

ارزیابی الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در خشخاش ایرانی

چکیده

خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum*) به عنوان یک گیاه دارویی با قابلیت تولید آلکالوئید تبائین، 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 (*Papaver bracteatum*) که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شده بودند به همراه یک نمونه کنترل *Papaver somniferum* 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 ۱۲۰-۱۳۰ کیلوالتون 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 یوش‌بلده و کردستان روستای پیرعمران ثبت گردید. با استفاده از الگوی الکتروفورز پروتئین بذر دو گونه *P. bracteatum* و *P. somniferum* به خوبی از هم 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 آنها است، بنابراین الگوی الکتروفورز پروتئین بذر قادر است برای جداسازی و شناسایی جمعیت‌های مختلف این گونه در برنامه‌های حفاظت مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه: خشخاش ایرانی، SDS-PAGE الگوی الکتروفورزی، روش استخراج پروتئین، تنوع ژنتیکی

Evaluation of seed storage proteins profile in *Papaver bracteatum*

Abstract

The Iranian poppy (*Papaver bracteatum*) is a medicinal plant known for its ability to produce the alkaloid tebane 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 *Papaver somniferum*, 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 120-13 kDa when comparing electrophoresis patterns. The least and most 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 *P. bracteatum* and *P. somniferum*. 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.

Key words: SDS-PAGE, electrophoresis pattern, protein extraction method, genetic diversity, *papaver bracteatum*

خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum*) گیاهی دیپلوئید ($2n=14$) و چندساله دگرگشن با خودناسازگاری گامتوفیتی است (Hadipour et al., 2020; Mohseni et al., 2015). این گونه گیاه دارویی ارزشمندی است که در مناطق محدودی از ایران یافت می‌شود. دارای مقدار قابل توجهی آکالوئید تبائین است که می‌تواند براحتی به کدئین تبدیل شود (Nematollahi et al., 2024; Anonymus, 2019). همچنین می‌تواند به ترکیبات بنتلی و چندین آنتاگونیست مخدر تبدیل شود (Nematollahi et al., 2024). تبائین از جمله متابولیت‌های ثانویه است که بدلیل انتشار گسترده و خواص دارویی بی‌نظیر آن نقش مهمی در تولید داروهای گیاهی و صنایع دارویی دارد (Qaderi et al., 2020). علاوه بر این ترکیبات، پاپاورین آکالوئید غیرمخدر مهم و اقتصادی دیگری است که خاصیت گشادکننده عروق را دارد (Labanca et al., 2018; Anonymus, 2020). با توجه به افزایش تقاضا برای استفاده از آکالوئیدهایی مثل تبائین، مورفین و اورپاوین در صنایع داروسازی، برنامه‌های اصلاحی و بیوتکنولوژی برای اصلاح خشخاش ایرانی بعنوان منبع چنین آکالوئیدهایی توصیه می‌شود (Rostampour et al., 2009; Rostampour et al., 2010). با تغییر در شرایط محیطی، گونه‌های مختلف گیاهی با داشتن تنوع ژنتیکی و سازگاری به این تغییرات سازگار زنده می‌مانند (Salgotra and Chauhan, 2023). بعلاوه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها در کشورهای زیستگاه گونه باید مورد مطالعه قرار گیرد تا دانش ما در مورد آخرین وضعیت منابع ژنتیکی گسترش یابد (Hadipour et al., 2020). آگاهی از تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی به برنامه‌های حفاظت از ژرم‌پلاسماها و بهبود ویژگی‌های گیاهی کمک می‌کند (Kalia et al., 2011). پروتئین‌های بذر بعنوان نشانگرهای زیستی استفاده می‌شوند زیرا آنها از نظر فیزیولوژیکی پایدار بوده به آسانی قابل ردیابی هستند. پروتئین‌ها عموماً تنوع چند شکلی داشته و قابل توارث هستند. آنها محصول مستقیم ژن‌های فعال هستند جاییکه محیط تاثیر کمی دارد (Omonhinmin and Ogunbodede, 2013; Garima et al., 2013). آنالیز پروتئین‌های بذر از طریق ژل الکتروفورز SDS-PAGE بطور گسترده برای مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ها استفاده می‌شود (Omonhinmin and Ogunbodede, 2013).

در بررسی تنوع ژنتیکی خشخاش ایرانی جمع‌آوری شده از چند منطقه در ایران با استفاده از نشانگرهای AFLP و ISSR مشخص شد که فاصله جغرافیایی درون جمعیت‌ها می‌تواند ناشی از جریان ژنی محدودشده 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 بر اساس داده‌های نشانگر RAPD ژنوتیپ‌ها در ۴ گروه جداگانه قرار گرفتند در حالیکه تجزیه کلاستر بر اساس نشانگر ISSR ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در دو گروه جداگانه قرار داد. بر اساس داده‌های این دو نشانگر تنوع ژنتیکی پایینی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد (Shanker Acharya and Sharma, 2009). وجود تنوع ژنتیکی گسترده در خشخاش ایرانی (*P. bracteatum*) با استفاده از نشانگر مولکولی و فیتوشیمیایی گزارش شده است (Qaderi et al., 2019). مقایسه الگوی باند پروتئین بذر ۷ گونه مختلف خشخاش از مناطق مختلف استان اردبیل با استفاده از SDS-PAGE این گونه‌ها را در ۴ گروه مختلف قرار داد. در گروه اول *P. somniferum* در گروه دوم *P. oreintale*، *P. bracteatum*، *P. lasiotrix*، *P. rhoeas* گروه سوم شامل *P. dubium* و در گروه چهارم *P. argemone* قرار گرفت (Ashrafi et al., 2013). ۱۲۴ ژرم‌پلاسما *P. somniferum* بر اساس الگوی الکتروفورز پروتئین بذر در ۱۳ گروه مختلف گروه‌بندی شدند (Verma et al., 2015). از آنجاییکه استفاده از پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر بعنوان نشانگر بیوشیمیایی در ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی از نظر زمان، هزینه و کارایی موثر است در این آزمایش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی خشخاش ایرانی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران بعنوان یک گونه ارزشمند در صنایع دارویی از نشانگر بیوشیمیایی پروتئین بذر استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۱۸ جمعیت از گونه خشخاش ایرانی (*P. bracteatum*) به همراه یک نمونه *P. somniferum* بعنوان 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 مختلف تریس (Ranjan et al., 2012)، فسفات (Schultz and Mosbach, 1971)، تری کلرواستیک‌اسید (Isaacson et al., 2006) و فنل (Hurkman and 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 آلومین گاهی 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 عرض از مبدأ این خط نیز مورد آزمون قرار گرفت. با مشخص شدن معادله نهایی خط رگرسیون، غلظت پروتئین در نمونه‌های مورد بررسی 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 پیر عمران	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 یوش بلده	۲
P17, P18	AlbZnBrdg	<i>P. bracteatum</i>	البرز	منطقه پل زنگوله	۲
P19	KrdSorn*	<i>P. somniferum</i>	کردستان	گردنه سورین	۱

هم غلظت 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 سدیم دودسیل سولفات (SDS) استفاده شد. در روش سدیم

دودسیل سولفات معمولی (یک بعدی) از دو ژل به نام ژل متمرکز کننده^۱ و ژل جدا کننده^۲ ۱۲/۵٪ جهت تفکیک پروتئین‌ها استفاده گردید. پس از آماده‌سازی ژل، نمونه‌ها با بافر نمونه با ترکیبات (برومو فنول بلو، گلیسرول، اوره، سدیم دودسیل سولفات، تریس HCl ۱/۵ مولار با اسیدیته ۸ و بتامرکاپتواتانول) مخلوط‌شده 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. الکتروفوز با ولتاژ ۹۰ ولت در ژل متمرکزکننده به مدت ۲ ساعت و با ولتاژ ۲۵۰ ولت در ژل جداکننده به مدت ۳ 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

با توجه به تنوع مشاهده‌شده در روش رنگ‌آمیزی ژل در بین 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 نیترا تفره 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 ۱۶ ساعت درون محلول قرار داده شد. بعد از آن ژل به مدت ۲-۳ ساعت در محلول رنگ‌بر به منظور شفاف‌شدن زمینه ژل و ظاهر شدن باندها قرار گرفت.

روش نیترا تفره

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 and Rezaie Tavirani, 2002) انجام شد و ژل به مدت ۱۶ 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 ۲-۳ ساعت یا بیشتر درون محلول روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار داده شد تا زمینه ژل کاملاً شفاف شود. سپس ژل اسکن‌شده و مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز داده‌ها

الگوی نواری باندهای چند شکل به صورت ۱ و ۰ و با استفاده از نرم افزار 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 کوفتیک، با استفاده از روش UPGMA مناسب‌ترین گروه‌بندی بدست آمد.

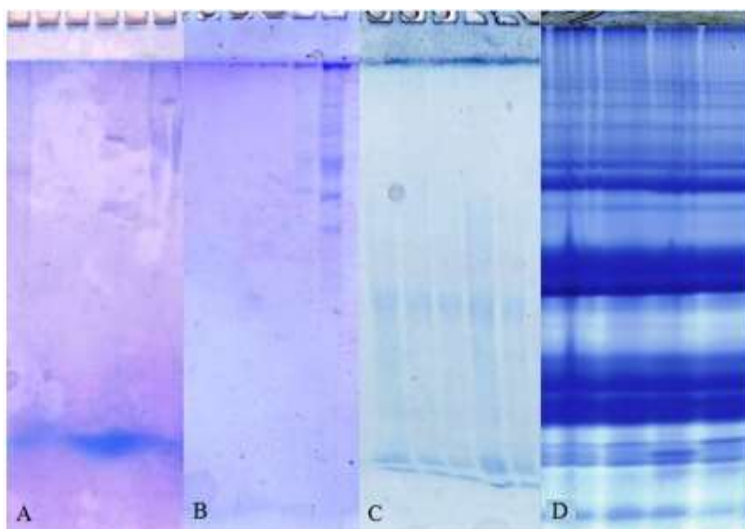
نتایج

نوع روش استخراج پروتئین بر کیفیت و کمیت پروتئین موثر 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

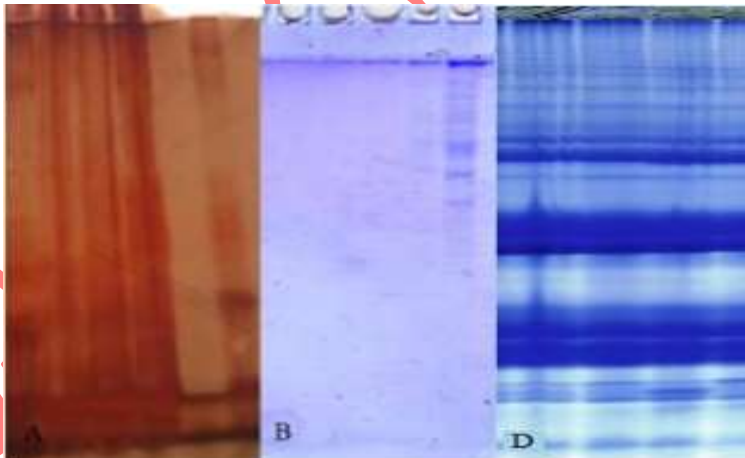
¹Stacking gel

²Resolving gel

الکتروفورز دو بعدی در گیاه (*Papaver somniferum*) توسط (Kutka Hlozakova et al., 2014) مشخص گردید که روش فنل مناسب‌ترین روش استخراج پروتئین می‌باشد که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. همچنین مقایسه روش‌های مختلف رنگ آمیزی (شکل ۲) نشان داد که الگوی باندها با روش کوماسی بریلیانت بلو G250 وضوح بالاتری داشتند و این روش رنگ‌آمیزی باعث بهبود در ردیابی باندهای پروتئینی شد



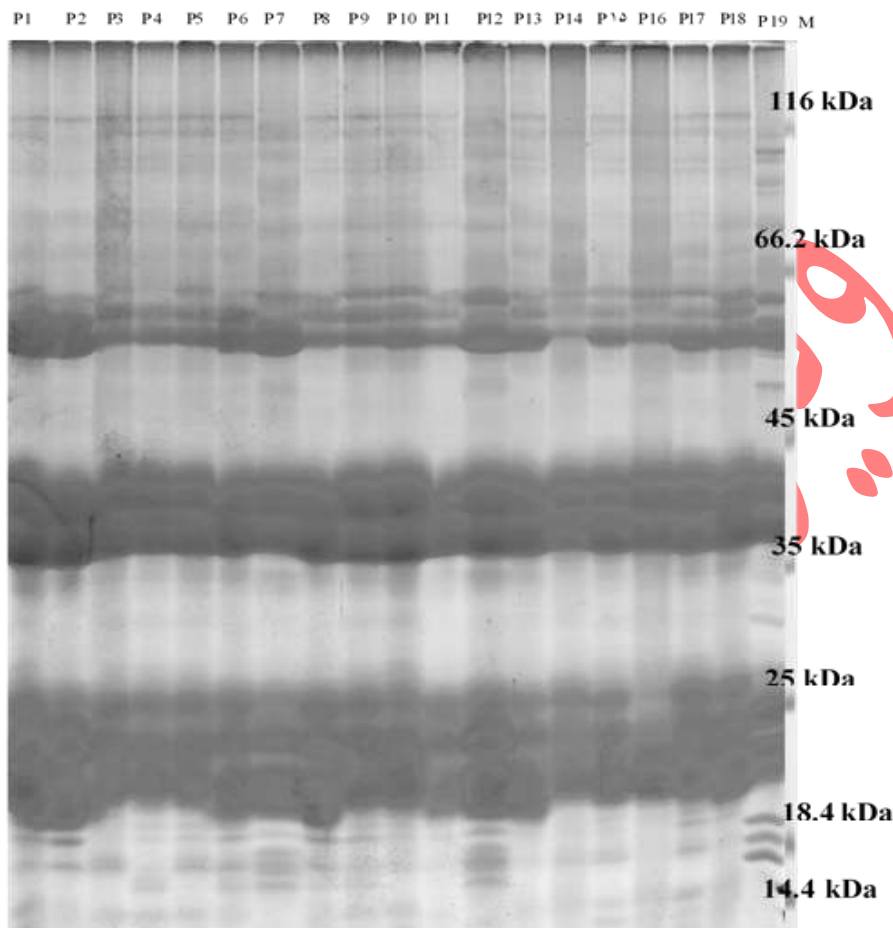
شکل ۱- مقایسه روش‌های مختلف استخراج پروتئین. A: روش تریس B: روش فسفات C: روش تری کلرو اسید استیک D: روش فنل



شکل ۲- مقایسه روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی پروتئین. A: روش نیرات نقره B: روش کوماسی بریلیانت بلو R۲۵۰ D: روش کوماسی بریلیانت بلو G۲۵۰

امتیازبندی نوآرها به طور کامل از انتخاب باندها تا اسکورینگ، با استفاده از نرم افزار Phoretix pro, v10.4 به صورت 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 دیده شد. اطلاعات کلی و اطلاعات مربوط به پروتئین‌ها در جدول ۲ آورده شده‌است. باندهای ۴۴ و ۶۵ اختصاصی جمعیت P15 بوده در حالیکه باند شماره ۱ فقط در جمعیت P4، باند شماره ۲۵ در جمعیت P1، باند شماره ۵۰ در جمعیت P7، باند شماره ۶۲ در جمعیت P12 دیده شد. باندهای ۱۳ و ۵۵ اختصاصی جمعیت P19 بودند. باند شماره ۶ در همه جمعیت‌ها بغیر از جمعیت P7 وجود داشت

همچنین باند شماره ۷ در همه جمعیت‌ها به غیر از دو جمعیت 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 باندی ایجاد شده از استخراج پروتئین بذر جمعیت‌های *Papver bractateum* بر روی ژل اکریل آمید SDS-PAGE

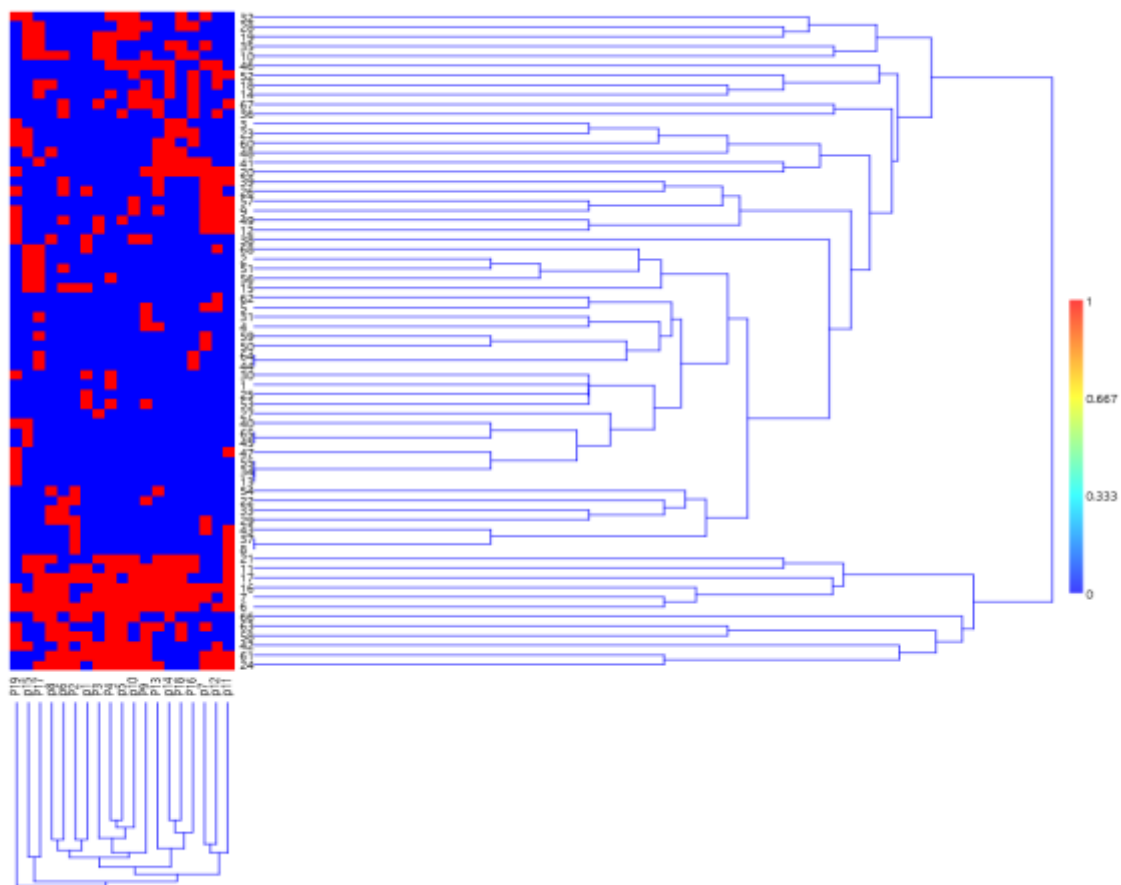
تشابه ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه مولفه‌های اصلی

شباهت ژنتیکی درون گونه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس 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 یوش‌بلده و کردستان روستای پیرعمران دیده شد (جدول ۳). بر اساس شاخص تشابه، شباهت بین ژرم پلاسماها به کاملاً شبیه ($G_s=1$)، خیلی شبیه ($G_s=0.8-0.9$)، شباهت متوسط ($G_s=0.6-0.7$) و کمترین شباهت ($G_s \leq 0.3$) تقسیم می‌شوند (Verma et al., 2015).

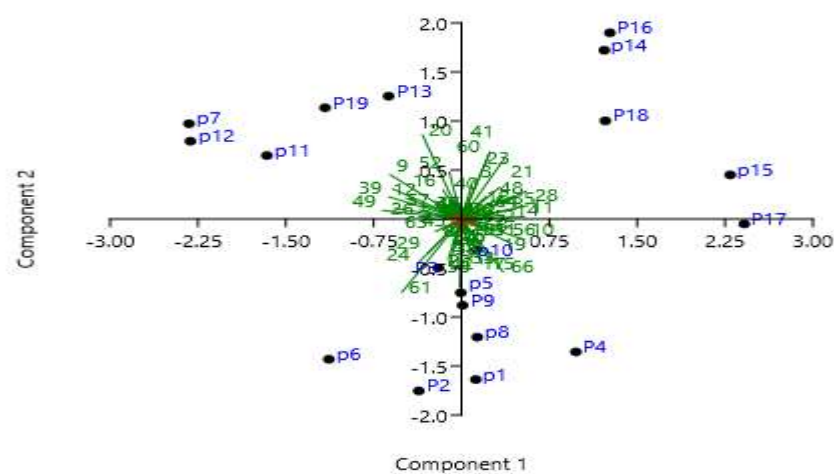
جدول ۲- تعداد، تحرک نسبی و وزن مولکولی باندهای مشاهده شده در خشخاش ایرانی

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	۱۲۲/۵	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

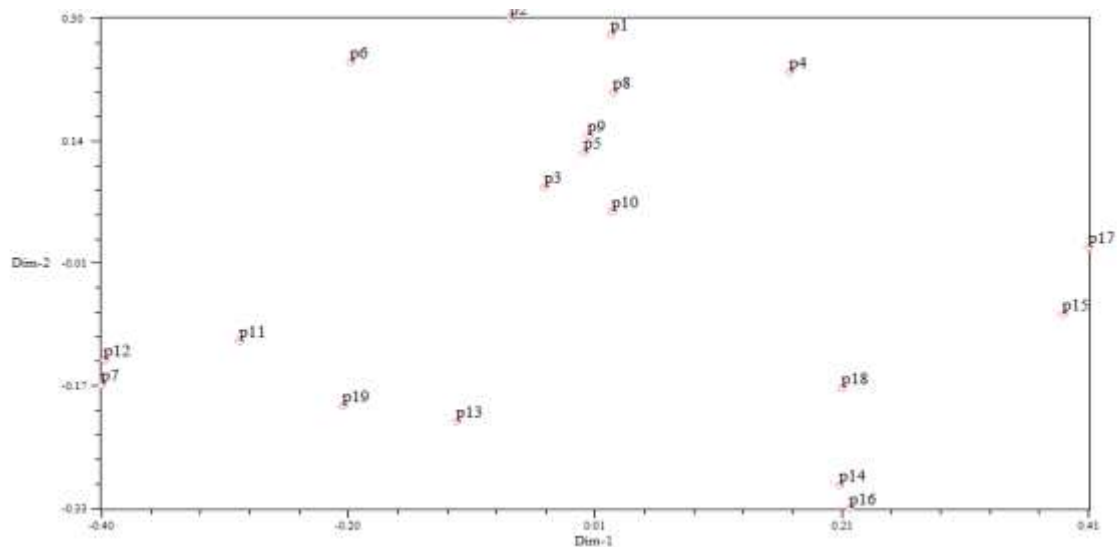
بر اساس این تقسیم‌بندی شباهت اکثر جمعیت‌های مورد مطالعه متوسط بود بجزء جمعیت‌های P14 ، P16 ، P18 و همچنین P5 با P4 و P10 که در گروه خیلی شبیه تقسیم‌بندی شدند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم افزار NTSYS pc 2.02 به روش UPGMA و ضریب تشابه دایس انجام شد (شکل ۴). در این مطالعه جمعیت‌های مورد مطالعه در پنج گروه مجزا تفکیک شدند. جمعیت‌های P1، P2، P3، P4 ، P5 ، P6 ، P8 ، P9 و P10 در گروه اول، جمعیت‌های P16 ، P18 ، P13 و P14 در گروه دوم و جمعیت‌های P7 ، P12 ، P11 در گروه سوم قرار گرفتند اما گروه چهارم شامل جمعیت‌های P15 و P17 بود



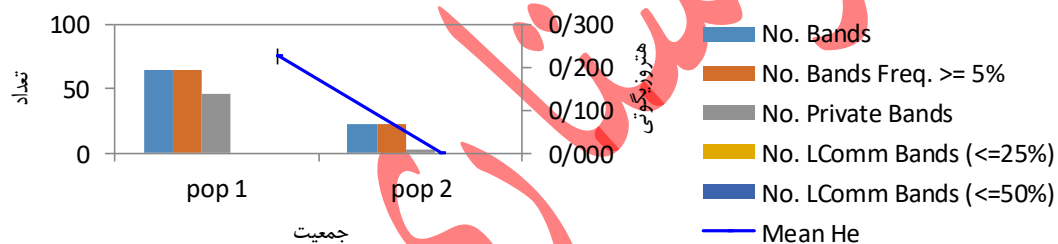
شکل ۴- نمودار خوشه‌ای ۱۹ نمونه حاصل از پروتئین‌های افراد هر منطقه با استفاده از ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA



شکل ۵- نمودار تجمع افراد در اطراف سه مولفه ابتدایی در تجزیه به مولفه‌های متعادل در حالت سه بعدی



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



شکل ۷- الگوی باندی در بین جمعیت‌های مورد مطالعه

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی در *P.bracteatum*

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

در حالیکه جمعیت P19 که تنها گونه *P. somniferum* بعنوان کنترل بود که در یک گروه جداگانه قرار گرفت. با توجه به جدول ۳ و شکل ۷ سطح هتروزیگوتی پایینی در گونه *P.bracteatum* ۰/۲۲ مشاهده شد در حالیکه تعداد آلل موثر و شاخص شانون در این گونه ۱/۳۴ و ۰/۶۶ بود. در گونه *P.bracteatum* ۶۵ باند مشاهده شد که ۴۶ اختصاصی گونه بود در حالیکه در *P. somniferum* ۲۲ باند مشاهده شد که ۳ باند آنها اختصاصی بود.

بحث

در مقایسه روش‌های مختلف استخراج پروتئین برای الکتروفورز دو بعدی در گیاه شقایق (*P. somniferum*) توسط (Kutka Hlozakova et al., 2014) مشخص گردید که روش فنل مناسب‌ترین روش استخراج پروتئین می‌باشد که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. همچنین مقایسه روش‌های مختلف رنگ آمیزی (شکل ۲) نشان داد که الگوی باندهای روش کوماسی بریلیانت بلو G250 وضوح بالاتری داشتند و این روش رنگ‌آمیزی باعث بهبود در ردیابی باندهای پروتئینی شد و این یافته‌ها با مطالعه Siavoshi و همکاران (2018) همسو می‌باشد. الگوی باندی متفاوت 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 نشان می‌دهد که تعدادی از پپتیدهای پروتئینی در وزن مولکولی خاصی روی هم قرار گرفته‌اند. جمعیت P19 که تنها گونه *P. somniferum* بعنوان کنترل بود که در یک گروه جداگانه قرار گرفت. با توجه به متفاوت بودن این گونه این نتیجه قابل پیش‌بینی بود و نشان‌دهنده قابلیت این نشانگر بیوشیمیایی در تفکیک گونه‌های مختلف می‌باشد. بیشترین شباهت در گروه اول و دوم مشاهده شد. نتایج آنالیز تجزیه مولفه‌های اصلی (شکل ۵ و ۶) با تجزیه خوشه‌ای هماهنگ می‌باشد که نشان‌دهنده صحیح بودن گروه‌بندی می‌باشد. در ابتدا چنین تصور می‌شود که بذره‌ای جمع‌آوری شده از مکان‌های نزدیک به هم شباهت بیشتری باید داشته باشند اما دندروگرام بدست آمده نشان داد که نزدیکی جغرافیایی در این جمعیت‌ها کمترین تاثیر را داشت.

قرار گرفتن جمعیت‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه در کلاسترهای مختلف و برعکس نشان‌دهنده تنوع درون گونه‌ای بالا در گونه *P. bracteatum* است. با توجه به جریان ژنی بالا در گونه‌های دگرگشن تنوع زیاد درون جمعیت‌ها امری طبیعی است (Talei et al., 2021).

بر اساس نتایج این بررسی مشاهده می‌شود که تاثیر منطقه جغرافیایی بر شباهت جمعیت‌ها و گروه‌بندی آنها ناچیز است. این می‌تواند به چند علت باشد:

۱- این سطح از شباهت بین جمعیت‌هایی در مناطق جغرافیایی مختلف نمی‌تواند ناشی از پدیده تلاقی بین گونه‌ای در مناطق جغرافیایی هم‌جوار باشد اگر چه با گذشت زمان بذرها به هر وسیله‌ای به مکان‌های دور جایی که شرایط رشد برای رشد و استقرار آنها مناسب است 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 مناطق مرتفع پراکنده شده است. این موضوع می‌تواند باعث جداسازی جمعیت گونه‌ها با فاصله دور از هم و حتی با فاصله نزدیک به هم به علت محدودیت جریان ژنی در بین آنها شود. بنابراین *P. bracteatum* می‌تواند مستقیماً تحت‌تاثیر هر گونه تغییر در جمعیت گرده‌افشان‌های زنده مثل زنبورهای عسل و سوسک به دلیل 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 بطور موفقیت‌آمیزی بعنوان یک نشانگر بیوشیمیایی در ارزیابی تنوع و تایید 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 اکولوژیکی نشان نمی‌دهد که نشان می‌دهد این نشانگر می‌تواند ابزار ارزشمندی برای شناسایی جمعیت‌هایی با تنوع ژنتیکی بالا باشد (Jafari et al., 2013). همچنین 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 ژرم پلاسماهایی با منشاء جغرافیایی مشترک در چندین کلاستر متفاوت توزیع شدند که نشان‌دهنده نقش جزئی توزیع جغرافیایی در تنوع ژنتیکی ژرم پلاسماهای خشخاش با منشاء هند بود (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 مستقل بودن تنوع ژنتیکی و پراکنش جغرافیایی از هم بوده و رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی وجود ندارد (Afkar and Zand., 2020). مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مریم گلی (*Salvia officinalis*) با استفاده از الگوی الکتروفورز پروتئین بذر رابطه منطقی بین جمعیت‌ها و منطقه جغرافیایی محل رشد آنها نشان داد (Mirjalili, 2016) که تحقیقات ذکرشده در بالا تاییدی بر نتایج این آزمایش می‌باشد. تکنیک‌های مختلفی شامل نشانگرهای مورفولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی برای مطالعه تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود (Farooq and Azam, 2002). با استفاده از الگوی الکتروفورز پروتئین بذر دو گونه *P. somniferum* و *P. bracteatum* از هم تفکیک شدند. از آنجاییکه در بذرهای بالغ نوع و مقدار پروتئین‌ها نسبت به برگ ثابت‌تر است الگوی SDS-PAGE پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در خشخاش، چندشکلی را بر اساس تفاوت در شدت پروتئین در ژرم پلاسماها نشان داد. مطالعه Verma و همکاران نشان داد که پروفایل پروتئین ذخیره بذر می‌تواند نشانگر خوبی برای شناسایی ژرم پلاسماهای خشخاش *P. somniferum* باشد (Verma et al., 2015) که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. این اولین گزارش تعیین بهترین روش استخراج پروتئین بذر، روش رنگ‌آمیزی و مطالعه الگوی الکتروفورزی گونه *P. bracteatum* می‌باشد. استفاده از الکتروز دو بعدی به منظور شناسایی دقیق‌تر تنوع ژنتیکی و وزن پپتیدهای مشاهده شده بسیار کاربردی‌تر بوده لذا پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده این جمعیت‌ها مدنظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

از میان ۴ روش استخراج پروتئین در نهایت استخراج پروتئین با استفاده از روش فنل و روش رنگ‌آمیزی کوماسی برلیانت بلو جی ۲۵۰ بهترین نتیجه را نشان دادند. بیشترین فاصله بین دو جمعیت روستای یوش بلده البرز با جمعیت از روستای پیرعمران کردستان وجود داشت و مشخص گردید که رابطه مشخصی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی وجود ندارد. بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که الگوی الکتروفورز پروتئین بذر توانایی جداسازی و شناسایی جمعیت‌های مختلف این گونه را دارد.

References

- Afkar, S., Zand, R. (2020) Genetic relationships of some mint species using seed storage protein pattern. *J Genet Resour.* 6 (1), 12-19.
- Anonymus (2019) EFSA, EFSA, Opium alkaloids in poppy seeds.; <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180516>.
- Anonymus. (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. (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.
- 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.
- 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.
- Eriksson, G., Namkoong, G., Roberds, J.H. (1993). Dynamic gene conservation for uncertain futures. *For Ecol Manage*. 62, 15–37.
- Farooq, S., Azam, F. (2002). Molecular markers in plant Breeding-I: concepts and characterization. *Pak J Biol Sci*, 5(10):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.
- 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.
- Hurkman, W.J., Tanaka, C.K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol*, 81: 802–806
- 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.
- 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.
- Kutka Hlozakova, T., Gregova, E., Slikova, S., Galova, Z. (2014). Protein extraction of poppy (*Papaver somniferum*) for proteomic 2- DE analysis. 1th 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.

- 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.
- 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.
- Meyfour, A., Rezaie Tavarani, 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., Fitt, A. (2005). Pollination biology of oilseed poppy, *Papaver somniferum* L. *Crop Pasture Sci*, 56: 483–490.
- 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.
- 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.
- Nematollahi, A., Raouf frad, 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.
- 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.
- Qaderi, A, Omid, M, Pour-Aboughadareh, A, Poczar, P, Shaghaghi, J, MehrAfarin, A, Nohooji, M. G., Etminan, A. (2019). Molecular diversity and phytochemical variability in the Iranian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.): A baseline for conservation and utilization in future breeding programmes. *Industrial Crops and Products*, 130: 237-247.
- 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
- 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.
- Rostampour, S., Sohi, H.H., Jourabchi, E., Ansari, E. (2009). Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and benzyloquinoline alkaloids production in Persian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.): preliminary report. *World J Microbiol Biotechnol*, 25:1807–1814.
- Salgotra, R.K., Chauhan, B.S. (2023) Genetic diversity, conservation and utilization of plant genetic resources. *Genes*, 14 (174): 1-20.
- Schultz, J., Mosbach, K. (1971). Studies on lichen enzymes. Purification and properties of an orsellinate depside hydrolase obtained from *Lasallia pustulata*. *Eur J Biochem*, 22: 153-7.
- 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.

- 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. (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.
- 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, 2010, pp. 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.

Extended Abstract

Introduction

Iranian poppy (*Papaver bracteatum*) is a valuable medicinal plant found in limited regions of Iran. It contains a significant amount of thebaine alkaloid which possesses important medicinal properties which can be easily converted into codeine. Additionally, It can be transformed to Bentley compounds and various narcotic antagonists. Thebaine serves as a precursor alkaloid with notable therapeutic benefits and is utilized in the synthesis of numerous morphine-based drugs, including noscapine as an antitumor agent, codeine as a cough suppressant, sanguinary as an antimicrobial drug, morphine as a narcotic, and palavering as a vasodilator. Seed storage proteins are employed as biomarkers due to their physiological stability and ease of handling. These proteins typically exhibit polymorphisms and are heritable, being the direct products of active genes with minimal environmental influence. The analysis of seed storage proteins through SDS-PAGE gel electrophoresis is commonly used to study genetic variation within and between species. In this experiment, the biochemical marker of seed protein was utilized to explore the genetic diversity of wild Iranian poppy species collected from various regions of Iran, highlighting its significance in the pharmaceutical industry.

Material and Methods

This experiment aims to determine the optimal method for protein extraction and staining of protein bands, as well as to investigate the genetic diversity of 18 populations of wild Iranian poppy species (*Papaver bracteatum*) collected from various regions of Iran, alongside a sample of *P. somniferum* as a control, using protein electrophoresis patterns. Four different methods, including Tris, phosphate, trichloroacetic acid, and phenol, were employed for seed protein extraction. Three gel staining methods, namely AgNO₃, Coomassie Brilliant Blue G250, and Coomassie Brilliant Blue R250, were also utilized. The band patterns of polymorphic bands in protein gels were scored as 1 and 0 using Phoretix Pro software. In this study, Photoshop CS11, GenAlex, and NtSYS V.2.0.2 software were used to analyze the molecular data.

Result and Discussion

Comparison of different methods of protein extraction determined that the phenol method yielded the best results. The band patterns observed with the Coomassie Brilliant Blue G250 method exhibited higher

resolution, and this staining technique enhanced the tracking of protein bands. A total of 68 bands with molecular weights ranging from 13 to 120 kDa were identified. The lowest and highest number of bands were found in the P2 and P17 populations, respectively. It is known that varying band patterns indicate genetic diversity, while the presence of a common band suggests a genetic relationship. Additionally, a common band among different genotypes may indicate a shared evolutionary origin. Notably, differences in the density of certain protein bands suggest that multiple protein peptides of specific molecular weights are stacked on top of one another. In this study, the genetic similarity among the investigated populations ranged from 0.4 to 0.8. The greatest distance between the two populations, P15 and P7, was observed from the Alborz region, specifically Yushbeldeh village and Kurdistan, Piromran village, respectively. Using seed protein electrophoresis patterns, *P. bracteatum* and *P. somniferum* species were distinctly separated. Given the differing nature of these species, this outcome was anticipated. The highest similarity was noted in the first and second groups. The results from the principal component analysis align with the cluster analysis, confirming the accuracy of the grouping. Cluster analysis was performed using the UPGMA method and the Dice similarity coefficient, resulting in the division of the studied populations into five distinct groups. Utilizing the seed protein electrophoresis pattern, the two species, *P. somniferum* and *P. bracteatum*, were effectively separated. Since the type and quantity of proteins in mature seeds are more stable than in other plant tissues, the SDS-PAGE pattern revealed the storage proteins of seeds in polymorphic poppy based on variations in protein intensity among germplasms. It was determined that the seed storage protein profile can serve as a reliable indicator for identifying *P. bracteatum* populations.

Conclusion

The results of this study indicate that the geographical region has an insignificant effect on the similarity and grouping of populations, while the pattern of seed protein electrophoresis effectively separates and identifies different populations of this species.