استفاده از روش انتخاب هدایت شده با نشانگر مولکولی (MAS) در به‌نژادی گیاهان دارویی

علی عزیزی

عضو هیئت علمی گروه علوم باغبانی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان.

چکیده

در راهبردهای مرتبط با توسعه گیاهان دارویی، جهت بهره برداری صحیح از رویشگاههای های طبیعی و جلوگیری از فرسایش ذخائر ژنتیکی این نوع گیاهان در اثر برداشت بی رویه، امروزه بحث اهلی سازی، کشت و اصلاح گیاهان دارویی، اهمیت زیادی پیدا کرده است. اولین قدم در راه بهنژادی گیاهان دارویی، انتخاب توده های مناسب جهت کشت و پرورش میباشد. فرایند انتخاب در برخی گیاهان دارویی یک مسئله بغرنج بوده زیرا هدف از کشت گیاهان دارویی در بسیاری موارد، نوع و کیفیت ماده موثره است و این صفات فیتوشیمیایی از نظر ظاهری قابل تشخیص نیستند. در برخی موارد، مثلا در گیاهان اسانس‌دار، مقدار گیاه لازم جهت استخراج از روشهای متداول اسانس، آن قدر زیاد است که حتی کل پیکر گیاه انتخاب شونده نیز کفاف نمیدهد. این خود دشواری مهم فرایند انتخاب در برنامه های بهنژادی این نوع گیاهان میباشد. بنابراین در فرایند گزینش گیاهان برتر باید به انتخاب غیرمستقیم متوسّل شویم. به عبارت دیگر به دنبال نشانگرهایی باشیم که با صفات فیتوشیمیایی پیوستگی داشته و ما را در این زمینه یاری کنند. این نشانگرها میتوانند مورفولوژیکی (ریختی)، شیمیایی یا مولکولی (ژنی) باشند. استفاده از نشانگر های مولکولی DNA مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) به دلیل متاثر نبودن آنها از شرایط محیط رویش، سن فیزیولوژیک و اندام گیاه، روش مطمئنی جهت مطالعات ژنتیکی و اصلاحی می باشد. به منظور بررسی وجود پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ترکیبات اصلی موثره در گیاهان دارویی از نرم افزار های خاص و مدل های آماری رگرسیون استفاده میشود. یافته های این نوع پژوهش ها می تواند در اصلاح به روش انتخاب هدایت شده با نشانگر های مولکولی برای این گیاهان کاربرد داشته باشند.

کلمات کلیدی: بهنژادی، گیاهان دارویی، انتخاب هدایت شده، نشانگر مولکولی

مقدمه

اصلاح گیاهان و بهنژادی محصولات کشاورزی بر پایه اصول ژنتیکی یکی از بزرگترین دستاوردهای موفق بشر در قرن بیستم به شمار می رود ولی با توجه به افزایش روز افزون جمعیت باید کارآیی روش های اصلاحی برای افزایش بازده در واحد سطح و صرفه جویی در زمان بهبود یابد و تکنیک های جدید در جهت شناسایی و دست ورزی ساختار ژنتیکی گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. در مورد گیاهان دارویی، اهلی سازی به عنوان اولین قدم، امروزه از اهمیت بالایی برخوردار شده است زیرا در حال حاضر حتی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، بیش از 90 % گیاهان دارویی بازار، از رویشگاه های طبیعی و به صورت گیاه وحشی برداشت میشود که میتواند باعث فرسایش ذخائر ژنتیکی و در نهایت انقراض نسل برخی گیاهان ارزشمند شود(1). در اصلاح گیاهان دارویی به طور کلی هدف بهنژادگر، تولید واریته هایی با عملکرد مناسب و دارای ماده موثره مطلوب با میزان قابل قبول می باشد. یکی از ویژگی های مهم دیگری که یک واریته گیاه دارویی باید دارای آن باشد، یکنواختی مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی است که این صفات در جمعیت های وحشی به علت دگرگشن بودن اکثر گیاهان دارویی، مشاهده نمیشود. در میان روشهای اصلاحی متداول برای گیاهان دارویی مثل سایر

محصولات کشاورزی، میتوان روشهای انتخاب(Selection) در توده‌های متنوع محلی، معرفی واریته های جدید از خارج (Introduction)، دورگ‌گیری برای ایجاد تنوع (Hybridization)، القاء جهش مصنوعی برای تولید ژنوتیپ های جدید (Mutation) و چندبرابر کردن تعدادکروموزوم ها (Polyploidization) را نام برد(2). انتخاب که اساسی ترین رکن بهنژادی گیاهان محسوب میشود کاملا به عامل تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت های گیاهی وابسته است. سبک های متعددی از انتخاب تاکنون ابداع شده است که انتخاب توده ای مثبت و منفی، انتخاب تک بوته، انتخاب بالک یا همگانی، انتخاب شجره ای و غیره از آن جمله اند. ما برای گزینش، نیاز به یافتن تفاوتها بین افراد هستیم که در حالت کلاسیک در تکنیک های مختلف انتخاب، از فنوتیپ به عنوان نشانگر تفاوت سود میجوییم. گزینش بر اساس فنوتیپ با یک مشکل بزرگ مواجه است و آن اثر متقابل محیط و ژن است یعنی در بسیاری موارد فنوتیپ صفات ظاهری و کمّی تحت تاثیر محیط قرار میگیرند(6). در ضمن، اندازه‌گیری و داده برداری از برخی صفات فنوتیپی (یا کموتیپی در گیاهان دارویی) بسیار سخت، زمان‌بر، پرهزینه و گاهی غیر قابل اعتماد است. مثلا در مورد گیاهان معطر، مقدار گیاه لازم جهت استخراج اسانس با روشهای متداول، حداقل 20 گرم ماده خشک از آن گیاه است که حتی در مواردی کل پیکر یک تک گیاه انتخاب شونده نیز کفاف این امر را نمیدهد. این یک مشکل بزرگ در انتخاب این نوع گیاهان میباشد. بنابراین در فرایند گزینش گیاهان برتر، باید به انتخاب غیرمستقیم متوسّل شویم. به عبارت دیگر به دنبال نشانگرهایی باشیم که با صفات فیتوشیمیایی پیوستگی داشته و ما را در این زمینه یاری کنند. این نشانگرها میتوانند مورفولوژیکی (ریختی) یا مولکولی باشند. در برخی مطالعات، نشانگرهای مورفولوژیکی ویژه‌ای با امکان اندازه گیری آسان، مانند قطر ساقه گزارش شده اند که مثلا در نعناع فلفلی، هم با درصد اسانس دارای همبستگی هستند و هم اندازه گیری آنها ساده است و ما میتوانیم گیاهان با درصد اسانس بالا را با استفاده از پیمایش اندازه قطر ساقه ردیابی کنیم(3).

نشانگرهای مولکولی

دانش زیست شناسی ملکولی در دو دهه اخیر با سرعت حیرت انگیزی باعث ایجاد تحولات بی شمار گردیده است. پیشرفت در تعیین تفاوتهای قابل ثبت DNA در موجودات زنده، زمینه مناسبی جهت مطالعات ژنتیکی فراهم آورده اند. شاید بهترین دستاورد این امر، یافتن نشانگرهای تفاوتهای ژنتیکی بین افراد باشد. طبق تعریف علمی، نشانگر ژنتیکی در واقع تفاوت موجود بین توالی ژنومی می باشد. در عین حال نشانگر ژنتیکی باید در دو فرد متفاوت باشد که توانایی تمایز بین آنها وجود داشته باشد و همچنین توانایی به ارث رسیدن داشته باشد که بتوان در چند نسل از آن استفاده کرد. امروزه با پژوهش های انجام شده، مشخص شده است که استفاده از نشانگر های مولکولی DNA به دلیل متاثر نبودن آنها از شرایط محیط رویش، سن و اندام گیاه مورد ارزیابی، روش مطمئنی جهت مطالعات ژنتیکی و اصلاحی می باشد. نشانگرهای مولکولی DNA خود به دو دسته مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) و غیر مبتنی بر آن تقسیم میشوند. امروزه بسیاری از این نشانگرها ابداع و توسعه یافته اند که هرکدام مزایا و معایبی دارند(4). در ایران مطالعات اولیه بر روی نشانگرهای ژنتیکی در سال 1976 شروع شد و در حال حاضر تلاش ها برای ردیابی نشانگرهای ژنتیکی جدید، جهت تهیه نقشه کامل ژنتیکی در اکثر گیاهان زراعی ادامه داشته و در اولویت قرار دارد.

کاربرد نشانگرهای مولکولی در اصلاح گیاهان دارویی

مطالعات شیموتاکسونومیکی (طبقه‌بندی گیاهان بر اساس ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه) تنها می‌توانند به عنوان معیار کیفی در مورد متابولیت‌های ثانویه، مورد استفاده قرار گیرند و برای تعیین کمّی این ترکیبات، استفاده از نشانگرهای ویژه (شیمیایی) که به‌کمک آن به آسانی بتوان گونه‌های گیاهان دارویی را از یکدیگر تشخیص داد، یک الزام است. یکی از عوامل مهمی که استفاده از پروفیل شیمیایی

را محدود می‌سازد، ابهام در داده‌های حاصل از انگشت‌نگاری شیمیایی (Chemical Fingerprinting) است. این ابهام، به این علت به وجود می آید که فاکتورهای دیگری، پروفیل شیمیایی یک گیاه را تغییر می‌دهند که از جمله این فاکتورها می‌توان فاکتورهای درونی چون عوامل ژنتیکی و فاکتورهای برونی چون روش های کاشت، داشت، زمان دقیق برداشت، تکنیک های مختلف خشک‌کردن و شرایط انبارداری گیاهان دارویی را ذکر نمود(5). برای اینکه یک ترکیب شیمیایی به‌عنوان یک نشانگر، جهت شناسایی یک گیاه دارویی خاص، مورد استفاده قرار گیرد، باید منحصر به همان‌گونهٔ گیاهی خاص باشد، در حالی‌که همهٔ گیاهان دارویی، دارای یک ترکیب شیمیایی منحصربه‌فرد نیستند. همچنین بین بسیاری از مولکول‌های شیمیایی که به‌عنوان نشانگر و یا ترکیب دارویی خاص مدنظر هستند، هم‌پوشانی وجود دارد؛ این موضوع در مورد ترکیبات فنولی و استرولی مشهودتر جلوه میکند.

همان‌طور که ذکر شد، در هرگیاه یک نشانگرشیمیایی منحصر به فرد را نمی‌توان یافت. مشکلی که در شناسایی گونه‌های گیاهان دارویی با استفاده از صفات مرسوم مرفولوژیک هم وجود دارد، علاوه بر تاثیر پذیری این صفات از محیط، وجود نام‌های گیاهشناسی متفاوت در مورد یک گیاه در نواحی مختلف جهان است. در این شرایط ممکن است گونه‌های گیاهان دارویی مفید، با گونه‌های دیگری که از لحاظ مرفولوژیکی به گیاه اصلی شبیه‌اند، اشتباه گرفته شوند. بنابراین، با توجه به مشکلات موجود در زمینهٔ شناسایی گیاهان دارویی با استفاده از روش‌های سنتی و با توجه به پیشرفت محققین در زمینهٔ ایجاد نشانگرهای DNA، استفاده از این تکنیک‌های نوین می‌تواند ابزاری قدرتمند در شناسایی گونه‌های دارویی محسوب شود. از جمله مزایای نشانگرهای DNA، عدم وابستگی به سن و شرایط فیزیولوژیکی و محیطی گیاه دارویی است. پروفیلی که از انگشت نگاری DNA یک گیاه دارویی به‌دست می‌آید، کاملاً به همان گونه اختصاص دارد. همچنین برای استخراج DNA به‌عنوان مادهٔ آزمایشی در آزمایشات نشانگرهای مولکولی، علاوه بر بافت تازه، می‌توان از بافت خشک نیز استفاده نمود و از این رو، شکل فیزیکی نمونه برای ارزیابی آن گونه، اهمیت ندارد. تعداد زیادی نشانگر DNAتاکنون ابداع شده و توسعه یافته اند که از آن جمله می‌توان به روش‌های مولکولی مبتنی بر هیبریداسیون مانند(RFLP) ، روش‌های مبتنی بر RCR مانند (SSR, ISSR, AFLP,RAPD) و روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی مانند (ITS) اشاره کرد. برخی موارد کاربرد نشانگرهای DNA در زمینهٔ گیاهان دارویی:

الف - پیمایش تنوع ژنتیکی و تعیین ژنوتیپ (Genotyping)
ب- تعیین هویت دقیق گونه درشناسایی گیاهان دارویی (Authentication)
ج- انتخاب کموتایپ‌های (Chemotype) مناسب به‌کمک نشانگر

را میتوان نام برد(9,7،8).

انتخاب هدایت شده با نشانگر (Marker Assisted Selection: MAS)

یکی از از استراتژی های مهم در برنامه های اصلاحی، شناسایی نشانگرهای مولکولی در گیاه هدف است به طوریکه این نشانگرها با صفات مهم اقتصادی پیوستگی داشته باشند و ما را در انتخاب گیاهان برتر یاری دهند(10). به کارگیری نشانگرهای مولکولی، بهنژادگر را قادر میسازد تا به جای انتخاب در مزرعه، گزینش را در آزمایشگاه انجام دهد. مارکر یا نشانگر مولکولی عبارتست از تفاوت در توالی

نوکلئوتیدهای DNA که این تفاوت دارای توارث مندلی است این قطعه ویژه متعلق به ژن یا ژنهائی‌است که بطور معنی‌داری در تنوع بین گیاهان سهیم هستند و در نتیجه ممکن است بین قطعه‌ویژه‌ای که نتاج از والدین دریافت می‌نمایند و عملکرد نتاج، یک ارتباط مشاهده شود. در نتیجه می‌توان نتاج را براساس قطعه کروموزومی که از والدین دریافت کرده‌اند انتخاب کرد. بنابراین خود نشانگر معمولا روی عملکرد گیاه بی‌تاثیر است ولی‌پیوستگی آن با یک ژن تاثیرگذار روی عملکرد گیاه یا توالی مجاور متصل به QTL مربوطه، آن را ارزشمند می‌کند. ما با استفاده از نشانگر ژنتیکی مستقیما تنوع ژنتیکی را پیمایش میکنیم و با شناسائی تنوع در سطح DNA قادر خواهیم بود تفاوت صحیح ژنتیکی دو فرد را بررسی کنیم. راه حل مناسب ترکیب اطلاعات حاصل از نشانگرهای ژنتیکی و فنوتیپ ها استفاده از روشهای آماری ویژه می‌باشد(12,11, 10). استفاده از نشانگرهای مولکولی در فرایند انتخاب باعث افزایش دقت و کاهش فاصلهِ نسل ها و نهایتا افزایش پاسخ به انتخاب می‌گردد. مزیت انتخاب به کمک نشانگر در یک صفت نسبت به روشهای انتخاب براساس فنوتیپ، بستگی به وراثت‌پذیری صفت دارد.

انتخاب براساس نشانگر در موارد زیر مفید است:

1- وراثت پذیری صفت کم باشد. 2- صفت در ابتدا یا اواسط زندگی گیاه بروز کند. 3- صفاتی که اندازه‌گیری آن مشکل و پرهزینه است. 4- اطلاعاتی از والدین جمعیت حاضر موجود نباشد.

نقطه ضعف انتخاب براساس نشانگر فقط در احتمال نوترکیبی است که سودمندی آن را کاهش می‌دهد. از سه راه کلی اطلاعات مستقیم بدست آمده از سطح ژنها، در برنامه‌های اصلاحی موثِراست: 1- نشانگرها می‌توانند فاصله نسلی را کاهش دهند و اجازه دهند که انتخاب در مراحل زودتری از زندگی صورت گیرد. 2- دقت انتخاب را با فراهم کردن اطلاعات بیشتر برای تخمین افزایش می دهد. 3- نشانگر شدت انتخاب را افزایش داده و اجازه انتخاب کاندیدهای اصلی را از میان تعداد زیادی‌کاندیدا برای انتخاب فراهم می‌کند.

پیش‌بینی غلظت مادهٔ شیمیایی فعال گیاهی نیز برای کنترل کیفی یک گیاه دارویی مهم است. شناسایی نشانگرهای DNA که با مقدار آن ترکیب دارویی خاص، همبستگی دارند، می‌تواند جهت کنترل کیفی و کمی مواد گیاهی، مؤثر واقع شود. تفاوت بین کموتایپ‌های مختلف یک گیاه دارویی، مقدار مادهٔ شیمیایی فعال آنها است. همچنین،داده های حاصل از نشانگرهای DNA می‌توانند جهت تعیین روابط فیلوژنتیکی (خویشاوندی) بین کیموتایپ‌های مختلف یک گونه گیاه دارویی به‌کار روند. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی به‌منظور تعیین رابطهٔ بین نشانگرهای DNA و تنوعات کمی وکیفی ترکیبات فعال دارویی در بین گونه‌ها و خویشاوندان نزدیک گیاهان دارویی، صورت گرفته و یا در حال انجام است. از طرفی، به‌کارگیری توأم تکنیک‌های مولکولی و تکنیک‌های آنالیزی دیگر، چون GC، TLC و HPLC ، می‌تواند شناخت ما را نسبت به یک گونهٔ دارویی خاص و به تبع آن کنترل کیفی و کمی ترکیب دارویی مورد نظر در سطح تجاری، افزایش دهد.

مطالعه موردی: پیوستگی نشانگرهای مولکولی با ترکیبات تیمول و کارواکرول در اسانس مرزنجوش

مرزنجوش *Origanum vulgare* L. یک گیاه معطر، ادویه ای و دارویی از خانواده نعناع *Lamiaceae* می باشد که به علت دارا بودن خواص ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی ، در صنایع غذایی و دارویی کاربرد فراوان دارد. در میان اهداف به نژادی از دیدگاه دارویی در گیاه مرزنجوش، بالا بردن بازده محصول اسانس و افزودن درصد مونوترپن های کارواکرول و تیمول، همواره مورد توجه اصلاحگران این گیاه بوده است(5). در مطالعه ای که نویسنده و همکاران انجام دادند(9) تعداد چهل و دو مرزنجوش ثبت شده در ژرم پلاسم اروپا

واقع در گترزلبن کشور آلمان با استفاده از دو نشانگر مولکولی AFLP و SAMPL مورد بررسی قرارگرفت. تعداد سه آغازگر برای هرکدام از این نشانگر ها جهت پیمایش ژنوم انتخاب شد. همچنین اسانس تمام گیاهان استخراج و مورد آنالیز قرار گرفت. هدف از پژوهش، یافتن هرگونه پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی AFLP و SAMPL و ترکیبات اسانس گیاه مرزنجوش بود. در مجموع 477 باند چندشکل شامل AFLP 214 و SAMPL 263 یافت شد. با استفاده از آنالیز GC-MS اسانس ها مجموعا 18 ماده اصلی شناسایی شد که در اکثر اسانس ها کاواکرول و تیمول مواد غالب اسانس بودند. به منظور بررسی وجود پیوستگی بین نشانگر های مولکولی و ترکیبات اصلی اسانس از نرم افزار TASSEL با 5 مدل آماری رگرسیون (3 مدل خطی عمومی و 2 مدل خطی ترکیبی) استفاده شد(12). نتایج نشان داد که از میان تمام 477 نشانگر مولکولی بررسی شده، مجموعا هفت نشانگر شامل AFLP 3 و SAMPL 4 با کارواکرول و تیمول موجود در اسانس مرزنجوش پیوستگی دارند. که در میان این نشانگرها، SAMPL-3_60 پیوستگی قابل ملاحظه‌ای با درصد تیمول در اسانس دارد که می تواند جهت مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد. نشانگر SAMPL-3_60 در همه پنج مدل آماری به کار رفته پیوستگی معنی داری با واریانس فنوتیپی صفت درصد تیمول در اسانس نشان داد(جدول 1). بنابراین پیشنهاد میشود این نشانگر در برنامه های اصلاحی گیاهان دارویی خانواده نعناع جهت پیشبرد روشهای هوشمند و استراتژی های انتخاب هدایت شده با نشانگر (Marker Assisted Selection: MAS) مورد استفاده آزمایشی قرار گیرد. یافته های این نوع پژوهش ها می توانند در اصلاح به روش انتخاب هدایت شده با مارکر های مولکولی برای گیاهان دارویی خانواده نعناع کاربرد داشته باشند.

جدول 1- R^2 بخشی از واریانس فنوتیپی دو صفت درصد کارواکرول و درصد تیمول اسانس که با نشانگر ها قابل توجیه هستند

Locus	CAC					THC				
AFLP-2_31	0,13	0,1	0,08	0,09	0,03					
AFLP-2_44	—	0,15	0,1	0,09	0,02	—	0,17	0,17	0,13	0,03
AFLP-3_6						0,19	0,12	—	0,1	0,1
SAMPL-3_43						0,15	0,16	0,14	0,1	0,07
SAMPL-3_49						0,1	0,16	0,12	0,08	0,05
SAMPL-3_55						0,18	0,14	0,13	0,08	0,07
SAMPL-3_60						0,23	0,19	0,19	0,17	0,09

The R2 values ,, the significance of marker at $P < 0.01$

CAC carvacrol content *THC* thymol content

منابع

1- Canter PH, Thomas H, Ernst E (2005) Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. Trends Biotechnol 23: 180–185

2- Bernáth J (2002) Strategies and recent achievements in selection of medicinal and aromatic plants. Acta Hort 576: 65–68

3- Mirzaie-Nodoushan H, Rezaie MB, Jaimand K (2001) Path analysis of the essential oil-related characters in Mentha spp. Flavour Fragr J 16: 340–343

4- Azizi A, Wagner C, Honermeier B, Friedt W (2009) Intraspecific diversity and relationships among subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. Plant Syst Evol 281: 151–160

5- Franz C, Novak J (2002) Breeding of Oregano. In: Kintzios SE (ed.) Oregano: The Genera *Origanum* and Lippia. Medicinal and Aromatic Plants, Industrial Profiles 25. Taylor & Francis/CRC Press, USA, pp 163–175

6- Curado MA, CBA Oliveira, JG Jesus, SC Santos, JC Seraphin, PH Ferri (2006) Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of Lychnophora ericoides. Phytochemistry 67: 2363–2369

7- Achleitner A, Tinker NA, Zechner E, Buerstmayr H (2008) Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits. Theor Appl Genet 117: 1041–1053

8- Li Y, Li Y, Wu S, Han K, Wang Z, Hou W, Zeng Y, Wu R (2007) Estimation of multilocus linkage disequilibria in diploid populations with dominant markers. Genetics 176: 1811–1821

9- Azizi A., Hadian J., Gholami M., Friedt W., and Honermeier B. (2012) Correlations between Genetic, Morphological, and Chemical Diversities in a Germplasm Collection of the Medicinal Plant *Origanum vulgare* L. Chemistry and Biodiversity 9: 2784– 2801

10- Xu Y. and Crouch J. H. (2008) Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. Crop Sci. 48:391–407

11- Collard B.C. Y. and Mackill D.J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Phil. Trans. R. Soc. B 363 , 557–572

12- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23: 2633–2635