



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 18, Issue 1, No. 67, 2026
Document Type: Research Paper
Received: 24/11/2025 Accepted: 11/05/2026

Comparison of morphological and physiological traits of three ecotypes of *Teucrium polium* L. under drought stress and evaluation of drought-tolerant genes *MYB* and *LEA* in the tolerant ecotype

Zahra sadat Tohidi¹, Hamid Sobhanian^{ib}*¹, Amin Baghizadeh²

¹ Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

² Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Abstract

Drought stress is one of the most important limiting factors for plant growth and performance, affecting a wide range of plant responses from metabolic alterations to changes in growth and productivity. The severity of this stress varies depending on water deficit level, growth stage, and plant species. Considering Iran's location in arid and semi-arid climates and the continuous decline in water resources, identifying drought-tolerant plants and ecotypes is essential. In recent years, research has increasingly focused on understanding the molecular mechanisms of drought tolerance and the key genes involved in this process. In this study, morphological and physiological traits of three ecotypes of the medicinal plant Kalpooreh *Teucrium polium* from Kerman province were evaluated under different drought stress levels (40%, 70%, and 100% field capacity), along with the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, POD) and lipid peroxidation (MDA). Additionally, expression of the *MYB* and *LEA* genes was assessed in the tolerant ecotype using Real-time PCR. The results showed that increasing drought stress intensity reduced stem height and total chlorophyll content, while root length, proline content, and protein content increased. Antioxidant enzyme activity and MDA levels also rose significantly, indicating intensified oxidative stress. Moreover, expression of the *MYB* and *LEA* genes showed a marked increase in the tolerant ecotype under drought stress. These findings confirm the combined roles of physiological, biochemical, and molecular responses in drought tolerance and suggest that these genes could serve as useful indicators for genetic improvement and selection of drought-resistant germplasms in *Teucrium polium*.

Keywords: drought stress, *MYB* and *LEA* gene expression, physiological traits, *Teucrium polium*

*Corresponding Author: hamid.sobhanian@pnu.ac.ir



Introduction

Drought stress is one of the most critical abiotic constraints limiting plant growth, productivity, and distribution, affecting plants at multiple levels from cellular metabolism to whole-plant morphology. The severity of drought damage depends on stress intensity and duration, developmental stage, and the genetic characteristics of each species or ecotype. Given Iran's location in arid and semi-arid regions and the continuous decline in water resources, identifying drought-tolerant plants and ecotypes is a major priority. Medicinal plants, despite their economic and therapeutic value, remain underexplored in terms of stress physiology. *Teucrium polium* L., widely distributed across Iran, possesses strong antioxidant and pharmacological properties, yet its drought-response mechanisms are poorly documented. In this study, morphological and physiological traits of three ecotypes of *T. polium* from Kerman province were evaluated under different drought stress levels (40%, 70%, and 100% field capacity), alongside antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, POD) and lipid peroxidation (MDA).

Additionally, expression of the MYB and LEA genes was assessed in the tolerant ecotype using Real-time PCR. The results showed that increasing drought stress reduced stem height and total chlorophyll content, while root length, proline, and protein content increased. Antioxidant enzyme activity and MDA levels also rose significantly, indicating intensified oxidative stress. Furthermore, MYB and LEA gene expression showed a marked increase in the tolerant ecotype, confirming the combined roles of physiological, biochemical, and molecular responses in drought tolerance.

Materials and Methods

A factorial experiment based on a completely randomized design with three replications was conducted in a greenhouse in Kerman, Iran. Three ecotypes (Sarcheshmeh, Rafsanjan, Sirjan) were subjected to 100%, 70%, and 40% field capacity. Morphological traits measured included stem length and root length. Physiological and biochemical traits included total chlorophyll, proline, soluble proteins, and MDA content. Antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, POD) were quantified by standard spectrophotometric assays. For molecular analysis, RNA was extracted from the tolerant ecotype, cDNA was synthesized, and expression of MYB and LEA genes was analyzed using Real-time PCR. Relative expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. ANOVA analyzed the data, and means were compared using Duncan's test at the 5% probability level.

Results

Drought stress significantly affected almost all measured traits. Increasing drought intensity reduced stem length and total chlorophyll content across all ecotypes, indicating impaired photosynthesis and inhibited aerial growth. In contrast, root length increased under moderate and severe drought, representing an adaptive strategy to improve water acquisition. Biochemically, proline concentration rose sharply under water deficit, likely contributing to osmotic adjustment and cellular protection. Protein content also increased, suggesting the production of stress-related proteins. Antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, POD) increased significantly with increasing drought severity, reflecting activation of the antioxidant defense system to detoxify reactive oxygen species. MDA content, indicative of lipid peroxidation, also increased, though tolerant ecotypes showed lower MDA accumulation, suggesting reduced membrane damage. At the molecular level, MYB and LEA genes were strongly upregulated in the tolerant ecotype, especially under 40% field capacity, corresponding with higher antioxidant activity, increased osmolyte accumulation, and improved root performance.

Discussion

Drought tolerance in *T. polium* is driven by a combination of structural, metabolic, and molecular mechanisms. Reduced shoot growth minimizes transpiration, while increased root length supports deeper soil exploration under water deficit. Chlorophyll reduction and increased ROS under drought are well-known physiological outcomes, but tolerant ecotypes demonstrated better chlorophyll retention and stronger oxidative defense. Accumulation of osmoprotectants such as proline and proteins contributes to maintaining cell turgor and stabilizing membranes. The marked increase in antioxidant enzyme activity reveals effective ROS scavenging, limiting oxidative damage. The strong upregulation of MYB and LEA genes further confirms their roles in

regulating transcriptional and protective responses under drought. These genes may therefore serve as functional biomarkers for screening drought-tolerant germplasm.

Conclusion

This study highlights substantial ecotypic variation in drought responses of *T. polium*. Drought tolerance is associated with improved root development, higher osmolyte and protein accumulation, strengthened antioxidant capacity, and significant upregulation of the MYB and LEA genes. The tolerant ecotype identified here, along with its molecular markers, holds promise for breeding programs, cultivation under limited water conditions, and future molecular studies aimed at enhancing drought resistance in medicinal plants.

مقایسه صفات ریخت شناسی و فیزیولوژیکی سه اکوتیپ گیاه دارویی کلپوره *Teucrium polium L.* در شرایط تنش خشکی و بررسی بیان ژنهای متحمل به تنش خشکی *MYB* و *LEA* در اکوتیپ متحمل

زهرا سادات توحیدی^۱، حمید سبحانین^{۱*} , امین باقی زاده^۲

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

^۲ گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان-ایران

چکیده

تنش خشکی یکی از مهم ترین عوامل محدود کننده رشد و عملکرد گیاهان است و طیف وسیعی از واکنش های گیاهی، شامل تغییرات متابولیکی تا دگرگونی در رشد و تولید را تحت تأثیر قرار می دهد. شدت این تنش بسته به میزان کم آبی، مرحله رشد و گونه گیاهی متفاوت است. با توجه به قرارگیری ایران در اقلیم خشک و نیمه خشک و کاهش منابع آب، شناسایی گیاهان و اکوتیپ های سازگار با کم آبی اهمیت زیادی دارد. در سال های اخیر، پژوهش ها به سمت شناخت سازوکارهای مولکولی مقاومت به خشکی و ژن های مؤثر در این فرایند هدایت شده اند. در این مطالعه، صفات ریخت شناسی و فیزیولوژیکی سه اکوتیپ گیاه دارویی کلپوره *Teucrium polium* استان کرمان تحت سطوح مختلف تنش خشکی (۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی)، همراه با فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و میزان پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) ارزیابی شد. همچنین در اکوتیپ مقاوم، بیان دو ژن *MYB* و *LEA* با روش Real-time PCR بررسی شد. نتایج پژوهش نشان داد افزایش شدت تنش خشکی سبب کاهش ارتفاع ساقه و محتوای کلروفیل کل و در مقابل افزایش طول ریشه، مقدار پرولین و میزان پروتئین شد. همچنین فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و میزان MDA نیز به طور معنی داری افزایش یافت که بیانگر تشدید تنش اکسیداتیو است. علاوه بر این، بیان ژن های *MYB* و *LEA* در اکوتیپ مقاوم تحت تأثیر تنش افزایش قابل توجهی داشت. این یافته ها نقش همزمان واکنش های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی را در تحمل خشکی تأیید کردند و نشان دادند ژن های مذکور می توانند به عنوان شاخص هایی کاربردی برای اصلاح ژنتیکی و انتخاب ژرم پلاسماهای مقاوم در کلپوره مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: بیان ژن، تنش خشکی، صفات فیزیولوژیکی، کلپوره *Teucrium polium*

مقدمه

تعیین نیاز آبی گیاه یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر کیفیت و کمیت محصولات گیاهی است. خشکی به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل محدودکننده رشد، توسعه و پراکنش گونه‌های گیاهی عمل می‌کند، زیرا کاهش آب قابل دسترس در خاک فرآیندهای رشد ریشه و بخش‌های هوایی گیاه را مختل می‌کند (Farooq et al., 2009). تنش خشکی سبب ایجاد شرایط اسمزی و تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود و پاسخ‌های حفاظتی متعددی را تحریک می‌کند (Farooq et al., 2009; Hasanuzzaman et al., 2022). در پاسخ به چنین شرایطی، گیاهان اقدام به افزایش قندهای محلول و سایر ترکیبات تنظیم‌کننده اسمزی می‌کنند تا فشار تورگور را حفظ نمایند، علیرغم آنکه این واکنش ممکن است رشد گیاه را کاهش دهد (Thomas & Gausling, 2000). پژوهش‌های اخیر نشان دادند این پاسخ در گیاهان دارویی شامل تجمع پرولین، بتائین و قندهای محلول است که منجر به افزایش مقاومت به خشکی می‌شود (Sami et al., 2016). مقاومت به خشکی در گونه‌های گیاهی متفاوت بوده و این تنوع به سازگاری‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی آن‌ها بستگی دارد. برای مثال، افزایش عمق یا ارتفاع ریشه یکی از سازوکارهایی است که می‌تواند مقاومت گیاه به تنش خشکی را ارتقاء دهد (Thomas & Gausling, 2000).

علاوه بر آن، گیاهان مقاوم در شرایط خشکی، ترکیبات تنظیم‌کننده اسمزی مانند پروتئین‌ها و پرولین را ذخیره می‌کنند (Reddy et al., 2004). همچنین در سطح مولکولی، گیاهان توسط گیرنده‌هایی مانند گیرنده اسید آبسزیک، هگزوکینازها و کانال‌های یونی، تنش را شناسایی می‌کنند (Yamaguchi & Shinozaki, 2006) و سپس سیگنال تنش توسط مسیرهای سرین-ترئونین کینازها، فسفاتازها و پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم منتقل می‌شود (Ahuja et al., 2010). به دنبال این مراحل، بیان ژن‌هایی که

کدکننده پروتئین‌های (Late Embryogenesis) *LEA* (Abundant)، دهیدرین، گونه‌های اکسیژن واکنشگر (ROS)، و فاکتورهای رونویسی مانند MYB، WRKY، NAC، ERF/AP2، DREB2 و bZIP هستند، تغییر می‌کند تا سازوکارهای پاسخ به تنش فعال شود و هموستازی سلولی بازسازی شود (Baldoni & Cominelli, 2015). در صورتی که این فرآیندها دچار اختلال شوند، آسیب‌های غیرقابل برگشت در هموستازی سلولی و غشاها رخ می‌دهد و این منجر به مرگ سلولی و کاهش محصول می‌شود (Farooq et al., 2009). پژوهش‌های جدید نشان دادند بیان ژن‌های *LEA*، *MYB* و *DREB* در گیاهان دارویی تحت تنش خشکی شدید به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و نقش مهمی در تجمع اسمولیت‌ها، بسته شدن روزنه‌ها و افزایش تحمل به خشکی دارد (Tunnacliffe & Wise 2007; Yamaguchi & Shinozaki, 2006; Gill & Tuteja, 2010). پژوهش‌های ترانسکریپتوم در گونه‌های مختلف نشان داده‌اند که پاسخ ژنومی به تنش خشکی متنوع است و بسته به گونه، ژنوتیپ و شرایط محیطی متفاوت می‌باشد (Lenka et al., 2011). برای گیاهان دارویی نیز، بررسی پاسخ‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی به ویژه در شرایط کم‌آبی اهمیت ویژه دارد؛ از جمله کاهش رشد در گونه‌هایی مانند ریحان، جعفری و ریحان بنفش گزارش شده است (Moeini et al., 2006; Petropoulos et al., 2008). بررسی‌های اخیر در گیاهان دارویی مانند نعناع، ریحان و آویشن نیز نشان داده‌اند که پاسخ‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی متنوع بوده و با ژنوتیپ و شدت خشکی ارتباط دارد (Yamaguchi & Shinozaki, 2006; Selmar & Kleinwachter, 2013).

در سال‌های اخیر، پژوهش‌های متعددی به بررسی اثر تنش خشکی بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان زراعی و دارویی پرداخته‌اند. نتایج این پژوهش‌ها نشان دادند تنش خشکی موجب کاهش رشد

ریخت شناسی، فیزیولوژیکی و مولکولی جنس *Teucrium* در شرایط تنش خشکی پرداخته اند و به ویژه مقایسه اکوتیپ های مختلف این گیاه از نظر سازوکارهای تحمل خشکی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. این خلأ پژوهشی ضرورت انجام پژوهش های دقیق تر در این زمینه را برجسته می سازد. پژوهش های جدید نشان دادند پاسخ اکوتیپ های مختلف *Teucrium* تحت تنش خشکی متفاوت است (Flexas et al., 2014). به عبارت دیگر، این پژوهش، با هدف مقایسه پاسخ سه اکوتیپ کلپوره از نظر ریخت شناسی و فیزیولوژیکی و مولکولی در شرایط تنش خشکی انجام شده است.

مواد و روش ها

پژوهش حاضر به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار در گلخانه ای در شهر کرمان تحت شرایط دمایی ۲۶ درجه سانتی گراد و رطوبت ۳۰ درصد انجام شد. دمای گلخانه در طول دوره آزمایش در محدوده 26 ± 2 درجه سانتی گراد تنظیم و کنترل شد. گیاهان تحت فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش یافتند. شدت نور در حدود ۳۰۰-۲۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه تأمین شد.

تیمارهای رطوبتی شامل ۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه به عنوان شاهد، ۷۰ درصد و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی به عنوان تنش خشکی اعمال شدند. بذرهاى سه اکوتیپ مورد پژوهش از مناطق مختلف استان کرمان جمع آوری شدند. مشخصات جغرافیایی و اقلیمی هر اکوتیپ در جدول ۱ ارائه شده است. برای کاشت بذرها ابتدا بذور با سدیوم هیپوکلراید ۰/۱ درصد ضد عفونی و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. بذرهاى ضد عفونی شده به مدت یک ساعت در آب مقطر قرار گرفتند. از گلدان های مناسب به قطر ۱۰ سانتی متر و ارتفاع ۱۵ سانتی متر و حاوی خاک با

رویشی، سطح برگ، وزن خشک و محتوای نسبی آب گیاه می شود و در مقابل، فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی و تجمع ترکیبات تنظیم کننده اسمزی افزایش می یابد (Farooq et al., 2014; Flexas et al., 2009). همچنین گزارش شده است که فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در شرایط کم آبی افزایش یافته و نقش مهمی در کاهش آسیب های ناشی از تجمع گونه های اکسیژن واکنش گرایفا می کنند (Gill & Tuteja, 2010).

در گیاهان دارویی، تنش خشکی علاوه بر تأثیر بر رشد، می تواند کیفیت و کمیت متابولیت های ثانویه را نیز تحت تأثیر قرار دهد. پژوهش ها بر روی گیاهانی نظیر نعناع، ریحان، آویشن و مریم گلی نشان داده اند که خشکی ملایم در برخی موارد سبب افزایش ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و اسانس ها می شود، با وجود این، خشکی شدید منجر به کاهش عملکرد و افت کیفیت دارویی گیاه می شود (Bettaieb et al., 2011; Selmar & Kleinwächter, 2013). از سوی دیگر، شدت پاسخ گیاهان دارویی به تنش خشکی به گونه، اکوتیپ و شرایط محیطی بستگی دارد.

گیاه کلپوره (*Teucrium spp.*)، از خانواده *Lamiaceae* با بیش از ۳۰۰ گونه در سراسر جهان، به ویژه در ایران و لبنان وجود دارد (Abdollahi et al., 2003; Bahramikia & Yazdanparast, 2012). این جنس دارای تنوع غنی از ترکیبات ثانویه شامل مونوترپن ها، سزکوئی ترپن ها، استرول ها، ساپونین ها، فلاونوئیدها و دی ترپن ها است که کاربردهای دارویی و اکولوژیکی چشم گیری دارند (Perez-Alonso et al., 1993; Sadeghi et al., 2022). با وجود اهمیت آن، اطلاعات کمی درباره واکنش این گیاه به تنش خشکی موجود است (Flexas et al., 2014). با وجود انجام پژوهش های متعدد در مورد گیاهان دارویی مختلف، یافته های محدودی به بررسی جامع پاسخ های

نسبت ماسه: رس: خاک برگ (۲:۱:۱) استفاده شد. سطح خاک با فوم عایق‌بندی شد تا تبادل حرارتی با محیط کاهش یابد. در هر گلدان پنج بذر کشت شدند که نهایتاً پس از فرآیند تنک کردن، دو گیاه در هر گلدان باقی ماند. گلدان‌ها هر سه روز یکبار با آب آبیاری شدند و برای بهتر شدن و سریع‌تر شدن رشد گیاه، هفته‌ای یک بار به گلدان‌ها محلول غذایی هوگلند با رقت (۱ به ۳) داده شد. اعمال تنش خشکی به مدت ۱۰ دوره به میزان ۷۰ درصد و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی انجام گرفت. اعمال تنش خشکی پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها انجام شد (در مرحله ۶ تا ۸ برگی

و حدود ۴۵ روز پس از کاشت). آبیاری به صورت هر سه روز یکبار انجام شد و اعمال تنش به مدت ۳۰ روز (شامل ۱۰ نوبت آبیاری) ادامه یافت. رطوبت خاک به صورت وزنی و بر اساس ظرفیت زراعی تعیین و کنترل شد، به طوری که رطوبت خاک در تیمارهای تنش در سطوح ۷۰ درصد (تنش ملایم) و ۴۰ درصد (تنش شدید) ظرفیت زراعی حفظ شد، از سوی دیگر، تیمار شاهد در سطح ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی نگه داشته شد. تنظیم رطوبت خاک در هر دوره با اندازه‌گیری وزن گلدان‌ها و جبران آب از دست‌رفته انجام شد.

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی و اقلیمی اکوتیپ‌های *Teucrium polium* مورد بررسی

Table 1. Geographical and climatic characteristics of the studied *Teucrium polium* ecotypes

Ecotype	Collection site	Latitude (°N)	Longitude (°E)	Altitude (m a.s.l.)	Climate type (Köppen)	Mean annual rainfall (mm)	Dominant soil type
Sarcheshmeh	Sarcheshmeh, Kerman	30.01	55.75	~1650	BWk (cold desert climate)	100–150	Sandy-loam
Rafsanjan	Rafsanjan, Kerman	30.40	55.99	~1500	BWk (cold desert climate)	100–140	Loamy-sand
Sirjan	Sirjan, Kerman	29.50	55.68	~1800	BSk (semi-arid steppe climate)	110–160	Sandy-clay loam

صفات مورفوفیزیولوژیکی

ویژگی‌های ریخت‌شناسی مورد بررسی در این پژوهش شامل طول ساقه و طول ریشه بود و همچنین ویژگی‌های فیزیولوژیکی شامل کلروفیل کل است. در پایان فصل رشد و در مرحله رسیدگی فیزیولوژیکی، طول ساقه و طول ریشه با خط کش اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه میزان کلروفیل از روش [Lichtenthaler](#) (1987) استفاده شد. در این روش ۰/۲ گرم از برگ‌های تازه گیاه در هاون چینی حاوی ۱۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شد و پس از صاف کردن جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۶، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. بر اساس فرمول‌های زیر مقدار کلروفیل کل به دست آمد.

$$a = 646 - 2.79A_{663} - 12.25A_{646} \text{ کلروفیل}$$

صفات بیوشیمیایی

برای اندازه‌گیری پرولین از [Bates et al.](#) (1973) استفاده شد. ۰/۲ گرم از بافت تازه را در ده میلی‌لیتر محلول سه درصد اسید سولفوسالسیلیک سائیده و مخلوط یکنواختی تهیه شد. عصاره حاصل توسط سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس دو میلی‌لیتر از مایع رویی با دو میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک خالص مخلوط شده و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم، قرار گرفت. بعد از این مدت، جهت قطع انجام کلیه واکنش‌ها، لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ، سرد شدند. سپس چهار میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه شده و لوله‌ها به خوبی تکان داده شد. با ثابت

$$b = 663 - 5.1A_{646} - 21.2A_{663} \text{ کلروفیل}$$

$$\text{کلروفیل کل} = \text{کلروفیل } a + \text{کلروفیل } b$$

نگه داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه دو لایه کاملاً مجزا در آنها تشکیل شد. از لایه رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود برای اندازه‌گیری غلظت پرولین استفاده شد. جذب مقدار مشخصی از این ماده رنگی در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار پرولین برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه شد. برای سنجش پروتئین از روش Bradford (1976) استفاده شد. برای تهیه عصاره پروتئینی، ۵۰۰ گرم بافت تازه برگ گیاه که در ۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار حاوی ۱ درصد پلی وینیل پیرولیدین و ۱ میلی مولار EDTA بود آسیاب شد و سپس سانتریفیوژ شد (تمام مراحل استخراج در یخ انجام شد). غلظت پروتئین با روش Bradford (1976) تعیین شد. برای این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی به ۵ میلی لیتر معرف Bradford اضافه و فوراً ورتکس شد. پس از ۱۰ دقیقه، جذب نوری نمونه‌ها در ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. همچنین غلظت پروتئین توسط منحنی استاندارد BSA محاسبه شد. فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با روش مهار احیای NBT تعیین شد (Giannopolitis & Ries, 1977). ۰/۲ گرم بافت تازه در ۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7.8) حاوی ۱ میلی مولار EDTA و ۱ درصد همگن شد. عصاره سانتریفیوژ و سپس با مخلوط NBT، متیونین، ریوفلاوین و بافر فسفات واکنش داده شد. پس از ۱۰ دقیقه در معرض نور فلورسنت، شدت رنگ آبی فورمازان در طول موج ۵۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (CE 7200، شرکت Cecil Instruments Ltd، انگلستان) خوانده شد. همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس کاهش جذب H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر طی ۶۰ ثانیه اندازه‌گیری شد (Aebi, 1984). ۰/۲ گرم بافت تازه در ۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7.8) همگن شد و پس از سانتریفیوژ، با ۰/۱ میلی لیتر H_2O_2 ۳۰ میلی مولار واکنش داده شد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش (Chance & Maehly, 1955) توسط محلول گایاکول ۲۰ میلی مولار و

H_2O_2 ۴۰ میلی مولار سنجیده شد. ۰/۲ گرم بافت تازه در ۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=6) حاوی ۱ درصد PVP همگن شد و پس از سانتریفیوژ، تغییر جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (CE 7200، شرکت Cecil Instruments Ltd، انگلستان) ثبت شد. فعالیت POD بر اساس ضریب خاموشی گایاکول محاسبه شد. برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها، روش تیوباربتوریک اسید (TBA) استفاده شد (Heath & Packer, 1968). ۰/۲ گرم بافت تازه در ۵ میلی لیتر محلول TCA ۱۰ درصد همگن شد و پس از سانتریفیوژ ۱۰ دقیقه‌ای در ۱۰۰۰۰ g، ۲ میلی لیتر از مایع رویی با ۲ میلی لیتر محلول TBA ۱ درصد در TCA ۲۰ درصد مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن در حمام یخ و سانتریفیوژ مجدد، جذب محلول شفاف در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (CE 7200، شرکت Cecil Instruments Ltd، انگلستان) خوانده شد و میزان MDA بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

صفات مولکولی

استخراج RNA

برای بررسی بیان ژن‌ها ابتدا جهت استخراج RNA، یک میکرولیتر از بافر بایوزول (Biozol، شرکت Fermentas، آلمان) داخل لوله ریخته شد و ۰/۱ گرم برگ سائیده شده به آن اضافه شد. سپس نمونه با دست تکان داده شد و ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب اضافه شد و بعد از ۵-۴ بار تکان دادن در داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت زمان ۲۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از بیرون آوردن نمونه از فریزر مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، قسمت شفاف بالای لوله حذف شد و پلت ایجاد شده جدا شد و ۱ میلی لیتر اتانول به آن اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی

و MYB و همچنین آنالیز بیان نسبی این ژن‌ها، به ترتیب از روش‌های $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و $2^{-\Delta Ct}$ استفاده شد

جدول ۲- اسامی و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن‌ها

Table 2- Names and sequences of primers used to examine gene expression

Gene	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')
actin	GCCCACTGTTCCAATCTATGA	TGATGGAATTGTATGTCGCTTC
18 sRNA	GTGACGGGTGACGGAGAATT	GACACTAATGCGCCCGGTAT
LEA	AGCTGTGTGCCCTGCT	AATCCTCTCCTGCACCG
MYB	GGATGGAAACCAGCGACAC	TCTAAATCTGCGACAACTCTGTAT G

آنالیزهای آماری

داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه واریانس با فرض نرمال بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس‌ها صورت گرفت. همچنین تحلیل واریانس بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

تجزیه واریانس صفات مورد بررسی نشان داد اثرات ساده فاکتورهای اکوتیپ و تنش خشکی در اکثر صفات معنی‌دار است. اثرات متقابل اکوتیپ در تنش خشکی در همه صفات معنی‌دار شد (جدول ۳). آزمون مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت و نتایج در شکل‌های ۱ تا ۹ آورده شده است.

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان دادند تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر طول ساقه دارد. افزایش شدت تنش خشکی سبب کاهش معنی‌دار طول ساقه شد. مقایسه نمونه‌های مناطق مختلف نشان داد که بیشترین طول ساقه تحت تنش

گراد با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند و دوباره فاز بالایی حذف و پلت RNA در دمای اتاق خشک شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر آب مقطر، به پلت ایجاد شده اضافه شد. غلظت و خلوص RNA جدا شده با خواندن جذب (A) بر روی اسپکتروفتومتر فرابنفش (NanoDrop 2000، شرکت Thermo Scientific، آمریکا) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد.

سنتز cDNA

از کیت سنتز cDNA پارس توس و بر اساس دستورالعمل شرکت برای سنتز cDNA استفاده شد. البته قبل از سنتز cDNA و جهت حذف DNA ژنومی که ممکن است به همراه RNA استخراج شود، RNA استخراج شده با آنزیم DNase (Fermentase, USA) تیمار شدند.

انجام واکنش Real-Time PCR

جهت بررسی تغییرات احتمالی بیان ژن در شرایط تنش خشکی، واکنش‌های Real-Time PCR برای هر ژن در ۳ تکرار طراحی شد. آزمایش‌های Real-Time PCR توسط معرف سایبرگرین شرکت آریا توس در دستگاه ترموسایکلر شرکت ABI انجام شد. توسط ۱/۵ میکرولیتر از هر نمونه cDNA و ۱۰ میکرولیتر از هر آغازگر (مشخصات آغازگرها در جدول ۲ آورده شده است)، واکنش Real-Time به صورت زیر انجام شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ دوره ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ ثانیه انجام شد. مقادیر CT (چرخه آستانه) توسط روش‌های $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای ارزیابی ثبات بیان ژن‌ها از نرم‌افزار micPCR (شرکت Bio Molecular Systems، استرالیا) استفاده شد. همچنین، ژن اکتین به عنوان کنترل داخلی و جهت نرمال کردن داده‌های حاصل از دستگاه Real-Time PCR انتخاب شد. برای اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن‌های LEA

۴۰ درصد مربوط به اکوتیپ رفسنجان بود، در حالی که کمترین طول ساقه (0.43 ± 12 سانتی متر) در اکوتیپ سرچشمه مشاهده شد (شکل ۱). این نتایج نشان می دهد که واکنش ریخت شناسی گیاهان کلپوره به خشکی می تواند به شدت وابسته به منشاء ژنتیکی و شرایط اکولوژیکی مناطق نمونه برداری باشد.

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات ریخت شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اکوتیپ های کلپوره تحت سطوح مختلف تنش خشکی
Table 3- Analysis of variance for morphological, physiological, and biochemical traits in ecotypes of *Teucrium polium* under different levels of drought stress

Source of Variation	df	Stem Length	Root Length	Total Chlorophyll	Proline	Protein	SOD	CAT	POD	MDA
Mean Square										
Ecotype (E)	2	14.56*	2.12 ^{ns}	45.23*	76.85*	10.25 ^{ns}	52.34**	48.12**	56.21**	1.42 ^{ns}
Drought Stress (DS)	2	32.78**	11.47**	182.34**	430.12**	85.36**	220.45**	215.32**	260.12**	5.67**
E × DS	4	18.45**	5.76**	28.76*	92.45*	22.37*	36.12**	34.23**	44.56**	1.83*
Error	18	3.12	1.05	8.12	21.34	5.12	6.34	5.98	7.45	0.45
CV (%)	—	5.4	6.1	7.2	6.8	5.9	7.1	6.7	6.5	8.2

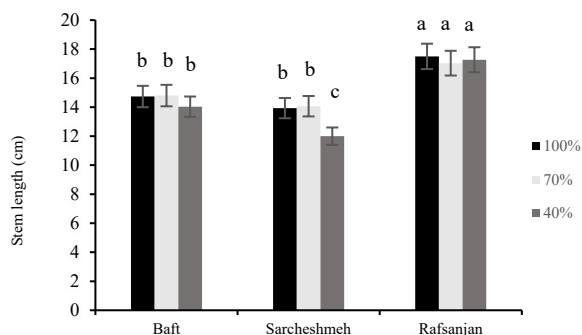
*: معنی دار در سطح احتمال ۵٪ ** : معنی دار در سطح احتمال ۱٪ ns: غیر معنی دار

* Significant at 5 % probability level ** : significant at 1 % probability level ns: Not significant

سرچشمه و کمترین مقدار در اکوتیپ بافت در رطوبت ۱۰۰ درصد مشاهده شد (شکل ۶). همچنین فعالیت کاتالاز نیز با شدت یافتن تنش خشکی افزایش یافت. بیشترین فعالیت در رطوبت ۴۰ درصد مربوط به اکوتیپ سرچشمه و کمترین فعالیت در رطوبت ۱۰۰ درصد اکوتیپ بافت ثبت شد (شکل ۷). آنزیم پراکسیداز نیز مشابه SOD و CAT تحت تنش خشکی به طور معنی داری افزایش یافت. در رطوبت ۴۰ درصد، بیشترین فعالیت POD در اکوتیپ سرچشمه و کمترین مقدار در رطوبت ۱۰۰ درصد اکوتیپ بافت مشاهده شد (شکل ۸). غلظت MDA که شاخص پراکسیداسیون لیپیدها و میزان آسیب اکسیداتیو به غشاهای سلولی است، تحت تنش خشکی به طور معنی داری افزایش یافت. بیشترین مقدار MDA در رطوبت ۴۰ درصد اکوتیپ بافت و کمترین مقدار در رطوبت ۱۰۰ درصد اکوتیپ سرچشمه ثبت شد (شکل ۹). با مقایسه جامع ویژگی های ریخت شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، اکوتیپ سرچشمه نسبت به اکوتیپ های دیگر نسبت به تنش خشکی مقاومت بیشتری نشان داد. بررسی بیان ژن های مرتبط با پاسخ به تنش خشکی *MYB* و *LEA* در اکوتیپ مقاوم نشان دادند نمونه های تحت

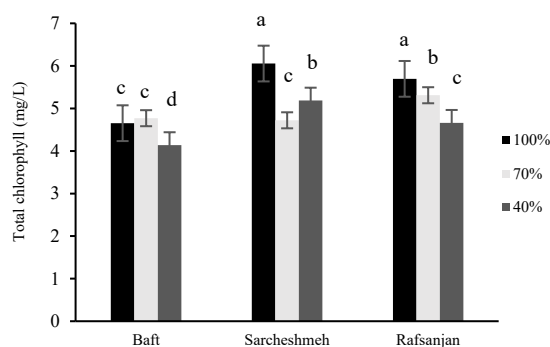
بررسی صفت طول ریشه نشان دادند تنش خشکی به طور معنی داری سبب افزایش طول ریشه می شود. کمترین طول ریشه در اکوتیپ های بافت و سرچشمه در شرایط فاقد تنش مشاهده شد (شکل ۲). ارزیابی مقادیر کلروفیل کل نیز نشان داد، بیشترین مقدار در اکوتیپ سرچشمه تحت تنش ۴۰ درصد و کمترین مقدار در اکوتیپ رفسنجان بدون تنش است (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین میزان پرولین نیز در اکوتیپ سرچشمه تحت تنش ۴۰ درصد و کمترین مقدار در اکوتیپ های بافت و رفسنجان در شرایط فاقد تنش مشاهده شد (شکل ۴). بیشترین مقدار پروتئین در اکوتیپ سرچشمه تحت تنش ۴۰ درصد و کمترین مقدار در اکوتیپ بافت تحت تنش ۴۰ درصد و ۷۰ درصد ثبت شد (شکل ۵). نتایج تجزیه واریانس نشان داد تنش خشکی اثرات معنی داری بر فعالیت آنزیم های SOD، CAT و POD و همچنین میزان MDA دارد. افزایش شدت تنش خشکی موجب افزایش تدریجی و معنی دار فعالیت تمامی آنزیم ها شد. فعالیت آنزیم SOD در تمامی اکوتیپ ها با کاهش رطوبت افزایش یافت. در رطوبت ۴۰ درصد، بیشترین مقدار SOD در اکوتیپ

که انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم می‌تواند بهینه‌سازی کشت کلپوره در مناطق خشک و کم‌آب را ممکن سازد.



شکل ۲- اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر طول ریشه در سه اکوتیپ کلپوره مورد بررسی

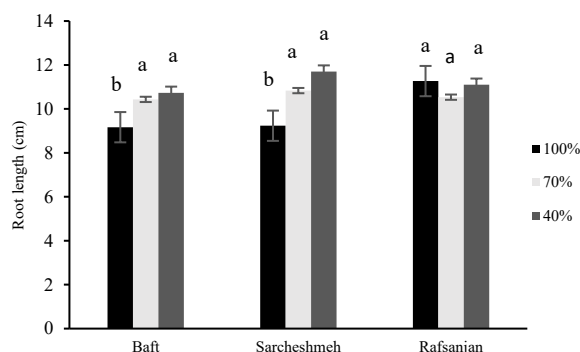
Figure 2- Effect of different levels of drought stress on the root length in three ecotypes of *Teucrium polium l*



شکل ۴- اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان پرولین در سه اکوتیپ کلپوره مورد بررسی

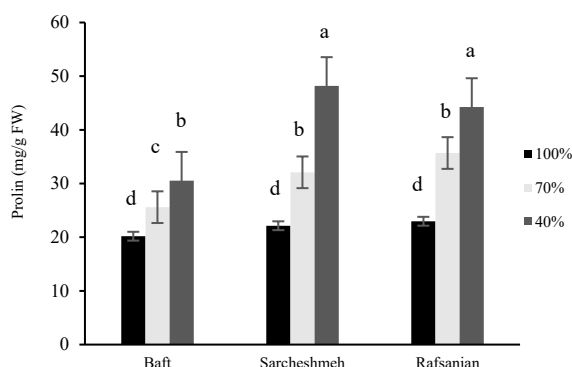
Figure 4- Effect of different levels of drought stress on the proline content in three ecotypes of *Teucrium polium l*

تنش به‌طور معنی‌داری بیان ژن‌های بیشتری نسبت به نمونه‌های شاهد دارند (شکل ۱۰). این یافته‌ها تأکید می‌کنند



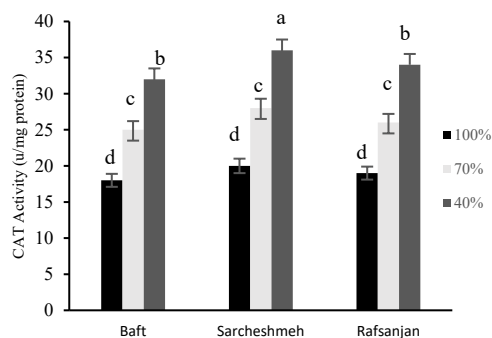
شکل ۱- اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر طول ساقه در سه اکوتیپ کلپوره مورد بررسی

Figure 1- Effect of different levels of drought stress on stem length in three ecotypes of *Teucrium polium l*



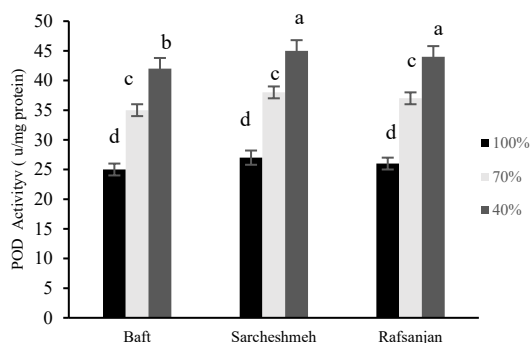
شکل ۳- اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان کلروفیل کل در سه اکوتیپ کلپوره مورد بررسی

Figure 3- Effect of different levels of drought stress on total chlorophyll content in three ecotypes of *Teucrium polium l*



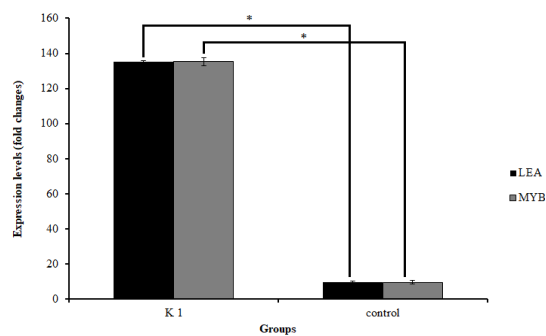
شکل ۷- اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر فعالیت آنزیم CAT در سه اکوتیپ کلپوره مورد بررسی

Figure 7- Effect of different levels of drought stress on CAT activity in three ecotypes of *Teucrium polium* l.



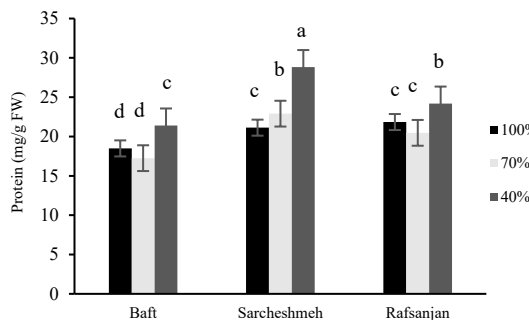
شکل ۸- اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر فعالیت آنزیم POD در سه اکوتیپ کلپوره مورد بررسی

Figure 8- Effect of different levels of drought stress on POD activity in three ecotypes of *Teucrium polium* l.



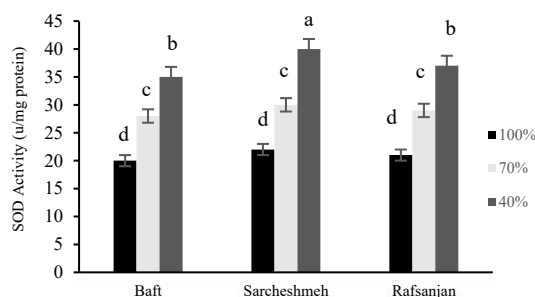
شکل ۱۰- بیان نسبی ژنهای *LEA* و *MYB* در اکوتیپ مقاوم سرچشمه تحت شرایط شاهد و تنش خشکی (K1).

Figure 10- Relative expression of *MYB* and *LEA* genes in Sarcheshmeh tolerant ecotype under control and drought stress (K1) conditions



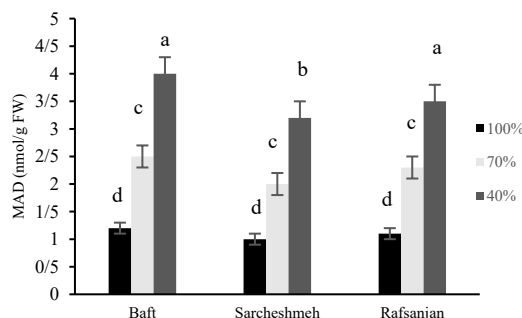
شکل ۵- اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان پروتئین در سه اکوتیپ کلپوره مورد بررسی

Figure 5- Effect of different levels of drought stress on the protein content in three ecotypes of *Teucrium polium* l.



شکل ۶- اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر فعالیت آنزیم SOD در سه اکوتیپ کلپوره مورد بررسی

Figure 6- Effect of different levels of drought stress on SOD activity in three ecotypes of *Teucrium polium* l.



شکل ۹- اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان MDA در سه اکوتیپ کلپوره مورد بررسی

Figure 9- Effect of different levels of drought stress on MDA content in three ecotypes of *Teucrium polium* l.

بحث

اثر تنش خشکی بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی و رشد گیاه: نتایج این پژوهش نشان داد تنش خشکی تأثیر قابل

توجهی بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی کلپوره داشت. کاهش رطوبت خاک سبب کاهش معنی دار طول ساقه و افزایش طول ریشه شد، که نشان‌دهنده واکنش تطبیقی گیاه برای

افزایش جذب آب و بهبود مقاومت در برابر کم آبی است. مقایسه اکوتیپ‌ها نشان داد که اکوتیپ سرچشمه نسبت به سایر اکوتیپ‌ها مقاومت بیشتری در برابر تنش خشکی دارد، زیرا طول ساقه آنها کمتر کاهش یافت و رشد ریشه به شکل مطلوب حفظ شد. این یافته‌ها با پژوهش‌های پیشین مبنی بر افزایش رشد ریشه و کاهش رشد اندام هوایی در پاسخ به خشکی مطابقت دارد (Sami et al., 2016; Farooq et al., 2014). بنابراین، تفاوت‌های مشاهده شده بین اکوتیپ‌ها نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی در پاسخ ریخت‌شناسی کلپوره به تنش خشکی است و نمونه‌های مقاوم می‌توانند در برنامه‌های بهبود ژنتیکی مورد توجه قرار گیرند. تنش آبی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی در گیاهان است که اثرات گسترده‌ای بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آنها دارد و موجب کاهش قابل توجه عملکرد محصولات کشاورزی می‌شود. برآوردها نشان می‌دهد حدود ۲۵ درصد از اراضی جهان به دلیل کمبود آب از بهره‌وری مطلوب خارج شده‌اند (Delfine et al., 2005). تنش خشکی تنشی چند بعدی است که تمامی مراحل رشد و نمو گیاه، از جمله تقسیم، کشیدگی و تمایز سلولی، را تحت تأثیر قرار می‌دهد. کاهش پتانسیل آب و تورگور سلولی در شرایط کم آبی منجر به اختلال در فرایندهای آنزیمی و فتوسنتز و در نتیجه کاهش رشد گیاه می‌شود. همچنین القای گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان سبب اختلال در عملکرد متابولیکی و فیزیولوژیکی آنها می‌شود (Farooq et al., 2009; Hasanuzzaman et al., 2022). در پاسخ به کمبود آب، گیاهان با افزایش رشد ریشه و گسترش سیستم ریشه‌ای، ظرفیت جذب آب را بالا می‌برند. به همین علت در شرایط خشکی ملایم، رشد ریشه معمولاً کاهش چندانی نمی‌یابد، در حالی که رشد اندام هوایی کاهش پیدا می‌کند. یکی از نخستین واکنش‌های گیاه در برابر تنش خشکی، کاهش میزان فتوسنتز است که به دلیل بسته شدن روزنه‌ها، کاهش محتوای کلروفیل و اختلال در زنجیره انتقال الکترون رخ می‌دهد (Sami et al., 2016; Farooq et al., 2014).

(Farooq et al., 2014). کاهش رنگدانه فتوسنتزی کلروفیل نشانه‌ای از استرس اکسیداتیو در گیاه است و رابطه مستقیمی با افت ظرفیت فتوسنتزی دارد. پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند، تنش خشکی سبب کاهش رشد و عملکرد در گیاهان دارویی می‌شود. برای مثال، کاهش ارتفاع، سطح برگ و ماده خشک در نعناع، بومادران، کاسنی، آویشن و بادرنجبویه گزارش شده است (Selmar & Kleinwachter, 2013). در شرایط خشکی، تجمع مواد آلی سازگار مانند قندها، پرولین و بتائین نقش مهمی در تنظیم اسمزی و حفظ پتانسیل آب سلولی ایفا می‌کند (Mohammadkhani & Heidari, 2008). این ترکیبات با حفظ تعادل اسمزی، پایداری ساختارهای سلولی و جلوگیری از تجمع ROS به مقاومت گیاه کمک می‌کنند.

پاسخ‌های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی در گیاه کلپوره موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و POD و نیز افزایش سطح MDA می‌شود، که نشان‌دهنده پاسخ محافظتی کلاسیک گیاه به تنش اکسیداتیو است. افزایش فعالیت SOD در پاسخ به خشکی نشانگر فعال شدن اولین خط دفاعی گیاه در برابر رادیکال سوپراکسید است (Alscher et al., 2002; Gill & Tuteja, 2010). فعالیت کاتالاز (CAT) نیز در شدت‌های بالاتر خشکی افزایش یافت، زیرا H_2O_2 محصول واکنش SOD باید حذف شود. کاتالاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در تجزیه H_2O_2 است و افزایش آن می‌تواند نشان‌دهنده تجمع مولکول‌های مضر باشد که در اثر تنش تولید شده‌اند (Aebi, 1984; Apel & Hirt, 2004; Hasanuzzaman et al., 2022). افزایش فعالیت CAT در اکوتیپ سرچشمه نشان می‌دهد که این ژنوتیپ توانایی بیشتری در محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو دارد.

2014). علاوه بر این، شواهد تازه نشان داده‌اند که تنظیم اپی‌ژنتیکی، از جمله متیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی، نقش مهمی در پاسخ گیاهان به خشکی دارد (Hasanuzzaman et al., 2022). سیستم ریشه‌ای نیز با انتقال سیگنال‌های کم‌آبی توسط هورمون ABA پاسخ‌های دفاعی را در اندام‌های هوایی فعال می‌کند (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006).

تغییرات متابولیکی: نتایج این پژوهش نشان داد که تجمع پرولین و پروتئین در اکوتیپ سرچشمه بیشترین مقدار را داشته و با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن‌های مقاومت همراه است. این همبستگی نشان می‌دهد که اکوتیپ سرچشمه از نظر متابولیسمی نیز توانایی بیشتری برای مقابله با تنش خشکی دارد. باز تنظیم مسیرهای کربوهیدراتی و انرژی در پاسخ به خشکی اهمیت ویژه‌ای دارد. در شرایط تنش، گیاهان انرژی خود را از رشد رویشی به سمت فعال‌سازی مسیرهای دفاعی و حفظ تعادل اسمزی منتقل می‌کنند (Farooq et al., 2009). این یافته‌ها چشم‌انداز جدیدی در درک سازوکار مقاومت گیاهان دارویی در برابر کم‌آبی فراهم کرده است.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد تنش خشکی اثر معنی‌داری بر صفات ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاه دارویی کلپوره دارد و شدت این اثرات در سه اکوتیپ مورد بررسی متفاوت بود. کاهش صفاتی مانند ارتفاع گیاه، سطح برگ و ماده خشک در شرایط تنش آبی بیانگر حساسیت رشد رویشی به کمبود آب است، با وجود این، اکوتیپ سرچشمه با حفظ بهتر این صفات، سازگاری ریخت‌شناسی بالاتری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها از خود نشان داد که احتمالاً ناشی از کارایی بیشتر سیستم ریشه‌ای و مدیریت بهتر منابع آبی است.

پراکسیداز (POD) نیز به‌طور معنی‌داری در شرایط خشکی افزایش یافت. این آنزیم علاوه بر نقش حفاظتی در حذف H_2O_2 ، در فرایندهای ساختاری مانند لیگنین‌سازی دیواره سلولی نیز شرکت دارد (Hiraga et al., 2001). افزایش POD در اکوتیپ سرچشمه می‌تواند بخشی از سازگاری بیوشیمیایی گیاه با تنش باشد. سطح MDA به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها افزایش یافت، که نشان‌دهنده آسیب غشایی ناشی از ROS است. بالاتر بودن MDA در برخی اکوتیپ‌ها نشان می‌دهد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها برای مهار کامل آسیب کافی نبوده است (Heath & Packer, 1968; Gill & Tuteja, 2010). مطابق داده‌های این پژوهش، اکوتیپ سرچشمه بیشترین افزایش SOD، CAT و POD را در سطح ۴۰٪ ظرفیت زراعی نشان داد، در حالی که اکوتیپ بافت افزایش کمتری داشت (شکل‌های ۶-۸). این تفاوت‌ها نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی در پاسخ آنتی‌اکسیدانی کلپوره و ظرفیت بالاتر اکوتیپ سرچشمه در مقابله با آسیب ROS است.

پاسخ مولکولی و بیان ژن:

نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ژن‌های *LEA* و *MYB* در اکوتیپ مقاوم سرچشمه در شرایط تنش شدید (۴۰٪ ظرفیت زراعی) نسبت به شرایط نرمال (شاهد) افزایش می‌یابد، که با فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هم‌راستا است. تنش خشکی با تنظیم بیان ژن‌های مقاومت مانند فاکتورهای رونویسی *MYB* و پروتئین‌های *LEA* همراه است. فاکتورهای *MYB* نقش مهمی در تنظیم پاسخ به تنش دارند و می‌توانند بیان ژن‌های دفاعی را افزایش دهند (Baldoni & Cominelli, 2015). افزایش بیان ژن *MYB* معمولاً موجب تجمع اسمولیت‌ها، بسته شدن روزنه‌ها و افزایش تحمل به خشکی می‌شود (Baldoni & Cominelli, 2015; Farooq et al., 2009). ژن‌های *LEA* نیز با پایداری ساختاری سلول در شرایط دهیدراسیون و محافظت از غشاها مرتبط هستند (Battaglia et al., 2008; Amara et al., 2008).

سطح مولکولی، افزایش بیان ژن‌های مرتبط با تحمل خشکی، در شرایط تنش شدید با بهبود پاسخ‌های بیوشیمیایی و حفظ نسبی صفات ریخت‌شناسی هم‌راستا بود. این همبستگی نشان می‌دهد که تحمل خشکی در کلیپوره نتیجه تعامل هماهنگ تنظیم بیان ژن‌ها، فعالیت سامانه آنتی‌اکسیدانی و سازگاری‌های رشدی است. بر این اساس، اکوتیپ سرچشمه به‌عنوان اکوتیپ مقاوم تر به خشکی شناسایی شد و می‌تواند گزینه مناسبی برای برنامه‌های به‌نژادی، کشت در مناطق کم‌آب و مطالعات آینده در زمینه اصلاح ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی گیاهان دارویی باشد.

References

- Abdollahi, M., Karimpour, H., & Monsef-Esfehani, H. R. (2003). Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. *Pharmacological Research*, 48(1), 31–35. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00059-8](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00059-8)
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ahuja, I., de Vos, R. C., Bones, A. M., & Hall, R. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, 15(12), 664–674. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.002>
- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331–1341. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331>
- Amara, I., Odena, A., Oliveira, E., Moreno, A., Masmoudi, K., & Pagès, M. (2014). Insights into maize LEA proteins: From proteomics to functional approaches. *Plant Signaling and Behavior*, 9(11), e973997. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.973997>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of*
- از نظر بیوشیمیایی، افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل SOD، CAT و POD در شرایط تنش خشکی نشان‌دهنده فعال شدن سیستم دفاعی گیاه در برابر استرس اکسیداتیو بود. شدت این پاسخ در اکوتیپ سرچشمه بیشتر از دو اکوتیپ دیگر مشاهده شد که با سطح پائین‌تر آسیب غشایی (MDA) همراه بود و بیانگر توان بالاتر این اکوتیپ در مهار گونه‌های فعال اکسیژن و حفظ پایداری غشاهای سلولی است. در مقابل، افزایش بیشتر MDA در برخی اکوتیپ‌ها نشان‌دهنده محدودیت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها در مقابله با تنش شدید خشکی است. در *Plant Biology*, 55, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Bahramikia, S., & Yazdanparast, R. (2012). Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/726724>
- Baldoni, E., Genga, A., & Cominelli, E. (2015). Plant MYB transcription factors: Their role in drought response mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15811–15851. <https://doi.org/10.3390/ijms160715811>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148(1), 6–24. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120725>
- Bettaieb, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourguou, S., Limam, F., & Marzouk, B. (2011). Drought effects on polyphenol content and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(3), 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.009>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Delfine, S., Alvino, A., & Loreto, F. (2005). Drought stress effects on physiology, growth and production of field-grown tomato. *Functional Plant Biology*, 32(1), 55-63. <https://doi.org/10.1071/FP04080>
- Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., & Siddique, K. H. M. (2009). Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29(1), 185-212. <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>
- Farooq, M., Hussain, M., & Siddique, K. H. M. (2014). Drought stress in wheat during flowering and grain-filling periods. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33(4), 331-349. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.875291>
- Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Conesa, M. A., Coopman, R. E., Douthe, C., Gago, J., Gallé, A., Galmés, J., Medrano, H., Ribas-Carbo, M., & Tomás, M. (2014). Mesophyll conductance to CO₂ and photosynthesis in drought-stressed plants. *Plant, Cell and Environment*, 37(1), 7-20. <https://doi.org/10.1111/pce.12102>
- Fermentas. (2010). *Biozol reagent user manual*. Thermo Fisher Scientific.
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., & Fujita, M. (2022). Plant response and tolerance to environmental stress: An overview. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(2), 509-540. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10199-5>
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>
- Lenka, S. K., Katiyar, A., Chinnusamy, V., & Bansal, K. C. (2011). Comparative analysis of drought-responsive transcriptome in indica rice genotypes with contrasting drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 315-327. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00560.x>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Moeini Alishah, H., Heidari, R., Hassani, A., & Asadi Dizaji, A. (2006). Effect of Water Stress on Some Morphological and Biochemical Characteristics of Purple Basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Biological Sciences*, 6(4), 763-767. <https://doi.org/10.3923/jbs.2006.763.767>
- Mohammadkhani, N., & Heidari, R. (2008). Water stress and solute accumulation in two wheat genotypes. *World Applied Sciences Journal*, 3(3), 448-453. [https://idosi.org/wasj/wasj3\(3\)/14.pdf](https://idosi.org/wasj/wasj3(3)/14.pdf)
- Perez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A., & Perez de Paz, P. L. (1993). Essential oils of *Teucrium* species from the Canary Islands. *Journal of Essential Oil Research*, 5(6),

- 663–668.
<https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698249>
- Petropoulos, S. A., Daferera, D., Polissiou, M. G., & Passam, H. C. (2008). The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Scientia Horticulturae*, 115(4), 393–397.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.10.008>
- Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161(11), 1189–1202.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013>
- Sadeghi, Z., Yang, J. L., Venditti, A., & Moridi Farimani, M. (2022). A review of the phytochemistry, ethnopharmacology and biological activities of *Teucrium* genus (Germander). *Natural Product Research*, 36(21), 5647–5664.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2022669>
- Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., & Hayat, S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 54–61.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.005>
- Selmar, D., & Kleinwächter, M. (2013). Stress enhances the synthesis of secondary plant products: The impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant and Cell Physiology*, 54(6), 817–826.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pct054>
- Thermo Scientific. (2012). *NanoDrop 2000 spectrophotometer user manual*. USA.
- Thomas, F. M., & Gausling, T. (2000). Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Q. robur*) to moderate drought stress. *Annals of Forest Science*, 57(4), 325–333.
<https://doi.org/10.1051/forest:2000123>
- Tunnacliffe, A., & Wise, M. J. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94(10), 791–812.
<https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698249>
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 781–803.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444>

