الفصل الثالث عشر

تحسين فترة صلاحية الخضراوات بالتحوير الوراثي

Improving the Shelf-Life of Vegetables by Genetic Modification

إل. سي. جارات، جي. بي. بور و إم. آر دافي، جامعة نوتينجهام

L. C. Garratt, J. B. Power and M. R. Davey, university of Nottingham

(١٣,١) مقدمة

Introduction

فترة صلاحية غذاء طازج (خام raw) أو مصنَّع ، مقياس للوقت الذي تحتفظ فيه هذه المنتجات بجودتها المثلى (الطبيعية) (optimum quality) ، أثناء النقل والتخزين والعرض عند درجات حرارة منخفضة أو درجة حرارة الجو (ambient temperatures). التدهور السريع للفواكه والخضراوات أثناء هذه الأوقات مشكلة مستمرة ملازمة (on-going problem) للمنتجين وموزعي المنتجات الغذائية بالتجزئة ، وبصفة خاصة المنتجات الطازجة ، إذا إنها تؤدي إلى خسائر(wastages) لأن المنتجات تصبح غير صالحة للتسويق (unsaleable) بسرعة. وبالتالي ، فإن أي تمديد لفترة الصلاحية وتحسين في جودة الخضراوات المحصودة طازجة ، وبقائها (durability) ، يكون ذلك أمراً ذا فائدة بالغة لكل من المنتج والمستهلك. ويمكن استغلال تقنيات المعالجات

obeikandl.com

الوراثية (genetic manipulation technologies) لفهم، وفي النهاية، معالجة كل من نضج الفواكه والخضراوات قبل الحصاد وبعده وشيخوختها.

(١٣,٢) شيخوخة أعضاء النبات
Senescence of Plant Organ

الشيخوخة هي المرحلة النهائية في تطور العضو، وتتضمن سلسلة من التغيرات الفسيولوجية والكيموحيوية. وبصفة عامة، تعتبر الشيخوخة شكلاً من أشكال موت الخلية (form of cell death)، الذي يتميز بفقدان الصبغات والدهون والبروتين الكلي والحمض النووي (أر إن أ RNA) (Smart, 1999). تستخدم الشيخوخة المبرمجة (programmed senescence) بالإضافة إلى انفصال(abscission) الأعضاء الموجودة، لمقاومة التوليد (التكوين) المستمر (continuous generation) للأعضاء بالمرستيمة النباتية(plant meristems) (Bleecker and Patterson, 1999). وهذه عملية جيدة التنظيم والتي يتم فيها تحريك الكربون والنيتروجين والعناصر الغذائية الأخرى ونقلها إلى أجزاء نبات معينة محددة، مثل البذور(seeds)، والثمار، والجذور والأوراق الصغيرة (Weaver et al., 1997). تمكّن هذه الاستعادة للحركة (remobilization) من تدوير العناصر التغذوية لاستيعاب النمو وفي النهاية، إنتاج البذور. وبالتالي، فإن الجهاز الوعائي (vascular system) الذي من خلاله يتم نقل العناصر الغذائية هو آخر عضو يشيخ (Buchanan-Wollaston, 1997). تخضع شيخوخة الأوراق لسيطرة نووية صارمة(strict nuclear control) وتتبع نموًّا واضحًا متميزاً، فيه فقد مطرد لتكوين الحجيرات الخلوية (cellular compartmentalisation).

يتضمن حدث مبكر في شيخوخة الخلايا تكسير (تحلل) خلايا الكلوروبلاست التي تحتوي على ٥٠٪ من البروتين و٧٠٪ من الدهون الموجودة في الأوراق. أيضاً،

هناك هدم للصبغات، وخاصة في الكلوروفيل، مما يؤدي إلى اصفرار الأنسجة الشائخة (senescing tissues)، مع فقد مطرد لبروتينات أخرى مرتبطة الكلوروبلاستات (Bleater and Paterson, 1997). تصل مثل هذه الأحداث أو تنتهي بانخفاض وتوقف حتمي (eventual sessation) للتمثيل الغذائي الضوئي ، photosynthesis. ويعزى اصفرار الأوراق خلال الشيخوخة المبكرة لفقد غير متكافيء للكلوروفيل مقارنة بفقد الكاروتينويدات (Biswal, 1995). ينخفض حجم السايتوبلازم (cytoplasmic volume) كما ينخفض عدد الريبوسومات السايتوبلازمية (cytoplasmic ribosomes)، وفي النهاية يؤدي ذلك إلى انخفاض في الحمض النووي ؛ الآر إن أ الرايبوسومي (ribosomal RNA) وفي تصنيع البروتين وذلك إثر تفكك، تحلل الشبكة الهيولية الداخلية (endoplasmic reticulumn) والبوليسومات (عديد الرايبوسومات، polysomes). تبقى بعض العضيات (organelles) مثل المايتوكوندريا (mitochndria) والأنوية (nuclei) على حالها حتى أواخر الشيخوخة (Hooden and Guiamet, 1996).

ولأن الشيخوخة تتطلب طاقة (Buchanan- Wollaston, 1997)، فلابد أن يكون للخلايا آليات وقائية للمحافظة على آليتها التنفسية والاستنساخية (الاستنسالية) (respiratory and transcriptional machinery) أثناء هذه العملية. عليه، فإن المحافظة على المايتوكوندريا تمكّن من استمرار التنفس لتوفير الطاقة(Smart, 1994)، بينما تبقى الأنوية بتماميتها من أجل تسهيل التعبير الجيني (الوراثي)(transcription of genes) المضمَّن في المسارات الهدمية التحللية (degradative pathways). يؤدي مثل هذا التعبير الوراثي إلى استعادة (الحفاظ على recovery) المكونات الخلوية. وفي نهاية الأمر، تتنكس (تتحلل) الأغشية الحويصلية(vacuolar membranes degenerate) وتحرر (تفرز release) الإنزيمات المحللة للبروتينات (proteolytic enzymes) في السايتوسول (مادة الخلية cytosol). ويمثل

هذا أحد المراحل النهائية للعملية الهدمية التحللية (degradative processes) المرتبطة بالشيخوخة.

(١٣,٣) السيطرة الجينية على شيخوخة الأوراق ونضج الفواكه
Genetic Control of Leaf Senescence and Fruit Ripening

تتضمن شيخوخة الأوراق تغيرات بالغة في التعبير الجيني الوراثي (gene expression). وبينما يتعطل(down-regulated) التنظيم، التعبير الوراثي لمعظم الجينات أثناء الشيخوخة، إلا أنه، أي التعبير، يرتفع في حالة الجينات المرتبطة بالسيطرة على هذه العملية (الشيخوخة) (Nam, 1997). لقد تم تحديد (التعرف على) عدد كبير من مثل هذه الجينات المرتبطة بالشيخوخة ((senescence-associated genes (SAGs) (Gan & Amasino, 1997) باستخدام المسح التفريقي (differential screening) وتقنيات التهجين الجنسية (subtractive hybridization techniques) والأكثر حداثة، استخدام خطوط حبس محفزة (enhancer trap lines) *للارابيدوبسيس ثاليانا* (*Arabidopsis thaliana*) (He *et al.*, 2000).

تتشابه بعض الجينات المرتبطة بالشيخوخة(SAGs) في التسلسل (sequence similarity)، مع الجينات المتوقع أن تكون متضمنة في تحلل وتحريك العناصر التغذوية، مثل البروتييزات(proteases)، الآر إن أيزات(RN Ases) والجلوتامين سينسيتيزات (glutamine synthesases)، بينما ما زالت وظائف أخرى في انتظار التحديد (Ori *et al.*, 1999). في بذور اللفت وهي من البذور الزيتية(oilseed rape) (*البراسسيكانابيوس Brassicanapus*) على سبيل المثال، تشمل الجينات المرتبطة بالشيخوخة زوج السيستيين بروتييز(cysteine proteases) (الـ LSC7) و(LSC 790)، والجلوتامين سينسيتيز (الـ LSC 460)، والـ أ تي ب سلفايوريليز(ATP slphurylase) (الـ LSC 680)، والكاتيلز(catalase)

(الـ LSC 650)، والميتالوثايونين(metallothionein) (الـ LSC 210)، والفيريتين(ferritin) (الـ LCS 30)، وبروتين مضاد للفطريات (الـ LSC 212) (Buchanan-Wollaston and Ainsworth) ١٩٩٧.

يحول الجلوتامين سينسيتيز الأمونيا (النشادر) إلى جلوتامين، وتشتق الأمونيا من إزالة أمينات(deamination) من الأحماض الأمينية ومن هدم(catabolism) أحماض النيوكليك(nucleic acids) أثناء الشيخوخة. الجلوتامين والأسباراجين (asparagines) هما الحمضان الأمينان السائدان في الفالويم (phloem) أثناء الشيخوخة ويعتبران الحمضين القابلين للنقل (transportable) الرئيسين (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997). الـ أ تي بي سلفايوريليز(ATP sulphurylase) متضمن في التصنيع الحيوي (biosynthesis) للسيستيين والمثيونين. وقد تم افتراض، أنه أثناء الشيخوخة يؤدي التنظيم الدقيق (ATP sulphurylase (up-regulation) إلى زيادة تالية/لاحقة في مخزون السيستيين (cysteine pool). السيستيين هو طليع (precursor) للتصنيع الحيوي للجلوتاثيون (glutathione biosynthesis)، والجلوتاثيون مضاد أكسدة رئيس، والذي بالإضافة إلى دوره في استعادة الأسكوربات وكسح أنواع الأكسجين المتفاعلة(ROS)، فإنه يعمل في نقل وتخزين الكبريت (Rennenberg, 1982) وكما يعمل في تنظيم انقسام الخلايا وتطورها (Earnshaw and Johnson, 1985) ويعمل في تنظيم التعبير والتأشير الجيني (الوراثي) (Wingate *et al.*, 1989; Herouart *et al.*, 1993; Moran gene expression and signalling) *et al.*, 2001) ويعمل في إزالة سمية المواد الغريبة عن الجسم (xenobioties) والمعادن الثقيلة(heavy metals) (Delhaize *et al.*, 1989; Halliwell and Gutteridge, 1986; Timmerman, 1989).

لقد تم وصف عدة أشكال متناظرة(isoforms) للكاتاليز، منظمة تنظيماً تمييزياً، والتي يُظهر كثيرٌ منها تعبيراً متزايداً أثناء الشيخوخة (Buchannan-Wollaston and

(Ainsworth, 1997). بالإضافة إلى دوره كمضاد أكسدة، أثبت أن الكاتاليز يستحث (ينشط) النشاط التنفسي، مؤدياً إلى زيادة صافية في إنتاج الـ ATP (Rodriguez et al., 2000). مثل الكاتاليز، قد يكون للميتالوثايونيين (mettallothionein) دور مضاد للأكسدة يقي به الـ DNA في أنواع الأكسجين التفاعلية (الـ ROS)، وأن هذه الأخيرة تتولد نتيجة للعمليات التحللية التي تحدث أثناء الشيخوخة. وأيضاً، للفيريتين دور مفترض كمضاد أكسدة أثناء الشيخوخة.

وقد تم توضيح أن إنتاج جذور (شقوق) الهيدروكسيل (hydroxyl radicals (OH)) يعتمد على وجود حديد حر داخل الخلايا (Hailwell and Gutteridge, 1986, 1999) وأن مثل هذه الجذور الهيدروكسيلية قد تسبب تحطيم وإتلاف كل مجموعات الجزيئات الكبيرة المهمة حيوياً (bidogically important macromolecules)، خاصة أحماض النيوكليك (الأحماض النووية (Deak *et al.*, 1999). عليه فإن السيطرة على تركيزات الحديد الحر داخل الخلايا من خلال تضمينه في الفيريتين أمر ذو أهمية بالغة إذا أريد أن تبتقى أنواع الأكسجين المتفاعلة في تركيزات أدنى من مستوى التركيزات المميتة (lethal concentrations). يتم حجز معظم الحديد غير القابل للأيض (non-metabolisable) داخل خلايا النبات في الفيرتين.

تشمل الجينات المرتبطة بالشيخوخة (SAGs) الموجودة في الـ *B. napus* تلك التي للميتالوثايونين (الـ LCC 54) (Bochanan- Wollaston, 1994) والشيتينيز (Chitinase) (الـ LSC 222) (Buchanan- Wollaston and Ainsworth, 1997). لقد تم توضيح أن ثلاث جينات مرتبطة بالشيخوخة، وبالتحديد الـ SENU1 والـ SENU4 والـ SENU5 منظمة تنظيماً دقيقاً أثناء شيخوخة الأوراق (foliar senescence) في الطماطم (Joun *et al.*,

(1997). بينما ما زالت وظائف الـ SENU1 والـ SENU5 لم تتحدد بعد، فإن الـ SENU4 يرمز للبروتين المرتبط بالإمراضية، الـ بي ٦ (P6).

لقد تم تحديد سبعة جينات مرتبطة بالشيخوخة(SAGs)، بالتحديد الـ pTOMs ١٣ و٣١ و٣٦ و٦٦ و٧٥ و١٢٩ و١٣٧، والتي بالإضافة إلى تنظيمها الدقيق في أوراق الطماطم أثناء الشيخوخة، قد وجدت منظمة تنظيماً دقيقاً في ثمار الطماطم أثناء النضج، أيضاً (Davies and Grierson, 1989). بالتالي، لقد تم افتراض أن الشيخوخة والنضج قد يتشاركان في تعبير جينات شائعة مشتركة (بينهما) (common genes).

لقد ربطت وظيفة الـ pTOM13 بتصنيع الإثيلين، ولكن لم يتم تحديد وظائف تقييم الـ pTOMs الأخرى بعد. وعلى أي حال، لقد تم اقتراح أن تعبير الـ pTOMs ٣١ و٣٦ و٦٦ و١٢٩ قد يكون مرتبطاً بالإجهاد (Davies and Grierson, 1989). لقد أثبت إنتاج الـ RNA المراسل (messenger RNA) بواسطة العينات المرتبطة بالشيخوخة الـ pTOMs ٣١ و٣٦ و١٣٧ و١٣ و٦٦ و٧٥ يعتمد على الإثيلين.

لقد تم تحديد جين مرتبط بالشيخوخة يُرَمِّز للشكل السايتوبلازمي للجلوتامين سينسيتيز في الفجل(radish) (Kawakami and Watanabe, 1988) ويتبعه جين مرتبط بالشيخوخة يستحث الظلام تكوينه(dark- inducible SAG) أي الـ *dinl* والذي وصفت وظيفته مبدئياً بأنها مرتبطة بالإمراضية(Azumi and Watanabe, 1991). إضافة لذلك، فقد ذكر جين مرتبط بالشيخوخة آخر يرمز لشكل آخر من الجلوتامين سينسيتيز في الأرز (الأوريازا ساتيفا (*Oryza sativa*) (Kamachi *et al.*, 1992). وقد تم توضيح أن جينين مرتبطين بالشيخوخة يرمزان لجلوتامين سينسيتيز العصارة الخلوية (cytosolic glutamine synthetase) (الـ GS1) ولجلوتامين سينسيتيز الجبيلي اليخضوري (chloroplastic glutamine synthetase) (الـ GS2) منظمين تنظيماً دقيقاً في الأرز بالرغم

من كثرة (وفرة) البيبتيدات العديدة المتناظرة (abundance of the corresponding polypeptides) لا ترتبط مع كثرة الـ mRNA في أوراق الأرز (Kamachi et al., 1992).

يوجد جين مرتبط بالشيخوخة يرمز لإنزيم الجلايواكسيسومال (glyoxysomal enzyme) أي المالات سينسيتيز [malate synthetase (MS)] في الخيار (*cucumis sativas*) (Graham *et al.*, 1992)، بينما وصف جين مرتبط بالشيخوخة شبيه مستقبل كينيز مرتبط بالشيخوخة (associated senescence- receptor- like kinase (SARK) SAG) في الفاصوليا (bean, *phaseolus vulgaris*) (Hajouj and Gepstein, 2000). يتولد التعبير الوراثي للـ SARK بواسطة الإثايلين، ولكن تؤخره السيتوكينينات. زيادة على ذلك، إذ أن البيبتيد العديد للـ SARK يشبه مستقبلات كاينيز أخرى مرتبطة بمسارات تحول الطاقة التأشيرية (signal transduction pathways)، فقد تم افتراض أن تعبير الـ SARK قد ينظم بعض مسارات عملية الشيخوخة(Hajouj and Gapstein, 2000).

في *الـ Arabidopsis*، ومن بين الجينات المرتبطة بالشيخوخة الكثيرة، تذكر التي تُرَمِّز لشكل جبيلي(plastidial form) للجلوتامين سينسيتيز (الـ Atgsr 2) (Bernhard and Matile, 1994) والذي يرمز للـ ANase (الـ RNS2) (Tayler *et al.*, 1993) وبوليبوبيكويتين (polyubiquitin)، الـ PSEN3 وبيبتيد مرتبط بالإنيدوكسي لوجلوكان ترانسفيريز(endoxyloglucan transferase) الـ PSEN4 (Park *et al.*, 1998). وباستخدام معالجة حجر تحفيزي تم تحديد ١٢٥ جينًا من الجينات المرتبطة بالشيخوخة المحتملة في *الـ Arabidopsis* (He *et al.*, 2001)؛ منها ثلاثة الـ Sel25 (SAG 103) وsel139 (SAG 101) وsel142 (SAG 102) قد تم استنسالها. وجد أن الـ SAG 101 تُرَمِّز اكايل هايدروليز (acyl hydrolase)؛ ولم تحدد وظائف الـ SAGs 102 و103. إن مستويات الـ mRNA لكل من الألفا في بي إي (alpha VPE) والجاما في بي إي (gamma VPE) التي تُرَمِّز الإنزيمات

التصنيعية الحويصلية (vacuolar processing enzymes) التخصصية للأعضاء النباتية منظمة تنظيماً دقيقاً في الأوراق الأولية للـ *Arabidopsis thaliana* أثناء الشيخوخة، بالتوازن مع الزيادات في مستويات الـ mRNA للـ SAG2 (Kinoshita *et al.*, 1999).

في التبغ، تظهر النباتات المحورة بجين الـ *ipt* المرمز للتصنيع الحيوي للسايتوكينين من الـ T-DNA لبلازميد Ti للبكتيريا السالبة لصبغة جرام الـ *Agrobacterium tumefaciens*، شيخوخة متأخرة عندما تم ربط الجين بمحفز صدمة حرارية (heat- shock promoter). لقد استخدمت مثل هذه النباتات المحورة وراثياً لعزل أنسال cDNA خاصة بالشيخوخة (senescence-specific cDNA) وتم التعبير عنها في مراحل محددة للشيخوخة(Cooper *et al.*, 1996). مستوى التعبير الوراثي للشيخوخة المتولدة اصطناعياً في الأوراق المفصولة، مشابه جداً للشيخوخة الطبيعية للأوراق السليمة، مع إظهار معظم الجينات المرتبطة بالشيخوخة لنفس نمط التعبير(Hajouj and Gepstein, 2000). هذه ملاحظة مهمة، مع معرفة أن معظم الأبحاث التي أجريت حتى التاريخ الحالي، على النباتات المحولة وراثياً لتسجيل الأحداث التي تحدث عند تأخر الشيخوخة، قد أجريت بتحاليل تتضمن أوراقاً مفصولة، وفي بعض الأحيان تحت ظروف عوز النيتروجين (nitrogen starvation).

في الفواكه، أثبت أن التغيرات التي تحدث أثناء التصنيع تكون ناتجة أساساً بسبب التغيرات في الاستنساخ الوراثي. تم تحديد كثير من الـ cDNAs المرتبطة بالنضج المحفز بالإيثلين(ethylene driven ripening) في الطماطم (Gray *et al.*, 1992)، بينما تم في الموز (musa acuminate) إثبات ١١ مجموعة للـ mRNAs والتي تم التعبير عنها تفريقياً/تمييزياً أثناء نضج الثمار (Clendennen and May, 1997). اثنان من الـ mRNAs

هذه، يرمزان بروتينات متضمنة في أيض الكربوهيدرات، بينما ترمز أخرى بروتينات مرتبطة بالمرضية والشيخوخة أو الاستجابات للإجهاد.

تزيد النسخ التي ترمز الإندوشيتينيز(endochitinase)، وبيتا - ١، ٣- جلوكانيز(B- 1,3- glucanase) والبروتين المشابه- للثاوماتين (thaumatin- like protein) والأسكوربات بيراُكسيديز (ascorbate peroxidase)، ذلك أثناء نضج ثمار الموز بينما تقل النسخ التي تُرمز الاستارش سينسيتيز(starch synthase) والاستراش سينسيتيز المربوط بالحبيبة(granule-bound starch synthetase) والشيتينيز(chitinase) والليكتين (lectin) والميتالوثاينونيين ١١ في وفرتها(Clendennen and May, 1997). تم عزل cDNAs مرتبطة بالنضج (ripening associated cDNAs) من عنب شيراز (shiraz grape) *الفيتس فينيفرا* (*vitis vinifera*) (Davis and Robinson, 2000). لقد تم توضيح أن بعض هذه الـ cDNAs ترمز للبيبتيدات العديدة المتضمنة في تركيب جدران الخلايا مثل البروتينات الغنية بالبرولين (proline-rich proteins) والبكتين ميثايل استيريز (pectin methyl esterases) والبروتينات الغنية بالجلوتامات (glutamate-rich preteins). وقد ذكرت cDNAs أخرى أنها بروتينات مرتبطة بالنضج أو الإجهاد مثل البروتين المشابه للثاوماتين والميتالوثايونينات وعوامل النسخ (transcription factors) وإنزيم السايتوكروم ب ٤٥ والبروتينات المتولدة بالماء(proteins induced by water) والسكر والإجهاد بسبب البرد(cold stress) في أنواع أخرى(Davies and Robinson, 2000). في البطيخ (melon, *Cucumis melo*)، درس تعبير مختلف الـ cDNAs المرتبطة بالنضج في سبعة أصناف والتي أظهرت اختلافات/ فروقات في سلوكها النضجي (Aggelis *et al.*, 1997). يوضح هذا البحث أن الأصناف ذات التعبير المتأخر للـ ١-أمينوسايكلو بروبين-١-كاربوكسيلك أسيد أُكسيديز إم آر إن ا (1- amino cyclopropane-1- carbpxylic acid oxidase (ACO)

mRNAs] أظهرت لينا (طراوة)(softening) متأخرا أثناء النضج ، وبذلك تطيل فترة صلاحية الثمار المحصودة.

(١٣,٤) تنظيم شيخوخة الأوراق

Regulation of Leaf Senescence

يُنظم بدء شيخوخة الأوراق بعوامل داخلية وبيئية مختلفة. وتشمل هذه المؤثرات البيئية ، طول اليوم (day length) ودرجات الحرارة القصوى (extremes of temperature) والجفاف (drought) وحجز الماء (water logging) ونقص العناصر الغذائية (nutrient defficiency) وعدوى الممرضات(Smart, 1994). تمكن شيخوخة الأوراق من استعادة تخصيص الموارد (reallocation of resources) للأعضاء التناسلية (reproductive organs) لضمان إكمال النباتات لدورات حياتها ، حتى تحت ظروف الإجهاد. وقد تسبب العوامل الداخلية الشيخوخة ، وتشمل هذه العوامل عمر الأوراق وتطور التكاثر (reproductive development) وتركيزات الهرمونات النباتية (phytohormones). بالتالي ، تحدث الشيخوخة حتى في عدم وجود الإجهاد البيئي (Gan and Amasino, 1997). لقد تم افتراض أن لمدى من الهرمونات النباتية أدواراً محتملة ممكنة في بدء (بعث ، نشوء) شيخوخة الأوراق وتشمل هذه الأوكسينات (auxins) والجيبيريلينات(gibberellins) والإيثلينوحمض الابسسيسيك (abscisic acid) والسايتوكينينات (Smart, 1994). وحقاً ، قد اتهمت السايتوكاينينات لبعض الوقت ، بأنها المسببة لشيخوخة الأوراق في كثير من الأنواع (Nooden and Leopold, 1978; Nooden, 1980). مع الاعتقاد بأن استنزاف السايتوكينينات في هذه الأعضاء ، يقدح (يستحث) تسلسل الأحداث (trigger the cascade of events) التي تشكل هذه العملية.

(١٣,٥) السايتوكينينات والشيخوخة
Cytokinins and Senescence

يعتقد بأن السايتوكينينات تؤخر الشيخوخة بالمحافظة على السلامة والتمامية الخلوية (التماسك الخلوي (cellular integrity))، خاصة المحافظة على غشاء التونوبلاست(الخلية الإيقاعية) (tonoplast membrane). يمنع هذا تسرب البروتييزات من الحويصلة إلى داخل السايتوبلازم ويمنعها من تحلل كل من البروتينات الذائبة (soluble proteins) والكلوروبلاست، جبيلة أو حبيبة اليخضور وأغشية المايتوكوندريا. وقد تعمل السايتوكينينات بتثبيط أكسدة دهون الأغشية، المفعلة بالجذور الحرة (free radical-mediated oxidation) (Lesham, 1992). استخدمت ثلاث معالجات لدراسة آثار السايتوكينينات في شيخوخة النبات، والتي تتضمن الاستخدام الخارجي لمحاليل السايتوكينينات وقياس السايتوكينينات الداخلية أثناء الشيخوخة والتصنيع الحيوي المرمز بالجينات المحورة، للسايتوكاينين (trans gene-encoded cylokinin biosynthesis). وتوضح التحاليل أن تركيز السايتوكينينات الداخلية في أنسجة النبات تنخفض مع اضطراد الشيخوخة (Van Staden and Joughin, 1988). ينخفض محتوى نُسْغ (لين) الزيلم (لين نسيج الخشب) (xylem sap) من السايتوكينين في النباتات مثل زهرة الشمس (sunflower) وفول الصويا، بسرعة، مع بدء الشيخوخة، ويفيد هذا بأن الانخفاض في نقل السايتوكينين من الجذور إلى البراعم والفروع (shoots) يمكّن الشيخوخة من التقدم والاضطراد (Nooden *et al.*, 1990).

إن الاستخدام الخارجي للسايتوكينينات قد يؤخر شيخوخة الأوراق المفصولة (من النبات)، بالرغم من أن منظمات النمو هذه تكون أحياناً أقل كفاءة في الأعضاء المرتبطة بالنبات الأصل (Gan and Amasino,1996). وفي هذا السياق، فإن الاستخدام الخارجي للسايتوكينينات، مثل الدايهايدروزياتين (dihydrozeatin) والبنزايلادينين

(benzyladenine)، قد استغل/استخدم تجارياً لإطالة فترة صلاحية الفواكه والخضراوات والزهور المقطوعة المحصودة طازجة (Ludford, 1987; Salisbury and Ross, 1992).

لقد كانت هناك معالجة لتأخير الشيخوخة من خلال استخدام التصنيع الحيوي للسايتوكينين المرمز بالجينات المحورة. في البداية، درس هذا في التبغ باستخدام التعبير الفائق التكويني أو القابل للاستحثاث (constitutive or inducible over expression) لجين الـ *ipt* الذي يرمز الأيسوبينتينايل فوسفوترانسفيريز (isopentenyl phosphotransferase). يحفز هذا الإنزيم المعدل الذي يحدد خطوة التصنيع الحيوي للسايتوكينين دي نوفو بايروفوسفات (de novo cytokinin pyrophosphate) (McGaw and Burch, 1995)، بمعنى آخر إضافة Δ^2-أيسوبينتينايل بايروفوسفات (Δ^2 isopentenyl pyrophosphate) إلى الـ *إن*٦ للـ ٥′-أدينوسين مونوفوسفات (of 5′-adenosine monophosphate) لتكوين أيسوبينتينايل أدينوسين ٥′-مونوفوسفات (isopentenyl adenosine 5′- monophosphate) (Chen, 1997). الأيسوبينتينايل فوسفوترانسفيريز متغير بدرجة بالغة، وحتى الوقت الحاضر لم تتم تنقيته(purified) من النباتات.

الإيسوبينتينايل أدينوسين ٥′- مونوفوسفات هو طليع كل السايتوكينينات الأخرى، والتي منها ثلاثة هي التي كشفت والأكثر كشفاً وبصورة شائعة كما أنها الأكثر نشاطاً فسيولوجياً؛ وهي الإيسوبينتينايل أدنين (isopentenyladenine) والزياتين (zeatin) والدايهايدروزياتين (dihydrozeatin) (Salisbury and Ross, 1992; Mok and Mok, 1994). وعلى أي حال، بينما أدى التعبير الفائق لجين الـ *ipt* في النباتات المحورة وراثياً إلى ارتفاع تركيزات سايتوكينينات الأوراق كما أدى إلى تأخير شيخوخة الأوراق، وارتفاع تركيزات السايتوكينين، فإن تركيزات السايتوكينينات العالية ضارة

جداً بالنمو والخصوبة (Medford *et al*., 1989; Yusibov *et al*, 1989; Smart *et al.* 1991; Li *et al.*, 1992; Hewelt *et al.*, 1994; Machakova *et al.*, 1997; Wang *et al*., 1997 a, b).

(١٣,٦) الإثيلين والشيخوخة

Ethylene and Senescence

يتحكم هرمون النباتات، الإيثلين، في عدة عمليات تطويرية (developmental processes)، تشمل نمو البذور(seedling growth) وشكلها، ونضج الفواكه وانفصال الأعضاء(abscission) والشيخوخة(Hackett *et al.*, 2000). يُصنع الإيثلينمن إس-ادينوسايل -إل -ميثيونين (S- adenosyle-L-methionine) من خلال نشاط إنزيمات حمض ١-أمينوسايكلوبروبين-١- كاربوكسيليك سينسيز (1- aminocyclopropane- 1-carboxylic acid (ACC) synthase) والـ ACC أُكسيديز (ACC oxidase). يحول الـ ACC synthase (ACS) الـ إس ادينوسايل-إل-ميثيونين إلى ACC، والذي من ثم يهدم إلى الإيثايلين بواسطة الـ(ACO) ACC oxidase. تؤخر مثبطات التصنيع الحيوي للإيثلين، مثل حمض الأمينو-أوكسياسيتيك وثيوسلفات الفضة(silver thiosulphate) الشيخوخة أو تمنعها (Savin *et al.*, 1994). لقد ثبت أن الإيثلين يحث تعبير الجينات المرتبطة بالشيخوخة (SAGs) (Davies and Grierson, 1989; Park *et al.*, 1998; Weaver *et al.*, 1998; Kinoshita *et al*., 1999; Hajouj and Gapstein, 2000). لقد تم تحديد بيروكسيديز (peroxidase) منظم تنظيماً دقيقاً أثناء الشيخوخة المستحثة بالإيثلين;(Abeles *et al.*, 1988) Morgens *et al.*, 1990) في خيار مستنسخ (cloned cucumber). لقد تم توضيح أن الطفرة غير الحساسة للإيثلين (ethylene-insensitive mutant)، أو *etrl* للـ *A. thaliana*، تظهر زيادة بنسبة ٣٠٪ في التعمير (العيش طويلاً، longevity) قبل أن تشيخ مقارنة بالنباتات البرية(wild-type plants). يتوافق هذا التأخير في بدء الشيخوخة مع الحث المتأخر

للجينات المرتبطة بالشيخوخة والمستويات العالية لتعبير الجينات المرتبطة بالتمثيل الضوئي (photosynthesis-associated genes) (Grbic and Bleecker 1995).

(١٣,٧) أنواع الأُكسجين المتفاعلة/التفاعلية والشيخوخة

Reactive Oxygen Species and Senescence (ROS)

يوجد برهان بأن نشاط البيروكسيديز وتركيزات **أنواع الأُكسجين المتفاعلة/التفاعلية** الـ ROS مثل الهيدروجين بيروكساید (H_2O_2)، يرتفعان أثناء الشيخوخة ونضج الفواكه (Hung and Kao, 1998; Lacan and Baccou, 1998; Lin and Kao, 1998; Yamane *et al*., 1999; Lester, 2000; Eskin and Robinson, 2001). في الخلايا المتنفسة (respiring cells) قد يختزل ما يصل إلى ٥٪ من الأُكسجين الكلي ليكوِّن أنواع الأُكسجين المتفاعلة(Eskin and Robinson, 2001). أثناء تخزين ما بعد الحصاد، خاصة للمواد المصنعة، ترتفع نسبة الأُكسجين، المختزل ليكوِّن الأنواع المتفاعلة.

قد تقود الفواقد المستحثة بالشيخوخة (senescence-induced less) في المحتوى الكيميائي لثايلاكويدات الكلوروبلاست (chloroplast thy- lakoids) مع التدهور في لصف(استشعاع) الكلوروفيل- أ (chlorophyll- a fluorescence) إلى التحميل المفرط الكمي (quanta overloading) لصبغات الكلوروبلاست (Biswal, 1995)، مؤدياً إلى التثبيط الضوئي وتحويل كثير من الإليكترونات إلى تكوين الـ ROS، مثل الأُكسجين المفرد(O_2 singlet oxygen). وإذ إن ثاني أُكسيد الكربون هو خزان الإلكترونات المتولدة في التفاعلات الخفيفة في الكلوروبلاست، فإن تكوين الـ ROS يرتفع بفقد في كفاءة دورة كالفين (Calvin cycle efficiency) وهدم الروبيسكو (Rubisco) أثناء الشيخوخة. إن التبدل أو التغير في تركيب الثايلاكويد أثناء الشيخوخة يؤدي إلى فرز كلوروفيل حر (free chlorophyll) وإنتاج كلوروفيل ثلاثي ذرة الكربون [($^3CHI^*$) triplet chlorophyll]،

والـذي، بـدوره، ينـتج الــ $^1O_2$. معـروف أن الأُكسـجين المفـرد وإمـا أن يؤكسـد الكاروتينويدات مباشرة، أو أنه يساهم في هدمها بشكل غير مباشر (Biswal, 1995).

في النباتـات، يثبط الهيـدروجين بيرأُكسـايد (فـوق أكسيد الهيـدروجين (H_2O_2)) التمثيـل الغـذائي لثـاني أُكسـيد الكربـون عنـد تركيـزات منخفضـة (Halliwell and Gutteridge, 1999) كمـا أنـه نشـط مـع الأُكسـيديزات ذات الوظـائف المختلفـة (mixed functions oxidases) في إعــلام (marking) عــدة إنزيمــات للهــدم التحليلــي البـروتيني(proteolytic degradation). قـد تثبط أنـواع أُكسـجين متفاعلـة أخـرى، مثـل السوبرأكسـايد(($O^{*}{}_2^-$) superoxide) بعـض الإنزيمـات المحتويـة علـى معـادن (metal- containing enzymes)، خاصة التي تحتوي على مجموعـات الهيـدروجين سلفايد سـهلة المنـال (accessible-SH groups)، مسببة تحطيم الأحمـاض الأمينيـة كمـا تسـبب فقـد وظـائف الـبروتين(Davies,1995). زيـادة علـى ذلـك، يتفاعـل الهيـدروجين بيرأُكسـايد (H_2O_2) والسوبرأُكسـايد($O^{*}{}_2^-$) بتفاعـل هـابير–وايـيس (Haber- Weiss reaction) لإنتـاج جـذور (شـقوق) الهايدروكسـيل (OH^*) وهـي مـن أنـواع الأُكسـجين المتفاعلـة شـديدة التفاعل. قد تحفز جذور الهايدروكسيل تفـاعلات ذاتيـة- الانتشـار (self- propagating reactions) مؤديـة إلى تحطيم خلـوي(cellular damage)، وبصـفة خاصـة، فـوق أكسـدة دهـون الأغشـية. عرفـت العمليـة الأخـيرة (فـوق أكسـدة دهـون الأغشـية) بأنهـا عامـل أساســي في فقــد نفاذيــة الأغشــية الانتقائيــة (membrane selective permeability) والسيولة(fluidity) أثنـاء الشـيخوخة، ممـا يـؤدي في النهائيـة إلى فقـد التماميـة والسـلامة الخلوية (Hong *et al.*, 2000).

لقد تم توضيح أن المحافظة علـى سـلامة، تماميـة الأغشـية الخلويـة داخـل أنسـجة الميزوكارب (لب الثمـرة mesocarp) لكـل مـن ثمـرات نـدى العسـل(honey dew fruit) أو

مشبك (netted) القاوون، الشمام (muskmelon, *Cucumis melo*)، أمراً حرجاً ومهماً، لتنظيم شيخوخة ما بعد الحصاد(Lester and Grusak,1999; Lester,2000). بمقارنة صنفي الشمام؛ الكليبر(Clipper) والجيراك(Jerac)، فقد اختلفا في فترة صلاحيتهما؛ مما يشير إلى أن زيادة النشاط المضاد للأكسدة ترتبط بالمحافظة على النفاذية الانتقائية (selective permeability) وتمامية الدهون الغشائية (integrity of membrane lipids) والشيخوخة المتأخرة وزيادة فترة الصلاحية (Lacan and Baccou, 1998). أدى الاستخدام الخارجي لكاسحات الجذور الحرة، بنزوات الصوديوم (sodium benzoate) والبروبايل جالات (propyl gallate) والـ ٣، ٤، ٥-ترايكلوروفينول (3, 4, 5 trichlorophenol) على/ في الكارنيشن (القرنفل *Dianthus caryophyillus*, carnation)، إلى تأخير تصنيع وتركيز الإيثلين (Paulin et al., 1986). وقد ارتبط هذا أو تمت مقارنته بالتأخير في إنتاج البروكسيدات وتحلل دهون الأغشية، وينتج عن ذلك في نهاية الأمر تأخير للشيخوخة وإطالة فترة الصلاحية. وبالمثل، فقد أخر الاستخدام الخارجي لمضاد الأكسدة الـ إل-سيستيين (antioxidants L-cysteine) وحمض الأسكوربيك والجلوتاثيون المختزل والميركابتوايثانول(mercaptaethanol) بتركيزات ١٠$^{-٣}$- ١٠$^{-٥}$ مول (M)، على السبانخ(*Spinacia, oleracea*) وعلى النباتات الثلاثة البحرية (three aquatic plants)؛ البوتاموجيتون بوكتينيتس (*Potamogeton pectinatus*) والفاليسنيريا اسبيراليس (*Vallisneria spiralis*) والهايدريلا فيرتيسيللاتا (*Hydrilla verticillata*)، الشيخوخة كما تمت متابعة وملاحظة هذا الأمر من خلال الاحتفاظ بالكلوروفيل والبروتين (Jana and Choudhuri, 1987).

تم تقييم نشاط عدد من الإنزيمات المضادات للأكسدة الموجودة في السبانخ تحت ظروف إحداث شيخوخة (معالجة بالإيثلين) أو منع الشيخوخة [١٠٪ (جم/ جم) ثاني

أُكسيد الكربون، ٨٪ (جم/ جم) أُكسجين و ٢ر٨٩٪ (جم/ جم) نيتروجين (Hodges and Forney, 1999). ومن أجل بحث الدور الذي تلعبه مضادات الأكسدة في تنظيم أو تعديل ديناميكيات الشيخوخة في أنسجة النبات، فقد تم اقتراح أن الانخفاض في نشاط الأسكوربات والأسكوربات بيروكسيديز (ascorbate peroxidase) والكاتليز خلال ٣٥ يوماً من التخزين، بصرف النظر عن محتوى مناخ التخزين، استجابة للتنظيم بواسطة الهيدروجين بيروكسايد. وكنتيجة، فقد تم افتراض أن تركيزات الهيدروجين بيروكسايد تلعب دوراً مهماً في ديناميكيات وحِدة شيخوخة ما بعد الحصاد، وبالتالي، تلعب دوراً في فترة صلاحية السبانخ (Hodges and Forney, 1999).

(١٣,٨) نكهة وفترة صلاحية الخضراوات
Flavor and Shelf-Life of Vegetables

تنتج المشتقات العضوية المقابلة لأنواع الأكسجين المتفاعلة، في الخلايا، وبصفة أساسية، في شكل أحماض دهنية مؤكسدة غير مشبعة، أثناء فوق أكسدة الدهون. وتشمل هذه دهون البيروكاسيل (LOO*) peroxyl radicals وهايدروبيروكسايدات hydroperoxides (LOOHs) وألكواكسايل (alkoxyl radicals (LO*)). تتحلل الهايدروبيروكسايدات (decompose) إلى مدى واسع من المنتجات الطيارة وغير الطيارة، والتي نفسها، قد تشهد مزيداً من الأكسدة و/ أو التحلل(decomposition)، وينتج عن ذلك روائح غير طيبة غير مرغوبة(off-flavor) ترتبط بالمنتجات المتزنخة (rancid products) (Eskin and Robinson, 2001). تولد أنزيمات الليبوكسيجينيزات (lipoxygenases) مركبات روائح ونكهات، ولكن لها القدرة على تكوين أنواع الأكسجين المتفاعلة. وبالتالي، فقد اتهمت بتكوين الروائح غير المرغوبة أثناء تخزين الأغذية، أيضاً.

(١٣,٩) التحوير النباتي
Plant Transformation

نُشرت كثير من البروتوكولات حول التحوير الفعال لمدى واسع من أنواع المحاصيل، مع استغلال معظم الطرق لاستخدام البيوليستيكات (التحولات الحيوية biolistics) أو آليات التحوير الجيني الطبيعية(natural gene transfer mechanism) للـ *A. tumefaciens* لتفعيل نقل الجينات المحورة للنباتات المستهدفة. تم نقاش الأساس الجزيئي للتحول النباتي(molecular basis) في استعراضات مرجعية متميزة كثيرة (Pawlowski and Somers, 1991; Christou, 1995; Jaehne *et al.*, 1995; Puddephat *et al.*, 1996; Tinland, 1996; Wysokinska and Chimel, 1997; Ignacimuthu *et al.*, 2000; Newell, 2000)، ذلك مع بروتوكولات تحوير محاصيل محددة (Gartland and Davey, 1995; Davey *et al*., 2001, 2002).

(١٣,١٠) التحوير الجيني (الوراثي) للنباتات لتحسين فترة الصلاحية (إطالتها)
Genetic Modification of Phants to Improve Shelf-life

من أجل الإحاطة بالآثار الضارة للتعبير المفرط للسايتوكينين التكويني (constitutive cytokinin over expression)، فقد صمم جان وأماسينو (١٩٩٥) (Gan and Amasino, 1995) إستراتيجية اعتمدت على إنتاج سايتوكينين منظم أوتوماتيكياً، والذي أخر شيخوخة الأوراق في التبغ المحور وراثياً دون تغيير الشكل الخارجي للنبات (plant phenotype). استخدمت هذه الإستراتيجية محفز الشيخوخة عالى التخصصية (highly senescence-specific promoter) أي (الـ SAG12، الجين المرتبط بالشيخوخة ١٢) من جين يرمز السيستيين بروتينيز للـ (*A thaliana*) (Lohman et al., 1994) الملتصقة بجين الـ *ipt* المرادف لجين التي إم آر(synonym *tmr* gene) من الـ *A. fumefacient* (Hidekamp *et al.*, 1983). لقد تم تنشيط جين الكايميريك بي إس أ جي١٢ ـ آي بي تي

(chimaeric P_{SAG12}-*IPT*)، فقط، عند بدء الشيخوخة في أوراق التبغ السفلي الناضجة(lower mature leaves of tobacco). وقد نتج عن هذا تصنيع حيوي للسايتوكينين في الأوراق، والذي أدى إلى تثبيط شيخوختها وبالتالي، أضعف هذا التصنيع الحيوي للسايتوكينين نشاط جين الـ P_{SAG12}-*IPT*، ومنع الإنتاج المفرط/الزائد للسايتوكينين. وبينما، نظرياً، يجب أن ينظم نظام التغذية الرجعية(feedback system) تنظيماً صارماً، فهناك تقارير تفيد بأن إستراتيجية جين الـ P_{SAG12}-*IPT* قد لا تكون مُنظمة أوتوماتيكياً تنظيماً صارماً كما تم توقعه في التبغ (*Nicotiana alata*) أولاً (Schroeder and Stimart, 1998) وفي الخس (*lactuca sativa*, lettuce) (McCabe *et al.*, 2001).

وحتى الآن، فإن أكثر الدراسات تفصيلاً لتأثيرات تعبير الـ *ipt* في النباتات المحورة وراثياً في الـ P_{SAG12}-*IPT* كانت بعدد محدود في أعضاء في السولانيسي (Solanaceae)، مثل التبغ (*N. tabacum*) (Gan and Amasino,1996; Schroeder and Stimart, 1998; Jordi *et al.*, 2000)، وبالرغم من وجود تقارير تفيد بإدخال جين الـ P_{SAG12}-*IPT* في الأرز (Oryza sativa) (Fu *et al.*, 1998). وفي الزهرة cauliflower (*Brassica oleracea*) (Nguyen *et al*., 1998) وفي الـ *A. thaliana* (Zhang *et al.* 2000) وفي الخس (Garratt et al., 2000, 2001 a; McCabe *et al*, 2001). وبالتحديد، كانت هذه الإستراتيجية ناجحة في الخس النوع إفولا(cv, Evola)، فقد أُخرت فيه الشيخوخة أثناء تطور النبات وبعد حصاد الرؤوس الناضجة(mature heads). عليه، ففي أربعة خطوط/انسال محورة وراثياً متجانسة الأمشاج (homozygous transgenic lines) تم تقييمها، لم توجد أوراق شائخة (senescent leaves) في أي من النباتات في مرحلة البذور (seedling stage) أو أثناء التطور المتأخر(later development). هذه الخاصية

مورَّثة بشكل ثابت (stability inherited) عبر أجيال البذور المتتالية الثلاث التي تم تقييمها. عكس ذلك أو في المقابل، أظهرت كل النباتات المقابلة متغايرة الأمشاج(azygous plants) وغير المحورة المتولدة المتجددة المزروعة (منقول نسيجها الحي لغير بيئته لغرض علمي بحثي) (leaf explants) أوراقاً قاعدية شائخة (senescent basal leaves). إضافة لذلك، فضلاً عن إبطاء شيخوخة الألياف، كانت النباتات الناضجة عمر ٦٠ يوماً (وهذا هو العمر المقابل والذي فيه عادة، تحصد الرؤوس تجارياً)، طبيعية الشكل(morphologically normal) وبدون فروقات معنوية في قطر الرأس (head diameter) أو فروقات في الوزن الطازج لأوراقها وجذورها. بعد حصاد الرؤوس بعد ستين يوما من نثر البذور، وتخزينها لمدة سبعة أيام، احتفظت الأوراق الخارجية لرؤوس النباتات الأربعة المحورة متجانسة الـ P_{SAG12}-*IPT*، احتفظت بالكلوروفيل. عكس ذلك، كانت الأوراق الخارجية لرؤوس النباتات الأربع متغايرة الخطوط، صفراء ونخرية (necrotic) بعد فترة التخزين هذه.

هناك عدة استخدامات محتملة للشيخوخة المتأخرة في الخس المعدل بالـ P_{SAG12}-*IPT*. وبما أن الأوراق تحتفظ بالكلوروفيل لمدة أطول بعد الحصاد، فإن الاستخدام الأكثر وضوحاً هو تحسن وإطالة فترة ما بعد الحصاد. ومما يثير الدهشة والاهتمام، أظهرت النباتات متجانسة الأمشاج انخفاضاً معنوياً (ملحوظاً) في قابليتها لعدوى الـ *Botrytis cinerea* (W.J.R.M. Jordi,unpublished) إذ إن هذا الممرض عادة، يستهدف الأنسجة الشائخة. إضافة لذلك، بقيت نباتات الخس المحورة بالـ P_{SAG12}-*IPT*، خضراء حتى بعد استنزاف النيترات في الكومبوست (سماد الروث، compost)). بهذا البرهان، فقد جاز اقتراح أن تعبير هذا الجين قد يوفر إستراتيجية لخفض محتوى الخس المزروع (cultivated lettuce) من النترات، أيضاً. وفي هذا المنحى، فقد تؤدي إزالة النيتروجين

من بيئة النمو خلال ٥–١٠ أيام قبل حصاد نباتات الخس المحورة بالـ P_{SAG12}-*IPT*، إلى انخفاض في محتوى الخس من النترات بنسبة ٧٠٪ مع انخفاض بسيط في النمو ولا يوجد فقد في الصبغة وعليه كذلك، لا يحدث تدهور في الجودة البصرية (visual quality). حد محتوى الخس من النترات، خاصة في أوربا الشمالية، يعني بأن انخفاض محتوى النترات (في النباتات والمزروعات) هدف تهجيني مهم (important breeding objective) لهذا المحصول (Gunes *et al.* 1994).

بالإضافة إلى استخدام محفز الـ SAG12، فقد استخدمت محفزات شيخوخة تخصصية، أخرى، مثل الـ SAG529 وSAG766A، في تركيبات جينات الكايمايريك (chimaeric genes) كجزء من إستراتيجية إحداث شيخوخة متأخرة لإطالة فترة الصلاحية. وقد استخدمت مثل جينات الكايمايريك هذه، لتحوير البروكلي [الملفوف، (broccoli, *B. oleracea*) ،مؤدية إلى إبطاء الشيخوخة، والمقاس (الإبطاء) باحتفاظ الملفوف بالكلوروفيل، بعد أربعة أيام من تخزين ما بعد الحصاد (Chen *et al.*, 2001). أيضاً، استخدمت جينات الـ *ipt* كايماريك المركبة باستخدام محفزات الصدمة الحرارية(heat- shock promoters)، في تأخير الشيخوخة في محاولة لإطالة فترة الصلاحية (Medford *et al.*, 1989; Smart et al., 1991; Smigocki *et al*, 1991; Ainley *et al.*, 1993; Van loven *et al.*, 1993; Harding and Smigocki, 1994; Veselov *et al.*, 1995; Cooper et al, 2995, 1996; Kudoyarova *et al.*, 1999). وعلى أي حال، فقد تؤثر عملية الصدمة الحرارية نفسها في النمو وتركيزات السايتوكينين الداخلية (Van Loven *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997 a, b).

في دراسات أو أبحاث أخرى، استخدم محفز ٣٥ إس (35 S promoter) من فيروس، موازيك القرنبيط((cauliflower mosaic (CaMV)) للسيطرة على جين الـ*ipt* في التبغ والخيار وراثياً) (Smigocki and Owens, 1988; Makarova *et al.*, 1997 a, b). وعلى

أي حال، في هذه الحالات، أدى التعبير التكويني لجين الـ *ipt* إلى ظواهر تطورية غير طبيعية، تشمل النمو المتقزم (stunted growth) والعقم (sterility).

أيضاً، تمت ملاحظة ظواهر غير طبيعية في النباتات المحورة بجين الـ*ipt* بمحفزات تكوينية أخرى. على سبيل المثال، عند استخدام محفز الكالكون سينثيز (chalcone synthase promoter (P_{CHS}) من الـ *Antirrhinum majus* لدفع جين الـ*ipt* داخل التبغ المحور وراثياً (Wang *et al.*, 1997a, b)، فقد سبب التعبير الوراثي المحور تثبيط الجذور وإبطاء شيخوخة الأوراق ورفع مستويات الكلوروفيل وتأخير تطور الأزهار وكتبعة أو نتيجة، تأخير في نشوء (بدء) الأزهار. أيضاً، أدى تعبير جين الـ*IPT*-P_{SAG12}، إلى جذوع أغلظ(thicker stems) ناتجة عن تحفيز متزامن لكل من انقسام الخلايا (cell division) وتمددها(cell expansion). وفي هذا المنحى أو السياق، فإن مثل هذه الظواهر الشكلية غير الطبيعية(phenotypic abnormalities) مشابهة لتلك التي تظهر أثناء المراحل المتأخرة لتطور التبغ والخس المحورين بجين الـ*IPT*-P_{SAG12} (Gan and Amasino, 1996; Jordi *et al.*, 2000; Garratt *et al.*, 2000, 2001a; Mccabe *et al.*, 2001)، كما أنها متوافقة مع فرط إنتاج السايتوكينينات الداخلية. قد يكون تضخم الخلايا الملاحظ في النباتات المحورة بجين الـ*IPT*-P_{SAG12} وجين الـ*IPT*-P_{CHN}، بسبب زيادة أخذ الماء الناتجة من الضغط الأسموزي الزائد (increased osmatic pressure). وقد تكون مثل هذه الزيادة في الضغط الأسموزي متوافقة مع تجمع سكر الهيكسوس (السكر السداسي hexose)، وهذا التجمع مميز لنباتات الـ *IPT*-P_{SAG12} (Garratt *et al.*, 2000, 2001a; McCabe *et al*, 2001). أظهر التبغ المحور بجين الـ*ipt* المتولد/المستحث بالنحاس (Cu-copper-inducible *ipt* gene) شيخوخة متأخرة عندما يعالج بتركيزات فسيولوجية للنحاس(Cu^{2+}) (Mckenzie *et al.*, 1998).

لقد تم إحداث شيخوخة أوراق، متأخرة، في التبغ المحور وراثياً باستخدام جين الهوميوبوكس((*kn1*) homeobox gene, *knottedl*) المعزول من الـ*A thaliana* الملصوق بمحفز الشيخوخة التخصصي الـ pSAG12 (Ori *et al.*, 1999). عادة، يتم تعبير جين الـ*knl* وشبيهاته في ميريستيم(بارضة) الجذور(shoot meristems). ومما يثير الاهتمام أن النباتات المحورة بالـ الـP_{SAG12}-*knl* أظهرت شيخوخة متأخرة بدون ظواهر تطورية غير طبيعية. وبالإضافة إلى الشكل الخارجي للشيخوخة المتأخرة، هناك عدد من الخواص الأخرى لهذه النباتات، والتي تمت ملاحظتها في نباتات التبغ المحورة بالـP_{SAG12}-*IPT*، والأكثر إثارة من هذه الخواص هذه الزيادة المعنوية (الكبيرة) في تركيزات السايتوكينات في الأوراق. وقد تم افتراض أن الـ*knl* قد يعمل كعامل نسخ، ويُفَعِّل تجمع السايتوكينين(Ori *et al.*, 1999). وبالمثل في الخس صنف الليوكسور(cv. luxor)، أدى تعبير الـ*PetE-KNAT1* شبيه للـ *knl* من الـ *Arabidopsis*، وتحت سيطرة محفز بلاستوسيانين البازلاء (pea plastocyanin promoter PetE.) إلى تأخير شيخوخة الأوراق (Frugis *et al.*, 2001).

أثناء نشوء، بدء شيخوخة الأوراق ونضج الثمار يتم فقد أغشية البلازما، وبالمثل تفقد أغشية الطبقة البلازمية الداخلية الظهارية نفاذيتها الانتقائية وسيولتها(Hong *et al.*, 2000)، ومعروف أن هذه التغيرات تستحث موت الخلايا المبرمج (بإذن الله) (programmed cell death) (Thompson *et al.*, 2000). وقد عُزى أو أرجع فقد النفاذية الانتقائية هذا، إلى الاضطرابات الجزيئية(molecular perturbations) في الطبقات الثنائية المزدوجة للدهون(lipid bilayers)، والناتجة من الزيادة في نسبة الأحماض الدهنية غير المؤسترة إلى المؤسترة (non- esterified to esterified fatty acids ratio) في الأغشية. إزالة أسترةdeestrification هذه الأحماض الدهنية، يسببها الليبيز

المولد بالشيخوخة (senescence induced lipase) المسمى الليبوليتيك أكايل هايدروليز (lipolytic acyl hydrolase) (Thompson et al., 2000). زيادة على ذلك تعمل إزالة أسترة الأحماض الدهنية عديدة عدم التشبع كمادة تفاعل لعمل إنزيم الليبوكسيجينز والذي يسبب فوق أكسدة الدهون، وبالتالي يسبب صلابة مطردة في الأغشية (progressive membrane rigidity) ويسبب فقد التمامية الوظيفية(functional integrity) (Asada and Takaha Shi, 1987).

ولدت النباتات المحورة وراثياً لل *A thaliana* والتي فيها لم يتم تنظيم تعبير الليبيز المستحث بالشيخوخة تعبيرا منظما من خلال التعبير التكويني للجين كامل الطول (full length gene) في تكييفه في حالة تجعله غير حساس(antisense orientation)، تحت نظام محفز ٣٥إس(35S promoter) (Thompson *et al.*, 2000). أظهرت النباتات الناتجة شيخوخة أوراق متأخرة، وبذلك أثبتت أن معالجة تعبير الليبيز قد تكون إستراتيجية فعالة لإطالة فترة الصلاحية.

في الزهور، أخر التثبيط غير المحسوس(antisense inhibition) لجين الـ ١- أمينو سايكلوبروبين أوكسيديز في القرنفل صنفي الـ cvs Red Sim والـ White Sim، شيخوخة البتلات (petal senescence) في النباتات المحورة وراثياً (Savin *et al.*, 1994)، وكما مكَّن من إطالة عمر الزهور في الزُهْرِية (vase-life). يقابل هذا التثبيط للشيخوخة، خفض ملحوظ معنوي في الـ ١-أمينوسايكلوبروبين أوكسيديز والـ أ سي سي سينثيز إم آر إن أ (ACC synthase mRNAs). وبالمثل، فقد أثبت أن التثبيط غير المحسوس لجين الـ ١-أمينوسايكلوبروبين أوكسيديز في الطماطم يؤخر بدء ومعدل نضج الفواكه (John et al., 1995; Bolitho et al., 1997). وحديثاً، أعتقد بأن الراب ١١/ واي بي تي٣(rab 11/ YPT3) وهو شبيه من الطماطم، والذي يرمز الجواناسين

ترايفوسفات ((guanacine tryphosphate (GTPase)، والذي يعتقد بأن له دوراً في السيطرة على نقل البروتين داخل الخلايا (protein trafficking with in cells) قد قوض تنظيمه(down regulated) في الطماطم المحورة وراثياً، باستخدام التثبيط غير المحسوس(Lu *et al.*, 2001). للثمار من نباتات تعبر الجين غير المحسوس، صبغة (لون) طبيعية، ولكنها فشلت في أن يكون لها تطوير قوام لين طري(soft texture).

لقد تمت معالجة تصنيع حيوي لمضاد أكسدة في الخس باستخدام تركيب يتكون من جينات الكايميريك التي ترمز عناصر مسار الأسكوربات–الجلوتاثيون(ascorbate-glutathione pathway) (Garratt *et al.*, 2001b). حفَّز وحسَّن هذا التعبير الفائق للجينات المحورة القدرة على كسح الأوكسي راديكال (الجذور الأوكسيجينية، المؤكسدة) (oxy radical scavenging potential) كما حسَّن محتوى هذه النباتات المحورة من مضادات الأكسدة. تظهر النباتات متماثلة الأمشاج زيادة بمقدار ٦ أضعاف في الجلوتاثيون المختزل الورقي مقارنة بالنباتات المرجعية متغايرة الأمشاج. يقل مستوى هايدروجين بيروكسايد الأوراق بمقدار ثلاثة أضعاف في الأوراق العليا وبمقدار ضعفين في الأوراق الوسطى والسفلى للنباتات متجانسة الأمشاج مقارنة بالنباتات المرجعية. انخفضت فوق أكسدة الدهون بدرجة كبيرة، مما يشير إلى أن تمامية الأغشية قد حفظت. زيادة على ذلك، فإن أقراص أسطوانات الأوراق المقصوصة من النباتات المحورة وراثياً والمعومة في الماء لمدة ٧ أيام لإحداث شيخوخة، قد أظهرت انخفاضاً في هيدروجين بيروكسايد الأوراق الذي قل بنسبة ٤٠٪ عن هيدروجين بيروكسايد أقراص الأوراق المقصوصة من نباتات متغايرة الأمشاج(مرجعية). كان محتوى النباتات المحورة وراثياً عمر ٦٠ يوماً (60- day- old transgenic plants) أعلى بدرجة معنوية ($P< 0.05$) في الأوراق العليا والسفلى >٤٠٪ و٢٠٪، على التوالي. وبمثل تحسين أداء المحصول أثناء

النمو، فإن استحثاث القدرة المضادة للأكسدة والتي أخرت فوق الأكسدة، قد حسنت أداء محاصيل الخس المحورة وراثياً بعد حصادها ، وأطالت فترة صلاحيتها، ذلك مع تحسين مظهرها ومحتوها التغذوي.

وبالإضافة إلى تأخير العلامات المرئية(visible sings) للشيخوخة، فقد جرت محاولات لخفض أو تأخير تكون/ تولد الروائح غير المرغوبة المرتبطة بتخزين المنتجات الغذائية. وقد تحقق هذا بتثبيط نشاط الإنزيمات المسئولة عن إنتاج مثل هذه المنتجات غير المرغوبة، أو بتطوير النباتات المحورة وراثياً المفتقرة إلى الإنزيمات غير المرغوبة. على سبيل المثال، تحسن النكهة والثباتية (stability) وبالتالي فترة الصلاحية لتحضيرات فول الصويا [(*Glycine max*) preparation of soybean]، وبصفة خاصة، فقد تحققت هذه التحسينات في دقيق الصويا (soy flour) وحليب الصويا (soy milk) بإزالة إنزيم الليبوكسيجينيز- ٢ ((lipoxygenase- 2 (LOX- 2)) (Davies *et al.*, 1987).

في حالة الطماطم(*Lycopersicon esculentum*) والتبغ(tobacco)، رفع تعبير الجين التحويري الـ Δ - ٩ ديساتيوريز الخميرة (expression of the yeast Δ-9 desturase transgene) تركيزات معظم الأحماض الدهنية أحادية عدم التشبع في كل من هذه النباتات. بالإضافة لذلك، خفض هذا التعبير تركيزات الأحماض الدهنية المشبعة في الطماطم (Polashock *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1996)، مؤدياً إلى تغيرات في مستوى نكهة ثمار النباتات المحورة وراثياً. وعلى أي حال، بينما يوضح ويثبت هذا، القدرة على تغيير مستويات النكهة بالمعالجة الجينية/ الوراثية للأحماض الدهنية، إلا أن هذه المعالجة وحتى الآن، لم تستخدم مباشرة في إطالة فترة الصلاحية. في المقابل، تمت ملاحظة زيادة كبيرة ملحوظة في فترة صلاحية ثمار نباتات الطماطم المحورة وراثياً، مع التثبيط غير المحسوس لنشاط البولي جالاكتيورنيز (antisense suppressed

(Sozzi- Quiroga and Fraschina, 1997) polygalacturonase activity). وبمثل قلة القابلية للتحطيم والعدوى، أظهرت ثمار الطماطم المحورة وراثياً تأخراً في النضج الزائد (retarded over- ripening)، ولكنها حافظت على التطور الطبيعي في فترة ما قبل الشيخوخة(pre- senescence).

أشار التتبع/التحليل الحسي والفيزيوكيميائي والكيموحيوي إلى أن تدريجات التفضيل القياسية(standard preference ratings)، والمستخدمة من قبل منافذ البيع بالمفرق(retail outlets) لهذه الثمار المحورة وراثياً، كانت أعلى بدرجة كبيرة من تلك التي للنباتات غير المحورة، وبالتحديد فيما يتعلق بلون الثمار ونكهتها (Sozzi- Quiroga and Fraschina, 1997).

(١٣,١١) تقييم جودة النبات
Assessment of Plant Quality

عادة، قد تضمن تقييم جودة فترة صلاحية الخضراوات الورقية المحورة وراثياً مثل الخس، التجريب (experimentation) بقص أقراص الأوراق تحت ظروف مختبرية متحكم فيها (Wingler *et al.*, 1998; Garratt *et al.*, 2006; McCabe et al., 2001)، وذلك لمتابعة/ ومراقبة الاحتفاظ بالكلوروفيل والبروتين، بينما عادة، توفر هذه المعالجة إشارة ممتازة للشيخوخة المتأخرة في أي مادة معينة، فمن المهم إدراك أن أي فروقات دراماتيكية في المحافظة على الكلوروفيل والبروتين ملاحظة بين أقراص أوراق النباتات المحورة وراثياً والنباتات المرجعية، قد لا تدرك دائماً، بسهولة في هذا النظام كما يتم إدراكها في مستوى النبات بكامله. عليه، من المهم إجراء دراسات مقارنة (comparative studies) باستخدام مواد معالجة ومعروضة ومخزنة تحت ظروف قريبة قدر الإمكان من الظروف الطبيعية للنقل التجاري وممارسات تخزين المنتجات الطازجة في المحلات الكبيرة.

بالإضافة إلى قياس الاحتفاظ بالكلوروفيل والبروتين، يجب تقييم القياسات الأخرى، مثل ابتعاث الهيدروجين بيروكساييد ومعدل فوق أكسدة الدهون والنشاط المضاد للأكسدة(Garratt *et al.*, 2001 b, c) ومعدل النضج(Wang *et al.*, 1997 a, b) وإنتاج الكتلة الحيوية (الوزن الطازج)، وأن يترافق هذا التقييم مع تقييم محتويات المنتجات الطيارة وغير الطيارة أثناء التخزين. عادة، يجرى تقييم التذوق على مواد تجرى عليها تقييمات فترة الصلاحية. وعلى أي حال، وبصفة عامة، مثل هذه المحاولات ليست ذات جدوى حالياً، عند التعامل مع المواد المحورة وراثياً. وبالتالي، فإن تقييم المكونات الطيارة للفراغ القمي(volatile constituents of the headspace) فوق المواد المحورة وراثياً، يستخدم عادة كمؤشر لأي تغيرات في مستوى النكهة (Roberts and Taylor, 2001).

(١٣,١٢) الاتجاهات المستقبلية
Future Trends

ركزت معالجات تحقيق فترة صلاحية ممتدة على تناول وتداول المسارات التنظيمية الأساسية القليلة، مثل التصنيع الحيوي للسايتوكينين، وعلى أي حال، من الواضح أنه إذا أريد تحقيق ضبط صارم للشيخوخة بدون تأثيرات ضارة مرافقة، على النمو والخصوبة، فإن تناول عناصر تسلسل التصنيع الحيوي للسايتوكينين وعوامل الضبط الأخرى له، يتطلب اهتماماً كبيراً (McCabe *et al.*, 2001). وحقاً، من أجل إنتاج أوراق تبقى خضراء وظيفية (functional stay-green leaves)، فلابد من تعديل/ تحوير عدة مسارات تنظيمية (Wingler *et al.*, 1998). وبالمثل، فقد اقترح بأن دراسات الفروقات في تعبير الجينات القابلة للترشيح (possible candidate genes) في نباتات الخس المحورة بالـP_{SAG12}-*IPT* وغير المحورة، أو حقاً، في أنواع أخرى، قد توضح مسارات

بديلة للمعالجات الجينية/ الوراثية من أجل تحقيق إستراتيجيات فعالة في تأخير الشيخوخة(McCabe *et al.*, 2001). وحتى الآن، توجد براهين قليلة حول المحاولات المستخدمة في تأخير شيخوخة محاصيل الجذور، مع استثناء توليد البطاطس المحور بجين الـ*ipt* (Mach/a-Kov/a *et al.*, 1997). وبالتأكيد، قد تكون تأثيرات تجزئة الكربوهيدرات المحورة(altered carbohydrate partitioning) في محاصيل الخضراوات مثل البطاطس والجذور، مثيرة للاهتمام. يجب أن يسهل التقدم السريع في الجينوميكس (علم الجينومات/الجينات التي تورث genomics) مع استخدام تقنيات التحليل الدقيقة (application of microarray)، تطور وتنقيح المعالجات الجديدة لتحسين وإطالة فترة الصلاحية. عليه، بمراقبة التعبير الوراثي التفريقي التمييزي (differential gene expression) أثناء الشيخوخة أو نضج الفواكه، قد يتم تحديد أهداف للمعالجات الجينية في سياق تمديد فترة الصلاحية. في الـ*A. thaliana*، درست الحالة المستقرة لمستويات الـ mRNA لأكثر من ٨٠٠ جين متزامناً مع استخدام تحاليل عالية الكثافة (high-density arrays) (Desprez *et al.*, 1998). زاد عدد الجينات التي يمكّن تقييمها باستخدام هذه التقنية، بدرجة كبيرة، مع تحاليل تحتوي ٧٠٠٠– ١٠٠٠٠ عروة متسلسلة معبرة غير مطولة (non-redundant expressed sequence tags (ESTs) تمثل حوالي ٧٥٠٠ جين، يتم توفيرها من جمعية/ اتحاد جينومات الأرابيدوبسيس الوظيفية (Arabidopsis Functional Genomics Consortium) المتضمن جامعة ولاية ميشجان (Michigan State University) وجامعة ويسكونسين (the University of Wisconsin) وجامعة يال (Yale University) ومعهد كارنيجي لواشنطن في جامعة استانفورد (Carnegie Institute of Washington at Stanford University)، ويتوقع أن يكبر هذا الرقم نحو تحقيق هدف بلوغ ٢٠٠٠٠ جين في المستقبل القريب. وبدون شك، ستثبت الجدوى والفائدة القصوى لمثل هذه المعالجة

في توجيه تكنولوجيا الجينات العكسية (reverse-genetics tech.) لتحديد الجينات المفتاحية (الأساسية) ذات العلاقة بإطالة فترة الصلاحية لمدى من أنواع محاصيل الخضراوات .

(١٣,١٣) مصادر لمزيد من المعلومات والنصائح

Sources of Further Information and Advice

توفر المراجع المرتبطة بهذا الفصل مصدراً رائعاً للمعلومات، إذ إنها توجه القارئ للمنشورات التي تحتوي بيانات تجريبية أصلية(original experimental data). بالإضافة لذلك، فإن الأوراق/الاستعراضات الأدبية المذكورة (cited review papers) توفر معلومات خلفية/مرجعية(background information) وتعطى صورة شاملة لهذا الموضوع سريع التمدد. يمكن الحصول على نصائح إضافية ترتبط بالطرق التجريبية بالاتصال على المؤلفين للمنشورات؛ معاهدهم وعناوينهم الإليكترونية (e- mail addresses) وعادة توجد أرقام الفاكسات والتلفونات في الأوراق المنشورة وتشمل مواقع الإنترنت التي تستحق الزيارة والتصفح، والمدرجة في القائمة التالية:

Center for Plant Environmental Stress Physiology, Purdue University, USA
http://newcrop.hort.purdue.edu/cfpesp/cfOOOO2.html
Edinburgh Data and Information Access
http://dina.ed.ac.uk/index.shtml
Federation of European Societies of Plant Physiology http://www.fespp.org .
GARNET, the Genomic *Arabidopsis* Resource Network; a platform for *Arabidopsis* international research and for research on other plant species.
www.york.ac.uk/res/garnet/gamet.htm
Plant Stress Resource Page
http://www.plantstress.com!

obeikandi.com

(١٣,١٤) المراجـــع

Refereces

ABELES F B, DUNN L J, MORGENS P, CALLAHAN A, DINT ERMAN R E and SCHMIDT J (1988) 'Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons', *Plant Physiol,* 87609-15.

AGGELIS A, JOHN I and GRIERSON D (1997) 'Analysis of physiological and molecular changes in melon *(Cucumis melo* L.) varieties with different rates of ripening', *J Exp Bot,* 308 769-78.

AINLEY W M, MCNEIL K J, HILL J W, LINGLE W L, SIMPSON R B, BRENNER M L, NAGAO R T and KEY J L (1993) 'Regulatable endogenous production of cytokinins up to "toxic" levels in transgenic plants and plant tissues', *Plant Mol Bioi,* 22 13-23.

ASADA K and TAKAHASHI M (1987) 'Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis', in *Photoinhibition,* eds Kyle D J, Osmond B and Arntzen C A, Amsterdam, Elsevier, 227-88.

AZUMI Y and WATANABE A (1991) 'Evidence for a senescence-associated gene induced by darkness', *Plant Physiol,* 95 577-83.

BERNHARD W R and MATILE P (1994) 'Differential expression of glutamine synthetase genes during the senescence of *Arabidopsis thaliana* rosette leaves', *Plant Sci,* 987-14.

BlSWAL B (1995) 'Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light', *J Photochem Photobiol, B Biol,* 30 3-13.

BLEECKER A B and PATTERSON S E (1997) 'Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis', Plant Cell,* 9 1169-79.

BOLITHO K M, LAY-YEE M, KNIGHTON M L and ROSS G S (1997) 'Antisense apple ACC oxidase RNA reduces ethylene production in transgenic tomato fruit', *Plant Sci,* 122 91-9.

BUCHANAN-WOLLASTON V (1994) 'Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus:* identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein', *Plant Physiol,* 105 839-46.

BUCHANAN-WOLLASTON V (1997) 'The molecular biology of leaf senescence', *J Exp Bot,* 48 181-99.

BUCHANAN-WOLLASTON V and AINSWORTH C (1997) 'Leaf senescence in *Brassica napus:* cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation', *Plant Mol Bioi,* 33 821-34.

CHEN C, (1997) 'Cytokinin biosynthess and interconversion', *Plant Physiol,* 101 665-73.

CHEN C, JIN G, ANDERSON BR and ERTL J R (1993) 'Modulation of plant gene expression by cytokinins', *Austral J Plant Physiol,* 20 609-19.

CHEN L, HWANG J, CHARNG Y, SUN C and YANG S (2001) 'Transformation of broccoli *(Brassica oleracea* var. italica) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation', *Mol Breed,* 7 243-57.

CHRISTOU P (1995) 'Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment' , *Euphytica,* 85 13-27.

CLENDENNEN S K and MAY G D (1997) 'Differential gene expression in ripening banana fruit', *Plant Physiol,* 115 463-9.

COOPER J M, ROGERS L J, SCOTT I M, SMART C M and THOMAS H (1995) 'Characterisation of natural leaf senescence in wild type and transgenic tobacco plants', *J Exp Bot*, 46 (supp!) 28.

COOPER J M, ROGERS L J, SMART C M and THOMAS H (1996) 'Isolation of senescence enhanced cDNAs from wildtype and transgenic tobacco plants using differential display PCR', *J Exp Bot*, 47 (suppl) 28.

DAVEY M R, MCCABE M S, MOHAPATRA U and POWER J B (2001) 'Genetic manipulation of lettuce', in *Transgenic Plants*, eds Hui Y H, Khachatourians G, Lydiate D, McHughen A, Nip W K and Scorza R, New York, Marcel Dekker (in press).

DAVEY M R, GARRATT L C, WILLIAMS F K and POWER J B (2002) *'In vitro* regeneration and transformation of the leafy vegetables lettuce, chicory and spinach', in *Plant Genetic Engineering: Improvement of Vegetables and Fruits*, eds Jaiwal P K and Singh R P, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, Vol 4 (in press).

DAVIES C and ROBINSON S P (2000) 'Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins', *Plant Physiol*, **122** 803-12.

DAVIES C S, NIELSEN S S and NIELSEN N C (1987) 'Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase 2', *J Am Oil Chem Soc*, **64** 1428-33.

DAVIES K J A (1995) 'Oxidative stress: the paradox of aerobic life', in *Biochemical Society Symposia; Free Radicals and Oxidative stress: Environment, Drugs and Food Additives*, eds Rice-Evans C, Halliwell Band Lunt G G, Biochemical Society Symposia, Volume 61, London, Portland Press, 1-31.

DAVIES K M and GRIERSON D (1989) 'Identification of complementary DNA clones for tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. Messenger RNA that accumulates during fruit ripening and leaf senescence in response to ethylene', *Planta*, **17973-80.**

DEAK M, HORVATH G V, DAVLETOVA S, TOROK K, SASS L, VAS I, BARNA B, KIRALY Z and DUDITS D (1999) 'Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens', *Nature Biotechnol*, **17** 192-6.

DELHAIZE E, JACKSON P J, LUJAN L D and ROBINSON N J (1989) 'Polygamma-glutamy1cysteinylglycine synthesis in *Datura innoxia* and binding with cadmium', *Plant Physiol*, **89** 700-6.

DESPREZ T, AMSELEM J, CABOCHE M and HOFTE H (1998) 'Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays', *Plant J*, **14643-52.**

EARNSHAW B A and JOHNSON M A (1985) 'The effect of glutathione on development in wild carrot suspension cultures', *Biochem Biophys Res Commun*, **133988-93.**

ESKIN N A M and ROBINSON D S (2001) *Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes*, Boca Raton, CRC Press.

FRUGIS G, GlANNINO D, MELE G, NICOLODI C, CHIAPPETTA A, BITONTI M B, INNOCENTI A M, DEWITTE W, VAN ONCKELEN H and MARIOTTI D (2001) 'Overexpression of KNAT1 in lettuce shifts leaf determinate growth to a shoot-like indeterminate growth associated with an accumulation of isopentenyl-type cytokinins', *Plant Physiol*, **126** 1370-80.

FU Y, DING Y, LIU X, SUN C, CAO S, WANG D, HE S, WANG X, LI L and TIAN W (1998) 'Rice transformation with a senescence-inhibition chimeric gene', *Chin Sci Bull*, **431810-15.**

GAN S and AMASINO R M (1995) 'Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin', *Science*, **270** 1986-8.

GAN S and AMASINO R M (1996) 'Cytokinins in plant senescence: from spray to pray to clone and play', *Bioassays*, **18** 557-65.

GAN S and AMASINO R M (1997) 'Making sense of senescence: molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence', *Plant Physiol*, **113** 313-19.

GARRATT L C, MCCABE M S, POWER J B, LOWE K C and DAVEY M R (2000) 'Effect of autoregulated *ipt* expression on carbohydrate partitioning in transgenic lettuce *(Lactuca sativa* L)', *J Exp Bot*, **51** (suppl) 56.

GARRATT L C, DAVEY M R, MCCABE M S and POWER J B (2001a) 'Enhancement of crop performance and quality in lettuce', *Buletinul USAMV-CN*, 55/2001, in press.

GARRATT L C, CREISSEN G, MCCABE M S, MULLINEAUX P, JIMENEZ A, KULAR B, POWER J B and DAVEY M R (2001b) 'Effects of altered glutathione biosynthesis and metabolism in transgenic lettuce *(Lactuca sativa* L)', *J Exp Bot*, **52** (suppl) 11.

GARRATT L C, JANAGOUDAR B S, ANTHONY P, DAVEY M R, POWER J B and LOWE K C (2001c) 'Hemoglobin-stimulated growth and antioxidant activities in cultured cotton cells', *Free Rad BioI Med*, **31** 1156-62.

GARTLAND K M A and DAVEY M R (1995) *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*, Volume 44, Totowa, New Jersey, Humana Press.

GRAHAM I A, LEAVER C J and SMITH S M (1992) 'Induction of malate synthase gene expression in senescent and detached organs of cucumber', *Plant Cell*, 4 349-57.

GRAY J, PICTON S, SHABBEER J, SCHUCH W and GRIERSON D (1992) 'Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes', *Plant Mol BioI*, **1969-87.**

GRBIC V and BLEECKER A B (1995) 'Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis'* , *Plant J*, 8 595-602.

GUNES A, POST W N K, KIRKBY E A and AKTAS M (1994) 'Influence of partial replacement of nitrate by amino acid nitrogen or urea in the nutrient medium on nitrate accumulation in NFT grown winter lettuce', *J Plant Nutr*, **17** 1929-38.

HACKETT R M, HO C-W, LIN Z, FOOTE, H C C, FRAY R G and GRIERSON D (2000) 'Antisense inhibition of the *Nr* gene restores normal ripening to tomato Never-ripe mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model', *Plant Physiol*, **124** 1079-85.

HAJOUJ T M R and GEPSTEIN S (2000) 'Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence', *Plant Physiol*, **124** 1305-14.

HALLIWELL Band GUTTERIDGE J M C (1986) 'Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts', *Arch Biochem Biophys*, **246** 501-14.

HALLIWELL B and GUTTERIDGE J M C (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, Oxford University Press.

HARDING S A and SMIGOCKI, A C (1994) 'Cytokinins modulate stress response genes in isopentenyl transferase-transformed *Nicotiana plumbaginifolia* plants', *Physiol Plant*, **90** 327-33.

HE Y, TANG W, SWAIN J D, GREEN A L, JACK T P and GAN S (2001) 'Networking senescence regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines', *Plant Physiol*, **126** 707-16.

HEROUART D, BOELER C, WILLE KENS H, VAN CAMP W, SLOOTEN L, VAN MONTAGU M and INZE D (1993) 'Genetic engineering of oxidative stress resistance in higher plants', *Philos Trans R Soc London B, BioI Sci*, **342** 235--40.

HEWELT A, PRINSEN E, SCHELL J VAN ONCKELEN H and SCHMUELLING T (1994) 'Promoter tagging with a promoterless *ipt* gene leads to cytokinin-induced phenotypic variability in transgenic tobacco plants: implications of gene dosage effects', *Plant J,* 6 879-91.

HIDEKAMP F, DINKSE W G, HILLE J and VAN ORMONDT H (1983) 'Nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid-encoded *tmr* gene', *Nucleic Acids Res,* 11 6211-33.

HODGES D M and FORNEY C F (1999) 'The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves', *J Exp Bot,* **51** 645-55.

HONG Y, WANG T, HUDAK K A, SCHADE F, FROESE C D and THOMPSON J E (2000) 'An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence', *Proc Natl Acad Sci USA,* **97** 8717-22.

HUNG K T and KAO C H (1998) 'Involvement of lipid peroxidation in methyl jasmonate promoted senescence in detached rice leaves', *Plant Growth Reg,* **24** 17-21.

IGNACIMUTHU S, AROCKIASAMY S and TERADA R (2000) 'Genetic transformation of rice: current status and future prospects', *Curr Sci,* **79** 186-95.

JAEHNE A, BECKER D and LORZ H (1995) 'Genetic engineering of cereal crop plants: a review', *Euphytica,* **1-335--44.**

JANA S and CHOUDHURI M A (1987) 'Effects of antioxidants on senescence and hill activity in three submerged aquatic plants' , *Aquat Bot,* **27** 203-6.

JOHN I, DRAKE R, FARRELL A, COOPER W, LEE P, HORTON P and GRIERSON D (1995) 'Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis', *Plant J,* 7 483-90.

JOHN I, HACKETT R, COOPER W, DRAKE R, FARRELL A and GRIERSON D (1997) 'Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs', *Plant Mol BioI,* **33** 641-51.

JORDI W, SCHAPENDONK A, DAVELAAR E, STOOPEN G M, POT C S, DE VISSER R, VAN RHIJN J A, GAN S and AMASINO R M (2000) 'Increased cytokinin levels in transgenic *PsAG12-IPT* tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning', *Plant Cell Environ,* 23 279-89.

KAMACHI K, YAMAYA T, HAYAKAWA T, MAE T and OJIMA K (1992) 'Changes in cytosolic glutamine synthase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plants during natural senescence', *Plant Physiol,* 98 1323-9.

KAWAKAMI N and WATANABE A (1988) 'Senescence-specific increase in cytosolic glutamine synthase and its messenger RNA in radish cotyledons', *Plant Physiol,* 88 1430-4.

KINOSHITA T, YAMADA K, HIRAIWA N, KONDO M, NISHIMURA M and HARA-NISHIMURA I (1999) 'Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions' , *Plant J,* 19 43-53.

KUDOYAROVA G, VALCKE R, TEPLOVA I and MUSTAFINA A (1999) 'Cytokinin content and transpiration of transgenic tobacco plants containing heat-inducible *ipt-gene* as affected by high temperature', *Biol Plant,* 42 (suppl) S75.

LACAN D and BACCOU J C (1998) 'High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits', *Planta,* 204 377-82.

LESHAM Y Y (1992) *Plant Membranes: a Biophysical Approach to Structure, Development and Senescence,* Dordrecht, Kluwer Academic.

LESTER G E (2000) 'Polyamines and their cellular anti-senescence properties in honey dew muskmelon fruit', *Plant Sci*, 160 105-12.

LESTER G E and GRUSAK M A (1999) 'Postharvest application of calcium and magnesium to honeydew and netted muskmelons: effects on tissue ion concentrations, quality, and senescence', *J Am Soc Hortic Sci*, 124 545-52.

LI Y, HAGEN G and GUILFOYLE T J (1992) 'Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinin in specific tissues and organs', *Dev Biol*, 153 386-95.

LIN J-N and KAO C H (1998) 'Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves', *Bot Bull Acad Sinica*, 39 161-5.

LOHMAN K N, GAN S, JOHN M C and AMASINO R M (1994) 'Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana'*, *Physiol Plant*, 92 322-8.

LU C, ZAINAL Z, TUCKER G A and LYCETT G W (2001) 'Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense Rab11 GTPase gene', *Plant Cell*, 13 1819-33.

LUDFORD P M (1987) 'Postharvest hormone changes in vegetables and fruit', in *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, ed Davies P J, Volume VIII, Dordrecht, Kluwer Academic, 574-92.

MACHAKOVA, SERGEEVA L, OND EJ M, ZALTSMAN O, KONSTANTINOVA T, EDER J, OVESNA J, GOLYANOVSKAYA S, RAKITIN Y and AKSENOVA N (1997) 'Growth pattern, tuber formation and hormonal balance in *in vitro* potato plants carrying *ipt* gene', *Plant Growth Reg*, 21 27-36.

MAKAROVA R V, ANDRIANOV V M, BORISOVA T A, PIRUZYAN E S and KEFELI v I (1997a) 'Morphogenetic manifestations of the expression of the bacterial *ipt* gene in regenerated tobacco plants *in vitro'*, *Fiziol Rast*, 44 11-19.

MAKAROVA R V, BORISOVA T A, VLASOV P V, MACHACKOVA I, RAKITINA T, YA. I, ANDRIANOV V M, PIRUZYAN E S and KEFELI V I (1997b) *'In vitro* phytohormone production in tobacco ipt-regenerants', *Fiziol Rast*, 44 762-8.

MCCABE M S, GARRATT L C, SCHEPERS F, JORD! W J R M, STOOPEN G M, DAVELAAR E, VAN RHIJN J H, POWER J B and DAVEY M R (2001) 'Effects of *PSAGIZ-IPT* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce', *Plant Physiol*, 127 505-16.

MCGAW B A and BURCH L R (1995) 'Cytokinin biosynthesis and metabolism', in *Plant Homones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, eds Davies P J, 2nd edition, Dordrecht, Kluwer Academic, 98-117.

MCKENZIE M J, METT v, REYNOLDS, PHS and JAMESON P E (1998) 'Controlled cytokinin production in transgenic tobacco using a copper-inducible promoter', *Plant Physiol*, **116** 969-77.

MEDFORD J I, HORGAN R, EL-SAWI Z and KLEE H J (1989) 'Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene', *Plant Cell*, 1 403-13.

MOK D W S and MOK M C (1994) *'Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*, Boca Raton, CRC Press.

MORAN L K, GUTTERIDGE J M C and QUINLAN G J (2001) 'Thiols in cellular redox signalling and control', *Curr Med Chem*, 8 763-72.

MORGENS P H, CALLAHAN A M, DUNN L J and ABELES F B (1990) 'Isolation and sequencing of complementary DNA clones encoding ethylene-induced putative peroxidases from cucumber cotyledons', *Plant Mol Biol*, **14715-26.**

NAM H G (1997) 'The molecular genetic analysis of leaf senescence', *Curr Opinion Biotechnol,* 8 200-7.

NEWELL C A (2000) 'Plant transformation technology. Developments and applications', *Mol Biotechnol,* **1653-65.**

NGUYEN, K H T, KANE E J and DIX P J (1998) 'Hormonal regulation of senescence in cauliflower *(Brassica oleracea* var. Botrytis)', in *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century,* eds Altman A, Ziv M and Izhar S, IX International Congress Plant Tissue Culture, Dordrecht, Kluwer Academic, 164.

NOODEN L D (1980) 'Senescence in the whole plants', in *Senescence in Plants,* ed Thimann K V, Boca Raton, CRC Press, 219-58.

NOODEN L D and GUIAMET J J (1996) 'Genetic control of senescence and aging in plants' , in *Handbook of the Biology of Aging,* 4th edition, eds Schneider ELand Roew J W, San Diego, Academic Press, 94-118.

NOODEN L D and LEOPOLD A C (1978) 'Phytohormones and the endogenous regulation of senescence and abscission', in *Phytohormones and Related Compounds - a Comprehensive Treatise,* eds Letham D S, Goodwin P B and Higgins T J, Volume **II,** Amsterdam, ElsevierlNorth-Holland Biomedical Press, 329-69.

NOODEN, L D, SINGH S and LETHAM D S (1990) 'Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean', *Plant Physiol,* **93** 33-9.

ORI N J, MICHELLE T, JACKSON D, YAMAGUCHI J, BANOWETZ G M and HAKE S (1999) 'Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knottedl* under the control of a senescence-activated promoter', *Plant Cell,* 11 1073-80.

PARK J, OH S, KIM Y, WOO Hand NAM H (1998) 'Differential expression of senescence associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis'* , *Plant Mol Biol,* 37 445-54.

PAULIN A, DROILLARD M J and BUREAU J M (1986) 'Effect of a free radical scavenger 3-4-5-trichlorophenol on ethylene production and on changes in lipids and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations *Dianthus caryophyllus'* , *Physiol Plant,* **67465-71.**

PAWLOWSKI W P and SOMERS D A (1991) 'Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment', *Mol Biotechnol,* 6 17-30.

POLASHOCK J J, CHIN C and MARTIN C E (1992) 'Expression of the yeast DELTA-9 fatty acid desaturase in *Nicotiana tabacum',* *Plant Physiol,* **100** 894-901.

PUDDEPHAT I J, RIGGS T J and FENNING T M (1996) 'Transformation of *Brassica oleracea* L: a critical review', *Mol Breed,* 2 185-210.

RENNENBERG H (1982) 'Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants', *Phytochemistry,* **21** 2771-81.

ROBERTS D D and TAYLOR A J (2001) *Flavor Release,* Washington, American Chemical Society.

RODRIGUEZ A M, CARRICO P M, MAZURKIEWICZ J E and MELENDEZ J A (2000) 'Mitochon drial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of HzOz', *Free Rad Biol M ed,* 29 801-13.

SALISBURY F B and ROSS C W (1992) *Plant Physiology,* 4th edition, California, Wadsworth Publishing Company, 382-600.

SAVIN K W, BAUDINETTE S C, GRAHAM M W, WHITE E L J, MICHAEL M Z, BAYLY A, LU C-Y, CHANDLER S F and CORNISH E C (1994) 'Delayed petal senescence in transgenic carnation using antisense ACC oxidase', *HortSci,* 29 574.

SCHROEDER K R and STIMART D P (1998) 'Effects of an autoregulatory senescence-inhibitor gene construct on *Nicotiana alata* Link and Otto', *HortSci,* 33 519.

SMART C M (1994) 'Gene expression during leaf senescence', *New Phytol,* 126419-48.

SMART C M, SCOFIELD S R, BEVAN M W and DYER T A (1991) 'Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr,* a gene for cytokinin production in *Agrobacterium'* , *Plant Cell,* 3 647-56.

SMIGOCKI A C (1991) 'Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyltransferase gene', *Plant Mol Biol,* 16 105-16.

SMIGOCKI A C and OWENS L D (1988) 'Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells', *Proc Natl Acad Sci USA,* 85 5131-5.

SOZZI-QUIROGA G O and FRASCHINA A A (1997) 'Evaluation of sensory attributes and biochemical parameters in transgenic tomato fruit with reduced polygalacturonase activity', *Food Sci Technol Internat,* 3 93-102.

TAYLOR C B, BARIOLA P A, DELCARDAYRE S B, RAINES R T and GREEN P J (1993) 'RNS2: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation', *Proc Natl Acad Sci USA,* 90 5118-22.

THOMPSON J, TAYLOR C and WANG T-W (2000) 'Altered membrane lipase expression delays leaf senescence', *Biochem Soc,* 28 775-7.

TIMMERMAN K P (1989) 'Molecular characterization of com glutathione S-transferase isozymes involved in herbicide detoxication', *Physiol Plant,* 77 465-71.

TINLAND B (1996) 'The integration of T-DNA into plant genomes', *Trends Plant Sci,* 1 178-93.

VAN LOVEN K, BEINSBERGER S E I, VALCKE R L M, VAN ONCKELEN H A and CLUSTERS H M M (1993) 'Morphometric analysis of the growth of *Phsp70-ipt* transgenic tobacco plants', *J Exp Bot,* 44 1671-8.

VAN STADEN J and JOUGHIN J I (1988) 'Cytokinins in cut carnation flowers Iv. Effects of benzyladenine on flower longevity and the role of different longevity treatments on its transport following application to the petals', *Plant Growth Reg,* 7 117-28.

VESELOV S Y, KUDOYAROVA G R, MUSTAFINA A R and VALCKE R (1995) 'Effect of heat shock on the dynamics of cytokinin concentration in transgenic and intact tobacco plants', *Fiziol Rast,* 42 696-9. WANG C, CHIN C, HO C, HWANG C, POLASHOCK J J and MARTIN C E (1996) 'Changes of fatty acids and fatty acid-derived flavor compounds by expressing the yeast A-9 desaturase gene in tomato', *J Agric Food Chern,* 44 3399-402.

WANG J, LETHAM D S, CORNISH E and STEVENSON K R (1997a) 'Studies of cytokinin action and metabolism using tobacco plants expressing either the *ipt* or the *GUS* gene controlled by a chalcone synthase promoter. I. Developmental features of the transgenic plants', *Austral J Plant Physiol,* 24 661-72.

WANG J, LETHAM D S, CORNISH E, WEI K, HOCART C H, MICHAEL M and STEVENSON K R (1997b) 'Studies of cytokinin action and metabolism using tobacco plants expressing either the *ipt* or the *GUS* gene controlled by a chalcone synthase promoter. II. *ipt* and *GUS* gene expression, cytokinin levels and metabolism', *Austral J Plant Physiol,* 24 673-83.

WEAVER L M, HIMELBLAU E and AMASINO R M (1997) 'Leaf senescence: gene expression and regulation', in *Genetic Engineering,* ed Setlow J K, New York, Plenum Press, 215-43.

WEAVER L M, GAN S, QUIRINO B and AMASINO R M (1998) 'A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment', *Plant Mol Bioi,* **37** 455-69.

WINGATE V PM, LAWTON M A and LAMB C J (1988) 'Glutathione causes a massive and selective induction of plant defence genes', *Plant Physiol,* **87** 206-10.

WINGLER A, YON SCHAEWEN A, LEEGOOD R C, LEA P J and QUICK W P (1998) 'Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars and light', *Plant Physiol,* **116329-35.**

WYSOKINSKA H and CHIMEL A (1997) 'Transformed root cultures for biotechnology', *Acta Biotechnol,* **17** 131-59.

YAMANE K, KAWABATA S and FUJISHIGE N (1999) 'Changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase during senescence of gladiolus florets', *J Jpn Soc Hortic Sci,* **68** 798-802.

YUSIBOV V M, POGOSY AN G P, ANDRIANOV V M and PIRUZY AN E S (1989) 'Transfer of the agrobacterial cytokinin biosynthesis gene into tobacco plants', *Mol Genet Mikrobiol Virusol,* 7 11-13.

ZHANG J, VAN TOAI T, HUYNH L and PREISZNER J (2000) 'Development of flooding tolerant *Arabidopsis thaliana* by autoregulated cytokinin production', *Mol Breed,* 6 135-44.

obeikandl.com