بود.

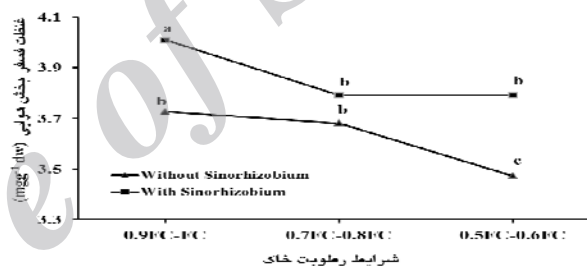


شکل ۱۲- اثر متقابل فسفر و باکتری بر غلظت فسفر بخش هوایی یونجه.

خاک را می‌توان به کاهش انتقال فسفر به سطح ریشه بر اثر کاهش سرعت پخشیدگی، کاهش حل‌پذیری ترکیب‌های فسفوری در خاک، کاهش سرعت معدنی شدن فسفر آلی نسبت داد (مارشمن ۱۹۹۵، هاولین و همکاران ۲۰۰۴). مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر ریشه برای اثر اصلی فسفر در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت فسفر ریشه با مصرف ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک به ترتیب  $25/6$  و  $50/2$  درصد نسبت به سطح بدون کود فسفر (شاهد) افزایش یافت. غلظت فسفر ریشه در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک  $19/7$  درصد بیشتر از سطح ۳۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک بود (جدول ۳). کاربرد فسفر سبب افزایش فسفر در خاک و جذب بیشتر فسفر از خاک توسط گیاه و در نتیجه افزایش غلظت فسفر ریشه شد.

مایه‌زنی باکتری از نظر اثر بر غلظت فسفر بخش هوایی به سطح رطوبت خاک بستگی دارد.

مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر بخش هوایی برای اثر متقابل فسفر و مایه‌زنی باکتری نشان داد که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش غلظت فسفر بخش هوایی در تمام سطوح فسفر شد و غلظت فسفر بخش هوایی در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک و با مایه‌زنی باکتری بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱۲). نداکیدی و همکاران (۲۰۱۱) و ماکوئی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که مایه‌زنی با برادی‌ریزوبیوم سبب افزایش جذب فسفر در گیاهان لگوم شد. باکتری‌های ریزوبیوم با ترشح ترکیباتی مثل اسیدهای آلی، آنزیم‌هایی مثل فیتاز و فسفاتاز و ترشح پروتون



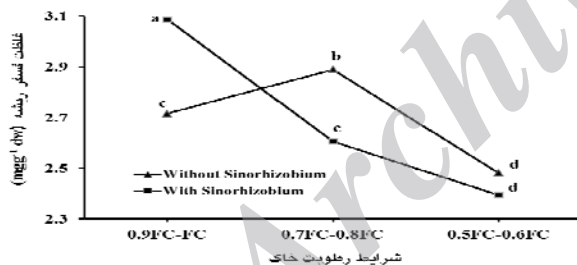
شکل ۱۱- اثر متقابل رطوبت و باکتری بر غلظت فسفر بخش هوایی یونجه.

**غلظت فسفر ریشه:** تجزیه واریانس نشان داد

که اثرهای اصلی رطوبت خاک و فسفر و اثرهای متقابل رطوبت خاک × فسفر، رطوبت خاک × مایه‌زنی باکتری، فسفر × مایه‌زنی باکتری و رطوبت خاک × فسفر × مایه‌زنی باکتری بر غلظت فسفر ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار، ولی اثر اصلی مایه‌زنی باکتری غیر معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر ریشه برای اثر اصلی رطوبت خاک در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت فسفر ریشه در شرایط رطوبت خاک  $0.9FC-FC$ ،  $5/5$  درصد بیشتر از  $0.7FC-0.8FC$  و  $18/9$  درصد بیشتر از  $0.5FC-0.6FC$  بود. همچنین، غلظت فسفر ریشه در شرایط رطوبت خاک  $0.7FC-0.8FC$ ،  $12/7$  درصد بیشتر از  $0.5FC-0.6FC$  بود (جدول ۳). کاهش غلظت فسفر ریشه با کاهش رطوبت

شکل ۱۴ نشان می‌دهد که نوع اثر متقابل رطوبت خاک و مایه‌زنی باکتری از نظر اثر بر غلظت فسفر ریشه به سطح رطوبت خاک بستگی داشت.

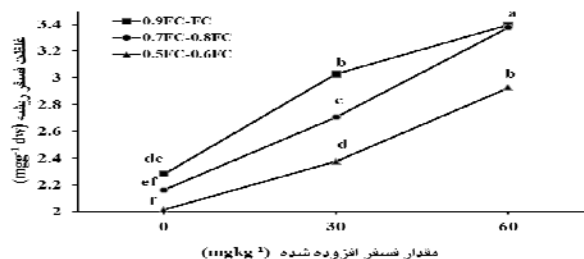
مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر ریشه برای اثر متقابل فسفر و مایه‌زنی باکتری نشان داد که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش غلظت فسفر ریشه در سطح بدون کود فسفر (شاهد) شد و در سطح ۳۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک مایه‌زنی با باکتری تفاوت معنی‌داری با بدون مایه‌زنی نداشت. غلظت فسفر ریشه در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک و بدون مایه‌زنی باکتری بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱۵). شکل ۱۵ نشان می‌دهد که نوع اثر متقابل فسفر و مایه‌زنی باکتری از نظر اثر بر غلظت فسفر ریشه به سطح فسفر خاک بستگی داشت. مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر ریشه برای اثر متقابل سه جانبه مایه‌زنی باکتری × فسفر × رطوبت خاک در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که بیشترین غلظت فسفر ریشه (۳/۷ mg g<sup>-1</sup> dw) در تیمار ۰.۷FC-۰.۷FC و بدون مایه‌زنی باکتری بود (جدول ۴).



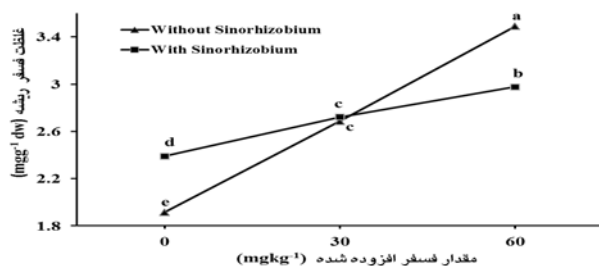
شکل ۱۴- اثر متقابل رطوبت و باکتری بر غلظت فسفر ریشه یونجه.

مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر ریشه برای اثر اصلی مایه‌زنی باکتری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که غلظت فسفر ریشه در مایه‌زنی باکتری تفاوت معنی‌داری با بدون مایه‌زنی باکتری نداشت (جدول ۳).

مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر ریشه برای اثر متقابل رطوبت خاک و فسفر نشان داد که افزایش رطوبت و فسفر خاک سبب افزایش غلظت فسفر ریشه شد (شکل ۱۳). شکل ۱۳ نشان می‌دهد که نوع اثر متقابل رطوبت خاک و فسفر از نظر اثر بر غلظت فسفر ریشه یونجه به سطوح رطوبت و فسفر خاک بستگی داشت. مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر ریشه برای اثر متقابل رطوبت خاک و مایه‌زنی باکتری نشان داد که مایه‌زنی باکتری سبب افزایش غلظت فسفر ریشه در سطح رطوبت خاک ۰.۹FC-FC شد و در سطوح رطوبت خاک ۰.۷FC-۰.۸FC و ۰.۵FC-۰.۶FC مایه‌زنی با باکتری سبب کاهش غلظت فسفر ریشه شد، هرچند این تفاوت در سطح ۰.۵FC-۰.۶FC از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. غلظت فسفر ریشه در شرایط رطوبت خاک ۰.۹FC-FC و مایه‌زنی باکتری بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱۴).



شکل ۱۳- اثر متقابل رطوبت و فسفر بر غلظت فسفر ریشه یونجه.



شکل ۱۵- اثر متقابل فسفر و باکتری بر غلظت فسفر ریشه یونجه.

### نتیجه‌گیری کلی

رطوبت خاک\*فسفر، رطوبت خاک\*باکتری و باکتری\*فسفر از نظر اثر بر شاخص کلروفیل برگ، غلظت نیتروژن و فسفر ریشه و بخش هوایی یونجه به سطوح رطوبت و فسفر خاک بستگی داشت. به‌طورکلی، برای بهبود تغذیه و رشد گیاه یونجه و افزایش تحمل آن در برابر تنش خشکی و بهبود کیفیت علوفه آن، مصرف ۳۰ یا ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک به همراه مایه‌زنی باکتری سینوریزوبیوم در شرایط مشابه این تحقیق می‌تواند توصیه شود. با توجه به اینکه در این تحقیق اثر تنش خشکی متوسط مورد مطالعه قرار گرفته است پیشنهاد می‌شود در بررسی‌های بعدی اثر متقابل کود فسفر و مایه‌زنی باکتری بر ویژگی‌های رشد و جذب عناصر غذایی یونجه در شرایط تنش خشکی شدید (سطوح رطوبت خاک کمتر) نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

نتایج نشان داد که اعمال تنش متوسط کمبود آب در خاک به گیاه یونجه، سبب کاهش معنی‌دار غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه و افزایش معنی‌دار شاخص کلروفیل برگ و غلظت نیتروژن بخش هوایی شد ولی بر غلظت نیتروژن ریشه اثر معنی‌داری نداشت. شاخص کلروفیل برگ، غلظت فسفر و نیتروژن بخش هوایی و ریشه یونجه با مصرف کود فسفر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که نشان‌دهنده رابطه هم‌افزایی میان نیتروژن و فسفر در گیاه یونجه هست. مایه‌زنی باکتری شاخص کلروفیل برگ، غلظت فسفر بخش هوایی و غلظت نیتروژن بخش هوایی و ریشه یونجه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ولی بر غلظت فسفر ریشه اثر معنی‌داری نداشت. بنابراین، مصرف فسفر و مایه‌زنی باکتری تحمل گیاه یونجه را در برابر تنش کمبود آب در خاک به‌طور معنی‌داری افزایش داد و وضعیت تغذیه‌ای آن را بهبود بخشید. نوع اثرهای متقابل دو جانبه

### منابع مورد استفاده

- اسفندیاری م، ۱۳۸۲. بررسی اثرات همزیستی توأم قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار و باکتری سینوریزوبیوم ملیوتی بر عملکرد، میزان پروتئین و جذب برخی عناصر غذایی یونجه در سطوح مختلف شوری. پایان‌نامه کارشناسی ارشد خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز.
- اصغری ش و علی‌اصغرزاد ن، ۱۳۸۳. مقایسه کارایی چند ماده حامل باکتری *Sinorhizobium meliloti* برای تولید مایه تلقیح یونجه. مجله علوم آب‌و خاک- علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، جلد ۸، شماره ۴، صفحه‌های ۶۳ تا ۷۵.
- پناه‌پور ح، ۱۳۸۶. اثر سویه‌هایی از سینوریزوبیوم ملیوتی بر روی (*Sinorhizobium melliloti*) خصوصیات کیفی علوفه در ۴ رقم یونجه زراعی (*Medicago sativa L.*). دو فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۱۶، شماره ۲، صفحه‌های ۲۰۷ تا ۲۱۷.
- راشی‌پور ل، ۱۳۸۱. بررسی اثرهای متقابل میکروارگانسیم‌های حل‌کننده فسفات و باکتری بردی ریزوبیوم ژاپونیکوم بر عملکرد و جذب فسفر در سویا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز.
- رفیعی م، نادیان ح، نورمحمدی ق و کریمی م، ۱۳۸۳. اثرهای تنش خشکی و مقادیر روی و فسفر بر غلظت و کل جذب عناصر در ذرت. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۵، شماره ۱، صفحه‌های ۲۳۵ تا ۲۴۳.
- زراعتکار م، لکزیان ا، جعفری ا و اخگر ع، ۱۳۸۹. تأثیر تنش خشکی بر سیستم تثبیت نیتروژن باکتری *Sinorhizobium* انباشت متابولیت‌های سازگار در گیاه یونجه (*Medicago sativa L.*) رقم بمی. نشریه آب‌و خاک، جلد ۲۴، شماره ۳، صفحه‌های ۴۰۷ تا ۴۱۶.
- علیزاده ا، ۱۳۷۴. رابطه آب‌و خاک و گیاه (ترجمه). چاپ اول. انتشارات نشر مشهد، مشهد.
- کریمی ه، ۱۳۶۹. یونجه. مرکز نشر دانشگاهی، تهران.



- مجیدیان م، قلاوند ا، کریمیان ن و کامکار ع، ۱۳۸۷. تأثیر مقادیر مختلف نیتروژن، کود دامی و آب آبیاری بر عملکرد و اجزای عملکرد ذرت. مجله تولید گیاهان زراعی، جلد ۱، شماره ۲، صفحه‌های ۶۷ تا ۸۵.
- ملکوتی م ج و غیبی م، ۱۳۷۹. تعیین حد بحرانی عناصر غذایی مؤثر در خاک، گیاه و میوه در راستای افزایش عملکرد کمی و کیفی محصولات استراتژیک کشور. نشر آموزش کشاورزی، کرج.
- نجفی ن، پارسازاده م، طباطبایی س ج و اوستان ش، ۱۳۸۹. تأثیر pH و نسبت نترات به آمونیوم محلول غذایی بر ویژگی‌های رشد و عملکرد اسفناج. مجله تحقیقات آب‌و خاک ایران، دوره ۴۱، شماره ۲، صفحه‌های ۲۸۲ تا ۲۷۳.
- Abdellatif KM, Osman EAM, Abdullah R and Abdelkader N, 2011. Response of potato plants to potassium fertilizer rates and soil moisture deficit. *Advance in Applied Science Research* 2(2): 388-397.
- Alizadeh O and Namazi L, 2011. Effect of different irrigation levels on nutrient uptake by mycorrhizal and non-mycorrhizal corn plants as affected by different soil phosphorus content. *Advances in Environmental Biology* 5(8): 2317-2321.
- Ankomah AB, Zapata F, Danso SKA and Axmann H, 1995. Cowpea varietal differences in uptake of phosphorus from Gafsa phosphate rock in a low-P Ultisol. *Fertilizer Research* 41: 219-25.
- Antolin MC, Yoller J and Sanchez M, 1995. Effect of temporary drought on nitrate-fed and nitrogen fixing alfalfa plants. *Plant Science* 107: 159-165.
- Ashraf M and Iram A, 2005. Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Flora* 200: 535-546.
- Asimi S, Gianinazzi P and Gianinazzi S, 1980. Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between vesicular arbuscular mycorrhizae and rhizobium in soybeans. *Canadian Journal of Botany* 58: 2200-2205.
- Bashan Y and de-Bashan LE, 2005. Bacteria/ Plant growth-promotion. Pp. 103-115. In: Hillel D (ed.) *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, Oxford, UK.
- Boem FA and Thomas GW, 1998. Phosphorus nutrition affects wheat response to water deficit. *Agronomy Journal* 90: 166-171.
- Bordeleau LM and Provost D, 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil* 161: 115-125.
- Bredemeier C, 2005. Laser-induced chlorophyll fluorescence sensing as a tool for site-specific nitrogen fertilizer evaluation under controlled environmental and field conditions in wheat and maize. Ph. D. Thesis, Technical University of Munich, Germany.
- Bremner JM and Mulvaney CS, 1982. Nitrogen-total. Pp. 595-622. In: Page et al. (eds.) *Methods of Soil Analysis*. Part II. 2ed. ASA, SSSA, Madison, WI.
- Bordeleau LM and Prevost D, 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil* 161: 115-125.
- Busse MD, and Bottomley PJ, 1989. Growth and nodulation responses of *Rhizobium meliloti* to water stress induced by permeating and nonpermeating solutes. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2431-2436.
- Chango G and McVetty PBE, 2001. Relationship of physiological characters to yield parameters in oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Science* 81: 1-6.
- Egilla JN, Davies FT and Drew JMC, 2001. Effect of potassium on drought resistance of *Hibiscus rosa-sinensis* cv. Leprechaun: Plant growth, leaf macro and micronutrient content and root longevity. *Plant and Soil* 229: 213-224.
- Graham RD and Webb MJ, 1991. Micronutrients and plant disease resistance and tolerance in plants. Pp. 329-370. In: Mortvedt JJ, Floyd RC, Shuman LM and Welch RM, 1991.(eds.) *Micronutrients in Agriculture*. Soil Science Society of America Book Series No. 4. Madison, WI.
- Hamidi H and Safarnejad A, 2010. Effects of drought stress on alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.) in germination stage. *American-Euroasian Journal of Agriculture and Environment Science* 8(6): 705-709.
- Havlin JL, Beaton JD, Tisdale SL and Nelson WL, 2004. *Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management*. 7th Edition, Prentice Hall, USA.
- Hazelton PA and Murphy BW, 2007. *Interpreting Soil Test Results: What Do All the Numbers Mean?* CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Hirpara DS, Patel JC, Patel BS and Khanpara VD, 1992. Response of rainy season hybrid sorghum (*Sorghum bicolor*) to nitrogen and Phosphorus. *Indian Journal of Agronomy* 27(3): 581-583.
- Iorio AF, Gorgoschide L, Rendina A and Barros MJ, 1996. Effect of phosphorus, copper, and zinc addition on the phosphorus/copper and phosphorus/zinc interaction in lettuce. *Journal of Plant Nutrition* 19: 481-491.
- Israel DW, 1993. Symbiotic dinitrogen fixation and host- plant growth during development of and recovery from phosphorus deficiency. *Physiologia Plantarum* 88: 294-300.

- Jin J, Wang G, Liu X, Pan X, Herbert SJ and Tang C, 2006. Interaction between phosphorus nutrition and drought on grain yield, and assimilation of phosphorus and nitrogen in two soybean cultivars differing in protein concentration in grains. *Journal of Plant Nutrition* 29(8): 1433-1449.
- Jones BJ, 2001. *Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis*. CRC Press, USA.
- Kennedy IR, 2004. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biology and Fertility of Soils* 39: 219-227.
- Keyvan S, 2010. The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *Journal of Animal & Plant Sciences* 8(3): 1051-1060.
- Kidambi SP, Matches AG and Bolger TP, 1990. Mineral concentrations in alfalfa and sainfoin as influenced by soil moisture level. *Agronomy Journal* 82: 229-236.
- Klute A, 1986. *Methods of Soil Analysis. Part I-Physical and Mineralogical Methods*. 2nd Edition, ASA, SSSA, Madison, WI.
- Kuo S, 1996. Phosphorus. Pp. 869-919. In: Sparks DL, (ed). *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*. 3rd Edition, SSSA Book Series No. 5. Madison, WI. USA.
- Lal P, Chhipa BR and Kumar A, 1993. *Salt Affected Soil and Crop Production: A Modern Synthesis*. Agro Botanical Publishers, India.
- Lindsay WL and Norvell WA, 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal* 42: 421-428.
- Lindsay WL, Velke PG and Chien SH, 1989. Phosphate minerals. Pp. 1089-1130. In: Dixon JB and Weed SB (eds.) *Minerals in Soil Environments*. Second Edition, SSSA Book Series No. 1, Madison, WI.
- Makoi JHJR, Bambara S and Ndakidemi PA, 2013. Rhizobium inoculation and the supply of molybdenum and lime affect the uptake of macroelements in common bean plants. *American Journal of Crop Science* 7(6): 784-793
- Marschner H, 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, USA.
- Matos I and Schroder EC, 1989. Strain selection for pigeon pea rhizobium under greenhouse conditions. *Plant and Soil* 116: 19-22.
- McLean EO, 1982. Soil pH and lime requirement. Pp. 199-224. In: Page AL, (ed). *Methods of Soil Analysis. Part II*. 2nd ed. ASA, SSSA, Madison, WI. USA.
- Mihalovic N and Lazarevic M, 1977. Chlorophyllase activity in wheat leaves during drought and its dependence on the nitrogen on applied. *Field Crops Research* 9: 46-58.
- Mohammadkhani N and Heidari R, 2007. Effects of water stress on respiration, photosynthetic pigments and water content in tow maize cultivar. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(22): 4022-4028.
- Motalebifard R, Najafi N, Oustan S, Nyshabouri MR and Valizadeh M, 2013. The combined effects of phosphorus and zinc on evapotranspiration, leaf water potential, water use efficiency and tuber attributes of potato under water deficit conditions. *Scientia Horticulturae* 162: 31-38.
- Nasri M, Zahedi H and Tohidi MHR, 2008. Investigation of water stress on macroelements in rapeseed genotypes leaf. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3: 669-672.
- Ndakidemi PA, Bambara S and Makoi JHJR, 2011. Micronutrient uptake in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by Rhizobium inoculation, and the supply of molybdenum and lime. *Plant Omics Journal* 4(1): 40-52.
- Nelson DW and Sommers LE, 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter. Pp. 539-579. In: Page AL, (ed). *Methods of Soil Analysis. Part II*. 2nd ed. ASA, SSSA, Madison, WI. USA.
- Nonami H, WU Y and Matthewse MA, 1997. Decreased growth-induced water potential a primary cause of growth inhibition at low water potentials. *Plant Physiology* 114: 501-509.
- Payne WA, Drew MC, Hossner LR, Lascano RJ, Onken AB and Wendt CW, 1992. Soil phosphorus availability and pearl millet water-use efficiency. *Crop Science* 32: 1010-1015.
- Pereira PAA and Bliss FA, 1989. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N<sub>2</sub> fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally-controlled conditions. *Plant and Soil* 115: 75-2.
- Rai MK, 2005. *Handbook of Microbial Biofertilizers*. Food Products Press, New York, USA.
- Rezaei M, Zehtab-Salmasi S, Najafi N, Ghassemi-Golezani K and Jalalikhmal M, 2010. Effects of water deficit on nutrient content and grain protein of bread wheat. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 8(3&4): 132-136.
- Richards LA, 1969. *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils*. US Salinity Laboratory Staff Agricultural Handbook No 60, USDA, USA.
- Rodriguez D and Goudriaan J, 1995. Effect of phosphorus and drought stress on dry-matter and phosphorus allocation in wheat. *Journal of Plant Nutrition* 18(11): 2501-2517.
- Rowell DL, 1994. *Soil Science: Methods and Applications*. Longman Scientific and Technical, Wiley, UK.
- Samarah NH, 2005. Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Agronomy for Sustainable Development* 25: 145-149.
- Sardans J, Peñuelas J, Prieto P and Estiarte M, 2008. Drought and warming induced changes in P and K concentration and accumulation in plant biomass and soil in a Mediterranean shrubland. *Plant and Soil* 306: 261-271.

- Serraj R, Sinclair TR and Purcell LC, 1999. Symbiotic N<sub>2</sub> fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany* 50: 143-155.
- Sinclair TR, Purcell LC, Vadez V and Serraj R, 2001. Selection of soybean (*Glycine max* L.) lines for increased tolerance of N<sub>2</sub> fixation to drying soil. *Agronomie* 21: 653-657.
- Singh DK and Sale PWG, 2000. Growth and potential conductivity of white clover roots in dry soil with increasing phosphorus supply and defoliation frequency. *Agronomy Journal* 92: 868-874.
- Slaton NA, Delong RE, Mozaffari M, Clark S, Allen C and Thompson R, 2007. Wheat grain response to phosphorus and potassium fertilizer rate. *Pakistan Journal of Botany* 74: 69-71.
- Smyth TJ and Cravo MS, 1990. Critical phosphorus levels for corn and cowpea in a Brazilian Amazon oxisoil. *Agronomy Journal* 82: 309-312.
- Sprent JI and Zahran HH, 1988. Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity. Pp. 145-151. In: Beck D and Materon LA (eds). *Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture*. ICARDA, Aleppo, Syria.
- Tsvetkova GE and Georgiev GI, 2003. Effect of phosphorus nutrition on the nodulation, nitrogen fixation and nutrient use efficiency of Bradyrhizobium japonicum-soybean (*Glycine max* L.) symbiosis. *Bulgarian Journal of Plant Physiology, Special Issue* 2003: 331-335.
- Waling I, Vark WV, Houba VJG. and Van der lee JJ, 1989. *Soil and Plant Analysis, a series of syllabi. Part 7. Plant Analysis Procedures*. Wageningen Agriculture University, the Netherland.
- Worrall VS and Roughly RJ, 1976. The effects of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifoli* Dang. *Journal of Experimental Botany* 27: 1233-1241.
- Yaman M and Cinsoy AS, 1996. Determination of the most effective *Rhizobium* strain (*Rhizobium japonicum* L.) in soybean. *Journal of Aegean Agriculture Research Institute* 6: 84-96.
- Yasin Ashraf M, Ala SA and Batti A, 1998. Nutritional imbalance in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes grown at soil water stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 20: 307-310.
- Yunca H and Schmidhalter U, 2005. Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168: 541-549.

Archive of SID