

ولقد مكنت التقدمات التي حدثت في تقنيات البيولوجيا الجزيئية تطوير معلّات الدنا DNA markers التي يمكن استعمالها في التعرف على الـ QTLs. كما أسهم استعمال الـ QTLs في تحسين كفاءة الانتخاب، وخاصة للصفات التي يتحكم فيها عديد من الجينات والتي تتأثر كثيراً بالعوامل البيئية. ويقلل ذلك الاختبار كثيراً من الوقت الذي يلزم لتقييم التراكيب الوراثية، ويقلل من تأثير العوامل البيئية عليها. وبالتعرف على مختلف الـ QTLs التي تتحكم في مختلف الصفات المصاحبة لتحمل الملوحة، فإنه يكون بالإمكان تجميع (تهريم) أكبر قدر ممكن من تلك الصفات - في تركيب وراثي واحد.

ويجرى تقييم تحمل الملوحة في دراسات التحول الوراثي - عادة - باستخدام عدد قليل من البادرات أو النباتات البالغة في تجارب معملية، أو في الصوبات، ولا تتعرض فيها النباتات للظروف التي تسود في الأراضي الملحية (مثل الـ pH القلوي، والحرارة العالية، والرطوبة النسبية المنخفضة، وتواجد أملاح صودية أخرى، وكذلك تواجد تركيزات عالية من السيلينيوم والبورون). ويحتاج الأمر إلى تقييم الملوحة للنباتات المحولة وراثياً تحت ظروف الحقل، وخاصة تقييم محصولها في تلك الظروف الملحية، وهو أمر يصعب تحقيقه بسبب عدم تجانس توزيع الملوحة في الحقل، وتفاعل خاصية التحمل مع مختلف العوامل البيئية (عن Yamaguchi & Blumwald 2005).

الهندسة الوراثية لتحمل الملوحة

على الرغم من أن تحمل الملوحة صفة كمية، فإن التحويل الوراثي للنباتات بجين واحد يتحكم في أي صفة من الصفات التي تُسهم في تحمل الملوحة يمكن أن يفيد في زيادة مقدرة النباتات المحولة وراثياً على تحمل الملوحة - ولو بقدر يسير - ولكنه يكون مفيداً من وجهة نظر مربي النبات. ومن الأمثلة على ذلك التحول الوراثي للتحكم في تمثيل بعض المركبات العضوية الذائبة التي تُسهم في التعديل الأسموزي (في عديد من النباتات)، وبالـ LEA gene (كما في الأرز)، وبجين الـ Mn-SOD (في الشوفان)، وبجين الخميرة HAL1 (في الكنتالوب والطماطم) (عن Gisbert وآخرين 2000).

ومن بين عمليات التحول الوراثى التى أجريته لأجل زيادة القدرة على تحمل الملوحة، ما يلى:

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

● أمكن تحويل الطماطم وراثياً بجين الـ oxalate oxidase؛ بهدف جعلها أكثر تحملاً للملوحة العالية. وأوضحت الدراسات تواجد نشاط إنزيم الـ oxalate oxidase فى جميع النباتات التى حولت وراثياً، وأن هذه النباتات أعطت محصولاً أعلى جوهرياً تحت ظروف الشد الملحى - وكذلك تحت الظروف العادية - عما أعطته نباتات الكنترول. ولقد أثار الشد الملحى - كذلك - على مستوى نشاط الإنزيم فى كل من الثمار والجذور (Dessalgne 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 الشد الملحى. وبتحويل الطماطم وراثياً بهذا الجين أصبحت أكثر تحملاً للملوحة، كما كانت النباتات المحولة وراثياً أكثر قدرة على الاحتفاظ بالبوتاسيوم داخل الخلايا، حيث ظهر فيها ارتفاع واضح فى نسبة أيون البوتاسيوم إلى أيون الصوديوم عما فى النباتات غير المحولة وراثياً (Gisbert وآخرون ٢٠٠٠).

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

ولقد أمكن حتى عام ٢٠٠٣ إجراء التحويل الوراثي بنحو ٤٠ جيناً فى ١٣ نوعاً نباتياً، كما هو مبين فى جدول (١١-٥).

هذا .. ويمكن الاستفادة من النبات المحب للملوحة *Thellungiella halophila* (حديث الاكتشاف) فى دراسات التربية لتحمل الملوحة فى النباتات. يتوطن هذا النبات التربة الملحية بالسواحل الشرقية للصين، وهو يصلح لأن يكون موديل وراثى. فهذا النبات يعد قريباً وراثياً من نبات الـ *Arabidopsis* (> ٩٠٪ تماثلاً فى النيكلويدات وتتابعها فى الدنا)، ويتشابه معه مورفولوجياً وفى دورة الحياة. كما يقل حجم جينوم هذا النبات قليلاً عن ضعف حجم جينوم الـ *Arabidopsis*. والأهم أن *T. halophila* يمكن تحويله وراثياً بطريقة غمس الأزهار floral dipping method، التى يشيع استخدامها فى الـ *Arabidopsis*؛ مما يمكن من إنتاج مئات الآلاف من الـ T-DNA insertion lines؛ بما يسمح بالتعرف على الطفرات والمسارات الأيضية المؤثرة فى تحمل الملوحة (Zhu ٢٠٠١).

تحويل النباتات وراثياً بناقلات الأيونات

طوّرت النباتات آليات مختلفة لمنع أضرار الملوحة العالية؛ بخفض امتصاصها للصدويوم Na^+ أو تحديد تواجده (compartmentation) فى الفجوات العصارية. يتحرك أيون الصوديوم سلبياً من خلال قناة أيونية عامة من البيئة الملحية إلى سيتوبلازم الخلايا النباتية، إلا أنه توجد - كذلك - أدلة على أن أيون الصوديوم يمكن أن يتحرك تحركاً نشطاً من خلال الـ Na^+/H^+ antiporters التى تبادل الـ Na^+ أو الـ Li^+ بالـ H^+ ، ويعتمد تنظيم امتصاص الـ Na^+ وتراكمه فى الخلايا النباتية على تنظيم مضخات البروتونات proton pumps، والـ antiporters التى تعمل عند كل من الغشاء البلازمى الخارجى والداخلى tonoplast المحيط بالفجوات العصارية. توجد الـ Na^+/H^+ antiporters فى جميع الممالك البيولوجية من البكتيريا إلى النباتات الراقية إلى الإنسان.

جدول (١١-٥): الأنواع النباتية التى حوّلت وراثيًا - حتى عام ٢٠٠٣ - بغرض زيادة قدرتها على تحمل الملوحة، والجينات التى استخدمت فى التحويل الوراثى (عن Flowers ٢٠٠٤).

الأنواع النباتية المحولة وراثيًا

Arabidopsis thaliana
Brassica napus and *B. juncea*
Citrus (Castizo citrange)
Cucumis melo (melon)
Diospyros kaki (Japanese persimmon)
Lycopersicon esculentum (tomato)
Medicago sativa (alfalfa)
Nicotiana tabacum (tobacco)
Oryza sativa (rice)
Solanum melongena (eggplant)
Solanum tuberosum (potato)
Triticum aestivum (wheat)

الجينات التى استخدمت فى التحويل الوراثى

Apoplastic invertase, Apo-Inv
Arginine decarboxylase, ADC
Betaine aldehyde dehydrogenase, BADH; betB, choline dehydrogenase (CDH);
choline oxidase, codA (glycinebetaine)
Ca²⁺-dependent protein kinase, CDPK
Ca/H antiporter, CAX1
Calcium-binding protein, EhCaBP
Calicneurin; protein kinase, CaN
Ca protein kinase, OsCDPK7
Glutathione S-transferase, GST and glutathione peroxidase, GPX
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GPD
Glycogen-synthase kinase-3, AtGSK1
Glutamine synthetase, GS2
Heat shock protein, DnaK/HSP70
High-affinity potassium transporter, *HKT1*
Isopentenyl transferase, ipt (increased cytokinin)
Late embryo abundant protein, HVA1 (a LEA)
Mannitol 1-phosphate dehydrogenase, mt1D (mannitol)
Myo-inositol O-methyltransferase, IMT1 (ononitol)
Omega-3 fatty acid desaturase, *fad7* (fatty acid processing)
Osmotin-like protein
Proline dehydrogenase: Delta (1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase (proline)
Proline transporter, *AhProT1*
Proton sodium exchanger, *HNX1*
Putative transcription factor, Alfin1
Rare Cold Inducible gene 3, RCI3
Rice *Hal2* like, *RHL*
S-adenosylmethionine decarboxylase, SAMDC (spermine, spermidine)
Serine/threonine kinase, AT-DBF2
Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, SPD (sorbitol)
SR-like, putative splicing protein
Transcription factors, DREB1A; AhDREB1
Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase, TPSP (trehalose)
Yeast halotolerance gene, *Hal2*
Yeast halotolerance gene, *Hal1*
Yeast mitochondrial superoxide dismutase, Mn-SOD
Vacuolar H⁺-pyrophosphatase, AVPI

- وتعرفه وحدة محاللات من الـ Na^+/H^+ antiporters تتضمن ما يلي،
- *NhaA* و *NhaB* و *NhaC*، و *NhaD*، و *NapA* في الـ prokaryotes.
 - *SOD2*، و *Nha1* في الفطريات.
 - *AtNHX1*، و *SOS1* في الـ *Arabidopsis*.

ولقد استخدمت تلك الجينات لتحويل النباتات المختلفة وراثياً لأجل التحكم فى امتصاص الأيونات السامة، ومن ثم زيادة تحملها للملوحة (جدول ١١-٦).

إن أيون الصوديوم يمكنه دخول الخلية بواسطة عديد من حوامل أيون البوتاسيوم، والتي منها *AtHKT1* من *Arabidopsis*، الذى وجد أنه يمكنه العمل كحامل متخصص للصوديوم، وبدرجة أقل كحامل للبوتاسيوم. ويفيد هذا الجين فى تجميع الصوديوم فى الفجوات العصارية، وذلك كما ثبت فى الطماطم المحولة وراثياً به، والتي كانت قادرة على النمو والإزهار وعقد الثمار فى وجود تركيز ٢٠٠ مللي مول من كلوريد الصوديوم. وبرغم أن أوراق هذه النباتات تراكم فيها تركيزات عالية من الصوديوم، فإن ثمارها لم توجد بها سوى كميات قليلة من العنصر. وحدث أمر مماثل فى نباتات لفت الزيت التى حولت وراثياً بالجين *AtNHX1* التى تراكم الصوديوم بأوراقها دون أن يتأثر فيها محصول البذور أو جودة الزيت.

وأدى تحويل الأرز وراثياً بالجين *OsNHX1* من النبات المحب للملوحة *Atriplex gmelini* (وهو Na^+/H^+ antiporter) إلى جعله متحملاً للملوحة.

ولقد أظهرت النباتات التى حولت وراثياً بمختلف جينات الـ *NHX1*، والتي كان منها: الذرة والقمح المحولان وراثياً بالجين *AtNHX1* من *Arabidopsis*، ولفت الزيت المحول وراثياً بالجين *BnNHX1*، والشعير المحول وراثياً بالجين *HbNHX1* من *Hordeum brevisubculatum*، والقطن المحول وراثياً بالجين *GhNHX1* من *Gossypium hirsutum*، وجميع هذه الجينات تعد Na^+/H^+ antiporters vacular (Yamaguchi & Blumwald ٢٠٠٥). ويعطى جدول (١١-٧) مزيداً من الأمثلة على عمليات التحويل الوراثى بطريق ناقلات الأيونات.

التحسن في النمو تحت ظروف الشدة الملحي	نوع الاختبار	الصفة المحسنة	مصدر الجين	النبات المحول وراثياً	الجين
البامرات	الصوبيات والمزارع	زيادة نشاط الـ vacular-type Na^+/H^+ antiporter	<i>Atriplex gmelini</i>	الأرز	Vacular antiporter AgNHXI Na^+/H^+
تحسين في طول النمو الخضري والجذور	المزارع المائية في الصوبات	النمو الجذري الكثيف	<i>Pennisetum glaucum</i>	الأرز	vacular antiporter PgNHXI Na^+/H^+
الجفاف للتمسوات الخضرية و ٢٦٪ زيادة في الوزن الجاف للجذور	الصوبات والحقل	تحسين الإنبات وإنتاج الكتلة الحيوية ومحصول الجيوب وتراكم البوتاسيوم في الأوراق ونقص محتواها من الصوديوم	<i>A. thaliana</i>	القمح	vacular antiporter AtNHXI Na^+/H^+
زيادة النمو وإنتاج الأزهار والبذور	المزارع المائية في الصوبات	زيادة إنتاج بروتين الـ vacular Na^+/H^+ antiporter protein	<i>A. thaliana</i>	الطماطم	vacular antiporter AtNHXI Na^+/H^+
استمر النمو في ٢,٢ مول كلوريد الصوديوم	المزارع المائية في غرف نمو	طراز برى من الأرز	<i>O. sativa</i>	الأرز	vacular antiporter OsNHXI Na^+/H^+
زيادة الوزن النباتي	الصوبات	تحسين النمو النباتي ومحصول البذور	<i>A. thaliana</i>	<i>Brssica napus</i>	vacular antiporter AtNHXI Na^+/H^+
الطمازج بنسبة ٢,٣٪ ومحصول البذور بنسبة ٢,٣٪ في ١٠ مللي مول كلوريد صوديوم	الصوبات	وجود الزيت وزيادة تراكم البرولين			

جدول (٧-١): جينات التحويل الوراثي الخاصة بناقلات الأيونات ion transporters، والتي استخدمت بهدف تحسين تحمل الملوحة (عن Blumwald

٢٠٠٦).

الصفة المقاسة	النبات الجول وراثيًا	الدور بالخلية	مصدر الجين	منشع الجين	الجين
الكتلة الحيوية	Arabidopsis	Na ⁺ vacuolar sequestration	<i>A. thaliana</i>	Vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter	AtNHX1
الكتلة الحيوية وإنتاج الثمار	الطماطم	Na ⁺ vacuolar sequestration	<i>A. thaliana</i>	Vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter	AtNHX1
الكتلة الحيوية وإنتاج الزيت	<i>B. napus</i>	Na ⁺ vacuolar sequestration	<i>A. thaliana</i>	Vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter	AtNHX1
الكتلة الحيوية	الذرة	Na ⁺ vacuolar sequestration	<i>A. thaliana</i>	Vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter	AtNHX1
الكتلة الحيوية	التغ	Na ⁺ vacuolar sequestration	<i>Gossypium hirsutum</i>	Vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter	GhNHX1
الكتلة الحيوية	الأرز	Na ⁺ vacuolar sequestration	<i>Atriplex gmelini</i>	Vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter	AgNHX1
الكتلة الحيوية	Arabidopsis	Na ⁺ extrusion	<i>A. thaliana</i>	Plasma membrane Na ⁺ /H ⁺ antiporter	AtSOS1
الكتلة الحيوية	Arabidopsis	Vacuolar acidification	<i>A. thaliana</i>	Vacuolar H ⁺ pyrophosphatase	AVP1
الطماطم والكتناوب و المحتوى الأيوني والنمو النباتي	Arabidopsis	K ⁺ /Na ⁺ homeostasis	<i>S. cerevisiae</i>	K ⁺ /Na ⁺ transport regulation	HAL1

وعلى الرغم من أن جميع النباتات التى حولت وراثياً والمبينة فى جدولى (١١-٦)، و (١١-٧) أظهرت قدرًا من تحمل الملوحة، فإن جميع الدراسات أجريت فى ظروف حجرات النمو أو فى الصوبات، ولم يعرف فيها سلوك النباتات التى حولت وراثياً تحت ظروف الحقل. كذلك فإن جميع الاختبارات أجريت إما فى مرحلة إنبات البذور، وإما فى مراحل النمو الأولية، ولا يعرف كيف سيكون سلوك النباتات فى مراحل النمو الأخرى، علمًا بأن تحمل الملوحة قد يختلف - فى النوع الواحد - من مرحلة نمو لأخرى (عن Ashraf & Akram ٢٠٠٩).

التحول الوراثى لتحمل الملوحة بتمثيل المركبات العضوية

المتوافقة

إن من أكثر استجابات النباتات للشد الملحى زيادة إنتاجها من أنواع مختلفة من مركبات عضوية ذائبة. ومن أكثر تلك المركبات - التى تلعب دورًا فى آلية تحمل الملوحة: البرولين proline، والتريمالوز trehalose، والسكروز sucrose، والبوليولات polyols، والمركبات رباعية الأمونيوم quaternary ammonium compounds، والتى من أمثلتها: الـ glycinebetaine، والـ prolinebetaine، والـ alaninebetaine، والـ hydroxyprolinebetaine، والـ pipercolatebetaine، والـ choline O-sulfate.

وعلى الرغم من زيادة إنتاج تلك المركبات فى كثير من النباتات تحت ظروف الشد الملحى، فإن بعض الأنواع النباتية تقوم بتمثيل بعض هذه المركبات وتتراكم فيها بكميات قليلة جدًا، بينما لا تقوم أنواع أخرى بتمثيلها لا تحت ظروف الشد الملحى ولا تحت ظروف عدم الشد.

وعلى سبيل المثال .. فإن الجليسين بيتين - وهو أحد أكثر المركبات رباعية الأمونيوم شيوعًا - يتراكم استجابة للشد الملحى فى عديد من النباتات، منها: بنجر السكر، والسبانخ، والشعير، والذرة الرفيعة، والقمح. وبالمقارنة فإن هناك أنواع نباتية كالأرز، والمسترد، والتبغ، والـ Arabidopsis - لا يمكنها إنتاج الجليسين بيتين لا فى

الظروف الطبيعية ولا تحت ظروف الشد الملحى. هذا .. إلا أنه أمكن نقل صفة القدرة على زيادة تمثيل المركبات العضوية الذائبة المتوافقة فى عديد من الأنواع النباتية، سواء أكانت منتجة لها بطبيعتها، أم غير منتجة لها.

ومن بين مختلف المركبات العضوية الذائبة المتوافقة فإن البرولين، والجليسين بيتين والتريهالوز كانت أكثر تفضيلاً لدراسات التحول الوراثى بسبب ما هو معروف عنها بخصوص ارتباطها فى النباتات بتحمل الملوحة وحالات الشد البيئى الأخرى. فمثلاً .. يُعرف أن للبرولين علاقة بتحمل الملوحة فى عدد من الأنواع النباتية، وعليه .. فإن زيادة إنتاج البرولين يؤدي إلى تحسين تحمل الملوحة فى النباتات. وبناء عليه .. قام العديدون بإجراء تحولات وراثية لزيادة التعبير عن الإنزيم Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (اختصاراً: P5CS) الذى يقوم بوظيفتين، هما: تحويل الـ glutamate إلى Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate ثم إلى برولين. وقد استخدم الجين P5CS فى التحويل الوراثى لكل من الأرز والبطاطس والقمح والتبغ، وتراكم البرولين لعدة أضعاف مستواه العادى فى جميع السلالات التى حولت وراثياً، وهى التى أظهرت زيادة واضحة فى القدرة على النمو تحت ظروف الشد الملحى.

كذلك أجريت تحويلات وراثية بالجينات المسئولة عن تمثيل الإنزيمات المفتاحية فى تمثيل الجليسين بيتين، مثل: الـ choline dehydrogenase، والـ choline oxidase، والـ choline monooxygenase، واستخدمت فيها نباتات مثل الكرنب، والأرز، والـ *Brassica juncea*، وهى التى أظهرت زيادة فى تحمل الملوحة.

أما التريهالوز فقد عُنَى بزيادة إنتاجه بالتحول الوراثى فى نباتات مثل الأرز، وأظهرت النباتات المحولة وراثياً زيادة فى تحمل الشد الملحى وشد الجفاف وشد البرودة.

كذلك جرت محاولات للتحويل الوراثى بهدف زيادة إنتاج المانيتول mannitol، والـ myo-inositol، والـ sorbitol وغيرهم من المركبات العضوية الذائبة المتوافقة.

وبالرغم من نجاح جميع عمليات التحويل الوراثى فى زيادة قدرة النباتات على تحمل الملوحة، فإن معظمها أجرى على التبغ والـ *arabidopsis*، وباستخدام ملح كلوريد الصوديوم فقط (على الرغم من كثرة ما قد يوجد بالتربة من أملاح)، كما أنها أجريت فى ظروف حجرات النمو والصوبات ولم يعرف سلوكها تحت ظروف الحقل التى تحدث فيها تفاعلات مع مختلف العوامل البيئية الأخرى غير شد الملوحة (عن Ashraf & Akram ٢٠٠٩).

ويعطى جدول (١١-٨) بعض الأمثلة على حالات التحول الوراثى لأجل تحسين تحمل الملوحة بالاعتماد على زيادة تمثيل المركبات العضوية الذائبة المتوافقة.

(الهنرسة الوراثية للإنتاج (الجليسين) بيتين)

يبدأ مسار تمثيل الجليسين بيتين glycine betaine بالكولين choline، ويتقدم من خلال تحولين، هما: dehydrogenation للكولين و oxygenation للـ betaine aldehyde. يتم الأول بإنزيم choline monoxygene (اختصاراً: CMO)، ويتم الثانى بإنزيم betaine aldehyde dehydrogenase (اختصاراً: BADH).

ولقد أمكن عزل جينات تشفر لتمثيل كل من الـ CMO، و BADH من عديد من الأنواع النباتية الراقية واستخدما فى عمليات تحويل وراثى لعدة أنواع نباتية، بهدف زيادة إنتاجها من الجليسين بيتين. ولقد تحسّن تحمل الملوحة فى نباتات الجزر المحولة وراثياً بالـ BADH، حيث نمت جيداً فى وجود ٤٠٠ مللى مول كلوريد صوديوم، وهو تركيز لا تعيش فيه سوى النباتات المحبة للملوحة، بينما عانت النباتات غير المحولة وراثياً من تثبيط شديد فى النمو عند تركيز ٢٠٠ مللى مول كلوريد صوديوم. كما تمكن الأرز المحول وراثياً بالـ BADH من النمو فى تربة تحتوى على ٠,٥٪ كلوريد صوديوم.

وعندما كان التحول الوراثى بالـ CMO أظهرت نباتات الأرز تحملاً أكبر لكل من الملوحة والجفاف، ونمت نباتات التبغ جيداً فى وجود ١,٢٪ كلوريد صوديوم (Liu وآخرون ٢٠١١).

جدول (٨-١) : جينات التبول الوراثي الخاصة بتمثيل المركبات العضوية الذائبة المتوافقة osmolytes compatible، والتي استخدمت بهدف تحسين تحمل الملوحة (عن Blumwald ٢٠٠٦)

الصفة المتيسمة	النبات المحول وراثياً	الدور بالخلية	مصدر الجين	منتج الجين	الجين
الوزن الجاف	التبغ	Glycinebetaine	<i>E. coli</i>	Choline dehydrogenase	betA
نمو الجذور	الطماطم	Glycinebetaine	<i>Atriplex hortensis</i>	Betaine dehydrogenase	BADH
تحمل الملوحة	التبغ	Ectoyne	<i>Halomonas elongate</i>	L-2,4-diaminobutyric acid	EctA, L-2,4- EctB, trans- EctC
زيادة الكتلة الحيوية والنمو	التبغ والأرز	Trehalose	<i>E. coli</i>	Trehalose-6-P synthase	OtsA OtsB
زيادة تحمل الجفاف	التبغ	Trehalose	<i>S. cerevisiae</i>	Trehalose-6-P phosphatase	TPS1
زيادة السهولتين، والنمو النباتي	التبغ	Proline	<i>V. aconitifolia</i>	Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate synthase	P5CS
رقاد النورة استجابة للشد المحمي	Arabidopsis	Proline	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proline dehydrogenase	ProDH
إنبات البذور	التبغ	D-Ononitol	<i>M. chrySTALLinum</i>	Myo-inositol-O-methyl transferase	IMT1
إنبات البذور والنمو النباتي	Arabidopsis والأرز	Glycinebetaine	<i>A. globifomis; A. panescens</i>	Choline oxidase	COD1; COX
نمو البادرات	Arabidopsis	K ⁺ /Na ⁺ homeostasis	<i>S. cerevisiae</i>	FMN-binding protein	HAL3

وأوضحت الدراسات أن الجينات المسؤولة عن تمثيل الـ fatty acid desaturaturases والـ choline oxidase هي المسؤولة عن تحمل شد الحرارة المنخفضة وشد الملوحة فى كل من البكتيريا الرزقاء cyanobacteria والنباتات. وقد أمكن عزل الجين codA الخاص بتمثيل الـ choline oxidase - الذى يحول الـ choline إلى glycinebetaine من بكتيريا التربة *Arthrobacter globiformis*. وعندما نقل هذا الجين إلى *Synechococcus sp.* PCC7942 فإن ذلك أدى إلى تراكم الـ glycinebetaine بها وجعلها متحملة لشد الملوحة (Murata وآخرون ١٩٩٦).

وأدى تحويل الكرنب (صنف Goldin Acre) بالجين البكتيرى betA المسئول عن تمثيل الجليسين بيتين glycinebetaine إلى زيادة تحمل النباتات المحولة وراثياً لشد الملوحة مقارنة بالنباتات التى لم تحول وراثياً. ولقد أظهرت النباتات المحولة وراثياً نمواً أفضل، وثباتاً أكبر فى المحافظة على العلاقات المائية فى المستويات العالية من الملوحة (Bhattacharya وآخرون ٢٠٠٤).

وكما أسلفنا .. أدى تحويل الجزر وراثياً - فى البلاستيدات - بالجين الذى يُشفر لتمثيل الإنزيم betaine aldehyde dehydrogenase (اختصاراً: BADH) إلى زيادة إنتاجه من الجليسين بيتين وزيادة تحمله لتركيز عالٍ جداً (٤٠٠ مللى مول) من كلوريد الصوديوم (Dalal وآخرون ٢٠٠٦).

كما أدى التحويل الوراثى للبرسيم الحجازى بالجين الذى يُشفر لتمثيل الإنزيم betaine aldehyde dehydrogenase (اختصاراً: BADH) إلى نموه بصورة جيدة فى ظروف شد ملحى لم تتمكن فيه النباتات غير المحولة وراثياً من البقاء.

وعندما حُوّل نبات الـ *Arabidopsis thaliana* وراثياً بالـ choline oxidase (اختصاراً: COD) فإن النباتات أصبحت متحملة للملوحة فى مراحل إنبات البذور مع القدرة على البقاء فى جميع مراحل النمو فى وجود تركيزات عالية من الملح. وحُصِل على تأثيرات مماثلة فى نباتات التبغ التى حولت وراثياً بالـ choline dehydrogenase (اختصاراً: CDH) (عن Liu وآخرين ٢٠١١).

الهندسة الوراثية للإنتاج البرولين

يتراكم البرولين تحت ظروف الشد الملحى والجفافى؛ بسبب زيادة تمثيله بصورة أساسية، ولحدوث انخفاض فى أكسدته. وهذا المركب العضوى الذائب المتوافق يلعب دوراً كحامٍ أسموزى، وكمستودع للطاقة، وكحامٍ للجزيئات الكبيرة من الدنترة.

وفى محاولة لزيادة تحمل الملوحة فى البطاطس تم تحويلها وراثياً باستخدام الجين P5CS من *A. thaliana* المتحكم فى إنتاج الإنزيم Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase، وهو المسئول عن اختزال Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate إلى برولين. أظهرت النباتات المحولة وراثياً زيادة هامة فى إنتاج البرولين مقارنة بما أنتجته النباتات التى لم تحول وراثياً، وازداد هذا التراكم - خاصة - فى وجود ١٠٠ مللى مول من كلوريد الصوديوم، كما أظهرت النباتات المحولة وراثياً تحسناً فى تحمل الملوحة، حيث كان تأثر محصول درناتها ووزنها بالملوحة قليلاً جداً، مقارنة بتأثير النباتات التى لم تحول وراثياً (Hmida-Sayari وآخرون ٢٠٠٥).

التحويل الوراثى لتحمل الملوحة بجين الخميرة HAL1

أدى تحويل الطماطم وراثياً بجين الخميرة HAL1 (*Saccharomyces cerevisiae*) (الذى يسمح فى الخميرة بالمحافظة على مستوى عال من الـ K^+ مع خفض لمحتوى الخلايا من الـ Na^+ أثناء تعرضها للشد الملحى) إلى زيادة تحمل الملوحة فى نسلى نباتين حمل أحدهما نسخة واحدة من الجين HAL1، وحمل الآخر أربع نسخ. كما أظهر تحليل أيونا البوتاسيوم والكالسيوم أن السلالات المحولة وراثياً كانت قادرة على الاحتفاظ بقدر أكبر من البوتاسيوم بأنسجتها فى ظروف الشد الملحى عن نباتات الكنترول (Arrillaga وآخرون ١٩٩٨، و Gisbert وآخرون ٢٠٠٠).

التحويل الوراثى لتحمل الملوحة بزيادة إنتاج مضادات الأكسدة

من بين التغيرات الفسيولوجية والبيوكيميائية التى يحدثها تعرض النباتات للملوحة، فإنه يحدث فيها عدداً من التفاعلات المفسدة للخلايا والأنسجة النباتية تهيمن عليها ما

يعرف بالعناصر النشطة فى الأوكسدة reactive oxygen species (اختصاراً: ROS)، مثل:

– الـ superoxide anion (O_2^-).

– فوق أكسيد الأيدروجين hydrogen peroxide (H_2O_2).

– الـ hydroxyl radical ($\cdot OH$).

– الـ singlet oxygen (1O_2).

وبينما تُنتج الـ ROS فى النباتات فى ظروف النمو الطبيعية بكميات قليلة، فإن إنتاجها يزداد فى معظم الظروف البيئية غير المناسبة من خلال مسارات مثل البناء الضوئى photorespiration والتنفس الميتوكوندريونى mitochondrial respiration، وكذلك بواسطة جهاز البناء الضوئى photosynthetic apparatus. ومن بين أكثر تأثيرات الشد الملحى على النباتات أنه يحد من وصول ثانى أكسيد الكربون للأوراق بسبب إغلاقه للثغور؛ الأمر الذى يخفض كثيراً من سلسلة انتقال الإليكترونات فى البناء الضوئى؛ مما ينتج عنه توليد العناصر النشطة فى الأوكسدة. وهذه العناصر تعد سامة للسيتوبلازم وتؤثر فى الأيض الطبيعى بإحداثها لأضرار أكسدة شديدة بليبيدات الغشاء البلازمى والبروتينات، والأحماض النووية.

هذا .. إلا أن للنباتات وسيلتها الطبيعية لتعقب هذه العناصر المحبة للأوكسدة، وإفقادها لسميتها من خلال إنتاجها لما يعرف بمضادات الأوكسدة antioxidants، والتي من أهمها ما يلى:

– حامض الأسكوربيك ascorbate.

– الجلوتاثيون glutathione.

– الـ alpha-tocopherol.

– الكاروتينات carotenoids.

– الإنزيمات المضادة للأوكسدة، مثل: الـ superoxide dismutase (اختصاراً:

SOD)، والكاتاليز catalase (اختصاراً: CAT)، والبيروكسيداز peroxidase، وإنزيمات

دورة الـ ascorbate-glutathione.

الاستفادة من الجينات الفائقة الحساسية للملوحة فى تحديد آليات التحمل

يلزم الجين SOS2 (وهو: salt overly sensitive) فى *Arabidopsis thaliana* لتحقيق التوازن بين أيونى الصوديوم والبوتاسيوم داخل الخلايا. وتؤدى الطفرات فى هذا الموقع الجينى إلى اختلال التوازن بين الأيونين وتجعل النباتات أكثر حساسية لتثبيط النمو فى البيئات التى يزيد فيها تركيز الصوديوم وينخفض تركيز البوتاسيوم. وقد أمكن عزل الجين SOS2 لاستخدامه فى عمليات التحول الوراثى (Liu وآخرون ٢٠٠٠).

لقد بدأ البحث عن جينات مسئولة عن تحمل الملوحة فى عام ١٩٩٨، حينما اكتشفت عدة طفرات، وأمكن التعرف على جينات الـ SOS. وباختصار فإن مسار SOS يؤدى إلى استبعاد أيونات الصوديوم Na^+ الزائدة خارج الخلايا عن طريق Na^+/H^+ antiporter بالغشاء البلازمى، وتعمل على إعادة التوازن الأيونى بالخلايا إلى طبيعته. وقد مهد اكتشاف جينات الـ SOS الطريق إلى اكتشاف مسار أيسى جديد يربط الـ Ca^{2+} signaling كاستجابة للشد الملحى (Mahajan & Tuteja ٢٠٠٥).

وأمكن التعرف فى الـ *Arabidopsis* على ثلاثة جينات زائدة الحساسية للملوحة (تأخذ الرمز SOS)، وهى - كما أسلفنا - طفرات تجعل النبات فائق الحساسية لكلوريد الصوديوم. وقد تبين أن كلها تلعب - كذلك - دوراً فى التغذية بالبوتاسيوم لأنها فائقة الحساسية للنمو فى التركيزات المنخفضة من البوتاسيوم. وبذا .. فإن التعرف على طفرات الـ SOS أوضح أن التغذية بالبوتاسيوم تعد عملية حاسمة فى خاصية تحمل الملوحة. كذلك فإن عزل الطفرة sos3 أكسبنا فهما أفضل لدور أيون الكالسيوم فى خاصية تحمل الملوحة؛ ذلك لأن تلك الطفرة الفائقة الحساسية لكلوريد الصوديوم أمكن إلغاء تأثيرها بتوفير مستويات مللى مولارية من الكالسيوم (عن Borsani وآخرين ٢٠٠١).

وكان Zhu وآخرون (١٩٩٨) قد تمكنوا من عزل ٢٨ آليلاً جديداً من sos1، و ٩ آليات طفرية من SOS2، وآليل واحد من SOS3 فى الـ *Arabidopsis*. فقد تبين أن طفرات sos2 - وجميعها متنحية - تقع على الذراع السفلى من الكروموسوم V، وكانت تلك الطفرات فائقة الحساسية - خاصة - للتثبيط بالصوديوم Na^+ أو الليثيم Li^+ ، ولم تكن فائقة الحساسية للضغط الأسموزى العام. ووجد - كذلك - أن موقع الـ SOS2 ضرورى للتغذية بالبوتاسيوم K^+ ، إلا أن طفرات الـ SOS2 لم تكن قادرة على النمو فى بيئة زراعة بها مستوى منخفض من البوتاسيوم. ويستدل من تلك الدراسة أن جينات SOS1، و SOS2، و SOS3 فى الـ *Arabidopsis* تشفر لتمثيل مركبات منظمة تتحكم فى تغذية النبات بالبوتاسيوم الضرورى لتحمل الملوحة.

كذلك أمكن استحداث ثلاث طفرات فائقة الحساسية للملوحة فى الطماطم. هذه الطفرات كانت بسيطة ومنتحية وتحتل موقعين كروموسوميين. كانت الطفرة tss1 فائقة الحساسية - خاصة - لتثبيط النمو بفعل أيون الصوديوم أو الليثيم، لكنها لم تكن فائقة الحساسية للضغط الأسموزى العالى بصفة عامة. أما الطفرة tss2 فكانت فائقة الحساسية لتثبيط النمو بالصوديوم أو الليثيم مثل الطفرة الأولى، ولكنها كانت - كذلك - فائقة الحساسية للضغط الأسموزى العالى بصورة عامة. ويُعد الجين TSS1 ضرورياً للتغذية بالبوتاسيوم، لأن طفرات الـ tss1 لم تكن قادرة على النمو فى بيئة تحتوى على تركيزات منخفضة من البوتاسيوم. وبزيادة الكالسيوم فى بيئة الزراعة فإن ذلك منع التأثير المثبط للطفرة tss1 فى التركيز المنخفض من البوتاسيوم. ويستفاد مما تقدم أن الموقع الجينى TSS1 ضرورى لكل من التغذية بالبوتاسيوم وتحمل كلوريد الصوديوم فى الطماطم. أما الموقع TSS2 فربما يكون منظماً سلبياً لإشارات حامض الأبسيسك؛ ذلك لأن الطفرة tss2 كانت فائقة الحساسية لتثبيط النمو بحامض الأبسيسك، وبذا .. يمكن الاستنتاج - كذلك - أن إشارات حامض الأبسيسك تعد هامة فى تحمل الملوحة والضغط الأسموزى فى النباتات الـ glycohytic مثل الطماطم (Borsani وآخرون ٢٠٠١).

مصادر إضافية

بالإضافة إلى ما أوردناه من مصادر خاصة بالمادة العلمية المتعلقة بالتربية لتحمل الملوحة فى الفصلين العاشر والحادى عشر، فإننا نشير إلى المراجع التالية التى تتناول الموضوع من جوانب شتى.

الموضوع	المرجع
وراثة وطبيعة تحمل الملوحة	١٩٨٥ Tal
شامل	١٩٩٧ Jaiwal وآخرون
أهمية وجهود التربية	١٩٩٧ Flowers & Yeo
وراثة التحمل	١٩٩٧ Shannon
مصادر الجيرمبلازم البرى للتحمل	١٩٩٧ Tal
استخدام مزارع الأنسجة	١٩٩٧ Gulati & Jaiwal
استئناس الأنواع المحبة للملوحة	١٩٩٧ Jaiwal وآخرون
استخدام الوراثة الجزيئية فى التربية لتحسين تحمل الملوحة	١٩٩٨ Winicor
التحليل الوراثةى لتحمل الملوحة باستعمال الـ Arabidopsis	٢٠٠٠ Zhu
فسيولوجيا تحمل الملوحة والجفاف	٢٠٠٥ Bartels & Sunkar
طبيعة تحمل الملوحة	٢٠٠٨ Munns & Tester