نشریه زراعت
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۹، تابستان ۱۳۹۲

# ارزیابی تحمل ژنوتیپ‌های عدس (*Lens culinaris* Medik.) به دماهای یخ‌زدگی با استفاده از عوامل فلورسانس کلروفیل

● **احمد نظامی**
عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
● **حمید رضا خزاعی**
عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
● **حمید رضا عشقی زاده** (نویسنده مسئول)
دانشجوی دکترای فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشگاه فردوسی مشهد
● **شهرام ریاحی نیا**
دانشجوی دکترای فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: دی ماه ۱۳۸۹
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۸۲۰۸۴۲۹
Email: hamid.eshghizdeh@gmail.com

**چکیده**

**اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل روشی سریع و غیر تخریبی را برای ارزیابی نحوهٔ عملکرد سیستم فتوسنتزی در طول و بعد از شرایط تنش‌های محیطی فراهم کرده و اطلاعات حاصل از آن برای مشخص کردن سرعت انتقال الکترون و چگونگی فرود انرژی الکترون برانگیخته بکار می‌رود. به همین منظور جهت ارزیابی تحمل ژنوتیپ‌های عدس شامل MLC۷، MLC۶۰، MLC۱۸۵، MLC۲۲۵، MLC۳۵۷، توده قزوین و توده محلی رباط به یخ‌زدگی ۰، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸-، ۲۱- و ۲۴- درجهٔ سانتیگراد، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در فریزر ترموگرادیان اجرا شد. بازتاب فلورسانسی از برگ سازگار شده به نور بسیار کم (F'o)، بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به نور (F'm)، فلورسانس متغیر (F'v) و بیشینه‌ی کارایی پتانسیل فتوشیمیایی فتوسیستم F'v/F'm II قبل، پنج و ده روز پس از اعمال تیمار یخ زدگی‌اندازه گیری و ثبت شد. درصد بقای ژنوتیپ‌های مختلف نیز سه هفته پس از اعمال تیمارهای دمایی تعیین شد. نتایج تجزیه واریانس مربوط به عوامل فلورسانس کلروفیل در پنج روز پس از اعمال تیمار نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند. ژنوتیپ MLC۲۲۵بیشترین و ژنوتیپ MLC۷ کمترین مقدار F'o را به خود اختصاص دادند. از نظر عامل F'm ژنوتیپ‌هایMLC۲۲۵، MLC۳۵۷ و قزوین بالاترین و ژنوتیپ‌های رباط و MLC۱۸۵ پایین‌ترین مقادیر را داشتند. همچنین در بین ژنوتیپ‌های مختلف، ژنوتیپ رباط کمترین مقدار F'v را داشت. تفاوت بالاترین نسبت F'v/F'm در ژنوتیپ MLC۷ با پایین‌ترین آن در ژنوتیپ رباط حدود ۱۶ درصد بود. همچنین در این مرحله سطوح مختلف دمایی با وجود مشابه بودن مقادیر F'o به علت تفاوت در F'm از نظر F'v و F'v/F'm با یکدیگر متفاوت بودند و به طور نسبی هم روند با کاهش دما، مقادیر این عوامل کاهش یافت. سه هفته بعد از اعمال تیمار یخ‌زدگی ژنوتیپ MLC۶۰ بیشترین (۴۹/۹ درصد) و ژنوتیپ قزوین کمترین (۳۸/۳ درصد) درصد بقا را داشت. اثر دمای یخ‌زدگی بر درصد بقا معنی‌دار بود. با افزایش شدت یخ‌زدگی، درصد بقای نمونه‌ها کاهش یافت، به صورتیکه در دمای ۱۲- درجه سانتی راد درصد بقا گیاهان حدود ۵۶ درصد بود ولی در دماهای پایین‌تر هیچ یک از گیاهان در ژنوتیپ‌های مختلف قادر به زنده ماندن نبودند. بین درصد بقای ژنوتیپ‌های مختلف عدس و نسبت F'v/F'm پیش از تیمار یخ‌زدگی رابطه قوی ($R^2$=۰/۹۳**) وجود داشت. ولی این رابطه دراندازه گیری‌های پس از اعمال تیمارهای یخ‌زدگی بسیار ضعیف بود. به نظر می‌رسد بتوان از طریق اندازه گیری نسبت F'v/F'm پیش از اعمال یخ‌زدگی تا حدودی به میزان تحمل به یخ‌زدگی ژنوتیپ‌های عدس پی برد.**

**کلمات کلیدی: عدس، یخ‌زدگی، نسبت F'v/F'm، ژنوتیپ، بقا**

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 99 pp: 24-33

**Evaluation of freezing temperature tolerance of lentil (*Lens culinaris* Medik) genotypes with using chlorophyll fluorescence parameters**

*By: Nezami, A. Academic Member Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. H. R. Khazaei, Academic Member Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad. Eshghizadeh, H. R. (Corresponding Author; Tel: +989138208429), PhD Student of Crop Physiology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad. Riahinia, Sh. PhD Student of Crop Physiology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.*

**Received: September 2009** **Accepted: January 2011**

During and after environmental stresses, measuring chlorophyll fluorescence parameters provide a fast and non-destructive method to evaluate the performance of photosynthetic system, and achieving data is used to determine the electron transfer rate and type of excited electrons quenching. So in order to assess tolerance of lentil genotypes including MLC7, MLC60, MLC185, MLC225, MLC357, Qazvin and Rabat to freezing temperatures consist of 0,-3,-6,-9,-12,-15,-18,-21,-24 oC, as a factorial experiment in randomized complete block design with three replications was conducted in the thermo gradient freezer. Reflection fluorescence of leaves adapted to low light (Fo), maximum fluorescence of light adapted leaves (Fm), variable fluorescence (Fv) and maximal photochemical efficiency potential PSII (Fv/Fm) were measured before, 5 and 10 days after the freezing treatments. Percent survival of different genotypes was determined also three weeks after applied the treatments. Analysis variance results showed that different genotypes were significantly varied related to chlorophyll fluorescence parameter in five days after the treatments. Two MLC225 and MLC7 genotypes indicated the highest and lowest F'o, respectively. MLC225, MLC357 and Qazvin genotypes allocated the highest values of Fm, also Rabat and MLC185 had the lowest levels. For Fv parameter, Rabat had the lowest contribution among the different lentil genotypes. Also in this phase, temperature levels regardless of similar F'o, had different Fv and Fv/Fm because of dissimilarity in F'm parameter, and relatively with decreased temperature this parameters were reduced. Three weeks after freezing treatment, MLC60 and Ghazvin genotypes had highest (49.9%) and lowest (38.3%) survival rate, respectively. Freezing effect on survival rate was significantly different. Survival rate decreased when freezing intensity was increased. Survival rate of plants were 56% in -12$^{oC}$ but in lower temperature none of plants of different genotypes could not be survive. There was positive correlation between survival rate and Fv/Fm ratio before freezing in all genotypes. While this correlation after freezing was weak. It seems we can predict freezing tolerance in lentil genotypes by measuring Fv/Fm ratio before exposure of freezing.

**Key words: Lentil, Freezing, Fv / Fm ratio, Genotype, Survival**

## مقدمه

سطح زیر کشت عدس در کشور ۲۵۵ هزار هکتار می‌باشد که ۹۲ درصد آن در شرایط دیم کشت می‌شود. متوسط عملکرد گیاه عدس در کشور نیز ۵۱۱ کیلوگرم در هکتار است که نسبت به میانگین عملکرد جهانی (۸۴۰ کیلو گرم در هکتار) و کشورهای مهم تولید کننده، بسیار پایین است (FAO، ۲۰۰۷). محققان در خصوص حبوباتی مانند عدس (Erskine و Malhotra، ۱۹۹۶)، نخود (Singh، Malhotra، Knights، Halila و Verma، ۱۹۹۸) و همچنین بقولات علوفه‌ای یک ساله (Fisk، Squire، Hesterman، Shrestha و Sheaffer، ۱۹۹۸) اظهار داشته‌اند که به دلیل رشد مناسب ارقام متحمل به یخزدگی در شرایط کاشت پاییزه، تولید و عملکرد این گیاهان بهبود یافته و بهتر از کاشت بهاره آنها می‌باشد. بنابراین وجود ارقام متحمل به یخزدگی جهت موفقیت در کشت پاییزه گیاهان زراعی ضروری به نظر می‌رسد.

محققان در آزمایشات بررسی تحمل به سرما در شرایط مزرعه، بقای گیاهان پس از زمستان را به عنوان معیار ارزیابی تحمل گیاهان به شرایط سخت زمستان مورد تاکید قرار داده‌اند (Eser، Murry، Gusta، Halila و Eteve، ۱۹۸۸؛ Singh و همکاران ۱۹۹۸). علیرغم مزیت آزمایش‌های مزرعه‌ای، واقعیت این است که به دلیل تنوع مکانی و زمانی وقوع یخزدگی در شرایط مزرعه، در این گونه ارزیابی‌ها مشکلات خاصی از جمله امکان عدم وجود زمستان‌های مطلوب از نظر شرایط به گزینی یا سردی هوا در حد مرگ گیاهان و ایجاد خطا در به‌گزینی وجود دارد (Blum، ۱۹۸۸؛ Mckersie، Falk، Bridger و Smith،

۱۹۹۶)، ضمن اینکه درصد بقاء گیاهان در مزرعه تا حد زیادی وابسته به میزان پوشش برف، دما و رطوبت خاک و سایر عوامل محیطی است (Gao، O'Connor، Gusta و Jana، ۲۰۰۰). از این رو محققان غالبا از روش آزمون یخزدگی در شرایط کنترل شده استفاده می‌کنند. نتایج بدست آمده از اغلب آزمایش‌های انجام شده به روش مذکور همبستگی خوبی با بقاء گیاه در مزرعه نشان داده‌اند (Blum، ۱۹۸۸؛ Kościelniak و Biesaga-Kościelniak، ۲۰۰۶). به‌عنوان مثال Swensen و Murray (۱۹۸۳) با بررسی تحمل به یخزدگی ژنوتیپ‌های نخود فرنگی در شرایط مزرعه و شرایط کنترل شده مشاهده کردند که با کاهش دما درصد بقای لاین‌های نخود فرنگی در هر دو محیط کاهش یافت. در آزمایش آنها ضرایب همبستگی درصد بقاء ۱۹ لاین نخود فرنگی بین دو محیط آزمایشی (مزرعه و شرایط کنترل شده) بالاتر از ۸۰ درصد بود که بیانگر امکان استفاده از شرایط کنترل شده در به‌گزینی ژنوتیپ‌ها برای تحمل به شرایط زمستان در مزرعه می‌باشد. این محققان اظهار داشتند که با به‌گزینی در دمای ۹- درجه سانتیگراد می‌توان گیاهان غیر مقاوم به یخزدگی را حذف کرد. با این وجود انجام آزمون یخزدگی و ارزیابی بقاء در شرایط کنترل شده نیز تخریبی، پرهزینه و زمان بر بوده و به ویژه در زمانی که مقدار کمی بذر از ژنوتیپ‌ها در دسترس است، انجام این آزمون امکان پذیر نمی‌باشد. بنابراین محققان شناسایی برخی شاخص‌های فیزیولوژیک مرتبط با تحمل به یخزدگی در گیاهان مانند؛ حفظ ظرفیت تبادل گازی یا فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و فلورسانس کلروفیل را جهت رفع اینگونه مشکلات مورد تاکید قرار داده‌اند (Baker و Rosenqvist، ۲۰۰۴؛ Maxwell و Johnson، ۲۰۰۰).

در سال‌های اخیراندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل روشی سریع و غیر تخریبی را برای ارزیابی نحوه‌ی عملکرد سیستم فتوسنتزی در طول و بعد از شرایط تنش محیطی فراهم کرده که اطلاعات حاصل از آن برای مشخص کردن سرعت انتقال الکترون و چگونگی فرود[1] انرژی الکترون برانگیخته به کار می‌رود (Shilling، Macdonald و Bewick، ۱۹۹۳). از جمله بارزترین واکنش‌های گیاهان به عامل تنش‌زای محیطی افت فتوسنتز ناشی از اختلال در فعالیت فتوسیستم II می‌باشد (Fryer، Andrews و Baker، ۱۹۹۵؛ Maxwell و Johnson، ۲۰۰۰). تحت چنین شرایطی به دنبال کاهش تولید و ذخیره فرآورده‌های انتقال الکترون یعنی ATP و NADPH در واکنش‌های وابسته به نور فتوسنتز، عملکرد کوانتومی‌فتوسیستم II (ΦPSII) افت پیدا می‌کند. در واقع مقدار فرود انرژی الکترون برانگیخته شده از مسیر غیر فتوشیمیایی[2] (NPQ) افزایش یافته و از این طریق فتوسیستم II دچار اختلال می‌شود. در شرایط محیطی و هنگامی‌که نور در سطح معمول می‌باشد، بخش غالب آن در فعالیت‌های فتوشیمیایی به مصرف می‌رسد و در نهایت تنها بخش کمی از انرژی نورانی به صورت فلورسانس ساطع می‌شود که به آن فلورسانس پایه یا کمینه برگ سازگار شده به روشنایی (F'o) می‌گویند. در این صورت فرود انرژی الکترون برانگیخته شده از طریق فتوشیمیایی (qP)[3] نزدیک به یک است. در مقابل هنگامی‌که برگ در معرض پالسی از نور اشباع قرار می‌گیرد، تمامی مولکول‌های موسوم به کوئینون آ[4] دست کم به صورت موقت به صورت احیا در آمده و به دلیل تداوم واکنش‌های فتوشیمیایی فتوسیستم II، فلورسانس به میزان بالایی افزایش می‌یابد که به آن بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به روشنایی (F'm) اطلاق می‌شود. در چنین حالتی فرود انرژی الکترون برانگیخته شده از طریق فتوشیمیایی نزدیک به صفر است (Maxwell و Johnson، ۲۰۰۰). تنش‌های محیطی از جمله تنش کمبود آب و یخزدگی باعث کاهش نسبت F'v/F'm- [F'm-F'o)/F'm] که تخمینی از بیشینه کارایی فتوشیمیایی PSII در یک شدت نور مشخص است، می‌شوند. زمانی که گیاهان در معرض تنش یخزدگی قرار می‌گیرند، متابولیسم برگ‌ها به شدت کاهش یافته و خسارت نوری به PSII اجتناب ناپذیر است. با افزایش فوتون فعال فتوسنتزی، سهم نور جذب شده که در زنجیره انتقال الکترون استفاده می‌شود، کاهش می‌یابد و این کاهش در دماهای پایین چشمگیر است. علاوه بر این گیاهانی که تحت تاثیر یخزدگی قرار گرفته‌اند، زمانی که در بازیابی به سر می‌برند (به ویژه در تشعشعات بالا) بایستی بر انرژی اضافی غلبه کنند، در غیر این صورت دستگاه فتوسنتزی و فعالیت‌های متابولیکی به شدت خسارت می‌بینند. از طرف دیگر این مساله به اثبات رسیده که نور از طریق فتوسنتز، انرژی لازم برای القای تحمل به یخزدگی در گیاهان تامین می‌کند (Dexter، ۱۹۹۳). بنابراین با اندازه‌گیری نسبت F'v/F'm میزان تحمل به یخزدگی در گیاهان قابل شناسایی می‌باشد (Baker و Rosenqvist، ۲۰۰۴). در ژنوتیپ‌های مختلف مقدار کاهش عملکرد کوانتومی‌و یا ثبات تغییرات فلورسانس در بازه‌ی زمانی به عنوان معیاری از درجه تحمل و مقاومت به تنش مورد استفاده قرار گرفته است (Grafts-Brander و Salvucci، ۲۰۰۴؛ Alexiou، Halshaw، Trivedi، Masojidek و Hall، ۱۹۹۱؛ Irigoyen، Gonzalez-Meler، Aroca، Ribas-Carbo و Sanchez-Diaz، ۲۰۰۰؛ Yamasaki و همکاران ۲۰۰۲).

این آزمایش با هدف بررسی بکارگیری عوامل فلورسانس کلروفیل در تعیین میزان تحمل به یخزدگی ژنوتیپ‌های عدس به عنوان روشی سریع و غیر تخریبی انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه در دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد در پاییز و زمستان سال ۱۳۸۷ انجام شد. بذور هفت ژنوتیپ عدس از بانک بذر دانشگاه[5] (MLC) انتخاب و با قرار دادن در اتانول ۷۵ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی و پس از قرار گرفتن در پنبه مرطوب در داخل پلاستیک‌های تمیز در مدت ۷۲ ساعت جوانه‌دار شدند. سپس تعداد ۸ بذر جوانه‌دار در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۰ سانتی متر حاوی مخلوطی از ماسه، خاک مزرعه و خاک‌برگ به نسبت یک سوم از هر کدام در عمق دو سانتی‌متری کشت و آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. به منظور ایجاد سازگاری به یخزدگی در شرایط طبیعی گیاهچه‌ها تا مرحله ۶-۴ برگی در محیط طبیعی رشد کردند. در این مرحله سنجش وضعیت فلورسانس به وسیله‌ی دستگاه فلورومتر[6] شامل؛ بازتاب فلورسانسی از برگ سازگار شده به روشنایی (F'o)، بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به نور (F'm)، فلورسانس متغیر (F'v) و بیشینه‌ی کارایی پتانسیل فتوشیمیایی فتوسیستم F'v/F'm:II از وسط برگچه دومین برگ کاملا توسعه یافته از نوک گیاه در ۳ بوته اندازه گیری شد.

گلدان‌ها، ۲۴ ساعت قبل از تیمار یخ‌زدگی آبیاری شدند و سپس به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. دمای فریزر در شروع آزمایش، ۵ درجه سانتی گراد بود و پس از قرار دادن نمونه‌ها با سرعت دو درجهٔ سانتی‌گراد در ساعت کاهش یافت. این وضعیت شرایط را برای توزیع مجدد آب به بافت‌های گیاهی و جلوگیری از تشکیل یخ در داخل سلول‌ها که در طبیعت به‌ندرت اتفاق می‌افتد، فراهم می‌کند (Murry و همکاران ۱۹۸۸). به منظور جلوگیری از پدیده فرایخ‌زدگی و ایجاد هسته یخ در گیاهچه‌ها و اطمینان از این که مکانیزم از نوع تحمل است و نه اجتناب، در دمای ۳- درجه سانتی گراد بر روی گیاهان، محلول باکتری‌های ایجاد کننده هسته یخ[۷] به نحوی پاشیده شد که قشر نازکی از این محلول روی برگ‌ها را پوشاند. برای اعمال تیمار یخ‌زدگی گیاهان تحت نه تیمار دمایی شامل دماهای صفر، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸-، ۲۱- و ۲۴- درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

به منظور ایجاد تعادل در دمای محیط آزمایش، گیاهان در هر تیمار دمایی، به مدت یک ساعت نگه داشته و سپس از فریزر خارج شدند (Murray، Ditterline، Auld و Swensen، ۱۹۸۳). به منظور کاهش سرعت ذوب، گلدان‌ها بلافاصله به اتاقک با دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در آن جا نگهداری شدند (Bridger و همکاران ۱۹۹۶). سپس گلدان‌ها به گلخانه منتقل شده و عوامل فلورسانس کلروفیل برگ پس از گذشت پنج و ۱۰ روز اندازه گیری شدند.

پس از ۲۱ روز، درصد بقاء گیاهان نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد بقا از طریق نسبت تعداد گیاهان زنده پس از اعمال تیمار یخ‌زدگی به تعداد گیاهان قبل از تیمار یخ‌زدگی ضرب در ۱۰۰ محاسبه شد. تجزیه داده‌های هر مرحله (پیش از اعمال تنش و پنج و ۱۰ روز پس از آن) جداگانه و با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. همچنین جهت مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

## نتایج

در این آزمایش عامل F'o بیانگر مقدار فلورسانس در زمانی است که پذیرنده کوئینون A در فتوسیستم II در بالاترین وضعیت اکسیداسیونی قرار دارد (مراکز فتوسیستم II باز هستند)، عامل F'm بیانگر مقدار فلورسانس در زمانی است که کوئینونA در فتوسیستمII در بالاترین وضعیت احیایی قرار دارد (مراکز فتوسیستمII بسته هستند)، F'v نشان دهنده ظرفیت فتوسیستم II در راه‌اندازی ابتدای مسیر فتوشیمیایی (احیا نوری QA) است و F'v/F'm تخمینی از بیشینه کارایی فتوشیمیایی در فتوسیستم II است که به ترتیب در سه مرحله اندازه‌گیری شده است که در ادامه وضعیت آنها در هر مرحله از اندازه‌گیری، ارزیابی می‌شود:

### عوامل فلورسانس کلروفیل قبل از اعمال تیمار یخ‌زدگی

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به عوامل فلورسانس کلروفیل (F'v، F'm، F'o و F'v/F'm) قبل از اعمال دماهای یخ‌زدگی نشان داد که بین ژنوتیپ‌های عدس اختلاف معنی دار (P<۰/۰۵) وجود ندارد (جدول ۱). با این وجود ژنوتیپ قزوین کمترین و ژنوتیپ‌های MLC۱۸۵ و MLC۳۵۷ بیشترین مقدار F'o را داشتند، که تفاوت آنها حدود ۱۳ درصد بود (شکل ۱). از طرف دیگر بین بیشترین مقدار F'm در ژنوتیپ MLC۶۰ با کمترین مقدار آن در ژنوتیپ قزوین حدود ۴۸۳ واحد اختلاف بود. همچنین ژنوتیپ‌های قزوین و رباط مقدار F'v کمتری در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند. ضمن اینکه ژنوتیپ‌های قزوین و MLC۶۰ کمترین و بیشترین نسبت F'v/F'm را به خود اختصاص دادند.

### عوامل فلورسانس کلروفیل پنج روز پس از تیمار یخ‌زدگی

نتایج تجزیه واریانس مربوط به عوامل فلورسانس کلروفیل در پنج روز پس از اعمال تیمار یخ‌زدگی نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف تفاوت معنی داری (P<۰/۰۱) با یکدیگر دارند (جدول ۲). ژنوتیپ MLC۲۲۵ بیشترین و ژنوتیپ MLC۷ کمترین مقدار F'o را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). از نظر عامل F'm ژنوتیپ‌های MLC۲۲۵، MLC۳۵۷ و قزوین بالاترین و ژنوتیپ‌های رباط و MLC۱۸۵ پایین ترین مقادیر را داشتند. همچنین در بین ژنوتیپ‌های مختلف عدس ژنوتیپ رباط کمترین مقدار F'v را داشت. تفاوت بالاترین نسبت F'v/F'm در ژنوتیپ MLC۷ با پایین ترین آن در ژنوتیپ رباط حدود ۲۰ درصد بود.

بین سطوح مختلف دماهای یخ‌زدگی پس از پنج روز بجز در مورد F'o در سایر عوامل تفاوت معنی داری (P<۰/۰۱) وجود داشت (جدول۲). با وجود مشابه بودن مقادیر F'o به علت تفاوت مقادیر F'm مقادیر F'v و F'v/F'm در سطوح مختلف دمایی با یکدیگر متفاوت بودند و به طور نسبی با کاهش دما مقادیر این عوامل کاهش یافت (جدول۴).

همچنین در این مرحله ازاندازه گیری به جز عامل F'o سایر عوامل تحت تاثیر برهمکنش معنی دار اثر ژنوتیپ عدس و دما قرار نگرفتند (جدول۲).

### عوامل فلورسانس کلروفیل ده روز پس از تیمار یخ‌زدگی

نتایج تجزیه واریانس مربوط به عوامل فلورسانس کلروفیل در ده روز پس از اعمال دماهای یخ‌زدگی نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف به جز برای نسبت F'v/F'm (در سطح احتمال ۵ درصد) در سایر عوامل تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۲).

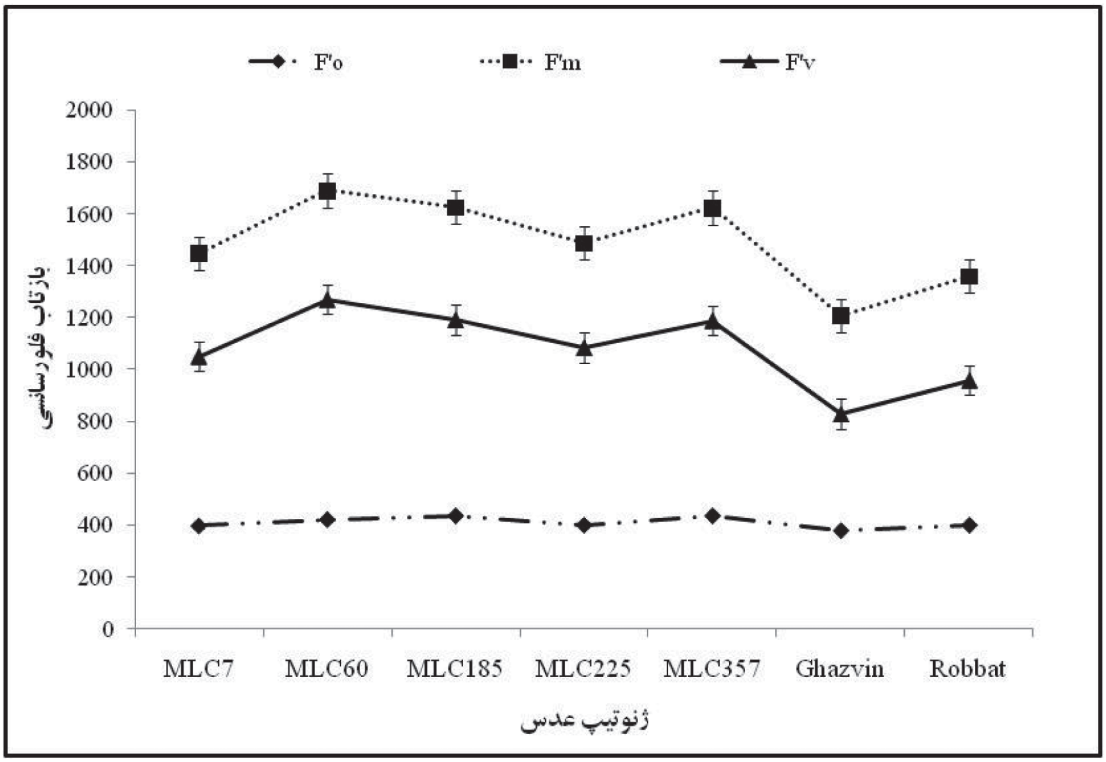
در بین ژنوتیپ‌ها، ژنوتیپ MLC۶۰ و MLC۲۲۵ بیشترین و کمترین مقدار F'v/F'm را به خود اختصاص دادند. به طور نسبی ده روز پس از اعمال تیمار یخ‌زدگی، همگام با کاهش دما، مقادیر این نسبت کاهش یافت هر چند در دمای صفر درجه یک استثنا وجود داشت (شکل۲).

### درصد بقا

بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه عدس از نظر درصد بقاء سه هفته بعد از اعمال تیمار یخ زدگی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. با وجود این، ژنوتیپ MLC۶۰ بیشترین و ژنوتیپ قزوین کمترین بقاء را داشت. اثر دمای یخ زدگی بر درصد بقا معنی دار (P<۰/۰۱) بود. با افزایش شدت یخ زدگی، درصد بقای نمونه‌ها کاهش یافت به طوریکه در دمای ۱۲- درجه سانتیگراد درصد بقاء گیاهان حدود ۵۶ درصد بود، ولی در دماهای پایین تر هیچ یک از گیاهان در ژنوتیپ‌های مختلف قادر به زنده ماندن نبودند (شکل۳).

جدول ۱- مقادیر درجه آزادی و سطح احتمال معنی دار بودن عوامل فلورسانس کلروفیل پیش از اعمال تیمار یخزدگی در برگچه ژنوتیپ‌های عدس

| منابع تغییر | درجه آزادی | عوامل فلورسانس کلروفیل | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | F'o | F'm | F'v | F'v/F'm |
| | | Pr > F | | | |
| تکرار | ۲ | ۰/۸۲۶۸ | ۰/۳۸۴۴ | ۰/۱۹۶۶ | ۰/۰۰۲۲ |
| ژنوتیپ | ۶ | ۰/۷۹۰۱ | ۰/۱۹۹۴ | ۰/۱۳۸۳ | ۰/۱۸۲۸ |
| خطای نمونه‌برداری | ۲ | ۰/۹۹۰۲ | ۰/۹۳۹۵ | ۰/۹۲۳۶ | ۰/۸۸۶۷ |




شکل۱- مقایسه روند تغییرات عوامل F'o، F'm و F'v در برگچه ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال تیمار یخزدگی

جدول ۳- مقادیر درجه آزادی و سطح احتمال معنی دار بودن عوامل فلورسانس کلروفیل پیش از اعمال تیمار یخزدگی در برگچه ژنوتیپ‌های عدس

| منابع تغییر | درجه آزادی | عوامل فلورسانس کلروفیل | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | F'o | F'm | F'v | F'v/F'm | F'o | F'm | F'v | F'v/F'm |
| | | Pr > F | | | | Pr > F | | | |
| ژنوتیپ عدس | ۶ | ۰/۰۰۰۱> | ۰/۰۰۰۴ | ۰/۰۰۰۱> | ۰/۰۰۰۱> | ۰/۵۷۸۹ | ۰/۱۲۳۳ | ۰/۱۴۱۶ | ۰/۰۵۴۸ |
| دما | ۴* | ۰/۴۷۳۹ | ۰/۰۰۵۰ | ۰/۰۰۰۷ | ۰/۰۰۰۱> | ۰/۰۸۰۱ | ۰/۰۷۲۵ | ۰/۱۶۳۳ | ۰/۰۴۱۴ |
| ژنوتیپ ×دما | ۲۴ | ۰/۰۱۳۵ | ۰/۳۵۷۸ | ۰/۴۶۱۹ | ۰/۲۳۲۵ | ۰/۶۶۱۹ | ۰/۶۱۳۴ | ۰/۶۳۹۶ | ۰/۴۳۸۹ |

• با توجه به اینکه گیاهان در همه ژنوتیپ‌ها در دمای پایین تر از ۱۲- درجه سانتیگراد از بین رفتند،اندازه گیری تنها در پنج تیمار یخزدگی انجام گرفت.

## بحث

به طور کلی در موجودات فتوسنتزکننده، در صورتی که تشعشع تابیده شـده در محدوده تشعشع فعال فتوسنتزی (PAR)[۸] توسط مولکول‌های کلروفیل برگ دریافت شـود، انرژی الکترون برانگیخته یا وارد مسیرهای بیوشیمیایی شده و واکنش‌های وابسته به نور فتوسنتز راه‌اندازی می‌شود (فرود فتوشیمیایی، qP)، یا به صورت گرما خارج شده و الکترون به لایه اول بـاز می‌گردد (فرود غیر فتوشـیمیایی، NPQ) و یا اینکه به صورت طول موج فلورسـانس (طول موجی بلندتر از طـول موج دریافتی، qF) ساطع می‌شود. سـه فرآیند ذکر شده در رقابت با یکدیگر بوده و افزایش یکی منجر به کاهش عملکرد کوانتومی دو مسیر دیگر خواهد شد. مجموع عملکـرد کوانتومی هر سـه فرآینـد معادل یک واحد به شـرح فرمول ۱ می باشد (Gray، Hope،Qin،Taylor و Whitehead، ۲۰۰۳).

فرمول ۱- $(qP+ NPQ + qF =1)$

این روندها رقابتی هسـتند و تغییر در فلورسـانس کلروفیل کارکرد فتوسـنتزی را تغییـر می‌دهـد (Krause و Weis، ۱۹۹۱). تنش‌های غیر زنـده می‌توانند به صورت مسـتقیم یا غیر مسـتقیم بر خصوصیات فتوسنتزی برگ‌ها اثر گذاشته و ویژگی‌های فلورسانس کلروفیل را تغییر دهـد (Baker و Rosenqvist، ۲۰۰۴؛ Gray و همـکاران ۲۰۰۳). زمانـی که گیاهـان در معرض تنش یخزدگی قرار می‌گیرند، متابولیسـم برگ‌ها به شـدت کاهش یافته و خسـارت نوری به PSII اجتناب ناپذیر است (Dexter، ۱۹۹۳).

در ایـن آزمایش از نظر عامـل F'o که بیانگر مقدار فلورسـانس در زمانـی اسـت کـه پذیرنـده کوئینـون A در فتوسیسـتم II در بالاترین مقدار شـرایط اکسیداسـیونی قرار دارد (مراکز فتوسیستم II باز هستند) (Baker و Rosenqvist، ۲۰۰۴)، پیش از اعمال تیمار یخزدگی تفاوت چشـمگیری بین ژنوتیپ‌ها وجود نداشـت، ولی پنـج روز پس از اعمال تیمـار، تفاوت افزایش یافت. با گذشـت مدت زمان بیشـتر (۱۰ روز) به تدریج وضعیت بهبـود یافته و تفاوت‌ها کاهش یافت. به هر حال می‌توان گفـت که ژنوتیپ‌های مختلـف توان متفاوتی در حفـظ ثبات این عامل داشـتند و ژنوتیپ MLC۷ حساسیت بیشـتری داشت و از حدود ۴۰۰، پیش از اعمال یخزدگی به ۲۸۲ رسـید (شـکل۱ و جـدول ۳). در مورد عامـل F'm که بیانگر مقدار فلورسـانس در زمانی اسـت کـه کوئینون A در فتوسیسـتم II در بالاترین مقدار شـرایط احیایی قرار دارد (مراکز فتوسیستم II بسته هستند). بالا بودن این عامل بیانگر توان تحمل بیشتر شـرایط نامساعد محیطی اسـت. همانگونه که ملاحظه شد، مقدار F'm در ژنوتیـپ MLC۶۰ که بیشـترین مقدار بقاء را نیـز دارد، در مراحل مختلف‌اندازه گیری بالا اسـت. این عامل حساسیت پایینی به کاهش دما داشـته و چنانچه در جدول ۴ ملاحظه شـد، بجـز در دمای ۱۲- درجه، سـایر تیمارها تفاوت چشـمگیری با یکدیگر ندارند که با در نظر گرفتن درصـد بقای متفاوت در این تیمارها، این عامل برای توجیه میزان تحمل به یخزدگی چندان مناسب به نظر نمی‌رسد (شکل۳).

ژنوتیـپ MLC۶۰ بیشـترین F'v را کـه نشـان دهنـده ظرفیت فتوسیسـتم II در راه‌انـدازی ابتـدای مسـیر فتوشـیمیایی (احیا نوری QA) اسـت قبل و پس از اعمال یخزدگی به خود اختصاص داده اسـت (شـکل۱ و جدول۳). ایـن عامل در پنج روز پـس از اعمال یخزدگی در تیمار ۱۲- به شـدت کاهش یافته اسـت، هر چند تا پیش از این دما افت قابل توجهی نداشـت (جدول۴). عامل F'v/F'm که تخمینی از بیشینه کارایی فتوشیمیایی در فتوسیستم II را در یک شدت نور مشخص فراهم می‌کند، در ژنوتیپ MLC۶۰ بالاترین میزان را در عین کمترین نوسـان به خود اختصاص داده اسـت. همانطور که در شـکل ۳ مشاهده می‌شود، یخزدگی باعث کاهش این شاخص شده است که با افزایش شدت یخزدگی مقدار این شاخص کمتر شده است. بین درصد بقای ژنوتیپ‌های مختلف

**جدول ۳- مقایسه میانگین عوامل فلورسانس کلروفیل پنج و ده روز پس از اعمال تیمار یخزدگی در برگچه ژنوتیپ‌های عدس**

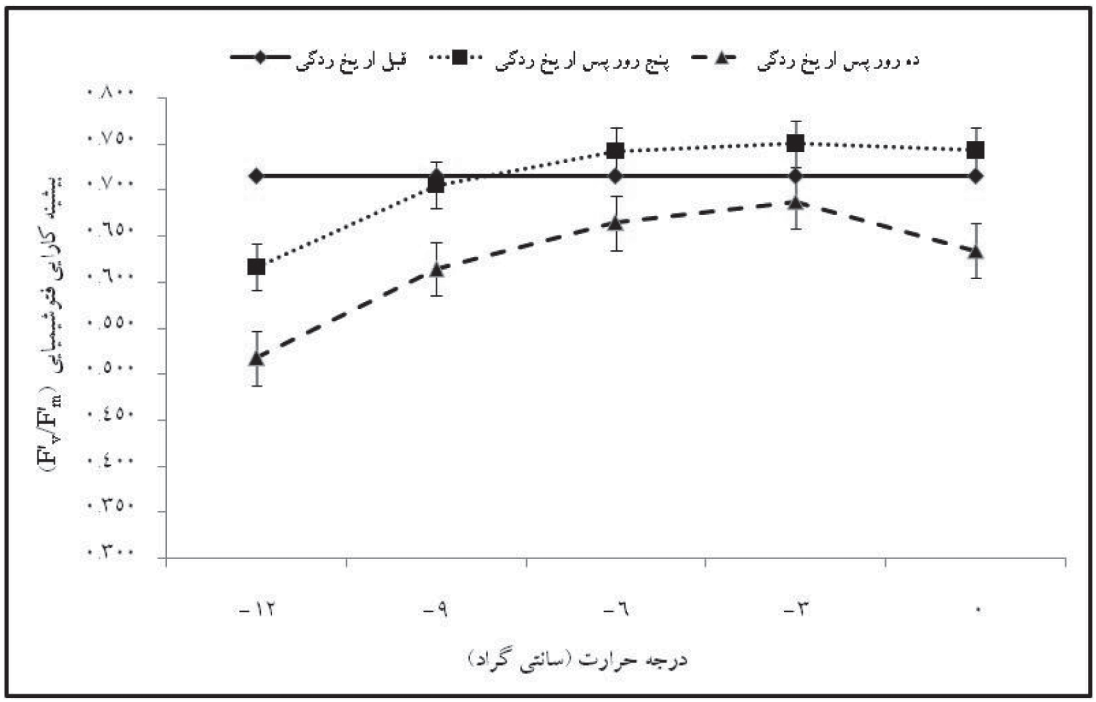
| ژنوتیپ عدس | عوامل فلورسانس کلروفیل (پس از پنج روز) | | | عوامل فلورسانس کلروفیل (پس از ۱۰ روز) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | F'o | F'm | F'v | F'o | F'm | F'v |
| MLC۷ | ۲۸۲ c | ۱۲۷۸ ab | ۹۹۶ abc | ۸۵۰ a | ۲۶۰۸ ab | ۱۷۵۷ a |
| MLC۶۰ | ۳۲۵ bc | ۱۲۶۶ ab | ۹۴۰ abc | ۷۹۷ a | ۲۶۷۰ ab | ۱۸۷۳ a |
| MLC۱۸۵ | ۳۴۱ bc | ۱۱۷۲ b | ۸۳۱ bc | ۸۲۹ a | ۲۵۹۸ ab | ۱۸۲۰ a |
| MLC۲۲۵ | ۴۴۰ a | ۱۴۶۵ a | ۱۰۲۴ ab | ۶۹۴ a | ۱۹۰۶ b | ۱۲۷۱ a |
| MLC۳۵۷ | ۳۰۱ bc | ۱۴۱۸ a | ۱۱۱۶ a | ۹۱۶ a | ۲۹۳۹ a | ۲۰۲۳ a |

۱-در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند.

جدول ۴- مقایسه میانگین عوامل فلورسانس کلروفیل در برگچه ژنوتیپ‌های عدس پنج روز پس از اعمال سطوح مختلف یخ‌زدگی

| دما | پنج روز پس اعمال تیمار یخ‌زدگی | | | |
|---|---|---|---|---|
| | F'o | F'm | F'v | F'v/F'm |
| ۰ | ۳۴۰ a | ۱۳۷۹ a | ۱۰۳۸ a | ۰/۷۷۴ a |
| -۳ | ۳۲۳ a | ۱۳۳۵ ab | ۱۰۱۱ a | ۰/۷۵۱ a |
| -۶ | ۳۵۳ a | ۱۳۹۷ a | ۱۰۴۳ a | ۰/۷۴۳ a |
| -۹ | ۳۴۵ a | ۱۳۰۸ ab | ۹۶۲ ab | ۰/۷۰۶ a |
| -۱۲ | ۳۳۲ a | ۱۱۳۹ b | ۸۰۷ b | ۰/۶۱۷ b |

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

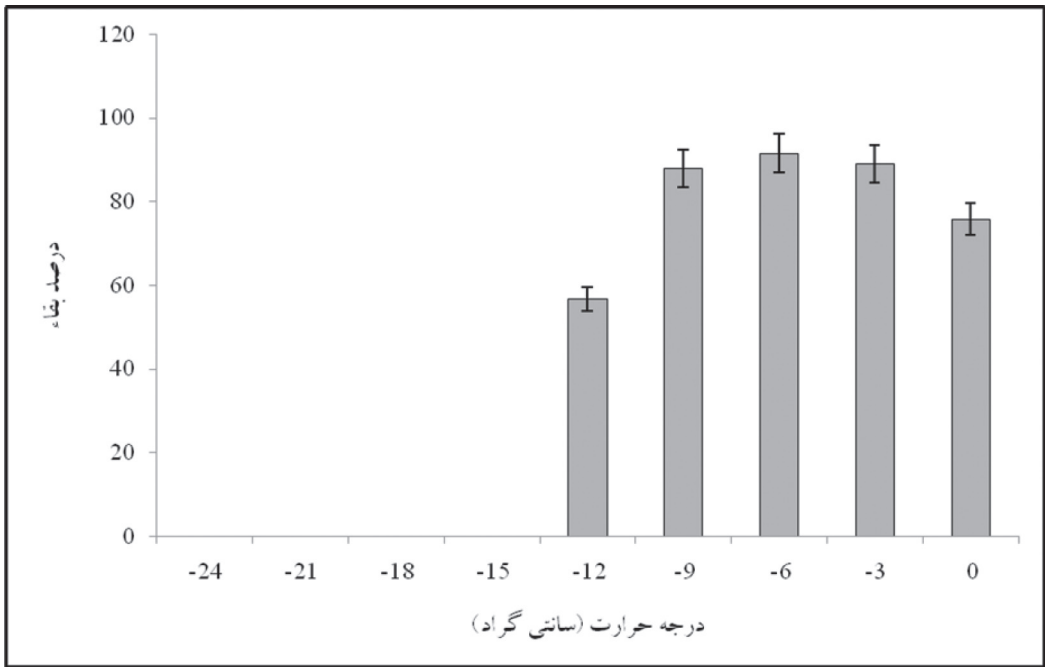



شکل۲- نسبت F'v/F'm در سطوح مختلف دمایی قبل و پس از تیمار یخ‌زدگی

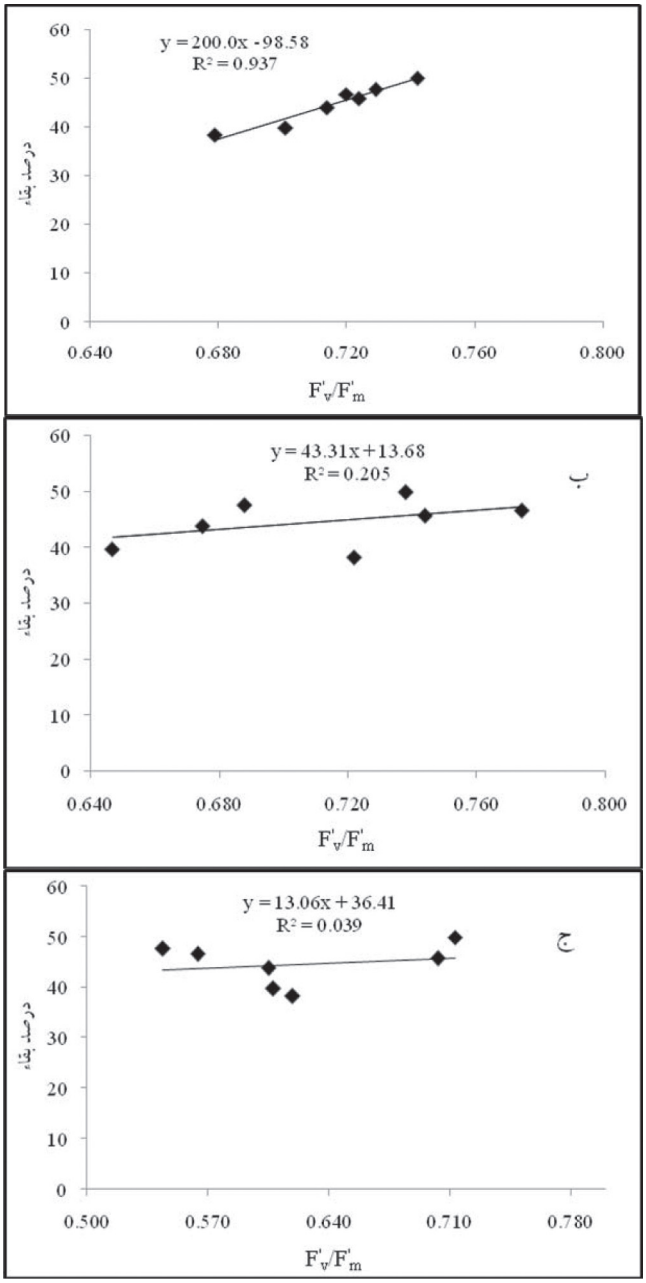
عدس و نسبت F'v/F'm پیش از تیمار یخزدگی رابطه رگرسیونی قوی ($R^2$=۰/۹۴**) وجود داشت، ولی این رابطه در اندازه‌گیری‌های پس از اعمال تیمارهای یخزدگی بسیار ضعیف بود (شکل۴).

Dolstra و همکاران (۱۹۹۴) بر اندازه‌گیری کارایی فتوسنتزی در اینبردهای ذرت از طریق پایش فلورسانس کلروفیل تاکید فراوان داشته و ابراز داشتند که تفاوت در کارایی فتوسنتزی برخی از اینبردها پیش و پس از تیمار ۱۰۰۰ میکرو مول در متر مربع در ثانیه در دمای ۷ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت، حدود ۳۹ درصد بود. Jung، Steffen و Lee (۱۹۹۸) نیز با بررسی اکوتیپ‌های گوجه فرنگی با خاستگاه عرض‌های جغرافیایی بالا و پایین از نظر ظرفیت فتوسنتزی و بازدارندگی نوری با استفاده از فلورسانس کلروفیل، اعلام کردند که اکوتیپ‌های با منشا عرض جغرافیایی بالا ظرفیت بیشتری برای توسعه ساختار فتوسنتزی و تحمل دماهای پایین دارند.

در مطالعه دیگری Koscielniak و Biesaga-Koscielniak (۲۰۰۶) بیان داشتند که شناسایی تفاوت‌های ژنوتیپی از نظر فرود غیر فتوشیمیایی الکترون بر انگیخته (NPQ) در ذرت جهت انتخاب گیاهان متحمل به دماهای پایین در آینده می‌تواند مورد استفاده واقع شود. از فلورسانس کلروفیل، در ارزیابی تحمل به دماهای پایین در سیب زمینی (Havaux و Davaud، ۱۹۹۴)، جو (Król، Ivanov، Jansson، Kloppstech و Huner، ۱۹۹۹)، لوبیا (Melkonian، Owens و Wolfe، ۲۰۰۴)، گندم (Öquist، Hurry و Huner، ۱۹۹۳)، برنج (Sthapit، Witcombe و Wilson، ۱۹۹۵) و اسفناج (Van Wijk و Van Hasselt، ۱۹۹۳) استفاده شده است، که نتایج آنها با نتایج مطالعه حاضر تا حدودی همخوانی دارد. برخی تفاوت‌های موجود به علت نوع گیاه، مرحله رشدی، شرایط مطالعه و نیز تیمارهای متفاوت در اینگونه مطالعات است. با توجه به نتایج حاصل از بقای ژنوتیپ‌ها در واقع می‌توان گفت که آستانه تحمل به یخزدگی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این آزمایش ۱۲- درجه سانتی گراد است و در کمتر از این دما خسارت یخ زدگی گیاهان ۱۰۰ درصد بوده است. در همین زمینه Swensen و Murray (۱۹۸۳)، نیز با بررسی اثر تیمار یخ زدگی برروی سه ژنوتیپ نخود فرنگی (دو ژنوتیپ زمستانه و یک ژنوتیپ بهاره) و ارزیابی درصد بقا آنها چهار هفته بعد از تیمار یخ زدگی، گزارش کردند که علی‌رغم اعمال تیمار سازگاری با سرما برروی هر سه ژنوتیپ، ژنوتیپ بهاره در دمای ۶- درجه سانتی گراد حدود ۳ درصد بقا داشت در صورتیکه درصد بقاء ژنوتیپ‌های زمستانه در دمای مذکور بین ۶۹ تا ۸۳ درصد بود. به طور کلی به نظر می‌رسد که ژنوتیپ MLC۶۰ در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در شرایط این آزمایش با داشتن درصد بقای بیشتر تحمل بالاتری نسبت دمای یخزدگی دارد. همچنین با توجه به وجود ضریب رگرسیون بالا بین F'v/F'm پیش از اعمال تیمار سرما و درصد بقاء گیاهان، شاید بتوان با اندازه گیری F'v/F'm پیش از اعمال تیمارهای یخزدگی تا حدودی به مقاومت گیاهچه‌های جوان عدس پی برد که رسیدن به نتایج قطعی‌تر نیاز به مطالعات تکمیلی دارد.




شکل۳- میانگین درصد بقا ژنوتیپ‌های مختلف عدس در سطوح مختلف یخزدگی




**شکل ۴- ارتباط بین نسبت F'v/F'm و درصد بقاء در ژنوتیپ‌های مختلف عدس،**
**الف: پیش از اعمال تیمار یخزدگی**
**ب: پنج روز پس از اعمال تیمار یخزدگی و**
**ج: ۱۰ روز پس از اعمال تیمار یخزدگی**

## سپاسگزاری

هزینه اجرای این مطالعه از محل طرح مصوب با کد «۱۲۸۴ پ» در معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تامین شده است، که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌نماید.

## پاورقی ها

1- Quenching
2- Non-photochemical quenching
3- Photochemical quenching
4- Quinone A
5- Mashhad Lentil Collection (MLC)
6- MINI-PAM Portable Chlorophyll Fluorometer, WALZ, German
7- Ice Nucleation Active Bacteria
8- Photosynthetic Active Radiation (PAR)

## منابع مورد استفاده

1- Andrews, J. R., Fryer, M.J. and Baker. N.R. (1995) Characterization of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence. *J. Exp. Bot*. 46: 1195-1203

2- Auld, D. L., Ditterline, R. L. Murray, G. A. and Swensen. J. B. (1983) Screening peas for winter hardiness under field and laboratory conditions. *Crop Sci*. 23:85-88.

3- Baker, N. R. and E. Rosenqvist. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55(403): 1607-1621.

4- Blum, A. (1988) *Plant Breeding for Environmental Stress.* CRC Press.

5- Bridger, G. M., D. E. Falk, B. D. Mckersie, and D. L. Smith. (1996) Crown freezing tolerance and field winter survival of winter cereals in eastern Canada. *Crop Sci*. 36:150-157.

6- Dexter, S. T. (1993) Effects of several environmental factors on hardening of plants. *Plant Physiol*. 8:123-139.

7- Dolstra, O., Haastra, S. R. Van der Putten, P. E. L. and Schapendonk. A. H. C. M (1994) Genetic variation for resistance to low-temperature photoinhibition of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*. 80: 85-93.

8- Erskine, W. and Malhotra. R. S. (1996) *Progress in breeding, selecting and delivering production packages for winter sowing chickpea and lentil*. In problems and prospects for winter sowing of grain legumes in Europs. AEP workshop, pp. 118. Paris: European Association for Grain Legume Research.

9- FAO. (2007) *Food and Agriculture Organization of the United Nations.* Food Outlook, Global market analysis. Statistical appendix. No.1.June. Available in: www.fao.org/docrep/009/j7927e/j7927e17.htm.

10- Grafts-Brander, S. J. and Salvucci. M. E. (2002) Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize, to heat stress. *Plant Physiol.*

129:1773-1780.

11- Gray, G. R., Hope, B. J. Qin, X. Q. Taylor, B. G. and Whitehead. C. L. (2003) The characterization of photoinhibition and recovery during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* using chlorophyll fluorescence imaging. *Physiol. Plant* 119:365-375.

12- Gusta, L. V., O'Connor, B. J. Gao, Y. P. and Jana. S. (2000) A re-evaluation of controlled freeze-tests and controlled environment hardening conditions to estimate the winter survival potential of hardy winter wheats. *Can. J. Plant Sci*. 80:241-246.

13- Havaux, M. and Davaud. A. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in chilled potato leaves is not correlated with a loss of Photosystem-II activity. Preferential inactivation of Photosystem I. *Photosynth. Res.* 40: 75-92.

14- Jung, S., Steffen, K. L. and Lee. H. J. (1998) Comparative photoinhibition of a high and a low altitude ecotype of tomato (*Lycopersicon hirsutum*) to chilling stress under high and low light conditions. *Plant Sci.* 134: 69-77.

15- Kościelniak, L. and Biesaga-Kościelniak. J. (2006) Photosynthesis and non-photochemical excitation quenching components of chlorophyll excitation in maize and field bean during chilling at different photon flux density. *Photosynthetica*. 44: 174-180.

16- Krause, G. H. and Weis. E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol*. *Plant Mol. Biol*. 42: 313-349.

17- Król, M., Ivanov, A. G. Jansson, S. Kloppstech, K. and Huner.N. P. A. (1999) Greening under high light or cold temperature affects the level of xanthophyll-cycle pigments, early light-inducible proteins, and light-harvesting polypeptides in wild-type barleyand the Chlorine f2 mutant. *Plant Physiol.* 120: 193-203.

18- Macdonald, G. E., Shilling, D. G. and Bewick. T. A. (1993) Effects of endothall and other aquatic herbicides on chlorophyll fluorescence, respiration and cellular integrity. *J. Aquat. Plant Manage.* 31: 50-55

19- Masojidek, J., Trivedi, S. Halshaw, L. Alexiou, A. and Hall. D. O. (1991) The synergistic effect of drought and light stresses in sorghum and pearl millet. *Plant Physiol.* 96:198-207.

20- Maxwell, K. and Johnson. G. N. (2000) Review article: Chlorophyll fluorescence: A practical guide. *J. Exp. Bot*. 51: 659–668.

21- Melkonian, J., Owens, T. G. and Wolfe. D. W. (2004) Gas exchange and co-regulation of photochemical and nonphotochemical quenching in bean during chilling at ambient and elevated carbon dioxide. *Photosynth. Res.* 79: 71-82.

22- Murry, G. A., Eser, D. Gusta, L. V. and Eteve. G. (1988) *Winter hardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea.* P. 831-843. In R.J. Summerfield (ed.) World Crops: Cool Season Food Legumes. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

23- Öquist, G., Hurry, V. M. and Huner. N. P. A. (1993) Low-temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. *Plant Physiol*. 101: 245-250.

24- Ribas-Carbo, M., Aroca, R. Gonzalez-Meler, M. A. Irigoyen, J. J. and Sanchez-Diaz. M. (2000) The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize differing in chilling sensitivity. *Plant Physiol*. 122: 199-204.

25- Shrestha, A., Hesterman, O. B. Squire, J. M. Fisk, J. W. and Sheaffer. C. C. (1998) Annual medics and berseem clover as emergency forage. *Agron. J*. 90:197-201.

26- Singh, K. B., Malhotra, R. S. Halila, M. H. Knights, E. J. and Verma. M. (1994) Current status and future strategy in breeding chickpea for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*. 73:137-149.

27- 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 Sci*. 35: 90-94.

28- Swensen, J. B. and Murray. G. A. (1983) Cold acclimation of field peas in a controlled environment. *Crop Sci.* 23:27-30.

29- Van Wijk, K. J. and Van Hasselt. P. R. (1993) Kinetic resolution of different recovery phases of photoinhibited photosystem II in cold acclimated and non-acclimated spinach leaves. *Physiol. Plant.* 87: 187-198.

30- Yamasaki, T., Yamakawa, T. Yamane, Y. Koike, H. Satoh, K. and Katoh. S. (2002) Temprature acclimation of photosynthesis and related changes in photosystem II electron transport in winter wheat. *Plant Physiol*. 128: 1087-1097.