الصدمة الحرارية في زيادة محتوى البروتين والكلوروفيل في كالس سيقان القرنفل *Dianthus caryophyllus* L♦

مزاحم قاسم الملاح قتيبة شعيب النعمة

قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة الموصل

ABSTRACT

Exposure of callus derived from stem segments of carnation (*Dianthus caryophyllus*) to heat shock (30 , 35 , 40 , 45 , 50 ° c) for 10 and 20 minutes for each degree increased callus growth , fresh weight , protein and chlorophyll content. Chlorophyll content reached up to 4.8 mg /g in callus exposed to the treatment 30° c/20 min., other treatment 30°c/10 min was found to stimulate protein content as compared with the untreated callus.

الخلاصة

أدى تعريض كالس سيقان نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* إلى صدمات حرارية (30 ، 35 ، 40 ، 45 ، 50 درجة سيليزية) وبفترات زمنية أمدها 10 و 20 دقيقة لكل درجة إلى زيادة نمو الكالس مقترنة بزيادة وزنه الطري في بعض المعاملات ورفع محتواه من البروتين والكلوروفيل فقد أظهرت النتائج أن لبعض المعاملات تأثيرا مشجعا في زيادة محتوى الكلوروفيل إذ بلغ 4.8 ملغم/ غم في الكالس المعرض لظروف 30 درجة سيليزية لمدة 20 دقيقة، وفي معاملة أخرى 30 درجة سيليزية لمدة 10 دقائق لوحظ زيادة في محتوى البروتين لعينات الكالس المعاملة قياسا بعينات المقارنة.

المقدمة

تشير الأدلة إلى أن لمعاملة الصدمة الحرارية تأثيرات مشجعة، عند إخضاع عدد من الكائنات الحية إليها، من خلال تحفيزها لبعض المسارات الأيضية في الخلية، حيث أشارت بعض الدراسات إلى أن تعريض بعض الأنواع البكتيرية للصدمة الحرارية شجع بناء بعض الأنزيمات في بكتريا *Salmonella typhimurium* (1)، وكذلك في الخمائر كما في

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4-5 أيلول 2007

Sacchromyces cerevisiae (2). وأما فيما يخص تأثيرات الصدمة الحرارية على الأنظمة النباتية فهناك العديد من الدراسات التي أشارت إلى التأثيرات الايجابية المرغوبة لهذه المعاملة على بعض الجوانب الخلوية أو الأيضية في النظام النباتي، فقد ذكرت إحدى الدراسات أن المعاملة الحرارية حفزت من حدوث الانقسامات الخلوية لخلايا المعلقات الخلوية لنبات زهرة الشمس(3)، وأوضحت دراسة أخرى أن تعريض المعلقات الخلوية لنبات التفاح إلى صدمات حرارية حفز من بناء بروتينات جديدة (4)، وأشار بعض الباحثين إلى التشابه مع تأثيرات الصدمة الكهربائية التي أدت إلى زيادة المحتوى البروتيني في نباتات عنيب الذيب الناتجة من الكالس المعرض لهذه الصدمة (5).

وتهدف هذه الدراسة إلى معرفة تأثيرات الصدمة الحرارية على مستويات البروتين والكلوروفيل في كالس نباتات القرنفل.

المواد وطرائق العمل

- **تكوين مزارع الكالس:**

عقمت بذور القرنفل *Dianthus caryophyllus* (صنف أجنبي) بغمرها في محلول 6% هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري) بواقع 1 حجم منه : 2 حجم ماء لمدة 10 دقائق، وبعدئذ غسلت البذور ثلاث مرات متتالية بالماء المعقم (6)، ونقلت البذور المعقمة إلى سطح 25 مل من وسط MS (7) الصلب الخالي من منظمات النمو داخل قناني زجاجية حجم 100 مل وبواقع بذرتين / قنينة، وحفظت العينات في غرفة الزرع بظروف ظلام تام في درجة حرارة 25 ± 2 درجة سيليزية وشدة إضاءة 1500 لوكس لحين مباشرتها بالإنبات.

استخدمت قطع السيقان بطول 1سم المستأصلة من بادرات القرنفل الناتجة عن البذور المعقمة بعمر 4 أسابيع لاستحداث الكالس باستخدام الوسط MS الصلب المدعم بـإضافة 0.5 ملغم/لتر 2,4-D و 0.1 ملغم/لتر BA (6)، وحضنت العينات النباتية في ظروف الإضاءة المتعاقبة (16 ساعة ضوء/ 8ساعات ظلام) تحت شدة إضاءة 1500 لوكس وبدرجة حرارة 25 ± 2 درجة سيليزية.

- **تعريض قطع الكالس للمعاملة الحرارية:**

أخذ 1غم / عينة من كالس السيقان بعمر 4 أسابيع ووضع كل منها في أنبوبة معقمة ذات غطاء سعة 25 مل، عرضت العينات للدرجات الحرارية (30 ، 35 ، 40 ، 45 ، 50

درجة سيليزية) لمدة 10 و 20 دقيقة لكل معاملة داخل حمام مائي مثبتة درجة حرارته مسبقاً على الدرجة المطلوبة، وعند نفاذ مدة المعاملة نقلت الأوعية الحاوية على العينات لتغمر في بيكر حاو على ماء بدرجة حرارة الغرفة (8). وبعد الانتهاء من تعريض جميع عينات الكالس للمعاملات المنتخبة نقلت عينات الكالس المعاملة إلى أوساط الاستحداث عينها وحضنت بنفس الظروف السابق ذكرها.

وقدرت الأوزان الطرية لعينات كالس سيقان القرنفل المعاملة بالحرارة وكذلك لعينة الكالس غير المعامل بالحرارة (المقارنة) بعد مرور أسبوعين من زراعة الكالس بحساب الفروقات بين وزن الكالس بعد الزراعة ووزنه قبل الزراعة.

- **تقدير البروتين والكلوروفيل في الكالس المعامل بالحرارة:**

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل Lowery وجماعته 1951 (9) في تقدير مستويات البروتينات والتي تعتمد أساسا على ترسيب بروتينات العينة النباتية باستعمال حامض ثالث كلوريد الخليك Trichloro acetic acid (TCA). ومن ثم تحديد كميات البروتين طيفيا باستخدام المطياف الضوئي (CECILL – CE 1011, France) عند الطول الموجي 750 نانوميتر، وحدد التركيز الكلي للبروتين باستخدام المنحنى القياسي الناتج عن استعمال تراكيز متدرجة تراوحت بين (10 – 100 مايكروغرام/مل) من مصل البروتين البقري.

واتبعت الطريقة القياسية في تقدير الكلوروفيل الكلي في عينات الكالس باستخدام الأسيتون (10) وتحديد الامتصاصية عند الطولين الموجيين 663 و 645 نانوميتر. وحسبت كمية الكلوروفيل الكلي باعتماد الصيغة الرياضية:

$$\text{mg total chlorophyll/ g tissue} = 20.2(D645) + 8.02(D663)\times V/1000\times W$$

إذ إن D = الكثافة الضوئية للمستخلص

V = الحجم النهائي للأسيتون المخفف بتركيز 80%

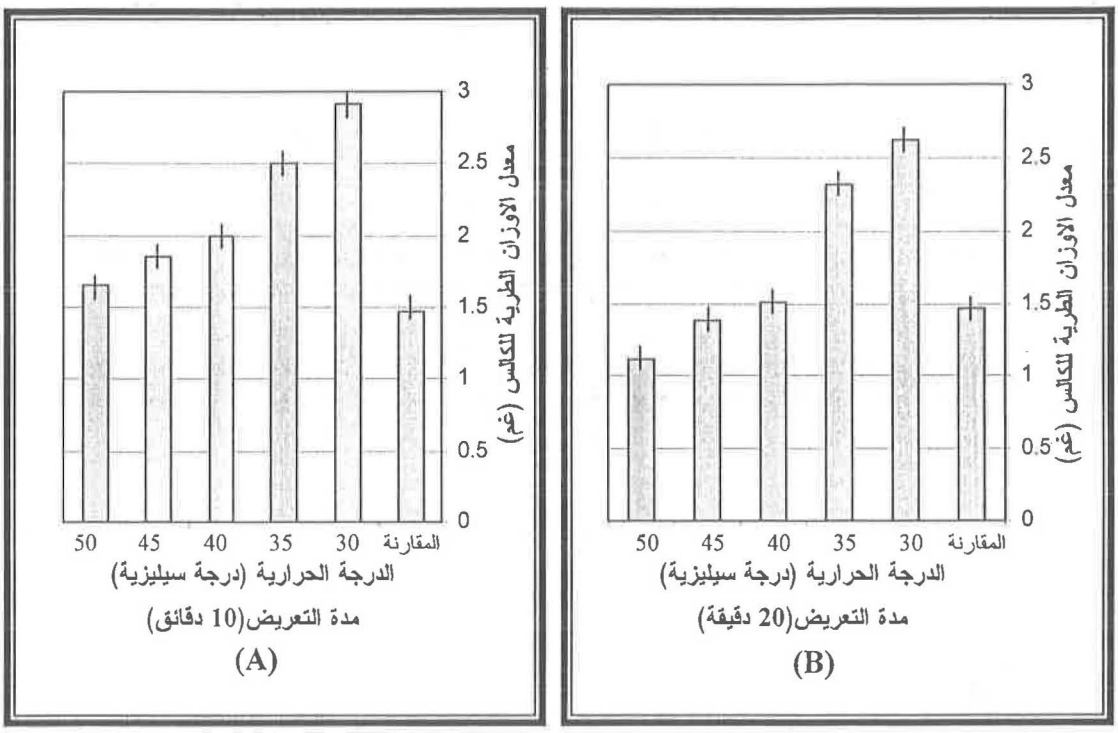
W = الوزن الطري للنسيج النباتي المستخدم

النتائج

- **تقدير الأوزان الطرية للكالس المعامل حراريا:**

أظهرت النتائج عموما حصول زيادة في معدلات الأوزان الطرية لعينات الكالس المعاملة من خلال تعريضها لبعض الدرجات الحرارية، وظهر هذا التأثير واضحا عند درجة

30 و 35 درجة سيليزية (الشكل 1 – A,B)، ولوحظ أن الاستمرار في ارتفاع درجة الحرارة سبب انخفاضاً في معدل الأوزان الطرية للكالس المعامل.



الشكل (1): تأثيرات المعاملة الحرارية على معدلات الأوزان الطرية لكالس ساق القرنفل *Dianthus caryophyllus*
(–) الخط العمودي يمثل الانحراف القياسي

▪ تأثيرات المعاملة الحرارية في محتوى البروتين في كالس سيقان القرنفل:

أثبتت النتائج أن تعريض عينات كالس سيقان القرنفل للمعاملات 30 و 35 درجة سيليزية كان ذا تأثير مشجع في زيادة المحتوى البروتيني في هذه العينات من الكالس. فقد أظهرت القراءات الطيفية حدوث زيادة واضحة في محتوى البروتين للكالس المعامل وخصوصا عند تعريضه لظروف 30 درجة سيليزية مدة 10 دقائق قياسا بعينات الكالس غير المعامل (الجدول 1).

- **تأثيرات المعاملة الحرارية في محتوى الكلوروفيل في كالس سيقان القرنفل:**

أكدت نتائج تعريض عينات كالس سيقان القرنفل للمعاملة الحرارية أن بعض هذه المعاملات وهي 30 درجة سيليزية / 20 دقيقة و 35 درجة سيليزية / 20 دقيقة كانت ذات دور واضح في زيادة كمية الكلوروفيل فقد سجلت أعلى كمية منه 4.8 ملغم /غم وزن طري في عينات الكالس عند المعاملة 30 درجة سيليزية / 20 دقيقة وبفرق واضح عن عينة الكالس غير المعامل (الجدول 1).

الجدول 1: تأثير تعريض عينات كالس سيقان القرنفل *Dianthus caryophyllus* للمعاملات الحرارية على محتوى البروتين والكلوروفيل الكلية

المعاملات درجة سيليزية / دقيقة	كمية البروتين ملغم / غم وزن طري	كمية الكلوروفيل ملغم / غم وزن طري
10 / 30	2.61	1.66
20 / 30	2.37	4.8
10 / 35	2.20	1.39
20 / 35	2.10	3.7
10 / 40	1.88	1.37
20 / 40	1.85	1.14
10 / 45	1.81	1.25
20 / 45	1.74	1.56
10 / 50	1.71	1.72
20 / 50	1.65	1.50
مقارنة	2.00	1.34

المناقشة

أكدت العديد من الدراسات على دور استخدام الصدمة الحرارية في تشجيع بعض الفعاليات الحيوية في الخلية (11). إن الزيادة الحاصلة في محتوى البروتين والكلوروفيل في هذه الدراسة قد تعزى إلى تحفيز بناء بعض البروتينات والأنزيمات داخل الخلية النباتية، فقد أشارت إحدى الدراسات إلى أن الدور الايجابي للمعاملات الحرارية يكمن في تحفيزها بناء أنواع من البروتينات في خلايا المعلقات الخلوية لنبات زهرة الشمس (12)، وقد أوعزت

أحدى الدراسات إلى دور المعاملة الحرارية في زيادة نفاذية الجدر الخلوية التي يترتب عنها استقطاب ايونات الكالسيوم وبعض المواد الغذائية (13). وأوجدت دراسة حديثة أن تعريض خلايا المعلقات الخلوية للمعاملة الحرارية أدت إلى زيادة الانقسامات الخلوية كما في نباتات الرز (14) فضلا عن أنها أدت إلى التبكير في بدء انقسامات الخلايا وزيادة أعداد بادئات الكالس الناشئة من خلايا المعلقات الخلوية لنبات زهرة الشمس (3). وأكدت دراسات أخرى على دور المعاملة الكهربائية المماثل في تحفيز الانقسامات المبكرة لخلايا المزارع الخلوية لنبات زهرة الشمس (15)، وكذلك على المحتوى البروتيني لكالس نبات عنيب الذيب (5).

إن التأثيرات المشجعة لهذه المعاملات والتي تنعكس على سلوك الخلايا سواءً للمعلقات الخلوية كما في نبات فول الصويا (16) أو الكالس كما في نبات البابونج (17) بل وحتى على البكتريا كما في *Salmonella typhimurium* (18)، تكمن في إزالة الحواجز متمثلة بالجدار الخلوي من خلال تكوين فتحات مؤقتة عليه (19) أو زيادة نفاذيته لبعض المواد (13) كما انها قد تحفز تكوين بعض المواد المهمة داخل الخلية (20).

إن الانخفاض الحاصل في محتوى البروتين في عينات الكالس المعرضة للدرجات الحرارية المرتفعة (40 و 45 و 50 درجة سيليزية) قد يعزى إلى حصول تلف في بروتينات الخلايا (21) أو تحطم أنزيماتها المسؤولة عن بنائها (22)، ويترتب على هذا التأثير موت الخلايا (23) نتيجة توقف أو عدم حصول الانقسامات الخلوية فيها(3)، وهذا قد يفسر الانخفاض الحاصل في معدلات الأوزان الطرية في عينات الكالس التي عرضت لبعض الدرجات العالية نسبيا في هذه الدراسة.

المصادر

1. Morgan, R.W.; Christman, M.; Jacobson, F. S. and Storz, G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 8059-8063. (1986).
2. Davidson, J. F.; Whyte, B.; Bissinger, P. H. and Schietl, R. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 5116-5121. (1996).
3. رشيد، جميلة هزاع و قاسم، وجدان سالم. مجلة زراعة الرافدين، 34(2): 22-28. (2006).
4. Bowen, J.; Lay-Yee, M.; Plummer, K. and Ferguson, I. J. Plant Physiol. 159: 599-606. (2002).
5. Al-Mallah, M. K. and Salih, S. M. Raf. J. Sci. 14: 33-42. (2003).
6. Yantcheva, A.; Vlahova, M. and Atanassov,A. Plant Cell Rep. 18: 148-153. (1998).
7. Murashige, T. and Skoog, F. Physiol. Plant. 15: 473-479. (1962).
8. Irina, I. P.; Roman, A. V. and Friedrich, S. Plant Physiol. 129: 838-853. (2002).
9. Lowery,O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. J. Biol. Chem. 193: 265-275. (1951).
10. Arnon, D. I. Plant Physiol. 24: 1-15. (1949).
11. Sholpan, D.;Tamás, M.; Pál, M.; Attila, O.; Katalin, T.; Zoltán M.; Dénes D. and Mária D. J.Exp. Bot 52: 215-221. (2001).
12. Coca, M. A.; Almoguera, C.; Thomas, T. L. and Jorano, J. Plant Mol. Biol. 31: 836-870. (1996).
13. Mejia, R.; Gomez, E. and Fememez, M. S. Biochem. Biophys. Acta. 1239: 195-200. (1995).
14. Thompson, J. A.; Abdullah, R.; Chen, W. H. and Gartl, K. M. J. Plant Physiol. 127: 367- 370. (1989).
15. رشيد، جميلة هزاع و قاسم، وجدان سالم. مجلة التربية والعلم، 17(4): 17-30. (2005).
16. زيدان، سهلة محمد، رشيد، جميلة هزاع و النعمة، قتيبة شعيب. مجلة التربية والعلم، 18(3): 80-92.(2006).
17. Salih, S.M. J. Educ. Sci., 53: 54-62. (2001).
18. حسن، اياد حازم، مجلة علوم الرافدين، 15(5): 155-164. (2004).
19. Joersbo, M. and Brunstedt, J., Physiol. Plant 81: 256-264.(1991).
20. Gong, M.; Li, Y. J. and Chens, Z., J. Plant Physiol. 153: 488-496.(1998).
21. Bukner, B.; Janick-Buckner, D.; Gary, J. and Johal, G. S. Trends Plant Sci. 3: 218-223. (1998).
22. Soloman, M.; Belenghi, B.; Delledon, M. and Menachem, E. Plant Cell. 11: 431- 444. (1999).
23. Loschiavo, F.; Balan, B.; Compagnin, D.; Ganz, R. and Mariani, P. Eu. J. Cell. Biol. 79: 294-298. (2000).