

تفکیک گونه‌های مهاجم علف‌هرز آبی‌ریزی مریفیلوم (*Myriophyllum* spp.) از خویشاوندان بومی آن با استفاده از بارکدگذاری DNA

رباب قهرمان زاده^{*۱} - سید حسن مرعشی^۲ - کلمنس ون دی ویل^۳ - سعید ملک زاده^۴ - فرج‌ا... شهریاری^۵ - رنه اسمالدرز^۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۲۲

چکیده

در مطالعه حاضر ۸۱ نمونه متعلق به ۱۳ گونه مختلف از جنس مریفیلوم مورد بررسی قرار گرفت که از مناطق بین‌رئی هسته‌های *ITS1* و *ITS2* مناطق کلروپلاستی *rbcL* *matK* و *trnH-psbA* برای تشخیص گونه‌های بومی و مهاجم متعلق به این جنس استفاده گردید. نتایج نشان داد که توالی *ITS2* با اینکه حاوی جایگاه‌های متغیر متعددی بودند که باعث تفکیک گونه‌ها از همدیگر شدند ولی به دلیل درصد تکثیر پایین آنان در میان نمونه‌های مورد بررسی به‌عنوان بارکد مناسب انتخاب نشدند. اگرچه *matK* درصد تکثیری بالاتری داشت ولی به دلیل وجود ساختار ثانویه در توالی این ژن و همچنین طول بلند آن توالی‌یابی مناسب آن ممکن نگردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه منطقه غیر کدکننده *trnH-psbA* قسمتی از منطقه کدکننده ژن *rbcL* بخاطر دارا بودن درجه عمومیت بالای تکثیر و نیز قدرت بالای تفکیک در بین گونه‌های مورد بررسی مریفیلوم، به‌عنوان بارکد ایده‌آل برای تشخیص گونه‌های مریفیلوم معرفی شدند. بنظر می‌رسد که سرمایه‌گذاری روی تکنیک بارکدگذاری DNA می‌تواند ابزار قوی برای تشخیص و تفکیک نمونه‌های گیاهی را در اختیار پژوهشگران قرار دهد. بویژه زمانی که از لحاظ مورفولوژیکی تشخیص گونه‌ها از یکدیگر مشکل باشد می‌توان از بارکدگذاری DNA بهره جست.

واژه‌های کلیدی: مناطق کلروپلاستی، مناطق بین‌رئی، *trnH-psbA* *rbcL* *matK* *ITS2* *ITS1*

مقدمه

علف‌های هرز آبی‌ریزی مهاجم به علت گسترش آسان و سریع از طریق آب‌های آزاد مشکلات عدیده‌ای را ایجاد می‌کنند. طی سال‌های اخیر با ورود علف‌های هرز مهاجم و گونه‌های غیربومی در مناطق مختلف، از طریق محیط‌های آبی، مدیریت علف‌های هرز آبی‌ریزی اهمیت بیشتری یافته است. افزایش مواد زائد درون آب از طریق فاضلاب‌های صنعتی و کشاورزی و پساب‌های شهری که اکثراً حاوی ترکیبات فسفره و ازته می‌باشند باعث رشد و توسعه بیش از حد گیاهان آبی‌ریزی می‌شوند (۲)، به‌عنوان مثال مشکل اصلی برای مبارزه با گونه‌های مهاجم گیاه آبی‌ریزی مریفیلوم، تشخیص گونه‌های نزدیک به هم از لحاظ مورفولوژیکی می‌باشد، و گونه مهاجمی که وارد منطقه می‌شود بواسطه شکل ظاهری از گونه‌های دیگر اصولاً قابل تشخیص نیست (۹)، پس از ورود، رشد و افزایش زیاد این گیاهان در منطقه برای کنترل آنان، از روش‌های کلاسیک کنترل علف هرز استفاده می‌شود. از سوی دیگر دامنه وسیعی از علف‌های هرز آبی‌ریزی به وسیله علف‌کش‌ها کنترل می‌شوند که مصرف علف‌کش باعث آلودگی آب شده و همچنین اثر کشندگی روی ماهی‌ها، جانوران و آبزیان کوچک

طی چند دهه اخیر اکولوژیست‌ها و متخصصین محیط زیست به این نتیجه رسیده‌اند که تهاجم و گسترش جانداران غیربومی یک خطر جدی برای حفظ محیط‌زیست می‌باشند. از آنجایی که گیاهان غیربومی پتانسیل بسیار بالایی در تسخیر منابع در مقابل گونه‌های بومی منطقه دارند و کنترل کردن آن‌ها به مراتب سخت‌تر از کنترل علف‌های هرز می‌باشد گسترش گیاهان خارجی و مهاجم در داخل فلور طبیعی یک منطقه باعث بروز مشکلات عدیده‌ای خواهد شد به همین دلیل ارائه یک راهکار عملی برای کنترل آن‌ها نیازمند تحقیقات وسیع در زمینه بیولوژی، اکولوژی و فیزیولوژی گیاه مهاجم می‌باشد (۱۲). یکی از روش‌های کنترل گیاه غیربومی، شناسایی و جلوگیری از ورود آن گیاه به منطقه جدید می‌باشد. در کنار گونه‌های خشک‌زی،

۱، ۲، ۴ و ۵- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، استادیار و دانشیار گروه

بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(نویسنده مسئول: Email: ghahramanzadeh9@yahoo.com)

۳ و ۶- استادان گروه اصلاح نباتات، دانشگاه واکنینگن هلند

بر روی ۹۰۷ نمونه از ۵۵۲ گونه شامل ۴۴۷ گونه نهانده، ۳۸ گونه بازده و ۶۷ گونه سرخس انجام گرفت. در نهایت این گروه پیشنهاد کردند که به صورت قراردادی از ترکیب ژن‌های *matK* و *rbcL* برای بارکد گیاهان بومی استفاده شود (۳).

جنس نهانده *مریافیوم* از خانواده هالروگاسه^۴ تقریباً شامل ۶۸ گونه می‌باشد که آبی بوده و گسترش جهانی دارد این گیاه به‌عنوان یک گیاه مهاجم شناخته شده است. در سطوح پایین‌تر از جنس در *مریافیوم*، شناسایی گونه‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی به تنهایی مشکل می‌باشد (۹)، زیرا این گونه‌ها خصوصاً در قسمت‌های زایشی و رویشی، شباهت زیادی بهم دارند، بنابراین تشخیص قابل اعتماد مورفولوژیکی زمانی که اندام‌های زایشی وجود نداشته باشد چندان آسان نمی‌باشد که این مشکل در بین بسیاری از گیاهان آبی مشاهده می‌شود بطوری که شناسایی بر اساس اندام‌های رویشی به تنهایی، در گونه‌های *مریافیوم* غوطه‌ور در آب که ممکن است از لحاظ ژنتیکی فاصله زیادی از هم داشته باشند به سختی امکان‌پذیر است (۱). به همین دلیل امروزه محققین برای بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های *مریافیوم* و تعیین محدوده هر گونه شروع به استفاده از روش‌های مولکولی از قبیل مطالعه ژنوم کلروپلاست (*trnk* و *matk*) و ژنوم هسته‌ای (*ITS*^۵) نموده‌اند (۹).

بنابراین در مطالعه حاضر سعی بر این بوده است تا بتوان با استفاده از بارکدگذاری DNA گونه‌های مختلف بومی و مهاجم *مریافیوم* را از هم تفکیک نمود و با استفاده از بارکدهای پیشنهاد شده توسط سایر محققین برای هر گونه بارکد خاصی معرفی کرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در مجموع ۸۱ نمونه گیاهی متعلق به ۱۳ گونه از جنس *مریافیوم* از مناطق مختلف هلند جمع‌آوری شدند و بلافاصله به منظور خشک شدن و جلوگیری از تخریب DNA در سیلیکا ژل قرار داده شدند. نمونه‌برداری در شرایط مختلف و به‌صورت دستی انجام گرفت و ۱۳ عدد از ۸۱ نمونه مورد بررسی از هرباریوم بخش گیاهشناسی دانشگاه لایدن به دست آمدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده جدید از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی و خاستگاه اولیه آنها تعیین گردید (جدول ۱). همچنین به منظور نگهداری به‌عنوان گونه-های موجود در فلور طبیعی هلند به هرباریوم ملی لایدن^۶ منتقل شدند. مطالعات مولکولی در دانشگاه واگنینگن هلند صورت گرفت.

دارد (۱۰). بنابراین به نظر می‌رسد اولین گام در مدیریت و خطر ایجاد شده توسط گونه‌های مهاجم آبی و خشک‌زی، توانایی در تشخیص این گونه‌ها و جلوگیری از ورود آن‌ها به منطقه می‌باشد. تشخیص گیاهان مهاجم مستلزم این است که از ابزارهایی برای تشخیص سریع آن‌ها استفاده شود. متأسفانه این شرایط بوسیله روش‌های سنتی که بر پایه مورفولوژی جانداران انجام می‌گیرد قابل دسترس نمی‌باشد. برای شناسایی و مدیریت گونه مهاجم بهتر است تشخیص در مراحل اولیه یعنی مرحله بذری صورت گیرد که اغلب، شناسایی بذر از روی خصوصیات مورفولوژیکی سخت خواهد بود. بنابراین امروزه از روش‌های مبتنی بر نشانگرها و توالی DNA برای این منظور استفاده می‌شود. روش‌های مبتنی بر DNA نسبت به روش‌های سنتی ارزان، سریع و دارای دقت بالایی در تشخیص گونه‌ها و همچنین ارزیابی تنوع زیستی می‌باشند. بارکدگذاری^۱ DNA (یک توالی DNA بسیار کوتاه استاندارد از یک ژن یا منطقه بین‌ژنی کاملاً شناخته شده که به کمک آن توالی می‌توان پی برد که هر جانور، گیاه یا قارچ به چه گونه‌ای تعلق دارد) به خاطر پتانسیل بالای آن در تشخیص و شناسایی گونه‌ها، ابزاری جدید و جذاب در پژوهش‌های تاکسونومیکی به‌شمار می‌رود (۱۳).

اولین بار هبرت در سال ۲۰۰۳ بارکدگذاری DNA موجودات زنده را مطرح کرد و از آن به‌عنوان ابزاری برای مستندسازی تنوع‌زیستی با استفاده از یک توالی ژنی نام برد (۶). وی ژن سیتوکروم اکسیداز (*COI*) میتوکندریایی که یک توالی ۶۴۸ جفت‌بازی می‌باشد را به‌عنوان بارکد اولیه برای حیوانات معرفی کرد. در سال ۲۰۰۴ سازمان CBOL^۲ به منظور ایجاد یک کتابخانه بارکدگذاری برای موجودات زنده راه‌اندازی شد^۳ (۱۱).

هر چند بارکدگذاری در حیوانات با استفاده از *COI* نسبتاً موفق-آمیز بوده ولی در گیاهان به دلیل پایین بودن سرعت تکامل ژنوم میتوکندریایی و در نتیجه عدم تفکیک گونه‌ها و حتی جنس‌ها از یکدیگر توسط *COI*، این ژن در گیاهان مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. تنوع زیادی بین گونه‌های گیاهی در زمینه توالی‌های پیشنهادی دیده می‌شود. برای این منظور مناطق مختلفی از DNA هسته‌ای و کلروپلاستی به‌عنوان توالی استاندارد در گیاهان معرفی شده‌اند (۴ و ۵). گروه مطالعات گیاهی سازمان CBOL هفت منطقه پلاستییدی (مکان‌های بین‌ژنی *atpF-atpH*، *psbK-psb1*، *trnH-psbA* و ژن‌های *matK*، *rbcL*، *rpoB*، *rpoCl*) را بر اساس ارزیابی قابلیت آنها در تشخیص گونه‌ها، کیفیت توالی و درصد تکثیر در گونه‌ها برای بارکدگذاری DNA مورد بررسی قرار دادند، این تحقیق

4-Haloragaceae

5- Internal Transcription Spacer

6- National Herbarium NHN in Leiden

1- DNA barcoding

2- Consortium for the Barcode of Life

3- www.barcodinglife.org

جدول ۱- لیست و مشخصات جامع نمونه‌های تکثیر شده گیاهی جنس مریافیوم مورد استفاده در مطالعه حاضر

گونه	شماره نمونه	جمع آوری کننده	سال جمع آوری	کشور	خاستگاه
<i>M. aquaticum</i>	418	Duistermaat, H.	2007	Netherlands	North-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 unknown	North Holland
<i>M. propinquum</i>	3266	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Hungary	North Holland
<i>M. propinquum</i>	3267	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. Hungary	North Holland
<i>M. aquaticum</i>	3294	Valkenburg, J.L.C.H. van		unknown	
<i>M. aquaticum</i>	3298	Valkenburg, J.L.C.H. van		unknown	
<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. NL	
<i>M. simulans</i>	3343	Valkenburg, J.L.C.H. van	2007	cult. NL	
<i>M. 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	Nederland	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	Nederland	North Holland
<i>M. heterophyllum</i>	3401	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	Nederland	
<i>M. spicatum</i>	3405	Valkenburg, J.L.C.H. van		Nederland	
<i>M. verticillatum</i>	3406	Valkenburg, J.L.C.H. van		Nederland	
unknown	3410	Valkenburg, J.L.C.H. van		Nederland	Drenthe
<i>M. heterophyllum</i>	3411	Valkenburg, J.L.C.H. van	2008	Nederland	Drenthe
<i>M. verticillatum</i>	3412	Valkenburg, J.L.C.H. van		Nederland	Drenthe
<i>M. heterophyllum</i>	3413	Valkenburg, J.L.C.H. van		Nederland	
<i>M. spicatum</i>	3419	Valkenburg, J.L.C.H. van		France	Burgundy
<i>M. heterophyllum</i>	3424	Valkenburg, J.L.C.H. van		Nederland	North 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	North Brabant
<i>M. simulans</i> cf	B7	Bruinsma, J.	2007	unknown	
<i>M. heterophyllum</i>	B8	Bruinsma, J.	2007	Netherlands	North-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	Nederland	Gelderland
<i>M. heterophyllum</i>	S3	Slikke, W. van der	2007	Nederland	Drenthe
<i>alterniflorum</i>	W6	Wiel, P. van der	2006	Nederland	North 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>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>	3472	Valkenburg, J.L.C.H. van	2009	cult. NL	
<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	

استفاده در تفکیک گونه‌ها از همدیگر درخت فیلوژنی برای هر کدام از خانواده‌های گیاهی و همچنین برای هر کدام از مکان‌های ژنی و بین ژنی استفاده از مدل Neighbor joining و استفاده از ضریب Bootstrapping 1000 ترسیم شد. از آزمون ویلکاکسون برای مقایسه تنوع بین و درون گونه‌ای هر جفت از بارکدهای مورد مطالعه برطبق مدل ارائه شده توسط کرس و اریکسون (۷) استفاده شد، و بارکدی را که دارای تنوع بین گونه‌ای زیاد و تنوع درون گونه کم نسبت به سایر بارکدها بود به عنوان بارکد هر یک از گونه‌های مورد مطالعه معرفی گردید.

نتایج

در این تحقیق در جنس *مریافیوم* ۱۳ گونه مختلف که شامل ۸۱ نمونه بود مورد بررسی قرار گرفتند. درصد تکثیر در PCR با استفاده از مناطق *trnH-psbA* *matK* *rbcL* *ITS1* و *ITS2* به ترتیب ۹۷، ۹۱، ۸۱، ۶۰ و ۴۲ درصد کل نمونه‌های مورد بررسی بود و همچنین به ترتیب ۹۷، ۸۴، ۲۵، ۹۴ و ۸۹ درصد از نمونه‌های تکثیر شده محصولات PCR، برای مکان‌های *trnH-psbA* (۶۲۳ جفت باز)، *rbcL* (۵۸۳ جفت باز)، *matK* (۶۰۰ جفت باز)، *ITS1* (۳۹۰ جفت باز)، و *ITS2* (۳۱۳ جفت باز)، توالی‌یابی گردیدند. دامنه تنوع درون گونه‌ای با استفاده از *trnH-psbA* از صفر درصد (در گونه‌های *M. tuberculatum* *Myriophyllum simulans* و *M. propinquum*، *M. verticillatum*، *M. scabratum* و *M. heterophyllum*) تا ۳/۶ درصد (در گونه *M. aquaticum*) در بین گونه‌های مورد بررسی متغیر بود. این در حالی است که دامنه تنوع بین گونه‌ای از صفر تا ۲۴/۱ درصد با میانگین ۱۵/۳ درصد متغیر بود. شکل ۱a نتایج هم‌ردیف نمودن توالی *trnH-psbA* را در جنس *مریافیوم* نشان می‌دهد. با استفاده از این مکان بین ژنی دو گروه مختلف بر اساس ۱۱۵ جایگاه متغیر، در این جنس متمایز گردید. که هر گونه SNP و Indel^۴ خاص خود را داشت. به عنوان مثال، گونه مهاجم *M. heterophyllum* در مقایسه با سایر گونه‌ها دارای یک Indel^۴ بزرگی بوده و با داشتن نه SNP خاص خود براحتی از گونه‌های بومی، *M. verticillatum*، *M. spicatum* و *M. M. alterniflorum* قابل تشخیص می‌باشد. گونه خارجی ولی غیر مهاجم *M. tuberculatum* که با *M. heterophyllum* در یک گروه قرار گرفت شامل ده SNP خاص گونه و یک Indel^۴ مخصوص به خود بود. گونه مهاجم *M. aquaticum* نیز دارای سه SNP خاص خود بود در حالیکه هیچ Indel^۴ خاصی در این گونه مشاهده نگردید. بر اساس نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که مکان بین ژنی *trnH-psbA* توانایی تفکیک گونه‌های بومی و مهاجم را از همدیگر با وضوح بالا دارا می‌باشد.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز^۱: از روش دستکاری شده CTAB^۲ برای استخراج DNA استفاده گردید. از دو مکان ژنی و کد کننده کلروپلاستی (*matK* و *rbcL*) و سه منطقه بین ژنی و غیر کد کننده کلروپلاستی و هسته‌ای (*trnH-psbA* و *ITS1* و *ITS2*) به عنوان بارکد استفاده شد. پرایمرهای عمومی استفاده شده برای تکثیر در جدول ۲ آورده شده است. به منظور بهینه کردن تکثیر و به دست آوردن پرایمر مطلوب در *matK* از چندین گروه پرایمری (که دارای درصد تکثیر بالایی در بین نمونه‌های مورد بررسی باشد) استفاده شد. برای تکثیر منطقه *ITS* مناطق حفظ شده ژن‌های ریبوزومی *ITS*، *ITS1*، *ITS2*، *ITS3* و *ITS4* به عنوان پرایمر انتخاب شدند. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از آنزیم پلی‌مراز Dream Taq (شرکت فرمنتاز) در دو تکرار همراه با نمونه کنترل منفی انجام گرفت. شرایط واکنش شامل ۲ میکرولیتر از PCR Buffer 10X، ۲۰ نانوگرم DNA، ۴ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت، ۲ پیکومول از هر dNTP، ۰/۲ واحد آنزیم در هر واکنش بود. واکنش‌ها در دستگاه ترموسایکلر BioRad Dyad تحت شرایط زیر انجام گرفت:

دنا توره شدن اولیه در ۹۴ °C در مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل دنا توره شدن بعدی در ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۵ به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله آخر یا مرحله گسترش در ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای نمونه‌ها و گونه‌هایی که به این طریق تکثیر نشدند یا تعداد باندهای زیادی داشتند از روش Hot-start PCR استفاده شد. برای این منظور از Amplitaq-Gold™ DNA polymerase (شرکت Applied Biosystems) استفاده گردید که بر طبق روش ارائه شده توسط کرس و اریکسون (۷) نمونه‌هایی که تکثیر نشده بودند دمای اتصال پایین (۵۰ °C) و تعداد سیکل بیشتر (۴۰ سیکل) و برای نمونه‌های که تعداد باند بیشتری داشتند دمای اتصال بالاتر (۵۵ °C) و تعداد سیکل کمتر (۳۰ سیکل) در نظر گرفته شد. واکنش PCR و شرایط تکثیر مطابق مدل ارائه شده توسط کرس و اریکسون انجام گرفت (۷). از ستون سفادکس مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (GE Healthcare) برای خالص سازی محصولات PCR استفاده گردید.

توالی‌یابی و آنالیز داده‌ها: توالی‌یابی مستقیم محصولات PCR رقیق شده با استفاده از BigDye 3.1 بر روی دستگاه توالی‌یابی ABI3100 انجام گرفت، توالی‌ها با استفاده از ClustalW هم‌ردیف شده و فواصل ژنتیکی درون و بین گونه‌ای با استفاده از نرم افزار MEGA 4.0 بر اساس مدل p-distance به دست آمد. برای نشان دادن توانایی بارکدهای مورد

3- Single Nucleotide Polymorphism
4- Insertion and deletion (Indel)-

1- Polymerase Chain Reaction (PCR)
2- Cetyltrimethyl ammonium bromide

جدول ۲- لیست و توالی پرایمر مورد استفاده برای تکثیر مناطق ژنی و بین ژنی مطالعه شده

مکان مورد بررسی	نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
<i>matK</i>	matK5_Rev	5' GTTCTAGCACAAGAAAAGTCG3'
<i>matK</i>	matKX_For	5' TAATTTACGATCAATTCATTC3'
<i>trnH-psbA</i>	psbA_For	5'GTTATGCATGAACGTAATGCTC 3'
<i>trnH-psbA</i>	trnH_Rev	5' CGCGCATGGTGGATTACAATCC3'
<i>rbcLa</i>	rbcLa- SI_For	5'ATGTCACCACAAAACAGAGACTAAAGC3'
<i>rbcLa</i>	rbcL- SI_Rev	5'GTAATAATCAAGTCCACCRGC3'
<i>ITS1</i>	17SE	5'ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG3'
<i>ITS1</i>	5.8/1	5'GTTGCCGAGAGTCGT 3'
<i>ITS2</i>	26SE	5'TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC3'
<i>ITS2</i>	5.8/2	5'GCCTGGGCGTCACGC3'

اساس این جایگاه‌های متغیر، این مکان بین ژنی توانست گونه‌های مختلف جنس مریافیوم را با حفظ فاصله ژنتیکی لازم در بین دو گونه مختلف از هم تفکیک کند (شکل ۲ا). گونه‌های بومی *M. verticillatum* و *M. spicatum* به ترتیب ۱۲ و ۲ SNP خاص گونه داشتند در حالیکه در گونه‌های مهاجم SNP خاص گونه مشاهده نگردید.

برای منطقه بین ژنی هسته‌ای *ITS2* تنوع درون گونه‌ای از صفر درصد (*M. verticillatum*) تا ۱۱/۷ درصد (*M. robetsum*) متغیر بود. همچنین دامنه تنوع بین گونه‌ای از ۵/۹ تا ۱۳/۶ درصد با میانگین تنوع بین گونه‌ای ۹/۴ بود. بر اساس ۷۲ جایگاه متغیر، این مکان بین ژنی نیز همچون *ITS2* توانست گونه‌های مختلف جنس مریافیوم را با حفظ فاصله ژنتیکی لازم در بین دو گونه مختلف از هم تفکیک نماید (شکل ۲ب)، با این تفاوت که همچون گونه‌های بومی، گونه‌های مهاجم و خارجی غیر مهاجم نیز SNP خاص گونه داشتند. به‌عنوان مثال گونه‌های مهاجم *M. heterophyllum*، *M. aquaticum* دارای دو، گونه‌های بومی *M. verticillatum* دارای سه و *M. spicatum* دارای چهار، گونه *M. scabratum* دارای یک (در موقعیت ۱۴۶) SNP مخصوص به خود بودند.

بحث

در مطالعه حاضر پنج بارکد توصیه شده توسط محققین مختلف برای بررسی توانایی آن‌ها در جداسازی گونه‌های بومی، غیر بومی و مهاجم جنس مریافیوم بکار برده شد. یک بارکد ایده‌آل باید بتواند با استفاده از یک جفت پرایمر عمومی در کل گونه‌های یک جنس یا حتی یک خانواده تکثیر شود، و نیز باید به‌صورت مستقیم توالی‌یابی شده و توالی دارای کیفیت مناسب باشد و همچنین توانایی تفکیک گونه‌ها را از هم کاملاً داشته باشد.

با استفاده از *rbcL* تنوع درون گونه‌ای از صفر درصد (*M. propinquum*, *M. spicatum*، *M. M. tuberculatum*) تا ۲ درصد (*M. simulans*، *M. heterophyllum* و *M. aquaticum*) متغیر بود. همچنین دامنه تنوع بین گونه‌ای از صفر تا ۳/۳ درصد با میانگین تنوع بین گونه‌ای ۱/۸۸ بود. در مقایسه با *trnH-psbA* فقط ۱۸ جایگاه متغیر در توالی *rbcL* نمونه‌های مورد بررسی وجود داشت با این حال دندروگرام حاصل از این مکان ژنی شبیه دندروگرام به‌دست آمده از *trnH-psbA* بود (شکل ۱ب). با استفاده از *rbcL* نیز SNP خاص گونه‌ای برای گونه‌های مهاجم و گونه‌های بومی وجود داشت. به‌عنوان مثال *M. tuberculatum* دارای چهار SNP مخصوص به خود، *M. aquaticum* یک SNP خاص به خود داشتند در حالیکه *M. heterophyllum* و *M. verticillatum* هیچ SNP منحصر به فردی نداشتند ولی با استفاده از چندشکلی بین توالی‌ها گونه‌های مهاجم و بومی توانستند از همدیگر تفکیک شوند (جدول ۳).

با استفاده از مکان ژنی *matK* با وجود اینکه درصد تکثیر قابل قبولی در بین نمونه‌های مورد بررسی به‌دست آمده بود ولی تنها ۲۵ درصد از نمونه‌های تکثیر شده، توالی‌یابی گردیدند و برای نمونه‌هایی که توالی‌یابی شده بودند توالی‌یابی تنها قطعه ۶۰۰ جفت بازی از این ژن امکانپذیر گردید، در حالیکه در اکثر مطالعات بارکدگذاری قطعه ۸۰۰ جفت بازی از این ژن به‌عنوان بارکد مورد استفاده قرار می‌گیرد بنابراین می‌توان گفت که مکان ژنی و کدکننده *matK* نتایج قابل قبولی در جنس مریافیوم در مطالعه حاضر از خود نشان نداد.

در منطقه بین ژنی هسته‌ای *ITS1* تنوع درون گونه‌ای از صفر درصد (*M. simulans* و *M. spicatum*) تا ۹/۱۹ درصد (*M. scabratum*) متغیر بود. همچنین دامنه تنوع بین گونه‌ای از ۲/۴ تا ۱۵/۲ درصد با میانگین تنوع بین گونه‌ای ۱۱/۴ بود. این مکان بین ژنی با داشتن طولی برابر ۳۹۰ جفت باز و ۱۱۹ عدد جایگاه متغیر نسبت به دو منطقه قبلی دارای تعداد جایگاه متغیر بیشتری بود. بر

جدول ۳- SNP های موجود در توالی گونه های جنس مریفیلوم با استفاده از مکان ژنی *rbcL* SNP خاص گونه با رنگ خاکستری مشخص است.

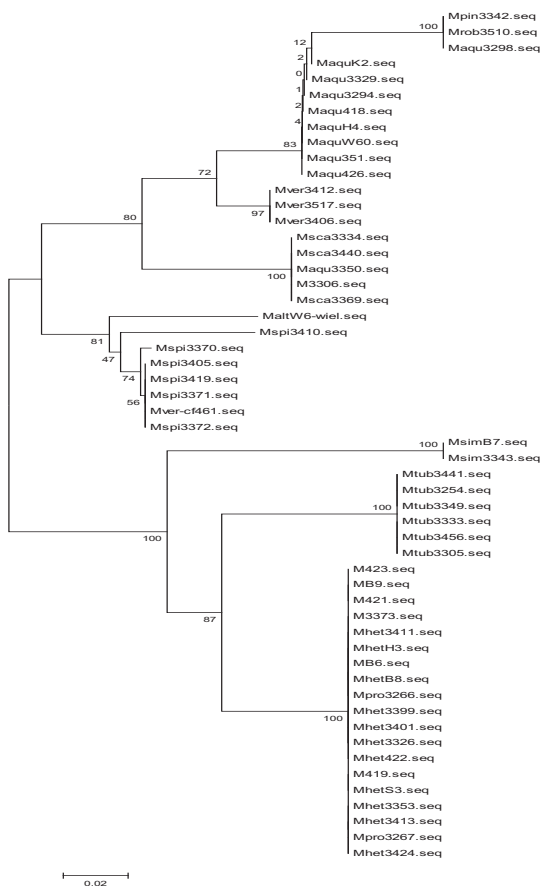
گونه	SNP															
	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳
<i>M. alterniflorum</i>	T	G	C	C	A	T	T	T	G	T	A	A	A	T	A	T
<i>M. spicatum</i>	T	G	C	A	A	T	T	T	G	T	T	A	T	T	A	T
<i>M. scabratum</i>	T	T	C	A	C	C	T	T	G	T	T	C	T	T	A	T
<i>M. aquaticum</i>	T	G	C	A	A	T	A	T	G	T	T	A	T	T	A	T
<i>M. verticillatum</i>	T	G	C	A	A	T	T	T	G	T	T	A	T	T	A	T
<i>M. propinquum</i>	T	G	C	A	A	T	T	T	G	T	T	A	T	T	A	T
<i>M. heterophyllum</i>	T	G	C	A	A	T	T	T	G	T	T	A	T	T	A	T
<i>M. tuberculatum</i>	G	G	C	A	A	T	T	A	A	T	T	A	T	T	T	T
<i>M. simulans</i>	T	G	C	A	A	T	T	T	G	C	T	A	T	T	A	C

مورد بررسی در گروه متعلق به *M. heterophyllum* قرار گرفتند. توالی DNA هر چهار منطقه مورد بررسی برای نمونه های *M.rob3510*، *M.pin3342* و *M.aqu3298* شباهت زیادی به یکدیگر داشته اند بطوری که در همه دندروگرام های به دست آمده از چهار مکان تقریباً در یک گروه فیلوژنی قرار گرفتند با اینکه متعلق به گونه های مختلفی بودند. به نظر می رسد با توجه به اینکه شناسایی گونه های جنس مریفیلوم از لحاظ مورفولوژیکی مشکل می باشد و نیز به دلیل اینکه در هر چهار منطقه مورد بررسی نتایج یکسانی حاصل شده تشخیص آنها از روی صفات مورفولوژیکی درست نبوده است و با توجه به گروه بندی این نمونه ها به وضوح (با استفاده از *rbcL*) در بین گونه *M. aquaticum* و یا با فاصله ژنتیکی (با استفاده از *trnH-psbA* (۴۲/۲ درصد)، *ITS1* (۳/۸ درصد) و *ITS2* (۲/۷ درصد)) در گروه جداگانه و نزدیک به این گونه قرار گرفتند. بر اساس نتایج فوق بنظر می رسد این نمونه ها تنها متعلق به گونه *M. aquaticum* می باشند. مشاهدات به دست آمده از توالی DNA بر اساس هر چهار منطقه نشان داد که نمونه *M.sca3373* که در مطالعات مورفولوژیکی متعلق به گونه *M. scabratum* عنوان شده بود باید متعلق به گونه *M. heterophyllum* باشد. نمونه *M.aqu3350* نیز بر اساس داده های مولکولی متعلق به گونه *M. scabratum* می باشد درحالی که قبلاً این نمونه در گونه *M. aquaticum* طبقه بندی شده بود.

علیرغم اینکه مکان های بین ژنی و هسته ای *ITS1* و *ITS2* دارای قدرت تشخیصی ۱۰۰ درصد بوده و تمام گونه های مورد بررسی را توانستند از هم تفکیک کنند ولی دارای درصد تکثیری پایین و معنی داری در مقایسه با مکان های مورد بررسی کلروپلاستی بودند و با توجه به خصوصیات بارکد مناسب که باید درجه عمومیت و درصد تکثیر بالایی داشته باشد این مناطق را به عنوان بارکد در گیاهان آبیزی مورد بررسی نمی توان توصیه کرد. ولی پیشنهاد می شود زمانی که مناطق کلروپلاستی نتوانند نمونه ای را تشخیص داده یا گونه ها را از هم تفکیک کنند از این مناطق به عنوان بارکد مکمل استفاده گردد.

در مطالعه حاضر علیرغم استفاده از چندین جفت پرایمر و پروتکل تکثیر PCR برخلاف سایر چهار منطقه مورد بررسی، مکان ژنی کلروپلاستی *matK* دارای نتایج قابل قبول توالی یابی نبود و به همین دلیل امکان استفاده از این مکان برای تفکیک گونه های مختلف میسر نگردید. در رابطه با میزان تکثیر و توالی یابی *matK* نتایج مختلف و متفاوتی توسط محققین مختلف ارائه شده است بطوری که در بعضی تحقیقات استفاده از این ژن به عنوان بارکد توصیه شده در حالیکه بعضی مطالعات دیگر آنرا به عنوان بارکد مناسب معرفی نکرده اند (۷ و ۸). بر اساس اصول ذکر شده برای بارکد مناسب چهار مکان دیگر مورد بررسی (*ITS1*، *trnH-psbA*، *rbcL* و *ITS2*) توانستند گونه های مهاجم را از گونه های خارجی و گونه های بومی جنس مریفیلوم جدا سازند که این نتیجه نشانگر تنوع توالی پایین تر در بین نمونه های یک گونه نسبت به گونه نزدیک به آن می باشد. به عنوان مثال، مکان های بین ژنی *ITS1* و *ITS2* توانستند همه گونه های مورد بررسی را از همدیگر کاملاً جدا کند. در حالیکه *rbcL* و *trnH-psbA* که تنوع بین گونه ای در بین بعضی گونه های آن صفر بود و این دو مکان نتوانستند بودند این گونه ها را از هم تفکیک کند نتایج حاصل از *ITS1* و *ITS2* همه گونه های مورد بررسی را از هم تفکیک کنند. از آنجائی که این دو مکان بین ژنی متعلق به ژنوم هسته بوده و دارای تعداد جایگاه متغیر بیشتری بودند بدیهی به نظر می رسد با اینکه همانطور که در شکل های ۱a و ۱b نشان داده شده است نمونه هایی که در گروه هایی برخلاف گروه مورد انتظار طبقه بندی شده اند بدلیل خطا در تشخیص مورفولوژیکی آنها بوده است و این مورد با توجه به نتایج به دست آمده از مناطق DNA کلروپلاستی که با استفاده از آنان نیز همین نتایج به دست آمده است، تأیید می گردد. بدین معنی که اگرچه تعداد زیادی از نمونه های شناسایی شده و یا نمونه های ناشناخته در این مطالعه به وضوح از همدیگر تفکیک شدند و در گروه مربوطه قرار گرفتند ولی این امر در همه نمونه ها مصداق نداشت به عنوان مثال *M.pro3266* و *M.pro3267* که هر دو از روی صفات مورفولوژیکی به عنوان *M.propinquum* شناخته شده بودند با استفاده از چهار منطقه

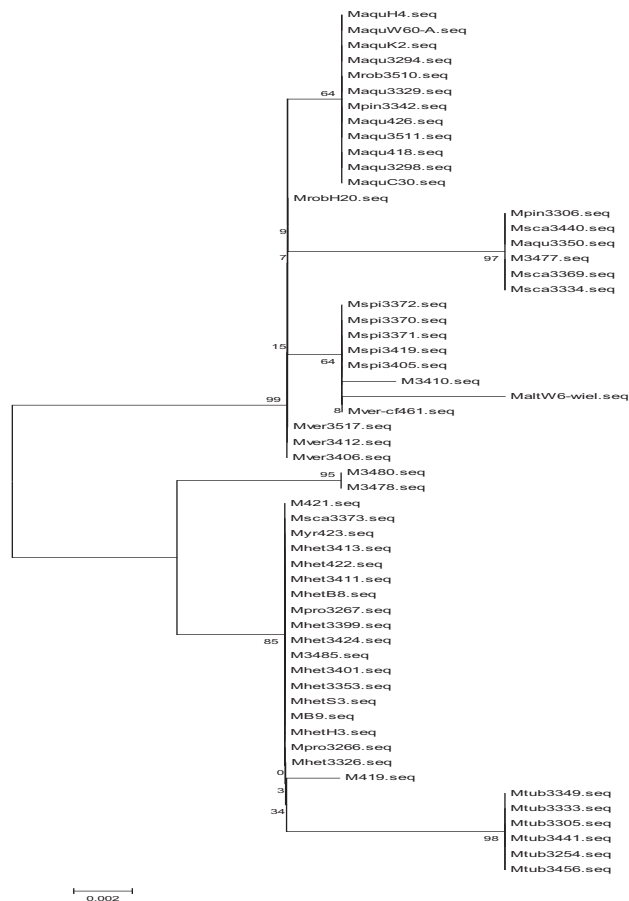
نداد. بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان پیشنهاد کرد که از مکان بین ژنی غیر کدکننده *trnH-psbA* و مکان ژنی و کدکننده *rbcl* برای بارکد جنس مریفیلوم می‌توان استفاده نمود. به عبارت دیگر توالی‌یابی مکان بین ژنی غیر کدکننده *trnH-psbA* و مکان ژنی و کدکننده *rbcl* قادر به تفکیک گونه‌های بومی و مهاجم از یکدیگر بوده و قادر به تمیز گونه‌های که شباهت زیادی به یکدیگر داشته و خیلی بهم نزدیک هستند می‌باشد. این موضوع در تشخیص گیاهان مهاجم و جلوگیری از ورود آن‌ها به فلور منطقه کمک می‌کند. این کار می‌تواند توسط افرادی که گیاه‌شناس نیستند نیز صورت گیرد (۴).



(a)

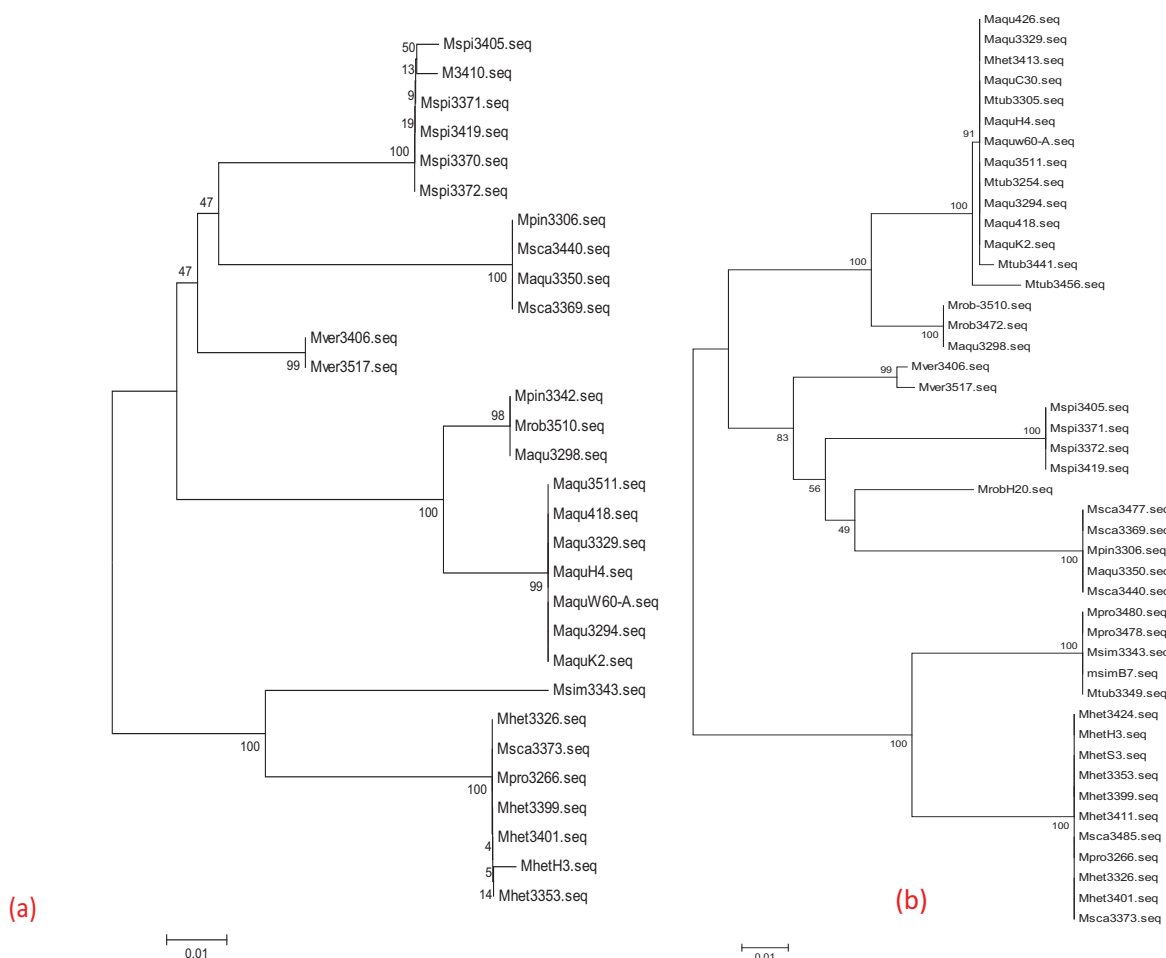
این نتایج توسط گروه محققین گیاهی سازمان CBOL نیز عنوان گردیده است (۳).

بر اساس نتایج حاصل از مکان‌های کلروپلاستی مورد بررسی در این مطالعه، بارکدگذاری DNA می‌تواند به صورت یک ابزار تشخیصی قوی برای نمونه‌های گیاهی مخصوصاً زمانی که نمونه‌ها بر اساس صفات مورفولوژی قابل تشخیص نباشند، بکار برده شود. نتایج به دست آمده با مطالعه صورت گرفته توسط کرس و همکاران (۷) همخوانی دارد. نتایج آن‌ها نیز نشان داد که منطقه غیر کدکننده *trnH-psbA* و قسمتی از منطقه کدکننده *rbcl* می‌تواند به عنوان بارکد عمومی برای گیاهان خشک‌زی استفاده شود این دو منطقه که به اندازه کافی دارای درصد تکثیر و قدرت تفکیک بالا در بین گونه‌های گیاهی می‌باشند. نتایج آزمون ویلکاکسون (داده‌ها نشان داده



(b)

شکل ۱- دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی (a) *trnH-psbA* و (b) مکان ژنی *rbcl* با استفاده از نرم افزار MEGA



شکل ۲- دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی هسته‌ای (a) *ITS1* و (b) مکان ژنی *ITS2* با استفاده از نرم افزار MEGA

بدین وسیله سپاسگزاری می‌شود.

سپاسگزاری

بودجه این طرح توسط وزارت کشاورزی هلند تامین شده است که

منابع

- 1- Aiken S. G. 1981. A conspectus of *Myriophyllum* (Haloragaceae) in North America. *Brittonia* 33: 57 – 69.
- 2- Baker H. G. 1965. Characteristics and modes of origin of Weeds, in *The Genetics of Colonizing Species*. New York, Academic Press.
- 3- CBOL PlantWorkingGroup. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences, 106 (31): 12794-12797.
- 4- Chase M.W. and Fay M. F. 2009. Barcoding of Plants and Fungi. *Science*, 325(5941): 682-683.
 - 5- Cowan R.S., Chase M.W., Kress W.J. and Savolainen V. 2006. 300,000 species to identify: problems, progress and prospects in DNA barcoding of land plants. *Taxon*, 55(3):611-616.
 - 6- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. and deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society Biological Science*, 270:313–321.
 - 7- Kress W. and Wurdack J. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants *National Academy of Sciences of the USA*, 102 (23): 8369-74.
 - 8- Lahaye R. and Bank M. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8): 2923.
 - 9- Moody M. and Donald H.L. 2010. Systematics of the Aquatic Angiosperm Genus *Myriophyllum* (Haloragaceae). *Systematic Botany*, 35(1): 121–139
 - 10- Murphy K. J. 1988. Aquatic weed problems and their management: a review. II. Physical control measures. *Crop Protection*, 7(5): 283-302.
 - 11- Ratnasingham S. and Hebert P.D.N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, 7: 355-364.
 - 12- Rejmanek M. and Randall J. 1994. Invasive alien plant in California: 1993 summary and comparison with other areas in North America. *Madrono*, 41: 161-177.
 - 13- Valentini A., Pompanon F.O. and Taberlet P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2): 110-117.