دراسة تأثير الإجهاد الملحي في نشاط بعض الأنزيمات المضادة للأكسدة وتعبيرها المورثي في نباتات البطاطا

صفاء نجلا*

الملخص

نُفذ هذا البحث بهدف دراسة التغيرات في نشاط بعض الأنزيمات المضادة للأكسدة (السوبرأوكسيد ديزموتاز SOD، الكتالاز CAT والأسكوربات بيروكسيداز APX) والتعبير المورثي لبعض المورثات المرمزة لهذه الأنزيمات (الحديد–سوبرأوكسيد ديزموتاز I-SOD، النحاس–زنك–سوبرأوكسيد ديزموتاز CuZn-SOD، الكاتالاز–1 CAT1، الكاتالاز–2 CAT2، الأسكوربات بيروكسيداز السيتوبلازمي APXcyto والأسكوربات بيروكسيداز الكلوروبلاستي APXt) في نباتات صنف البطاطا Amarin المزروعة بالأنسجة تحت تأثير تراكيز مختلفة من الملوحة (0، 50، 100، 150 و200 ميلليمولر من NaCl). أدى الإجهاد الملحي إلى زيادة نشاط كل الأنزيمات المضادة للأكسدة المدروسة عند تراكيز الملوحة المتوسطة (100 و150 ميلليمولر) بينما انخفض عند التركيز المرتفع (200 ميلليمولر). وتوافق هذا التغير في نشاط الأنزيمات مع تغير التعبير المورثي للمورثات المسؤولة عنها، حيث ازداد تعبير هذه المورثات عند تراكيز الملوحة المنخفضة والمتوسطة وانخفض عند تراكيز الملوحة المرتفعة. وبالتالي يمكن القول أن الأنزيمات المضادة للأكسدة تؤدي دوراً مساعداً في أليات الدفاع لدى نباتات البطاطا في البيئات المجهدة ملحياً.

الكلمات المفتاحية: البطاطا، الإجهاد الملحي، إجهاد الأكسدة، الأنزيمات المضادة للأكسدة، التعبير المورثي.

* أستاذ مساعد في قسم علوم البستنة– كلية الزراعة – جامعة دمشق.

Effect of saline stress on the activity of some antioxidant enzymes and their gene expression in potato plants

Safaa Najla*

Abstract

This research was carried out to study the changes in the activity of some antioxidant enzymes (superoxide dismutase SOD, catalase CAT and ascorbate peroxidase APX) and the gene expression of some genes encoded these enzymes (iron-superoxide dismutase I-SOD, copper-zinc-superoxide dismutase CuZn-SOD, catalase-1 CAT1, catalase-2 CAT2, cytoplasmic ascorbate peroxidase APXcyto and chloroplastic ascorbate peroxidase APXt) in potato cultivar Amarin cultivated in-vitro under the effect of different concentrations of salinity (0, 50, 100, 150 and 200 mM of NaCl). Saline stress increased the activity of all studied antioxidant enzymes at medium salinity concentrations (100 and 150 mM) and decreased it at high concentration (200 mmol). This change in the activity of enzymes coincided with the change in the expression of the genes responsible for these enzymes, the expression of these genes increased at low and medium salinity concentrations and decreased at high salinity concentrations. Thus, antioxidant enzymes play an important role in the defense mechanisms of potato plants in salt-stressed environments.

Key words: Potatoes, saline stress, oxidative stress, antioxidant enzymes, gene expression.

* **Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, University of Damascus, Syria.**

المقدمة:

تؤدي الإجهادات البيئية التي تتعرض لها النباتات إلى إنتاج أشكال الأوكسجين النشطة Reactive Oxygen Species (ROS)، وهي الجذور الحرة التي تتشكل في خلايا الكائنات الحية الهوائية خلال عمليات الاستقلاب والتمثيل الغذائي، والتي يزداد إنتاجها عند التعرض للإجهادات الحيوية واللاحيوية المختلفة (Babu وزملاؤه، 2003). ومن أهم الأنواع النشطة للأوكسجين الذي تنتج رداً على الإجهاد: بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)، السوبر أوكسيد ($O_2^{\bullet-}$)، والهيدروكسيل ($OH^{\bullet}$)، والأوكسجين المتهيج في الحالة الفردية ($^1O_2$) (Halliwell وGutteridge، 1985). تعد البلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا والغشاء السيتوبلازمي المواقع الرئيسة لإنتاج الـ ROS في الخلية النباتية خلال الإجهادات اللاحيوية، بالإضافة إلى التشكيل الطبيعي لل ROS باعتبارها منتجات ثانوية للعمليات الاستقلابية (Apel وHirt، 2004). تؤدي زيادة إنتاج الـ ROS إلى حدوث إجهاد الأكسدة في الخلايا والذي يلحق الضرر بالليبيدات والبروتينات والأحماض النووية (Hernandez وزملاؤه، 2000)، وهذا الضرر التأكسدي يضعف الوظائف الطبيعية للخلايا ويؤثر في نمو النبات (Foyer وFletcher، 2001). ينتج عن أكسدة الـ ROS للبيدات الغشاء الخلوي مشتقات ليبيدية شديدة السمية تسبب فقد الغشاء الخلوي لبنيته ووظيفته وخصائصه الفيزيائية، ويمكن أن تؤدي إلى موت الخلية، وتعتبر زيادة تركيز هذه المشتقات مؤشراً على شدة الضرر التأكسدي (Zhang وزملاؤه، 2004).

طورت النباتات نظام معقد من مضادات الأكسدة بحيث تستطيع من خلاله كنس الـ ROS لتحمي الخلايا من الضرر التأكسدي، وينقسم هذا النظام إلى مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية (Farooq وزملاؤه، 2008)، ومن أهم مضادات الأكسدة غير الأنزيمية: حمض الأسكوربيك (فيتامين C)، الغلوتاثيون، الكاروتينات، الفينولات، التيكوفيرول والفلافونيدات. أما أهم مضادات الأكسدة الأنزيمية فهو السوبر أوكسيد دزموتاز Superoxide dismutases (SOD)، ويوجد نظائر أنزيمات isoforms متعددة

منه في الأنسجة النباتية، والتي تصنف عموماً وفقا للمعدن الموجود في الموقع النشط من الأنزيم: SOD–النحاس والزنك (Cu/Zn-SOD)، SOD–الحديد (Fe-SOD) وSOD–المنغنيز (Mn-SOD) (McCord وFridovich، 1969)، ويقوم الـ SOD بتحويل السوبر أوكسيد إلى H_2O_2، والكتالاز catalase (CAT) والأسكوربات بيروكسيداز ascorbat peroxidase (APX)، واللذان يقومان بإزالة الـ H_2O_2 عن طريق تحويله إلى ماء وأوكسجين (Sairam وزملاؤه، 2005). وتبين الدراسات أن الدور الفعّال للأنزيمات المضادة للأكسدة في إزالة سمية الـ ROS يعتمد على شدة الإجهاد بالإضافة إلى مرحلة نمو النباتات عند تعرضها للإجهاد (Ashraf، 2009).

أن الآلية الدقيقة التي يستعملها النبات خلال ظروف الإجهاد كاستجابة دفاعية ليست معروفة بشكل دقيق، ولكن يعتقد أنها إما أن تكون على مستوى تغيير في تعبير المورثات، أو مسالك متداخلة بين تعبير المورثات والأنزيمات الوظيفية (Scandalios، 1974). حيث تؤدي ظروف الإجهاد المختلفة إلى حدوث تغيير في تعبير المورثات المتحكمة بالأنظمة الدفاعية في الخلية، وزيادة فعالية النظام المضاد للأكسدة لإزالة ضرر الجذور الحرة (Neill وزملاؤه،2002). وقد تمت دراسة تغير التعبير المورثي تحت ظروف الإجهاد في العديد من النباتات، مثل الرز (Hazen وزملاؤه، 2005)، الشعير (Guo وزملاؤه، 2009)، الذرة (Hayano-Kanashiro وزملاؤه، 2009) والبطاطا (Vasquez-Robinet وزملاؤه، 2008).

يعد محصول البطاطا واحداً من أهم محاصيل الخضر في سورية، وهناك ازدياد مستمر في استهلاك هذا المحصول مع تزايد التركيز على النوعية المميزة، وتتعرض النباتات بشكل دائم لحالات الإجهاد البيئي الذي يعوق تطورها ويسبب خسائر في الغلة والنوعية. ومن أجل التقليل من هذه الآثار لابد من زيادة مقدرة النبات على تحمل الإجهادات غير الحيوية، والشرط الأساسي للتحسين الوراثي لنباتات المحاصيل هو فهم مفصل لأسباب وآثار الضرر الناجم عن الإجهاد وتحديد الآليات الدفاعية التي

يستخدمها النبات لتحمله. لذلك يهدف هذا البحث إلى تقييم فعالية الآليات الدفاعية في خلايا صنف البطاطا Amarin عن طريق تقدير تأثير الإجهاد الملحي في تغير نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة (SOD،CAT وAPX) وتغير تعبير بعض المورثات المرمزة لهذه الأنزيمات وذلك بتقدير مستويات التراكم النسخي لـ mRNA الخاص بهذه المورثات باستخدام تقنية Real Time PCR.

مواد البحث وطرائقه:

زمان ومكان تنفيذ البحث:

نفذ البحث في مخبر أبحاث الخضار في كلية الزراعة – جامعة دمشق، ومخبر التقانات النباتية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق، خلال عامي 2014 و2015.

المادة النباتية:

استعمل في تنفيذ هذا البحث صنف Amarin وهو من أصناف البطاطا التجارية المرغوبة لدى المزارعين، والذي تمَّ الحصول عليه من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية. تمت زراعة النهايات الوردية المأخوذة من الدرنات في أصص بلاستيكية تحتوي على البيتموس المعقم ثم جمعت النموات الناتجة عنها بعد 45 يوماً من الزراعة، ثم تم قص هذه النموات إلى عقلٍ مفردةٍ بطول 1–1.5 سم، يحتوي كل منها برعم جانبي واحد، وغُسلت بالماء الجاري ثم غُمرت بالكحول الإيتيلي Ethanol تركيز (70%) لمدة 1 دقيقة ثم نقعت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) تركيز 0.5 % لمدة 10 دقائق، ثم غسلت الخزعات النباتية 3 مرات متتالية بالماء المقطر المعقم، وذلك بمعدَّل 5 دقائق في كل مرة. زُرعت العقل بعد تعقيمها في أنابيب اختبار تحتوي على 12.5 مل من وسط Murashige and Skoog (MS) (1962)، المضاف له 30 غ.ل$^{-1}$ سكروز و7 غ.ل$^{-1}$ آجار وبدرجة حموضة (pH) 5.8. حُضنت الأنابيب المزروعة بغرفة النمو على درجة حرارة 22±2 م$^{\circ}$ وإضاءة 16 ساعة/8 ظلام وشدة ضوئية 3000 لوكس.

معاملات الإجهاد:

تمَّ استعمال تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl (0، 50، 100، 150 و200 ميلليمولر) كعامل مُسببٍ للإجهاد الملحي. حيث قسّمت العينات النباتية الناتجة من مرحلة الإكثار إلى عقل صغيرة بطول 1–1.5 سم تحتوي برعم جانبي مع ورقة، وزرعت في وسط الإكثار نفسه، لكن مع إضافة عامل الإجهاد. كُررت التجربة مرتين، وبمعدل 16 مكرراً لكل معاملة. بعد مضي 45 يوم على تطبيق معاملات الإجهاد المختلفة، تم أخذ كامل النمو الخضري للنباتات المجهدة ملحياً والشاهد، وتم تجميدها مباشرةً وطحنها في الآزوت السائل، ثم وضعت العينات المطحونة في عبوات بلاستيكية وخزنت على درجة حرارة – 80 درجة مئوية لحين القيام بالتحاليل.

تقدير نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة:

تمت جميع الاختبارات الأنزيمية عند درجة حرارة 25 م° باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي حسب طريقة Murshed وزملاؤه (2008b):

1. استخلاص الأنزيمات:

من أجل استخلاص الأنزيمات المدروسة، تم أخذ مسحوق العينات المجمدة والمطحونة في الآزوت السائل (0.2 – 0.4 غ)، وتم مجانسته في 1 مل من محلول MES/KOH بتركيز 50 ميلليمولر وpH 6 والحاوي على 40 ميلليمولر من KCl و2 ميلليمولر من $CaCl_2$ و1 ميلليمولر من الأسكوربات. ثم تم وضعها في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة وبسرعة 16000g وعلى درجة حرارة 4 م°. ثم استخدمت الرشاحة الناتجة لقياس نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة بشكل مباشر، وكذلك لقياس تركيز البروتينات والذي تم بطريقة Bradford (1976).

2. تقدير نشاط الأنزيمات:

- **تقدير نشاط أنزيم السوبر أوكسيد دزموتاز(SOD):**

قدر نشاط أنزيم الـ SOD بإضافة 10 µL من المستخلص الأنزيمي إلى 1 مل من محلول التفاعل الحاوي على فوسفات البوتاسيوم بتركيز 50 ميلليمولر وpH 7.8 والميثيونين بتركيز 13 ميلليمولر وNBT بتركيز 75 ميكرومولر وEDTA بتركيز 0.1 ميلليمولر والريبوفلافين بتركيز 2 ميكرومولر. بعد التحريك الجيد، تم تعريض الخليط إلى الإضاءة الاصطناعية لمدة 5 دقائق، ثم قراءة امتصاص العينة للأشعة الضوئية على طول موجة 560 نانومتر بواسطة جهاز قياس الطيف الضوئي. واستخدم منحنى معياري، رسم باستخدام تراكيز معلومة من SOD التجاري، لحساب نشاط SOD في العينة.

- **تقدير نشاط أنزيم الكاتالاز (CAT) :**

قدر نشاط أنزيم CAT من خلال تقدير تناقص تركيز H_2O_2 بقياس الانخفاض في الامتصاص لمدة 5 دقائق عند طول موجة ضوئية 240 نانومتر لمحلول التفاعل (1 مل) الحاوي على محلول فوسفات البوتاسيوم بتركيز 50 ميلليمولر وpH 7 و15 ميلليمولر H_2O_2 و100 ميكرولتر من المستخلص الأنزيمي. وتم حساب نشاط CAT باستخدام معامل التحلل 43.6 مولر/سم.

- **تقدير نشاط أنزيم الأسكوربات بيروكسيداز (APX):**

قدر نشاط أنزيم APX من خلال تقدير أكسدة الأسكوربات بقياس الانخفاض في الامتصاص لمدة 5 دقائق عند طول موجة ضوئية 290 نانومتر لمحلول التفاعل (1 مل) الحاوي على محلول فوسفات البوتاسيوم بتركيز 50 ميلليمولر وpH 7 و0.25 ميلليمولر من الأسكوربات و50 ميكرولتر من المستخلص الأنزيمي. وتم حساب نشاط APX باستخدام معامل التحلل 2.8 ميلليمولر/سم.

دراسة التعبير المورثي:

يمكن دراسة تعبير مورث ما عن طريق تعقب الحمض النووي الريبي الرسول (mRNA) المنسوخ عن هذا المورث، لذلك لتقدير تعبير المورثات المدروسة تم استخلاص الحمض النووي الريبي الكلي (Total RNA) ثم تحويل الحمض النووي الريبي الرسول (mRNA) إلى الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين المكمل (cDNA; Complementary DNA). ثم دراسة تعبير المورثات المدروسة باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي (Real time PCR) وباستخدام بادئات خاصة بكل مورث.

1. استخلاص الـ RNA الكلي:

تم استخلاص الـ RNA الكلي من حوالي 50 – 100 ميلليغرام من مسحوق العينات المجمدة والمطحونة في الآزوت السائل، وذلك باستخدام طريقة الـ Tri-Reagent (MRC, Molecular Research Center, INC) وذلك حسب التعليمات الموضوعة من قبل الشركة المصنعة. ثم تم تقدير تركيز RNA الكلي بواسطة جهاز قياس الطيف الضوئي وذلك بقياس الامتصاص عند طول الموجة الضوئية 260 نانومتر. وكذلك التأكد من نوعية RNA الكلي باستخدام الرحلان الكهلربائي وجيل agarose تركيز 1 %. ثم تم تخزين المستخلصات على درجة حرارة – 20 م ه حتى الاستعمال.

2. تركيب الـ cDNA:

تم تركيب الـ cDNA من 4 ميكروغرام من الـ RNA الكلي بواسطة تقنية النسخ العكسي بواسطة تفاعل البوليميرازالمتسلسل (RT-PCR) وبوجود أنزيمات النسخ العكسي (Reverse transcriptase) وبادئ خاص Oligo-d(T). تم تركيب الـ cDNA بواسطة Masterscript^{TM} RT-PCR System (PRIME 5) وذلك حسب التعليمات الموضوعة من قبل الشركة المصنعة.

3. دراسة تعبير المورثات:

تم تصميم بادئات مختصة بكل مورث من المورثات المدروسة والمتحكمة بأنزيمات SOD وCAT وAPX اعتماداً على تسلسل القواعد النتروجينية للمورثات المشابهة والموجودة في GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (الجدول 2). تم دراسة تعبير كل مورثة من المورثات وذلك بمقارنة تعبير هذه المورثة مع مورثة شاهد معروفة بعدم تأثرها بالإجهاد (SlActin) وكذلك كمقارنة تعبير هذه المورثة في النباتات المعرضة للإجهاد مع تعبير نفس المورثة في نباتات الشاهد. وذلك باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي (Real time PCR) وبوجود البادئات المختصة بكل مورثة وباستخدام طريقةReal Master Mix SYBR ROX (5PRIME)، وذلك حسب التعليمات الموضوعة من قبل الشركة المصنعة.

الجدول (2): المورثات المتحكمة بالأنزيمات المضادة للأكسدة وتسلسل البادئات المستعملة في دراسة تعبيرها الموثي.

رمز المورثة	تسلسل البادئ	
STISOD	F	CTGGGGGAAGCATCACAAGACGT
	R	TCCAGGCCTGAGCAGCATCGT
STCuZnSOD	F	GCTTCCATGTCCATGCCCTTGGT
	R	CACAAGCAATCCTTCCGCCAGCA
STCAT1	F	AAGGTTTTGGCGTCCACGCGT
	R	ACGCGAGCTGCTCATTCTCAGC
STCAT2	F	TCCATGAACGTGGAAGCCCCGA
	R	ACGGCAAGAGATCCTCAGGCCA
STCYTAPX	F	TGGTGATCGGAAGAGCTGGGAGTG
	R	AGAGCAGCAAAACACAACAGCTCCA
STAPX	F	TCCCACCGTGAGCGAGGAGTAC
	R	TTGGTGGCATCAGGCAAGCGA
STACTIN	F	ATGACTCAAATCATGTTTGAG
	R	TACCTTAATCTTCATGCTGCT

النتائج والمناقشة:

تتعرض نباتات البطاطا باستمرار لمجموعة واسعة من الإجهادات البيئية التي تحد من إنتاجها، ومنها الإجهاد الملحي الذي يزيد الجهد الحلولي للتربة وبالتالي يحد من امتصاص الماء من قبل النبات. إن النتائج السلبية التي تسببها الأنواع المختلفة من الإجهادات البيئية للنباتات تحدث بشكل رئيسي نتيجة فرط إنتاج الأنواع النشطة من الأوكسجين في النباتات التي تعاني من الإجهادات البيئية مثل الجفاف والملوحة. هذا الفرط في الإنتاج ينتج بشكل أساسي نتيجة الخلل في سلاسل نقل الإلكترونات الخاصة بالتنفس والتركيب الضوئي، والذي يؤدي إلى أكسدة الأوكسجين (O_2) وإنتاج عدة أنواع نشطة من الأوكسجين مثل السوبر أوكسيد (O_2^-) وبيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) والهيدروكسيل (OH^-).

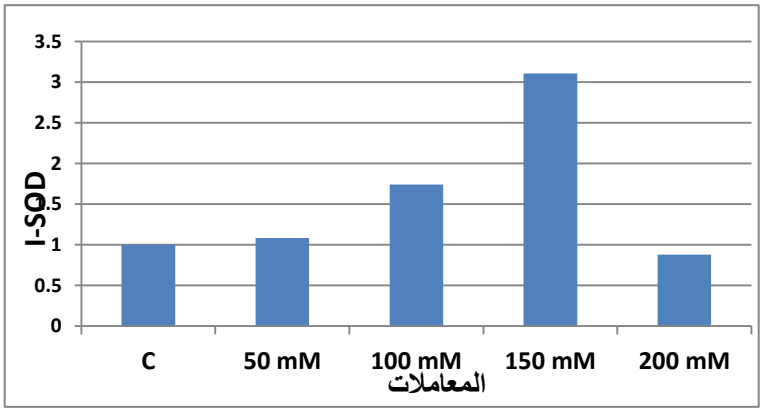
لوحظ من خلال النتائج أن نشاط أنزيم السوبرأوكسيد ديزموتاز SOD ازداد معنوياً بتأثير إضافة NaCl إلى وسط النمو بتركيز 100 و 150 ميلليمولر فقط، بينما انخفض عند تركيز 200 ميلليمولر (الجدول 3). ترافق تغير نشاط أنزيم الـ SOD بتأثير معاملات الملوحة المختلفة بتغير في تعبير بعض المورثات المتحكمة بهذا الأنزيم، حيث لوحظ ازدياد التعبير المورثي لمورثة الحديد–سوبرأوكسيد ديزموتاز I-SOD بتأثير جميع معاملات الملوحة عدا التركيز 200 mM حيث انخفض تعبير هذه المورثة (الشكل 1). كذلك بالنسبة لتعبير مورثة النحاس–زنك–سوبر أوكسيد ديزموتاز CuZn-SOD، فقد ازداد بتأثير التراكيز 50، 100 و 150 mM وانخفض بتأثير التركيز 200 mM (الشكل 2). يمكن تفسير الزيادة في نشاط أنزيم الـ SOD وزيادة تعبير المورثات المتحكمة به تحت تأثير الملوحة من خلال زيادة الحاجة لأنزيم الـ SOD بسبب زيادة عملية الأكسدة وإنتاج ROS في النباتات بتأثير الإجهاد، حيث يقوم الـ SOD بتحويل السوبر أوكسيد إلى H_2O_2، وتعتبر هذه العملية الخطوة الأولى في التخلص من ROS في الخلايا. وتتوافق هذه النتائج مع نتائج Rahnama و Ebrahimzadeh (2004)،

اللذين لاحظوا تزايد نشاط الـ SOD عند المستويات المنخفضة من الملوحة في أصناف البطاطا (Agria وKennebec) لكنه انخفض عند مستويات الملوحة الأعلى. كذلك تتوافق نتائجنا مع نتائج Fidalgo وزملاؤه (2004)، واللذين درسوا تغيير الأنزيمات المضادة للأكسدة تحت ظروف الإجهاد الملحي لفترة طويلة، فلاحظوا أن نشاط الـ SOD في النباتات ازداد تحت تأثير الإجهاد.

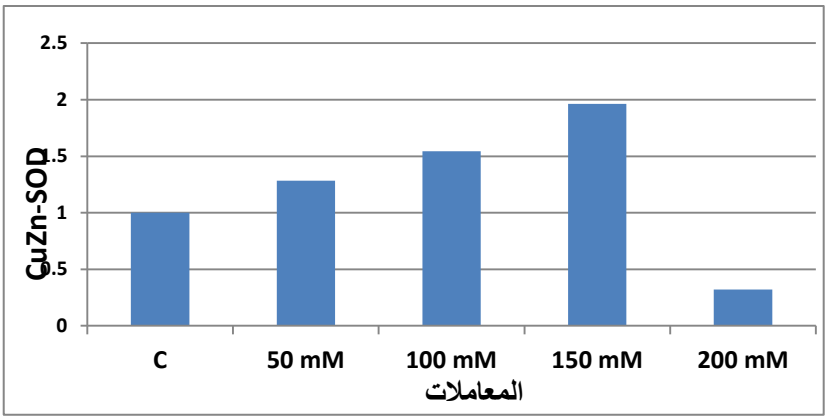
الجدول (3): النشاط الأنزيمي لأنزيم السوبرأوكسيد ديزموتاز SOD (وحدة/مغ بروتين)، الأسكوربات بيروكسيداز APX والكاتلاز CAT (ميكرومول/الدقيقة/مغ بروتين) في نباتات البطاطا الخاضعة للإجهاد الملحي.

المعاملة	SOD	CAT	APX
الشاهد	1.70 C	13.11 D	22.79 C
50ميلليمولر	1.75 C	25.97 C	26.18 C
100 ميلليمولر	3.42 A	120.98 B	141.76 A
150 ميلليمولر	2.97 B	149.00 A	48.48 B
200 ميلليمولر	1.48 D	1.71 E	13.34 D
$LSD_{0.05}$	0.11	8.13	7.43

* تشير الأحرف المختلفة ضمن العامود الواحد إلى وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية 95 %.

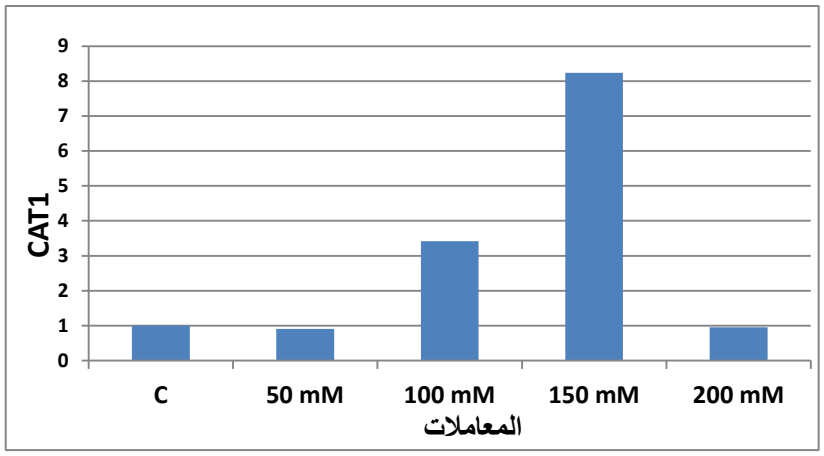


الشكل (1): التعبير المورثي لمورثة الحديد – سوبرأوكسيد ديزموتاز I-SOD في نباتات البطاطا الخاضعة للإجهاد الملحي.

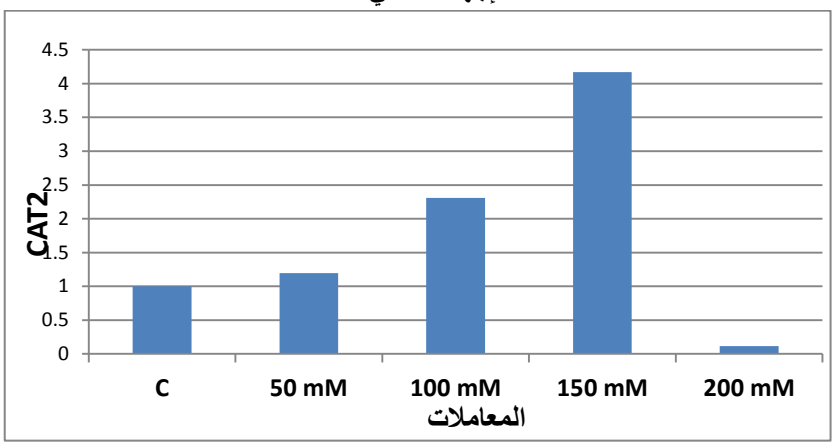


الشكل (2): التعبير المورثي لمورثة النحاس– زنك – سوبرأوكسيد ديزموتاز -CuZn SOD في نباتات البطاطا الخاضعة للإجهاد الملحي.

لوحظ من خلال النتائج كذلك ازدياد نشاط أنزيم الكاتالاز CAT معنوياً في جميع معاملات الملوحة عدا التركيز 200 ميلليمولر حيث انخفض نشاطه (الجدول 3). ترافق تغير نشاط الأنزيم CAT بتأثير معاملات الملوحة المختلفة أيضاً بتغير في تعبير بعض المورثات المتحكمة بهذا الأنزيم، حيث لوحظ ازدياد التعبير المورثي لمورثة الكاتالاز–1 CAT1 في المعاملة بالتراكيز 100 و150 ميلليمولر فقط بينما انخفض تعبير هذه المورثة في المعاملة بالتراكيز 50 و200 ميلليمولر (الشكل 3). بالنسبة لتعبير مورثة الكاتالاز–2 CAT2، فقد ازداد بتأثير جميع معاملات الملوحة عدا التركيز 200 ميلليمولر حيث انخفض تعبير هذه المورثة (الشكل 4). وتتوافق هذه النتائج مع نتائج Rahnama و Ebrahimzadeh (2004)، اللذين لاحظوا تزايد نشاط الـ CAT عند مستويات الملوحة المختلفة في أصناف البطاطا (Agria و Kennebec).



الشكل (3): التعبير المورثي لمورثة الكاتالاز–1 CAT1 في نباتات البطاطا الخاضعة للإجهاد الملحي.

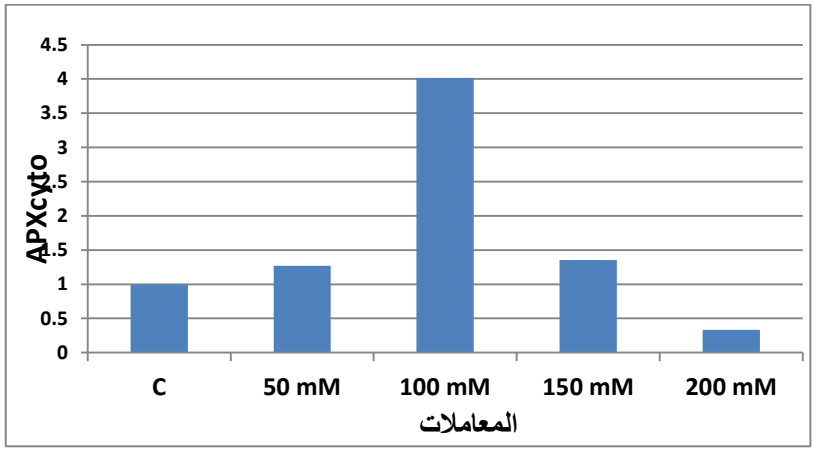


الشكل (4): التعبير المورثي لمورثة الكاتالاز–2 CAT2 في نباتات البطاطا الخاضعة للإجهاد الملحي.

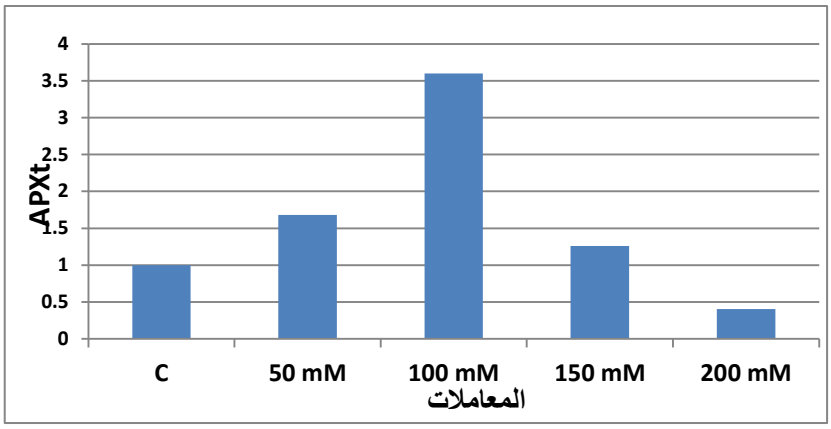
أظهرت النتائج كذلك أن نشاط أنزيم الأسكوربات بيروكسيداز APX ازداد بتأثير إضافة NaCl إلى وسط النمو بتركيز 100 و150 ميلليمولر فقط بينما انخفض بتأثير التركيز 200 ميلليمولر (الجدول 3). ترافق أيضاً تغير نشاط الأنزيم APX بتأثير

معاملات الملوحة المختلفة بتغير في تعبير بعض المورثات المتحكمة بهذا الأنزيم، حيث لوحظ ازدياد التعبير المورثي لمورثة الأسكوربات بيروكسيداز السيتوبلازمي APXcyto بتأثير جميع معاملات الملوحة عدا التركيز 200 mM حيث انخفض تعبير هذه المورثة (الشكل 5). كذلك بالنسبة لتعبير مورثة الأسكوربات بيروكسيداز الكلوروبلاستي APXt، فقد ازداد بتأثير جميع معاملات الملوحة عدا التركيز 200 ميلليمولر حيث انخفض تعبير هذه المورثة (الشكل 6).

ويمكن تفسير ازدياد نشاط أنزيم الكتالاز والأسكوربات بيروكسيداز تحت تأثير الإجهاد الملحي نتيجة ازدياد إنتاج H_2O_2 بسبب ازدياد نشاط أنزيم السوبرأوكسيد ديزموتاز، حيث يقومان بإزالة الـ H_2O_2 عن طريق تحويله إلى ماء وأوكسجين (Sairam وزملاؤه، 2005).



الشكل (5): التعبير المورثي لمورثة الأسكوربات بيروكسيداز السيتوبلازمي APXcyto في البطاطا الخاضعة للإجهاد الملحي.



الشكل (6): التعبير المورثي لمورثة الأسكوربات بيروكسيداز الكلوروبلاستي APXt في نباتات البطاطا الخاضعة للإجهاد الملحي.

في الخلاصة، تظهر هذه الدراسة حدوث تغيرات هامة في الأنظمة المضادة للأكسدة الأنزيمية (SOD، CAT و APX) وفي تعبير المورثات المتحكمة بهذه الأنزيمات تحت تأثير الإجهاد الملحي، مما يدل على الدور الهام الذي تلعبه هذه الأنزيمات في تحمل نباتات البطاطا للإجهاد الملحي.

المراجع

- Apel, K. and H. Hirt. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annual Review of Plant Biology. 55:373-379.
- Ashraf, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnol. Adv. 27:84–93.
- Babu R.C., B.D. Nguyen, V. Chamarerk, P. Shanmugasundaram, P. Chezhian, P. Jeyaprakash, S. K. Ganesh, A. Palchamy, S. Sadasivam, S. Sarkarung, L. J. Wade and H.T. Nguyen. 2003. Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: association between secondary traits and field performance. Crop Sci. 43:1457–1469.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72(1–2):248-254.
- Farooq, M., S.M.A. Basra, A. Wahid, Z.A. Cheema, M.A. Cheema and A. Khaliq. 2008. Physiological role of exogenously applied glycinebetaine in improving drought tolerance of fine grain aromatic rice (Oryza sativa L.). J. Agron. Crop Sci. 194:325–333.
- Fidalgo, F., A. Santos, I. Santos and R. Salema. 2004. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. Ann. appl. Biol. 145:185-192.
- Foyer, C.H. and J.M. Fletcher. 2001. Plant antioxidants: colour me healthy. Biologist. 48:115–120.
- Guo P., M. Baum, S. Grando, S. Ceccarelli, G. Bai and R. Li. 2009. Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. J. Exp. Bot. 60:3531–3544.
- Halliwell, B. and M.C. Gutteridge. 1985. The Chemistry of Oxygen Radicals and Other Oxygen-Derived Species. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Eds., Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford, 20-66.
- Hayano-Kanashiro, C., C. Calderon-Vasquez, E. Ibarra-Laciette, L. HerreraEstrela and J. Simpson. 2009. Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. PLoS ONE. 4:1-19.

- Hazen, S.P., M.S. Pathan, A. Sanchez, I. Baxter, M. Dunn, B. Estes, HS. Chang, T. Zhu, JA. Kreps and HT. 2005. Nguyen. Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. Functional and Integrative Genomics. 5:104–116.
- Hernández, J.A., A. Jiménez, P.M. Mullineaux and F. Sevilla. 2000. Tolerance of pea (Pisum sativum L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. Plant Cell Environ. 23:853–862.
- McCord, J.M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein). Journal of Biological Chemistry. 244:6049-6055.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol Plantarum. 15:473-497.
- Murshed, R., F. Lopez-Lauri and H. Sallanon. 2008. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate–glutathione cycle. Analytical Biochemistry. 383(2):320-322.
- Neill, S.J., D. Desikan, A. Clarke and J.T. Hancock. 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. Plant Physiology. 128:13-16.
- Rahnama, H. and H. Ebrahimzadeh. 2004. The effect of NaCl on proline accumulation in potato seedlings and calli. Acta Physiologiae Plantarum. 26(3):263–270.
- Sairam, R.K., G.C. Srivastava, S. Agarwal and R.C. Meena. 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. Biological Plantarum. 49:85–91.
- Sairam, R.K., G.C. Srivastava, S. Agarwal and R.C. Meena. 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. Biol. Plant. 49:85–91.
- Scandalios, J.G. 1974. Isozymes in Development and Differentiation. Annu. Rev. Plant Physiol. 20:225-258.
- Vasquez-Robinet, C., S.P. Mane, A.V. Ulanov, J.I. Watkinson, V.K. Stromberg, D. De Koeyer. 2008. Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. J. Exp. Bot. 59:2109–2123.
- Zhang, J.F., X.R. Wang, H.Y. Guo, J.C. Wu and Y.O. Xue. 2004. Effects of water- soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defences of the goldfish (Carassius auratus). Ecotox Environ Saf. 58:110–116.