

اثر نش 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 تربیت 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 ضدمیکروبی و ضداسپاسم شناخته شده و به جهت تقاضای روزافزون تحقیقات روی این جنس مورد تاکید است. نش‌های محیطی از قبیل خشکی از مهم‌ترین عوامل کاهش عملکرد می‌باشند که تغییرات هورمونی می‌تواند در این میان نقش بهسازی ای داشته باشند. در این آزمایش دو گونه آویشن حساس (*Thymus vulgaris*) و متتحمل (*Thymus serpyllum*) به نش خشکی به کار گرفته شدند که در انتهای دوره نش (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 ذخیره‌گر آب و از طرف دیگر گونه حساس به عنوان مصرف‌کننده آب شناخته شد. در هر دو گیاه در هنگام نش، برداشت مواد گیاهی انجم 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، نتوگرانتین (پیش‌ساز آبسیزیک اسید) ۱۲۲ درصد، اکسین ۱۶۶ درصد و جیبرلین ۱۸۰ درصد افزایش را نسبت به غلظت هورمون‌ها 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 نتوگرانتین ۶۲ درصد و جیبرلین ۳۶ درصد کاهش معنی‌داری نشان داد. افزایش میزان نتوگرانتین (پیش‌ساز آبسیزیک اسید) در رقم متتحمل با حفظ محتوای آبی و کاهش وزن ماده خشک بخش هوایی همراه بود. نتایج این آزمایش نقش کلیدی اسید آبسیزیک و اسید سالیسیلیک را در مکانیزم تحمل به خشکی مجدد تایید نمود. ولی به نظر می‌رسد پاسخ نهایی گیاه به نش کم آبی در نتیجه اثرات متقابل بین همه هورمون‌ها بروز می‌یابد. افزایش پیش ساز ABA موجب بازدارندگی رشد در گیاهان متتحمل شد که در نهایت موجب مصرف آب کمتر گردید در حالیکه در گیاهان حساس نتوگرانتین افزایش نداشت که به نظر می‌رسد به این دلیل است که پتانسیل آبی گیاه هنوز به آستانه لازم جهت تحریک بیوسنتر آبسیزیک اسید نرسیده است.

کلمات کلیدی: آویشن، هورمون، اسید آبسیزیک، 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 (Abscisic Acid), CK (Cytokinin), BR (brassinosteroids), SL (strigolactone).

عنوان معطر کننده و طعم‌دهنده غذا نیز مورد استفاده بوده‌اند.

مقدمه:
گیاهان دارویی علاوه بر مصرف دارویی در طب سنتی، به امروزه نقش دارویی گیاهان در بسیاری از کشورهای پیشرفتنه

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

همافزایی (antagonistic) یا هم‌ستیزانه (synergistic) 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 یا اسیدهای آمینه. تمام فرم‌های متعدد ذکر شده دارای همان نقش بیولوژیکی فرم آزاد هورمون‌ها هستند. بنابراین برای مطالعه هورمون‌ها، بایستی غلطت تمام فرم‌های مذکور اندازه گیری شود (Sakakibara, 2006). اولین تکنیک برای جداسازی و اندازه گیری هورمون‌های گیاهی (Thin-layer chromatography- TLC) کروماتوگرافی لایه نازک (Nordström *et al.*, 2004; Karadeniz *et al.*, 2006) وی بود (Roche *et al.*, 2009). ولی تا به حال چندین روش جهت اندازه گیری هورمون‌ها به طور همزمان گزارش شده‌اند که شامل HPLC (با آشکارسازهای مختلفی نظیر UV، طیف سنج جرمی و یا الکتروشیمیایی CE/MS و Nordströmetal., 2004; Prinsenetal., 1995) و (Ge *et al.*, 2005) می‌باشند. در مطالعات یاد شده، یک گروه از هورمون‌ها از قبیل سیتوکینین‌ها، اکسین‌ها و متابولیت‌های آنها هدف گذاری شده‌اند. ولی به هر حال، گرایش اصلی مطالعات فیزیولوژیک هورمون‌ها به سوی پروفایل متابولیکی هورمون‌ها و اندازه گیری هر چه بیشتر تعداد هورمونهای است (Tarkowskietal., 2010; López-Carbonelletal., 2009). برای تحقق این هدف (اندازه گیری 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 دقیقت اندازه گیری جرم و بالاترین وضوح جرمی در بین تکنیک‌های طیف سنج 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 کاهش دهنده 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 لاپیاته (لامپاسه) است که دارای بیش از ۲۵۰ گونه و زیر گونه می‌باشد. کاربردهای غذایی و دارویی این گیاه و رشد تقاضای برای محصولات متعدد آویشن بیانگر اهمیت تحقیقات بیشتر بر روی این گیاه است (Stahl-Biskup and Sàez, 2002) در بین عوامل محیطی، احتمالاً آب محدود کننده ترین عامل برای کیفیت و عملکرد محصول تولیدی گیاهان زراعی می‌باشد (Yordanov *et al.*, 2000). تنش خشکی از چندین جنبه مختلف گیاه را تحت تاثیر قرار داده (Bahrani *et al.*, 2010) و در سطوح مختلف مورفو فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی نمود پیدا می‌کند همانند جلوگیری از رشد (Sánchez-Díaz *et al.*, 2008)، تجمع مواد ارگانیک سازگار 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 آبسیزیک، 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 آبسیزیک (ABA)، اتیلن، سیتوکینین (CK)، اکسین (IAA)، جیبرلین (GA)، اسید جاسمونیک (JA)، اسید سالیسیلیک (SA)، اسید نیتریک (NO) براسینو استروپید (brassinosteroids-BR) و استرگولاکتون (Peleg and Blumwald, 2011) (SL-strigolactone). این هورمون‌ها در سازگاری به تنش‌های محیطی به صورت

به خشکی (*Thymus serpyllum*) و حساس به خشکی (*Thymus vulgaris*) بودند که بذور آنها از شرکت سمیلا سیلولسترس (*Semilla silvstres*) اسپانیا خریداری گردید. سطوح تحمل این توده‌ها در مرحله گیاهچه‌گی قبلًاً توسط مولف و همکاران (۲۰۱۴) تعیین گردیده بود (Moradi *et al.*, 2014a). بذور در گلدان‌های با قطر ۸ سانتیمتر با ترکیب خاک کمپوست (۴ قسمت): پرلیت (۱ قسمت) کشت گردیده و در اتفاق 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 خشکیدگی ادامه یافت، ولی برای گیاهان شاهد آبیاری طبق روال قبلی تا انتهای آزمایش ادامه یافت (نحوه کد دهی و تعیین مراحل پژمردگی قبلًاً 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) اندازه‌گیری 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) (Bertin *et al.*, 2014) شده است.

برای ثبت صفات فیزیولوژیک و متابولیت‌ها، نمونه‌برداری از ۶ تکرار بیولوژیک و ۳ تکرار تکنیکی انجام گرفت. برای استخراج متابولیت‌ها، حدود ۱۰۰ میلی گرم برگ تر در نقطه بحرانی (بالاصله قبل از پژمردگی گیاه) دوره تنش خشکی برداشت و در نیتروژن مایع فریز شدند. سپس عصاره نمونه‌های فریز شده خشک شده، بر اساس پروتوكل 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 پریسیلیس ۲۴ هموژیزه شدند (Bertin *et al.*, 2014). سپس ۳۲ میکرولیتر کلروفرم و ۱۶ میلی لیتر آب اضافه شده و ترکیب حاصل سانتریفیوژ شد.

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

تا به حال مطالعات زیادی بر روی تنش خشکی در سطح فیزیولوژیکی و انسانی آن انجام گرفته است که نمونه‌ای از آنها (Babaei *et al.*, 2010; Aziz *et al.*, 2010; Sotomayor *et al.*, 2004; Thymus zygis *et al.*, 2008) و همچنین (*Thymus hyemalis* Jordan *et al.*, 2003) توان ذکر نمود. ولی هیچ مطالعه‌ای 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، اوکالیپتوس، سیب زمینی، انگور، گوجه فرنگی و آرایدوسپسیس پروفایل متابولیکی برای مطالعه تنش خشکی انجام یافته است (Vasquez-Robinet *et al.*, 2008; Levi *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2012; Vasquez-Robinet *et al.*, 2008).

علیرغم داشتن فراوان در خصوص پاسخ گیاه به کم آبی، هنوز جنبه‌های دیگری از این تنش نیاز به مطالعه بیشتر هستند (Bhargava and Sawant, 2013; Shao *et al.*, 2009) از آنها پاسخ گیاه به تنش از طریق تغییرات هورمونی می‌باشد. ولی چنین مطالعاتی در مورد آویشن هنوز گزارش نگردیده است. از سوی دیگر آزمایشات مقایسه‌ای که گیاه حساس به همراه گیاه مقاوم تحت شرایط تنش مورد مطالعه قرار می‌گیرد روش مناسبی برای مطالعه نقش متابولیت‌ها در تحمل تنش‌ها می‌باشد (Korn *et al.*, 2010; Lughan *et al.*, 2010). بنابراین در مطالعه حاضر، دو گونه آویشن متتحمل و حساس به تنش خشکی (به ترتیب *Thymus vulgaris* و *Thymus serpyllum*) 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 روش‌ها:

گیاهان آویشن مورد استفاده در این تحقیق شامل گونه متتحمل

(2010). در مرحله تجزیه آماری، نرمال سازی داده‌ها با روش Probabilistic Quotient Normalization (PQN) صورت گرفته (Dieterle *et al.*, 2006) سپس داده‌ها برای برآورد k-nearest neighbour (KNN) (Dixon, 1979; imputation method (Hrydziuszko and Viant, 2012) تیمار شدند. بالاخره برای حذف اثر غالیت پیک‌های باشد بالا، داده‌ها با روش Generalized Log Transformation (Glog) 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.

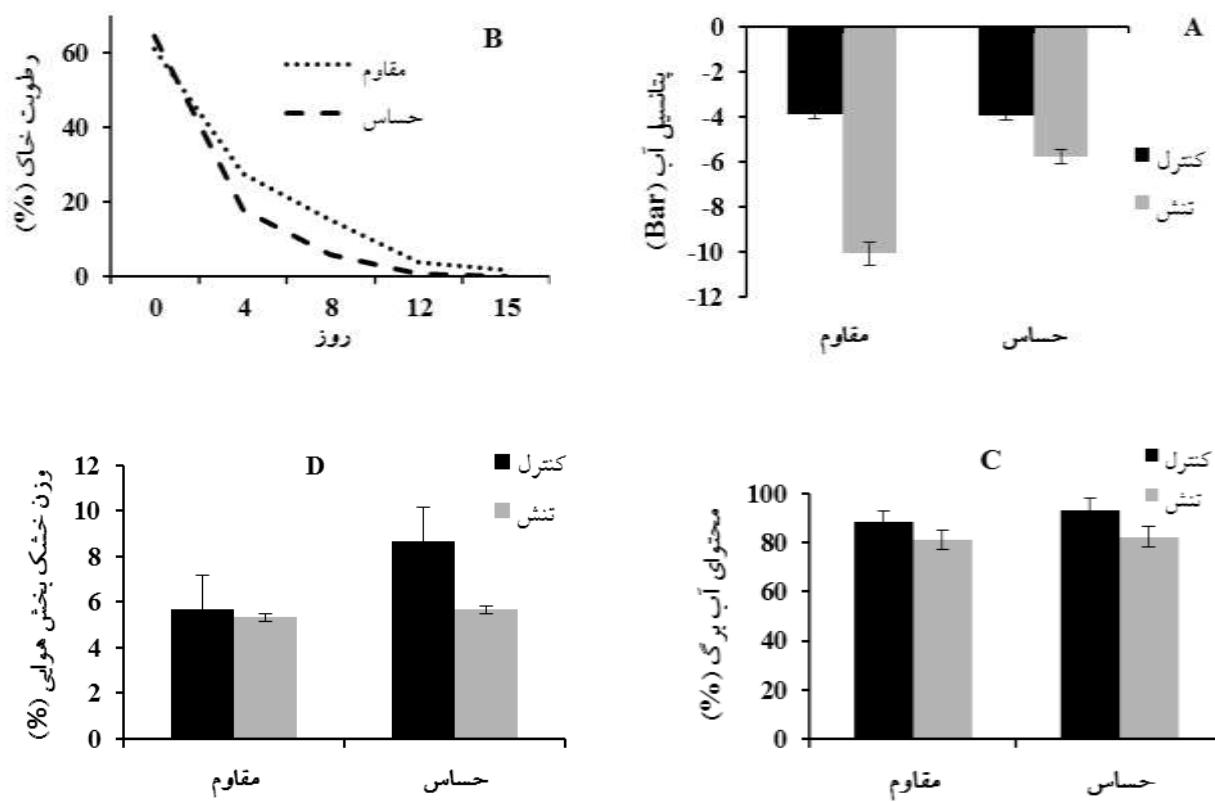
نتایج و بحث:

دو پارامتر اصلی وضعیت آب در گیاه یعنی محتوای آب و پتانسیل آب گیاه به همراه وضعیت رشدی گیاه در انتهای دوره تنفس خشکی قبل از پژمردگی نسبت به ابتدای دوره تنفس 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 ۴-۶ بار در شرایط آبی به ۶-۷ بار در شرایط خشکی کاهش داشت. رطوبت خاک که قبل از تنفس بیش از ۶۰ درصد بود تا روز چهارم تنفس 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 تنفس، گونه *T. serpyllum* دارای پتانسیل آبی پایین‌تری نسبت به گونه *T. vulgaris* بود. نتایج بررسی تغییرات پارامترهای فیزیولوژیک، کارایی این شاخص‌ها را در مطالعات تنفس خشکی تایید نمود. برای مثال، درصد رطوبت خاک به عنوان شاخصی توانست شدت تنفس خشکی را به صورت کمی نمایش دهد (Granier *et al.*, 2006).

بالاخره این محلول دو قسمتی به دو ریز لوله شیشه‌ای 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) با گاز نیتروژن خشک گردیده و تا زمان تجزیه نگهداری شدند. اندازه گیری متابولیتها با استفاده از روش طیف سنجی (FT-ICR Mass spectrometry) 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 نمونه‌ها به مقدار ۱۰ میکرولیتر به همراه نمونه‌های کنترل کیفیت به نمونه‌بردار اتوماتیک منتقل شدند. نمونه‌ها با طیف سنج جرمی با قدرت ۷ تسلی ساخت شرکت ترمو ساینتیک (LTQ FT, Thermo Scientific, Bremen, Germany) تجزیه شدند که صفحه یونیزه نانوالکترواسپری چیپ‌دار (chip-based direct infusion nanoelectrospray ionisation (Triversa, Advion Biosciences, Ithaca, NY) مجهز بود الکترواسپری برای یونهای مثبت برابر ۱/۷ کیلوولت و برای یونهای منفی ۱/۷ کیلوولت بود. دامنه ۵۹۰-۷۰ جرم به بار برای ترکیبات قطبی و دامنه ۲۰۰۰-۷۰ 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 استیچ (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 (Weber and Viant, Mi-Pack) وارد شد.



شکل ۱- تغییرات پارامترهای وضعیت آب گونه های گیاهی متحمل (*Thymus vulgaris*) و حساس (*Thymus serpyllum*) 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 آب برگ را برحسب درصد و شکل D وزن خشک بخش هوایی گیاه را برحسب گرم نشان می دهد. ارقام به صورت $\bar{x} \pm SEM$ با ۶ تکرار هستند.

پتانسیل اسمزی پایین کمتر به تخریب آوند چوبی حساس هستند (Gyenge *et al.*, 2005). گونه های گیاهی مصرف کننده آب، روزنها را باز نگه داشته و دی اکسید کربن بیشتری آسمیمه (Assimilate) می کنند بنابراین عملکرد بالاتر (نرخ رشد بیشتری) نسبت به ذخیره گرهای 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

قبلی 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 (Aguirrezzabal *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 لویت (1972)، گیاهان در شرایط کم آبی دو استراتژی در پیش می گیرند: ذخیره آب یا مصرف آب در رطوبت کافی خاک، روزنها بسته می شود که بدینوسیله موجب کاهش تلفات آب از طریق تعرق می گردد (Levitt, 1972; Kalapos, 1994). در ذخیره گرهای آب، حتی (Reynolds *et al.*, 1997) گیاهان علاوه بر دارا بودن دیواره سلولی محکم (به دلیل خاصیت الاستیسیته بالا) و

جدول ۱- مشخصات هورمون‌های گیاهی در گیاه آویشن

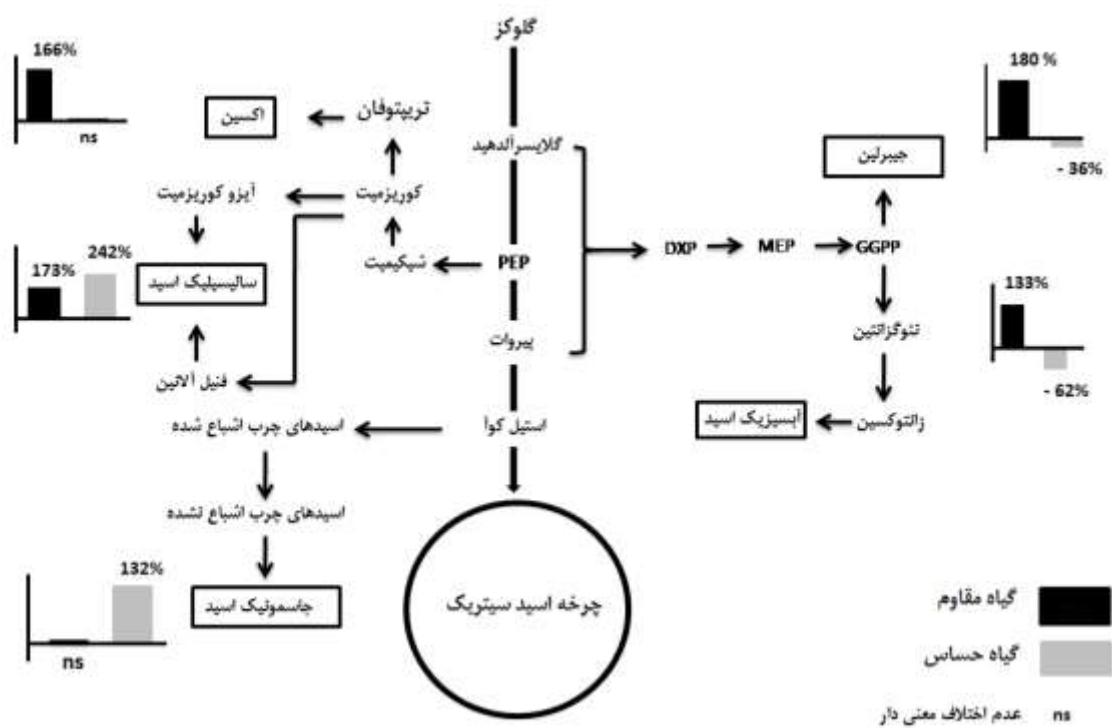
ردیف	نام هورمون	گونه گیاهی	میزان تغییر(%)	میزان پیک در شرایط میزان پیک در شرایط	تنش*	بدون تنش*	بار/جرم
۱	جیبرلین	<i>T. vulgaris</i>	-۳۶	۵۸۵۲۵	۱۶۲۱۰۱	۱۶۰۸۹	۳۳۱/۱۵۵۱
۲	جامسونیک اسید	<i>T. vulgaris</i>	۱۳۲	۱۵۹۴۲	۱۶۹۴۷	۱۲۰۸۹	۴۹/۰۸۸۶
۳	متیل سالیسیلات	<i>T. vulgaris</i>	۲۴۲	۴۱۱۳۸	۷۳۸۱۹۱	۱۱۸۶۳۹۱	۱۵۱/۰۴۰۲
۴	نئوگزانتین	<i>T. vulgaris</i>	-۶۲	۷۳۸۱۹۱	۱۱۰۳۲	۱۹۰۹۰	۱۳۸/۰۵۲۵
۵	سالیسیلیک اسید	<i>T. serpyllum</i>	۱۷۳	۱۳۷۲۸	۸۲۶۶	۱۶۶	۱۵۷/۰۴۲۱
۶	ایندول-۳-استالدهاید	<i>T. serpyllum</i>	۱۶۶	۸۹۲۰۲	۴۹۴۷۸	۱۸۰	۳۳۱/۱۵۵۱
۷	جیبرلین	<i>T. serpyllum</i>	۱۳۳	۷۸۰۹۷	۵۸۵۶۹	۱۳۳	۵۹۹/۴۱۱۴

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

استیل کوآنزیم آ (Acetyl CoA) منشا می‌گیرد (شکل ۲). افزایش آبسیزیک اسید مجدد نقش حیاتی این هورمون را در مکانیزم‌های مقابله با خشکی گیاهان مقاوم تایید می‌کند که قبل از مطالعات متعدد بر روی گیاهانی همانند ذرت (Xin *et al.*, 2008), Huang *et al.*, 2008 (Huang *et al.*, 2008; Wang, 1997; Wang, 2008), آربیدوپسیس (Abernethy and Abernethy and Shafi *et al.*, 2010)، فستوکا (Shafei *et al.*, 2010) و یونجه (Thameur *et al.*, 2011), جو (McManus, 1998) 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 تحريك می‌نماید. از این مکانیزم‌ها می‌توان به کاهش میزان فتوستز، هدایت روزنها 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 آبسیزیک 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

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 آبسیزیک اسید) ۱۳۳٪، اکسین ۱۶۶ درصد و جیبرلین ۱۸۰ درصد نسبت به غلظت هورمون‌ها در حالت آبیاری کامل افزایش معنی‌داری نشان داد. در حالیکه در گیاهان حساس جامسونیک 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 آبسیزیک اسید از محصولات مسیر بیوستزی ترکیبات فرار MEP می‌باشد که درون پلاستید رخ می‌دهد. هورمون‌های اکسین و سالیسیلیک اسید نیز از محصولات مسیر بیوستزی شیکیمیت بوده و پس از مرحله کوریزمیت (Chorismate) تولید می‌شوند. جامسونیک اسید نیز حاصل اشباع نشدنگی اسیدهای چرب اشباع شده می‌باشد که از



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

البته پیش تر نیز ثابت گردیده است که هورمون اکسین (Pieterse *et al.*, 2009), اتیلن (Mahouachi *et al.*, 2007) و اسید جاسمونیک (Wasternack, 2007) و اسید سالیسیلیک (Raskin, 1992) به طور معنی داری در پاسخ به تنفس 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 تنفس خشکی تایید می نماید که این هورمون نقش اساسی در افزایش تحمل به تنفس خشکی (Munne-Bosch and Penuelas, 2003) و تنظیم فعالیتهاي اسمزی و شوری (Borsani *et al.*, 2001) و تنظیم اسید آنزیمی (Durner and Klessig, 1996) را دارد. 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 فتوسترات و هدایت روزنه ای می باشد (Shakirova, 2007). هر چند 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 A-۱، در انتهای دوره تنفس 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 بیوسنتر آبسیزیک اسید نرسیده و در نتیجه نشوگزانتین افزایش نداشته است. زبادال (۱۹۷۴) در آزمایشی دریافت که آستانه پتانسیل آبی برای *Ambrosia artemisiifolia* L. برابر atm-۸ در حالی که این آستانه در گیاه *Ambrosia trifida* برابر atm-۱۲ است. با این وجود، شواهد اخیر پیشنهاد می کنند که هورمونهای دیگر از قبیل NO, BR, JA, SA و JA 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 احتمالا در ابتدای دوره تنفس رخ داده باشد. در این مرحله که رطوبت خاک شروع به کاهش می کند، هر دو هورمون JA و SA تجمع می یابند که این تغییرات هورمونی قبل از 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 می‌باید. 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 متقابلی بین جیبرلین و دیگر هورمونها وجود دارد که کنترل رشد و نمو گیاه را تحت شرایط تنش های 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. شاخص های فیزیولوژیک محقق را قادر ساخت تا گونه مقاوم 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 پاسخ های متفاوتی از خود نشان دادند. براین اساس، گیاه متحمل در شرایط تنش سعی بر افزایش و یا نگهداری سطح متابولیت‌های خاص و کلیدی دارد که در این آزمایش گونه مقاوم به خشکی، از نظر میزان جیبرلین، نئوگراناتین، اکسین و اسید سالیسیلیک افزایش و اسید جاسمونیک تفاوت معنی داری نشان نداد. درحالی که در گیاهان حساس، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک افزایش و نئوگراناتین و جیبرلین کاهش معنی داری نشان داد. افزایش نئوگراناتین با کاهش وزن ماده خشک پخش 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 تنش های 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 هرچقدر غلظت SA بالاتر رود به دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو، حساسیت گیاه به تنش غیر زیستی بیشتر می‌شود و بر عکس این هورمون در غلظت پاییتر 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 آتنی اکسیدانها و پروتئین (Heat Shock Protein) HSPs ثابت شده است (Yuan and Lin, 2008)، این آنزیم ها و پروتئین ها از طریق از بین بردن ROSها موجب کاهش زیان ناشی از تنش می‌شوند (Sun *et al.*, 2001). در غلظت بالاتر به دلیل تجمع بیش از حد ROSها موجب مرگ سلولی می‌شود (Mittler, 2002) ولی در غلظت پاییتر 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 پاسخ های دفاعی مستقیم و غیرمستقیم (در مقابل آفات و بیماریها)، متابولیسم ثانویه، فرایندهای تولیدمثلى (مانند رسیدگی دانه گرده و نمو Arimura *et al.*, 2005) و تخمرک (Wasternack, 2007).

گونه های حساس آویشن را به تنش خشکی افزایش دهنده طریقه دیگر استفاده از یافته های این آزمایش می تواند استفاده از ترکیبات تجاری این هورمون ها به صورت های مختلف نظری محلول پاشی در جهت افزایش تحمل گونه های حساس باشد.

محتوای آبی گیاه همراه بود. مطالعات بیشتر در خصوص ژنهای کنترل کننده مسیرهای بیوسترزی این هورمونها می تواند راهنمای خوبی برای محققان آینده باشد تا بتوانند با مهندسی ژنتیک ژنهای دخیل، تحمل

منابع:

- Aguirrezaabal, L., Bouchier-Combaud, S., Radziejwoski, 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, prolin 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 Haghghi, 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 National 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 metabonomics. *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.
- Hrydziszko, 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 Hincha, 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) Abscisic 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 cultivarsand culture medium on callus formation and plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) Pakestan 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 higherplants - biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment 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 oilquality. 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 ioncyclotron 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) Herbals, 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.

