

تأثیر جنسستین (Genestein) بر گره‌زایی و میزان نیتروژن سه گونه یونجه یک‌ساله در دمای پائین منطقه ریشه

خسرو عزیزی^{۱*}، علیرضا دادخواه^۲ و سعید جلالی هنرمند^۳

۱. استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان خرم آباد

۲. استادیار دانشکده کشاورزی شیروان، دانشگاه فردوسی مشهد

۳. استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه

تاریخ وصول: ۱۳۸۷/۰۷/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۲/۰۴

چکیده

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های جنسستین بر میزان نیتروژن و گره‌زایی گونه‌های یونجه یک‌ساله، در دمای ۵°C منطقه ریشه، آزمایشی در شرایط کنترل شده در اتاقک رشد با دمای ۲۰/۲۵°C روز/ شب بالای سطح خاک انجام گرفت. سه گونه یونجه یک-ساله شامل *Medicago polymorpha*، *Medicago radiata* و *Medicago rigidula* که با مناطق سرد و معتدله سازگاری دارند و پنج سطح جنسستین شامل ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرومول بر لیتر در نظر گرفته شد. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به اجرا در آمد. گونه‌های *Medicago rigidula* و *Medicago polymorpha*، از لحاظ تمامی صفات اندازه گیری شده نسبت به گونه *Medicago radiata* برتر بوده و توانایی بیشتری در تولید گره در دمای پائین منطقه ریشه دارا بودند. استفاده از جنسستین باعث افزایش گره‌زایی و میزان نیتروژن گونه‌های یونجه یک‌ساله در دمای ۵°C و غلظت ۲۰ میکرومول بر لیتر جنسستین نسبت به سایر تیمارها تأثیر بیشتری در گره‌زایی و همچنین میزان نیتروژن گونه‌های یونجه یک‌ساله مورد آزمایش داشته است. تیمار جنسستین، ماده خشک ریشه و گره، تعداد گره و میزان نهایی نیتروژن گونه‌های یونجه یک‌ساله در دمای ۵°C را افزایش داد. بررسی اثر متقابل ارقام و غلظت‌های مختلف جنسستین نشان داد که گونه *Medicago polymorpha* در غلظت ۲۰ میکرومول بر لیتر جنسستین از لحاظ صفات مورد بررسی نسبت به سایر تیمارها برتر بود. بنابراین می‌توان با توجه به نتایج حاصل از آزمایش، استفاده از جنسستین را برای یونجه‌های یک‌ساله جهت توسعه و افزایش تعداد و اندازه گره‌های ریشه در مناطقی که در آغاز فصل رویش دمای خاک به ۵ درجه سانتی گراد یا کمتر می‌رسد، موفقیت آمیز دانست.

واژه‌های کلیدی: یونجه یک‌ساله، دمای پائین منطقه ریشه، گره‌زایی، میزان نیتروژن، جنسستین

مقدمه

یونجه‌های یک‌ساله منبع بسیار خوبی برای تثبیت بیولوژیکی نیتروژن هوا (N_2) هستند. یونجه‌های یک‌ساله علاوه بر ازدیاد نیتروژن آلی خاک، کربن آلی خاک را نیز افزایش می‌دهند (۱۵).

در بین گیاهان لگومینوز، یونجه‌های یک‌ساله از جمله گیاهانی هستند که با توجه به ویژگی‌های مطلوبشان مانند ارزش علوفه‌ای بالا، تأثیر مثبت بر حاصلخیزی خاک و توسعه وسیع آنها در مقیاس جهانی، در کانون توجه قرار گرفته‌اند (۸).

استقرار یونجه‌های یک‌ساله در مراتع و مزارع به عوامل مختلفی بستگی دارد و یکی از مهم‌ترین آنها ایجاد همزیستی بین باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن با میزبان آن می‌باشد که نتیجه این همزیستی افزایش نیتروژن قابل دسترس برای گیاه (به ویژه در سیستم‌های کشاورزی پایدار که کمتر از کودهای شیمیایی استفاده می‌گردد) و در نهایت افزایش رشد گیاه و تولید محصول می‌باشد (۲۷). از طرفی از مهمترین عوامل تأثیرگذار بر ایجاد همزیستی مطلوب بین گیاه و باکتری، دمای محیط و به ویژه دمای خاک می‌باشد (۳۱).

یونجه‌های یک‌ساله اکثراً بومی مناطق مدیترانه با آب و هوای معتدل هستند، بنابراین تحمل آنها نسبت به سرمای زمستان کم است (۳۴). این در حالی است که بحرانی‌ترین زمان برای تولید علوفه در کشور ایران و کشورهای با اقلیم مشابه آن، اواخر پائیز و اوائل زمستان می‌باشد، دوره‌ای که محتوای رطوبت خاک در شرایط مطلوبی است اما دمای پائین محیط و خاک، از رشد گیاه و تولید محصول جلوگیری می‌کند (۳۱). گونه‌های مختلف یونجه‌های یک‌ساله دارای مقاومت‌های متفاوتی در برابر سرما می‌باشند و از این نظر در رویشگاه‌های مختلف نیز به طور طبیعی و با توجه به میزان مقاومت در برابر سرما و سایر تنش‌های محیطی، گونه‌های خاصی از این جنس استقرار یافته‌اند

(۲۳). برای مثال نتایج تحقیقات نشان داده گونه *Medicago rigidula* بیشترین پتانسیل زنده ماندن در زمستان را نسبت به سایر گونه‌های یونجه یک‌ساله دارا می‌باشد (۲۲ و ۲۳). در مقابل گونه *Medicago polymorpha* در سطح وسیعی از شرایط آب و هوایی کشور انتشار یافته و از سازگارترین یونجه‌های یک‌ساله ایران است (۱) اما مقاومت به سرمای این گونه به‌طور جدی مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین ضرورت دارد گونه‌های مختلف از یونجه‌های یک‌ساله هم از نظر مقاومت به سرما و هم از نظر تولید محصول مورد ارزیابی قرار گیرند. در آب و هوای سرد، زمانی که حرارت خاک به شکل قابل توجهی افت می‌کند، یونجه‌های یک‌ساله قادر به رشد فعال نمی‌باشند و در بهترین حالت فقط سرما را تحمل کرده و زنده می‌مانند (۵). در چنین شرایطی تولید ماده خشک گیاهی به شدت کاهش می‌یابد و بدون تردید فعالیت باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن (ریزوبیوم‌ها) نیز متوقف می‌گردد. مطالعات انجام شده در مورد تأثیر دمای پائین منطقه ریشه بر تثبیت نیتروژن در گیاه سویا و سایر لگوم‌های علوفه‌ای نیمه-گرمسیری مشخص نموده که کاهش دما موجب کاهش گره‌بندی و کاهش فعالیت و کارایی گره‌ها می‌گردد که نتیجه این فرایند افت چشم‌گیر عملکرد می‌باشد (۲۵). لینچ و اسمیت (۱۹۹۳) گزارش کرده‌اند دمای نامطلوب منطقه ریشه سرایت، آلودگی و توسعه گره‌ها را در سویا محدود کرده و تثبیت نیتروژن را تقریباً ۴ تا ۶ هفته پس از تلقیح به تأخیر می‌اندازد. اندک پژوهش‌های انجام گرفته به منظور پی بردن به فیزیولوژی کاهش تثبیت نیتروژن در دماهای پائین بر کاهش سیگنال‌های مولکولی بین ریشه گیاه و باکتری تأکید داشتند (۱۷، ۶).

تثبیت نیتروژن در لگوم‌ها، در سرمای ۵ درجه سانتیگراد، به حد صفر رسیده و این تأثیر در مرحله اول مربوط به کاهش غده‌زایی بوده و به کاهش فعالیت آنزیم نیتروژناز مربوط نمی‌شود (۲۴). هنگامی که حرارت خاک

در گره ریشه می‌باشد که ایزوفلاون فعال کننده شیمیایی باکتری ریزوبیوم و القا کننده ژن گره‌زایی است (۳۰ و ۳۸). جنستین تولید لیپوالیگوساکاریدها را تحریک کرده و فاصله زمانی بین تلقیح و ایجاد پیچیدگی تارهای کشنده را کوتاه می‌نماید، در نتیجه گره‌زایی و تثبیت نیتروژن افزایش می‌یابد که در شرایط اقلیم سرد مهم است (۴۳).

کاهش سیگنالهای مولکولی بین گیاه و باکتری نظیر جنستین ممکن است عامل مهم محدود کننده تشکیل گره در گیاهان لگوم به دلیل دمای پائین منطقه ریشه باشد. جنستین موجب کاهش اثر جلوگیری کننده دمای پائین منطقه ریشه شده و گره‌زایی و تثبیت نیتروژن را در سویا افزایش می‌دهد. هنگامیکه در مزرعه به منطقه ریشه جنستین اضافه گردید، اثر جلوگیری کننده دمای سرد بهاره خاک را روی تشکیل گره و تثبیت نیتروژن کاهش داد (۱۷). ریشه گیاهچه‌های یونجه همانند سلولهای ریشه بسیاری از لگومها، حاوی انواع ایزوفلاونوئیدهای پیوسته و فورمونتن^۷ می‌باشند و مجاورت گیاه با باکتری ریزوبیوم آزاد سازی فورمونتن خاصی را تحریک می‌کند (۷). ایجاد آلودگی توسعه سریع گره‌ها حساس‌ترین مراحل چرخه ایجاد همزیستی است (۴۰).

حضور و فراوانی یونجه‌های یک‌ساله در هر محیط می‌تواند منبای انتخاب گونه‌های سازگار با آن محیط باشد (۱۱). گونه *Medicago polymorpha* دارای گسترده‌ترین پراکنش در ایران است بنابراین بایستی در اولویت انتخاب قرار گیرد. گونه *Medicago radiata* می‌تواند زمستان با دوره یخبندان را بدون آسیب سپری کند. احتمالاً گیاهچه‌های گونه *Medicago rigidula* نیز مانند *Medicago polymorpha* و *Medicago rotata* تعداد زیادی اکوتیپ در نواحی سردسیر داشته باشد. گونه‌های *Medicago scutellata* و *Medicago tornata* و *Medicago truncatula* نسبت به سرما حساسیت زیادی

صفر یا پائین‌تر از آن باشد، تولید ماده خشک گیاهی متوقف شده و فعالیت ریزوبیوم‌ها نیز در چنین شرایطی متوقف می‌گردد (۴). دمای پائین، رشد گیاهان تثبیت کننده نیتروژن را بیشتر از گیاهانی که از ترکیبات نیتروژنه استفاده کرده، محدود می‌کند (۲۵). اکثر گونه‌های یونجه یک‌ساله نسبت به سرما حساس بوده و درجه حرارت‌های پایین باعث مرگ و میر بوته‌های جوان می‌شود (۷). مطالعات تأثیر دمای منطقه ریشه کمتر از حد مطلوب، بر روی تثبیت نیتروژن در سویا و سایر لگومهای علوفه‌ای نیمه گرمسیری مشخص نمود که موجب کاهش گره بندی، فعالیت و کارایی گره می‌شود (۲۰، ۲۵، ۲۶ و ۳۲).

دمای ۱۵ درجه سانتیگراد منطقه ریشه، سرایت آلودگی و نیز توسعه گره‌ها و تثبیت نیتروژن را در سویا محدود کرده و تثبیت نیتروژن را تقریباً ۴-۶ هفته پس از تلقیح به تأخیر می‌اندازد (۲۶). این امر موجب دیر سبز شدن برگهای جدید و بالائی سویا می‌شود (۴۰). کاهش مشابهی در توسعه گره و تعداد گره در دمای پائین منطقه ریشه مشاهده شد (۱۸).

جذب و تکثیر ریزوبیوم نیاز به ترشحات ریشه لگوم دارد (۳۶). ترشح فلاونوئیدها^۱ و ایزوفلاونوئیدها^۲ مانند لوتین^۳ دایدازین^۴ و جنستین از تارهای کشنده، نقش مهمی در شیمیوتاکسی^۵ و القاء ژن‌های گره‌زایی در ریزوسفر خاک دارند (۲۸). این مواد در غلظت پائین به عنوان سیگنال شیمیوتاکسی ریزوبیوم در محیط اطراف ریشه^۶ عمل می‌کنند، در حالی که در غلظت بالا، تشکیل گره را القاء می‌نمایند (۳۶). یکی از نقش‌های این مواد ایجاد رابطه همزیستی بین گیاه و باکتری ریزوبیوم جهت تثبیت نیتروژن

¹Flavonoids²Isoflavonoids³Lutein⁴Daidzein⁵Chemiotaxi⁶Rhizospher⁷Formontin

در این آزمایش برای تنظیم دمای پائین منطقه ریشه دستگاه مبردی طراحی و ساخته شد. دستگاه مذکور دارای سه بخش مجزا با کارکردی متفاوت بوده که عبارتند از سیستم سردکننده دستگاه که سرمای مورد نیاز را بر اساس تعداد گلدها تأمین می‌نمود، سیستم گردش آب برای یکنواختی دما در تمام سطوح دستگاه و بخش سوم نیز قسمت کنترل و تنظیم دمای دستگاه، تا دمای پائین منطقه ریشه را با حساسیت یک دهم درجه سانتیگراد تأمین نماید. در این آزمایش از سه گونه یونجه یک‌ساله سازگار با مناطق سرد و معتدله استفاده شد که عبارتند بودند از:

Medicago polymorpha، *Medicago radiata* و *Medicago rigidula*.

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک-های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. گونه‌ها در سه سطح و غلظت‌های جنسستین (۴-۵-۷ تری هیدروکسی فلاوون با خلوص ۹۹٪) سنتز شده، در پنج سطح ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرومول بر لیتر استفاده شد. دمای منطقه ریشه 5°C در نظر گرفته شد. هر کرت شامل یک گلدها با ده بوته (تراکم ۱۰۰۰ بوته در مترمربع مورد استفاده قرار گرفت) و آزمایش دارای ۴۵ کرت بود.

آزمایش در اتاقک رشد در دمای 25°C روز و 20°C شب و با دوره ۱۴ ساعت روز و ۱۰ ساعت شب انجام گرفت. پس از ضدعفونی بذور (با الکل اتیلیک ۹۸ درصد و محلول کلرید جیوه یک دهم درصد) در گلدها حاوی کوارتز ضد عفونی شده (با دمای 180°C در ۳ ساعت) کشت شده و گلدها با آب مقطر آبیاری شدند. هنگامی که برگ‌های کوتیلدونی گیاهچه‌ها ظاهر شدند تغذیه با محلول غذایی هوگلند^۸ بدون نیتروژن (۲۹) آغاز شد.

جهت تلقیح گیاهان از باکتری ریزوبیوم ملیوتی که در محیط استریل بدون آگار کشت شده بود، استفاده گردید (برای تهیه باکتری، گره‌های فعال را از ریشه جدا و پس از

دارند (۳). یکی از کولتیوارهای گونه *Medicago rigidula* cv. *Rigidula* که در مناطق شمال غرب، جنوب غرب، شمال شرق و غرب کشور در ارتفاعات ۲۰۰ تا ۲۴۰۰ متری از سطح دریا رویش داشته و یکی از امید بخش‌ترین گونه‌ها در نواحی سرد ایران بنظر می‌رسد (۱۶). گونه *Medicago radiata* محدود به مناطق سرد (۱۱) و بعضی از گونه‌های یونجه یک‌ساله مثل *Medicago rigidula* و *Medicago noeana* در مناطق سرد ترکیه و ایران یافت می‌شوند (۱۲).

نتایج تحقیقات نشان داده است که گونه *M. rigidula* بیشترین پتانسیل زنده ماندن در زمستان را نسبت به گونه‌های *M. polymorpha* و *M. truncatula* دارد (۲۳). بنابراین تحقیقاتی برای رفع عوامل بازدارنده گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در یونجه‌های یک‌ساله در دمای پائین خاک و افزایش میزان نیتروژن تثبیت شده توسط گیاه ضروری می‌باشد.

با توجه به وسعت دیمزارها و مراتع کشور که در اوایل فصل رویش، بارندگی و رطوبت مناسبی برای رشد و نمو یونجه‌های یک‌ساله داشته اما دمای پائین هوا و خاک این مناطق به صورت عامل بازدارنده در جهت استفاده و گسترش کشت آنها می‌باشد، بنابراین برای رفع این معضل و افزایش مقاومت گیاهان در برابر سرما، نیاز به افزایش تثبیت نیتروژن، جهت رشد و نمو بیشتر یونجه‌های یک‌ساله و ایجاد سیستم غله-لگوم به جای تناوب رایج غله-آیش لازم بنظر می‌رسد. با توجه به عدم بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف جنسستین در دمای پائین منطقه ریشه بر روی گره‌زایی و تثبیت نیتروژن ارقام یونجه یک‌ساله سازگار با مناطق سرد و معتدل، آزمایشی جهت بررسی تأثیر جنسستین بر روی گره‌زایی و تثبیت نیتروژن گونه‌های یونجه یک‌ساله در دمای پائین منطقه ریشه، انجام گرفت تا با توجه به نتایج حاصله، بتوان از یونجه‌های یک‌ساله در مناطق سردسیر استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

⁸ Hogland

شده است و غلظت ۲۰ میکرومول بر لیتر جنسستین نسبت به سایر تیمارهای جنسستین تأثیر بیشتری در گره‌زایی گونه‌های یونجه یک‌ساله مورد آزمایش داشته است (جدول ۲). با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که کاهش سیگنال‌های مولکولی بین گیاه و باکتری نظیر جنسستین در دمای پائین منطقه ریشه، عامل محدود کننده گره‌زایی در لگوم‌ها می‌باشد. کاهش سیگنال‌های مولکولی بین گیاه و باکتری نظیر جنسستین ممکن است عامل مهم محدود کننده تشکیل گره در گیاهان لگوم در دمای پائین منطقه ریشه باشد. جنسستین موجب کاهش اثر جلوگیری کننده دمای پائین منطقه ریشه شده و گره‌زایی را افزایش می‌دهد (۲).

حداکثر میزان ماده خشک گره متعلق به گونه *M. polymorpha* در غلظت ۲۰ میکرومول بر لیتر جنسستین با ۰/۸۷ میلی‌گرم در بوته و حداقل آن در گونه‌های *M. polymorpha*، *M. rigidula* و *M. radiata* در غلظت صفر میکرومول بر لیتر جنسستین بدست آمد (جدول ۲). بیشترین تعداد گره در ریشه با ۸/۷ گره متعلق به گونه *M. polymorpha* در غلظت ۲۰ میکرومول بر لیتر جنسستین و کمترین تعداد گره در ریشه متعلق به گونه‌های *M. polymorpha*، *M. radiata* و *M. rigidula* در غلظت صفر میکرومول بر لیتر جنسستین بوده است (جدول ۲). بیشترین طول و قطر گره متعلق به گونه *M. rigidula* در غلظت ۱۰ میکرومول بر لیتر جنسستین و کمترین طول و قطر گره در گونه‌های *M. polymorpha*، *M. radiata* و *M. rigidula* در غلظت صفر جنسستین بدست آمد. جنسستین با تسریع در ایجاد گره، موجب افزایش دوره فعالیت آنها شده و باعث افزایش رشد و نمو گره گردیده و گره‌های بزرگتر و فعال‌تری تولید می‌کند.

شستشو، استریل و سپس به محیط کشت بدون آگار که در دمای 120°C به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو ضدعفونی شده بود، اضافه شدند. برای تکثیر سریع باکتری، محیط کشت به مدت ۴ روز در دمای 25°C قرار داده شد. پس از سپری شدن این زمان باکتری‌ها برای تلقیح گیاهان قابل استفاده بودند. پس از ظهور برگ‌های کوتیلدونی یک میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری جهت تلقیح گیاهان به ازاء هر گلدان همراه با محلول غذایی، اضافه گردید. تیمار جنسستین همزمان با تلقیح باکتری و نیز همزمان با مصرف محلول غذایی اعمال شد. صفاتی که در این آزمایش مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفتند عبارتند از: طول و میزان ماده خشک ریشه، میزان ماده خشک گره ریشه، تعداد گره در ریشه، طول و قطر گره، درصد و مقدار نیتروژن در گیاه. تجزیه و تحلیل داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SAS انجام گرفت (۳۳) و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن صورت پذیرفت (۳۷).

نتایج

اثرات اصلی ارقام، جنسستین و اثر متقابل آنها در سطح یک درصد معنی‌دار شده‌اند (جدول ۱). با توجه به معنی‌دار بودن اثرات متقابل مرتبه اول، اثرات اصلی به اختصار شرح داده می‌شوند.

گونه *M. rigidula* از لحاظ تمامی صفات اندازه‌گیری شده نسبت به سایر گونه‌ها برتر بوده و قادر به گره‌زایی و تثبیت نیتروژن بیشتری در دمای پائین منطقه ریشه (۵ درجه سانتیگراد) در مقایسه با سایر گونه‌ها می‌باشد (جدول ۱). دمای پائین منطقه ریشه از طریق تاخیر در ایجاد آلودگی ریشه بوسیله باکتری، مانع از تثبیت نیتروژن می‌گردد و کاهش در فراهمی نیتروژن، کاهش در رشد و نمو گیاه را به همراه دارد (۴۳). گونه‌های یونجه یک‌ساله نسبت به جنسستین حساسیت متفاوتی نشان داده و استفاده از جنسستین باعث افزایش گره‌زایی در دمای پائین منطقه ریشه

جدول ۱- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌های اثرات اصلی گونه‌های یونجه یک‌ساله و غلظت جنسیتین بر گره زایی و تثبیت نیتروژن در دمای پائین منطقه ریشه

میانگین مربعات									منابع تغییر
مقدار نیتروژن	درجه آزادی	درصد	قطر گره	طول گره	طول گره	تعداد گره	میزان ماده خشک ریشه	میزان ماده خشک ریشه	
در گیاه	در آزادی	نیتروژن در گیاه	طول گره	دسته گره	طول گره	در ریشه	میزان ماده خشک ریشه	طول ریشه	
۰/۱۳	۲	۰/۰۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۶	۰/۰۰۰۸	۰/۲۲	
۳۱/۳**	۲	۳/۳**	۰/۱۳**	۰/۳۱**	۱/۲**	۸۴/۷**	۰/۶۲**	۳۰۷/۸**	
۱۰/۵**	۴	۰/۷۹**	۰/۴۳**	۰/۹۵**	۵/۶**	۴۳/۹**	۰/۳۵**	۶۹/۱**	
۳/۰**	۸	۰/۳۳**	۰/۱**	۰/۲۲**	۱/۳**	۱۶/۷**	۰/۱۷**	۵/۸**	
۰/۱۲۷	۲۸	۰/۰۲۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۶	۰/۰۱۴	۰/۰۸۴	۰/۰۰۱	۰/۳۳۷	
مقایسه میانگین‌های اثرات اصلی									
گونه	(mg/g)	%	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mg)	(mg)	
پلی مورفا	۷/۱۸ a	۲/۴۳ a	۰/۲۹ c	۰/۴۲ c	۱/۱ b	۲/۱ b	۰/۲ b	۱۳/۱ B	
رادیاتا	۴/۷ b	۱/۶۳ b	۰/۳۷ b	۰/۵۹ b	۱/۱ b	۱/۳ c	۰/۰۵ c	۱۳/۳ B	
ریجیدولا	۷/۲ a	۲/۴۴ a	۰/۴۸ a	۰/۷۱ a	۱/۶ a	۵/۸ a	۰/۵ a	۲۱/۰ a	
غلظت جنسیتین									
۰ μmol/lit	۴/۵ c	۱/۷ c	۰ b	۰ c	۰ d	۰ d	۰ d	۱۰/۹ d	
۱۰ μmol/lit	۶/۹ b	۲/۳ b	۰/۴۰ c	۰/۶۴ b	۱/۲ c	۲/۸ c	۰/۱۶ c	۱۶/۳ c	
۲۰ μmol/lit	۷/۲ a	۲/۴ a	۰/۵۲ a	۰/۷۶ a	۲/۲ a	۶/۲ a	۰/۵۴ a	۱۷/۷ a	
۳۰ μmol/lit	۶/۸ a b	۲/۲ a b	۰/۵۱ a	۰/۷۵ a	۱/۴ b	۳/۴ b	۰/۱۹ b	۱۷/۲ a b	
۴۰ μmol/lit	۶/۵ b	۱/۲ c	۰/۴۵ b	۰/۷۸ b	۱/۵ b	۲/۷ c	۰/۲۲ b	۱۶/۹ b	

* و ** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد. در ستون میانگین دارای حداقل یک حرف مشترک تفاوت معنی داری در سطح ۱ درصد ندارند.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت‌های مختلف جنس‌تین و گونه‌های یونجه یک‌ساله

نیتروژن اندام‌های هوایی (mg/g)	ماده خشک ریشه گیاه (mg)	ماده خشک گره در هر گیاه (mg)	طول ریشه (cm)	تعداد گره در ریشه	صفت تیمار
۵/۲ f	۲/۱ h	۰ f	۷/۷ g	۰ h	G ₀ P
۳ h	۲/۹ g	۰ f	۱۰/۶ f	۰ h	G ₀ Ra
۵/۲ f	۴ ef	۰ f	۱۴/۵ cd	۰ h	G ₀ Ri
۹ a	۵/۵ d	۰ f	۱۴/۱ cd	۰ h	G ₁₀ P
۵/۱ f	۳/۳ fg	۰/۰۴ f	۱۲/۶ e	۰/۶ g	G ₁₀ Ra
۶/۵ de	۸/۷ a	۰/۴ d	۲۲ b	۷/۹ b	G ₁₀ Ri
۷/۴ bc	۷/۹ a b	۰/۹ a	۱۴/۶ cd	۸/۷ a	G ₂₀ P
۶/۳ e	۴/۱ e	۰/۰۳ f	۱۳/۹ d	۲/۲ e	G ₂₀ Ra
۷/۸ b	۸/۲ ab	۰/۷ b	۲۴/۶ a	۷/۷ b	G ₂₀ Ri
۷/۳ bc	۶/۸ c	۰/۰۱۳ f	۱۵ cd	۰/۸ fg	G ₃₀ P
۵/۴ f	۴/۳ e	۰/۱ e	۱۵/۲ c	۲/۶ e	G ₃₀ Ra
۷/۷ b	۸/۵ a	۰/۴ d	۲۱/۵ b	۶/۹ c	G ₃₀ Ri
۷ cd	۷/۵ bc	۰/۰۰۸ f	۱۴ d	۰/۸ fg	G ₄₀ P
۳/۷ g	۳ g	۰/۰۴ f	۱۴/۲ cd	۱/۲ f	G ₄₀ Ra
۸ b	۸/۵ a	۰/۶ c	۲۲/۵ b	۶/۳ d	G ₄₀ Ri

G = Genestein, P = *Medicago Polymorpha*, Ra = *Medicago Radiate*, Ri = *Medicago Rigidula*

در هر ستون میانگین‌های که دارای حداقل یک حرف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند

در غلظت ۰ میکرومول بر لیتر جنس‌تین حاصل شد (جدول ۲). استفاده از جنس‌تین در دمای پائین منطقه ریشه موجب افزایش آلودگی و در نتیجه تعداد و ماده خشک گره گشت.

میزان ماده خشک ریشه و تعداد گره با یکدیگر و نیز طول و قطر گره، درصد و مقدار نیتروژن گیاه همبستگی مثبتی نشان دادند ($P < 0/01$). همبستگی مثبتی بین میزان ماده خشک گره، تعداد گره، طول و قطر گره و درصد و مقدار نیتروژن در گیاه مشاهده شد. میزان ماده خشک و طول ریشه با یکدیگر و همچنین با تعداد گره در ریشه، میزان ماده خشک گره، طول و قطر گره و درصد و مقدار نیتروژن در گیاه همبستگی مثبتی دارا بودند ($P < 0/01$). درصد و مقدار نیتروژن گیاه با میزان ماده خشک ریشه، تعداد گره در ریشه، میزان ماده خشک گره، طول و قطر گره همبستگی مثبتی نشان دادند ($P < 0/01$). ضریب همبستگی بالایی بین میزان ماده خشک و تعداد گره ($r = 0/94$).

بیشترین میزان ماده خشک ریشه در گونه *M. rigidula* در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرومول بر لیتر جنس‌تین و کمترین آن در گونه *M. polymorpha* در غلظت صفر میکرومول بر لیتر جنس‌تین بدست آمد (جدول ۲).

بیشترین طول ریشه (۲۴/۶ سانتی‌متر) در گونه *M. rigidula* و در غلظت ۲۰ میکرومول بر لیتر جنس‌تین و کمترین آن (۷/۷ سانتی‌متر) در گونه *M. polymorpha* و در غلظت ۰ میکرومول بر لیتر جنس‌تین حاصل گردید (جدول ۲). افزایش سنتز ماده خشک در اثر استعمال جنس‌تین، در شرایط تنش دمای پائین منطقه ریشه باعث اختصاص ماده خشک بیشتری به بخش‌های مختلف گیاه نظیر ریشه‌ها گردیده و باعث افزایش طول ریشه یونجه یک‌ساله شده است.

بیشترین درصد و مقدار نیتروژن گیاه در گونه *M. polymorpha* در غلظت ۱۰ میکرومول بر لیتر جنس‌تین و کمترین درصد و مقدار نیتروژن گیاه در گونه *M. radiata*

نیتروزن نهایی موجود در یونجه یک‌ساله تحت استرس سرما را افزایش داد، که این احتمالاً به دلیل تأثیر آن در تسریع ایجاد آلودگی‌ها، که حساسیت زیادی به دمای پائین دارد، می‌باشد. جنسستین موجب کاهش اثر جلوگیری کننده دمای پائین منطقه ریشه شده و گره‌زایی را در سویا افزایش می‌دهد (۲ و ۴۱). استفاده از جنسستین تعداد و مقدار ماده خشک گره را در گیاه افزایش داده و زمان شروع تثبیت نیتروزن در سویا در طول فصل رشد و هنگامیکه خاک هنوز سرد است را تسریع می‌کند (۴۲).

بررسی اثر متقابل ارقام و غلظت‌های مختلف جنسستین نشان داد گونه *M. polymorpha* در غلظت ۲۰ میکرومول در لیتر جنسستین از لحاظ گره‌زایی و تثبیت نیتروزن نسبت به سایر تیمارها برتر بوده است. نتایج حاصله حاکی از این بود که استفاده از غلظت ۲۰ میکرومول در لیتر جنسستین در دمای پائین‌تر از حد مناسب منطقه ریشه، باعث افزایش گره‌زایی در گونه *M. polymorpha* شده است. با توجه به خصوصیت القاء گره‌زایی جنسستین در یونجه‌های یک‌ساله، می‌توان گفت که در اثر کاهش دما، میزان تولید و ترشح جنسستین به محیط اطراف ریشه کاهش یافته، بنابراین میزان گره‌زایی به شدت کاهش می‌یابد. گونه *M. polymorpha* از نظر گره‌زایی و درصد نیتروزن، حساسیت بیشتری به کاهش دمای منطقه ریشه نسبت به گونه *M. rigidula* نشان می‌دهد، بنابراین استفاده جنسستین در گونه *M. polymorpha* اثر بیشتری در کاهش تأثیر منفی دمای پائین منطقه ریشه بر روی گره‌زایی و تثبیت نیتروزن و افزایش آنها نسبت به سایر گونه‌ها داشته است. استفاده از جنسستین تعداد گره‌ها و مقدار ماده خشک گره را در گیاه افزایش می‌دهد، و زمان شروع تثبیت نیتروزن را در سویا در طول فصل رشد و هنگامیکه خاک هنوز سرد است تسریع می‌کند (۴۲). جنسستین زمان آغاز پیچیدگی ریشه‌های موئین را جلو می‌اندازد و زمان شروع تلقیح، برای تثبیت نیتروزن را کوتاه می‌نماید و میزان نهایی نیتروزن موجود در گیاه را در دمای

مشاهده گردید که نشان دهنده تأثیر زیاد این صفات بر روی یکدیگر و نیز تأثیر شدید بر روی گره‌زایی در گیاه می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص می‌گردد که گونه‌ها از لحاظ گره‌زایی و سایر صفات مورد بررسی تفاوت معنی‌داری داشته‌اند و گونه‌های *M. rigidula* و *M. polymorpha* از لحاظ تمامی صفات اندازه‌گیری شده نسبت به گونه *M. radiata* برتر بوده و توانایی بیشتری در تثبیت نیتروزن در دمای پائین منطقه ریشه دارا بودند. که مشابه نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر در مورد سایر لگوم‌ها می‌باشد (۴۲ و ۴۴).

دمای ۵ درجه سانتی‌گراد منطقه ریشه بر روی گره‌زایی و تثبیت نیتروزن گونه‌های یونجه یک‌ساله تأثیر شدیداً کاهنده‌ای داشت. حرارت زیر ۳ درجه سانتی‌گراد در خاک سبب توقف فعالیت باکتری‌ها شده، به علاوه باعث تأخیر نفوذ باکتری به ریشه گیاه و کاهش فعالیت نیتروزناز می‌گردد (۱۰). استقرار یک گره کارآمد، ناشی از یک‌سری رخدادها، شامل کلنی شدن باکتری در ریزوسفر، جذب ریزوبیوم به تارهای کشنده ریشه، خمیدگی تار کشنده و تشکیل رشته تلقیح در درون تارهای کشنده حاصل می‌شود (۲۱). بررسی‌های روبین و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد دمای پائین محیط به ویژه دو مرحله ابتدائی تشکیل گره (کلنی شدن باکتری در ریزوسفر و جذب ریزوبیوم به تارهای کشنده ریشه) را متوقف کرده مانع از تلقیح مناسب ریشه با باکتری می‌گردد.

استفاده از جنسستین باعث افزایش گره‌زایی و تثبیت نیتروزن گونه‌های یونجه یک‌ساله مورد بررسی در دمای پائین منطقه ریشه شده است. غلظت ۲۰ میکرومول بر لیتر جنسستین نسبت به سایر تیمارهای جنسستین تأثیر بیشتری در گره‌زایی و درصد نیتروزن گونه‌های یونجه یک‌ساله مورد آزمایش داشت. جنسستین تعداد و ماده خشک گره و میزان

گونه‌های دیگر است، بنابراین عکس‌العمل گونه *M. rigidula* به افزایش جنسیتین به محیط ریشه به شدت گونه *M. polymorpha* نمی‌باشد. جنسیتین تعداد آلودگی‌ها را در گونه‌های یونجه یک‌ساله که در دمای پائین منطقه ریشه کشت شده، افزایش داده و در گونه‌های حساس‌تر به سرما، این تأثیر بیشتر می‌باشد. ارتباط مثبت و قوی بین غلظت ایزوفلاوین ریشه و تعداد گره در سویا وجود دارد (۱۳).

در نهایت می‌توان اظهار داشت که در شرایط اقلیمی سرد، که دماهای پائین در ابتدای فصل رشد و نمو حاکم بوده و دمای منطقه ریشه کمتر از حد مناسب است، استعمال جنسیتین در ارقام مقاوم و نیمه مقاوم به سرما یونجه یک‌ساله باعث افزایش تعداد گره، وزن خشک گره، کارایی و فعالیت گره می‌گردد.

پائین منطقه ریشه افزایش می‌دهد (۴۱). کارایی و تعداد بیشتر گره‌ها که در نتیجه کاربرد جنسیتین حاصل شده، بوسیله درجه حرارت محدود نشده و نیتروژن تثبیت شده کل و عملکرد نیتروژن گیاهان سویا که با *B. japonicum* و جنسیتین در دوره قبل از جوانه‌زنی تیمار شده بیشتر از آنهایی بود که بطور منظم، ماده تلقیحی باکتری را دریافت کرده بودند (۴۱).

نتایج نشان داد که جنسیتین تأثیر بیشتری بر روی گره‌زایی و تثبیت نیتروژن ارقام حساس نسبت به ارقام نسبتاً مقاوم به سرما دارا است. در گونه *M. rigidula* استفاده از جنسیتین نیز باعث افزایش گره‌زایی و درصد نیتروژن شده، اما این اثر به دلیل مقاومت بیشتر این گونه به سرما، که احتمالاً به توانایی آن در تولید و ترشح بیشتر ایزوفلاون‌ها در شرایط تنش سرما به محیط اطراف ریشه نسبت به

منابع

- ۱- امینی دهقی، م. ۱۳۸۲. تأثیر دماهای مختلف هوا و خاک بر رشد، نمو، گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در گونه‌های یونجه یک-ساله. رساله دکتری زراعت. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس. ۳۶۶ صفحه.
- ۲- امینی دهقی، م.، مدرسی ثانوی، ع. و حیدری شریف آباد، ح. ۱۳۸۵. تأثیر جنسیتین بر روی رشد و نمو سه گونه یونجه یک-ساله تحت تنش دمای پائین خاک. مجله علمی کشاورزی. ۲۹: ۱۵-۳۳ ص.
- ۳- ترک نژاد، ا. ۱۳۷۸. بررسی پتانسیل‌های اکولوژیکی یونجه‌های یک‌ساله ایران، پایان نامه دکتری زراعت، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ۲۱۲ ص.
- ۴- سندگل، ع. ملک پور، ب. ۱۳۷۱. اصول زراعت و انتخاب گونه و ارقام مناسب یونجه‌های یک‌ساله در مراتع و مناطق دیم ایران، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، نشریه شماره: ۸۹، ۶۹ ص.
- 5- Amini Dehaghi, M. and Modarres, S. A. M. 2003. Effect of root-zone temperature on morphology, growth and development, yield and components of annual medics. Australian Journal of Agricultural Research, 54: 917-921.
- 6- Azizi, K., Amini Dehaghi, M. and Abbasipour, H. 2004. Effect of different air and root- zone tempratures on nitrogen fixation and nodulations of annual medics. Journal of Agronomy, 3 (2): 131-136.
- 7- Bauchan, G. R., 1998, What are annual medics?. Proceeding of the 35th North American Alfalfa Improvement Conference.
- 8- Blondel, J. and J. Aronson. 1999. Biologi and wildlife in the Mediterranean region. Oxford University Press. Oxford
- 9- Bounejmate, M., Robson, A. D. and Beale, P. E. 1992. Annual Medicago species in Morocco. II. Distribution in Relation to soil and climate. Australian Journal of Agriculture Research, 43: 751- 763.
- 10-Clarkson, N. M., and Russel, J. S., 1979. Effect of temperature on the development of two annual medics. Australian Journal of Agriculture Research, 30: 909-916.

- 11-Cocks, P. S. and Ehrman, T. A. M. 1987. The effect of geographic origin on frost tolerance of pasture legumes in Syria. *Journal of Applied Ecology*, 24: 673- 683.
- 12-Cocks, P. S. 1992. Plant attributes leading to persistence in grazed annual medics (*Medicago* spp.) growing in rotation with Wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 43: 1106-1112.
- 13-Cho, M. J. and Harper, J. E. 1991b. Effect of localized nitrate application on isoflavonoid concentration and nodulation-mutant soybean plants. *Plant Physiology*, 96: 1106-1112.
- 14-Dalal, R. C., Strong, W. M., Weston, E. J., Cooper, J. E., Lahance, K. J., King, A. J., and Chiken, C. J. 1995. Sustaining productivity of a Vertisol at Wara, Queensland with fertilizers, no-tillage, or legumes 1. Organic matter status. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 35: 903-913
- 15-Ehrman, T. A. M., and Cocks, P. S., 1990. Ecogeography of annual legumes in dryland. *Agronomy Journal*, 63: 359-362.
- 16-Francis, C. M., 1988. Selection and agronomy of medics for dryland pasture in Iran. Project TcP/IRAN/6652. 235.
- 17-Feng, Z. 1996. Soybean symbiotic signal exchange, nodulation and nitrogen fixation under suboptimal rootzone temperature. Department of Plant Science, McGill University, Montreal, Quebec. Ph.D Thesis. pp:220.
- 18-Fyson, A. and Sprent, J. I. 1982. The development of primary root nodule on *Vicia faba* L. grown at two root temperatures. *Ann. Bot.*, 50:681-692.
- 19-Hanson, C. H. 1988. Alfalfa improvement and production. *Journal of the American Society of Agronomy*, 39: 350-353.
- 20-Hardy, R. W., Holstein, W. F., Jackson, E. K. and Burns, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43: 1185-1207.
- 21-Heidari, S. A. H. 1994. Variation in the sensitivity of nodulation and nitrogen fixation to nitrate in annual *Medicago* species. Ph.D. Thesis. Adelaide University, Australia. pp: 179.
- 22-Hekenby, M., M. Carmen Antolin and M. Sanchez-Diaz. 2006. Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environmental and Experimental Botany*. 55:305-314.
- 23-Krall, J., Groose, R.W. and Sobels, J. 1996. Winter survival of Australian winter pea and annual medic on the Western High Plains. p. 237-240. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Alexandria, VA.
- 24-Lee, M. T. and Wilson, G. L. 1972. The calcium and pH component of lime responses in tropical legumes. *Australian Journal of Agricultural Research*, 23: 45-53.
- 25-Legros, P. and Smith, D. L. 1994. Root zone temperature sensitivity of nitrogen fixing and nitrate supplied soybean [*Glycin max* (L.) Merr. Cv. Maple Arrow] and lupin (*Lupinus albus* L.cv. Illtra) plants. *Environ. Exp. Bot.*, 34: 117-784.
- 26-Lynch, D.H. and Smith, D.L. 1993a. Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]Nodulation and N₂ fixation as affected by period of exposure to a low root zone temperature. *Plant Physiol.*, 88:212-223.
- 27-Obaton, M., L. Materon, M. Zaklouta and G. Gintzburger. 1996. Effect of low temperature on the nitrogen nutrition of annual medics: Preliminary results. In: Genier, G. and Prosperi, J. M. (Eds.). FAO/CIHEAM. *Option Mediterraneennes*, 18:103-112.
- 28-Peters, N. K. and Long, S. R. 1988. *Rhizobium meliloti* nodulation gene inducers and inhibitors. *Plant Physiology*, 88: 394-400.
- 29-Puckridge, D. W. and French, R. J. 1983. The annual Legume pasture in cereal- Ley farming systems of southern Australia: a review. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 9: 229-267.
- 30-Pueppke, J. L. 1996. The genetics and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. *Critical Review of Biotechnology*, 16: 1-51.
- 31-Robin, G., K. Sulta-Tubeileh, M. Obaton and A. Guckert. 2005. Nitrogen fixation and growth of annual *Medicago-Sinorhizobium* associations at low temperature. *European Journal of Agronomy*, 15:221-229
- 32-Roughly, R. J. and Date, R. A. 1986. The effect of strain of *Rhizobium* and of temperature on nodulation and early growth of *Trifolium semipilosum*. *Exp. Agric.*, 22: 123-131.
- 33-SAS Institute Inc. 1997. *SAS User,s Guide*. Statistical Analysis Institute Inc., Cary, North Carolina. 1675 p.
- 34-Shrestha, A., J. W. Fisk, P. Jeranama, J. M. Squire and O. B. Hesterman. 2001. Annual medics. Department of Crop and Soil Science. Michigan State University.
- 35-Sultan, K., G. Gintzburger, M. Obaton, C. Robin, H. Touchane and A. Guckert. 2001. Growth and nitrogen fixation of annual *Medicago-Rhizobium* associations during winter in Mediterranean region. *European Journal of Agronomy*. 15:221-229
- 36-Sprent, J. I. and Minchin. F. R. 1985. *Rhizobium*, nodulation and nitrogen fixation. In: *Grain Legume Crops*, eds. Summerfield R. J. and Robert E. H. pp.115-143. Collins and Sons, London.
- 37-Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1980. *Principles and procedures of statistics: a Biometric Approach*. 2nd Edition, McGraw-Hill, New York, NY. 633p.

- 38-Van, R. R. and Vanderleyden, J. 1995. The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiology Review*, 59: 124-142.
- 39-Verma, D. P. S. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of rhizobium. *Plant Cell*, 4: 372-382.
- 40-Zhang, F., and Smith, D. L. 1994. Effects of low root zone temperature on the early stages of symbiosis establishment between soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Exp.Bot.*, 279:1467-1473.
- 41-Zhang, F., and Smith, D. L. 1995. Preincubation of *Bradyrhizobium japonicum* with genistein accelerates nodule development of soybean [*Glycin max* (L) Merr.] at suboptimal root zone temperatures. *Plant Physiol.*, 108:961-968.
- 42-Zhang, F., Dashti, N., Hynes, R. K. and Smith, D. L. 1996. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycin max* (L.) Merr.] Nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root temperatures. *Ann. Bot.*, 35:279-285.
- 43-Zhang, F., Lynch, D. H. and Smith, D. L. 1995. Impact of low root temperatures on soybean [*Glycin max* (L.) Merr.] On nodulation and nitrogen fixation. *Journal of Environmental and Experimental Botany*, 35: 276-285.
- 44-Zhu, Y., C. C. Sheaffer, M. P. Russel and C. P. Vance. 1998. Dry matter acculation and dinitrogen fixation of annual *Medicago* species. *Agronomy Journal*, 90:103-108

Effect of Genestein Concentration on Nodulation and Nitrogen Content of Three Annual Medic Species in Low Root Zone Temperature

Kh. Azizi^{1,*}, A. Dadekhah² and S. Jalali Honarmand³

1. Assistant Professor of Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University.
2. Assistant Professor of Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University.
3. Assistant Professor of Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Razi University.

Received: 07/10/2008

Accepted: 22/02/2009

Abstract

Effect of different genestein concentrations on nitrogen content and nodulation in annual medics was studied; this research was done under controlled environmental condition at the 20/25 °C day/night air temperatures and 5 °C low root zone temperature. Three annual medics species (*Medicago polymorpha*, *Medicago radiata*, *Medicago rigidula*) adapted to cold and temperate zones and 5 genestein levels (0, 10, 20, 30 and 40 μM) were considered in this study. The experiment was conducted in complete randomize block design, factorially arranged, with 3 replications. *M. rigidula* and *M. polymorpha* were superior than *M. radiata* for all measured traits. The mentioned species produced more nodules than *M. radiata* at low root zone temperature. Genestein increased nodulation and nitrogen content of annual medics at low root zone temperature. Also 20 μM genestein had the highest effect on nodulation and nitrogen content at low root zone temperature. Root dry matter, nodule number, nodulation and nitrogen content were increased in annual medics at 5 °C, by genestein application. Interaction between cultivars and genestein concentrations showed that *M. polymorpha* with 20 μM genestein application was more efficient in most of measured traits than other species. So, using genestein could be helpful for increasing nodulation and size of nodules in regions with low air and soil temperature in the beginning of growing season.

Keywords: Annual medics, Low root temperature, Nodulation, Nitrogen content, Genestein.