



Evaluation of seed storage proteins patterns in *Papaver bracteatum*

Soheila Afkar¹ , Zahra Akbari² 

1. Corresponding Author, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran. Corresponding author. E-mail: Dr.afkar@pnu.ac.ir

2. Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran. E-mail: zahraakbari@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	<p>The Iranian poppy (<i>Papaver bracteatum</i>) is a medicinal plant known for its ability to produce the alkaloid tebaine and grows in specific regions of Iran. This study aimed to identify the optimal protein extraction method and investigate the genetic diversity of 18 populations of Iranian poppy collected from various parts of Iran, along with a control sample of <i>Papaver somniferum</i>, using seed protein electrophoresis patterns. The results indicated that the protein extraction method utilizing phenol yielded the best results. Additionally, after staining with Coomassie Brilliant Blue G250, the band patterns displayed higher clarity and provided greater precision in tracking protein bands. A total of 68 bands were observed within a molecular weight range of 13-120 kDa when comparing electrophoresis patterns. The least and the greatest number of bands were recorded in populations P2 (Lar Dam, Alborz) and P17 (Pol Zanguleh region, Alborz), respectively. Genetic similarity among the studied populations varied significantly, ranging from 0.4 to 0.8. The greatest distance was noted between populations P15 and P7 from two different regions: Yush-Baladeh village in Alborz and Pir-Imran village in Kurdistan. Seed protein electrophoresis effectively distinguished between species <i>P. bracteatum</i> and <i>P. somniferum</i>. Cluster analysis using UPGMA method along with Dice similarity coefficient revealed five distinct groups among the studied populations. The findings suggest that geographic location has minimal impact on population similarity and their clustering; therefore, seed protein electrophoresis can be utilized for isolating and identifying different populations of this species in conservation programs.</p>
Article history: Received: 4 August 2024 Received in revised form: 30 January 2025 Accepted: 19 February 2025 Published online: Summer 2025	
Keywords: <i>SDS-PAGE, electrophoresis pattern, protein extraction method, genetic diversity, papaver bracteatum.</i>	

Cite this article: Afkar, S. & Akbari, Z. (2025). Evaluation of seed storage proteins patterns in *Papaver bracteatum*. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 56 (2), 323-339. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2025.379747.2193>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2025.379747.2193>

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Iranian poppy (*Papaver bracteatum*) is a valuable medicinal plant that grows in limited regions of Iran. This species contains a high concentration of thebaine, an important alkaloid with significant pharmaceutical properties that can be readily converted into codeine. Moreover, thebaine can be transformed into Bentley compounds and various narcotic antagonists. As a precursor alkaloid with notable therapeutic value, thebaine plays a key role in the synthesis of numerous morphine-derived drugs, including codeine (a cough suppressant), morphine (a narcotic analgesic), noscapine (an antitumor agent), sanguinarine (an antimicrobial compound), and papaverine (a vasodilator).

Seed storage proteins are widely used as biochemical markers due to their physiological stability and ease of handling. These proteins are typically polymorphic, heritable, and represent the direct products of gene expression, with minimal influence from environmental factors. Analysis of seed storage proteins using SDS-PAGE electrophoresis is a common and reliable method for evaluating genetic variation within and between plant species.

In the present study, seed protein biochemical markers were employed to assess the genetic diversity of wild populations of Iranian poppy collected from different regions of Iran, highlighting the species' importance for pharmaceutical applications.

Materials and Methods

This study aimed to (1) determine the most efficient method for protein extraction and staining, and (2) investigate the genetic diversity of 18 wild populations of *Papaver bracteatum* collected from various regions of Iran, along with one sample of *P. somniferum* used as a control, based on seed protein electrophoresis patterns.

Four protein extraction methods—Tris's buffer, phosphate buffer, trichloroacetic acid (TCA), and phenol—were evaluated. Additionally, three staining techniques were applied: silver nitrate (AgNO_3), Coomassie Brilliant Blue G-250, and Coomassie Brilliant Blue R-250.

Polymorphic protein bands were scored as presence (1) or absence (0) using Phoretix Pro software. Molecular data were analyzed using Photoshop CS11 for image processing, GenAlEx for genetic analysis, and NTSYS v2.0.2 for cluster analysis.

Results and Discussion

Comparison of the extraction methods revealed that the phenol method produced the most reliable and reproducible results. Among the staining techniques, Coomassie Brilliant Blue G-250 provided higher resolution and improved visualization of protein bands.

A total of 68 protein bands, ranging from 13 to 120 kDa, were detected. The lowest and highest numbers of bands were observed in populations P2 and P17, respectively. Variation in banding patterns reflects genetic diversity among populations, whereas the presence of shared bands indicates genetic relatedness and possibly a common evolutionary origin. Differences in band intensity suggest that multiple protein polypeptides with similar molecular weights may overlap within the same band.

Genetic similarity among the studied populations ranged from 0.4 to 0.8. The greatest genetic distance was observed between populations P15 (Yushbeldeh village, Alborz region) and P7 (Piomran village, Kurdistan region). Seed protein electrophoresis clearly distinguished *P. bracteatum* from *P. somniferum*, as expected given their taxonomic differences.

The highest similarity was detected between populations grouped in the first and second clusters. Principal component analysis (PCA) results were consistent with cluster analysis findings, confirming the reliability of the grouping pattern. Cluster analysis using the UPGMA method and Dice similarity coefficient divided the populations into five distinct groups.

Because seed storage proteins are more stable in mature seeds than proteins in other plant tissues, SDS-PAGE effectively revealed polymorphisms based on variations in protein intensity among germplasms. These findings indicate that seed storage protein profiles provide a reliable tool for identifying and differentiating populations of *P. bracteatum*.

Conclusion

The results suggest that geographic origin has only a minor influence on population similarity and grouping. In contrast, seed protein electrophoresis patterns effectively differentiate and identify populations of *Papaver bracteatum*, demonstrating their usefulness as reliable biochemical markers for genetic diversity studies.

Author Contributions

Dr. Soheila afkar a conceived and planned the experiments. Ms. akbari carried out the experiments. Dr. Soheila afkar analyzed data, wrote the first manuscript and revised according to reviewers' comments.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

The authors would like to thank the research council of the University of Payame Noor, Iran for the financial support of this research.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

ارزیابی الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در خشخاش ایرانی

سهیلا افکار^۱ | زهرا اکبری^۲۱. نویسنده مسئول، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. رایانامه: Dr.afkar@pnu.ac.ir۲. گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. رایانامه: zahraakbari@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	خشخاش ایرانی (<i>Papaver bracteatum</i>) به‌عنوان یک گیاه دارویی با قابلیت تولید آکالوئیدتائین، در مناطق خاصی از ایران رشد می‌کند. این آزمایش با هدف شناسایی بهترین روش استخراج پروتئین و بررسی تنوع ژنتیکی ۱۸ جمعیت از خشخاش ایرانی که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده بودند به همراه یک نمونه کنترل <i>Papaver somniferum</i> با استفاده از الگوی الکتروفورزی پروتئین بذر انجام شد. نتایج نشان داد که روش استخراج پروتئین با استفاده از فنل، بهترین نتیجه را ارائه می‌دهد. همچنین الگوی باندها پس از رنگ‌آمیزی با کوماسی بریلیانت بلو G250 وضوح بالاتری داشت و دقت بیشتری در ردیابی باندهای پروتئینی فراهم کرد. با مقایسه الگوی الکتروفورز باندهای پروتئینی تعداد ۶۸ نوار با وزن مولکولی در دامنه ۱۲۰-۱۳ کیلودالتون مشاهده گردید. کمترین و بیشترین تعداد باند به ترتیب در جمعیت P2 (سد لار البرز) و P17 (منطقه پل زنگوله البرز) مشاهده شدند. میزان تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد بررسی متغیر بوده و دامنه بین ۰/۴ تا ۰/۸ را شامل می‌شد. بیشترین فاصله بین دو جمعیت P15 و P7 به ترتیب از دو منطقه البرز روستای یوش بلده و کردستان روستای پیرعمران ثبت گردید. با استفاده از الگوی الکتروفورز، پروتئین بذر دو گونه <i>P. bracteatum</i> و <i>P. somniferum</i> به خوبی تفکیک شدند. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و ضریب تشابه دایس انجام شد و جمعیت‌های مورد مطالعه در پنج گروه مجزا تفکیک گردیدند. نتایج این بررسی نشان‌دهنده تأثیر کم منطقه جغرافیایی بر شباهت جمعیت‌ها و گروه‌بندی آنهاست؛ بنابراین الگوی الکتروفورز پروتئین بذر، ظرفیت آن را داراست که برای جداسازی و شناسایی جمعیت‌های مختلف این گونه در برنامه‌های حفاظت مورد استفاده قرار گیرد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۴ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱ تاریخ انتشار: تابستان ۱۴۰۴	کلیدواژه‌ها: خشخاش ایرانی، SDS-PAGE، الگوی الکتروفورزی، روش استخراج پروتئین، تنوع ژنتیکی.

استاد: افکار، سهیلا؛ و اکبری، زهرا (۱۴۰۴). ارزیابی الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در خشخاش ایرانی. نشریه علوم باغبانی ایران، ۵۶ (۲)، ۳۳۹-۳۲۳. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2025.379747.2193>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2025.379747.2193>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

خشخاش ایرانی گیاهی دیپلوئید ($2n=14$) و چندساله دگرگشن با خودناسازگاری گامتوفیتی است (Hadipour *et al.*, 2015; Mohseni *et al.*, 2020). این گونه، گیاه دارویی ارزشمندی است که در مناطق محدودی از ایران یافت شده و دارای مقدار قابل توجهی آلکالوئید تبائین است که می‌تواند به‌راحتی به آکدئین (Nematolahi *et al.*, 2024; Anonymous, 2019) همچنین ترکیبات بنتلی و چندین آنتاگونیست مخدر تبدیل شود (Nematolahi *et al.*, 2024). تبائین از جمله متابولیت‌های ثانویه است که به‌دلیل انتشار گسترده و خواص دارویی بی‌نظیر، نقش مهمی در تولید داروهای گیاهی و صنایع دارویی دارد (Qaderi *et al.*, 2020). علاوه بر این ترکیبات، پاپاورین، آلکالوئید غیرمخدر مهم و اقتضادی دیگری است که خاصیت گشادکننده عروق را دارد (Labanca *et al.*, 2018; Anonymus, 2020). با توجه به افزایش تقاضا برای استفاده از آلکالوئیدهایی مثل تبائین، مورفین و اوریپاوین در صنایع داروسازی، برنامه‌های اصلاحی و بیوتکنولوژی برای اصلاح خشخاش ایرانی به‌عنوان منبع چنین آلکالوئیدهایی توصیه می‌شود (Rostampour *et al.*, 2010; Rostampour *et al.*, 2009). با تغییر در شرایط محیطی، گونه‌های مختلف گیاهی با داشتن تنوع ژنتیکی و سازگاری به این تغییرات سازگار زنده می‌مانند (Salgotra and Chauhan, 2023). افزون بر آن، ضروری است که تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها در کشورهای زیست‌گاه گونه، جهت تکمیل دانش در خصوص آخرین وضعیت منابع ژنتیکی مورد مطالعه قرار گیرد (Hadipour *et al.*, 2020) چرا که آگاهی از تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی به برنامه‌های حفاظت از ژرم‌پلاسم‌ها و بهبود ویژگی‌های گیاهی کمک می‌کند (Kalia *et al.*, 2011). پروتئین‌های بذر که از نظر فیزیولوژیک، پایدار بوده و به‌آسانی قابل‌ردیابی هستند، به‌عنوان نشان‌گرهای زیستی استفاده می‌شوند و عموماً دارای تنوع چندشکلی و قابل‌توارثند؛ همچنین در شرایطی که محیط، تأثیر کمی دارد، این عناصر محصول مستقیم ژن‌های فعال هستند (Omonhinmin & Ogunbodede, 2013; Garima *et al.*, 2013). آنالیز پروتئین‌های بذر از طریق ژل الکتروفورز SDS-PAGE به‌طور گسترده برای مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین‌گونه‌ها استفاده می‌شود (Omonhinmin and Ogunbodede, 2013).

در بررسی تنوع ژنتیکی خشخاش ایرانی جمع‌آوری شده از چند منطقه در ایران توسط نشانگرهای ISSR و AFLP مشخص شد که فاصله جغرافیایی درون جمعیت‌ها می‌تواند ناشی از جریان ژنی محدود شده و تنوع ژنتیکی بالا در بین جمعیت‌های خشخاش ایرانی باشد. تنوع ژنتیکی در خشخاش زراعی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR مورد بررسی قرار گرفت که براساس داده‌های نشانگر RAPD، ژنوتیپ‌ها در چهار گروه قرار گرفتند در حالی که تجزیه کلاستر براساس نشانگر ISSR، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در دو گروه قرار داد. براساس داده‌های این دو نشانگر، تنوع ژنتیکی پایینی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد (Shanker Acharya and Sharma, 2009). وجود تنوع ژنتیکی گسترده در خشخاش ایرانی توسط نشانگر مولکولی و فیتوشیمیایی گزارش شده است (Qaderi *et al.*, 2019). مقایسه الگوی باند پروتئین بذر هفت گونه خشخاش از مناطق مختلف استان اردبیل با استفاده از SDS-PAGE، این گونه‌ها را در چهار گروه دسته‌بندی کرد. در گروه اول، *P. somniferum*؛ در گروه دوم، *P. orientale*، *P. bracteatum*، *P. lasiotrix*، *P. rhoeas*؛ گروه سوم شامل *P. dubium* و در گروه چهارم، *P. argemone* قرار گرفت (Ashrafi *et al.*, 2013). ۱۲۴ ژرم‌پلاسم *P. somniferum* براساس الگوی

1. *Rp*aver bracteatum
2. Gametophytic
3. Alkaloid
4. Tebaine
5. Cdeine
6. Bentley compounds
7. Qrioid antagonist
8. Rpaverine
9. Mphine
- 1 . Gpavine

الکتروفورز پروتئین بذر در سیزده گروه تفکیک شدند (Verma et al., 2015). از آنجایی که استفاده از پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به‌عنوان نشان‌گر بیوشیمیایی در ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی از نظر زمان، هزینه و کارایی مؤثر است، در این آزمایش نیز باهدف بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی خشخاش ایرانی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران به‌عنوان یک گونه ارزشمند در صنایع دارویی، از نشان‌گر بیوشیمیایی پروتئین بذر استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل هجده جمعیت از گونه خشخاش ایرانی به‌همراه یک نمونه *P. somniferum* به‌عنوان کنترل از ده منطقه مختلف بود که از بانک ژن مؤسسه جنگل‌ها و مراتع تهیه شدند (جدول ۱).

استخراج کل پروتئین‌های بذری

از چهار روش تریس (Ranjan et al., 2012)، فسفات (Schultz & Mosbach, 1971)، تری کلرواستیک‌اسید (Isaacson et al., 2006) و فنل (Hurkman & Tanaka, 1986) برای استخراج پروتئین‌های بذر استفاده گردید.

تعیین غلظت پروتئین‌های استخراجی

پس از استخراج پروتئین از نمونه‌های بذر، غلظت پروتئین توسط روش برادفورد و پروتئین‌های استاندارد سرم آلبومین گاوی تعیین شد (Bradford, 1976). محلول‌های پروتئین استاندارد در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و میزان جذب نور توسط دستگاه با طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. برای هر نمونه یک استاندارد ثبت شد و با استفاده از غلظت پروتئین‌ها، خط رگرسیون ترسیم گردید. منحنی استاندارد با رسم مقادیر خوانده‌شده توسط دستگاه در مقابل غلظت‌های معلوم آن‌ها رسم گردید. پس از آن، معنی‌دار بودن ضریب رگرسیون و عرض‌ازمبدأ آن نیز موردآزمون قرار گرفت. با مشخص شدن معادله نهایی خط رگرسیون، غلظت پروتئین در نمونه‌های موردبررسی تعیین گردید (Seyedi et al., 2010).

جدول ۱. گونه‌ها و مناطق جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی خشخاش

کد	منطقه	نام گونه	استان	محل جمع‌آوری	تعداد نمونه
P1, P2	AlbLrI	<i>P. bracteatum</i>	البرز	سدلار	۲
P3, P4	AlbDmvP1	<i>P. bracteatum</i>	البرز	دماوند	۲
P5, P6	AlbDmvPII	<i>P. bracteatum</i>	البرز	دماوند	۲
P7, P8	KrdBnh*	<i>P. bracteatum</i>	کردستان	روستای پیرعمران	۲
P9, P10	KrdMrvn*	<i>P. bracteatum</i>	کردستان	مریوان	۲
P11, P12	KrdSndj*	<i>P. bracteatum</i>	کردستان	منطقه سارال	۲
P13, P14	KrdIhgh	<i>P. bracteatum</i>	کردستان	روستای قطور	۲
P15, P16	AlbUsh	<i>P. bracteatum</i>	البرز	روستای یوش‌بلده	۲
P17, P18	AlbZnBrdg	<i>P. bracteatum</i>	البرز	منطقه پل زنگوله	۲
P19	KrdSorn*	<i>P. somniferum</i>	کردستان	گردنه سورین	۱

هم‌غلظت کردن پروتئین‌ها و الکتروفورز

پیش از بردن پروتئین‌ها بر روی ژل، تمام پروتئین‌ها با استفاده از فرمول $M_1V_1=M_2V_2$ هم‌غلظت شدند. جهت تفکیک پروتئین‌ها از روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید در حضور سدیم‌دودسیل‌سولفات استفاده شد. در روش سدیم‌دودسیل‌سولفات معمولی (یک بعدی) از دو ژل با نام‌های ژل متمرکز کننده ۵٪ و ژل جداکننده ۱۲/۵٪ جهت تفکیک پروتئین‌ها استفاده گردید. پس از آماده‌سازی ژل، نمونه‌ها با بافر نمونه با ترکیبات (بروموفنول‌بلو، گلیسرول، اوره، سدیم‌دودسیل‌سولفات، تریس HCl ۱/۵ مولار با اسیدیتیه هشت و بتامرکاپتواتانول) مخلوط شده و از هر نمونه با غلظت یکسان روی ژل بارگذاری گردید. به منظور تعیین وزن ملکولی پروتئین‌ها، یک نشان‌گر دارای پروتئین‌هایی با وزن ملکولی مشخص (۱۱۶-۱۴/۴ kDa) از شرکت Bio Basic کانادا در اولین چاهک در نظر گرفته شد. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت در ژل متمرکز کننده به مدت دو ساعت و با ولتاژ ۲۵۰ ولت در ژل جداکننده به مدت سه ساعت انجام شد. پس از رسیدن سطح رنگ به انتهای ژل، جریان برق قطع شده و ژل از دستگاه خارج گردید (Bollag *et al.*, 1991).

رنگ‌آمیزی ژل SDS-PAGE

باتوجه به تنوع مشاهده شده در روش رنگ‌آمیزی ژل در میان منابع مختلف و به منظور انتخاب بهترین روش رنگ‌آمیزی، ابتدا در آزمایش حاضر روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی از جمله روش کوماسی بریلیانت بلو آر ۲۵۰، روش نیترات‌نقره و روش کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵۰ از نظر ظاهر سازی باندهای پروتئین مقایسه شدند.

روش کوماسی بریلیانت بلو آر ۲۵۰

محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو آر ۲۵۰ (Lee *et al.*, 1975) تهیه و ژل به مدت شانزده ساعت درون محلول قرار داده شد. بعد از آن ژل به مدت ۲-۳ ساعت در محلول رنگ‌بر به منظور شفاف شدن زمینه ژل و ظاهر شدن باندها قرار گرفت.

روش نیترات نقره

رنگ‌آمیزی ژل با روش (Chaffin *et al.*, 1998) انجام شد.

روش کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵۰

رنگ‌آمیزی ژل توسط کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵۰ (آب مقطر، متانول، اسیداستیک خالص و کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵۰) به روش Meyfour & Rezaie Tavirani (۲۰۰۲) انجام شد و ژل به مدت شانزده ساعت درون این محلول روی دستگاه هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت. به منظور وضوح باندهای پروتئین، رنگ‌زدایی در محلول رنگ‌بر (آب مقطر، متانول و اسیداستیک خالص) صورت گرفت و ژل به مدت دو، سه ساعت یا بیشتر درون محلول روی دستگاه هم‌زن مغناطیسی قرار داده شد تا زمینه آن کاملاً شفاف شود؛ سپس اسکن شده و مورد بررسی قرار گرفت.

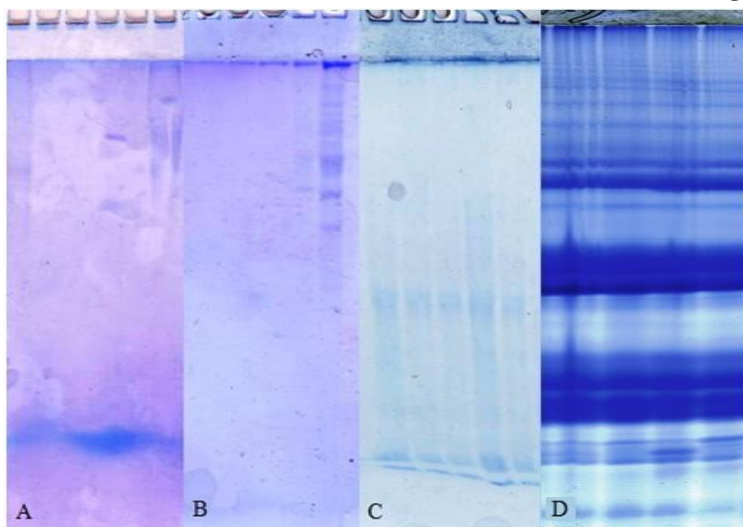
آنالیز داده‌ها

الگوی نواری باندهای چندشکل به صورت صفر و یک و با استفاده از نرم‌افزار Phoretix pro امتیازدهی شد. در این مطالعه، از نرم‌افزارهای GenAlex، Photoshop CS11 و NtSYS V.2.0.2 جهت آنالیز داده‌های مولکولی استفاده شد. با مقایسه روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای و محاسبه ضریب کوفنتیک، با استفاده از روش UPGMA مناسب‌ترین گروه‌بندی به دست آمد.

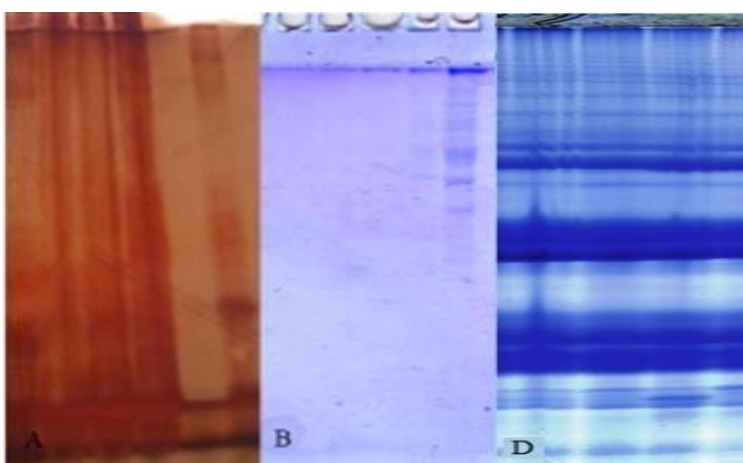
1. SDS
2. Sacking gel
3. Rsolving gel

نتایج

نوع روش استخراج پروتئین بر کیفیت و کمیت پروتئین مؤثر است. مقایسه روش‌های مختلف استخراج پروتئین (شکل ۱) مشخص کرد که روش فنل بهترین نتیجه را نمایش می‌دهد. در مقایسه روش‌های مختلف استخراج پروتئین برای الکتروفورز دو بعدی در گیاه *Papaver somniferum* توسط Kutka Hlozakova et al., (۲۰۱۴)، مشخص گردید که روش فنل مناسب‌ترین روش استخراج پروتئین می‌باشد که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. همچنین مقایسه روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی (شکل ۲) نشان داد که الگوی باندها با روش کوماسی بریلینت بلو G250 وضوح بالاتری داشتند و این روش رنگ‌آمیزی باعث بهبود در ردیابی باندهای پروتئینی شد.



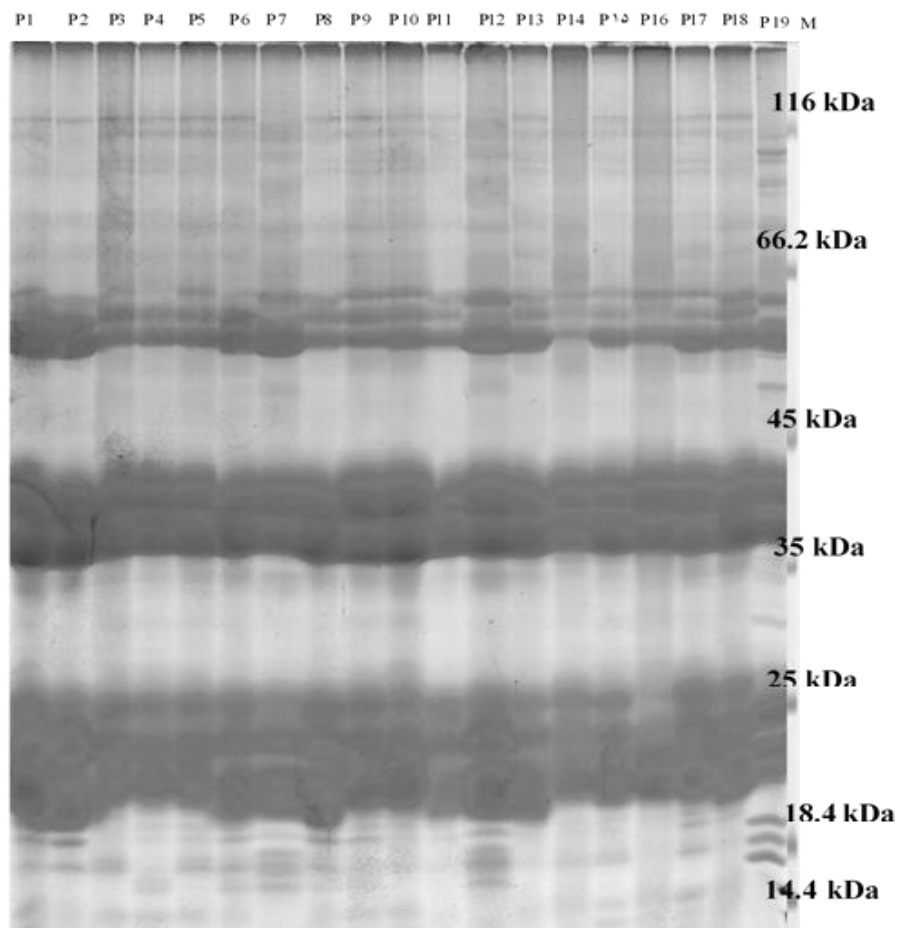
شکل ۱. مقایسه روش‌های مختلف استخراج پروتئین. A: روش تریس B: روش فسفات C: روش تری کلروآسیداستیک D: روش فنل



شکل ۲. مقایسه روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی پروتئین. A: روش نیترات نقره B: روش کوماسی بریلینت بلو R۲۵۰ D: روش کوماسی بریلینت بلو G۲۵۰

امتیازبندی نوارها به‌طور کامل از انتخاب باندها تا اسکورینگ، با استفاده از نرم‌افزار Phoretix pro, v10.4 به‌صورت حضور (۱) و عدم حضور (۰) برای هر نوار صورت گرفت. تعداد ۶۸ نوار با وزن مولکولی در دامنه ۱۲۰-۱۳ کیلودالتون مشاهده شد (شکل ۳). کمترین و بیشترین تعداد باند به ترتیب در جمعیت P2 و P17 ثبت شد. اطلاعات کلی و اطلاعات مربوط به پروتئین‌ها

در جدول ۲ آورده شده است. باندهای ۴۴ و ۶۵ اختصاصی جمعیت P15 بوده درحالی‌که باند شماره ۱ فقط در جمعیت P4، باند شماره ۲۵ در جمعیت P1، باند شماره ۵۰ در جمعیت P7 و باند شماره ۶۲ در جمعیت P12 دیده شد. باندهای ۱۳ و ۵۵ اختصاصی جمعیت P19 بودند. باند شماره ۶ در همه جمعیت‌ها غیر از P7 وجود داشت؛ باند شماره ۷ در همه جمعیت‌ها غیر از P2 و P12 مشاهده گردید. باندهای شماره ۶ و ۷ با وزن مولکولی ۹۹/۵ و ۱۰۳/۴ KDa، باندهای شماره ۱۶ و ۱۷ با وزن مولکولی ۷۳/۲ و ۷۸/۷ و باندهای شماره ۲۴ و ۶۱ با وزن مولکولی ۵۹/۳ و ۱۵/۸ KDa در اکثر جمعیت‌های مورد مطالعه مشترک بودند.



شکل ۳. الگوی باندهای ایجادشده از استخراج پروتئین بذر جمعیت‌های *Papver bractateum* بر روی ژل اکریل‌آمید SDS-PAGE

تشابه ژنتیک، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه مؤلفه‌های اصلی

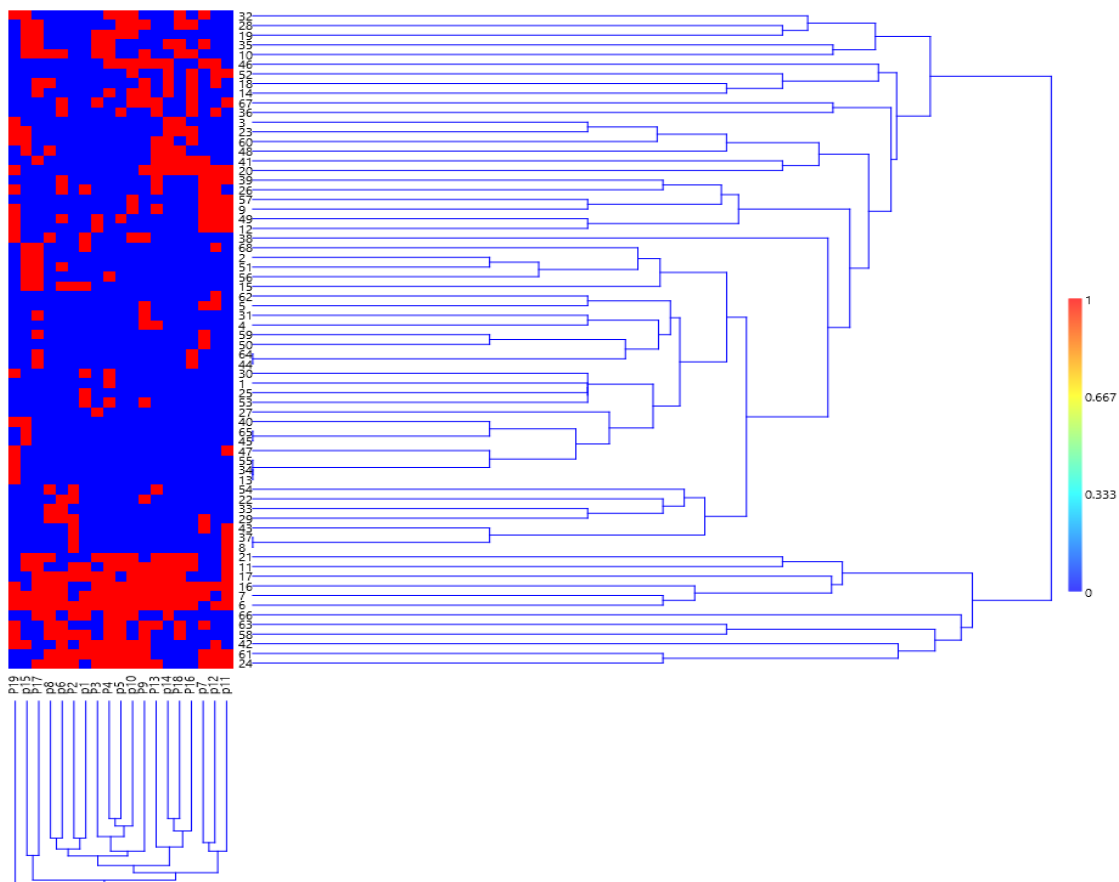
شباهت ژنتیکی درون گونه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه براساس ضریب تشابه دایس به وسیله نرم‌افزار NTSYS ver 2.02 محاسبه گردید. در این مطالعه، میزان تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد بررسی از ۰/۴ تا ۰/۸ متغیر بود. بیشترین شباهت بین جمعیت‌های P14 با P16 و P18، P5 با P4 و P10 مشاهده شد. بیشترین فاصله بین دو جمعیت P7 و P15 به ترتیب از دو منطقه البرز روستای یوش بلده و کردستان روستای پیرعمران دیده شد (جدول ۳). بر اساس شاخص تشابه، شباهت بین ژرم‌پلاسماها به کاملاً شبیه ($G_s=1$)، خیلی شبیه ($G_s=0/8-0/9$)، شباهت متوسط ($G_s=0/8-0/9$) و کمترین شباهت ($G_s \leq 0/3$) تقسیم می‌شوند (Verma et al., 2015).

جدول ۲. تعداد، تحرک نسبی و وزن مولکولی باندهای مشاهده شده در خشخاش ایرانی

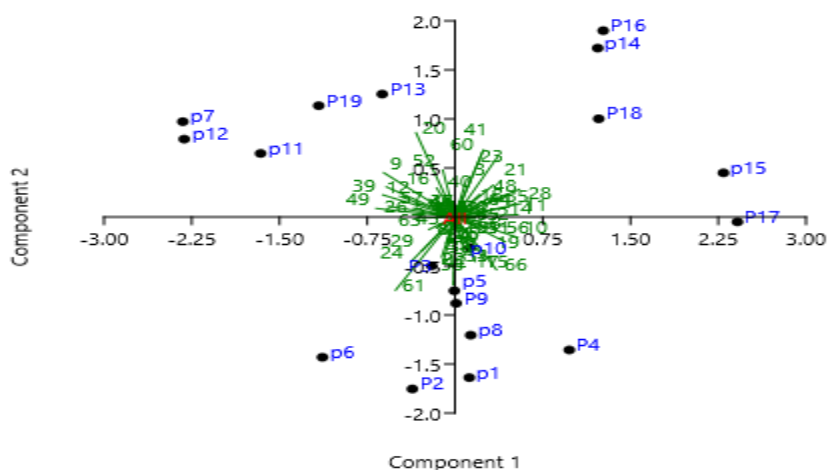
وزن مولکولی (kDa)	تحرک نسبی	باند	وزن مولکولی (kDa)	تحرک نسبی	باند
۳۵/۶	۰/۵۵۹	۳۵	۱۲۳/۱	۰/۰۰۵	۱
۳۵/۵	۰/۵۶۱	۳۶	۱۲۳/۵	۰/۰۰۷	۲
۳۴/۹	۰/۵۶۸	۳۷	۱۱۹/۰	۰/۰۲۰	۳
۳۴/۲	۰/۵۷۷	۳۸	۱۱۱/۸	۰/۰۴۸	۴
۳۳/۰	۰/۵۹۳	۳۹	۱۰۵/۵	۰/۰۷۴	۵
۳۰/۷	۰/۶۲۵	۴۰	۱۰۳/۴	۰/۰۸۳	۶
۲۹/۸	۰/۶۳۹	۴۱	۹۹/۵	۰/۱۰۰	۷
۲۹/۲	۰/۶۴۸	۴۲	۹۷/۷	۰/۱۰۸	۸
۲۸/۷	۰/۶۵۵	۴۳	۹۴/۳	۰/۱۲۴	۹
۲۴/۲	۰/۷۳۱	۴۴	۹۲/۸	۰/۱۳۱	۱۰
۲۳/۹	۰/۷۳۸	۴۵	۹۰/۴	۰/۱۴۳	۱۱
۲۳/۶	۰/۷۴۳	۴۶	۸۸/۲	۰/۱۵۴	۱۲
۲۳/۳	۰/۷۴۹	۴۷	۸۵/۵	۰/۱۶۸	۱۳
۲۲/۰	۰/۷۷۵	۴۸	۸۴/۱	۰/۱۷۵	۱۴
۲۱/۴	۰/۷۸۶	۴۹	۸۰/۸	۰/۱۹۳	۱۵
۲۰/۱	۰/۸۱۴	۵۰	۷۸/۷	۰/۲۰۵	۱۶
۱۹/۶	۰/۸۲۵	۵۱	۷۳/۲	۰/۲۳۷	۱۷
۱۹/۳	۰/۸۳۲	۵۲	۷۰/۳	۰/۲۵۵	۱۸
۱۹/۰	۰/۸۴۱	۵۳	۶۶/۸	۰/۲۷۸	۱۹
۱۸/۴	۰/۸۵۵	۵۴	۶۵/۸	۰/۲۸۵	۲۰
۱۷/۸	۰/۸۶۹	۵۵	۶۳/۵	۰/۳۰۱	۲۱
۱۷/۶	۰/۸۷۴	۵۶	۶۲/۲	۰/۳۱۰	۲۲
۱۷/۲	۰/۸۸۵	۵۷	۶۰/۰	۰/۳۲۶	۲۳
۱۶/۹	۰/۸۹۲	۵۸	۵۹/۳	۰/۳۳۱	۲۴
۱۶/۵	۰/۹۰۳	۵۹	۵۷/۵	۰/۳۴۵	۲۵
۱۶/۱	۰/۹۱۵	۶۰	۵۲/۵	۰/۳۸۶	۲۶
۱۵/۸	۰/۹۲۲	۶۱	۵۱/۹	۰/۳۹۱	۲۷
۱۵/۳	۰/۹۳۸	۶۲	۵۰/۶	۰/۴۰۲	۲۸
۱۵/۰	۰/۹۴۵	۶۳	۴۹/۵	۰/۴۱۲	۲۹
۱۴/۷	۰/۹۵۴	۶۴	۴۸/۸	۰/۴۱۸	۳۰
۱۴/۴	۰/۹۶۳	۶۵	۴۲/۲	۰/۴۸۳	۳۱
۱۴/۲	۰/۹۷۰	۶۶	۴۱/۸	۰/۴۸۷	۳۲
۱۴/۰	۰/۹۷۷	۶۷	۴۰/۹	۰/۴۹۷	۳۳
۱۳/۶	۰/۹۸۹	۶۸	۳۶/۶	۰/۵۴۷	۳۴

بر اساس تقسیم‌بندی فوق، شباهت اکثر جمعیت‌های مورد مطالعه متوسط بود غیر از جمعیت‌های P14 با P16، P18، همچنین با P4 و P10 که در گروه خیلی شبیه تقسیم‌بندی شدند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc 2.02 به روش UPGMA و ضریب تشابه دایس انجام شد (شکل ۴). در این تحقیق، جمعیت‌های مورد مطالعه در پنج گروه مجزا تفکیک شدند. جمعیت‌های P1، P2، P3، P4، P5، P6، P8، P9، P10 و P11 در گروه اول، جمعیت‌های P12، P13، P14، P15، P16، P17، P18، P19، P20، P21، P22، P23، P24، P25، P26، P27، P28، P29، P30، P31، P32، P33، P34 در گروه دوم و جمعیت‌های P1، P2، P3، P4، P5، P6، P7، P8، P9، P10، P11، P12، P13، P14، P15، P16، P17، P18، P19، P20، P21، P22، P23، P24، P25، P26، P27، P28، P29، P30، P31، P32، P33، P34 در گروه سوم قرار گرفتند اما گروه چهارم شامل جمعیت‌های P15 و P17 بود؛ در حالی که جمعیت P19 که تنها گونه *P. somniferum* به عنوان کنترل بود، در یک گروه جداگانه قرار گرفت. باتوجه به جدول ۳ و شکل ۷، سطح هتروزیگوتی پایینی در گونه *P. bracteatum* ۰/۲۲ مشاهده شد در حالی که تعداد آلل مؤثر و شاخص شانون در این گونه ۱/۳۴ و ۰/۶۶ بود.

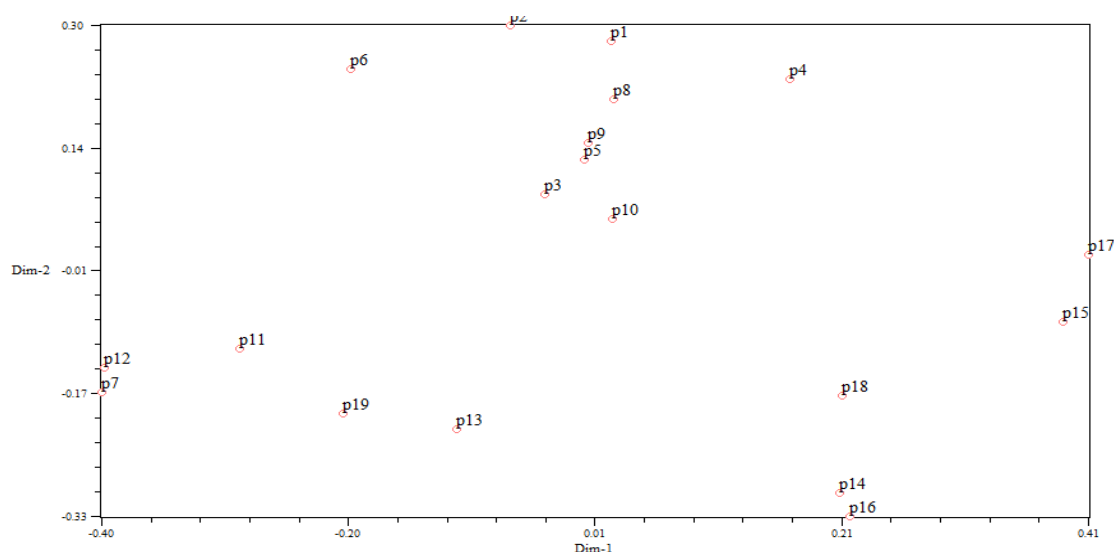
در گونه *P. bracteatum*، ۶۵ باند مشاهده شد که ۴۶ عدد آن، اختصاصی گونه بود در حالی که در *P. somniferum*، ۲۲ باند مشاهده شد که تنها ۳ باند از میان آنها اختصاصی بود.



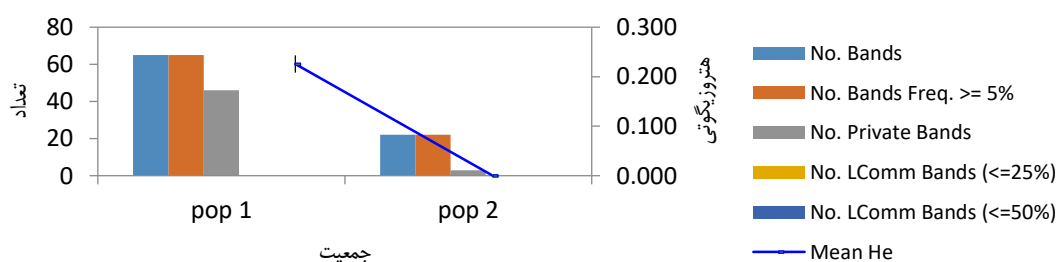
شکل ۴. نمودار خوشه‌ای ۱۹ نمونه حاصل از پروتئین‌های افراد هر منطقه با استفاده از ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA



شکل ۵. نمودار تجمع افراد در اطراف سه مؤلفه ابتدایی در تجزیه به مؤلفه‌های متعادل در حالت سه‌بعدی



شکل ۶. نمودار مختصات اصلی شباهت ژنتیکی دایس برای دو جزء اصلی اول



شکل ۷. الگوی باندهای بین جمعیت‌های مورد مطالعه

جدول ۳. پارامترهای تنوع ژنتیکی در خشخاش ایرانی

جمعیت	تعداد	تعداد آلل	تعداد آلل مؤثر	شاخص شانون	هتروزیگوتی موردانتظار	هتروزیگوتی	تعداد باندها	تعداد باندها با فراوانی $\leq 5\%$	تعداد باندهای اختصاصی
<i>P.bracteatum</i>	۱۸	۱/۹۱	۱/۳۴	۰/۳۶۶	۰/۲۲۶	۰/۲۳۲	۶۵	۶۵	۴۶

بحث

در مقایسه روش‌های مختلف استخراج پروتئین برای الکتروفورز دوبعدی در گیاه شقایق (*P. somniferum*) توسط Kutka *et al.*, (۲۰۱۴)، مشخص گردید که روش فنل مناسب‌ترین روش استخراج پروتئین است که با نتایج این مطالعه نیز همخوانی دارد. همچنین مقایسه روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی (شکل ۲) نشان داد که الگوی باندها با روش کوماسی بریلیانت‌بلو G250 وضوح بالاتری داشتند و این روش، موجب بهبود ردیابی باندهای پروتئینی شد و این یافته‌ها با مطالعه Siavoshi *et al.* (۲۰۱۸) همسو می‌باشد. الگوی باندهای، تفاوت تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد اما حضور باند مشترک قرابت ژنتیکی را به نمایش می‌گذارد (Sinha *et al.*, 2012). همچنین باند مشترک بین ژنوتیپ‌های مختلف می‌تواند نشان‌دهنده منشاء تکاملی مشابه آنها باشد (Azeez *et al.*, 2013). مشاهده تفاوت در تراکم برخی از باندهای پروتئینی حاکی از آن است که تعدادی از پپتیدهای پروتئینی در وزن مولکولی خاصی روی هم قرار گرفته‌اند. جمعیت P19 که تنها گونه *P.*

somniferum به‌عنوان کنترل بود، در یک گروه جداگانه دسته‌بندی شد؛ که باتوجه به متفاوت بودن این گونه، این نتیجه قابل‌پیش‌بینی بود و نشان‌دهنده قابلیت این نشانگر بیوشیمیایی در تفکیک گونه‌های مختلف می‌باشد. بیشترین شباهت در گروه اول و دوم مشاهده شد. نتایج آنالیز تجزیه مؤلفه‌های اصلی (شکل ۵ و ۶) با تجزیه خوشه‌ای هماهنگ است که نشان از صحت گروه‌بندی دارد. در ابتدا، چنین تصور می‌شد که بذرهای جمع‌آوری شده از مکان‌های نزدیک به هم، دارای شباهت بیشتری باشند اما دندروگرام به‌دست‌آمده، نشان داد که نزدیکی جغرافیایی در این جمعیت‌ها کمترین تأثیر را داراست. قرار گرفتن جمعیت‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه در کلاسترهای مختلف و برعکس، نشان‌دهنده تنوع درون‌گونه‌ای بالا در گونه *P. bracteatum* است که باتوجه به جریان ژنی بالا در گونه‌های دگرگشن، تنوع زیاد درون جمعیت‌ها امری طبیعی است (Talei et al., 2021).

براساس نتایج این تحقیق، مشاهده می‌شود که تأثیر منطقه جغرافیایی بر شباهت جمعیت‌ها و گروه‌بندی آنها ناچیز است؛ پدیده‌ای که می‌تواند به علل ذیل مربوط باشد:

۱. این سطح از شباهت بین جمعیت‌هایی در مناطق جغرافیایی مختلف نمی‌تواند ناشی از پدیده تلاقی بین‌گونه‌ای در مناطق جغرافیایی هم‌جوار باشد؛ اگرچه بذرها با گذشت زمان، به هر وسیله‌ای به مکان‌های دور اما دارای شرایط رشد و استقرار مناسب، منتقل می‌شوند (Eriksson et al., 1993; Gole et al., 2008; Li et al., 2014).
۲. گونه *P. bracteatum* یک گونه گیاهی دگرگرده‌افشان است که عمدتاً در مناطق کوهستانی یا مرتفع پراکنده شده است. این موضوع می‌تواند منشأ جداسازی جمعیت گونه‌ها با فاصله دور از هم، و حتی با فاصله نزدیک به هم به علت محدودیت جریان ژنی در میان آنها شود. بنابراین *P. bracteatum* می‌تواند مستقیماً تحت تأثیر هر گونه تغییر در جمعیت گرده‌افشان‌های زنده مثل زنبورهای عسل و سوسک به‌واسطه ماهیت دگرگرده‌افشان آن قرار گیرد (Miller et al., 2005; Tetany et al., 2010).
۳. نشان‌گر پروتئینی از شرایط محیطی مستقل بوده و تنوع از طریق پلی‌مورفیسم نمایش می‌دهد. الگوی الکتروفورزی پروتئین بذر به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌عنوان یک نشان‌گر بیوشیمیایی در ارزیابی تنوع و تأیید شناسایی ارقام استفاده می‌شود (Bompalli and Nallabilli, 2013).

مطالعات انجام شده در گیاهان مختلف نشان داد که پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، ارتباطی با توزیع جغرافیایی و عوامل اکولوژیک نشان نمی‌دهد که این دریافت، حاکی از توانایی و ظرفیت این نشان‌گر به‌عنوان ابزار ارزشمندی برای شناسایی جمعیت‌هایی با تنوع ژنتیکی بالا است (Jafari et al., 2013). افزون‌برآن، نشان‌گر پروتئین بذر می‌تواند باعث تسهیل تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بین گونه‌های مختلف گیاهی شود (Decker et al., 2000).

در بررسی تنوع ژنتیکی خشخاش در هند معلوم گردید که ژرم‌پلاسم‌هایی با منشأ جغرافیایی مشترک در چندین کلاستر متفاوت توزیع شدند که نشان از نقش جزئی توزیع جغرافیایی در تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌های خشخاش با منشأ هند داشت (Singh et al., 2003, 2004). همچنین در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف نعنای مشخص شد که جمعیت‌هایی از مناطق مجاور در گروه‌های مختلف قرار گرفتند که نشان‌دهنده عدم‌بستگی مؤلفه‌های تنوع ژنتیکی و پراکنش جغرافیایی بوده و رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی وجود ندارد (Afkar & Zand, 2020). مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مریم‌گلی با استفاده از الگوی الکتروفورز پروتئین بذر، حاکی از رابطه منطقی بین جمعیت‌ها و منطقه جغرافیایی محل رشد گیاه بود (Mirjalili, 2016) که تأییدی بر نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. پروتئین بذر دو گونه *P. somniferum* و *P. bracteatum* با استفاده از الگوی الکتروفورز به‌صورت مشخص تفکیک شدند و از آنجایی که در بذرهای بالغ، نوع و مقدار پروتئین‌ها نسبت به برگ، ثابت‌تر است، الگوی SDS-PAGE پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در خشخاش، چندشکلی را براساس تفاوت در شدت

پروتئین در ژرم پلاسماها نشان داد. مطالعه Verma و همکاران نشان داد که پروفایل پروتئین ذخیره بذر می تواند نشان گر خوبی برای شناسایی ژرم پلاسماهای خشخاش *P. somniferum* باشد (Verma et al., 2015) که با نتایج این تحقیق همسو است که نخستین گزارش در تعیین روش مطلوب استخراج پروتئین بذر، روش رنگ آمیزی و مطالعه الگوی الکتروفورزی گونه *P. bracteatum* می باشد. استفاده از الکتروز دو بعدی به منظور شناسایی دقیق تر تنوع ژنتیکی و وزن پپتیدهای مشاهده شده، شیوه ای با درجه کاربرد بالاتری بوده لذا پیشنهاد می شود در تحقیقات آینده نیز، این جمعیت ها مدنظر قرار گیرند.

نتیجه گیری

از میان چهار روش استخراج پروتئین، روش فنل و روش رنگ آمیزی کوماسی برلیانت بلوجی ۲۵۰ مطلوب ترین نتایج را نشان دادند. بیشترین فاصله بین دو جمعیت روستای یوش بلده البرز با جمعیت از روستای پیر عمران کردستان وجود داشت و مشخص گردید که رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی وجود ندارد. به طور کلی، می توان چنین نتیجه گیری نمود که الگوی الکتروفورزی پروتئین بذر، توانایی جداسازی و شناسایی جمعیت های مختلف این گونه را داراست.

REFERENCES

- Afkar, S. & Zand, R. (2020). Genetic relationships of some mint species using seed storage protein pattern. *J Genet Resour*, 6(1): 12-19.
- Anonymous. (2019). EFSA, EFSA, *Opium alkaloids in poppy seeds*. <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180516>.
- Anonymous. (2020). United Nations, Office on Drugs and Crime, https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1953-01-01_3_page005.html.
- Ashrafi, R.; Najaphy; A.; Shaban, M. & Fathi, M. (2012). Evaluation of diversity seed storage proteins and some morphological traits in various species of Papaver. *IJMAPR*, 28(3): 385-398. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2012.2941> [In Persian]
- Azeez, M. A.; Aremu, C. O. & Olaniyan, O.O. (2013). Assessment of genetic variation in accessions of Sesame (*Sesamum indicum*) and its crosses by seed protein electrophoresis. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 19(4): 383 -391. <https://doi.org/10.1108/JAAPT-06-2013-003>
- Bollag, A. & Edelstein, M. (1991). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Bompalli, L.K. & Nallabilli, L. (2013). Genetic diversity of Ocimum species through biochemical technique and UPGMA cluster analysis. *Int J Pharm*, 5(4): 155-159.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 38: 248-252. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Decker, G.; Wanner, G.; Zenk, M.H. & Lottspeich, F. (2000). Characterization of proteins in latex of opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis*, 21: 3500-3516. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(20001001\)21:16<3500::AID-ELPS3500>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3500::AID-ELPS3500>3.0.CO;2-R)
- Eriksson, G., Namkoong, G., Roberds, J.H. (1993). Dynamic gene conservation for uncertain futures. *For Ecol Manage*. 62, 15–37. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(93\)90039-W](https://doi.org/10.1016/0378-1127(93)90039-W)
- Farooq, S. & Azam, F. (2002). Molecular markers in plant Breeding-I: Concepts and characterization. *Pak J Biol Sci*, 5(10):1135–1140. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2002.1135.1140>
- Garima, M.; Chittora, K. & Tiwari. (2013). Assessment of genetic diversity based on polypeptide banding pattern among different isolates of *Aspergillus flavus* using SDS-PAGE. *International Journal of Bioassays*, 2(07): 1034-1036.
- Gole, T.W.; Borsch, T.; Denich, M. & Teketay, D. (2008). Floristic composition and environmental factors characterizing coffee forests in southwest Ethiopia. *For Ecol Manage*, 255: 2138–2150. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.12.028>
- Hadipour, M.; Kamal Kazemitabar, S.; Yaghini, H. & Dayani, S. (2020). Genetic diversity and species differentiation of medicinal plant Persian poppy (*Papaver bracteatum*) using AFLP and ISSR. *Ecological Genetics and Genomics*, 16: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2020.100062>
- Hurkman, W.J. & Tanaka, C.K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol*, 81: 802–806. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.802>
- Isaacson, T.; Damasceno, C.M.; Saravanan, R.S.; He, Y.; Catala, C.; Saladie, M. & Rose, J.K.C. (2006). Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc*. 1: 769–74. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.102>
- Jafari, A.A.; Salehi Shanjani, P.; Kouhi, L. & Bakhshi Khaneki, Gh.R. (2013). Genetic diversity and geographic relationship among 11 *Dactylis glomerata* populations using total protein electrophoresis. *Cell Mol Res*, 36(3): 278-288.
- Kalia, R.K.; Rai, M.K.; Kalia, S.; Singh, R. & Dhawan, A.K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177: 309–334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>
- Kutka Hlozaková, T.; Gregová, E.; Sliková, S. & Galová, Z. (2014). Protein extraction of poppy (*Papaver somniferum*) for proteomic 2-DE analysis. *1st International Interdisciplinary Meeting*

- on *Bioanalysis*, 228-231. Brno, Czech Republic.
- Labanca, F.; Ovesnà, J. & Milella, L. (2018). *Papaver somniferum* L. taxonomy, uses and new insight in poppy alkaloid pathways. *Phytochemistry Reviews*, 17: 853–871. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9563-3>
- Lee, K.L.; Buckley, H.R. & Camobell, C.C. (1975). An amino acid liquid synthetic medium for development of mycelia and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 13(2): 148-53. <https://doi.org/10.1080/00362177585190271>
- Li, T.; Liu, J.; Xie, Y.; Wang, Q. & Meng, F. (2014). Analysis of genetic diversity in *Prunus mira* Koehne ex Sargent populations using AFLP markers. *Plant Systemat Evol.* 300: 475–482. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0906-5>
- Meyfour, A. & Rezaie Tavirani, M. (2002). Comparison of three staining methods, Coomassie blue R250, colloidal Coomassie blue and blue silver for detecting mouse brain proteins separated by two-dimensional electrophoresis. *Ilam University of Medical Sciences*, 22(3): 46-51.
- Miller, J.; Henning, L.; Heazlewood, V.; Larkin, P.J.; Chitty, J.; Allen, R.; Brown, P.H.; Gerlach, W. & Fist, A. (2005). Pollination biology of oilseed poppy, *Papaver somniferum* L. *Crop Pasture Sci*, 56: 483–490. <https://doi.org/10.1071/AR04242>
- Mirjalili, S.A. (2016). Assessment of genetic diversity among some accessions of sage (*salvia officinalis*) using electrophoresis of seed storage proteins. *Iran J Plant Biol*, 8(28): 79-107. <https://doi.org/10.22034/ijpb.2016.132350>
- Mohseni, Z.; Bernousi, I.; Mandoulakani, B.A. & Darvishzadeh, R. (2015). Genetic diversity in *Papaver bracteatum* and *Papaver somniferum* populations revealed by ISSR markers. *Bulg J Agric Sci*, 21(3): 485-493. <https://doi.org/10.15550/ASJ.2015.42.485493>
- Nematollahi, A.; Raouf Fard, F.; Saharkhiz, M.J.; Khosravi, A.R.; Kavooosi, Gh.; Naddaf, F. & Karami, A. (2024). Morphological and phytochemical diversities among Persian poppy (*Papaver bracteatum*) population in Iran. *Industrial Crops and Producta*, 210: 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117678>
- Omonhinmin, C.A. & Ogunbodede, O. (2013). Genetic diversity, taxonomy and legumes implications of seed storage protein profiling in Fabaceae. *African Journal of Biotechnology*, 12(17): 2157-2163. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13142>
- Qaderi, A.; Omidi, M.; Pour-Aboughadareh, A.; Poczai, P.; Shaghghi, J.; Mehrafarin, A.; Nohooji, M. G. & Etmnan, A. (2019). Molecular diversity and phytochemical variability in the Iranian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.): A baseline for conservation and utilization in future breeding programmers. *Industrial Crops and Products*, 130: 237-247. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.010>
- Qaderi, A.; Qavami, N.; Gezelbash, S. & Zarrinpanjeh, N. (2021). Enhanced production of Thebaine in cell suspension cultures of *Papaver bracteatum* by overexpression of SalAT gene. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 1:69-75. <https://doi.org/10.22092/JMPB.2021.353523.1138>
- Ranjan, S.; Matcha, R.; Madhuri, B. & Babu, N. (2012). Comparative evaluation of protein extraction methods from few leguminous seeds. *Int J Adv Biotechnol Res*, 3(2): 558-563.
- Rostampour, S.; Sohi, H. & Dehestani, A. (2010). In vitro regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*). *Biologia*, 65: 647–652. <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0075-7>
- Rostampour, S.; Sohi, H.H.; Jourabchi, E. & Ansari, E. (2009). Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and benzyloisoquinoline alkaloids production in Persian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.): preliminary report. *World J Microbiol Biotechnol*, 25: 1807–1814. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0117-4>
- Salgotra, R.K. & Chauhan, B.S. (2023) Genetic diversity, conservation and utilization of plant genetic resources. *Genes*, 14(174): 1-20. <https://doi.org/10.3390/genes14010174>
- Schultz, J. & Mosbach, K. (1971). Studies on lichen enzymes. Purification and properties of an orsellinate depside hydrolase obtained from *Lasallia pustlata*. *Eur J Biochem*, 22: 153-7. <https://doi.org/10.1042/ejb00220153>
- Seyedi, N.; Jalali, S.G.A.; Moghaddam, M.; Tabari, M. & Mohammadi, S.A. (2010). Application of seed storage protein in intra-specific variation in three populations of *Pistacia Atlantica*.

- Journal of Plant Biology*, 2(6): 1-14.
- Shanker Acharya, H. & Sharma, V. (2009). Molecular characterization of Opium Poppy (*Papaver somniferum*) germplasm. *American Journal of Infectious Diseases*, 5(2): 148-153. <https://doi.org/10.3923/ajid.2009.148.153>
- Siavoshi, Y.; Bahreini Behzadi, M.R. & Behjatian Esfahani, M. (2018). Isolation, characterization and evaluation of protein changes in the milk glands of honey bee at different ages using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). *Journal of Animal research*, 30(4): 428-435. <https://doi.org/10.22092/jsr.2018.107169.1205> [In Persian]
- Singh, S.P.; Shukla, S. & Yadav, H.K. (2004): Multivariate analysis in relation to breeding system in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Genetika*, 36: 111-120. <https://doi.org/10.2298/GENSB0402111S>
- Singh, S.P.; Shukla, S.; Yadav, H.K. & Chatterjee, A. (2003): Multivariate and canonical analyses in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 25: 380-384.
- Sinha, K.N.; Singh, M. & Kumar, C. (2012). Electrophoretic study of seed storage protein in five species of Bauhinia. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 4(2): 8 -11.
- Talei, D.; Khayam Nekouei, M. & Kadkhodaei, S. (2021). Assessment of the genetic diversity among Nain-e Havandi medicinal plants accessions based on protein and SRAP markers. *Modares j Biotech*, 13(3): 14- 29.
- Tetany, P. (2010). Opium poppy (*Papaver somniferum*): botany and horticulture, in: J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews*, John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK: 373-408.
- Verma, N.; Shukla, S.; Yadav, K.; Mishra, B.K. & Rastogi, A. (2015). Biochemical characterization based on SDS-PAGE analysis and correlation among traits in opium poppy (*Papaver somniferum* L.) germplasm. *Genetika*, 47(3): 1029 -1050.