Archive of SID

کاربرد روش Real Time-PCR جهت شناسائی سیب زمینی دستورزی شده ی ژنتیکی مقاوم به ویروس PVY در مقایسه با سیب زمینی های غیر تراریخته

زهره ربیعی[1*]، حمید راشدی[2]، ستار طهماسبی انفرادی[3]، غلامعباس اکبری[4]

1- گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوریهای نوین، دانشگاه شهید بهشتی
2- دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده های فنی، دانشگاه تهران
3- گروه ژنتیک ملکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
4- گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: 89/5/22 تاریخ پذیرش: 89/7/22)

چکیده

مقایسه بین سیب زمینی های تراریخته و غیر تراریخته یکی از مشکلات عمده سازمانهای بازرگانی و تحقیقاتی می باشد. استفاده از روش های جدید آنالیتیکی مبتنی بر ارزیابی ژنوم جهت تفکیک و شناسائی بین آنها از اهداف اصلی این تحقیق می باشد. نمونه های سیب زمینی از چهار استان ایران جمع آوری شده و از نظر تراریخته بودن مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از استخراج DNA به روش CTAB، آغازگرهای معرفی شده جهت تعقیب توالی های تراریخته با استفاده از دو تکنیک PCR و Real time-PCR و تعقیب ژن هدف 35S promotor و coat protein gene و ژن اندوژن Sucrose synthase gene یا B-fructosidase مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به عدم ردیابی نمونه های GM مثبت، آنالیزها جهت تعقیب مستقیم ویروس PVY^O و PVY^N در نمونه ها ادامه یافت که نتایج آلودگی نمونه ها به این دو ویروس را نشان داد.

کلید واژگان: سیب زمینی ، محصولات تراریخته، ویروس PVY

1- مقدمه

سیب زمینی *Solanum tuberosum* L. چهارمین محصول بعد از گندم، برنج و ذرت بوده که در تغذیه انسان از اهمیت بسزائی برخوردار است. بر اساس گزارش سازمان خواربار جهانی (FAO)، میزان تولید سیب زمینی در دنیا 325 میلیون تن در سال 2008 بوده است. کشورهای چین، هند، روسیه فدرال، اوکراین، آمریکا و آلمان از عمده ترین تولید کنندگان سیب زمینی سیب زمینی به دو صورت کشت آبی و دیم در استانهای اردبیل، همدان، اصفهان، ... ادامه دارد. ایران مقام چهاردهم را در دنیا در سال 2008 از نظر تولید سیب زمینی با تولید 4/7 میلیون تن دارا می باشد [1].

تاکنون 36 ویروس مسئول ایجاد بیماری های عفونی در سیب زمینی شناسائی شده اند [2]. اولین گزارشات از وجود بیماری ویروس سیب زمینی در ایران به سال

* مسئول مکاتبات: z_rabiei@sbu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

در دنیا می باشند. در ایران نیز روند رو به افزایش کشت 1330 بر می گردد [3]. شیوع کمتر ویروس های سیب

www.SID.ir

Archive of SID

زمینی (حدود 10–5 درصد) اثر کمتری بر کاهش محصول دارد درحالیکه شیوع بیشتر آنها باعث کاهش شدیدتر محصول می شود. تخمین زده شده که آلودگی 50–40 درصد سیب زینی با این ویروس منجر به کاهش 40 درصدی محصول می شود که همراه با خسارت های مالی فراوان در دنیا می باشند.

بیماری Potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) بیماری ویروسی است که با ایجاد حلقه های نکروز کننده روی سطح غده سیب زمینی ایجاد عفونت می کند و خسارت زیادی به محصول وارد میکند که آنرا جهت مصارف خوراکی نامناسب می کند [4]. با توجه به اینکه سیب زمینی از طریق غده تکثیر می یابد آلودگی گیاه مادر به PVY منجر به آلوده شدن غده های حاصله به این ویروس گردیده و نهایتاً نسلهای تکثیری بعدی نیز آلوده به ویروس خواهد بود [5]. ویروس PVY از خانواده Potyvirus و خانواده Potyviridae با پیکره ایزومتریک و ژنوم RNA تک رشته و مثبت می باشد [6، 7]. این خانواده ویروسی بزرگترین و از نظر اقتصادی مهمترین گروه از ویروسهای بیماریزا در گیاهان می باشند. ویروس PVY از تنوع ژنتیکی بالائی برخوردار می باشد و معمولاً بر اساس علائم ایجاد شده بر روی توتون و سیب زمینی به نژادهای PVY^O و PVY^N و PVY^C و PVY^{NTN} تقسیم می گردد [8]. شناسائی و بررسی حضور این ویروس در سیب زمینی توسط روشهائی مثل الکتروفورز و وسترن بلاتینگ با یافتن دو باند پروتئینی 26 و 31 کیلو دالتون که به ترتیب مربوط به پروتئین RNA ویروس و پروتئین پوششی ویروس می باشند، امکان پذیر گشته است [3]. اخیرا پروتکل های مختلفی جهت شناسائی انواع مختلف این ویروس با استفاده از سنتز cDNA و تکثیر با پرایمرخاص طراحی شده روی رشته آنتی سنس معرفی شده اند [9]. روشهای قدیمی تر مبتنی بر روش های سرولوژیک، روش وسترن بلات و الایزا نیز برای تشخیص سیب زمینی های آلوده به ویروس ها مورد استفاده قرار گرفته اند [3].

واریته های سیب زمینی تراریخته مقاوم به ویروسهای گیاهی مثل potato virus Y (PVY) و همچنین Leafroll virus (PLRV) نیز معرفی شده اند که با اضافه شدن توالی مربوط به ژن پروتیین پوششی (CP) ویروس معمولی یا O-strain همان ویروس بدست آمده اند [10 ، 11]. پروتیین پوششی از ژنوم RNA ویروس محافظت می کند و وزن بیش از 95٪ از کل ذره ویروس را به خود اختصاص داده است. البته مکانیسم قطعی ایجاد کننده مقاومت در سیب زمینی دستورزی شده ژنتیکی ناشناخته است. اما عمدتا پیشنهاد می شود که بیان پوشش پروتئینی ویروس در هنگام تکثیر شدن ویروس و حذف پوشش پروتیینی از ویروس ورودی انجام می شود [12]. لاینهای جدید سیب زمینی SEMT15-02 و SEMT15-15 و RBMT15-101 توسط کمپانی مونسنتا، آمریکا جهت مصرف انسانی و دامی معرفی شده اند و نسبت به ویروس PVY مقاوم می باشند [13]. گیاهان تراریخته دارای یک ژن (یا گروهی از ژنها) که به ژنوم اصلی شان اضافه شده میباشند. این ژن (های) جدید، ترجمه و پروتئینهای جدیدی را بیان می کنند که خصوصیات جدیدی مثل مقاومت به حشرات مخصوص، علف کشها، ویروسها،.. را به آنها می دهند.

کشت، پرورش و فروش محصولات تراریخته در آمریکا، کشورهای اتحادیه اروپا و برخی کشورهای دیگر تحت کنترل های بسیار دقیقی انجام می گیرد و آنالیزهای دقیقی را شامل می شود [14]. این مطالعات معمولا موارد فراوانی از مسائل زراعی، تغذیه ای، محیط زیست و سلامتی مصرف کننده را پوشش می دهند. آنچه مهم به نظر میرسد اینست که باید یک چهارچوب هماهنگ شده بین المللی در جهت کنترل ارگانیسم های با DNA نوترکیب بنیان نهاده شود [15، 16]، چرا که ژنوتیپهای جدید بدست آمده از دستورزی و اصلاح ژنتیکی به اکوسیستم طبیعی حمله و تغییرات ناخواسته مثل هیبریداسیون با گونه های بومی و وحشی ایجاد می کنند [5].

اساس شناسائی DNA ترانسژنیک جدید اضافه شده و یا شناسائی پروتئین جدید بیان شده با کاربرد دو تکنیک شامل روش های مبتنی بر PCR و روش های مبتنی بر ELISA امکان پذیر می باشد. روش PCR اجازه میدهد تا تکثیر روی قطعه DNA اضافه شده با استفاده از پرایمر طراحی شده روی پروموتور، ژن ترانسژن، و یا ترمیناتور انجام شود [17، 18]. نتیجه کار بروی ژل آگاروز به صورت مثبت و یا منفی بودن واکنش مشخص می شود. روش سنجش پروتئینی بر پایه ELISA از حساسیت کمتری نسبت به روش PCR برخوردار است، یعنی از درصد بالاتر positive false برخوردار است. آلودگی های جزئی، هزینه بالا جهت تهیه آنتی بادی و استاندارد پروتئین، و زمان بیشتر نسبت به روش PCR از سایر معایب این روش می باشند.

در تعیین کمیتی محصولات تراریخته دو نکته اساسی وجود دارد: 1- تعیین کمیت یک ژن هدف مخصوص 2- تعیین ژن رفرانس (آندوژن) مربوط به آن تاکسون [19، 20، 21].

www.SID.ir

Archive of SID

در این تحقیق شناسائی سیب زمینی تراریخته مقاوم به ویروس PVY نسبت به سیب زمینی های غیر تراریخته با استفاده از روشهای مبتنی بر PCR انجام شده است.

2- مواد و روش ها

2-1- استخراج DNA

نمونه های سیب زمینی از بازارهای عمده استان های اردبیل، البرز، تهران و همدان بصورت کاملاً اتفاقی به میزان حداقل 5 غده به ازاء هر گونی انتخاب گردیدند. استخراج DNA از دو چشم انتهایی غده های سیب زمینی به روش Doyle & Doyle [22] انجام گردید و کمیت DNA استخراجی توسط فلوریمتر (Hoefer DyNA Quant 200 Fluorometer (Pharmacia Biotech)، ارزیابی گردید.

2-2- طراحی آغازگر

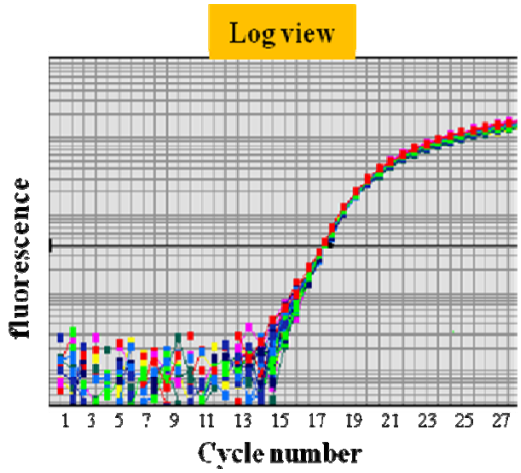
سه جفت آغازگر برای تعقیب و تعیین ژن هدف مخصوص و تعیین ژن رفرانس (اندوژن) در اینجا Sucrose synthase gene یا B-fructosidase. از بانک اطلاعاتی محصولات تراریخته تعیین شدند. ژن هدف در این آنالیز 35S promotor و coat protein gene میباشند.

دو جفت آغازگر جهت تعقیب مستقیم ویروس PVY در نمونه ها و دو تک بازوی کاوشگر Taqman تغییر یافته با دو رنگ فلورسنت FAM و HEX جهت انجام RT-PCR طراحی گردیدند.

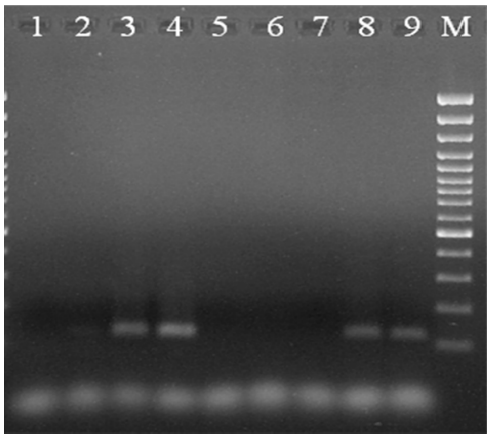
2-3- واکنش زنجیره پلیمراز

شناسائی و تعیین کیفی حضور ژن تراریخته در ابتدا توسط PCRنرمال، در شرایط ذیل انجام گردید. واکنش PCR در حجم نهائی 25µL محتوی 20 ng از DNA، 0.5 µM از هر آغازگر For و Rev (که با رنگ فلورسنت HEX یا FAM نشاندار شده اند)، 200 µM از هر dNTP، 0.5 U پلیمراز Taq، 2.5µL بافر 10X در ماشین PTC-200 (MJ Research, USA) با برنامه 2 دقیقه در 94°C (واسرشته سازی DNA)، 27 سیکل 45 ثانیه در 94°C (اتصال آغازگر، دمای مناسب هر آغازگر در جدول (1) گزارش شده است)، 1 دقیقه در 72°C (طویل شدن رشته) و نهایتاً 8 دقیقه در 72°C [23].

واکنش Real Time-PCR در حجم نهائی 20µL محتوی 2.5µL بافر 1X بافر Taqman (حاوی EtROX به عنوان رنگ رفرانس)، 6 mM از $MgCl_2$، 400 µM از هر dATP، dCTP ، dGTP، 400 µM dUTP، 500 nM از پرایمرها، 200 nM کاوشگر، 1 U آمپلی تک گولد پلیمراز ، 0.2 U اوراسیل ان-گلایکوزیلاز و 2 µL DNA در ماشین ABI PRISM 7700 Sequence detection system device (Applied Biosystem devision of Perkin Elmer Crop. Foster City, CA, USA) با برنامه 2 دقیقه در 50°C و 10 دقیقه در 95°C، 50 سیکل 15 ثانیه در 94°C و 1 دقیقه در 72°C و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار sequence detection system software 1.7 و ترسیم منحنی رگرسیون انجام شد [24].



شکل 1 تکثیر ژن آندوژن (کنترل) نمونه های سیب زمینی در Real-time PCR با آغازگرهای معرفی شده در جدول (1) عدم تکثیر ژن تراریخته در تمامی نمونه ها، غیر تراریخته بودن نمونه های مورد بررسی را تایید می نماید.



www.SID.ir

Archive of SID

شکل 2 عدم تکثیر DNA نمونه های سیب زمینی در PCR معمولی با پرایمر cp (جدول 1). M نشانگر Gen ruler است. ، 3، 4، 8، 9 کنترل مثبت، سایر چاهک ها محتوی نمونه های سیب زمینی از مناطق مختلف استان های اردبیل، البرز، تهران و همدان می باشند.

3- یافته ها و بحث

DNA استخراج شده از نمونه های سیب زمینی از کیفیت و کمیت مناسب پس از انجام PCR نرمال و همچنین سنجش با دستگاه فلوریمتر برخوردار بود.

جدول 1 سه جفت آغازگر جهت تعقیب سیب زمینی تراریخته

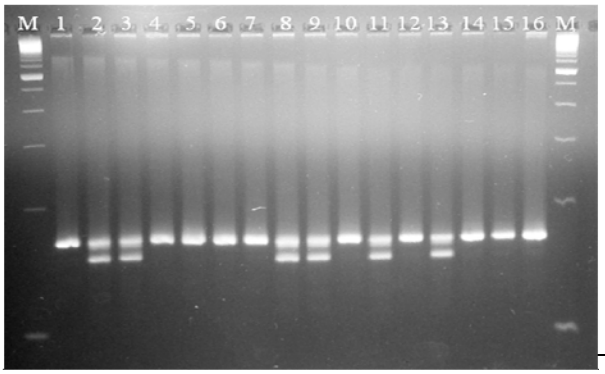
Gene name	Target code		For sequence 5'-3'	Rev sequence 5'-3'	Length (bp)
	For	Rev			
35S promoter	P-FMV	CP	AAAAGAGCTGTCCTGACAGC	TCCTCCTGCATCAATTGTGT	225
Coat protein gene	CP	CP	GAATCAAGGCTATCACGTCC	CATCCGCACTGCCTCATACC	161
Sucrose synthase gene			TGACCTGGACACCACAGTTAT	GTGGATTTCAGGAGTTCTTCGA	161
RpO_Rev			TAAACTAGGCAGCTCTGCATCATG		

بر اساس نتایج بدست آمده از PCR معمولی و Real-time PCR، و عدم مشاهده تکثیر DNA، آزمایشات به سمت تعقیب مستقیم ویروس PVY در نمونه ها هدایت شد. آغازگرهای معرفی شده در جدول (2) بر اساس توالی های موجود در NCBI برای ویروس PVY^O به شماره U09509 [16] و برای ویروس PVY^N به شماره X97895 [25] طراحی گردیدند.

تکثیر نمونه های مورد بررسی با PCR معمولی در شکل (3) نشان داده شده است.

جدول 2 آغازگر های طراحی شده جهت تعقیب ویروس PVY در سیب زمینی

Primer	Sequence
FpN_For	AACCATGATGGATCTGGCTACAA
RpN_Rev	TTCTAGGCAGTTCTGCATCATGAA
FpO_For	TATGATGGATTTGGCGACCACTTGT



شکل 3 تکثیر نمونه های سیب زمینی در PCR معمولی با پرایمرهای مخصوص پیگیری ویروس PVY.. M نشانگر Gen ruler، 2، 3، 8، 9، 11 و 13 با دو باند نشانگر حضور هر دو ویروس هستند.

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز های فوق الذکر عدم حضور سیب زمینی تراریخته در بازار مصرف ایران در سال 1388 اجرای PCR معمولی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده

(جدول 1) عدم آمپلی فیکاسیون تمامی نمونه های مورد بررسی را نشان داد. این موضوع با آمپلی فیکاسیون نمونه کنترل مثبت، صحت کار PCR را نشان داد. در این رابطه انجام RT-PCR بطور دقیق می تواند حضور یا عدم حضور کپی DNA ترانسژن را تایید نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

تأیید می گردد. حضور باندهای مربوط به تکثیر توالی های ویروسی در نمونه های سیب زمینی شاهد دیگری بر عدم تراریخته بودن سیب زمینی های مورد بررسی می باشد. بررسی حضور غده های سیب زمینی تراریخته که به عنوان بذر مورد استفاده قرار می گیرند، نیز در دست آزمون می باشد.

با توجه به اینکه سازمان های محافظت از سلامتی و مصرف کننده، سازمان جهانی سلامتیWHO، ملاحظات خاصی را در رابطه با استفاده از محصولات تراریخته در نظر دارند، از اینرو توسعه دانش و تعمق در آن از جنبه های مختلف برای شناسائی و تعیین مقدار، طراحی و اعتبار سنجی روشهای مختلف ضروری به نظر می رسد. با در نظر گرفتن یک سری معیارهای سیستماتیک در رابطه با سلامتی مواد خوراکی agro-GMOs، ریسک و تاثیر محصولات مختلف تراریخته تعیین حد خطرزا بودن، آلرژی زا بودن و یا داشتن تاثیرات تغذیه ای، ضرورت آگاهی دادن به مصرف کننده، درج تراریخته بودن روی برچسب با تعیین مقدار GMO% را آشکار می سازد. از طرف دیگر، قیمت تمام شده محصولات GMO در بازار داخلی و صادراتی ضرورتا باید کنترل شود.

4- تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایتهای مالی انجام شده از طرف دانشگاه شهید بهشتی و فراهم کردن تسهیلات و تجهیزات آزمایشگاهی قدردانی به عمل می آورد. هزینه های اجرای این تحقیق از سوی دانشگاه شهید بهشتی بر اساس طرح پژوهشی به شماره 600/1396 تأمین گردیده است.

5- منابع

[1] www.FAO.org

[2] Slack, S. A., and German, T. L. 2001. Diseases caused by viruses and viroids. Pages 57-62 in: Compendium of Potato Diseases, 2nd ed. R. Stevenson, R. Loria, G. D. Franc, and D. P. Weingartner, eds. American Phytopathology Society, St. Paul, MN.

[3] Hosseinzadeh, M.R., Jafarpour, B., Varaste, A. 2000. Molecular Weight Determination and identification of Potato virus S proteins by means of electrophoresis and western blotting. 1st Iranian Applied Biology.

[4] Boonham, N., Perez, L.G., Mendez, M.S., Peralta, e.L., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I., Mumford, R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of potato spindle tuber viroid. J. Virol. Meth. 116: 139-146.

[5] Raybould A F and Gray A J. 1993. Genetically Modified Crops and Hybridization with Wild Relatives: A UK Perspective. *The Journal of Applied Ecology*, 30 (2): 199-21.

[6] Blanco-Urgoiti, B., Tribodet, M., Leclere, S., Ponz, F., Perez de San Roman, C., Legorburu, F.J., Kerlan, C. 1998. Characterization of potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. Eur. J. Plant Pathol. 104: 811-819.

[7] Fox, A., Evans, F., Browning, I. 2005. Direct tuber testing for potato Y potyvirus by real-time RT-PCR and ELISA: reliable options for post-harvest testing? Bulletin de lorganisation europeenne et mediterranenne pour la protection des plantes (OEPP), 35.

[8] Balme-sinibaldi, V., Tribodet , M., Croizat, F., Lefeuvre, P., Kerlan, C., Jacquot, E. 2006. Improvement of potato virus Y (PVY) detection and quantitation using PVY^{N} – and PVY^{O} – specific real-time RT-PCR assays. Journal of Virological Methods. 134: 261-266.

[9] Nie X and Singh RP. 2003. Specific differentiation of recombinant $PVY^{N:O}$ and PVY^{NTN} isolates by multiplex RT-PCR . Journal of Virological Methods. 113(2): 69-77.

[10] Agbios 2005, *GM Crop Database*, Merrickville, Ontario, August (www.agbios.com).

[11] Singh, M., Singh, R.P. 1996. Nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of the common strain of *potato virus Y* (PVY^{O}). Can. J. Plant Pathol. 18, 209-224.

[12] MacKenzie, D., McLean, M. 2002. Who's afraid of GM feed? FEED MIX. 10(3): 16- 19.

[13] Guideline for the safety assessment of Novel Foods, FD/OFB-096-313-A October 1999.

[14] Hernandez, M., Pla, M., Esteve, T., Prat, S., Puigdomenech, P., Ferrando, A. 2003. Transgenic research. 12: 179-189.

www.SID.ir

Archive of SID

Quantification of Four Solanaceae in GMO Analysis: Potato (*Solanum Tuberosum*), Tomato (*Solanum Lycopersicum*), Eggplant (*Solanum Melongena*), and Pepper (*Capsicum Annuum*). ASAP *J. Agric. Food Chem.*, ASAP Article, 10.1021/jf073313n

[21] Taverniers, I., Windels, P., Van Bockstaele, E., De Loose, M. 2001. Use of cloned DNA fragments for event specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. Eur Food Res Technol, in press.

[22] Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13–5.

[23] Wiseman, G. 2002. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. J.A.O.A.C. Intl. 85 (3):792–796.

[24] Terry, C.F., Harris, N. 2001. Event specific detection of Roundup ReadyTM Soya using two different real time PCR detection chemistries. Eur Food Res Technol, 33-39.

[25] Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D., Malnoe, P. 1997. Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-lenght cDNA clone of $PVY^{N}605$, a Swiss necrotic isolate of *Potato virus Y*. Gen. Virol. 78, 3141-3145.

[15] James, C. 2000. Global status of commercialized transgenic crops: 2000, ISAAA Briefs. 21.

[16] Schaad, N. W., Berthier-Achaad, Y., Sechler, A., Knorr, D. 1999. Detection of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Dis. 83:1095–1100.

[17] Kay, S., Van den Eede, G. 2001. The limits of GMO detection. *Nat Biotechnol* 19: 405.

[18] Nazarenko, I., Lowe, B., Darfler, M., Ikonomi, P., Scuster, D., Rashtchian, A. 2002. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. Nucleic Acids Res. 30 (9): 37.

[19] Abdeeva, I.A., Goldenkova-Pavlova, I.V., Mokriakova, M.V., Volkova, L.V., Bogush, V.G., Sidoruk, K.V., Iur'eva, N.O., Debabov, V.G., Piruzian, E.S. 2007. Experimental models of transgenic plants promising for the modern technologies. Tsitol Genet. 41(3): 55-61

[20] Chaouachi M, Malki RE, Berard A, Romaniuk M, Laval V, Brunel D, Bertheau Y. 2008. Development of a Real-Time PCR Method for the Differential Detection and

www.SID.ir

Archive of SID

The use of Real-Time PCR technique for detection of transgenic potato against PVY virus compared with non-transgenic ones

Rabiei, Z. [1*], Rashedi, H. [2], Tahmasebi Enferadi, S. [3], Akbari, G. A. [4]

1. Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University
2. Chemical ENG.Department Faculty of Engineering , University of Tehran
3. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran free way 15 Km, Pajouhesh BLV. Zip
4.Department of agronomy and plant Breeding, Aboureihan College Pardis, University of Tehran University
(Received:89/5/22 Accepted: 89/7/22)

Comparison between GM potatoes against non-GM potatoes is considered as a serious obstacle in trading and research institutes in Iran. The use of new analytical methods based on genome evaluation for differential identification between GM/non-GM products has a great importance.
Sampling has been carried out from the market of four provinces. After DNA extraction according CTAB method, normal PCR and Real Time-PCR has been used for following up the target and endogen genes, 35S promoter, cp gene and Sucrose synthase gene/B-fructasidase respectively. Absence of amplification in the aforementioned PCRs, conducted the analyses to follow up PVY^O and PVY^N through the specific primers designed for their detection. All samples have provided good amplification implying contamination of samples by viruses and absence of GM potatoes in Iran market, as well.

Key words: Genetically Modified Products, Potato Virus Y (PVY), *Solanum Tuberosum* L.

* Corresponding Author E-Mail address: z_rabiei@sbu.ac.ir

www.SID.ir