

مطالعه بیوسنتز ترکیبات سیانوژنیک در بادام (*Prunus dulcis*) تلخ و شیرین

عباس یداللهی*، کاظم ارزانی**، علی عبادی***، میشل ویرتسون**** و تریشیا فرانکس****

چکیده

سیانوژن در جنس *Prunus* منجر به تولید ترکیبات سیانوژنیک گلیکوزیدی (نظیر ماده تک قندی پرونازین و دو قندی آمیگدالین) می‌شود. با وجود شناخته شدن مکانیسم توارث تلخی در جنس *Prunus* و گونه بادام، چرخه بیوسنتز ترکیبات سیانوژنیک در ژنوتیپ‌های مختلف آن مشخص نیست. لذا نمونه‌های میوه از ژنوتیپ‌های تلخ و شیرین بادام جمع‌آوری و پروتئین‌های محلول آنها استخراج شد. پروتئین‌های محلول با استفاده از مندلونیتریل گلوکوزیل ترانسفراز و آنتی بادی پلی کلونال تهیه شده برای آن، با روش ایمونولوژیک وسترن و با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد (HPLC) محصولات حاصل از این پروتئین مطالعه شدند. نتایج نشان داد که این آنزیم در همه ژنوتیپ تلخ و شیرین وجود داشته و در مراحل اولیه نمو بذر شروع به بیان شدن می‌کند و بیان آن در کلیه ژنوتیپ‌ها تا اواسط مراحل نمو قابل ردیابی است. در ژنوتیپ‌های شیرین با وجود افزایش غلظت پروتئین‌های محلول بذر، سنتز این پروتئین در ۲۶-۲۵ هفته بعد از گلدهی متوقف شده و فقط ژنوتیپ‌های تلخ همچنان به سنتز این آنزیم (پروتئین) ادامه می‌دهند. نتایج تجزیه متابولیت‌ها با HPLC نشان داد که همزمان با افزایش بیان این پروتئین از مقدار پرونازین کاسته شده و آمیگدالین در بذرها تجمع می‌یابد. بنابراین فقط ژنوتیپ‌های تلخ قادر به حفظ سطح زیاد از بیان پروتئین تا پایان نمو بذر هستند که نهایتاً باعث تبدیل پرونازین به آمیگدالین در بذر و ایجاد مزه تلخی می‌شود.

کلمات کلیدی: آمیگدالین، آنتی‌بادی، پرونازین، تلخی، سیانوژن

* - دانشجوی دکترای باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران

** - دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران (نویسنده مسئول مکاتبات):

(arzani_k@modares.ac.ir)

*** - دانشیار، گروه باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، تهران - ایران

مقدمه

آمیگدالین دی‌گلیکوزیدی است که فقط محدود به خانواده رزاسه است و وجود آن در بذرها گزارش شده است (۱۱). تنها ترکیبات سیانوژنیک شناخته شده در بادام آمیگدالین و پرونازین هستند (۲، ۱۳ و ۱۴).

آمیگدالین موجود در بذرها یک ترکیب دی‌گلیکوزیدی است که در برخی ژنوتیپ‌ها از مونوگلیکوزید پرونازین توسط عمل آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز ساخته می‌شود. درک رابطه بین این دو ممکن است به اصلاح یک گونه با پتانسیل تولید مقادیر زیاد از ترکیبات سیانوژنیک در ریشه منجر شود زیرا گزارش شده است که وجود پرونازین در ریشه‌ها مانع حمله نماتدها به ریشه گیاه می‌شود (۳ و ۵).

تولید پرونازین در بافت‌های رویشی ممکن است یک صفت کمی باشد درحالی‌که تبدیل آن به آمیگدالین در بذرها توسط یک تک ژن کنترل می‌شود. بنابراین ژنوتیپ‌های دارای مغز تلخ باید مقادیر زیادی پرونازین در ریشه داشته باشند درحالی‌که ژنوتیپ‌های شیرین ممکن است که دارای پرونازین یا فاقد آن باشند (۳). شیرینی و تلخی در بادام توسط یک ژن دوآلی کنترل می‌شود و شیرینی بر تلخی غالب است (۷). با این وجود همواره بادام‌هایی وجود دارند که درجات مختلفی از تلخی را نشان می‌دهند که به نام نیمه تلخ یا کمی تلخ^۸ مشهور هستند. نتایج تحقیقات

سیانوژنز به معنای تولید متابولیت‌های ثانویه ازت داری است که به ترکیبات سیانوژنیک مشهورند (۱۳). ترکیبات گلیکوزید سیانوژنیک در بافت‌های مختلف گیاهان مانند بافت‌های رویشی یا بذر وجود دارند و گیاهان بسیاری قادر به سنتز این ترکیبات هستند. حداقل ۲۵۰۰ گونه گیاهی از خانواده‌های رزاسه^۱، گرامینه^۲، لیناسه^۳ و کمپوزیته قادر به سنتز یکی از ترکیبات سیانوژنیک هستند (۱، ۱۰ و ۱۳). سیانید هیدروژن در گیاهان اساساً از ترکیبات سیانوژنیک آزاد می‌شود. اغلب ترکیبات سیانوژنیک دارای ترکیبات قندی ساده (مونوگلیکوزید) مانند لینامارین^۴، پرونازین و دورین^۵ هستند ولی برخی از آنها نیز مانند آمیگدالین، ویسیانین^۶ و گزرانین^۷ دو قندی یا چند قندی هستند. حدود ۷۵ نوع ترکیب سیانوژنیک در گیاهان شناخته شده است (۱). دو ترکیب سیانوژنیک گلیکوزیدی در بافت‌های مختلف جنس *Prunus* یافت شده‌اند. مونوگلیکوزید پرونازین در بافت‌های رویشی اغلب گیاهان یافت می‌شود. ولی

-
- 1- Rosaceae
 - 2 - Graminae
 - 3 - Linaceae
 - 4 - Linamarin
 - 5 - Dhurrin
 - 6 - Vicianin
 - 7 - Xeranthin

8 - Semi Bitter

و محصولات حاصل از آن در بادام‌های تلخ و شیرین بررسی شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی شامل میوه‌های در حال رشد بادام بود که از درختان بادام حاصل از تلاقی ارقام میشن^۲ و نونپاریل^۳ جمع‌آوری شدند. گیاهان حاصل از تلاقی‌های فراوان در سال‌های ۱۹۹۸ و ۱۹۹۹ در محل لیندسی پوینت^۴ و ویکتوریا، استرالیا، (۳۴/۰۴ شمالی و ۱۴۰/۶۸ شرقی) بدون پیوند کاشته شده بودند. فنوتیپ گیاهان با آزمون تلخی و شیرینی مغزها معین شد. در دو فصل رویشی ۶-۲۰۰۵ دو ژنوتیپ تلخ و شیرین با کدهای خاص انتخاب شده و در طول فصل در زمان‌های مشخص از میوه‌ها نمونه‌برداری انجام شد. در فصل دوم به منظور بررسی دقیق‌تر از سه ژنوتیپ تلخ و پنج ژنوتیپ شیرین نیز در ۱۸ و ۲۶ هفته بعد از گلدهی نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله با ازت مایع منجمد شده و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آدلاید منتقل شدند.

پروتئین‌های محلول با استفاده از بافر جونز^۵ جونز^۵ ۲۰۰۰ (۹) که کمی تغییر یافته بود استخراج شدند. بافت‌ها توسط هاون چینی و ازت

نشان می‌دهد که بادام‌های اهلی کاشته شده تجاری، به میزان زیاد هتروزیگوت هستند و اغلب والدین انتخاب شده در تلاقی‌های اصلاحی از نظر ژن تلخی هتروزیگوت می‌باشند (۳ و ۱۴). در بادام، ژنوتیپ شیرین دارای یک آلل غالب (S) است در حالی که ژنوتیپ تلخ دارای دو آلل مغلوب (ss) می‌باشد. بنابراین احتمال دارد که ژنوتیپ‌های (Ss) با توجه به تغییر نسبی سیستم غلبه درجات مختلفی از مزه تلخی را بیان کنند که در این صورت می‌توان انتظار ژنوتیپ‌های با مزه نیمه تلخ یا کمی تلخ را داشت.

گرده‌افشانی با منابع مختلف دانه گرده تأثیری بر مزه میوه ندارد و طعم میوه فقط به ژنوتیپ والد مادری وابسته است. بنابراین والد نر تأمین‌کننده گرده به همراه والد مادری ژنوتیپ میوه درخت یا بذر آن را تعیین می‌کنند و ژنوتیپ بذر کشت شده برای تولید نهال در طعم میوه آن مؤثر نیست. کلیه بذرهای یک درخت شیرین یا تلخ هستند و فقط ژنوتیپ بذر کشت شده در فنوتیپ (طعم) شیرینی و تلخی میوه بادام مؤثر است (۲، ۳ و ۴). علی‌رغم این که مشخص شده است که توارث تلخی بادام تحت کنترل تک ژن است ولی جنبه‌های فیزیولوژیک متابولیسم این ترکیبات کاملاً روشن نیست و پروسه شروع سنتز و تجمع مواد سیانوژنیک در بذرهای کاملاً مشخص نشده است (۶). در پژوهش حاضر روند بیوسنتز و فعالیت آنزیم مندلو نیتریل گلیکوزیل ترانسفراز^۱

2 - Mission

3 - Nonpariel

4 - Lindsay Point

5 - Jones, 1999

1 - Glucosyl Transferase

شده و سیگنال‌های بیوشیمیایی آن توسط دستگاه اسکنر Chem.Chemi Doc×Rs (Bio-Rad) عکس برداری گردیدند.

بررسی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

آنالیز با دستگاه HPLC سری آجیلنت^۳ ۱۱۰۰ انجام شد. عصاره گیاهی حاوی متانول ابتدا با استفاده از فیلتر (Millex-Hv Unit, ۰/۴۵µm) خالص شده و با دستگاه تزریق‌کننده خودکار به میزان ۷/۵ میکرولیتر برای هر نمونه تزریق شد. دمای ستون ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ستون آجیلنت ZORBAX Eclipse XDB-C18 و ۵µm، ابعاد ۱۵۰mm × ۴/۶ بود. فاز متحرک آب (A) و استونیتریل (B) و شرایط فازی شامل ۱- ۲۰ درصد B در ۲۰۰ میکرولیتر در دقیقه، ۲- صفر درصد B برای شش دقیقه، ۳- صفر درصد B تا ۲۸/۸ درصد B برای ۱۰ دقیقه، ۴- ۲۸/۸ درصد B برای دو دقیقه، ۵- ۲۸/۸ درصد تا ۱۰۰ درصد B برای ۱۰ دقیقه، ۶- ۱۰۰ درصد B برای دو دقیقه، ۷- ۱۰۰ درصد B تا صفر درصد B برای پنج دقیقه، ۸- صفر درصد B برای هفت دقیقه بود. خروجی ستون توسط آشکارساز U.V با طول موج ۱۹۰ تا ۴۴۰nm اندازه‌گیری شد. سایر شرایط مطابق روش دیستتا و همکاران^۴ (۲۰۰۲) بود (۲).

مایع و به کمک دستگاه IKA[®] A11 کاملاً پودر شده و سپس به نسبت ۱:۱ تا ۱:۴ (بافت گیاه به بافر استخراج) برحسب به نوع بافت با دستگاه لرزاننده و همزن مغناطیسی مخلوط شدند. سپس مخلوط در سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و مایع روشن‌آور برداشته شد.

تجزیه و سترن

جدا کردن پروتئین‌ها با روش الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل پلی‌اکریلامید دو قسمتی (ژل متراکم‌کننده و جداکننده) انجام شد. سپس پروتئین به غشاء نیتروسلولوزی (Hybond Tm-C (Amersham) Extra , با روش انتقال نیمه خشک و انتقال تانکی^۱ منتقل شدند (سلول انتقال Mini Trans - Blot[®] Bio - Rad). پروتئین مندلونیتریل گلوکوزیل ترانسفراز بادام از طریق توالی‌یابی آمینواسید مشابه در سورگوم (*Sorghum bicolor*) جداسازی و استخراج شد (۶). آنتی بادی پلی کلونال به این پروتئین از آزمایشگاه علوم دامی دانشگاه آدلاید با تزریق به خرگوش تهیه شد و آنتی بادی با غلظت یک به ۳۰۰ برای پروب کردن بلات به کار رفت. آنتی بادی‌های باند شده با هورس ردیش پراکسیداز^۲ با استفاده از (ECL Tm Western Blotting Analysis system Amersham) قابل شناسایی

3 - Agilent 1100 series

4 - Dicenta *et al.*, 2002

1 - Semi Dry Tank Transfer

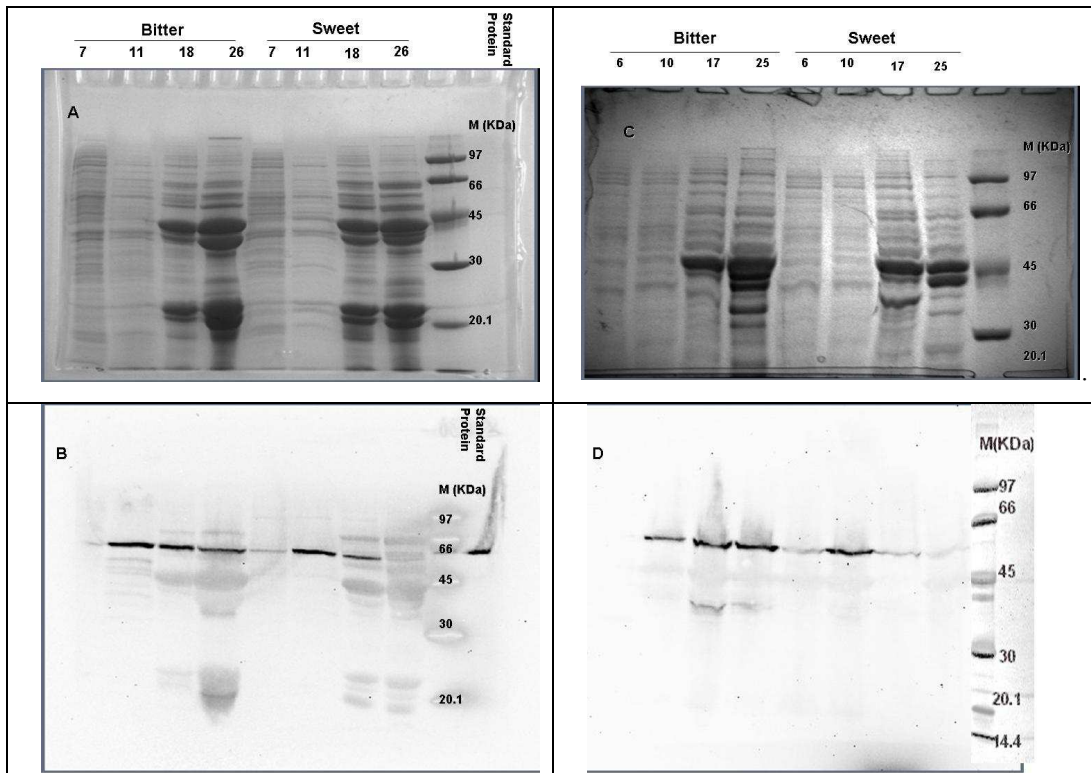
2 - Horse Radish Peroxidase

نتایج و بحث

در بادام‌های تلخ و شیرین استفاده شد، عدم حضور باند در محل مورد انتظار در هفته ۶-۷ نشانه عدم سنتز پروتئین مورد نظر در میوه‌های تلخ و شیرین تا این زمان بود. از هفته ۶-۷ تا هفته ۱۰-۱۱ بعد از گلدهی میوه‌ها رشد سریعی داشتند در حالی که هیچ اثری از آمیگدالین دیده نشد و فقط مطابق انتظار مقدار کمی پرونازین ثبت گردید (۱۲). در هفته ۱۰-۱۱ پس از گلدهی در هر دو ژنوتیپ تلخ و شیرین سیگنال‌های قوی در محل باند دیده شد. در این زمان پروتئین مورد نظر در همه ژنوتیپ‌های تلخ و شیرین شروع به سنتز نمود و شدت بیان آن نیز ربطی به نوع ژنوتیپ نداشت. غلظت پروتئین‌های کل باتوجه به شکل (۱) (A و C) از ۱۷-۱۸ هفته پس از گلدهی شروع به افزایش نمود که این امر با نتایج سایر تحقیقات مطابقت داشت (۶). با وجود این سنتز پروتئین مورد نظر فقط در ژنوتیپ تلخ افزایش یافت و در ژنوتیپ‌های شیرین کاهش یافت به طوری که در هفته ۲۵-۲۶ بیان پروتئین در ژنوتیپ شیرین تقریباً به صفر رسید (شکل ۱ B و D). حداقل ۱۰ روز پس از شروع سنتز آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز می‌توان انتظار داشت که فرآورده‌های آنزیم در گیاه تجمع یابند (۱). تا زمان شروع تجمع ترکیبات سیانوژنیک (حدود هفته ۱۳) کلیه مواد سیانیدی در میوه‌ها فقط شامل پرونازین بود و بعد از آن مقدار آمیگدالین به دلیل حضور آنزیم شروع به افزایش نمود که نشان وجود پرونازین در مراحل اولیه نمو میوه در بادام مطابق پژوهش‌های قبلی است (۱۱ و ۱۳).

آنتی‌بادی پلی کلونال نسبت به گلوکوزیل ترانسفراز کاملاً اختصاصی عمل نمود و یک باند مشخص صحیح در محل پروتئین حدود ۵۴ کیلودالتون را نشان داد که با سایر نتایج کاملاً مطابقت داشت (۵). بررسی ترکیبات حاصل از گلوکوزیل ترانسفراز بادام در محیط *In vitro* نشان داد که این آنزیم بنزیل الکل و مندلونیتریل را به آر-پرونازین و سپس به آمیگدالین تبدیل می‌کند (۵). بنابراین در صورت بیوسنتز آن می‌توان انتظار داشت که مقدار فرآورده آن افزایش پیدا کند. آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز در برخی گیاهان با افزودن گلوکز به مندلونیتریل تولید پرونازین و مجدداً با افزودن یک گلوکز دیگر تولید آمیگدالین می‌کند (۸، ۹ و ۱۰).

منحنی رشد میوه در بادام نشان می‌دهد که دو هفته پس از تمام گل وزن خشک میوه شروع به افزایش می‌کند که تا ۲۰ هفته بعد از گلدهی نیز ادامه دارد. در این زمان جنین کاملاً نمو یافته و میوه به حجم نهایی خود رسیده است ولی میوه‌ها هنوز سبز هستند و اندوکاپ سخت و چوبی شده است. سنتز و تجمع روغن‌ها در بذر حدود هفت هفته بعد از گلدهی انجام می‌گیرد (۶). در سال دوم اجرای این تحقیق به علت افزایش میانگین دمای روزانه تغییرات نمودی نسبت به سال قبل یک هفته زودتر انجام شد. بنابراین تغییرات نمودی با یک هفته اختلاف زمانی نشان داده می‌شود. وقتی که آنتی‌بادی برای مقایسه پروتئین‌های محلول در طول فصل (سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶)



شکل ۱ - SDS-PAGE با رنگ آمیزی ژل با کوماسی آبی (بالا) و آنالیز وسترن ژل مشابه با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال برای تشخیص وجود پروتئین گلوکوزیل ترانسفراز (پایین) در مغز بادام‌های تلخ و شیرین به منظور نشان دادن غلظت و پروتئین‌های مغز. A و B - ۷، ۱۱، ۱۸ و ۲۶ هفته پس از گلدهی (سال ۲۰۰۶)، C و D - ۶، ۱۰، ۱۷، ۲۵ هفته پس از گلدهی (سال ۲۰۰۵).

Ehrh همزمان با افزایش سریع در مقدار وزن میوه در مرحله I رشد میوه، پرونازین نیز افزایش یافت و به ۳/۱ میکرومول در هر میوه تا چهار هفته بعد از گلدهی رسید (۱۲). از این مرحله بذرها و فرابری میوه حاوی مقدار مساوی پرونازین بوده و پس از آن مقدار پرونازین شروع به کاهش نمود و تا پایان مرحله III رشد میوه این کاهش ادامه یافت. ولی مقدار آمیگدالین از پنج هفته بعد از گلدهی که مقدار آن صفر بود شروع به افزایش نمود و در ۱۱ هفته بعد گلدهی به پنج میکرومول در میوه رسید. در شروع نمو لپه‌ها (هفته ۶)

مطالعات بر روی بذر *P. Virganiana* و *Prunus serotina* Ehrh نشان داد که میوه‌ها در اوایل دوره نمو حاوی هر دو ترکیب پرونازین و آمیگدالین به نسبت ۱۶ به یک هستند. این الگوی تجمع مواد سیانوژنیک با این حقیقت که در بادام‌های تلخ آمیگدالین ترکیب سیانوژنیک اصلی است کاملاً مطابقت دارد. الگوی مشابهی در تجمع آمیگدالین و افزایش نسبت آن به پرونازین در گیلاس (*P. Avium*) و شیر خشت (*C. bullata*) گزارش شده است (۶). در یک تحقیق مشخص شد که در گیاه *P. serotina*

تجمع آمیگدالین (سه میکرومول در میوه) و آنزیم‌های تجزیه‌کننده نمودند و در صورت خرد کردن میوه‌ها، به شدت قادر به تولید سیانید هیدروژن بودند. در همین زمان مقدار پرونازین کاهش یافت و در هنگام رسیدن میوه مقدار آن در حد صفر بود. در مدت مرحله II (سه تا نه هفته بعد گلدهی) و مرحله III (۱۰-۱۲ هفته بعد گلدهی) فرابر میوه نیز آمیگدالین تولید نمود و مقدار پرونازین آن تدریجاً به صفر رسید. با این حال این قسمت از میوه به‌طورکلی فاقد آنزیم‌های ذکر شده بود و بنابراین توانایی تولید سیانید هیدروژن را نداشت. لذا بررسی روند بیوسنتز آنزیم‌های تجزیه‌کننده فوق در ژنوتیپ‌های مختلف بادام در سایر پژوهش‌ها می‌تواند مکانیسم بیوسنتز ترکیبات سیانوژنیک را کاملاً روشن نماید.

به‌طورکلی آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز در کلیه ژنوتیپ‌ها تولید می‌شود و تا اواسط فصل رویشی نیز ادامه می‌یابد. بنابراین مزه تلخ میوه به توانایی تولید این آنزیم بستگی ندارد. بیان این پروتئین در ژنوتیپ‌های شیرین در اواسط فصل رشد متوقف^۴ می‌شود. بنابراین تبدیل پرونازین به آمیگدالین نیز در این ژنوتیپ‌ها اتفاق نمی‌افتد. ولی در ژنوتیپ‌های تلخ پروتئین همچنان تا اواخر فصل بیان شده و موجب سنتز آمیگدالین به عنوان ماده اصلی مزه تلخ در مغز میوه می‌شود. زیرا سنتز این پروتئین با فعالیت افزاینده گلوکز به مندلونیتریل و تولید آمیگدالین ارتباط مستقیم دارد.

آمیگدالین شروع به افزایش کرد به‌طوری‌که در هفته ۱۱ بعد از گلدهی مقدار آن به سه میکرومول رسید. ولی مقدار پرونازین روند کاهشی داشت و مقدار آن در این روز تقریباً صفر شد. در ۱۷-۱۸ هفته بعد از گلدهی، بیان پروتئین گلوکوزیل ترانسفراز در ژنوتیپ‌های تلخ قوی‌تر از شیرین بود (شکل ۱-B و D، شکل ۲-B و C). با وجود جداسازی مقدار کمی پرونازین در ژنوتیپ‌های شیرین (۶-۸ mg/L)، مقدار پرونازین (۵۰-۶۰ mg/L) و آمیگدالین (۲۰۰-۳۰۰ mg/L) در ژنوتیپ‌های تلخ بسیار بیشتر بود. در هفته ۲۶-۲۵ بعد از گلدهی آنتی بادی فقط در ژنوتیپ‌های تلخ پروتئین را شناسایی کرد در همین حال مقدار پرونازین در این ژنوتیپ‌ها کاهش (۱۰-۲۰ mg/L) و مقدار آمیگدالین (۵۰۰-۶۰۰ mg/L) بسیار افزایش یافت و بعد از هفته ۲۶ آمیگدالین بیش از ۹۵ درصد مواد سیانوژنیک بادام‌های تلخ را تشکیل می‌داد (شکل ۲-E و F).

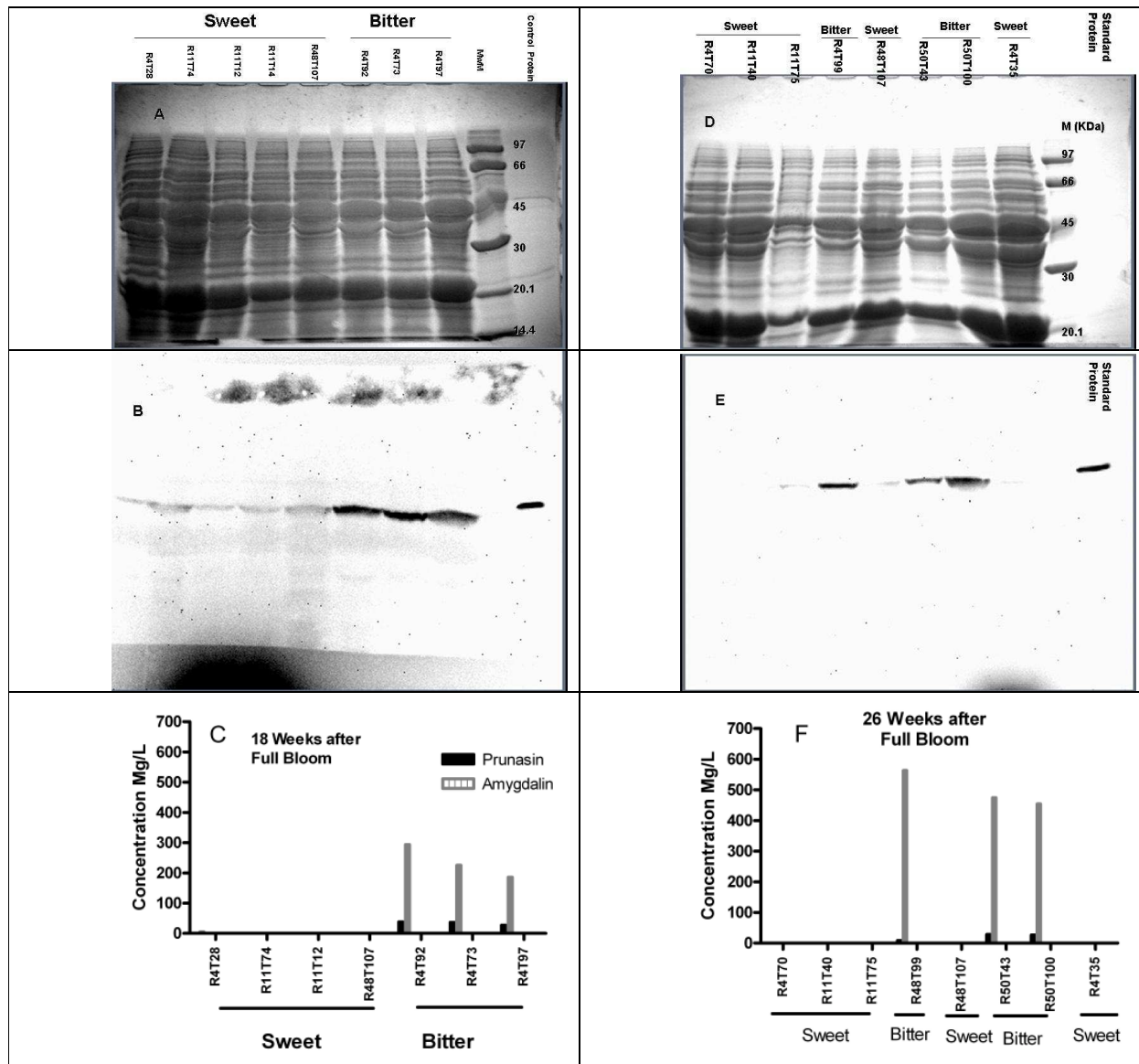
تغییرات بیوشیمیایی مربوط به تولید ترکیبات سیانوژنیک در میوه *P.serotina* Ehrh نیز بررسی شده است (۱۲). در مدت سه هفته بعد از گلدهی سه میکرومول پرونازین میوه‌های نارس تجمع نمود ولی قادر به تولید سیانید هیدروژن نبودند. زیرا در این زمان آنزیم‌های تجزیه‌کننده (پرونازین هیدرولاز^۱، آمیگدالین هیدرولاز^۲ و مندلونیتریل لیاز^۳) وجود نداشت. به تدریج همراه با نمو لپه‌ها در اواسط مرحله II رشد میوه، میوه‌ها شروع به

1 - Prunasin Hydrolase

2 - Amygdalin Hydroase

3 - Mandelonyl Lyase

4 - Suppress



شکل ۲ - SDS-PAGE با رنگ آمیزی ژل با کوماسی آبی (بالا) و آنالیز وسترن ژل مشابه با استفاده از با آنتی بادی پلی کلونال برای تشخیص وجود آنزیم گلوگوزیل ترانسفران، باند سمت راست پروتئین استاندارد را نشان می دهد (وسط) و غلظت متابولیت های موجود توسط HPLC (پایین) در مغز بادام های تلخ (۳ ژنوتیپ) و شیرین (۵ ژنوتیپ) به منظور نشان دادن غلظت و پروتئین های مغز در سال ۲۰۰۶. A و B و C - ۱۸ هفته پس از گلدهی، D، E و F - ۲۶ هفته پس از گلدهی

References

- 1 . Chassagne D, Crouzet JC, Bayonove CL and Baumes RL (1996) Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides. *J Agr Food Chem* 44: 3817-3820.
- 2 . Dicenta F, Martinez-Gomez P, Grane N, Martin ML, Leon A, Canovas JA and Berenguer V (2002) Relationship between cyanogenic compounds in kernels, leaves, and roots of sweet and bitter kernelled almonds. *J. Agr. F. Chem.* 50: 2149-2152.
- 3 . Dicenta F, Berenguer V, Grane N, Martin ML, León A, and Martinez-Gomez P (1999) Relationship between cyanogenic compounds in seeds, leaves and roots of sweet and bitter kernelled almonds. VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Murcia (Spain) 351-355.
- 4 . Dicenta F, Martínez-Gomez P and Ortega E (2000) Cultivar pollinizer does not affect almond flavor. *Hortscience* 35: 1153-1154.
- 5 . Franks TK, Hayasaka Y, Choimes S and Heeswij RV (2005) Cyanogenic glucosides in grapevine: polymorphism, identification and developmental patterns. *Phytochem.* 66: 165-173.
- 6 . Frehner M, Scalet M and Conn EE (1990) Pattern of the cyanide-potential in developing fruits *Plant Physiol.* 94: 28-341.
- 7 . Heppner J (1926). Further studies on the factor for bitterness in the sweet almond. *Genetics* 8: 390-391.
- 8 . Jones DA (1998) Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochem.* 47: 155-162.
- 9 . Jones PR, Andersen MD, Nielsen JS, HJ PB and Miller BL (2000) The biosynthesis, degradation, transport and possible function of cyanogenic glucosides. In: Ibrahim, R., Varin, L., DeLuca, V., Romeo, J.T. (Eds.), *Recent Advances in Phytochemistry. The Biosynthesis, Degradation, Transport and Possible Function of Cyanogenic Glucosides*, vol. 34. Elsevier Press, New York, London, pp. 191-247.
- 10 . Poulton JE (1990) Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol.* 94: 401-405.
- 11 . Santamour JRFS (1998) Amygdalin in prunus leaves. *Phytochem.* 47(8): 1537-1538.
- 12 . Swain E, Li CP and Poulton JE (1992) Development of the potential for cyanogenesis in maturing black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) fruits. *Plant Physiol.* 98: 1423-1428.
- 13 . Vetter J (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon.* 38: 11-36.
- 14 . Wirthensohn M, Collins G and Sedgley M (2004) Benefits to the Australian almond industry from international collaboration. *Austral. Nutgrower.* 18(1): 40.