جزوهٔ درسی

اصلاح گیاهان دارویی (۲)

(اصلاح مولکولی)

استاد درس: دکتر شکرپور

(دانشگاه تهران ـ پردیس کشاورزی و منابع طبیعی)

Agrisoft.ir

agrisoft

agrisoft.ir

کد فایل: ۰۰۳۴

به نام خدا

دکتر مجید شکرپور

- رتبه علمی: استادیار
- دانشگاه: تهران (پردیس کشاورزی و منابع طبیعی)
- دانشکده: علوم و مهندسی کشاورزی
- گروه دانشگاهی: مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز
- تخصص: اصلاح نباتات – ژنتیک بیومتری ـ اصلاح گیاهان دارویی– تنشهای زیستی و غیر زیستی

پیشگفتار

طی چند سالی که از فعالیت گروه اگریسافت می‌گذرد، مایهٔ افتخار ماست که مخاطبانی از دانشگاه‌ها و برخی مراکز علمی ـ تحقیقاتی کشور داریم. بسیار خرسندیم که این اثر را مورد مطالعه و استفاده قرار می‌دهید. حدالامکان سعی کردیم اصطلاحات و اسامی علمی بکار رفته در جزوهٔ دستنویس را با مراجعه به منابع مختلف (کتاب، جزوه، اینترنت و...) تصحیح نماییم.

هرگونه انتقادات و پیشنهادات خود و همچنین اشکالات موجود در این محصول را به شماره تماس موجود در سایت، تلگرام/پیامک نمایید و یا از طریق بخش نظرات ارسال فرمایید و ما را در رفع نقایص موجود یاری فرمایید.

در پایان ضمن آرزوی سلامتی و طول عمر برای این استاد گرانقدر، و همچنین موفقیت شما مخاطب عزیز در مراحل مختلف تحصیلی، امیدواریم در حین استفاده از این اثر، رضایت کافی از کیفیت و کمیت آن داشته باشید.

گروه نرم افزاری ـ کشاورزی اگریسافت

تذکر:

ـ تمام حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به سایت اگریسافت بوده و هرگونه استفاده تجاری (اعم از کپی فایلهای بارگذاری شده در سایت، بارگذاری آن در سایت‌های دیگر و یا فروش آنها به هر نحو) ممنوع می‌باشد.

ـ در صورتی که این جزوه از منبعی (سایت، وبلاگ و...) به غیر از سایت اگریسافت به دست شما رسیده است، شخص خاطی را از طریق تماس با شماره تلفن موجود در سایت یا تلگرام به ما معرفی کرده و در قبال آن محصولات دلخواه خود را به رایگان دریافت نمایید.

http: //agrisoft.ir
https: //telegram.me/agrisoft
Copyright©1399

به نام خدا

فهرست عناوین

انواع پروب ۵
۱. پروبهای اختصاصی یک مکان ژنی Locus Specific Probes ۵
۲. پروبهای چند مکانی Multilocus ۵
تکنیک VNTR ۶
معایب: ۶
تکنیک PCR ۶
مراحل واکنش PCR ۷
مزایای RAPD ۸
معایب RAPD ۸
تکنیک SCAR ۹
مزایای SCAR ۹
معایب ۱۰
تکنیک CAPS (PCR-RFLP) ۱۰
مزایا: ۱۰
نشانگرهای microsatellite (نشانگرهای SSR, SSLP, STMS) ۱۰
ویژگی‌ها ۱۱
مارکر ISSR (inter simple sequence repeat) ۱۲
آخرین تکنیک: AFLP (amplified fragment length polymorphism) ۱۳
کاربرد نشانگرهای DNA در گیاهان دارویی ۱۴
استاندارد کردن و گواهی کردن گیاهان دارویی ۱۵
اصلاح گیاهان دارویی ۱۷
هدف اصلاح نباتات ۱۷
برخی از اهداف اصلاحی در گیاهان دارویی ۱۸
مشکلات در اصلاح گیاهان دارویی ۱۸
روشهای اصلاحی گیاهان دارویی به طور گذرا ۱۹
الف. تنوع ۱۹
چگونه تنوع ایجاد کنیم؟ ۱۹
۱. اصلاح ترکیبی از طریق تلاقی ۲۰
۲. تلاقی برگشتی تکراری ۲۰
۳. اصلاح هیبرید یا تولید ارقام هیبرید ۲۱
۴. ارقام سنتتیک ۲۲
۵. جهش القایی ۲۴
۶. تنوع سوماکلونال ۲۴
۷. هیبریداسیون سوماتیکی (الحاق پروتوپلاست) ۲۵

۸. انتقال ژن ملکولی ۲۵
روش‌های انتقال ژن ۲۶
ب. گزینش selection ۲۶
۱. گزینش توده‌ای mass selection ۲۶
۲. گزینش دوره‌ای ۲۶
۳. گزینش انفرادی با آزمون نتاج ۲۷
اصلاح گیاهان apomicts breeding ۲۸
مزایای استفاده از Apomixy ۲۸
چارچوب اصلاحی گیاهان آپومیکت ۲۹
flow cytometric seed screening (FCSS) ۳۰
اصلاح کلونی clonal breeding ۳۲
پاسخ به گزینش selection response ۳۳
عوامل بهبود پاسخ به گزینش ۳۳
گزینش زودهنگام early selection ۳۴
هاپلوئیدهای مضاعف شده double haploids ـ ۸۹/۲/۲۹ ..... ۳۵
روش‌های شناسایی خصوصیات افراد یا صفات افراد ۳۵
۱. روش‌های تجزیه‌ای سریع ۳۶
اصلاح برای مقاومت به آفات و بیماری‌ها ۳۷
۱. اولین گام: آزمون مقاومت ← آلوده کردن گیاهان ۳۸
۲. بررسی شدت حساسیت و یا شدت آلودگی در گیاهان مورد بررسی ۳۸
نتیجه مطالعات وراثت پذیری در گیاهان دارویی ۴۰
مثال‌ها ۴۱
تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط‌های کنترل شده ۴۱
بیورآکتورها Bioreactor (fermaentor) ۴۲
تحریک elicitation ۴۵
تنش فیزیکی physical stress ۴۷
غیر متحرک کردن یا ثابت کردن immobilization ۴۷
تبدیل زیستی Biotransformation ۴۹

انواع پروب prob ← cDNA و gDNA بودند.

انواع پروب

۱. پروبهای اختصاصی یک مکان ژنی Locus Specific Probes

یعنی یک یا چند ناحیهٔ خالی از ژنوم را شامل می‌گردند، در صورت استفاده از این پروبها نشانگرها هم بارز خواهند بود.

در RFLP بیشتر از این‌ها استفاده می‌گردد.

۲. پروبهای چند مکانی Multilocus

از بخشهای مربوط به بخشهای تکراری پی در پی تشکیل می‌گردند.

Tandem repeat:
- minisatellaite
- microsatellites (SSRs) (ریزماهواره)

این نواحی چند شکلی بالایی دارند و استفاده از این نواحی الگوی نواربندی پیچیده‌ای را ایجاد می‌کند، با وجودی که این نواحی خیلی متغیرند و اختصاصی برای افراد می‌باشند ولی نشانگرهای مربوط به پروبهای مولتی لوکوس اغلب به صورت غالب امتیازدهی می‌گردند؛ چون باندها آنقدر زیاد است که روابط اللی را نمی‌توان به راحتی تشخیص داد. مثال: پروب (GATA) که خیلی رایج می‌باشد.

RFLP ⇨ VNTR
RFLP → prob locus specific
variable number of tandem repeat (VNTR) → multilocus

الگو به صورت کیفی و غالب و مغلوبی می‌باشد. (باندها به صورت ۱و۰ هستند.)

در این تکنیک‌ها با استفاده از آنزیمهای برشی مختلف می‌توان چند شکلی‌های مختلفی بدست آورد. عواملی که باعث چند شکلی می‌شوند:

۱. جهشهای نقطه ای

۲. اختلاف در طول قطعات (حذف یا درج یک قطعه)

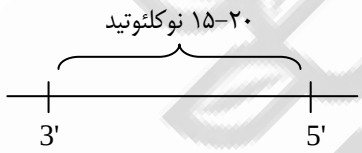
۳. ناشی از تفاوت افراد در محل اتصال کاوشگر می‌باشد.

۴. الگوی نواربندی برای تعیین اللی و مکانهای ژنی نمی‌توان به کار برد.

برای رفع مشکل تکرارپذیری از یک راهکار می‌توان استفاده کرد. این راهکار هنگامی است که در تکنیک RAPD تشخیص داده شود که یک نوار از RAPD با یک صفت خاصی ارتباط داشته باشد، می‌توان تکنیک (مارکر) RAPD را به تکنیک دیگری بنام SCAR (ناحیهٔ تکثیر شده با توالی مشخص) تغییر داد.

تکنیک SCAR

در تکنیک SCAR یک مارکر غالب مانند RAPD را به یک مارکر همبارز بنام SCAR تبدیل می‌کنیم. به عبارت دیگر، اگر یک نوار رپید با صفت خاصی در ارتباط باشد، یعنی در افراد مقاوم نوار موجود بوده، ولی در افراد حساس وجود نداشته باشد، قطعهٔ مورد نظر را از ژل جدا و نوار را از دو انتها ('3 یا '5) توالی یابی می‌کنند. معمولا از ۲ انتها ۳۰-۱۵ نوکلئوتید عمل توالی یابی را انجام می‌دهند. در نهایت یک جفت آغازگر که مکمل با انتهاهای '3 و '5 می‌باشد طراحی می‌گردد. طول پرایمر بستگی به فعالیت قطعات تولید شده در RAPD دارد. و چون یک مکان ژنی خاص را بررسی می‌کند، نشانگر همبارز می‌باشد.



مزایای SCAR

ـ تکرارپذیر است.

ـ طول پرایمرها بالا ← دمای اتصال بالا ← تولید نوار غیر اختصاصی کاهش می‌یابد.

ـ پرایمر SCAR به ناحیه خاصی از ژنوم مربوط است ← به هرجایی که مکمل بود مثل رپید نمی‌چسبد.

ـ به علت همبارز بودن تشخیص اللها امکانپذیر است.

معایب

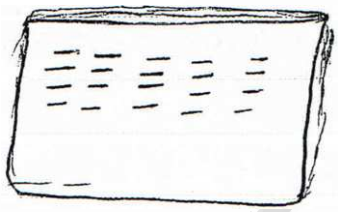
دانستن قطعه نوکلئوتیدی پرایمر مورد نظر.

اگر پرایمرهای طراحی (هر دو) یک محل را که همپوشانی دارد تکثیر کند، غیر از ناحیهٔ اختصاصی به جای دیگری از ژنوم هم بتوانند متصل شوند در این صورت SCAR غالب خواهد شد و دیگر همبارز نیست.

تکنیک CAPS (PCR-RFLP)[1]

گاهی اوقات زمانی که PCR انجام می‌شود افراد از نظر الگوی نواربندی اختلافی ندارند ولی از نظر خیلی صفات متفاوت هستند.

بعد از عمل PCR، محصول واکنش PCR را با یک یا ۲ آنزیم برشی هضم می‌کند. اگر اختلاف افراد از نظر طول قطعات نباشد ولی از نظر توالی متفاوت باشند، جایگاه‌های برشی متفاوتی خواهند داشت؛ لذا الگوی نواربندی پس از برش آنزیمی، چند شکلی نشان خواهد داد.



با PCR قطعات kb ۲-۰/۵ سنتز می‌گردد. و بایستی با یک آنزیم ۴ بازبُر برش داد.

مزایا:

یک نشانگر همبارز است و مزایای RFLP و PCR را دارد.

تکنیک ساده بوده و پرهزینه نمی‌باشد.

کابرد: تهیهٔ نقشه ژنی و طبقه بندی ژنوتیپی و....

نشانگرهای microsatellite (نشانگرهای SSR, SSLP, STMS)

هر سه مترادف می‌باشند. بیش از ۹۰ درصد ژنوم را در گیاهان در واقع توالی‌های تکراری تشکیل می‌دهند.

[1] . cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) : تفاوت ردیف تکثیری شکسته شده. یک نوع تنوع در طول قطعات DNA می‌باشد که از طریق هضم آنزیمی محصولات PCR حاصل می‌شوند. (اگریسافت)

در صورتی که تنوع ژنتیکی محدود گردد در اینجا نیاز می‌باشد که تنوع جدید ایجاد گردد و ژنهای جدید یا کمپلکس‌های ژنی به جمیعت وارد گردد. برخی از روش‌های مرسوم عبارتند از:

۱. اصلاح ترکیبی از طریق تلاقی

اصلاح مبتنی بر هیبریداسیون (بالک و...). هدف از تلاقی ترکیب تظاهر صفات والدینی در نتایج مشترک، (نتاج برتر از والدین یا تفکیک متجاوز).

A × B

F1

⊗

↓

F2 → حداکثر تنوع

در تلاقی‌ها دانهٔ گرده به کلاله منتقل می‌گردد.

گیاهان الیت یا گیاهان خاصی که در تلاقی‌ها مورد توجه می‌باشند. در نسلهای تفرق یافته نیز بایستی گزینش گردد بطوریکه از طریق گزینشهای تکراری پایداری در میان صفت ایجاد گردد. این روند بیشترین استفاده را در اصلاح گیاهان دارویی به منظور ایجاد تنوع جدید دارد.

۲. تلاقی برگشتی تکراری

یکی دیگر از روشهای اصلاح ترکیبی می‌باشد. recurrent back crossing

در گیاهان دگرگشن ← هیبرید

اصلاح مبتنی برتلاقی هیبریداسیون

در گیاهان خودگشن ← لاین (رقم خالص)

اگر گیاهی داریم که تنوع ندارد و یک جمعیت را تصادفی پیدا کردیم، رقم خوبی را پیدا کرده، مثلا وارد می‌کنیم و آن را که مطلوب می‌باشد با قبلی تلاقی می‌دهیم.

در این روش انتقال یک صفت را از یک رقم به رقم دیگر انجام می‌دهیم. در این روش، ژنوم یک والد که به آن والد گیرنده می‌گویند، توسط چندین چرخهٔ تلاقی در ژنوم نتاج تثبیت می‌گردد. ژنوم نتاج به جز ژنهای کد کنندهٔ صفت نامطلوب مورد نظر، دارای سایر بخشهای ژنومی والد اولیه می‌باشند

در اصلاح هیبرید به ویژه در گیاهان دگرگشن، نیاز به لاینهای دارای نرعقیمی ژنی سیتوپلاسمی می‌باشد تا از هزینهٔ زیاد اخته کردن گیاهان مادری و نیز گرده افشانی توسط گیاهان پدری تا حد زیادی کاسته شود.

بذر استریل یا عقیم		گرده دهنده
msms (S)	×	MsMs (N)
	↓	
hybrid seeds	F1	pollinator line seeds

۱. لاین نرعقیم؛ ۲. لاین گرده دهنده؛ ۳. لاین نگهدارنده.

لاین نگهدارنده: msms (N) ← هدف تولید افراد نرعقیم

N : نرمال ← برای اینکه بتواند گرده تولید کند.

msms (S) نرعقیم ماده (سیتوپلاسم دهنده)	×	لاین نگهدارنده نر (N)

برای تولید تجاری بایستی :

msms (S)	×	MsMs (N)
	↓	

... ایجاد می‌گردد (دیگر سیتوپلاسم اهمیت ندارد)

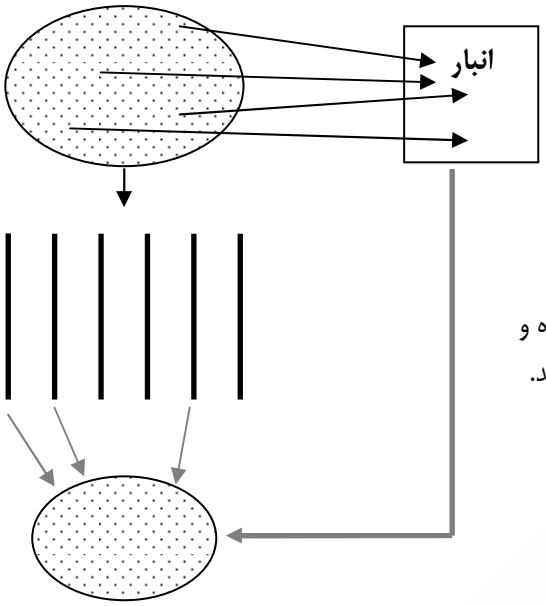
۴. ارقام سنتتیک

در مورد ارقام هیبرید تنها از قابلیت ترکیب ۲ تایی بهره برداری می‌کنیم (در F1). در حالیکه در ارقام سنتتیک یا مصنوعی چندین لاین قابلیت ترکیب پذیری خوب مورد استفاده قرار می‌گیرد. از طرفی در اینجا علاوه بر نسل ۵ از نسلهای پیشرفته یا بعدی نیز برای تولید استفاده می‌گردد.

ارقام سنتتیک: تولید ارقام مصنوعی. در اینجا دو لاین خوب نداریم و ویژگی مورد نظر وجود ندارد. ۳۰-۲۰ لاین می‌توان انتخاب کرد که مجموعهٔ اینها تولید لاینی با ترکیب خوب می‌کند.

تعداد بالا از افرادی که مطلوبند (۵۰) انتخاب می‌شوند و انتخاب براساس ترکیب پذیری عمومی صورت می‌گیرد.

ترکیب پذیری عمومی: آن لاین در ترکیب با سایر لاینها ارزش خود را آشکار کند.



گرده افشانی غیر کنترلی طی آزمون نتاج رخ می‌دهد؛ بنابراین بذور ذخیره‌ای برای مراحل بعدی استفاده می‌شود.

اصلاح گیاهان apomicts breeding

آپومیکسی تشکیل بذر غیر جنسی بدون ترکیب دو گامت می‌باشد. در عمل، تکثیر رویشی به حساب می‌آید. به طوری که کلیهٔ نتاج ساختار ژنتیکی یکسان مانند والد مادری یا گاهی والد پدری دارند.

مزایای استفاده از Apomixy

۱. نیازی به خالص سازی ژنوتیپ‌ها نمی‌باشد؛

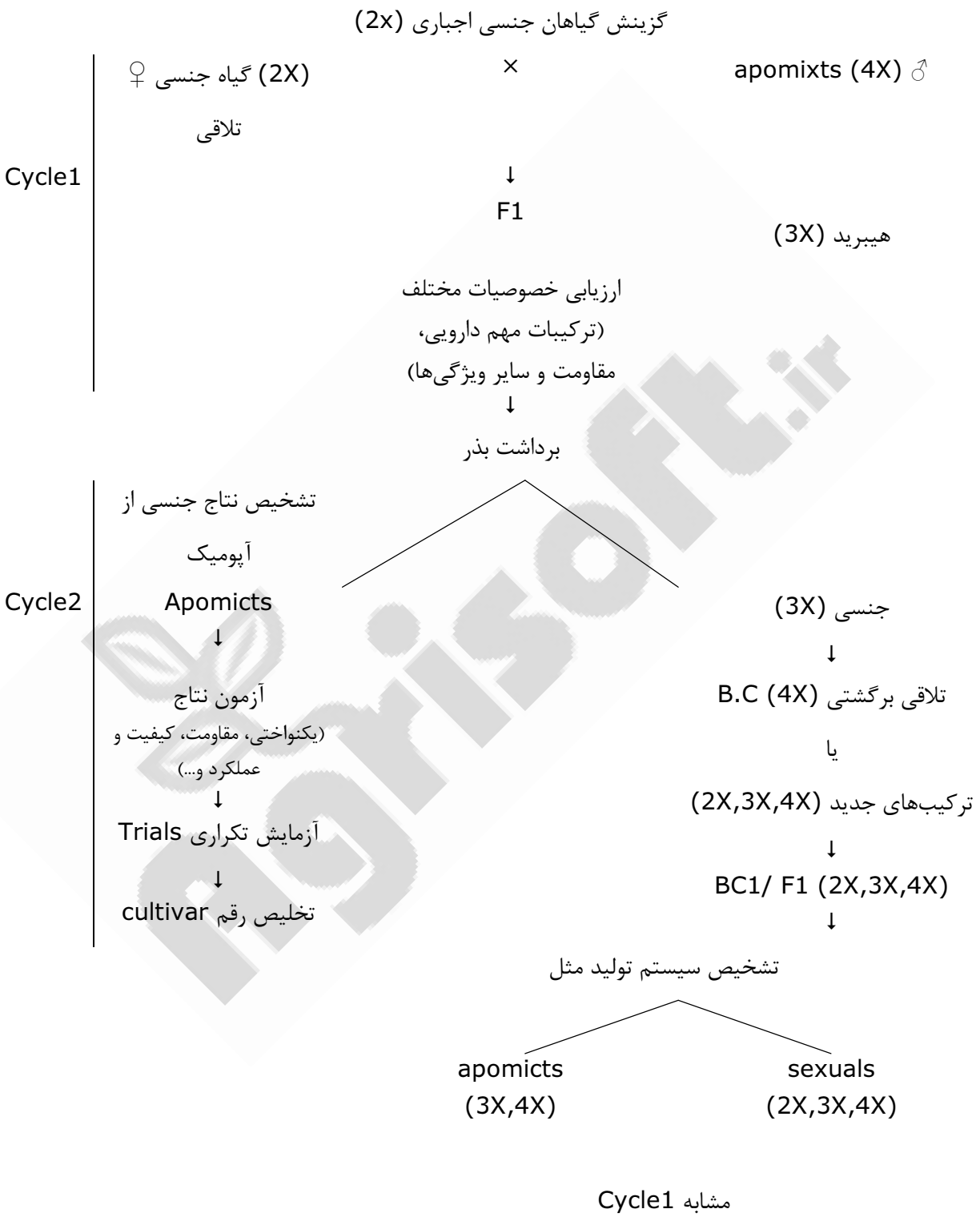
۲. هزینهٔ کمتری برای آزمون نتاج تلاقی‌ها لازم می‌باشد؛

۳. اثرات هیبرید یا هتروزیس را می‌توان تثبیت نمود؛

۴. تولید بذر ارقام هیبرید کم هزینه خواهد بود.

مهمترین عیب: اصلاح ترکیب مشکل است؛ چون لاینهای جنسی قبلا بایستی تولید شده باشند. به عبارت دیگر: پیچیده و مشکل بودن استفاده از آنها در روشهای اصلاحی که مبتنی بر تلاقی یا ترکیب ژنوتیپ‌ها است چون لاین‌های جنسی باید از قبل تهیه شود.

چارچوب اصلاحی گیاهان آپومیکت

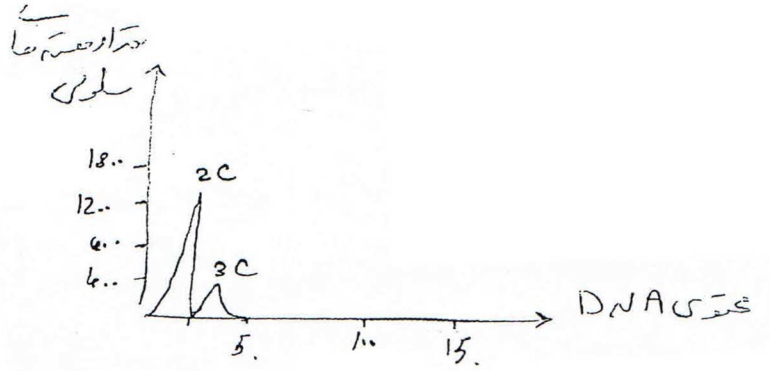


محتوای DNA جنین و آندوسپرم بستگی به سطح پلوئیدی گیاه در هنگام کاهش میوزی گامتها و وقوع لقاح سلول تخم و هسته‌های قطبی که آندوسپرم را ایجاد می‌کند دارد.

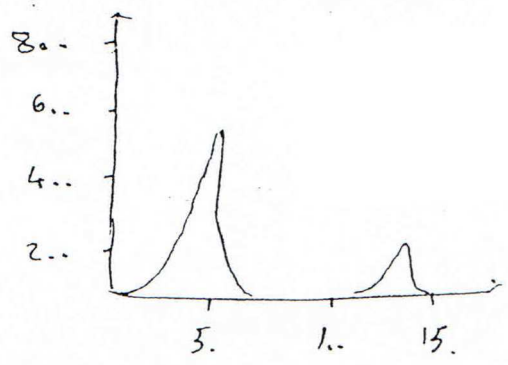
... و آپومیکت دارای کیسه جنینی کاهش نیافته است.

در گل راعی، C-Value جنین و هسته‌های قطبی به ترتیب ۴ و ۲ است. اما پس از گرده افشانی جنین دارای C-Value برابر با ۲ و هسته‌های قطبی برابر با ۵ می‌گردد.

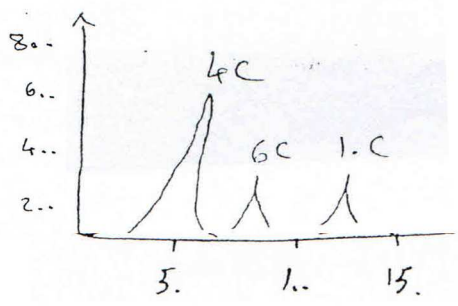
C-Value هسته‌های سلولی جداسازی شده در بذور گل راعی را می‌توان با استفاده از flow cytometry اندازه گیری نمود. سپس داده‌ها را به صورت یک نمودار نشان می‌دهد.



تولید مثل جنسی



obligate apomicts



facultative apomicts

۴. روش الایزا

enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

برای بررسی بسیاری از ترکیبات دارویی بسیار مفید بوده. در این روش نمونه‌ها را در کوت (cuvette) قرار می‌دهند و در معرض منبع نور تنگستن قرار می‌گیرد. پس از کالیبراسیون، تخمین میزان ماده مورد بررسی از میزان طیف مادون قرمز منعکس شده انجام می‌گیرد.

چون غیر تخریبی است بسیار مورد توجه می‌باشد.

۵. روش solid phase microextraction (SPME)

در گیاه oenothera lamarckiana میزان چربی بذور اندازه گیری شده، بدون اینکه به بذور صدمه‌ای وارد گردد. ترکیبات فرار که از ماده گیاهی تخریب می‌شود توسط یک سوزن ظریف جذب شده و سپس در در فضای یک دستگاه GC قرار گرفته و در نهایت مواد تخریبی آنالیز می‌شود. در اینجا نیز مثل روش قبل، مقادیر حداقل از مواد گیاهی برای آنالیز مورد نیاز است.

۶. اسپکتوفتومتری رنگ

رنگ یک صفت و کیفیت مهم در گیاهان دارویی است که تحت کنترل ژنتیکی نیز قرار دارد و از طریق اصلاح قابل تغییر است.

اندازه گیری اسپکتوفتومتری رنگ، روش آلترناتیو (جایگزین) به جای ارزیابی‌های ظاهری خواهد بود. این روش نیز سریع و غیر تخریبی است. مثال:

داروی حاصل از گیاه مرزنگوش Marjoram است که در صنعت فراوری دارویی به رنگ سبز روشن از گیاه فوق مورد توجه است. با استفاده از این روش و ارزیابی بصری، برگهای بوته‌های مختلف این گیاه بررسی شده و نتایج نشان داد که این روش به طور مؤثری قادر به تشخیص رنگ‌های مورد نظر بوده است.

اصلاح برای مقاومت به آفات و بیماری‌ها

گیاهان دارویی نیز مورد حمله قرار می‌گیرند؛ لذا اتلاف عملکرد و کاهش کیفیت در آنها نیز صورت می‌گیرد. بنابراین اصلاح ارقام مقاوم، یک هدف مهم بویژه در جهت کاهش استفاده از روشهای شیمیایی کنترل پاتوژن‌ها است.

اگر واریانس غالبیت بالا باشد ← تهیه لاین‌ها ← زیرا پس از تهیه لاین‌های خوب با تلفیق آنها، هیبریدهای مناسب بدست می‌آید.

$$V_a = V_A + V_D$$

$$h_N^2 = \frac{V_A}{V_P}$$

$$h_B^2 = \frac{V_a}{V_P}$$

مثال‌ها

زیره سیاه : میزان وراثت پذیری اسانس ۸۵درصد $=h^2$ برآورده شده است. البته اثر متقابل ژنوتیپ با محیط نیز بررسی شد. یعنی ژنوتیپ‌ها در محیط‌های متفاوت بررسی شد و عملکردشان متفاوت بود.

در وراثت پذیری عمومی $h^2 = \frac{V_a + V_{aE}}{V_P}$ بالاتر می‌باشد.

حتما بررسی‌ها باید در چند محیط (چند نسل، چند مکان و در شرایط متفاوت محیطی) انجام شود.

در سنبل الطیب، میزان وراثت پذیری سزکوئی ترپن‌های سیکلوپنتان که عمدتاً شامل اسید والریک valeric acid و valernal است وراثت پذیری آنها ۰/۹۱-۰/۸۱ بوده است. در مورد سنبل الطیب مشاهده شده که واریانس غالبیت نسبت به واریانس افزایشی بیشتر بود ← پاسخ به گزینش کارایی کافی را ندارد.

$$V_D \geq V_A$$

تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط‌های کنترل شده

اصولاً در بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، سعی بر آن است که از تکنیک‌های بیوتکنولوژی استفاده شود ؛ چون این تکنیک‌های مزایای ویژه‌ای را در ارتباط با متابولیت‌های ثانویه