دراسة تأثير بعض منظمات النمو في فعالية عدد من إنزيمات الحلمهة وإنزيمات الأكسدة في خلايا ساق نبات الذرة الصفراء *Zea mays*

تهاني الحوراني[1] وأحمد مالو[2]

قسم الكيمياء ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ سورية

تاريخ الإيداع 2011/12/01

قبل للنشر في 2012/08/06

الملخص

جرى في البحث تحري تأثير كلٍ من منظمات النمو النباتية الآتية: حمض أندول الخل (IAA) وحمض 2.4 - ثنائي كلورو فينوكسيٍ الخل (2,4-D)، و حمض اندول الزبدة (IBA)، في فعالية كل من إنزيمي الحلمهة: α -الأميلاز و الريبونوكلياز وفي فعالية ثلاثة من إنزيمات الأكسدة والإرجاع: الكاتالاز والغوياكول بيروكسيداز والأسكوربات أوكسيداز في خلايا مقاطع ساق نبات الذرة الصفراء من نوع غوطة - 82 المستنبتة مدة ستة أيام في الظلام وبدرجة حرارة 26°C؛ وذلك بعد20 ساعة من عزلها وحضنها بالماء وفي محاليل منظمات النمو المبينة أعلاه بتركيز (50 ملغ/ل) وفي الدرجة 30°C. وقد أظهرت النتائج التي تم الوصول إليها أن حضن المقاطع بالماء المقطر أو بمحاليل منظمات النمو المدروسة بتركيز (50 ملغ/ل)، قد أثر تأثيراً متفاوتاً في فعالية الإنزيمات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: منظمات النمو النباتية، الذرة الصفراء، الأميلاز، الريبونوكلياز، الكاتالاز، الغوياكول بيروكسيداز، الأسكوربات أوكسيداز.

[1] طالبة، [2] الأستاذ المشرف.

Studing the Effect some of plant growth regulators on the activity of hydrolysis and oxidation enzymes in the seedling of Zea mays stems cells

T. Alhourane(1) and A. Malo(2)

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

Received 01/12/2011

Accepted 06/08/2012

ABSTRACT

Investigate studied the activity of some enzymes in zea maize plant seedlings cells, (Ghota 82) under the influence of phytohormone Auxin & growth regulators 2,4-D and IBA.

Maize plant seeds were germinated in water medium for six days in darkness and temperature of 26^{0}C.

Then stem cells of the developing seedling were incupated in darkness with water or in different solutions of auxin, 2,4-D & IBA (50 mg/l) for 20 houre in 30 ^{0}C. Then magared the activity of α-Amylase, RNAase, Catalayse, Guaiacol Peroxidase, Ascorbate oxidase in the stem cells

The results showed that the incupation has defferent effects.on hydrolysis and oxidative enzymes in zea maize plant seedlings cells.

Key Words: Plant growth regulators, Zea Maize, Catalayse, α-Amylase, RNAase Ascorbate oxidase, Guaiacol Peroxidase.

(1)Student, (2) Superviser.

المقدمة

بيّنت البحوث أن العديد من المركبات الكيميائية تساعد الخلايا على مقاومة ظاهرة المعاناة Stress وتأخير تفكك مكوناتها قبل موتها[1].

حيث تبدأ المعاناة Stress عند الخلايا النباتية بعد عزلها عن مصادر الغذاء، تبدأ بالموت نتيجة توقف التفاعلات الوظيفية فيها وتفكك المركبات البنيوية، وذلك بتأثير إنزيمات الحلمهة Hydrolysis Enzymes التي تنشط وتبدأ بتفكيك المركبات الحيوية قبل الموت [2].

ومن هذه المركبات منشطات الإنزيمات والهرمونات النباتية الطبيعية Phytohormones ومنظمات النمو النباتية الصنعية Artificial plant growth regulatores [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].

كما أن الأوكسين يحرِّض عملية تشكل الجذور العرضية في ساق النبات التي تترافق بزيادة المحتوى البروتيني في خلايا الجذر الأصلي للنبات؛ مما يعني زيادة في عمليات اصطناع البروتينات الإنزيمية [6].

وفي الأنسجة المعزولة والمحضونة في الماء المقطر يلاحظ تفكك سريع للحموض النووية والبروتينات والكلوروفيل، وفي الوقت نفسه يحدث ازدياد في فعالية الإنزيمات المفككة لها [7].

كما لوحظ أن حمض أندول الخل بتركيز 10 ميكرو مول يعمل على زيادة سكريد الغلوكوز في جدار خلايا الطحلب Pellia epiphylla، وينشط عمل الإنزيمات العاملة في الجدران الخلوية عدا إنزيم السيلولاز الذي لم يتأثر بالأوكسين [8] .

وقد لاحظ الباحثون في تجارب على أوراق نبات Tropaeolum أن حمض أندول الخل و حمض أندول الزبدة يعملان على خفض فعالية إنزيم الكاتالاز في بداية مرحلة الشيخوخة، وفي الوقت ذاته لم يبد الأوكسينان المدروسان تأثيراً في فعالية إنزيم البيروكسيداز عند تطبيق الأوكسين على هذا النبات[9].

هدف البحث

جرى في الدراسة الحالية التحري عن تأثير منظمات النمو المدروسة في فعالية إنزيمي الحلمهة: α-الأميلاز والريبونوكلياز، وإنزيمات الأكسدة: الكاتالاز، الغوياكول

أوكسيداز، والأسكوربات أوكسيداز في خلايا مقاطع من سويقة نبات الذرة الصفراء بعد عزل هذه المقاطع عن النبات الأم وحضنها في الماء أو في محاليل منظمات النمو مدة 20 ساعة في الظلام وبدرجة حرارة 30 ºC. وتفيد هذه الدراسة بمعرفة دور بعض المدخرات وحركيتها في النباتات للتكيف مع الضغوط ومقاومتها.

مواد البحث وطرائقه

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

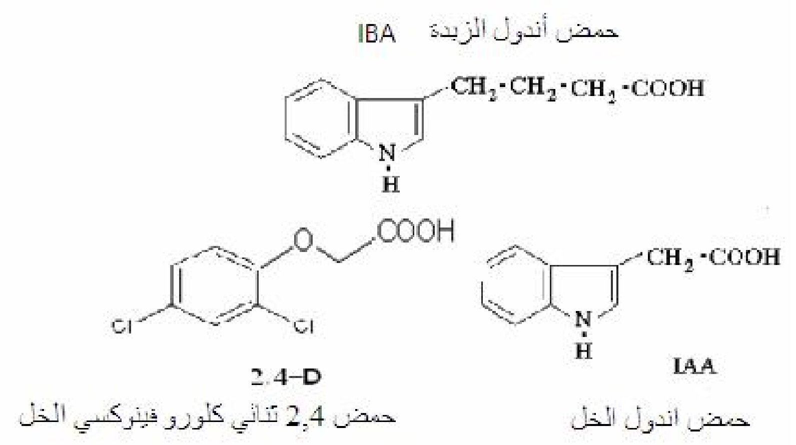
2- حمض أندول الخل (IAA)

3- حمض4,2 - ثنائي كلورو فينوكسي الخل (2.4 –D).

4 – حمض اندول الزبدة (IBA).

5- ثلاثي كلور حمض الخل ومجموعة من المحلات العضوية كالايتانول والأسيتون.

6- محلول RNA الخمائري.



كما استخدمت الأجهزة الآتية:

1- محمات ومحركات مغناطيسية من نوع PHilip Harris Limited

2- جهاز رج الأنابيب من نوع Ms1 Mini Shaker IKA

3- جهاز الطيف الضوئي (Vis 7220) Viso spectro photo meter

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

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

طرائق البحث

تحضير بذور الذرة الصفراء

تُغسل بذور الذرة الصفراء بالماء العادي للتخلص من آثار الغبار والأتربة، وبعد نقعها بالماء في الدرجة 40ºC مدة ثلاث ساعات، تُزرع مدة ستة أيام داخل محم بترتيبها على شكل صفوف بين ثنيّات من ورق الترشيح التي توضع فوق طبقة من القطن في أوعية خاصة، في وسط مائي عند الدرجة 26ºC وفي الظلام مع متابعة تزويدها بالماء يومياً في أثناء نموها.

إعداد العينات النباتية لعملية الحضن

يُقطع ساق بادرات الذرة Zea mays seedling على بعد 2 ملم من أسفل العقدة. توضع المقاطع المعزولة في كأس زجاجي ضمن الماء المقطر. توزع بعدها على خمس مجموعات من أوعية بيتري، تحتوي كل من الأربع الأولى على 30 مل من أحد أوساط الحضن الآتية (كل عينة 1غ مقاطع):

1- الماء المقطر.

2- محلول حمض أندول الخل بتركيز 50 ملغ/ل.

3- محلول حمض2.4- ثنائي كلور فينوكسي الخل (2,4-D) بتركيز50 ملغ/ل.

4- محلول حمض أندول الزبدة (IBA) بتركيز 50 ملغ/ل. تحضن المجموعات الأربع السابقة الذكر بعد تجهيزها في حاضنة بالدرجة 30^0C مدة 20 ساعة في الظلام. بعد انقضاء مدة الحضن تؤخذ المقاطع لإجراء الدراسة المطلوبة.

5- المجموعة الأخيرة من المقاطع لا يضاف إليها أي من أوساط الحضن السابقة وإنما تؤخذ مباشرة لمعايرة فعالية الإنزيم المدروس فيها بوصفها عينة الحالة الأولية أو الشاهدة (أي لا تتعرض المقاطع فيها للدرجة 30^0C مدة 20 ساعة).

الدراسة الإحصائية: أجريت كل تجربة ثلاث مرات، وفي كل تجربة كان عدد العينات المدروسة لكل نوع من المعالجة 3 عينات، ثم حُسِبَ المتوسط لكل نتيجة من التجارب وأُدرج في النتائج.

قياس فعالية إنزيم الأميلاز بطريقة سميث و روي

يصنف إنزيم α-أميلاز مع إنزيمات الحلمهة، فهو يعمل على حلمهة الروابط 1،4 في السلاسل المستقيمة لجزيئات النشاء، وتجري معايرة الإنزيم اعتماداً على قياس الامتصاصية الضوئية للمعقد المتشكل بفعل امتزاز اليود على سلاسل النشاء المتبقية في وسط التفاعل بعد تثبيط الإنزيم [10].

تحضير المادة النباتية لدراسة فعالية الإنزيم: يؤخذ 5غ من مقاطع البادرات، وتسحق سحقاً جيداً على البارد في هاون بورسلان مبرد، ويضاف إليها 50 مل من موقي الفوسفات المبرَد (pH=7،0.005 M). يحرّك المزيج المتشكل مع المحافظة على تبريد العينة مدة 30 دقيقة، ثم يثفل وتؤخذ الرشاحة التي تشكل مستحضراً لإنزيم الأميلاز المستخلص من المادة النباتية.

قياس فعالية الإنزيم: تؤخذ ثلاثة أنابيب أحدها للعينة المدروسة والثاني للعينة الشاهدة وذلك للمقارنة، والأنبوب الثالث للعينة العيارية التي لن تحتوي على نشاء متفاعل؛ ولذلك يضاف في كل من أنبوب التجربة وفي أنبوب الشاهد1 مل محلول النشاء 3% الطازج المحضر في محلول موقي خلات (PH=5،0.1M) ويضاف في الأنبوب العياري 1 مل من المزيج ذي التركيب الآتي:

(50 مل ماءً مقطراً +0.5 مل من حمض كلور الماء 0.1 N +0.1 مل من اليود0.3%). ثم يضاف إلى كل من الأنابيب الثلاثة المذكورة أعلاه 3 مل من موقي الخلات(PH=5،0.1 M) و1 مل من محلول كلوريد الكالسيوم 0.5 M.

تحضن الأنابيب الثلاثة في الدرجة $40\ ^0C$ مدة 15 دقيقة، وبعد انقضاء هذه المدة يضاف في أنبوب التجربة 1 مل من المستحضر الإنزيمي، ويتابع حضنه، كما تُحضن الأنابيب مدة عشر دقائق أخرى في درجة الحرارة ذاتها.

بعد انتهاء الحضن يضاف إلى الأنابيب الثلاثة 0.5 مل من حمض كلور الماء 1N؛ من أجل تثبيط التفاعل الإنزيمي، وللتوافق مع أنبوب التجربة يضاف 1 مل من المستحضر الإنزيمي إلى الأنبوب الشاهد والأنبوب العياري (يستخدم العياري لضبط صفر الجهاز). ينقل محتوى كل أنبوب إلى حوجلة معايرة سعة 50 مل تحتوي على0.5 مل من حمض كلور الماء 0.1N و40 مل ماءً مقطراً. ثم يضاف إلى كل حوجلة 0.1 مل محلول اليود في يود البوتاسيوم (3% يود البوتاسيوم+ 0.3% يود)، ويمدد الحجم بالماء المقطر وتقاس شدة الامتصاص اللوني عند طول الموجة 610 نانومترات، وتحسب الفعالية الإنزيمية وفق المعادلة الآتية[10]:

$$P = \frac{(A-B)}{A} \cdot \frac{C}{3} \cdot \frac{1}{T}$$

إذْ: P: الفعالية الإنزيمية. (يعبر عن وحدة فعالية إنزيمα-الأميلاز بكمية الإنزيم الذي يحلمه 10 ملغ نشاء في الدقيقة ضمن شروط التجربة).

A: الكثافة الضوئية للعينة الشاهدة. B: الكثافة الضوئية للعينة المدروسة.

C: كمية النشاء المأخوذة في بداية التجربة مقدرةً بالملغ. T: زمن الحضن مقدراً بالدقيقة.

قياس فعالية إنزيم الريبونوكلياز Ribonuclase

يصنف إنزيم الريبونوكلياز مع إنزيمات الحلمهة، فهو يعمل على حلمهة الروابط النوكليوتيدية في سلسلة الحمض الريبي النووي RNA. يعتمد مبدأ معايرة فعالية إنزيم الريبونوكلياز في العينة المدروسة على تغيّر الكثافة الضوئية لمحلول RNA النقي نتيجة حلمهته بفعل إنزيم النوكلياز.

تحضير المادة النباتية لدراسة فعالية الإنزيم: يؤخذ1غ من مقاطع الساق بعد انتهاء الحضن وتثبت بالآزوت السائل، ثم تسحق سحقاً جيداً في هاون مبرد مع 0.5 مل من محلول خلات الصوديوم 0.05M المبرد، ينقل المزيج المتجانس بوساطة محلول خلات الصوديوم 0.05M إلى دورق معايرة سعة 50 مل، ويمدد بوساطة المحلول المبرد نفسه، ثم يثفل بسرعة 10ألف دورة/دقيقة مدة 20 دقيقة مع التبريد، وتعدُّ الرشاحة الناتجة مستخلصاً إنزيمياً.

قياس فعالية الإنزيم: يصب في أنبوب تثفيل سعة 10 مل مقدار 2 مل من المستخلص الإنزيمي و2 مل من محلول RNA النقي (تركيزه 5 ملغ/مل) والمحضر في محلول خلات الصوديوم السابق. يحضن المزيج في الدرجة $37\ ^\circ C$ مدة ساعة، ولتحضير عينة شاهدة يؤخذ بشكل متواقت مع تحضير العينات 4 مل من محلول حمض الكلور $HClO_3$ في الايتانول 96% (الذي يؤدي دور مثبط للإنزيم)، ويضاف إليه 2 مل من محلول RNA وكذلك يضاف إلى المزيج 2 مل من المستخلص الإنزيمي، ثم تحفظ العينة الشاهدة في البراد. بانتهاء زمن الحضن للعينة المدروسة، يجري تثبيط التفاعل الإنزيمي بإضافة 4 مل من حمض الكلور 0.5 M في الايتانول والمبرد جيداً. يحرك المزيج تحريكاً جيداً، ثم يوضع مدة 60 دقيقة في الدرجة $10-\ ^\circ C$ يثفل المزيج بسرعة 10 ألف دورة/دقيقة مع التبريد مدة 20 دقيقة، تستخدم الرشاحة الناتجة لقياس كثافتها الضوئية في طولي الموجة 260 nm و290 nm، وتحسب فعالية إنزيم RNAase بالنسبة إلى عينة شاهدة، وفق العلاقة الآتية [11].:

$$N = \frac{\Delta E\ (260\text{-}290) \cdot \alpha \cdot \beta \cdot y_1}{P \cdot T}$$

إذْ: N: فعالية إنزيم RNAase في الشروط المعطاة

حيث يعبر عنها بالواحدة الإنزيمية u وتقدر بكمية الإنزيم التي تؤدي إلى تغيّر الكثافة الضوئية لمحلول RNA بمقدار 0.1 بالوحدة الإنزيمية.

$\Delta E_{(260\ -\ 290)}$: تغيّر الكثافة الضوئية للعينة النباتية المدروسة بين طولي الموجتين 260 و280 نانومتراً.

α، β، Y: نسب تمديد مستخلص العينة الإنزيمية المدروسة.

p: وزن النسيج المستخلص منه إنزيم الريبونوكلياز (غ).

T : زمن حضن عينة الحمض الريبي النووي مع الإنزيم المدروس مقدراً بالساعات.

قياس فعالية إنزيم الكاتالاز

تقـــاس فعاليـــة الإنـــزيم بالاســـتفادة مـــن دوره فـــي تفكيـــك المـــاء الأكـــسجيني (الركازة Substrate)، وذلك خلال مدة معينة من الزمن.

تحضير المادة النباتية لدراسة الإنزيم: يسحق مقدار 5غ من المادة النباتية مع 0.3غ من كربونات الكالسيوم و20 مل من الماء المقطر، ويتابع السحق حتـــى تتـــشكل كتلـــة متجانسة، ينقل هذا المزيج إلى دورق سعة 100 مل، ويكمل الحجم بالماء المقطر، يتـــرك المزيج مدة 40 دقيقة، ثم يرشح، وتستعمل الرشاحة كمستخلص إنزيمي.

قياس فعالية الإنزيم : تؤخذ عينتان من الرشاحة الإنزيمية (20 مل) وتوضعان فـــي دورقين سعة 100 مل، تغلى إحدى العينتان مدة 3 دقائق لتخريب البروتين الإنزيمي فيها بوصفها عينة شاهدة، ثم تبرد ويضاف إلى كل من الدورقين 20 مل ماءً مقطراً و3 مـــل من الماء الأكسجيني 1%، ثم يحضن الدورقان من 30-40 دقيقة في الدرجة ^{0}C 40. بعد انتهاء مدة الحضن يضاف5 مل من حمض الكبريت 10% لتثبيط الإنزيم. يعـــاير المـــاء الأكسجيني المتبقي بمحلول برمنغنات البوتاسيوم 0.1N حتى ظهور اللون الوردي الخفيف الذي يجب أن يثبت مدة دقيقة. تعبّر كِمية الماء الأكسجيني المتفككة في أثناء الحضن عن فعالية الإنزيم، وتحسب الفعالية مقدرةً بـــعدد ميلي غرامات H_2O_2 المتفككة فـــي زمـــن الحضن محسوب بالنسبة إلى 1 غ من المادة النباتية المدروسة وفق المعادلة الآتية [12]:

$$p = \frac{(A - B) \cdot 0.17}{T \cdot H}$$

إذْ: p: فعالية الكاتالاز

A: حجم برمنغنات البوتاسيوم 0.01 نظامي المستهلك لمعايرة التجربة الشاهدة.

B: حجم برمنغنات البوتاسيوم (0.01 نظامي) المستهلك لمعايرة تجربة العينة.

0.17: عدد الميلي غرامات من H_2O_2 المكافئة لــ 1 مل من $KMnO_4$ (0.01 N)

H: وزن العينة النباتية المأخوذة لدراسة الإنزيم فيها.

T : زمن الحضن.

قياس فعالية إنزيم أسكوربات أوكسيداز Ascorbate oxidase

يعمل الإنزيم على إبطال سميِّة فوق الأكاسيد مثل الماء الأكسيجيني، مستخدماً حمض الأسكوربيك كركازة. وتحدد فعالية الإنزيم بالكمية التي تحوِّل 1 ميكرو مول من حمـــض

الأسكوربيك عند الدرجة 25 ºC، وذلك خلال دقيقة واحـــدة إلـــى حمـــض الأســـكوربيك منقوص الهيدروجين (المؤكسد) [13].

تحضير العينة النباتية لدراسة الإنزيم: يؤخذ غرام واحد من مقاطع البادرات ويسحق في هاون مبرد، ثم يضاف إليها 10 مل من موقي الفوسفات (0.1 M، PH=7)، يحـــرك المزيج على البارد بضع ساعات؛ ثم يثفل في الدرجة 4 ºC بسرعة 5000 دورة/دقيقـــة، تؤخذ الرشاحة الناتجة لتتم معايرة فعالية الإنزيم فيها.

طريقة القياس: يؤخذ أنبوبان سعة 5 مل أحدهما للعينة المدروسة، والثـــاني للعينـــة الشاهدة، ويضاف إلى كل منهما 2 مل من موقي الفوسفات/EDTA، و0.1 مـــل حمـــض الأسكوربيك المحضر طازجاً 0.005 M، ثم يضاف في أنبوب التجربـــة 0.1 مـــل مـــن المستحضر الإنزيمي، ويستعاض عن حجم الإنزيم في أنبوب الشاهد بحجم 0.1 مل مـــن الموقي الفوسفاتي. تحضن العينة المدروسة مدة دقيقة واحدة، وتقاس امتـــصاصيتها عنـــد طول الموجة 265 nm، تحسب فعالية الإنزيم بحسب العلاقة الآتية [14]:

$$u/ml = \frac{A_{265}/min \cdot vt \cdot d}{Vs \cdot E}$$

إذْ: u/ml: الفعالية الإنزيمية مقدرة بالوحدات الإنزيمية في الميلي ليتر.

$A_{265/min}$: امتصاصية العينة الإنزيمية خلال دقيقة حضن واحدة.

Vt : هو حجم العينة المحضونة.

d: عامل التمديد. E : معامل الإطفاء النوعي و قيمته 13.386.

Vs : حجم مستحضر الإنزيم.

قياس فعالية إنزيم غوياكول بيروكسيداز Guaiacol peroxidase

$$4guaiacol + 4H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxidase}} Tetraguaicol + 8\,H_2O$$

قياس فعالية الإنزيم: يجهز تفاعل العينة الإنزيمية بإضـــافة 2.8 مـــل مـــن مـــوقي الفوسفات (0.1M و pH=7)، و0.05 مل من محلول الغوياكول 0.018 M، ومقدار 0.05 مل من الماء الأكسجيني و0.1 مل من المستحضر الإنزيمي المستخلص من المادة النباتية، يحضن المزيج المتفاعل مدة دقيقة واحدة، ثم تقاس الامتـــصاصية عنـــد طـــول الموجـــة 436nm مقابل عينة شاهدة تحضر بمزج مكونات العينة الإنزيمية ذاتها عدا المستحـــضر الإنزيمي، الذي يستعاض عنه بإضافة الحجم نفسه من موقي الفوسفات، تحـــسب الفعاليـــة الإنزيمية وفق العلاقة الآتية[14] :

$$(U/ml) = \frac{\Delta A/min \cdot 4 \cdot vt \cdot d}{V_s \cdot E}$$

إذْ: u/ml تعبّر عن الفعالية الإنزيمية مقدرة بالوحدات الإنزيمية في مل من العينة الإنزيمية المقيسة.

ΔA: امتصاصية العينة الإنزيمية. Vt : حجم العينة المحضونة.

d: عامل التمديد. E معامل الإطفاء النوعي و قيمته 25.5

Vs: حجم مستحضر الإنزيم.

النتائج والمناقشة

تأثير منظمات النمو المدروسة في فعالية إنزيم الأميلاز

بعد انقضاء مدة النقع لمقاطع الساق استخلص منها الإنزيم وفق الطريقة الموصوفة سابقاً. يبيّن الشكل (1) النتائج التي تم الوصول إليها، وقد عبر عن الفعالية الإنزيمية بعدد ميللغرامات النشاء المتفككة خلال دقيقة من حضن الإنزيم مع العينة الحاوية على كمية محددة من النشاء.

الشكل (1) فعالية الأميلاز في مقاطع الساق بعد الحضن مع الماء أو مع المنظمات المدروسة.
(1)الحالة الأولية ؛ (2) H_2O؛ (3) IAA؛ (4)2.4-D؛ (5) IBA

توضح النتائج التي تم الوصول إليها أن منظمات النمو المدروسة تبدي تأثيراً واضحاً في فعالية إنزيم α-الأميلاز في خلايا مقاطع الساق التي حضنت بها، إذ يلاحظ من الشكل السابق أن حضن المقاطع بالماء المقطر أو بمحاليل منظمات النمو حمض أندول الخل

وحمض 2.4- ثنائي كلورو فينوكسي الخل وحمض أندول الزبدة (بتراكيز 50 ملغ/ل) أدى إلى انخفاض فعالية α-الأميلاز بالنسبة إلى الشاهد، ولكن هذا الانخفاض تفاوت من وسط حضن إلى آخر، فقد انخفضت فعالية الأميلاز المدروس عند الحضن بالماء المقطر بنسبة 66.5% عن فعاليته في العينة الشاهدة، وكذلك انخفضت عند الحضن بحمض أندول الزبدة بنسبة 62.9%، وبعيداً عن نسب الانخفاض هذه كانت نسبة انخفاض فعالية الأميلاز عند الحضن بمحاليل حمض أندول الخل وحمض 2.4- ثنائي كلورو فينوكسي الخل قليلة، إذ وصل تثبيط فعاليته عند الحضن بالمحلول الأول إلى21.9%، وعند الحضن بالمحلول الثاني إلى 23.6% بالنسبة إلى الحالة الأولية. كما يقرأ من النتائج السابقة أن الحضن بمنظمات النمو المدروسة عمل على تنشيط α-الأميلاز في المقاطع المحضونة مقارنةً بحالة الحضن بالماء المقطر، وهو ما يمكن تفسيره باحتمال مقاومة تفاعلات التفكك في خلايا الساق المعزولة في أثناء تعرضها للمعاناة. وتتوافق هذه النتائج مع نتائج الدراسة [Klerck,2002] التي أظهرت أن معالجة فسائل التفاح بمحلول حمض أندول الخل قد أثرت في تحولات الكربوهيدرات الادخارية، إذ سرعت تفكك سلاسل النشاء فيها [15].

تأثير منظمات النمو المدروسة في فعالية إنزيم الريبونوكلياز

يبيّن الشكل (2) النتائج التي تم الوصول إليها في قياس فعالية الريبونوكلياز وفق الطريقة الواردة في شرح طرائق البحث التي عبَّر فيها عن فعالية الإنزيم بكميته الموجودة في 1غ من مقاطع الساق التي تحلمه كمية معينة من RNA خلال ساعة.

الشكل (2) فعالية الريبونوكلياز في مقاطع الساق بعد الحضن مع الماء أو مع المنظمات المدروسة (1)الحالة الأولية؛ (2) H_2O؛ (3) IAA؛ (4)2.4-D؛ (5) IBA

تبيّن نتائج معايرة الإنزيم أن الحضن بالماء المقطر أدى إلى ارتفاع فعالية الريبونوكلياز المدروس بنسبة واضحة تقارب 40% من الفعالية الريبونوكليآزية في الخلايا قبل الحضن (الحالة الأولية). أمّا تأثير منظمات النمو المدروسة في فعالية إنزيم الريبونوكليآز في خلايا الساق عند استخدامها كوسط للحضن، فيظهر الشكل (2) أن الحضن بمحلول IAA وبثنائي كلورو فينوكسي أسيتات (50ملغ/ل) أدى إلى انخفاض فعالية الإنزيم في الخلايا المدروسة بالنسبة إلى فعاليته في حالة الماء المنشط لتفاعلات التفكك بنسبة 21% في حالة IAA، وبنسبة23% في حالة 2,4-D، ولكنهما عجزا عن إيقاف تفاعلات تفكك الخلايا الحاصلة في الوسط المائي وتهدمها كلياً. أمّا في حال حمض أندول الزبدة فقد كان تأثيره مغايراً تماماً حيث خفض فعالية الريبونوكليآز بنسبة وصلت 47% عما هي عليه في العينة الشاهدة.

وبذلك يمكن الاستنتاج أن حمض أندول الخل وثنائي كلوروفينوكسي أسيتات عملا كمحفزات أو منشطات لإنزيم الريبونوكليآز، وعمل حمض أندول الزبدة كمثبط له.

وتشترك النتيجة التي تم الوصول إليها مع نتيجة أظهرتها دراسة (Pietro De Leo *et al.*,1970) التي أشارت إلى دور الأوكسين في الحد من الزيادة في فعالية الريبونوكليآز التي تنتج عن تأثير حمض الأبسيسيك في مقاطع أجزاء الورقة المفصولة عن النبات المدروس[16].

تأثير منظمات النمو المدروسة في فعالية إنزيم الكاتالاز

درست فعالية الكاتالاز بالشروط نفسها التي درست الإنزيمات السابقة. ويوضح الشكل (3) النتائج التي تظهر تأثير منظمات النمو المدروسة في فعالية الكاتالاز:

الشكل (3) فعالية الكاتالاز في مقاطع الساق بعد الحضن مع الماء أو مع المنظمات المدروسة
(1)الشاهد؛ (2) H2O؛ (3) IAA؛ (4)2.4-D؛ (5) IBA

تبين النتائج التي تم الحصول عليها أن عزل مقاطع ساق الذرة عن النبات وحضنها بالماء أو بمحلول حمض أندول الخل قد أدى إلى حصول ارتفاع كبير في فعالية إنزيم الكاتالاز عما كانت عليه في العينة الشاهدة، في حين أن هذا الارتفاع في الفعالية كان أقل بتأثير 2.4 ثنائي كلور فينوكسي أسيتات. وقد اختلف تأثير حمض أندول الزبدة عن الهرمونين الآخرين المدروسين الذي أدى إلى انخفاض في فعالية الإنزيم عند حضن المقاطع بمحلوله؛ وذلك بالنسبة إلى العينة الشاهدة. وتتفق هذه النتائج، في جزء منها، مع نتائج الدراسة التي أُجريت على أوراق نبات *Tropaeolum*، والتي أظهرت أن حمض أندول الخل و حمض أندول الزبدة عملا على خفض فعالية إنزيم الكاتالاز في بداية مرحلة الشيخوخة [8].

تأثير منظمات النمو المدروسة في فعالية إنزيم غوياكول بيروكسيداز

درست فعالية الغوياكول بيروكسيداز بالشروط نفسها التي درست فيها فعالية الإنزيمات السابقة المدروسة، ويبيّن الشكل (4) تأثيرات منظمات النمو المدروسة في فعالية إنزيم غوياكول بيروكسيداز، إذ عبَّر عن فعالية الإنزيم بكميته الموجودة في 10 ملغ مسحوق المادة النباتية (وهو ما يعادل 0.1 مل من مستحضر العينة المأخوذ للتفاعل) التي تقوم بتفكيك كمية معينة من الماء الأكسيجيني خلال دقيقة واحدة.

الشكل (4) فعالية غوياكول بيروكسيداز في مقاطع الساق بعد الحضن مع الماء أو مع المنظمات المدروسة

(1)الحالة الأولية ؛ (2) H2O؛ (3) IAA؛ (4)2.4-D؛ (5) IBA

تبيّن النتائج التي تم الوصول إليها أن حضن الخلايا المعزولة في الوسط المائي قد زاد من فعالية الغوياكول بيروكسيداز على فعاليته في الخلايا قبل الحضن بنسبة 20%. وأمّا حضن الخلايا بحمض أندول الخل فقد خفض من فعالية هذا الإنزيم بنسبة 19% عن الحالة الأولية، في حين لم يبدِ مركب 2,4-D تأثيراً واضحاً في فعالية هذا الإنزيم، في حين أدى حضن خلايا الساق بحمض أندول الزبدة إلى خفض فعالية الإنزيم بنسبة كبيرة وصلت إلى نحو 40% من الفعالية الأولية. ومن الصعب هنا إيجاد العلاقة بين فعالية منظم النمو المدروس والتأثير الوظيفي له في الإنزيم سوى الفروقات في الأدوار العامة لكل من هذه المركبات فـ IAA هرمون طبيعي و2,4-D منظم نمو كيميائي صنعي ومجال عملها الرئيس في خلايا القسم الهوائي من النبات، أمّا IBA فهو المركب الذي ينشط نمو الجذور، ومن الواضح هنا ضرورة إجراء المزيد من التجارب لتوضيح النتائج.

تأثير منظمات النمو المدروسة في فعالية إنزيم أسكوربات أوكسيداز

درست فعالية الأسكوربات أوكسيداز في شروط التجارب السابقة نفسها، يبيّن الشكل (5) نتائج التجارب التي تظهر فعالية منظمات النمو على إنزيم أسكوربات أوكسيداز.

الشكل (5) فعالية أسكوربات أوكسيداز في مقاطع الساق بعد الحضن مع الماء أو مع المنظمات المدروسة.

(1) الحالة الأولية؛ (2) H2O؛ (3) IAA؛ (4)2.4-D؛ (5) IBA

يظهر من النتائج المبينة في الشكل (5) أنَّ لمحاليل منظمات النمو المدروسة تأثيراً في فعالية إنزيم أسكوربات أوكسيداز خلايا ساق الذرة المحضونة بها، إذ أدى الحضن بالماء المقطر إلى خفض فعالية الأسكوربات أوكسيداز بنسبة واضحة بلغت 35.6%، في حين أنَّ نسبة التثبيط تجاوزت هذه القيمة إلى 36.6% عند الحضن بمحلول IBA، على عكس

ما أبداه كل من حمض أندول الخل و2.4 ثنائي كلور فينوكسي حمض الخل، فقد عملا كدارئات للأثر التثبيطي لفعالية إنزيم أسكوربات أوكسيداز الذي حفزه الوسط المائي. ففي الحالة الأولى انخفضت فعالية الإنزيم 12.5 % عن فعاليته الأولية-الحالة الأولية- ولم يتجاوز انخفاض الفعالية في الحالة الثانية عن الفعالية في الحالة الأولية 11.3% .

الاستنتاجات والتوصيات

- يبدي كل من حمض أندول الخل وثنائي كلورو فينوكسي أسيتات زيادة في فعالية الريبونوكلياز عن الحالة الأولية، وهو التأثير الذي لم يبده IBA، وكانت الفعالية الأعظمية في حالة الحضن بالماء المقطر.
- انخفضت فعالية إنزيم الأميلاز المدروس في حالات الحضن المدروسة جميعها عنها في الحالة الأولية.
- خفضت المنظمات المدروسة من فعالية إنزيم الأسكوربات أوكسيداز عن الحالة الأولية.
- في حين تساوت فعالية غوياكول بيروكسيداز في الخلايا المحضونة بثنائي كلورو فنوكسي أسيتات مع الحالة الشاهدة، وانخفضت بوجود حمض أندول الخل وحمض أندول الزبدة، في حين كانت أعظمية بوجود الماء وبلغت الزيادة 20%.
- ارتفعت فعالية إنزيم الكاتلاز خمس مرات في حالة الحضن بحمض أندول الخل، في حين لم يبدِ المنظمان الباقيان تأثيراً مشابهاً، وازدادت فعاليته سبع مرات على الحالة الأولية في حالة الحضن بالماء.
- ولذلك نوصي بدراسة تأثير منظمات النمو النباتية غير المدروسة لدينا في تفاعلات الاستقلاب، وكذلك دراسة تأثير هذه المنظمات في أنسجة نباتية مغايرة لدراستنا، ويمكن أن تكون ثنائية الفلقة كالفول.

REFERENCES المراجع

1- مالو أحمد و مالك أزهار 2010، تأثير مستحلبات زيت بذور التويا الشرقية وكـل مـن α- البنـين وα- التوجون على استقلاب البروتينات والشحوم في خلايا الساق عند بادرات الذرة الصفراء.

2-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 .59-61.

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

6-Husen, A. 2008. Clonal propagation of Dalbergia sissoo Robx. And associated metabolic changes during adventitious root primordium development. New Forests 36,13-27.

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

8- Robert J. T; Fredrich J. B; Craig S. L; Jason J. S. 2006. Effects of auxin on wall polysaccharide composition and enzyme activity during extension-growth of Pellia (Bryophyta). International jornal of Plant physiology, (60)4, 502-506.

9-Ilhami, K., Lokman, O., Yurdagul, E., yener, O. 2010. Effects of Auxin on photosynthetic pigments and some enzyme activities during dark induced senescence of *Tropaeolum* leaves. Pak.j.bot (42)3,1881-1888.

10- روبين،ب.أ. 1978. عملي الفيزيولوجيا النباتية، بطرسبورغ. (الكتاب باللغة الروسية).

11- سكفيرسكي، آ.ب.، شبينوف. 1964. التجارب العملية في الحموض النووية. موسكو (الكتاب باللغة الروسية).

12- بلشكوف، 1968. كتاب العملي في بيوكيمياء النبات، مؤسسة العلوم، موسـكو. (الكتـاب باللغـة الروسية).

13-Raven EL, Lad L, Sharp KH, Mewies M, Moody PC. 2004. "Defining substrate specificity and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase". *Biochem. Soc. Symp.* (71), 27–38.

14-Bergmeyer H. U. 1974. Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, 2nd Edition , page 495.

15-Klerck, G. J. 2002. Rooting of microcuttings: theory and practice, In vitro Cell. Div. Biol, 38,415- 422.

16-Pietro De Leo, JosepH A. Sacher. 1970. Control of Ribonuclease and Acid phosphatase by Auxin and Abscisic Acid during senescence of *Rhoeo* Leaf Sections. Plant PHysiol. December, 46(6), 806–811.