DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2014.7666

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۲، شماره ۱، صفحه ۴۲-۳۴ (۱۳۹۳)

بررسی تنوع ژنتیکی در تعدادی از ژنوتیپ‌های بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*.L) با بررسی صفات ریختی، بیوشیمیایی و پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

میترا امام*[۱]، فرشته اسدی کرم[۲]، حسین میرزایی ندوشن[۳]، کامکار جایمند[۴]و عباس قمری زارع[۵]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
پست‌الکترونیک: memam@rifr-ac.ir
۲- کارشناس ارشد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۳- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۴- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۵- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۰۶

چکیده

گونه بادام کوهی (*Amygdalus scoparia* L.) به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم دارویی و تجاری از خانواده گل سرخ و مقاوم به خشکی و گرماست. با توجه به اینکه کشور ما دارای آب و هوای خشک بوده، توسعه کشت و کار گونه‌های مختلف بادام در مناطق مناسب ضروری به‌نظر می‌رسد. گونه بادام کوهی به طور طبیعی بذر تلخ تولید می‌کند و تاکنون بذر تنها یک پایه از این گونه در شهرستان نائین، شیرین گزارش شده است و با توجه به اهمیت شیرین بودن بذر این گونه از نظر اقتصادی و نیز به‌منظور حفظ ذخایر ژنتیکی در عرصه‌های طبیعی، در این تحقیق ژنوتیپ‌هایی از این گونه با بذر تلخ و شیرین و براساس خصوصیات ریختی و ترکیبات شیمیایی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. صفات ریختی نظیر طول و عرض برگ، طول شاخه و دمبرگ، وزن بذر و مغز ژنوتیپ‌های مختلف اندازه‌گیری و مقایسه شدند. تجزیه شیمیایی عصاره و مقایسه آن با استاندارد، برای تعیین میزان آمیگدالین آنها انجام شد. استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر دو پایه (با بذر شیرین و تلخ) نیز با استفاده از تکنیک SDS-PAGE، پروفیل ژنوتیپ‌هایی از این گونه را مشخص نمود. از نظر صفات ریختی، نتایج نمایانگر آن بود که میانگین طول شاخه، طول و عرض برگ، قطر و وزن بذر در مورد پایه شیرین کمتر از پایه تلخ بود ولی میانگین طول دمبرگ در مورد پایه شیرین بیشتر از پایه تلخ و در مورد عرض برگ در هر دو ژنوتیپ مقادیر، با هم مساوی بودند. نتایج بررسی‌های شیمیایی عصاره بذر نیز نمایانگر میزان کمتر آمیگدالین در ژنوتیپ شیرین نسبت به تلخ بود. نتایج حاصل از پروفیل پروتئینی، تفاوت‌هایی را بین دو پایه مشخص نمود و نشان داد که با استفاده از این روش می‌توان برای مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف این گونه استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: بادام کوهی، ریختی، بیوشیمیایی، تنوع، پروتئین ذخیره‌ای بذر

مقدمه

گونه بادام کوهی، با نام علمی *Amygdalus scoparia* L. یکی از گیاهان تیره گل سرخ و متعلق به دولپه‌ای‌ها می‌باشد. درخت بادام از درختان میوه بومی مناطق با آب و هوای مدیترانه‌ای آسیای غربی است. این درخت یا درختچه بی‌خار با شاخه‌های کوتاه یا فاقد آن، با برگ‌های متناوب و خزان‌کننده بوده و گل‌ها قبل از باز شدن برگ‌ها ظاهر می‌شوند. میوه آن شفت مانند با فرابر خشک است. درخت بادام دارای یک سیستم ریشه‌بندی قوی عمودی و تاج مدور است و ریشه‌های قوی آن امکان

می‌دهد که حتی در شرایط نامساعد خاک و با کمی رطوبت نیز رشد کند و به حیات خود ادامه دهد. این درخت تقریبا در تمام خاک‌ها رشد می‌کند؛ ولی خاک‌های آهکی را ترجیح می‌دهد و از خاک‌های پررطوبت و بدون زهکش صدمه می‌خورد. برگ‌های آن ساده و در شاخه‌های تازه سال اول با فرم بیضی باریک دراز و نوک تیز با رنگ سبز ظاهر می‌شود. گل‌های آن که روی شاخه‌های سال دوم ظاهر می‌شود در اوایل بهار قبل از باز شدن جوانه‌های درخت بیرون می‌آیند. بادام دو نوع عمده دارد: یکی درخت بادام با میوه شیرین و نام علمی آن *Prunus amygdalus* می‌باشد و دیگری با میوه تلخ و نام علمی *Amygdalus scoparia* L. است. نوع شیرین بادام گل‌های صورتی تولید می‌کند و مغز آن حاوی روغن نافرار و امولسیون است. نوع بادام تلخ، گل‌های سفید دارد و نسبتا پهن‌تر و کوتاه‌تر از نوع شیرین بوده و حاوی تقریبا ۵۰ درصد روغن نافرار موجود در بادام‌های شیرین می‌باشد (Khatamsaz, 1992). میوه بادام از تخمدان یک خامه‌ای گل بادام که دارای دو تخمک است به وجود می‌آید و معمولا یکی از این دو تخمک بارور می‌شود و به صورت شفت که قشر خارجی آن گوشتی و سبز رنگ و پوشیده از کرک است می‌باشد، ولی پس از رسیدن بادام به‌ترتیب این پوشش سبز گوشت‌دار، خشک می‌شود و در داخل آن پوست سفت و سخت بادام که مغز بادام داخل آن است رشد کرده و در نهایت بادام رسیده آماده چیدن می‌شود. پوست تنه، برگ و مغز بادام حاوی گلیکوزیدهای سیانوژنیک سمی است. مغز بادام شیرین و با طعم ملایم و خوشمزه‌ای است و به‌سهولت از بادام تلخ تشخیص داده می‌شود. از کلیه قسمت‌های درخت بادام شیرین مانند شکوفه، برگ و میوه آن استفاده طبی می‌شود. مغز بادام اهمیت تجاری خاصی داشته و یکی از اقلام صادراتی می‌باشد. بادام تلخ دارای ماده مخصوصی (۱ تا ۳ درصد) بنام آمیگدالین می‌باشد. آمیگدالین ماده متبلوری با فرمول خام H2O، NO113، H27 و C20 است که از اثر آب بر روی این ماده اسید سیانیدریک، آلدئید بنزوئیک و گلوکز حاصل می‌شود که برای تهیه داروهای مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. البته ممکن است بادام تلخ بین ۶ تا ۸ درصد سیانید هیدروژن تولید نماید.

اسانس بادام تلخ (آلدئید بنزوئیک) در عطرسازی بکار می‌رود و همچنین از آن رنگ سبزی بنام مالاشیت (Malachite) درست می‌کنند (Izaddoost,1984). ترکیبات گلیکوزید سیانوژنیک در بافت‌های مختلف گیاهان مانند بافت‌های رویشی و بذر وجود دارد و گیاهان بسیاری قادر به سنتز این ترکیبات هستند. حداقل ۲۵۰۰ گونه گیاهی از خانواده رزاسه، گرامینه، لیناسه و کمپوزیته قادر به سنتز یکی از ترکیبات سیانوژنیک هستند. اغلب ترکیبات سیانوژنیک دارای ترکیبات قندی ساده (مونوگلیکوزید) مثل پرونازین یا (دی‌گلیکوزید) مانند آمیگدالین می‌باشند (Yadollahi *et al*., 2007). در ایران، طرح‌های مختلفی در زمینه شناسایی گونه‌ها و ارقام بادام اصفهان از لحاظ تعیین خواص زراعی و مورفولوژیکی آنها و نیز بررسی گوناگونی ژنتیکی توده‌های وحشی بادام با استفاده از نشانگرهای مولکولی (Kadkhodaie *et al*., 2007) و نشانگرهای رپید (Kadkhodaie *et al*., 1993) و نیز در زمینه تنوع ژنتیکی توده‌های وحشی بادام استان اصفهان با استفاده از صفات مورفولوژیکی و پروتئین ذخیره‌ای بذر (Zeinolabedini, 2006) مورد ارزیابی قرار گرفت. این تحقیق در زمینه بررسی تنوع ریختی، بیوشیمیایی و ژنتیکی ژنوتیپ‌هایی از بادام کوهی نائین انجام شد.

مواد و روش‌ها

روش تهیه مواد اولیه و استخراج عصاره از بذر

بذرهای بادام کوهی، از پایه‌های شیرین و تلخ در منطقه چاه‌گربه انارک نائین در ماه خرداد جمع‌آوری شد و پس از پوسته‌برداری در هاون چینی و با کمک ازت مایع پودر شده و توزین با ترازوی معمولی انجام شد. میزان ۲ گرم پودر از هر ژنوتیپ برداشت شده و در سه مرحله با اتانول خالص (هر مرحله ۲۰ میلی‌لیتر) و هر بار به مدت یک ساعت بر روی هم‌زن- هیتر مغناطیسی (حرارت ۷۰ درجه سانتی‌گراد و ۹۲۰ دور در دقیقه) بازیافت گردید. مخلوط حاصل با کاغذ صافی صاف شده و محلول رویی که دارای حلال اتانل بود، در دستگاه تقطیر در خلأ گردشی قرار گرفت و حلال مزبور جدا شد. سپس نمونه به‌دست آمده با اتر و ان-بوتانول به نسبت ۱:۱ و از هر کدام ۱۰ میلی‌لیتر حل گردیده و حلال اتر

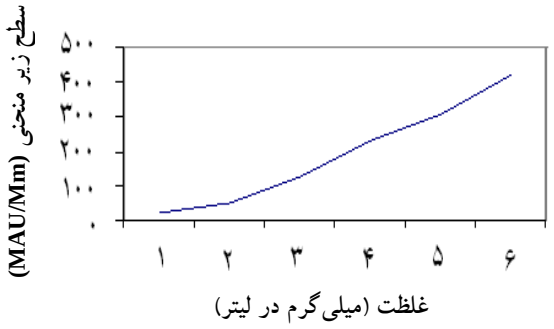
آن، به‌وسیله ارتعاش صوتی به مدت ۲۰ دقیقه تصعید گردید. سپس فاز ان- بوتانول محلول، به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسیده و آماده تزریق به دستگاه HPLC گردید.

طرز تهیه محلول استاندارد آمیگدالین

از استاندارد آمیگدالین، محلول‌هایی با غلظت ۴۰۰ تا ۸۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه و در میزان ۲۰ میکرولیتر برای هر غلظت به دستگاه HPLC تزریق و منحنی استاندارد حاصل در برنامه نرم‌افزاری Excell ترسیم شد (شکل ۱). عصاره نمونه‌های مجهول دو ژنوتیپ (شیرین و تلخ) در دو تکرار از تیمار غلظتی مورد بررسی (جدول ۵ ردیف از ۷ تا ۱۰، به‌ترتیب ۷ و ۸ شیرین- ۹ و ۱۰ تلخ) به دستگاه تزریق گردید. داده‌های مربوط به زمان خروج منحنی (Ret. time)، میزان غلظت آمیگدالین این تیمارها (برحسب میلی‌گرم در لیتر) و سطح و ارتفاع پیک خروجی منحنی در جدول ۵ ارائه شده است.

بررسی میانگین شاخص‌های ریختی

در فصول مختلف سال ثبت اطلاعات مربوط به خواص ریختی براساس محاسبه طول و عرض برگ، طول شاخه و دمبرگ، ابعاد بذر و مغز و وزن مغز دانه دو ژنوتیپ بادام کوهی انجام شد (جدول ۱). **تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS** و در قالب آزمایش فاکتوریل در طرح بلوک‌های کامل تصادفی، با سه تکرار برای هر صفت (صفات **طول شاخه، طول و عرض برگ، طول دمبرگ، طول و عرض بذر و طول و عرض و وزن مغز دانه**) در نظر گرفته شد.



شکل۱- منحنی استاندارد آمیگدالین
(برحسب غلظت نمونه/ سطح زیر منحنی)

جدول ۱- داده‌های ریختی (شاخص‌های رشدی) دو ژنوتیپ تلخ و شیرین بادام

نوع بادام	طول شاخه (cm)	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	طول دمبرگ (cm)	طول مغز دانه (cm)	عرض مغز دانه (cm)	طول بذر (cm)	عرض بذر (cm)	وزن مغزدانه (gr)
شیرین	۴۰-۳۸	۱/۸-۱/۷	۰/۲۲-/۲	۰/۵۳-/۵	۰/۴۵-۰/۵	۰/۳۲-۰/۴	۱-۱/۲	۰/۵۵-۰/۴	۰/۳۷-۰/۳۲
تلخ	۶۰-۵۸	۲/۲-۲	۰/۲۲-/۲	۰/۲۴-/۲	۰/۴۵-۰/۵	۰/۳-/۳۵	۱/۱-۱/۴	۰/۴۵-۰/۵	۰/۴۸-/۴۳

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های بادام‌کوهی با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر: در هر پایه تلخ و شیرین، از ۵ بذر (۵ ژنوتیپ مختلف) برای استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای با روش الکتروفورز SDS-PAGE به‌منظور تفکیک آنها براساس وزن مولکولی استفاده شد (جدول ۲). استخراج پروتئین هر بذر به‌طور جداگانه انجام شد. به‌این صورت که هر بذر در هاون چینی سائیده شد و متناسب با وزن هر بذر (۳ میلی‌لیتر بافر به ازاء هر ۰/۲ گرم بذر) مقادیر لازم از بافر استخراج (گلیسین ۰/۴ ml، تریس Mm۴۶۰ و اسیدیته ۸/۳) را به نمونه‌ها افزوده و مخلوط حاصل به مدت ۷ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول زیری برای بار دوم سانتریفیوژ شده و تا زمان مصرف در فریزر نگهداری شد (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۰).

جدول ۲- پایه‌ها و کدهای اختصاری

گونه *Amygdalus scoparia.L*

ردیف	پایه	کد اختصاری
۱	بادام شیرین	O(1-5)
۲	بادام تلخ	B(1-5)

تعیین غلظت پروتئین‌های مجهول

از روش بردفورد جهت سنجش کمی پروتئین‌ها و از سرم آلبومین گاوی در هفت غلظت ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵ (میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌عنوان پروتئین‌های استاندارد به نحو زیر استفاده شد. ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر روی طول موج ۵۹۵ نانومتر تنظیم شد؛ سپس محلول‌های پروتئین استاندارد مزبور به‌ترتیب در دستگاه قرار داده شدند و میزان جذب نوری نمونه‌های مجهول یا پروتئین‌های استخراج شده از نمونه‌های بذری در دستگاه خوانده شد. با استفاده از غلظت پروتئین‌های معلوم، خط رگرسیون ترسیم شد و منحنی استاندارد با پلات کردن مقادیر جذب نوری خوانده شده توسط دستگاه، در مقابل غلظت‌های معلوم آنها رسم شد. سپس معنی‌دار بودن ضریب رگرسیون و عرض از مبدأ این خط آزمون شد. بعد از مشخص شدن معادله نهایی خط رگرسیون، با استفاده از مدل رگرسیون حاصل، غلظت پروتئین در نمونه‌های مورد بررسی معلوم و به این ترتیب میزان پروتئین لازم برای بارگیری بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید تعیین شد.

اجرای الکتروفورز

به‌منظور بارگیری پروتئین‌ها بر روی ژل آکریل‌آمید ابتدا ۲۰ میکرولیتر از پروتئین استخراج شده را با ۲۰ میکرولیتر بافر نمونه (تریس – اسید ۷۷ میلی مول، سدیم دو دسیل فسفات ۴٪ و مرکاپتواتانل ۱۰٪، گلیسرل ۲۰٪ و برومومفنل بلو ۱٪ با pH: 6.8) مخلوط شده و به مدت ۳ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفته و آماده بارگیری شدند. از سیستم بافری ناپیوسته با ژل اکریل‌آمید استفاده شد. در زمان بارگیری از هر نمونه به تناسب تراکم پروتئین‌ها در عصاره‌های استخراج شده بین ۱۰ تا ۲۰ میکرولیتر از پروتئین حرارت دیده در درون هر چاهک بارگیری شده و نمونه‌ها با شدت جریان متوسط ۴۰mA الکتروفورز شدند و پس از تثبیت با TCA ۲۰٪ و شستشو با آب مقطر به مدت یک شب در دمای محیط در محلول رنگ کماسی‌بلو رنگ‌آمیزی شد. با توجه به این که باندهای پروتئینی و تنوع آنها، مبنای مقایسه ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مورد مطالعه بود، هر باند به‌عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و حضور یا عدم حضور هر باند بر روی ژل با اعداد صفر و یک مشخص گردید. سپس ماتریس عددی حاصل شد که مشتمل بر ۱۰ سطر (تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه) و ۳۵ ستون (تعداد باندها) بود. فاصله هر یک از مقرهای باندی از مبدأ ژل به سانتی‌متر و مجموع فواصل باندهای موجود در پروفیل هر ژنوتیپ تعیین که به‌عنوان صفت مکمل به ماتریس عددی مذکور افزوده و این ماتریس عددی با استفاده از نرم‌افزار JMP، مورد تجزیه خوشه‌ای به روش Ward قرار گرفت و از دندروگرام حاصل برای دسته‌بندی و مطالعه قرابت و شباهت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه استفاده و باندهای مشاهده شده از نظر کیفی نیز مقایسه شدند.

جدول۳- بررسی میانگین شاخص‌های رشدی دو ژنوتیپ تلخ و شیرین بادام در دو فصل بهار و تابستان

فصل و نوع بادام	طول شاخه (cm)	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	طول دمبرگ (cm)	طول مغز دانه(cm)	عرض مغز دانه(cm)	طول بذر (cm)	عرض بذر (cm)	وزن مغز(gr) دانه
بهار (شیرین)	۳۸	۱/۷	۰/۲	۰/۵	۰/۵	۰/۴	۱/۲	۰/۴	۰/۳۲
تابستان (شیرین)	۴۰	۱/۸	۰/۲۲	۰/۵۳	۰/۴۵	۰/۳۲	۱	۰/۵۵	۰/۳۷
بهار (تلخ)	۵۸	۲	۰/۲	۰/۲	۰/۵	۰/۳۵	۱/۴	۰/۵	۰/۴۳
تابستان (تلخ)	۶۰	۲/۲	۰/۲۲	۰/۲۴	۰/۴۵	۰/۳	۱/۱	۰/۴۵	۰/۴۸

نتایج

نتایج بررسی‌های ریختی ژنوتیپ‌های شیرین و تلخ، نمایانگر آن است که میانگین شاخص‌های رشدی طول شاخه، طول برگ، وزن بذر و قطر طولی بذر در مورد ژنوتیپ شیرین کمتر از تلخ بود، ولی میانگین شاخص طول دمبرگ در مورد پایه شیرین بیشتر از تلخ و در مورد عرض برگ، قطر طولی مغز و قطر عرضی بذر در هر دو ژنوتیپ مقادیر میانگین‌ها، با هم مساوی بودند. همچنین در فصول مختلف سال مقادیر مربوط به شاخص‌های مورد بررسی افزایش یافتند (جدول ۳).

در بررسی تفاوت میانگین مربعات شاخص‌های رشد از طریق تجزیه واریانس، میانگین طول دمبرگ و برگ و همچنین وزن مغز دانه در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی در سطح تفاوت ۱ درصد معنی‌دار بوده و بقیه شاخص‌های رشد فاقد تفاوت معنی‌دار بودند. در حالی‌که این تفاوت از نظر فصل رویش و تنها برای شاخص وزن مغز دانه و در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول۴).

جدول ۴- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات طول برگ و دمبرگ و وزن مغزدانه تحت تأثیر ژنوتیپ و فصل رویش

منابع تغییر	درجه آزادی	طول دمبرگ	طول برگ	وزن مغز دانه
ژنوتیپ	۱	۰/۲۷**	۰/۳۶**	/۰۳۹**
فصل	۱	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۰۶^{ns}	۰/۰۰۷*
تکرار	۲	۰/۰۰۳^{ns}	۰/۱۶*	۰/۰۰۵^{ns}
خطا	۷	۰/۰۱۲	۰/۰۲۴	۰/۰۰۱

**، * و ns: به‌ترتیب به مفهوم معنی‌دار در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و بدون معنی‌داری

نتایج بررسی‌های شیمیایی عصاره بذر بادام شیرین و تلخ نیز نمایانگر میزان بیشتر آمیگدالین در ژنوتیپ تلخ نسبت به شیرین بود (جدول۵).

جدول ۵- مختصات میزان آمیگدالین، زمان خروج پیک منحنی و ارتفاع و سطح آن در مقایسه با منحنی استاندارد

ردیف	غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	سطح زیر منحنی (میلی‌آمپرواحد/دقیقه)	ارتفاع (میلی‌آمپر واحد)	زمان خروج (دقیقه)
۱	۴۰۰	۲۱/۲۸۷	۲۰/۳۵۲	۱۰/۷۰۰
۲	۱۰۰۰	۵۱/۲۱۱	۳۶/۸۸۱	۱۰/۹۲۵
۳	۲۰۰۰	۱۲۶/۱۶۳	۹۴/۱۱۹	۱۰/۹۵۶
۴	۴۰۰۰	۲۳۰/۴۵۳	۱۶۳/۴۷۹	۱۱/۰۳۳
۵	۶۰۰۰	۳۰۵/۵۲۷	۲۰۷/۸۱۲	۱۱/۲۱۰
۶	۸۰۰۰	۴۱۷/۵۵۲	۲۸۲/۴۹۵	۱۱/۲۳۳
۷	۶۹۳/۹۰۶	۳۶/۷۹۹	۳۷/۹۱	۱۲/۰۸۳
۸	۱۱۱۴/۸۲	۵۹/۱۲۰۷	۴۵/۲۲۷	۱۲/۶۵
۹	۲۹۹۳/۴۹	۱۵۸/۷۵	۲۰۶/۳۴	۱۲/۸۳۳
۱۰	۲۹۹۸/۹۵	۱۶۰	۹۶/۱۹۲۸	۱۴/۳۰۲

بررسی تفاوت میانگین مربعات شاخص آمیگدالین از طریق تجزیه واریانس و برحسب ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نیز نمایانگر معنی‌دار بودن این تفاوت در سطح ۱ درصد بود (جدول ۶).

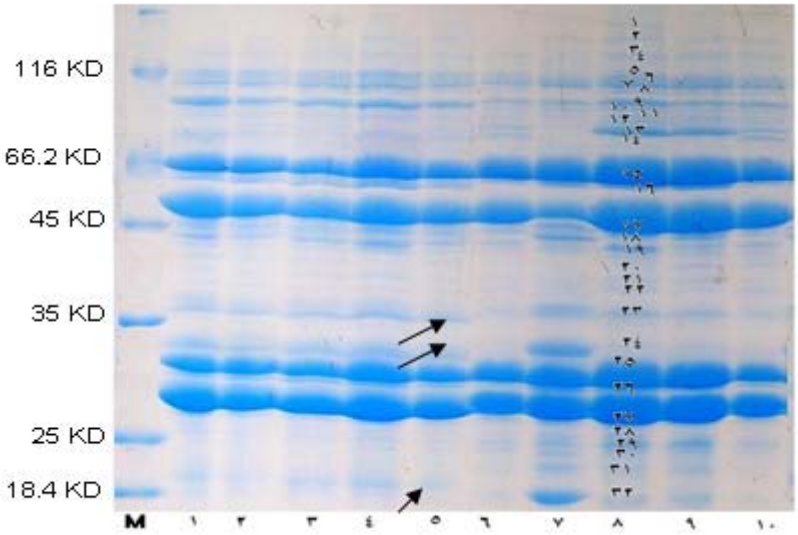
جدول ۶- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس شاخص غلظت آمیگدالین در ژنوتیپ‌های مورد بررسی بادام کوهی

منابع تغییر	درجه آزادی	غلظت آمیگدالین
ژنوتیپ	۹	۲۴۳۰۳۶۹۸/۱**
تکرار	۲	۲۰۳۰۲۴/۹ns
خطا	۱۸	۲۳۷۳۹۰۴/۵

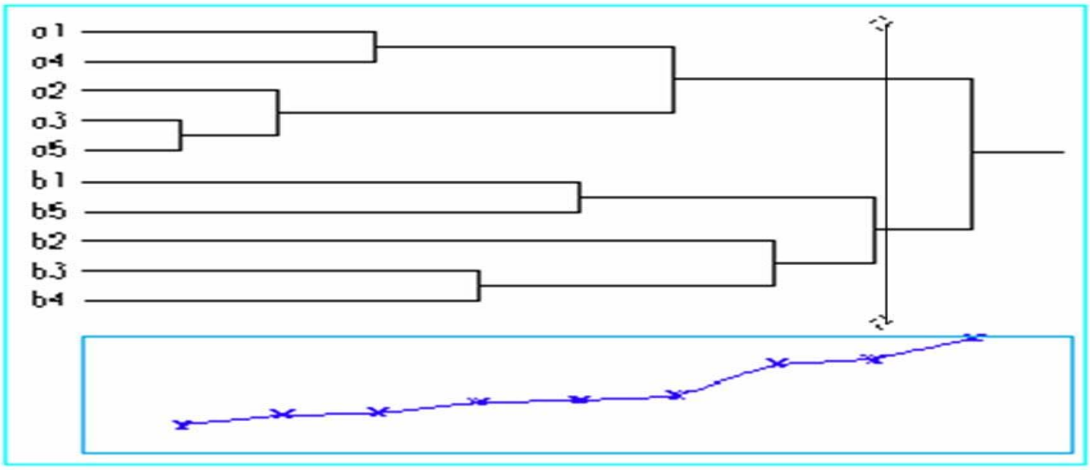
** تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ ns تفاوت بدون معنی

در پروفیل گونه مورد مطالعه در مجموع ۳۵ باند مشاهده شد که اندازه یا وزن مولکولی باندهای پلی‌پپتیدی تفکیک شده آنها در دامنه ۱۸ تا ۱۱۶ کیلودالتون متغیر بود و از بالای ژل به پایین شماره‌گذاری شد. پروفیل حاصل از باندهای پروتئینی به سه قسمت تقسیم شد. بخش اول از پروتئین‌های با وزن مولکولی زیاد (بین ۴۵ تا ۱۱۶ کیلودالتون)، بخش دوم با وزن مولکولی متوسط (بین ۲۵ تا ۴۵ کیلودالتون) و بخش سوم با وزن مولکولی کم (بین ۱۸ تا ۲۵ کیلودالتون) تشکیل شد (شکل۲). بیشترین تعداد باندها در محدوده پروتئین‌های با وزن مولکولی زیاد و کمترین در باند کم بود. بررسی‌های کیفی به روش SDS-PAGE تفاوت باندهای پروتئینی در بین ژنوتیپ‌های متعلق به دو پایه شیرین و تلخ و نیز در بین ژنوتیپ‌های هر پایه را از نظر تراکم و وجود یا عدم وجود پروتئین‌های خاص نمایان نمود. البته تفاوت بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر پروفیل باندهای پروتئینی را می‌توان به تفاوت‌های کمی و کیفی دسته‌بندی نمود. از نظر کمی، با وجود یکسان بودن میزان پروتئین‌های بار شده در کلیه چاهک‌ها، تفاوت‌هایی در تراکم برخی باندها در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شد، به‌طوریکه در سه نقطه ۳۰، ۴۵ و ۶۶ کیلو دالتون، تراکم باندها بیشتر از سایر مناطق بود (شکل ۲). از این نظر در این ناحیه بین ژنوتیپ‌های مختلف نیز تفاوت‌های آشکاری دیده شد. از نظر کیفی بیشترین تنوع در باندهای موجود در محدوده پروتئین‌های با وزن مولکولی زیاد و کمترین تنوع در محدوده پروتئین‌های با وزن مولکولی متوسط دیده شد. البته باندهای پروتئینی اضافی در ژنوتیپ‌های بادام تلخ نسبت به شیرین بخصوص در منطقه ۱۸ تا ۲۵ کیلودالتون (وجود باندهای ۸ ، ۳۰ و ۳۲ در ژنوتیپ‌های ۷، ۸ و ۹) و نیز در محدوده ۶۶ تا ۱۱۶ کیلو دالتون (باند ۱۱) در ژنوتیپ‌های تلخ قابل توجه بود. باند پروتئینی ۱۳ در ژنوتیپ‌های ۸ و ۹ با تراکم بیشتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها وجود داشت و نیز باندهای ۲۳، ۲۴ و ۳۲ تنها برای ژنوتیپ ۷ با غلظت بالایی نمایان بود (شکل۲). تراکم زیادی در باندها در مناطق۰۵ و ۳۰ کیلودالتون دیده شد که موجب هم‌پوشانی سه باند ۱۸، ۲۶ و ۲۸ در پروفیل پروتئینی ژنوتیپ‌های ۸ و ۹ و ۱۰ در این نواحی شد، در حالی‌که در این محدوده در پروفیل سایر ژنوتیپ‌ها، این باندها قابل تفکیک بودند.

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های الکتروفورز نشانگر آن است که تمام ژنوتیپ‌های مربوط به بادام شیرین در یک دسته و ژنوتیپ‌های مربوط به بادام تلخ در دسته مجزای دیگر قرار گرفتند (شکل۳). همچنین قرارگرفتن ژنوتیپ‌های O4 , O1 در یک زیرخوشه و O5 , O3 در زیرخوشه دیگر برای ژنوتیپ‌های شیرین و نیز جاگیری B1, B5 در یک زیرخوشه و B3,B4 در زیرخوشه دیگر در مورد ژنوتیپ‌های تلخ، حکایت از تشابه زیاد پروفیل باندهای پروتئینی این ژنوتیپ‌ها داشت که از جمعیت‌های مشترکی سرچشمه گرفته بودند.



شکل ۲- پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر حاصل از ده ژنوتیپ مختلف گونه
Amygdalus scoparia.L



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های الکتروفورزی حاصل از ژنوتیپ‌های *Amygdalus scoparia*.L

بحث

نتایج بررسی‌های شیمیایی عصاره بذر بادام شیرین و تلخ، نمایانگر میزان بیشتر آمیگداالین در ژنوتیپ تلخ نسبت به شیرین بود. در تأیید این تحقیق، (Yadollahi *et al.* , 2007) با مطالعه بیوسنتز ترکیبات سیانوژنیک به روش کروماتوگرافی مایع (HPLC) در بادام تلخ و شیرین، نشان دادند که میزان آمیگدالین در بذرهای تلخ بیشتر از شیرین بوده و علت آن بیان آنزیم مندلونیتریل گلوکوزیل ترانسفراز و تبدیل پرونازین به آمیگدالین در بذر و ایجاد مزه تلخی در آن می‌باشد.

نتایج بررسی‌های ریختی ژنوتیپ‌های شیرین و تلخ، نمایانگر آن است که میانگین شاخص‌های رشدی طول شاخه، طول برگ، وزن بذر و قطر طولی بذر در مورد ژنوتیپ شیرین به طور معنی‌داری کمتر از تلخ بود ولی میانگین شاخص طول دمبرگ در مورد پایه شیرین بیشتر از تلخ و در مورد عرض برگ، قطر طولی مغز و قطر عرضی

بذر در هر دو ژنوتیپ مقادیر میانگین‌ها، با هم مساوی بودند. این مسئله می‌تواند ناشی از وجود یک همبستگی مثبت از نظر مکان ژنی، با صفات عملکرد هسته، درصد هسته، وزن دانه، طول برگ و ارتفاع درخت باشد. در این خصوص Fathi و همکاران (۲۰۰۸) نیز طی تحقیقی در مورد تنوع ژنتیکی بادام با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و صفات مورفولوژیکی، که نشانگر تنوع ژنتیکی ۵۶ ژنوتیپ بادام با تجزیه ۱۴ صفت مورفولوژیکی بود به این مسئله اذعان داشتند.

بررسی‌های کیفی به روش SDS-PAGE تفاوت باندهای پروتئینی در بین ژنوتیپ‌های متعلق به دو پایه شیرین و تلخ و نیز در بین ژنوتیپ‌های هر پایه را از نظر تراکم و وجود یا عدم وجود پروتئین‌های خاص نمایان نمود. پروتئین‌ها به‌عنوان محصولات مستقیم ژن‌ها، نشانگرهای مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی محسوب می‌شوند، زیرا این نشانگرها کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار گرفته و از نشانگرهای مورفولوژیک اعتبار بیشتری داشته و به‌عنوان ابزار مناسبی در انگشت‌نگاری برخی از گونه‌ها و جمعیت‌های گیاهی با خواص مورفولوژیک مشابه مورد استفاده قرار می‌گیرند (Mirzaie-Nodoushan *et al*., 2001). در تحقیق اخیر وجود بعضی باندهای انحصاری مشخص شد که از آنها می‌توان در انگشت‌نگاری برای تفکیک ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌های مختلف این گونه استفاده نمود. به‌عنوان مثال، وجود باندهای پروتئینی اضافی در ژنوتیپ‌های بادام تلخ نسبت به شیرین بخصوص در محدوده با وزن مولکولی ۱۸ تا ۲۵ کیلودالتون (باندهای ۲۸، ۳۰ و ۳۲ در ژنوتیپ‌های ۷، ۸ و ۹) و نیز (باند ۱۱) در محدوده ۶۶ تا ۱۱۶ کیلو دالتون که تنها در تمام ژنوتیپ‌های تلخ وجود داشت و باند پروتئینی ۱۳ در ژنوتیپ‌های ۸ و ۹ و نیز باندهای ۲۳، ۲۴ و ۳۲ که تنها برای ژنوتیپ ۷ با غلظت بالایی نمایان بود، ازجمله این پروتئین‌ها بودند. نتایج دسته‌بندی با استفاده از روش خوشه‌ای نیز نشان داد که از ترتیب و ترکیب باندهای پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر این دو پایه می‌توان به خوبی در مجزا کردن و تشخیص آنها استفاده نمود، ولی تفکیک ژنوتیپ‌های مختلف این دو جمعیت از یکدیگر امری نسبی بوده، به‌طوری‌که برخی از این ژنوتیپ‌ها در مجاور یکدیگر و در یک زیرخوشه قرار گرفتند. بنابراین به نظر می‌رسد وجوه مشترک زیادی در سطح مولکولی در بین این پایه‌ها وجود دارد که حکایت از پیشینه مشترک ژنتیکی آنها دارد (Asadi-Corom *et al*., 2010).

منابع مورد استفاده

- Asadi-Corom, F., Mirzaie Nodoushan, H., Emam, M. and Bakhshi-Khaniki, G., 2010. Variation in seed storage proteins of two *Moringa* species (*Moringa peregrina & M. oleifera).* Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 18: 154 -163.
- Fathi, A., Gharayazi, B., Haghnazari, A. and Mardi, M., 2008. Study of *Amygdalus* genetic variation by microsattelite markers and morphological characters. Iranian Journal of Biotechnology, 6: 130-136.
- Izaddoost, M., 1984. Plant Chemistry. Tehran University Publication: 32-32.
- Khatamsaz, M., 1992. Flore of Iranica. Rosaceae: Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, pp. 314-319.
- Kadkhodaie, S. and Tabaei-Aghdaei, S.R.,1993. Genetic variation in some *Amygdalus* cultivars by RAPD markers. Third Biotechnology Congress, Tehran, Iran.
- Kadkhodaie, S. and Tabaei Aghdaei, S.R., 2007. Genetic identity of *Amygdalus. cumminus* by molecular markers. Fifth Biotechnology Congress,Tehran, Iran.
- Mirzaie-Nodoushan, H., Shariat, A., and Asadi-Corom, F., 2001. Evaluation of existing genetic variation in different populations of *Haloxylon* spp. using electerophoresis techniques. Iranian Journal of Forests and Rangelands Plant Breeding and Genetic Research, 7: 1 -26.
- Yadollahi, A., Arzani, K., Ebadi, A., Virtenson, M. and Feranks, V., 2007. Study of cyanogenic materials biosynthesis in bitter and sweet *Amygdalus*. Journal of Agriculture, 9: 67-75.
- Zeinolabedini, M., 2006. Genetic variation of some *Amygdalus* species in Isfahan by some morphological aspects and seed storage proteins. M.Sc. Thesis. Tabriz University. Agriculturing Faculity, Horticulture Dep., Tabriz, Iran.

Investigation of genetic variation of *Amygdalus scoparia.* L genotypes using some morphological, biochemical and seed storage proteins characteristics

M. Emam[1]*, F. Asadi-Corom[2], H. Mirzaie-Nodoushan[3], K. Jaimand[4]. and A. Ghamari-Zare[5]

1*- Corresponding author, M.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, I.R. Iran.
E-Mail: memam@rifr-ac.ir
2- M.Sc., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran.
3- Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran.
4- Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran.
5- Assist. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran.

Received: 06.02. 2012 Accepted: 24.02.2013

Abstract

Amygdalus scoparia L. is an important medicinal and commercial species of Rosaceae, resistant to heat and drought. Iran's weather is dry, then *A. scoparia* is suitable for reforestation in the country. *A. scoparia* produces bitter seeds normally but one sweet *Amygdalus* stand was found among the bitter *Amygdalus* accessions in Naein province. Due to economical importance of *Amygdalus* sweet seeds and for preservation of genetic resources in natural stands, this research compared the morphological, biochemical and variation of the sweet and bitter accessions. Morphological characters such as leaf length and width shoot and petiole length, seed and kernel weight were compared. Biochemical analysis of seed extracts, in comparison with standard sample, determined their amygdaline quantities. Protein profiles of seed storage extracts were compared using SDS-PAGE techniques. Results revealed that means of shoot length, leaf length and width, seed diameter and kernel weight for sweet genotype were less than those of bitter ones, but petiole length of sweet stand was longer than that of bitter. Leaf width in sweet stand was the same as that of bitter ones. Quantity of amygdaline in sweet sample was less than that of bitter ones. Due to differences observed between the protein profiles on the genotypes, this method seems to be suitable for genetic variation evaluation of *A.scoparia* population.

Keywords: *Amygdalus scoparia* L., Morphological, Biochemical, Variation, Seed storage protein.