

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

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

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

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (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 روشنی 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 A₄، ریشه‌های موین در شرایط درون شیشه‌ای اanca شدند. جهش‌زایی بهوسیله ماده سدیم آزید در پنج سطح غلظتی (۱-۵ میلی‌مولار) صورت گرفت. از محیط کشت فاقد سدیم آزید به عنوان شاهد استفاده شد. بهمنظور بررسی رخداد جهش، نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آغازگرهای مربوط به نشانگرهای ISSR و RAPD روی ژل آکارز 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، ۰.۲۱ درصد به کمک نشانگر RAPD و ۰.۳۳ درصد به کمک نشانگر ISSR در تیمار غلظتی دو میلی‌مولار سدیم آزید بود.

واژه‌های کلیدی

جهش
ریشه موین
سدیم آزید
ISSR
RAPD

مقدمه

تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های موین تحت تاثیر عوامل مختلف قابل افزایش است. سویه اگروباکتریوم رایزوجنز (Bhadra *Agrobacterium rhizogenes*) مرحله رشد ریشه موین (Kim et al. 2001) and Shanks 1997; Fukui et al. 1998; Davies et al. 2011) گیاهی خارجی (Kim et al. 2001)، گازهایی مانند دی‌اکسید 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 (Mahandjiev et al. 2001; Adamu and Karmarkr and 2009) ایجاد جهش است (Aliyu 2007; Khan et al. 2009) ایجاد جهش زایی هچنین برای 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. جهش القایی برای بهبود غلات اصلی از جمله گندم، جو، برنج، کتان، نخود و لوبیا استفاده شده است. جهش‌ Zahای 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). جهش‌ Zahای شیمیایی معمولاً منجر به ایجاد جهش جایگزینی باز می‌شود که به تغییر در عملکرد پروتئین می‌انجامد. این جهش‌ Zahای شیمیایی طیف وسیعی از تغییرات ریخت‌شناسی و صفات زراعی را نسبت به گیاهان معمولی سبب می‌شود. پژوهشگران زیادی کارایی جهش‌ Zahای

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 لاكتونی و فلاونوییدها است که به آن خاصیت حشره‌کشی، ضد میکروبی و ضد انگلی داده‌اند. در طب سنتی این گیاه به طور وسیع برای درمان دیابت، افسردگی، صرع، بی‌خوابی و اضطراب به کار می‌رود. کلیه بخش‌های گیاه از خواص کرم کشی، ضد عفونی کنندگی، ضد تشنج، ضد نفخ، مسهّل صفرا، خلط آور، آرام‌بخش و مسهّل ب Roxوردار است (Kumar and Kumari 2009; Sujartha et al. 2013).

ریشه‌های موین تاریخت به واسطه فعالیت باکتری اگروباکتریوم رایزوجنز *Agrobacterium rhizogenes* در نواحی آسیب دیده گیاه ایجاد می‌شود. ایجاد ریشه‌های موین در اثر انتقال بخشی از پلاسمید *Ri* اگروباکتریوم رایزوجنز حاوی ژن‌های *rolb* و *rolc* به سلول‌های گیاه و ورود این ژن‌ها به ژنوم سلول‌های واقع در ناحیه آسیب دیده همراه است (Karmarkr and Keshavachandran 2001; Kuzma et al. 2006; Fu et al. 2006) ریشه‌های موین رشد سریعی دارند و در مدت زمان محدود زیست‌توده زیادی ایجاد می‌کنند. از جمله کاربردهای ریشه‌های موین 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 موین 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 موین برای یا بیشتر از گیاه *Beta vulgaris* است. در بسیاری از گیاهان از جمله *Salvia miltiorrhiza*, (Pavlov et al. 2005) *Gentiana macrophylla* و *Tiwari et al. 2007* ریشه‌های موین برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است. تاکنون علت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در بافت تاریخت ریشه موین مشخص نشده است (Jain et al. 2008).

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

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه *A. vulgaris* A. از باغ گیاه‌شناسی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراع خردباری شد. اگروباکتریوم رایزوجنز سویه A₄ از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی و سدیم آزید از شرکت Merck آلمان تهیه شد.

ضد عفونی و کشت بذرها

برای ضد عفونی، 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 تویین ۸۰ غوطه‌ور و متعاقباً سه مرتبه با آب مقطر استریل هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه شست و شو شدند. بذرها ضد عفونی 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 موین

برگ‌های گیاهان یک ماهه برای القای ریشه‌های موین استفاده شدند. جهت القای ریشه‌های موین 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* A₄ سویه (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 میلی گرم/لیتر سفووتاکسیم منتقل و در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. عمل انتقال به محیط MS تازه حاوی سفووتاکسیم 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 موین 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) 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 (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 Galloppodi 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 (Klienhofs et al. 1978; Gichner and Veleminski 1997) به اثبات رسیده است (Ahooowalia 1976; Castro et al. 2003). (et al. 1997) Bhagwat از نشانگر RAPD به منظور بررسی القای ریش 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 ISSR و RAPD را مورد بررسی قرار دادند آنها با استفاده از داده‌های بدست آمده از این نشانگرها مشخص کردند که جهش یافته‌های RT-7 و RT-10 و RT-12 از این نشانگر ارتباط نزدیکتری با هم 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 موین 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 موین 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 میلی‌مolar تهیه شد. سپس به ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط MS ۱/۴ مایع اضافه شد. در هر ارلن مقدار ۰/۲ گرم بافت ریشه موین کشت داده شد. از ارلن مایر 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 ۱/۴ مایع شست و شو شدند و سپس به محیط MS ۱/۲ مایع متقل و روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

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 پلیمراز با استفاده از هفت آغازگر 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 ۳۵ RAPD/ISSR 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 آکارز 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 آلدگی با اگروباکتریوم رایزوجنز سویه A₄ ایجاد شدند (شکل ۱). ریشه‌های موین در محیط MS ۱/۲ مایع به خوبی رشد کردند.

بررسی محصولات PCR مربوط به آغازگر *rol b* روی ژل آکارز، تاریخت بودن بافت‌های ریشه موین را تایید کرد (شکل ۲).

حدود یک سانتی‌متر رشد کردند، هر کدام به عنوان یک کلونی مجزا به طور جداگانه به محیط MS ۱/۲ مایع متقل و در دستگاه شیکر یخچال دار (شرکت سنهن آذر، ایران) با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی تاریختی ریشه‌های موین

استخراج DNA از بافت ریشه موین با استفاده از روش C-TAB انجام شد (Heidari et al. 2011). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز *rol b* (F: ۵'-AGGC GGCT GTTAGTGGACGC-3', R: ۵'-GTCT CCCCTGGCCCGAGTG-3') بدست آمده از نمایه NCBI و نرم‌افزار NTI vector طراحی شدند، جهت تایید تاریختی 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 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 (600 bp) روی ژل آکارز ۱/۲ درصد (w/v) بررسی شدند.

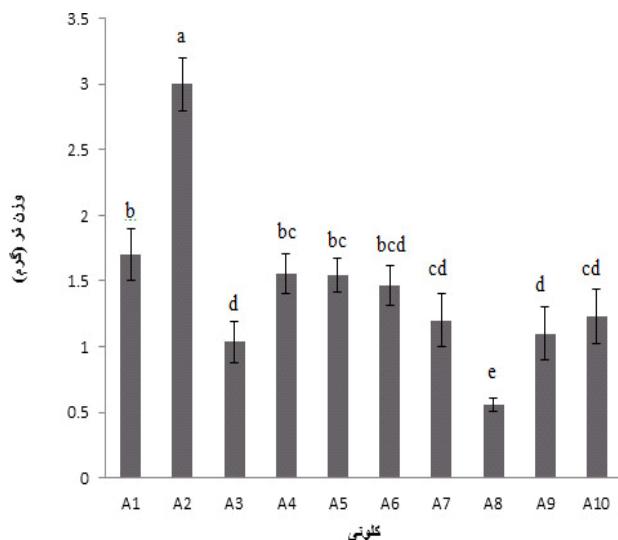
انتخاب بهترین کلونی و رسم منحنی رشد انتخاب بهترین کلونی بر اساس میزان رشد صورت گرفت. مقدار ۰/۲ گرم از بافت ریشه موین هر کدام از کلونی‌ها به طور جداگانه در ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط MS ۱/۲ مایع کشت شد. نمونه‌برداری و اندازه‌گیری وزن تر و خشک ۲۰ روز پس از کشت صورت گرفت. برای رسم منحنی رشد کلونی انتخاب شده، ۰/۲ گرم از بافت ریشه موین کلونی A₂ در ارلن مایرهای 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 RAPD و ISSR

آغازگرهای ISSR			آغازگرهای RAPD		
نام آغازگر	نام آغازگر	دماي اتصال (°C)	نام آغازگر	نام آغازگر	دماي 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	GTCAGTGCAG	35
HB-10	(GA) ₆ -CC	44	P14	CCAGCCGAAC	35
HB-11	(GT) ₆ -CC	44			

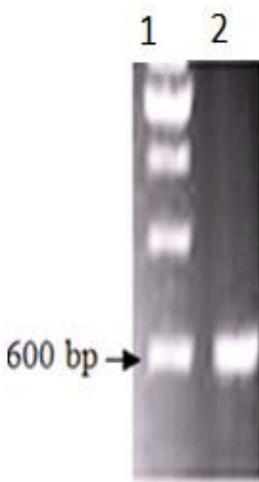
تعداد ۳۰ کلونی اولیه ایجاد شد که اکثر کلونی‌ها رشد مناسبی نداشتند و در همان ابتدا حذف شدند. ۱۰ کلونی با رشد مناسب تکثیر شد که از بین این کلونی‌ها، کلونی A₂ بیشترین میزان رشد را نشان داد (شکل ۳). بنابراین، این کلونی انتخاب و در ادامه آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. برای پی‌بردن به زمان مناسب برای نمونه‌برداری 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 نمونه‌برداری در نظر گرفته شد.



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

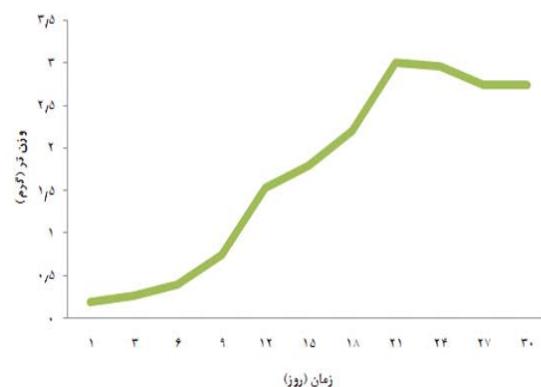


شکل ۱- القای ریشه موین از برگ برنجاسف. ریشه‌های موین از محل زخم برگ ایجاد شدند.



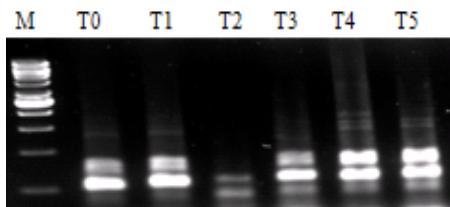
شکل ۲- تایید تواریختی ریشه‌های موین. الکتروفورز محصولات PCR ژن *rolb* تواریخت بودن ریشه‌های موین را تأیید کرد. چاهک (۱) نشانگ وزن مولکولی و چاهک (۲) زن *rolb*

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 (2001) 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 تا کنون یک گزارش از القای ریشه موین منتشر شده است. (Sujatha et al. 2013) در مطالعه خود، اثر سویه‌های مختلف اگروباکتریوم، نوع ریزنمونه، قند و محیط کشت را بر القای ریشه موین در *A. vulgaris* مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در این مطالعه سویه A₄ ریزنمونه برگ، محیط 1/2MS و میزان ۴۰ گرم/لیتر ساکاراز 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 A₄ اگروباکتریوم رایزوجنز و از ریزنمونه برگ صورت گرفت. میزان تراویختی 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 بدست آمده همه غلظت‌های سدیم آزید منجر به افزایش آرتمیزینین شد که غلظت سه میلی مولار بیشترین تاثیر را بر افزایش تولید آرتمیزینین داشت.

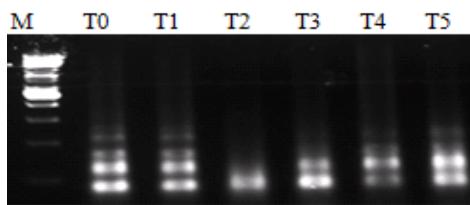


شکل ۴- منحنی رشد کلونی A₂. رسم منحنی رشد کلونی A₂ نشان داد که بیشترین میزان رشد در روز ۲۱ ایجاد می‌شود.

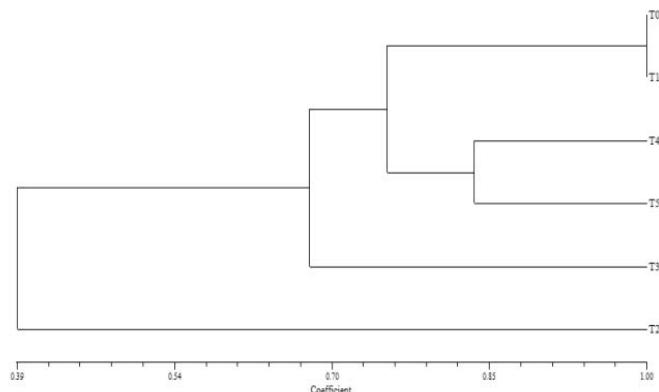
تصویر ژل آگارز مربوط به محصولات PCR نشانگرهای ISSR و RAPD به ترتیب تعداد ۳۴ و ۲۳ جایگاه تکثیر شده را نشان داد که تعداد چندشکلی برای این نشانگرهای PCR نمونه‌های جایگاه بود (شکل‌های ۵ و ۶). نتایج مربوط به PCR تحت تیمار سدیم آزید و شاهد که روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (وزنی/حجمی) بارگذاری شده بودند، با استفاده از نرم افزار NTSYS مورد بررسی قرار گرفتند. طبق نتایج به دست آمده مربوط به نشانگر ISSR، تیمار غلطی دو میلی مولار جهش نشان نداد. تصویر ژل تشابه آلی های ایجاد شده از تیمار غلطی دو میلی مولار و نمونه شاهد را نشان داد. همچنین نمودار درختی حاصل از بررسی نتایج با نرم افزار NTSYS نشان دهنده ضریب شباهت صد درصد بین نمونه تحت تیمار غلطی یک میلی مولار و نمونه شاهد بود. کمترین ضریب شباهت نسبت به شاهد ۳۳ درصد مربوط به تیمار غلطی دو میلی مولار بود. طبق نمودار درختی تیمارها به دو دسته کلی تقسیم شدند که تیمار T₂ به عنوان یک دسته مجزا از سایر تیمارها قرار گرفت (شکل ۷). بررسی جهش‌ذایی با نشانگر RAPD نیز عدم ایجاد جهش در نمونه‌های تحت تیمار غلطی یک میلی مولار را تایید کرد. همچنین تیمار غلطی T₂ کمترین ضریب شباهت (۲۱ درصد) را نسبت به شاهد از خود نشان داد. به طور کلی تیمارها از نظر میزان جهش‌ذایی در دو دسته کلی قرار گرفتند. به طوری که، تیمارهای T₁ و T₃ به همراه شاهد در یک گروه و تیمارهای T₂ و T₅ در گروه دیگر قرار گرفتند (شکل ۸).



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



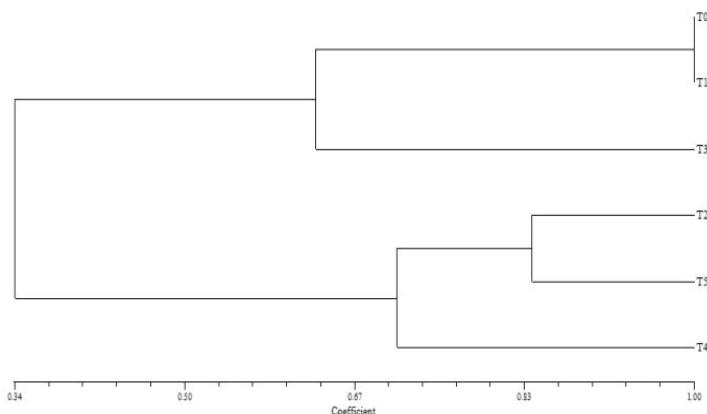
تصویر ۶- نتایج الکتروفورز مخصوصات PCR مربوط به آغازگر HB10 M.ISSR نشانگر HB10 نشانگر اندازه مولکولی، T0، شاهد، T1-5، نمونه‌های تحت تیمارهای غلطی یک تا ۵ میلی مولار سدیم آزید.



شکل ۷- نمودار درختی مربوط به نشانگر ISSR. طبق نمودار درختی تیمارها به دو دسته کلی تقسیم شدند که تیمار T_2 به عنوان یک دسته مجزا از سایر تیمارها قرار گرفت.

معمول برای تشخیص جهش نقطه‌ای روش TILLING است. از 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 غلطهای مختلف سدیم آزید مورد استفاده، غیر از غلطت دو میلی مولار، جهش ایجاد کردند. در تصاویر مربوط به ژل آگارز که محصولات PCR مربوط به آغازگرهای نشانگر RAPD و هم نشانگر ISSR به آغازگر نشان داده شدند، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS نشان داد که کمترین میزان ضریب شباهت

سدیم آزید یک ماده شیمیابی 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، گستنگی آنزیمی و شیمیابی هترودوپلکس، تغییر شیمیابی هترودوپلکس، تغییر خواص الکتروفورتیکی هترودوپلکس 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 T_0 ، T_1 و T_3 در یک گروه و تیمارهای T_2 و T_5 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.
- Ahloowalia 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 غلطی 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 غلطت دو میلی‌مولار نسبت به سایر غلطت‌ها بیشترین تاثیر را بر ایجاد جهش داشته است. Divanli et al. (2006) تاثیر پنج سطح غلطی سدیم آزید (۱-۵ میلی‌مولار) را بر چهار رقم مختلف نخود فرنگی مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه آن‌ها به این نتیجه رسیدند که غلطت یک میلی‌مولار سدیم آزید بهترین غلطت برای القای القای جهش بود و کمترین اثر کشنیدگی را داشت. جهش در ریشه‌های موین می‌تواند به علت ثبات ژنتیکی این بافت‌های تراویخت 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 غلطی مورد استفاده غلطت دو میلی‌مولار بیشترین اثر جهش‌زایی را از خود نشان داد و غلطت یک میلی‌مولار جهش ایجاد نکرد. تعداد آلل‌های 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.
- Kleinholz 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 secoiridoidglucosidegentiopicroside 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 miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation. Journal of Biotechnology 119: 416-424.

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