

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

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 کم آبی 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 به صورت 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 اسیدآمین لیزین و متیونین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز، میزان قند محلول 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 پروتئین و قندهای محلول در برگ گردید. استفاده از نیترات و نیترات + آمونیوم بیشترین میزان تولید پروتئین و قندهای محلول را در روزهای بعد از تنش نشان داد. در حالی که 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 اسیدآمین لیزین شد در حالی که 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-فنل اکسیداز 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 کم آبی شده است.

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

مقدمه:

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

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) به عنوان مهم‌ترین لگو 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

* نویسنده مسئول، 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، به عنوان 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 (Girardin et al., 1987). یکی از نقش‌های نیتروژن در گیاهان تحت تنش، مشارکت آن در تولید مواد اسمزی مانند پرولین، گلايسین-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 آلفاکتوگلو تارات تولید گلو تانات یا اسید گلو تامیک را می‌کند که یک اسید آمینه است. در کل واکنش ترکیب آلفاکتوگلو تارات + آمونیاک و تشکیل گلو تانات یک مولکول NADH مصرف می‌شود که معادل با سه مولکول ATP است. آلفاکتوگلو تارات ماده‌ای است که در چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید تولید می‌شود. گلو تانات با یک مولکول آمونیاک ترکیب شده و تولید گلو تامین 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 آگیری 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 سیستمین جزء دو اسید آمینه حاوی سولفور می‌باشد. متیونین یک واسطه در بیوسنتز سیستمین، کارنتین، 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) به منظور 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 آسپاراتات مانند، متیونین، فنیل‌آلانین، آسپاراتات 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 آنجایی که 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 آسیمیلایون منابع مختلف نیتروژن می‌تواند از طریق مقادیر متفاوتی از انرژی و عوامل احیایی توأم 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 ۳×۴ 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 آمونیوم از کود سولفات آمونیوم ۶۰ کیلوگرم در هکتار و برای تیمار آمونیوم + نیترات از کود نیترات آمونیوم ۶۵ کیلوگرم در هکتار محاسبه و به خاک اضافه گردید.

صفات اندازه‌گیری شده شامل میزان اسیدآمین 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 بذر ۲۰ 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 Na₂EDTA یک مولار و ۰/۰۴٪ (v/v) -۲- مرکاپتو اتانول می-باشد 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 سولفوسالسیلیک 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 میکرولیتر آب 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.

جدول ۱- نتایج تجزیه خاک مورد استفاده در آزمایش

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

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

نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی فنل اکسیداز بر حسب فعالیت بین المللی بر میلی گرم 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 کم آبی و کود نیتروژن و اثر متقابل آنها بر میزان اسیدآزمینه لیزین و متیونین در سطح ۱٪ معنی دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد بیشترین مقدار اسیدآزمینه لیزین ($2/75$ میکروگرم بر میلی گرم وزن تر) در تیمارهای آمونیوم و نیترات در تنش شدید و کمترین مقدار آن ($1/7$ میکروگرم بر میلی گرم وزن تر) از مصرف نیترات در شرایط بدون تنش (80 درصد ظرفیت زراعی) حاصل شد (شکل ۱، a)، درحالی که بیشترین میزان متیونین ($0/41$ میکروگرم بر میلی گرم وزن تر) در تیمار عدم مصرف کود و بدون محدودیت آبی و کمترین میزان آن ($0/10$ میکروگرم بر میلی گرم 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).

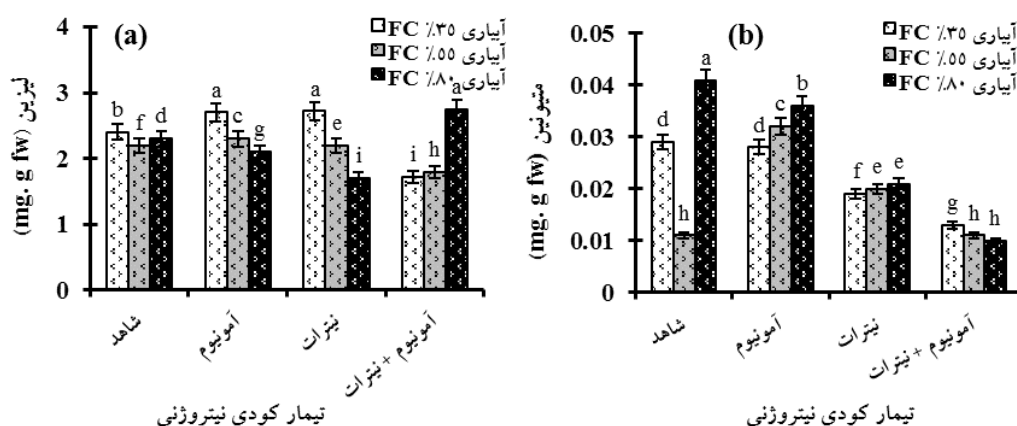
استفاده از تیمارهای نیتروژن معدنی لیزین برگ را افزایش داد. به نظر می‌رسد استفاده از منبع کودی آمونیوم و نیترات تأثیر تنش شدید را تا حدودی خنثی کرده و مقدار این اسیدآزمینه را نسبت به تنش متوسط و سطح بدون تنش (80 درصد ظرفیت زراعی) افزایش داده است. در بین تیمارهای نیتروژن، آمونیوم نسبت به بقیه تیمارها در افزایش متیونین موثرتر بود.

اندازه‌گیری لیزین و متیونین با استفاده از روش Feller و همکاران (۱۹۶۹) صورت گرفت، به این صورت که برای لیزین $0/5$ گرم نمونه را در 50 میلی لیتر از هیدروکلریک اسید ($0/1$ نرمال) حل کرده آن را با آب به حجم 100 میلی لیتر رسانده و صاف کرده و سپس نیم میلی لیتر از آن را با گلیسرول (50 درصد)، دو میلی لیتر از بافر فسفات ($\text{pH}=6$) و یک میلی لیتر نین هیدرین حل و به مدت 30 دقیقه در آب جوش 100 درجه سانتی گراد قرار داده شد و جذب در 570 نانومتر قرائت شد. همچنین برای اندازه‌گیری مقدار متیونین 10 میلی لیتر از محلول فیلتر شده در مرحله سه لیزین را برداشته و در فلاکس 50 میلی لیتری به آن چهار میلی لیتر از سدیم هیدروکسید (5 نرمال)، دو میلی لیتر از محلول گلیسین آبدار و دو میلی لیتر از محلول سدیم نیتروفری سیانید آبدار ($0/1$) اضافه شد بعد از هر اضافه کردن خوب مخلوط (ورتکس) گردید. محلول حاصل به مدت 10 دقیقه در دمای 40 درجه سانتی گراد و سپس به مدت 5 دقیقه در حمام یخ نگهداری شد. پنج میلی لیتر هیدروکلریک-اسید ($1:1$) را اضافه کرده و خوب مخلوط نموده و سپس به مدت $2-3$ دقیقه خنک کرده و از یک صافی عبور داده شد. سپس میزان جذب در 510 نانومتر قرائت و میزان لیزین و متیونین بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید. فعالیت کاتالاز نیز به روش Cakmak و Heuer (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شد. برای این کار $0/2$ گرم نمونه گیاهی را در سه میلی لیتر بافر تریس $0/1$ میلی مولار با $\text{pH}=7$ ساییده و 12000 دور در دقیقه به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شد. از این عصاره برای سنجش آنزیم کاتالاز استفاده شد. سنجش آنزیم کاتالاز در طول موج 240 نانومتر با اسپکتروفتومتر انجام شد. برای سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز از روش Khan (۱۹۷۵) استفاده شد که جذب نوری عصاره آنزیمی نیز در طول موج 410

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	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**
کم آبی	۲	۰/۲۴۵**	۰/۰۰۰۱**	۱۳۰۲۴/۶۶**	۱۱۸۹۶/۸۱**
نیتروژن × کم آبی	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 معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد



شکل ۱- تأثیر مصرف منابع مختلف نیتروژن بر میزان اسید آمینه لیزین (a) و متیونین (b) لوبیا تحت تنش کم آبی. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می باشد.

طریق گلوتامین (آنزیم گلوتامین سینتاز) و گلوتامات (آنزیم گلوتامات سینتاز) به اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها تبدیل می‌شود (Lockhart, 1965). آمونیوم جذب شده از طریق ریشه برای آسمیلیه شدن به صورت اسیدهای آمینه و آمیدها به ساقه انتقال می‌یابند. آسمیلاسیون 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

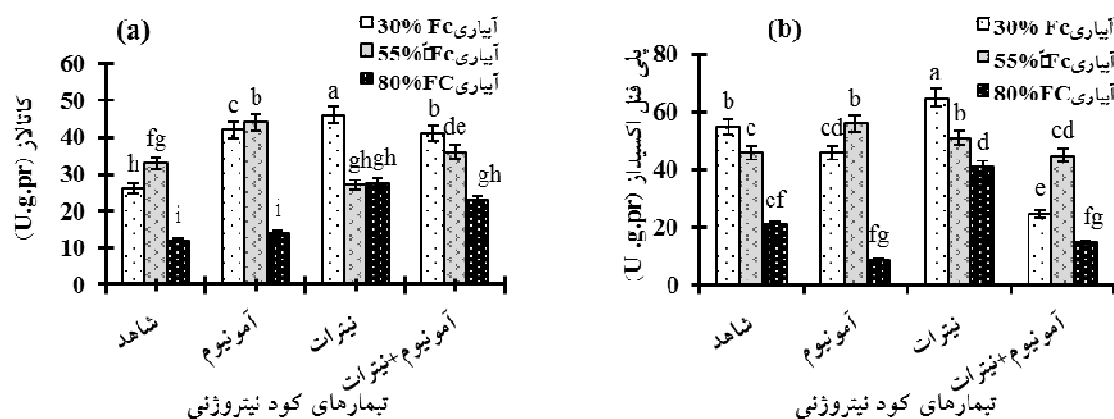
تنش شدید در کلیه تیمارها بجز در تیمار آمونیوم + نیترات باعث کاهش متیونین شد. احتمالاً استفاده از منبع کودی آمونیوم + نیترات تأثیر تنش شدید را تا حدودی خنثی کرده و مقدار این اسید آمینه را نسبت به تنش متوسط و شاهد افزایش داده است. محتوای اسیدهای آمینه و ترکیبات نیتروژن‌دار تحت تأثیر کود نیتروژن قرار می‌گیرد (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 اسید آمینه گیاهان می‌گردد (Atanasova, 2008). در داخل گیاه نیترات به وسیله نیترات رداکتاز (NR) به نیتريت و در نهایت نیتريت نیز بوسیله نیتريت رداکتاز تبدیل به آمونیوم می‌شود. آمونیوم عاقبت از

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).

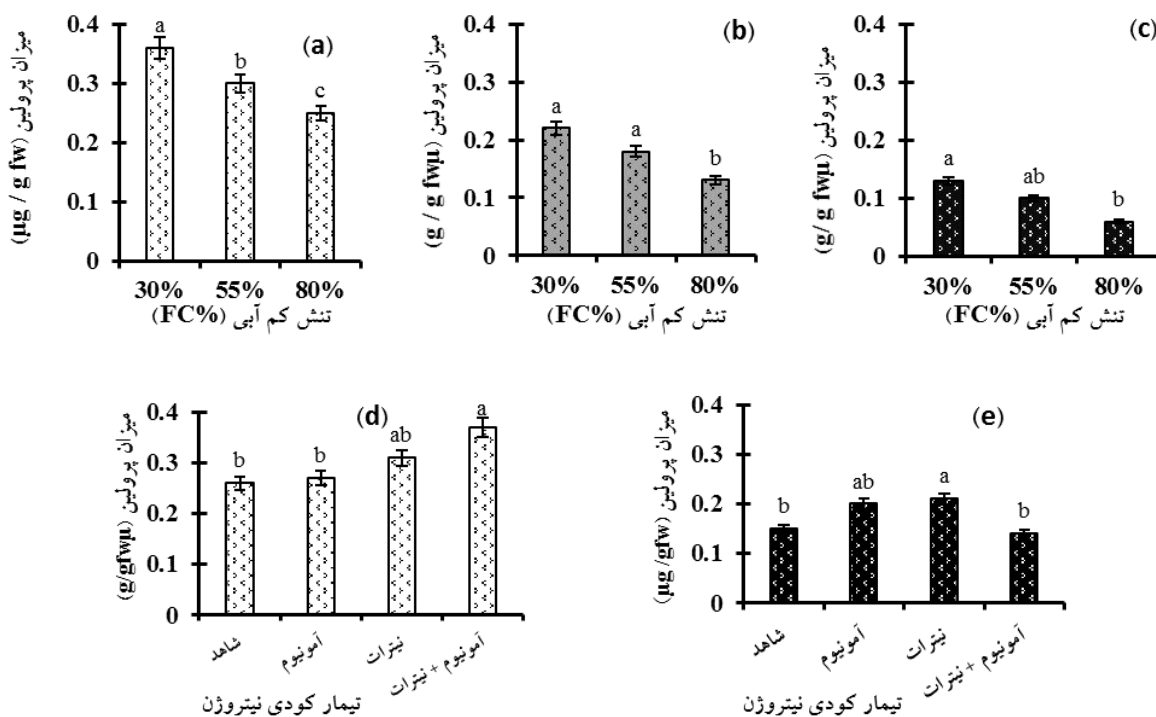
نتایج این پژوهش نشان داد اثر متقابل کم آبی و نیتروژن نیز در سطح ۱٪ بر فعالیت آنزیم کاتالاز و پلی فنل اکسیداز معنی دار بود (جدول ۲). با مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که با افزایش شدت تنش کم آبی، بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز افزوده می‌شود. بالاترین مقدار کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در 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 آمونیوم) مشاهده شد (شکل ۲، a و b).

در شرایط تنش کم آبی 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 پراکسیداسیون لیپیدها، دنا توره 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., 1973 Hisao, 2000). آنزیم پلی فنل اکسیداز در واکنش مهلر دخیل بوده و در مزوفیل کلروپلاست موجب کاهش اکسیژن مولکولی فتوسیستم نوری II و تنظیم سطح اکسیژن پلاستییدی 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 معنی دار بود ($\alpha = 1\%$ 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 و b). 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 میکرو مول بر گرم وزن تر) مربوط به تیمار شاهد بود ولی در روز هفتم بعد از اعمال تنش بالاترین مقدار این اسید آمینه (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 آسبزیک اسید بر فرایندهای نوری است (Rontein et al., 2002). تنش کم آبی 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 نیتروژن معدنی در مقایسه با گیاهان متکی به تثبیت نیتروژن، مقدار پرولین بیشتری انباشت کردند. محدودیت دسترسی به نیتروژن در شرایط تنش به دلیل 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 کم آبی مقاوم تر می‌نماید.



شکل ۲- تأثیر منابع نیتروژن بر فعالیت آنزیم کاتالاز (a) و پلی فنل اکسیداز (b) لوبیا در شرایط تنش کم آبی. حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می باشد.



شکل ۳- تأثیر تنش کم آبی 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 معنی دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می باشد.

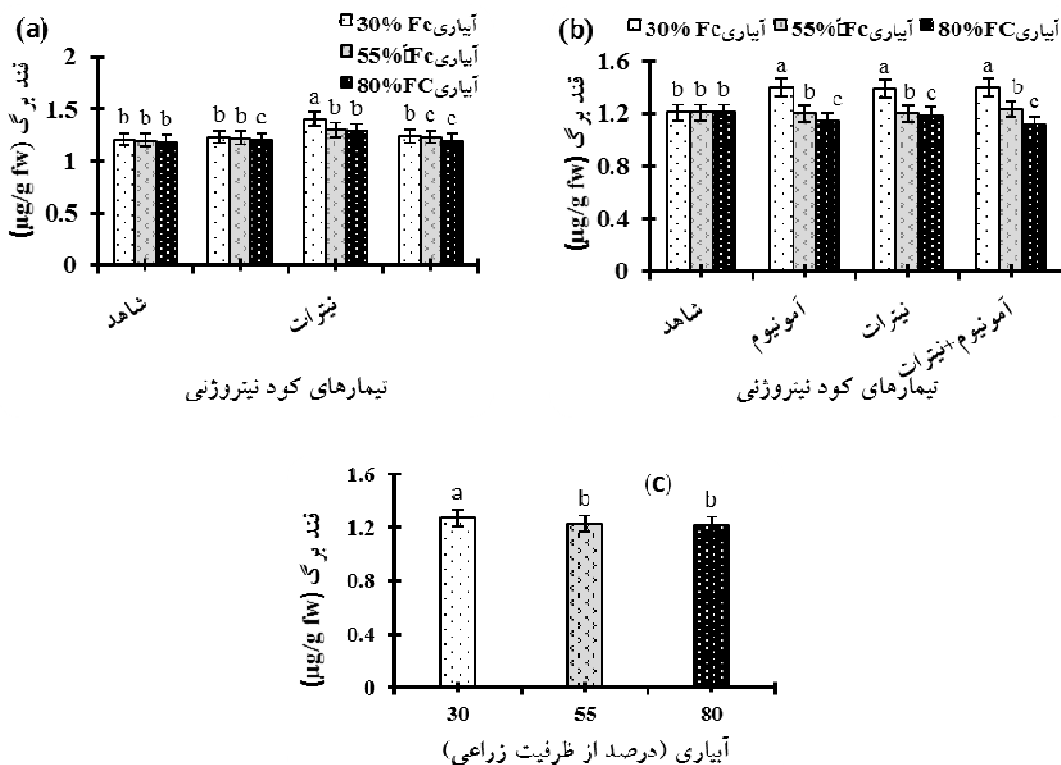
در رشد و نمو گیاه و تغییر در مقدار پرولین بیشتر از نیترات است (Botella et al., 1994).

پژوهشگران نشان دادند که نقش آمونیوم در ساخت آمینواسیدها از طریق گلوتامات دهیدروژناز بیشتر از نیترات بوده و نقش آن

جدول ۳- تأثیر مصرف نیتروژن بر میزان قند، پروتئین و پروتئین برگ لویا در سه، پنج و هفت روز پس از تنش کم آبی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		قندهای محلول برگ			پروتئین برگ					
		سوم	پنجم	هفتم	سوم	پنجم	هفتم	سوم	پنجم	هفتم
تکرار	۲	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۴۷	۷۰/۴۹	۰/۸۵	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۵
نیتروژن	۳	۰/۰۰۹۸*	۰/۰۰۱۷**	۰/۰۰۰۰۰۲ ^{ns}	۱/۷۵**	۳۱/۲۳**	۳/۳۱ ^{ns}	۰/۳۳**	۰/۰۰۲۹**	۰/۰۰۹۸**
کم آبی	۲	۰/۱۵*	۰/۰۶۲**	۰/۰۰۵*	۳/۶۴**	۶۶/۴۴**	۱۰۳/۷**	۲/۰۳**	۰/۰۲۷**	۰/۰۸۱**
نیتروژن × کم آبی	۶	۰/۰۱*	۰/۰۲۶**	۰/۰۰۱۴ ^{ns}	۰/۰۰۸۹ ^{ns}	۲/۱۸ ^{ns}	۳/۴۴ ^{ns}	۰/۰۶۶**	۰/۰۰۶۳**	۰/۰۱۹**
خطا	۲۲	۰/۰۵۶	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۷	۵/۵۹	۵/۶۳	۲/۳۸	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۳
ضریب تغییرات %	-	۴/۰۳	۲/۳۲	۲/۳۱	۱۷/۸۳	۲۵/۲۷	۲۶/۱۷	۱۰/۷۹	۱۰/۴۴	۱۱/۱۲

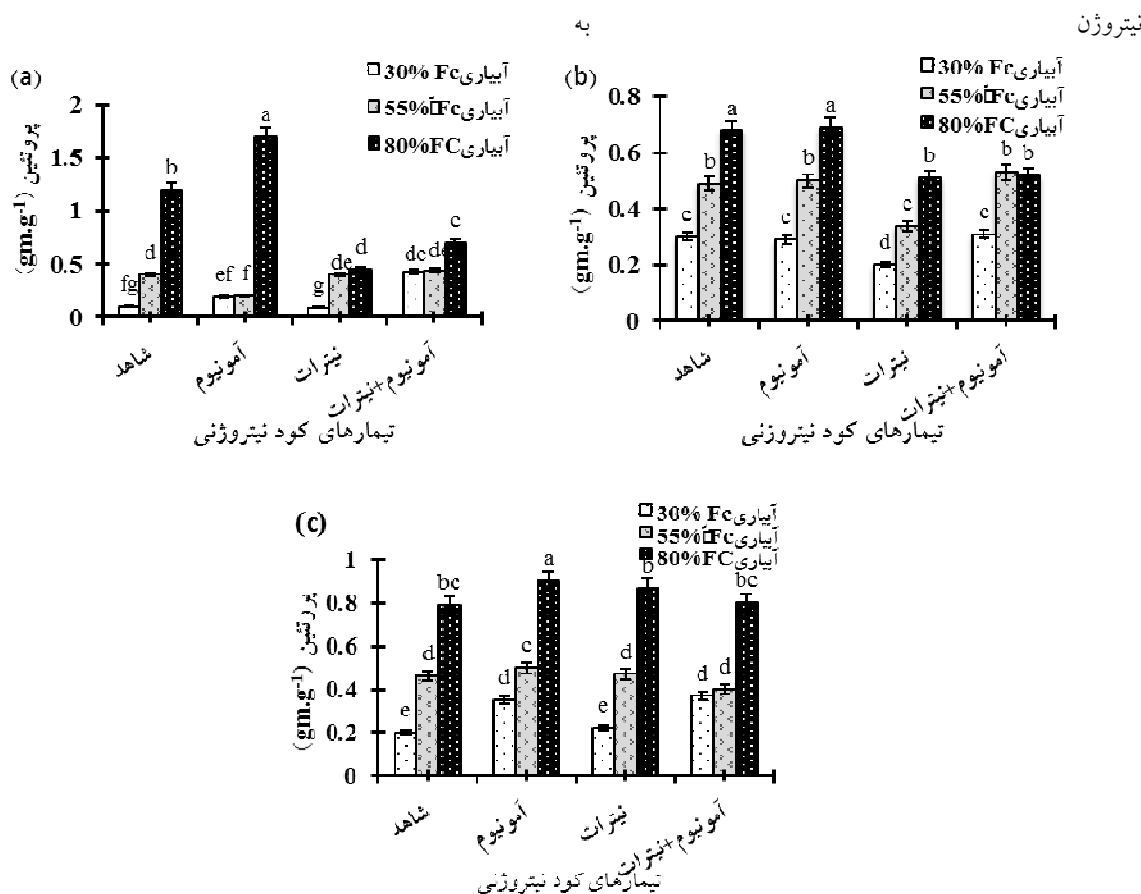
* و ** به ترتیب معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد



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 معنی دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می باشد.

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 این که میزان قند در روز هفتم بعد تنش در تمام تیمارهای کودی افزایش یافت ولی بین آنها.

کود نیتروژن و تنش کم آبی بر میزان قند محلول تأثیر معنی داری داشت، اثر نیتروژن در سطح ۵٪ در روز سوم و در سطح ۱٪ در روز پنجم معنی دار شد. اثر کم آبی در سطح ۵٪ در روز سوم و هفتم و در سطح ۱٪ در روز پنجم بر میزان قند محلول معنی دار بود (جدول ۳). در روز سوم بعد تنش بیشترین میزان



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.

زمان تنش با توقف رشد یا سنتز این ترکیبات از مسیرهای غیر فتوسنتزی و تجزیه قندهای نامحلول انجام می‌گیرد (قربانی 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 آمونیم 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

اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴، a و b و c). اثرات متفاوت نیترات و آمونیم 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 آمونیم با سرعت کمتری جذب و تثبیت می‌شود، مصرف نیتروژن به صورت نیترات موجب می‌شود تا کربوهیدرات کمتری در گیاه استفاده شود (Ulrich, 1992). هنگامی که پتانسیل آب برگ کاهش می‌یابد تجمع قندها احتمالاً در تنظیم اسمزی نقش اصلی ایفا می‌نماید (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

نتیجه گیری کلی:

با توجه به نتایج این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که لوبیا در طی تنش کم‌آبی با افزایش میزان اسیدآمین 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 متیونین 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 می‌تواند به تجزیه پروتئین‌ها به اسیدآمین‌های 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 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 گره‌ها 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. 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 سازگاری گیاه نقش دارد.

هاشمی دزفولی، ا.، کوچکی، ع. و بنایان اول، م. (۱۳۷۴) افزایش عملکرد گیاهان زراعی (ترجمه). جهاد دانشگاهی مشهد. ص ۲۳۵.

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

تنش تنها کود آمونیوم و عدم مصرف نیتروژن میزان پروتئین بالاتری دارد ولی با ادامه تنش به روز هفتم میزان پروتئین بیشتر شد (شکل ۵، a و b و c). تنش کم‌آبی با تولید رادیکال‌های مخرب اکسیژن سبب تخریب ساختار پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه می‌شود. کاهش پتانسیل آب در برگ‌های موجب نقصان قابل توجهی در پلی‌ریبوزوم‌ها و مونوریبوزوم‌ها 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). گزارش‌های 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 می‌یابد.

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 معلم ۳: ۵۹-۴۳.

- 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 sensitive method for the quantitation of microgram quantities 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 dismutase, 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 Molecular 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 relationship 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 Agriculture* 4: 305-311.
- Feller, R. E., Feller, D. A. and Shepherd, A. D. (1969) Determination of free lysine and Methionine in Amino acid-Fortified wheat. 46: 614-620.
- Girardin, P. M. Tollenaar, A. and Muldoon, D. (1987) Temporary N starvation in maize effects on development, dry accumulation and grain yield. *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 Physiology* 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.
- 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 متابولیت‌های 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.، تویه، 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: ۲۰-۱.
- 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 ammonium 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

- 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) Physiological responses of cabbage plug seedlings to water stress during low-temperature 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-fixing alfalfa. Journal Plant Physiology 146:57-69
- Serraj, R., Cinclair, T. R. and Purcell, L. C. (1999) Symbiotic N₂ 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., Kasser, 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 of plant to water and High Temperature 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.
- Kuznetsov, 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 C₃ and C₄ 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-Daneshgahi 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* scop) 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 officinalis 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 nitratoreductaseActivity in Rice under light and

