ولقد وجد أنه يمكن الحد من أضرار الشدّ التأكسدى بإحدى استراتيجيتين، هما: إما بزيادة مستوى الإنزيمات التى تعمل على التخلص من المركبات النشطة فى الأكسدة، وإما بزيادة مستوى مضادات الأكسدة التى تتفاعل مع المركبات النشطة فى الأكسدة.

ولقد أمكن إجراء عمليات تحول وراثى بثلاثة من الإنزيمات التى ظهرت فى شكل (١٧-٢)، وهى ascorbate peroxidase، و glutathione peroxidase، و glutathione reductase، حيث نقلت إلى الـ *Arabidopsis* والتبغ (جدول ١٧-٣)؛ مما أدى إلى زيادة قدرتها على تحمل مختلف حالات الشدّ غير البيولوجى، مثل: الحرارة العالية، والبرودة، والملوحة، كما وفر الـ glutathione reductase - كذلك - مقاومة للشدّ التأكسدى الناتج من المعاملة بالباراكوات paraquat (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

هذا ويجمع جدول (١٧-٤) بين مجموعة من الجينات التى استعملت فى عمليات التحول الوراثى لأجل تحمل مختلف حالات الشد البيئى (عن Chawla ٢٠٠٠).

التحول الوراثى لتحمل حالات خاصة من الشدّ البيئى

تحمل الملوحة العالية

من بين عمليات التحول الوراثى التى أجريت لأجل زيادة القدرة على تحمل الملوحة، ما يلى.

● أنتجت نباتات تبغ محولة وراثيًا لتحمل الملوحة ولذلك بالجينmtlD، الذى حُصِلّ عليه من البكتيريا *Escherichia coli*، والذى يجعل النباتات تنتج كميات محسوسة من المانيتول mannitol، وتبين أن النباتات التى حولت وراثيًا بهذا الجين كانت أكثر تحملاً للملوحة عن قريناتها غير المحولة (عن Pharr وآخرين ١٩٩٥).

● أمكن تحويل السيانوبكتيريا: *Synechococcus* sp. وراثيًا بالجين codA المسئول عن تمثيل الإنزيم choline oxidase المنقول من النوع البكتيرى الذى يعيش فى التربة *Arthrobacter globiformis*. وقد تراكم الـ glycinebetaine فى البكتيريا التى حولت وراثيًا، وأصبحت أكثر تحملاً للملوحة (Murata وآخرون ١٩٩٦).

جدول (١٧-٣). الجينات التى استعملت فى عمليات التحول الوراثى لتحمل الشدّ التأكسدى (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الجين	النبات المحول وراثيًا	حالة التحمل للشدّ البيئى
Mitochondrial Mn-SOD Tobacco	Alfalfa chloroplast	2X increase in SOD. Increased field drought tolerance. Increased freezing tolerance
Mitochondrial Mn-SOD Tobacco	Alfalfa chloroplast	2-4X increase in SOD. Increased ozone tolerance
Mitochondrial Mn-SOD Tobacco	Tobacco mitochondria	8X increase in SOD. No effect on ozone tolerance
Mn SOD	Canola	Increased aluminium tolerance
Chloroplast Cu/Zn-SOD Pea	Tobacco chloroplast	3-15X increase in SOD. Increased tolerance to high light and chilling
Cytosolic Cu/Zn-SOD	Tobacco cytosol	1.5-6X increase in SOD. Reduced damage from acute ozone exposure
Fe-SOD *Arabidopsis*	Tobacco	Protected plants from ozone damage
Apx3 (ascorbate peroxidase)	Tobacco	Increased protection against oxidative stress
Apx1 (ascorbate peroxidase)	*Arabidopsis*	Heat tolerance
GST/GPX (glutathione S-transferase with glutathione peroxidase)	Tobacco	Increased stress tolerance
Nt107 (glutathione S-transferase)	Tobacco	Snstained growth under cold and salinity stress
ParB (glutathione S-transferase)	*Arabidopsis*	Protects against aluminium toxicity and oxidative stress
NtPox (glutathione peroxidase)	*Arabidopsis*	Protects against aluminium toxicity and oxidative stress
Glutathione reductase *E. coli*	Tobacco chloroplast	3-6X increase in foliar GR. Increased tolerance to SO_2 and paraquat
Glutathione reductase *E. coli*	Tobacco cytosol	1-35X increase in GR. Increased tolerance to paraquat
Glutathione synthetase *E. coli*	Poplar cytosol	100X increase in GS. GSH not increased. No effect on paraquat tolerance
MsFer Alfalfa ferritin	Tobacco	Increased tolerance to oxidative damage caused by excess iron

SOD, superoxide dismutase; GST, glutathione S-transferase; GPX, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GS, glutathione synthetase; GSH, glutathione.

جدول (١٧-٤): حالات متنوعة من التحول الوراثى لأجل زيادة التحمل لمختلف عوامل الشدّ البيئى.

النبات المحول وراثيًا	الجين المستعمل	المركب المعبر عنه	حالة التحمل
التبغ	Mannitol 1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*) from *E. coli*	Mannitol	الملوحة
Arabidopsis	*MtlD* from *E. coli*	Mannitol	الملوحة
التبغ	*SacB* from *Bacillus subtilis*	Fructan	الجفاف
التبغ	TPS1 subunit encoding trehalose synthase from *E. coli*	Trehalose	الجفاف
التبغ	γ-Pyrroline-5-carboxylate synthetase	Proline	الشدّ الأسموزى
الأرز	Barley *lea* gene (*HVAI*)	LEA	الجفاف والملوحة
التبغ	*BetA* from *E. coli* encoding choline dehydrogenase	Glycine betaine	الملوحة
الأرز	*CodA* from *Arthrobacter globiformis* endcoding choline oxidase	Glycine betaine	الملوحة
Arabidopsis thaliana	*CodA* from *Arthrobacter globiformis endcoding choline oxidase*	Glycine betaine	الملوحة والبرودة

● تتراكم فى النباتات - عادة - بروتينات خاصة خلال المراحل المتأخرة لتكوين الأجنة أثناء فترات التعرض للجفاف، يعتقد بأنها توفر للخلايا حماية من الشدّ بالمرتبط بالفقد الرطوبى. يُعبر عن أحد هذه الجينات - وهو le25 - فى أوراق الطماطم وجذورها استجابة للنقص الرطوبى وتراكم حامض الأبسيسك. ولقد درست وظيفة هذا الجين وتأثير التعبير عنه فى الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* بعد تحويلها وراثيًا، حيث أظهرت الخميرة عدة استجابات لنوعيات مختلفة من الشدّ البيئى، منها: تحسن النمو فى بيئة تحتوى على ١,٢ مولار كلوريد صوديوم، مقارنة بمدى نمو نظيراتها غير المحولة وراثيًا فى الظروف ذاتها، هذا .. إلاّ إنه لم يحدث لها تحسن فى النمو فى بيئة تحتوى على ٢ مولار سوربيتول sorbitol. كذلك أظهرت الخميرة المحولة وراثيًا قدرة أكبر على البقاء بعد التعرض للتجمد، ولكن ليس بعد التعرض لظروف الحرارة العالية (Imai وآخرون ١٩٩٦).

• أمكن تحويل الطماطم وراثيًا بجين الـ oxalate oxidase، بهدف جعلها أكثر تحملاً للملوحة العالية. وأوضحت الدراسات تواجد نشاط إنزيم الـ oxalate oxidase فى جميع النباتات التى حولت وراثيًا، وأن هذه النباتات أعطت محصولاً أعلى جوهريًا تحت ظروف الشد الملحى - وكذلك تحت الظروف العادية - عما أعطته نباتات الكنترول ولقد أثَّر الشد الملحى - كذلك - على مستوى نشاط الإنزيم فى كل من الثمار والجذور (Dessalegne وآخرون ١٩٩٧).

• من المعروف أن زيادة التعبير عن الجين HAL1 فى الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* يجعلها أكثر تحملاً للملوحة، وذلك بجعلها تحتفظ بتركيزات عالية من البوتاسيوم مع تركيزات منخفضة من الصوديوم أثناء حالات الشدِّ الملحى وبتحويل الطماطم وراثيًا بهذا الجين أصبحت أكثر تحملا للملوحة، كما كانت النباتات المحولة وراثيًا أكثر قدرة على الاحتفاظ بالبوتاسيوم داخل الخلايا، حيث ظهر فيها ارتفاع واضح فى نسبة أيون البوتاسيوم إلى أيون الصوديوم عما فى النباتات غير المحولة وراثيًا (Gisbert وآخرون ٢٠٠٠).

• كذلك أمكن تحويل القاوون وراثيًا بهذا الجين HAL1، وفى بيئات صناعية تحتوى على ١٠ جم كلوريد صوديوم/لتر أظهرت النباتات المحولة وراثيًا قدرًا أعلى من التحمل للملح عن نباتات الكنترول، على الرغم من انخفاض نموها الجذرى والخضرى مقارنة بنمو النباتات المحولة وراثيًا التى نُميت فى بيئة غير ملحية (Bordas وآخرون ١٩٩٧).

تحمل ظروف الجفاف

من المعروف أن عديدًا من النباتات تستجيب لظروف الجفاف بتمثيل مجموعة من مشتقات السكر يطلق عليها اسم بوليولات polyols (مثل المانيتول mannitol، والسوربيتول . إلخ)؛ ولذا . يعتقد بأن النباتات ذات المحتوى العالى من البوليولات قد تكون أكثر تحملاً لظروف الشدِّ البيئى. وباستعمال جين بكتيرى يشفر لإنزيم قادر على تمثيل المانيتول أمكن هندسة نباتات وراثيًا يتراكم فيها المانيتول إلى مستويات عالية

نسبيًا (حوالى ٣٠-٤٠ جم من المانيتول لكل كيلوجرام من النبات). وقد أظهرت تلك النباتات قدرة أكبر على تحمل ظروف الجفاف عن نظيراتها التى لم تحول وراثيًا (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

تحمل الحرارة العالية

تستخدم فى عمليات التحول الوراثى الجينات التى تتحكم فى إنتاج بروتينات خاصة فى النباتات لدى تعرضها للصدمات الحرارية، وهى التى تعرف باسم heat-shock proteins، وتعرف منها أنواعًا كثيرة. ويبين جدول (١٧-٥) عددًا من تلك الجينات، والبروتينات التى تتحكم فى إنتاجها، والنباتات التى حولت وراثيًا بها.

جدول (١٧-٥): جينات التحول الوراثى لأجل تحمل الحرارة العالية (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الجين	البروتين الذى يتحكم الجين فى إنتاجه	النبات المحول وراثيًا
AtHSF1	Heat-shock transcription factor HSF1::GUS fusion	*Arabidopsis*
Hsp101	HSP100 class heat-shock protein	*Arabidopsis*
Hsp70	HSP70 class heat-shock protein	*Arabidopsis*
Hsp17.7	SmHSP small heat-shock protein family	الجزر
T1.HS1	Class I smHSP	التبغ

تحمل الحرارة المنخفضة والتجمد

تعد القدرة على تحمل الحرارة المنخفضة أو التجمد صفة معقدة تتأثر بعديد من الجينات التى تؤثر - بالتالى - فى عديد من المسارات الأيضية. وعلى سبيل المثال .. فإن التغيرات فى التعبير الجينى أثناء عملية التأقلم على الحرارة المنخفضة تتضمن عدم تشبع الأغشية الخلوية، وتراكمات فى كل من السكر، والبروتين، والأحماض النووية، والمركبات التى تزيد من الضغط الإسموزى، والهرمونات ... إلخ. ومن المعتقد أن تلك التغيرات تنظم توقيت ومعدل حدوث حالة الأقلمة ومستوى الأقلمة التى تصل إليها

النباتات، ومدة اكتساب النباتات لها خلال فصل التتاء، ومعدل فقدها لها عند ارتفاع درجة الحرارة فى الربيع ولهذه الأسباب فإن دراسات التحول الوراثى لأجل زيادة القدرة على تحمل البرودة أو التجمد لم تأت بنتائج فعالة كثيرًا

تحمل الحرارة المنخفضة

تبين لدى مقارنة الأحماض الدهنية فى الأغسية الخلوية للنباتات الحساسة للبرودة بتلك التى تكون فى النباتات المتحملة لها، وفى النباتات التى أقلمت على البرودة مقابل تلك التى لم تؤقلم تبين وجود وفرة أكبر من الأحماض الدهنية التى تحتوى إما على رابطتين غير مشبعتين (حامض اللينوليك linolelc acid)، وإما على ثلاث روابط غير مشبعة (حامض اللينولينك linolenic acid) بكل حامض دهنى من الدهون الفوسفوريه التى توجد فى الأغشية الخلوية بالنباتات الأكثر تحملا للبرودة عن الأقل تحملاً، وبالنباتات الأكثر تأقلما على البرودة عن غير المؤقلمة، هذا مع العلم بأن الأحماض الدهنية غير المشبعه تجعل الأغشية الخلوية أكثر سيولة فى الحرارة المنخفضة، مما يمنع صلابتها عند انخفاض الحرارة إلى أقل من ١٠م

ومن المعلوم أن معظم الـ cyanobacteria وعديد من النباتات تحتوى على مستويات عالية من الأحماض الدهنية غير المشبعة فى أغشيتها الخلوية، ولقد وجد أن الجينات الخاصة بعدم تشبع الأحماض الدهنية fatty acid desaturases (مثل الجينات desA، و desB، و desC فى السيانوبكتيريا *Synechocystus* sp) هى المسئولة عن تحملها للحرارة المنخفضة

وقد أمكن تحديد وعزل ونقل الجين الذى يشفر لتكوين الإنزيم glycerol-3-phosphate acyltransferase الذى يختص بإضافة ولحام الأحماض الدهنية غير المشبعة إلى العمود الفقرى الجليسرولى glycerol backbone للدهون الفوسفورية، وبذا أمكن هندسة نباتات وراثيًا (نباتات التبغ) كانت أكثر تحملاً للحرارة المنخفضة (عن Murata وآخرين ١٩٩٦، و Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

تحمل التجمد

من بين دراسات التحول الوراثى التى أجريت بهدف زيادة القدرة على تحمل التجمد، ما يلى:

● أوضحت دراسات Culter وآخرون (١٩٨٩) أن البروتين المضاد للتجمد المتحصل عليه من نوع السمك القطبى *Pseudopleuronectes americanus* لدية القدرة على للعمل كمضاد لبدء تكوين نويات البللورات الثلجية anti-nucleator فى الأنسجة النباتية. وأدى تعريض المزارع المعلقة لـ *Bromus intermis* للبروتين المضاد للتجمد إلى خفض كميات الماء القابل للتجمد فى أى درجة حرارة. كما أوضحت الدراسة أن هذا البروتين يمكن أن يعمل كواق من أضرار التجمد العميق (أى إنه يعمل كـ cryoprotectant)، وأنه قلل من معدل تكوين البللورات الثلجية.

● أدى تحويل نباتات التبغ وراثيًا لتعبر عن البروتين: AFP type II، و AFP type III اللذان يتحكم فيهما جينين حُصل عليهما من نوع السمك القطبى *Pseudopleuronectes americanus* (الذى أسلفنا الإشارة إليه والذى يعرف فى الإنجليزية باسم flounder) .. أدى ذلك إلى جعلها تتحمل حرارة وصلت إلى -٣,٥ إلى -٤,٥م، وهى تقل بمقدار ١-١,٥م - فقط - عن تلك التى تحملتها نباتات الكنترول (عن Gusta وآخرين ١٩٩٦).

● أنتج Hightower وآخرون (١٩٩١) نباتات تبغ وطماطم بحولة وراثيًا بالجين afa3 المضاد للتجمد والمجهز صناعيًا على أساس جين الـ antifreeze الخاص بالسمك القطبى *P. americanus*، إلاَ أنه لم يكن مؤثرًا فى منع التجمد.

○ تمكن الباحثون من تخليق جين يشفر لتكوين بروتين مضاد للتجمد مماثل للبروتين الذى ينتجه سمك الـ winter flounder، وأمكن التعبير عن هذا الجين فى الخميرة وعدد من النباتات. ويمكن لهذه النباتات المعدلة وراثيًا تحمل التجمد والتفكك بصورة أفضل دون أن تفقد خصائصها المتعلقة بالمذاق والقوام. وفى البطاطس ظهر ارتباط بين مستوى التعبير عن الجين المنقول ودرجة تحملها للتجمد. كذلك يمكن إضافة هذا

البروتين إلى ألايس كريم لمنع تكوين القوام الجيبى للبلورات الثلجية (Wallis وآخرون ١٩٩٧، و عن Malık وآخرين ١٩٩٩).

• أدى تعديل نباتات الـ *Arabidopsis* غير المتحملة للبرودة – وراثيًا – بجين الـ *Arabidopsis* cor15a (المتحصل عليه من سلالة متحملة للبرودة) إلى حمايتها من حرارة وصلت إلى -٤ وحتى -٨م، مما يدل على أن هذا الجين (الذى يوفر حماية للإنزيم الحساس للبرودة lactate dehydrogenase من الدنترة ووقف النشاط، والذى يتواجد البروتين الذى يتحكم الجين فى إنتاجه فى الكلوروبلاستيدات) ربما يلعب دورا فى حماية الكلوروبلاستيدات أثناء التجمد.

• يلزم الإنزيم سوبر أوكسيديز ديسميوتيز superoxıdase dısmutase (اختصارًا SOM) لأجل التخلص من الـ superoxıde free radıcals السامة التى تنتج فى ظروف الشدّ البيئى وقد اقتُرح أن التعبير الزائد للبروتين الـ SOD يمكن أن يُحسِّن من القدرة على تحمل التجمد فى النباتات. وبالفعل .. تم تحويل البرسيم الحجازى وراثيًا بجين الـ Mn-SOD الميتوكوندرى والبلاستيدى (mıtochondrıal and chloroplast Mn-SOD) من النوع *Nıcotiana plumbagınifolia*، وأظهرت النباتات المحولة وراثيًا قدرًا أكبر من النشاط الكلى للـ SOD بالأوراق، واستعادة أكبر للنمو – على أساس إنتاج المادة الجافة بالنموات الخضرية – بعد تعرضها لحرارة التجمد. كذلك أدت زيادة التعبير الخاص بالجين Cu/Zn-SOD – من البسلة – فى التبغ والبيتونيا إلى إحداث خفض كبير فى الأضرار التى تحدث لعملية البناء الضوئى خلال ظروف التعرض للحرارة المنخفضة والإضاءة العالية، كما حفزت استعادة البناء الضوئى لمعدله الطبيعى بعد دورة من التجمد والتفكك (عن Gusta وآخرين ١٩٩٦).