Archive of SID

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۰، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ٥٤-۳۹ (۱۳۹۱)

بررسی روابط خویشاوندی برخی گونه‌های ماشک (*Vicia* spp.) براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای و نشانگرهای RAPD

علی اصغری[1*]، زهرا بزرگی[2]، مجید شکرپور[3] و علی اشرف جعفری[4]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
پست‌الکترونیک: ali_asgharii@yahoo.com
۲- کارشناس ارشد، اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی
۳- استادیار، گروه باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
٤- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۹/۲۱

چکیده

به منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی برخی گونه‌ها، زیرگونه‌ها و اکوتیپ‌های ماشک، ۱۷ نمونه توسط الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و ١٤ نمونه نیز توسط نشانگرهای RAPD (رپید) مورد مطالعه قرار گرفتند. پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه از بذرهای جمع‌آوری شده و DNA نمونه‌ها از برگ بوته‌های کشت شده استخراج شد. شاخص تنوع ژنی نی و شانون مربوط به نشانگرهای رپید و پروتئین تفاوت قابل ملاحظه‌ای باهم نداشت، ولی شاخص‌های PIC و MI مربوط به نشانگرهای پروتئینی بیشتر از میانگین این شاخص‌ها در آغازگرهای رپید بود. در درخت فیلوژنی براساس نشانگرهای پروتئینی، زیرگونه‌ها و اکوتیپ‌های گونه *sativa* در یک شاخه قرار گرفتند. در تجزیه رپید نیز این نمونه‌ها در یک شاخه بزرگ قرار گرفتند که در زیر شاخه‌های آن گونه-های دیگر نیز قرار داشتند. دو اکوتیپ از گونه *V. pannonica* در یک شاخه و در رده بالاتر، گونه *V. cracca* قرار گرفت. ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از ترکیب داده‌های دو سری نشانگر، نتایج بهتری را ارائه کرد. گروه‌بندی نمونه‌ها با استفاده از روش تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی، با نتایج حاصل از درخت فیلوژنی در هر سه حالت تاحدودی هم‌خوانی داشت. البتّه مقایسه ماتریس فاصله مربوط به نشانگرهای رپید و پروتئین توسط آزمون مانتل، همبستگی کمی بین این دو دسته داده نشان داد.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، ماشک، نشانگر، رپید، SDS-PAGE.

مقدمه

در کنار نقش کاربردی سیستماتیک، در نظر گرفتن روابط فیلوژنتیک، پیش نیاز درک تکامل موجودات زنده است و ضرورت مشارکت فیلوژنتیک، برای فهم تنوع مورفولوژیکی بر کسی پوشیده نیست. تعیین هویت گیاهان از لحاظ تاریخ تکاملی در تشخیص و فهم قرابت‌های بین آنها کمک شایانی به تحقیقات بعدی به‌ویژه در برنامه‌های اصلاحی، خواه اصلاح با روش‌های

www.SID.ir

Archive of SID

کلاسیک و خواه با روش‌های نوین مهندسی ژنتیک خواهد نمود. فیلوژنی نه تنها در مباحث بررسی تکامل موجودات، بلکه در مورد تکامل ژن‌های آنها نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Doyle & Gaut, 2000). چارچوب کاری فیلوژنتیکی، نیازمند تشخیص صفات اجدادی از سایر صفات ایجاد شده جدید در واحد فرد، گونه و بالاتر است.

گونه‌های گیاهی وحشی، بخش عمده ذخایر ژنتیکی را شامل می‌شوند و ابزار مبارزه با فرسایش ژنتیکی می‌باشند. همچنین، این گونه‌ها منبعی برای معرفی گیاهان زراعی و باغی جدید برای مصارف مختلف هستند (Straus, 2003). خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی منبع انواع ژن‌های مورد استفاده در برنامه‌های اصلاحی بشمار می‌روند و به دلیل انتخاب طبیعی برای ژن‌های مقاومت و سازگاری در طی سالیان دراز، پتانسیل بالایی از لحاظ این نوع ژن‌ها دارند. امروزه اصلاح کنندگان به جای اهلی نمودن گونه‌های وحشی، بیشتر به ژن‌های مفید توجه می‌کنند. بدلیل اینکه، از نظر علم ژنتیک، اصلاح نباتات و تکامل، گیاهان اهلی و وحشی نکات مشترکی دارند (Ehdayi, 1992).

بقولات یکی از سه خانواده بزرگ گیاهان عالی و به عنوان علوفه، دارای دومین رتبه از نظر اهمیت در کشاورزی هستند. یکی از جنس‌های مهم این خانواده، ماشک (*Vicia spp.*) می‌باشد که از گیاهان دارای پتانسیل علوفه‌ای بالا بوده و بیش از ۱۵۰ گونه را شامل می‌شود. ماشک‌ها دارای توزیع آسیایی- اروپایی هستند (Sevimay *et al.*, 2005) و در نواحی معتدل نیم‌کره شمالی و به طور عمده در نواحی مدیترانه‌ای، آسیای غربی و آمریکای جنوب غربی دارای توزیع گسترده می‌باشند (Weber & Schifino-Wittmann, 1999). تنوع در تعداد کروموزوم‌های گونه‌های این جنس (١٤ یا ١٢، ٢n=٢x=١٠)، از آنها مدل جالبی برای مطالعات کاریوتیپی ساخته است (Navratilova *et al.*, 2003). هیبریداسیون در ماشک‌ها در داخل جنس انجام می‌شود و بنا به گزارش Ladizinisky، (1978) هیبریدها به طور جزئی بارورند.

در سال ١٩٧٦، Kupicha برای اولین بار، این جنس را به دو زیرجنس *Cracca* یا *Vicilla* شامل ١٠٠ گونه و *Vicia* شامل ٣٢ گونه، تحت ٥ بخش تقسیم‌بندی نمود. تاریخ رده‌بندی این جنس گسترده است. ٢٠ رده‌بندی بزرگ، فقط برای زیرجنس *Vicia* از زمان لینه بوجود آمده است (Maxted, 1995). به‌رغم مطالعات گسترده در رابطه با گونه‌های ماشک، برخی پرسش‌های اساسی در مورد آنها بی‌پاسخ مانده است. به‌ویژه موقعیت برخی گونه‌های مهم این جنس، همچون *V. faba* همیشه مورد بحث بوده است. زیرا برخی محققان تفاوت‌های موجود را در نتیجه نوآرایی کروموزومی به سبب جهش یا هیبریداسیون طبیعی بین رده‌ها می‌دانند (Potokina *et al.*, 2000).

پروتئین‌های دانه توسط ویژگی‌هایی ازجمله درجه بالای تجمع در دانه در طول مرحله نیمه رسیدگی، ساخته شدن تنها در بذر و رسوب کردن در اندامک‌های ذخیره‌ای ویژه‌ای به نام اجسام پروتئینی از پروتئین‌های گیاهی دیگر مجزا می‌شوند. همچنین، پروتئین ذخیره‌ای دانه در لگوم‌ها، اغلب آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها می‌باشند (Mirali *et al.*, 2007). از مهمترین امتیازات نشانگرهای مربوط به DNA نیز عدم متأثر شدن آنها از عوامل محیطی و مراحل مختلف رشد و نمو می‌باشد (Bebeli & Kaltsikes, 1993). همچنین، تجزیه‌های مولکولی براساس نشانگرهای DNA می‌تواند فرم‌های بینابینی را که در

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه جریان ژن بوجود آمده‌اند و توسط نشانگرهای مورفولوژیکی قابل تشخیص و استفاده در رده‌بندی فیلوژنتیکی نیستند، مشخص و دسته‌بندی کند (Potokina *et al.*, 2000). از این نشانگرها، به‌طور گسترده در بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین و درون جنس و گونه‌های مختلف استفاده شده است. روابط فیلوژنتیکی ۱۲ تاکسون و ۹ گونه از جنس *Vicia* در شرق آسیا توسط Potokina و همکاران (۲۰۰۳) مطالعه و گزارش شد که در بررسی روابط خویشاوندی براساس داده‌های مورفولوژیکی و DNA تناقض‌هایی وجود دارد. در حالی‌که، پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در روشن کردن خویشاوندی بین و درون گونه‌ها بسیار مفید می‌باشد. با استفاده از پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه (Mirali *et al.*, 2007)، نشانگرهای رپید و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه (Potokina *et al.*, 2000) گزارش شد که گونه‌های *V. sativa* و *V. ervilia* نسبت به سایر گونه‌های ماشک قرابت بیشتری دارند. در مطالعه‌ای با استفاده از نشانگرهای AFLP تنوع ژنتیکی جنس *Faba* را بررسی و اکوتیپ‌های آسیایی از اکوتیپ‌های اروپایی و آفریقایی جدا گردید (Zeid *et al.*, 2003). اکوتیپ‌های اروپایی و آفریقایی بطور کامل از هم جدا نشده و زیر گروه‌های خویشاوندی مختلفی را تشکیل دادند. روابط خویشاوندی زیرجنس‌ها و گونه‌های *Vicia* با استفاده از نشانگرهای رپید و RFLP ژن‌های کلروپلاستی تکثیر شده توسط PCR بررسی و نتیجه‌گیری شد که مجموعه *narbonensis* از دیگر مجموعه‌ها جدا بوده و با جنس *Vicia* قرابت زیادی دارد (Potokina *et al.*, 1999). نشانگرهای رپید سطح بالایی از تنوع و تمایز را در سطوح درون‌گونه‌ای جنس ماشک فراهم می‌کند (Jarret & Austin, 1994).

این پژوهش نیز به منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی برخی گونه‌های ماشک با استفاده از تکنیک الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و نشانگرهای رپید انجام شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق، شامل ۱۷ نمونه می‌باشد که شامل ۹ گونه، ۳ زیرگونه و ۷ اکوتیپ برای تکنیک الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای و ١٤ نمونه شامل ۸ گونه، ۳ زیرگونه و ۵ اکوتیپ از نمونه‌های استفاده شده در پروتئین، برای بررسی نشانگرهای رپید در نظر گرفته شد که کلیه آنها از شهر اردبیل، مناطق و جنگل‌های هم‌جوار آن جمع‌آوری شده بود. یکی از نمونه‌ها در هر دو روش تجزیه گونه‌ای متعلق به جنس خلر (*Lathyrus sp.*) بود (جدول ۱).

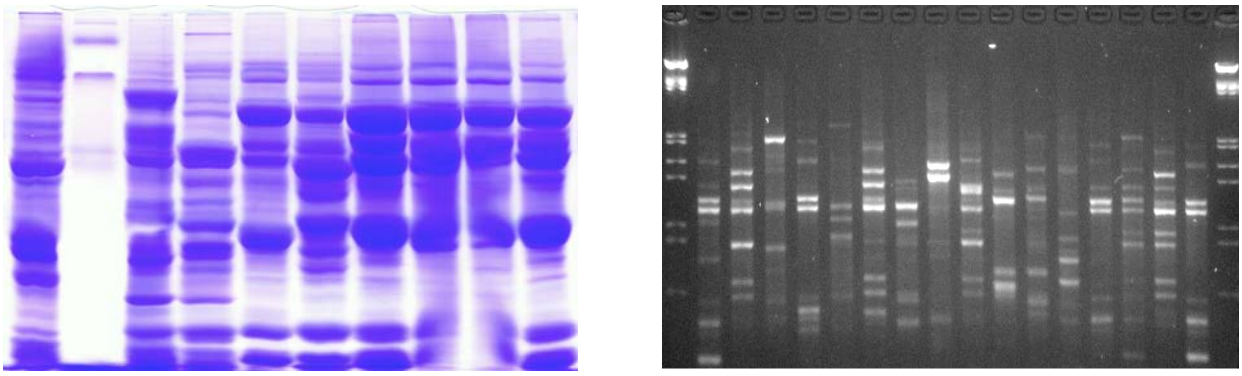
برای استخراج DNA، نمونه‌های برگی از بوته‌های کشت شده در گلخانه، از روش CTAB، مطابق با روش Krizman و همکاران (٢٠٠٦) استخراج گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. DNA افراد درون هر گونه (۲۰ بوته برای هر گونه، زیر گونه و اکوتیپ) پس از رقیق شدن به نسبت غلظت‌شان، به سهم مساوی درون یک تیوب جداگانه باهم ترکیب و به عبارتی بالک شدند (Fu *et al.*, 2003) و در واکنش‌های PCR از نمونه‌های DNA بالک شده استفاده گردید. برای تکثیر DNA ژنومی، ٤٠ آغازگر رپید شرکت Metabion آلمان مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط هر واکنش PCR به حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ٦/٣١ میکرولیتر از محلول master mix red 2x شرکت Ampliqon، ٦/٣١ میکرولیتر آب، ۲ میکرولیتر DNA (۲۵

www.SID.ir

Archive of SID

نانوگرم در میکرولیتر) و ۰/۳۹۲ میکرولیتر آغازگر (۵ میکرومول) در نظر گرفته شد. چرخه‌های حرارتی واکنش PCR شامل سه مرحله بود. مرحله اول: واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم: ٤۰ چرخه شامل واسرشته سازی به مدت ۱ دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو به مدت ۱ دقیقه در ۳٤ درجه سانتی‌گراد و بسط رشته DNA توسط آنزیم *Taq* DNA پلیمراز به مدت ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، مرحله سوم: بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. فرآورده‌های تکثیر شده توسط PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد جداسازی و به روش رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکارسازی شدند (شکل ۱). الگوهای نواری حاصل به صورت یک و صفر (حضور یا عدم حضور نوار) مورد امتیازدهی قرار گرفتند.

پروتئین‌های ذخیره‌ای کل دانه نیز از ۲۰ بذر از هر نمونه با استفاده از روش Sing و همکاران (۱۹۹۱)، استخراج و مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از انجام مراحل رنگ‌آمیزی، رنگ‌بری و اسکن کردن ژل‌ها (شکل ۱)، نوارهای حاصل از پروتئین‌ها به‌صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) امتیازدهی شدند. تعداد کل نوارهای چندشکل و تعداد نوارها در هر نمونه برآورد شد. شاخص تنوع ژنتیکی نی (Nei, 1973) و شاخص اطلاعات شانون (Lewontin, 1978) و فاصله ژنتیکی بین گروه‌ها براساس فاصله ژنتیکی نااریب نی (Nei, 1978) با استفاده از نرم‌افزار POPGENE ver 1.31 محاسبه گردید. ماتریس فاصله حاصل به نرم‌افزار MEGA ver.4 برای رسم نمودار درختی تجزیه روابط خویشاوندی منتقل شد. درخت فیلوژنی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbour-Joining رسم شد. تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (Principle Coordinate Analysis) نیز با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-PC ver2 با هدف ارزیابی و تأیید نتایج تجزیه فیلوژنی در نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه انجام شد. همچنین، همبستگی فواصل ژنتیکی حاصل از هر دو نوع داده، با استفاده از آزمون مانتل (Mantel, 1967) توسط نرم‌افزار GenAlex 6.3 مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱- چندشکلی آغازگر رپید شماره ۳۱ (سمت راست) و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه (سمت چپ)

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

از میان ۴۰ آغازگر ارزیابی شده رپید، تعداد ۱۹ آغازگر الگوهای نواربندی مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند (شکل ۱). در مجموع ۴۲۵ نوار، در دامنه ۵۴۶ تا ۴۲۶۸ جفت باز در کل افراد تولید شد. میانگین کل نشانگرها به‌ازای هر آغازگر در کل جمعیت، ۲۲/۳۷ بود. گونه *V. peregrina* با ۱۰۴ و گونه *V. faba* با ۶۴ نوار چندشکل به‌ترتیب بیشترین و کمترین چند شکلی را به خود اختصاص دادند. در بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر Oligo–۱۹ بیشترین تعداد نوار چندشکل (۳۴ نوار) و آغازگر Oligo–۲۷ کمترین چندشکلی (۱۳ نوار) را تولید کردند. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC, Polymorphic Information Content) برای آغازگرهای مورد استفاده بین ۰/۱۹ در آغازگر Oligo–۶ و ۰/۳۶ در آغازگر Oligo–۴، با میانگین ۰/۲۷ برآورد شد. شاخص نشانگر (MI, Marke Index) نیز دارای تغییراتی بین ۱/۹۹ تا ۹/۷۹ به‌ترتیب در آغازگرهای Oligo–۶ و Oligo–۱۹، با میانگین ۶ بود (جدول ۲). شاخص تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانون برای داده‌های حاصل از نشانگرهای رپید به‌ترتیب برابر ۰/۲۸۸۱ و ۰/۴۴۹۹ برآورد شد. این مقادیر نشان‌دهنده‌ی تنوع نسبتاً بالایی میان نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش می‌باشد.

درخت فیلوژنی حاصل از هر دو نشانگر براساس ماتریس فاصله ژنتیکی نی (Nei, 1978) با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایه‌ها (Nei and Kumar, 2000; Saitou and Nei, 1978) ترسیم شد (شکل ۲). درخت فیلوژنی حاصل‌از نشانگرهای رپید شامل ۴ خوشه اصلی بود. در گروه شماره ۱، زیر گونه *Segetalis* از گونه *V. sativa* از دیگر گونه‌های *V. sativa* جدا شده و نزدیک‌ترین نمونه به *V. peregrina* قرار گرفت و در یک سطح بالاتر از آن دو گونه *V. ervilia* ظاهر شد. در رده بالاتر گروه شماره ۲ شامل گونه‌های *V. faba* و *Lathyrus* sp. و در یک سطح بالاتر، اکوتیپ ۳ از *V. satira* ssp. *nigra* و بالاتر از آن گونه *V. narbonensis* قرار گرفت. شاخه شماره ۳ شامل *V. sativa* ssp. *sativa* و اکوتیپ شماره ۲ *V. sativa* ssp. *nigra* در ارتباط نزدیک با اکوتیپ شماره ۴ *V. sativa* ssp. *nigra* و *V. hyrcanica* بود. شاخه ۴ این درخت فیلوژنی که در بالاترین سطح تکاملی به خوشه‌های ۱، ۲ و ۳ پیوست، شامل ۲ اکوتیپ از گونه *V. pannonica* در کنار هم و در رده بالاتر از آنها گونه *V. cracca* بود (شکل ۲). در تجزیه به‌مؤلفه‌های هماهنگ اصلی براساس ماتریس فاصله نی (Nei, 1978) مؤلفه‌های اول و دوم به‌ترتیب ۲۲/۱۳ و ۱۹ درصد (در مجموع حدود ۴۲ درصد) از تغییرات موجود در بین داده‌ها را توجیه نمودند. توجیه کم واریانس داده‌ها توسط چند مؤلفه اصلی اول می‌تواند به‌دلیل پراکنش مناسب آغازگرها در سراسر ژنوم باشد (Mohammadi, 2002). در کل نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی تا حدودی نتایج تجزیه فیلوژنتیکی را تأیید نمود (شکل ۳).

از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه ۳۸ نوار حاصل شد. اکوتیپ ۱، از گونه *V. pannonica* با ۱۲ نوار و گونه *V. peregrina* فقط با ۲ نوار چندشکل به‌ترتیب بیشترین و کمترین نوار را تولید کردند. میانگین نوارهای تولید شده ۷/۲۴، تعداد متوسط آن در گونه‌های زراعی ۷ و در گونه‌های وحشی برابر ۷/۵ بود. این میانگین‌ها، به اندازه مقادیر متناظر در نشانگرهای رپید برای گونه‌های زراعی و وحشی متفاوت نیستند، ولی به هر حال چندشکلی بیشتر گونه‌های وحشی نسبت به گونه‌های زراعی را نشان می‌دهند. مقدار PIC محاسبه شده برای نشانگرهای پروتئینی برابر ۰/۴۵ و MI آن ۷/۶۵۳ برآورد شد. شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص

www.SID.ir

Archive of SID

اطلاعات شانون در نمونه‌های مورد مطالعه به‌ترتیب برابر ۰/۲۷۷۲ و ۰/٤۳۸٦ بود (جدول ۱). این مقادیر، تفاوت قابل ملاحظه‌ای با مقادیر مشابه در تکنیک رپید نداشتند. درخت فیلوژنی مربوط به نشانگرهای پروتئینی در شکل ٤ ملاحظه می‌شود. مجموعه اطلاعات دو خوشه ۱ و ۲ نشان‌دهنده گروه‌بندی مناسب زیرگونه‌ها و اکوتیپ‌های *V. sativa*، با استفاده از نشانگرهای پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه می‌باشد. شاخه سوم در گروه‌بندی حاضر شامل گونه‌های *V. faba* و *V. cracca* در کنار هم و نزدیک با گونه

V. hyrcanica بود که در رده‌های بالاتر به شاخه‌های تک‌گونه *V. peregrina* و *V. villosa* پیوست. شاخه‌های تک‌گونه ٤ و ٥ به‌ترتیب شامل گونه‌های *V. peregrina* و *V.villosa* بود که در رده بعدی به خوشه شماره ٦ پیوست که در آن گونه *Lathyrus sp.* در کنار اکوتیپ شماره ۲ گونه *V. pannonica* قرار گرفت. خوشه شماره ۷ نیز اکوتیپ شماره ۱، گونه *V. pannonica* و گونه *V. narbonensis* و در رده بالاتر *V. ervilia* را در بر گرفت (شکل ٤). در تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی که با استفاده از ماتریس فاصله نی (Nei, 1978) انجام گرفت، دو مؤلفه اول به‌ترتیب ۳۲/۲٤ و ۱۹/۰۱ درصد، و در مجموع ۵۱/۲۵ درصد از کل واریانس را تبیین کردند. این گروه‌بندی، نتایج حاصل از تجزیه فیلوژنتیکی را تا حدودی مورد تأیید قرار داد (شکل ۵). ماتریس فواصل ژنتیکی ۱٤ نمونه از نمونه‌های ماشک مورد مطالعه در تجزیه رپید که در تجزیه پروتئین نیز حضور داشتند، با استفاده از آزمون مانتل (Mantel, 1967) باهم مقایسه شدند. مقدار ضریب همبستگی بین این دو ماتریس (r=۰/۲۸٤) نشان‌دهنده ارتباط کم میان این دو دسته داده بود.

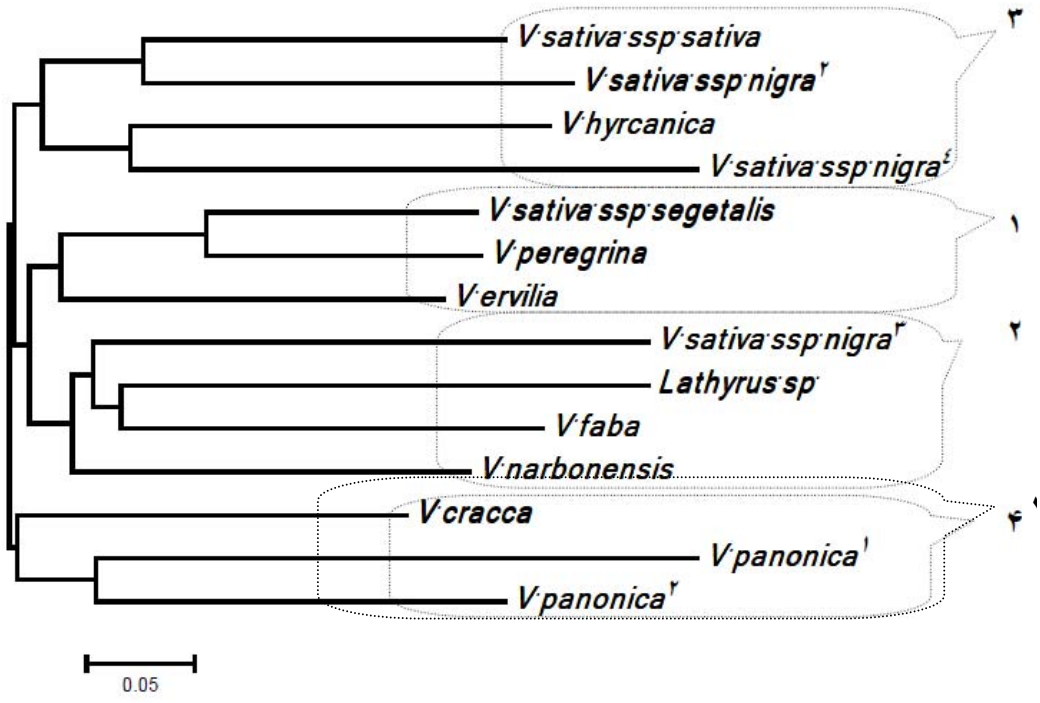
به منظور بررسی دقیق‌تر و جامع‌تر روابط بین نمونه‌های ماشک مورد مطالعه، تجزیه فیلوژنتیکی براساس داده‌های رپید و پروتئین به طور یک‌جا انجام شد. شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعات شانون در نمونه‌های مورد مطالعه به‌ترتیب برابر ۰/۲۸٦۹ و ۰/٤٤۸۸ بود که با تجزیه‌های جداگانه اختلاف زیادی نداشت. در درخت فیلوژنی مربوطه، گونه‌ها در ۵ گروه مجزا از هم تفکیک شدند (شکل ٦). در خوشه شماره ۱، زیرگونه *V. sativa* ssp. *sativa* مانند گروه‌بندی براساس نشانگرهای رپید، نزدیک به اکوتیپ دوم زیرگونه *V. sativa* ssp *nigra* قرار گرفت. در شاخه دوم گونه *V. hyrcanica*، مشابه با گروه‌بندی مربوط به نشانگرهای رپید در کنار اکوتیپ شماره ٤ زیرگونه*V. sativa* ssp. *niga* قرار گرفت. در شاخه سوم،*V. cracca* در یک رده بالاتر از گونه *V. peregrina* و زیرگونه *segetalis* از گونه *V. sativa* قرار گرفت. شاخه چهارم درخت فیلوژنی حاضر، موقعیت دو گونه *V. narbonensis* و *V. ervilia* را که در گروه‌بندی براساس نشانگرهای پروتئین در کنار هم در یک خوشه قرار گرفته بودند، تأیید کرد. اما این شاخه درکل، مانند شاخه دوم درخت فیلوژنی حاصل از نشانگرهای رپید نشان‌دهنده نزدیکی *V. faba* با *Lathyrus* sp و در دو رده بالاتر، با *V. narbonensis* بود. این گروه‌بندی در شاخه ۵، مثل شاخه چهارم خوشه‌بندی براساس نشانگرهای رپید توانست دو اکوتیپ گونه *V. pannonica* را به خوبی از بقیه نمونه‌ها تفکیک کرده و در یک شاخه مجزا قرار دهد. در تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی برای داده‌های تلفیق شده با استفاده از ماتریس فاصله نی (Nei, 1978)، دو مؤلفه اول به‌ترتیب ۲۱/۲۵ و ۱۹/۵۵ درصد و در مجموع ٤۰/۸ درصد از کل واریانس را تبیین کردند. گروه‌بندی براساس دو مؤلفه هماهنگ اصلی اول و دوم، با وجود توجیه کم واریانس، نتایج حاصل از تجزیه فیلوژنتیکی را تا حدود زیادی تأیید کرد (شکل ۷).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- PIC، MI و نوارهای چندشکل حاصل از نشانگرهای پروتئین ذخیره‌ای دانه

نمونه	محل جمع‌آوری	تعداد نوارهای چندشکل	نمونه	محل جمع‌آوری	تعداد نوارهای چندشکل
V. sativa ssp *nigra*4	شورابیل اردبیل	۷	*V. sativa* ssp *segetalis*	اردبیل	٦
V. sativa ssp *nigra*2	سومرین اردبیل	۸	*V. villosa*	اردبیل	۸
V. faba	اردبیل	۹	*V. sativa* ssp *nigra*3	جنگل فندقلو	٦
V. sativa ssp *nigra*1	سومرین اردبیل	۸	*V. cracca*	اردبیل	٤
Lathyrus sp.	اردبیل	۷	*V. pannonica*2	جنگل فندقلو	۷
V. ervilia	اردبیل	۸	*V. sativa* ssp *sativa*	اردبیل	٦
V. peregrina	اردبیل	۲	*V. narbonensis*	اردبیل	۱۰
V. hyrcanica	اردبیل	۸	*V. pannonica*1	سومرین اردبیل	۱۲
V. sativa ssp *nigra*5	دانشگاه محقق	۷			
تعداد کل نوارهای چندشکل		۳۸	میانگین نشانگر در کل جمعیت		۲/۲٤
میانگین PIC		۰/٤٥	MI		۷/٦٥۳

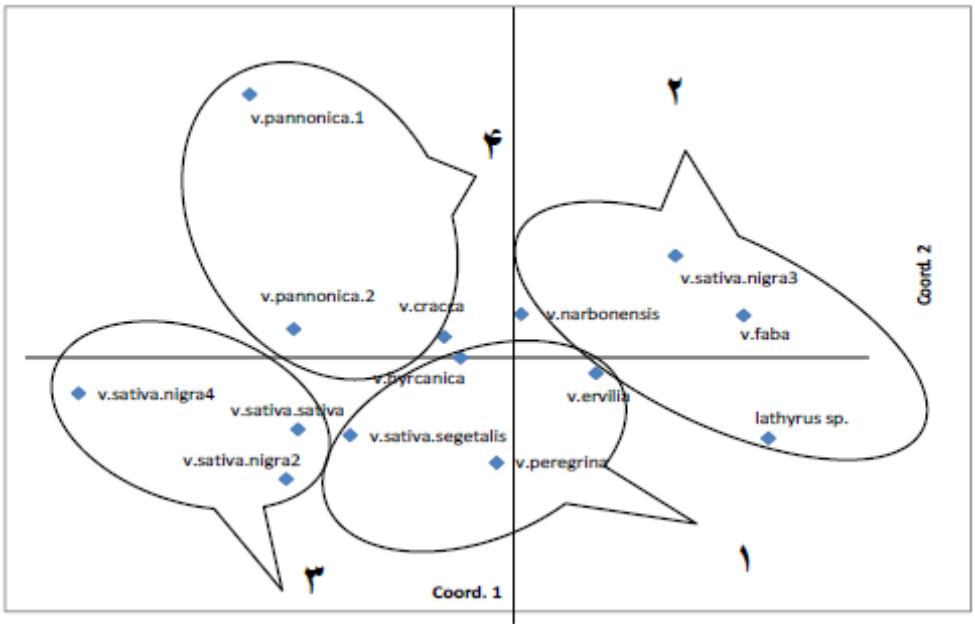


شکل ۲- نمودار خوشه‌بندی نمونه‌های ماشک با استفاده از روش Neighbour-Joining و فاصله ژنتیکی نی (Nei, 1978) براساس نشانگرهای رپید

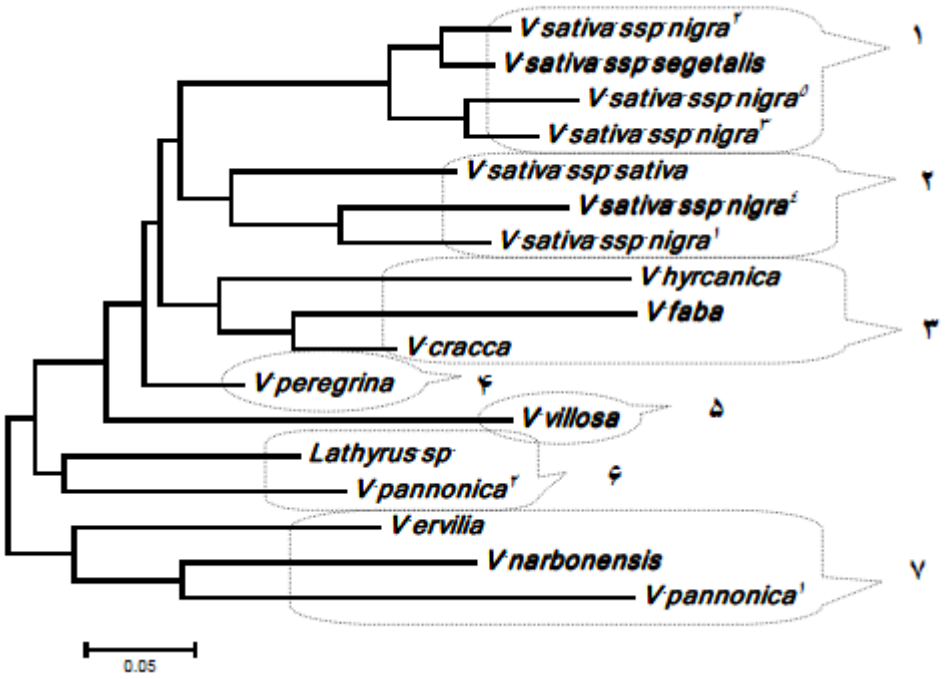
(شماره‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ اکوتیپ‌های مربوط به هر گونه می‌باشند)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- نمایش دو بعدی نمونه‌های ماشک براساس دو مؤلفه هماهنگ اصلی اول و دوم براساس نشانگرهای رپید



شکل ٤- نمودار خوشه‌بندی نمونه‌های ماشک با استفاده از روش Neighbour-Joining و فاصله ژنتیکی نی (Nei, 1978) براساس نشانگرهای پروتئین دانه

(شماره‌های ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ اکوتیپ‌های مربوط به هر گونه می‌باشند)

www.SID.ir

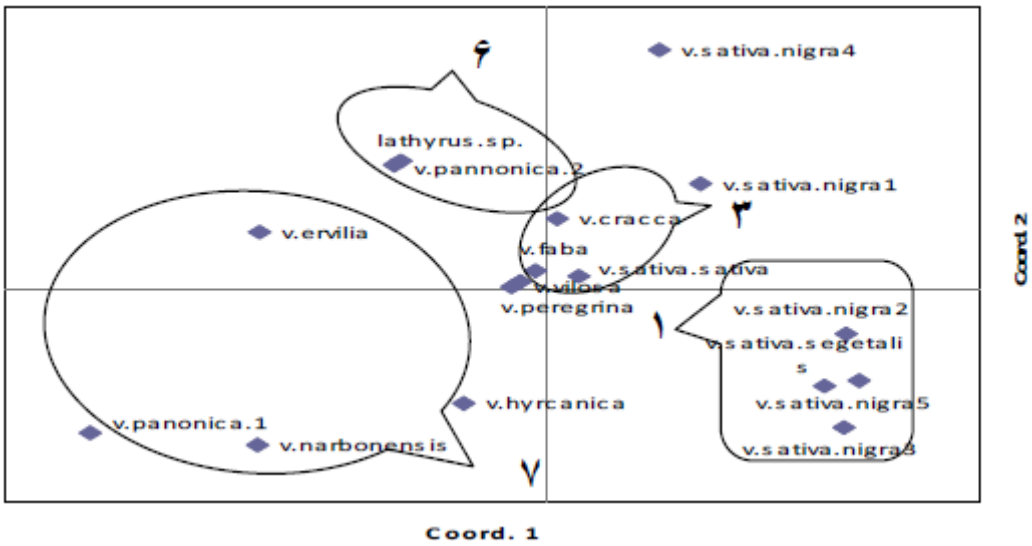
Archive of SID

جدول ۲- توالی، میزان اطلاعات چندشکلی، شاخص نشانگر و تعداد نوارهای چندشکل تولید شده توسط ۱۹ آغازگر رپید

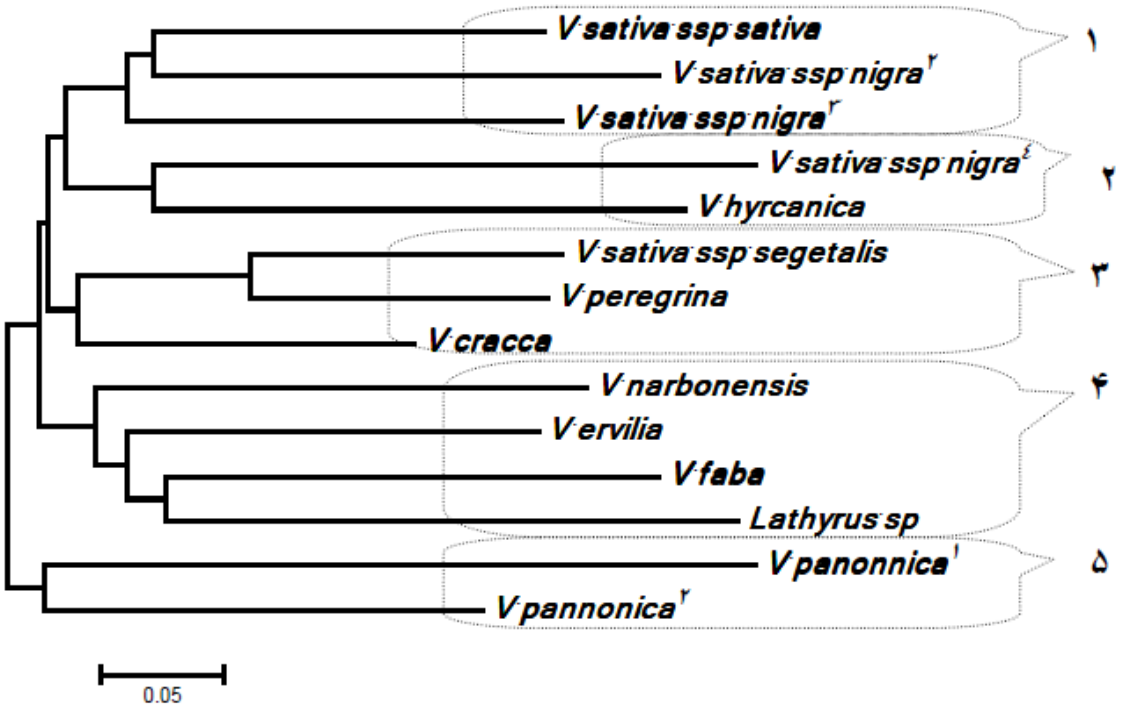
نام آغازگر	توالی آغازگر	شاخص MI	میانگین نوارهای چندشکل در هر آغازگر PIC	*V. sativa nigra3*	*V. cracca*	*V. pannonica2*	*V. sativa sativa*	*V. narbonensis*	*V. pannonica1*	*V. hyrcanica*	*V. peregrina*	*V. ervilia*	*Lathyrus sp.*	*V. sativa segetalis*	*V. faba*	*V. sativa nigra2*	*V. sativa nigra4*
Oligo-۰۱	CCTGGGCTTC	٤/٥	۰/۲٤	٥	۳	۰	٥	٤	۰	٤	۲	۱	۲	۲	٤	۲	٥
Oligo-۰۳	CCTGGGCTTA	٥/٦	۰/۳۱	۷	٦	٦	۷	٤	٦	۷	۷	٥	۰	٤	۱	۷	٥
Oligo-۰٤	CCTGGGCTGG	۷/۱۱	۰/۳٦	٦	۳	٦	٥	۷	٤	٥	۸	٤	۳	٦	٦	۷	۷
Oligo-۰٦	CCTGGGCCTA	۱/۹۹	۰/۱۹	۲	۳	۲	۳	۲	۷	۳	۲	۲	۲	۳	۲	۲	۳
Oligo-۱۲	CCTGGGTCCA	۷/٤٦	۰/۲٦	۸	٤	٦	۷	٤	٥	٥	۳	۳	۷	۸	۲	۳	٤
Oligo-۱۳	CCTGGGTGGA	۳/٥۹	۰/۲۱	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۲	٥	۲	۰	۲	۰	٥	۳
Oligo-۱٦	GGTGGCGGGA	۸/۲۲	۰/۲٦	۷	۷	٥	۷	٤	۱۱	۰	۸	۸	۹	٥	٦	٤	۰
Oligo-۱۸	GGGCCGTTTA	۸/٥۳	۰/۲٦	۷	۷	۷	٦	۷	٤	٤	۷	٥	٤	۷	٤	٥	٤
Oligo-۱۹	GCCCGGTTTA	۹/۷۹	۰/۲۹	۱۰	۹	۱۱	۷	٤	۱۰	۱۰	۱۱	۷	٦	۷	٥	۷	۹
Oligo-۲۰	TCCGGGTTTG	۷/۱	۰/۲٦	۲	۸	٤	٦	۸	٦	٥	۸	۸	۰	٦	۲	۰	۲
Oligo-۲۳	CCCGCCTTCC	٦/۰۸	۰/۲٦	٦	۷	۳	۸	٦	۰	۷	٦	٥	٤	٤	۰	٤	٦
Oligo-۲٤	ACAGGGGTGA	٥/٦۹	۰/۲۷	٥	۳	٤	۳	۲	٦	٦	۷	۳	۳	۸	۱	۲	٥
Oligo-۲۷	TTTGGGGGGA	۳/۱	۰/۲٤	۲	۳	٤	۳	٤	۲	٤	۲	۱	۰	۳	۰	۲	۲
Oligo-۲۸	CCGGCCTTAA	٤/۳۸	۰/۲۷	۱٦	۳	٤	٥	۳	٤	۱	٦	٥	٤	٦	٤	۰	۰
Oligo-۲۹	CCGGCCTTAC	۷/۰۱	۰/۳۲	۲۲	۷	٦	۷	٦	۰	٥	۷	۸	۳	٥	۷	٥	٥
Oligo-۳۰	CCGGCCTTAG	۸/۷۹	۰/۲۷	۳۲	۹	۹	٦	۷	۷	٥	۷	۳	٦	۸	٥	٦	۷
Oligo-۳۱	CCGGCCTTCC	۷/۰۹	۰/۳٤	۲۱	۲	۰	۰	٦	۸	٤	٥	۷	۲	۹	٦	٤	۱۰
Oligo-۳۲	GGGGCCTTAA	۳/٦٥	۰/۲۱	۱۷	٤	٤	٤	۳	۰	۲	۲	۱	۲	۰	٤	۲	۰
Oligo-۳۳	CCGGCTGGAA	۲/۲۸	۰/۲۷	۱٦	۳	٥	٤	٤	٥	٤	۳	۳	٥	۳	٦٤	۷	٤
تعداد کل نوارها				٤۲٥													
میانگین		٦	۰/۲۷	۲۲/۳۷	٤/۷۹	٤/۳۲	٤/۷٤	٤/٥۳	٤/٦۳	٤/۳۲	٥/٤۷	٤/۳۲	۳/۳۲	٥/۰٥	۳/۳۷	۳/٦۸	٤/۰٥

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٥- نمایش دو بعدی نمونه‌های ماشک براساس دو مؤلفه هماهنگ اصلی اول و دوم براساس نشانگرهای پروتئین دانه

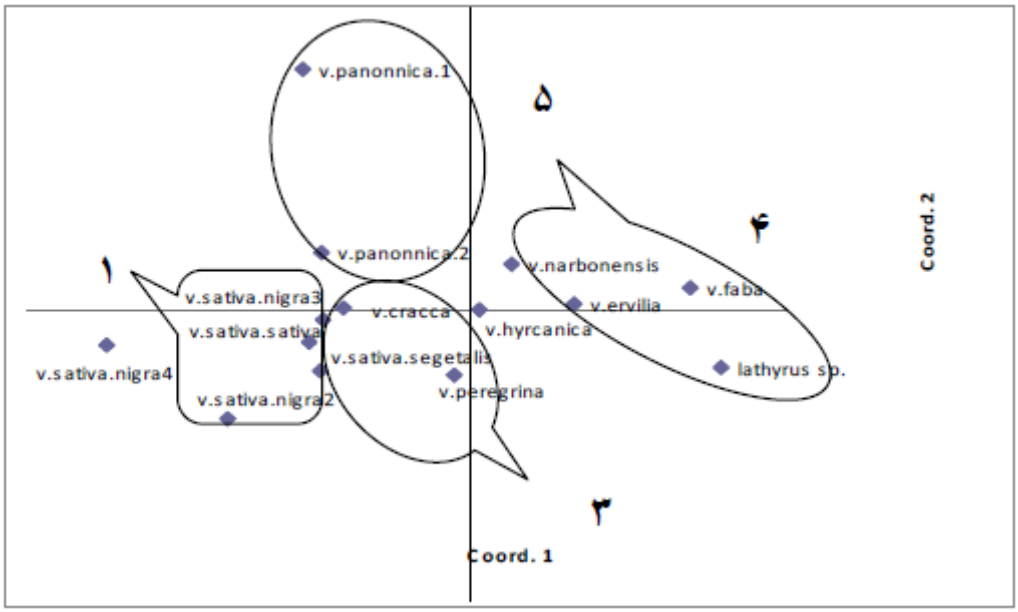


شکل ٦- نمودار خوشه‌بندی نمونه‌های ماشک با استفاده از روش Neighbour-Joining و فاصله ژنتیکی نی (Nei, 1978) براساس داده‌های تلفیقی رپید و پروتئین

(شماره‌های ١، ٢، ٣ و ٤ اکوتیپ‌های مربوط به هر گونه می‌باشند).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- نمایش دو بعدی نمونه‌های ماشک براساس دو مولفه هماهنگ اصلی اول و دوم براساس داده‌های تلفیق شده رپید و پروتئین دانه

بحث

با استفاده از نشانگرهای RAPD و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه، Potokina و همکاران (2000) و Mirali و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که گونه‌های *V. sativa* و *V. ervilia* نسبت به سایر گونه‌های ماشک قرابت بیشتری دارند. این مطلب در درخت فیلوژنی براساس تجزیه رپید فقط درباره زیرگونه *segetalis* از گونه *V. sativa* صادق بود. دیگر زیرگونه‌های *V. sativa* فاصله کم و بیش، بیشتری از *V. ervilia* داشتند. بنابر آنچه که در خوشه ۲ این درخت آشکار است، گونه *V. faba* در بین دیگر گونه‌های ماشک مورد مطالعه از لحاظ آغازگرهای رپید مورد استفاده در این تحقیق، نزدیک‌ترین گونه به *Lathyrus sp.* بود. این نزدیکی توسط Choi و همکاران (۲۰۰٦) نیز در گروه‌بندی براساس ویژگی‌های خامه نشان داده شده است. پراکندگی اغلب زیرگونه‌ها و اکوتیپ‌های گونه *V. sativa* در رده‌های مجزا و دور از هم از نکات مبهم در تفسیر نتایج حاصل از گروه‌بندی براساس نشانگرهای رپید بود. البته تنوع ژنتیکی قابل توجهی بین و درون زیرگونه‌های *Sativa* توسط Potokina و همکاران (۲۰۰۰) گزارش شده است که همیشه در سطح فنوتیپ آشکار نشده و توسط نشانگرهای مورفولوژیکی قابل برآورد نمی‌باشد. برخی محققان نیز زیرگونه *V. sativa* ssp.*sativa* را به چندین رده کوچک‌تر تقسیم کرده‌اند (Van de Whow *et al.*, 2001). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه رپید، اکوتیپ‌های گونه *V. pannonica* به نحو نسبتاً خوبی گروه‌بندی شده و از دیگر گونه‌ها و زیرگونه‌ها، به استثنای *V. cracca* تفکیک گردیدند.

مقایسه میانگین PIC و MI مربوط به نشانگرهای پروتئین (۰/٤٥ و ۷/٦٥۳) (جدول ۱) و آغازگرهای رپید (۰/۲۷ و ٦) (جدول ۲) نشان داد که نشانگرهای پروتئینی

www.SID.ir

Archive of SID

اطلاعات چندشکلی بیشتری داشتند. البته بدیهی است که در تکنیک رپید این قابلیت وجود دارد که با افزایش تعداد آغازگرهای مورد بررسی، اطلاعات مولکولی به مراتب بیشتری نسبت به اطلاعات حاصل از تکنیک الکتروفورز پروتئین تولید می‌شود. نزدیکی مقادیر شاخص‌های تنوع (شاخص نی و شانون) در تجزیه نشانگرهای رپید و پروتئین نشان‌دهنده کارآیی مشابه این دو روش در تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های ماشک می‌باشد.

در داخل گونه *V. sativa*، زیرگونه‌های *segetalis* و *nigra* تشابهات مورفولوژیکی زیادی دارند و برخی مطالعات پیشین این دو را پیوسته و نزدیک به هم نشان داده است (Maxted, 1995; Stankevich, 1987). تفاوت در نتیجه تجزیه نشانگرهای رپید و پروتئین، ممکن است به دلیل تفاوت در توالی‌های غیر کد کننده یا کد کننده غیر مؤثر در تولید پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در ژنوم این دو زیرگونه باشد که منجر به تفاوت در نتیجه حاصل از نشانگرهای مربوط به DNA و پروتئین‌های این دو زیرگونه شده و تفکیک آن‌ها را در تجزیه نشانگرهای رپید موجب شده است. در حالی که در گروه‌بندی براساس نشانگرهای پروتئین که حاصل توالی‌های کد کننده ژنوم می‌باشند، این زیرگونه‌ها در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. براساس برخی مطالعات، رابطه خویشاوندی نزدیکی بین *V. peregrina* و *V. faba* نشان داده شده است (Potokina *et al*., 2000; Jaaska, 1997) که در خوشه سوم درخت فیلوژنی حاصل از نشانگرهای پروتئینی، این مطلب تأیید شد. اگرچه درخت فیلوژنی حاصل از تجزیه رپید، قادر به نشان دادن این رابطه نبود. برخلاف گروه‌بندی براساس نشانگرهای رپید، موقعیت اکوتیپ‌های گونه *V. pannonica* که هر کدام در گروه‌های مجزا و دور از یکدیگر قرار گرفتند، از ابهامات این درخت فیلوژنی بود. این مطلب تا حدودی می‌تواند مربوط به تغییرپذیری ذاتی در برخی گونه‌ها در شرایط اکولوژیکی متفاوت باشد که البته بررسی آن در حیطه این پژوهش نبود. این تغییرپذیری در سطح ژنوم اتفاق نمی‌افتد، زیرا، نشانگرهای مربوط به DNA تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند. بلکه در سطوح فنوتیپی (مورفولوژی و پروتئین‌ها و غیره) نمود پیدا می‌کند. گونه *V. narbonensis* در مطالعه Jaaska (1997) نزدیک به گونه *V. pannonica* گروه‌بندی شد. این مطلب در خوشه‌بندی براساس نشانگرهای رپید مشاهده نشد، ولی در درخت فیلوژنی براساس الکتروفورز پروتئین‌های دانه، به‌ویژه در مورد یکی از اکوتیپ‌های گونه *V. pannonica* (اکوتیپ شماره ۱) مورد تأیید قرار گرفت. براساس مطالعات Potokina و همکاران (۲۰۰۰) گونه *V. faba* از زیرگونه‌های *V. sativa* فاصله زیادی دارد. البته در گروه‌بندی براساس خصوصیات خامه گل توسط Choi، (2006) خلاف این مطلب نشان داده شده است. به‌هرحال، این فاصله در گروه‌بندی‌های حاصل از تجزیه نشانگرهای رپید و پروتئین در تحقیق حاضر آشکار بود. گونه‌های *V. faba* و *V. ervilia* طی مطالعات پیشین در گروه‌های مجزا قرار گرفتند (Choi *et al*., 2006). گروه‌بندی براساس هر دو نوع نشانگر مورد مطالعه (رپید و پروتئین) نیز، این دو گونه را در خوشه‌های مجزا قرار دادند. همچنین گونه‌های *V. faba* و *V. narbonensis* تشابهات مورفولوژیکی زیادی دارند. اما با وجود این، براساس مطالعات الکتروفورز پروتئین دانه (Ladizinsky, 1975؛ Perrino & Pignone, 1981؛ Przybylska & Zimniak-Przybylska, 1995؛ Potokina *et al*., 2000؛ Mirali *et*

www.SID.ir

Archive of SID

al., 2007) در شاخه‌های دور از هم قرار گرفتند. مطالعه داده‌های حاصل از نشانگرهای رپید نیز توسط Potokina و همکاران (۱۹۹۹) تفکیک این دو گونه را نشان داده است. به‌رغم تمام این مطالعات، آغازگرهای مورد استفاده در تکنیک رپید و نشانگرهای پروتئینی در این آزمایش، هیچ‌کدام قادر به تفکیک متناسب با مطالعات پیشین برای این دو گونه نبودند. طی مطالعه‌ای بر روی گونه‌های *Vicia* با استفاده از تجزیه رپید و پروتئین دانه (Potokina *et al.*, 2000)، ارتباط بین گونه‌های با تعداد کروموزوم مشابه (۱٤ یا ۱۲، ۲n=۲x=۱۰) را در خوشه‌بندی، به طور روشن نشان دادند. گروه‌بندی گونه‌های با تعداد کروموزم مشابه در درخت فیلوژنی حاصل از نشانگرهای رپید چندان صادق نبود ولی تا حدودی در درخت فیلوژنی مربوط به نشانگرهای پروتئینی مشاهده شده و کلیه زیرگونه‌های *V. sativa* با هم و *V. faba* با *V. hyrcanica* که دارای ۲n=۲x=۱۲ کروموزم هستند و همچنین گونه‌های با ۲n=۲x=۱٤ تا حدودی نزدیک به هم گروه‌بندی شدند. هر دو درخت فیلوژنی مربوط به نشانگرهای رپید و الکتروفورز پروتئین، قسمتی از اطلاعات پژوهش‌های دیگر محققان را تأیید نمودند و این مطلب در مورد درخت فیلوژنی مربوط به پروتئین مصداق بیشتری داشت. در آزمون مانتل، همبستگی کم داده‌های حاصل از نشانگرهای DNA با نشانگرهای پروتئینی ممکن است در نتیجه تعداد کم نمونه‌های مورد مطالعه، تأثیر عوامل محیطی بر روی پروتئین‌ها در گیاهان روییده در محیط‌های مختلف و یا در نتیجه خنثی بودن نشانگرهای مولکولی از لحاظ بیان یا عدم بیان صفات مربوطه باشد. چرا که برخی نشانگرهای مولکولی که در تولید داده سهیم هستند، مربوط به قسمت‌های غیر کد کننده ژنوم می‌باشند که در فنوتیپ آشکار نمی‌شوند (Terzopoulos & Bebeli, 2008).

بر خلاف تجزیه رپید که نتوانست اکوتیپ شماره ۳ زیرگونه *nigra* را از بقیه گونه‌ها جدا کند، گروه‌بندی براساس داده‌های تلفیق شده در خوشه شماره ۱ آن را در خوشه مربوط به گونه *V. sativa* قرار داد. این نتیجه مشابه گروه‌بندی براساس نشانگرهای پروتئین بود. رابطه موجود در شاخه شماره ۲ این درخت نیز از ابهامات درخت فیلوژنی حاصل از تجزیه رپید بود که در این گروه‌بندی نیز آشکار شد. موقعیت گونه *V. cracca* در این خوشه مشابه با هیچ‌کدام از گروه‌بندی‌های حاصل از تجزیه نشانگرهای پروتئین و رپید نبود. بنظر می‌رسد تلفیق داده‌ها و گروه‌بندی حاصل از آنها نتایج بهتری در خصوص روابط خویشاوندی نمونه‌های مورد مطالعه، نسبت به هر کدام از روش‌های تجزیه نشانگرهای رپید و پروتئین به صورت جداگانه ارائه کرده باشد و با وجود مشابهت زیاد به گروه‌بندی براساس نشانگرهای رپید، که احتمالاً به دلیل زیاد بودن تعداد نشانگرهای آن نسبت به نشانگرهای پروتئین در داده‌های تلفیق شده بود، برخی معایب نمودار خوشه‌بندی حاصل از نشانگرهای رپید، مانند عدم گروه‌بندی مناسب زیرگونه‌ها و اکوتیپ‌های *V. sativa*، در تلفیق هر دو نوع داده و خوشه‌بندی حاصل از آنها تا حدود زیادی رفع گردید. چنین بنظر می‌رسد که استفاده از نشانگرهای مولکولی و بیوشیمیایی و مورفولوژیکی مختلف و تلفیق آنها نتایج کامل‌تری را ارائه می‌کند و تلفیق داده‌ها قادر است عدم توانایی هر کدام از نشانگرها را در تفکیک برخی نمونه‌ها کم و بیش جبران کند. تعداد نوارهای چندشکل تولید شده توسط هر دو تکنیک رپید و الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه با مطالعات مشابه زیاد بود، البتّه این مطلب نشان-دهنده کارآیی این تکنیک‌ها در ارزیابی تنوع ماشک‌ها می-باشد. لازم به ذکر است که استفاده از گونه *Lathyrus sp.* در این پژوهش به دلیل شباهت‌های مورفولوژیکی گونه-های این جنس با گونه‌های جنس *Vicia* بود. تنوع زیاد بین گونه‌های ماشک که گاهی در حد تفاوت بین جنس برآورد شده است، از یک سو و شباهت آنها با برخی گونه‌های جنس *Lathyrus*، از سوی دیگر، دانشمندان رده‌بندی را به مطالعه روابط فیلوژنتیکی این دو جنس واداشته است. بر اساس نشانگرهای آیزوزایم (Jaaska, 2005) و بر اساس مورفولوژی خامه و توالی‌های ITS (Choi *et al.*, 2006) برخی گونه‌های *Lathyrus* در کنار گونه‌های *Vicia* بررسی شده‌اند.

به‌طورکلی، از تلفیق داده‌های دو سری نشانگر برای بررسی روابط خویشاوندی نتایج بهتری حاصل شد. مسلماً، با استفاده از نشانگرهای مولکولی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی بیشتر، عدم توانایی هر کدام از نشانگرها برطرف شده و نتایج کامل‌تری بدست می‌آید. در این مطالعه، زیر گونه‌های *V. sativa* در رده‌های مختلف از بقیه گونه‌ها جدا شدند و با گونه‌های *V. peregrina*، *V. hyrcanica* و *V. cracca* قرابت بیشتری نشان دادند. گونه *V. faba* نزدیک‌ترین گونه به *Lathyrus sp.* بود و در رده‌های بالاتر به گونه‌های *V. ervilia* و *V. narbonensis* نزدیک بودند. دو زیرگونه *V. pannonica* در یک گروه مجزا قرار گرفتند.

سپاسگزاری

بذر نمونه‌های گیاهی، در قالب یک طرح تحقیقاتی در دانشگاه محقق اردبیلی به سرپرستی آقای مهندس میکائیل بدرزاده جمع‌آوری و شناسایی شده بود که از زحمات ایشان بی‌نهایت قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Bebeli, P.J. and Kaltsikes, P.J., 1993. New developments in varietal identification. Seed Science and Technology, ICARDA, Aleppo, Syria.
- Choi, B.H., Seok, D. I., Endo, Y. and Ohashi, H., 2006. Phylogenetic significance of styler features in genus *Vicia* (Legominosae): An analysis with molecular phylogeny. Journal of Plant Resources, 119: 513-523.
- Doyle, J.J. and Gaut, B., 2000. Evolution of genes and taxa: a primer. Plant Molecular Biology, 42: 1-23.
- Ehdayi, B., 1992. Plant Breeding. Shahid Chamran University Press, 456 P.
- Fu, Y.B., Guerin, S., Peterson, G.W., Carlson, J.E. and Richards, K.W., 2003. Assessment of bulking strategy for RAPD analysis of flax germplasm. Genetic Resources and Crop Evolution, 50: 743-746.
- Jaaska, V., 1997. Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities in *Vicia* subgenus *vicia* (*Fabaceae*). Genetic Resources and Crop Evolution, 44: 557-574.
- Jaaska, V., 2005. Isozyme variation and phylogenetic relationship in *Vicia* subgenus *Cracca* (*Fabaceae*). Annals of Botany, 96: 1085-1096.
- Jarret, R. and Austin, D., 1994. Genetic diversity and systematic relationship in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and related species as revealed by RAPD analysis. Genetic Resources and Crop Evolution, 41: 165-173.
- Krizman, M., Jakse, J., Baricevic, D., Javornik, B. and Prosek, M., 2006. Robust CTAB-activated characoal protocol for plant DNA extraction. Acta Agriculturae Slovenia, 87 (2): 427-433.
- Kupicha, F.K., 1976. The infrageneric structure of *Vicia*. Not Royal Botany and Garden Edinburgh, 34: 287-326.
- Ladizinsky, G., 1975. Seed protein electrophoresis in the wild and cultivated species of the section *Faba* of the *Vicia*. Euphytica, 24: 785-788.
- Ladizinsky, G., 1978. Chromosomal polymorphism in wild population of *Vicia sativta* L. Caryologia, 31: 233-241.
- Lewontin, R.C., 1978. The apportionment of human diversity. Evolution and Biology, 6: 381-398.
- Mantel, N.A., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27: 209-220.
- Maxted, N., 1995. Systematic and ecogeographical studies on crop gene pools: An ecogeographical

www.SID.ir

Archive of SID

– Przybylska, J. and Zimniak-Przybylska, A., 1995. Electrophoretic seed albumin patterns and species relationships in *Vicia* sect. *Faba* (Fabaceae). Plant Systematic and Evolution, 198: 179-194.
– Saitou, N. and Nei, M., 1987. The Neighbour-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406-425.
– Sevimay, C.S., Guloglu, D. and Khawar, K.M., 2005. Karyotype analysis of eight Turkish Vetch (*Vicia sativa* L.) cultivars. Pakistanian Journal of Botany, 37: 313-317.
– Sing, M., Srivastava, A. and Kumar, B., 1991. Cell membrane stability in relation to drought tolerance in wheat genotypes. Journal of Agronomy and Crop Science, 168: 186-190.
– Stankevich, A.K., 1978. Systematic politipnogo vida *Vicia sativa* L. Bulletin, 81: 3-11.
– Straus, S.H., 2003. Genomics, genetic engineering and domestication of crops. Science, 300: 61-620.
– Terzopoulos, P.J., and Bebeli, P.J., 2008. Genetic diversity analysis of Mediteranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. Field Crops Research, 108: 39-44.
– Van de Whow, M., Maxted, N., Chabane, K. and Ford-Lioyd, B.V., 2001. Molecular taxonomy of *Vicia* ser. *Vicia* based on Amplified Fragment Length Polymorphism. Plant Systematics, 229: 91-105.
– Weber, L.H. and Schifino-Wittmann, M.T., 1999. The *Vicia sativa* L. aggregate (*Fabaceae*) in Southern Brazil. Genetic Resources and Crop Evolution, 467: 207-211.
– Zeid, M., Schon, C.C., Link, W. 2003. Genetic diversity in recent elite faba bean lines using AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 107: 1304-1314.
study of *Vicia* subgenus *Vicia*. International Plant Genetic Resources Institue, Rome, Italy.
– Mirali, N., El-Khouri, S. and Rizq, F., 2007. Genetic diversity and relationships in some *Vicia* species as determined by SDS-PAGE of seed proteins. Biologya Plantarum, 51 (4): 660-666.
– Mohammadi, S.A., 2002. Statistical methods in genetic. 6th International Statistic Conference, September, Tarbiat Modaress University, Tehran, Iran.
– Navratilova, A., Neumann, P. and Macas, J., 2003. Karyotype analysis of four *Vicia* species using *In Situ* hybridization with repetitive sequences. Annals of Botany, 91: 921-926.
– Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Science. USA., 70: 3321-3323.
– Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.
– Nei, M. and kumar, S., 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.
– Perrino, P., Pignone, D., 1981. Contribution to the taxonomy of *Vicia* species belonging to the section *Faba*. Kulturpflanze, 29: 311-319.
– Potokina, E., Endo, Y., Eggi, E., Ohashi, H., 2003. Electrophoretic patterns of seed proteins in the East Asian *Vicia* species (Leguminosae) and their systematic utility. Journal of Japanese Botany, 78 (1): 29-37.
– Potokina, E., Tomooka, N., Vaughan, D.A., Alexandra, T. and Xu, R.Q., 1999. Phylogeny of *Vicia* shubgenus *Vicia* (*Fabaceae*) based on analysis of RAPDs and RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. Genetic Resoures and Crop Evolution, 46: 149-161.
– Potokina, E., Vaughan, D.A., Eggi, E.E. and Tomooka, N., 2000. Population diversity of the *Vicia sativa* agg. (*Fabaceae*) in the flora of the former USSR deduced from RAPD and Seed protein analyses. Genetic Resources and Crop Evolution, 47: 171-183.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of phylogenetic relationships of some *Vicia* species using storage proteins and RAPD markers

A. Asghari[*1], Z. Bozorghi[2], M. Shokrpour[3] and A.A. Jafari[4]

1*- Corresponding Author, Assoc. Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh ardabili, Ardabil, I.R.Iran.
Email: ali_asgharii@yahoo.com
2- M.Sc. student in plant breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R.Iran
3- Assis. Prof., University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. Tehran, I.R.Iran.
4- Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran.

Received: 10.04.2010 Accepted: 11.12.2010

Abstract

In order to evaluate phylogenetic relationships among some *Vicia* species, subspecies and ecotypes from Iran, 17 and 14 entries were studied using seed storage proteins electrophoresis and RAPDs markers, respectively. Total seed storage proteins were extracted from the collected seeds and DNA was extracted from leaf samples of seedlings. Nei and Shanon genetic diversity indices didn't show considerable difference between RAPD and storage protein data. While the PIC and MI indices for protein markers were greater than those of RAPD markers. In the phylogeny tree based on protein markers, the subspecies and ecotypes of *sativa* species were classified in the same group. In RAPD analysis, the subspecies and ecotypes were classified in a larger group along with other species. Ecotypes of *V. panonica* and *V. cracca* were classified in another group. Constructing the phylogenetic tree using incorporated RAPD and protein markers produced better results than separated ones. Also, classifying the entries using PCoA method was in correspondence to the classifying by phylogenetic trees. The distance matrices from RAPD and protein data were compared using Mantel test and were not observed any significant correlation between the two data sets.

Key words: *Vicia*, RAPD, SDS-PAGE, Phylogeny.

www.SID.ir