تمييز بعض أصناف الحنطة الناعمة المحلية باستخدام جهاز الفصل الكروموتوكرافي السائل عالي الاداء

Identifcation of some local wheat varieties by high performance liquid chromatography technique

مكارم علي موسى فاروق فاضل النوري صبري جثير عبود

قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة/ جامعة بغداد

Makarim Ali Mousa Farook Fathel. Al- nouri Sabri Ch. Abood

Food Sciences and Biotechnology Dept /College of Agriculture /Baghdad Univ

المستخلص

تم استخلاص وفصل بروتين الكلايدين لثلاثة أصناف من الحنطة الناعمة المعتمدة وهي أبو غريب وإباء 99 واللطيفية باستخدام الفصل الكروموتوكرافي High performance liquid chromatography هدف تقدير كميته وتوضيح إمكانية استخدام هذه التقنية كوسيلة تعريف مثبتة لهوية هذه الأصناف واستخدامه كطبع الإصبع fingerprint في التمييز بين هذه الأصناف . وبينت النتائج وجود فروق معنوية بين قيم النسب المئوية للكلايدين من البروتين الكلي وكان طحين حنطة اللطيفية هو الأعلى في محتواه من الكلايدين من البروتين الكلي إذ بلغ 34.02 % مقارنةً بصنف إباء 99 الذي كان 30.20 % وصنف أبو غريب 31.00 %. ووضحت نتائج الـ HPLC إن هناك ثلاثة أنماط مختلفة لكلايدين الأصناف الثلاثة إذ اظهر كلايدين صنف أبو غريب 6 قمم واضحة بينما كان لصنف إباء 99 15 قمة ولصنف اللطيفية 10 قمم .

Abstract

Gliadin protein of three soft wheat cultivars namely Abu-Ghraib, IPA 99 and AL-Littefia was extracted and separation by high performance liquid chromatography HPLC. Result showed that there were significant differences between the gliadin percentage ratio with the order of AL-Littefia 34.02% , IPA99 30.20% and Abu-Ghraib 31.00% . Also the result of HPLC analysis revealed that the gliadin of the test cultivars has 3 distinguish patterns of separation. Thus it appears that HPLC provides efficient tool for identification of wheat cultivars. Abu-Ghraib gliadin showed 6 peaks while IPA99 and AL-Littefia showed 15 and10 peaks respectively.

المقدمة

يعد محصول الحنطة من محاصيل الحبوب المهمة في العالم والتي تحتل المرتبة الأولى عالمياً من حيث المساحة المزروعة وكمية الإنتاج . وللحصول على محصول جيد لابد من استعمال بذور ذات جودة عالية ، ومع استنباط العديد من الأصناف الجديدة برزت الحاجة إلى تحديد وتثبيت هويتها . ولقد دأبت دراسات سابقة على تحديد هوية بعض الأصناف الجديدة المنتجة محلياً بطرائق مختلفة منها تقليدية بالاعتماد على الخصائص المورفولوجية [1] او فسيولوجية او كيميائية او غيرها وفقاً لما حددته قواعد الاتحاد الدولي لفحص البذور [2] . إن هذه الطرائق وان كانت سهلة التطبيق إلا إنها مكلفة من الناحية الاقتصادية والزمن كما إن الوصف المظهري للنباتات يتأثر بصورة كبيرة بالعوامل البيئية وكذلك فان التحوير الوراثي Genetic Modified GM اضاف تعقيداً أكثر لتتبع الأصناف المنتجة مما شجع الباحثين على إيجاد طرق بديلة للتشخيص ومنها طريقة الترحيل الكهربائي وتقنية الفصل الكروموتوكرافي [3] . إن تقنية HPLC قادرة الآن على توضيح المعلومات فيما يخص كمية بروتينات حبة الحنطة ونوعيتها [4] وهي تساعد على انتخاب الأصناف في أثناء عمليات التربية وتوقع الاستعمال النهائي End use للأصناف ونجاح تسويقها [5] . إن عملية تمييز الأصناف من خلال هذه التقنية تعتمد على فصل بروتينات الحنطة إذ إن جميع الصفات الوظيفية ومنها قابليتها على تصنيع الخبز ترجع أو تعود إلى الصفات الفيزيوكيميائية للكلايدين والكلوتنين واللذان يكونان كلونين الحنطة [6،7] تضم بروتينات الحنطة (الكلايدين

والكلوتنين) مجموعة من البروتينات المحمولة على الكروموسومات المتشابهة وان التعبير الجيني Gene expression لها ثابتا تقريباً تحت الظروف البيئية والحقلية [8] لذا يمكن استخدامها كدليل وراثي Genetic indicator ، لهذا استخدمت بروتينات الحنطة كبصمة وراثية fingerprint وبشكل واسع لتمييز الأصناف المختلفة [9 ،10] وقد اعتمدت معظم البحوث والدراسات في تمييز اصناف الحنطة على أنماط فصل الكلايدينات وذلك لسهولة استخلاصها وانخفاض وزنها الجزيئي مقارنةً بالكلوتنين الذي يتصف بالتعقيد في التركيب ، ولكن هناك عدد من الدراسات أكدت أن كلاً من الكلايدين والوحدات عالية الوزن الجزيئي (HMW) من الكلوتيين يمكن إن تستخدم في تمييز الأصناف [11] أكدت اعداد كبيرة من الدراسات والبحوث على قدرة هذه التقنية في تمييز أصناف الحنطة بالاعتماد على نمط فصل الكلايدين ومقارنته بالعينات القياسية وذلك بالاعتماد على عدد مساحات وارتفاعات القمم الذي يستغرق المدى نفسه من الوقت للخروج من العمود [12] ، وأكدوا كذلك على دور تقنية SE -HPLC (Size exclusion HPLC) والـ (RP-HPLC) (Reverse Phase) في التفريق بين الأصناف والطرز البيئية وإنها يمكن أن تساهم في تسجيل واعتماد الأصناف الجديدة وفي تصديق البذور للاستدلال على النقاوة الوراثية وفي الدراسات النوعية والوراثية لمحصول الحنطة [13] فضلاً عن إنها قادرة على تمييز أصناف الحنطة الخشنة [14] وأصناف الشعير والذرة الصفراء [3] إلى جانب حنطة الخبز تهدف الدراسةالحالية إلى تثبيت نمط فصل بروتين الكلايدين لأصناف الحنطة قيد الدراسة لغرض تثبيت وتمييز هويتها والرجوع إليها في حالات الغش أو الخلط بين الأصناف .

المواد وطرائق العمل

استخدمت في الدراسة ثلاثة أصناف محلية من حنطة الخبز وهي أبي غريب ، إباء 99 واللطيفية ومن حاصل حصاد عام 2004 . وهي من الأصناف المحلية المعتمدة في العراق ، قدرت نسبة البروتين باستعمال طريقة كلدال القياسية رقم (11-46) [15] وقدرت نسبة الكلوتين الرطب في طحين الحنطة باستعمال الطريقة القياسية (77-38) [15] وباستعمال جهاز Glutomitic gluten وثم جفف في فرن هوائي على 70ْم للحصول على الكلوتين الجاف . تم استخلاص الكلايدين الكلي وتقديره باستعمال الطريقة التي ذكرها [16] وذك بأخذ أربع حبات من كل صنف وسحقها في هاون خزفي ثم استخلص الكلاديدين باستخدام الكحول الاثيلي 70% .

تم فصل بروتين الكلايدين باستخدام جهاز الكروموتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC نوع Shimadzu AV باستخدام عمود نوع C_1 exclusion column shimadzu بالأبعاد التالية (.4.6 I.D × 250) وبحجم دقائق 17 ملي مايكرون وباستخدام مذيب مكون من ماء مزال منه الايونات Deionized water و TetraHydrofurun (THF) رباعي هايدرو فيوران وبنسبة (90 : 10) حجم/حجم وسرعة جريان I /Min Ml وكان حجم العينة التي تم زرقها في العمود 5 مايكرولتر وتم الفصل على 30 °م وتم الكشف عن المركبات المفصولة باستخدام كاشف Detector يعتمد على الأشعة فــوق البفســجية نوع Shimadzu 10 AV وجرى حساب مساحات القمم بواسطة حاسبة Shimadzu CR-3A Data processor واستخدم الكلايدين القياسي المجهز من شركةBDH biochemical تركيز 2% اما اجزاءالكلايدين fraction تم فصله باستعمال الطريقة التي ذكرها[17] باستخدام عمود نوع superpose-12 بابعاد 300×10وباستخدام المذيب فوسفات الصوديوم تركيزm 0.1 وpH7 الحاوي على اسيتونيتريل20% وداي ثايوثريتول تركيز0.1%SDS تركيز 3. 0% وبسرعة جريان 0.6ml/min وتم الفصل على35مْ كان حجم العينة 5 مايكرولتر وتم الكشف عن المركبات المفصولة على طول موجي قدره 210nm وتم التعرف على القمم باستخدام الكلايدين القياسي .

النتائج والمناقشة

يبين جدول (1) قيم البروتين لطحين أصناف الحنطة والتي بلغت (10.0 ، 10.9 , 9.7) % لكل من صنف أبو غريب وإباء 99 واللطيفية على التوالي ، تشير النتائج الى تفوق الصنف اباء 99 في نسبة البروتين في الحبوب على الصنفين لطيفية وابي غريب اللذان لم يظهرا اختلاف معنويا فيما بينهما وهذه القيمة قريبة لما حصلت عليه [18] للصنف نفسه والتي كانت 10.2 % .

يبين جدول (1) محتوى طحين الحنطة من الكلوتين الرطب والتي بلغت (24.7 ، 26.1 و 23.2) % والكلوتين الجاف التي كانت (8.10 ، 9.10 ، 7.20) % لكل من صنف أبو غريب وإباء 99 واللطيفية على التوالي ، وتبين النتائج وجود فروقات معنوية في نسبة الكلوتين الرطب والجاف على مستوى معنوية 0.05 أعلى قيمة في نسبة الكلوتين الرطب والجاف كانت للحنطة صنف اباء (26.7 ,9.10) % بينما سجل صنف اللطيفية اقل قيمة

في نسبة الكلوتين الرطب والجاف ان انخفاض النسبة المئوية للكلوتين الرطب في صنف اللطيفية يعود السبب إلى انخفاض المحتوى البروتيني في هذا الصنف لكون نسبة الكلوتين الرطب تعد انعكاساً لنسبة البروتين ونوعيته في الطحين وبالتالي يعد مؤشراً عن نوعية الحنطة [19] ويوضح جدول (1) أيضا النسبة المئوية للكلايدين ونسبهم في البروتين الكلي والتي تم تقديرها بتقنية HPLC والتي كانت (31.00 ، 30.20 ، 34.02) % في طحين أبو غريب وإباء 99 و اللطيفية عل التوالي وتوضح النتائج وجود فروق معنوية عند مستوى 0.01 بين قيم نسبة الكلايدين حيث نلاحظ ارتفاع معنوي في نسبة الكلايدين في صنف اللطيفية مقارنةً بالصنفين الآخرين .

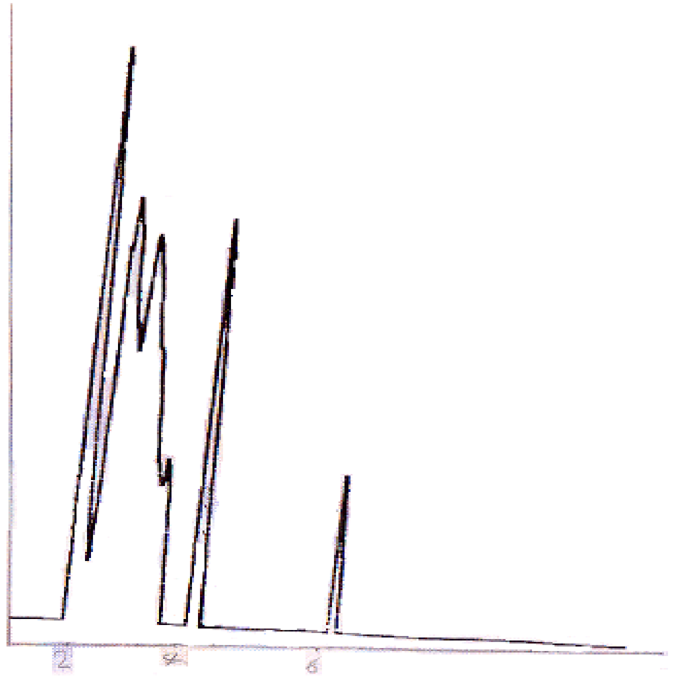
توضح الاشكال(1 ،2، 3) مخططات فصل الكلايدينات من طحين الحنطة للاصناف الثلاث ابو غريب اباء 99 واللطيفية وقد اعتمد في التمييزبين الاصناف على عدد القمم ووقت الاحتفاظ retention time ومساحتها peak area وذلك وفق ماذكره كل من [4،20] وتم اختيار صنف الحنطة ابوغريب كمقياس وذلك لكونه من الاصناف المعروفة والثابتة الهويه [18] .

جدول (1) :النسب المئوية لكل من البروتين والكلوتين والكلايدين في طحين أصناف الحنطة

الأصناف	البروتين	الكلوتين الرطب	الكلوتين الجاف	نسبة الكلادين الكلي في الطحين بطريقة HPLC	نسبة الكلادين الكلي في البروتين الكلي * بطريقة HPLC
أبو غريب	10.00 bd	24.7 ad	8.10 a	3.100	31.00 bd
إباء 99	10.90 a	26.10 a	9.10 a	3.300	30.20
اللطيفية	9.700 cd	23.10 cd	7.20 bd	3.600	34.02 a

$$\text{* النسبة المئوية للكلايدين في البروتين} = \frac{\text{النسبة المئوية للكلايدين}}{\text{النسبة المئوية للبروتين}} \times 100$$

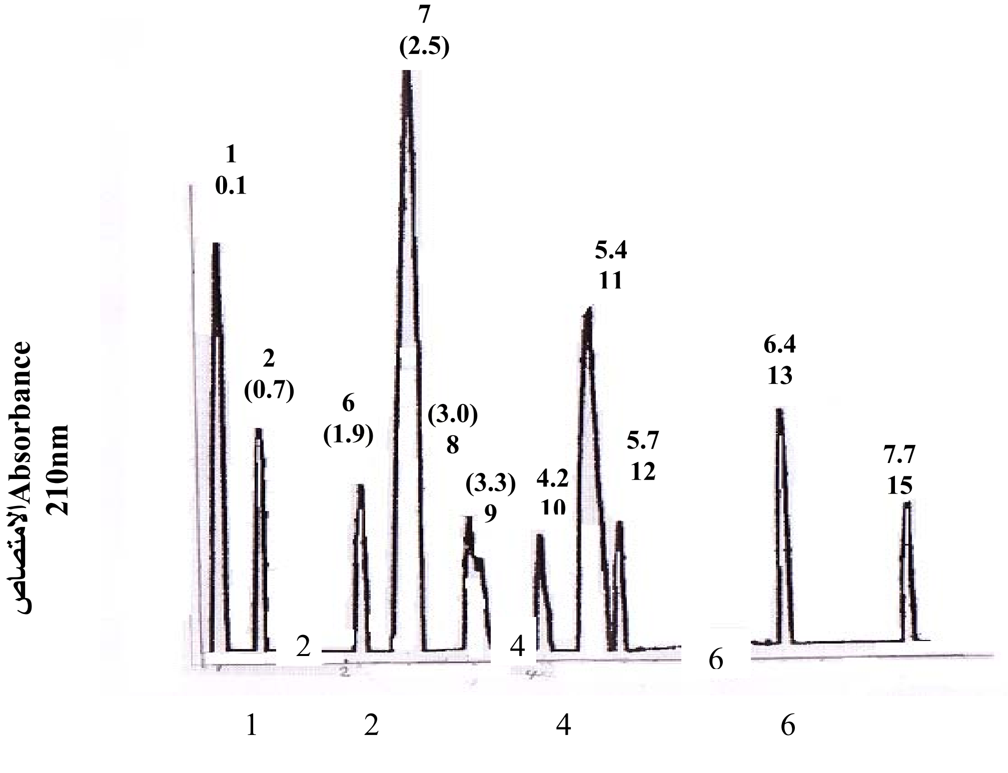
الحروف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية على مستوى 0.01حسب اختبار اقل فرق معنوي L.S.D



شكل (1) : كلايدين حنطة أبو غريب المفصول بجهاز الكروموتوكرافي السائل عالي الاداء يلاحظ فيه تسلسل القمم ووقت الاحتفاظ /دقيقة

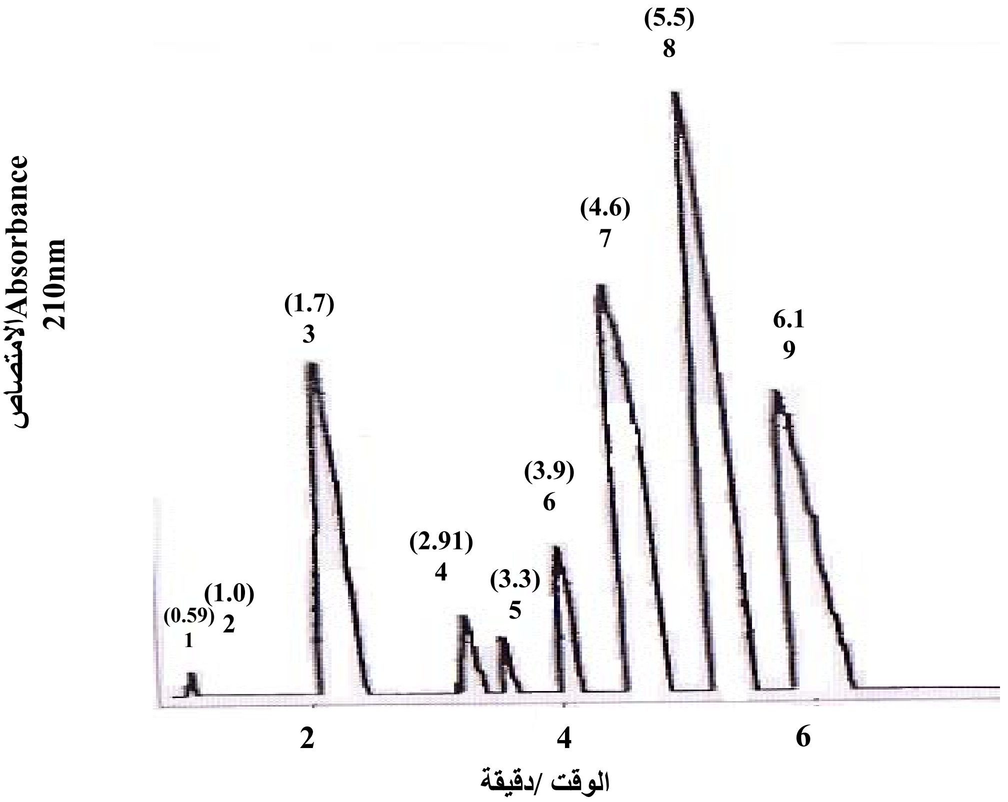
يلاحظ في مخطط فصل كلايدين حنطة أبو غريب 6 قمم واضحة فضلاً عن وجود أكتاف shoulders واضحة قبل القمة الثانية والرابعة وتراوحت النسبة المئوية لمساحة القمم من مجموع مساحات القمم المفصولة 8.47 – 24.05 % كما في جدول (2) ، أما بالنسبة إلى صنف إباء 99 فقد تم الحصول على 15 قمة بينما 4 قمم غير ظاهرة في المخطط بسبب انخفاض مساحتها جدول (2) وتراوحت النسبة المئوية لمساحة القمم المفصولة لصنف إباء 99 بين (1.10 – 21.60) % ، ويلاحظ في شكل 2 ظهور بعض القمم المبكرة مقارنةً بمخطط فصل أبو غريب والتي تراوحت مساحتها بين (3.12 – 8.15) % والتي تراوحت وقت احتفاظها بين (1.4-0.7) دقيقة .

ويلاحظ إن هناك تقارباً في وقت احتفاظ بعض القمم وهي القمة 1 والقمة 2 من مخطط فصل كلايدين صنف أبو غريب مع القمة (6 , 8) من مخطط فصل كلايدين صنف إباء 99 ولكن النسبة المئوية لمساحة هذه القمم كانت منخفضة في صنف إباء 99 مقارنةً بصنف أبو غريب .



شكل (2) : كلايدين حنطة إباء 99 المفصول بجهازالكروموتوكرافي السائل عالي الاداء يلاحظ فيه تسلسل القمم ووقت الاحتفاظ

إن هذه النتائج مطابقة لما ذكرته[18] من وجود اختلاف واضح بين نمط الترحيل الكهربائي لكل ممن صنف أبو غريب وصنف إباء 99 أما فيما يخص فصل كلايدين حنطة اللطيفية فيلاحظ في جدول (2) إن هناك 10 قمم اثنين منها لم يتحسس الكاشف لتركيزها وهي القمة 1 والقمة 2 وهما قمتان مبكرتان ويوضح شكل(1 ،3) وجود تقارب في وقت احتفاظ بعض القمم في كل من الصنفين أبو غريب واللطيفية وهي القمم (3 ، 4 ، 5 ، 6) على التوالي ولكنها كانت مساحتها اقل مقارنةً لصنف أبو غريب .



شكل (3) : مخطط فصل كلايدين حنطة اللطيفية المفصول بجهاز الكروموتوكرافي السائل عالي الاداء
يلاحظ فيه تسلسل القمم ووقت الاحتفاظ

جدول (2): نتائج كلايدين حنطة الأصناف المفصولةبجهازالكروموتوكرافي السائل عالي الاداء

تسلسل القمم	الأصناف					
	أبو غريب		إباء 99		اللطيفية	
	وقت الظهور	المساحة%	وقت الظهور	المساحة%	وقت الظهور/دقيقة	المساحة%
1	2.0	18.25	0.1	8.15	0.59	-
2	2.9**	20.00	0.7	6.58	1.0	-
3	3.1**	24.05	1.0 *	4.91	1.7	11.60
4	3.6	8.47	1.4 *	3.12	2.9**	8.70
5	4.9**	13.45	1.7 *	3.39	3.3**	5.00
6	6.1**	13.34	1.9	7.06	3.9	7.11
7			2.5	21.60	4.6	14.80
8			3.0**	3.83	5.5**	19.00
9			3.3**	1.10	6.1**	26.00
10			4.2	7.88	7.4 *	6.70
11			5.4**	19.785		
12			5.7	2.5		
13			6.4**	4.00		
14			6.7 *	3.10		
15			7.7	2.16		
		58111		197498		243486

* قمم لم يرسمها الجهاز

إن القمم الأولى من مخططات فصل كلايدينات الأصناف الثلاثة والتي كان وقت احتجازها 0.1-3.0 دقيقة تشير إلى الأوزان الجزيئية العالية من الكلايدينات بينما القمم التي كان وقت احتجازها بين 3.1-5.0 دقيقة تشير إلى

الأوزان الجزيئية المتوسطة أما القمم الأخيرة فهي تمثل الأوزان الجزيئية المنخفضة جدول (2) وقد وضح [17] بانه تم الحصول على 4 قمم من فصل كلايدينات طحين الحنطة الصلبة تراوحت أوزانها الجزيئية من أعلى من 67000 واقل من 25000 دالتون وذلك باستخدام ظروف الفصل نفسها .

إن مخططات الفصل هذه يمكن أن تعطي وصفاً مميزاً لكل صنف إذ يمكن التفريق بين الأصناف الثلاثة وتحديد نقاوتها بشرط تثبيت ظروف الاستخلاص والفصل ودرجة الحرارة ونوع العمود وأبعاده وسرعة جريان الطور السائل (المذيب) .

المصادر

1. Edwards.,I.B.(1997). A global approach to wheat quality international wheat quality conference, Manhattan, Kansas, U.S.A.
2. ISTA.(1973). International Seed Testing Association Handbook of Seed Testing for Genuiness of Cultivar .pp 112
3. Wrigley, C.W.(2005). Identification of food Cereal grain variety. Science and Technology. Book Form, C.Hip.S.
4. Mentovska, M., Chung, O.K.and Veijanov, S.(2005). RP-HPLC Analysis of Glidins in Macedonian Wheat Varieties. Third, international wheat quality conference proceedings Meeting, Abstract .p.395.
5. Ohm, J.B., and Chung,O.K.(2000). Effect of kernel size in end use properties within a hard winter wheat variety in: Abstract Book of The 85th AACC. Annual Meeting p320.
6. Antes,S. and Wiser, H.(2001).Effect of high and low molecular weight glutenin subunit on rheological dough properties and bread making quality of wheat. Cereal Chem.78:157-159.
7. Johansson,E.; Prieto,U.Linde,M.L.Sesson,C. and Jonsson.J.O.(2003). Influence of cultivar, cultivation year and fertilizer rate on amount of protein groups and size distribution of Mono and Polymeric protein in wheat. Agriculture Science 140: 275-344
8. ICARDA.(2001).Theme I.Crop Germplasm Enhancement Project 1.3. Spring bread wheat germplasm improvement for increased productivity, yield stability and grain quality in West Asia and North Africa, Annual Report. 1-3.
9. Autran,J.C.(2000).Wheat identification in European (ed) Wrigley,C.W. Identification of food grain varieties,American Association 0f Cereal Chem.in CSI Paul.pp.55-71.
10. Allan,R.E.and Simone,M.C.,(2001).Identification and characterization of near isogenic hard and soft hexoploid wheat.Crop Sci.41: 211-217.
11. Lookhart, G.L.,and Bean, S.(2003). Wheat quality and wheat variety identification, USDA.
12. Roger.J.,obutti,J.L., Lerner,S.E., Dimartino, A.M.,and Ponzio, N.R. (2005) . multivariate RP-HPLC analysis as a tool in quality studies in durum wheat Czech. Genet. Plant Breed 41,314-318 .
13. Paulis maize protein by reversed – phase high – performance.J. Cereal Sci.4:205-216, J.W.and Bietz, J.A.(1986). Separation of alcohol soluble

14. Labuschagne,M.T.,Koen,E.,Dessalegen, I.(2004). Use of size - exclusion high-performance liquid chromatography for wheat quality protection in thiopia. Cereal Chem.41:235-239

15. AACC.(1998). Approved Methods of the American Association of Cereal Chem.,Paul. Minesota. U.S.A

16. Hubner,F.R; and Beitz,J.A.(1986). Assessment of the potential bread – making quality of hard red spring wheat by reversed phase high performance liquid chromatography of gliadins.Cereal Sci,4:379-388

17. Hubner, F.R., Christianson, D.D.;Nelson, T.C. and Bietz, J.A.(1989). Gliadin and glutenin analysis by SE-HPLC for wheat classification. Cereal Chem.,66 :145-155

18. المهداوي ، أزهار عبد الرضا.(2004). دراسة تمييزية لبعض أصناف الحنطة المحلية باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد العراق

19. سعيد ، جلال احمد فضل. (2000). العلاقة بين نوعية بعض أصناف الحنطة العراقية وعوامل الجودة . أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد،العراق

20. Ng,P.K.W.,Scanlon,M.C. and Bushuk, W.(2000). Electrophoretic and high performance liquid chromatography patterns of registered Canadian wheat cultivars.Cereal Research Communications. 17:5-10.