بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

ارزیابی تنوع مورفولوژیکی، مولکولی و شیموتایپی توده‌های مختلف هندوانه ابوجهل ایرانی (*Citrullus colocynthis* L.) از نظر میزان تولید متابولیت ضدسرطان الاتریسین بی

اساتید راهنما:
دکتر اسد معصومی‌اصل
دکتر فواد مرادی

استاد مشاور:
دکتر فرنگیس قنواتی

پژوهشگر:
سهیلا قنواتی

شهریور ماه ۱۳۹۳

"پایان‌نامه‌ی حاضر، حاصل پژوهش‌های نگارنده در دوره‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات است که در شهریورماه سال ۱۳۹۳ در دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه یاسوج به راهنمایی جناب آقایان دکتر اسد معصومی‌اصل و دکتر فواد مرادی و مشاوره‌ی سرکار خانم دکتر فرنگیس قنواتی از آن دفاع شده است و کلیه‌ی حقوق مادی و معنوی آن متعلق به دانشگاه یاسوج است".

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودش که در این

سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است

به پاس قلب بزرگش که فریادرس است و سرگردانی و ترس

در پناهش به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغش که هرگز فروکش نمی کند

این مجموعه را به همسر عزیز و فرزند دلبندم علی، تقدیم می کنم.

سپاسگزاری

خداوند مهربان را شاکرم که مرا نیرو بخشید تا نگارش پایان‌نامه پیش رو را به اتمام برسانم، بر خود لازم می‌دانم کمال تقدیر و تشکر خود را نثار کسانی کنم که در این مسیر پر فراز و نشیب لحظه‌ای از راهنمایی، پشتیبانی و تشویق من دریغ نکردند.

آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند. حال این برگ سبزی است تحفه درویش تقدیم آنان به پاس تعبیر عظیم و انسانی‌شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی.

از استاد بردبارم، جناب آقای دکتر معصومی‌اصل، که تمام روزهایی که تحت نظارت ایشان مشغول به کار بودم سرشار از آموختن توام با علم و اخلاق بود، نهایت تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر مرادی که کمک‌های ارزشمندشان مساعدتی بزرگ در پیشرفت کار بود، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از سرکار خانم دکتر قنواتی که افزون بر نقطه نظرات استادانه، با کمک‌های بی‌دریغ‌شان نقش مهمی در دلگرم کردن اینجانب داشتند، کمال امتنان و تشکر را دارم.

از پدر و مادر همسر عزیزم که همیشه حامی من بوده‌اند، دعاهایشان بدرقه راهم و وجودشان شادی‌بخش و صفایشان مایه آرامش من بوده است، صمیمانه تشکر می‌کنم.

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم همسری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودش بیاسایم و از سایه وجودش در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. از همسر عزیزم که استقامت در تلاش را به من آموخت و در تمام این سال‌ها با فراهم کردن آرامش فکری و آسایش روحی، بسیاری دشواری‌ها را بر من آسان نمود، با تمام وجود قدردانم.

ارزیابی تنوع مورفولوژیکی، مولکولی و شیموتایپی توده‌های مختلف هندوانه ابوجهل ایرانی (*Citrullus colocynthis* L.) از نظر میزان تولید متابولیت ضدسرطان الاتریسین بی

به وسیله‌ی:

سهیلا قنواتی

پایان‌نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به‌عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

اصلاح‌نباتات

در تاریخ ۱۳۹۳/۶/۲۲ توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنما: دکتر اسد معصومی‌اصل با مرتبه علمی استادیار.....امضاء

۲- استاد راهنما: دکتر فواد مرادی با مرتبه علمی استادیار.....امضاء

۳- استاد مشاور: دکتر فرنگیس قنواتی با مرتبه علمی دانشیار.....امضاء

۴- استاد داور داخل گروه: دکتر رضا امیری‌فهلیانی با مرتبه علمی استادیار .....امضاء

۵- استاد داور خارج از گروه: دکتر حمیدرضا بلوچی با مرتبه علمی استادیار.....امضاء

۶- نماینده تحصیلات تکمیلی دانشگاه: دکتر محمدرضا بحرینی‌بهزادی با مرتبه علمی استادیار .....امضاء

شهریور ۱۳۹۳

نام : سهیلا **نام خانوادگی: قنواتی**

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته و گرایش: اصلاح نباتات**

استاد راهنما: دکتر اسد معصومی‌اصل و دکتر فواد مرادی **تاریخ دفاع: ۱۳۹۳/۶/۲۲**

ارزیابی تنوع مورفولوژیکی، مولکولی و شیموتایپی ژنوتیپ‌های مختلف هندوانه ابوجهل ایرانی (*Citrullus colocynthis* L.) از نظر میزان تولید متابولیت ضدسرطان الاتریسین بی

چکیده

هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* L.) یکی از گیاهان دارویی متعلق به خانواده کدوییان می‌باشد. با اینکه در کشور ایران توده‌های مختلفی از این گیاه دارویی مهم وجود دارد ولی گزارشی از بررسی تنوع ژنتیکی و شیمیوتایپی آن موجود نیست. در این مطالعه برای ارزیابی تنوع مورفولوژیکی، ژنتیکی و شیمیوتایپی، از ۱۵ ژنوتیپ هندوانه ابوجهل جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران (دزفول، شوشتر، هندیجان، گچساران (امامزاده‌جعفر و آبریگون)، زابل (بندان و میل‌نادر)، لنده، کاشان، کازرون، بندرعباس، اهرم، بندردیلم، کرمان، سبزوار) استفاده گردید. صفات مورفولوژیکی مورد ارزیابی شامل طول برگ، عرض برگ، ارتفاع ساقه، قطر ساقه، قطر میوه، طول بذر، عرض بذر، وزن صد دانه، وزن میوه و رنگ بذر بود. به منظور گروه‌بندی ارقام براساس صفات مورفولوژیک، با استفاده از داده‌های استاندارد شده، از تجزیه خوشه‌ای به روش ward استفاده شد که دندروگرام حاصله در فاصله اقلیدسی ۱۸ برش داده شد و چهار گروه به دست آمد. گروه‌های اول تا چهارم به ترتیب ۱، ۶، ۳ و ۵ ژنوتیپ را شامل شدند که در نظر اول بر وجود تنوع ژنتیکی در میان توده‌ها دلالت دارند. در دسته اول ژنوتیپ سبزوار به تنهایی قرار گرفت که از لحاظ صفات طول برگ، عرض برگ، طول بذر، قطر میوه، وزن میوه و وزن صددانه در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها بیشترین میزان را دارا بود. شوشتر و کازرون در زیرگروه الف گروه ۱، کمترین فاصله را نسبت به دیگر ژنوتیپ‌های مورد بررسی داشتند. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های صفات مورفولوژیک، سه مولفه اول به ترتیب ۴۸/۷۷۱، ۱۷/۳۸۵ و ۱۱/۸۸۵ درصد (مجموعا ۷۸/۰۴۰٪) از تنوع موجود بین ژنوتیپ‌ها را توجیه کردند. مقایسه میانگین به روش آزمون t انجام و نتایج نشان داد که بین میانگین صفات در بین ژنوتیپ‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در این مطالعه، نشانگر مولکولی RAPD برای همه ۱۰ آغازگر مورد استفاده، نوارهای چندشکل تولید و ۱۳۷ باند تولید شده، ۹۹/۱۶٪ چندشکلی نشان دادند. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده ۱۷ عدد و مربوط به آغازگر Ah6 و کمترین آن ۱۱ عدد و مربوط به آغازگر Ah1 بود. آغازگر Ah6 بیشترین میزان درصد باندهای چندشکل، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و همچنین بیشترین تعداد آلل‌های موثر را داشته و کمترین میزان باندهای چندشکل را آغازگر Ah2 نشان داد. تجزیه کلاستر با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA، ۱۵ ژنوتیپ به چهار دسته اصلی تقسیم شدند. بیشترین شباهت و کمترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های دزفول و بندان (۰/۶۸) در گروه ۱ و کمترین تشابه و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های کاشان و

هندیجان (۰/۲۴) مشاهده شد. نتایج نشان دادند که نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها ابزار مناسبی است. بین گروه‌بندی بر اساس نشانگر RAPD و پراکندگی جغرافیایی ژنوتیپ‌ها ارتباطی مشاهده گردید. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌ها، سه مولفه اول یعنی PCA1، PCA2، PCA3، PCA4 و PCA5 به ترتیب ۳۶/۶۸۸، ۱۰/۶۷۰، ۷/۱۸۲، ۶/۴۷۶ و ۴/۸۹۱ (مجموعا ۶۵/۹۱٪) از واریانس کل را توجیه کردند. یعنی نشانگرهای مورد استفاده دارای توزیع نسبتا مناسبی در سطح ژنوم بوده و در ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام هندوانه ابوجهل موردمطالعه، نسبتا مناسب عمل کرده‌اند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از ارزیابی شیمیوتایپی سه ژنوتیپ مورد بررسی، مشخص شد که ماده مؤثره کوکوربیتاسین I (الاتریسین B) در همه اجزای ژنوتیپ بندان، اعم از ریشه، ساقه، میوه و برگ وجود دارد و بیشترین میزان این ماده در قسمت ریشه ژنوتیپ دیلم، بیشترین میزان آن در ساقه ژنوتیپ بندان و در میوه گیاه، بیشترین میزان ماده مورد نظر در ژنوتیپ بندان بود. میزان کوکوربیتاسین I در برگ ژنوتیپ امامزاده‌جعفرگچساران نیز بسیار بالاتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود.

کلمات کلیدی: تنوع شیموتایپی، تنوع مورفولوژیکی، تنوع ژنتیکی، هندوانه ابوجهل

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و هدف
۱-۱- اهمیت تحقیق ۱
۱-۲- اهداف تحقیق ۴
۱-۳- فرضیه‌های تحقیق ۴
فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های انجام شده
۲-۱- خصوصیات گیاهشناسی ۵
۲-۱-۱- تیره کدوئیان (*cucurbitacea*) ۵
۲-۱-۲- هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* L.) ۶
۲-۱-۲-۱- دامنه انتشار ۸
۲-۱-۲-۲- ترکیبات شیمیایی ۸
۲-۲- تحقیقات انجام شده در رابطه با خواص دارویی هندوانه ابوجهل ۱۰
۲-۳- تنوع ژنتیکی ۱۳
۲-۴- نشانگرها و انواع آن ۱۵
۲-۴-۱- نشانگرهای مورفولوژیک (ظاهری) ۱۶
۲-۴-۱-۱- مزایای نشانگرهای مورفولوژیک ۱۶
۲-۴-۱-۲- معایب نشانگرهای مورفولوژیک ۱۶
۲-۴-۱-۳- پژوهش‌های انجام شده در خانواده کدوئیان با استفاده از نشانگرهای ظاهری ۱۷
۲-۴-۱-۴- بررسی تنوع مورفولوژیکی در سایر گیاهان دارویی ۱۷
۲-۴-۲- نشانگرهای مولکولی ۱۸
۲-۵- نشانگر RAPD (چند شکلی قطعات حاصل از تکثیر تصادفی DNA) ۱۹
۲-۶- مزایای نشانگرهای RAPD ۲۰
۲-۷- معایب نشانگرهای RAPD ۲۱
۲-۸- پژوهش‌های انجام شده در خانواده کدوئیان با استفاده از نشانگر RAPD ۲۱
۲-۹- روشهای تجزیه و شناسایی اجزای تشکیل دهنده عصاره‌های استخراج شده از گیاهان ۲۳
۲-۹-۱- کروماتوگرافی ۲۳
۲-۹-۲- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ۲۴
۲-۹-۲-۱- فاز ساکن و متحرک ۲۴
۲-۹-۲-۲- اجزا و قسمت‌های مختلف دستگاه HPLC ۲۵
۲-۱۰- ارزیابی تنوع شیمیوتایپی (کموتایپی) ۲۸
۲-۱۰-۱- بررسی تنوع شیمیوتایپی با استفاده از HPLC ۲۹
فصل سوم: مواد و روش‌ها
۳-۱- ویژگی‌های مورفولوژیک ۳۰

۳-۱-۱- تهیه نمونه‌های گیاهی ۳۰
۳-۱-۲- صفات ظاهری مورد بررسی ۳۳
۳-۱-۳- تجزیه و تحلیل آماری صفات مورفولوژیک ۳۳
۳-۱-۳-۱- تجزیه به مولفه‌های اصلی ۳۳
۳-۱-۳-۲- تجزیه خوشه‌ای ۳۳
۳-۲- بخش مولکولی ۳۳
۳-۲-۱- استخراج DNA ۳۴
۳-۲-۱-۱- مراحل استخراج DNA ۳۴
۳-۲-۲- محلول‌های مورد نیاز ۳۵
۳-۲-۲-۱- محلول تریس ۱ مولار ۳۵
۳-۲-۲-۲- محلول اتیلن‌دی‌آمین‌ترا استیک‌اسید ۰/۵ مولار ۳۵
۳-۲-۲-۳- محلول کلرید سدیم ۵ مولار ۳۵
۳-۲-۲-۴- بافر Tris-HCl- EDTA (TE) ۳۶
۳-۲-۲-۵- بافر TBE ۳۶
۳-۲-۳- بررسی کمیت و کیفیت DNA ۳۶
۳-۲-۳-۱- بررسی کمیت و کیفیت DNA به روش اسپکتروفتومتری ۳۶
۳-۲-۳-۲- بررسی کمیت و کیفیت DNA با استفاده از ژل الکتروفورز ۳۶
۳-۲-۳-۳- الکتروفورز ژل آگارز ۳۷
۳-۲-۴- دستورالعمل PCR ۳۷
۳-۲-۴-۱- آغازگرها ۳۷
۳-۲-۴-۲- واکنش PCR ۳۸
۳-۲-۴-۳- الگوی دمایی ۳۸
۳-۲-۴-۴- بررسی محصول PCR با الکتروفورز ژل ۳۹
۳-۲-۴-۵- تجزیه داده‌های مولکولی ۳۹
۳-۳- بخش شیمیوتایپی ۴۰
۳-۳-۱- تهیه نمونه‌های گیاهی برای استخراج عصاره ۴۰
۳-۳-۲- استخراج و خالص‌سازی نمونه‌های گیاهی جهت سنجش میزان کوکوربیتاسین ۴۰
۳-۳-۳- شرایط کروماتوگرافی ۴۰

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- تجزیه داده‌های مورفولوژیک ۴۳
۴-۱-۱- مقایسات میانگین با استفاده از آزمون t ۴۳
۴-۱-۱-۱- طول ساقه ۴۳
۴-۱-۲-۲- قطر ساقه ۴۳
۴-۱-۲-۳- طول برگ ۴۳
۴-۱-۲-۴- عرض برگ ۴۴
۴-۱-۲-۵- طول بذر ۴۴
۴-۱-۲-۶- عرض بذر ۴۴

۴-۱-۲-۷- قطر میوه ۴۴
۴-۱-۲-۸- وزن میوه ۴۴
۴-۱-۲-۹- وزن صد دانه ۴۴
۴-۱-۲-۱۰- رنگ بذر ۴۵
۴-۱-۳- تجزیه خوشه‌ای براساس صفات مورد مطالعه ۴۶
۴-۱-۴-تجزیه به مولفه‌های اصلی ۴۷
۴-۱-۵- همبستگی صفات مورفولوژیک ۴۸
۴-۲- نتایج تجزیه داده‌های مولکولی ۴۹
۴-۲-۱- نتایج تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی ۵۳
۴-۲-۲- نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی ۵۳
۴-۳- نتایج حاصل از تجزیه شیمیوتایپی به روش HPLC ۵۵
نتیجه‌گیری ۵۹
پیشنهادات ۵۹
منابع ۶۱

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۳-۱- مناطق جمع‌آوری ژنوتیپ‌های هندوانه ابوجهل ۳۲
جدول۳-۲- مواد مورد استفاده در تهیه بافر استخراج CTAB..... ۳۵
جدول۳-۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده ۳۸
جدول۳-۴- برنامه دمایی واکنش PCR..... ۳۹
جدول۳-۵- مشخصات شیمیایی کوکوربیتاسین آی ۴۲
جدول۴-۱- مقایسه میانگین برای صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه
هندوانه ابوجهل با استفاده از آزمون t..... ۴۵
جدول۴-۲- مقادیر مولفه‌های اصلی و ضرایب عاملی صفات مختلف در مولفه‌های اصلی برآورد شده ۴۸
جدول ۴-۳- ضرایب همبستگی بین صفات مورفولوژیکی در توده‌های مورد مطالعه..... ۴۹
جدول۴-۴- داده‌های حاصل از آنالیز نشانگر RAPD..... ۵۱
جدول۴-۵- همبستگی بین ماتریس‌های تشابه..... ۵۲
جدول۴-۶- مقادیر مولفه‌های اصلی برای بخش مولکولی ۵۴
جدول ۴-۷- افزایش اندازه پیک کوکوربیتاسین تزریق‌شده با افزایش غلظت..... ۵۶
جدول۴-۸- میزان غلظت ماده کوکوربیتاسین آی (بر حسب ppm) اندازه‌گیری شده در ریشه، ساقه، برگ
و میوه سه ژنوتیپ هندوانه ابوجهل ایرانی ۵۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل۲-۱- اندام‌های مختلف هندوانه ابوجهل ۸
شکل۲-۲- عناصر شیمیایی موجود در هندوانه ابوجهل ۱۱
شکل۲-۳- دستگاه HPLC به همراه اجزاء مختلف آن ۲۶
شکل ۳-۱- گیاهچه تولید شده از طریق کشت بافت و انتقال گیاهچه به گلدان حاوی پرلیت ۳۱
شکل۳-۲- انتقال گیاهچه‌ها به پیت‌ماس و پرلیت در اتاق فیتوترون ۳۱
شکل۳-۳- کشت گیاه در گلخانه موسسه بیوتکنولوژی کرج ۳۱
شکل۳-۴- دستگاه HPLC استفاده شده در موسسه بیوتکنولوژی کرج ۴۲
شکل۴-۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد بررسی به روش Ward بر اساس صفات ظاهری ۴۶
شکل۴-۲- بررسی مقدماتی وجود DNA در نمونه‌های مورد بررسی روی ژل آگارز ۱ درصد ۵۰
شکل۴-۳- الگوی باندی ۱۵ ژنوتیپ هندوانه ابوجهل با آغازگر Ah6 ..... ۵۰
شکل۴-۴- الگوی باندی ۱۵ ژنوتیپ هندوانه ابوجهل با آغازگر Ah2 ..... ۵۰
شکل۴-۵- الگوی باندی ۱۵ ژنوتیپ هندوانه ابوجهل با آغازگر Ah7 ..... ۵۱
شکل۴-۶- دندروگرام حاصل از داده‌های RAPD با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA ۵۲
شکل۴-۷- پلات تجزیه به مولفه‌های اصلی برای نشانگرهای RAPD ژنوتیپ‌های هندوانه ابوجهل مورد مطالعه ۵۵
شکل۴-۸- نمودار سه‌بعدی حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی برای نشانگرهایRAPD ژنوتیپ‌های هندوانه ابوجهل مورد مطالعه با استفاده از روش جاکارد ۵۵
شکل ۴-۹- منحنی کالیبراسیون ۵۶
شکل۴-۱۰- کروماتوگرام HPLC روی ریشه هندوانه ابوجهل ژنوتیپ دیلم ۵۷
شکل۴-۱۱- کروماتوگرام HPLC روی ساقه هندوانه ابوجهل ژنوتیپ زابل ۵۷
شکل۴-۱۲- کروماتوگرام HPLC روی میوه هندوانه ابوجهل ژنوتیپ زابل ۵۸
شکل۴-۱۳- کروماتوگرام HPLC روی برگ هندوانه ابوجهل ژنوتیپ گچساران ۵۸

فصل اول: مقدمه و هدف

۱-۱- اهمیت تحقیق

گیاهان دارویی در طول تاریخ همیشه با انسان قرابت خاصی داشته و آثار دارویی و موارد استفاده آن‌ها بر هیچ کس پوشیده نیست. اگر چه علاقه‌مندی و توجه به این گیاهان مفید در سال‌های گذشته ناچیز بوده ولی خوشبختانه اخیرا مورد توجه و عنایت بیشتری قرار گرفته‌است (فلک‌ناز و همکاران، ۱۳۸۸).

در فلات پهناور ایران، با توجه به وجود اقلیم‌های گوناگون و در نتیجه مهیا بودن شرایط متنوع و خاص، بالغ بر ۷۵۰۰ گونه گیاهی رویش دارند که برخی از آنها با فواید منحصر به‌فردی تنها در ایران یافت می‌شوند. تا سال ۱۳۸۶، سطح زیر کشت گیاهان دارویی در کشور حدود ۷۰ هزار هکتار بوده که از این میزان سطح زیر کشت، به‌طور متوسط سالانه ۶۰ هزار تن انواع گیاهان دارویی تولید می‌شود (مجنون حسینی و دوازده امامی، ۱۳۸۶).

موسسات داروسازی طالب گیاهان یک‌دست و استاندارد با مواد مؤثره یکنواخت و معینی می‌باشند که این ویژگی‌ها در گیاهان خودرو به جهت وجود تنوع ژنتیکی و متفاوت بودن شرایط محیطی، زمان برداشت و روش‌های خشکانیدن وجود ندارد، در صورتی‌که خصوصیات فوق در گیاهان دارویی زراعی به دلیل یکنواخت بودن شرایط فوق قابل حصول است و برای رسیدن به این هدف باید در زمینه‌های به‌نژادی و به‌زراعی تحقیقاتی انجام شود (حاج هاشمی، ۱۳۶۶).

گیاهان، مواد شیمیایی مختلفی را در دیواره سلولی خود جمع می‌کنند که این مواد را می‌توان به دو دسته کلی تقسیم‌بندی کرد. دسته اول، موادی هستند که در نتیجه سوخت‌وساز اولیه[1] گیاه تولید می‌شوند، نظیر پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها و دسته دوم، مواد ناشی از سوخت‌وساز ثانویه[2] نظیر ترکیب‌های فنولیک، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها. این ترکیبات به‌نظر نمی‌رسند که در فعالیت‌های حیاتی گیاه نقش اساسی بازی کنند، اما نقش مهمی در سازگاری گیاهان ایفا می‌کنند و اثرات درمانی آن‌ها قابل توجه است (قاسمی، ۱۳۸۸؛ زمان، ۱۳۷۶). فرآورده‌های حاصل از سوخت‌وساز ثانویه گیاهی جزو گرانبهاترین ترکیبات شیمیایی گیاهی هستند (فلک‌ناز و همکاران، ۱۳۸۸). این مواد عموما در حالت خالص یافت نمی‌شوند و به حالت ترکیب با عناصر دیگری که به‌صورت مکمل اثرات آن‌ها را

1-Primary metabolism
2-Secondary metabolism

تقویت می‌کنند، همراه هستند. با این‌حال، حتی اگر گیاه دارویی فقط یک ماده فعال داشته باشد، باز اثر آن روی بدن انسان مفیدتر از همان ماده در حالت به‌دست آمده از سنتز شیمیایی است. این خاصیت، ارجحیت گیاه درمانی یا استفاده از داروهایی که منشأ گیاهی دارند را به ثبوت می‌رساند. در این‌جا ماده مؤثره تنها یک ترکیب شیمیایی نیست، بلکه دارای تعادل فیزیولوژیک است که بدن آن را بهتر تحمل نموده و اثرات جانبی نیز بر جای نمی‌گذارد (زمان، ۱۳۷۶).

به‌طور مشخص از اوایل قرن نوزدهم بود که دانشمندان پی بردند می‌توانند از مواد مؤثره دارویی موجود در گیاهان در صنایع داروسازی استفاده کنند. از آن پس روش‌های علمی ویژه‌ای برای استخراج مواد مؤثره موجود در گیاهان و نیز برای اعمال اثرات آنها بر انسان، جایگزین روش‌های سنتی گردید. به بیان دقیق‌تر از این تاریخ به بعد بود که تحقیقات بر روی گیاهان دارویی با هدف جداسازی مواد فعال موجود در آنها و مشخص‌سازی ترکیب آن و اثرات دارویی مرتبط با آن‌ها تدریجا انجام گرفت (توموتاک[۱] و همکاران، ۲۰۰۰). نتایج این بررسی‌ها از همان اوایل کار نشان داد که گیاهان دارویی علاوه بر ترکیبات عمومی و اساسی، هر کدام حداقل دارای یک ماده موثره ثانوی مخصوص هستند (امیدبیگی، ۱۳۸۴).

هندوانه‌ی ابوجهل[۲] و یا خربزه روباه که در کتب طب سنتی با نام‌های حنظل و مراره الصحاری نام برده شده است، یکی از گیاهان دارویی متعلق به خانواده کدوییان می‌باشد که از خواص مهم این گیاه اثر ضددیابتی، ضدویروسی، ضدمیکروبی و ضدسرطانی آن است (صمصام شریعت، ۱۳۶۸).

گوشت میوه[۳] هندوانه ابوجهل دارای گلیکوزیدها، آلکالوئیدها و ساپونین است. از موادمتشکله آن می‌توان به کولوسینتتین[۴] و کولوسینتین[۵] (گلیکوزید و عامل اصلی تلخی و اثر مسهلی آن)، یک گلیکوزید فیتوسترول[۶] و دیگر گلیکوزیدها مانند الاترین ای[۷] و دی هیدرو- الاتریسین بی[۸] اشاره کرد که جزو ترکیبات ضدسرطان محسوب می‌شوند (جعفرنیا و همکاران، ۱۳۸۷).

ممکن است اندام خاصی مانند ریشه، ساقه، برگ، گل، دانه و پوست حاوی مواد موثره مورد نظر باشد. اندام‌هایی از گیاه انتخاب می‌شوند که دارای بالاترین غلظت مواد موثره باشند (امیدبیگی، ۱۳۸۴).

در قرن بیستم مطالعات فیتوشیمیایی درترکیبات طبیعی گیاهان دارویی منجر به کشف تعداد فراوانی از ترکیبات با ساختارهای شیمیایی متنوع شده‌است (فرانسیسکو[۹] و همکاران، ۲۰۰۷). در حدود صد سال گذشته، روش کروماتوگرافی برای جداسازی ترکیبات طبیعی معرفی شد. روش‌های کروماتوگرافی مختلفی جهت اندازه‌گیری و شناسایی ترکیب‌ها وجود دارد که یکی از مهمترین آن‌ها کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۱۰]ست. بیش از دو دهه است که روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

1-Tomotake
2-Citrullus colocynthis L.
3-Pulp
4-Colocynthetin
5-Colocynthin
6-phyto citrullo
7- ElaterinA
8-Dihydro-Elatericin B
9-Francisco
10-High performance liquid chromatography (HPLC)

توسط فیتوشیمیست‌ها به‌طور گسترده برای جداسازی و خالص‌سازی ترکیبات طبیعی به‌کار می‌رود و توسط تکنیک‌های پیشرفته اسپکتروسکوپی و انجام واکنش‌های شیمیایی، فرمول ساختمانی آن‌ها تعیین شده و به کمک آزمایشات فارماکولوژیکی، اثرات درمانی این ترکیبات مشخص می‌شود (مارستون[1]، ۲۰۰۷). در این روش، اغلب از ستون‌های پر شده با ذرات ریز ساکن استفاده می‌شود. به همین علت سطح بیشتری از فاز ساکن در ستون در معرض اجزای نمونه قرار می‌گیرد و در نتیجه بازده جداسازی از این روش از سایر روش‌های کروماتوگرافی بیشتر است (کدخدا و همکاران، ۱۳۹۰).

اکثر تحقیقات گذشته روی گیاهان دارویی به استخراج مواد موثره و ترکیبات ثانویه آن‌ها معطوف شده‌است. این در حالی است که امروزه پژوهشگران در تلاشند تا بتوانند راه‌کارهای جدیدی برای اصلاح گیاهان دارویی ارائه دهند. ارقام بومی گیاهان دارویی مختلف و خویشاوندان وحشی آن‌ها بخش اعظم نمونه‌های گیاهی ارزنده فلور هر کشور را تشکیل می‌دهند. این ارقام به دلیل سازشی که طی دوران بسیار طولانی با شرایط و تنش‌های محیطی خود پیدا کرده‌اند، حاوی ژن‌های بسیار ارزنده مانند مقاومت به تنش‌هایی از قبیل خشکی، شوری، سرما، گرما و نیز مقاومت در برابر حمله آفات و بیماری‌های مهم گردیده‌اند که معمولا به‌عنوان منابع و مخازن ژنی ارزنده و دست‌افزار کار به‌نژادگران گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. امروزه خطرات مختلف از جمله خشکسالی، چرای بیش از حد دام، برداشت بیش از حد گیاهان دارویی، ذخایر ژنتیکی این گیاهان را در خطر انقراض قرار داده است. از این‌رو محققین به‌دنبال استفاده از روش‌های نوین زیست‌فناوری در جهت ارائه راه‌کارهای حفاظت ژنتیکی می‌باشند (رحیم ملیک[2] و همکاران، ۲۰۰۹).

گیاهان دارویی به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه همچون اسانس‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و فلاونوییدها در خطر اکسیدشدن شدید DNA می‌باشند و برخی از آن‌ها به دلیل داشتن پلی‌ساکارید و پروتئین فراوان، کیفیت لازم برای مراحل بعدی مطالعات مولکولی را ندارند (پیرتیلا[3] و همکاران، ۲۰۰۱). از این‌رو، پژوهشگران گیاهان دارویی روش‌های متفاوتی برای استخراج DNA ارائه داده‌اند که هر کدام معایب و محاسن خاص خود را دارد. در بیشتر این روش‌ها دو نکته اساسی مدنظر است: ۱-کیفیت DNA استخراج‌شده، ۲-سرعت استخراج و ۳-عدم اکسیداسیون DNA (رحیم ملک، ۱۳۹۰).

استفاده از نشانگرهای ژنتیک، خصوصاً نشانگرهای مولکولی، ابزاری برای شناسایی تنوع و نوع تنوع هستند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲). روش‌های مولکولی ابزاری مناسب برای مطالعه اثر تنوع ژنتیکی گیاهی بر پایداری اکوسیستم‌هاست. این تنوع را ممکن است در چند سطح مورد بررسی قرار داد. روش‌های مولکولی، امکانات ویژه‌ای را برای ارزیابی تنوع زیستی ارائه داده و می‌توانند روش کلیدی ۱برای ایجاد راهبردهای حفاظتی مناسب باشند.

روش‌های مولکولی بررسی تنوع ژنتیکی بیشترین و مطمئن‌ترین اطلاعات را از ژنوم در اختیار می‌گذارند. بین نشانگرهای مختلف، نشانگرهای رپید[4] به علت مزیت‌هایی چون عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی DNA برای طراحی و ساخت آغازگرها، امکان بررسی همزمان چندین جایگاه در

1-Marston
2-Rahim Maleek
3-Pirttila
4-RAPD

ژنوم نمونه‌ها، عدم نیاز به کاوشگر و مواد پرتوزا، هزینه کم و سرعت اجرای آن از پراستفاده‌ترین نشانگرهای مولکولی هستند (ویلیامز[1] و همکاران، ۱۹۹۰). از طرفی معایبی چون عدم تکرارپذیری و حساسیت بالا به آلودگی را نیز می‌توان با افزایش دقت و تکرار آزمایش و نمره‌دهی باندهای واضح و مشترک در تکرارها افزایش داد. نشانگرهای مولکولی رپید به عنوان ابزاری موثر در بررسی تنوع درون و بین جمعیتی معرفی شده‌اند (لینچ و میلیگان[2]، ۱۹۹۴).

بین هندوانه‌های ابوجهل مناطق مختلف ایران از نظر صفات ظاهری و ترکیبات شیمیایی موجود تنوع زیادی وجود دارد، به‌طوری‌که فرم برگی و ساقه‌ای متفاوت داشته و از نظر مقدار متابولیت‌های ثانویه نیز تفاوت دارند. بررسی تنوع موجود در صفات ظاهری و بخصوص میزان متابولیت‌های ثانویه در مورد هر گیاه دارویی بخصوص گیاهان دارویی ضدسرطان و از آن‌جمله هندوانه ابوجهل جزء کارهای پایه‌ای و مهم می‌باشد. استفاده از نشانگرها برای ردیابی مکان‌های ژنی و نواحی ژنومی در این گیاه دارویی نیز می‌تواند ارزشمند باشد. با بررسی تنوع شیموتایپی می‌توان توده‌های مختلف هندوانه‌های ابوجهل را از نظر میزان تولید متابولیت ثانویه مورد نظر دسته‌بندی کرده و توده‌هایی را که بیشترین میزان تولید این ماده را دارند، شناسایی کرد. لذا با توجه به این‌که بررسی تنوع مورفولوژیکی، مولکولی و تنوع ژنتیکی مبتنی بر ترکیب شیمیایی (شیموتایپی) این گیاه مهم هنوز در ایران انجام نشده بود، با اجرای این پژوهش و بررسی گونه‌های مختلف هندوانه ابوجهل، دسته‌بندی آنها صورت گرفت.

۱-۲- اهداف تحقیق:

۱-جمع‌آوری ژنوتیپ‌هایی از هندوانه ابوجهل ایران و ارزیابی تنوع آنها بر اساس صفات مورفولوژیکی، مولکولی و شیموتایپی

۲-دسته‌بندی ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از لحاظ صفات مورفولوژیکی، مولکولی و شیموتایپی

۳-انتخاب برترین ژنوتیپ‌ها از میان توده‌های مورد بررسی از نظر میزان تولید متابولیت مورد نظر

۱-۳- فرضیه‌های تحقیق:

۱-در بین ژنوتیپ‌های هندوانه ابوجهل تنوع وجود دارد.

۲-بعضی از این ژنوتیپ‌ها توان تولید مواد ضدسرطانی بیشتری دارند.

۳-می‌توان با استفاده از صفات مورفولوژیکی، مولکولی و شیموتایپی، تنوع را بررسی و توده‌های جمع‌آوری شده را دسته‌بندی‌کرد.

1-Williames
2-Lynch and Milligan

فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های انجام شده

۲-۱- خصوصیات گیاهشناسی

۲-۱-۱- تیره کدوئیان (Cucurbitacea)

این تیره شامل حدود ۱۱۸ جنس و ۸۲۵ گونه بوده (آی‌پک اولوترک[1] و همکاران، ۲۰۱۱) که همگی طالب آب و هوای گرم هستند. گیاهان این خانواده به سرما بسیار حساس و در آب و هوای گرم رشد می‌کنند (دانشور، ۱۳۷۹). گیاهانی هستند یک‌ساله، خزنده که به صورت وحشی در نواحی گرمسیری مشاهده می‌شوند (امید بیگی، ۱۳۸۴). بالا رفتن آنها از تکیه‌گاه‌ها معمولا به کمک پیچک‌های آنها صورت می‌گیرد. از اختصاصات آن‌ها این است که به مجرد نزدیک شدن به تکیه‌گاه، پیچک‌های آن‌ها که نمو خیلی سریع دارد دور آن می‌پیچد و گاهی نیز در دو جهت مخالف می‌پیچد (زرگری، ۱۳۷۵).

کدوئیان دارای ریشه سطحی هستند که حجم زیادی را در خاک به خود اختصاص می‌دهند، این حجم در بعضی از گیاهان این تیره به بیش از ۱۰۰ مترمکعب می‌رسد. حجم ریشه این گیاهان بیش از حجم ساقه آن‌ها است. از دیگر مشخصات بارز این گیاهان متوقف شدن رشد ساقه اصلی در هر گره است که بعد از تشکیل ساقه فرعی به رشد خود ادامه می‌دهد (سیمپودیال[2]). سیستم آوندها در این گیاهان از نوع بایکولاتریال[3] است یعنی دو آوند آبکش در طرفین و یک آوند چوبی در وسط قرار دارد. این گیاهان برگ‌هایی ساده، متناوب و پهنک کامل یا منقسم به لوب‌های عمیق دارند. پیچک‌ها اغلب از تغییر شکل برگ‌ها به وجود می‌آید و معمولا در محور برگ‌ها ظاهر می‌شوند ولی در بعضی از مواقع نیز می‌تواند از روی ساقه‌های فرعی یا اصلی به وجود آیند. ساقه این دسته از گیاهان ممکن است به صورت توخالی درآمده باشد، برگ و ساقه آنها نیز پوشیده از کرک و خارهای بسیار ریز است (دانشور، ۱۳۷۹؛ آزادبخت، ۱۳۷۸).

1-Ipek Uluturk
2- sympodial
3-bicollaterial

گل‌های آن‌ها منظم، معمولا با دو نوع نر و ماده، یک پایه یا دو پایه، به‌ندرت نر- ماده، مرکب از قطعات ۵ تایی، منفرد و یا غالبا مجتمع به صورت گرزن هستند. کاسه و جام گل آن‌ها معمولا به یکدیگر و به تخمدان (تا ناحیه بالای آن) به‌نحوی پیوستگی دارد که به ظاهر در حاشیه فوقانی تخمدان به نظر می‌رسد. وجود این حالت باعث گردیده که عده‌ای از گیاه‌شناسان، آن‌ها را در بین جدا گلبرگ‌ها جای دهند. جام گل این گیاهان غالبا نمو زیاد دارد و از محلی که پیوستگی آن با کاسه گل قطع می‌گردد به صورت‌های مختلف در گیاهان این تیره دیده می‌شود (زرگری، ۱۳۷۵). گیاهان این تیره یک پایه می‌باشند (امیدبیگی، ۱۳۸۴). گل نر این گیاهان غالبا دارای ۵ پرچم آزاد است ولی گاهی در بعضی از آن‌ها، فقط یک پرچم آزاد دیده می‌شود و ۴ پرچم دیگر دو به دو به هم متصل می-باشند. گل ماده آن‌ها به غیر از موارد استثنایی، مرکب از ۳ برچه است که مجموعا تخمدانی ۳ خانه و تحتانی به وجود می‌آورند. میوه آن‌ها به‌صورت سته است که گاهی حجم زیاد پیدا می‌کند مانند خربزه و هندوانه. دانه این گیاهان دارای آلبومن کم حجم ولی لپه‌های گوشت‌دار و ضخیم با اندوخته‌ای از مواد روغنی است (زرگری، ۱۳۷۵). بذور فاقد آندوسپرم بوده و شکل آن‌ها به وسیله پوشش‌های ظریفی که اطراف آن‌ها را می‌پوشاند، مشخص می‌گردد. بذور حاوی مقادیر فراوانی روغن هستند. برخی میوه‌های متعلق به تیره کدو تلخ می‌باشند، علت تلخی آن‌ها وجود موادی به نام کوکوربیتاسین و ساپونین‌های تری‌ترپن‌تتراسایکلین می‌باشد. برخی از جنس‌های متعلق به این تیره حاوی بعضی از انواع آلکالوئیدها (نظیر لوفانین و بریونیسین) است (امیدبیگی، ۱۳۸۴). ترکیب گلیکوزیدی کوکوربیتاسین دارای اثر ضدسرطانی است (آزادبخت، ۱۳۷۸).

جنس‌های مهم این تیره عبارتند از: Cucumis، Citrullus، Cucurbita، Luffa، Lagenaria، Bryonia. بعضی از گونه‌های جنس Luffa (لیف) و Lagenaria به صورت زینتی کاشته می‌شوند. *Ecballium elatricum*، *Citrullus colocynthis* و *Bryonia dioica* گونه‌هایی هستند که ارزش دارویی دارند (مظفریان، ۱۳۷۵).

۲-۱-۲- هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis L.*)

هندوانه ابوجهل یا خربزه روباه در کتب طب سنتی با نام‌های حنظل و مراره الصحاری نام برده شده و این جنس دارای چهار گونه دیپلوئید با 2n=22 عدد کروموزوم است (لوی[1] و همکاران، ۲۰۰۱). یک گیاه چند ساله است که با هر دو روش زایشی و رویشی قابل تکثیر است. با این‌حال، جوانه‌زنی بذر ضعیف است. بنابراین انتشار رویشی شایع‌تر و در طبیعت موفق است (شافرمن[2] و همکاران، ۱۹۹۸).

گیاهی علفی، چندساله، دارای ساقه خوابیده یا بالارونده و پوشیده از کرک است. پهنک برگ‌ها به طول ۲/۵-۱۰ و به عرض ۲-۷ سانتی‌متر، با محیط تخم‌مرغی کشیده، روی سطح فوقانی در امتداد رگبرگ‌ها با کرک‌های شکننده، روی سطح تحتانی با کرک‌های زبر، با ۳-۵ لوب عمیق، با لبه‌ای سینوسی-دندانه‌ای مواج، با قاعده‌ای قلبی، با انتهای نوک‌دار، با لوب‌های شانه‌ای لوب‌دار با لوب مرکزی بلندتر، با رگبرگ‌های شانه‌ای، دمبرگ به طول ۱-۱۰ سانتی‌متر و زبر، کاسبرگ‌ها به طول ۲-۵

1-Levi
2-Schafferman

میلی‌متر و سرنیزه‌ای است. گلبرگ‌ها به طول ۶-۱۰، به عرض ۴-۶ میلی‌متر و به رنگ سبز مایل به زرد هستند. گل نر آن دارای جامی به رنگ زرد نارنجی و متصل از راه قاعده به کاسه گل است. دمگل گل‌های نر به طول ۵-۲۰ میلی‌متر و گل بنه‌ای به طول ۲-۴ میلی‌متر است. پنج پرچم دارد بدین نحو که میله ۴ پرچم آن دو به دو به یکدیگر چسبیده و فقط یک میله پرچم آزاد است. گل‌های ماده آن شباهت کامل به گل‌های نر دارد و فقط به جای پرچم، مادگی با تخمک‌های متعدد در آن دیده می‌شود. طول دمگل گل‌های ماده ۱۰-۵۰ میلی‌متر، تخمدان به طول ۶-۹ و به عرض ۴-۸ میلی‌متر، تقریبا کروی و پشمالو است. میوه‌اش کروی، به رنگ سبز، به بزرگی یک نارنگی کوچک، با خطوط طولی سفید یا دارای لکه‌های زرد، پوشیده از یک پوسته نسبتا نازک ولی سخت و دارای میان‌بر سفید رنگ و اسفنجی است (زرگری، ۱۳۷۵؛ معاونی، ۱۳۸۸؛ مظفریان، ۱۳۹۱) (شکل۲-۱). میوه به قطر ۳۰ تا ۱۲۰ میلی‌متر، در حالت رسیده، زردفام و مملو از بافت اسفنجی تلخ با دانه‌های متعدد صاف قهوه‌ای به طول ۴ تا ۵ و به قطر ۲ میلیمتر که در حاشیه فشرده شده‌است. فرابر میوه سرانجام ضخیم‌شونده و بخش گوشتی میوه، سرانجام خشک‌شونده هستند (شکل۲-۱). زمان گلدهی و میوه‌دهی از فروردین تا تیر یا از مهر تا آذر ماه است (صفوی، ۱۳۹۰؛ مظفریان، ۱۳۹۱). در منطقه خشک هند، رشد بین ژانویه و اکتبر صورت می‌گیرد، اما مطلوب‌ترین دوره رشد رویشی در طول تابستان است، با بارش باران و کاهش دما و در طول ماه‌های سرد و خشک از ماه دسامبر و ژانویه رشد تقریبا متوقف می‌شود (آگاهیو[1] و همکاران، ۲۰۱۱).

هندوانه ابوجهل می‌تواند بارش سالانه از ۲۵۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌متر و دمای سالانه ۱۴/۸ تا ۲۷/۸ درجه سانتیگراد را تحمل کند. در ارتفاع از سطح دریا ۱۵۰۰ و در بافت لومی شنی، خاکهای ریز صحرا و در امتداد سواحل شنی دریا با محدوده pH بین ۵/۰ تا ۷/۸ رشد می‌کند (شافرمن و همکاران ، ۱۹۹۸). علاوه بر این، می‌تواند در زمین‌های حاشیه‌ای رشد کند و ممکن است به عنوان کشت مخلوط برای بهبود کیفیت خاک مورد استفاده قرارگیرد (آگاهیو و همکاران، ۲۰۱۱). با توجه به پتانسیل رشدی، این گیاه می‌تواند در خاک‌های فقیر تنها با رطوبت کم و بدون کود آلی رشد کند و از آنجا که به عنوان غذای اصلی استفاده نمی‌شود، دانه‌های آن ممکن است یک منبع جالب برای تولید سوخت‌های زیستی باشد (شافرمن و همکاران، ۱۹۹۸). مبارک التاوادی و گریس[2] (۱۹۸۶) در پژوهشی نرخ استفاده از آب سطح برگ هندوانه ابوجهل را با استفاده از اندازه‌گیری دمای سطح و زیر برگ مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان می‌دهد یک سازوکار کنترل عالی یا دقیق، مانند یک سوئیچ، زمانی که برگ تجربه شرایط دشوار را داشته باشد، توانایی جلوگیری از دماهای کشنده را دارد. هندوانه ابوجهل یک گونه متحمل به خشکی است که در محیط خشک ضمن حفظ محتوای آب خود، بدون هیچ‌گونه پژمردگی برگ و یا خشک‌شدگی، حتی در شرایط تنش شدید زنده می‌ماند (دین[3] و همکاران، ۲۰۰۷).

1-Agahiu
2-Mubarak Althawadi and Grace
3-Dane