



Effect of sodium chloride on some of parameters Physiology, biochemical and expression two gene *ADS* and *CYP71AV1* artemisinin biosynthetic pathway in *Artemisia absinthium*

Sara Salimian Rizi¹, Zahra Rezayatmand^{2*}, Monireh Ranjbar³,
Nasrin Yazdanpanahi⁴, Zarrindokht Emami Karvani⁵

¹Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. Email: salimin97s@gmail.com

²Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. Email: zrezayatmand12@yahoo.com

³Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. Email: ranjbarmonir@yahoo.com

⁴Department of Biotechnology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. Email: n.yazdanpanahi@gmail.com

⁵Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. Email: zarrindokht20@gmail.com

Serial 67, 17th year, Number 3, Autumn 2022 (38-60)

Abstract

Article type:
Research Full Paper

Article history
Received: 10.08.2021
Revised: 27.09.2021
Accepted: 02.10.2021

Keywords
Artemisinin
Antioxidant activity
Artemisia absinthium
Gene expression
Salinity stress

Salinity stress is one of the important factors in decreasing the rate of growth and changing physiologic and metabolic processes of plants. In the present study to investigate the effect of salinity stress on physiological and biochemical performances and also gene expressions of *Artemisia absinthium* plant, an experiment was conducted with three level of salinity (0, 75, and 15 Mmol NaCl) in a completely randomized design with three replications under greenhouse conditions. Results showed that salinity stress decreased the rate of growth parameters in the plants including shoot length, root length, wet shoot weight, wet root weight, dry shoot weight, and dry root weight. Also, salinity decreased the levels of potassium, calcium, magnesium, and iron ions while increasing sodium levels in the plants. Increased salinity stress increased levels of proline, malondialdehyde, phenolic compounds, and activities of some antioxidant enzymes while it led to protein reduction in the plants under study. The expression of *CYP71AV1* and *ADS* genes reduced to minimum at 150 Mmol and 75 Mmol NaCl treatments, respectively leading to reduced level of artemisinin in the *Artemisia absinthium* plants. According to the findings of this study, it might be argued that in its attempt to confront salinity stress induced from sodium chloride, *Artemisia absinthium* employs the system of increased level of antioxidant enzymes activity, osmotic potential regulators, and phenolic compounds. Also, decreased expression of *ADS* gene can be an effective factor in reducing artemisinin contents in *Artemisia absinthium*.



اثر کلرید سدیم بر خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیان دو ژن *CYP71AV1* و *ADS* دخیل در مسیر بیوسنتزی آرتیمیزینین در گیاه افسنتین (*Artemisia absinthium*)

سارا سلیمیان ریزی^۱، زهرا رضایتمند^{۲*}، منیره رنجبر^۳، نسرین یزدان پناهی^۴، زرین دخت امامی کرون^۵

۱. گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. رایانامه: salimin97s@gmail.com

۲. گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. رایانامه: zrezayatmand12@yahoo.com

۳. گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. رایانامه: ranjbarmonir@yahoo.com

۴. گروه بیوتکنولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. رایانامه: n.yazdanpanahi@gmail.com

۵. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. رایانامه: zarrindokht20@gmail.com

سال هفدهم، شماره ۶۷، پاییز ۱۴۰۱ / صفحات: ۶۰-۳۸

نوع مقاله:

مقاله کامل علمی-پژوهشی

چکیده

تنش شوری یکی از عوامل مهم در رابطه با کاهش میزان رشد و تغییر در فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیسمی گیاهان می باشد. در این تحقیق جهت بررسی اثر تنش شوری بر عملکرد فیزیولوژی، بیوشیمیایی و بیان ژن در گیاه افسنتین، آزمایشی در سه سطح شوری (۰، ۷۵، ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه ای انجام گرفت. بررسی نتایج نشان داد که تنش شوری باعث کاهش میزان پارامترهای رشدی گیاه مانند طول ساقه، طول ریشه، وزن تر ساقه، وزن تر ریشه، وزن خشک ساقه، خشک ریشه شد، همچنین شوری سبب کاهش میزان یون های پتاسیم، کلسیم، منیزیم و آهن و افزایش میزان سدیم در گیاه گردید. افزایش تنش شوری میزان پرولین، مالون دی آلدئید، ترکیبات فنلی و فعالیت برخی آنزیم های آنتی اکسیدان را افزایش و میزان پروتئین در گیاه را کاهش داد. میزان بیان ژن های *CYP71AV1* و *ADS* نیز به ترتیب در غلظت های ۱۵۰ میلی مولار و ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم بیشترین میزان کاهش را نشان داد که این امر باعث کاهش میزان آرتیمیزینین در گیاه افسنتین گشت. با توجه به نتایج این پژوهش می توان عنوان نمود که گیاه افسنتین برای مقابله با تنش شوری حاصل از کلرید سدیم از سیستم افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی و مواد تنظیم کننده پتانسیل اسمزی و ترکیبات فنلی استفاده نموده است و کاهش بیان ژن *ADS* می تواند عامل موثر در کاهش مقدار آرتیمیزینین گیاه افسنتین باشد.

واژه های کلیدی:

آرتیمیزینین
آنزیم های آنتی اکسیدان
افسنتین
بیان ژن
تنش شوری

مقدمه

(2011). در پژوهشی شوری موجب افزایش معنی دار در میزان یون‌های Na^+ و Cl^- و کاهش یون‌های K^+ و Ca^{+2} در برگ‌های تمام ارقام در برگ‌های تمام ارقام نخود شد (Patel et al., 2010).

در گیاهان تغییرات بیوشیمیایی سلول می‌تواند به‌عنوان یکی از راهکارهای ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های غیر زیستی شود، این تغییرات شامل تکامل راههای متابولیکی جدید، سنتز پروتئین‌های ویژه و تجمع متابولیت‌ها در گیاهان می‌باشد. تولید متابولیت‌های سازگار همانند پرولین یکی دیگر از راهکارهای گیاه جهت تحمل گیاهان نسبت به تنش شوری می‌باشد. افزایش میزان پرولین در گیاه اسپرس و بادام، خرفه، کاهو و گوجه (Karmian and Atai, Barazandeh, 2012; Kafi et al., 2011; Ahmad et al., 2019; Gehanbazy Gojani et al., 2014; S. Attia et al., 2021) گزارش شده است. یکی از تغییرات بیوشیمیایی که طی تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری ایجاد می‌شود تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) می‌باشد (Apple and Hirt, 2004). گیاهان از طریق سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیره آنزیمی (آنزیم‌های همانند کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و عوامل غیر آنزیمی همانند ترکیبات فنلی) قادر به کاهش اثرات زیانبار تنش اکسیداتیو حاصل از عوامل تنش زا می‌باشند (2017, Jahanbakhsh GodehKahriz et al.,). افزایش میزان فعالیت‌های آنزیم پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در تنش شوری در گیاه گندم، گل محمدی، زوفا (*Hyssopus Officinalis* L.) (M. Abd Elhamid, Jahantigh et al., 2015; Omid et al., et al., 2014; 2021) گزارش شده است. ترکیبات فنلی نیز دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند و غیر فعال کردن اکسیژن فعال و مهار اکسیداسیون لیپیدها می‌تواند باعث کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهان شوند (Omid et al., 2021)

تنش شوری به‌عنوان یکی از تنش‌های غیر زیستی می‌تواند باعث ایجاد تغییراتی در فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی شود، که نتیجه آن کاهش میزان رشد گیاهان است و این کاهش نوعی سازگار شدن گیاه به شرایط نامساعد محیطی می‌باشد (Zhu, 2001). کاهش پایداری غشاء سلول، کاهش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، تفاوت در جذب یون‌های سدیم و پتاسیم، تجمع اسمولیت‌های سازگار و تولید متابولیت‌های ثانویه، سازوکارهای تحمل شوری در گیاهان می‌باشد. همچنین تخریب غشاء و تولید مالون دی‌آلدئید یکی از معیارهای واکنش گیاهان به تنش شوری محسوب می‌گردد (Farhoudi, 2013). افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در گیاه گندم، کلزا و گلرنگ (Motamedi and Farhoudi, 2010; Farhoudi, 2013) (Farhoudi, 2012; در تحقیقات مختلف گزارش شده است. عنوان شده است در تنش شوری افزایش نسبت یون پتاسیم و یون کلسیم نسبت به کلرید سدیم یکی از راهکارهای تحمل تنش شوری در گیاهان است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد بررسی میزان یون پتاسیم و یون سدیم گیاه از صفات مناسب برای تعیین ارقام متحمل به شوری می‌باشد (Farhoudi, 2013). در مورد گیاه سویا مشاهده شد با افزایش شوری غلظت یون‌های Na^+ و Cl^- در برگ و ریشه در مقایسه با گیاه بدون تیمار شوری افزایش یافت. و از طرفی دیگر با افزایش شوری میزان یون k^+ روند نزولی طی نمود (Doğan, 2011). در پژوهشی دیگر گزارش شده که میزان یون‌های Na^+ و Cl^- در برگ‌های گیاه *Hedera helix* با افزایش شوری افزایش معنی‌داری پیدا کرده است (Younes et al., 2014). همچنین گزارش شده است با افزایش شوری محتوای یون Na^+ در برگ و ریشه خرفه افزایش، در حالی که محتوای یون K^+ در برگ و ریشه کاهش یافت (Kafi and Rahimi,)

آمورفا-۴،۱۱-دین به آرتیمیزینیک الکل و آرتیمیزینیک آلدئید توسط آمورفا-۴،۱۱-دین ۱۲-مونوکسیژناز (CYP71AV1) کاتالیز می‌شود (Teoh et al., 2006). (CYP71AV1) یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز آرتیمیزینین، در حالیکه سیتو کروم P450 ردوکتاز (CPR) یک شریک اکسایشی برای (CYP71AV1) می‌باشد (Shen et al., 2012).

با توجه به آنکه گونه‌های گیاهی از نظر پاسخ به تنش شوری به صورت متفاوتی عمل می‌نمایند، لذا مطالعه درباره ی مکانیسم‌های ایجاد کننده تحمل به شوری در گیاهان مختلف ضروری می‌باشد. با در نظر گرفتن اهمیت گیاه دارویی افسنتین بواسطه متابولیت‌های ثانویه این گیاه و عدم وجود اطلاعات کافی در رابطه با اثر تنش شوری بر این گیاه، این پژوهش با هدف بررسی تغییرات فیزیولوژیکی و بررسی میزان برخی خصوصیات بیوشیمیایی و همچنین بیان ژن‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز آرتیمیزینین (ADS و CYP71AV1) تحت تنش شوری در این گیاه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در داخل گلدان و در شرایط گلخانه‌ای در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان انجام شد. کاشت گیاه افسنتین در خاک حاوی مخلوط پیت ماس+ کوکو پیت، پرلیت (به ترتیب با نسبت‌های ۵۰، ۳۰، ۲۰ درصد) صورت گرفت. گیاهان پس از رسیدن به مرحله چهار برگی به مدت ۱۰ روز به صورت یک روز در میان تحت تیمار کلرید سدیم، در سه سطح صفر (شاهد، ۷۵، ۱۵۰ میلی مولار NaCl) با سه تکرار قرار گرفت. بعد از گذشت ۷۲ ساعت (رفرنس) از آخرین تیمار کلرید سدیم، برگ گیاهان برای بررسی بیان ژن و بعد از سه هفته از اولین تیمار دهی، گیاهان

گیاه افسنتین *Artemisia absinthium* L. (Afsanteen) یک گیاه بوته‌ای، معطر، تلخ و چند ساله است (Wasim et al., 2010). آرتیمیزیا، یکی از بزرگترین و گسترده ترین جنس‌های خانواده آسترآسه که بیش از ۴۰۰ گونه دارد (Koul et al., 2017). افسنتین (*Artemisa Absinthium* L.) گیاهی علفی و پایا، که به ارتفاع ۴۰ تا ۶۰ سانتی‌متر و حتی یک متر می‌رسد به حالت انبوه در زمین‌های بایر سنگلاخی، کناره جاده‌ها و دامنه کوهستان‌ها تا ارتفاعات ۲۰۰۰ متر می‌روید. پراکندگی آن به این صورت می‌باشد که در نواحی مختلف فرانسه، دامنه‌های آلپ و پیریه، سوئیس، بلژیک و در آسیا مانند ایران و سیبری می‌روید (Zargari, 2011). گیاه افسنتین با داشتن مواد موثره متعدد دارای خاصیت ضد انگلی، ضد مالاریائی، ضد عفونی کننده و ضد التهاب است و همچنین در درمان درد معده در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hahnazi et al., 2015).

آرتیمیزینین به‌عنوان یکی از مواد موثره در گیاه افسنتین، یک سزکویی ترپن لاکتون با عملکرد پراکسیدی می‌باشد (O. Duke et al., 1987). آرتیمیزینین و آنالوگ‌های آن موثرترین متابولیت ثانویه ضد مالاریا می‌باشد که به مقدار کمی در گیاه *Artemisa* یافت می‌شود (et al., 2018). یکی از ژن‌های کلیدی در این مسیر ADS (am1) می‌باشد که آنزیم آمورفا-۴،۱۱-دین سینتاز (ADS) را کد می‌کند که، یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز آرتیمیزینین می‌باشد (et al., 2011). (Hosseini). آمورفا-۴،۱۱-دین سینتاز (ADS) باحلقویی کردن سوبسترای فارنسیل پیروفسفات، آمورفا-۴،۱۱-دین را به عنوان یک محصول اصلی تولید می‌کند. این مرحله محدود کننده میزان و سرعت بیوسنتز آرتیمیزینین ضد مالاریا محسوب می‌شود (Abdallah et al., 2018). اکسیداسیون

جهت بررسی های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برداشت شدند.

بررسی خصوصیات رشدی گیاه: بعد از گذشت سه هفته از شروع تیمار دهی و مشاهده تاثیر تنش کلرید سدیم اقدام به خروج گیاهان از خاک گردید و طول ریشه و ساقه با خط کش میلی متری اندازه گیری گردید. سپس بخش های مختلف گیاه (ریشه و بخش هوایی) به کمک آون خشک گردید و وزن تر و خشک گیاه به کمک ترازوی دیجیتالی اندازه گیری شد.

تهیه عصاره آنزیمی: به منظور تهیه عصاره آنزیمی ابتدا ۰/۱ گرم بافت تازه را بر روی یخ در ۱ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با (pH ۷/۵) حاوی پلی وینیل پیرولیدین ۰/۰۱ و EDTA ۱ میلی مولار سائیده و عصاره به حاصل با دور ۱۰۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله آخر محلول رویی جهت انجام آزمایش های سنجش پروتئین و بررسی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت (Gapinska et al., 2008).

اندازه گیری پروتئین: به منظور اندازه گیری میزان پروتئین، ابتدا به ۱۹۰ میکرولیتر از محلول برادفورد مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید و در نهایت در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری و با استفاده از منحنی استاندارد میزان پروتئین بر حسب میلی گرم بر گرم بافت گیاهی محاسبه گردید. از آلبومین سرم گاوی برای محاسبه مقدار پروتئین نمونه ها به عنوان استاندارد استفاده شد (Bradford, 1976).

اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز: اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز از طریق توانایی این آنزیم در ممانعت از احیا نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید صورت گرفت.

به این منظور مخلوط واکنش ۳ میلی لیتری، که حاوی فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH ۷/۸)، متیونین ۱۳۰ میلی مولار، نیترو بلو تترازولیوم کلراید ۷۵ میکرو مولار، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۱ میلی مولار، ریپوفلاوین ۳۶۰ میکرومولار و همچنین ۳۰ میکرولیتر عصاره خام، بعد از آن که مخلوط همزده شد. در مرحله بعد به مدت ۱۰ دقیقه کوت های اسپکتروفتو متر در زیر لامپ فلورسنت ۱۵ وات به فاصله ۳۵ سانتی متر قرار داده شد. توقف واکنش با خاموش کردن لامپ صورت گرفت و سپس جذب مخلوط واکنش در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، میزان آنزیمی در نظر گرفته شده است که قادر است تا ۵۰٪ از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید جلوگیری کند. فعالیت ویژه آنزیم به روش تعداد واحد جذب در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش شد (Dhindsa et al., 1981).

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز: در ابتدا به ۲/۷ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات (۲۵ میلی مولار) با PH=۶/۸، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول (۲۰ میلی مولار)، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (۴۰ میلی مولار) اضافه گردید. با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش فعالیت آنزیم شروع گردید. اندازه گیری افزایش جذب نور بعد از اضافه کردن آب اکسیژنه در طول موج ۴۷۰ نانومتر صورت گرفت. با استفاده از ضریب خاموشی ۶۶/۲ میلی مولار بر سانتی متر میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد جذب در دقیقه در میلی گرم پروتئین محاسبه شد (Chance and Maehly, 1995).

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: اندازه گیری میزان آنزیم کاتالاز به روش Aebi (1984) با اندکی تغییر انجام شد. به این منظور ۲/۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با (PH=۷) روی ۱۰ میلی مول

سپس جذب محلول رویی حاصل در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری گردید و محاسبه غلظت مالون دی آلدئید به کمک ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی مولار بر سانتی متر انجام شد (Heath and Packer, 1968).

اندازه گیری ترکیبات فنلی کل: در ابتدا ۰/۱ گرم از اندام هوایی خشک گیاه را با ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و سپس به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در تاریکی قرار داده شد. در مرحله بعد به ۱ میلی لیتر محلول رویی ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و سپس با استفاده از آب مقطر حجم محلول به ۵ میلی لیتر رسانده شد. در مرحله بعد ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی لیتر کربتات سدیم ۵ درصد به آن اضافه شد. مخلوط به وجود آمده به مدت ۱ ساعت در تاریکی قرار گرفت و بعد از آن جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید و غلظت ترکیبات فنلی کل برحسب میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه و با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد (Ronald and Laima, 1999).

اندازه گیری ترکیب آرتیمیزینین به روش HPLC:

اندازه گیری ترکیب آرتیمیزینین به روش کروماتوگرافی مایع با کرائی بالا HPLC صورت گرفت. برای این منظور ابتدا ۱ گرم نمونه برگ با ۲۰ سی سی متانول به مدت ۳۰ دقیقه التراسونیک شد و در مرحله بعد فیلتر گردید و به مقدار $20 \mu l$ از عصاره حاصل به دستگاه HPLC با مدل Knauer تزریق گردید. همچنین به جهت آنالیز کمی ترکیب آرتیمیزینین، با تزریق محلول استاندارد با غلظت‌های معین و به دست آوردن سطح زیر پیک هر کدام منحنی کالیبراسیون مربوط رسم گردید و با استفاده از معادله خطی این منحنی کالیبراسیون، میزان کلی آرتیمیزینین برحسب میلی گرم بر گرم وزن خشک گیاه تعیین گردید.

H_2O_2 و ۰/۳ میلی لیتر عصاره آنزیمی ریخته شد و سپس فعالیت آن بعد از یک دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

اندازه گیری پرولین: ابتدا ۰/۲ گرم از بافت فریز شده گیاه (ساقه و برگ) در ۱۰ میلی لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید سائیده و عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد، ۲ میلی لیتر از مایع رویی با ۲ میلی لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی لیتر استیک اسید خالص مخلوط شد و به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سلیسیوس در حمام آب گرم قرار داده شد. لوله‌های محتوی مخلوط بلا فاصله در یخ، سرد شد. در مرحله بعد ۴ میلی لیتر تولوئن به مخلوط اضافه و لوله‌ها تکان داده شد. سپس دو لایه مجزا با ثابت نگه داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه تشکیل گردید. میزان جذب لایه رنگی فوقانی که شامل تولوئن و پرولین بود، در ۵۲۰ نانومتر مشخص و از منحنی استاندارد پرولین برای محاسبه مقدار پرولین استفاده شد. نتایج بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر گیاه محاسبه شد (Bates et al., 1973).

اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA): ۰/۱ گرم از برگ تر گیاه درون هاون چینی (روی یخ و دمای ۴ درجه سانتی گراد) سائیده گردید. سپس بر روی مخلوط حاصله، ۱/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱٪ اضافه و سپس ورتکس شد. محلول به وجود آمده در شرایط $10000 \times g$ و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد به ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی، ۱ میلی لیتر محلول ۰/۵٪ تیو باریتونیک اسید (TBA) به اضافه ۲۰٪ TCA اضافه گردید. سپس مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد درون حمام بخار قرار داده شد. در مرحله آخر پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمونه‌ها با دور $10000 \times g$ سانتریفوژ،

جدول ۱: مشخصات دستگاه HPLC

مشخصات دستگاه	
ستون	۵ میکرو متر، C18
طول ستون	۱۵ سانتی متر
قطر ستون	۴/۶ میلی متر
سرعت جریان دستگاه	۰/۳ میلی لیتر در دقیقه
طول موج	۳۰۰ نانومتر، ۲۵۰ نانومتر

سازنده در شرایط کاملاً استریل و بدون RNase صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از ژل الکتروفورز و نانودراپ ارزیابی شد. نمونه‌های RNA با نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ برابر با ۱/۷ تا ۲/۱ برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

سنتر cDNA: قبل از استفاده از RNA استخراج شده در مرحله سنتر cDNA، ابتدا DNA احتمالی موجود در آن طی مراحل تیمار با DNase I (فرمتناز) حذف گردید. برای اینکار مقدار ۸ µl (حدود ۱۰۰۰ ng) از RNA استخراج شده از مرحله قبلی را در یک میکروتیوب ریخته و سپس ۱ µl DNase I 10x Buffer (سیناژن)، ۱ µl DNase I (فرمتناز) و ۱ µl RNase Inhibitor (Ribolock RI) به آن اضافه و به آرامی مخلوط و سانتریفوژ شد. محتویات مذکور با آب بدون نوکلئاز (فرمتناز) به حجم ۲۰ µl رسانده شد. میکروتیوب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. در مرحله بعد ۱ µl EDTA به محتوی میکروتیوب فوق اضافه شد. مجدداً میکروتیوب در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. این کار برای غیرفعال کردن آنزیم‌های RNase و RI انجام گرفت. سپس میکروتیوب برای ایجاد یک شوک حرارتی بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد. سنتر cDNA توسط کیت سنتر cDNA بایوفکت (BioFact™ RT kit, Korea) انجام شد. جهت سنتر cDNA بر اساس دستورالعمل کیت ۱۰ µl

اندازه گیری یون به روش ICP-MS: برای اندازه‌گیری میزان یون‌های سدیم، کلسیم، منیزیم، پتاسیم و آهن ابتدا ۰/۲۵ گرم نمونه اندام هوایی در ظرف هضم مایکروویو ریخته و سپس ۴ میلی‌لیتر از HNO₃ غلیظ و ۱ میلی‌لیتر H₂O₂ ۳۰٪ به هر ظرف هضم اضافه گردید. در مرحله بعد ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۵۰ میلی‌گرم در لیتر فلزات (AU+LU) به هر یک از ظروف هضم اضافه گردید. ظروف را محکم کرده و سپس به سیستم مایکروویو Berghof Speedwave 4 انتقال داده شد. نمونه‌ها در حداقل دمای ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه هضم گردید. در مرحله بعد اجازه داده شد که، ظروف تا دمای اتاق سرد شود. سپس نمونه‌ها صاف گردید و محتویات هر ظرف را در یک لوله سانتریفیوژ HDPE ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و با آب دیونیزه تا حجم نهایی ۲۰ میلی‌لیتری رقیق گردید. برای تهیه استانداردها و محدوده غلظت هر کدام از عناصر مورد بررسی، آنالیز مقدماتی انجام و استانداردهای مورد نیاز برای هر عنصر با ۳ تکرار آماده شد. نمونه‌های هضم شده به دستگاه HP 4500 ICP-MS مجهز به Asos- 520 Autosampler (انگلستان) جهت اندازه‌گیری عناصر تزریق شد.

بررسی بیان ژن به روش Real time PCR

استخراج RNA: استخراج RNA از بافت برگ گیاه افسنتین با استفاده از کیت استخراج RNA (Trizol kit, Germany) و طبق دستورالعمل شرکت

حضور کنترل منفی (فاقد نمونه cDNA و دارای کلیه اجزای لازم برای PCR انجام شد. واکنش‌های Real time PCR در این پژوهش توسط کیت Real time PCR BioFact™ Real time Kit, (Korea) حاوی رنگ سایبرگرین و در حجم کلی ۲۰ μl انجام گرفت. از آنجا که طبق منحنی استاندارد و نتایج بررسی باندهای محصولات PCR مرحله قبل بر ژل الکتروفورز، غلظت ۲۰۰ ng/μl بهینه و مناسب بود، از این غلظت برای واکنش‌های Real time PCR استفاده شد. محلول واکنش شامل شامل ۱ μl cDNA با غلظت اولیه ۲۰۰ ng/μl (غلظت نهایی ۱۰ ng/μl)، ۰/۵ μl از هر یک از پرایمرهای فوروارد (F) و ریورس (R) با غلظت اولیه ۱۰ pM (غلظت نهایی ۰/۲۵) با توالی مندرج در جدول (۲)، ۱۰ μl مستر BioFact™ 2x Real time PCR Master Mix و ۸ μl آب مقطر استریل انجام شد. برنامه دمایی واکنش‌ها برای ژن‌های هدف و رفرنس بصورت زیر بود:

واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۵ سیکل شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه و واسرشت نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه. همچنین منحنی ذوب در دمای ۶۰ تا ۹۵ درجه، با ۰/۳ درجه افزایش دما به ازای هر خوانش فلورسنت ترسیم گشت. طراحی پرایمرها با استفاده از توالی‌های ارائه شده در سایت NCBI برای ژن‌های *CYP71A1* (GenBank accession number AB706290.1) و *ADS* (GenBank accession number LC106017.1) مربوط به *Artemisia absinthium* و توالی‌های حفظ شده ژن *18S rRNA* بین گونه‌های مشابه انجام گردید. پرایمرها توسط نرم‌افزار

از RNA استخراج شده و تیمار شده با DNase I که به طریق مذکور تهیه شد، برداشته و به آن ۱ μl پرایمر راندم هگزامر ۵۰ ng/μl و ۲/۵ μl آب بدون نوکلئاز فرمتناز اضافه شد. میکروتیوب‌های فوق به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا ساختارهای ثانویه پرایمرها و نیز RNA باز شود. میکروتیوب‌ها بر روی یخ منتقل شد. به محتویات فوق، به ترتیب ۲ μl بافر (M-MLV10x Buffer)، ۱ μl RNase ۰/۵ mM dNTP mix ۱۰ اضافه، ۰/۵ μl (Thermoscientific) Inhibitor (Ribolock RI) و ۰/۵ آنزیم رونویسی معکوس (M-MLV Reverse Transcriptase) اضافه شد. ترکیبات فوق با آب بدون نوکلئاز فرمتناز به حجم ۲۰ μl رسانده شد. سپس میکروتیوب‌ها ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در مرحله بعد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد برای واکنش سنتز و در مرحله پایانی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد برای توقف واکنش قرار داده شد. در این شرایط آنزیم، در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد فعالیت خود را شروع کرده و می‌تواند از روی RNA مورد نظر cDNA بسازد. میکروتیوب‌ها نیز داخل دستگاه (gradient, Germany) Eppendorf mastercycler PCR قرار داده شدند. کیفیت و کمیت cDNAهای سنتز شده به ترتیب با الکتروفورز و بررسی جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ nm با استفاده از نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت و cDNAهایی که دارای کیفیت و کمیت مناسب بودند (عدم ایجاد اسمیر، دارای باند با شدت مناسب بر روی ژل و با نسبت جذب نوری در رنج ۱/۶ تا ۲/۱) در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد ذخیره شد.

واکنش Real Time PCR: کلیه واکنش‌های Real time PCR بصورت تکرار دوتایی توسط دستگاه (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) Step-One™ Real-Time PCR System و در

شرکت آرین ژن گستر سنتز و تهیه شد. از ژن *18S rRNA* به عنوان ژن رفرنس استفاده گردید. اطلاعات پرایمر برای ژنهای مورد مطالعه در پژوهش حاضر در جدول ۲ ارائه شده است.

Oligo (version 7.60) طراحی و با نرم افزار (version 1.0.2) Oligo Analyzer از لحاظ کیفیت (تشکیل لوپ، دایمر و غیره) بررسی شد. همچنین با استفاده از بلاست در پایگاه داده NCBI از لحاظ اتصال اختصاصی به مکان هدف ارزیابی گردید. سپس توسط

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در Real Time PCR

ژن	توالی پرایمر (5'→3')	طول محصول PCR (جفت باز (bp))	دمای ذوب (Tm) (درجه سانتی گراد)
<i>18S rRNA</i>	F:TAGAGCTAATACGTGCAACAAACC R:TAATTCTCCGTCACCCGTCACCA	۲۱۶	۵۹/۳ ۶۳
<i>CYP71AV1</i>	F:TGTCATGGGTGCAGAATACGAG R:ACCATTGGGGAGTTTCCAGTTG	۱۳۹	۶۰/۴ ۶۰/۸
<i>ADS</i>	F:GAGGGACACATACCAACCACTGA R:AGAGACAGCCATTCGACAGC	۱۳۵	۶۱/۹ ۶۲/۴

ریشه در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری وجود داشت با توجه به داده های (جدول ۴) مشاهده گردید که با افزایش سطح شوری میزان وزن تر و خشک اندام های هوایی کاهش یافت و کم ترین میزان وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم می باشد. وزن تر و خشک ریشه گیاه افسنتین نیز با افزایش میزان سطح شوری کاهش نشان داد.

اثر تنش شوری بر طول ساقه و ریشه گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر طول ساقه و ریشه در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده های (جدول ۴) مشاهده گردید که با افزایش میزان شوری طول ساقه و ریشه نیز به عنوان یکی دیگر از شاخص های بررسی رشد گیاه کاهش نشان داد. این کاهش در غلظت ۱۵۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم بیش ترین میزان بود

محاسبات آماری: این آزمایش در قالب یک طرح آماری کاملاً تصادفی در سه سطح شوری با سه تکرار انجام گرفت و نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد و سطح معنی داری مساوی یا کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و در نهایت با استفاده از نرم افزار Excel نمودارها رسم گردید. نتایج C_1 بدست آمده نیز با استفاده از روش آنالیز نسبی و $2^{-\Delta\Delta C_t}$ مورد تجزیه و تحلیل قرار (Livak and Schmittgen, 2001) تا میزان بیان نسبی ژنهای (*ADS* و *CYP71AV1*) بدست آید.

نتایج

اثر تنش شوری بر وزن تر و خشک ساقه و ریشه گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر وزن تر ساقه و ریشه در سطح یک درصد و وزن خشک ساقه و

جدول ۳: تجزیه واریانس شاخص‌های رشد در گیاه افسنطین تحت تیمار کلرید سدیم

تیمار کلرید سدیم (میلی مولار)	درجه آزادی	وزن تر ساقه (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک ساقه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	طول ساقه (سانتی متر)	طول ریشه (سانتی متر)
شوری	۲	۱۴/۵۸۰**	۱۲/۴۷۸**	۰/۲۲۵*	۰/۰۴۴*	۳۴/۹۰۶**	۴۳/۶۴۱**
خطا	۶	۱/۴۶۷	۱/۷۷۶	۰/۰۶۴	۰/۰۱۶	۰/۸۹۶	۲/۰۳۲
ضریب تغییرات (%CV)	-	۵۲/۳۵	۴۶/۹۰	۵۵/۷۳	۵۹/۴۴	۲۴/۱	۲۰/۲۴

** و * به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح ۵ درصد، معنی داری در سطح ۱ درصد

جدول ۴: مقایسه میانگین شاخص‌های رشد در گیاه افسنطین تحت تیمار کلرید سدیم

تیمار کلرید سدیم (میلی مولار)	وزن تر ساقه (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک ساقه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	طول ساقه (سانتی متر)	طول ریشه (سانتی متر)
شاهد	۶/۴۷۵±۰/۷۶۳ ^a	۶/۳۰±۱/۱۵۴ ^a	۰/۸۳±۰/۱۷۴ ^a	۰/۳۸±۰/۱۱۴ ^a	۱۶/۱۵±۰/۶۲۷۸ ^a	۲۱/۶۳±۱/۱۲۸۹ ^a
غلظت ۷۵	۳/۹۲۳±۰/۸۳۵ ^b	۴/۹۰±۰/۵۱۷ ^{ab}	۰/۶۱±۰/۱۷۹ ^{ab}	۰/۲۲±۰/۰۴۸ ^b	۱۲/۵۹±۰/۴۰۹۵ ^b	۱۴/۲۰±۰/۸۶۸۵ ^b
غلظت ۱۵۰	۲/۰۸±۰/۴۳۰ ^b	۲/۲۸±۰/۴۱۸ ^b	۰/۲۸±۰/۰۴۸ ^b	۰/۱۵±۰/۰۲۳ ^b	۹/۳۳±۰/۵۷۸۳ ^c	۹/۳۳±۰/۵۷۷۳ ^b

داده‌های (جدول ۸) مشاهده گردید میزان پروتئین موجود در بخش هوایی گیاه در غلظت ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم یک افزایش به مقدار ۳۳/۶۶ میلی گرم در گرم بافت گیاهی را نشان داد و سپس در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم یک افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد.

اثر تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۷) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح نیم درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۸) مشاهده گردید میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش تنش شوری افزایش یافت به صورتی که در غلظت ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم یک افزایش ۵ برابری و در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم یک افزایش ۹ برابری در فعالیت کاتالاز نسبت به شاهد مشاهده شد.

اثر تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۷) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان پراکسیداز در سطح نیم درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۸) مشاهده گردید فعالیت

اثر تنش شوری بر میزان پرولین گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان پرولین در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۶) مشاهده گردید که میزان پرولین با افزایش سطح شوری در گیاه افزایش یافت. این افزایش در غلظت ۱۵۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم نسبت به نمونه شاهد ۳ برابر مشاهده شد.

اثر تنش شوری بر میزان مالون دی‌آلدئید غشاء گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان مالون دی‌آلدئید در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۶) مشاهده گردید با افزایش تنش شوری میزان آنزیم مالون دی‌آلدئید افزایش یافت. به صورتی که در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم مقدار مالون دی‌آلدئید به ۰/۲۰۲ نانومول در گرم بافت تازه گیاهی رسید.

اثر تنش شوری بر میزان پروتئین کل گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۷) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان پروتئین اختلاف معنی داری وجود نداشت. با توجه به

آنزیم پراکسیداز نسبت به نمونه شاهد با افزایش سطح کلرید سدیم افزایش نشان داد که این افزایش در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم بیشترین میزان و برابر ۰/۰۸۹ واحد در میلی گرم پروتئین بود. اثر تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۷) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان

جدول ۵: تجزیه واریانس مقادیر ترکیبات فنلی کل، میزان آرتمیزینین و مقدار مالون دی آلدهید در گیاه افسنطین تحت تیمار کلرید سدیم

تیمار کلرید سدیم (میلی مولار)	درجه آزادی	ترکیبات فنل کل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک)	آرتمیزینین (میلی گرم در گرم وزن خشک)	مالون دی آلدهید (نانومول در گرم در بافت تازه)	پرولین (میکرومول در گرم در بافت تازه)
کلرید سدیم	۲	۱۳/۸۲۳**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۷**	۱۹۰۷/۹۳**
خطا	۶	۰/۴۸۶	۶/۴ × ۱۰ ^{-۵}	۲/۱۷۸	۱۷/۲۸
ضریب تغییرات (CV%)	-	۷۹/۷۲	۴۴/۷۴	۲۵/۲۷	۶۳/۳۶

ns و ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح ۵ درصد، معنی داری در سطح ۱ درصد

جدول ۶: مقایسه میانگین مقادیر ترکیبات فنلی کل، آرتمیزینین و مالون دی آلدهید در گیاه افسنطین تحت تیمار کلرید سدیم

تیمار کلرید سدیم (میلی مولار)	ترکیبات فنل کل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک)	آرتمیزینین (میلی گرم در گرم وزن خشک)	مالون دی آلدهید (نانومول در گرم در بافت تازه)	پرولین (میکرومول در گرم در بافت تازه)
شاهد	۰/۲۲۱۰۴ ± ۰/۰۷۵۹ ^b	۰/۰۴۵۶ ± ۰/۰۰۵۰۴ ^a	۰/۱۱۰۵ ± ۰/۰۰۴۰۲ ^c	۱۹/۶۸۵ ± ۱/۲۸۶۲ ^b
غلظت ۷۵	۱/۷۲۹۶ ± ۰/۲۲۱۰۴ ^b	۰/۰۳۸۰۰ ± ۰/۰۰۵۱۹ ^a	۰/۱۷۶۶ ± ۰/۰۰۲۱۲ ^b	۲۱/۰۷۲۶ ± ۱/۹۱۵۰۴ ^b
غلظت ۱۵۰	۴/۸۶۶۱ ± ۰/۶۲۳۱ ^a	۰/۰۱۶۳۳ ± ۰/۰۰۵۰۴ ^b	۰/۲۰۲۴ ± ۰/۰۰۱۰۸ ^a	۶۴/۰۴۲۹ ± ۷/۳۷۸۲۳ ^a

جدول ۷: تجزیه واریانس میزان پروتئین، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز و بیان ژن های ADS و CYP71AV1 در گیاه افسنطین تحت تیمار کلرید سدیم

تیمار کلرید سدیم (میلی مولار)	درجه آزادی	پروتئین (میلی گرم بر گرم بافت گیاه)	سوپراکسید- دیسموتاز (واحد جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	کاتالاز (واحد جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	پراکسیداز (واحد جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	بیان ژن ADS	بیان ژن CYP71AV1
کلرید سدیم	۲	۱۹/۱۹۴ ^{ns}	۰*	۳۸/۳۴*	۰/۰۱۲*	۰/۱۲۴*	۰/۷۸۹*
خطا	۶	۱۷/۱۱۱	۲/۷ × ۱۰ ^{-۵}	۱۰/۳۹	۰/۰۰۶	۰/۱۳۳	۰/۷۷۱
ضریب تغییرات (CV%)	-	۲۰/۲۱	۲۲/۲۳	۷۱/۴۶	۳۴/۰۹	۴۴/۴۵	۶۴/۱۱

ns و ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح ۵ درصد، معنی داری در سطح ۱ درصد

اثر تنش شوری بر میزان ترکیبات فنل تام: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان ترکیبات فنل تام در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۶) مشاهده گردید میزان

ترکیبات فنلی تام نیز با افزایش تنش شوری در گیاه افزایش نشان داد و در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم بیشترین میزان و برابر با ۴/۸۶ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه بود.

جدول ۸: مقایسه میانگین میزان پروتئین، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز در گیاه افسنطین تحت تیمار کلرید سدیم

تیمار کلرید سدیم (میلی مولار)	پروتئین (میلی گرم بر گرم بافت گیاه)	سوپراکسید دیسموتاز (واحد جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	کاتالاز (واحد جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	پراکسیداز (واحد جذب در دقیقه بر میلی گرم پروتئین)
شاهد	۲/۸۸۶ ± ۱۸/۵ ^b	۰/۰۰۱۳ ± ۰/۰۰۵۴ ^c	۰/۳۱۴۳ ± ۱/۶۶۱ ^c	۰/۰۰۱۴۵ ± ۰/۰۳۱۲ ^c
غلظت ۷۵	۲۰/۰ ± ۳۳/۶۶۶ ^a	۰/۰۰۸۴۱ ± ۰/۰۴۲۵ ^b	۰/۹۰۵ ± ۷/۹۸۲ ^b	۰/۰۶۴۴ ± ۰/۰۲۲۴ ^b
غلظت ۱۵۰	۲/۸۸۶ ± ۲۳/۵ ^b	۰/۰۱۴۶ ± ۰/۱۳۰۹ ^a	۱/۵ ± ۱۴/۲۰۸۱ ^a	۰/۰۱۳۸ ± ۰/۰۸۹۸ ^a

اثر تنش شوری بر میزان محتوای یون سدیم در اندام هوایی گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۹) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان یون سدیم در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۱۰) مشاهده گردید میزان یون سدیم در گیاه شاهد بدون اعمال تنش شوری ۳/۹۴ میلی گرم در گرم وزن خشک بود که با افزایش میزان تنش شوری در غلظت ۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم افزایش میزان یون سدیم مشاهده گردید که بیشترین مقدار آن در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم و به میزان ۷/۹۵ میلی گرم در گرم وزن خشک بافت گیاهی نسبت به شاهد بود.

اعمال تنش شوری ۶/۶ میلی گرم در گرم وزن خشک بود که با افزایش میزان تنش شوری در غلظت ۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم کاهش میزان یون پتاسیم مشاهده گردید که کمترین مقدار آن در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم و به میزان ۳/۳۵ میلی گرم در گرم وزن خشک بافت گیاهی بود.

اثر تنش شوری بر نسبت یون پتاسیم به یون سدیم در اندام هوایی گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۹) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر نسبت یون پتاسیم به یون سدیم در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۱۰) مشاهده گردید نسبت یون سدیم به یون پتاسیم در گیاه شاهد بدون اعمال تنش شوری ۱/۶۶ میلی گرم در گرم وزن خشک بود که با افزایش میزان تنش شوری در غلظت ۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم کاهش نسبت یون پتاسیم به یون سدیم مشاهده گردید که کمترین مقدار آن در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم و به میزان ۰/۴۲۰

اثر تنش شوری بر میزان محتوای یون پتاسیم در اندام هوایی گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۹) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان یون پتاسیم در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۱۰) مشاهده گردید میزان یون پتاسیم در گیاه شاهد بدون

میلی گرم در گرم وزن خشک بافت گیاهی نسبت به شاهد بود.

اثر تنش شوری بر میزان محتوای یون کلسیم در اندام هوایی گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۹) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان یون کلسیم در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۱۰) مشاهده گردید میزان یون کلسیم در گیاه شاهد بدون اعمال تنش شوری ۳/۲۳ میلی گرم در گرم وزن خشک بود که با افزایش میزان تنش شوری در غلظت ۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم کاهش میزان یون کلسیم مشاهده گردید که کمترین مقدار آن در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم و به میزان ۱/۴۲ میلی گرم در گرم وزن خشک بافت گیاهی بود.

اثر تنش شوری بر میزان محتوای یون منیزیم در اندام هوایی گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۹) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان یون آهن در سطح نیم درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۱۰) مشاهده گردید میزان آهن موجود در بافت گیاهی با افزایش تنش شوری کاهش یافت و کمترین میزان آهن در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم به مقدار ۰/۲۵ میکرو گرم در گرم وزن خشک گیاه بود.

معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۱۰) مشاهده گردید میزان یون منیزیم در گیاه شاهد بدون اعمال تنش شوری ۱/۶۵۳ میلی گرم در گرم وزن خشک بود که با افزایش میزان تنش شوری در غلظت ۷۵ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم کاهش میزان یون منیزیم مشاهده گردید که کمترین مقدار آن در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم و به میزان ۰/۴۷۳ میلی گرم در گرم وزن خشک بافت گیاهی بود.

اثر تنش شوری بر میزان محتوای یون آهن در اندام هوایی گیاه: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۹) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان یون آهن در سطح نیم درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۱۰) مشاهده گردید میزان آهن موجود در بافت گیاهی با افزایش تنش شوری کاهش یافت و کمترین میزان آهن در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم به مقدار ۰/۲۵ میکرو گرم در گرم وزن خشک گیاه بود.

جدول ۹: تجزیه واریانس میزان عناصر سدیم، پتاسیم، نسبت سدیم به پتاسیم، کلسیم، منیزیم و آهن، نسبت پتاسیم به سدیم در گیاه افسنتین تحت تیمار کلرید سدیم

تیمار کلرید سدیم	درجه آزادی	سدیم (میلی گرم در گرم وزن خشک)	پتاسیم (میلی گرم در گرم وزن خشک)	پتاسیم/سدیم (میلی گرم در گرم وزن خشک)	کلسیم (میلی گرم در گرم وزن خشک)	منیزیم (میلی گرم در گرم وزن خشک)	آهن (میکرو گرم در گرم وزن خشک)
کلرید سدیم	۲	۱۳/۳۶۵**	۷/۹۶۰**	۱/۱۸۵**	۲/۵۹۵**	۱/۰۴۵**	۰/۰۱۰*
خطا	۶	۰/۰۷۹	۰/۱۹۸	۰/۰۱۵	۰/۰۶۰	۰/۰۲۹	۰/۰
ضریب تغییرات cv(%)	-	۳۳/۱۲	۲۹/۶۷	۵۳/۴۴	۳۷/۷۸	۴۹/۵۷	۷۴/۸۵

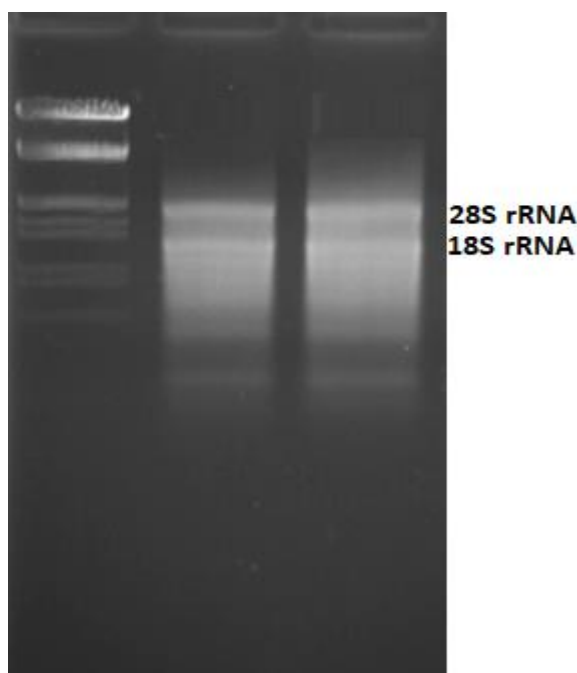
ns** و *** به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح ۵ درصد، معنی داری در سطح ۱ درصد

نتایج بررسی بیان ژن‌های ADS و CYP71AV1 در گیاه افسنتین: پس از پایان مرحله استخراج و بررسی RNA بدست آمده از لحاظ کیفی و کمی وجود دو

باند مربوط به 28S rRNA و 18S rRNA بر ژل آگارز نشان دهنده کیفیت قابل قبول و مناسب برای RNA استخراج شده بود (شکل ۱).

جدول ۱۰: مقایسه میانگین میزان عناصر سدیم، پتاسیم، نسبت سدیم به پتاسیم، کلسیم، منیزیم و آهن، نسبت پتاسیم به سدیم در گیاه افسنطین تحت تیمار کلرید سدیم

تیمار کلرید سدیم (میلی مولار)	سدیم (میلی گرم در گرم وزن خشک)	پتاسیم (میلی گرم در گرم وزن خشک)	پتاسیم/سدیم (میلی گرم در گرم وزن خشک)	کلسیم (میلی گرم در گرم وزن خشک)	منیزیم (میلی گرم در گرم وزن خشک)	آهن (میکرو گرم در گرم وزن خشک)
شاهد	۳/۹۴±۰/۰۹۶۳ ^c	۶/۶±۰/۲۱۴۲ ^a	۱/۶۶۷±۰/۰۵۷۴ ^d	۳/۲۳±۰/۰۹۸۷ ^a	۱/۶۵۳±۰/۱۲۷۱ ^a	۰/۱۳۶±۰/۰۱۸۵۵ ^a
غلظت ۷۵	۴/۸۱±۰/۱۹۶۷ ^b	۴/۸۳±۰/۳۰۱۷ ^b	۱/۰۱۱۹±۰/۱۰۳۹ ^b	۱/۹۴±۰/۱۴۵۲ ^b	۱/۰۸۶±۰/۱۰۱۳ ^b	۰/۰۵۱±۰/۰۰۳۶۰ ^b
غلظت ۱۵۰	۷/۹۵±۰/۱۷۶۴ ^a	۳/۳۵±۰/۲۴۷۵ ^c	۰/۴۲۰۷±۰/۰۲۴۹ ^c	۱/۴۲±۰/۱۶۹۷ ^c	۰/۴۷۳±۰/۴۹۱ ^c	۰/۰۲۵±۰/۰۰۵۶۸ ^b

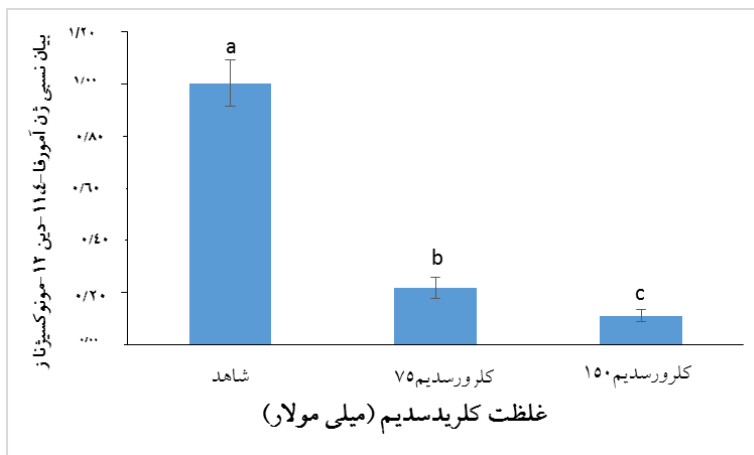


شکل ۱: ژل الکتروفورز RNA کل استخراج شده. ستون اول از سمت چپ مارکر و دو ستون دوم و سوم مربوط به RNA استخراج شده از دو نمونه مختلف

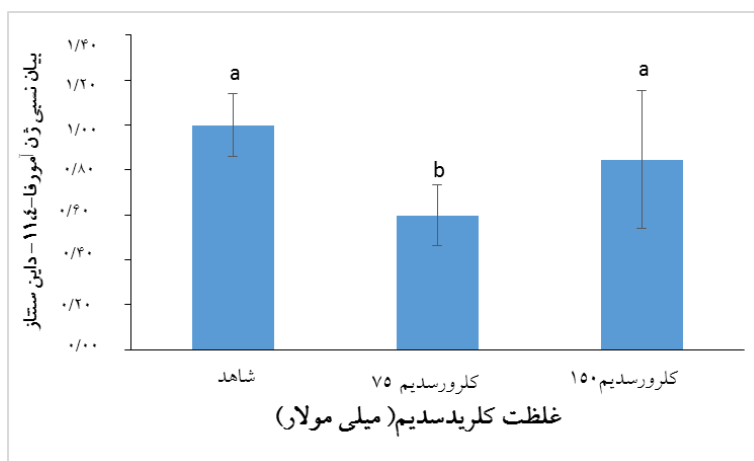
میلی مولار کلرید سدیم بیش تر از ۱۵۰ میلی مولار بود (شکل ۲ و ۳).

نتایج میزان آرتمیزینین در گیاه افسنطین: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد که بین سطوح مختلف کلرید سدیم از نظر میزان آرتمیزینین در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. با توجه به داده‌های (جدول ۶) مشاهده گردید با افزایش میزان تنش شوری میزان آرتمیزینین نسبت به شاهد کم تر شد.

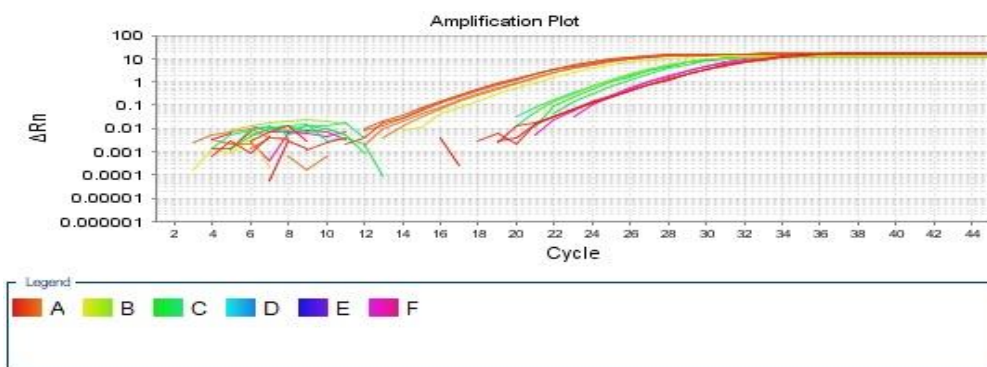
نتایج مربوط به بررسی بیان ژن‌ها نشان داد که با افزایش تنش شوری میزان بیان ژن *CYP* در غلظت ۷۵ میلی مولار و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم به ترتیب ۰/۲۲ و ۰/۱۱ برابر گروه شاهد بود که در سطح کمتر از ۰/۰۵ کاهش معنی داری را نشان داد. همچنین بیان ژن *ADS* در تنش شوری در غلظت‌های ۷۵ میلی مولار و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم به ترتیب ۰/۶ و ۰/۸ برابر گروه شاهد بود و کاهش غیر معنی داری را نشان داد. میزان کاهش بیان این ژن در غلظت ۷۵



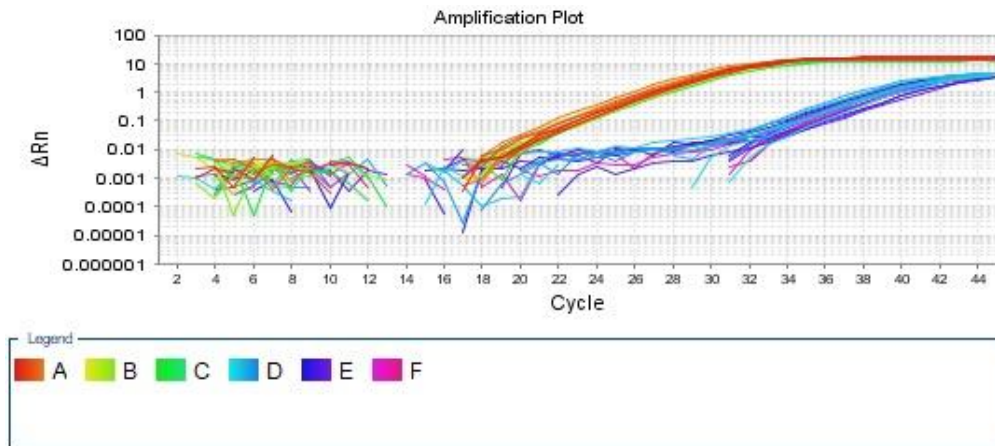
شکل ۲: بیان نسبی ژن آمورفا-۱۱،۴-دین ۱۲-مونوکسیژناز (*CYP71A1*) در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم در گیاه افسنتین



شکل ۳: بیان نسبی ژن آمورفا-۱۱،۴-دین سنتاز (*ADS*) در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم در گیاه افسنتین



شکل ۴: منحنی‌های تکثیر ژن (*ADS*) در سمت راست و ژن خانه‌دار 18SrRNA در سمت چپ



شکل ۵: منحنی‌های تکثیر ژن (*CYP71A1*) در سمت راست و ژن خانه دار 18S rRNA در سمت چپ

بحث

(Matysik et al., 2002). ارتباط مستقیمی بین تجمع پرولین و تنش شوری در گیاهان مختلفی همانند گوجه فرنگی (Amini and Ehsanpour, 2005)، تنباکو (Razavizade and Ehsanpour, 2009) و برنج (Demiral et al., 2008) گزارش شده است. در این تحقیق ابتدا یک افزایش در میزان پروتئین در غلظت کم کلرید سدیم و سپس یک کاهش در غلظت بالای کلرید سدیم در گیاه مشاهده شد که دلیل آن را می‌توان افزایش سنتز پروتئین‌های دفاعی در تنش شوری ضعیف و عدم سنتز یا کاهش سنتز و یا تخریب پروتئین‌های گیاه در تنش شوری شدید دانست. پروتئین‌های محلول گیاه تحت تنش شوری و در نتیجه واکنش با رادیکال‌های آزاد، افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین، کاهش ساخت پروتئین و تخریب سازوکارهای رونویسی و ترجمه mRNA کاهش می‌یابد (Ranyan et al., 2001). در زمان تنش شوری میزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز پروتئین‌ها ممکن است کاهش یا افزایش یابد که نتیجه آن تغییر در میزان پروتئین‌های گیاه است (Wimmer et al., 2003).

نتایج این تحقیق افزایش آنزیم مالون دی آلدهید را با افزایش میزان تنش شوری نشان داد که با نتایج گزارش شده توسط (Motamedi and Farhoudi, 2003).

در این مطالعه کاهش میزان وزن تر و خشک و همچنین طول ریشه و ساقه گیاه افسنطین تحت تنش شوری مشاهده شد. تحقیقات نشان داده است تنش شوری باعث اختلال در فرآیندهای رشد و نمو گیاهان می‌شود. رشد در گیاهان بواسطه ی تقسیم سلولی و افزایش حجم سلول ایجاد می‌گردد. تنش شوری با اثر گذاری بر تقسیمات سلولی و متابولیسم گیاه باعث کاهش میزان رشد در گیاهان می‌شود. کاهش میزان وزن خشک بخش هوایی و ریشه گیاه تحت تنش شوری در گزارشات متعددی عنوان شده است (Hussein et al., 2007; Aghai et al., 2014). همچنین کاهش میزان ارتفاع در گیاه کتان و لوبیا تحت تنش شوری نیز گزارش شده است (Dash et al., 2001; Meloni et al., 2003).

در این تحقیق با افزایش غلظت کلرید سدیم میزان پرولین افزایش یافته که می‌تواند باعث کاهش اثرات تخریبی تنش شوری بر گیاه افسنطین شود. عنوان شده است پرولین به عنوان یک محلول سازگار کننده در گیاهان می‌باشد (Savarus et al., 1995). نقش پرولین در حذف رادیکال‌های آزاد که نتیجه آن حفظ مولکول‌های حیاتی سلول همانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشد مشخص شده است.

گیاه می‌تواند اثرات تنش شوری را تعدیل نماید. افزایش میزان ترکیبات فنلی در تعدادی از گیاهان همانند آویشن (فابریکی اورنگ و داود نیا، ۱۳۹۷)، بارهنگ (Golkar et al., 2017)، علف هفت بند (Boughlleb et al., 2020)، و مریم گلی (Valifard et al., 2014)، گل محمدی (Omidi et al., 2021) گزارش شده است.

در این پژوهش میزان یون‌های سدیم با افزایش تنش شوری افزایش و میزان یون‌های کلسیم، منیزیم، پتاسیم و آهن کاهش یافت. تحقیقات نشان داده است تنظیم هموستازی یون‌ها در گیاهان، برای مقاومت گیاه در برابر تنش شوری لازم است. در تنش شوری میزان تجمع یون‌های سدیم، کلر در گیاهان زیاد می‌شود که برای گیاه سمی بوده و روی کلیه مکانیسم‌ها و فعالیت‌های آنزیمی گیاه اثر گذار است (Ahmad et al., 2020). یون پتاسیم نقش مهمی در تنظیم فعالیت آنزیمی و تنظیم هموستازی سلول و تثبیت سنتز پروتئین دارد (Sharma et al., 2013). در گیاه آویشن گزارش شده است که تنش شوری باعث افزایش محتوای یون سدیم و کاهش میزان یون پتاسیم در گیاه شد (Emami Bistgani et al., 2019).

همچنین افزایش میزان یون سدیم و کاهش نسبت یون‌های پتاسیم به سدیم در گیاه بارهنگ تحت تنش شوری گزارش شده است (Golkar et al., 2017). کاهش میزان یون‌های منیزیم و کلسیم بواسطه اثر آنتاگونیسمی آن با یون سدیم نیز در گیاه suaeda گزارش شده است (Khan et al., 2000). تنش شوری در گیاه آرتمیسیا آنوا باعث کاهش میزان یون پتاسیم و نسبت یون‌های پتاسیم به سدیم در بخش هوایی گیاه شد و این در حالی است که غلظت یون سدیم افزایش یافت (Prasad et al., 1996). عنوان شده است مقدار یون‌های کلسیم و منیزیم بافت‌های گیاهی در گیاهان حساس به شوری با افزایش تنش شوری کاهش می‌

(2010; Khalid et al., 2015; S.Attia et al., 2021) مطابقت داشت. عنوان شده است رادیکال سوپراکسید تولید شده در طی تنش شوری در گیاهان باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شود و شاخص بررسی تنش اکسیداتیو در گیاهان بررسی میزان آنزیم مالون دی آلدئید می‌باشد (Davey et al., 2005).

در این تحقیق میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز با افزایش غلظت شوری افزایش یافت که بیانگر فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی در این گیاه در مقابله با تنش شوری می‌باشد. گیاهان از طریق سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی خود قادر به کاهش اثرات زیانبار تنش اکسیداتیو حاصل از عوامل تنش زای محیطی می‌باشند، تحمل تنش شوری همبستگی مثبتی با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) و همچنین تجمع ترکیبات غیر آنزیمی همانند ترکیبات فنلی دارد (Gupta, 2005; Asada, 1999). افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان ذرت (Daneshmand et al., 2009) و سیب زمینی (Samia et al., 2009) (Omidi et al., 2021)، گل محمدی (et al., 2011)، آویشن (Razavizadeh and Mohagheghian, 2015)، آراییدوبسیس (Zaidi and Hanin, 2016) گزارش شده است.

افزایش میزان ترکیبات فنلی در این تحقیق بیانگر اثر سیستم غیر آنزیمی گیاه افسنتین در کاهش اثرات تنش شوری در این گیاه است. ترکیبات فنلی نیز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در گیاهان رفتار می‌کنند به طوری که با افزایش میزان این ترکیب پراکسیداسیون اسیدهای چرب کاهش می‌یابد (Valifard et al., 2014). با تولید ترکیبات فنلی به عنوان متابولیت‌های ثانویه که کاهش تنش آنتی‌اکسیدانی را به عهده دارند،

یابد. همچنین گزارش شده است که جذب زیاد یون سدیم در گیاهان در طی تنش شوری باعث کاهش جذب یون‌های پتاسیم و کلسیم در برخی گیاهان همانند گندم و برنج و سورگوم می‌شود (Box and Lecerda; Saedipoor, 2017; 2011 Schachtman, et al., 2014). کاهش میزان عناصر میکرو همانند آهن نیز در تنش شوری در چهارگونه بادام وحشی گزارش شده است (Gehanbazy Gojani et al., 2014). افزایش یون سدیم موجب کاهش کاتیون‌های دیگر و تغییر در تعادل کاتیونی در گیاه گردیده و موجب کاهش میزان یون‌های کلسیم، منیزیم و پتاسیم در گیاه گردید. در غلظت‌های بالای شوری، به سبب جایگزینی یون سدیم، مقدار یون پتاسیم کاهش می‌یابد که موجب برهم خوردن تعادل یونی می‌گردد (Maqsoomi Holaso and Pourakbar, 2014).

بررسی و مطالعه بیان ژن‌ها و عوامل رونویسی در یک مسیر متابولیسمی در شناسایی و بیان ژن‌های آن مسیر به محقق کمک می‌کند که بتواند با تغییر بیان ژن‌ها میزان تولید فرآورده را تغییر دهد. اهمیت روز افزون ترکیب آرتیمیزینین به عنوان یک داروی ضد مالاریا و ضدسرطان باعث شکل‌گیری تحقیقات زیادی در راستای افزایش میزان این ماده در گیاه آرتیمیزیا شده است (Board et al., 2013). ژن‌های (ADS) و (CYP71AV1) دو ژن بسیار مهم در مسیر بیوسنتزی آرتیمیزینین می‌باشد (Olofsson et al., 2011).

ADS آنزیم کلیدی برای سنتز آرتیمیزینین است که می‌تواند سطح این ماده را در گیاه آرتیمیزیا آنوا افزایش دهد (Alam et al., 2010). ستیوکروم منواکسیژناز (CYP71AV1) نیز یک سزکوئی ترپن اکسیداز است متعلق به خانواده سیتوکروم P450 که نقش موثری در مسیر بیوسنتزی آرتیمیزینین دارد (Shan et al., 2012). تحقیقات نشان داده که بیان ژن (CYP71AV1) در گیاه آرتیمیزیا آنوا با افزایش محتوی

آرتیمیزینین گیاه ارتباط مستقیم دارد (Li et al., 2012). بیان متفاوت ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی آرتیمیزینین در بافت‌ها و مراحل مختلف رشد گیاه آرتیمیزیا عنوان شده است (Olofsson et al., 2011) و همکاران (Yarizadeh, 2011) با مطالعه روی بیان ژن‌های گونه‌های مختلف آرتیمیزیا عنوان نمودند که در گونه *Artemisia absinthinum* بیان ژن ADS نسبت به گونه *Artemisia annua* زیاد تر می‌باشد. گیاه نسبت به تنش شوری حساس می‌باشد و در تنش شوری شدید میزان آرتیمیزینین در این گیاه کاهش و در غلظت پایین نمک میزان آرتیمیزینین نسبت به شاهد افزایش یافت (Aftab et al., 2010; Qian et al., 2007). تنش‌های محیطی می‌توانند سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاه را با تغییر در بیان ژن‌های آنزیم‌های مسیرهای بیوسنتزی آنها تغییر دهند. در این پژوهش میزان آرتیمیزینین و بیان ژن *CYP71AV1* با افزایش غلظت کلرید سدیم کاهش یافت. بیان ژن ADS نیز با تنش شوری نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد اما در غلظت ۷۵ میلی‌مولار نسبت به ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم کاهش بیشتر بود. با توجه به اینکه در پژوهش کنونی دو ژن از مجموعه ژن‌های دخیل در مسیر سنتز آرتیمیزینین در سطح رونویسی بررسی شده‌اند، یک توجیه احتمالی برای بیان نوسانی ژن ADS می‌تواند این باشد که تنش شوری در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم با کاهش ترجمه RNA ژن مذکور باعث کاهش بیان و تولید محصول پروتئینی این ژن و در نتیجه باعث کاهش میزان آرتیمیزینین شده است. بنابراین اگرچه میزان رونویسی از ژن در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار نسبت به غلظت ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم به میزان ناچیزی بیشتر است اما در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار احتمالاً سطح ترجمه کاهش یافت. به هر حال برای اثبات این مطلب نیاز به مطالعه در سطح ترجمه می‌باشد. توجیه احتمالی

استنباط نمود که اثر تنش شوری حاصل از تیمار کلرید سدیم بر فرآیندهای مختلف گیاه متفاوت می‌باشد. از یک طرف کاهش میزان عناصر غذایی ضروری و افزایش عناصر سمی همانند سدیم در حین تنش شوری باعث کاهش میزان شاخص‌های رشدی گیاه گشت و از طرف دیگر گیاه با افزایش میزان ترکیبات فنلی و اسید آمینه پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تا حدودی توانسته تنش شوری را تحمل نماید. همچنین کاهش میزان بیان ژن *ADS* نشان می‌دهد این ژن در بیوستتز آرتمیزینین در گیاه *CYP71AV1* افسنطین نقش بیشتری نسبت به ژن *CYP71AV1* داشت.

دیگر این است که در تولید آرتمیزینین ژنهای مختلفی به غیر از *ADS* دخیل هستند بنابراین ممکن است بیان ژنهای دیگر با افزایش غلظت کلرید سدیم روند نزولی داشته و در نتیجه میزان آرتمیزینین کاهش یابد. اگر چه بیوستتز متابولیت‌های ثانویه از مسیرهای ژنتیکی تنظیم می‌شود، اما بیوستتز و عملکرد آنها متاثر از عوامل محیطی می‌باشد. به هر حال برای اثبات این فرضیه‌ها نیاز به مطالعات بیش تر می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طور کلی از نتایج بدست آمده می‌توان چنین

Reference

- Abdallah, II., Van Merkerk, R., Klumpenaar, E., Quax, J.W. (2018).** Catalysis of amorpho-4, 11-diene synthase unraveled and improved by mutability landscape guided engineering. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/s41598-018-28177-4.
- Aebi, H. (1984).** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.
- Aftab, T., A. Khan, M.M., Idrees, M., Naeem, M., Hashmi, N. and Moinuddin. (2010).** Effect of Salt Stress on Growth, Membrane Damage, Antioxidant Metabolism and Artemisinin Accumulation in *Artemisia annua* L. *Plant Stress*. 4 (1): 36-43.
- Aghai, K., Tayei, N., Kanaani, M.R. and Yazdani, M. (2014).** The effect of salinity stress on some physiological and biochemical traits of two species of *Salvia*. *Plant Process and Function*. 3 (9): 96-85.
- Ahmed, H. A.A., Koçak Şahin, N., Akdoğan, G., Yaman, C., Köm, D. and Uranbey, S. (2020).** Variability in salinity stress tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties using in vitro screening. *Ciência e Agrotecnologia*. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-7054202044004220>
- Ahmed, S., Ahmed, Sh., Roy, S.K., Woo, S.H., Sonawane, K.D. and Shohaël, A.M. (2019).** Effect of salinity on the morphological, physiological and biochemical properties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Bangladesh. *De Gruyter*. 4: 361-373.
- Alam, P., Kiran, U., Ahmad, M.M., Kamaluddin., Ali Khan, M., Jhanwar, Sh. and Abdin, M.Z. (2010).** Isolation, characterization and structural features of amorpho- 4, 11-diene synthase (*ADS3963*) from *Artemisia annu* L. *Bioinformation*. 4(9): 421-429.
- Amini, F. and Ehsanpour, A.A. (2005).** Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na⁺/K⁺ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under in vitro salt stress. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1(4): 212-216.
- Appel, K. and Hirt, H. (2004).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55(1): 373-399.
- Asada, K. (1999).** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annual Review of Plant Biology*. 50: 601-639.

- Bates, L.S. (1973).** Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*. 39: 205-207.
- Board, R., Reza Zadeh, Sh.Gh., Omid, M., Torabi, S., Hariri Akbari, Ph., Parvaneh, S. and Taghizad Farid, R. (2013).** Investigation of Quantitative diversity Artemisinin of *Artemisia annua* in plant populations native in northern Iran. *Scientific-Research Quarterly of Plant and Ecosystem*. 9 (35): 50-43.
- Boughalleb, F., Abdellaoui, R., Mahmoudi, M. and Bakhshandeh, E. (2020).** Changes in phenolic profile, soluble sugar, proline, and antioxidant enzyme activities of *Polygonum equisetiforme* in response to salinity. *Turkish Journal of Botany*. 44(1): 25-35.
- Box, S. and Schachtman, D. P. (2011).** The effect of low concentrations of sodium on potassium uptake and growth of wheat. *Australian Journal of Plant Physiology*. 27: 175-182.
- 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: 248-254.
- Chance, B. and Maehly, A.C. (1995).** Assay of catalase and peroxidases. *Methods of Enzymology*. 11: 764-775.
- Daneshmand, F., Arvin, M.J. and Kalantari, Kh.M. (2009).** Effect of Acetylsalicylic Acid (Aspirin) on Salt and Osmotic Stress Tolerance in *Solanum bulbocastanum* in Vitro: Enzymatic Antioxidants. *American-Eurasian Journal Agriculture and Environmental Science*. 6 (1): 92-99.
- Dash, M. and Panda, S. (2001).** Salt Stress Induced Changes in Growth and Enzyme Activities in Germinating *Phaseolus Mungo* Seeds. *Biologia Plantarum*. 44(4): 587-589.
- Dhindsa, R.A., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T.A. (1981).** Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*. 126: 93-101.
- Davey, M.W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J. and Swennen, R.L. (2005).** High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Analytical Biochemistry*. 347: 201-207.
- Doğan, M. (2011).** Antioxidative and proline potentials as a protective mechanism in soybean plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology*. 10(32): 5972-5978.
- Demiral, T. and Turkan, I. (2005).** Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 53(3): 247-257.
- Emami Bistgani, Z., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggic, F. and Morshedloo, M.R. (2019).** Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*. 135: 311-320.
- Farhoudi, R. (2012).** Effect of salinity stress on alpha-amylase enzyme activity, cell membrane permeability and seedling growth of rapeseed cultivars. *Plant Process and Function*. 1(1): 24-14.
- Farhoudi, R. (2013).** Investigation of the effect of salinity stress on growth and histological characteristics of nine wheat cultivars in vegetative growth stage. *Journal of Crop Physiology - Islamic Azad University, Ahvaz Branch*. 5 (20): 86-71.
- Fabriky Aurang, S. and Davoodnia, B. (2018).** Evaluation of changes in growth traits and secondary metabolites in *Thymus vulgaris* L. under mild salinity and drought stress. *Journal of Ecophytic Chemistry of Medicinal Plants*. 6(2): 40-27.
- Gapinska, M., Sklodowska, M. and Gabara, B. (2008).** Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Physiologia Plantarum*. 30: 11-18.

- Gehanbazy Gojani, H., Hosseini Nasr, S., Saqib Talebi, Kh. and Hojjati, S. (2014).** The Effect of salinity stress on vegetative factors, proline, plant pigments and nutrient uptake in shoots of four species of wild almonds. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 27 (5): 787-777.
- Golkar, P., Amooshahi, F. and Arzani, A. (2017).** The effects of salt stress on physio-biochemical traits, total phenolic and mucilage content of *Plantago ovata* Forsk under in vitro conditions. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 90: 224 - 231.
- Gupta, K.J., Stoimenova, M. and Kaiser, W.M. (2005).** In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ, *Journal of Experimental Botany*. 56(420): 2601-2609.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1969).** Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125: 189-198.
- Hosseini, R., Yazdani, N., Garoosi, GA. (2011).** The presence of amorpho-4, 11-diene synthase, a key enzyme in artemisinin production in ten *Artemisia* species. *Daru*. 19: 332-337.
- Hussein, M.M., Balbaa, L.K. and Gaballah, M.S. (2007).** Salicylic Acid and Salinity Effects on Growth of Maize Plants. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 3(4): 321 - 328.
- Jahanbakhsh GodehKahriz, S., Khadem Sedighi, S., Ebadi, Gh., Tavakoli, N. and Davari, M. (2017).** The effect of salinity stress on the expression of salinity resistance proteins and antioxidant activity in *Echium amoenum* using calcium. *Genetic Engineering and Biosafety*. 6 (1): 129-117.
- Jahantigh, O., Najafi, F., Naghdi badi, H.A., Khavari-nejad, R.A. and Sanjarian, F. (2015).** Changes In Antioxidant Enzymes Activities and Proline, Total Phenol And Anthocyanine Contents In *Hyssopus Officinalis*L. Plants Undersalt Stress. *Acta Biologica Hungarica*. 67(2): 195-204.
- Kafi, M. and Rahimi, Z. (2011).** Effect of salinity and silicon on root characteristics, growth, waterstatus, proline content and ion accumulation of purslane (*Portulaca oleracea* L.).*Soil Science and Plant Nutrition*. 57(2): 341-347.
- Karmian, R. and Atai Barazandeh, S. (2012).** Study of the effect of salinity stress on some growth indices in three species of sainfoin (*Onobrychis*) in Iran. *Plant Biology*. 5 (15): 82-69.
- Khalid, H., Kumari, M., Grover, A. and Nasim, M. (2015).** Salinity Stress Tolerance of *Camelina* Investlgated in vitro. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 46(4): 137-144.
- Khan Kayani, W., Hafeez Kiani, B., Dilshad, E. and Mirza, B. (2018).** Biotechnological approaches for artemisinin production in *Artemisia*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 34: 1-14.
- Khan, M.A., A. Ungar, I. and M. Showalter, A. (2000).** The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte, *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. *Journal of Arid Environments*. 45: 73-84.
- Koul, B., Taak, P., Kumar, A., Khatri, T. and Sanyal, I. (2017).** The *Artemisia* Genus: A Review on Traditional Uses, Phytochemical Constituents, Pharmacological Properties and Germplasm Conservation. *Journal of Glycomics and Lipidomics*. 7:1-7.
- Li, J., Zhao, G .Zh., Varma, A., Qin, Sh., Xiong, Zh., Huang, H.Y., Zhu, W.Y., Zhao, L.X., Xu, L. H., Zhang, S. and Li, W.J. (2012).** An Endophytic *Pseudonocardia* Species Induces the Production of Artemisinin in *Artemisia annua*. *Public Library of Science One*. 7: 1-9.
- Livak, K.J. and Schmittgen, Th.D. (2001).** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method, *Methods*. 25: 402-408.
- Maqsoomi Holaso, S. and Pourakbar, L. (2014).** Effects of salinity on growth and some physiological parameters of wheat

- seedlings. *Plant Biology of Iran*. 6(19):31-42.
- Matysik, J., Alia, B.B. and Mohanty, P. (2002).** Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*. 82: 525-532.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A. and Cambraia, J.(2003).** Photosynthesis and ctivity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. 49: 69-76.
- Motamedi, M. and Farhoudi, R. (2010).** Effect of Salt Stress on Antioxidant Activity and Seedling Growth of Safflower Cultivars. *International Journal of Applied Agricultural Research*. 5(3): 367-375.
- M. Abd Elhamid, E., Sh. Sadak, M. and M. Tawfik, M. (2014).** Alleviation of Adverse Effects of Salt Stress in Wheat Cultivars by Foliar Treatment with Antioxidant 2—Changes in Some Biochemical Aspects, Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes and Amino Acid Contents. *Agricultural Sciences*. 5: 1269-1280.
- O. Duke, S., C. Vaughn, K., M. Croom, E. and N. Elsohly, H. (2008).** Artemisinin, a Constituent of Annual Wormwood (*Artemisia annua*), is a Selective Phytotoxin. *Weed Science*. 35(4):499-505.
- Olofsson, L., Engstrom, A., Lundgren, A. and Brodelius, P.E. (2011).** Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua L.* *BMC Plant Biology*. 11: 1-12.
- Omidi, M., Khandan-Mirkohi, A.Gh., Kafi, M. and Zamani, Z.A. (2021).** Investigation of The effect of salinity stress on some morphological and physiological indices of *Rosa damascena* Kashan genotype. *Iranian Horticultural Sciences*. 51(1): 17-1.
- Prasad, A., Kumar, D., Anwar, M., Singh, D.V. and Jain, D.C. (1996).** Response of *Artemisia annua L.* to Soil Salinity. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*.
https://doi.org/10.1300/J044v05n02_07 .
- Qian, Zh., Gong, K., Zhang, L., Lv, J., Jing, F., Wang ,Y., Guan, Sh., Wang, G. and Tang, K. (2007).** A simple and efficient procedure to enhance artemisinin content in *Artemisia annua L.* by seeding to salinity stress. *Full Length Research Paper*. 6: 1410-1413.
- R. Patel, P., S. Kajal, S., R. Patel, V.J., Patel, V. and M. Khristi, S. (2010).** Impact of salt stress on nutrient uptake and growth of cowpea. *Brazilian Society of Plant Physiology*. 22(1): 43-48.
- Ranjan, R., Bohra, S.P. and Jeet, A.M. (2001).** Book of plant senescence. Jodhpur Agrobios New York. 18-42.
- Razavizadeh, R. and Ehsanpour, A.A. (2009).** Effects of salt stress on proline content, expression of delta -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, and activities of catalase and ascorbate peroxidase in transgenic tobacco plants. *Biological Plantarum*. 46(2): 63-75.
- Razavizadeh, R. and Mohagheghian, N. (2015).** Investigation of changes in antioxidant enzyme activity and secondary metabolites of thyme seedlings (*Thymus vulgaris*) under salinity stress under in vitro culture conditions. *Plant Biology of Iran*. 8 (26): 58-41.
- Ronald, S.F. and Laima, S.K. (1999).** Phenolics and cold tolerance of Brassica napus. *Plant Agriculture*. 1: 1-5.
- Saeedipoor, S. (2017).** Effect of salinity stress on yield, concentration and distribution of some elements in different organs of two cultivars Barbej (*Oriza sativa L.*). *Journal of Crop Physiology - Islamic Azad University, Ahvaz Branch*. 9 (36): 40-27.
- Samia, M., Tahani, A., Hathout, A., R.Ahsour, A. and Abd Almalik, A. (2009).** Brassinolide and Salinity Acid Induced Antioxidant Enzymes, Hormonal Balance and Protein Profile of Maize Plants Grown under Salt Stress. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 5(4): 391-402.
- Savarus, A., Ja Oua, S., Hua, X.J., Ardiles, W., Van.Montago, M. and Verbruggen, N. (1995).** Isolation, Characterization, and Chromosomal Location of Gene Encoding the 1-pyrroline-5-carboxylate Synthetase in

- Arabidopsis Thaliana. Federation of European Biochemical Societies. 372: 13-19.
- S. Attia, O., S. Osman, M., S. Mohamed, A., A. Mahgoub, H., O. Garada, M., S. Abdelmouty, E. and Abdel Latef, A.A.H. (2021).** Impact of Foliar Application of Chitosan Dissolved in Different Organic Acids on Isozymes, Protein Patterns and Physio-Biochemical Characteristics of Tomato Grown under Salinity Stress. *Plants*. 10(2): 1-23.
- Shahnazi, M., Azadmehr, A., Hajiaghaee, R., Mosalla, S. and Latifi, R. (2015).** Effects of Artemisia Absinthium L. Extract on the Maturation and Function of Dendritic Cells. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 10: 1-6.
- Sharma, T., Dreyer, I., Riedelsberger, J. (2013).** The role of K⁺ channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*. 4: 1-16.
- Shen, Q., Chen, Y.F., Wang, T., Wu, S.Y., Lu, X., Zhang, L., Zhang, F.Y., Jiang, W.M., Wang, G.F. and Tang, K.X. (2012).** Overexpression of the cytochrome P450 monooxygenase (*cyp71av1*) and cytochrome P450 reductase (*cpr*) genes increased artemisinin content in *Artemisia annua* (Asteraceae). *Genetics and Molecular Research*. 11 (3): 3298-3309.
- Teoh, K.H., Polichuk, D.R., Reed, D.W., Nowak, G., Covello, P.S. (2006).** *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal *CYP71AV1*, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*. 580:1411-1416.
- Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Kholdebarin, B. and Rowshan, V. (2014).** Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*. *South African Journal of Botany*. 93: 92-97.
- Wasim, A., hasan, A., Abdullah, A. and Tarannum, T. (2010).** Medicinal Importance of *Artemisia absinthium* Linn (Afsanteen) in Unani Medicine: A Review. *Hippocratic Journal of Unani Medicine*. 5: 117-125.
- Wimmer, M.A., Muhiling, K.H., Lauchli, A., Brown, P.H. and Goldbach, H.E. (2003).** The Interaction between Salinity and Boron Toxicity Effects the Subcellular Distribution of ions Proteins in Wheat Leaves. *Plant Cell and Environmental*. 26: 2567-1271.
- Yarizadeh, K., Hosseini, R. and Moghaddami, M. (2015).** Gene study *ADS*, *DBR2* and *SQS* in five species of Different artemisia. *Plant Biology of Iran*. 7 (25): 52-43.
- Younis, A., Riaz, A., Hasan, S.U., Mustaq, N. and Hameed, M. (2014).** Response of *Hedera helix* (English Ivy) to various salinity levels. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 18(1): 1-6.
- Zaidi, I. and Hanin, M. (2016).** The wheat MAP kinase phosphatase 1 alleviates salt stress and increases antioxidant activities in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*. 193: 12-21.
- Zargari, A. (2011).** *Medicinal Plants*. University of Tehran press. P. 85. (In Persian).
- Zhu, J.K. (2001).** Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. 6(2): 66-71.