Bull. Fac. Agric., Cairo Univ.,53 (2002):411-426.

COMPARATIVE STUDY ON STORAGE PROTEINS OF OLIVE SEEDS *Olea europea* AND OLEACEAE

(Received: 4.12.2001)

By
M. K. Sousow

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Damascus University , Syria

ABSTRACT

Among the storage proteins in olive seeds, an abundant glycoprotein with MW of 49.2 kDa (GP50) is considered a homopolymer which is dissociated in the presence of detergent SDS in non- reducing conditions and constitutes about 10% of these proteins (Sousow, 2001).

In the present study, this protein was purified by preparative electrophoresis after deglycosylation of oligosaccharides moieties by a chemical method in order to prepare an immunsera. The carbohydrate moiety of GP50 was analysed. It contained galactose, xylose, mannose and N-acetyl-glucosamine residues in a ratio of 2.5: 2: 3: 2.

The preparation of antibodies specific for GP50 permited the immunochemical caracterization of this protein.

There was a strong homology in the polypeptides composition of storage proteins from seeds of different olive cultivars of *Olea europea*. However, antibodies specific for GP50 were immunodetected polypeptides specific for spanish varieties. Proteins of similar molecular weights and antibodies related to GP50 were immunodetected in all Oleaceae seeds examined.

***Key words**: oleaceae, Olea europea, olive seeds, storage proteins.*

دراسة مقارنة للبروتينات المخزنة في بذور أصناف مختلفة من الزيتون *Olea europea* وبذور أنواع مختلفة من الفصيلة الزيتونية Oleacaea

مواهب خالد السوسو

قسم البساتين – كلية الزراعة– جامعة دمشق – سوريا

ملخص

يوجد من بين البروتينات المخزنة في بذور الزيتون جليكوبروتين وفير (يمثل حوالي ١٠% من هذه البروتينات) ذو وزن جزيئي 49.2 kDa (كيلو دالتون) يسمى (GP50) وهو مكوّن من ببتيدات عديدة متجانسة وينفصل إلى مكوناته الرئيسية في وجود عامل استحلاب detergent (SDS) في وسط غير مختزل (Sousow, 2001). لقد تمّ استخلاص وتنقية هذا الجليكوبروتين بواسطة طرق التفريد الكهربائي التحضيري electrophoresis preparative والإحلال الكهربائي Electroelution بغرض تحضير أجسام مضادة له antibodies وذلك بعد إزالة الجزء السكري منه كيميائياً. كما تمّ تنقية وتحليل الجزء السكري المرتبط بهذا الجليكوبروتين حيث تبين أنه مكوّن من الجالاكتوز, الزيلوز, المانوز ون-أستيل جلوكوز أمين بالنسب ٢,٥ : ٢ : ٣ : ٢ على التوالي. كذلك فإن تحضير هذه المضادات anti-GP50 سمح لنا بالتوصيف المناعي الكيميائي immunochemical characterization لهذا البروتين حيث تبين أن تركيب الببتيدات المتعددة فى البروتينات المخزنة في بذور أصناف مختلفة Cultivars من الزيتون *Olea europea* أظهر تجانساً كبيراً. كذلك وبفضل استخدام هذه المضادات أمكن تمييز ببتيدات عديدة خاصة بالأصناف الأسبانية المدروسة.

من ناحية أخرى, فالببتيدات العديدة ذات الأوزان الجزيئية المتقاربة كان لها مقاطع ببتيدية epitopes مشتركة مع GP50 حيث لوحظت في جميع بذور الأنواع المدروسة والتابعة للفصيلة الزيتونية Oleaceae.

١. مقدمة

استخدمت طرق التفريد الكهربائي Electrophoresis والكشف بواسطة النقل المناعي Immunoblotting بصورة واسعة في دراسة البروتينات المخزنة في البذور النباتية Daussant and Skakoun, 1983 and Krishna and Mitra, 1987) أمكن بهذه الطرق الكشف عن التشابه في تركيب

البروتيـــنات المخزنة لبذور منحدرة من أنواع نباتية مختلفة (James and Fairbrothers, 1983 and Mimouni, 1989).

كمـــا وجـــد أن الكشف عن تفاعل مناعي كامل أو جزءي بين جسمين غريبيـــن antigenes يعكس تواجد مقاطع مشتركة بينهما, هذه المقاطع تتوافق مـــع تـــتابع ببتيدي أو سكر أوليجو ذو بنية متماثلة أو متقاربة. لقد استخدمت دراسة التشابه في التركيب بهذه الطريقة من الكشف منذ وقت طويل في مجال التصـــنيف النباتـــي بمساعدة الصفات المناعية لتحديد التقارب بين الأصناف (Alston and Turner, 1963 and Harbone *et al.*, 1971) . والجدير بالذكر أنه كلما كان التفاعل المتصالب بين صنفين معينين أكثر تعدداً ووضوحاً, كلما كان هذان الصنفان متقاربان على لائحة التصنيف النباتي.

ولقـــد تمّ تحديد الفصيلة الزيتونية للمرّة الأولى عام ١٨٠٩ من قبل العالم Hoffmannsegg *et al.* (1809) ومساعديه, إذ تحتوي على ٣٠ جنس genus تقريباً و٦٠٠ نوع species تتوزع على مساحة جغرافية واسعة. قسمت فيما بعـــد هـــذه الفصـــيلة إلى تحت فصيلتين: الزيتونية Oleoidees والياسمينية Jasminoidees وإلـــى سبعة عشائر tribes وذلك إثر دراسة خلوية وراثية مـــن قـــبل Taylor عـــام ١٩٤٥. وفي دراسة حديثة اقترحت دراسة تكوّن وتطور الأنسال phylogenetic والتي تعتمد على تحليل تتابع الحمض النووي DNA (Wallander and Albert, 1999) كتصـــنيف جديـــد لهذه الفصيلة. تغاضى هذا التصنيف عن مستوى تحت الفصائل وبيّن أن هذه الفصيلة تتكون مـــن ٢٤ جـــنس وخمســـة عشـــائر هـــي: Fontanesiees, Forsythiees, Myxopyrees, Jasminees and Oleaees.

تم في هذه الدراسة استخدام الطرق المذكورة أعلاه بهدف:

- مقارنـــة البروتيـــنات المخزنة في بذور أصناف مختلفة من الزيتون *Olea europea* ودراسة إمكانية تعرّف (تفاعل) المضادات anti-GP50 الخاصة بالبروتيـــن ذي الـــوزن الجزيئي 50 kDa والموجود في الصنف الفرنسي Tanche علـــى البروتينات المخزنة الموجودة في هذه الأصناف: Luques صـــنف فرنســـي, Lecchino صـــنف إيطالـــي و Verdal, Picual, Hojiblanca أصناف أسبانية.
- مقارنـــة البروتينات المخزنة في بذور أنواع مختلفة من الفصيلة الزيتونية ودراسة إمكانية تعرّف (تفاعل) المضادات anti-GP50 الخاصة بالزيتون علـــى البروتينات المخزنة الموجودة في هذه الأنواع: الدردار *Fraxinus excelsior*, زهـــرة الـــثلج *Chionanthus virginicus L.*, الليغســـتروم *Ligustrum japonica*, الـــليلك *Syringa vulgaris L.*, وكلها من تحت الفصيلة الزيتونية, بالإضافة إلى النوع الفونتانيزيا *Fontanesia fortunei Carr.* الذي يتبع تحت الفصيلة الياسمينية.

ونظـــراً لقلـــة الأبحاث حول العلاقات المناعية immunologic بين أنواع الزيتون وأصناف الفصيلة الزيتونية فإننا سنناقش النتائج بالمقارنة مع ماعُرف عن دراسة البروتينات المخزنة في بذور أنواع وفصائل نباتية أخرى.

٢. المواد المستخدمة وطرق العمل

٢-١. المـــواد المســـتخدمة والكـــيماويات: تمّ استيراد بذور أصناف الزيتون المســـتخدمة فـــي هذا العمل من مدينة مدريد بأسبانيا عن طريق مركز Conseil Oleicole International. أمـــا بذور أنواع الفصيلة الزيتونية فتمّ استقدامها من شركة Societe Sandeman Seeds(GB) بفرنسا. بينما كان مصدر الكيماويات المستخدمة هو شركة Sigma الأمريكية.

٢-٢. الـــتفريد الكهربائـــي للبروتيـــنات: استخدمت طريقة التفريد الكهربائي Electrophoresis (SDS-PAGE) الموصوفة من قبل Laemmli(1970), أمـــا طـــريقة الـــنقل الكهربـــي Electrophoretic transfer (blotting) للبروتيـــنات المفصـــولة على جيل الأكريلاميد بطريقة SDS-PAGE إلى غشـــاء سيليلوزي خاص فتمت وفقاً لطريقة (Sousow, 1992 and 2001) ,طـــريقة الكشـــف عن طريق النقل بالتآلف Affinoblotting مع الليكتين ConA/peroxidase فهـــي كما ذُكرت من قبل (Laine and Faye,1988) أمـــا طريقة الكشف المناعي عن طريق النقل المناعي Immunoblotting *بمساعدة المضادات anti-GP50 والمضادات الخاصة بالسكريات الأوليجو* فقد تمت وفق طريقة(Faye *et al.*, 1993).

٢-٣.الإحلال الكهربي للبروتينات من الجيل Electroelution of proteins: يـــتم اقتطاع البروتين المطلوب من الجيل, بعد تلوينه, بمساعدة شفرة خاصة ثـــم يقسم إلى مكعبات صغيرة تعامل بعد ذلك على درجة حرارة ١٠٠م لمدة ٣ دقائق ضمن محلول منظم يتكون من Tris-HCl 10 mM, pH 7.0, SDS 2.5%, EDTA1 mM and sucrose 10% , ثـــم توضـــع فـــي جهـــاز الاستخلاص المخصص لذلك تحت تأثير تيار كهربائي مقداره 110V طوال الليل. تهاجر البروتينات المشحونة والمستخلصة من الجيل عبر غشاء خاص وتدخـــل فـــي مكان خاص بها حيث يمكن ترسيبها بواسطة ١٠%من ثالث كلـــورو حمض الخليك TCA على درجة حرارة ٤م لمدة ساعتين وتُغسل ٣ مـــرات بالأســـتون (تركـــيز ٩٠%), ولمعرفة مدى نقاوة هذه البروتينات. تم اســـتخدام طريقة التفريد الكهربائي SDS-PAGE لتفريدها لأنواعها المختلفة ثم تخزن على درجة حرارة -٢٠م في شكل عينات صغيرة.

٢-٤. **الجـزء السـكري من تركيب الجليكوبروتين:** تم التعرف على تركيب الجـزء السـكري للجليكوبروتيـنات طبقاً للطريقة المذكورة من قبل Chaplin and Kennedy (1994).

٢-٥. **إزالة الجزء السكري من الجليكوبروتينات Deglycosylation :** تمت إزالـة الجـزء السـكري كيميائـياً باسـتخدام مركـب TFMS (Trifluoromethanesulfonic acide) وفقاً لطريقة(Edge *et al.*, 1981). ولاختـبار مـدى نجاح هذه الطريقة أجريت نفس الخطوات السابقة على جليكوبروتين قياسي نقي.

٢-٦. **تحضـير المضـادات antibodies:** تـمّ تحضـير الأمصال المناعية immunsera ضد GP50 في جسم أرنب وفق طريقة العالم Harboe and Ingild (1983) ثم خزنت في كبسولات صغيرة على درجة _٢٠م.

٣. النتائج

٣-١. GP50 وتحضير المضادات الخاصة به:

GP50 هو عبارة عن جليكوبروتين وفير يتواجد في بذور الزيتون, يتكون الجـزء السـكري مـنه علـى الأقـل مـن سلسلتين من السكرات الأوليجو oligosaccharides, الأولى من نموذج مانوزي قابل للتفاعل مع الـ ConA, والثانـية مـن نمـوذج معقـد تحـتوي علـى Xyloseβ1-2 والتركيـب $ManXyl(GlcNAc)_2$ (Sousow, 2001).

وباسـتخدام طريقة التفريد الكهربائي ومن ثمّ الإحلال الكهربي للبروتينات مـن الجيل Electroelution أمكن الحصول على مادة بروتينية GP50 ذات نقـاوة عالـية وبكمـية كافـية (الشكل-١, العمود ٢) لتحليل وتوصيف هذا الجليكوبروتين وتحضير المضادات الخاصة به (anti GP50).

هـذا وقـد بُرهن سابقاً بأن سلاسل السكرات الأوليجو في الجليكوبرتينات النباتية تكون متشابهة وراثياً (Faye and Chrispeels, 1988), وهذا يعني أن الأمصال المناعية immunsera المحضرة ضد الجليكوبرتينات النباتية تحتوي فـي أغلـب الأحـيان على مضادات نوعية anticorps ذات تركيب سكري مشـترك بين سلاسل السكرات الأوليجو النباتية. هذه المضادات هي المسؤولة غالـباً عـن التفاعلات المتصالبة بين الجليكوبروتينات النباتية (Laine and Faye, 1988), لـذا كـان لابدّ من إزالة الجزء السكري من بنية الـ GP50 النقـي قبل تحضير المضادات الخاصة به, وتمّ ذلك كيميائياً باستخدام مركب TFMS الـذي يـزيل السلاسل السكرية مهما كان نوع الرابطة التي تربطها بالجزء البروتيني للجليكوبروتين المعالج (Edge *et al.*, 1981).

ولكي يتم التحقق من نتائج عملية إزالة الجزء السكري deglycosylation من الـ GP50 أجريت طريقة التفريد الكهربائي ثمّ الكشف عن طريق النقل بالتآلف والنقل المناعي affino- and immuno-blotting لهذا الجليكوبروتين, أظهرت النتائج الممثلة في الشكل ٢ أنه بعد المعالجة بمركب TFMS, لم يعد الليكتين ConA يتعرف على GP50 (الشكل 2B – العمود ٢), ولاحتى المضادات الخاصة بالسكرات الأوليجو المحضرة بطريقة (Faye *et al.*, 1993) لم تتعرف على هذا الجليكوبروتين بطريقة الكشف المناعي (الشكل 2C – العمود ٢). وبذلك تكون قد أزيلت جميع السلاسل السكرية والمُتعرف عليها بطرق الكشف المذكورة آنفاً. وبمقارنة مسافة التفريد الكهربائي بـ SDS-PAGE قبل إزالة السكرات (الشكل 2A– العمود ١) وبعد إزالتها (العمود ٢) نستطيع أن نستنتج أن الجزء البروتيني لـ GP50 له وزن جزيئي ظاهري يُقدر بحوالي 46 kDa وبالتالي فإن للجزء السكري المُستبعد وزناً جزيئياً يُقدر بحوالي 3.2 kDa , أي مايعادل ٦,٥% من الوزن الجزيئي الكلي لهذا الجليكوبروتين.

بعد تنقية GP50 وإزالة الشق الكربوهيدراتي منه, تمّ تحضير المضادات الخاصة به anti-GP50 بعد حقنه في جسم أرنب. تسمح هذه المضادات بتطبيق طريقة الكشف المناعي على غشاء سيليلوزي لهذا الجليكوبروتين الطبيعي ذي الوزن الجزيئي 50 kDa والمُزال منه الجزء السكري ذو الوزن الجزيئي 46 kDa. وأظهرت النتائج أن هذه المضادات لم تتعرف إلا على هذا الجليكوبروتين من بين كل بروتينات بذور الزيتون. وبالحصول على GP50 بنقاوة وبكمية كافية تمكنّا من تحديد تركيب الجزء السكري له إذ تبين أنه مكوّن من جالاكتوز, زيلوز, مانوز ون-أستيل جلوكوز أمين بالنسب ٢,٥ : ٢ : ٣ : ٢ على التوالي. يُعتبر هذا التركيب الغني بالزيلوز نادر الوجود في الجزء السكري من أصل نباتي.

٣-٢. تحليل البروتينات المخزنة ومقارنتها في بذور أصناف مختلفة من الزيتون *Olea europea*

يُعتبر النوع *Olea europea* الأكثر عدداً واختلافاً من بين أنواع الفصيلة الزيتونية طبقاً لما ذكره العالمان (Loukoas and Krimbas, 1983). تمّ تحضير العينات البروتينية للتحليل بطريقة التفريد الكهربائي حسب الطريقة المذكورة من قبل (Sousow, 2001).

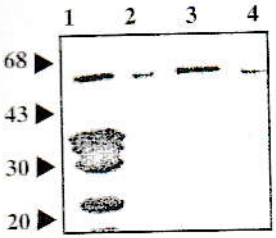
بتحليل بروتينات بذور صنف الزيتون Tanche (يعتبر هذا الصنف بمثابة مرجع لباقي الأصناف)، وباستخدام طريقة SDS-PAGE في حالة غياب العامل المختزل ME وجد أن هذه البروتينات تتكون من ٣ مجموعات (وحدات)رئيسية A,B,C أوزانها الجزيئية هي 58 - 60 , 53-56, 49-50 kDa

علـــى التوالي. هذا بجانب وجود مجموعتين (وحدتين) أخرتين من البروتينات أقل أهمية هما D, E وزنهما الجزيئي 45 و 16-18 kDa على التوالي ظهرتا أيضـــا (الشكل-3 عمود ٢) . أما في وجود العامل المختزل ME (العمود ١) فقـــد لوحظ غياب تام للمجموعتين A و B وكذلك D و E لتظهر مجموعة ببتـــيدات عديدة أمكن تقسيمها إلى تحت مجموعتين β , α تختلفان بوزنهما الجزيئـــي الذي يبلغ في المتوسط 33 kDa و 22 kDa على التوالي. ظهرت كذلـــك بعض الببتيدات العديدة ذات أوزان جزيئية منخفضة أقل من 15 kDa تحـــت هذه الظروف (العمود ١). أما المجموعة C فقد أظهرت وزنا جزيئيا واحـــدا (49.2 kDa) في وجود أو غياب العامل المرجع, وقد تبين أنه عبارة عن جليكوبروتين وهو ماأعتبر باسم GP50 (Sousow, 2001).

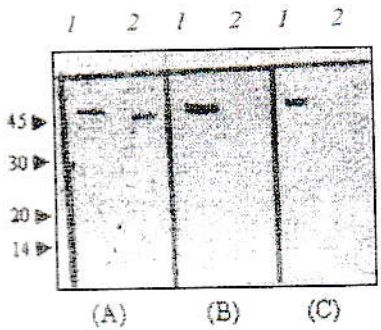
هـــذا وقد لوحظ وجود تشابه كبير في توزيع وحدات البروتين بعد التفريد الكهربائـــي, عـــند مخـــتلف الأصناف المدروسة بغياب العامل المختزل ME (الشكل-4A) أو بوجوده (الشكل- 4B), مع ماوجد في الصنف Tanche وأنه وجـــدت بعض الاختلافات البسيطة, على وجه الخصوص في بعض الأصناف الأســـبانية Picual, Hojiblanca التـــي انفـــردت ببعض الصفات التي تسمح بتميـــيزها عن غيرها, حيث لوحظ وجود ببتيدين عديدين ذات أوزان جزيئية 28, 36 kDa (الشكل 4A) فقط في الصنفين المذكورين سابقا.

أجريـــت من ناحية أخرى, مقارنة بين الببتيدات العديدة للصنف Tanche وتلـــك الخاصـــة بالأصناف الأخرى التابعة للجنس *Olea europea* باستخدام طـــريقة الكشف المناعي وذلك بمساعدة المضادات التي تم تحضيرها (anti-GP50) مـــن الصـــنف Tanche. يبيـــن (الشكل 4C) أن مختلف الأصناف المدروســـة تحـــتوي على ببتيد عديد ذى وزن جزيئي 50 kDa, والذي يُظهر تفـــاعلا إيجابـــيا مـــع المضادات المذكورة. بالإضافة إلى ذلك ففي الصنفين الأســـبانيين Picual و Hojiblanca تعرفـــت هذه المضادات بشكل جيد على الببتيديـــن العديديـــن المذكورين سابقاً 28,36 kDa وكذلك على الببتيد العديد الأخـــر ذي الـــوزن الجزيئي20 kDa . وعلى هذا فإن هذه الببتيدات العديدة تحتوي على مقاطع مشتركة ومتشابهة مع GP50. وتجدر الإشارة هنا إلى أن الببتيديـــن العديديـــن 28,36 kDa يـــتواجدان بوفرة في هذين الصنفين وتمّ الكشف عنهما بطريقة التفريد الكهربائي.

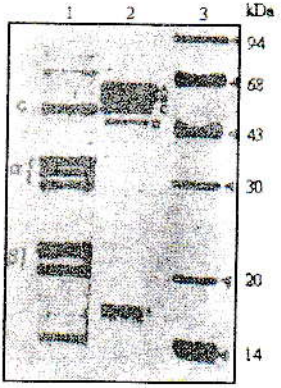
لهذا وبشكل عام, فإن البروتينات المخزنة في مختلف الأصناف المدروسة تظهـــر نفس المكونات الببتيدية العديدة, حيث توجد بعض الصفات التي تسمح بتمييز بعض الأصناف, كما سبق ذكره في حالة الأصناف الأسبانية Picual و Hojiblanca التي تحتوي على ببتيدات عديدة 20,28,36 kDa حيث أظهرت تشـــابهاً في التركيب مع الجليكوبروتين GP50 الموجود في الصنف الفرنسي Tanche.



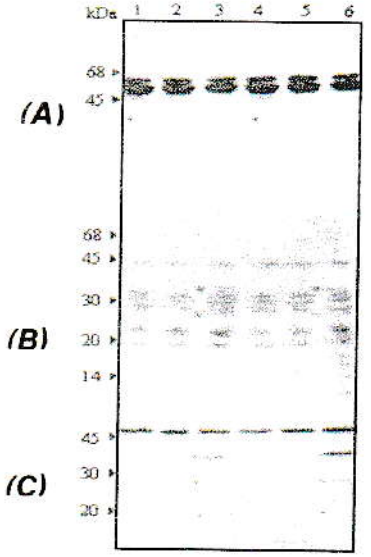
الشـــكل (١): مراقـــبة نقاوة GP50 وخصوصية المضادات المحضرة ضده.
حُلّلـــت البروتيـــنات الكلـــية المخزنة لبذور الزيـــتون وكذلـــك GP50 النقـــي بالـــتفريد الكهربائي electrophoresis (العمود ١ و ٢) ثـــم بطـــريقة الكشـــف المناعي باستخدام anti-GP50 (العمود ٣ و ٤).
يمـــثل العمـــود ١ و ٣ البروتينات المخزنة في الزيتون والعمود ٢ و ٤ يمثل GP50 النقي.



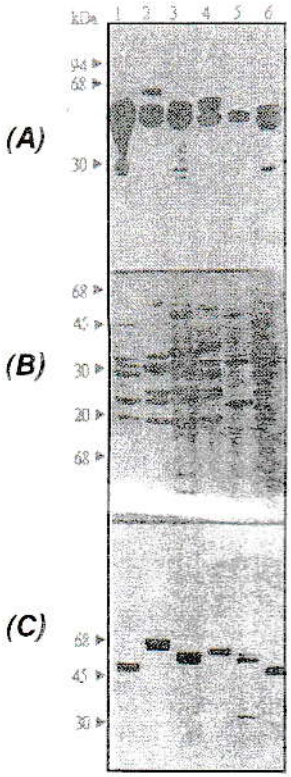
الشكل (٢): إزالة الجزء السكري من GP50 كيميائـــياً بمســـاعدة المركـــب TFMS.
GP50 النقي (العمود ١) تمّ إزالة الجزء الســـكري مـــنه (العمـــود ٢) ثـــمّ بالـــ electrophoresis (الجزء A) ثم بتقنية الكشـــف affinoblotting بواســـطة ConA/peroxidase (الجـــــزء B) وأخـــيراً بتقنـــية الكشـــف المناعـــي immunoblotting باستخدام المضادات الخاصـــة بالسلاســـل السكرية المحتوية على بقايا سكر الزيلوز.



الشـــكل (٣): فصـــل البروتيـــنات المخزنة لبذور الزيتون بطريقة التفريد الكهربائي.
تمّ التحليل بغياب (العمود ٢) أو بحضور (العمود ١) العامل المـــرجع ME, العمود ٣ يمثل الأوزان الجزيئية لبروتينات تجارية معروفة.



الشكل (٤): تحليل بروتينات التخزين لبذور أصناف مختلفة من الجنس *Olea europea* بتقنـــية الـــتفريد الكهربائـــي بغياب (الجزء A) أو بحضور (الجزء B) العـــامل المـــرجع, ومـــن ثمّ بتقنية الكشـــف المناعي بالمضادات anti-GP50 (الجزء C).
الأصـــناف المدروسة: ١- Tanche, ٢- Verdal, ٣- Hojiblanca, ٤- Lecchino, ٥- Lucques, ٦- Picual.



الشـــكل (٥): تحلـــيل بروتينات التخزين لبذور أنواع مخـــتلفة مـــن الفصيلة الزيتونية Oleacea بتقنـــية الـــتفريد الكهربائـــي بغياب العامل المختزل(الجزء A) أو بحضوره (الجزءB), ومـــن ثمّ بتقنية الكشف المناعي بالمضادات anti-GP50 (الجزء C).

الأنواع المدروسة: ١- الزيتون *Olea europea*,

٢- الـــــدردار *Fraxinus excelsior*,

٣- اللـــــيلك *Syringa vulgaris* L.

٤- الليغســـتروم *Ligustrum japonica*,

٥-الفونتانـــيزيا *Fontanesia fortunei*

٦- زهرة الثلج *Chionanthus virginicus* L., Carr.

٣-٣. مقارنـــة البروتيـــنات المخـــزنة في بذور أنواع مختلفة من الفصيلة الزيتونية:

تـــمّ تحلـــيل البروتينات المخزنة لبذور أنواع مختلفة من الفصيلة الزيتونية بطـــريقة التفريد الكهربائي في غياب العامل المختزل ME (الشكل- 5A) أو فـــي وجـــوده (الشـــكل- 5B), ففي وجود هذا العامل لوحظ ا) غياب بعض الوحـــدات البروتينية ذات الوزن الجزيئي الأعلى من ٥٠ كيلودالتون والمكونة للمخـــزون البروتينـــي فـــي بـــذور الأنـــواع المختلفة المدروسة. ب) ظهور مجموعتين من الببتيدات العديدة α و β اللتين تختلفان أساساً بأعدادها وأوزانها الجزيئية. كما لوحظ أن التوزيع البروتيني لهذه الببتيدات العديدة أظهرت تبايناً قويـــاً في كل الأنواع المدروسة, ففي بذور الليلك (العمود ٣), اللغستروم (٤) وزهـــرة الـــثلج (٦) تـــتكون المجموعـــة α من ثلاثة ببتيدات عديدة, كما في الزيتون, وتنحصر أوزانها الجزيئية بين ٣١ و ٣٩ كيلودالتون (الشكل 5B), في حين أنه في بذور الدردار (٢) والفونتانيزا (٥) تتكون هذه المجموعة من ببتيدين عديدين من نفس الوزن الجزيئي تقريباً ٣٢,٥-٣٣ كيلودالتون وآخر

ذى وزن جزيئـــي ٣٦,٥ كيلودالـــتون. كذلـــك لوحظ وجود ببتيد واحد يشكل المجموعة β ظهر نتيجة التحليل في النوع فونتانيزا حيث كان ذو وزن جزيئي ٢٣,٥ كيلودالتون (الشكل- 5B , العمود ٥) في حين أن هذه المجموعة مكونة من ٣ ببتيدات عديدة عند باقي الأنواع المدروسة حيث تتباين فيما بينها بشدة بأوزانها الجزيئية التي تتراوح بين ٢٠ و ٢٦,٥ كيلودالتون.

تـــمّ مـــن ناحـــية أخرى الكشف عن الببتيدات العديدة ذات أوزان جزيئية مساوية أو أعلى من ٥٠ كيلودالتون عند جميع الأنواع المدروسة. تختلف هذه الأنـــواع في عدد الببتيدات المتعددة وأوزانها الجزيئية التي تتراوح بين ٥٠ كيلودالتون في زهرة الثلج (٦) و٦٤ كيلودالتون في الدردار (٢) (الشكل B). وبمقارنـــة كـــثافة التلوين على جيل الأكريلاميد SDS-PAGE ظهر أن هذه الببتـــيدات العديدة تكون أقل تواجداً من تلك المكونة للمجموعات α وβ عند جمـــيع الأنـــواع المدروسة. وعند استخدام المضادات anti-GP50 الخاصة بالزيتون أمكن تحديد التشابه بين هذا الببتيد العديد في النوع *Olea europea* وبعض الببتيدات العديدة المنحدرة من باقي أنواع الفصيلة الزيتونية.

وباســـتخدام طـــريقة الكشـــف المناعـــي بمساعدة المضادات anti-GP50 للبروتينات المخزنة المفصولة لمختلف الأنواع المدروسة كما في الشكل (5C) نجد أن هذه المضادات قد تعرفت على الببتيد العديد ذى الوزن الجزيئي مماثل ٥٠ كيلودالـــتون في زهرة الثلج (العمود ٦), أما عند باقي الأنواع المدروسة فالببتيدات العديدة المُتعرف عليها لها أوزان جزيئية أعلى من ذلك. فمثلاً الليلك (٣) هناك ببتيدان عديدان ٥٤ و٥٨ كيلودالتون, في حين أن الدردار (٢) ثلاثة ببتيدات عديدة متراصة من ٦٠, ٦٢ و٦٤ كيلودالتون تمّ التعرف عليها, وفقط ببتيد عديد واحد ذو وزن جزيئي ٦٠ كيلودالتون عند الليغستروم (٤). وأخيراً عند الفونتانيزا التابعة لتحت الفصيلة الياسمينية تم الكشف عن ببتيد عديد وفير ذى وزن جزيئـــي ٥٤ كيلودالـــتون بواسطة المضادات anti-GP50 وكذلك ببتيدين عديدين آخرين أقل تواجداً هما ٥٨ و ٢٢ كيلودالتون.

٤. المناقشة

GP50 عبارة عن جليكوبروتين رئيسي يتواجد بنسبة ١٠% من البروتينات المخـــزنة فـــي بـــذور الزيتون, يتكون الجزء السكري فيه من نموذجين من الســـكرات الأوليجو, الأول يحتوي على سكر مانوز والآخر يحتوي على عدة سكرات منها الزيلوز (Sousow, 2001).

ولفصـــل هـــذا الجليكوبروتيـــن استخدمنا طريقة فصل البروتينات بالتفريد الكهربائـــي Electrophoresis كمرحلة تحضيرية ثمّ إحلال هذا البروتين من الجيل كهربائياً Electroelution. هذه الطريقة سمحت لنا بالحصول على كمية

كافية ونقية من البروتين لتحضير المصل Immunsera الخاص به.

الجدير بالذكر وطبقاً لما ذكره العلماء (Feizi and Childs, 1988 and Faye and Chrispeels, 1988) فإن الأجزاء السكرية المرتبطة بالبروتينات النباتية أو الحيوانية هي مكونات مرتبطة مناعياً وتتفاعل إيجابياً مع بعضها البعض. لهذا السبب تمّ إزالة الجزء السكري المرتبط بـ GP50 كيميائياً بواسطة المركب TFMS قبل تحضير المضادات, سببت هذه الإزالة انخفاضاً بسيطاً في الوزن الجزيئي من ٤٩,٢ إلى ٤٦ كيلودالتون, بالتالي فإن هذا الجزء السكري (٣,٢ كيلو دالتون) يشكل حوالي ٦,٥% من الكتلة الكلية لهذا الجليكوبروتين.

تبيّن بالتحليل الكيميائي للسكرات المكونة لهذا الجزء السكري أنه مكون من الجالاكتوز, الزيلوز, المانوز ون-أستيل جلوكوز أمين بالنسب ٢,٥ : ٢ : ٣ : ٢ على التوالي, لذا فهو غني بالزيلوز, وفي المقابل فإنه لايحتوي على فيكوز. يعتبر التركيب نادر الوجود لجليكوبروتين نباتي.

وقد سمح لنا تحضير المضادات anti-GP50 باستخدام طريقة الكشف المناعي لعمل دراسة مقارنة بين البروتينات المخزنة في بذور أصناف مختلفة من الزيتون *Olea europea* وأنواع مختلفة من الفصيلة الزيتونية Oleaceae.

وتعتبر البروتينات من العلامات الهامة للتصنيف النباتي طبقاً للعلماء (Johansson and Hillebrand, 1969 and Dickerson, 1972). كما أن البذور الناضجة تشكل مادة جيدة لدراسات التصنيف حيث أنها تشتمل على كمية كبيرة من البروتينات بمرحلة من التطور سهلة المنال (Levin and Schaal,1970),هذا وقد استخدمت البروتينات لمثل هذه الدراسات في عدة بذور نباتية (Fairbrothers, 1983 and Jensen, 1981).

ومما هو جدير بالذكر فإن دراسة العلاقات التصنيفية بين أنواع الفصيلة الزيتونية بدأت منذ عشرات السنين باستخدام معايير مورفولوجية, بعد ذلك أدخلت طرق التفريد الكهربائي للبروتينات وطرق الكشف المناعي لكن بشكل محدود في البداية لوصف وتمييز هذه العائلة (James and Fairbrothers,1983). وفي المقابل استخدمت هذه الطرق بشكل واسع في دراسة بروتينات بذور البقوليات لتمييز الأصناف والأنواع فيها, على وجه الخصوص عند الفول البلدي *Vicia faba* (Maplestone *et al.*, 1985) الفول السوداني *Arachis hypogaea* (Krishna and Mitra, 1987) وكذلك اللفت *Brassica napus* (Mimouni, 1989).

تم في هذه الدراسة استخدام الطرق المذكورة في دراسة مقارنة للمكونات البيتيدية العديدة لبذور عدة أصناف من الزيتون *Olea europea* وعدة أنواع من الفصيلة الزيتونية. وقد أظهرت النتائج بوضوح وجود تشابه كبير في التوزيع البروتيني للبيتيدات العديدة في أصناف الزيتون المختلفة المدروسة ولم

يظهر إختلافات واضحة بين الأصناف باستثناء ثلاثة من الببتيدات العديدة ذات الأوزان الجزيئية ٢٠, ٢٨ و ٣٦ كيلودالتون مرتبطة وراثياً مع GP50 لوحظت فقط في الأصناف الأسبانية Hojiblanca و Picual. يمكن أن تعتبر هذه الببتيدات العديدة الثلاث كعلامة مميزة أو دليل للأصناف المذكورة, حيث إن وجود مقاطع ببتيدية مشتركة وراثياً بين GP50 وهذه الببتيدات العديدة المذكورة ذات الوزن الجزيئي الأقل يمكن أن يُفسر بتحليل أنزيمي (protease بروتياز) لبعض جزيئات GP50 خلال مراحل تكوين وتخزين هذا الجليكوبروتين.

تتفق هذه النتائج مع نتائج عدة دراسات بيّنت أن الاختلافات في التركيب الببتيدي العديد لبذور الأصناف التابعة لنوع ما تكون صغيرة دائماً كما في حالة أصناف نبات الترمس *Lupinus angustifolus* (Gillespie and Blagrove, 1975) وحالة أصناف فول الصويا *Glycine max* (Hughes and Murphy, 1983) والفول البلدي *Vicia faba* (Maplestone *et al.*, 1985).

تبين من دراسة العائلة الزيتونية أن البروتينات المخزنة تظهر النماذج نفسها من المكونات فى مختلف الأنواع المدروسة: حيث أن الببتيدات العديدة تكون مرتبطة فيما بينها بجسور ثنائية التركيب انفصلت بوجود العامل المختزل ME. وفي الغالب أيضاً فإن الوحدات المتجانسة homopolymers تتكون غالباً من ببتيدات عديدة سكرية من ٥٠ إلى ٦٤ كيلودالتون. هذا ومن الملاحظ أن التركيب الببتيدي المتعدد للبروتينات المتواجدة بوفرة في البذور تُظهر تشابهاً كبيراً عند كل أنواع الفصيلة الزيتونية المدروسة, فيما عدا صفة خاصة تسمح بتمييز النوع فونتانيزا Fontanesia fortunri Carr. من تحت الفصيلة الياسمينية عن أنواع تحت الفصيلة الزيتونية. ففي حين يتكون التوزيع البروتيني فى الفونتانيزا من ٢ إلى ٣ ببتيدات عديدة فقط مرتبطة فيما بينها بجسور كبريتيدية, فإنه يتكون من ٥ إلى ٦ ببتيدات عديدة مرتبطة فيما بينها بنفس النموذج من الروابط فى بذور الأنواع التابعة لتحت الفصيلة الزيتونية.

يُعتبر من ناحية أخرى الببتيد العديد GP50 الموجود في بذور الزيتون كدليل (كاشف) مميز وهام لأنواع الفصيلة الزيتونية, حيث أنه وبطريقة الكشف المناعي أمكن التعرف والكشف عن الببتيدات العديدة المقاربة في الوزن الجزيئي لـ GP50 الغالب في كل الأنواع المدروسة.

كذلك كما في بعض الفصائل النباتية Cruciferacaea و Papillonacaea, لاحظنا في الفصيلة الزيتونية أنها تحتوي على وحدات الجلوبولين 11S مكونة من ببتيدات عديدة مرتبطة فيما بينها بجسور كبريتيدية. وطبقاً لما ذكره العالمان Borroto and Dure (1987) فإن البروتينات المخزنة من نموذج 11S تنحدر من مورثة قديمة مشتركة والتي وجدت من بداية تطور مغطاة البذور. هذا وقد اقترح العالم Stebbins عام (١٩٤٠), على مستوى الفصيلة

الزيتونية, أن أنواع تحت الفصيلة الزيتونية قد تطورت انطلاقاً من أنواع تحت الفصيلة الياسمينية, أي أن الأخيرة هي مصدر وأساس لتحت الفصيلة الزيتونية. تؤكد هذه النتائج التي ذُكرت سابقاً الأهمية التصنيفية الكيميائية للبروتينات المخزنة والتي تساهم في تحديد انتماء أنواع مختلفة لأجناس أو عائلات محددة.

٥. الخاتمة

يتراكم خلال مراحل تطور بذور الزيتون مخزون بروتيني كبير. من بين هذه البروتينات الجليكوبروتين GP50 والذي يمثل ١٠% منها, يُشكل الجزء السكري فيه حوالي ٦,٥% من كتلته ويتكون من نموذجين من سكرات أوليجو, الأول يحتوي على مانوز والآخر يحتوي على عدة سكرات هي الجالاكتوز, الزيلوز, المانوز ون-أستيل جلوكوز أمين بالنسب ٢,٥ : ٢ : ٣ : ٢ على التوالي. يعتبر هذا التركيب السكري نادر الحدوث لجليكوبروتين نباتي.

أظهر تحليل البروتينات المخزنة في بذور الأصناف المدروسة والتابعة للنوع *Olea europea* تواجد نفس المكونات الببتيدية العديدة في كل هذه الأصناف. كما لوحظت بعض الببتيدات العديدة التي تُظهر مقاطع epitopes مشتركة مع GP50 ويمكن اعتبارها كدلائل هامة لتمييز بعض الأصناف الأسبانية.

لوحظ من ناحية أخرى وجود صفات مشتركة بين أنواع الفصيلةالزيتونية:١) وجود بروتينات من نموذج 11S مكونة من ببتيدات عديدة غير مرتبطة بسكرات وترتبط فيما بينها بجسور كبريتيدية. ب) وجود ببتيدات عديدة تظهر أو تنفصل بوجود SDS وبدون العامل المختزل ME وتمتلك مقاطع مشتركة مع GP50 الزيتون. وعلى مايبدو فإن التركيب ذي التحت وحدات α و β لبروتينات أنواع تحت الفصيلة الياسمينية كان أكثر بساطة من ذاك التركيب الخاص بانواع تحت الفصيلة الزيتونية. تم أخيراً إيضاح كيف أن GP50 الزيتون يُعتبر دليلاً هاماً لتمييز مختلف الأنواع المدروسة. وهكذا أمكن تقديم بعض المعلومات التي تتعلق بوصف البروتينات المخزنة فى بذور الزيتون والفصيلة الزيتونية.

-Abb. SDS: Sodium dodecylsulfate; PAGE: Polyacrylamide gel electrophorèse; TFMS: Trifluoromethanesulfonic acid; ME: Mercaptoethanol; TCA: Trichloroacetic acid.

6. REFERENCES

Alston R.E. and Turner B.L. (1963). "Biochemical systematics",

Mcelroy, W.D and Swanson C.P. ed, Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, 67-90.

Borroto K., and Dure L. (1987). The globuline seed storage proteins of flowering plants are derived from two ancestral genes. Plant Mol. Biol., 8 : 113-131.

Chaplin M.F. and Kennedy J.F. (1994). A pratical approach of carbohydrate analysis. Published in the United States by Oxford University Press, New York and Tokyo. pp. 31-32.

Daussant J. and Skakoun A. (1983). Immunochemistry of seed proteins. In seed proteins. eds. Daussantt, J., Mosse J. and Vaughan J., Academic press, London, New-York, pp.101-133.

Dickerson R.E. (1972). The structure and history of an ancient protein. Sci. Amer., 226 : 58-72.

Edge A.S.B., Faltyneck C.R. , Hof L. , LE Reichet J.R. and Weber P.(1981). Deglycosylation of glycoproteins by trifluorom-ethanesulfonic acid. Anal. Biochem., 118:131-137.

Fairbrothers D.E. (1983). Evidence from nucleic acid and protein chemistry in particular serology in angiosperm classification. Nord. J. Bot., 3.

Faye L., and Chrispeels M.J.(1988). Common antigenic determinnants in the glycoprotein of plants, molluscs and insects. Glycoconjugate J., 5 : 245-256.

Faye L., Gomorod V., Fitchette-Laine A-C. and Chrispeels M. J. (1993). Affinity purification of antibodies specific for Asn-Linked glycans containing 1-3 fucose or 1-2 xylose. Anal. Biochem. 109 : 104-108.

Feizi T. and Childs R. A. (1988). Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. Biochem. J., 245 : 1-11.

Gillespie J. M. and Blagrove J. (1975). Variability in the proportion and type of subunits in lupin storage globulins. Aust. J. plant physiol., 2 :29-39.

Harboe N.M.G. and Ingild A. (1983). Immunization, isolation of immunoglobulins and antibody determinnation. Scand. J. Immunol., 17 : 345-351.

Harbone J.B., Boulter D. and Turner B.L.(1971). Chemotaxonomy of the Leguminosae PP.1-612. Academic Press, Londres et New York.

Hoffmannsegg J., Graf C.and Link G.F. (1809). Flore portugaise. Vol I and II. Eds., C.F. Amelang, Kronenstrasse N. 58, Berlin.

Hughes S.A. and Murphy P.A.(1983). Varietal influence on the quantity of glycinin in soybeans. J. Agric. Food. Chem., 31:376-379.

James E.P. and Fairbrothers D.E. (1983).The use of proteins - serological characters in the systematics of the family Oleaceae. Amer. J. Bot., 70 : 780-789.

Jensen H. (1981). Proteins in plant evolution and systematic. In progress in botany. Eds., H. Ellenbrg, H. Esser, K. Kubitzki, D. Schnepf and H. Ziegler, PP. 344-369, Fortschritte der Botanik, 43. Springer-verlag, Berlin.

Johansson B. and Hillebrand G.R. (1969). A serological and electrophoretic comparaison of proteins in crude saline extracts of *triticeae* and *agrosteae*. Hereditas, 63 : 429-443.

Krishna T.G. and Mitra R.(1987). Arachin polymophism in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Phytochemistry, 26:897-902.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature,227:680-685.

Laine A.C. and Faye L. (1988). Significant immunological cross-reactivity of plant glycoprotéin. Electrophoresis, 9: 841-844.

Levin D.A. and Schaal B.A. (1970). Reticulate evolution in phlox as seen through protein electrophoresis. Amer. J. Bot.,57:977-987.

Loukoas M. and Krimbas C. B. (1983). History of olive cultivars based on their genetic distances. J. Hort. Sci., 58 : 121-127.

Maplestone P., Allison J., Hussein E.H.A., Gamal el-edin A.Y., Gatehouse J.A. and Boulter D. (1985). Variation of the legumin seed storage protein amongst Vicia species. Phytochemistry, 24 : 1717-1723.

Mimouni B. (1989). Etude comparative des constituants polypeptidiques de la fraction globuline des graines de Colza (*Brassica napus* L.) et de ses espèces parentales (*B. oleracea L. et B. campestris* L.). Thèse de Doctorat, Univ. de Bordeaux I.

Sousow M. K. (1992). Contribution à l'étude des protéines de réserve de l'amande d'olive (*Olea europea*). Thèse de doctorat, Univ. de Rouen , France.

Sousow M. K. (2001). Storage protein of olive seeds (*Olea europea*). Bull. Fac. Agric. , Cairo Univ., 52 No. 1 : 61-84.

Stebbins G.L., Jr. (1940). The significance of polyploidy in plant evolution. Amer. Nat., 74 : 54-66.

Taylor H. (1945). Cyto-taxonomy and phylogeny of the Oleaceae. Brittonia, 5 : 337-367.

Wallander E. and Albert V. A. (1999). Phylogeny of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data. XVI International Botanical Congress, Abstracts, p. 415.