

ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف سیب زمینی با استفاده از الکتروفورز پروتئین های ذخیره ای غده

عباداله عبادی^۱ - احمدرضا بلندی^۲ - حسن حمیدی^{۳*} - جمشید معاون^۴ - حسن حسن آبادی^۵

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۹

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹

چکیده

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از مهمترین گیاهان زراعی در تغذیه انسان است که در جهان از نظر اهمیت غذایی مقام چهارم را داراست. تعیین تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مختلف نقش کلیدی در عملیات اصلاح نباتات دارد. در این تحقیق از روش SDS-PAGE جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۳ رقم سیب زمینی استفاده شد. استخراج پروتئین از غده های سیب زمینی نیز با استفاده از روش لاملی (۱۹۷۰) صورت گرفت. درصد پلی مورفیسم (چند شکلی) محاسبه شده و دندروگرام ارقام بر اساس روش UPGMA با استفاده از نرم افزار NTSys تعیین و رسم شد. همچنین فاصله ژنتیکی نمونه های مورد بررسی در نرم افزار SPSS محاسبه شد. نتایج حاصل از الکتروفورز، حضور ۳۹ باند پروتئینی را در ارقام مورد مطالعه نشان داد که بیشترین تعداد باند (۲۳ باند) در رقم Markiz مشاهده گردید. دندروگرام حاصل نشان داد ارقام مورد مطالعه به طور کلی در دو گروه بزرگ قرار گرفتند. دو رقم Impala و Granola با یکدیگر دارای قرابت ژنتیکی بالایی (۷۳/۳ درصد) می باشند. همچنین مشاهده شد که دو رقم Savalan و Fontaneh دارای پایین ترین درصد شباهت (۹/۱ درصد) در بین ارقام مورد مطالعه نسبت به یکدیگر می باشند. دو گروه عمده از پروتئین های ذخیره ای نیز در دامنه ۲۲ و ۴۰ کیلودالتون به ترتیب شامل ایزومرهای اسپورامین و پاتاتین مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان دهنده وجود پتانسیل بالای تنوع ژنتیکی در بین ارقام سیب زمینی می باشد.

واژه های کلیدی: پلی مورفیسم، تنوع ژنتیکی، سیب زمینی، پروتئین های ذخیره ای غده، SDS-PAGE

مقدمه

بسیار مهم در بحث اصلاح نباتات می باشد. طبقه بندی به روشهای مختلفی انجام می گیرد که روشهای اولیه مبتنی بر تفاوت های مورفولوژیکی یا ظاهری غده ها می باشد. الگوی الکتروفورزی پروتئین غده های سیب زمینی و عواملی که بر آنها تأثیر می گذارد در دهه های اخیر مورد مطالعه مستمر واقع شده اند (۳، ۹ و ۱۵).

نشانگر های مولکولی ابزارهای مطمئنی جهت شناسایی ژنوتیپ های مطلوب هستند (۲۴). نشانگرهای مولکولی از قبیل پروتئین های ذخیره ای، ایزوزایم ها و قطعات تکرار شونده DNA کاربرد زیادی در بررسی تفاوت های ژنتیکی بین منشاء ارقام و نهایتاً هدایت برنامه های اصلاح و تهیه بانک ژن دارند (۵، ۱۴ و ۱۵). بررسی خصوصیات ارقام مختلف با استفاده از انگشت نگاری ژنتیکی و شناسایی تفاوت های ژنتیکی بین ارقام در برنامه های اصلاح باعث صرفه جویی در زمان، منابع و هزینه ها می گردد (۱۱ و ۱۹).

اولین تحقیقات الکتروفورزی توسط زوارتز (۲۶) انجام گرفت. سپس استگمن و همکاران (۲۳) بر روی کاغذ صافی عصاره سیب زمینی را الکتروفورز نموده و ضمن شناسایی ۶ گروه از پروتئین های

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) مهمترین گیاه باغی در تغذیه انسان است که از نظر اهمیت غذایی مقام چهارم در جهان را داراست. همچنین از نظر پراکندگی بعد از ذرت دارای گسترده ترین پراکنش در دنیا است (۴ و ۵). در بیش از ۱۲۵ کشور جهان از اروپا گرفته تا آسیا، استرالیا و امریکا بیش از ۲۵۰ میلیون تن سیب زمینی در سال تولید می گردد. این گیاه به دامنه وسیعی از شرایط آب و هوایی سازگار بوده و تنوع بیولوژیکی وسیعی را دارا می باشد (۱۰). شناسایی و تشخیص واریته ها و طبقه بندی آنها یکی از اهداف

۳ و ۲۱- کارشناس ارشد، استادیار و کارشناس ارشد بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

(*- نویسنده مسئول: Email: Hamidy1065@yahoo.com)

۴- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج

۵- عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

و کاهش اثر عوامل محیطی در نقوش پروتئینی حاصل، بیشتر از پروتئین های سایر قسمت های سبب زمینی در تحقیقات کاربرد دارد. دستیابی به ارقام بومی دارای عملکرد بالا و مقاوم به شرایط تنش از عوامل موثر در خودکفایی و استقلال در کشورهای در حال توسعه است. با توجه به اینکه پتانسیل ارقام مختلف با یکدیگر متفاوت می باشد ضرورت دارد روی شناسایی خصوصیات سلولی و مولکولی ارقام مختلف مطالعاتی انجام گیرد. بعلاوه با توجه به اینکه از ارقام برتر قطعاً تعدادی انتخاب و نامگذاری خواهند شد، ضرورت دارد قبل از معرفی، مطالعاتی در جهت شناسایی کامل آنها از نظر نقوش پروتئینی و دیگر خصوصیات مولکولی انجام گیرد تا اطلاعات کامل و جامعی از ارقام در اختیار باشد. با عنایت به تنوع و پتانسیل بالای ژنتیکی ارقام سبب زمینی، شناسایی خصوصیات سلولی و مولکولی آنها ضروری به نظر می رسد. شناسایی کامل ارقام از نظر پروفایل پروتئینی و دیگر خصوصیات مولکولی می تواند اطلاعات کاربردی و جامعی را در اختیار قرار دهد. این فعالیت ها همچنین مقدمات اولیه جهت تشکیل بانک ژن سبب زمینی را امکان پذیر می سازد.

مواد و روش ها

در این تحقیق ۲۳ رقم سبب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) موجود در بانک ژن بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی در سال زراعی ۱۳۸۸ با هدف ارزیابی قرابت ژنتیکی و تنوع ژنتیکی این ارقام مورد مطالعه قرار گرفت. ارقام مورد بررسی شامل Leady، Emrad(EM)، Oushna(OU)، Markiz(MZ)، rosta(LR)، Labadia(LA)، Diamant(DT)، Alori(AR)، Hermes(HM)، Sinora(SN)، Savalan(SV)، Agria(AG)، Almera(AL)، Sante(SA)، Marfona(MA)، Arnova(AV)، Desire(DS)، Impala(IM)، Marabel(MR)، Granola(GR)، Picasso(PC)، Florida(FL) و Daifla(DA) شامل ارقام زودرس، میان رس و دیررس با منشأ هلندی، انگلیسی، آلمانی، ایرانی و دانمارکی می باشند (جدول ۱).

غده های رسیده و سالم ارقام مورد مطالعه بلافاصله پس از برداشت به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد منجمد گردیدند. استخراج پروتئین از نمونه های منجمد غده این ارقام با استفاده از روش تغییر یافته لاملی (۱۷) بطور جداگانه صورت گرفت. بدین منظور، ابتدا غده ها در دمای اتاق تا دمای نزدیک به ذوب در شرایط استریل قرار داده شدند. سپس عصاره آنها توسط هاون استریل گرفته شد. معادل حجم عصاره، بافر استخراج به آنها اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه در آب جوش حرارت داده شدند. پس از آن، میکروتیوب های حاوی مخلوط عصاره و بافر استخراج برای ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد در ۵۰۰۰ دور سانتیفریوژ شدند. مایع شفاف رویی برداشته شد و دوباره به همان ترتیب سانتیفریوژ گردید. نهایتاً مایع رویی دوباره استحصال شده و به فریزر منتقل شد.

محلول در غده، ۵۹ رقم سبب زمینی را بدین طریق از یکدیگر تفکیک کردند. در آزمایش دیگری بیش از ۱۰۰۰ رقم سبب زمینی بر اساس طیف پروتئینی از یکدیگر متمایز گردیدند، بدین منظور عصاره ها پس از سانتریفوژ در ژل سیانوگام ۶٪ الکتروفورز گردیدند (۷).

در سال ۱۹۹۶ عصاره پروتئینی ۱۲ رقم مختلف سبب زمینی به روش SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی در تمامی ارقام باندهای منتسب به ایزومرهای اسپورامین و باند مربوط به بتا آمیلاز مشاهده شد (۱۰). وتالانا و ماتجوا (۲۵) ۲۵ رقم سبب زمینی شامل ۷ رقم بسیار زودرس، ۶ رقم زودرس، ۷ رقم متوسط رس و ۵ رقم دیررس را با استفاده از الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار دادند و الگوی الکتروفورزی مشابهی را در ۷۵ درصد باندها مشاهده نمودند.

بدر و همکاران (۵) با استفاده از الگوی الکتروفورزی پروتئین های بافت های مختلف شامل برگ، ساقه و غده پنج رقم سبب زمینی، فواصل ژنتیکی آنها را تعیین و دندروگرام مربوطه را بدست آوردند. آنها همچنین میزان تأثیر هر کدام از این بافت های پروتئینی را در تفکیک مناسبتر این ارقام بررسی نمودند. الگوی نوار بندی پروتئینی حاصل از ۱۳ رقم سبب زمینی به روش SDS-PAGE توسط عمارلو و همکاران (۱) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. در این تحقیق سه ناحیه باند پروتئینی با استفاده از پروتئین های مارکر در سه محدوده وزن مولکولی سبک (۲۹-۶/۵ کیلو دالتون)، متوسط (۶۶-۳۰ کیلو دالتون) و سنگین (۲۰۵-۶۷ کیلو دالتون) بر روی ژل پلی آکریلامید شناسایی گردید. میزان پلی مورفیسم (چند شکلی) در هر یک از نواحی سه گانه به ترتیب ۷۵، ۹۲ و ۸۳ درصد بدست آمد. پروفایل ایزوزایمی و پروتئینی حاصل از الکتروفورز برای شناسایی و بررسی روابط درون گونه ای استفاده می شود (۱۳). لسرانتا و همکاران (۱۸) در آزمایشات خود با استفاده از آنالیز پروتئین های غده، ارقام سبب زمینی تراریخته را از ارقام زراعی معمولی تفکیک کردند.

همچنین بدر و همکاران (۵) توانستند با استفاده از آنالیز پروتئین های پنج رقم سبب زمینی نشان دهند که روابط فیلوژنتیک حاصل از آنالیز پروتئینی قابل تعمیم به خصوصیات فیزیولوژیکی و زراعی ارقام است. آنها همچنین توانستند با استفاده از آنالیز پروتئین و مشاهده ارتباط نزدیک رقم سبب زمینی اسپونتا با رقم دیاموند، مقاومت رقم اسپونتا را به تنش خشکی پیش بینی نمایند. مطالعات متعدد محققین نشان داده است که، باندهای پروتئینی متفاوت در ارقام مختلف ناشی از تفاوت در بیان ژن ها می باشد (۲، ۱۲ و ۲۲).

روش های آنالیز پروتئین قابلیت بالایی در شناسایی جهش های ناشی از عوامل چندگانه دارند (۸). بررسی پروفایل پروتئینی برای ارقام تجاری سبب زمینی و سایر محصولات به عنوان روشی سریع و دقیق برای شناسایی تنوع و خصوصیات ارقام در برنامه های اصلاح قابل استفاده است (۵). استفاده از پروتئین های ذخیره ای غده به دلیل سهولت نگهداری غده سبب زمینی، استخراج ساده تر پروتئین از آنها

جدول ۱- مشخصات مورفولوژی ارقام مورد مطالعه

ارقام												
Florida	Daifla	Leady rosta	Markiz	Oushna	Emrad	Hermes	Alori	Diamant	Labadia	Sinora	Savalan	
FL	DA	LR	MZ	OU	EM	HM	AR	DT	LA	SN	SV	اختصار
NL	NL	NL	NL	NL	UK	NL	NL	NL	NL	NL	IRI	منشأ
E	ML	ME	L	-	VE	ML	ME	ML	ME	ME	L	دوره رشد
-	-	قرمز	زرد	-	زرد	زرد	زرد	زرد	زرد	زرد	زرد	رنگ پوست غده
-	-	زرد روشن	نسبتاً زرد	-	زرد روشن	نسبتاً زرد	زرد روشن	زرد روشن	زرد روشن	زرد روشن	زرد روشن	رنگ گوشت غده
-	-	گرد	تخم مرغی	-	گرد	گرد تخم مرغی	تخم مرغی	تخم مرغی	تخم مرغی	-	گرد	شکل غده
-	-	متوسط	نسبتاً پایین	-	بالا	خوب	-	بالا	نسبتاً بالا	نسبتاً بالا	بالا	عملکرد

ارقام

Agria	Almera	Sante	Marfona	Arnova	Desire	Picasso	Impala	Marabel	Granola	Fontanteh	
AG	AL	SA	MA	AV	DS	PC	IM	MR	GR	FO	اختصار
NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	NL	DE	GR	NL	منشأ
ME	ME	ME	ME	E	M	ML	VE	E	ML	ML	صفت
زرد	زرد	زرد روشن	زرد	زرد	قرمز	زرد با لکه قرمز	زرد روشن	زرد	زرد	زرد	رنگ پوست غده
زرد	زرد روشن	زرد روشن	زرد روشن	زرد روشن	زرد روشن	زرد روشن	نسبتاً زرد	نسبتاً زرد	نسبتاً زرد	زرد روشن	رنگ گوشت غده
تخم مرغی کشیده	تخم مرغی کشیده	تخم مرغی	تخم مرغی گرد	تخم مرغی کشیده	تخم مرغی کشیده	تخم مرغی	تخم مرغی کشیده	تخم مرغی	تخم مرغی گرد	تخم مرغی	شکل غده
بالا	خوب	نسبتاً بالا	بالا	خوب	خوب	عالی	نسبتاً پایین	پایین	متوسط	پایین	عملکرد

*- علائم اختصاری جدول، DE: دانمارک، GR: آلمان، IRI: ایران، NL: هلند، UK: انگلیس، VE: خیلی زودرس، E: زودرس، ME: کمی زودرس، M: میان رس، ML: کمی دیررس و L: دیررس می باشد.

در سه سطح پروتئین های سبک، متوسط و سنگین شمارش شد و درصد پلی مورفیسم در هر کدام از این سطوح محاسبه گردید. ضمناً مشخصات الکتروفوریتیکی تمامی باند های مشاهده شده ثبت گردید. برای ورود و آماده سازی داده ها از نرم افزار Excel و تجزیه و تحلیل های آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۱/۵) انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از الکتروفورز ۲۳ رقم سیب زمینی، حضور ۳۹ باند پروتئینی را در ارقام مورد مطالعه نشان داد (جدول ۲) که بیشترین تعداد باند (۲۳ باند) در رقم MZ مشاهده گردید (شکل ۱، ۲ و ۳). باندهای پروتئینی ارقام مختلف در دامنه ۷ تا ۱۳۰ کیلو دالتون مشاهده شد. در این میان باندهای پروتئینی به سه گروه سبک (۲۹ - ۶/۵ کیلو دالتون)، متوسط (۶۶ - ۳۰ کیلو دالتون) و سنگین (۲۰۵ - ۶۷ کیلو دالتون) تقسیم گردیدند. بیشترین تعداد باند در دامنه سبک (۱۷ باند) و کمترین آن در دامنه سنگین (۱۰ باند) قرار داشت. در

نقوش پروتئینی برای هر رقم در حضور پروتئین های نشانگر به روش SDS-PAGE بر روی ژل پلی آکریل آمید (ژل بالا با غلظت ۳ درصد و ژل پایین با غلظت ۱۲/۵ درصد) با استفاده از تانک الکتروفورز عمودی (پدیده نوژن پارس، مدل VU-130D) و مولد جریان (بیوراد، مدل Power Pack Basic) بدست آمد. شدت جریان ۴۰ میلی آمپر اعمال شد و میزان حرکت پروتئین ها در ژل حدود ۱۰ سانتی متر بود (۲۰).

باند های پروتئینی با کوماسی بلو R-250 رنگ آمیزی شد. شمارش باندها به دو روش چشمی و استفاده از نرم افزار LabWroks صورت پذیرفت. درصد پلی مورفیسم ارقام با شمارش باندهای متناظر و رسم جدول ماتریکس محاسبه گردید و بر اساس مقیاس اقلیدسی فاصله به صورت گرافیکی تحت عنوان دندروگرام ارقام با استفاده از نرم افزار NTSysPC رسم شد. همچنین برای محاسبه فاصله ژنتیکی نمونه های مورد بررسی از نرم افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ استفاده شد. با استفاده از ماتریس فاصله محاسبه شده گروه بندی نمونه ها از لحاظ قرابت ژنتیکی براساس نقوش پروتئینی صورت گرفت و دندروگرام متناظر ترسیم گردید. در ادامه تعداد باند های مشترک و غیر مشترک

تنوع در الگوی مقطعی پروتئینی بود و نواحی پروتئینی سبک و سنگین به ترتیب در رده های بعدی قرار داشتند. به عبارت دیگر، در منطقه سنگین پروفایل ژل در ارقام مورد مطالعه، پروتئین هایی با وزن مولکولی مشابه وجود دارند که از نظر کمیت تنوع چندان قابل توجه نیستند. در مقابل، در ناحیه متوسط تعداد باندهای پروتئینی و همچنین تنوع اندازه آنها بالاتر است. عمارلو و همکاران (۱) نیز با مطالعه ۱۳ رقم سیب زمینی، ناحیه پروتئین های ۳۰ تا ۶۶ کیلو دالتون را دارای بالاترین درصد پلی مورفیسم اعلام کردند. لذا توصیه می شود سایر محققین در ارزیابی های خود به صورت اخص به پروتئین های ناحیه متوسط توجه نمایند.

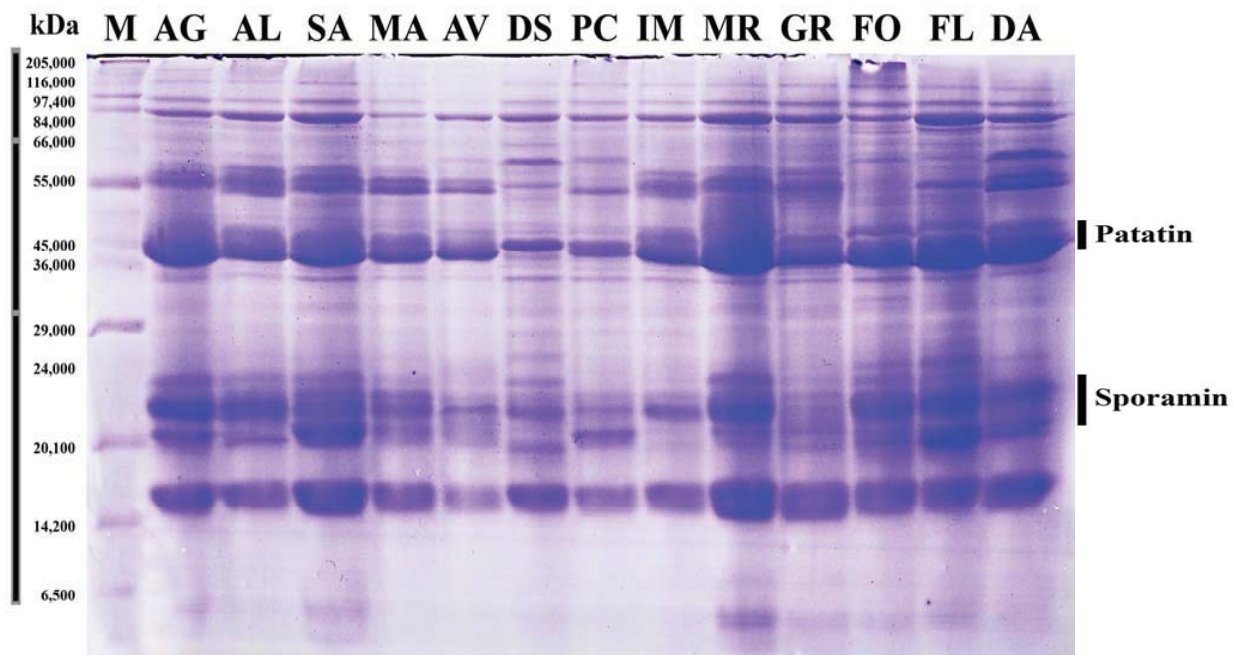
ادامه، درصد پلی مورفیسم در دامنه های فوق الذکر محاسبه گردید که بر این اساس دامنه متوسط (۸۵/۷ درصد) به عنوان تأثیر گذارترین دامنه (از نظر وجود تنوع در الگوی مقطعی پروتئینی) شناسایی شد (جدول ۳). همچنین، دندروگرام حاصل از آنالیز پروتئین غده های ۲۳ رقم سیب زمینی نشان داد ارقام مورد مطالعه به طور کلی در ۲ گروه اصلی قابل مطالعه هستند. دندروگرام ترسیم شده از یکنواختی کمی برخوردار است که به دلیل سطوح پایین تشابه در بین ارقام سیب زمینی می باشد. پایین بودن تشابه ژنتیکی و نیز اختلاف در انشعابات دندروگرام، تنوع ژنتیکی بالا را در ارقام نشان می دهد. در این تحقیق، در میان نواحی سه گانه وزن پروتئینی، ناحیه متوسط دارای بیشترین

جدول ۲- خصوصیات الکتروفورتیکی ۳۹ پروتئین شناسایی شده

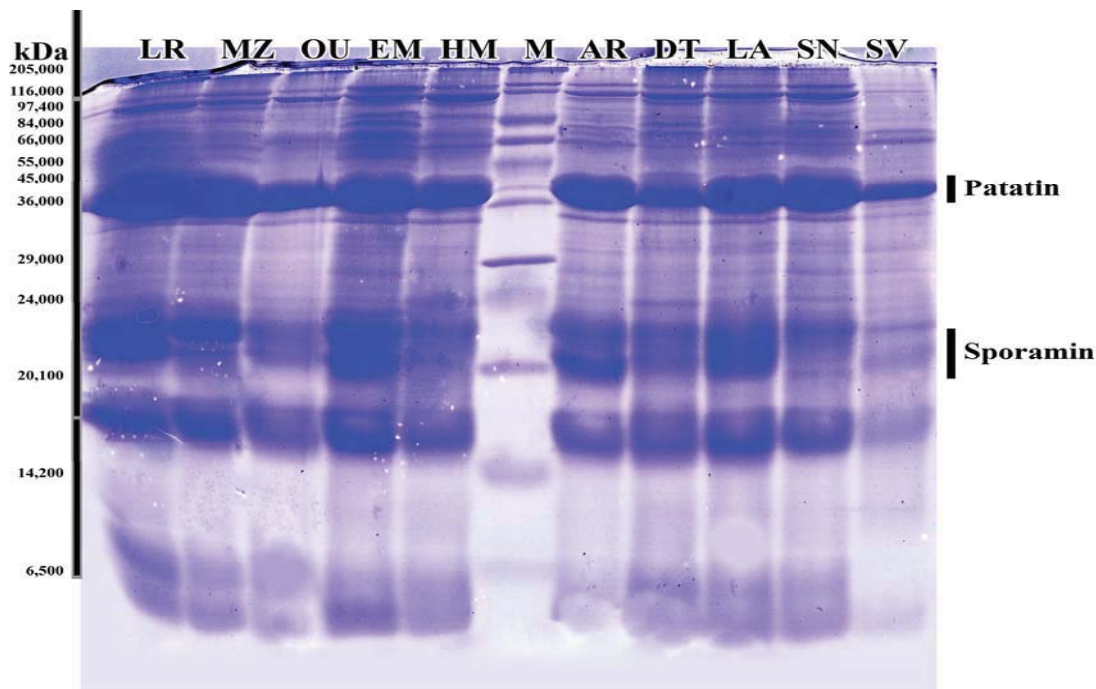
ردیف	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹
وزن مولکولی	۱۱۰۱۳۰	۹۴	۸۳	۸۰	۷۵	۷۳	۷۰	۶۹	۶۷	۶۳	۶۱	۵۹	۵۹	۵۴۹/۵۴۷/۵۴۶/۵۴۴/۵۴۳	۴۳	۴۲	۴۲	۳۹	۳۹
ردیف	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳	۳۴	۳۵	۳۶	۳۷	۳۸	۳۹
وزن مولکولی	۳۵	۳۲	۲۴/۵	۲۳/۵	۲۳/۵	۲۲/۵	۲۲/۵	۲۱/۵	۲۰/۵	۲۰/۵	۱۹/۵	۱۷/۵	۱۶/۵	۱۶	۱۲	۹	۷	۷	۷

جدول ۳- محاسبه درصد پلی مورفیسم در نواحی سه گانه وزن پروتئینی

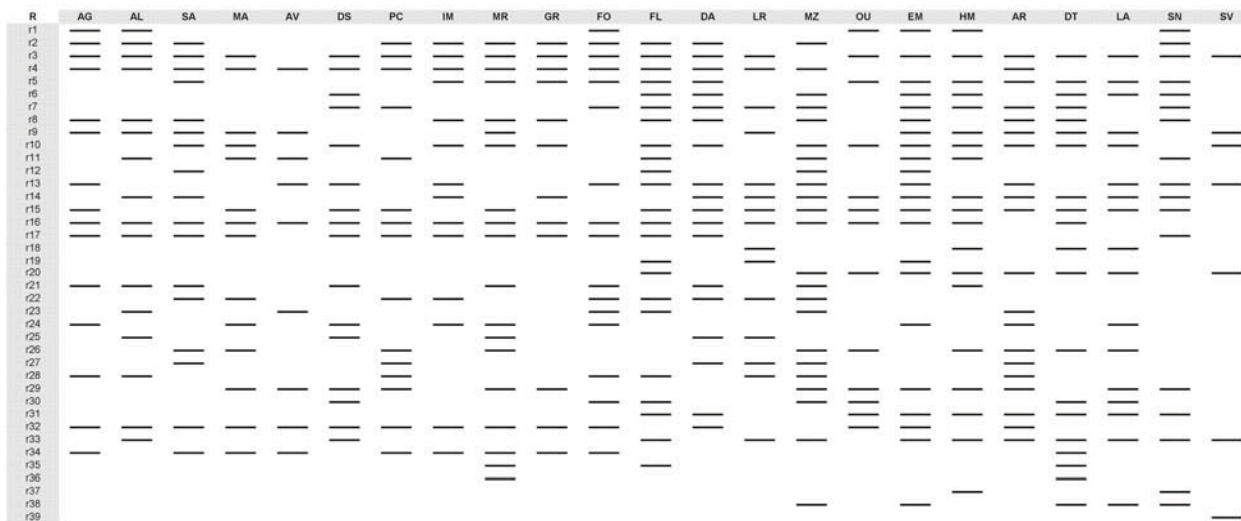
ناحیه	دامنه وزن مولکولی (کیلو دالتون)	باند مشترک	باند غیر مشترک	درصد پلی مورفیسم
سبک	۶/۵ - ۲۹	۳	۱۷	۸۵
متوسط	۳۰ - ۶۶	۲	۱۲	۸۵/۷
سنگین	۶۷ - ۲۰۵	۲	۱۰	۸۳/۳



شکل ۱- نقوش پروتئینی حاصل از الکتروفورز ۱۳ رقم سیب زمینی (اسامی ارقام براساس اختصارات بکار رفته در جدول ۱ تنظیم شده است. حرف M نشان دهنده مارکر مولکولی پروتئینی دامنه گسترده (SigmaMarker Wide Range (M.W. 6,500-205,000)) می باشد.)



شکل ۲- نقوش پروتئینی حاصل از الکتروفورز ۱۰ رقم سیب زمینی (اسامی ارقام براساس اختصارات بکار رفته در جدول ۱ تنظیم شده است. حرف M نشان دهنده مارکر مولکولی پروتئینی دامنه گسترده (SigmaMarker Wide Range (M.W. 6,500-205,000) می باشد).



شکل ۳- دیاگرام شماتیک باندهای مشاهده شده حاصل از الکتروفورز ارقام مورد مطالعه سیب زمینی

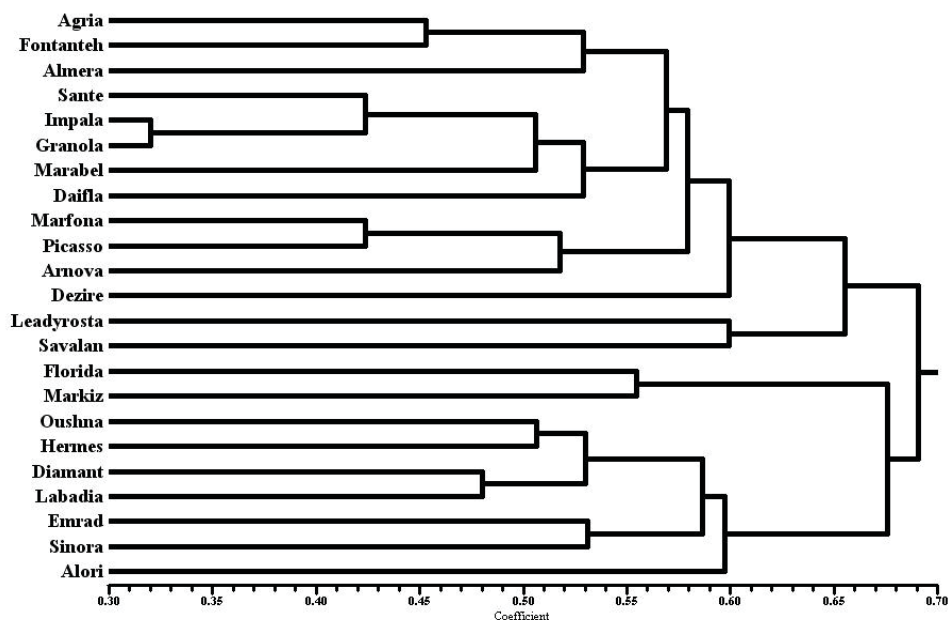
نتایج نشان می دهد برخی ارقام شامل LR، SV، MZ، FL و DS با فاصله ژنتیکی بیشتری از سایر ارقام در خوشه های متمایزی واقع شدند. همچنین دو رقم IM و GR با یکدیگر دارای قرابت ژنتیکی بالایی (۷۳/۳ درصد) می باشند (شکل ۴). دو رقم SV و FO نیز دارای پایین ترین درصد شباهت (۹/۱ درصد) در بین ارقام مورد مطالعه نسبت به یکدیگر می باشند (جدول ۴). در بررسی تطبیقی وضعیت گروه بندی با صفات ارقام و همچنین با وجود مشاهده تنوع

نتایج دندروگرام حاصل از آنالیز پروتئین غده های ۲۳ رقم سیب زمینی نشان داد در گروه اول ۱۴ رقم شامل LR، SV، AG، AL، SA، MA، AV، DS، PC، IM، MR، GR، FO، DA و در گروه دوم ۹ رقم شامل MZ، OU، EM، HM، AR، DT، LA، SN و FL قرار گرفتند. همچنین مشاهده شد که سه رقم AG، FO و AL با یکدیگر ارتباط نزدیکی داشته و در خوشه اول از گروه اول واقع شدند. در این گروه AL فاصله ژنتیکی بیشتری با دو رقم دیگر دارد.

دالتون) و اسپورامین (دامنه ۲۲ و ۳۱ کیلو دالتون) مورد شناسایی قرار گرفتند که توسط باندهایی با غلظت بالای پروتئین در تصاویر قابل شناسایی می باشند. تفاوت های چشم گیری در میزان و تعداد باندهای منتسب به این دو گروه مهم پروتئین های محلول در ارقام مختلف مشاهده شد (شکل ۱ و ۲). براساس غلظت باند های منتسب به این دو پروتئین مهم، ارقام در سه گروه میزان زیاد، متوسط و کم به صورت جداگانه طبقه بندی شدند. در این دسته بندی، ارقام AG, AR, DA, EM, FL, FO, LA, LR, MR, MZ و SA دارای مقادیر بالاتری از هر دو پروتئین پاتاتین و اسپورامین بودند. همچنین ارقام AV, DS و PC دارای مقادیر پائین تر این دو نوع پروتئین در مقایسه با سایر ارقام بودند (جدول ۵). ایزومر های پاتاتین حدود ۴۰ درصد پروتئین های ذخیره سیب زمینی را تشکیل می دهند. این پروتئین در فرایند غده زایی سیب زمینی و مقاومت گیاه به آفات و بیماری های گیاهی نقش مهمی دارد (۶). همچنین در کودکان و افراد مستعد ایجاد حساسیت می نماید (۲۱). تفاوت های قابل ملاحظه ای در تنوع و میزان سنتز باند های مربوط به این پروتئین در بین ارقام مورد مطالعه مشاهده شد. ارقام PC, DS و AV دارای باند های ضعیف تری در طیف پروتئین پاتاتین بودند. در بررسی خصوصیات فیزیولوژی و زراعی ارقام، بررسی نقوش پروتئینی از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا وجود یا عدم وجود یک باند پروتئینی ممکن است ارتباط مستقیم با سنتز یا عدم سنتز یک ایزو آنزیم داشته باشد که مقاومت یا حساسیت به یک عامل زنده یا غیر زنده را باعث می شود.

بالای پروفایل پروتئینی ارقام در مقایسه با یکدیگر، در بسیاری از موارد گروه بندی با خصوصیات شامل وضعیت صفت نحوه مصرف، وضعیت صفت شرایط رشد فیزیولوژیک، منشأ و مقاومت هم خوانی داشت. در جدول ۱ برخی از مشخصات مورفولوژی ارقام مورد مطالعه از نظر منشأ و صفت دوره رشد (خیلی زودرس، زودرس، میان رس، کمی دیررس و دیررس) نشان داده شده است. برای مثال، ارقام AG و FO که در دندروگرام در نزدیکی یکدیگر قرار دارند، هر دو نیمه دیررس، دارای صفت نحوه مصرف مشابه، رنگ گل سفید، مصون نسبت به ویروس PVX و حساس به اسکب می باشند. لیکن در مجموع دسته بندی کلی ارقام قابل ارجاع به هرکدام از خصوصیات مورفولوژیکی و زراعی شامل منشأ، صفت رسیدگی، رنگ، مقاومت به تنش های زنده و غیر زنده به تنهایی نبودند و در برخی موارد دلایل کافی از نظر خصوصیات ظاهری برای قرار گرفتن ارقام در یک زیر گروه پیدا نشد. نتایج تحقیقات بدر و مبروک (۴) و عمارلو و لامعی (۳) نیز این مطلب را تأیید می کنند. در بررسی های عمارلو و لامعی (۳) همبستگی خاصی بین رنگ گوشت و پوست مشاهده نگردید. تعداد ۸۹ واریته سیب زمینی توسط کاروری و همکاران (۱۶) با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و نشانگرهای SSR مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس هر یک از مارکرها، دندروگرام مربوطه رسم گردید. علیرغم تنوع بالای ژنتیکی در هر دو روش، ارتباط ضعیفی بین دندروگرام های بدست آمده وجود داشت که دلیل آنرا اثرات محیطی بر نشانگرهای مورفولوژیکی ذکر کردند.

در بررسی تصاویر باند های پروتئینی دو گروه مهم از پروتئین های محلول شامل ایزومرهای پاتاتین (باندهای حدود ۴۰ کیلو



شکل ۴- دندروگرام حاصل از آنالیز پروتئین های محلول غده ارقام مختلف سیب زمینی

جدول ۴- ماتریس قرابت ژنتیکی ارقام مختلف سیب زمینی با استفاده از ضریب جاکارد

رقم سیب زمینی		AG	AL	SA	MA	AV	DS	PC	IM	MR	GR	FO	FL	DA	LR	MZ	OU	EM	HM	AR	DT	LA	SN	SV
AG																								
AL	۵۵																							
SA	۴۵/۵	۴۳/۵																						
MA	۴۵	۳۰/۴	۴۷/۶																					
AV	۳۳/۳	۳۱/۶	۲۳/۸	۴۳/۸																				
DS	۴۰/۹	۳۳/۳	۲۶/۹	۴۲/۹	۲۵																			
PC	۴۲/۹	۳۴/۸	۴۵/۵	۶۱/۱	۳۳/۳	۳۴/۸																		
IM	۵۲/۶	۳۶/۴	۶۳/۲	۴۷/۴	۲۷/۸	۳۶/۴	۳۸/۱																	
MR	۵۴/۵	۴۰	۵۶/۵	۵۷/۱	۲۷/۳	۴۵/۸	۴۱/۷	۵۰																
GR	۴۲/۱	۴۰	۶۱/۱	۴۴/۴	۳۱/۳	۳۳/۳	۴۲/۱	۷۳/۳	۵۵															
FO	۶۰	۴۳/۵	۴۱/۷	۳۴/۸	۳۰	۴۳/۵	۴۵/۵	۵۵	۳۸/۵	۳۸/۱														
FL	۳۱	۳۴/۵	۳۳/۳	۲۷/۶	۱۸/۵	۲۹/۳	۳۵/۷	۳۷	۳۱/۳	۲۹/۶	۴۲/۹													
DA	۴۱/۷	۴۰	۵۶/۵	۳۲	۱۶/۷	۵۲/۲	۴۱/۷	۵۷/۱	۴۶/۲	۴۷/۶	۴۴	۵۰												
LR	۳۰/۴	۳۴/۸	۲۸	۲۶/۱	۲۰	۳۴/۸	۳۶/۴	۲۶/۱	۲۱/۴	۱۷/۴	۲۸	۳۵/۷	۴۱/۷											
MZ	۲۶/۷	۳۴/۵	۳۷/۹	۲۷/۶	۲۳/۱	۳۹/۳	۴۰/۷	۲۷/۶	۲۷/۳	۲۵	۳۳/۳	۵۸/۶	۴۴/۸	۳۵/۷										
OU	۲۱/۷	۲۰/۸	۳۰/۴	۳۵	۱۵/۸	۳۱/۸	۲۷/۳	۲۸/۶	۳۳/۳	۳۸/۹	۲۵	۲۸/۶	۳۳/۳	۱۶/۷	۲۸/۶									
EM	۳۲/۱	۳۱	۳۰	۳۳/۳	۲۴	۴۰/۷	۲۳/۳	۳۳/۳	۳۲/۳	۳۰/۸	۲۵/۸	۵۰	۴۱/۴	۳۲/۱	۴۵/۲	۴۵/۸								
HM	۲۱/۴	۲۹/۶	۲۸/۶	۳۲	۱۶/۷	۳۴/۶	۲۵/۹	۱۷/۹	۳۱	۲۴	۲۰	۳۵/۵	۳۵/۷	۳۰/۸	۴۰	۵۲/۴	۵۷/۷							
AR	۳۴/۶	۳۳/۳	۳۷	۳۶	۲۶/۱	۲۸/۵	۳۴/۶	۳۶	۳۹/۳	۳۳/۳	۳۲/۱	۴۳/۳	۴۴/۴	۴۰	۴۸/۳	۴۳/۵	۵۵/۶	۴۴/۴						
DT	۲۰/۷	۲۰	۳۲/۱	۲۵/۹	۱۱/۵	۲۸/۶	۲۰/۷	۲۵/۹	۳۹/۳	۲۸	۱۹/۴	۴۳/۳	۳۴/۵	۲۹/۶	۳۸/۷	۴۳/۵	۵۰	۵۶	۴۲/۹					
LA	۱۸/۵	۱۴/۸	۲۱/۴	۲۹/۲	۱۳	۳۷/۵	۱۴/۳	۲۴	۲۸/۶	۲۰/۸	۱۷/۲	۳۳/۳	۲۸/۶	۲۸	۳۷/۹	۵۰	۵۶	۵۶/۵	۵۴/۲	۶۰/۹				
SN	۲۸	۳۲	۲۱/۴	۱۹/۲	۱۳	۳۲	۲۸	۲۹/۲	۲۴/۱	۳۱/۸	۲۵/۹	۴۲/۹	۴۴	۳۳/۱	۳۷/۹	۳۰/۴	۵۶	۵۰	۳۷	۳۷	۴۱/۷			
SV	۱۵/۸	۱۵	۱۴/۳	۱۶/۷	۱۴/۳	۲۱/۱	۴/۸	۱۶/۷	۱۳	۱۱/۸	۹/۱	۲۰	۱۳	۲۲/۲	۱۵/۴	۱۷/۶	۲۶/۱	۲۳/۸	۲۸/۶	۲۲/۷	۳۳/۳	۱۴/۳		

کشاورزان نیز توصیه می گردد چنانچه در ارزیابی های مزرعه ای از یک رقم نتیجه مطلوب را نگرفتند از ارقامی که فاصله ژنتیکی بیشتری دارند استفاده کنند، زیرا ارقام نزدیکتر ممکن است عملکرد مشابهی داشته باشند. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان دهنده وجود پتانسیل بالای تنوع ژنتیکی در بین ارقام سیب زمینی مورد مطالعه می باشد.

با توجه به اثرات مهم این گروه از پروتئین های محلول غده در زمینه سلامت تغذیه و مقاومت به تنش ناشی از عوامل زنده و غیر زنده، توصیه می گردد تحقیقات تکمیلی در مورد ارقام زراعی مهم سیب زمینی در ایران صورت پذیرد. همچنین پیشنهاد می شود، در مطالعات از ارقامی استفاده شود که فاصله ژنتیکی بیشتری با هم دارند چون تنوع و فاصله ژنتیکی با هتروزیس همبستگی مثبت دارد. به

منابع

- ۱- عمارلو ع.، میرفخرایی س.ر. و دهقانی ح. ۱۳۸۰. معرفی ناحیه حاوی پلی مورفیسم در ارقام سیب زمینی به روش SDS-PAGE. دومین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. کرج. مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی.
- 2-Abdel-Tawab F.M., Fahmy E.M., Bahieldin A., Asmahan A.M., and Saleh O.M. 1998. Development of molecular genetic indices for drought tolerance in some inbreds and hybrids of maize (*Zea mays* L.). Proc. Third Arab Conf. Modern Biotech. and Areas of Application in the Arab World, Cairo. Dec., 14(17): 641-660.
- 3-Ammarelou A., and Lamei J. 2007. Study on variation of potato varieties using electrophoretic tuber storage proteins. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(18): 3195-3199.
- 4-Badr E.A., and Mabrouk Y.M. 2000. Identification of potato cultivars and somaclonal variations by RAPDs. Arab. J. Biotech., 3: 181-188.
- 5-Badr E.A., Badawy O.M., and Hekal H.A. 2001. Identification of five potato cultivars by isozyme patterns in leaf and callus. Egypt J. Genet Cytol., 30: 61-74.

- 6-Bauw G., Nielsen H.V., Emmersen J., Nielsen K.L., Jørgensen M., and Welinder K.G. 2006. Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 273(15): 3569-84.
- 7-Burton W.G. 1989. *The potato*. 3rd ed. Chapman and Hall, London, pp. 742.
- 8-Canovas F.M., Dumas-Gaudot E., Recorbet G., Jorriin J., Mock H.P., and Rossignol M. 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics*, 4: 285-298.
- 10-Delaplace P., Van D.W.F., Dierick J.F., Cordewener J.H.G., Fauconnier M.L., Du Jardin P., and America A.H.P. 2006. Potato tuber proteomics: Comparison of two complementary extraction methods designed for 2-DE of acidic proteins. *Proteomics Journal*, 6(24): 6494-6497.
- 10-Douches D.S., Jastrzebski K., Maas D., and Chase R.W. 1996. Assessment of potato breeding over the past century. *Crop Science*, 36: 1544-1552.
- 11-El-Demerdash H.M. 2000. Physiological genetic studies on irradiated potato plants by the use of biotechnology. Ph.D. Thesis, Fac. Agric. Ain Shams Univ.
- 12-El-Farash E.M., Taghian A.S., Abdollah H.I., and Ahmed M.H. 1998. Selection for salinity tolerance through tissue culture and germinability in maize. *Egypt. J. Appl. Sci.*, 13: 34-57.
- 13-Hosaka K., and Hanneman R.E. 1991. Seed protein variation within accessions of wild and cultivated potato species and inbred *Solanum chacoense*. *Potato Research*, 34: 419- 428.
- 14-Jae-Wook Y., Jae-Yeon J., Hyun-Jung C., Mi-Ryung K., Chan-Wha K., and Seung-Taik L. 2010. Identification of botanical origin of starches by SDS-PAGE analysis of starch granule-associated proteins. *Journal of Cereal Science*, 52: 321-326.
- 15-Jorgensen M., Bauw G., and Welinder K.G. 2006. Molecular properties and activities of tuber proteins from starch potato cv. Kuras. *J. Agric. Food Chem.* 54(25): 9389-97.
- 16-Karuri H.W., Ateka E.M., Amata R., Nyende A.B., Muigai A.W.T., Mwasame E., and Gichuki S.T. 2010. Evaluating diversity among Kenyan sweet potato genotypes using morphological and SSR markers. *Int. J. Agric. Biol.*, 12: 33-38.
- 17-Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- 18-Lehesranta S.J., Davies H.V., Shepherd L.V.T., Nunan N., McNicol J.W., Auriola S., Koistinen K.M., Suomalainen S., Kokko H.I., and Kärenlampi S.O. 2005. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. *Plant Physiology*, 138: 1690-1699.
- 19-Novakova A., Simackova K., Barta J., and Curn V. 2009. Potato variety identification by molecular markers based on retrotransposon analyses. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 45(1): 1-10.
- 20-Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY .
- 21-Shewry P.R. 2003. Tuber storage proteins. *Annals of Botany*, 91: 755-769.
- 22-Singh N.K., Handa A.K., Hasegawa P.M., and Berssan R.A. 1985. Proteins associated with adaptation cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.*, 79: 126-136.
- 23-Stegeman H., Francksen H., and Macko V. 1973. Potato proteins: Genetic and physiological changes, evaluated by one and two-dimensional PAA-gel-techniques. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 28c: 722-732.
- 24-Stuber C.W. 1992. Biochemical and molecular markers in plant breeding. *Plant Breeding Rev.*, 9: 37-61.
- 25-Svetlana S., and Matejova E. 2006. Characterization of potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties by electrophoresis of tuber proteins. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 42 (4): 142-146.
- 26-Zwartz J.A. 1966. Potato varieties and their protein electropherogram characteristics. *Eur. Potato J.*, 9: 111-128.