مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۲۹، شماره ۲، سال ۱۳۹۲

استفاده از مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل در گزینش ارقام متحمل به سرما در برخی از گونه‌های شبدر

Application of Chlorophyll Fluorescence Attributes in Selection for Cold Tolerance in Some Clover Species

محمد زمانیان[۱]، سید عطاءالله سیادت[۲]، قدرت‌الله فتحی[۳]، رجب چوکان[۴]، علی‌اشرف جعفری[۵]، عبدالمهدی بخشنده[۶] و علی مقدم[۷]

۱- دانشجوی دکتری زراعت دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز (نگارنده مسئول)
۲، ۳ و ۶- استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز
۴- استاد موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۵- استاد موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران
۷- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۹

چکیده

زمانیان، م.، سیادت، س. ع.، فتحی، ق.، چوکان، ر.، جعفری، ع. ا.، بخشنده، ع. م. و مقدم، ع. ۱۳۹۲. استفاده از مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل در گزینش ارقام متحمل به سرما در برخی از گونه‌های شبدر. **مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۲۹ (۱):** ۲۶۷ - ۲۵۱.

به منظور بررسی مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل و صفات فیزیولوژیک در گونه‌های شبدر در دماهای پایین آزمایشی در سال ۹۱-۱۳۹۰ در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر با ۱۰ رقم شبدر به صورت کرت‌های خرد شده در زمان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در سه زمان نمونه‌برداری در مزرعه اجرا شد. نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های شبدر از نظر مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل برگ و صفات فیزیولوژیک در دمای پایین تفاوت معنی‌دار وجود داشت. مؤلفه F_v/F_m (۰/۷۵۵-۰/۵۹۷) نشان داد که تنش دما پایین بر ژنوتیپ‌های شبدر موثر بود. بیشترین مقدار F_v/F_m مربوط به گونه شبدر ایرانی و حداقل آن مربوط به گونه شبدر قرمز بود و از این نظر نسبت به سرما متحمل‌ترین و حساس‌ترین گونه‌ها شناسایی شدند. عدد کلروفیل بیشترین همبستگی معنی‌دار را با مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل برگ در شرایط تاریکی داشت. با توجه به نتایج این پژوهش از بین مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل، مؤلفه حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) و از بین صفات فیزیولوژیک، حداکثر نشت سلولی (EL) و عدد کلروفیل (CCI) معیارهای مناسب برای انتخاب ارقام شبدر متحمل به تنش دماهای پایین می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: شبدر، تنش دمای پایین، صفات فیزیولوژیک و فلورسانس کلروفیل.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: m_zamaniyan@yahoo.com

مقدمه

شبدر از مهم‌ترین گونه‌های علوفه‌ای خانواده بقولات در مناطق سرد و معتدل است (Jiang, 2004). در ایران شبدر بعد از یونجه مهمترین گیاه علوفه ای بوده که دارای سطح زیر کشت حدود یک صد هزار هکتار می‌باشد (Zamanian, 2005).

فلورسانس در معنی لغوی بازتاب نور است. چنانچه مقدار ملایمی از نور بر روی واحدهای فتوسنتزی موجود در غشای تایلاکوئید تابیده شود، رنگدانه‌های موجود در آنتن‌های جمع‌آوری کننده نور آن را دریافت و با طول موج نور قرمز آن را به مرکز واکنش فتوسیستم دو (PS II) منتقل می‌نمایند. اگر به هر دلیلی در زنجیره انتقال الکترون، پذیرش الکترون جدید صورت نگیرد انرژی به صورت نور قرمز رنگ (فلورسانس) بازتاب خواهد کرد که به آن فلورسانس کلروفیل می‌گویند (Hasibi, 2007). اگر چه مقدار کل فلورسانس کلروفیل خیلی کم است (۱ تا ۲٪ کل نور جذب شده) اما اندازه‌گیری آن کاملاً آسان است(Maxwell and Johanson, 2000).

مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل شامل F_0 (حداقل فلورسانس از برگ سازگار شده با تاریکی)، F_m (حداکثر فلورسانس در برگ سازگار شده با تاریکی)، F_v (میزان تغییر فلورسانس یا فلورسانس متغیر از برگ سازگار شده با تاریکی)، F_v/F_m (حداکثر کارآیی یا عملکرد کوآنتومی فتوسیستم دو در شرایط سازگار شده با تاریکی) می‌باشند (Maxwell and Johanson, 2000).

موسکوین و همکاران (Moskvin *et al.*, 1998) گزارش دادند که در شرایط مختلف تشعشعی و تغذیه‌ای میزان فلورسانس در شبدر متفاوت است. فیلهو و همکاران (Filho *et al.*, 2004) از بررسی پارامترهای فلورسانس کلروفیل در دو جمعیت بقولات گزارش دادند که برتری کارایی فتوسنتز در فتوسیستم دو در جمعیت برتر به علت بالا بودن پارامتر F_v/F_m (۰/۸۱۴) آن نسبت به جمعیت دیگر (۰/۷۸۳) بود.

النا و همکاران (Elena *et al.*, 2003) از بررسی تاثیر ازن بر فلورسانس کلروفیل دو گونه شبدر سفید و شبدر قرمز گزارش دادند که ازن در هر دو گونه باعث کاهش معنی‌دار پارامتر F_v/F_m شد. آنها همچنین میزان پارامترهای F_0، F_m و F_v/F_m را در شبدر سفید و شبدر قرمز به ترتیب ۷۸ و ۸۲،۴۲۱ و ۴۲۹، ۰/۷۹۳ و ۰/۸۰۹ اعلام نمودند.

فرانسینی و همکاران (Francini *et al.*, 2007) از بررسی اثر ازن بر تغییر متابولیکی شبدر سفید گزارش دادند که ازن باعث تغییر مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل گردید، به طوری در تیمارهای شاهد و تنش ازن میزان F_0 به ترتیب ۱۷۶ و ۱۸۹، F_m برابر ۱۱۲۰ و ۹۹۲ و F_v/F_m برابر ۰/۸۴۴ و ۰/۸۰۹ بود.

شان گوان (Shanguan, 2008) از بررسی تاثیر سطوح مختلف غلظت نیتروژن و تشعشع بر

عملکرد فتوسنتز گیاهچه‌های شبدر سفید نشان داد با افزایش سطوح نیتروژن از ۵ به ۱۵ میلی‌مولار و میزان تشعشع از ۲۰۰ به ۴۰۰ میکرومتر بر مترمربع در ثانیه، میزان کلروفیل برگ، کارایی فتوسنتز و F_v/F_m افزایش یافت. ایشان میزان F_v/F_m در میزان تشعشع ۲۰۰ میکرومتر بر مترمربع در ثانیه در غلظت‌های ۵ و ۱۵ میلی‌مولار نیتروژن را به ترتیب ۰/۸۴۲ و ۰/۸۴۶ گزارش نمود.

ابراهیم و همکاران (Ibrahim *et al.*, 2008) اعلام نمودند اندازه‌گیری پارامتر F_v/F_m در شرایط تاریکی یک روش سریع برای نشان دادن میزان حساسیت به سرما در اغلب گیاهان است و در حالت انطباق با تاریکی (Dark adaptation) پارامتر F_v/F_m نشان‌دهنده حداکثر کارایی کوانتوم فتوسیستم II بوده و شاخص مهمی برای عملکرد فتوسنتزی گیاه می‌باشد (Johanson *et al.*, 1993; Araus *et al.*, 1998; Maxwell and Johanson, 2000; Baker and Rosenqvist, 2004).

فلورسانس اولیه (F_0) تحت تاثیر تنش‌های محیطی که تغییر ساختاری در مراکز واکنش اولیه PS II بوجود می‌آورد قرار گرفته بنابراین خسارت خشکی و دمایی با خسارت به مرکز واکنش PS-II موجب افزایش شدید F_0 می‌گردد (Araus *et al.*, 1998). کارایی افت غیر فتوشیمیایی فلورسانس نیز به عوامل بیرونی و درونی زیادی وابسته بوده و در تغییر F_m با فلورسانس حداکثر منعکس می‌گردد (Maxwell and Johanson, 2000).

حسیبی و همکاران (Hasibi *et al.*, 2007) از غربال کردن ژنوتیپ‌های برنج در دماهای پایین با استفاده از فلورسانس کلروفیل گزارش دادند که از بین مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل مؤلفه F_v/F_m (حداکثر عملکرد کوآنتمی فتوسیستم دو) بهترین معیار برای انتخاب لاین‌های متحمل به تنش دماهای پایین است. شهبازی و همکاران (Shahbazi *et al.*, 2009) از بررسی وراثت‌پذیری پارامترهای فلورسانس گندم در شرایط تنش خشکی آخر فصل گزارش دادند که از بین پارامترهای فوق فقط پارامتر F_v/F_m رابطه مثبتی با تحمل تنش به خشکی دارد و از آن به عنوان یک معیار مکمل در انتخاب برای تحمل به تنش خشکی نام برد.

تحقیقات نشان می‌دهد که در اکثر گونه‌های گیاهی مقادیر F_v/F_m در شرایط سازگاری به تاریکی در شرایط مطلوب حدود ۰/۸۳ است و در مقادیر کمتر از ۰/۸۳ بیانگر تحت تنش بودن گیاه می‌باشد (Johnson *et al.*, 1993; Schreiber and Bilger, 1987; Bjorkman and Demming, 1987). به طور کلی مقادیر F_v/F_m در برگهای عادت کرده به تاریکی در گیاهان تحت تنش شدید بین ۰/۷۵ تا ۰/۸۵ متغیر می‌باشد (Baker, 1991).

آزمون نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی به عنوان روشی مناسب برای ارزیابی تراوایی غشاء در ارتباط با اثر تنش‌های محیطی

از جمله سرما بر گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گرفته است (Eugenia *et al.*, 2003). پورموسوی و همکاران (Poormosavi *et al.*, 2007) از بررسی اثر تنش خشکی و کود دامی بر میزان محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشاء سلولی و میزان کلروفیل سویا گزارش دادند که با افزایش درصد محتوای نسبی آب برگ (Relative Water Content = RWC)، فشار درون سلول برای رشد و در نهایت اتساع دیواره سلول افزایش می‌یابد و همین مسئله باعث کاهش پایداری غشاء سلولی می‌شود. میزان کلروفیل در گیاه به قابلیت دسترسی نیتروژن خاک و توانایی جذب نیتروژن توسط گیاه، وابسته است و اینها از جمله عوامل مهم مدیریت در مزارع به شمار می‌روند (Jongschaap and Booij, 2004).

هدف از این پژوهش بررسی و مطالعه مؤلفه‌های فلورسانس و صفات فیزیولوژیک ارقام شبدر در دماهای پایین بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی پارامترهای فلورسانس کلروفیل و صفات فیزیولوژیک ارقام شبدر در دماهای پایین آزمایشی به صورت کرت‌های خرد شده در زمان با ۱۰ رقم شبدر مربوط به چهار گونه مختلف در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در کرت‌هایی با ابعاد ۱۰ ×۴ متر در سال ۹۱-۱۳۹۰ در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر با طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۶ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۵۹ دقیقه شمالی، ارتفاع ۱۳۲۱ متری از سطح دریا، بافت خاک مزرعه لومی در عمق ۴۰-۰ سانتی‌متری، pH= ۸/۱، EC= ۳/۴ دسی‌زیمنس بر متر و درصد ماده آلی ۰/۹۴ درصد در مزرعه اجرا شد.

در این آزمایش عامل اصلی ۱۰ رقم شبدر (جدول ۱) و عامل فرعی سه زمان نمونه‌برداری به هنگام وقوع تنش دمایی (۱۳۹۰/۹/۲۹ با میانگین حداقل دمای ۴/۳- و ۳/۶- درجه سانتی‌گراد، ۱۳۹۰/۱۰/۷ با میانگین حداقل دمای ۳/۵- و ۱/۲- درجه سانتی‌گراد و ۱۳۹۰/۱۱/۱۷ با میانگین حداقل دمای ۵/۳- و ۵/۸- درجه سانتی‌گراد به ترتیب دمای ماهیانه و روزانه در سطح خاک) در نظر گرفته شدند.

کاشت در ۲۴ شهریور بر اساس میزان بذر مصرفی برای ارقام گونه‌های شبدر ایرانی و شبدر قرمز ۲۰ کیلوگرم و برای ارقام گونه‌های شبدر برسیم و شبدر لاکی ۲۵ کیلوگرم در هکتار و فاصله خطوط ۵۰ سانتی‌متر انجام شد. بر اساس توصیه کودی در شهریور قبل از کاشت مقدار ۹۰ کیلوگرم فسفر به صورت P_2O_5 و ۴۰ کیلوگرم نیتروژن خالص در هکتار مصرف شد (Zamanian, 2005).

اندازه‌گیری پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگ شامل F_0 (حداقل فلورسانس از برگ سازگار شده با تاریکی)، F_m (حداکثر

جدول ۱- نام و منشاء ژنوتیپ‌های شبدر

Table 1. Name and origin of clover genotypes

شماره ژنوتیپ Genotyps No.	Clover name	نام شبدر	نام علمی Scientific name	نام/کد ژنوتیپ Name/ Code of genotype	Origin	منشا	Maturity group	گروه رسیدگی
1	Persian clover	شبدر ایرانی دیررس	*Trifolium resupinatum* L.	KPC-PL1	Iran	ایران	Late maturity	دیررس
2	Persian clover	شبدر ایرانی متوسطرس	*Trifolium resupinatum* L.	KPC-PM	Iran	ایران	Medium maturity	متوسطرس
3	Persian clover	شبدر ایرانی زودرس	*Trifolium resupinatum* L.	KPC-PE1	Iran	ایران	Early maturity	زودرس
4	Persian clover	شبدر ایرانی (یک چین)	*Trifolium resupinatum* L.	KPC-PE2	Iran	ایران	Very early maturity	خیلی زودرس
5	Persian clover	شبدر ایرانی دیررس	*Trifolium resupinatum* L.	KPC-L13	Iran	ایران	Late maturity	دیررس
6	Persian clover	شبدر ایرانی دیررس	*Trifolium resupinatum* L.	KPC-L17	Iran	ایران	Late maturity	دیررس
7	Persian clover	شبدر ایرانی دیررس	*Trifolium resupinatum* L.	KPC-PL2	Iran	ایران	Late maturity	دیررس
8	Berseem clover	شبدر برسیم (کرج)	*Trifolium alexandrinum* L.	KBC-Toli.K	Italy	ایتالیا	Late maturity	دیررس
9	Red clover	شبدر قرمز	*Trifolium pratense* L.	Nasim	FAO	فائو	Late maturity	دیررس
10	Crimson clover	شبدر لاکی	*Trifolium incarnatum* L.	Alborz1	FAO	فائو	Very early maturity	خیلی زودرس

فلورسانس در برگ سازگار شده با تاریکی)، F_v (فلورسانس متغیر از برگ سازگار شده با تاریکی)، F_v/F_m (حداکثر عملکرد کوآنتومی فتوسیستم دو در شرایط سازگار شده با تاریکی) و صفات فیزیولوژیک حداکثر درصد نشت سلولی (Electrolyte Leakage = EL) و درصد محتوای نسبی آب برگ (Relative Water Content = RWC) و عدد کلروفیل (Chlorophyll Content Index = CCI) در مرحله رشد روزتی و رویشی (حدفاصل بین مرحله نموی ظهور اولین سه برگچه مرکب تا مرحله پنجه‌زنی) در سه نوبت آذر (۱۳۹۰/۹/۲۹ با میانگین حداقل دمای ۴/۳- و ۳/۶- درجه سانتی‌گراد)، دی (۱۳۹۰/۱۰/۷ با میانگین حداقل دمای ۳/۵- و ۱/۲- درجه سانتی‌گراد و بهمن (۱۳۹۰/۱۱/۱۷ با میانگین حداقل دمای ۵/۳- و ۵/۸- درجه سانتی‌گراد) به ترتیب دمای ماهانه و روزانه اندازه گیری (جدول ۲) شد.

جدول ۲- میانگین حداقل دمای ماهانه در سطح خاک، هوا و زمان نمونه گیری
Table 2. Monthly and daily mean minimum temperature of soil surface, air and sampling time

		Sampling time زمان نمونه‌گیری		
		S1	S2	S3
Mean Min. Temp.(C)	میانگین حداقل دما			
Soil surface	سطح خاک			
Monthly	ماهانه	-4.30	-3.5	-5.3
Sampling time	زمان نمونه‌گیری	-3.60	-1.2	-5.8
Air	هوا			
Monthly	ماهانه	-0.98	-1.03	-2.4
Sampling time	زمان نمونه گیری	0.68	1.3	-4.4

S1: Sampling on 19 Dec. 2012
S2: Sampling on 27 Dec. 2012
S3: Sampling on 05 Feb. 2013

S1: نمونه‌گیری در تاریخ ۲۹ / ۹ / ۱۳۹۰
S2: نمونه‌گیری در تاریخ ۷ / ۱۰ / ۱۳۹۰
S3: نمونه‌گیری در تاریخ ۱۷ / ۱۱ / ۱۳۹۰

برای اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل برگ بعد از حادث شدن دماهای پایین(زیر صفر درجه سانتی‌گراد حداقل در سه روز متوالی) در مزرعه، از هر رقم به طور تصادفی شش برگ کاملاً توسعه یافته در فاصله زمانی ساعت ۱۰-۸ صبح انتخاب و بعد از ۱۵ دقیقه تاریکی توسط کلیپس‌های مخصوص، شاخص‌های F_0، F_m، F_v و F_v/F_m توسط دستگاه فلورسانس متر کلروفیل (Opti-Science, USA) OS 30P اندازه‌گیری شدند.

برای تعیین وضعیت پایداری غشاء سلولی از حداکثر درصد نشت سلولی (EL) استفاده شد. به همین منظور بعد از وقوع تنش دماهای پایین در مزرعه تعداد ۱۰ برگچه کاملاً توسعه یافته

به طور تصادفی از بوته‌ها جدا و پس از انتقال به آزمایشگاه (به علت کوچکی برگچه‌ها امکان تهیه دیسک مقدور نبود و مستقیماً از برگچه‌های استفاده شد)، سه مرتبه با آب دو بار تقطیر جهت حذف املاح از سطح برگچه‌ها و سطوح آسیب دیده نیز شسته شدند.

نمونه‌های برگی از تیمارهای مختلف در ویال‌های محتوی ۲۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس میزان هدایت الکتریکی توسط دستگاه EC متر(مدل LF 538 ساخت آلمان) هدایت الکتریکی اولیه (EC1) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. سپس برای تعیین حداکثر هدایت الکتریکی (EC2) نمونه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۰۶ کیلوگرم بر سانتی‌متر اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند و بعد از سرد شدن لوله‌ها دوباره هدایت الکتریکی اندازه‌گیری و حداکثر درصد نشت سلولی از فرمول زیر محاسبه گردید (Eugenia *et al*., 2003).

$$EL\ (\%) = (EC1/EC2) \times 100$$

برای اندازه‌گیری درصد محتوای نسبی آب برگ‌ها (RWC) بعد از وقوع تنش دماهای پایین در مزرعه (در همان مرحله نمونه‌برداری نشت سلولی) بین ساعت ۱۲-۱۰ روز پنج برگ کاملاً توسعه یافته را به طور تصادفی از هر کرت انتخاب و بعد از قرار دادن در فویل‌های آلومینیومی، داخل کیسه‌های پلاستیکی و روی یخ قرار داده و سریعاً به آزمایشگاه منتقل و سپس با دستمال کاغذی گرد و خاک احتمالی روی سطح برگ را تمیز و در نهایت با ترازوی دقیق (دقت ترازو حداقل تا ۲ رقم اعشار و حداکثر تا ۴ رقم اعشار) وزن تر (Fresh Weight = WF) و سپس برگها را در ویال‌های محتوی ۲۵ سی‌سی آب مقطر دو بار تقطیر به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد و محیط تاریک قرار داده شدند.

بعد از این مدت برگها را خارج و با خشک کردن سطح آن (با دستمال کاغذی) دوباره وزن و وزن اشباع (Saturated weight = WS) آنها بدست آمد. در آخر همین برگها را در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و وزن خشک (Dry Weight = WD) برگها بدست آمد و سپس با استفاده از رابطهٔ زیر مقدار RWC محاسبه گردید (Kostopoulou and Barbayiannis, 2009; Koide *et al*., 1991).

$$RWC(\%) = \frac{WE - WD}{WS - WD} \times 100$$

شاخص محتوی کلروفیل (CCI) با استفاده از دستگاه کلروفیل متر CCM مدل ۲۰۰ (Opti-Science, USA) در همان شرایط مربوط به اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل بر روی ۱۰ برگ در هر تیمار انجام شد.

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Mstat-c و SAS و مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

فلورسانس کلروفیل برگ

نتایج این پژوهش نشان دادکه در تنش دماهای پایین مزرعه بین پارامترهای فلورسانس کلروفیل در شرایط تاریکی ارقام شبدر در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۳). همچنین این نتایج نشان داد که بین پارامترهای فلورسانس کلروفیل در زمان‌های اندازه‌گیری و اثر متقابل ارقام × زمان‌های اندازه‌گیری اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین مقدار پارامتر F_0 (حداقل فلورسانس از برگ سازگار شده با تاریکی) در زمان تنش S1 مربوط به ارقام شبدر ایرانی رقم شماره ۲ و شبدر قرمز به میزان ۱۳۴/۸، در زمان‌های تنش S2 و S3 مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۱ به میزان ۶۶/۵ و ۹۳/۳ می‌باشند (جدول ۴). در همین رابطه محققان علت افزایش فلورسانس اولیه (F_0) را تاثیر تنش‌های محیطی (دمایی) بر ساختار مراکز واکنش اولیه PS-II می‌دانند (Bobo and Planchon, 1992; Araus *et al.*, 1998).

با توجه به نتایج بالا گونه شبدر برسیم به علت سرعت رشد بالا و استقرار بهتر نسبت به بقیه گونه‌های شبدر کمتر تحت خسارت تنش سرما قرار گرفته و مقدار F_0 آن در همه تنش‌ها کمتر از بقیه بود. بیشترین مقدار پارامتر F_m (حداکثر فلورسانس در برگ سازگار شده با تاریکی) در زمان تنش S1 مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۴ به میزان ۵۶۷/۸، در زمان تنش S2 مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۲ به میزان ۲۷۸ و در زمان تنش S3 مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۱ به میزان ۳۷۳/۵ بود.

بیشترین مقدار پارامتر F_v (فلورسانس متغیر از برگ سازگار شده با تاریکی) در زمان تنش S1 مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۴ به میزان ۴۵۰/۸، در زمان تنش S2 مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۲ به میزان ۲۲۴/۸ و در زمان تنش S3 مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۱ به میزان ۲۸۰/۳ است. بیشترین مقدار پارامتر F_v/F_m (حداکثر عملکرد کوآنتومی فتوسیستم دو در شرایط سازگار شده با تاریکی) در زمان تنش S1 مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۴ به میزان ۰/۷۹۴، در زمان تنش S2 مربوط به شبدر برسیم به میزان ۰/۸۱۶ و در زمان تنش S3 مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۱ به میزان ۰/۷۵۰ بود (جدول ۴).

نتایج بالا نشان داد که در تنش دماهای پایین مزرعه نیز شبدر قرمز دارای عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) کمتری نسبت به بقیه ارقام بود (جدول ۴). به عبارت دیگر بیشتر تحت تاثیر تنش دماهای پایین قرار گرفت که این ممکن است به علت مرحله رشدی و

جدول ۳- خلاصه تجزیه واریانس مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل، محتوای نسبی آب برگ، نشت سلولی و عدد کلروفیل در ژنوتیپ‌های شبدر در شرایط دمای پایین

Table 3. Summary of analysis of variance for chlorophyll fluorescence attributes, relative water content (RWC), electrolyte leakage (LE) and SPAD value (CCI) in clover genotypes under low temperature conditions

			میانگین مربعات MS						
		درجه آزادی	حداقل فلورسانس	حداکثر فلورسانس	فلورسانس متغیر	کارایی کوانتومی فتوسیستم II	محتوای نسبی آب	نشت سلولی	عدد کلروفیل
S.O.V.	منابع تغییرات	df	F_0	F_m	F_v	F_v/F_m	RWC	EL	CCI
Replication (R)	تکرار	3	221.12^{ns}	2360.120^{ns}	2921.600^{ns}	0.0010^{ns}	21.49^{ns}	9.630^{ns}	47.970^{ns}
Treatment (T)	تیمار	9	371.51^{**}	18404.100^{**}	18133.900^{**}	0.0260^{**}	97.50^{**}	12.590^{**}	283.130^{**}
Error $_a$	خطای الف	27	95.93	2062.800	2499.200	0.0040	7.39	2.440	19.930
Sample time (S)	زمان نمونه‌برداری	2	41869.91^{**}	845786.300^{**}	559553.200^{**}	0.5940^{**}	5.63^{ns}	265.600^{**}	24.050^{**}
S × T	زمان نمونه‌برداری × تیمار	18	387.91^{*}	12208.100^{**}	10684.200^{**}	0.0170^{**}	17.15^{**}	8.450^{**}	21.870^{**}
Error $_b$	خطای ب	60	174.27	2777.559	2709.195	0.0051	6.66	2.115	2.158

* and **: Significant at the 5% and 1% probability levels, repectively.

ns: Not-significant

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪.

ns: غیر معنی‌دار

جدول ۴- میانگین مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل، محتوای نسبی آب برگ، نشت سلولی و عدد کلروفیل ژنوتیپ‌های شبدر در شرایط دمای پایین

Table 4. Mean of chlorophyll flurescence attributes, relative water content (RWC), electrolyte leakage (EL) and SPAD value (CCI) in clover genotypes under low temperature conditions

زمان نمونه‌برداری	ژنوتیپ	حداقل فلورسانس	حداکثر فلورسانس	فلورسانس متغیر	کارایی کوانتومی فتوسیستم II	محتوای نسبی آب	نشت سلولی	عدد کلروفیل
Sampling time	Genotype	F_0	F_m	F_v	F_v/F_m	RWC	EL	CCI
19 Dec. 2012	1	105.3bc	442.0bc	336.8b	0.762ab	89.1a	7.9bc	33.5a
	2	134.8a	525.5ab	390.9ab	0.744ab	85.6a	8.8ab	27.7bc
	3	113.0bc	503.0ab	390.0ab	0.775ab	88.6a	6.6c	29.1bc
	4	117.0abc	567.8a	450.8a	0.794a	87.4a	9.5a	32.3a
	5	115.8abc	482.5ab	366.8ab	0.760ab	86.4a	9.2a	29.8bc
	6	115.0abc	470.0ab	355.0b	0.755ab	89.0a	9.4a	28.5bc
	7	109.8bc	517.5ab	407.8ab	0.788a	85.6a	8.9ab	31.6a
	8	98.3c	337.5d	239.3c	0.709b	77.4b	8.2ab	28.9de
	9	134.8a	369.3cd	234.5c	0.63c	88.4a	7.1b	16.3e
	10	120.8ab	439.8bc	319.0bc	0.725b	79.9b	8.7ab	20.6d
	Mean	116.4a	465.4a	349.3a	0.734b	85.7a	8.9b	26.8a
27 Dec. 2012	1	66.5a	268.8ab	202.3a	0.753ab	83.7a	5.8cd	29.2a
	2	53.3ab	278.0a	224.8a	0.808a	85.4a	7.0b	26.6ab
	3	53.0ab	230.0ab	177.0a	0.770a	84.3a	10.0a	22.7b
	4	53.3ab	261.0ab	207.8a	0.796a	88.1a	7.3b	27.2ab
	5	50.5ab	247.0ab	196.5a	0.796a	83.6a	7.3b	29.6a
	6	42.3b	207.0b	164.8a	0.796a	85.3a	6.5bc	30.4a
	7	46.3b	212.8b	166.5a	0.783a	87.7a	7.3b	28.2ab
	8	41.9b	228.0ab	186.1a	0.816a	82.2a	6.4bc	26.6ab
	9	62.3ab	215.0ab	152.8a	0.710b	89.7a	4.9cd	15.7c
	10	51.5ab	234.0ab	182.5a	0.780a	84.3a	5.2cd	20.1b
	Mean	52.1c	238.2b	195.7b	0.788a	85.4a	6.8c	25.6b
05 Feb. 2013	1	93.3a	373.5a	280.3a	0.750a	88.8a	10.7cd	28.1a
	2	74.5bc	135.8cd	61.3d	0.451de	88.9a	13.0b	25.6b
	3	87.3bc	175.3bcd	88.0bcd	0.502bcde	88.1a	12.1bc	21.7c
	4	69.3c	212.3bc	143.0b	0.674abc	85.6b	12.0bc	26.9b
	5	80.0abc	200.8bc	120.8bcd	0.601abcd	85.1b	11.6bc	28.7a
	6	90.5ab	220.5b	130.0bc	0.590abcd	88.5a	12.2bc	29.2a
	7	79.5abc	144.3bcd	64.8cd	0.449cde	85.1b	15.3a	28.1a
	8	67.5c	163.5bcd	96.0bcd	0.587bcde	80.2c	10.4cd	26.2b
	9	68.0c	122.8d	54.8d	0.446cde	90.3a	12.7c	15.1d
	10	68.3c	198.8bc	130.5bc	0.657c	81.2c	9.1d	19.1d
	Mean	78.0b	194.7c	116.7c	0.555	86.2a	11.9a	24.8b
Mean	1	88.3a	361.4a	273.1a	0.755a	87.2bc	8.1c	30.6a
	2	87.5a	313.1bc	225.6bc	0.668c	86.6bc	9.6b	26.6b
	3	84.4a	302.8bc	218.3bc	0.682bc	87.0bc	9.6b	24.4c
	4	79.8a	247.0b	267.2ab	0.755a	87.0bc	9.6b	28.7ab
	5	82.1a	310.1bc	228.0bc	0.719abc	85.0c	9.3b	29.4a
	6	82.6a	299.2c	216.6c	0.714abc	87.6ab	9.3b	29.3a
	7	78.5ab	291.5c	213.0c	0.673bc	86.1bc	10.5a	29.3a
	8	69.2b	243.0d	173.8d	0.704b	79.9d	8.4c	23.8c
	9	88.3a	235.7d	147.3e	0.597de	89.5a	8.2c	15.7e
	10	80.2ab	290.8c	210.7c	0.721ab	81.8d	7.7cd	19.9d

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% of probability level- using Duncan's Multiple Range Test.

فنولوژیک آن باشد چون این رقم نسبت به بقیه ارقام از سرعت رشد کمتری برخوردار بود و از نظر رشد و استقرار نسبت به بقیه جوانتر بود و احتمالاً باعث حساسیت بیشتر آن به سرما شد.

در شبدر برسیم به علت سرعت رشد بالا و خواب پاییزه کمتر دارای رشد بیشتری نسبت به بقیه ارقام شبدر بود و همین باعث بهبود نسبی F_v/F_m آن شد (جدول ۴). میانگین مقادیر پارامتر F_v/F_m ارقام شبدر در تیمارهای تنش دماهای پایین در مزرعه (S1، S2 و S3) به ترتیب برابر ۰/۷۳۴، ۰/۷۸۸ و ۰/۵۵۵ بود که این بیانگر تاثیر سرما بر پارامتر F_v/F_m مخصوصا در تنش S3 نسبت به بقیه تیمارهای سرما بود (جدول ۴). اطلاعات هواشناسی تاییدی بر این موضوع می باشد (جدول ۲).

این تحقیق نشان داد که مؤلفه F_v/F_m یکی از مهمترین شاخص‌ها برای انتخاب ارقام متحمل به تنش سرما است. بیکر و نیی (Baker and Nie, 1994) و همچنین استاپیت و همکاران (Sthapit *et al.*, 1995) نشان دادند که از کاهش عملکرد کوانتومی می‌توان برای تعیین میزان تحمل به سرما در برنج استفاده نمود. آدامز و همکاران (Adams *et al.*, 1995) نیز با بررسی‌های زیاد گزارش دادند که مؤلفه F_v/F_m می‌تواند معیار مفیدی برای تعیین درجه تحمل به تنش سرما در گیاهان مختلف حتی در شدت نور کم باشد.

در همین راستا تعدادی از محققان (Schreiber *et al.*, 1994; Bjorkman and Demming, 1987; Johnson *et al.*, 1993) نیز گزارش دادند که مقادیر F_v/F_m در شرایط سازگاری به تاریکی در اکثر گونه‌های گیاهی در شرایط مطلوب حدود ۰/۸۳ می‌باشد و در مقادیر کمتر از ۰/۸۵ تا ۰/۷۵ گیاه تحت استرس شدید است. بنابراین با توجه به مقادیر F_v/F_m ارقام شبدر، می‌توان به موثر بودن تیمارهای دما پایین مزرعه بر F_v/F_m و تحت تنش بودن ارقام شبدر اذعان نمود. با توجه به شبکه متفاوت ریشه‌ای و همزیستی با باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن و تفاوت در اندام‌های هوایی (شاخ و برگ) گونه‌های مختلف شبدر در پاییز امکان تغذیه و دریافت تشعشع توسط برگ‌ها متفاوت خواهد بود و همین خصوصیات بر روی میزان فلورسانس کلروفیل برگ تاثیر دارد.

نتایج این پژوهش با گزارش‌های بسیاری از محققان مطابقت دارد و در همین رابطه موسکوین و همکاران (Moskvin *et al.*, 1998) گزارش دادند که پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگ در شبدر در شرایط مختلف تشعشعی و تغذیه‌ای متفاوت بود. فیلهو و همکاران (Filho *et al.*, 2004) از بررسی پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگ در دو جمعیت بقولات گزارش دادند که پارامتر F_v/F_m در بین جمعیت‌های بقولات متفاوت بود. آنها برتری کارایی فتوسنتز در فتوسیستم دو را در جمعیت برتر به بالاتر بودن پارامتر F_v/F_m (۰/۸۱۴) آن نسبت به جمعیت دیگر

(۰/۷۸۳) اعلام نمودند.

النا و همکاران (Elena *et al.*, 2003) از بررسی تاثیر ازن بر فلورسانس کلروفیل دو گونه شبدر سفید و شبدر قرمز نشان دادند میزان پارامترهای F_0، F_m و F_v/F_m در شبدر سفید و شبدر قرمز به ترتیب ۷۸ و۸۲، ۴۲۱ و۴۲۹، ۰/۷۹۳ و ۰/۸۰۹ بود. فرانسینی و همکاران (Francini *et al.*, 2007) نیز از بررسی اثر ازن بر تغییر متابولیکی شبدر سفید نشان دادند که در تیمارهای شاهد و تنش ازن میزان F_0 به ترتیب ۱۷۶ و ۱۸۹، F_m برابر ۱۱۲۰ و ۹۹۲ و F_v/F_m برابر ۰/۸۴۴ و ۰/۸۰۹ است.

صفات فیزیولوژیک

تجزیه آماری داده‌ها مربوط به صفات فیزیولوژیک نشان داد که بین ارقام شبدر از نظر محتوی نسبی آب برگ‌ها (RWC)، نشت سلولی (EL) و عدد کلروفیل (CCI) تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۳). بین صفات فیزیولوژیک در زمان‌های تنش (بجز اثر RWC) و اثر متقابل زمان نمونه‌گیری × ارقام نیز در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود داشت.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در تنش S1 حداکثر محتوی نسبی آب برگ‌ها (RWC) مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۱ به میزان ۸۹/۱ درصد، نشت سلولی (EL) مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۴ به میزان ۹/۵ میکرو زیمنس بر سانتی‌متر و عدد کلروفیل (CCI) مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۱ به میزان ۳۳/۵ بود (جدول ۴).

در زمان تنش S2 حداکثر درصد محتوی نسبی آب برگ‌ها (RWC) مربوط به شبدر قرمز به میزان ۸۹/۷ درصد، نشت سلولی (EL) مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۳ به میزان ۱۰ میکرو زیمنس بر سانتی‌متر و عدد کلروفیل (CCI) مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۶ به میزان ۳۰/۴ بود (جدول ۴). در زمان تنش S3 حداکثر درصد محتوی نسبی آب برگ‌ها (RWC) مربوط به شبدر قرمز به میزان ۹۰/۳٪، نشت سلولی (EL) شبدر ایرانی رقم شماره ۷ به میزان ۱۵/۳ میکروزیمنس بر سانتی‌متر و عدد کلروفیل (CCI) مربوط به شبدر ایرانی رقم شماره ۶ به میزان ۲۹ بود (جدول ۴).

از نظر بیشترین عدد کلروفیل (CCI) در زمان تنش S1 و میانگین سه زمان تنش شبدر ایرانی رقم شماره ۱ با عدد ۳۳/۵ و ۳۰/۶، در زمان‌های تنش‌های S2 و S3 شبدر ایرانی رقم شماره ۶ با عدد کلروفیل ۳۰/۴ و ۲۹ برترین ارقام بودند (جدول ۴). این در حالی است که در زمان‌های تنش و میانگین سه زمان تنش تقریباً گونه‌های قرمز و لاکی کمترین عدد کلروفیل را دارا بودند.

با توجه به ارتباط مثبت میزان کلروفیل برگ با میزان F_v/F_m این ارتباط در همین ارقام مشاهده شد. این نتایج با تحقیقات بازاز (Bazzaz, 1996) و ماکسول و یوهانسون (Maxwell and Johanson, 2000) مطابقت

جدول ۵- همبستگی بین مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل و صفات فیزیولوژیک ژنوتیپ‌های شبدر

Table 5. Correlation between chlorophyll fluorescence attributes and physiological traits of clover genotypes

	حداقل فلورسانس	حداکثر فلورسانس	فلورسانس متغیر	کارایی کوانتومی فتوسیستم II	محتوای نسبی آب	نشت سلولی	عدد کلروفیل
	F_0	F_m	F_v	F_v/F_m	RWC	EL	CCI
F_0	1						
F_m	0.361^{ns}	1					
F_v	0.222^{ns}	0.990^{**}	1				
F_v/F_m	-0.257^{ns}	0.733^{*}	0.806^{**}	1			
RWC	0.802^{**}	0.276^{ns}	0.164^{ns}	-0.325^{ns}	1		
EL	-0.051^{ns}	0.226^{ns}	0.244^{ns}	-0.065^{ns}	0.316^{ns}	1	
CCI	-0.047^{ns}	0.733^{*}	0.774^{**}	0.655^{*}	0.096^{ns}	0.567^{ns}	1

* and **: Significant at the 5% and 1% probability levels, repectively.

ns: Not-significant

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪.

ns: غیر معنی‌دار

RWC: Relative Water Content
EL: Electrolyte Leakage
CCI: Chlorophyll Content Index

دارد. نتایج همبستگی بین مؤلفه‌های فلورسانس و صفات فیزولوژیک (جدول ۵) نشان داد که مؤلفه F_v بیشترین همبستگی را با مؤلفه F_m (۰/۹۹۰) داشت و بیانگر این است که مؤلفه F_m جزء مهمی از مؤلفه F_v ($F_v=F_0+F_m$) بوده و تغییرات مؤلفه F_m باعث تغییر در میزان مؤلفه F_v می‌شود .این بررسی نشان داد که مؤلفه F_v/F_m دارای همبستگی معنی‌دار با مؤلفه‌های F_m و F_v است و نشان‌دهنده نقش مؤلفه‌های F_m و F_v در حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (F_v/F_m) است.

به طور کلی با افزایش محتوای نسبی آب برگ، تساع سلولی افزایش و همین باعث افزایش میزان نشت سلولی می‌شود. در همین رابطه پور موسوی و همکاران (Poormosavi *et al.*, 2007) نشان دادند که با افزایش درصد محتوای نسبی آب برگ (RWC) فشار درون سلول برای رشد و در نهایت اتساع دیواره سلول افزایش می‌یابد و باعث کاهش پایداری غشاء سلولی در سویا می‌شود. در این آزمایش این رابطه مشاهده نشد و به نظر می‌آید عوامل دیگری در این مسئله دخیل باشند و برای اظهار نظر دقیق‌تر انجام تحقیقات تکمیلی ضروری است.

نتایج بالا نشان داد که بین مؤلفه‌های F_m، F_v و F_v/F_m با عدد کلروفیل همبستگی معنی‌داری وجود دارد (جدول ۵). این بیانگر نقش کلروفیل در میزان مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل است. در این تحقیق می‌توان گفت که علت کاهش F_v/F_m مربوط به وقوع آشفتگی در کلروپلاست بود. کاهش عدد کلروفیل تقریباً در هر سه زمان تنش در گونه‌های شبدر بخصوص در گونه‌های شبدر قرمز و شبدر لاکی موید همین موضوع است (Hasibi *et al.*, 2007). زیرا فلورسانس کلروفیل به طور مستقیم به فعالیت کلروفیل در مرکز واکنش فتوسیستم‌ها ارتباط داشته و می‌توان از آن به عنوان معیاری برای اندازه‌گیری کارایی فتوسنتز استفاده نمود (Maxwell and Johanson, 2000; Bazzaz, 1996).

نتایج جدول ۵ نشان دادکه در این پژوهش بین میزان F_v/F_m و نشت سلولی همبستگی منفی وجود داشت به طوری که در تیمارهایی با میزان F_v/F_m بالا میزان نشت سلولی کمتر بود. این روند منطقی به نظر می‌رسد چون میزان نشت سلولی کمتر به معنی خسارت کمتر سرما و افزایش حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (F_v/F_m) می‌باشد. البته این نتیجه در گونه شبدر قرمز مشاهده نشد و با اینکه نشت سلولی کمتری دارد ولی میزان F_v/F_m آن هم کاهش یافته که شاید به دلیل کاهش بیش از حد میزان کلروفیل آن نسبت به سایر گونه‌های شبدر بود. شاید بتوان چنین نتیجه گرفت که بین میزان کلروفیل برگ و نشت سلولی ارتباط غیر مستقیمی وجود دارد.

بنابراین در بررسی اثر تنش دماهای پایین در شبدر تعیین صفات فیزیولوژیک EL و CCI مفید می‌باشد چون با افزایش تنش سرما تغییر این دو صفت مشهودتر بود. از این دو صفت

می‌توان به عنوان شاخص‌های کاربردی در مطالعات تنش سرما در شرایط مزرعه‌ای برای شبدر استفاده نمود.

با توجه به نتایج این پژوهش برای مطالعه و بررسی واکنش ژنوتیپ‌های شبدر به تنش دماهای پایین استفاده از شاخص‌هایی مثل پارامتر F_v/F_m (حداکثر عملکرد کوآنتومی فتوسیستم دو در شرایط سازگار شده با تاریکی)، صفات فیزیولوژیکی مثل حداکثر نشت سلولی(EL)، عدد کلروفیل (CCI) در مرحله رشدی حد فاصل مرحله ظهور اولین سه برگچه تا پنجه‌زنی توصیه می‌شود. از این شاخص‌ها می‌توان در غربال مزرعه‌ای برای انتخاب ارقام متحمل به سرما شبدر استفاده نمود.

با توجه به نقش نیتروژن در ساختمان کلروفیل و ارتباط کلروفیل با پارامتر F_v/F_m و همزیستی متفاوت ریشه گونه‌های شبدر با باکتری ریزوبیوم، مطالعه در این زمینه می‌تواند در راستای تکمیل این پژوهش باشد. به هر حال جهت مطالعه دقیقتر اثر تنش سرما بر روی صفات فیزیولوژیکی و پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگ ارقام گونه‌های مختلف شبدر در مزرعه و گلخانه نیاز به وسایل و تجهیزات مدرن و پیشرفته می‌باشد.

این پژوهش برای اولین بار جهت امکان غربال نمودن ژنوتیپ‌های مختلف شبدر در دماهای پایین بر اساس شاخص‌های فلورسانس کلروفیل و صفات فیزیولوژیک در شرایط مزرعه در کرج صورت گرفت. امید است تحقیقات تکمیلی در این زمینه در مورد گیاهان علوفه‌ای از جمله شبدر در آینده توسط محققان ادامه یابد.

References

Adams, W. W., Demming-Adams, B., Verhoven, A. S., and Barker D. H. 1995. Photo inhibition during winter stress-involvement of sustained xanthophylls cycle-dependent energy dissipation. Australian Journal of Plant Physiology 122: 261-267.

Araus, J. L., Amaro, T., Voltas, J., Nakkoul, H., and Nachit, M. M. 1998. Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. Field Crops Research 55: 209-223.

Baker, N. R. 1991. A possible role for photosystem II in environmental perturbation of photosynthesis. Physiologia Plantarum 81: 563-570.

Baker, N. R., and Nie, G. 1994. Chilling sensitivity of photosynthesis in maize. Pp. 465-481. In: Baja Y. P. S. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry: Maize. Berlin: Springer-Verlag.

Baker, N. R., and Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany 55 (403): 1607-1621.

Bazzaz, F. A. 1996. Plants in changing environments: linking physiological population and community ecology. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 320 pp.

Bjorkman, O., and Demmig, B. 1987. Photon yield of evolution and chlorophyll fluorescence at 77k among vascular plants of diverse origins. Planta 170: 489-504.

Elena, D. T., Carla, V., Lacia, D., and Gian, F. S. 2003. Co_2 photo-assimilation and chlorophyll flurescence in two clover species showing different response to O_3. Plant Physiology and Biochemistry 41: 485-493.

Eugenia, M., Nunes, S., and Smith, G. R. 2003. Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. Crop Science 43: 1349-1357.

Filho, J. P. L., Goulart, M. F., and Lavato, M. B. 2004. Chloropyll fluorescence parameters in population of two legume trees: Stryphnodendron adstringens and Cassia ferruginea. Revista Brasil Botany 27(3): 527-532.

Francini, A., Nali, C., Picchi, V., Lorenzini, G. 2007. Metabolic changes in white clover clones exposed to ozone. Environmental and Exprimental Botany 60: 11-19.

Hasibi, P., Moradi, F., Nabipoor, M. 2007. Screeing of rice genotypes for low temperature stress-using chlorophyll fluorescence. Iranian Journal of Crop Sciences 9(1): 14-31.

Hasibi, P . 2007. Physiological study of cold stress effect in seedling stage of rice genotyps. Ph. D thesis, University of Agriculture and Natural Resources of Ramin, Ahwaz. 145pp.

Ibrahim, M. M., and Bafeel, S. O. 2008. Photosynthetic efficiency and pigment contents in alfalfa seedling subjected to dark and chilling condition. International Journal of Agriculture and Biology 10-3: 306-310.

Jiang, G. M. 2004. Plant physiological ecology. Higher Education Press, Beijing.

Johnson, G, N., Young, A. J., Scholes, J. D., Horton, P. 1993. The dissipation of excess excitation energy in British plant species. Plant Cell and Environment 16: 673-679.

Jongschaap, R. E. E., and Booij, R. 2004. Spectral measurements at different spatial scales in potato relating leaf, plant and canopy nitrogen status. International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation 5: 205-218.

Maxwell, K., Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. Journal of Experimental Botany 51(345): 659-668.

Moskvin, O. V., Novichkova, N. S., and Ivanov, B. N. 1998. Induction of chlorophyll a fluorescence in clover leaf growth at varying nitrogen supply and irradiance levels. Russian Journal Plant Physiology 45:353-358.

Poormosavi, S. M., Golwi, M., Daneshiyan, J., Ghanbari, A., and Basirani, N. 2007. Study of stress drought and manure fertilizer effect on moisture content, electrolyte leakage and leaf chlorophyll content of soybean. Journal of Agriculture Science and Natural Resources 14(4): 65-77.

Schreiber, U., and Bilger, W. 1987. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. Pp. 27-53. In: Plants response to stress. Tenhunen, J. D., Catarino, F. M., Lange, O. L., and Oechel, W. D. (eds). Springer, Berlin.

Shahbazi, H., Bihamta, M. R., Taeb, M., and Darvish, F. 2009. Chlorophyll fluorescence attribute inheritance and correlation with terminal drought stress in wheat. Journal of Agriculture Sciences (Tabriz) 3 (10): 53-65.

Shangguan, Z. P. 2008. Specific leaf area, leaf nitrogen content and photosynthetic of *Trifolium repens* L. seedling grown at different irradiances and nitrogen concentrations. Photosynthetica 46(1): 143-147.

Sthapit, B. R., Witcombe, J. R., and Wilson, J. M. 1995. Methods of selection for chilling tolerance in Nepalese rice by chlorophyll fluorescence analysis. Crop Science 35: 90-94.

Zamanian, M. 2005. The effect of planting season on forage production of clover species. Seed and Plant 21(2): 159-173.