کاربرد نشانگر پروتئین های ذخیره ای بذر در جداسازی چند رقم بادام زمینی (*Arachis hypogaea*)

معصومه جمال امیدی*[۱]، مهران غلامی[۲]، فاطمه جمال امیدی[۳]

تاریخ دریافت :۹۵/۸/۱۱
تاریخ تصویب : ۹۶/۵/۹

چکیده

بادام زمینی(Arachis hypogaea) یکی از مهمترین دانه های روغنی خوراکی تیره بقولات در دنیا است که درک تنوع ژنتیکی بین ارقام آن، در انتخاب نوع رقم و انتقال ژن های مفید بین آن ها بسیار ارزشمند است. به منظور بررسی روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی ارقام بادام زمینی، ۱۰ رقم آن در یک مزرعه تحقیقاتی در لشت نشاء (گیلان) در سال زراعی ۱۳۹۵ در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی به صورت دیم با سه تکرار کاشته شد. پس از برداشت بذور ارقام بادام زمینی، پروتئین محلول به روش برادفورد و الکتروفورز پروتئین های بذر به روش SDS-PAGE انجام شد. در بررسی پروتئین محلول، رقم محلی گیلان (گلی) به تنهایی در گروه A قرار گرفت و در خوشه بندی گروه خود نسبت به سایر ارقام فاصله داشت. آنالیز باندهای پروتئینی با نرم افزار Total lab حضور ۱۷ باند اصلی و قابل رویت را بر روی ژل عمودی نشان داد. بیشترین سطح بیان پروتئین در باند شماره ۱۱ با وزن مولکولی تقریبی ۲۶ کیلو دالتون مشاهده شد که در تمام

۱*- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
(نویسنده مسئول mjamalomidi@pnu.ac.ir)
۲-مربی پژوهشی (دانشجوی دکتری اصلاح نباتات)، بخش تحقیقات زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
۳-کارشناس (دانشجوی دکتری زیست تکوینی)، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

رقم ها بیان شد. تجزیه خوشه ای باندهای پروتئینی به روش Ward و برش آن در ۵۰٪ تشابه، رقم ها را در ۴ گروه تقسیم کرد. رقم های ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ در گروه اول، رقم های ۳، ۴ و ۵ در گروه دوم و رقم های ۱ و ۲ به طور جداگانه در گروه های سوم و چهارم قرار گرفتند. در مجموع، نتایج به دست آمده نشان داد که تنوع کافی در مورد پروتئین های ذخیره ای دانه در میان ارقام بادام زمینی مورد مطالعه وجود داشت.

واژه های کلیدی: الکتروفورز، بادام زمینی، پروتئین، تنوع ژنتیکی

مقدمه

بادام زمینی (*Arachis hypogaea* L.) از بقولات یکساله است که به دلیل کیفیت بالای روغن و پروتئین دانه، در ۱۰۹ کشور جهان کشت می شود. این گیاه بومی منطقه جنوب شرقی آمریکا است که در صورت عدم دسترسی به گوشت، می تواند بخش ارزشمندی از پروتئین غذایی انسان را تامین کند. سالانه ۲۵/۷ میلیون تن بادام زمینی در سطح جهان از ۲۱ میلیون هکتار زمین زراعی تولید می شود، که آسیا با داشتن ۱۷/۹ میلیون تن بادام زمینی حدود ۷۰% از تولید این محصول را به خود اختصاص داده است (Wang et al., 2011). سطح زیر کشت بادام زمینی در ایران حدود ۳ هزار هکتار است که تقریباً ۲۸۰۰ هکتار آن در استان گیلان قرار دارد (راسخ و همکاران، ۱۳۸۵). جنس *Arachis* دارای ۷ گونه است که تقریباً همه آنها دیپلوئید هستند. علی رغم تنوع مورفولوژیکی بالا در خزانه ژنتیکی بادام زمینی، این تنوع به اندازه کافی در برنامه های اصلاحی بادام زمینی مورد استفاده قرار نگرفته است و بسیاری از ارقام زراعی موجود معمولاً بر پایه یک یا چند والد مشترک تولید شده اند (Al-saghir and Abdel-salam, 2015). مارکرهای پروتئینی برای مطالعه تنوع ژنتیکی بسیار موثر عمل می کنند. برخی از محققین، الکتروفورز پروتئین دانه بادام زمینی را برای تشخیص بین واریته های وحشی و زراعی آن موثر می دانند (Javaid et al., 2004). این روش همچنین می تواند به عنوان یک ابزار مفید و مورد اطمینان برای تشخیص رقم های زراعی خاص استفاده گردد (Bushehri et al., 2000). پروتئین های ذخیره ای دانه به دلیل اینکه به میزان زیادی مستقل از نوسانات محیطی هستند، برای مطالعه تنوعات ژنتیکی ارزشمندتر از پروتئین های رویشی (Vegetative proteins) می باشند (Nematollahi et al., 2013). مطالعات نشان دادند که تنوع موجود بین پروفایل های پروتئینی و پروتئین های ذخیره ای دانه بادام زمینی دارای قابلیت طبقه بندی گونه ای و حتی دورگ گیری بین گونه ای را دارد (Krishna et al., 2015). Javaid و همکاران (2004) پروتئین کل بذر ۱۵۰ توده بادام زمینی را که نماینده ۵ قاره بودند،

توسط روش SDS-PAGE ارزیابی کردند. در میان باندهای مشاهده شده ۵ باند برجسته در اکثر توده ها دیده شد و تنها ۸ توده در یک باند برجسته متفاوت بودند.

Alege و همکاران (2014) پروفایل پروتئین ذخیره دانه ۱۰ عضو از خانواده بقولات از جمله بادام زمینی را با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-PAGE بررسی کردند. نتایج آنها یک باند مشترک در تمام گیاهان مورد بررسی را نشان داد. آنها پیشنهاد کردند که می توان از این باند به عنوان باند عمومی در میان اعضای خانواده بقولات استفاده کرد. با توجه به کارآمد بودن این نشانگر در تفکیک ارقام درون خانواده بقولات و متفاوت بودن ژنوتیپ های مورد مطالعه در این تحقیق، هدف پژوهش حاضر بر ارزیابی تنوع ژنتیکی در ارقام بادام زمینی بر اساس الکتروفورز پروتئین های ذخیره دانه قرار گرفت.

مواد و روش ها

به منظور انجام این تحقیق ۹ ژنوتیپ بادام زمینی وارداتی از کشور هندوستان (موسسه تحقیقات ICRISAT) (جدول شماره۱) به همراه رقم NC2، رقم رایج محلی در گیلان مشهور به گلی (شاهد) به صورت دیم در سال زراعی ۱۳۹۵ در مزرعه آزمایشی در لشت نشاء (توابع رشت) و در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار کشت گردید. هر کرت آزمایشی دارای ۵ خط به فاصله ۵۰ سانتی متر از یکدیگر و هر خط شامل ۱۰ گیاه با فاصله ۳۰ سانتی متر در نظر گرفته شد. فاصله بین تکرارها و بین کرت ها یک متر در نظر گرفته شد.

جدول ۱: نام رقم های مورد مطالعه

ردیف	شناسه ژنوتیپ
۱	*ICGV*۰۰۴۴۱
۲	*ICGV*۹۷۱۲۸
۳	*ICGV*۹۶۱۷۷
۴	*ICGV*۰۱۲۶۰
۵	*ICGV*۰۰۳۵۱/۱
۶	*ICGV*۰۳۰۶۰
۷	*ICGV*۰۰۳۵۱/۲
۸	*ICGV*۹۲۰۴۰
۹	*ICGV*۹۵۱۴۸
۱۰	$NC_۲$، رقم رایج محلی در گیلان مشهور به "گلی"

پس از برداشت بذور بادام زمینی، جهت استخراج پروتئین ابتدا بذرها از غلاف خارج شدند، لپه ها و جنین موجود در آن ها توسط نیتروژن مایع تبدیل به پودر گردید. سپس جهت چربی زدایی پودرهای حاصله از هر رقم، به آنها استن سرد اضافه شد (Rostami and Ehsanpour, 2009). پودرهای فاقد چربی برای هر رقم در دمای اتاق و به مدت ۸ ساعت در جریان هوا خشک شدند.

سپس به پودرهای خشک شده هر رقم، محلول ۵۰ میلی مولار بافر تریس محتوی ۱ میلی مولار DTT، ۲ میلی مولار EDTA و ۲ میلی مولار مرکاپتواتانول pH ۷/۵= به نسبت ۱ به ۲۰ وزنی/ حجمی اضافه و به مدت ۲ تا ۳ ساعت بر روی شیکر با سرعت ۵۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ٤ درجه سانتی گراد تکان داده شدند (Rostami and Ehsanpour, 2009). پس از این مدت سوسپانسیون های حاصله به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm در ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. نمونه ها تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

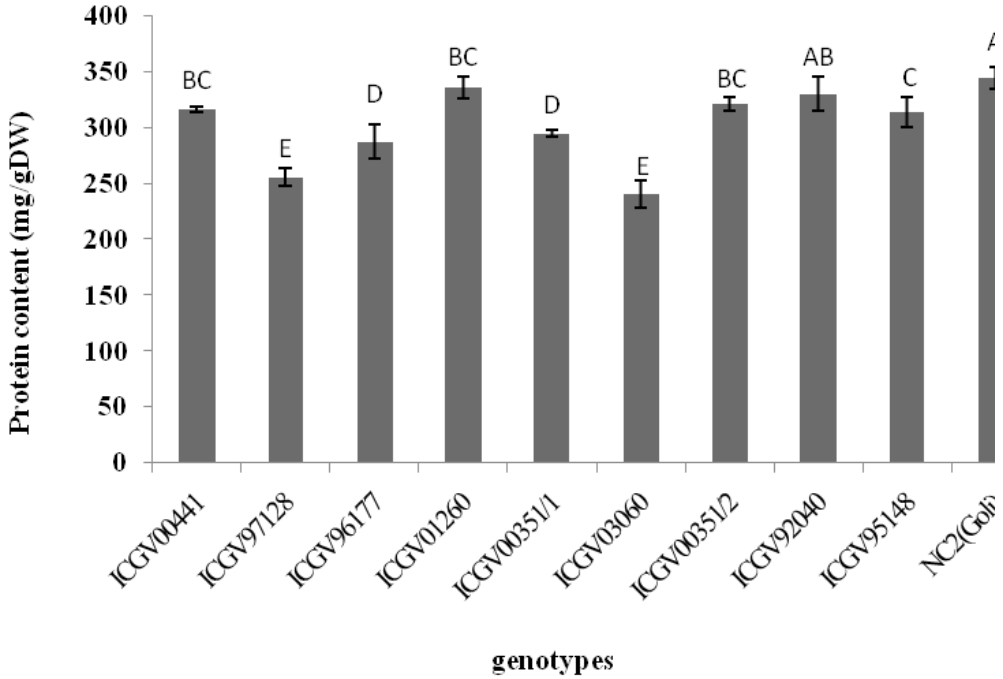
اندازه گیری پروتئین کل(میلی گرم در گرم پودر فاقد چربی) بر اساس روش تغییر یافته Bradford با استفاده از آلبومین سرم گاوی (*Bovine Serum Albomin*) به عنوان استاندارد انجام گرفت (Bradford, 1976). نمونه ها به نسبت ۱ به ۳ با بافر نمونه مخلوط و به مدت ۳ دقیقه جوشانده شدند. به طور متوسط ۲/۵ میلی گرم پروتئین در هر چاهک ژل تزریق شد. آنالیز SDS-PAGE با استفاده از ژل متمرکز کننده (Stacking) با غلظت ۵ درصد و ژل جداکننده (Separating) با غلظت ۱۲ درصد با استفاده از مارکر پروتئینی Protein ladder PLUS PS11 انجام گرفت. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت و با جریان متغیر به مدت ۲ ساعت انجام شد. باندهای پروتئینی با استفاده از نیترات نقره رنگ آمیزی شدند. برای این منظور ژل به مدت یک ساعت در محلول تثبیت کننده قرار گرفت و سپس سه بار با اتانول ۵۰ درصد و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه شستشو داده شد. سپس یک دقیقه در محلول تیوسولفات سدیم غوطه ور و سه بار به مدت ۲۰ ثانیه با آب شسته و در محلول رنگ آمیزی قرار گرفت و مجدداً سه بار هر بار ۲۰ ثانیه توسط آب مقطر شسته شد و سپس از محلول آشکار کننده جهت ظهور باندهای پروتئینی استفاده شد. تراکم نسبی باندهای پروتئینی به وسیله نرم افزار Total lab آنالیز گردید.

همه آزمایش ها در ۳ تکرار انجام و داده ها با کمک نرم افزار SPSS و آنالیز ANOVA و آزمون دانکن در سطح P<۰/۰۵ مقایسه گردیدند. برای تجزیه داده های الکتروفورزی، هر یک از باندهای الکتروفورزی به عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و به حضور و عدم حضور نوارها به ترتیب اعداد یک و صفر اختصاص داده شد. سپس با استفاده از نرم افزار SPSS ماتریس تشابه محاسبه و برای تجزیه خوشه ای از ضریب تشابه جاکارد (Coefficient Jaccard) استفاده شد.

نتایج

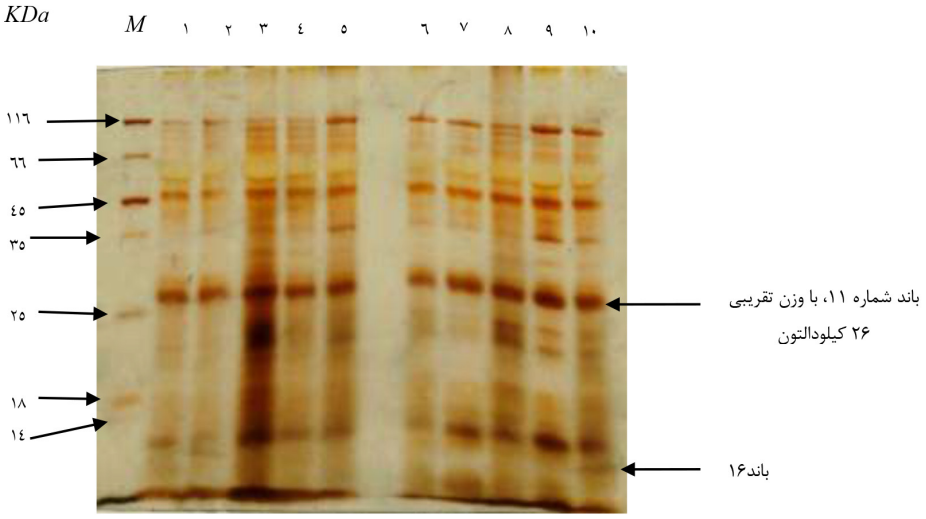
تغییرات غلظت پروتئین کل در رقم های مختلف مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. ابتدا منحنی استاندارد جذب، بر اساس جذب های خوانده شده، برای نمونه های استاندارد رسم و توسط شیب خط منحنی و معادله ی حاصل از این نمودار، غلظت پروتئین کل نمونه ها محاسبه شد. تجزیه واریانس نتایج نشان داد که در سطح احتمال ۵% بین رقم ها اختلاف معنی دار آماری وجود دارد، یعنی از نظر محتوای پروتئینی رقم های مورد مطالعه با یکدیگر تفاوت دارند. مقایسه

میانگین داده ها با دانکن (۵ درصد) نشان داد که میانگین داده ها در نمونه ها، دارای اختلاف معنی داری است. بیشترین مقدار پروتئین با ۳٤٤/۹۹ میلی گرم در گرم وزن خشک در ژنوتیپ گلی (رقم محلی گیلان) و کمترین آن به ترتیب با مقادیر ۲٤۰/۲ و ۲٤۰/۷ میلی گرم در گرم وزن خشک در رقم های ICGV۹۷۱۲۸ و ICGV۰۳۰٦۰ مشاهده شد. به این ترتیب رقم محلی گیلان در گروه جداگانه A قرار گرفت. پس از آن رقم ICGV۹۲۰٤۰ در گروه AB، سه رقم ICGV۰۰٤٤۱، ICGV۰۱۲٦۰ و ۲/ICGV۰۰۳۵۱ با هم در گروه BC، رقم ICGV۹۵۱٤۸ در گروه C، رقم های ICGV۹٦۱۷۷ و ۱/ICGV۰۰۳۵۱ در گروه D و در نهایت دو رقم ICGV۹۷۱۲۸ و ICGV۰۳۰٦۰ در یک گروه E قرار گرفتند.



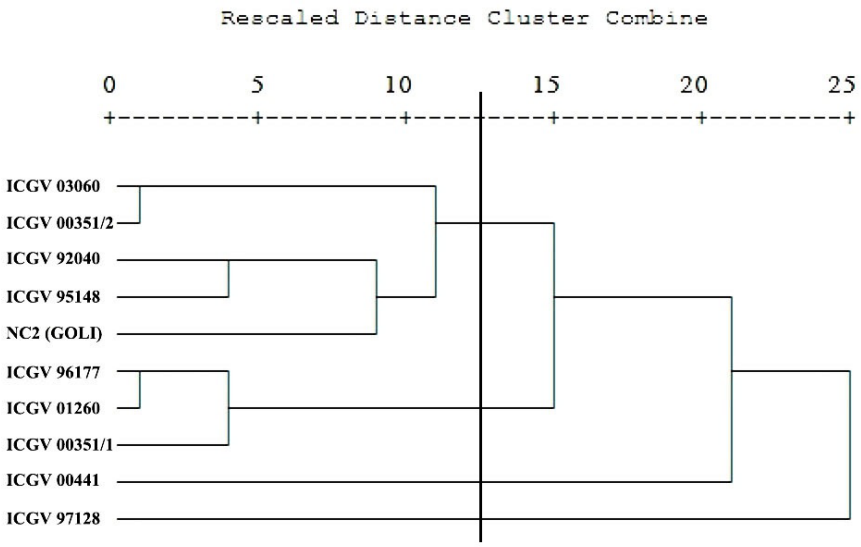
شکل۱: تغییرات محتوای پروتئینی ارقام بادام زمینی به روش برادفورد داده ها میانگین ۳ تکرار SD و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار (P<0/05) بر اساس آزمون دانکن می باشد.

شکل ۲: باندهای پروتئینی موجود در بذر ۱۰ رقم بادام زمینی را بر روی ژل پلی آکریل آمید (SDS–PAGE) ۱۲% نشان می دهد.



شکل ۲: تصویر الگوی باندی بر روی ژل الکتروفورزی ۱۲% (رنگ آمیزی شده با نیترات نقره) شماره ارقام بر مبنای جدول ۱ می باشد.

ژل در نرم افزار Total lab آنالیز شد. تعداد باند، وزن مولکولی، Rf، سطح (Area)، حجم (Volume) و پیک (Peak) تمام باندهای شناسایی شده، استخراج گردید. تعداد نوارهای اصلی و قابل رویت در روش رنگ آمیزی با نیترات نقره ۱۷ باند بود. باندهایی با Rf ۰/۱۰٤، ۰/۱٦۱، ۰/۲۳۹، ۰/۲٦٦، ۰/۵۰۸ و ۰/۸٤۸ در تمامی ارقام مشترک بودند. بیشترین تعداد باند مربوط ارقام ۹ و ۱۰ و کمترین آن مربوط به رقم ۲ بود. بیش ترین حجم (Volume) و سطح (Area) به باند با Rf ۰/۵۰۸، باند ۱۱ (با وزن تقریبی ۲٦ کیلودالتون) مربوط بود که در تمامی ارقام مشترک بود. بزرگترین پیک (Peak) نیز در همین باند دیده شد. باند ۱٦ (با وزن تقریبی ۷ کیلودالتون) در دو رقم ۲ و ۱۰ (رقم محلی گیلان) مشاهده شد و در سایر ارقام بیان نشد. باند ۸ (با وزن تقریبی ۳۹ کیلو دالتون) تنها در دو رقم ٦ و ۸ مشاهده شد. پس از بررسی میزان بیان باندهای پروتئینی مشخص گردید که باند ۱ (با وزن تقریبی ۱۱٦ کیلو دالتون) تنها در رقم ۱ و دو باند ۲ و ۱۳ (با وزن تقریبی ۱۰۲ و ۲٤کیلو دالتون) تنها در رقم ۲ قابل تشخیص نبوده در حالیکه بیان این باندهای پروتئینی در سایر ارقام بادام زمینی مشاهده شد. بیشترین سطح بیان پروتئین در باند شماره ۱۱ (با وزن تقریبی ۲٦ کیلو دالتون) بود که در تمام ارقام بیان شد. شکل ۳- دندروگرام روابط خویشاوندی ارقام مورد بررسی بادام زمینی را بر اساس داده های باندهای پروتئینی نشان می دهد.



شکل ۳: نمودار خوشه بندی به روش Ward بر اساس باندهای پروتئینی دانه در ۱۰ رقم بادام زمینی مورد مطالعه

بر اساس نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه ای و برش آن در ناحیه ۵۰% تشابه ارقام در ٤ گروه قرار گرفتند. ارقام ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ با هم در گروه اول، ارقام ۳، ٤ و ٥ در گروه دوم و دو رقم ۱ و ۲ هرکدام به طور جداگانه در گروه های سوم و چهارم قرار گرفتند. البته در داخل هر گروه نیز تفاوت های چشمگیری قابل مشاهده است.

بحث و نتیجه گیری

داشتن اطلاعات کافی در مورد درجه تشابه ژنتیکی در مورد ژنوتیپ های مختلف گیاهان اهمیت خاصی در برنامه اصلاح گیاهان دارد. چنین اطلاعاتی برای شناسایی گروه های ناهمگون و انتخاب والدها در دورگ گیری و ایجاد هیبریدها، مفید و با ارزش است (Bonato et al., 2006). الکتروفورز پروتئین ها یک ابزار قوی برای تشخیص تنوع ژنتیکی است و مخصوصاً SDS-PAGE پروتئین های دانه به عنوان یک تکنولوژی قابل اطمینان در نظر گرفته می شود. الگوی الکتروفورزی پروتئین ها می تواند باندهایی را به عنوان نشانگر مولکولی معرفی نماید و در این خصوص بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین های ذخیره ای بذر به دلیل عدم تاثیر پذیری آنها از محیط اهمیت خاصی دارند (Dvoracek et al., 2003 & Javid et al., 2004 & Iqbal et al., 2005). عوامل محیطی روی پروتئین های بذور رسیده بی تاثیر یا کم تاثیر هستند و همانند ایزوزیم ها، نحوه توارث آنها به صورت همبارز است (Magni et al., 2007). بنابراین الگوی پروتئینی بذرهای بادام زمینی بر پایه حضور و عدم حضور باندهای پروتئینی به عنوان نشانگرهای پروتئینی می

توانند تنوع ژنتیکی را در میان ارقام مشخص سازد. به طوریکه می توان در این مطالعه باند شماره ۵ را به عنوان نشانگر رقم ۱، باند شماره ۱۶ را به عنوان نشانگر ارقام ۲ و ۱۰ و یا عدم حضور باند شماره ۱ در رقم شماره ۱ و عدم حضور باندهای ۲ و ۱۳ را در رقم ۲ به عنوان نشانگر برای این ارقام پیشنهاد کرد. هر چند اکثر تجزیه و تحلیل های پروتئین های ذخیره در گونه هایی به کار رفته که بذر یا فراورده شان قسمت خوراکی آنهاست، با این حال پروتئین های بذر برای شناسایی ارقام مراتع نیز به کار رفته است (Abde Mishani and Boushehri,1997). مشابه با مطالعه حاضر، الگوی SDS-PAGE پروتئین های بذر به عنوان شناساگرهای پروتئینی برای شناسایی و مقایسه رقم های سویا (رضوی زاده و احسانپور، ۱۳۹۱)، جو دوسر (Dvoracek et al., 2003)، گونه های پسته (Ehsanpour et al., 2010) و ارقام براسیکا (Sadia et al., 2009) استفاده شده اند. نتایج بررسی روابط خویشاوندی بر اساس الگوی پروتئینی دانه های ارقام بادام زمینی نشان داد،که رقم های ۳، ٤ و ۵ و از طرفی ۸، ۹ و ۱۰ بیشترین شباهت و رقم های ۱ و ۲ کمترین شباهت را با سایر ارقام دارند.

در مطالعه ی که رضوی زاده و احسانپور (۱۳۹۱) بر روی هفت رقم سویا انجام دادند، پروتئین محلول کل دانه و الگوی پروفایل باندهای پروتئینی را با روش SDS-PAGE بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که تنها در یک رقم محتوای پروتئین کل به صورت معنی داری نسبت به سایر واریته ها کمتر بود. دندروگرام به دست آمده بر اساس باندهای پروتئینی دانه در ارقام سویا نیز شش رقم سویا را در یک گروه و یک رقم ساری را به تنهایی در گروه دیگر قرار داد. Valizadeh (2001) پروفایل پروتئین بذر ٤٧ توده متعلق به یازده گونه و چهار قبیله از خانواده حبوبات را با استفاده از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید بررسی کرد. نتایج نشان داد که تمام گونه ها از طریق الگوی باندهای پروتئینی قابل تمایزند، اما تنها لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) تنوع درون گونه ای بالا از خود نشان داد. تجزیه خوشه باندهای پروتئینی رقم بادام زمینی را به طور کامل در گروه جداگانه و بافاصله ای قرار داد. در بررسی پروتئین محلول، رقم محلی گیلان(گلی) به تنهایی در گروه A قرار گرفت و در خوشه بندی گروه خود نسبت به سایر ارقام فاصله دارد، که می توان از این رقم به عنوان یکی از والدین در دورگ گیری و برنامه های اصلاحی استفاده نمود. در کل نتایج وجود تنوع کافی بین ژنوتیپ ها را در گروه بندی نشان می دهد. با توجه به تنوع بالا در صفات مورفولوژی ارقام بادام زمینی بررسی توام صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و مقایسه تجزیه خوشه ای آنها توصیه می شود.

سپاسگزاری

از همکاران دانشگاه پیام نور استان گیلان که نویسندگان را در انجام این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

راسخ، ح. صفرزاده ویشکایی، م. ن. و اصغری، ج. (۱۳۸۵) واکنش عملکرد و صفات کیفی بادام زمینی (*Arachis hypogaea* L.) به تراکم بوته و آرایش کاشت در گیلان، مجله علوم کشاورزی ۲: ۳۹۵-۳۸۷.

رضوی زاده، ر. و احسانپور، ع. ا. (۱۳۹۱) کاربرد نشانگر پروتئین های ذخیره ای بذر در جداسازی هفت رقم سویا (*Glycine max*)، مجله سلول و بافت ۳: ۳۲۶-۳۱۹.

Abde Mishani, S. and Shahnejate Boushehri, A. A. (1997) Supplementary of plant breeding. Tehran University Press, Tehran, Iran.

Alege, G. O., Abu Ngozi, E. and Sunday, C. E. (2014) Seed storage protein electrophoresis of some members of the family Fabaceae. African Journal of Biotechnology 13: 3730-3735.

Al- Saghir, M. G. and Abdel- Salam, A. S. (2015) Genetic Diversity of Peanut (*Arachis hypogea* L.) Cultivars as Revealed by RAPD Markers. American Journal of Plant Sciences 6: 2303-2308.

Bonato, A.V., CalvoII, E.S., Geraldi, I.O. and Arias, A.A. (2006) Genetic similarity among soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars released in Brazil using AFLP markers. Genetics and Molecular Biology 29: 692-704.

Bushehri, S. A. A., abd-Mishani, C., Yazdi- Samadi, B., Sayed- Tabatabaei, B. E. (2000) Variety specific electrophoretic profiles of soybean cultivars. Iranian Agriculture Science Journal 31: 55-61.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing of protein– day binding. Analytical Biochemistry 72: 248–254.

Dvoracek, V., Curn, V. and Moudry, J. (2003) Suitability of oat-seed storage-protein markers for identification of cultivars in grain and flour samples. Plant, Soil Environment 49: 486-491.

Ehsanpour, A. A., Shojaie, B. and Roatami, F. (2010) Characterization of seed storage protein patterns of four Iranian Pistachios using SDS-PAGE. Natural Science 2: 737-740.

Iqbal, S.H., Ghafoor, A. and Ayub, N. (2005) Relationship between SDS-PAGE markers

and *Ascochyta* blight in chickpea. Pakistan Journal of Botany 37: 87-96.

Javaid, A., Ghafoor, A. and Anwar, R. (2004) Seed storage protein electrophoresis in groundnut for evaluating genetic diversity. Pakistan Journal of Botany 36: 25-29.

Krishna, G., Singh, B. K., Kim, E. K., Mrya, V.K. and Ramteke, P.W. (2015) Progress in genetic engineering of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Biotechnology Journal 13:147-162.

Magni, C., Scarafoni, A., Herndl, A. and Sessa, F. (2007) Combined 2D electrophoretic approaches for the study of white lupin mature seed storage proteome. Phytochem 68: 997-1007.

Nematollahi, A. KH., Golein, B., Vadati, K. (2013) Analysis of genetic diversity in Citrus (*Citrus* spp.) species using SSR markers. Journal of Plant Physiology and Breeding 3: 41-49.

Rasekh, H., safarzadeh wishkahi, M. N. and Asghari, J. (2006) Response of yield and qualitative characteristics of peanut (Arachis hypogaea L.) to planting pattern and plant density in guilan province. Journal of Agricultural Sciences 12(2):387-395(in persian)

Razavizadeh, R. and Ehsanpour, A.A. (2013) Application of seed storage protein marker for identification of seven soybean (Glycine max) cultivars. Journal of Cell and Tissue 3(4):319-324 (in persian)

Rostami, F., Ehsanpour, A. A. (2009) Application of silver thiosulfate (STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Solanum tuberosum* L.) under in vitro cultivar. Malaysian Applied Biology 38: 49-54.

Sadia, M., Salman, A. M., Rabbani, M. A., Pearce S. R. (2009) Electrophoretic characterization and the relationship between some *Brassica* species. Electron Journal of Biology 5: 1-4.

Valizadeh, M. (2001) Seed storage protein profile of grain legumes grown in Iran, using SDS-PAGE. Journal of Agriculture Science Technology 3:287-292.

Wang, X.J., Liu, S. T., Xia, H., Wan, S. B., Zhao, C.Z. and Li, A. Q. (2011) Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Omics and Biotechnology in China. Plant Omics Journal 4: 339-349.