

تفکیک گونه‌ها و بررسی هیبریدهای احتمالی علف هرز مریافیوم (*Myriophyllum* spp.)

مقدمه‌ای جهت جلوگیری از تهاجم و راهکاری برای حفظ تنوع زیستی بوم نظام

رباب قهرمان زاده^{*۱} - سید حسن مرعشی^۲ - سعید ملک زاده شفارودی^۳ - رنه اسمالدرز^۴ - کلمنس ون دی ویل^۵ -

فرج اله شهریاری احمدی^۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۲

چکیده

از جمله مسائل مطرح در محبت امنیت زیستی به حداقل رساندن زیان اقتصادی حاصل از ورود گونه‌های خارجی مهاجم به فلور طبیعی منطقه می‌باشد. در برخی گیاهان هرز مهاجم از قبیل مریافیوم (*Myriophyllum* spp.) پدیده هیبریداسیون و به تبع آن قدرت بالای هیبریدها یکی از دلایل اصلی ایجاد قدرت تهاجم و قابلیت بالای آنها در تبدیل شدن به گونه مهاجم در منطقه جدید به حساب می‌آید. این مطالعه به منظور ارائه راهکاری برای شناسایی و تفکیک گونه‌های مهاجم جنس مریافیوم از گونه‌های بومی هلند و همچنین شناسایی نمونه‌های هیبرید احتمالی در این جنس در دانشگاه واگنینگن هلند طی سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱ انجام گرفت. برای این منظور ۷۱ نمونه مختلف جنس مریافیوم که متعلق به ۱۲ گونه بودند با استفاده از مکان بین ژنی هسته‌ای ITS برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آنالیز کلاستر بدست آمده از مناطق هسته‌ای بین ژنی ITS نشان داد که این مکان بین ژنی بدلیل درجه عمومیت بالا، قابلیت تکثیر و قدرت تفکیک بالای گونه‌ای در جنس مریافیوم قادر به تفکیک گونه‌های بومی و مهاجم می‌باشد. برخلاف مطالعات مورفولوژیکی که برخی گونه‌های عقیم مریافیوم موجود در فلور طبیعی هلند را بعنوان هیبرید معرفی نموده بودند، مناطق بین ژنی ITS آنها را در داخل گونه *M. heterophyllum* گروه بندی کرد. بنابراین به نظر می‌رسد که نمونه‌های مشکوک به هیبرید بررسی شده در مطالعه حاضر از جمله نمونه‌های مهاجمی باشند که در مناطق مختلف معرفی گردیده و تغییرات مورفولوژیکی و ژنتیکی را متحمل شده‌اند، ولی گونه جدیدی را بوجود نیاورده‌اند. نتایج کلی این تحقیق نشان داد که با بهره‌گیری از روش‌های مولکولی و توالی‌یابی ژن‌های مرجع می‌توان گونه‌های مهاجم، بومی و هیبرید را از هم تشخیص داد که این مطلب بویژه در مرحله بذری و مراحل اولیه رشد گیاهان مهاجم باعث جلوگیری از گسترش آنها شده و در نتیجه حفظ تنوع زیستی و ثبات بوم نظام را به دنبال خواهد داشت.

واژه‌های کلیدی: امنیت زیستی، ثبات بوم نظام، گونه مهاجم، هیبریداسیون

مقدمه

بین برنده تنوع زیستی معرفی نموده است. این خطر تهاجم از طریق گسترش گونه‌های خارجی در سرتاسر جهان با تجارت و گردشگری بین‌المللی افزایش پیدا کرده است که میزان زیان اقتصادی ناشی از حضور آنها تحت تأثیر شرایط اقلیمی و حاصلخیزی خاک منطقه جدید می‌تواند افزایش پیدا کند، بطوریکه سالانه ۳۵۰ میلیارد دلار در دنیا برای از بین بردن این گونه‌های خارجی هزینه می‌گردد (۴). بدین ترتیب باید تدبیری برای جلوگیری از ورود گونه‌های خارجی به فلور طبیعی منطقه بکار گرفته شود.

امروزه یکی از مهمترین تدابیری که برای حفظ تنوع زیستی پیش روی جامعه اکولوژیست‌ها قرار گرفته امنیت زیستی^۸ است که شامل

اتحادیه بین‌المللی حفظ طبیعت^۷ گونه‌های مهاجم خارجی را به همراه تغییرات اقلیمی و تخریب زیستگاه‌ها از جمله عوامل عمده از

۱- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

(*) نویسنده مسئول: Email: ghahramanr@uma.ac.ir

۲، ۳ و ۶- به ترتیب دانشیار، استادیار و استاد گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴ و ۵- استادان گروه اصلاح نباتات، دانشگاه واگنینگن هلند

7- International Union for Conservation of Nature (IUCN)

8- Biosecurity

مقبولیت گسترده آن بعنوان نشانگر فیلوژنتیکی شده است. علاوه بر آن ITS به دلیل حضور در سراسر ژنوم، داشتن توارث دو والدی و تغییرات تکاملی بالا در مطالعات تشخیص هیبریدها موفق عمل کرده است (۳، ۱۳ و ۱۴).

بنابراین با توجه به قدرت تهاجم بالای گیاه هرز آبی مریفیلوم و اهمیت بسزای آن ارائه راهکاری برای جلوگیری از ورود و گسترش آن در فلور طبیعی هلند، از منطقه بین ژنی هسته‌ای ITS برای تفکیک گونه‌های مهاجم و بومی مریفیلوم در هلند به منظور جلوگیری از ورود گیاهان مهاجم به منطقه از طریق شناسایی سریع آنها و همچنین تشخیص نمونه‌های مشکوک به هیبرید در جنس مذکور استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه اصلاح نباتات دانشگاه واگنینگن هلند طی سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱ انجام گرفت. مشخصات مواد گیاهی مورد استفاده و مراحل اجرای آزمایش به تشریح در ذیل ارائه شده است.

مواد گیاهی: بدلیل حضور نمونه‌های عقیم مشکوک به هیبرید مریفیلوم در فلور طبیعی هلند (که بر اساس مطالعات مورفولوژیکی انجام گرفته در بخش گیاه شناسی دانشگاه لایدن مشخص گردیده بود)، ۷۱ نمونه متعلق به ۱۲ گونه مختلف (جداول ۱ و ۲) از این جنس از مناطق مختلف هلند جمع‌آوری و به منظور خشک شدن و جلوگیری از نابودی DNA بلافاصله در ژل سیلیکا قرار داده شد. جمع‌آوری نمونه‌ها در شرایط مختلف بصورت دستی انجام شد. برخی دیگر از نمونه‌ها از هر بار بوم بخش گیاهشناسی دانشگاه لایدن^۴ تهیه گردید. گونه‌های والدینی بر اساس صفات مورفولوژیکی براحتی شناسایی شدند، ولی گونه‌های مشکوک به هیبرید (M419، M421، M423، M-b6 و M-b9) که بر اساس مطالعات مورفولوژیکی هیبرید تشخیص داده شده بودند برای تأیید هیبرید بودن، مورد مطالعات مولکولی قرار گرفتند.

استخراج و تکثیر DNA: روش‌های مختلف استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت، از کیت‌های استخراج DNA DNeasy Plant Mini Kit و QIAamp DNA Stool Mini Kit شرکت کیژن^۵ و همچنین از CTAB^۶ تغییر شکل یافته (۸) برای استخراج DNA استفاده گردید. تکثیر منطقه بین ژنی هسته‌ای ITS شامل دو بخش ITS1 و ITS2 با استفاده از آغازگرهای ذکر شده در جدول ۳ انجام شد.

مجموعه‌ای از اقدامات پیشگیرانه برای کاهش خطر انتقال مواردی از قبیل آفات قرنطینه‌ای، موجودات دستکاری شده ژنتیکی^۱ و گونه‌های خارجی می‌باشد (۱۲). بنابراین یکی از اهداف امنیت زیستی به حداقل رساندن زیان اقتصادی حاصل از ورود گونه‌های خارجی مهاجم به فلور طبیعی منطقه می‌باشد (۵). از جمله مسائلی که در مبحث گیاهان مهاجم و خارجی مطرح است هیبریداسیون بین گونه‌ای می‌باشد که با ورود گونه جدید به منطقه، هیبریداسیون در بین گونه‌های گیاهی مهاجم و بومی یا بین دو گونه مختلف مهاجم رخ داده و باعث ایجاد گونه جدید در منطقه مورد تهاجم می‌شود. این گونه‌های مهاجم و هیبرید از لحاظ پتانسیل ژنتیکی مزایای بیشتری نسبت به والدین خود دارا بوده و با کسب خصوصیات جدید قادر به رشد و گسترش سریع در منطقه جدید می‌باشند که این امر به دلیل ایجاد یکنواختی گونه‌ای باعث از بین رفتن تنوع زیستی طبیعی منطقه می‌شود (۷). بنابراین مطالعه روی گیاهان هیبرید به منظور شناسایی والدین آنها می‌تواند در بررسی منشأ گیاه مورد مطالعه، عوامل مؤثر در استقرار و همچنین گسترش این گیاهان در منطقه مفید واقع شود که در نهایت درک بهتری از مطالعاتی که باید روی این گیاهان انجام شود را در اختیار محققان اکولوژی قرار می‌دهد (۱). از آنجا که این گونه‌ها با سرعت بالایی تکامل پیدا می‌کنند، بنابراین از لحاظ افزایش هزینه‌های اقتصادی و خطرات زیست محیطی نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشند. از طرف دیگر، با توجه به سرعت تکامل و تغییرات فنوتیپی و ژنتیکی سریع این گونه‌ها، پیشگیری از گسترش آنها به مراتب مشکل می‌باشد (۷).

از جمله گیاهان هرز مهاجمی که هیبریداسیون به وفور در آن اتفاق می‌افتد جنس آبی مریفیلوم^۲ است (۱۳ و ۱۴) که شامل ۶۸ گونه مختلف بوده و گسترش جهانی دارد. گونه مهاجم Cf. *Myriophyllum spicatum* با منشأ آسیایی-اروپایی به عنوان گیاه مهاجم خارجی حاصل از هیبریداسیون شناخته شده است (۱۴). بنظر می‌رسد که هیبریداسیون نقش مهمی را در تنوع مریفیلوم ایفا می‌کند. از آنجا که در گونه‌های این جنس تکثیر رویشی مرسوم است، بنابراین شناسایی فقط بر اساس شکل ظاهری دشوار می‌باشد (۱۱)، بطوریکه طی مطالعات اخیر برای بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های مریفیلوم و تعیین محدوده هر گونه از روش‌های مبتنی بر DNA استفاده گردیده است. بعنوان مثال، از مناطق کدکننده ژنوم کلروپلاست شامل trnK و matK و منطقه بین ژنی هسته‌ای همچون ITS^۳ برای این منظور استفاده شده است (۱۳). منطقه بین ژنی هسته‌ای ITS بعنوان یکی از مفیدترین نشانگرهای فیلوژنتیکی در گیاهان و حیوانات مورد توجه محققان قرار گرفته است که به دلیل قدرت تشخیص نمونه‌ها در سطح گونه و سهولت تکنیکی، باعث

4- National Herbarium NHN in Leiden
5- Qiagen
6- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

1- Genetic modified organisms
2- Myriophyllum
3- Internal Transcribed Spacer

جدول ۱- لیست و مشخصات جامع نمونه‌های گیاهی جنس *مریاقیوم* بررسی شده در مطالعه حاضر*

گونه	شماره	جمع‌آوری کننده	سال	خاستگاه	محل جمع‌آوری
<i>M. aquaticum</i>	418	Duistermaat, H.	2007	Netherlands	Noord-Brabant
Unknown	419	Duistermaat, H.	2007	Netherlands	Limburg
Unknown	421	Duistermaat, H.	2007	Netherlands	Limburg
<i>M. heterophyllum</i>	422	Duistermaat, H.	2007	Netherlands	Limburg
Unknown	423	Duistermaat, H.	2007	Netherlands	Limburg
<i>M. aquaticum</i>	426	Duistermaat, H.	2007	France	Bretange
<i>M. verticillatum</i> Cf.	461	Duistermaat, H.		Greece	
<i>M. tuberculatum</i>	3254	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Origin	Noord Holland
<i>M. propinquum</i>	3266	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Hungary	Noord Holland
<i>M. propinquum</i>	3267	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Hungary	Noord Holland
<i>M. aquaticum</i>	3294	Valkenburg, J.L.C.H. van		Unknown	cult. Origin
<i>M. aquaticum</i>	3298	Valkenburg, J.L.C.H. van		Unknown	cult. Origin
<i>M. tuberculatum</i>	3305	Valkenburg, J.L.C.H. van		cult. Singapore	
<i>M. pinnatum</i>	3306	Valkenburg, J.L.C.H. van		cult. Singapore	
<i>M. heterophyllum</i>	3326	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	Netherlands	Drenthe
<i>M. aquaticum</i>	3329	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	Netherlands	Drenthe
<i>M. tuberculatum</i>	3333	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Malaysia	
<i>M. scabratum</i>	3334	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Malaysia	
<i>M. pinnatum</i>	3342	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Netherlands	
<i>M. simulans</i>	3343	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Netherlands	
<i>tuberculatum</i>	3349	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Singapore	
<i>M. aquaticum</i> Cf.	3350	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Singapore	
<i>M. heterophyllum</i>	3353	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	Netherland	Utrecht
<i>M. scabratum</i>	3369	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	cult. Malaysia	
<i>M. spicatum</i>	3370	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	cult. Hungary	
<i>M. spicatum</i>	3371	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	cult. Hungary	
<i>M. spicatum</i>	3372	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	cult. Hungary	
<i>M. scabratum</i>	3373	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	cult. Hungary	
<i>M. heterophyllum</i>	3399	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	Netherlands	Noord Holland
<i>M. heterophyllum</i>	3401	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	Netherlands	
<i>M. spicatum</i>	3405	Valkenburg, J.L.C.H. van		Netherland	
<i>M. verticillatum</i>	3406	Valkenburg, J.L.C.H. van		Netherlands	
Unknown	3410	Valkenburg, J.L.C.H. van		Netherlands	Drenthe
<i>M. heterophyllum</i>	3411	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	Netherlands	Drenthe
<i>M. verticillatum</i>	3412	Valkenburg, J.L.C.H. van		Netherlands	Drenthe
<i>M. heterophyllum</i>	3413	Valkenburg, J.L.C.H. van		Netherlands	
<i>M. spicatum</i>	3419	Valkenburg, J.L.C.H. van		France	Burgundy
<i>M. heterophyllum</i>	3424	Valkenburg, J.L.C.H. van		Netherlands	Noord Brabant
<i>M. scabratum</i>	3440	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	cult. Malaysia	
<i>M. tuberculatum</i>	3441	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	cult. Malaysia	
<i>M. tuberculatum</i>	3456	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	cult. Singapore	
Unknown	B6	Bruinsma, J.	2007	Netherlands	Noord Brabant
<i>M. Simulans</i> Cf.	B7	Bruinsma, J.	2007	Unknown	cult. origin
<i>M. heterophyllum</i>	B8	Bruinsma, J.	2007	Netherlands	Noord-Brabant
Unknown	B9	Bruinsma, J.	2007	Netherlands	Utrecht
<i>M. heterophyllum</i>	H3	Hussner, A.	2008	Germany	
<i>M. aquaticum</i>	H4	Hussner, A.	2008	Germany	
<i>M. aquaticum</i>	K2	Kloen, H.	2006	Netherlands	Gelderland
<i>M. heterophyllum</i>	S3	Slikke, W. van der	2007	Netherlands	Drenthe
<i>M. alterniflorum</i>	W6	Wiel, P. van der	2006	Netherlands	Noord Brabant
<i>M. aquaticum</i>	W60	Watterlot, A.	2008	France	Somme
Unknown	3478	Valkenburg, J.L.C.H. van	2009	cult. Singapore	
Unknown	3480	Valkenburg, J.L.C.H. van	2009	cult. SEAsia	
Unknown	3477	Valkenburg, J.L.C.H. van	2009	cult. Singapore	
<i>M. alterniflorum</i>	3491	Valkenburg, J.L.C.H. van	2009	Netherlands	Gelderland
Unknown	3485	Valkenburg, J.L.C.H. van	2009	cult. Romania	
<i>M. robustum</i> Cf.	3472	Valkenburg, J.L.C.H. van	2009	cult. Netherland	
<i>M. robustum</i>	H20	Hofstra, D.	2009	New Zealand	
<i>M. robustum</i>	3510	Valkenburg, J.L.C.H. van	2009	cult. Hungary	
<i>M. aquaticum</i>	3511	Valkenburg, J.L.C.H. van	2009	cult. Hungary	

*- فقط اسامی گیاهانی که مکان بارکد آنان با موفقیت تکثیر شد آورده شده است.

جدول ۲- گونه‌های متعلق به جنس *مریافیوم* بررسی شده در مطالعه حاضر

نوع پراکنش	گونه						
بومی هرز	<i>M. alterniflorum</i>	<i>M. spicatum</i>	<i>M. verticillatum</i>				
مهاجم	<i>M. aquaticum</i>	<i>M. heterophyllum</i>					
خارجی- غیرمهاجم	<i>M. propinquum</i>	<i>M. tuberculatum</i>	<i>M. simulans</i>	<i>M. pinnatum</i>	<i>M. scabratum</i>	<i>M. crispatum</i>	<i>M. robustum</i>

بندی شدند.

به منظور بدست آوردن یک توالی مورد توافق^۴ برای هر کدام از نمونه‌ها، برای هر نمونه دو توالی بدست آمده (که از توالی‌یابی محصولات PCR با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشتی بصورت جداگانه بدست آمده بودند) در نرم‌افزار Seq Man متعلق به DNASTAR هم‌ردیف شدند. بدین طریق در هر کدام از نمونه‌ها برای هر مکان *ITS* یک توالی واحد^۵ بدست آمد. برای هم‌ردیف سازی چندگانه^۶ (MSA) در هر گونه از نرم افزار MEGA Ver. 4.0 استفاده گردید. سپس با استفاده از داده‌های بدست آمده از توالی‌های *ITS1* و *ITS2* میزان تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای، سایت‌های متغیر و سایت‌های محافظت شده تعیین و دندروگرام‌ها با استفاده از مدل ϕ -distance، روش Neighbor joining Bootstrap- استفاده از ضریب بوتسترپ ۱۰۰۰ ترسیم گردیدند.

نتایج و بحث

بر اساس مطالعات مورفولوژیکی انجام گرفته در بخش گیاهشناسی دانشگاه لایدن، نمونه‌های M419، M421، M423، M- b6 و M-b9 (جدول ۱) بدلیل عدم گله‌ی و عقیم بودن، مشکوک به هیبرید بین دو گونه مختلف از جنس *مریافیوم* بودند. به منظور بررسی صحت نتایج بدست آمده در مطالعات مورفولوژیکی و تأیید هیبرید بودن این نمونه‌ها از مناطق هسته‌ای بین ژنی *ITS1* و *ITS2* استفاده گردید که این دو مکان بین ژنی در مطالعات مختلف برای بررسی هیبرید مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳، ۱۰ و ۱۴). نتایج بدست آمده نشان داد که مکان بین ژنی *ITS1* نسبت به مکان *ITS2* میزان موفقیت در تکثیر بالاتری داشت، بطوری که تکثیر در این نواحی به ترتیب ۷۶ و ۵۶ درصد کل نمونه‌های *مریافیوم* مورد بررسی بود. همچنین ۹۴ و ۸۵ درصد محصولات PCR نمونه‌های تکثیر شده برای *ITS1* و *ITS2* با موفقیت توالی-یابی گردیدند.

تکثیر DNA با استفاده از آغازگرهای 26SE و 17SE به صورت زیر انجام شد:

واکنش‌های تکثیر در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از آنزیم Taq پلی‌مراز (به منظور بدست آوردن محصولات PCR با انتهای چسبنده) در دو تکرار همراه با نمونه کنترل منفی انجام گرفت. شرایط واکنش PCR شامل دو میکرولیتر از ۲۰ نانوگرم DNA، ۱۰X PCR Buffer، ۰/۲ واحد Taq پلی‌مراز در هر چهار پیکومول از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (26SE و 17SE)، دو پیکومول از هر dNTP و ۰/۲ واحد Taq پلی‌مراز در هر واکنش بود. واکنش‌ها در دستگاه ترموسایکلر BioRad Dyad تحت شرایط زیر انجام گرفت:

داناتوره شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه دیگر داناتوره شدن بعدی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام گردید. مرحله اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله آخر یا مرحله گسترش در ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

همسانه‌سازی^۱ محصولات PCR نمونه‌های مشکوک به هیبرید: محصولات PCR مکان بین ژنی *ITS* با استفاده از ستون سفادکس بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده (اینویترژن^۲) خالص‌سازی شدند و همسانه‌سازی نمونه‌ها از کیت TOPO TA Cloning شرکت اینویترژن بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط آن انجام شد.

توالی‌یابی و آنالیز داده‌ها: برای توالی‌یابی *ITS1* از آغازگرهای 17SE و 5.8/1 و برای توالی‌یابی *ITS2* از آغازگرهای 26SE و 5.8/2 استفاده گردید. توالی‌یابی نمونه‌ها توسط شرکت گرینومیکس^۳ مستقر در دانشگاه واگنینگن انجام شد.

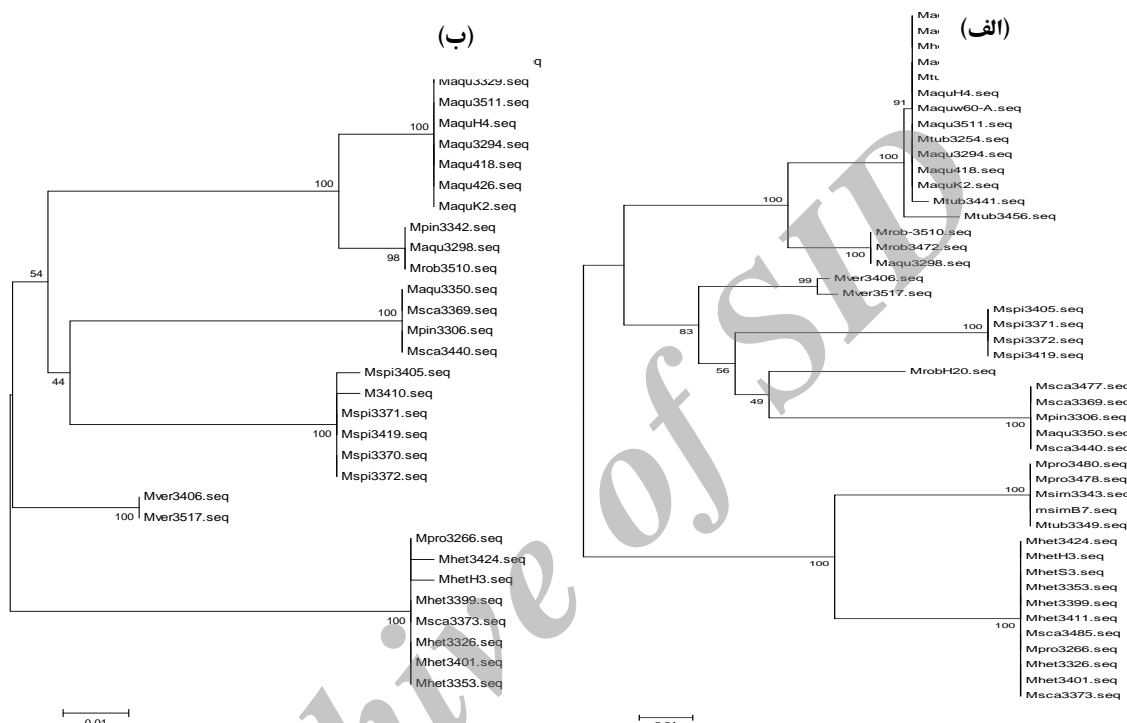
برای بررسی نتایج بدست آمده، داده‌ها در چهار گروه شامل (۱) *ITS1* بدون نمونه‌های مشکوک به هیبرید، (۲) *ITS1* با احتساب نمونه‌های مشکوک به هیبرید، (۳) *ITS2* بدون نمونه‌های مشکوک به هیبرید و (۴) *ITS2* با احتساب نمونه‌های مشکوک به هیبرید دسته-

4- Consensus sequence
5- Contig
6- Multiple Sequence Alignment

1- Cloning
2- Invitrogen
3- Greenomics

جدول ۳- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر و توالی‌یابی مناطق بین ژنی ITSs

مکان بین ژنی	نام آغازگر	نوع آغازگر	توالی (3'---->5')	مراحل استفاده
ITS	26SE	رفت	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	تکثیر و توالی‌یابی
ITS	17SE	برگشت	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCTG	تکثیر و توالی‌یابی
ITS2	5.8/2	رفت	GCCTGGGCGTCAACGC	توالی‌یابی
ITS1	5.8/1	برگشت	GTTGCCGAGAGTCGT	توالی‌یابی



شکل ۱- دندروگرام بر اساس روش Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی (الف) توالی‌های هسته‌ای ITS1 و (ب) ITS2 در جنس *مریافیوم* با استفاده از نرم‌افزار MEGA

به تفکیک گونه‌های مختلف جنس *مریافیوم* (که با موفقیت تکثیر و توالی‌یابی شدند) بود (شکل ۱- الف). گونه‌های بومی *M. spicatum* و *M. verticillatum* به ترتیب ۱۲ و ۲ SNP خاص گونه داشتند، در حالیکه در گونه‌های مهاجم، SNP‌های خاص گونه مشاهده نگردید.

در منطقه بین ژنی هسته‌ای ITS2 (گروه سوم) دامنه تنوع درون گونه‌ای از صفر درصد برای *M. verticillatum* تا ۱۱/۷ درصد برای *M. robertsum* متغیر بود. همچنین دامنه تنوع بین گونه‌ای از ۵/۹ تا ۱۳/۶ درصد متغیر و دارای میانگین تنوع بین گونه‌ای ۹/۴ درصد بود. بر اساس ۷۲ جایگاه متغیر، این مکان بین ژنی نیز توانست گونه‌های مختلف جنس *مریافیوم* را تفکیک نماید (شکل ۱- ب).

با توجه به میزان موفقیت پایین‌تر تکثیر در ITS2، سه نمونه از پنج نمونه مشکوک به هیبرید با استفاده از این مکان بین ژنی تکثیر شدند. طول توالی بدست آمده از تکثیر کل منطقه ITS در جنس *مریافیوم* ۸۱۰ جفت باز بود که بر اساس توالی‌یابی مستقل دو مکان بین ژنی، طول توالی بدست آمده برای ITS1 ۳۹۰ و ITS2 ۳۱۳ جفت باز بود.

آنالیز توالی‌ها: بدون در نظر گرفتن نمونه‌های مشکوک به هیبرید، در داخل داده‌های گروه اول (منطقه بین ژنی هسته‌ای ITS1) دامنه تنوع درون گونه‌ای از صفر درصد برای *M. simulans* و *M. spicatum* تا ۹/۱۹ درصد برای *M. scabratum* متغیر بود. همچنین دامنه تنوع بین گونه‌ای از ۲/۴ تا ۱۵/۲ درصد متغیر و میانگین آن ۱۱/۴ درصد بود. مکان بین ژنی ITS1 با داشتن طولی برابر ۳۹۰ جفت باز حاوی ۱۱۹ جایگاه متغیر بود که این جایگاه‌های متغیر قادر

1- Single nucleotide polymorphism

جدول ۴- موقعیت SNPهای خاص در نمونه‌های مشکوک به هیبرید و برخی گونه‌های مهاجم، بومی و غیرمهاجم *مریافیوم* در توالی مکان بین ژنی ITS2

نمونه‌ها و گونه‌ها	SNP																				
	۲۲	۲۷	۲۹	۳۰	۳۶	۳۹	۴۲	۴۵	۵۷	۷۵	۹۹	۱۵۱	۱۶۳	۱۶۵	۱۷۴	۱۷۹	۱۸۷	۲۰۷	۲۱۲	۲۲۳	۲۲۷
<i>M. aquaticum</i>	-	C	A	C	G	A	T	T	G	A	A	G	C	T	C	T	T	C	A	T	T
<i>M. verticillatum</i>	G	T	C	C	G	A	T	T	G	A	G	G	C	T	C	T	C	C	T	T	T
<i>M. spicatum</i>	A	C	T	T	A	A	C	T	T	G	A	A	C	C	C	T	T	C	C	A	G
<i>M. scabratum</i>	A	C	C	C	G	A	T	T	G	A	A	G	C	T	C	T	T	C	T	T	T
<i>M. heterophyllum</i>	-	C	C	C	G	G	T	G	G	C	A	G	A	T	T	C	A	T	C	T	T
<i>M423</i>	-	C	C	C	G	G	T	G	G	C	A	G	A	T	T	C	A	T	C	T	T
<i>M421</i>	-	C	C	C	G	G	T	G	G	C	A	G	A	T	T	C	A	T	C	T	T
<i>M-b9</i>	-	C	C	C	G	G	T	G	G	C	A	G	A	T	T	C	A	T	C	T	T

استفاده از تکنیک توالی‌یابی مستقیم برای نمونه‌های مشکوک به هیبرید موفقیت‌آمیز نبود که با نتایج بدست آمده توسط مودی و همکاران (۱۴) مطابقت داشت. آنان چنین اظهار داشتند که دلیل عدم تشابه کامل دو رشته DNA والدینی (احتمال وجود حذف و اضافه در یکی از والدین و یا وجود SNP خاص هر والد در موقعیت نوکلئوتیدی خاص) ممکن است ترکیب مختلفی از دو رشته متفاوت در واکنش توالی‌یابی حضور داشته و آن را مختل نمایند. برای بدست آوردن توالی با کیفیت بالا و اطمینان از نتایج بدست آمده از تکنیک همسانه کردن تک رشته‌ای برای توالی‌یابی نمونه‌های هیبرید استفاده گردید. با استفاده از این تکنیک هر تک رشته DNA نمونه هیبرید بصورت جداگانه در یک حامل قرار گرفته و سپس توالی‌یابی گردید. به منظور اطمینان از نتایج بدست آمده تعدادی از نمونه‌های والدینی که در طول توالی خود حاوی پیک‌های توالی دوتایی^۲ بودند، نیز همسانه گردیدند. نتیجه حاصل از توالی‌یابی همسانه‌های والدینی تنها حاوی یک آلل منفرد بود و در توالی‌های بدست آمده از همسانه متعلق به نمونه‌های مشکوک به هیبرید نیز تنها یک آلل منفرد مشاهده شد. عبارتی دیگر، دو رشته DNA در منطقه ITS دارای توالی نوکلئوتیدی یکسانی بودند که بر اساس این توالی‌های بدست آمده تمام نمونه‌های مشکوک به هیبرید در گونه *M. heterophyllum* دسته‌بندی شدند (شکل ۲). توالی بدست آمده از نمونه‌های مشکوک به هیبرید با گونه *M. heterophyllum* شباهت صد در صد نشان نداد (جدول ۵ و ۶) و هر کدام از آنها در هر دو توالی ITS بررسی شده در یک یا چند جایگاه نوکلئوتیدی، SNP خاص خود را نسبت به گونه *M. heterophyllum* و حتی سایر گونه‌های جنس *مریافیوم* داشتند (جدول ۷ و ۸). با افزودن توالی نمونه‌های مشکوک به هیبرید به گروه داده‌های اول و سوم (ایجاد گروه داده‌های دوم و چهارم) تعداد سایت‌های متغیر در توالی ITS1 و ITS2 به ترتیب به ۱۳۱ و ۹۰ عدد

با استفاده از مکان ITS2 گونه‌های بومی هلند، گونه‌های مهاجم و خارجی غیرمهاجم نیز دارای SNPهای خاص گونه بودند. بعنوان مثال، گونه‌های مهاجم *M. heterophyllum* و *M. aquaticum* به ترتیب دارای هشت و یک SNP خاص، گونه‌های بومی *M. verticillatum* دارای چهار و *M. spicatum* دارای نه SNP منحصر به خود بودند (جدول ۴).

نتایج آنالیز کلاستر بدست آمده از مناطق هسته‌ای بین ژنی ITS توانست گونه‌های مختلف جنس *مریافیوم* را از یکدیگر جدا نمایند (شکل ۱). با توجه با این که گونه‌های جنس *مریافیوم* از لحاظ مورفولوژیکی بسیار شبیه به یکدیگر می‌باشند (۱۳)، لذا شناسایی این گونه‌ها و تفکیک آنان از یکدیگر تنها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی به سختی امکان‌پذیر است. با این وجود، نمونه‌های مشکوک به هیبرید به دلیل عدم گلدهی به راحتی از سایر نمونه‌ها قابل تفکیک بودند. بر اساس نتایج مطالعه‌ای که بر روی بارکدگذاری DNA جنس *مریافیوم* با استفاده از مکان‌های کلروپلاستی *rbcL* و *trnH-psbA* انجام شد (۸)، فرض بر این بود که برخی از نمونه‌های گونه مهاجم *M. heterophyllum* پس از ورود به منطقه جدید با گونه بومی موجود در این منطقه تلاقی پیدا کرده و گونه جدیدی را بوجود آورده‌اند که به دلیل فاصله ژنتیکی زیاد والدین از یکدیگر، عقیم می‌باشد. از آنجا که ژنوم کلروپلاست این نمونه‌ها با ژنوم کلروپلاستی *M. heterophyllum* شباهت داشت، لذا چنین بنظر می‌رسید که *M. heterophyllum* بعنوان والد مادری، کلروپلاست خود را به این نمونه‌ها منتقل نموده است.

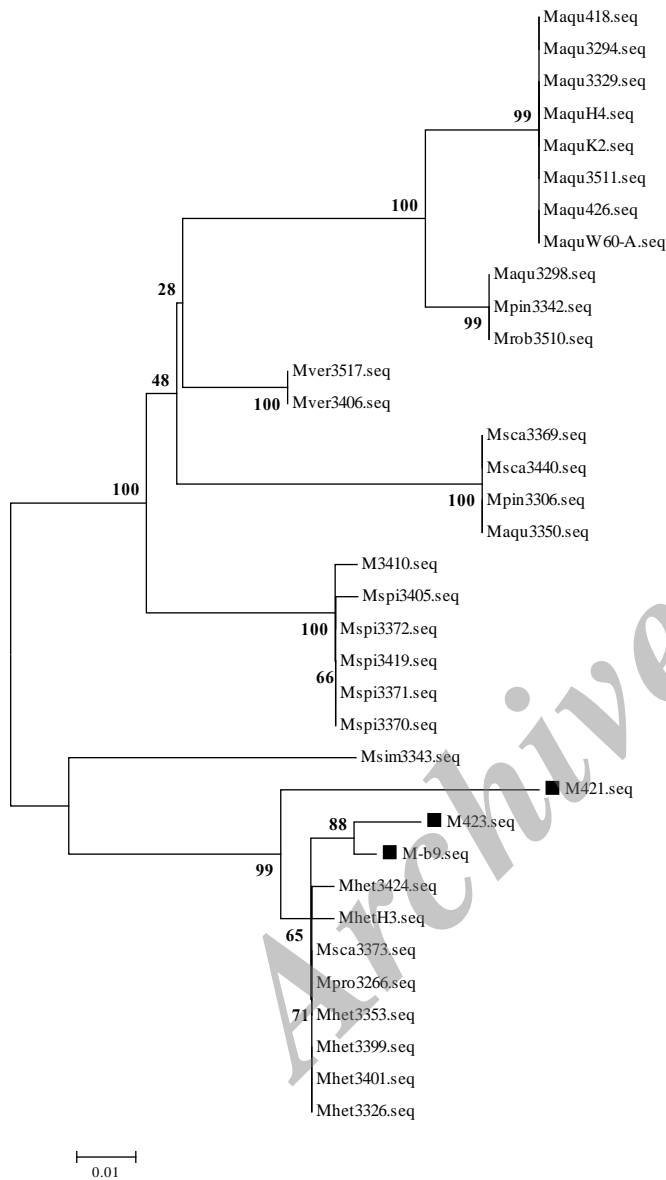
در تعدادی از موقعیت‌های نوکلئوتیدی در فایل ABI^۱ توالی ITS بدست آمده از توالی‌یابی مستقیم محصولات PCR نمونه‌های مشکوک به هیبرید، نوع نوکلئوتید حاضر در این موقعیت قابل تشخیص نبود و توالی باکیفیت در این مرحله حاصل نشد. بنابراین،

2- Double peak

1- Trace file

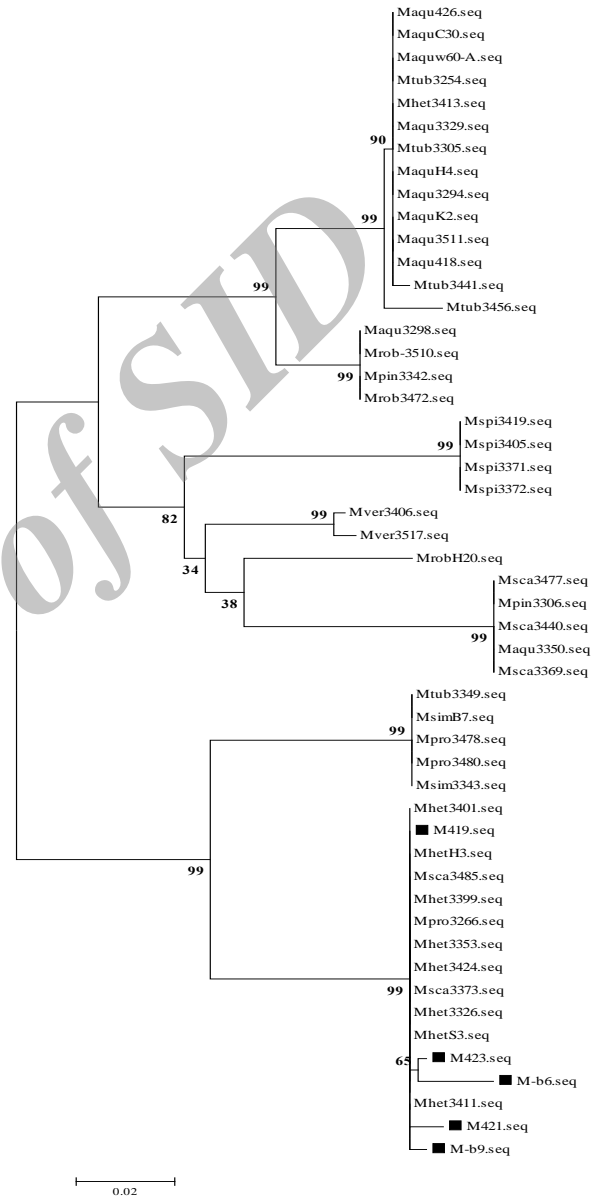
ITS1 و ITS2 در گروه داده‌های دوم و چهارم نسبت به دو گروه اول و سوم افزایش پیدا کرد (به ترتیب ۰/۰۵ و ۲/۲ درصد افزایش در درون گروه داده‌های دوم و چهارم).

(ب)



افزایش پیدا کرد که این افزایش سایت‌های متغیر تنوع درون گونه‌ای را در داخل گونه *M. heterophyllum* بالا برد. بطوریکه تنوع درون گونه‌ای *M. heterophyllum* با استفاده از هر دو مکان بین ژنی

(الف)



شکل ۲- دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی (الف) توالی هسته‌ای ITS1 برای داده‌های گروه دوم و (ب) ITS2 برای گروه داده‌های چهارم در جنس *مریافیوم* با استفاده از نرم‌افزار MEGA. نمونه‌های مشکوک به هیبرید با علامت ■ مشخص گردیده است.

جدول ۵- میانگین فاصله (p-distance) بین نمونه‌های مشکوک به هیبرید با گونه *M. heterophyllum* با استفاده از مکان بین ژنی ITS1

شماره	۱	۲	۳	۴	۵	۶
۱ <i>M. heterophyllum</i>	-					
۲ M419	۰					
۳ M421	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶				
۴ M423	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۸			
۵ M-b6	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۰۲	۰/۰۱۴		
۶ M-b9	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۸	۰/۰۰۶	۰/۰۱۷	-

جدول ۶- میانگین فاصله (p-distance) بین نمونه‌های مشکوک به هیبرید با گونه *M. heterophyllum* با استفاده از مکان بین ژنی ITS2

شماره	۱	۲	۳	۴
۱ <i>M. heterophyllum</i>	-			
۲ M421	۰/۰۵۶			
۳ M423	۰/۰۲۶	۰/۰۶۶		
۴ M-b9	۰/۰۱۱	۰/۰۵۹	۰/۰۲۱	-

جدول ۷- موقعیت SNPهای موجود در هر کدام از نمونه‌های مشکوک به هیبرید و گونه *M. heterophyllum* در توالی مکان بین ژنی ITS1

نمونه و گونه	SNP																							
	۴	۳	۳	۴	۵	۵	۵	۵	۶	۶	۷	۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲		
M423	C	A	G	G	A	G	G	T	T	G	G	T	T	A	T	C	T	T	C	T	T	G	T	
M421	G	T	C	T	C	A	A	A	A	G	G	C	A	A	C	C	C	C	G	G	G	G	T	G
M-b9	G	T	C	G	A	G	G	T	T	C	G	T	T	T	T	C	T	T	G	T	G	G	G	T
<i>M. heterophyllum</i>	G	T	C	G	A	G	G	T	T	G	C	T	T	T	T	G	T	T	G	T	G	G	G	G

SNP خاص نمونه با رنگ خاکستری مشخص است.

جدول ۸- موقعیت SNPهای موجود در هر کدام از نمونه‌های مشکوک به هیبرید و گونه *M. heterophyllum* در توالی مکان بین ژنی ITS2

نمونه و گونه	موقعیت SNP در توالی											
	۲۵	۷۴	۷۶	۷۸	۸۲	۲۹۰	۳۳۸	۳۴۲	۳۴۳	۳۴۷	۳۵۰	۳۵۶
M-b9	C	T	C	C	T	C	C	G	G	T	C	G
M-b6	G	T	G	C	T	C	T	C	A	G	A	A
M423	G	T	G	C	T	C	C	C	G	T	C	T
M419	G	T	G	C	T	C	C	C	G	T	C	G
M421	G	C	G	G	G	A	C	C	G	T	C	G
<i>M. heterophyllum</i>	G	T	G	C	T	C	C	C	G	T	C	G

SNP خاص نمونه با رنگ خاکستری مشخص است.

تنها بر اساس تنوع نوکلئوتیدی موجود در توالی براحتی قادر به تفکیک این گونه‌ها از یکدیگر بودند.

تنوع بین گونه *M. heterophyllum* و نمونه‌های مشکوک به هیبرید با استفاده از هر دو مکان ITS1 و ITS2 بسیار پایین بود (جدول ۵ و ۶). بطوریکه با تنوع درون گونه‌ای جنس *مریافیوم* همپوشانی داشت که بر اساس میزان پایین این تنوع، نمونه‌های مشکوک به هیبرید در گروه جداگانه‌ای از گونه *M. heterophyllum* قرار نگرفتند. همانطور که در جداول ۷ و ۸ نشان داده شده است

بطور کلی نتایج هیبریداسیون در جنس *مریافیوم* متعلق به کشورهای مختلف (شامل مجارستان، هلند، یونان، فرانسه، سنگاپور، مالزی، رومانی، ایالات متحده آمریکا، آفریقای جنوبی، انگلیس، آلمان و نیوزیلند) نشان داد با وجود اینکه این گونه‌ها متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف بودند، ولی شباهت زیادی از لحاظ مورفولوژیکی با یکدیگر داشتند، با این وجود داده‌های مولکولی گونه‌هایی که از لحاظ ظاهری مشابه بودند را از یکدیگر تفکیک نمودند. عبارتی دیگر، مناطق بین ژنی استفاده شده در این بررسی (شامل ITS1 و ITS2)،

آنالیز توالی ITS چنین به نظر می‌رسد که هیبریداسیون در این نمونه‌ها اتفاق نیفتاده و عدم گلدهی ممکن است به دلیل قرارگیری این نمونه‌ها در شرایط محیطی مختلف و یا تغییرات ژنتیکی رخ داده در سایر مکان‌های ژنی هسته‌ای باشد. این امر مؤید این مطلب می‌باشد که ممکن است این نمونه‌ها در طول زمان تغییرات بیشتری را متحمل شده و با ایجاد تغییرات ژنتیکی در آنها و در نتیجه کم شدن فاصله ژنتیکی با سایر گونه‌های جنس *مریافیوم* احتمال تشکیل هیبرید در این نمونه‌ها نیز افزایش پیدا کند که این امر در نهایت باعث ایجاد گونه جدید خواهد شد.

نتیجه‌گیری

از آنجا که جنس *مریافیوم* بخوبی بعنوان گیاه هرز مهاجم در دنیا شناخته شده است، لذا چنین به نظر می‌رسد که پدیده هیبریداسیون و به تبع آن قدرت بالای هیبریدها یکی از دلایل اصلی ایجاد قدرت تهاجم و قابلیت بالای این گیاه آبی‌زی در تبدیل شدن به گونه‌ای مهاجم در منطقه جدید باشد. به دلیل اینکه تکثیر بیشتر گیاهان غوطه‌ور در آب از جمله *مریافیوم* بصورت رویشی می‌باشد، لذا هیبرید هتروزیس حاصله به راحتی تکثیر شده و به سرعت در منطقه جدید گسترش می‌یابد. بنابراین بایستی از بروز هیبریداسیون در این گونه مهاجم جلوگیری نمود. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مکان بین ژنی ITS قادر به شناسایی این نمونه‌ها و تفکیک گونه‌های مختلف از یکدیگر بود و می‌توان از آن برای تشخیص گونه‌های مختلف *مریافیوم* از یکدیگر استفاده کرد و بدین ترتیب از ورود گونه‌های غیربومی به منطقه جلوگیری نمود. بطور کلی بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان چنین بیان داشت که با استفاده از روش‌های مولکولی و تعیین توالی مناطق ژنی و بین ژنی مرجع تشخیص گونه‌های بومی، مهاجم و هیبرید از یکدیگر امکان‌پذیر می‌باشد که این مطلب بویژه در مرحله بذری و مراحل اولیه رشد گیاهان مهاجم باعث جلوگیری از گسترش آنها شده که در نهایت حفظ تنوع زیستی و ثبات بوم نظام را به دنبال خواهد داشت.

قدردانی

بدین طریق از گروه اصلاح نباتات دانشگاه واگنینگن هلند به دلیل فراهم آوردن شرایط اجرای این طرح و از دانشگاه‌های لایدن و فردوسی مشهد که در اجرای این طرح همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

نمونه‌های مشکوک به هیبرید M-b9، M-b6، M423، M419 و M421 با استفاده از توالی ITS1 به ترتیب حاوی سه، پنج، یک، صفر و چهار سایت متغیّر و متفاوت نسبت به *M. heterophyllum* بودند. همچنین با استفاده از توالی ITS2، نمونه‌های M421، M423 و M-b9 نسبت به گونه *M. heterophyllum* به ترتیب حاوی ۶، ۱۲ و ۲ موقعیت نوکلئوتیدی متفاوت بودند. با توجه به فاصله ژنتیکی کم بین نمونه‌های مشکوک به هیبرید و گونه *M. heterophyllum*، این نمونه‌ها در داخل گونه مذکور دسته‌بندی شدند (شکل ۲). بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده چنین بنظر می‌رسد که این نمونه‌ها متعلق به گونه *M. heterophyllum* می‌باشند، ولی برخلاف سایر نمونه‌های موجود در این گونه که اختلاف توالی و ظاهری با یکدیگر ندارند، این نمونه‌ها تفاوت‌هایی را از لحاظ مورفولوژیکی (عدم گلدهی) و ژنتیکی (توالی هسته‌ای) با سایر نمونه‌های موجود در این گونه دارا هستند. البته نتایج حاصل از این مطالعه با یافته‌های مودی و لس (۱۴) که هیبریدهای زیادی در داخل جنس *مریافیوم* شناسایی کردند و هیبریداسیون را به عنوان یکی از مکانیسم‌های تکامل در داخل این جنس معرفی نمودند، مطابقت نشان نداد.

درصد کمی از گونه‌های علف هرز وارد شده به منطقه جدید قارند تا در محیط جدید موفق عمل کرده و تبدیل به گیاه مهاجم شوند. در همین راستا، پژوهشگران سه دلیل عمده سپری کردن دوره کمون طولانی بعد از ورود به منطقه جدید، وارد شدن این گونه‌ها به مناطق جغرافیایی مختلف^۱ و مکانیسم تکاملی هیبریداسیون را برای قدرت تهاجم آنها عنوان داشته‌اند (۷). مکانیسم هیبریداسیون در گونه مهاجم *M. heterophyllum* مشاهده گردیده است، بدین ترتیب که از لحاظ پتانسیل ژنتیکی گونه‌های مهاجم و هیبرید مزایای بیشتری نسبت به والدین خود دارا بوده و با کسب خصوصیات جدید قادر به رشد و گسترش سریع در منطقه جدید می‌باشند (۱۴). به نظر می‌رسد که داشتن دوره کمون طولانی و معرفی چندگانه در محیط‌های اکولوژیکی مختلف پیش نیاز برخی گونه‌های مهاجمی می‌باشد که از سایر گونه‌ها ایزوله بوده و حال با ورود به مناطق مختلف و طی کردن دوره کمون طولانی آمادگی لازم را برای هیبرید شدن با سایر گونه‌ها پیدا کرده‌اند.

گونه *M. heterophyllum* در مناطق مختلف بعنوان مهاجم معرفی گردیده است (۲ و ۹). بنابراین این گیاه از جمله علف‌های هرزی محسوب می‌شود که در مناطق مختلف وارد شده و تغییرات زیادی را متحمل گردیده است (۶). بر اساس این پیشینه بنظر می‌رسد که نمونه‌های مشکوک به هیبرید بررسی شده در مطالعه حاضر از جمله نمونه‌هایی باشند که در مناطق مختلف معرفی گردیده و تغییرات مورفولوژیکی و ژنتیکی را متحمل شده‌اند. بر اساس نتایج

منابع

- 1- Abbott, R. J. 1992. Plant invasions, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. *Trends in Ecology and Evolution*, 7: 401–405.
- 2- Aiken, S. G. 1981. A conspectus of *Myriophyllum* (Haloragaceae) in North America. *Brittonia*, 33: 57–69.
- 3- Álvarez, I., and J. F. Wendel. 2003. Ribosomal *ITS* sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 417–434.
- 4- Armstrong, K. F., and S. L. Ball. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360: 1813–1823.
- 5- Cock, M. J. W., M. Kenis, and R. Wittenburg. 2003. Biosecurity and forests: an introduction—with particular emphasis on forest pests. *FAO Forest Health and Biosecurity Working Paper FBS/2E*.
- 6- Cox, G. W. 1999. *Alien Species in North America and Hawaii: Impacts on Natural Ecosystems* (Island, Washington, DC).
- 7- Ellstrand, N. C. and K. S. Schierenbeck. 2000. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (13): 7043–7050.
- 8- Ghahramanzdeh, R., H. Marashi, S. Malekzadeh, and F. Shahriyari. 2011. Discrimination of the invasive plant species, *Myriophyllum* spp., from native relatives using DNA barcoding. *Plant Protection*, In Press.
- 9- Harvey, J. L., and D. R. Varley. 1996. Evaluation of European pathogens for the control of *Myriophyllum spicatum* in the United States of America. *Proceeding IX International Symposium Biological Control weeds*, Stellenbosch, South Africa.
- 10- Mahelka, V., J. Fehrer, F. Krahulec, and V. Jarolimova. 2007. Recent natural hybridization between two allopolyploid wheat grasses (*Elytrigia*, Poaceae): Ecological and Evolutionary Implications. *Annals of Botany*, 100: 249–260.
- 11- Meijden, R. V. D. 1969. An annotated key to the South-East Asiatic, Malesian, Mascarene, and African species of *Myriophyllum* (Haloragaceae). *Blumea*, 17: 304–311.
- 12- Meyerson, L. A., J. K. Reaser, and C. F. Chyba. 2002. A unified definition of biosecurity. *Science*, 295: 44.
- 13- Moody, M., and H. Les. 2010. Systematics of the aquatic angiosperm genus *Myriophyllum* (Haloragaceae). *Systematic Botany*, 35 (1): 121–139.
- 14- Moody, M. L., and D. H. Les. 2002. Evidence of hybridity in invasive watermilfoil (*Myriophyllum*) populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 14867–14871.