تأثير بعض منظمات النمو النباتية في استقلاب البروتينات في خلايا ساق نبات الذرة الصفراء

تهاني الحوراني[1] وأحمد مالو[2]

قسم الكيمياء ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ سورية

تاريخ الإيداع 2011/11/20

قبل للنشر في 2012/08/06

الملخص

دُرس في البحث المقدم تأثير مجموعة من منظمات النمو النباتية وهي حمض اندول الخل (IAA) وحمض 4,2 ثنائي كلورو فنوكسي الخل (2,4-D)، وحمض اندول الزبدة (IBA)، في استقلاب البروتينات الكلية في خلايا مقاطع ساق بادرات نبات الذرة الصفراء من نوع غوطة - 82 المستنبتة مدة ستة أيام في الظلام وبدرجة حرارة 25°c، وذلك بعد20 ساعة من عزلها وحضنها بالماء وفي محاليل منظمات النمو المبينة أعلاه بتركيز (50 ملغ/ل). كما درست التغيرات البنيوية الحاصلة في تراكيز كل من المجموعات البروتينية الأربع المكونة لبروتينات خلايا الساق في نبات الذرة، وهي الألبومينات، الغلوبولينات، البرولامينات، والغلوتيلينات.

بيّنت النتائج التي تم الوصول إليها أن تركيز البروتينات الكلي يتناقص عند عزل مقاطع البادرات وحضنها سواء بالماء المقطر أو بمحاليل منظمات النمو المدروسة بتركيز (50 ملغ/ل)، إلا أن منظمات النمو عملت على التقليل من معاناة مقاطع النبات المعزولة؛ وذلك بتثبيطها لعملية تفكك بروتينات الخلايا في البادرات المحضونة مقارنة بما تعرضت له هذه البروتينات في المقاطع المحضونة بالماء المقطر.

الكلمات المفتاحية: منظمات النمو النباتية، الذرة الصفراء، الألبومينات، البرولامينات، الغلوبولينات، الغلوتيلينات.

[1] طالبة، [2] الأستاذ المشرف.

Effect of plant growth regulators on metabolism of proteins in the seedling of Maize plant stems cells

T. Alhourane[1] and A. Malo[2]

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

Received 20/11/2011

Accepted 06/08/2012

ABSTRACT

This research aims to study the proteins transformation in zea maize plant seedlings cells, (GHOTA 82) under the influence of phyto hormone Auxin & grothregulators 2,4-D and IBA.

Maize plant seeds were germinated in water medium for six days in darkness and temperature of 25 ºC.

The quantity different groups of proteins, were analyzed in the stem cells of the developing seedling mesochotyles after incupation in darkness water and in different solutions of auxin, 2, 4D & IBA (in concentration 50 mg/l) for 20 hours in 26 ºC.

The results showed that had inhibition effects on hydrolysis of protein groups in zea maize plant seedlings cells.

Key words: Plant growth regulators, Albumins, Globulins, Glutelines, Prolamins, Zea Maize.

(1)Student, (2) Superviser.

المقدمة

من المؤكد أنه عند تعرض الخلايا النباتية للمعاناة عند عزلها عن مصادر الغذاء فإنها تبدأ بالموت نتيجة توقف التفاعلات الوظيفية فيها وتفكك المركبات البنيوية، وذلك بتـأثير إنزيمات الحلمهة التي تنشط وتبدأ بتفكيك المركبات الحيوية قبل الموت [1].

وقد بيّنت البحوث أن هناك العديد من المركبات الكيميائية التي تساعد الخلايا على مقاومة ظاهرة المعاناة وتأخير تفكك مكونات الخلايا قبل موتها[2]. ومن هذه المركبات منشطات الإنزيمات والهرمونات النباتية الطبيعية Phytohormones ومنظمات النمو الصنعية growth regulators [3،4].

تعدُّ الهرمونات النباتية عوامل تنظيم للوظائف الحيوية عند النباتات، فبوساطتها تتحقق العلاقات المتبادلة بين مختلف الخلايا والأنسجة النباتية، فهي المسؤول غير المباشر عن تنظيم التفاعلات الكيميائية التي تنظم تفاعلات التمايز الخلوي النسيجي الوظيفي والمورفولوجي والأنظمة الفعالة الحيوية [5].

الهرمونات النباتية هي جزيئات كيميائية صغيرة الوزن الجزيئي نسبياً، إذْ لمعظمها أوزان جزيئية تراوح بين 200-300، وهذا ما يسمح لها بالانتقال عبر الأنسجة بسهولة نسبية. تصنف هذه الهرمونات ضمن خمسة صفوف رئيسة هي: الأوكسينات Auxins والجيبيريلينات Gibberellins والسيتوكينينات sytokinins وحمض الأبسيسيك Abscisic acid والإيثيلين Ethylene [5].

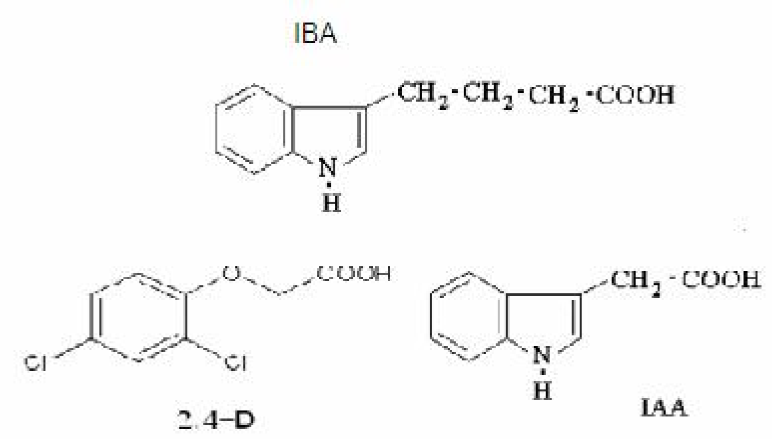
إن لبعض الكيماويات التي لا تصطنع في النباتات بشكل طبيعي، خصائص وظيفية مشابهة للهرمونات وتدعى لذلك منظمات نمو نباتية. وبالتعريف تكون الهرمونات جميعها هي منظمات نمو، ولكن ليست منظمات النمو جميعها هي هرمونات[5]. ومن أكثر منظمات النمو استخداماً في التطبيق العملي مركب حمض ثنائي كلورو فينوكسي الخل Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) وحمض اندول الزبدة Indole-3-butyric acid. (IBA) المعروف باسم هرمون التجذير [5].

من المعروف أن إنتاش البذور النباتية يتأثر بالعديد من العوامل البيئية المحيطة، وكذلك بالمركبات الكيميائية خارجية المنشأ التي من أهمها الهرمونات النباتية. وقد بَيَّنَ كثير من الباحثين أن الاستقلاب في سويداء البذرة عند إنتاشها ينتشط عند إضافة حمض الجيبيريليك GA خارجي المنشأ [6].

كما أن هناك العديد من المعطيات التجريبية التي تثبت أن للهرمونات النباتية تأثيرات واضحة في تفاعلات الهرم والشيخوخة عند النباتات، إذ تبيّن هذا التأثير في التجارب التي أجريت على المقاطع النباتية المعزولة التي يرتبط استقلاب المواد فيها بوصول الهرمونات

إليها من أجزاء أخرى من النبات. ففي الأنسجة المعزولة والمحضونة في الماء المقطر يلاحظ تفكك سريع للحموض النووية والبروتينات والكلوروفيل وفي الوقت نفسه يحدث ازدياد فعالية أنزيمات الحلمهة [7].

هذه التفاعلات التهديمية destroctive reactions لا يمكن ايقافها بإضافة المواد الغذائية والأملاح إلى وسط الحضن، ولكن المعاملة بالهرمونات النباتية أدت -في حالات عديدة- إلى الإبطاء من تفاعلات الهرم ageding التهديمية ومثبطة لتفاعلات تفكك مكونات الخلية [8]. كما أن هناك معطيات عن أن إضافة الأوكسين إلى وسط حضن مقاطع ساق النبات يمنع تفكك RNA في الخلايا خلال الساعات الأولى بنسبة 63%، وتزداد هذه النسبة خلال 24 ساعة التالية إلى 69%. وقد تبيّن في تجارب استخدم فيها اليوراسيل الموسوم بـ C^{14} أن الأوكسين يحافظ على تركيز الحمض النووي في الخلايا ليس عن طريق تنشيط عمليات اصطناعه ولكن بتثبيط تفككه. [8] ونبيّن فيما يأتي بنى منظمات النمو المدروسة في البحث:



هدف البحث

دراسة تأثير عملية عزل خلايا مقاطع نبات الذرة الصفراء- غوطة 82 بعمر ستة أيام من نموها عن النبات الأم، وحضنها في الوسط المائي وفي محاليل منظمات النمو المدروسة مدة 20 ساعة في الظلام وبدرجة حرارة C^0 26، في التغيّرات الكمية التي تتعرض لها البروتينات الكلية، وفي المجموعات البروتينية المختلفة في هذه الخلايا.

مواد البحث وطرائقه

استخدم في العمل المقدم المواد الآتية:

1- بذور الذرة الصفراء من نوع غوطة -82 التي تم الحصول عليها من مؤسسة إكثار البذار في محافظة حلب.

2- حمض اندول الخل (IAA).

3- حمض 4,2 ثنائي كلورو فنوكسي الخل (D -2.4).

4– حمض اندول الزبدة(IBA).

5- أزرق الكوماسي R- 250.

6- مجموعة من المحلات العضوية كالأسيتون والايتانول والايتر.

8- ثلاثي كلور حمض الخل.

كما استخدمت الأجهزة الآتية:

1- محمات ومحركات مغناطيسية من نوع Philip Harris Limited

2- استخدم جهاز رج الأنابيب من نوع Ms1 Mini Shaker IKA

3- جهاز الامتصاص اللوني (السبكترفوتومتر) من نوع Viso spectro photo meter (Vis - 7220).

4- مثقلة مبردة من نوع Boeco موديل U – 32R

5- مقياس درجة الحموضة pH من نوع Orion - 420 A pH meter

طرائق البحث

تحضير بذور الذرة الصفراء

تُغسل بذور الذرة الصفراء بالماء العادي للتخلصِ من أي آثار للغبار والأتربة، ثم تنقع بماء عادي وبدرجة $60\ C^0$ مدة ثلاث ساعات، ثم تزرع هذه البذور بترتيبها على شكل صفوف بين ثنيّات من ورق الترشيح التي توضع فوق طبقة من القطن في أوعية خاصة، حيث تُوضع في وسط مائي مدة ستة أيام داخل محم بدرجة حرارة $25\ C^0$ وفي الظلام مع متابعة تزويدها بالماء يومياً في أثناء نموها.

إعداد العينات النباتية لعملية الحضن

يُقطَّع ساق بادرات الذرة في جو معتم بعيداً عن الضوء المباشر، على مسافة 2 ملم من أسفل العقدة وبطول يقرب من 1.5 سم، وتوضع المقاطع المعزولة في كأس زجاجي ضمن الماء المقطر.

توزع المقاطع على أربع مجموعات من أوعية بيتري ، تتكون المجموعة الواحدة من ثلاثة أوعية وتحوي كل مجموعة على 30 مل من أحد أوساط الحضن الآتية:

1- الماء المقطر.

2- محلول حمض الاندول الخلي بتركيز 50 ملغ/ ل.

3- محلول حمض ثنائي كلور فينوكسي الخل (2,4-D) بتركيز50 ملغ/ ل.

4- محلول حمض إندول البوتيريك (IBA) بتركيز 50 ملغ / ل.

كما أُخذت ثلاث عينات من المقاطع بوزن 1غ للعينة؛ وذلك لتستخدم مباشرة لمعـــايرة تركيز البروتين المدروس في الخلايا الأصلية قبل الحضن.

تحضن أوعية بيتري بعد تجهيزها ضمن الحاضنة بالدرجة 26 C^0 مدة 20 ساعة فـــي الظلام.

بعد انقضاء مدة الحضن تؤخذ المقاطع لدراسة التركيب الكمي للبروتينات فيها.

تحضير كاشف الكوماسي

ملاحظة: يجب إجراء عملية تحضير الكاشف بعيداً عن الضوء وفق الخطوات الآتية: يذاب 100 ملغ من مسحوق أزرق الكوماسي Coomassie Brilliant Blue G-250 فـــي 50 مل من الايتانول النقي 96%. وبعد تمام الانحلال يــضاف 100 مــل مـــن حمــض الفوسفور النقي المركز 85%.

ثم يمدد الحجم إلى لتر باستخدام الماء ثنائي التقطير. يكون المحلول المحضر صـــالحاً للاستخدام مدة أسبوعين عند حفظه في وعاء معتم، مع الإشارة إلى أن أي تغيّر في درجة حموضةpH الوسط سيؤدي إلى عدم صلاحية الكاشف [9].

رسم المنحنى المعياري للبروتين

ــ تُحضر سلسلة عيارية من بروتين الكـــازيين بتراكيـــز مـــن 0,01؛ 0,02؛ 0,03؛ 0,04؛ 0,05؛ 0,06؛ 0,07 و0,08 ملغ بروتين/مل.

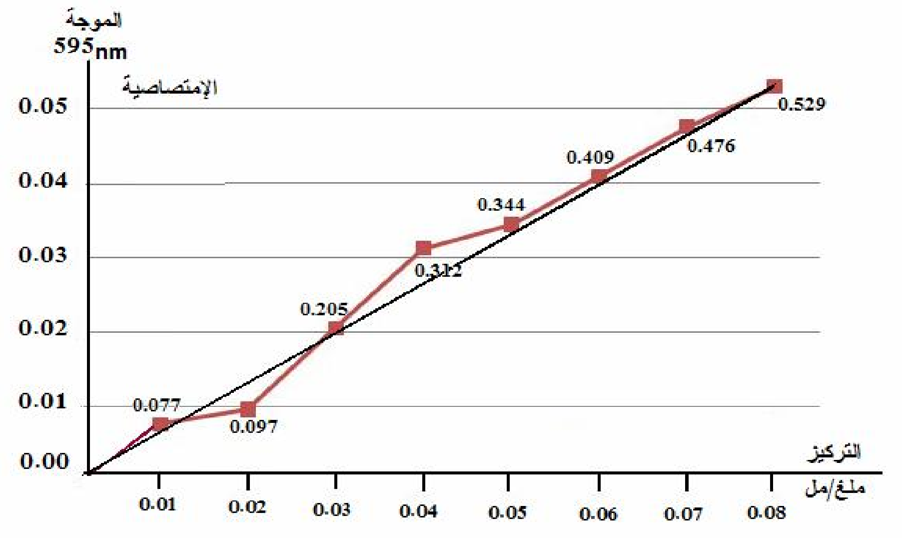
ــ تعاير البروتينات في المحاليل السابقة وفق طريقة برادفورد[9]، حيث يُضاف فـــي أنبوب اختبار إلى 1.5 مل من كاشف الكوماسي 1.5 مل من محلول البروتين المحـــضر، وبعد المزج الجيد بوساطة الهزاز الآلي يترك المزيج ليهدأ مدة عشر دقـــائق لاســـتكمال تكوين معقد الكوماسي الأزرق بين البروتين والكاشف.

تقاس امتصاصية المعقد الملون المتشكل عند طول الموجـــة 595nm مقابـــل عينـــة شاهدة تحوي 1.5 مل من كاشف الكوماسي و1.5 مل من الماء المقطر.

يرسم المنحنى المعياري الذي يستخدم لتحديد تركيز البروتينات (الجدول والشكل1).

الجدول (1) امتصاصية العينات البروتينية المعالجة بالكوماسي في طول الموجة 595

العينات	1	2	3	4	5	6	7	8
تركيزالكازئين ملغ/مل	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08
الامتصاصية في 595nm	0.077	0.097	0.205	0.312	0.344	0.409	0.476	0.529



الشكل (1) المنحنى المعياري للبروتينات في طول الموجة 595 نانومتراً.

استخلاص البروتينات الكلية

غالباً ما توجد البروتينات في الخلايا النباتية مرتبطة مع مركبات أخرى فتكون على شكل بروتينات سكرية glycoprotiens أو بروتينات شحمية lipoprotiens أو بروتينات معدنية metaloprotiens .. وهكذا، ولذلك فإن استخلاصها يستدعي تفكيكها وتنقيتها من المركبات غير البروتينية المرتبطة معها. وتنبع أهمية دراسة تأثير منظمات النمو في تركيز هذه الأنواع البروتينية من أهمية البروتينات في حياة الكائنات الحية من حيوان ونبات.

تؤخذ مقاطع ساق بادرات الذرة المحضونة وفق الشروط أعلاه وتُثبّتُ بوساطة الإيتانول 96% المغلي، ثم تسحق بوجود رمل الكوارتز ثم تثفل العينة وترمى رشاحة الإيتانول، وللتخلص من المركبات المرافقة للبروتينات في الخلايا كالأصبغة ومختلف المركبات العضوية، يعاد غسل راسب الخلايا وهو في أنبوب التثفيل نفسه بالمحاليل الآتية على الترتيب:

1- الايتانول 96%.
2- الأسيتون 85%.
3- مزيج الايتانول والأسيتون (1:1).
4- ثلاثي كلور حمض الخل 5% ويترك في البراد مدة 20 دقيقة قبل التثفيل.
5- ايتانول 96%.

بعد انتهاء عمليات الغسل بالمحلات العضوية يترك الراسب في المجفف الكهربائي حتى تمام الجفاف. ثم تُضاف إليه كمية من هيدروكسيد البوتاسيوم 10%، ويحرك ويترك في المحم في الدرجة37 C^0 مدة ساعة. ثم يثفل وتؤخذ الرشاحة القلوية.

تكرر عملية الاستخلاص بالقلوي مع جمع المستخلصات في دورق معايرة، حتى يصبح تفاعل كشف البروتينات على آخر رشاحة استخلاصاً سلبياً.

تعدّل الرشاحة القلوية إلى PH=7 بوساطة حمض كلور الماء (لأن كاشف الكوماسي يعطي مع هيدروكسيد البوتاسيوم معقداً بلون أزرق)، ثم تعاير كمية البروتينات بوساطة كاشف الكوماسي بحسب الطريقة المذكورة أعلاه.

استخلاص المجموعات البروتينية المختلفة

تحتوي البذور النباتية وعدد من الأعضاء الإعاشية على بروتينات تصنف في أربع مجموعات رئيسة اعتماداً على الاختلافات في انحلاليتها واحتوائها على بعض الحموض الأمينية بتركيز مميز [10،11].

الألبومينات albumin وتنحل في الماء المقطر، وهي بروتينات تملك فعاليات إنزيمية وخاصة إنزيمات الحلمهة كالأميلاز والبروتياز، وتتركز كمياتها الكبيرة في خلايا الجنين في أثناء النمو.

الغلوبولينات globulins وتنحل في محاليل الأملاح المعتدلة المخففة. وهذه المجموعة من البروتينات تسهم بدور ادخاري بشكل رئيس، ولكن تحوي أيضاً على بروتينات إنزيمية.

البرولامينات prolamins وتنحل في الايتانول 70- 80%، وهي تدخل بشكل رئيس في بروتينات الحبوب، كالقمح والشعير والشوفان والذرة. وهي من الأنواع البروتينية التي حظيت بالدراسة أكثر من غيرها من حيث تركيب الحموض الأمينية فيها، إذ تبيّن أنها تحوي كميات كبيرة من البرولين وحمض الغلوتاميك في حين تكون نسبة الحموض الأساسية فيها قليلة. كما حُدّدت نقطة التعادل الكهربائي لهذه البروتينات وغيرها من المواصفات.

الغلوتيلينات glutelines وتنحل في المحاليل القلوية، تعدُّ هذه البروتينات مزيجاً من بروتينات مستقلة ومتباينة وتُجرى البحوث لتحديد مواصفات هذه البروتينات عند النباتات.

ولفصل كل من هذه المجموعات واستخلاصها بشكل مستقل، يُعتمد على الاختلاف في انحلاليتها بمختلف الأوساط.

تجرى عمليات الاستخلاص جميعها على البارد بالدرجة $C^0 4$.

وبعد تمام الاستخلاص لكل مجموعة على حدة تجري معايرة البروتينات بوساطة كاشف أزرق الكوماسي.

استخلاص الألبومينات

تؤخذ مقاطع الساق بعد انتهاء عملية الحضن وتجمد في الثلاجة، ثم تسحق في هاون مبرد بشكل مسبق باستخدام الماء المقطر المبرد جيداً حتى الحصول على مسحوق متجانس مع المحافظة على درجة الحرارة بحدود $C^0 4$، تنقل محتويات الهاون إلى أرلينة مبردة بوساطة خمسة أضعاف وزنها من الماء المقطر المبرد مسبقاً، وبعد وضع الأرلينة في حمام ثلجي يُحرَّكُ المزيج بوساطة محرك مغناطيسي مدة ساعة. تحضن الأرلينة بعد ذلك في البراد مدة 18 ساعة في الدرجة $C^0 0$.

تستخدم المثقلة المبردة لفصل المذيب (الماء المقطر) الذي ينقل إلى دورق معايرة، لتعاد عملية الاستخلاص والتحريك على الخلاط المغناطيسي ودون الحضن في البراد. تكرر عملية الاستخلاص حتى يصبح تفاعل الكوماسي سلبياً على آخر رشاحة استخلاص، ثم تجري معايرة الألبومينات بطريقة برادفورد[9] .

استخلاص الغلوبولينات

تُستخلص الغلوبولينات من مسحوق خلايا البادرات بعد الانتهاء من استخلاص الألبومينات. وذلك بوساطة محلول KCl (1M) المبرد مسبقاً، وذلك باتباع الخطوات المستخدمة نفسها عند استخلاص الألبومينات من نقع وحضن في البراد ومزج على الخلاط وجمع الرشاحات الناتجة إثر كل عملية في دورق المعايرة حتى الانتهاء من الاستخلاص ومعايرة الغلوبولينات كمياً بطريقة برادفورد.

استخلاص البرولامينات

يعالج راسب خلايا بادرات الذرة الناتجة عن استخلاص الغلوبولينات أعلاه، بكمية من الايتانول80% المبرد مسبقاً وتحرك بوساطة المحرك الميكانيكي مدة ساعة مع التبريد ثم توضع في البراد مدة 18 ساعة لتُثقّل بعد ذلك في المثقلة المبردة عند الدرجة $4\ C^o$ وجمع الرشاحة في دورق معايرة. وتكرر عمليات الاستخلاص بكمية جديدة من الايتانول 80% كما في المراحل أعلاه ومعايرة البرولامينات بطريقة برادفورد.

استخلاص الغلوتيلينات

الغلوتيلينات هي بروتينات نباتية توجد في البذور النباتية وفي بعض الأعضاء الأخرى، وهي مركبات توجد في خلايا ساق نبات الذرة، ولاستخلاصها نقية يستخدم راسب الخلايا الناتج بعد عمليات الاستخلاص المذكورة أعلاه الذي استخلصت منه المجموعات البروتينية الأخرى، إذ إنَّ مذيب أي مجموعة بروتينية يستطيع استخلاص المجموعات التي سبقت إذا بقي منها شيء دون استخلاص.

يضاف إلى الراسب النباتي محلول KOH (10%) أيضاً ويُحرك بوساطة المحرك الميكانيكي أو المغناطيسي مدة ساعة مع التبريد، ثم يُحضن في البراد مدة 18 ساعة، وتتابع عملية الاستخلاص بعد جمع الرشاحة في دورق معايرة، حتى يصبح التفاعل مع أزرق الكوماسي سلبياً على آخر رشاحة استخلاص.

تجري معايرة الغلوتيلينات بطريقة برادفورد المذكورة أعلاه.

النتائج والمناقشة

تأثير تركيز البروتينات الكلية في خلايا ساق الذرة المعزولة وفق شروط الحضن

بعد حضن مقاطع بادرات نبات الذرة بالماء وبمختلف أوساط منظمات النمو المدروسة: الأوكسين IAA، والمركبين الصنعيين 2.4-D وIBA، جرت عملية تثبيت المقاطع بوساطة الإيتانول الساخن قبل البدء باستخلاص مجموع البروتينات منها باستخدام محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 10% ويبيّن الجدول (2) والشكل (2) النتائج التي تم التوصل إليها، فقد أدى عزل المقاطع بشكل عام إلى تنشيط تفاعلات تفكك البروتينات في خلايا الساق بشكل واضح في أوساط الحضن جميعها مقارنة بالحالة الشاهدة.

الجدول (2) تأثير شروط الحضن في تركيز البروتينات الكلية

نوع المعالجة	الحالة الأولية	ماء	IAA	2.4-D	IBA
تركيز البروتينات الكلي (ملغ/غ)	5.94	3.93	5.04	5.29	5.41

الشكل (2) تأثير شروط الحضن في تركيز البروتينات الكلي.
1- الحالة الأولية؛ 2-H_2O ؛ 3- IAA؛ 4- 2.4-D؛ 5- IBA.

على الرغم من أن الحضن بالمركبات الفعالة كالأوكسين والمركبين الصنعيين 2.4-D وIBA قد أدت جميعها إلى تثبيط تفاعلات تفكك البروتينات مقارنة بما هي عليه في الوسط المائي، إلا أنها تباينت فيما بينها بمقدار التأثير. انخفض تركيز البروتينات ضمن الخلايا المحضونة في الماء بمعدل 36.4% من كميتها الأصلية، في حين كان 15.3% فقط مع وجود حمض الاندول الخلي في وسط الحضن، وكان التأثير المثبط في تفكك البروتينات لكل من 2,4-D وIBA أكثر وضوحاً من تأثير حمض الاندول الخلي، فلم يتعدَ هذا الانخفاض معدل 12.4 % وفي الخلايا المحضونة في المركب الثاني معدل 10.0%.

تغيرات تركيز المجموعات البروتينية المختلفة عند حضن خلايا الساق بمحاليل منظمات النمو المدروسة

في تجارب مشابهة تماماً لما هو مبيّن في بداية العمل من شروط تنمية بذور الذرة وعزل المقاطع وحضنها في الوسط المائي ومختلف محاليل منظمات النمو، أخذت العينات في نهاية الحضن واستخلصت منها **الألبومينات** ثم قيس تركيزها:

ويظهر من الجدول (3) والشكل (3) نتائج القياسات التي توصلنا إليها، إذ إنَّ تركيز ألبومينات خلايا الساق قد انخفض نتيجة حضن المقاطع في الماء بمعدل 43%؛ كما يتبيّن من نتائج التجارب التي أجريناها أن منظمات النمو التي استخدمت في العمل جميعها قد خفضت من تفكك البروتينات في المقاطع المحضونة. وبينما وصلت نسبة التفكك بوجود الهرمون الطبيعي IAA إلى نحو 40%، كان تفكك البروتينات بوجود المركب الصنعي 2,4-D بمعدل 23%، وبوجود المركب IBA بنسبة 36%، وهنا يلاحظ أيضاً أن الفعالية المثبطة للتفكك التي أبداها منظما النمو الصنعيان كانت أعلى من فعالية الهرمون الطبيعي.

الجدول (3) تأثير منظمات النمو في تركيز الألبومينات في خلايا مقاطع ساق الذرة

الحضن	الحالة الأولية	H_2O	IAA	2.4-D	IBA
الألبومينات ملغ/غ	2.05	1.16	1.24	1.58	1.32

الشكل (3) تركيز الألبومينات بعد حضن مقاطع ساق الذرة بمحاليل منظمات النمو
1- الحالة الأولية؛ 2-H_2O؛ 3- IAA؛ 4- 2.4-D؛ 5- IBA.

في التجارب التي استهدفت متابعة التغيّرات في كمية **الغلوبولينات** استُخدمَ مسحوق خلايا الساق بعد الانتهاء من استخلاص الألبومينات، وعولجت بمحلول KCl ذي التركيز 1M وبالدرجة 4+ C^0، وكما هو مذكور في الطريقة أعلاه، ثم جمعت محاليل الاستخلاص وعويرت فيها البروتينات ليتبيّن أن خارطة النتائج السابقة على تحولات البروتينات الكلية والألبومينات تتكرر في حالة الغلوبولينات. إذ وصلت نسبة التفكك بوجود الوسط المائي الحاضن إلى 15% من الكمية الأصلية خلال 20 ساعة من الحضن. كما قامت منظمات النمو المستخدمة في أوساط الحضن بتثبيط هذا التفكك بالنسب الآتية:

وصلت نسبة تفكك الغلوبولينات البروتينية بوجود الأوكسين إلى 7.75% فقط.

ووصلت نسبة التفكك بوجود 2,4-D إلى 6.89% أيضاً.

ووصلت نسبة التفكك بوجود IBA إلى 10.34%.

الجدول (4) تأثير منظمات النمو في تركيز الغلوبولينات في خلايا مقاطع ساق الذرة

الحضن	الحالة الأولية	H_2O	IAA	2.4-D	IBA
الغلوبولينات ملغ/غ	1.16	0.99	1.07	1.08	1.04

الشكل (4) تركيز الغلوبولينات بعد حضن مقاطع ساق الذرة بمحاليل منظمات النمو المدروسة

1- التركيز الأولي ؛ 2- H_2O ؛ 3- IAA؛ 4- 2.4-D؛ 5- IBA

أمَّا البرولامينات التي استخلصت بوساطة الإيتانول ومعايرتها، بعد استخلاص الغلوبولينات ومعايرتها، فقد تكرر التأثير المسبب لتفكك البروتينات عند عزل المقاطع وحضنها في الأوساط المختلفة المائية ومنظمات النمو، كما كان التأثير المثبط للتفكك الذي تبديه منظمات النمو في وسط الحضن واضحاً في الحالات جميعها (الجدول 5) و(الشكل5).

وصل معدل تفكك البرولامينات البروتينية بوجود الماء إلى 40.5 %.

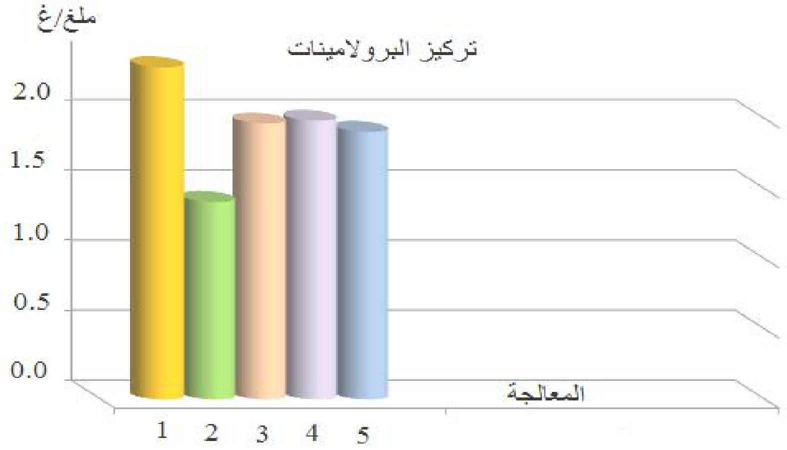
ووصل معدل التفكك بوجود الأوكسين إلى 17% فقط، وهي نسبة تثبيط مرتفعة مقارنة بما أبداه هذا الهرمون في الحالات السابقة .

ووصل معدل التفكك بوجود 2,4-D إلى 16% .

ووصل معدل التفكك بوجود IBA إلى19% .

الجدول (5) تأثير منظمات النمو في تركيز البرولامينات في مقاطع ساق الذرة

الحضن	الحالة الأولية	H_2O	IAA	2.4-D	IBA
البرولامينات ملغ/غ	2.37	1.41	1.97	1.99	1.91



الشكل (5) تركيز البرولامينات بتأثير حضن مقاطع ساق الذرة بمحاليل منظمات النمو المدروسة
1- التركيز الأولي؛ 2- H_2O؛ 3- IAA؛ 4- 2.4-D؛ 5 - IBA.

استخدمنا المحلول القلوي KOH (10%) لاستخلاص **بروتينات الغلوتيلينات** المتبقية ومعايرتها، بعد استخلاص المجموعات السابقة، كانت النتائج مشابهة لما سبق من التفكك بعد عزل المقاطع، بلغت النسبة في الوسط المائي أعلى مما هي عليه في أوساط الحضن بوجود منظمات النمو، كما يبيّن الجدول (6) والشكل (6):

وصل معدل تفكك البرولامينات البروتينية بوجود الماء إلى 33.33 % تقريباً.

ووصل معدل تفكك بوجود الأوكسين إلى 17% فقط .

ووصل معدل تفكك بوجود 2,4-D إلى 8.6% .

ووصل معدل تفكك بوجود IBA إلى7.40% أيضاً.

الجدول (6) تأثير منظمات النمو في تركيز الغلوتيلينات في خلايا مقاطع ساق الذرة

الحضن	الحالة الأولية	H_2O	IAA	2.4-D	IBA
الغلوتيلينات ملغ/غ	0.81	0.54	0.67	0.74	0.75

الشكل (6) تركيز الغلوتيلينات بتأثير حضن مقاطع ساق الذرة بمحاليل منظمات النمو المدروسة

1- التركيز الأولي؛ 2- H_2O؛ 3- IAA؛ 4- 2.4-D، 5- IBA

تدل النتائج التي توصلنا إليها في هذه التجارب عندما عولجت فيها مقاطع ساق نبات الذرة التي نمّيت في الظلام وبوسط مائي مدة ستة أيام، ثم عزلت عن النبات وحضنت مدة 20 ساعة في الظلام وبدرجة 26 C^0 في الوسط المائي وفي أوساط المركبات الفعالة حيوياً من منظمات النمو النباتية ما يأتي:

1- تناقص تركيز البروتينيات الكلي عند عزل مقاطع البادرات وحضنها بالماء أو بمحاليل منظمات النمو المدروسة.

2- يؤدي الحضن بمحاليل منظمات النمو المدروسة إلى تثبيط عملية تفكك بروتينات الخلايا مقارنة بتلك المحضونة بالماء في الحالات جميعها.

3- يؤدي الحضن بمحاليل المركب الصنعي حمض ثنائي كلورو فنوكسي الخل إلى تفكك أقل في الألبومينات يليه حمض اندول الزبدة وأخيراً حمض اندول الخل.

4- يكون تفكك الغلوبولينات متقارباً بوجود كل من حمض اندول الخل وحمض ثنائي كلورو فنوكسي الخل وأعلى بوجود حمض اندول الزبدة.

5- يكون تفكك البرولامينات أقل بوجود حمض ثنائي كلورو فنوكسي الخل يليه حمض اندول الخل، وأعلى بوجود حمض اندول الزبدة.

6- يكون تفكك الغلوتيلينات أقل بوجود حمض اندول الزبدة يليه حمض ثنائي كلورو فنوكسي الخل، وأعلى بوجود حمض اندول الخل

ويمكن أن تُعزى الزيادة في تفكك البروتينات إلى سببين:

السبب الأول: تنشيط انزيمات بروتيآز الخلايا عند تعرضها للمعاناة نتيجة عزلها عن النبات الأم وحضنها في الوسط المائي، وأن وجود منظمات النمو قد ثبط من هذه الزيادة في فعالية البروتيآز، وهنا من الجدير بالملاحظة أن تأثير الهرمون الطبيعي IAA، وبسبب وجود الإنزيمات المسيطرة على تفككه في الخلايا، يملك فعالية أقل من فعالية منظمات النمو الأخرى الصنعية التي لاتستقلب بشكل سريع لعدم وجود الإنزيمات المفككة لها في الخلايا.

والسبب الثاني: أن تكون منظمات النمو المستخدمة عوامل تحفيز لزيادة الاصطناع الحيوي للبروتينات، الشيء الذي يعوض عن الكمية المتفككة. ومن الطبيعي أن الحصول على معطيات عن هذه النقطة يتطلب اللجوء إلى دراسة فعالية إنزيمات البروتيآز في شروط التجربة المعنية. ووفق نتائج (غير منشورة) لتجارب قمنا بها استخدمت فيها طريقة فصل البروتينات بالالكتروفريز على هلام الأكريل أميد، تم التوصل إلى أن التفكك في بروتينات خلايا الساق وتثبيط هذا التفكك يكون شاملاً لأشكال الجزيئات البروتينية جميعها في الخلايا، ولايمس نوعاً معيناً منها. وننصح بمتابعة البحث والتعمق فيه للوصول إلى تفسير أعمق وأدق.

RFERENCES المراجع

1-Onwuka, C. Frank, Ikewuchi, C. Catherin. Jude & Ayalogu, O. Edward. 2009. Investigation on the effect of Germination on the Proximate Composition of African Yam Bean. Journal of Applied Sciences & Environmental.Vol. 13, No. 2, June .pp.59-61.

2-Malo. A, Malek. A. 2010. The influence of Thuja oil, α- pinene and α- thujone emulsions on the proteins and lipids metabolism in the seedlings maize plant stems cells,Aleppo University Journal No73; 2010.

3- بيلينشيك م.م. 1970 .الآلية الجزيئية للشيخوخة، موسكو، الأكاديمية العلمية (البحث باللغة الروسية).

4-Junqi Wang, Yubing Li, Sze Wan Lo, Stefan Hillm, Sam Uel S. M. Sun, Sun, David G. Robinson, and Liwen Jiang. 2007. Protein Mobilization in Germinating Mung Bean Seeds Involves Vacuolar Sorting Receptors and Multivesicular Bodies, Sciences, University of Heidelberg, plant physiology 143:1628-1639.

5-Fundamentals of plant science. Marihelen Glass, Rick Parker. 2009. Delmar, Cengage Learning.

6-John Ingle and R. H. Hagema. 1965. Metabolic Changes Associated with the Germination of Corn. Effects of Gibberellic Acid on Endosperm Metabolism Department of Agronomy, University of Illinois, Urbana.

7-Knight R. M., Quick w. A. 1969. Changes in the ribonucleic acid of senesecung radish leaves. cand. J. BOT. 947, N11,pp.1809-1812.

8-Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* V 72,pp. 248-254.

9- بلشكوف ، كتاب العملي في بيوكيمياء النبات،1968 . موسكو.

10-T. W. Goodwin & E. I. Mercer. 1986. Introduction to Plant Biochemistry, Pergaman Press, Oxford, NY, Paris, Frankfurt.