تحليل جزيئي ووظيفي للمورثة غلوتاثيون ترانسفيراز في العدس *Lens culinaris* Medik.

فاتح خطيب[1] وتسنيم بساطة*[1]

(1). قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية.

(* للمراسلة: م. تسنيم خياطة بساطة. البريد الالكتروني: simobsata@gmail.com)

تاريخ الاستلام: 2020/05/31 تاريخ القبول: 2020/07/7

الملخص

تتميز مورثات الغلوتثيون ترانسفيراز Glutathione S-Transferase (GST) في قدرتها على إبطال سمية المواد الغريبة (xenobiotics) ومنها مبيدات الأعشاب. يعتبر أنزيم الـ GST أحد الأنزيمات المضادة للأكسدة التي تعمل على كسح (تنظيف) أنواع الأوكسجين الفعّال Reactive oxygen species (ROS). تم في هذه الدراسة استخدام تقنية النسخ العكسي reverse transcription للكشف عن تعبير المورثة GST ومقارنة تعبيرها مع مورثة داخلية المنشأ actin. تم اختبار كفاءة المورثة GST في تحمل مبيدي الأعشاب غليفوسات glyphosate و2.4-D. بالإضافة لذلك اختبر النشاط المضاد للأكسدة عند الأنزيم GST في تثبيط الجذور الحرة باستخدام المركب DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhdrazyl). أظهرت نتائج التفاعل التسلسلي للبوليميراز لناتج النسخ العكسي نشاط المورثة GST ونسخها إلى mRNA وعدم إخمادها في هذه المرحلة. كما أظهرت نباتات السلالة المعدلة وراثياً A7 تحمل لمبيدات الأعشاب غليفوسات و2.4-D عند التراكيز 0.5 و1 و 2 ميلي مولر. تباينت المعاملات المدروسة في نشاط التثبيط للجذور الحرة DPPH، حيث تفوقت أيضاً السلالة المعدلة وراثياً A7 وبفروق معنوية في متوسط النسبة المئوية للتثبيط (79.4%) على السلالة الأبوية ILL5588 حيث بلغت نسبة التثبيط (67.2%). وبذلك يمكن استخدام السلالة A7 في تجارب موسعة لاختبار تحمل نباتات هذه السلالة لبعض الإجهادات الأحيائية أو اللاأحيائية لإظهار قيمة الصفة التي نقلت لهذه النباتات.

الكلمات المفتاحية: تعبير المورثات، النسخ العكسي، إجهاد الأكسدة، أنواع الأوكسجين الفعّال، العدس.

المقدمة:

أصبحت عملية التحوير الوراثي للنبات تقنية واسعة الانتشار، وتستخدم لأغراض متعددة في المجال الزراعي، وفي مجال أبحاث البيولوجيا الجزيئية في النبات. تعد البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* أهم الأدوات المستخدمة كوسيط في عملية نقل المورثات من المصـــادر الوراثية المختلفة إلى النبات، والتي لا يمكن نقلها غالباً بالطرائق التقليدية. تتم عملية التحوير بداية على مســـتوى عدد محدود من الخلايا في المختبر، ومن ثم تجري عملية تجديد نبات كامل بدءاً من هذه

الخلايا على أوساط مناسبة لزراعة الأنسجة (Stewart, 2008). بعد الحصول على النبات الكامل، تجرى مجموعة من الاختبارات الجزيئية، والوظيفية لتأكيد انتقال هذه المورثة إلى النبات، وضمان تعبيرها بشكل مناسب يمنح الصفة التي تشفر لها المورثة المنقولة. يحدث التركيب الوراثي construct المنقول إلى النبات، موقعاً وراثياً في جينوم النبات المضيف. وبناءً على ذلك فإن كل حدث event تحوير وراثي يقال عنه بأنه حدث مستقل independent عن الحوادث الأخرى، بمعنى أن النمط الظاهري سوف يتغير بالطريقة المتوقعة لكل حدث. ومن الضروري تعريف حوادث التحوير المستقلة وتمييزها عن بعضها، وعن النباتات غير المحورة (Visarada *et al.*, 2009).

تستخدم تقنية النسخ العكسي reverse transcription، في الكشف عن التعبير الوراثي للمورثات المنقولة، وذلك من خلال تركيب السلسلة المتممة لها من الـ DNA complementary DNA (cDNA) بدءاً من سلسلة الحمض النووي الريبي الرسول mRNA للمورثة المراد دراستها، حيث تحوّل بوساطة أنزيم النسخ العكسي reverse transcriptase، وتستخدم السلسلة المتممة cDNA كقالب مكاثرة في تفاعل PCR عادي يتم الكشف عن نواتجه بالرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز (Schmittgen *et al.*, 2000).

تحفز عدة عمليات استقلاب (مثل التنفس والتمثيل الضوئي)، وكذلك الظروف البيئية المعاكسة (الملوحة المرتفعة، الجفاف، التحفيز الميكانيكي، السمية الكيميائية، الإصابة بالممرضات، درجات الحرارة المتطرفة)، عند النباتات الراقية، إنتاج أنواع الأوكسجين الفعّال (ROS)، مثل السوبرأوكسيد ($O_2^{\bullet -}$)، بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وجذر الهيدروكسيل (•OH) (Chang *et al.*, 2009). تسبب أنواع الأوكسجين هذه ضرراً للبيدات الغشاء الخلوي، البروتينات، والحموض النووية، ويعتقد أن هذه الجزيئات شديدة الفعالية هي العوامل الأساسية المساهمة في التسبب بضرر سريع للخلايا (McCord, 2000). يحرّض بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الخارجي تعبير مورثات الدفاع، وكذلك يؤسس لموت الخلايا المبرمج في النبات (Levine *et al.*, 1994; Desikan *et al.*, 1998). تحدد الحالة المستقرة لأنواع الأوكسجين الفعال ROS بشكل رئيسي بوساطة نشاط النظام المضاد للأكسدة في الخلايا النباتية (Depege *et al.*, 2000). هناك العديد من الأنزيمات الداخلية المضادة للأكسدة مثل سوبر أوكسيد ديسموتاز superoxide dismutase (SOD)، غلوتاثيو بيروكسيداز glutathione peroxidase (GPX)، الكاتالاز catalase (CAT)، اسكوربات بيروكسيداز ascorbate peroxidase (APX)، غلوتاثيون ريدكتاز glutathione reductase (GR) التي تلعب دوراً مهماً في حماية الخلية النباتية من ضرر الأكسدة (Roxas *et al.*, 2000)، ويعد الأنزيم GPX الأنزيم الأساسي في تنظيف بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في الخلايا النباتية (Mittler, 2002). يضاف لأنزيمات GPXs مجموعة أخرى من الأنزيمات القادرة على تنظيف البيروكسيدات في النباتات، والتي درست بشكل موسع، ومن المعروف جيداً أن هناك نوعاً محدداً من الغلوتاثيون – اس– ترانسفيراز glutathione – S–transferase (GST) يظهر نشاطاً قوياً للغلوتاثيون بيروكسيداز (GST/GPX) تجاه البيروكسيدات المائية ويفككها إلى كحولات أقل سمية (Cummins *et al.*, 1999).

تشارك أنزيمات GPXs للعديد من الإجهادات اللاأحيائية والهرمونات (Gaber *et al.*, 2012). عبرت المورثة GPX بقوة في الأنسجة الطبيعية للرز التي تتميز بكفاءة تمثيل ضوئي مرتفعة، وكذلك في أنسجة حفزت بإجهادات أكسدة (Li *et al.*, 2000). منح التعبير المفرط للمورثة GST/GPX في نباتات التبغ المعدلة وراثياً تحملاً للبرودة والملوحة بسبب تنظيف

أنواع الأوكسجين الفعال ROS، وتقليل تضرر الأغشية الخلوية (Roxas *et al.*, 2000). تلعب مورثات GPXs في الكلوروبلاست عند نبات الأرابيدوبسس دوراً في التشويش التداخلي بين الإجهاد الضوئي والاستجابة المناعية (Gaber *et al.*, 2012). كما أظهرت دراسة أخرى أن تعبير المورثة PHGPx في التبغ، والمنقولة من البندورة قد يمنع الموت المبرمج للخلايا (Chen *et al.*, 2004).

تم الإشارة للأنزيم غلوتاثيون ترانسفيراز Glutathione S-Transferase (GST EC 2.5.1.18) لأول مرة في العام 1970، حيث تم الكشف عن دوره في منع سمية مبيد الأعشاب atrazine، على الذرة الصفراء من خلال اقترانه بالغلوتاثيون ثلاثي الببتيد (GSH, g-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) (Frear and Swanson, 1970). أدت هذه النتائج الأولية إلى أبحاث مكثفة عن دور المورثة غلوتاثيون ترانسفيراز (GST)، والتي ركّزت في غالبيتها على التخلص من السمية النباتية لمبيدات الأعشاب، وغيرها من المركبات الحيوية السامة في النبات (Schröder *et al.*, 2007).

تعمل المورثة GST على تحفيز الاقتران بين مختلف الكائنات الغريبة مع مراكز جاذبة للالكترونات electrophilic ومانحة للالكترون GSH nucleophilic، وبالتالي وسم tagging المواد الغريبة لحجزها في الفجوة (Martinoia *et al.*, 1993). تمتلك أنزيمات GSTs القدرة على تعزيز تحمل النبات لمبيدات الأعشاب، وتتطلب هذه الحالة أن تقود عملية إدخال المورثات للنبات إلى تعطيل سمية مبيد الأعشاب بشكل كامل. ينشأ عن عملية اقتران مبيد الأعشاب مع الغلوتاثيون GSH تغير خواصه الفيزيائية والكيميائية مما يجعل هذه المركبات أكثر قطبية، وغير قادرة على الحركة بحريّة، أو إعادة التموضع ضمن السيمبلاست symplast (الجزء الداخلي من الغشاء السيتوبلازمي والذي يتحرك فيه الماء والمواد الذوابة ذات الوزن الجزيئي المنخفض بحريّة). علاوة على ذلك يصبح ناتج الاقتران بين الغلوتاثيون ومبيد الأعشاب هدفاً لعمليات استقلاب إضافية والتعرف عليه من قبل ناقلات الطاقة ليتم نقله خارج الجزء المائع من السيتوبلازم (السيتوسول cytosol)، (Riechers *et al.*, 2010). أشار العديد من الدراسات إلى اكتساب النباتات صفة التحمل لمبيدات الأعشاب نتيجة إدخال المورثة GST. فقد أظهرت نباتات التبغ المعدلة وراثياً والحاوية على المورثة GST I التي مصدرها نبات الذرة الصفراء، تحمل لمبيد الأعشاب Alachlore (Milligan et al., 2001). كما تحمل نبات القمح المعدل وراثياً لكل من مبيدات الأعشاب Alachlor, dimethemamid, thiocarbamate نتيجة إدخال المورثة GST27 التي مصدرها نبات الذرة (Karavangeli *et al.*, 2005).

يهدف البحث إلى:

1. الكشف عن تعبير المورثة GST في النباتات المعدلة بواسطة التفاعل التسلسلي للبوليميراز لناتج النسخ العكسي Reverse transcription (RT)-PCR.
2. تحمل النباتات المعدلة لمبيدي الأعشاب غليفوسات و 2,4-D.
3. تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام المركب DPPH.

مواد البحث وطرائقه:

نفذت هذه الدراسة في مختبر أبحاث وقاية النبات في كلية الهندسة الزراعة بجامعة حلب في عام 2019.

1. المادة النباتية:

تم الحصـــول على المادة النباتية من المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا) وهي عبارة عن بذور أربع سلالات من العدس: A1، A2، A3، A7 المعدلة وراثياً عن المدخلين ILL5883 و ILL5588. استخدمت البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* السـلالة LBA4404 كوسـيط في عملية التعديل الوراثي. عدلت هذه البكتريا وراثياً بحيث تحوي على البلازميد pROKII، والذي يحمل بدوره المورثتين GST/GPX مصدرها نبات البندورة، والمورثة الواسمة للانتخاب nptII التي تمنح صفة المقاومة للصاد الحيوي كانامايسين kanamycin. يتم تشغيل كلتا المورثتين بواسطة الحاث CaMv35S promoter (تم تصـــنيع البلازميد من قبل الدكتور أنطونيوس ماركس، المعهد الزراعي لحوض المتوسط، خانيا، اليونان).

2. استخلاص الحمض النووي الريبي الكلي Total RNA:

تمت عملية استخلاص الـ RNA الكلي وفق تعليمات الشركة الصانعة (Promega, USA) مع إجراء تعديل بسيط في طريقة تحضير العينة؛ حيث سحقت العينة النباتية الطازجة مباشرة في محلول الاستخلاص RNA lysis buffer (RLA)، عوضاً عن سحقها في النيتروجين السائل، ومن ثم إضافة الكمية المطلوبة من محلول حل الجدر الخلوية. حيث جمعت كمية 30 مغ تقريباً من أوراق النباتات، وسحقت مباشرةً في 175 ميكرولتر من محلول الاستخلاص (RLA). ونقل المزيج إلى أنابيب ابندورف Eppendorf سعة 2 مل. أضيف 350 ميكرولتر من محلول التخفيف RNA dilution buffer، وخلطت المكونات بشكل جيد، ثم فصلت بالطرد المركزي لمدة 10 دقائق، عند سرعة 13000 دورة /دقيقة. نقل الرائق إلى أنابيب طرد مركزي جديدة مع تجنب تحريك البقايا النباتية أو نقلها مع الرائق. أضيف للرائق 200 ميكرولتر كحول إيتيلي تركيز 95 % ومزجت المكونات بالتقليب 3–4 مرات. نقل المزيج إلى عمود الفصل المثبت فوق أنبوب الجمع Spin column Assembly، ومن ثم ثفلت لمدة دقيقة واحدة، عند سرعة 13000 دورة /الدقيقة. تم التخلص من السائل في أنبوب الجمع collection tube وأعيد تركيب عمود الفصل عليه مرة ثانية. أضيف 600 ميكرولتر من محلول الغسيل RNA wash solution (RWA) إلى عمود الفصل ومن ثم كررت عملية طرد مركزي عند شروط الخطوة السابقة. تم التخلص من السائل (محلول الغسيل) في أنبوب الجمع وإعادة تركيب عمود الفصل عليه إلى الحامل. حضّر مزيج مكون من (5 ميكرولتر DNaseI، 5 ميكرولتر من كلوريد المنغنيز MnCl2 تركيزه 0.09 مولر، 40 ميكرولتر من المحلول yellow core) وذلك للتخلص من الـ DNA في كل عينة. وأضيف 50 ميكرولتر من المزيج السابق فوق الفلتر في عمود الفصل الموجود في عمود الفصل مباشرة مع التأكد أن المزيج يغطي قاعدة الأنبوب تماماً. حضنت العينات لمدة 15 دقيقة عند حرارة الغرفة، ثم أضيف 200 ميكرولتر من محلول إيقاف الأنزيم DNAse stop solution (DSA)، تم التثفيل عند السرعة القصوى لمدة دقيقة واحدة. أضيف 600 ميكرولتر من محلول الغسيل RWA ، ومن ثم التثفيل عند السرعة القصوى لمدة دقيقة واحدة. تم تفريغ أنبوب الجمع وإضافة كمية 250 ميكرولتر مرة أخرى من محلول الغسيل RWA وإعادة عملية التثفيل السابقة لمدة دقيقتين. التخلص من أنبوب الجمع ووضع عمود الفصل ضمن أنابيب التنقية Elution tube سعة 1.5 مل. أضيف 100 ميكرولتر من الماء المعقم والخالي من أنزيمات النوكلياز إلى أنبوب الفصل فوق الفلتر مباشرة، وتركت لمدة 5 دقائق حتى ذاب الحمض النووي فيها. ثم تم التثفيل عند السرعة القصوى لمدة دقيقة واحدة،

والتخلص من عمود الفصل، وحفظ الـ RNA المستخلص عند حرارة −80 °س لحين استخدامه. تم قياس تركيز الحمض النووي الريبي الكلي Total RNA المستخلص، ونقاوته بواسطة المطياف الضوئي Spectrophotometer.

3. تركيب سلسلة الـ DNA المتممة:

أجريت عملية النسخ العكسي وفق تعليمات الشركة الصانعة باستخدام المجموعة الجاهزة (كيت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit من شركة (fermentas, Germany).

استخدم حجم من الـ RNA المستخلص يحوي 3 ميكرغرام منه، وأضيف لهذا الحجم 1 ميكرولتر من البادئة (oligo dT18)، ثم أكمل الحجم بالماء المعقم منزوع الشوارد، إلى حجم نهائي 12 ميكرولتر. مزجت المكونات بشكل لطيف، ثم جمعت مرة أخرى أسفل الأنبوب بالطرد المركزي لعدة ثواني. حضّنت العينات عند حرارة 65 °س لمدة 5 دقائق، ثم وضعت مباشرة في الثلج للعمل على ارتباط البادئة مع الـ mRNA. جمعت القطيرات أسفل الأنبوب بالطرد المركزي لعدة ثواني. بعد ذلك حضّر مزيج تفاعل يكفي 10 عينات، حيث أُخذ منه كمية 8 ميكرولتر لكل من العينات السابقة وبذلك يصبح الحجم النهائي لمزيج تفاعل النسخ العكسي هو 20 ميكرولتر وقد احتوى هذا المزيج على 4 ميكرولتر 5x Reaction Buffer، 1 ميكرولتر RNase RiboLock RNase Inhibitor (20U/µl)، 2 ميكرولتر dNTP Mix (تركيز 10 ميلي مولر)، 1 ميكرولتر RevertAid M−MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl). ثم حضّن المزيج لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة 42°س وذلك لاصطناع السلسلة المتممة cDNA، ثم أوقف التفاعل بالتسخين لمدة 5 دقائق عند درجة 70 °س.

4. التفاعل التسلسلي للبوليميراز لناتج النسخ العكسي RT-PCR

استخدم ناتج تفاعل النسخ العكسي مباشرة؛ كقالب تضخيم في تفاعل PCR عادي، وذلك للكشف النوعي عن نشاط المورثات المنقولة، بمقارنة تعبيرها مع المورثة اكتين actin داخلية المنشأ.

استخدمت كمية 2 ميكرولتر من ناتج النسخ العكسي كقالب مكاثرة في تفاعل PCR عادي لمكاثرة المورثة GST، حُضّر مزيج التفاعل باستخدام بادئات متخصصة بها حيث كان تسلسل البادئة الأمامية GST−F: 5'−CCTTATGAGAGAGCACAAGC−3'، والبادئة العكسية GST−R: 5'−CGCAATATCCACACAACCAA−3'، في حجم نهائي 20 ميكرولتر، حيث احتوى على 2 ميكرولتر محلول منظم للتفاعل مع كلوريد المغنيزيوم (10x PCR Buffer + 15 mM MgCl2)، 2 ميكرولتر dNTPs (تركيز 2 ملي مولر)، 1 ميكرولتر من كل بادئة (تركيز 10 ميكرومولر)، 0.2 ميكرولتر من أنزيم البلمرة DNA Taq polymerase (5U/µ1)(GeneDirex®)، وأكمل الحجم بالماء المعقم منزوع الشوارد. تمت عملية التضخيم للمورثة GST في جهاز التدوير الحراري وفق البرنامج التالي: فصل أولي عند حرارة 94 °س لمدة 5 دقائق ولدورة واحدة، ثم 40 دورة تتضمن الفصل الثانوي عند حرارة 94 °س لمدة 60 ثانية، التحام البادئات عند حرارة 56 °س لمدة 60 ثانية، الامتداد عند حرارة 72 °س لمدة 60 ثانية، ومن ثم الامتداد النهائي لدورة واحدة عند 72 °س لمدة 7 دقائق كما استخدم ذات الكمية من المزيج في تفاعل آخر للكشف عن نشاط المورثة اكتين actin كشاهد للمقارنة؛ وذلك باستخدام بادئات متخصصة بها، حيث كان تسلسل البادئة الأمامية: ACT−1−F: 5'− CGTCTTGACCTGGCTGGTCGC−3'، والبادئة العكسية ACT−

1-R: 5'-GGCTGTCTCCAGCTCTTGCTCG-3'، وذلك لتضخيم قطعة بطول 164 زوج نكليوتيدي. تمت عملية المكاثرة للمورثة actin وفق برنامج التدوير الحراري التالي: فصل أولي عند حرارة 94 °س لمدة 5 دقائق ولدورة واحدة، ثم 35 دورة تتضمن الفصل الثانوي عند حرارة 94 °س لمدة 60 ثانية، التحام البادئات عند حرارة 55 °س لمدة 60 ثانية، الامتداد عند حرارة 72 °س لمدة 60 ثانية، ومن ثم الامتداد النهائي لدورة واحدة عند 72 °س لمدة 7 دقائق لتضخيم قطعة بطول 204 زوج نكليوتيدي. فصلت نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز تركيز 1.2%، ومن ثم لونت الهلامة في محلول بروميد الايثيديوم تركيز 0.5 ميكروغرام/مل، وظُهّرت صورة الهلامة تحت الأشعة فوق البنفسجية في جهاز توثيق الهلام، ثم أخذت صور رقمية للهلامة لتحليل النتائج. تم التعرف على قياس القطع الناتجة باستخدام مؤشر قياسي للوزن الجزيئي 100 زوج نكليوتيدي.

5. تحمل مبيدات الأعشاب:

اختبرت 6 نباتات من العدس والحاوية على المورثة GST من حيث تحملها لعدة تراكيز من المبيدين 2,4-D وغليفوسات. نفذت التجربة على نباتات بعمر 6 أسابيع مزروعة في الحاضنة ضمن أصص سعة 500 غ، وتحوي خلطة ترابية مكونة من تربة معقمة وبيتموس بنسبة 1:3. حضنت النباتات عند حرارة 24 °س، وتناوب إضاءة وظلام 16: 8 ساعة. تم رش أوراق النباتات المعدلة وراثياً ونباتات الشاهد من السلالات الأبوية بتركيز 0، 0.5، 1، 2 ميلي مولر لكل من المبيدين 2,4-D وغليفوسات. تركت النباتات تحت نفس شروط زراعتها مع مراقبة تطور أعراض السمية عليها.

6. تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام DPPH:

من الممكن تقييم النشاط المضاد للأكسدة بعدة طرائق سواءً في النبات أو في الأنابيب في المختبر. ومن أكثر الطرق المتبعة في المختبر شيوعاً هي المعتمدة على استخدام الجذر الحر DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhdrazyl) نظراً لبساطتها، وسرعتها، وكلفتها المنخفضة، حيث يتم في هذه الطريقة اختزال الركيزة DPPH بنقل الهيدروجين إليها من مركبات أخرى (Alam *et al.*, 2013). تمت عملية التقييم باتباع الطريقة المقترحة من قبل (De Torre *et al.*, 2019) مع إجراء بعض التعديل في طريقة تحضير العينة حيث جففت العينات في المفرغة بدلاً من المجففة freeze drier. اختبرت نباتات العدس وذلك من خلال رصد تأثير الأنزيم GST في تنظيف الجذور الحرة DPPH• (cat. no. D9132, Sigma-Aldrich, USA).

سحقت كمية حوالي 0.5 غ من أوراق العدس في الكحول الايثيلي تركيز 70%، بنسبة (3:1)، وذلك ضمن هاون معقم، ثم نقلت إلى أنابيب معقمة سعة 2 مل، وحضنت تحت ظروف المختبر، في الظلام لمدة 30 دقيقة. أجريت عملية طرد مركزي لمدة 10 دقائق، عند سرعة 13000 دورة/دقيقة. تم التخلص من الرائق، ومن ثم جفف الراسب ضمن مفرغة vacuum لمدة 3 ساعات. وزنت كمية 20 مغ من الراسب ثم خففت في 1 مل كحول ايثيلي تركيز 70%. حضر من المخزون السابق 10 تخفيفات في الكحول الايثيلي بحيث تحوي (1000، 500، 250، 125، 62.5، 31.25، 15.63، 7.81، 3.91، 1.95 ميكروغرام/مل). أجريت نفس العملية على الشاهد الإيجابي فيتامين Ascorbic acid C، والشاهد السلبي سكر الغلوكوز. حضّر المركب DPPH• بتركيز 0.04 مغ/مل، في الكحول الايثيلي تركيز 70%. مزج كمية 1 مل من التخفيف لكل عينة مع 1 مل من محلول المركب DPPH•. حضنت العينات لمدة 30 دقيقة. تم قياس الامتصاصية

عند طول موجة 517 نانومتر بواسطة المطياف الضوئي، ومن ثم حساب النسبة المئوية لنشاط تثبيط الجذور الحرة (% للتثبيط) من العلاقة:

$$\% \text{ للتثبيط} = 1 - \frac{\text{امتصاصية العينة} - \text{امتصاصية العينة الفارغة}}{\text{امتصاصية العينة الفارغة} - \text{امتصاصية العينة الشاهد}} \times 100$$

حيث أن: -امتصاصية العينة: امتصاص التفاعل بوجود العينة (تخفيفات العينة + DPPH).

- امتصاصية العينة الفارغة: (تخفيفات العينة + مذيب DPPH).
- امتصاصية العينة الشاهد: (مذيب العينة + DPPH).

صممت التجربة بطريقة القطاعات المنشقة Split Block design، وبمعدل ثلاثة مكررات لكل معاملة، ثم حللت إحصائياً باستخدام برنامج التحليل الإحصائي GenStat 12، وحساب أقل فرق معنوي L.S.D عند مستوى معنوية 5%.

النتائج والمناقشة:

1. **تقدير تركيز ونقاوة الـ RNA المستخلص:**

بينت نتائج قياس تركيز الـ RNA الكلي المستخلص بواسطة المطياف الضوئي أن تركيز الـ RNA قد تراوح مابين 336 -1832 (وسطياً 920.8) نانوغرام/ميكرولتر. أما فيما يخص نوعية الـ RNA فقد تميزت أيضاً بنقاوتها وخلوها من البروتينات في غالبية العينات، حيث تراوحت بين 1.6-2.13 (الجدول 1).

الجدول 1. تركيز الـ RNA الكلي المستخلص من عينات أوراق نبات العدس ونقاوته حسب قراءة المطياف الضوئي

السلالة	رقم العينة	تركيز الـ RNA (نانوغرام/ميكرولتر)	النقاوة (النسبة 280/260)
A1	1	1832	2.12
	2	688	2.04
A2	3	336	1.68
	4	464	2.07
A3	5	1264	1.9
	6	1440	2.0
A7	7	1400	1.98
	8	632	2.13
ILL5883	9	584	2.08
ILL5588	10	568	2.08
المتوسط		920.8	2.01

تعد التراكيز المستخلصة من الـ RNA كافية لإجراء عملية النسخ العكسي للحمض النووي الرسول بدءاً من الـ RNA الكلي، حيث تقترح الشركة الصانعة لمجموعة النسخ استخدام تراكيز تتراوح بين 0.5 – 5 ميكروغرام من الـ RNA الكلي (Fermentas, Germany). في حين تتطلب عملية النسخ العكسي استخدام RNA نقي من البروتينات، بحيث يكون قيمة مؤشر النقاوة حسب قراءة المطياف الضوئي تساوي 2.0 (Sambrook and Russel, 2001)، وقد تحقق ذلك في غالبية العينات، باستثناء العينة رقم 3 (من السلالة A2).

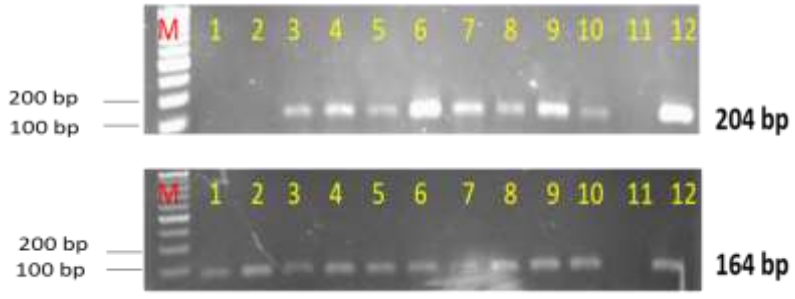
يمتص الـ RNA بقوة عند طول موجة 260 نانومتر، وتقيم نقاوته من النسبة A280/A260، وA230/A260، والتي يجب أن تكون > 1.9 لضمان نقاوتها من البروتينات، والمركبات العضوية. عندما تكون النسبة A280/A260 > 2.3، فإنها تشير إلى أن معظم الـ RNA قد تحطم (Claros and Cánovas , 1999).

2. التفاعل التسلسلي للبوليميراز للنسخ العكسي RT–PCR:

دُرِس تعبير المورثات المنقولة إلى نبات العدس بالمقارنة مع المورثة actin من خلال الكشف عن الحمض النووي الريبي الرسول mRNA الذي تنسخه هذه المورثات وذلك بعد تحويله إلى سلسلة DNA متممة complementary DNA (cDNA) بطريقة النسخ العكسي RT–PCR. أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز تركيز 1.2% لنواتج تفاعل الـ PCR باستخدام سلاسل الـ DNA المتممة لكل من المورثتين GST وactin كقالب لعملية المكاثرة، وبوساطة بادئات متخصصة على المورثات؛ الحصول على القطع المتوقعة من كل مورثة وهي بطول 204 زوج نكليوتيدي للمورثة GST، و164 زوجاً نكليوتيدياً للمورثة actin (الشكل 1). حيث ظهر تعبير المورثة actin في كل من النباتات المعدلة وراثياً ونبات الشاهد غير المعدل، ويعود ذلك إلى أن هذه المورثة موجودة أصلاً في النبات (مورثة داخلية المنشأ endogenous gene) ولها تعبير مستقر في جميع مراحل نمو النبات.

من الشائع أن يتم فحص النباتات المفترض أنها معدلة وراثياً لأول مرة بواسطة اختبار الـ PCR، ثم بواسطة اختبار تفاعل البوليميراز للنسخ العكسي RT–PCR، وذلك للكشف عن التعبير الوراثي للمورثات المنقولة.

تعد هذه الطريقة نوعية في الكشف عن تعبير المورثات المنقولة، والرغم من ذلك يلاحظ من قوة توهج الحزمة لتعبير المورثة actin تشابه تعبير المورثة في كل النباتات سواء المحورة أو غير المحورة، وهذا يعود لكونها مورثة داخلية ذات تعبير ثابت في جميع المراحل التطورية للنبات. في ذات الوقت نلاحظ أن هناك تبايناً في تعبير المورثة GST في نباتات العدس المحورة، حيث كان واضحاً في العينتين 6 و9 (الشكل 1)، والذي يفسر في حال استخدم نفس التركيز من الـ RNA في تركيب السلسلة المتممة؛ أن هناك تبايناً في تعبير المورثة نشأ عنه إنتاج عدد أكبر من نسخ الحمض النووي الريبي الرسول mRNA. إلا أن ذلك يبقى مرهوناً باستخدام تقنية أدق في التقدير الكمي لتعبير المورثات، وهي التفاعل التسلسلي للبوليميراز في الزمن الحقيقي real time PCR.



الشكل 1. الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز 1.2% لنواتج تفاعل الـ PCR لسلسلة الـ DNA المتممة (cDNA) للمورثتين GST (أعلى) و *actin* (أسفل) في العدس

M: مؤشر قياسي للوزن الجزيئي 100 زوج نكليوتيدي، المسارات 1–2: نباتات الشاهد، 3–10 نباتات عدس معدلة وراثياً (3–4: السلالة A1، 5–6: السلالة A2، 7–8: السلالة A3، 9–10: السلالة A7)، 11: عينة ماء (شاهد سلبي بدون DNA) ، 12: شاهد إيجابي (البلازميد pROKII).

يفيد اختبار التفاعل التسلسلي لناتج النسخ العكسي RT–PCR في الكشف عن ظاهرة إخماد المورثة gene silencing في مرحلة ما قبل النسخ Pre–transcription، وذلك نتيجة مَثْيلة Methylation الـ DNA مما يعيق عملية النسخ. تجدر الإشارة هنا إلى أن المورثة GST يتم دفعها بواسطة محضض بنيوي constitutive promoter، يعمل على تشغيلها بشكل مستمر دون الحاجة لوجود تحريض مسبق.

أظهر التحليل الجزيئي لفول الصويا (Christou *et al.*, 1998)، والأرز (Kohli *et al.*, 1998)، والقمح (Stöger *et al.*, 1999)، والذرة (Mehlo *et al.*, 2000) المعدلة وراثياً أنها تحتوي على تراكيب متنوعة للمواقع الوراثية للمورثات المنقولة، حيث تضمنت تراكيب سليمة، ومبتورة، وإعادة ترتيب داخلي للنسخ، وكذلك نسخ يتخللها الـ DNA الجينومي، وقد حدث ذلك بغض النظر عن طريقة التحوير المتبعة سواء كانت مباشرة أو باستخدام البكتريا Agrobacterium كوسيط.

أوضح تحليل وصمة سوثرن Southern blot لمنتجات طويلة من التفاعل التسلسلي للبوليميراز لموقع وراثي في الذرة الصفراء المعدلة وراثياً، تبعه عملية سَلْسَلة؛ أن عملية دخول الـ DNA الغريب في الجينوم كانت مترافقة وبشكل موسع مع عملية إعادة ترتيب للمورثات المنقولة حيث تضمنت عمليات اقتطاع، وحذوفات داخلية، وتداخلها مع الـ DNA الجينومي، وعمليات انعكاس لهذه النسخ (Mehlo *et al.*, 2000). تسبب عملية إعادة ترتيب النسخ المنقولة فقداً في تعبير المورثة، ولكن أحياناً تستطيع أن تعبر النسخ معادة الترتيب بشكل طبيعي عن البروتين. لذلك نادراً ماتؤخذ عملية إعادة ترتيب المورثة المنقولة بعين الاعتبار كعامل مسبب لتثبيط المورثة أو التباين في تعبيرها. وقد أظهرت الدراسات التي حاولت الربط بين عمليات إعادة الترتيب غير المكتشفة وعدد نسخ المورثة، أن لها تأثيراً قوياً في مستويات تعبير المورثة (Kohli *et al.*, 1999). قد تؤثر آليات إخماد التخلق المتوالي epigenetic silencing mechanisms بشكل مفرط عندما تكون عملية تثبيط المورثة المنقولة متسببة عن عملية إعادة الترتيب لهذه المورثات.

يؤثر العديد من المعقدات البروتينية سواءً بشكل مباشر أو غير مباشر في تركيب الكروماتين المحيط بالمورثات المنقولة، وقد يكون لذلك دور مهم في تعبير المورثة كما أظهرت الدراسات ذلك. وقد يكون هذا الأخير كنتيجة لنماذج التنظيم المختلفة للكروماتين في النواة. الاختلافات الحقيقية بين الأنواع بما يتعلق بتنظيم الكروماتين، كنتيجة لحجم الجينوم، ومحتواه من GC، يمكن أن تكون عوامل مؤثرة في تعبير المورثات المنقولة. مثيلة االحمض النووي DAN methylation، وتعديلات الهستونات بعد الترجمة؛ هي آليات رئيسية في التنظيم بوساطة الكروماتين للتعبير الجيني. يوجد أيضا دليل على أن التغيرات الكيميائية الحيوية مرتبطة بتغيرات فيزيائية في تنظيم الموقع الوراثي للمورثة المنقولة. ترتبط ظاهرة التخلق المتوالي والإخماد بمثل هذه التغيرات في تنظيم الموقع الوراثي وبالتالي تؤثر في التعبير الوراثي لهذه المورثات.

تكتسب هذه العوامل اليوم أهمية في تنظيم تعبير المورثة، إضافة إلى الأمور التي كانت تؤخذ بعين الاعتبار غير تلك المتعلقة بتسلسلات الـ DNA، وهي المعززات enhancers، والمحضضات promoters (Kohli *et al.*, 2006).

3. مقاومة مبيدات الأعشاب:

تباينت ردة فعل النباتات تجاه سمية المبيد وذلك تبعاً لنوع المبيد والتركيز المستخدم بالمقارنة مع السلالات الأبوية غير المعدلة وراثياً. ظهرت الأعراض بعد عشرة أيام من المعاملة وتراوحت ردة الفعل بين التحمل لهذه المبيدات، والسمية الخفيفة التي ظهرت على شكل اصفرار في أوراق النبات، وموت النباتات بالكامل (الجدول 2، 3)، (الشكل 2).

الجدول 2. تأثير المبيد 2,4-D في سلالات العدس المختبرة

المبيد	السلالة	التركيز			
		0 ميلي مولر	0.5 ميلي مولر	1 ميلي مولر	2 ميلي مولر
2,4-D	A2	لا يوجد تأثير	اصفرار طفيف على الأوراق	اصفرار وموت النبات	موت الأوراق بالكامل
	A3	لا يوجد تأثير	لا يوجد تأثير	لا يوجد تأثير	اصفرار طفيف على الأوراق
	ILL5883	لا يوجد تأثير	اصفرار طفيف على الأوراق	اصفرار الأوراق وموتها	موت الأوراق بالكامل
	A7	لا يوجد تأثير	لا يوجد تأثير	لا يوجد تأثير	لا يوجد تأثير
	ILL5588	لا يوجد تأثير	اصفرار طفيف على الأوراق	شحوب عام للأوراق وموت بعض الوريقات	موت الأوراق بالكامل

الجدول 3. تأثير المبيد غليفوسات في سلالات العدس المختبرة

المبيد	السلالة	التركيز			
		0 ميلي مولر	0.5 ميلي مولر	1 ميلي مولر	2 ميلي مولر
غليفوسات	A2	لا يوجد تأثير	لا يوجد تأثير	اصفرار طفيف على الأوراق	اصفرار معظم الوريقات وبقاء بعضها خضراء
	A3	لا يوجد تأثير	اصفرار طفيف على الأوراق	اصفرار الأوراق وموت حوافها	موت الأوراق بالكامل
	ILL5883	لا يوجد تأثير	اصفرار طفيف على الأوراق	اصفرار الأوراق وموت حوافها	اصفرار معظم الوريقات وبقاء بعضها خضراء
	A7	لا يوجد تأثير	لا يوجد تأثير	لا يوجد تأثير	اصفرار بعض الوريقات
	ILL5588	لا يوجد تأثير	اصفرار طفيف للأوراق	موت معظم الوريقات	موت النبات بالكامل

الشكل 2. تحمل سلالات العدس للرش بتراكيز مختلفة من المبيدين غليفوسات و 2,4-D

بشكل عام كان هناك تحسن في تحمل النباتات الحاوية على المورثة GST/GPX لمبيدي الأعشاب 2,4–D و غليفوسات، كأحد مسببات إجهادات الأكسدة اللاأحيائية، الأمر الذي قد يؤمن حماية لهذه النباتات من التراكيز المنخفضة للمبيدات التي قد تنجرف إليها أثناء عملية الرش في الحقول المجاورة، أو من بقايا المبيدات في خزان المرش.

تسبب أيضاً المبيدات مثل المبيدات الحشرية والفطرية إجهاد أكسدة للنبات عند استخدامها بتراكيز مرتفعة أعلى من تلك الموصى باستخدامها، وتظهر على شكل أعراض سمية وبالتالي قد تساهم هذه المورثة في التقليل من آثار السمية المتسببة عن استخدام مثل هذه المبيدات وزيادة هامش الأمان في تطبيق المبيد بين الجرعة المطلوبة لمكافحة الآفة وحساسية النبات للمبيد المستخدم.

برزت الهندسة الوراثية كواحدة من أهم التقنيات المستخدمة في العصر الحديث في تطوير نباتات مقاومة لمبيد الأعشاب، حيث أمكن تطوير نباتات عدس مقاومة لمبيد الأعشاب غلوفوسينيت أمونيوم، عن طريق نقل المورثة bar التي تعمل على تعطيل عمل هذا المبيد في النبات (Khatib *et al.*, 2007).

تضم آلية إزالة السموم من مبيدات الأعشاب النباتية نظاماً لإزالة السموم من ثلاث مراحل (Yuan *et al.* 2007)، يشمل عائلات أنزيمية محددة في كل مرحلة. في المرحلة الأولى، تنتمي عائلة الأنزيم الرئيسية إلى السيتوكروم P450 أحادي الأكسجين (CYPs)، في المرحلة الثانية، GSTs و (GTs) glycosyltransferases، اللذان يحفزان اقتران الكائنات الغريبة مع GSH والغلوكوز، على التوالي. ينشأ عن هذا الاقتران، في المرحلة الثالثة، إفراز المواد الغريبة الحيوية من السيتوبلازم وتقسيمه في الفجوة بواسطة بروتينات نقل مرتبطة بـATP متخصصة (ABC) (Rea, 2007; Schröder *et al.*, 2007; Pang *et al.*, 2012; Burla *et al.*, 2013). وبالتالي، فمن الواضح أن GSTs لها دور رئيسي في نظام إزالة السموم ثلاثي المراحل، حيث أن المكونات الغريبة المرتبطة بالـ GSH أصبحت غير سامة بشكل غير عكوس، ويمكن أن تكون في متناول المزيد من الإجراءات الاستقلابية الأخرى (Duhoux *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017).

4. تقويم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام DPPH:

أظهرت النتائج وجود تثبيط للجذور الحرة في محلول الإيثانول المستخدم كمذيب للجذر الحر DPPH، حيث تحول لون الشاهد الإيجابي إلى اللون الأصفر الباهت عند إضافة الركيزة DPPH مباشرة على التركيز المطلوب من المستخلص النباتي، بينما حافظ الشاهد السلبي على اللون البنفسجي بعد التحضين لمدة 30 دقيقة.

تباينت المعاملات المدروسة في نشاط التثبيط للجذور الحرة حيث لوحظ تغير اللون في جميع المعاملات بما فيها نباتات سلالتي الشاهد عند أعلى تركيزين (1000 و 500 ميكروغرام/مل).

أظهر تحليل التباين ANOVA وجود فروق معنوية بين المعاملات المدروسة (Pr <0.001)، وبين التراكيز المستخدمة (Pr <0.001)، وكذلك في الفعل المتبادل بين التركيز والمعاملة (Pr <0.001).

عند مقارنة متوسطات التراكيز المدروسة؛ تفوقت السلالة المعدلة وراثياً A7 في متوسط النسبة المئوية للتثبيط (79.4%)، وبفروق معنوية على السلالة الأبوية ILL5588 (67.2%). كما سجلت فروق معنوية على نحو مختلف بتفوق السلالة الأبوية ILL5883 معنوياً (81.7%)، على السلالات الثلاث المعدلة وراثياً المشتقة منها A1 (78.3%)، A2 (79.7%)، A3 (79.5%)، ودون أن يكون بين هذه الأخيرة فروقاً معنوية فيما بينها.

سجلت فروق معنوية بين جميع السلالات المدروسة سواء كان معدلة أو غير معدل وراثياً، وبين الغلوكوز (17.8-%) كشاهد سلبي لا يمتلك القدرة على تنظيف الجذور الحرة في الوسط. في حين تفوق الشاهد الإيجابي فيتامين C كمضاد أكسدة قوي في تثبيط الجذور الحرة وبفروق معنوية (95.7%) على جميع المعاملات المدروسة (الجدول 4).

الجدول 4. النسبة المئوية لتثبيط الجذور الحرة في مستخلص لأوراق من سلالات نباتات العدس المدروسة

التركيز (ميكروغرام/مل)	النسبة المئوية للتثبيط Inhibition (%)							
	A1	A2	A3	A7	ILL5883	ILL5588	غلوكوز	فيتامين C
1000	72.9	77.9	69.2	84.0	89.7	84.0	-14.0	100.0
500	80.4	80.4	72.9	83.3	84.9	81.9	-12.0	100.0
250	81.1	79.2	80.0	82.5	84.7	72.6	-13.0	100.0
125	80.6	80.4	81.2	74.1	80.7	75.4	-14.0	100.0
62.5	80.4	79.4	81.8	78.8	80.9	76.1	-15.0	99.0
31.25	79.4	78.2	80.6	77.9	79.2	75.0	-16.0	98.4
15.63	79.5	75.8	80.3	78.0	79.2	54.6	-18.0	91.8
7.81	75.7	81.9	81.9	78.5	79.2	53.0	-21.0	87.4
3.91	75.2	82.7	84.6	77.6	79.2	50.1	-25.0	91.6
1.95	77.6	80.7	82.7	79.2	79.2	48.9	-30.2	88.7
المتوسط	78.3^{c}	79.7^{cd}	79.5^{cd}	79.4^{c}	81.7^{d}	67.2^{b}	-17.8^{a}	95.7^{e}
أقل فرق معنوي L.S.D	المعاملات: 1.42			التراكيز: 0.60		التركيز × المعاملة: 2.08		

تم من خلال هذا الاختبار تأكيد دور المورثة GST في تنظيف المحلول من الجذور الحرة. استخدم هذا الاختبار في دراسة التأثير المضاد للأكسدة عند نباتات يعرف عنها التأثير المضاد للأكسدة عند الإنسان مثل الشاي الأخضر وذلك بقراءة الامتصاصية ست مرات بفاصل 15 دقيقة. أظهرت النتائج تفوق هذه المادة كمضاد أكسدة حيث كان النشاط أعظمياً بعد 30 دقيقة من المعاملة بالركيزة DPPH، ثم بدأ بالتباطؤ بعد مرور 60 دقيقة على المعاملة (De Torre *et al.*, 2019). لكن لم تشر الدراسات المرجعية إلى استخدام هذا الاختبار من قبل في تقييم النشاط المضاد للأكسدة عند نباتات معدلة وراثياً بمورثات معروفة بنشاطها المضاد للأكسدة.

الاستنتاجات:

- نجاح تعبير المورثة GST في مرحلة النسخ إلى mRNA وعدم إخمادها في هذه المرحلة.
- اختلاف تعبير المورثة المنقولة GST بين سلالات العدس المدروسة.
- تحسن تحمل النباتات الحاوية على المورثة GST/GPX لمبيدي الأعشاب 2,4-D وغليفوسات.
- تفوق السلالة A7 في تحمل مبيدي الأعشاب عند التراكيز 0.5، 1، 2 ميلي مولر مقارنة مع السلالة الأبوية ILL5588.
- تأكيد دور المورثة GST كمضاد أكسدة، وذلك من خلال تثبيط الجذر الحر DPPH، ولكن تباين ذلك تبعاً للنمط الوراثي للسلالة المدروسة.

التوصيات:

- التقدير الكمي لتعبير المورثة المنقولة في السلالات المختلفة بواسطة التفاعل التسلسلي للبوليميراز بالزمن الحقيقي real time PCR.
- الكشف عن تعبير المورثة في مرحلة الترجمة إلى بروتين.

- اختبار تحمل السلالات لتراكيز مرتفعة من مبيدات الفطور والحشرات المستخدمة على العدس.
- اختبار تحمل السلالات لإجهادات لا أحيائية أخرى مثل الملوحة.

المراجع:

Alam, M.N.; N.J. Bristi; and M. Rafiquzzaman (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmceutical Journal. 21, 143–152

Burla, B.; S. Pfrunder; R. Nagy; R.M. Francisco; Y. Lee; and E. Martinoia (2013). Vacuolar transport of abscisic acid glucosyl ester is mediated by ATP-binding cassette and proton-antiport mechanisms in Arabidopsis. Plant Physiology. 163:1446–1458.

Chang, C.C.; I. Slesak; L. Jorda; A. Sotnikov; M. Melzer; Z. Miszalaski; P.M. Mullineaux; J.E. parker; B. Karpinska; and S. Karpinski (2009). *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses. Plant Physiol. 150: 670–683.

Chen. S.; Z. Vaghchhipawala; W. Li; H. Asard; and M.B. Dickman (2004). Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants. Plant Physiol. 135: 1630–1641.

Christou, P.; W.F. Swain; N.S. Yang; and D.E. McCabe (1989). Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 86:7500-7504.

Claros, M.G.; and F.M. Cánovas (1999). RNA isolation from plant tissues: a practical experience for biological undergraduates. Biochemical Education. 27 : 110-113

Cummins, I.; D.J. Cole; and R. Edwards (1999). A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. The Plant Journal. 18: 285–292.

De Torre, M.P.; R.Y. Rita Yolanda Cavero; M.I. María Isabel Calvo; and J.L. Vizmanos (2019). A Simple and a Reliable Method to Quantify Antioxidant Activity In Vivo. Antioxidants. 8 (142): 1-11.

Depege, N.; M. Varenne; and N. Boyer (2000). Induction of oxidative stress and GPX-like protein activation in tomato plants after mechanical stimulation. Physiol Plantarum: 209–214.

Desikan, R.; A. Reynolds; J.T. Hancock; and S.J. Neill (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspension cultures. Biochemical journal. 330:115-120.

Duhoux, A.; S. Carrère; A. Duhoux; and C. Délye (2017). Transcriptional markers enable identification of rye-grass (Lolium sp.) plants with non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase. Plant Science. 257:22–36

Frear, D.S.; and Swanson H.R. (1970). Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6isopropyl-amino-2-s-triazino) glutathione: partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. Phytochemistry 9: 2123–2132. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85377-7

Gaber, A.; T. Ogata; T. Maruta; K. Yoshimura; M. Tamoi; and S. Shigeoka (2012). The involvement of *Arabidopsis* glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damage in the nucleus and cytosol. Plant Cell Physiol. 53: 1596–1606.

Karavangeli, M.; N.E. Labrou; Y.D. Clonis; and A. Tsaftaris (2005). Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione *S*-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. Biomolecular Engineering. 22:121-128.

Khatib, F.; S. Koudsieh; B. Ghazal; J.E. Barton; H. Tsujimoto; and M. Baum (2007). Developing Herbicide Resistant Lentil (Lens culinaris Medikus subsp. culinaris) through Agrobacterium Mediated Transformation. Arab Journal of Plant Protection. 25: 185-192.

Kohli, A.; D. Gahakwa; P.Vain; D.A. Laurie; and P. Christou (1999). Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. Planta, 208:88-97.

Kohli, A.; M. Leech; P. Vain; D.A. Laurie; and P. Christou (1998). Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot-spots. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 95:7203-7208

Kohli, A.; P. G. Melendi; R. Abranches; T. Capell; E. Stoger; and P. Christou (2006). The Quest to Understand the Basis and Mechanisms that Control Expression of Introduced Transgenes in Crop Plants. Plant Signaling & Behavior. 1(4): 185-195.

Levine, A.; R. Tenhaken; R. Dixon; and C. Lamb (1994). H O from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell. 79:583–593.

Li, D.; L. Xu; S. Pang; Z. Liu; K. Wang; and C. Wang (2017). Variable levels of glutathione S-transferases are responsible for the differential tolerance to metolachlor between maize (Zea mays) shoots and roots. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 65:39–44.

Li, W.J.; H. Feng; J.H. Fan; R.Q. Zhang; N.M. Zhao; and J.Y. Liu (2000). Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa*. Biochim Biophys Acta. 1493: 225–230.

Martinoia, E.; E. Grill; R. Tommasini; K. Kreuz; and N. Amrhein (1993). ATP dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. Nature. 364: 247–249. doi: 10.1038/364247a0.

McCord, J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. The American journal of meicine. 108:652-659.

Mehlo, L.; G. Mazithulela; R.M. Twyman; M.I. Boulton; J. Davies; and P. Christou (2000). Structural analysis of transgene rearrangements and effects on expression in transgenic maize plants generated by particle bombardment. Maydica, 45:277-287.

Milligan, A.S.; A. Daly; M.A.J. Parry; P.A. Lazzeri; and I. Jepson (2001) The expression of a maize glutathione S-transferase in transgenic wheat confers herbicide tolerance, both in planta and in vivo. Molecular Breeding;7:301–5

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7: 405–410.

Pang, S.; L. Duan; Z. Liu; X. Song; X. Li; and C. Wang (2012). Co-induction of a glutathione-s-transferase, a glutathione transporter and an ABC transporter in maize by xenobiotics. PLoS One 7:e40712

Rea, P.A. (2007). Plant ATP-binding cassette transporters. Annual Review of Plant Biology 58:347–375.

Riechers, D.E.; K. Kreuz; and Q. Zhang (2010) Detoxification without intoxication: herbicide safeners activate plant defense gene expression. Plant Physiology.153, 3–13.

Roxas, V.P.; S.A. Lodhi; D.K. Garrett; J.R. Mahan; and R.D. Allen (2000). Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione Stransferase/glutathione peroxidase. Plant Cell Physiol. 41: 1229–1234.

Sambrook, J.; and D.W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schmittgen, T.D.; B.A. Zakrajsek; A.G. Mills; V. Gorn; M.J. Singer; and M.W. Reed (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. Analytical Biochemistry. 285 (2): 194–204.

Schröder, P.; C.E. Scheer; F. Diekmann; and A. Stampfl (2007). How plants cope with foreign compounds –translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (Hordeum vulgare). Environmental Science and Pollution. 14:114–122.

Stewart, C. N.(2008). Plant biotechnology and genetics: Principles, Techniques and Applications, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.

Stöger, E.; S. Williams; D. Keen; and P. Christou (1999). Constitutive versus seed specific expression in transgenic wheat: temporal and spatial control. Transgenic Research. 8:73-82.

Visarada, K.B.R.S; K. Mena; C.R. Arenua; S. Srujana; N.Saikishore; and N.Seetharama (2009). Transgenic breeding:prospectives and prospects, crop science, 49:1555-1563.

Yuan, J.S.; P.J. Tranel; and CN. Jr. Stewart (2007) Non-target-site herbicide resistance: a family business.Trends . Plant Science 12:6–13.

Molecular and functional analysis of Glutathion transferase gene in lentil *Lens culinaris* Medik.

Fateh Khatib[(1)] and Tasneem Khayata Bsata*[(1)]

(1) Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Aleppo University. Aleppo, Syria.

(*corresponding author: Tasneem Bsata E-Mail: simobsat@gmail.com).

Received: 31/05/2020 Accepted: 7/07/2020

Abstract

Lentil crop is exposed to many environmental stresses, which reduce its productivity. Genetic engineering was used in gene transferring from different organisms into plants; in a way that cannot be achieved by conventional breeding. Mainly, gene transferring enhanced the performance of plants in the field as well as their tolerance to some of biotic and abiotic stresses. Glutathione S-Transferase (GST) genes are characterized by their ability to detoxify xenobiotics including herbicides. GST enzyme is considered as one of the antioxidant enzymes, which scavenge the reactive oxygen species (ROS). In this study, The Reverse Transcription technique was used to detect the expression of GST gene in lentil, comparing to actin as an endogenous gene. Furthermore, the antioxidant activity of GST enzymes was tested in inhibiting the free radical substrate DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhdrazyl). The result of reverse transcription (RT)-PCR detected the expression of GST gene in the transgenic plants, which indicates the transcription into mRNA and the fact that no pre-transcription silencing at this stage was occurred. The transgenic line A7 exhibited tolerance to glyphosate and 2.4-D herbicides with 0.5, 1, 2 mM. Different inhibition percentages were scored according to the event of the transgenic lines. The Statistical analysis showed significant differences in the rate of inhibition of free radical DPPH, between the line A7 and the parental line ILL5588, where they reached 79.4% and 67.2%, respectively. Thus, the line A7 can be used in extended experiments under some biotic or abiotic stresses which may reveal the value of the transgene.

Key words: gene expression, reverse transcription, oxidative stress, reactive oxygen species, lentil.