

بررسی اثر جهش‌زایی سدیم آزید در ریشه‌های موین *Artemisia vulgaris* با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR

Investigation on effect of sodium azide in hairy root culture of *Artemisia vulgaris* by ISSR and RAPD markers

کاظم یاری‌زاده^{۱*}، رامین حسینی^۱، امین البرزبان ده‌شیخ^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه بین‌المللی امام‌خمينی (ره)، قزوین

Yaryzadeh K^{*1}, Hosseini R¹, Alborzian Dehsheikh A¹

1. MSc Student, Assistant Professor, MSc Student, Imam Khomeini International University, Qazvin

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: k.yarizade@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸)

چکیده

سدیم آزید (NaN_3) یک ماده جهش‌زا است که منجر به ایجاد جهش‌های نقطه‌ای در ژنوم می‌شود. جهش‌زایی القایی روشی مفید برای بهبود صفت یا صفات خاصی در گیاه به‌شمار می‌رود. گیاه *Artemisia vulgaris* که در ایران به برنجاسف معروف است، حاوی متابولیت‌های ثانویه متعددی است. ایجاد کلون‌های جهش‌یافته ریشه‌های موین حاصل از این گیاه می‌تواند راهکاری مفید برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در آن باشد. در این مطالعه، با استفاده از باکتری اگروباکتریوم رایزوجنز سویه A_4 ، ریشه‌های موین در شرایط درون شیشه‌ای القا شدند. جهش‌زایی به‌وسیله ماده سدیم آزید در پنج سطح غلظتی (۵-۱ میلی‌مولار) صورت گرفت. از محیط کشت فاقد سدیم آزید به عنوان شاهد استفاده شد. به‌منظور بررسی رخداد جهش، نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آغازگرهای مربوط به نشانگرهای ISSR و RAPD روی ژل آگارز بررسی شد. نتایج به‌وسیله نرم‌افزار NTYSIS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که چهار سطح غلظتی از پنج سطح غلظتی اعمال شده منجر به جهش‌زایی شدند. سطح غلظتی یک میلی‌مولار، جهش‌زایی در نمونه‌های بررسی شده نشان نداد. کمترین ضریب شباهت نسبت به شاهد، ۲۱ درصد به کمک نشانگر RAPD و ۳۳ درصد به کمک نشانگر ISSR در تیمار غلظتی دو میلی‌مولار سدیم آزید بود.

واژه‌های کلیدی

جهش
ریشه موین
سدیم آزید
ISSR
RAPD

مقدمه

گیاه *Artemisia vulgaris* که در ایران به برنجاسف معروف است، متعلق به خانواده *Asteraceae* و یک گیاه چند ساله است که یک تا دو متر رشد می‌کند. برنجاسف حاوی روغن‌های فرار، ترکیبات سزکویی‌ترین لاکتونی و فلاونوئیدها است که به آن خاصیت حشره کشی، ضد میکروبی و ضد انگلی داده‌اند. در طب سنتی این گیاه به‌طور وسیع برای درمان دیابت، افسردگی، صرع، بی‌خوابی و اضطراب به کار می‌رود. کلیه بخش‌های گیاه از خواص گرم کشی، ضد عفونی‌کنندگی، ضد تشنج، ضد نفخ، مسهل صفرا، خلط آور، آرام‌بخش و مسهل برخوردار است (Kumar and Kumari 2009; Sujartha et al. 2013).

ریشه‌های مویین تراویخت به واسطه فعالیت باکتری *Agrobacterium rhizogenes* در نواحی آسیب دیده گیاه ایجاد می‌شود. ایجاد ریشه‌های مویین در اثر انتقال بخشی از پلاسمید *Ri* آگروباکتریوم رایزوجنز حاوی ژن‌های *rolB*، *rolA* و *rolC* به سلول‌های گیاه و ورود این ژن‌ها به ژنوم سلول‌های واقع در ناحیه آسیب دیده همراه است (Karmarkar and Keshavachandran 2001; Kuzma et al. 2006; Fu et al. 2006).

ریشه‌های مویین رشد سریعی دارند و در مدت زمان محدود زیست‌توده زیادی ایجاد می‌کنند. از جمله کاربردهای ریشه‌های مویین می‌توان به تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش، زیست‌پالایی مواد مضر از طبیعت، زیست تبدیل ترکیبات مهم و انتقال ژن اشاره کرد (Guillon et al. 2006). استفاده از ریشه‌های مویین در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه یکی از مهم‌ترین کاربردهای آن‌ها است، زیرا علاوه بر خصوصیات گفته شده در بالا، توان تولید متابولیت‌های ثانویه توسط ریشه‌های مویین برابر یا بیشتر از گیاه مادری است. در بسیاری از گیاهان از جمله *Beta vulgaris* (Pavlov et al. 2005)، *Salvia miltiorrhiza* (Yan et al. 2005) و *Gentiana macrophylla* (Tiwari et al. 2007)، از کشت ریشه‌های مویین برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است. تاکنون علت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در بافت تراویخت ریشه مویین مشخص نشده است (Jain et al. 2008).

تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین تحت تاثیر عوامل مختلف قابل افزایش است. سویه آگروباکتریوم رایزوجنز (*Agrobacterium rhizogenes*، مرحله رشد ریشه مویین Bhadra and Shanks 1997; Kim et al. 2001) اجزای محیط کشت (Fukui et al. 1998; Davies et al. 2011) تنظیم کننده‌های رشد گیاهی خارجی (Kim et al. 2001)، گازهای ماند دی اکسید کربن، اکسیژن و اتیلن (Williams and Doran 2000) و نور (Liu et al. 2002)، از جمله عوامل موثر بر تولید متابولیت‌های ثانویه هستند.

جهش‌زایی در گیاهان به روش‌های گوناگون و با اهداف متفاوت انجام می‌شود. ایجاد ارقام جدید با ویژگی‌های مفید، افزایش قدرت یک صفت مفید، از بین بردن صفات نامناسب و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی از جمله کاربردهای ایجاد جهش است (Mahandjiev et al. 2001; Adamu and Aliyu 2007; Khan et al. 2009). مطالعه عملکرد ژن‌ها نیز استفاده می‌شود. ایجاد جهش معمولاً به روش‌های شیمیایی و فیزیکی صورت می‌گیرد. سدیم آزید (NaN_3) یک جهش‌زای شیمیایی قوی در گیاهان زراعی محسوب می‌شود (Dhanayanth and Reddy 2000; Ahloowalia and Maluszynski 2001; Bhat et al. 2005).

جهش‌زایی شیمیایی یک شیوه ساده برای ایجاد جهش در گیاهان در جهت بهبود صفات زراعی آن‌ها محسوب می‌شود. جهش‌ها ابزارهایی برای مطالعه ساختار و عملکرد ژن‌ها محسوب می‌شوند. مهمترین مزیت جهش‌زایی بهبود کیفیت یک یا دو خصوصیت بدون تغییر در بقیه ژنوم است. جهش‌القایی برای بهبود غلات اصلی از جمله گندم، جو، برنج، کتان، نخود و لوبیا استفاده شده است. جهش‌زاهای متنوعی به منظور ایجاد جهش‌های مطلوب مورد استفاده قرار می‌گیرند که به دو گروه کلی پرتوهای یونیزه کننده و مواد شیمیایی تقسیم می‌شوند (Ahloowalia and Maluszynski 2001). جهش‌زاهای شیمیایی معمولاً منجر به ایجاد جهش جایگزینی باز می‌شود که به تغییر در عملکرد پروتئین می‌انجامد. این جهش‌زاهای شیمیایی طیف وسیعی از تغییرات ریخت‌شناسی و صفات زراعی را نسبت به گیاهان معمولی سبب می‌شود. پژوهشگران زیادی کارایی جهش‌زاهای

برنجاسف منتشر شده است (Sujatha et al. 2013). این مطالعه اولین گزارش از جهش‌زایی در ریشه‌های مویین برنجاسف است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه *A. vulgaris* از باغ گیاه‌شناسی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع خریداری شد. آگروباکتریوم رایزوجنز سویه A₄ از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فن‌آوری زیستی و سدیم آزید از شرکت Merck آلمان تهیه شد.

ضد عفونی و کشت بذرها

برای ضد‌عفونی، بذرها به مدت سه ثانیه در الکل ۹۶ درصد غوطه‌ور و سپس با استفاده از آب مقطر استریل به مدت ۵ دقیقه شست و شو شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد حاوی یک قطره توین ۸۰ غوطه‌ور و متعاقباً سه مرتبه با آب مقطر استریل هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه شست و شو شدند. بذرها ضد‌عفونی شده به تعداد سه عدد بذر در هر شیشه کشت و در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Sujatha et al. 2013).

القای ریشه مویین

برگ‌های گیاهان یک ماهه برای القای ریشه‌های مویین استفاده شدند. جهت القای ریشه‌های مویین ابتدا برگ‌ها با اندازه تقریباً یکسان از یک گیاه واحد جدا و در لبه‌ها و سطح برگ با استفاده از تیغ، زخم ایجاد شد. نمونه‌های برگ پس از ایجاد زخم، به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری *A. rhizogenes* سویه A₄ (OD=۰/۴) غوطه‌ور شدند. نمونه‌های برگ پس از آلوده‌سازی به محیط MS جامد منتقل و به مدت دو روز در تاریکی و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای حذف باکتری‌ها، نمونه‌ها به محیط MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم/لیتر سفوتاکسیم منتقل و در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. عمل انتقال به محیط MS تازه حاوی سفوتاکسیم به صورت هر دو روز یک بار انجام شد. پس از سه زیرکشت متوالی در محیط آنتی‌بیوتیک‌دار، انتقال نمونه‌های برگ به محیط فاقد آنتی‌بیوتیک انجام و هر هفته یک بار به محیط تازه منتقل شدند. پس از اینکه ریشه‌های مویین ایجاد و به اندازه

متفاوت روی غلات متفاوتی را مورد بررسی قرار داده‌اند و نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که تاثیر جهش‌زاهای متناسب با گونه یا رقم است. در حالی که بسیاری از پژوهشگران جهش‌زاهای شیمیایی را موثرتر از جهش‌زاهای فیزیکی می‌دانند (Dhanayanth and Reddy 2000; Bhat et al. 2005). بسیاری دیگر اثر جهش‌زاهای فیزیکی را بیش از جهش‌زاهای شیمیایی اعلام کرده‌اند (Zeerak 1991). سدیم آزید یک ماده شیمیایی جهش‌زا است که اثر جهش‌زایی آن در چندین گونه گیاهی و جانوری گزارش شده است (Rines 1985; Raicu and Mixich 1992; Grant and Slamone 1994). سدیم آزید در همه موجودات منجر به جهش نمی‌شود برای مثال در مگس سرکه این ماده جهش‌زا نیست (Kamra and Gallopedi 1979). خاصیت جهش‌زایی سدیم آزید به دلیل تولید یک متابولیت آلی آزیدی است که این متابولیت به هسته وارد شده و با DNA برهمکنش می‌دهد و باعث ایجاد جهش نقطه‌ای در ژنوم می‌شود (Klienhs et al. 1978; Gichner and Veleminski 1997). سدیم آزید علاوه بر خاصیت جهش‌زایی منجر به پلی‌پلوئیدی نیز می‌شود، اثرات جهش‌زایی سدیم آزید روی ریخت‌شناسی گیاه، کلروفیل، عقیمی و میزان تولید محصول به اثبات رسیده است (Ahoowalia 1976; Castro et al. 2003). Bhagwat et al. (1997) از نشانگر RAPD به منظور بررسی القای جهش با اشعه ایکس در بادام زمینی استفاده کردند. آنها در این مطالعه ۶۵ جایگاه چندشکلی مشاهده کردند. Clara et al. (2007) تعداد ۱۰ لاین جهش یافته بادام زمینی را با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR را مورد بررسی قرار دادند آنها با استفاده از داده‌های بدست آمده از این نشانگرها مشخص کردند که جهش یافته‌های RT-7، RT-10 و RT-12 ارتباط نزدیکی باهم دارند. Bibi et al. (2010) از نشانگر مولکولی RAPD برای بررسی اثر جهش‌زایی اشعه گاما در جمعیت نیشکر استفاده کردند. در این مطالعه ۷۳ جایگاه به وسیله ۱۳ آغازگر تکثیر شد که حدود ۷۵ درصد از این جایگاه‌ها چند شکلی نشان دادند. هدف از این مطالعه، القای ریشه‌های مویین در برنجاسف با استفاده از سویه A₄، جهش‌زایی با استفاده از سدیم آزید و بررسی مولکولی آن با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD بود. تاکنون تنها یک گزارش از القای ریشه مویین در

اعمال تیمار سدیم آزید مطابق روش Al-Quariny and Khan (2010)، انجام شد. ابتدا سدیم آزید با غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌مولار تهیه شد. سپس به ارلن‌مایره‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط MS ¼ مایع اضافه شد. در هر ارلن مقدار ۰/۲ گرم بافت ریشه موین کشت داده شد. از ارلن‌مایر حاوی محیط کشت فاقد سدیم آزید نیز به عنوان شاهد استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها با محیط کشت MS ¼ مایع شست و شو شدند و سپس به محیط MS ½ مایع منتقل و روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

نمونه‌برداری پس از ۲۱ روز از اعمال تیمار سدیم آزید انجام شد. استخراج DNA به روش CTAB انجام شد (Heidari et al. 2011). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از هفت آغازگر نشانگر مولکولی ISSR و شش آغازگر نشانگر RAPD (جدول ۱)، به این ترتیب انجام شد: مرحله واسرشت کننده در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال RAPD 35 / درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه. همچنین مرحله واسرشت کننده اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

بررسی محصولات PCR

محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (حجمی/وزنی) مورد بررسی قرار گرفتند. عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل مدل VL500 (شرکت UVP، امریکا) انجام شد. بررسی نتایج با استفاده از نرم‌افزار NTSYS صورت گرفت.

نتایج و بحث

نخستین ریشه‌های موین حدود ۱۲ روز پس از اعمال آلودگی با اگروباکتریوم رایزوجنز سویه A₄ ایجاد شدند (شکل ۱). ریشه‌های موین در محیط MS ½ مایع به خوبی رشد کردند. بررسی محصولات PCR مربوط به آغازگر *rol b* روی ژل آگارز، تراریخت بودن بافت‌های ریشه موین را تایید کرد (شکل ۲).

حدود یک سانتی‌متر رشد کردند، هرکدام به عنوان یک کلونی مجزا به طور جداگانه به محیط MS ½ مایع منتقل و در دستگاه شیکر یخچال‌دار (شرکت سه‌سند آذر، ایران) با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی تراریختی ریشه‌های موین

استخراج DNA از بافت ریشه موین با استفاده از روش C-TAB انجام شد (Heidari et al. 2011). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگر ژن *rol b* (F: 5'-AGGCGGCTGTTAGTGGACGC-3', R: 5'-GTCTCCCCTGGCCCGAGTGT-3') که با استفاده از توالی بدست آمده از نمایه NCBI و نرم‌افزار vector NTI طراحی شدند، جهت تایید تراریختی ریشه‌ها انجام گرفت. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (TECHNE) در ۳۵ چرخه به صورت زیر انجام شد: مرحله واسرشت کننده در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۸ سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه. همچنین مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR (۶۰۰ bp) روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (w/v) بررسی شدند.

انتخاب بهترین کلونی و رسم منحنی رشد

انتخاب بهترین کلونی بر اساس میزان رشد صورت گرفت. مقدار ۰/۲ گرم از بافت ریشه موین هر کدام از کلونی‌ها به طور جداگانه در ارلن‌مایره‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط MS ½ مایع کشت شد. نمونه‌برداری و اندازه‌گیری وزن تر و خشک ۲۰ روز پس از کشت صورت گرفت. برای رسم منحنی رشد کلونی انتخاب شده، ۰/۲ گرم از بافت ریشه موین کلونی A₂ در ارلن‌مایره‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری کشت شد. نمونه برداری هر سه روز یک بار طی یک دوره ۳۰ روزه انجام شد. تجزیه آماری در سه تکرار در قالب بلوک کامل تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

اعمال تیمار سدیم آزید

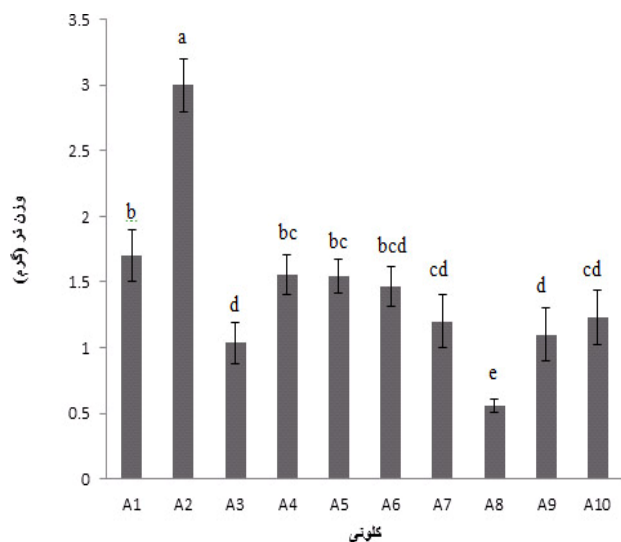
جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده مربوط به نشانگرهای ISSR و RAPD

آغازگرهای ISSR			آغازگرهای RAPD		
نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)	نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)
17898A	(CA) ₇ -AC	44	C08	TGGACCGGTG	35
17898B	(CA) ₇ -GT	44	E07	AGATGCAGCC	35
17899A	(CA) ₇ -AG	44	J20	AAGCGGCCTC	35
17899B	(CA) ₇ -GG	44	A16	AGCCAGCGAA	35
HB-9	(GT) ₆ -GG	44	U19	GTCAGTGGCGG	35
HB-10	(GA) ₆ -CC	44	P14	CCAGCCGAAC	35
HB-11	(GT) ₆ -CC	44			

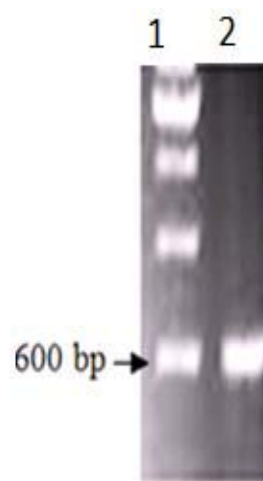
تعداد ۳۰ کلونی اولیه ایجاد شد که اکثر کلونی‌ها رشد مناسبی نداشتند و در همان ابتدا حذف شدند. ۱۰ کلونی با رشد مناسب تکثیر شد که از بین این کلونی‌ها، کلونی A₂ بیشترین میزان رشد را نشان داد (شکل ۳). بنابراین، این کلونی انتخاب و در ادامه آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. برای پی‌بردن به زمان مناسب برای نمونه‌برداری تیمارهای سدیم آزید، منحنی رشد رسم شد (شکل ۴). منحنی رشد نشان داد که روز بیست و یکم پس از کشت، پایان مرحله نمایی رشد است و بنابراین، این زمان به عنوان زمان نمونه برداری در نظر گرفته شد.



شکل ۱- القای ریشه مویین از برگ برنجاسف. ریشه‌های مویین از محل زخم برگ ایجاد شدند.



شکل ۳- انتخاب کلونی برتر. مقایسه میانگین وزن تر ۱۰ کلونی رشد یافته نشان داد که کلونی A₂ بیشترین میزان رشد را دارد.



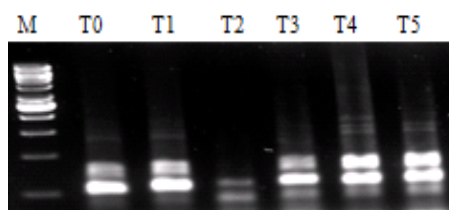
شکل ۲- تایید تراریختی ریشه‌های مویین. الکتروفورز محصولات PCR ژن *rolB* تراریخت بودن ریشه‌های مویین را تأیید کرد. چاهک (۱) نشانگر وزن مولکولی و چاهک (۲) ژن *rolB*.

کشت ریشه‌های موین از اهمیت زیادی در تولید متابولیت‌های ثانویه و به‌ویژه متابولیت‌های ثانویه‌ای که در گیاه به مقدار پایین تولید می‌شوند برخوردار است. امروزه یکی از روش‌های کارا در تولید متابولیت‌های ثانویه مهم و مواد دارویی گیاهی در مقیاس وسیع کشت ریشه‌های موین در بیوراکتورها است (Kim et al. 2001). اهمیت ریشه‌های موین در تولید متابولیت‌های ثانویه سبب شده که فعالیت‌های زیادی در زمینه کشت و بررسی ریشه‌های موین انجام شود (Bolivar et al. 2007; Chaudhary et al. 2008). گونه‌های مختلف جنس درمنه از گیاهان دارویی مهم در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه ترکیب ضد مالاریای آرتمیزینین به‌شمار می‌روند (Abdul-Manan et al. 2010). مطالعات متعددی در زمینه کشت ریشه‌های موین در گونه‌های مختلف این جنس صورت گرفته است (Aryanti et al. 2001). در *A. vulgaris* تا کنون یک گزارش از القای ریشه موین منتشر شده است. (Sujatha et al. 2013). در مطالعه خود، اثر سویه‌های مختلف اگروباکتريوم، نوع ریزنمونه، قند و محیط کشت را بر القای ریشه موین در *A. vulgaris* مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در این مطالعه سویه A_4 ، ریزنمونه برگ، محیط $1/2MS$ و میزان 40 گرم/لیتر ساکارز را به عنوان بهترین شرایط برای القای ریشه موین معرفی کردند (Sujatha et al. 2013). در مطالعه حاضر القای ریشه‌های موین در این گیاه با استفاده از سویه A_4 اگروباکتريوم رایزوجنز و از ریزنمونه برگ صورت گرفت. میزان تراریختی بدست آمده در این مطالعه با نتایج Sujatha et al. (2013) مطابقت داشت. از آنجا که یکی از خصوصیات مهم ریشه‌های موین ثبات ژنتیکی بالا است، جهش ایجاد شده می‌تواند برای مدت طولانی در ژنوم گیاه حفظ شود. بنابراین، جهش القایی می‌تواند منجر به ایجاد کلونی‌هایی با توان بالای تولید متابولیت‌های ثانویه شود. (Al-Qurainy and Khan 2010) تاثیر سدیم آزید را بر افزایش تولید آرتمیزینین در بافت کالوس *A. annua* مورد مطالعه قرار دادند. طبق نتایج به‌دست آمده همه غلظت‌های سدیم آزید منجر به افزایش آرتمیزینین شد که غلظت سه میلی‌مولار بیشترین تاثیر را بر افزایش تولید آرتمیزینین داشت.

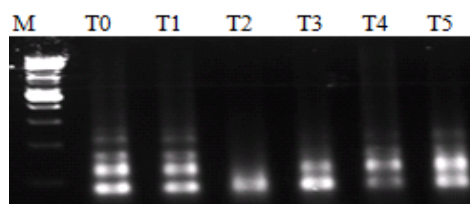


شکل ۴- منحنی رشد کلونی A_2 . رسم منحنی رشد کلونی A_2 نشان داد که بیشترین میزان رشد در روز ۲۱ ایجاد می‌شود.

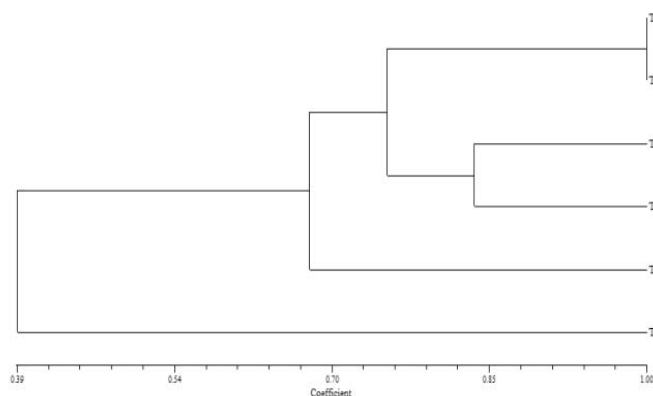
تصویر ژل آگارز مربوط به محصولات PCR نشانگرهای ISSR و RAPD به ترتیب تعداد ۳۴ و ۲۳ جایگاه تکثیرشده را نشان داد که تعداد چندشکلی برای این نشانگرها به ترتیب ۲۱ و ۱۴ جایگاه بود (شکل‌های ۵ و ۶). نتایج مربوط به PCR نمونه‌های تحت تیمار سدیم آزید و شاهد که روی ژل آگارز $1/2$ درصد (وزنی/حجمی) بارگذاری شده بودند، با استفاده از نرم افزار NTSYS مورد بررسی قرار گرفتند. طبق نتایج به‌دست آمده مربوط به نشانگر ISSR، تیمار غلظتی دو میلی‌مولار جهش نشان نداد. تصویر ژل تشابه آل‌های ایجاد شده از تیمار غلظتی دو میلی‌مولار و نمونه شاهد را نشان داد. همچنین نمودار درختی حاصل از بررسی نتایج با نرم‌افزار NTSYS نشان دهنده ضریب شباهت صد درصد بین نمونه تحت تیمار غلظتی یک میلی‌مولار و نمونه شاهد بود. کمترین ضریب شباهت نسبت به شاهد (33 درصد) مربوط به تیمار غلظتی دو میلی‌مولار بود. طبق نمودار درختی تیمارها به دو دسته کلی تقسیم شدند که تیمار T_2 به‌عنوان یک دسته مجزا از سایر تیمارها قرار گرفت (شکل ۷). بررسی جهش‌زایی با نشانگر RAPD نیز عدم ایجاد جهش در نمونه‌های تحت تیمار غلظتی یک میلی‌مولار را تایید کرد. همچنین تیمار غلظتی T_2 کمترین ضریب شباهت (21 درصد) را نسبت به شاهد از خود نشان داد. به‌طور کلی تیمارها از نظر میزان جهش‌زایی در دو دسته کلی قرار گرفتند. به‌طوری‌که، تیمارهای T_1 و T_3 به همراه شاهد در یک گروه و تیمارهای T_2 ، T_4 و T_5 در گروه دیگر قرار گرفتند (شکل ۸).



شکل ۵- نتایج الکتروفورز محصولات PCR مربوط به آغازگر J20 نشانگر M.RAPD، نشانگر اندازه مولکولی، T0، شاهد، T1-5، نمونه‌های تحت تیمارهای غلظتی یک تا ۵ میلی‌مولار سدیم آزید.



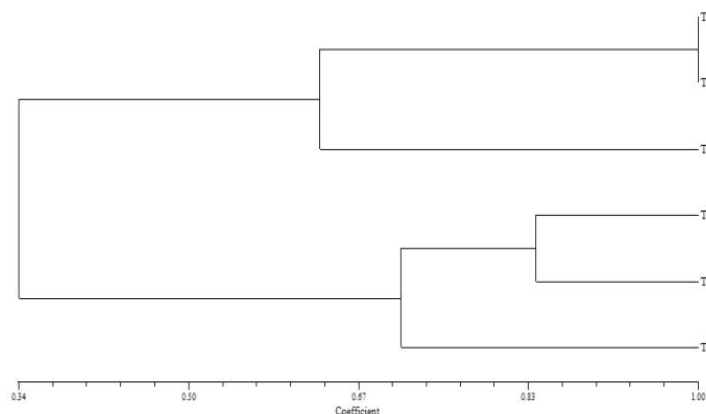
تصویر ۶- نتایج الکتروفورز محصولات PCR مربوط به آغازگر HB10 نشانگر M.ISSR، نشانگر اندازه مولکولی، T0، شاهد، T1-5، نمونه‌های تحت تیمارهای غلظتی یک تا ۵ میلی‌مولار سدیم آزید.



شکل ۷- نمودار درختی مربوط به نشانگر ISSR. طبق نمودار درختی تیمارها به دو دسته کلی تقسیم شدند که تیمار T2 به‌عنوان یک دسته مجزا از سایر تیمارها قرار گرفت.

معمول برای تشخیص جهش نقطه‌ای روش TILLING است. این روش برای تشخیص جهش نقطه‌ای در ذرت استفاده شده است (Bradley et al. 2004). در مطالعه حاضر از نشانگرهای RAPD و ISSR استفاده شد. در این مطالعه همه غلظت‌های مختلف سدیم آزید مورد استفاده، غیر از غلظت دو میلی‌مولار، جهش ایجاد کردند. در تصاویر مربوط به ژل آغازز که محصولات PCR مربوط به آغازگرهای نشانگر RAPD و هم نشانگر ISSR تنوع آلی زیادی مشاهده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS نشان داد که کمترین میزان ضریب شباهت

سدیم آزید یک ماده شیمیایی است که منجر به القای جهش‌های نقطه‌ای می‌شود. روش‌های مختلفی برای تشخیص جهش ناشی از سدیم آزید استفاده می‌شود که روش‌های تشخیصی بر پایه PCR دقیق‌تر و قابل اطمینان‌تر است. AFLP، آزمون PTT، دورگه‌سازی سادرن، گسستگی آنزیمی و شیمیایی هترو دوپلکس، تغییر شیمیایی هترو دوپلکس، تغییر خواص الکتروفورتیکی هترو دوپلکس و تعیین توالی نوکلئوتیدی از جمله روش‌های مورد استفاده برای تشخیص جهش ایجاد شده بر اثر سدیم آزید مورد استفاده قرار می‌گیرند (Khan et al. 2009). از دیگر روش‌های



شکل ۸- نمودار درختی مربوط به نشانگر RAPD. تیمارها در دو دسته کلی قرار گرفتند. به طوری که، تیمارهای T₀، T₁ و T₃ در یک گروه و تیمارهای T₂، T₄ و T₅ نیز در یک گروه مجزا قرار گرفتند.

نشانگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۲۳ و ۳۴ جایگاه بود که به ترتیب ۱۴ و ۲۱ جایگاه چندشکل مشاهده شد.

منابع

- Abdul Mannan IA, Waheed A, Muhammad FA, Rizwana AQ, Izhar H, Bushra M (2010) Survey of artemisinin production by diverse *Artemisia* species in northern Pakistan. *Malaria Journal* 9: 3-10.
- Adamu AK, Aliyu H (2007) Morphological effects of sodium azide on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Science World Journal* 2: 9-12.
- Ahloowalia BS, Maluszynski M (2001) Induced Mutation, A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 2: 167-173.
- Ahoowalia BS (1967) Colchicine induced in polyploids in ryegrass *Lolium perenne* L. *Euphytica* 16: 49-60.
- Al-Qurainy F, Khan S (2010) Mutational approach for enhancement of artemisinin in *Artemisia annua*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4: 1714-1726.
- Aryanti B, Bintang M, Ermayanti TM, Mariska I (2001) Production of antileukemic agent in untransformed and transformed root cultures of *Artemisia cina*. *Annals Bogorienses* 8:11-16.
- Bhat TA, Khan AH, Parveen S (2005). Comparative analysis of meiotic abnormalities induced by gamma rays, EMS and MMS in *Vicia faba* L. *Journal of Indian Botanical Society* 84: 45-58.
- Bhadra R, Shanks J V (1997) Transient studies of nutrient uptake, growth, indole alkaloid accumulation in heterotrophic cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Bioengineering* 55: 527-534.

نسبت به شاهد مربوط به نمونه‌های تحت تیمار غلظتی دو میلی-مولار بود. از آنجا که ضریب شباهت کمتر نشان‌دهنده تفاوت بیشتر ناشی از تاثیر سدیم آزید نسبت به شاهد است، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که غلظت دو میلی‌مولار نسبت به سایر غلظت‌ها بیشترین تاثیر را بر ایجاد جهش داشته است. Divanli et al. (2006) تاثیر پنج سطح غلظتی سدیم آزید (۵-۱ میلی‌مولار) را بر چهار رقم مختلف نخود فرنگی مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه آن‌ها به این نتیجه رسیدند که غلظت یک میلی‌مولار سدیم آزید بهترین غلظت برای القای جهش بود و کمترین اثر کشندگی را داشت. جهش در ریشه‌های موین می‌تواند به علت ثبات ژنتیکی این بافت‌های تراریخت حفظ شود و منجر به ایجاد کلونی‌های با توان تولید متابولیت‌های ثانویه بیشتر شود. تایید این موضوع نیاز به بررسی میزان تولید متابولیت‌های ثانویه نسبت به کلونی معمولی با استفاده از ابزارهای تجزیه‌ای مثل کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) دارد.

نتیجه‌گیری

سدیم آزید در ریشه‌های موین برنجاسف منجر به ایجاد جهش شد که از پنج سطح غلظتی مورد استفاده غلظت دو میلی‌مولار بیشترین اثر جهش‌زایی را از خود نشان داد و غلظت یک میلی-مولار جهش ایجاد نکرد. تعداد آل‌های ایجاد شده مربوط به

- Bhagwat A, Krishna TG, Bhatia CR (1997) RAPD analysis of induced mutants groundnut. *Journal of Genetics* 67:201-208.
- Bibi S, Khan IA, Khatri A, Yasmin Sh, Seema N, Afghan S, Arian M (2010) Screening of mutated population of sugarcane through RAPD. *Pakistan Journal Botany* 46:3765-3773.
- Bolivar FM, Condori J, Agnes M, Rimando C, Hubstenberger J, Shelton K, Sean F, Bennett S, Maureen CD (2007) Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of *peanut*. *Phytochemistry* 68: 1992-2003.
- Bradley JT, Steven HR, Clifford W, Nathan S, Burtner C, Young K, Bowers E, Christine AC, Henikoff S (2004) Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *Biological Medical Central Plant Biology* 4: 147-155.
- Castro CM, Oliveira AC, Calvaho FF (2003) Changes in allele frequencies in colchicine treated Ryegrass population assessed with APD marker. *Agrociencia* 9: 107-112.
- Chaudhary V, Kapoor R, Bhatnagar AK (2008) Effectiveness of two *Arbuscular mycorrhizal* fungi on concentrations of essential oil and artemisinin in three accessions of *Artemisia annua* L. *Applied Soil Ecology* 40: 174-181.
- Clara R A, Azer SA, Khaleifa AMM, Abdol-ela FA (2007) Characterization of peanut mutants and molecular markers associated with resistance to pod rot diseases and aflatoxin contamination by RAPD and ISSR. *Arab Journal of Biotechnology* 10: 301-320.
- Divanli AT, Khawari KM, Ciftci CY, Ozcan S (2006) Effects of mutagenic sodium azide (NaN₃) on *in Vitro* development of four pea (*Pisum sativum* L.) Cultivars. *International Journal of Agriculture and Biology* 3: 349-351.
- Dhanayanth, KPM, Reddy V (2000). Cytogenetic effect of gamma rays and ethyle methane sulphonate in chilli piper (*Capsicum annum*). *Cytologia* 65:129-133
- Davies MJ, Atkinson CJ, Burns C, Arroo R, Woolley J (2011) Increases in leaf artemisinin concentration in *Artemisia annua* in response to the application of phosphorus and boron. *Industrial Crops and Products* 34: 1465-1473.
- Fukui H, Hasan A, Ueoka FM, Kyo FTM (1998) Formation and secretion of a new brown benzoquinone by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* 47: 1037-1039.
- Fu CX, Xu YJ, Zhao DX, Ma FS (2006). A comparison between hairy root cultures and wild plants of *Saussurea involucrata* in phenylpropanoids production. *Plant Cell Reports* 24: 750-754.
- Gichner T, Veleminsky J (1977) The very low mutagenic activity of sodium azide in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 19: 153-155.
- Guillon S, Jocelyne G, Kumar P, Rideau M, Gantet P (2006) Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 9:341-346.
- Grant WF, Salamone MF (1994) Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the international program on chemical safety collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research* 310:187-209.
- Heidari R, Haddad R, Garoosi G (2011) Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Molecular Biotechnology* 49:129-137.
- Jain N, Light ME, Van SJ (2008). Antibacterial activity of hairy-root cultures of *Maytenus senegalensis*. *South African Journal of Botany* 74: 163-166.
- Kumar SP, Kumari BDR (2009) *in vitro* and *in vivo* identification of variation in protein expression in *Artemisia vulgaris*. *Advances in Biological Research* 3: 237-241.
- Karmarkar SH, Keshavachandran R (2001) Genetic transformation and hairy root induction in *Holostemma adakodien*. vulnerable medicinal plant. *Indian Journal Experiment Biology* 39: 1263-1267.
- Kuzma L, Skrzypek Z, Wysokinska H (2006) Diterpenoids and triterpenoids in hairy roots of *Salvia sclarea*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 84:171-9.
- Kim Y, Wyslouzil BE, Pamela J W (2001) Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 38: 1-10.
- Khan S, Al-Qurainy F, Firoz A (2009) Sodium Azide: a Chemical Mutagen for Enhancement of Agronomic Traits of Crop Plants. *Environment International Journal Science Technology* 4: 1-21.
- Kamra OP, Gallopudi B (1979) Mutagenic effects of sodium azide in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 25: 381-384.
- Kleinhofs A, Warner RL, Muehlbauer FJ, Nilan RA (1978) Induction and selection of specific gene mutations in *Hordeum* and *Pisum*. *Mutation Research* 51: 29-35.
- Liu CZ, Guo C, Wang Y, Ouyang F (2002) Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry* 38: 581-585.
- Mahandjiev A, Kosturkova G, Mihov M (2001). Enrichment of *Pisum sativum* gene resources through combined use of physical and chemical mutagens. *Israel Journal of Plant Sciences* 49: 279-284.
- Pavlov A, Georgiev V, Ilieva M (2005) Betalain biosynthesis by red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy root culture. *Process Biochemistry* 40:1531-1533.
- Rines HW (1985) Sodium azide mutagenesis in diploid and hexaploid oats and comparison with ethyl methane sulfonate treatments. *Environmental and Experimental Botany* 25: 7-16.
- Raicu P, Mixich F (1992) Cytogenetic effects of sodium azide encapsulated in liposomes on heteroploides cell cultures. *Mutation Research* 283: 215-219.
- Sujatha GS, dravkovic Z, Korac DC, alic G, Flaminic BD, Ranjitha K (2013) High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia*

vulgaris: Hairy root production and essential oil analysis. *Industrial Crops and Products* 44: 643- 652.

Tiwari RK, Trivedi M, Guang ZC, Guo GQ, Zheng GC (2007) Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoidglucosidegentiopicoside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Report* 26:199-210.

Williams GRC, Doran PM (2000) Hairy root culture in a liquid-dispersed bioreactor: characterization of spatial heterogeneity. *Biotechnology Progress* 16: 391-401.

Yan Q, Hu Z, Xiang TR, Wu J (2005). Efficient production and recovery of diterpenoidtanshinones in *Salvia multiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation. *Journal of Biotechnology* 119: 416-424.

Zeeraq NA (1991) Cytogenetical effect of gamma rays and ethylmethane sulphonate in brinjal (*Solanum melongena* L.). *Cytologia* 56: 639-643.