

ارتباط بین کاهش دمای محیط با میزان کلروفیل و کارایی فتوسیستم II برگ گونه‌های شبدر^۱

محمد زمانیان*

هیئت علمی پژوهش موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج-ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۲/۲۵)

چکیده:

به منظور بررسی ارتباط بین کاهش دمای محیط با میزان کلروفیل، کارایی فتوسیستم II و کارتنوئید برگ گونه‌های شبدر، آزمایشی به صورت اسپلینت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی شامل تاریخ کاشت به‌عنوان کرت اصلی در دو سطح (۲۴ شهریور و ۷ مهر)، و گونه‌های شبدر به‌عنوان کرت فرعی در ۱۰ سطح (گونه شبدر ایرانی ۷ رقم، گونه شبدر برسیم یک رقم، گونه شبدر قرمز یک رقم و گونه شبدر لاک‌ی یک رقم) با چهار تکرار در مزرعه پژوهشی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در سال ۹۱-۱۳۹۰ اجرا شد. اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک گونه‌های شبدر در مرحله رشد روزتی در روزهایی که دمای هوا زیر صفر درجه سانتی‌گراد بود، اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد تنش دماهای پایین باعث کاهش معنی‌دار کلروفیل برگ در گونه‌های شبدر شد. از بین گونه‌های شبدر، گونه شبدر قرمز (رقم نسیم) از نظر کلروفیل دارای کمترین میزان بود. همچنین تنش دماهای پایین در مزرعه باعث کاهش بیشتر میزان کلروفیل a نسبت به میزان کلروفیل $a+b$ و a/b و کلروفیل b شد. در زمان‌های وقوع تنش ($S1$ ، $S2$ و $S3$) در مزرعه، عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (F_v/F_m) ارقام شبدر به ترتیب برابر $0/734$ ، $0/788$ و $0/555$ بود که این بیانگر تأثیر تنش دماهای پایین بر پارامتر F_v/F_m مخصوصاً در تنش $S3$ نسبت به بقیه تیمارها است. همچنین نتایج نشان داد که در تنش دماهای پایین، رقم نسیم (گونه شبدر قرمز) دارای عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (F_v/F_m) کمتری نسبت به بقیه ارقام است و تحت تأثیر بیشتر تنش دماهای پایین بود. به‌طور کلی استفاده از شاخص‌های F_v/F_m ، میزان کلروفیل و کارتنوئید برگ برای ارزیابی و غربال مزرعه‌ای ارقام شبدر در شرایط تنش دماهای پایین پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: شبدر، تنش سرما، فلورسانس کلروفیل برگ و عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو.

مقدمه:

(Joes et al., 2004; Janska et al., 2010). تنش سرما اثر برگشت‌ناپذیری بر کلروفیل دارد و باعث تخریب و اختلال در غشاهای تیلاکوئیدی، تجزیه و تخریب کلروفیل و زرد شدن برگ می‌شود (Peterson et al., 1993). Ma و همکاران (۱۹۹۵) اظهار داشتند که به دلیل این‌که شدت فتوستنز برگ با میزان کلروفیل در ارتباط است، اندازه‌گیری کلروفیل می‌تواند یکی از معیارهای مناسب جهت سنجش شدت فتوستنز باشد. Moskvin و همکاران (۱۹۹۸) گزارش دادند در شدت‌های

شبدر (*Trifolium spp.*) یکی از گیاهان مهم علوفه‌ای خانواده لگومینوز در مناطق معتدل و سرد است که بعد از یونجه بیشترین سطح زیر کشت را در کشور دارا است (کوچکی و همکاران، ۱۳۷۲; Taylor, 1985). در مناطق سردسیر تأخیر در کاشت پاییزه شبدر می‌تواند بر سطح سبز و استقرار بوته‌ها تأثیر منفی داشته باشد و لذا دوام بوته‌ها بستگی به میزان تحمل آنها در شرایط تنش دماهای پایین حادث‌شده در مزرعه دارد

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی:

۱- این مقاله مستخرج شده از طرح مصوب ۸۹۱۵۰-۰۳-۰۳ می باشد

کوانتومی فتوسیستم دو) بهترین معیار برای انتخاب لاین‌های متحمل به تنش دماهای پایین است. تحقیقات نشان می‌دهد که در اکثر گونه‌های گیاهی مقادیر F_v / F_m در شرایط عادت کرده به تاریکی در شرایط مطلوب حدود ۰/۸۳ است و در مقادیر کمتر از ۰/۸۳ بیانگر تحت تنش بودن گیاه می‌باشد (Johanson., 2009; Bjorkman and Demmig., 1987).

بین ۰/۷۵ تا ۰/۸۵ متغیر می‌باشد (Baker., 1991).

هدف از انجام این پژوهش بررسی ارتباط بین کاهش دمای محیط و میزان کلروفیل، کارایی فتوسیستم II و کارتنوئید برگ گونه‌های شبدر در مرحله رشد روزتی در طی فصل زمستان و امکان استفاده از این صفات در غربالگری گونه‌های شبدر در شرایط سرما است.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه جهت بررسی ارتباط بین کاهش دمای محیط و میزان کلروفیل، کارایی فتوسیستم II و کارتنوئید برگ گونه‌های شبدر در مرحله رشد روزتی در طی فصل زمستان، به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی شامل تاریخ کاشت به‌عنوان کرت اصلی در دو سطح (۲۴ شهریور به‌عنوان تاریخ کاشت مرسوم و ۷ مهر به‌عنوان تاریخ کاشت تأخیری)، و گونه‌های شبدر به‌عنوان کرت فرعی در ۱۰ سطح (گونه شبدر ایرانی ۷ رقم، گونه شبدر برسیم یک رقم، گونه شبدر قرمز یک رقم و گونه شبدر لاکمی یک رقم) با چهار تکرار در مزرعه پژوهشی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، با موقعیت طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۵۹ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۳۲۱ متری از سطح دریا در خاکی با خصوصیت بافت لومی رسی (جدول ۱) طی سال ۹۱-۱۳۹۰ اجرا شد. میزان بذر مصرفی در هکتار بر مبنای ۲۰ کیلوگرم در هکتار برای شبدر ایرانی و شبدر قرمز و ۲۵ کیلوگرم در هکتار برای شبدر برسیم و شبدر لاکمی کاشت صورت گرفت (حیدری

مختلف تشعشعی و تغذیه‌ای باعث تفاوت میزان فلورسانس کلروفیل برگ شبدر می‌شود. Joes و همکاران (۲۰۰۴) از بررسی پارامترهای فلورسانس کلروفیل در دو جمعیت لگوم گزارش دادند که برتری کارایی فتوستتیز 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. Elena و همکاران (۲۰۰۳) از بررسی تأثیر آزن بر فلورسانس کلروفیل دو گونه شبدر سفید و شبدر قرمز گزارش دادند که آزن در هر دو گونه باعث کاهش معنی‌دار پارامتر F_v / F_m شده است. 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. Francini و همکاران (۲۰۰۷) از بررسی اثر آزن بر تغییرات متابولیکی شبدر سفید گزارش دادند که آزن باعث تغییر پارامترهای فلورسانس کلروفیل شده به‌طوری‌که در تیمارهای شاهد و تنش آزن 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 می‌باشد. Shangguan (۲۰۰۸) از بررسی تأثیر سطوح مختلف غلظت نیتروژن و تشعشع بر عملکرد فتوستتیز 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 فتوستتیز و F_v / F_m افزایش خواهد 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. Bafeel و Ibrahim (۲۰۰۸) 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 پارامتر F_v / F_m نشان‌دهنده حداکثر کارایی کوآنتوم فتوسیستم دو بوده و شاخص مهمی برای عملکرد فتوستتیزی گیاه می‌باشد. حسینی و همکاران (۱۳۸۶) از غربال کردن ژنو تیپ‌های برنج در دماهای پایین با استفاده از فلورسانس کلروفیل برگ گزارش دادند که از بین مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل برگ مؤلفه F_v / F_m (حداکثر عملکرد

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش.

عمق خاک	هدایت الکتریکی $Ec \cdot 10^3$	درصد جذب pH	کربن آلی بافت خاک (%)	ازت کل (%)	فسفر قابل جذب (pmm)	بافت خاک
۰-۲۵	۰/۶۸	۷/۹	۰/۴۹	۰/۲۰	۱۵	رسی، لومی
۲۵-۵۰	۱/۴	۷/۱	۰/۳۰	۰/۲۵	۶	رسی، لومی

جدول ۲- میانگین حداقل دما ماهانه و روز نمونه برداری در سطح خاک و هوا (مربوط به زمان اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل برگ).

زمان نمونه برداری	میانگین حداقل دما (درجه سانتی گراد) و سرعت باد (متر بر ثانیه)				
	سطح خاک		هوا		
	ماهانه	روز	ماهانه	روز	
		نمونه برداری	نمونه برداری	سرعت باد	
(S ₁) ۱۳۹۰/۹/۲۹	-۴/۳	-۳/۶	-۸/۹۸	-۰/۷	۶
(S ₂) ۱۳۹۰/۱۰/۷	-۳/۵	-۱/۲	-۱/۳	۱/۳	۲
(S ₃) ۱۳۹۰/۱۱/۱۷	-۵/۳	-۵/۸	-۲/۴	۴/۸	۳

S₁: زمان وقوع دماهای پایین زیر صفر درجه سانتی‌گراد در تاریخ ۱۳۹۰/۹/۲۹؛ S₂: زمان وقوع دمای پایین زیر صفر درجه سانتی‌گراد در تاریخ ۱۳۹۰/۱۰/۷؛ S₃: زمان وقوع دماهای پایین زیر صفر درجه سانتی‌گراد در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۱۷.

شریف‌آباد، ۱۳۸۰ و زمانیان، ۱۳۸۳).

اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل: اندازه‌گیری F_v / F_m (حداکثر عملکرد کوآتومی فتوسیستم دو در شرایط سازگار شده با تاریکی) در مرحله رشد روزتی و رویشی (حداصل بین مرحله نموی ظهور اولین سه برگچه مرکب تا مرحله پنجه‌زنی) در سه نوبت آذر (در تاریخ ۱۳۹۰/۹/۲۹ با میانگین حداقل دمای ۴/۳- و ۳/۶- درجه سانتی‌گراد)، دی (در تاریخ ۱۳۹۰/۱۰/۷ با میانگین حداقل دمای ۳/۵- و ۱/۲- درجه سانتی‌گراد و بهمن (در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۱۷ با میانگین حداقل دمای ۵/۳- و ۵/۸- درجه سانتی‌گراد) به ترتیب دمای ماهانه و روز اندازه‌گیری در سطح خاک (جدول ۲) انجام شد. 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 به‌طور تصادفی شش برگ کاملاً توسعه‌یافته در فاصله زمانی ساعت ۸-۱۰ صبح انتخاب و بعد از ۱۵ دقیقه تاریکی توسط کلیس‌های مخصوص، شاخص‌های F_v / F_m و F_v / F_m ، F_v ، F_m ، F_0 توسط دستگاه فلورسانس متر کلروفیل OS 30P (Opti-Science, USA) اندازه‌گیر و محاسبه شدند

(Maxwell and Johnson., 2000).

اندازه‌گیری میزان کلروفیل و کاراتنوئید برگ: از تاریخ کاشت ۲۴ شهریور بعد از استقرار بوته‌ها، در ۳ آبان با میانگین دمای روزانه ۱۵/۸ درجه سانتی‌گراد پایه برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل و کاراتنوئید برگ به‌عنوان قبل تنش سرما و ۱۷ اسفند بعد از چند روز متوالی دماهای زیر صفر درجه سانتی‌گراد به‌عنوان بعد از تنش سرما از هر دو تاریخ کاشت ۲۴ شهریور و ۷ مهر نمونه‌هایی از برگ تیمارها به‌طور تصادفی تهیه و توسط نیتروژن مایع فریز و در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، بعد از استخراج محلول حاوی رنگ‌دانه سبز برگ توسط استون ۸۰٪ میزان جذب نوری محلول به‌دست‌آمده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Varian 300 Scan, USA) در طول موج‌های ۶۶۳ (کلروفیل a) ۶۴۵ (کلروفیل b) و ۴۷۰ (کاراتنوئید) نانومتر قرائت شد و غلظت کلروفیل a، b، نسبت a/b و رنگ‌دانه کاراتنوئید بر اساس روابط زیر (Arnon., 1949) تعیین گردید. در روابط زیر V حجم نهایی نمونه استخراج‌شده و W وزن تر نمونه است.

میلی‌گرم کلروفیل a در هر گرم وزن‌تر:

گرم وزن تر به ترتیب بیشترین و کمترین میزان کلروفیل a را به خود اختصاص دادند. نتایج نشان داد که از نظر کلروفیل b شبدر ایرانی (لاین ۷) با ۰/۵۶۷ و شبدر قرمز (رقم نسیم) با ۰/۲۳۳ میلی گرم در گرم وزن تر، از نظر میزان کلروفیل a+b شبدر ایرانی (لاین ۷) با ۲/۲۲ و شبدر قرمز (رقم نسیم) با ۰/۹۲۰ میلی گرم در گرم وزن تر، از نظر نسبت کلروفیل a/b شبدر ایرانی (متوسط رس) با ۳/۵۰ و شبدر ایرانی (دیررس) با ۲/۸۹ و از نظر میزان کارتنوئیدها، شبدر برسیم (تولیدی کرج) با ۳/۰۹ و شبدر قرمز (نسیم) با ۱/۵۳ میلی گرم در گرم وزن تر به ترتیب بیشترین و کمترین میزان کلروفیل را دارا بودند. نتایج نشان داد که از نظر کلیه نسبت‌ها، میزان کلروفیل شبدر قرمز (نسیم) نسبت به سایر گونه‌ها از میزان کمتری برخوردار است و مشاهدات مزرعه‌ای هم نشان داد که رنگ برگ‌های این رقم نسبت به دیگر سبز روشن تری داشت. مقایسه میانگین‌ها بعد از تنش سرما (جدول ۴) نشان داد از نظر میزان کلروفیل a و b و شبدر برسیم (تولیدی کرج) با ۱/۳۴ و ۱/۷۵ و شبدر قرمز (نسیم) با ۰/۹۱۱ و ۱/۲۲ میلی گرم در گرم وزن تر به ترتیب بیشترین و کمترین میزان را دارا بودند. نتایج نشان داد که از نظر کلروفیل b شبدر ایرانی (زودرس) با ۰/۵۰۷ و شبدر ایرانی (لاین ۱۳) با ۰/۳۲۸ و از نظر نسبت کلروفیل a/b شبدر ایرانی (لاین ۱۳) با ۳/۶۶ و شبدر قرمز (نسیم) با ۲/۸۱ میلی گرم در گرم وزن تر به ترتیب بیشترین و کمترین میزان را به خود اختصاص دادند. از نظر میزان کارتنوئیدها شبدر قرمز (نسیم) و شبدر لاک (رقم البرز ۱) با ۱/۱۶ و شبدر ایرانی (لاین ۱۳) با ۰/۰۹۰ میلی گرم در گرم وزن تر به ترتیب بیشترین و کمترین میزان را دارا بودند.

مقایسه میانگین سطوح تاریخ کاشت در رقم (جدول ۶) نشان داد که کلیه مقادیر کلروفیل a، b و کارتنوئیدها تحت تأثیر تاریخ کاشت قرار گرفته و کلیه مقادیر فوق در تاریخ کاشت دوم (تأخیری) نسبت به تاریخ کاشت مرسوم کاهش یافته‌اند. همچنین از نظر کلروفیل a شبدر قرمز (نسیم) نسبت به بقیه ارقام دارای میزان کمتری است. این در حالی است که از نظر کارتنوئیدها شبدر قرمز (نسیم) و شبدر لاک (البرز ۱) از میزان

($1000W \times$) / $V \times$ { جذب در ۶۴۵ نانومتر) ۲/۶۹ -
{ جذب در ۶۶۳ نانومتر} ۱۲/۷

میلی گرم کلروفیل b در هر گرم وزن تر:

($1000W \times$) / $V \times$ { جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۴/۶۹ -
{ جذب در ۶۴۵ نانومتر} ۲۲/۹

میلی گرم کلروفیل a و b در هر گرم وزن تر:

($1000W \times$) / $V \times$ { جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۸/۰۲ + (جذب در ۶۴۵ نانومتر) ۲۰/۲

میلی گرم کارتنوئید در هر گرم وزن تر:

($1000 A \text{ Chla} - 1/8 \text{ Chla} - 85/02 \text{ Chlb}$) / ۱۹۸

برای تجزیه آماری داده‌ها به دست آمده، از نرم‌افزارهای SAS، Mstat-C و برای رسم گرافها از Excel استفاده شد. تجزیه بر روی داده‌های کلروفیل و کارتنوئید قبل از تنش سرما به صورت بلوک‌های کامل تصادفی، بعد از تنش به صورت اسپلیت پلات و برای فلورسانس کلروفیل چون نمونه برداری در طول زمان صورت گرفت به صورت اسپلیت پلات در زمان انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون دانکن انجام و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی دار بودن اختلافها در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث:

کلروفیل و کارتنوئیدها: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که در شرایط نرمال (عدم تنش سرما) بین ارقام شبدر از نظر میزان کلروفیل a، b، a+b و a/b و کارتنوئیدها در سطح احتمال خطای یک درصد تفاوت معنی دار وجود دارد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴) بعد از تنش سرما نشان داد که اثر تاریخ کاشت، رقم و اثر سطوح تاریخ کاشت در رقم برای میزان کلروفیل a، b و a+b و کارتنوئیدها در سطح احتمال خطای یک درصد معنی دار است و برای میزان کلروفیل b و نسبت کلروفیل a/b بین این اثرها تفاوت معنی داری مشاهده نشد. مقایسه میانگین‌ها در شرایط نرمال (جدول ۵) نشان داد که از نظر میزان کلروفیل a شبدر ایرانی (لاین ۷) با ۱/۶۶ میلی گرم در گرم وزن تر و شبدر قرمز (رقم نسیم) با ۰/۶۸۶ میلی گرم در

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس میزان کلروفیل ارقام شبدر در تاریخ ۱۳۹۰/۸/۳ (قبل از تنش سرما).

میانگین مربعات						
منبع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a+b	نسبت کلروفیل a/b	کارتونوئیدها
تکرار	۳	۰/۰۰۵۳	۰/۰۰۲۲	۰/۰۱۸۸	۰/۰۳۴۸	۰/۰۵۲
ارقام	۹	۰/۲۸۸**	۰/۰۳۷**	۰/۵۲۸**	۰/۲۵۹**	۶۷۹**
خطا	۲۷	۰/۰۰۹۷	۰/۰۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۷۴	۰/۰۲۸
درصد ضریب تغییرات	۷/۲۹	۸/۰۱	۶/۲۳	۸/۸۶	۶/۹۱	

ns * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس میزان کلروفیل ارقام شبدر در تاریخ‌های مختلف کاشت.

میانگین مربعات						
منبع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a+b	نسبت کلروفیل a/b	کارتونوئیدها
تکرار	۳	۰/۰۰۲۵	۰/۰۲۸	۰/۰۴۱	۰/۳۱۹	۰/۳۸۰
تاریخ کاشت	۱	۰/۲۵۰**	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۲۷۷**	۰/۱۷۵ ^{ns}	۱/۱۶**
خطا	۳	۰/۰۳۸	۰/۰۱۷	۰/۱۲۵	۰/۱۰۴	۰/۲۱۷
ارقام	۹	۰/۱۶۷**	۰/۰۲۶ ^{ns}	۰/۲۶۳**	۰/۵۲۰ ^{ns}	۱/۳۳**
تاریخ کاشت × ارقام	۹	۰/۰۶۷**	۰/۰۱۵ ^{ns}	۰/۰۸۴**	۰/۴۴۶ ^{ns}	۰/۲۶۹**
خطا	۵۴	۰/۰۲۳	۰/۰۱۵	۰/۰۲۸	۰/۴۶۱	۰/۰۷۷
درصد ضریب تغییرات	۱۳/۴۰	۳۳/۲۶	۱۱/۱۶	۲۱/۰۰	۵۶/۷۸	

ns * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد.

می‌دهد (Toth et al., 2007). افزایش سطوح توکوفرول‌ها در برگ یا افزایش سطوح رنگ ریزه‌های کم‌اهمیت‌تر مثل کارتونوئیدها که ترجیحاً در دمای سرد اکسید شده و به کاهش تلفات کلروفیل a و b منجر می‌شوند، ممکن است موجب متحمل شدن گیاه به سرما شود و از خسارت سرما جلوگیری کند (Abbasi et al., 2007). در این پژوهش دماهای پایین درکشت‌های تأخیری باعث کاهش میزان کلروفیل و کارتونوئیدها شد و این روند در بین ارقام شبدر متفاوت بود به طوری که شبدر قرمز در مرحله رشد رویشی نسبت به بقیه ارقام حساس‌تر بود و این موضوع از روی میزان کم کلروفیل آن قابل‌درک است. بین میزان کارتونوئیدها و کلروفیل نسبت عکس و جود دارد و در رقم که میزان کلروفیل کمتر خسارت‌دیده به علت میزان بالای در آن بود و این موضوع در

بیشتری برخوردار هستند و این ممکن است یکی از علل سبز ماندن برگ آنها در شرایط سرما باشد.

تحقیقات نشان داد مقدار کلروفیل a و b تحت تأثیر تنش سرما قرار دارند و بر اثر سرما کاهش می‌یابند (Wise and Naylor., 1987). کاهش مقدار کلروفیل برگ‌ها ناشی از توقف عمل کمپلکس تشکیل‌دهنده اکسیژن است. این توقف ناشی از شرکت الکترون‌های زنجیره انتقال الکترون برای تشکیل انواع فعال اکسیژن به‌ویژه O₂ است و این بیانگر نقش اکسیداتیو می‌باشد (Bowler, Rizhsky and Mittler., 2003). تنش سرما باعث تغییر خصوصیات و میزان افزایش فلورسانس کلروفیل a می‌شود و آنالیز تغییر فلورسانس کلروفیل اطلاعات مهمی در زمینه‌ی فتوسنتز دو و اتفاقات فیزیولوژیک که گیاه در شرایط تنش با آن مواجه است، ارائه

جدول ۶ - مقایسه میانگین میزان کلروفیل و کارآلودگی برگ ارقام شنبدر در تاریخ های مختلف کاشت در دمای زیر صفر درجه سانتی گراد (۱۳۹۰/۱۲/۱۷)

تاریخ مهر	تاریخ شهریور	تاریخ مهر	a+b کلروفیل		تاریخ مهر	تاریخ شهریور	b کلروفیل		تاریخ مهر	تاریخ شهریور	تاریخ مهر	تاریخ شهریور	ارقام
			نسبت کلروفیل a/b	تاریخ مهر			تاریخ شهریور	نسبت کلروفیل a/b					
۰/۱۶۹ ^{gh}	۰/۱۹۶ ^{gh}	۰/۳۳۳ ^{ab}	۳/۴۱ ^{ab}	۱/۴۹ ^{c-h}	۱/۶۶ ^{bcd}	۰/۳۳۹ ^b	۰/۳۸۶ ^b	۱/۱۵ ^{cd}	۱/۲۸ ^{bc}	شنبدر ایرانی (دیررس)			
۰/۰۶۷ ^{gh}	۰/۱۹۶ ^{gh}	۲/۶۸ ^b	۳/۴۳ ^{ab}	۱/۲۴ ^{gh}	۱/۲۷ ^{fgh}	۰/۲۸۹ ^b	۰/۴۰۱ ^b	۰/۸۴۶ ^g	۰/۹۸۹ ^{d-g}	شنبدر ایرانی (متوسط رس)			
۰/۳۴۳ ^{c-h}	۰/۳۵۴ ^{c-h}	۲/۵۸ ^b	۳/۱۹ ^{ab}	۱/۷۰ ^{bc}	۱/۷۱ ^{bc}	۰/۴۱۰ ^b	۰/۶۰۴ ^d	۱/۰۹ ^{c-g}	۱/۳۰ ^{bc}	شنبدر ایرانی (زودرس)			
۰/۱۴۵ ^{gh}	۰/۱۶۴ ^{gh}	۳/۱۷ ^{ab}	۳/۴۴ ^{ab}	۱/۴۰ ^{d-h}	۱/۵۶ ^{c-f}	۰/۳۳۸ ^b	۰/۳۵۱ ^b	۱/۰۶ ^{c-g}	۱/۲۱ ^{cd}	شنبدر ایرانی (یک چین)			
۰/۰۰۴ ^h	۰/۱۷۶ ^{gh}	۳/۳۹ ^{ab}	۳/۹۴ ^a	۱/۴۹ ^{c-h}	۱/۵۳ ^{de}	۰/۳۱۷ ^b	۰/۳۴۰ ^b	۱/۱۲ ^{c-e}	۱/۱۷ ^{cd}	شنبدر ایرانی (لاین ۱۳)			
۰/۵۱۱ ^{d-g}	۰/۸۹۸ ^{cd}	۳/۰۶ ^{ab}	۳/۴۵ ^{ab}	۱/۵۵ ^{de}	۱/۸۷ ^{ab}	۰/۳۸۴ ^b	۰/۴۲۱ ^{ab}	۱/۱۱ ^{cd}	۱/۴۵ ^{ab}	شنبدر ایرانی (لاین ۷)			
۰/۱۵۴ ^{gh}	۰/۵۷۷ ^{c-f}	۲/۹۴ ^{ab}	۳/۲۲ ^{ab}	۱/۳۳ ^{c-h}	۱/۵۱ ^{c-g}	۰/۳۱۶ ^b	۰/۳۹۱ ^b	۱/۰۲ ^{c-g}	۱/۱۲ ^{c-e}	شنبدر ایرانی (توده)			
۰/۲۰۶ ^{gh}	۰/۹۴۷ ^{bcd}	۲/۹۵ ^{ab}	۳/۵۷ ^{ab}	۱/۴۹ ^{c-h}	۲/۰۱ ^a	۰/۳۷۸ ^b	۰/۴۴۱ ^{ab}	۱/۱۱ ^{c-e}	۱/۵۷ ^{ab}	شنبدر برسیم (تولیدی کرج)			
۰/۹۹۵ ^{bc}	۱/۳۴ ^{ab}	۲/۷۸ ^{ab}	۳/۰۳ ^{ab}	۱/۲۲ ^h	۱/۲۲ ^h	۰/۳۰۶ ^b	۰/۳۳۳ ^b	۰/۹۰۰ ^{fg}	۰/۹۲۳ ^{efg}	شنبدر قمر (نسیم)			
۰/۳۳۳ ^{cd}	۱/۶۰ ^a	۳/۳۸ ^{ab}	۳/۷۰ ^{ab}	۱/۳۶ ^{e-h}	۱/۶۰ ^{cd}	۰/۲۹۶ ^b	۰/۳۶۶ ^b	۱/۰۶ ^{c-g}	۱/۲۳ ^{bcd}	شنبدر لاک (الوز ۱)			
۰/۳۳۳ ^{ab}	۰/۶۴۴ ^a	۳/۰۳ ^a	۳/۴۳ ^{ab}	۱/۴۲ ^b	۱/۵۹ ^a	۰/۳۳۷ ^{ab}	۰/۴۰۳ ^a	۱/۰۵ ^b	۱/۲۲ ^a	میانگین			
۰/۲۷۷	۰/۶۷۹	۰/۱۶۹	۰/۱۲۳	۰/۱۶۹	۰/۱۲۳	۰/۱۵۳	۰/۱۵۳	۰/۱۵۳	۰/۱۵۳	انحراف معیار			

میانگین ماهی که در هر ستون، حداقل دارای یک حرف مشترک هستند براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

جدول ۷- تجزیه واریانس اسپلیت پلات در زمان مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل ارقام شبدر در زمان‌های نمونه برداری.

میانگین مربعات (MS)					
منابع تغییرات	درجه آزادی	حداقل فلورسانس	حداکثر فلورسانس	فلورسانس متغیر	کارایی کوانتومی فتوسیستم ۲
تکرار	۳	۲۲۱/۱۲	۲۳۶۰/۱۲	۲۹۲۱/۶۲	۰/۰۰۹
رقم	۹	۳۷۱/۵۱*	۱۸۴۰۴/۱۹**	۱۸۱۳۳/۹۰**	۰/۰۲۶**
خطا	۲۷	۹۵/۹۳	۲۰۶۲/۸۰	۲۴۹۹/۲۰	۰/۰۰۴
زمان نمونه‌برداری	۲	۴۱۸۶۹/۹۱**	۸۴۵۷۸۶/۳۲**	۵۵۹۵۵۳/۲۷**	۰/۵۹۴**
زمان نمونه‌برداری × رقم	۱۸	۳۸۷/۹۱**	۱۲۲۰۸/۰۷**	۱۰۶۸۴/۲۳**	۰/۰۱۷**
خطا	۵۴	۱۶۶/۷۶	۲۷۴۲/۳۱	۲۶۳۸/۴۵	۰/۰۰۵
ضریب تغییرات	-	۱۵/۷۱	۱۷/۴۸	۲۳/۲۸	۱۰/۵۶

ns و * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

برخوردار است و از نظر رشد و استقرار نسبت به بقیه جوان‌تر است و همین مسئله باعث حساسیت بیشتر آن به سرما شده است. در شبدر برسیم (تولیدی کرج) به علت سرعت رشد بالا و خواب پاییزه کمتر دارای رشد بیشتری نسبت به بقیه ارقام شبدر است و همین باعث بهبود نسبی F_v/F_m آن شده است. نتایج جدول ۸ نشان داد 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 است که این بیانگر تأثیر سرما بر پارامتر F_v/F_m مخصوصاً در تنش S3 نسبت به بقیه تیمارهای سرما است که آمارهای هوشناسی (جدول ۲) تأییدی بر این موضوع می‌باشد. این تحقیق نشان داد که مؤلفه F_v/F_m یکی از مهم‌ترین شاخص‌های انتخاب ارقام متحمل به تنش سرما است. Baker and Nie (۱۹۹۴) و همچنین Sthapit و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند که از کاهش عملکرد کوانتومی می‌توان برای تعیین میزان تحمل به سرما برنج استفاده نمود. Adams و همکارانش (۱۹۹۵) با بررسی‌های زیاد گزارش دادند که مؤلفه F_v/F_m می‌تواند معیار مفیدی برای میزان تحمل به تنش سرما در گیاهان مختلف حتی در شدت‌های نور کم باشد. در همین راستا تعدادی از محققان (Jansen and Ison., 1987; Bjorkman and Demmig., 1994a) گزارش دادند که مقادیر F_v/F_m در شرایط عادت کرده به تاریکی در اکثر

رقم شبدر قرمز رقم نسیم کاملاً مشهود است. نتایج به‌دست‌آمده با نتایج محققان مطابقت دارد.

عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (F_v/F_m): نتایج این پژوهش (جدول ۷) نشان داد که در تنش دماهای پایین مزرعه بین پارامترهای فلورسانس کلروفیل در شرایط تاریکی ارقام شبدر در سطح احتمال خطای یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. همچنین این نتایج نشان داد که بین پارامترهای فلورسانس کلروفیل در زمان‌های اندازه‌گیری و اثر سطوح رقم در زمان‌های اندازه‌گیری در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد. مقایسه میانگین‌ها (جدول ۸) نشان داد که بیشترین مقدار پارامتر F_v/F_m (حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو در شرایط سازگار شده با تاریکی) در زمان تنش S1 مربوط به شبدر ایرانی (یک چین) به میزان ۰/۷۹۴، در زمان تنش S2 مربوط به شبدر برسیم (تولیدی کرج) به میزان ۰/۸۱۶ و در زمان تنش S3 مربوط به شبدر ایرانی (دیررس) به میزان ۰/۷۵۰ است. همچنین نتایج نشان داد که در تنش دماهای پایین مزرعه شبدر قرمز (نسیم) دارای عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (F_v/F_m) کمتری نسبت به بقیه ارقام است، به عبارت دیگر بیشتر تحت تأثیر تنش دماهای پایین قرار گرفته که این ممکن است به علت میزان کم کلروفیل، مرحله رشدی و فنولوژیک آن باشد چون این رقم نسبت به بقیه ارقام از سرعت رشد کمتری

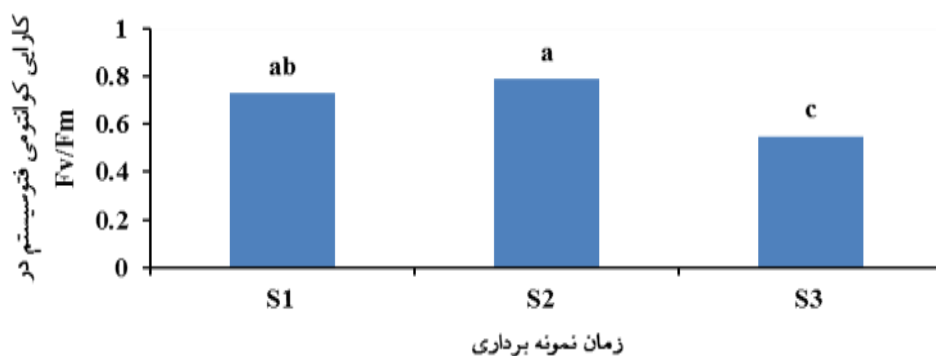
جدول ۸- میانگین مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل ارقام شبدر در دمای پایین (سال ۱۳۹۰)

کارایی کوانتومی فتوسنتز ۲	فلورسانس متغیر	حداکثر فلورسانس	حداقل فلورسانس	ارقام	زمان نمونه‌برداری
۰/۷۶۲ ^{ab}	۳۳۶/۸ ^b	۴۴۲/۰ ^{bc}	۱۰۵/۳ ^{bc}	شبدر ایرانی (دیررس)	S ₁ ۱۳۹۰/۹/۲۹
۰/۷۴۴ ^{ab}	۳۹۰/۹ ^{ab}	۵۲۵/۵ ^{ab}	۱۳۴/۸ ^a	شبدر ایرانی (متوسط‌رس)	
۰/۷۷۵ ^{ab}	۳۹۰/۰ ^{ab}	۵۰۳/۰ ^{ab}	۱۱۳/۰ ^{bc}	شبدر ایرانی (زودرس)	
۰/۷۹۴ ^a	۴۵۰/۸ ^a	۵۶۷/۸ ^a	۱۱۷/۰ ^{abc}	شبدر ایرانی (یک چین)	
۰/۷۶۰ ^{ab}	۳۶۶/۸ ^{ab}	۴۸۲/۵ ^{ab}	۱۱۵/۸ ^{abc}	شبدر ایرانی (لاین ۱۳)	
۰/۷۵۵ ^{ab}	۳۵۵/۰ ^b	۴۷۰/۰ ^{ab}	۱۱۵/۰ ^{abc}	شبدر ایرانی (لاین ۷)	
۰/۷۸۸ ^a	۴۰۷/۸ ^{ab}	۵۱۷/۵ ^{ab}	۱۰۹/۸ ^{bc}	شبدر ایرانی (توده)	
۰/۷۰۹ ^b	۲۳۹/۳ ^c	۳۳۷/۵ ^d	۹۸/۳ ^c	شبدر برسیم (تولیدی کرج)	
۰/۶۳۰ ^c	۲۳۴/۵ ^c	۳۶۹/۳ ^{cd}	۱۳۴/۸ ^a	شبدر قرمز (نسیم)	
۰/۷۲۵ ^b	۳۱۹/۰ ^{bc}	۴۳۹/۸ ^{bc}	۱۲۰/۸ ^{ab}	شبدر لاک‌البرزا (۱)	
۰/۷۳۴	۳۴۹/۳	۴۶۵/۴	۱۱۶/۴	میانگین	
۰/۰۴۳	۵۸/۱۷	۶۲/۵۶	۱۲/۸۵	انحراف معیار	
۰/۷۵۳ ^{ab}	۲۰۲/۳ ^a	۲۶۸/۸ ^{ab}	۶۶/۵ ^a	شبدر ایرانی (دیررس)	S ₂ ۱۳۹۰/۱۰/۷
۰/۸۰۸ ^a	۲۲۴/۸ ^a	۲۷۸/۰ ^a	۵۳/۳ ^{ab}	شبدر ایرانی (متوسط‌رس)	
۰/۷۷۰ ^a	۱۷۷/۰ ^a	۲۳۰/۰ ^{ab}	۵۳/۰ ^{ab}	شبدر ایرانی (زودرس)	
۰/۷۹۶ ^a	۲۰۷/۸ ^a	۲۶۱/۰ ^{ab}	۵۳/۳ ^{ab}	شبدر ایرانی (یک چین)	
۰/۷۹۶ ^a	۱۹۶/۵ ^a	۲۴۷/۰ ^{ab}	۵۰/۵ ^{ab}	شبدر ایرانی (لاین ۱۳)	
۰/۷۹۶ ^a	۱۶۴/۸ ^a	۲۰۷/۰ ^b	۴۲/۳ ^b	شبدر ایرانی (لاین ۷)	
۰/۷۸۳ ^a	۱۶۶/۵ ^a	۲۱۲/۸ ^b	۴۶/۳ ^b	شبدر ایرانی (توده)	
۰/۸۱۶ ^a	۱۸۶/۱ ^a	۲۲۸/۰ ^{ab}	۴۱/۹ ^b	شبدر برسیم (تولیدی کرج)	
۰/۷۱۰ ^b	۱۵۲/۸ ^a	۲۱۵/۰ ^{ab}	۶۲/۳ ^{ab}	شبدر قرمز (نسیم)	
۰/۷۸۰ ^a	۱۸۲/۵ ^a	۲۳۴/۰ ^{ab}	۵۱/۵ ^{ab}	شبدر لاک‌البرزا (۱)	
۰/۷۸۸	۱۹۵/۷	۲۳۸/۲	۵۲/۱	میانگین	
۰/۰۲۵	۵۱/۸۴	۳۸/۳۳	۱۲/۰۱	انحراف معیار	

میانگین‌هایی که در هر ستون، حداقل دارای یک حرف مشترک هستند براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

و تولید متفاوت اندام هوایی (شاخ و برگ) گونه‌های مختلف شبدر در پاییز امکان تغذیه و دریافت تشعشع توسط برگ‌ها متفاوت خواهد بود و همین خصوصیات می‌تواند روی میزان فلورسانس کلروفیل برگ تأثیر نمایند که این نتایج با گزارش‌ها بسیاری از محققان مطابقت دارد و در همین رابطه Moskvin و همکاران (۱۹۹۸) گزارش دادند که پارامترهای فلورسانس

گونه‌های گیاهی در شرایط مطلوب حدود ۰/۸۳ است 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 مؤثر بودن تیمارهای دماهای پایین مزرعه بر F_v/F_m و تحت تنش بودن ارقام شبدر اذعان نمود (شکل ۱). با توجه به شبکه متفاوت ریشه‌ای و همزیستی با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن



شکل ۱ - میانگین کارایی کوانتومی فتوسیستم دو در زمان های نمونه برداری، S1: ۲۹ آذر ۱۳۹۰، S2: ۷ دی ۱۳۹۰ و S3: ۱۷ بهمن ۱۳۹۰. (انحراف معیار برای S1= ۰/۰۴۳، S2= ۰/۰۲۵ و S3= ۰/۱۱۱)

۱۷۶ و ۱۸۹، F_m برابر ۱۱۲۰ و ۹۹۲ و F_v/F_m برابر ۰/۸۴۴ و ۰/۸۰۹ است.

نتیجه گیری کلی:

با توجه به نتایج این آزمایش، برای مطالعه و بررسی عکس العمل ارقام شبدر به تنش دماهای پایین استفاده از شاخص‌هایی مثل پارامتر F_v/F_m و میزان کلروفیل در مرحله رشدی حدفاصل مرحله ظهور اولین سه برگچه تا پنجه‌زنی پیشنهاد می‌شود و از این شاخص‌ها می‌توان در غربال مزرعه‌ای 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 تحقیق باشد.

کلروفیل برگ در شبدر در شرایط مختلف تشعشعی و تغذیه‌ای، متفاوت است. Joes و همکاران (۲۰۰۴) از بررسی پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگ در دو جمعیت لگوم گزارش دادند که پارامتر F_v/F_m در بین جمعیت‌های لگوم متفاوت است. آنها برتری کارایی فتوستتز در فتوسیستم دو را در جمعیت برتر، بالا بودن پارامتر F_v/F_m (۰/۸۱۴) آن نسبت به جمعیت دیگر (۰/۷۸۳) اعلام نمودند. Elena و همکاران (۲۰۰۳) از بررسی تأثیر ازن بر فلورسانس کلروفیل دو گونه شبدر سفید و شبدر قرمز نشان دادند میزان پارامترهای F_m ، F_0 و F_v/F_m در شبدر سفید و شبدر قرمز به ترتیب ۷۸ و ۸۲ و ۴۲۱ و ۴۲۹، ۰/۷۹۳ و ۰/۸۰۹ می‌باشد. Francini و همکاران (۲۰۰۷) از بررسی ازن بر تغییرات متابولیکی شبدر سفید نشان دادند که در تیمارهای شاهد و تنش ازن میزان F_0 به ترتیب

منابع:

حسیبی، پ و مرادی، ف و نبی پور، م. (۱۳۸۶) انتخاب ژنو تیپ‌های برنج در دماهای پایین از طریق فلورسانس کلروفیل برگ. معلوم زراعی ایران. ۹: ۳۱-۱۴.

حیدری شریف‌آباد، ح.، و م. دری. (۱۳۸۰) نباتات علوفه‌ای (نیامداران). جلد اول. ۳۱۱ صفحه.

زمانیان، م. (۱۳۸۳) مقایسه عملکرد علوفه و صفات مورفولوژیکی ارقام شبدر. مجله علوم زراعی ایران. ۶: ۲۰۲-۱۹۳.

کوچکی، ع. (۱۳۷۲) زراعت در مناطق خشک. چاپ دوم. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، صفحه ۱۵۷-۱۵۴.

Abbasi, A. R., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, U., and Voll, L. M. (2007) Specific roles of α - and β -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology* 143: 1720-1738.

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 Plant Physiology* 122: 261-267.

Arnon, D. L. (1949) Cooper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology* 24: 1-15.

- Baker, N. R. (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbation of photosynthesis. *Physiology Plant* 81: 563-570.
- Baker, N. R., and Nie, G. (1994) Chilling sensitivity of photosynthesis in maize. In: *Biotechnology of Maize* (ed. Baja, Y.P.S) Pp. 465-481. Springer Verlag, Berlin.
- 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.
- Bowler, C., Montagu, M. V., and Inze, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 43: 83-116.
- Elena, D. T., Carla, V., Lacia, D., and Gian, F. S. (2003) CO_2 photoassimilation and chlorophyll fluorescence in two clover species showing different response to O_3 . *Plant physiology and Biochemistry* 41: 485-493.
- Francini, A., Nali, C., Picchi, V., and Lorenzini, G. (2007) Metabolic changes in white clover clones exposed to ozone. *Environmental and Experimental Botany* 60: 11-19.
- 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.
- Jansen, P. I. and Ison, R. L. (1994a) Temperature effects on germination of *Trifolium balansae* and *T. resupinatum* with special reference to high-temperature dormancy. *Australian Journal of Agricultural Research* 45: 689-701.
- Joes, P. L., Goulart, M. F., and Lavato, M. B. (2004) Chlorophyll fluorescence parameters in population of two legume trees. *Stryphnodendron adstringens* and *Cassia ferruginea*. *Revista Botany* 27: 527-532.
- Johanson, T. J. (2009) How Four Legumes Response to Grazing. *Literature and Review*. 15pp.
- Ma, B. L., Morrison, M. J., and Vadeng, H. D. (1995) Leaf greenness and photosynthetic rates in soybean. *Crop Sci.* 35: 1411-1414.
- Maxwell, K., and Johnson, G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 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.
- Peterson, T. A., Blackmer, T. M., Francis, D. D., and Scheppers, J. S. (1993) Using and chlorophyllmeter to improve N management. A webguide in soil resource management: D-13 fertility. Cooperative Extension, Institute of Agriculture and Natural Resource, University of Nebraska, Lincoln, NE, USA.
- Rizhsky, L., Liung, H., and Mittler, R. (2003) The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Journal of Biological Chemistry* 278: 38921-38925.
- Schreiber, U., and Bilger, W. (1987) Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In: *Plants Response to Stress* (ed. Tenhunen, J. D.) Pp. 27-28. Springer Verlag, Berlin.
- 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: 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: 90-95.
- Taylor, N. L. (1984) *Clover science and technology*. American Society of Agronomy. Publishers Madison, Wisconsin, USA. 645pp.
- Toth, S. Z., Schansker, C., Astrasser, R. J. (2007) Anon invasive assay of the plastoquin one pool redox state based on intransient. *Photosynthesis Research* 93: 193-203.
- Wise, R. R., and Naylor, A. W. (1987) The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. *Plant Physiology* 83: 272-277.