

تنوع ژنتیکی و مقایسه صفات فیزیوشیمیایی سه جمعیت خیار آب پران (*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@uma.ac.ir; ghanbari66@yahoo.com

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 پذیرش: تیر ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶

چکیده

خیار آب پران (*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 آب پران از سه رویشگاه طبیعی آن در استان اردبیل شامل مناطق گرمی، ببله‌سوار 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 به صورت جامع بررسی نشده، از این رو در این پژوهش تنوع ژنتیکی سه اکوتیپ خیار آب پران 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 آب پران نشان داد که کمترین شباهت ژنتیکی بین دو اکوتیپ از جمعیت ببله‌سوار 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 آب پران را آشکار کند.

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

مقدمه

بوم شناختی آنها، گام های اساسی برای استفاده از اسانس های گیاهی و ترویج شیوه های اصولی بهره برداری 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 گونه های گیاهی مورد نظر و در نهایت حفاظت از رویشگاه های طبیعی گیاهان گامی مؤثر برداشت (Mozafarian, 2008). روش های مولکولی مبتنی بر DNA به طور قابل توجهی در تجزیه و تحلیل فیلوژنی، شناسایی مولکولی و بررسی تنوع و خویشاوندی ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرند (Ye et al., 2005).

هدف از این تحقیق ارزیابی تنوع مورفوبیوشیمیایی و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های خیار آب پران با استفاده نشانگر (Inter-Simple Sequence) ISSR (Repeat) می باشد.

مواد و روش ها

برای انجام این تحقیق و به منظور مطالعه مورفولوژیکی و ژنتیکی گیاه خیار آب پران، نمونه های گیاهی (۱۰ اکوتیپ از هر منطقه) از سه رویشگاه استان اردبیل (پارس آباد، انجیرلو، گرمی) در سال ۱۳۹۵ جمع آوری شدند (جدول ۱). نمونه ها پس از جمع آوری 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 میلی متر است.

یکی از مهمترین گیاهان دارویی، خیار آب پران (*Ecballium elaterium* (L.) Rich) از تیره Cucurbitaceae است که بومی مناطق معتدل آسیا، شمال آفریقا و اروپا می باشد. خیار آب پران در ایران یک گونه دارد که بیشتر در آذربایجان و گیلان می روید (Leppik et al., 1996). ترکیب های یافت شده در برگ ها، ساقه ها، ریشه ها و میوه این گیاه سمی بوده و خاصیت آنتی باکتریال دارد (Koca et al., 2010; Adwan et al., 2011). میوه این گیاه به عنوان داروی گیاهی مورد توجه است و مایع درون آن به مصارف دارویی می رسد. آنالیز میوه این گیاه نشان دهنده وجود ترکیب هایی مانند تری ترپنوئیدها (کوکوربیتاسین)، کربوهیدرات ها، صمغ، لکانتوسیانین، تانن ها و پیتیدها می باشد. اثرات سمی اسانس خیار آب پران روی سلول های سرطانی (Hep G2) توسط دانشمندان نیز گزارش شده است (Omidbaigi, 1995).

بررسی تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی در ژرم پلاسما، 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 جمع آوری و حفاظت مواد گیاهی به عنوان منابع ژنتیکی و دارویی با اهمیت می باشند (Ye et al., 2005).

با توجه به شرایط مختلف اقلیمی کشورها لازم است تا با شناخت گونه های گیاهی و دستیابی به اطلاعات لازم در مورد مناسب ترین محل های رویش و خصوصیات

جدول ۱- مختصات جغرافیایی مناطق مورد بررسی

محل جمع آوری نمونه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
انجیرلو (بیله سوار)	۴۵۰	E ۴۸° ۰۴' ۳۰/۴	N ۳۹° ۱۰' ۵۳/۹
گرمی	۸۵۷	E ۴۸° ۰۴' ۳۰/۴	N ۳۹° ۰۲' ۴۲/۹
پارس آباد	۹۱	E ۴۷° ۵۹' ۰۸/۲	N ۳۹° ۳۲' ۵۲/۹

DNA به وسیله الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۰/۸٪ و روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. برای تکثیر DNA ژنومی از ۱۳ آغازگر ISSR استفاده شد (جدول ۲).

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

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

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

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

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 به وسیله 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 نمونه برداری شد تا تنوع ژنتیکی آنها مورد بررسی قرار گیرد. استخراج DNA به روش CTAB با اندکی تغییرات انجام شد. کمیت و کیفیت

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده

منبع	دمای اتصال	توالی آغازگر	آغازگر
Brake <i>et al.</i> , 2014	52	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	ISSR1
Brake <i>et al.</i> , 2014	52	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3'	ISSR2
Brake <i>et al.</i> , 2014	52	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	ISSR3
Brake <i>et al.</i> , 2014	50	5'-CTCTCTCTCTCTCTA-3'	ISSR4
Brake <i>et al.</i> , 2014	54	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	ISSR5
Pivoriene <i>et al.</i> , 2008	52	5'-TCTCTCTCTCTCTCC-3'	ISSR6
Brake <i>et al.</i> , 2014	54	5'-TGTGTGTGTGTGTGTGRA-3'	ISSR7
Brake <i>et al.</i> , 2014	52	5'-ACACACACACACACC-3'	ISSR8
Brake <i>et al.</i> , 2014	52	5'-ACACACACACACACYT-3'	ISSR9
Pivoriene <i>et al.</i> , 2008	48	5'-CACACACACACACA-3'	ISSR10
Pivoriene <i>et al.</i> , 2008	52	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGG-3'	ISSR11
Brake <i>et al.</i> , 2014	50	5'-ACACACACACACACT-3'	ISSR12
Brake <i>et al.</i> , 2014	52	5'-ACACACACACACACG-3'	ISSR13

معیار مقایسه انجام شد و به صورت 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 پارس آباد کمترین مقدار را داشت. طبق نتایج بین رویشگاه گرمی و پارس آباد تفاوت معنی داری 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 معنی داری بین رویشگاه‌های مختلف مورد بررسی وجود داشت (جدول ۳). همچنین وزن، طول و عرض میوه در منطقه پارس آباد بیشترین و در منطقه بيله سوار کمترین مقدار را داشت (جدول ۴).

تجزیه واریانس داده‌های سه رویشگاه مختلف نشان داد که در کلروفیل و کاروتنوئید خیار آب پران در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی داری 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 معنی داری نداشت (جدول ۳). با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها میزان کلروفیل a و b خیار آب پران به ترتیب در منطقه پارس آباد و گرمی بیشتر از سایر رویشگاه‌های مورد بررسی بود. همچنین میزان کاروتنوئید خیار آب پران در منطقه بيله سوار بیشترین و در منطقه گرمی کمترین بود (جدول ۴).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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 رنگ آمیزی با ژل رد آشکارسازی شدند.

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

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

الگوهای نواری حاصل از تجزیه مولکولی به صورت صفر و یک (به ترتیب 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

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس برای صفات مورفوبیوشیمیایی اندازه گیری شده

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

ns و *، به ترتیب بیانگر غیرمعنی دار بودن و معنی دار بودن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین‌ها برای صفات مورفوبیوشیمیایی اندازه گیری شده

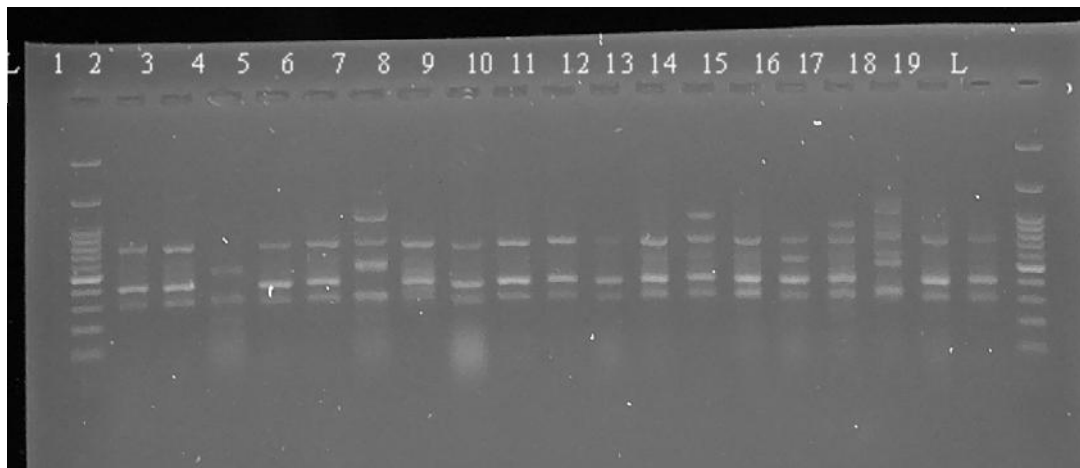
میانگین											نام رویشگاه	
کاروتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	قطر میوه	عرض میوه	طول میوه	وزن میوه	سطح برگ	عرض برگ	طول برگ		
$\mu\text{g}/100\text{g}$	$\mu\text{g}/100\text{g}$	$\mu\text{g}/100\text{g}$	$\mu\text{g}/100\text{g}$	(mm)	(mm)	(mm)	(g)	(mm ²)	(mm)	(mm)		
۴/۹ab	۱۰/۵a	۱/۶a	۸/۱a	۱۶a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

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار 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

ISSR13 با شاخص اطلاعاتی شانون ۰/۹۰، میزان تنوع بیشتری را در مقایسه با سایر نشانگرها بین اکوتیپ‌ها نشان داد (جدول ۶). محدوده شاخص قدرت تفکیک نشانگر (RP) بین ۳/۴ تا ۱/۲۶ متغیر بود. کمترین شاخص قدرت تفکیک نشانگر برای آغازگر ISSR3 و بیشترین آن برای آغازگر ISSR13 بدست آمد.

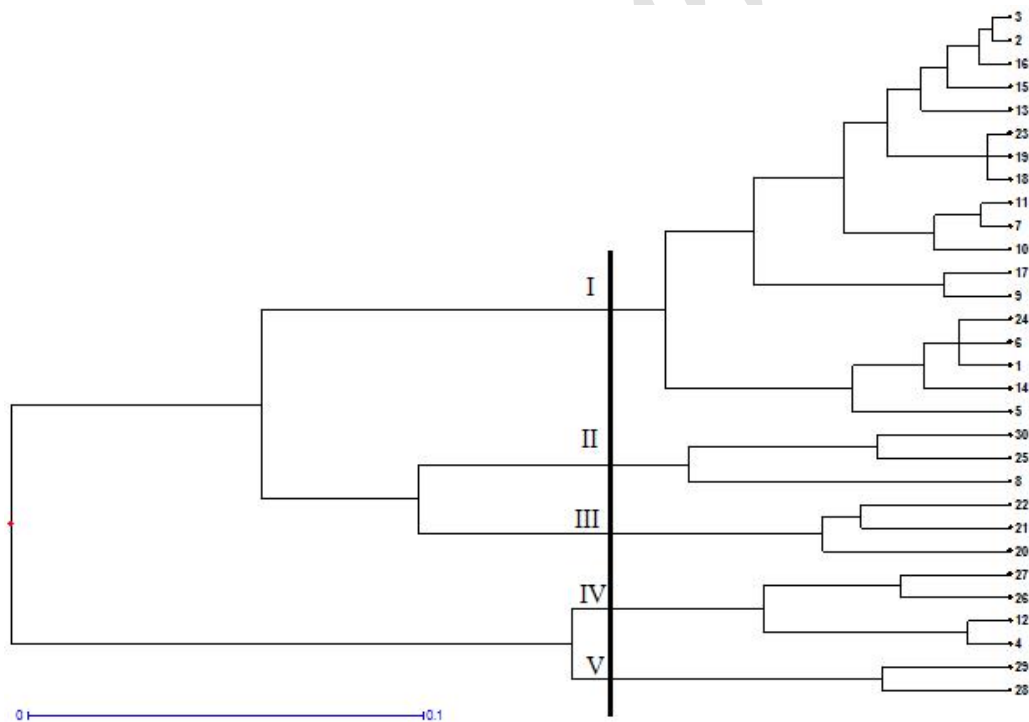
در این مطالعه شاخص اطلاعاتی شانون (I)، تعداد آللهای مشاهده شده (Na)، تعداد آللهای مؤثر (Ne) و قدرت تفکیک نشانگر (RP) طبق جدول ۶ محاسبه گردید که به‌ترتیب با میانگین ۶۱/۸۴، ۶/۵۲، ۴۵/۶۰ و ۳۸/۸۳ بدست آمد. البته هر چه شاخص شانون بیشتر باشد میزان تنوع نیز بیشتر است که در بین این نشانگرها، نشانگر

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

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

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

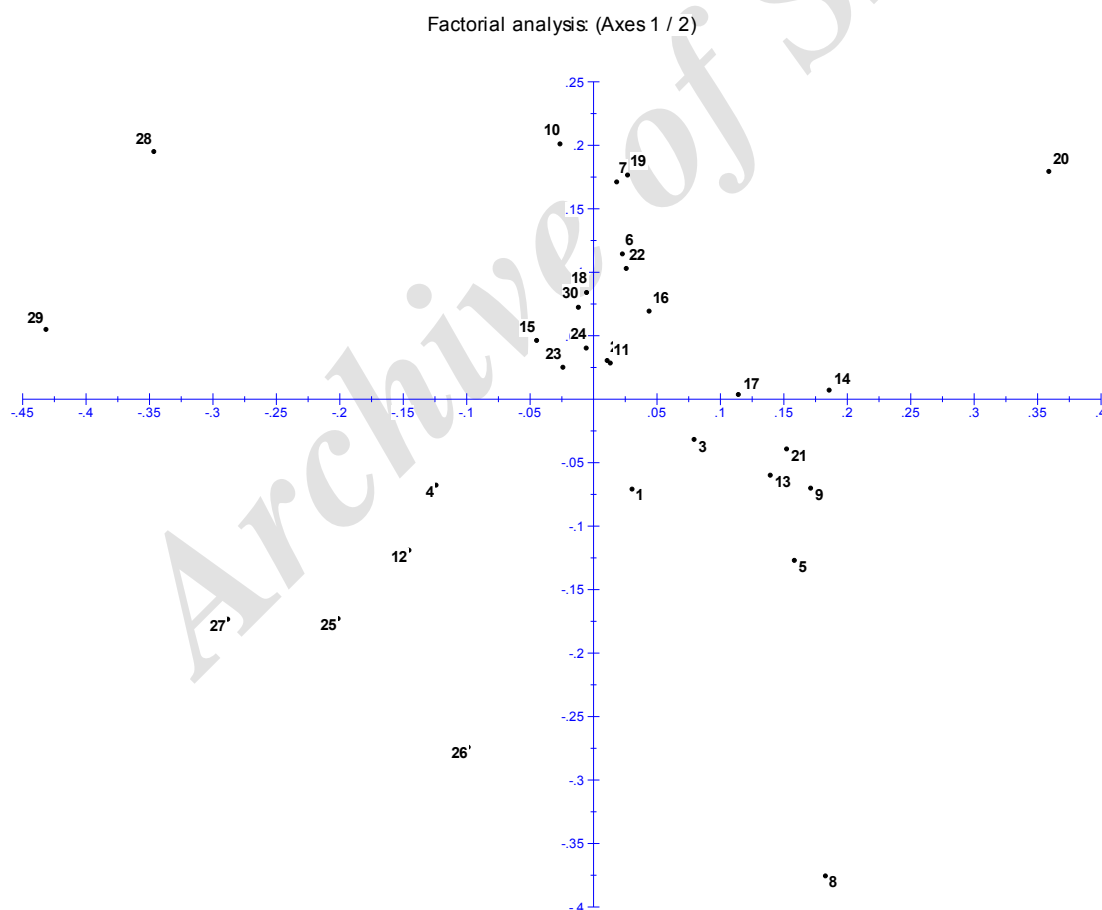
پارس‌آباد (اکوتیپ‌های ۱۰-۱)، بیله‌سوار (اکوتیپ‌های ۲۰-۱۱) و گرمی (اکوتیپ‌های ۳۰-۲۱)

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.

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 کوفتتیک $r=0/93$ ، $P<0.0001$ 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



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

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

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 (Cavaliere, 2009; McMahon *et al.*, 2011). 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 به دلیل 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 برگ 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 *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 به دلیل 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.
- Najari, 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.

Archive of SID

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 Amini², A. Estaji³, S. Fahim⁴ and H. Ghorbani Ghozhd⁵

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 Germe, Bilesuar-Anjirloo 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 Germe 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.