هشتمین کنگره ملی
زیست شناسی و علوم طبیعی ایران

# واکنشهای پروتئینی و فیتوشیمیایی گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa L.*) به نیتروژن و متانول تحت تنش خشکی

**میلاد سلطانیه[1]، داریوش طالعی[*،2]، پریسا نجاتخواه[3]**

**[1]دانشجوی دکتری زراعت،گروه کشاورزی، دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران**

**[2]دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد، تهران، ایران**

**[3]دانشیار زیست شناسی دریایی، دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران**

[*]نویسنده مسئول:
داریوش طالعی
Email: d.talei@shahed.ac.ir

**چکیده**

هدف از این تحقیق بررسی واکنش‌های پروتئینی و فیتوشیمیایی گیاه سیاه دانه به نیتروژن و متانول تحت تنش خشکی می باشد. برای این منظور آزمایشی به صورت کرت‌های دو بار خرد شده بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت که در آن فاکتور آبیاری با ۴ سطح در کرت-های اصلی، نیتروژن با ۴ سطح در کرتهای فرعی و متانول با ۳ سطح در کرت‌های فرعی فرعی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که غلظت های مختلف نیتروژن و متانول تحت تنش خشکی بر محتوای پروتئین و ترکیبات فیتوشیمیایی اثر معنی دار دارد. با افزایش تنش خشکی محتوای پروتئین برگ کاهش و کاربرد نیتروژن و متانول باعث افزایش میزان پروتئین گردید. بیشترین میزان پروتئین برگ در اثر متقابل تنش متوسط آبیاری، ۹۰ کیلوگرم نیتروژن و ۳۰٪ متانول به مقدار ۲/۹۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. بیشترین میزان وزن روغن و درصد وزن روغن به ترتیب با مقدار ۱۰/۴ گرم و ۸۶/۷ درصد تحت تنش ملایم به دست آمد، در حالیکه بیشترین حجم روغن تحت تنش شدید با مقدار ۱۲/۵ میلی-لیتر حاصل شد. نتایج نشان داد که افزایش سطوح نیتروژن و متانول به ترتیب منجر به افزایش و کاهش وزن روغن، حجم روغن و درصد وزن روغن گردید. افزایش تنش خشکی باعث کاهش میزان ترکیبات فیتوشیمیایی گردید اما تنش ملایم باعث افزایش معنی دار مقادیر پارا-سیمن و کارواکرول گردید. کاربرد نیتروژن در غلظت های بالا باعث کاهش مقدار ترکیبات آلفا-پینن و پارا-سیمن گردید، در حالیکه غلظت بالای نیتروژن باعث افزایش مقدار ترکیبات کارواکرول و تیموکینون گردید. محلول پاشی ۱۰٪ متانول باعث افزایش ترکیبات فیتوشیمیایی گردید. از بررسی نتایج تحقیق می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که کاربرد غلظت های کم نیتروژن و متانول می تواند بیشترین تاثیر را در کاهش اثرات ناشی از تنش خشکی بر گیاه و بهبود عملکرد و ترکیبات فیتوشیمیایی داشته باشد.

**کلمات کلیدی:** پروتئین، ترکیبات فیتوشیمیایی، تنش خشکی، سیاه دانه، متانول

## ۱. مقدمه

گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa* L.) گیاهی است علفی و یکساله از تیره آلاله (Ranunculaceae) که در اروپا، آفریقا و آسیا کشت می شود. این گیاه در مناطق مختلف ایران از جمله اراک و اصفهان نیز یافت می‌شود. بذور سیاهدانه منبع غنی از اسیدهای چرب اشباع نشده، پروتئین، کربوهیدرات و محتوای خاکستر است. سیاهدانه در درمان افسردگی، بیماری دیابت، نارسایی کلیه، بیماری‌های معده، سر درد و دندان درد نقش داشته و دارای اثرات آنتی بیوتیکی، ضد انگلی، ضد میکروبی و ضد سرطانی می‌باشد (Adam Mariod et al., 2017).

تنش های محیطی، مخصوصا تنش خشکی معمولا بدلیل کاهش پتانسیل اسمزی محلول خاک (تنش اسمزی)، اثرات یونی خاص (تنش یونی)، عدم تعادل تغذیه ای گیاه و یا ترکیبی از این عوامل، بعنوان یکی از مهمترین عوامل محدود کننده رشد و توسعه گیاه، واکنش های مختلف بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاهان را تحت تاثیر قرار می دهد است (Ashraf, 2004). Razmjoo و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثرات خشکی بر برخی پارامترهای رشدی و فیزیولوژی گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla* L.) نشان دادند که رشد گیاه در سطوح بالای خشکی کاهش می‌یابد، هم چنین تنش خشکی باعث تجمع پرولین و پاد اکسیدان‌ها در گیاه می شود. Simon و همکاران (۱۹۹۲) در بررسی اثر تنش خشکی بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه ریحان *(Ocimum basilicum* L.) نشان دادند که تنش خشکی باعث کاهش تمام صفات مورفولوژیکی و افزایش غلظت پرولین و میزان اسانس برگ‌های تازه در مقایسه با گیاه شاهد گردید.

عناصر غذایی از جمله نیتروژن بر تغذیه، رشد رویشی و زایشی گیاهان نقش قابل توجهی دارند و می‌توانند در عملکرد گیاهان و همچنین کمیت و کیفیت مواد موثره آنها تغییراتی ایجاد کنند. نیتروژن به عنوان دومین ماده سازنده ساختار گیاهی از عناصری است که در متابولیسم گیاه نقش اساسی دارد و یکی از مهمترین عناصر غذایی پر مصرف می‌باشد که تولید محصولات زراعی و دارویی را بهبود می‌بخشد (Salmerón-Miranda, 2008). نیتروژن در ساختار ترکیبات آلی مانند آمینواسیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و آنزیم‌ها وجود دارد (Walker, 2001) و در ترکیب با عناصری همچون کربن، اکسیژن، هیدروژن و گوگرد بر فتوسنتز گیاهان تاثیر می‌گذارد و فعالیت آنزیم رابیسکو و میزان کلروفیل را افزایش می‌دهد، لذا در افزایش تولید ماده خشک، درصد باروری گل و عملکرد دانه نقش مهمی را ایفا می‌کند (Peng et al., 2006).

متانول به عنوان یک منبع کربن به آسانی از طریق لیپیدهای موجود در غشا و به صورت غیرفعال از غشاهای پروتوپلاستی عبور می‌کند و به سرعت وارد بافت‌های گیاهی می‌شود و بر متابولیسم کربن گیاه تاثیر و رشد و عملکرد گیاهان را افزایش می دهد (Badiger, et al., 2017). افزایش رشد گیاه با کاربرد متانول در محصولات زراعی و گیاهان زینتی گزارش شده است (Rezaeieh et al., 2015). محلول‌پاشی متانول فعالیت آنزیمی و چرخه کربن را در گیاهان، تحت تاثیر قرار می‌دهد (Badiger, et al., 2017). گزارش شده است که محلول‌پاشی متانول منجر به افزایش فتوسنتز خالص در پنبه افزایش گردیده است (He et al., 2013). تحت شرایط خشکی، اسپری متانول بر روی محصولات زراعی مانند پنبه و سویا، نیازهای آبی محصولات را کاهش می‌دهد و توانایی آنها را برای مقابله با تنش خشکی افزایش می‌دهد (Mirakhori et al., 2009). همچنین متانول باعث افزایش تعداد روزهای بین دوره‌های آبیاری و کاهش مصرف آب کشاورزی می‌شود (Nonomura and Benson, 1992). با توجه به اهمیت و ارزش اقتصادی گیاه سیاه دانه در صنایع داویی و اینکه تحقیقات قابل توجهی در زمینه واکنش‌های این گیاه به تیمار سالسیلیک اسید و متانول تحت تنش خشکی صورت نگرفته است، هدف از این تحقیق بررسی شاخص‌های رشدی گیاه سیاه دانه به تیمار سالسیلیک اسید و متانول تحت تنش خشکی و تعیین آستانه تحمل این گیاه به تنش خشکی می باشد.

## ۲. مواد روشها

### ۲-۱. ماده گیاهی و شرایط کاشت

بذور سالم و عاری از علف هرز سیاه دانه از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد تهیه شد. بذور سیاه دانه به منظور پخش یکنواخت با ماسه بادی مخلوط شدند و در کرت‌هایی به مساحت ۱/۲ متر مربع (به ابعاد ۱/۲×۱ متر) بصورت خشکه کاری و دست‌پاش در عمق ۲-۳ سانتیمتری کشت شدند. فاصله بین کرت‌ها ۰/۵ متر و فاصله بین بلوک‌ها یک متر بود. گیاهچه‌های سیاه‌دانه در مرحله چهار برگی برای دستیابی به فاصله بوته مناسب (۲ سانتی‌متر) تنک شدند. عملیات زراعی شامل کنترل علف‌های هرز، مبارزه با آفات و بیماری‌ها در طول فصل رشد انجام گرفت.

### ۲-۲. طرح آزمایشی

آزمایش به صورت کرت‌های دو بار خرد شده با سه فاکتور بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹۸ انجام شد که در آن تنش آبیاری (خشکی) با ۴ سطح (بدون تنش، آبیاری در زمان ۸۰ درصد ظرفیت زراعی خاک (تنش ملایم)، آبیاری در زمان ۶۰ درصد ظرفیت زراعی خاک (تنش متوسط)، آبیاری در زمان ۴۰ درصد ظرفیت زراعی خاک (تنش شدید) به عنوان فاکتور اصلی و غلظت‌های مختلف نیتروژن با ۴ سطح (شاهد، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ کیلوگرم در هکتار) به عنوان فاکتور فرعی و غلظت‌های مختلف متانول با ۳ سطح (۰، ۱۰ و ۳۰ درصد) به عنوان فاکتور فرعی فرعی مورد بررسی قرار گرفتند. برای افزایش میزان چسبندگی محلول متانول، به هر یک از غلظت های متانول، مقدار دو گرم بر لیتر گلایسین، یک گرم بر لیتر تتراهیدروفولات به عنوان کاتالیزور و یک گرم بر لیتر توئین ۸۰ اضافه شد. بعد از پایان دوره تیمار نیتروژن، متانول و تنش خشکی در مرحله رشد کامل گیاه (قبل از گلدهی)، نمونه برداری از هر واحد آزمایشی انجام و عصاره پروتئینی و عصاره ترکیبات فیتوشیمایی استخراج شدند.

### ۲-۳. اندازه گیری محتوای پروتئین

برای استخراج پروتئین ها از روش طالعی و همکاران (۲۰۱۲) استفاده گردید. در این روش مقدار یک گرم نمونه برگی درون هاون‌های ضدعفونی شده همراه با ازت مایع به خوبی پودر شدند، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر استخراج هپس (حاوی ۲۰ میلی‌مولار HEPES/KOH با pH ۷/۵ ، ۴۰ میلی‌مولار پتاسیم کلرید، ۱ میلی‌مولار اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، ۱۰ درصد گلیسرول، ۰/۶ درصد بتامرکاپتو اتانول و ۱ درصد پلی وینیل پلی پیرولیدون) به هر نمونه اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه ورتکس شدند و ۲-۳ مرتبه در ۲۰۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ فاز رویی نمونه‌ها به داخل لوله‌های سترون انتقال داده شد و کمیت پروتئین‌های محلول در برگ با استفاده از روش بردفورد انجام گرفت (Bradford, 1976).

### ۲-۴. اندازه گیری درصد روغن، اسانس و تیموکینون

به منظور اندازه‌گیری روغن و اسانس سیاه‌دانه از روش مجاب و همکاران (۱۳۸۲) استفاده گردید.در این روش ابتدا ۲۵ گرم از بذور پس وزن، آسیاب شدند و توسط حلال اتر نفت به مدت ۴ ساعت توسط دستگاه سوکسله استخراج گردید. سپس عصاره تحت خلا تغلیظ شد. ۱ میلی‌لیتر از عصاره غلیظ شده، در ۲۰ میلی‌لیتر اتر نفت حل کرده و به آن ۲ میلی‌لیتر محلول پتاس متانولی ۲ مولار اضافه گردید. مخلوط دو دقیقه تکان داده شد و سپس ۱۰ دقیقه ثابت ماند. لایه بالایی برداشته و با آب شسته شد. در نهایت مقدار روغن بر حسب درصد بیان گردید. به منظور استخراج اسانس، ۲۵ میلی‌لیتر از این عصاره تغلیظ شده، به مدت ۴ ساعت با آب تقطیر گردید. سپس حاصل تقطیر با هگزان نرمال استخراج شد. لایه آلی برداشته و تحت خلا تغلیظ گردید تا به حجم ۱ میلی‌لیتر برسد.

روغن اسانس به صورت لایه‌ای مجزا روی آب تشکیل شد که با سرنگ کاملا تمیز از لوله آزمایش خارج شد و به شیشه مات منتقل شد. سپس اسانس حاصل با سولفات سدیم انیدر آبگیری شد و با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MC) (مدل Agilent 7890B GC System-5977AMSD) مجهز به ستون مویینه HP-5ms (به طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر) تجزیه شد. گاز حامل هلیوم (۹۹/۹۹۹ درصد) با میزان جریان ۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه و نسبت شکافت نمونه ۱ به ۱۰۰ بود. مقادیر نسبی اجزای اسانس (تیموکینون، کارواکرول، پارا-سیمن و آلفا-پینن) از روی سطح کل پیک‌ها توسط نرم‌افزار دستگاه محاسبه شد.

### ۲-۵. تجزیه آماری

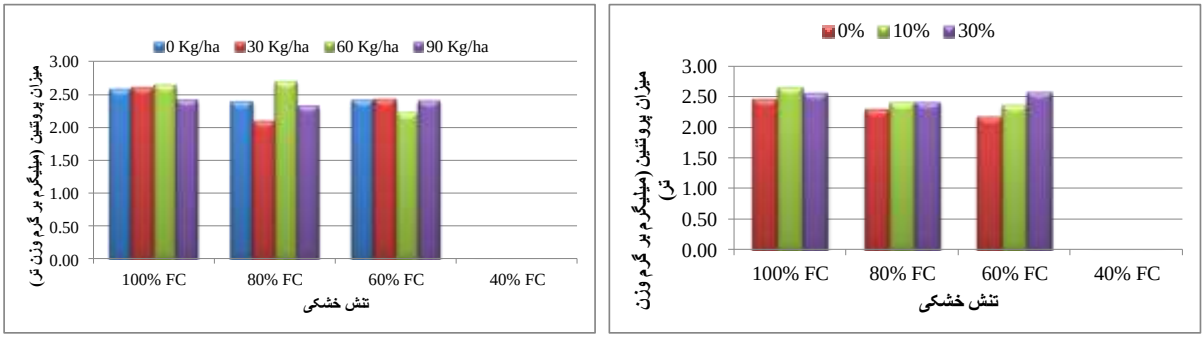
تجزیه و تحلیل داده های حاصل از آزمـایش با استفاده از نرم افزار SPSS26 انجام شد و برای مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنـه‌ای دانکـن در سطح یک درصد و برای رسم نمودار ها و گرافها از اکسل استفاده شد.

## ۳. نتایج و بحث

### ۳-۱. محتوای پروتئین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین سطوح مختلف فاکتورهای نیتروژن، متانول و آبیاری و اثرات متقابل دوگانه آبیاری و نیتروژن، آبیاری و متانول، و نیتروژن و متانول و اثرات متقابل (نیتروزن، متانول و آبیاری) در سطح یک درصد براساس محتوای پروتئین برگ وجود داشت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش تنش خشکی محتوای پروتئین برگ نسبت به شاهد کاهش یافت، به طوریکه در تنش شدید خشکی تمام برگهای گیاه ریزش نمودند. کاربرد نیتروژن با غلظت کم ۳۰ باعث افزایش میزان پروتئین نسبت کنترل شد، در حالیکه غلظت های بالای نیتروژن (۶۰ و ۹۰ کیلوگرم در هکتار) باعث کاهش معنی دار میزان پروتئین نسبت به شاهد شد. محلول‌پاشی متانول باعث افزایش میزان پروتئین برگ نسبت به شاهد شد و بیشترین افزایش میزان پروتئین برگ مربوط به سطح متانول ۳۰ درصد با میانگین ۱/۸۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود.

نتایج مقایسه میانگین همچنین نشان داد که بیشترین میزان پروتئین برگ در اثر متقابل سه گانه تنش متوسط آبیاری، کاربرد ۹۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و ۳۰ درصد محلول پاشی متانول به مقدار ۲/۹۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد، در حالیکه کمترین مقدار سرعت جذب خالص در اثر متقابل سه گانه تنش ملایم، کاربرد ۹۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و صفر درصد محلول پاشی متانول به مقدار ۱/۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بدست آمد. بیشترین میزان پروتئین برگ در اثر متقابل کاربرد ۹۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار با ۳۰ درصد محلول پاشی متانول به مقدار ۲/۰۲ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ بوده که نسبت به اثر متقابل سه گانه تنش متوسط آبیاری، کاربرد ۹۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و ۳۰ درصد محلول پاشی متانول ۳۱/۹۹ درصد کاهش داشت و کمترین میزان پروتئین برگ در اثر متقابل کاربرد ۹۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار با صفر درصد محلول پاشی متانول به مقدار ۱/۴۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بوده که نسبت به کمترین میزان پروتئین برگ در اثر متقابل سه گانه تنش ملایم، کاربرد ۹۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و صفر درصد محلول پاشی متانول ۱۷/۱۴ درصد کاهش داشت. نتایج نشان داد که کاربرد ۶۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در شرایط تنش ملایم آبیاری بیشترین میزان پروتئین برگ (۲/۷۰) و عدم کاربرد نیتروژن در شرایط تنش متوسط آبیاری کمترین میزان پروتئین برگ (۱/۸۶) در مقایسه با دیگر اثرات متقابل دو گانه سطوح آبیاری و نیتروژن بود (شکل ۱). نتایج همچنین نشان داد که کاربرد ۱۰ درصد متانول در شرایط آبیاری کنترل بیشترین میزان سرعت جذب خالص (۲/۶۶) و عدم کاربرد متانول در شرایط تنش متوسط آبیاری کمترین میزان پروتئین برگ (۲/۱۷) در مقایسه با دیگر اثرات متقابل دو گانه سطوح آبیاری و متانول بود (شکل ۱).




شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و نیتروژن و اثر متقابل آبیاری و متانول میزان پروتئین برگ

کاهش میزان پروتئین می‌تواند به دلیل افت شدید فتوسنتز در شرایط افزایش خشکی و متعاقبا کاهش پیش ماده‌های تولید کننده پروتئین باشد که منجر به کاهش سنتز پروتئین‌ها می‌شود (Mohammadkhani and Heidari, 2008). کمبود آب با تولید گونه‌های اکسیژن فعال باعث اکسیداسیون اسیدهای آمینه به گروه‌های کربونیل و صدمه به پروتئین‌ها می‌شود که در نهایت پروتئین‌ها توسط پروتئازها هضم می‌شوند (Takeda et al., 1995). تنش خشکی میزان پروتئین برگ گیاه دارویی شوید (Setayeshmehr and Ganjali 2013) و گیاه سیاه‌دانه را کاهش داد (احمدپور دهکردی و بلوچی، ۱۳۹۱) که نتایج مطالعه ما با مطالعات فوق مبنی بر کاهش پروتئین با افزایش شدت کم آبی مطابقت داشت.

هورمون‌های اکسین و سیتوکینین در افزایش پروتئین‌سازی در گیاهان نقش مهمی دارند و از آنجا که متانول باعث افزایش فعالیت باکتری‌های متیلوتروفیک می‌شود، در نهایت این باکتری‌ها با فراهم کردن پیش‌ماده ساخت بعضی از هورمون‌ها مانند اکسین و سیتوکینین می‌توانند باعث افزایش تولید اکسین و سیتوکینین در گیاه شوند (Ivanova et al., 2001) که این امر در نهایت منجر به افزایش پروتئین می‌شود. متانول با تحریک سنتز مداوم پروتئین محلول در برگ‌های گیاهان باعث تاخیر در پیری برگ و در نهایت افزایش عملکرد فتوسنتز می‌شود (Wu et al., 2013). افزایش پروتئین کل با محلول‌پاشی متانول در گیاهانی مانند نخود (حسین‌زاده و همکاران، ۱۳۹۴) و بادام زمینی (Vyshkayy et al., 2008) نیز گزارش شده است که نتایج ما با مطالعات فوق مطابقت داشت.

مقدار پروتئین‌های محلول برگ ذرت در تیمار نیتروژن بیشتر از شاهد بود (منصوری‌فر و همکاران، ۱۳۸۴) که نتایج ما با مطالعه فوق مطابقت داشت. کمبود نیتروژن بر روی تغییرات پروتئین برگ‌ها در طی دوره تنش تاثیر منفی گذاشته و مقاومت گیاهان را در برابر تنش کاهش می دهد (کشفی، ۱۳۸۸). از آنجا که نیتروژن در ساختار پروتئین‌ها به ویژه پروتئین‌های فتوسنتزی مثل آنزیم رابیسکو حضور دارد، از این رو سطوح کم نیتروژن تا حدی بر روی تغییرات پروتئین برگ‌ها در طول دوره خشکی تاثیر منفی گذاشته و مقاومت گیاهان را در تنش کاهش می‌دهد که این نتیجه با نتایج مطالعه منصوری‌فر و همکاران (۱۳۸۴) مطابقت داشت.

### ۳-۲. روغن

نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن روغن و درصد وزن روغن به ترتیب با مقدار ۱۰/۴ گرم و ۸۶/۷ درصد تحت تنش ملایم به دست آمد، در حالیکه بیشترین حجم روغن تحت تنش شدید با مقدار ۱۲/۵ میلی‌لیتر حاصل شد (جدول ۱). با بررسی نتایج مشخص شد که با افزایش سطوح نیتروژن منجر به افزایش وزن روغن، حجم روغن و درصد وزن روغن در مقایسه با عدم کاربرد نیتروژن می‌شود به طوری که بیشترین افزایش به ترتیب با مقدار ۱۱/۱ گرم، ۱۰/۶ میلی‌لیتر و ۹۲/۵ درصد در تیمار ۹۰ کیلوگرمدر هکتار نیتروژن مشاهده شد. نتایج نشان داد که محلول‌پاشی هر دو سطح متانول باعث کاهش وزن روغن، حجم روغن و درصد وزن روغن می‌شوند به طوری که بیشترین میزان این صفات با عدم کاربرد متانول به دست آمد. بیشترین کاهش این صفات در متانول ۱۰ درصد رخ داد.

درصد روغن گیاه همیشه بهار تحت تنش خشکی افزایش یافت (Shubhra et al., 2004) که با نتایج این مطالعه مبنی بر افزایش درصد حجم روغن تحت تنش ملایم مطابقت دارد. اعمال تنش خشکی میزان روغن را در گیاه مرزنجوش افزایش داد (Rhizopoulous and Diamatoglon, 1991) و همچنین تیمار خشکی سبب افزایش روغن سیاه‌دانه شد (حیدری و جهان تیغی، ۱۳۹۲) که با نتیجه این مطالعه مبنی بر افزایش روغن تحت تنش کم‌آبی مطابقت داشت. کاهش درصد روغن با محلول‌پاشی متانول در این مطالعه با تحقیقات دیگر بر گیاهانی چون کدوی تخم کاغذی (نصراللهی و همکاران، ۱۳۹۱) و سویا (Mirakhori, 2008) مطابقت نداشت. در گیاه همیشه بهار بیشترین عملکرد و درصد روغن تحت تیمار ۶۰ و ۹۰ کیلوگرم نیتروژن به دست آمد (Valadabadi et al., 2010) که نتایج مطالعه ما مبنی بر افزایش میزان روغن با کاربرد نیتروژن با مطالعه فوق مطابقت داشت. افزایش سطوح نیتروژن، درصد روغن کدوی تخم کاغذی را کاهش داد (آقایی و احسانزاده، ۱۳۹۰). کاهش درصد روغن در سطوح

بالای نیتروژن با مطالعه آقایی و احسانزاده (۱۳۹۰) مطابقت داشت. در واقع با افزایش سطوح نیتروژن، افزایش فراهمی نیتروژن در محلول خاک و افزایش جذب آن توسط گیاه، مقدار پروتئین‌های مختلف در گیاه از جمله در سلول‌های دانه‌ها افزایش می‌یابد و احتمالا مقدار پروتئین در دانه با درصد روغن دارای نسبت عکس می‌باشد (آقایی و احسانزاده، ۱۳۹۰). افزایش روغن سیاه‌دانه با تیمار نیتروژن نیز در مطالعه ولی‌پورچهارده چریکی و همکاران (۱۳۹۶) نیز گزارش شده است.

### ۳-۳. درصد اسانس

بررسی نتایج نشان داد که بیشترین حجم اسانس و درصد حجم اسانس به ترتیب با مقدار ۸/۱ میلی‌لیتر و ۷۷/۹ درصد مربوط به تنش ملایم بود ولی بیشترین درصد وزن اسانس در تیمار تنش متوسط با مقدار ۵۷/۳ درصد مشاهده شد. بیشترین وزن اسانس در تیمار آبیاری شاهد با مقدار ۵/۴۱ گرم به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱- حجم و وزن اسانس، حجم و وزن روغن، درصد حجم اسانس، درصد وزن اسانس، درصد وزن روغن و درصد تیموکینون در سطوح مختلف آبیاری، متانول و نیتروژن در گیاه سیاه دانه

| سطوح فاکتورها | حجم اسانس (ml) | وزن اسانس (g) | درصد حجم اسانس | درصد وزن اسانس | وزن روغن (g) | حجم روغن (ml) | درصد وزن روغن |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| شاهد | 7.2 | 5.41 | 60 | 54.1 | 10 | 12 | 83.3 |
| تنش ملایم | 8.1 | 5.26 | 77.9 | 50.6 | 10.4 | 10.4 | 86.7 |
| تنش متوسط | 5.41 | 4.7 | 54.1 | 57.3 | 8.2 | 10 | 68.3 |
| تنش شدید | 3.3 | 1.8 | 26.4 | 18 | 10 | 12.5 | 83.3 |
| ۰ | 0.92 | 0.92 | 9.2 | 11.2 | 8.2 | 10 | 68.3 |
| ۳۰ Kg/ha N | 5.95 | 5.95 | 56.7 | 57.8 | 10.3 | 10.5 | 85.8 |
| ۶۰ Kg/ha N | 5.5 | 4.5 | 52.4 | 42.9 | 10.5 | 10.5 | 87.5 |
| ۹۰ Kg/ha N | 6.2 | 5.12 | 58.5 | 46.1 | 11.1 | 10.6 | 92.5 |
| ۰ | 5 | 4.5 | 33.3 | 37.2 | 12.1 | 15 | 75.6 |
| ۱۰٪ متانول | 1.4 | 1.38 | 12.3 | 14.7 | 9.38 | 11.4 | 58.6 |
| ۳۰٪ متانول | 4.5 | 3.6 | 36 | 34.3 | 10.5 | 12.5 | 65.6 |

نتایج نشان داد که متانول باعث کاهش حجم اسانس، وزن اسانس و درصد وزن اسانس نسبت به عدم کاربرد متانول شدند ولی درصد حجم اسانس با محلول‌پاشی ۳۰ درصد متانول افزایش یافت. با بررسی نتایج مشخص شد که افزایش سطوح نیتروژن منجر به افزایش حجم اسانس و درصد حجم اسانس در مقایسه با عدم کاربرد نیتروژن می‌شود به طوری که بیشترین افزایش به ترتیب با مقدار ۶/۲ میلی‌لیتر و ۵۸/۵ درصد در تیمار ۹۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن مشاهده شد و بیشترین وزن اسانس و درصد وزن اسانس به ترتیب با مقدار ۵/۹۵ گرم و ۵۷/۸ درصد مربوط به تیمار ۳۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بود (جدول ۱).

افزایش میزان اسانس با اعمال تنش خشکی در مطالعه ما، در گیاهانی مانند ریحان (Simon et al.,1992)، ریحان و آویشن (Letchamo et al., 1994) و گیاه گشنیز (نورزاد و همکاران، ۱۳۹۳)، نیز مشاهده شده است. نوع الکل، ساختار شیمیایی و همچنین متابولیسم آنها می‌تواند بر مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی اثرات مختلفی داشته باشد. یکی از راه‌های تغییر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی (مانند متابولیت‌های اجزای اسانس) مواجه شدن با تنش‌ها و یا هر محرکی است که بتواند مسیر بیوسنتز را تحت تاثیر قرار دهد (ساجدی مقدم و همکاران، ۱۳۹۱).

افزایش درصد حجم اسانس با کاربرد متانول در سایر مطالعات بر روی گیاهانی مثل اسطوخدوس (Bagheri et al., 2014)، بادرنجبویه (حدادی و همکاران، ۱۳۹۵)، نعناع فلفلی (نورافکن و کلانتری، ۱۳۹۵) و آویشن باغی (ساجدی مقدم و همکاران، ۱۳۹۱) گزارش شده است. افزایش درصد اسانس با کاربرد متانول را می‌توان علاوه بر نقش تغذیه‌ای الکل‌ها به عنوان یک منبع مستقیم و سهل الوصول کربنی، به واکنش گیاه در مقابل غلظت‌های بالای الکل‌ها در داخل بافت‌های گیاه (همچون هنگام دریافت تنش‌های محیطی) نیز نسبت داد (Gout et al., 2000). افزایش میزان اسانس با تیمار نیتروژن در گیاهان شوید (Bist et al., 2000)، گیاه نعناع فلفلی (حکم‌علی‌پور، ۱۳۹۶)، نعناع (امیدبیگی، ۱۳۹۰)، رازیانه (Khan

et al., 1992) و سیاه‌دانه (ولی‌پورچهارده چریکی و همکاران، ۱۳۹۶) نیز مشاهده شده است که با نتایج مطالعه ما مبنی بر افزایش میزان اسانس با کاربرد نیتروژن در یک راستا می‌باشد.

### ۳-۴. درصد تیموکینون، کارواکرول، پارا-سیمن و آلفا-پینن

بیشترین درصد تیموکینون با مقدار ۵۶/۰۶۲ درصد تحت شرایط آبیاری شاهد به دست آمد. سطوح نیتروژن درصد تیموکینون را نسبت به عدم کاربرد نیتروژن کاهش دادند و بیشترین مقدار تیموکینون مربوط به عدم کاربرد نیتروژن بود. کاربرد متانول ۱۰ درصد باعث افزایش درصد تیموکینون در مقایسه با عدم کاربرد متانول شد (جدول ۲).

جدول ۲- درصد تیموکینون، کارواکرول، پارا-سیمن و آلفا-پینن در سطوح مختلف آبیاری، متانول و نیتروژن در گیاه سیاه دانه

| سطوح فاکتورها | تیموکینون ٪ | کارواکرول ٪ | پارا-سیمن ٪ | آلفا-پینن ٪ |
|---|---|---|---|---|
| شاهد | 56.062 | 1.068 | 11.125 | 0.818 |
| تنش ملایم | 23.521 | 4.78 | 28.96 | 0.619 |
| تنش متوسط | 50.808 | 1.277 | 16.879 | 0.329 |
| تنش شدید | 27.83 | 1.935 | 5.822 | 0.656 |
| ۰ | 41.012 | 0.892 | 25.549 | 1.618 |
| ۳۰ Kg/ha N | 23.325 | 0.962 | 29.731 | 2.616 |
| ۶۰ Kg/ha N | 22.925 | 0.351 | 36.79 | 3.612 |
| ۹۰ Kg/ha N | 24.464 | 0.434 | 34.615 | 3.498 |
| ۰ | 22.941 | 0.608 | 34.807 | 3.565 |
| ۱۰٪ متانول | 57.982 | 1.285 | 12.678 | 0.277 |
| ۳۰٪ متانول | 29.12 | 0.610 | 35.552 | 2.17 |

با این حال سطوح تنش خشکی مقدار تیموکینون را کاهش دادند. در یک تحقیق مشاهده شد که با اعمال تنش خشکی کنترل شده بر شیرین بیان، بیان ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز ساپونین‌های تری ترپنوئید افزایش یافته و بدین ترتیب تولید متابولیت‌های ثانویه بیشتر شد (نصراللهی و همکاران، ۱۳۹۱). با اینکه مطالعات دیگر افزایش تیموکینون را در گیاه سیاه‌دانه با کاربرد نیتروژن گزارش کرده‌اند (El-Sayed et al., 2000)، با این حال در مطالعه ما کاربرد نیتروژن میزان تیموکینون را کاهش داد. کاربرد تیمارهای هیدروالکلی متانول بر گیاه دارویی بادرنجبویه توانست باعث افزایش و تغییر در بیوسنتز اجزای تشکیل دهنده اسانس شود (Khosravi et al., 2012) که با مطالعه ما مبنی بر افزایش تیموکینون با کاربرد متانول ۱۰ درصد مطابقت داشت.

بیشترین درصد کارواکرول با مقدار ۴/۷۸ درصد تحت شرایط تنش ملایم به دست آمد و بیشترین مقدار کارواکرول با کاربرد ۳۰ کیلوگرم نیتروژن با مقدار ۰/۹۶۲ درصد مشاهده شد کاربرد متانول ۱۰ درصد در هر دو مکان، درصد کارواکرول را در مقایسه با عدم کاربرد متانول افزایش داد (جدول ۲).

درصد کارواکرول درگیاهان آویشن باغی و آویشن دنایی تحت تنش خشکی بیشتر از گیاهان بدون تنش بود (Alavi-Samani et al., 2015). همچنین در دو گونه از آویشن (*Thymus transcaucasicus* و *T. trautvetterii*) تحت تنش خشکی، مقدار کارواکرول در دو شرایط تنش ملایم و شدید زیاد بود (یوسف‌زاده و همکاران، ۱۳۹۴). افزایش کارواکرول تحت شرایط تنش ملایم با افزایش کارواکرول در آویشن تحت شرایط تنش رطوبتی (Timmermann et al., 1984) و نیز افزایش کارواکرول در گیاه مرزه (Baher et al., 2002) و مرزنجوش (Said-Al Ahl et al., 2009) در شرایط تنش خشکی ملایم همخوانی داشت. بیشترین مقدار کارواکرول در گیاه آویشن باغی با محلول‌پاشی با متانول به دست آمد (ساجدی مقدم و همکاران، ۱۳۹۱) که مطالعه ما با مطالعه فوق مطابقت داشت. کاربرد نیتروژن در مطالعه جباری و همکاران (۱۳۹۱) باعث کاهش میزان کارواکرول در گیاه آویشن باغی شد که با نتایج مطالعه ما مبنی بر کاهش میزان کارواکرول در سطوح بالای نیتروژن (۶۰ و ۹۰ کیلوگرم نیتروژن) مطابقت داشت.

بیشترین درصد پارا-سیمن در هر دو مکان تحت شرایط تنش ملایم به دست آمد. بیشترین درصد پارا-سیمن مربوط به کاربرد ۶۰ کیلوگرم نیتروژن بود. محلول‌پاشی ۳۰ درصد متانول (با ۳۵/۵۵۲ درصد) مقدار پارا-سیمن را افزایش داد (جدول ۲).

درصد پارا-سیمن درگیاهان آویشن باغی و آویشن دنایی تحت تنش خشکی بیشتر از گیاهان بدون تنش بود (Alavi-Samani et al., 2015) و همچنین در آویشن باغی در تنش ملایم (Letchamo and Gosselin, 1995)، در مرزنجوش (Said-Al Ahl et al., 2009)، آویشن دنایی (Bahreininejad et al., 2013) و زیره سیاه (Laribi et al., 2009) تحت تاثیر تنش خشکی شدید افزایش نشان داد. نصراللهی و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه خود نشان دادند که با اعمال تنش خشکی کنترل شده بر شیرین بیان، بیان ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز ساپونین‌های تری ترپنوئید افزایش یافته و بدین ترتیب تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه بیشتر شد. افزایش پارا-سیمن با کاربرد نیتروژن با نتایج مطالعه پیوندی و همکاران (۱۳۸۸) در گیاه درمنه شیرین با کاربرد ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ کیلوگرم کود اوره در هکتار مطابقت داشت.

بیشترین درصد آلفا-پینن با مقدار ۰/۸۱۸ درصد تحت شرایط آبیاری شاهد به دست. کاربرد ۶۰ کیلوگرم نیتروژن درصد آلفا-پینن افزایش یافت کاهش میزان آلفا-پینن تحت شرایط خشکی نسبت به شرایط بدون خشکی، با مطالعه احمدیان و نورزاد (۱۳۹۳) در گیاه گشنیز مطابقت داشت. افزایش آلفا-پینن با کاربرد نیتروژن با نتایج مطالعه پیوندی و همکاران (۱۳۸۸) در گیاه درمنه شیرین با کاربرد ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ کیلوگرم کود اوره در هکتار مطابقت داشت. با اینکه تولید متابولیت‌های ثانویه توسط ژن‌ها کنترل می‌شود، اما تولید آنها توسط شرایط محیطی همچون آب و عناصر غذایی کم مصرف و پر مصرف نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Sharifi Ashourabadi et al., 2006).

## ۴. منابع

احمدپور دهکردی، س.، بلوچی،ح.ر.، ۱۳۹۱، اثر پرایمینگ بذر بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول گیاهچه سیاهدانه (Nigella sativa L.) تحت تنش شوری و خشکی، مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی، ۵ (۴): ۶۳-۸۵.

احمدیان، ا.، نورزاد، س.، ۱۳۹۳، بررسی تاثیر تنش کم آبی و مراحل برداشت بر عملکرد کمی و کیفی گیاه دارویی گشنیز (Coriandrum sativum L.) در شرایط تربت حیدریه، نشریه بوم شناسی کشاورزی، ۶(۱): ۱۴۱-۱۳۰.

آقایی ا.ج.، احسانزاده پ.، ۱۳۹۰، اثر رژیم آبیاری و نیتروژن بر عملکرد و برخی پارامترهای فیزیولوژیک گیاه داروئی کدوی تخم کاغذی، مجله علوم باغبانی ایران، ۴۲ (۳): ۲۹۱-۲۹۹.

امید بیگی، ر.، ۱۳۹۰، تولید و فرآوری گیاهان دارویی، انتشارات آستان قدس رضوی، جلد دوم، ۳۴۸ صفحه.

پیوندی، م.، رفعتی، ا.، میرزا، م.، ۱۳۸۸، تاثیر ازت و فسفر بر رشد و میزان اسانس .Artemisia annua L، تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۵ (۱): ۷۵-۸۴.

ساجدی مقدم، س.، مهرآفرین، ع.، نقدی‌بادی، ح.ع.، پازکی، ع.ر.، قوامی، ن.، ۱۳۹۱، ارزیابی عملکرد فیتوشیمیایی گیاه آویشن باغی (Thymus vulgaris L.) تحت محلول‌پاشی هیدروالکل‌ها، فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۱ (۴): ۱۳۰-۱۴۰.

حسین زاده، س.ر.، سلیمی، ا.، گنجعلی، ع.، احمدپور، ر.، ۱۳۹۴، اثر کاربرد متانول بر برخی ویژگی های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در گیاه نخود (Cicer arietinum L.) تحت تنش خشکی، مجله فیزیولوژی و بیوشیمی گیاهی ایران، ۱ (۱): ۱۷-۳۰.

حدادی، ه.، مرادی، پ.، مطلبی، ا.، ۱۳۹۵، تأثیر محلول پاشی متانول و سولفات منگنز بر میزان و اجزای اسانس بادرنجبویه (Melissa officinalis L.)، فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۵ (۲): ۸۰-۸۸.

حیدری، م.، جهان تیغی، ح.، ۱۳۹۲، ارزیابی اثر تنش خشکی و مقادیر مختلف کود نیتروژن بر خصوصیات کیفی دانه گیاه دارویی سیاهدانه، نشریه پژوهشهای زراعی ایران، ۱۱ (۴): ۶۴۷- ۶۴۰.

کشفی، م.ح.، ۱۳۸۸، بررسی تاثیر تنش خشکی و نیتروژن بر خصوصیات پروتئین‌های محلول و برخی صفات فیزیولوژیکی در دو رقم سورگوم علوفه‌ای، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه رازی.

مجاب، ف.، نیک آور، ب.، جاویدنیا، ک.، رودگر آملی، م.ع.، ۱۳۸۲، ترکیب شیمیایی اسانس و روغن سیاه دانه، فصلنامه گیاهان دارویی، ۶: ۲۱-۲۶.

منصوری‌فر، س.، مدرس ثانوی، س.ع.م.، جلالی جواران، م.، ۱۳۸۴، تاثیر تنش خشکی و کمبود نیتروژن بر تغییرات کمی و کیفی پروتئین‌های محلول در برگ ذرت، مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۶ (۳): ۶۲۵-۶۳۷.

نصراللهی، و.، میرزایی اصل، ا.، پیری، خ.، ناظری، س.، ۱۳۹۱، اثر تنش آبی پلی اتیلن گلیکول بر میزان بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی تری‌ترپن ساپونین‌ها در گیاهچه‌های شیرین بیان (Glycyrrhiza glabra)، دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران، تهران، انجمن ژنتیک ایران.

نورافکن، ح.، کلانتری، ز.، ۱۳۹۵، اثر محلول‌پاشی با متانول و اتانول بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی نعناع فلفلی، فصلنامه بوم‌شناسی گیاهان زراعی، ۱۲ (۴): ۱-۹.

نورزاد، س.، احمدیان، ا.، مقدم، م.، دانشفر، ا.، ۱۳۹۳، اثر تنش خشکی بر عملکرد، اجزای عملکرد و اسانس گیاه دارویی گشنیز تحت تأثیر انواع کود آلی و شیمیایی، به‌زراعی کشاورزی، ۱۶ (۲): ۲۸۹-۳۰۲.

ولیپور چهارده چریکی، ی.، عبدلزاده، ا.، قادریفر، ف.، ۱۳۹۶، اثر انواع و مقادیر متفاوت کود نیتروژن بر میزان رشد، کلروفیل، روغن و اسانس گیاه دارویی سیاه دانه (Nigella sativa L.)، نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۲ (۴۵): ۶۸-۸۰.

یوسف زاده، ک.، هوشمند، س.، شیران، ب.، زینلی، ح.، هادیان، ج.، قیصری، م.م.، ۱۳۹۴، بررسی اثر تنش خشکی بلندمدت بر کمیت و کیفیت اسانس گونه های مختلف جنس Thymus spp. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۳ (۴): ۱-۱۴.

Adam Mariod A., Elwathig M., Mirghani S., Hussein I., Nigella sativa L., Black Cumin. Unconventional Oilseeds and Oil Sources. 73–80. 2017.

Alavi-Samani, S.M., Kachouei, M.A., Pirbalouti, A.G., Growth, yield, chemical composition, and antioxidant activity of essential oils from two thyme species under foliar application of jasmonic acid and water deficit conditions, Horticulture, Environment, and Biotechnology, 56(4), 411-420. 2015.

Ashraf, M., Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants, Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants. 199(5): 361-376. 2004.

Badiger B., Hunje R., Biradar D.P., Biradarpatil N.K., Gurumurthy R., Mugali S., Effect of Foliar Application of Micronutrients and Methanol on Seed Yield of Soybean. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 6(10): 1442-1450. 2017.

Bagheri H.R. Ladan Moghadam A.R., Afshari H., The effects of foliar application of methanol on growth and secondary metabolites in lavender. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 8 (2): 150-152. 2014.

Baher, Z.F., Mirza, M., Ghorbanli, M., Bagher Rezaii, M., The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. Flavour and Fragrance Journal, 17(4), 275-277. 2002.

Bahreininejad, B., Razmjoo, J., Mirza, M., Influence of water stress on morpho-physiological and phytochemical traits in *Thymus daenensis*. Int. J. Plant Prod., 7(1), 151-166. 2013.

Bradford, MM., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72(1–2): 248–254. 1976.

El-Sayed, K.A., Ross, S.A., El-Sohly, M.A., Khalafall, M.M., Abdel Halim, O.B., Ikegami, F., Effect of different fertilizers on the amino acid, fatty acid and essential oil composition of *Nigella sativa* seeds, Saudi Pharm. J., 8, 175-182. 2000.

Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rebeille, F., Nonomura, A.R., Benson, A.A., Douce, R., Metabolism of methanol in plant cells, Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies, Plant Physiol., 123, 287–296. 2000.

He, Z.L., Bai, Y.R., Wang, J., Ti, X.N., Effects of exogenous methanol on Rubisco and photosynthetic diurnal variation in cotton during flower-bolling stage. Journal of Xinjiang Agricultural University, 36, 218−223. 2013.

Ivanova, E.G., Dornina, N.V., and Trotsenko, Y.A., Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. Microbiology 70: 392-397. 2001.

Khan, M.M.A, Afag, s., Afidi, M.M.R.K., Yield and quality of fennel (Foeniculum vulgare. mill) in relation to base and foliar application to nitrogen and phosphorus, J. Plant Nut., 15(11), 2505-2515. 1992.

Khosravi E, Mehrafarin A, Naghdibadi H, Hajiabadi R, Khosravi M. The phytochemical response of (Melissa officinalis L.) to foliar application of hydro-alcoholic solutions (methanol and ethanol). J. Herbal Drugs 1: 21 – 5. 2012.

Laribi, B., Bettaieb, I., Kouki, K., Sahli, A., Mougou, A., Marzouk, B., Water deficit effects on caraway (Carum carvi L.) growth, essential oil and fatty acid composition, Indus. Crop. Prod., 30(3), 372-379. 2009.

Letchamo, W., Gosselin, A., Effects of HPS supplemental lighting and soil water levels on growth, essential oil content and composition of two thyme (Thymus vulgaris L.) clonal selections, Can. J. Plant Sci., 75(1), 231-238. 1995.

Mirakhori M., Farzad Paknejad, Foad Moradi, Mohammadreza Ardakani, Hossein Zahedi and Parisa Nazeri, Effect of Drought Stress and Methanol on Yield and Yield Components of Soybean Max (L 17). American Journal of Biochemistry and Biotechnology 5 (4): 162-169. 2009.

Mohammadkhani, N., Heidari, R., Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties, Turk. Biol., 32, 23-30. 2008.

Nonomura, A., & Benson, A., The path of carbon in photosynthesis: improved crop yields with methanol. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89(20), 9794-9798. 1992.

Peng, S., Buresh, R.J., Huang, J., Yang, J., Zou, Y., Zhong, X., Wang, G., & Zhang, F., Strategies for overcoming low agronomic nitrogen use efficiency in irrigated rice system in China, Field Crop. Res. 96, 37-47. 2006.

Razmjoo K., Heydarizadeh P, Sabzalian MR., Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of Matricaria chamomila. Int. J. Agri. Biol., 10: 451–454. 2008.

Rezaeieh A.D., Aminpanah H., Sadeghi S.M., Competition between rice (Oryza sativa L.) and (barnyardgrass (Echinochloa crus-galli (L.) P. Beauv.) as affected by methanol foliar application. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, 87(2): 879-890. 2015.

Rhizopoulous, S., Diamatoglon, S., Water stress induced diurnal variations in leaf water relations, stomatal conductance, soluble sugars, lipids and essential oil content of Origanum majorana L., J. Hortic. Sci., 66 (1), 119- 125. 1991.

Said-Al Ahl, H., Omer, E., Naguib, N., Effect of water stress and nitrogen fertilizer on herb and essential oil of oregano, Int. Agrophysics, 23, 269-275. 2009.
Salmerón-Miranda, F., Nitrogen Use in a Maize-Bean rotation in Nicaragua, Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Science, Department of Crop Production Ecology, Uppsala. 2008.
Setayeshmehr, Z., & Ganjali, E., Investigation of the effects of drought stress on growth and physiological characteristics of dill (Anethum graveolens L.), Horticultural Sciences (Agricultural Sciences and Industries). 27 (1): 27-35. 2013.
Sharifi Ashourabadi, E., Ardakani, M.R., Paknejhad, F., Habibi, D., Adraki, M., Effect of solid nitrogen application on biological yield, essential oil percentage and essential oil yield of balm (Melissa officinalis L.) under greenhouse condition, Proceeding of 18th World Congress of Soil Science, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 9-15 July, 147. 2006.
Shubhra, K., Dayal, J., Goswami, C.L., & Munjal, R., Effects of water deficit on oil of Calendula aerial parts, Biol. Plant. 48(3), 445-448. 2004.
Simon, J.E., R.D. Bubenheim, R.J.Joly and D. J. Charles., Water stress induced alterations in essential content and composition of sweet basil. Journal of Essential Oil Research. 4: 71-75. 1992.
Takeda, T., Yokota, A., Shigeoka, S., Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae, Plant Cell Physiol., 36, 1089-1095. 1995.
Talei, D, Valdiani A, Puad MA., An effective protein extraction method for two-dimensional electrophoresis in the anticancer herb Andrographis paniculata Nees. Biotechnology and applied biochemistry 60(5): 521-526. 2013
Timmermann, B.N., Steelink, C., Loewus, F.A., Recent advanced in phytochemistry, Vol. 18, phytochemical adaptation to stress, Plenum Press, 333. 1984.
Valadabadi, S.A., Aliabadi Farahani, H., Moaveni, P., Investigate effect of nitrogen application on essential oil content and seed yield in different cumin (Cuminum cyminum L.) populations at Qazvin zone, Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26(3), 347-357. 2010.
Vyshkaei, M., Noormohammadi, G.H., Majidi, A., Rabii, B., Effect of methanol on the growth function peanuts, Special Issue, J. Agric. Sci., 1, 87–102. 2008.
Walker, A.J., The effects of soil fertilizer, nitrogen and moisture on yield, oil and protein of flaxseed, Field Crop Res. 932, 101-114. 2001.
Wu K., Chen Q., Xiao S., Tan H., Wang Q., Zhao Y., Wu W., Li K., Yu Y., Chen L., cDNA Microarray Analysis of Transcriptional Responses to Foliar Methanol Application on Tamba Black Soybean Plants Grown on Acidic Soil. Plant Mol Biol Rep, 31:862–876. 2013.