Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 49, No 1, Spring 2018 (167-177)
DOI: 10.22059/ijfcs.2017.228905.654289

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۷ (ص۱۷۷-۱۶۷)

کاربرد نویدبخش تنش خشکی به‌منظور افزایش کیفیت محصول گیاه داروئی مرزهٔ سهندی (*Satureja sahendica* Bornm.) بومی ایران

آناهیتا شریعت[۱]، قاسم کریم زاده[۲*]، محمد حسن عصاره[۳] و جواد هادیان[۴]

۱و۲، به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۴- دانشیار، گروه مهندسی کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۱- تاریخ پذیرش:۹۶/۰۶/۲۲)

چکیده

مرزهٔ سهندی (*Satureja sahendica* Bornm.) گیاه بومی و انحصاری ایران و از خانوادهٔ نعناعیان است. این گیاه کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی، آرایشی - بهداشتی و دارویی دارد. در این پژوهش، تنش خشکی در مرحلهٔ گلدهی در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا شد. تیمارها، شامل پنج زمان نمونه‌برداری (شاهد، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز) به فاصلهٔ سه روز بودند که پس از قطع آبیاری اعمال شد. رطوبت حجمی خاک و شماری صفات فیزیولوژیک مانند پتانسیل آبی برگ، محتوای نسبی آب برگ، رنگیزه‌های گیاهی، قندهای محلول و پرولین اندازه‌گیری شد. بررسی نمایهٔ متابولیتی نشان داد، بعضی از متابولیت‌ها مانند رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، اورسولیک اسید و کارنوزیک اسید و نیز قندهای محلول و پرولین متأثر از تنش خشکی بوده و افزایش معنی‌داری یافتند. میزان بازدهٔ اسانس و نیز تیمول به‌عنوان مهم‌ترین و فراوان‌ترین ترکیب موجود در اسانس مرزهٔ سهندی، افزایش معنی‌داری نشان داد، اگرچه میزان کمی بعضی از ترکیب‌های دیگر موجود در اسانس، مانند کارواکرول، گاماترپینن و پاراسیمن در نتیجهٔ تنش خشکی کاهش یافت. نتایج این تحقیق بیانگر این است که گیاه مرزه افزون بر افزایش تنظیم‌کننده‌های اسمزی مانند قندهای محلول و پرولین با تغییر در ترکیب‌های ثانویهٔ موجود در اسانس و عصاره توانسته است خشکی را تحمل کند. درمجموع نمایهٔ متابولیتی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی، ما را به درک بهتری از سازوکارهای مرزه در سطح متابولومیکی هدایت خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: **بازدهٔ اسانس، عصارهٔ الکلی، متابولیت‌های ثانویه، مرزه، نمایهٔ متابولیتی.**

A promising application of drought stress for increasing product quality of Iranian endemic *Satureja sahendica* Bornm. medicinal plant

Anahita Shariat[1], Ghasem Karimzadeh[2]*, Mohammad Hassan Assareh[3], Javad Hadian[4]

1an 2, Ph.D. Student and Associate Professor, respectively, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran Iran,

3. Professor Research Institute of Forests and Rangelands of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran.

4. Associte Professor, Department of Agricultural Engineering, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti, University, G.C. Evin, Tehran, I.R. Iran.

(Received: March 1, 2017- Accepted: September 13, 2017)

ABSTRACT

Sahendian savory (*Satureja sahendica* Bornm.) is an Iranian endemic species from Lamiaceae family. This plant has been used in the food industry, cosmetics and medical preparations. In the current study, drought stress was induced at flowering stage based on a completely randomized design (CRD) with three replications in green house. Treatments were considered as five sampling times (control, 3, 6, 9 and 12 days) with three interval days that imposed after stopping irrigation. Soil volumetric moisture, and several physiological traits were measured, including leaf water potential, relative water content, pigments, soluble sugars, and proline. Metabolite profiling revealed that metabolites, such as rosmarinic acid, caffeic acid, ursolic acid, carnosic acid, soluble sugars and proline affected by drought stress and significantly increased by drought stress. The oil yield and thymol as the most valuable compound in the oil of Sahandian savory, was significantly increased, although, the quantitative content of some compounds in oil such as Carvacrole, γ-Terpinene and p- Cymene were decreased in response to drought stress. It can be concluded that in addition to osmoprotectant accumulation, savory plant improved its drought tolerance by changing in its secondary metabolites' components in essential oil and in extract. In conclusion, the combination of metabolite profiling and physiological parameters contributed to a greater understanding of the mechanisms of savory plant's response at metabolomics level.

Keywords: Savory, metabolite profiling, essential oil yield, secondary metabolites, methanolic extracts.

* Corresponding author E-mail: : karimzadeh_g@modares.ac.ir

مقدمه

گیاه مرزه (Savory) در ایران پانزده گونهٔ بومی دارد که یکی از آن‌ها مرزهٔ سهندی (*Satureja sahandica*) بوده که از گونه‌های انحصاری ایران به شمار می‌آید و در آذربایجان، زنجان، کردستان، کرمانشاه و ایلام پراکنش دارد (Yousefzadi *et al*., 2012). از مهم‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهندهٔ اسانس این‌گونه تیمول، گاماترپینن و پاراسیمن است (Akbarinia *et al*., 2009). گیاه مرزه، گیاهی دگرگشن بوده و در گونه‌های مختلف، میزان دگرگرده‌افشانی متفاوت و تا بیش از ۸۰ درصد نیز گزارش شده است (Hadian *et al*., 2010). بنابراین، می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که پایه‌های مختلف از نظر ژنتیکی با یکدیگر متفاوت بوده، در نتیجه از نظر تحمل به تنش و تولید متابولیت‌های ثانویه با یکدیگر متفاوت هستند (Weckwerth, 2007). بنابراین، اگر هدف از تحقیق بررسی الگوی تغییرپذیری در برابر تنش باشد، لازم است از یکسان بودن پایه‌ها اطمینان به دست آورد که به‌طورمعمول بهترین روش تولید همسانه (کلون) است. تنش‌های غیر زیستی از جمله خشکی منجر به تغییر سوخت‌وسازی (متابولیکی) گسترده‌ای می‌شوند که از ساخت (سنتز) مقادیر کم متابولیت‌های خاص تا تغییر زیاد در ترکیب‌های اولیهٔ متابولیتی و پاسخ‌های فیزیولوژیکی را شامل می‌شود. قندها، قندهای الکلی، آمینواسیدها و آمین‌ها در شرایط تنش خشکی در گونه‌های مختلف گیاهی تجمع می‌یابند (Taji *et al*., 2002). این متابولیت‌ها به‌عنوان اسمولیت، پاداکسنده (آنتی‌اکسیدان) یا جاروکننده، باعث پرهیز یا تحمل تنش در گیاه می‌شوند (Bartels and Sunkar, 2005). گزارش‌های مختلفی در ارتباط با تأثیر تنش خشکی بر صفات مختلف فیزیولوژی گیاهان داروئی مانند مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) (Nowak *et al.* 2010)، بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) (Manukyan. 2011) و علف چای (*Hypericum brasiliense*) (De Abreu and Mazzafera, 2005) ارائه شده است. متابولوم (Metabolum) محتوای متابولیت‌های یک موجود است و بررسی آن را متابولومیکس می‌گویند (Weckwerth and Kahl, 2013). نمایهٔ متابولیتی که یکی از نگرش‌های متابولومیکس به شمار می‌آید از اندازه‌گیری همزمان همه یا یک چند از متابولیت‌ها در نمونه به دست می‌آید و کاربرد گسترده‌ای در شناسایی الگوهای منشعب از پاسخ‌های به تنش‌های خاص دارد (Shulaev, 2006). تهیهٔ نمایهٔ متابولیتی بارها توسط دیگر محققان در شرایط تنش خشکی از جمله در صنوبر (*Populus euphratica*) Brosché *et al.* (2005)، در چچم (*Lolium perenne*) Foito. (2010) و در شماری از گونه‌های جنس آویشن (*Thymus* spp.) Moradi (2014) گزارش شده است. هدف از انجام این تحقیق ۱) بررسی تأثیر تنش خشکی بر الگوی تغییرپذیری متابولیتی در گیاه شاهد در مقایسه با گیاه تحت تنش، ۲) کاربرد تنش خشکی به‌منظور افزایش کمی و کیفی اسانس و تعیین بهترین و مؤثرترین زمان برداشت گیاهان پس از قطع آبیاری که میزان تولید اسانس به بیشترین میزان رسیده باشد، ۳) بررسی تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی از جمله ترکیب‌های متابولیت‌ها و اسانس‌ها در گیاه مرزهٔ سهندی است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ مواد گیاهی و ریزازدیادی به‌منظور تولید کلون

بذرهای مرزهٔ سهندی بومی ایران از دامنه‌های سهند واقع در آذربایجان شرقی گردآوری شد و در آغاز فصل بهار در گلخانه با کمینه و بیشینه دمای ۱۵ و ۲۵ درجهٔ سلسیوس در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۲ سانتی‌متر حاوی خاک لوم رسی-شنی (۶۵٪ شن، ۱۴٪ ماسه و ۲۱٪ رس) کشت شد. لازم به یادآوری است که در هر گلدان شمار پنج بذر در عمق ۰.۵ سانتی‌متری کشت و تا زمان جوانه‌زنی، روزانه با آب فشان، آبیاری شد. ازآنجایی‌که در بررسی‌های متابولومیک، داشتن افراد همسان یکی از ضروریات است در گام اول از طریق ریز ازدیادی اقدام به تولید همسانه شد. برای این منظور از نهال‌های سه‌ماههٔ

کشت‌شده در گلخانه، ریزنمونه تهیه و به آزمایشگاه کشت بافت انتقال داده شد. ریز نمونه‌ها از قسمت‌های مختلف گیاهان که اغلب جوان و بدون آلودگی و بیماری بودند، تهیه شد. به‌منظور نوساقه‌زایی از ترکیب هورمونی ایندول بوتیریک اسید (IBA) (۰/۱)، بنزیل آمینوپورین (BAP) (۰/۳) و کینتین (Kin) (۰/۲) برحسب میلی‌گرم بر لیتر و به‌منظور ریشه‌زایی از ترکیب هورمونی IBA (۰/۱) برحسب میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد.

اعمال تنش خشکی در گلخانه

همسانهٔ تولیدشده پس از سازگاری و استقرار در گلخانه که در حدود یک ماه به طول انجامید، به گلدان‌های ۳۰ کیلوگرمی حاوی خاک لوم رسی-شنی (۶۵٪ شن، ۱۴٪ ماسه و ۲۱٪ رس) انتقال و به مدت سه ماه به‌طورمعمول آبیاری شد. تنش خشکی در مرحلهٔ گلدهی در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در فصل تابستان در گلخانه با کمینه و بیشینه دمای ۲۵ و ۳۵ درجهٔ سلسیوس اجرا شد که به این منظور از روش قطع آبیاری استفاده شد. تیمارها، پنج زمان نمونه‌برداری (شاهد، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز) به فاصلهٔ سه روز پس از قطع آبیاری بودند و فراسنجه (پارامتر)های مختلفی اندازه‌گیری شدند. رطوبت حجمی خاک با استفاده از دستگاه TDR (Time Domain Reflectometer) هر سه روز یک‌بار اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری پتانسیل آبی برگ با استفاده از روش غوطه‌وری در مایع انجام گرفت (Michel, 1972).

تعیین میزان درصد رطوبت نسبی برگ (Relative Water Content) با استفاده از روش Boyer (1968) محاسبه شد. برای اندازه‌گیری میزان کل قندهای محلول از روش آنترون استفاده شد .Irigoyen *et al* (1992). محتوای پرولین نیز با روش Bates *et al* (1973) انجام شد. رنگیزه‌های گیاهی شامل سبزینهٔ (کلروفیل) کل، سبزینهٔ a، b، و کاروتنوئید نیز با روش Jason (1978) استخراج شد. برای استخراج اسانس از روش تقطیر با آب (Clevenger) به مدت سه ساعت استفاده شد. بازدهٔ اسانس نیز از درصد اسانس به‌دست‌آمده از میزان ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک محاسبه شد.

شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهندهٔ اسانس

برای تجزیهٔ فام‌نگاری (کروماتوگرافی) گازی اسانس، از فام‌نگار گازی (GC) (Varian CP 3800, Varian, USA) و برای تجزیهٔ اسانس از دستگاه فام‌نگار جفت (کوپل) شده با طیف‌سنج جرمی (GC/MS) (TRACE/DSQ, Thermo Finnigan, USA) استفاده شد. شناسایی ترکیب‌ها با استفاده از شاخص‌های مختلف مانند زمان و شاخص بازداری، بررسی طیف‌های جرمی و مقایسهٔ این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانهٔ رایانهٔ دستگاه GC/MS صورت گرفت (Adams, 2007). درصد نسبی هرکدام از ترکیب‌های تشکیل‌دهندهٔ اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در فام‌نگار گازی (GC) به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضریب‌ها پاسخ به دست آمد. لازم به یادآوری است که برای اندازه‌گیری ترکیب‌های اسانس نیز مانند دیگر صفات از سه تکرار استفاده شد به‌این‌ترتیب با توجه به شمار تیمارها، درمجموع ۱۵ نمونه اسانس به دستگاه GC تزریق شد.

کمی کردن برخی از ترکیب‌های به‌دست‌آمده از GC

پس از شناسایی ترکیب‌های به‌دست‌آمده از دستگاه GC، مشخص شد که بیشترین درصد ترکیب‌های اسانس مربوط به چهار متابولیت کارواکرول، تیمول، پاراسیمن و گاماترپینن است. در نتیجه به‌منظور کمی کردن نتایج به‌دست‌آمده از GC، استاندارد متابولیت‌های یادشده تهیه و به دستگاه GC در پنج غلظت تزریق شد و معادلهٔ خط میان میزان متابولیت‌ها و سطح زیر پیک آن‌ها تعیین شد. بنابراین، داده‌های مربوط به چهار ترکیب نامبرده کمی‌شده و به‌جای درصد بر پایهٔ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در نمایهٔ متابولیتی و نیز تجزیهٔ واریانس استفاده شد.

ارزیابی میزان فنولیک اسیدها (رزمارینیک اسید و کافئیک اسید)و ترپنوئیدها (اورسولیک اسید و کارنوزیک اسید) با دستگاه HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography)

با توجه به نوع متابولیت‌های مورد نظر از دو روش عصاره‌گیری استفاده شد. روش اول برای اندازه‌گیری اورسولیک اسید با روش ارائه شده Liang *et al*. (2009) انجام شد. روش دوم برای اندازه‌گیری‌های رزمارینیک اسید، کارنوزیک اسید و کافئیک اسید با روش ارائه شده Baskan *et al*. (2007) انجام شد. به‌این‌ترتیب برای ارزیابی ترکیب‌های بالا با توجه به اینکه شمار تیمار و تکرار به ترتیب پنج و سه بود، شمار ۱۵ عصاره از روش اول و شمار ۱۵ عصارهٔ دیگر از روش دوم تهیه شد. جداسازی و شناسایی فنولیک اسیدها و ترپنوئید با استفاده از سامانهٔ فام‌نگاری لایهٔ نازک با کارایی بالا (HPTLC) شامل پیمایشگر به همراه لکه‌گذار لینومات۵ و نرم‌افزار WinCATs 1.2.2 از شرکت CAMAG (Muttens, Switzerland) انجام شد (Reich and Schibli, 2006). برای تجزیه‌های مربوط به رزمارینیک اسید، کافئیک اسید و کارنوزیک اسید طول‌موج ۳۲۷ نانومتر (Hadian *et al*., 2010) و برای اورسولیک اسید ۵۱۰ نانومتر در نظر گرفته شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری نتایج صفات فیزیولوژیک، اسانس، HPTLC و GC

نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیولوژیک، بازدهٔ اسانس، میزان متابولیت‌های کارواکرول، تیمول، پاراسیمن و گاماترپینن و نیز رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، کارنوزیک اسید و اورسولیک اسید پس از آزمون نرمال بودن، در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار تجزیه شدند. لازم به یادآوری است که برای تجزیهٔ داده‌ها از نرم‌افزارهای Minitab 17 IBM SPSS Statistics 24 و Excel 2007 استفاده شد.

نتایج و بحث

تأثیر تنش خشکی بر شاخص‌های فیزیولوژیک

میانگین مربعات به‌دست‌آمده از تجزیهٔ واریانس اثر تنش خشکی بر شاخص‌های مختلف فیزیولوژیک در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسهٔ روند تغییرپذیری شاخص‌های مختلف در روزهای پس از قطع آبیاری بیانگر تغییر معنی‌دار ($P < 0.05$) در همهٔ شاخص‌های فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده، بود. لازم به یادآوری است که تنش خشکی تأثیر معنی‌داری نیز بر میزان کمی ترکیب‌های اصلی اسانس (کارواکرول، تیمول، گاماترپینن و پاراسیمن) و نیز میزان کمی ترکیب‌های موجود در عصاره (رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، اورسولیک اسید و کارنوزیک اسید) داشت (جدول ۱). همچنین، مقایسهٔ میانگین شاخص‌های اندازه‌گیری‌شدهٔ فیزیولوژیک در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نیز در جدول ۲ نشان داده شده است. دوازده روز پس از قطع آبیاری، میزان پتانسیل آبی برگ، رطوبت حجمی خاک و محتوای نسبی آب برگ به کمترین میزان خود رسید. میزان پتانسیل آبی برگ از ۰/۹۳- مگاپاسکال (شاهد) به ۴/۹- مگاپاسکال در روز دوازدهم کاهش یافت. رطوبت حجمی خاک نیز از ۲۸/۶ درصد (ظرفیت زراعی خاک) به ۷ درصد در روز آخر کاهش یافت. محتوای نسبی آب برگ نیز تا روز آخر تنش حدود ۱۴درصد کاهش یافت. میزان رنگیزه‌های گیاهی در برگ‌های انتهایی (سبزینهٔ کل، a، b و کاروتنوئید) نیز کاهش معنی‌داری یافتند. بازدهٔ اسانس نیز با افزایش ۲۹ درصدی در روز ششم به بیشترین میزان خود رسید. در تحقیق دیگری، تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه دارویی نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth) بیانگر افزایش معنی‌دار میزان پرولین و قندهای محلول و کاهش رنگیزه‌های گیاهی بود (Dashti *et al*., 2014). در جمعیت‌های رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.) نیز تنش خشکی منجر به کاهش فاحش پتانسیل آب برگ و محتوای نسبی آب برگ شد اگرچه در جمعیت متحمل به دلیل استفاده از راهکارهایی مانند بالا بردن میزان پرولین و قندهای محلول، گیاه توانست با شرایط کم‌آبی سازش کند (Rezaei Chiyaneh *et al*., 2012). در گیاه آویشن

(*Thymus vulgaris*) نیز تنظیم‌کننده‌های اسمزی مانند قندهای محلول و پرولین نقش مؤثری در تحمل این گیاه در برابر تنش خشکی ایفا می‌کنند (Sarajuoghi *et al*., 2014). مقایسهٔ نتایج این بخش از تحقیق با نتایج دیگر محققان بیانگر این واقعیت است که گیاه مرزه با افزایش تجمع مواد سازگارکننده‌ای مانند پرولین و قندهای محلول سعی در تنظیم اسمزی و حفظ آماس به‌منظور کاهش آسیب غشاء یاخته‌ای کرده است.

جدول۱. نتایج تجزیهٔ واریانس(میانگین مربعات) تأثیر تنش خشکی بر مرزهٔ سهندی (*Satureja sahendica*)

Table 1. Results of ANOVA (mean of squares) for effect of drought stress on Sahandian savory (*Satureja sahendica*)

S.O.V	df	Leaf water potential (MPa)	Soil volumetric moisture (%)	Relative water content (%)	Total chlo (mg g^{-1} FW)	Chlo a (mg g^{-1} FW)	Chlo b (mg g^{-1} FW)	Carotenoid (mg g^{-1} FW)	Soluble sugar (µg g^{-1} FW)	Proline (µg g^{-1} DW)
Sampling time	4	9.00**	256.85**	853.33**	0.09**	0.04**	0.005**	7.04**	2,815,843**	60.24**
Error	10	0.13	3.94	92.8	0	0.01	0	0.94	13,198	0.3

ادامهٔ جدول ۱

Continued Table 1.

S.O.V	Df	Oil yield	Carvacrole (mg g^{-1})	Thymol (mg g^{-1})	P-Cymene (mg g^{-1})	γ-Terpinen (mg g^{-1})	Rosmarinic acid (mg g^{-1})	Caffeic acid (mg g^{-1})	Ursolic acid (mg g^{-1})	Carnosic acid (mg g^{-1})
Sampling time	4	0.06^{ns}	0.83**	5.86**	2.67**	0.05^{ns}	251.02**	5.03**	216.55**	0.86**
Error	10	0.03	0.06	0.69	0.4	0.08	10.61	0.08	7.2	0.09

^{ns} ، ** به ترتیب نبود اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

$^{ns, **}$ Non significant and significant ($P < 0.01$), respectively.

جدول۲. مقایسهٔ میانگین‌های شاخص‌های اندازه‌گیری‌شدهٔ فیزیولوژیک مرزهٔ سهندی در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در شرایط تنش خشکی. ارزش‌ها بر پایهٔ میانگین ± خطای استاندارد

Table 2. Means comparison for physiological traits in different sampling times during drought stress. Means ± SE

Sampling times	Leaf water potential (MPa)	Soil volumetric moisture (%)	Relative water content (%)	Total chlorophyll (mg g^{-1} FW)	Chlorophyll a (mg g^{-1} FW)	Chlorophyll b (mg g^{-1} FW)	Carotenoid (mg g^{-1} FW)	Oil yield (%)
Day 0	-0.93 ± 0.03^{a}	28.6 ± 0.82^{a}	83.2 ± 6.45^{a}	1.64 ± 0.05^{a}	1.01 ± 0.03^{a}	0.48 ± 0.03^{a}	15.10 ± 0.61^{a}	2.72 ± 0.03^{b}
Day 3	-2.20 ± 0.15^{b}	11.3 ± 0.86^{b}	79.8 ± 7.11^{a}	1.58 ± 0.05^{a}	0.99 ± 0.04^{a}	0.44 ± 0.02^{ab}	16.37 ± 0.32^{a}	2.78 ± 0.04^{b}
Day 6	-3.93 ± 0.14^{c}	7.4 ± 1.75^{b}	75.2 ± 6.84^{a}	1.47 ± 0.06^{b}	0.97 ± 0.09^{a}	0.42 ± 0.02^{ab}	16.10 ± 0.49^{a}	3.50 ± 0.09^{a}
Day 9	-4.70 ± 0.30^{d}	7.4 ± 0.64^{b}	53.6 ± 3.39^{ab}	1.35 ± 0.07^{b}	0.89 ± 0.07^{ab}	0.40 ± 0.02^{b}	16.10 ± 0.81^{a}	2.70 ± 0.07^{b}
Day 12	-4.96 ± 0.28^{d}	7.1 ± 1.29^{b}	45.4 ± 2.05^{b}	1.22 ± 0.10^{c}	0.74 ± 0.07^{b}	0.38 ± 0.02^{b}	12.67 ± 0.43^{b}	2.76 ± 0.07^{b}
$LSD_{1\%}$	0.94	5.14	24.93	0.16	0.18	0.07	2.50	0.33

میانگین‌های با حرف‌های متفاوت در هر ستون در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌داری دارند.

Means with different letters in each column are significantly different ($P < 0.01$)

تأثیر تنش خشکی بر درصد ترکیب‌های اسانس

مقایسهٔ میانگین‌های درصد ترکیب‌های اسانس مرزهٔ سهندی در فرآیند پنج مرحلهٔ زمانی پس از قطع آبیاری در جدول ۳ ارائه شده است. در این جدول، نتایج تجزیهٔ واریانس به‌صورت معنی‌داری ترکیب‌های مختلف اسانس نمایش داده شده است. از میان هجده ترکیب متابولیتی شناسایی‌شده، تنها شش ترکیب α-thujene، p-Cymene، Thymol، Carvacrole، β-bisabolene، و β-caryophyllene در پاسخ به قطع آبیاری تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) نشان دادند و دیگر ترکیب‌ها تغییر معنی‌داری نشان ندادند ($P > 0.05$). روند تغییرپذیری برای α-thujene به‌گونه‌ای بود که در روز نهم با ۶۰ درصد کاهش، به کمترین میزان خود رسید. ترکیب p-Cymene نیز در روز دوازدهم به کمترین میزان خود رسید. تیمول که یکی از مهم‌ترین ترکیب‌های تشکیل‌دهندهٔ اسانس مرزهٔ

سهندی است در دو روز نهم و دوازدهم نمونه‌برداری به بیشترین میزان خود رسیده و بیش از ۳۱ درصد افزایش داشت. تغییرپذیری β-bisabolene نیز به‌گونه‌ای بود که با افزایش تنش از میزان این ترکیب به‌شدت کاسته شد (جدول ۳). ترکیب β-caryophyllene نیز در روز نهم به بیشترین میزان خود رسید و پس از آن نیز با افزایش تنش، کاهش یافت. نتایج به‌روشنی نشان داد، با افزایش تنش، بازدهٔ اسانس افزایش معنی‌داری یافت. در این تحقیق، تنش خشکی افزون بر افزایش میزان بازدهٔ اسانس، بر میزان ترکیب‌های اصلی موجود در اسانس از جمله کارواکرول و تیمول تأثیر معنی‌داری داشت. افزون بر این، بر میزان ترکیب‌های اصلی موجود در عصارهٔ گیاه (رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، کارنوزیک اسید، و اورسولیک اسید) نیز تأثیر معنی‌داری نشان داد. به‌عبارت‌دیگر، تنش هم بر کمیت و هم بر کیفیت مرزهٔ مورد بررسی تأثیر قابل‌توجهی داشت. لازم به یادآوری است که تغییرپذیری کمی و کیفی به‌حتم همیشه مثبت نیست. به‌طوری‌که در نتایج نشان داده شد، بیشترین تغییرپذیری حدود یک هفته پس از قطع آبیاری به دست آمد و منجر به افزایش بازدهٔ اسانس و ترکیب‌های موجود در عصاره شد. در تحقیقی، Nowak *et al.* (2010) در نتایج بررسی‌های خود نشان دادند، افزایش زیاد مونوترپن‌ها در مریم‌گلی در اثر تنش خشکی بسیار بالاتر از کاهش زیست‌توده (بیوماس) بود. بنابراین، میزان همهٔ مونوترپن‌ها در گیاهان در شرایط تنش ملایم خشکی در مقایسه با گروه شاهد (کنترل)، به‌طور قابل‌توجهی بالاتر بود. در مقابل، Manukyan (2011) نشان داد، تنش ملایم خشکی، با افزایش غلظت مونوترپن‌ها در سنبل بری و بادرنجبویه همراه بود ولی باعث کاهش میزان کلی ترپنوئیدها در *Melissa officinalis*، *Nepeta cataria* و *Salvia officinalis* شد. در تحقیقی که تأثیر تنش خشکی بر علف چای (*Hypericum brasiliense*) بررسی شد، نتایج نشان داد، نه‌تنها غلظت، بلکه میزان کل ترکیب‌های فنلی به‌شدت در گیاهان در شرایط تنش افزایش یافت (De Abreu and Mazzafera, 2005).

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین‌های درصد ترکیب‌های اسانس مرزهٔ سهندی طی پنج مرحلهٔ زمانی پس از قطع آبیاری

Table 3. Means comparison for oil compounds in five sampling times after stopping irrigation

Sampling time	Control	Day 3	Day 6	Day 9	Day 12	Sig.	P value
α-thujene	0.60 ± 0.09^{a}	0.40 ± 0.08^{b}	0.28 ± 0.04^{b}	0.24 ± 0.03^{b}	0.27 ± 0.05^{b}	*	0.011
α-Pinene	0.35 ± 0.07^{ab}	0.26 ± 0.03^{b}	0.30 ± 0.15^{ab}	0.58 ± 0.08^{a}	0.20 ± 0.02^{b}	ns	0.075
β-Pinene	0.71 ± 0.31	0.75 ± 0.12	0.57 ± 0.06	0.84 ± 0.16	0.55 ± 0.17	ns	0.785
Myrcene	0.25 ± 0.14	0.26 ± 0.16	0.56 ± 0.03	0.60 ± 0.02	0.50 ± 0.16	ns	0.176
p-Cymene	28.45 ± 2.18	27.59 ± 3.47	20.62 ± 1.98	27.11 ± 0.61	19.57 ± 1.61	*	0.041
γ-Terpinene	9.02 ± 1.64	8.71 ± 0.90	7.49 ± 0.42	8.99 ± 1.28	8.21 ± 0.45	ns	0.820
(Z)-Sabinene hydrate	0.29 ± 0.09	0.27 ± 0.05	0.44 ± 0.02	0.27 ± 0.14	0.26 ± 0.10	ns	0.607
Linalool	0.22 ± 0.09	0.16 ± 0.08	0.28 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.28 ± 0.04	ns	0.238
Borneol	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.04	0.02 ± 0.02	0.19 ± 0.10	0.19 ± 0.19	ns	0.468
Terpin-4-ol	0.37 ± 0.07	0.52 ± 0.05	0.55 ± 0.04	0.52 ± 0.06	0.37 ± 0.08	ns	0.180
Thymol	44.47 ± 2.85^{b}	47.41 ± 0.84^{b}	53.57 ± 3.8^{ab}	59.12 ± 4.63^{a}	58.40 ± 1.66^{a}	*	0.042
Carvacrol	10.21 ± 0.57^{a}	6.36 ± 0.39^{b}	6.15 ± 0.11^{b}	5.92 ± 0.07^{b}	6.12 ± 0.39^{b}	*	0.045
Carvacryl acetate	0.47 ± 0.39	2.49 ± 0.08	1.86 ± 0.06	1.73 ± 0.87	1.81 ± 0.89	ns	0.254
β-Caryophyllene	0.81 ± 0.76^{b}	0.09 ± 0.09^{b}	0.00 ± 0.0^{b}	2.43 ± 0.12^{a}	0.07 ± 0.04^{b}	**	0.002
β-Bisabolene	0.08 ± 0.06^{bc}	0.32 ± 0.10^{a}	0.24 ± 0.12^{ab}	0.00 ± 0.00^{c}	0.05 ± 0.05^{c}	*	0.020
Sphathelenol	0.37 ± 0.14	0.25 ± 0.13	0.13 ± 0.08	0.50 ± 0.25	0.35 ± 0.27	ns	0.712
Caryophyllene oxide	0.09 ± 0.09	0.07 ± 0.07	0.14 ± 0.07	0.28 ± 0.04	0.70 ± 0.45	ns	0.255
(Z)-Bisabolene oxide	0.17 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.18 ± 0.10	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.03	ns	0.080

میانگین‌ها با حرف‌های متفاوت در هر ردیف، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال درج‌شده برای آن ردیف، دارند.

Means with different letters in each row are significantly different at probability level shown for each row.

بررسی نمایهٔ متابولیتی مرزهٔ سهندی

روند تغییر تأثیر تنش خشکی بر میزان کمی و نیز نسبت تغییرپذیری ده ترکیب اندازه‌گیری‌شده، در جدول ۴ نشان داده شده است. روند تغییرپذیری میزان قندهای محلول در جدول ۴ بیانگر آن است که بیشترین میزان تغییرپذیری، شش روز پس از قطع آبیاری مشاهده شد به‌طوری‌که تا ۳/۹ برابر افزایش نسبت به تیمار شاهد نشان داد. ادامهٔ روند تنش در مراحل بعد (روز ۹ و ۱۲) منجر به کاهش در تولید قندهای محلول شد. میزان پرولین نیز بیانگر افزایش ۵/۱ برابری این اسیدآمینه، شش روز پس از قطع آبیاری بود که با ادامهٔ تنش از میزان یادآوری شده کاسته و به ۳/۲ برابر در روز ۱۲ (نسبت به شاهد) کاهش یافت. بررسی روند تغییرپذیری ترکیب‌های موجود در عصارهٔ الکلی نیز گویای افزایش معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد ($P < 0.01$) برای رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، اورسولیک اسید و کارنوزیک اسید بود (جدول ۱).

از میان اسیدهای اندازه‌گیری‌شده توسط دستگاه HPTLC، اورسولیک اسید بیشترین افزایش را نشان داد، به‌گونه‌ای که شش روز پس از قطع آبیاری تا بیش از ۳/۸۵ برابر افزایش یافت درحالی‌که رزمارینیک اسید، کافئیک اسید و کارنوزیک اسید به ترتیب افزایش ۲/۲، ۲/۴ و ۱/۴ برابری در مقایسه با شاهد را نشان دادند. روند تغییرپذیری میزان کمی‌شدهٔ ترکیب‌های اندازه‌گیری‌شده با دستگاه GC بیانگر آن بود که بیشترین تغییرپذیری ۹ و ۱۲ روز پس از قطع آبیاری، برای اصلی‌ترین ترکیب مرزهٔ سهندی (تیمول) مشاهده شد به‌گونه‌ای که میزان تیمول تولید شده ۲۵ درصد افزایش یافت ولی میزان سه ترکیب دیگر کارواکرول، گاماترپینن و پاراسیمن کاهش یافتند که در مورد دو ترکیب کارواکرول و پاراسیمن این کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) بود.

جدول ۴. نمایهٔ متابولیتی مرزهٔ سهندی در پاسخ به تنش خشکی (پنج مرحله نمونه‌برداری پس از قطع آبیاری). میزان تغییرپذیری نسبت به روز صفر (شاهد) به‌صورت نسبت و به شکل ایتالیک بیان شده است.

Table 4. Metabolite profiling of *Satureja sahendica* under drought stress (five sampling times after withholding water). The fold change relative to the control day 0 is indicated in a separate column in italics.

Metabolite	Sampling times (day)												$LSD_{1\%}$
	3			6			9			12			
	Average	SE	*x fold change*	Average	SE	*x fold change*	Average	SE	*x fold change*	Average	SE	*x fold change*	
Soluble sugar (µg g^{-1} FW)	1555.3^{d}	61.80	*1.90*	3278.20^{a}	144.50	*3.90*	2761.60^{b}	163.10	*3.30*	2267.30^{c}	100.20	*2.70*	297.20
Proline (µg g^{-1} DW)	3.37^{d}	0.24	*1.35*	12.76^{a}	0.48	*5.12*	10.72^{b}	0.84	*4.30*	7.93^{c}	0.66	*3.18*	1.42
Rosmarinic acid (mg g^{-1} DW)	25.99^{bc}	4.39	*1.40*	40.82^{a}	1.32	*2.20*	30.60^{b}	5.20	*1.65*	19.34^{c}	0.88	*1.04*	8.43
Caffeic acid (mg g^{-1} DW)	2.43^{b}	0.48	*1.09*	5.37^{a}	0.20	*2.41*	2.66^{b}	0.27	*1.19*	2.71^{b}	0.06	*1.22*	0.73
Ursolic acid (mg g^{-1} DW)	28.73^{a}	2.68	*2.11*	33.47^{a}	3.85	*2.46*	33.67^{a}	3.60	*2.48*	22.36^{b}	0.84	*1.65*	6.94
Carnosic acid (mg g^{-1} DW)	3.42^{cd}	0.17	*1.04*	4.57^{a}	0.35	*1.39*	4.20^{a}	0.37	*1.28*	3.89^{ab}	0.36	*1.19*	0.78
Carvacrole (mg g^{-1} DW)	2.59^{a}	0.19	*0.86*	1.99^{b}	0.21	*0.62*	1.97^{b}	0.30	*0.62*	1.99^{b}	0.16	*0.62*	0.60
Thymol (mg g^{-1} DW)	14.89^{b}	1.06	*1.13*	15.87^{ab}	0.46	*1.21*	17.46^{a}	0.58	*1.25*	17.41^{a}	0.87	*1.25*	2.15
γ- Terpinene (mg g^{-1} DW)	2.42^{a}	0.25	*0.99*	2.16^{a}	0.01	*0.88*	2.44^{a}	0.35	*1.00*	2.29^{a}	0.13	*0.93*	0.73
p- Cymene (mg g^{-1} DW)	7.67^{a}	0.96	*0.99*	6.72^{a}	0.69	*0.87*	7.37^{a}	0.17	*0.95*	5.46^{b}	0.45	*0.71*	1.63

میانگین‌ها با حرف‌های متفاوت در هر ردیف، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال درج‌شده برای آن ردیف، دارند.

Means with different letters in each row are significantly different at probability level shown for each row.

تهیهٔ نمایهٔ متابولیتی بارها توسط دیگر محققان در شرایط تنش خشکی گزارش شده است. نمایهٔ متابولیتی ترکیب‌های فرار در گونه‌هایی از جنس آویشن (*Thymus* spp.) که با استفاده از دستگاه GC/MS انجام شد، بیانگر روند افزایشی – کاهشی در بیشتر ترکیب‌های اصلی ترپنی در گیاه حساس بود ولی در جمعیت متحمل، در طول دورهٔ تنش میزان ترپن‌ها تغییری نکرد. به‌این‌ترتیب، جمعیت‌های حساس و متحمل آویشن، راهبردهای متفاوتی را در برابر تنش خشکی به کار بردند (Moradi, 2014). در

گراس چندساله (*Lolium perenne*) تفاوت معنی‌داری در نمایهٔ متابولیتی برگ‌های جمعیت‌های رشد یافته در شرایط تنش خشکی، مشاهده شد. تفاوت‌ها به‌طور عمده به دلیل کاهش اسیدهای چرب در نژادگان (ژنوتیپ) حساس و افزایش ترکیب‌های سازگارکننده مانند قندها در نژادگان متحمل بود (Foito, 2010). به نظر می‌رسد تاکنون گزارشی در ارتباط با تأثیر تنش خشکی بر نمایهٔ متابولیتی مرزهٔ سهندی ارائه نشده است. نتایج این بررسی نشان داد، کاهش پتانسیل اسمزی تأثیر معنی‌داری در افزایش میزان پرولین داشته است، این موضوع بیانگر آن است که گونهٔ مورد بررسی، پرولین را به‌عنوان محلول سازشی در تنظیم و حفظ نیروی اسمزی استفاده می‌کند. در تحقیقی که در گیاه مریم‌گلی انجام شد، در نتایج نشان داده شد، افزایش پرولین ناشی از تنش خشکی منجر به کاهش اختلال‌های پروتئینی می‌شود (Radwan, 2014). پرولین به‌عنوان یک تنظیم‌کنندهٔ اسمزی، رابندهٔ گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و حفاظت‌کنندهٔ ساختار پروتئین‌ها بوده و منجر به محافظت یاخته‌های گیاه از آسیب‌های ناشی از تنش می‌شود (Krasensky and Jonak, 2012). چهار دلیل برای افزایش تجمع پرولین در حین تنش پیشنهاد شده است که عبارت‌اند از: تحریک ساخت آن از گلوتامیک اسید، کاهش خروج آن از راه آوند آبکش، جلوگیری از اکسایش (اکسیداسیون) آن در طول تنش و جلوگیری از تخریب و اختلال در فرآیند ساخت پروتئین Lutts *et al.* (1996). همچنین پرولین به‌عنوان یک منبع قابل‌دسترس نیتروژن عمل کرده و نیاز گیاه را در دوره‌ای که گیاه متحمل کمبود آب است، فراهم می‌کند (Dawalibi *et al.*, 2015).

در این تحقیق روند تغییرپذیری قندهای محلول به‌این‌ترتیب بود، تا هنگامی‌که گیاه تنش خشکی را تحمل کرده (روز ششم)، بر میزان قندهای محلول افزوده و پس از آن کاسته شده است به‌گونه‌ای که در روز ۹ و ۱۲ کاهش معنی‌داری مشاهده شد. تنظیم اسمزی می‌تواند به‌وسیلهٔ تبدیل پلی ساکاریدها (نشاسته، فروکتان‌ها) به یکدیگر و الیگوساکاریدها (ساکارز، گلوکز) به یکدیگر کنترل شود، زیرا پتانسیل اسمزی بستگی به شمار مولکول‌های ماده دارد (Hendry, 1993). عمل فیزیولوژیک این قندها جلوگیری از اتصال بین غشاهای مجاور در طول دورهٔ تنش است و منجر به نگهداری لیپیدها و پایداری پروتئین‌ها از طریق ایجاد پیوندهای هیدروژنی با دنباله‌های خطی پروتئین‌ها می‌شود Ho *et al.* (2001). عمده نتایج تحقیقات گویای افزایش قندهای محلول در نتیجهٔ تنش خشکی در گیاهان مختلف از جمله بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) (2013) Rezaei *et al.*، بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) Abbaszadeh *et al.* (2008) و آویشن (*Thymus vulgaris*) Sarajuoghi *et al.* (2014) دارد.

با توجه به نتایج این تحقیق و نتایج گزارش‌شدهٔ دیگر محققان لازم است توجیهی منطقی و علمی برای افزایش میزان ترکیب‌های ثانویه در گیاه، در پاسخ به تنش خشکی وجود داشته باشد. در شرایط عادی هنگامی‌که تنش خشکی اعمال می‌شود، وضعیت سوخت‌وسازی بسیار پیچیده می‌شود. کمبود آب باعث بسته شدن جزئی روزنه‌ها می‌شود (Chaves, 1991). بنابراین، با توجه به افزایش متناظر مقاومت نفوذ، به میزان قابل‌توجهی از میزان CO_2 کاسته می‌شود. به‌عنوان نتیجه، میزان بسیار کمتر از $NADPH + H^+$ و ATP در چرخهٔ کالوین مصرف می‌شود. در نتیجه، غلظت $NADP^+$ و در نتیجه از پتانسیل بالقوهٔ گیرنده‌ها برای انتقال چرخهٔ الکترونی کاسته می‌شود. اگرچه هدررفت انرژی از طریق غیر فتوشیمیایی و اکسایش دوباره $NADPH + H^+$ توسط سازوکار بازخورد افزایش‌یافته، ولی کاهش بیشتر منجر به تولید شدید رادیکال‌های اکسیژن می‌شود. به‌عنوان نتیجه، در شرایط تنش خشکی، کارایی فرایند سم‌زدایی از طریق بیان ژن آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) به‌شدت افزایش می‌یابد Gratao *et al.* (2005). سوپراکسید دسموتاز منجر به تجزیهٔ رادیکال‌های سوپراکسید به H_2O_2 و O_2 گشته و پس از آن APX، آن را به آب تبدیل می‌کند Shalata *et al.* (2001). درنتیجهٔ

فرآیندهای سوخت‌وسازی یادشده می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که نسبت $NADPH + H^+$ به $NADP^+$ در شرایط تنش به میزان زیادی افزایش می‌یابد. ساخت و تجمع ترکیب‌های طبیعی تحت تأثیر عامل‌های مختلفی قرار می‌گیرد از جمله شدت بالای تابش، افزایش دما، افزایش تابش UV، افزایش فشار علفخواران، عامل‌های بیماری‌زا و ... (Wink, 2010).

بنابراین، باید از پیچیدگی اثر متقابل ناشی از عامل‌های بی‌شمار آگاهی داشته و برای شناخت آن‌ها، از نشانگرهای مناسب و قابل‌اعتماد استفاده کرد. با توجه به تنش خشکی، مناسب‌ترین نشانگر می‌تواند نسبت NADPH + H+ به NADPH و یا میزان رادیکال‌های اکسیژن تولید شده باشد. متأسفانه، غلظت دو ترکیب بالا در شرایط آزمایشگاهی بدون تلاش و هزینه امکان‌پذیر نیست. در شرایط استاندارد مصرف، برای زیست‌ساخت (بیوسنتز) ایزوپرن‌ها، کمتر از ۱ درصد انرژی لازم است (Magel *et al*., 2006).

بااین‌حال، در دماهای بالاتر، میزان انرژی تلف‌شده بر نتیجهٔ انتشار ایزوپرن به‌شدت افزایش می‌یابد و ممکن است بیش از ۲۵ درصد از منبع انرژی خالص نورساختی (فتوسنتزی) استفاده شود. این پیوستگی بیان می‌دارد که زیست‌ساخت محصولات طبیعی درواقع یک سامانهٔ هدررفت انرژی مؤثر می باشد. بنابراین، متابولیت‌های ثانویه جدا از اهمیت اکولوژیکی خود در اتلاف انرژی نقش دارند (Grace and Logan, 2000; Wilhelm and Selmar, 2011).

نتیجه‌گیری کلی

تأثیر تنش خشکی بر کیفیت گیاهان داروئی ابعاد بسیار و پیچیدگی‌های فراوان دارد. در حقیقت یک توصیهٔ کلی برای کاربرد تنش خشکی به‌منظور افزایش کمی و کیفی محصول وجود ندارد، اگرچه در این پژوهش، کاربرد تنش خشکی موفقیت‌آمیز بود. در این تحقیق، از گیاه مرزه به‌عنوان مدل، برای تجزیه‌وتحلیل تأثیر تنش خشکی و علل افزایش مونوترپن‌ها استفاده شد.

نتایج تجزیهٔ GC/MS و HPTLC نشان داد، بیشترین میزان ترکیب‌های موجود در اسانس مربوط به مونوترپن‌های حلقوی تیمول، کارواکرول، گاماترپینن و پاراسیمن است. تنش خشکی منجر به افزایش معنی‌دار تیمول و کاهش سه ترکیب دیگر شد. با توجه به اینکه بیش از نیمی از اسانس مرزهٔ سهندی، از ترکیب فنلی تیمول تشکیل شده است و از سویی این ترکیب به‌عنوان یک پاداکسندهٔ قوی، خواص داروئی پرشماری دارد، می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که تنش خشکی باعث افزایش کیفی در خواص اسانس گشته است. رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، اورسولیک اسید و کارنوزیک اسید نیز از مهم‌ترین ترکیب‌های موجود در عصاره هستند که تنش خشکی بر میزان این ترکیب‌ها تأثیر افزایشی معنی‌داری داشت. همچنین، برای نخستین بار تأثیر تنش خشکی بر نمایهٔ متابولیتی مرزهٔ سهندی بررسی شد. از دیگر نتایج این تحقیق می‌توان اشاره به زمان برداشت گیاه داروئی مرزهٔ سهندی کرد که لازم است پیش از برداشت، گیاهان را در معرض یک دوره تنش خشکی قرار داد به‌این‌ترتیب که آبیاری را قطع کرده و پس از حدود یک هفته، اقدام به برداشت گیاهان کرد.

REFERENCES

1. Abbaszadeh, B., Sharifi Ashourabadi, E., Lebaschi M.H., Naderi Haji Bagherkandi, M. & Moghadami, F. (2008).The effect of drought stress on proline contents, soluble sugars, chlorophyll and relative water contents of balm (*Melissa officinalis* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 38(4), 504-513.
2. Adams, R.P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th edn. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.
3. Akbarinia, A., Sefikon, F. & Razaz Hashemi, S.R. (2009). Essential oil components of cultivated and wild accessions of *Satureja sahendica* Bornm. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 25(3), 376-385.
4. Baskan, S., Oztekin, N. & Erim, F. (2007). Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 101, 1748-1752.

5. Bates, I.S., Waldern, R.P. & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
6. Bartels, D. & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 23-58.
7. Boyer, J.S. 1968. Measurement of the water status of plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 9, 351-363.
8. Brosché, M., Vinocur, B., Alatalo, E.R., Lamminmäki, A., Teichmann, T., Ottow, E. & Kangasjärvi, J. (2005). Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. *Genome Biology*, *6*(12), R101.
9. Chaves, M.M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 42, 1-6.
10. Dashti, M ., Kafi, M ., Tavakoli, H . & Mirza, M . (2014). Effect of Water Deficit on Water Relations, Photosynthesis and Osmolytes Accumulation of *Salvia leriifolia* Benth. *Iranian Journal Of Field Crops Research*, 12, 813-821.
11. Dawalibi, V., Monteverdi, M., Moscatello, S., Battistelli, A. & Valentini, R. (2015). Effect of salt and drought on growth, physiological and biochemical responses of two *Tamarix* species. *iForest - Biogeosciences and Forestry*, e1–e8.
12. De Abreu, I.N. & Mazzafera, P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 241-248.
13. Foito, A. (2010). *A Metabolomics-Based Approach to Study Abiotic Stress in Lolium perenne*. Ph.D. Thesis, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK.
14. Grace, S.C. & Logan, B.A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 355, 1499-1510.
15. Gratao, P.L., Polle, A., Lea, P.J. & Azevedo, R.A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32, 481-494.
16. Hadian, J., Ebrahimi, S.N. & Salehi, P. (2010). Variability of morphological and phytochemical characteristics among *Satureja hortensis* L. accessions of Iran. *Industrial Crops and Products*, 32(1), 62-69.
17. Hendry, G.A.F. & Wallace, R.K. (1993). *The origin, distribution and evolutionary significance of fructans.* In: Suzuki M. & Chatterton, J.N. (eds.), Science and Technology of Fructans. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 119-139.
18. Ho, S., Chao, Y., Tong, W. & Yu, S. (2001). Sugar coordinately and differentially regulates growth and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiology*, 46, 281-285.
19. Irigoyen, J.J., Eineric, D.W. & Sanchez-Diaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84 (1), 58-60.
20. Jamzad, Z. (2009). *Thymus* and *Satureja* species of Iran, Research Institute of Forests and Rangelands Publication, Tehran, Iran, 76 p.
21. Jason, A. (1978). *Chlorophyll and Cartenoid: Handbook of Physiological Method*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 59-65.
22. Krasensky, J. & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63: 1593-1608.
23. Liang, Z., Jiang, Z., Fong, D.W. & Zhao, Z. (2009). Determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Oldenlandia diffusa* and its substitute using high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17(2), 69-77.
24. Lutts, S.J., Kint, M. & Bouharmount, J. (1996). Effect of various salts and mannitolon ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa*) callus cultures. *Journal of Plant Physiology*, 149, 186-195.
25. Magel, E., Mayrhofer, S., Müller, A., Zimmer, I., Hampp, R. & Schnitzler, J.P. (2006). Photosynthesis and substrate supply for isoprene biosynthesis in poplar leaves. *Atmospheric Environment*, 40, 138-151.
26. Manukyan, A. (2011). Effect of growing factors on productivity and quality of lemon catmint, lemon balm and sage under soilless greenhouse production: I. Drought stress. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5, 119-125.
27. Michel, B.E. (1972). Solute potentials of sucrose solutions. *Plant Physiology*, 50, 196-198.
28. Moradi, P. (2014). *Use of metabolomics to study water deficit stress on the medicinal plant thyme*.

Ph.D. Thesis, University of Birmingham, Birmingham, UK.
29. Nowak, M., Manderscheid, R., Weigel, H. J., Kleinwachter, M. & Selmar, D. (2010). Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83, 133-136.
30. Radwan, A. (2014). *The impact of drought stress on monoterpene biosynthesis in sage (Salvia officinalis): Dehydrins and monoterpene synthases as molecular*. Thesis, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Zu Braunschweig. Braunschweig, Germany.
31. Reich, E. & Schibli, A. (2006). *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. Thieme Medical Pub, New York, USA, 197 p.
32. Rezaei Chiyaneh, E ., Zehtab Salmasi, S ., Ghassemi Golezani, K . & Delazar, A . (2012). Physiological responses of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) to water limitation. *Agroecology*, *4*, 347-355.
33. Rezaei, H., Ghorbanli, M., Peivandi, M. & Pazoki, A. (2013). Effect of drought interactions with ascorbate on some biochemical parameters and antioxidant enzymes activities in *Dracocephalum moldavica* L. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 13(4), 522-531.
34. Sarajuoghi, M., Abbaszadeh, B. & Ardakani, M.R. (2014). Investigation morphological and physiological response of *Thymus vulgaris* L. to drought stress, *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 5(2), 486-492.
35. Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. & Tal, M. (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, 112, 487-494.
36. Shulaev, V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief Bioinform*, 7, 128-139.
37. Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2002). Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 29, 417-426.
38. Weckwerth, W. (2007). Metabolomics, methods and protocols. Humana Press, New Jersey, USA.
39. Weckwerth, W. & Kahl, G. (2013). The Handbook of Plant Metabolomics. 1st edn. Oxford: Wiley-Blackwell, UK.
40. Wilhelm, C. & Selmar, D. (2011). Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 168, 79-87.
41. Wink, M. (2010). *Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites*. In: Wink, M. (Ed.), Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. pp. 1-19. Wiley Blackwell, Oxford, UK.
42. Yousefzadi, M., Riahi-Madvar, A., Hadian, J., Rezaee, F., & Rafiee, R. (2012). *In vitro* cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja sahendica*. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 94, 1735-1745.