ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۴۹۲- ۴۸۳

بررسی اثر جهش‌زایی سدیم آزید در ریشه‌های مویین *Artemisia vulgaris* با 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*[۱]، رامین حسینی[۱]، امین البرزیان ده‌شیخ[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استادیار، دانشجوی کارشناسی‌ارشد، دانشگاه بین‌المللی امام‌خمینی (ره)، قزوین

Yaryzadeh K[*1], Hosseini R[1], Alborzian Dehsheikh A[1]

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 مویین 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 مویین در شرایط درون شیشه‌ای القا شدند. جهش‌زایی به‌وسیله ماده سدیم‌آزید 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 پلیمراز 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 مویین
سدیم آزید
ISSR
RAPD

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.10.5]

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 سزکویی‌ترپن لاکتونی و فلاونوییدها 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، بی-خوابی و اضطراب به کار می‌رود. کلیه بخش‌های گیاه از خواص کرم کشی، ضدعفونی کنندگی، ضد تشنج، ضد نفخ، مسهل صفرا، خلط آور، آرام‌بخش و مسهل برخوردار است (Kumar and Kumari 2009; Sujartha et al. 2013).

ریشه‌های مویین تراریخت به واسطه فعالیت باکتری اگروباکتریوم رایزوجنز *Agrobacterium rhizogenes* در نواحی آسیب دیده گیاه ایجاد می‌شود. ایجاد ریشه‌های مویین در اثر انتقال بخشی از پلاسمید *Ri* اگروباکتریوم رایزوجنز حاوی ژن‌های *rola*، *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 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 برخصوصیات 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 تراریخت ریشه مویین مشخص نشده است (Jain et al. 2008).

تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین تحت‌تاثیر عوامل مختلف قابل افزایش است. سویه اگروباکتریوم 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)، گازهایی مانند 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) از جهش‌زایی هچنین برای مطالعه عملکرد ژن‌ها نیز استفاده می‌شود. ایجاد جهش معمولا 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. 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 معمولا 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.10.5]

متفاوت روی غلات متفاوتی را مورد بررسی قرار داده‌اند و نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که تاثیر جهش‌زاها متناسب با گونه یا رقم است. در حالی‌که 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 Gallopodi 1979). خاصیت جهش‌زایی سدیم‌آزید به‌دلیل 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). سدیم آزید علاوه بر خاصیت جهش‌زایی منجر به پلی‌پلوئیدی نیز می‌شود، اثرات جهش‌زایی سدیم‌آزید 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 نزدیکتری 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 A_4، 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 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. اگروباکتریوم رایزوجنز سویه A_4 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 متعاقبا سه مرتبه با آب مقطر استریل هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه شست و شو شدند. بذرهای 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 تقریبا 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 A_4 (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/لیترسفوتاکسیم 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.10.5]

حدود یک سانتی‌متر رشد کردند، هرکدام به عنوان یک کلونی مجزا به طور جداگانه به محیط MS ۱/۲ مایع منتقل و در دستگاه شیکر یخچال‌دار (شرکت سهند آذر، ایران) با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی تراریختی ریشه‌های مویین

استخراج DNA از بافت ریشه مویین با استفاده از روش C-TAB انجام شد (Heidari et al. 2011). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (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 سانتی-گراد 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 مویین هر کدام از کلونی‌ها به طور جداگانه در ارلن مایرهای 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 مویین کلونی A_2 در ارلن‌مایرهای 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 سدیم‌آزید

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 ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط MS ¼ مایع اضافه شد. در هر ارلن مقدار ۰/۲ گرم بافت ریشه مویین 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 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 نشانگر مولکولی ISSR و شش آغازگر نشانگر RAPD (جدول۱)، به این ترتیب انجام شد: مرحله واسرشت کننده در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال RAPD 35/ ISSR 44 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 مویین حدود ۱۲ روز پس از اعمال آلودگی با اگروباکتریوم رایزوجنز سویه A_4 ایجاد شدند (شکل۱). ریشه‌های مویین در محیط MS ½ مایع به خوبی رشد کردند.

بررسی محصولات PCR مربوط به آغازگر *rol b* روی ژل آگارز، تراریخت بودن بافت‌های ریشه مویین را تایید کرد (شکل۲).

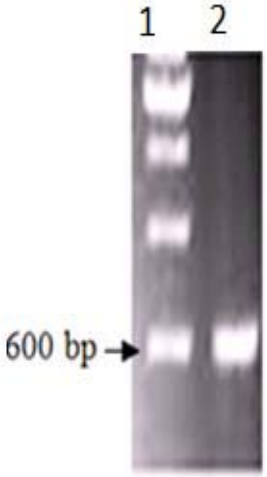
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.10.5]

جدول۱- آغازگرهای مورد استفاده مربوط به نشانگرهای RAPD و ISSR

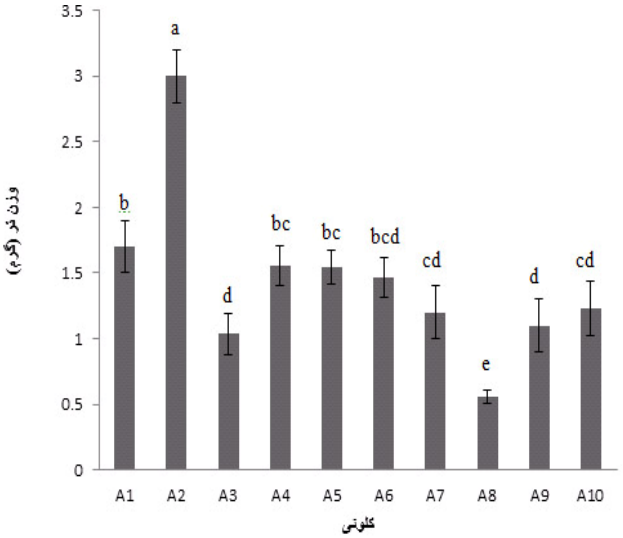
آغازگرهای ISSR			آغازگرهای RAPD		
نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)	نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)
17898A	$(CA)_7$-AC	44	C08	TGGACCGGTG	35
17898B	$(CA)_7$-GT	44	E07	AGATGCAGCC	35
17899A	$(CA)_7$-AG	44	J20	AAGCGGCCTC	35
17899B	$(CA)_7$-GG	44	A16	AGCCAGCGAA	35
HB-9	$(GT)_6$-GG	44	U19	GTCAGTGCGG	35
HB-10	$(GA)_6$-CC	44	P14	CCAGCCGAAC	35
HB-11	$(GT)_6$-CC	44			

شکل۱- القای ریشه مویین از برگ برنجاسف. ریشه‌های مویین از محل زخم برگ ایجاد شدند.



شکل۲- 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*.

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 A_2 بیشترین میزان رشد را نشان داد (شکل۳). 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 (شکل۴). 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.



شکل۳- انتخاب کلونی برتر. مقایسه میانگین وزن تر ۱۰ کلونی رشد یافته نشان داد که کلونی A_2 بیشترین میزان رشد را دارد.

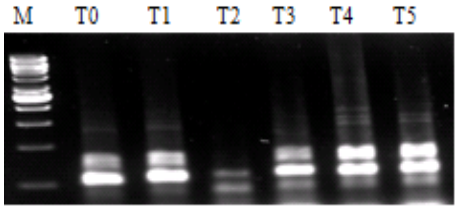
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.10.5]

شکل۴- منحنی رشد کلونی A_2. رسم منحنی رشد کلونی A_2 نشان داد که بیشترین میزان رشد در روز ۲۱ ایجاد می‌شود.

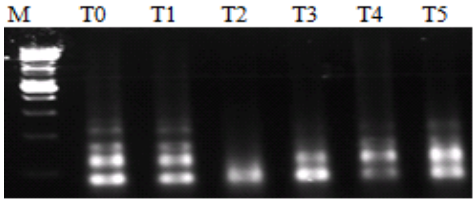
تصویر ژل آگارز مربوط به محصولات PCR نشانگرهای ISSR و RAPD به ترتیب تعداد ۳۴ و ۲۳ جایگاه تکثیرشده را نشان داد که تعداد چندشکلی برای این نشانگرها به ترتیب ۲۱ و ۱۴ جایگاه بود (شکل‌های ۵ و ۶). نتایج مربوط به PCR نمونه‌های تحت تیمار سدیم آزید و شاهد که روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (وزنی/حجمی) بارگذاری شده بودند، 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 آلل های 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 (۳۳ 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 (شکل۷). 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 (۲۱ 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).

کشت ریشه‌های مویین 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 مویین در بیوراکتورها است (Kim et al. 2001). اهمیت ریشه‌های مویین در تولید متابولیت‌های ثانویه سبب شده که فعالیت‌های زیادی در زمینه کشت و بررسی ریشه-های مویین 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 مویین در گونه‌های مختلف این جنس صورت گرفته است (Aryanti et al. 2001). در *A. vulgaris* تا کنون یک گزارش از القای ریشه مویین منتشر شده است. Sujatha et al. (2013) در مطالعه خود، اثر سویه‌های مختلف اگروباکتریوم، نوع ریزنمونه، قند و محیط کشت را بر القای ریشه مویین در *A. vulgaris* مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در این مطالعه سویه A_4، ریزنمونه برگ، محیط 1/2MS و میزان ۴۰ گرم/لیتر ساکارز را به عنوان بهترین شرایط برای القای ریشه مویین معرفی کردند (Sujatha et al. 2013). در مطالعه حاضر القای ریشه‌های مویین در این گیاه با استفاده از سویه A_4 اگروباکتریوم 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 مویین ثبات ژنتیکی بالا است، جهش ایجاد شده می-تواند 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.

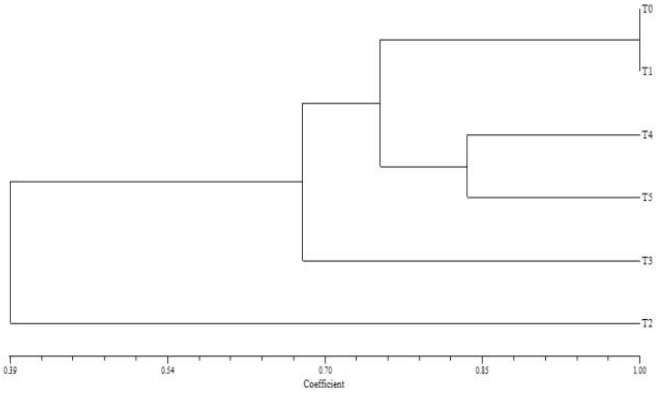
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.10.5]



شکل ۵- نتایج الکتروفورزمحصولات 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.



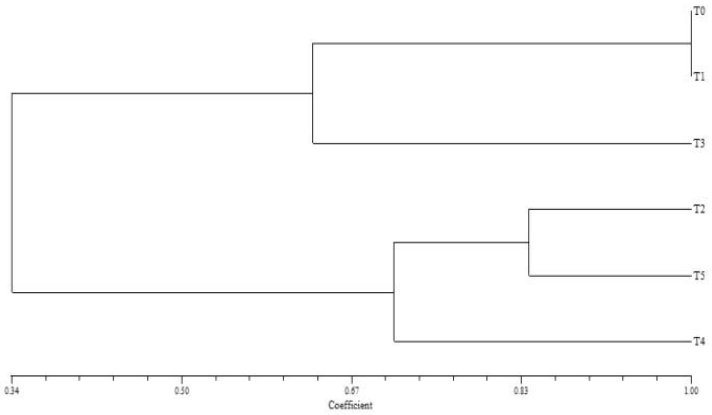
تصویر ۶- نتایج الکتروفورزمحصولات PCR مربوط به آغازگر HB10 نشانگر M.ISSR، نشانگر اندازه مولکولی، T0، شاهد، T1-5، نمونه‌های تحت تیمارهای غلظتی یک تا ۵ میلی‌مولار سدیم آزید.



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

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 هترودوپلکس، تغییر شیمیایی 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 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 غلظت‌های مختلف سدیم آزید مورد استفاده، غیر از غلظت دو میلی‌مولار، جهش ایجاد کردند. در تصاویر مربوط به ژل آگارز که محصولات PCR مربوط به آغازگرهای نشانگر RAPD و هم نشانگر ISSR تنوع آللی زیادی مشاهده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS نشان داد که کمترین میزان ضریب شباهت

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.10.5]



شکل۸- نمودار درختی مربوط به نشانگر RAPD. تیمارها در دو دسته کلی قرار گرفتند. به‌طوری‌که، تیمارهای T_0، T_1 و T_3 در یک گروه و تیمارهای T_2، T_4 و T_5 نیز در یک گروه مجزا قرار گرفتند.

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 مویین 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 مویین 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 آلل‌های ایجاد شده مربوط به 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.10.5]

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 *Maytenussenegalensis*. 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 *Holostmma 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 Biochemistery 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*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.10.5]

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-14]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.10.5]