

الاستجابة البيوكيميائية لبعض طرز الحمص لإجهاد الجفاف

روعه عيوش* (1) وفيصل بكور (2) ولينا النداف (2)

(1). مركز بحوث التقنيات، جامعة البعث، حمص، سورية.

(2). كلية الهندسة الزراعية، جامعة البعث، حمص، سورية.

(*للمراسلة: الباحثة روعة عيوش. البريد الإلكتروني: rawaayoush1987@gmail.com).

تاريخ القبول: 2021/01/28

تاريخ الاستلام: 2020/09/16

الملخص

نُفذت تجربة حقلية في قرية جندر التابعة لمدينة حمص وأُجريت التحاليل الكيميائية في مركز بحوث التقنيات الحيوية التابع لجامعة البعث عام 2019، بهدف دراسة التغير في بعض الصفات البيوكيميائية (محتوى الأوراق من البرولين (pro) - بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) - نشاط أنزيم الكاتلاز (CAT)) عند الري بمستويات مختلفة من السعة الحقلية، وتحديد مدى إمكانية اعتماد هذه المؤشرات كوسيلة كشف سريعة عن الطرز الوراثية المحتملة لاستخدامها لاحقاً في برامج التربية. زُرعت البذور في أكياس مصنوعة من البولي إيثيلين ووضعت تحت مظلة شفافة وذلك لتفادي تعرض النباتات للأمطار، استعمل في التجربة التصميم العشوائي الكامل (CRD)، وبثلاثة مكررات، احتوت كل معاملة على عشرين كيساً، وبذلك بلغ عدد أكياس التجربة 480 كيساً، وتم الري بانتظام عند وصول الرطوبة الأرضية إلى 75% من السعة الحقلية للنباتات غير المجهدة و40% للنباتات المجهدة، تم دراسة المؤشرات المذكورة في نهاية مرحلة الإزهار وأظهرت النتائج زيادة معنوية في كل الصفات المدروسة عند معاملة الري عند السعة الحقلية 40% مقارنة بالمعاملة 75%، كما أظهرت النتائج أن الطرز المحتملة (غاب 5 وغاب 4) حققت نسبة زيادة عالية معنوياً لأنزيم الكاتلاز (CAT) مقارنة بالطرزين الحساسين ونسبة زيادة أقل من الجذر الحر بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) تحت ظروف الإجهاد، في حين كان دور البرولين متفاوتاً بين الطرز الوراثية فقد انخفض معنوياً عند الطراز المتحمل غاب 5 وارتفع معنوياً عند الطراز الحساس LIC3279 بينما كان محتواه أعلى معنوياً عند الطراز المتحمل غاب 4 مقارنة بالطرزين الحساس البلدي الربيعي.

الكلمات المفتاحية: الحمص - إجهاد الجفاف - الكاتلاز - البرولين - بيروكسيد الهيدروجين.

المقدمة:

يؤدي تعرض النباتات لإجهاد الجفاف إلى إجهادها تأكسدياً (Pinheiro and Chaves, 2014)، حيث يُعرف الإجهاد التأكسدي بأنه عملية تشكل أنواع الأكسجين التفاعلية (Reactive oxygen species: ROS) نتيجة تعرّض النباتات لظروف النمو غير المناسبة، مثل الجفاف، والحرارة المرتفعة، والملوحة. يُعد الماء الأوكسجيني Hydrogen peroxide (H_2O_2) في النباتات من أكثر جذور الأوكسجين الحرة النشطة ثباتاً، ويؤدي دوراً مزدوجاً، فهو عند التراكيز المنخفضة يلعب دوراً كإشارة تأقلمية Acclamatory signal، تُمكن النباتات من تحمل الإجهادات (Mittler *et al.*, 2004; Fukao and Bailey-Serres, 2008)، وعند التراكيز المرتفعة فإنه ينظم عملية الموت المبرمج للخلايا النباتية (Apoptosis) (Dat *et al.*, 2000). طورت النباتات لحماية أنفسها من أنواع ROS السامة أنظمة فعالة تشمل الأنزيمات المضادة للتأكسد ROS-scavising بما في ذلك سوبر أكسيد ديسموتاز (Superoxide dismutase: SOD)، الكاتلاز (Catalase: CAT)، بيروكسيداز (Peroxidase POD)، أسكوريات بيروكسيداز (Ascorbate peroxidase: APX) و مضادات التأكسد غير الأنزيمية بما في ذلك حمض الأسكوربيك، الجلوتاثيون، الكاروتينات، وتوكوفيرول (Ashraf, 2009; Singh *et al.*, 2012; El-Rahman *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016). أثبت العديد من الباحثين أن تخليق مضادات التأكسد الأنزيمية مهم لتحمل إجهاد الجفاف (Miller *et al.*, 2010; Chugh *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012)، ويُعد أنزيم الكاتلاز من أهم هذه المضادات حيث يقوم بتفكيك بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء وأكسجين (Zhu and Shinozaki, 2004)، ويزداد نشاطه عند التعرض للجفاف (Mohammadi *et al.*, 2011; Shafei, 2005) ويكون أعلى بشكل ملحوظ في أصناف الحمص المقاومة للجفاف مقارنة بتلك الحساسة (Oberoi *et al.*, 2014). يُعد التعديل الحلولي Osmotic adjustment (OA) أيضاً أحد الآليات التي تستعملها النباتات استجابةً لظروف الإجهاد المائي، وذلك من خلال تصنيع الذائبات العضوية التوافقية التي تعمل على خفض الكون المائي داخل الخلايا النباتية، والمحافظة على التدرج في الكون المائي الضروري لاستمرار تدفق الماء وامتصاصه من قبل المجموعة الجذرية، وترتبط المقدرة على التعديل الحلولي بتحسين تحمل النباتات للإجهادات غير الاحيائية (الجفاف، والحرارة المرتفعة، والملوحة ... وغيرها) في العديد من الأنواع النباتية Chimenti *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). يعد البرولين أهم الذائبات العضوية ويتراكم بشكلٍ طبيعي تحت ظروف الإجهاد، ويختلف تركيزه حسب النوع النباتي/الطرز الوراثي ومقدرته على تحمل الإجهاد، حيث يزداد عادةً تركيزه في الأنواع النباتية المتحملة للإجهاد بالمقارنة مع الأنواع الحساسة، ولكن يُمكن أن تصنّع الطرز الوراثية الحساسة للإجهاد أحياناً كميات أكبر من البرولين، وهنا يكون تراكم البرولين مرتبط مع حجم الضرر وليس مستوى التحمل (Kavi Kishore *et al.*, 2005). تختلف النباتات في مدى تحملها للإجهاد خلال مراحل النمو المختلفة، وقد أجريت هذه الدراسة لمعرفة التغيرات البيوكيميائية التي تحدث أثناء تعرض طرز الحمص للجفاف في مرحلة الإزهار باعتبارها مرحلة حرجة من عمر النبات ويمكن أن يؤدي الإجهاد الشديد في هذه المرحلة إلى الحد من عدد القرون على النبات وبالتالي الحد من الغلة، وإمكانية اعتماد حجم الضرر الناتج عن عمليات التأكسد بتقدير محتوى الأوراق من بيروكسيد الهيدروجين (الماء الأوكسجيني) كونه مؤكسد قوي لمكونات الخلية، ونسبة الزيادة في نشاط أنزيم الكاتلاز كمضاد للتأكسد والزيادة في محتوى البرولين كمؤشرات انتقائية للأصناف المتحملة للجفاف ما يخفف العبء على مربي النبات، وإمكانية تتبع المورثات المسؤولة عن هذه الصفات التي تحسن من تحمل الحمص للجفاف.

مواد البحث وطرائقه:

نفذت التجربة في قرية جندر الواقعة إلى الجنوب من مدينة حمص، بينما أجريت التحاليل الكيميائية في مركز بحوث التقنيات الحيوية في جامعة البعث. تضمنت المادة النباتية أربعة طرز من الحمص تم الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية صنفت بناء على مؤشر الحساسية للجفاف (DSI) Drought sensitivity index كما ورد في (Gunes *et al.*, 2008; Johal *et al.*, 2020) (الجدول، 1):

الجدول (1):الطرز النباتية المستخدمة

الطرز	DSI	حساس/متحمل
البلدي الربيعي	1.34	حساس
غاب 4	0.9	متحمل
غاب 5	0.86	متحمل
LIC3279	2.01	حساس

تمت الزراعة في شهر شباط 2019 في أكياس مصنوعة من البولي ايثيلين قطرها 20 سم وارتفاعها 40 سم وتم تعبئتها بالتربة حتى ارتفاع 35سم، وتمت زراعة 4 بذور في منتصف كل كيس على عمق 2-3 سم، تم تفريد النباتات إلى نبات في كل كيس، وإجراء عملية التعشيب بشكل دوري للتخلص من الأعشاب الضارة التي يمكن تنمو في الأكياس، أما الري فتمت إضافة كميات محسوبة من المياه عند الوصول إلى السعة الحقلية المطلوبة لكل معاملة، ولم يتم استخدام أي نوع من الأسمدة وذلك لأن التربة المستخدمة كانت جيدة المحتوى من الآزوت والفوسفور والبوتاسيوم والجدول التالي (2) يبين التحليل الكيميائي والفيزيائي للتربة:

الجدول (2) بعض الصفات الفيزيائية والكيميائية لتربة الزراعة

التحليل الكيميائي							التحليل الفيزيائي		
%Caco3	ppm KOH	P2O5 Ppm	الأزوت Ppm	PH	EC dS.m ⁻¹	مادة عضوية %	طين %	سلت %	رمل %
0.92	648	33	44.88	8.03	0.14	1.2	48.6	21.3	30.2

صممت التجربة وفق التصميم العشوائي الكامل (CRD)، وبثلاثة مكررات، احتوت كل معاملة على عشرين كيساً، وبذلك بلغ عدد أكياس التجربة 480 كيساً.

المؤشرات البيوكيميائية في نهاية مرحلة الإزهار:

1. تركيز الحمض الأميني البرولين (ميكروغرام.غ⁻¹وزن رطب):

حل البرولين Proline حسب طريقة (Bates *et al.*, 1973)، حيث تم أخذ وزن من الأوراق الغضة 0.5 غ طحنت، ثم مزجت مع 10 مل من محلول حمض السلفوسالسيك (sulphosalicylic acid) 3% ووضعت في جهاز الطرد المركزي 2000 دورة/دقيقة ثم رشح المخروط، وأخذ 2 مل من الرشاحة ووضع عليه 2 مل من حمض الخل و 2 مل من النينهيدرين (Ninhydrin)، ثم وضع لمدة ساعة في حمام مائي درجة حرارته 100 م، وبعد التبريد مباشرة في حمام ثلجي لوقف التفاعل، أضيف للمزيج 4 مل من التولوين، ومزج بشكل جيد لمدة عشرين ثانية، وترك في درجة حرارة الغرفة، تفصل طبقة من التولوين (Toluene) وماتحمله من البرولين فوق

المخلوط، أخذ من هذه الطبقة 3مل ثم تم قياس البرولين بواسطة جهاز مقياس الطيف الضوئي بطول موجة 520 نانومتر وقورن مع منحني قياسي للبرولين النقي.

ثانياً- تقدير نشاط أنزيم الكاتالاز (CAT) (ميكروغرام.غ⁻¹ وزن رطب):

تم تحضير المستخلص الأنزيمي الذي يمكن تقدير نشاط كافة الأنزيمات فيه عن طريق أخذ 0.5 غ من الأوراق من النبات وسحقها مباشرة في هاون خزفي بعد إضافة 10 مل فوسفات البوتاسيوم (phosphate potassium) 0.1 M و PH=7.8 والتثقيب لمدة 10 دقائق 5000 دور/د على درجة حرارة 4 درجة مئوية (Pitotti *et al.*,1995)

تم تقدير نشاط أنزيم الكاتالاز حسب طريقة (Aebi,1974) أخذ 100 µl من المستخلص الأنزيمي ونضيفه إلى محلول التفاعل الحاوي على 1.9 مل فوسفات البوتاسيوم بتركيز 50 mM و pH=7 و 1مل H₂O₂ تركيز 30 mM وقياس الامتصاص عند طول موجة 240 نانومتر وتتبع التغير في الامتصاصية لمدة ثلاث دقائق.

ثالثاً- قياس محتوى النباتات من H₂O₂ (ميكرومول.غ⁻¹ وزن رطب):

تم قياس محتوى النبات من H₂O₂ حسب (Velikova *et al.*,2000)، حيث تمت إضافة 5 مل من حمض الخليك ثلاثي الكلور (TCA (Trichloroacetic acid) بتركيز 0.1% وزن/ حجم الى 0.5 غ من مسحوق الأوراق، أخذ 500 ميكروليتر من الرشاحة الناتجة بعد التثقيب وأضيف لها 500 ميكروليتر من محلول فوسفات البوتاسيوم تركيز 0.01 M عند pH=7 و 500 ميكروليتر من يود البوتاسيوم تركيز 1 M، وتم قراءة امتصاص العينة للأشعة الضوئية عند طول موجة 390 نانومتر بواسطة مقياس الطيف الضوئي.

6- التحليل الإحصائي:

تم تحليل البيانات إحصائياً باستخدام برنامج GENSTAT11 لتحديد معامل الاختلاف وتحديد معنوية القيم المدروسة، واستخدام اختبار LSD لمقارنة المتوسطات وتحديد معنوية الفروق فيما بينها على المستوى 1%.

النتائج:

الجدول رقم (3): محتوى الأوراق من البرولين (ميكرو مول .غ⁻¹ وزن رطب) لدى بعض طرز الحمص عند معاملتي الري

متوسط A	الزيادة %	معاملة الري B		الطرز A
		%75	%40	
4.69 ^a	90.18 ^c	0.84	8.55	ربيعي
4.20 ^c	94.61 ^b	0.43	7.98	غاب 4
0.66 ^d	80.00 ^d	0.22	1.10	غاب 5
4.40 ^b	98.50 ^a	0.13	8.67	ILC3279
-	93.92	0.40 ^b	6.58 ^a	متوسط B
A*B	-	B	A	LSD 0.01
0.040	0.4989	0.020	0.028	

تُشير الأحرف المتماثلة على مستوى السطر أو العمود أمام المتوسطات إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.01.

2. تأثير إجهاد الجفاف في محتوى الأوراق من بيروكسيد الهيدروجين (ميكرو مول .غ⁻¹ وزن رطب)

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.01$) في صفة محتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني (H₂O₂) بين معاملتي الري، والطرز الوراثية المدروسة والتفاعل المتبادل بينهما. كان متوسط محتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني (H₂O₂) الأعلى

معنوياً عند معاملة الإجهاد (31.80 ميكرو مول . غ⁻¹ وزن رطب)، وبنسبة زيادة (60.85%) على المعاملة 75% الأدنى معنوياً (12.45 ميكرو مول . غ⁻¹ وزن رطب). وكانت نسبة الزيادة في محتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني (H₂O₂) الأعلى معنوياً لدى الطراز الوراثي البلدي الربيعي (78.67%)، تلاه وبفروقاتٍ معنوية الطراز الوراثي LIC3279 (64.78%)، ثم وبفروقاتٍ معنوية الطراز الوراثي غاب 5 (48.62%)، في حين كان نسبة الزيادة الأدنى معنوياً لدى الطراز الوراثي غاب 4 (37.13%)، وسلكت الطرز السلوك نفسه من حيث المتوسطات في صفة محتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني (H₂O₂) (22.23، 25.93، 21.68، 18.66 ميكرو مول . غ⁻¹ وزن رطب) عند الطرز البلدي الربيعي، LIC3279، غاب 5 وغاب 4 على التوالي مرتبة من الأعلى معنوياً إلى الأدنى معنوياً.

الجدول رقم (4): محتوى الأوراق من بيروكسيد الهيدروجين (ميكرو مول . غ⁻¹ وزن رطب) لدى بعض طرز الحمص عند معاملي الري

الطرز A	متوسط A	معاملة الري B		
		الزيادة %	%75	%40
ربيعي	25.93 ^a	78.67 ^a	9.12	42.75
غاب 4	18.66 ^d	37.13 ^d	14.41	22.92
غاب 5	21.68 ^c	48.62 ^c	14.72	28.65
ILC3279	22.23 ^b	64.78 ^b	11.58	32.88
متوسط B	-	60.85	12.45 ^a	31.80 ^b
A*B		-	B	A
1.108		3.264	0.554	0.783
LSD 0.01				

تُشير الأحرف المتماثلة على مستوى السطر أو العمود أمام المتوسطات إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.01.

3. تأثير إجهاد الجفاف في نشاط أنزيم الكاتلاز (ميكرو غرام . غ⁻¹ وزن رطب)

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.01$) في صفة نشاط أنزيم الكاتلاز بين معاملي الري، والطرز الوراثية المدروسة، والتفاعل المتبادل بينهما. كان نشاط الكاتلاز الأعلى معنوياً عند معاملة الإجهاد (1.22 ميكروغرام . غ⁻¹ وزن رطب)، وبنسبة زيادة (47.54%) على المعاملة 75% الأدنى معنوياً (0.64 ميكروغرام . غ⁻¹ وزن رطب). وكانت الزيادة في نشاط الكاتلاز الأعلى معنوياً لدى الطراز غاب 5 (59.30%)، تلاه وبفروقاتٍ معنوية الطراز الوراثي غاب 4 (48.65%)، ثم وبفروقاتٍ معنوية الطرازين الوراثيين البلدي الربيعي والسلالة ILC3279 (38.20، 38.14%)، وبدون فروقاتٍ معنوية بينهما.

الجدول رقم (5): نشاط أنزيم الكاتلاز في الأوراق (ميكرو غرام . غ⁻¹ وزن رطب) لدى بعض طرز الحمص عند معاملي الري

الطرز A	متوسط A	الإجهاد B		
		الزيادة %	%75	%40
ربيعي	0.95 ^b	38.14 ^c	0.73	1.18
غاب 4	0.84 ^c	48.65 ^b	0.57	1.11
غاب 5	1.21 ^a	59.30 ^a	0.70	1.72
ILC3279	0.72 ^c	38.20 ^c	0.55	0.89
متوسط B	-	47.54	0.64 ^b	1.22 ^a
A*B		-	B	A
0.054		2.485	0.027	0.038
LSD 0.01				

تُشير الأحرف المتماثلة على مستوى السطر أو العمود أمام المتوسطات إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.01.

المناقشة:

أظهرت نتائجنا فروقاً معنوية في محتوى الأوراق من البرولين عند معالمتي الري، ويُساعد بشكلٍ عام تراكم البرولين في تحسين تحمل النباتات للجفاف، حيث يعمل على خفض قيمة الكمون المائي داخل الخلايا النباتية (يصح الكمون المائي أكثر سلباً) نتيجة شد جزئيات الماء، مما يزيد من فرق التدرج في الكمون المائي بين النبات والوسط المحيط، فيزداد معدّل امتصاص الماء من قبل النبات (Hare and Cress, 1998) مما يُساعد على زيادة كمية الماء الممتصة، وتُصبح إلى حدٍ ما كافية لتعويض الماء المنتوح، والمحافظة على كمون الإنتاج داخل الخلايا النباتية الضروري لاستمرار استيطانها، وضمان فتح المسام، وانتثار غاز ثنائي أكسيد الكربون اللازم لعملية التركيب الضوئي وتصنيع المادة الجافة. تتوافق هذه النتائج مع نتائج (Rontein *et al.*, 2002)، حيث بينوا أنّ تراكم الغلايسين والبرولين يزداد تحت العديد من الإجهادات غير الاحيائية، مثل الجفاف، والملوحة والحرارة المنخفضة. وتُشير النتائج إلى أنّ التباين في معدّل تصنيع وتجميع البرولين هو أحد الأسباب المهمة لتباين الطرز الوراثة في تحمل الإجهاد المائي (Chen and Murata, 2008). على الرغم من هذا فقد كانت نسبة الزيادة في محتوى الطراز الحساس LIC3279 من البرولين (98.50%) الأعلى معنوياً بينما كانت الأدنى عند الطراز المتحمل للجفاف غاب5 (80.00%)، وراكم الطراز المتحمل غاب4 نسبة زيادة أعلى معنوياً من تلك التي راكمها الطراز الحساس البلدي الربيعي. أنّ معدّل تصنيع البرولين يُحدد وبشكلٍ كبير كفاءة الطراز الوراثي في استعادة النمو، حيث يُشكل البرولين مصدراً مهماً للطاقة والكربون، الذي يمكن أن تستخدمه الخلايا النباتية في استعادة نموها عند زوال العامل البيئي (الجفاف) المحدد للنمو. وترتبط تبعاً لذلك المقدرة على استعادة النمو طرداً مع كمية الحافظات الحلوية Osmoprotectants المُصنّعة خلال فترة الإجهاد (AL-Ouda, 1999) فتراكم البرولين تحت ظروف الإجهادات غير الاحيائية في العديد من الأنواع النباتية يرتبط مع تحسين التحمّل للإجهادات، وتكون تراكيزه عادةً مرتفعة في النباتات المتحمّلة للإجهادات أكثر من النباتات الحساسة، ولكن يُمكن أن تُصنّع الطرز الوراثة الحساسة للإجهاد أحياناً كمياتٍ أكبر من البرولين Proline، وهنا يكون تراكم البرولين مرتبط مع حجم الضرر وليس بمستوى التحمّل (Kav kishore *et al.*, 2005)، خاصةً عندما تكون نسبة تراكم البرولين تفوق نسبة الضرر في الأغشية السيتوبلاسمية وتراكم الجذور الحرة، ويؤثر ذلك سلباً في معدّل نمو نباتات الحمص وتطورها بسبب تراجع كمية المادة الجافة الكلية المتبقية، لأنّ البرولين وغيره من الذائبات العضوية يُصنّع ابتداءً من نواتج التركيب الضوئي (Dar *et al.*, 2016)، ووجد (Kavi Kishor *et al.*, 2005) أنّ البرولين يشكل 5% من مجموع الأحماض الأمينية في الظروف الطبيعية بينما ترتفع هذه النسبة إلى 80% تحت ظروف الإجهاد مما يؤكد على تنشيط الجينات المسؤولة عن تخليق البرولين تحت ظروف الاجهاد، وأثبتت بعض الدراسات وجود علاقة سلبية بين تراكم البرولين والكلورفيل الكلي فكلما زاد تركيز البرولين في الأوراق انخفض محتوى الكلورفيل الكلي مما يقلل من عملية التمثيل الضوئي (Tahri *et al.*, 1997) فالبرولين والكلورفيل يبدأ تخليقهما من الحمض الأميني ذاته وهو حمض الغلوتاميك (Dar *et al.*, 2016; Von Wettstein *et al.*, 1995) لذلك يمكن القول أنّ دور البرولين في تحمل الإجهاد يتباين من نبات إلى آخر فليس بالضرورة أن يؤدي تراكم البرولين إلى تحسين تحمل النبات للإجهاد في جميع الأوقات، كما أنّ النباتات المتحمّلة للإجهاد يمكن ألا تراكم البرولين، خاصةً عندما تمتلك آليات دفاعية أخرى كأن تراكم السكريات لرفع الجهد الحلولي للخلية بدلاً من البرولين، أو امتلاكها مجموعة من مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية (Gong *et al.*, 2005)، من ضمنها أنزيم الكاتالاز الذي له دور في تفاوت تحمل النباتات للإجهادات من خلال تحلل بيروكسيد الهيدروجين الذي يتم إنتاجه تحت تأثير الضغوط البيئية ومنها الجفاف بالإضافة إلى الأنزيمات الأخرى كأنزيم السوبر أكسيد ديسموتاز والأسكوريات بيروكسيداز، حيث

يزداد نشاط هذه الأنزيمات عند التعرض للجفاف كوسيلة دفاعية لتخفيف الضرر الناتج عن جذور الأكسجين الحرة المتشكلة بشكل رئيسي نتيجة لغلق الثغور (Jiang and Ren, 2014).

أزداد نشاط الكاتلاز بنسبة (47.54%) عند التعرض للإجهاد مقارنة بالمعاملة المروية هذه الزيادة تساعد النبات على التخلص من الجذر H_2O_2 الذي يعتبر عامل مؤكسد شرس عند ازدياد مستوياته عن الحدود التي يستطيع النبات تحملها. تتفق هذه النتائج مع ماتوصل إليه (Sohrabi *et al.*, 2012) في كردستان على صنفين من الحمص أحدهما من النوع الكابولي والآخر من الديسي وتم تعريف الطرازين لمستويين من الإجهاد نصف مجهد ومجهد بالإضافة إلى الشاهد المروي فلاحظوا زيادة في نشاط الكاتلاز كلما ازدادت شدة الإجهاد، وقد تفوقت معاملة الإجهاد الشديد تقوفاً معنوياً على باقي المعاملات في كلا الطرازين بينما لم يلاحظ فرق معنوي بين معاملة الإجهاد المتوسط والشاهد، نتائج مماثلة تم التوصل إليها في أصناف من القمح (Luna *at al.*, 2004) وفي الشعير (Kublis, 2003)، لذلك يرتبط ازدياد نشاط الكاتلاز عند الطراز الوراثي بازدياد تحمله لإجهاد الجفاف وإجهاد التأكسد الناتج عنه، فقد كانت أعلى نسبة زيادة معنوية في نشاط الكاتلاز عند الطراز الوراثي غاب5 الذي يعتبر متحماً للجفاف تلاه الطراز المتحمل غاب 4 في حين كانت النسبة الأدنى معنوياً عند الطرازين الوراثين LIC3279 والبلدي الربيعي الحساسين للجفاف. قام الباحثون (Mafakheri *et al.*, 2010) بقياس نشاط أنزيم الكاتلاز في ثلاث أصناف من الحمص خلال مرحلتي النمو الخضري والإزهار ووجدوا أن نشاط الكاتلاز أعلى بكثير في الطرز الثلاثة عند التعرض للجفاف ومع وجود فروق معنوية بينهم وأن زيادة نشاط الكاتلاز يعزز من قدرة النبات على التخلص من الجذر الحر H_2O_2 ويمنع تراكم الجذور الحرة في النباتات ويحميها من أكسدة لبيدات الجذر الخلوية وبالتالي زيادة مقاومة الطراز الذي أبدى فيه الكاتلاز فعالية أكبر عند التعرض للجفاف من الطرز الأخرى. وتشير هذه النتائج إلى إن نشاط CAT يلعب دوراً وقائياً أساسياً ضد إجهاد الجفاف في الحمص. أشار (Farooq *et al.*, 2008) إلى أن الأنزيمات المضادة للتأكسد هي أكثر الآليات فعالية ضد الإجهاد التأكسدي في الذرة الصفراء، وهذا مايفسر انخفاض الزيادة في محتوى البرولين عند تعرض الطراز الوراثي المتحمل غاب 5 للإجهاد (الجدول 3) إذ أن امتلاكه فعالية عالية لأنزيم الكاتلاز جعل من تراكم البرولين أمر ثانوي في تحمل الإجهاد، والأمر نفسه ينطبق على الطراز الحساس LIC3279 الذي راكم البرولين بكميات أعلى معنوياً لكن نشاط أنزيم الكاتلاز كان الأدنى معنوياً عنده مما يشير إلى أن تراكم البرولين جاء كنتيجة سلبية لإجهاد الجفاف واستنزاف زائد لنواتج عملية التمثيل الضوئي ووجد (Johal *et al.*, 2020) أن الطرز الوراثية للحمص شديدة التحمل للجفاف كانت محتوى الأوراق لديها من المألون داي أدهيد (MDA) الناتج عن أكسدة لبيدات الأغشية الخلوية بفعل جذور الأكسجين الحرة ومن ضمنها بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) أقل مايمكن نتيجة زيادة في فعالية الأنظمة المضادة للتأكسد الأنزيمية ومن ضمنها الكاتلاز (CAT).

جاء الازدياد المعنوي في محتوى الأوراق من الجذر الحر H_2O_2 عند معاملة الإجهاد مقارنة بالشاهد كنتيجة أساسية لغلق الثغور وتراجع معدّل التركيب الضوئي وزيادة تفاعل ميلر حيث يزداد في النباتات المجهد بنسبة 50% مقارنة بالنباتات غير المجهد (Biehler and Fock, 1996) وزيادة معدل التنفس الضوئي على حساب التمثيل الضوئي (Noctor *et al.*, 2002)، يُعزى التباين في محتوى الأوراق من الماء الأوكسجيني (H_2O_2) بين الطرز الوراثية جزئياً إلى التباين في نشاط أنزيم الكاتلاز، حيث يتحكم بتركيز هذا الجذر العديد من الأنزيمات إضافة إلى الكاتلاز بشكل مباشر كأنزيم الأسكوريات بيروكسيداز الذي يتخلص من الجذر H_2O_2 باستعمال الأسكوريات كركيزة، أو غير مباشر كأنزيم السوبر أكسيد ديسموتاز الذي يحول الجذر O^{2-} إلى H_2O_2 ، يُلاحظ أنّ الطراز الوراثي

البلدي الربيعي قد صنّع معنوياً أعلى كمية من H_2O_2 تلاه الطراز الحساس LIC3279، ما أدى إلى زيادة حساسيتهما لظروف اجهاد الجفاف، وعلى الرغم من ازدياد نشاط الكاتلاز بفارق معنوي عند الطراز البلدي الربيعي مقارنة بالطراز LIC3279، فقد كان من المتوقع أن تكون الزيادة في محتوى بيروكسيد الهيدروجين أقل معنوياً عنده مقارنة بالطراز LIC3279، لكن النتائج جاءت مخالفة لذلك ويعزى ذلك إلى احتمال النشاط العالي لأنزيم السوبر أكسيد ديسموتاز عند الطراز الوراثي البلدي الربيعي والذي يقوم بتحول الجذر الحر (O^{-2}) ال H_2O_2 وعدم زيادة فعالية أنزيم الكاتلاز بالقدر نفسه مما أدى الى تراكم أعلى من بيروكسيد الهيدروجين الناتج عن نشاط SOD إضافة لذلك الناتج عن اجهاد الجفاف، والأمر نفسه قد لاحظناه عند الطرازين المتحملين للجفاف غاب 5 وغاب 4 فعلى الرغم من زيادة نشاط أنزيم الكاتلاز معنوياً عند الطراز غاب 5 مقارنة بالطراز غاب 4 إلا أن كمية بيروكسيد الهيدروجين كانت أعلى معنوياً عند الطراز غاب 5 مقارنة بالطراز غاب 4، وتعزى هذه الزيادة الى إمكانية زيادة SOD أو نتيجة للدور الذي تلعبه الزيادة المنخفضة لهذا الجذر كإشارة تأقلمية.

الاستنتاجات:

أظهرت نتائجنا زيادة في نشاط أنزيم الكاتلاز وانخفاض في محتوى بيروكسيد الهيدروجين عند الطرازين المتحملين (غاب 4 وغاب 5) مقارنةً بالطرازين الحساسين (البلدي الربيعي و LIC3279)، في حين تفاوت محتوى البرولين فقد ارتفع معنوياً عند الطراز الحساس LIC3279 وانخفض معنوياً عند الطراز المتحمل غاب 5 ونستنتج مما سبق أن نشاط الكاتلاز يعطي مؤشراً واضحاً ومهماً على مدى تحمل الطراز للجفاف بزيادة فعاليته، وكذلك الجذر الحر بيروكسيد الهيدروجين يعطي تصوراً عن مدى حساسية الطراز للجفاف بازدياد تركيزه في الأوراق، في حين يلعب البرولين دوراً مزدوجاً ويجب أن يكون محتواه العالي مدعوماً بالأنظمة المضادة للتأكسد الأنزيمية وغير الأنزيمية وإلا فإن زيادة تركيزه سيكون نتيجة سلبية تستنزف منتجات التمثيل الضوئي.

المقترحات:

- 1- اعتماد فعالية أنزيم الكاتلاز ومستوى بيروكسيد الهيدروجين كدلالة على مدى تحمل أو حساسية الطرز للجفاف في مرحلة الإزهار.
- 2- تحديد مواقع المورثات للصفات البيوكيميائية المرتبطة وراثياً بتحسين التحمل لإجهاد الجفاف، لتسهيل عملية نقلها باستعمال التقانات الحيوية الحديثة، لتسريع وتيرة التحسين الوراثي في الحمص لمواكبة وتيرة التغيرات المناخية، للمحافظة على استقرار الإنتاج الزراعي.

المراجع:

- Aebi, H.E.(1974).Catalase In :Methods of Enzymatic Analysis .(2): 673-684.
- Ahmad, P., Hameed, A., Abd-Allah, E. F., Sheikh, S. A., Wani, M. R., Rasool, S., ... & Kumar, A. (2014). Biochemical and molecular approaches for drought tolerance in plants. In *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment* (pp. 1-29). Springer, New York, NY.
- AL- Ouda, A. SH. (1999). Genetic Variability in temperature and moisture stress tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) Ph. D. Thesis, submitted to USA, India
- Alwhibi, M.S; A.Hashem; E.F Abd_Allah; A.A. Alqarawi; D.W.K. Soliman ;Wirth, S and D .Egamberdieva.(2017). Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal

- treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *J. Integr. Agri.* 16 (8), 1751–1757
- Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances.* (27): 84-93
- Bates LS; R.P. Waldren; I.D.Teare .(1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil.* (39): 205-207.
- Biehler, K and H. Fock (1996). Evidence for the contribution of the Mehler-Peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology* (112): 265-272.
- Chen, T.H. and N. Murata (2008). Glycinbetaine: an effective protactant against abiotic stress in plants . *Trends in plant science.* 13(9): 499-505.
- Chimenti, C.A.;J.Pearson and A.J.Hall (2002). Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crop Res.* (10):235–246.
- Chugh, V; N.Kaur and A. K.Gupta (2011). Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.)seedlings in response to drought. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics.* (48): 47-53.
- Dar, M.I., M.I.Naikoo., F.Rehman ., F.Naushin and F.A. Khan (2016). Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In: Iqbal N, Nazar R, Khan NA (eds) *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies.* Springer, India, pp 155–166.
- Dat,J; S. Vandenabeele; E.Vranova; M.Van Montagu; D.Inzé and F. Van Breusegem.(2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS.* 57(5): 779-795.
- Dikilitas, M; S.Karakas; A.Hashem; E.F. Abd_Allah and P.Ahmad.(2016). Oxidative stress and plant responses to pathogens under drought conditions. In: Ahmad, Parvaiz (Ed.), *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach, Volume 1, First Edition.* Edited by Parvaiz Ahmad. © 2016 John Wiley & Sons, Ltd. Published 2016 by John Wiley & Sons, Ltd.
- Dubey, A; A.Kumar; E.F. Abd_Allah; A.Hashem and M.L.Khan (2018). Growing more with less: breeding and developing drought resilient soybean to improve food security *Ecological Indicators*, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.03.003>
- El-Rahman, S.S.A; M.M. Mazen; H.I.Mohamed; and N.M.Mahmoud (2012). Induction of defence related enzymes and phenolic compounds in lupin (*Lupinus albus* L.) and their effects on host resistance against *Fusarium* wilt. *Eur. J. Plant Pathol.* (134), 105–116.
- Fang, Y and L.Xiong (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants, *Cell. Mol. Life Sci.* 72:673–689
- Farooq M; T.Aziz; S.M.A.Basra; M.A.Cheema and H.Rehamn.(2008). Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid, *J. Agron. Crop Sci.* 194, 161–168.
- Fukao, T. and J.Bailey-Serres.(2008). Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.* 105: 16814-16819.
- Gong, H J; K.M.Chen; G.C.Chen; S M.Wang and C.L.Zhang C L (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Sci* 169: 313–321.

- Gunes, A., A. Inal., M.S .Adak., E.G.Bagci., N.Cicek and F.Eraslan(2008). Effect of Drought Stress Implemented at Preor Post-Anthesis Stage on Some Physiological Parameters as Screening Criteria in Chickpea Cultivars, *Russ. J. Plant Physiol.* vol. 55, pp. 59–67.
- Hare, P.D; W.A.Cress and Van J.Staden (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation in plants. *Plant Cell Environ.*, 21:535-553.
- Jiang,S.F and X.P.Ren.(2014). The effect on SOD activity and protein content in groundnut leaves by drought stress. *Acta Agron Sin*30:169–174.
- Johal,N; J.Kaur; S.K.Grewal; S.Singh and A.Kushwah (2020) Physiological and Biochemical Responses of Chickpea Accessions at Reproductive Stage Under Receding Moisture Conditions, *Agric Res*,vol. 7.1–9
- Kavi Kishor, P.B; S.Sangam; R.N.Amrutha; P.Sri Laxmi; R.N.Naidu; K.R.S.S Rai; S.Rao; K.J.Reddy; P.Theriappan and N.Sreenivasulu. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88:424–438.
- Kublis,J (2003) Polyamines and scavenging system:influence of exogenous spermidine on catalase and guaiacol peroxidase activities, and free polyamine level in barley leaves under water deficit. *Acta Physiol Plant* 25:337-343.
- Luna,C.M.; G.M.Pastori; S.Driscoll; K.Groten; S.Bernard and C.H.Foyer (2004). Drought controls on H₂O₂ accumulation,catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat.*J Exp Bot* 56:417–423.
- Mafakheri ,A.; A. Siosemardeh ;B.Bahramnejad ; P.C.Struik and E.Sohrabi (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *AJCS* 4(8):580-585.
- Miller,G.; N. Suzuki ; S.Ciftci-Yilmaz and R.Mittler (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 2010; 33: 453-467.
- Mittler, R.; S. Vanderauwera; M. Gollery; F. Van Breusegem (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9: 490-498.
- Mohammadi , A.; D.Habibi; M. Rohami and S.Mafakheri (2011). Effect of Drought Stress on Antioxidant Enzymes Activity of Some Chickpea Cultivars. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 11 (6): 782-785.
- Noctor ,G.; S.Veljovic-Jovanovic; S.Driscoll; L.Novitskaya and C.Foyer (2002).Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: A predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* **89**: 841-50.
- Oberoi, H. K.; A. K.Gupta; S.Kaur and I. Singh(2014) .Stage specific upregulation of antioxidant defence system in leaves for regulating drought tolerance in chickpea *Journal of Applied and Natural Science* 6 (2): 326-337.
- Pinheiro C and M.M.Chaves (2011).Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62 :869–882
- Pitotti, A.; B.E. Elizalde and M. Anese (1995).Effect of caramelization and maillard reaction products on peroxidase activity. *J. Food Biochem.*18:445-457.
- Rontein, D.; G.Basset and A.Hanson (2002). Metabolic engineering of osmoprotectants accumulation in plants. *Metab. Eng.* 4, 49–56.

- Shafei, S. (2005). Study on water shortage effect at some of physiological traits, yield and yield components in some genotypes of soybean. M.Sc. Thesis. Faculty of Agriculture and Natural Resources, Karaj-Branch, Islamic Azad University (In Farsi).
- Singh, R.; S.Singh; P. Parihar; R.K.Mishra; D.K. Tripathi; V.P.Singh; D.K. Chauhan, and S.M.Prasad (2016). Reactive oxygen species (ROS): Beneficial companions of plants' developmental processes. *Front. Plant Sci* 7,1299.
- Singh, S.; A.K. Gupta and N.Kaur (2012). Differential responses of antioxidative defence system to long-term field drought in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes differing in drought tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 198: 185-195.
- Sohrabi, E. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *AJCS* 4(8):580-585.
- Sohrabi, Y.; G. Heidari; W. Weisany; K. Ghasemi Golezani and K. Mohammadi (2012). Some physiological responses of chickpea cultivars to arbuscular mycorrhiza under drought stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 59, 708–716.
- Sperdoui, I and M.Moustakas (2012). Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *J. Plant Physiol.* 169: 577–585.
- Tahri, E.; A.Belabed and K.Sadki (1998). Effet d'un stress osmotique sur l'accumulation de proline, de chlorophylle et des ARNm codant pour la glutamine synthétase chez trois variété de blé dur (*Triticum durum*) 21 :81-87.
- Velikova, V.; I. Yordanov and A. Edereva (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* 151: 59-66.
- Verma, K. K.; M. Singh; R. K. Gupta and C. L. Verma (2014). Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes and growth responses of *Jatropha curcas* during soil flooding. *Turkish Journal of Botany*, 38: 130-40.
- Von Wettstein, D., S.Gough and C.G.Kannangara (1995). Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell.* Jul;7(7):1039–1057.
- Wang, W.X.; B. Vinocur and A. Altman (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1–14.
- Zhu, J.K and K. Shinozaki (2004). Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol.*, 135:1697-1709.

Biochemical response of some chickpea Genotypes to drought stress

Rawaa Aoush*⁽¹⁾, Faysal Bakkour⁽²⁾ and Lina AL-Nadaf⁽²⁾

(1). Biotechnology Research Center, Homas, Syria.

(2). Faculty of Agriculture , Albaath University Homas, Syria.

(*Corrsponding author: Rawaa Aoush. E-Mail: rawaayoush1987@gmail.com).

Received: 16/09/2020

Accepted: 28/01/2021

Abstract

Chickpea (*Cicer arietinum*.L) is one of the most important leguminous crops in the world, drought is one of the most important abiotic stress that limit plant production as a whole, and it causes morphological, physiological, biochemical and molecular changes in plants, field study was carried out in the village of Jandar in Homs, and chemical analyzes were conducted at the Biotechnology Research Center of Al-Baath University in 2019, with the aim of studying the change in some biochemical characteristics (the content of the leaves of proline (pro) - hydrogen peroxide (H₂O₂) - the activity of the enzyme catalase (CAT). Under drought stress, and to determine the possibility of adopting these indicators as a rapid detection method for the tolerant genotypes for later use in breeding programs. Seeds were sown in polyethylene pot and placed under a transparent canopy to avoid rain, completely randomized design was used in the experiments (CRD), and with three replications, and Irrigation was carried out regularly when ground moisture reached to 75% of the field capacity of non-stressed plants and 40% for stressed plants. The aforementioned indicators were studied at the flowering stage, and the results showed a significant increase in all the studied traits under stress when compared to the irrigated control. The tolerant Genotypes (Gap 5 and Gap 4) showed a significantly higher percentage of catalase increase compared to the two sensitive models and a lower percentage increase of free radical hydrogen peroxide (H₂O₂) under stress conditions, Whereas the role of proline varied between genotypes, it was significantly lower in the tolerant genotype GAP5 and significantly higher in the sensitive genotype LIC3279, while its content was significantly higher for the tolerant genotype GAP 4 compared to the sensitive Genotype Spring Municipal which indicates that the role that proline plays when exposed to stress It should be supported by an integrated antioxidant system as it is either evidence of tolerance or anaphylaxis and depletion of photosynthetic products.

Keyword: chickpeas – drought stress - catalase - proline - hydrogen peroxide.