اثر منبع نیتروژن بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لوبیا در شرایط تنش کم‌آبی

سکینه رشیدی[۱]، علی عبادی*[۲]، قاسم پرمون[۳] و سدابه جهانبخش[۲]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد زراعت دانشگاه محقق اردبیلی، [۲] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی و [۳]دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۰۹/۲۷ ، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۲/۳۰)

چکیده:

نیتروژن نقش مهمی در تأمین اسکلت‌های کربنی و تولید متابولیت‌ها و آنزیم‌های در تحمل تنش دارد. تنش کم‌آبی تثبیت نیتروژن را در گیاهان تیره بقولات تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین نقش منابع مختلف نیتروژن بر روی صفات فیزیولوژیک، مورفولوژیک و بیوشیمیایی لوبیا در شرایط تنش مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۱ اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل ۳ سطح آبیاری (۳۰، ۵۵ و ۸۰ درصد ظرفیت زراعی) و منابع نیتروژن (شاهد یا عدم مصرف کود نیتروژن، تغذیه از منبع آمونیومی، تغذیه از منبع نیتراتی و تغذیه از منبع نیترات + آمونیوم) بود. در این آزمایش میزان اسیدآمینه لیزین و متیونین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی‌فنل‌اکسیدار، میزان قند محلول و پرولین و پروتئین در ۳، ۵ و ۷ روز بعد از تنش اندازه‌گیری شد. در این آزمایش سطوح آبیاری ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به عنوان عدم تنش، ۵۵ درصد به عنوان تنش ملایم و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی به عنوان تنش شدید در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که خشکی سبب افزایش میزان پرولین و قندهای محلول در برگ گردید. استفاده از نیترات و نیترات+ آمونیوم بیشترین میزان تولید پرولین و قندهای محلول را در روزهای بعد از تنش نشان داد. در حالی‌که با افزایش تنش آبی از میزان پروتئین کاسته شد. نیترات نقش بسیار مهمی در افزایش پروتئین در شرایط محدودیت آبی داشت. تنش شدید موجب تولید بیشترین مقدار اسیدآمینه لیزین شد در حالی‌که افزایش شدت تنش خشکی میزان متیونین را کاهش داد. تیمارهای نیتروژنی لیزین را به مقدار قابل توجهی نسبت به شاهد افزایش داد و نیترات موثرترین تیمار در افزایش متیونین بود. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی-فنل‌اکسیداز در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط معمولی بیشتر شد و استفاده از آمونیوم و نیترات به فعالیت این آنزیم‌ها کمک نمود، بنابراین استفاده از منابع کودی موجب کاهش اثر تنش کم‌آبی شده است.

کلمات کلیدی: پرولین، نیتروژن، کاتالاز، لیزین، متیونین، قند محلول

مقدمه:

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) به عنوان مهم‌ترین لگوم در کشورهای در حال توسعه بوده و بدلیل ۱۸ تا ۳۲ درصد پروتئین از منابع مهم غذایی و سرشار از پروتئین برای انسان و دام می‌باشد. تنش خشکی و کمبود مواد غذایی به‌ویژه نیتروژن از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی محسوب می‌شود (Majnoon Hoseini, 2008) .

تنش‌های محیطی به‌خصوص خشکی از مهم‌ترین فاکتورهای تعیین کننده پراکنش گیاهی است و در بخش وسیعی از جهان که در محدوده مناطق خشک و نیمه خشک

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: ebadi@uma.ac.ir

قرار دارد، کمبود آب مهم‌ترین عامل محدود کننده رشد گیاهان و تولید محصول به حساب می‌آید (Mir Hosseini Dehabadi, 1994). تنش خشکی به علت عدم توازن بین دریافت نور و مصرف آن منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن به ویژه هیدروژن پراکسید علاوه بر صدمه به سلول‌های گیاهی، به‌عنوان نشانگر عمل کرده و سبب فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی موجود زنده در برابر تنش می‌گردند (Arora *et al.*, 2002). در بافت‌های گیاهی دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نقش مهمی در زدودن پراکسید هیدروژن ایفا می‌کنند. آنزیم کاتالاز قادر است بدون نیاز به عامل احیاکننده، پراکسید هیدروژن موجود در سلول را به اکسیژن و آب تبدیل کند (Basu *et al.*, 1998). آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تبدیل مونو فنل‌ها را به دی فنل‌ها کاتالیز می‌کند. همچنین این آنزیم اکسیداسیون دی‌فنل‌ها به کوئینون‌ها را کاتالیز می‌کند که در پلیمریزاسیون رنگدانه‌ها نقش دارند (Hernandez *et al.*, 2000).

نیتروژن از عناصر مورد نیاز گیاه بوده و جز اصلی بسیاری از ترکیبات سلولی شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها است و کمبود آن، رشد گیاه را به شدت کاهش می‌یابد (هاشمی دزفولی ۱۳۷۴). تغییر در مقدار قابل دسترس نیتروژن به‌ویژه در شرایط تنش آب عملکرد گیاه را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد. مقدار نیتروژن قابل دسترس بر توزیع مواد فتوسنتزی بین اندام‌های رویشی و زایشی موثر بوده و مراحل فنولوژیک رشد و نمو در اثر کمبود آن به تأخیر می‌افتد (Giradin *et al.*, 1987). یکی از نقش‌های نیتروژن در گیاهان تحت تنش، مشارکت آن در تولید مواد اسمزی مانند پرولین، گلایسین- بتائین است. تأمین متابولیت‌های سازگاری برای گیاه با هزینه کربن و آبی برای ساخته شدن این مواد همراه است. تولید اسیدهای آمینه پرولین و گلیسین- بتائین نیاز به صرف نیتروژن توسط گیاه دارد که به مصرف نیتروژن بیشتر نیاز خواهد بود (Jones, 1980). اسیدهای آمینه در مقاومت گیاهان در برابر شرایط نامساعد محیطی همانند خشکی، شوری، غرقابی، مقاومت به آفات و بیماری‌ها، مقاومت به آلودگی‌های هوا نقش مهمی را ایفا می‌کنند. در این رابطه می‌توان نقش اسیدهای آمینه در مقاومت به تنش‌ها را در صرفه‌جویی در مصرف انرژی برای گیاه خلاصه کرد. با مصرف کودهای شیمیایی، آمونیاک وارد خاک شده که در اثر ترکیب با ماده آلفاکتوگلوتارات تولید گلوتامات یا اسید گلوتامیک را می‌کند که یک اسیدآمینه است. در کل واکنش ترکیب آلفاکتوگلوتارات + آمونیاک و تشکیل گلوتامات یک مولکول NADH مصرف می‌شود که معادل با سه مولکول ATP است. آلفاکتوگلوتارات ماده‌ای است که در چرخه تری‌کربوکسلیک اسید تولید می‌شود. گلوتامات با یک مولکول آمونیاک ترکیب شده و تولید گلوتامین را می‌کند که این واکنش نیز با صرف یک مولکول ATP همراه است (نجفی ۱۳۹۲). پرولین به عنوان یکی از مهمترین اسید آمینه که در طی شرایط مختلف محیطی تغییر پیدا از طریق حفظ ظرفیت آبگیری در سیتوپلاسم سلول منجر به حفظ ماکرومولکول‌ها از جمله آنزیم‌ها شده و از تشکیل اشکال نامطلوب و یا قطعه‌قطعه شدن آن‌ها جلوگیری می‌کند (Heuer, 1994). پرولین به‌عنوان یک محافظ در برابر تنش عمل می‌کند و به طور مستقیم با ماکرومولکول‌ها اثر متقابل داشته و از این طریق به حفظ شکل و ساختار طبیعی آن‌ها تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Kuzntsov and Shevyakva, 1999). متیونین نیز یکی دیگر از اسیدهای آمینه است که به‌عنوان یکی از اسیدهای آمینه ضروری غیره قطبی طبقه‌بندی می‌شود و به همراه سیستین جزء دو اسید آمینه حاوی سولفور می‌باشد. متیونین یک واسطه در بیوسنتز سیستئین، کارنتئین، تورین، لیستین و فسفولیپیدها دارای نقش بوده و به عنوان پیش ساز هورمون اتیلن و در تنظیم باز شدن روزنه‌های برگ موثر است، متیونین به عنوان باقی مانده پروتئین‌ها اکسید شده بوده که می‌تواند توسط رایکال‌های فعال اکسیژن تولید شده در سیستم‌های بیولوژیکی تولید شود (Refsum *et al.*, 1998; Vogt, 1995). همچنین لیزین در تنظیم باز شدن روزنه‌های برگ، جوانه‌زنی دانه‌های گرده و سنتز کلروفیل کاربرد دارد که می‌تواند نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه به تنش ایفا کند (نجفی، ۱۳۹۲). آزمایشی توسط Losak و همکاران (۲۰۱۰) به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف کود نیتروژن بر روی متابولیسم اسید آمینه‌های ضروری و غیرضروری دانه ذرت صورت گرفت و نشان داد که کاربرد

کود نیتروژن اگرچه تأثیر معنی‌داری بر غلظت اسیدآمینه لیزین نداشت، ولی بر میزان اسیدآمینه متیونین موثر بود Hoff و همکاران (۱۹۷۱) اعلام کردند کود نیتروژنه، میزان اسیدآمینه‌های خانواده آسپارتات مانند، متیونین، فنیل‌آلانین، آسپارتات و تریپتوفان را افزایش داد. همچنین Eppendorfer (1978) در آزمایش‌های خود بر روی گیاهان مختلف به این نتیجه رسید که با افزایش نیتروژن از میزان اسید آمینه‌های لیزین، متیونین کاهش یافت. قندهای محلول به‌عنوان محافظت کننده‌های اسمزی در تنظیم اسمزی سلول نقش دارند و در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابند (Pagter *et al.*, 2005). تنظیم اسمزی می‌تواند به‌وسیله تبدیل پلی‌ساکاریدها به یکدیگر و الیگوساکاریدها کنترل شود (Hendry 1993)، قندها با ممانعت از اتصال بین غشاهای مجاور هم در طول دوره تنش از نگهداری لیپیدها و پایداری پروتئین‌ها از طریق ایجاد پیوند هیدروژنی با دنباله‌های خطی پروتئین‌ها، تنظیم ژن و تنظیم اسمزی عمل می‌کند (Ho *et al.*, 2001). با افزایش شدت تنش خشکی، بر میزان قندهای محلول افزوده می‌شود (Mohsenzade *et al.*, 2006).

کمبود آب در زمان گلدهی و پر شدن دانه باعث کاهش عملکرد، کاهش وزن بذر و بلوغ زودرس لوبیا می‌شود (Singh, 1995). محمدی و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی صفات موثر بر قابلیت پخت و درصد پروتئین در ژنوتیپ‌های لوبیا قرمز (*Phaseolus vulgaris* L) در طی تنش خشکی نشان دادند که خشکی سبب کاهش صفات مورفولوژیکی مانند طول بوته، تعداد گره روی ساقه اصلی، مدت زمان جوانه‌زنی، تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی، تعداد روز تا رسیدگی کامل، تعداد دانه در بوته، طول دانه، قطر دانه، وزن صد دانه و عملکرد دانه شده و همچنین سبب افزایش طول دوره پر شدن دانه، درصد پروتئین و برخی صفات کیفی و تغذیه دانه‌های لوبیا شد. همچنین در بررسی تنش کم‌آبی و مصرف نیتروژن بر عملکرد دانه و متابولیت‌های سازگاری ذرت نشان داد که تنش کم‌آبی سبب کاهش میزان اسیدهای آمینه و افزایش میزان پرولین و پروتئین محلول شده و مصرف نیتروژن نیز سبب افزایش مقدار آنها شد (منصوری فر و همکاران، ۱۳۸۹). حساسیت تثبیت نیتروژن به شرایط کمبود آب در گیاهان تیره بقولات توسط بسیاری از پژوهشگران گزارش شده است (Serraj *et al.*, 1999). نیاز زیاد دانه‌های سویا به نیتروژن موجب تسریع انتقال این عنصر از برگ‌ها به دانه می‌گردد، این انتقال مجدد نیتروژن از اندام‌های سبز سبب تسریع پیری برگ‌ها می‌شود (Kumodini *et al.*, 2002)، در چنین شرایطی استفاده از کودهای نیتروژنی را به منظور افزایش عملکرد محصول دانه King و Purcell (۱۹۹۶) توصیه نمودند. فتحی و همکاران (۱۳۸۰) نشان دادند که کاربرد نیتروژن تا سطح ۱۰۰ کیلوگرم خالص در هکتار از طریق افزایش تعداد و وزن نیام، عملکرد سویا را افزایش داد. عبادی و همکاران (۱۳۸۵) اعلام کردند تنش کم‌آبی از طریق کاهش سطح برگ، ارتفاع بوته، تعداد نیام و وزن هزار دانه عملکرد سویا را کاهش داد در حالی که مصرف نیتروژن معدنی با افزایش صفات یاد شده موجب افزایش عملکرد محصول گردید. عبادی (۱۳۷۸) اعلام کرد که کاهش در دسترسی ارقام یونجه به آب موجب کاهش تثبیت نیتروژن گردید. وی علت این کاهش را در اثر کاهش دسترسی گرهک‌ها به فتوآسیمیلات و اکسیژن دانسته و از طرفی دیگر هزینه‌های تثبیت هر مول نیتروژن را بیشتر از احیای آن بیان نمود. از آنجایی‌که بقولات به ویژه حبوبات برای تولید محصول به نیتروژن بیشتری نیاز دارند و در شرایط محدودیت آب که به کاهش و توقف تثبیت نیتروژن منجر می‌شود، هر مقدار مصرف نیتروژن علاوه بر جبران تثبیت در تولید متابولیت‌هایی مانند پرولین گیاه را در شرایط تنش یاری می‌نماید. از آنجایی که آسیمیلاسیون منابع مختلف نیتروژن می‌تواند از طریق مقادیر متفاوتی از انرژی و عوامل احیایی توام باشد که به تفاوت در هزینه آن منابع مربوط می‌باشد، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر منابع مختلف این عنصر در رشد و مقاومت به خشکی لوبیا بود.

مواد و روش‌ها:

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۴×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۱ انجام گرفت. آزمایش به صورت

گلخانه‌ای در موقعیت جغرافیای ۳۸/۲۵ شمالی ۴۸/۳۰ شرقی در ارتفاع ۱۵۰۰ متری از سطح دریا در شرایط کاملاً بسته اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش شامل تنش کم‌آبی در سه سطح ۸۰، ۵۵ و ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای و منابع نیتروژن (شاهد یا عدم مصرف نیتروژن معدنی، منبع آمونیوم، تغذیه نیتراتی و تغذیه آمونیوم به‌همراه نیترات) بود. در این آزمایش سطوح آبیاری ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به عنوان عدم تنش، ۵۵ درصد به عنوان تنش ملایم و ۳۳ درصد ظرفیت زراعی به عنوان تنش شدید در نظر گرفته شد. مقدار کود استفاده شده براساس آزمون تجزیه خاک که در جدول ۱ آمده است و نیاز کودی گیاه انتخاب شد. برای اعمال تیمارهای کودی برای تأمین نیترات از کود نیترات پتاسیم به میزان ۴۵ کیلوگرم در هکتار، برای تأمین آمونیم از کود سولفات آمونیم ۶۰ کیلوگرم در هکتار و برای تیمار آمونیم + نیترات از کود نیترات آمونیم ۶۵ کیلوگرم در هکتار محاسبه و به خاک اضافه گردید.

صفات اندازه‌گیری شده شامل میزان اسیدآمینه لیزین و متیونین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی‌فنل‌اکسیداز، میزان متابولیت‌های سازگار پرولین و قندهای محلول و همچنین میزان پروتئین برگ بعد از ۳، ۵ و ۷ روز بعد از اعمال تنش بود. بذرهای لوبیا رقم کشاورزی محلی شمال گیلان پس از ضدعفونی بذور با پودر حاوی سویه باکتری آغشته شد. برای چسبندگی بهتر سویه‌های باکتری و بذرها به هر یک کیلوگرم بذر۲۰ میلی لیتر صمغ عربی (Gum Arabic)۲۰ درصد اضافه گردید و سپس در گلدان‌های ۵ کیلوگرمی کاشته شد. جهت آبیاری هر بار گلدان‌ها توزین و با آب به حد ظرفیت زراعی مورد نظر رسانده شد. پس از استقرار بوته‌ها و رسیدن به مرحله سه تا چهار برگی تیمار نیتروژن اعمال شد و یک هفته پس از اعمال تیمار نیتروژن، تنش کم‌آبی اعمال شد. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین ۰/۵ گرم نمونه تر برگی در هاون چینی کوبیده و سپس ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج که شامل ۵ میلی‌لیتر تریس- اسید کلریدریک یک مولار، ۲۰۰ میکرولیتر Na_2EDTA یک مولار و ۰/۰۴٪ (v/v- ۲- مرکاپتو اتانول) می‌باشد مخلوط شده و مخلوط حاصل به مدت ۲۱ دقیقه با سرعت ۱۱۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس برای خارج کردن تمام ناخالصی‌ها موجود در نمونه قسمت بالایی داخل لوله مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و ۵۰۰۰ میکرولیتر از محلول برادفورد و ۲۹۰ میکرولیتر بافر استخراج و ۱۰ میکرولیتر عصاره استخراج را مخلوط کرده و بعد از ورتکس میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری میزان پرولین برگ نیز با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) صورت گرفت، به این صورت که مقدار یک گرم بافت برگی در ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳ درصد سائیده و همگنای حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس به دو میلی‌لیتر از عصاره حاصل، دو میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین که ۱/۲۵ گرم پودر اسید نین هیدرین را در ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال حل نموده و سپس ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار به آن اضافه کرده و سپس دو میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال خالص اضافه گردید. لوله‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم قرار داده شد و سپس چهار میلی‌لیتر تولوئن به هر یک از لوله‌ها اضافه و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. پس از تشکیل دو فاز جداگانه، فاز بالایی رنگی، با دقت جدا و جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل یو وی ۲۱۰۰ ساخت یونیکو امریکا) با طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. اندازه‌گیری قند محلول برگ به روش فنول سولفوریک (Dubois *et al.*, 1956) با کمی تغییر صورت گرفت. به این صورت که مقدار ۰/۲ گرم از نمونه‌های جوان‌ترین برگ کاملاً توسعه یافته پودر شده را با دو میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات (pH= ۷) ساییده و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. از محلول رویی ۱۰ میکرو لیتر برداشته و به آن ۹۹۰ میکرولیترآب مقطر افزوده شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل، ۰/۵ میلی‌لیتر فنول ۵ درصد (محلول آبی) و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک (۹۸ درصد) افزوده شد. پس از تثبیت رنگ به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای ۳۰-۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد.

جدول۱- نتایج تجزیه خاک مورد استفاده در آزمایش

شوری*	pH	کربن آلی(٪)	میزان عناصر قابل جذب					بافت خاک
			نیتروژن	فسفر	پتاسیم	رس	سیلت	شن	
۰/۶۲۵	۷/۸۸	۰/۶۲	۰/۰۶	۸/۵	۱۷۰	۲	۱۴	۸۴	لوم

***شوری (دسی زیمنس بر متر)، pH بدون واحد، فسفر و پتاسیم ($mg.kg^{-1}$)، سایر صفات (درصد) و بافت خاک لومی می‌باشند.**

اندازه‌گیری لیزین و متیونین با استفاده از روش Feller و همکاران (۱۹۶۹) صورت گرفت، به این صورت که برای لیزین ۰/۵ گرم نمونه را در ۵۰ میلی‌لیتر از هیدروکلریک اسید (۰/۱ نرمال) حل کرده آن را با آب به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده وصاف کرده و سپس نیم میلی‌لیتر از آن را با گلیسرول (۵۰ درصد)، دو میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH=6) و یک میلی لیتر نین‌هیدرین حل و به مدت ۳۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و جذب در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. همچنین برای اندازه‌گیری مقدار متیونین ۱۰ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده در مرحله سه لیزین را برداشته و در فلاکس ۵۰ میلی‌لیتری به آن چهار میلی‌لیتر از سدیم هیدروکسید (۵ نرمال)، دو میلی‌لیتر از محلول گلیسین آبدار و دو میلی‌لیتر از محلول سدیم نیتروفری‌سیانید آبدار (۰/۱) اضافه شد بعد از هر اضافه کردن خوب مخلوط (ورتکس) گردید. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای۴۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۵ دقیقه در حمام یخ نگهداری شد. پنج میلی‌لیتر هیدروکلریک-اسید (۱:۱) را اضافه کرده و خوب مخلوط نموده و سپس به مدت ۳-۲ دقیقه خنک کرده و از یک صافی عبور داده شد. سپس میزان جذب در ۵۱۰ نانومتر قرائت و میزان لیزین و متیونین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید. فعالیت کاتالار نیز به روش Cakmak و Heuer (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شد. برای این کار ۲ /۰ گرم نمونه گیاهی را در سه میلی‌لیتر بافر تریس ۰/۱ میلی مولار با pH=۷ ساییده و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. از این عصاره برای سنجش آنزیم کاتالاز استفاده شد. سنجش آنزیم کاتالاز در طول موج ۲۴۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر انجام شد. برای سنجش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز از روش Khan (۱۹۷۵) استفاده شد که جذب نوری عصاره آنزیمی نیز در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی فنل اکسیداز بر حسب فعالیت بین المللی بر میلی‌گرم پروتئین که نشان دهنده تغییرات فعالیت آنزیمی نمونه‌ها بعد از گذشت زمان می‌باشد.

تجزیه داده‌های آماری با نرم افزار SAS و مقایسات میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD صورت گرفت. نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Excle ترسیم شد.

نتایج و بحث

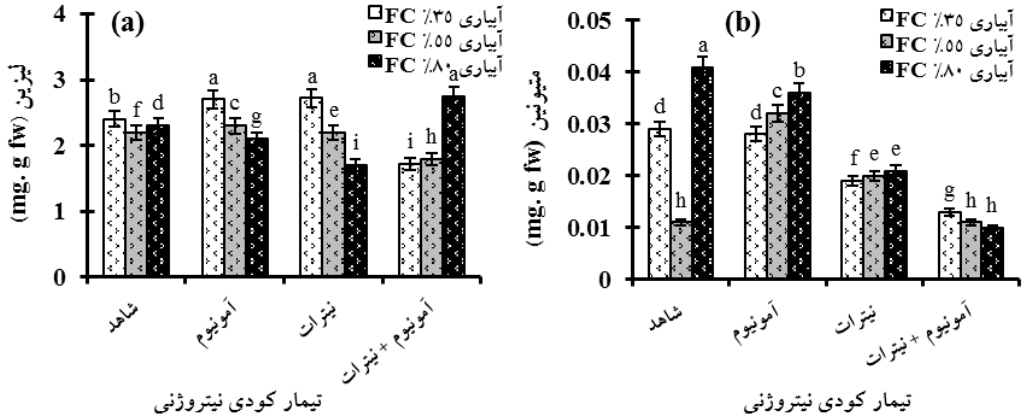
نتایج نشان داد اثر اصلی کم‌آبی و کود نیتروژن و اثر متقابل آنها بر میزان اسیدآمینه لیزین و متیونین در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد بیشترین مقدار اسیدآمینه لیزین (۲/۷۵ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر) در تیمارهای آمونیوم و نیترات در تنش شدید و کمترین مقدار آن (۱/۷ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر) از مصرف نیترات در شرایط بدون تنش (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) حاصل شد (شکل ۱، a)، درحالی‌که بیشترین میزان متیونین (۰/۰۴۱ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر) در تیمار عدم مصرف کود و بدون محدودیت آبی و کمترین میزان آن (۰/۰۱۰ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر) در تیمار عدم مصرف کود و تنش متوسط و تیمار با آمونیوم + نیترات در تنش متوسط و همچنین شرایط بدون تنش مشاهده شد (شکل ۱، b).

استفاده از تیمارهای نیتروژن معدنی لیزین برگ را افزایش داد. به‌نظر می‌رسد استفاده از منبع کودی آمونیوم و نیترات تأثیر تنش شدید را تا حدودی خنثی کرده و مقدار این اسیدآمینه را نسبت به تنش متوسط و سطح بدون تنش (۸۰ درصد ظرفیت زراعی) افزایش داده است. در بین تیمارهای نیتروژن، آمونیوم نسبت به بقیه تیمارها در افزایش متیونین موثرتر بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر نیتروژن بر میزان لیزین، متیونین، کاتالاز و پلی فنل اکسیداز تحت تنش کم‌آبی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		لیزین	متیونین	آنزیم کاتالاز	آنزیم پلی فنل اکسیداز
تکرار	۲	۰/۰۰۰۰۰۴۴	۰/۰۰۰۰۱۵	۶۹/۹۰	۵۷/۰۶
نیتروژن	۳	۰/۰۹۸۸**	۰/۰۰۰۴**	۲۰۰۰/۲۴**	۶۰۷۰/۷۰**
کم‌آبی	۲	۰/۲۴۵**	۰/۰۰۰۱**	۱۳۰۲۴/۶۶**	۱۱۸۹۶/۸۱**
نیتروژن× کم‌آبی	۶	۰/۴۶۶**	۰/۰۰۰۲۴**	۳۷۵۸/۴۸**	۵۶۰۱/۲۷**
خطا	۲۲	۰/۰۰۰۰۶۲۴۶	۰/۰۰۰۰۰۰۲۳	۴۹/۶۸	۷۰/۱۰
ضریب تغییرات٪	–	۰/۳۶۹	۲/۱۵	۱۳/۴۷	۱۵/۷۰

*** و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد**



شکل ۱- تأثیر مصرف منابع مختلف نیتروژن بر میزان اسیدآمینه لیزین (a) و متیونین (b) لوبیا تحت تنش کم‌آبی. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد.

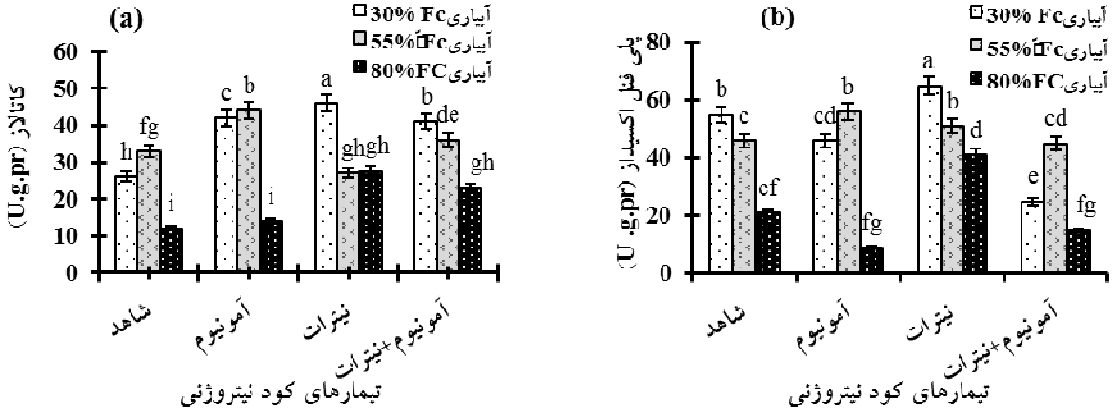
تنش شدید در کلیه تیمارها بجز در تیمار آمونیوم + نیترات باعث کاهش متیونین شد. احتمالاً استفاده از منبع کودی آمونیوم + نیترات تأثیر تنش شدید را تا حدودی خنثی کرده و مقدار این اسیدآمینه را نسبت به تنش متوسط و شاهد افزایش داده است. محتوای اسیدهای آمینه و ترکیبات نیتروژن‌دار تحت تأثیر کود نیتروژن قرار می‌گیرد (Pavlik *et al.*, 2010). نیترات و آمونیوم از منابع قابل استفاده نیتروژن برای گیاهان بوده و فراهمی آمونیوم برای گیاهان اغلب باعث افزایش غلظت آمینواسیدها می‌شود. تأمین نیترات برای گیاهان در سطوح بالاتر نیتروژن باعث افزایش در محتوای اسیدآمینه گیاهان می گردد (Atanasova, 2008). در داخل گیاه نیترات به‌وسیله نیترات رداکتاز (NR) به نیتریت و در نهایت نیتریت نیز بوسیله نیتریت رداکتاز تبدیل به آمونیوم می‌شود. آمونیوم عاقبت از طریق گلوتامین (آنزیم گلوتامین سینتتاز) و گلوتامات (آنزیم گلوتامات سینتتاز) به اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها تبدیل می‌شود (Lockhart, 1965). آمونیوم جذب شده از طریق ریشه برای آسیمیلیه شدن به‌صورت اسیدهای آمینه و آمیدها به ساقه انتقال می‌یابند. آسیمیلاسیون آمونیوم در ریشه نیازمند انتقال کربوهیدرات از ساقه به سمت ریشه برای ساختن اسکلت‌های کربنی و انرژی و عوامل احیایی (ATP و NADPH) است. دلایل کاهش غلظت اسیدهای آمینه‌ها با کاربرد کود نیتروژن ممکن است به خاطر اثر سوء بر چرخه اسید تری کربوکسیلات (اسید سیتریک) یا کمبود اسکلت کربنی برای جذب NH_4 و تبدیل به آمیدها و اسیدهای آمینه باشد (Losak *et al.*, 2010). Eppendorfer (۱۹۷۸) در آزمایش‌های خود بر روی گیاهان مختلف به این نتیجه رسیدند که با افزایش

نیتروژن از میزان اکثر اسیدهای آمینه (مانند لیزین، متیونین و...) کاسته شد. در سطوح بالاتر نیتروژن به خاطر کمبود کربوهیدرات و انرژی، تولید اسیدهای آمینه اکثراً کاهش می-یابد (Mengel and Kirkby, 2001).

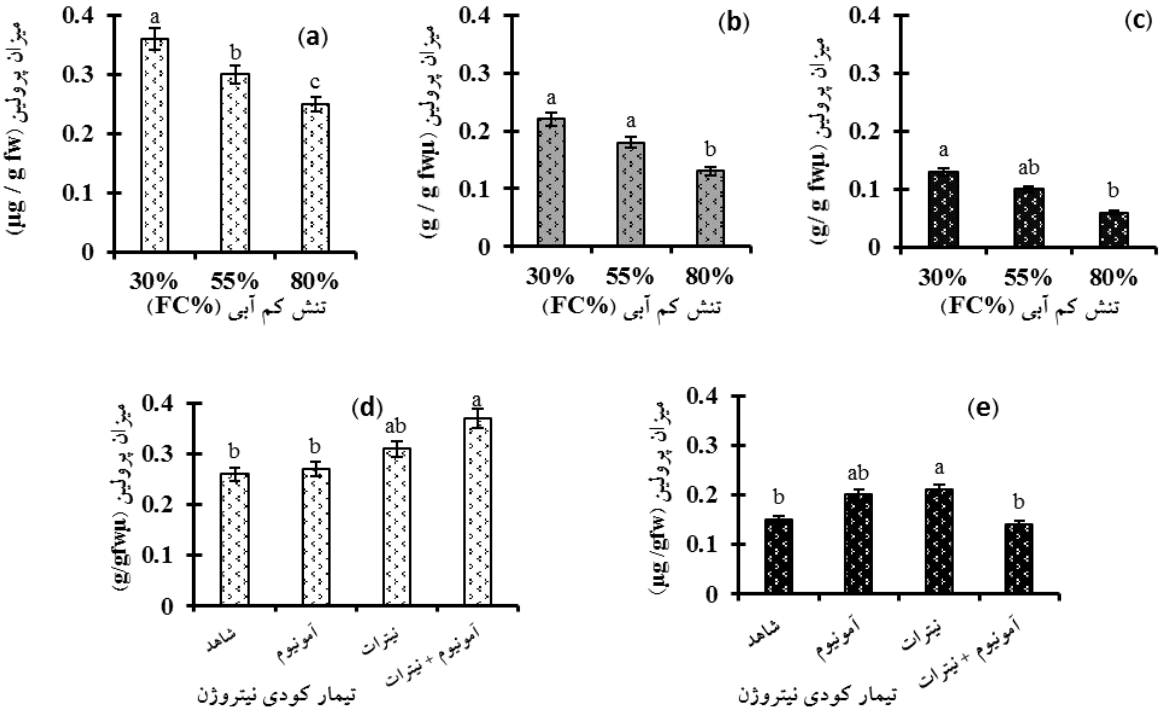
نتایج این پژوهش نشان داد اثر متقابل کم‌آبی و نیتروژن نیز در سطح ۱٪ بر فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی فنل اکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۲). با مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که با افزایش شدت تنش کم‌آبی، بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز افزوده می‌شود. بالاترین مقدار کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در بین تیمارهای نیتروژنی در شرایط بدون تنش مربوط به نیترات بود. بیشترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز به ترتیب ۴۶ و ۶۵ واحد فعالیت بین المللی بر گرم پروتئین در تنش شدید (۳۰٪ ظرفیت زراعی) با منبع کودی نیترات و کمترین مقدار آنها (۲۶ و ۲۵ واحد استاندارد بر گرم پروتئین) در مورد کاتالاز در گیاهان متکی به تثبیت نیتروژن (عدم استفاده از کود) و در مورد پلی فنل اکسیداز در استفاده از ترکیب هر دو منبع کود (نیترات و آمونیم) مشاهده شد (شکل ۲، a و b).

در شرایط تنش کم‌آبی با بسته شدن روزنه‌ها ظرفیت انتقال الکترون فتوسنتزی کاهش که این عامل موجب تجمع الکترون-ها و افزایش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد. تولید گونه‌های اکسیژن فعال در سلول‌های گیاهی در طی تنش باعث پرکسیداسیون لیپیدها، دناتوره شدن پروتئین‌ها و اکسیداسیون DNA می‌شود و گیاه برای مقابله با این تغییرات فعالیت آنزیم-های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز برای خنثی سازی فعالیت این رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد (Dat *et al.,* 2000 Hisao, 1973). آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در واکنش مهلر دخیل بوده و در مزوفیل کلروپلاست موجب کاهش اکسیژن مولکولی فتوسیستم نوری II و تنظیم سطح اکسیژن پلاستیدی می‌شود (Trebst and Depka, 1995). فعالیت این آنزیم از تولید بیش از حد اجزای خطی انتقال الکترون در شرایط تنش آب در واکنش مهلر جلوگیری می‌کند (Thipyapong *et al.,* 2004). چنین نتایجی توسط پوراسماعیل و همکاران (۱۳۸۵) نیز گزارش شده است.

میزان پرولین تحت تأثیر تنش خشکی در طی سه و پنج و هفت روز بعد از تنش قرا گرفت این در حالی است که اثر اصلی مصرف نیتروژن تنها در سه و پنج روز پس از تنش بر میزان پرولین معنی‌دار بود (۱٪= α جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد با گذشت زمان در طی تنش میزان پرولین کم شد. بیشترین میزان پرولین (۰/۳۶ میکرو مول بر گرم وزن تر برگ) در تیمار ۳۰٪ ظرفیت زراعی در سه روز بعد از تنش و کمترین مقدار (۰/۰۶ میکرو مول بر گرم وزن تر) در شرایط بدون تنش در روز هفتم مشاهده شد (شکل ۳، a وb وc). تغییرات پرولین برگ بعد از اعمال تنش تحت تیمار نیتروژن معدنی نیز قرار گرفت و در روز سوم بعد از اعمال تنش بیشترین میزان پرولین (۳/۴۲ میکرو مول بر گرم وزن تر) به تیمار نیترات + آمونیوم و کمترین آن (۲/۴۴ میکرول بر گرم وزن تر) مربوط به تیمار شاهد بود ولی در روز هفتم بعد از اعمال تنش بالاترین مقدار این اسیدآمینه (۱۱/۳۴ میکرو مول بر گرم وزن تر) از تیمار نیترات به دست آمد (شکل ۳، d و e). افزایش پرولین منجر به حفظ تورژسانس و کاهش خسارت غشا در گیاهان می‌شود (Pandey and Agarwal, 1998). تجمع پرولین در گیاه در شرایط تنش خشکی به علت اثر تنظیمی آبسزیک اسید بر فرایندهای نوری است (Rontein *et al.*, 2002). تنش کم‌آبی از طریق افزایش بیان آنزیم‌های سنتز کننده پرولین و کاهش فعالیت آنزیم‌های تخریب پرولین باعث افزایش میزان پرولین در گیاه می‌شود (Zhang *et al.,* 1999). تجمع پرولین نتیجه هیدرولیز پروتئین‌ها بوده و مسیر سنتز آن از گلوتامیک اسید گزارش شده است. گیاهان مصرف کننده از نیتروژن معدنی در مقایسه با گیاهان متکی به تثبیت نیتروژن، مقدار پرولین بیشتری انباشت کردند. محدودیت دسترسی به نیتروژن در شرایط تنش به‌دلیل اختلال در تثبیت نیتروژن موجب مصرف مقادیر معین از نیتروژن معدنی در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان متکی به تثبیت گشته و آن‌ها را در مقابل کم‌آبی مقاوم‌تر می‌نماید.



شکل ۲- تأثیر منابع نیتروژن بر فعالیت آنزیم کاتالاز (a) و پلی فنل اکسیداز (b) لوبیا در شرایط تنش کم‌آبی. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد.



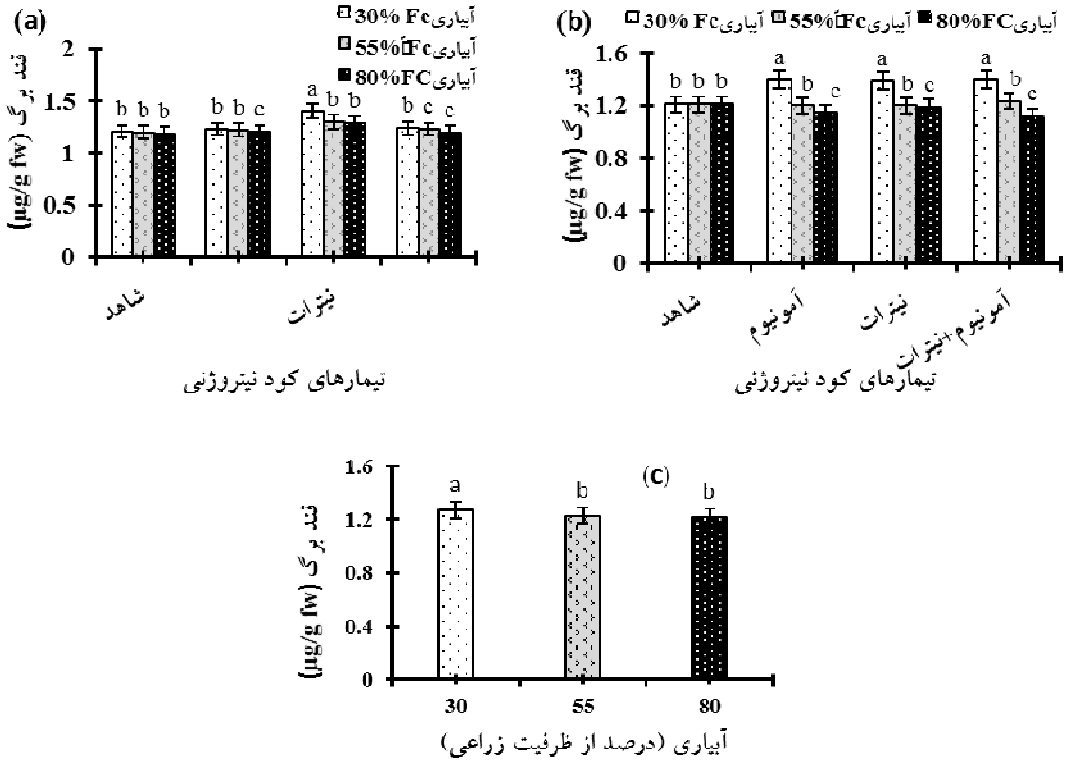
شکل ۳- تأثیر تنش کم‌آبی بر میزان پرولین در روزهای سوم (a)، پنجم (b) و هفتم (c) بعد از اعمال تنش و همچنین تأثیر تیمارهای کودی نیتروژن بر میزان پرولین در روزهای سوم (d) و هفتم (e) بعد تنش در برگ لوبیا. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد.

پژوهشگران نشان دادند که نقش آمونیوم در ساخت آمینواسیدها از طریق گلوتامات دهیدروژناز بیشتر از نیترات بوده و نقش آن در رشد و نمو گیاه و تغییر در مقدار پرولین بیشتر از نیترات است (Botella *et al.*, 1994).

جدول ۳- تأثیر مصرف نیتروژن بر میزان قند، پرولین و پروتئین برگ لوبیا در سه، پنج و هفت روز پس از تنش کم‌آبی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		قندهای محلول برگ			پرولین برگ			پروتئین برگ		
		سوم	پنجم	هفتم	سوم	پنجم	هفتم	سوم	پنجم	هفتم
تکرار	۲	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۶	۰/۴۷	۷۰/۴۹	۰/۸۵	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۱۵
نیتروژن	۳	۰/۰۰۹۸*	۰/۰۱۷**	۰/۰۰۰۰۰۲^{ns}	۱/۷۵**	۳۱/۲۳**	۳/۳۱^{ns}	۰/۳۳**	۰/۰۲۹**	۰/۰۹۸**
کم‌آبی	۲	۰/۱۵*	۰/۰۶۲**	۰/۰۰۵*	۳/۶۴**	۶۶/۴۴**	۱۰۳/۷**	۲/۰۳**	۰/۲۷**	۰/۸۱**
نیتروژن× کم‌آبی	۶	۰/۰۱*	۰/۰۲۶**	۰/۰۰۱۴^{ns}	۰/۰۸۹^{ns}	۲/۱۸^{ns}	۳/۴۴^{ns}	۰/۶۰۶**	۰/۰۶۳**	۰/۱۹**
خطا	۲۲	۰/۰۵۶	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۷	۵/۵۹	۵/۶۳	۲/۳۸	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات٪	–	۴/۰۳	۲/۳۲	۲/۳۱	۱۷/۸۳	۲۵/۲۷	۲۶/۱۷	۱۰/۷۹	۱۰/۴۴	۱۱/۱۲

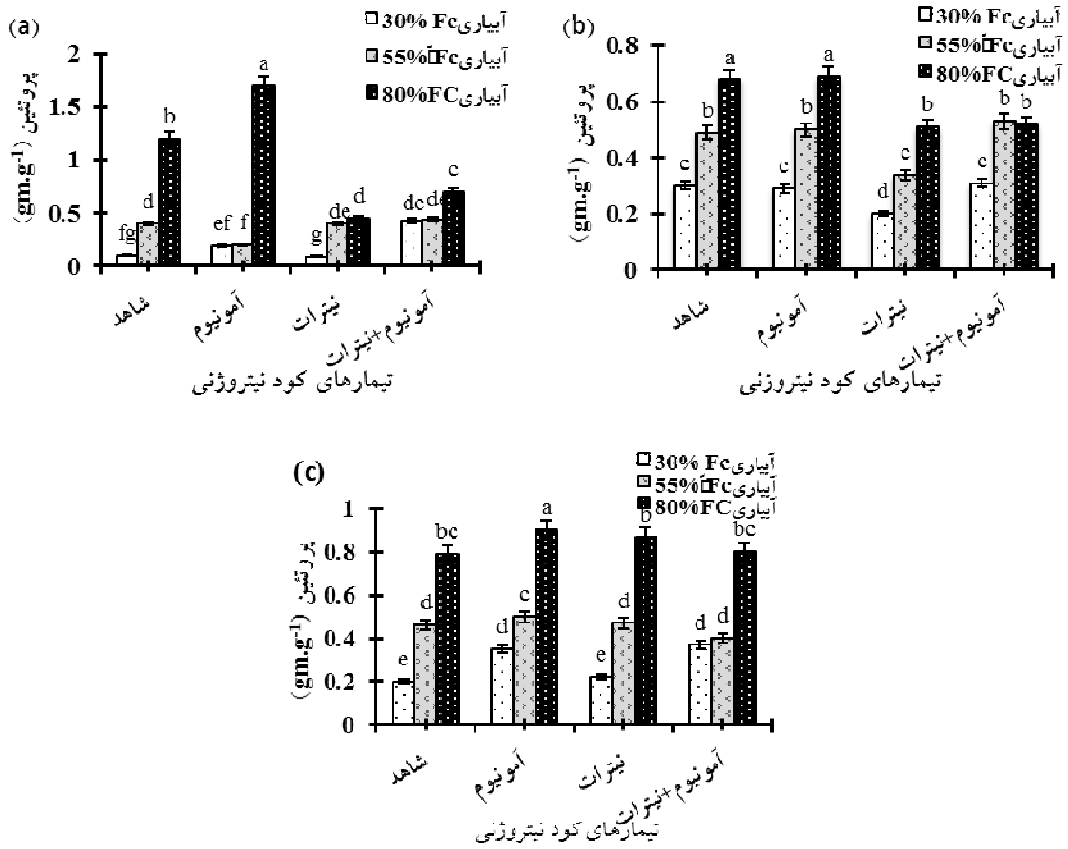
* و ** **به ترتیب معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد**



شکل ۴- تأثیر مصرف منابع مختلف نیتروژن بر میزان قند محلول برگ در سه (a)، پنج (b) و هفت روز (c) بعد از اعمال تنش کم آبی. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد.

کود نیتروژن و تنش کم‌آبی بر میزان قند محلول تأثیر معنی-داری داشت، اثر نیتروژن در سطح ۵٪ در روز سوم و در سطح ۱٪ در روز پنجم معنی‌دار شد. اثر کم‌آبی در سطح ۵ ٪ در روز سوم و هفتم و در سطح ۱٪ در روز پنجم بر میزان قند محلول معنی‌دار بود (جدول۳). در روز سوم بعد تنش بیشترین میزان قند (۱/۴ میکروگرم بر گرم وزن تر) در تنش شدید (۳۰٪ ظرفیت زراعی) و نیترات و کمترین مقدار (۱/۱۹ میکروگرم بر گرم وزن تر) در ۸۰٪ ظرفیت زراعی و عدم استفاده از کود مشاهده گردید. با وجود این‌که میزان قند در روز هفتم بعد تنش در تمام تیمارهای کودی افزایش یافت ولی بین آنها.

نیتروژن به



شکل ۵- تأثیر مصرف نیتروژن بر میزان پروتئین برگ در روز سوم (a)، پنجم (b) و هفتم (c) پس از شروع تنش کم‌آبی. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد.

اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل۴، a و b وc). اثرات متفاوت نیترات و آمونیوم بر رشد، به طور عمده برحسب محل‌های تثبیت متفاوت و بیشترین فعالیت نیترات رداکتاز در بخش هوایی بوده و نیترات عمدتاً در برگ احیاء می‌شود (Lewis *et al.*, 1990). از آنجایی که در گیاهان نیتروژن به صورت نیترات نسبت به آمونیمی با سرعت کمتری جذب و تثبیت می‌شود، مصرف نیتروژن به صورت نیترات موجب می‌شود تا کربوهیدرات کمتری در گیاه استفاده شود (Ulrich, 1992). هنگامی‌که پتانسیل آب برگ کاهش می‌یابد تجمع قندها احتمالاً در تنظیم اسمزی نقش اصلی ایفا می‌نمایند (Sato *et al.*, 2004). افزایش قندهای محلول در گیاهان تحت تنش در برقراری آماس و جلوگیری از پلاسمولیز مؤثر است (Munne, and Alegre, 1999). افزایش قندهای محلول در زمان تنش با توقف رشد یا سنتز این ترکیبات از مسیرهای غیر فتوسنتزی و تجزیه قندهای نامحلول انجام می‌گیرد (قربانلی و نیاکان، ۱۳۸۴).

اثر اصلی مصرف نیتروژن و کم‌آبی بر میزان پروتئین در طی زمان پس از اعمال تنش در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. اثرات متقابل مصرف نیتروژن در تنش کم‌آبی نیز در سطح ۱٪ در زمان‌های بعد از اعمال تنش اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). بیشترین مقدار پروتئین برگ در روز سوم (۱/۷ میلی‌گرم بر گرم)، پنجم (۰/۶۹ میلی‌گرم بر گرم) و هفتم (۰/۹ میلی‌گرم بر گرم) از آمونیوم در شرایط بدون تنش و کمترین مقدار آن در روز سوم (۰/۰۹ میلی‌گرم بر گرم)، پنجم (۰/۲ میلی‌گرم بر گرم) و هفتم (۰/۲۲ میلی‌گرم بر گرم) از تیمار نیترات در تنش شدید مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد در روزهای اول

تنش تنها کود آمونیوم و عدم مصرف نیتروژن میزان پروتئین بالاتری دارد ولی با ادامه تنش به روز هفتم میزان پروتئین بیشتر شد (شکل۵، a وb و c). تنش کم‌آبی با تولید رادیکال های مخرب اکسیژن سبب تخریب ساختار پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه می‌شود. کاهش پتانسیل آب در برگ‌های موجب نقصان قابل توجهی در پلی ریبوزوم‌ها و مونوریبوزوم ها می‌شود که این مسئله بازگوکننده کاهش سنتز پروتئین‌هاست (Bradford and Hsiao, 1982). نیتروژن یکی از مهم‌ترین عناصر در تغذیه گیاهان محسوب می‌شود و هنگامی که در تغذیه گیاه مقدار نیتروژن و نوع آن مناسب باشد، ساخت مواد پروتئینی افزایش می‌یابد، قدرت حیات گیاه زیاد می‌شود، رشد برگ‌ها تسریع و پیری آن‌ها کند می‌شود (Yamashita *et al.*, 1994). گیاهان جوان معمولاً آمونیوم را ترجیح می‌دهند. با آنکه نیترات به‌عنوان منبع اصلی نیتروژن است، لیکن بسیاری از گیاهان قادرند نیتروژن آمونیمی را به آسانی جذب نموده و مورد استفاده قرار دهند. به خصوص هنگامی که شرایط محیطی برای افزایش شدت فتوسنتز و در نتیجه افزایش سرعت رشد مساعد باشد (Baligar, and Schanffert, 1993). گزارش های گوناگونی مبنی بر افزایش مقدار آمونیوم در محیط، به علت سمیت آن سبب ایجاد شرایط تنش می‌شود و مقدار پروتئین کل گیاه در مقابله با آن افزایش می‌یابد که برخی از آنها به عنوان یک واکنش سریع می‌باشند (Zhang *et al.*, 1999). Doyle و همکاران (۱۹۹۳) در گندم به این نتیجه رسیدند که با افزایش مصرف نیتروژن کارایی زراعی و فیزیولوژیک نیتروژن کاهش، ولی کارایی پروتئین افزایش می یابد.

نتیجه‌گیری کلی:

با توجه به نتایج این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که لوبیا در طی تنش کم‌آبی با افزایش میزان اسیدآمینه پرولین، لیزین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز و میزان قندهای محلول تأثیرات تنش را کاهش می‌دهد. همچنین تغذیه همزمان لوبیا با نیترات به همراه آمونیوم سبب کاهش تغییرات لیزین و متیونن و بیشترین پرولین در طی تنش شد، این در حالی است که بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و قندهای محلول با کاربرد منبع نیترات مشاهده شد. تنش کم‌آبی سبب کاهش میزان پروتئین شده که علت آن می‌توان به تجزیه پروتئین‌ها به اسیدآمینه‌های پرولین و لیزین در طی تنش می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد منابع نیتروژن دارای تأثیرات متفاوت می‌باشد ولی در بیشتر صفات اندازه‌گیری شده استفاده همزمان از نیترات و آمونیوم بیشترین تأثیر را داشت که می‌تواند علت آن به تأمین همزمان شده استفاده همزمان از نیترات و آمونیوم بیشترین تأثیر را داشت که می‌تواند علت آن به تأمین همزمان نیترات و آمونیوم و بالا رفتن کارایی گیاه در استفاده از نیتروژن نسبت داد. کاهش در میزان دسترسی به آب در طی تنش موجب کاهش تثبیت نیتروژن در اثر کاهش دسترسی گرهک‌ها به فتوآسیمیلات و اکسیژن بوده از آنجایی‌که بقولات به ویژه حبوبات برای تولید محصول به نیتروژن بیشتری نیاز دارند و در شرایط محدودیت آب که به کاهش و حتی توقف تثبیت نیتروژن منجر می‌شود، تأمین منابع نیتروژن علاوه بر جبران تثبیت در تولید متابولیت‌هایی سازگاری گیاه نقش دارد.ترات و آمونیوم و بالا رفتن کارایی گیاه در استفاده از نیتروژن نسبت داد. کاهش در میزان دسترسی به آب در طی تنش موجب کاهش تثبیت نیتروژن در اثر کاهش دسترسی سازگاری گیاه نقش دارد.

منابع:

قربانلی، م. و نیاکان، م. (۱۳۸۴) بررسی اثر تنش خشکی بر روی میزان قندهای محلول، پروتئین، پرولین،ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز گیاه سویا رقم گرگان. نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم۳: ۵۹-۴۳.

هاشمی دزفولی، ا.، کوچکی.، ع. و بنایان اول، م. (۱۳۷۴) افزایش عملکرد گیاهان زراعی(ترجمه).جهاد دانشگاهی مشهد. ص۲۳۵.

محمدی، آ.، بی‌همتا، م. ر. و دری، ح. ر. (۱۳۸۹) بررسی صفات موثر بر قابلیت پخت و درصد پروتئین در ۱۵

ژنوتیپ لوبیا قرمز (*Phaseolus vulgaris* L.) در شرایط آبیاری معمولی و تنش خشکی. نشریه پژوهش‌های حبوبات ایران. ۲: ۱۵۲-۱۴۳.

منصوری فر، س.، مدرس ثانوی، س. ع. م. و محمدی، خ. (۱۳۸۹) تأثیر تنش کم‌آبی و نیتروژن بر عملکرد دانه و متابولیت های سازگاری دو رقم ذرت هیبرید میان رس. مجله دانش آب و خاک ۲: ۴۵-۲۹.

نجفی، م. نقش اسیدهای آمینه در کشاورزی ارگانیک. http://www.talfighdaneh.ir/News/post-23550 زمان استخراج اسفند ۱۳۹۲.

عبادی خزینه قدیم، ع.(۱۳۷۸) بررسی جنبه‌های فیزیولوژیک افزایش عملکرد در یونجه‌های دیم. پایان‌نامه دکتری زراعت، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

عبادی، ع.، توبه، ا.، کربلایی، ح. و خدادوست، ز.(۱۳۸۵) بررسی تأثیر مصرف نیتروژن در شرایط کم‌آبی بر عملکرد و اجزای عملکرد سویا، پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی، ۷۱:. ۵۷ - ۵۱

فتحی، ق.، سیادت، س. ع. و قلمبران، م .ر. (۱۳۸۰) بررسی تأثیر کوددهی نیتروژن در تراکم و الگوی کاشت مختلف بر روی رشد و عملکرد سویا. مجله کشاورزی. ۱: ۱-۲۰.

Arora, A., Sairam, R. K., and Srivastava, G. C. (2002) Oxidative stress and antioxidant system in plants. Plant Physiology 82: 1227-1237.

Atanasova, E. (2008) Effect of nitrogen sources on the nitrogenous forms and accumulation of amino acid in head cabbage. Plant Soil and Environment 54: 66–71.

Baligar, V. C. and Schanffert. R. E. (1993) Growth and nutrient uptake parameters in sorghum as influenced by aluminum. Agronomy Journal 58: 1068-1074

Basu, P. S., Ashoo, S., Sukumaran, N. and Sharma, A. (1998). Changes in net Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in potato leaves induced by water stress. Photosynthetica 35: 13-19.

Bates, L. S., Waldern, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39:205-207.

Botella, M. A., Cerda A., Martinz, U. and Lips S. H. (1994) Nitrate and ammonoum uptake by wheat seedling as affected by salinity and light. Journal of Plant Nutrition 17:539-580

Bradford, K. J. and Hsiao, T. C. (1982) Physiological response to moderate water stress. In: II. Water physiological plant ecology relation and carbon assimilation encyclopedia plant physiques (eds Laneg, O. L., Nobel, P. S., Osmond, C. B. and Zeigler, Z.) Pp. 263-324. Springer Vellage, Berlin and New York.

Bradford, M. (1976) A rapid and sestive mrthod for the quanititation of microgram quanyities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Biochemistry 72: 248-254.

Cakmak, I. and Horst, W. J. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismuatse, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) Plant Physiology 83: 463-468.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2000) Dual action of active oxygen species during plant stress responses. Cellular Molecul Life Science 57: 779-795.

Doyle, A. D. and Holford, J. C. R. (1993) The uptake of nitrogen by wheat, its agronomic efficiency and their relation ship to soil and fertilizer nitrogen. Australian Journal of Agricultural Research 44:1245-1258.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-356.

Eppendorfer, W. H. (1978) Effects of N-fertilisation on amino acid composition and nutritive value of spinach, kale, cauliflower and potatoes. Journal Science Food Agricultueal 4: 305-311.

Feller, R. E., Feller, D. A. and Shepherd, A. D. (1969) Determiation of free lysine and Methionine in Amino acid-Forttified wheat. 46: 614-620.

Giradin, P. M. Tollenaar, A. and Muldoon, D. (1987) Temporary N stavation in maize effects on development, dry accumulation and grain yieid. Agronomy Journal 7: 289-296.

Hendry, G. (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans. New Phytologist 123:3-14.

Hernandez, J. A., Jimenez, A. Mullineaux, P. and Sevilla, F. (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. Plant, Cell and Environment 23: 853-862.

Heuer, B. (1994) Osmoregulatory role of proline in water-and salt -stressed plants. 363- 481.

Hisao, T C. (1973) Plant responses to water stress. Annual Review of Plant Physiology 24: 519-570.

Ho, S., Chao, Y., Tong, W. and Yu, S. (2001) Sugar coordinately and differentially regulates growth and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. Plant Physoilogy 46:281-285.

Hoff, J., Jones, E., Wilcox, C. M., Marlene, G. E. and Castro, D. (1971) The effect of nitrogen fertilization on the composition of the free amino acid pool of potato tubers. American Journal of Potato 48: 390-394.

Darkcondition. Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 4: 53-57

Pavlik, M., Pavlikova, D., Balik, J. and Neuberg, M. (2010) The contents of amino acids and sterols in maize plants growing under different nitrogen conditions. Plant Soil and Environment 56: 125-132.

Purcell, L. C. and King, C. A. (1996) Drought and nitrogen fertilization effects on yield in soybean. Research Series Arkansas Agricultural Experiment Station 450: 37-38

Refsum H., Ueland, P. M, Nygard, O. and Vollset, S. E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. Annual review of medicine 49: 31–62

Rontein, D., Basset, G. and Hanson, A. D. (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. Metabolic Engineering 4: 49-56.

Sato, F., Yoshioka, H., Fujiwara, T., Higashio, H., Uragami, A. and Tokuda, S. (2004) Physiologycal responses of cabbage plug seedlings to water stress during low-temprature storage in darkness. Scientia Horticulturae 101:349-357.

Schubert, S., Serraj, R. and Balzer, P. E. (1995) Effect of drought stress on growth sugar concentrations and amino acid accumulation in N-2-fixiy alfalfa. Journal Plant Physiology 146:57-69

Serraj, R., Cinclair, T. R. and Purcell, L. C. (1999) Symbiotic N_2 fixation response to drought. Journal of Experimental Botany *50: 143-155.*

Singh, S. P. (1995) Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean. Crop Sci., 35: 118-124.

Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D. W. and Steffens, J. C. (2004). Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. Plant Science 167: 693–703.

Trebst, A. and Depka, B. (1995) Polyphenol oxidase and photosynthesis research. Photosynthesis Research 46: 41-44.

Ulrich, W. R. (1992) Inorganic nitrogen in plants and microorganism uptake and metabolism. Springer. NewYork. 21: 81 - 93.

Vogt, W. (1995) Oxidation of methionine residues in proteins: Tools, targets, and reversal. Free Radical Biology and Medicine 18: 93-105

Yamashita, K., Kasseri, K. M., Yoammoto, Y. and Matsumoto, H. (1994) Stimulation of plasma membrane H^+ transport activity in barely roots by salt stress. Soil Science and Plant Nutrition 40: 555 - 563.

Zhang, J., Nguyen, H. T. and Blum, A. (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. Journal of Experimental Botany 50:291-302.

Jones, H. G. (1980). Interaction and integration of adaptive responses to water stress: the implications of an unpredictable environment. In Adaptation od plant to water and High Temperutre stress (Ed.by N.C Turner & P.J. Kramer), pp. 353-365, Wiley, New York.

Khan, V. (1975) Polyphenol oxide activity and browning of three Avocado varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 26: 1319-1324.

Kumodini, S. D., Mume, J. and Chu, G. (2002) Genetic improvement in short season soybean. Crop Science 42: 141-145.

Kuzntsov, V. V. and Shevyakva, N. I. (1999) Proline under stress: Biological role, metabolism, and regulation. Russian Journal of Plant Physiology 46: 274-287.

Lewis, O. A. M., Cramer, M. and Uanderleij, T. (1990) The influence of nitrogen source on carbon distribution in plants exhibiting the C_3 and C_4 photosynthetic pathway. Annals of Botany 329-351.

Lockhart J.A. (1965). An analysis of irreversible plant cell elongation. The Journal of Theoretical Biology 8: 264-275.

Losak, T., Hlusek, J., Filipcik, R., Pospisilova, L., Manasek, J., Prokes, K., Bunka, F., Kracmar, S., Martensson, A. and Orosz, F. (2010) Effect of nitrogen fertilization on metabolisms of essential and non-essential amino acids in field-grown grain maize (*Zea mays* L.). Plant Soil and Environment 56: 574-579.

Majnoon Hoseini, N. (2008) Grain legume production. Jihad-Daneshghahi Pub. University of Tehran. 283.

Martin, M., Morgan, J. A., Zerbi, G. and Lecain, D. R. (1997) Water stress imposition rate affects osmotic adjustment and cell wall properties in winter wheat. Italian Journal of Agronomy 1: 11–20.

Mengel, K. and Kirkby, E. A. (2001) Principles of Plant Nutrition. 5th Edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 849.

Mir-Hosseini-Dehabadi, S. R. (1994) The effect of water stress on water relations, Carbon isotope discrimination, and shoot and root growth of sainfoin (*Onobrychis visifolia* scope) and Lucerne (*Medicago Sativa* L.). Ph.D. Thesis. Massey Univ. Newzealand. PP: 367.

Mohsenzade, S., Malboobi, M. A., Razavi, K. and Farrahi Aschtiani, S. (2006) Physiological and molecular responses of *Aeluropus lagopoides* (*Poaceas*) to water deficit. Environmental and Experimental Botany 56:374-322.

Munne, S. and Alegre, L. (1999) Role of dew on the recovery of water stressed Melissa officinallis L. Journal Plant Physiology 154: 759-766.

Pagter, M., Bragato, C. and Brix, H. (2005) Tolerance and physiological responses of phragmites australis to water deficit. Aquatic Botany 81:285-299.

Pandey, R. and Agarwal, R.M. (1998) Water stress-induced change in prolinecontents and nitratreductaseActivity in Rice under light and