نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۱، شماره ۴ ، زمستان ۱۳۹۲، ص. ۵۹۲-۵۸۳

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 11, No.4, Winter. 2014, p. 583-592

تفکیک گونه‌ها و بررسی هیبریدهای احتمالی علف هرز مریافیلوم (*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 مبحث 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 *مریافیلوم* (*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 *مریافیلوم* 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 *مریافیلوم* 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 مریافیلوم قادر به تفکیک گونه‌های بومی و مهاجم می‌باشد. برخلاف مطالعات مورفولوژیکی که برخی گونه‌های عقیم مریافیلوم 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

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

۱- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
(*- نویسنده مسئول: Email: ghahramanr@uma.ac.ir)
۲، ۳ و۶- 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

مجموعه‌ای از اقدامات پیشگیرانه برای کاهش خطر انتقال مواردی از قبیل آفات قرنطینه‌ای، موجودات دستکاری شده ژنتیکی[1] 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 آبزی مریافیلوم[2] است (۱۳ و ۱۴) که شامل ۶۸ گونه مختلف بوده و گسترش جهانی دارد. گونه مهاجم *Myriophyllum spicatum* Cf. 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 *مریافیلوم* 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 *مریافیلوم* 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[3] 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 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 آبزی *مریافیلوم* 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 *مریافیلوم* 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 *مریافیلوم* 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 هرباریوم بخش گیاهشناسی دانشگاه لایدن[4] 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 DNeasy DNA Plant Mini Kit و QIAamp DNA Stool Mini Kit شرکت کیاژن[5] و همچنین از CTAB[6] 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.

1- Genetic modified organisms
2- Myriophyllum
3- Internal Transcribed Spacer
4- National Herbarium NHN in Leiden
5- Qiagen
6- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

جدول۱- لیست و مشخصات جامع نمونه‌های گیاهی جنس *مریافیلوم* بررسی شده در مطالعه حاضر*

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

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

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 PCR Buffer 10X، ۲۰ نانوگرم DNA، چهار پیکومول از هر کدام از آغازگرهای رفت وبرگشت (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:

دناتوره شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه دیگر دناتوره 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[1] 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 (اینویتروژن[2]) خالص‌سازی شدند و همسانه‌سازی نمونه‌ها از کیت TOPO TA Cloning شرکت اینویتروژن 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 5.8/2استفاده گردید. توالی یابی نمونه‌ها توسط شرکت گرینومیکس[3] 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-بندی شدند.

به منظور بدست آوردن یک توالی مورد توافق[4] برای هر کدام از نمونه‌ها، برای هر نمونه دو توالی بدست آمده (که از توالی‌یابی محصولاتPCR با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشتی بصورت جداگانه بدست آمده بودند) در نرم‌افزار Seq Man متعلق به DNAstarهمردیف شدند. بدین طریق در هر کدام از نمونه‌ها برای هر مکان *ITS* یک توالی واحد[5] بدست آمد. برای هم‌ردیف سازی چندگانه[6] (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 متغیّر و سایت‌های محافظت شده تعیین و دندروگرام‌ها با استفاده از مدل p-distance، روش Neighbor joining -Bootstrap و 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 گلدهی و عقیم بودن، مشکوک به هیبرید بین دو گونه مختلف از جنس *مریافیلوم* 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).

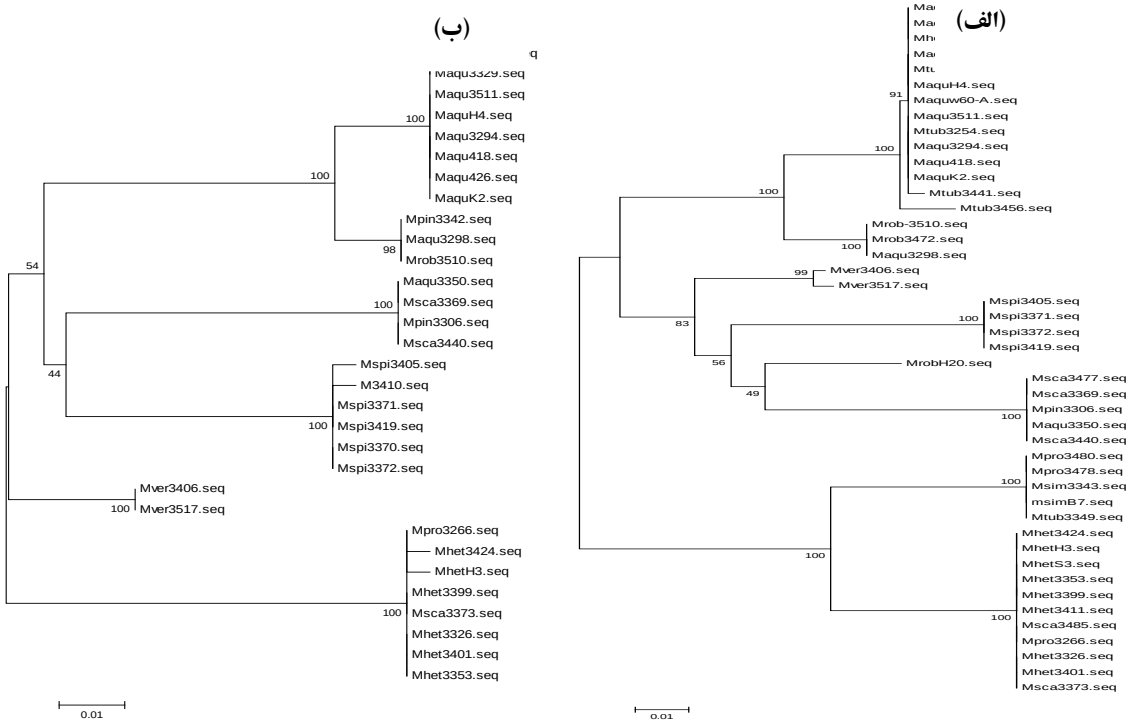
نتایج بدست آمده نشان دادکه مکان بین ژنی ITS1 نسبت به مکان ITS2 میزان موفقیت در تکثیر بالاتری داشت، بطوری که تکثیر در این نواحی به ترتیب ۷۶ و ۵۶ درصد کل نمونه‌های *مریافیلوم* مورد بررسی بود. همچنین ۹۴ و ۸۵ درصد محصولات PCR نمونه‌های تکثیر شده برای ITS1 و ITS2 با موفقیت توالی-یابی گردیدند.

1- Cloning
2- Invitrogen
3- Greenomics

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

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	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	تکثیر و توالی‌یابی
ITS2	5.8/2	رفت	GCCTGGGCGTCACGC	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 *مریافیلوم* با استفاده از نرم‌افزار MEGA

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 *مریافیلوم* 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* متغیّر بود. همچنین دامنه تنوع بین گونه‌ای از ۲/۴ تا ۱۵/۲ درصد متغیّر و میانگین آن ۱۱/۴ درصد بود. مکان بین ژنی ITS1 با داشتن طولی برابر ۳۹۰ جفت باز حاوی ۱۱۹ جایگاه متغیّر بود که این جایگاه‌های متغیّر قادر به تفکیک گونه‌های مختلف جنس *مریافیلوم* (که با موفقیت تکثیر و توالی یابی شدند) بود (شکل ۱- الف). گونه‌های بومی *M. spicatum* و *M. verticillatum* به ترتیب ۱۲ و ۲ SNP[1] 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. robetsum* متغیّر بود. همچنین دامنه تنوع بین گونه‌ای از ۵/۹ تا ۱۳/۶ درصد متغیّر و دارای میانگین تنوع بین گونه‌ای ۹/۴ درصد بود. بر اساس ۷۲ جایگاه متغیّر، این مکان بین ژنی نیز توانست گونه‌های مختلف جنس *مریافیلوم* را تفکیک نماید (شکل ۱- ب).

1- Single nucleotide polymorphism

جدول ٤- موقعیت SNPهای خاص در نمونه‌های مشکوک به هیبرید و برخی گونه‌های مهاجم، بومی و غیرمهاجم *مریافیلوم* در توالی مکان بین ژنی ITS2

نمونه‌ها و گونه‌ها	SNP																				
	۲۲	۲۷	۲۹	۳۰	۳٦	۳۹	٤۲	٤٥	٥۷	۷٥	۹۹	۱٥۱	۱٦۳	۱٦٥	۱۷٤	۱۷۹	۱۸۷	۲۰۷	۲۱۲	۲۲۳	۲۲۷
M. aquaticum	-	C	A	C	G	A	T	T	G	A	A	G	C	T	C	T	T	C	A	T	T
M. verticillatum	G	T	C	C	G	A	T	T	G	A	G	G	C	T	C	T	C	C	T	T	T
M. spicatum	A	C	T	T	A	A	C	T	T	G	A	A	C	C	C	T	T	C	C	A	G
M. scabratum	A	C	C	C	G	A	T	T	G	A	A	G	C	T	C	T	T	C	T	T	T
M. heterophyllum	-	C	C	C	G	G	T	G	G	C	A	G	A	T	T	C	A	T	C	T	T
M423	-	C	C	C	G	G	T	G	G	C	A	G	A	T	T	C	A	T	C	T	T
M421	-	C	C	C	G	G	T	G	G	C	A	G	A	T	T	C	A	T	C	T	T
M-b9	-	C	C	C	G	G	T	G	G	C	A	G	A	T	T	C	A	T	C	T	T

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 *مریافیلوم* را از یکدیگر جدا نمایند (شکل ۱). با توجه با این که گونه‌های جنس *مریافیلوم* 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 *مریافیلوم* 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.

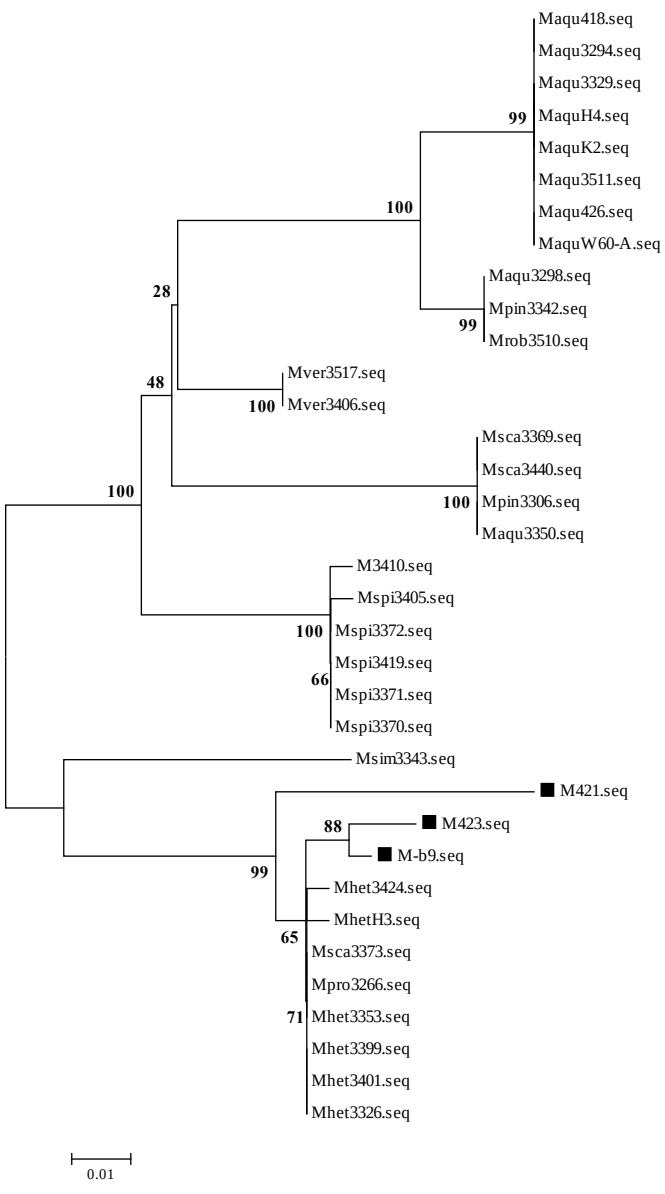
در تعدادی از موقعیت‌های نوکلئوتیدی در فایل ABI[1] توالی ITS بدست آمده از توالی‌یابی مستقیم محصولات PCR نمونه‌های مشکوک به هیبرید، نوع نوکلئوتید حاضر در این موقعیت قابل تشخیص نبود و توالی باکیفیت در این مرحله حاصل نشد. بنابراین، استفاده از تکنیک توالی‌یابی مستقیم برای نمونه‌های مشکوک به هیبرید موفقیت‌آمیز نبود که با نتایج بدست آمده توسط مودی و همکاران (۱۴) مطابقت داشت. آنان چنین اظهار داشتند که بدلیل 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[2] 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. بعبارتی 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 (جداول 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 *مریافیلوم* داشتند (جداول ۷ و ۸). با افزودن توالی نمونه‌های مشکوک به هیبرید به گروه داده‌های اول و سوم (ایجاد گروه داده‌های دوم و چهارم) تعداد سایت‌های متغیّر در توالی ITS1 و ITS2 به ترتیب به ۱۳۱ و ۹۰ عدد

1- Trace file

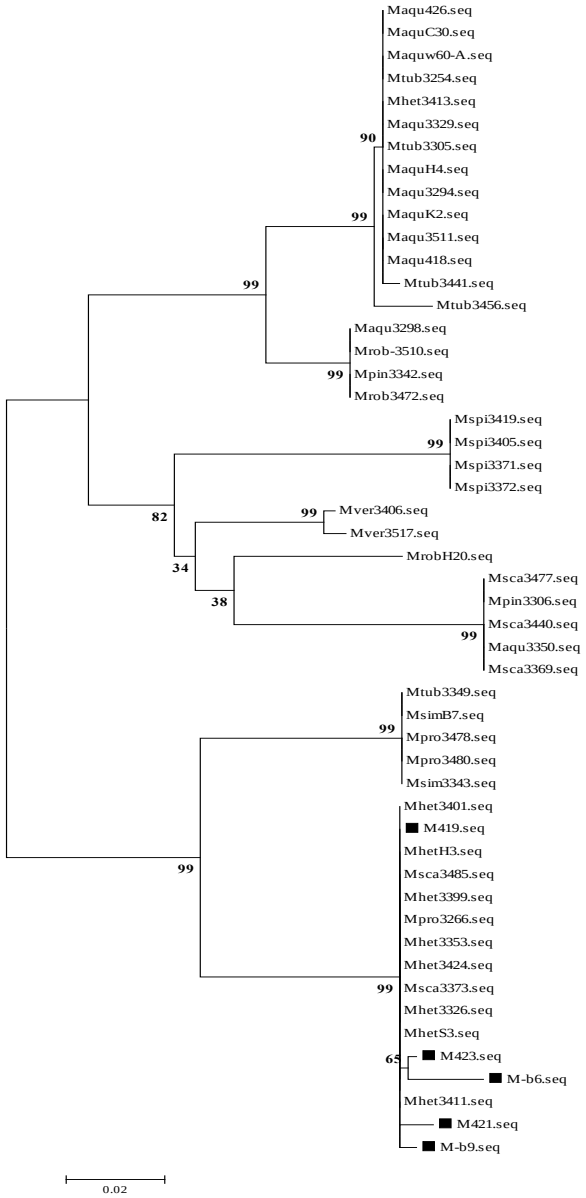
2- Double peak

افزایش پیدا کرد که این افزایش سایت‌های متغیّر تنوع درون گونـه‌ای را در داخل گونه *M. heterophyllum* بالا برد. بطوریکه تنـوع درون گونه‌ای *M. heterophyllum* با استفاده از هـر دو مکـان بـین ژنـی ITS1 و ITS2 در گروه داده‌های دوم و چهارم نسبت به دو گـروه اول و سوم افزایش پیدا کرد (بـه ترتیـب ۰/۰۵ و ۲/۲ درصـد افـزایش در درون گروه داده‌های دوم و چهارم).

الف)



ب)



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 *مریافیلوم* 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	٤	٥	٦
۱	*M. heterophyllum*	-					
۲	M419	۰					
۳	M421	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶				
۴	M423	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۸			
۵	M-b6	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۲	۰/۰۱۴		
۶	M-b9	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۸	۰/۰۰۶	۰/۰۱۷	-

جدول ٦- میانگین فاصله(p-distance) بین نمونه‌های مشکوک به هیبرید با گونه *M. heterophyllum* با استفاده از مکان بین ژنی ITS2

شماره		۱	۲	۳	٤
۱	*M. heterophyllum*	-			
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																							
	٤	۳۲	۳۸	٤۳	٥٤	٥٥	٥۷	٥۹	٦٥	٦۹	۷۲	۹۲	۱٤۲	۱٤٥	۱٤۹	۱٥۳	۱٥٦	۱٦۸	۱٦۹	۲۷	۲۱	۲۳	۲٤۷	۲۸۷
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	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	T
M. heterophyllum	G	T	C	G	A	G	G	T	T	G	C	T	T	T	T	G	T	T	G	T	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											
	۲٥	۷٤	۷٦	۷۸	۸۲	۲۹۰	۳۳۸	۳٤۲	۳٤۳	۳٤۷	۳٥۰	۳٥٦
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
M. heterophyllum	G	T	G	C	T	C	C	C	G	T	C	G

SNP خاص نمونه با رنگ خاکستری مشخص است.

بطور کلی نتایج هیبریداسیون در جنس *مریافیلوم* 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. بعبارتی دیگر، مناطق بین ژنی استفاده شده در این بررسی (شامل ITS1 و ITS2)، 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 (جداول ۵ و ۶). بطوریکه با تنوع درون گونه‌ای جنس *مریافیلوم* 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

نمونه‌های مشکوک به هیبرید M-b9، M-b6، M423، M419 و M421با 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 M423، M421 و M-b9نسبت 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 *مریافیلوم* 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 قادرند 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[1] 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 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 *مریافیلوم* 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 *مریافیلوم* 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 آبزی در تبدیل شدن به گونه‌ای مهاجم در منطقه جدید باشد. به دلیل اینکه تکثیر بیشتر گیاهان غوطه‌ور در آب از جمله *مریافیلوم* 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 *مریافیلوم* 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.

1- Multiple introductions

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.