دانشگاه فردوسی مشهد
دانشکده کشاورزی
رسالة دکتری رشته بیوتکنولوژی

بارکدگذاری DNA برخی از گونه‌های مهاجم و بومی علف‌هرز با استفاده از مکان‌های ژنی *matK*، *rbcL* و منطقه بین ژنی *trnH-psbA*

رباب قهرمان‌زاده

مرداد ۱۳۹۰

دانشکده کشاورزی
رسالة دکتری رشته بیوتکنولوژی

بارکدگذاری DNA برخی از گونه‌های مهاجم و بومی علف‌هرز با استفاده از مکان‌های ژنی *matK*، *rbcL* و منطقه بین ژنی *trnH-psbA*

رباب قهرمان‌زاده

استادان راهنما

دکتر سید حسن مرعشی

دکتر سعید ملک زاده شفارودی

استاد مشاور

دکتر فرجا... شهریاری احمدی

مرداد ۱۳۹۰

اظهار نامه

عنوان رساله: بارکدگذاری DNA برخی از گونه‌های مهاجم و بومی علف‌هرز با استفاده از مکان‌های ژنی *matK*، *rbcL* و منطقه بین ژنی *trnH-psbA*

اینجانب **رباب قهرمان زاده** دانشجوی دوره دکتری رشته **بیوتکنولوژی** دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد نویسنده رساله تحت راهنمایی **حسن مرعشی و سعید ملک زاده شفارودی** متعهد می شوم:

- تحقیقات در این رساله توسط اینجانب انجام شده و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در این رساله تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی به جایی ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد است و مقالات مستخرج با نام "دانشگاه فردوسی مشهد" و یا "Ferdowsi University of Mashhad" به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی رساله تاثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از آن رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این رساله، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده، ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این رساله، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ

امضای دانشجو قهرمان زاده

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد است. این مطالب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج این رساله بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده

تهاجم و گسترش بی‌رویه جانداران غیربومی یک خطر جدی برای تنوع زیستی بشمار می‌آید، بطوریکه اتحادیه بین‌المللی حفظ طبیعت گونه‌های خارجی مهاجم را به همراه تغییرات اقلیمی و تخریب زیستگاه‌ها از عوامل عمده از بین رفتن تنوع زیستی معرفی نموده است. سالیانه ۳۵۰ میلیارد دلار در کل دنیا برای از بین بردن این گونه‌های خارجی هزینه می‌گردد. علف‌های هرز آبزی از قبیل جنس‌های *Myriophyllum*، *Cabomba* و *Ludwigia* و خانواده Hydrocharitaceae مثال‌هایی از گونه‌های خارجی مهاجم هستند که به علت گسترش آسان و سریع از طریق آب‌های آزاد مشکلات عدیده‌ای را ایجاد می‌کنند. روش‌های مختلفی از قبیل زراعی و شیمیایی برای کنترل این گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. حتی با ارائه تمام تحقیقات مورد نیاز برای کنترل یک گیاه غیربومی، از ریشه‌کن شدن آن بطور کامل نمی‌توان اطمینان حاصل کرد. به همین دلیل مطمئن‌ترین روش در کنترل گیاه غیربومی، شناسایی و جلوگیری از ورود آن گیاه به منطقه جدید می‌باشد که البته تشخیص گونه‌های نزدیک بهم از لحاظ مورفولوژیکی همیشه امکان‌پذیر نمی‌باشد. در این موارد روش بارکدگذاری DNA که به خاطر پتانسیل بالای آن در تشخیص و شناسایی گونه‌ها، ابزاری جدید و جذاب در پژوهش‌های تاکسونومی به شمار می‌رود، می‌تواند جایگزین روش‌های سنتی گردیده و در شناسایی گونه‌های مهاجم حتی در مرحله بذری مؤثر واقع شود. در مطالعه حاضر ۳۵۱ نمونه علف‌هرز متعلق به ۷۶ گونه شامل ۲۱ جنس از شش خانواده مختلف در دانشگاه واگنینگن هلند مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه سعی بر این بود تا با استفاده از هفت مکان ژنی کدکننده *matK*، *rbcL*، *YCF5*، *ndhJ*، *accD*، *rpoB* و *rpoC1* و یک منطقه بین‌ژنی غیرکدکننده *trnH- psbA* بارکد مناسب برای گیاهان مورد مطالعه معرفی نمود تا بتوان راهکاری برای تشخیص گیاهان مهاجم از بومی هلند و به تبع آن حفظ جمعیت بومی منطقه ارائه داد. بر اساس نتایج تفکیک گونه‌ای موفق در گونه‌های آبزی بررسی شده (۹۶/۲ درصد، ۹٤/۲ درصد و ۹٦/۸ درصد بترتیب برای *trnH-psbA*، *rbcL* و *matK*) بنظر می‌رسد که سرمایه‌گذاری روی تکنیک بارکدگذاری DNA می‌تواند ابزار قوی برای تشخیص و تفکیک نمونه-های گیاهی را در اختیار پژوهشگران قرار دهد. بویژه زمانیکه از لحاظ مورفولوژیکی تشخیص گونه‌ها از یکدیگر مشکل باشد می‌توان از بارکدگذاری DNA بهره جست. نتایج نشان داد که از بین مناطق بررسی شده مکان کلروپلاستی بین ژنی غیرکدکننده *trnH- psbA* بدلیل درجه عمومیت بالا، قابلیت تکثیر و قدرت تفکیک بالای گونه‌ای در اکثر گونه‌های بررسی شده قادر به تفکیک گونه‌های بومی و مهاجم می‌باشد. بنابراین در اکثر آنها، تک مکان بین ژنی غیر کدکننده *trnH-psbA* بعنوان بارکد مناسب معرفی گردید

واژه‌های کلیدی: *Cabomba*، Hydrocharitaceae، *Ludwigia*، *Myriophyllum*، تفکیک گونه‌ای

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه ۱

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱ تنوع زیستی ۶

۲-۱-۱ اهمیت تنوع زیستی ۸

۲-۲ امنیت زیستی و نقش آن در حفظ تنوع زیستی ۹

۲-۲-۱ امنیت زیستی و تهاجم بیولوژیکی ۱۱

۲-۳ علف‌های هرز مهاجم ۱۳

۲-۳-۱ علف‌های هرز مورد بررسی ۱۵

۲-۳-۱-۱ جنس *Myriophyllum* ۱۵

۲-۳-۱-۲ جنس *Ludwigia* ۱۶

۲-۳-۱-۳ خانواده Hydrocharitaceae ۱۷

۲-۳-۱-۴ جنس *Cabomba* ۱۸

۲-۳-۱-۵ خانواده Cyperaceae ۲۰

۲-۳-۱-۶ جنس *Sorghum* ۲۰

۲-۳-۲ روش‌های کنترل علف‌های هرز مهاجم ۲۱

۲-۳-۳ روش‌های تشخیص علف‌های مهاجم ۲۵

۲-۳-۳-۱ تشخیص مولکولی علف‌های هرز مهاجم ۲۷

۲-۳-۳-۲ تشخیص مولکولی علف‌های هرز ناشناخته ۳۰
۲-۳-۳-۳ تفکیک مولکولی بذور گونه‌های مختلف علف‌هرز در نمونه محیطی ۳۱
۲-۴ بارکدگذاری DNA ۳۶
۲-۴-۱ خصوصیات اصلی یک توالی بارکد ۳۷
۲-۴-۲ نقش توالی ژنوم هسته در بارکدگذاری ۳۸
۲-۴-۲-۱ مناطق بین ژنی *ITS* ۳۹
۲-۴-۳ استفاده از ژنوم میتوکندریائی در بارکدگذاری ۴۲
۲-۴-۴ استفاده از ژنوم کلروپلاست در بارکدگذاری ۴۴
۲-۴-۴-۱ کلروپلاست و سازماندهی ژنوم آن ۴۴
۲-۴-۴-۲ توارث خارج هسته‌ای ژن‌های کلروپلاست ۴۶
۲-۴-۴-۳ تغییرات تکاملی در DNA کلروپلاست ۴۸
۲-۴-۴-۴ تکامل مناطق غیر کدکننده ژنوم کلروپلاست ۴۸
۲-۴-۴-۵ توالی ژنوم کلروپلاست ۴۹
۲-۴-۵ مکان‌های ژنی و بین ژنی کلروپلاستی مورد استفاده در مطالعات فیلوژنی گیاهان ۵۰
۲-۴-۵-۱ توالی ژن *rbcL* ۵۰
۲-۴-۵-۱-۱ مزایای ژن *rbcl* برای مطالعه فیلوژنی گیاهان ۵۱
۲-۴-۵-۲ توالی ژن *matK* ۵۳
۲-۴-۵-۳ توالی ژن‌های $rpoC_1$ و *rpoB* ۵۵
۲-۴-۵-۴ توالی ژن *accD* ۵۷
۲-۴-۵-۵ توالی ژن *ycf5* ۵۷
۲-۴-۵-۶ توالی ژن *ndhJ* ۵۸
۲-۴-۵-۷ توالی بین ژنی *atp-F_atPH* ۵۹

۲-۴-۵-۸ توالی بین ژنی *trnH-psbA* ۶۰
۲-۴-۵-۹ توالی بین ژنی *psbK-psbI* ۶۱
۲-۴-۵-۱۰ توالی بین ژنی *trnF*(GAA) *trnL*-(UAA) ۶۲
۲-۴-۶ بارکدگذاری در گیاهان ۶۳
۲-۴-۶-۱ مشکلات یا ملاحظات موجود در بارکدگذاری گیاهان ۶۷
۲-۵ آنالیز داده‌های ژنتیکی ۷۲
۲-۵-۱ انتخاب مارکر ژنتیکی ۷۲
۲-۵-۲ ساختن هم‌ردیفی توالی‌ها ۷۴
۲-۵-۳ تحلیل فیلوژنتیک داده‌های مولکولی ۷۶
۲-۵-۴ انتخاب مدل جایگزینی نوکلئوتیدها ۷۶
۲-۵-۵ روش‌های ایجاد درخت‌های فیلوژنتیک ۷۸
۲-۵-۵-۱ روش مبتنی بر معیار فاصله ۷۸
۲-۵-۵-۲ روش بیشترین پارسیمونی ۷۹
۲-۵-۵-۳ روش حداکثر درستنمایی ۸۰
۲-۶ پایگاه اینترنتی داده‌های بارکدگذاری DNA ۸۰
۲-۶-۱ بانک اطلاعاتی داده‌ها ۸۳
۲-۶ ۲ مدیریت داده‌ها ۸۴

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱ بخش اول: بارکدگذاری DNA ۸۷
۳-۱-۱ جمع‌آوری نمونه‌ها ۸۷
۳-۱-۲ استخراج DNA ۸۸
۳-۱-۲-۱ بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده ۸۹
۳-۱-۲-۲ الکتروفورز DNA ۹۰

۳-۱-۳ مناطق بارکد مورد بررسی ۹۱
۳-۱-۴ شرایط واکنش‌های PCR..... ۹۲
۳-۱-۴-۱ خالص‌سازی محصولات PCR..... ۹۷
۳-۱-۴-۲ بررسی کمی محصولات PCR ۹۸
۳-۱-۵ توالی‌یابی نمونه‌های تکثیر شده ۹۹
۳-۱-۶ ویرایش و آنالیز توالی‌ها..... ۱۰۰
۳-۱-۶-۱ ایجاد توالی‌های هم‌ردیف شده (MAS)..... ۱۰۱
۳-۲ بخش دوم: تشخیص هیبریدهای احتمالی جنس *مریافیلوم* با استفاده از *ITSs* ۱۰۲
۳-۲-۱ مواد گیاهی ۱۰۲
۳-۲-۲ استخراج و تکثیر DNA..... ۱۰۲
۳-۲-۳ کلون‌سازی محصولات PCR نمونه‌های مشکوک هیبرید ۱۰۴
۳-۲-۳-۱ خالص‌سازی محصولات PCR..... ۱۰۴
۳-۲-۳-۲ واکنش اتصال ۱۰۵
۳-۲-۳-۳ وارد نمودن DNA نوترکیب به سلول میزبان ۱۰۶
۳-۲-۳-۴ شناسایی سلول‌های حاوی DNA نوترکیب ۱۰۸
۳-۲-۳-۵ تأیید حضور قطعه مورد نظر در پلاسمید با استفاده از هضم آنزیمی ۱۱۰
۳-۲-۳-۶ تأیید حضور قطعه مورد نظر در پلاسمید با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۱۱۰
۳-۲-۴ توالی‌یابی کلون ۱۱۱
۳-۲-۵ آنالیز داده‌ها ۱۱۱

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱ بخش اول: بارکدگذاری DNA..... ۱۱۳
۴-۱-۱ استخراج DNA..... ۱۱۳
۴-۱-۲ تکثیر مکان‌های بررسی شده..... ۱۱۴

۴-۱-۳ نتایج بارکدگذاری به تفکیک جنس‌های مطالعه شده ۱۱۹
۴-۱-۳-۱ جنس *Myriophyllum* ۱۱۹
۴-۱-۳-۲ جنس *Ludwigia* ۱۲۵
۴-۱-۳-۳ خانواده Hydrocharitaceae ۱۳۱
۴-۱-۳-۴ جنس *Cabomba* ۱۳۶
۴-۱-۳-۵ خانواده Cyperaceae ۱۴۰
۴-۱-۳-۶ خانواده Poaceae ۱۴۴
۴-۱-۴ بحث پیرامون نتایج حاصل از بارکدگذاری DNA ۱۴۵
۴-۲ بخش دوم- بررسی هیبریداسیون احتمالی در جنس *مریافیلوم* ۱۵۳
۴-۲-۱ تکثیر و توالی‌یابی ITS_S ۱۵۳
۴-۲-۲ آنالیز توالی‌ها ۱۵۴
۴-۲-۳ بحث پیرامون نتایج حاصل از مطالعه هیبریداسیون احتمالی در جنس مریافیلوم ۱۶۲
۴-۳ نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات ۱۶۷
منابع ۱۶۹
پیوست ۱۸۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱. سه منطقه کد کننده و دو منطقه بین ژنی واحدهای تکراری DNA ریبوزومی هسته‌ای در نهاندانگان ۳۹

شکل ۲-۲. جریان اطلاعات ژنتیکی بین اندامک‌ها در سلول گیاهی ۴۹

شکل ۲-۳. سازماندهی ساختار ژنوم کلروپلاست تنباکو ۵۰

شکل۲-۴. صفحه نمونه برای یک فرد از *Macroglossus mininus* (Chiroptera) ۸۵

شکل۲-۵. صفحه توالی برای یک فرد از *Macroglossus mininus* (Chiroptera) ۸۶

شکل ۳-۱. نمای ظاهری برخی از گیاهان مورد بررسی ۸۹

شکل۳-۲. مقدار توصیه شده DNA الگو در واکنش‌های توالی‌یابی (محصولات PCR) ۹۸

شکل ۳-۳. ترکیب ژن rDNA در هسته نهاندانگان ۱۰۳

شکل ۳-٤. نقشه حلقوی وکتور pCR®2.1-TOPO® مورد استفاده در همسانه‌سازی ۱۰۵

شکل۳-۵. مقدار توصیه شده DNA الگو در واکنش‌های توالی‌یابی (محصولات PCR با طول بزرگ و پلاسمیدها) ۱۱۱

شکل٤-۱. نمونه DNA استخراج شده از برخی نمونه‌های جنس *مریافیلوم* با استفاده از کیت کیامپ ۱۱٤

شکل٤-۲. نتیجه ارزیابی کیفی و نمودار جذب نوری DNA یک نمونه *مریافیلوم* در دستگاه نانودراپ ۱۱٤

شکل ۴-۳. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی (a) *trnH-psbA* و (b) مکان ژنی *rbcL*با استفاده از نرم افزار MEGA در جنس *مریافیلوم* ۱۲۴

شکل۴-۴. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی (a) *trnH-psbA* و (b) مکان ژنی *rbcL* با استفاده از نرم افزار MEGA در جنس *Ludwigia*. ۱۲۷

شکل ۴-۵. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی *matK* با استفاده از نرم‌افزار MEGA در جنس *Ludwigia*. ۱۳۰

شکل ۴-۶. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی (a) *trnH-psbA* و (b) مکان ژنی ۱۳۴

rbcL با استفاده از نرم افزار MEGA در خانواده Hydrocharitaceae.

شکل ۴-۷. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی *matK* با استفاده از نرم افزار MEGA در خانواده Hydrocharitaceae ۱۳۵

شکل ۴-۸. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی *trnH-psbA* (a) و (b) مکان ژنی *rbcL* با استفاده از نرم‌افزار MEGA در جنس *Cabomba* ۱۳۷

شکل ۴-۹. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی *matK* با استفاده از نرم‌افزار MEGA در جنس *Cabomba* ۱۳۹

شکل ۴-۱۰. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی *trnH-psbA* با استفاده از نرم‌افزار MEGA در خانواده Cyperaceae ۱۴۱

شکل ۴-۱۱. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی *rbcL* با استفاده از نرم‌افزار MEGA در خانواده Cyperaceae ۱۴۳

شکل ۴-۱۲. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی کلروپلاستی *trnH-psbA* (a) و (b) مکان ژنی *rbcL* با استفاده از نرم‌افزار MEGA در خانواده گرامینه ۱۴۵

شکل۴-۱۳. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی (a) توالی‌های هسته‌ای *ITS1* و (b) *ITS2* با استفاده از نرم‌افزار MEGA ۱۵۷

شکل ۴-۱۴. دندروگرام Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی (a) توالی هسته‌ای *ITS1* برای داده‌های گروه دوم و (b) *ITS2* برای گروه داده‌های چهارم، با استفاده از نرم‌افزار MEGA ۱۶۰

شکل ۴-۱۵. شمای کلی از فاصله مورد انتظار در بارکدگذاری DNA ۱۶۳

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱. توالی آغازگرهای عمومی مورد استفاده برای تکثیر مناطق *ITS1* و *ITS2* ٤٠

جدول ۲-۲ مجموعه دسته‌های آغازگری مناسب برای مناطق نامزد بالقوه انتخاب شده به عنوان مارکرهای بارکدگذاری ٦٩

جدول ۲-۳. مناطق بارکدمورد بررسی و توصیه شده بعنوان بارکد عمومی در گیاهان ٧٠

جدول۳-۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر مناطق کاندیدای بارکدگذاری در مطالعه حاضر ٩١

جدول ۳-۲. آنزیم‌های پلی‌مراز مختلف استفاده شده برای تکثیر مکان ژنی کدکننده *matK* ٩٦

جدول ۳-۳. توالی دنباله M13 مورد استفاده برای تکثیر مناطق *matK* و *ITS* ٩٦

جدول ۳-۴. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر و توالی‌یابی منطقه بین ژنی *ITSs* ١٠٣

جدول ۳-۵. غلظت و حجم‌های بهینه شده مواد تشکیل دهنده واکنش اتصال *محصول* PCR و وکتور ١٠٦

جدول ۳-۶. غلظت و حجم‌های بهینه شده مواد تشکیل دهنده واکنش هضم پلاسمید برای حجم ۲۰ میکرولیتر ١١٠

جدول ۴-۱. خلاصه موفقیت درتکثیر و توالی‌یابی سه مکان ژنی و بین ژنی کاندیدا برای بارکدگذاری در گیاهان مورد بررسی ١١٧

جدول ۴-۲. نتایج تکثیر پنج مکان ژنی*ycf5*، *ndhJ*، *accD*، *rpoB* و *rpoC1* با استفاده از ترکیب‌های آغازگری مختلف در گیاهان بررسی شده ١١٨

جدول ۴-۳. نتایج درصد تکثیر مکان ژنی *matK* با استفاده از ترکیب‌های آغازگری مختلف در جنس‌ها و خانواده - های گیاهی مورد بررسی ١١٩

جدول ۴-۴. نوع پراکنش گونه‌های متعلق به جنس *مریافیلوم* بررسی شده در این مطالعه در فلور طبیعی هلند ١٢٢

جدول۴-۵. میانگین تنوع بین گونه‌ای در گونه‌های بررسی شده مختلف آبزی با استفاده از مکان ژنی *rbcL*، *matK* و مکان بین ژنی *trnH-psbA* بر اساس مدل *p-distance* ١٢٢

جدول ۴-۶. SNPهای موجود در توالی گونه‌های جنس *مریافیلوم* با استفاده از مکان ژنی *rbcL* ١٢٣

جدول ۴-۷. SNPهای مشاهده شده در توالی ژن *rbcL* نمونه‌های *L. peploides* ۱۲۹

جدول ۴-۸. SNPهای مشاهده شده درتوالی ژن *matK* گونه‌های *Ludwigia* ۱۲۹

جدول ۴-۹. SNPهای خاص گونه مشاهده شده درتوالی ژن *matK* گونه‌های *Cabomba* ۱۳۸

جدول ٤-۱۰. موقعیت SNPهای خاص گونه در برخی گونه‌های مهاجم، بومی و غیرمهاجم *مریافیلوم* در توالی مکان بین ژنی *ITS2* ۱۵۵

جدول ۴-۱۱. میانگین فاصله بین گونه‌ای (p-distance) با استفاده از مکان بین ژنی *ITS2* در بین گونه‌های جنس *مریافیلوم* ۱۵٦

جدول ٤-۱۲. میانگین فاصله بین گونه‌ای (p-distance) با استفاده از مکان بین ژنی *ITS1* در بین گونه‌های جنس *مریافیلوم* ۱۵٦

جدول ٤-۱۳. میانگین فاصله بین نمونه‌های مشکوک به هیبرید با گونه *M. heterophyllum* (p-distance) با استفاده مکان *ITS1* ۱٦۱

جدول٤-۱٤. میانگین فاصله بین نمونه‌های مشکوک به هیبرید با گونه *M. heterophyllum* (p-distance) با استفاده از مکان *ITS2* ۱٦۱

جدول٤-۱۵. موقعیت SNPهای موجود در هر کدام از نمونه‌های مشکوک به هیبرید و گونه *M. heterophyllum* در مکان بین ژنی *ITS1* ۱٦۱

جدول ٤-۱٦. موقعیت SNPهای موجود در هر کدام از نمونه‌های مشکوک به هیبرید و گونه *M. heterophyllum* در توالی مکان بین ژنی *ITS2* ۱٦۲

علائم و اختصارات

معادل کامل فارسی	معادل کامل انگلیسی	علامت

accD	Acetyl-CoA Carboxylased	استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز
AFLP	*Amplified Fragment Length Polymorphism*	تفاوت طول قطعه‌های حاصل از تکثیر
ATP	Adenosine Triphosphate	آدنوزین تری‌فسفات
atpA	ATP Synthasea	آ.ت.پ. سنتتاز
atp-F_atPH	ATP Synthase –F- ATP Synthase-H	آ.ت.پ. سنتتازف. - آ.ت.پ. سنتتاز اچ.
BOLD	Barcod Of Life Data System	بانک اطلاعاتی بارکد موجودات زنده
CBOL	Consortium For The Barcode Of Life	کنسرسیوم بارکد موجودات زنده
CFO	Chloroplast ATP Synthase	آ.ت.پ. سنتتاز کلروپلاست
COI	Cytochrome C Oxidase Subunit I	زیر واحد یک سیتوکروم اکسیداز سی
cpDNA	Chloroplast DNA	دی.ان.ای. کلروپلاستی
ctDNA	Chloroplast DNA	دی.ان.ای. کلروپلاستی
DDBJ	*DNA Data Bank Of Japan*	بانک داده‌های دی.ان.ای. ژاپن
DGGE	*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*	الکتروفورز ژل گرادیانت
DNA	Deoxyribonucleic Acid	دی اکسی ریبونوکلئویک اسید
EMBL	*European Molecular Biology Laboratory*	آزمایشگاه بیولوژی مولکولی اروپا
GBIF	Global Biodiversity Information Facility	بانک اطلاعاتی تنوع زیستی جهان
Indel	Insertion And Deletion	حذف و اضافه
ITS	*Internal Transcribed Spacer*	مکان بین ژنی
K2P	Kimura 2-Parameter	دو پارامتری کیمورا
matK	MaturaseK	موتاراز کا
MSA	Multiple Sequence Alignment	هم‌ردیف توالی‌های چندگانه
mtDNA	Mitochondria DNA	دی.ان.ای. میتوکندری
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید
NCBI	National Center For Biotechnology Information	
ndhy	NADH Dehydrogenasey	ان.ا.د.هاش.دهیدروژناز
nrITS	Nucear Ribosomal ITS	آی.تی.اس. ریبوزوم هسته
ORF	Open Reading Frame	چارچوب قرائت
PCR	Polymerase Chain Reaction	واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
POA_S	*Phylogenetic* Oligonucleotide *Arrays*	اری الیگونوکلئوتیدی فیلوژنتیکی
PsbA	Photosystem II Protein A	پروتین آ فتوسیستم دو
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA	دی.ان.ای. چند شکل تکثیر شده تصادفی
rbcL	Ribulose-Bisphosphate Carboxylasel	ریبولوز بی‌فسفات کربوکسیلاز یک

rDNA	Ribosomal DNA	در.ان.ای. ریبوزومی
rpoB	RNA Polymeraseb	آر.ان.آ. پلی‌مراز بی.
rpoC1	RNA Polymerase C	ار.ان.آ. پلی‌مراز سی
rRNA	Ribosomal RNA	آر. ان. آ. ریبوزومی
SNP	*Single-Nucleotide Polymorphism*	تفاوت تک نوکلئوتیدی
SSCP	*Single-Strand Conformation Polymorphism*	تفوت فرم فضایی رشته‌های منفرد
SSP	Specie Specific PCR	پی.سی.ار. خاص گونه
SSR	Simple Sequence *Repeat*	ردیف‌های تکراری ساده
TGGE	*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*	ژل الکتروفورز گرادیانت دمایی
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism	تفاوت طول قطعه‌های حاصل از هضم دی.ان.ای. انتهایی
$tRNA_S$	*Transferase RNA*	آر. ان .ای حامل
trnF	Trna-Phe	آر. ان .ای حامل فنیل آلانین
trnH-psbA	Trna-His	آر. ان .ای حامل هیستدین
trnK	Trnalys	آر. ان .ای حامل لایزین
trnL	Trna-Leu	آر. ان .ای حامل لوسین
UPGMA	Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean	

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

طی چند دهه اخیر متخصصین اکولوژی و محیط زیست به این نتیجه رسیده‌اند که تهاجم وگسترش جانداران غیربومی یک خطر جدی برای حفظ محیط زیست به شمار می‌آید. گسترش گیاهان خارجی و مهاجم در داخل فلور طبیعی منطقه باعث بروز مشکلات عدیده‌ای خواهد شد. گیاهان غیربومی به دلیل پتانسیل بسیار بالایی که در تسخیر منابع در مقابل سایر گونه‌های بومی منطقه دارند و نیز به علت مشکل‌تر بودن کنترل آنان نسبت به کنترل علف‌های هرز، ارائه یک راهکار عملی برای کنترل آنها نیاز به تحقیقات وسیع در زمینه بیولوژی، اکولوژی و فیزیولوژی گیاهان مهاجم دارد. حتی با ارائه تمام تحقیقات و در نتیجه روش‌های مورد نیاز برای کنترل یک گیاه غیربومی، از ریشه‌کن شدن آن بطور کامل نمی‌توان اطمینان حاصل

کرد. به همین دلیل، مطمئن‌ترین روش در کنترل گیاه غیربومی، شناسایی و جلوگیری از ورود آن گیاه به منطقه جدید می‌باشد. علاوه بر گونه‌های خشکزی، علف‌های هرز آبزی مهاجم به علت گسترش آسان و سریع از طریق آب‌های آزاد مشکلات عدیده‌ای را ایجاد می‌کنند. کنترل علف‌های هرز آبزی در اغلب موارد جهت تسهیل در حرکت آب، فراهم شدن محیط مناسب برای ماهیگیری، جلوگیری از بروز مشکل در کشتیرانی و حمل و نقل آبی و بهداشت عمومی ضروری می‌باشد. طی سال‌های اخیر با ورود علف‌های هرز مهاجم و گونه‌های غیربومی در مناطق مختلف، از طریق محیط‌های آبی، مدیریت علف‌های هرز آبزی 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 آبزی شده است، بعنوان مثال، رشد بی‌رویه و گسترش غیرقابل کنترل گیاه مهاجم و وارداتی آزولا[1] در تالاب انزلی باعث شده که ۲۵ درصد کل تالاب توسط آنها اشغال شده بطوریکه تاکنون راه‌حلی برای مقابله با افزایش سریع آن پیدا نشده است (نجفی و همکاران، ۱۳۸۸). مثال دیگر مبارزه با گونه‌های مهاجم آبزی *مریافیلوم* [2] می‌باشد که مشکل اصلی در کنترل آن تشخیص گونه‌های نزدیک بهم از لحاظ مورفولوژیکی می‌باشد و گونه مهاجمی که وارد منطقه می‌شود بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی به سختی قابل تشخیص می‌باشد، بعد از رشد زیاد این گیاهان در منطقه و افزایش مشکل‌ساز آنان، امروزه از روش‌های کلاسیک کنترل علف هرز برای کنترل این گیاهان استفاده می‌شود (مودی و لس، ۲۰۱۰).

دامنه وسیعی از علف‌های هرز آبزی به وسیله علف‌کش‌ها کنترل می‌شوند. مصرف علف‌کش باعث آلودگی آب شده و همچنین اثر کشندگی روی ماهی‌ها و جانوران و آبزیان کوچک دارد. بنابراین به نظر

1- *Azolla filiculoides*
2- *Myriophyllum*

می‌رسد مدیریت ریسک و خطر ایجاد شده توسط گونه‌های مهاجم آبزی و خشکزی، به توانایی در تشخیص این گونه‌ها و جلوگیری از ورود آنها به منطقه احتیاج دارد. مبحث تشخیص گیاهان مهاجم مستلزم این است که ابزارهایی برای تشخیص سریع آنها استفاده گردد که در ضمن بهترین ابزارها باید در دامنه وسیعی از گونه‌ها قابل بهره‌برداری باشد. متأسفانه این شرایط بوسیله روش‌های سنتی که بر پایه مورفولوژی جاندارن انجام می‌گیرد فراهم نمی‌گردد. روش‌های سنتی نیاز به تخصص تاکسونومیست‌های زیادی برای تشکیل یک کمیته بزرگ به منظور تشخیص جاندارن غیر بومی و شناخت دقیق تنوع‌زیستی منطقه دارد. پرواضح است که این کار نیاز به صرف هزینه و زمان زیادی دارد (گاسمن و همکاران، ۲۰۰۶).

برای شناسایی و مدیریت گونه مهاجم بهتر است تشخیص در مراحل اولیه یعنی مرحله بذری صورت گیرد که اکثراً شناسایی بذر از روی مورفولوژی سخت خواهد بود. بنابراین امروزه از روش‌های مبتنی بر DNA برای این منظور استفاده می‌گردد. روش‌های مبتنی بر DNA نسبت به روش‌های سنتی ارزان، سریع و دارای دقت بالایی در تشخیص گونه‌ها و همچنین ارزیابی تنوع زیستی می‌باشند. روش بارکدگذاری[1] DNA (یک توالی DNA بسیار کوتاه استاندارد از یک ژن یا منطقه بین‌ژنی کاملاً شناخته شده است که به کمک این 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 تاکسونومی به شمار می‌رود و از سال ۲۰۰۳ بطور فراگیر در شناسایی گونه‌های گیاهی به کار گرفته می‌شود (هبرت و همکارن، ۲۰۰۳). این روش در نتیجه تکثیر توالی هدف می‌تواند گونه‌های خیلی نزدیک بهم را از یکدیگر تشخیص دهد. هدف اولیه بارکدگذاریDNA شناسایی توالی خاصی برای هر گونه و تشکیل بانک اطلاعاتی بارکد موجودات زنده می‌باشد که تمام پژوهشگران در زمینه‌های تخصصی مختلف بتوانند به این بانک

1- DNA barcoding

اطلاعاتی دسترسی داشته باشند. با استفاده از بارکد برای گیاهان بومی منطقه و گیاهان مهاجم تشخیص آنها از همدیگر امکان پذیر بوده و از ورود مهاجم‌ها به منطقه جلوگیری خواهد شد. در صورتیکه جلوگیری از ورود گونه مهاجم بطور کامل امکان‌پذیر نباشد و این گونه وارد منطقه شود. می‌توان با رجوع به بانک اطلاعاتی بارکد موجودات زنده BOLD[1] در صورت وجود اطلاعات گونه مورد نظر در این بانک اطلاعاتی آن را شناسایی کرد. با توجه به اینکه در بانک اطلاعاتی BOLD تمامی اطلاعات از قبیل گیاهشناسی، مرکز تنوع، شرایط مطلوب رشدی، مقالات مرتبط با روش‌های مبارزه و سایر اطلاعات لازم موجود می‌باشد می‌توان با استفاده از این اطلاعات ثبت شده با گونه مهاجم مورد نظر مبارزه کرد. در نتیجه در گام اول بواسطه جلوگیری از ورود موجودات مهاجم و خارجی به منطقه، باعث حفظ محیط زیست و تنوع زیستی آن، و در گام دوم می‌توان با بکارگیری سریع روش‌های رایج مبارزه و کنترل گونه مورد نظر از گسترش گیاه مهاجم در منطقه جلوگیری کرد(فرزال و لبلویس، ۲۰۰۸).

اولین بار در سال ۲۰۰۳ هبرت بحث بارکدگذاری DNA موجودات زنده را مطرح کرد. هبرت از بارکدگذاری بعنوان ابزاری برای مستندسازی تنوع‌زیستی با استفاده از یک توالی ژنی نام برد. وی ژن سیتوکروم اکسیداز I[2] (*COI*) میتوکندریایی که یک توالی ۶۴۸ جفت بازی می‌باشد را بعنوان بارکد اولیه برای حیوانات معرفی نمود. در سال ۲۰۰۴ سازمان CBOL[3] به منظور ایجاد یک کتابخانه بارکدگذاری برای موجودات زنده راه‌اندازی شد (راتناسینقام و هبرت،۲۰۰۷).

در گیاهان مشکلاتی در زمینه پیدا کردن توالی عمومی استاندارد وجود دارد و تنوع زیادی بین گونه‌های گیاهی در زمینه توالی‌های پیشنهادی به چشم می‌خورد. به همین دلیل مناطق مختلف DNA در

1- The Barcode of Life Data System
2- Cytochrome *C* Oxidase Subunit I
3- Consortium for the Barcode of Life