

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 کارتوئید برگ گونه‌های شبدر، آزمایشی به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی شامل تاریخ کاشت به عنوان کرت اصلی در دو سطح (۲۴ شهریور و ۷ مهر)، و گونه‌های شبدر به عنوان 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 ۱۳۹۰- ۹۱ اجرا شد. اندازه گیری صفات فیزیولوژیک گونه‌های شبدر در مرحله رشد روزی در روزهایی که دمای هوا زیر صفر درجه سانتی گراد بود، اندازه گیری شد. نتایج نشان داد تنش دماهای پایین باعث کاهش معنی دار 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 b، a/b، a+b و کلروفیل b شد. در زمان‌های وقوع تنش (S1 و S2 و S3) در مزرعه، عملکرد کواتنومی فتوسیستم دو (F_v/F_m) ارقام شبدر به ترتیب برابر ۰/۷۳۴ و ۰/۷۸۸ و ۰/۵۵۵ 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 کواتنومی فتوسیستم دو (F_v/F_m) کمتری نسبت به بقیه ارقام است و تحت تأثیر بیشتر تنش دماهای پایین بود. به طور کلی استفاده از شاخص‌های F_v/F_m ، میزان کلروفیل و کارتوئید 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 کواتنومی فتوسیستم دو.

مقدمه:

تنش سرما اثر (Joes *et al.*, 2004; Janska *et al.*, 2010) برگشت‌ناپذیری بر کلروفیل دارد و باعث تخرب و اختلال در غشاهای تیلاکوئیدی، تجزیه و تخرب کلروفیل و زرد شدن برگ می‌شود (Peterson *et al.*, 1993). Ma و همکاران (1995) اظهار داشتند که به دلیل این‌که شدت فتوستز برگ با میزان کلروفیل در ارتباط است، اندازه گیری کلروفیل می‌تواند یکی از معیارهای مناسب جهت سنجش شدت فتوستز باشد. Moskvin و همکاران (1998) 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 حادث شده در مزرعه دارد

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی:

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

کوانتمی فتوسیستم دو) بهترین معیار برای انتخاب لاین‌های متحمل به تنش دماهای پایین است. تحقیقات نشان می‌دهد که در اکثر گونه‌های گیاهی مقادیر F_m / F_v 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; Schreiber and Bilger., 1987) برگ‌های عادت کرده به تاریکی در گیاهان تحت تنش شدید، 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 کارتنتوئید 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 کارتنتوئید برگ گونه‌های شبدر در مرحله رشد روزتی در طی فصل زمستان، به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی شامل تاریخ کاشت به عنوان کرت اصلی در دو سطح ۲۴ شهریور به عنوان تاریخ کاشت مرسوم و ۷ مهر به عنوان تاریخ کاشت تأخیری)، و گونه‌های شبدر به عنوان کرت فرعی در ۱۰ سطح (گونه شبدر ایرانی ۷ رقم، گونه شبدر لاکی 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، 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 لومنی 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 برسمیم و شبدر لاکی کاشت صورت گرفت (حیدری

مخالف تششععی 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 فتوستتر در فتوسیستم دو در جمعیت برتر به علت بالا بودن پارامتر F_m / F_v (۰/۸۱۴) آن نسبت به جمعیت دیگر (۰/۷۸۳) بود. Elena و همکاران (۲۰۰۳) از بررسی تأثیر ازن بر فلورسانس کلروفیل دو گونه شبدر سفید و شبدر قرمز گزارش دادند که ازن در هر دو گونه باعث کاهش معنی‌دار پارامتر F_m / F_v شده است. آنها همچنین میزان پارامترهای F_0 و F_m / F_v را در شبدر سفید و شبدر قرمز به ترتیب ۷۸ و ۷۹۳، ۴۲۹ و ۸۲، ۰/۸۰۹ و ۰/۷۹۳ اعلام نمودند. Francini و همکاران (۲۰۰۷) از بررسی اثر ازن بر تغییرات متابولیکی شبدر سفید گزارش دادند که ازن باعث تغییر پارامترهای فلورسانس کلروفیل شده به طوری که در تیمارهای شاهد و تنش ازن میزان F_0 به ترتیب ۱۷۶ و ۱۸۹، برابر ۱۱۲۰ و ۹۹۲ و F_m / F_v برابر ۰/۸۴۴ و ۰/۸۰۹ می‌باشد. Shangguan (۲۰۰۸) از بررسی تأثیر سطوح مختلف غلاظت نیتروژن و تششعع بر عملکرد فتوستتر گیاهچه‌های شبدر سفید نشان داد با افزایش سطوح نیتروژن از ۵ به ۱۵ میلی‌مولار و میزان تششعع از ۲۰۰ به ۴۰۰ میکرومتر بر مترمربع در ثانیه، میزان کلروفیل برگ، کارایی فتوستتر و F_m / F_v افزایش خواهد یافت. ایشان میزان F_v / F_m در میزان F_v تششعع ۲۰۰ میکرومتر بر مترمربع در ثانیه در غلاظت‌های ۵ و ۱۵ میلی‌مولار نیتروژن را به ترتیب ۰/۸۴۲ و ۰/۸۴۶ گزارش نمود. Ibrahim و Bafeel (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 کوآنتم فتوسیستم دو بوده و شاخص مهمی برای عملکرد فتوستتری گیاه می‌باشد. حسیبی و همکاران (۱۳۸۶) از غربال کردن ژنو تیپ‌های برج 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	$E_c \times 10^3$	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).

میانگین حداقل دما (درجه سانتی گراد) و سرعت باد (متر بر ثانیه)

سرعت باد	هوای سطح خاک			زمان نمونه برداری
	روز نمونه برداری	ماهیانه	روز نمونه برداری	
	-۰/۷	-۸/۹۸	-۳/۶	
۶	۱/۳	-۱/۳	-۱/۲	(S ₁) ۱۳۹۰/۹/۲۹
۲	۴/۸	-۲/۴	-۵/۸	(S ₂) ۱۳۹۰/۱۰/۷
۳				(S ₃) ۱۳۹۰/۱۱/۱۷

 S_1 : زمان وقوع دماهای پایین زیر صفر درجه سانتی گراد در تاریخ ۱۳۹۰/۹/۲۹ S_2 : زمان وقوع دماهای پایین زیر صفر درجه سانتی گراد در تاریخ ۱۳۹۰/۱۰/۷ S_3 : زمان وقوع دماهای پایین زیر صفر درجه سانتی گراد در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۱۷.

Shirif آباد، ۱۳۸۰ و زمانیان، ۱۳۸۳).

(Maxwell and Johnson., 2000)

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

اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل: اندازه‌گیری F_v / F_m (حداکثر عملکرد کوآنتومی فتوسیستم دو در شرایط سازگار شده با تاریکی) در مرحله رشد روزتی و رویشی (حدفاصل 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 سانتی گراد، دی (در تاریخ ۱۳۹۰/۱۰/۷ با میانگین حداقل دمای -۳/۵ و -۱/۲ درجه سانتی گراد و بهمن (در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۱۷ با میانگین حداقل دمای -۵/۳ و -۵/۸ درجه سانتی گراد) 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 سانتی گراد) در فاصله زمانی حداقل در سه روز متواالی در مزرعه، از هر رقم به طور تصادفی شش برگ کاملاً توسعه یافته در فاصله زمانی ساعت ۸-۱۰ صبح انتخاب و بعد از ۱۵ دقیقه تاریکی توسط کلیپس‌های مخصوص، شاخص‌های OS F_v / F_m , F_v / F_0 و F_0 توسط دستگاه فلورسانس متر کلروفیل (Opti-Science, USA) 30P اندازه‌گیر و محاسبه شدند

گرم وزن تر به ترتیب بیشترین و کمترین میزان کلروفیل a را به خود اختصاص دادند. نتایج نشان داد که ازنظر کلروفیل b شبدر ایرانی (لاین ۷) با ۰/۵۶۷ و شبدر قرمز (رقم نسیم) با ۰/۲۳۳ میلی گرم در گرم وزن تر، ازنظر میزان کلروفیل b+a با ۰/۹۲۰ میلی گرم در گرم وزن تر، ازنظر نسبت کلروفیل b/a با ۰/۹۲۰ میلی گرم در گرم وزن تر، ازنظر ایرانی (دیررس) شبدر ایرانی (متوسط رس) با ۳/۵۰ و شبدر ایرانی (تولیدی کرج) با ۲/۸۹ و ازنظر میزان کارتنتوئیدها، شبدر بررسیم (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 ازنظر کلیه نسبت ها، میزان کلروفیل شبدر قرمز (نسیم) نسبت به سایر گونه ها از میزان کمتری برخوردار است و مشاهدات مزرعه ای هم نشان داد که رنگ برگ های این رقم و تنفس سرما (جدول ۴) نشان داد ازنظر میزان کلروفیل a+b و شبدر بررسیم (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 ازنظر کلروفیل b شبدر ایرانی (زودرس) با ۰/۵۰۷ و شبدر ایرانی (لاین ۱۳) با ۰/۳۲۸ و ازنظر 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. ازنظر میزان کارتنتوئیدها شبدر قرمز (نسیم) و شبدر لاکی (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 کارتنتوئیدها تحت تأثیر تاریخ کاشت قرار گرفته و کلیه مقادیر فوق در تاریخ کاشت دوم (تأخری) نسبت به تاریخ کاشت مرسوم کاهش یافته اند. همچنین ازنظر کلروفیل a شبدر قرمز (نسیم) نسبت به بقیه ارقام دارای میزان کمتری است. این در حالی است که ازنظر کارتنتوئیدها شبدر قرمز (نسیم) و شبدر لاکی (برز ۱) از میزان

(۱۰۰WX) / V × (جذب در ۶۴۵ نانومتر) ۲/۶۹ - (جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۱۲/۷ میلی گرم کلروفیل b در هر گرم وزن تر: (۱۰۰WX) / V × (جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۴/۶۹ - (جذب در ۶۴۵ نانومتر) ۲۲/۹ میلی گرم کلروفیل a و b در هر گرم وزن تر: (۱۰۰WX) / V × (جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۲ + ۸/۰۲ (جذب در ۶۴۵ نانومتر) ۲۰/۲ میلی گرم کارتنتوئید در هر گرم وزن تر: (۱۰۰ A ۴۷۰ - ۸۵/۰۲ Chlb / Chla) برای تجزیه آماری داده ها به دست آمده، از نرم افزارهای Mstat-C SAS و برای رسم گراف ها از Excel استفاده شد. تجزیه بر روی داده های کلروفیل و کارتنتوئید قبل از تنفس سرما به صورت بلوک های کامل تصادفی، بعد از تنفس 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 اختلاف ها در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث:

کلروفیل و کارتنتوئیدها: نتایج تجزیه واریانس داده ها (جدول ۳) نشان داد که در شرایط نرمال (عدم تنفس سرما) بین ارقام شبدر ازنظر میزان کلروفیل a، b، a+b و کارتنتوئیدها در سطح احتمال خطای یک درصد تفاوت معنی دار وجود دارد. نتایج تجزیه واریانس داده ها (جدول ۴) بعد از تنفس سرما نشان داد که اثر تاریخ کاشت، رقم و اثر سطوح تاریخ کاشت در رقم برای میزان کلروفیل a، a+b و کارتنتوئیدها 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 میانگین ها در شرایط نرمال (جدول ۵) نشان داد که ازنظر میزان کلروفیل a شبدر ایرانی (لایه 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 شبد در تاریخ ۱۳۹۰/۸/۳ (قبل از تنش سرما).

منبع تغییرات						
کارتنوئیدها	نسبت کلروفیل a/b	کلروفیل a+b	کلروفیل b	کلروفیل a	کلروفیل a	درجه آزادی
۰/۰۵۲	۰/۰۴۸	۰/۰۱۸۸	۰/۰۰۲۲	۰/۰۰۵۳	۳	تکرار
۷۷۹**	۰/۲۵۴**	۰/۵۲۸**	۰/۰۳۷**	۰/۲۸۸**	۹	ارقام
۰/۰۲۸	۰/۰۷۴	۰/۰۱۲	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۹۷	۲۷	خطا
۷/۹۱	۸/۸۶	۶/۲۳	۸/۰۱	۷/۲۹	درصد ضریب تغییرات	

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

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس میزان کلروفیل ارقام شبد در تاریخ های مختلف کاشت.

منبع تغییرات						
کارتنوئیدها	نسبت کلروفیل a/b	a+b	کلروفیل b	کلروفیل a	کلروفیل a	درجه آزادی
۰/۳۸۰	۰/۳۱۹	۰/۰۴۱	۰/۰۲۸	۰/۰۰۲۵	۳	تکرار
۱/۱۶**	۰/۱۷۵ ns	۰/۲۷۷**	۰/۰۰۳ ns	۰/۲۵۰**	۱	تاریخ کاشت
۰/۲۱۷	۰/۱۰۴	۰/۱۲۵	۰/۰۱۷	۰/۰۳۸	۳	خطا
۱/۳۳**	۰/۵۲۰ ns	۰/۲۶۳**	۰/۰۲۶ ns	۰/۱۶۷**	۹	ارقام
۰/۲۶۹**	۰/۴۴۶ ns	۰/۰۸۴**	۰/۰۱۵ ns	۰/۰۶۷**	۹	تاریخ کاشت × ارقام
۰/۰۷۷	۰/۴۶۱	۰/۰۲۸	۰/۰۱۵	۰/۰۲۳	۵۴	خطا
۵/۷۸	۲۱/۰۰	۱۱/۱۶	۳۳/۲۶	۱۳/۴۰	درصد ضریب تغییرات	

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

می دهد (Toth *et al.*, 2007). افزایش سطوح توکوفرول ها در برگ یا افزایش سطوح رنگ ریزه های کم اهمیت تر مثل کاروتونوئیدها که ترجیحاً در دمای سرد اکسید شده و به کاهش تلفات کلروفیل a و b منجر می شوند، ممکن است موجب متحمل شدن گیاه به سرما شود و از خسارت سرما جلوگیری کند (Abbasi *et al.*, 2007). در این پژوهش دماهای پاییں در کشت های تأخیری باعث کاهش میزان کلروفیل و کارتنوئیدها شد و این روند در بین ارقام شبد متفاوت بود به طوری که شبد قرمز در مرحله رشد رویشی نسبت به بقیه ارقام حساس تر بود و این موضوع از روی میزان کم کلروفیل آن قابل درک است. بین میزان کارتنوئید ها و کلروفیل نسبت عکس و جود دارد و در رقم که میزان کلروفیل کمتر خسارت دیده به علت میزان بالای در آن بود و این موضوع در

بیشتری برخوردار هستند و این ممکن است یکی از علل سیزماندن 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 می یابند (Wise and Naylor., 1987). کاهش مقدار کلروفیل برگ ها ناشی از توقف عمل کمپلکس تشکیل دهنده اکسیژن است. این توقف ناشی از شرکت الکترون های زنجیره انتقال الکترون برای تشکیل انواع فعال اکسیژن به ویژه O_2 است و این بیانگر نقش Rizhsky and Mitller., 2003: Bowler (and Inze., 1992) نشن سرما باعث تغییر خصوصیات و میزان افزایش فلورسانس کلروفیل a می شود و آنالیز تغییر فلورسانس کلروفیل اطلاعات مهمی در زمینه فتوسیستم دو و اتفاقات فیزیولوژیک که گیاه در شرایط نشن با آن مواجه است، ارائه

حروف مشترک هستند براساس آزمون چند داده‌ای طاکن در سطح اختیال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندازند.

میلی میرم در گرمه و زن پر

جدول ۵ - مطالعه میانگین کثروفیل ارقام شبیر در دمای نرمال (۳۷°C) و دمای پختن (۱۶۰°C)

جدول ۶ - مقایسه پیانگین مودان کاروپلی و کاتوتپید بروگ ارقم شبلور در تاریخ های مختلف کاشت در دمای نزدیک سطح درجه سانتی گراد (۷/۱۲/۰۳۹۰)

میانگین هایی که در هر سهون حداقلی دارای یک حرف مشترک هستند بوساس آزمون چند دامنه ای باشند در سطح اختلال ۵ درصد تفاوت معنی دار نمایند.

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

میانگین مربعات (MS)						منابع تغییرات
کارایی کوانتوسومی	فلورسانس	حداکثر	حداقل	درجه آزادی		
فتوسیستم ۲	متغیر	فلورسانس	فلورسانس			
۰/۰۰۹	۲۹۲۱/۶۲	۲۳۶۰/۱۲	۲۲۱/۱۲	۳		تکرار
۰/۰۲۶**	۱۸۱۳۳/۹۰**	۱۸۴۰۴/۱۹**	۳۷۱/۵۱*	۹		رقم
۰/۰۰۴	۲۴۹۹/۲۰	۲۰۶۲/۸۰	۹۵/۹۳	۲۷		خطا
۰/۵۹۴**	۵۵۹۵۵/۳/۲۷**	۸۴۵۷۸/۶/۳۲**	۴۱۸۶۹/۹۱**	۲		زمان نمونه برداری
۰/۰۱۷**	۱۰۶۸۴/۲۳**	۱۲۲۰۸/۰۷**	۳۸۷/۹۱**	۱۸		زمان نمونه برداری × رقم
۰/۰۰۵	۲۶۳۸/۴۵	۲۷۴۲/۳۱	۱۶۶۷/۶	۵۴		خطا
۱۰/۵۶	۲۳/۲۸	۱۷/۴۸	۱۵/۷۱	-		ضریب تغییرات

* و **: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار 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 تنفس دماهای پایین در مزرعه (S2، S1، 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 تنفس S3 نسبت به بقیه تیمارهای سرما است که آمارهای هواشناسی (جدول ۲) تأییدی بر این موضوع می‌باشد. این تحقیق نشان داد که مؤلفه F_v/F_m یکی از مهمترین شاخص‌های انتخاب ارقام متتحمل به تنفس سرما است. Baker and Nie (۱۹۹۴) و همچنین Sthapit و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند که از کاهش عملکرد کوانتوسومی 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 تنفس سرما در گیاهان مختلف حتی در شدت‌های نور کم باشد. در همین راستا تعدادی از محققان (Jansen and Ison., 1987; Bjorkman and Demmig., 1987) 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 به دست آمده با نتایج محققان مطابقت دارد.

عملکرد کوانتوسومی فتوسیستم دو (F_v/F_m): نتایج این پژوهش (جدول ۷) نشان داد که در تنفس دماهای پایین مزرعه بین پارامترهای فلورسانس کلروفیل در شرایط تاریکی ارقام شبدر در سطح احتمال خطای یک درصد تفاوت معنی دار 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 معنی دار وجود دارد. مقایسه میانگین‌ها (جدول ۸) نشان داد که بیشترین مقدار پارامتر F_v/F_m (حداکثر عملکرد کوانتوسومی فتوسیستم دو در شرایط سازگار شده با تاریکی) در زمان تنفس S1 مربوط به شبدر ایرانی (یک چین) به میزان ۰/۷۹۴ در زمان تنفس S2 مربوط به شبدر برسیم (تولیدی کرج) به میزان ۰/۸۱۶ و در زمان تنفس S3 مربوط به شبدر ایرانی (دیررس) به میزان ۰/۷۵۰ است. همچنین نتایج نشان داد که در تنفس دماهای پایین مزرعه شبدر قرمز (نسیم) دارای عملکرد کوانتوسومی فتوسیستم دو کمتری نسبت به بقیه ارقام است، به عبارت دیگر بیشتر (F_v/F_m) تحت تأثیر تنفس 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)

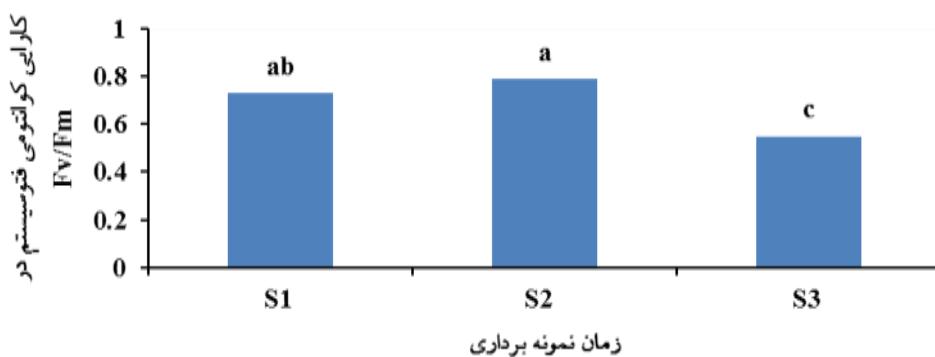
زمان نمونه برداری	ارقام	حداقل فلورسانس	حداکثر فلورسانس	فلورسانس	کارایی کواتسومی فتوسیستم ۲
شبدر ایرانی (دیررس)	۱۰۵/۳ ^{bcd}	۴۴۲/۰ ^{bc}	۳۳۶/۸ ^b	۰/۷۶۲ ^{ab}	۰/۷۶۲ ^{ab}
شبدر ایرانی (متوسطرس)	۱۳۴/۸ ^a	۵۲۵/۵ ^{ab}	۳۹۰/۹ ^{ab}	۰/۷۴۴ ^{ab}	۰/۷۴۴ ^{ab}
شبدر ایرانی (زودرس)	۱۱۳/۰ ^{bc}	۵۰۳/۰ ^{ab}	۳۹۰/۰ ^{ab}	۰/۷۷۵ ^{ab}	۰/۷۷۵ ^{ab}
شبدر ایرانی (یک چین)	۱۱۷/۰ ^{abc}	۵۶۷/۸ ^a	۴۵۰/۸ ^a	۰/۷۹۴ ^a	۰/۷۹۴ ^a
شبدر ایرانی (لاین ۱۳)	۱۱۵/۰ ^{abc}	۴۸۲/۵ ^{ab}	۳۶۶/۸ ^{ab}	۰/۷۶۰ ^{ab}	۰/۷۶۰ ^{ab}
شبدر ایرانی (لاین ۷)	۱۱۵/۰ ^{abc}	۴۷۰/۰ ^{ab}	۳۵۵/۰ ^b	۰/۷۵۵ ^{ab}	۰/۷۵۵ ^{ab}
شبدر ایرانی (توده)	۱۰۹/۸ ^{bcd}	۵۱۷/۵ ^{ab}	۴۰۷/۸ ^{ab}	۰/۷۸۸ ^a	۰/۷۸۸ ^a
شبدر برسمیم (تولیدی کرج)	۹۸/۳ ^c	۳۳۷/۵ ^d	۲۳۹/۳ ^c	۰/۷۰۹ ^b	۰/۷۰۹ ^b
شبدر قرمز (نسیم)	۱۳۴/۸ ^a	۳۶۹/۳ ^{cd}	۲۳۴/۵ ^c	۰/۶۳۰ ^c	۰/۶۳۰ ^c
شبدر لاکی (البرز ۱)	۱۲۰/۸ ^{ab}	۴۳۹/۸ ^{bcd}	۳۱۹/۰ ^{bc}	۰/۷۲۵ ^b	۰/۷۲۵ ^b
میانگین	۱۱۷/۴	۴۶۵/۴	۳۴۹/۳	۰/۷۳۴	۰/۷۳۴
انحراف معیار	۱۲/۸۵	۶۲/۵۶	۵۸/۱۷	۰/۰۴۳	۰/۰۴۳

شبدر ایرانی (دیررس)	۶۶/۵ ^a	۲۶۸/۸ ^{ab}	۲۰۲/۳ ^a	۰/۷۵۳ ^{ab}	۰/۷۵۳ ^{ab}
شبدر ایرانی (متوسطرس)	۵۳/۳ ^{ab}	۲۷۸/۰ ^a	۲۲۴/۸ ^a	۰/۸۰۸ ^a	۰/۸۰۸ ^a
شبدر ایرانی (زودرس)	۵۳/۰ ^{ab}	۲۳۰/۰ ^{ab}	۱۷۷/۰ ^a	۰/۷۷۰ ^a	۰/۷۷۰ ^a
شبدر ایرانی (یک چین)	۵۳/۳ ^{ab}	۲۶۱/۰ ^{ab}	۲۰۷/۸ ^a	۰/۷۹۶ ^a	۰/۷۹۶ ^a
شبدر ایرانی (لاین ۱۳)	۵۰/۰ ^{ab}	۲۴۷/۰ ^{ab}	۱۹۷/۵ ^a	۰/۷۹۷ ^a	۰/۷۹۷ ^a
شبدر ایرانی (لاین ۷)	۴۲/۳ ^b	۲۰۷/۰ ^b	۱۶۴/۸ ^a	۰/۷۹۷ ^a	۰/۷۹۷ ^a
شبدر ایرانی (توده)	۴۶/۳ ^b	۲۱۲/۸ ^b	۱۶۶/۵ ^a	۰/۷۸۳ ^a	۰/۷۸۳ ^a
شبدر برسمیم (تولیدی کرج)	۴۱/۹ ^b	۲۲۸/۰ ^{ab}	۱۸۶/۱ ^a	۰/۸۱۶ ^a	۰/۸۱۶ ^a
شبدر قرمز (نسیم)	۶۲/۳ ^{ab}	۲۱۵/۰ ^{ab}	۱۵۲/۸ ^a	۰/۷۱۰ ^b	۰/۷۱۰ ^b
شبدر لاکی (البرز ۱)	۵۱/۵ ^{ab}	۲۳۴/۰ ^{ab}	۱۸۲/۵ ^a	۰/۷۸۰ ^a	۰/۷۸۰ ^a
میانگین	۵۲/۱	۲۳۸/۲	۱۹۵/۷	۰/۷۸۸	۰/۷۸۸
انحراف معیار	۱۲/۰۱	۳۸/۲۳	۵۱/۸۴	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵

میانگین‌هایی که در هر ستون، حداقل دارای یک حرف مشترک هستند براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی دار 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 می‌توانند 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 دمایی 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 تشییت‌کننده نیتروژن



شکل ۱ - میانگین کارایی کوانتومی فتوسیستم دو در زمان های نمونه برداشتی، S1: ۲۹ آذر ۱۳۹۰، S2: ۷ دی ۱۳۹۰ و S3: ۱۷ بهمن ۱۳۹۰.
(انحراف معیار برای $S1=0/043$ $S2=0/025$ و $S3=0/111$)

F_m برابر ۱۱۲۰ و F_v/F_m برابر ۰/۸۴۴ و ۰/۸۰۹ است.

نتیجه‌گیری 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 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_0 ، F_m و F_v/F_m در شبدر سفید و شبدر قرمز به ترتیب ۷۸ و ۸۲، 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:

- حسینی، 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: ۳۱-۴۱.
- حیدری شریف‌آباد، ح، و م. دری. (۱۳۸۰) بیاتات علوفه‌ای (نیامداران). جلد اول. صفحه ۳۱۱.
- 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 *Trifoliumbalansae* 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 photosynthetice 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 invasire 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 ti photosynthesis and ultrastructure. *Plant Physiology* 83: 272-277.