

أضرار إجهاد الأكسدة على النبات

Damage of Oxidative Stress on the Plants

مقدمة

ينشأ إجهاد الأكسدة من تكون صور الأكسجين المختزلة النشيطة الضارة reactive oxygen species وأهمها أنيون فوق الأكسجين (superoxide anion radical O_2^-)، فوق أكسيد الهيدروجين (hydrogen peroxide H_2O_2)، hydroxyl radical (OH) والأكسجين المنهيج في الحالة الفردية (singlet oxygen 1O_2). تسبب صور الأكسجين النشيطة، وخاصة OH، أضراراً لجميع الجزئيات الكبيرة في الخلية، مثل الدهون غير المشبعة (يحدث لها فوق أكسدة peroxidation) ويؤدي ذلك إلى أضرار للأغشية الخلوية وأغشية العضيات الخلوية والبروتينات والأحماض النووية، وخاصة DNA. يوجد عديد من العوامل البيئية المجهدة والتي تسبب تكون صور الأكسجين النشيطة وتسبب في تكون أضرار إجهاد أكسدة في النبات، ومن هذه العوامل البيئية: زيادة شدة الإضاءة، الجفاف، الحرارة المرتفعة، الحرارة المنخفضة، الغمر بالماء، العناصر الثقيلة، الأوزون، الأشعة فوق البنفسجية.

صور الأكسجين النشيطة

1- superoxide anion radical

إن O_2^- مع حمضه perhydroxyl radical acid (HO $^-$) لها خواص أكسدة واختزال. يؤكسد O_2^- عدة مركبات إحيائية، مثل المركبات الكبريتية، o-diphenol، وحمض الأسكوربيك ascorbic acid، و NADPH، ويختزل سايتوكروم c والأيونات المعدنية (Elstner, 1982).

2- فوق أكسيد الهيدروجين

- له صفات أكسدة واختزال. يتبع من عدة مسارات أضيوية وهي:

- مسار أكسدة الأحماض الدهنية، والمسمى β -oxidation.

- تفاعلات التنفس الضوئي photorespiration.

- من تفاعل جزيئين من O_2^- معاً، كما هو موضح في المعادلة التالية:



ويحفز هذا التفاعل الإنزيم superoxide dismutase وكذلك ينتج من نشاط الإنزيمات glycollate oxidase و curate oxidase وينتج كنتاج ثانوي في الميتوكوندريا، ويزداد إنتاجه في البلاستيدات الخضراء أثناء الإجهادات.

٣- OH radical

ينتج OH من تفاعل H_2O_2 مع O_2^- ، مع وجود أيون معدني، مثل Fe و Cu، ويسمى التفاعل بتفاعل هبرو - ويس Haber-Weise reaction.

٤- الأكسجين المنهيج في الحالة الفردية

يتكون من تفاعل جزيء الأكسجين مع الكلوروفيل المنهيج في الحالة الثلاثية triplet chlorophyll (ينشأ من تحول الكلوروفيل في الحالة الفردية singlet chlorophyll إلى الكلوروفيل في الحالة الثلاثية).

مقاومة إجهاد الأكسدة

تستخدم النباتات عدة طرق لمقاومة إجهاد الأكسدة oxidative stress resistance الذي تسببه صور الأكسجين النشيطة، وتسمى هذه الطرق مضادات الأكسدة antioxidant. ويحدد مستوى صور الأكسجين النشيطة نشاط مضادات الأكسدة، فإذا كان إنتاج صور الأكسجين النشيطة يفوق نشاط مضادات الأكسدة للتخلص منها، فعندها يحدث إجهاد الأكسدة في النسيج النباتي.

قد تكون الطرق المستخدمة لمقاومة إجهاد الأكسدة أنزيمية أو غير أنزيمية.

الطرق غير الأنزيمية هو استخدام المركبات التالية:

١- جلوتاثيون glutathione وهو مركب كبريتي، ثلاثي الببتيد tripeptide وتركيبه هو glycine-L-Y—glutanyl-L-cysteinyl، وتزداد كميته في النبات أثناء إجهاد الأكسدة.

٢- حمض الأسكوربيك ascorbic acid وهو فيتامين C، ويزداد محتوى النبات منه أثناء إجهاد الأكسدة.

٣- α-tocopherol (فيتامين E).

٤- هيدروكينون hydroquinone.

٥- المنتول mannitol.

٦- الفلافينويدات flavenoids.

٧- بعض القلويدات alkaloids.

٨- بيتا كروتين β-carotene.

من مضادات الأكسدة الإنزيمية

superoxide dismutase, monodehydroascorbate reductase, catalase glutathione, glutathione peroxidase, ascorbate peroxidase.

أجريت عدة أبحاث على أنزيم مهم هو الأنزيم glutathione peroxidase ويستخدم glutathione المختزلة كمادة تفاعل، وقد وجد أن نشاطه يزداد أثناء معاملة النبات بالبرودة (كما في التفاح) وعند تعرض النبات إلى ثاني أكسيد الكبريت (كما في الشعير)، وأثناء الجفاف (كما في الحزازيات). كما وجدت عدة دراسات معملياً أنه يمكن أن يتخلص النبات من O_2 بتفاعله مع أشباه الكاروتينات carotenoids.

الدرس العملي العشرون: تكون مضادات الأكسدة غير الإنزيمية

بالنباتات المعرضة لإجهاد الأكسدة

Synthesis of Non- Enzymatic Cellular Anti-oxidants

in Oxidative Stressed Plants

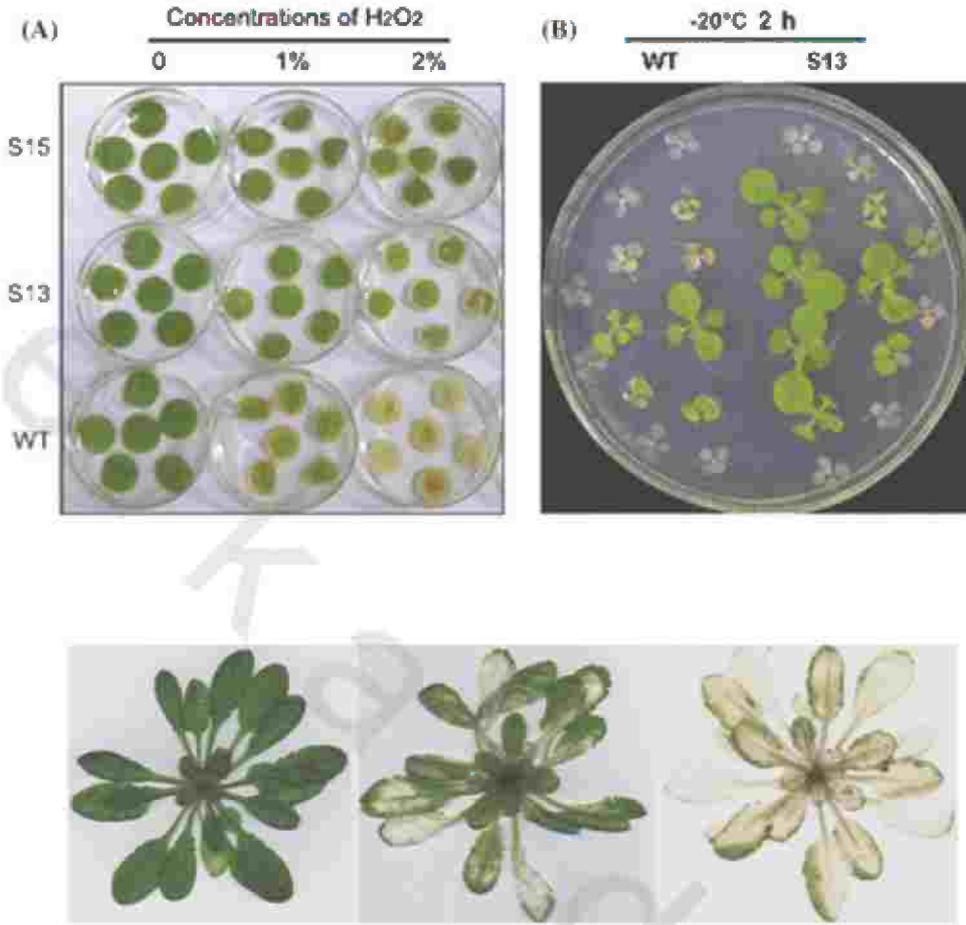
مقدمة

يحدث إجهاد الجفاف تغيرات لأغلب العمليات الفسيولوجية وعديد من الاستجابات الفسيولوجية في النبات من ضمنها حدوث أضرار أكسدة؛ بسبب تكون أنواع الأوكسجين النشط (ROS) مسبباً أضراراً للنبات. مثل أكسدة الدهون وتحلل البروتينات وتحطم الأحماض النووية ومن أجل منع حدوث مثل هذه الأضرار أو التخفيف منها لدي النبات أنظمة دفاع من مضادات الأكسدة تشمل العديد من المركبات الكيميائية والإنزيمات تقوم بدور أساسي في حماية النبات من هذه التأثيرات الضارة، إذ يؤدي تعرض النبات للإجهاد المائي إلى زيادة في نشاط إنزيمات مضادات الأكسدة والتي تعد كمنظفات كيميائية لأغلب أنواع الشقوق الحرة للأوكسجين النشط. كما تعمل كأنظمة لإزالة السموم وإخادها أو إعادة توليد مضادات الأكسدة بتخفيض الطاقة التي توفرها عملية البناء الضوئي.

أضرار الأكسدة الناتج عن الإجهاد البيئي

يسبب تعرض النباتات للإجهادات بالعوامل البيئية مثل الجفاف أو الحرارة المرتفعة أو التعرض لشدة الإضاءة أو نقص المغذيات إلى حدوث أضرار أكسدة تحدث في الأنسجة والخلايا النباتية تحدث هذه الأضرار عن زيادة إنتاج أنواع الأوكسجين النشط في الأنسجة والخلايا النباتية (Elstner, 1982) مثل الشقوق الحرة لمركب السوبر أوكسيد O_2^- وبيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) (شكل ١٠١) والشقوق الحرة للهيدروكسيل OH وتعمل أنواع الأوكسجين النشطة على تثبيط عمل الإنزيمات وحدوث دمار للمكونات الخلوية العامة وتظهر النباتات والكائنات الحية الأخرى مدى عريض من الآليات لكي تتعامل مع هذه المشكلة وأنظمة مضادات الأكسدة للنبات تضم مضادات أكسدة جزئية وأنزيمية. يوجد في النباتات نظام دفاع من مضادات الأكسدة يشمل العديد من المركبات الكيميائية والإنزيمات. من المركبات غير الإنزيمية مركب الأسكوربيت ascorbate وجلوتاثيون glutathione و flavonoids, carotenoids, و tocopherol ومن الإنزيمات (SOD) superoxide dismutase، (CAT) catalase، (POX) peroxidase، (APX)، (GR) glutathione reductase، (PPO) polyphenol oxidase.

ويلعب تعاون هذه الإنزيمات والعمل مع بعضها بعض دور أساسي لدفع هذا النظام للعمل على حماية النبات من التأثيرات الضارة الناتجة عن إجهاد الأكسدة. وفي الآونة الأخيرة تطرقت بعض الدراسات إلى دراسة تأثير بعض التطبيقات التي يتم إجراؤها على النباتات لتعزيز نظام مضادات الأكسدة في النبات بزيادة مقدرة هذا النظام للقيام بحماية النبات من أضرار الأكسدة وزيادة نشاط إنزيمات مضادات الأكسدة في نباتات مختلفة وفي هذه الدراسة العملية سيتم التطرق إلى أهم التأثيرات التي يحدثها الجفاف على مستوى التأكسد الجزيئي وتأثيره على مضادات الأكسدة واستعراض بعض التجارب الحديثة التي تناولت بعض التطبيقات للتخفيف من التأثير الضار للإجهاد المائي على النباتات بزيادة وتعزيز نظام دفاع مضادات الأكسدة.



شكل (١٠١). تجربة دراسة أضرار إجهاد الأكسدة (تراكيز بيروكسيد الهيدروجين) على الأنسجة والخلايا النباتية.

التجربة: تقدير محتوى الجلوتاثيون Glutathione content في النسيج النباتي

تم تحديد الجلوتاثيون المختزل (GSH) والجلوتاثيون المؤكسد (GSSG) والجلوتاثيون الكلي (GSSG+GSH) وذلك بواسطة طريقة تدوير الجلوتاثيون (Anderson 1985).

أولاً: المواد والمحاليل اللازمة

تحضير المحاليل:

- ٥ ٪ (وزن/ حجم) حمض السلفوساليساليك (Sulphosalicylic acid):
يتم ذلك بإذابة خمس جرامات من حمض السلفوساليساليك في ماء مقطر مرتين ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل.
- محلول منظم للاستخلاص
يتم تحضير محلول ١ ، ٠ مول من فوسفات البوتاسيوم أحادي القاعدة بإذابة ١ ، ٣٦ جم من (K₂HPO₄) في ماء مقطر مرتين ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل، و محلول ١ ، ٠ مول من فوسفات البوتاسيوم ثنائي القاعدة بإذابة ١ ، ٧٤

جم من (K_2HPO_4) في ماء مقطر مرتين ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل. يتم خلط المحتويين ثم يضبط الرقم الهيدروجيني عن ٧,٠ بواسطة جهاز قياس الرقم الهيدروجيني (pH Meter). يضاف ٠,١ جم من (Polyvinylpyrrolidone) PVP. محلول منظم للتفاعل:

كما في المحلول المنظم للاستخلاص أعلاه ولكن يحذف منه الـ PVP (Polyvinylpyrrolidone) ويضاف إليه ٢,٣٧ جم من (Ethylenediaminetetraacetic acid) EDTA.

• ٠,٥ مول ثنائي كربونات الصوديوم $(NaHCO_3)$:

يتم ذلك بإذابة ١,٠٥ جرام من ثنائي كربونات الصوديوم في ٢٥ مل من ماء مقطر مرتين.

• ٠,٤ % (وزن/حجم) NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate):

يتم ذلك بإذابة ٢٠ مليجرام في ٥ مل من ثنائي كربونات الصوديوم $(NaHCO_3)$.

• ٠,١٥ % (وزن/حجم) محلول DTNB:

يتم ذلك بإذابة ٦ مليجرام في ٤ مل من ثنائي كربونات الصوديوم $(NaHCO_3)$.

ثانياً: طريقة العمل

• اطحن ٠,٥ جم من الأوراق النباتية الطازجة حتى تتجانس في ٢ مل من محلول ٥% (وزن/حجم) حمض السلفوساليساليك (Sulphosalicylic acid) تحت التبريد.

• عمل طرد مركزي للخليط المتجانس عند ١٠,٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة عشر دقائق.

• يؤخذ ٠,٥ مل من الراشح الصافي في أنبوبة طرد مركزي صغيرة ويضاف لها ٠,٦ مل من محلول منظم

التفاعل و ٤٠ ميكروليتر من DTNB.

• يُقرأ طيف الامتصاص (Absorbance) لتحديد الـ GSH (الجلوتاثيون المختزل) عند طول الموجة ٤١٢

نانوميتر بعد دقيقتين.

• يضاف إلى نفس الأنبوب ٥٠ ميكروليتر من NADPH، واحد (٠,١) ميكروليتر من الـ GR (Glucocor-

ticoid receptor) وذلك لتحديد الجلوتاثيون الكلي.

• وبخضم الجلوتاثيون المختزل من الجلوتاثيون الكلي يتم تحديد الجلوتاثيون المؤكسد (GSSG).

• يترك التفاعل جارياً لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ٢٥ درجة مئوية.

• يتم تسجيل التغير في طيف الامتصاص عند ٤١٢ نانوميتر.

• يتم تصحيح قيم طيف الامتصاص لراشح العينة النقي ومحلول DTNB.

• يتم تحضير منحني قياسي لحساب الجلوتاثيون المختزل GSH يغطي المدى من ١٠ - ١٠٠ نانومول.

• كميات الجلوتاثيون المختزل (GSH) والجلوتاثيون المؤكسد (GSSG) والجلوتاثيون الكلي (GSSG+ GSH)

يتم التعبير عنها على النحو التالي: نانومول/جم وزن الطازج $(nmolg^{-1} fw)$.

النتائج والمناقشة

- ١- في جدول (٢٤) اذكر قيم الجلوتاثيون المختزل والمؤكسد والكلبي مقدراً بالنانو مول / جم.
- ٢- ناقش معدل تكون نسب الجلوتاثيون ومدى علاقة ذلك كمضادات للأكسدة في النباتات المعرضة للإجهاد.
- ٣- هل هناك فرق في نشاط إنزيم glutathione oxidase في الأوراق النباتية المعاملة بالبرودة كوسيلة لتعرض النبات لإجهاد الأكسدة والأوراق الأخرى غير المعرضة (ناقش ذلك).
- ٤- اكتب تقريراً مفصلاً عن الفكرة القائمة عليها التجربة والنتائج المتحصل عليها ومناقشة تلك النتائج في ظل استخدام الجلوتاثيون كطريقة غير إنزيمية لمقاومة إجهاد الأكسدة.

جدول (٢٤). قيم الجلوتاثيون المختزل والمؤكسد والكلبي.

القيمة مقدرة بالنانو مول / جرام	الجلوتاثيون
	المختزل
	المؤكسد
	الكلبي

