جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم علوم البستنة

إنتاج نباتات معدلة وراثياً من بعض أصناف وأصول التفاح

Production of Transgenic Plants from some Apple Cultivars and Rootstocks

رسالة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية

قسم علوم البستنة

إعداد

نبيلة محمد علي باشا

إشراف

المشرف العلمي
أ.د. محمد بطحه
جامعة دمشق
كلية الزراعة

المشرف المشارك
أ. د. أحمد عبد القادر
الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
قسم التقانات الحيوية

1435
2015

جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم علوم البستنة

إنتاج نباتات معدلة وراثياً من بعض أصناف وأصول التفاح

Production of Transgenic Plants from some Apple Cultivars and Rootstocks

رسالة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية

قسم علوم البستنة

إعداد

نبيلة محمد علي باشا

إشراف

المشرف العلمي
أ.د. محمد بطحه
جامعة دمشق
كلية الزراعة

المشرف المشارك
أ. د. أحمد عبد القادر
الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
قسم التقانات الحيوية

1435
2015

DAMSCUS UNIVERSITY
FACULTY OF AGRICULTURE
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Production of Transgenic Plants from some Apple Cultivars and Rootstocks

THESIS

SUBMETED FOR DOCTORATE DEGREE (Ph. D)
IN AGRICULTURAL ENGENERING
HORTICULTURE

By

NABILA MOHAMAD ALI BACHA

Supervisors

Prof. Dr. Mohamad Battha **Prof. Dr. Ahmad Abdul Kader**

1435
2015

DAMSCUS UNIVERSITY
FACULTY OF AGRICULTURE
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Production of Transgenic Plants from some Apple Cultivars and Rootstocks

THESIS
SUBMETED FOR DOCTORAT DEGREE (ph.D)
IN AGRICULTURAL ENGENERING
HORTICULTURE

by

NABILA MOHAMAD ALI BACHA

Supervisors

Prof. Dr. Mohamad Battha
Department of Horticulture
Faculty of Agriculture
Damascus University
Damascus - Syria

Prof. Dr. Ahmad Abdul Kader
Biotechnology Department
General Commission for Scientific
Agricultural Research
Damascus- Syria

1435
2015

DAMSCUS UNIVERSITY
FACULTY OF AGRICULTURE
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Production of Transgenic Plants from some Apple Cultivars and Rootstocks

THESIS
SUBMETED FOR DOCTORAT DEGREE (Ph.D)
IN AGRICULTURAL ENGENERING
-HORTICULTURE-

by
NABILA MOHAMAD ALI BACHA

Special Degree in Agricultural Engineering, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria, 1994
Diploma of post–graduate Studies in Horticulture, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria, 2002
Master Degree (M.Sc.) in Agricultural Engineering Horticulture Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria, 2009

Supervisors

Prof. Dr. Mohamad Battha
Department of Horticulture
Faculty of Agriculture
Damascus University
Damascus - Syria

Prof. Dr. Ahmad Abdul Kader
Biotechnology Department
General Commission for Scientific Agricultural Research
Damascus- Syria

1435
2015

بسم الله الرحمن الرحيم

وما أوتيتم من العلم

إلا قليلاً

صدق الله العظيم

الفصل الأول

الفصل الثاني

الفصل الثالث

الفصل الرابع

فهرس المحتـــويات

المحتـــويات	رقم الصفحة
شهادة	I
شكر وتقدير	III
فهرس المحتويات	IV
فهرس الجداول	XI
فهرس الأشكال	XII
المختصرات العلمية الواردة في الأطروحة	XV
الملخص باللغة العربية	XVIII
1. المقدمة	1
الفصل الأول	
2. الدراسة المرجعية	8
1.2. تجديد التفاح باستخدام الأوراق كأجزاء نباتية	8
2.2. التحوير الوراثي للتفاح	11
1.2.2. طبيعة الأجزاء النباتية	14
2.2.2. منظمات النمو النباتية	15

3.2.2. المضادات الحيوية	15
4.2.2. إجراء العدوى وسلالة بكتريا التدرن التاجي	16
5.2.2. مورثة الانتخاب	17
6.2.2. كفاءة التعديل الوراثي	19
7.2.2. المورثات المستخدمة في التعديل الوراثي للتفاح	22
8.2.2. استخدام المورثات المتعلقة بالدفاع	25
9.2.2. استخدام مورثات بكتيرية	27
10.2.2. تعديلات أخرى	28
3.2. تطبيقات الهندسة الوراثية من أجل التحسين الوراثي للتفاح	28
1.3.2. مقاومة الأمراض البكتيرية والفطرية:	36
1.1.3.2. الأمراض البكتيرية	36
1.1.1.3.2. مرض اللفحة النارية البكتيري	36
2.1.1.3.2. مرض التدرن التاجي البكتيري	39
2.1.3.2. الأمراض الفطرية	40
1.2.1.3.2. مرض جرب التفاح	40
2.2.1.3.2. مرض البياض الدقيقي	43
2.3.2. مقاومة الحشرات	44
3.3.2. التقزم (قصر طول الشجرة) والقدرة على التجذير	45

4.3.2. نضج الثمرة	46
5.3.2. الخصائص الصحية الفريدة	48
6.3.2. الحساسية لثمار التفاح	50
7.3.2. الصفات الأخرى التي تم تحسينها وبدرجات متفاوتة من النجاح	51
4.2. حدود التكنولوجيا والتطورات الجديدة	51
1.4.2. القبول والوعي الشعبي حول التعديل الوراثي في التفاح والنباتات المحورة وراثياً	51
2.4.2. النباتات المعدلة وراثياً التي تحتوي مورثات من نفس النوع النباتي	53
الفصل الثاني	
3. مـــــواد البحث وطرائقه	56
1.3. مكان وفترة تنفيذ البحث	56
2.3. المادة النباتية المدروسة	56
1.2.3. الصنف Golden Delicious	56
2.2.3. الصنف رويال غالا Royal Gala	56
3.2.3. الأصلMM111	57
4.2.3. الأصل M26	57
3.3. خطوات العمل	57
1.3.3 تأسيس زراعات الأنسجة النباتية	57
2.3.3. التجديد من أقراص الأوراق	59

1.2.3.3. تحديد الشروط المثلى للتجديد مخبرياً بدءاً من نسيج الورقة	59
2.2.3.3. .تحضير الخزعة النباتية	59
3.2.3.3. تجديد النموات الخضرية	60
4.2.3.3. تكاثر النموات الخضرية وإعادة الزرع	60
5.2.3.3. أوساط تجديد النموات	60
6.2.3.3. دراسة العوامل المؤثرة في تجديد النموات	61
7.2.3.3. التجذير	62
8.2.3.3. النقل إلى أصص الزراعة والتقسية	63
3.3.3. التعديل الوراثي	63
1.3.3.3. أمثلة شروط التحوير الوراثي للأصناف والأصول المدروسة	63
1.1.3.3.3. البلازميد المستخدم للتعديل الوراثي	63
2.1.3.3.3. التعديل الوراثي للتفاح بوساطة الأغروباكتريوم الحاملة للمورثة *g2ps1*	65
1.2.1.3.3.3. إكثار نباتات من صنفي وأصلي التفاح المدروسين بطريقة زراعة الأنسجة	65
2.2.1.3.3.3. تحضير لقاح الآغروبكتريوم	66
3.2.1.3.3.3. جمع المستزرعات الورقية وتلقيحها بالبكتريا	67
4.2.1.3.3.3. الزراعة المشتركة	68
5.2.1.3.3.3. نقل الأجزاء الورقية إلى أوساط التجديد والانتخاب	68

4.3.3. تقييم التعديل الوراثي للأصناف والأصول المدروسة	69
1.4.3.3. الزرع على وسط يحوي عامل انتخابي	69
2.4.3.3. التقييم بالطرائق الجزيئية	70
1.2.4.3.3. اختبار نوعية الـ DNA المستخلص وتقدير تركيزه	71
2.2. 4. 3.3. تمديد عينات الـ DNA	72
3.2. 4. 3.3. تضاعف الحمض النووي DNA	72
4.2.4.3.3. تحديد تتابعات نيكليوتيدات المورثة*g2ps1* ومطابقتها مع التتابع النيوكليوتيدي للمورثة المنقولة في النباتات المعدلة وراثياً	74
5.3.3. إكثار النباتات المعدلة وراثياً	74
6.3.3. تجذير وتقسية النباتات المعدلة وراثياً	74
7.3.3. شروط الزرع (التحضين)	74
5.3.3. التحليل الإحصائي	75
الفصل الثالث	
4. النتائـــــــج	76
1.4. تأسيس زراعات الأنسجة النباتية	76
2.4. تجديد النموات الخضرية من الأوراق	76
1.2.4. تأثير موقع وجزء الورقة في تشكل النموات الجديدة	77
2.2.4. تأثير منظمات النمو في تجديد النموات الخضرية	78

3.2.4. تأثير شدة الإضاءة في تشكل النموات العرضية	81
4.2.4. تأثيرات خدش الورقة في التجدد والقدرة على تشكل الأعضاء النباتية	82
5.2.4. تأثير مصدر الكربون وعوامل التهليم المستخدمة في التعضي والنمو	82
6.2.4. الإكثار الخضري الدقيق للنباتات الناتجة من التجديد من نسيج الورقة	83
7.2.4. تجذير النموات المتجددة	84
8.2.4. تقسية النموات المتجددة	84
3.4. التعديل الوراثي	85
1.3.4.أمثلة شروط التعديل الوراثي للأصناف والأصول المدروسة	85
1.1.3.4. تأثير خدش الورقة في تجدد النموات العرضية المعدلة وراثياً والقدرة على تشكل الأعضاء النباتية	85
2.1.3.4. تأثير منظمات النمو في التجديد والقدرة في تشكيل الأعضاء	86
3.1.3.4. تأثير فترة الزرع المشترك في نقل المورثة	86
4.1.3.4. تأثير الأسيتوسيرينغون في نقل المورثة	86
5.1.3.4. تأثير عامل الانتخاب والمضادات الحيوية	87
2.3.4. الإكثار الخضري الدقيق للنموات المعدلة وراثياً	87
3.3.4. تجذير النباتات المعدلة وراثياً	88
4.3.4.تقسية النباتات المعدلة وراثياً	88
5.3.4. تقييم النباتات المعدلة وراثياً واختبارها جزيئياً	89

1.5.3.4. التقييم بالزرع على وسط يحوي عامل انتخابي	89
2.5.3.4. التقييم بالطرائق الجزيئية	89
1.2.5.3.4. اختبار التفاعل التسلسلي للبوليمراز للتأكد من اندماج المورثة المنقولة *g2ps1* ومورثة الانتخاب *bar* في النباتات المعدلة وراثياً	89
2.2.5.3.4. تحديد تطابق المورثة المنقولة في النباتات المعدلة وراثياً مع تسلسل المورثة *g2ps1*	90
3.2.5.3.4. التقييم الجزيئي للنباتات المؤقلمة	91
الفصل الرابع	
5. **المناقشة**	92
1.5. التجديد من أقراص الأوراق	92
1.1.5. تأثير منظمات النمو في نسبة التجديد وعدد النموات المتجددة	93
2.1.5. تأثير جزء الورقة في تشكل النموات الجديدة	96
3.1.5. تأثير شدة الإضاءة في التجديد والقدرة على تشكيل الأعضاء	97
4.1.5. تأثير خدش و جرح الأوراق في تشكل النموات العرضية	98
5.1.5. تأثير مصدر الكربون والـ MES وعوامل التهليم المستخدمة في الاستجابة التعضي والنمو	98
2.5. التعديل الوراثي لأصناف وأصول التفاح المدروسة بمورثة *g2ps1* من نبات الجربيرا من أجل زيادة مقاومتها للأمراض الفطرية	99
3.5.تحليل الـ Polymerase Chain Reaction Analysis (PCR)	103
6 .الإستنتاجات	104

7.المقترحات	105
8.المراجـــــــــع	106
9. ملحق خاص بالمورثة Gerbera hybrida mRNA for 2-pyrone synthase *g2ps1* gene	136
الملخص الانكليزي	141

فهـرس الجــداول

رقم الجدول	محتوى الجـــدول	رقم الصفحة
1	ملخص دراسات أصناف وأصول التفاح المحورة وراثياً	12
2	ملخص لبعض دراسات التعديل الوراثي على التفاح والعوامل المؤثرة في كفاءة نقل المورثات	19
3	المورثات المستخدمة في التحوير الوراثي للتفاح	23
4	الصفات الخاصة بمقاومة الأمراض المعبرة في التفاح المحور وراثياً.	29
5	أوساط إكثار واستطالة وتجذير النموات	58
6	تركيب الأوساط المستخدمة لدراسة التجديد من نسيج الورقة	61
7	. تركيب الأوساط المستخدمة لدراسة التجديد من نسيج الورقة مع التعديل الوراثي (بوجود عامل الانتخاب)	69
8	مكونات تفاعل الـ PCR	73
9	برنامج عمل الـ PCR للكشف عن المورثات *g2ps1* و *bar*	73
10	التسلسل النكليوتيدي للمرئسات (Primers) المستخدمة في الدراسة للكشف عن التعديل الوراثي للصنفين والأصلين	73

	المدروسين من شركة MWG Eurofins Genomics, Germany	
11	نتائج تأسيس زراعات الأنسجة للصنفين والأصلين المدروسين	76
12	متوسط عدد النموات المتجددة على أوساط مختلفة باستخدام الأجزاء الثلاثة للورقة. للصنفين Golden Delicious و Royal Gala المدروسين	78
13	متوسط عدد النموات المتجددة على أوساط مختلفة باستخدام الأجزاء الثلاثة للورقة. للأصلين M26, MM111 المدروسين	78
14	جدول14. متوسط عدد النموات المتجددة على الأوساط المختلفة باستخدام الجزء الوسطي للورقة في الصنفين والأصلين المدروسين	79

فهرس الأشكال

رقم الشكل	محتوى الشـــكل	رقم الصفحة
1	إجراءات التجديد والتحوير الوراثي في التفاح	17
2	البلاسميد PGreen II 35S-G2PS1 الحامل للمورثة *g2PS1* المستخدم في التعديل الوراثي	64
3	شكل الناقل الثنائي binary vectors المستخدم في التعديل الوراثي للتفاح	65
4	النسب المئوية لتجديد النموات الخضرية ابتداءً من الأجزاء المختلفة للورقة على أوساط التجديد المختلفة للصنفين Royal Gala و Golden Delicious المدروسين	77
5	النسب المئوية لتجديد النموات الخضرية ابتداءً من الأجزاء المختلفة للورقة على أوساط التجديد المختلفة للأصلين MM111 و M26 المدروسين	77
6	مخطط النسب المئوية للتجديد من الورقة باستخدام الجزء الوسطي للورقة للصنفين والأصلين المدروسين على أوساط التجديد المختلفة	79

7	تشكل النموات الجديدة على أفضل وسط للتجديد R01	80
8	تشكل النموات الجديدة على وسط التجديدR02 الذي يحويBAP	80
9	تشكل النموات بدءاً من الجزء الوسطي للورقة على أوساط تجديد مختلفة في الصنفين والأصلين المدروسين.	81
10	تشكل الكالوس عند استخدام 2,4,D في مرحلة التجديد من نسيج الورقة للتفاح.	81
11	نموات النبتات المتجددة على أوساط تحوي سوربيتول كمصدر للطاقة مقارنة مع أوساط تحوي سكروز	82
12	تشكل نموات باستخدام أوساط مهلمة بالجلرايت والآغار	83
13	مرحلة الإكثار الخضري في الأنابيب بعد مرحلة التجديد من الورقة في الأطباق	83
14	تجذير العينات الناتجة من الإكثار بطريقة التجديد من نسيج الورقة للصنفين والأصلين المدروسين	84
15	تقسية العينات المكاثرة بطريقة التجديد من نسيج الورقة للصنفين والأصلين المدروسين	84
16	تجديد أجزاء ورقية معدلة وراثياً من الصنفين والأصلين المدروسين على أوساط تجديد تحوي عامل انتخاب	86
17	إكثار النموات المعدلة وراثياً المتجددة على أوساط تحوي عامل الانتخابPPT	87
18	تجذير النباتات المعدلة وراثياً على وسط تجذير يحوي عامل الانتخاب	88
19	نباتات معدلة وراثياً تنمو في ظروف البيت الزجاجي	88
20	تقييم النباتات المعدلة وراثياً بالزرع على وسط يحوي العامل الانتخابيPPT	89
21	التقييم الجزيئي للنموات المعدلة وراثياً باختبار الPCR على هلامة الآجاروز للكشف عن وجود المورثة *g2ps1* ومورثة الانتخاب *bar* في الصنفين	90

	والأصلين المدروسين	
22	التقييم الجزيئي للنباتات المؤقلمة والنامية في البيت الزجاجي باختبار الـ PCR على هلامة الاجاروز للكشف عن وجود المورثة *g2ps1* في الصنفين والأصلين المدروسين	91
23	التقييم الجزيئي للنباتات المؤقلمة والنامية في البيت الزجاجي باختبار الـ PCR على هلامة الاجاروز للكشف عن وجود المورثة *g2ps1* والمورثة *bar* في الصنفين والأصلين المدروسين	91

1. المقدمـــة Introduction

تم تسويق محاصيل التكنولوجيا الحيوية لأول مرة في عام 1996 وازدادت المساحة المزروعة بها سنوياً من 1.7lمليون هكتار في عام 1996 وحتى181.5 مليون هكتار في عام 2014 زرعت في 28 دولة من قبل 18 مليون مزارع، في البلدان النامية والدول الصناعية على حد سواء. تعتبر الولايات المتحدة البلد الرائد بزراعة المحاصيل المعدلة وراثياً بمساحة 73.1 مليون هكتار، يليها في المرتبة الثانية البرازيل، ثم الأرجنتين والهند، فكندا. أما أهم المحاصيل المزروعة فتتضمن الذرة والقطن وفول الصويا والكانولا والباباظ والبندورة لإنتاج أصناف مقاومة للأمراض والحشرات ومبيدات الأعشاب (James, 2013). في القرن الماضي، تركزت الجهود في مجال البحوث الزراعية على زيادة إنتاج المحاصيل. ومع ذلك فان التربية التقليدية لأشجار الفاكهة محدودة بسبب طول دورتها التكاثرية وطول فترة دخولها في طور الإثمار وبيولوجيا التكاثر المعقدة والدرجة العالية من تباين الزيغوت فيها. لقد وفرت الإنجازات على مدى العقد الماضي في علوم الوراثة والمعلوماتية الحيوية خيارات جديدة لتحديد مركبات مفيدة، ومورثات مقاومة الأمراض والمورثات المسؤولة عن نمو وتطور النبات. وبدا أنه من الممكن إنتاج الأصناف الموجودة مع تغيير خواصها حسب المرغوب في إطار زمني أقصر مقارنة بالتربية التقليدية (Aldwinckle and Malony, 2009).

يعتبر التفاح أحد أهم محاصيل فاكهة المناطق المعتدلة. في عام 2012، كان التفاح ثالث أهم محصول فاكهة بعد البرتقال والموز وبلغ إنتاج التفاح في العالم 76.3 مليون طن وفي سورية 257 ألف طن والمساحة المزروعة 53 ألف هكتار وبلغ إجمالي عدد الأشجار المزروعة 13565.1ألف شجرة (FAO STAT, 2013). وتشير المعلومات الإحصائية الأخيرة التي نشرت من قبل وزارة الزراعة الأمريكية، إلى أن الاتحاد الأوروبي يحتل المركز الأول في تصدير التفاح بنسبة 22% يليه الصين بنسبة 19%، ثم تشيلي بنسبة 18% من إجمالي المعروض في السوق، ثم الولايات المتحدة الأمريكية، وجنوب أفريقيا، ونيوزيلندا والأرجنتين(Polanco *et al,* 2010).

ينتمي التفاح إلى العائلة الوردية *Rosaceae*، تحت عائلة *Maloideae*(*Pomoidea*) (Haris *et al,* 2002) ، ومن المرجح أن يكون قد نشأ أصل التفاح المزروع في المنطقة المحيطة بالجبال الشاهقة على الحدود الغربية للصين، في الاتحاد السوفيتي السابق وفي آسيا الوسطى ومن المفترض أنه مجمع هجين بين الأنواع، وسمي بـ *Malus domestica* Borkh (Korban and Skirvin, 1984). في العصور الوسطى، كانت الأديرة مسؤولة عن الانتخاب

والإكثار والحفاظ على استمرار مئات الأنواع المزروعة المختلفة. وقد أصبحت هذه الزراعات المصدر الرئيسي لانتخاب وتربية النباتات لإجراء تهجينات مدروسة متحكم بها من أجل التحسين الوراثي لصفات محددة في القرن التاسع عشر (MacHardy, 1996). خلال أواخر القرن التاسع عشر والقرن العشرين، تم التحسين الوراثي لأصناف التفاح المزروع *M. domestica* في أوروبا وروسيا وأمريكا الشمالية ونيوزيلندا واليابان واستراليا، وأخيراً، أدخل التفاح إلى بقية دول العالم. شكلت هذه الإدخالات الجديدة الأساس لمعظم أصناف التفاح التجارية الحالية(Way *et al*; 1991; Janick *et al*; 1996).في الوقت الحاضر، تم توصيف أكثر من 7000 صنف، ويطور مربوا النبات في جميع أنحاء العالم سنوياً انتخابات جديدة، ومع ذلك. لا يوجد سوى عدد قليل من الأصناف التي تنتج على مستوى تجاري (Janick *et al*; 1996). وإلى جانب أهميته الاقتصادية، أصبح التفاح كنموذج للأبحاث الوراثية في الأشجار الخشبية المعمرة مغلفة البذور نظراً لحجم الجينوم الصغير نسبياً فيه (750 ميغا زوج من القواعد/في أحادي الصيغة الصبغية)، وتوافر الموارد الوراثية مثل أكثر من 300000 علامة تسلسل معبر عنه expressed sequence tags (EST) ومكتبات الكروموزومات الاصطناعية البكتيرية (BAC) والخرائط الوراثية، ونشر التسلسل الكامل للتركيب الوراثي (جينوم) له والنسخ المتوقعة للمورثات (جزئيات الـ RNA التي تم تصنيعها من قالب الـDNA)، ومواقع المورثات ووظائفها المفترضة على أساس التماثل مع مورثات معروفة، بالإضافة إلى تطوير طرائق تحوير وراثي عملية وناجحة للعديد من أصناف وأصول التفاح(Tatum *et al*, 2005; Newcomb *et al* , 2006; Han *et al*, 2007; Aldwinckle and Malony, 2009; Velasco *et al*, 2010).

معظم سلالات التفاح المزروعة هي ثنائية الصيغة الصبغية diploids (2N = 34)، غير متوافقة ذاتياً، خلطية التلقيح، وذات فترة يفاعة حتى تدخل مرحلة الإثمار تتراوح من 6 إلى10 سنوات أو أكثر (Korban and Chen, 1992).

في الوقت الحاضر يحتاج السوق إلى أصناف تفاح عالية الإنتاجية ومنتظمة الإنتاج وتتصف بجودة عالية للثمار. بالإضافة إلى ذلك، يرغب المنتجون والمربون بالأصناف المقاومة للأمراض والآفات وتتحمل مشاكل التخزين. وعلى الرغم من أن مزايا الأصناف المقاومة مثبتة، لكن الأصناف المقاومة لا تزال ليست هي السائدة في السوق. والسبب في ذلك بسيط وواضح، هو أن معظم أصناف التفاح الناجحة تجارياً، فقدت فعالية مورثات الحساسية للأمراض الفطرية الأكثر شيوعاً، وهي جرب التفاح *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter) ومرض البياض الدقيقي الذي يسببه الفطر(*Podosphaera leucotricha* Ellis

.Everh &)، لذلك تقريباً جميع أصناف التفاح تحتاج إلى وقاية مستمرة من هذين الفطرين في كل الظروف المناخية المفضلة لنموها وغيرها من المسببات المرضية. على سبيل المثال، تحتاج أشجار التفاح وسطياً من 10 إلى 15 رشة بمبيدات فطرية خلال الموسم من أجل الحصول على ثمار خالية من الجرب، وهذا يعني زيادة تكلفة إنتاج التفاح وزيادة مخاوف المستهلكين وأنصار حماية البيئة من مخاطر استخدامات المبيدات (MacHardy, 1996; Gessler and Patocchi, 2007) ولذلك، فإن معظم برامج تربية التفاح الحالية موجهة نحو التقليل من الحاجة إلى استخدام المبيدات، دون أن تؤثر في جودة الثمار. للأسف، بسبب طول فترة الدخول في الإثمار والمستويات الكبيرة في التباين في الزيغوت غير متماثل المورثات والوقت اللازم لتقييم الهجين، فإن عملية إطلاق أصناف جديدة من برامج تربية التفاح التقليدية بطيئة، وخاصة إذا كان مربي النبات ينقل مورثات (جينات) من أصناف أو تراكيب وراثية غير متكيفة مثل الأنماط الوراثية البرية. على سبيل المثال، التهجين بين الأنواع المزروعة (المستأنسة) والأنواع البرية يحتاج إلى تهجين رجعي عدة مرات لاستبعاد الصفات الموروثة غير المرغوب فيها من الأنواع البرية. يمكن أن يستغرق إطلاق صنف جديد نحو 10 سنوات أو أكثر، وتقريباً 40 عاماً لإدخال وتأسيس صنف جديد في السوق(Korban and Chen, 1992; Brown, 1992).

إن تطبيق طرائق التحليل المتطورة للحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA مثل الخرائط الوراثية، وتحديد واسمات الـ DNA المرتبطة بالصفات المرغوبة والانتخاب بمساعدة المعلمات الجزيئية في برامج التربية يمكن أن تساعد في تسريع هذه العملية وبالتالي تطوير صنف جديد مقاوم للأمراض والآفات خلال فترة أقصر. ولكن مع ذلك، هذه الأصناف الجديدة ينبغي أن تكون مقبولة من قبل المستهلكين، الذين يتطلبون مواصفات محددة للغاية من حيث جودة الثمار.

في إطار هذا الوضع، يعد التحسين الوراثي للتفاح من خلال إدخال مورثة معينة (أو مورثات معينة) إلى الأصناف التجارية الحالية، على المدى القصير، إستراتيجية جذابة للغاية (Aldwinckle and Malony, 2009).

تعتبر الهندسة الوراثية طريقة حديثة في عملية نقل الصفات الوراثية مباشرةً من كائن حي إلى آخر حتى ولو لم يكن بينهما قرابة وراثية، وهذا على خلاف ما هو معروف بنقل الصفات الوراثية عن طريق التهجين، إذ لابد من وجود صلة قرابة بين الكائنين وهذا ما يطلق عليه "التربية الكلاسيكية للنبات". تتيح الهندسة الوراثية نقل المورثات بين أنواع متباعدة وراثياً، ويعود السبب

في ذلك إلى أن مورثات الكائنات الحية كافة مكونة من نفس المادة وهي جزيئة DNA والتي يمكن قصها ولصقها وإعادة ترتيبها من جديد مخبرياً.

وقد برزت الهندسة الوراثية في نهاية القرن الماضي لتعتمد التعديل الوراثي كحل لعدد من المشكلات المتعلقة بمستويات الإنتاج والجودة ومقاومة الآفات والتكيف مع بيئات مختلفة. نتج عن ذلك اتساع المساحات المزروعة بالمحاصيل المعدلة وراثياً عبر العالم لتصل عام 2008 إلى 125 مليون هكتار معظمها في أمريكا الشمالية (James, 2009).

تميزت الهندسة الوراثية في أن الإنسان ولأول مرة في التاريخ أصبح يملك الوسيلة لأن يتلاعب بالمخزون الوراثي الكائن في جميع الكائنات الحية سواء أكانت نباتات أم حيوانات أم كائنات دقيقة بما يحقق ويرضي رغباته وطموحاته، أي أن التراكيب الوراثية لصور الحياة المختلفة يمكن أن توضع على طاولة العمليات الوراثية لتصبح مطواعة للجراحة الوراثية لاستحداث نباتات معدلة وراثياً بهدف تغيير وظائفها البيولوجية عن طريق إضافة مورثات تحمل صفات وراثية جديدة ومرغوب فيها أو إزالة مورثات تحمل صفات وراثية غير مرغوب فيها وتعديل نظام عمل المورثات التي تحمل الصفات المرغوب فيها. كل ذلك يؤدي في النهاية إلى تعديل الإمكانات الوراثية للكائن الحي.

وعموماً، يعد الاستخدام والتطبيق الناجح للتقانات الحيوية من أجل تحسين النباتات حاجة أساسية في دراسات التعديل الوراثي ويتطلب تطوير طرائق فعالة وناجحة لتجديد النموات الخضرية من الخلايا والأنسجة المزروعة.

مع توفر طرائق التعديل الوراثي للـDNA المأشوب، أصبحت الطرائق الجديدة للتحكم بالأمراض النباتية استراتيجيةً هامةً، إذ يتم نقل مورثةٍ واحدةٍ لمركبٍ مضادٍ لميكروبٍ واحد أو أكثر. هذه المورثة يمكن أن تشفر للكيتيناز على سبيل المثال الذي يحطم الجدران الخلوية المحتوية على الكيتين في بكثير من الفطريات. ويمكن تحسين مقاومة النبات بتعبير بروتين أو أكثر مضاد للميكروبات في النبات نفسه (Bent, 2003). وعموماً، يعد التعديل الوراثي طريقة جيدة وبديلة أو مكملة للطرائق التقليدية لتطوير أصناف مقاومة نظراً للقابلية العالية لأهم أصناف وأصول التفاح التجارية للإصابة بالأمراض الفطرية. كان التفاح هدفاً مبكراً لتكنولوجيا الحمض النووي المأشوب منذ نشوءها.

في هذا الاستعراض، سوف يتم مراجعة المعرفة الحالية حول إجراءات التعديل الوراثي وتطبيقاتها في التفاح، بالإضافة إلى عرض موجز للموارد المتاحة وأحدث التطورات في تطبيقات الهندسة الوراثية في تطوير أصناف تفاح مقاومة للأمراض الفطرية والبكتيرية، مع التركيز بشكل خاص على تطوير أصناف تفاح مقاومة لمرض اللفحة النارية البكتيري

Erwinia amylovora ومرض جرب التفاح الفطري *Venturia inaequalis* (Cooke) G.Winter, واللذين يعتبران المشكلة الرئيسية التي تؤثر على صحة محصول التفاح من الأمراض في أغلب مناطق إنتاج التفاح في العالم. هذا بالإضافة إلى استعراض سريع لتحسين مواصفات التفاح الأخرى وحدود التكنولوجيا والتطورات الجديدة والوعي العام للتعديل الوراثي في التفاح والمنظورات المستقبلية.

أما الدراسات المنشورة عن التعديل الوراثي للصنفين والأصلين المدروسين في هذه الدراسة فتشمل: التعديل الوراثي للصنف **رويال غالا** Royal Gala. (Faize *et al*, 2003, 2004; *al*, 2007; Espley *et al*,2007; Joshi,2010). والصنف **غولدن ديليشس** Golden Delicious (James *et al*,1989,1993;Janse *et al*, 2002; Ali Bacha *et al*,2012). **والأصل M.26**(Abdul-Kader *et al*,1998; 1999; Malnoy**,** *et al*, 2006 a, 2006b;2007; Xue,*et al*,2008). بينما لم تنشر سوى دراسة واحدة حول الأصل **MM111** (Ali Bacha *et al*, 2012).

وعموماً، نُشرت أبحاث عديدة أخرى حول التعديل الوراثي للتفاح واستخدام طرائق زراعة الأنسجة من أجل الإكثار الدقيق وتجديد عدد كبير من أصناف وأصول التفاح Aldwinckle and Malony, 2009). الأسلوب الأكثر استخداما على نطاق واسع لإدخال المورثات الجديدة في النباتات ثنائية الفلقة هو التعديل الوراثي بوساطة بكتريا التدرن التاجي (آغروباكتيريوم). في هذه العملية، الناقل الثنائي المجرد من المورثات التي تسبب الأورام والمحمول في بكتريا التدرن التاجي وأجزاء ورقة النبات أو الكالوس (الكنب) هي العناصر الرئيسية للتحوير الناجح (James *et al*,1989). وعموماً، بدأت معظم الدراسات باستخدام مقاطع ورقية مخدوشة Norelli *et al*, (1996) ولكن المستزرعات من سلاميات قمية من نموات صنف التفاح رويال غالا المحجوب عنها الضوء قد أعطت كفاءة أعلى في إنتاج نموات معدلة وراثياً (Liu *et al*, 1998).

تشفر المورثة *g2ps1* في نبات الجربيرا التزييني لأنزيم 2- بيرون سينستيز حيث تستخدم الـ Acetyl-co-A و الـ Malonyl- co-A وتفاعلي تكثيف من أجل التصنيع الحيوي لنوعين من مشتقات البيرون هيدروكسي ميثيل هما: الجيربيرين والباراسوربوزايد اللذين يساهمان في مقاومة الأمراض الفطرية و الحشرات أيضاً .

يعد الإكثار الخضري الدقيق طريقة واسعة الانتشار لإكثار النباتات، لكنه لا يزال هناك بعض العوامل المحددة لانتشار تطبيقه بشكل أوسع في المشاتل، حيث لا تزال معدلات التكاثر غير مرضية. كما أنه عادة ما يترافق تجديد النباتات الخشبية من العائلة الوردية بمشاكل منها على وجه الخصوص الإفرازات الفينولية. وقد ثبت أن تشكل النموات العرضية طريقة فعالة وأكثر إنتاجية من تكاثر النموات الجانبية والتي تستخدم بشكل واسع في بعض المخابر التجارية المعروفة. وثبت من جهة أخرى، أن تكاثر النموات العرضية باستخدام أجزاء الورقة هو طريقة فعالة في إكثار أصناف وأصول التفاح ونباتات أخرى كثيرة (Famiani *et al* 1994;Yao *et al* 1995;Modgil *et al*,1999). وقد ثبتت فعالية التجديد من أجزاء الورقة في العديد من أصناف وأصول التفاح (Caboni *et al* ,1996; Ferradini *et al*,1996; Yao *et al*, 1995; Norelli *et al*, 1996; Modgil *et al*, 1999; Szankowski *et al*,2001; ونشرت دراسات عن التجديد لعدد من أنسجة التفاح شملت الساق والفلقات والهيبوكتيل والمئبر والبروتوبلاست(Korban and Chen,1992; Gercheva *et al*, 2009)، لكن من جهة ثانية، تعد خزعات الأوراق من النموات الخضرية المأخوذة من زراعات الأنسجة بأنها الأكثر فعالية وأكثر مصدر أنسجة موثوق من أجل التجديد (Wilson and James, 2003)

<u>مبررات البحث</u>

- حاجة السوق إلى أصناف تفاح تتصف بجودة عالية للثمار وذات إنتاجية منتظمة
- رغبة المنتجون والمربون بالأصناف المقاومة للأمراض والآفات وتحمل مشاكل التخزين
- تحتاج أشجار التفاح إلى عدد كبير من الرشات بالمبيدات الفطرية خلال الموسم من أجل الحصول على ثمار خالية من هذه الأمراض زيادة تكلفة إنتاج التفاح و مخاوف المستهلكين وأنصار حماية البيئة من مخاطر استخدام المبيدات.
- التفاح نموذجاً للأبحاث الوراثية في الأشجار الخشبية المعمرة مغلفة البذور نظراً لحجم الجينوم الصغير نسبياً فيه (750Mb/haploid) وتوافر الموارد الوراثية ومكتبات الكروموزومات الاصطناعية البكتيرية (BAC) والخرائط الوراثية ونشر التسلسل الكامل للتركيب الوراثي (جينوم) له والنسخ المتوقعة للمورثات ومواقع المورثات ووظائفها المفترضة, تطوير طرائق تعديل وراثي عملية وناجحة للعديد من أصناف وأصول التفاح.

أهداف البحث: هدف البحث إلى ما يلي:

1. دراسة التجديد من نسيج الورقة وبعض العوامل المؤثرة فيه وذلك كشرط أساسي لعملية التحوير الوراثي للأصناف والأصول المدروسة

2.إنتاج نباتات معدلة وراثياً من أصناف وأصول التفاح المدروسة (الصنفين Golden Delicious و Royal Gala والأصلين MM111 و M26) تحمل المورثة *g2PS1* والتي لها دور في زيادة تحمل النباتات لبعض الأمراض الفطرية.

3. اختبار النباتات المحورة والتأكد من التعديل الوراثي باستخدام تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR وتقنيات أخرى.

إنتاج نباتات معدلة وراثياً من بعض أصناف وأصول التفاح

ملخص

هدفت الدراسة الحالية إلى تطوير طريقة فعالة للتجديد المباشر من الورقة لصنفي التفاح Golden Delicious و Royal Gala والأصلين'MM111' و'M26'، بدءاً من أجزاء الورقة وذلك كطريقة سريعة للإكثار وكشرط أساسي لتطوير طريقة عملية وفعالة للتعديل الوراثي بوساطة بكتريا التدرن التاجي التي تحمل المورثة *g2ps1* من أجل إنتاج نباتات مقاومة للأمراض الفطرية من صنفي وأصلي التفاح المدروسين.

تم الحصول على تشكلات عرضية باستخدام الجزء الوسطي من الورقة من الأوراق الفتية للنباتات المكاثرة بطرائق زراعة الأنسجة النباتية وبنسب تجدد 90%,95%,92%,94% ومعدل نموات 4.5 ,5.6 ,4.0 ,4.1 للصنفين والأصلين المدروسين على التوالي وذلك على وسط موراشيج وسكوغ MS المزود بـ :

MS+ B5 vitamins + 1.0 g/l MES + 2.0 mg/l TDZ+ 0.2 mg/l NAA

بينما لم يلاحظ تشكل أعضاء على وسط الإكثار غير المزود بالسيتوكينينات. واعتمدت القدرة على التعضي من نسيج الورقة على عمر وأصل ومنشأ الورقة حيث تم استخدام الأوراق الفتية بلون أخضر فاتح لامع والتي تكون أكثر قدرة على التجديد من الأوراق القديمة. وقد كان الجزء الوسطي للورقة أكثر قدرةً على التجديد من الجزأين القمي والقاعدي للورقة. وقد تم تشكل النموات الجانبية العرضية من كل مناطق القطع ومن أسطح الأجزاء الورقية المجروحة. ولذلك تم استخدام الجزء الوسطي للورقي من أجل التعضي من نسيج الورقة للصنفين والأصلين المدروسين والتي تمت على وسط MS المزود بالإضافات الآتية:

MS+ B5 vit. + 1.0 g/l MES+ 30 g/l sucrose+ 1 mg/l BAP+ 0.3 mg/l IBA+ 0.2 mg/l GA_3 + 6 g/l agar

وتمت عمليات إعادة الزراعة كل أربعة أسابيع لتوفير كميات كبيرة من الأوراق الضرورية للتعديل الوراثي.

تمت دراسة العوامل المؤثرة على التعديل الوراثي وأمثلتها باستخدام بكتريا التدرن التاجي المحتوية مورثة *g2ps1* من نبات الجربيرا والتي تشفر للبيرون سينثيز الذي يساهم في زيادة المقاومة للأمراض الفطرية والحشرات.

الملخـــص

تم تجديد نموات خضرية معدلة وراثياً على وسط موراشيج وسكوغ الحاوي 5 مغ/ل BAP أو 2 مغ/ل ثيوديزيرون TDZ و0.2 مغ/ل NAA بوجود العامل الانتخابيPPT بتركيز 3 مغ /ل. وتم إكثار النموات المعدلة وراثياً على وسط موراشيج وسكوغ الحاوي:

MS + B5 vitamins + 1.0 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} IBA, 0.2 mg l^{-1} *GA3+1.0 g/l MES+ 30 g/l sucrose + 7.0 g/l Agar*

وذلك بوجود العامل الانتخابيPPT بتركيز 3 مغ /ل وتم إعادة إكثارها كل أربعة أسابيع للحصول على كميات كافية لزوم اختبارات إثبات التعديل الوراثي.

تم الحصول على كلونات معدلة وراثياً من الصنفين والأصلين المدروسين على التوالي والتي تم إثبات تعديلها الوراثي بنموها على الوسط الانتخابي وأيضاً بعزل دنا من المتجددات المفترضة معدلة وراثياً ثم تم إجراء اختبار التفاعل التسلسلي للبوليمراز باستخدام بادئات خاصة للكشف عن المورثة المنقولة (بحجم 1244 زوج قاعدي) ومورثة الانتخاب (بحجم 477 زوج قاعدي) والتي أثبتت وجود المورثة المنقولة في الأجزاء المعدلة وراثياً، وكانت نسبة التعديل الوراثي 0.4 و 0.6 و0.1 و 0.3 % على التوالي ، وكذلك من خلال نتائج تحليل التتابع النكليوتيدي لسلاسل الـ دنا المعزول من النباتات المعدلة وراثياً ومقارنته مع تسلسل المورثة g2ps1 من الجربيرا Gerbera hybrida mRNA for 2-pyrone synthase (accession no. Z38097.2)، وبنسبة تشابه تراوحت بين 97 و99%.

تم بعد ذلك تجذير النباتات المعدلة وراثياً مخبرياً ضمن الأنابيب بنقل الأجزاء النباتية بطول 2-3 سم إلى وسط التجذير MS ½ والمزود بـ 1.0 mg/l إندول بيوتريك أسيد (IBA) بوجود العامل الانتخابي وتمت أقلمة النباتات المجذرة بسهولة ونجاح في البيت الزجاجي، ثم تركت لتنمو في ظروف البيت الزجاجي حسب قانون الأمان الحيوي في سورية لعام 2012 ليتم تقييم أدائها في مقاومة الأمراض الفطرية.

3. مـــواد البحث وطرائقه Materials and Methods

1.3. مكان وفترة تنفيذ البحث :

نفذت التجارب في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – قسم التقانات الحيوية – دائرة التعديل الوراثي– دوما– دمشق– سوريا خلال الفترة بين 2011–2014 , وتم إجراء جزء من الاختبارات الجزيئية في جامعة هانوفر في ألمانيا(تحديد تتابعات نيكليوتيدات المورثة *g2ps1* ومطابقتها مع التتابع النيوكليوتيدي للمورثة المنقولة في النباتات المعدلة وراثياً).

2.3. المادة النباتية المدروسة:

نموات خضرية من زراعات الأنسجة تم الحصول عليها من زراعات مخبرية لصنفي التفاح غولدن ديليشس Golden Delicious رويال غالا Royal Gala والأصلين MM111 وM26 والتي يتم إكثارها في مخبر زراعة الأنسجة– قسم التقانات الحيوية منذ بضعة سنوات (Al-Rihani *et al*, 2008), (Al-Tinawi *et al*,2010) وتتميز كل منها بمواصفات جيدة، لكنها تصاب بالأمراض الفطرية.

1.2.3. الصنف Golden Delicious: صنف أمريكي، ثماره صفراء اللون، يحتاج إلى فترة متوسطة من البرودة شتاءً، ثماره متوسطة إلى كبيرة الحجم، متطاولة، الطعم حلو والنكهة محببة، صنف مرغوب لقابلية زراعته في الشتاء الدافئ، يحمل بغزارة، يتحمل النقل والتخزين، صنف تجاري هام ومنتشر في أكثر البلدان، ينضج في الثلث الأول من تشرين أول. يصاب بالبياض الدقيقي والجرب.

2.2.3. الصنف Royal Gala: أنتج عن طريق التهجين بين الصنفين Golden Delicius X Kidds Orang. أدخل إلى سورية من فرنسا عام1987.أشجاره قوية النمو، متوسطة الحجم، متوسط طول الطرد68 سم وبمتوسط ثخانة 6.5 مم، يتركز الحمل بشكل رئيسي على التشكلات الثمرية، أوراقه كبيرة بيضوية الشكل، أزهاره بيضاء اللون، ثماره كروية إلى مخروطية الشكل كبيرة الحجم لونها أصفر مخضر، موشح بالأحمر، طعمه حلو، موعد إزهاره في الثلث الأخير من نيسان وموعد عقد الثمار بداية أيلول والنضج آخر شهر آب وبداية أيلول.

3.2.3. الأصلMM111 : وهو أصل متوسط القوة ومتوسط في موعد الإثمار وذو قدرة ممتازة على الإثمار. الثباتية في التربة جيدة وكذلك قدرته على التكاثر. تحمله لبرودة الشتاء متوسطة وللجفاف جيدة. وهذا الأصل جيد المقاومة لأمراض Phytophthora واللفحة النارية، في حين أن مقاومته للبياض الدقيقي وللجرب متوسطة.

4.2.3. الأصل M26: أصل مقزم يعطي أصغر الأشجار التي يمكن زراعتها بدون تدعيم. حجم الشجرة أصغر بـ 40% من الحجم القياسي. الأشجار المطعمة عليه مبكرة الدخول بطور الإثمار, يتحمل الترب الطينية الثقيلة. مقاوم لتعفن العنق الجذري collar rot تجذيره متوسط توافقه مع الأصناف جيد, مقاومته للبياض الدقيقي والجرب متوسطة.

3.3. خطوات العمل

شملت خطوات التعديل الوراثي ما يلي:

1-تأسيس زراعات التفاح مخبرياً في الأنابيب **وإكثارها** بطريقة زراعة الأنسجة النباتية

2- تحديد الشروط المثلى للتجديد من أقراص الأوراق.

3- التعديل الوراثي بالأغروباكتريوم الحاملة للمورثة المرغوبة بالزراعة المشتركة لأقراص الأوراق **وتجديد النموات بوجود عامل انتخابي** (التحمل لمبيد الأعشاب)

4- تقييم المتحورات واختبارها جزيئيا (عزل الـDNA واختبارها لوجود المورثة المرغوبة ومورثة الانتخاب) وذلك باستخدام تفاعل التسلسل البوليميرازي PCR بوجود البادئات المناسبة

5- تجذير النباتات المعدلة وراثياً وتقسيتها وتنميتها في ظروف البيت الزجاجي.

1.3.3. تأسيس زراعات الأنسجة النباتيةEstablishment of Aseptic Culture

أجريت التجارب على نموات خضرية من زراعات الأنسجة التي تم الحصول عليها من زراعات مخبرية للصنفين Golden Delicious و Royal Gala والأصلينMM111 وM26.

- تم أخذ القمة النامية والبراعم القمية والجانبية في بداية الربيع من طرود فتية بعمر سنة ومأخوذة من أشجار بالغة نامية في الحقل تحت الشروط الطبيعوأزيلت الحراشف والأوراق الخارجية ثم وضعت تحت الماء الجاري مدة (1) ساعة.
- تم تعقيمها سطحياً بالكحول 70% مدة (1) دقيقة واحدة ثم نقعت بمحلول الكلوراس التجاري الذي يحوي هيبوكلور الصوديوم بتركيز25% مدة 15 دقيقة مع إضافة نقطة توين 20 لكل100 مل محلول ثم غسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم للتخلص من بقايا المادة المعقمة.

●زرعت الخزعات النباتية على أوساط غذائية طازجة صلبة بنصف تركيز العناصر الكبرى لوسط MS والمضاف إليه مضادات الأكسدة0.15غ/ل حمض الليمون و0.1 غ/ل حمض الأسكوربيك مع1 غ /ل PVP و200 غ/ ل حمض الكافيين مع 2.5 مغ/ل فحم منشط وحفظت في الظلام مدة أسبوع في ظروف غرف النمو وكان يتم نقل هذه الخزعات إلى أوساط جديدة كل ثلاث أيام للتخلص من الإفرازات الفينولية التي ترافق زراعة التفاح وتعيق نموها واستمرت هذه المرحلة مدة 4 أسابيع وبعد توقف هذه الإفرازات نقلت الخزعات إلى أواني زجاجية (قطرميزات) سعة 250 ميلي ليتر تحوي 50 ميلي ليتر من وسط الزراعة الأساس لموراشيج وسكوج (Murashige and Skoog ; 1962) المغذي مضافاً إليه (BA) بنزيل أدنين بتراكيز 0.5 و1مليغرام /ليتر مع Indol-3- butyric acid(IBA) بتركيز 0.1 و0.3 مليغرام /ليتر معGibberelic acid GA3 بتركيز 0.2 غرام /ليتر +1000مليغرام/ليتر MES.

● تم **إكثار النموات الناتجة وإعادة الزراعة** كل ثلاثة أسابيع واستمرت هذه المرحلة من الإكثار حوالي6 أشهر حتى تم الحصول على عدد كاف من المادة النباتية المناسبة لتجارب التجديد باستخدام أجزاء الورقة وتجارب التعديل الوراثي.

● نقلت إلى **مرحلة الاستطالة**: في الزرع الثالث نقلت النموات إلى وسط مغذي MS المضاف له 0.2 مغ/ لNaphthalene acetic acid (NAA) و8.3 مغ/ل من Iso-(2ip) Pentenyladenine.

● ثم نقلت إلى **مرحلة التجذير** بنقل النموات الخضرية إلى وسط موراشيج وسكوغ بنصف تركيز العناصر الكبرى وإضافة 1مغ/ل IBA.

● ثم نقلت إلى **مرحلة التقسية** التدريجية في الحاضنات والبيت الزجاجي والتي ستذكر لاحقاً بشكل مفصل ضمن فقرة التجديد من الورقة والتعديل الوراثي وذلك منعاً للتكرار والجدول5. ويوضح الأوساط المغذية المستخدمة في الإكثار والاستطالة والتجذير.

جدول5. أوساط إكثار واستطالة وتجذير النموات

أوساط الزرع	تركيب الوسط
وسط الإكثار	MS+1 mg/l BAP +0.3 mg/l IBA+0.2 mg/l GA3
وسط الاستطالة	MS+8.3 mg/l 2ip +0.2 mg/l NAA
وسط التجذير	½MS+1 mg/L IBA

2.3.3. التجديد من أقراص الأوراق Regeneration from leaf tissues

1.2.3.3. تحديد الشروط المثلى للتجديد مخبرياً بدءاً من نسيج الورقة

تمت دراسة التجديد من نسيج الورقة كشرط أساسي للتعديل الوراثي، وذلك على نموات خضرية من زراعة الأنسجة تم الحصول عليها من زراعات مخبرية للصنفين والأصلين المدروسين و وتمت دراسة بعض العوامل المؤثرة في التجديد مثل

1 - تأثير جزء الورقة حيث تم تقسيم الورقة إلى ثلاثة أجزاء: قمي(1) و وسطي(2) وقاعدي(3) لدراسة أفضل جزء من الورقة يعطي أعلى نسبة تجدد وأعلى متوسط عدد النموات المتكونة.

2- تأثير تركيب أوساط التجديد من حيث:

– **تأثير مصدر العناصر الكبرى** حيث استخدم مصدرين العناصر الكبرى لوسط MS والعناصر الكبرى لوسط لوسطNitsch (N6).

- **تأثير الهرمونات النباتية** (تأثير نوع السيتوكينيات حيث استخدم نوعين من السيتوكيننيات الثيديازورون والبنزيل أدينين بيورين ، وتأثير نوع الأوكسينات حيث استخدم مدرين للأوكسينات هما نفتالين حمض الخل NAA و 2,4,D).

– **تاثير مصدر الطاقة:** سكروز أو سوربيتول.

وتم تقييم المعايير التالية:

– عدد الزراعات التي أعطت نموات عرضية (النسبة المئوية للتجدد%).

– عدد النموات الخضرية المنتجة من كل مستزرع (معدل التكاثر)

2.2.3.3 ..تحضير الخزعة النباتية

بعد ثلاثة– أربعة أسابيع من الزراعة على وسط الاستطالة (نهاية الزرع الثانوي الثالث) جمعت الأوراق الفتية الخضراء فاتحة اللون والتي لا تزال في حالة نشطة من النمو والانقسام الخلوي وليس عليها أي أعراض اصفرار وذات عروق واضحة وقوية من النموات المكاثرة مخبرياً لصنفي التفاح Golden Delicious و Royal Gala وللأصلين MM111 وM26، ثم أزيلت النهايات الطرفية والقاعدية لنصل الورقة، ثم تم تقسيم الورقة إلى ثلاثة أجزاء (قمي، وسطي وقاعدي) من أجل دراسة التجديد من نسيج الورقة وتأثير جزء الورقة على التجديد من الورقة، وكذلك من أجل دراسة التعديل الوراثي.

3.2.3.3. تجديد النموات الخضرية:

زرعت الأجزاء الورقية على الوسط الغذائي MS في أطباق بتري قطر9 سم بمعدل 5 زرعات في كل طبق مع تمام ملامسة السطح العلوي للورقة للوسط الغذائي، ثم حضنت بالظلام مدة 21 يوماً بظروف غرفة النمو بدرجة حرارة 23±1مْ، ثم عرضت للإضاءة المنخفضة dim light (3.5-6 µmol/m^2/sec) و16 وبمعدل ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام لمدة أسبوع، ثم نقلت إلى الإضاءة الكاملة تحت شروط غرفة النمو. نقلت الزراعات المتجددة إلى وسط الإكثار المؤلف من وسط MS كوسط أساسي و100 مغ/ل من الميواينوزيتول وفيتامينات B5 و1غ/ل من MES و3% سكروز و2.5 غ/ل جيلرايت، وقد تم استخدام ثمانية تراكيب من المتممات للوسط الأساس من أجل دراسة كفاءتها للتجديد وتشكل الأعضاء (جدول4). تم تعديل درجة حموضة(PH) الأوساط المستخدمة إلى5.7 باستخدام KOH أو HCL تركيز1 نظامي قبل التعقيم بالأوتوكلاف على درجة 121م° وضغط 1.4 كغ/سم² لمدة 20 دقيقة.

4.2.3.3.. تكاثر النموات الخضرية وإعادة الزرع

بعد التحضين على وسط تحريض النموات بنحو 4 أسابيع، تم استئصال النموات إفرادياً من الزرعات المختلفة وإعادة زرعها على وسط MS خالي من منظمات النمو، وبعد 4 أسابيع نقلت إلى أنابيب تحوي 10 مل من الوسط الغذائي MS مع التوافق الهرموني:

1 mg/l BAP + 0.3 mg/l IBA+ 0.2 mg/l GA3

ثم تمت إعادة الزرع (الزرعات الثانوية) بتقسيم النموات الخضرية المتفرعة إلى أجزاء صغيرة بطول 1-2 سم مع عدة براعم جانبية ونموات خضرية صغيرة كل 4 -6 أسابيع تحت شروط معقمة في حجرة دفق الهواء ونقلت إلى أوساط غذائية للتكاثر والتضاعف

5.2.3.3. أوساط تجديد النموات:

استخدم الوسط المغذي الذي يحوي أملاح العناصر الكبرى وأملاح العناصر الصغرى لـ MS والفيتامينات، أو أملاح العناصر الكبرى لوسط Nitsch وأملاح العناصر الصغرى لـ MS والفيتامينات B5 مع 30 غ/ل سكروز. أضيف للوسط البنزيل أمينو بيورين BAP بتركيز2.5−5 مغ/ل أوTDZ بتركيز2 مغ/ل بالتوافق مع الأوكسين نفتالين حمض الخل NAA بتركيز 0.2 مغ/ل أو 2.4-D بتركيز 0.2 مغ/ل. وحضنت هذه الزراعات في غرفة النمو تحت درجة حرارة 24ْم وذلك تحت ظروف الظلام الكامل لمدة 2-3 أسابيع، نقلت بعدها إلى شروط الإضاءة وبشكل تدريجي حتى تصل إلى ظروف الزرع العادية من الإضاءة 16 ساعة إضاءة/8 ساعات

ظلام حيث تم بعدها أخذ قراءات التجديد بعد حوالي 6-8 أسابيع من حيث نسبة التجديد وعدد النموات المتجددة بدءاً من الجزء النباتي المستخدم. ويبين الجدول1. تركيب الأوساط المستخدمة لدراسة التجديد من نسيج الورقة.

جدول 6. تركيب الأوساط المستخدمة لدراسة التجديد من نسيج الورقة

الوسط	تركيب وسط الزراعة
R0	MS+2.5 g/l Gelrite + 30 g/l Sucrose+1g/lMES
R01	MS+2 mg/l TDZ +0.2 mg/l NAA+2.5 g/l Gelrite + 30 g/l Sucrose+1g/lMES
R02	MS+ 5 mg/l BAP +0.2 mg/l NAA+2.5 g/l Gelrite + 30 g/l Sucrose+1g/lMES
R02*	MS+ 5 mg/l BAP +0.2 mg/l NAA+2.5 g/l Gelrite + 30 g/l Sorbitol+1g/lMES
R02**	MS+ 5 mg/l BAP +0.2 mg/l NAA+0.625 g/l Gelrite + 5.25 g/l Agar 30 g/l Sucrose+1g/lMES
R03	MS+ 0.5 mg/l TDZ +0.5 mg/l BAP +0.2 mg/l NAA+2.5 g/l Gelrite + 30 g/l Sucrose+1g/lMES
R04	N6 macro + MS micro +B5 vitamin +5 mg/l BAP +0.2 mg/l NAA +2.5g/l Gelrite +30 g/l Sucrose+1g/lMES
R05	MS+5 mg/l BAP + 0.2 mg/l 2,4-D +2.5 g/l Gelrite + 30 g/l Sucrose+1g/lMES

6.2.3.3. دراسة العوامل المؤثرة في تجديد النموات

تم تقييم المعايير التالية:

أولاً. مكونات وسط التجديد:

1-العناصر الكبرى لوسط التجديد: حيث استخدم في تجاربنا مصدران للعناصر الكبرى لوسط التجديد هما العناصر الكبرى لوسط MS، والعناصر الكبرى لوسط Nitsch من أجل تحديد أفضلها للتجديد من نسيج الورقة ومن ثم استخدامها في تجارب التعديل الوراثي للحصول على أعلى نسبة تجديد للنباتات المحورة.

2- منظمات النمو المستخدمة في وسط التجديد:

السيتوكينينات: تمت مقارنة البنزيل أمينوبيورينBAP بتركيز5 مغ/ل مع الثيديازورون TDZ بتركيز2 مغ/ل.

الأوكسينات: تمت مقارنة نوعين من الأوكسينات هما NAA و2,4-D.

3- عامل تهليم وسط التجديد وتركيزه: تمت مقارنة وسط التجديد الذي يحتوي على % 100 جيلرايت (بتركيز2.5غ/ل) مع وسط يحتوي على 25% جيلرايت (بتركيز0.625غ/ل) مع 75%آغار (5.25غ/ل).

4- مصدر الطاقة: حيث قورن بين مصدرين للطاقة هما السكروز أو السوربيتول بنسبة 3%.

ثانياً. دراسة جزء الورقة المستخدم: تم استخدام ثلاثة أجزاء للورقة (قمي، وسطي، قاعدي) وتم تقييم قدرتها على التجديد ودراسة أفضل جزء للورقة الذي يعطي أعلى نسبة تجديد وأعلى متوسط تجديد للنموات.

– حُضِّنت الزرعات في جميع التجارب ضمن غرفة النمو على درجة حرارة 24 ±1مْ مع فترة وحضنت مدة 3 أسابيع في الظلام ثم عرضت للإضاءة غير مباشرة مدة أسبوع ثم نقلت إلى ظروف الإضاءة المباشرة وبمعدل 16 ساعة إضاءة/8 ساعات ظلام.

ثالثاً. تأثير شدة الإضاءة في تشكل النموات العرضية:

تم تحضين المستزرعات في تجارب الدراسة لمدة 3 أسابيع الأولى في الظلام الكامل دون التعريض لأي أشعة أو إضاءة، ثم رفعت الإضاءة إلى شدة 10 µmol/m^2/sec لمدة أسبوع بعد ذلك تم وضعها في الإضاءة الكاملة في غرف النمو وبشدة إضاءة 50 µmol/m^2/sec حتى نهاية التجربة بعد 8 أسابيع من بداية الزراعة.

رابعاً. تأثيرات خدش الورقة في التجدد والقدرة على تشكل الأعضاء النباتية:

تم خدش الأوراق قبل أن تتم زراعتها على أوساط التجديد وذلك باستخدام الملقط الخاص من نوع (BD157-Aesculap) الذي لا يحدث ضرراً كبيراً والمقترح من قبل (Norelli *et al*, 1996) حيث وجد Hemerly *et al* (1993) أنه يزيد من نسبة تجدد النموات العرضية.

بعد الحصول على النموات المتجددة، نقلت هذه النموات إلى أنابيب اختبار تحوي 10 مل من وسط الإكثار ليتم إكثارها بطريقة زراعة الأنسجة وباستخدام وسط الإكثار السابق الذكر: MS مع التوافق الهرموني: 1 mg/l BAP + 0.3 mg/l IBA+ 0.2 mg/l GA3

7.2.3.3. التجذير:

استؤصلت القمم النامية المتجددة بطول (20-35 ميليمتر) والناتجة من مرحلة الإكثار وتم تجذيرها بسهولة على وسط MS ½ المزود بـ1 مغ/ل IBA وحضنت لمدة أسبوع في الظلام، ثم نقلت هذه النموات إلى أنابيب جديدة تحوي وسط MS ½ الخالي من منظمات النمو ووضعت في غرفة النمو لتشكل الجذور(Al- Tinawi *et al*,2010; Al-Rihani *et al*, 2008; Ali Bacha *et al*, 2009; 2012).

8.2.3.3. النقل إلى أصص الزراعة والتقسية: نقلت النبتات المجذرة في نهاية فترة التجذير إلى أصص تحوي خليطاً من البيتموس والبيرليت بنسبة 2:1 (حجم/حجم) مرطب بمحلول MS سائل مع مبيد فطري بينليت لمنع تعفن الجذور وحضنت في غرفة النمو بدرجة حرارة 24±1 م^{o} لمدة 3-4 أسابيع وغطيت النبتات بأكياس شفافة من مادة بولي إيتيلين ثم تم عمل ثقوبٍ صغيرةٍ ثم أكبر فأكبر حتى إزالة الأكياس نهائياً بعد أسبوعين، وقد استغرقت عملية التقسية فترة تراوحت بين 3–4 أسابيع. نقلت بعدها النباتات إلى البيت الزجاجي حيث أمضت نحو2 شهر قبل نقلها إلى الأرض الدائمة وسمدت أسبوعياً بمحلول 1/10 MS. غرست النباتات في الحقل تحت الشروط الطبيعية.

3.3.3. التعديل الوراثي Genetic Transformation

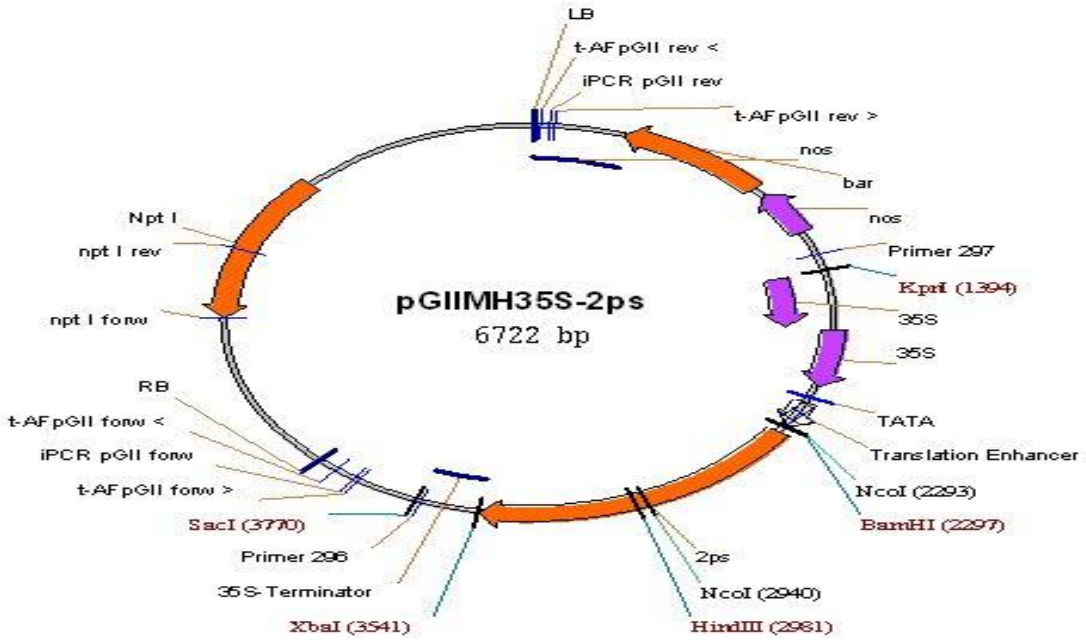
1.3.3.3. أمثلة شروط التعديل الوراثي للأصناف والأصول المدروسة:

تم إجراء عدة تجارب لأمثلة شروط التحوير لنقل المورثة المدروسة *g2PS1* بهدف تقييم إمكانيتها على زيادة المقاومة لمرض الجرب والبياض الدقيقي في التفاح.

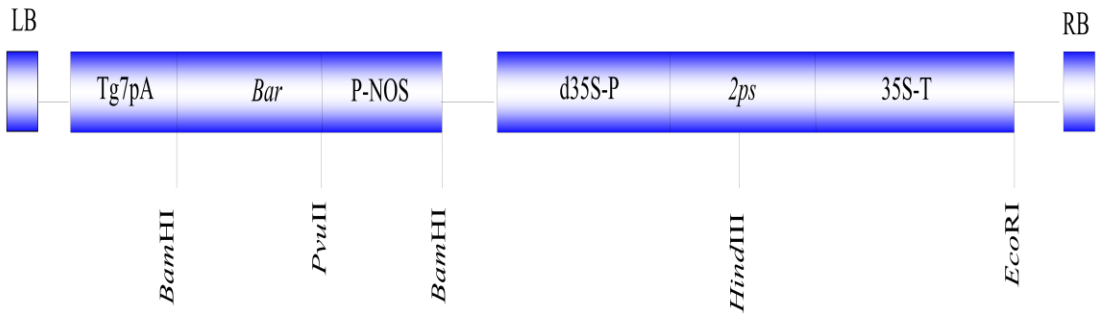
1.1.3.3.3. البلاسميد المستخدم للتعديل الوراثي:

تم إجراء التعديل الوراثي للصنفين والأصلين المدروسين وذلك بنقل المورثة*g2ps1* المحمولة على البلاسميد p Green II-35S-*g2PS1* (شكل2) والذي يحوي مورثة *bar* المعزولة من الـ Streptmyces والتي تعطي الأنزيم فوسفينو ثيريسين ppt الذي يبطل مفعول المبيد العشبي. تشفر المورثة *g2PS1* لأنزيم ذا خواص متنوعة في نبات الجربيرا التزييني، فهي تشفر لأنزيم البيرون، وهو يختلف عن أنزيمات الـ (Chalcon Synthase) المعروفة بدورها في تكوين الصبغات (Pigmentation) النباتية ويختلف تسلسل الحموض الأمينية عن أنزيمات الـ chalcon synthase النموذجية وأيضاً خواصها الإستقلابية الهدمية مختلفة والمعطيات تدل على أنها تمثل صنفاً جديداً من عائلة الـCHS الكبيرة والمورثات القريبة من هذه العائلة. فهي سابقاً اعتبرت بأنها عضو غير اعتيادي مختلف عن مورثات عائلة الـ CHS ولها تركيب مختلف ونمط تعبير وراثي أيضاً مختلف، فهي بالتأكيد ليس لها دور في تصنيع الأنثوسياتينات و تشفر لأنزيم ذي خواص هدمية (إستقلابية) فريدة. ولذلك أعيد تسميتها بدلاً من GCHS2 إلى *G2PS1* وذلك بناء على خواصها المتعلقة بتصنيع أنزيم البيرون فهي تستخدم الـ Acetyl-co-A و الـ Malonyl- co-A وتفاعلي تكثيف على عكس مورثات الـ CHS التي تشتمل على ثلاث تفاعلات تكثيف من أجل التصنيع الحيوي لنوعين من مشتقات البيرون هيدروكسي ميثيل

هما: الجيربيرين والباراسوبوزايد اللذين يساهمان في مقاومة الأمراض الفطرية و الحشرات أيضاً. الـ GCSH 2 هو بروتين ذو قرابة بالـ CHS وهو أنزيم يستخدم الـ Asetyl-co-A كركيزة بداية وينجز تفاعلي تكثيف باستخدام الـMalonyl- co-A ليشكل قالب البيرون الطبيعي, الأنزيم أيضاً يزيل الكربون (CO2) بسلسلة الـ Malonyl- co-A ليشكل الـ Acetyl-co-A، وبالتالي يستطيع أن يصنع ركيزته الخاصة. فهي تستخدم الـ Acetyl-co-A كركيزة بداية بدلاً من فينيل بروبانويد co-A- و تنجز تفاعلي تكثيف بدلاً من ثلاثة وتحرر6- ميثيل-4-هيدروكسي-2-بيرو- (ميثيل بيرون). الناتج من هذه التفاعلات هو الباراسوبوزايد وهو مركب فعال مضاد لتغذية يرقات الفراشات الصفراء وهو مادة طليعية لحمض الباراسوربيك المعروف بتثبيطه للفطور والبكتيريا وهو أيضاً يؤخر إنبات البذور ودرنات البطاطا. وقد أثبتت التجارب الأولية على قابلية الإصابة بالمسببات المرضية للسلالات المضادة للـ Anti-GCSH2 أن الجربيرين والباراسوبوزايد ومشتقاتهما ذات خواص وقائية ضد المسببات الفطرية وهجوم الحشرات أيضاً في الجربيرا. وعلاوة على ذلك، هذه المورثة تقبل الـ Benzoyl co-A لتصنيع الفينيل بيرون حيث بينت النواتج (المشتقات) بأن لها خواص مثبطة للبروتياز (HIV-1). ولهذا تم اختيار هذه المورثة لنقلها إلى التفاح لاختبار مدى فعاليتها في مقاومة الأمراض الفطرية في التفاح مثل البياض الدقيقي والجرب. والمورثة*g2ps1* تحت تحكم (سيطرة) البروموتر 35S المكرر بنسختين.



شكل 2. البلاسميد PGreen II 35S-G2PS1 الحامل للمورثة *g2PS1* المستخدم في التعديل الوراثي



شكل .3 شكل الناقل الثنائي binary vectors المستخدم في التعديل الوراثي للتفاح

(double 35S promoter:d35S-P، محفز ثنائي: مُبدأ)، 35S-T: 35S terminator،P: promoter منهي)، NOS: *Agrobacterium* nopaline synthase gene، Bar: herbicide resistance selectable marker from *Streptomyces hygroscpicus*، RB: right border، LB: left border)

2.1.3.3.3. التعديل الوراثي للتفاح بوساطة الأغروباكتريوم الحاملة للمورثة *g2ps1*:

تم إجراء التعديل الوراثي لصنفي وأصلي التفاح المدروسين وذلك باستخدام بكتريا التدرن التاجي EHA105 المعدلة وراثياً والتي تحوي بلازميدين EHA105-PGII35S–pSoup-*g2ps1* (الناقل الثنائي binary vector): البلازميد الأول اسمه p Soup فيه T- DNA الذي يحوي مورثة الانتخاب للبكتريا وهي مقاومة المضاد الحيوي الكنامايسين*nptII* والبلازميد الأخر P Green II 35S-*G2PS1* يحوي مورثة المقاومة للأمراض الفطرية *g2ps1* تحت تحكم البروموتر 35S (شكل2.)، كما يحتوي هذا البلاسميد على مورثة الـ *bar* المعزولة من الـ Streptmyces والتي تعطي الأنزيم فوسفينوثيريسين ppt الذي يبطل مفعول المبيد العشبي Basta كورثة انتخاب. وبذلك أصبح الاسم الكامل للبلازميد والذي يحوي مورثة المقاومة ومورثتي الانتخاب للبكتريا المحورة وللنباتات المعدلة وراثياً(EHA105- PGII35s– pSoup-*g2ps1*). وتم التعديل الوراثي بإتباع الخطوات التالية:

1.2.1.3.3.3. إكثار نباتات من صنفي وأصلي التفاح المدروسين بطريقة زراعة الأنسجة:

1- تم إكثار الزراعات المخبرية لنباتات التفاح من الصنفين والأصلين المدروسين على وسط MS المضاف له1 مغ/لBAP ثم أعيدت زراعتها على وسط الإكثار (جدول 2.) وذلك كل 4 أسابيع عدة مرات حتى تم الحصول على عدد كاف من المادة النباتية للقيام بتجربة التعديل الوراثي.

2- ثم نقلت القمة النامية القوية النمو من النموات الناتجة على وسط الإكثار وذلك قبل التحوير بمدة 3-4 أسابيع إلى وسط استطالة الأوراق المحتوي على 8.3mg/l + 0.2mg/l NAA MS+2ip . (جدول 5.)

3- نميت الزراعات تحت شروط إضاءة لمدة 3-4 أسابيع قبل جمع الأوراق، وحفظت الزراعات في الشروط نفسها بعد جمع الأوراق بحيث يمكن إعادة جمع أوراق جديدة منها بعد أسبوع. وتم الانتباه إلى أن يوضع فقط نمو واحد في وعاء الزراعة الذي يحتوي 30 مل فقط من وسط الإكثار وزرعت في وضع أفقي وحفظت تحت شروط غرفة النمو(16ساعة/8 ساعات إضاءة/ظلام وشدة إضاءة تصل إلى 50- 60 ميكرومول/ فوتون/م^2 / ثانية بدرجة حرارة 24± 1°م. يبين (الجدول 5.) تركيب الأوساط المستخدمة في إكثار واستطالة النموات المستخدمة في التعديل الوراثي والتجديد من الورقة وكذلك تركيب الوسط المستخدم في تجذير هذه النباتات المعدلة والمتجددة .

2.2.1.3.3.3. تحضير لقاح الآغروبكتريا:

1- تم تحضير وسط تنمية البكتريا: الذي يتكون حسب (Sambrook and Russell, 2001) من

- 10 g/l Poly trypton
- 05 g/l Yeasty extract
- 10 g/l Na Cl
- 15 g/l Agar

وتم تعقيمه بواسطة الأوتوغلاف. ثم أضيف له المضاد الحيوي (50 مغ/ل كانامايسين) لانتخاب البكتريا الحاملة للمورثة المدروسة.حيث أن مورثة الانتخاب للبكتريا الحاملة للمورثة هي مورثة مقاومة المضاد الحيوي (الكانامايسين) وهذه المورثة محمولة على البلازميد psoup

2- تمت زراعة سلالة الأغروباكتريوم EHA105 pSoup المحتوية على الناقل الثنائي P Green II(يحوي بلازميدين الأول pSoup على أطباق بتري تحوي وسط تنمية البكتريا (LB) Luria-Bertani

حيث نشرت البكتريا على الطبق بحيث تغطي كامل الطبق وحفظت الأطباق لمدة 2-4 أيام بدرجة حرارة 28 °م.

3 - أضيف 2 مل/ ل من وسط التحريض الذي يتكون من:

100 µM +1mM Betaine phosphate +(SIM) induction medium acetosyringone.

إلى الطبق الذي يحوي البكتريا النامية على الوسط الصلب ليتم جمع هذه البكتريا النامية ونقلها إلى دورق معقم ثم غُسل الطبق البكتيري بـ 1مل إضافي من وسط SIM. حيث تم قياس الامتصاص على طول موجة 600 nm (نانومتر) للزراعة البكتيرية المخففة 10مرات بحيث يكون نحو0.7 ثم تحضين المحلول البكتيري على درجة 28°م لمدة 4 ساعات على الأقل قبل البدء بعملية التعديل الوراثي على رجاجة بسرعة 100 دورة/الدقيقة بدرجة حرارة 28°م لتحريض تعبير مورثات الشراسة في الأغروباكتريوم (James *et al*. 1993a) بعد أن خفف تركيز الزراعات البكتيرية لتصبح امتصاصية المحلول (0.1-0.5) OD على طول موجة (600) نانو متر.

4- نميت البكتريا طوال الليل على جهاز رجاج بسرعة 2500 دورة في الدقيقة وبدرجة حرارة 28 °م ، ثم تم قياس تركيزها ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 4500 دورة بالدقيقة لمدة 10دقائق ودرجة حرارة 4 °م، ثم تم التخلص من الرائق وأعيدت إذابة الرسابة Pellet التي تحوي البكتريا في 20 مل وسط تحريض شراسة البكتريا MSO المؤلف من العناصر العضوية لـ MS مع 10 ميكرومول من TDZ و100 ميكرومول أسيتوسيرنغون acetosyringone .

3.2.1.3.3.3. جمع المستزرعات الورقية وتلقيحها بالبكتريا:

1- جمعت الأوراق المستخدمة من النموات النشطة ذات اللون الأخضر الفاتح الصغيرة والتي لا يظهر عليها أي علامات اصفرار وذات العروق الواضحة على الطرف الخلفي والتي لا تزال في مرحلة النمو بشكل نشط وذلك من زراعات مخبرية بعمر 3-4 أسابيع نامية على وسط MS استطالة الأوراق الحاوي على 8.3 مغ /ل 2ip و0.2 مغ/ل NAA. وقد تم جمع 1-3 أوراق من كل نمو خضري، ووضعت الأوراق في طبق بتري مرطب بماء مقطر معقم للحيلولة دون جفاف الأوراق .

2- تم غمر الملقط غير المحدث للجروح (non –traumetric) (Aesculap # BD-157R, Tuttingen, Germany) المقترح من قبل Norelli *et al* (1996) وهو نوع من الأدوات الجراحية بمحلول البكتريا ثم خدشت الأوراق بشكل خفيف به، وقسمت إلى شرائح.

حيث تم تلقيح 1000 جزءاً نباتياً من كل صنف وأصل بمحلول البكتريا لمدة 30 د. وعلى درجة حرارة الغرفة، بحيث تمت زراعة 5 أجزاء ورقية في كل طبق ليتم حساب النسبة المئوية لنجاح التعديل الوراثي كنسبة مئوية للمستزرعات التي تنتج نموات خضرية معدلة وراثياً ،أي نسبة المئوية ظهور للنموات التي تظهر على وسط التجديد وتستمر بالنمو على وسط الإكثار وبوجود العامل الانتخابي أيضاً.

3- تم سحب المعلق البكتيري بماصة معقمة، ثم جففت الأوراق على ورق فلتر معقم للتخلص من بقايا البكتريا.

4.2.1.3.3.3.الزراعة المشتركة:

1- بعد عدوى الأجزاء الورقية نقلت هذه الأوراق إلى وسط الزراعة المشتركة مع سلالة الأغروباكتريوم EHA105 المذكورة وذلك بعد التحريض بواسطة Acetosyringone و Betaine phosphate لمدة ثلاثة أيام، وبحيث يكون السطح العلوي للورقة على تماس مع الوسط الذي احتوى MS مع 2 مغ/ل من TDZ و 0.2 مغ/ل من NAA مع 100 ميكرومول أسيتوسيرينغون (Acetosyrengon) و1مل مول من Betaine phosphate ومهلم بالجيلرايت 2.5 غ/ل (Sigma chemical co. st. Lois) في أطباق بتري. والأسيتوسيرنغون مركب فينولي ينتج أثناء جرح أو خدش الخلايا النباتية ثبت أنه يزيد من فعالية التحوير الوراثي بالأغروباكتريوم حيث بينت الدراسات السابقة انه يحرض نسخ مورثات العدوى (الشراسة) في بكتريا التدرن التاجي وله دور كإشارة جاذبة ومحورة في بكتريا التدرن التاجي. تتحرض مورثة الشراسة على الـ Ti Plasmid في بكتريا التدرن التاجي وبكتريا الشعيرات الجذرية من خلال التشفير لمستقبل من الأسيتوسيرنغون ومركبات فينولية أخرى تفرزها الجروح النباتية بينما يلعب البيتايين فوسفات دور واقي أسموزي (James *et al* ,1993a; Muthu *et al*, 2013)

2- حضنت الأطباق في الظلام على درجة حرارة 24 °م لمدة 3 أيام وذلك باستخدام وسط الزراعة المشتركة الذي يتكون من:

MS+2 mg/l TDZ+0.2 mg/l NAA+2.5 g/l Gelriet + 30 g/L Sucrose

5.2.1.3.3.3. نقل الأجزاء الورقية إلى أوساط التجديد و الانتخاب:

1- بعد 3 أيام من الزراعة المشتركة تم غسل الأجزاء النباتية بمضاد حيوي لقتل البكتريا ثم نقلت الأجزاء الورقية بما فيها الأجزاء الورقية الشاهد إلى أوساط تجديد مختلفة تحتوي منظمات نمو وهي الأوساط نفسها المستخدمة في التجديد من الورقة مع إضافة 3 مغ/ل PPT (كعامل انتخاب) و150 مغ/ل Ticarcillin و50 مغ/ل Combactam أو Cefotaxime بتركيز 250 مغ/ل كمضادات حيوية للتخلص من البكتريا(جدول 6.)

2- حضنت في الظلام لمدة ثلاثة أسابيع في غرفة النمو بدرجة 25 °م±1.

3- ثم عرضت الزراعات إلى إضاءة غير مباشرة لمدة أسبوع بعدها نقلت إلى ظروف غرفة النمو ونظام إضاءة 16ساعة إضاءة/8 ساعة ظلام وشدة إضاءة 50 µmol $m^{-2}s^{-1}$photon flux.

4 – عندما ظهرت النموات الخضرية استؤصلت ونقلت إلى **وسط استطالة النموات** ووضعت في غرفة النمو تحت شروط الإضاءة.

جدول7. تركيب الأوساط المستخدمة لدراسة التجديد من نسيج الورقة مع التعديل الوراثي (بوجود عامل الانتخاب)

الوسط	التركيب
R0	MS+2.5 g/l Gelrite + 30 g/l Sucrose+1g/lMES
R1	MS+2 mg/l TDZ +0.2 mg/l NAA+2.5 g/l Gelrite + 30 g/l Sucrose+1g/lMES
R2	MS+ 5 mg/l BAP +0.2 mg/l NAA+2.5 g/l Gelrite + 30 g/l Sucrose+1g/lMES
R3	MS+ 0.5 mg/l TDZ +0.5 mg/l BAP +0.2 mg/l NAA+2.5 g/l Gelrite + 30 g/l Sucrose+1g/lMES
R4	N6 macro + MS micro +B5 vitamin +5 mg/l BAP +0.2 mg/l NAA +2.5g/l Gelrite +30 g/l Sucrose+1g/lMES

تم **إكثار النموات الخضرية** المتجددة المعدلة على أوساط جديدة تحوي التركيب نفسه المستخدم لإكثار النباتات المتجددة من الورقة لكن مع إضافة عامل الانتخاب لتوفير مادة لإجراء اختبارات الكشف عن نجاح التعديل الوراثي وانتقال المورثة المرغوبة إليها. حيث تم استخدام وسط موراشيج وسكوغ مع الإضافات التالية:(B5 Vitamins و 5.0 مغ/لBAP أو 2.0 مغ/ل TDZ و0.2 مغ/ل NAA و3.0 مغ/لPPT).

4.3.3. تقييم التعديل الوراثي للأصناف والأصول المدروسة

تم التأكد من التعديل الوراثي بإتباع الطرائق التالية:

1.4.3.3. الزرع على وسط يحوي عامل انتخابي:

تم زرع النباتات المتجددة على أوساط تحوي عامل الانتخاب PPT بتركيز3 مغ/ل حيث تعيش فقط النباتات المعدلة والتي تحوي مورثة المقاومة لعامل الانتخاب، بينما تموت الأجزاء النباتية غير المعدلة لأنها لا تحوي مورثة المقاومة لعامل الانتخاب. بعد نقل المتجددات إلى أوساط الإكثار العامة والمحتوية على Cefotaxime وPPT بنحو 2-5 أسابيع، تم تقييمها من حيث بقائها حية ونموها. في الحالات التي كانت فيها استطالة النموات أكبر من 5 مم، جمعت هذه النموات ونقلت إلى حجرة رطبة معقمة. وعندما كان هناك أكثر من نمو خضري جمعت القمة النامية من النمو القوي ونظراً لأنه غير واضح إذا كانت الميرستيمات التي أنتجت عدة نموات قد نشأت من حدوث تحوير واحد أو أكثر، فإنه جمع نمو واحد فقط من كل ميرستيم متجدد أو مجموعة من الميرستيمات لتجنب وجود سلالات معدلة وراثياً متعددة منتجة من حدوث تحوير

واحد، إذا بقيت الميرستيمات خضراء بعد خمسة أسابيع، لكن إذا لم يحدث استطالة ونمو بها فإنها عندئذ نقلت إلى وسط نمو طازج يحتوي على PPT بتركيز3 مغ/ل مع cefotaxime بتركيز 250 µg وإذا ماتت الميرستيمات تم تعقيمها ثم إتلافها وهنا تم حساب النسبة المئوية لنجاح التعديل الوراثي بعدد النموات الناتجة على وسط الإكثار بوجود عامل الانتخاب.

2.4.3.3. التقييم بالطرائق الجزيئية:

من أجل إثبات التعديل الوراثي جزيئياً والتأكد من انتقال المورثة المرغوبة إلى التفاح، تم إجراء تفاعل الـ PCR باستخدام مرئسات متخصصة للكشف عن المورثة *bar* والمورثة *g2ps1* أيضاً. ولذلك تم أولاً عزل الـ DNA من الأنسجة الورقية للكلونات التي عاشت على وسط الانتخاب بإتباع طريقة محلول الاستخلاص CTAB-buffer (Chaudhry *et al*,1999). بعد إجراء تعديل طفيف شمل تخفيض تركيز المحلول الملحي من 2M إلىM 1.2بسبب الـ (degradation تكسير جزيئات الـDNA) الذي ظهر في عينات الـ DNA بإتباع البروتوكول دون تعديل والذي يعود إلى وجود البولي سكرايد، أو إلى وجود شوائب معينة مع الـ DNA والتي تؤدي إلى زيادة في حجم الـDNA وبقائها في البئر. وفيما يلي الخطوات المتبعة لعزل الـ : DNA

1- يتم وزن 50-75غرام من أوراق التفاح المعدل وراثياً و المكاثر بطرائق زراعة الأنسجة .

2- تنقل الأوراق الموزونة من كل عينة نباتية إلى الآزوت السائل ليتم طحنها بوساطة جهاز الطحن الكهربائي للحصول على مسحوق ناعم من المادة النباتية .

3- يؤخذ (0.1 غرام) من العينة المطحونة، وتوضع العينات في أنابيب Ependorf سعة 2 1مل وترقم الأنابيب حسب أرقام العينات النباتية.

4- يضاف لكل أنبوب 750 ميكروليتر من محلول الاستخلاص المسخن مسبقاً على درجة حرارة60 أو 65 درجة مئوية لكل عينة والمكون من:

Nacl (2M), 0.1 m EDTA (pH 8), (20 mM) Tris (100mM) (pH 8) , PVP1 % (W/V) , 0.2 % 2-Mercaptoethanol

وتوضع الأنابيب على هزاز دوراني ولمدة 10 دقائق حتى يتم التجانس.

5- توضع العينات في الحمام المائي 65 °م لمدة 30-60 دقيقة ويتم خلالها تحريك العينات بين فترة و أخرى وبشكل هادئ

6- يتم إضافة µl 750من , Chloroform/ Iso amyl alcohol بنسبة 24/1 ويتم المزج بشكل جيد مدة 10 دقائق

7- توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة (13000دورة/ دقيقة) وبدرجة حرارة 4ْم حتى يتشكل ثلاثة أطوار

8- ينقل الطور المائي العلوي إلى أنبوب جديد (500 µl) ويتم التخلص من الباقي .

9- تتم إضافة الإيزوبروبانول المبرد (20-)°م للرشاحة بمقدار3/4 حجمها تقريباً وتمزج جيداً وتترك لمدة 30 دقيقة في درجة (20-)°م

10- تتم عملية التثفيل (الطرد المركزي) لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4°م وبمعدل 6000 دورة في الدقيقة .

11- تم أخذ الراسب (DNA) ثم غسله بمحلول الغسيل (800) µl والذي يتكون من (23.5 ml d H2O+76 ml absolute Ethanol+ 134 µl NH4AC) أوكحول مبرد (70% cooled Ethanol)

12- توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي مدة 10دقائق على درجة حرارة 4°م و بمعدل 6000 دورة في الدقيقة.

13- يتم إزالة محلول الغسيل بكل حذر ويجفف الـDNA في درجة حرارة الغرفة.

14 - يتم حل الراسب (DNA) بـ100µL(TE buffer)

15- يضاف 5µL من أنزيم (10mg/ml) RNAs وتترك مدة 30 دقيقة في حرارة 37°م للتخلص من الـ RNA

16- يحفظ الـ DNA في البراد على حرارة 4 °م أو على -20°م

1.2.4.3.3 اختبار نوعية الـ DNA المستخلص وتقدير تركيزه:

تم فحص نوعية الـ DNA بواسطة الرحلان الكهربائي باستخدام هلام أغاروز (gel agarose) بحجم 0.8 % **تحتوي على** صبغة Safe Red (100 مايكروليتر/ل) والتي ثبت أنها غير مسرطنة مقارنة مع الإثيديوم بروماید لصبغ الـDNA كما تم التقدير النوعي على هلامة Agaros، إذ يظهر DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band، بينما يكون DNA سيء النوعية مبعثراً وغير واضح الحدود Smear.ومن ثم إظهار حزم الـ DNA باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (UV) ويستخدم مؤشر قياسي للإشارة لمواقع وحجم الحزم، تم انتقاء الأفضل من العينات وأعيد عزل DNA من العينات ذات النوعية غير الجيدة، وتم قياس تركيز الحمض النووي DNA في العينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي (spectrophotometer)، حيث يعتمد ذلك على مبدأ اختراق الأشعة لجزيئات الـ DNA، فكلما كان تركيز الـDNA عالياً يكون اختراق الأشعة قليلاً وبالتالي تقل نوعيتها، وكلما قلت القراءة على طول موجة 280 تعطي مؤشراً على وجود مواد أخرى غير الـ DNA وبالتالي قلة نقاوتها

وبالعكس كلما قلت القراءة على طول موجة 280 زادت نقاوتها. يعتمد الجهاز في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق تقديره لامتصاص DNA للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و 280 نانومتر. حيث ذكر Maniatis *et al* عام 1982 أن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر(OD 260/OD 280) تساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي إذ يجب أن تتراوح هذه النسبة بين1.8-2 .

كما أوضح الباحث نفسه أن قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتر تسمح بحساب تركيز DNA في العينة المقاسة، إذ أن كل وحدة من الكثافة الضوئية (Optical density OD) تقابل حوالي50 ميكروغرام/ مل من DNA (ذات السلاسل المضاعفة).

وبذلك حُسب تركيز DNA من المعادلة التالية (Maniatis *et al*, 1982):

DNA concentration (g/L) = [OD_{260} X معامل التمديد X 50 (g/ml)]/1000
تركيز الحمض النووي

إذ تمثل OD 260 الكثافة الضوئية لامتصاص الحمض النووي (ميكروغرام) عند الموجة 260 نانومتر.

2.2.4.3.3. تمديد عينات الـDNA: تم تمديد عينات الـ DNA بالماء المقطر المعقم، للوصول لتركيز (20ng/µl)، وهو التركيز المطلوب لتفاعل الـ PCR.

الحجم قبل التمديد× التركيز قبل التمديد= الحجم بعد التمديد× التركيز بعد التمديد

Y × تركيز الـ DNA ng/µl = 20ng/µl×200

DNA ng/µl تركيز الـ /20ng/µl× 200 µl = Y µl

كمية الماء =Y -200.

3.2.4.3.3. تضاعف الحمض النووي DNA: استخدم جهاز التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR طراز Mastercycler-Eppendorf بحجم تفاعل 20 ميكرولتر و 35 دورة، حيث تتكون كل دورة من ثلاث مراحل تؤدي في النهاية إلى تصنيع سلاسل جديدة من الـ DNA. وذلك للكشف عن وجود مورثة الانتخاب *bar* والمورثة المرغوبة *g2PS1* باستخدام 4 مرئسات (بادئات) تخصصية مصنعة لدى شركة MWG Eurofins-GENOMICS, GERMANY حسب الجدول 10. الذي يبين التسلسل النكليوتيدي للمرئسات المستخدمة في الدراسة الحالية.

جدول 8. مكونات تفاعل الـ PCR

المادة	الحجم اللازم لعينة واحدة (ميكرو ليتر)
H2O	5.3
5X PCR buffer	4
25 mM MgCl2	1.5
2 mM dNTPs	2
10 p.m/µl primer (f)	1
10 p.m/µl primer(r)	1
5 U/µl Taq Polymerase	0.2
20 ng/µl DNA	5
Total	20 µl

جدول 9. برنامج عمل الـ PCR للكشف عن المورثات *g2ps1* و *bar*

المراحل	الحرارة/ م		الزمن		عدد الدورات	
	bar	*g2ps1*	*Bar*	*g2ps1*	*bar*	*g2ps1*
Melting /Initial denaturation مرحلة الفصل الأولي	94	94	3 دقيقة	3 دقيقة	1	1
Denaturation فصل السلسلة المزدوجة	95	95	1 دقيقة	1 دقيقة	30	30
Anneling التحام المرئسات	60	65	1 دقيقة	1 دقيقة		
Extension الاستطالة	72	72	1 دقيقة	1 دقيقة		
Final Extension استطالة أخيرة	72	72	5 دقيقة	10دقيقة	1	1
Holdتخزين	4	4	لا نهاية	لا نهاية	حفظ	حفظ

جدول10. التسلسل النكليوتيدي للمرئسات (Primers) المستخدمة في الدراسة للكشف عن التعديل الوراثي للصنفين والأصلين المدروسين من شركة MWG Eurofins Genomics, Germany

اسم المرئس	التسلسل النيكلوتيدي	الحجم المتوقع
g2ps1 (f.)	5'-CCG ACG GTA CCC CCC CTG CAG GTC GAC GG-3'	1244bp
g2ps1 (r)	5'- GTC GGT CTA GAT CAG TTT CCA TTG GCA ACC GC-3'	
bar (f)	5'-GATTTCGGTGACGGGCAGGA -3'	477 bp
bar (r)	5'-TGCGGCTCGGTACGGAAGTT -3'	

4.2.4.3.3. تحديد تتابعات نيكليوتيدات المورثة*g2ps1* ومطابقتها مع التتابع النيوكليوتيدي للمورثة المنقولة في النباتات المعدلة وراثياً:

تم تحديد التسلسل الوراثي للـ DNA الذي تم عزله من النباتات المعدلة وراثياً باستخدام جهاز تحديد التتابع النيكليوتيدي DNA Sequencer الذي يسمح بالتعرف على التتابع النيكليوتيدي لجزيئة الـDNA في شركة EUROFINS, MWG OPERON (www.eurofinsdna.com)، في ألمانيا (Ebersberg, Germany). حيث أُجري اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز للعينات المدروسة باستخدام البادئات الموافقة ، ثم تمت عملية تنقية نواتج تفاعل الـ PCR وأرسلت للشركة بمعدل 10 ميكروليتر لكل عينة، لتحديد تسلسل نيوكليدتيداتها. تم تجميع قراءات (Sequencer) جهاز محدد التتابع النكليوتيدي ومعالجتها ببرامج حاسوبية خاصة تسمح بالحصول على التتالي المطلوب على شكل نصي يمكن تحليله بوساطة برامج معالجة البيانات الحيوية (Bioinformatics analysis) . استخدم برنامج Chromas (Version 2.33) وتمت المقارنة فيما بينها وتحديد نسب التشابه والاختلافات في تتابع نكليوتيداتها بعد رصف التتابعات باستخدام (Sequence alignment).وتمت مقارنة هذه التسلسلات مع تسلسل مورثة *g2ps1* في مدخلات موقع الـ NCBI المركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية في الولايات المتحدة الأمريكية (accession no. Z38097.2). على الموقع www.ncbi.nim.niln.gov

5.3.3. إكثار النباتات المعدلة وراثياً:

تم إكثار النموات المتجددة المعدلة وراثياً على أوساط تحوي عامل الانتخاب:

MS+ 1 mg/l BAP+ 0.3 mg/l IBA **+** 0.2 mg/l GA3+ 3 mg/l PPT

6.3.3. تجذير وتقسية النباتات المعدلة وراثياً

تم التجذير على الوسط نفسه المستخدم في تجذير النباتات المتجددة من الورقة ولكن مع إضافة العامل الانتخابي للنباتات المعدلة وراثياً.

تمت التقسية للنباتات المعدلة وراثياً بالطريقة نفسها المتبعة لتقسية النباتات المتجددة من نسيج الورقة.

وتم حفظ هذه النباتات في البيت الزجاجي لإجراء الاختبارات الجزيئية عليها ومتابعة الاختبارات الأخرى.

7.3.3. شروط الزرع (التحضين): حُضِّنت الزرعات في جميع التجارب ضمن غرفة النمو على درجة حرارة 24 ± 1مْ مع فترة ضوئية 8/16 ساعة إضاءة/ظلام.

8.3.3. التحليل الإحصائي:

حللت المعطيات والقراءات لجميع التجارب باستخدام البرنامج الإحصائي Gen Stat. وباستخدام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة وقورن بين المتوسطات بعد حساب المتوسط ± الخطأ المعياري، وقيمة أقل فرق معنوي على مستوى 5% وبشكل عام أُخِذ 40 مكرراً لكل معاملة إكثار وكررت التجارب ثلاث مرات وفي الشروط نفسها. كررت تجارب التجديد والتحوير على الأقل ثلاث مرات. تم تسجيل قراءات تجدد النموات العرضية بعد 8 أسابيع من الزرع وتم تقييم المعايير التالية :

- عدد الزراعات التي أعطت نموات عرضية (النسبة المئوية للتجدد%).
- عدد النموات الخضرية المنتجة من كل مستزرع (معدل التكاثر).

المختصرات العلمية الواردة في الأطروحة

1- الأوساط الغذائية		
Murashige and skoog (1962)	MS	وسط موراشيج وسكوغ
Schenk and Hilderandet(1972)	SH	وسط شينيك – هيلدربراندت
Woody plant medium	WPM	وسط زراعة النباتات الخشبية
Nitsch medium(1969)	N6	وسط نيتش
Luria-Bertani (Sambrook,.and Russell, 2001)	LB	وسط تنمية البكتريا
½Murashige and skoog +acetosyrngon	MSO	وسط تحريض شراسة البكتريا
Murashige and skoog+1.5%sucrose+1.5% gluose+ acetosyrngon	MS-I	وسط تحريض شراسة البكتريا
induction medium = MS+5.88g/L Citric acid+20g/L sucrose+1m M Betaine phosphate + 100 µM acetosyringone	SIM	وسط تحريض شراسة البكتريا
2- السيتوكينينات		
Benzyl Amino Burin	BAP	بينزيل أمينو بيورين
Benzyl Adeneen	BA	بينزيل أدنين
Thediazoron (*N*-phenyl-*N*-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea)	TDZ	ثيديازورون
Iso- Pentenyladenine	2ip	إيزوبينتيل أدينين
Kinetine	Kin	الكينيتين
3- الأوكسينات		
Indol-3- butyric acid	IBA	اندول حمض االزبدة
Naphthalene acetic acid	NAA	نفتالين حمض الخل
2,4- Dichlorophenoxy acetic acid	2,4-D	
4- الجبريلينات		
Gibberelic acid	GA3	
5- رموز أخرى		
2-N-Morpholino Ethane sulfonic acid	MES	
Glufosinate-amonnium Pestanal ® (Riedel-de Haen	PPT	غلوفوسفيات أمونيوم

bar gene	*bar*	مورثة الانتخاب مورثة لمقاومة مبيد الأعشاب فوسفينوثريسين PPT
New mysin Phosphotransferase	المورثة *nptII*	مورثة انتخاب لمقاومة المضاد الحيوي الكنامايسين " نيومايسين فوسفوترانسفيراز "
fungal resistance gene from gerbera	G2ps1	مورثة مقاومة الأمراض الفطرية المعزولة من نبات الجربيرا التزييني
Fire blight resistance gene	*Attacin E Attacin E, Cecropin, SB 37, Shiva-1, Lysozyme T4,*	مورثات لمقاومة اللفحة النارية
eps-depolymerase gene	*eps-depolymerase*	المورثة الفيروسية ايبس دي بلويميراز *eps-depolymerase* لمقاومة اللفحة النارية
Apple scab Resistance gene	Vr2	مورثة مقاومة جرب التفاح
Apple scab Resistance gene	*Chitinase*	مورثة الكيتناز *Chitinase* من أجل المقاومة لمرض الجرب في التفاح
stilbene synthase gene from grape for fungal resistance	*stilbene synthase*	مورثة من العنب من أجل مقاومة الأمراض الفطرية
PGIP gene for fungal resistance,	*PGIP*	مورثة من الكيوي من أجل مقاومة الأمراض الفطرية

Apple Scab resistance gene from wheat	(*pinB*)	مورثة من القمح لمقاومة جرب التفاح
Antothianin accrual gene	MdMYB10 (MYB Atranscription factor**)**	مورثة تحريض تراكم الآنثوسيانين، لون ثمرة التفاح أحمر
Agrobacterium tumefaciens strain	EHA105, LBA4404، AGLO، C58C1، CBE21، *A. rhizogenesis* GV3101, A4, LBA4404, C58C1	wheat سلالات أغروباكتريوم
Transfer Plasmid=T Plasmid	pCGP257, pBI121, pLDB15, pKIWI1105, pKIWI110,	بلازميدات ناقلة
2-(N-Morpholino) Ethanesulfonic acid (Applichem GmbH, Germany)	MES	2 ن (مورفولينو) حمض سلفات الاتانول
- Gellan Gum, Sigma	**Gelrite**	جلرايت

2. الدراســـــة المرجعيـــــة . Literature Review

1.2. تجديد التفاح باستخدام الأوراق كأجزاء نباتية:

نشرت دراسات عن التجديد لعدد من أنسجة التفاح شملت الساق والفلقات والهيبوكتيل والمئبر والبروتوبلاست(Korban and Chen, 1992; Patat-Ochatt, 1994; Gercheva *et al*, 2009). لكن من جهة ثانية، تعتبر خزعات الأوراق من النموات الخضرية المأخوذة من زراعات الأنسجة بأنها الأكثر فعالية وأكثر مصدر أنسجة موثوق من أجل التجديد(Korban and Chen, 1992; Wilson and James, 2003)

ويتم عادة اختيار الأوراق الفتية الثلاث الأولى (العليا) من النموات الخضرية القمية الفتية الخضراء فاتحة اللون والتي لا تزال في حالة نشطة من النمو والانقسام الخلوي وليس عليها أي أعراض اصفرار وذات عروق واضحة وقوية بعمر 3-4 أسابيع، ثم يتم إزالة الجزء الطرفي والقاعدي للصفيحة الورقية تم تقسيم الورقة إلى ثلاثة أجزاء (جزء قمي، وسطي وقاعدي)، من أجل التجديد من نسيج الورقة، ثم تزرع الأجزاء الورقية على الوسط الغذائي في أطباق بتري مع تمام ملامسة السطح العلوي الورقة للوسط الغذائي، وتحضن بالظلام لمدة 21 يوماً بظروف غرفة النمو وبعد 4 أسابيع تستبعد المستزرعات الميتة وتنقل المستزرعات المتجددة إلى وسط الإكثار الخالي من منظمات النمو من أجل الاستطالة، وبعد أربعة أسابيع تنقل إلى وسط الإكثار(Ali Bacha *et al*; 2009).

توجد دراسات كثيرة حول إكثار التفاح باستخدام طرائق التجديد من نسيج الورقة منها دراسات Quoirin (1974) و Walkey (1972) حول تجديد نمو نبتات تفاح من قمم ميرستيمية مأخوذة من بادرات بذرية ومن الأصل 'M26'، ولكن دون أي تكاثر للنموات قبل التجذير (Sriskandarajah *et al;*1990) والذي استخدم أوراق من زراعات في طور الإكثار لثلاثة أصناف تفاح وقصت كل ورقة إلى جزئين زرعت في أطباق تحوي ثلاث بيئات إكثار، ولاحظ أن أفضل تشكل للنموات العرضية على بيئة MS المضاف إليها Thidiazuron بتركيز 3 µM و NAA بتركيز 5.4 µM. وتبين أن التجديد من أوراق كبيرة (بعرض 15مم) أفضل بشكل واضح من الأوراق الأصغر. كما أن سطح القص لأجزاء الورقة أعطى أعلى عدد من مواقع التجديد. وكان معدل الإكثار وطول النموات أعلى معنوياً على بيئة الإكثار التي احتوت 4.44 µM من BA و13.59 µM من Kin، كما تحسن حجم الورقة بشكل معنوي عند زراعة النموات على وسط إكثار يحوي إما 2-Isopentylodenine أو Kinetin فقط.

ودرس Karhu, (1997) تأثير ثلاثة مصادر للكربوهيدرات هي السكروز والسوربيتول والغلوكوز فكان إنتاج الكتلة الحيوية للصنف 'McIntoch' الأقل عند استخدام السوربيتول، وكان متوسط طول النموات منخفضاً للأصناف 'Make' و 'McIntosh'، وعزز استخدام السوربيتول التفرع الإبطي للصنفين 'McIntoch' و' Jaspi' وكان النمو القمي للنموات الأصلية ضعيفاً. وفي العام نفسه قام Karhu و Ulvinin بتقييم تأثير استخدام 5 مصادر للكربوهيدرات هي السكروز والفركتوز والغلوكوز والسوربيتول والإكسيلول على تجذير نموات صنفين مكاثرين مخبرياً، فكان أعلى عدد وأفضل نمو للجذور عند استخدام السكروز.

ودرس Pawlicki and Welander عام 1994 تشكل النموات العرضية باستعمال أجزاء من الورقة مأخوذة من زراعات مخبرية من أصل التفاح 'Jork 9'، حيث تأثرت القدرة التجديدية بالمعاملة الأولية للنموات الأم وبالعناصر الكبرى وتركيز الهرمونات وعامل تهليم الوسط الأساسي الذي يحتوي العناصر الكبرى لوسط MS مع BA بتركيز 22µM و NAA بتركيز 0.1µM مع السوربيتول بتركيز 165 mM أو 220 mM. حيث كان السوربيتول أكثر فعالية من السكروز والغلوكوز والفركتوز، أو خليط من هذه السكريات، وقد عززت المعاملة الأولية للنموات بالبرودة والظلام تشكل النموات العرضية.

كما درس Pawlicki and Walende عام 1994 تأثير مصدر الكربوهيدرات وتركيز الأوكسين ووقت التعريض له على تجذير أصل التفاح 'Jork 9' وتبين أن تراكيز السكروز 29–59 mM أدت لأفضل تشكل للجذور، كما أن التوافق سكروز ومانيتول مع التعريض لـ 540 دقيقة لتركيز 49.2µM من IBA أدى إلى تجذير 100% للنموات. وبلغ أكبر عدد للجذور 6.55 جذر وأقل نسبة لتشكل الكالوس 4.4 %، كما درس تأثير السكر المضاف إلى الوسط QL على تشكل النموات حيث تبين أن الغلوكوز بتركيز 20 غ/ل أدى إلى تشكل النموات بشكل أقل منه بالمقارنة مع السوربيتول. وتمت دراسة تأثير تراكيز البنزيل أدنين (4.44, 22.2, 11.1) µM خلال أخر إعادة زراعة subculture وقبل التجديد وكذلك وقت استئصال الورقة -30 15 يوماً من بدء إعادة الزراعة وعمرها ومعاملات الظلام على تجديد النموات العرضية لأصل التفاح 'M26'. حيث أن الأوراق المستأصلة بعمر 30 يوماً من بدء إعادة الزراعة الأخيرة والناتجة من دون بنزيل أدنين في الوسط لم تشجع تشكل الأعضاء، بينما لم يختلف عدد النموات المتجددة بكل مستزرعة بشكل واضح باختلاف تركيز البنزيل أدنين ووقت استئصال الورقة معاً. أعطى أعلى تركيز للبنزيل أدنين 22.2 µM بوسط التجديد أعلى نسبة للأوراق المتجددة وبدون اختلاف بين الطول وعدد النموات بكل ورقة متجددة. وأظهرت الورقتان القميتان غير المتفتحتين تماماً أكبر قدرة تجديدية مقارنة مع الورقتين الثالثة والرابعة بينما كان عدد وطول النموات المتجددة بكل ورقة متماثلاً. ولوحظ أعلى معدل تجدد للورقة عندما تم تعريض الزراعات إلى

الظلام عند بداية بداية طور التجديد، وفي عام 1996 درس Ferradini تأثير تراكيز مختلفة من الـ BAP و IBA وفترة (الضوء/الظلام) المطبقة خلال كل من إعادة الزراعة الأخيرة وطور التجديد على إعادة التجديد من الورقة في أصل التفاح 'M26' فوجد أن لنسبة السيتوكينين/أوكسين في وسط الزراعة الأخيرة تأثير إيجابي على تشكيل الكالوس وأن الزيادة في تركيز الأوكسين IBA من 0.49 إلى 4.92 في طور الزراعة الأخير عند غياب أو استخدام تركيز منخفض من السيتوكينين في الوسط يساعد على إعادة التجديد من الورقة.

اختبر Karho (1997) .تأثير مصادر مختلفة من الكربون: غلوكوز وسوربيتول وسكروز في كفاءة التجديد لثلاث مستزرعات مختلفة من التفاح. وجد أن السوربيتول والسكروز لهما التأثير نفسه في تحريض تجديد الأوراق كما حرض السوربيتول وبنجاح تشكل الأعضاء في التفاح *Malus domestica*.

حصل Bolar *et al* (1998)على معدل تجدد جيد من أصناف التفاح Granny Smith (غراني سميث)، Mark (مارك)، Novolo (نوفولو)، Lanseeb (لانسيب) وSepeeLand (سيبي لاند) مع زيادة في عدد النموات المتجددة من الصنف Gala والصنف Golden delicious، حيث تم تجديد النموات من الكالوس المتشكل أو بشكل مباشر من الأوراق المأخوذة من زراعات مخبرية مع نسبة تجدد 100% ومعدل تجدد 14.2 نمو في الصنف Gala. وقد حصل(1990) Dufour على إنتاج من النموات المخبرية العرضية في أصناف التفاح 'Lancep', 'Novole', 'Mark', 'Granny' Smith' وCepiland' مع زيادة معنوية في عدد الأجزاء والنموات المتجددة المتشكلة في'Gala' و'Golden Delicious'. وقام بتجديد النباتات من الكالوس أو من الورقة مباشرة ودون المرور بمرحلة الكالوس وذلك من نباتات مكاثرة مخبرياً وحصل على نسبة تجديد وصلت إلى 100% مع عدد تفرعات وصل إلى 14.2 من كل جزء نباتي في الصنف 'Gala'. وحصل على تجديد النموات العرضية في زراعات التفاح 'Lancep', 'Novole', 'Mark', Smith' وCepiland' وبزيادة معنوية في الصنفين'Gala' و'Golden Delicious'. وقد تمت دراسة العوامل المؤثرة في الإكثار الخضري في الأنواع والطرز النموذجية الأصلية للتفاح بدراسة تحليلية من قبل Teixeira *et al* (2011)

تم نشر أول تقرير عن تجديد النموات العرضية في الأنابيب من شتلات التفاح في عام 1983 (Liu e*t al*,1983 a,b). وكشفت العديد من التقارير في وقت لاحق العوامل المؤثرة في وتيرة التجديد من الورقة في أصناف طعوم وأصول وشتلات التفاح البذرية(Barbieri and Morini 1987; Fasolo *et al*, 1989; Korban *et al*, 1992; Sriskandarajah *et al*, 1990; Swartz *et al*, 1990; Welander, 1988)

والتي تشمل: مصدر وتركيز النيتروجين ومنظمات النمو النباتية وظروف التحضين ومنشأ الورقة ونضجها وموقعها على الساق وطريقة الاستئصال وجهة وضع الجزء النباتي في وسط الزراعة.

ذكرت الدراسات استخدام السلاميات (Liu *et al* 1998; 2001)، نموات خضرية (Pawlicki-Jullian *et al*, 2002) ومستزرعات من الساق (Yamashita *et al*. 2004) وبروتوبلاست (Hyung *et al*, 1995) كمستزرعات للتجديد.

تجديد النباتات من البروتوبلاست هو عملية طويلة مقارنة بالتعديل الوراثي باستخدام الأنسجة النباتية المعتادة. لذلك، فإن التعديل الوراثي الوراثي من البروتوبلاست من غير المرجح أن يكون مصدراً لمادة نباتية معدلة وراثية جديدة. ولكن هذه الطريقة إذا تمت أمثلتها، ستكون مفيدة كطريقة عالية الإنتاجية من أجل الاختبارات المؤقتة لدراسة وظيفة المورثة أواستهداف البروتين(Aldwinckle and Malony, 2009)

2.2. التعديل الوراثي للتفاح:

أُنتجت نباتات تفاح معدلة وراثياً أول مرة في عام1989 من صنف التفاح التجاري Green sleeves باستخدام بكتريا التدرن التاجي وذلك بعدوى الخزعات الورقية (James *et al*,1989; 1993 ;1996 ; Lambert and Tepfer, 1992; Norelli *et al*,1994) تلا ذلك التعديل الوراثي للعديد من أصناف التفاح الهامة تجارياً مثل: Delicious (Sriskandarajah *et al*,1994) ، Jona gold و Elstar و Gala(De Bondt *et al*,1994; De Bondt,1996) ومن الصنف Granny Smith و Royal Gala (Yao *et al*,1995; Norlli *et al*,1996)، ومن الأصناف Jonagold وGala و Elstar و Golden Delicious (Puite and Schaart ,1996) وتمت دراسة العوامل المؤثرة في تجديد صنف التفاح Malus communis Barukeh المعدل وراثياً (De Bondt *et al*,1996).

مع توفر طرائق التعديل الوراثي للدنا المأشوب، أصبحت الطرائق الجديدة للتحكم بالأمراض النباتية إستراتيجية هامة، إذ يتم نقل مورثة واحدة لمركب مضاد لميكروب واحد أو أكثر. هذه المورثة يمكن أن تشفر للكيتيناز على سبيل المثال الذي يحطم الجدران الخلوية المحتوية على الكيتين للكثير من الفطريات. ويمكن تحسين مقاومة النبات بتعبير بروتين أو أكثر مضاد للميكروبات في النبات نفسه (Bent, 2003). يعتمد تطوير طريقة فعالة لنقل المورثات في التفاح إلى حد كبير على توفر تقنيات زراعة الأنسجة التي تتيح تجديد فعال للنموات الخضرية وانتخاب الأجزاء المعدلة وراثياً وإكثار النباتات المعدلة وراثياً. تعد زيادة كفاءة التجديد من الورقة أمراً بالغ الأهمية لتطوير طريقة التعديل الوراثي في التفاح باستخدام بكتريا التدرن التاجي كناقل

(Klee and Rogers, 1989) أو بواسطة عملية قذف المورثات. في كثير من الحالات، يعتبر عدم وجود طرائق فعالة للتجديد العامل المحدد الرئيسي الذي يحول دون تطوير تكنولوجيا نقل المورثات للمحاصيل المعمرة (Dandekar, 1992).

يضم الجنس *Malus* أكثر من 63 نوعاً ويعتبر صنف التفاح غرين سليفز *Malus* domestica cv 'Greensleeves' أول صنف تفاح تم تعديله وراثياً بكفاءة تحوير بين-0.1 0.5 % من كل جزء نباتي مستزرع explant. وقد تركزت الدراسات على تطوير إجراءات التعديل الوراثي لنحو 30 صنف تفاح وسبعة أصول *M. domestica* ودراستان على *M. prunifolia* و دراسة لصنف M. robusta ودراستان على *M . prunifolia*(الجدول رقم 1)

جدول 1. ملخص دراسات أصناف وأصول التفاح المعدلة وراثياً

المراجع References	المورثات المدخلة Introduced genes	الصنف /الأصل Scion/rootstock
Genetically transformed *M. domestica* varieties أصناف *M. domestica* المعدلة وراثياً		
39, 70,69,145,146	PinB, MpNPR1, Endohitinase (ech42), Exochitinase (nag 70), Puroindoline-b	Ariane
50,47, 187	GFP – green fluorescent protein; GUS – β-glucuronidase	Braeburn
184	LeIRT2	Balenghait
151, 156, 213, 212	GUS, synthetic green fluorescent protein gene (SGFP), pC58, p pGV3850::1103neo	Delicious, Red Delicious
29, 46, 47, 52, 81, 113, 183, 191, 201,186, 90	stilbene synthase, PGIP, Attacin E (-sp), T4 Lysozyme, hordothionin, S3 gene silencing (self-fertility),Mal d1 Rnai (allergy حساسية) واستخدام إيزوميراز فوسفومانوز كمورثة واسمة	Elstar
186	rol A	Florina
46, 47, 98, 127, 124, 125, 165	Polyphenol oxidase	Fuji
5, 4, 8, 14, 15, 18, 19, 28, 49,48, 69, 71, 70, 99, 115, 116, 127, 126, 125, 135, 140, 139, 146, 151, 150, 151, 149, 155, 156, 173, 171, 167, 188, 205, 206, 215, 217, 218,236, 245, 253	PinB, GUS, MpNPR1, MB39(+sp), T4 lysozyme, cecropia attacin E, cecropin B, SB-37 (+/-sp), Shiva-1 (-sp), Endohitinase (ech42), Exochitinase (nag 70), (RSV)-F, synthetic green fluorescent protein gene (SGFP), DIPM, hordothionin, Puroindoline-b, HcrVf2, Vfa1, Vfa2 and Vfa4, MdMyB10 (تغيير اللون), ACC synthase antisense, Amino cyclopro A Apple Pane 1 carboxylic(ACC) synthase 2 antisense, MdMyb10, MdMyb11 تعديل الاستقلاب الغذائي Ascorbate Peroxidase (اجهاد درجات الحرارة) Poly galacturonase (التصاق خلوي /التحام Cell adhesion), Gst promoter, XVEpromoter, Avidin streptavidin, Proteinase inhibitor	Gala, Galaxy, Royal Gala
6, 114, 110, 115, 155, 183, 204	Hordothionin, GUS, synthetic green fluorescent protein gene (SGFP), *g2ps1*	Golden Delicious
33, 39, 86, 85, 84, 156,	Aldose 6 phosphate (A6PR) antisense also	Greensleeves

183, 274	called S6PDH, Osmyb4, synthetic green fluorescent protein gene (SGFP), GA 20-oxidase	
56, 54, 55, 197, 225	stilbene synthase, PGIP, Lc (leaf color), MdMyb10, MdMyb11 (metabolic) isomerase (pmi), Phosphomannose	Holsteiner Cox, Gloster
8, 30, 49, 47, 92, 130, 243	iaaM and ipt , Ace-AMP1, Ai-AMP, Rs-AFP2, Attacin E (-sp), T4 Lysozyme	Jonagold, Jonagold King, Jonagold Red, Liberty
25, 24, 23, , 149, 166, 272	Rab, Endochitinase, Vfa1, Vfa2 and Vfa4, Gai gibberellic acid insensitive	McIntosh, Wijick
272	Gai gibberellic acid insensitive	Gravenstein
60,58,59	Thaumatin	Melba
49	(Gus) glucuronidase	Merlijn
114, 129, 164, 163	MdTFL1, Polyphenol oxidase, Antisense Sorbitol 6 phosphate Dehydrogenase (S6PDH) تراكم السكر	Orin
219	*β*-glucuronidase (GUS)	Pink Lady
79, 78, 92	Attacin E (-sp), T4 Lysozyme, Dpo BpMADS4 (self fertility)	Pinova, Pilot, Pirol, Pingo , Pi-AU56-83, Remo, Reka
246	pSCV1.6 (with selectable marker gene npt II and GUS reporter gene uid A).	Queen Cox
Genetically transformed apple rootstocks		**أصول التفاح المعدلة وراثياً**
276, 272	*rol A* , *Gai* gibberellic acid insensitive	A2
227	EPS depolymerase gene	JET-H
183, 214, 213,	*rol A*	Jork 9
2, 1, 5, 4, 27, 98, 97, 126, 152, 150, 151, 170, 168, 229, 245, 244, 278, 277, 275	HrpN; gst-1, Rol B, Attacin E, Dpo, *MpNPR1*,cecropin SB-37, shiva-1, lysozyme, *rol A, Phytochrome B, rolB*,Gst promoter, XVEpromoter Phospho mannose isomerase (pmi), *ZNT1*, *ZIP4*(التوتياء) اجهاد الزنك	M.26
6	g2ps1	MM111
97, 246, 245, 279, 278	*Phytochrome B, rolB*	M9/29
60,58,59,	Bar	N545
102	*rolC*	*Malus prunifolia* Marubakiado
252	*rolC*	*Malus prunifolia* Ringo Asami
273	*rolC*	*Malus micromalus* Makino
156, 222	Ans RNAi Anthocyanidin synthase	*Malus siervesii* TNR 31-35 neidzwetzkyana
190	LeIRT2تحمل نقص الحديد	*Malus robusta* Balenghaitang
250	GFP	*Malus baccata* (L.) Borkhausen
85	extA promoter, RS-AFP2, ACE-AMP1	*M. pumila*

وعموماً، تعتمد كفاءة التعديل الوراثي والقدرة على التجديد بشكل كبير على الخلفية الوراثية للصنف أو الأصل (De Bondt *et al*, 1994; Norelli *et al*, 1996). ونظراً للقابلية العالية لأهم أصناف وأصول التفاح التجارية للإصابة بالأمراض الفطرية، يعد التعديل الوراثي طريقة

جيدة وبديلة أو مكملة للطرائق التقليدية لتطوير أصناف مقاومة للأمراض. التعديل الوراثي للنباتات هو العملية التي يتم فيها إدخال جزء محدد من الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين– دنا– (مورثة) ودمجها في جينوم النبات، متجنبين بذلك الإكثار الجنسي. توسع التعديل الوراثي جاهزية المورثات إلى حد كبير، وهي محدودة في برامج التربية التقليدية، نظراً لإمكانية نقل المورثات المعزولة من نباتات أو حيوانات أو كائنات دقيقة أخرى إلى النباتات (Polanco *et al*, 2010; Aldwinckle and Malony , 2009) و كان التفاح هدفاً مبكراً لتكنولوجيا الحمض النووي المأشوب منذ نشوءها.

وقد أصبح التعديل الوراثي للتفاح في الوقت الحاضر ممارسة روتينية شائعة في العديد من المختبرات حيث تم تطوير البروتوكولات (الطرائق) المختلفة لتعزيز كفاءة التعديل الوراثي (Aldwinckle, *et al* 2009; Bolar *et al*, 1999, De Bondt *et al*, 1994; 1996; Flachowsky *et al*, 2004; James *et al*, 1993; Liu *et al*, 1998; Norelli *et al*, 1996; Puite and Schaart, 1996; Sriskandarajah *et al*, 1994, Sriskandarajah and Goodwin,1998; Yao *et al*, 1999; Yepes and Aldwinckle ,1993)

أما الأسلوب الأكثر استخداماً على نطاق واسع لإدخال المورثات الجديدة في النباتات ثنائية الفلقة فهو التعديل الوراثي بوساطة بكتريا التدرن التاجي (الأغروباكتيريوم Agrobacterium tumefaciens). في هذه العملية، الناقل (البلاسميد) الثنائي المجرد من المورثات التي تسبب الأورام والمحمول في بكتريا التدرن التاجي وأجزاء ورقة النبات أو الكالوس callus (أو الكنب وهو عبارة عن نموات خلوية غير متمايزة) هي العناصر الرئيسية للتعديل الوراثي الناجح (James *et al*, 1989). وعموماً، بدأت معظم الدراسات باستخدام مقاطع ورقية مخدوشة (Norelli *et al*, 1996)، ولكن المستزرعات من سلاميات قمية من نموات صنف التفاح رويال غالا المحجوب عنها الضوء قد أعطت كفاءة أعلى في إنتاج نموات معدلة وراثياً(Liu *et al*, 1998).

1.2.2. طبيعة الأجزاء النباتية:

في الغالبية العظمى من الأبحاث المنشورة، استخدمت الأوراق الفتية من التفاح كأجزاء نباتية للتجديد والتعديل الوراثي. وتم تحسين تجديد السلالات المعدلة وراثياً من الأوراق عن طريق وضع الجانب العلوي للورقة في تماس مع وسط الزراعة، حيث من المحتمل أن السبب يعزى إلى زيادة تبادل الأوكسجين نظراً لأن المسامات النباتية تقع على الجانب السفلي للورقة (Yepes and Aldwinckle, 1994). ونشر أن تهيئة نموات التفاح لعدة أيام في وسط زراعة سائل مناسب يعزز القدرة التجديدية لمستزرعات الأوراق عن طريق تقليل الحاجة لمرحلة كالوس طويلة

(Sriskandarajah and Goodwin, 1998). لكن مع ذلك، لم ينشر عن هذه العملية لتهيئة المستزرعات لاحقا في بروتوكولات التعديل الوراثي. وذكرت إجراءات أخرى استخدام السلاميات (Liu *et al* ,1998; 2001)، نموات خضرية (Pawlicki-Jullian *et al*, 2002) ومستزرعات من الساق (Yamashita *et al* , 2004) وبروتوبلاست (Hyung *et al*, 1995; Van Nerum *et al*, 2000) كمستزرعات للتجديد.

تجديد النباتات من البروتوبلاست هو عملية طويلة مقارنة بالتعديل الوراثي باستخدام الأنسجة النباتية المعتادة. لذلك فإن التعديل الوراثي من البروتوبلاست من غير المرجح أن يكون مصدراً لمادة نباتية مهندسة وراثية جديدة. ولكن هذه الطريقة إذا تم تطويرها، ستكون مفيدة كطريقة عالية الإنتاجية من أجل الاختبارات المؤقتة لدراسة وظيفة المورثة أو استهداف البروتين (Aldwinckle and Malnoy, 2009).

2.2.2. منظمات النمو النباتية: بشكل عام، يعد وسط موراشيج وسكوغ (Murashige and Skoog ,1962) MS والمكمل بـ 2–3% سكروز أو سوربيتول، والفيتامينات القياسية وسط التجديد الذي أنتج أكثر نموات خضرية جديدة. الفرق الرئيسي بين طريقة وطريقة أخرى هو في تركيبة الهرمونات النباتية (أوكسين وسيتوكينين) التي تستخدم للحث على تشكل الكالس (الكنب) والنموات العرضية. السيتوكينين المستخدم في تجديد معظم أصناف وأصول التفاح وإجراءات التعديل الوراثي هو ثيديازورون TDZ بتركيزات مختلفة (De Bondt *et al*,1994; Bolar *et al*, 1999; Hanke *et al*, 2000; Kanamaru *et al*,2004; Norelli *et al*, 1996). وأفيد في بعض التقارير، باستخدام البنزيل أدنين BA أيضاً (James Gittins *et al*, 2003; *et al*, 1989; James *et al*, 1993). ويعتبر نوع وتركيز الأوكسين هو عامل متغير جداً بين الإجراءات المختلفة لتجديد التفاح حيث استخدم الأوكسين نفتالين حمض الخل NAA في معظم بروتوكولات التجديد (Bolar *et al* ,1998; Dolgov *et al*, 2000; Hanke *et al*, 2000; Sedira *et al*, 2001; Sedira *et al*, 2005; Zhu, 2001b). على الرغم من أن Indol-3- butyric acid (IBA)، و Indol acetic acid(IAA) أيضاً استُخدما في تجديد بعض الأصناف (Aldwinckle and Malnoy, 2009; De Bondt *et al*, 1994; Igarashi *et al*, 2002; Polanco *et al*, 2010; Szankowski *et al*, 2009; Yamashita *et al*, 2004).

3.2.2.المضادات الحيوية :

خلال عملية التعديل الوراثي، تميل بكتريا التدرن التاجي *Agrobacterium tumefaciens* الى تشكيل مستعمرات بكتيرية على الجزء النباتي المزروع. للحد من تطور هذه البكتيريا، يتم

تجديد الأنسجة المستزرعة عادة على أوساط زراعة تحتوي على مضاد حيوي. وقد استخدمت ثلاثة مضادات حيوية بتركيزات مختلفة للسيطرة على انتشار بكتريا التدرن التاجي (الأغروباكتريوم) في التفاح هي: كاربنسيللين وسيفاتوكسيم وتيكاريسيللين. ويعتبر السيفوتاكسيم الأكثر استخداماً في التفاح بمعدلات تركيز في حدود 200– 500 مغ/لتر، يليه تيكاريسسلين ثم كاربنسيللين(Igarashi *et al*, 2002; Norelli *et al*, 1994; 1996; Szankowski *et al* 2009) كما استخدم أيضاً مضادات حيوية أخرى مثل كالفوران Claforan (Krishnamurthy *et al*, 2001) وسيفوكزيتين Cefoxitin (Liu *et al*, 1998).

2.2 .4.إجراء العدوى وسلالة بكتريا التدرن التاجي:

في حين أنه تم التعديل الوراثي للعديد من أصناف التفاح بمورثات مختلفة، فإن معظم الإجراءات (95%) تعتمد على نقل المورثات بالتعديل الوراثي بوساطة الأغروبكتريوم ، وهذه الطرائق متشابهة إلى حد كبير، ما تبقى 5% من إجراءات التعديل الوراثي تستخدم بكتريا الشعيرات الجذرية A. rhizogenes لدمج الـ T- DNA (Pawlicki-Jullian *et al*, 2002; Yamashita *et al*, 2004). وبالنظر إلى حقيقة أن جميع التراكيب الوراثية لا تستجيب على نحو مماثل للإجراء نفسه من التعديل الوراثي، فقد تم نشر تعديلات عديدة على إجراءات التعديل الوراثي السابقة. سلالة بكتريا التدرن التاجي الأكثر شيوعاً والتي استخدمت تقريباً في نصف طرائق التعديل الوراثي كانت EHA105 أو EHA101. شملت السلالات الأخرى المستخدمة LBA4404، AGLO، C58C1، CBE21، وGV3101. وقد استخدمت طريقتان لإجراء العدوى (التلقيح) بالباكتريا. الأولى: تتكون من خدش الأوراق بملقط تم غمره في لقاح البكتريا (Wilson and James, 2003). والثانية: هي تغطيس الأوراق بعد خدشها في محلول اللقاح البكتيري لفترة تتراوح من بضعة دقائق (De Bondt *et al*, 1994; Norelli *et al*, 1994) إلى عدة ساعات (Mooney and Goodwin, 1989). وقد تم اختبار وسائل أخرى للتلقيح ولكن لم تزد من معدل التعديل الوراثي زيادة كبيرة. على سبيل المثال، أدى تعريض الأجزاء الورقية بوجود محلول اللقاح للأمواج فوق الصوتية إلى زيادة التعديل الوراثي في صنف التفاح Holsteiner وولم يزده في الصنف Elstar (Szankowski *et al*, 2001). ونشر أن الترشيح بالتفريغ لأوراق رويال غالا لا تؤثر في التعديل الوراثي (Norelli *et al*, 1996). ويبين الشكل 1. إجراءات التجديد والتعديل الوراثي في التفاح.

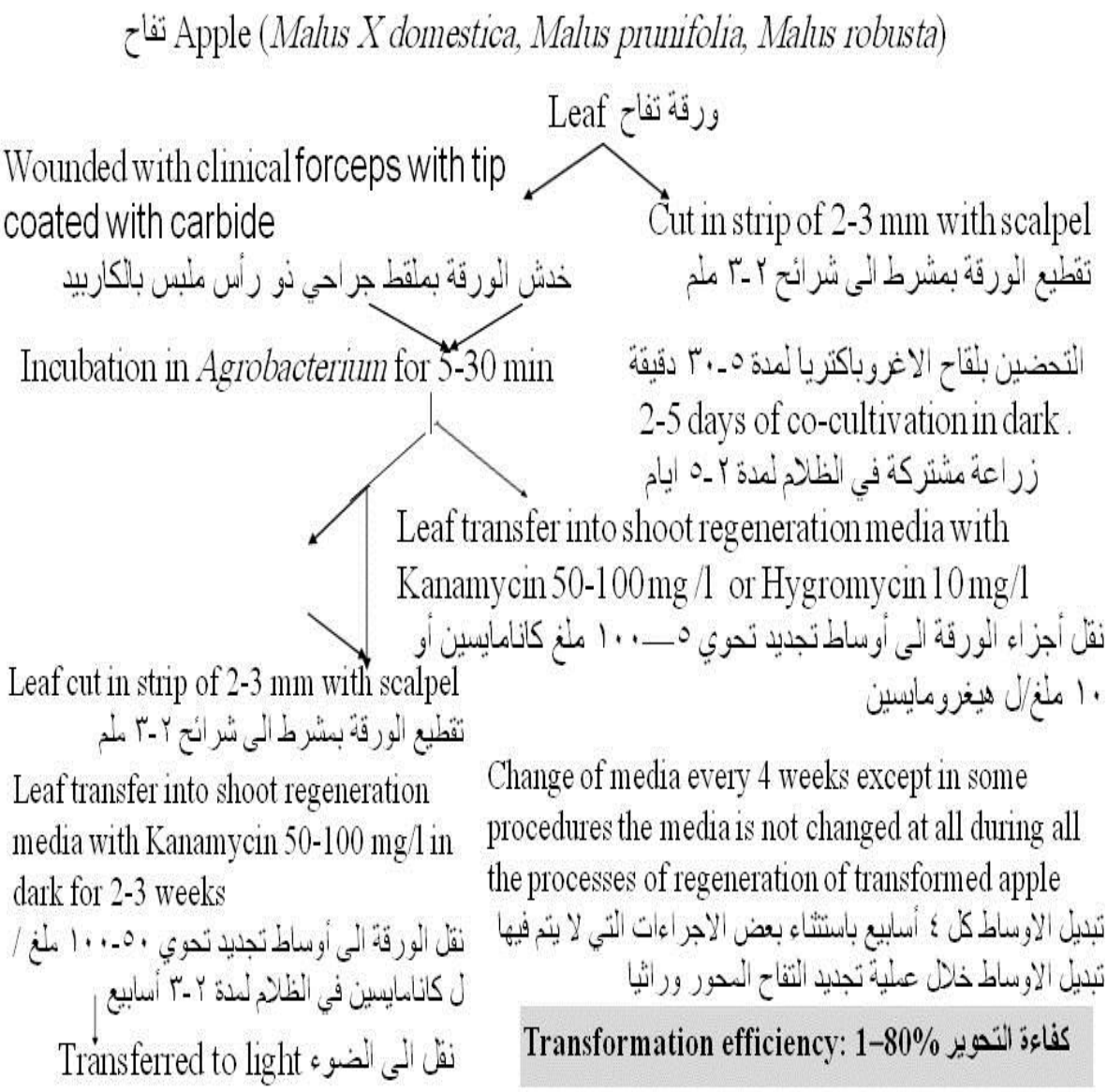


Fig. 1. Representation of the apple (*Malus X domestica, M. prunifolia, M. robusta*) transformation procedure

شكل ١. اجراءات التجديد والتحوير الوراثي في التفاح (حسب Aldwincke and Malony (2009)

2.2 .5. مورثة الإنتخاب Selectable marker:

يعتمد تجديد النباتات المعدلة وراثياً على كفاءة المورثات الواسمة المنقولة والقدرة على النمو بوجود مادة انتخاب. يوجد نحو 50 مورثة قابلة إنتخاب. يوجد نوعان من المورثات الواسمة للانتخاب السلبي والايجابي. ففي حالة الانتخاب السلبي الذي يتم فيه قتل الخلايا غير المعدلة وراثياً يستخدم في معظم الحالات (90 %) مورثات المقاومة للمضادات الحيوية مثل الكانامايسين والهيغرومايسين (Dolgov and Skryabin, 2004; Dolgov *et al*, 2004) كمورثات انتخاب، أو استخدام مورثة *bar* لمقاومة مبيد الأعشاب فوسفينوثريسين PPT

(Szankowski) *et al*, 2003. حيث يبدو أن المستزرعات من أصناف التفاح المختلفة لديها حساسيات مختلفة للكانامايسين. ويتراوح التركيز الأمثل للكانامايسين المستخدم في الانتخاب، حسب الصنف، بين 25 و100 مغ/ لتر. وبناءً على حساسية أصناف التفاح، تم انتخاب بعض أصناف التفاح باستخدام تركيز منخفض من الكانامايسين بعد الزراعة المشتركة، تلتها زيادة في التركيز في إعادة الزراعات اللاحقة(Dolgov and Skryabin ,2004a; Dolgov *et al* 2004b, Murata *et al*, 2000; Murata *et al*, 2001; Welander *et al*; 1998; Wilson and James, 2003). يتيح التركيز المنخفض من المضادات الحيوية النمو السريع لنموات خلوية غير متمايزة (كالوس callus) وبدء تشكل النموات الخضرية، في حين أن التركيز الأعلى في نهاية المطاف يقضي على النموات الخضرية غير المعدلة وراثياً. وقد استخدم الإجراء نفسه عند استخدام مبيدات الأعشاب PPT (Szankowski *et al*, 2003). في حال استخدام مورثة الانتخاب الإيجابي أي التي تمكن من تحديد وانتخاب الخلايا المعدلة وراثياً دون الاضرار أو قتل الخلايا غير المعدلة وراثياً (كما في الانتخاب السلبي). لكن في هذه الحالة مورثة الانتخاب الايجابي تعطي الخلايا المعدلة وراثياً القدرة على استقلاب (تمثيل) بعض المركبات التي عادة لا تستطيع استقلابها أي يعطيها ميزة عن الخلايا غير المعدلة وراثياً. وبالتالي فإضافة هذه المركبات الى وسط الزراعة كمصدر غذائي أثناء عملية التجديد يتيح للخلايا المعدلة وراثياً النمو والتمايز، بينما الخلايا غير المعدلة وراثياً لا تستطيع النمو ولا تجدد نموات ولا نباتات. أمثلة ذلك تشمل مورثة phosphomannose isomerase (pmi) Degenhardt and Szankowski, 2006; Flachowsky *et al*, 2004; Szankowski) and Degenhardt ,2007; Zhu,*et al* 2004. Vr- ERE والمورثة manA، أو (Chevreau *et al*, 2007) ومورثة بيتا غلوكورونيديز GUS (1,2) و Xyl A وGFP (Maximova *et al*, 1998) وغيرها. نشر Degenhardt and Szankowski (2006) عن تجديد سلالات معدلة وراثياً باستخدام مورثة pmi كمورثة قابلة للإنتخاب بكفاءة تحوير في حدود 1–24%. ومع ذلك، لم ينشر عن أي كفاءة تحوير لصنف التفاح 'Elstar'. والجانب السلبي لهذه الإجراءات هو أنه في بعض السلالات لم تستأصل مورثة الانتخاب وهي لا تزال موجودة في جينوم النبات ((2004; Kondrak *et al*, 2006) Schaart,*et al*. أو يتم الانتخاب بدون استخدام أي مورثة انتخاب (Malnoy *et al*, 2007b). وفي هذه الحالة، يتم إنتاج التفاح المعدل وراثياً بواسطة العدوى بلقاح بكتريا التدرن التاجي، يليها تجديد النموات الخضرية من دون استخدام مادة انتخاب. وهذا ينتج نباتات كثيرة يكون بعضها غير معدل وراثياً (نحو 70% حسب الصنف). ومع ذلك ، فحسب نسب التجديد ونقل المورثات، فإن بعض النباتات هي معدلة وراثياً ويمكن تحديدها عن طريق اختبار الـ PCR. ولكن أحد الشروط

الأساسية للتعديل الوراثي الناجح هو إيجاد طريقة تجديد ذات كفاءة عالية. حتى الآن، يقتصر هذا الأسلوب على النباتات النموذج وبضعة أصناف محاصيل محددة، على سبيل المثال، في البطاطا. طور Malnoy وزملاؤه (2007 b) هذه التقنية في التفاح وبكفاءة عالية جداً للصنف غالاكسي والأصل M.26، حيث كانت كفاءة التعديل الوراثي نحو 12% لـ غالاكسي و 25%للـ M.26 . وقد نشر أيضاً إنتاج تفاح معدل وراثياً خال من المورثة المعلمة باستخدام المورثة R recombinase المحرضة وهي ثنائية الوظيفة كمورثة انتخاب سلبي وايجابي لتخفض حدوث الطفرات الكميرية بسبب استئصال الحمض النووي غير المكتمل (Kondrak *et al*, 2006; Schaart, 2004).

.2.2 .6. كفاءة التعديل الوراثي :

عادةً ما يتم وصف كفاءة التعديل الوراثي كنسبة مئوية للمستزرعات التي تنتج نموات خضرية معدلة وراثياً . ذكرت الأبحاث المبكرة من التعديل الوراثي كفاءة تحوير بنسبة 0.2 إلى 15%. بعد التحسين في هذه الإجراءات، أمكن الوصول إلى معدل تعديل وراثي مرتفعً حتى 80% وهي تختلف حسب الصنف والمحصول أيضاً (Aldwinckle and Malnoy, 2009).فهناك عوامل عديدة تؤثر في كفاءة التعديل الوراثي أولها النمط الوراثي للنبات المدروس وعوامل أخرى تتعلق بالمورثات ومصدرها، ومورثات الانتخاب، وطريقة العدوى، والمحفز(الأسيتوسيرنغون والبيتايين فوسفات) وطريقة التعديل الوراثي وطريقة تجديد النبات وخدش الأوراق وعوامل أخرى (الجدول2).

جدول 2. ملخص لبعض دراسات التعديل الوراثي على التفاح والعوامل المؤثرة في كفاءة نقل المورثات

الصنف / الأصل	أهم النتائج / ملاحظات	المرجع
'Greensleeves'	استخدمت سلالة الأغروباكتريوم LBA4404 والبلاسميد الناقل pBIN 6. أول نباتات تفاح معدلة وراثياً	James *et al.*, 1989
'M26'	استخدمت سلالة الأغروباكتريوم LBA4404, CZ707 والبلاسميد الناقلpBI121, pCGP257. الجلرايت أفضل من الآجار من أجل تجديد نباتات تفاح معدلة وراثياً	Maheswaren *et al.* ,1992
'M26'	استخدمت سلالة الأغروباكتريوم *A. rhizogenesis* A4 النباتات جددت من الجذور المعدلة وراثياً	Lambert and Tepfer .,1992
'M26'	استخدمت سلالة الأغروباكتريوم LBA4404 والبلاسميد الناقل	Norelli *et al.*, 1994

	pLDB15. تجديد نباتات معدلة وراثياً تحوي المورثة *attacin E*	
'Greensleeves'	استخدمت سلالة الأغروباكتريوم C58C1 والبلاسميد الناقل pLDB15. الأسيتوسيرنغون وبيتايين فوسفات يعزز نقل المورثات في التفاح	James *et al.*,1993
'Delicious'	استخدمت سلالة الأغروباكتريوم pGV3850 والبلاسميد الناقل 1103 neo، النموات المعدلة وراثياً جددت من الكالوس	Sriskandaraja h *et al*., 1994
'Jonagold', 'Elstar', 'Fuji', 'Braeburn', 'Merliji'	استخدمت سلالة الأغروباكتريوم LBA4404, EHA105, C58C1 والبلاسميد الناقل pGV2492. دراسة تأثير عوامل عديدة على كفاءة نقل المورثات في المراحل المبكرة للتحوير وتبين أن *pEHA101* أعطى نسبة كالوس محور أكبر خمسة أضعاف مقارنة بسلالتي البكتريا الأخريين. وجدوا أن محتوى وسط الزراعة المشتركة من الهرمونات ومصدر السكر يؤثران بشكل كبير على كفاءة نقل المورثات. وأن وسط الزراعة المشتركة الحاوي سيتوكينين عالي أفضل لنقل المورثات من الوسط الحاوي أوكسين مرتفع التركيز	De Bondet *et al*., 1994
'Royal Gala'	استخدمت سلالة الأغروباكتريوم LBA4404 والبلاسميد الناقل pKIWI1105, pKIWI110. نباتات تفاح معدلة وراثياً مقاومة للمبيد العشبي Glean في البيت الزجاجي	Yao *et al*., 1995
'Fuji'	بروتوبلاست من الورقة– تعبير المورثة *gus* في البروتوبلاست– طريقة الثقب الكهربائي	Hyung *et al.* 1995
'Greensleeves'	تجارب حقلية– إنتاج ثمار تفاح معدلة وراثياً	James *et al*., 1996
'Jonagold'	تجديد وتحوير ناجح من الورقة باستخدام سلالة الأغروباكتريوم EHA101 والبلاسميد الناقلpFAJ3003, pFAJ3027. المورثة *nptII* أفضل من المورثة *bar* لانتخاب التفاح المعدل وراثياً	De Bondet *et al*., 1996
'Gala', 'Elstar', 'Golden' 'Delicious'	استخدمت سلالة الأغروباكتريوم AGLO, EHA101 والبلاسميد الناقل pCGN7001, pMOG410 نباتات تفاح معدلة وراثياً في البيت الزجاجي	Puite and Schaart, 1996
'Royal Gala'	استخدمت سلالة الأغروباكتريوم EHA105 والبلاسميد الناقل p35GUS-INT، خدش الأوراق بالملقط يزيد كفاءة التعديل الوراثي الوراثي– اختبار *gus*	Norelli *et al*., 1996
غير محدد	أمثلة شروط التجديد والتعديل الوراثي من الورقة في التفاح	Sriskandarajah and Godwin, 1998

Abdul-Kader *et al.*,1998	التعـديل الـوراثي بالمورثـة *hrpN* باسـتخدام الناقـل الثنـائي pBINPLUS. الحصـول علـى المتجـددات علـى أوسـاط حاويـة علـى المضـاد الحيـوي كانامايسـين بتركيـز 100 مـغ /ل, وتـم إكثـار النمـوات المتجـددة وتجـذيرها وأقلمتهـا لشـروط البيـت الزجـاجي. تـم إثبـات التعـديل الـوراثي بواسـطة طريقـة الإليزا NPTII -ELISA لوجود المورثة *nptII* وباختبار الـ PCR لوجود المورثة *hrpN* تم إثبات التعبير الجيني عن المورثة *hrpN* باختبار Western.	'M26'
Abdul Kader *et al.*, 1999	التعديل الوراثي بالمورثة *hrpN* والمورثة *gst-1*	'M26'
Bolar, *et al.*, 1999	دراسة حول التعديل الوراثي بمورثات محللة للكيتين وتم التأكد من فعالية التعديل الوراثي بواسطة تفاعل الـ PCR وتحليل الـ Southern للدنا ولوحظت اختلافات حقيقية باستخدام التحليل الأنزيمي واختبار الـ Western للبروتينات	'McIntosh', 'Marshal'
Borejsza-Wysocka, *et al.*,1999	التعديل الوراثي وذلك لزيادة المقاومة لمرض اللفحة النارية في التفاح بالمورثة *Attacin E* واثبات التعديل الوراثي بالـ PCR و Western	'M26', 'M7'
Norelli *et al.*, 1999	التعديل الوراثي لزيادة المقاومة لمرض اللفحة النارية في التفاح بالمورثات *Attacin E, Cecropin, SB 37, Shiva-1, Lysozyme.*	'RoyalGala', 'Galaxy', 'M26'
Hanke *et al.*, 1999	التعـديل الـوراثي بالمورثـة *T4-LYSOZYME-* لزيـادة المقاومـة لمـرض اللفحـة الناريـة فـي التفـاح– اليـزا *nptII* – وPCR لوجـود المورثة المنقولة	'Pinova', 'Pilot', 'Pinol', 'Pingo', 'Remo', 'Elstar', 'Liberty'
Holefores *et al.*, 2000	دراسـة حـول التعـديل الـوراثي لأصـل التفـاح M26 بالمورثـات *nptII* و *phyB* من الإرابدوبسس– تم الحصول على 13 كلون من أصل 329 جزءاً نباتياً.	'M26'
Bolar *et al* ., 2000	أدخلـت مورثـة الكيتنـاز *Chitinase* مـن أجـل المقاومـة لمـرض الجرب في التفاح	'McIntosh'
Dolgov *et al.*, 2000	بروتوكول ناجح للتعديل الوراثي باستخدام السلالات الحساسة جداً CBE21 with vector pBI121 الحاملة للمورث *gus* . نسبة التعديل الوراثي 1.5-13.3%	'cv. Melba' and 'clonal rootstock N545'
Hanke *et al.*, 2002	التعديل الوراثي للتفاح لزيادة المقاومة لمرض اللفحة النارية بتعبير	'cultivar 'Pinova'

	المورثة الفيروسية ايبس دي بلويميراز *eps-depolymerase*	
Szankowski *et al.*, 2003	التعديل الوراثي للتفاح بمورثة *stilbene synthase* من العنب و*PGIP* من الكيوي من أجل مقاومة الأمراض الفطرية، دراسة تأثير الأمواج الصوتية على كفاءة التجديد والتعديل الوراثي في التفاح. استخدمت سلالة الأغروباكتريوم EHA101 والبلاسميد الناقل pIBGUS	'Elstar', 'Holsteiner Cox'
Zhu *et al* ., 2001	استخدام الفوسفو مانوز إيزوميراز كمورث انتخاب (تحمل 2غ/ل). إثبات التعديل الوراثي باختبار Southern	'M26'
Faiz *et al*, 2003	التعديل الوراثي بوساطة الأغروباكتريوم بمورث (*pinB*), من القمح لمقاومة جرب التفاح تحت تحكم CaMV35S – 24 كلون متحمل للكاناميسين . اختبار ELISA	'Ariane' and 'Galaxy',
Wilson and James, 2003	دراسة العوامل المؤثرة على التجديد والتعديل الوراثي– مقارنة وسط MS مع وسط DKW معدل التعديل الوراثي بين2.2% و0.5%	'Queen Cox'
MCAdam *et al.*, 2004	سيفوتاكسيم وكاناميسين أعطيا مستوىً جيداً من الانتخاب لاستبعاد الأغروباكتريوم – أفضل وسط للإكثار MS+2 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA	'Bramley', 'Greensleeves'
Reim and Hanke,2004	دراسة ثباتية انتقال المورثات والتعبير الوراثي في التفاح المعدل وراثياً	Commercial varieties أصناف تفاح تجارية
Flachowsky *et al.*, 2004	طريقة بديلة للانتخاب باستخدام مورثة معلمة *manA* – المورثة *GFP*	غير محدد
Seong *et al.*, 2005	دراسة تأثير نترات الفضة وأمينو اثيو فنيل غلايسين على التعديل الوراثي بوساطة الأغروباكتريوم في التفاح	'Fuji, Gala'
Malnoy *et al.*, 2007.	التعديل الوراثي في التفاح بدون استخدام مورثة واسمة التعبير المفرط لمورثة *MpNPR1* يزيد المقاومة للمرض	Galaxy','Ariane *'Malus* × *domestica*'

2.2 .7. المورثات المستخدمة في التعديل الوراثي للتفاح:

اعتمدت التعديلات الوراثية في الغالب على استخدام الأصناف التقليدية وقد نفذت باستخدام مورثات معزولة من التفاح (Espley *et al* , 2007; Malnoy *et al* ,2007a, Malnoy *et al*, 2008) أو من عضويات أخرى (Bolar *et al* ,2000;; Faize *et al* 2004)

أدخلت أيضاً المورثات المؤثرة في بعض النواحي الفيزيولوجية أو المورفولوجية مثل النمو (2000 Holefors *et al*,) والإزهار (Yao *et al*, 1999) والخصوبة الذاتية (Van Nerum *et al*, 2000) الى التفاح المعدل وراثياً. كما درست وظائف بعض المورثات مثل sorbitol-6-phosphate سوربيتول فوسفاتيز (Cheng *et al*, 2005; Kanamaru *et al*, 2004) و سيتي بين سينسيز stilbene synthase (Rühmann *et al*, 2006) و بولي غالاكتورونيز polygalacturonase (Atkinson *et al*, 2002) ومن محفزات عديدة (Gittins *et al*,2001; Gittins *et al*, 2003; Ko *et al*, 2000; Szankowski, *et al*, 2008) في التفاح المعدل وراثياً (جدول 3).

جدول 3. المورثات المستخدمة في التعديل الوراثي للتفاح

Reference المرجع	Results النتائج	Donor مصدر المورثة	Gene المورثة المستخدمة في التعديل الوراثي	Genes isolated from apple مورثات معزولة من التفاح	Over-Expressi تعبير
14	تغير في التحام ونضج الخلية	*M. domestica Borkh.*	MdPG1 (Polygalacturonase)		
18, 19	Scab-resistance مقاومة الجرب	*Malus floribunda* 821	HcrVf2 (R-genes)		
150	مقاومة الأمراض الفطرية	*M. domestica Borkh.*	MpNPR1(pathogenesis-related gene)		
69	تحريض تراكم الآنثوسيانين، لون ثمرة التفاح أحمر	M. domestica *Borkh.*	MdMYB10 (MYB transcription factor)		
149, 116	Scab-resistance مقاومة الجرب	*M. floribunda* 821	HcrVf1 (R-genes)		
236	Scab-resistanceمقاومة الجرب	*M. floribunda* 821	HcrV2 (R-gene)		
169	Fire blight resistance مقاومة اللفحة النارية	*Hyalophora cecropia*	Attacin E	Genes isolated not from apple مورثات	
139	Fire blight resistance مقاومة اللفحة النارية	*Hyalophora cecropia*	Cecropin MB39		
247	Scab-resistance	*Trichoderma*	ech42		

	مقاومة الجرب	*harzianum*	(Endochitinase)	معزولة من مصادر غير التفاح	مفرط للمورثة
24, 23	مقاومة الجرب. لوحظت علاقة عكسية بين نمو السلالات المعدلة وراثياً وفعالية الآندوكيتينيز. 6 من اصل 8 سلالات معدلة وراثياً معبرة عن الآندوكيتينيز كانت اكثر مقاومة من الشاهد.	*Trichoderma harzianum Trichoderma Atroviride (fungus)*	ech42 (Endochitinase) Nag70 (Exochitinase)		
225	Antifungal activity فعالية مضادة للفطريات	*Grapevine (Vitis vinifera L.)*	Vst1 (Stilbene synthase)		
225	Antifungal activity فعالية مضادة للفطريات	*Kiwi (Actinidia deliciosa)*	PGIP (Polygalacturonase inhibitor)		
155	Insect resistance (light brown apple moth)مقاومة الحشرات (فراشة التفاح البنية)	*Streptomyces avidi*	Avidin or Streptavidin		
97	Root inductionتخليق الجذور	*Agrobacterium rhizogenesnii*	RolA (Hydrolyze phytohormone glucoside A)		
246	Root induction تخليق الجذور	*A. rhizogenes*	RolB (Hydrolyze phytohormone glucoside B)	Genes isolated not from apple مورثات معزولة	
106	Root induction تخليق الجذور	*A. rhizogenes*	RolC (Hydrolyze phytohormone glucoside C)		
70	Antifungal activity فعالية مضادة للفطريات	*Wheat (Triticum aestivum)*	PinB (puroindoline)		
58, 59	مقاومة للفطر في التفاح Melba	*Thaunatococcus danielli (Plant)*	thaumatin		

Silencing اخماد / ابط فعالية المورثة		S-RNase gene	*M. domestica Borkh.*	Self-fertilityخصب ذاتيا	237
		S6PDH (Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase)	*M. domestica Borkh.*	تنظيم الفصل بين السوربيتول والسكروز	117
Promotors المورثة المحفزة		ExtA promoter	*Brassica napus L.*	توزيع خاص بالنسيج النباتي	120
		RolC promoter	*A. rhizogenes*	توزيع خاص بالنسيج النباتي	121
		HcrVf2 promotor	*M. floribunda 821*	Scab-resistance مقاومة الجرب	223

حسب ما نشره Polanco ووزملاؤه (2010) مع إضافة بعض المراجع

2.2 .8.استخدام المورثات المتعلقة بالدفاع

أثبت العديد من الباحثين أن النباتات تنتج بروتينات متعلقة بالدفاع، مثل البروتينات المتعلقة بالمسببات المرضية (Pathogensis-related proteins PR) وببتيدات مضادة للممرضات(Broothaerts *et al* ,2000). لذا اعتمدت الدراسات الأولية لتعزيز مقاومة النبات على أنظمة الدفاع الخاصة بالنبات وخصوصاً بالتعديل الوراثي للنباتات بمورثات تشفر لبروتينات خاصة بالممرضات. تم تحوير العديد من النباتات بمورثات تشفر لأنزيم الكيتيناز Chitinase وغلوكانيز Glucanase لمكافحة المسببات الفطرية. يحطم هذان الأنزيمان البوليمرات في الجدر الخلوية للكثير وليس لكل الفطريات بدون التأثير على العائل النباتي أو أي حيوان. تم عزل الأنزيمات من عدد من المصادر شملت نباتات (الرز، الشعير)، بكتريا (Serratiamarcescens) و Streptomyces (Holefors *et al*, 1998) olivaceoviridis) وحتى من الفطريات (Trichoderma harizianum) (Salter *et al*, 2008). اعتمد اختيار الأنزيم على توفره وعلى فعاليته ضد المسبب المرضي المراد مكافحته، حيث من المرجح أن المسببات المرضية الناجحة لديها مقاومة ضد أنظمة النبات الدفاعية. استخدم المحفز 35S من فيروس القرنبيط غالباً لتعبير هذه المورثات. صمم التعبير الدائم (الجهازي) لبروتين الدفاع لتوفير عائق أمام الهجوم الأولي ولكي لا يسمح للمسبب المرضي أن يتثبت بالنبات لأنه ربما يكون هذا هو الحال أثناء فترة تحريض جهاز الدفاع بالعائل. وقد

استخدمت أيضاً محفزات تتحرض بالجروح مثل المحفز Prp1-1 من البطاطا في التعديل الوراثي لأصل التفاح M.26(Abdul Kader *et al* , 1998) والذي يتوسط التعبير السريع الموضعي استجابة لهجوم المسبب المرضي. يقيد هذا النوع من المحفزات تعبير المورثة بالمكان المطلوب فيه البروتين ويمكن أن يقلل الأخطار المحتملة المترافقة مع البروتينات. وحيث أن تعبير المورثة يعمل فقط أثناء العدوى فهو بالنتيجة يحد من تعبير المورثة وهذا يعني أنه لا يوجد استنزاف دائم في مقدرة التصنيع الحيوي بالنبات ولن يكون هناك أيضاً انخفاض كبير في كمية المحصول. اختبرت كفاءة هذه الأنظمة في العديد من النباتات وثبت في بعض الحالات وجود مستوى معين من التحمل لمسببات مرضية معينة (Salter *et al*, 2008). فقد يعزز التعبير الجهازي (الداخلي الدائم) لهذه الجزيئات مقاومة النبات. على سبيل المثال، بورواندولاينز (PinA puroindolines and PinB) والببتيدات المضادة للميكروبات هي بروتينات غنية بالسيستين مضادة للفطريات، والتي توجد في بذور القمح. كل هذه المورثات تم توصيفها بشكل جيد وقد استخدمت في التعديل الوراثي للرز. وقد أظهرت السلالات المعدلة وراثياً المعبر فيها هذه المورثات زيادة المقاومة لأهم الأمراض الفطرية الرئيسية في الرز (Krishnamurthy *et al*, 2001). أظهرت دراسات أخرى أن التعبير على مستوٍ عال لمورثات بروتينات الدفاع PR يمكن أن تقي الأصناف الحساسة التي هي عرضة للعدوى من الإصابة بالممرضات المختلفة. أثبتت التحليلات النسخية للتفاح الحساس والمقاوم للجرب أن مستويات النسخ التي تشفر لعدد من البروتينات المتعلقة بالدفاع النباتي (مثل بيتا 1−3 غلوكونيز و PR10 الشبيه بـ ريبونوكليز ومثبط أنزيم بروتين السيستين واندوكايتينيز وفيروتشيلاتيز β-1,3-glucanase, ribonuclease-like PR10,cysteine protease inhibitor, endochitinase, ferrochelatase وعامل أدينوزين ثنائي الفوسفات ريبوسيليشين ADP-ribosylation factor أو ازالة السمية في الأنواع التفاعلية مع الأوكسجين (مثل سوبرأوكسيد ديسموتيز) (superoxide dismutase) قد تم تنشيطها الى حد كبير في الصنف المقاوم ريمو عند مقارنة كمياتها النسبية بالصنف الحساس Elstar. والأكثر إثارة للدهشة كان وجود عدد كبير من الكلونات الناتجة من استنساخ الـ رنا الرسول لتصنيع ميتا اللوثيونينز من النمط 3 في مجموعة الصنف المقاوم ريمو. لكن النسخ المطابقة كانت موجودة فقط بكميات قليلة في الأوراق الفتية غير المصابة بالصنف الحساس ايلستار، لكنها كانت منشطة في هذا الصنف الحساس بعد العدوى بالفطر المسبب للجرب V. inaequalis (Degenhardt *et al*, 2005). وأظهرت دراسات أخرى قدمتها مجموعة باحثين في جامعة كورنيل في أمريكا(Malnoy *et al*, 2007a; Malnoy *et al*, (2007b أن الإفراط في تعبير مورثة التفاح MpNPR1 يضفي زيادة مقاومة المرض في *M. domestica*. تم اكثار السلالات المعدلة وراثياً المختارة للتقييم في التجارب

الحقلية لمقاومة الأمراض وجودة الثمار (Salter *et al*, 2008). النوع الثالث من البروتينات هي البروتينات التي تنشط الريبوزومات Ribosome-inactivating protins (RIPs) والتي استخدمت كوسيلة دفاع ضد العدوى بالفطريات. هذه البروتينات هي أنزيمات تزيل آثار الادنين من موقع معين في عدد ضخم من الـ RNA الرسول في ريبوزومات حقيقيات وطلائعيات (أوليات) النوى وبالتالي تثبط تصنيع البروتين. تتنوع تخصصية هذه البروتينات لكن النقطة الحاسمة هي أن أمثلة معينة لا تثبط ريبوزومات النبات (Salter *et al*, 2008) ..

2.2 .9. استخدام مورثات بكتيرية:

أدخل أيضاً العديد من المورثات الأخرى التي تشفر لبروتينات ذات فعالية مزدوجة كمضادة للفطريات ومضادة للبكتريا إلى النباتات بدرجات نجاح مختلفة. شملت هذه البروتينات الليزوزيم lysozyme حيث يفكك هذا الأنزيم الكيتين إلى ببتيد وغليكان الذي يعيق حدوث العدوى بالفطر لفترة قصيرة. وقد أجريت بعض الدراسات لمكافحة مرض اللفحة النارية البكتيري. حيث أن معظم أصناف وأصول التفاح التجارية المزروعة في أوروبا حساسة للفحة النارية، ومسبب هذا المرض هو البكتريا Erwinia amylovora والتي حالما تتوضع فإنها تقتل الشجرة خلال موسم النمو. وقد درس عدد من الباحثين هذه المشكلة بإنتاج أشجار معدلة وراثياً تحوي مورثات تنتج بروتينات مضادة للميكروبات. استخدمت إحدى هذه الاستراتيجيات الطريقة المحللة لإنتاج أشجار معدلة وراثياً تحتوي على المورثة T4 lysozyme ومورثات لبروتينات مضادة لممرضات حشرية هي cecropine و attacin E. وشملت الطريقة الثانية المستخدمة مورثة لاكتوفيرين البقري bovine lactoferrin ومورثة دي بوليمراز depolymerase والنبات الذي ينتجها قادر على تفكيك الاكسوبولي سكاريد exopolysaccharide. أظهر الكثير من السلالات المعدلة وراثياً أعراض اللفحة النارية أقل من نباتات الشاهد. وأظهرت إحدى السلالات فقط 5% من طول الطرد مصاب باللفحة مقارنة بـ 56% في الشاهد غير المعدل وراثياً (Salter *et al*, 2008). المجموعة الأخرى من الببتيدات التي اختبرت هي الـ Temporins وهي عبارة عن ببتيدات صغيرة مضادة للميكروبات كاتيونية معزولة من مفرزات جلد الضفدع الأحمر الأوروبي Rana temporaria وهذه تتميز أنها ليست انحلالية وبالتالي فليس من المرجح أنها سامة. هذه الببتيدات غير المحتوية على الليستين هي بطول 13-10 حمض أميني وأكثرها قوة هو Temporin A والذي له فعالية مضادة للفطور وفعالية مضادة للبكتريا. استخدم الشكل المحور من مورثة هذا الببتيد لتحوير البطاطا والذي يجعل تعبيره نباتات البطاطا مقاومة لمسببات مرضية عديدة تشمل العفن الطري البكتيري E. carotovora spp. Carotovora واللفحة المتأخرة للبطاطا P. infestans والتي تسبب خسائر تقدر بـ 4 بليون دولار سنويا وكذلك العفن

القرمزي Phytophthora erythroseptica الذي يسبب خسائر كبيرة بعد الحصاد. وطورت مقاومة فقط للمبيد الفطري الفعال Mefanoxam. وهناك أمثلة أخرى كثيرة عن مورثات لبروتينات مضادة للميكروبات تم ادخالها في النباتات مثل Ace-AMP1 في الورد وفي القمح. وكذلك الـ gallerimycin وهو بروتين فراشة تم تعبيره في التبغ و كذلك Esculentin-1 من Rana esculenta، أيضاً تم تعبيره في التبغ والتي كلها تحدث تغييرا في أنماط المقاومة في النبات العائل. تلقي هذه الأمثلة المذكورة أعلاه الضوء على استخدام البروتينات المضادة للميكروبات التي تتفاعل بشكل مباشر مع المسببات المرضية وتوقف العدوى (*et al*, 2008 Salter).

2.2 .10. تعديلات أخرى:

تم إجراء تعديلات أخرى على هذه البروتوكولات من أجل زيادة كفاءة التعديل الوراثي . شملت هذه التعديلات استخدام:

- مركبات فينولية نباتية (أسيتوسيرينغونacetosyringone، بيتين فوسفات betaine phosphate) لزيادة التعبير عن عدة مورثات شرسة (معدية) في العديد من أنواع بكتريا التدرن التاجي (أغروباكتريا) A . tumefaciens .
- مادة التهليم /التبلور،
- مصدر النيتروجين،
- تركيز نترات الفضة AgNO3 (Seong *et al*, 2005)
- الناقل الثنائي

نشر *et al* Hammerschlag (2000) عن إنتاج تفاح معدل وراثياً خالي من الآغروباكتريوم عن طريق فلترة بالتفريغ للمستزرعات الملقحة بالأغروبكتريوم بوسط حامضي مع تركيز مرتفع من المضادات الحيوية (500 ملغرام/ليتر كاربنسيللين وسيفوتاكسيم وسيفوكزينتين). الطريقة الأخرى لتجنب التلوث بالأغروباكتيريوم هي غمر الأوراق بعد خدشها باللقاح لفترة قصيرة. فقد استخدم *et al* Zhu (2005) الغمر المؤقت بالمفاعل الحيوي temporary immersion bioreactor (TIB) كجزء من إكثار أصل التفاح M.26. ويمكن أيضاً أن تستخدم هذه الطريقة لتحوير التفاح (Aldwinckle and Malnoy, 2009; Polanco *et al*, 2010).

3.2. تطبيقات التعديل الوراثي من أجل التحسين الوراثي للتفاح:

أظهر التقرير الأول عن نباتات التفاح المعدلة وراثياً في عام James (1989 *et al*,a,b) تطبيقاً واعداً لإنتاج أصناف تفاح جديدة من شأنها أن تكون متفوقة في المذاق وصحية وأسهل زراعياً. على الرغم من أنه قد تم حالياً إدخال العديد من الصفات المختلفة بنجاح في التفاح

(Aldwinckle and Malnoy, 2009). لم تدخل بعد أصناف التفاح المعدلة وراثياً في مرحلة الإنتاج التجاري. معظم التقارير المنشورة سابقاً عن التعديل الوراثي للتفاح تصف تجارب إثبات مفهوم ينطوي على وضع بروتوكولات التجديد، واختيار المورثة المحفزة المناسبة ومورثات الانتخاب الملائمة. لكن، ثمة مشكلة رئيسية لتطوير التفاح المعدل وراثياً تتجلى في استخدام المورثة nptII كمورثة انتخاب للمضاد الحيوي كانامايسين (والتي من المتصور أن تنتقل أفقياً إلى البشر بعد تناول الغذاء المعدل وراثياً)، وهي لا تزال تستخدم على نطاق واسع. مؤخراً، بدأ بعض الباحثين تطوير بدائل تتمثل باستخدام واسمات غير معتمدة على الانتخاب بوساطة مورثات المقاومة للمضادات الحيوية (Flachowsky *et al*, 2004) مثل استخدام المورثة فوسفومانو ايزميريز (Zhu *et al* ,2004; Degenhardt, 2006) أو بدون استخدام أي مورثات انتخاب (Malnoy *et al*, 2007b). مؤخراً انتقل التركيز إلى الاختبارات الوظيفية للصفات ذات الفوائد التجارية المحتملة. ويمكن تصنيف هذه الصفات إلى فئتين :الصفات الإنتاجية والصفات المرغوبة من قبل المستهلك. تشمل الصفات الإنتاجية: المقاومة للأمراض البكتيرية (التدرن التاجي، اللفحة النارية) والفطرية (مثل: جرب التفاح والبياض الدقيقي...) ومقاومة الحشرات والآفات الأخرى، والتقزم (أصناف/ أصول مقصرة)، ومقاومة مبيدات الأعشاب والإكثار ومقاومة الإجهادات البيئية/ اللاحيوية (درجات الحرارة العالية والمنخفضة، الجفاف والبرودة، تحمل نقص الحديد، إجهاد الزنك)، موعد الإزهار والنضج المبكر، وطول فترة التخزين والخصوبة الذاتية. أما عن الأمثلة للصفات المرغوبة من قبل المستهلك فتشمل: الخصائص الصحية المميزة، وتحسين النكهة والطعم الجيد، وتغيير اللون وتعديل الاستقلاب (التمثيل الغذائي) وانخفاض اسمرار الثمرة بعد تقطيعها، وتقليل الحساسية وغيرها Aldwinckle, and (Malnoy, 2009). في هذا القسم، سنقوم بشرح بعض الأمثلة على استخدام التفاح المعدل وراثياً لتحسين مقاومته لأهم الأمراض البكتيرية والفطرية.

يبين **جدول 4** أمثلة عن المورثات المعبرة في التفاح بهدف تحسين مقاومته للأمراض البكتيرية والفطرية .

جدول 4. الصفات الخاصة بمقاومة الأمراض المعبرة في التفاح المعدل وراثياً

References المراجع	Principal results النتائج الرئيسية	Promoter المحفز	Gene origin مصدر المورثة	Gene introduced المورثة المدخلة	Apple cv. الصنف	Trait الصفة
المقاومة للأمراض البكتيرية Bacterial resistance						
243	لوحظ اسكات (فقدان تعبير المورثة) مورثة iaaM.	CaMV35S FMV	A.tumefaciens	iaaM and ipt (اسكات)	Jonagold	Agrobacterium tumefaciens

بكتريا التدرن التاجي					ولوحظ انخفاض وإلغاء تشكل الدرنات الجذرية Silencing of iaaM gene expression was observed. Reduction. Also, abolition of Crown Gall formation was observed.	
Erwinina (fire blight) مرض اللفحة النارية	Gala	SB37(+/_sp) Shiva 1 (-sp)	Synthetic peptide	Pin2 CaMV35S	بعض سلالات SB-37 معدلة وراثيا ذات مقاومة جزئية زرعت في الحقل Some SB-37 transgenic lines with partial resistance cultivated in the orchard.	4, 171
	Royal Gala	MB39(+sp)	Modified cecropin	Osmotin يحرض بالجرح	أظهرت 3 من أصل 7 سلالات معدلة لزيادة مقاومة في البيت الزجاجي (مقاومة أكثر بمعدل 205 إلى303 أضعاف الشاهد 3 of 7 transgenic lines showed an increase in resistance in greenhouse (2.5 to 3.3 fold more resistance than the control).	140, 139
	M.26	Attacin E	Hyloho ra	Pin 2 CaMV35S	أظهرت بعض السلالات	173, 126, 5, 4

	المعدلة مقاومة جزئية في البيت الزجاجي وفي الحقل. وزادت المقاومة عند استخدام ببتيد إشارة ومعزز الترجمة (AMV) Some transgenic lines showed partial resistance in greenhouse and in the orchard. Increased resistance when signal peptide and translation enhancer (AMV) were used.		ceropia (فراشة الحرير العملاقة) (giant silk moth)			
92	أظهرت بعض السلالات المعدلة مقاومة جزئية في البيت الزجاجي Some transgenic lines showed partial resistance in greenhouse.	Pin2 CaMV35S	Hyalophora cecropia (فراشة الحرير العملاقة) T4 Bacteriophage	Attacin E (-sp) T4 Lysozyme	Pinova, Pilot, Pirol, Pingo Elstar, Remo Liberty, Reka	
5,4, 127, 125	اظهرت بعض السلالات مقاومة جزئية في البيت الزجاجي. لم يكن هناك زيادة في المقاومة عند ترافقت هذه المورثة مع مورثة attacin Some transgenic lines showed partial resistance in greenhouse. No increase in resistance when this gene was combined with attacin gene	Pin2 (attacin E) CaMV35S (T4ly)	T4 Bacteriophage Hyalophora cecropia	T4 Lysozyme لوحدها أو مترافقة مع attacin E	Gala	
78	اظهرت 7 سلالات من اصل 33 مرض أقل من الانماط الوراثية غير المعدلة وراثيا في لبيت الزجاجي لكن هذا الفرق لم يكن معنويا باستثناء سلالة واحدة.. 7 of 33 lines show less disease than the non transformed genotype in greenhouse, but this difference was not statistically different, except for one line.	CAMV 35S	phage□ □Ea1h	Dpo	Pinova	

27	زيادة المقاومة للفحة النارية. لوحظت مقاومة أعلى عند تحكم المحفز caMV35s بالمورثة Dpo Increased resistance to fire blight. Higher resistance observed when the Dpo gene was driven by CaMV35S promote	CAMV 35S Gst1			M.26	
2,1, 4	امتلكت معظم السلالات المعدلة مقاومة جزئية للفحة النارية في البيت الزجاجي وفي الحقل. أظهر اثنان من هذه السلالات مستوى مقاومة مماثل لمقاومة الأصل M7. Most of the transgenic lines had partial resistance to E. amylovora in greenhouse and in the field. Two of these lines showed a level of resistance similar to the resistant rootstock M.7	Gst1 (يتحرض بالجروح)	Eriwinia amylovora	HrPN	**M.26**	
146	انخفاض كبير في الإصابة باللفحة النارية بمقدار 33–86% في الصنف غالاكسي. أظهر M26 انخفاض أقل بكثير مقارنة بالصنف غالاكسي (0 إلى 70%. Significant reduction in susceptibility to E. amylovora of 33-86% for Galaxy; M.26 showed a less substantial reduction in susceptibility compared to Galaxy (0 to 70%)	Pin2 CaMV35S	Apple	MpNPR1	**Galaxy M26**	
28	أظهرت بعض السلالات المعدلة عدم تعبير عن المورثة DIPM وزيادة في المقاومة للفحة النارية Some transgenic lines showed silencing of the DIPM genes and an increase in resistance to E. amylovora	CaMV35S	Apple	DIPM 4(اسكات مورثات مختلفة)	**Galaxy**	
المقاومة للأمراض الفطرية Fungal resistance						

59	اثبت التعديل الوراثي الناجح لتحسين الطعم والمقاومة للأمراض النباتية للصنف بال بي سي آر وتعبير المورثة بلطخة ويسترن . تعديل بمذاق الأوراق بالسلالات المهندسة. The successful transformation to improve taste and phytopathogen resistance was confirmed by PCR analysis and its expression by Western blotting. Leaves from transgenic lines demonstrated taste modification.	CaMv35S	Thaumatococcus daniell(plant)	Thaumatin	Melba	Fungal resistance Altenaria mai
24, 23	لوحظت علاقة ارتباط سلبية بين نمو السلالات المعدلة والاندوكيتينيز وكانت 6 من أصل 8 سلالات مهندسة أكثر مقاومة من الشاهد . انخفضت شدة المرض بمقدار0 إلى 99.7% (عدد الآفات) والى 90% (% من مساحة الورقة المصابة). كان الكيتينيز الخارجي أقل فعالية من الاندوكيتينيز الداخلي . بعض النباتات المعبرة كلا المورثتين كانت أكثر فعالية من النباتات المعبرة عن أي من المورثتين لوحدها Negative correlation between growth of transgenic lines and endochitinase activity was observed. 6 of 8 transgenic lines	2CaMV35S	Trchoderma atroviride (fungus)	Endochitinase	Mcintosh	Venturia inaequalis (جرب التفاح)

	expressing endochitinase were more resistant than control. Disease severity was reduced by 0 to 99.7% (number of lesions) and 0 to 90% (% of leaf area infected). Exochitinase was less effective than endochitinase. Some plants expressing both genes were more resistant than plants expressing either single gene					
71	لوحظت علاقة ارتباط سلبية بين نمو السلالات المعدلة ونشاط الاندوكيتينيز. ويبدو أن انخفاض النمو مترافق مع محتوى مرتفع من اللغنين وفعالية والبيروكسيداز والغلوكونيز. أبدت كل السلالات ذات الفعالية المرتفعة من الاندوكيتينيز انخفاض كبير في أعراض الجرب. Negative correlation between growth of transgenic lines and endochitinase activity was observed. Reduced growth appeared to be associated with high lignin content, peroxidase and glucanase activity. All the lines with high endochitinase activity exhibited significant reduction of scab symptoms.	2CaMV 35S	Trichoderma atroviride	Endohitinase (ech42) Exochitinase (nag 70)	Ariane Galaxy	
47	اظهر الطرد المعبر عن المورثة Rs-AFP2 فعالية مضادة للفطريات بمقدار 8 الى 32 ضعف مقارنة بالشاهد. أظهر الطرد المعبر عن المورثة Ace-AMP1 فعالية مضادة للفطريات زيادة بمقدار 4 أضعاف مقارنة بالنباتات الشاهد. Rs-AFP2 expressing shoot showed 8 to 32 fold antifungal activity compared to	CaMV35S	Onion بصل Radish فجل	Ace-AMP1 Rs-AFP2	Jonagold	

	the control. Ace-AMP1 expressing shoot showed 4 fold increased antifungal activity relative to control plants					
30	Ndغير محدد	CaMV35S	Nd	Ai-AMP	Jonagold	
115	نقص في تطور اعراض الجرب Decrease in scab symptom development	CaMV35S	Barley	hordothionin	Golden Delicious, Gala, Elstar	
70	انخفاض باعراض الإصابة بالجرب في الصنف غالاكسي (55% بأحسن السلالات المعدلة وراثياً) وفي الصنف آريان (64%) بعد التلقيح بعترة الجرب 6 . لم يلاحظ زيادة في المقاومة في سلالات غالاكسي المعدلة بعد إجراء العدوى بسلالة الجرب1. Reduction of symptoms in transgenic Galaxy (55% for best lines) and in Ariane (64%) after inoculation with the apple scab race 6. No increase in resistance was observed in the transgenic Galaxy lines after inoculation with the apple scab race 1	CaMV35S	Wheat	Puroindoline-b	Ariane Galaxy	
15, 18, 19, 217, 218	تمنح المورثة Hcrvj2 مقاومة للجرب في الصنف الحساس غالا. المقاومة المكتسبة خاصة بالسلالة (العترة). Hcrvf2 confers scab resistance to the susceptible apple cultivar Gala Acquired resistance is race-specific.	CaMV35S	Apple	HcrVf2	Gala	
149	أظهرت السلالات المعدلة	Their	Apple	Vfa1, Vfa2	Galax	

	y McIntosh	and Vfa4		own native promoter	المعبرة المورثة Vfa1 أو المورثة Vfa2 زيادة كبيرة في المقاومة لجرب التفاح. وكانت السلالات المعدلة المعبرة المورثة Vfa4 مثل أو أكثر حساسية للجرب من الشاهد . Transgenic lines expressing either Vfa1 or Vfa2 showed a significant increase in resistance to Venturia inaequalis. Transgenic lines expressing Vfa4 gene were as, or more susceptible than control	
	Gala	HcrVf Hcrv2	Apple	rubisco	تم عزل مورثات HcrVf من التفاح وتطوير نباتات تفاح Cisgenic معدلة وراثيا (بمورثات من التفاح). HcrVf genes were isolated from apple and introduced to apple producing cisgenic plants.	116,236

حسب Malony و Aldwinckle .(Aldwinckle and Malnoy 2009) و مع إضافة بعض المراجع

1.3.2. مقاومة الأمراض البكتيرية والفطرية:

1.1.3.2. الأمراض البكتيرية

1.1.1.3.2. مرض اللفحة النارية البكتيري:

كانت اللفحة النارية أول وربما أهم صفة مستهدفة في التعديل الوراثي للتفاح، والتي كان رائدها مجموعة جامعة كورنيل بقيادة البروفسور.Herb S. Aldwinckle فقد تم إدخال عدد كبير من المورثات في التفاح لتحسين مقاومتها للبكتيريا المسببة لمرض اللفحة النارية البكتيري Erwinia amylovora بدرجات متفاوتة من النجاح (جدول 3). وقد استخدمت لذلك ثلاث استراتيجيات مختلفة: إنتاج البروتينات المضادة للممرضات، مما يعوق العوامل المرضية البكتيرية، وتثبيط أو التعبير المفرط overexpression للمورثات ذات الصلة بالدفاع. وقد استخدمت المورثات Attacin E، cecropin وLayzozim وهي ثلاث مورثات مضادة للميكروبات متميزة

استخدمت لزيادة المقاومة لمرض اللفحة النارية (جدول 3). وذكر عدد من الباحثين زيادة المقاومة، في التجارب الإختبارية في البيوت الزجاجية لمرض اللفحة النارية في أصناف التفاح المختلفة المعبرة عن هذه المورثات

(Hanke *et al* ,2000;2002, Ko *et al*, 2000; 2002; Liu *et al*, 2001, Norelli *et al*, 1994;,1999). ومع ذلك، تم الحصول على أفضل النتائج بالمورثة attacin E. أبدت إحدى الكلونات المعدلة وراثياً عدوى بنسبة 5% فقط باللفحة مقارنة مع ما يقرب من 60 % في تفاح رويال غالا كنبات شاهد غير محور وراثياً في التجارب الحقلية (Norelli *et al*, 1999a; 1999b; 2000). وقد قدمت مجموعة جامعة كورنيل لمحة موجزة عن التجارب الحقلية لهذه الكلونات المعدلة وراثياً بهذه المورثات المختلفة المحللة للبروتينات. حيث أظهرت هذه الدراسات أن نقل المورثة attacinE الأساسية والمورثة SB-37 الاصطناعية من العثة saturniid moth (Hyalophora cecropia) ومورثات التحلل الليزوزيم lysozyme من السائل الأبيض لبيضة الدجاج وT4 فاج البكتيريا، كلها عززت المقاومة بدرجات متفاوتة (Aldwinckle *et al*,1999). وقد بدأ العمل بطرائق مماثلة لاستخدام تربية الفاكهة في معهد دريسدن Dresden Pillnitz، ألمانيا، حيث طور الباحثون هناك سلالات معدلة وراثياً من التفاح المحور بمورثة الليزوزيم، من T4 فاج البكتيريا، و/أو attacniE. لكن مع ذلك، تتركز الجهود في هذا البرنامج على الآثار اللاحقة للعدوى بمرض اللفحة النارية البكتيري (Ko *et al*, 2000).

الإستراتيجية الثانية المستخدمة لتحسين مقاومة اللفحة النارية هو عن طريق تثبيط العوامل البكتيرية الممرضة. تلعب السكريات المتعددة خارج الخلية (EPS) التي تنتجها بكتريا اللفحة النارية E. amylovora دوراً في الإمراضية البكتيرية، وبقاء البكتريا على قيد الحياة، وكذلك في الالتصاق بالعائل وامتصاص العناصر الغذائية، وتجنب الكشف من المضيف. فقد تم ادخال المورثة بوليميراز المتعددة السكريات depolymerase (DPO) من فاج E. amylovora EA1 والتي يتحكم بها محفزات مختلفة، على سبيل المثال CaMV35S أو Gst1 في أصول التفاح JTEH و M.26 والى الصنف Pinova(Borejsza-Wysocka *et al*, 2007; Flachowsky *et al*, 2008; Sul *et al*, 2002) (الجدول 3). في التقارير الأولى، كانت 4 من أصل 5 نباتات معدلة وراثياً مقاومة تماماً للفحة النارية (Sul *et al*, 2002). وقد تأكدت هذه النتائج فقد أظهرت النتائج أن 7 سلالات من أصل 33 سلالة تفاح Pinova معدلة وراثياً أظهرت أقل قابلية إصابة باللفحة النارية مقارنة بالنبات الأم الشاهد Pinova، ولكن لم يلاحظ أي فرق إحصائي باستثناء سلالة واحدة معدلة وراثياً (Hanke *et al*, 2003). ومع ذلك، لوحظت مقاومة أكبر لمرض اللفحة النارية عندما تم دمج المورثة DPO إلى الببتيد الاشاري

تحت تحكم المحفز القابل للتحريض بالمسبب المرضي gst1 بدلا من المحفز CaMV35S (Borejsza-Wysocka *et al*, 2007). خلال عملية العدوى يفرز المسبب المرضي مركبات تحفز مجموعة من استجابات الدفاع في النبات العائل والتي تحدث بمعدلات مختلفة. وقد حاول الباحثون حث استجابات الدفاع في النبات عن طريق إدخال محرضات elicitors أو من خلال تسريع استجابة الدفاع بمحفزات مختلفة. البروتين الفعال harpin N من بكتريا اللفحة النارية .E amylovora ، قادر على حماية جزئية ضد العدوى اللاحقة بالبكتريا E. amylovora عندما يرش على الأزهار ربما عن طريق تحفيز استجابة المقاومة الجهازية المكتسبة (SAR). لذلك، تم إدخال المورثة المرمزة لـ harpin N في أصل التفاح 'M.26' تحت سيطرة إما المورثة nos الضعيفة دائمة التعبير أو المحفز gst1 الذي يحرض بالعامل الممرض(Abdul-Kader *et al*,1999). حيث أظهرت نتائج عامين من الاختبار في الحقل للنباتات ذات الجذور الذاتية من الكلونات clones المعدلة وراثياً من الأصل 'M.26' التي تحتوي على المورثة harpinN مع المحفز gst1، إنخفاضاً كبيراً في التعرض للإصابة باللفحة النارية. وأظهر كلونان(سلالتين) منها مستوى مقاومة يعادل مستوى مقاومة أصل التفاح M.7، وهو أصل مقاوم للفحة النارية. ويمكن لهذه السلالات المعدلة وراثياً أن تساعد أيضاً في تعزيز فهم أفضل لدور harpinNEa في تحريض المقاومة للفحة النارية في الكلونات(النسخ)(السلالات) المعدلة وراثياً. سيكون من المثير للإهتمام أيضاً أن ننظر إلى سلوكها في استجابتها للممرضات الأخرى في التفاح.

في كل من الطرائق المذكورة أعلاه الهادفة إلى ايجاد نباتات مقاومة لمرض اللفحة النارية، عهد بتحريض المقاومة لمورثة ليست معزولة من التفاح. إضافة الى أن E. amylovora harpin N تنتج البروتين المستجيب للمسبب المرضي dspE، الذي يتفاعل بشكل مباشر مع أربع تكرارات غنية باللايسن (LRR) شبيهة بانزيمات الكيناز سيرين/ثريونين الشبيهة بالمستقبلات (DIPMs). إذا لم يحدث هذا التفاعل فان بكتريا اللفحة النارية لا تكون قادرة على إصابة المضيف. بهدف تثبيط تاثير المورثات DIPM ومنع التفاعل المسبب للمرض مع DspE، تم ادخال 400 زوج من النيوكلوتيدات بالاتجاه الصحيح المشفر للدنا من المناطق المتغيرة (non conserved) من كل مورثة، مع التماثل بين بعضها البعض بنسبة أقل من 50 % أدخلت في جينوم صنف التفاح "غالاكسي" (Borejsza-Wysocka *et al*, 2006). بالإضافة إلى ذلك، تم ادخال ثلاثة تراكيب تحتوي على أربعة تسلسلات من 400 زوج من النيوكلوتيدات جنباً إلى جنب، تسلسل كامل بالاتجاه الصحيح بمقدار طول مورثة واحدة، وتسلسل مورثة الهربين أيضاً أدخلت في التفاح غالاكسي. وقد أظهرت اختبارات تفاعل البوليمريز المتسلسل العكسي RT-PCR للنباتات المعدلة وراثياً لتعبير نسخ الـ رنا للمورثة المستهدفة DIPMs دليلاً على إسكات على مستوى messenger RNA في بعض السلالات. كما تم تقييم بعض السلالات المعدلة

وراثياً لمقاومة مرض اللفحة النارية بتلقيح الطرود الخضرية لنباتات في أصص على جذورها الذاتية بالسلالة الفتاكة Ea 273 من E. Amylovora. وتشير النتائج الأولية إلى أن بعض السلالات زادت المقاومة لديها (Borejsza-Wysocka *et al*, 2006). باستخدام الطريقة نفسها المستخدمة لتعريف البروتين DIPM، تم التعرف على البروتين الذي يتفاعل مع العامل المحرض للـ harpin من E. amylovora (Oh and Beer, 2007). هذا البروتين الصغير (60 Da) لديه ببتيد إشارة وظيفية ويرتبط مع أغشية البلازما النباتية. بهدف إسكات (تعطيل عمل) المورثات التي ترمز للبروتين harpin NEa الذي يتفاعل مع بروتين التفاح (HIPM)، تم ادخال مركب رنا المتداخل RNAi يحتوي على كامل طول هذه المورثة في صنف التفاح غالاكسي. وأظهرت النتائج الأولية مقاومة جزئية لمرض اللفحة النارية (Aldwinckle and Malnoy, 2009).

واعتمدت طريقة أخرى على التعبير المفرط لمنظم رئيسي للاستجابة للمرض النباتي. المورث المتعلق بالمسبب المرضي PR (NPR1) غير المعبر هو وسيط رئيسي للمقاومة الجهازية المكتسبة. تم إدخال نسخة إضافية من مطابق ortholog (مورث نشأ بين أنواع متباعدة) التفاح، MpNPR1، في الصنف غالاكسي والأصل M.26 (Malnoy *et al* , 2007b). تم إجراء العدوى ببكتريا اللفحة النارية E. amylovora لسلالات غالاكسي المعدلة وراثياً في ظروف غرفة النمو حيث تلوثت 17.5-35.5 من طول الطرود الخضرية بالعدوى مقارنة بـ 80% في النباتات الشاهد. بالإضافة إلى ذلك، كان هناك زيادة بالمقاومة لاثنين من مسببات الأمراض الأخرى هما جرب التفاح Venturia inaequalis وصدأ التفاح الأرزي Gymnosporangium juniper virginianae (Malnoy *et al*, 2007a). إن زيادة المقاومة واسعة الطيف التي ينتجها إدخال نسخة إضافية من مورثة مصدرها من داخل التفاح، يجعل استخدام MpNPR1 (واستراتيجيات مماثلة) جذابة للغاية، حيث أن جميع مورثات المقاومة الأخرى المستخدمة سابقاً كانت من منشأ فيروسي أو بكتيري أو فطرية أو من أصل حيواني.

2.1.1.3.2. <u>مرض التدرن التاجي البكتيري</u>:

التدرن التاجي مشكلة مهمة في القطاع الزراعي في جميع أنحاء العالم. بكتريا التدرن التاجي هي بكتيريا فريدة تعيش في التربة في كل مكان، تحول خلايا النبات وراثياً لتنمو كأورام، لذا، وبعد بضع ساعات من الإصابة بالبكتريا سوف يستمر تقدم المرض حتى ولو تم قتل البكتيريا المسببة للورم بالمضادات الحيوية. وبالتالي، فإن الوقاية هي الطريقة الوحيدة الفعالة للسيطرة على التدرن التاجي. ينتج تشكل الأورام على الساق والأوراق من الإنتاج المفرط للهرمونات النباتية من أوكسين وسيتوكينين في الخلايا النباتية بواسطة بكتريا التدرن التاجي المسببة للورم. تنجم

مستويات الهرمونات النباتية العالية عن تعبير ثلاث مورثات مسرطنة تنقل بشكل ثابت الى جينوم النبات من بكتريا التدرن التاجي هي:aaM و iaaH و ipt. توجه المورثتان المسرطنتان iaaM و iaaH التصنيع الحيوي للأوكسين وتسبب المورثة ipt إنتاج السيتوكينين. وعلى النقيض من الأنسجة الأخرى، فان الجذور لا تستجيب لمستويات السيتوكينين المرتفعة، والإفراط في إنتاج الأوكسين يكفي ليسبب نمو الورم على الجذور. ألغى تعطيل المورثة iaaM تشكيل الأورام على جذور شجرة التفاح. ومنعت المورثات المنقولة المصممة للتعبير عن RNA المزدوج السلسلة من تسلسلات المورثتان iaaM وIPT في صنف التفاح Jonagold مرض التدرن التاجي على جذور أشجار التفاح المعدلة وراثياً (Viss *et al*, 2003). وبالتالي، يوفر إسكات المورثة المسرطنة iaaM في بكتريا التدرن التاجي وسيلة فعالة للوقاية من مرض التدرن التاجي في النباتات المعمرة مثل أشجار التفاح (Salter *et al*, 2008)

2.1.3.2. الأمراض الفطرية:

1.2.1.3.2. مرض جرب التفاح:

جرب التفاح الذي يسببه الفطر الزقي Venturia. inaequalis (Cke.) هو أهم مرض فطري يصيب التفاح في معظم مناطق زراعة التفاح التي تكون فيها أمطار كثيرة في الربيع والصيف. التحكم بهذا المرض في البساتين التجارية يمكن أن يتطلب ما يصل إلى1 –15 رشة أو أكثر من المبيدات الفطرية سنوياً. ومع ذلك، بسبب تزايد مقاومة الفطريات داخل الممرض، فإن استخدام مبيدات فطريات محددة حديثة يجب أن تكون محدودة و/أو متناوبة بشكل دقيق ومدروس. الطريقة البديلة هي زراعة أصناف مقاومة والتي تستخدم مورثات مقاومة للجرب من الأنواع البرية (معظمها صغيرة الثمار). ومع ذلك، فإن إنتاج أصناف مقاومة عالية الجودة من خلال التربية التقليدية صعب لأن مرحلة اليفاعة والدخول في طور الإثمار طويلة وبسبب عدم التوافق الذاتي في التفاح. لهذا وبدءاً من النوع البري821 *M. floribunda* والذي يحمل المورثة Vf لمقاومة جرب التفاح، طور العديد من المربين أصناف مقاومة للجرب، ولكن القليل فقط حقق قدر من النجاح التجاري وذلك بسبب عدم الجودة العالية للثمار أو ضعف قدرتها التخزينية. يقدم النقل المباشر لمورثة المقاومة للجرب بديلا جديداً لتحسين الصنف. وقد حاول عدة باحثين تحسين مقاومة أصناف التفاح الحساسة للجرب (الجدول 3) مثل الصنف غالا وغالاكسي (Belfanti *et al*, 2004a, Belfanti *et al*, 2004b, Janse *et al* , 2002) وجوناغولد (Faize *et al*, 2003; 2004; Malnoy *et al*, 2008) وماكنتوش(Bolar *et al* , 2000; Malnoy e*t al*, 2008) أو أصناف مقاومة جزئياً مثل الصنف آريان (Faize *et al*, 2003; 2004) من خلال دمج مورثات مختلفة (De Bondt *et al*, 1999)

المصدر مضادة للفطريات(chitinases, Amp1, AFP2, puroindolin, or hordothionin) أو مطابق مورثة Vf. لقد بذلت جهود كبيرة منذ الثمانينات في أوروبا والولايات المتحدة، ونيوزيلندا لرسم خريطة مورثات مقاومة الجرب والبياض الدقيقي P. leucotricha الرئيسية. هذين المرضين الفطريين يحتلان موقع الصدارة إذا لم يكونا هدف كل تطبيقات الرش بالمبيدات الفطرية الضروري لإنتاج تفاح عالي الجودة. لكن من ناحية ثانية، حتى التسعينات عندما تم وضع طرائق جيدة للتعديل الوراثي للتفاح، لم يتم إدخال أي مورثة مقاومة من نبات التفاح. وتم التركيز على المورثات الغريبة، التي لها آثار سامة محتملة أو مثبطة لنمو الفطر المسبب للجرب وفطر البياض الدقيقي. وتشمل هذه الإستراتيجية استخدام المورثات من أنواع أخرى تشفر للكيتيناز chitinases وغلوكانيز glucanases، والمعزولة من فطر الترايكوديرما Trichoderma (المعروف جيدا كمبيد حيوي للأمراض الفطرية)، وتلك تشفر لأنزيمات التحلل بغمديات الجناح Lepidoptera وبعض الببتيدات المضادة للميكروبات (AMP) من الفاجات. ذكرت العديد من الدراسات أن التعبير الدائم (الجهازي) للأنزيمات المحللة للكيتين chitinolytic مثل endochitinase و chitobiosidase من فطر المكافحة الحيوية الترايكوديرما Trichoderma harzianum أظهرت فعالية مضادة للفطريات ويمكن أن يزيد من مقاومة العائل للجرب (Wong *et al*, 1999). في هذه الدراسة، كان اثنتان من أصل ثلاث سلالات تفاح رويال غالا المعدلة وراثياً بالمورثة endochitinase (ech42) أكثر مقاومة من الصنف رويال غالا غير المعدل وراثياً عندما رشت النموات المطعمة بالتطعيم المخبري الدقيق بلقاح عدوى الجرب. و في الوقت نفسه، نشر أيضاً التعديل الوراثي للصنف ماكنتوش بالمورثة ech42 والمورثة Nag70، والمورثة exochitinase المشفرة لـ N- أسيتيل β-D- جلوكوز، والمعزولة من فطر المكافحة البيولوجية T. harzianum (Bolar *et al*, 1999). امتلكت السلالات المعدلة وراثياً بكلا المورثتين (تعبير منخفض each42 وتعبير عالي Nag 70) مستواً عالياً من المقاومة للجرب واحتفظت بقوة نمو جيدة (Norelli *et al*, 2000). ينتج فطر المكافحة الحيوية الترايكوديرما Trichoderma atroviride (سابقا T. harzianum) العديد من الإنزيمات المحللة للكيتين، بما في ذلك اندوكيتينيز، الذي يحطم عشوائياً الكيتين وهو العنصر الرئيسي في جدار خلية الفطر. يثبط اندوكيتينيز الترايكوديرما والذي تشفره المورثة *ech42* إنبات الأبواغ واستطالة الهيفا. وتم الحصول على عدة سلالات من صنف التفاح ماكنتوش الحساس للجرب مع مستويات متفاوتة من تعبير المورثة *ech42*. حيث أظهرت بعض السلالات المعدلة وراثياً زيادة في المقاومة للجرب. ومع ذلك، امتلكت السلالات المعدلة وراثياً التي فيها نشاط مرتفع للاندوكيتينيز قوة نمو منخفضة (Bolar *et al*, 2000). وقد لوحظت نتائج مماثلة أيضاً عندما تم إدخال المورثة ech42 في أصناف التفاح غالاكسي

وآريان. هذا الحد من النمو يبدو أنه يترافق مع محتوى اللجنين والبيروكسيداز وفعالية الغلوكانيز في السلالات المعدلة وراثياً (Faize *et al*, 2003). ربما يكون أكثر عمل طموح تم تنفيذه في أشجار الفاكهة هو بمورثة الكيتيناز. فقد تم إنتاج أشجار تفاح تعبر عن المورثة اكسوكيتيناز exochitinase و/أو اندو كيتيناز endochitinase معزولة من الفطر T. harizianum بالتعديل الوراثي بواسطة الأغروباكتريوم. حيث وجد ارتباط ايجابي بين المقاومة للجرب ومستوى تعبير البروتينات. وعند إدخال كلا المورثتين في النبات، عملت البروتينات تآزريا. لكن أحد العيوب كانت أن تعبير الاندوكيتيناز خفض نمو النبات. أحد الأسئلة الهامة التي ينبغي الإجابة عنها هو إلى متى ستستمر المقاومة؟ إن العامل السلبي الآخر لطريقة الكيتيناز هو أن معظم المسببات المرضية الريئيسة Oomycete مثل فيتوفثورا .Phytophthora spp لا تحتوي كيتين في جدرانها الخلوية. للتغلب على هذه الصعوبات، تم استخدام تجميع تركيبي من بروتينات خاصة بالمسببات المرضية وبروتينات أخرى مضادة للميكروبات. هذه استراتيجية معقولة على اية حال حيث أن استخدام أكثر من مورثة سيساعد على منع ظهور وتطور المقاومة ويوفر حماية لفترة أطول. واستخدم أيضاً الغلوكانيز وهي أحد مجموعات البروتينات الخاصة بالمسببات المرضية كطريقة لتعزيز المقاومة للعدوى الفطرية (Salter *et al*, 2008). تتفاعل الاندوكيتينيز من المورثة ech42 بالتآزر مع أنزيمات أخرى محللة للكيتين chitinolytic من T. atroviride مثل (exochitinase nag 70) N-acetyl-glucosaminidase. وأظهرت دراسة سلالات معدلة وراثياً من ثلاثة أصناف تفاح مختلفة معبرة للمورثة ech42 و nag 70 لوحدهما أو معاً جنباً إلى جنب تآزر بين هذه الإنزيمات في النبات. في الواقع، كانت السلالات المعدلة وراثياً المعبرة لهذه المورثات أكثر مقاومة من النباتات المعبرة لأي من الأنزيمين لوحده في المستوى نفسه (Bolar *et al* ,2001 Faize *et al*, 2003). ولوحظ وجود زيادة كبيرة في مقاومة فطر الجرب أيضاً عند تعبير مورثات أخرى مضادة للفطريات. تم تعبير المورثة puroindolin B، وهي عضو من بروتينات نقل الدهون النباتية plant lipid transfer proteins (LTPs)، في صنف التفاح أريان، وهو صنف مقاوم للعترات 5-1 من سلالات فطر الجرب وحساس للعترات 6 و 7، وكذلك في الصنف غالاكسي والذي هو حساس وعرضة للإصابة بجميع عترات فطر الجرب. بعد العدوى والتلقيح بالعترة 6 من عترات الفطر V. inaequalis، انخفضت الأعراض بمقدار 55% و 64% في السلالات المعدلة وراثياً الأكثر مقاومة من الصنفين غالاكسي وأريان على التوالي (Faiz *et al*, 2004). وقد أظهرت النتائج الأولية أن المورثة hordothionin (Janse, *et al*, 2002) والمورثة Ace-AMP1 و Rs-AFP2 (De Bondt *et al*, 1999) لديها القدرة على زيادة مقاومة التفاح للفطر المسبب لجرب التفاح. تم تحديد الموقع الوراثي لمورثة الجرب Vf على الصبغي في التفاح البري، *M.*

floribunda 821، وتم إدخاله على نطاق واسع في أصناف التفاح المعرضة للإصابة. وقد تم تحديد مجموعة من أربع تسلسلات شبيهة بالمستقبلات في موقع المورثة Vf، التي تشبه مورثات المقاومة Cf في البندورة (Xu and Korban , 2002 ;Vinatzer *et al* , 2001. ثلاث منها رمز لها بـ Vfa1، Vfa2 و Vfa4، لها إطار قراءة مفتوح كامل (Open Reading Frame (ORFs، في حين أن المورثة الرابعة Vfa3، ناقصة (غير مكتملة أو مقتطع منها truncated وهي من الواضح أنها مورثة كاذبة (غير حقيقية pseudogene). وقد لوحظ تعبير تفاضلي بين مطابقات المورثة Vf الأربعة خلال تطور ونمو الورقة، إذ يتم التعبير بشكل كبير عن المورثات Vfa1، Vfa2، و Vfa3 في الأوراق غير الناضجة، ولكن فقط يمكن كشفها بشكل طفيف في الأوراق الناضجة، في حين يتم التعبير عن المورثة Vfa4 في الأوراق غير الناضجة، ويعبر عنها بشكل كبير في الأوراق الناضجة (Xu and Korban , 2002). وقد أثبت أن التعبير المفرط للمورثة (Hcrvf2 = Vfa2)، تحت تحكم المحفز CaMV35S الذي يتم التعبير عنه بشكل دائم كانت كافية لتمنح المقاومة ضد جرب التفاح للأصناف الحساسة للإصابة (Aldwinckle and Malnoy 2009; Barbieri *et al*, 2003; Belfariti *et al* 2004a; 2004b) (Silfverberg-Dilworth *et al* , 2005a; 2005b). وقد أظهر أيضاً أن المورثة Vfa2 كافية لمنح مقاومة جزئية للجرب V. inaequalis في الأصناف غالاكسي وماكينتوش عندما يتم التعبير عنها تحت تحكم محفزها الخاص بها، وأيضاً أن المورثة Vfa1 قادرة على منح مقاومة جزئية لخليط من عترات الجرب (خليط من العترات 1- 5) (Malnoy *et al*, 2007b). أظهرت هذه الدراسات أن المورثتان Vfa1 و Vfa2 لهما دور في مقاومة جرب التفاح، في حين أن المورثة Vfa4 لا تشارك في المقاومة. في الواقع، كانت سلالات غالاكسي وماكينتوش المعدلة وراثياً والمعبر فيها المورثة Vfa4، حساسة أو أكثر عرضة للإصابة بالجرب من نباتات الشاهد (Malnoy *et al*, 2007b). سيكون من المثير للاهتمام تحوير أصناف التفاح الحساسة للجرب بالمورثتان Vfa1 و Vfa2 معاً جنباً إلى جنب، لتحديد تأثير التآزر بينهما في منح المقاومة للجرب. كما سيكون من المفيد دراسة خصوصية السلالات المختلفة للجرب في سلالات الصنفين غالاكسي وماكينتوش المعدلة وراثياً والتي تعبر المورثتان Vfa1 أو Vfa2. وقد حرض التعبير المفرط للمورثة Hcrvf2 في التفاح العديد من المورثات المرتبطة بالدفاع (Paris *et al*, 2009). كما طور تفاح مقاوم للجرب محور بمورثات مقاومة معزولة من التفاح (Van blaere , 2011; Joshi, 2010).

2.2.1.3.2. مرض البياض الدقيقي:

مرض خطير ينتشر في المناطق الرطبة معتدلة الحرارة يسببه الفطر *Podosphaera leucotricha*. مورثة المقاومة الرئيسية لهذا الفطر في التفاح هي المورثة Pl-2 من التفاح

البري *Malus zumi*، ولكن تبين مؤخرا أن المجاميع الفتاكة من الفطر تتغلب عليها. وقد أدى جمع المورثة Pl-2 مع مورثات مقاومة كمية إلى زيادة مستوى المقاومة للمرض (Caffier and Parisi , 2007). وتجدر الإشارة أيضاً إلى أنه قد نشر عن زيادة المقاومة في التفاح لاثنين من الأمراض الأخرى غير الجرب والبياض الدقيقي هما مرض التدرن التاجي البكتيري وتبقع الترناريا الفطري (الجدول 3).

2.3.2. مقاومة الحشرات:

تمت دراسة زيادة المقاومة في صنف التفاح رويال غالا لحشرة فراشة ثمار التفاح البنية الفاتحة بواسطة التعديل الوراثي(Maheswaran *et al*, 2007; Markwick *et al*, 2003). فراشة ثمار التفاح ذات اللون البني الفاتح (LBAM، Epiphyas postvittana)، هي آفة خطيرة لثمار التفاحيات ولثمار الفاكهة ذات النواة الحجرية (اللوزيات) والعديد من المحاصيل البستانية الأخرى، بما في ذلك العنب والحمضيات وفاكهة الكيوي وثمار التوت والأفوكادو وبعض محاصيل الخضر والزهور في نيوزيلندا. وتم إنتاج سلالات تفاح صنف رويال غالا معدلة وراثياً تعبر فيها المورثة أفيدين avidin أو المورثة ستريبافيدين strepavidin (Markwick *et al*, 2003). أظهرت اختبارات الإدمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (إليزا ELISA) أن تعبير أفيدين تراوح بين 1.9-11.2 M وتعبير streptavidin تراوح بين 0.4- 6.14 M بالتعبير عنها بهذه المستويات، فان كلاً من البروتينات المرتبطة بالبيوتين منحت مستواً عالياً من المقاومة للحشرة في نباتات التفاح المعدلة وراثياً ضد يرقة فراشة ثمار التفاح. وكان معدل الوفيات من يرقات هذه الفراشة أعلى بكثير ($P < 0.05$) على ثلاثة سلالات معبر فيها مورثة أفيدين (89.6، 84.9 و 80.1%) واثنين معبر فيها مورثة streptavidin (90 و 82.5%) من سلالات التفاح مقارنة بالشاهد غير المحور (14.1%) بعد21 يوماً. كما تم تخفيض وزن يرقات فراشة ثمار التفاح بشكل كبير عن طريق التغذية على طرود التفاح الخضرية المعبر فيها عن المورثة أفيدين وعلى الطرود المعبر فيها المورثة streptavidin عند مستويات 3.8 M وأعلى (Markwick *et al*, 2003). وفي الصنف رويال غالا نفسه أيضاً ولكن المحور بمورثة مثبط البروتينيز Proteinase inhibitor من Nicotiana alata تحت تحكم المحفز 35s و Ribuloase-1,5-biphosphate carboxylas، امتلكت فراشة التفاح البنية الفاتحة (Epiphyas. postvittana) التي تغذت على التفاح المعدل وراثياً وزن جسم منخفض بشكل كبير بعد 7 أيام والشرانق الأنثى كانت أصغر بنسبة 19-28% من الشاهد. بالإضافة الى ذلك، لوحظت تغيرات مورفولوجية مثل إتصال غلاف الشرنقة بالأجنحة وأجنحة مشوهة، شكل جسم مشوه وغلاف الشرنقة وأجنحة مجعدة متصلة بالجسم في الحشرات البالغة وفي اليرقات المغذاة

بأوراق التفاح المعدل وراثياًالمعبر عن المورثة PI عند المقارنة مع اليرقات المغذاة على أوراق التفاح غير المحور (Maheswaran *et al*,2007).

3.3.2. التقزم (قصر طول الشجرة) والقدرة على التجذير:

التقزم هو أيضاً صفة رئيسية استهدفت في التعديل الوراثي للتفاح. تعتمد النباتات المكاثرة خضرياً على القدرة العالية على التجذير أو يجب أن تكون مطعمة على أصول. إن الأصل المستخدم لتطعيم الصنف المرغوب عليه لا بد أن يحوي إلى جانب خصائص نموه المميزة القدرة على إعطاء الحجم المطلوب للشجرة، مع قدرة تجذير جيدة. يتم اكثار أصول التفاح بواسطة ترقيد الخلفات ونادراً بتجذير العقل وهو ضعيف في معظم الأصول، حتى مع استخدام الأوكسين. تم توصيف المورثات المحرضة على التجذير (rolA, rolB, and rolC) في بكتريا التدرن الجذرية Agrobacterium rhizogenes والتي تسبب مرض الجذور الشعرية في العائل. وقد أجريت الأبحاث الرئيسية في التعديل الوراثي على أصول التفاح بالمورثات rol من قبل مجموعة Welander في قسم البساتين في الجامعة السويدية للعلوم الزراعية، Alnarp. تم تعبير المورثة rolB بنجاح في عدة أصول تفاح هي: M26 (Welander *et al* (1998 والأصل M.9 (Zhu *et al*, 2001b) والأصل Jork 9)Pawlicki-Jullian *et al* ,2002; (Sedira *et al*,2001;2005 وفي صنف التفاح فلورينا (Puhringer *et al* ,2000). وأظهرت أصول وأصناف التفاح المعدلة وراثياً الناتجة تحسين التجذير عموماً وزيادة في عدد الجذور بكل عقلة Pawlicki-Jullian *et al*,2002; Radchuck and) Korkhovoy .2005; Sedira *et al*,2001; Welander *et al*, 1998; Zhu *et al*, (2001b. لكن، من ناحية ثانية، انخفض النمو في بعض الأصول مقارنة بالشاهد (Zhu *et al*, 2001b; Vinatzer *et al* , 2004). على عكس ذلك، لم يبد الصنف فلورينا المعدل وراثياً أي اختلافات ظاهرية فينولوجية بعد عدة أشهر من النمو في المخبر أو في البيت الزجاجي مقارنة مع الشاهد (Radchuck and Korkhovoy 2005). التفسير المحتمل لهذا التأثير التفاضلي للمورثة rolB على النمو ربما يرجع إلى أن Radchuck and Korkhovoy (2005) نميا النباتات لمدة سنتين بينما نمى Zhu *et al*. (2001b) النباتات لمدة أربعة أشهر وتحت ظروف إمداد محدود من العناصر المغذية مقارنة مع ظروف الإمداد بالعناصر الغذائية بشكل ثابت(Zhu, and Welander 2000a). أصول التفاح التي فيها تعبير للمورث rolB أكثر حساسية للأوكسين (IBA) مقارنة مع الشاهد(Zhu *et al* ,2001a; Sedira *et al*, 2005). وتبين أيضاً أن التعبير عن المورثات rolA زاد الحساسية للأوكسينات في السلالات المعدلة وراثياً بالأصل M.26 بالمقارنة مع الشاهد (Zhu *et al*, 2001a). أثر تعبير المورثة rolA على

قدرة نمو النباتات المعدلة وراثياً بالأصل M.26 ((Flachowsky *et al*,2008 وبالأصل A2 (Zhu *et al*, 2001a). وأظهرت بعض هذه الأصول المعدلة وراثياً انخفاضاً في الطول وفي المساحة الورقية والوزن الجاف. وقد لوحظت نتائج مماثلة مع تعبير إما المورثة rolC أوالمورثة فيتوكروم B في أصل التفاح Marubakaidou (Igarashi, *et al*,2002) والأصل M.26 Holefors *et al*, (2000)على التوالي. وقد بينت دراسات سابقة تأخير في الأزهار وانخفاض الخصوبة بشدة في بعض النباتات المعدلة وراثياً بالمورثة rolA. ومع ذلك، فإن هذا لم يكن قد لوحظ في صنف التفاح Gravenstein، المطعم على الأصل M.26 المحور بالمورثة rolA (Zhu *et al*, 2001a). أزهر الصنف Gravenstein على كل من الأصل المعدل وراثياً بالمورثة rolA وعلى الأصل غير المحور في السنة الثانية بعد التطعيم، وكان الإزهار طبيعياً في البيت الزجاجي (Zhu *et al*, 2001a). وعموماً قد تكون الآثار الجانبية لهذه المورثة rolA في التفاح عدم الإنتقال إلى الصنف الطعم كما اتضح من النتائج الأولية للتجارب (Zhu *et al*, 2001a). أن الأصل A2 المعدل وراثياً بالمورثة rolA والأصل M.26 بالمورثة rolB والأصل M9/29 بالمورثة rolB المطعمة بأصناف تفاح مختلفة هي قيد التجارب الحقلية لتقييم تأثيرات الأصول على نمو وتطور الأصناف المطعمة عليها والانتقال المحتمل لبروتين rolB من الأصل إلى الصنف الطعم. وأظهرت النتائج الأولية أنه بالنسبة لنفس الصنف، لا يوجد فروق في تفتح البراعم، والإزهار وعدد الأزهار بين النباتات المعدلة وراثياً والأصول غير المعدلة وراثياً. وانخفض ارتفاع النبات وقطر الساق للأصناف القوية المطعمة على أصول rolB مقارنة بالأصول غير المعدلة وراثياً (Zhu *et al* ,2007) بالإضافة إلى ذلك، لم يتم العثور على المورثة المنقولة في الطعم غير المعدل وراثياً المطعمة على أصول تحتوي(rolB Zhu *et al*,2007; Wong *et al*, 1999). وبأخذ نفس الهدف في الاعتبار، أنتجت طعوم الصنف Greensleeves المقصر (قصر طول السلاميات) من خلال إسكات (إخماد) الإنزيم الداخلي فيه GA-20 أوكسيديز (Bulley *et al*, 2005). تراوح حجم الأشجار المعدلة وراثياً بين 50– 80% من الشاهد غير المحور واستدام التأثير المقصر بعد التطعيم على أصول قوية النمو بشكل طبيعي (M.25 وMM.106).

4.3.2. نضج الثمرة:

إمكانية التخزين الجيد هي إحدى صفات الجودة المهمة لأي من أصناف التفاح الحديثة. في حين أن تكنولوجيا التخزين بغرف التخزين المعدل المتحكم في ظروفها وباستخدام المواد الكيميائية مثل 1-methylcyclopropene (1-MCP) يمكن أن تخفف من سوء التخزين في بعض الأصناف، لكن لهذه التقنيات عيوب من حيث استخدام الطاقة والتبريد والتحكم في الجو المحيط، والتكلفة وتطبيق المادة الكيميائية الخاضعة للرقابة التنظيمية. وقد تم تحديد عدد من

المورثات التي تلعب دوراً مفترضاً في إنضاج وصلابة الثمار، ولكن لا يزال الإثيلين العامل الرئيسي المحدد لها. يتم تصنيع الاثيلين في النباتات من S- adenosyl ميثيونين بمساعدة إنزيمين هما: الإنزيم 1-minocyclopropane- 1-carboxylic acid synthase (ACS) الذي يحول S-adenosyl methionine إلى 1-amino-cyclopropane carboxylic acid (ACC) والإنزيم الثاني هو: 1-aminocyclopropane carboxylic acid (ACO) oxidase الذي يؤكسد ACC إلى الإثيلين. ينخفض تنظيم التعبير الوراثي في أصناف التفاح غالا وماكينتوش و Greensleeves عندما ينتج أي من ACS أو ACO (Degenhardt *et al*, 2005; Hrazdina *et al*, 2003; Schaffer *et al*, 2007). وبتحليل الثمار من نفس سلالات التفاح المعدلة وراثياً والتي نميت في ظروف تقليص التصنيع الحيوي للايثيلين إلى حد كبير، لوحظت زيادة كبيرة في فترة تخزين الثمار وزيادة تماسكها مقارنة مع الشاهد (2004 ;Degenhardt *et al*, 2005). وقد وجد فروقات كبيرة في المواد الصلبة الذائبة (السكر) والحموضة عند القطاف وبعد التخزين، في حين كانت نسبة السكر والأحماض مختلفة عن الشاهد في الثمار المخزنة بدون المعاملة بالإثيلين ولكنها لم تختلف عن الشاهد بالنسبة للثمار المعاملة بالإيثيلين (Defilippi *et al*, 2004; Degenhardt *et al*, 2005). تم كبح إنتاج الإستر الطيار، وهذه الإسترات الطيارة هي من العناصر المهمة في تركيب نكهة الفاكهة. ولكن لوحظ وجود مستوى مماثل من الكبح لإنتاج استر طيار عند معاملة الثمار الشاهد بـ 1- MCP (Defilippi *et al*, 2005a; 2005b). تتيح المعاملة بالإيثيلين تصنيع الإستر والكحول لاسترداد 70% من قيم الثمار الشاهد، في حين يسترد فقط تصنيع الإستر والكحول بشكل طفيف في الثمار المعاملة بـ MCP Defilippi *et al* , (Defilippi *et al*, 2005a, 2005b). في دراسة منفصلة، وجد أن منظم خفض التعبير ACC أوكسيديز في الصنف رويال غالا، أدى الى استرداد مستوى الإستر والكحول تماماً بعد المعاملة بالاثيلين. وكشفت معطيات المصفوفات الدقيقة الخاصة بها أن الإثيلين يتحكم فقط في الخطوات الأخيرة للتصنيع الحيوي للنكهة. قد تفسر عوامل النمط الوراثي، مثل الحساسية للإيثيلين، الإختلافات في استرداد تصنيع الإستر والكحول. إن إمكانية استخدام الإيثيلين للتحكم بالنضج يقدم حالة مماثلة لتلك التي تستخدم فعلياً للموز، وزيادة فترة التخزين دون تبريد قد تتيح توفيرات كبيرة في الطاقة(Schaffer *et al*,2007).

لقد وفرت هذه الدراسات معلومات قيمة حول تعقيدات نضج الثمار وتطور النكهة. لكن، وحيث أن الاثيلين هو هرمون نباتي هام ويشارك أيضاً في توسط استجابة النبات للإجهادات (الغمر والجفاف والتجميد /التبريد، الخدش وهجوم المسبب الممرض)، وتفتح الأزهار وانفصالها، فهناك حاجة إلى مزيد من العمل حول التطبيقات التجارية التي من الممكن تحقيقها. يمكن الاطلاع

على هذه الدراسات من وجهة نظر الاستخدام التجاري لكنها أيضاً تسهم إلى حد كبير في فهمنا لعمليات النضج في التفاح. والبعض الآخر ليس لها مثل هذه التطبيقات التجارية المحتملة، ولكن تستحق الذكر لأنها تساهم في معرفة العمليات الفيزيولوجية في التفاح (Cheng *et al*, 2005) وتمكن الباحثون من تحديد أن مورثة السوربيتول 6 فوسفات ديهيدروجينيز (S6PDH) sorbitol 6 phospahte dehydrogenase وهو الأنزيم الرئيسي الذي ينظم توزع السوربيتول والسكروز في أوراق التفاح (Kanamaru *et al*, 2004). وكذلك تم زيادة تعبير مورثة بولي غالاكتورونيز polygalacturonase بشكل مفرط والحصول على مجموعة من الظواهر الجديدة، كتغيير شكل الورقة والعلاقات المائية في النبات وبنية ووظيفة خلايا المسامات، فضلاً عن التصاق الورقة بالنبات (Atkinson *et al*, 2002). أدى التعبير الضعيف للأنزيمpolyphenoloxidase (PPO)وهو الأنزيم المسؤول عن الإسمرار الإنزيمي في التفاح من خلال استخدام مورثة PPO بالاتجاه المعاكس التي أدت بشكل واضح إلى انخفاض اسمرار الكالس (Murata *et al*, 2000) والطرود كانت أقل ميلاً نحو اسمرار مماثل من خلال نشاط PPO (Murata *et al*, 2001). إن مثل هذه الفاكهة ستكون جذابة لكل من المستهلكين ومصنعي الأغذية. تم تحوير أصناف تفاح تجارية متنوعة بمورثات كيميرية (مصنعة) بهدف إنتاج أنماط وراثية لا تتصف بظاهرة الاسمرار. هذه المورثة الكيميرية تكونت من مكونات تسلسل أربع مورثات PPO مختلفة في التفاح تحت سيطرة محفز دائم التعبير. حقق التخفيض المنسق لتعبير كل عائلة المورثة PPO في التفاح، انخفاض مستويات النشاط الإجمالي لأنزيم PPO في أوراق وثمار هذه السلالات المعدلة وراثياً (<90%) والحصول على أنماط ظاهرية لا تبدي ظاهرة الإسمرار البني في عدة أصناف تفاح Okanagan Specialty Fruits (OSF 2013)، ولقد أكدت التجارب الحقلية لهذه المواد على استقرار النمط الظاهري الذي يبدي عدم اسمرار بني ولم تحدد أي آثار سلبية على الصفات البستانية، أو على مقاومة الأمراض والحشرات عندما نمت في ظل الظروف الحقلية (OSF, 2013).

5.3.2. الخصائص الصحية الفريدة:

مكونات البوليفينول المشتقة من الفواكه مثل التفاح هي مواد مضادة للأكسدة أكثر فاعلية في المختبر من الفيتامينات C و E، وبالتالي قد تكون أكثر قيمة للحماية في الجسم الحي. وبالتالي، فإن المادة الفعالة التي أدت إلى مقولة " تفاحة يومياً تغنيك عن الطبيب " قد تكون جيدة من بين المكونات النباتية من ثمار التفاح. وتشمل المكونات النباتية الفلافونويد، فنيل بروبانويد phenylpropanoids، والأحماض الفينولية وقد تم تسليط الضوء عليها كعوامل هامة مساهمة كما هو الحال في النشاط المضاد للأكسدة في النظام الغذائي لدينا (Rice-Evans *et al*,

1997; Li , 2008). في التفاح، المركب كيرسيتين quercetin الشبيه بالفلافونول والمركب rutin الشبيه بالفلافونات قد يكونان مهمين أيضاً (Rice-Evans *et al*, 1997). في الواقع، إن المركب كيرسيتين المستمد من التفاح له آثار مضادة للسرطان ووقاية محتملة للأعصاب. الإنزيم ستيلبين سينسيز Stilbene synthase هو إنزيم لتصنيع الدواء النباتي ريسفيراترول phytoalexin resveratrol. يرتبط إنتاج الريسفيراترول بالعدوى الفطرية والاجهادات غيرالحيوية (Chung *et al*, 2003; Rudolf and Resurreccion, 2005) مثل الأشعة فوق البنفسجية والأوزون. الـ Stilbenes، بصفة عامة، وريسفيراترول على وجه الخصوص، هي مركبات فعالة بيولوجيا، ولها أنشطة مضادة ضد مختلف مسببات الأمراض والتي من بينها مرض جرب التفاح (Schulze *et al*, 2005). بالإضافة إلى هذه الآثار المترتبة على مقاومة الأمراض، جذب ريسفيراترول وغليكوزيداته اهتمام الهيئات المعنية بالصحة بسبب فعاليتها المضادة للالتهابات، والاستروجين والمضادة للصفيحات، وفعاليتها المضادة للسرطان. ويعتقد أن الفعالية البيولوجية والدوائية للريسفيراترول تعزى إلى خصائصها المضادة للأكسدة. بالرجوع الى حقيقة أنه منذ فترة طويلة معروف بأن التفاح يعتبر مصدراً ممتازاً لمضادات الأكسدة، فإن تصنيع الريسفيراترول في التفاح المعدل وراثياً يوسع هذه الخاصية، وبالتالي يمكن اعتبارها عاملاً إضافياً لتحسين النوعية الأصلية في ثمرة التفاح. وأنتجت نباتات تفاح معدلة وراثياً تعبر فيها مورثة ستيلبين سينسيز من شجرة العنب تحت تحكم محفز خاص يتحرض بالجرح وبالعامل الممرض وبالأشعة فوق البنفسجية. في ظل ظروف البيت الزجاجي، كانت سلالات التفاح المعدلة وراثياً هذه طبيعية ظاهرياً، وأزهرت في غضون السنتين الأولى والثانية بعد التطعيم. كانت ثمار التفاح المعدلة وراثياً غير مميزة ظاهرياً عن الثمار غير المعدلة وراثياً من نفس الأصناف (Szankowski *et al*, 2003) وظهر التعبير عن المورث ستيلبين سينسيز في قشرة ولب الثمرة بعد تحريض المحفز. لم يؤثر إدخال هذا المسار الفريد بشكل كبير في تراكم المركبات الفينولية الأخرى الموجودة بشكل طبيعي في ثمار التفاح. بسبب الفعالية المرتفعة المضادة للأكسدة من الرسفيراترول resveratrol، فان تصنيعه في التفاح يسهم في جودة الثمار، وربما يكون له أيضاً آثار إيجابية على ثبات قوام الثمار أثناء التخزين (Rühmann *et al*, 2006). وقد أدخلت مورثة عامل نسخ Lc من الذرة المسؤولة عن التحكم بتعبير مورثات بنيوية في مسار التصنيع الحيوي للفلافونيدات في الذرة. وأظهرت السلالات المعدلة وراثياً مستويات متزايدة في نسخ العديد من الفلافونيدات. كما أدخلت أيضاً تسلسلات إخماد RNAi لمورثة انثوسيانين سينثاز (ANS) حيث أدى التعديل الوراثي بهذه المورثة إلى زيادة التصنيع الحيوي للفلافونول و كاتيشين وايبيكاتيشين والتي تلعب دورا هاما في مقاومة الأمراض النباتية (Li , 2008.).

6.3.2. الحساسية لثمار التفاح:

هي ظاهرة شائعة في المرضى الذين يعانون من حساسية حبوب لقاح شجرة البتولا. نحو 90% من المرضى الذين يعانون حساسية من حبوب لقاح البتولا لديهم الأجسام المضادة ضد حساسية حبوب لقاح البتولا Betv1 (Ebner *et al* , 1995). ينتمي مسبب الحساسية هذا إلى مجموعة من البروتينات المتعلقة بالمسبب المرضي، وبشكل أكثر تحديداً بروتينات PR10 (Puhringer *et al*, 2000). العديد من الأغذية النباتية، وخصوصاً ثمار الفواكه والمكسرات (الجوزيات) تحتوي على بروتينات متجانسة والتي تدركها الأجسام المضادة نفسها الخاصة بـ BetV1. في التفاح، حدد مسبب الحساسية هذا باسم Mald1 (Vanek-Krebitz *et al*, 1995). وقد تبين أن نحو 70 % من المرضى الذين يعانون حساسية لحبوب لقاح البتولا لديهم ردود فعل سلبية على التفاح كنتيجة رد فعل الأجسام المضادة. على الرغم من أن الحساسية للتفاح المرتبطة بالحساسية لحبوب لقاح شجرة البتولا هي محدودة وعلى وجه الحصر تقريباً خفيفة وتقتصر على تجويف الفم، ومعظم المرضى الذين لديهم حساسية من التفاح يتجنبون ثمارها في نظامهم الغذائي (Gilissen *et al*, 2004). فواكه أخرى أيضاً مثل الكمثرى، والكرز و الدراق يمكن أيضاً أن تحرض ردود فعل سلبية على أساس الأجسام المضادة نفسها عبر التفاعلية (Ortolani *et al*, 1988). لذلك، غالباً ما يؤدي تجنب ثمار التفاح إلى حرمان النظام الغذائي من مجموعة واسعة من الأغذية النباتية الشائعة التي لها قيمة غذائية هامة. يبدو أن إنتاج تفاح يتصف بانخفاض كبير في التعبير الإجمالي للمورثة Mald1 من الأصناف الناجحة اقتصادياً وستكون نهجاً جذاباً. واختيرت طريقة إدخال الحمض النووي الريبي المتداخل RNA interference (RNA i) للإسكات ما بعد النسخ (post-transcriptional silencing) للمورثةMald1. حيث تم عزل مورثة واحدة Mald1 من الصنف غالا وتم تحوير صنف التفاح إيلستار Elstar بالناقل Mald1 RNA i (Gilissen *et al*, 2004). يستغرق عادة نمو شجرة التفاح لتصبح منتجة فترة 3– 5 سنوات. نظراً لأن المورثات Mal d1 تعبر في الأوراق وكذلك في ثمرة التفاح، استطاع الباحثون تقييم إسكات (تعطيل عمل) المورث Mald1 في أوراق طرود التفاح الفتية النامية في الأنابيب بالزراعة المخبرية. وأظهرت نتائجهم انخفاض تعبير المورثة Mal d 1 بواسطة اختبار التلطيخ المناعي immunoblotting. تدعم هذه الملاحظات جدوى الإنتاج من خلال تعطيل عمل المورثات بأصناف التفاح التي تسبب حساسية أقل والتي لا تحتوي على المورثة Mal d1. سوف تحتاج هذه البيانات لمزيد من التأكيد من خلال تحليل تعبير المورثة Mal d1 في الثمار المعدلة وراثياً وعن طريق اختبار الحساسية الخاصة بها. نظراً لأن المورثة Mald1 هي بروتين مرتبط بالمسبب المرضي، فانه يجب تقييم النباتات التي

تم تعطيل عمل المورثة فيها (gene Silencing) أيضاً من حيث الانخفاض غير المرغوب فيه في مقاومة الأمراض (Gilissen *et al*, 2004).

7.3.2. الصفات الأخرى التي تم تحسينها وبدرجات متفاوتة من النجاح:

مقاومة الإجهاد البيئي (Swietlik *et al*, 2007) ومقاومة مبيدات الأعشاب (2003 , *et al* Szankowski)، ووقت الإزهار (Kotoda *et al* , 2006) واللون (Espley *et al*, 2007) والتصاق الخلية (Atkinson *et al*, 2002) وغيرها (, Aldwinckle and Malnoy 2009).

4.2. حدود التكنولوجيا و التطورات الجديدة

1.4.2. القبول والوعي الشعبي حول التعديل الوراثي في التفاح والنباتات المعدلة وراثياً:

على الرغم من التطورات الكبيرة التي تم اكتسابها في عملية التعديل الوراثي في التفاح، لا يزال استخدام المضادات الحيوية ومبيدات الأعشاب كمورثات انتخاب يفرض قيوداً لقبول المستهلك (Penna *et al*, 2002; Degenhardt and Szankowski, 2006). وهكذا فان المشكلة الرئيسية للتفاح المعدل وراثياً (GM) هو استخدام المورثة nptII كمورثة معلمة للانتخاب. تقريباً كل البحوث المنشورة عن التعديل الوراثيات الوراثية للتفاح التي تم استعراضها، مع استثناءات قليلة، اعتمدت على استخدام المورثة nptII الواسمة كمورثة انتخاب، مع استخدام محفزات ليست من التفاح (CaMV 35S، من بين محفزات أخرى) واستخدام بكتريا التدرن التاجي. لكن ومع ذلك، للأغراض التجريبية، تم أيضاً اختبار مورثات لا تؤثر على الصفة المستهدفة مثل المورثة GUS المنتجة β بيتا غلوكورونيداز. لهذا، بدأ بعض الباحثين بتطوير نظم انتخاب جديدة يمكن أن تكون أكثر قبولاً من عامة الناس والتي تشمل استبعاد واسمات الانتخاب من المنتج النهائي أي من النباتات المعدلة وراثياً. حالياً، إحدى بدائل مقاومة المضادات الحيوية الواعدة جداً، وربما تكون أكثر قبولاً، استخدام مورثة فوسفو مانوزايزميريز phosphomanose isomerase (PMI). الخلايا المعدلة وراثياً بهذه المورثة قادرة على استخدام المانوز كمصدر للكربون، بينما خلايا التفاح غير المحور لا يمكنها القيام بذلك (Degenhardt, and Degenhardt ,2006; Szankowski, 2006; (Degenhardt *et al*, 2006; Flachowsky *et al*, 2004; Zhu *et al*, 2004. من الواضح أن تطويرالتكنولوجيا النظيفة من الناقل من أجل نبات معدل وراثياً خالي من الواسمات في التفاح وغيره من المحاصيل هو الهدف النهائي. فقد طورت واقترحت في هولندا مؤخراً استخدام هذه التكنولوجيا (Schaart *et al* , 2004; Krens *et al* , 2004 a; 2004 b) التي تتيح الحصول على نباتات تفاح معدلة وراثياً خالية من مورثات واسمات الإنتخاب. عموماً، لا توجد دراسات منشورة عن المخاطر البيئية للتفاح المعدل وراثياً. فربما لا

يزال الباحثون يركزون اهتماماتهم على إنتاج أصناف تفاح معدلة وراثياً هامة تجارياً مقبولة وذات منافع بيئية، مثل الحد من استخدام المبيدات (James *et al*, 2003). في ظل هذه الظروف، فان تسويق التفاح المعدل وراثياً والذي يحتوي حمض نووي ريبي منقوص الأوكسجين من أنواع أو أجناس مختلفة في المستقبل القريب هو حتمي. وقد نشرت نتائج مشروع الاتحاد الأوروبي المتعدد التخصصات بعنوان: "الإنتاج المستدام لنباتات الفريز المعدلة وراثياً: العواقب الأخلاقية والتأثير المحتمل على المنتجين، وعلى البيئة والمستهلكين (Aldwinckle and Malnoy, 2009; Polanco *et al*, 2010)، حيث مسح هذا المشروع و جمع الآراء بخصوص موقف المستهلكين من استخدام أو استهلاك النباتات المعدلة وراثياً. كان موقف المستهلكين في النرويج والدنمارك والمملكة المتحدة نحو التعديل الوراثي سلبياً نوعاً ما، حول نمط نباتات الفريز المعدلة وراثياً والصفات التي تغيرت في عملية التعديل الوراثي. على سبيل المثال، ازداد قبول المستهلك عند النظر إلى صفة التعديل المفيدة لهم وعندما تم استخدام حمض نووي من الفريز ذاته لتحوير النبات. وأظهرت دراسة مسحية لآراء المستهلك في الولايات المتحدة الأمريكية أن غالبية المستطلع آرائهم يمكن أن يأكلوا الخضروات التي تحتوي على مورثة من النوع نفسه(81%)، أو من نوع آخر من الخضار (61%)، بالمقارنة مع تلك التي من مصادر أخرى مثل المورثات الفيروسية (14%)(Lusk and Sullivan, 2002). وأظهرت الدراسات الاجتماعية(Aldwinckle and Malnoy , 2009; Polanco *et al*, 2010) أن الدافع وراء التصور أو الوعي الشعبي العام حول المحاصيل المعدلة وراثياً هو العواطف، بدلاً من مناقشة مفتوحة بشأن المزايا أو القيود المحتملة في كل حالة.

من أجل الاستفادة الكاملة من إمكانيات التعديلات الوراثية لتحسين المحاصيل، سيكون من المثير للاهتمام مناقشة ما هي أدنى مسافة وراثية مطلوبة لتعديل التركيب الوراثي (جينوم) من أجل ضمان ما يكفي للقبول العام. حتى الآن، لا يوجد أي قلق لدى الجمهور عندما يتم تهجين داخل وبين التراكيب الوراثية التي تنتمي إلى النوع نفسه ، بما في ذلك البرية والمادة الوراثية المستأنسة (المزروعة). في العديد من الحالات، يستفيد مربوا النبات بالطرائق التقليدية من الأصول الوراثية التي منشؤها من نباتات الجيل الأول، ومن التراكيب الوراثية التي ترتبط ارتباطاً وثيقاً حيث لا تشكل التهجينات أي قيود بيولوجية، أو من مورثات الجيل الثاني، حيث يستخدم مربي النبات بعض التقنيات مثل انقاذ الجنين للحصول على نسل خصب عند تهجين أنماط وراثية بعيدة القرابة أو دمج بروتوبلاست من خلايا مختلفة عند الحاجة للحصول على نسل مغاير.

تقتصر المخاطر البيئية على منتجات المورثات (أي البروتينات) وليست متلازمة مع التفاح بالذات حيث يمكن أن تكون من منتجات مورثات أي محصول آخر غير التفاح. التفاح هو منتج

طازج غالباً ما يستهلك دون طبخ، وبالتالي ينتبه المستهلكون لأي تعديل فيه. في الوقت الراهن، ليس وارداً أن المورثات المدخلة من مصدر غير التفاح ستكون مقبولة من قبل المستهلكين، وسوف لن يتم الإنتاج التجاري لمثل هذا النوع من التفاح المعدل وراثياً في المستقبل القريب.

مؤخراً، تم تحديد تسلسلات نيوكليوتيدات جينوم التفاح (Velasco *et al*, 2010)، وسيتم في المستقبل القريب اكتشاف مورثات المقاومة في التفاح وستنقل إلى الأصناف الإختبارية، وربما تحت تحكم محفزات خاصة بها، وكما أفادت بعض الدراسات، فإن تكنولوجيا إدخال الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين المأشوب ستكون قادرة على كبح صفات محددة غير مرغوب فيها. وسوف تتوفر المورثات المستمدة من المسبب المرضي الذي يحفز مقاومة العائل. وسوف يصبح ممكناً توفر المحفزات الخاصة التي مصدرها من التفاح والتي تؤدي إلى تعبر المورثات فقط أين ومتى نريد.

باستخدام "تكنولوجيا الناقلات النظيفة" (Krens *et al*, 2004a; 2004b; Malnoy *et al* , 2007b) والتي تتيح إنتاج نباتات معدلة وراثياً بدون معلمات انتخاب، سيكون من الممكن إنتاج نباتات "ضمن الجنس" (Nielsen, 2003) أو أصلية (Rommens, 2004) أو من النوع نفسه cisgenic (أي النباتات التي يظهر على الصبغي ذاته إما بديلان سائدان أو متنحيان لمورثتين مختلفتين)(Schouten *et al* , 2006a;, 2006b) من أجل تحسين وراثي متخصص جداً.

لا بد من تفادي العديد من المخاوف بشأن المخاطر، سواء كانت ذات أساس تفكيري أو علمي. إن نظم إنتاج محصول التفاح المعتمدة على التكاثر الخضري الاصطناعي لأنماط وراثية معينة وزراعتها على مساحات واسعة جعل هذا المحصول وراثياً عرضة للكثير من الإجهادات الحيوية واللا حيوية. يمكن استخدام الإمكانية التي تتيحها تكنولوجيا الحمض النووي المأشوب لاستبدال أليلات المقاومة غير الوظيفية non-functional resistance alleles بآليلات مقاومة وظيفية functional resistance alleles (العلاج بالمورثات gene therapy). سوف يكون فوائد التفاح المعدل وراثياً المقاوم للأمراض المختلفة حقيقياً، ليس فقط لصاحب براءة الاختراع ولكن أيضاً للمستهلك والبيئة. إن الانخفاض في استخدام مبيدات الفطريات والمضادات الحيوية والمبيدات الحشرية وحده يبرر كل هذه الجهود. ولكن يبقى أن نرى كم من الوقت سيستغرق هذا حتى يتم التوصل إلى قبول واسع من قبل الجمهور (Aldwinckle and Malnoy , 2009; Polanco *et al*, 2010).

2.4.2. النباتات المعدلة وراثياً التي تحتوي مورثات من النوع النباتي نفسه(Cisgenic).

من أجل زيادة القبول للنباتات المعدلة وراثياً من قبل المستهلكين، وضعت مجموعة من الباحثين في مخبر البحوث الدولية (جامعة واغننغن، هولندا) وفي مركز البحوث في هولندا سلسلة جديدة

من الاستراتيجيات البيوتكنولوجية للحد من القيود المفروضة على طرائق التعديل الوراثي التقليدية المتاحة (Schaart, 2004; Krens *et al*, 2004a; 2004 b). يتضمن هذا الابتكار استخدام مورثات من النوع نفسه أو الأنواع ذات القرابة الوثيقة، جنباً إلى جنب مع استخدام المحفزات الخاصة بها وتكنولوجيا تحوير بدون معلمات انتخاب، مثل مورثات المقاومة للمضادات الحيوية ومورثات مقاومة مبيدات الأعشاب التي تستخدم لانتخاب السلالات المعدلة وراثياً (Schouten, *et al*, 2006a; 2006b). ويتوقع أن تسهل كل هذه الابتكارات قبول وتسويق النباتات المعدلة وراثياً من قبل المستهلكين والمزارعين والسلطات التنظيمية المسؤولة. هذا الابتكار الجديد تمت تسميته "Cisgenesis"، وهو يعد تقنية صديقة وإستراتيجية ممتازة لتحسين مقاومة النبات وتكمل برامج التربية التقليدية(Jacobsen and Schouten , 2007; Schouten and Jacobsen, 2008; Schouten, *et al* ,2006a; 2006b). حتى الآن، فإن غالبية الأنظمة والتشريعات المعمول بها في الكائنات المعدلة وراثياً في جميع أنحاء العالم لا تميز النباتات الـ cisgenic عن النباتات المعدلة وراثياً التي لا تتصف بهذه الصفة. هذا قد يكون لأنه حتى الآن، فقط عدد محدود من النباتات cisgenic قد طورت وقدمت للحصول على الموافقة عليها. كندا هي الدولة الوحيدة في العالم التي لديها تشريع يعتمد على المنتج بدلاً من التشريع المعتمد على عملية التعديل. وبالتالي، فمن الممكن أن يعامل هذا النبات الـ cisgenic بشكل أقل صرامة من النباتات الأخرى المعدلة وراثياً (Schouten *et al* ,2006b). حيث تختلف النباتات Cisgenic جوهرياً عن النباتات المعدلة وراثياً. في حالة نقل المورثات، تدخل إلى النبات المعدل وراثياًمورثة أجنبية جديدة، من نوع أو جنس مختلف. لذلك، يفترض أن النبات المعدل وراثياً يمتلك نمط ظاهري لا يوجد في هذه الأنواع (البرية والمزروعة) ولا يؤثر إدخاله من خلال الصفات ذاتها أو من خلال انتقال المورثات من النبات المحور المزروع إلى أقاربه البرية,Schouten and Jacobsen (2008). على النقيض من ذلك، في نباتات الـ cisgenesis المورث المدخل مع محفزه الأصلي هو بالأساس موجود في الأنواع المستأنسة أو البرية منذ عدة قرون. وبالتالي، الـ cisgenesis لا يضيف سمة إضافية إلى الأنواع. إنها لا تحرض على تغيير التأقلم والتي لا يمكن أيضاً أن تحدث من خلال التربية التقليدية أو في الطبيعة. الشيء نفسه ينطبق على المخاطر البيئية الأخرى، مثل التأثيرات على الكائنات المستهدفة أو غير المستهدفة أو نظم التربة الإيكولوجية، وللاستخدام في الأغذية أو الأعلاف. ونتيجة لذلك ، فان الإطلاق المتعمد لنباتات cisgenic في البيئة يمكن أن يكون آمناً مثله مثل الإطلاق المتعمد للنباتات التقليدية (Jacobsen and Schouten, 2008; Schouten *et al*, 2006a; 2006b.) لقد وصفت طرائق عديدة لتطوير تفاح cisgenic بإدخال مورثات من الأصناف البرية للتفاح وتجميع مورثات مقاومة في التفاح (Joshi, 2010). كما طور تفاح غالا

محور بمورثة من التفاح Hcrv2 أي cisgenic مقاوم للجرب (Van blaere, 2011). في الوقت الحاضر، يتطلب إنتاج الفاكهة الحديثة ومتطلبات المستهلك العالية أصناف ذات إنتاجية أفضل ومتماثلة، ولها إمكانية التخزين لمدى طويل، ومقاومة للأمراض والآفات وذات نوعية جيدة لضمان النجاح التجاري. في كثير من الدول المنتجة للتفاح، يعتبر التفاح من أكثر الفاكهة الهامة التي يتم تصديرها إلى مختلف الأسواق وهي تلعب دوراً اقتصادياً واجتماعياً رئيسياً في القطاعين الزراعي والاقتصادي في تلك الدول. ولكن تشكل الآفات والأمراض واحدة من العوامل الرئيسية التي تحد من التنامي المحتمل لهذه الصناعة التصديرية الهامة. استنادا إلى تلك الوقائع، فان استخدام نباتات تفاح cisgenic يمكن أن تساعد على تطوير وسيلة جديدة للتنمية المستدامة لعمليات إنتاج هذا المحصول. في الآونة الأخيرة، بدأ معهد Investigaciones Agropecuarias INIA Quilamapu بتطوير أساس لإنتاج تفاح رويال غالا والصنف غراني سميثcisgenic لتحسين مقاومتها لفطر الجرب (Aldwinckle and Malnoy,2009; Polanco *et al* , 2010).

ABSTRACT

Production of Transgenic Plants from some Apple Cultivars and Rootstocks

Abstract

The aim of the present study was to develop an efficient direct shoot regeneration approach from leaf explants for apple cvs. 'Golden Delicious', 'Royal Gala' and 'MM111', 'M26' rootstocks as a method for rapid clonal multiplication and also as a prerequisite for genetic transformation with antifungal genes of the studied apples to reach the final desired aim of establishing an efficient and practical reproducible approach of *Agrobacterium*-mediated transformation which harbour *g2ps1* gene for apple cultivars and rootstocks studies for improving their fungal resistance.

Adventitious shoot formation from leaf pieces of apples studied was achieved using middle leaf segments taken from the youngest leaves from *in vitro*-grown plants. Optimum conditions for 'direct' shoot organogenesis resulted in high regeneration efficiency of 90%,95%,92%,94% producing one or more shoot per explant with high regeneration rates of 4.5, 5.6, 4.0 and, 4.1 new shoots in the studied apples respectively on MS basal medium with B5 vitamins, 1.0 g/l MES, 2.0 mg/l TDZ with 0.2 mg/l NAA. While, no regeneration could be observed on media free of cytokinins.

The organogenic capacity of leaf pieces was related to the leaf maturity and the origin of the leaf piece with the youngest light green expanding leaves being more regenerative than the older ones. Middle leaf segments were more responsive than the upper or lower part of the

leaf. Adventitious shoots were regenerated from cut sides and leaf surfaces. Therefore, middle leaf parts were used afterwards for organogenesis using leaf tissues of the studies apples. The most efficient regeneration media consisted of: MS+ B5 vit. + 1.0 g/l MES+ 30 g/l sucrose+ 1 mg/l BAP+ 0.3 mg/l IBA+ 0.2 mg/l GA_3 + 6 g/l agar

Subcultures were carried our every 4 weeks to provide sufficient amount of leaves needed for transformation.

Genetic transformation conditions of the studied apples were then optimized using *g_2ps_1* gene from *Gerbera hybrida* coding for 2-pyrone synthase which contribute for fungal and insect resistance was used.

Putative transgenic shoots could be obtained on MS media with B5 Vitamins, 5.0 mg l^{-1} BAP, or 2.0 mg l^{-1} TDZ with 0.2 mg l^{-1} NAA in the presence of the selection agent "PPT" at 3.0 mgl^{-1}.

Shoot multiplication of transgenic shoots was achieved on: MS + B5 vitamins + 1.0 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} IBA, 0.2 mg l^{-1} GA3+1.0 g/l MES+ 30 g/l sucrose + 7.0 g/l Agar, with the selection agent PPT at 3 mg l^{-1} and were sub-cultured every 4 weeks in order to get sufficient material to confirm transformation of the putative shoots obtained.

Transgenic clones of the apples studied respectively have been obtained and confirmed by selection on the media containing the selection agent "PPT" and by PCR analysis using the suitable primers in all clones obtained for the presence of the selection" bar gene (447 bp) and the gene-of- interest *"g2PS1*" (1244 bp), with transformation efficiency of 0.4%, 0.6%, 0.1% and 0.3% respectively.

Results of DNA sequence analysis of the transgenic plants also

proved the successful transformation and had 97 to 99% sequence homology with the gerbera hybrida mRNA for 2-pyrone synthase *g2ps1* gene (accession no. Z38097.2). These transgenic clones were multiplied further and rooted *in vitro* by transferring 2-3 cm long shoot tips to rooting ½ MS basal medium supplemented with 1.0 mg/l indole-3-butyric acid (IBA), in the presence of the selection agent 'PPT'. Rooted transgenic plantlets were successfully acclimatized and are being kept under-containment conditions according to the biosafety by-law in Syria to evaluate their performance for fungal resistance.

5. المناقشة Discussion

1.5. التجديد من أقراص الأوراق Regeneration from leaf tissues

تم تطوير طريقة فعالة من أجل الإكثار الخضري الدقيق السريع للتفاح وتم الحصول على تشكلات عرضية باستخدام الجزء الوسطي من الورقة من الأوراق الفتية للنباتات المكاثرة بطرائق زراعة الأنسجة النباتية وبنسب تجدد عالية، وذلك كشرط أساسي للتعديل الوراثي لصنفي التفاح Golden Delicious و Royal Gala والأصلين MM111 و M26 المدروسين، وفي الدراسة الحالية تشكلت النموات العرضية بشكل مباشر من الورقة خلال 4-8 أسابيع من بدء الزراعة وبنسب تجديد ومعدلات إكثار جيدة على أوساط محتوية على الـTDZ أو الـBAP.

لقد سمحت ملاحظة أجزاء الورقة المستخدمة من حيث كفاءتها في التجدد بتحديد مناطق أكثر قدرة على التجدد في الورقة، فقد تشكلت النموات العرضية على حواف قطع الأوراق، وربما يعزى السبب في ذلك إلى الاتصال الأكبر مع وسط الزراعة، و تشكلت أيضاً من سطوح الأوراق ولكن بنسب أقل. وحسب دراسة Ferradini *et al* (1996) *فقد* كانت الأوراق الأقرب إلى قاعدة الورقة أكثر قدرةً على التجدد في الأصل M26، بينما في الدراسة الحالية، كانت الأجزاء المتوسطة من الورقة أكثر قدرةً على التجدد منها مقارنة بالجزء القاعدي أو العلوي من الورقة وربما يعزى السبب إلى كبر حجم القطع في الجزء المتوسط من الورقة مقارنة بالجزأين القاعدي والعلوي .

تؤكد النتائج في الدراسة الحالية ملاحظات سابقة تظهر أن الأوراق بشكل عام هي جزء مناسب وجيد لتشكيل النموات العرضية (Sicurani *et al*, 2001; Ferradini *et al*, 1996)، لكن تجدر الإشارة إلى أن اختيار المستزرعات وجودتها وقطعها وزراعتها يستغرق وقتاً وجهداً كبيرين.

تم في الدراسة الحالية تجديد النموات العرضية من أوراق أصناف وأصول التفاح المدروسة وتم تقييم وسط الأساس ومصدر الكربون وتركيب وتركيز منظمات النمو والفترة الضوئية والظلام التام وتم الحصول على أفضل كفاءة للتجديد والتي كانت بشكل عام باستخدام الـTDZ بالتوافق مع الـ NAA ووجد أن التجديد من الأوراق كان طريقةً ناجعةً جداً لتشكيل النموات العرضية بشكل مباشر.

تأتي أهمية تطوير طريقة للتجديد من نسيج الورقة كشرط أساسي لتطبيق طرائق التقانات الحيوية وخاصةً التعديل الوراثي من أجل تطوير أصناف متحملة للأمراض، إذ يعد التفاح من الفاكهة المفضلة للإنسان وهو أحد أنواع الفاكهة المستهدفة في التعديل الوراثي عالمياً. وعلى أية حال، تستغرق الطرق التقليدية للتربية وقتاً كبيراً، وهذا يعتمد على التهجين وإنبات البذور والانتخاب، بينما نجد أن التقانات الحيوية النباتية والهندسة الوراثية لها قدرةٌ على تقليل الوقت

اللازم بالطرائق التقليدية. كما أن تطبيق التجديد من نسيج الورقة يفتح آفاقاً أعمق للتعديل الوراثي لأصناف وأصول التفاح ذات الأهمية الاقتصادية. على أية حال، فقد أظهرت هذه التقانة كفاءة تجديد منخفضة حيث طورت على أصناف قليلة والتي تعتبر محدودة التسويق غالباً (Yang and Schmidt,1992; Tang *et al*, 2002).

إن العوامل التي تؤثر في كفاءة التجديد في النباتات الخشبية هي نوع المستزرعة، وتركيب الوسط والتوافق الهرموني ومنشطات النمو (Benson, 2000) .

إن لمنظمات النمو تأثيراً كبيراً في تجديد النموات لكثير من النباتات الخشبية حيث تبين في العديد من الدراسات أن السيتوكينين (ثيديازورون TDZ) أكثر كفاءةً من الـ BAP(Leblay *et al*, 1991; Korban *et al*,1992; Escalettes and Dosba,1993;DeBond *et al*, 1996; Sarwar and Sirvin,1997; Hemmat and Grant,1998).

كما وجد أن للأوكسينات IAA وIBA وNAA تأثيرٌ في التجديد (Yancheva *et al*, 2003).

من أجل تأسيس نظام تجديد فعال، فإن للحالة الفيزيولوجية ونوع المستزرعة أهمية كبيرة في الاستجابة. فقد وجد Caboni *et al* (2000) أن متوسط عدد النموات العرضية المتجددة من قمم النموات الخضرية من أصناف التفاح المختلفة كانت أعلى بشكل معنوي من الأوراق.

1.1.5. تأثير منظمات النمو في نسبة التجديد وعدد النموات المتجددة:

في الدراسة الحالية، ظهر تباين وبفروقات معنوية في نسبة ومعدل إنتاج النموات من كل جزء نباتي باختلاف تركيز الـ TDZ والـ BAP على مستوى معنوية ($p>0.01$).

وعموماً، مع الأخذ بعين الاعتبار النسبة المئوية للتجديد ومتوسط عدد النموات المتشكلة من كل جزء نباتي، فان أفضل إنتاج للتفرعات كان على الوسط المزود بـ 2.0 mg/l TDZ و 0.20 mg/l NAA. وبالمقابل فإنه عند تخفيض تركيز الـ TDZ أو استبداله بالـ BAP، أدى ذلك إلى تخفيض نسبة التجديد. هذا التأثير للـ TDZ يتوافق مع عدد من الدراسات في نباتات مختلفة(Malik and Saxena 1992; Kanyand *et al*. 1994; Jain and Rashid 2001, Thomas 2003.)

وقد عزا Gill and Saxena (1992) الدور الأساسي للـ TDZ إلى التفاعل مع المخزون الداخلي للهرمونات وبالتالي التأثير على التعضي وتكوين وتخليق الأعضاء النباتية وإعاقة عمل الأوكسين. وعموماً، إن لتفاعل الأوكسينات مثل الـIAA, NAA, IBA مع السيتوكينينات دور أساسي أيضاً في التجديد من الورقة (Yancheva *et al*. 2003). فربما يزداد تشكل الأعضاء مع استخدام الـ TDZ و NAA معاً. حيث يظهر هذا التركيب TDZ-NAA في وسط الزراعة

تأثيراً واضحاً على تكوين النموات والتجديد من الورقة في التفاح. وفي الدراسة الحالية، لوحظ أن استخدام الـNAA مع الـTDZ ينتج استجابة مُرضية، والتي تظهر أن هذه هي المعاملة الأفضل للتخلص من المواد الفينولية وهذا التأثير ربما يعزا أيضاً إلى أكسدة الفينولات بالـ auxin oxidase وكانت نسبة تخليق النموات والاستجابة للتعضي ذات تأثير واضح معنوي وذلك تبعاً لنمط الجزء النباتي المستخدم وتراكيز المواد والهرمونات المستخدمة (Sarwar and Skirvin 1997; D'Angeli *et al*. 2001; Magyarné *et al*. 2001; Jámborné and (Dobranszki 2005.

اعتمد التجديد من النموات العرضية على نوع المستزرعة وتركيب الوسط الغذائي وتركيز الهرمونات.حرض الوسط Q وكذلك الوسط DKW/WPM (1:1) حرضت تشكيل الأعضاء بشكل كبير وأفضل من الأوساط QL/WPM (1:1) وCP و MS وDKW أو WPM. من الممكن أن يكون ذلك تبعاً للتأثير المختلف للضغط الأسموزي المولاري والاختلافات في المحتوى من العناصر المعدنية مثل النتروجين. إن الاختلاف في تراكيز الأملاح يمكن أن يكون له تأثير على الاختلافات في كفاءة تجديد النموات. حيث وجد(Yang and Schmidt,1992) أن وسط N6 (Chu, *et al*,1975) كان أفضل للحصول على نموات عرضية متجددة من الأوراق للكرز الحلو بينما لم يوجد اختلافات معنوية بين MS و QL. كما وجد(Welander,1988; Fasolo *et al*, 1989) أن الأملاح المعدنية والعضوية N6 كانت مناسبة لكل الأنماط الوراثية بالتفاح، وهذا لا يتوافق مع نتائج دراستنا حيث استخدمت العناصر اللاعضوية لـN6 والعضوية لـ MS بينما يتوافق مع دراسات. (Caboni *et al*, 1996).

إن للسيتوكينينات مثل TDZ وBAP تأثيراً كبيراً في تحريض التجدد في التفاح وعدد من النباتات المتخشبة الأخرى، فقد أظهر الـ TDZ كفاءة أكثر من الـ BAP korban *et)* *al*,1992; Debondet, 1996) استخدم الـTDZ في تحريض تشكيل النموات العرضية في التفاح(Van Niewkerket *at al*, 1986; Theiler-Hedtrich and Theiler, 1990; Fasolo *et al*, 1990; Sarwar and Sirvin, 1997; McAdam-O'Connell *et al*, .(2004

ومن أجل تجديد النموات العرضية من الورقة، استخدمت تراكيز متنوعة من الـ TDZ والـ BAP، وتم تحديد التركيز المثالي من كل منها على حدا، حيث تبين كفاءة الـ TDZ بتركيز 2 مغ/ل وبشكل أفضل من استخدام الـBAP بتركيز 5 مغ/ل، وقد تفوق الثيديازورون على البينزيل أدنين بتأثيره في تخليق النموات العرضية.

طور McAdam-O'Connell *et al* (2004) طريقة تجديد من الورقة من غراس التفاح Bramely فبينما استجاب الصنف Green Sleeves بما يتوافق مع الدراسات السابقة، فقد أنتج

الصنف Bramely نموات أقل حيث تم الحصول على النموات منه باستخدام الـ BAP بتركيز 5 مغ/ل مع 1مغ/ل NAA، بينما لم يؤد الـ TDZ إلى زيادة معدل التجدد بشكل كبير.

تم في الدراسة الحالية الحصول على معدل تجدد مرتفع باستخدام الـTDZ وكذلك الـ BAP بتركيز 5 مغ/ل لكن مع NAA بتركيز 0.2 مغ/ل، بينما في الدراسة السابقة لـ McAdam *et al*, (2004) فقد استخدم تركيز 1مغ/ل.من الـ NAA.

وبشكل مماثل فإن للأوكسينات مثل NAA, IBA, IAA دوراً كبيراً في تأثيرها في تجديد النموات العرضية (Magyarne *et al*, 2001; Jamborne, and Dobranszki, 2005)

وقد أمكن في الدراسة الحالية زيادة تشكل النموات العرضية باستخدام التركيب TDZ مع NAA وتبين أن هذا التركيب هو طريقة جيدة لتشكيل النموات العرضية من الأوراق في الصنف والأصل المدروسين.

كما يعتمد ذلك على الصنف النمط الوراثي ونوع المستزرعة (Andrea and Jehle, 2005) حيث حصل هذان الباحثان على أفضل نسبة للتجديد على وسط QL الحاوي 5 مغ/ل BAP+0.5 مغ/ل IBA عند استخدام المقاطع العقدية في صنف الكرز "Schneiders" بينما كان TDZ الأفضل بأصناف أخرى بالتوافق مع IBA على حين كانت النتائج أفضل عند استخدام TDZ بالتوافق مع الـ NAA بدءاً من الأوراق (Bhagwat and Lane, 2004).

وأيضاً وجد Mante *et al* (1989) أنه بالرغم من حدوث التجديد بوجود الـ BAP إلا أن الـ TDZ أعطى نتائج أفضل لبدء التشكل المورفولوجي في بعض اللوزيات. وهذا على عكس ما وجده Tang *et al* (2002) بأن الـ BAP أكثر كفاءة من TDZ من أجل تحريض النموات العرضية في كل من الكرز الحلو والحامض، على حين وجد Yang and Schmidt,(1992) أنه لا يوجد اختلافات بين كلا السيتوكينين. كما وجد Andrea and Jehle (2005) أن زيادة تركيز الـ NAA أدت لنقصان كفاءة التجديد.

عند الدراسة الأولية للتجديد من الورقة في صنف التفاح Golden Delicious والأصل MM111 أدى استبدال الـ NAA بالـ 2,4,D إلى تكوين الكالوس ومنع تجديد النموات، لذا تم استبعاده فيما بعد.

طور Caboni *et al* (2000) طريقة من أجل تخليق وتشكل النموات العرضية من التفاح عن طريق تحريض تشكل الكالوس باستخدام وسط MS دون وجود الglycine والمزود بـ 17.8 µM BA و 2.7 µM NAA وقد وجدوا أن درجة تشكل وتجديد النموات العرضية بدءاً من القمم النامية كان ذو دلالة معنوية عالية أكثر من تلك الناتجة عن التجديد بدءاً من نسيج الورقة، بينما في الدراسة الحالية تم تجاوز مرحلة الكالوس وتجديد النموات العرضية بشكل مباشر من الأوراق.

2.1.5. تأثير جزء الورقة في تشكل النموات الجديدة:

استخدم في الدراسة الحالية الأوراق الفتية كأجزاء نباتية للتجديد من نسيج الورقة وتم وضع الجزء العلوي للورقة في تماس مع سطح وسط الزراعة وذلك تطبيقاً لما في الغالبية العظمى من الدراسات المنشورة، التي استخدمت الأوراق الفتية من التفاح كأجزاء نباتية للتجديد والتعديل الوراثي. وتم تحسين تجديد السلالات المعدلة وراثياً من الأوراق عن طريق وضع الجانب العلوي للورقة في تماس مع وسط الزراعة، حيث من المحتمل أن السبب يعزى إلى زيادة تبادل الأوكسجين نظراً لأن المسامات النباتية تقع على الجانب القاعدي للورقة (Yepes and Aldwinckle, 1994).

إن أجزاء الورقة المتصلة مباشرة إلى السويقة أكثر قدرة على التجديد، وهذا ما يثبته تكوين النموات العرضية من أوراق أصل التفاح M26 (Ferradini *et al*. 1996).

تتوافق النتائج الحالية مع المعطيات التي توصل إليها Ferradini *et al*.(1996) و Sicurani *et al* (2001) حيث أظهروا أن جزء الورقة يعتبر جزء نباتي جيد للإكثار وتكوين النموات العرضية.

تبين أنه من المحتمل أن يحدث التشكل العضوي للنموات دون المرور بمرحلة الكالوس(Bassi and Cossio,1994) وهذا ما تم في الدراسة الحالية أيضا، وقد نشر Sriskandarajah and Goodwin (1998) أن تهيئة نموات التفاح لعدة أيام في وسط زراعة سائل مناسب يعزز القدرة التجديدية لمستزرعات الأوراق عن طريق تقليل الحاجة لمرحلة كالوس طويلة، لكن مع ذلك، لم ينشر عن هذه العملية لتهيئة المستزرعات لاحقاً في بروتوكولات التعديل الوراثيالوراثي.

وفي الدراسة الحالية، تم تحريض تشكل النموات الخضرية مباشرة دون مرحلة كالوس وسيط من أجل تجنب احتمال ظهور تغيرات جسمية في النموات المتشكلة والحفاظ على النوع الوراثي.

إن الإختلاف بين أجزاء الورقة المختلفة للنبات نفسه ربما يعود إلى المستويات المختلفة في المحتوى الداخلي للأجزاء النباتية المأخوذة من مواقع مختلفة(Magyarné *et al*. 2001; Jámborné and Dobranszki 2005) تتوافق النتائج الحالية مع المعطيات التي توصل إليها Ferradini *et al*. (1996) و Sicurani *et al* (2001) حيث أظهروا أن جزء الورقة يعتبر جزء نباتي جيد للإكثار وتكوين النموات العرضية.

لا بد من ملاحظة أن عملية الاختيار وانتخاب الجزء النباتي، وعملية القطع والجرح ودراسة وسط الزراعة لها أهميتها في نجاح عملية التجديد من الورقة إذ أظهرت الدراسة أن الجزء الوسطي من الورقة هو الجزء الأكثر فعالية في التجديد، وقد تم الحصول على أعلى متوسط عدد نموات متجددة وأعلى نسبة تجديد من كل خزعة نباتية من الجزء الوسطي للورقة. يمكن أن يعزى

الاختلاف بين أجزاء الورقة من النبات نفسه في استجابتها لتشكيل النموات العرضية إلى المستويات المختلفة في محتواها من منظمات النمو النباتية في الجزء النباتي المأخوذ من مواقع مختلفة في النبات(Jamborne and Dobramszki, 2005; Magyarne *et al*, 2001)
كما يمكن أن يعزى أيضاً إلى اختلاف مساحة القطع في أجزاء الورقة المختلفة وبالتالي كلما كان حجم القطع أكبر كلما كان أفضل للتجدد.

كما تظهر نتائج الدراسة أن تطور مرحلة أو حالة ونوعية الأوراق المستخدمة في التجديد تلعب دوراً أساسياً في نجاح عملية التجديد والحصول على متجددات جيدة من نسيج الورقة. حيث تم الحصول على أفضل النتائج باستخدام أجزاء الورقة الخضراء اللامعة الفتية وغير الملتفة من نباتات قوية بعمر 21 يوماً ولاسيما عند وضع السطح العلوي للورقة ملامساً مباشرة لوسط التجديد (Bassi and Cossio, 1994; Caboni *et al*, 1996) وهذا ما يتوافق مع الدراسة الحالية ، بينما تكون الأجزاء النباتية المأخوذة من نباتات أكبر من ذلك غير مستجيبة للتجديد وغير فعالة.
لقد ثبت أنه يمكن استخدام الأوراق من أجل الإكثار الخضري السريع للنباتات ضمن الشروط المثالية للإكثار و من أجل الحصول على نموات خضرية معدلة وراثياً في دراسات التعديل الوراثي والذي تم أيضاً في الدراسة الحالية.
وتبقى عملية تجديد النموات العرضية صعبة في كثير من الأصناف والأنواع. حيث تختلف الظروف المثالية لتجديد النموات تبعاً **للنمط الوراثي**. فقد وصلت كفاءة التجديد في التفاح إلى 50 % لمعظم الطرز الوراثية. وهذه النسبة يمكن تطويرها بالطرائق الحديثة (Tabori, 2011)

3.1.5. تأثير شدة الإضاءة في التجديد والقدرة على تشكيل الأعضاء :

أدى كبح تعريض المستزرعات الورقية يومياً لمدة خمس دقائق إلى الأشعة الحمراء (651 نانومتر) إلى تشكل النموات العرضية بنسبة 80%، بينما تعريضها أيضاً لمدة خمس دقائق يومياً للأشعة فوق الحمراء (طول موجة 729 نانومتر) وذلك فوراً بعد تعريضها للأشعة الحمراء قد أبطل تأثير كبح الأشعة الحمراء لتشكل النموات العرضية (Liu *et al*, 1983b).
في الدراسة الحالية، حضنت المستزرعات خلال الأسابيع الثلاث الأولى من الزراعة في الظلام الكامل دون التعريض للإضاءة ثم عرضت للإضاءة من لمبات فلورسنت بيضاء بشدة 10 $\mu mol/m^2/sec$ لمدة أسبوع ثم رفع شدتها بعد ذلك إلى 50 $\mu mol/m^2/sec$ لمدة أربعة أسابع أخرى. وقد بين Bassi and Cossio (1994) أن الإضاءة أعطت نتائج إيجابية في التجديد، بينما أدى حفظ أطباق بتري بالظلام في الـ 25 يوماً الأولى من التجديد إلى خفض نسبة التجديد وهذا بخلاف ما حصلنا عليه. كما أعطى الضوء الأبيض أعلى عدد من النموات المتجددة بكل

ورقة وهذا ما توافق مع الدراسة الحالية حث تم الحصول على نتائج جيدة وايجابية بالتعريض للضوء الأبيض بعد فترة الظلام .

4.1.5. تأثير خدش و جرح الأوراق في تشكل النموات العرضية:

تم تشكيل النموات العرضية من الأوراق بقطع الأوراق وخدشها باستخدام ملقط خاص غير محدث للجروح حسب (Norelli *et al;*1996). وهذا أيضاً ما تم في الدراسة الحالية. لقد فسر Hemerly *et al*(1993) أن خدش الأجزاء النباتية يحرض تعبير المورثات على الانقسام الخلوي والتمايز. تم إثبات التأثير الإيجابي للخدش على تجديد النموات في الأصل M26 من قبل (Sicurani *et al*; 2001) وفي الصنف رويال غالا من قبل(Norelli *et al;*1996) وكذلك في الدراسة الحالية، وكان للخدش تأثيراً إيجابياً في الصنفين والأصلين المدروسين حيث حرض تشكل النموات العرضية، بينما أدى الخدش (الزائد) إلى إفراز المواد الفينولية واسوداد الجزء النباتي وموته.

5.1.5. تأثير مصدر الكربون والـ MES وعوامل التهليم المستخدمة في الاستجابة التعضي والنمو:

تبين أن الكربوهيدرات ليست مصدراً للكربون والطاقة فحسب، إنما تؤثر أيضاً في الضغط الأسموزي خلال التشكل العضوي(Thorpe and Murashige,1970; Verma and Dougall,1977) إن أكثر مصادر الكربون استخداماً هو السكروز لأنه أقل تكلفةً وجاهز للتمثيل وثابت نسبياً وهو من أهم الكربوهيدرات التي تنتقل في كثير من الأنواع النباتية (Andrea and Jehle;2005). وهناك دراسات تشير إلى أن هناك أنسجة نباتية محددة تحوي أو تستعمل كربوهيدرات مختلفة في الوقت نفسه (Mello *et al;* 2001). واستعمل السوربيتول بشكل ناجح لتحريض التشكل العضوي في التفاح *Malus domestica* (Karho, 1997). ووجد Andrea and Jehl (2005) أن السكروز كان ذا كفاءة تجديد أفضل بدءاً من المستزرعات الورقية وبتركيز (10-30)غ/ل والمثالي 20غ/ل وأعطى التركيز 30غ/ل في الدراسة الحالية نتائج ايجابية.

وكان **للجلرايت** تأثيراً إيجابياً في تصليب الوسط وجعله شفافاً هشاً في وجود الأملاح القابلة للذوبان بشكل جيد. ففي تجاربنا التمهيدية للدراسة، لوحظ عند استخدام الآغار لوحده كان يعيق رؤية نمو النبات أو التلوث البكتيري لقلة صفائه ونقاوته أو شفافيته لذا تم استبداله بالجلرايت أو استخدم الآغار مع الجلرايت بحيث يتم تقليل الكمية المستخدمة من الآغار في التجارب.

ويتم استخدام الجلرايت بدلاً من الآغار وذلك لأنه شفاف ونقي بشكل يكفي لرؤية نمو النبات إضافة إلى أنه يمكن استخدام كمية قليلة من أجل تهليم ليتر واحد من الوسط وهذا ما يضمن

تقليل تكاليف العمل ويزيد إمكانية مراقبة نمو النبات أوالتلوث البكتيري بشكل أوضح من استخدام الآغار(Pasqualetto *et al*, 1986). ولا تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة Szankowski *et al* (2003) الذين استخدموا الجلرايت gelrite 3% والذي نتج عنه فرط كبير في الرطوبة وظهور ظاهرة الشفافية أو ما يسمى الزجاجية hyperhydricity والذي توافق مع تطور غير طبيعي خلال طور التجديد. واستناداً إلى Pasqualetto *et al* (1986) الذين استخدموا تراكيز عالية والذين توصلوا للنتيجة نفسها فإننا نصل لنتيجة إن استخدام تراكيز عالية من المادة المهلمة قد يؤدي إلى الحالة نفسها لذا تم استخدام تركيز منخفض في الدراسة الحالية 5 مغ/ل والذي أعطى نتيجة إيجابية دون حدوث ظاهرة الزجاجية في الزراعات.

بينما وجد Caboni *et al*(1996) أن إضافة الجيلرايت بوجود وسط MS قد حسن كفاءة التجديد لكنه سرع حدوث ظاهرة الشفافية بالنموات المتجددة والتي وصفت بشكل واضح من قبل (Pasqualeto *et al*, 1986) ومن أجل تجاوز هذه الصعوبة تم إضافة مزيج من الآغار والجيرليت (0.3 و0.125%) على التوالي. بينما وجد في الدراسة الحالية أن الجيلرايت أفضل من الآغار لوحده وقد أدى إلى زيادة كفاءة التجديد ومن دون حدوث ظاهرة الشفافية وذلك نظراً لاستخدام تراكيز منخفضة من الجيلرايت (2.5%).

إن **لدرجة الحموضة** تأثيراً في امتصاص المواد المغذية وبالتالي فإنها تؤثر في فعالية تخليق وتحريض النموات، لذا تم استخدام الـ 2-N-Morpholino Ethane sulfonic acid (MES) في الدراسة الحالية من أجل ضبط حموضة وسط الزراعة وتأمين وسط معتدل الحموضة وبما أننا نعلم أن درجة الحموضة يمكن أن تؤثر في امتصاص المواد المغذية وبالتالي فإنها تؤثر في فعالية تخليق وتحريض النموات حيث أن الـMES مادة كيميائية غير فعالة وليس لها أي تأثيرات أخرى ولا تتفاعل مع أي أيونات أخرى(Bugbee and Salisbury, 1985). وعموماً، تبقى عملية تجديد النموات العرضية صعبة في كثير من الأصناف والأنواع. حيث تختلف الظروف المثالية لتجديد النموات تبعاً للنمط الوراثي.

2.5. التعديل الوراثي لأصناف وأصول التفاح المدروسة بمورثة *g2ps1* من نبات الجربيرا من أجل زيادة مقاومتها للأمراض الفطرية

تشفَر **المورثة *g2ps1*** لأنزيمات ذات خواصه متنوعة في نبات الجربيرا التزييني، فهي تشفر لأنزيم بيرون، وهو تختلف عن أنزيمات الـ Chalcon Synthase المعروفة بدورها في تكوين الصبغات Pigments النباتية ويختلف تسلسل الحموض الأمينية عن أنزيمات chalcon synthase النموذجية، وأيضاً خواصه الاستقلابية الهدمية مختلفة وتدل المعطيات على أنه تمثل

صنفاً جديداً من عائلة *CHS* الكبيرة والمورثات القريبة من هذه العائلة. فهي سابقاً اعتبرت بأنها عضو غير اعتيادي مختلف عن مورثات عائلة الـ *CHS* ولها تركيب مختلف ونمط تعبير وراثي أيضاً مختلف، وتشفر لأنزيم ذي خواص استقلابية فريدة. ولذلك أعيد تسميتها بدلاً من *gchs2* إلى *g2PS1* وذلك بناء على خواصها المتعلقة بتصنيع أنزيم البيرون فهي تستخدم الـ Acetyl-co-A و الـ Malonyl- co-A وتفاعلي تكثيف على عكس مورثات الـ CHS التي تشتمل على ثلاث تفاعلات تكثيف من أجل التصنيع الحيوي لنوعين من مشتقات البيرون هيدروكسي ميثيل هما: الجيربيرين والباراسوربوزايد اللذين يساهمان في مقاومة الأمراض الفطرية والحشرات أيضاً. الـ *gchs2* هو بروتين ذو قرابة مع *CHS* وهو أنزيم يستخدم Asetyl-co-A كركيزة بداية وينجز تفاعلي تكثيف باستخدام Malonyl- co-A ليشكل قالب البيرون الطبيعي, الأنزيم أيضاً يزيل الكربون (CO_2) بسلسلة Malonyl- co-A ليشكل Acetyl-co-A، وبالتالي يستطيع أن يصنع ركيزته الخاصة. فهو يستخدم Acetyl-co-A كركيزة بداية بدلاً من فينيل بروبانويد co-A وينجز تفاعلي تكثيف بدلاً من ثلاثة ويحرر 6- ميثيل-4-هيدروكسي-2- بيرو- (ميثيل بيرون). الناتج من هذه التفاعلات هو الباراسوربوزايد وهو مركب فعال مضاد لتغذية يرقات الفراشات الصفراء وهو مادة طليعية لحمض الباراسوربيك المعروف بتثبيطه للفطور والبكتيريا. وقد أثبتت التجارب الأولية على قابلية الإصابة بالمسببات المرضية للسلالات المضادة لـ Anti-GCSH2 أن الجربيرين والباراسوربوزايد ومشتقاتهما ذات خواص وقائية ضد المسببات الفطرية وهجوم الحشرات أيضاً في الجربيرا. وقد طور Eloomaa *et al* (1993) طريقة تجديد و تعديل وراثي لنبات الجيربيرا التزييني من العائلة (Astreaceae) بواسطة بكتريا التدرن التاجي المنزوع منها مورثة الشراسة والحاوية على الـcDNA كاملاً بالاتجاه المعاكس والذي يشفر لأنزيم الثالكون في الجيربيرا تحت تحكم البروموتر 35S والمورثة المعلمة *nos–npt II*. وفي عام 1995 نشر Helariutta وزملاؤه أن المورثة الشبيهة بأنزيم الثالكون النشط أثناء تطور التويج Corolla عبر عنها بشكل تفصيلي وهي تشفر لأنزيمات ذات خواص هدمية متنوعة في الجيربيرا. وكانت هناك دراسات لاحقة عن أنزيم الثالكون (CHS) والأنزيم القريب منه Stillbene synthase (STS) والتي اقترحت أن بنية المورثات الشبيهة بالثالكون في النباتات قد أدت إلى نشوء أشكال مختلفة (Helariutta *et al*,1995; Eloomaa *et al*,1993). ويعد التعديل الوراثي طريقة جديدة لتحسين صفات معينة بدون إعادة ترتيب في التركيب الوراثي الموجود في أصناف وأصول التفاح التجارية. لهذا تم اختيار هذه المورثة لنقلها إلى التفاح لاختبار مدى فعاليتها في مقاومة الأمراض الفطرية في التفاح مثل البياض الدقيقي والجرب، حيث تم إجراء التعديل الوراثي بنجاح والحصول على متجددات محورة على أوساط حاوية على العامل الانتخابيPPT بتركيز 3 مغ/ل، والتي تم إكثارها أيضاً بوجود عامل الانتخاب

للحصول على نباتات كافية للاختبارات المطلوبة من أجل التأكد من انتقال المورثة المطلوبة للصنفين والأصلين المدروسين واختبارها والتأكد من التعديل الوراثي بالطرائق الجزيئية ومن ثم تجذيرها والحصول على تفاح محور وراثياً ليتم اختبارها ضمن ظروف البيت الزجاجي من حيث تحملها للأمراض الفطرية.

عادة ما يتم وصف كفاءة التعديل الوراثي كنسبة مئوية للمستزرعات التي تنتج نموات خضرية معدلة وراثياً. ذكرت الإجراءات المبكرة من التعديل الوراثي كفاءة تحوير بنسبة 0.2 إلى 15%. بعد التحسين في هذه الإجراءات، يمكن أن يكون معدل التعديل الوراثي كبيراً حتى 80% (Aldwinckle and) Malnoy, 2009). تراوحت كفاءة التعديل الوراثي في الدراسة الحالية بين0.1- 0.6 %حسب الصنف/الأصل.

وكانت فترة 3 أيام من الزراعة المشتركة فعالة بدليل الحصول على عدد من المتجددات بعد 3– 4 أسابيع من أقراص الأوراق المعاملة بالأغروباكتريوم المعدلة وراثياً وزراعتها في وسط الزراعة المشتركة ونقلها إلى وسط الإكثار بعد إجراء التعديل الوراثي والتجديد وذلك بوجود عامل الانتخاب PPT ، ولم يلاحظ أي تأثير إيجابي في كفاءة التعديل الوراثي مع زيادة مدة الزراعة المشتركة، ولم يجد Yao *et al* (1999) أي تأثير لتغير مدة الزرع المشترك في كفاءة نقل المورثة، واستخدم أقصر فترة للزرع المشترك (2 يوم) في تجاربه كافةً وتوافق مع الدراسة المعدة حول نقل مورثة الـ GUS للصنف Royal Gala باستخدام صبغ الـ GUS بعد 5 أيام من الزراعة المشتركة. درس James *et al* (1993a) تأثير مادة الأسيتوسيرينغون Acetosyringone كعامل محرض لتعبير مورثة الشراسة في بكتريا التدرن التاجي والمادة الواقية الأسموزية Betaine Phosphate على كفاءة نقل المورثة في خزعات صنف التفاح Green selves ووجدوا أن إضافة هذين المكونين إلى محلول البكتريا لمدة 6 ساعات قبل عملية التلقيح بالبكتريا قد عزز وبشكل كبير كفاءة نقل المورثة. بينت التجارب الأولية أن كفاءة نقل المورثة ازدادت بشكل كبير عند استخدام الأسيتوسيرينغون وقد تطابق ذلك مع دراسة(Yao *et al*,1999) لصنف التفاح Green sleeves وكذلك مع دراسة(James *et al*,1993)

وفي عام 1994 رأى De Bondt *et al* أن التعديل الوراثي لأوراق التفاح صنف Jona Gold بسلالة بكتريا التدرن التاجي EHA101(PEH a101) أعطى كالوس معدل وراثياً بمعدل خمسة أضعاف مقارنة بسلالتين من البكتريا المجردة من مورثة الشراسة disarmed ولاحظ أن التركيب الهرموني وطبيعة مصدر الكربون في وسط الزراعة المشتركة أثر بشكل كبير جداً على كفاءة نقل المورثة.

ونشر Norelli *et al* (1996) عن التعديل الوراثي لصنف التفاح 'Royal Gala' باستخدام بكتريا التدرن التاجي ووجد أن خدش الأوراق بالملقط غير المحدث للرضوض non-traumatic

قد زاد بشكل كبير نسبة التعديل الوراثي مقارنة مع الأوراق المقطوعة. وقد لاحظوا أن تعبير المورثة الواسمة gus ظهر عند مواقع الخدوش بدلاً من مواقع قطع الأوراق. واستنتجوا أن خدش أوراق التفاح قبل التعديل الوراثي يزيد مواقع العدوى بالبكتريا مما يؤدي إلى مستوى أعلى من التعديل الوراثي. ولهذا السبب استخدم الملقط نفسه واتبعت إجراءات الخدش نفسها في الدراسة الحالية. واستخدمت المورثة المسوؤلة عن بروتين الوميض الأخضر التركيبي في أربعة أصناف من التفاح (Delicious و Golden Delicious و Royal Gala وGreen sleeves) باستخدام سلالة الآغروباكتيرييوم (EHA101) التي تحوي بلازميد PDM96.0501 (Welander *et al*,1998)، بينما استخدمت في الدراسة الحالية سلالة الآغروباكتيريوم EHA105. وفي عام2001 نشر Szankowski *et al* بحثهم حول كفاءة التجديد التعديل الوراثي باستخدام طريقة التعديل الوراثي بمساعدة الأمواج فوق الصوتية حيث استخدموا ثلاثة أصناف هي هولشتاين كوكس،Glosta (غلوستا) و Elestar (إلستار)، ودلت نتائجهم على وجود مورثة الـ gus في صنف Holoshtein(هولشتاين كوكس). واستنتجوا أن تحسين كفاءة التعديل الوراثي مرتبط بالنمط الوراثي لأن الصنفين الآخرين لم يتأثرا. من جهة ثانية، تبين أن معدلات التجديد انخفضت عند استخدام الأمواج الصوتية بشكل واضح عند استخدام الأمواج الصوتية حسب زمن المعاملة. في الدراسة الحالية، لم تستخدم الأمواج فوق الصوتية بينما أعطى خدش الأوراق بالملقط غير المحدث للجروح فعالية جيدة في التعديل الوراثي.

خلال عملية التعديل الوراثي، تميل بكتريا التدرن التاجي إلى تشكيل مستعمرات بكتيرية على الجزء النباتي المزروع. ومن أجل الحد من تطور هذه البكتيريا، يتم تجديد الأنسجة المستزرعة عادة على أوساط زراعة تحتوي على مضاد حيوي. لذلك، يعتمد تجديد النباتات المعدلة وراثياً وقد استخدمت ثلاثة مضادات حيوية بتركيزات مختلفة للسيطرة على انتشار بكتريا التدرن التاجي أغروباكتريوم في التفاح هي: كاربنسيللين وسيفاتوكسيم وتيكاريسيللين. ويعد السيفوتاكسيم الأكثر استخداماً في التفاح بمعدلات تراكيز بين 500-200 مغ/ل، يليه تيكاريسسلين ثم كاربنسيللين(Norelli *et al*,1994;1996; Szankowski *et al*, 2009; Igarashi *et al*, (2002) وتشمل المضادات الحيوية الأخرى المستخدمة: كالفوران Claforan (Kotoda *et al*,2006) وسيفوكزيتين Cefoxitin (Liu *et al*,1998). تم في الدراسة الحالية استخدام سيفوتاكسم وتيكاريسللين وكومباكتام والتي حدت من نمو البكتريا بشكل جيد. وعموماً، في معظم الحالات (90%) استخدمت مورثة المقاومة للمضاد الحيوي كانامايسين كمورثة انتخاب. يعتمد تركيز الكانامايسين المستخدم لتجديد التفاح المعدل وراثياً على الصنف. وقد استخدم اثنان آخران من المضادات الحيوية للانتخاب هما: هيغرومايسين HYG(Dolgov *et al*, 2000; 2004) وفوسفينوثريسينPPT (Szankowski *et al*, 2003). يبدو أن المستزرعات من أصناف التفاح

المختلفة لديها حساسيات مختلفة للكانامايسين. في الواقع، حسب الصنف، تراوح التركيز الأمثل للكانامايسين المستخدم في الانتخاب بين 25 و100مغ/ل. استناداً إلى حساسية أصناف التفاح، أجري انتخاب بعض أصناف التفاح باستخدام تركيز منخفض من الكانامايسين بعد الزراعة المشتركة، تلتها زيادة في التركيز في إعادة الزراعات اللاحقة(Welander *et al*,1998; Murata *et al*, 2000; 2001; Wilson and James, 2003; Dolgov and Schestibratove, 2004) يتيح التركيز المنخفض من المضادات الحيوية النمو السريع للكالوس وبدء تشكل النموات الخضرية، في حين أن التركيز الأعلى في نهاية المطاف يقضي على النموات الخضرية غير المعدلة وراثياً. وقد استخدم الإجراء نفسه في مبيدات الأعشابPPT بواسطة (Szankowski *et al*, 2003).

درس (Yao, *et al*. ,1999) الكلورسولفون كمادة انتخاب بدلاً من الكانامايسين في تجاربه على التعديل الوراثيالتفاح، واختبر 3 تراكيز لهذا المضاد الحيوي هي 50,10 ,250 ميكروغرام/ليتر. وذلك لأجزاء ورقية من النباتات المعدلة وراثياً بالبلازميد pKIW110 حيث تجددت على الوسط الذي يحتوي على 250 ميكروغرام/ ليتر من الكلورسولفون، بينما ماتت أجزاء الأوراق من النباتات غير المعدلة وراثياً بتركيز 10 ميكروغرام/لتر من الكلورسولفون(قتلت بشكل كامل قبل أن يحدث التجديد أو أنتجت عدة نموات غير معدلة وراثياً). كما لوحظت نتائج مشابهة باستخدام المضاد الحيوي الجينتامايسين (Norelli and Aldwiinckle; 1993) والمبيد العشبي فوسفينوثريسين (Bolar, *et al*;1998) وكلاهما يبدو أنهما غير ملائمين كعامل انتخابي في تحوير التفاح.

وأخيراً، تجدر الإشارة إلى أنه لا توجد دراسات منشورة حول الأخطار البيئية المحتملة للتفاح المعدل الوراثي. ربما يعزى ذلك إلى أن الباحثون مهتمون بإنتاج أصناف تفاح هامة تجارياً معدلة وراثياً ذات فوائد بيئية مثل تقليل استخدام المبيدات. وبالتالي يمكن القول أن نباتات التفاح المعدلة وراثياً والتي تحوي مورثات من أجناس أخرى هي شيء مؤكد في المستقبل القريب . (Polanco *et al*, 2010)

3.5.تحليل الـ PCR: Polymerase Chain Reaction Analysis

استخدم الـ PCR لإثبات التعديل الوراثي في السلالات المتجددة والتي عاشت على وسط الانتخاب، وقد أثبت اختبار الـ PCR للنموات المفترضة بأنها معدلة وراثياً، وجود مورثة الانتخاب *bar* في كل النباتات المختبرة بالـ PCR والتي أظهرت وجود حزمة المورثة حسب

الحجم المتوقع بحجم 447bp باستخدام البادئات المناسبة ، وكذلك وجود المورثة *g2ps1* بحجم 1244 bp باستخدام بادئات، بينما لم يلاحظ أي حزمة في عينات الـDNA المعزولة من النباتات الشاهد غير المعدل الوراثي وكذلك لم يلاحظ أي حزمة في العينة الشاهد السلبي الذي يحتوي على الماء بدلاً من الـ DNA كشاهد سلبي. لوحظ وجود عدد محدود جداً من النموات التي ظهرت في وسط التجديد لكنها ماتت بعد نقلها إلى أوساط الإكثار المحتوية على عامل الانتخاب. وقد تم تجذير النباتات المعدلة وراثياً مخبرياً على وسط MS مع 1 مغ/ل IBA ثم تمت تقسيتها تدريجياً تحت ظروف الاحتواء في غرف النمو.

6.الاســـــــــتنتاجات

1- تم التوصل إلى طريقة سهلة وعملية للتجديد من أقراص الأوراق مباشرة ودون المرور بمرحلة الكالوس للصنفين والأصلين المدروسين وذلك كشرط أساسي للتعديل الوراثي.

2- تبين أن للسيتوكينينات TDZ وBAP دوراً أساساً وهاماً في التجديد مباشرة من نسيج الورقة للصنفين والأصلين المدروسين، وثبت الـ TDZ أنه أكثر فعالية من الـBAP في إنتاج وتحفيز التجديد، لكن ومع ذلك فإن الـ BAP له خاصيات تتميز عن الـ TDZ ويمكن أن يحل مكانه.

3- تم التوصل إلى طريقة جيدة للتعديل الوراثي بنجاح والحصول على متجددات معدلة وراثياً على أوساط محتوية على العامل الانتخابي بتركيز 3 مغ/لPPT في كافة مراحل التجديد والإكثار

4- استخدمت المورثة *bar* المعزولة من الـ Streptomyces hygroscopicus كمورثة لانتخاب النباتات المعدلة وراثياً، وهي تؤثر في مقاومة المبيد العشبي فوسفينوثريسين/غلوفوسينات أمونيوم (glufosinate, PPT)، بينما تبين الدراسات المرجعية أن أكثر مورثات الانتخاب المستخدمة في التعديل الوراثي للتفاح هي المورثة: نيومايسين فوسفو ترانسفيراز (*npt II*) المسؤولة عن مقاومة المضاد الحيوي" الكانامايسين".

8- تعد هذه الدراسة الأولى عالمياً التي تستخدم هذه المورثة للتعديل الوراثي للتفاح.

10- تعد النتائج الأولية التي تم الحصول عليها في التعديل الوراثي نتائج واعدة، بينت إمكانية إنتاج نباتات تفاح معدلة وراثياً تحوي المورثة *g2ps1* المعزولة من نبات الجربيرا التزييني بوساطة الأغروباكتريوم كناقل ناجح للمورثات يمكن أن تطبق بنجاح على أصناف وأصول تفاح أخرى هامة في سورية وغيرها.

7 .المقترحـــــــات

1. استخدام طريقة التجديد المباشر من نسيج الورقة التي طورت في هذه الدراسة وذلك كشرط أساسي للتعديل الوراثي لأصول وأصناف تفاح أخرى.

2. تطبيق طريقة التعديل الوراثي بوساطة الأغروباكتريوم على أصناف وأصول تفاح أخرى هامة في سورية.

3. متابعة الكشف والتأكد من التعديل الوراثي باستخدام Southern blot analysis لتحديد عدد النسخ من المورثة التي دخلت في االسلالات المعدلة وراثياً ودراسة التعبير الوراثي للمورثة *g2ps1*

4. تقييم السلالات الناتجة من حيث مقاومتها للفطور الممرضة وبشكل أساسي مرضي البياض الدقيقي وجرب التفاح وذلك من خلال العدوى الصناعية في ظروف البيت الزجاجي.

4.النتائـــــــج

1.4. تأسيس زراعات الأنسجة النباتية:

تم تأسيس زراعات الأنسجة لكل من الصنفين والأصلين المدروسين وذلك بغية الحصول على مادة نباتية جيدة من أجل دراسة التجديد من نسيج الورقة والتعديل الوراثي للصنفين والأصلين المدروسين. وقد كانت نسبة التلوث مرتفعة وقد أعطى الكلوراكس التجاري بتركيز 25% نتائج مقبولة وبنسب تعقيم بلغت 70 و50 و80 و 65% للصنفين والأصلين المدروسين على الترتيب. وفي مرحلة الإكثار تشكلت النموات الخضرية الجديدة بعد أسبوعين من الزراعة الأولية على الوسط الأساس واستمر تطور هذه النموات حتى 4-5 أسابيع ولوحظ تشكل النموات الخضرية استمر إكثار النموات الجديدة نحو 6 أشهر وبعدها نقلت إلى أوساط الاستطالة لتؤخذ منها المادة النباتية لدراسة التجديد من الورقة كشرط أساسي للتعديل الوراثي. والجدول11 ويبين نتائج إكثار الزراعات التأسيسية للصنفين والأصلين على وسط MS المضاف له 1 مغ/ل BA

جدول 11: نتائج تأسيس زراعات الأنسجة للصنفين والأصلين المدروسين

الصنف أو الأصل	متوسط عدد النموات	متوسط طول النمو/ سم	النسبة المئوية لنجاح التعقيم%
الصنف Golden Delicious	4.50	1.51	70
الصنف Royal Gala	5.00	1.45	50
الأصلMM111	4.36	1.52	80
الأصل M26	5.40	1.80	65

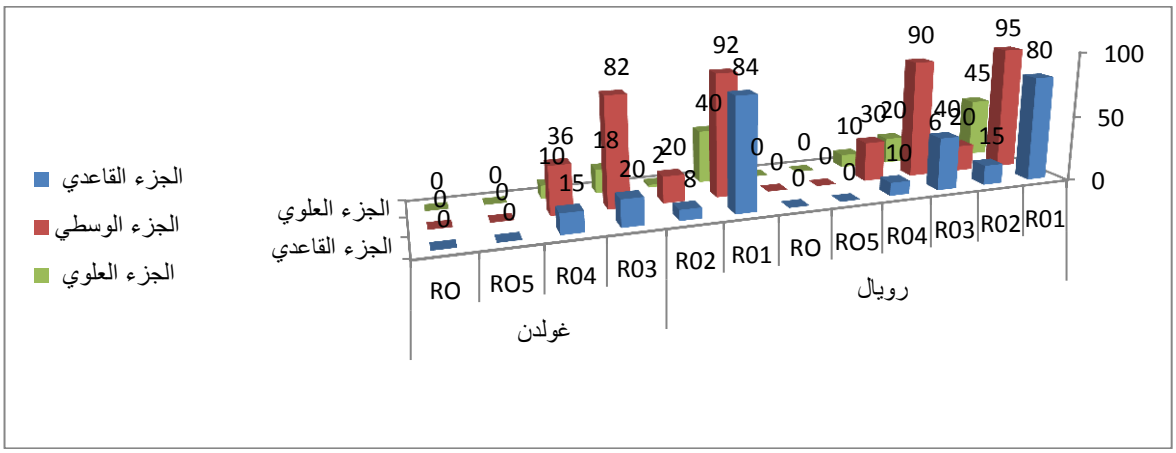
2.4. تجديد النموات الخضرية من الأوراق:

تم إيجاد طريقة التجديد من نسيج الورقة وذلك باستخدام وسط موراشيج وسكوغ الذي يحوي البنزيل أدنين بيورين BAP بتركيز5 مغ/ل أوTDZ بتركيز2 مغ/ل مع إضافة النفتالين أستيك أسيد NAA بتركيز 0.2 مغ/ل. بدأت المستزرعات النباتية بالتجدد خلال أربعة أسابيع من بدء الزراعات على أوساط التجديد واستمرت النموات الجديدة بالتشكل حتى الأسبوع الثامن من الزراعة حيث لم يظهر أي نمو بعد ذلك. وقد تشكلت عدة نموات في أطباق الزراعة خلال 4–8 أسابيع على وسط موراشيج وسكوغ المكمل:

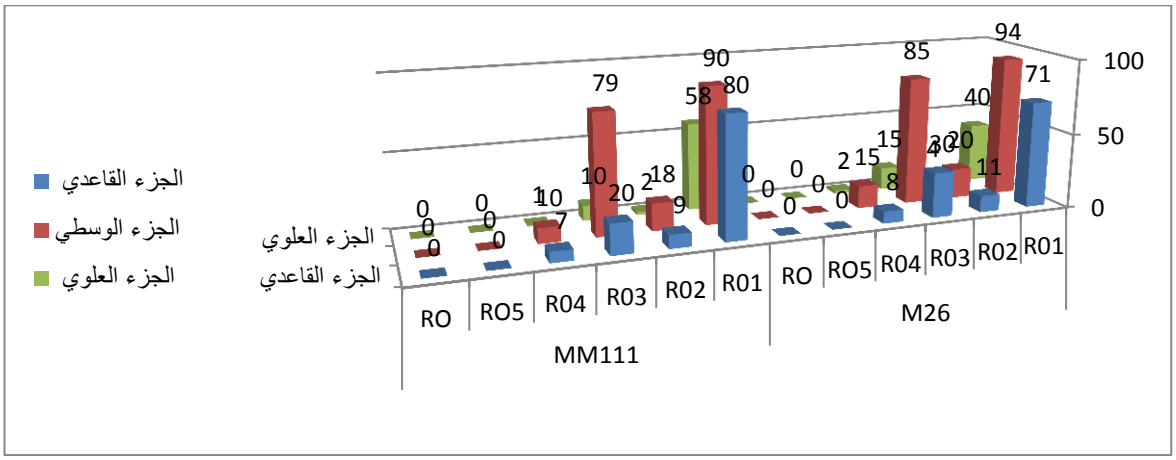
MS + 1.0 g/l MES + 5 mg/l BAP (2.0 mg/l TDZ) + 0.2 mg/l NAA+ 30 g/l Sucrose + 2.5 g/l Gerlite

1.2.4. تأثير موقع وجزء الورقة في تشكل النموات الجديدة:

تمت دراسة تأثير موقع الخزعة النباتية من الورقة والتي أوضحت تفوق الجزء الوسطي من الورقة على الجزأين القمي والقاعدي منها وقد تم الحصول على أعلى متوسط عدد نموات متجددة وأعلى نسبة تجديد من كل خزعة نباتية من الجزء الوسطي للورقة (جداول13,12,) وشكل(5,4). يبين الشكلان 4 و5 النسب المئوية لتجديد النموات الخضرية ابتداءً من الأجزاء المختلفة للورقة على أوساط التجديد المختلفة للصنفين والأصلين المدروسين. بينما يبين الجدولان 12 و13 عدد النموات المتجددة على أوساط مختلفة باستخدام الأجزاء الثلاثة للورقة للصنفين والأصلين المدروسين.



شكل.4: النسب المئوية لتجديد النموات الخضرية ابتداءً من الأجزاء المختلفة للورقة على أوساط التجديد المختلفة للصنفين Royal Gala و Golden Delicious المدروسين



شكل.5. النسب المئوية لتجديد النموات الخضرية ابتداءً من الأجزاء المختلفة للورقة على أوساط التجديد المختلفة للأصلين MM111 و M26 المدروسين.

جدول 12. متوسط عدد النموات المتجددة على أوساط مختلفة باستخدام الأجزاء الثلاثة للورقة. للصنفين Golden Delicious و Royal Gala المدروسين

Media	Golden Delicious			Royal Gala		
	الجزء القاعدي	الجزء الوسطي	الجزء القمي	الجزء القاعدي	الجزء الوسطي	الجزء العلوي
R01	2.275a±0.129	4.025a ±0.141	1.625a±0.099	2.341a±0.131	5.615a ±0.121	1.851a±0.141
R02	0.185c±0.057	2.225c ±0.067	1.00c±0.000	1.30c±0.057	2.505c ± 0.67	1.00c±0.00
R03	2.10b±0.112	2.525b±0.080	1. 40b±0.00	1.55b±0.112	4.212b±0.080	1.520b±0.073
R04	1.00d±0.000	1.575d±0.080	1.00d±0.000	1.00d±0.00	2.00d ±0.80	1.00d±0.43
R05	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
RO	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
LSD 0.05	0.228	0.290	0.172	0.170	0.310	0.231

جدول 13. متوسط عدد النموات المتجددة على أوساط مختلفة باستخدام الأجزاء الثلاثة للورقة. للأصلين M26, MM111 المدروسين

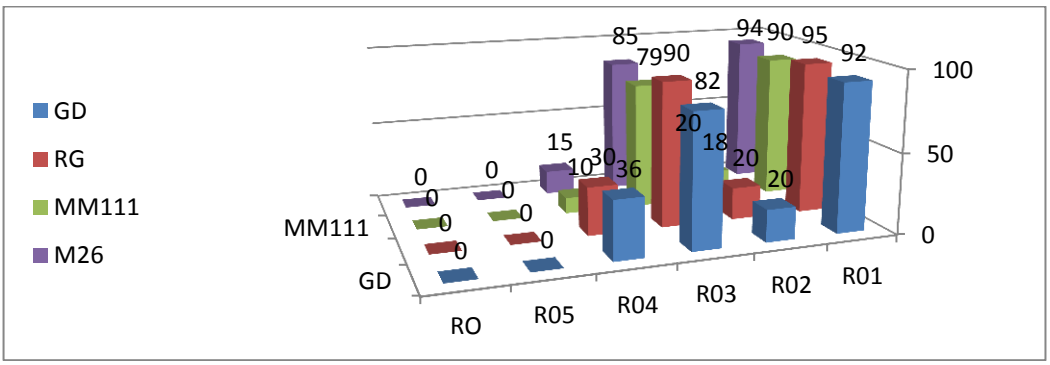
Media	M26			MM111		
	الجزء القمي	الجزء الوسطي	الجزء القاعدي	الجزء القمي	الجزء الوسطي	الجزء القاعدي
R01	1.801a±0.06	4.500a ±0.160	2.602a±0.085	1.75a ±0.06	4.100a ±0.171	2.375a±0.085
R02	1.000c±0.42	2.100c ± 0.80	0.200d±0.078	1.075c±0.42	2.512c ± 0.80	1. 40c±0.078
R03	1.446b±0.84	3.10b ± 0.103	2.110b±0.067	1.35b±0.84	2.80b ± 0.103	1.775b±0.067
R04	1.00c±0.41	1.500d ±0.60	1.32c±0.00	1.00c±0.43	1.65d ±0.80	1.150d±0.00
R05	0.00d	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
RO	0.00d	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
LSD 0.05	0.154	0.301	0.211	0.144	0.293	0.197

يتبين من النتائج الواردة أعلاه أن تشكل النموات العرضية يمكن أن يتم مباشرة من نسيج الورقة ودون المرور بمرحلة الكالوس. علاوة على ذلك، تبين أن لنمط الجزء النباتي أو وسط الإكثار وتركيب منظمات النمو تأثيراً كبيراً إلى حد بعيد في الكفاءة والقدرة على التجديد (شكل4 ,5، جدول 13,12) وهذا يثبت إمكانية استخدام أجزاء الورقة من أجل الإكثار الخضري السريع باستخدام أوساط غذائية بتراكيب خاصة أكثر فعالية، من أجل إعادة إكثار وتجديد الأجزاء النباتية المعدلة وراثياً المدروسة والتي هي الهدف النهائي المرجو من هذه الدراسة. حيث يعد تطوير طريقة للتجديد من نسيج الورقة بوساطة زراعة الأنسجة النباتية شرطاً أساسياً للتعديل الوراثي.

2.2.4. تأثير منظمات النمو في تجديد النموات الخضرية:

يبين الشكل 6 النسب المئوية للتجدد من الجزء الوسطي للورقة، بينما يظهر الجدول. 14 معدلات التجديد على الأوساط المختلفة المستخدمة في إكثار الصنفين والأصلين المدروسين باستخدام الجزء الوسطي للورقة. حيث تظهر أفضل استجابات في الوسط RO1 يليه الوسط

RO3 ثم RO4 وRO2 ونلاحظ من ذلك تفوق الوسط الذي احتوى على أملاح العناصر الكبرى لوسط Nitsch (N6) (Nitsch and Nitsch, 1969) على الأوساط التي احتوت على العناصر الكبرى لموراشيج وسكوج (Murashige and Skoog, 1962) وذلك عند استخدام التوافق الهرموني: بنزيل أمينو بيورين ونفتالين حمض الخل، بينما تفوقت الأوساط التي احتوت على الثيديازورون على كافة الأوساط الأخرى بغض النظر عن مصدر العناصر الكبرى، ولم يلاحظ أي تجدد على الوسط R0 الخالي من منظمات النمو. كما تشكل الكالوس على الوسط الذي احتوى على أوكسين الـ 2,4,D فتم استبعاد هذه النموات واستبعاد استخدام هذا الوسط (شكل 6، جدول14)



شكل 6. مخطط النسب المئوية للتجديد من الورقة باستخدام الجزء الوسطي للورقة للصنفين والأصلين المدروسين على أوساط التجديد المختلفة.

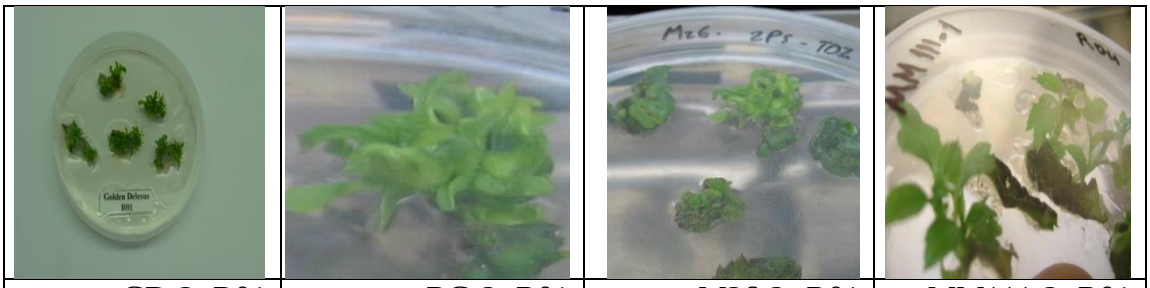
جدول14. متوسط عدد النموات المتجددة على الأوساط المختلفة باستخدام الجزء الوسطي للورقة في الصنفين والأصلين المدروسين.

	Apple cvs.		Apple Rootstocks	
Media	Golden Delicious	Royal Gala	MM111	M26
R01	4.025a ±0.141	5.615a ±0.121	4.100a ±0.171	4.500a ±0.160
R02	2.225c ± 0.067	2.505c ± 0.67	2.512c ± 0.80	2.100c ± 0.80
R03	2.525b ± 0.080	4.212b ± 0.080	2.800b ± 0.103	3.100b ± 0.103
R04	1.575d± 0.080	2.00d ±0.80	1.65d ±0.80	1.500d ±0.60
R05	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
RO	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
$LSD_{0.05}$	0.290	0.310	0.293	0.301

الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير إلى فروقات معنوية عند مستوى ثقة 95%

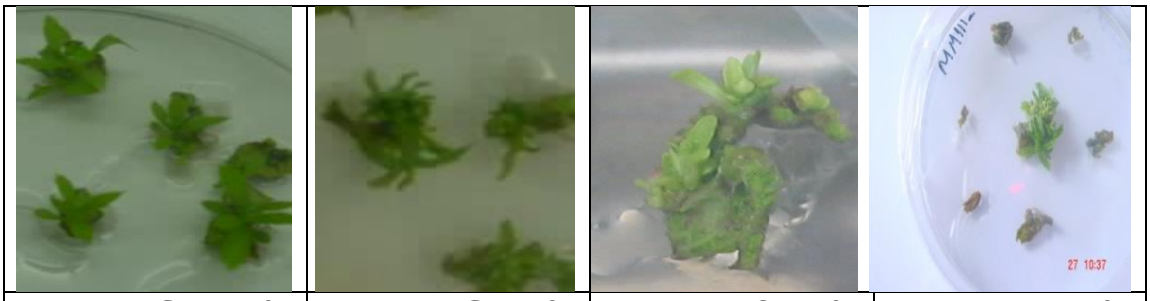
تحقق أكثر تشكل للنموات الجديدة على الوسط (Ro1) المحتوي 2 مغ/ل ثيديازورون (TDZ) مع 0.2 مغ/ل نفتالين حمض الخل (NAA). وكان تأثير هذا التركيب معنوياً على مستوى

معنوية ($p<0.05$) مقارنة بالأوساط الأخرى المستخدمة (جدول 14، شكل 6 و7). وبلغت نسب التجدد 92 و 95 و90 و94 % مع معدل نموات 4.0 و 5.6 و4.1 و 4.5 نمو جديد من كل مستزرع في الصنفين والأصلين المدروسين على التوالي على الوسطٌ R01 المحتوي ثيديازورون (TDZ). بينما أعطى الوسط R02 المحتوي على 0.5 مغ/ل بنزيل أمينو بيورين BAP مع 0.5 مغ/ل TDZ نسبة تجدد بلغت 82 و90 و79 و85% في الأصناف والأصول المدروسة على التوالي و تم الحصول على متوسط عدد نموات متجددة جيد على الوسط R02 الذي احتوى 5 مغ/ل BAP 2.22 و2.5 و2.51 و 2.10 للأصناف والأصول المدروسة على التوالي (جدول 14، الشكل,8). يبين الشكل7. تشكل النموات من نسيج الورقة في الصنفين والأصلين المدروسين باستخدام أفضل وسط تجديدR01. والشكل 8 يبين تشكل النموات من نسيج الورقة في الصنفين و الأصلين باستخدام وسط الذي يحوي BAP



GD-2- R01	RG-2- R01	M26-2- R01	MM111-2- R01

شكل 7 . تشكل النموات الجديدة على أفضل وسط للتجديد R01



GD-2-R02	RG-2-R02	M26-2-R02	MM111-2- R02

شكل 8. تشكل النموات الجديدة على وسط التجديدR02 الذي يحويBAP

حيث يدل رقم **2 المرفقة باسم الصنف أو الأصل على الجزء الوسطي للورقة.*

وبشكل عام كان معدل تشكل النموات الجديدة مقبولاً باستخدام الجزء الوسطي (2) من الورقة ولم تلاحظ أي نموات شاذه مورفولوجياً (شكل9)

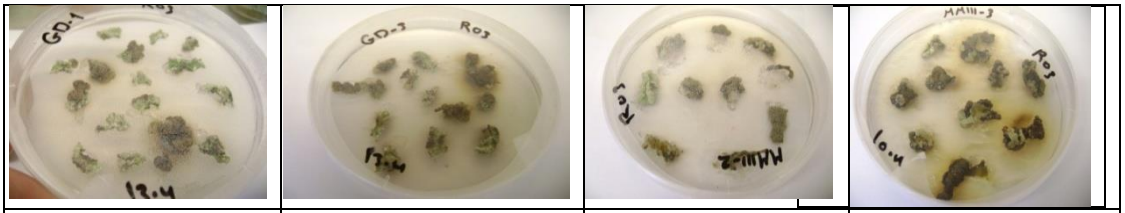
GD-2-R03	RG-2-R02	M26-2-R02	MM111-2- R04

شكل9. تشكل النموات بدءاً من الجزء الوسطي للورقة على أوساط تجديد مختلفة في الصنفينوالأصلين المدروسين.

لوحظ أنه عند تخفيض تركيز الـ TDZ أو استبداله بالـ BAP، أدى ذلك إلى تخفيض نسبة التجديد. هذا التأثير للـ TDZ يتوافق مع عدد من الدراسات في نباتات مختلفة(Malik and Saxena 1992; Kanyand *et al*. 1994; Jain and Rashid 2001, Thomas 2003)

و أن استخدام الـNAA مع الـTDZ ينتج استجابة مُرضية، والتي تظهر أن هذه هي المعاملة الأفضل للتخلص من المواد الفينولية.

من جهة ثانية أدى استبدال الـ NAA بالـ 2,4,D إلى تكوين الكالوس ومنع تجديد النموات، لذا تم استبعاده فيما بعد حيث أن تشكل الكالوس يؤدي إلى تشكل نباتات غير مشابهة للنبات الأم وهو ما يعاكس الهدف من الإكثار الخضري وبطرائق زراعة الأنسجة (شكل10) ويظهر شكل10 تشكل الكالوس مع استخدام الأوكسين 2,4,D عند دراستنا الأولية للتجديد من الورقة في صنف التفاح Golden Delicious والأصلMM111 وباستخدام الجزء الوسطي من الورقة



GD- 2,4,D	GD- 2,4,D	MM111- 2,4,D	MM111- 2,4,D

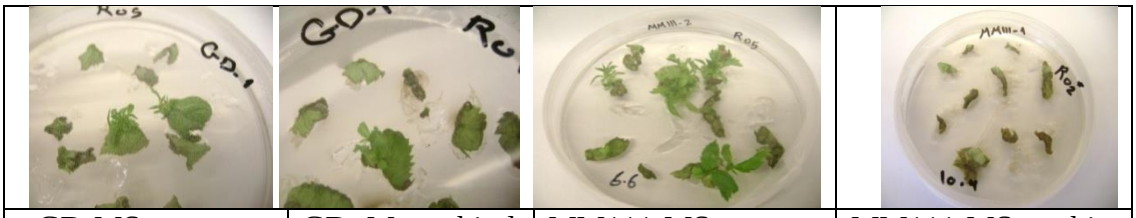
شكل10. تشكل الكالوس عند استخدام 2,4,D في مرحلة التجديد من نسيج الورقة للتفاح.

3.2.4. تأثير شدة الإضاءة في تشكل النموات العرضية: تم تحضين المستزرعات في تجارب الدراسة لمدة 3 أسابيع الأولى في الظلام الكامل دون التعريض لأي أشعة أو إضاءة، ثم رفعت الإضاءة إلى شدة 10 µmol/m^2/sec لمدة أسبوع بعد ذلك تم وضعها في الإضاءة الكاملة في غرف النمو وبشدة إضاءة 50 µmol/m^2/secحتى نهاية التجربة بعد 8 أسابيع من بداية الزراعة حيث تعزز التجدد عند تحضين المستزرعات في الظلام في الأسابيع الثلاثة

الأولى من الزراعة مع معدل تجدد 4.0، 4.1،5.6، 4.5 نمو جديد من كل مستزرع في الصنفين والأصلين المدروسين على التوالي على أوساط حاوية على سيتوكينينات.

4.2.4. تأثيرات خدش الورقة في التجدد والقدرة على تشكل الأعضاء النباتية: تبين في النتائج الأولية للدراسة أن معاملة الأوراق بالملقط الخاص من نوع (BD157-Aesculap) الذي لا يحدث ضرراً كبيراً والمقترح من قبل (Norelli *et al*, 1996) أدى إلى زيادة الإفرازات الفينولية واسوداد الأوراق وموتها نتيجة الخدش الزائد، بينما تم الحصول على زيادة تجدد النموات العرضية المتشكلة عند تحديد درجة الخدش المناسبة الخفيفة وغير المحدثة للجروح وهذا يتوافق مع نتائج كل من: (Hemerly *et al*,1993 و Piccioni and Valecchi ,1996)

5.2.4. تأثير مصدر الكربون وعوامل التهليم المستخدمة في التعضي والنمو: تم اختبار مصدرين للطاقة هما السكروز والسوربيتول من أجل التجديد من نسيج الورقة للصنفين والأصلين المدروسين ووجد أن لاستبدال السكروز بالسوربيتول تاثيراً سلبياً على التجديد فلم يتم الحصول على نموات جيدة وكانت نسبة التجديد منخفضة جداً. بينما كان التخليق أكثر فعالية في الحث على التجديد عندما تم استخدام السكروز واستبعاد السوربيتول. (أشكال.11,9,8,7). بينما اختبر Karhu (1997) ثلاث مصادر للكربون هي (الغلوكوز والسوربيتول والسكروز) من أجل دراسة تأثيراتها على التجديد من نسيج الورقة على مختلف الأجزاء النباتية في التفاح (*Malus domestica*) ووجد أن للسوربيتول والسكروز التاثير نفسه في تخليق المتجددات. كذلك وضح كل من Jamborné and Dobranszki (2005) تاثيرات مختلفة لمصادر الكربون المختلفة (السكروز والسوربيتول والغلوكوز) على التجديد في التفاح.



GD-MS- sucrose	GD- Ms-sorbitol	MM111-MS-sucrose	MM111-MS -sorbit

شكل11. نموات النبتات المتجددة على أوساط تحوي سوربيتول كمصدر للطاقة مقارنة مع أوساط تحوي سكروز.

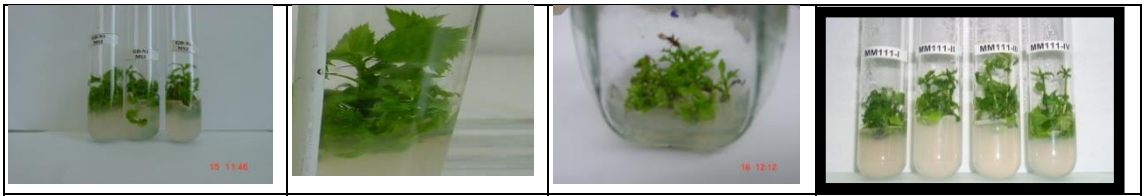
وكان للجلرايت تأثيراً ايجابياً في تصليب الوسط وجعله شفافاً هشاً في وجود الأملاح القابلة للذوبان بشكل جيد. ففي تجاربنا التمهيدية للدراسة، لوحظ عند استخدام الآغار لوحده أنه يعيق رؤية نمو النبات أو التلوث البكتيري لقلة صفائه أو شفافيته لذا تم استبداله بالجلرايت أو استخدم الآغار مع الجلرايت بحيث يتم تقليل الكمية المستخدمة من الآغار في التجارب وقد كان لذلك التأثير الإيجابي على نسبة التجديد من الورقة وعدد النموات الناتجة (الأشكال 7 ,8,9,10,12). كما أن استخدام كمية قليلة من الجلرايت من أجل تهليم وسط الزراعة ما يساعد في التقليل من تكاليف العمل ويزيد إمكانية مراقبة نمو النبات أو التلوث البكتيري بشكل أوضح من استخدام الآغار(Pasqualetto *et al*. 1986).

MM111- MS- gelrite	M26- MSAgar	GD-MS-Agar	RG-MS-gelrite

شكل12. تشكل نموات باستخدام أوساط مهلمة بالجلرايت والآغار.

6.2.4. الإكثار الخضري الدقيق للنباتات الناتجة من التجديد من نسيج الورقة:

من أجل تشكيل النموات العرضية كان يتم إعادة زراعتها كل أربعة أسابيع، وتتم عملية الإكثار بسهولة اعتماداً على الدراسة السابقة للإكثار الخضري الدقيق للصنفين والأصلين المدروسين في مخابر الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بقسم التقانات الحيوية و AL- Ttinawi *et al*. (2010)لإكثار الصنف Golden Delicious و(2008) AL- Rihani *et al*. (2008) لإكثار الأصلMM111 باستخدام وسط MS المضاف له1مغ/ل بينزيل أدنين BA و0.3 مغ/ل IBA و0.2 مغ/ل GA3 حيث يظهر الشكل 13 مرحلة الإكثار الخضري في الأنابيب بعد مرحلة التجديد من الورقة في الأطباق على وسط MS



GD	RG	M26	MM111

شكل 13. مرحلة الإكثار الخضري في الأنابيب بعد مرحلة التجديد من الورقة في الأطباق.

7.2.4. تجذير النموات المتجددة: تمت عملية التجذير بسهولة بإتباع طرائق الدراسة السابقة للإكثار الخضري الدقيق للأصل MM111 والصنف غولدن ديليشس المدروسين في مخابر الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بقسم التقانات الحيوية. حيث تشكلت الجذور خلال 2–4 أسابيع. وكل النباتات الناتجة كانت جيدة من الناحية الفيزيائية والمورفولوجية حيث بلغت نسبة نجاح عملية الجذير 92, 95 % للصنفين Golden Delicious, وRoyal Gala على التوالي و 95,85% للأصلين M26, MM111 على التوالي (شكل14.)

GD	RG	M26	MM111

شكل 14. تجذير العينات الناتجة من الإكثار بطريقة التجديد من نسيج الورقة للصنفين والأصلين المدروسين.

8.2.4. تقسية النموات المتجددة

بلغت نسبة نجاح عملية التقسية جيدة حيث بلغت نسبة نجاح عملية التقسية 87, 90 % للصنفين Golden Delicious, و Royal Gala على التوالي و92,50 %للأصلينM26, MM111 على التوالي ويبين الشكل15. نجاح عملية التقسية للصنفين والأصلين المدروسين نقلت بعدها النباتات إلى البيت الزجاجي حيث أمضت نحو شهرين قبل نقلها إلى الأرض الدائمة وسمدت أسبوعياً بمحلول 1/10 MS. غرست النباتات في الحقل تحت الشروط الطبيعية وبلغ طولها نحو 60 سم في نهاية فصل النمو. كما اجتازت فصل الشتاء وابتدأت النمو في بداية الربيع التالي وهي سليمة من الأمراض وخالية من الشواذات المورفولوجية الظاهرية وجيدة النمو.

GD	RG	M26	MM111

شكل 15. تقسية العينات المكاثرة بطريقة التجديد من نسيج الورقة للصنفين والأصلين المدروسين.

3.4. التعديل الوراثي Genetic Transformation

1.3.4. أمثلة شروط التعديل الوراثي للأصناف والأصول المدروسة

ظهرت المتجددات المعدلة وراثياً خلال 4– 8 أسابيع. حيث تم الحصول على بعض المتجددات بوجود عامل الانتخاب وذلك من حواف قطع الأوراق بشكل رئيسي وكذلك من على سطوح الأوراق حيث نقلت النموات المتجددة إلى أوساط الإكثار التي احتوت على عامل الانتخاب PPT بتركيز 3 مغ/ل.

وقد تبين أن الأجزاء الورقية المتضررة من الخدش أو الجرح الزائد بالمشرط أو الملقط قد ماتت ولم تتجدد منها نموات بسبب الاسمرار البني المفرط بينما تجددت النموات من الأجزاء الورقية غير المتضررة على الأوساط بوجود عامل الانتخاب والذي يثبت إنها معدلة وراثياً، بينما ماتت الأجزاء الورقية غير المعدلة وراثياً بسبب عدم انتقال المورثة التي تضفي مقاومة الانتخاب. فصلت الأجزاء المتجددة ونقلت إلى أوساط جديدة تحوي عامل الانتخاب والتي نمت بوجود عامل الانتخاب مما يثبت أنها معدلةً وراثياً (شكل 16). وبالتالي، تم الحصول على كلونات معدلة وراثياً من الصنفين والأصلين المدروسين، بينما لم يتم الحصول على أي نمو متجدد من الزرعات الشاهد التي زرعت على وسطٍ يحوي عامل الانتخابPPT.

وبلغت نسبة نجاح التعديل الوراثي ,0.4 و0.6 و0.3 و0.1% للصنفين Golden Delicious و Royal Gala والأصلين M26 و MM111 على التوالي.

حيث تم حساب النسبة المئوية للتعديل الوراثي بحساب النسبة المئوية لعدد العينات التي نمت على أوساط التجديد التي تحوي عامل الانتخاب وذلك بعد تلقيحها بالبكتريا وبقيت على قيد الحياة خلال مرحلتي التجديد والاكثار بوجود عامل الانتخاب. حيث تم معاملة 1000عينة من كل صنف وأصل مدروس بالبكتريا وزرع في كل طبق 5 أجزاء ورقية وبقي على قيد الحياة بعد نقلها الى وسط الاكثار وبوجود عامل الانتخاب 4 و6 و3 و1 نموات من الأصناف والأصول المدروسة على التوالي.

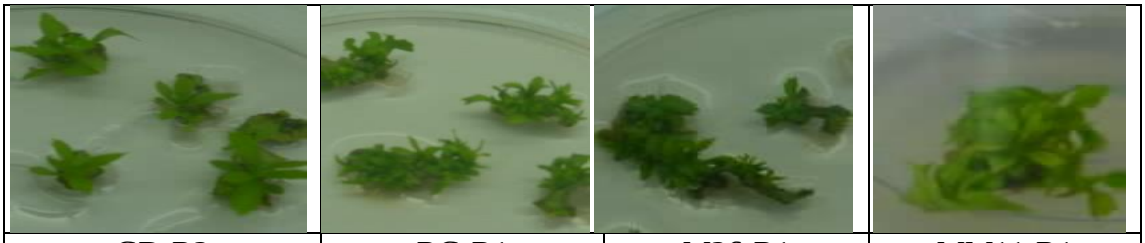
1.1.3.4. تأثير خدش الورقة في تجدد النموات العرضية المعدلة وراثياً والقدرة على تشكل الأعضاء النباتية:

تبين في تجاربنا الأولية أن معاملة الأوراق بالملقط الخاص من نوع (BD157-Aesculap) الذي لا يحدث رضوضاً وضرراً كبيراً في الأوراق (بحيث لا يؤدي الخدش إلى إفرازات فينولية واصفرار وموت الأوراق) والمقترح من قبل Norelli e*t al* (1996) ساعد في تجدد النموات

العرضية المعدلة وراثياً بسبب اختراق البكتريا من خلال الجروح وهذا يتوافق مع نتائج كل من Hemerly *et al* (1993) ونتائج Piccioni and Valecchi (1996).

2.1.3.4. تأثير منظمات النمو في التجديد والقدرة في تشكيل الأعضاء:

بينت التجارب في التجديد قبل التعديل الوراثي بدون وجود عامل انتخاب الحصول على نسبة تجدد عالية وعدد نموات مرتفع باستخدام التركيب الهرموني : TDZ بتركيز 2 مغ/ل مع NAA بتركيز 0.2 مغ/ل (جدول 6.) ولم يلاحظ أية شذوذات مورفولوجية ولا اصفرار أو اسوداد خلال مراقبة النباتات الناتجة عن عملية إعادة الزرع، فمعظم المستزرعات أعطت نموات عرضية حيث أمكن ملاحظة تشكل البداءات الخضرية على أوساط التجديد المستخدمة والتي احتوت على TDZ أو BAP مع NAA (جدول6.). ولذلك اتبعت الإجراءات نفسها لكن مع إضافة عامل انتخاب حيث تشكلت النموات المعدلة وراثياً وقد انخفضت نسبة التجدد بسبب إجهاد عامل الانتخاب. يبين الشكل 16. تجدد النموات الخضرية المعدلة وراثياً من الصنفين والأصلين المدروسين على أوساط تحوي عامل انتخاب بينما يلاحظ موت الأجزاء غير المعدلة وراثياً بلون بني.



GD-R2	RG-R1	M26-R1	MM11-R1

شكل 16. تجديد أجزاء ورقية معدلة وراثياً من الصنفين والأصلين المدروسين على أوساط تجديد تحوي عامل انتخاب

3.1.3.4. تأثير فترة الزرع المشترك في نقل المورثة: تم الحصول على بعض المتجددات بعد التعديل الوراثي على أوساط التجديد والمضاف لها عامل الانتخاب غلوفوسينات أمونيوم Glufosinate ammounium (PPT) بتركيز 3 مغ/ل (شكل16.)

4.1.3.4. تأثير الأسيتوسيرينغون في نقل المورثة: كانت كفاءة نقل المورثة التي تم الحصول عليها جيدة مع استخدام الأسيتوسيرينغون ذلك تطبيقاً لما ذكره Yao *et al*, (1999) في دراسته لصنف التفاح Green sleeves وكذلك وتوافق مع دراسة James *et al*,(1993).

5.1.3.4. تأثير عامل الانتخاب والمضادات الحيوية:

تم الانتخاب لمورثة الانتخاب *bar* وذلك باستخدام وسط الزرع المشترك والذي يحتوي 3 مغ/ل PPT (Glufosinate ammonium) حيث تعتبر النموات المتجددة على هذه الأوساط نموات معدلة وراثياً وذلك بسبب نموها على الوسط الذي يحوي عامل الانتخاب لتحمل مبيدات الأعشاب، وقد تم الحصول على نموات خالية من التلوث البكتيري وذلك بسبب التخلص من البكتريا بالزرع على أوساط التجديد التي تحوي مضادات حيوية المعقمة بالفلتر Ticarcillin) (150mg/l+ Combactam 50 mg/l، وباستخدام أوساط تجديد مختلفة تحتوي 3 مغ/ل PPT كعامل انتخابي للأجزاء النباتية المعدلة وراثياً وغسيل الأجزاء الورقية بعد ثلاثة أيام من الزرع المشترك بمحلول وسط مغذي MS0 يحوي على 350 مغ/ل Cefotaxime كمضاد حيوي أيضاً للحد من نمو البكتيريا قبل أن يتم نقل الأجزاء الورقية إلى وسط التجديد، وقد أعطت هذه الإضافات من المضادات الحيوية نتائج جيدة حيث تم الحصول على النموات بعد التعديل الوراثي الوراثي دون أي تلوث بكتيري، وهذا ما دل على فعالية التركيز المستخدم من هذه المضادات الحيوية، وكذلك فعالية التركيز المستخدم (3 مغ/ل) من عامل الانتخاب وقد تم استخدام تراكيز أعلى من ذلك (10,8,6) مغ/ل لكنها أدت جميعها إلى تماوت النموات النباتية، بسبب عدم تحملها تراكيز أعلى من 3 مغ/ل.

2.3.4. الإكثار الخضري الدقيق للنموات المعدلة وراثياً:

تم نقل النباتات المتجددة من الورقة (المعدلة وراثياً) بعد عملية التعديل الوراثي إلى مرحلة الإكثار الخضري الدقيق في أوساط تحوي عامل انتخاب (شكل 17) باستخدام وسط MS مع 1مغ/ل BA و0.3 مغ/ل IBA و0.2 مغ/ل GA3 وذلك بوجود عامل الانتخاب السابق الذكر بتركيز 3-5 مغ/ل، وتم الحصول على نباتات كاملة (شكل 17)، حيث أثبت نموها على هذه الأوساط أنها معدلة وراثياً وتحوي المورثة المعنية في تركيبها الوراثي، وقد تم التأكد من ذلك لاحقاً باستخدام تقانة الـ PCR .

GD-T27 *g2ps1*	RG- T01 *g2ps1*	M26-T17 *g2ps1*	MM111-T2,T5 *g2ps1*

شكل 17.إكثار النموات المعدلة وراثياً المتجددة على أوساط تحوي عامل الانتخاب PPT

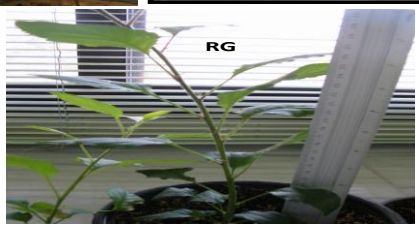
3.3.4. تجذير النباتات المعدلة وراثياً: جذرت النباتات المعدلة وراثياً بوجود عامل الانتخاب خلال 2-4 أسابيع وبنسبة نجاح نحو 90 و85 و 93 و 80 % للأصناف والأصول المدروسة على التوالي(شكل 18)

GD	RG	M26	MM111

شكل18. تجذير النباتات المعدلة وراثياً على وسط تجذير يحوي عامل الانتخاب.

4.3.4. تقسية النباتات المعدلة وراثياً:

أُقلمت النباتات المجذرة لظروف البيت الزجاجي وبنسبة نجاح نحو 65 و60 و50 و64 % للأصناف والأصول المدروسة على التوالي وتركت لتنمو ضمن المحتوى في ظروف البيت الزجاجي حسب قانون الأمان الحيوي في سوريا من أجل تقييم كفاءتها لمقاومة الأمراض الفطرية (شكل 19)

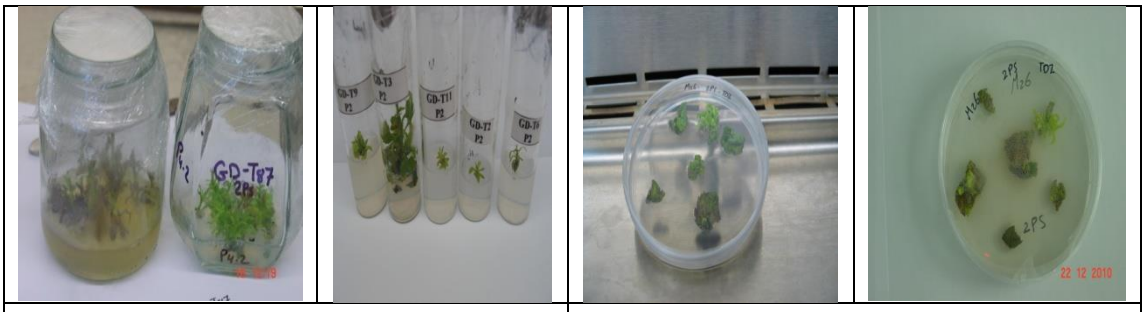


شكل19. نباتات معدلة وراثياً تنمو في ظروف البيت الزجاجي

5.3.4. تقييم النباتات المعدلة وراثياً واختبارها جزيئياً:

1.5.3.4. التقييم بالزرع على وسط يحوي عامل انتخابي:

عاشت فقط النباتات المعدلة وراثياً والتي تحوي مورثة المقاومة لعامل الانتخاب، بينما ماتت الأجزاء النباتية غير المعدلة وراثياً لأنها لا تحوي مورثة المقاومة لعامل الانتخاب PPT. والشكل20. يظهر بقاء الأجزاء النباتية المعدلة وراثياً على قيد الحياة وموت الأجزاء النباتية غير المعدلة وراثياً بوجود عامل الانتخاب وذلك في مرحلتي التجديد بعد العدوى بالبكتريا ومرحة الإكثار



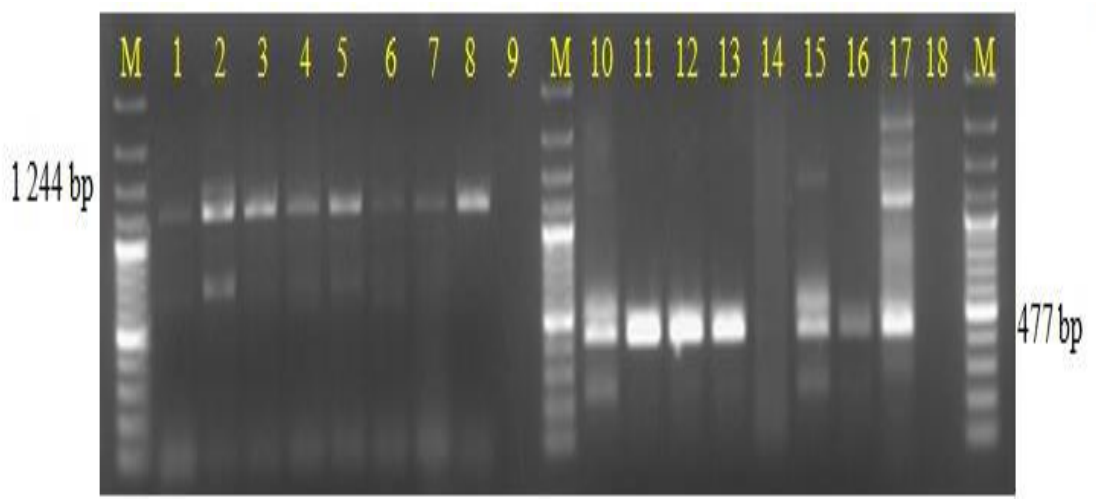
مرحلة التجديد بعد العدوى بالبكتريا	مرحلة الإكثار

شكل 20. تقييم النباتات المعدلة وراثياً بالزرع على وسط يحوي العامل الانتخابيPPT

2.5.3.4. التقييم بالطرائق الجزيئية:

1.2.5.3.4. اختبار التفاعل التسلسلي للبوليمراز للتأكد من اندماج المورثة المنقولة *g2ps1* ومورثة الانتخاب *bar* في النباتات المعدلة وراثياً:

استخدم الـ PCR لإثبات التعديل الوراثي في السلالات المتجددة والتي عاشت على وسط الانتخاب، وقد أثبت اختبار الـ PCR لنموات الصنفين والأصلين المدروسة بأنها معدلة وراثياً لوجود مورثة الانتخاب *bar* في كل النباتات المختبرة بالـ PCR والتي أظهرت وجود حزمة المورثة حسب الحجم المتوقع (447 bp) وباستخدام البادئات المناسبة، في الآبار (شكل21.)، وكذلك بالنسبة للمورثة *g2ps1* بحجم (1244 bp)، بينما لم يلاحظ أي حزمة في عينات الـDNA المعزولة من النباتات الشاهد غير المحور (البئر رقم 18)، وكذلك لم يلاحظ أي حزمة في عينة الشاهد السلبي (الحزمة رقم 9) الذي يحتوي على الماء بدلاً من الـDNA كشاهد سلبي. وذلك مقارنة مع عينة البلازميد (Positive control) الموجودة في البئر(8).



شكل21. التقييم الجزيئي للنموات المعدلة وراثياً باختبار الـPCR على هلامة الآجاروز للكشف عن وجود المورثة *g2ps1* ومورثة الانتخاب *bar* في الصنفين والأصلين المدروسين.

الآبار1،2: Golden Delicious،3،4: M26، 5، 6: Royal Gala، 7: MM111، 8: شاهد ايجابي/بلاسميد، 9: ماء، 10: Golden Delicious، 11، 12: M26، 13: Royal Gala، 14: شاهد سلبي ماء 15:MM111، 16: شاهد موجب،17: Golden Delicious(2 بادئ لكشف المورثتين معاً) ، 18: شاهد سلبي (دنا معزول من تفاح غير محور وراثياً). M : ماركر 100 زوج

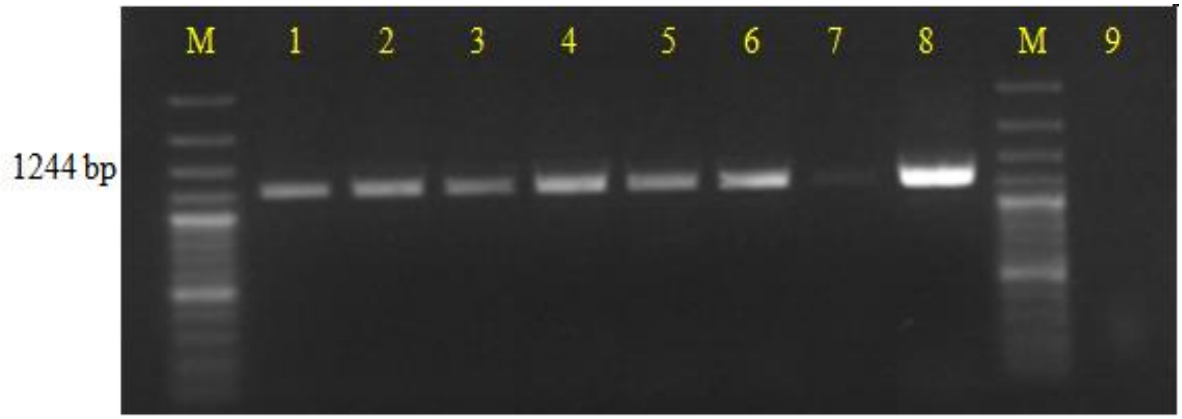
2.2.5.3.4. تحديد تطابق المورثة المنقولة في النباتات المعدلة وراثياً مع تسلسل المورثة *g2ps1*

تم استخلاص الـDNA من هلامة الأغاروز بعد إجراء تفاعل الـ PCR باستخدام مرئسات المورثة *g2ps1* حيث تم استخلاص الحزمة المستهدفة وتنقيتها ثم تم تحديد تسلسل النيوكليوتيدات باستخدام جهاز الـSequencer. ثم تمت مطابقة البيانات الناتجة لتحديد التشابه بين التتابع النيوكليوتيدي للمورثة المعزولة من النباتات المعدلة وراثياًمع التتابع النيوكليوتيدي للمورثة المنشورة عالمياً في البنك الوراثي Gene BankAccession (accession no. Z38097.2) على الموقع www.ncbi.nim.niln.gov، فأظهرت النتائج تطابقا عالياً بلغت نسبته ما بين 97 و99 % مع Gerbera hybrida mRNA for 2-pyrone synthase *g2ps1* gene.

ويظهر ذلك في الملحق المرفق في نهاية هذه الرسالة.

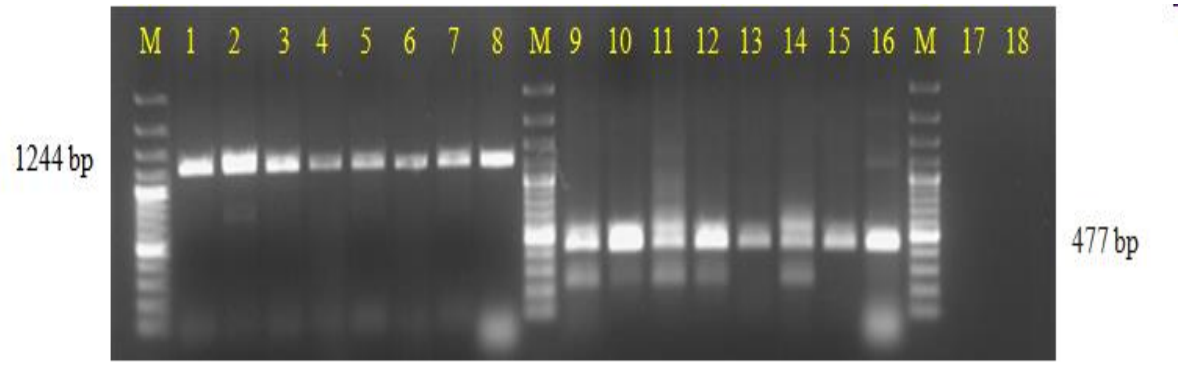
3.2.5.3.4. التقييم الجزيئي للنباتات المؤقلمة

تم عزل الـDNA من أوراق النباتات المنتجة النامية في البيت الزجاجي واختبارها من حيث وجود المورثة المنقولة *g2ps1* ومورثة الانتخاب *bar* لها حيث ثبت وجودها في الصنفين والأصلين المدروسين (شكل 22).



شكل 22. التقييم الجزيئي للنباتات المؤقلمة والنامية في البيت الزجاجي باختبار الـ PCR على هلامة الاجاروز للكشف عن وجود المورثة *g2ps1* في الصنفين والأصلين المدروسين.

الآبار: M : ماركر Marker، 1−2: Golden Delicious، 3− Royal Gala، 4−5: M26، 6: MM111، 7: شاهد سلبي (ماء)، 8: شاهد ايجابي (المورثة)، 9:Golden غير معدل وراثياً



شكل 23. التقييم الجزيئي للنباتات المؤقلمة والنامية في البيت الزجاجي باختبار الـ PCR على هلامة الاجاروز للكشف عن وجود المورثة *g2ps1* والمورثة *bar* في الصنفين والأصلين المدروسين.

الآبار: 2,1: GD؛ 4,3: M26؛ 6,5: RG؛ MM111:7؛ 8 : positive control،10,9: GD؛12,11: M26؛ 14,13: RG؛ 15: MM111 ؛ 16:positive control ؛ 17: negative control (DNA isolated from non-transformed apple) ؛18: water ؛ M: 100 bp marker

شهـــــــــادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة:

إنتاج نباتات معدلة وراثياً من بعض أصناف وأصول التفاح

هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة **نبيلة محمد علي باشا** تحت إشراف **الأستاذ الدكتور محمد بطحة،** كلية الزراعة بجامعة دمشق **والأستاذ الدكتور أحمد عبد القادر،** الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية-دمشق،وأي رجوع إلى بحث آخر في هذا الموضوع موثق في هذا النص. كما نشهد بأن هذا البحث لم يسبق أن قبل للحصول على أي شهادة وهو غير مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشحة	المشرف العلمي	المشرف المشارك
م.نبيلة محمد علي باشا	أ. د. محمد بطحه	أ. د. أحمد عبد القادر

CERTIFICATION

It is hereby to certify that the work described in this thesis **titled:**

Production of Transgenic Plants from some Apple Cultivars and Rootstocks

Is the result of **NABILA MOHAMAD ALI BACHA** own investigations under the supervision of **Prof. Dr. Mohamad Battha** Faculty of Agriculture, Damascus University, and **Prof. Dr. Ahmad Abdul Kader**, General Commission for Scientific Agricultural Research, and any return to other research work has been duly acknowledged in the text.

This work has not already been accepted for any degree, and it is not being submitted concurrently for any other degree.

Candidate

NABILA MOHAMADALI BACHA

Supervisors

Prof. Dr. Mohamad Battha **Prof. Dr. Ahmad Abdul Kader**

إنتاج نباتات معدلة وراثياً من بعض أصناف وأصول التفاح

Production of Transgenic Plants from some Apple Cultivars and Rootstocks

قدمت هذه الدراسة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم البستنة، اختصاص علوم ال بستنة في كلية الزراعة، جامعة دمشق. وأجيزت من قبل السادة أعضاء لجنة الحكم.

This Thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirements for Ph-D Degree in Horticulture science, faculty of Agriculture, Damascus University This thesis approved by the referee committee.

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2015/6/2 وأجيزت

أعضاء لجنة الحكم:

الدكتور فيصل حامد الأستاذ في قسم علوم البستنة - كلية الزراعة - جامعة دمشق

الدكتور خليل المعري الأستاذ في قسم علوم البستنة – كلية الزراعة - جامعة دمشق

الدكتور محمد بطحه الأستاذ في قسم علوم البستنة– كلية الزراعة - جامعة دمشق

الدكتور حسين الزعبي الباحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية

الدكتور رمزي مرشد المدرس في قسم علوم البستنة – كلية الزراعة- جامعة دمشق

References المراجـــــــــع

1- Abdul-Kader, A.M; Bauer, D.W; Beer, S.V; Norelli, J.L; Aldwinckle HS (1999). Evaluation of the *hrpN* gene for increasing resistance to fire blight in transgenic apple. *Acta Horticulturae* 489, 247-250.

2- Abdul Kader, A.M; Norelli, J.L; Aldwinckle, H.S; Bauer, W.B. and Beer, S.V. (1998). Transfer of prp1-1 promoter expressing uidA to M.26 apple rootstock. Phytopathology Vol. 88, No. 9, S134.

3- Aldwinckle, H.S. and Malnoy, M. (2009). Plant Regeneration and Transformation in the Rosaceae. *Transgenic Plant Journal* 3 (1):1-39. Global Science Books.

4- Aldwinckle, H.S; Borejsza-Wysocka, E.E; Malnoy, M; Brown, S.K; Norelli, J.L; Beer, S.V; Meng, X; He, SY; Jin, Q.L. (2003) Development of fire blight resistant apple cultivars by genetic engineering. *Acta Horticulturae* **622**, 105-111.

5- Aldwinckle, H.S; Norelli, J.L; Bolar, J.P; Ko, K.S; Harman G.E. and Brown, S.K.. (1999). p. 449. In Altman, A;M. Ziv, and S. Izhar. (eds.) Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st Century. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands**.**

6- Ali Bacha, N; Kader, A. A; Jacobsen, H.-J. and Hassan, F. (2012). Production of Transgenic Apple (Malus domestica Borkh.) for Improvement of Fungal Resistance. Acta Hort. **International Society for Horticultural Science** 961: 195-203.

7- Ali Bacha, N; Adul-Kader, A; Darkazanly, K. (2009). Direct organogenesis and plantlet multiplication from leaf explants of in vitro-grown shoots of apple (Malus domestica Borkh) cv. 'Golden Delicious' and 'MM111' rootstock. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, vol. **3** (1): 28-43.

8- Al Rihani, K.(2011). Metabolic engineering in apple: overexpression of apple transcription factors involved in the regulation of the flavonoid pathway for increased disease resistance. Ph.D Diss., Faculty of Nat. Sci, Leibniz Uni. Hannover, Germany.

9- Al-Rihani, K. , Khalhout, A; Dayoub, A. and Abdul-Kader, A. (2008). A study on *in vitro* propagation of the apple rootstock 'MM111'. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4, 191-205.

10- Al-Tinawi, E;. Ali Bacha, N ; Al-Rihani, K. and Abdul Kader, A. (2010). *In vitro* micro propagation of apple cv. 'Golden Delicious' using tissue culture technique. *Al-Bassel Journal for Agricultural Engineering Sciences*. Ministry of Higher Education, Syria, vol. 26: 47-64.

11- Ancherani, M; Rosati, P. and Predieri, S. (1990). Adventitious shoot formation from *in vitro* leaves of MM.106 apple clonal rootstock. *Acta Horticulturae* (ISHS) **280**, 95-98.

12- Andrea, M and Jehle, A. (2005) *In vitro* plant Regeneration from leaves and internode sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Plant Cell*, **24**: 468-476.

13- Artlip, T; Wisniewski, M. Norelli, J.L; Cui, M. and Fuchigami, L. (2007). Using biotechnology to improve resistance to environmental stress in fruit crops: The importance of understanding physiology. *Acta Horticulturae* 738, 145-156.

14- Atkinson, R.G; Schoröder, R; Hallet, I.C; Cohen, D. and MacRae, E.A. (**2002).** Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. Plant Physiol. 129:122-133.

15- Barbieri, M; Belfanti, E; Tartarini, S; Vinatzer, B.A; Sansavini S, Silverberg Dilworth E, Gianfranceschi L, Hermann D, Patocchi A, Gessler C (2003). Progress of map based cloning of the *Vf* resistance gene and functional verification: preliminary results from expression studies in transformed apple. *HortScience* **38**, 329-331.

16- Barbieri, C. and Morini, S. (1987) *In vitro* regeneration from somatic tissues and seed explants of apple. *Advances in Horticultural Science* 1, 8-10.

17- Bassi, G; and Cossio, F. (1994). Simplified Protocol for *in vitro* Shoot Regeneration from leaves of *Prunus domestica L*. cv. Susina di Dro. In: Schmidt H& Kellerhals M (eds). Progress in Temperate Fruit Breeding, **pp**.316-363. Kluwer Academic publisher, Dordrecht.

18- Belfanti, E; Barbieri, M; Tartarini, S; Vinatzer, B; Gennari, F;

Paris, R; *et al*. (**2004a).** Gala apple transformed with the Putative Scab Resistance Gene HcrVf2. Acta Hortic. 663:453-456.

19- Belfanti, E; Silverberg-Dilworth, E; Tartarini, S; Patocchi, A; Barbieri, M; Zhu, J; Vinatzer, B.A; Gianfranceschi, L; Gessler, C; Sansavini, S. (2004b) The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 886-890.

20- Benson DA.; Boguski MS.; Lipman DJ.; Ostell JO.; Francis.B.A.; Rapp BA and Wheeler DL. (2000). Gene Bank. Oxford University Press, **27** (1): 12-17.

21- Bent, A.F. (2003). Crop diseases and strategies for their control. Pp.: 390-413. In: Chrispeeels M.J. and Sadavo DE. (eds.). Plants, genes and crop biotechnology. Second edit. Jones and Bartlett Publishers, Canada.

22- Bhagwat, B. and Lane, D. (2004). *In vitro* shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*), Lapins and Sweetheart. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **78**:173-181.

23- Bolar, J.P; Norelli, J.L; Harman, G.E; Brown, S.K; Aldwinckle, H.S. (2001). Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Research* 10, 533-543

24- Bolar JP, Norelli JL, Wong K-W, Hayes CK, Harman GE, Aldwinckle HS (2000). Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* 90, 72-77.

25- Bolar JP, Brown SK, Norelli JL, Aldwinckle HS (1999) Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55, 31-38

26- Bolar, J. P.; Norelli, J.L. and Aldwinekle, S. (1998). An efficient method for rooting and acclimatiztaion of micropropagation apple cultivars. *Hort. Sci*; **33**(7): 1251-1252.

27- Borejsza-Wysocka, E.E; Malnoy, M; Kim, W.S; Geider, K; Beer, S; Aldwinckle, H.S. (2007). Expression of Phi-Ea1h phage

depolymerase gene with constitutive and inducible promoters, translation enhancer and signal sequence in transgenic apple plants increases resistance to fire blight. *Acta Horticulturae* 738, 273-276.

28- Borejsza-Wysocka, E.E; Malnoy, M; Meng, X; Bonasera, J.M; Nissinen, R.M; Kim, J.F; Beer, S.V; Aldwinckle, H.S. (2006). The fire blight resistance of apple clones in which DspE-interacting proteins are silenced. *Acta Horticulturae* 704, 509-513.

29- Borejsza-Wysocka, E.E; Norelli, JL. Aldwinckle, H.S. and Ko, K. (1999). Transformation of authentic M.26 apple rootstock for enhanced resistance to fire blight. *Acta Hort.* (ISHS) 489: 259-266.

30- Broothaerts, W; De Cubber, K; Zaman, S; Coppens, S; Keulemans, J. (2000) The feasibility of fungal disease resistance in apple by expression of antimicrobial peptide genes. *Acta Horticulturae* 521, 91-94.

31- Brown, S.K. (1992). Genetics of apple. Plant Breed. Rev. 9:333-366.

32- Bugbee ,B.G. and Salisbury, F.B. (1985) An evaluation of MES (2(N-Morpholino) ethanesulfonic acid) and amberlite IRC-50 as pH buffers for nutrient solution studies. *Journal of Plant Nutrition* vol. **8** (7), 567-583.

33- Bulley, S.M; Wilson, F.M; Hedden, P; Phillips, A.L; Croker, S; James, D. (2005). Modification of gibberellin biosynthesis in the grafted apple scion allows control of tree height independent of the rootstock. *Plant Biotechnology Journal* 3, 215-223.

34- Caboni, E; Lauri, P; D'Angeli, S. (2000). *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Reports* **19,** 755-760

35- Caboni. E; Tonelli, M; Falasca, G; Damiano, C. (1996). Factors affecting adventitious shoot regeneration *in vitro* in the apple rootstock 'Jork 9'. *Advances in Horticultural Science* **10**, 1–5.

36- Caffier, V. and Parisi, L. (2007). Development of apple powdery mildew on sources of resistance to *Podosphaera leucotricha*, exposed to an inoculum virulent against the major resistance gene *Pl-2*. Plant Breeding 126 (3): 319–322.

37- Calenge, F; Faure, A; Goerre , M; Gebhardt,C; Van de Weg,

W.E; Parisi, L. and Durel, C.E.. (2004). Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. Phytopathology 94:370-379.

38- Chaudhry, B, Yasmeen , A; Husnain, T. and Riazuddin, S. (1999). Mini-scale genomic DNA extraction from Cotton. Plant Molecular Reporter 17: 1-7.

39- Cheng, L; Zhou, R; Reidel, E.J; Sharkey, T.D. and Dandekar , A.M. (2005). Antisense inhibition of sorbitol synthesis leads to up-regulation of starch synthesis without altering CO2 assimilation in apple leaves. Planta 220:767-776.

40- Chevreau, E; Taglioni, J.P; Cesbron, C; Dupuis, F; Sourice, S; Loridon, K. (2007). Feasibility of alternative selection methods for transgenic apple and pear using the detoxification gene *Vr-ERE*. *Acta Horticulturae* 738, 277-281.

41- Chu,CC.; Wang, C.C.; Sun, C.S. and Hsu,C. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica*, **18**: 659-688.

42- Chung, E.Y; Kim, B.H; Lee, M.K; Yun, Y.P; Lee, S.H; Min, K.R; Kim, Y. (2003). Anti-inflammatory effect of the oligomeric stilben alpha-Viniferin and its mode of the action through inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric axide synthase *Planta Medica* 69, 710-714.

43- Crosby, J.A; Janick, J; Pecknold, P.C; Korban, S.S; O'Connor , P.A; Ries, S.M; *et al*. (1992). Breeding apples for scab resistance: 1945-1990. Acta Hortic. 317:43-70.

44- D'Angeli, S; Lauri, P; Caboni, E; Dewitte ,W; Van Onckelen, H. (2001). Factors affecting *in vitro* shoot formation from vegetative shoot apices of apple and relationship between Organo genetic response and cytokinin localisation. *Plant Biosystems* **135**: 95-100.

45- Dandekar, A.M. (1992). Transformation. In: Hammerschlag FA, Litz RE (Eds) *Biotechnology of Perennial Fruits Crops*. CAB Inter; Wallingford, UK.141-168.

46- Dandekar, A.M; Teo, G; Defilippi, B.G; Uratsu, S.L; Passey, A.J; Kader, A.A; Stow, J.R; Colgan, R.J; James, D.J. (2004). Effect of down regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Research* 13, 373-384.

47- De Bondt, A; Zaman, S; Broekaert, W; Cammue, B; Keulemans J (1999). Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) for increased fungal resistance: *in vitro* antifungal activity in protein extracts of transgenic apple expressing *RS-AFP2* or *ACE-AMP1*. *Acta Horticulturae* 484, 565-570.

48- De Bondt A, Eggermont K, Penninckx I, Goderis I, Broekaert WF (1996). *Agrobacterium* mediated transformation of apple (*Malus X domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 15, 549-554.

49- De Bondt, A; Eggermont, K; Druart, P; De Vil, M; Goderis, I; Vanderleyden, J; Broekaert, W.F. (1994). *Agrobacterium* mediated transformation of apple (*Malus X domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Reports* 13, 587-593.

50- Defilippi, B; Dandekar, A.M; Kader, A.A. (2005a). Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3133-3141.

51- Defilippi B, Dandekar AM, Kader AA (2005b). Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. Plant Science 168, 199-1210.

52- Defilippi, B; Dandekar, A.M; Kader, A.A. (2004). Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus X domestica* Borkh.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5694-5701.

53- Degenhardt, **J. (2006).** Transcript analysis of apple scab susceptible and resistant Malus domestica Borkh. cultivars and establishment of a mannose selection transformation system for apple. Ph.D thesis, Faculty of Natural Sciences, Leibniz University Hannover, Germany.

54- Degenhardt, J. and Szankowski, I. (2006). Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) using the phosphomannose isomerase

gene as a selectable marker. Acta Hort. (ISHS) 725:811-816.

55- Degenhardt, J; Poppe, A; Montag, J; Szankowski, I. (2006). The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. *Plant Cell Reports* **25**, 1149-1156.

56- Degenhardt, J; Al-Masri, A.N; Kürkcüoglu, S; Szankowski, I; and Gau, A.E. (2005). Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. Mol. Genet. Genomics 273:326-335.

57- Dobránszki, J. and Teixeira, d.a; Silva, J.A. (2010). Micropropagation of apple — A review. Biotechnology Advances 28:462–488.

58- Dolgov, S.V. and Skryabin, K.G. (2004a). Transgenic apple clonal rootsock resistant to Basta herbicide. *Acta Horticulturae* 663, 499-502.

59- Dolgov, S.V; Schestibratov, K.A; Morishnichenko, D.N. (2004b). Apple transformation with the gene of supersweet protein thaumatin II. Acta Horticulturae 663, 507-510.

60- Dolgov, S.V; Morishnichenko, D.N; Schestibratov, K.A. (2000). *Agrobacterium* transformation of apple cultivar and rootstock. *Acta Horticulturae* 538, 619-624.

61- Dufour, M. (1990). Improving yield of adventitious shoots in apple. *Acta Horticulturae* (ISHS) **280:** 51-60.

62- Durel, C.E; van de Weg, W.E; Venisse, J.S. and Parisi, L. (2000). Localization of a major gene for apple scab resistance on the European genetic map of the Prima × Fiesta cross. OILB/WPRS Bull. 23:245-248.

63- De Bondet, A; Eggermont, K; Penninckx, I; Goderis ,I. and Broekaert ,W.F. (1996). *Agrobacterium*- mediated transformation of apple *(Malus x domesestica Borkh.*): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 15: 549-554.

64- De Bondet, A; Eggermont, K; Druart, P; De Vil, M; Godris, I; Vanderleyden, J. and Broekaert, W.F. (1994). *Agrobacteririum*-mediated transformation of apple (*Maluse x domesestica Borkh*.): an

assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. Plant Cell Rep 13:587-593.

65- Ebner, C; Hirschwehr, R; Bauer, L; Breiteneder, H; Valenta, R; Ebner, H. (1995). Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE crossreactivities with the important birch pollen allergens Betv1 and Betv2 (birch profilin). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 95, 962-969.

66- Elooma, P; Honkanen, J. Puske ,R; Seppanen ,P; Helaritutta, Y; Mehto ,M; Kotilainen, M; Nevalainen, L. and Teeri, T.H. (1993). *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. Bio/Technology 11:505-508.

67- Erdin, N; Tartarini ,S; Broggini, G.A; Gennari, F; Sansavini, S; Gessler, C. and Patocchi, A. (2006). Mapping of the apple scab-resistance gene *Vb*. Genome 49:1238-45.

68- Escalettes, V. and Dosba, F. (1993). *In vitro* adventitious Shoot Regeneration from leaves of *Prunus spp. Plant Sci.* **90:** 201-209.

69- Espley, R.V; Hellens, R.P; Putterill, J; Stevenson, D.E; Kutty-Amma, S; Allan, A.C. (2007). Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. The Plant Journal 49, 414-427.

70- Faize, M; Sourice, S; Dupuis, F; Parisi, L; Gautier, M.F; Chevreau, E. (2004). Expression of wheat puroindoline b reduces scab susceptibility in transgenic apple (Malus X domestica Borkh.). Plant Science 167, 347-354.

71- Faize, M; Malnoy, M; Dupuis, F; Chevalier, M; Parisi, L; Chevreau, E. (2003). Chitinases of *Trichoderma atroviridae* induce scab resistance and some metabolic changes in two cultivars of apple. *Phytopathology* 93, 1496-1504.

72- Famiani, F;Ferradini, N; Staffolani, P; Standardi, A. (1994). Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatment on *in vitro* shoot regeneration of 'M.26' apple rootstock. *Journal of Horticultural Science* **69:** 679-685

73- FAO.2012.http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?Pag

eID=567#ancor**.**

74- Fasolo Fabbri Malavasi, F. and Predieri, S. (1990). Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. *Acta Hort*. (ISHS). **280,** 61-68.

75- Fasolo, F; Zimmermann, R.H; Fordham, I. (1989). Adventitious shoot formation on excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16, 75-87.

76- Ferradini, N; Famiani, F; Proietti, P, Stanica, F. (1996). Influence of growth regulators and light on *in vitro* shoot regeneration in 'M.26' apple rootstock. *Journal of Horticultural Science* **71**, 859-865.

77- Fiola, J.A; Hassan, M.A; Swartz, H.J; Bors, R.H. and McNicolas, R. (1990). Effect of thidiazuron, light flounce rates and kanamaycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **20**: 223.

78- Flachowsky, H; Richter, K; Kim W-S; Geider, K; Hanke, V. (2008). Transgenic expression of a viral EPS-depolymerase is potentially useful to induce fire blight resistance in apple. *Annals of Applied Biology* 153, 345-355.

79- Flachowsky, H; Birk, T; Hanke, V. (2004). Preliminary results to establish an alternative selection system for apple transformation. *Acta Hortic.* 663, 425-430.

80- Gercheva, P; Nacheva, L; Dineva, V. (2009). The Rate of shoot regeneration from apple (*Malus domestica*) leaves depending on the *in vitro* culture conditions of the source plants. *Acta Hort;* **825**, 71-76.

81- Gessler, C; and A. Patocchi. (2007). Recombinant DNA technology in apple. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 107:113-132.

82- Gilissen, LJWJ; Bolhaar, STHP; Matos C.I, Rouwendal, GJA; Boone, MJ; Krens, FA; Zuidmeer, L; Van Leeuwen, A; Akkerdaas ,J; Hoffmann-Sommergruber, K; Knulst, AC; Bosch, D; Van de Weg, WE; Van Ree, R. (2004). Silencing the major apple allergen Mal d1 by using the RNA interference approach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **115**, 364-369.

83- Gill, R and Saxena, PK. (1992). Direct somatic embryogenesis and regeneration of plant from seedling explant of peanut (*Arachis hypogae* L.: Promotive role of thidiazouron. *Can. J. Bot.* **70:** 1186-1192.

84- Gittins, J.R; Pellny, T.K; Biricolti, S; Hiles, E.R; Passey, A,J; James, D.J. (2003). Transgene expression in the vegetative tissues of apple driven by the vascular specific rolC and CoYMV promoters. *Transgenic Research* **12**, 91-402.

85- Gittins, J.R; Hiles, E.R; Pellny, T.K; Biricolti, S; James, D.J. (2001). The *Brassica napus* extA promoter: A novel alternative promoter to *CaMV*35S for directing transgene expression to young stem tissues and load bearing regions of transgenic apple trees (*Malus pumila* Mill). *Molecular Breeding* **7**, 51-62.

86- Gittins, J.R., T.K. Pellny, E.R. Hiles, C. Rosa, S. Biricolti and D.J. James. (**2000**). Transgene expression driven by heterologous ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small-subunit gene promoters in the vegetative tissues of apple (*Malus pumila* Mill.). Planta, 210: 232-240.

87- Gygax, M; Gianfranceschi, L; Liebhard, R; Kellerhals, M; Gessler, C. and Patocchi, A. (2004). Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata jackii*. Theor. Appl. Genet. 109:1702-1709.

88- Hammerschlag, F.A; Liu, Q; Zimmerman, R.H; Gercheva, P. (2000). Generating apple transformants free o*f Agrobacterium tumefaciens* by vacuum infiltrating explants with an acidified medium and without antibiotics. *Acta Hortic***.** 530, 103-111.

89- Han, Y; Gasic, K; Sun, F; Xu, M. and Korban, S.S. (2007). A gene encoding starch branching enzyme I(SBEI) in apple (*Malus* x *domestica*, Rosaceae) and its phylogenetic relationship to Sbe genes from other angiosperms. Mol. Phylogenet. Evol. 43:852-863.

90- Hanke, V; Geider, K; Richter, K. (2003). Transgenic apple plants expressing viral EPS-depolymerase: evaluation of resistance to the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora*. In: Vasil IK (Ed) Plant Biotechnology*: 2002 and Beyond*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 153-157.

91- Hanke, V; Kim, W.S; Geider, K. (2002). Plant transformation for

induction of fire blight resistance: transgenic apples expressing viral EPS depolymerase. *Acta Horticulturae* 590, 393-395.

92- Hanke, V; Hiller, I; Klotzsche, G; Richter, K; Norelli, J.L; Aldwinckle, H.S. (2000). Transformation in apple for increased disease resistance. *Acta Hortic* 538, 611-616.

93- Haris, S.A; Robinson, J.P. and Juniper, B.E. (2002). Genetic clues to the origin of apple. Trends in Genetics 18: 426-430.

94- Helariutta, Y; Elomaa, P; Kotilainen, M; Griesbach, R.J; Schroder, J. and Teeri, T.H. (1995). Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in Gerbera hybrida (Asteraceae). *Plant Mol Biol.* 28(1):47-60.

95- Hemerly, A.S; Ferreira, P.de; Almeida Engler, J; Van Montagu, M; Engler, G. and Inzé. D. (1993). Cdc2a expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division. *Plant Cell*, 5 (12):1711-23.

96- Hemmat, N. and Grant, N.J. (1998). Shoot regeneration from leaves of *Prunuse serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry). *Plant Cell Reports***, 17:**526-530.

97- Holefors, A; Xue, Z.T; Zhu, L.H; Welander, M. (2000). The *Arabidopsis* phytochrome B gene influences growth of the apple rootstock M26. *Plant Cell Reports* 19, 1049-1056.

98- Holefors, A; Xue, Z.T; Welander, M. (1998). Transformation of the apple rootstock M26 with rolA gene and its influence on growth. *Plant Science* 136, 69-78.

99- Hrazdina, G; Kiss, E; Galli, Z; Rosenfield, C; Norelli, J.L; Aldwinckle, H.S. (2003). Down regulation of ethylene production in Royal Gala apples. *Acta Horticulturae* 628, 239-251.

100- Hyung, NI; Lee, CH; Kim, S.B. (1995). Foreign gene transfer using electroporation and transient expression in apple (*Malus domestica* Borkh). *Acta Horticulturae* 392, 179-185.

101- Huang, W.L. and Liu, L.F. (2002). Carbohydrate metabolism in rice during callus inducation and shoot regeneration induced by osmotic stress. *Bot. Bull. Acid. Sin;* **43:** 107-113.

102- Igarashi, M; Ogasawara, H; Hatsuyama, Y; Saito, A. and Suzuki, M.(2002). Introduction of *rol*C into Marubakaidou (*Malus prunifolia* Borkh. var.RingoAsami Mo 84-A) apple rootstock via *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci. 163:463-473.

103- Jacobsen, E. and Schouten, H.J. (2008). Cisgenesis, a new tool for traditional plant breeding, should be exempted from the regulation on genetically modified organisms in a step by step approach. Potato Res. 51:75-78.

104- Jacobsen, Eand; Schouten, H.J. (2007). Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. Trends Biotechnol. 25: 219-223.

105- Jain, R. and Rashid, A. (2001). Stimulation of shoot regeneration on *Linum* hypocotyl segments by thidiazuron and its response to light and calcium. *Biologia Plantarium* **44** (**4)**: 460-481.

106- Jámborné dr BE, Dobránszki J (2005). Kertészeti növenyek mikroszaporítása. Mezőgazda Kiadó**,** Budapest, Hungary, 423 pp**.**

107- James, Clive. (2013). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: *ISAAA Brief* No. 46. ISAAA: Ithaca, NY.

108- James, D; Passey, A; Baker, S; Wilson, F; Stow, J; Colgan, R; *et al*. (2003). Genetic modification to improve fruit quality: benefits for the grower, the consumer and the environment. Acta Hort. (ISHS) 622: 97-104.

109- James, D.J; Passy, A.J; Baker, S.A. and Wilson, F.M. (1996). Transgenes display stable pattern of expression in apple fruit and Mendelian segregation in the progeny. Bio /Technology 14:56-60.

110- James, D.J; Passey, A.J; Baker, S.A.(1994). Stable gene expression in transgenic apple tree tissues and segregation of transgenes in the progeny – preliminary evidence. *Euphytica* **77**, 119-121.

111- James, D.J; Uratsu, S; Cheng, J; Negri, P; Viss, P. and Dandekar, A.M. (1993a). Acetosyringon and osmo protectants like

betaine or proline synergistically enhance *Agrobaacterium*- mediated transformation of apple. Plant Cell Rep. 12:559-563.

112- James, D.J; Passey, A.J; Webster, A.D; Barbara, D.J; Viss, P; Dandekar, A.M; Uratsu, S. (1993b). Transgenic apples and strawberries: Advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants. *Acta Horticulturae* 336, 179-184.

113- James, D.J; Passey, A.J; Barbara, D.J; Bevan, M.V. (1989). Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports* **7**, 658-666.

114- Janick, J; J.N, Cummins; S.K, Brown and M, Hemmat. (1996). Apples. *In* Janick, J; and J.M. Moore (eds.) Fruit breed. Vol. I. Tree and Tropical Fruits. Wiley, New York, USA.

115- Janse, J; Schaart, J.G; Puite, K.J; Florack, D.E.A; Groenwold, R; Pelgrom, K; Krens, F.A .(2002). Enhanced resistance to *Venturia inaequalis* in transgenic apple by a gene coding for hordothionin. 10th IAPTC&B Congress, Plant Biotechnology and Beyond, June 23-28, , Orlando, Florida, USA.

116- Joshi, S.J. (2010). Towards durable resistance to apple scab using cisgenes. Ph.D thesis, Wageningen University. The Netherlands.

117- Kanamaru, N; Ito, Y; Komori, S; Saito, M; Kato, H; Takahashi, S; *et al*. (2004). Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. Plant Sci. 167:55-61.

118- Kanyand, M; Dessaim, A.P; Prakash, C.S. (1994). Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants *in vitro*. *Plant Cell Reports*, **14**: 1-5.

119- Karho, S.T. (1997). Sugar use in relation to shoot induction by sorbitol and cytokinin in apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**:476-480

120- Klee, H.J. and Rogers, S.G. (1989). Plant genetic vectors and transformation: plant transformation systems based on the use of *Agrobacterium tumefaciens*. In: Shell J, Vasil IK (Eds) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants (Vol 6) Molecular Biology of Plant*

Nuclear Genes, Academic Press, San Diego, CA, USA, pp 2-25.

121- Korban, S.S. (1998). What's new with disease-resistant apple cultivars. Proc. Trans. Ill. Hortic. Soc. 131:74-76.

122- Korban, S.S; O'Conner, P.A. and Edobeidy, A (1992). Effect of thidiazouron, naphthalen acetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves. *J. Hortic. Sci*. **67,** 341-349.

123- Korban, S.S. and Chen, H (1992). Biotechnology of apples. p. 203-227. *In*: Hammerschlag, F. and R.Litz (eds.) Biotechnology of fruit tree crops. CAB International, Oxford, U.K.

124- Korban, S.S. and Skirvin, H (1984). Nomenclature of the cultivate apple. HortScience 19: 177-180.

125- Ko, K; Norelli, J.L; Reynoird, J.P; Aldwinckle, H.S; Brown, S.K. (2002). T4 lysozyme and attacin genes enhance resistance of transgenic Galaxy apple against *Erwinia amylovora*. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **127**, 515-519.

126- Ko, K; Norelli, J.L; Reynoird, J.P; Boresjza-Wysocka, E.E; Brown, S; Aldwinckle, H.S. (2000). Effect of untranslated leader sequence of AMV RNA 4 and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on attacin gene expression, and resistance to fire blight in transgenic apple. *Biotechnology Letters* 22, 373-381.

127- Ko, K., S. Brown, J.L. Norelli and H.S. Aldwinckle. **(1998).** Alteration in nptII and gus expression following micropropagation of transgenic M.7 apple rootstock lines. Journal of the American Society of Horticultural Science, 123: 11-18.

128- Kondrak, M; van der Meer, I; Banfalvi, Z. (2006). Generation of marker and backbone-free transgenic potatoes by site specific recombination and a bifunctional marker gene in a non regular one border *Agrobacterium* transformation vector. *Transgenic Research* **15**, 729-737.

129- Kotoda, N; Iwanami, H; Takahash, S; Abe K. (2006). Antisense expression of *MdTFL1*, a *TFL1* like gene, reduces the juvenile phase in apple. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **131**, 74-81.

130- Koiwa, H, M. Nishihara, R. Matsuki, N. Hoshi, M. Nakano, T.

Oomiya, T. Takezawa and S. Yamamura. 2001. Agrobacterium-mediated transformation of the commercial apples. OECD, ENV/JM/MONO, (2001) 14: 34-36. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 19. Report of the workshopon the environmental considerations of genetically modified trees.

131- Krens, F.A; Pelgrom, K.T.B; Schaart, J.G; den Nijs, A.P.M. and Rouwendal, G.J.A. (2004a). Clean vector technology for marker-free transgenic ornamentals. Acta Hort. (ISHS) 651:101-105.

132- Krens ,F.A; Pelgrom, K.T.B; Schaart, J.G; Den; Nijs, A.P.M; Rouwendal, G.J.A. (2004b). Clean vector technology for marker-free transgenic fruit crops. *Acta Horticulturae* 663, 431-435.

133- Krishnamurthy, K. , Balconi ,C; Sherwood, J.E. and Giroux, M. (2001). Increased tolerance to fungal diseases of rice plants transformed with puroindoline genes. Molec. Plant-Microbe Interact. 14:1255-1260.

134- Lambert, C. and Tepfer, D. (1992). Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. Theor. Apple. Genet. 85: 105-109.

135- Lau, J.M. and S.S. Korban. (2010). Transgenic apple expressing an antigenic protein of the human respiratory syncytial virus. Journal of Plant Physiology, 167: 920–927.

136- Leblay, C; Chevereau, E; Raboin, L. M. (1991). Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Tissue* ***Organ Cult*****; 25: 99-105.**

137- Li, H. (2008). Metabolic engineeri**ng** of flavonoid biosynthes*is in ap*ple by genetic transformation. Ph.D *thesis, Faculty* of *Natural Sciences, Leibniz Un*iv**er**sity Hannover, Germany.

138- Liebhard, R; Koller, B; Gianfranceschi, L. and Gessler, C. (2003). Creating a saturated reference map for the apple (*Malus* x *domestica* Borkh.) genome. Theor. Appl. Genet. 106:1497-1508.

139- Liu, Q; Ingersoll, J; Owens, L; Salih, S; Meng, R; Hammerschlag, F.A. (2001). Response of transgenic Royal Gala apple (*Malus X domestica* Borkh.) shoots carrying a modified cecropin MB39 gene, to *Erwinia amylovora*. *Plant Cell Reports* 20, 306-312.

140- Liu, Q; Salih, S, and Hammerschlag, F. (1998). Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus X domestica* Borkh.) shoots promotes high frequency shoot organogenesis and enhanced E-glucuronidase expression from stem internodes. *Plant Cell Reports* 18, 32-36.

141- Liu, J.R; Sink, K.C; Dennis, F.G. Jr. (1983a). Adventive embryogenesis from leaf explants of apple seedling. *HortScience* 18, 871-873.

142- Liu, J.R; Sink, K.C; Dennis, F.G. Jr. (1983b). Plant regeneration from apple seedling explants of apple and callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2, 293-304.

143- Lusk, J.L. and Sullivan, P.(2002). Consumers acceptance of genetically modified foods. Food Technol. 56:32-37.

144- MacHardy, W.E.(1996). Apple scab: Biology, epidemiology and management. 545 p. APS Press, St. Paul, Minessota, USA.

145- Magyarné T.K; Dobránszki, J; Ferenczy, A; Jámborné, B.E; Lazányi, J. (2001). Citokynin- és auxin szintek szerepe a 'Red Fuji' és a 'McIntosh' almafajták mikroszaporításában. Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények **1**, 53-59.

146- Maheswaran, G; Pridmore, L; Franz, P; Anderson, M.A. (2007). Aproteinase inhibitor from *Nicotiana alata* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. *Plant Cell Reports* **26**, 773-782.

147- Maheswaren, G; Welander, M; Hutchinson, J.F; Graham M.W. and Richards, D. (1992). Transformation of apple rootstock M.26 with *Agrobacterium tumefaciens.* J. Plant Physiol. 139: 560-568.

148- Malik, K.A. and Saxena, P.K. (1992). Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta* **186**: 384-389.

149- Malnoy, M; Xu, M; Borejsza-Wysocka, E.E; Korban, S.S; Aldwinckle, H.S. (2008). Two receptor-like genes, *Vfa1* and *Vfa2*, confer resistance to the fungal pathogen *Venturia inaequalis* inciting apple scab disease *Molecuar Plant Microbe Interaction* 21, 448-458.

150- Malnoy, M; Jin, Q; Borejsza-Wysocka, E; He, S.Y. and Aldwinckle, H.S. (2007a). Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in Malus ×domestica. Mol. Plant-Microbe Interact. 20:1568-1580.

151- Malnoy, M; Borejsza-Wysocka, E; Abbott, P; Lewis, S; Norelli, J; Flaishman, M; *et al*. (2007b). Genetic transformation of apple without use of a selectable marker. Acta Hort. (ISHS) 738:319-322.

152- Malnoy, M; Reynoird, J.P; Borejsza-Wysocka, E; Aldwinckle, H.S. (2006). Activation of the pathogen-inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus domestica*). *Transgenic Research* 15, 83-93.

153- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. (1982). Molecular cloning: Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/ NY.

154- Mante, S.R, Scorza, R & Cordis, J.M. (1989). Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica, Prunus domestica* and *Prunus cerasus*. Plant Cell Tiss Org. Cult; **19**:1-11

155- Markwick, N.P; Docherty, L.C; Phung, M.M; Lester, M.T; Murray, C; Yao, J.L; Mitra, D.S; Cohen, D; Beuning, L.L; Kutty-Amma, S. and Christeller, J.T. (2003). Transgenic tobacco and apple plants expressing biotin-binding proteins are resistant to two cosmopolitan insect pests, potato tuber moth and lightbrown apple moth, respectively. Transgenic Research 12, 671-681.

156- Maxemova, S.N; Dandekar, A.M; , and Guiltinan, M. (1998). Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T- DNA transfer are rate limiting. *Plant Molecular Biology*, 37(3): 549-559.

157- McAdam-O; Connell, D; Mac Antsaoir, S. and Copeland, R.(2004). Development of a leaf disk regeneration system for 'Bramley's' seedling apple (*Malus* × *domestica* Borkh.). *Acta Horticulturae* **663,** 483-486.

158- Mello, M.O.; Diass, CTS.; Amaral, AFC.; Mello, M. (2001). Growth of *Bauhinia forticata* Link, *Curcuma zedoaria* Roscoe and

Phaseolus vulgaris L. cell suspension cultures with carbon socures. *Sci. Agric;* **58 (**3)

159- Mencuccini, M. & Rugini, E. (1993). *In vitro* shoot regeneration from olive cultivar tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **32**: 283-288.

160- Modgil, M; Handa, R. And Sharma, DR. (1999). Direct shoot regeneration from excised leaves of *in vitro* raised shoots of clonal apple rootstock, MM106. *Current Science*, **76** (**3**), 278-279.

161- Mooney, P.A; Goodwin, P.B. (1989). Presumptive transformation of apple by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Horticulturae* 240, 5961.

162- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

163- Murata, M; Nishimura, M; Murai, N; Haruta, M; Homma, S. and Itoh, Y. (2001). A transgenic apple callus showing reduced polyphenol oxidase activity and lower browning potential. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65, 383-388.

164- Murata, M; Haruta, M; Murai, N; , Tanikawa, N, Nishimura, M; Homma, S; Itoh, Y. (2000). Transgenic apple (*Malus X domestica*) shoot showing low browning potentail. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5243-5248.

165- Muthu T; Jerome J; Malaiyandi K; Ill-Min Ch; Jong-Jin K. (2013). Optimization of Agrobacterium-mediated genetic transformation in gherkin (Cucumis anguria L.). POJ 6(3):231-23

166- Newcomb, R.D; Crowhurst, R.N; Gleave, A.P; Rikkerink, E.H.A; Allan, A.C; Beuning, L.L, *et al*. (2006). Analyses of expressed sequence tags from apple (*Malus* x *domestica*). Plant Physiol. 141:147-166.

167- Nitsch, J.P. and Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science* **169,** 85.

168- Norelli, J.L; Basset, C.L; Artlip, T.S; Aldwinckle, H.S; Malnoy, M; Boresjza-Wysocka, E.E; Gidoni, D; Flaishman, M.A. (2007). Inducible DNA promoters for use in apple. *Acta Horticulturae* 738, 329-334.

169- Norelli, J.L; Borejsza-Wysocka, E; Reynoird, J.P. and Aldwinckle, H.S. (2000). Transgenic 'Royal Gala' apple expressing attacin E has increased field resistance to *Erwinia amylovora* (fire blight). Acta Hort. (ISHS) 538:631-633.

170- Norelli, J.L; Borejsza-Wysocka, E; Momol, T.M; Aldwinckle, H.S; Abdul Kader, A.M; Bauer, W.B, and Beer, S.V. (1999a). Genetic transformation for fire blight resistance in apple. *Acta Horticulturae* 489, 295-296.

171- Norelli, J.L; Mills, J.Z; Momol, M.T; Aldwinckle, H.S. (1999b). Effect of cecropinlike transgenes on fire blight resistance of apple. *Acta Horticulturae* 489, 273-278.

172- Norelli, JL; Mills, JA. and Aldwiinckle, HS .(1996). Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium* – mediated transformation of apple. *HortScience* **31** (**6**), 1026-1027.

173- Norelli, J.L; H.S. Aldwinckle, L; Destéfano-Béltran, J and M. Jaynes. 1994. Transgenic "Malling 26" apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* 77(1-2): 123-128.

174- Nielsen, K.M. (2003). Transgenic organisms: time for a conceptual change. *Nature Biotechnology* 21, 227-228.

175- Oh, C.S. and Beer, S.V.(2007). AtHIPM, an ortholog of *the apple HrpN-inte**racting*** protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in Arabidopsis. *Molecuar Plant-Microbe Interactions* 145, 426-436.

176- Ortolani, C; Ispano, M; Pastorello, E; Bigi, A; Ansaloni, R. (1988). The oral allergy syndrome. *Annals Allergy* 61, 47-52.

177- OSF. (2013). Okanagan Specialty Fruits Inc.'s Petition (10-161-01p) for Determination of Non-regulated Status of Non-browning ArcticTM Apple Events GD743 and GS784. http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/10_16101p_dpra.pdf.

178- Paris, R; Cova, V; Pagliarani, G; Tartarini, S; Komjanc, M; Sansavini, S. (2009). Expression profiling in *Hcrvf2*-transfromed apple plants in response to *Venturia inaequalis*. *Tree Genetics and Genomes* 5, 81-91.

179- Park, S; N, Sugimoto; Larson, M.D; Beaudry, R. and Nocker, S,van. (2006). Identification of genes with potential roles in apple fruit development and biochemistry t**.** hrough large-scale statistical analysis of expressed sequence tags. Plant Physiol 141:811-824.

180- Patat-OchattE. M. (1994). Regeneration of Plants from Protoplast of *Malus x domestica* Brokh (apple). In: **Bajaja YPS** (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 83 -101.

181- Pasqualetto, P.L; Zimmermann, R.H. and Fordham, I. (**1986).** Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of Gala apple in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **111 (6),** 976-980.

182- Pasqualis, G., S. Biricolti, F. Locatelli, E. Baldoni and M. Mattana. **(2008)**. Osmyb4 expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples. Plant Cell Reports, 27: 1677-1686.

183- Pawlicki-Jullian, N; Sedira, M; Welander, M .(2002). The use of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots to obtain transgenic shoots of apple rootstock *Jock9. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7*0, 163-171.

184- Pawlicki, N . and Welander, M. (1994). Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* culture shoots of the apple rootstock 'Jork9'. *Jornal of Horticulture Science* **69**(**4**):687-696.

185- Penna, S; Sági, L. and Swennen, R. (2002). Positive selectable marker genes for routine plant transformation. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 38:125-128.

186- Piccioni, E. and Valecchi, G.(1996). Effects of wounding and of rooting in the regenerative ability of micropropagated alfalfa tissues. Agr. Med. 126: 311–315.

187- Polanco, V; Paredes M; Becerra, V. and Pérez, E. (2010). Advances in apple transformation technology to confer resistance to fungal diseases in apple crops: a Chilean perspective. CHIL. J. AGRIC. RES. 70 (2) : 297-308.

188- Puhringer, H; Moll, D; Hoffmann-Sommergruber, K; Watillon, B; Katinger, H, Machado, M.L.D .(2000). The promoter of an apple

Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Science* 152, 35-50.

189- Puite, K.J. and Schaart, J.G. (1996). Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar *via* an *Agrobacterium*-mediated transformation method. *Plant Science*, 119, 125-133.

190- Qu, S.C., X.D. Huang, Z. Zhang, Q-H. Yao, J-M. Tao, Y.S. Qiao and J.Y. Zhang (2005). Agrobacterium mediated transformation of Malus robusta with tomato iron transporter gene. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 31: 235-240.

191- Qu oirin, M. and **Lepoivre, P. (1977).** Improved media for *in vitro* culture of *Prunus sp. Acta Horti*.**, 78**:437-442.

192- Radchuck, V.V. and Korkhovoy, V.I. (2005). The *rolB* gene promotes rooting *in vitro* and increases fresh root weight *in vivo* of transformed apple scion cultivar 'Florina'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81, 203-212

193- Ratnasiri, M; Fung, R.M.W; Weir I; Ding, H; Simons, J.L; Allan, AC. (2002) Efficient transient transformation of suspension culture-derived apple protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70, 77-82.

194- Rice-Evans, C.A; Sampson, J; Bramley, P.M; Holloway, D.E.(1997). Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*? *Free Radical Research* 26, 381-398.

195- Rommens, C.M. (2004). All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends in Plant Science* 9, 457-464.

196- Rudolf, J.R. and Resurreccion, A.V. (2005). Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 10186-10192.

197- Rühmann, S; Treutter, D; Fritsche, S; Briviba, K. and Szankowski, I. (2006). Piceid (resveratrol glucoside) Synthesis in stilbene synthase transgenic apple fruit. J. Agric. Food Chem. 54:4633-4640.

198- Salter, A; Scott, N.W. and Fowler, M.R. (2008). Plant disese

resistance. Pp. 156-183. In: Plant Biotechnology, the genetic manipulation of plants. Second edition. Oxford Univ. Press.

199- Sambrook, J. and Russell, W.D. (2001). Molecular cloning: A Laboratory Manual. third edition, volume 1, Preparation of plasmid DNA by Alkaline lysis with SDS: Minipreparation, 132-134.

200- Sansavini, S; Barbieri, M; Belfanti, E; Tartarini, S; Vinatzer, B.A; Gessler, C; *et al*. (2004). Trasformazione genetica del melo Gala con un gene di resistenza a ticchiolatura. Riv. Frutticoltura 1:54-58.

201- Sansavini, S; Barbieri, M; Belfanti, E; Tartarini, S; Vinatzer, B; Gessler, C; *et al*. (2003). 'Gala' apple transformed for scab resistance with cloned *Vf* gene region construct. Proceedings of the XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruit and Nuts, Toronto. August 11-17, 2002. Acta Hort. (ISHS) 622:113-118.

202- Sarwar, M. and Skirvin, R.M. (1997). Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of McIntosh apple (*Malus domestica* Borkh.) *in vitro*. *Scientia Horticulturae* **68,** 95-100.

203- Schaart, J. (2004a). Toward consumer-friendly cisgenic strawberries with are less susceptible to *Botrytis cinerea*. Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

204- Schaart, J.G; F. A, Krens; K.T.B, Pelgrom; O, Mendes and G.J.A. Rouwendal. (2004b). Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. Plant Biotechnol. J. 2:233-240.

205- Schaart, J.G., KJ. Puite, L. Kolova and N. Pogrebnyak. (**1995).** Some methodological aspects of apple transformation by Agrobacterium. Euphytica, 85: 131-134.

206- Schaffer, R.J; Frie,l E.N; Souleyere, E.J.F; Bolitho, K; Thodey, K; Ledger, S; Bowen, J.H; Ma, J.H; Naim, B; Cohen, D; Gleave, A.P; Crowhurst, R.N; Janssen, B.J; Yao, J.L; Newcomb, R.D. (2007). A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiology* 144, 1899-1912.

207- Schaart, J.G; Krens, F.A; Pelgrom, K.T.B; Mendes, O;

Rouwendal, G.J.A. (2004). Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnology Journal* 2, 233-240.

208- Schaart. J.G; Puite, K.J; Kolova, L. and Pogrebnyak, N. (1995). Some methodological aspects of apple transformation by Agrobacterium. Euphytica 85, 131-134.

209- Schouten, H.J. and Jacobsen, E. (2008). Cisgenesis and intragenesis, sisters in innovative plant breeding. Trends Plant Sci. 13: 260-261.

210- Schouten, H.J; Krens, F.A, and Jacobsen, E. (2006a). Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. EMBO Rep. 7:750-753.

211- Schouten, H.J; Krens F.A. and Jacobsen, E. (2006)b. Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? Nature Biotechnol. 24:753.

212- Schulze, K; Screiber, L; Szankowski, I. (2005). Inhibiting effects of resveratrol and its glucoside piceid against Venturia inaequalis, the causal agent of apple scab. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 356-362.

213- Sedira, M; Butler, E; Gallagher, T; Welander, M. (2005). Verification of auxin induced gene expression during adventitious rooting in *rolB* transformed and untransformed apple Jork 9. *Plant Science* 168, 1193-1198.

214- Sedira, M; Holefors, A; Welander, M. (2001). Protocol for transformation of the apple rootstock Jork9 with the *rolB* gene and its influence on rooting. *Plant Cell Reports* 20, 517-524.

215- Seong, E.S; Song, K.S; Jegal, S; Yu, C.Y; Chung, I.M . (2005). Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect *Agrobacterium*-mediated apple transformation. *Plant Growth Regulation* 45, 75-82.

216- Sicurani, M; Piccioni, E. and Standardi, A. (2001). Micropropagation and preparation of synthetic seed in M.26 apple rootstock i: Attempts towards saving labor in the production of adventitious shoot tips suitable for encapsulation. Cultures, 66: 207-216.

217- Silfverberg-Dilworth, E; Patocchi, A; Belfanti, E; Tartarini, S; Sansavini, S; Gessler, C. (2005 a). *Hcrvf2* introduced into Gala confers race-specific apple scab resistance. In: *Plant & Animal Genome XIII Conference*, January 15-19, 2005, San Diego, CA, USA.

218- Silfverberg-Dilworth, E; Besse, S; Paris, E; Belfanti, E; S; Tartarini, S; Sansavini; *et al*. (2005b). Identification of functional apple scab resistance gene promoter. Theor. Appl. Genet. 110:1119-1126.

219- Sriskandarajah, S; Goodwin, P.B. (1998). Conditionong promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 53:1-11.

220- Sriskandarajah, S; Goodwin, P.B; Speirs, J. (1994). Genetic transformation of the apple scion cultivar 'Delicious' via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36, 317-329.

221- Sriskandarajah, S; Skirvin, R.M; Abu Qaoud, H; Korban. S.S. (1990). Factors involved in elongation and growth of adventitious shoots from tree apple scion cultivars *in vitro. Journal of Horticultural Science* 65, 113-121.

222- Szankowski, I; Flachowsky, H; Li H; Halbwirth , H; Treutter, D; Regos, I; Hanke, M.V; Stich, K; Fischer, T.C. (2009). Shift in polyphenol profile and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple (*Malus* sp.). *Planta* 229, 681-692.

223- Szankowski, I; Waidmann, S; Degenhardt, J. and Patocchi A. (2008). Functional characterization of the native promoter of the apple scab resistance gene *HcrVf2*. *In* Biotechfruit ISHS First International Symposium on Biotechnology of Fruit Species. September 1-5. Julius-Kühn Institut, Bundesanstalt für Kulturpflanzen (JKI), Dresden, Germany.

224- Szankowski, I. and Degenhardt, J. (2007). Alternative selection for apple transformation. *Acta Horticulturae* 738, 287-292.

225- Szankowski, I; Briviba, K; Fleschhut, J; Schoenherr, J; Jacobsen, H.J; Kiesecker, H. (2003). Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera L.*) and a *PGIP* gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Reports* **22**, 41-149.

226- Szankowski, I; Lubke, A; Schoenherr, J; Jacobsen, H.J. (2001).

Influence of sonication on regeneration and transformation efficiencies in apple. *Acta Horticulturae* 560, 505-508

227- Sule, S; Kim, W.S; Geider, K. (2002). Transformation of SR1. tobacco and JTE-H apple rootstock with the EPS depolymerase gene from *Erwinia amylovora* phage. *Acta Horticulturae* 590, 407-409.

228- Swartz, H.J; Bors, R; Mohamed, F; Naess, S.K. (1990). The effect of *in vitro* pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21, 179-184.

229- Swietlik, D; Vann, C; Wisniewski, M; Artlip, T; Norelli, J.L; Kochian, L. (2007). The effect of transporter genes on zinc stress in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Acta Horticulturae* 738, 345-349.

230- Tang, H.; Ren, Z.; Reustle, C.; & Krczal, G. (2002). Plant regeneration from leaves of sweet and sourcherry cultivars. *Scientia Hort*; **93**: 235-244

231- Tatum, T; Stepanovic, S; . Biradar, D.P; Rayburn, A.L. and S.S. Korban. (2005). Variation in nuclear DNA content in *Malus* species and cultivated apples. Genome 48: 924-930.

232- Teixeira, da Silva1 J.A. and Dobránszki, J. (2011). The Plant Growth Correction Factor. I. The Hypothetical and Philosophical Basis. *International Journal of Plant Developmental Biology* 5 (1): 73-74. *©2011 Global Science Books.*

233- Theiler-Hedtrich, C. and Theiler-Hedtrich, R. (1990). Influence of TDZ and BA on adventitious shoot regeneration from apple leaves. *Acta Hort*. (ISHS) **280,** 195-200.

234- Thomas, T.D. 2003. Thiadiazuron induced multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary explants of mulberry. *Biol. Plant;* **46**: 529-533.

235- Thorpe, T.A. and Murashig. (1970). Some histological changes underlying shoot initiation in tobacco cultures. *Physiol Plant*; **66**: 58-62**.**

236- Vanblaere, Th. (**2011**). The development of a cisgenic scab resistant apple cv. Gala. Ph.D thesis. ETH Zurich.

237- Van Nerum. I., F. Incerti, I. F; Keulemans, J. and Broothaerts, W. (2000). Analysis of self-fertility in transgenic apple lines, transformed with an S-allele in sense or antisense direction. Acta Hort. (ISHS) 538:625-630.

238- Van Nieuwkerk, J.D; Zimmermann, R.H. and Fordham, I. (1986). Thidiazuron Stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. *Hort.Sci*. **21(3),** 516-518.

239- Vanek-Krebitz, M; Hoffmann-Sommergruber, K; Machado, M.L.D; Susani, M; Ebner, C; Kraft, D; Scheiner, O; Breiteneder, H. (1995). Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214, 538-551.

240- Verma, D.C.; Dougall, D.K. (1977). Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wide carrot suspension cultures. *Plant Physiol*; **59:**81-85.

241- Velasco, *et. al*. (2010). The genome of the domesticated apple (Malus × domestica Borkh). *Nature Genetics* 42, 833–839.

242- Vinatzer, B.A; Patocchi, A; Gianfranceschi, L; Tartarini, S; Zhang, H.B; Gessler, C. and S. Sansavini. (2001). Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance. Mol. Plant-Microbe Interact. 14:508-514.

243- Viss, W.J; Pitrak, J; Humann, J; Cook; M; Driver, J; Ream, W. (2003). Crown gall resistance transgenic trees that silence *Agrobacterium.*

244- Walkey, D.G. (1972). Production of apple plantlets from auxillary bud meristems. *Cand. J. Plant Sci*., **52:** 1085-1087.

245- Welander, M., L.H. Zhu and X.Y. Li. (2004). Transformation of dwarfing apple and pear rootsocks aith the rolB gene and its influence on rooting and growth. Acta Horticulturae, 663: 437-442.

246- Welander, M; Pawlicki, N; Holefors, A. and Wilson F. (1998). Genetic transformtion of apple rootstock M26 with rolB gene and its influence on rooting. Journalof Plant Physiology 53, 371-380.

247- Welander, M.; Pawlicki, N.; Holefors, A. and Wilson, F. (1988). Genetic transformation of the apple rootstock M26 with the RolB gene and its influence on rooting. *Journal of Plant Physiology*, **153** (3-4): 371-380.

248- Wilson, F. M. and D, James. (2003). Regeneration and transformation of Premier UK apple (*Malus x Pumila Mill)* cultivar Queen Cox. Horticulture Science &Biotechnology 78(5) 656-662.

249- Wong, K.W., G.E. Harman, J.L. Norelli, H.L. Gustafson and H.S. Aldwinckle. 1999. Chitinase-transgenic lines of 'Royal Gala' apple showing enhanced resistance to apple scab. Acta Horticulturae, 484: 595-599.

250- Wu, Y., Y. Li, Y. Wu, H. Cheng, Y. Li, Y. Zhao and Yusheng Li. (2011). Transgenic plants from fragmented shoot tips of apple (*Malus baccata* (L.) Borkhausen) via agrobacterium-mediated transformation. Scientia Horticulturae, 128: 450–456.

251- Xu, M.L. and Korban, S.S. (2002). A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* 162, 1995-2006.

252- Xue, M; Malony, M; Borejsza-Wysocka, E; Korban, S.S, and. Aldwinckle. H.S. (2008). Two Receptor-Like Genes, Vfa1 and Vfa2, Confer Resistance to the Fungal Pathogen *Venturia inaequalis* Inciting Apple Scab Disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(4): 448-458.

253- Yamashita, H; H. Daimon, Y. Akasaka-Kennedy and T. Masuda. 2004. Plant regeneration from hairy roots of apple rootstock, Malus prunifolia Borkh. Var. ringo Asami, strain Nagano No. 1, transformed by Agrobacterium rhizogenes. Japanese Society of Horticultural Science, 73: 505-510.

254- Yao, Y; M. Li, Z. Liu, Y. Hao and H. Zhai. (2007). A novel gene, screened by cDNA-AFLP approach, contributes to lowering the acidity of fruit in apple. Plant Physiology and Biochemistry, 45: 139-45.

255- Yao, J.L; Cohen, D; Van den Brink, R. and Morris, B. (1999). Assessment of expression and inheritance patterns of three transgenes with the aid of techniques for promoting rapid flowering of transgenic apple trees. Plant Cell Rep.18:727-732.

256- Yao, J.L; Cohen, D; Atkinson, R; Richardson, K. and Morris, B. (1995). Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar 'Royal Gala'. *Plant Cell Reports* 14: 407-412.

.

257- Yao, Y; Li,M. Z. Liu, Y. Hao, and H. Zhai. (2007). A novel gene, screened by cDNA-AFLP approach,contributes to lowering the acidity of fruit in apple. Plant Physiol. Biochem. 45:139-45

258- Yepes, L.M. and Aldwinckle , H.S. (1994). Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37, 257-269.

259- Way, R.D; Aldwinckle, H.S; Lamb, R.C; Rejman, A; Sansavini, S; Shen ,T; *et al*. (1991). Apples (*Malus*). *In* Moore, J.N; and R. Ballington (eds.) Genetic resources of temperate fruit and nuts, Int. Soc. Wageningen. Acta Hort. (ISHS) 290:1-62.

260- Welander, M; Pawlicki, N; Holefors, A; Wilson, F. (1998). Genetic transformation of apple rootstock M26 with *rolB* gene and its influence on rooting. *Journal of Plant Physiology* 53, 371-380

261- Welander, M .(1988). Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. *Journal of Plant Physiology* 132, 738-744.

262- Wilson, F.M. and James, D.J .(2003). Regeneration and transformation of the premier UK apple (*Malus x pumila* Mill.) cultivar Queen Cox. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78, 656-662.

263- Williams, E.B and Kuc , J. (1969). Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. Annu. Rev. Phytopathol. 7:223-246.

264- W**ong, K.W; Harman, G.E; Norelli, J.L; Gustafson , H.L. and Aldwinckle ,H.S .(1999).** Chitinase-transgenic lines of 'Royal Gala' apple showing enhanced resistance to apple scab. Acta Hort. (ISHS) 484:595-599.

265- Xu, M.L. and Korban. S.S. (2002). A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* 162, 1995-2006.

266- Xu, M.L; Song ,J; Cheng, Z; Jiang, J. and Korban, S.S. (2001) A bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Malus floribunda* 821 for positional cloning of the apple scab resistance gene *Vf*. Genome 44:1104-1113.

267- Yamashita, H; Daimon, H; Akasaka-Kennedy, Y; Masuda,T. (2004). Plant regeneration from hairy roots of apple rootstock, *Malus prunifolia* Borkh. Var. *ringo* Asami, strain Nagano No. 1, transformed by *Agrobacterium rhizogenes. Japanese Society of Horticultural Science* 73, 505-510.

268- Yancheva, S.D; Golubowicz, S; Fisher, E; Lev-Yadun, S; Flaishman, M.A. (2003). Auxin type and timing of apple location determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. *Plant Sci* **165**: 299-309.

269- Yang, HY.; Schmidt, H. (1992). Untersuchungen zur Adventi-vsprossregeneration *in vitro* bei Kirschen. II. Adventi- vs. pross abildung an *in vitro* Blatten vershiedener *Prunus avium*-Idiotypen. *Gartenbauwissendschaft*, **57**:7-10.

270- Yao, J.L; Cohen, D; Atkinson, R; Richardson, K; Morris, B. (1995). Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar 'Royal Gala'. *Plant Cell Reports* 14, 407-412.

271- Yao, J.L; Cohen, D; Van, R; den Brink. and Morris, B. (1999) . Assessment of expression and inheritance patterns of three transgenes with the aid of techniques for promoting rapid flowering of transgenic apple trees. Plant Cell Rep.18:727-732.

272- Yepes, L.M; Aldwinckle, H.S. (1994). Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37, 257-269

273- Yepes, L.M. and Aldwinckle, H.S. (1993). Pathogenesis of *Venturia inaequalis* on shoot tip cultures and on greenhouse grown apple cultivars. Phytopathology 83:1155-1162.

274- Zhang, Z., A. Sun, Y. Cong, B. Sheng, Q. Yao and M.Z. Cheng. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of the apple rootstock *Malus micromalus* makino with the rolC gene. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Planta, 42: 491-497.

275- Zhu, L.H., X.Y. Li and M. Welander. **(2008)**. Overexpression of the Arabidopsis gaigene in apple significantly reduces plant size. Plant Cell Reports, 27: 289-296.

276- Zhu, L.H; Li, X.Y; Nyqvist, M; Welander, M .(2007). Improvement of rooting and reduction in plant height in apple and pear through gene transfer. *Acta Horticulturae* 738, 353-360

277- Zhu, L.H; Li, X.Y; Welander, M .(2005). Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81, 313-318.

278- Zhu, L.H; Li, X.Y; Ahlman, A; Xue, Z.T; Welander. M (2004) The use of mannose as *a* selection agent in transformation of the apple rootstock M.26 via *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Horticulturae* 663, 503-506

279- Zhu, L.H; Ahlman, A; Li, X.Y; Welander, M. (2001a)Intergration of the *rolA* gene into the genome of the vigorous apple rootstock A2 reduced plant height and shortened internodes. *J. of Horticultural Science and Biotechnology* 76, 758-763.

280- Zhu, L.H; Holefors, A; Ahlman, A; Xue, Z.T; Welander, M. (2001b) Transformation of the apple rootstock M.9/29 with the *rolB* gene and its influence on rooting and growth. Plant Science 160, 433-439.

281- Zhu, L.H. and Welander, M. (2000) Growth characteristics of apple cultivar Gravenstein plants grafted onto the transformed rootstock M.26 with *rolA* and *rolB* under non-limiting nutrient conditions. *Plant Science* 147, 75-80.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/13276208

Gerbera hybrida mRNA for 2-pyrone synthase

GenBank: Z38097.2

FASTA Graphics

```
LOCUS       Z38097                 1555 bp    mRNA    linear   PLN 12-
JUN-2006
DEFINITION  Gerbera hybrida mRNA for 2-pyrone synthase.
ACCESSION   Z38097
VERSION     Z38097.2  GI:13276208
KEYWORDS    2-pyrone synthase; g2ps1 gene.
SOURCE      Gerbera hybrid cultivar (Gerbera hybrida)
  ORGANISM  Gerbera hybrid cultivar
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetalae; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae;
            Mutisioideae; Mutisieae; Gerbera.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Helariutta,Y., Elomaa,P., Kotilainen,M., Griesbach,R.J.,
            Schroder,J. and Teeri,T.H.
  TITLE     Chalcone synthase-like genes active during corolla
            development are differentially expressed and encode
            enzymes with different catalytic properties in Gerbera
            hybrida (Asteraceae)
  JOURNAL   Plant Mol. Biol. 28 (1), 47-60 (1995)
   PUBMED   7787187
REFERENCE   2
  AUTHORS   Helariutta,Y., Kotilainen,M., Elomaa,P., Kalkkinen,N.,
Bremer,K.,
            Teeri,T.H. and Albert,V.A.
  TITLE     Duplication and functional divergence in the chalcone
            synthase gene family of Asteraceae: evolution with
            substrate change and catalytic simplification
  JOURNAL   Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (17), 9033-9038 (1996)
   PUBMED   8799149
REFERENCE   3
  AUTHORS   Eckermann,S., Schroder,G., Schmidt,J., Strack,D.,
            Edrada,R.A.,NHelariutta,Y., Elomaa,P., Mika
            Kotilainen,M., Kilpelainen,I., Proksch,P., Teeri,T.H. and
            Schroder,J.
  TITLE     New pathway to polyketides in plants
  JOURNAL   Nature 396, 387-390 (1998)
REFERENCE   4  (bases 1 to 1555)
  AUTHORS   Helariutta,Y.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-OCT-1994) Helariutta Y., University of
            Helsinki, Helsinki University, FIN
REFERENCE   5  (bases 1 to 1555)
  AUTHORS   Teeri,T.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-MAR-2001) Teeri T., Institute of Biotechnology,
P.O.
            Box 56, FIN-00014, University of Helsinki, FINLAND
COMMENT     On Mar 12, 2001 this sequence version replaced gi:853929.
```

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1555
                     /organism="Gerbera hybrid cultivar"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:18101"
                     /tissue_type="corolla"
                     /clone_lib="plasmid library pUEX (Amersham)"
                     /dev_stage="floral"
     gene            1..1555
                     /gene="g2ps1"
     CDS             163..1371
                     /gene="g2ps1"
                     /codon_start=1
                     /product="2-pyrone synthase"
                     /protein_id="CAA86219.2"
                     /db_xref="GI:13276209"
                     /db_xref="GOA:P48391"
                     /db_xref="InterPro:IPR001099"
                     /db_xref="InterPro:IPR011141"
                     /db_xref="InterPro:IPR012328"
                     /db_xref="InterPro:IPR016038"
                     /db_xref="InterPro:IPR016039"
                     /db_xref="InterPro:IPR018088"
                     /db_xref="PDB:1EE0"
                     /db_xref="PDB:1QLV"
                     /db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:P48391"

/translation="MGSYSSDDVEVIREAGRAQGLATILAIGTATPPNCVAQADYADY
YFRVTKSEHMVDLKEKFKRICEKTAIKKRYLALTEDYLQENPTMCEFMAPSLNARQDL
VVTGVPMLGKEAAVKAIDEWGLPKSKITHLIFCTTAGVDMPGADYQLVKLLGLSPSVK
RYMLYQQGCAAGGTVLRLAKDLAENNKGSRVLIVCSEITAILFHGPNENHLDSLVAQA
LFGDGAAALIVGSGPHLAVERPIFEIVSTDQTILPDTEKAMKLHLREGGLTFQLHRDV
PLMVAKNIENAAEKALSPLGITDWNSVFWMVHPGGRAILDQVERKLNLKEDKLRASRH
VLSEYGNLISACVLFIIDEVRKRSMAEGKSTTGEGLDCGVLFGFGPGMTVETVVLRSV
RVTAAVANGN"

polyA_site       1555

 gi|13276208|emb|Z38097.2| Gerbera hybrida mRNA for 2-pyrone synthase

                     /gene="g2ps1"
ORIGIN
1 aaaaggccta ctcaagcctt gaaattctct tttcttttct tttcattccc ttccctcaaa
61 ttataaactt acctttctgt ttctttcaaa gaatttagct gcctcaaacg aagatcttca
121 tatctcattt gttaggatat acaaacatca atctcgagta aaatgggatc ttactcatcc
181 gatgatgtgg aggtgattcg tgaggccgga cgggcacaag gtttagccac gattcttgcc
241 attggcactg ctactcctcc caattgcgtc gctcaagctg attatgcaga ctattatttt
301 cgtgtcacta agagcgaaca tatggttgat cttaaagaga aatttaaacg catttgtgag
361 aaaacagcga taaagaaacg atacctagcc ctcaccgaag actatctgca agagaaccca
421 acaatgtgtg agttcatggc tccatcctta aacgctcgac aagacctagt ggtcaccggc
481 gtcccaatgc ttggcaaaga agccgcagtc aaggccattg atgaatgggg actaccaaaa
541 tccaagatca cccacctcat cttctgcacc accgctggcg ttgacatgcc cggtgctgac
601 tatcaactcg tcaaactcct tggtctctcc ccttcagtca aacgctatat gttgtaccaa
661 cagggatgtg ccgccggcgg cacagtcctc cggctagcca aggaccttgc tgaaaacaac
721 aagggctcac gagtccttat cgtctgctcc gagatcactg ctatcttatt ccatggaccc
781 aatgagaacc accttgactc actcgtcgct caagctttat tcggagacgg agctgcagca
841 ctcattgtgg gttcaggccc tcacttggcc gtagaacggc caatattcga gatcgtgtca
901 actgatcaaa caatcttgcc ggacactgag aaggcaatga agttacactt gagagaggga
961 gggttgacgt ttcagttgca tagagatgta cccttgatgg tcgcaaagaa catagagaac
1021 gcagcggaga aagcgttgtc tccactaggg ataactgatt ggaactcagttttctggatg
1081 gtgcacccag gtggtcgagc catattggac caggtggagc gaaaactaaaccttaaggaa
```

```
1141 gataagttaa gggctagcag gcatgtgctt agtgaatacg gaaacctgattagcgcttgt
1201 gtgttgttca tcattgacga ggtgaggaag agatctatgg cggaagggaagagtacaacc
1261 ggtgaaggtt tggattgcgg tgttttgttt ggatttggac cgggtatgactgttgagact
1321 gttgttcttc gtagcgtccg cgttactgct gcggttgcca atggaaactgatcactgttg
1381 tttgcaaaat attacttttt actacggtat gtttccttgt ttatgagtttgtcattcacc
1441 tatgataata gggtctgtat ttttcttgtt tatgatttta ttttctcaaagatgatgtaa
1501 gttggcaatt aaataaagat tgtttttcct atgaataata taagattaca ttttc//
```

……

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/13276208

Gerbera hybrida mRNA for 2-pyrone synthase

GenBank: Z38097.2

GenBank Graphics

```
>gi|13276208|emb|Z38097.2| Gerbera hybrida mRNA for 2-pyrone synthase
AAAAGGCCTACTCAAGCCTTGAAATTCTCTTTTCTTTTCTTTTCATTCCCTTCCCTCAAATTATAAACTT
ACCTTTCTGTTTCTTTCAAAGAATTTAGCTGCCTCAAACGAAGATCTTCATATCTCATTTGTTAGGATAT
ACAAACATCAATCTCGAGTAAAATGGGATCTTACTCATCCGATGATGTGGAGGTGATTCGTGAGGCCGGA
CGGGCACAAGGTTTAGCCACGATTCTTGCCATTGGCACTGCTACTCCTCCCAATTGCGTCGCTCAAGCTG
ATTATGCAGACTATTATTTTCGTGTCACTAAGAGCGAACATATGGTTGATCTTAAAGAGAAATTTAAACG
CATTTGTGAGAAAACAGCGATAAAGAAACGATACCTAGCCCTCACCGAAGACTATCTGCAAGAGAACCCA
ACAATGTGTGAGTTCATGGCTCCATCCTTAAACGCTCGACAAGACCTAGTGGTCACCGGCGTCCCAATGC
TTGGCAAAGAAGCCGCAGTCAAGGCCATTGATGAATGGGGACTACCAAAATCCAAGATCACCCACCTCAT
CTTCTGCACCACCGCTGGCGTTGACATGCCCGGTGCTGACTATCAACTCGTCAAACTCCTTGGTCTCTCC
CCTTCAGTCAAACGCTATATGTTGTACCAACAGGGATGTGCCGCCGGCGGCACAGTCCTCCGGCTAGCCA
AGGACCTTGCTGAAAACAACAAGGGCTCACGAGTCCTTATCGTCTGCTCCGAGATCACTGCTATCTTATT
CCATGGACCCAATGAGAACCACCTTGACTCACTCGTCGCTCAAGCTTTATTCGGAGACGGAGCTGCAGCA
CTCATTGTGGGTTCAGGCCCTCACTTGGCCGTAGAACGGCCAATATTCGAGATCGTGTCAACTGATCAAA
CAATCTTGCCGGACACTGAGAAGGCAATGAAGTTACACTTGAGAGAGGGAGGGTTGACGTTTCAGTTGCA
TAGAGATGTACCCTTGATGGTCGCAAAGAACATAGAGAACGCAGCGGAGAAAGCGTTGTCTCCACTAGGG
ATAACTGATTGGAACTCAGTTTTCTGGATGGTGCACCCAGGTGGTCGAGCCATATTGGACCAGGTGGAGC
GAAAACTAAACCTTAAGGAAGATAAGTTAAGGGCTAGCAGGCATGTGCTTAGTGAATACGGAAACCTGAT
TAGCGCTTGTGTGTTGTTCATCATTGACGAGGTGAGGAAGAGATCTATGGCGGAAGGGAAGAGTACAACC
GGTGAAGGTTTGGATTGCGGTGTTTTGTTTGGATTTGGACCGGGTATGACTGTTGAGACTGTTGTTCTTC
GTAGCGTCCGCGTTACTGCTGCGGTTGCCAATGGAAACTGATCACTGTTGTTTGCAAAATATTACTTTTT
ACTACGGTATGTTTCCTTGTTTATGAGTTTGTCATTCACCTATGATAATAGGGTCTGTATTTTTCTTGTT
TATGATTTTATTTTCTCAAAGATGATGTAAGTTGGCAATTAAATAAAGATTGTTTTTCCTATGAATAATA
TAAGATTACATTTTC
```

……

GenBank: Z38096.1

Gerbera hybrida mRNA chalcone synthase, gchs1

Gerbera hybrida mRNA chalcone synthase, gchs1

GenBank: Z38096.1

GenBank Graphics

>gi|853927|emb|Z38096.1| Gerbera hybrida mRNA chalcone synthase, gchs1
CTTTGAACTAAAAAACTCTTCTTGCCGGCGCCGGAGATCAGATAACAATGGCGTCCTCCGTTGACATGAA
GGCGATCAGAGATGCTCAACGTGCAGAAGGTCCGGCGACCATTCTTGCCATCGGAACTGCAACTCCGGCG
AATTGCGTCTATCAAGCGGATTATCCCGATTACTATTTTCGGATCACCAAGAGTGAACACATGGTGGATC
TCAAAGAGAAATTCAAGCGCATGTGTGACAAGTCGATGATAAGGAAACGTTACATGCACATCACAGAGGA
GTATCTTAAACAAAACCCTAACATGTGCGCGTACATGGCGCCGTCGCTCGACGTCCGGCAAGACCTGGTC
GTCGTCGAAGTCCCAAAGCTCGGCAAGGAAGCCGCCATGAAAGCCATCAAAGAATGGGGCCACCCCAAAT
CCAAGATCACCCACCTCATCTTCTGCACCACCTCCGGCGTCGACATGCCCGGCGCCGACTACCAGCTCAC
CAAACTCCTCGGTCTCCGGCCATCCGTCAAACGCTTCATGATGTACCAACAAGGCTGCTTCGCCGGCGGC
ACGGTTCTCCGGCTAGCCAAAGATCTCGCGGAGAACAATAAAGGCGCTAGGGTTCTTGTGGTGTGCTCCG
AGATCACGGCGGTGACTTTCCGAGGACCTAATGACACCCACCTTGATTCCCTCGTCGGACAGGCCTTGTT
CGGCGACGGGGCTGCGGCGGTGATCGTGGGTTCCGATCCCGACTTGACGACGGAGCGGCCGTTGTTTGAA
ATGGTTTCCGCCGCTCAGACGATCTTGCCGGACTCCGAGGGAGCCATTGATGGACACTTGAGGGAAGTAG
GGTTGACGTTTCATTTACTCAAAGACGTGCCTGGGTTGATATCGAAGAACATAGAGAAAGCTTTAACGAC
GGCGTTTTCTCCGTTGGGTATCAACGACTGGAACTCGATATTCTGGATAGCACATCCCGGAGGTCCGGCG
ATACTGGACCAGGTGGAGCTCAAGCTAGGGTTGAAGGAGGAGAAGCTTAGAGCTACTAGACATGTTTTAA
GCGAGTACGGTAACATGTCAAGTGCTTGTGTGTTGTTTATTATCGACGAAATGAGAAAGAAGTCGTCGGA
GAACGGCGCCGGCACCACCGGAGAAGGTTTGGAGTGGGGTGTTCTGTTTGGGTTTGGGCCTGGGTTGACG
GTGGAGACGGTGGTTCTTCACAGTGTCCCAACCACCGTGACGGTTGCCGTCTAAACTTTATCATCAATGG
TGCAAAAGTCATCATACATCCTCTGTCAATCGGTTTCGTTTAACTAAATAAATTTTTGTTTTTTTTTTTT
GTTTTTGTTCACATATTTAGTTTAAATGTTTTGTGTGATTTTTTTATATGTTGGAATGAATGTACGTTTG
TTAAAATAATAATAAGTGTACTGTTTGG
……

2-pyrone synthase; g2ps1 gene

Gerbera hybrida mRNA for 2-pyrone synthase

1 aaaaggccta ctcaagcctt gaaattctct tttcttttct tttcattccc ttccctcaaa
61 ttataaactt acctttctgt ttctttcaaa gaatttagct gcctcaaacg aagatcttca
121 tatctcattt gttaggatat acaaacatca atctcgagta aaatgggatc ttactcatcc
181 gatgatgtgg aggtgattcg tgaggccgga cgggcacaag gtttagccac gattcttgcc
241 attggcactg ctactcctcc caattgcgtc gctcaagctg attatgcaga ctattatttt
301 cgtgtcacta agagcgaaca tatggttgat cttaaagaga aatttaaacg catttgtgag
361 aaaacagcga taaagaaacg atacctagcc ctcaccgaag actatctgca agagaaccca
421 acaatgtgtg agttcatggc tccatcctta aacgctcgac aagacctagt ggtcaccggc
481 gtcccaatgc ttggcaaaga agccgcagtc aaggccattg atgaatgggg actaccaaaa
541 tccaagatca cccacctcat cttctgcacc accgctggcg ttgacatgcc cggtgctgac
601 tatcaactcg tcaaactcct tggtctctcc ccttcagtca aacgctatat gttgtaccaa
661 cagggatgtg ccgccggcgg cacagtcctc cggctagcca aggaccttgc tgaaaacaac
721 aagggctcac gagtccttat cgtctgctcc gagatcactg ctatcttatt ccatggaccc
781 aatgagaacc accttgactc actcgtcgct caagctttat tcggagacgg agctgcagca
841 ctcattgtgg gttcaggccc tcacttggcc gtagaacggc caatattcga gatcgtgtca
901 actgatcaaa caatcttgcc ggacactgag aaggcaatga agttacactt gagagaggga
961 gggttgacgt ttcagttgca tagagatgta cccttgatgg tcgcaaagaa catagagaac
1021 gcagcggaga aagcgttgtc tccactaggg ataactgatt ggaactcagttttctggatg
1081 gtgcacccag gtggtcgagc catattggac caggtggagc gaaaactaaaccttaaggaa
1141 gataagttaa gggctagcag gcatgtgctt agtgaatacg gaaacctgattagcgcttgt
1201 gtgttgttca tcattgacga ggtgaggaag agatctatgg cggaagggaagagtacaacc
1261 ggtgaaggtt tggattgcgg tgttttgttt ggatttggac cgggtatgactgttgagact
1321 gttgttcttc gtagcgtccg cgttactgct gcggttgcca atggaaactgatcactgttg
1381 tttgcaaaat attacttttt actacggtat gtttccttgt ttatgagtttgtcattcacc
1441 tatgataata gggtctgtat ttttcttgtt tatgatttta ttttctcaaagatgatgtaa
1501 gttggcaatt aaataaagat tgtttttcct atgaataata taagattaca ttttc//

GenBank: Z38097.2

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/13276208