دراسة المحتوى البروتيني لبذور بعض أنواع الفصة *Medicago* المنتشرة في القنيطرة

أسيل أزعط وجورجيت بابوجيان

قسم علم الحياة النباتية ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ ــ سورية

تاريخ الإيداع 2011/07/19

قبل للنشر في 2011/10/17

الملخّص

تعدُّ دراسة البروتينات الادخارية البذرية في النباتات القرنية (الفصيلة الفولية *Fabaceae*) أمراً في غاية الأهمية. ففضلاً عن قيمتها الاقتصادية الكبيرة، تعدُّ البروتينات الادخارية البذرية Seed Storage Proteins إحدى أدوات التصنيف النباتي بسبب ثبات مكوناتها. تشكل أنواع الفصة *Medicago* قاعدة علفية مهمة في بلدان حوض المتوسط بشكل عام، وسورية بشكل خاص. تناول البحث دراسة المحتوى البروتيني لبذور خمسة أنواع من الفصة المنتشرة في القنيطرة باستخدام تقانة الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد 30%. بيّنت النتائج سيطرة عُصابات بروتين الفيسلين من الغلوبيولينات على هلامة عديد الأكريلاميد (قرابة 11 عصابة)، في حينٍ ظهرت قرابة ثلاث عصابات تمثل بروتين الليغومين فضلاً عن ظهور ضعيف للألبومينات التي تكون غالباً أنزيمات. ظهرت بروتينات دفاعية مثل تحت الوحدة β لمثبط α- أميلاز في الأنواع *M.arabica, M.hispida, M.rotata*. تم الحصول على بصمات بروتينية Protein Fingerprint مميزة للأنواع المدروسة ساعدت في إيضاح علاقات القرابة بينها، إذ تم التوصل إلى أربع مجموعات هي:

1- *M.sativa*، 2- *M.rotata*، 3- *M.arabica*، 4- *M.hispida* مع *M.polymorpha*.

الكلمات المفتاحية: الفصة، الفصيلة الفولية (القرنيات)، البروتينات الادخارية البذرية، البصمة البروتينية.

Studyiny Seed Storage Proteins of some *Medicago* species from Al Qnaiterah Zone

A. Azat and G. Babojian
Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

Received 19/07/2011
Accepted 17/10/2011

ABSTRACT

Studying seed storage proteins in legumes (*Fabaceae*) is very important. Besides its economic value, seed storage proteins play an important role in plant taxonomy because of the stability of their contents. *Medicago* species constitute a wide pasture base in the Mediterranean Regional Countries, especially Syria. Thereby, we were interested in seed storage protein study of five *Medicago* species from Al Qnaiterah Zone using SDS polyacrylamide- gel electrophoresis (SDS-PAGE) 30%.

Results showed the dominance of vicilins 7S (globulins) bands (about 11 bands). However, legumins 11S presented about three bands and albumins 2S (only one or two bands). Furthermore, results showed bands that presented subunit β of α-amylase inhibitor, a defence protein. Protein Fingerprints were used to study relationships between the studied species of *Medicago*, which allowed to distinguish four groups:

1-*M.rotata,* 2-*M.sativa,* 3-*M.arabica,* 4-*M.hispida* and *M.polymorpha.*

This study confirms the importance of studying seed storage proteins in legumes for the nutritional value of these plants to be improved.

Key words: *Medicago, Fabaceae* (legumes), seed storage proteins, Protein Fingerprint.

المقدمة

تحتوي البذور النباتية على بروتينات تقوم بأدوار استقلابية وبنيوية مهمة، فضلاً عن العديد من المجموعات البروتينية الموجودة بكميات كبيرة التي تزود البذرة بالحموض الأمينية اللازمة لإنباتها ونمو البادرة. تدعى هذه المجموعات البروتينية "البروتينات الادخارية البذرية "Seed Storage Proteins إذ إنها تُصطنع مرة واحدة في دورة حياة النبات (مرحلة نمو البذرة) ويدخرها النبات في مراحل لاحقة للتزود بالعناصر الضرورية لإنبات البذرة وخاصة عنصري الآزوت والكبريت (Croy *et al.*,1984, Boulter and Croy, 1997).

تتجلى أهمية البروتينات الادخارية في أنّها تحدد المحتوى البروتيني الإجمالي للبذرة كما تحدد مدى جودتها، ومن ثم إمكانية الاستفادة منها في مجالات عديدة. فعلى سبيل المثال، يوجد السيستئين والميثونين بنسب منخفضة في بذور القرنيات مما يخفض جودتها ويحد من ثمَّ من إمكانية استعمالها علفاً للحيوانات ذات المعدة الواحدة.

تتميز البروتينات الادخارية بمجموعة من الخصائص، منها:

- أنها تُصطنع بكميات كبيرة في أنسجة معينة خلال مدة نمو البذرة.
- أنها توجد في البذور الناضجة بشكل "أجسام بروتينية" Protein Bodies.
- أنها عبارة عن مزيج من مكونات تعبّر عن تعدد شكلي polymorphism ضمن النمط الوراثي الواحد genotype وبين الأنماط الوراثية لبعض الأنواع.

تعدُّ البروتينات الادخارية البذرية من أقدم البروتينات التي جرى عزلها ودراستها. على سبيل المثال، عُزل غلوتيلين القمح عام 1754(Beccari, 1745) وتم الحصول على غلوبيولين الجوز البرازيلي Brazil nut عام 1859(Maschke, 1859)، ثم جاء Osborne (Osborne, 1924) بتصنيف البروتينات الادخارية ضمن أربع مجموعات وفقاً لانحلاليتها:

1- الألبومينات Albumins: بروتينات منحلة في الماء، تتمثل بشكل أساسي بالأنزيمات وهي ذات معامل ترسيب 2S. تتوزع بشكل واسع في بذور ثنائيات الفلقة، وقد دُرست دراسة جيدة في الفصيلة الملفوفية *Brassicaceae* وخاصة في نبات *Arabidopsis*.

2- الغلوبيولينات Globulins: بروتينات غير منحلة في الماء لكنها تنحل في المحاليل القلوية الممددة، وهي البروتينات الأساسية في بذور القرنيات، تحوي كميات مرتفعة من الليزين والتربتوفان (Mossée *et al.*,1990).

3- البرولامينات Prolamins: بروتينات منحلة في محلول الإيتانول الممدد (70-60%) أو البروبانول الممدد (50%)، تحوي مستويات مرتفعة من الغلوتامين والبرولين. ينحصر

وجودها في الحبوب الرئيسية حيث تشكل البرولامينات ما يقارب نصف محتواها الإجمالي من الآزوت. يستثنى من هذه القاعدة العامة الشوفان والأرز حيث تكون البروتينات الادخارية فيهما شبيهة بالغلوبيولين 11S في حين توجد البرولامينات فيهما بمستويات منخفضة؛ ما يقارب 5-10% من إجمالي بروتين الحبة.

4- الغلوتيلينات Glutelins: بروتينات منحلة في الحموض الممددة أو القلويدات الممددة، وهي البروتينات الأكثر توافراً في الأرز، وهي تبدي تشابهاً مع بروتينات الليغومين الموجودة في البازلاء وفول الصويا؛ ويعود ذلك إلى أنّها تُصطنع بشكل مشابه لاصطناع الليغومين وأن تسلسل حموضها الأمينية شبيه كذلك بالليغومين (Yamagate *et al.*,1982; Takaiwa *et al.*, 1986).

تعدُّ الغلوبيولينات المجموعة الأوسع انتشاراً من بين البروتينات الادخارية، فهي لا تقتصر على القرنيات (الفصيلة الفولية *Fabaceae*) بل توجد كذلك في أحاديات الفلقة بما في ذلك الحبوب والنخيل وفي أبواغ السراخس (Tempieman *et al.*,1987). يراوح محتوى البروتين في بذور القرنيات بين 20-25% وهو يفوق محتوى الحبوب منها (8-13%). من خلال دراسة محتوى بذور الفصة المزروعة *Medicago sativa* من البروتينات تبيّن أنها تضم ألبومينات وغلوبيولينات، ثم فصلت الغلوبيولينات بدورها إلى الفيسلين 7S Viclin والليغومين 11S legumin من خلال معرفة نقطة التعادل الكهربائي لكل منهما (Blair, E. H. *et al.*,1951). يبدي كلا النمطين من الغلوبيولينات اختلافاً ملحوظاً في البنية ينتج جزئياً عن عمليات ما بعد الترجمة post-translational processing (الحلمهة البروتينية proteolis وإضافة الغليكوز glycosylation) كما يفتقر كلاهما إلى الحموض الأمينية الحاوية عنصر الكبريت مثل السيستئين والميثيونين، مع الإشارة إلى أن الليغومين 11S يحوي مستويات أعلى –جزئياً- من هذه الحموض الأمينية.

بروتينات الليغومين 11S Legumins:

هي البروتينات الادخارية الأساسية في أغلب النباتات القرنية (الفصيلة الفولية) وكذلك في العديد من ثنائيات الفلقة مثل الفصيلة الملفوفية *Brassicaceae* والنجمية *Asteraceae* والقرعية *Cucurbitaceae* وفي بعض الحبوب مثل الشوفان والأرز. البروتينات الناضجة ذات وزن يراوح بين 300,000-400,000 كيلودالتون ويتألف من ست تحت وحدات مرتبطة بروابط ثنائية الكبريت (Derbyshire, Wright& Boulter, 1976)، يتألف كل منها من تحت وحدة حمضية ذات وزن يقارب 40,000 كيلودالتون وتحت وحدة أساسية وزنها 20,000 كيلودالتون (Boulter & Cropy, 1997). أشارت دراسة حديثة أجريت على غلوبيولين 11S في بذور القنب المسمى "edestin" إلى أن تحت الوحدات تترتب في

بنية خاتم مفتوح وتتجه بشكل متعاقب نحو الأعلى والأسفل في قرص يبلغ قطره Å145 وثخانته Å90 (Petal *et al.*,1994).

بروتينات الفيسيلين 7S Vicilins:

هي بروتينات سكرية glycoproteins توجد بشكل تريميرات trimers ذات وزن يراوح بين 150000 كيلودالتون و190000 كيلودالتون وكل تحت وحدة ذات وزن جزيئي يقارب 50000 كيلودالتون (Boulter & Cropy, 1997; Hall, McsLeester & Bliss, 1977) وهي تفتقد إلى ثمالات السيستئين؛ ولذلك لا يمكنها تشكيل روابط ثنائية الكبريت بين تحت الوحدات (Meng & Ma, 2001a; Tang, 2008). تختلف البنية التفصيلية لتحت الوحدات بشكل واضح، ويعود هذا بشكل أساسي إلى اختلافات في عمليات ما بعد الترجمة، الأمر الذي يسبب ارتفاع الأوزان الجزيئية لتحت الوحدات. ففي البازلاء يتم اصطناع تحت وحدات الفيسيلين بشكل مجموعات من عديدات الببتيد ذات الوزن 47000-50000 كيلودالتون، لكن عمليات ما بعد الترجمة قد تسبب ارتفاعاً في أوزان تحت الوحدات تلك (Gatehouse *et al.*,1984, Cysey *et al.*,1986,1993). حُدّدت البنية ثلاثية الأبعاد للعديد من الغلوبيولينات 7S مؤخراً بوساطة دراسة بلوراتها بالأشعة السينية x-ray crystallography حيث تظهر البروتينات بشكل تريميرات تشكل قرصاً قطره يعادل Å90 وثخانته تراوح بين 30-Å40 (Lawrence *et al.*,1990,1994; Ko *et al.*,1993).

تجدر الإشارة إلى أنه يمكن لبروتينات الليغومين والفيسيلين أن ترتبط مع بعضها مشكلة تريميرات وهكساميرات، هذا فضلاً عن وجود تشابه بين هاتين المجموعتين من البروتينات من حيث البنية الثالثية، وقد توصل باحثون إلى أنهما قد نشأتا من أصل بروتيني واحد (Shewry,P. *et al.*,1995).

في هذه الدراسة، اختيرت خمسة أنواع من الفصة *Medicago: M.sativa, M.rotata, M.arabica, M.hispida, M.polymorpha*، ولا يخفى على أحد ما يتمتع به هذا النبات من أهمية اقتصادية وزراعية.

لذا، هدف هذا البحث إلى:

- تعرّف أهم المجموعات البروتينية الموجودة في بذور الفصة مقارنة بغيرها من النباتات القرنية.
- دراسة علاقات القرابة بين أنواع الفصة المدروسة من خلال محتوى بذورها من البروتينات، نظراً إلى أنّ المحتوى البروتيني للبذور ثابت، وقد جرى اعتماده في كثير من البحوث التصنيفية (Fyad-Lameche, F. Z. *et al.*, 1996).

مواد البحث وطرائقه

أولاً- استخلاص البروتينات:

بعد الحصول على قرابة 50 بذرة لكل نوع من الأنواع الخمسة المدروسة، جرت عملية الاستخلاص وفق الخطوات الآتية:

- طحن البذور في هاون مع قليل من الرمل السيليسي حتى الحصول على مسحوق ناعم جداً.
- أخذ مسحوق البذور ووضع في أرلينة وأضيف إليه عشرة أمثال وزنه من محلول واقٍ منظم من البورات(pH10) مع إضافة بضع قطرات من محلول ثاني سلفيت الصوديوم $Na_2S_2O_3$ تركيزه 0.2% من أجل تثبيط أكسدة بقايا البولي فينولات التي قد تتفاعل مع البروتينات مؤثرة بذلك في لونها وجودتها (Elena Pastor-Cavada *et al.*, 2010).
- وضعت الأرلينة على هزازة (رجاج) مدة 20-30 دقيقة.
- ثفل محتوى الأرلينة بسرعة 4000 دورة/الدقيقة مدة 10 دقائق.
- صبت الرشاحة الحاوية بروتينات في وعاء زجاجي نظيف ونقل الراسب إلى أرلينة وأضيف إليه عشرة أمثال حجمه من المحلول الواقي المنظم البوراتي، وأعيد الاستخلاص من جديد باستخدام الهز والتثفيل.
- أضيفت الرشاحة الناتجة إلى الرشاحة السابقة وكررت عملية استخلاص البروتينات من الراسب عدة مرات للحصول على كامل المحتوى البروتيني تقريباً.

ثانياً- الترسيب والتنقية:

- رُسّبت البروتينات عند نقطة التعادل الكهربائي وهي 4.4-4.5 بالنسبة إلى بروتينات القرنيات (Pastor-Cavada, E. *et al.*, 2010) باستخدام حمض الخل10% في حمام مائي درجة حرارته 70°م.
- تم الحصول على البروتينات المترسبة بالتثفيل.
- رميت الرشاحة وغسل الراسب في أنابيب التثفيل بحمض الخل1% الذي يرمى بدوره بعد التثفيل.
- يجري حل البروتينات بوساطة محلول NaOH 0.2N الذي يسمح بانحلالية المجموعات البروتينية جميعها (Tang, Chuan-He *et al.*,2009)؛ وذلك في حمام مائي درجة حرارته 50°م مع التحريك المستمر حتى تمام الانحلال.

- § أضيف محلول حمض الخل مثلث الكلور50% إلى ترسيب البروتينات من جديد بحيث أصبح تركيزه في المحلول البروتيني 5%.
- § جرى الحصول على البروتينات المترسبة بالتثفيل ورميت الرشاحة.
- § غسل الراسب البروتيني بالأسيتون 80% عدة مرات وترك ليجف في درجة حـــرارة الغرفة.
- § حُفظ المسحوق البروتيني في درجة حرارة -20°م.

ثالثاً- المعايرة اللونية:

جرت المعايرة اللونية للعينات البروتينية بطريقة برادفورد(Bradford, 1976).

رابعاً- الرحلان الكهربائي:

قبل ترحيل العينات وُحّد تركيز العينات العائدة إلى الأنواع الخمسة المدروسة بحيــث رُحّل 30.4 µg/20µl من كل نوع.

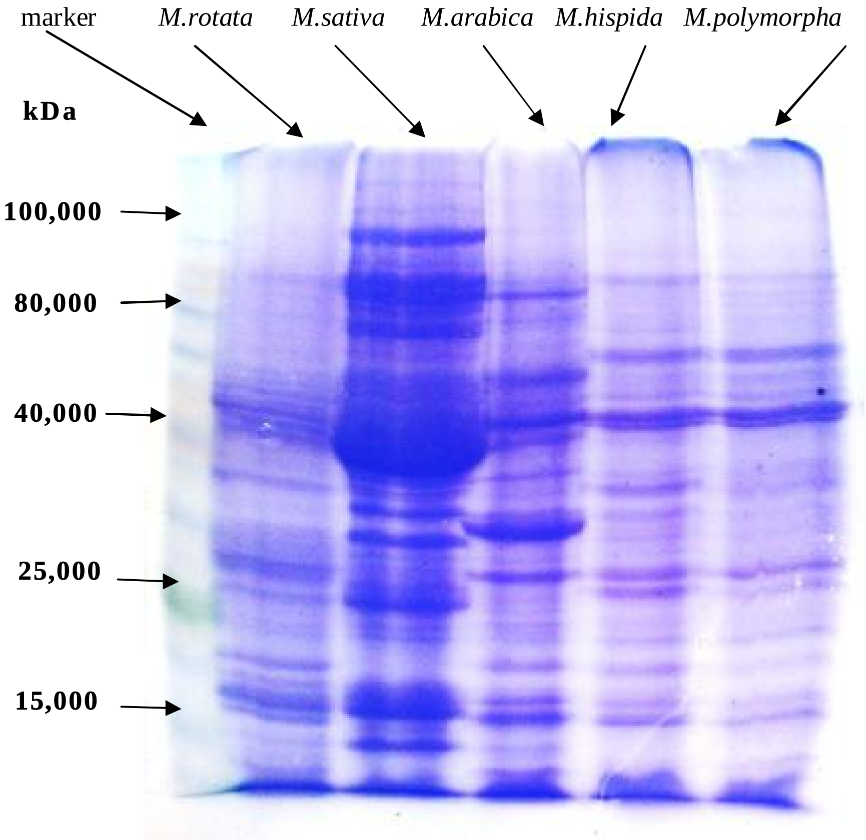
جرى الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد 30% SDS-PAGE لفــصل البروتينات وفقاً لأوزانها الجزيئية بحــسب Schägger and Von Jagow (1987) بعــد تطبيق تيار كهربائي شدته 120 أمبيراً.

نقلت الهلامة إلى محلــول مـــن أزرق الكوماســـي Coomassie bleu 0.2% لتلـــوين العصابات البروتينية الناتجة مدة ساعتين، ثم غمرت بمحلول مزيـِـل اللـــون (300 مـــل ميتانول، 100 مل حمض الخل الثلجي600 مل ماء مقطر) الذي غُيِّرَ عدة مـــرات حتـــى ظهور العصابات بشكل واضح.

النتائج والمناقشة

بدا واضحاً أن بروتينات بذور الفصة ذات خصائص شبيهة بالبروتينات الموجودة في بذور العديد من أنواع أخرى من القرنيات (الفصيلة الفوليـــة *Fabaceae*). فمـــن خـــلال عمليات الترسيب والتنقية لوحظ أن البروتينات بدأت بالترســـب عنـــد درجـــة حموضـــة 4.4-4.5، وهذا ما يتفق مع ما ورد في دراسة عن أنـــواع تعـــود إلـــى نبـــات الجلبـــان *Lathyrus* وأخرى إلى نبات الفاصولياء *Phaseolus* حيـــث وجـــد أن نقطـــة التعـــادل الكهربائي هي 4.5 (Pastor, E. 2010, Pereire,H., 2008, Chavan, McKenzie and Shaidi, 2001). كما وجد أن أفضل ذوبانية للمجموعات البروتينية المختلفة كانت ضمن مجال pH 9.5-10.5، وهذا ما أكده باحثون آخرون (Tang, Chuan-He *et al.*, 2009).

يوضح الشكل (1) نتائج الرحلان الكهربائي لبروتينات بذور أنواع الفصة المدروســـة.



الشكل (1) نتائج الرحلان الكهربائي للبروتينات البذرية على هلامة عديد الأكريلاميد.

بالنظر إلى الشكل (1) يمكن ملاحظة وجود عصابات بروتينية مشتركة بين الأنواع الخمسة المدروسة وظهور عصابات مميزة لبعض الأنواع، هذا فضلاً عن اختلاف ثخانة العصابات المشتركة.

يمكن تفسير نتائج الرحلان الكهربائي كما يأتي:

§ تعود العصابات ذات الأوزان الجزيئية التي تراوح بين 39-49 ألف كيلودالتون إلى عديدات ببتيدية تشكل تحت الوحدات الحمضية لبروتين الليغومين (Krocho and Bewley,1989)، وقد ظهرت هذه العصابات في الأنواع المدروسة جميعها بشكل جيد، لكنها وجدت بكميات أكبر بكثير في الفصة المزروعة *M.sativa*.

- تمثل العصابات ذات الأوزان 20، 23، 24 ألف كيلودالتون عديدات ببتيدية أساسية لبروتين الليغومين (Krocho & Bewley, 1989)، وقد ظهرت هذه البروتينات في الأنواع جميعها مع ملاحظة وجودها بكميات أكبر في الفصة المزروعة *M.sativa*.
- عزيت الأوزان المرتفعة (70-130) ألف كيلودالتون إلى بروتينات الفيسيلين نظراً إلى وجودها في الأنسجة البذرية بشكل تريميرات وهكساميرات عالية الأوزان الجزيئية (Tang, Chuan-He, 2008).
- تمثل العصابات ذات الأوزان الجزيئية التي تراوح بين 14-50 ألف كيلودالتون عديدات ببتيدية تعود إلى بروتين الفيسيلين (Krocho & Bewley, 1989)، كما عزيت العصابات ذات الوزن60 و63 ألف كيلودالتون إلى بروتين الفيسيلين (Derbyshire & Boulter, 1976) وقد تباينت طريقة ظهور هذه العصابات بين الأنواع الخمسة المدروسة.
- تمثل العصابات ذات الأوزان 11 ألف كيلودالتلون و15 ألف كيلودالتون ألبومينات حمضية تتألف من عديدات ببتيدية مرتبطة مع بعضها بروابط ثنائية الكبريت (Krocho & Bewley, 1989)، وقد ظهرت هذه البروتينات في الأنواع المدروسة جميعها.
- عزيت العصابات ذات الأوزان 17 ألف كيلودالتون و18 ألف كيلودالتون إلى تحت الوحدة β لمثبط α- أميلاز (Moreno, Altabella,& Chrispeels, 1990)، علماً أن مثبطات α- أميلاز هي بروتينات دفاعية تدافع عن النبات ضد الحشرات التي تتغذى على البذور الناضجة والجافة (Chrispeels and Raikhel, 1991). لم تظهر هذه البروتينات في النوعين *M.sativa, M.polymorpha*.

يبيّن الجدول (1) الأوزان الجزيئية للعصابات (مقدرة بألف كيلودالتون) العائدة إلى المجموعات البروتينية المختلفة في كل نوع على حدة، مع الإشارة إلى العصابات الثخينة بالخط العريض.

الجدول (1) الأوزان الجزيئية للعصابات البروتينية مقدرة بألف كيلو دالتون.

	M.polymorpha	*M.hispida*	*M.arabica*	*M.sativa*	*M.rotata*
ليغومينات حمضية	**42**،39	**45**،**42**	40،**39**	**39**	**45**
ليغومينات أساسية	20	20	23	**24**،**20**	24
فيسيلينات	،28،**25**،21،**14** 63،**60**	،31،**26**،**25**،**14** **63**،**60**	،**28**،**25**،**21**،**14** 65،**52**،47،33	،**56**،**30**،**21** **63**،62	،63،**28**،14 65
تجمعات من الفيسيلين	،104،98،78،70 110	،98،87،78 123،**110**	130،104،**98**	110،104،**83** 163،146،**130**	83،74،70 104،98،87
ألبومينات	15،11	15،11	11	15،11	15،11
مثبطات α- أميلاز	0	18	17	0	**18**،17

كما يمكن إجمال نتائج الرحلان الكهربائي لبروتينات البذور في الأنواع الخمسة المدروسة بالجدول (2).

الجدول (2) تعداد العصابات البروتينية العائدة إلى المجموعات البروتينية المختلفة.

	M.polymorpha	*M.hispida*	*M.arabica*	*M.sativa*	*M.rotata*
عدد عصابات الليغومين	3	3	3	3	2
عدد عصابات الفيسيلين	11	11	11	11	10
عدد عصابات الألبومينات	2	2	1	2	2
عدد عصابات مثبطات α-أميلاز	0	1	1	0	2
عدد العصابات الكلي	16	17	16	16	16

من خلال النتائج السابقة يمكن التوصل إلى الاستنتاجات الآتية:

§ من الواضح أن الغلوبيولينات هي المجموعات البروتينية المسيطرة على نتائج الرحلان في الأنواع المدروسة جميعها، في حين لوحظ ظهور ضعيف للألبومينات وبعض البروتينات الدفاعية مثل مثبطات α-أميلاز. ضمن الغلوبيولينات لوحظ تفوق بروتين الفيسيلين 7S(11 عصابة غالباً) على الليغومين 11S (3عصابات غالباً) وهذا يشبه -إلى حد كبير- ما توصل إليه Bickoff وزملاؤه (Bickoff, E.M. *et al.*,1972)، إذ تمكنوا من فصل بروتين الفيسيلين إلى 13 عصابة وبروتين الليغومين إلى 4 عصابات من خلال إجراء رحلان كهربائي لبروتينات بذور النوع *Medicago sativa* على هلامة عديد الأكريلاميد.

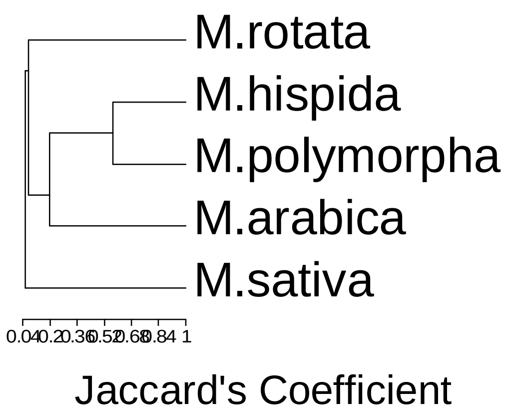
§ تفوقت الفصة المزروعة *M.sativa* من حيث الكم بشكل عام، حيث كانت العصابات البروتينية العائدة إليها الأكثر ثخانة مقارنة ببقية الأنواع. يمكن ربط هذه النتيجة بأنّ الفصة المزروعة هي النوع الوحيد المعمر، في حين أن بقية الأنواع المدروسة هي أنواع حولية (Hanson, C. H., 1972).

§ رغم وجود العديد من العصابات المشتركة، أمكن من خلال الرحلان الكهربائي لبروتينات البذور الحصول على نماذج profiles مميّزة للأنواع من خلال تفاوت الأوزان الجزيئية للعصابات الناتجة وتفاوت ثخانة العصابات ذات الوزن الجزيئي الواحد بين الأنواع. يمكن إيضاح ذلك بشيء من التفصيل:

- وجدت عصابات الليغومين الأساسية في الأنواع جميعها إلا أن كميتها كانت أكبر في النوع *M.sativa*.
- تميّز النوع *M.sativa* بظهور عصابة ثخينة وزنها الجزيئي 130000 كيلودالتون فضلاً عن العصابتين 146000 و163000 كيلودالتون بشكل أقل وضوحاً، وكلها تعود إلى بروتين الفيسيلين.

- تميّز النوع *M.rotata* بوجود عصابات باهتة لبروتينــات الفيــسيلين ذات الأوزان الجزيئية المرتفعة (أعلى من 70000 كيلودالتون)، وبوجود العــصابة ذات الــوزن 18000 كيلودالتون بشكل أوضح من باقي الأنواع التي عزيت إلى تحت الوحـــدة β من مثبطات α- أميلاز.
- تميّز النوع *M.arabica* بظهور واضح للعصابة ذات الــوزن 98000 كيلودالتــون والعصابة 28000 كيلودالتون، وكلاهما يعودان إلى بروتينات الفيسيلين الادخارية.
- أظهر النوعان *M.hispida, M.polymorpha* نموذجين متقاربين -إلى حد كبيــر- من حيث الأوزان الجزيئية للعصابات البروتينية مع اختلافات طفيفة في ثخانة هــذه العصابات.

لدراسة علاقة القرابة بين الأنواع الخمــسة، قمنــا باســتخدام برنــامج MVSP 3.1 (MultiVariate Statistical Package) وإجراء التحليل العنقــودي Cluster Analysis لنتائج الرحلان الكهربائي، فكانت النتيجة كالآتي:



الــشكل (2) شــجرة القرابــة بــين الأنــواع المدروســة بعــد إجــراء التحليــل العنقــودي cluster analysis.

بالنظر إلى الشكل (2) نلاحظ أن الأنواع الخمسة توزعت في أربع مجموعات تضم إحداها النوعين *M.hispida, M.polymorpha*، في حين مثل كل من الأنواع الثلاثة الباقية مجموعة مستقلة. يأتي هذا التقسيم منسجماً مع المعطيات المورفولوجية للأنواع المدروسة، حيث يبدي النوعان *M.hispida, M.polymorpha* تشابهاً مورفولوجياً كبيراً (Mouterde, P., 1983)، حتى أن النوع *M.hispida* من التسميات المرادفة للنوع *M.polymorpha* كما جاء في افلورا تركيا (Davis, P., H., 1970).

تتفق هذه الاستنتاجات مع ما أوردته دراسة تصنيفية عن أجناس قبيلة النفل *Trifolieae* في مصر، إذ رأى الباحثون أن النوع *M.sativa* يمثل مجموعة مستقلة؛ وكذلك الأمر بالنسبة إلى النوع *M.arabica*، في حين عُدَّ النوع *M.polymorpha* جزءاً من مجموعة تتضمن أنواعاً هي *M.minima, M.laciniata, M.coronata, M.aschersoniana* (Ahmad&Taia,1994).

كما أكدت دراسة تصنيفية عن أنواع الفصة الحولية "Medics" أن الرحلان SDS-PAGE لبروتينات البذور قد أعطى دلالات تصنيفية أفضل من اختبار أنزيمات allozymes، وأن نتائجه جاءت بالتوازي مع نتائج الاختبارات الوراثية للأنواع المدروسة (Fyad-Lameche,F.Z. *et al.*,1996).

التوصيات والمقترحات

- § ضرورة الاهتمام بدراسة المحتوى البروتيني للنباتات القرنية بشكل عام والعلفية بشكل خاص لأنّها تشكل قاعدة اقتصادية مهمة محلياً وإقليمياً.
- § محاولة رفع القيمة الغذائية للنباتات العلفية من خلال إيجاد سلالات ذات محتوى مرتفع من العوامل التغذوية مثل البروتينات والفيتامينات وإنقاص العوامل اللاتغذوية مثل مثبطات التربسين وα-غالاكتوزيدات الموجودة عادة في بذور القرنيات (Augustin and Klein, 1989).
- § تسليط الضوء على المحتوى البروتيني للبذور في الدراسات التي تعنى بالتنوع الحيوي على مستوى وراثي، وهذا ما أكده باحثون درسوا التنوع الوراثي ضمن النوع *Medicago truncatula* حيث أشارت الدراسة إلى حصول باحثين على 50 سلالة من خلال دراسة محتوى البذور من البروتينات، الأمر الذي سمح بإجراء اختبارات وراثية مؤكدة لهذه النتيجة (Signor, C. *et al.*, 2005).

REFERENCES المراجع

1. Ahmad, M.F. and Taia, W.K., 1994. Taxonomical Studies on the genus *Medicago* in Egypt. Journal of King Saud University, vol.6, pp. 167-180.
2. Amonosou, E., Tylor, J., Minnaar, A., 2011. Microstructure of protein bodies in Marama bean spieces. Food Science and Technology, No.44, pp. 42-47
3. Fyad-Lameche, F.Z., Bellatar, G., Bouabdallah, S., Yahia, N., 1996. Between and within species variation in annual *Medicago* species: The Genus *Medicago* in the Mediterranean Region- Current Study and Prospects in Research. Cahiers Options Méditerranéennes, vol.18, pp. 161-166.
4. Hanson, C. H., 1972. Alfalfa: science and technology. American society of Agronomy, vol.15, pp.56-59.
5. Herman, M. and Larkins, A., 1999. Protein Storage Bodies and Vacoules. The Plant Cell, vol.11, pp. 601-613.
6. Jezierny, D., Mosenthin, R., Bauer, E., 2010. The use of grain legumes as protein source in pig nutrition. Animal Food Science and Technology, No. 157, pp. 111-128.
7. Krocho, J. and Bewley, J., 1989. Identification and Characterization of the Seed Storage Proteins from Alfalfa (*Medicago sativa*). Journal of Experimental Botany. http://jxb.oxfordjournals.org/content
8. Kuo, Y., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J., Valverde, C., 2004. Effect of different germination conditions on the content of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. Food Chemistry, No. 86, pp. 537-545.
9. Ladizinsky, G. and Hymowitz, T., 1979. Seed Protein Electrophoresis in Taxonomic and Evolutionary Studies. Springer-Verlag, No. 54, pp. 145-151.
10. Matta, N.K., Singh, A., Kumar, Y., 2009. Manipulating seed storage proteins for enhanced grain quality in cereals. African Journal of Food Science, Vol.3, pp. 439-446.
11. Mouterde, P., 1983. Nouvelle flore du Liban et de la Syrie, Tom. 2, Dar El Mashreq, Beurouth, Lebanon.
12. Pastor-Cavada. E., Juan, R., Pastor, J., Vioque, J., 2010. Protein isolates from two Mediterranean legumes: *Lathyrus clymenum* and *Lathyrus annuus.* Chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chemistry, No. 122, pp. 533-538.
13. Pereire, H., Saraiva, K., Carvalho, L., Andrade, L., Pedrosa, C., Pierucci, A., 2008. Legumes seed in the production of ascorbic acid microparticles. Food Research International, No. 42, pp. 115-121.
14. Shewry, R., Napier, J., Tatham, A., 1995. Seed storage Proteins: structures and Biosynthesis. The Plant Cell, vol.7, pp. 945-956.
15. Signor, C., Gallarado, K., Prosperi, J.M., Salon, C., Quillien, L., Thompson, R., Duc, G., 2005. Genetic diversity for seed protein composition in *Medicago truncatula*. Plant Genetic Resources, vol.3, pp. 59-71.

16. Tang, Chuan-He, 2008. Thermal denaturation and gelation of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus* legumes: A comparative study. Food Science and Technology, No. 41, pp. 1380-1388.

17. Tang, C., Sun, X., Yin, S., 2009. Physiochemical, fuctional and structural properties of vicilin-rich isolates from three *Phaseolus* legumes: Effects of heat treatment. Food Hydrocolloids, No. 23, pp. 1771-1778.

18. Davis, P., H., 1970. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol.3, Edinburg University Press.