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 (O_2^-) superoxide anion radical، فوق أكسيد الهيدروجين (H_2O_2) hydrogen peroxide، hydroxyl radical (OH) والأكسجين المتهيج في الحالة الفردية ($^1O_2$) singlet oxygen. تسبب صور الأكسجين النشيطة، وخاصة OH، أضراراً لجميع الجزيئات 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 وتتسبب 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 النشطة

١ – superoxide anion radical

إن O_2^- مع حمضه (HO$_2$) perhydroxyl radical acid لهما 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).

٢ – فوق أكسيد الهيدروجين

– له صفات أكسدة واختزال. ينتج من عدة مسارات أيضية 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:

$$2\,O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

ويحفز هذا التفاعل الإنزيم superoxide dismutase وكذلك ينتج من نشاط الإنزيمات glycollate oxidase و urate oxidase، وينتج كناتج ثانوي في الميتوكندريا، 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 المتهيج في الحالة الفردية

يتكون من تفاعل جزيء الأكسجين مع الكلوروفيل المتهيج 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- جلوتثيون glutathione وهو مركب كبريتي، ثلاثي الببتيد tripeptide وتركيبه هو glycine-L-Y—gltamyl-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- ά - tocopherol (فيتامين E).

٤- هيدروكينون hydroquinone.

٥- المنتول mannitol.

٦- الفليفينودات 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 معملية 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

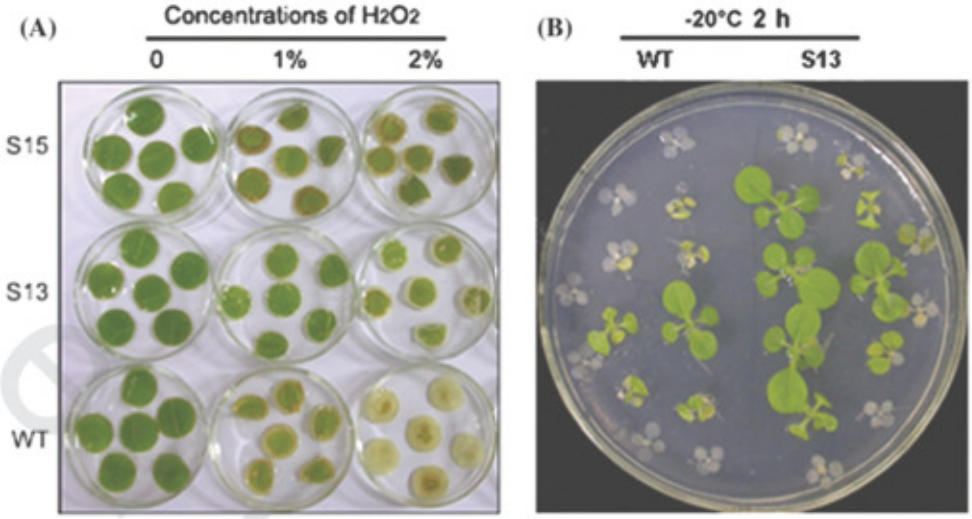
يحدث إجهاد الجفاف تغيرات لأغلب العمليات الفسيولوجية وعديد من الاستجابات الفسيولوجية في النبات من ضمنها حدوث أضرار أكسدة؛ بسبب تكون أنواع الأكسجين النشط (ROS) مسبباً أضرار للنبات. مثل أكسدة الدهون وتحلل البروتينات وتحطم الأحماض النووية ومن أجل منع حدوث مثل هذه الأضرار أو التخفيف منها لدي النبات أنظمة 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 للأكسيجين النشط. كما تعمل كأنظمة لإزالة السموم وإخمادها أو إعادة توليد مضادات الأكسدة بتخفيض الطاقة التي توفرها عملية البناء الضوئي.

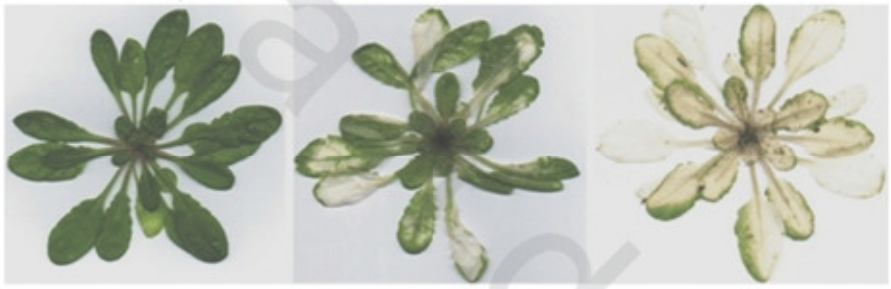
أضرار الأكسدة الناتج عن الإجهاد البيئي

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 الأكسجين 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 الأكسجين 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 جزيئية وأنزيمية. يوجد في النباتات نظام دفاع من مضادات الأكسدة يشمل العديد من المركبات الكيميائية والإنزيمات. من المركبات غير الإنزيمية مركب الأسكوربيت ascorbate وجلوتاثيون gluta thione و flavonoids, carotenoids, tocopherol ومن الإنزيمات superoxide dismutase (SOD)، catalase (CAT)، peroxidase (POX)، ascorbate peroxidase (APX)، glutathione reductase (GR)، polyphenol oxidase (PPO).

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 المعملية 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.

openkandil.com





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

التجربة: تقدير محتوى الجلوتاثيوني 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 السلفوساليسالليك (Sulphosalicylic acid):

يتم ذلك بإذابة خمس جرامات من حمض السلفوساليسالليك في ماء مقطر مرتين ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مل.

- محلول منظم للاستخلاص

يتم تحضير محلول ١ , ٠ مول من فوسفات البوتاسيوم آحادي القاعدة بإذابة ١ , ٣٦ جم من (KH_2PO_4) 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 ١,٠ جم من PVP (Polyvinylpyrrolidone).

- محلول منظم للتفاعل:

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

- ٥,٠ 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 (NaHCO3).

- 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 السلفوساليسالك (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 (١,٠) ميكروليتر من الـ GR (Glucocorticoid receptor) وذلك لتحديد الجلوتاثيون الكلي.
- وبخصم الجلوتاثيوون 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 منحنى 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).

openkanal.com

النتائج والمناقشة

١- في جدول (٢٤) اذكر قيم الجلوتاثيون المختزل والمؤكسد والكلي 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 والكلي.

الجلوتاثيون	القمية مقدرة بالنانومول / جرام
المختزل	
المؤكسد	
الكلي	

obeikandl.com

مقرر الفسيولوجيا البيئية للنباتات العملية

تقرير التجربة رقم ( )

اسم الطالب/ .....

الرقم الجامعي/ .....

عنوان التجربة: .....

تاريخ بدء التجربة: .....

تاريخ انتهاء التجربة: .....

تاريخ تقديم التقرير: .....

١- المقدمة والهدف من التجربة:

.....

.....

.....

.....

.....

٢- المواد وطريقة العمل:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

obeikandl.com

٣- النتائج:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

٤- المنحنيات البيانية والتصوير (أو الرسم):

obeikandl.com

٥- الخلاصة ومناقشة النتائج:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

٦- المراجع:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

obeikandi.com

obeikandl.com