Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

Contemporary International Scientific Forum
for Educational, Social, Human, Administrative and Natural Sciences
"Present Vs Future Outlook"

الملتقى العلمي الدولي المعاصر
للعلوم التربوية والاجتماعية والانسانية والادارية والطبيعية
"نظرة بين الحاضر والمستقبل

30 - 31 ديسمبر –2019 - اسطنبول – تركيا

http://kmshare.net/isc2019

Electrical shock enhanced nucleic acids, proteins and specific activity of thymine nucleotide biosynthesis enzymes in stem callus of *Sesamum indicum* L.

Nihal E. Al-Taee **Sajida A. Abood*** **Mozahim K. Al. Mallah**
* *Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul/Iraq*
E-mail: azizsajida@yahoo.com

Abstract

The present study revealed that exposure of stem derived callus of *Sesamum indicum* L. that grown on initiation medium Murashige and Skoog (MS) supplemented with BA and NAA at 2 mg/l and 1mg/l respectively to electrical shocks at 200,250 and 300 volts of periods 25 and 50 msec. treatment enhanced a desirable changes of callus growth and development. The treatment 200v/msec exposure had sustainable effect through enhancement the specific activity of TS,DHFR and SHMT enzymes which recorded 2.110, 0.861 and 0.196µmol/min/mg protein compared with 1.670, 0.441 and 0.139µmol/min/mg protein in control. The amounts of DNA and RNA were increased from 67µg/g and 650µg/g callus fresh weight respectively compared with 57 µg/g and 538 µg/g in control. On the other hand, the protein content and the fresh weight of callus were increased from 1.43 mg/g to 2.11mg/g and 3.921g to 9.055 g respectively. The result also predicted that electrical shock enhanced folate content 4.51 µg/ml to 7.97 µg/ml. Whereas, the other electrical shock treatments decreased the specific activities of the above enzymes compared to 200volt/msec.

Key words: *Sesamum indicum* L. callus, Electrical shock, Thymine nucleotide enzymes

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

الصدمة الكهربائية تحفز محتوى الاحماض النووية والبروتينات والفعالية النوعية لانزيمات نيوكليوتيد الثايمين في كالس سيقان السمسم *Sesamum indicum* L.

نهال عزت الطائي ساجدة عزيز عبود* مزاحم قاسم الملاح
*قسم علوم الحياة/كلية العلوم/ جامعة الموصل/ العراق

الملخص

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان تعريض الكالس المستحدث من سيقان السمسم *Sesamum indicum* L. النامي في الوسط المغذي MS المجهز بمنظمات النمو BA وNAA بتركيز 2 ملغم/ لتر و1 ملغم/ لتر على التوالي للصدمة الكهربائية بفولتية 200، 250 و300 فولت وبمدد زمنية قدرها 25 و50 ملي ثانية/ معاملة حصول تغيرات مرغوبة في نمو وتطور الكالس. تفوقت المعاملة 200 فولت/25 ملي ثانية في تأثيرها، اذ سجلت زيادة واضحة في الفعالية النوعية لانزيمات الثايمدليت سنثيز TS والداي هيدروفوليت ردكتيز DHFR والسيرين هيدروكسي مثيل ترانسفريز SHMT في مستخلصات كالس سيقان السمسم مسجلة 2.110 و0.861 و0.196 مايكرومول/دقيقة/ملغم بروتين على التوالي قياسا بفعاليتها 1.670، 0.441 و0.139 مايكرومول/ دقيقة / ملغم بروتين في عينات المقارنة، وقد رافقها زيادة في كمية الاحماض النووية DNA وRNA وبلغت 67 و650 مايكروغرام/ غرام على التوالي قياسا بنظيراتها البالغة 57 و538 مايكروغرام / غرام من عينات المقارنة. ومن ناحية اخرى ازداد المحتوى البروتيني والوزن الطري للكالس من 1.43 ملغم /غم الى 2.11 ملغم/ غرام و3.921 غرام الى 9.055 غرام على التوالي. اظهرت النتائج ايضا ان الصدمة الكهربائية سببت زيادة الفوليت من 4.51 مايكروغرام /سم^3 الى 7.97 مايكروغرام /سم^3. وادت معاملات التعريض الاخرى للصدمة الكهربائية الى خفض الفعالية النوعية للانزيمات المشار اليها وكمية الاحماض النووية والبروتين وحامض الفولك وكذلك الوزن الطري للكالس مقارنة بمعاملة 200 فولت/25 ملي ثانية.

الكلمات الدالة: كالس السمسم، الصدمة الكهربائية، انزيمات نيوكليوتيد الثايمين.

البحث مستل من اطروحة الباحث الاول.

المقدمة

يؤدي تعريض الخلايا للصدمة الكهربائية المتضمنة فولتيات معينة لمدد مختلفة بالمايكرو ثانية في إحداث فتحات مجهرية مؤقتة في الأغشية البلازمية كافية لإدخال الجزيئات المرغوبة، ويعد تعريض الأنسجة النباتية لصدمة كهربائية تقنية فعالة تتفوق عن مثيلاتها من المعاملات الفيزياوية الأخرى كونها طريقة غير حرارية تمتاز بكفاءتها العالية (Vorobiev and Lebovka, 2008). وتستعمل على نحو واسع لزيادة انبات البذور ونمو الشتلات وزيادة الحاصل (Al-Taweel *et al.*, 2018; Gätjens-Boniche *et al.*, 2017)، فضلا عن تطبيقاتها مع الخلايا الحيوانية والفطريات والبكتريا (Joersbo and Brunstedt, 1991). وظفت المعاملة الكهربائية في مجال زراعة الانسجة النباتية بسبب تأثيراتها الناجحة, متمثلا في تأثيرها في نمو كالس نباتات التبغ (Al-Mallah, 1994) والحلبة (احمد, 2000) والبابونج (Salih, 2001) وزيادة أعداد النباتات الناتجة من عنيب الذيب ومحتواها من البروتين والكلوروفيل (Al-Mallah and Salih, 2003). وأدى تعريض الأجنة الجسمية المشتقة من كالس نبات القهوة

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

الى زيادة اعداد الأجنة الجسمية والحصول على اعداد كبيرة من النباتات (Silva and Yuffa, 2003). بينما لوحظ في دراسة أخرى (Eing *et al.*, 2009) موت مزرعة المعلقات الخلوية لنباتات *Arabidopsis thaliana* عند تعريضها للمعاملة 5kv/cm لمدة 100 ملي ثانية, ونموها عند تعريضها للمعاملة ذاتها مدة 10 ملي ثانية. وعموما يلاحظ في غالبية الدراسات السابقة استعمال الفولتيات الواطئة التي تشجع نفاذية الأغشية الخلوية, وأثبتت إحدى الدراسات الحديثة بوساطة الفحوصات المجهرية لأنسجة البصل تحت ظروف المعاملة الكهربائية عن وجود علاقة بين تردد الفولتية المستخدمة وسرعة جريان السايتوبلازم مفسرة العلاقة بين نفاذية الأغشية الخلوية المعاملة وتأثيرها في جريان السايتوبلازم (Asavasanti *et al.*, 2012).

تكّمن تأثيرات الصدمة الكهربائية في إحداث فتحات في أغشية الخلايا الحية يطلق عليها احيانا النفاذية الكهربائية Electro-permeabilization ولها تطبيقات بيولوجية متعددة (Gupta and Ibaraki, 2008). وعلى الرغم من كثرة الدراسات حول تأثيرات هذه الصدمة في الأنظمة النباتية فقد لوحظ قلة أو ندرة دراسة تأثيراتها في فعالية الإنزيمات في مزارع الكالس. وتناولت معظم الدراسات المتوفرة تأثيراتها في الأحماض الأمينية المشتقة من الخلايا الحيوانية أو النباتية وقياس فعالية إنزيمات مضادات الأكسدة. فعلى سبيل المثال لوحظت تأثيرات الصدمة الكهربائية في فعالية إنزيم Pectin methyl esterase عند تعريض مستخلص ثمار البرتقال مسببا القضاء على كافة الأحياء المجهرية والخمائر الموجودة فيه (Yeom *et al.*, 2000) وزيادة فعالية إنزيمات التحلل المائي للبروتينات (Asavasanti *et al.*, 2012). وغياب الدراسات التي تتناول تأثيراتها في انزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين. بالنسبة لتأثيرات الصدمة الكهربائية في الأحماض النووية فقد حفّزت تضاعف DNA في بروتوبلاست ميزوفيل اوراق عنيب الذيب والعرموط عند تعريضه لفولتية 250 ملي فولت لمدة 87 مايكروثانية و750 ملي فولت لمدة 29 مايكرو ثانية على التوالي (Rech *et al.*, 1988).

هدفت الدراسة الحالية الى التحري في انسجة كالس السمسم عن وجود مسار de novo لبناء نيوكليوتيد الثايمين احد نيوكليوتيدات بناء DNA بدلالة قياس فعالية انزيمات اضافة دورة المثيل لبناء dTMP وتحديد تأثيرات الصدمة الكهربائية في نشاط هذه الانزيمات وكميات الاحماض النووية والبروتينات والفوليت.

المواد وطرائق العمل

التعقيم السطحي للبذور والحصول على البادرات المعقمة

جُهزت بذور السمسم *Sesamum indicum* L. المعتمدة زراعتها في حقول محافظة نينوى من الأسواق المحلية وكانت نسبة إنباتها 100%.

عقمت مجموعة من البذور (500 بذرة) بغمرها في 50 ملليتر من الكحول الأثيلي 96% مع التحريك لمدة دقيقتين ثم نقلت إلى 100 ملليتر من محلول القاصر التجاري NaOCl المخفف بنسبة2:1 (قاصر: ماء معقم) لمدة 4-5 دقائق. بعدئذ غسلت جيداً بالماء المعقم أربع مرات متتالية (3 دقيقة/ مرة) لإزالة آثار محلول التعقيم وخلّصت البذور المعقمة من الماء العالق بها بوضعها على أوراق ترشيح معقمة. زُرعت البذور المعقمة سطحيا على سطح 30 ملليتر من وسط Arnon (Arnon and Hogland, 1944) في قنانٍ زجاجية حجم 100 ملليتر وبمعدل خمس بذور/ قنينة. حفظت العينات في غرفة الزرع في ظروف الظلام التام/23±2°م لمدة ثلاثة أيام وحين إنباتها وظهور الجذير وبداية الرويشة نقلت إلى ظروف إضاءة 16 ساعة وظلام 8 ساعات وشدة إضاءة 2000 لوكس لمواصلة نموها وإنتاج البادرات المعقمة وعلى نفس الدرجة اعلاه.

استحثاث مزارع كالس السيقان تحت الفلقية وإدامته

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

جُهزتْ قطع السيقان تحت الفلقية بطول 1-1.5 سم تقريباً من بادرات السمسم المعقمة بعمر أسبوعين وزرعت بمعدل 3 قطع/ قنينة على سطح 30 ملليتر من أملاح الوسط MS الصلب المضاف إليهBA و NAA بتركيز 2 ملغم/لتر و1 ملغم/لتر على التوالي. حُفظتْ العينات في غرفة الزرع تحت ظروف إضاءة 16 ساعة وظلام 8 ساعات وشدة إضاءة 2000 لوكس وفي23±2°م.

تعريض كالس السيقان تحت الفلقية للصدمة الكهربائية

استخدمت عينات كالس السيقان تحت الفلقية النامية في الوسط MS + 1.0 ملغم/ لتر NAA+ 2.0 ملغم/ لتر BA بعمر 30 يوما وبوزن غرام في تجربة تعريضها للصدمة الكهربائية لمعرفة تأثيرها في بعض المكونات الخلوية المهمة. وضعتْ كل ثلاث عينات كالس في أنٍ واحد في خلية جهاز التحفيز الكهربائي (الملاح، 2002) وانتخبتْ الفولتيات 200، 250 و300 فولت وبمدد زمنية قدرها 25، 50 ملي ثانية/ معاملة. وبعد ضبط الجهاز عند المعاملة المنتخبة (الفولتية المطلوبة والمدة الزمنية) تم إمرار الصعقة (Al- Mallah and Salih, 2003). زُرعتْ العينات المعاملة في وسط الاستحداث MS + 1.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغم/ لتر BA. وحفظتْ في ظروف غرفة الزرع المشار إليها سابقا.

تقدير الأوزان الرطبة للكالس

قدّرت الأوزان الرطبة للكالس من تحديد الفرق في وزن الكالس (غرام واحد) عند معاملته ووزنه بعد 30 يوماً من نموه بعد المعاملة.

أستخلاص انزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين من الكالس المعامل فيزياوياً

استعملَ كالس السيقان تحت الفلقية بعمر ثلاثين يوماً من بعد تعريضه للصدمة الكهربائية بوزن غرام واحد/عينة من مزرعته على وسط الاستحداث وسحقت كل عينة بصورة مستقلة في هاون خزفي مبرد في درجة صفر مئوية وأضيف إليه 30 ملليتراً من محلول بوتاسيوم-فوسفيت المنظم (50 ملي مولار) K_2HPo_4 وبدالة حامضية 7 مضافا إليها 0.56% من N-acetyl cysteine, أكمل سحق خلايا الكالس بتسليط 20000 ذبذبة/ ثانية ولمدة نصف دقيقة بواسطة جهاز الترددات فوق الصوتية. فصل الرائق عن الراسب بطردها مركزيا 9000 دورة/ دقيقة / لمدة ساعة في ظروف تبريد وحُفِظ الرائق في ظروف -60 درجة مئوية في المجمدة لاستخدامه في اختبارات تقدير الفعالية النوعية لإنزيمات بناء dTMP.

تقدير الفعالية النوعية للإنزيمات المشاركة في بناء dTMP

شملتْ تقدير الفعالية النوعية للإنزيمات الآتية:

إنزيم الثايميدليت سنثيز Thymidylate synthase (EC 2.1.1.45)

قيستْ فعالية هذا الإنزيم من الزيادة في قيم الامتصاص الضوئي للمحلول عند الطول الموجي 340 نانوميتر بوجود الديوكسي يوريدين أحادي الفوسفيت (dUMP) كمادة أساس والتتراهيدروفوليت THF (Friedkin,1963) كعامل مساعد بواسطة المطياف الضوئي عند 30 درجة مئوية /10 دقائق. ويتكون محلول التفاعل حجمه النهائي 3 ملليتر من 50 ملي مولار من محلول بوتاسيوم فوسفيت (pH 7), 1.5 ملي مولارTHF(مذابة في واحد مولار من ميركابتوايثانول pH 7), 40 ملي مولار فورمالديهايد, 50 ملي مولار كلوريد المغنيسيوم, واحد ملي مولار dUMP وكمية محددة من مستخلص الانزيم. وحددت وحدة فعاليته على أنها كمية الإنزيم اللازمة لإنتاج مايكرومول واحد من مادة DHF خلال دقيقة واحدة من التفاعل باستخدام معامل الامتصاص الضوئي لـ DHF والمساوي إلى 5.8×10^3 $M^{-1}cm^{-1}$ (Mathews *et al.*,1963).

إنزيم الداي هيدروفوليت ردكتيز Dihydrofolate reductase (EC1.5.1.3)

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

قيستْ فعالية هذا الإنزيم من معرفة الانخفاض الحاصل في قيم الامتصاص الضوئي لمحلول التفاعل عند الطول الموجي340 نانوميتر بوجود مركبDHF كمادة أساس ومركبNADPH كمانح للهيدروجين (Osborne and Huennekens, 1958). ويتكون محلول التفاعل حجمه النهائي 3 ملليتر من 50 ملي مولار من المحلول المنظم بوتاسيوم فوسفيت (pH 6.8), 10 ملي مولار كبريتات المغنيسيوم, 10 ملي مولار من ميركابتوايثانول, 0.1 ملي مولارEDTA , 0.1 ملي مولار DHF, 0.4 ملي مولار NADPH وكمية محددة من مستخلص الانزيم. وحددت الفعالية بالمطياف الضوئي عند 30 درجة مئوية/ 10 دقائق. وتمثل وحدة الفعالية النوعية للإنزيم كميته اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من NADPH خلال دقيقة واحدة من التفاعل باستخدام معامل الامتصاص الضوئي للمركبNADPH الذي يعادل $6.2 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$ (Mathews *et al.*,1963).

إنزيم السيرين هيدروكسي ميثايل ترانسفريز Serinehydroxymethyl transfrase (EC 2.1.2.1)

حُددتْ فعالية هذا الإنزيم من معرفة الانخفاض في قيم الامتصاص الضوئي للمحلول عند الطول الموجي 298 نانوميتر بوجود السيرين مادة أساس ومادة THF عاملاً مساعداً (Uyeda and Rabinowitz, 1968). ويتكون محلول التفاعل وبحجم نهائي 3 مليلتر من 50 ملي مولار من المحلول المنظم بوتاسيوم فوسفيت (pH 7), 5.7 ملي مولار سيرين, 48 ملي مولار من ميركابتوايثانول, 0.04 ملي مولار من THFوكمية محددة من مستخلص الانزيم. وقيست فعاليته بالمطياف الضوئي عند 30 درجة مئوية/ 10 دقائق باعتبار إن الفعالية النوعية للإنزيم تمثل كمية الإنزيم اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من THF إلى 5, 10- methylene THF خلال دقيقة واحدة من التفاعل. باستخدام معامل الامتصاص الضوئي لمادة THF الذي يعادل $28 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$ (Huennekens *et al.*, 1963).

تقدير المحتوى البروتيني

قدرت كمية البروتين الكلي في عينات الكالس بعد 30 يوما من تعريضه للصدمة الكهربائية حسب طريقة Lowry (1951) وبالإعتماد على المنحني القياسي المحضر من مصل البقر BSA.

تقدير الأحماض النووية الكلية

قدرت كمية الاحماض النووية حسب طريقة (Cherry,1962) من الكالس المعامل بالصدمة الكهربائية بايقاف فعالية انزيم Nuclease وترسيب الاحماض النووية DNA وRNA وبالاعتماد على المنحنى القياسي المحضر من خلايا الخميرة النقية .أتبعتْ الطريقة القياسية (Giles and Mayer, 1967) في تحديد كمية DNA باستخدام كاشف الأمين ثنائي الفينول Diphenyl amine reagent. وقدرتْ كمية الحامض النووي DNA من إيجاد الفرق بين شدة الكثافة الضوئية للمحلول عند الطول الموجي 700 نانوميتر والطول الموجي 595 نانوميتر بوساطة المطياف الضوئي ومقارنتها مع منحناه القياسي الناتج من استعمال تراكيز متدرجة تراوحت بين1-10 مايكروغرام/ مل DNA الغدة الدرقية للعجل Calf thymus. اما كمية RNA حددت من الفرق بين كمية الاحماض النووية الكلية وكمية الحامض النووي DNA.

استخلاص الفوليت الكلي وتقدير كميته في مستخلص البادرات والكالس

استخلصَ الفوليت من أنسجة السمسم بإضافة 10 ملليتر من المحلول المنظم فوسفيت اسكوربيك (0.1 مولار فوسفيت مع 0.01 % من حامض الاسكوربيك عند7 pH) إلى غرام واحد لكل من كالس السيقان تحت الفلقية، الكالس المعامل بالصدمة الكهربائية 200 فولت/ 25 ملي ثانية، فضلاً عن السيقان تحت الفلقية للبادرات المعقمة. وضع المستخلص في حمام مائي بدرجة 100مئوية ولمدة 10 دقائق لتثبيط فعالية انزيمات

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

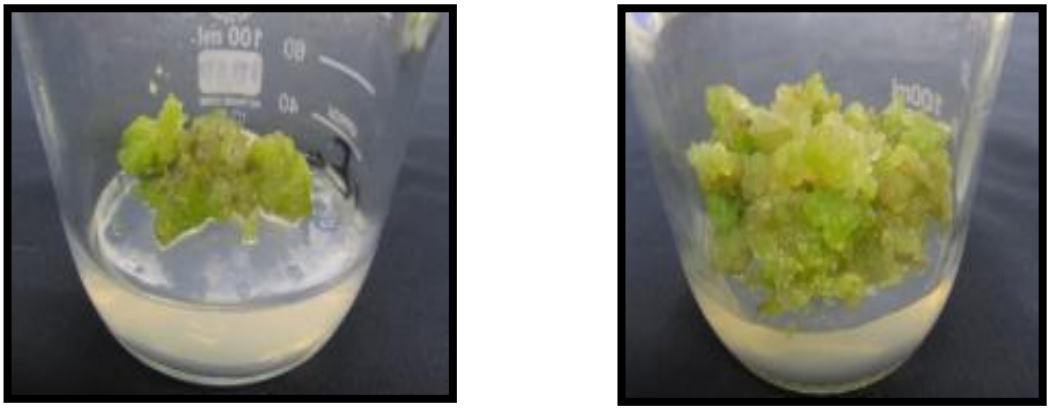
الكونجوكيز Gongoconase. عزل الرائق عن الراسب بعملية الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق واخذ الرائق وضبط pH عند 4.5 (Batra *et al.*, 1977).

وقُدِرتْ كمية الفوليت (Gao *et al.*, 2010) من قياس كمية حامض الفوليك الكلية بواسطة HPLC باستخدام عمود الفصل أبعاده 140×4.6 مليميتر وبدرجة حرارة المختبر 22 مئوية ومقدار الضغط 14 بار. واستخدم الميثانول النقي الخاص بجهاز HPLC والماء المقطر بنسبة 40: 60% مع اضافة 0.3 من حامض الخليك الثلجي كمذيب في الطور المتحرك بعد ترشيحه وطرد الغازات منه باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية وبمعدل جريان 1.0 مل/دقيقة وعند الطول الموجي 254 نانوميتر. حقن حجم 20 مايكروليتر من العينة المهيأة مسبقاً. تم المقارنة بين زمن الاحتباس Retention time لمركب الفوليت القياسي مع زمن الاحتباس للفوليت المستخلص من السيقان تحت الفلقية لبادرات السمسم المعقمة والكالس المستحدث منه والمعامل بالصدمة الكهربائية 200 فولت/ 25 ملي ثانية. وسجل زمن الاحتباس في جميع العينات وكذلك المساحة تحت المنحني.

النتائج

تأثيرات الصدمة الكهربائية في كتلة الكالس ووزنه الرطب ومحتواه البروتيني

بصورة عامة أظهرت الملاحظات تحمل الكالس للصدمة الكهربائية وانعكاس تأثيراتها الايجابية في زيادة كتلة الكالس مقارنة بالكالس غير المعامل (الشكل1،A) وبصورة متباينة مع شدة الصدمة, وبقاء الكالس محتفظا بنمط نموه ولونه بعد التعريض (الشكل1،B).

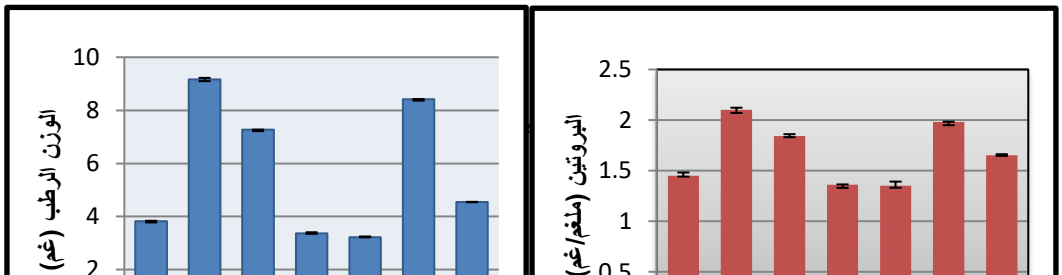


A– مزرعة كالس المقارنة **B– كالس الصدمة 200 فولت/25 ملي ثانية**

الشكل (1): كالس السيقان تحت الفلقية للسمسم *Sesamum indicum* L. بعد ثلاثين يوما من تعريضه للصدمة الكهربائية ونمو في وسط الاستحداث (MS +2.0ملغم/ لتر BA+1.0ملغم /لتر NAA)

وتدعم البيانات المرسومة (الشكل2) زيادة كتلة الكالس بدلالة الزيادة الحاصلة في معدل اوزانه الرطبة عند تعريضه لبعض من معاملات هذه الصدمة قياساً بمعدلات اوزانه في عينات المقارنة. كما لوحظ سلبية المعاملة 300 فولت/50 ملي ثانية في تغيير لون الكالس الى البني على الرغم من الزيادة الطفيفة في وزنه الرطب ومحتواه من البروتينات.

وعموما فقد اوضحت النتائج ان انماط الزيادة في كمية البروتين في هذا الكالس (الشكل2, B) اتخذت أنماطاً مشابهة لأنماط الزيادة في اوزانه الرطبة (الشكل A,2).



Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

الشكل (2): انعكاسات تأثير الصدمة الكهربائية في الاوزان الرطبة(A) وكمية البروتينات (B) في كالس السيقان تحت الفلقية للسمسم *Sesamum indicum* L. النامي في وسط الاستحداث (MS +2.0ملغم/لتر+BA1.0ملغم/لترNAA) بعد ثلاثين يوماً من التعريض. كل قيمة تمثل معدل خمس مكررات للوزن الرطب وثلاث مكررات لكمية البروتين.

تأثيرات الصدمة الكهربائية في الفعالية النوعية لإنزيمات TS وDHFR وSHMT وكمية الاحماض النووية DNA و RNA

برهنت نتائج اخضاع كالس السيقان تحت الفلقية للسمسم لصدمة فولتيات ثلاث شملت 300، 250، 200 فولت ولمدد 25، 50 ملي ثانية عن تحفيزها للفعالية النوعية لإنزيمات بناء نيوكليوتيد dTMP في هذا الكالس بدلالة سلوك نموه على وسط الادامة (MS+ 2.0 ملغم /لتر BA+ 1.0 ملغم/ لتر NAA). ولوحظ تباين مستوى التحفيز مع تباين الفولتية ومدة التعريض. وبصورة عامة أظهرت الفولتية 200 بمدة تعريض 25 ملي ثانية افضل مستويات تحفيزها لفعالية الانزيمات متبوعة بالفولتية 300 فولت/ 25 ملي ثانية (الجدول 1).

الجدول (1): تأثيرات الصدمة الكهربائية في الفعالية النوعية لإنزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين وكميات DNA وRNA في كالس السيقان تحت الفلقية للسمسم *Sesamum indicum* L. بعد30 يوما من تعريضه.

المعاملة فولت/ ملي ثانية	الفعالية النوعية للإنزيمات (مايكرومول/دقيقة/ ملغم بروتين) الخطأ القياسي ∓ (			كمية الأحماض النووية (مايكروغرام غم$^{-1}$)	
	TS*	DHFR**	SHMT***	DNA	RNA
المقارنة	0.309 ∓ 1.67	0.010 ∓ 0.441	0.002 ∓ 0.139	57 b	538 b
25/200	0.093 ∓ **2.110**	0.031 ∓ **0.861**	0.011 ∓ **0.196**	**67 a**	**650 ab**
50/200	0.085 ∓ 1.911	0.051 ∓ 0.630	0.003 ∓ 0.176	60 b	580 ab
25/250	0.061 ∓ 1.076	0.005 ∓ 0.462	0.013 ∓ 0.121	45 c	449 c
50/250	0.074 ∓ 1.082	0.011 ∓ 0.325	0.021 ∓ 0.093	48 c	435 c
25/300	0.142 ∓ 1.915	0.041 ∓ 0.723	0.020 ∓ 0.156	61 b	620 b
50/300	0.021 ∓ 0.097	0.020 ∓ 0.044	0.001 ∓ 0.032	23 e	229 d

* TS: كمية الإنزيم اللازمة لإنتاج مايكرومول منDHF \ دقيقة \ ملغم بروتين.

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

** DHFR: كمية الإنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول من NADPH \ دقيقة \ ملغم بروتين.

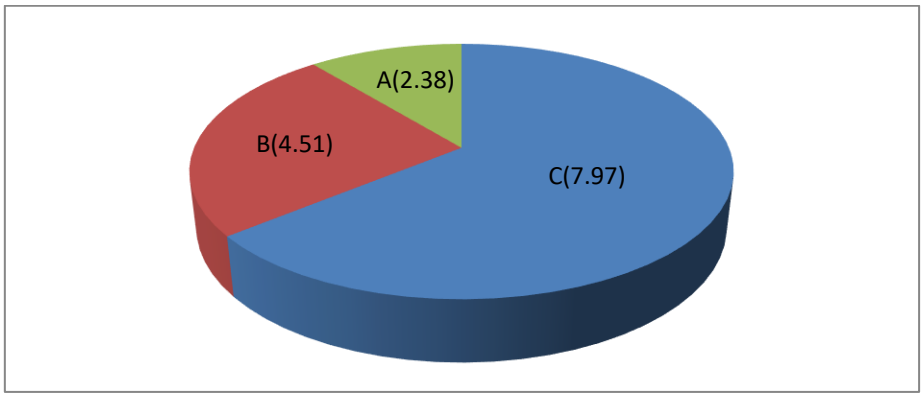
*** SHMT: كمية الإنزيم اللازمة لتحويل مايكرومول من THF إلى Methylene THF \ دقيقة \ ملغم بروتين.

تشير الأحرف المتشابهة عموديا إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.0001 > احتمالية بين المتوسطات باختبار DMRT. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.

يلاحظ من بيانات الجدول اعلاه انفراد الصدمة 200 فولت/ 25 ملي ثانية في دعم نشاط انزيمات TS و DHFR و SHMT لأعلى مستوياتها. وعلى العكس فقد ادى تعريض الكالس للصدمة 50/300 تثبيطا واضحا في فعاليتها النوعية. ومن النتائج المهمة ان الصدمة 200 فولت/ 25 ملي ثانية حققت زيادة في كمية الاحماض النووية DNA و RNA. وبصورة موازية فان المعاملة 300 فولت/ 50 ملي ثانية سببت اختزالا في كمية الحامضين DNA و RNA.

تأثير الصدمة الكهربائية في محتوى الكالس من الفوليت

أظهرت النتائج أن تركيز الفوليت المستخلص من كالس السيقان تحت الفلقية بعمر 60 يوم كان أكثر من تركيزه في سيقان بادرات السمسم. ولوحظ زيادة هذا التركيز في الكالس المعرض والمتأثر ايجابيا بأفضل معاملة للصدمة الكهربائية. فقد حققت الصدمة الكهربائية 200 فولت/25 اعلى تركيز للفوليت اذ بلغ 7.97 مايكروغرام/مل قياسا بمعاملة المقارنة 2.38 مايكروغرام/ مل(الشكل، 2).



A- السيقان تحت الفلقية للبادرات

B- كالس السيقان تحت الفلقية بعمر 60 يوم (المقارنة)

C- كالس الصدمة الكهربائية (200 فولت/25 ملي ثانية)

الشكل (2): تقدير تركيز الفوليت في مستخلصات كالس السيقان تحت الفلقية للسمسم *Sesamum indicum* L. المتأثر ايجابيا بالصدمة الكهربائية باستخدام كروماتوكرافيا السائل عالي الاداء.

المناقشة

ان صعوبة دراسة فعالية انزيمات دورة اضافة المثيل في النباتات قد تعزى الى الانخفاض الكبير في فعالياتها (Santi and Danenberg, 1984) وهذا يعود الى الانخفاض في معدلات تضاعف DNA فيها (Blakley, 1969), في حين وجد ان الفعالية تزداد في الخلايا السريعة الانقسام والنمو كخلايا الاورام السرطانية والخلايا البكتيرية (Nakagawa *et al*., 2012) لحاجة تلك الخلايا الى البناء المستمر للحامض

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

DNA, وبذلك يَعّد الكالس المستحدث احد الانسجة الناجحة في عزل وقياس فعالية الانزيمات بضمنها انزيمات دورة اضافة المثيل من كالس زهرة الشمس (Mohammad *et al.*, 1989a) وكالس الخس (محمد وأخرون, 2007) وانزيم الكلوتاميت ديهايدروجنيز في كالس الحبة السوداء (الطائي , 2005) وقد اكدت الدراسة الحالية بان استمرار انقسام ونمو خلايا كالس السمسم رافقه زيادة في فعالية انزيمات دورة اضافة المثيل ومن ثُمّ زيادة في محتوى الخلايا من الاحماض النووية والبروتينات والفوليت الضرورية لعملية الانقسام, فضلا عن زيادة فعالياتها بواسطة تاثير الصدمة الكهربائية على أنسجة كالس السمسم. **إن** التأثيرات المشجعة للصدمة الكهربائية في بعض المتغيرات الفسيولوجية لكالس السيقان تحت الفلقية للسمسم في هذه الدراسة ادت الى زيادة وزنه الرطب ومحتواه البروتيني كما في زيادة نمو كالس عنيب الذيب (Al-Mallah and Salih, 2003) وفي زيادة نمو كالس الارابيدوبس *Arabidopsis* (Eing *et al.*, 2009) وزيادة كفاءة الاندروجين في كالس الحمص (Rashidi *et al*, 2019). وان تحفيز الفعالية النوعية لأنزيمات TS و DHFR و SHMT وزيادة كميات DNA و RNA عند المعاملة 200 فولت/25 ملي ثانية قد تفسر بأن هذه الصدمة حفزت تكوين ثقوب دقيقة مؤقتة في الغشاء البلازمي والجدار الخلوي تسهل دخول الايونات والمغذيات من الوسط إلى داخل الخلايا (Purves, 2001) واشارت دراسات اخرى إلى دور ظاهرتي الانتشار والحمل الحراري اذ لهما وقت كافٍ يعتمد على مدة الصدمة لنقل كميات من الأملاح (Verchot *et al.*, 2010; Goldstein *et al.*, 2008) وإلى التأثيرات النوعية لظواهر ارتفاع السوائل بين الخلوية وانتشار المحاليل داخل الخلية المهمة متضمنة electro-osmotic وelectrolysis ومساهمتهما في زيادة استقطاب الخلايا لاحتياجاتها الغذائية لإنجاز التفاعلات الايضية بضمنها زيادة فعالية انزيمات بناء دورة اضافة المثيل المهمة لبناء DNA, ومن ثمّ اسهامها في زيادة انقسامات الخلايا (Ersus and Barrett, 2010; Asavasanti *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2006). كما رافقتها زيادة في كميات DNA و RNA في خلايا كالس السيقان تحت الفلقية للسمسم في بعض من معاملات الصدمة الكهربائية كما حصل في زيادة تضاعف DNA في بروتوبلاست الخلايا (Rech *et al.*, 1988).

في هذه الدراسة قد يعزى تماثل انماط الزيادة في فعالية انزيمات TS و DHFR و SHMT وكميات الاحماض DNA و RNA والبروتين في خلايا الكالس مع انماط الزيادة في تركيز الفوليت في خلايا كالس السيقان تحت الفلقية للسمسم, الى دور حامض الفوليك ومشتقاته في بناء نيوكليوتيد الثايمين. وان الزيادة الحاصلة في تركيز الفوليت, بسبب تعريض الكالس للصدمة الكهربائية, ادت الى زيادة فعالية انزيمات بناء نيوكليوتيد الثايمين ومن ثمّ زيادة محتوى الخلايا من DNA و RNA. وهذا قد يعزى الى الجينات التي تشفر لهذه الإنزيمات وان زيادة نشاطها واحداثها اية تغيرات محتملة فيها أدت إلى تغيرات مماثلة في كمية الفوليت (Basset *et al.*, 2005) ومن ثمّ تأثيرها في بناء DNA بدلالة تباين محتوى الفوليت الكلي المستخلصة من أنسجة كالس السيقان تحت الفلقية مقارنة بتركيزه في أنسجة السيقان تحت الفلقية للبادرات المعقمة. ويمكن القول أن التباين في تركيز الفوليت تأثرت بحالة الخلايا, او بعبارة اخرى أن الفوليت يبنى بمستوى معين يرتبط بأيض الخلية وحاجاتها لبناء نيوكليوتيدات DNA (Jabrin *et al.*, 2003) وادى اخضاع هذا الكالس للصدمة الى زيادة تركيز الفوليت في أنسجته معززا تأثيرها في نفاذية اغشية وجدران الخلايا التي ساهمت في الحصول على حاجاتها من الجزيئات العضوية ورفع مستوى الفوليت فيها (Basset *et al.*, 2005) او ان الزيادة في نشاط انزيمات دورة اضافة المثيل, بتأثير الصدمة, ادت الى زيادة الحاجة لبناء مشتقات الفوليت لتعويض المستهلك منها. وذكرت دراسة حديثة زيادة محتوى الفوليت في كالس الكزبرة في الوسط الغذائي المدعم بإضافة منظمات النمو K ABA, BA, فضلا عن زيادة استقراريتها 10% عن معاملة المقارنة (Puthusseri *et al.*, 2012), اعقبها دراسة أخرى للنبات ذاته مؤكدا زيادة كمية الفوليت فيه بوجود حامض السالسليك وزيادة فعالية الانزيمات المضادة للأكسدة (Puthusseri *et al.*, 2013). وأيدّت دراسة أخرى التغيرات في محتوى DNA و RNA والبروتين في كالس نبات الخس (محمد

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

وأخرون, 2007) وكالس السمسم (محمد وعبود، 1995). ان الافتراضات اعلاه تؤكد دور مركبات الفوليت في بناء الأحماض النووية والبروتينات بسبب مشاركتها في بناء نيوكليوتيدات البيورين والثايمين وبعض الأحماض الأمينية. وأن التعرض لعوامل فيزياوية لا يؤدي فقط إلى تغير في الصفات المظهرية للنباتات وانما إلى تغير في محتواها من المركبات (مرتضى، 2001 ; البياتي، 2002). ان الزيادة في المحتويات الخلوية سببت زيادة في الاوزان الرطبة للكالس ، قد يعزى هذا الى دور مركبات الفوليت في اكمال بناء حلقة البيورين واضافة مجموعة المثيل لبناء نيوكليوتيد الثايمين احد اهم نيوكليوتيدات بناء DNA, وتشترك أيضاً في بناء السايتوكاينينات الداخلية في خلايا الكالس بصورة غير مباشرة بسبب دورها المعروف في تحفيز الانقسام الخلوي من خلال دعم بناء tRNA الذي يشارك في بناء البروتينات وأنواع معينة من الانزيمات المسؤولة عن تحفيز الانقسام الخلوي وهذا يؤكد حاجة خلايا الكالس إلى مركبات الفوليت لعمليات التوسع والانقسام (Smith *et al.*, 1987).

المصادر العربية:

أحمد، جاسم محمد ياسين (2000). التحول الوراثي في نباتات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* بواسطة بلازميدات Ri و Ti لبكتريا *Agrobacterium* . رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل, العراق.

البياتي، فراس عباس يونس (2002). احداث التغايرات الوراثية في بذور ونباتات وكالس فول الصويا (صنف اباء) *Glycine max* L. باستخدام أشعة كاما وتأثيراتها في المحتوى البروتيني ونسبة الزيت. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل, العراق.

الطائي، نهال عزت (2005). التنقية الجزئية لإنزيم الكلوتاميت ديهايدروجنيز من كالس سيقان نبات الحبة السوداء *Nigella sativa* L. بوجود منظم النمو 2, 4- D أو PDA في الوسط الغذائي. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل, العراق.

الملاح, مزاحم قاسم (2002). ابتكار جهاز التحفيز الكهربائي (الجهاد1) وتطبيقاته في زراعة الانسجة النباتية. براءة اختراع 3033. جهاز التقييس والسيطرة النوعية. جمهورية العراق.

محمد، عبد المطلب وعبود، ساجدة عزيز (1995). تأثير بعض منظمات النمو على محتوى البروتين والأحماض النووية واخلاف النباتات من كالس نبات السمسم *Sesamum indicum* L. مجلة علوم الرافدين، 1: 1-12.

محمد, عبد المطلب, الجلبي , قصي عبد القادر وعبود، ساجدة عزيز (2007). عزل وتنقية جزئية لانزيم الثايميدليت سينثيز من كالس الخس *Lactuca sativa* L. . مجلة التربية والعلم, 2:1-11.

مرتضى، عبدالقادر اسكندر (2001). مقارنة صنفي القطن اشور وكركر 310 واستجابتهما لتأثير اشعة كاما في مظاهر وانتاجية النباتات. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.

المصادر الاجنبية:

Al- Mallah, M. K. (1994). Electrostimulation of *in vitro* cultures. Agricell Repts., 22: 29-32.

Al- Mallah, M. K. and Salih, S. M. (2003). Electroporation increased growth of callus, regeneration capability and protein content of *Solanum nigrum* L. Plants. Raf. J. Sci. , 14: 35-42.

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

Arnon, D. I. and Hoagland, D. R. (1944). The investigation of plant nutrition by artificial culture methods, Biol. Rev. 19: 55- 67.

Asavasanti, S. ; Stroeve, P. ; Barrett, D. ; Jernsted, J. and Ristenpart, W. (2012). Enhanced Electroporation in plant tissues via low frequency pulsed electric fields: influence of cytoplasmic streaming. AIChE. USA.

Al-Taweel, S.K.;Cheyed,S.H. and Al-Amrani,H.A.(2018). Effect of electrical shock on germination and seedling growth in henbane species,Academia Journal Medicinal Plants,6(5):071-078.

Basset, G. J. ; Quinlivan, F. P. ; Gregorg, J. F. and Hanson, A. P. (2005). Folate metabolism in plants. Crop. Sci. 45: 449-453.

Batra, K. K. ; Wagner, J. R. and Stokstad, E. L. R. (1977). Folic acid compound in romanine Lettuce. J. Bio Chem. 55: 865-868.

Blakley, R. L. (1969). The biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines. American Elsevier Publishing Co, Inc. , New York.

Chen, C. ; Smye, S.W., Robinson, M. P. and Evans, J. A. (2006). Membrane electroporation theories: overview. Med. Biol. Eng. Comp. 44: 5-14.

Cherry, J. H. (1962). Nucleic acid determination in storage tissue of higher plants. Plant Physiol. 37: 670- 678.

Eing, C. J. ; Bonnet, S. ; Pacher, M. ; Puchta, H. and Frey, W. (2009). Effects of nanosecond pulsed electric field exposure on *Arabidopsis thaliana.* Karlsruhe Institute of Technology. 1322-1328.

Ersus, S. and Barrett, D. M. (2010). Determination of membrane integrity in onion tissues treated by pulsed electric fields: Use of microscopic images and ion Leakage measurements. Innovative food Sci. Emerg. Technol. 11: 598-603.

Friedkin, M. (1963). Thymidylate Synthetase, Adv. Enzymol. 38: 235- 292.

Gao, G. ; Sheng, X. and Li, X. (2010). Determination of folic acid in folic acid tablets by HPLC. J. Jining Medical University. Rizhao, China.

Gätjens-Boniche,O.; Díaz,C.; Hernández-Vásquez,L.; Chavarría-Rodríguez,P. and Martínez-Ávila,E.(2017). Effect of Electrical Current Applied in Soaking Conditions on Germination of Acacia and Maize Seeds, IOSR-JAVS,10:11-18.

Giles, K. W. and Mayer, A. (1967). Determination of DNA concentration with diphenylamine reagent. Meth. Enzymol. 12: 163.

Goldstein R. E. ; Tuval, I. and Van De Meent, J. W. (2008). Micro fluids of cytoplasmic streaming and its implications for intracellular transport. Proc. Natl Acad Sci. 105: 3663-3667.

Gupta, S. D. and Y. Ibaraki (2008). Plant Tissue Culture Engineering. 417-462. Springer, Netherland.

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

Huennekens, F. M. ; Ho, P. P. K. and Scrimegour, K. G. (1963). Preparation and Properties of Active Formaldehyde and Active Formate. Eds. : Colowick, S.P. and Kaplau, N.O. Meth. Enzy. 6: 806- 811.

Jabrin, S. ; Ravanel, S. ; Gambonnet, B. ; Douce, R. and Rebeille, F. (2003). One- carbon metabolism in plants: regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. Plant Physiol. 131: 1431-1439.

Joersbo, M. and Brunstedt, J. (1991). Electroporation: mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in plant protoplasts: Physiol. Plant. 81: 256-264.

Lowry, O. H. ; Rosebruogh, N. J. ; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). "Protein measurements with the Folin reagent", J. Biol. Chem., 193: 265-275.

Mathews, C. K. ; Scrimgeour, K. G. and Huennekens, F.M. (1963). Dihydrofolic acid reductase. (Eds.: Colowick, S. P. and Kaplau, N.O.) Meth. Enzym. 6: 364- 368.

Mohammad, A. M. S. ; Al-Chalabi, K. A. and Abood, S. A. (1989a). The occurrence and properties of dihydrofolate reductase isolated from sunflower callus. J. Exp. Bot. 40:693-699.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473- 497.

Nakagawa, T. ; Shimada, M. ; Kurita, N. ; Lwata, T. ; Nishioka, M. ; Yoshikawa, K.; Higashijima, J.; and Wts Vnomiya, T. (2012). Thymidylate synthase (TS) protein expression as a prognostic factor in advanced colorectal cancer: a comparison with TS mRNA expression. Hepatogastroenterology. Department of Surgery, the University of Tokushima, Japan. 59: 1059- 1062.

Osborne, M. J. and Huennekens, F.M. (1958). Enzymatic reduction of dihydrofolic acid. J. Biol. Chem. 233: 969- 974.

Purves, W.K. (2001). Life: the science of biology. Sinauer Associates. 6: 316-317. India, 136: 569-75.

Puthusseri, B. ; Divya, P. ; Lokesh, V. and Neelwarne, B. (2012). Enhancement of folate content and its stability using food grade elicitors in coriander (*Coriandrum sativum* L.). Plant Food Hum. Nutr. 67: 162-170.

Puthusseri B. ; Divya, P. ; Lokesh V. and Neelwarne, B. (2013). Salicylic acid-induced elicitation of folates in coriander (*Coriandrum sativum* L.) improves bioaccessibility and reduces pro-oxidant status**.** Food Chem.

Rashidi ,S; Abdollahi ,M; Sarikhani, H and Moosavi S. (2019). Investigation of the Effect of Centrifugation and Electrical Shock Pretreatments on the Androgenesis Efficiency in Chickpea (Cicer arientinum L.) Anther Culture. JMBS. 2019; 10 (2) :173-181

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

Rech, E. L. ; Ochatt, S. J. ; Chand, P. K. ; Davey, M. R. ; Mulligan, B. J. and Power, J. B. (1988). Electroporation increases DNA synthesis in cultured plant protoplasts. BioTechn. 6: 1091-1093.

Salih, S. M. (2001). Enhancement of growth and regeneration ability of callus culture from *Chamomile matricaria*, chamomilla. J. Educ. and Sci. 53: 54-62.

Santi, D. V. and Danenberg, P. V. (1984). Folates in Pyrimidines nucleotide biosynthesis. In: Folates and Pterins . John Wiley and Sons , New York.

Silva, R. F. and Yuffa, A.M. (2003). Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes ***gus*** and ***bar***. Elect. J. Biotech. 6 : 3414-3428.

Smith, K. H. ; Kerns, H. A. ; Antony, J. L. and Wild, J. R. (1987). Methotrexate and aminopterin effects on growth and regeneration in *Daucus carota.* Plant Cell Repts. 6:60-62.

Uyeda, K. and Rabinowitz, J.C. (1968). Enzymes of the clostridial purine fermentation serine hydroxymethyl transferase. Arch. Biochem. Biophys. 123: 271- 278.

Verchot, L. ; Lubicz, J. and Goldstein, R. (2010). Cytoplasmic streaming enables the distribution of molecules and vesicles in large plant cells Protoplasma. 240: 99-107.

Vorobiev, E. and Lebovka, N. (2008). Pulsed- Electric- Fields- Induced Effects in Plant Tissue: Fundamental Aspects and Perspectives of Applications. Electro technologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials. France Springer. Science Business Media. 39-78.

Yeom, H. W. ; Streaker, C. B. ; Zhang, Q. H. and Min, D. B. (2000). Effects of pulsed electric fields on the activities of microorganisms and pectin methyl esterase in orange juice. J. Food Sci. 65: 1359-1363.