الصدمة الحرارية تحفز محتوى الأحماض النووية والبروتينات والفعالية النوعية لأنزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين في كالس سيقان السمسم *Sesamum indicum* L.

Heat shock enhanced nucleic acids, proteins content and specific activity of thymine nucleotide biosynthetic enzymes in stem callus of *Sesamum indicum* L.

نهال عزت الطائي ساجدة عزيز عبود مزاحم قاسم الملاح*

قسم علوم الحياة /كلية العلوم / جامعة الموصل

*قسم علوم الحياة/ كلية التربية / جامعة الموصل

Nihal E. Al- Taee Sajida A. Abood Mozahim K. Al-Mallah*

Dept. of Biology/ College of Science/ University of Mosul

*Dept. of Biology/ College of Education/ University of Mosul

المستخلص

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن تعريض الكالس المستحدث من سيقان السمسم النامي في الوسط المغذي MS الحاوي على توليفة منظمات النمو (1.0mgL^{-1} NAA +2.0 mgL^{-1}BA) للدرجات الحرارية 25،40،35،30، 45،50م بنمط الصدمة قصيرة المدى لمدة5 أو10 دقيقة والطويلة المدى لمدة 15 أو 20 دقيقة، حصول تغييرات مرغوبة في نموه وانعكاسها في زيادة كمية الأحماض النووية DNA و RNA والمحتوى البروتيني وتحفيز الفعالية النوعية لإنزيمات الثاميدليت سنثيز TS والداي هيدروفوليت ريدكتيز DHFR والسيرين هيدروكسي مثيل ترانسفيريزSHMT. وتفوقت المعاملة40°م/15 دقيقة في تأثيرها اذ سجلت كمية الحامض النووي DNA 95 مايكروغرام/غرام وزن طري والحامض النووي RNA 949 مايكروغرام/غرام وزن طري زيادة واضحة قياساً بنظيراتها من DNA، RNA في المقارنة الحاوية 58مايكروغرام DNA/غرام وزن طري و550 مايكروغرام RNA/غرام وزن طري. وسجل المحتوى البروتيني 2.85 ملغم/غرام من وزن الكالس قياساً بـ 1.47 ملغم /غرام من عينة المقارنة. وأظهرت قياسات الفعالية النوعية لإنزيمات TS، DHFR، SHMT 3.41،0.97، 0.31 مايكرومول/ دقيقة/ملغم بروتين على التوالي قياسا بـعينات المقارنة 1.70 و0.43 و0.13 مايكرومول/ دقيقة/ملغم. بينما أدت الدرجات الحرارية40،50م في كلتا الصدمتين انخفاضا في وزن الكالس وفي محتواه من الأحماض النووية وانحرافا سلبيا في الفعالية النوعية للإنزيمات المشار اليها.

Abstract

The present study revealed that exposure of stem derived callus of *Sesamum indicum* L. that grown on initiation medium Murashige and Skoog (MS) supplemented with naphthalene acetic acid (NAA 1.0 mg L^{-1}) + benzyl adenine BA 2.0 mg L^{-1} to 25, 30, 35, 40, 45 or 50° C as short term heat shock stHS 5,10 min. and long term heat shock ltHS 15, 20min. enhanced a desirable changes of callus growth. Moreover, the amounts of nucleic acids DNA, RNA, proteins and the specific activity of thymidylate synthase (TS), dihydrofolate reductase (DHFR) and serine hydroxy methyl transeferase (SHMT) enzymes were also increased. The heat shock treatment 40° C/15 min. gave the best effect in amount of both DNA and RNA that increased to 95 and 949 µg/g compared to control 58 and 550µg/g callus fresh weight respectively. Total protein was also increased to2.85 mg/g compared to control 1.47 mg/g. Maximum specific activities of TS, DHFR and SHMT enzymes were recorded 3.41, 0.97, 0.31µmol/min/mg protein respectively compared with control 1.70, 0.43, 0.13µmol/min/mg protein. Whereas, heat shock treatments 45 and 50◦ C of both tearms reduced each of callus fresh weight, DNA, RNA amount, and decreased the specific activities of the above enzymes.

Key words: Heat shock, *Sesamum indicum* L.,

المقدمة :

تعرف الصدمة الحرارية بأنها ارتفاع في درجة حرارة النسيج النباتي عن الحد الأمثل لنمو النبات لمدة زمنية مسببة صدمة غير عكسية في نمو النبات وتطوره ويتراوح الارتفاع في درجات الحرارة من 10-15م . وتعبر الصدمة عن وظيفة معقدة تعتمد على درجة الحرارة ومدة بقائها والزيادة في درجة الحرارة التي تتعرض لها الخلايا والأنسجة النباتية [1]، وذكرت المصادر التأثيرات الايجابية للصدمة الحرارية في عدد من الأنظمة النباتية وتحفيزها للمسارات الأيضية في الخلايا متمثلة في بناء بروتينات جديدة وتراكمها في أوراق الشعير يطلق عليها بروتينات الصدمة الحرارية Heat Shock Proteins (HSPs) [2]، ويحفز بناءها في جميع الكائنات ابتداءً من البكتريا إلى الإنسان ، وأطلق عليها بالبروتينات المحافظة وصنفت اعتمادا على أوزانها الجزيئية إلى ست عوائل (HSP100، Chaperonins ،HSP90 ،HSP70 ،HSP60 و small heat shock proteins17-30، KDa. 8-5) sHSPs) [3]. وتكمن وظيفتها في حماية الخلايا من الصدمة الحرارية من خلال منع مسخ البروتينات أو عدم تغيير شكلها الثانوي أو الثلاثي [4] وعموما تستجيب النباتات لتأثيرات الصدمة الحرارية بإحداث تغييرات بايوكيميائية وجزيئية تتضمن انجاز مختلف العمليات الميكانيكية للحفاظ على استقرارية الأغشية وإنتاج إنزيمات مضادات الأكسدة ومنها المواد المثبطة (الكاسحة) لـReactive oxygen species (ROS) او الجذور الحرة الناتجة في ظروف الإجهاد أو الصدمة وتحفيز إنزيمات Mitogen–activated protein kinase (MAPK) وCalcium-dependent protein kinase(CDPK) وتحفيز الإشارات المرافقة لعمليات الاستنساخ التي تنظم عند المستوى الجزيئى وتجعل النبات قادرا على النمو بقوة تحت ظروف الصدمة [5،6].

يُبنى نيوكليوتيد الثايمين (dTMP) بمسار الدي نوفو بتحويل dUMP إلى dTMP بوجود إنزيمات متضمنةً (TS) و (DHFR) و (SHMT) و المركبات المشتقة من حامض الفولك متضمنةً التتراهيدروفوليت (THF) والداي هيدروفوليت (DHF) و N^5,N^{10},methyleneTHF في دورة إضافة المثيل. وقد درست إنزيماتها في الخلايا الحيوانية والأحياء المجهرية لكونها أحد أهداف المعالجة الكيميائية للأورام السرطانية [4] وسجلت دراسات محدودة لتلك الإنزيمات في نباتات الخس[7]. وان تعريض نباتات فول الصويا الى الدرجات الحرارية من28- 40م شجع بناء عدد كبير من بروتينات الصدمة الحرارية sHSPs [8]، كما إن تعريض البروتينات المتواجدة في أوراق وأزهار الشليك للدرجات الحرارية 20 ،23 ،24م مدة 4 ساعات كشفت عن تواجد بروتينات جديدة صنفت ضمن مجموعة sHSPs وغيابها عند تعريضها لدرجة 40م [9]. وأكدت احدى الدراسات [10] تباين القابلية الوراثية للخلايا في بناء بروتينات الصدمة الحرارية في نباتات الحنطة والشعير والذرة والبطاطا. فضلا عن أن تأثير الصدمة الحرارية يكمُن في زيادة نفاذية الجدر الخلوية أو تحفيز بناء بروتينات خاصة في أنسجة نبات زهرة الشمس [11] أو تحفيز بناء بروتينات جديدة في أوراق نباتات الشعير والذرة البيضاء [2] .

هدفت الدراسة الحالية إلى التحري في أنسجة كالس السمسم عن وجود مسار denovo لبناء نيوكليوتيد الثايمين احد نيوكليوتيدات بناء DNA بدلالة قياس فعالية إنزيمات دورة إضافة المثيل المهمة لبناء الـ dTMP، وتحديد تأثيرات الصدمة الحرارية في نشاط هذه الإنزيمات وكميات الاحماض النووية والبروتينات.

المواد وطرائق العمل :

أستحثاث مزارع كالس السيقان

عُقمت بذور السمسم صنف محلي/ أبيض اللون بغمرها في الكحول الأثيلي 96% لمدة دقيقتين متبوعا بغمرها في محلول 3%هايبوكلورات الصوديوم(NaOCl) لمدة 5 دقائق بعدئذ غسلت البذور أربع مرات بالماء المعقم، نقلت البذور المعقمة سطحيا إلى دوارق زجاجية سعة 100مل حاوية على25مل من وسط Arnon وHoagland الصلب [12] حُضنت العينات في الظلام في حاضنة النمو عند 23± 2°م وحين مباشرتها بالإنبات حفظت النبيتات في ظروف إضاءة شدتها 2000 لوكس وبتعاقب 8/16 ضوء/ظلام ساعة للحصول على بادرات معقمة. قطعت إلى قطع بطول1.5 سم من سيقان بادرات السمسم المعقمة بعمر12-15 يوماً وزرعت على وسط موراشيج وسكوك MS [13] الحاوي 3%سكروز والمدعم بإضافة مستويات منتخبة من$NAA1.0mgL^{-1}$ و$BA\ 2.0mgL^{-1}$ وحفظت المزارع في الحاضنة لمدة 30 يوم تحت الظروف المشار أليها في أعلاه.

تعريض كالس السيقان للمعاملة الحرارية

أخذت مجموعة من عينات الكالس بعمر 30 يوم وبوزن غرام واحد لكل منها ووضعت في قنانٍ زجاجية معقمة سعة 100مل وعرضت في المعاملة الأولى إلى الدرجات الحرارية 25 ،30 ،35 ، 40 ، 45 ، 50م وعند مدة التعريض (5 ،10) دقائق وسميت الصدمة الحرارية قصيرة المدى وفي المعاملة الأخرى عرضت إلى الدرجات الحرارية ذاتها

لمدة 15،20 دقيقة وسميت الصدمة الحرارية طويلة المدى [14]. أستخدم حمام مائي مثبتة حرارته مسبقا عند الدرجة المطلوبة لكل من المعاملتين وبعد انتهاء مدة التعريض رفعت العينات ووضعت مباشرة في بيكر حاوٍ ماء بدرجة حرارة الغرفة لخفض حرارتها وبعد الانتهاء من تعريض جميع العينات حسب طريقة العمل زرعت عينات الكالس وعينات المقارنة في وسطMS المذكور في أعلاه.

قياس الفعالية النوعية للإنزيمات الداخلة في بناء dTMP في المستخلص المائي للكالس

أخذت عينات كالس بوزن ثلاثة غرام /عينة من المزرعة الفتية للكالس المعرض للصدمة الحرارية النامي على وسط الاستحثاث بعمر60 يوماً وسحقت كل عينة بصورة مستقلة في هاون خزفي مبرد في درجة -4م وأضيف إليها30مللتر من محلول 50mM Potassium phosphate buffer وبدالة حامضية 7 مضافا إليها 0.56% من N-acetyl cysteineأكمل سحق وتحطيم الخلايا بتسليط 20000 ذبذبة/ ثانية ولمدة نصف دقيقة بوساطة جهاز الترددات فوق الصوتية (Romany PG-1545) وفصل الرائق عن الراسب عند طردها مركزيا (Hettich, REF1406, Germany) في ظروف تبريد بسرعة 9000 دورة/ دقيقة ولمدة ساعة وحفظ الرائق في درجة حرارة -60م في deep freez لاستخدامه في التجارب اللاحقة.

1- قياس فعالية أنزيمات دورة اضافة المثيل

إنزيم الثايميديليت سنثيز TS (EC 2.1.1.45)

قيست فعالية هذا الإنزيم من الزيادة في قيم الامتصاص الضوئي للمحلول عند الطول الموجي340 نانوميتر بوجود الديوكسي يوربدين أحادي الفوسفيت (dUMP) كمادة أساس والتتراهيدروفوليت (THF) كعامل مساعد وبوساطة المطياف الضوئي (APEL PD- 303UV.) عند 30°م/ 10 دقائق [15]. وحددت وحدة فعاليته على أنها كمية الإنزيم اللازمة لإنتاج مايكرومول واحد من مادة DHF خلال دقيقة واحدة من التفاعل باستخدام معامل الامتصاص الضوئي لـ DHF والمساوي إلى$5.8 \times 10^{-3}\ M^{-1}\ Cm^{-1}$ [16].

إنزيم الداي هيدروفوليت ريدكتيزDHFR (EC 1.5.1.3)

قيست فعالية الإنزيم بالطريقة القياسية [17] من معرفة الانخفاض الحاصل في الامتصاص الضوئي لمحلول التفاعل عند الطول الموجي340 نانوميتر بوجود مركب (DHF) كمادة أساس ومركب (NADPH) كمانح للهيدروجين. حددت الفعالية بالمطياف الضوئي عند 30°م/ 10 دقائق وتمثل وحدة الفعالية النوعية للإنزيم كميته اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من NADPH خلال دقيقة واحدة من التفاعل باستخدام معامل الامتصاص الضوئي لمادة NADPH والمساوي إلى $6.2 \times 10^{3}\ M^{-1}\ Cm^{-1}$ [16].

إنزيم السيرين هيدروكسي ميثايل ترانسفريزSHMT (EC 2.1.2.1)

قيست فعالية هذا الإنزيم من تحديد انخفاض الامتصاص الضوئي للمحلول عند الطول الموجي 298 نانوميتر بوجود السيرين مادة أساس ومادة THF عاملاً مساعداً[18]. قيست فعالية الإنزيم بالمطياف الضوئي عند30°م/ 10دقائق على أساس ان فعالية الإنزيم تمثل كمية الإنزيم اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من THF إلى 5, 10- methylene THF خلال دقيقة واحدة من التفاعل. باستخدام معامل الامتصاص الضوئي لمادة THF والمساوي إلى$28 \times 10^{3} M^{-1} Cm^{-1}$ [19].

2- تقدير كمية الأحماض النووية الكلية

حددت الكمية الكلية للأحماض النووية [20] المستخلصة من كالس السمسم المعتمدة لإيقاف فعالية إنزيم Nuclease وترسيب الأحماض النووية بنوعيها DNA وRNA وحدد التركيز الكلي للأحماض النووية بالمقارنة مع المنحني القياسي للأحماض النووية لخلايا الخميرة النقية. وحددت كمية DNA [21] من تقدير كمية السكر فيه وحدد تركيز هذا الحامض بالاعتماد على المنحنى القياسي المحضر من Calf thymus DNA وحددت كميةRNA من الفرق بين الكمية الكلية للأحماض النووية وكمية الحامض DNA.

3- تقدير البروتين الكلي في نسيج الكالس: استخدمت الطريقة المتبعة من قبل Pollack وSkacterle [22] في تقدير البروتين في مستخلص نسيج الكالس واستعمل البومين مصل البقر(BSA) بوصفه محلولاً قياسيا.

4- تقدير الوزن الطري للكالس: أحتسب الوزن الطري للكالس النامي على وسط MS من فرق وزن القناني الزجاجية حاوية على الوسط الغذائي فقط ووزنها بعد زرع الكالس المعرض للصدمة الحرارية بعد30 يوما من تعريضها.

النتائج:

تأثيرات الصدمة الحرارية في المحتوى الكلي من الأحماض النووية DNA و RNA والفعالية النوعية لإنزيمات SHMT, DHFR, TS

أشارت النتائج عموما ان الصدمة الحرارية بنمطيها القصيرة والطويلة حفزّت كمية الأحماض النووية DNA وRNA في خلايا الكالس بعد 30 يوماً من تعريضها. وأشارت البيانات الى زيادة كميتها مع زيادة أمد التعريض لدرجات الصدمة الحرارية جدول (1).

جدول (1): تأثيرات تعريض كالس سيقان السمسم *Sesamum indicum* L. للصدمة الحرارية قصيرة المدى (stHS) لمدة 5 دقائق في فعالية إنزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين وكمية الأحماض النووية

المعاملة (°م/ 5 قائق)	*الفعالية النوعية لإنزيمات ∓ الخطأ القياسي			كمية الأحماض النووية	
	TS	DHFR	SHMT	RNA مايكروغرام غم$^{-1}$	DNA مايكروغرام غم$^{-1}$
المقارنة 23	1.701 ∓ 0.562	0.274 ∓ 0.004	0.112 ∓ 0.003	544 b	53 a
25	1.752 ∓ 0.466	0.291 ∓ 0.010	0.128 ∓ 0.002	546 b	55 a
30	1.943 ∓ 0.411	0.391 ∓ 0.004	0.173 ∓ 0.010	575 a	61 a
35	1.986 ∓ 0.320	0.344 ∓ 0.012	0.166 ∓ 0.001	577 a	61 a
40	2.153 ∓ 0.201	0.426 ∓ 0.061	0.251 ∓ 0.031	580 a	62 a
45	1.551 ∓ 0.110	0.221 ∓ 0.052	0.101 ∓ 0.003	465 c	37 b
50	1.421 ∓ 0.231	0.203 ∓ 0.032	0.953 ∓ 0.002	326 d	34g b

*** TS: كمية الإنزيم اللازمة لإنتاج مايكرومول واحد منDHF \ دقيقة \ ملغم بروتين.* DHFR: كمية الإنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من \ NADPHدقيقة \ ملغم بروتين. *SHMT: كمية الإنزيم اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من THF الى MethyleneTHF \ دقيقة \ ملغم بروتين. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.**

كما حُفِزت الفعالية النوعية لإنزيمات TS، DHFR، SHMT عند الدرجات الحرارية التي تراوحت من(25- 40)م فقط بينما أدت الدرجتين(45 ،50)م في كلتا الصدمتين انخفاضاً واضحاً في كمية الأحماض النووية والفعالية النوعية للإنزيمات أعلاه. وإن مدة التعريض خمسة دقائق حققت أعلى كمية للحامض النووي DNA عند الدرجة 40م قياسا بالمقارنة مترافقة مع زيادة كمية RNA والى حصول قفزة في الفعالية النوعية لإنزيم TS قياسا بعينة المقارنة وكذلك الحال بالنسبة لإنزيمي DHFR وSHMT وتشير الأحرف المتشابهة عموديا إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.0001 >احتمالية بين المتوسطات باختبارDMRT. ويستعرض جدول (2) البيانات المتعلقة بالتأثيرات الايجابية للمعاملة 40°م/10دقيقة.

جدول (2): تأثيرات تعريض كالس سيقان السمسم .Sesamum indicum L للصدمة الحرارية قصيرة المدى (stHS) لمدة 10 دقائق في فعالية إنزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين وكمية الأحماض النووية

المعاملة (°م/ 10 دقائق)	*الفعالية النوعية لإنزيمات ∓ الخطأ القياسي			كمية الأحماض النووية	
	TS	DHFR	SHMT	RNA مايكروغرام غم$^{-1}$	DNA مايكروغرام غم$^{-1}$
المقارنة 23	1.661 ∓ 0.411	0.494 ∓ 0.010	0.122 ∓ 0.003	546 c	57 b
25	1.760 ∓ 0.037	0.543 ∓ 0.022	0.165 ∓ 0.031	552 c	59 ab
30	1.932 ∓ 0.251	0.602 ∓ 0.056	0.181 ∓ 0.002	585 b	60 ab
35	1.952 ∓ 0.311	0.522 ∓ 0.023	0.162 ∓ 0.017	592 b	58 b
40	2.292 ∓ 0.571	0.782 ∓ 0.011	0.288 ∓ 0.031	610 a	64 a
45	1.170 ∓ 0.332	0.356 ∓ 0.032	0.115 ∓ 0.050	436 d	37 c
50	1.099 ∓ 0.121	0.311 ∓ 0.011	0.877 ∓ 0.020	410 e	30 d

*** TS: كمية الإنزيم اللازمة لإنتاج مايكرومول واحد منDHF \ دقيقة \ ملغم بروتين.* DHFR: كمية الإنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من \ NADPHدقيقة \ ملغم بروتين. *SHMT: كمية الإنزيم اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من THF الى MethyleneTHF \ دقيقة \ ملغم بروتين. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.**

إذ حققت زيادة في كمية DNA من 57 إلى 64 مايكروغرام غم$^{-1}$ مقترنة بزيادة ملحوظة لكمية RNA من546 الى 610 مايكروغرام غم$^{-1}$ وزن طري كالس. وسجلت إنزيماتSHMT, DHFR, TS نشاطا قيمته 2.292، 0.782، 0.188 مايكرومول/دقيقة/ملغم بروتين على التوالي قياسا بـ1.661،0.494،0.122 مايكرومول/دقيقة/ملغم بروتين لعينة المقارنة

عند المعاملة ذاتها. وتعكس البيانات الواردة في جدول (3) تأثير الصدمة الحرارية عند خمسة عشر دقيقة إذ سجلت كمية DNA 95 مايكروغرام غم$^{-1}$ عند 40°م متفوقة على كميته في معاملات الصدمة الحرارية قصيرة المدى وكذلك الحال بالنسبة لكمية RNA. كما سجلت زيادة واضحة في الفعالية النوعية لإنزيمات TS, DHFR , SHMT وبالذات إنزيم TS متجاوزة فعاليته في معاملات الصدمة قصيرة المدى.

جدول (3): تأثيرات تعريض كالس سيقان السمسم .*Sesamum indicum* L للصدمة الحرارية طويلة المدى(ltHS) لمدة 15 دقيقة في فعالية إنزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين وكمية الأحماض النووية.

المعاملة	*الفعالية النوعية لإنزيمات ∓ الخطا القياسي			كمية الأحماض النووية	
(°م/ 15 دقيقة)	TS	DHFR	SHMT	RNA مايكروغرام غم$^{-1}$	DNA مايكروغرام غم$^{-1}$
المقارنة	1.701	0.433	0.133	550 e	58 c
23	0.031 ∓	0.062 ∓	0.006 ∓		
25	1.756	0.592	0.163	573 d	59 c
	0.052 ∓	0.007 ∓	0.010 ∓		
30	1.925	0.551	0.175	590 c	61 bc
	0.041 ∓	0.023 ∓	0.002 ∓		
35	2.126	0.641	0.208	625 b	65 b
	0.032 ∓	0.015 ∓	0.013 ∓		
40	3.410	0.972	0.311	949 a	95 a
	0.091 ∓	0.082 ∓	0.004 ∓		
45	1.532	0.386	0.125	445 f	42 d
	0.031 ∓	0.032 ∓	0.002 ∓		
50	1.416	0.332	0.941	380 g	29 e
	0.003 ∓	0.005 ∓	0.006 ∓		

*** TS: كمية الإنزيم اللازمة لإنتاج مايكرومول واحد منDHF \ دقيقة \ ملغم بروتين.* DHFR: كمية الإنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من \ NADPHدقيقة \ ملغم بروتين. *SHMT: كمية الإنزيم اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من THF الى MethyleneTHF \ دقيقة \ ملغم بروتين. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.**

بينما تشير البيانات الواردة في جدول (4) إلى ارتفاع مؤشرات الفعالية الانزيمية تحت الدراسة وكمية الأحماض النووية عند درجة حرارة 40م وفي زمن مدته 20 دقيقة مع ملاحظة حصول انخفاض معنوي في كمية DNA عند 50°م حيث بلغت ادناها27 مايكروغرام غم$^{-1}$ بينما كمية RNA بلغت 275 مايكروغرام غم$^{-1}$ عند درجة 50 م ولجميع اوقات التعريض قياساً بـ 56 و540 مايكروغرام غم$^{-1}$ على التوالي لعينة المقارنة.

جدول (4): تأثيرات تعريض كالس سيقان السمسم .*Sesamum indicum* L للصدمة الحرارية طويلة المدى(ltHS) لمدة 20 دقيقة في فعالية إنزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين وكمية الأحماض النووية

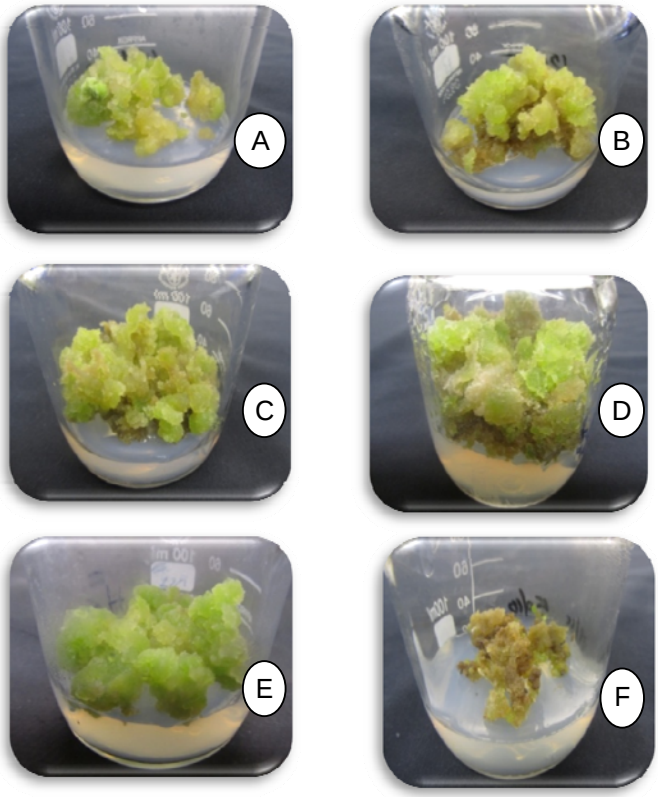
المعاملة	*الفعالية النوعية لإنزيمات ∓ الخطأ القياسي			كمية الأحماض النووية	
(°م/ 20 دقيقة)	TS	DHER	SHMT	RNA مايكروغرام غم$^{-1}$	DNA مايكروغرام غم$^{-1}$
المقارنة	1.684	0.452	0.124	540 d	56 c
23	0.061 ∓	0.034 ∓	0.004 ∓		
25	1.911	0.571	0.132	545 d	58 bc
	0.070 ∓	0.005 ∓	0.017 ∓		
30	1.950	0.633	0.160	560 c	59 bc
	0.105 ∓	0.015 ∓	0.002 ∓		
35	2.042	0.692	0.165	595 b	65 ab
	0.027 ∓	0.081 ∓	0.005 ∓		
40	2.661	0.723	0.201	620 a	68 a
	0.0421 ∓	0.011 ∓	0.002 ∓		
45	1.332	0.377	0.115	330 e	31 d
	0.032 ∓	0.052 ∓	0.003 ∓		
50	1.123	0.314	0.860	275 f	29 d
	0.055 ∓	0.060 ∓	0.0050 ∓		

*** TS: كمية الإنزيم اللازمة لإنتاج مايكرومول واحد منDHF \ دقيقة \ ملغم بروتين.* DHFR: كمية الإنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من \ NADPHدقيقة \ ملغم بروتين . *SHMT: كمية الإنزيم اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من THF الى MethyleneTHF \ دقيقة \ ملغم بروتين . كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.**

تأثير الصدمة الحرارية في الوزن الطري للكالس ومحتواه من البروتين الكلي :

أظهرت النتائج استمرار نمو الكالس مع وجود فروق مظهرية بين عينات الكالس غير المعرضة للصدمة الحرارية شكل (A-1) وبقية العينات النامية في نفس وسط الاستحداث بعد ثلاثون يوما من معاملتها، وحصول زيادة واضحة

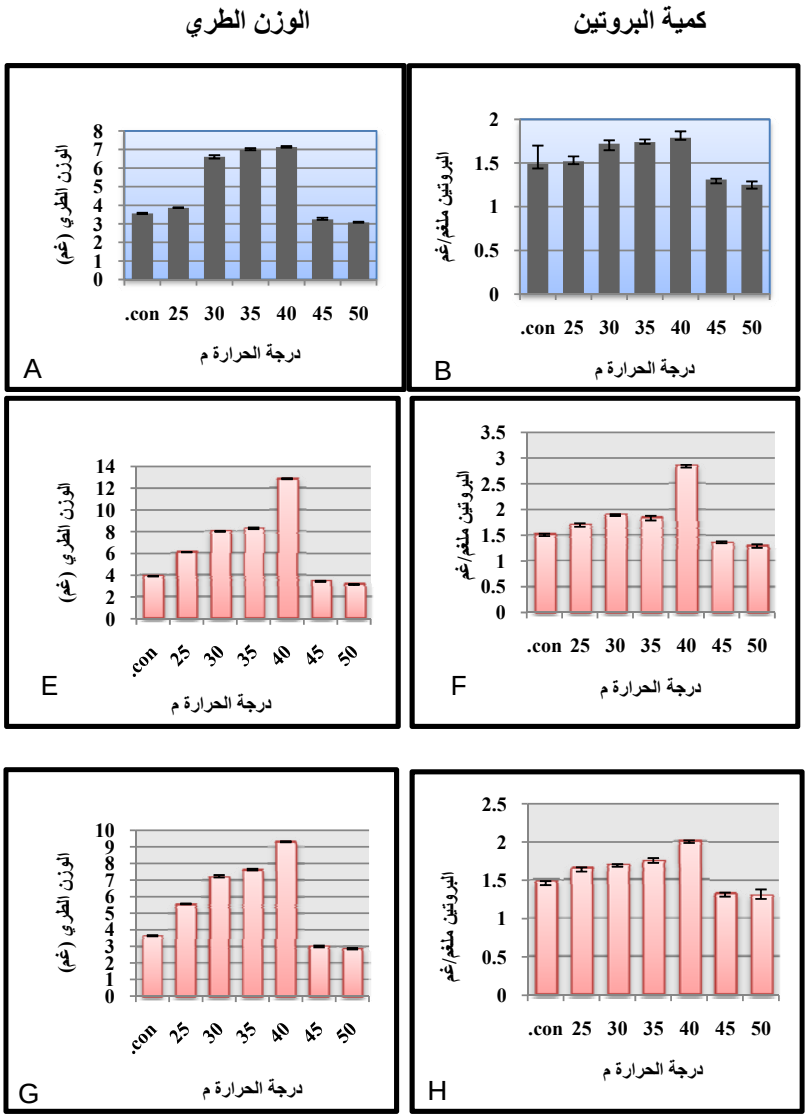
في كتلة الكالس التي سبق تعريضها لمعاملة الصدمة الحرارية قصيرة المدى 40°م/5 دقائق شكل (B-1) وللدرجة ذاتها لمدة 10 دقائق شكل (C-1). وترتب عن هذه الزيادة امتلاء وعاء الزراعة بكتلة نسيج الكالس الذي بقي محتفظا بلونه الأخضر المصفر وبنيته الهشة. ولوحظ ان تعريض الكالس لصدمة حرارية طويلة المدى 40°م/15 دقيقة أدت إلى زيادة حجم كتلته شكل (D-1) وبدأ حصول اختزال في حجم كتلة الكالس عند تعريضه للدرجة ذاتها مع زيادة فترة التعريض الى20 دقيقة شكل (E-1). ويبدو واضحا الانحراف السلبي في حجم كتلة الكالس عند رفع درجة حرارة التعريض من 40 الى 50م مع إبقاء مدة التعريض شكل(F-1).



الشكل(1): تأثيرات الصدمة الحرارية القصيرة والطويلة المدى في حجم ونمو كالس سيقان السمسم *Sesamum indicum* L. بعد ثلاثون يوما من زراعتها على وسط MS حاو على NAA 1.0 mgL^{-1} و BA 2.0 mgL^{-1} .

(A) : مزرعة الكالس بدون تعريض للصدمة الحرارية (مقارنة).
(B) : مزرعة الكالس المعرض للصدمة الحرارية قصيرة المدى (40°م \5) لاحظ الزيادة في حجمه.
(C) : مزرعة الكالس المعرض للصدمة الحرارية قصيرة المدى (40°م \10) تطور الزيادة في حجمه بشكل اكبر مما في(A).
(D) : مزرعة الكالس المعرض للصدمة الحرارية طويلة المدى (40°م \15) لاحظ كتلة الكالس الناتج.
(E) : مزرعة الكالس المعرض للصدمة الحرارية طويلة المدى (40°م \20) لاحظ كتلة الكالس الناتج.
(F) **: مزرعة الكالس المعرض للصدمة الحرارية طويلة المدى (50°م \20) لاحظ مدى موت الكالس.**

وتعبر البيانات المثبتة في شكل (2) عن نمط التغايرات الحاصلة في الكمية الكلية للبروتينات والأوزان الطرية للكالس فقد كشفت النتائج عن اتخاذ الزيادة في الاوزان الطرية لعينات الكالس التي عرضت للدرجات (30،35، 40)م أنماطا مماثلة لانماط الزيادة في كمية البروتينات في الصدمة القصيرة المدى/5 دقائق شكل (B,A 2)، بينما شجعت الصدمة قصيرة المدى/10 دقائق حصول زيادة أخرى في الاوزان الطرية والبروتينات شكل (D,C2). وأرتقت المعاملة 40°م /15 دقيقة في الصدمة طويلة المدى في دعمها لزيادة واضحة في الوزن الطري والبروتينات شكل (F,E 2). وأدت المعاملة 50°م /20 دقيقة الى حدوث أنحرافا سلبيا واضحا في الأوزان الطرية والبروتينات شكل(H,G 2).



شكل (2): انعكاسات تأثير الصدمة الحرارية بنمطيها القصيرة المدى (A ----- D) والطويلة المدى (E ----- H) في كمية البروتينات والأوزان الطرية لكالس سيقان السمسم *Sesamum indicum* L. النامي في وسط الاستحداث بعد ثلاثون يوما من المعاملة.

(T) : الانحراف القياسي. كل قيمة تمثل معدل خمس مكررات.

المناقشة :

أن الزيادة الحاصلة في كمية الأحماض النووية بنوعيها DNA وRNA والبروتين في عينات كالس سيقان السمسم التي سبق تعريضها لمدايات من الصدمتين الحراريتين عموما من المحتمل أن تعزى إلى زيادة في بناء بروتينات الصدمة الحرارية HSPs، اذ أن الخلايا النباتية تستجيب للصدمة الحرارية بزيادة تعبيراتها الجينية التي تشفر فيما بعد بناء بروتينات الصدمة الحرارية بسبب تحفيزها عوامل الصدمة الحرارية HSFs المتمثلة بتنشيط مجموعة جيناتHSPs [5]. فقد ذكرت احدى الدراسات [23] إن تحفيز بناء بروتينات HSPs يحصل عند تعريض خلايا المزرعة النسيجية لفول الصويا والتبغ لدرجة الحرارة بين 39-40م. ووجدت دراسة أخرى [24] أن تعريض DNA لبذور الشليك الأحمر لمعاملة الحرارة لفترة قصيرة (أقل من ساعة) أدى إلى زيادة كميتها مقارنة مع البذور غير المعاملة، وقيام عوامل الصدمة الحرارية وحامض السالسيلك بوظيفة محفزات تحمل جهد الجفاف في بعض النباتات [25]. ووجد حديثا أن الصدمة الحرارية لها تأثير واضح في زيادة تردد التعبير الجيني في نباتات الرز [5]. وإن تعريض مزرعة الجذور الشعرية في التبغ المحولة وراثياً لصدمة حرارية تتراوح من36-42°م لمدة ساعتين حفزت

مجموعة جينات ß-glucuronidase (*GUS*) [26] فضلا عن زيادة في فعالية إنزيمات (Polyphenol oxidase PPO) وPenoxidase (POD) في نبات الخس الثلجي عند تعريضها لصدمة حرارية [27]. وقد تفسر الزيادة الحاصلة في الفعالية النوعية لأنزيمات بناء dTMP الى أن معظم التفاعلات البايوكيميائية في خلايا النبات مسيطر عليها أنزيميا وتزداد بمعدل مرتين مع كل 10 درجات زيادة لمدى من 20-30 °م بينما الدرجات الحرارية فوق هذا المدى تؤدي إلى كبح سرعة التفاعل خطوة خطوة حتى يتوقف الإنزيم فإما أن يحصل له مسخ أو يكون غير فعال [4].

وأشارت العديد من الدراسات أن النبات يمتلك أنظمة مضادة للأكسدة متمثلة بإنزيمات Ascorbate peroxidase (APX) وSuper oxid dismutase (SOD) وGlutathion reductase (GR) و Dehydro asconbate reductase (DHAR) تنتج عند ظروف الإجهاد. وهذه الأنظمة تسيطر على Reactive oxygen species (ROS) أي الجذور الحرة التي تتكون في الخلايا النباتية عند استجابتها لظروف الإجهاد (الصدمة) ولكن هذه المواد المضادة للأكسدة تعد مواد مثبطة أو كاسحة لهذه الجذور الحرة مسببة زيادة تحمل إجهاد الأكسدة الناتجة عن الحرارة و إنتاج أنزيمات مثل أنزيمات GR وPolyaminase وتكمن الأهمية الفسيولوجية في تأثيرها في التعبير عن جينات الدفاع اذ تساهم إنزيمات GR الناتجة بفعل إجهاد الحرارة في تفاعلات الأكسدة والاختزال في انقسام الخلية [6].

أن الاختزال الواضح في كمية DNA وRNA والفعالية النوعية للإنزيمات عند تعريض الكالس لدرجة حرارة 40-50م يعزى الى أن زيادة درجة الحرارة فوق الحد الأمثل لفعالية الإنزيم يعمل على زيادة درجة التصادم بين الجزيئات مؤذياً التركيب الثلاثي للإنزيم الذي تعتمد عليه التفاعلات الإنزيمية وتختزل فعاليته وكذلك نسبة التفاعل مما يؤثر سلبا في أنزيمات بناء dTMP الأساسية في عملية بناء الحامض DNA وبالتالي عدم انقسام الخلايا. وانعكس هذا في انخفاض معدل الوزن الطري لأنسجة الكالس. فقد أشار بعض الباحثين إلى انخفاض فعالية إنزيمات PPO و POD عند تعريض خلايا الخس الثلجي إلى درجة 50م [27]. كما أن بناء HSPs ينخفض عند 45°م [23].

أن الاستنتاج الذي توصلت إليه الدراسة الحالية يكمن في أن المزارع النسيجية تمثل نظاماً بديلاً عن النبات الكامل في تقديم التفسيرات لهذه المؤثرات الفيزيائية وعلاقتها بفعالية الإنزيمات المشاركة في بناء dTMP . وأمكانية أستخدام الصدمة الحرارية 40°م /15 دقيقة كعامل فيزيائي لإحداث تغييرات داخلية في أنسجة الكالس انعكست في زيادة فعالية أنزيمات TS وDHFR وSHMT مقترنة بزيادة كمية DNA وRNA والبروتينات والوزن الطري للكالس.

المصادر:

1. Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H. J. and Marmiroli, N. (2002). Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals, Plant Mol. Biol. 48: 667- 681.
2. Clarke, A. K., and Critchley, C. (1990). Synthesis of early heat shock proteins in young leaves of barley and sorghum, Plant Physiol. 94:567-576.
3. Vierling, E. (1997).The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins, Acta Physiol. Plant. 19:539-547.
4. Montgomery, A., Conway, L., Spector, A., and Cappell, H. (2004). Biochemistry. A Case oriented approach. St. Mosby and company. 525: 470- 495.
5. Chauhan, H., Khrana, N., Agarwal, P. and Khurana, P. (2011). Heat Shock factors in rice (*Oryza sativa* L.). Genome-wide expression analysis during reproductive development and abiotic stress. India Mol.Genet Genomics. 286 :171-187.
6. Wahid, A., Gelan, S., Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants, An overview. Environ. and Exp. Bot. 61:199- 223.
7. محمد، عبد المطلب سيد، الجلبي، قصي عبد القادر وعبود، ساجدة عزيز. (2007). عزل وتنقية جزئية لانزيم الثايميدليت سينثيز من كالس الخس. *Lactuca sativa* L ، مجلة التربية والعلم، المجلد (19)، العدد (2):1-11.

8. Tsung, L., J., Pi- fang, L., Ch., Yih- Ming, Ch., Joe, L.K. and Chu- Yung Lin. (1997). Tissue-Type specific heat- shock response and Immunolocalization of Class I low- molecular- weight heat- shock proteins in soybean. Plant Physiol. 114:429-438.

9. Ledesma, N. A. and Kawabata, S. (2004). Effect of high temperature on protein expression in strawberry plants. Biol. Plant. 48: 73- 79.

10. Iba, K. (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants, approaches of genetic engineering for temperature tolerance. Ann. Rev. Plant Biol. 53: 225- 245.

11. Coca, M.A., Almoguera, C., Thomas, T.L. and Jorano, J. (1996). Differential regulation of small heat shock gene in plant: analysis of water- stress- inducible and developmentally activated sunflower promoter, Plant Mol. Biol. 31: 836- 870.

12. Arnon, D.I. and Hoagland, D.R. (1944). The investigation of plant nutrition by artificial culture methods, Biol. Rev. 19: 55- 67.

13. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473- 497.

14. رشيد، جميلة هزاع و قاسم، وجدان سالم. (2006). دور المعاملة الحرارية في تحفيز الانقسام الخلوي وتكوين الكالس من زراعة المعلقات الخلوية لنباتات زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. في قطرات الاكار المتعددة. مجلة زراعة الرافدين، المجلد(34) العدد(2):1-10.

15. Friedkin, M. (1963). Thymidylate Synthetase. (Ed. Mesister, A.) Adv. In Enzym. 38: 235- 292.

16. Mathews, C.K., Scrimgeour, K. G. and Huennekens, F.M. (1963). Dihydrofolic Acid Reductase.(Eds.: Colowick, S. P. and Kaplau, N.O.) Meth. In Enzym. 6: 364- 368.

17. Osborne, M.J. and Huennekens, FM. (1958). Enzymatic reduction of dihydrofolic acid. J. Biol. Chem. 233: 969- 974.

18. Uyeda, K. and Rabinowitz, J.C. (1968). Enzymes of the clostridial purine fermentation serine hydroxymethyl transferase. Archs. Biochem. Biophys. 123: 271-278.

19. Huennekens, F.M., Ho, P.P.K. and Scrimegour, K.G. (1963). Preparation and Properties of Active Formaldehyde and Active formate. (Eds., Colowick, S.P. and Kaplau, N.O.) Meth. In Enzym. 6: 806- 811.

20. Cherry, J. H. (1962). Nucleic acid determination in storage tissue of higher plants. Plant Physiol. 37: 670- 678.

21. Giles, K.W. and Mayer, A. (1967). Determination of DNA concentration with diphenylamine reagent. Meth. In Enzym. 12: 163.

22. Skacterle, G. R., and Pollack, R. L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological materials. Anal. Biochem. 51: 654-655.

23. Thomas B., Mitchell, A., Cari, M. and Joseph, M. (2005). Heat shock induced proteins in plant cells. Devel. Genet. 1: 331-340.

24. Maura, M., and Maria L. (2009). DNA integrity and germination in heat-treated strawberry achenes Electronic J. Environ. Agri. and Food Chemistry. 8:991-996.

25. Azooz, M. M. and Youssef, M. M. (2010). Evaluation of heat shock and salicylic acid treatments as inducers of drought stress tolerance in Hassawi Wheat. Amer. J. Plant Physiol., 5: 56 – 70.

26. Lee, K.T, Chen, S.C, Chiang, B.L, Yamakawa and Appi T. (2007). Heat –inducible of beta-glucuronidase in tobacco hairy root cultures.Microbio. Biotechnol.10:53- 73.

27. Ana, B. M., Daniel, R., Cathrine, B., Jemina, M., Jesus, F., and Gary, T. M. (2005). Effect of heat shock on browning related enzymes in minimally processed Iceberg Lettuce and crude extracts. Biotechnol. Biochem. 69: 1677-1685.