

اثر تنش خشکی بر رشد و تغییرات هورمونی گیاه آویشن

پرویز مرادی*

بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۲۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۱/۱۸)

چکیده:

گیاه دارویی آویشن با داشتن بیش از ۲۵۰ گونه متعلق به خانواده لابیاته، در سرتاسر جهان با خصوصیات ضد میکروبی و ضد اسپاسم شناخته شده و به جهت تقاضای روزافزون تحقیقات روی این جنس مورد تاکید است. تنش های محیطی از قبیل خشکی از مهم ترین عوامل کاهش عملکرد می باشند که تغییرات هورمونی می تواند در این میان نقش به سزایی داشته باشند. در این آزمایش دو گونه آویشن حساس (*Thymus vulgaris*) و متحمل (*Thymus serpyllum*) به تنش خشکی به کار گرفته شدند که در انتهای دوره تنش (بر روی گیاهان یک ماهه با قطع آبیاری تا زمان خشکیدگی گیاهان)، صفات محتوای آبی گیاه، پتانسیل آبی، وزن خشک بخش هوایی و همچنین درصد رطوبت خاک اندازه گیری شد. این آزمایش در سال ۱۳۹۲ در دانشکده علوم زیستی دانشگاه بیرمنگام به اجرا درآمد. بر اساس این پارامترها، گونه مقاوم به عنوان ذخیره گر آب و از طرف دیگر گونه حساس به عنوان مصرف کننده آب شناخته شد. در هر دو گیاه در هنگام تنش، برداشت مواد گیاهی انجام گرفته و توسط روش متابولومیکس مبتنی بر طیف سنج جرمی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که در گیاه مقاوم، محتوای سالیسیلیک اسید به میزان ۱۷۳ درصد، نوگزانتین (پیش ساز آبسازیک اسید) ۱۳۳ درصد، اکسین ۱۶۶ درصد و جیبرلین ۱۸۰ درصد افزایش را نسبت به غلظت هورمون ها در حالت آبیاری کامل نشان داد. در حالیکه در گیاهان حساس، اسید جاسمونیک (JA) به میزان ۱۳۲ درصد و اسید سالیسیلیک ۲۴۲ درصد افزایش و نوگزانتین ۶۲ درصد و جیبرلین ۳۶ درصد کاهش معنی داری نشان داد. افزایش میزان نوگزانتین (پیش ساز آبسازیک اسید) در رقم متحمل با حفظ محتوای آبی و کاهش وزن ماده خشک بخش هوایی همراه بود. نتایج این آزمایش نقش کلیدی اسید آبسازیک و اسید سالیسیلیک را در مکانیزم تحمل به خشکی مجددا تایید نمود. ولی به نظر می رسد پاسخ نهایی گیاه به تنش کم آبی در نتیجه اثرات متقابل بین همه هورمون ها بروز می یابد. افزایش پیش ساز ABA موجب بازدارندگی رشد در گیاهان متحمل شد که در نهایت موجب مصرف آب کمتر گردید در حالیکه در گیاهان حساس نوگزانتین افزایش نداشت که به نظر می رسد به این دلیل است که پتانسیل آبی گیاه هنوز به آستانه لازم جهت تحریک بیوستز آبسازیک اسید نرسیده است.

کلمات کلیدی: آویشن، هورمون، اسید آبسازیک، جیبرلین، اسید جاسمونیک، خشکی، متابولیت.

کلمات مخفف:

TLC: Thin-layer chromatography, HPLC: High Pressure Liquid Chromatography, CE/MS: Capillary Electrophoresis Mass spectrometry, DI FT-ICR: Direct infusion Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, PQN (Probabilistic Quotient Normalization), KNN(k-nearest neighbour imputation method), Glog (Generalized Log Transformation), SA (Salysilic acid), MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate), JA (Jasmonic acid), IAA (Indole acetic acid), GA (Gibberellic Acid), NO (Nitric Oxide), ABA (Absciscic Acid), CK (Cytokinin), BR (brassinosteroids), SL (strigolactone).

مقدمه:

عنوان معطر کننده و طعم دهنده غذا نیز مورد استفاده بوده اند.

گیاهان دارویی علاوه بر مصرف دارویی در طب سنتی، به امروزه نقش دارویی گیاهان در بسیاری از کشورهای پیشرفته

*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: parvizmoradi@gmail.com

هم‌افزایی (synergistic) یا هم‌ستیزانه (antagonistic) نقش کلیدی خود را ایفا می‌نمایند (Jaillais and Chory, 2010). هورمون‌ها با تنظیم پاسخ‌های متفاوت موجب سازگاری گیاه به شرایط تنش می‌شوند (Wang et al., 2009; Moradi, 2016).

فارغ از نقش بیولوژیکی هورمون‌ها در رشد و نمو و تنش گیاهی، همه‌ی هورمون‌ها به صورت فرم‌های ساختمانی مختلف در گیاه ظاهر می‌شوند از قبیل متابولیت‌های تجزیه شده، جهت انتقال، فرم غیرفعال (یا ساختار ذخیره‌ای)، ترکیب شده با کربوهیدرات‌ها و یا اسیدهای آمینه. تمام فرم‌های متنوع ذکر شده دارای همان نقش بیولوژیکی فرم آزاد هورمون‌ها هستند. بنابراین برای مطالعه هورمون‌ها، بایستی غلظت تمام فرم‌های مذکور اندازه‌گیری شود (Sakakibara, 2006). اولین تکنیک برای جداسازی و اندازه‌گیری هورمون‌های گیاهی کروماتوگرافی لایه نازک (Thin-layer chromatography- TLC) بود (Nordström et al., 2004; Karadeniz et al., 2006). ولی تا به حال چندین روش جهت اندازه‌گیری هورمون‌ها به طور همزمان گزارش شده‌اند که شامل HPLC (با آشکارسازهای مختلفی نظیر UV، طیف سنج جرمی و یا الکتروشیمیایی) (Nordström et al., 2004; Prinsen et al., 1995) و CE/MS (Ge et al., 2005) می‌باشند. در مطالعات یاد شده، یک گروه از هورمون‌ها از قبیل سیتوکینین‌ها، اکسین‌ها و متابولیت‌های آنها هدف‌گذاری شده‌اند. ولی به هر حال، گرایش اصلی مطالعات فیزیولوژیک هورمون‌ها به سوی پروفایل متابولیکی هورمون‌ها و اندازه‌گیری هر چه بیشتر تعداد هورمون‌هاست (Tarkowski et al., 2010; López-Carbonell et al., 2009). برای تحقق این هدف (اندازه‌گیری همزمان چندین هورمون) در این مطالعه از روش متابولومیکس مبتنی بر طیف سنجی جرمی - اف تی آی سی آر (DI FT-ICR) استفاده شده است زیرا که این تکنیک بالاترین دقت اندازه‌گیری جرم و بالاترین وضوح جرمی در بین تکنیک‌های طیف‌سنج جرمی را به خود اختصاص داده و برای نمونه‌های بیولوژیک دارای گروه‌های مختلف ترکیبات مناسب‌تر است (Allwood et al., 2012; Moradi et al., 2014b).

نظیر کانادا، آمریکا، آلمان و ژاپن به اثبات رسیده است (Lai and Roy, 2004). پژوهش‌های قبلی تاثیر ضد میکروبی، ضد سرطانی و کاهش‌دهندگی فشار خون توسط گیاهان دارویی مختلف از جمله آویشن ثابت شده است (Balentine et al., 1999; Craig, 1999; Wargovich et al., 2001; Zaika, 1988). آویشن (*Thymus spp*) گیاهی چند ساله متعلق به خانواده لابیاته (لامیاسه) است که دارای بیش از ۲۵۰ گونه و زیرگونه می‌باشد. کاربردهای غذایی و دارویی این گیاه و رشد تقاضای برای محصولات متنوع آویشن بیانگر اهمیت تحقیقات بیشتر بر روی این گیاه است (Stahl-Biskup and Sàez, 2002).

در بین عوامل محیطی، احتمالاً آب محدود کننده‌ترین عامل برای کیفیت و عملکرد محصول تولیدی گیاهان زراعی می‌باشد (Roche et al., 2009). تنش خشکی از چندین جنبه مختلف گیاه را تحت تاثیر قرار داده (Yordanov et al., 2000) و در سطوح مختلف مورفوفیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی نمود پیدا می‌کند همانند جلوگیری از رشد (Bahrani et al., 2010)، تجمع مواد ارگانیک سازگار (Sánchez-Díaz et al., 2008)، تغییرات میزان هورمون‌های داخلی (Seki et al., 2007) تغییرات بیان ژن‌های پاسخگر به تنش (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005). بخشی از این پاسخ‌ها مستقیماً با وضعیت آب گیاه شروع می‌شود، در حالی که غالب آنها به وسیله هورمون‌های گیاهی تحریک می‌شوند (Chaves et al., 2003). از این لحاظ، اسید آبسزیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک در شبکه‌ای پیچیده از نوع القای سیگنال (signal transduction) مشارکت می‌کنند و رشد و نمو گیاه را در واکنش به محیط تنظیم می‌کنند (Szalai et al., 2011). هورمون‌های گیاهی که تا به حال شناخته شده‌اند عبارتند از اسید آبسزیک (ABA)، اتیلن، سیتوکینین (CK)، اکسین (IAA)، جیبرلین (GA)، اسید جاسمونیک (JA)، اسید سالیسیلیک (SA)، اکسید نیتریک (NO) براسینواستروئید (brassinosteroids-BR) و استرگولاکتون (SL-strigolactone) (Peleg and Blumwald, 2011). این هورمون‌ها در سازگاری به تنش‌های محیطی به صورت

روش بدلیل تزریق مستقیم و نبود کروماتوگرافی دارای زمان تفکیک (retention time) نبوده و شناسایی متابولیت ها فقط براساس جرم بوده و نمی تواند ایزومرها را از هم تشخیص دهد و همچنین یک جرم به چندین فرمول ساختمانی مرتبط می شود (Moradi et al., 2014b).

تا به حال مطالعات زیادی بر روی تنش خشکی در سطح فیزیولوژیکی و اسانس آن انجام گرفته است که نمونه ای از آنها بر روی *Thymus vulgaris* (Babae et al., 2010; Aziz et al., 2008) و *Thymus zygis* (Sotomayor et al., 2004) و همچنین *Thymus hyemalis* (Jordan et al., 2003) را می توان ذکر نمود. ولی هیچ مطالعه ای تا به حال بر روی جنس تیموس با جزئیات دقیق تغییرات متابولیکی از قبیل هورمونها در زمان تنش خشکی گزارش نگردیده است. ولی در گیاهان دیگر از قبیل سویا، گندم، اوکالپتوس، سیب زمینی، انگور، گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس پروفایل متابولیکی برای مطالعه تنش خشکی انجام یافته است (Vasquez-Robinet et al., 2008; Levi et al., 2011; Sanchez et al., 2012).

علیرغم دانش فراوان در خصوص پاسخ گیاه به کم آبی، هنوز جنبه های دیگری از این تنش نیاز به مطالعه بیشتر هستند (Bhargava and Sawant, 2013; Shao et al., 2009) که یکی از آنها پاسخ گیاه به تنش از طریق تغییرات هورمونی می باشد. ولی چنین مطالعاتی در مورد آویشن هنوز گزارش نگردیده است. از سوی دیگر آزمایشات مقایسه ای که گیاه حساس به همراه گیاه مقاوم تحت شرایط تنش مورد مطالعه قرار می گیرد روش مناسبی برای مطالعه نقش متابولیت ها در تحمل تنش ها می باشد (Korn et al., 2010; Lugan et al., 2010). بنابراین در مطالعه حاضر، دو گونه آویشن متحمل و حساس به تنش خشکی (به ترتیب *Thymus serpyllum* و *Thymus vulgaris*) در شرایط تنش خشکی قرار گرفتند تا تغییرات هورمونی که ممکن است در تحمل به خشکی نقش داشته باشند مورد ارزیابی قرار گیرند.

مواد و روش ها:

گیاهان آویشن مورد استفاده در این تحقیق شامل گونه متحمل

به خشکی (*Thymus serpyllum*) و حساس به خشکی (*Thymus vulgaris*) بودند که بذور آنها از شرکت سمیلا سیلواسترس (*Semilla silvestres*) اسپانیا خریداری گردید. سطوح تحمل این توده ها در مرحله گیاهچه گی قبلاً توسط مولف و همکاران (۲۰۱۴) تعیین گردیده بود (Moradi et al., 2014a). بذور در گلدان های با قطر ۸ سانتیمتر با ترکیب خاک کمپوست (۴ قسمت): پرلیت (۱ قسمت) کشت گردیده و در اتاقک رشد با شرایط ۱۶:۸ (تاریکی: روشنایی) و دمای ۲۲ درجه سلسیوس و آبیاری مرتب در دانشکده علوم زیستی دانشگاه بیرمنگام در سال ۲۰۱۳ نگهداری شدند. در گیاهان تیمار شده، تیمار خشکی بوسیله قطع آبیاری در گیاهان یک ماهه آغاز و تا زمان خشکیدگی ادامه یافت، ولی برای گیاهان شاهد آبیاری طبق روال قبلی تا انتهای آزمایش ادامه یافت (نحوه کد دهی و تعیین مراحل پژمردگی قبلاً توسط Moradi و همکاران (2014a) شرح داده شده است).

در این آزمایش، صفات رطوبت خاک، محتوای آبی و پتانسیل آبی گیاه در انتهای دوره تنش خشکی و قبل از پژمردگی گیاه (در گیاهان یک ماهه) اندازه گیری شدند. رطوبت حجمی خاک با سنسور رطوبتی مدل SM300 (ساخت شرکت Delta-T Devices Ltd. UK) به عنوان معیاری برای پیشرفت تنش خشکی در خاک و پتانسیل آبی گیاه با استفاده از محفظه فشار (Skye Company Model SKPM 1400) اندازه گیری شده است.

برای ثبت صفات فیزیولوژیک و متابولیت ها، نمونه برداری از ۶ تکرار بیولوژیک و ۳ تکرار تکنیکی انجام گرفت. برای استخراج متابولیت ها، حدود ۱۰۰ میلی گرم برگ تر در نقطه بحرانی (بلافاصله قبل از پژمردگی گیاه) دوره تنش خشکی برداشت و در نیتروژن مایع فریز شدند. سپس عصاره نمونه های فریز شده خشک شده، بر اساس پروتوکل متانول: کلروفرم: آب استخراج شدند. بدین نحو که ۳۲ میکرولیتر متانول و ۱۲/۸ میکرولیتر آب به ازای هر گرم برگ اضافه شده و با دستگاه پرسیلیس ۲۴ هموژنیزه شدند (Bertin Technologies Ltd, USA). سپس ۳۲ میکرولیتر کلروفرم و ۱۶ میلی لیتر آب اضافه شده و ترکیب حاصل سانتریفیوژ شد.

بالاخره این محلول دو قسمتی به دو ریز لوله شیشه ای مجزا منتقل گردید که لایه بالایی بخش قطبی و لایه پایینی بخش غیر قطبی محلول بود. بخش قطبی به وسیله دستگاه خلا (Thermo Savant, Holbrook, NY, USA) و بخش غیر قطبی با گاز نیتروژن خشک گردیده و تا زمان تجزیه نگهداری شدند. اندازه گیری متابولیتها با استفاده از روش طیف سنجی

جرمی اف تی آی سی آر (FT-ICR Mass spectrometry)

نمونه‌های خشک شده قطبی و غیر قطبی با محلول متانول:آب (۲۰:۸۰) مخلوط و با ورتکس (Vortex) و سونیکت (Sonicate) مخلوط شده سپس در دمای ۴ درجه با دور ۱۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. این نمونه ها به مقدار ۱۰ میکرولیتر به همراه نمونه‌های کنترل کیفیت به نمونه‌بردار اتوماتیک منتقل شدند. نمونه‌ها با طیف سنج جرمی با قدرت ۷ تسلا ساخت شرکت ترمو سایننتیفیک (LTQ FT, Thermo Scientific, Bremen, Germany) تجزیه شدند که صفحه یونیزه نانوالکترواسپری چیپ‌دار (chip-based direct infusion nanoelectrospray ionisation) مجهز بود (Triversa, Advion Biosciences, Ithaca, NY). ولتاژ الکترواسپری برای یونهای مثبت برابر ۱/۷+ کیلوولت و برای یونهای منفی ۱/۷- کیلوولت بود. دامنه ۷۰-۵۹۰ جرم به بار برای ترکیبات قطبی و دامنه ۷۰-۲۰۰۰ جرم به بار (m/z) برای مواد غیر قطبی تجزیه شد که در کل ۲ دقیقه و ۱۵ ثانیه برای هر نمونه طول کشید.

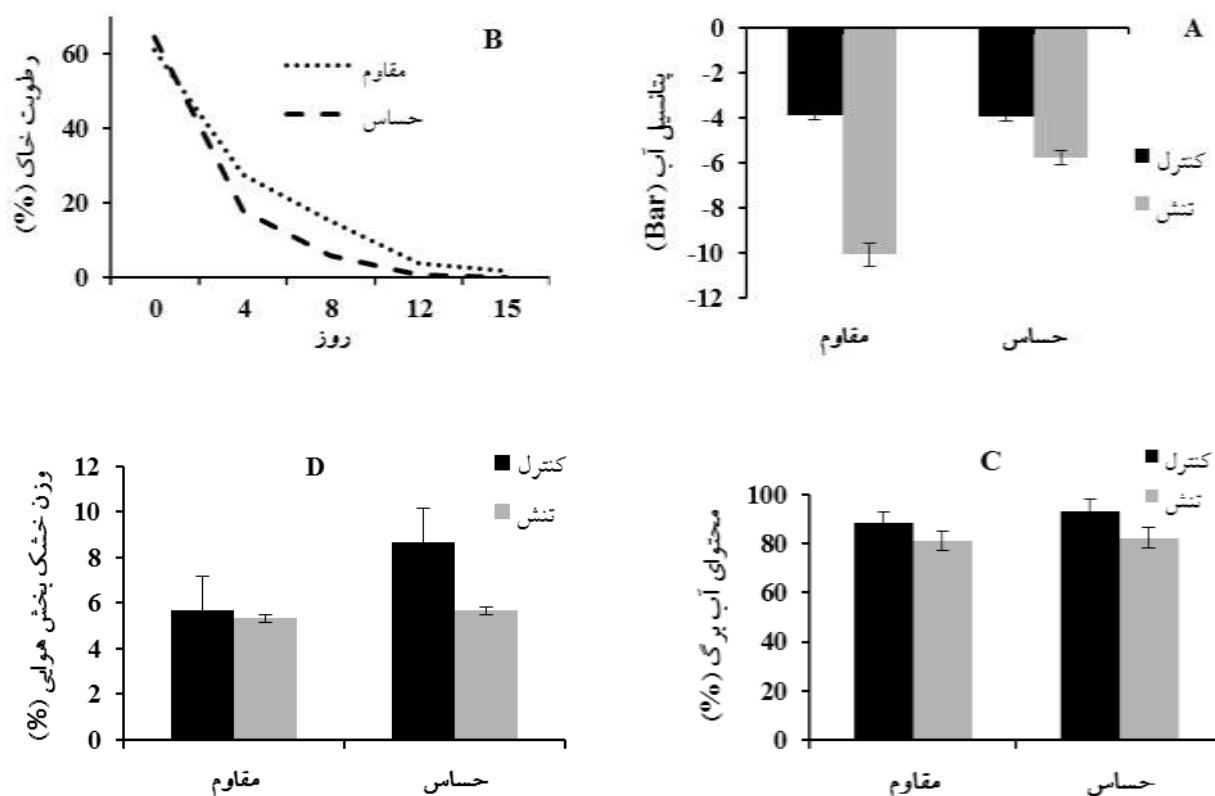
تجزیه داده‌ها شامل سه مرحله پیش تجزیه (Pre-processing)، شناسایی متابولیت‌ها و تجزیه‌های آماری بود. به طور خلاصه، در مرحله پیش تجزیه، داده‌های خروجی در برنامه MATLAB و پکیج برنامه سیم استیج (SIM-stitchalgorithm version 2.8) مورد تجزیه اولیه قرار گرفته (Southam et al., 2007) و سپس با ۳ برنامه دیگر نیز تحت عنوان فیلتر پیک (Peakfiltering) مورد تجزیه قرار گرفتند (Payne et al., 2009). در این مرحله دو فایل لیست پیک (Peak list) و ماتریس پیک (Peak matrix) تولید می‌شوند. در مرحله شناسایی متابولیتها لیست پیک به بسته نرم افزاری مای پک (Mi-Pack) وارد شد (Weber and Viant,

2010). در مرحله تجزیه آماری، نرمال سازی داده‌ها با روش PQN (Probabilistic Quotient Normalization) صورت گرفته (Dieterle et al., 2006) سپس داده‌ها برای برآورد داده‌های گمشده با تکنیک KNN (k-nearest neighbour imputation method) تیمار شدند (Dixon, 1979; Hrydziusko and Viant, 2012). بالاخره برای حذف اثر غالبیت پیک‌های با شدت بالا، داده‌ها با روش Glog (Generalized Log Transformation) تبدیل شدند (Parsons et al., 2007). مقایسه میانگین داده‌ها، رسم نمودارها و تجزیه تحلیل داده‌های فیزیولوژیک با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 20 انجام گردید.

نتایج و بحث:

دو پارامتر اصلی وضعیت آب در گیاه یعنی محتوای آب و پتانسیل آب گیاه به همراه وضعیت رشدی گیاه در انتهای دوره تنش خشکی قبل از پژمردگی نسبت به ابتدای دوره تنش اندازه گیری شد. پارامتر وضعیت رشد (وزن خشک بخش هوایی) در هر دو گونه حدود ۱/۵ برابر کاهش نشان داد. محتوای آبی، پتانسیل آبی و درصد رطوبت خاک به طور معنی داری تحت تاثیر قرار گرفت. محتوای آبی گیاه از ۹۰ درصد به ۸۰ درصد و پتانسیل آبی از ۴- بار در شرایط آبی به ۶- بار در شرایط خشکی کاهش داشت. رطوبت خاک که قبل از تنش بیش از ۶۰ درصد بود تا روز چهارم تنش به ۲۰ درصد رسیده و به تدریج تا روز دوازدهم به حدود صفر رسید (شکل ۱).

بررسی تغییرات صفات فیزیولوژیک نشان داد که کمبود آب، پتانسیل آبی را گیاهان تیمار نسبت به گیاهان شاهد کاهش داده (شکل ۱)، ولی پاسخ گیاهان حساس و متحمل متفاوت بود. هر دو گونه در شرایط آبی دارای پتانسیل آبی یکسانی بودند ولی در شرایط تنش، گونه *T. serpyllum* دارای پتانسیل آبی پایین‌تری نسبت به گونه *T. vulgaris* بود. نتایج بررسی تغییرات پارامترهای فیزیولوژیک، کارایی این شاخص‌ها را در مطالعات تنش خشکی تایید نمود. برای مثال، درصد رطوبت خاک به عنوان شاخصی توانست شدت تنش خشکی را به صورت کمی نمایش دهد (Granier et al., 2006). مطالعات



شکل ۱- تغییرات پارامترهای وضعیت آب گونه های گیاهی متحمل (*Thymus serpyllum*) و حساس (*Thymus vulgaris*) به خشکی در اثر تنش خشکی. A پتانسیل آبی گیاهان را برحسب بار نشان می دهد. B تغییرات رطوبت خاک را در طول تنش خشکی نمایش می دهد. C محتوای آبی برگ را بر حسب درصد و شکل D وزن خشک بخش هوایی گیاه را برحسب گرم نشان می دهد. ارقام به صورت 1 ± 6 با تکرار هستند.

پتانسیل اسمزی پایین کمتر به تخریب آوند چوبی حساس هستند (Gyenge et al., 2005). گونه های گیاهی مصرف کننده آب، روزنه ها را باز نگه داشته و دی اکسید کربن بیشتری آسیمیل (Assimilate) می کنند بنابراین عملکرد بالاتر (نرخ رشد بیشتری) نسبت به ذخیره گره های آبی دارند (Dong and Zhang, 2001). در کل، نرخ رشد بالاتر ویژگی مناسبی برای گیاه است ولی شاید برای گیاهی که در شرایط تنش قرار می گیرد خصوصیت مناسبی نباشد. در این آزمایش نیز گیاه متحمل به عنوان ذخیره گر آبی، با پایین نگاه داشتن پتانسیل آبی گیاه، آب بیشتری در حالت تنش جذب می کند طوری که محتوای آبی گیاه در حالت تنش اختلاف معنی داری با گیاه شاهد نداشت. بنابراین، این گیاه از نظر وزن خشک بخش هوایی نیز با گیاه شاهد تفاوت معنی دار نداشت (شکل ۱).

در این آزمایش تعداد ۳۳۲۸ پیک برای فاز قطبی و ۲۵۲۷

قبل از نیز ثابت نموده اند که این پارامترهای فیزیولوژیک می توانند به عنوان ابزاری قوی در ارزیابی جمعیت های مختلف در برابر تنش خشکی مورد استفاده قرار گیرند (Aguirrezabal et al., 2006). به هر حال، گونه *T. serpyllum* به عنوان ذخیره گر آب (Water saver) بوده در حالی که *T. vulgaris* رفتار مصرف کننده آب (Water spender) را نشان داد (Larcher, 2003). بر اساس تعاریف و مفاهیم پیشنهاد شده به وسیله لوی (۱۹۷۲)، گیاهان در شرایط کم آبی دو استراتژی در پیش می گیرند: ذخیره آب یا مصرف آب (Levitt, 1972; Kalapos, 1994). در ذخیره گره های آب، حتی در رطوبت کافی خاک، روزنه ها بسته می شود که بدینوسیله موجب کاهش تلفات آب از طریق تعرق می گردد (Reynolds et al., 1997). این گیاهان علاوه بر دارا بودن دیواره سلولی محکم (به دلیل خاصیت الاستیسیته بالا) و

جدول ۱- مشخصات هورمون‌های گیاهی در گیاه آویشن

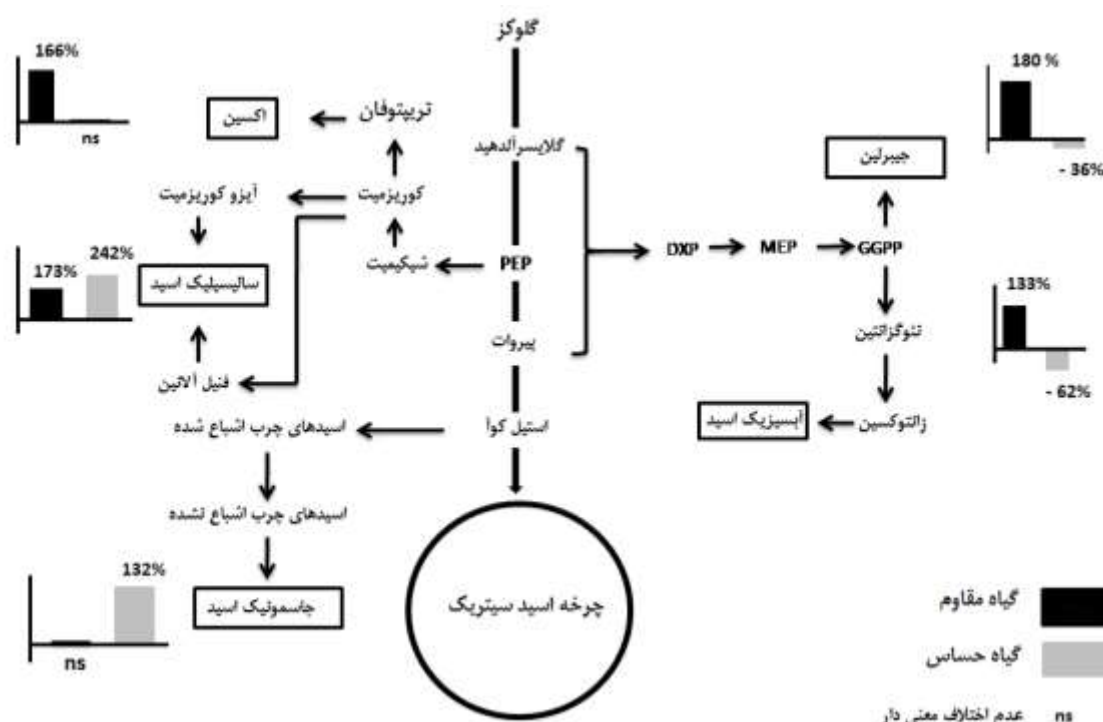
ردیف	نام هورمون	گونه گیاهی	میزان تغییر (%)	تنش*	میزان پیک در شرایط بدون تنش*	میزان پیک در شرایط بار/جرم
۱	جیبرلین	<i>T. vulgaris</i>	-۳۶	۵۸۵۲۵	۱۶۲۱۰۱	۳۳۱/۱۵۵۱
۲	جاسمونیک اسید	<i>T. vulgaris</i>	۱۳۲	۱۵۹۴۲	۱۲۰۸۹	۴۹/۰۸۸۶
۳	متیل سالیسیلات	<i>T. vulgaris</i>	۲۴۲	۴۱۱۳۸	۱۶۹۴۷	۱۵۱/۰۴۰۲
۴	نئوگزانتین	<i>T. vulgaris</i>	-۶۲	۷۳۸۱۹۱	۱۱۸۶۳۹۱	۶۵۹/۴۳۲۹
۵	سالیسیلیک اسید	<i>T. serpyllum</i>	۱۷۳	۱۹۰۹۰	۱۱۰۳۲	۱۳۸/۰۵۲۵
۶	ایندول-۳-استالدهاید	<i>T. serpyllum</i>	۱۶۶	۱۳۷۲۸	۸۲۶۶	۱۵۶/۰۴۲۱
۷	جیبرلین	<i>T. serpyllum</i>	۱۸۰	۸۹۲۰۲	۴۹۴۷۸	۳۳۱/۱۵۵۱
۸	نئوگزانتین	<i>T. serpyllum</i>	۱۳۳	۷۸۰۹۷	۵۸۵۶۹	۵۹۹/۴۱۱۴

* میزان پیک‌ها بدون واحد بوده و نسبت به بالاترین پیک آن طیف محاسبه می‌شوند.

پیک برای فاز غیرقطبی تشخیص داده شد. متابولیت‌هایی که تغییرات معنی‌داری داشته و بر اساس بررسی منابع دارای نقشی در تنش‌های گیاهی می‌باشند انتخاب شده و در چهار گروه اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آلی و هورمون‌های گیاهی تقسیم شدند. فهرست هورمون‌های گیاهی به همراه مشخصات آنها در جدول ۱ ارائه شده است.

همانگونه که در جدول ۱ نیز نشان داده شده است، در گیاه متحمل تحت شرایط تنش خشکی، سالیسیلیک اسید (Salysilic acid-SA) به میزان ۱۷۳ درصد، نئوگزانتین (پیش ساز آبسزیک اسید) ۱۳۳٪، اکسین ۱۶۶ درصد و جیبرلین ۱۸۰ درصد نسبت به غلظت هورمون‌ها در حالت آبیاری کامل افزایش معنی‌داری نشان داد. درحالی‌که در گیاهان حساس جاسمونیک اسید (JA) به میزان ۱۳۲ درصد و سالیسیلیک اسید ۲۴۲ درصد افزایش و نئوگزانتین ۶۲ درصد و جیبرلین ۳۶ درصد کاهش معنی‌داری نشان داد. بر طبق شکل ۲، هورمون‌های جیبرلین و آبسزیک اسید از محصولات مسیر بیوستتزی ترکیبات فرار MEP می‌باشد که درون پلاستید رخ می‌دهد. هورمون‌های اکسین و سالیسیلیک اسید نیز از محصولات مسیر بیوستتزی شیکیمیت بوده و پس از مرحله کوریزمیت (Chorismate) تولید می‌شوند. جاسمونیک اسید نیز حاصل اشباع نشدگی اسیدهای چرب اشباع شده می‌باشد که از

استیل کوآنزیم آ (Acetyl CoA) منشا می‌گیرد (شکل ۲). افزایش آبسزیک اسید مجدداً نقش حیاتی این هورمون را در مکانیزم‌های مقابله با خشکی گیاهان مقاوم تایید می‌کند که قبلاً در مطالعات متعدد بر روی گیاهانی همانند ذرت (Xin et al., 1997; Wang, 2008)، آرابیدوپسیس (Huang et al., 2008)، گندم (Shafi et al., 2010)، فستوکا (Abernethy and McManus, 1998)، جو (Thameur et al., 2011) و یونجه (Han et al., 2008) به اثبات رسیده است. ABA یکی از ترکیبات مهم سیگنالی است که مکانیزم‌های سازگاری گیاه به شرایط خشکی را تحریک می‌نماید. از این مکانیزم‌ها می‌توان به کاهش میزان فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و سرعت رشد گیاه (بر اساس ارتفاع ساقه و تعداد و سطح برگ‌ها) اشاره نمود (Wilkinson and Davies, 2010). با مراجعه به تغییرات نرخ رشد (شکل ۱) می‌توان دلیل اختلاف کم رشد گیاهان مقاوم در دو حالت شاهد و تیمار شده را تا حدی به غلظت بالای پیش ساز آبسزیک اسید نسبت داد در حالی‌که در گیاه حساس چنین نبوده است. نئوگزانتین (پیش ساز هورمون ABA) در گیاهان متحمل بیشتر از گیاهان حساس افزایش یافته است که آزمایشات قبلی نیز این تفاوت را تایید می‌نمایند (Chandrasekar et al., 2000). عدم افزایش این هورمون در گیاهان حساس به نظر می‌رسد مربوط به آستانه پتانسیل آبی



شکل ۲- تغییرات هورمونی گیاهی پس از اعمال تنش خشکی در گیاهان حساس و متحمل آویشن. نمودارهای جانبی هر متابولیت نشانگر تغییر معنی دار آنها در شرایط تنش نسبت به گیاهان شاهد بر حسب درصد است.

البته پیش تر نیز ثابت گردیده است که هورمون اکسین (Mahouachi et al., 2007)، اتیلن (Pieterse et al., 2009)، اسید جاسمونیک (Wasternack, 2007) و اسید سالیسیلیک (Raskin, 1992) به طور معنی داری در پاسخ به تنش های زیستی و غیرزیستی (De Diego et al., 2012) مشارکت می کنند.

تجمع هورمون اسید سالیسیلیک در هر دوی گیاهان حساس و متحمل به خشکی تحت شرایط تنش خشکی تایید می نماید که این هورمون نقش اساسی در افزایش تحمل به تنش خشکی (Munne-Bosch and Penuelas, 2003)، تنش اسمزی و شوری (Borsani et al., 2001) و تنظیم فعالیتهای آنزیمی (Durner and Klessig, 1996) را داراست. اسید سالیسیلیک همچنین در تعدادی دیگر از فرایندهای فیزیولوژیک نقش دارند که شامل جوانه زنی، رشد گیاه، رسیدگی میوه، گلدهی، انتقال و جذب یون، میزان فتوسنتز و هدایت روزنه ای می باشد (Shakirova, 2007). هرچند که در این آزمایش در هر دو گیاه مقاوم و حساس افزایش اسید

گیاه می باشد (Hopper et al., 2014; Lin et al., 2011). با توجه به نتایج تغییرات پتانسیل آبی گیاه در شکل ۱-۴، در انتهای دوره تنش خشکی، گیاهان حساس و مقاوم به ترتیب تا ۴- و ۱۰- بار کاهش یافته اند، بنابراین به نظر می رسد که پتانسیل آبی گیاه حساس هنوز به آستانه لازم جهت تحریک بیوستز آبسازیک اسید نرسیده و در نتیجه نتوانسته افزایش نداشته است. زابادال (۱۹۷۴) در آزمایشی دریافت که آستانه پتانسیل آبی برای *Ambrosia artemisiifolia* L. برابر ۸ atm- در حالی که این آستانه در گیاه *Ambrosia trifida* برابر ۱۲ atm- است. با این وجود، شواهد اخیر پیشنهاد می کنند که هورمونهای دیگر از قبیل BR, JA, SA و NO نیز در بسته شدن روزنه ها دخالت دارند (Ribeiro et al., 2009). عدم تفاوت معنی دار اسید جاسمونیک در گیاه مقاوم پیشنهاد می کند که افزایش این متابولیت احتمالاً در ابتدای دوره تنش رخ داده باشد. در این مرحله که رطوبت خاک شروع به کاهش می کند، هر دو هورمون SA و JA تجمع می یابند که این تغییرات هورمونی قبلاً در چندین مطالعه گزارش گردیده است (De Ollas et al., 2013).

جیبرلین در گیاه مقاوم افزایش و گیاه حساس کاهش نشان داد (شکل ۲). مطالعات نیز نشان داده است که جیبرلین تحت شرایط تنش زیستی (McConn et al., 1997) و غیر زیستی (Lehmann et al., 1995) تجمع می‌یابد. به هر حال نقش جیبرلین در رشد و نمو گیاه ثابت شده است. این هورمون جوانه‌زنی بذر، افزایش سطح برگ، افزایش طول ساقه و گلدهی را کنترل می‌نماید (Magome et al., 2004). هرچند که می‌دانیم اثر متقابل بین جیبرلین و دیگر هورمون‌ها وجود دارد که کنترل رشد و نمو گیاه را تحت شرایط تنش‌های محیطی بر عهده می‌گیرد (Javid et al., 2011).

نتیجه‌گیری کلی:

مطالعه ترکیبی آزمایش متابولومیکس مقایسه‌ای با شاخص‌های مورفو-فیزیولوژیکی، تکنیک کارآیی برای بررسی تغییرات هورمون‌های گیاهی ناشی از اعمال تنش خشکی در گیاه دارویی آویشن بود. پتانسیل آبی به همراه حسگر رطوبتی خاک، نمایش روند تنش خشکی را در خاک و گیاه فراهم نمودند. شاخص‌های فیزیولوژیک محقق را قادر ساخت تا گونه مقاوم (*T. serpyllum*) را به عنوان ذخیره‌گر آب و گونه حساس (*T. vulgaris*) را به عنوان مصرف کننده آب تفکیک نماید. استراتژی ذخیره آب، این امکان را برای گونه مقاوم فراهم می‌نماید که رطوبت خاک را کمتر استفاده نموده و وزن خشک پایین تری هم داشته باشد.

گیاهان حساس و مقاوم هم در سطح فیزیولوژیک و هم در سطح هورمونی پاسخ‌های متفاوتی از خود نشان دادند. براین اساس، گیاه متحمل در شرایط تنش سعی بر افزایش ویا نگهداری سطح متابولیت‌های خاص و کلیدی دارد که دراین آزمایش گونه مقاوم به خشکی، از نظر میزان جیبرلین، نوگزانتین، اکسین و اسید سالیسیلیک افزایش و اسید جاسمونیک تفاوت معنی‌داری نشان نداد. درحالی که در گیاهان حساس، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک افزایش و نوگزانتین و جیبرلین کاهش معنی‌داری نشان داد. افزایش نوگزانتین با کاهش وزن ماده خشک بخش هوایی و حفظ

سالیسیلیک مشاهده شد، ولی در بعضی از گیاهان تحت تاثیر تنش خشکی، کاهش این هورمون نیز گزارش گردیده است (Aimar D. et al., 2011). علی‌رغم این که نقش این هورمون در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مشاهده می‌شود، ولی هنوز مکانیزم مولکولی آن هنوز مشخص نیست (Miura and Tada, 2014). به نظر می‌رسد تحمل به تنش به غلظت هورمون اسید سالیسیلیک وابسته باشد، زیرا ثابت شده است که هرچهقدر غلظت SA بالاتر رود به دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو، حساسیت گیاه به تنش غیر زیستی بیشتر می‌شود و بر عکس این هورمون در غلظت پایتتر موجب افزایش تحمل گیاه به تنش می‌شود. این حالت در این آزمایش نیز مشاهده گردید. به عبارت دیگر، هرچند که نقش سالیسیلیک اسید در تقویت سیستم دفاعی در تنش زیستی از طریق سنتز آنتی اکسیدانها و پروتئین HSPs (Heat Shock Protein) ثابت شده است (Yuan and Lin, 2008)، این آنزیم‌ها و پروتئین‌ها از طریق از بین بردن ROSها موجب کاهش زیان ناشی از تنش می‌شوند (Sun et al., 2001). SA در غلظت بالاتر به دلیل تجمع بیش از حد ROSها موجب مرگ سلولی می‌شود (Mittler, 2002) ولی در غلظت پایتتر تحمل به تنش را از طریق فعال سازی آنزیم‌های محافظتی سلولی را افزایش می‌دهد (Yuan and Lin, 2008).

اسید جاسمونیک در این آزمایش فقط در گونه حساس افزایش نشان داد. مداخله اسید جاسمونیک در تنش خشکی و شوری در چندین گونه گیاهی از قبیل ذرت (Xin et al., 1997) و گوجه فرنگی (Pedranzani et al., 2003) گزارش شده است. در برخی از گونه‌های گیاهی نیز مقدار اسید جاسمونیک ثابت بوده است (Aimar D. et al., 2011). جاسمونات‌ها در تعدادی از فرایندهای مربوط به نمو گیاهی و حیاتی مشارکت دارند که شامل پاسخ‌های دفاعی مستقیم و غیرمستقیم (در مقابل آفات و بیماریها)، متابولیسم ثانویه، فرایندهای تولیدمثلی (مانند رسیدگی دانه کرده و نمو تخمک)، نمو میوه می‌باشند (Arimura et al., 2005; Wasternack, 2007).

محتوای آبی گیاه همراه بود. گونه های حساس آویشن را به تنش خشکی افزایش دهند. مطالعات بیشتر در خصوص ژنهای کنترل کننده مسیرهای بیوسنتزی این هورمونها می تواند راهنمای خوبی برای محققان آینده باشد تا بتوانند با مهندسی ژنتیک ژنهای دخیل، تحمل از ترکیبات تجاری این هورمونها به صورت های مختلف نظیر محلول پاشی در جهت افزایش تحمل گونه های حساس باشد.

منابع:

- Aguirrezabal, L., Bouchier-Combaud, S., Radziejowski, A., Dauzat, M., Cookson, S. J. and Granier, C. (2006) Plasticity to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana*: dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant Cell and Environment* 29: 2216-2227.
- Aimar D., Calafat M., Andrade A. M., Carassay L., Abdala G. I. and Molas, M. L. (2011) Drought Tolerance and Stress Hormones: From Model Organisms to Forage Crops. In: *Plants and Environment* (Ed Vasanthaiah, H.) Pp. 245-298. Rijeka, Croatia: InTech.
- Allwood, J. W., Parker, D., Beckmann, M., Draper, J. and Goodacre, R. (2012) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for plant metabolite profiling and metabolite identification. In *Plant Metabolomics* (pp. 157-176): Springer.
- Arimura, G., Kost, C. and Boland, W. (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1734: 91-111.
- Aziz, E., Hendawi, S., Ezz El Din, A. and Omer, E. (2008) Effect of soil type and irrigation intervals on plant growth, essential oil yield and constituents of *Thymus vulgaris* plant. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 4: 443-450.
- Babaei, K., Dehaghi, M. A., Sanavi, S. A. M. M. and Jabbari, R. (2010) Water deficit effect on morphology, proline content and thymol percentage of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 26: 239-251.
- Bahrani, M. J., Bahrami, H. and Haghighi, A. A. K. (2010) Effect of water stress on ten forage grasses native or introduced to Iran. *Grassland Science* 56: 1-5.
- Balentine, D. A., Albano, M. C. and Nair, M. G. (1999) Role of medicinal plants, herbs, and spices in protecting human health. *Nutrition Reviews* 57: 41-45.
- Bhargava, S. and Sawant, K. (2013) Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding* 132: 21-32.
- Borsani, O., Valpuesta, V. and Botella, M. A. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* 126: 1024-1030.
- Chandrasekar, V., K Sairam, R. and Srivastava, G. (2000) Physiological and biochemical responses of hexaploid and tetraploid wheat to drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 185: 219-227.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P. and Pereira, J. S. (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- DaCosta, M. and Huang, B. (2009) Physiological adaptations of perennial grasses to drought stress. *Perspectives in biophysical plant ecophysiology*. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico: 169-190.
- De Diego, N., Pérez-Alfocea, F., Cantero, E., Lacuesta, M. and Moncaleán, P. (2012) Physiological response to drought in radiata pine: phytohormone implication at leaf level. *Tree Physiology* 32: 435-449.
- De Ollas, C., Hernando, B., Arbona, V. and Gómez-Cadenas, A. (2013) Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia Plantarum* 147: 296-306.
- Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G. and Senn, H. (2006) Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabolomics. *Analytical Chemistry* 78: 4281-4290.
- Dixon, J. K. (1979) Pattern recognition with partly missing data. *Systems, Man and Cybernetics, IEEE Transactions on* 9: 617-621.
- Dong, X. and Zhang, X. (2001) Some observations of the adaptations of sandy shrubs to the arid environment in the Mu Us Sandland: leaf water relations and anatomic features. *Journal of Arid Environments* 48: 41-48.
- Durner, J. and Klessig, D. F. (1996) Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *Journal of Biological Chemistry* 271: 28492-28501.
- Ge, L., Yong, J. W. H., Goh, N. K., Chia, L. S., Tan, S. N. and Ong, E. S. (2005) Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* 829: 26-34.

- Granier, C., et al. (2006) Phenopsis, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytologist* 169: 623-635.
- Gyenge, J. E., Fernández, M. E., Salda, G. D. and Schlichter, T. (2005) Leaf and whole-plant water relations of the Patagonian conifer *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser. et Bizzarri: implications on its drought resistance capacity. *Annals of Forest Science* 62: 297-302.
- Han, R.-h., Zhang, Y.-g., Tian, H. and Lu, X.-s. (2008) Study on changes of endogenous hormones in the leaves of alfalfa under drought stress. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* 3: 23-29.
- Hopper, D. W., Ghan, R. and Cramer, G. R. (2014) A rapid dehydration leaf assay reveals stomatal response differences in grapevine genotypes. *Horticulture Research* 1:2-10.
- Hrydziusko, O. and Viant, M. R. (2012) Missing values in mass spectrometry based metabolomics: an undervalued step in the data processing pipeline. *Metabolomics* 8: 161-174.
- Jaillais, Y. and Chory, J. (2010) Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature structural & Molecular Biology* 17: 642-645.
- Javid, M. G., Sorooshzadeh, A., Moradi, F., Modarres Sanavy, S. A. M. and Allahdadi, I. (2011) The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science* 5:726-734.
- Jordan, M. J., Martinez, R. M., Cases, M. A. and Sotomayor, J. A. (2003) Watering level effect on *Thymus hyemalis* Lange essential oil yield and composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5420-5427.
- Kalapos, T. (1994) Leaf Water Potential Leaf Water-Deficit Relationship for 10 Species of a Semiarid Grassland Community. *Plant and Soil* 160: 105-112.
- Karadeniz, A., Topcuoglu, S. and Inan, S. (2006) Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 1061-1064.
- Korn, M., Gärtner, T., Erban, A., Kopka, J., Selbig, J. and Hinch, D. K. (2010) Predicting *Arabidopsis* freezing tolerance and heterosis in freezing tolerance from metabolite composition. *Molecular Plant* 3: 224-235.
- Lai, P. and Roy, J. (2004) Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current medicinal chemistry* 11: 1451-1460.
- Larcher, W. (2003) *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*: Springer
- Lehmann, J., et al. (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta*, 197, 156-162.
- Levi, A., Paterson, A. H., Cakmak, I. and Saranga, Y. (2011) Metabolite and mineral analyses of cotton near-isogenic lines introgressed with QTLs for productivity and drought-related traits. *Physiologia Plantarum*, 141, 265-275.
- Levitt, J. (1972) *Responses of plants to environmental stresses*. New York: Academic Press.
- Lin, Y.-L., Chao, Y.-Y., Huang, W.-D. and Kao, C. H. (2011). Effect of nitrogen deficiency on antioxidant status and Cd toxicity in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 64, 263-273.
- López-Carbonell, M., Gabasa, M. and Jáuregui, O. (2009) Enhanced determination of abscisic acid (ABA) and abscisic acid glucose ester (ABA-GE) in *Cistus albidus* plants by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 256-261.
- Lugan, R., et al. (2010) Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *The Plant Journal*, 64, 215-229.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y. and Oda, K. (2004) Dwarf and delayed-flowering 1, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *The Plant Journal* 37: 720-729.
- Mahouachi, J., Arbona, V. and Gómez-Cadenas, A. (2007) Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. *Plant Growth Regulation* 53: 43-51.
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E. and Mullet, J. E. (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 5473-5477.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7, 405-410.
- Moradi, P. (2016). Key plant products and common mechanisms utilized by plants in water deficit stress responses. *Botanical Sciences*, 94: 1-15.
- Moradi, P., Ford-Lloyd, B. and Pritchard, J. (2014a). Plant-water responses of different medicinal plant thyme (*Thymus* spp.) species to drought stress condition. *Australian Journal of Crop Science*, 8: 666-673.
- Moradi, P., Ford-Lloyd, B. and Pritchard, J. (2014b). Use of metabolomics to Study of water deficit stress on the medicinal plant Thyme. *Biosciences* (p. 287): Birmingham.
- Munne-Bosch, S. and Penuelas, J. (2003) Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*, 217: 758-766.
- Nordström, A., et al. (2004) Derivatization for LC-electrospray ionization-MS: a tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Analytical chemistry*, 76: 2869-2877.

- Parsons, H. M., Ludwig, C., Gunther, U. L. and Viant, M. R. (2007) Improved classification accuracy in 1-and 2-dimensional NMR metabolomics data using the variance stabilising generalised logarithm transformation. *BMC bioinformatics*, 8.
- Payne, T. G., Southam, A. D., Arvanitis, T. N. and Viant, M. R. (2009) A signal filtering method for improved quantification and noise discrimination in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry-based metabolomics data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20: 1087-1095.
- Pedranzani, H., *et al.* (2003) Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation*, 41: 149-158.
- Peleg, Z. and Blumwald, E. (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current opinion in plant biology*, 14: 290-295.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wees, S. C. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
- Prinsen, E., Redig, P., Van Onckelen, H. A., Van Dongen, W. and Esmans, E. L. (1995) Quantitative analysis of cytokinins by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* 9: 948-953.
- Raskin, I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annual review of plant biology* 43 439-463.
- Reynolds, J., Virginia, R. and Schlesinger, W. (1997) fl) Defining functional types for models of desertification. *Plant functional types: their relevance to ecosystem properties and global change*, 1, 195.
- Ribeiro, D. M., *et al.* (2009) Differential requirement for NO during ABA-induced stomatal closure in turgid and wilted leaves. *Plant Cell Environ* 32: 46-57.
- Roche, J., Hewezi, T., Bouniols, A. and Gentzbittel, L. (2009) Real-time PCR monitoring of signal transduction related genes involved in water stress tolerance mechanism of sunflower. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 139-145.
- Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 431-449.
- Sanchez-Díaz, M., Tapia, C. and Antolín, M. C. (2008) Absciscic acid and drought response of Canarian laurel forest tree species growing under controlled conditions. *Environmental and experimental botany*, 64, 155-161.
- Sanchez, D. H., Schwabe, F., Erban, A., Udvardi, M. K. and Kopka, J. (2012) Comparative metabolomics of drought acclimation in model and forage legumes. *Plant Cell and Environment* 35: 136-149.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. and Shinozaki, K. (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses . *Current opinion in plant biology* 10: 296-302.
- Shafi, M., and, F. U. and Akmal, M. (2010) Effect of cultivars and culture medium on callus formation and plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Pakistan Journal Botanical* 42: 639-652.
- Shakirova, F. (2007) Role of hormonal system in the manifestation of growth promoting and antistress action of salicylic acid. In *Salicylic acid: a plant hormone* (Pp. 69-89): Springer.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Panneerselvam, R. and Shao, M. A. (2009) Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants - biotechnologically and sustainably improving agriculture and the environment in arid regions of the globe. *Critical Reviews in Biotechnology* 29: 131-151.
- Sotomayor, J. A., Martinez, R. M., Garcia, A. J. and Jordan, M. J. (2004). *Thymus zygis* subsp *gracilis*: Watering level effect on phytomass production and essential oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5418-5424.
- Southam, A. D., Payne, T. G., Cooper, H. J., Arvanitis, T. N. and Viant, M. R. (2007) Dynamic range and mass accuracy of wide-scan direct infusion nanoelectrospray fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry-based metabolomics increased by the spectral stitching method. *Anal Chem* 79: 4595-4602.
- Stahl-Biskup, E. and Sàez, F. (Eds.) (2002) *Thyme, The genus Thymus*. London and New York Taylor & Francis. p.331.
- Sun, W., Bernard, C., Van De Cotte, B., Van Montagu, M. and Verbruggen, N. (2001). At-HSP17. 6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *The Plant Journal* 27: 407-415.
- Szalai, G., Horgosi, S., Soós, V., Majláth, I., Balázs, E. and Janda, T. (2011) Salicylic acid treatment of pea seeds induces its de novo synthesis. *Journal of plant physiology* 168: 213-219.
- Tarkowski, P., *et al.* (2010) Analysis of 2-methylthio-derivatives of isoprenoid cytokinins by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta* 680: 86-91.
- Thameur, A., Ferchichi, A. and López-Carbonell, M. (2011) Quantification of free and conjugated abscisic acid in five genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.) under water stress conditions. *South African Journal of Botany* 77: 222-228.
- Vasquez-Robinet, C., *et al.* (2008) Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of experimental Botany* 59: 2109-2123.
- Veselov, D., Sharipova, G., Veselov, S. and Kudoyarova, G. (2008) The effects of NaCl treatment on water relations, growth, and ABA content in barley cultivars differing in drought tolerance. *Journal of plant growth regulation* 27: 380-386.

- Wang, L., *et al.* (2009) OsGSR1 is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice. *The Plant Journal* 57: 498-510.
- Wang, Y. (2008) Needs for new plant-derived pharmaceuticals in the post-genome era: an industrial view in drug research and development. *Phytochemistry Reviews* 7: 395-406.
- Wargovich, M. J., Woods, C., Hollis, D. M. and Zander, M. E. (2001) Herbs, cancer prevention and health. *The Journal of nutrition* 131: 3034S-3036S.
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of botany* 100: 681-697.
- Weber, R. J. and Viant, M. R. (2010) MI-Pack: Increased confidence of metabolite identification in mass spectra by integrating accurate masses and metabolic pathways. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 104, 75-82.
- Wilkinson, S. and Davies, W. J. (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, cell & environment* 33: 510-525.
- Xin, Z.-y., Zhou, X. and Pilet, P.-E. (1997) Level changes of jasmonic, abscisic, and indole-3yl-acetic acids in maize under desiccation stress. *Journal of plant physiology*, 151, 120-124.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends in plant science* 10: 88-94.
- Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica* 38: 171-186.
- Yuan, S. and Lin, H. (2008) Role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Zeitschrift fur Naturforschung c*, 63, 313.
- Zaika, L. L. (1988) Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety* 9: 97-118.

