الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة دمشق
كلية الزراعة
ماجستير التقانات الحيويّة

دراسة كيميائيّة وجزيئيّة لبعض أنواع اللوز البري المنتجة للأميغدالين في محافظتي حمص والسويداء

A chemical and molecular study of some wild almond species producing amygdalin in the governorates of Homs and Suwayda

رسالة أعدت لاستكمال متطلبات الحصول على درجة الماجستير في التقانات الحيويّة

إعداد المهندس

فراس العراوي

المشرف الرئيس

الأستاذ الدكتور محمد محمد

الأستاذ في قسم علوم الأغذية

كلية الهندسة الزراعية - جامعة دمشق

المشرف المشارك

الدكتورة نسرين نقشو

الباحثة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية

وزارة التعليم العالي

دمشق 2020م

الإشراف العلمي

الأستاذ الدكتور محمد محمد:

أستاذ في قسم علوم الأغذية / كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق (المشرف الرئيس).

الدكتورة نسرين نقشو:

باحثة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية – دمشق (المشرف المشارك).

Scientific Supervision

Prof. Dr. Mohamad Mohamad:

Professor in the Department of Food Sciences / Faculty of Agricultural Engineering - Damascus University (Main Supervisor).

Dr. Nisrin Nakshoo:

Researcher at the National Commission of Biotechnology – Damascus (Co-Supervisor).

تصريح

أصرح بأن العمل المقدم في هذه الرسالة، بعنوان:

"دراسة كيميائية وجزيئية لبعض أنواع اللوز البري المنتجة للأميغدالين في محافظتي حمص والسويداء"

لم يسبق أن قُدم للحصول على أية شهادة أخرى، وغير مُقدم حالياً لذلك. وإنّ أية معلومات أو نتائج أخرى ذكرت في الرسالة قد نُسبت إلى مصادرها ومؤلفيها في النص وفي قائمة المراجع.

المرشح

م. فراس العراوي

Declaration

I declare that the presented work in this thesis. in titled:

"A chemical and molecular study of some wild almond species producing amygdalin in the governorates of Homs and Suwayda"

He has not previously applied to obtain any other degree, and is not currently submitted for that. Any other information or results mentioned in the thesis have been attributed to its reference and authors in the text and in the reference list.

Candidate

Eng. Firas Alarawi

شهادة

نشهد بأن العمل المقدم في هذه الرسالة، هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح **المهندس فراس العراوي**. بإشراف **الأستاذ الدكتور محمد محمد** (المشرف الرئيس)، أستاذ في قسم علوم الأغذية / كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق. و**الدكتورة نسرين نقشو** (المشرف المشارك) باحثة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية. وأي مراجع أخرى ذكرت في هذا العمل موثقة في نص الرسالة.

المرشح	المشرف المشارك	المشرف الرئيس
م. فراس العراوي	**د. نسرين نقشو**	**أ. د. محمد محمد**

Certification

We witness that the described work in this thesis is the result of scientific research carried out by the candidate **Eng. Firas Alarawi**. Under the supervision of **Prof. Dr. Mohamad Mohamad** (Main Supervisor), Professor in the Department of Food Sciences / Faculty of Agricultural Engineering - Damascus University. And **Dr. Nisrin Nakshoo** (Co-Supervisor), Researcher at the National Commission of Biotechnology. And any other references mentioned in this work are documented in the text of the thesis.

Candidate	Co-Supervisor	Main Supervisor
Eng. Firas Alarawi	**Dr. Nisrin Nakshoo**	**Prof. Dr. Mohamad Mohamad**

السيد الأستاذ الدكتور عميد كلية الزراعة المحترم

ع/ط السيد الدكتور النائب العلمي المحترم

تحية طيبة وبعد،

نحيطكم علماً بأن الطالب فراس زيد العراوي المسجل في درجة ماجستير التقانات الحيوية، والذي ناقش رسالة الماجستير بتاريخ 2020/12/1، تحت عنوان:

"دراسة كيميائية وجزيئية لبعض أنواع اللوز البري المنتجة للأميغدالين في محافظتي حمص والسويداء".

قد أنهى كافة التعديلات المطلوبة من قبل لجنة الحكم.

دمشق في 2020/12/13

أعضاء لجنة الحكم المؤلفة من السادة الأساتذة:

أ. د. محمد محمد

أستاذ في قسم علوم الأغذية / كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق (عضواً مشرفاً)

أ. د. محمد خير طحلة

أستاذ في قسم علوم الأغذية / كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق (عضواً)

د. سلام لاوند

أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية / كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق (عضواً)

قُدمتْ هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في التقانات الحيوية / كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق.

This thesis has been submitted to complete the requirements for obtaining a Master degree in biotechnology / Faculty of Agricultural Engineering - Damascus University.

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2020/12/1 وأجيزت، أمام لجنة الحكم المؤلفة من السادة الأساتذة:

أ. د. محمد محمد

أستاذ في قسم علوم الأغذية / كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق (عضواً مشرفاً)

أ. د. محمد خير طحلة

أستاذ في قسم علوم الأغذية / كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق (عضواً)

د. سلام لاوند

أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية / كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق (عضواً)

التدقيق اللغوي

أنا الموقع أدناه وسام عبد الكريم بو فاعور، الحاصل على إجازة في اللغة العربية وآدابها من كلية الآداب في جامعة دمشق عام 2016م.

أشهد بأن الرسالة الموسومة بـ "دراسة كيميائيّة وجزيئيّة لبعض أنواع اللوز البري المنتجة للأميغدالين في محافظتي حمص والسويداء" قد تم تدقيقها تدقيقاً لغوياً وعلى مسؤوليتي.

المدقق اللغوي

وسام بو فاعور

كلمة الشكر

إلى المنارات التي أضاءت لي طريق البحث، أتقدم بجزيل الشكر إلى الأستاذ الدكتور محمد محمد الأستاذ في قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة – جامعة دمشق (المشرف الرئيس)، والدكتورة نسرين نقشو الباحثة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية (المشرف المشارك).

كما أتقدم بجزيل الشكر إلى لجنة الحكم، التي أثرت البحث وأكملت نواقصه، والممثلة بـ (الأستاذ الدكتور محمد محمد، والأستاذ الدكتور محمد خير طحلة، والدكتورة سلام لاوند)، وصولاً إلى عمادة كلية الزراعة بجامعة دمشق، ممثلة بعميد الكلية والوكيلين العلمي والإداري، ومناهل العلم أساتذتي في ماجستير التقانات الحيوية الذي نهلنا منه تلك المعلومات التي أوصلتنا إلى هنا، وأخص بالذكر الدكتورة سلام لاوند (أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية – كلية الزراعة – جامعة دمشق) التي كان لها فضلاً كبيراً بالمساعدة العلمية في هذا البحث. ولا أستطيع أن أنسى أيضاً الفضل الكبير للدكتور رمزي مرشد (أستاذ مساعد في قسم علوم البستنة – كلية الزراعة – جامعة دمشق) على الدعم العلمي والعملي الكبيرين لإنجاز هذا البحث، شكراً من القلب.

إلى مركز العلم في هذه البقعة، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، ممثلة بالمدير العام وجميع مخابرها التي أتاحت لي الفرصة لإتمام هذا العمل. كلماتي عاجزة عن صياغة كلمات الشكر لكل ما قدمته وتقدمه لدعم البحث العلمي. وأخص بالذكر الدكتور فهد البيسكي (رئيس قسم تقانات زراعة الأنسجة النباتية) والدكتور بسام العقلة (رئيس قسم تقانات الأغذية) على دعمهما العملي الدائم، والدكتور نورس الأبرص (رئيس قسم التنوع الحيوي) الذي قدم المساعدة في جمع وتصنيف الطرز المدروسة. والكادر الفني من مهندسين ومخبريين الذين لا يسعني ذكر أسمائهم جميعاً.

وأشكر الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في دمشق وكل من قدم لي المساعدة لإنجاز هذا العمل، وأخص بالذكر الدكتورة محاسن توكلنا رئيسة قسم اللوزيات والمهندس أمجد فرح، والدكتورة نجوى الحجار (الباحثة في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في السويداء)، والدكتور طلال فوزو (رئيس قسم اللوزيات في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في حمص) والمهندس تامر العمر.

والشكر الكبير لكل أصدقائي في الكلية والهيئة وخارجها الذين كانوا عوناً لي في عملي هذا، وأخص بالذكر المهندس محمود الدرويش، والسيد نبراس عبيد، والسيد أنس أبو زيدان، والسيد وسام بو فاعور الذي قام بالتدقيق اللغوي لهذه الرسالة.

عائلتي الغالية لكم مني كل الشكر والحب على وقوفكم بجانبي وتخفيف أعبائي ومواساتي ودعمكم ومساندتكم لي في مسيرتي بغية وصولي إلى هذا الهدف.

الإهداء

إلى من كلله الله بالهيبة والوقار.. إلى من أحمل اسمه بكل افتخار.. ستبقى كلماتك نجوماً أهتدي بها إلى الأبد.. كنت وما زلت سندي في هذه الحياة.. سرُّ قوتي وثقتي بنفسي.. مثبت خطواتي.. شكراً لكل قطرة عرق بذلتها لأجل وضعي على هذا الطريق.. " **أبي الغالي** "

إلى ملاكي.. بسمة الحياة وسر الوجود.. إلى من جعلت حياتي مكللة بالورود.. التي وهبتني أكثر ما يقال.. يا من لا حروف توافيكِ.. الأم ما عرف قدرها إلا الله فجعل الجنة تحت قدميها.. شكراً لكل ليلة سهرتها بجانبي، ولكل دمعة جعلتني أتحسس روحك.. " **أمي الحبيبة** "

إلى من أرى بأعينهم التفاؤل، الذين يضيئون أيامي بابتسامتهم وتشجيعهم.. شكراً لوجودكم في حياتي.. " **أخي وأختي** "

إلى من تحلوا بالإخاء وتميزوا بالمحبة والوفاء.. إلى من تناسيت أحزاني بدعمهم وتشجيعهم.. " **أصدقائي**"

إلى من ساندوني وأروني العلم بطريقة مختلفة، وكرموا عليَّ بمعلوماتهم ولم يبخلوا، وكان لهم الفضل في صياغة هذا العمل المتواضع كبداية لمستقبل مختلف.. " **أساتذتي المشرفين** "

إلى من بنيت نجاحي على جهودكم ونصائحكم وكلماتكم الصادقة.. " **إلى جميع أساتذتي** "

إلى كل من شاركني فرحة نجاحي.. " **أقاربي ومعارفي** "

أخيراً وليس آخراً.. إلى كل شخص مرّ في حياتي واستطاع أن يترك بصمته في روحي وقد ساهم بشكل أو بآخر في وصولي إلى هنا..

فراس زيد العراوي

فهرس المحتويات

الموضوع **الصفحة**

فهرس المحتويات I

فهرس الجداول IV

فهرس الأشكال V

جدول المختصرات VI

الملخص VII

Abstract VIII

المقدمة Introduction 1

مبررات وأهداف البحث Research justification and objectives 5

الفصل الأول: الدراسة المرجعية Literature review 7

1. اللوز: 8

1. 1. أصله وتاريخه: 8

1. 2. التصنيف العلمي والوصف المورفولوجي: 9

1. 3. القيمة الغذائية لبذور اللوز: 11

2. الدراسة الكيميائية: 13

2. 1. المرارة في بذور اللوز: 13

2. 2. الغلوكوزيدات السيانوجينية (CGs): 14

2. 3. الأميغدالين: 15

2. 3. 1. الفوائد الطبية للأميغدالين: 17

2. 3. 2. مسار التخليق الحيوي للأميغدالين (البناء) وتحلله (الهدم): 19

2. 3. 3. طرائق تقديره وتحليله: 20

3. الدراسة الجزيئية: 24

3. 1. مورثة حلاوة الحبة Sweet Kernel (*SK*): 24

3. 2. تحليل التباين والانتخاب المبكر باستخدام الواسمات الجزيئية: 27
3. 3. التكرارات الترادفية البسيطة Simple Sequence Repeat (SSR): 30
الفصل الثاني: مواد وطرائق البحث Methods & Materials..... 33
1. المادة النباتية: 34
2. طريقة العمل وتحضير العينات: 35
2. 1. الدراسة الكيميائية: 35
2. 1. 1. استخلاص الأميغدالين من بذور اللوز: 35
2. 1. 2. المنحنى المعياري (القياسي) الأميغدالين: 36
2. 1. 3. تحضير العينات لتحليل HPLC:..... 36
2. 1. 4. HPLC: 36
2. 1. 6. تقدير تركيز الأميغدالين في البذور: 37
2. 2. الدراسة الجزيئية:..... 38
2. 2. 1. عزل الـ DNA:..... 38
2. 2. 2. الواسمات الجزيئية SSR المدروسة:..... 40
2. 2. 3. التفاعل التسلسلي البوليميرازي Polymerase Chain Reaction (PCR):..... 40
2. 2. 4. فصل نواتج التضخيم باستخدام تقنية الرحلان الكهربائي: 41
3. تصميم التجربة والتحليل الإحصائي:..... 41
الفصل الثالث: النتائج والمناقشة Discussion Results and..... 42
1. الدراسة الكيميائية..... 43
1. 1. محتوى الأميغدالين في بذور أنواع اللوز البري:..... 43
1. 2. مقارنة المراحل الفينولوجية للبذور في الطراز 12 من حيث نسبة الأميغدالين: 47
2. الدراسة الجزيئية:..... 50
2. 1. الواسم الجزيئي EPDCU2584: 51
2. 2. الواسم الجزيئي BPPCT037: 52

2. 3. الواسم الجزيئي UDA-045: 53
2. 4. الواسم الجزيئي CPDCT028: 54
3. الترابط بين النتائج الكيميائية والجزيئية: 60
الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and recommendatios 61
الاستنتاجات: 62
التوصيات:..... 62
المراجع References 63
المراجع العربية:..... 64
المراجع الأجنبية:..... 64

فهرس الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1	التصنيف العلمي للوز	9
2	الأنواع والطرز الوراثية المدروسة ومواقع الجمع وخط الطول والعرض والارتفاع	34
3	واسمات الـ SSR المستخدمة في تضخيم DNA النباتات المدروسة	40
4	متوسط كمية الأميغدالين في مرحلة النضج الكامل للطرز المدروسة	44
5	الفروق المعنوية بين المراحل الفينولوجية المدروسة	48
6	أطوال الحزم الناتجة عن الواسم الجزيئي EPDCU2584	51
7	أطوال الحزم الناتجة عن الواسم الجزيئي BPPCT037	52
8	أطوال الحزم الناتجة عن الواسم الجزيئي UDA-045	53
9	أطوال الحزم الناتجة عن الواسم الجزيئي CPDCT028	54
10	طبيعة ارتباط الواسمات الجزيئية الأربعة مع كل طراز وراثي من الأنواع المدروسة	57

فهرس الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1	الصيغة الجزيئية للأميغدالين	16
2	مسار التخليق الحيوي للأميغدالين	19
3	الخريطة الوراثية لـ LG5 حول موقع المورثة SK/sk	26
4	المنحنى المعياري للأميغدالين	36
5	متوسط كمية الأميغدالين في الطرز المدروسة	43
6	الكروماتوغرافي الخاص بالطراز رقم 17 (حمص – آبل)	45
7	الكروماتوغرافي الخاص بالطراز رقم 4 (السويداء – الكوم)	45
8	التحليل العنقودي للطرز المدروسة	46
9	نسبة الأميغدالين في المراحل الفينولوجية المختلفة (12 طور النضج الكامل للبذرة، 12* الطور اللبني للبذرة، 12** الطور المائي للبذرة)	48
10	الكروماتوغرافي الخاص بالطراز **12 في الطور المائي للبذرة	49
11	الكروماتوغرافي الخاص بالطراز *12 في الطور اللبني للبذرة	49
12	هلامات ميتافورأغاروز 4% بعد الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR. توضح نواتج تضخيم الطرز الوراثية المدروسة مع الواسمات الجزيئية المختلفة	55
13	شجرة القرابة الوراثية بناءاً على الواسمات الجزيئية المدروسة	56
14	الربط بين النتائج الكيميائية والجزيئية	60

جدول المختصرات

المختصر	التسمية الكاملة	الترجمة
CGs	Cyanogenic Glycosides	الغلوكوزيدات السيانوجينية
HCN	Hydrogen Cyanide	حمض الهيدروسيانيك أو سيانيد الهيدروجين
LDL	Low Density Lipoproteins	البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (الكولسترول السيئ)
HDL	High Density Lipoproteins	البروتينات الدهنية عالية الكثافة (الكولسترول الجيد)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الآداء
DAD	Diode-Array Detection	كشف مصفوفة الصمام الثنائي
UHPLC	Ultra High-Performance Liquid Chromatography	الكروماتوغرافيا السائلة فائقة الآداء
GC	Gas Chromatography	الكروماتوغرافيا الغازية
TLC	Thin-Layer Chromatography	كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة
RP-HPLC	Reversed-Phase HPLC	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الآداء ذات الطور العكسي
SK	Sweet Kernel	مورثة حلاوة البذور
LG5	Linkage Group 5	مجموعة الربط الخامسة على جينوم اللوز
QTLs	Quantitative Trait Loci	مواقع الصفات الكمية
PIC	Polymorphism Information Content	محتوى معلومات التعددية الشكلية
MAS	Marker Assisted Selection	الانتخاب بمساعدة الواسمات
MAB	Marker Assisted Backcrossing	التهجين الرجعي بمساعدة الواسمات
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA	المكاثرة العشوائية ذات التعدد الشكلي للـ DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	تقييد القطع ذات التعدد الشكلي للـ DNA
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	مكاثرة القطع ذات التعدد الشكلي للـ DNA
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeat	التكرارات الترادفية البسيطة البينية
SSR	Simple Sequence Repeat	التكرارات الترادفية البسيطة
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence	التسلسل المشقوق والمضخم عديد التكوين
PCR	Polymerase Chain Reaction	التفاعل التسلسلي البوليميرازي

الملخص

أُجريَ هذا البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية (NCBT) في دمشق بين عامي (2019 و2020) م. قُدِرَ تركيز الأميغدالين في بذور عدة طرز وراثية من بعض أنواع اللوز البري السورية، المنتشرة في محافظتي حمص والسويداء، وذلك باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). أظهرت النتائج أن بذور الطرز المدروسة تحتوي على تراكيز عالية نسبياً من الأميغدالين (تتراوح من 22.360 إلى 77.860 ملغ/غ)، وأن هذه التراكيز تتأثر بالمنطقة والظروف البيئية وبالتحديد الارتفاع عن سطح البحر، حيث لوحظ أن ازدياد تركيز الأميغدالين يتناسب عكساً مع الارتفاع عن سطح البحر، فكانت بذور طرز اللوز البري كورشنسكي في محافظة حمص كانت دائماً شديدة المرارة، وبالتالي يمكن العمل على إكثار هذه الطرز في منطقة حمص في حال كان الهدف الحصول على كميات كبيرة من الأميغدالين لاستخدامه طبياً على سبيل المثال. دُرِسَتْ ثلاث مراحل فينولوجية للبذور (الطور المائي واللبني والنضج الكامل) في الطراز 12 من حيث تركيز الأميغدالين فأظهرت النتيجة أن تركيز الأميغدالين في البذور يزداد تدريجياً مع زيادة نضجها حتى يتركز الأميغدالين بشكل كبير في البذور في مرحلة النضج الكامل. دُرستْ في هذا البحث 4 واسمات لتكرارات ترادفية بسيطة SSR (EPDCU2584 وBPPCT037 وUDA-045 وCPDCT028)، والتي تم تحديدها على أنها مرتبطة بموقع المورثة *SK*، لتحديد كفاءتها في الكشف عن المرارة في طرز اللوز البري المدروسة. أظهرت النتائج أن درجة مرارة البذرة تختلف بين الأنواع وحتى بين الطرز الوراثية ضمن النوع الواحد. انقسمت الطرز الوراثية المدروسة بحسب نتائج الواسمات الجزيئية إلى طرز متماثلة اللواقح للقرين المتنحي (*sk*/*sk*) وهي ذات بذور شديدة المرارة، وطرز متخالفة اللواقح (*SK*/*sk*) وهي ذات بذور متوسطة المرارة. عند مقارنة نتيجة الدراسة الجزيئية مع الكيميائية لوحظ وجود توافق في النتائج، حيث إن الطرز التي تبين في الدراسة الجزيئية أنها شديدة المرارة كانت أيضاً تحتوي على تركيز مرتفع من الأميغدالين في الدراسة الكيميائية، وكذلك الأمر بالنسبة للطرز متوسطة المرارة. بالتالي نستنتج من ذلك أن الواسمات الجزيئية التي تمت دراستها مناسبة لانتخاب صفة مرارة بذور اللوز البري السورية، وهو جانب ذو أهمية أساسية في تربية اللوز.

الكلمات المفتاحية: الأميغدالين، اللوز البري، المورثة SK، الواسمات الجزيئية، مرارة البذور.

Abstract

This thesis was conducted in the laboratories of National Commission for Biotechnology (NCBT) in Damascus between (2019 & 2020) AD. The concentration of amygdalin was determined in several genotypes kernels of some Syrian wild almond species, which are widespread in the governorates of Homs and Suwayda, by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technology. Results showed that the studied genotype kernels contain relatively high concentrations of amygdalin (ranging from 22.360 to 77.860 mg/g), and these concentrations are affected by the region and environmental conditions, specifically the height above sea level, as it was observed that the increase in the concentration of amygdalin is inversely proportional to the height above sea level. Then, the kernels of the wild almond species *korschinskii* in Homs were always severe bitterness, and thus it can be work on the proliferation of these genotypes in Homs region, for example, if the goal is to obtain large quantities of amygdalin for medical use. Three phenological phases of kernels (aqueous, milky and full maturity phase) were studied in genotype 12 in terms of the concentration of amygdalin, and the result showed that the concentration of amygdalin in the kernels increases gradually with increasing their maturity until amygdalin is concentrated significantly in the kernels at the maturity phase. In this research, 4 markers of simple sequence repeats SSR were studied (EPDCU2584, BPPCT037, UDA-045 and CPDCT028), which were identified as related to the loci of the gene *SK*, to determine their efficiency in detection. The results showed that the kernel bitterness degree varies between species and even between genotypes within the same species. The studied genotypes were divided, according to the results of the molecular markers, into homozygous genotypes of the recessive allele (*sk*/*sk*), which have severe bitterness, and heterozygous (*SK*/*sk*) genotypes with medium bitterness kernels. When comparing the results of the molecular study with the chemical, it was noticed that the results were identical, as the genotypes that were found in the molecular study to be severe bitterness were also, they contain a high concentration of amygdalin in the chemical study, as are the moderately bitter genotypes. Thus, we conclude that the studied molecular markers are suitable for selecting the bitterness characteristic of Syrian wild almond kernels, which is an aspect of fundamental importance in almond breeding.

Keywords: amygdalin, kernel bitterness, molecular markers, SK gene, wild almond.

المقدمة

Introduction

المقدمة:

يُعد اللوز محصولاً شجرياً قديماً، يزرع من أجل الحصول على بذور صالحة للأكل، ولا تزال مناطق انتشاره تزداد في جميع أنحاء العالم. وقد تم إجراء العديد من الدراسات لتحديد أصل اللوز، حيث يعد موطنه الأصلي من غرب الصين إلى الصحاري والمنطقة الجبلية في كردستان وتركستان وأفغانستان وإيران والعراق، بينما يذكر في دراسات أخرى بأن الجد الأصلي للوز يوجد في شبه جزيرة البلقان. ويتم تصنيف اللوز ضمن جنس *Prunus*، وينتمي إلى الفصيلة الوردية *Rosaceae*، كالعديد من أشجار الفاكهة الحجرية. وهو عبارة عن شجرة معمرة يبلغ قطرها حوالي 30 سم وارتفاعها 4–10 م، وذات أوراق متساقطة، وأزهار غير متوافقة ذاتياً، وثمار مفردة النواة مكونة من بذرة واحدة وفلقتين كبيرتين تنضج بعد 7–8 أشهر من الإزهار. وبذور اللوز هي الجزء الصالح للأكل والمنتج التجاري، حيث لها قيمة صحية وخصائص غذائية مهمة كونها واحدة من المصادر الغذائية الغنية بالطاقة بسبب محتواها العالي من البروتينات والدهون، ويمكن أن تحافظ على مستوى صحي من الكوليسترول ومن المرجح أنها تفيد في الوقاية من مخاطر أخرى مثل أمراض القلب والأوعية الدموية ومرض السكري، وكدواء مضاد للسعال.

يعود الطعم المر في بعض حبات اللوز وخاصة البري إلى تراكم مستقلب ثانوي هو أميغدالين ديغلوكوسيد السيانوجيني. ينتمي الأميغدالين إلى مجموعة الغلوكوزيدات السيانوجينية، وهو الاسم الكيميائي لما يعرف بفيتامين B17. والغلوكوزيدات السيانوجينية (CGs) هي منتجات نباتية نشطة بيولوجياً توجد في أقدم النباتات الأرضية (السرخس)، وفي عاريات البذور ومغلفات البذور، حيث تتوزع على نطاق واسع في المملكة النباتية، كونها موجودة في أكثر من 2500 نوعاً من النباتات، وتسمى أيضاً المستقلبات الثانوية أو المنتجات النباتية المتخصصة، وتصنف على أنها مضادات حيوية.

يعد الأميغدالبن مادة طبيعية موجودة في المكسرات الخام مثل اللوز والحبوب كالفاصولياء والبرسيم والذرة وبذور العديد من الفاكهة ولا سيما المشمش، وينتشر على نطاق واسع خاصة في بذور نباتات الفصيلة الوردية *Rosaceae* ذات محتوى الأميغدالين الأعلى من الأنواع غير الوردية. والصيغة الكيميائية للأميغدالين هي C20H27NO11، حيث يتكون من وحدة واحدة من سيانيد الهيدروجين (HCN)، ووحدة واحدة من البنزالدهيد ووحدتين من الجلوكوز. إن الأميغدالين نفسه غير سام، ولكن إنتاجه لـ HCN الذي يتحلل بواسطة بعض الأنزيمات هو الذي يشكل المادة السامة، والتي لها بعض الآثار الوقائية عند النباتات. وقد عرف الأميغدالين للمرة الأولى في روسيا عام 1830، وتم استعماله كعنصر أو مركب مضاد للسرطان للمرة الأولى في روسيا عام 1845، ولكن دخوله للولايات المتحدة الأميركية واستعماله بصفته دواءً مضاداً للسرطان لأول مرة كان في عام 1920، وكان على شاكلة حبوب ولكن أوقف استعمال هذا المركب بسبب سميته. وكانت هناك العديد من الدراسات حول التأثير

المضاد للأورام للأميغدالين، الذي يقتل الخلايا السرطانية بشكل انتقائي في موقع الورم، ولكن لا يزال هناك جدل حول فعاليته وسلامته للبشر، لأن منتجه الأيضي هو سيانيد الهيدروجين السام، حيث تبلغ الجرعة القاتلة الدنيا من السيانيد حوالي 50 ملغ أو 0.5 ملغ/كغ من وزن الجسم، وحددت لجنة تابعة للاتحاد الأوروبي النسبة الأمنة بـ 20 ميكروغرام لكل كيلوغرام من وزن الإنسان. وبالتالي نتيجة للسمية وعدم كفاية الأدلة السريرية، لم يتم اعتماد الأميغدالين باعتباره عاملاً مضاداً للسرطان. ولكن على الجانب الآخر، يتم إنتاج الأميغدالين عادة ويستخدم كعامل علاجي مضاد للسرطان في بعض البلدان في آسيا وأمريكا الوسطى في الغالب على شكل مكملات غذائية طبيعية. وأظهرت الدراسات الدوائية أن الأميغدالين له العديد من الأنشطة الحيوية مثل التليف الكلوي وتثبيط الأوعية الدموية ومنظم للغدد الصماء ومضاد لتصلب الشرايين، والتأثيرات المناعية والمعدية ويقوي الحماية العصبية والجهاز العصبي ويستخدم في الطب الشرقي لعلاج الربو وفقر الدم اللاتنسجي.

يعد الحصول على معلومات دقيقة عن الفيتامينات في مصادر الغذاء في كثير من الأحيان أمراً بالغ الأهمية لتقييم الكفاية الغذائية، واتباع نظام غذائي صحي ومتوازن، ومن هنا تبرز أهمية تحديد الفيتامين، ونظراً لهذه الأهمية استخدمت طرائق آلية متنوعة ومختلفة من أجل تحديد وجودها، وفاعليتها ونسبها، فاستخدمت الطرائق الكروماتوغرافية بمختلف أنواعها لتحديد الفيتامينات منذ وقت طويل، وعلى الرغم من تعدد الطرائق وتنوعها بقيت الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC تتصدر تقنيات التحليل المعتمدة، بسبب حساسيتها وانتقائيتها العاليتين، ودقتها الفائقة وخاصة عندما تزود بكواشف مناسبة.

يتم التحكم في العديد من الصفات الزراعية المهمة في اللوز بواسطة المورثات الرئيسة، ويعد طعم البذرة في اللوز صفة مهمة درسها مزارعي اللوز ومربيه، لأن انتخاب الأصناف الحلوة يعد هدفاً مبكراً، حيث ذُكر في عدة دراسات أن المرارة هي عبارة عن دفاع كيميائي في اللوز البري، تحمي البذور من الحيوانات العاشبة والحشرات ومسببات الأمراض. فقدمت الدراسات الوراثية الحديثة دليلًا على أن أكثر من مورثة واحدة تشارك في الطعم المر في أنواع اللوزيات الأخرى مثل المشمش. بينما في حالة اللوز، يعتمد تحديد حلاوة أو مرارة البذرة على النمط الوراثي للنبات الأم، بغض النظر عن الملقح، فالتركيب الوراثي للنبات الأم هو المسؤول عن طعم البذرة، وبالتالي فإن جميع ثمار شجرة اللوز ستكون إما حلوة أو مرة. علاوة على ذلك، تخضع هذه الصفة لسيادة أحادية، حيث يكون القرين المسؤول عن الحلاوة في مورثة حلاوة الحبة (*SK*) هو السائد على المسؤول عن المرارة *sk*. وتقع المورثة *SK* في مجموعة الربط الخامسة (LG5) من جينوم اللوز كما ورد في خريطتي الربط الوراثي للوز، ولا تزال الطبيعة الجزيئية لموقع المورثة *SK* غير معروفة، على الرغم من أنه قد تم اقتراح أن ترمز مورثة *SK* إلى بروناسين هيدرولاز (PH)، الذي يحول البروناسين (طليعة الأميغدالين)، إلى الجلوكوز ومانديلونيتريل. وعلى الرغم

من أنه تم العثور في الدراسات الحديثة على واسمات جزيئية مرتبطة بالموقع *SK*، إلا أن تحديد الموقع الدقيق لها على LG5 ووظيفتها الكيميائية الحيوية أمراً بعيد المنال.

منذ وقت طويل، كان تحديد وتوصيف أصناف اللوز، كما هو الحال بالنسبة لمحاصيل الأشجار الأخرى، يرتكز على الصفات المورفولوجية. ومع ذلك، فإن بعضها غير متاح دائماً للتحليل، حيث تتأثر بالظروف البيئية وقد تكون مرئية فقط في الأشجار البالغة، مما يتطلب وقتاً طويلاً لتحليلها. وإن التعرف على أنواع اللوز وأصنافه بالاعتماد على الاختلافات المورفولوجية هو أمر صعب، لذلك توفر الواسمات الجزيئية معلومات وراثية دقيقة لجهود التربية المستقبلية، حيث يتم استخدام الواسمات الجزيئية المعتمدة على DNA على نطاق واسع في انتخاب الصفات الوراثية ودراسة التباين الوراثي والتوصيف الوراثي. وتعد الصفات الكمية، مثل الغلة ومقاومة الأمراض وتحمل الإجهاد وجودة البذور والثمار، مهمة جداً لبرامج التربية، كما تستخدم الواسمات الجزيئية في الدراسات المتعلقة بمواقع الصفات الكمية (QTLs)، مما يساعد على تحديد المورثات المرشحة أو تطور الواسمات الجزيئية المرشحة المرتبطة بالصفة قيد التحقق. ومن هذه الواسمات نذكر التالي: MAS، وMAB، وRAPD، وRFLP، وAFLP، ISSR، وSSR، وCAPS.

تسمح واسمات SSR، التي تسمى أيضاً Microsatellite أو التكرارات الترادفية البسيطة، باكتشاف الاختلافات بين تكرار تسلسل الحمض النووي والتي هي بسيطة وقصيرة (5–2 أزواج قاعدية)، ومشتتة في الجينوم بأكمله. إنها واسمات قابلة للتكرار بسهولة وغالباً ما تكون ذات موضع واحد. وبناءً على ذلك وكون تقنية SSR غير عشوائية مقارنة مع ISSR وRAPD، أمكن استخدام تقنية SSR في دراسة واسمات وراثية قريبة أو مرتبطة بموقع محدد على الجينوم لإنتاج مادة معينة. حيث تم تحديد 2 من واسمات RFLP، (FG202 وAG46) بالقرب من موقع *SK* ومع ذلك، فإن RFLP ليست كافية لتطبيقات تربية النباتات الروتينية لأنها تتطلب كميات كبيرة من الحمض النووي عالي الجودة. وبدلاً من ذلك، تتطلب واسمات SSR كميات قليلة من الحمض النووي (DNA) وتفاعل (PCR) بسيط ورخيص نسبياً ومناسب بشكل أفضل للقرارات واسعة النطاق اللازمة للتربية بمساعدة الواسمات. فتم تحديد 4 واسمات SSR (BPPCT037 وCPDCT028 وEPDCU2584 وUDA045) على أنها وثيقة الارتباط بموقع المورثة *SK* على LG5.

مبررات وأهداف البحث

Research justification and objectives

مبررات وأهداف البحث:

إن أهمية الأميغدالين في العديد من المجالات (الطب، والمستحضرات الصيدلانية، ومستحضرات التجميل، والمضافات الغذائية، والمكملات الغذائية)، وبالتالي ضرورة الحصول عليه بسهولة بشكل نقي ومن مصدر طبيعي، تجعل من الأهمية الاتجاه نحو دراسته بشكل أعمق. وأيضاً أن الدراسات التي أنجزت في موضوع تحليل الأميغدالين قليلة على مستوى القطر، وخاصة باستخدام تقنيات تحليلية متطورة، كالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)، وكذلك الأمر بالنسبة لاستخدام الواسمات الجزيئية في انتخاب صفة المرارة في بعض أنواع اللوز البري السورية.

لذلك هَدَفَ هذا البحث إلى:

- ✓ تقدير نسبة الأميغدالين في بذور بعض أنواع اللوز البري في محافظتي حمص والسويداء، وبالتالي تحديد النوع البري الذي تحوي بذوره أعلى تركيز من الأميغدالين والمنطقة المناسبة لزراعته. ودراسة ثلاث مراحل فينولوجية لبذور اللوز، في أحد الأنواع المدروسة، وهي الطور المائي واللبني ومرحلة النضج الكامل. وذلك لتحديد المرحلة الفينولوجية التي تحوي أعلى نسبة من الأميغدالين في البذور.
- ✓ دراسة امكانية استخدام الواسمات الجزيئية في انتخاب الطرز الوراثية لبعض أنواع اللوز البري المنتشرة في سورية بحسب مرارة بذورها.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية

Literature review

1. اللوز:

1. 1. أصله وتاريخه:

يُعد اللوز محصولاً شجرياً قديماً، يزرع من أجل الحصول على بذور صالحة للأكل، وينتمي إلى جنس *Prunus*، ولا تزال مناطق انتشاره تزداد في جميع أنحاء العالم. وقد تم إجراء العديد من الدراسات لتحديد أصل اللوز. حيث توجد العديد من الأنواع البرية، مثل *Prunus fenzliana* (Fritsch) Lipsky و*Prunus bucharica* Korschinsky و*Prunus kuramica* (من تحت الجنس *Euamygdalus*)، تم إيجادهم من غرب الصين (جبل Tian Shan) إلى الصحاري والمنطقة الجبلية في كردستان وتركستان وأفغانستان وإيران والعراق (Grasselly، 1976b؛ Kester و Gradziel، 1996). وتم وصف هذه الأنواع بأنها مرتبطة ارتباطاً وثيقاً باللوز، وقد تكون من أجداد اللوز المزروع حديثاً (Grasselly، 1976a؛ Kester وزملاؤه، 1991). وقد اقترح Ladizinsky (1999)، أن *P. fenzliana* هو الجد البري الوحيد للوز، على عكس Grasselly (1976a، 1976b) و Browicz و Zohary (1996)، الذين وصفوا *P. webbii* (Spach) Vieh وموطنه الأصلي شبه جزيرة البلقان؛ على أنه الجد الذي يرتبط بقوة باللوز. علاوة على ذلك، اقترح Watkins (1979)، أن اللوز المزروع جاء من الانتخاب ضمن الأنواع المدرجة أصلاً باسم اللوز الشائع *Amygdalus communis* (syn. *P. communis Archangeli*) استنادًا إلى دراسات أجريت على مجموعتين طبيعيتين تحتويان على العديد من الأفراد ذات البذور الحلوة بدلاً من الأنواع ذات البذور المرة الموجودة عادةً في الأنواع البرية. بعد ذلك، تم استخدام زراعة *communis* Amygdalus في إيران، والقوقاز، وشرق تركيا، وسورية، وبالتالي تداخلت مع المواقع المعروفة لزراعة اللوز القديم (Denisov، 1988؛ Kester وزملاؤه، 1991).

وفقاً لهذه النظريات، أدرك Ladizinsky (1999)، أن مجموعات أشجار اللوز ذات البذور الحلوة بدت وكأنها متشابهة في النمط الظاهري مع مجموعات اللوز المزروعة اليوم، واعد أن مجموعات Kobet Dagh و Tian Shan كانت بقايا حديثة لحقل اللوز المدجّن أو شبه المدجن لاحقًا. وفي الآونة الأخيرة، اقترح كل من Gradziel (2009) و Zeinalabedini وزملائه (2010)، أن اللوز المزروع ربما يكون ناتجاً عن التهجين بين *P. fenzliana* ومجموعة من الأنواع الأخرى مثل *P. bucharica* و *P. Kuramica* و *P. Triloba*، والذي يحدث بشكل طبيعي.

حدث تطور وتوزع للوز في الزراعة وفي الحالة شبه البرية، على ثلاث مراحل: الآسيوي، والبحر الأبيض المتوسط، وكاليفورنيا، وكان هذا التوزع يتوافق مع المناطق الجغرافية التي يزرع وينتشر فيها اللوز (Grasselly، 1976a؛ Kester وزملاؤه، 1991؛ Kester و Gradziel، 1996؛ Gómez

وزملاؤه، 2007؛ Gradziel، 2009). ترتبط المرحلة الأولى بشكل خاص ببداية تدجين اللوز وانتشاره اللاحق عبر أفغانستان وإيران وتركيا والجمهوريات الجنوبية من الاتحاد السوفيتي القديم. وفي مرحلة البحر الأبيض المتوسط، كان من المفترض أن يتم جلب اللوز من اليونان قبل 300 قبل الميلاد، وربما خلال فترة الفينيقيين واليونانيين، وبانتقال مستعمراتهم إلى صقلية وأماكن أخرى في البحر المتوسط (Bacarella وزملاؤه، 1991). ووافق الرومان والبربر أيضاً على توزيع اللوز في جميع أنحاء تلك المنطقة. علاوة على ذلك، حوالي (600–500) م، نشر العرب اللوز في جنوب إسبانيا والبرتغال، من خلال غزو شمال أفريقيا. وسمحت الزراعة المستمرة لمدة تزيد 2000 عام في البحر المتوسط بالحصول على أنواع لوز محلية خاصة بكل منطقة ومناسبة تماماً لمختلف الظروف المناخية والبيئية. وأخيراً، بدأت مرحلة ولاية كاليفورنيا كامتداد للثقافة الوراثية للبحر الأبيض المتوسط وجلب المادة الوراثية من إسبانيا، ولكن في وقت لاحق، تم تقديم أصناف اللوز الأولى من منطقة لانغدوك في جنوب فرنسا، في كاليفورنيا في القرن التاسع عشر، لتوقيع عهد جديد لارتفاع نشر وإنتاج لوز كاليفورنيا في العالم.

1. 2. التصنيف العلمي والوصف المورفولوجي:

يتم تصنيف اللوز ضمن جنس *Prunus*، في الفئة الفرعية *Amygdalus*، وينتمي إلى الفصيلة الوردية *Rosaceae*، كالعديد من أشجار الفاكهة الحجرية مثل الخوخ (*Prunus persica*)، والتفاح (*Malus domestica*)، والمشمش (*Prunus armeniaca*) والكرز الأسود (*Prunus serotina*) (الجدول 1).

الجدول (1): التصنيف العلمي للوز

Kingdom	*Plantae*
Phylum	*Spermatophyta*
Subphylum	*Angiospermae*
Subphylum	*Dicotyledoneae*
Subclass	*Rosidas*
Super Order	*Rosanae*
Order	*Rosales*
Family	*Rosaceae*
Subfamily	*Prunoidea*
Genus	*Prunus*
Subgenus	*Amygdalus*

كانت التسمية النباتية للوز لغزاً لسنوات عديدة، حتى اعتُمدتْ تسمية *Amygdalus communis* (Grasselly وCrossa–Raynaud، 1984). وأخيراً، اقترحت اللجنة العامة للتسمية النباتية تسمية اللوز المزروع *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Web، في المدونة الدولية للتسميات النباتية (Pou،

2003)، واعتبرت *Prunus amygdalus* (Batsch) و*Prunus communis* (Archangeli) مرادفات لهذه التسمية.

اللوز عبارة عن شجرة معمرة يبلغ قطرها حوالي 30 سم وارتفاعها 4–10 م. الأوراق متساقطة ومتناوبة وضيقة وممدودة ومدببة، وحجمها وطريقة توزعها على الجذع هي سمات مميزة بين الأصناف. وقد أظهرت دراسة حديثة أهمية أوراق اللوز كمصدر حافظ للفينولات، مع أنشطة مضادة للبكتيريا ومضادات الأكسدة، والتي يمكن استخدامها في الصناعات الغذائية والصيدلانية (Tiwari وزملاؤه، 2015).

الأزهار غير متوافقة ذاتياً، وهي نموذجية لـ *Prunus* وتظهر قبل الأوراق في أوائل الربيع (Griffiths وHuxley، 1992؛ Rushforth، 1999). تحتوي خمس بتلات يتم إنتاجها منفردة أو في أزواج، ملونة من الأبيض إلى الوردي الفاتح. ويختلف حجم البتلات والشكل واللون والترتيب وطول المآبر بين الأصناف. ويمكن أن يتراوح عدد الأسدية من 20 إلى 40، ولكن عادة ما يكون حوالي 30 (Ensminger، 1994).

يعد وقت التفتح إحدى أهم الصفات التكيفية في اللوز، بسبب التعرض لصقيع الربيع والأمطار. يتأثر بشدة من كسر السكون، وهذا يتوقف بدوره على كمية البرودة في فصل الشتاء، والتعرض لدرجات الحرارة الدافئة في فصل الربيع قبل الإزهار، ودرجات حرارة متدنية لنمو البراعم (Pou، 2003).

يتميز نمط تكاثر اللوز، بخصوصية لإظهار خصوبة مزدوجة، بغرض إنتاج الإندوسبيرم، وهو نسيج نباتي ذو قيمة غذائية عالية لتغذية الجنين خلال المراحل المبكرة من النمو (Kordium، 2008). علاوة على ذلك، فإن كل أنواع اللوز تعبر عن عدم التوافق الذاتي المتجانس الذي يتحكم فيه موضع واحد (S) مع سلسلة قرائن سائدة (Socias وFelipe، 1988؛ Dicenta وGarcía، 1993b) وبالتالي، فإن الإخصاب يفضل التلقيح المتبادل، ولكن يتم الحفاظ على التباين الوراثي العالي، ضمن مجموعات الشتلات.

تم تحديد العديد من "مجموعات عدم التوافق" وأيضاً القرائن المقابلة (Tamura وزملاؤه، 2000؛ Bošković وزملاؤه، 2003؛ Channuntapipat وزملاؤه، 2003؛ Lòpez وزملاؤه، 2004)، وما زالوا يديرون انتخاب مجموعات الأصناف عن طريق الانتخاب بمساعدة الواسمات (MAS). ففي كاليفورنيا، على سبيل المثال، تم تحديد هذه المجموعات لجميع أصناف اللوز الرئيسة والمهمة (Barckley وزملاؤه، 2006).

في الثمانينات من القرن الماضي، كان التوافق الذاتي أحد الأهداف الرئيسة لبرامج تربية اللوز في أوروبا والولايات المتحدة الأمريكية (Grasselly وزملاؤه، 1981؛ Vargas وزملاؤه، 1984؛ Socias وFelipe، 1988؛ Dicenta وGarcía، 1993b؛ Gradziel وKester، 1998). ومؤخراً تم اكتشاف درجات مختلفة من التوافق الذاتي والإثمار الذاتي (Gradziel وزملاؤه، 2002)، كما أفاد Godini (2002) بمعلومات عن أصناف اللوز المتوافقة ذاتياً، حيث أصبح *P. webbii* مصدراً للخصوبة الذاتية.

1. 3. القيمة الغذائية لبذور اللوز:

ثمرة اللوز، كالأنواع الأخرى من *Prunus*، عبارة عن ثمرة مفردة النواة مكونة من بذرة واحدة وفلقتين كبيرتين. وغالباً ما تحتوي بعض الأصناف على بذور مزدوجة، وتعد هذه الصفة عيباً تجارياً بسبب عدم تماثل الغلة (Gulcan، 1975). ومن الناحية الشكلية، تتكون الثمرة من قشرة خارجية خشبية (exocarp)، وجسم رقيق (mesocarp) يصبح جافاً عند النضج، وتحته يوجد قشرة بنية داخلية (endocarp) وظيفتها حماية البذرة.

يصنف اللوز على أنه "جوز"، وبذوره هي الجزء الصالح للأكل والمنتج التجاري (Gómez وزملاؤه، 2008). يتبع تطور الثمار ثلاث مراحل بعد الإخصاب، والتي تتطور فيها القشرة والنواة خلال المرحلة الأولى، بينما يزداد حجم الجنين والسويداء خلال المرحلة الثانية، ويستبدل الأخير ببطء خلال نمو الفلقات، وأخيراً الوزن الجاف للجنين يزداد خلال المرحلة الثالثة. والغلاف (المعطف أو الجلد) هو نسيج بني يغطي ويحمي النواة من الأكسدة والتلوث الجرثومي (Werner وCreller، 1997؛ Dicenta وزملاؤه، 2007).

تنضج الثمار بعد 7–8 أشهر من الإزهار (Griffiths وHuxley، 1992). وقد تتطلب عملية نضج وتجفيف الثمرة بأكملها من 2 إلى 6 أسابيع. عادةً، يتميز النضج ببدء وازدياد تشقق الغلاف الخشبي الخارجي (King وزملاؤه، 1970).

على الرغم من أن Grossa وزملاءه (1994) وDicenta وزملاءه (2002)، أجروا العديد من الدراسات حول تأثر سمات اللوز باستخدام معالجات التلقيح المختلفة، ولم يتم العثور على فرق بين الأصناف التي تم اختبارها ولم يلحظ أي تأثر للتركيب الكيميائي بنوع التلقيح. وهكذا حتى أجرى Kodad وSocias (2015) بحثاً مهماً حول جودة اللوز المتعلقة بنوع التلقيح في الطرز الوراثية المتوافقة ذاتياً، فأظهرت النتائج كيف يمكن للتلقيح الذاتي أن يكون مسؤولاً عن التأثير الإيجابي على تركيب الأحماض الدهنية، مما يحسن جودة بذور اللوز.

لبذور اللوز قيمة صحية، وخصائص غذائية مهمة كونها واحدة من المصادر الغذائية الغنية بالطاقة بسبب محتواها العالي من البروتين والدهون (50%–55%) على التوالي، وذات نكهة جيدة (Venkatachalam وShridhar، 2006). بذور اللوز لها العديد من التطبيقات الغذائية المهمة (Rosengarten، 1984؛ Kendall وزملاؤه، 2003). حيث ترتبط القيمة الغذائية للوز ببذوره، وأجزاء أخرى مثل الجلد البني والقشرة وجسم الثمرة التي تمثل 55% من وزن الثمرة، ولكن يتم تجاهلها كمنتجات زراعية ثانوية (Martínez وزملاؤه، 1995؛ Fadel، 1999). في الآونة الأخيرة فقط، بدأ الباحثون في دراسة طرائق بديلة لتوظيفها.

يتم حصاد البذور بعد نضجها، وتؤكل إما نيئة أو محمصة، أو كعنصر في مجموعة متنوعة من الأطعمة المصنعة، وخاصة في صناعة الحلويات (Woodrof، 1979؛ Kester وGradziel، 1996؛ Schirra، 1997؛ Sang وزملاؤه، 2002b). ويمكن بيع اللوز مع القشرة بالكامل أو معالجته بأشكال مختلفة دون قشر، ويتم استخدام البذور إما غير المبيضة (مع الجلد) أو المبيضة التي يتم فيها إزالة الجلد بواسطة الماء الساخن أو البخار (Sang وزملاؤه، 2002b؛ Wijeratne وزملاؤه، 2006). يمكن أيضاً تقطيعه لاستخدامه في المعجنات والآيس كريم، وأيضاً يمكن طحنه لاستخدامه في منتجات المخابز والحلويات. يمكن تكثيف نكهة اللوز من خلال الاختيار المناسب لتركيب البذور التي تنتمي إلى أصناف مختلفة ومحتوى الرطوبة ومعالجتها (Kester وزملاؤه، 1993). ومحتوى الأميغدالين والغلوكوزيدات السيانوجينية (McCarty وزملاؤه، 1952؛ Chandler، 1957؛ Woodroof، 1979؛ Frehner وزملاؤه، 1990).

من بين الخصائص المفيدة لبذور اللوز، أنه عند دمجها في النظام الغذائي هناك إمكانية لخفض إجمالي مستويات البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL (الكولسترول السيئ)، وزيادة البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL (الكولسترول الجيد) (Abbey وزملاؤه، 1994؛ Cordeiro وMonteiro، 2001؛ Hyson وزملاؤه، 2002؛ Martins وزملاؤه، 2003؛ Moure وزملاؤه، 2007). تُظهر الأبحاث أيضاً وجود صلة بين الاستهلاك المنتظم للوز وتناقص حالات الإصابة بأمراض القلب التاجية (Dreher وزملاؤه، 1996) وارتفاع ضغط الدم، وفشل القلب الاحتقاني، والأمراض المزمنة (Fulgoni وزملاؤه، 2002؛ Lovejoy وزملاؤه، 2002؛ Pellegrini وزملاؤه، 2006؛ Socias وزملاؤه، 2008).

تحتوي البذور إضافة لقيمتها الغذائية على مجموعة واسعة من الفينولات والفلافونيدات، والتي تظهر آثاراً بيولوجية مثيرة للاهتمام مثل الأنشطة المهدئة والمضادة للالتهابات والمضادة للشحوم ومضادات

الأورام ومضادات الأكسدة (Donovan وزملاؤه، 1998؛ Wang وزملاؤه، 1999؛ Sang وزملاؤه، 2002b؛ Chen وزملاؤه، 2005؛ Milbury وزملاؤه، 2006؛ Esfahlan وزملاؤه، 2010).

تحتوي بذور اللوز على زيت أحادي غير مشبع ذي جودة عالية (Abdallah وزملاؤه، 1998؛ Kodad وزملاؤه، 2005) والذي يمكن أن يشكل أكثر من 50% من الوزن الجاف للبذرة، ويتكون الزيت في الغالب من أحماض دهنية مستقرة (أولييك 70%، ولينوليك 15%) (García–López وزملاؤه، 1996) المستخدمة منذ العصور القديمة كمراهم ومطريات وأدوية. وهي غنية أيضاً بالمعادن مثل المنغنيز والبوتاسيوم والكالسيوم والمولبيدينيوم والفوسفور والحديد والمغنيسيوم والزنك والنحاس والسيلينيوم، ويحتوي على كميات جيدة من الريبوفلافين (فيتامين B2) وفيتامين E (Kester وزملاؤه، 1991؛ Kester وGradziel، 1996؛ Sabate وHaddad، 2001؛ Chen وزملاؤه، 2005). ويشارك فيتامين E في الحماية من أمراض القلب وبعض أنواع الوقاية من السرطان (Kodad وزملاؤه، 2006). يمثل اللوز أيضاً مصدراً مناسباً لحمض الفوليك والألياف (Vezvaei وJackson، 1996؛ Schirra، 1997). علاوة على ذلك، يعد اللوز أحد أفضل مصادر البروتينات النباتية، ولكنه خالٍ من الغلوتين، وهو واحد من المكونات الشائعة في إعداد الأطعمة الخالية من الغلوتين، حيث يصبح بديلاً صحياً للأشخاص الذين يعانون من الحساسية لأطعمة القمح وأمراض الاضطرابات الهضمية.

يمتلك اللوز قيمة عالية كمادة طبية في مجموعة متنوعة من الأطعمة والأدوية والذي يشمل أصناف حلوة ومرة. ويمكن أن يحافظ اللوز على مستوى صحي من الكوليسترول ومن المرجح أنه يفيد في مخاطر أخرى مثل أمراض القلب والأوعية الدموية ومرض السكري، وكدواء مضاد للسعال (Kamil وChen، 2012).

2. الدراسة الكيميائية:

2. 1. المرارة في بذور اللوز:

يعود الطعم المر الغريب في بعض حبات اللوز وخاصة البري إلى تراكم مستقلب ثانوي هو أميغدالين ديغلوكوسيد السيانوجيني (McCarty وزملاؤه، 1952؛ Chandler، 1957؛ Woodroof، 1967). حيث أظهر Lechtenberg وNahrstedt (1999)، أن اللوز البري يحتوي على أميغدالين غلوكوزيد السيانوجيني في البذور. ويتواجد أيضاً في بذور الأصناف الحلوة والأجزاء النباتية الأخرى (الجذور والأوراق والساق) بكميات قليلة (Dicenta وزملاؤه، 2002؛ London–Shafir وزملاؤه، 2003)، بالتالي فإن الأميغدالين يتراكم في بذور الأنواع البرية بشكل أساسي. واكتشف Sánchez–Pérez وزملاؤه (2009، 2010)، وجود البروناسين في الأوراق، وبتلات الأزهار، والسويداء، والفلقات

في بذور أصناف اللوز الحلو والمر، وكما تم العثور على الأميغدالين في الأنسجة النباتية المختلفة في الطرز الوراثية المرة مع أقصى كمية خلال النضج، وخاصة في النواة والسويداء.

ولقد أثبت Wirthensohn وزملاؤه (2008) مؤخراً أن الأميغدالين ليس هو الوحيد الذي يعطي النكهة المرة للبذور، ما يؤكد وجود كحول البنزيل، وتم تحديد مركب 2,3- butanediol باستخدام تحليل أجهزة الاستشعار الكيميائية.

كما ذكر Dicenta وزملاؤه (2000)، افتراض أن النمط الظاهري للنواة يتم تحديده بواسطة النمط الوراثي للشجرة، فيمكن التحكم في تراكم الأميغدالين في البذور وأنسجة النبات التي تظهر النمط الوراثي نفسه للشجرة. لذلك، فإن معطف البذرة هو موقع جيد للسيطرة على تراكم الأميغدالين، حيث أنه مشتق من غشاء البويضة (Haughn و Chaudhury، 2005).

بَينت الدراسات الاستقلابية والوراثية للوز الحلو والمر أن غلاف البذرة يرتبط بالمرارة (Franks وزملاؤه، 2008). علاوةً على ذلك، تم اقتراح أن تكون المواقع الخلوية المميزة للأنزيمات المشاركة في مسار التحلل، كهيدرولاز بروناسين في غلاف البذور، مرتبطة بالمرارة في اللوز (Sánchez-Pérez وزملاؤه، 2008). ومع ذلك، لا يزال يتعين تحديد المورثات التي تحدد المرارة في اللوز والأنواع الأخرى من جنس Prunus.

2. 2. الغلوكوزيدات السيانوجينية (CGs):

تُعد الغلوكوزيدات السيانوجينية CGs منتجات نباتية نشطة بيولوجياً توجد في أقدم النباتات الأرضية (السرخس)، وفي عاريات البذور ومغلفات البذور (Zagrobelny و Møller، 2011؛ Bak وزملاؤه، 2006). حيث تتوزع على نطاق واسع في المملكة النباتية، كونها موجودة في أكثر من 2500 نوعاً من النباتات (Vetter، 2000). وتسمى أيضاً المستقلبات الثانوية أو المنتجات النباتية المتخصصة، وتصنف على أنها مضادات حيوية، ويمكن تعريفها كيميائياً على أنها غلوكوزيدات من α- hydroxynitriles (cyanohydrins) وتستقر عند ارتباطها بالجلوكوز، حيث تتكون من غليكون وجزء سكري، ويتم تصنيعها من الأحماض الأمينية العطرية والأليفاتية (التيروزين، والفينيل ألانين، والفالين، والإيسوليوسين، والليوسين) (Bjarnholt وزملاؤه، 2008) وبعض الأحماض الأمينية غير البروتينية (Møller و Conn، 1979؛ Sibbesen وآخرون، 1995؛ Bak وزملاؤه، 1998؛ Jones وزملاؤه، 1999؛ Bjarnholt وزملاؤه، 2008؛ Clausen وزملاؤه، 2002؛ Conn، 1980؛ Møller، 2010؛ Selmar، 2010).

من الخصائص المهمة للنباتات السيانوجينية القدرة على توليد وسيانيد الهيدروجين HCN السام. على الرغم من أن غلوكوزيدات السيانوجين ليست سامة عندما تكون النباتات سليمة، إلا أنها تصبح سامة عندما تتلامس أنزيمات النبات (بيتا غلوكوزيداز وألفا هيدروكسي لياز) مع غلوكوزيدات السيانوجين في النبات، نتيجة تلف الأنسجة بعد الكدمات أو المضغ. ويؤدي نشاط الأنزيم إلى انقسام جزء الكربوهيدرات من غلوكوزيد السيانوجين لإنتاج سيانوهيدرين الذي يتحلل أيضاً لإطلاق HCN والألدهيد أو الكيتون (Poulton، 1990). وبعد تناوله من قبل الحيوانات وكذلك البشر، قد يتم أيضاً إنتاج HCN من خلال عمل أنزيمات ميكروبات الأمعاء على الغلوكوزيدات السيانوجينية التي يتم تناولها (Carter، 1980).

ينتمي [(6−O−β−D−Glucopyranosyl−β−D−glucopyranosyl) oxy] (فينيل) أسيتونيتريل (أميغدالين)، ويطلق عليه أيضاً "فيتامين B17"، إلى مجموعة الغلوكوزيدات وبالتحديد الغلوكوزيدات السيانوجينية (Vetter، 2000؛ McMurry، 2014).

كان الأميغدالين أول غلوكوزيد سيانوجيني معزول. وفي الواقع، تم اكتشاف HCN المتحرر من أنسجة النبات التالفة لأول مرة في عام 1802 من قبل الصيدلاني Bohm في برلين عند تقطير اللوز المر. وفي عام 1830، اكتشف Robiquet و Boutron−Chalard التركيب الكيميائي لـ HCN في اللوز المر (Lechtenberg و Nahrstedt، 1999).

2. 3. الأميغدالين:

يعدّ علم الفيتامينات أحد فروع العلوم البيولوجية والغذائية المهمة، وقد أصبح علماً مستقلاً بذاته نتيجة لما تم اكتشافه من أدوار ووظائف حيوية وفيزيولوجية للفيتامينات وأثر بالغ على العضوية الحية لجميع الكائنات دون استثناء (Combs، 2008). والفيتامينات هي مجموعة مركبات عضوية تعد عناصر غذائية أساسية يجب أن تقدم للجسم بكميات مناسبة على أساس منتظم لأداء مختلف الوظائف الكيميائية والفيزيولوجية في جسم الإنسان. وعلى الرغم من خصائصها الهيكلية والكيميائية المختلفة فإنه يمكن تصنيفها بسهولة في مجموعتين على أساس ذوبانها (المدني وقمصاني، 2004):

- الفيتامينات الذوابة في الدهون وتتضمن فيتامين A، D، E، K وغيرها من الكاروتينات.
- والفيتامينات القابلة للذوبان في الماء وتتضمن: فيتامين C ومجموعة فيتامين B.

للفيتامينات استخدامات متنوعة: كمساعدات أنزيمية، ومضادات أكسدة، وعوامل تدخل في التنظيم المورثي، ومضافات غذائية (المدني وقمصاني، 2004؛ Combs، 2008).

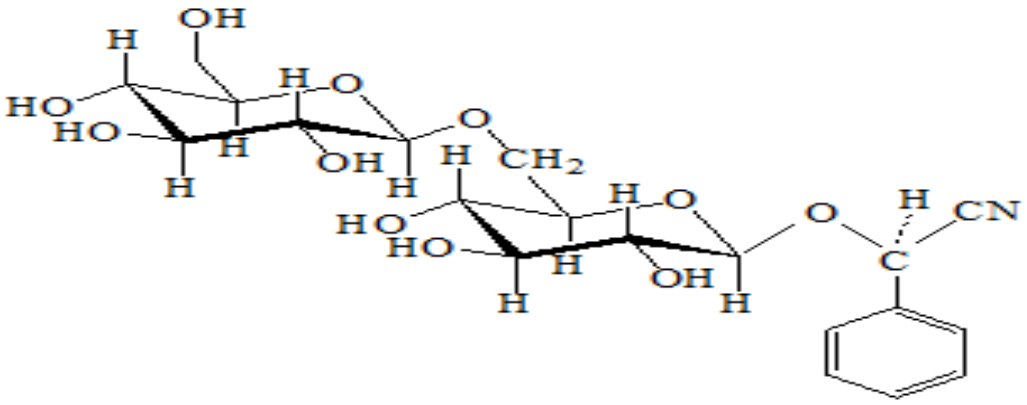
يعد الأميغدالين مادة طبيعية موجودة في المكسرات الخام مثل اللوز والحبوب كالفاصولياء والبرسيم والذرة وبذور العديد من الفاكهة ولا سيما المشمش (McMurry، 2014). وينتشر على نطاق واسع

خاصة في بذور نباتات الفصيلة الوردية *Rosaceae* ذات محتوى الأميغدالين الأعلى من الأنواع غير الوردية، مثل التفاح (*Malus spp.*)، والخوخ (*Prunus persica*)، والمشمش (*Prunus armeniaca*)، والكرز الأسود (*Prunus serotina*)، والخوخ (*Prunus spp.*) (McCarty وزملاؤه 1952؛ Chandler، 1957؛ Woodrof، 1979؛ Conn، 1980؛ Frehner وزملاؤه، 1990؛ Swain وزملاؤه، 1992a، 1992b؛ Poulton وLi، 1994؛ Møller وSeigler، 1999؛ Arrázola، 2002؛ Dicenta وزملاؤه، 2002؛ Mizutani وزملاؤه، 2002؛ Franks وزملاؤه، 2008؛ Sánchez-Pérez وزملاؤه، 2008؛ Wirthensohn وزملاؤه، 2008؛ Ganjewala وزملاؤه، 2010؛ Bolarinwa وزملاؤه، 2015).

ومن أهم مصادر الأميغدالين (Marchione، 2016):

- بذور: المشمش، والتفاح، والخوخ، والكتان، واليقطين، والحنطة السوداء.
- المكسرات: اللوز وخاصة المر، والكاجو.
- ثمار الفاكهة: التوت بمختلف أنواعه، والفراولة، والكينوا.
- البراعم: الخيزران، والبرسيم، والحمص الأخضر.
- أوراق نباتات: الكينا، والبرسيم.
- البقوليات: الفاصولياء الحمراء، والفاصولياء السوداء، والحمص، والفول الأخضر.
- البطاطا الحلوة بأنواعها.

الصيغة الجزيئية للأميغدالين هي $C_{20}H_{27}NO_{11}$ (الشكل 1)، يتكون من وحدة واحدة من حمض الهيدروسيانيك (HCN)، ووحدة واحدة من البنزالدهيد ووحدتين من الجلوكوز. الأميغدالين نفسه غير سام، ولكن إنتاجه HCN الذي يتحلل بواسطة بعض الأنزيمات هو الذي يشكل المادة السامة، والتي لها بعض الآثار الوقائية عند النباتات (Swain وPoulton، 1994).



الشكل (1): الصيغة الجزيئية للأميغدالين

2. 3. 1. الفوائد الطبية للأميغدالين:

الأميغدالين هو الاسم الكيميائي لما يعرف بفيتامين B17، وصيغته الكيميائية (Mandelonitril beta–D–gen obioside C20H27NO11). أما اللايتريل Latrile فهو مركب صنعي حصل على شعبية كبيرة في سبعينيات القرن الماضي في عدة مناطق من العالم باعتباره علاجاً للأشخاص المصابين بالسرطان ولكنه وبرغم هذا الانتشار فإنه غير مرخص به من قبل هيئة الغذاء والدواء الأميركية FAD للسرطان أو لأي مرض أخر. يتم تصنيعه مخبرياً، وصيغته الكيميائية (Mandelonitrile–beta–glucuronide C14H15NO7) (Milazzo وHorneber، 2015؛ NCI، 2018).

عرف الأميغدالين للمرة الأولى في روسيا عام 1830، وتم استعماله كعنصر أو مركب مضاد للسرطان للمرة الأولى في روسيا عام 1845، ولكن دخوله للولايات المتحدة الأميركية واستعماله بصفته دواءً مضاداً للسرطان لأول مرة كان في عام 1920، وكان على شكل حبوب، ولكن أوقف استعمال هذا المركب بسبب سميته. تلت ذلك فترة تم فيها تصنيع مركباً مشابهاً للأميغدالين في الولايات المتحدة الأميركية هو اللايتريل، وذلك في السبعينات من القرن الماضي، وتم التصريح بعدم سميته، مما أدى إلى انتشاره انتشاراً كبيراً بين مرضى السرطان، ليقارب عدد مستعملي هذا المركب 70 ألف مريضاً في عام 1978 في الولايات المتحدة الأميركية فقط. ولكن تم منعه لاحقا في عام 1980؛ بسبب عدم وجود أدلة سريرية كافية تظهر أهمية اللايتريل باعتباره دواءً فعالاً ضد السرطان. لكن الذي دفع للاعتقاد بأن اللايتريل قد يكون مفيداً في علاج السرطان، هو أنه بالإضافة لسيانيد الهيدروجين الذي هو أحد نواتج تفكك اللايتريل داخل الجسم –والذي يعتقد بدوره مركباً في علاج السرطان– يوجد أيضاً مركبان آخران ينتجان عن تفكك الأميغدالين، هما البنزألدهيد والبروناسين، اللذين يعتقد بوجود دور لهما أيضاً في كبح نشاط الخلايا السرطانية (Song وXu، 2014؛ NCI، 2018). وكان اللايتريل يستعمل لعلاج السرطان إما بشكل إفرادي دون مشاركته مع أي دواء آخر، أو بالمشاركة مع علاج استقلابي يتضمن حمية خاصة بالإضافة لجرعات عالية من الفيتامينات والأنزيمات البنكرياسية (NCI، 2018).

كانت هناك العديد من الدراسات حول التأثير المضاد للأورام للأميغدالين، الذي يقتل الخلايا السرطانية بشكل انتقائي في موقع الورم، ولكن لا يزال هناك جدل حول فعاليته وسلامته للبشر، لأن منتجه الأيضي هو سيانيد الهيدروجين السام (O´Brien وزملاؤه، 2005؛ Chen وزملاؤه، 2013؛ Song وXu، 2014؛ Moon وزملاؤه، 2015). حيث إن تناول 500 ملغ من الأميغدالين عن طريق الفم قد يحتوي على 30 ملغ من السيانيد (Newton وزملاؤه، 1981). وتبلغ الجرعة القاتلة الدنيا من السيانيد حوالي 50 ملغ أو 0.5 ملغ/كغ من وزن الجسم. (Shrag وزملاؤه، 1982). ويمكن أن تحدث السمية السيانيدية الحادة عند البشر بجرعات تتراوح بين 0.5 و3.5 ملغ/كغ من وزن الجسم (Speijers،

1993). حيث إن استخدام الأميغدالين بجرعات عالية يمكن أن يسبب الدوخة وخفقان القلب والصداع والغثيان والقيء، وقد يؤدي إلى الوفاة (Mouaffak وزملاؤه، 2013). لذلك، ينبغي تحديد نوعية اللوز المر من خلال محتوى الأميغدالين.

بسبب السمية وعدم كفاية الأدلة السريرية، لم يتم اعتماد الأميغدالين باعتباره عاملاً مضاداً للسرطان. ولكن على الجانب الآخر، يتم إنتاج الأميغدالين عادة ويستخدم كعامل علاجي مضاد للسرطان في بعض البلدان في آسيا وأمريكا الوسطى في الغالب على شكل مكملات غذائية طبيعية. وهناك العديد من الأمثلة على استخدام المكملات الغذائية الطبيعية التي تحتوي على الأميغدالين في أوروبا. ويمكن شراؤها دون وصفة طبية في الصيدليات ومحلات السوبر ماركت والمتاجر المتخصصة وعبر الإنترنت (Boháčová وزملاؤه، 2019).

أظهرت الدراسات الدوائية أن الأميغدالين له العديد من الأنشطة الحيوية مثل التليف الكلوي وتثبيط الأوعية الدموية (Mirmiranpour وزملاؤه، 2012؛ Guo وزملاؤه، 2013)، ومنظم للغدد الصماء (Halenar وزملاؤه، 2017)، ومضاد لتصلب الشرايين، والتأثيرات المناعية والمعدية (Baroni وزملاؤه، 2005؛ Deng وزملاؤه، 2012)، يقوي الحماية العصبية والجهاز العصبي (Cheng وزملاؤه، 2015). كما يستخدم في الطب الشرقي لعلاج الربو وفقر الدم اللاتنسجي والسرطان (Zhu، 1998). وكمكون للأدوية المضادة للسرطان ومضاد للسرطان، حيث جذب اهتمام كثير من الناس (Fukuda وزملاؤه، 2003؛ Todorova وزملاؤه، 2017). وتوصل الباحثون إلى نتيجة مفادها أن النسبة 0.5 إلى 3.5 ملغ من السيانيد لكل كغ من وزن الإنسان قد تكون قاتلة، وحددت لجنة تابعة للاتحاد الأوروبي النسبة الأمنة بـ 20 ميكروغرام لكل كيلوغرام من وزن الإنسان، وإن معظم الخبراء يوصون بجرعة يومية من بذور المشمش من بين 24 إلى 40 حبة، موزعة على مدار اليوم، لحين تحسن حالة المريض (PDQ، 2017؛ NCI، 2018).

ومن أهم الفوائد الطبية للأميغدالين (Halenár وزملاؤه، 2013):

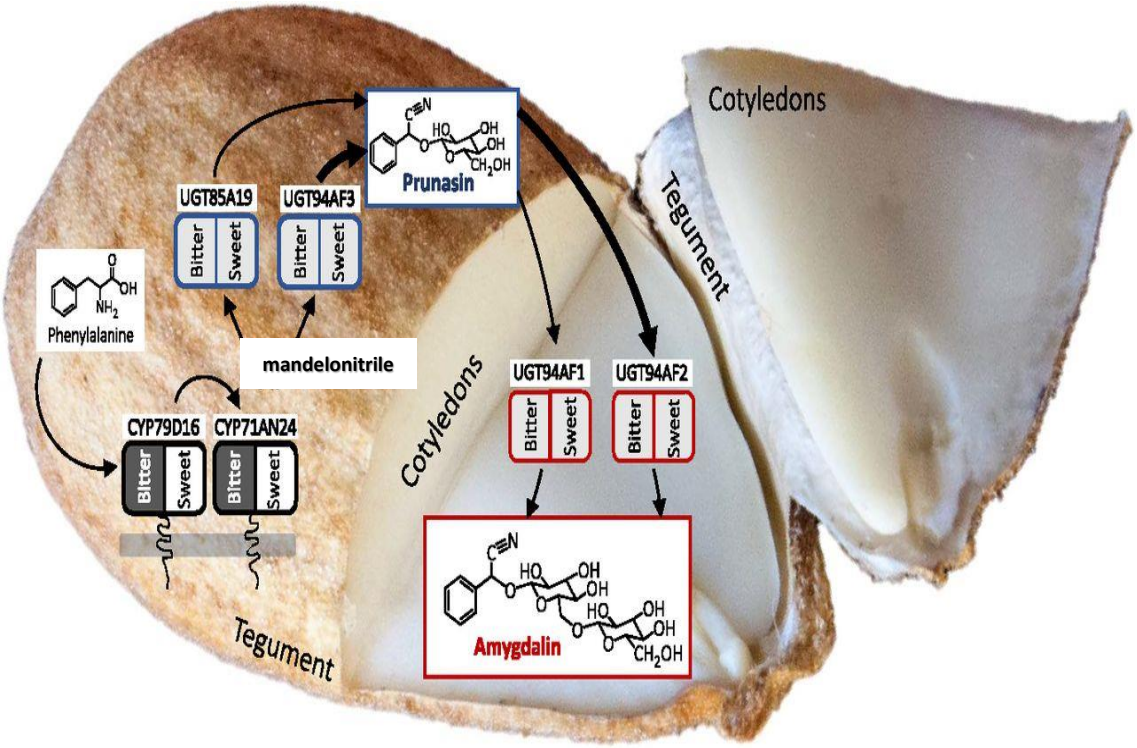
1. استخدم دواءً تقليدياً بسبب فوائده الطبية على نطاقٍ واسع، بما في ذلك علاج السرطان أو الوقاية منه، وتخفيف الحمى، وقمع السعال، وتبديد العطش.
2. بالإضافة إلى النشاط المضاد للأورام، فقد استخدم الأميغدالين أيضاً لعلاج الربو والتهاب الشعب الهوائية وانتفاخ الرئة ومرض السكري. ويتحلل أيضاً بفعل β–D–glucosidase لإنتاج الـ HCN الذي يحفز مركز التنفس بشكل انعكاسي وينتج نوعاً من التأثيرات المضادة للسعال.

3. يمكن استخدام الأميغدالين في الطب للوقاية من الشقيقة وعلاجها وارتفاع ضغط الدم والالتهابات المزمنة.
4. يكون فعالاً كعلاج للأمراض الدماغية مثل الأمراض النفسية، وأمراض الأعصاب، والأمراض الذاتية، واضطراب نشاط الحياة اليومية.
5. وقد تم استخدامه لتحريض التبويض عند النساء اللواتي يعانين من العقم.

ونتيجة لهذه الفوائد المختلفة تم استخدام الأميغدالين في العديد من التطبيقات في مجال (الطب– ومستحضرات التجميل– والمضافات الغذائية– والمكملات الغذائية– والمستحضرات الصيدلانية).

2. 3. 2. مسار التخليق الحيوي للأميغدالين (البناء) وتحلله (الهدم):

يقوم اثنان من السلالات المتضادة متعددة الوظائف من السيتوكروم P450، وهما CYP79 وCYP71، الموجودان على الغشاء البني للبذرة، بتحويل Phenylalanine إلى Mandelonitrile، وثم يتم تحويل هذا الأخير إلى Prunasin بعد إضافة بقايا الغلوكوزيد بواسطة glucosil–transferase (GT1) وglucosyltransferase (5' –uridin difosfoglucose) UDPG–mandelonitrile، وبعد ذلك يتم تحويل Prunasin إلى amygdalin عن طريق إضافة جزيء جلوكوز ثانٍ بواسطة GT2 وglucosyltransferase UDPG–prunasin (Sánchez–Pérez وزملاؤه، 2008) (الشكل 2).



الشكل (2): مسار التخليق الحيوي للأميغدالين

عند سحق حبات اللوز الناضجة والمرة، يتحلل الأميغدالين بسبب نشاط ثلاثة أنزيمات (بيتا غلوكوزيداز أميغدالين هيدرولاز AH، وبروناسين هيدرولاز PH، ومانديلونيتريل لياز MDL1)، إلى البنزألدهيد وHCN، ويرافق ذلك إطلاق الجلوكوز (Evreinoff، 1952؛ Mentzer و-Favre Bonvin، 1961؛ Frehner وزملاؤه، 1990؛ Swain وPoulton، 1994؛ Kester وGradziel، 1996؛ Dicenta وزملاؤه، 2002؛ Sánchez-Pérez وزملاؤه، 2008؛ Wirthensohn وزملاؤه، 2008).

ينقسم التحلل الأنزيمي للأميغدالين إلى ثلاثة أجزاء. يتضمن الجزء الأول تقسيم الأميغدالين إلى البروناسين والجلوكوز بواسطة أنزيم أميغدالين لياز. الجزء الثاني هو التحلل المائي للبروناسين إلى المانديلونيتريل والجلوكوز بواسطة أنزيم بروناسين لياز. المرحلة الأخيرة من التحلل المائي هي تحلل المانديلونيتريل إلى بنزالدهيد وHCN بواسطة هيدروكسي نيتريل لياز (Haisman وKnight، 1967).

عادة ما يحدث التحلل المائي الأنزيمي للأميغدالين إلى المانديلونيتريل في حالة حمضية قليلاً (الرقم الهيدروجيني 5.0-5.8) بينما يتحلل المانديلونيتريل إلى بنزالدهيد وHCN بسرعة في محلول قلوي (الرقم الهيدروجيني 10). وتعمل الأنزيمات عادة عند درجة حرارة 20-40 مْ ويمكن تخريبها عند درجة حرارة أعلى. ويحدث التحلل المائي الأنزيمي للأميغدالين في الأطعمة النباتية في غضون 30 دقيقة إلى 6 ساعات اعتماداً على درجة النقع لعينة الغذاء (Tunçel وزملاؤه، 1995).

بالإضافة إلى التحلل الأنزيمي، يمكن أن يحدث تدهور الأميغدالين أيضاً في محلول مائي ساخن من خلال عملية الأزمرة وفقاً لـ Hwang وزملاؤه (2002). ويمكن قياس منتجات تدهور الأميغدالين (إما من خلال عملية أنزيمية أو أزمرة) بطريقة HPLC ذات المرحلة العكسية (Wasserkrug وRassi، 1997؛ Hwang وزملاؤه، 2002؛ Koo وزملاؤه، 2005).

2. 3. 3. طرائق تقديره وتحليله:

يعد الحصول على معلومات دقيقة عن الفيتامينات في مصادر الغذاء في كثير من الأحيان أمراً بالغ الأهمية لتقييم الكفاية الغذائية، واتباع نظام غذائي صحي ومتوازن، ومن هنا تبرز أهمية تحديد الفيتامين، ونظراً لهذه الأهمية استخدمت طرائق آلية متنوعة ومختلفة من أجل تحديد وجودها، وفاعليتها ونسبها، من هذه الطرائق:

- ✓ الطرائق الفولط مترية: حيث استخدم مسرى متجدد على شكل شريط حلقي من الفضة للتعيين الفولط أمبيرومتري لكل من الفيتامينات C، B1، B2 في العينات الدوائية، وعصائر الفاكهة، ومقارنته مع التحديد البولاروغرافي لها باستخدام مسرى الزئبق (Bas وزملاؤه، 2011).

- ✓ الطرائق البيولوجية: حيث طورت طريقة لتحديد الفيتامينات القابلة للذوبان في الماء باستخدام قابلية التحديد الميكروبي اللوني اعتماداً على إرجاع ملح tetrazolium (Tsukatani وزملاؤه، 2011).
- ✓ كذلك تم تحليل الفيتامينات بواسطة التكنولوجيا القائمة على جهاز الاستشعار البيولوجي (Gao وزملاؤه، 2008).
- ✓ الطرائق الطيفية: تمت دراسة بعض المضافات الغذائية باستخدام طريقة سريعة وفعالة وتعتمد على طيف الفلورة. كما طور نظام تدفق متعدد التغيرات لتحديد عدة فيتامينات منحلة في الماء باستخدام التحليل الطيفي الضوئي في مستحضرات دوائية (Ivanović وزملاؤه، 1999).
- ✓ الطرائق الكروماتوغرافية:

استخدمت الطرائق الكروماتوغرافية بمختلف أنواعها لتحديد الفيتامينات منذ وقت طويل، كالكروماتوغرافيا الغازية بمختلف كواشفها، كاشف التأين باللهب (FID) وكاشف الالتقاط الإلكتروني (ECD). وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التي كانت ولاتزال تقنية مخبرية لا غنى عنها في تحاليل الفيتامينات والمجموعات الصبغية، حيث لها أهمية عملية في تحديد النقاوة، وتحديد الهوية، والتعيين الكمي للفيتامينات. (Ball، 2006).

رغم تعدد الطرائق وتنوعها بقيت الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) تتصدر تقنيات التحليل المعتمدة، بسبب حساسيتها وانتقائيتها العاليتين، ودقتها الفائقة وخاصة عندما تزود بكواشف مناسبة (Ball، 2006). فقد استخدمت الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء لتحديد فيتامينات B2 وB6 في المشروبات المعززة بالفيتامينات، كما استخدمت هذه التقنية مع عمود الطور المعكوس كطور ثابت وأوكتيلامين اورتو فوسفات أو أوكتيلامين ساليسيلات ككاشف لفصل 13 مركباً من فيتامينات وعناصر أخرى من مستحضرات دوائية متعددة الفيتامينات (Falcon وزملاؤه، 2001).

تم تطوير طريقة قياس الطيف الكتلي اللوني عالي الأداء (UPLC–MS) للتحري عن خواص الواسمات الدوائية للإيفيدرين والأميغدالين وحمض الغليسيرايزك بعد التورم الفموي من San–Ao–decoction (SA) في كلاب بيجل. تم معالجة عينات بلازما كلاب بيجل باستخدام استخلاص سائل–سائل، وتم إجراء الفصل الكروماتوغرافي على عمود C18 باستخدام محلول فصل مكون من الماء وحمض الفورميك (0.1%). وتم تحقيق الكشف النوعي للمركبات الثلاثة عن طريق مراقبة أيونات مختارة (سالبة / موجبة) ESI–MS. واعتمد الاستقصاء على مراقبة التفاعل المتعدد مع التحولات الأيونية للمواد إلى المنتج (الإيفيدرين) m/z 116.983–166.096 و(الأميغدالين) m/z 323.074–456.351

و(حمض الغليسيرايزك) m/z 351.062–821.606. وكانت الحساسية، والدقة، والاستقرار في حدود النطاقات المقبولة (Chunhua وزملاؤه، 2013).

تم إجراء دراسة لتحديد وتحليل الأميغدالين في اللوز المر، بواسطة HPLC–ESI–MS / MS وHPLC–DAD. وفي الوقت نفسه، تم استخدام الحساب الكمي للأميغدالين بواسطة HPLC–DAD (Diode–Array Detection). أشارت البيانات إلى أن محتوى الأميغدالين في اللوز المر يتأثر بطريقة المعالجة. كما أنه يعطي فهماً جديداً لمبدأ معالجة اللوز المر. علاوة على ذلك، يمكن تصنيف مختلف أنواع اللوز المر على أساس محتوى الأميغدالين (Shuya وزملاؤه، 2017).

أجريت دراسة لفصل وتحديد الأميغدالين في المكملات الغذائية الطبيعية بواسطة HPLC–DAD، وتم استخدام عمود عالي الاستقرار يستند إلى السيليكا، مع مجموعة وظيفية C18. تم دراسة تأثير تركيبة الطور المتحرك وكذلك درجة حرارة العمود على فصل الأميغدالين. وحقق الغسل باستخدام طور متحرك مكون من 0.05% حمض الفورميك المائي والأسيتونيتريل الفصل المطلوب في غضون 17 دقيقة. وتم استخدام طريقة استخراج بسيطة تستخدم الميثانول، وحمام بالموجات فوق الصوتية، مع استخراج في حدود 94.8% إلى 104.3%. كان حد الكشف وحد قيم القياس الكمي للأميغدالين 0.13 ملغ/ل و0.40 ملغ/ل، على التوالي. وأثبتت الطريقة أنها تكون دقيقة مع قيم الانحراف المعياري الأقل من 2.23٪ (Boháčová وزملاؤه، 2019).

تم تقدير الأميغدالين في أنسجة مختلفة من شجرة فاكهة الأكدنيا (*Eriobotrya japonica* Lindl) بواسطة تحليل HPLC. حيث يتواجد الأميغالين بشكل كبير في نبات الأكدنيا الذي ينتمي إلى الفصيلة الوردية، ويستخدم كمركب صيدلاني مهم. وأظهرت النتائج أن النواة تحتوي على أعلى نسبة للأميغدالين بين أنسجة الفاكهة المختلفة، بينما كان لحم الثمار يحتوي على أقل محتوى. علاوة على ذلك، أظهرت النتائج اختلافات كبيرة في محتوى الأميغدالين بين النواة والأوراق، بينما لم تكن هناك فروق ذات دلالة إحصائية بين محتوى النواة مقارنة بالجذور والزهور. وتم تحديد محتوى الأميغدالين في النواة خلال مراحل النمو المختلفة. وأظهرت النتائج وجود اختلاف كبير في محتوى الأميغدالين في النواة خلال مراحل النمو المختلفة (Wu وزملاؤه، 2017).

يعد استخراج الأميغدالين في مصانع الأغذية جانباً حاسماً في أي إجراء تحليلي نظراً لاحتمال تدهوره السريع. حيث أفاد Koo وزملاؤه (2005)، أن استخدام 4% من محلول حامض الستريك لاستخراج الأميغدالين من بذور المشمش (*Prunus armeniaca* Linne)، أدى إلى زيادة كفاءة الاستخراج. وبالمثل، قارن Lv وزملاؤه (2005)، استخدام الموجات فوق الصوتية، واستخراج سوكسليت مع الميثانول، والتبخير المرتد باستخدام حمض الستريك لاستخراج الأميغدالين من نواة المشمش والكرز

(*prunus tomentosa* thumb)، وأظهرت النتائج أن الاستخلاص بالماء المحتوي على 0.1% من حمض الستريك كان الخيار الأفضل.

تم ذكر العديد من الطرائق التحليلية لتحديد الكميات الإجمالية من الأميغدالين في عينات مختلفة، بما في ذلك الكروماتوغرافيا الغازية مع مطياف الكتلة (GC–MS) (Chassagne وزملاؤه، 1996)، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة مع الكشف الطيفي الضوئي (TLC–UV) (Badr وTaewfik، 2010) وHPLC مع الكشف الطيفي الضوئي (HPLC–UV) (Zhao وزملاؤه، 2007؛ Bolarinwa وزملاؤه، 2015؛ Wang وزملاؤه، 2015) وUHPLC–MS/MS (Lee وزملاؤه، 2013؛ Zhang وزملاؤه، 2018).

وقد شملت الدراسات التحليلية السابقة للأميغدالين تصميم HPLC (Wasserkrug وRassi، 1997؛ Lv وزملاؤه، 2005) وGC (Cirns وزملاؤه، 1978). حيث تم استخدام طريقة HPTLC مع الكشف الطيفي للأشعة فوق البنفسجية لتحديد الأميغدالين في نواة *P. armeniaca* L (Badr وTaewfik، 2010).

لفصل مركبات الأميغدالين، تم استخدام العديد من الطرائق التحليلية بما في ذلك الكروماتوغرافيا الغازية (GC) (Takayama وKawai، 1980)، وHPLC (Hwang وزملاؤه، 2002؛ Koo وزملاؤه، 2005). وقدم Kang وزملاؤه (2000) طريقة كروماتوغرافيا كهرومغناطيسية لتحديد مركبات الأميغدالين في مستخلص نواة المشمش دون أي معالجة مسبقة. علاوة على ذلك، تم تطوير طريقة سريعة وموثوقة باستخدام HPLC لتحليل مركبات الأميغدالين (Wahab وزملاؤه، 2015).

استندت العديد من الدراسات على استخدام الماء أو الميثانول لاستخراج الأميغدالين. وتم إجراء القياس الكمي في اللوز والمشمش والأدوية العشبية الصينية التي تحتوي على الأميغدالين كمكون رئيس. وكانت هناك بعض الأبحاث حول تحديد الأميغدالين في بذور الفاكهة الأخرى (Volduich وKyzlink، 1992؛ Haque وBradbury، 2002؛ Ghiulai وزملاؤه، 2006). ولم تكن هناك أبحاث عن محتويات الأميغدالين في المنتجات الغذائية، فتم تحسين استخراج الأميغدالين واستخدام طريقة HPLC لقياس كمية الأميغدالين لأول مرة في بعض بذور الفاكهة والمنتجات المصنعة المتوفرة تجارياً في المملكة المتحدة، فأظهرت النتائج أن بذور أنواع الفصيلة الوردية تحتوي على كميات عالية نسبياً (تتراوح من 0.1 إلى 17.5 ملغ/غ) من الأميغدالين مقارنة ببذور الأنواع غير الوردية (من 0.01–0.2 ملغ/غ). وكان محتوى الأميغدالين في المنتجات الغذائية المصنعة منخفضاً للغاية (Bolarinwa وزملاؤه، 2014).

تم تطوير طريقة الفصل الكروماتوغرافي ذات الطبقة الرقيقة عالية الأداء مع الكشف عن الطيف بالأشعة فوق البنفسجية لتحديد الأميغدالين في بذور المشمش (*Prunus armeniaca* L.). وتم إجراء

الفصل باستخدام (أسيتات الإيثيل: ميثانول: ماء: حمض الخل الثلجي) (1: 4: 5: 30) على التوالي، وذلك خلال مدة 18 دقيقة، حيث تم تطبيق الطريقة بنجاح على التحليل الكمي للأميغدالين دون أي تدخل من المكونات الأخرى للمستخلص. وعلاوة على ذلك، أجريت دراسة مقارنة لكل من الأميغدالين النقي ومستخلص كلي من بذور المشمش (*Prunus armeniaca* L.) حيث ثبت أن كلاهما أظهر تأثير مسكن، ومضاد للالتهاب. وكشفت دراسات السمية أنها آمنة تصل إلى تركيز 100 ملغ/كغ من وزن جسم الحيوان (Badr وTaewfik، 2010).

أجريت العديد من الدراسات لتحديد الجزء النباتي الذي يحتوي على أعلى تركيز من الأميغدالين، وكذلك المرحلة الفينولوجية للبذور التي يكون فيها تركيز الأميغدالين بالمستوى الأعظمي، وذلك للحصول على البذور واستخلاص الأميغدالين منها في الوقت المناسب للحصول على أكبر انتاج من الأميغدالين، لاستخدامه بالأغراض المختلفة.

حيث أجريت دراسة من قبل Zhao وزملاؤه (2010)، تم خلالها فحص محتوى الأميغدالين لأربعة أنواع من أشجار الفاكهة الحجرية (المشمش، والخوخ، والجارنك، والمشمش المر) خلال المراحل المختلفة بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، فأظهرت النتائج أن محتوى الأميغدالين في البذور كان أعلى بكثير من أي جزء نباتي آخر (الجذور أو الساق أو الأوراق)، وأن أعلى نسبة من الأميغدالين كانت في بذور المشمش المر من بين الأنواع النباتية المدروسة، وكان مستوى الأميغدالين في البذور يزداد باستمرار ووصل إلى أعلى قيمة في المرحلة الأخيرة مرحلة النضج الكامل.

وأجريت دراسة أيضاً من قبل Wu وزملاؤه (2017)، تم فيها استخدام (HPLC) لتحديد محتوى الأميغدالين في الأنسجة المختلفة لنبات الأكدنيا الذي ينتمي أيضاً للفصيلة الوردية، فأظهرت النتائج أن البذرة كانت تحتوي على أعلى محتوى من الأميغدالين بين أنسجة الفاكهة المختلفة (الأوراق والجذور والأزهار)، وكان مستوى الأميغدالين في البذور يزداد تدريجياً في المرحلة المبكرة، ووصل إلى أعلى قيمة في المرحلة ما قبل الأخيرة، ثم انخفض بشكل حاد، وحافظ على ثباته حتى نضج الثمار.

3. الدراسة الجزيئية:

3. 1. مورثة حلاوة الحبة Sweet Kernel (*SK*):

يبدو أن العديد من الصفات الزراعية المهمة في اللوز يتم التحكم فيها بواسطة المورثات الرئيسة (Dirlewanger وزملاؤه، 2004). ويعد طعم النواة صفة مهمة درسها مزارعي اللوز ومربيه، لأن انتخاب الأصناف الحلوة يعد هدفاً مبكراً مهماً، حيث ذكر في عدة دراسات أن المرارة هي عبارة عن دفاع كيميائي في اللوز البري، تحمي البذور من الحيوانات العاشبة والحشرات ومسببات الأمراض (Conn، 1969؛ Nahrstedt، 1985؛ Jones، 1998؛ Morant وزملاؤه، 2003؛ Zagrobelny وزملاؤه،

2004، 2007a، 2007b). بالإضافة إلى هذا الدور، قد يوفر تراكم الغلوكوزيدات السيانوجينية في بعض بذور مغلفات البذور رواسب تخزين للنيتروجين والسكر للشتلات النامية (Lieberei وزملاؤه، 1985؛ Selmar وزملاؤه، 1988، 1990؛ Swain وزملاؤه، 1992a، 1992b).

من المحتمل أن الطعم الحلو لحبات اللوز المزروع ينشأ من طفرة تم انتخابها خلال التربية والحفاظ عليها في الأصناف الحديثة (Dicenta وزملاؤه، 2007). وقدمت الدراسات الوراثية الحديثة دليلًا على أن أكثر من مورثة واحدة تشارك في الطعم المر في أنواع اللوزيات الأخرى مثل المشمش *Prunus armeniaca*، حيث تشارك بالمرارة خمس مورثات غير مرتبطة، في مسارين كيميائيين حيويين متميزين (ثلاث في التخليق الحيوي لـ CGs أو نقلها واثنتان في تفكيك CGs) (Negri وزملاؤه، 2008). على النقيض من ذلك، اقترحت الدراسات الوراثية في الخوخ *Prunus persica* وراثة أحادية العامل، على الرغم من أن المرارة مسيطرة على الحلاوة في الحبة (Werner وCreller، 1997). بينما في حالة اللوز، يعتمد تحديد الحلاوة أو المرارة على الخلفية الوراثية للنبات، فالتركيب الوراثي للنبات الأم هو المسؤول عن طعم البذرة، وبالتالي فإن جميع ثمار شجرة اللوز ستكون إما حلوة أو مرة (Kester وAsay، 1975)، مما يدل على أن كلا الوالدين يؤثران في الجيل التالي (Dicenta وآخرون، 2000).

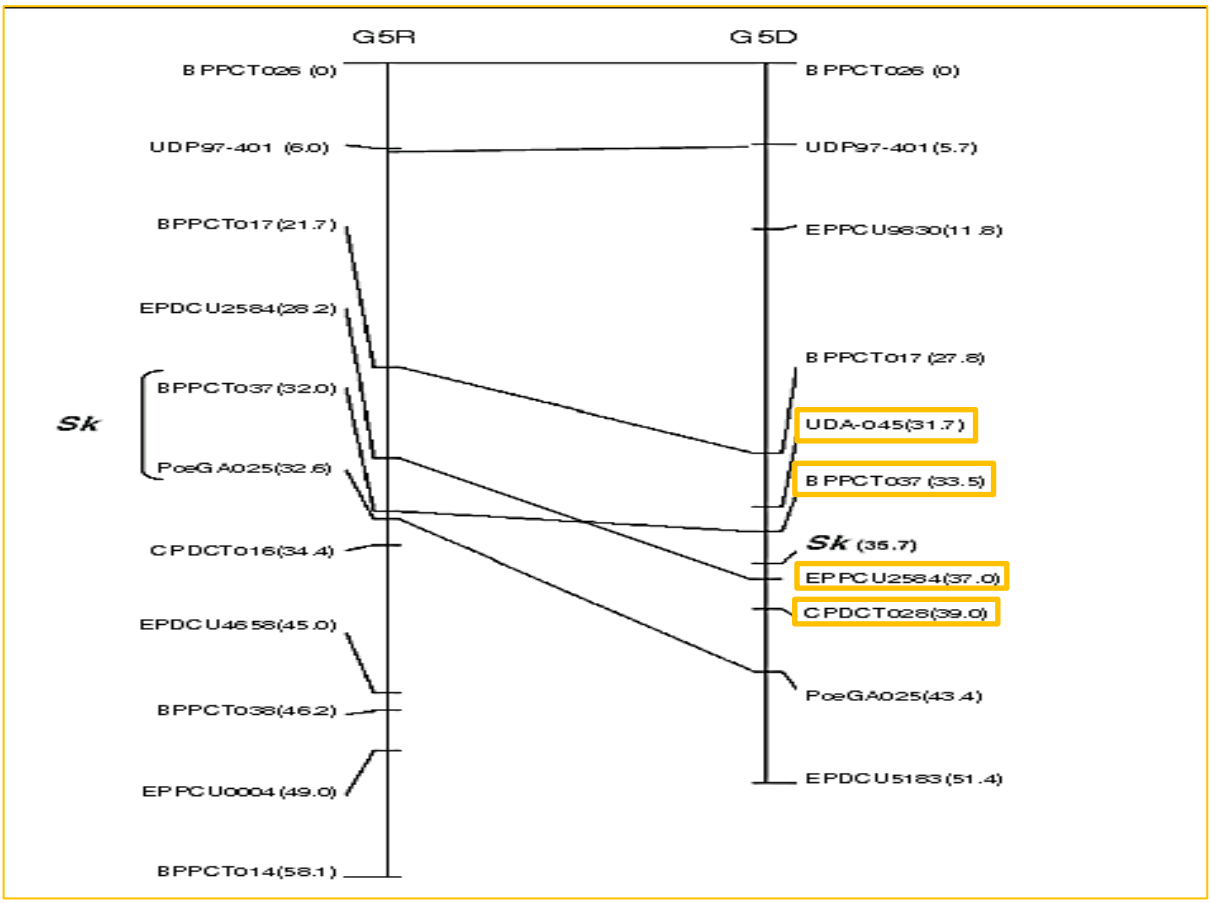
تم تنفيذ نهج لرسم خريطة المورثات المرشحة المشاركة في المسارات الاستقلابية للأميغدالين وترميز ثلاث مورثات هي: glucosyl transferases، وprunasin hydrolase one، و one hydrolase amygdalin، من قبل Sánchez-Pérez وزملائه (2010). ومع ذلك، لم يتم العثور على أي ارتباط بين prunasin hydrolase والمرارة لأن المورثات المذكورة أعلاه تقع على مجموعات الربط الأخرى. فبهدف تحديد المورثات المرشحة التي يمكن أن تشارك في تراكم الأميغدالين، تم إجراء تحليل وراثي مقارن إضافي لتحت الفصيلة البرقوقية *Prunoideae* (Koepke وزملاؤه، 2013).

أظهرت الدراسات الوراثية السابقة أن طعم الحبة في اللوز يعتمد على النمط الوراثي للنبات الأم، بغض النظر عن الملقح (Dicenta وزملاؤه، 2000). علاوة على ذلك، تخضع هذه الصفة لسيادة أحادية، حيث يكون القرين المسؤول عن الحلاوة لمورثة حلاوة الحبة (*SK*) هو السائد على المسؤول عن المرارة *sk* (Dicenta وزملاؤه، 1993a؛ Sánchez-Pérez وزملاؤه، 2007). ولا تزال الطبيعة الجزيئية لموقع *SK* غير معروفة، على الرغم من أنه قد تم اقتراح أن ترمز مورثة *SK* إلى برونوسين هيدرولاز (PH)، الذي يحول البروناسين (طليعة الأميغدالين)، إلى الجلوكوز ومانديلونيتريل (Sánchez-Pérez وزملاؤه، 2008).

اقترح Spiegel-Roy وKochba (1974)، نوعاً معقداً من الوراثة مع وجود ثلاث مورثات. حيث إنها صفة أحادية المورثة وذات وراثة بسيطة. رغم ما قيل حتى الآن، ومع ذلك، فمن المقبول اليوم

أن يكون قرين طعم النواة الحلو *SK* هو السائد على المر (المتنحي) *sk* نتيجة لعدة دراسات (Heppner، 1923، 1926؛ Kester وزملاؤه، 1977؛ Gharbi، 1981؛ Grasselly و Crossa-Raynaud، 1983؛ Vargas وزملاؤه، 1984، 2001؛ Dicenta و García، 1993b؛ Dicenta وزملاؤه، 2007). من خلال دراسة عدد كبير من العائلات من قبل Dicenta وزملائه (2001)، صنفت العديد من الأصناف الحلوة على أنها متخالفة أو متماثلة اللواقح ووجد أن معظم أنواع اللوز متخالفة اللواقح.

تقع المورثة *SK* في مجموعة الربط الخامسة (LG5) من جينوم اللوز كما ورد في خريطتي الربط الوراثي للوز (Joobeur وزملاؤه، 1998؛ Bliss وزملاؤه، 2002؛ Sánchez-Pérez وزملاؤه، 2010). وعلى الرغم من أنه تم العثور في الدراسات الحديثة على واسمات جزيئية مرتبطة بالموقع *SK*، إلا أن تحديد الموقع الدقيق لها على LG5 ووظيفتها الكيميائية الحيوية أمر بعيد المنال. ويظهر الشكل (3) الخريطة الوراثية لـ LG5 التي تم الحصول عليها باستخدام مجموعة F1 المشتقة من التصالب بين الأبوين R1000 (R) و Desmayo Largueta (D)، كلاهما متخالفا اللواقح لموقع *SK*، ويتم قياس المسافات الوراثية بالسنتيمورجان (cM). (Sánchez-Pérez وزملاؤه، 2010).



الشكل (3): الخريطة الوراثية لـ LG5 حول موقع المورثة *SK/sk*

3. 2. تحليل التباين والانتخاب المبكر باستخدام الواسمات الجزيئية:

كان تحديد وتوصيف أصناف اللوز منذ وقت طويل، كما هو الحال بالنسبة لمحاصيل الأشجار الأخرى، يركز على الصفات المورفولوجية. ومع ذلك، فإن بعضها غير متاح دائماً للتحليل، حيث تتأثر بالظروف البيئية وقد تكون مرئية فقط في الأشجار البالغة، مما يتطلب وقتاً طويلاً لتحليلها.

أجريت دراسات على مجموعات كبيرة من الأشجار التي تحتاج فترة طويلة لتصبح قادرة على الإنتاج (Gómez وزملاؤه، 2003a؛ Scorza، 2001)، وأخرى حول التعبير الوراثي المتنحي أو ما يهدف إلى دراسة مقاومة الإجهاد الإحيائي واللاإحيائي (Luby وShaw، 2001)، ويصعب القيام بها في المحاصيل الشجرية. أعطت هذه العقبات الفرصة لتطوير تقنيات جديدة أكثر فائدة من تلك المستخدمة في التربية التقليدية، والحرص على نقل السمات المرجوة، وتجنب الحصول على تلك السلبية (Quilot وزملاؤه، 2004).

إن التعرف على أنواع اللوز وأصنافه بالاعتماد على الاختلافات المورفولوجية هو أمر صعب، لذلك توفر الواسمات الجزيئية معلومات وراثية دقيقة لجهود التربية المستقبلية، حيث يتم استخدام الواسمات الجزيئية المعتمدة على DNA على نطاق واسع في انتخاب الصفات الوراثية ودراسة التباين الوراثي ومنها: MAS، وMAB، وRAPD، وRFLP، وAFLP، ISSR، وSSR، وCAPS.

في الوقت الحاضر، يتم استخدام الواسمات الجزيئية بشكل روتيني في تربية النباتات بهدف انتخاب الصفات ذات الأهمية الاقتصادية. ويمكن تعريف الواسم الجزيئي على أنه موقع جينومي ذي أبعاد متغيرة (عموماً بين 50 و3000 زوجاً من النكليوتيدات)، يمكن اكتشافه بواسطة واسمات محددة، يكون وجودها البسيط كافياً لتمييز تمدد الصبغيات بطريقة لا لبس فيها. وتميز الوراثة المندلية البسيطة هذا النوع من الواسمات، لذلك لا يوجد تأثيرات متعددة الاتجاهات. علاوة على ذلك، يجب أن تكون هذه الواسمات واسعة الانتشار ومتاحة بسهولة في الجينوم وألا تتأثر بالبيئة ومراحل تطور النبات (Frey، 1981).

بصرف النظر عن هذه المزايا، غالباً ما تجد الواسمات تطبيقاً محدوداً بسبب إعادة التركيب المتكرر خلال الإنقسام المنصف الأول الذي يحدث ويفك الإرتباط مع المورثات ذات الأهمية، أو لأنها تنتج أشكالاً أحادية بين الطرز الوراثية قيد الانتخاب. في الواقع، ترتبط القيمة العملية لواسم ما ارتباطاً وثيقاً ببعده عن المورثات أو مواقع الصفات الكمية (QTLs) التي تحدد النمط الظاهري، وكذلك من قدرته على الاحتفاظ بقيمته التشخيصية في مجموعات الأشجار. لذلك، يجب أن يكون الواسم المثالي متعدد الأشكال (PIC) وفي موضع واحد، مع محتوى عالٍ من المعلومات، وتم تعريفه على أنه نتاج احتمالية أن يكون الأب متخالف اللواقح والنسل غني بالمعلومات (Botstein وزملاؤه، 1980)؛ وسائداً مشتركاً، مع إمكانية تحديد المزيد من المواقع، وأن تكون قابلة للتحويل داخل الأنواع وفيما بينها.

تتمثل الخصائص الرئيسة للواسمات الجزيئية في التعرف على الوالدين وذريتهم، وتسليط الضوء على التباين الوراثي، وفي الوقت نفسه، استخدام تقنيات رخيصة وسريعة كالرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز أو بولي أكريلاميد. وتقدم الواسمات الجزيئية الدعم أيضاً في رسم الخرائط ووضع واسمات للمورثات ذات الأهمية الزراعية ومقاومة الأمراض ورسم خرائط الجينوم (الخرائط الوراثية، وخرائط المقارنة، خرائط الربط)، والانتخاب بمساعدة الواسمات (MAS) والنسخ العكسي بمساعدة الواسمات (MAB) خلال برامج التربية، وتحديد الجنس، ودراسة التركيب الوراثي للجماعات والعلاقات التصنيفية والتطورية. وعلى وجه الخصوص، تعد MAS أداة قوية من خلال التحليل المباشر للطراز الوراثي للنبات باستخدام واسمات مرتبطة ارتباطاً وثيقاً بالصفات المرغوبة، وتسمح بانتخاب صفات النباتات قبل زراعتها، وهذا يساعد في الانتخاب المبكر للنباتات، وتقليل الأوقات والتكاليف والمساحات المطلوبة عادة في التربية التقليدية (Wünsch وHormaza، 2002؛ Gómez وزملاؤه، 2003b؛ Sánchez-Pérez وزملاؤه، 2004). وأخيراً، تعد الصفات الكمية، مثل الغلة ومقاومة الأمراض وتحمل الإجهاد وجودة البذور والثمار، مهمة جداً لبرامج التربية، كما تستخدم الواسمات الجزيئية في الدراسات المتعلقة بـ QTLs، مما يساعد على تحديد المورثات المرشحة أو تطور الواسمات الجزيئية المرشحة المرتبطة بالصفة قيد التحقق (Neeraja وزملاؤه، 2007؛ Romero وزملاؤه، 2009).

تم استخدام تقنية RAPD وISSR عموماً في العقدين الأخيرين في برامج تعريف الأصناف على مستوى الحمض النووي؛ بسبب كفاءتها من حيث التكلفة والبساطة، دون الحاجة إلى معرفة مسبقة بتسلسلات DNA الأنواع، حيث تم تطبيق هذه الطرائق لتحديد الأصناف في العديد من الأنواع النباتية مثل الكركم والتفاح والفراولة (Tian وزملاؤه، 2015).

في دراسة أجريت من قبل Tian وزملاؤه (2015)، لتقييم التنوع الوراثي في صنف الخوخ *Prunus mira* Koehne الذي نشأ في الصين، وهي شجرة فاكهة تزرع على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم، وذات قيمة اقتصادية عالية. تم استخدام اثنين من الواسمات الجزيئية المستندة إلى الحمض النووي وهي: ISSR وRAPD، من أجل تقييم التنوع الجيني في 48 عينة في ثلاث مناطق هي: التبت (XZ)، ومقاطعة خنان (HN) ومقاطعة هيلونغ جيانغ (HLJ). فلوحظت في هذه الدراسة مستويات عالية من تعدد الأشكال: 77.80% (ISSR) و72.73% (RAPD). وأكدت نتائج هذه الدراسة أن كل من الواسمات ISSR وRAPD هي طرائق فعالة لتقييم التنوع الوراثي في *P. mira* Koehne.

أجريت دراسة لتقييم التنوع الشكلي لثمانية وعشرين صنفاً وطرازاً من أصناف الدراق واللوز المحلية والمدخلة إلى سورية ودراسة تنوعها الوراثي باستخدام واسمات SSR كما تم الكشف عن التغايرات النيكليوتيدية المفردة SNPs بين أجزاء من مورثات rbcL وmatK وrRNA 18S بين الأنواع المدروسة،

مما سمح بدراسة جزء من العلاقات الوراثية التطورية بين الدراق واللوز، وتقييم الحالة التصنيفية لهما، بالاعتماد على DNA النواة والصانعات، ووضع قاعدة لأساس منهجي تصنيفي ضمن إطار العمل في دراسات العلاقات التطورية (سرحان، 2015).

في دراسة من قبل Ricciardi وزملاؤه (2016)، تم رسم خرائط دقيقة لمواضع المرارة في اللوز، حيث يخضع طعم نواة اللوز لسيطرة أحادية المنشأ، فترتبط الحلاوة بقرين النواة الحلوة السائد SK وترتبط المرارة بالقرين المتنحي. نظراً لأن معظم اللوز المزروع غير متماثل اللواقح، فيتم الحصول على شتلات اللوز المرة أيضاً خلال برامج التربية، ومن المهم تطوير واسمات جزيئية تمكن من المساعدة في الانتخاب. على الرغم من أن الوظيفة الكيميائية الحيوية لـ LG5 من جينوم اللوز لا تزال مجهولة الهوية، فقد تم تحديد مورثة SK في LG5 في الخريطة الوراثية التي تم الحصول عليها من التقاطع بين الطرز الوراثية غير المتجانسة "Desmayo Largueta" × "R1000" (RxD). تم في هذه الدراسة تحديد العديد من التعددية SNPs في منطقة تبلغ مساحتها 3.7 ميغابايت (*Prunus persica*. L)، والتي يتم تركيبها على المنطقة التي تحتوي على موضع SK في اللوز، وتم تحويل بعضها إلى واسمات (CAPS) للانتخاب بمساعدتها.

في دراسة أجريت لتقييم التباين الوراثي بين اللوز المزروع *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb والخوخ *Prunus persica* (L.) Batsch باستخدام الواسمات الجزيئية (SSR وCAPS). تم استغلال تسلسل التشابك والترابط بين جينومات اللوز والخوخ، لتحديد (CAPS) المرتبطة بالموقع SK. وتم استخدام مجموعة F1 من النباتات لتخطيط هذه الواسمات على منطقة الجينوم SK، إلى جانب واسمات SSR مرتبطة بـ SK تم وصفها مسبقاً من قبل Sánchez–Pérez وزملاؤه (2007)، وأشارت الواسمات الجزيئية إلى إمكانية استخدام CAPS في هذه الدراسة في تقييم التباين الوراثي بين الأصناف (Ricciardi وزملاؤه، 2018).

يعد اللوز من الأنواع المعمرة الخشبية التي تحتاج لفترة طويلة لتصبح قادرة على الإنتاج. لهذا السبب، يتيح الانتخاب المبكر لسمات الحبة المطلوبة المرتكز على الواسمات الجزيئية فحص الغراس قبل عدة سنوات من التقييم المظهري للحبات في هذا المجال، حيث إن تطوير خرائط الارتباط باستخدام الواسمات الجزيية مثل (RFLP) و(SSR) قد وفرت أساساً أكثر فعالية لعلم الوراثة وتربية الفاكهة الحجريّة (Dirlewanger وزملاؤه، 2004). وتم إنشاء خريطة ارتباط من 246 واسماً في الجيل F2 الناتج عن تهجين "تكساس" × "الخوخ المبكر" (Joobeur وزملاؤه، 1998). وتم تعيين هذه الخريطة (T×E) كخريطة مرجعية لجنس Prunus ولديها حالياً 826 واسماً (Dirlewanger وزملاؤه، 2004؛ Howad وزملاؤه، 2005). باستخدام البيانات من خرائط الارتباط المختلفة المرتكزة على هذه

الخريطة المرجعية، أصبح من الممكن تحديد موقع 28 مورثاً رئيساً يؤثر في السمات الزراعية للفاكهة (طعم الحبة، وقت التفتح، لون لحم الحبة، إلخ) في أنواع مختلفة (الخوخ، والمشمش، واللوز) (Dirlewanger وزملاؤه، 2004). وتم تحديد موقع SK في LG5 (Joobeur، 1998؛ Sánchez-Pérez وزملاؤه، 2007).

تم تحديد اثنتين من RFLP (FG202 وAG46) بالقرب من موقع SK بواسطة Joobeur وزملائه (1998). ومع ذلك، فإن RFLP ليست كافية لتطبيقات تربية النباتات الروتينية لأنها تتطلب كميات كبيرة من الحمض النووي عالي الجودة. وبدلاً من ذلك، تتطلب واسمات SSR كميات قليلة من الحمض النووي (DNA) وتفاعل (PCR) بسيط ورخيص نسبياً ومناسب بشكل أفضل للقرارات واسعة النطاق اللازمة للتربية بمساعدة الواسمات. تم تعيين عدة مواقع SSR في منطقة LG5 على موقع SK (Dirlewanger وزملاؤه، 2004؛ Howad وزملاؤه، 2005)، تمت دراسة هذه الواسمات في مجموعة من أنواع اللوز لتحديد المرارة، ووُجِدَ أن بعضها مرتبط بشكل وثيق بهذه المورثة ومفيد لانتخابها (Sánchez-Pérez وزملاؤه، 2007).

3. 3. التكرارات الترادفية البسيطة Simple Sequence Repeat (SSR):

تسمح واسمات SSR، التي تسمى أيضاً Microsatellite أو التكرارات الترادفية البسيطة، باكتشاف الاختلافات بين تكرار تسلسل الحمض النووي والتي هي بسيطة وقصيرة (2-5 أزواج قاعدية، ومشتتة في الجينوم بأكمله. إنها واسمات قابلة للتكرار بسهولة وغالباً ما تكون ذات موضع واحد. وتظهر SSR تعددية شكلية عالية (Tautz، 1989؛ Morgante وOlivieri، 1993؛ Bell وEcker، 1994). وتستخدم على نطاق واسع لوصف التنوع الوراثي في مجموعة واسعة من الأنواع النباتية (Gupta وزملاؤه، 1996؛ Powell وزملاؤه، 1996). وتم استخدام واسمات SSR لتأسيس التنوع الوراثي والعلاقات الوراثية بين أصناف الخوخ واللوز وأنواع *Prunus* الأخرى (Serrano وزملاؤه، 2002؛ Gómez وزملاؤه، 2003b). واستخدمت تقنية SSR في توصيف معظم أنواع الفاكهة، وكذلك في دراسات التنوع الوراثي، وتحديد درجة التشابه الوراثية. حيث طبقت على نطاق واسع في رسم الخرائط الوراثية وتحليل البنية الوراثية للجماعات (Barreneche وزملاؤه، 1998). واستخدمت بشكل واسع في الفصيلة الوردية (*Rosaceae*)، وكان استخدامها بداية على التفاح لتوصيف مصادر التفاح الوراثية وذلك من قبل Hokanson وزملاؤه (1998).

بالإضافة إلى ذلك، تم استخدام SSR أيضاً في رسم الخرائط الوراثية للخوخ (Sosinski وزملاؤه، 2000؛ Dettori وزملاؤه، 2001؛ Etienne وزملاؤه، 2002؛ Aranzana وزملاؤه، 2003)، واللوز (Joobeur وزملاؤه، 2000؛ Bliss وزملاؤه، 2002)، والمشمش (Hurtado وزملاؤه، 2002؛

Vilanova وزملاؤه، 2003). علاوة على ذلك، وجد Testolin وزملاؤه (2004) المجموعة الأولى من واسمات SSR في اللوز، ثم استخدمت بنجاح لتوصيف أصناف اللوز بواسطة Gómez وزملائه (2003a) وTestolin وزملائه (2004)، ولأنواع *Prunus* الأخرى بواسطة Gómez وزملائه (2003c).

أصبحت واسمات SSR هي الواسمات الوراثية المختارة لتحديد البصمة الوراثية في أنواع نباتية عديدة (Tautz، 1989)، وذلك لأنها تعتمد على PCR وذات تباين وتكرارية عالية وعادة ما تكون متعادلة السيادة وموجودة بغزارة ضمن المادة الوراثية لحقيقيات النوى (Powell وزملاؤه، 1996؛ Gupta وVarshney، 2000). وتحاط مواقع SSR من جانبيها بتسلسلات نكليوتيدية، عادة ما تكون فريدة ومحددة للنوع أو الجنس، وبالاعتماد على هذه التسلسلات يمكن تصميم واسمتين متخصصتين إحداهما مكملة لهذه التسلسلات الفريدة على إحدى سلسلتي الـ DNA، والواسمة الأخرى مكملة لهذه التسلسلات الفريدة على السلسلة الأخرى بحيث يكون اتجاه كلا الواسمتين نحو داخل مواقع SSR وذلك لتضخيمها (Tautz، 1989). ويمكن تحديد مواقع SSR بعدة طرائق مثل البحث ضمن قواعد بيانات DNA مثل Genebank وEMBL أو من خلال معرفة التتابع النيكلوتيدي لقطع صغيرة من الـ DNA (200–600 زوجاً قاعدياً) (Powell وزملاؤه، 1996). وبناءً على ذلك وكون تقنية SSR غير عشوائية مقارنة مع ISSR وRAPD، أمكن استخدام تقنية SSR في دراسة واسمات جزيئية قريبة أو مرتبطة بموقع محدد على الجينوم لإنتاج مادة معينة، والمثال على ذلك في الدراسات التالية:

تُستخدم واسمات الحمض النووي المرتبطة بالصفات المهمة اقتصادياً بشكل روتيني لاستبدال أو استكمال الانتقاء المظهري للصفات في برامج تربية النباتات. وتستخدم واسمات SSR، التي تكشف عن الأطوال المتعددة لقطع الحمض النووي في مواقع SSR، على نطاق واسع لاستقصاء التنوع الوراثي في النباتات (Vieira وزملاؤه، 2016). ففي دراسة من قبل Delplancke وزملاؤه (2016)، لاستنتاج التاريخ التطوري للوز الحلو (*Prunus Amygdalus* s.l)، تم وضع إطار زمني، من خلال تحليل 13 موضعاً نووياً SSR فأكد تحليل التطوُّر باستخدام مواضع SSR الانقسام بين *Amygdalus* و*Persica*. وتتفق هذه النتيجة مع بيانات بيوجغرافية تبين أن كل قسم من القسمين موزع بشكل طبيعي على كل جانب من سلسلة جبال آسيا الوسطى.

لا يمكن إجراء الانتقاء المظهري للأنواع ذات البذرة الحلوة إلا بعد سنتين إلى ثلاث سنوات، حتى تصبح قادرة على الإنتاج. لذلك، من أجل المساعدة في برامج التربية، تم في عدد من الدراسات تحديد الواسمات الجزيئية المرتبطة بالمورثة *SK* (Sánchez–Pérez وزملاؤه، 2007؛ Sánchez–Pérez وزملاؤه، 2010). في أحدها، تم عرض عدد من واسمات SSR المرتبطة بمجموعة (LG5) في اللوز

على أنها مرتبطة بالموقع *SK*، وتم وضع خريطتين لمنطقة *SK*، واحدة لكل من الوالدين لخريطة الجيل F1 (Sánchez–Pérez وزملاؤه، 2010). حيث أجريت دراسة لتحديد الواسمات الجزيئية المتعلقة بمرارة الثمار في اللوز. وتم الربط بين LG5 وSSR باستخدام المتوالية الوراثية الناتجة عن التقاطع بين الطرز الوراثية غير المتجانسة "Desmayo Largueta" × "R1000" وتم إيجاد 6 واسمات SSR (UDA–045، EPDCU2584، CPDCT028، BPPCT037، PPCGA025، CPDCT016) مرتبطة بالقرب من الموقع *SK*، وقد سمحت الأنماط الوراثية لأربع من هذه الواسمات التي تحيط بموقع *SK*، في عدد من الأنواع البرية والأصناف المزروعة بتحديد الأنماط المتنوعة للآباء، مع تحديد قرائن تعطي دقة كافية لانتخاب مبكر وفعال للغاية ضد الطرز الوراثية المرة، وهذا يثبت جدوى تقانة SSR في فحص مجموعات الأشجار المثمرة مثل اللوز بطريقة سهلة (Sánchez–Pérez وزملاؤه، 2010).

الفصل الثانـي

مواد وطرائق البحث

& Materials

Methods

تم إنجاز البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية (NCBT) بين عامي (2019 و2020)م.

1. المادة النباتية:

حُدِدَتْ أماكن جمع العينات النباتية بالاعتماد على كتاب صادر عن المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والاراضي القاحلة (أكساد) من قبل شلبي وزملاؤه (1997)، وتم الحصول عليها من 24 طرازاً وراثياً من ثلاثة أنواع من اللوز البري المنتشرة في سورية في مواقع مختلفة. حيث تم الحصول على نوع اللوز العربي من محافظة السويداء (خمسة طرز وراثية من منطقة الكوم وطراز واحد من منطقة سهوة بلاطة). وتم الحصول من نوع اللوز الكورشنسكي على ستة طرز وراثية من محافظة السويداء (خمسة منها من منطقة الكفر وطراز واحد من منطقة ظهر الجبل)، وستة طرز وراثية من منطقة آبل في محافظة حمص. وتم الحصول من نوع اللوز الشرقي على ستة طرز وراثية من منطقة حسياء في محافظة حمص (الجدول 2). ونقلت العينات من مواقع الجمع إلى المخبر بواسطة حافظة مبردة للمحافظة على حيويتها، ووضعت في المجمدة على حرارة −80 مْ لحين الاستخدام.

الجدول (2): الأنواع والطرز الوراثية المدروسة ومواقع الجمع وخط الطول والعرض والارتفاع.

النوع	الطراز الوراثي	موقع الجمع	خط الطول	دائرة العرض	الارتفاع
اللوز العربي	1	السويداء – الكوم	36°34`E	32°40`N	1012M
	2				
	3				
	4				
	5				
	6	السويداء – سهوة بلاطة	36°36`E	32°38`N	1172M
اللوز الكورشنسكي	7	السويداء – الكفر	36°39`E	32°39`N	1607M
	8				
	9				
	10				
	11				
	12	السويداء – ظهر الجبل	36°40`E	32°41`N	1577M
	13	حمص – آبل	36°40`E	34°38`N	548M
	14				
	15				
	16				
	17				
	18				
اللوز الشرقي	19	حمص – حسياء	36°45`E	34°24`N	784M
	20				
	21				
	22				
	23				
	24				

2. طريقة العمل وتحضير العينات:

2. 1. الدراسة الكيميائية:

2. 1. 1. استخلاص الأميغدالين من بذور اللوز:

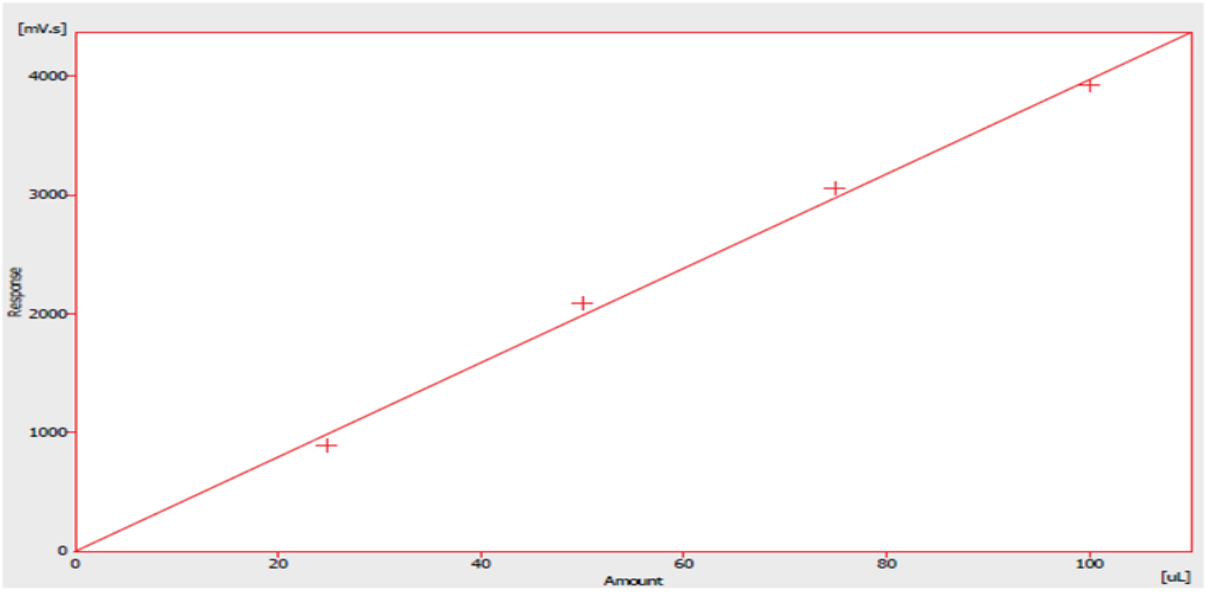
تعتمد الطريقة المستخدمة لاستخراج الأميغدالين على غليان الإيثانول حسب Miller وزملاؤه (2010)، وفق الخطوات التالية:

1. أُخذتْ الثمار الناضجة والجافة تماماً وفُصلتْ البذور عن القشرة باستخدام المطرائقة اليدوية.
2. طُحنَ حوالي 10 غ من البذور جيداً في المطحنة الكهربائية حتى الحصول على مسحوق متجانس.
3. حُفظَ في الثلاجة في أكياس من البولي إيثلين محكمة الإغلاق، لحين الاستعمال.
4. أُخذَ وزن من العينات قدره 2غ.
5. وُضعتْ في دورق زجاجي سعة 200 ml.
6. أُضيفَ لها 50 مل من الإيثانول المطلق.
7. سُخنَ الخليط عند الدرجة 100مْ باستخدام السخان الكهربائي مع محرك مغناطيسي لمدة 100 دقيقة (بوجود تبخير مرتد).
8. رُشحَ الخليط المغلي باستخدام ورق ترشيح whatman في دورق زجاجي خاص بالمبخر الدوار، وأُضيفَ 5 مل ايتانول مطلق على ورقة الترشح للحصول على كل ما هو عالق عليها من المستخلص.
9. بُخر المرشح بواسطة المبخر الدوراني على درجة حرارة 70 مْ وعدد الدورات 70 دورة/دقيقة.
10. وُزِن أنبوب فالكون سعة 15 مل وهو فارغ.
11. أُضيف 10 مل من ثنائي إيثيل الإيثر إلى العينة المجففة، الموجودة في دورق المبخر الدوراني، لترسيب الأميغدالين وازالة الشوائب والدهون واذابة العينة والحصول عليها.
12. نُقلت العينة الى انبوب الفالكون الذي وُزنَ وهو فارغ.
13. رُجت العينة باستخدام رجاج كهربائي (vortex) لمدة 3 دقائق على سرعة 3000 دورة/د.
14. ثُفلت العينة لمدة عشر دقائق بدرجة حرارة الغرفة وبسرعة 9000 دورة/د لترسيب الأميغدالين.
15. تَم التخلص من السائل الطافي والحفاظ على الراسب.
16. أُضيف للراسب 10 مل ثنائي إيثيل الإيثر مرة أخرى وكُرِرَتْ الخطوات 13 و14 و15.
17. كُررتْ الخطوة 16 مرتين أو ثلاث مرات للتأكد من غسل العينة جيداً من الشوائب والدهون.
18. تَم التخلص من السائل والحفاظ على الراسب.
19. وُزِنَ الأنبوب الحاوي على الراسب، وبالمقارنة بين وزن الأنبوب وهو فارغ مع وزنه وهو حاوي للراسب، يكون الفرق هو وزن الأميغدالين.

20. وُضِع الراسب في المجمدة لحين الاستخدام.

2. 1. 2. المنحنى المعياري (القياسي) الأميغدالين:

أُذيبَ 0.0050غ من الأميغدالين النقي (Sigma–Aldrich) في 25مل من الماء للحصول على محلول أم تركيزه 200 ميكروغرام/مل (200 ppm)، والذي خُزِنَ عند درجة حرارة 20 مْ ليتم تحليله. وأُجْرِيَ منحنى المعايرة باستخدام أربعة تراكيز (25، 50، 75 و100 ميكروغرام/مل) من الأميغدالين النقي (الشكل 4).



الشكل (4): المنحنى المعياري للأميغدالين

2. 1. 3. تحضير العينات لتحليل HPLC:

1. وُزِنَ 0.0050غ من كل عينة ووُضعتْ في أنبوب فالكون سعة 50 مل.
2. حُلَتْ في 50 مل ماء HPLC.
3. رُجَتْ باستخدام الرجاج الكهربائي Vortex لمدة 3 دقائق حتى تمام الانحلال.
4. فُلْتِرَتْ العينات باستخدام مرشحات (PTFE 0.45µm).

2. 1. 4. HPLC:

اِسْتُخدِمَ جهاز HPLC ماركة (YL9100 Plus^{+})، يوجد في مخبر تقانات الأغذية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، مزود بكاشف في المجال المرئي وفوق البنفسجي (UV – Vis)، وبطارد غازات آلي، وحاقن آلي للعينات، وببرنامج تشغيل متطور لتقنية HPLC يعمل بنظام Windows 10، ويستخدم عمود C18 أبعاده 250 x 4.6 mm. وُضعتْ العينات في الحاقن الآلي على طول موجة (214)، ومعدل تدفق 1 مل/د، وحرارة تحليل 40 مْ. وكان الطور المتحرك عبارة عن الميثانول والماء (40:60،

v:v) على التوالي، وطُرِدَتْ الغازات منه في جهاز Ultrasonic لمدة 20 دقيقة وعلى درجة حرارة 25 مْ، لإزالة فقاعات الغاز قبل الاستخدام. وكان حجم الحقن 20 ميكرولتر.

2. 1. 5. حساب نسبة الرطوبة في بذور الطراز 12 في 3 مراحل فينولوجية للبذرة:

المراحل هي (الطور المائي للبذرة، والطور اللبني، والنضج الكامل). وذلك باتباع طريقة (AOAC، 2000) كما هو موضح بالخطوات التالية:

1. وُزن طبق بتري زجاجي فارغ.
2. صُفِرَ الميزان على وزن الطبق.
3. وُضعَ البذور في الطبق وقُطِعَتْ إلى قطع صغيرة لزيادة السطح المعرض للحرارة.
4. وُزنتْ العينة قبل التجفيف.
5. وُضعَ الطبق الحاوي على العينة في فرن التجفيف على درجة حرارة 105 مْ حتى ثبات الوزن.
6. وُزنَ الطبق مع العينة بعد التجفيف.
7. حُسبتْ نسبة الرطوبة باستخدام المعادلة التالية:

نسبة المادة الجافة % = وزن الطبق مع العينة بعد التجفيف – وزن الطبق فارغ/ وزن العينة قبل التجفيف × 100. وتكون النسبة الباقية هي نسبة الرطوبة %.

فكانت نسبة الرطوبة في المراحل الفينولوجية الثلاث هي: 94.46% للطور المائي، 84.03% للطور اللبني و4.28% لمرحلة النضج الكامل.

2. 1. 6. تقدير تركيز الأميغدالين في البذور:

حُضرَ تركيز من العينات للحقن في جهاز HPLC وحُددتْ كمية الأميغدالين فيها، وهذا التركيز هو 100 ميكروغرام/مل (100 ppm).

اختلفت كمية العينة التي وُزِنَتْ لتحضيرها للحقن اعتماداً على نسبة الرطوبة حسب المرحلة الفينولوجية للبذور، لذلك طُبِقَ التالي:

- بالنسبة للبذور في مرحلة النضج الكامل:

بعد استخلاص العينة حُضرتْ للحقن وذلك بوزن 0.0050غ منها وحلها في 50مل (ماء HPLC) للحصول على تركيز 100 ميكروغرام/مل. (0.0050 / 50 = 0.0001غ هي كمية العينة في 1مل ماء)، بالتالي فالنتيجة التي أظهرها الجهاز والمقاسة بالميكروغرام أو ppm هي عبارة عن كمية

الأميغدالين الموجودة في 0.0001غ من العينة بعد الاستخلاص. فحُسِبتْ الكمية في 1غ من العينة بعد الاستخلاص وحُوِلَتْ وحدة قياسها إلى الـ ملغ بدلاً من الميكروغرام وضُربت النتيجة بوزن العينة الناتج بعد الاستخلاص، وهكذا نتجت كمية الأميغدالين في 2غ بذور (لأن الكمية التي تم وزنها من البذور المطحونة للاستخلاص من كل عينة هي 2غ، وهذا الرقم تم حسابه بناءً على نسبة الرطوبة أيضاً)، ثم قُسمتْ النتيجة على 2 فنتجت كمية الأميغدالين مقاسة بالملغ في 1غ من البذور.

- بالنسبة للبذور في الطور اللبني:

بعد استخلاص العينة حُضرتْ للحقن وذلك بوزن 0.0982غ منها وحلها في 50مل (ماء HPLC) للحصول على تركيز 100 ميكروغرام/مل. (0.0982 / 50 = 0.001964غ هي كمية العينة في 1مل ماء) بالتالي فالنتيجة التي أظهرها الجهاز والمقاسة بالميكروغرام أو ppm هي عبارة عن كمية الأميغدالين الموجودة في 0.001964غ من العينة بعد الاستخلاص. فحُسِبتْ الكمية في 1غ من العينة بعد الاستخلاص وحُوِلَتْ وحدة قياسها إلى ملغ بدلاً من الميكروغرام وضُربتْ النتيجة بوزن العينة الناتج بعد الاستخلاص، وهكذا نتجت كمية الأميغدالين في 39.27غ من البذور، (لأن الكمية التي تم وزنها من البذور في الطور اللبني للاستخلاص هي 39.27غ، وهذا الرقم تم حسابه بناءً على نسبة الرطوبة أيضاً)، ثم قُسمتْ النتيجة على 39.27غ، فنتجت كمية الأميغدالين مقاسة بالملغ/غ من البذور.

- بالنسبة للبذور في الطور المائي:

بعد استخلاص العينة حُضرتْ للحقن وذلك بوزن 0.1104غ منها وحلها في 50مل (ماء HPLC) للحصول على تركيز 100 ميكروغرام/مل. (0.1104 / 50 = 0.002208غ هي كمية العينة في 1مل ماء) بالتالي فالنتيجة التي أظهرها الجهاز والمقاسة بالـ الميكروغرام أو ppm هي عبارة عن كمية الأميغدالين الموجودة في 0.002208غ من العينة بعد الاستخلاص. فحُسِبتْ الكمية في 1غ من العينة بعد الاستخلاص وحُوِلَتْ وحدة قياسها إلى ملغ بدلاً من الميكروغرام وضُربتْ النتيجة بوزن العينة الناتج بعد الاستخلاص، وهكذا نتجت كمية الأميغدالين في 44.14غ بذور (لأن الكمية التي تم وزنها من البذور في الطور اللبني للاستخلاص هي 44.14غ، وهذا الرقم تم حسابه بناءً على نسبة الرطوبة أيضاً)، ثم قُسمتْ النتيجة على 44.14غ فنتجت كمية الأميغدالين مقاسة بالملغ/غ من البذور.

2. 2. الدراسة الجزيئية:

2. 2. 1. عزل الـ DNA:

عُزِلَ الـ DNA من كل طراز وراثي من حوالي 0.2 غ من الأوراق الفتية، وفقاً لطريقة "CTAB" (Doyle وDoyle، 1987) مع تعديلات (Sonneveld وزملاؤه، 2001):

1. انتُقِيَتْ المادة النباتية السليمة والخالية من الإصابات الظاهرية من النباتات المدروسة وجُمدتْ وطُحنتْ مباشرة في الآزوت السائل.
2. وُضع حوالي 200 ملغ من المادة النباتية المجمدة والمطحونة في الآزوت السائل في أنبوب 2 مل.
3. أُضيف لكل عينة 750 µl من محلول الاستخلاص الحاوي على 100 Mm Tris، 1.4 M NaCl، 20 Mm EDTA، 2% CTAB و0.2% Mercaptoethanol والمسخن مسبقاً على درجة حرارة 60 مْ.
4. حُركت العينات جيداً، ووُضعت في الحمام المائي على درجة حرارة 65 مْ مع التحريك المستمر مدة 60 دقيقة.
5. أُضيف 750 µl من chloroform/isoamyl alchohol (1: 24) لكل عينة ثم حُركت جيداً.
6. ثُفِلَتْ العينات على سرعة 12000 rpm لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 مْ. نتيجة التثقيل انفصل المزيج إلى ثلاث طبقات: الطبقة العليا (الطور المائي) ويحوي الـ DNA، الطبقة الوسطى وتحوي البروتينات والطبقة السفلى وتحوي الكلوروفورم.
7. نُقِلَ الطور المائي بحذر إلى أنبوب 2 مل مدرج.
8. كُررت الخطوة 5 بإضافة حجم مماثل لحجم الطور المائي المنقول من chloroform/isoamyl alchohol، ثم تكرر الخطوات 6 و7.
9. أُضيف ما يعادل ثلثي حجم الطور المائي المنقول من Isopropanol المبرد مسبقاً ثم حُرِكَ بلطف بالتقليب حتى ترسب الـ DNA.
10. وُضعت الأنابيب في البراد (لمدة ساعة على –20 مْ) أو (حتى اليوم التالي على 4 مْ).
11. تُركت العينات حتى تذوب في حرارة الغرفة ثم ثُفلتْ على سرعة 10000 rpm لمدة 5 دقائق على درجة حرارة 4 مْ.
12. تم التخلص من السائل، ثم أُضيف 1 مل من الـ Ethanol (70%) المبرد مسبقاً. وحُرِكَ بلطف بالتقليب عدة مرات.
13. ثُفِلَ على سرعة 10000 rpm لمدة 5 دقائق على درجة حرارة 4 م.
14. كُررت الخطوات 12 و13.
15. تم التخلص من الإيثانول وجُفِفَتْ العينات في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة.
16. أُذيبَ الـ DNA في 100 µl من الماء المقطر المعقم أو محلول TE.
17. قِيسَ تركيز الـ DNA الناتج على طول موجة (260 nm و280 nm). حيث كل وحدة امتصاص على طول موجة 260 nm تعادل 50 µg/ml. وقِيستْ نقاوة الـ DNA من خلال

حساب نسبة الامتصاص عند طول الموجة 260 nm وقسمتها على نسبة الامتصاص عند طول الموجة 280 nm، فكانت قريبة من 1.8.

18. تم التأكد من جودة الاستخلاص من خلال الرحلان الكهربائي على جيل أغاروز 1% ضمن محلول TBE (1X) (Tris, Boric acid, EDTA).

19. خُزنت المستخلصات على درجة حرارة −20 مْ حتى الاستعمال.

2. 2. 2. الواسمات الجزيئية SSR المدروسة:

اِسْتُخْدِمَ 4 أزواج من الواسمات الجزيئية SSR هي: EPDCU2584، وBPPCT037، وUDA045، وCPDCT028 (Sánchez−Pérez وزملاؤه، 2007) (الجدول 3).

الجدول (3): واسمات الـ SSR المستخدمة في تضخيم DNA النباتات المدروسة

رمز الواسم الجزيئي	التسلسل النكليوتيدي (5َ−3َ)	حرارة الإلتحام مْ
UDA-045	FW: CCATCCCAGGCCTTAGTACA	57
	REV: GGAGGATGCTATTGGGGTC	55
EPDCU2584	FW: TTCAGCTCATCTAGTTTCAT	49
	REV: CACGGTTCGAACAACATCTG	55
CPDCT028	FW: TGAACGTTGCACTCCTTCAC	55
	REV: ACCACCACCATAACCACCA	53
BPPCT037	FW: CATGGAAGAGGATCAAGT	47
	REV: CTTGAAGGTAGTGCCAAAG	51
ملاحظة: استخدمت في هذا البحث درجة حرارة التحام 60 مْ لجميع البادئات، لأن PCR Master Mix الذي تم استخدامه يعمل على درجة حرارة 60 مْ لجميع البادئات.		

2. 2. 3. التفاعل التسلسلي البوليميرازي Polymerase Chain Reaction (PCR):

ضُخِمَ الحمض النووي DNA باستعمال واسمات الـ SSR المدروسة (الجدول 2) وذلك باستخدام تقنية PCR، كما هو موضح في دراسة Sánchez−Pérez وزملائه (2007)، في حجم نهائي قدره 25 ميكروليتر، حيث استخدم 50 نانوغرام من الحمض النووي DNA و12.5 ميكروليتر من PCR Master Mix (الذي تم الحصول عليه من شركة Sigma والحاوي على: Taq−Polymeras، dNTPs، MgCl2)، و20 بيكومول من البادئات، وذلك وفق البرنامج الحراري التالي:

- ✓ المرحلة الأولى (مرحلة الفصل الأولي): لمرة واحدة على درجة حرارة 95 مْ لمدة 3 دقائق.
- ✓ المرحلة الثانية: كُررت 45 مرة وتضم الخطوات التالية:

1. مرحلة الفصل: على درجة حرارة 95 مْ لمدة 10 – 15 ثانية.
2. مرحلة الالتحام: على درجة الحرارة 60 مْ لمدة 10 – 15 ثانية.

3. مرحلة الاستطالة: على درجة حرارة 72 مْ لمدة 1 – 15 ثانية.

✓ المرحلة الثالثة (مرحلة الاستطالة النهائية): وتمت لمرة واحدة على درجة حرارة 72 مْ لمدة 1 دقيقة.

بعد انتهاء هذا التفاعل حُفظت العينات في درجة حرارة −20 مْ.

2. 2. 4. فصل نواتج التضخيم باستخدام تقنية الرحلان الكهربائي:

فُصِلَتْ نواتج عمليات التضخيم باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي على هلامة من ميتافورأغاروز ذات تركيز 4% في محلول (1X) TBE (Tris, Boric acid, EDTA) وبوجود صبغة Red safe. وتم الرحلان بوجود مؤشر جزيئي 100 زوج من النكليوتيدات لمدة ساعة ونصف على 100 فولت، ثم أُخِذَتْ الصور للهلامة بوجود الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز Gel Documentation ماركة Cleaver (الشكل 12).

3. تصميم التجربة والتحليل الإحصائي:

نُفذتْ التجربة الكيميائية وفق تصميم التجارب العشوائية البسيطة باستخدام برنامج XLSTAT، وحُللتْ النتائج باستخدام تحليل التباين ANOVA باستعمال اختبار Fisher لحساب أقل فرق معنوي LSD بين المتوسطات عند درجة ثقة 99%. كما فُصِلتْ الطرز المدروسة إلى مجموعات باستخدام التحليل العنقودي باستعمال معامل المسافة الإقليدية وطريقة Ward.

أما بالنسبة للتجربة الجزيئية، فحُدِدَ طول حزم الـ DNA الناتجة عن التضخيم باستخدام برنامج TotalLab (Calif, Inc., Claremont, Ultra* Lum). وحُسبتْ النسبة المئوية لاحتمالية كون بذور الطرز المدروسة شديدة أو متوسطة المرارة باستخدام المعادلات التالية:

- النسبة المئوية لاحتمال أن بذور الطراز شديدة المرارة = عدد الواسمات الجزيئية متماثلة اللواقح / عدد الواسمات الجزيئية الكلية المرتبطة في الطراز × 100
- النسبة المئوية لاحتمال أن بذور الطراز متوسطة المرارة = عدد الواسمات الجزيئية متخالفة اللواقح / عدد الواسمات الجزيئية الكلية المرتبطة في الطراز × 100

ورُسِمتْ شجرة القرابة الوراثية باستخدام برنامج XLSTAT باستعمال معامل Jaccard وطريقة Unweighted pair-groub average.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

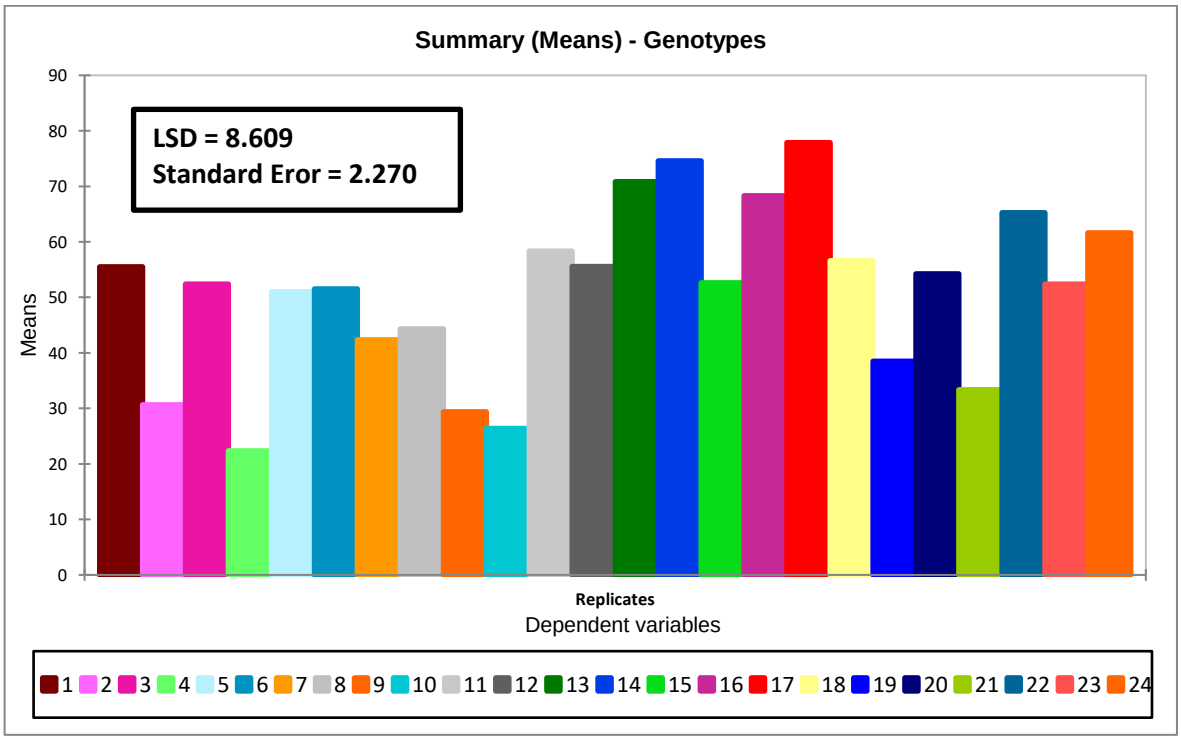
Results and Discussion

1. الدراسة الكيميائية

هناك أبحاث سابقة تصف تقدير كمية الأميغدالين في أنسجة النبات (Fermenia وزملاؤه، 1995؛ Gómez وزملاؤه، 1998؛ Haque وBradbury، 2002؛ Lee وزملاؤه، 2013؛ Yildirim وAskin، 2010)، ولكن لا توجد أبحاث عن تقدير كمية الأميغدالين في طرز وأنواع اللوز البري السورية بالتحديد، لذلك تمت هذه الدراسة لتحديد نوعية اللوز البري من خلال محتوى الأميغدالين وبالتالي تحديد الطراز أو النوع البري الذي يحتوي على أعلى نسبة من الأميغدالين.

1. 1. محتوى الأميغدالين في بذور أنواع اللوز البري:

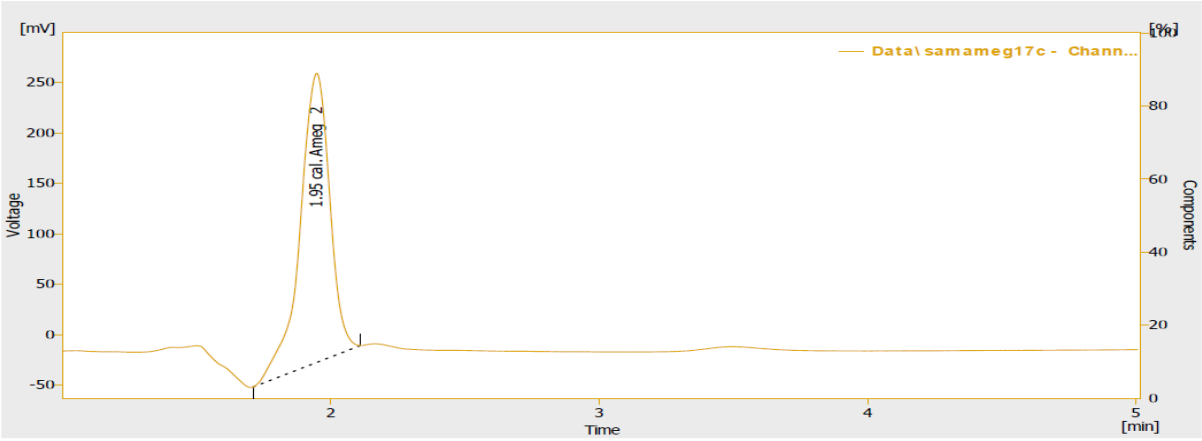
بينت نتائج التحليل الإحصائي عند درجة ثقة 1% والشكل (5) والجدول (4)، أن محتوى الأميغدالين أَظهر اختلافاً كبيراً بين طرز وأنواع اللوز البري، حيث تراوح تركيز الأميغدالين في الطرز المدروسة ما بين 22.360 و77.860 ملغ/غ، حيث بينت نتائج التحليل الإحصائي أن الطراز 17 يحتوي على أعلى نسبة من الأميغدالين بالمقارنة مع الطرز المدروسة (77.860 ملغ/غ)، وقد تفوق معنوياً على جميع الطرز المدروسة الأخرى، ما عدا الطرازين 14 و13 فلا يظهر معهما أي فروقات معنوية (الشكل 6). بينما أحتوى الطراز 4 على أقل نسبة من الأميغدالين بالمقارنة مع الطرز المدروسة (22.360 ملغ/غ بذور)، ولا يوجد فرق معنوي بينه وبين الطرز 2، 9 و10 وتوجد فروق معنوية بينه وبين جميع الطرز الأخرى، حيث إن جميع الطرز الأخرى تتفوق عليه معنوياً (الشكل 7).



الشكل (5): متوسط كمية الأميغدالين في الطرز المدروسة

الجدول (4): متوسط كمية الأميغدالين في مرحلة النضج الكامل للطرز المدروسة

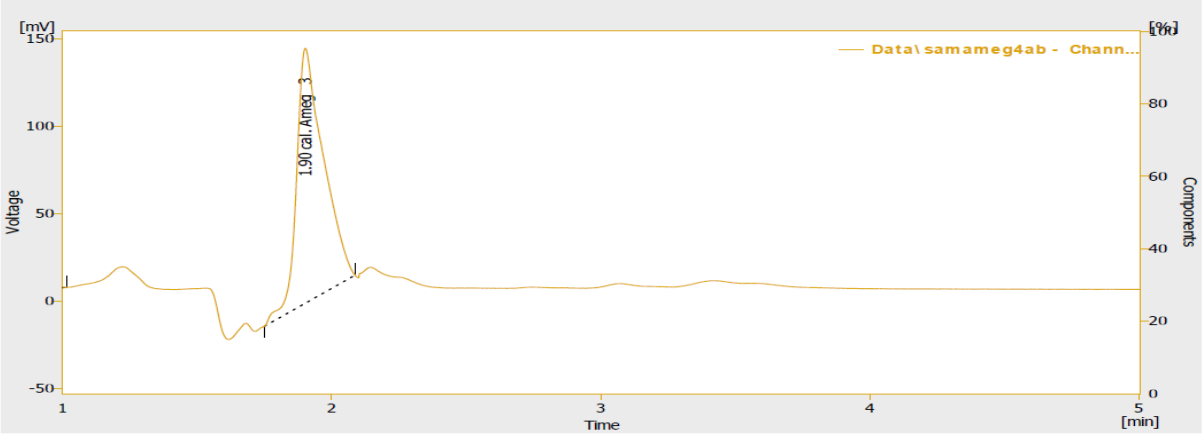
النوع	موقع الجمع	رقم العينة (الطراز الوراثي)	كمية الأميغدالين في الطراز (ملغ/غ)
اللوز العربي	السويداء – الكوم	1	55.510 fg
		2	30.680 jkl
		3	52.413 gh
		4	22.360 l
		5	51.000 gh
	السويداء – سهوة بلاطة	6	51.553 gh
اللوز الكورشنسكي	السويداء – الكفر	7	42.383 i
		8	44.317 hi
		9	29.370 kl
		10	26.387 kl
		11	58.320 efg
	السويداء – ظهر الجبل	12	55.550 fg
	حمص – آبل	13	70.823 abc
		14	74.620 ab
		15	52.637 gh
		16	68.320 bcd
		17	77.860 a
		18	56.623 fg
اللوز الشرقي	حمص – حسياء	19	38.473 ij
		20	54.220 fg
		21	33.360 jk
		22	65.253 cde
		23	52.407 gh
		24	61.637 def
$LSD_{0.01}$		8.609	
Standard Eror		2.270	



Summary Table

		Data\samameg 17c
		Channel 1
Sample ID		samameg17c
Sample		samameg17c
Sample Amount		1.000
cal. Ameg	Reten. Time [min]	1.947
	Response	2200.154
	Amount [PPM]	55.381
	Amount% [%]	5538.1
	Peak Type	Ordnr
	Compound Name	cal. Ameg

الشكل (6): الكروماتوغرافي الخاص بالطراز رقم 17 (حمص – آبل)

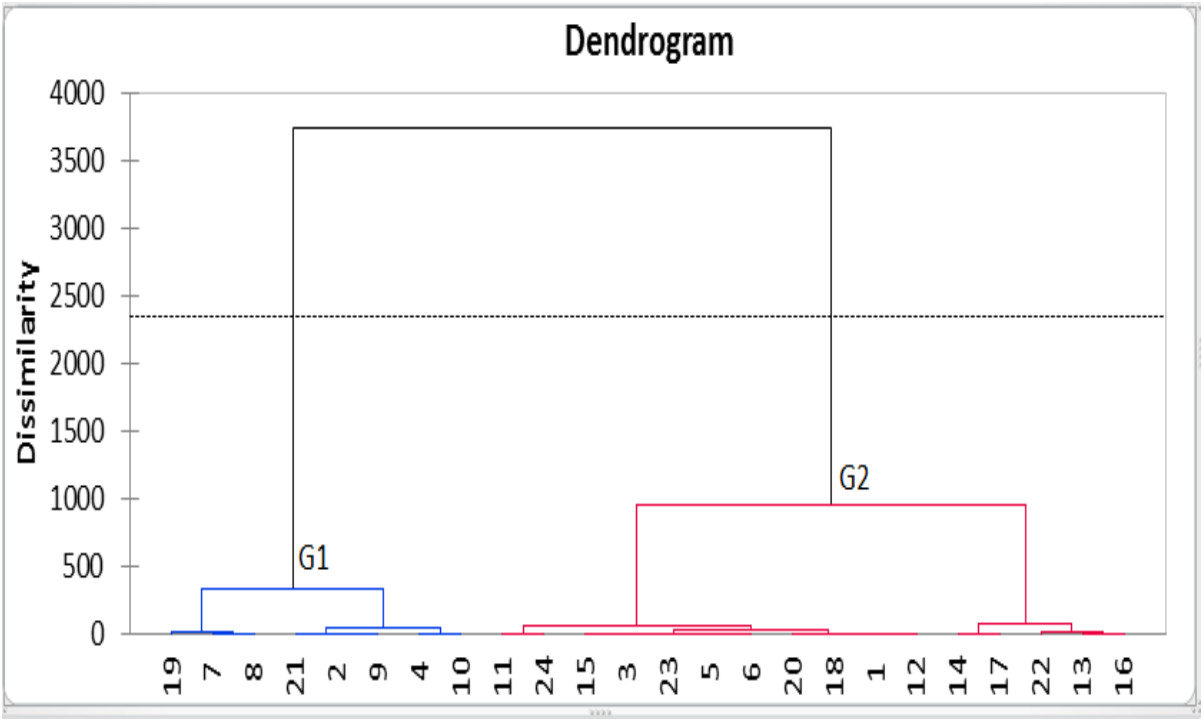


Summary Table

		Data\samameg 4ab
		Channel 1
Sample ID		samameg4ab
Sample		samameg4ab
Sample Amount		1.000
cal. Ameg	Reten. Time [min]	1.903
	Response	1012.668
	Amount [PPM]	25.490
	Amount% [%]	2549.0
	Peak Type	Ordnr
	Compound Name	cal. Ameg

الشكل (7): الكروماتوغرافي الخاص بالطراز رقم 4 (السويداء – الكوم)

وعند إجراء تحليل عنقودي للطرز بناءً على محتواها من الأميغدالين، انقسمت الطرز إلى مجموعتين (الشكل 8): المجموعة الأولى (G1) ذات محتوى الأميغدالين الأقل، أي متوسطة المرارة، وضمت الطرز 2، 4، 7، 8، 9، 10، 19 و21، بينما ضمت المجموعة الثانية (G2) الطرز 1، 3، 5، 6، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 20، 22، 23 و24 وهي ذات محتوى الأميغدالين المرتفع، أي شديدة المرارة.



الشكل (8): التحليل العنقودي للطرز المدروسة

عند مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها مع نتائج الدراسات الأخرى لوحظ أن أقل نسبة أميغدالين ظهرت في بذور أنواع اللوز البري السورية المدروسة كانت أعلى من نسبة الأميغدالين في بذور جميع نباتات الفصيلة الوردية عدا بذور المشمش المر وكرز موريللو واللوز المر. حيث أفاد Bolarinwa وزملاؤه (2014) بأن، الجارنك يحتوي على أعلى نسبة من الأميغدالين (17.5 ملغ/غ) يليه المشمش الحلو (14.4 ملغ/غ)، والخوخ الأسود (10 ملغ/غ)، والخوخ (6.8 ملغ/غ)، والكرز الأحمر (3.9 ملغ/غ) والكرز الأسود (2.7 ملغ/غ). كانت محتويات الأميغدالين من الخوخ الأرجواني والأحمر 2.16 و1.54 ملغ/غ، على التوالي. وكان لدى النكتارين أدنى محتوى من الأميغدالين (0.1 ملغ/غ) بين بذور الفاكهة الحجرية التي تم تحليلها.

أفادت دراسة سابقة لتكوين السيانيد في الفاكهة الحجرية، أن محتوى الأميغدالين في بذور الخوخ هو 2.6 ملغ/غ، على الرغم من أن هذه القيمة تشابه القيمة المذكورة للخوخ الأرجواني، وهي أقل من القيم

مقابل الخوخ الأخضر والأسود والأصفر والأحمر. وكان الخوخ المستخدم في هذه الدراسة من صنف غير معروف واستندت طريقة القياس الكمي على تقدير HCN، الذي لا يعطي عادةً قياساً دقيقاً للأميغدالين نتيجة للتحلل المائي الأنزيمي السريع الذي يصعب التحكم فيه، وأثبتت هذه الدراسة أيضاً وجود الأميغدالين بتراكيز (0.9، 10.2، 4.9 و11.1) ملغ/غ، لأصناف Sunhaven وSunflower وStarking Delicious وRedhaven على التوالي، (Volduich وKyzlink، 1992).

كما ذكر أن محتوى الأميغدالين 14.7 و12 ملغ/غ في الخوخ من قبل Sayre وKaymakcalan (1964)؛ Haque وBradbury (2002). وفي المقابل، لاحظ Holzbecher وزملاؤه (1984)؛ وجود نسبة عالية جداً (43.3 ملغ/غ)، وGhiulai وزملاؤه (2006)، لاحظوا انخفاض قيمة الأميغدالين (0.02 ملغ/غ) للخوخ. يمكن أن تكون الاختلافات في محتوى الأميغدالين في الخوخ ناتجة عن اختلافات في العوامل المختلفة التي تم تحليلها أو العوامل البيئية في أثناء تكوين الفاكهة وزراعتها.

وفي دراسة عن محتوى كرز موريللو من قبل Volduich وKyzlink (1992)، وجد أنه يحتوي 65 ملغ/غ من الأميغدالين، وهذه القيمة أعلى من القيمة الملحوظة في الكرز الأحمر والأسود من قبل Bolarinwa وزملاؤه، (2014). ذُكر أن محتويات الأميغدالين في اللوز الحلو والمر، كانت تتراوح من 0–11.6 و0.3–68.5 ملغ/غ، على التوالي، اعتماداً على الصنف (Berenguer–Navarro وزملاؤه، 2002؛ Dicenta وزملاؤه، 2002؛ Yildirim وAskin، 2010).

في الخلاصة تم تحديد محتوى الأميغدالين في بذور عدة طرز من بعض أنوع اللوز البري المنتشرة في سورية، وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن بذور طرز نوع اللوز الكورشنسكي المأخوذة من محافظة حمص تحتوي أعلى نسبة من الأميغدالين، بالتالي فإن نسبة الأميغدالين في البذور تتأثر بالمنطقة والظروف البيئية وبالتحديد الارتفاع عن سطح البحر، حيث لوحظ أن ازدياد تركيز الأميغدالين يتناسب عكساً مع الارتفاع عن سطح البحر.

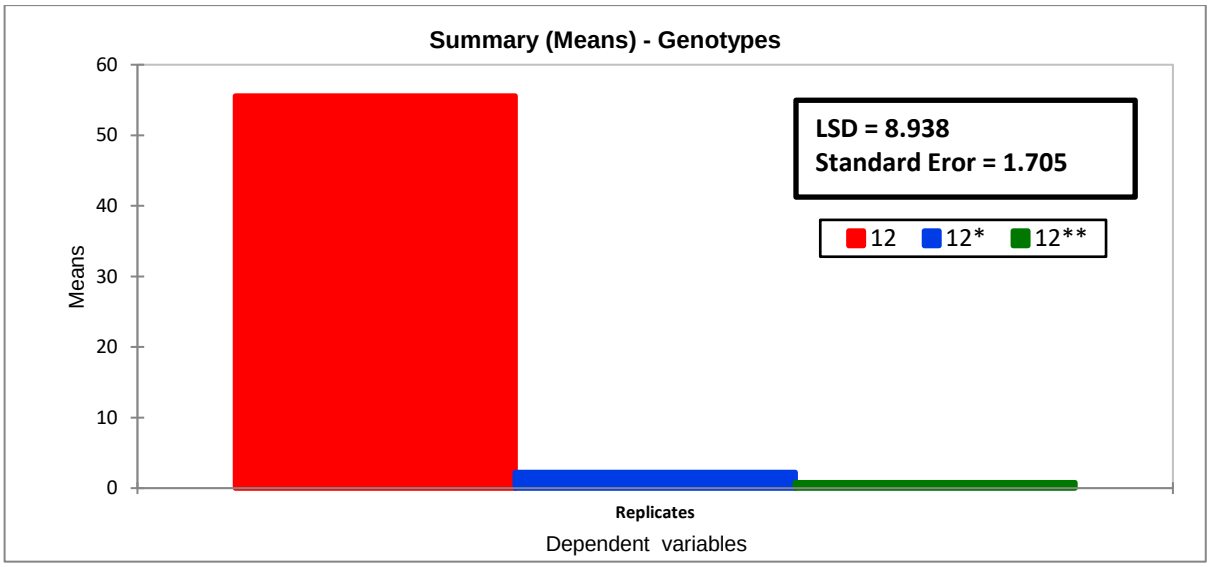
1. 2. مقارنة المراحل الفينولوجية للبذور في الطراز 12 من حيث نسبة الأميغدالين:

لوحظ من الجدول (5) والشكل (9)، أن الطراز رقم 12 في مرحلة النضج الكامل للبذرة متفوق معنوياً على نفسه في مرحلتي النضج اللبني والمائي للبذرة. بينما لا يوجد أي فروق معنوية بين نسبة الأميغدالين في بذور هذا الطراز في مرحلتي النضج اللبني والمائي للبذرة (الشكل 10) و(الشكل 11). ولوحظ من النتيجة أن نسبة الأميغدالين في البذور تزداد تدريجياً مع زيادة نضجها حتى يتركز الأميغدالين بشكل كبير جداً في البذور في مرحلة النضج الكامل.

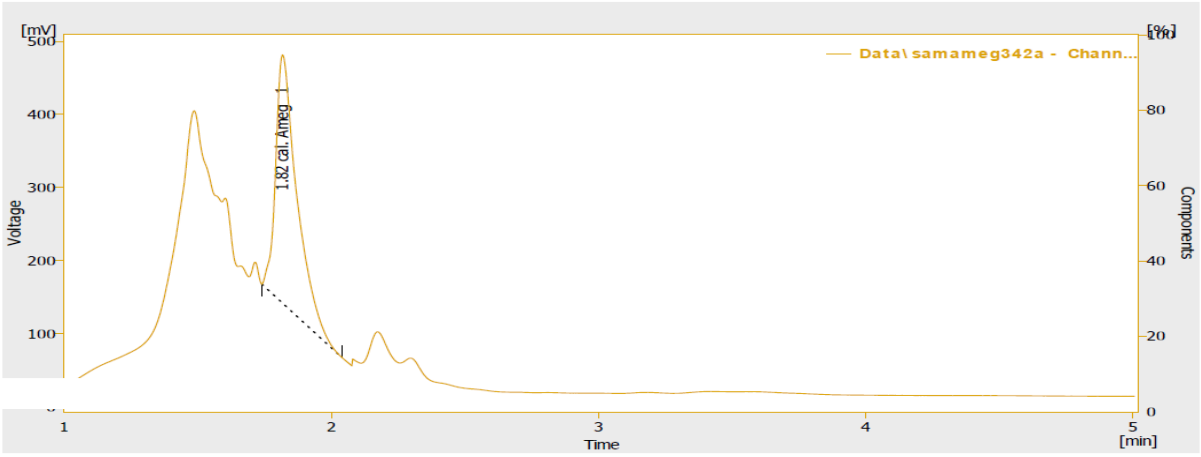
هذه النتيجة تتوافق مع Zhao (2010)، الذي حدد محتوى الأميغدالين لأربعة أنواع من أشجار الفاكهة ذات البذور الحجرية (المشمش، والخوخ، والجارنك والمشمش المر) خلال مراحل مختلفة، ووجد أن مستوى الأميغدالين في البذور يزداد باستمرار ووصل إلى أعلى قيمة في المرحلة الأخيرة. ولكن لا تتوافق مع دراسة Wu وزملاؤه (2017)، عن محتوى الأميغدالين في بذور الأكدنيا خلال مراحل النمو المختلفة، حيث أظهرت نتائجهم أن المحتوى زاد تدريجياً في المرحلة المبكرة، ووصل إلى أعلى قيمة في المرحلة ما قبل الأخيرة، ثم انخفض بشكل حاد، وحافظ على ثباته حتى نضج الثمار، وسبب عدم التوافق أنه ربما تختلف محتويات الأميغدالين أثناء نمو الفاكهة في أنواع الفاكهة المختلفة.

الجدول (5): الفروق المعنوية بين المراحل الفينولوجية المدروسة

رقم العينة (الطراز الوراثي)	كمية الأميغدالين في الطراز (ملغ/غ)
12	55.550 [a]
12*	2.240 [b]
12**	0.800 [b]
$LSD_{0.01}$	8.938
Standard Eror	1.705
12 طور النضج الكامل للبذرة، 12* الطور اللبني للبذرة، 12** الطور المائي للبذرة	



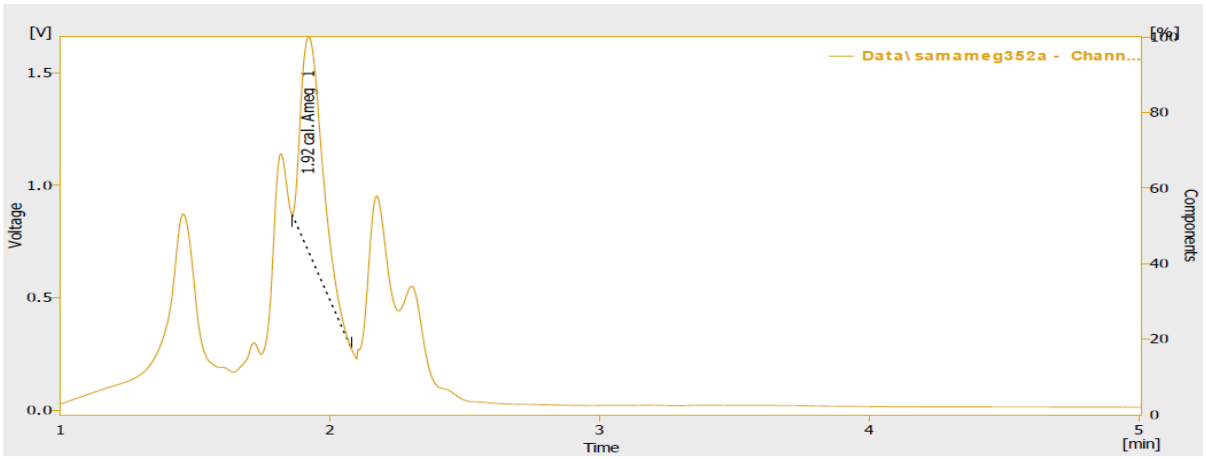
الشكل (9): نسبة الأميغدالين في المراحل الفينولوجية المختلفة (12 طور النضج الكامل للبذرة، 12* الطور اللبني للبذرة، 12 الطور المائي للبذرة)**



Summary Table

		Data\samameg 342a
		Channel 1
Sample ID		samameg 342a
Sample		samameg 342a
Sample Amount		1.000
cal. Ameg	Reten. Time [min]	1.817
	Response	1889.051
	Amount [PPM]	47.550
	Amount% [%]	4755.0
	Peak Type	Ordnr
	Compound Name	cal. Ameg

الشكل (10): الكروماتوغرافي الخاص بالطراز **12 في الطور المائي للبذرة



Summary Table

		Data\samameg 352a
		Channel 1
Sample ID		samameg 352a
Sample		samameg 352a
Sample Amount		1.000
cal. Ameg	Reten. Time [min]	1.920
	Response	5395.681
	Amount [PPM]	135.817
	Amount% [%]	13581.7
	Peak Type	Ordnr
	Compound Name	cal. Ameg

الشكل (11): الكروماتوغرافي الخاص بالطراز *12 في الطور اللبني للبذرة

2. الدراسة الجزيئية:

وجد Sánchez–Pérez وزملائه (2007)، 15 واسم SSR، تحيط بالموقع *Sk* على خريطة LG5 من D × R، بما في ذلك ثمانية (BPPCT026، UDP97–401، BPPCT017، PceGA025، EPDCU4658، EPDCU5183، BPPCT038 وBPPCT014)، وسبعة (EPDCU9830، UDA–045، EPDCU2584، BPPCT037، CPDCT016، CPDCT028 وEPDCU0004) تم تعيينها في دراسة من قبل Sánchez–Pérez وزملائه (2010)، لدراسة مرارة البذور في اللوز، وتحديد القرائن الملائمة للوقت المناسب لانتخاب فعال للطرز الوراثية المرة.

في هذه الرسالة تم استخدام 4 من هذه الواسمات الأقرب لموقع المرارة *sk* حسب الدراسة التي أجراها Sánchez–Pérez وزملائه (2010). وذلك للتأكد من تواجدها وموقعها على بعض أنواع اللوز البري المنتشرة في سورية.

إن درجة مرارة البذور تختلف من نوع لآخر وتختلف أيضاً من طراز وراثي لآخر ضمن النوع الواحد. وبما أن جميع الأنواع المدروسة هي برية وذات طعم مر. فإذا كانت نواتج تضخيم الطراز الوراثي مع الواسم الجزيئي متماثلة اللواقح تكون بذور الطراز شديدة المرارة، وإذا كانت نواتج التضخيم متخالفة اللواقح تكون بذور الطراز متوسطة المرارة.

2. 1. الواسم الجزيئي EPDCU2584:

يبين الجدول (6) أن الطراز الوراثي 2 لم يعطِ نواتج تضخيم مع هذا الواسم، لذلك فإن هذا الواسم غير مناسب لانتخاب صفة مرارة البذور في هذا الطراز، بينما أعطت جميع الطرز المدروسة الأخرى نواتج تضخيم. كانت نواتج تضخيم الطرز 1، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 22، 23، 24 متماثلة اللواقح، حيث أعطت الطرز 22، 23، 24 حزمتين بطول (130) bp، بينما أعطت الطرز 1، 3، 4، 5، 7، 8، 9، 10، 11، 12 حزمتين بطول (135) bp، وأعطت الطرز 6، 13، 14، 15، 16، 17، 18 حزمتين بطول (140) bp، هذا يعني أن بذور هذه الطرز شديدة المرارة وفقاً لهذا الواسم. وكانت نواتج تضخيم الطرز 19، 20 و21 متخالفة اللواقح، حيث أعطت حزمتين بطول (140 و165) bp، لذلك فإن بذور هذه الطرز متوسطة المرارة وفقاً لهذا الواسم.

الجدول (6): أطوال الحزم الناتجة عن الواسم الجزيئي EPDCU2584

النوع	الطراز الوراثي	طول الحزم bp
اللوز العربي	1	135، 135
	2	-
	3	135، 135
	4	135، 135
	5	135، 135
	6	140، 140
اللوز الكورشنسكي	7	135، 135
	8	135، 135
	9	135، 135
	10	135، 135
	11	135، 135
	12	135، 135
	13	140، 140
	14	140، 140
	15	140، 140
	16	140، 140
	17	140، 140
	18	140، 140
اللوز الشرقي	19	140، 165
	20	140، 165
	21	140، 165
	22	130، 130
	23	130، 130
	24	130، 130

2. 2. الواسم الجزيئي BPPCT037:

يبين الجدول (7) أن الطرز الوراثية 1، 2، 3، 4، 5، 6، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 22، 23 لم تعطِ نواتج تضخيم مع هذا الواسم، لذلك فإن هذا الواسم غير مناسب لانتخاب صفة مرارة البذور في هذه الطرز، بينما أعطت الطرز 7، 8، 9، 10، 11، 19، 20، 21، 24 نواتج تضخيم. كانت نواتج تضخيم الطرز 7، 8، 9، 10 متخالفة اللواقح، حيث أعطى الطراز 7 حزمتين بطول (140 و165) bp، بينما أعطت الطرز 8، 9، 10 حزمتين بطول (145 و160) bp، هذا يعني أن بذور هذه الطرز متوسطة المرارة وفقاً لهذا الواسم. وكانت نواتج تضخيم الطرز 11، 19، 20، 21، 24 متماثلة اللواقح، حيث أعطت الطرز 11، 19، 20، 21 و24 حزمتين بطول (145) bp، بالتالي فإن بذور هذه الطرز شديدة المرارة وفقاً لهذا الواسم.

الجدول (7): أطوال الحزم الناتجة عن الواسم الجزيئي BPPCT037

النوع	الطراز الوراثي	طول الحزم bp
اللوز العربي	1	-
	2	-
	3	-
	4	-
	5	-
	6	-
اللوز الكورشنسكي	7	140، 165
	8	145، 160
	9	145، 160
	10	145، 160
	11	145، 145
	12	-
	13	-
	14	-
	15	-
	16	-
	17	-
	18	-
اللوز الشرقي	19	145، 145
	20	145، 145
	21	145، 145
	22	-
	23	-
	24	145، 145

2. 3. الواسم الجزيئي UDA-045:

لُوحظَ من الجدول (8) أن جميع الطرز الوراثية أعطت نواتج تضخيم مع هذا الواسم. كانت نواتج تضخيم الطرز 1، 2، 3، 5، 6، 9، 10، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 19، 20، 22، 23، 24 متماثلة اللواقح، حيث أعطت الطرز 1، 2، 3، 5، 6، 13، 14، 15، 16، 17 و18 حزمتين بطول (70) bp، بينما أعطت الطرز 9، 10، 11، 12 حزمتين بطول (65) bp، كما أعطت الطرز 19، 20، 22، 23، 24 حزمتين بطول (60) bp، هذا يعني أن بذور هذه الطرز شديدة المرارة وفقاً لهذا الواسم. وكانت نواتج تضخيم الطرز 4، 7، 8، 21 متخالفة اللواقح، حيث أعطى الطراز 4 حزمتين بطول (70 و95) bp، بينما أعطى الطرازين 7 و8 حزمتين بطول (65 و165) bp، وأعطى الطراز 21 حزمتين بطول (60 و150) bp، لذلك فإن بذور هذه الطرز متوسطة المرارة وفقاً لهذا الواسم.

الجدول (8): أطوال الحزم الناتجة عن الواسم الجزيئي UDA-045

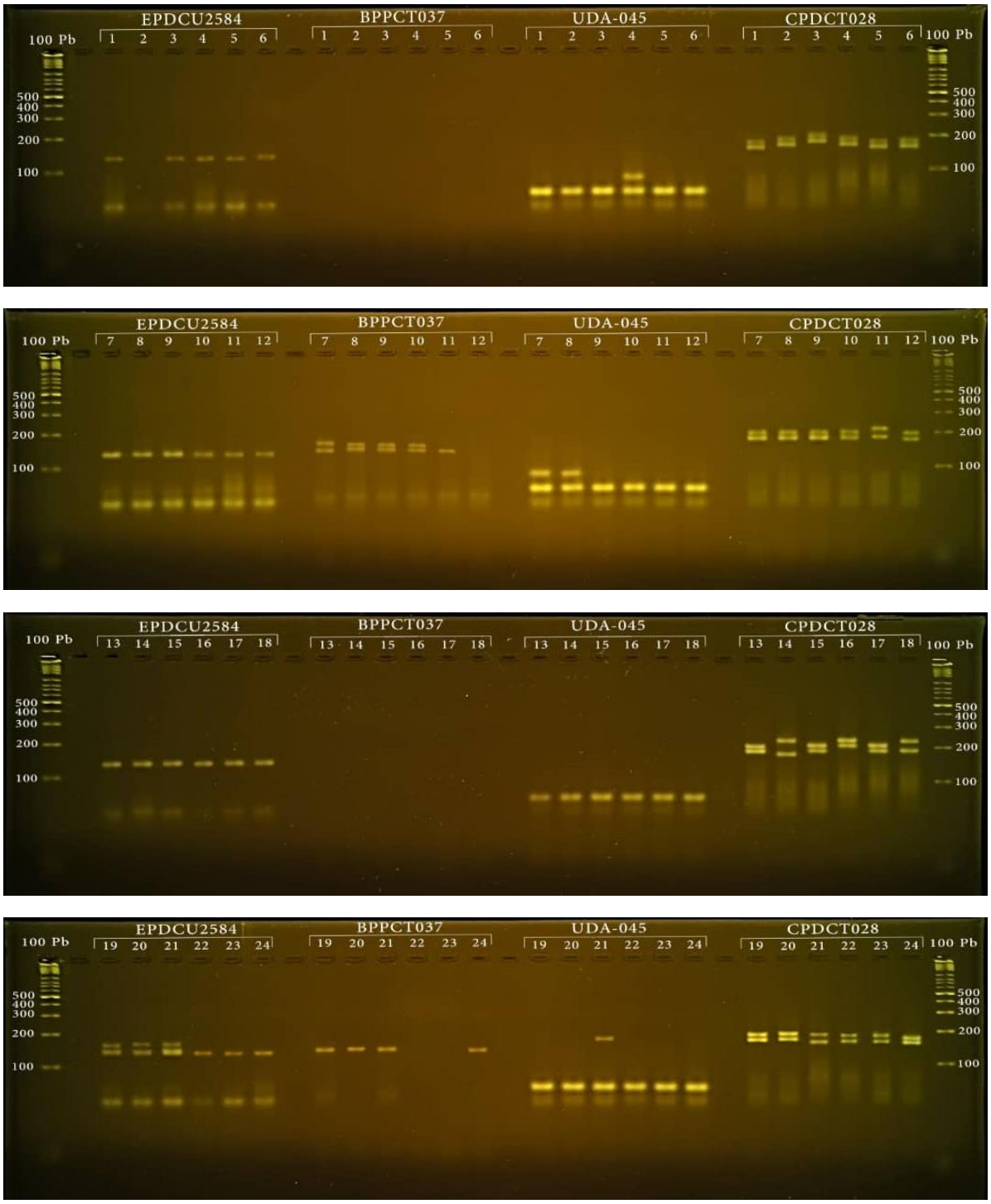
النوع	الطراز الوراثي	طول الحزم bp
اللوز العربي	1	70، 70
	2	70، 70
	3	70، 70
	4	70، 95
	5	70، 70
	6	70، 70
اللوز الكورشنسكي	7	65، 165
	8	65، 165
	9	65، 65
	10	65، 65
	11	65، 65
	12	65، 65
	13	70، 70
	14	70، 70
	15	70، 70
	16	70، 70
	17	70، 70
	18	70، 70
اللوز الشرقي	19	60، 60
	20	60، 60
	21	60، 150
	22	60، 60
	23	60، 60
	24	60، 60

2. 4. الواسم الجزيئي CPDCT028:

لُوحظَ من الجدول (9) أن جميع الطرز الوراثية أعطت نواتج تضخيم مع هذا الواسم، وكانت نواتج تضخيمها متخالفة اللواقح. حيث أعطت الطرز 1، 2، 3، 4، 5، 11، 12، 13، 14، 16، 18، 21، 24 حزمتين بطول (170 و180)، (175 و190)، (190 و210)، (170 و195)، (165 و180)، (190 و220)، (180 و205)، (185 و195)، (175 و225)، (210 و225)، (190 و230)، (165 و190)، (165 و175) bp، على التوالي، بينما أعطت الطرز 7، 8، 9 و10 حزمتين بطول (180 و210) bp، وأعطى الطرازان 15 و17 حزمتين بطول (190 و200) bp، كما أعطى الطرازان 19 و20 حزمتين بطول (175 و195) bp، وأعطت الطرز 6، 22، 23 حزمتين بطول (170 و190) bp. بالتالي فإن بذور هذه الطرز متوسطة المرارة وفقاً لهذا الواسم (الجدول 9).

الجدول (9): أطوال الحزم الناتجة عن الواسم الجزيئي CPDCT028

النوع	الطراز الوراثي	طول الحزم bp
اللوز العربي	1	170، 180
	2	175، 190
	3	190، 210
	4	170، 195
	5	165، 180
	6	170، 190
اللوز الكورشنسكي	7	180، 210
	8	180، 210
	9	180، 210
	10	180، 210
	11	190، 220
	12	180، 205
	13	185، 195
	14	175، 225
	15	190، 200
	16	210، 225
	17	190، 200
	18	190، 230
اللوز الشرقي	19	175، 195
	20	175، 195
	21	165، 190
	22	170، 190
	23	170، 190
	24	165، 175

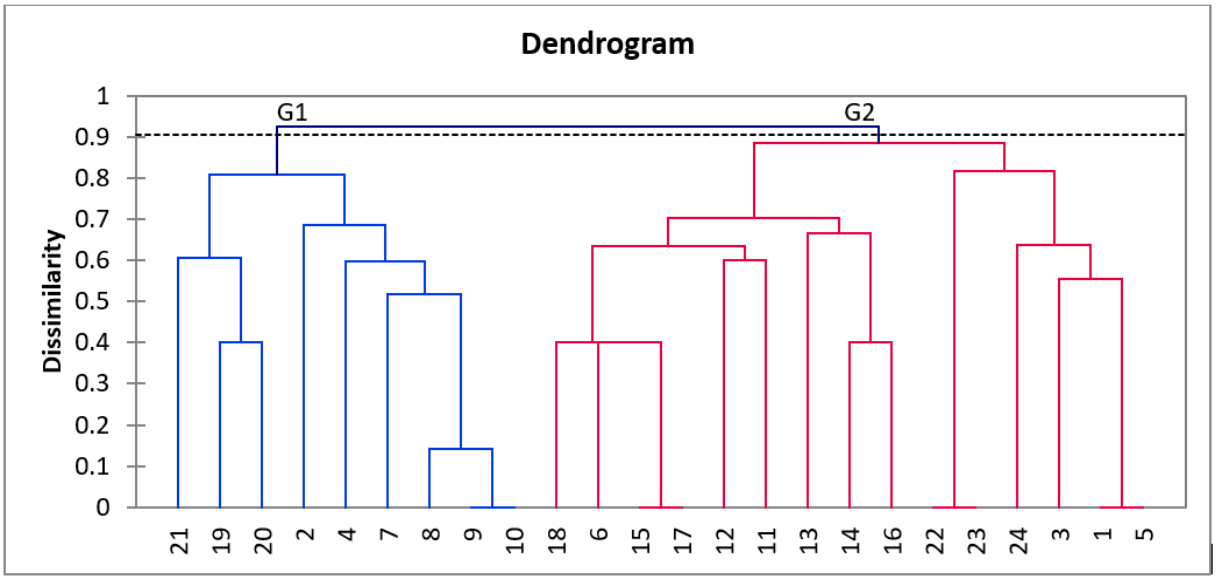


الشكل (12): هلامات ميتافورأغاروز 4% بعد الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR. توضح نواتج تضخيم الطرز الوراثية المدروسة مع الواسمات الجزيئية المختلفة.

نتيجة لذلك لوحظ أن الطرز الوراثية المدروسة انقسمت بحسب نتائج الواسمات الجزيئية إلى طرز متماثلة اللواقح للقرين المتنحي (*sk*/*sk*) وهي ذات بذور شديدة المرارة، وطرز متخالفة اللواقح (*SK*/*sk*) وهي ذات بذور متوسطة المرارة. فالنسبة المئوية لاحتمالية كون بذور هذه الطرز شديدة أو متوسطة المرارة هي كالتالي (الجدول 10):

- بذور الطرز 1، 3، 5، 6، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 22 و23، ستكون شديدة المرارة بنسبة 66.6% أو متوسطة المرارة بنسبة 33.3%.
- بذور الطرز 2، 9، 10، 19 و20، ستكون شديدة المرارة بنسبة 50% أو متوسطة المرارة بنسبة 50%.
- بذور الطراز 4، ستكون شديدة المرارة بنسبة 33.3% أو متوسطة المرارة بنسبة 66.6%.
- بذور الطرز 7، 8 و21، ستكون شديدة المرارة بنسبة 25% أو متوسطة المرارة بنسبة 75%.
- بذور الطرازين 11 و24، ستكون شديدة المرارة بنسبة 75% أو متوسطة المرارة بنسبة 25%.

وتم رسم شجرة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة بالإعتماد على نواتج تضخيمها مع الواسمات الجزيئية المدروسة والمتخصصة بموقع المرارة في اللوز البري، فلوحظ أن الطرز انفصلت إلى مجموعتين بناءً على ذلك، (الشكل 13): المجموعة الأولى (G1) وضمت الطرز التي كان احتمال مرارة بذورها متوسطاً بنسبة عالية، وهي 2، 4، 7، 8، 9، 10، 19، 20 و21. بينما ضمت المجموعة الثانية (G2) الطرز 1، 3، 5، 6، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 22، 23 و24 وهي التي كان احتمال مرارة بذورها شديداً بنسبة عالية. وبالتالي هذا الانفصال الوراثي للطرز بالاعتماد على هذه الواسمات يثبت صحة النتائج الجزيئية وفعالية الواسمات المدروسة في انتخاب صفة المرارة في بذور اللوز البري.



الشكل (13): شجرة القرابة الوراثية بناءاً على الواسمات الجزيئية المدروسة

الجدول (10): طبيعة ارتباط الواسمات الجزيئية الأربعة مع كل طراز وراثي من الأنواع المدروسة.

النوع	الطراز الوراثي	الواسمات الجزيئية وارتباطها												شديد المرارة %	متوسط المرارة %
		EPDCU2584			BPPCT037			UDA-045			CPDCT028				
		متماثل اللواقح	متخالف اللواقح	غير مناسب للانتخاب	متماثل اللواقح	متخالف اللواقح	غير مناسب للانتخاب	متماثل اللواقح	متخالف اللواقح	غير مناسب للانتخاب	متماثل اللواقح	متخالف اللواقح	غير مناسب للانتخاب		
اللوز العربي	1	×					×	×				×		%66.6	%33.3
	2			×			×	×				×		%50	%50
	3	×					×	×				×		%66.6	%33.3
	4	×					×		×			×		%33.3	%66.6
	5	×					×	×				×		%66.6	%33.3
	6	×					×	×				×		%66.6	%33.3
اللوز الكورشنسكي	7	×				×			×			×		%25	%75
	8	×				×			×			×		%25	%75
	9	×				×			×			×		%50	%50
	10	×				×			×			×		%50	%50
	11	×			×				×			×		%75	%25
	12	×					×		×			×		%66.6	%33.3

	13	×					×	×					%66.6	%33.3
	14	×					×	×					%66.6	%33.3
	15	×					×	×					%66.6	%33.3
	16	×					×	×					%66.6	%33.3
	17	×					×	×					%66.6	%33.3
	18	×					×	×					%66.6	%33.3
اللوز الشرقي	19	×					×			×		×	%50	%50
	20	×					×			×		×	%50	%50
	21	×			×					×		×	%25	%75
	22	×					×	×					%66.6	%33.3
	23	×					×	×					%66.6	%33.3
	24	×					×			×			%75	%25

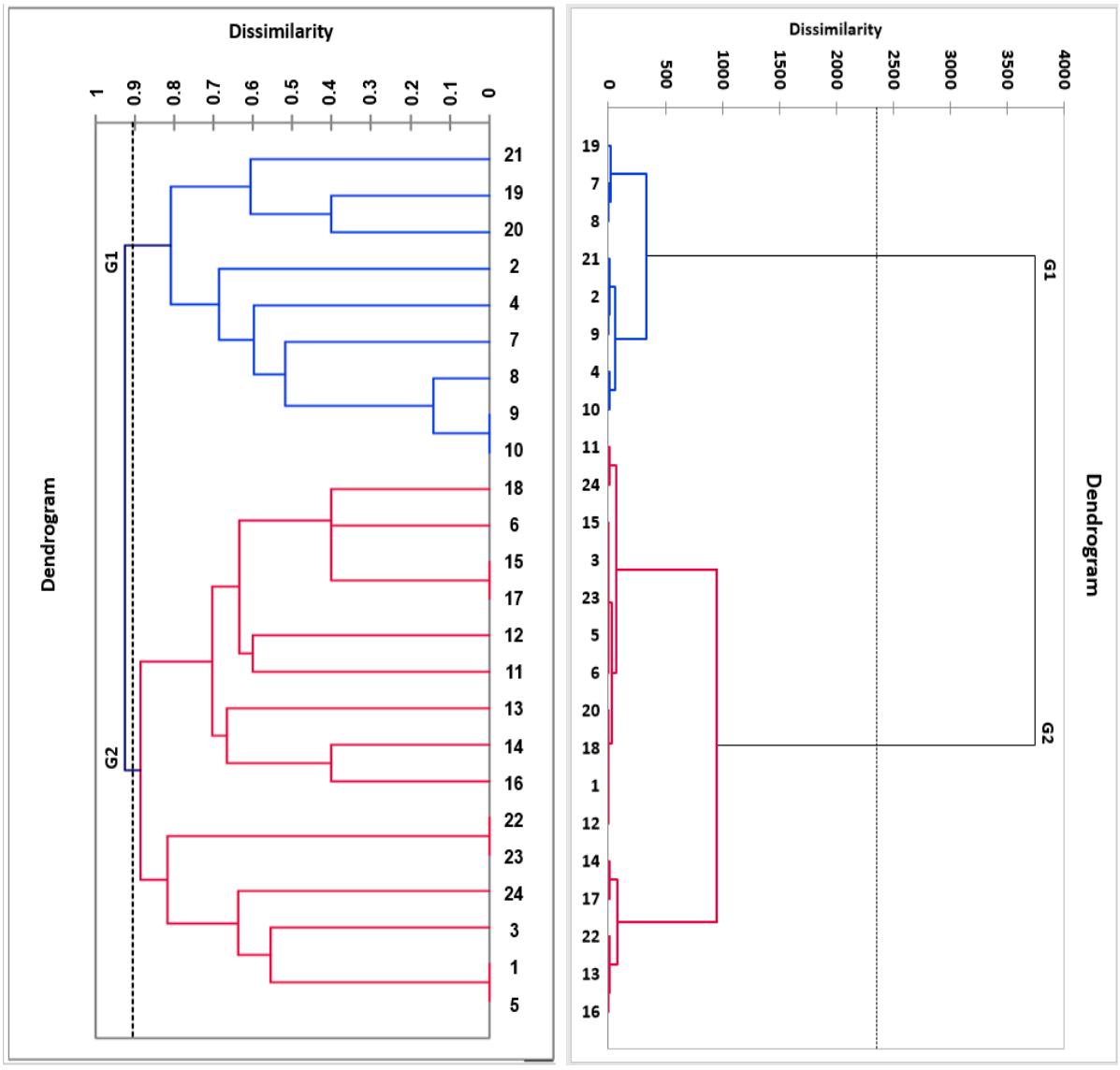
أظهر Sánchez-Pérez وزملاؤه (2010)، أن 6 واسمات SSR (UDA-045 وEPDCU2584 وBPPCT037 وCPDCT016 وPceGA025 وCPDCT028) كانت قريبة من موقع *Sk*، في منطقة تمتد 6.2 cM حول موقع خريطة "R1000" (LG5R) و11.7 cM لخريطة "Desmayo Largueta" (LG5D). وفقط (EPDCU2584 وBPPCT037 وPceGA025) كانوا متخالفي اللواقح في كلا الوالدين، وكانت (UDA-045 وCDPCT016 وCPDCT028) متخالفة اللواقح في أحد الوالدين فقط. ولدى مقارنة نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي تم الحصول عليها، نجد أنها تتوافق معها، لكن الواسمات التي تم دراستها هنا (EPDCU2584، BPPCT037، UDA-045 وCPDCT028) كانت متخالفة اللواقح بالنسب التالية على التوالي (12.5%، 16.67%، 16.67% و100%). بالتالي يمكن اعتبار الواسم CPDCT028 هو الواسم الوحيد الذي كانت نواتج تضخيمه متخالفة اللواقح بشكل كامل في أنواع اللوز البري السورية، أما باقي الواسمات المدروسة فكانت متماثلة اللواقح بنسبة تفوق الـ 80%، وأيضاً كان هناك اختلاف بسيط في طول الحزم بالنسبة للواسمات (EPDCU2584، BPPCT037 وCPDCT028) بينما كان الاختلاف كبيراً بالنسبة للواسم UDA-045 بما يزيد عن 100 نكليوتيد.

وفي دراسة أخرى من قبل Ricciardi (2016) تم دراسة الواسمات المدروسة نفسها في هذه البحث والتحقق من وجودها ومكانها على خريطة LG5 في نوع اللوز البري الشائع (*Amygdalus communis* L.= *Prunus Dulcis* Mill)، فتم إثبات وجودها بالقرب من المورثة *SK*، ولكن طول الحزم التي تم الحصول عليها للواسمات BPPCT037 وEPDCU2584 يزيد بنحو 20 نكليوتيد عن طول الحزم التي ذكرها Sánchez-Pérez وزملاؤه (2010)، بالتالي فإن النتائج التي تم الحصول عليها أيضاً تتوافق مع هذه الدراسة، ولكنها تختلف عنها أيضاً اختلافاً بسيطاً في طول الحزم للواسمات المدروسة عدا الاختلاف الكبير في طول حزم الواسم UDA-045 كما ذُكر سابقاً.

بالتالي فإن الواسمات التي تمت دراستها في هذا الأطروحة والتي أثبت Sánchez-Pérez وزملاؤه (2010) فعاليتها في انتخاب صفة المرارة في أنواع اللوز الحلوة والمرة، لوحظ أيضاً أنها كانت فعالة في انتخاب صفة المرارة في أنواع اللوز البري السورية المدروسة.

3. الترابط بين النتائج الكيميائية والجزيئية:

لدى مقارنة نتيجة الدراسة الكيميائية مع الجزيئية لوحظ التوافق في النتيجة، حيث إن الطرز التي أظهرت في الدراسة الكيميائية أنها شديدة المرارة بنسبة عالية كانت أيضاً شديدة المرارة في الدراسة الجزيئية، وكذلك الأمر بالنسبة للطرز متوسطة المرارة (الشكل 14). بالتالي نستنتج أن الواسمات الجزيئية التي تمت دراستها مناسبة لانتخاب صفة مرارة البذور في أنواع اللوز البري السورية، ويمكن تعميم استخدامها لانتخاب أنواع اللوز البري حسب مرارة بذورها.



التحليل العنقودي للنتائج الكيميائية　　شجرة القرابة الوراثية

الشكل (14): الربط بين النتائج الكيميائية والجزيئية

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and recommendatios

الاستنتاجات:

- الطرز البرية المدروسة للنوع كورشنسكي المنتشرة في محافظة حمص كانت دائماً شديدة المرارة، فتركيز الأميغدالين يتأثر بالمنطقة والظروف البيئية وبالتحديد الارتفاع عن سطح البحر، حيث أن ازدياد تركيز الأميغدالين يتناسب عكساً مع الارتفاع عن سطح البحر.
- تزداد نسبة الأميغدالين في البذور تدريجياً مع زيادة نضجها حتى يتركز الأميغدالين بشكل كبير جداً في البذور في مرحلة النضج الكامل.
- الواسمات الجزيئية الأربعة (EPDCU2584، BPPCT037، UDA-045، CPDCT028) التي تمت دراستها، أثبتت فعاليتها في انتخاب الطرز الوراثية المدروسة لبعض أنواع اللوز البري المنتشرة في سورية بحسب مرارة بذورها.

التوصيات:

- دراسة أنواع اللوز البري الأخرى المنتشرة في سورية ودراسة الأنواع المدروسة في هذا البحث أيضاً في مناطق أخرى من سورية لتحديد النوع الذي يعطي أعلى انتاج من الأميغدالين والمنطقة المناسبة له في سبيل إكثاره في هذه المنطقة مستقبلاً.
- المرحلة التي يجب أن يتم فيها الحصول على البذور في حال كان المراد استخلاص الأميغدالين منها لاستخدامه في العمليات الغذائية والطبية المختلفة، هي مرحلة النضج الكامل للبذور.
- ضرورة الحصول على الأميغدالين بشكل نقي ومن مصدر طبيعي.
- تعميم إمكانية استخدام الواسمات الجزيئية المدروسة في انتخاب الطرز الوراثية للوز البري من حيث مرارة بذورها قبل زراعتها.

المراجع

References

المراجع العربية:

1. المدني، خالد؛ قمصاني، طه. (2004). الفيتامينات بين الصحة والمرض.
2. سرحان، صبا ياسين. (2015). التوصيف الجزيئي لبعض أصناف وطرز جنسي الدراق واللوز المنتشرة في سورية. أطروحة دكتوراه. قسم البستنة. كلية الزراعة. جامعة دمشق.
3. شلبي، محمد نبيل؛ الريس، رفيق؛ غزال، عبد الله؛ أسود، نابغ غزال. (1997). تحريات أولية بيئية وجغرافية نباتية حول الأصول البرية لجنس اللوز *Amygdalus L.* في سورية. المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والاراضي القاحلة (أكساد)، إدارة الدراسات النباتية – IPGRI.

المراجع الأجنبية:

1. Abbey M., Noakes M., Belling G.B. and Nestel P.J., (1994). Partial replacement of saturated fatty acids with almonds or walnuts lowers total plasma cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol. Am. J. Clinic. Nutrit., 59, pp.:995–999.
2. Abdallah A., Ahumada M.H. and Gradziel T.M., (1998). Oil content and fatty acid composition of almond kernels from different genotypes and California production regions. J. Am. Soc. Hort. Sci., 123:1029–1033.
3. AOAC. 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC.
4. Aranzana M.J., Pineda A., Cosson P., Dirlewanger E., Ascasibar J., Cipriani G., Ryder C.D., Testolin R., Abbott A., King G.J., Iezzoni A.F. and Arús P., (2003). A set of simplesequence repeat (SSR) markers covering the Prunus genome. Theor. Appl. Genet., 106:819–825.
5. Arràzola G., (2002). Anàlisis de glucòsidos cianogénicos en variedades de almendro: implicaciones en la mejora genética. PhD thesis. Universidad de Alicante, Alicante, Spain.
6. Bacarella A., Chironi G. and Barbera G., (1991). Aspetti tecnici, economici e di mercato del mandorlo in Sicilia. Quarderni di Ricerca di Sperimentazione, (Palermo, Sicily), 40: 1–191.
7. Badr JM, and Tawfik MK. (2010). Analytical and Pharmacological Investigation of Amygdalin in Prunus armeniaca L. Kernels. J Pharm Res. 3(9),2134-2137.
8. Bak S., Kahn R.A., Nielsen H.N., Møller B.L. and Halkier B.A., (1998). Cloning of three Atype cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from Sorghum bicolor (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in Escherichia coli of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome

P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. Plant Mol. Biol., 36:393–405.

9. Bak S., Paquette S.M., Morant M., Rasmussen A.V., Saito S., Bjarnholt N., Zagrobelny M., Jørgensen, K., Hamann T. and Osmani S., (2006). Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes p450. Phytochem. Rev., 5:309–329.

10. Ball, G.F.M. (2006). Vitamins in foods: analysis, bioavajlability and stability. Taylor & Francis. USA, 814p.

11. Barckley K., Uratsu S.L, Gradziel T.M. and Dandekar A.M., (2006). Multidimensional analysis of S-alleles from cross-incompatible groups of California almond cultivars. J. Am. Soc. Hort. Sci., 131:632–636.

12. Baroni A, Paoletti I, Greco R, Satriano RA, Ruocco E, Tufano MA, Perez JJ. (2005). Immunomodulatory effects of a set of amygdalin analogues on human keratinocyte cells. Exp Dermatol. 14: 854-859.

13. Barreneche, T.; Bodenes, C.; Lexer, C.; Trontin, J.F.; Fluch, S.; Streiff, R.; Plomion, C.; Roussel, G.; Steinkellner, H.; Burg, K.; Favre, J.M.; Glo¨ ssl, J. and Kremer, A. (1998). A genetic linkage map of Quercus robur L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, Microsatellite, isozyme and 5S rDNA markers. Theor. Appl. Genet. 97: 1090–1103.

14. Bas, B; Jakubowska, M; Gorski, Y. (2011). Application of renewable silver amalgam annular band electrode to voltammetric determination of vitamins C, B1 and B2, Talanta. Vol. 84, 4, 1032-1037.

15. Bell C.J. and Ecker J.R., (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis. Genomics, 19:137-144.

16. Berenguer-Navarro, V., Giner-Galván, R. M., & Grané-Teruel, N., Arrazola-Paternina, G. (2002). Chromatographic determination of cyanoglycosides prunasin and amygdalin in plant extracts using a porous graphitic carbon column. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 50, 6960-6963.

17. Bjarnholt N., Laegdsmand M., Hansen H.C., Jacobsen OH. and Møller B.L., (2008). Leaching of cyanogenic glucosides and cyanide from white clover green manure. Chemosph., 72:897–904.

18. Bliss F.A., Arulsekar S., Foolad M.R., Becerra A.M., Gillen A., Warburton M.L., Dandekar A.M., Kocsisne G.M. and Mydin K.K., (2002). An expanded genetic linkage map of Prunus based on and interspecific cross between almond and peach. Genome, 45, 520–529.

19. Boháčová I, Procházková S, Halko R. (2019). Separation and determination of amygdalin and unnatural neoamygdalin in natural food supplements by HPLC- DAD, Food Additives & Contaminants: Part A, DOI: 10.1080/19440049.2019.1650962.

20. Bolarinwa, IF, Orfila, C and Morgan, MRA. (2014). Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially- available in the UK. Food Chemistry, 152. 133-139.

21. Bolarinwa, IF, Orfila C, Morgan MRA. (2015). Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. Food Chem. 170:437–442.

22. Bošković R., Tobutt KR., Batlle I., Duval H., Gómez P.M. and Gradziel T.M., (2003). Stylar ribonucleases in almond: correlation with and prediction of self-incompatibility genotypes. Plant Breed., 122:70–76.

23. Botstein D, White R.L, Skolnick M. and Davis R.W., (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet., 32:314–331.

24. Browicz K. and Zohary D., (1996). The genus Amygdalus L. (Rosaceae): species relationships, distribution and evolution under domestication. Genet. Resour. Crop Evol., 43:229–247.

25. Carter, J. H., McLafferty, M.A., & Goldman, P. (1980). Role of the gastrointestinal microflora in amygdalin (laetrile)-induced cyanide toxicity. Biochemical Pharmacology. 29, 301-304.

26. Chandler WH. (1957). In: Deciduous orchards. Lea and Febiger, Philadelphia.

27. Channuntapipat C., Wirthensohn M., Ramesh S.A., Batlle I., Arús P., Sedgley M. and Collins G., (2003). Identification of incompatibility genotypes in almond using specific primers based on the introns of the S-alleles. Plant Breed., 122:164–168.

28. Chassagne D, Crouzet JC, Bayonove CL, Baumes RL. (1996). Identification and quantification of passion fruit cyano- genic glycosides. J Agric Food Chem. 44:3817–3820.

29. Cheng Y, Yang C, Zhao J, Tse HF, Rong J. (2015). Proteomic identification of calcium-binding chaperone calreticulin as a potential mediator for the neuroprotective and neuritogenic activities of fruit-derived glycoside amygdalin. J Nutr Biochem. 26: 146-154.

30. Chen C.Y., Milbury P.E., Lapsley K. and Blumberg J.B., (2005). Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. J. Nutr., 135:1366–1373.

31. Chen Y, Ma J, Wang F, Hu J, Cui A, Wei C, Yang Q, Li F. (2013). Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells. Immunopharmacol Immunotoxicol. 35:43–51.

32. Chunhua MA, Zhanqiang MA, Qiang FU, and Shiping MA. (2013). Pharmacokinetic properties of ephedrine, amygdalin and glycyrrhizic acid after oral gavage of San-Ao-decoction in beagle dogs using a UPLC-MS method. Author affiliations. Issue 8, Analytical Methods.

33. Cirns T, Eroberg J, Gonzales S. (1978). Analytical chemistry of amygdalin, Anal. Chem. 50, 317- 322.

34. Clausen V., Frydenvang K., Koopmann R., Jørgensen L.B., Abbiw D.K., Ekpe P. and Jaroszewski J.W., (2002). Plant analysis by butterflies: occurrence of cyclopentenylglycines in Passifloraceae, Flacourtiaceae, and Turneraceae and discovery of the novel nonproteinogenic amino acid 2-(3_-cyclopentenyl) glycine in Rinorea. J. Nat. Prod., 65:542– 47.

35. Combs, Jr. (2008). The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. Elsevier Academic Press, 3rd ed. USA, 603P.

36. Conn E.E., (1969). Cyanogenic glycosides. J. Agric. Food Chem., 17(3):519-526.

37. Conn E.E., (1980). Cyanogenic compounds. Annu. Rev. Plant Physiol., 31:433–51.

38. Cordeiro V. and Monteiro A., (2001). Almond growing in Trasos-Montes region (Portugal). Acta Hortic., 591:161-165.

39. Delplancke M, Yazbek M, Arrigo N, Espíndola A, Joly H, Alvarez N. (2016). Combining conservative and variable markers to infer the evolutionary history of Prunus subgen. Amygdalus s.l. under domestication. Genetic Resources and Crop Evolution. Volume 63, Issue 2, pp 221–234.

40. Deng JG, Wang HL, Liu YD, Li CY, Hao EW, Du ZC, Bao CH, Lv JZ, Wang Y. (2012). Anti-atherosclerotic effects mediated by the combination of probucol and amygdalin in apolipoprotein E-knockout mice fed with a high fat diet. J Anim Vet Adv. 11: 20-25.

41. Denisov V.P., (1988). Almond genetic resources in the USSR and their use in production and breeding. Acta Hort., 224:299–306.

42. Dettori M.T., Quarta R. and Verde I., (2001). A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. Genome, 44:783–790.

43. Dicenta, F.; García, J.E. (1993a). Inheritance of the kernel flavour in almond. Heredity, 70, 308–312.

44. Dicenta F. and García J.E., (1993b). Inheritance of self-compatibility in almond. Heredity, 70:313–317.

45. Dicenta, F.; Gómez P.M.; Ortega, E.; Duval, H. (2000). Cultivar pollinizer does not affect almond flavour. HortScience. 35, 1153–1154.

46. Dicenta F., Ortega E., Cánovas J.A. and Egea J., (2001). Self-pollination versus crosspollination of six self-compatible almond cultivars: Pollen tube growth and fruit set. Cah. Options Méditerr., 56:369–372.

47. Dicenta, F., Gómez P.M., Grané, N., Martín, M.L., and León, A. (2002). Relationship between cyanogenic compounds in kernels, leaves and roots of sweet and bitter kernelled almonds. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 50, 2149-2152.

48. Dicenta F., Ortega E. and Gómez P.M., (2007). Use of recessive homozygous genotypes to assess the genetic control of kernel bitterness in almond. Euphytica, 153:221– 225.

49. Dirlewanger E, Graziano E, Joobeur T, Garriga-Caldré F, Cosson P, Howad W and Arús P. (2004). Comparative mapping and marker- assisted selection in Rosaceae fruit crops. Proc Natl Acad Sci USA. 101:9891–9896.

50. Donovan J.L., Meyer A.S.and Waterhouse A.L., (1998). Phenolic composition andantioxidant activity of prunes and prune juice (Prunus domestica). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46:1247–1252.

51. Doyle JJ, Doyle JL. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry. 19: 11-15.

52. Dreher M.L., Maher C.V. and Kearney P., (1996). The traditional and emerging role of nuts in healthful diets. Nutrition Reviews, 54:241–245.

53. Ensminger A., (1994). Foods & Nutrition. Encyclopedia, 2nd Edition. United States of America: CRC Press, pp: 1167.

54. Esfahlan A.J., Jamei R. and Esfahlan R.J., (2010). The importance of almond (Prunus amygdalus L.) and its by-products. Food Chem., 120:349–360.

55. Etienne C., Rothan C., Moing A., Plomion C., Bodenes C., Svanella-Dumas L., Cosson P., Pronier V., Monet R. and Dirlewanger E., (2002). Candidate

genes and QTLs for sugar and organic content in peach [Prunus persica (L.) Batsch]. Theor. Appl. Genet., 105:145–159.

56. Evreinoff VA. (1952). Quelques observations biologiques sur l'amandier. Rev Int Bot Appl Agric Trop. 32:442–459.

57. Fadel J.G., (1999). Quantitative analyses of selected plant by-product feedstuffs, a global perspective. Animal Feed Science and Technology, 79:255–268.

58. Falcon, M.S; Gandara, J; Sequeiros, R.A. (2001). Analysis of Fluorescent Vitamins Riboflavin and Pyiridoxine in Beverages with Added Vitamins, Chromatographia. Vol.53, 5236-5239.

59. Fermenia, A., Rossello, C., Mulet, A., & Canellas. J. (1995). Chemical composition of bitter and sweet apricot kernels. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 43, 356-361.

60. Franks TK, Yadollahi A, Wirthensohn MG, Guerin JR, Kaiser BN, Sedgley M, Ford CM. (2008). A seed coat cyanohydrin glucosyl- transferase is associated with bitterness in almond (Prunus dulcis) kernels. Funct Plant Biol 35:236–246.

61. Frehner M., Scalet M. and Conn E.E., (1990). Pattern of the cyanide-potential in developing fruits. Plant Physiol., 94:28–34.

62. Frey K.J., (1981). Cababilities and limitations of conventional plant breeding. In: "Genetic engineering for crop improvement". Rakye and Lyman (Eds), pp:15-63.

63. Fukuda T, Ito H, Mukainaka T, Tokuda H, Nishino H. (2003). Anti- tumor promoting effect of glycosides from Prunus persica seeds. Biol Pharm Bull. 26: 271-273.

64. Fulgoni V.L., Abbey M., Davis P., Jenkins D., Lovejoy J., Most M., Sabate J. and Spiller G., (2002). Almonds lower blood cholesterol and LDL-cholesterol but not HDLcholesterol in human subjects: results of a meta-analysis. FASEB J., 16: A981–A982.

65. Ganjewala D, Kumar S, Asha DS, Ambika K. (2010). Advances in cyanogenic glycosides biosynthesis and analyses in plants: A review. Acta Biol Szeged; 54: 1-14.

66. Gao, Y; Guo, F; Gokavi, S; Chow, A; Sheng, Q; Guo, M. (2008). Quantification of water-soluble vitamins in milk-based-infant formulae using biosensor-based assay, Food Chemistry. Vol.110,3,769-776.

67. García-López C., Grané-Teruel N., Berenguer-Navarro V., García- García J.E. and Martín-Carratalá M.L., (1996). Major fatty acid composition of 19 almond cultivars of different origins. A chemometric approach. J. Agri. Food Chem., 44:1751–1755.

68. Ghiulai, VM., Socaciu, C., Jianu, I., *Ranga*, F., & *Fetea*, F. (2006). Identification and quantitative evaluation of amygdalin from apricot, plum and peach oils and kernels. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca. 62, 246-253.

69. Gharbi A., (1981). Résultats préliminaires des croisements intervariétaux d'amandier réalisés en Tunisie. Opt. Med. Serie Etudes, 8 1/1, 23-35.

70. Godini A., (2002). Almond fruitfulness and role of self-fertility. Acta Hort., 591:191–203.

71. Gómez E, Burgos L, Soriano C, Marin J. (1998). Amygdalin content in the seeds of several apricot cultivars. J Sci Food Agric. 77: 184-186.

72. Gómez P.M., Arulsekar S., Potter D. and Gradziel T.M., (2003a). An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. Euphytica, 131:313–322.

73. Gómez P.M., Sozzi G.O., Sánchez-Pérez R., Rubio M. and Gradziel T.M., (2003b). New approaches to Prunus tree crop breeding. J. Food. Agri. Environ., 1:52–63.

74. Gómez P.M., Arulsekar S., Potter D., Gradziel T.M., (2003c). Relationships among peach and almond and related species as detected by SSR markers. J. Am. Soc. Hort. Sci., 128:667–671.

75. Gómez P.M., Sánchez-Peréz R., Dicenta F., Howad W., Arùs P. and Gradziel T.M., (2007). 11 almonds. In: Genom mapping and molecular breeding in plants. Vol 4, Fruits and nuts, C. Kole Ed.

76. Gómez P.M., Sánchez-Pérez R. and Dicenta F., (2008). Fruit Development in Almond for Fresh Consumption. Journal of the American Pomological Society, 62 (2), pp.:82-86.

77. Gradziel T.M. and Kester D.E., (1998). Breeding for self-fertility in California almond cultivars. Acta Hort., 470:109–117.

78. Gradziel T.M., Gómez P.M., Dandekar A., Uratsu S. and Ortega E., (2002). Multiple genetic factors control self-fertility in almond. Acta Hort., 591:221–227.

79. Gradziel T.M., (2009). Almond (Prunus dulcis) breeding. In: “Breeding of plantation tree crops”, S.M. Jain and M. Priyadarshan (Eds.), pp.: 1–31, Springer Science, New York.

80. Grasselly C., (1976a). Origine et évolution de l’amandier cultivé. Options Méditerr., 32:45–50.

81. Grasselly C., (1976b). Les espèces sauvages d’amandier. Options Méditerr., 32:28–44.

82. Grasselly C., Crossa Raynaud P., Olivier G., Gall H., (1981). Transmission du caractère d’autocompatibilité chez l’amandier (Amygdalus communis). Options Méditerr., 1:71–75.

83. Grasselly C.H. and Crossa-Raynaud R., (1983). Mejora genética. In: “El Almendro”, Grasselly C.H. and P. Crossa-Raynaud (Eds)”, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp.:165—207.

84. Grasselly C.H., Crossa-Raynaud P., (1984). El almendro. Ed. Mundi Prensa, Madrid, p.465.

85. Griffiths, M.D.and Huxley A.J., (1992). The New Royal Horticultural Society dictionary of gardening. London: MacMillan Press.

86. Grossa J.P.T., Vaissiere B.E., Rodet G., Botella L. and Cousin M., (1994). Besoins en pollinisation de la vari´et´e d’amandier autocompatible ‘Lauranne’. Acta Hort., 373:145– 152.

87. Gulcan R., (1975). Cytological studies on young seedlings of double almond seeds. II Colloque du Groupe de Recherche et d’ètude Mediterranéen pour l’Amandier, Montpellier, France.

88. Guo J, Wu W, Sheng M, Yang S, Tan J. (2013). Amygdalin inhibits renal fibrosis in chronic kidney disease. Mol Med Rep. 7: 1453-1457.

89. Gupta P.K., Balyan H.S., Sharma P.C. and Ramesh B., (1996). Microsatellites in plants. A new class of molecular markers. Curr. Sciences, 70(1): 45-54.

90. Gupta, P.K. and Varshney, R.K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica. 113:163-185.

91. Haisman, D. R., & Knight, D. J. (1967). The enzymic hydrolysis of amygdalin. Biochemical Journal. 103, 528-534.

92. Halenár M, Medveďová M, Maruniaková N, Kolesárová A. (2013). Amygdalin and its effects on animal cells. Food Sciences. 2 (1) 1414-1423.

93. Halenar M, Chrastinova L, Ondruska L, Jurcík R, Zbynovska K, Tušimová E, Kovacik A, Kolesarova A. (2017). The evaluation of endocrine regulators after intramuscular and oral application of cyanogenic glycoside amygdalin in rabbits. Biologia. 72: 468-474.

94. Haughn G. and Chaudhury A., (2005). Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. Trends Plant Sci., 10:472–477.

95. Heppner J., (1923). The factor for bitterness in the sweet almond. Genetics, 8:390–392.

96. Heppner J., (1926). Further evidence on the factor for bitterness in the sweet almond. Genetics, 11: 605–606.

97. Haque, M. R., & Bradbury, J.H. (2002). Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. Food Chemistry. 77, 107-114.

98. Hokanson, S.C.; Szewc-McFadden, A.k.; Lamboy, W.F.; McFerson, JR. (1998). Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a Malus × domestica Borkh. Core subset collection. Theor. Appl. Genet. 97:671–683.

99. Holzbecher, M. D., Moss, M. A., & Ellenberger, H. A. (1984). The cyanide content of laetrile preparations, apricot, peach and apple seeds. Clinical Toxicology. 22, 341-347.

100. Howad W, Yamamoto T, Dirlewanger E, Testolin R, Cosson P, Cipriani G, Monforte AJ, Georgi L, Abbott AG, Arús P. (2005). Mapping with a few plants: using selective mapping for micro- satellite saturation of the Prunus reference map. Genetics. 171:1305–1309.

101. Hurtado M.A., Romero C., Vilanova S., Abbot A.G., Llacer G.and Badenes M.L., (2002). Genetic linkage map of two apricot cultivars (Prunus armeniaca L.) and mapping of PPV (sharka) resistance. Theor. Appl. Genet., 106:819–825.

102. Hwang EY, Lee JH, Lee YM, Hong SP. (2002). Reverse-phase HPLC separation of D-amygdalin and neoamygdalin and optimum conditions for inhibition of racemization of amygdalin. Chem Pharm Bull. 50:1373–1375.

103. Hyson D., Schneeman B.O. and Davis P.A., (2002). Almonds and almond oil have similar effects on plasma lipids and LDL oxidation in healthy men and women. J. Nutrit., 132:703– 707.

104. Ivanović D, Popović A, Radulović D, Medenica M. (1999). Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. J Pharm Biomed Anal. Vol. 29,9,410-415.

105. Jones D.A. (1998). Why are so many food plants cyanogenic? Phytochem., 47:155–62.

106. Jones P.R., Møller B.L. and Hoj P.B., (1999). The UDP-glucose: p-hydroxymandelonitrile Oglucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in Sorghum bicolor: isolation, cloning, heterologous expression, and substrate specificity. J. Biol. Chem., 274:35483–91.

107. Joobeur T. (1998). Construcción de un mapa de marcadores molec- ulares y análisis genético de caracteres agronómicos en Prunus. PhD Thesis. Universitat de Lleida, Lleida, Spain.

108. Joobeur T, Viruel MA, de Vicente MC, Jáuregui B, Ballester J, Dettori MT, Verde I, Truco MJ, Messeguer R, Battle I, Quarta R, Dirlewanger E, and Arús P. (1998). Construction of a saturated linkage map for Prunus using an almond × peach F2 progeny. Theor Appl Genet. 97:1034–1041.

109. Joobeur T., Periam N., deVicente M.C., King G.J. and Arús P., (2000). Development of a second-generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers. Genome, 43:649–655.

110. Kamil, A.; Chen, C.Y.O. (2012). Health Benefits of Almonds beyond Cholesterol Reduction. J. Agric. Food Chem., 60, 6694–6702. [CrossRef] [PubMed].

111. Kang, S. H., Jung, H., Kim, N., Shin, D-H. & Chung, D.S. (2000) Micellar electrokinetic chromatography for the analysis of D-amygdalin and its epimer in apricot kernel. Journal of Chromatography A. 866, 253-259.

112. Kendall C.W., Jenkins D.J., Marchie A., Ren Y., Ellis P.R. and Lapsley K.G., (2003). Energy availability from almonds: implications for weight loss and cardiovascular health. A randomized controlled dose-response trial. FASEB J., 17: A339.

113. Kester D.E. and Asay R.N., (1975). Almonds. In: "Advances in fruit Breeding". Janick J., Moore J.N. (eds), Purdue Univ. Press, West Lafayette, Indiana, USA, pp.:387–419.

114. Kester D.E., Hansche P.E., Beres W. and Asay R.N., (1977). Variance components and heritability of nut and kernel traits in almond. J. Am. Soc. Hort. Sci., 102:264–266.

115. Kester D.E., Gradziel T.M. and Grasselly C., (1991). Almonds (Prunus). In: “Genetic resources of temperate fruit and nut crops”, Moore J.N., Ballington H.J. (eds), Int. Soc. Hort. Sci., The Netherlands, pp.: 701–758.

116. Kester D.E., Cunningham S. and Kader A.A., (1993). Almonds. In: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition, pp.: 121–126, Academic Press, London.

117. Kester D.E. and Gradziel T.M., (1996). Almonds (Prunus) In: “Fruit Breeding”, Moore J.N., Janick J. (eds), Wiley & Sons, New York, USA, pp.:1–97.

118. King A.D., Miller J.R. M.J. and Eldridge L.C., (1970). Almond harvesting, processing and microbial flora. Appl. Microbiol., 20:208–214.

119. Kodad O., Gracia-Gómez M.S. and Socias R., (2005). Fatty acid composition as evaluation criterion for kernel quality in almond breeding. Acta Hort., 663: 301–304.

120. Kodad O., Socias R., Prats M.S. and Lopez Ortiz M.C., (2006). Variability in tocopherol concentrations in almond oil and its use as a selection criterion in almond breeding. J. Hort. Sci. Biotechnol., 81:501–507.

121. Kodad O. and Socias R., (2015). Fruit Quality in Almond as Related to the Type of Pollination in Self-compatible Genotypes. Int. J. Curr. Microbiol. App.Sci., 4 (5):728- 736.

122. Koepke T., Schaeffer S., Harper A., Dicenta F., Edwards M., Henry R.J., Moller B.L., Meisell L., Oraguzie M., Silva H., Sanchez- Perez R. and Dhingra A., (2013). Comparative genomics analysis in Prunoideae to identify biologically relevant polymorphisms. Plant Biotechnol. J., 11:883–93.

123. Koo JY, Hwang EY, Cho S, Lee JH, Lee YM, Hong SP. (2005). Quantitative determination of amygdalin epimers from armeniacae semen by liquid chromatography. J Chromatogr B. 814:69–73.

124. Kordium E.L., (2008). Double fertilization in flowering plants: 1898-2008. Tsitol Genet., 42(3):12-26.

125. Ladizinsky G., (1999). On the origin of almond. Genet. Resour. Crop Evol., 46:143–147.

126. Lechtenberg M. and Nahrstedt A., (1999). Cyanogenic glycosides. In: “Naturally Occurring Glycosides”, R. Ikan (ed.), Wiley, Chichester, pp.: 147-91.

127. Lee J, Zhang G, Wood E, Castillo CR, Mitchell AE. (2013). Quantification of amygdalin in nonbitter, semibitter, and bitter almonds

(Prunus ducli) by UHPLC-(ESI) QqQ MS/ MS. J Agric Food Chem. 61:7754–7759.

128. Lieberei R., Selmar D. and Biehl B., (1985). Metabolisation of cyanogenic glucosides in Hevea brasiliensis. Plant Syst. Evol., 150:49–63.

129. London-Shafir I., Shafir S. and Eisikowitch D., (2003). Amygdalin in almond nectar and pollen facts and possible roles. Plant Syst. Evol., 238: 87–95.

130. López M., Mnejja M., Rovira M., Colins G., Vargas F.J., Arús P. and Batlle I., (2004). Selfincompatibility genotypes in almond re-evaluated by PCR, stylar ribonucleases, sequencing analysis and controlled pollinations. Theor. Appl. Genet., 109:954–964.

131. Lovejoy J.C., Most M.M., Lefevre M., Greenway F.L. and Rood J.C., (2002). Effect of diets enriched in almonds on insulin action and serum lipids in adults with normal glucose tolerance or type 2 diabetes. Am. J. Clin. Nutr., 76:1000–1006.

132. Lv, WF.; Ding, MY.; Zheng, R. (2005). Isolation and quantification of amygdalin in apricot-kernel and prunus tomentosa thunb by HPLC with solid-phase extraction. Journal of Chromatographic Science, 43, 383-387.

133. Luby J.J. and Shaw D.V., (2001). Does marker-assisted selection make dollars and sense in a fruit breeding program? HortSci., 36:872–879.

134. Marchione V, MD. (2016). Food and Nutrition » Vitamin B17 (Laetrile) Foods: Fruits, Sprouts and More.

135. Martínez J.M., Granado J.M., Montane D., Salvado J. and Farriol X., (1995). Fractionation of residual lignocellulosics by dilute-acid prehydrolysis and alkaline extraction: application to almond shells. Biores. Technol., 52:59–67.

136. Martins M., Tenreiro R. and Oliveira M.M., (2003). Genetic reladness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Rep., 22:71–78.

137. McCarty CD, Leslie JW, Frost HB. (1952). Bitterness of kernels of almond x peach hybrids and their parents. Proc Am Soc Hortic Sci 59:254–258.

138. McMurry JE. (2014). Organic Chemistry, USA: Cengage Learning, Page 869.

139. Mentzer C. and Favre-Bonvin J., (1961). Sur la biogenése du glucoside cyanogé- neétique des feuilles de laurier-cerise (Prunus lauro-cerasus). C. R. Acad. Sci. (Paris), 253: 1072–1074.

140. Milazzo S, Horneber M. (2015). "Laetrile treatment for cancer (Review)", Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 4, Page 1-5.

141. Milbury P.E., Chen C.Y., Dolnikowski G.G. and Blumberg J.B., (2006). Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. J. Agric. Food Chem., 54:5027– 5033.

142. Miller, F. P., Vandome, A. F., & McBrewster, J. (2010). Amygdalin (pp. 1-2). UK: Alphascript.

143. Mirmiranpour H, Khaghani S, Zandieh A, Khalilzadeh OO, Gerayesh-Nejad S, Morteza A, Esteghamati A. (2012). Amygdalin inhibits angiogenesis in the cultured endothelial cells of diabetic rats. Indian J Pathol Microbiol. 55: 211-214.

144. Mizutani M., Nakanishi H., Ema J., Ma S.J., Noguchi, E., Inohara-Ochiai, M., Fukuchi- Mizutani M., Nakao M. and Sakata K., (2002). Cloning of betaprimeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. Plant Physiol., 130:2164–2176.

145. Møller B.L. and Conn E.E., (1979). The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants: Nhydroxytyrosine as an intermediate in the biosynthesis of dhurrin by Sorghum bicolor (L.) Moench. J. Biol. Chem., 254:8575–83.

146. Møller B.L. and Seigler D.S., (1999). Biosynthesis of cyanogenic glucosides and related compounds, in: Singh B.K. (Ed.), Plant amino acids. Marcel Dekker, New York, pp:563– 609.

147. Møller B.L., (2010). Functional diversifications of cyanogenic glucosides. Curr. Opin. Plant Biol., 13:337–46.

148. Moon JY, Kim SW, Yun GM, Lee HS, Kim YD, Jeong GJ, Ullah I, Rho GJ, Jeon BG. (2015). Inhibition of cell growth and down-regulation of telomerase activity by amygdalin in human cancer cell lines. Anim Cells Syst. 19:295–304.

149. Morant M., Bak S., Møller B.L. and Werck-Reichhart D., (2003). Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. Curr. Opin. Biotechnol., 14:151–162.

150. Morgante M. and Olivieri A.M., (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant J., 3 (1):175-82.

151. Mouaffak, Y.; Zegzouti, F.; Boutbaoucht, M.; Najib, M.; ElAdib, A.; Sbihi, M.; Younous, S. (2013). Cyanide poisoning after bitter almond ingestion. Ann. Trop. Med. Public Health. 6, 679–680.

152. Moure A., Pazos M., Medina I., Dominguez H. and Parajo J.C., (2007). Antioxidant activity of extracts produced by solvent extraction of almond shells acid hydrolysates. Food Chem., 101:193-201.

153. Nahrstedt A., (1985). Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms. Plant Syst. Evol., 150, (1-2), 35-47.

154. NCI (National Cancer Institute). (2018). Laetrile/Amygdalin (PDQ®)-Patient Version. Retrieved 3-6.

155. Neeraja C.N., Maghirang-Rodriguez R., Pamplona A., Heuer S., Collard B.C., Septiningsih E.M., Vergara G., Sanchez D., Xu K., Ismail A.M. and Mackill D.J., (2007). A markerassisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. Theor. Appl. Genet., 115:767–776.

156. Negri P, Bassi D, Magnanini E, Rizzo M and Bartolozzi F. (2008). Bitterness inheritance in apricot (P. armeniaca L) seeds. Tree Genetic Genomes 4:767–776.

157. Newton GW, Schmidt ES, Lewis JP, Conn E, Lawrence R. (1981). Amygdalin toxicity studies in rats predict chromic cyanide poisoning in humans. Western J Med. 134:97–103.

158. O´Brien B, Quigg C, Leong T. (2005). Severe cyanide toxicity from ´vitamin supplements´. Eur J Emer Med. 12:257–258.

159. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. (2017). Laetrile/Amygdalin (PDQ®).

160. Pellegrini N., Serafini, M., Salvatore S., Del Rio D., Bianchi M. and Brighenti F., (2006). Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. Molec. Nutrit. Food Res., 50:1030–1038.

161. Poulton, J. E. (1990). Cyanogenesis in plants1. Review. Plant Physiology. 94, 401-405.

162. Poulton J.E. and Li C.P., (1994). Tissue level compartmentation of (R)-amygdalin and amygdalin hydrolase prevents large-scale cyanogenesis in undamaged Prunus seeds. Plant Physiol., 104:29–35.

163. Pou M.M., (2003). El Almendro. Manual Técnico. 1st Edition. Barcelona: Eds Mundi-Prensa, pp. 413.

164. Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S. and Rafalski A., (1996). Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed., 2:225–238.

165. Quilot B., Wu B.H., Cervella J., Génard M., Foulongne M. and Moreau K., (2004). QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between Prunus persica cultivars and the wild relative species P. davidiana. Theor. Appl. Genet., 109:884–897.

166. Ricciardi F. (2016). Genetic analysis on biosynthesis of compounds affecting bitterness in almond tree (Amygdalus communis L.= Prunus Dulcis Mill.). PhD Thesis. Università degli Studi di Foggia. Italy.

167. Ricciardi F., Del Cueto J., Lotti C., Pavan S., Ricciardi L., Dhingra A., Dicenta F., Moller B.L. and Sánchez-Pérez R. (2016). Fine-mapping of the bitterness locus in almond. Zaragoza: CIHEAM Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens. 119:69- 72.

168. Ricciardi F, Del Cueto J, Bardaro N, Mazzeo R, Ricciardi L, Dicenta F, Sánchez-Pérez R, Pavan S, Lotti C. (2018). Synteny-Based Development of CAPS Markers Linked to the Sweet kernel LOCUS, Controlling Amygdalin Accumulation in Almond (Prunus dulcis (Mill.) D.A. Webb). Genes, 9, 385.

169. Romero G., Adeva C. and Battad Z., (2009). Genetic fingerprinting: advancing the frontiers of crop biology research. Philipp. Sci. Lett., 2:8–13.

170. Rosengarten F.J., (1984). The book of edible nuts. Walker and Co., New York, 384.

171. Rushforth K., (1999). Collins wildlife trust guide trees: a photographic guide to the trees of Britain and Europe. London: Harper Collins.ISBN 0-00-220013-9.

172. Sabate J. and Haddad E., (2001). Almond-rich diets simultaneously improve plasma lipoproteins and alpha-tocopherol levels in men and women. Ann. Nutr. Metab., 45:596.

173. Sánchez-Pérez R., Dicenta F., Gradziel T.M., Arús P. and Martínez-Gómez P., (2004). Application of molecular markers in almond breeding programmes. Nucis-Newsl., 12:9–12.

174. Sánchez-Pérez, R.; Howad, W.; Dicenta, F.; Arùs, P.; Gómez P.M. (2007). Mapping major genes and quantitative trait loci controlling agronomic traits in almond. Plant Breed. 126, 310–318.

175. Sánchez-Pérez, R.; Jørgensen, K.; Olsen, C.E.; Dicenta, F.; Møller, B.L. (2008). Bitternes in almond. Plant Physiol. 146, 1040–1052.

176. Sánchez-Pérez R., Jørgensen K., Motawia M.S., Dicenta F. and Møller B.L., (2009). Tissue and cellular localization of individual β-glycosidases using a substrate-specific sugar reducing assay. Plant J., 60:894–906.

177. Sánchez-Pérez, R.; Howad, W.; Garcia-Mas, J.; Arús, P.; Gómez P.M.; Dicenta, F. (2010). Molecular markers for kernel bitterness in almond. Tree Genetics & Genomes. 6:237–245.

178. Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W.S., Lachence, P.A., Ho, C.T. and Rosen R.T., (2002b). Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (Prunus amygdalus Batsch). J.Agric. Food Chem., 50:2459–2463.

179. Sayre, J. W., & Kaymakcalan, S. (1964). Cyanide poisoining from apricot seeds among children in Central Turkey. New England Journal of Medicine. 270, 1113-1115.

180. Schirra M., (1997). Post-harvest technology and utilization of almonds. Hort. Rev., 20:267– 292.

181. Scorza R., (2001). Progress in tree fruit improvement through molecular genetics. Hort. Sci., 36:855–857.

182. Selmar D., Lieberei R. and Biehl B., (1988). Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides: the linustatin pathway. Plant Physiol., 86:711–16.

183. Selmar D., Grocholewski S. and Seigler D.S., (1990). Cyanogenic lipids: utilization during seedling development of Ungnadia speciosa. Plant Physiol., 93:631–636.

184. Selmar D., (2010). Biosynthesis of cyanogenic glycosides, glucosinolates and non-protein amino acids. Annu. Plant Rev., 40:92–181.

185. Serrano B.B., Gómez-Aparisi J. and Hormaza J., (2002). Molecular fingerprinting of Prunus rootstocks using SSRs. J. Hort. Sci. Biol., 77(3):368-372.

186. Shrag TA, Albertson TE, Fisher CJ. (1982). Cyanide poisoning after bitter almond ingestion. Western J Med. 136:65–69.

187. Shuya Xu, Xinfang Xu ID, Shaoxiong Yuan, Huan Liu, Mengnan Liu, Ying Zhang, Hui Zhang, Yan Gao, Ruichao Lin and Xiangri Li. (2017). Identification and Analysis of Amygdalin, Neoamygdalin and Amygdalin Amide in Different Processed Bitter Almonds by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD. *22*(9), 1425.

188. Sibbesen O., Koch B., Halkier B.A. and Møller B.L., (1995). Cytochrome P-450TYR is a multifunctional hemethiolate enzyme catalyzing the conversion of L-tyrosine to phydroxyphenylacealdehyde oxime in the

biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in Sorghum bicolor (L.) Moench. J. Biol. Chem., 270:3506–11.

189. Socias R. and Felipe A.J., (1988). Self-compatibility in almond: transmission and recent advances. Acta Hort., 224:307–317.

190. Socias R., Kodad O., Alonso J.M. and Gradziel T.M., (2008). Almond quality: a breeding perspective. Hort. Rev., 34:197–238.

191. Song Z, Xu X. (2014). Advanced research on anti-tumor effects of amygdalin. J Canc Res Ther. 10:3–7.

192. Sonneveld T, Robbins TP, Boškoviæ R, and Tobutt KR. (2001). Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. Theoretical and Applied Genetics. 102: 1046-1055.

193. Sosinski B., Gannavarapu M., Hager L.E., Beck L.E., King G.J., Ryder C.D., Rajapakse S., Baird W.V., Ballard R.E. and Abbott A.G., (2000). Characterization of microsatellite markers in peach (Prunus persica (L) Basch). Theor. Appl. Genet., 101:421–428.

194. Speijers, G. (1993). Cyanogenic glycosides. WHO Food Additives Series 30. Geneva. JECFA.

195. Spiegel-Roy P. and Kochba J., (1974). The inheritance of bitter and double kernel characters in the almond. Z. Pflanz., 71:319–329.

196. Swain E., Li C.P. and Poulton J.E., (1992a). Development of the potential for cyanogenesis in maturing black cherry (Prunus serotina Ehrh.) fruits. Plant Physiol., 98:1423–1428.

197. Swain E., Li C.P. and Poulton J.E., (1992b). Tissue and subcellular localization of enzymes catabolizing (R)-amygdalin in mature Prunus serotina seeds. Plant Physiol., 100:291–300.

198. Swain E, and Poulton JE. (1994). Utilization of Amygdalin during Seedling Development of Prunus serotina. Plant Physiol. 106: 437-445.

199. Takayama Y, Kawai S. (1980). Improved gas chromatography of amygdalin and its diastereomer. J Chromatogr. 197:240–245.

200. Tamura M., Ushijima K., Sassa H., Hirano H., Tao R., Gradziel T.M. and Dandekar A.M., (2000). Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. Theor. Appl. Genet., 101:344–349.

201. Tautz, D. (1989). Hyper variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res.17:6463-6471.

202. Testolin R., Messina R., Lain O., Marrazo T., Huang G. and Cipriani G., (2004). Microsatellites isolated in almond from an ACrepeat enriched library. Mol. Ecol. Notes, 4:459–461.

203. Tian Y, Xing C, Cao Y, Wang C, Guan F, Li R, Meng F. (2015). Evaluation of genetic diversity on Prunus mira Koehne by using ISSR and RAPD markers. 1053-1061.

204. Tiwari O., Dubey N. and Kaushik S., (2015). Antibacterial and antioxidant efficacy analysis of leaves extracts of Prunus amygdalus (Badam) in different solvents. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 4(5): 728-736.

205. Todorova A, Pesheva M, Iliev I, Bardarov K, Todorova T. (2017). Antimutagenic, antirecombinogenic, and antitumor effect of amygdalin in a yeast cell-based test and mammalian cell lines. J Med Food. 20: 360-366.

206. Tsukatani, T; Suenaga, H; Ishiyama, M; Ezoe, T; Matsomoto, K. (2011). Determination of water-soluble vitamins using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium salts, Food Chemistry. Vol. 127, 2, 711-715.

207. Tunçel, G., Nout, M. J. R., and Brimer, L. (1995). The effects of grinding, soaking and cooking on the degradation of amygdalin of bitter apricot seeds. Food Chemistry. 53, 447-451.

208. Vargas F.J., Romero M.A., Rovira M. and Girona J., (1984). Amélioration de l'amandier par croisement de variétés. Résultats préliminaires à Tarragone (Espagne). Options Méditerr., 1:101–122.

209. Vargas F.J., Romero M.A. and Batlle I., (2001). Kernel taste inheritance in almond. Options Méditerr., 56:129–134.

210. Venkatachalam M. and Shridhar K.S., (2006). Chemical composition of selected edible nut seeds. J. Agric. Food Chem., 54:4705–4714.

211. Vetter J. (2000). Plant cyanogenic glycosides. Toxicon. 38:11–36.

212. Vezvaei A. and Jackson J.F., (1996). Almond nut analysis. In: "Modern methods of plant analysis". H.F. Linskens and J.F. Jackson (eds.), Fruit analysis. Springer- Verlag, Berlin. Vol. 18. pp.:135-148.

213. Vieira, M.L.C.; Santini, L.; Diniz, A.L.; Munhoz, C.D.F. (2016). Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. Genet. Mol. Biol. 39, 312–328.

214. Vilanova S., Romero C., Abbot A.G., Llacer G. and Badenes M.L., (2003). An apricot (Prunus armeniaca L.) F2 progeny linkage map based on

SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. Theor. Appl. Genet., 107:239–247.

215. Volduich, M., & Kyzlink, V. (1992). Cyanogenesis in canned stone fruits. Journal of Food Science. 57, 161-162.

216. Wahab, M.F.; Breitbach, Z.S.; Armstrong, D.W.; Strattan, R.; Berthod, A. (2015). Problems and Pitfalls in the Analysis of Amygdalin and Its Epimer. J. Agric. Food Chem. 63, 8966–8973.

217. Wang H., Nair M.G., Strasburg G.M., Booren A.M. and Gray J.I., (1999). Novel antioxidant compounds from tart cherries (Prunus cerasus). J. Natur. Prod., 62:86–88.

218. Wang T, Lu S, Xia Q, Fang Z, Johnson S. (2015). Separation and purification of amygdalin from thinned bayberry kernels by macroporous adsorption resins. J Chromatogr B. 975:52–58.

219. Watkins R., (1979). Cherry, plum, peach, apricot and almond. In: "Evolution of crop plants". Prunus spp., N. W. Simmonds (ed.), Longman, London, pp:242–247.

220. Wasserkrug, K., & Rassi, Z. E. (1997). High performance liquid phase separation of glycosides. I. Reversed phase chromatography of cyanogenic glycosides with UV and pulsed amperometric detection. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. 20, 335-349.

221. Werner D.J. and Creller M.A., (1997). Genetic studies in peach: Inheritance of Sweet Kernel and Male Sterility. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 122 (2):215-217.

222. Wijeratne S.S.K., Abou-zaid M.M. and Shahidi F., (2006). Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. J. Agric. Food Chem., 54:312-318.

223. Wirthensohn M.G., Chin W. L., Franks T.K., Baldock G., Ford C.M. and Sedgley M., (2008). Characterising the flavour phenotypes o f almond (Prunus dulcis Mill.) kernels. J. Hortic. Sci. & Biotechn., 83(4):462–468.

224. Woodroof JG. (1967). Tree nuts: production, processing, products, vol I. AVI Publishing, New York.

225. Woodrof J.G., (1979). Tree nuts, production and processing products. Vol. III, 2nd ed. AVI Publications, Westport, CT.

226. Wu H, Cao C, Zhou C. (2017). Determination of amygdalin in the fruit of Eriobotrya japonica Lindl by high performance liquid chromatography. Biomedical Research. 28 (20): 8827-8831.

227. Wünsch A. and Hormaza J.I., (2002). Cultivar identification and genetic fingerprinting of fruit tree species using DNA markers. Euphytica, 125:56–67.

228. Yildirim, F. A., & Askin, M. A. (2010). Variability of amygdalin content in seeds of sweet and bitter apricot cultivars in Turkey. African Journal of Biotechnology. 9, 6522-6524.

229. Zagrobelny, M.; Bak, S.; Rasmussen, A.V.; Jørgensen, B.; Naumann, C.M.; Møller, B.L. (2004). Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. Phytochemistry. 65, 293–306.

230. Zagrobelny M., Bak S., Ekstrøm C.T., Olsen C.E. and Møller B.L., (2007a). The cyanogenic glucoside composition of Zygaena filipendulae (Lepidoptera: Zygaenidae) as effected by feeding on wild-type and transgenic Lotus populations with variable cyanogenic glucoside profiles. Insect Biochem. Mol. Biol., 37:10–18.

231. Zagrobelny M., Bak S., Olsen C.E. and Møller B.L., (2007b). Intimate roles for cyanogenic glucosides in the life cycle of Zygaena filipendulae (Lepidoptera, Zygaenidae). Insect Biochem. Mol. Biol., 37:1189–1197.

232. Zagrobelny M. and Møller B.L., (2011). Cyanogenic glucosides in the biological warfare between plants and insects: The Burnet moth-birdsfoot trefoil model system. Phytochem., 72:1585–92.

233. Zeinalabedini M., Khayam-Nekoui M., Grigorian V., Gradziel T.M. and Martínez- Gómez P., (2010). The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by nuclear and chloroplast SSR marker analysis. Sci. Hort., 125:593–601.

234. Zhang RH, Li CR, Yang H, Li MN, Tsim KWK, Li P, Gao W. (2018). An UPLC-MS/MS method for simultaneous deter- mination of multiple constituents in Guizhi Fuling capsule with ultrafast positive/negative ionization switching. Chin J Nat Med. 16:313–320.

235. Zhao X, Zang W, Zhao X, Wang S, Zheng X, Zheng J. (2007). HPLC with column switching coupled to APCI-MS for pharmacokinetic study of amygdalin in rabbit plasma. Chromatographia. 65:149–153.

236. Zhao YY. (2010). Amygdalin content in four stone fruit species at different developmental stages. Sci Asia. 38: 1513-1874.

237. Zhu YP. (1998). Chinese material medicine. New York (USA): CRC Press.