دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.116113.2181
جلد ۳۴، شماره ۴، صفحه ۶۸۳- ۶۷۲ (۱۳۹۷)

تنوع ژنتیکی و مقایسه صفات فیزیکوشیمیایی سه جمعیت خیار آب‌پران (*Ecballium elaterium* (L.) Rich.) واقع در استان اردبیل

علیرضا قنبری[۱*]، رحیم موید امینی[۲]، اصغر استاجی[۳]، سمیه فهیم[۴] و حسن قربانی قوژدی[۵]

۱*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

پست الکترونیک: ghanbari66@yahoo.com؛ ghanbari66@uma.ac.ir

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳- دانشجوی پسادکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۵- مربی، گروه مهندسی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی گناباد، گناباد، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۷

چکیده

خیار آب‌پران (*Ecballium elaterium* (L.) Rich.) از تیره Cucurbitaceae و گونه وحشی بوده که بومی مناطق معتدل آسیا، شمال آفریقا و اروپا می‌باشد. این گیاه یکی از ذخایر مهم دارویی در دنیا محسوب می‌شود. در این تحقیق صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی اکوتیپ‌های خیار آب‌پران از سه رویشگاه طبیعی آن در استان اردبیل شامل مناطق گرمی، بیله‌سوار و پارس‌آباد (از هر منطقه ۱۰ جمعیت) بررسی شدند. نتایج نشان دادند که اکوتیپ‌های پارس‌آباد دارای میوه‌های بزرگتر و میزان کلروفیل و کاروتنوئید بیشتری بودند. از آن‌جایی که تنوع ژنتیکی این گیاه در منابع جهانی به‌صورت جامع بررسی نشده، ازاین‌رو در این پژوهش تنوع ژنتیکی سه اکوتیپ خیار آب‌پران با استفاده از ۱۳ نشانگر ISSR بررسی شد و برای ارزیابی شباهت ژنتیکی میان نمونه‌ها از تجزیه خوشه‌ای به روش جاکارد استفاده گردید. آغازگر ISSR13 بیشترین چندشکلی (۴۶٪) را بین آغازگرها نشان داد. تجزیه نتایج مولکولی توده‌های خیار آب‌پران نشان داد که کمترین شباهت ژنتیکی بین دو اکوتیپ از جمعیت بیله‌سوار و گرمی دیده شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی نیز نمونه‌ها را در پنج گروه دسته‌بندی کرد. نتایج نشان داد که نشانگر ISSR به‌عنوان یک نشانگر مناسب قادر است تنوع ژنتیکی موجود بین اکوتیپ‌های گیاه خیار آب‌پران را آشکار کند.

واژه‌های کلیدی: *Ecballium elaterium* (L.) Rich.، مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، نشانگر مولکولی، نشانگر ISSR.

مقدمه

یکی از مهمترین گیاهان دارویی، خیار آب‌پران (*Ecballium elaterium* (L.) Rich) از تیره Cucurbitaceae است که بومی مناطق معتدل آسیا، شمال آفریقا و اروپا می‌باشد. خیار آب‌پران در ایران یک گونه دارد که بیشتر در آذربایجان و گیلان می‌روید (Leppik *et al*., 1996). ترکیب‌های یافت شده در برگ‌ها، ساقه‌ها، ریشه‌ها و میوه این گیاه سمّی بوده و خاصیت آنتی‌باکتریال دارد (Koca *et al*., 2010؛ Adwan *et al*., 2011). میوه این گیاه به‌عنوان داروی گیاهی مورد توجه است و مایع درون آن به مصارف دارویی می‌رسد. آنالیز میوه این گیاه نشان‌دهنده وجود ترکیب‌هایی مانند تری‌ترپنوئیدها (کوکوربیتاسین)، کربوهیدرات‌ها، صمغ، لکانتوسیانین، تانن‌ها و پپتیدها می‌باشد. اثرات سمّی اسانس خیار آب‌پران روی سلول‌های سرطانی (Hep G2) توسط دانشمندان نیز گزارش‌شده است (Omidbaigi, 1995).

بررسی تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی در ژرم‌پلاسم، تعیین ساختار ژنتیکی و قابلیت هر گونه گیاهی قبل از انجام هر کار اصلاحی برای معرفی ارقام کیفی با عملکرد بالا امری لازم و ضروریست. همچنین این اطلاعات در توسعه راهبردهای جمع‌آوری و حفاظت مواد گیاهی به‌عنوان منابع ژنتیکی و دارویی با اهمیت می‌باشند (Ye *et al*., 2005).

با توجه به شرایط مختلف اقلیمی کشورها لازم است تا با شناخت گونه‌های گیاهی و دستیابی به اطلاعات لازم در مورد مناسب‌ترین محل‌های رویش و خصوصیات بوم‌شناختی آنها، گام‌های اساسی برای استفاده از اسانس‌های گیاهی و ترویج شیوه‌های اصولی بهره‌برداری از این گیاهان، برداشته شود. در همین راستا می توان با بکارگیری نشانگرهای مولکولی در جهت حفظ منابع ژنتیکی گیاهی موجود، در جهت حفظ و بقای گونه‌های گیاهی مورد نظر و در نهایت حفاظت از رویشگاه‌های طبیعی گیاهان گامی مؤثر برداشت (Mozafarian, 2008). روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA به طور قابل توجهی در تجزیه‌وتحلیل فیلوژنی، شناسایی مولکولی و بررسی تنوع و خویشاوندی ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ye *et al*., 2005).

هدف از این تحقیق ارزیابی تنوع مورفوبیوشیمیایی و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های خیار آب‌پران با استفاده نشانگر ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق و به‌منظور مطالعه مورفولوژیکی و ژنتیکی گیاه خیار آب‌پران، نمونه‌های گیاهی (۱۰ اکوتیپ از هر منطقه) از سه رویشگاه استان اردبیل (پارس آباد، انجیرلو، گرمی) در سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری شدند (جدول ۱). نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی انتقال یافتند. مناطق انتخاب شده از لحاظ آب و هوایی در منطقه نیمه خشک قرار دارد و میانگین بارندگی سالیانه کمتر از ۲۸۰ میلی‌متر است.

جدول ۱- مختصات جغرافیایی مناطق مورد بررسی

محل جمع‌آوری نمونه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
انجیرلو (بیله‌سوار)	۴۵۰	E °۴۸ °۰۴ ۳۰/۴	N °۳۹ °۱۰ ۵۳/۹
گرمی	۸۵۷	E °۴۸°۰۴ ۳۰/۴	N °۳۹ °۰۲ ۴۲/۹
پارس‌آباد	۹۱	E °۴۷ °۵۹ ۰۸/۲	N °۳۹ °۳۲ ۵۲/۹

در مرحله اول به منظور اندازه‌گیری وزن تر میوه از ترازوی دیجیتالی و صفات طول، عرض و قطر میوه و همچنین طول و عرض برگ از کولیس استفاده شد. اندازه‌گیری میزان سطح برگ به‌وسیله دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (مدل BioScientific Ltd Area meter AM300) تعیین شد. میزان کلروفیل و کاروتنوئید کل با استفاده از روش Miguera Mosquera و Perez Galvez (۱۹۹۸) برحسب میکروگرم در ۱۰۰ گرم وزن تر اندازه‌گیری و با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

در مرحله دوم در رویشگاه‌های مورد نظر از برگ‌های تازه گیاهان نمونه‌برداری شد تا تنوع ژنتیکی آنها مورد بررسی قرار گیرد. استخراج DNA به روش CTAB با اندکی تغییرات انجام شد. کمیت و کیفیت DNA به‌وسیله الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۰/۸٪ و روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. برای تکثیر DNA ژنومی از ۱۳ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲).

$$Chla\ (mg/ml)= 12.25A_{663.2}-2.79A_{646.8}$$

$$Chlb\ (mg/ml)= 21.50A_{646.8}-5.10A_{663.2}$$

$$Tchl\ (mg/ml)= chla+chlb$$

$$C_{x+c}= (100A_{470}-1.8C_a-85.02C_b)/198$$

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده

آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال	منبع
ISSR1	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	52	Brake *et al*., 2014
ISSR2	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	52	Brake *et al*., 2014
ISSR3	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	52	Brake *et al*., 2014
ISSR4	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTA-3'	50	Brake *et al*., 2014
ISSR5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	54	Brake *et al*., 2014
ISSR6	5'-TCTCTCTCTCTCTCTCC-3'	52	Pivoriene *et al*., 2008
ISSR7	5'-TGTGTGTGTGTGTGTGRA-3'	54	Brake *et al*., 2014
ISSR8	5'-ACACACACACACACACC-3'	52	Brake *et al*., 2014
ISSR9	5'-ACACACACACACACACYT-3'	52	Brake *et al*., 2014
ISSR10	5'-CACACACACACACACA-3'	48	Pivoriene *et al*., 2008
ISSR11	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGG-3'	52	Pivoriene *et al*., 2008
ISSR12	5'-ACACACACACACACACT-3'	50	Brake *et al*., 2014
ISSR13	5'-ACACACACACACACACG-3'	52	Brake *et al*., 2014

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با حجم ۱۲ میکرولیتر حاوی کیت PCR و ۲۵ نانوگرم از DNA ژنومی و ۱/۵ میکرومولار از هر ۱۳ جفت آغازگر توسط دستگاه Q-cycler انجام گردید. چرخه‌های حرارتی واکنش PCR به این صورت بود؛ مرحله اول: واسرشته‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم که شامل ۴۰ چرخه بود: واسرشته‌سازی به مدت یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو به مدت یک دقیقه در دمای مناسب برای هر آغازگر و بسط رشته DNA به مدت دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. فرآورده‌های تکثیر شده با استفاده از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با ژل رِد آشکارسازی شدند.

روش‌های تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 و به‌صورت طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون دانکن (در سطح احتمال ۵٪) استفاده شد.

الگوهای نواری حاصل از تجزیه مولکولی به‌صورت صفر و یک (به‌ترتیب عدم وجود یا وجود نوار) امتیازدهی شدند. نتایج حاصل از آغازگرهای ISSR با استفاده از نرم‌افزارهای POPGENE Version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) و DARwin5 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006) براساس تجزیه خوشه‌ای بین افراد با استفاده از ضریب تشابه جاکارد به عنوان معیار مقایسه انجام شد و به‌صورت دندروگرام و تجزیه به مختصات اصلی ترسیم گردید.

نتایج

بررسی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی

در مقایسه بین رویشگاه‌های مورد مطالعه طول، عرض و سطح برگ خیار آب پران در منطقه گرمی بیشترین و در منطقه پارس‌آباد کمترین مقدار را داشت. طبق نتایج بین رویشگاه گرمی و پارس‌آباد تفاوت معنی‌داری در طول، عرض و سطح برگ خیار آب پران وجود داشت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در صفات برگ و میوه خیار آب پران در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری بین رویشگاه‌های مختلف مورد بررسی وجود داشت (جدول ۳). همچنین وزن، طول و عرض میوه در منطقه پارس‌آباد بیشترین و در منطقه بیله‌سوار کمترین مقدار را داشت (جدول ۴).

تجزیه واریانس داده‌های سه رویشگاه مختلف نشان داد که در کلروفیل و کاروتنوئید خیار آب‌پران در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری بین رویشگاه‌های مختلف مورد بررسی وجود دارد. طبق نتایج میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید در بین سه رویشگاه تفاوت معنی داری داشتند اما کلروفیل کل بین سه رویشگاه مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳). با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها میزان کلروفیل a و b خیار آب‌پران به‌ترتیب در منطقه پارس‌آباد و گرمی بیشتر از سایر رویشگاه‌های مورد بررسی بود. همچنین میزان کاروتنوئید خیار آب پران در منطقه بیله‌سوار بیشترین و در منطقه گرمی کمترین بود (جدول ۴).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس برای صفات مورفوبیوشیمیایی اندازه‌گیری شده

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات										
		سطح برگ (mm^2)	عرض برگ (mm)	طول برگ (mm)	وزن میوه (g)	عرض میوه (mm)	طول میوه (mm)	قطر میوه (mm)	کلروفیل a µg/100g	کلروفیل b µg/100g	کلروفیل کل µg/100g	کاروتنوئید µg/100g
رویشگاه‌ها	۲	۱/۵۱۸*	۳/۵۰۸*	۸/۴۵۳*	۰/۵۴۳ns	۲/۶۲۲ns	۷۳/۵۵*	۵۸/۴۴*	۱۰/۵۸*	۳/۹۰*	۶/۸۴ns	۳/۵۷*
خطاء	۲۷	۱۳۲۷/۳	۱/۱۹۲	۱/۷۳۲	۰/۲۳۶	۲/۴۸	۲۰/۱۸	۱۵/۵۱	۲/۴۸	۰/۹۵	۳/۷۳	۰/۱۳
ضریب تغییرات (٪)		۲۴/۱	۱۳/۵۲	۱۹/۵۹	۵/۲	۱۴/۸	۸/۸۵	۲۰/۹	۲۱/۴۰	۲۱/۰۶	۱۸/۹۴	۷/۷۵

ns و *، به‌ترتیب بیانگر غیرمعنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین‌ها برای صفات مورفوبیوشیمیایی اندازه‌گیری شده

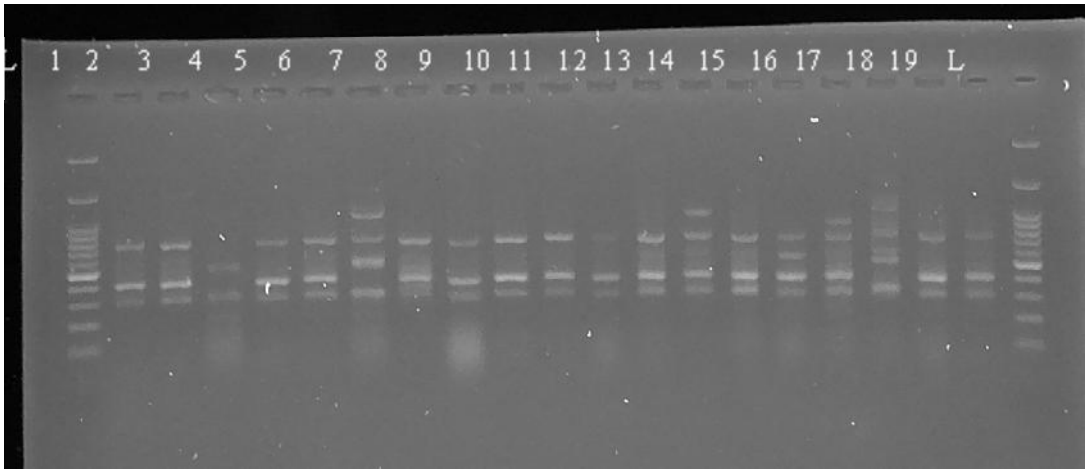
نام رویشگاه	میانگین										
	طول برگ (mm)	عرض برگ (mm)	سطح برگ (mm^2)	وزن میوه (g)	طول میوه (mm)	عرض میوه (mm)	قطر میوه (mm)	کلروفیل a µg/100g	کلروفیل b µg/100g	کلروفیل کل µg/100g	کاروتنوئید µg/100g
پارس‌آباد	۵۷/۰۵a	۷۱/۱۰b	۲۳۵۲b	۹/۶a	۳۴a	۱۸/۱۲a	۱۶a	۸/۱a	۱/۶a	۱۰/۵a	۴/۹ab
بیله‌سوار	۶۰/۰۲ab	۷۲/۱۱b	۲۷۵۵ab	۹/۳a	۲۸/۸۵b	۱۷/۰۵a	۲۱a	۶/۷ab	۱/۳ a	۸/۴a	۵/۰۲a
گرمی	۷۸/۱۲a	۸۱/۱۵a	۳۵۴۲a	۹/۵a	۳۲/۵۶ab	۱۷/۶۶a	۱۵a	۶/۰۳b	۲/۵a	۹/۴a	۴/۰۳b

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

بررسی‌های مولکولی

در تجزیه مولکولی، در مجموع ۴۳ باند به‌وسیله ۱۳ آغازگر مورد استفاده بدست آمد که اندازه این باندها در محدوده ۲۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز متغیر بود. آغازگر ISSR13 با پنج باند بیشترین (شکل ۱) و آغازگر ISSR8 با دو باند کمترین تعداد باند را در بین آغازگرها داشتند.

همچنین آغازگر ISSR13 بیشترین میزان چندشکلی (۰/۴۶) و آغازگر ISSR8 و ISSR7 به‌ترتیب با میزان ۰/۲۲٪ و ۰/۲۵٪ کمترین میزان چندشکلی را نشان دادند (جدول ۵). تمام آغازگرهای مورد استفاده، چندشکلی خوبی با میانگین ۰/۳۹ نشان دادند.



شکل ۱- الگوی نواری حاصل از قطعات تکثیر روی ۱۹ اکوتیپ خیار آب‌پران با نشانگر ISSR13

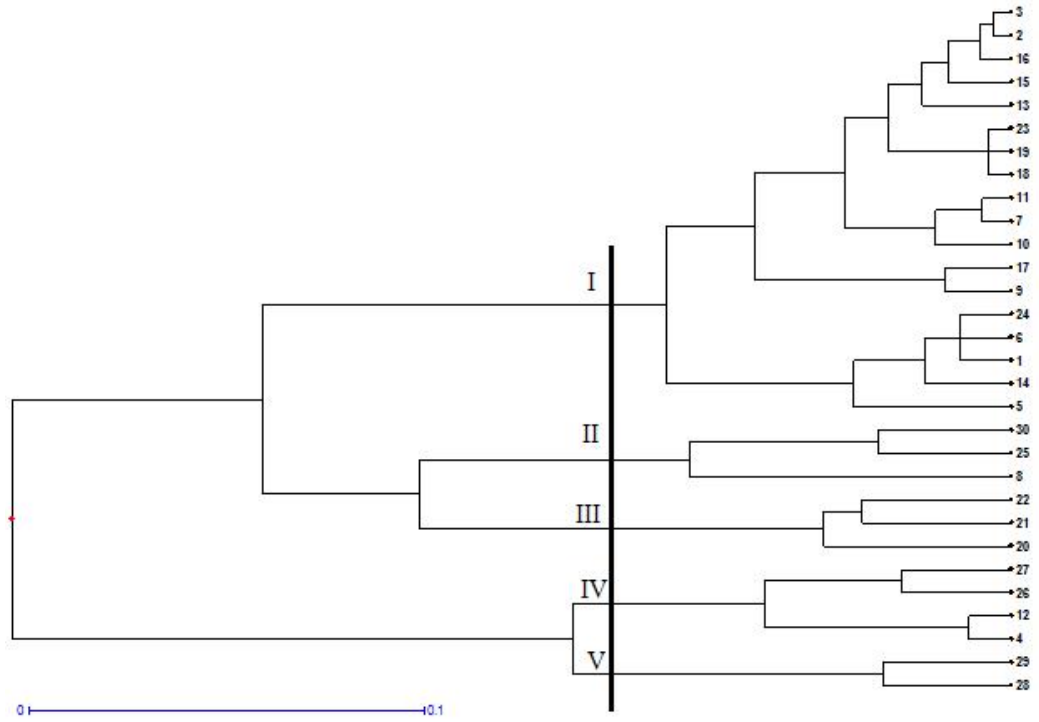
در این مطالعه شاخص اطلاعاتی شانون (I)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) و قدرت تفکیک نشانگر (RP) طبق جدول ۶ محاسبه گردید که به‌ترتیب با میانگین ۶۱/۸۴، ۶/۵۲، ۴۵/۶۰ و ۳۸/۸۳ بدست آمد. البته هر چه شاخص شانون بیشتر باشد میزان تنوع نیز بیشتر است که در بین این نشانگرها، نشانگر ISSR13 با شاخص اطلاعاتی شانون۰/۹۰، میزان تنوع بیشتری را در مقایسه با سایر نشانگرها بین اکوتیپ‌ها نشان داد (جدول ۶). محدوده شاخص قدرت تفکیک نشانگر (RP) بین۳/۴ تا ۱/۲۶ متغیر بود. کمترین شاخص قدرت تفکیک نشانگر برای آغازگر ISSR3 و بیشترین آن برای آغازگر ISSR13 بدست آمد.

جدول ۵- اسامی آغازگرها، تعداد باندهای تکثیر شده و چندشکلی مربوط به اکوتیپ‌های مورد مطالعه خیار آب‌پران

آغازگر	توالی آغازگر	تعداد باندهای تکثیرشونده	تعداد باندهای چندشکلی	درصد چندشکلی	میزان چندشکلی	شاخص نشانگر
ISSR1	5´ -AGAGAGAGAGAGAGAGC-3´	۴	۴	۱۰۰	۰/۳۵	۴
ISSR2	5´ -GAGAGAGAGAGAGAGAT-3´	۳	۳	۱۰۰	۰/۴۲	۳
ISSR3	5´ -GAGAGAGAGAGAGAGAC-3´	۳	۳	۱۰۰	۰/۳۲	۳
ISSR4	5´ -CTCTCTCTCTCTCTCTA-3´	۳	۳	۱۰۰	۰/۴۰	۳
ISSR5	5´ -AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3´	۳	۳	۱۰۰	۰/۴۳	۳
ISSR6	5´ -TCTCTCTCTCTCTCTCC-3´	۳	۳	۱۰۰	۰/۴۲	۳
ISSR7	5´ -TGTGTGTGTGTGTGTGRA-3´	۴	۴	۱۰۰	۰/۲۵	۴
ISSR8	5´ -ACACACACACACACACC-3´	۲	۲	۱۰۰	۰/۲۲	۲
ISSR9	5´ -ACACACACACACACACYT-3´	۳	۳	۱۰۰	۰/۴۳	۳
ISSR10	5´ -CACACACACACACACA-3´	۳	۳	۱۰۰	۰/۴۱	۳
ISSR11	5´ -AGAGAGAGAGAGAGAGG-3´	۴	۴	۱۰۰	۰/۳۷	۴
ISSR12	5´ -ACACACACACACACACT-3´	۳	۳	۱۰۰	۰/۴۴	۳
ISSR13	5´ -ACACACACACACACACG-3´	۵	۵	۱۰۰	۰/۴۶	۵

جدول ۶- پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده براساس نشانگرهای ISSR

آغازگر	شاخص اطلاعاتی شانون (I)*	تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)	تعدادهای آلل‌های مؤثر (Ne)	شاخص تنوع ژنتیکی (H)	قدرت تفکیک نشانگر (RP)
ISSR1	۰/۵۷	۸	۶/۸۲	۰/۳۹	۲/۶
ISSR2	۰/۶۱	۶	۵/۳۴	۰/۴۲	۱/۷۳
ISSR3	۰/۴۱	۶	۴/۳۵	۰/۷۹	۱/۲۶
ISSR4	۰/۶	۶	۵/۱۱	۰/۴۱	۲/۸۶
ISSR5	۰/۶۳	۶	۵/۴۷	۰/۴۳	۲
ISSR6	۰/۶۲	۶	۵/۴۶	۰/۴۳	۱/۸
ISSR7	۰/۵۷	۸	۶/۶۷	۰/۳۸	۲/۹۳
ISSR8	۰/۶۲	۴	۳/۵۱	۰/۴۲	۱/۸۶
ISSR9	۰/۶	۶	۵/۲	۰/۴۱	۲/۳۲
ISSR10	۰/۴۸	۶	۴/۴۵	۰/۳۱	۲/۰۶
ISSR11	۰/۶۱	۸	۷/۷۶	۰/۴۷	۲/۶۶
ISSR12	۰/۶۷	۶	۵/۸۴	۰/۴۸	۲
ISSR13	۰/۹۰	۱۰	۹/۶	۰/۴۷	۳/۴



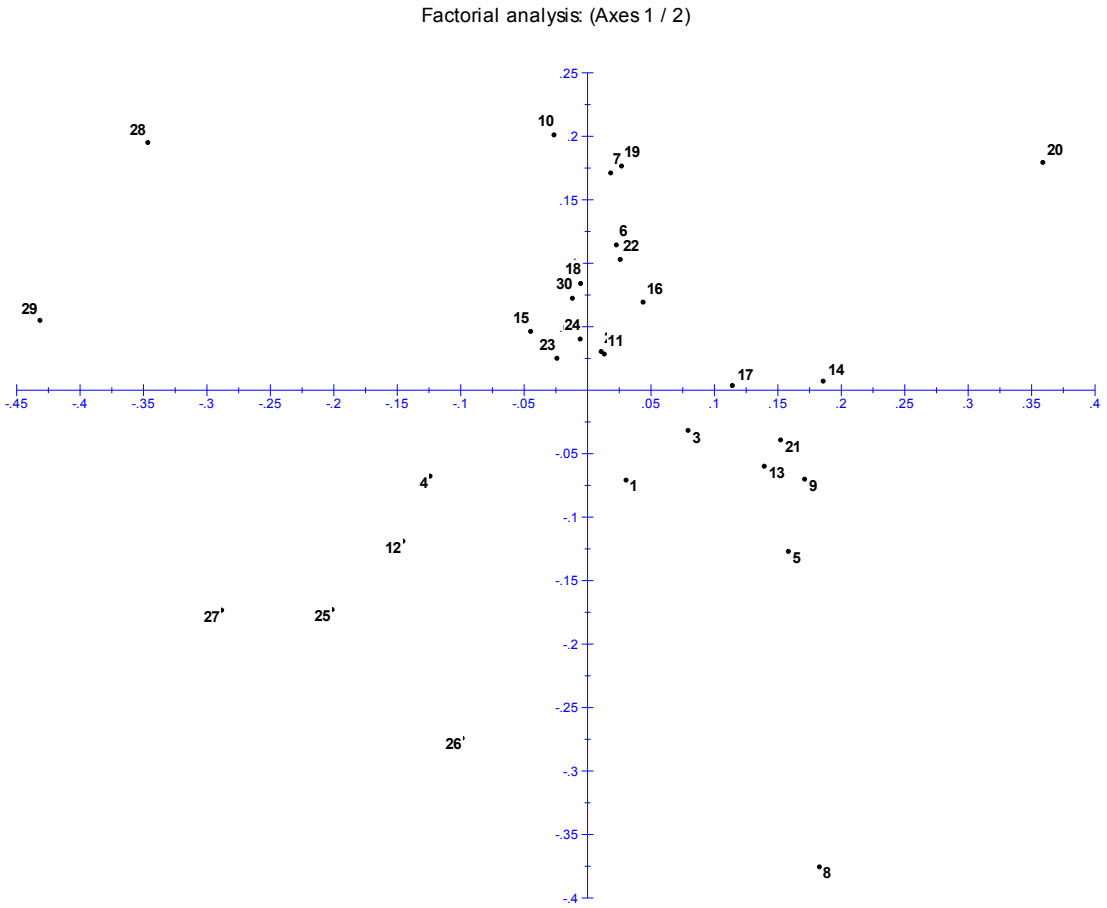
شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی اکوتیپ‌های خیار آب‌پران الگوریتم Ward و براساس ضریب Jacard

پارس‌آباد (اکوتیپ‌های ۱۰-۱)، بیله‌سوار (اکوتیپ‌های ۲۰-۱۱) و گرمی (اکوتیپ‌های ۳۰-۲۱)

کمترین فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های پارس‌آباد (۰/۱۳) مشاهده شد که این نتایج با داده‌های مورفولوژیکی مطابقت داشت. براساس این نتایج بیشترین فاصله ژنتیکی هم مربوط به اکوتیپ‌های گرمی و بیله‌سوار (۰/۷۵) بود. ضریب کوفنتیک r=۰/۹۳، P<0.0001 بدست آمد.

با توجه به نتایج بدست آمده از تجزیه خوشه‌ای، اکوتیپ‌ها در فاصله ۰/۶۶ در پنج گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل هفت اکوتیپ (از ۱۰ اکوتیپ) پارس‌آباد و هشت اکوتیپ (از ۱۰ اکوتیپ) بیله‌سوار بود. در گروه دوم دو اکوتیپ گرمی و یک اکوتیپ پارس‌آباد؛ در گروه سوم دو اکوتیپ گرمی و یک اکوتیپ بیله‌سوار؛ در گروه چهارم دو اکوتیپ گرمی و یک اکوتیپ پارس‌آباد و بیله‌سوار و در گروه پنجم هم دو اکوتیپ گرمی قرار گرفتند (شکل ۲). معمولاً اکوتیپ‌های مربوط به یک توده در زیرگروه یا گروه‌های مشابهی قرار می‌گیرند که این توده‌ها شامل اکوتیپ‌هایی هستند که از محل جمع‌آوری مشابه و یا نزدیک می‌باشند.

با توجه به شکل ۳ مشاهده می‌شود که بیشتر اکوتیپ‌های بیله‌سوار و پارس‌آباد در فاصله نزدیکی از یکدیگر قرار گرفته‌اند که این با نتایج تجزیه خوشه‌ای هماهنگی دارد و نتایج فاصله ژنتیکی نیز نشان از فاصله ژنتیکی پایین بین اکوتیپ‌های این دو منطقه دارد؛ همچنین اکوتیپ‌های گرمی نیز متمایز از این دو گروه بوده و در گروه جداگانه قرار گرفتند.



شکل ۳- پراکنش اکوتیپ‌های خیار آب‌پران مورد مطالعه براساس تجزیه به مختصات اصلی براساس دو عامل اول

پارس‌آباد (اکوتیپ‌های ۱۰-۱)، بیله‌سوار (اکوتیپ‌های ۲۰-۱۱) و گرمی (اکوتیپ‌های ۳۰-۲۱)

بحث

گیاهان دارویی نیز همانند سایر موجودات زنده تحت تأثیر تغییرات اقلیمی و جغرافیایی می‌باشند و این تغییرات بر پراکنش، تنوع ژنتیکی، مراحل رویشی و میزان و ترکیب‌های مواد مؤثره گیاهان دارویی تأثیرگذار خواهند بود (McMahon *et al*., 2011 ؛Cavaliere, 2009). این امر می‌تواند به این دلیل باشد که گرده‌ها و بذرها به راحتی با باد پراکنده می‌شوند و می‌توانند جریان ژنی بین جمعیت‌ها را تسهیل کنند. البته شایان ذکر است چندساله بودن این گیاه در حفظ نسبی اکوتیپ‌های قدیمی آن مؤثر است. همچنین وجود تنوع می‌تواند به‌دلیل وجود خرد اقلیم‌ها در مناطق جمع‌آوری باشد و ضرورت نمونه‌گیری گسترده‌تر را از مناطق جمع‌آوری نشان می‌دهد.

عوامل محیطی و ژنتیکی بر ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاهان مؤثر هستند (Najar *et al*., 2015). از میان ویژگی‌های مورفولوژیکی صفات میوه و برگ حائز اهمیت هستند. ویژگی‌های برگی مانند طول، عرض و به‌ویژه سطح برگ معیار مناسبی برای برآورد میزان تغییرات گیاه در شرایط مختلف محیطی می‌باشد. این شاخص‌ها رابطه مستقیمی با حاصلخیزی خاک و ژنتیک گیاه دارند (Babaei Kafaki *et al*., 2009). از دیگر عوامل مؤثر بر ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه ارتفاع از سطح دریا می‌باشد. در تحقیق Najar و همکاران (۲۰۱۵) بیان شده که صفات مرتبط با اندام‌های هوایی گیاه گزنه (*Urtica dioica*) با افزایش ارتفاع کاهش نشان داده‌اند که البته این یافته‌ها با نتایج تحقیق ما همخوانی نداشت. به‌طوری که سطح برگ اکوتیپ‌های گرمی با ارتفاع ۸۵۷ متر از سطح دریا بیشتر از اکوتیپ‌های پارس‌آباد با ۹۱ متر ارتفاع از سطح دریا بودند، این می‌تواند به دلیل دخالت سایر عوامل مانند ژنتیک و شرایط حاصلخیزی رویشگاه باشد؛ هر چند ویژگی‌های مرتبط با میوه و صفات بیوشیمیایی در اکوتیپ‌های پارس‌آباد بیشتر سایر اکوتیپ‌ها بود که این با توجه به ارتفاع کمتر این ناحیه معمول است. در بین نشانگرهای مورد بررسی، نشانگر ISSR13 با توجه به بالا بودن شاخص اطلاعاتی شانون و قدرت تفکیک از بقیه نشانگرها در تمایز اکوتیپ‌ها کارآمدتر بود. نتایج نشان داد که توده خیار آب‌پران گرمی از لحاظ ژنتیکی از دو توده پارس‌آباد و بیله‌سوار متمایز بوده است. داده‌های جغرافیایی منطقه گرمی و دو منطقه پارس‌آباد و بیله‌سوار نیز نشان داد که منطقه گرمی به‌دلیل اختلاف ارتفاع بیشتر از لحاظ جغرافیایی از دو منطقه دیگر متمایز می‌باشد. نتایج بدست‌آمده در این پژوهش، حکایت از تنوع بالایی در میان نمونه‌های خیار آب‌پران دارد که به‌علت تنوع اقلیمی و همچنین تکثیر جنسی توسط بذر و دگرگرده‌افشانی در این گیاه قابل توجیه خواهد بود. از آن‌جا که تاکنون تنوع ژنتیکی گیاه خیار آب‌پران به صورت جامع مورد مطالعه قرار نگرفته است، نتایج این پژوهش می‌تواند به‌عنوان نقطه عطف مهم در برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی مطرح باشد و می‌توان از آن در تولید هیبریدهایی با عملکرد بالاتر و خصوصیات فیتوشیمیایی مناسب استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

- Adwan, G., Salameh, Y. and Adwan, K., 2011. Effect of ethanolic extract of *Ecballium elaterium* against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1: 456-460.
- Babaei Kafaki, S., Khademi, A. and Mataji, M., 2009. Relationship between leaf area index and phisiographical and edaphical condition in a *Quercus macranthera* stand (Case study: Andebil's forest, Khalkhal). Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 17(2): 280-289.
- Brake, M., Migdadi, H., Al-Gharaibeh, M., Ayoub, S., Haddad, N. and El Oqlah, A., 2014. Characterization of Jordanian olive cultivars (*Olea europaea* L.) using RAPD and ISSR molecular markers. Scientia Horticulturae, 176: 282-289.
- Cavaliere, C., 2009. The effects of climate change on medicinal and aromatic plants. Herbal Gram, 81: 44-57.
- Koca, U., Ozcelik, B. and Ozgen, S., 2010. Comparative in vitro activity of medicinal plants *Arnebia densiflora* and *Ecballium elaterium* against isolated strains of *Klebsiella pneumonia*. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 7: 197-204.
- Leppik, E.F., 1996. Searching gene cucumis through host-parasite relationship. Euphytica, 15(3): 323-328.

- Omidbaigi, R., 1995. Approaches to Production and Processing of Medicinal Plants (Vol 2). Astan-Quds Razavi Publication, 414p.
- Perrier, X. and Jacquemoud-Collet, J.P., 2006. DARwin software, http://darwin.cirad.fr/darwin.
- Pivoriene, O., Pasakinskiene, I., Brazauskas, G., Lideikyte, L., Jensen, L.B. and Lübberstedt, T., 2008. Inter-simple sequence repeat (ISSR) loci mapping in the genome of perennial ryegrass. Biologija, 54(1): 17-21.
- Ye, C., Yu, Z., Kong, F., Wu, S. and Wang, B., 2005. R-ISSR as a new tool for genomic fingerprinting, mapping, and gene tagging. Plant Molecular Biology Reporter, 23: 167-177.
- Yeh, F.C., Yang, R.C. and Boyle, T., 1999. POPGENE version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- McMahon, S.M., Harrison, S.P., Armbruster, W.S., Bartlein, P.J., Beale, C.M. and Edwards, M.E., 2011. Improving assessment and modelling of climate change impacts on global terrestrial biodiversity. Trends in Ecology & Evolution, 26: 249-259.
- Miguera Mosquera, M.I. and Perez Galvez, A., 1998. Study of ability and kinetics of the main carotenoid pigments of red pepper in the de-esterification reaction. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 566-569.
- Mozafarian, V., 2008. Iran Flora: Number 347. Research Institute of Forests and Rangelands, 54p.
- Najar, M., Hemati, Kh., Khorasaninezhad, S., Garmkhani, A. and Bagherifard, A., 2015. The effect of height on morphological characteristics and some secondary metabolites of Nettle plant in Mazandaran and Golestan provinces. Iranian Plant Ecophysiology Research, 53(5): 223-234.

Genetic diversity and comparison of physicochemical characteristics of three Squirting cucumber (*Ecballium elaterium* (L.) Rich.) populations collected in Ardabil province, Iran

A.R. Ghanbari[1*], R. Moayed Amini[2], A. Estaji[3], S. Fahim[4] and H. Ghorbani Ghozhdi[5]

1*- Corresponding author, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resource, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, E-mail: ghanbari66@yahoo.com; ghanbari66@uma.ac.ir
2- M.Sc. student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resource, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3- Post Doctoral Fellowships, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resource, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
4- Ph.D student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resource, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
5- Faculty of Agriculture, Gonabad University, Gonabad, Iran

Received: October 2017 Revised: June 2018 Accepted: June 2018

Abstract

Squirting cucumber (*Ecballium elaterium* (L.) Rich.) is a wild species that is native to temperate regions of Asia, North Africa, and Europe. This plant is one of the most important medicinal plants in the world. In the present study, morphological and biochemical traits of squirting cucumber ecotypes were investigated from three natural habitats in Ardabil province including Germi, Bilesuar-Anjirlooin and Parsabad regions (10 genotypes per region). The results showed that Parsabad ecotypes had large fruits and higher chlorophyll and carotenoids content. Since the genetic diversity of this plant is not been thoroughly investigated, the genetic diversity of three squirting cucumber ecotypes were examined by using ISSR markers. To assess the genetic similarity between samples a cluster analysis was performed using Jacquard. Among primers, the primer ISSR-13 showed the most polymorphism (46%). The lowest genetic similarity was found between the two genotypes of Bilesuar and Germi population. Cluster analysis of molecular data was categorized into five groups. This preliminary study demonstrated that ISSR markers were an effective method to evaluate genetic variability among squirting cucumber plant genotypes.

Keywords: *Ecballium elaterium* (L.) Rich., morphological, biochemical, molecular marker, ISSR markers.