به نژادی گیاهان دارویی و معطر

ضرورت فاز دوم توسعه

مجید عزیزی [1*]

۱- استاد گروه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد و عضو شاخه کشاورزی فرهنگستان علوم جمهوری اسلامی ایران.

*نویسنده مسئول: azizi@um.ac.ir

چکیده

روند فزاینده مصرف گیاهان دارویی و توجه ویژه جامعه جهانی به این گیاهان در سال‌های اخیر پژوهشگران عرصه‌های مختلف علوم را برآن داشته است تا جنبه‌های مختلف این گروه از گیاهان را بیشتر مورد کنکاش قرار دهند. این تلاش‌ها، گستره‌ی وسیعی را در بر داشته و از حفظ و حراست گونه‌ها از خطر انقراض، کشت و اهلی کردن، بهینه‌سازی تولید و عملیات پس از برداشت در دانشکده‌های کشاورزی و منابع طبیعی گرفته تا کاربرد آنها در درمان بیماری‌های انسان و دام در دانشکده‌های پزشکی، داروسازی و دامپزشکی را شامل می‌شود. این تلاش‌ها نیز به سرعت در حال پیشرفت هستند. در این راستا بهبود خواص کیفی گیاهان دارویی که همانا افزایش کمیت و کیفیت مواد موثره موجود در آنهاست از جمله فعالیت‌های مهمی است که اکثر محققین در بخش تولید و فرآوری اولیه گیاهان دارویی با آن روبرو هستند تا بتوانند محصول خام اولیه مورد نیاز صنایع داروسازی دارای استانداردهای لازم را تولید نمایند. بدون شک توجه توام به عملیات به نژادی به همراه عملیات به زراعی نقش بی نظیری در بهبود عملکرد و افزایش کمیت و کیفیت مواد موثره گیاهان دارویی خواهد داشت. لذا در این مقاله کلیدی ضرورت توجه به اصلاح گیاهان دارویی با تاکید بر منابع ژنتیکی بومی کشور و نیز نیازمندیهای صنایع داروسازی و عملیات تولید گیاهان دارویی خصوصا تولید مکانیزه در راستای کشاورزی پایدار مورد بحث و کنکاش دقیق قرار گرفته و سیاستها و خط مشی های آینده در این خصوص با در نظر گرفتن سند ملی توسعه گیاهان دارویی ارائه خواهد شد.

کلمات کلیدی: به نژادی، مواد موثره، سلکسیون

نیازهای مورد انتظار از ارقام اصلاح شده گیاهان دارویی

اهداف به نژادی گیاهان دارویی بسته به وضعیت اهداف اصلی در زنجیره تولید متفاوت است. جامعه‌ی هدف شرکت‌های تولیدکننده بذر، کشاورزان، شرکت های داروسازی، مصرف کنندگان و همچنین عموم مردم هستند. بعضی از اهداف اصلی اصلاح عبارتند از:

- عملکرد بالا و ثابت و بهبود شاخص برداشت یعنی بهبود نسبت قسمت‌های مورد استفاده گیاه (برای مثال برگ‌ها) به کل توده گیاهی.
- یکنواختی داروی خام گیاهی.
- افزایش ترکیبات مطلوب و کاهش یا حذف ترکیبات مضر.

برای ترکیبات مطلوب میتوان به آنتول در رازیانه، تیمول در آویشن، هایپریسین در گل راعی، اسید گامالینولنیک در گل مغربی، فیتواسترولها در روغن کدو دارویی، منتول در نعنا فلفلی، دیوسژنین در شنبلیله، اسید والرنیک در سنبل الطیب اشاره نمود. همچنین برای ترکیبات نامطلوب میتوان به استراگول در رازیانه، منتون و منتوفوران در نعنا فلفلی، والپوتریات در سنبل الطیب) بر اساس استانداردهای مورد نظر.

- مقاومت به تنش‌های زیستی (آفات و بیماریها) و غیرزیستی (مقاومت به یخبندان و خشکی).

- ارزش عملکردی بالا و ایمنی محصول.
- ارقام اصلاح شده گیاهان دارویی باید برای تولید مکانیزه مناسب باشند برای مثال نمو سریع در دوره‌ی رشد اولیه به منظور غلبه بر علف‌های هرز، بلوغ همزمان جهت برداشت با کمباین، رشد عمودی و رو به بالا، عدم تمایل به ورس، گلدهی در دامنه‌ی محدودی از ارتفاع بوته (مثل بابونه)، عدم تمایل ریزش میوه‌ها جهت برداشت با کمباین، دارا بودن میوه با کپسول بسته (مثل گل مغربی)، ریشه‌های ضخیم با انشعاب محدود (مثل ریشه‌های سنبل‌الطیب).

برای فرآیندهای تکنولوژیکی در صنعت (مناسب برای روش‌های فرآوری) موارد زیر مورد نیاز است:

- نیاز به نهاده‌ی کم (نیازهای تغذیه‌ای کم)، صرفه‌جویی در هزینه و تولید مناسب
- حفظ مؤثر حقوق اصلاح‌گرها (مثل: از طریق واریته‌های هیبرید)

برای مثال در رازیانه تلخ[1] ارقام زودرس، ارتفاع محدود(۱۲۰ سانتی متر) عدم تمایل به ریزش میوه‌ها در هنگام برداشت و مقاومت به بیماری سفیدک[2] را میتوان نام برد. صنعت فرآوری این محصول همچنین به میوه‌هایی با اندازه کوچک نیاز دارد تا در ماشین‌های پرکننده چای‌های کیسه‌ای[3] مورد استفاده قرار گیرند. بر طبق استاندارد فارماکوپه اروپا این محصول باید حداقل ۴ درصد اسانس و حداقل ۶۰ درصد آنتول[4] و ۱۵ درصد فنکون[5] داشته باشد. همچنین لازم است میزان استراگول[6] در ارقام اصلاح شده کاهش یابد چرا که اخیراً متخصصین کمیسیون غذای اتحادیه اروپا استراگول را به عنوان یک ترکیب مضر معرفی نموده‌اند. بنابراین استراگول در ارقام جدید تا حد ممکن باید کم باشد.

خصوصیات ویژه مرتبط با اصلاح گیاهان دارویی و معطر

اصلاح‌گرهای ارقام گیاهان دارویی و معطر با حالت‌های ویژه‌ای مواجه هستند که با اصلاح سایر محصولات کشاورزی متفاوت است این موارد عبارتند از:

- در زمینه اصلاح این گروه از گیاهان نتایج تحقیقات معدودی موجود است (برای مثال خصوصیات ژنتیکی برخی از صفات و نیز روش‌های اصلاح آنها مشخص شده است)
- تعداد زیادی گونه در گیاهان دارویی و معطر وجود دارند.
- اغلب اهداف اصلاحی در یک گونه با توجه به نوع کاربرد آن متفاوت خواهد بود.
- بررسی کمیت و کیفیت مواد موثره بطور قابل توجهی پرهزینه است.
- پتانسیل‌های محدودی برای تحقیق در زمینه اصلاح و نیز اصلاح این محصولات موجود است.
- برگشت هزینه اصلاح‌گران بدلیل سطح زیر کاشت محدود و تولید بذر کم کافی نیست.

با این وجود مزایایی هم در به نژادی گیاهان دارویی وجود دارد برای مثال وجود تنوع طبیعی بالایی منجر به پیشرفت خوبی تنها پس از چند مرحله انتخاب خواهد شد. با توجه به خصوصیات فوق و به منظور اطمینان از شاخص سود و زیان، اصلاح‌گران باید با دقت نوع محصول، اهداف اصلاحی و روش‌های اصلاحی را برنامه ریزی کنند.

[1] *Foeniculum vulgare* MILL. ssp. *vulgare* var. *vulgare*
[2] *Mycosphaerella anethi*
[3] Tea Bag
[4] Anethole
[5] Fenchone
[6] Estragole

منابع ژنتیکی

اصلاح موفقیت آمیز به وجود ژن‌های کدکننده خصوصیات مطلوب در ارقام جدید نیازمند است. اصلاح‌گران یک برنامه اصلاحی را از طریق غربال نمودن یک مجموعه از ژرم‌پلاسم‌های موجود برای دستیابی به یک ژنوتیپ مطلوب آغاز می‌کنند. هر چه تنوع در جمعیت‌های طبیعی بیشتر باشد احتمال شناسایی یک توده بومی مناسب نیز بیشتر است. تنوع متابولیکی و مورفولوژیکی بسیاری از توده های بومی گیاهان دارویی ایران شامل بومادران، زیره سیاه ایرانی، شنبلیله، گل راعی، آویشن، زرشک، نعنا، مریم گلی، بابونه توسط عزیزی و همکاران در دانشگاه فردوسی مشهد بررسی شده است و در بسیاری از موارد نتایج بسیار ذیقیمتی به همراه داشته است مثلا وجود مقاومت به بیماری آنتراکنوز در گل راعی توده اردبیل نسبت به ارقام اصلاح شده Topaz، Ines، Riger ،NLC همچنین میزان بالای دیوسژنین در برخی از شنبلیله های بومی ایران توسط مولف گزارش شده و صفات مطلوب دیگر در این گیاهان در حال بررسی است.

روش‌های اصلاحی

تنوع ژنتیکی جمعیت اولیه مهم‌ترین شرط یک اصلاح موفقیت آمیز است. در ابتدا اصلاح‌گر تنوع ژنتیکی موجود را بررسی کرده و در صورت نیاز برای ایجاد تنوع جدید اقدام می‌کند. در صورت وجود جمعیتی با تنوع ژنتیکی مناسب، اصلاح‌گر شروع به انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب برای بیان خصوصیات مورد نظر می‌کند. تکنیک‌های مؤثر انتخاب لازمه کارایی روش‌های اصلاحی است. امروزه، روش‌های کلاسیک در بین روش‌های اصلاح گیاهان دارویی بدلیل شرایط بیولوژیکی و اقتصادی خاص غالب هستند. این روش‌ها در مقایسه با یافته‌های بیوتکنولوژیکی بسیار کم هزینه می‌باشند.

کاربرد تنوع طبیعی موجود

به دلیل تنوع ژنتیکی خاص بالای اکثر گونه‌های گیاهان دارویی و معطر، اصلاحگران در صورت انتخاب جمعیت‌هایی با عملکرد مناسب می‌تواند به پیشرفت خوبی در زمینه اصلاح این گروه از گیاهان دست یابد.

منابع تنوع طبیعی شامل:

- جمعیت‌های وحشی موجود
- توده‌های موجود در کلکسیونهای ژرم‌پلاسمی (برای مثال بانک‌های ژنی و باغ‌های گیاهشناسی)
- ارقام قدیمی اولیه و توده‌های بومی.
- ارقامی که بطور دائم مورد استفاده قرار می‌گیرند.

معرفی جمعیتی با عملکرد بالا که از بین جمعیت‌های مختلف انتخاب شده اند، می‌تواند پیشرفت قابل توجهی را در تأمین نیازهای گونه‌های گیاهان دارویی و معطر بدون صرف هزینه و زمان ارائه دهد. برای مثال نتایج ارزیابی مقدار اسانس ارقام مختلف آویشن در مقایسه با رقم رایج منطقه (رقم Deutscher Winter) نشان داد که با انجام عملیات انتخاب ساده میتوان جمعیتی از آویشن با درصد بالایی از اسانس بدست آورد که نسبت به رقم استاندارد منطقه ۶۲ درصد افزایش داشته باشد. کاشت این رقم با عملکرد بالا نسبت به رقم استاندارد منطقه باعث تولید میزان اسانس بیشتری بدون نیاز به انجام امور اصلاحی گردید.

ایجاد تنوع جدید

در صورت مناسب نبودن تنوع ژنتیکی موجود و عدم بیان خصوصیات مطلوب، نیاز به ایجاد تنوع جدید است. بعضی از روش‌های معمول ایجاد تنوع شدید در ادامه شرح داده شده است.

ایجاد جهش

جهش‌های تصادفی در ژنوم همه گیاهان تا حد خاصی رخ می‌دهد. فراوانی این جهش‌ها برای ایجاد تنوع جدید مورد نیاز که برای یک به‌نژادی مؤثر ضروری باشد، بسیار کم است. میزان جهش‌های تصادفی از طریق کاربرد روش‌هایی مانند تشعشع یا موتاژن‌های شیمیایی افزایش می‌یابد. تغییر ژنوم از طریق جهش باعث ایجاد عکس‌العمل‌های متفاوت در گیاهان جهش یافته نسبت به گیاهان جهش نیافته خواهد شد. ترکیب‌های متوالی جهش یافته‌ها با ژنوتیپ‌های موجود تنوع بیشتری را از طریق ایجاد جهش های ژنومی (تغییر تعداد کروموزوم‌ها، آنیوپلوییدها، هاپلوییدها، آتوپلوییدها، آلوپلوییدها)، جهش کروموزومی (همه بخش‌های یک کروموزوم تغییر کند)، جهش‌های ژنی (تنها یک ژن تغییر کند)، جهش‌های پلاستیدی و جهش‌های پلاسمونی به وجود می آورد.

برای مثال واریته نعناع پلی پلوئید (*Mentha* × *piperita*) موسوم به "مولتی منتا" توسط یک جهش ژنومی بوسیله اصلاح از طریق جهش بدست آمده است. نعناع فلفلی از تلاقی *M. aquatica* × *M. spicata* بدست آمده در حالیکه *M. aquatica* از تلاقی *M. longifolia* × *M. rotundifolia* حاصل شده است. باروری واریته Mitcham (2n = 64) که یک آلوپلوئید عقیم است از طریق دو برابر کردن کروموزوم‌ها (2n = 128) با استفاده از کلشی‌سین حفظ گردید. این روش امکان ایجاد ترکیبی جدید از ژن‌ها از طریق تکثیر جنسی را به وجود می‌آورد. تقریباً تعداد ۵۰۰۰ نتاج برای افزایش عملکرد، اجزای مناسب اسانس و مقاومت در برابر زنگ نعنا[1] مورد بررسی قرار گرفتند و نتیجه این انتخاب معرفی رقم "مولتی منتا" با عملکرد بالا بود که به دلیل تعداد کروموزوم‌ها 2n = 96 عقیم است. ثبات ژنتیکی در این واریته به دلیل تکثیر از طریق غیرجنسی پایدار است.

در گروه باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد نیز مولف با تیمار کلشی سین موفق به ایجاد جهش در گونه ای نعنا (*Mentha mozaffarianii*) گردید. غلظت مطلوب ۰,۰۲۵ درصد به مدت ۶ ساعت بود که با آزمایشات فلوسایتومتری و بررسی وضعیت روزنه ها نزدیک به ۱۲,۵ درصد تتراپلوییدی تشخیص داده شد. مثال‌های دیگر از گونه‌هایی که منشأ واریته‌های جهش یافته داشته باشند شامل بابونه (رقم Zolty lan, Bodegold) مرزنجوش شیرین (رقم Miraz, Tetrata) خرگوشک[2] (رقم Polyverb) گشنیز و اسطوخودوس هستند.

تنوع سوماکلونال

اصلاح‌گران گیاهان دارویی همچنین می‌توانند از تنوع ژنتیکی ایجاد شده در کشت‌های درون شیشه‌ای مانند کشت بافت وکشت سلول استفاده کنند. تنش‌های اعمال شده در کشت‌های درون شیشه‌ای همراه با فرآیندهای تمایزیابی و تمایززدایی می توانند به عنوان موتاژن عمل کنند. سلکسیون می‌تواند هم در سطح سلولی در محیط درون شیشه‌ای و هم در سطح کل گیاه باززایی شده از سلول یا بافت انجام شود.

اصلاح ترکیبی از طریق تلاقی

هدف از تلاقی، ترکیب صفات هرکدام از والدین (با خصوصیات مطلوب) در نتاج مشترک آن دو والد می‌باشد. دانه گرده از والد پدری به کلاله مادگی گل ماده عقیم شده منتقل شده و گل تلقیح شده باید در طی دوره باروری از سایر گل‌ها مجزا یا ایزوله گردد (برای مثال داخل پاکت کاغذی قرار گیرد). گیاهان الیت با خصوصیات مطلوب در نسل‌های بعدی تفکیک شده و از طریق تکرار مراحل گزینش تثبیت می‌شوند. این روش، روش غالب در اصلاح گیاهان دارویی و معطر است (*عزیزی و همکاران، ۱۳۹۴*). از بک کراس دوره‌ای[3] برای انتقال یک خصوصیت واریته A به واریته B استفاده می‌شود. ژنوم والد B از طریق چندین دوره تلقیح هیبریدها با دانه گرده والد B به هیبریدها انتقال داده می‌شود. تنها این هیبریدها از بین زاده‌های هیبرید برای تلاقی جدید بک کراس

[1] *Puccinia menthae*
[2] *Verbascum* sp
[3] Recurrent backcrossing

که صفات انتقال یافته را نشان دادند استفاده می‌شوند. ژنوم واریته A به جز ژن‌های کد کننده صفات جدید مورد نظر با ژنوم واریته B از طریق تکرار دوره‌های بک کراس جایگزین می‌شوند.

ژنوتیپ‌های رازیانه تلخ[1] از نظر اجزای اسانس مطلوب هستند اما عادت رشدی آنها بلند و دیررس هستند. برعکس، در ژنوتیپ رازیانه شیرین[2] میزان و اجزای اسانس رضایت بخش نیست اما زودرس بوده و عادت رشدی کوتاه دارد. تلاش بر این است که صفات مطلوب زودرس بودن و عادت رشدی کوتاه رازیانه شیرین را با صفت اجزای اسانس مطلوب رازیانه تلخ از طریق تلاقی دوجانبه ترکیب کنند. میزان اسانس رازیانه تلخ در حدود ۶ تا ۱۱ درصد و میزان اسانس رازیانه شیرین حدود ۲ درصد بود. میزان اسانس هیبریدها وراثت پذیر بود و تمایل به کاهش نشان می‌داد. میزان اسانس گیاهان الیت از طریق گزینش بهبود یافت. دو گیاه از مجموع سه گیاه الیت نیاز اصلی فارماکوپه اروپا یعنی ۴ درصد اسانس را دارا بودند.

اگر همبستگی ژنتیکی شدیدی بین صفات مطلوب و نامطلوب وجود داشته باشد امکان اصلاح ترکیبی محدود خواهد شد. دلیل این موضوع وجود خاصیت پلیوتروپی[3] (یک ژن یا ژنهای مشابه مسئول دو صفت هستند) است و یا به این دلیل است که دو ژن مسئول صفت مطلوب و صفت نامطلوب با فاصله کمی روی یک کروموزوم قرار دارند. در این صورت احتمال تفکیک این دو ژن به کروماتیدهای مختلف از طریق تشکیل کیاسماتا و کراسینگ اور در میوز بسیار کم خواهد بود.

اصلاح از طریق هیبریداسیون

اصلاح از طریق هیبریداسیون به دلیل مزایای زیر به صورت فزاینده‌ای برای اصلاح گیاهان دارویی و معطر مورد استفاده قرار می‌گیرد:

- عملکرد بالا به دلیل قدرت دورگ
- یکنواختی
- حفاظت از حقوق اصلاح گران گیاهی به دلیل اینکه تکثیر بذر بصورت گواهی نشده منجر به تفرقه صفات و منتهی به جمعیت های بی ارزش خواهد شد.

به منظور اصلاح گیاهان دارویی و معطر از طریق هیبریداسیون باید از لاین‌های دارای صفت نرعقیمی ژنتیکی-سیتوپلاسمی استفاده نمود تا گرده‌افشانی کنترل شده و صرفه جویی در هزینه‌های فوق العاده زیاد عقیم‌سازی تضمین گردد. مطالعه عادت گلدهی در آویشن آلمانی وجود حالت ژینودایوشسی را اثبات نمود و این پدیده مولف را بر آن داشت تا وجود چنین صفتی در آویشنهای بومی ایران مورد بررسی قرار گیرد. در حال حاضر در گروه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد مطالعه عادت گلدهی در آویشنهای بومی ایران و هیبریداسیون بین آنها در حال انجام است. ایجاد هیبریداسیون مابین آویشن دنایی و آویشن آلمانی با بهره گیری از حالت ژینودایوشسی با هدف مقاومت به سرمای زمستانه و افزایش میزان تیمول از اهداف چنین طرح اصلاحی بر روی آویشن میباشد.

ارقام سنتتیک

در حالیکه ارقام هیبرید در نسل F_1 از قابلیت ترکیب‌پذیری مطلوب موجود فقط بین دو لینه‌ی مجزا به عنوان والدین به وجود می‌آیند، جمعیت‌های سنتتیک از چند لاین والدینی با قابلیت ترکیب‌پذیری مطلوب حاصل می‌شوند. بذرها نه تنها همانند ارقام هیبرید از نسل F_1 به وجود می‌آیند بلکه از نسل‌های بعدی نیز هستند. از لحاظ پتانسیل عملکرد اگرچه ارقام سنتتیک همیشه پتانسیل

[1] *Foeniculum vulgare* MILL. ssp. *vulgare* var. *vulgare*
[2] *F. vulgare* MILL. ssp. *vulgare* var. *dulce*
[3] Pleiotropy

عملکرد یکنواختی ندارند ولی در بیشتر موارد با ارقام هیبرید برابری می‌کنند. در ابتدا لازم است اینبرد لاین‌ها یا کلون‌های با عملکرد بالا و متفاوت از نظر ژنتیکی ایجاد شوند. سپس آزمون قابلیت ترکیب‌پذیری اینبرد لاین‌ها بوسیله تلاقی چندگانه تعیین گردد. چندین گیاه از هر اینبرد لاین به گونه‌ای در زمین کشت خواهند شد که هر گیاه برای گرده‌افشانی گیاهان دیگر شانس برابری داشته باشد. بنابراین لاین‌هایی با قابلیت ترکیب‌پذیری عمومی انتخاب خواهند شد. این لاین‌ها اساس تشکیل واریته سنتتیک را تشکیل می‌دهند و توسط اصلاح‌گر حفظ خواهند شد. برای تولید بذر، لاین‌های برگزیده با قابلیت ترکیب‌پذیری بالا برای گرده‌افشانی دوطرفه دوباره کاشته می‌شوند، این نسل syn0 نامیده می‌شود. نسل‌های بعدی به ترتیب سنتتیک ۱(syn1)، سنتتیک ۲(syn2)، سنتتیک ۳(syn3) و ..... نامیده می‌شوند. قدرت دورگه (هتروزیگوتی) و پتانسیل عملکرد بدست آمده در نسل سنتتیک ۱ به صورت زیادی در نسل‌های بعدی حفظ خواهد شد. اگرچه میزان محصول بعد از نسل سنتتیک ۲ کاهش خواهد یافت تا در نسل‌های بعدی به تعادل برسد. واریته سنتتیک از طریق یک تلاقی پلی کراس جدید با والدین برگزیده (سنتتیک صفر) یا از طریق گزینش در نسل‌های بعدی (سنتتیک ۴) حفظ خواهد شد.

هیبریداسیون سوماتیکی (امتزاج پروتوپلاست‌ها)

گیاهان می‌توانند به سلول‌های منفرد تفکیک شده و پس از هضم دیواره سلولی با استفاده از پکتیناز و سلولاز امتزاج پروتوپلاست‌ها از طریق پلی اتیلن گلیکول در حضور کلسیم یا از طریق امتزاج الکتریکی ایجاد شود. پروتوپلاست‌های امتزاج یافته می‌توانند به گیاهان کامل باززایی شوند. امتزاج سوماتیکی امکان افزایش دو ژنوم هتروزیگوت به یکدیگر بدون انجام تقسیم میوزی را مهیا می‌کند. به این ترتیب اصلاح‌گر می‌توانند به ناسازگاری جنسی که در تلاقی گونه‌ها یا جنس‌های مختلف رخ می‌دهد غلبه کند. امتزاج موفقیت آمیز پروتوپلاست‌ها در چند گیاه دارویی به شرح ذیل گزارش شده است:

Catharanthus roseus/Vinca minor,
Rauwolfia serpentina/Vinca minor,
Rauwolfia serpentina/Catharantus roseus
Datura innoxia/Physalis minima

انتقال مولکولی ژن

انتقال اطلاعات ژنتیکی از طریق هیبریداسیون سوماتیکی اساس انتقال مولکولی ژن است. ایجاد تنوع جدید در روش‌های کلاسیک در نتیجه ترکیب تصادفی است. در این حالت ژنوم‌ها یا حداقل بخشی از ژنوم‌ها با هم ترکیب شده و یک صفت مطلوب همیشه با چندین صفت نامطلوب همراه است و به این ترتیب پیش‌بینی خصوصیات نسل‌های جدید محدود می‌شود. با شناسایی ژن های منفرد و انتقال آنها از یک ژنوتیپ به ژنوتیپ دیگر، پیش‌بینی خصوصیات نسل‌های جدید بهتر صورت می‌گیرد. برای این کار موارد زیر باید در نظر گرفته شوند:

- ژن باید به عنوان بخشی از مولکول DNA موجود باشد.
- این بخش ازDNA باید قابل کلون کردن باشد.
- ژن در سیستم انتقال باید قابل کنترل باشد.
- DNA بتواند در ژنوم سلولی تلفیق شود
- سلول ترانسفورم شده باید قابل باززایی بوده و امکان تبدیل شدن به گیاه کامل وجود داشته باشد
- گیاه باید قادر به بروز صفت انتقال یافته باشد

روش‌های انتقال ژن شامل: میکرواینجکشن، الحاق از طریق میکروپروجکتیل‌ها، انتقال مستقیم، انتقال ژن با استفاده از وکتور برای مثال از طریق ایجاد تومور مثل پلاسمید Ti در اگروباکتریوم. این روش انتقال ژن با روش‌های اصلاح کلاسیک برای حذف تنوع‌های نامطلوب در جمعیت‌های تغییر یافته دنبال می‌شود.

توسعه تکنولوژی‌های ژنی در زمینه کشاورزی با استفاده از بیوسنتز مواد مؤثر مطلوب در گیاهان در حال تحقیق و بررسی است. در حال حاضر اینچنین تحقیقاتی در مورد گیاهان دارویی و معطر مربوط به تشخیص مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مهم، شناسایی آنزیم‌های مربوطه، جداسازی ژن‌های کدکننده و تشخیص پروتوکل‌های انتقال ژن می‌باشد. موفقیت‌های گزارش شده شامل تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تراریخت شده شامل اینترفرون‌ها در تنباکو و واکسن‌ها در سایر گیاهان هستند. اما هزینه این بررسی‌ها بسیار بالاست و تاکنون مثال‌های بسیار کمی از اصلاح ارقام تراریخت دارای اهمیت اقتصادی، موفق بوده‌اند. اکنون مشتریان از مصرف گیاهان دارویی و معطر مهندسی ژنتیک شده در مهم‌ترین بازارهای این محصولات در اروپا امتناع می‌ورزند. برعکس، تولید داروها (عمدتا پپتیدها و پروتئین‌ها) ازطریق سلول‌ها یا میکروارگانیسم‌های تراریخت شده با موفقیت همراه بوده است.

سلکسیون یا گزینش (انتخاب)

اگرجمعیت با تنوع طبیعی یا مصنوعی در دسترس باشد اصلاح‌کننده اصلاح جمعیت را از طریق گزینش شروع خواهد کرد. این عمل موجب تجمع ژن در آن جمعیت می‌گردد که صفت مطلوب را کنترل می‌نماید. بیان بسیاری از صفات مهم از والدین به نتاج آنها به ارث می‌رسد. انتخاب در جمعیت‌های وحشی و یا توده‌های بومی رایج‌ترین روش اصلاح گیاهان دارویی است. به دلیل اینکه بسیاری ازگونه‌ها در حال حاضر بصورت وحشی بوده و تنوع ژنتیکی بالایی دارند. انجام تنها چند مرحله انتخاب می‌تواند نتایج رضایت‌بخشی را حاصل کند.

انتخاب توده‌ای مثبت و منفی

ساده‌ترین روش انتخاب، انتخاب توده‌ای مثبت است، که به موجب آن از درون مخلوطی از فنوتیپ‌ها افراد دارای صفت مورد نظر انتخاب می‌شوند و با یکدیگر تکثیر خواهند شد. سپس بهترین گیاهان نسل اصلاح شده کشت گردیده و بذور آنها را می‌توان به عنوان رقم مورد استفاده قرار داد. به‌نژادی صفاتی که بصورت غالب به ارث می‌رسند با این روش دشوار خواهد بود چون فنوتیپ گیاهان هموزیگوت و هتروزیگوت از یکدیگر قابل تفکیک نیست. گزینش توده‌ای منفی عکس حالت قبل بوده و در این حالت فنوتیپ‌های نامطلوب حذف می‌شوند و گیاهان باقی مانده تکثیر خواهند شد. از این روش گزینش به منظور حفظ و نگهداری واریته‌های بدست آمده استفاده خواهد شد. برای مثال میتوان به بوته های ماریتیغال دارای گلهای سفید اشاره کرد که نسبت به بوته های گل بنفش از مواد موثره مطلوبی برخوردار نیستند و لازم است به محض مشاهده در مزرعه نسبت به حذف آنها اقدام نمود. بوته های گل سفید پروانش کبیر نیز همین گونه است. در مجموع به منظور افزایش راندمان سلکسیون در گیاهان دارویی ضروری است به دنبال همبستگی مابین صفات مورفولوژیکی و مواد موثره بود و چنانچه چنین همبستگی یافت شود انجام عملیات سلکسیون موثرتر و ارزانتر خواهد بود. در تعدادی از گیاهان دارویی مانند شنبلیله، گل راعی، آویشن چنین همبستگی هایی توسط مولف بدست آمده است.

انتخاب دوره‌ای[1]

انتخاب دوره‌ای با هدف افزایش فراوانی ژن‌های مطلوب در جمعیت از طریق تکرار دوره‌های زیر صورت می‌گیرد:

۱. انتخاب

[1]Recurrent selection

۲. کشت گیاهان نزدیک یکدیگر
۳. تلاقی آزادانه

نتیجه و کارایی سلکسیون را می‌توان با اقدامات زیر بهبود بخشید:

۱. خودگشنی گیاهان الیت سلکسیون شده
۲. آزمون نتاج آنها
۳. انتخاب گیاهان الیت فقط از خانواده‌های با کارایی بالا برای کشت توام و تلاقی آزادانه بین آنها.

افزایش دو برابر مقدار اسانس زیره سیاه اروپایی یکساله[1] با انتخاب دوره‌ای طویل‌المدت بین سال‌های ۱۹۸۶ تا ۲۰۰۴ به دست آمده است.

انتخاب انفرادی گیاهان با آزمون نتاج

در این روش سلکسیون، به جای ارزیابی گیاهان انتخاب شده به ارزیابی نتاج آن گیاهان پرداخته خواهد شد. بنابراین در روش انتخاب انفرادی گیاهان ژنوتیپ گیاه ارزیابی می‌شود در حالیکه در انتخاب توده‌ای فنوتیپ گیاه مورد توجه قرار می‌گیرد. درگیاهان خودگشن هر فرد نتاج ازگیاهان الیت انتخاب شده مورد بررسی قرار گرفته و خانواده‌های ضعیف و نامطلوب از برنامه اصلاحی حذف خواهند شد. درگیاهان دگرگشن در طی آزمون نتاج گیاهان الیت، گرده‌افشانی کنترل نشده صورت می‌گیرد. بنابراین ادامه عملیات به‌نژادی بر روی بذور مادری (به جای بذور نتاج) انجام خواهد شد.

اصلاح گیاهان دارای خاصیت آپومیکسی

آپومیکسی تشکیل بذر غیرجنسی بدون ادغام دو گامت با کروموزوم کاهش یافته تعریف می‌شود، این روش عملا تکثیر رویشی است که به موجب آن همه نتاج از نظر ژنتیکی مشابه گیاهان مادری هستند. در اصلاح این گیاهان، گیاهان مادری که بذر جنسی تولید میکنند توسط گیاهان آپومیکت گرده‌افشانی می‌شوند و در ادامه نتاج به گیاهان جنسی و گیاهان آپومیکت تفرق می یابند. گیاهان جنسی می‌تواند برای بک کراس‌های بعدی استفاده شوند، درحالیکه نتاج با آپومیکتی زیاد و دارای صفت موردنظر می‌توانند به عنوان ارقام مورد استفاده قرار گیرند.

پژوهش‌های اخیر به روشن و خاموش کردن رفتار آپومیکسی در گیاهان با انتقال ژن پرداخته‌اند. آپومیکسی در برخی از گیاهان دارویی و معطر مانند گشنیز (*Coriandrum sativum*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) یافت شود. به تازگی تجاربی در مورد آپومیکسی گل راعی (*Hypericum perforatum L.*) دست آمده است. این گیاه یک گیاه آلوتتراپلوئید و ترکیبی از کروموزوم های دو گونه *H. maculatum* و *H. attenuatum* است و این گیاه تا حدی آلوگام می‌باشد. انتقال دانه گرده توسط حشرات و یا توسط باد صورت می‌گیرد. خودناسازگاری جزئی در این گیاه نیز مشاهده شده است. گل راعی گیاهی آپومیکت اختیاری سودوگام[2] است ولی در شرایط نادر حالات جنسی اجباری و آپومیکت خالص نیز رخ می‌دهد. یک روش سریع برای تعیین روش تولیدمثل دراین گیاه با استفاده از فلوسایتومتری گزارش شده است تنوع میزان DNA ازهسته (به اصطلاح مقدار C[3]) مربوط به سلولهای آندوسپرم و جنین به عنوان یک علامت کلیدی برای طبقه‌بندی انواع تولیدمثل مورد استفاده قرار می‌گیرد.

[1] *Carum carvi*
[2] Pseudogamous facultative apomict
[3] Cvalue

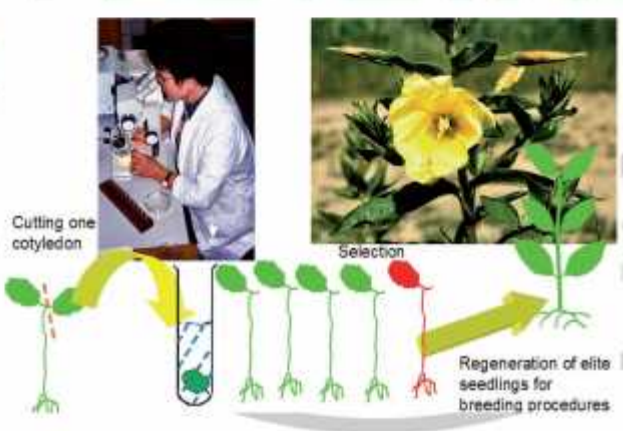
اصلاح کلونال

اصلاح کلونی در گیاهان دارویی و معطر از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است چرا که این روش دوره اصلاح را بطور قابل توجهی کوتاه می‌نماید. واریته‌های کلونی یا به دلیل عقیم بودن گونه‌ها مانند نعنا از روش غیر جنسی تکثیر می‌شوند و یا به منظور اطمینان از پایداری گونه‌های بارور آلوگام به این روش تکثیر می‌گردند. از این روش میتوان در اصلاح گل محمدی، زعفران، رزماری، اسطوخودوس، گل راعی و بسیاری دیگر از گیاهان دارویی کهخ بطور رویشی قابل تکثیر هستند میتوان استفاده نمو. اصلاح کلونی شامل تلفیق مراحل زیر است:

ایجاد تنوع از طریق تلاقی- انتخاب گیاهان الیت از بین گیاهان حاصل از تلاقی-تکثیر رویشی گیاهان الیت- بررسی مقایسه‌ای عملکرد گیاهان الیت کلون شده و بهترین کلون به عنوان واریته جدید بصورت رویشی تکثیر می‌شود.

سلکسیون در مراحل اولیه رشد گیاه

شدت انتخاب را می‌توان با سلکسیون در مراحل اولیه رشد گیاه نیز بهبود بخشید بطوریکه گیاهان نامطلوب در آغاز دوره کشت حذف می‌گردند. در این روش، هزینه کشت را می‌توان کاهش داد و تعداد بیشتری از گیاهان را با توجه به ظرفیت موجود گنجاند. سلکسیون در مراحل اولیه رشد گیاه در سطح گیاه جوان،کالوس‌ها و یا سوسپانسیون سلولی قابل اجرا است. سلکسیون در مراحل اولیه رشد گیاه در گل مغربی[1] در شکل زیر آورده شده است. میزان اسید گامالینولنیک در یک لپه جدا شده از گیاهچه در زیر میکروسکوپ بررسی می‌شود سپس گیاهان الیت دارای اسید گامالینولنیک زیاد مشخص شده و گیاهچه‌های برتر در شرایط درون شیشه‌ای باززایی خواهند شد و از آنها می‌توان برای مراحل بعدی اصلاح استفاده نمود.



شکل ۱- سلکسیون در مراحل اولیه در گل مغربی به منظور بهبود اسید گامالینولنیک

[1] *Oenothera lamarckiana*

روش دابل هاپلویید

واریته‌های جدید گیاهان دارویی باید یکنواخت (هموژنوس) باشند. اصلاح برای صفاتی که بصورت غالب به ارث می‌رسند زمان‌بر است، چون وضعیت ژنتیکی آنها را نمی‌توان از روی خصوصیات فنوتیپی تشخیص داد. استفاده از هاپلوئیدها سرعت این فرآیند را افزایش می‌دهد.

بساک یا میکروسپورها برای تولید گیاهان هاپلوئید مورد استفاده قرار می‌گیرند. پس از پلی پلوئید شدن بصورت خودبه‌خودی و یا درآزمایشگاه با استفاده از کلشی‌سین گیاهان هموزیگوت را می‌توان ایجاد نمود. گیاهان هاپلوئید استریل، کوچک‌تر از گیاهان دیپلوئید بوده و رشد آهسته دارند. در طی باززایی، ژنوم آنها را می‌توان با تیمار کلشی‌سین (با غلظت نیم درصد) ازطریق ریشه یا استفاده بر روی محل جدا شدن جوانه توسط پنبه آغشته به کلشی‌سین دو برابر می‌شود. این روش دو برابر نمودن کروموزوم‌ها منجر به ایجاد گیاهان کاملا هموزیگوت بارور خواهد شد. از این روش در اصلاح گل راعی، گل گاوزبان، زنیان، پروانش، زیره سیاه اروپایی، گل انگشتانه، گندم سیاه، مریم گلی کبیر، و زنجفیل استفاده شده است.

تعیین ویژگی‌ها

نشانگرها

استفاده از نشانگرها روشی ارزشمند برای بهبود راندمان گزینش می‌باشد چون با استفاده از آنها می‌توان تعداد بیشتری از گیاهان را مورد ارزیابی قرار داد. مبنای کاربرد نشانگرها این است که چون اندازه‌گیری صفات هزینه زیادی در بر دارد می‌توان به طور غیرمستقیم با تعیین نشانگرهای همبسته با صفات آنها را راحت‌تر ارزیابی نمود. این کار از طریق گزینش غیر مستقیم و با تعیین همبستگی بین صفات و نشانگرها صورت می‌گیرد. در کشورمان تحقیقات ارزشمندی در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی با استفاده از نشانگرهای مولکولی صورت گرفته است و امید است در ادامه چنین تحقیقاتی شاهد بهره برداری عملی از نتایج آنها باشیم.

روش‌های آنالیز سریع

یکی از مهم‌ترین اهداف اصلاح گیاهان دارویی بهبود مواد موثره است ولی هزینه بالا برای آنالیز این مواد اغلب از فاکتورهای محدود کننده و بازدارنده است. بنابراین معرفی و توسعه روشهای ویژه آنالیز در اصلاح گیاه دارویی بطوریکه بتوان با هزینه کمتر نمونه‌های زیادتری را بررسی نمود و شدت انتخاب کافی را اعمال کرد از اولویتهای این بخش به حساب می‌آید. اخیرا با استفاده از روشهای به روش NIR[1] و SPME[2] گامهای موثری در آنالیز مواد موثره گیاهان دارویی برداشته شده است که در عین دقت بالا با هزینه کم و با سرعت بالا امکان پذیر است.

اصلاح برای مقاومت به آفات و بیماری‌ها

آفات و بیماری‌های گیاهان دارویی و معطر منجر به بروز تلفات و کاهش عملکرد و کیفیت محصول خواهند شد. از این رو استفاده از ارقام مقاوم به یک امر مهم در اصلاح نبات تبدیل شده است چرا که نه تنها از نظر هزینه‌های تولید این امر مهم می‌باشد بلکه از نظر سلامت مصرف کننده و نیز سلامت جامعه نیز بسیار مهم است. برخی از بیماری‌ها و آفات مهم گیاهان دارویی و معطر در جدول ذیل آورده شده است (جدول۱).

[1]Nearinfrared spectroscopy
[2]Solidphase microextraction

روش‌های موثر برای آزمون مقاومت در برابر آفات و بیماری‌ها یک پیش‌نیاز ضروری برای اصلاح کارآمد گیاهان دارویی و معطر برای مقاومت به بیماری‌ها و آفات است. اولین مرحله درآزمون مقاومت آلوده نمودن گیاهان است و گام دوم ارزیابی شدت آلودگی ایجاد شده می‌باشد. آلودگی مصنوعی می‌تواند در مزرعه با روش‌های مختلفی صورت گیرد که برای نمونه تهیه سوسپانسیون از اسپور یا کنیدی قارچ و تنظیم تراکم اسپور با استفاده از هموسیتومتر و درنهایت اسپری نمودن این سوسپانسیون بر روی گیاهان می‌باشد. به منظور ارزیابی میزان خسارت و به بیان دیگر شدت آلودگی می‌توان از علایم ظاهری استفاده نمود که البته این علایم برای بیماری‌های ویروسی کاربرد نداشته و برای این دسته از بیماری‌ها از روش الایزا می‌توان استفاده نمود.

جدول ۱- مثال‌هایی از آفات و بیماری‌های مهم گیاهان دارویی و معطر

عامل بیماری یا آفت	گیاه میزبان	نوع عامل
Erwinia, Pseudomonas sp.	گونه‌های خانواده چتریان	باکتری
Alternaria sp.	گونه‌های گیاهی مختلف	قارچ
Botrytis cinerea	*Digitalis lanata*	قارچ
Colletotrichum cf. gloeosporioides	*Hypericum perforatum*	قارچ
Erysiphe, Peronospora, Plasmopara sp.	گونه‌های گیاهی مختلف	قارچ
Helminthosporium papaveris	*Papaver somniferum*	قارچ
Mycocentrospora acerina	*Carum carvi*	قارچ
Mycosphaerella anethi	*Foeniculum vulgare*	قارچ
Phoma exigua	*Valeriana officinalis*	قارچ
Phomopsis diachenii	*Carum carvi var. annuum*	قارچ
Puccinia sp.	گونه‌های گیاهی مختلف	قارچ
Rhizoctonia, Fusarium, Pythium, Olpidium	گونه‌های گیاهی مختلف در زمان خروج از خاک	قارچ
Septoria sp.	گونه‌های گیاهی مختلف	قارچ
Aphids	گونه‌های گیاهی مختلف	حشره
Depressaria nervosa	*Carum carvi*	حشره
Eupteryx atropunctata	گونه‌های گیاهی مختلف	حشره
Lygus sp.	گونه‌های خانواده چتریان	حشره
Olibrus aenes	*Chamomilla recutita*	حشره
Psila rosae	ریشه گیاهان خانواده چتریان	حشره
Acerina carvi	*Carum carvi*	مایت (هیره)
Viruses	گونه‌های گیاهی مختلف	ویروس

چشم‌انداز آینده

امروزه، به‌نژادی یک فاکتور کلیدی در بهبود وضعیت تولید گیاهان دارویی و معطر است و این موضوع عمدتا به دلیل این است که ارقام بدست آمده در طی به‌نژادی با نیازهای اصلی در زنجیره تولید سازگاری داشته و می‌تواند نقش مهمی در سودآوری، تولید محصول با کیفیت عالی، و نیز تولید پایدار داشته باشند. بهره‌برداری از پتانسیل ژنتیکی گیاهان دارویی و معطر تنها آغاز راه است. به‌نژادی گیاهان دارویی و معطر باید با اصلاح ارقام با کیفیت عالی که در بین دیگر محصولات باغبانی قبلا صورت گرفته است منطبق باشد. به منظور دستیابی موثر و کارآمد به این وظیفه ارزشمند، تلاش‌های جامع و کامل با بهره‌گیری از متخصصین مختلف در حیطه‌های مختلف مانند ژنتیک، سیتولوژی، ژنتیک مولکولی، باغبانی، گیاه‌شناسی و بیماری شناسی گیاهی ضروری است. لذا امید است با همکاری کلیه متخصصین حوزه های فوق الذکر در آینده ای نه چندان دور شاهد معرفی ارقام اصلاح شده ی گیاهان دارویی و معطر حاصل پژوهشهای متخصصین کشور بوده و نیاز به واردات بذور اصلاح شده که در بسیاری از موارد مسائل و مشکلات عدیده ای را به همراه دارند را برطرف نمود.

منابع

۱- مجید عزیزی، گلنار قاضیان، سمیه میرمصطفایی (۱۳۹۴) اصلاح گیاهان دارویی، جلد اول، انتشارات نخست، ۳۸۸ص.

۲- مجید عزیزی (۱۳۸۵) مطالعه چهار رقم بابونه اصلاح شده (*Matricaria chamomila L.*) در شرایط آب و هوایی ایران. فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۲ شماره ۴ ، صفحه ۳۸۶-۳۹۶.

3- Azizi Majid, Askar Ghnai, Taghi Ebadi and Sarta Crockett (2011). The Ex Situ Comparison of Two Improved St. John's wort. (*Hypericum perforatum* L.) Cultivars with an Iranian Wild Population. *Acta Horticulturae*, 925:163-170.

4- Azizi Majid and Dias, Alberto (2002) Phytochemical analysis of Iranian St.John’s wort by HPLC-DAD . *The 3th International IRAN and RUSSIA Conferences, Agriculture and natural resource*. Sep.18-20. Moscow/RUSSIA.

5-Azizi Majid, Gh. Davareenejad, R. Bos, H. J. Woerdenbag and O. Kayser (2009) Essential oil content and constituents of Black Zira (Bunium persicum [Boiss.] B. Fedtsch.) from Iran during field cultivation (domestication). *Journal of Essential Oils Research*, 21(5):19-23.

6- Azizi Majid, Ghnai, A., Ebadi. T, and Crockett, S. (2011). The Ex Situ Comparison of Two Improved St. John's wort. (*Hypericum perforatum* L.) Cultivars with an Iranian Wild Population. *Acta Horticulturae*, 925:163-170.

7- Ghani, A., Majid Azizi, Hassanzadeh-Khayyat, M. and Pahlavanpour, AA. (2008) Essential Oil Composition of *Achillea eriophora*, *A. nobilis*, *A. biebersteinii* and *A. wilhelmsii* from Iran. *Journal of Essential Oils Bearing Plants*, 11(5): 460-467.

8- Shahriari,-Ahmadi, F., Dehghan, E. Farsi, M. and Azizi, M. (2008). Tetraploid induction of *Hyoscyamus muticus* L. Using colchicin treatment. *Journal of Biological Science*, 11(24)2653-2659.

9- Ghani, A. Neamati, H. Majid Azizi, Saharkhiz, Farsi, M. (2014). Artificial Autotetraploidy Induction Possibility of Two Iranian Endemic Mint (*Mentha mozaffarianii*) Ecotypes. *Notulae Scientia Biologicae*, 6(2):185-191.

10- Moradi, H. Majid Azizi, Rowshan, V. (1393). Comparison of essential oil content and constituents of *Nepeta glomerulosa* during three developmental stages. 3rd National Congress on Medicinal Plants, 5-7 May, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

11- Najafzadeh, S. Majid Azizi (1393). Comparison of vegetative and generative chatacteristic of six local landraces of dill (*Anethum graveolence* L) cultivated in Mashhad climatic condition. 3rd National Congress on Medicinal Plants, 5-7 May, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Breeding of Medicinal and Aromatic Plants

The Necessity of the Second Phase of Development

M. Azizi [*1]

1-Professor in Horticultural Department Ferdowsi University of Mashhad and Invited Scholar in Academy of Sciences, Islamic Republic of IRAN.

*Corresponding author: azizi@um.ac.ir

Abstract

The growing use of medicinal and aromatic plants (MAP) and special attention of international community to MAP in recent years has led researchers to explore various aspects of the plants more often. These efforts involve a wide range of issues including: protecting endangered species, cultivation and domestication, optimizing production and post-harvest operations in the colleges of agriculture and natural resources and their use in the treatment of diseases in humans and animals in medical schools, pharmaceutical and veterinary systems. These activities are also rapidly advancing. In this context, increasing the qualitative properties of MAP, which is the improvement of quantity and quality of active ingredients of MAP is one of the most important issues and the most researchers in the field of production and primary processing of MAP face to them. This activities is necessary for supplying of the raw material need to pharmaceutical industries for production of standards pharmaceutical products. It is clear that breeding activities accompanied to the cultural practices has a unique role in improving the performance and increasing of quantity and quality of active ingredients of MAP. A glance to the published articles in scientific journals and scientific conferences suggests that currently the majority of studies in our country have focused on agricultural operation of MAP. This is while according to Vavilov theory, Iran is one of the eight center of world's plant diversity. In this key lecture, the necessity of MAP breeding with emphasis on indigenous genetic resources, pharmaceutical industries requirements and also cultural practices especially mechanization production of MAP will discussed in detail. Future vision and policies with respect to the National Development Documents of MAP will be offered.

Key words: Breeding, Selection, Active ingredient, Plant natural resources