مراجعة علمية حول أحدث تطبيقات التحوير الوراثي لإنتاج أصناف وأصول تفاح (*Malus domestica* Borkh.) مقاومة للأمراض الفطرية والبكتيرية

نبيلة علي باشا[1]، محمد بطحة[2]، أحمد عبد القادر[1] وفتحي حسن[3]

(1) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، قسم التقانات الحيوية، دمشق، ص. ب. 12573، دمشق، سورية،

البريد الإلكتروني: nalibasha@live.com؛ للمراسلات ahmadabdulkader2@gmail.com؛ (2) قسم البساتين، كلية الزراعة، جامعة دمشق، دمشق، ص. ب. 30621، سورية، البريد الإلكتروني: mohamadbattha@yahoo.com؛ (3) قسم التقانات الحيوية النباتية، معهد الوراثة النباتية، جامعة هانوفر، ألمانيا، البريد الإلكتروني: fathihassan@hotmail.com

الملخص

علي باشا، نبيلة، محمد بطحة، أحمد عبد القادر وفتحي حسن. 2015. مراجعة علمية حول أحدث تطبيقات التحوير الوراثي لإنتاج أصناف وأصول تفاح (*Malus domestica* Borkh.) مقاومة للأمراض الفطرية والبكتيرية. مجلة وقاية النبات العربية، 33(1): 1-35.

تزداد المعرفة الوراثية يوماً بعد يوم وهي بالتالي تقدم معلومات ضخمة يمكن الافادة منها في التحسين الوراثي للأصناف باستخدام طرائق التربية التقليدية أو طرائق الهندسة الوراثية. يعد التفاح (*Malus domestica* Borkh.) واحداً من ثمار الفاكهة الأكثر استهلاكاً في العالم. يتطلب إنتاج الفاكهة الحديث ومتطلبات المستهلك العالية، في الوقت الحاضر، تطوير أصناف ذات إنتاجية أفضل، ومقاومة للأمراض والآفات، وذات نوعية جيدة، ولها إمكانية التخزين لمدى طويل، وذلك من أجل ضمان إنتاج تجاري مستدام. يعتبر التفاح في معظم الدول المنتجة أهم فاكهة تصديرية إلى مختلف الأسواق ويسهم بدورٍ اقتصاديٍ واجتماعي رئيس في القطاعين الزراعي والاقتصادي في تلك الدول. على أن الآفات والأمراض تعد واحدة من العوامل الرئيسية التي تحد من تنامي هذه الصناعة التصديرية المهمة. يعد التحوير الوراثي عملية رئيسية للحفاظ على هذا المطلب من خلال تعزيز إمكانات تطوير الأصناف الموجودة وكذلك تطوير أصناف جديدة متفوقة بالمذاق وصحية أكثر وأسهل في الخدمات الزراعية، وبخاصة مقاومة للآفات والأمراض الخطرة، وحل مشكلات التخزين التي توجد في مناطق الإنتاج الرئيسية للتفاح. فضلاً عن أهميته الاقتصادية، فقد غدا التفاح، شجرة معمرة نموذجية للدرسات الوراثية، لأسباب عديدة منها تطوير طرائق تحوير وراثي مثبتة للعديد من الأصناف والأصول. ونظراً للقابلية العالية لأهم أصناف التفاح التجارية للإصابة بالأمراض الفطرية والبكتيرية، يعتبر التحوير الوراثي طريقة جيدة لتطوير أصناف مقاومة لهذه الأمراض. لذا، كان التفاح هدفاً مبكراً لتكنولوجيا الهندسة الوراثية (الحمض النووي المؤشوب) منذ نشأتها. وأصبح التحوير الوراثي للتفاح في الوقت الحاضر ممارسة روتينية شائعة في العديد من المختبرات. وقد تحسن باستمرار تطوير البروتوكولات لتعزيز كفاءة التحوير لتعديل الصفات المرغوبة فيه وانتاج أصناف متفوقة في المذاق وصحية أكثر وخدماتها الزراعية أسهل وخصوصا تطوير أصناف مقاومة للأمراض والتي يمكن انتاجها خلال فترة زمنية أقصر مقارنة بطرائق التربية التقليدية. تقدم هذه المراجعة العلمية أهم طرائق الهندسة الوراثية من أجل التحسين الوراثي للتفاح مع عرض موجز لمواردها المتاحة وأحدث التطورات في تطبيقاتها في تطوير أصناف تفاح مقاومة للأمراض الفطرية والبكتيرية، مع التركيز بشكل خاص على تطوير أصناف تفاح مقاومة لمرض اللفحة النارية البكتيري ومرض جرب التفاح الفطري واللذان يعتبران المشكلة الرئيسية التي تؤثر في إنتاج التفاح في العالم. كما تمت مناقشة تحسين مواصفات التفاح الأخرى والتطورات الجديدة للتكنولوجيا وحدودها والوعي العام حول التعديل الوراثي في التفاح والمنظورات المستقبلية.

كلمات مفتاحية: تفاح، تحوير وراثي، مرض فطري، جرب التفاح، نباتات مهندسة وراثياً، نباتات معدلة وراثياً بمورثات من النوع أو الجنس نفسه.

المقدمة

تم تسويق محاصيل التكنولوجيا الحيوية لأول مرة في عام1996 وزادت المساحة المزروعة بها سنوياً من 1.7 مليون هكتار في 1996 إلى 181.5 مليون هكتار في 2014، زرعت في 28 دولة من قبل 18 مليون مزارع، في البلدان النامية والدول الصناعية على حد سواء. تعتبر الولايات المتحدة البلد الرائد في زراعة المحاصيل المحورة 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/الطماطم لإنتاج أصناف مقاومة للأمراض والحشرات ومبيدات الأعشاب (82). تركزت الجهود في مجال البحوث الزراعية، في القرن الماضي، على زيادة إنتاج المحاصيل. ومع ذلك، فان إمكانات التربية التقليدية لأشجار الفاكهة محدودة بسبب طول دورتها التكاثرية وطول فترة يفاعتها (قبل دخولها في طور الإثمار)، وبيولوجيا التكاثر المعقدة، والدرجة العالية من تباين البيضة الملقحة/الزيغوت فيها. لقد وفرت الإنجازات في علوم الوراثة

والمعلوماتية الحيوية، على مدى العقد الماضي، خيارات جديدة لتحديد مركبات مفيدة، ومورثات مقاومة الأمراض والمورثات المسؤولة عن نمو وتطور النبات. وبدا فجأة أنه من الممكن إنتاج الأصناف الموجودة مع تغيير خواصها حسب المرغوب في إطار زمني أقصر مقارنة بالتربية التقليدية (3). ينتمي التفاح الى العائلة الوردية *Rosaceae*، تحت عائلة *Maloideae* (71)، ومن المرجح أن يكون أصل التفاح المزروع قد نشأ في المنطقة المحيطة بالجبال الشاهقة على الحدود الغربية للصين، في الاتحاد السوفياتي السابق وفي آسيا الوسطى ومن المفترض أنه مجمع هجين بين الأنواع، وسمي بـ *Malus domestica* Borkh (78، 71، 95). ، كانت الأديرة، في العصور الوسطى، مسؤولة عن الإنتخاب والإكثار والحفاظ على استمرار مئات الأنواع المزروعة المختلفة. وقد أصبحت هذه الزراعات المصدر الرئيس لانتخاب وتربية النباتات لإجراء تهجينات مدروسة متحكم بها من أجل التحسين الوراثي لصفات محددة في القرن التاسع عشر 1800's (192). تم التحسين الوراثي لأصناف التفاح المزروع *M. domestica* ، خلال آواخر القرن التاسع عشر والقرن العشرين، في أوروبا وروسيا وأمريكا الشمالية ونيوزيلندا واليابان وأستراليا، وأخيراً، أدخل التفاح إلى بقية دول العالم. شكلت هذه الإدخالات الجديدة الأساس لمعظم أصناف التفاح التجارية الحالية (94، 182، 192). تم، في الوقت الحاضر، 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 (58، 94). في عام 2012، كان التفاح ثالث أهم محصول فاكهة بعد البرتقال والموز وبلغ إنتاج التفاح في العالم 76.3 مليون طن (54). وتشير المعلومات الإحصائية الأخيرة التي نشرت من قبل وزارة الزراعة الأمريكية، الى 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 (143، 183). وإلى جانب أهميته الاقتصادية، أصبح التفاح كنموذج للأبحاث الوراثية في الأشجار الخشبية المعمرة مغطاة البذور نظراً لحجم المجين/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) (126، 140، 189، 199) والخرائط الوراثية (3، 8، 11، 22، 25، 26، 46، 48، 50، 73، 74، 112، 143، 181)، ونشر التسلسل الكامل للتركيب الوراثي (جينوم) له (187) والنسخ المتوقعة للمورثات (جزئيات "رنا" تم تصنيعها من قالب "دنا")، ومواقع المورثات ووظائفها المفترضة على أساس التماثل مع مورثات معروفة، وتطوير طرائق تجديد وتحوير وراثي عملية وناجحة للعديد من أصناف التفاح وأصوله (3، 5، 6، 7، 31، 33، 34، 43، 55، 65، 66، 68، 69، 78، 85، 93، 96، 102، 108، 109، 122، 129، 157، 165، 168، 169، 171، 173، 178، 191، 193، 205، 213). معظم سلالات التفاح المزروعة هي ثنائية المجموعة الصبغية diploids (2N=2X=34)، غير متوافقة ذاتياً، مفتوحة التلقيح، وذات فترة يفاعة حتى تدخل مرحلة الإثمار تتراوح من 6 إلى 10 سنوات أو أكثر (101). في الوقت الحاضر، يحتاج السوق الى أصناف تفاح عالية الإنتاجية ومنتظمة الإنتاج وتتصف بجودة عالية للثمار. بالإضافة إلى ذلك، يرغب المنتجون والمربون بالأصناف المقاومة للأمراض والآفات والتي تمتلك القدرة على تحمل مشاكل التخزين. وعلى الرغم من أن مزايا الأصناف المقاومة مثبتة، لكن الأصناف المقاومة ليست هي السائدة في السوق حتى الآن. والسبب في ذلك بسيط وواضح، هو أن معظم أصناف التفاح الناجحة تجارياً، فقدت فعالية مورثات المقاومة لديها تجاه مسببات الأمراض الفطرية الأكثر شيوعاً، وهي جرب التفاح (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter) ومرض البياض الدقيقي الذي يسببه الفطر (*Podosphaera leucotricha* Ellis & Everh.). لذلك، تحتاج جميع أصناف التفاح تقريباً الى وقاية مستمرة من هذين الفطرين وغيرهما من المسببات المرضية في كل الظروف المناخية المفضلة لنموها. حيث تحتاج أشجار التفاح وسطياً، على سبيل المثال، من 10 الى 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 (58، 113، 127). 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 (اليفاعة)، والمستويات الكبيرة في التباين في الزيغوت غير متماثل المورثات والوقت اللازم لتقويم الهجين)، فان عملية إطلاق أصناف جديدة من برامج تربية التفاح التقليدية بطيئة، وبخاصة 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 حوالي 10 سنوات أو أكثر، وتقريباً 40 عاماً لادخال وتأسيس صنف جديد في السوق (22، 192). إن تطبيق طرائق التحليل المتطورة للحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (دنا) مثل الخرائط الوراثية، وتحديد واسمات الدنا المرتبطة بالصفات

المرغوبة والإنتخاب بمساعدة الواسمات الجزيئية في برامج التربية يمكن أن تساعد في تسريع هذه العملية وبالتالي تطوير صنف جديد مقاوم للأمراض والآفات خلال فترة أقصر. ينبغي أن تكون هذه الأصناف الجديدة مقبولة من قبل المستهلكين، الذين يتطلبون مواصفات محددة للغاية من حيث جودة الثمار. في إطار هذا الوضع، يعتبر التحسين الوراثي للتفاح من خلال إدخال مورثة أو مورثات معينة الى الأصناف التجارية الحالية، على المدى القصير، استراتيجية جذابة للغاية (3، 4، 11، 22، 25، 26، 46، 48، 50، 73، 94، 112، 143، 180، 181، 189).

في الدراسة الحالية، سوف تتم مراجعة المعرفة الحالية حول إجراءات التحوير 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* (Burrill) Winslow *et al.* ومرض جرب التفاح الفطري *Venturia inaequalis* (Cooke) G.Winter, واللذان يعتبران المشكلة الرئيسية التي تؤثر في صحة محصول التفاح من الأمراض في أغلب مناطق إنتاج التفاح في العالم. هذا بالإضافة الى استعراض سريع لتحسين مواصفات التفاح الأخرى وحدود التكنولوجيا والتطورات الجديدة والوعي العام حول التعديل الوراثي في التفاح والمنظورات المستقبلية.

1. طرائق التكنولوجيا الحيوية من أجل التحسين الوراثي للتفاح

1.1. رسم الخرائط الوراثية وتحليل الموقع الوراثي لصفة كمية Quantitative Trait Locus (QTL)

تم ربط الواسمات الجزيئية لعدد من الصفات في التفاح بمورثة وحيدة (180، 181). وقد تم أغلب العمل على مورثة *Vf* لمقاومة الجرب، حيث تم تحديد أكثر من 40 واسمة لها. وتم أيضاً تحديد واسمات لمورثات أخرى لمقاومة الجرب من قبل العديد من الباحثين شملت مورثة *Vh* من غراس التفاح الروسي R12740-7A من *M. sieversii* (73) والمورثة *Vm* (26) والمورثة *Va* والمورثة*Vb* (50) والمورثة *Vd* (181) والمورثة *Vbj* (64) والمورثة *Vg* (25، 46) والمورثة *Vf* (11، 154، 189، 200) والمورثة *Vfa* (119). وأجرى Gessler وآخرون (59) دراسة مرجعية استعرضت المراجع البحثية عن المقاومة للجرب من خلال تجميع المورثات pyramiding. واستخدم Vinatzer وآخرون (189) التفاعل التسلسلي للبوليمراز مع النسخ العكسي (RT/PCR) وتكرار التسلسلات البسيطة (SSR) لتحديد كلونات مكتبات الكروموزومات الاصطناعية البكتيرية bacterial artificial chromosome (BAC) المحتوية على مورثة مقاومة جرب التفاح *Vf* ووجدوا هذه المورثة في مدخلات (سلالات) مقاومة للجرب في *Malus* ×*micromalus* Makino وفي كلون المدخل 'Golden Gem' من *M. prunifolia* (Willd.) Borkh. والذي كان في السابق غير معروف أنه يحمل هذه المورثة. كما تم ربط الواسمات بمورثات المقاومة للآفات *Sd1* لـ *Dysaphis devecta (Walker, 1849)* و *Er1* و *Er2* لحشرة مَنّ التفاح القطني woolly apple aphid (Hausmann, 1802) *Eriosoma lanigerum*. وكذلك، تم ربط عدد قليل من الواسمات بمورثات تنظيم الصفات الشكلية/المورفولوجية والتي شملت صفة استقامة الجذع (*Co*) ولون الثمرة (Rf) وحموضتها (*Ma*). كما تم استخدام طرائق cDNA/AFLP (عديد التكوين ذو القطعة الطولية المضخمة/دنا المكمل) لتحديد المورثة التي تسهم في خفض حموضة الثمرة (204). وقد عملت عدة فرق بحثية في أوروبا خصوصا على رسم خرائط الموقع الوراثي لـ QTL المرتبطة بمقاومة جرب التفاح بمجموعات الارتباط المختلفة linkage groups (LGs). وقد استخدم تهجين Prima' x Fiesta وغيره من السلالات الناتجة من جيلها الأول F1 لتحديد المورثات الرئيسية المرتبطة بالمقاومة في مشروع DARE (مشروع المقاومة الدائمة في التفاح في أوروبا (http://www7.inra.fr/internet/Projets/DARE/) Durable Apple Resistance in Europe (FAIR5-CT97-3898) (46). ووجدت المورثات الرئيسية لمقاومة الجرب *Vg* على LG12. وتم تجميع نظائر مورثات مقاومة من نمط موقع ربط عدة نيوكلوتيدات مختلفة في الجزء السفلي من LG5 وفي أعلى LG17 لمقاومة العترات 1 و 6. وقد سبق أن تم تحديد موقع وراثي لـ QTL غير مختصة بالعترة قرب عنقود نظائر موقع ارتباط النيوكليوتيد NBS على مجموعة الارتباط LG10. وقد تم تحديد ثلاث مورثات رئيسية لمرض البياض الدقيقي الفطري بوساطة طرائق الانعزال الجماعي، ويقع أحدها على LG2 في منطقة مورثة مقاومة الجرب نفسها. وقد استخدمت خمسة أنسال أجيال سلالات التفاح في المشروع DARE لتحديد الموقع الوراثي لموقع الصفات الكميةQTL لطيف واسع من المقاومة لعدد كبير من عترات الفطر (47). وتم التحقق من وجود أربع مناطق جينومية رئيسية تحمل مقاومة لعترات/عروق (races) متعددة من الفطر في منطقة موقع وراثي لـ QTL على LG 17 الذي يحمل أوسع نطاق من المقاومة. وهكذا يتبين أن الواسمات الجزيئية وتحليل مواقع الـ QTLs تعد مفتاحاً لتحديد مورثات المقاومة لمسببات الأمراض ويتيح تطبيقها إيجاد سلالات تفاح جديدة معدلة وراثياً (143) .

2.1. المصادر الوراثية

يتيح البحث والتنقيب عن علامة تحديد التسلسل المُعَبر عنه expressed sequence tags (EST) (وهي نسيل دنا متمم تمت

سلسلته جزئياً) في التفاح، واستخدام المصفوفات الدقيقة microarray (142) وتوسيع المعرفة عن مورثات كثيرة هامة في التحسين الوراثي للتفاح. كما يقدم تطوير قواعد البيانات العامة مثل بيانات GDR (قاعدة بيانات المورثات للعائلة الوردية (Genome Database for Rosaceae, http://www.rosaceae.org) وقاعدة بيانات تربية التفاح في أوروبا HIDRAS Apples Breed (8) /http://www.hidras.unimi.it فرصاً ممتازة لتعزيز التعاون بين المربين، وباحثي المعلوماتية الحيوية وأولئك الذين يعملون في البيولوجيا الجزيئية. يتوافر في قاعدة بيانات ألمانيا الشرقية سابقا بمفردها أكثر من 50000 علامة (واسمة) تحديد التسلسل ESTs من أنواع وأنسجة عديدة وفي مراحل نمو عديدة من أجل استخدامها في برامج التحوير الوراثي (8، 46، 126، 140، 142).

3.1. التحوير الوراثي للتفاح

مع توافر طرائق الهندسة الوراثية للدنا المؤشوب، أصبحت الطرائق الجديدة للتحكم بالأمراض النباتية استراتيجية مهمة، إذ يتم نقل مورثة واحدة لمركب مضاد لميكروب واحد أو أكثر. يمكن أن تشفر هذه المورثة للكيتيناز، على سبيل المثال، الذي يحطم الجدران الخلوية المحتوية على الكيتين لعديد من الفطور. ويمكن تحسين مقاومة النبات بتعبير بروتين أو أكثر مضاد للميكروبات في النبات نفسه (14). يعتمد تطوير طريقة فعالة لنقل المورثات في التفاح إلى حد كبير على توافر تقنيات زراعة الأنسجة التي تتيح تجديداً فعالاً للنموات الخضرية وانتخاب الأجزاء المحورة وراثياً وإكثار النباتات المهندسة وراثياً. تعتبر زيادة كفاءة التجديد من الورقة أمراً بالغ الأهمية لتطوير طريقة التحوير في التفاح باستخدام بكتريا التدرن التاجي كناقل (92) أو بوساطة عملية قذف المورثات. يعتبر عدم وجود طرائق فعالة للتجديد، في كثير من الحالات، العامل المحدد الرئيس الذي يحول دون تطوير تكنولوجيا نقل المورثات للمحاصيل المعمرة (31). تم نشر أول تقرير عن تجديد النموات العرضية في الأنابيب من شتلات التفاح في عام 1983 (108، 109). وكشف العديد من التقارير في وقت لاحق العوامل المؤثرة في وتيرة التجديد من الورقة في أصناف طعوم وأصول وشتلات التفاح البذرية (10، 55، 85، 96، 169، 178، 193) 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. يضم الجنس *Malus* أكثر من 40 نوعاً ويعتبر صنف التفاح *Malus X domestica* cv. Greensleeves أول صنف تفاح تم تحويره وراثياً بكفاءة تحوير بين 0.1-0.5% من كل جزء نباتي مستزرع/خزعة explant. وقد تركزت الدراسات على تطوير إجراءات التعديل الوراثي لحوالي 30 صنف تفاح وسبعة أصول *M. X domestica* ودراستان على *Malus prunifolia (Willd.) Borkh.* و دراسة لصنف *Malus × robusta (Carrière) Rehder (1920)* (جدول 1).

تعتمد كفاءة التحوير الوراثي والقدرة على التجديد عموماً، بشكل كبير على الخلفية الوراثية للصنف أو الأصل (33، 129). ونظراً للقابلية العالية لأهم أصناف وأصول التفاح التجارية للإصابة بالأمراض الفطرية، يعتبر التحوير الوراثي طريقة جيدة وبديلة أو مكملة للطرائق التقليدية لتطوير أصناف مقاومة للأمراض. التحوير 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 الهندسة الوراثية جاهزية المورثات إلى حد كبير، وهي محدودة في برامج التربية التقليدية، نظراً لامكانية نقل المورثات المعزولة من نباتات أو حيوانات أو كائنات دقيقة أخرى إلى النباتات (3، 94، 143). كان التفاح هدفا مبكراً لتكنولوجيا الحمض النووي المؤشوب منذ نشوءها. وقد أصبح التحوير الوراثي للتفاح في الوقت الحاضر ممارسة روتينية شائعة في العديد من المختبرات حيث تم تطوير البروتوكولات (الطرائق) المختلفة لتعزيز كفاءة التحوير (3، 15، 33، 34، 65، 84، 94، 110، 129، 144، 170، 171، 203، 206). أما الأسلوب الأكثر استخداماً على نطاق واسع لإدخال المورثات الجديدة في النباتات ثنائية الفلقة فهو التحوير الوراثي بوساطة بكتريا التدرن التاجي (أغروباكتيريا). في هذه العملية، الناقل (البلاسميد) الثنائي المجرد من المورثات التي تسبب الأورام والمحمول في بكتريا التدرن التاجي وأجزاء ورقة النبات أو الكالس callus (أو الكنب وهو عبارة عن نموات خلوية غير متمايزة) هي العناصر الرئيسية للتحوير الناجح (83). وعموماً، بدأت معظم الدراسات باستخدام مقاطع ورقية مخدوشة (129)، ولكن المستزرعات من سلاميات قمية من نموات صنف التفاح رويال غالا المحجوب عنها الضوء قد أعطت كفاءة أعلى في إنتاج نموات مهندسة وراثياً (110).

1.3.1. طبيعة الأجزاء النباتية – استخدمت الأوراق الفتية من التفاح، في الغالبية العظمى من البحوث المنشورة، كأجزاء نباتية للتجديد والتحوير. وتم تحسين تجديد السلالات المعدلة وراثياً من الأوراق عن طريق وضع الجانب العلوي للورقة في تماس مع وسط الزراعة، حيث من المحتمل أن يعزى السبب إلى زيادة تبادل الأوكسجين نظراً لأن المسامات النباتية تقع على الجانب السفلي للورقة (205). ونشر أن تهيئة نموات التفاح لعدة أيام في وسط زراعة سائل مناسب يعزز القدرة التجديدية لمستزرعات الأوراق عن طريق تقليل الحاجة لمرحلة كالس طويلة (171). لكن مع ذلك، لم ينشر عن هذه العملية لتهيئة المستزرعات لاحقاً في بروتوكولات التحوير الوراثي. وذكرت إجراءات

أخرى كاستخدام السلاميات (110، 111)، والنموات الخضرية (139) ومستزرعات من الساق (201) وبروتوبلاست (78، 148) كمستزرعات للتجديد. ويعد تجديد النباتات من البروتوبلاست عملية طويلة مقارنة بالتحوير باستخدام الأنسجة النباتية المعتادة. لذلك، من غير المرجح أن يكون التحوير الوراثي من البروتوبلاست مصدراً لمادة نباتية جديدة مهندسة وراثية. ولكن إذا تم تطوير هذه الطريقة، ستكون مفيدة كطريقة عالية الإنتاجية من أجل الاختبارات المؤقتة لدراسة وظيفة المورثة أو استهداف البروتين (3).

جدول 1. ملخص لدراسات التحوير الوراثي لأصناف التفاح وأصوله الجذرية

Table 1. Summary of genetic transformation studies in apple varities and rootstocks

References المراجع	Introduced genes المورثات المدخلة	Scion/rootstock الصنف /الأصل
Genetically transformed *M. domestica* varieties أصناف *M. domestica* المحورة وراثياً		
28، 52، 53، 117، 118	PinB, MpNPR1, Endohitinase (ech42), Exochitinase (nag 70), Puroindoline-b	Ariane
33، 34، 148	GFP – green fluorescent protein; GUS – β-glucuronidase	Braeburn
146	LeIRT2	Balenghait
121، 122، 170، 171	GUS, synthetic green fluorescent protein gene (SGFP), pC58, p pGV3850::1103neo	Delicious, Red Delicious
21، 33، 34، 40، 60، 68، 88، 144، 152،157، 174	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
147	rol A	Florina
33، 34، 78، 102، 124، 125، 165	Polyphenol oxidase	Fuji
4، 5، 7، 9، 11، 12، 13، 19، 33، 34، 51، 52، 53، 77، 88، 89، 97، 98، 99، 106، 110، 111، 115، 116 117، 118، 119، 120، 121، 129، 130، 133، 144، 154، 155، 157، 158، 165، 166، 167، 185، 198، 199، 202	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, Proteinase inhibitor, MdMyb10, MdMyb11 تعديل الاستقلاب الغذائي Ascorbate Peroxidase (اجهاد درجات الحرارة) Poly galacturonase (التحلم /التصاق خلوي Cell adhesion), Gst promoter, XVEpromoter, Avidin streptavidin,	Gala, Galaxy, Royal Gala
6، 83، 84، 88، 121، 144، 157	Hordothionin, GUS, synthetic green fluorescent protein gene (SGFP), g2ps1	Golden Delicious
23، 27، 61، 62، 63، 121، 138، 212	Aldose 6 phosphate (A6PR) antisense also called S6PDH, Osmyb4, synthetic green fluorescent protein gene (SGFP), GA 20-oxidase	Greensleeves
39، 41، 42، 152، 174	stilbene synthase, PGIP, Phosphomannose, Lc (leaf color), MdMyb10, MdMyb11 (metabolic) isomerase (pmi)	Holsteiner Cox, Gloster
7، 21، 33، 35، 68، 102، 190	iaaM and ipt , Ace-AMP1, Ai-AMP, Rs-AFP2, Attacin E (-sp), T4 Lysozyme	Jonagold, Jonagold King, Jonagold Red, Liberty
15، 16، 17، 91، 119، 129، 214	Rab, Endochitinase, Vfa1, Vfa2 and Vfa4, Gai gibberellic acid insensitive	McIntosh, Wijick
214	Gai gibberellic acid insensitive	Gravenstein
43، 44، 45	Thaumatin	Melba
33	(Gus) glucuronidase	Merlijn
90، 101، 124، 125	MdTFL1, Polyphenol oxidase, Antisense Sorbitol 6 phosphate Dehydrogenase (S6PDH) تراكم للسكر	Orin
171	β-glucuronidase (GUS)	Pink Lady
56، 57، 68	Attacin E (-sp), T4 Lysozyme, Dpo BpMADS4 (self fertility)	Pinova, Pilot,Reka, Pirol, Pingo, Remo, Pi-AU56-83
196	pSCV1.6 (with selectable marker npt II and GUS reporter uid A).	Queen Cox

Genetically transformed apple rootstocks أصول التفاح المحورة وراثياً		
214 ،209	*rol A* , *Gai* gibberellic acid insensitive	A2
177	EPS depolymerase gene	JET-H
164 ،163 ،139	*rol A*	Jork 9
1، 2، 4، 5، 20،73، 75، 76، 98، 116، 117، 118، 128، 130، 133، 179، 192، 194، 195، 208، 210، 211	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* (Zinc stress إجهاد الزنك)	M.26
6	g2ps1	MM111
97	Gus	M.7
76، 194، 195، 208، 210	*Phytochrome B*, *rolB*	M9/29
43، 44، 45	Bar	N545
79	*rolC*	*Malus prunifolia* Marubakiado
201	*rolC*	*Malus prunifolia* Ringo Asami
207	*rolC*	*Malus micromalus* Makino
121، 176	Ans RNAi Anthocyanidin synthase	Malus siervesii TNR 31-35 neidzwetzkyana
146	LeIRT2 تحمل نقص الحديد Iron deficiency tolerance	*Malus robusta* Balenghaitang
118، 191	GFP بروتين فلورسنتي أخضر	*Malus baccata* (L.) Borkhausen
5، 62	extA promoter, RS-AFP2, ACE-AMP1	*M. pumila*

2.3.1. منظمات النمو النباتية – يعتبر وسط موراشيج وسكوغ MS (120) والمكمل بـ 2–3% سكروز أو سوربيتول، والفيتامينات القياسية، بشكل عام، وسط التجديد الذي أنتج أكثر النموات الخضرية الجديدة. ويكمن الفرق الرئيس بين طريقة وأخرى في تركيبة الهرمونات النباتية (أوكسين وسيتوكينين) التي تستخدم للحث على تشكل الكالس (الكنب) والنموات العرضية. السيتوكينين المستخدم في تجديد معظم أصناف وأصول التفاح وإجراءات التحوير الوراثي هو ثيديازورون TDZ بتركيزات مختلفة (15، 33، 68، 90، 129). وأفيد في بعض التقارير، عن استخدام البنزيل أدنين BA أيضاً (63، 83، 84). ويعد نوع الأوكسين وتركيزه عنصراً متغير جداً بين الإجراءات المختلفة. كان يستخدم الاوكسين نفتالين حمض الخل NAA لتجديد التفاح في معظم بروتوكولات التجديد (15، 43، 68، 163، 164، 210). على الرغم من أن IBA، وIAA أيضاً استخدما في تجديد بعض الأصناف (3، 33، 79، 143، 176، 201).

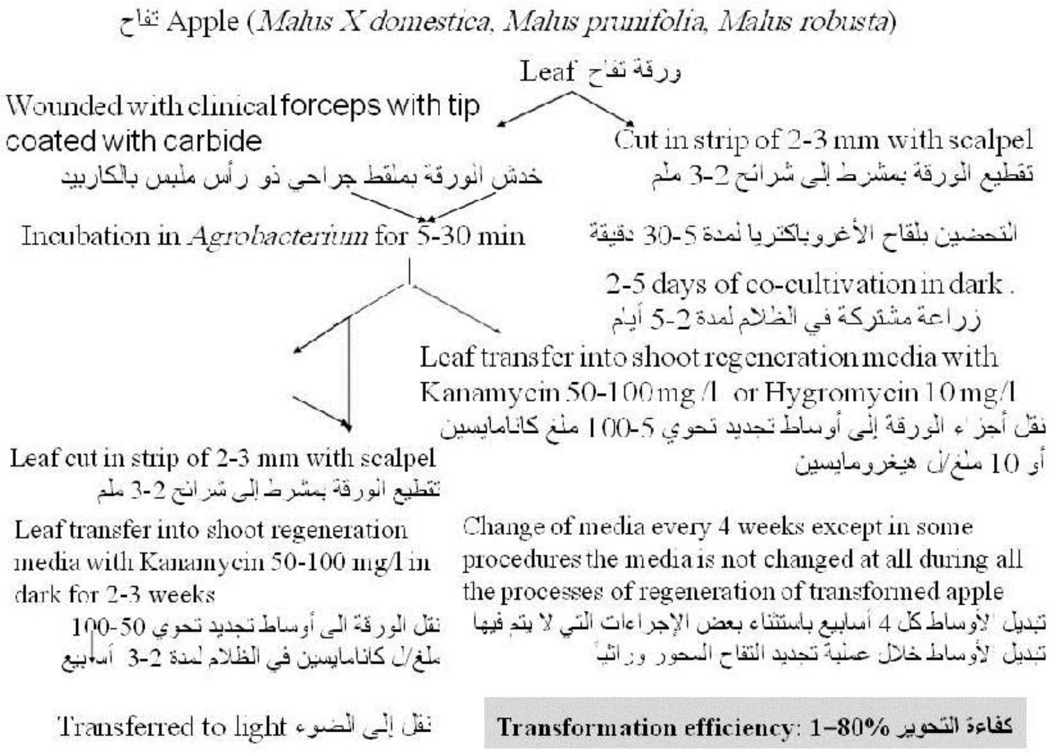
3.3.1. الصادات/المضادات الحيوية – تميل بكتريا التدرن التاجي، خلال عملية التحوير الوراثي، إلى تشكيل مستعمرات بكتيرية على الجزء النباتي المزروع. وللحد من تطور هذه البكتيريا، يتم تجديد الأنسجة المستزرعة عادة على أوساط زراعة تحتوي على مضاد حيوي. وقد استخدمت ثلاثة مضادات حيوية بتركيزات مختلفة للسيطرة على انتشار بكتريا التدرن التاجي أغروباكتريا في التفاح هي: كاربنسيللين وسيفاتوكسيم وتيكاريسيللين. ويعتبر السيفوتاكسيم الأكثر استخداما في التفاح بمعدلات تركيز في حدود 200–500 مغ/لتر، يليه تيكاريسسلين ثم كاربنسيللين (79، 128، 129، 176). كما استخدمت أيضاً مضادات حيوية أخرى مثل كالفوران Claforan (101) وسيفوكزيتين Cefoxitin (110).

4.3.1. إجراء الإعداد وسلالة الأغرويكتريا Strain – في الوقت الذي تم فيه تحوير العديد من أصناف التفاح بمورثات مختلفة، فإن معظم الإجراءات (95%) تعتمد على نقل المورثات بالتحوير الوراثي بوساطة الأغروبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend, 1907، وهذه الطرائق متشابهة الى حد كبير، تستخدم ما تبقى (5%) من إجراءات التحوير الوراثي بكتريا الشعيرات الجذرية *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al. 1930) Conn 1942 لدمج الـ T- DNA (139، 201). وبالنظر إلى حقيقة أن جميع التراكيب الوراثية لا تستجيب على نحو مماثل للإجراء نفسه من التحوير الوراثي، فقد تم نشر تعديلات عديدة على إجراءات التحوير الوراثي السابقة. سلالة الأغروباكتريا strain الأكثر شيوعا والتي استخدمت تقريبا في نصف بروتوكولات التحوير كانت EHA105 أو EHA101. شملت السلالات الأخرى المستخدمة LBA4404، AGLO، C58C1،

CBE21، و GV3101. وقد استخدمت طريقتان لإجراء العدوى (التلقيح) بالأغروباكتريا. الأولى: تتكون من خدش الأوراق بملقط تم غمره في لقاح البكتريا (196). والثانية: هي تغطيس الأوراق بعد خدشها في محلول اللقاح البكتيري لفترة تتراوح من بضعة دقائق (33، 128). إلى عدة ساعات (122). وقد تم اختبار وسائل أخرى للتلقيح ولكنها لم تزد من معدل التحوير زيادة كبيرة. فقد أدى تعريض الأجزاء الورقية بوجود محلول اللقاح للأمواج فوق الصوتية، على سبيل المثال، إلى زيادة التحوير في صنف التفاح Holsteiner ولكن ليس الصنف Elstar (173). ونشر أن الترشيح بالتفريغ لأوراق رويال غالا لا تؤثر في التحوير (129). يبين الشكل (1) إجراءات التجديد والتحوير الوراثي في التفاح.

5.3.1. المورثة الواسمة القابلة للانتخاب – Selectable marker

يعتمد تجديد النباتات المعدلة وراثياً على كفاءة اندماج المورثات المنقولة والقدرة على النمو بوجود مادة انتخاب. كما تستخدم أيضاً طرائق انتخاب بديلة (28، 40، 56، 141، 172). يوجد حوالي 50 مورثة قابلة للانتخاب. يوجد نوعان من المورثات الواسمة للانتخاب السلبي والإيجابي. ففي حالة الانتخاب السلبي الذي يتم فيه قتل الخلايا غير المحورة وراثياَ يستخدم في معظم الحالات (90%) مورثات المقاومة للمضادات الحيوية مثل الكانامايسين والهيغرومايسين (43، 44، 45) كمورثات انتخاب، أو استخدام مورثة bar لمقاومة مبيد الأعشاب فوسفينوثريسين PPT (44، 174). حيث يبدو أن للمستزرعات من المختلفة أصناف التفاح 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 (44، 45، 124، 125، 194، 196). يتيح التركيز المنخفض من المضادات الحيوية النمو السريع لنموات خلوية غير متمايزة (كالس 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 مبيد الأعشاب PPT (174). ويتم الانتخاب السلبي أيضاً باستخدام عدة مورثات مثل المورثة *codA* وهي مورثة سائدة قاتلة شرطياً (conditionally lethal dominant gene) تشفر للأنزيم الذي يحول 5–FC غير السام الى 5–FU السام للخلايا (3).



شكل 1. إجراءات التجديد والتحوير الوراثي في التفاح حسب Aldwinckle و Malnoy (3)

Figure 1. Representation of the apple (*Malus x domestics*, *M. prunifolia*, *M. robusta*) transformation procedure, based on Aldwinckle & Malnoy (3)

بينما يمكن في حال استخدام مورثة الانتخاب الإيجابي أي التي تمكن من تحديد وانتخاب الخلايا المحورة دون الإضرار أو قتل الخلايا غير المحورة (كما في الانتخاب السلبي). لكن في هذه الحالة، تعطي مورثة الانتخاب الإيجابي الخلايا المحورة القدرة على استقلاب (تمثيل) بعض المركبات التي عادة لا تستطيع استقلابها أي يعطيها ميزة عن الخلايا غير المحورة. وبالتالي فإضافة هذه المركبات الى وسط الزراعة كمصدر غذائي أثناء عملية التجديد يتيح للخلايا المحورة النمو والتمايز، بينما لا تستطيع الخلايا غير المحورة النمو ولا تجدد نموات ولا نباتات. وتشمل الأمثلة على ذلك مورثة phosphomannose isomerase (*pmi*) (41، 42، 56، 172، 211)، أو manA والمورثة Vr- ERE (28) ومورثة بيتا غلوكورونيديز GUS (1، 2) و Xyl A و GFP (121) وغيرها. وقد نشر Degenhardt وآخرون (41) عن تجديد سلالات معدلة وراثياً باستخدام مورثة *pmi* كمورثة قابلة للانتخاب بكفاءة تحوير في حدود 1–24%. ومع ذلك، لم ينشر عن أي كفاءة تحوير لصنف التفاح 'Elstar'. والجانب السلبي لهذه الإجراءات هو أن مورثة الانتخاب لم تستأصل في بعض السلالات وهي لا تزال موجودة في جينوم النبات (100، 156). أو يتم الانتخاب بدون استخدام أي مورثة انتخاب (118). وفي هذه الحالة، يتم إنتاج التفاح المعدل وراثياً بوساطة العدوى بلقاح الأغروبكتريا، يليها تجديد النموات الخضرية من دون استخدام مادة انتخاب. وهذا ينتج نباتات كثيرة يكون بعضها غير معدل وراثياً (حوالي 70% حسب الصنف). ومع ذلك، فحسب نسب التجديد ونقل المورثات، فان بعض النباتات هي معدلة وراثياً ويمكن تحديدها عن طريق إختبار الـ PCR. ولكن أحد الشروط الأساسية للتحوير الناجح هو إيجاد بروتوكول تجديد ذو كفاءة عالية. يقتصر هذا الأسلوب، حتى الآن، على النباتات النموذج وبضعة أصناف محاصيل محددة كالبطاطا/البطاطس.،فقد طور Malnoy وآخرون (118)، على سبيل المثال، هذه التقنية في التفاح وبكفاءة عالية جدا للصنف غالاكسي والأصل M.26، حيث كانت كفاءة التحوير حوالي 12% لـ غالاكسي و 25% لـ M.26. وقد نشر أيضاً إنتاج تفاح معدل وراثياً خال من المورثة المعلمة باستخدام المورثة R recombinase المحرضة وهي ثنائية الوظيفة كمورثة انتخاب سلبي وإيجابي لتخفض حدوث الطفرات الكميرية بسبب استئصال الحمض النووي غير المكتمل (100، 156).

6.3.1. كفاءة التحوير (% من المتجددات المعدلة وراثياً) – عادة ما يتم وصف كفاءة التحوير كنسبة مئوية للمستزرعات التي تنتج نموات خضرية معدلة وراثياً. ذكرت الأبحاث المبكرة من التحوير كفاءة تحوير بنسبة 0.2 إلى 15%. أمكن الوصول، بعد عمل تحسينات على هذه الإجراءات، إلى معدل تحوير مرتفع حتى 80% وهي تختلف حسب الصنف والمحصول أيضاً (3).

7.3.1. المورثات المستخدمة في التحوير الوراثي للتفاح – اعتمدت التحويرات الوراثية في الغالب على استخدام الأصناف التقليدية وقد نفذت باستخدام مورثات معزولة من التفاح (13، 51، 117، 119) أو من عضويات أخرى (16، 17، 53، 68، 111، 120، 128، 131، 174، 198). كما أدخلت المورثات المؤثرة في بعض النواحي الفيزيولوجية أو المورفولوجية مثل النمو (76) والإزهار (203) والخصوبة الذاتية (184) الى التفاح المهندس وراثياً. وكذلك استخدمت الأصناف المطعمة في اختبارات النباتات المهندسة وراثياً لتحسين معدلات التجذير والنمو (75، 79، 139، 163، 194)، كما درست وظائف بعض المورثات مثل sorbitol-6-phosphate سوربيتول فوسفاتيز (27، 90). و stilbene synthase (152) وبولي غالاكتورونيز polygalacturonase (9). ودرس تعديل صفات كثيرة أهمها زيادة المقاومة لمرض اللفحة النارية وجرب التفاح ومقاومة الحشرات وصفات أخرى متنوعة. واستخدمت محفزات عديدة (61، 62، 63، 98، 116، 133، 145، 167، 175) في التفاح المهندس وراثياً (جدول 2).

8.3.1. استخدام مورثات المقاومة – يعتبر مرض جرب التفاح أحد الأمراض الخطيرة التي تؤثر في بساتين التفاح مسبباً ضعفاً للأشجار وأضراراً للثمار. تم تحديد ستة مورثات رئيسية لمقاومة الجرب هي: *Vf*، *Vm*، *Vb*، *Vbj*، *Vr*، *Va* من أنواع التفاح البرية ذات الثمار الصغيرة (11، 22، 197). وقد تم، حتى الآن، إدماج مورثة *Vf* فقط ، مصدرها صنف التفاح*Malus floribunda* 821 Siebold ex Van Houtte، بشكل واسع في أصناف التفاح التجارية الحساسة (30، 93). تمنح المورثة *Vf* المقاومة لخمسة من أصل سبعة عترات معروفة لفطر الجرب *V. inaequalis* وقد احتفظت بالمقاومة بشكل جيد في البساتين لأكثر من 80 عاماً. وهناك طريقة مختلفة للحصول على نباتات مقاومة للجرب جرت محاولة إنفاذها من قبل فريق مشترك في قسم أشجار الفاكهة وعلوم النباتات الخشبية في جامعة بولونيا، إيطاليا، مع مجموعة أمراض النبات في معهد التكنولوجيا في سويسرا (ETH) زيوريخ، سويسرا (155) وذلك بدءاً من مشروع الاتحاد الأوروبي الذي قدم خريطة ارتباط للتفاح والواسمات الجزيئية المعينة في الخريطة في منطقة مورثة مقاومة الجرب *Vf*، ثم بدأ هذا الفريق استنساخ مكان تموضع المورثة *Vf*.

Table 2. Genes used in genetic transformation of apple

جدول 2. المورثات المستخدمة في التحوير الوراثي للتفاح

المرجع Reference	Results النتائج	Donor مصدر المورثة	المورثة المستخدمة في التحوير Gene
Over-Expression تعبير مفرط للمورثة			
Genes isolated from apple 1. مورثات معزولة من التفاح			
9	تغير في التحام ونضج الخلية Changes in cell adhesion/Maturation	*M. domestica* Borkh.	*MdPG1* (Polygalacturonase)
12، 13	Scab-resistance مقاومة الجرب	*Malus floribunda* 821	*HcrVf2* (R-genes)
117	مقاومة الأمراض الفطرية Fungal disease resistance	*M. domestica* Borkh.	*MpNPR1* (pathogenesis-related gene)
51	تحريض تراكم الأنثوسيانين، لون ثمرة التفاح أحمر Induce anthocyanin accumulation/ red apple fruit color	*M. domestica* Borkh.	*MdMYB10* (MYB transcription factor)
89، 119	Scab-resistance مقاومة الجرب	*M. floribunda* 821	*HcrVf1* (R-genes)
185	Scab-resistance مقاومة الجرب	*M. floribunda* 821	*HcrV2* (R-gene)
Genes isolated not from apple 2. مورثات معزولة من مصادر غير التفاح			
131	Fire blight resistance مقاومة اللفحة النارية	*Hyalophora cecropia*	*Attacin E*
111	Fire blight resistance مقاومة اللفحة النارية	*Hyalophora cecropia*	*Cecropin* MB39
198	Scab-resistance مقاومة الجرب	*Trichoderma harzianum*	*ech42* (Endochitinase)
16، 17	مقاومة الجرب. لوحظت علاقة عكسية بين زمو السلالات المحورة وفعالية لأندوكيتينيز. 6 من أصل 8 سلالات مهندسة وراثياً معبرة عن الآندوكيتينيز كانت أكثر مقاومة من الشاهد Scab resistance. Negative correlation between growth of transgenic lines and endochintinase activity was observed. 6 of 8 transgenic lines expressing endochitinase were more resistant than control.	*Trichoderma harzianum* Trichoderma Atroviride (fungus)	*ech42* (Endochitinase) *Nag70* (Exochitinase)
174	Antifungal activity فعالية مضادة للفطور	Grapevine (*Vitis vinifera* L.)	*Vst1* (Stilbene synthase)
174	Antifungal activity فعالية مضادة للفطور	Kiwi (*Actinidia deliciosa*)	*PGIP* (Polygalacturonase inhibitor)
115، 120	Insect resistance (light brown apple moth) مقاومة الحشرات (فراشة التفاح البنية)	*Streptomyces avidi*	Avidin or Streptavidin
76	Root induction تخليق الجذور	*Agrobacterium rhizogenesnii*	*RolA* (Hydrolyze phytohormone glucoside A)
194	Root induction تخليق الجذور	*A. rhizogenes*	*RolB* (Hydrolyze phytohormone glucoside B)
79	Root induction تخليق الجذور	*A. rhizogenes*	*RolC* (Hydrolyze phytohormone glucoside C)
53	Antifungal activity فعالية مضادة للفطور	Wheat (*Triticum aestivum*)	*PinB* (puroindoline)
44، 45	Melba مقاومة الفطور في التفاح	*Thaunatococcus danielli* (Plant)	*thaumatin*

Table 2. Cont…… **تابع جدول 2.**

91	الفطر *Alternaria mali* في الصنف ماكنتوش. يحرض بالجروح. إصابة أصغر بالمرض وحجم البقع في السلالات المهندسة وراثياً مقارنة بغير المحورة *Alternaria mali* fungus in apple cv. McIntosh. Small disease lesion and spot size in transgenic lines compared to untransformaed.	Plant (Wound inducible promoter)	*Rab*
إخماد / إبطال فعالية المورثة Silencing			
184	خصب ذاتياً Self-fertility	*M. domestica* Borkh.	*S-RNase* gene
87	تنظيم الفصل بين السوربيتول والسكروز Regulating partitioning between sorbitol and sucrose	*M. domestica* Borkh.	*S6PDH* (Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase)
المورثة المحفزة Promotors			
62	توزيع خاص بالنسيج النباتي Tissue-specific distribution	*Brassica napus* L.	*ExtA* promoter
63	توزيع خاص بالنسيج النباتي Tissue-specific distribution	*A. rhizogenes*	*RolC* promoter
175	Scab-resistance مقاومة الجرب	*M. floribunda* 821	*HcrVf2* promotor

Based on Polanco *et al.* (143) حسب ما نشره Polanco وآخرون (143) مع إضافة بعض المراجع

تم تركيب تسلسل نيوكلوتيدات كلونات BAC الممتدة بين الواسمتين الجزيئيتين M18 و AM19 للمورثة *Vf*، واحدة على كل جانب من جانبي المورثة *Vf* والذي أتاح تحديد أربعة مورثات سميت *HcrVf1* إلى *HcrVf4*. تشفر هذه المورثات لبروتينات شبيهة بالمستقبلات التي لها تجانس كبير مع عائلة مورثة مقاومة *Cladosporium fulvum* (*Cf*) Cooke, (1878) في البندورة/الطماطم. ولهذه المورثات تسلسلاً غنياً باللايسين وقسم منها عبر غشائي (188، 189) (جدول 2). تم، باستخدام هذه المعلومات، إدخال المورثة *HcrVf2* تحت تحكم المحفز *CaMV35S* إلى الصنف غالا الحساس للإصابة باستخدام المورثة *nptII* كمورثة لانتخاب النباتات المحورة وراثياً. وتم، في الخطوة الأولى، تقويم تطور العدوى بالجرب في المختبر (الاختراق وتشكيل ستروما (نسيج ضام معضد) من قبل الفطر) (11، 154). تلا ذلك إجراء العدوى اصطناعيا في البيت الزجاجي على سلالات التجربة والتي تحتوي على نسخة وظيفية واحدة من المورثة *HcrVf2* حيث أظهرت هذه التقويمات، بشكل لا لبس فيه، أن أربعة سلالات تحمل المورثة *HcrVf2* كانت على الأقل مقاومة للجرب (12، 13) مثل الصنف فلورينا المقاوم والمربى بالطرائق التقليدية والذي يحتوي مورثة المقاومة *Vf*. وبما أن مورثة المقاومة *Vf* تتغلب على عترات الفطر 6 و 7، فقد كان من المهم اختبار ما اذا كان إدخال المورثة بالفعل يضفي النمط نفسه من المقاومة أي إدراك الأنماط الوراثية لفطر الجرب *V. inaequalis* غير المعدية وتحريض أو اصطناع سلسلة دفاعية. تم إجراء العدوى في الحقل لنباتات محورة بالمورثتين HcrVf2 و *nptII*، ولنباتات محورة فقط بالمورثة *nptII*، وللنمط البري غير المحور غالا وللصنف فلورينا والذي يحتوي مورثة المقاومة *Vf* (خليط من الأنماط الوراثية) المعروف بأن لديها القدرة على الإصابة بالجرب على 'غالا'، ولكن ليس على فلورينا، وبلقاح (عدوى) مصدره السلالة 821 *M. floribunda* والتي هي المانح الأصلي للمورثة *Vf*. بينت النتائج أن السلالة *HcrVf2* كانت، كما هو متوقع، مقاومة للعدوى الحقلية مثل الصنف فلورينا، بينما أظهرت كل النباتات الأخرى الأعراض النموذجية للإصابة بالجرب مع تبوغ وفير. وأسفرت العدوى بالعترة 7 من *M. floribunda* 821 عن فطر متبوغ على جميع النباتات، لكن كانت شدة الإصابة أقل والتبوغ أقل وفرة منه مقارنة بالعدوى الحقلية. والأكثر غرابة أن العترة *HcrVf2* التي لا تزال تحتفظ بشيء من المقاومة، كانت مقاومة أكثر بقليل من السلالة المحورة فقط بالمورثة *nptII* والصنف غالا الأصلي (58، 166). لقد أثبتت هذه التجربة أن المقاومة في السلالات المحورة بالمورثة *HcrVf2* تحمل المورثة *Vf* (143). وحدد المزيد من البحث تسلسل محفز المورثات *HcrVf1* و 2 و 4 والتي أثبتت وظيفيتها (167). وقد ثبت أن *Vfa1* (*HcrVf1*) و (*HcrVf2*) *Vfa2* تحت تحكم محفزاتها الخاصة بها تضفي المقاومة لفطر الجرب *V. inaequalis* (89، 119، 185).

9.3.1. استخدام المورثات المتعلقة بالدفاع – أثبت العديد من الباحثين أن النباتات تنتج بروتينات متعلقة بالدفاع، مثل البروتينات المتعلقة بنشوء المرض (Pathogensis-related proteins (PR) وببتيدات مضادة للممرضات (21). لذا اعتمدت الدراسات الأولية

لتعزيز مقاومة النبات على أنظمة الدفاع الخاصة بالنبات وخصوصا بتحوير النباتات 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 لعديد، وليس لكل الفطور بدون التأثير في العائل النباتي أو أي حيوان. تم عزل الأنزيمات من عدد من المصادر شملت نباتات (الرز، الشعير)، بكتريا (*Serratia marcescens* Bizio 1823) و *Streptomyces olivaceoviridis* Waksman & Henrici 1943 (72) وحتى من الفطور (*Trichoderma harizianum* Rifai, (1969)) (153). اعتمد اختيار الأنزيم على توافره وعلى فعاليته إزاء المسبب المرضي المراد مكافحته، حيث من المرجح أن يكون للمسببات المرضية الناجحة مقاومة ضد أنظمة النبات الدفاعية. استخدم المحفز 35S من فيروس القرنبيط غالبا لتعبير هذه المورثات. وقد 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 في العائل. وقد استخدمت أيضاً محفزات تتحرض بالجروح مثل المحفز *Prp1-1* من البطاطا في التحوير الوراثي لأصل التفاح M.26 (1) 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 أيضاَ 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 (153). فقد يعزز التعبير الجهازي (الداخلي الدائم) لهذه الجزيئات مقاومة النبات. على سبيل المثال، بوروانودولاينز puroindolines (*PinA* and *PinB*) والببتيدات المضادة للميكروبات هي بروتينات غنية بالسيستين مضادة للفطور، والتي توجد في بذور القمح. تم توصيف كل هذه المورثات بشكل جيد وقد استخدمت في التحوير الوراثي للرز. وقد أظهرت السلالات المحورة المعبر فيها هذه المورثات زيادة المقاومة لأهم الأمراض الفطرية الرئيسية في الرز (105). تم إجراء تجربة مماثلة لاختبار إمكانيات PinB في التفاح. وأشارت النتائج إلى أن العترة 104 والعترة 1 (والتي تمثل مجموعة الفطر *V. inaequalis* الشائع على الأصناف التجارية)، لا تتأثران بهذه المورثة PinB ولا تحت أي مستوى من التعبير الوراثي للمورثة؛ لكن العترة EU D42 والعترة 6، تثبطتا تدريجياً مع ازدياد كمية المورثة PinB. فقد أظهرت العترتان الأخيرتان تحملاً تفاضلياً للمورثة *PinB* (53). ومن ناحية أخرى، أظهرت دراسات أخرى أن التعبير على مستوى عال لمورثات بروتينات الدفاع PR يمكن أن تقي الأصناف القابلة للإصابة المعرضة للعدوى من الإصابة بالممرضات المختلفة. وقد أثبتت التحليلات النسخية للتفاح القابل للإصابة 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 إلى حد كبير في الصنف المقاوم ريمو عند مقارنة كمياتها النسبية بكمياتها في الصنف الحساس Elstar. والأكثر إثارة للدهشة كان وجود عدد كبير من الكلونات الناتجة من استنساخ رنا الرسول لتصنيع ميتاللوثيونيز 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* (39). وأظهرت دراسات أخرى قدمتها مجموعة باحثين في جامعة كورنيل في أمريكا (117، 118) أن الإفراط في تعبير مورثة التفاح *MpNPR1* يضفي زيادة مقاومة المرض في *M. domestica*. تسهم المورثة *NPR1* بدورٍ مهمٍ في المقاومة الجهازية المكتسبة في النباتات. لذا تم استنساخ شبيه المورثة *NPR1*، وهو *MpNPR1-1*، من *M. domestica*، وتم التعبير عنه بشكل مفرط في نمطين هامين من التفاح هما غالاكسي والأصل M.26 مما أدى الى زيادة مقاومة المرض ورفع تعبير المورثات المتعلقة بمسببات الأمراض (PR). حيث امتلكت سلالات غالاكسي المحورة وراثياً وذات التعبير المفرط للمورثة *MpNPR1* مقاومة متزايدة لاثنين من مسببات الأمراض الفطرية الهامة من التفاح هما الجرب: *V. inaequalis* والصدأ (1822) Schwein., *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. وقد تم إكثار السلالات المحورة المختارة للتقويم في التجارب الحقلية لمقاومة الأمراض وجودة الثمار (153). 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 رنا 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 (153).

10.3.1. استخدام مورثات بكتيرية – أدخل أيضاً العديد من المورثات الأخرى التي تشفر لبروتينات ذات فعالية مزدوجة كمضادة للفطور ومضادة للبكتريا إلى النباتات بدرجات نجاح مختلفة. شملت هذه البروتينات الـ ليزوزيم lysozyme حيث يفكك هذا الأنزيم الكيتين الى 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 قابلة للإصابة به، ومسبب هذا المرض هو البكتريا *Erwinia amylovora* والتي حالما تتموضع فإنها تقتل الشجرة خلال موسم النمو. وقد درس عدد من الباحثين هذه المشكلة بإنتاج أشجار محورة وراثياً تحوي مورثات تنتج بروتينات مضادة للميكروبات. استخدمت إحدى هذه الاستراتيجيات الطريقة المحللة لإنتاج أشجار محورة 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 المحورة وراثياً أعراض اللفحة النارية أقل من نباتات الشاهد. وأظهرت إحدى السلالات فقط 5% من طول الطرد مصاب باللفحة مقارنة بـ 56% في الشاهد غير المحور وراثياً (153).

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* Linnaeus, 1758 وهذه تتميز بأنها ليست انحلالية وبالتالي فليس من المرجح أن تكون سامة. هذه الببتيدات غير المحتوية على الليستين هي بطول 10-13 حمض أميني وأكثرها قوة هو Temporin A والذي يمتلك 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* (Jones 1901) Bergey *et al.* 1923 واللفحة المتأخرة في البطاطا *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary والتي تسبب خسائر تقدر بـ 4 بلايين دولار سنويا وكذلك العفن القرمزي *Phytophthora erythroseptica* Pethybr., (1913) الذي يسبب خسائر كبيرة بعد الحصاد. وطورت مقاومة فقط للمبيد الفطري الفعال Mefanoxam. وهناك أمثلة أخرى كثيرة عن مورثات لبروتينات مضادة للميكروبات تم إدخالها في النباتات مثل Ace-AMP1 في الورد وفي القمح. وكذلك الـ gallerimycin وهو بروتين فراشة تم تعبيره في التبغ وكذلك تم تعبير Esculentin-1 من *Rana esculenta* Linnaeus, 1758، في التبغ وهي تحدث كلها تغييراً 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 (153).

11.3.1. أنواع المورثات المحفزة (المحفزات) المستخدمة – من أجل دراسة تعبير المورثات، اعتمد الباحثون في كثير من الحالات على استخدام المحفز 35S من فيروس موزاييك القرنبيط (CaMV 35S) الذي يتصف بالتعبير الدائم (جدول 2). وقد بذلت بعض المحاولات لاكتشاف واستخدام محفزات أخرى (61، 62، 63، 98، 116، 133، 145، 167، 175). فحتى وإن لم يكن مذكوراً على وجه التحديد بالتزامن مع المورثات المستهدفة، فقد تم تحديد المحفزات المرتبطة بأنماط التعبير المستهدفة في التفاح. على سبيل المثال: المحفز extA 940 والذي يكون نشطاً في الأنسجة الفتية (63)، واثنين من المحفزات هما: SRS1 و RBCS3C، مناسبين للتعبير عن المورثات المنقولة في أنسجة التفاح الخضراء التي تصنع ضوئياً (63) والمحفز ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase، ومحفز مورثة مقاومة الجرب الموجود بالأصل في التفاح *HcrVf2*, (89، 175، 185) ومحفزات أخرى ذات نمط تعبير وراثي خاص بالظروف التي هي فيها (41). ومحفزات تتحرض استجابة للإجهادات الأحيائية أو اللا أحيائية (1، 116، 133).

12.3.1. تعديلات أخرى – تم إجراء تعديلات أخرى على هذه البروتوكولات من أجل زيادة كفاءة التحوير. شملت هذه التعديلات استخدام:

- مركبات فينولية نباتية (اسيتوسيرينغون acetosyringone، 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 (165) AgNO3
- الناقل الثنائي (89، 100)

نشر Hammerschlag وآخرون (66) عن إنتاج تفاح مهندس وراثياً خالٍ من الأغروباكتريا عن طريق فلترة بالتفريغ للمستزرعات الملقحة بالأغروبكتريا في وسط حامضي مع تركيز مرتفع من المضادات

الحيوية (500 ملغ/ل كاربنسيللين وسيفوتاكسيم وسيفوكزينتين). والطريقة الأخرى لتجنب التلوث بالأغروباكتيريا هي غمر الأوراق بعد خدشها باللقاح لفترة قصيرة. فقد استخدم Zhu وآخرون (212) الغمر المؤقت بالمفاعل الحيوي temporary immersion bioreactor (TIB) كجزء من إكثار أصل التفاح M.26. ويمكن أن تستخدم هذه الطريقة أيضاً لتحوير التفاح (3، 143).

2. تطبيقات الهندسة الوراثية من أجل التحسين الوراثي للتفاح

أظهر التقرير الأول عن نباتات التفاح المحورة وراثياً في عام 1989 (83) 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 (3)، لم تدخل بعد أصناف التفاح المحورة في مرحلة الإنتاج التجاري. ومعظم التقارير المنشورة سابقاً عن تحوير التفاح 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، وقد بدأ بعض الباحثين بتطوير بدائل تتمثل باستخدام واسمات غير معتمدة على الانتخاب بوساطة مورثات المقاومة للمضادات الحيوية (56) مثل استخدام المورثة فوسفومانو ايزميريز (40، 41، 42، 211). أو بدون استخدام أي مورثات انتخاب (118). وانتقل التركيز مؤخراً 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 مثل: التدرن التاجي (190)، واللفحة النارية (1، 2، 5، 18، 19، 20، 70، 98، 99، 130، 131، 132) والفطرية مثل: جرب التفاح (6، 15، 16، 17، 30، 39، 46، 47، 52، 53، 59، 72، 88، 89، 91، 114، 119، 154، 162، 197، 200، 206) والبياض الدقيقي (24) ومقاومة الحشرات والآفات الأخرى، (84، 112، 115، 120) والتقزم (أصناف / أصول مقصرة) (213، 214)، ومقاومة مبيدات الأعشاب (44) والإكثار ومقاومة الإجهادات البيئية/اللاحيوية (درجات الحرارة العالية والمنخفضة، الجفاف والبرودة (138)، تحمل نقص الحديد (146)، إجهاد الزنك (179)، موعد الإزهار والنضج المبكر (203)، وطول فترة التخزين والخصوبة الذاتية (184). أما عن الأمثلة عن الصفات المرغوبة من قبل المستهلك فتشمل: الخصائص الصحية المميزة، وتحسين النكهة والطعم الجيد (86)، وتغيير اللون وتعديل الاستقلاب (التمثيل الغذائي) وانخفاض اسمرار الثمرة بعد تقطيعها (124، 125، 136)، وتقليل الحساسية (49، 135، 186) وغيرها (86، 101، 106، 107، 124، 125، 138، 146، 149، 176، 179، 184، 203، 213، 214).

سنقوم في هذا القسم، بشرح بعض الأمثلة على استخدام التفاح المعدل وراثياً لتحسين مقاومته لأهم الأمراض البكتيرية والفطرية. يبين جدول 3 أمثلة عن المورثات المعبرة في التفاح بهدف تحسين مقاومته للأمراض البكتيرية والفطرية.

1.2. مقاومة الأمراض البكتيرية والفطرية

1.1.2. الأمراض البكتيرية

1.1.1.2. 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 تعبير 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، والتثبيط أو التعبير المفرط overexpression للمورثات ذات الصلة بالدفاع. وقد استخدمت المورثات *Attacin E*، *cecropin* والليزوزيم وهي ثلاثة مورثات مضادة للميكروبات متميزة استخدمت لزيادة المقاومة لمرض اللفحة النارية (جدول 3). وذكر عدد من الباحثين زيادة المقاومة، في التجارب الاختبارية في البيوت الزجاجية لمرض اللفحة النارية في أصناف التفاح المختلفة المعبرة عن هذه المورثات (54، 67، 69، 95، 98، 99، 111، 128، 130). ومع ذلك، تم الحصول على أفضل النتائج بالمورثة *attacin E*. أبدت احدى الكلونات المحورة إصابة بنسبة 5% فقط باللفحة مقارنة مع ما يقارب من 60 % في تفاح رويال غالا كنبات شاهد غير محور وراثياً في التجارب الحقلية في عام 1998 (130، 131). وقد قدمت مجموعة جامعة كورنيل لمحة موجزة عن التجارب الحقلية لهذه الكلونات المحورة بهذه المورثات المختلفة المحللة للبروتينات. حيث أظهرت تلك الدراسات أن نقل المورثة *attacinE* الأساسية والمورثة SB-37 الاصطناعية من فراشة الليل *Hyalophora cecropia* (Linnaeus, saturniid moth 1758) ومورثات التحلل الليزوزيم lysozyme من السائل الأبيض لبيضة الدجاج وT4 فاج البكتيريا، كلها عززت المقاومة بدرجات متفاوتة (4). 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*، من عثة saturniid. لكن تتركز الجهود في هذا البرنامج مع ذلك،على الآثار اللاحقة للعدوى بمرض اللفحة النارية البكتيري (68).

تتمثل الاستراتيجية الثانية المستخدمة لتحسين مقاومة اللفحة النارية في تثبيط العوامل البكتيرية الممرضة. تسهم السكريات المتعددة خارج الخلية (EPS) التي تنتجها بكتريا اللفحة النارية *E. amylovora* بدور في الإمراضية البكتيرية، ومثابرة البكتريا ، وكذلك في الالتصاق بالعائل وامتصاص العناصر الغذائية، وتجنب الكشف من المضيف. فقد تم إدخال المورثة بوليميراز السكريات المتعددة depolymerase (DPO) من فاج EA1 *E. amylovora* والتي يتحكم به محفزات مختلفة، على سبيل المثال CaMV35S أو Gst1 في أصول التفاح JTEH و M.26 والى الصنف Pinova (20، 57، 177) (جدول 3).

جدول 3. **الصفات الخاصة بمقاومة الأمراض المعبر عنها في التفاح** المحور وراثياً.

Table 3. Traits related to resistance to diseases expressed in transformed apple.

المراجع **References**	النتائج الرئيسية **Principal results**	المحفز **Promoter**	المورثة المدخلة **Gene introduced**	مصدر المورثة **Gene origin**	الصنف **Apple cv.**
					بكتريا التدرن التاجي *Agrobacterium tumefaciens*
190	لوحظ إسكات (فقدان تعبير المورثة) مورثة iaaM. ولوحظ انخفاض وانعدام تشكل الدرنات الجذرية Silencing of iaaM gene expression was observed. Reduction. Also, abolition of Crown Gall formation was observed.	CaMV35S FMV	*iaaM and ipt* (إسكات)	*Agro. tumefaciens*	Jonagold
					مرض اللفحة النارية *Erwinina amylovora* (fire blight)
5، 130	بعض سلالات SB-37 مهندسة وراثيا ذات مقاومة جزئية زرعت في الحقل Some SB-37 transgenic lines with partial resistance cultivated in the orchard.	Pin2 CaMV35S	SB37 (+/-sp) Shiva 1 (-sp)	Synthetic peptide	Gala
110، 111	أظهرت 3 من أصل 7 سلالات مهندسة زيادة مقاومة في البيت الزجاجي (مقاومة أكثر بمعدل 2.5 الى 3.3 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).	Osmotin يحرض بالجرح	MB39(+sp)	Modified cecropin	Royal Gala
4، 5، 98، 128	أظهرت بعض السلالات المهندسة مقاومة جزئية في البيت الزجاجي وفي الحقل. وزادت المقاومة عند استخدام ببتيد اشارة ومعزز الترجمة (AMV) Some transgenic lines showed partial resistance in green-house and in the orchard. Increased resistance when signal peptide and translation enhancer (AMV) were used.	Pin 2 CaMV35S	Attacin E	Hylohora ceropia (فراشة الحرير العملاقة) (giant silk moth)	M.26
68	أظهرت بعض السلالات المهندسة مقاومة جزئية في البيت الزجاجي Some transgenic lines showed partial resistance in greenhouse	Pin2 CaMV35S	Attacin E (-sp) T4 Lysozyme	*Hyalophora cecropia* (فراشة الحرير العملاقة) *T4 Bacteriophage*	Pinova, Pilot, Pirol, Pingo Elstar, Remo Liberty, Reka
4، 5، 97، 99	أظهرت بعض السلالات المهندسة مقاومة جزئية في البيت الزجاجي. ولم يكن هناك زيادة في المقاومة عندما 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 Lysozyme لوحدها أو مترافقة مع *cecropia* attacin E	*T4 Bacteriophage* *Hyalophora*	Gala
57	أظهرت 7 سلالات من أصل 33 مرض أقل من الانماط الوراثية غير المحورة 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.	CAMV35S	*Dpo*	phage IEa1h	Pinova

20	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 promoter.	CAMV35S Gst1			M.26
1، 2، 5	امتلكت معظم السلالات المهندسة مقاومة جزئية للفحة النارية في البيت الزجاجي وفي الحقل. أظهر اثنان من هذه السلالات مستوى مقاومة مماثل لمقاومة الأصل م.7 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)	HrPN	*Eriwinia amylovora*	M.26
115	انخفاض كبير في الإصابة باللفحة النارية بمقدار 33-86% في الصنف غالاكسي. أظهر م.26 انخفاض أقل بكثير مقارنة بالصنف غالاكسي (0 الى 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	*MpNPR1*	Apple	Galaxy M26
19	أظهرت بعض السلالات المهندسة 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	*DIPM* (إسكات 4 مورثات مختلفة)	Apple	Galaxy
Fungal resistance المقاومة للأمراض الفطرية					
Altenaria mai					
45	Nd غير محدد	CaMv35S	Thaumatin	*Thaunatococcus* daniell (plant)	Melba
91	آفة مرضية وحجم بقع أصغر في السلالات المهندسة مقارنة بغير المحورة Wound inducible Smaller disease lesion and spot size in transgenic lines compared to the control.	محفز يتحرض بالجروح	Rab	Plant	Mcintosh
***Venturia inaequalis* (جرب التفاح)**					
16، 17	لوحظت علاقة ارتباط سلبية بين نمو السلالات المهندسة والاندوكيتينيز وكانت 6 من اصل 8سلالات مهندسة اكثر مقاومة من الشاهد. انخفضت شدة المرض بمقدار0 الى 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 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	2 CaMV35S	Endochitinase	Trichoderma atroviride (fungus)	Mcintosh

Table 3. Cont…… **تابع جدول 3.**

52، 53	لوحظت علاقة ارتباط سلبية بين نمو السلالات المهندسة 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.	2CaMV35S	*Endohitinase (ech42)* *Exochitinase* (nag 70)	Trichoderma atroviride	Ariane Galaxy
32	أظهر 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 the control. *Ace-AMP1* expressing shoot showed 4 fold increased antifungal activity relative to control plants	CaMV35S	*Ace-AMP1* *Rs-AFP2*	Onion بصل Radish فجل	Jonagold
21	غير محدد Nd	CaMV35S	*Ai-AMP*	Nd	Jonagold
88	نقص في تطور أعراض الجرب Decrease in scab symptom development	CaMV35S	*hordothionin*	Barley	Golden Delicious, Gala, Elstar
53	انخفاض اعراض الإصابة بالجرب في الصنف غالاكسي (55% بأحسن السلالات المهندسة) وفي الصنف آريان (64%) بعد التلقيح بعترة الجرب 6. لم يلاحظ زيادة في المقاومة في سلالات غالاكسي المهندسة بعد إجراء العدوى بعترة الجرب 1. 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	*Puroindoline-b*	Wheat	Ariane Galaxy
11، 12، 13، 166، 167	تمنح المورثة Hcrvj2 مقاومة للجرب في الصنف الحساس غالا. المقاومة المكتسبة خاصة بالعترة. *Hcrvf2* confers scab resistance to the susceptible apple cultivar Gala Acquired resistance is race-specific.	CaMV35S	*HcrVf2*	Apple	Gala
119	أظهرت السلالات المهندسة المعبرة المورثة *Vfa1* أو المورثة *Vfa2* زيادة كبيرة في المقاومة لجرب التفاح. وكانت السلالات المهندسة 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	Their own native promoter المحفز الأصلي الخاص بها	*Vfa1*, *Vfa2* and *Vfa4*	Apple	Galaxy McIntosh
89، 185	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.	Rubisco	*HcrVf* *Hcrv2*	Apple	Gala

حسب Aldwinckle و Malnoy (3).مع تحديث وإضافة بعض المراجع

Based on Aldwinckle and Malnoy (3) with addition of some references

وفي التقارير الأولى، كانت 4 من أصل 5 نباتات محورة وراثياً مقاومة تماماً لللفحة النارية (177). وقد تأكدت هذه النتائج فقد أظهرت 7 سلالات من أصل 33 سلالة تفاح Pinova محورة قابلية أقل للإصابة باللفحة النارية مقارنة بالنبات الأم الشاهد Pinova، ولكن لم يلاحظ أي فرق إحصائي باستثناء سلالة واحدة معدلة وراثياً (70). ومع ذلك، لوحظت مقاومة أكبر لمرض اللفحة النارية عندما تم دمج المورثة DPOإلى الببتيد الاشاري تحت تحكم المحفز القابل للتحريض بالمسبب المرضي *gst1* بدلا من المحفز CaMV35S (20). يفرز المسبب المرضي، خلال عملية العدوى، 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. وكان البروتين الفعال harpin N من بكتريا اللفحة النارية *E. amylovora*، قادر على حماية جزئية ضد العدوى اللاحقة بالبكتريا *E. amylovora* عندما رش 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 (2). 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*، انخفاضاً كبيراً في التعرض للاصابة باللفحة النارية. وأظهر كلونان منها مستوى مقاومة يعادل مستوى مقاومة أصل التفاحM.7، وهو أصل مقاوم للفحة النارية. ويمكن لهذه الكلونات المعدلة وراثياً أن تساعد أيضاً في تعزيز فهم أفضل لدور harpinNEa في تحريض المقاومة للفحة النارية في الكلونات المهندسة وراثياً. وسيكون من المثير للاهتمام أيضاً أن ننظر إلى سلوكها في استجابتها للممرضات الأخرى في التفاح.

في كل من الطرائق المذكورة أعلاه الهادفة إلى إيجاد نباتات مقاومة لمرض اللفحة النارية، عُهِد 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 فلن تكون بكتريا اللفحة النارية قادرة على إصابة المضيف. بهدف تثبيط تأثير المورثات DIPM ومنع التفاعل المسبب للمرض مع DspE، تم إدخال 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" (19). بالإضافة إلى ذلك، تم إدخال 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 (بي سي آر) العكسي RT- PCR للنباتات المعدلة وراثياً لتعبير نسخ الـ رنا للمورثة المستهدفة DIPMs دليلاً على إسكات على مستوى رنا الرسول في بعض السلالات. كما تم تقويم بعض السلالات المعدلة وراثياً لمقاومة مرض اللفحة النارية بتلقيح الطرود الخضرية لنباتات في أصص على جذورها الذاتية بالسلالة الفتاكة Ea273 من*E. amylovora* ، وتشير النتائج الأولية إلى ازدياد المقاومة لدى بعض السلالات (19). باستخدام الطريقة نفسها المستخدمة لتعريف البروتين DIPM، تم التعرف على البروتين الذي يتفاعل مع العامل المحرض للـ harpin من *E. amylovora* (134). ويمتلك هذا البروتين الصغير (60 Da) 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 إدخال مركب رنا المتداخل RNAi يحتوي على كامل طول هذه المورثة في صنف التفاح غالاكسي. وأظهرت النتائج الأولية مقاومة جزئية لمرض اللفحة النارية (3).

واعتمدت الاستراتيجية الثالثة على التعبير المفرط للمنظم الرئيس للاستجابة للمرض النباتي. إن المورث المتعلق بالمسبب المرضي PR غير المعبر (*NPR1*) هو وسيط رئيس للمقاومة الجهازية المكتسبة. تم إدخال نسخة إضافية من مطابق ortholog (مورث نشأ بين أنواع متباعدة) التفاح، MpNPR1، في الصنف غالاكسي والأصل M.26 (118). تم اجراء العدوى ببكتريا اللفحة النارية *E. amylovora* لكلونات غالاكسي المحورة في ظروف غرفة النمو حيث تلوثت 17.5-35.5 من طول الطرود الخضرية بالعدوى مقارنة بـ 80% في النباتات الشاهد. بالإضافة إلى ذلك، كانت هناك زيادة بالمقاومة لاثنين من مسببات الأمراض الأخرى هما جرب التفاح *Venturia inaequalis* وصدأ التفاح الأرزي *Gymnosporangium juniper virginianae* (117). 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 سابقا كانت من منشأ فيروسي أو بكتيري أو فطري أو من أصل حيواني.

2.1.1.2. مرض التدرن التاجي البكتيري – يعد التدرن التاجي مشكلة مهمة في القطاع الزراعي في جميع أنحاء العالم. وبكتريا 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 بوساطة بكتريا التدرن التاجي المسببة للورم. تنجم مستويات الهرمونات النباتية العالية عن تعبير ثلاثة 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، ويكفي الإفراط في إنتاج الأوكسين 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 المورثتين iaaM و IPT في صنف التفاح Jonagold مرض التدرن التاجي على جذور أشجار التفاح المعدلة وراثياً (190). وبالتالي، يوفر إسكات المورثة المسرطنة iaaM في بكتريا التدرن التاجي وسيلة فعالة للوقاية من مرض التدرن التاجي في النباتات المعمرة مثل أشجار التفاح (153).

2.1.2. الأمراض الفطرية

1.2.1.2. مرض جرب التفاح – جرب التفاح الذي يسببه الفطر الزقي(.Cke) *V. inaequalis*، هو أهم مرض فطري يصيب التفاح في معظم مناطق زراعة التفاح التي تسود فيها أمطار كثيرة في الربيع والصيف. يمكن أن يتطلب التحكم بهذا المرض في البساتين التجارية ما يصل إلى 15 رشة أو أكثر من المبيدات الفطرية سنوياً. ومع ذلك، بسبب تزايد مقاومة الفطور داخل الممرض، فان استخدام مبيدات فطور 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 الاثمار طويلة وبسبب عدم التوافق الذاتي في التفاح. لهذا وبدءاً من النوع البري *M. floribunda* 821 والذي يحمل المورثة *Vf* لمقاومة جرب التفاح، طور العديد من المربين أصناف تفاح مقاومة للجرب، ولكن حقق القليل منها فقط قدراً من النجاح التجاري 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 (جدول 3) مثل الصنف غالا (12، 13، 88) وغالاكسي (52، 53، 119) وجوناغولد (35) وماكنتوش(15، 16، 91، 119) أو أصنافاً مقاومة جزئياً مثل الصنف آريان (52، 53) من خلال دمج مورثات مختلفة المصدر مضادة للفطور (*Amp1*، *chitinases*، *AFP2*، *puroindolin* أو *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. يحتل هذان المرضان الفطريان موقع الصدارة اذا لم يكونا هدف كل تطبيقات الرش بالمبيدات الفطرية الضرورية لإنتاج تفاح عالي الجودة. لكن من ناحية ثانية، حتى التسعينات عندما تم وضع طرائق جيدة للتحوير الوراثي للتفاح، لم يتم إدخال أي مورثة مقاومة من نبات التفاح. وتم التركيز على المورثات الغريبة، التي تمتلك آثاراً سامة محتملة أو مثبطة لنمو الفطر المسبب للجرب وفطر البياض الدقيقي. وتشمل هذه الاستراتيجية 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 بحرشفيات الأجنحة *Lepidoptera* وبعض الببتيدات المضادة للميكروبات (AMP) من الفاجات. في عام 1998، 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 للفطور ويمكن أن يزيد من مقاومة العائل للجرب (198). في هذه الدراسة، كان اثنان من أصل ثلاثة سلالات تفاح رويال غالا المهندسة وراثياً بالمورثة endochitinase (ech42) أكثر مقاومة من الصنف رويال غالا غير المحور وراثياً عندما رشت النموات المطعمة بالتطعيم المخبري الدقيق بلقاح عدوى الجرب. وفي الوقت نفسه ، نشر أيضاً التحوير الوراثي للصنف ماكنتوش بالمورثة ech42 والمورثة Nag70، والمورثة exochitinase المشفرة لـ N- أسيتيل -β-D جلوكوز، والمعزولة من فطر المكافحة البيولوجية *T. harzianum* (15). امتلكت السلالات المحورة وراثياً بكلتا المورثتين (تعبير منخفض *each42* وتعبير عالٍ *Nag70*) مستوى عال من المقاومة للجرب واحتفظت بقوة نمو جيدة (131). ينتج فطر المكافحة الحيوية الترايكوديرما *Trichoderma atroviride* (سابقاً *T. harzianum*) العديد من الإنزيمات المحللة للكيتين، بما في ذلك اندوكيتينيز، الذي يحطم عشوائيا الكيتين وهو العنصر الرئيس في جدار خلية الفطر. يثبط اندوكيتينيز الترايكوديرما والذي تشفره المورثة *ech42* إنبات الأبواغ واستطالة الهيفا. وتم الحصول على عدة سلالات من صنف التفاح ماكنتوش القابل للإصابة بالجرب 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 (16). وقد لوحظت نتائج مماثلة أيضاً عندما تم إدخال المورثة ech42 في أصناف التفاح غالاكسي وآريان. يبدو أن هذا الحد من النمو يترافق مع محتوى اللجنين والبيروكسيداز وفعالية الغلوكانيز في السلالات المعدلة وراثياً (52). ربما يكون أكثر عمل طموح تم تنفيذه في أشجار الفاكهة هو بمورثة الكيتيناز. فقد تم انتاج أشجار تفاح تعبر عن المورثة اكسوكيتيناز exochitinase و/أو اندو كيتيناز endochitinase معزولة من الفطر *T. harizianum* بالتحوير الوراثي بوساطة الأغروباكتريا. حيث وجد ارتباط ايجابي بين المقاومة للجرب ومستوى تعبير البروتينات. وعند إدخال كلتا المورثتين في النبات، عملت البروتينات تآزريا. لكن أحد العيوب كان أن تعبير الاندوكيتيناز خفَّض 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 الرئيسة *Oomycete* مثل فيتوفثورا *Phytophthora* spp. لا تحتوي في جدرانها الخلوية على كيتين. للتغلب على هذه الصعوبات، تم استخدام تجميع تركيبي من بروتينات خاصة بالمسببات المرضية وبروتينات أخرى مضادة للميكروبات، وهي استراتيجية معقولة على أية حال حيث أن استخدام أكثر من مورثة سيساعد على منع ظهور وتطور المقاومة ويوفر حماية لفترة أطول. واستخدم أيضا الغلوكانيز وهو أحد مجموعات البروتينات الخاصة بالمسببات المرضية كطريقة لتعزيز المقاومة للعدوى الفطرية (153). تتفاعل الاندوكيتينيز من المورثة ech42 بالتآزر مع إنزيمات أخرى محللة للكيتين chitinolytic من *T. atroviride* مثل (exochitinase *nag70*) -N acetyl-E-glucosaminidase. وأظهرت دراسة سلالات معدلة وراثياً من ثلاثة أصناف تفاح مختلفة معبرة للمورثة ech42 و *nag 70* بمفردها أو معاً جنباً إلى جنب تآزراً بين هذه الإنزيمات في النبات. في الواقع، كانت السلالات المعدلة وراثياً المعبرة لهذه المورثات أكثر مقاومة من النباتات المعبرة لأي من الإنزيمين كلٌ بمفرده في المستوى نفسه (17، 52). ولوحظ وجود زيادة كبيرة في مقاومة فطر الجرب أيضاً عند تعبير مورثات أخرى مضادة للفطور. تم تعبير المورثة *puroindolin B*، وهي عضو من بروتينات نقل الدهون النباتية plant lipid transfer proteins (LTPs)، في صنف التفاح آريان، وهو صنف مقاوم للعترات 1-5 من سلالات فطر الجرب وحساس للعترات 6 و 7، وكذلك في الصنف غالاكسي والذي هو حساس وعرضة للاصابة بجميع عترات فطر الجرب. بعد العدوى والتلقيح بالعترة 6 من عترات الفطر *V. inaequalis*، انخفضت الأعراض بمقدار 55% و 64% في السلالات المهندسة وراثياً الأكثر مقاومة من الصنفين غالاكسي وآريان على التوالي (53). وقد أظهرت النتائج الأولية أن المورثة hordothionin (88) والمورثة *Ace-AMP1* و *Rs-AFP2* (32) لديها القدرة على زيادة مقاومة التفاح للفطر المسبب لجرب التفاح. تم تحديد الموقع الوراثي على الصبغي لمورثة الجرب *Vf* في التفاح البري، *M. floribunda* 821، وتم إدخاله على نطاق واسع في أصناف التفاح المعرضة للإصابة. يمنح الموقع *Vf* المقاومة لخمسة عترات من *V. inaequalis*، ولكن ليس للعترات 6 و 7 المعروفة حتى الآن فقط في أوروبا. وقد تم تحديد مجموعة من أربعة تسلسلات شبيهة بالمستقبلات في موقع المورثة *Vf*، التي تشبه مورثات المقاومة *Cf* في البندورة/الطماطم (188). رمز لثلاثة منها بـ*Vfa1*، *Vfa2* و *Vfa4*، لها إطار قراءة مفتوح كامل (Open Reading Frame (ORFs، في حين أن المورثة الرابعة *Vfa3*، ناقصة (غير مكتملة أو مبتوزة truncated ومن الواضح أنها مورثة كاذبة (غير حقيقية pseudogene). وقد لوحظ تعبير تفاضلي بين المطابقات الأربعة للمورثة *Vf* خلال تطور الورقة ونموها، إذ يتم التعبير بشكل كبير عن المورثات*Vfa1*، *Vfa2*، و *Vfa3* في الأوراق غير الناضجة، ولكن يمكن كشفها فقط بشكل طفيف في الأوراق الناضجة، في حين يتم التعبير عن المورثة *Vfa4* في الأوراق غير الناضجة، ويعبر عنها بشكل كبير في الأوراق الناضجة (186). 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 القابلة للإصابة (3، 11، 12، 13). ومع ذلك، تقتصر هذه المقاومة على عترات (races) فطر الجرب 1-5، ولكن ليس العترة 6 (166، 167). وقد ظهر 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) (118). أظهرت هذه الدراسات أن للمورثتين *Vfa1* و *Vfa2* دور في مقاومة جرب التفاح، في حين لا تشارك المورثة *Vfa4* في المقاومة. في الواقع، كانت سلالات غالاكسي وماكينتوش المحورة والمعبر فيها المورثة *Vfa4*، حساسة أو أكثر عرضة للاصابة بالجرب من نباتات الشاهد (118). سيكون من المثير للاهتمام تحوير أصناف التفاح الحساسة للجرب بالمورثتين *Vfa1* و *Vfa2* معا 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 (137). كما طور تفاح مقاوم للجرب محور بمورثات مقاومة معزولة من التفاح (123).

2.2.1.2. 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 مؤخراً أن المجاميع الشرسة من الفطر تتغلب عليها. وقد أدى جمع المورثة *Pl-2* مع مورثات مقاومة كمية الى زيادة مستوى المقاومة للمرض (24).

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 (جدول 3).

2.2. مقاومة الحشرات

تم نشر عدد محدود عن البحوث عن التعديل الوراثي لمقاومة الحشرات (112، 115، 120). فقد نشر بحث عن زيادة المقاومة في صنف التفاح رويال غالا لحشرة دودة ثمار التفاح البنية الفاتحة عن طريق التعديل الوراثي (112). فراشة ثمار التفاح ذات اللون البني الفاتح Light brown apple moth (LBAM) *Epiphyas postvittana* (Walker, 1863)، هي آفة خطيرة لثمار التفاحيات ولثمار الفاكهة ذات النواة الحجرية (اللوزيات) والعديد من المحاصيل البستانية الأخرى، بما في ذلك الكرمة 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 *streptavidin* (112). أظهرت اختبارات الادمصاص 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 كلا من البروتينات المرتبطة بالبيوتين منحت مستوىً عالياً من المقاومة للحشرة في نباتات التفاح المحورة ضد يرقة فراشة ثمار التفاح. وكان معدل نفوق 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%) بعد 21 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 عن المورثة streptavidin عند مستويات 3.8 M وأعلى (112). وفي الصنف رويال غالا نفسه أيضاً ولكن المحور بمورثة مثبط البروتينيز *Proteinase* inhibitor من *Nicotiana alata* Link & Otto تحت تحكم المحفز 35s و Ribuloase-1,5-biphosphate carboxylas، امتلكت فراشة التفاح البنية الفاتحة (*E. postvittana*) التي تغذت على التفاح المحور وراثياً وزن جسم منخفض جداً بعد 7 أيام والشرانق الأنثى كانت أصغر بنسبة 28-19% من شرانق الشاهد. بالإضافة الى ذلك، لوحظت تغيرات شكلية/مورفولوجية مثل اتصال غلاف الشرنقة بالأجنحة وأجنحة مشوهة، شكل جسم مشوه وغلاف الشرنقة وأجنحة مجعدة متصلة بالجسم في الحشرات البالغة وفي اليرقات المغذاة بأوراق التفاح المحور وراثيا المعبر عن المورثة PI عند المقارنة مع اليرقات المغذاة على أوراق التفاح غير المحور (112).

3.2. التقزم (قصر طول الشجرة) والقدرة على التجذير

التقزم هو أيضاً صفة رئيسية استهدفت في الهندسة الوراثية 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 بوساطة ترقيد الخلفات ونادراً بتجذير العقل وهو ضعيف في معظم الأصول، حتى مع استخدام الأوكسين. تم توصيف المورثات المحرضة على التجذير (*rol*A, *rol*B, and *rol*C) في بكتريا التدرن الجذرية *Agrobacterium rhizogenes* والتي تسبب مرض الجذور الشعرية في العائل. وقد أجريت الأبحاث الرئيسية في الهندسة الوراثية 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 (194 (194) والأصل M.9 (210) والأصل Jork9 (139، 163، 164). وفي صنف التفاح فلورينا (147). وأظهرت أصول وأصناف التفاح المهندسة وراثياً الناتجة تحسن التجذير عموماً وزيادة في عدد الجذور بكل عقلة (139، 147، 163، 194، 210). لكن، من ناحية ثانية، انخفض النمو في بعض الأصول مقارنة بالشاهد (139، 210). وعلى نقيض ذلك، لم يبد الصنف فلورينا المهندس وراثياً أي فرق ظاهري فينولوجي بعد عدة أشهر من النمو في المختبر أو في البيت الزجاجي مقارنة مع الشاهد (147). التفسير المحتمل لهذا التأثير التفاضلي للمورثة *rolB* في النمو ربما يرجع الى أن Radchuck و Korkhovoy (147) نميا النباتات لمدة سنتين بينما نمى Zhu وآخرون (210) النباتات لمدة أربعة أشهر وتحت ظروف إمداد محدود من العناصر المغذية مقارنة مع ظروف الإمداد بالعناصر الغذائية بشكل ثابت (208). كانت أصول التفاح التي فيها تعبير للمورث *rolB* أكثر حساسية للأوكسين (IBA) مقارنة مع الشاهد (164، 209). وتبين أيضاً أن التعبير عن المورثات *rolA* زاد الحساسية للأوكسينات في السلالات المعدلة وراثياً بالأصل M.26

بالمقارنة مع الشاهد (209). أثر تعبير المورثة *rolA* في قدرة نمو النباتات المعدلة وراثياً بالأصل M.26 (75) وبالأصل A2 (209). وأظهرت بعض هذه الأصول المعدلة وراثياً انخفاضا في الطول وفي المساحة الورقية والوزن الجاف. وقد سجلت نتائج مماثلة مع تعبير إما المورثة *rolC* أوالمورثة فيتوكروم B في أصل التفاح Marubakaidou (79) والأصل M.26 (76)، على التوالي. وقد نشر سابقا ملاحظة تأخير في الإزهار 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* (209). أزهر الصنف Gravenstein على كل من الأصل المحور بالمورثة *rolA* وعلى الأصل غير المحور في السنة الثانية بعد التطعيم، وكان الإزهار طبيعياً في البيت الزجاجي (209). وعموماً قد تكون الآثار الجانبية لهذه المورثة *rolA* في التفاح عدم الإنتقال إلى الصنف الطعم كما اتضح من النتائج الأولية للتجارب (209). ونشر 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 لتقويم تأثيرات الأصول في نمو وتطور الأصناف المطعمة عليها والإنتقال المحتمل لبروتين *rolB* من الأصل الى 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 المحورة (213). بالإضافة إلى ذلك، لم يتم العثور على المورثة المنقولة في الطعم غير المحور المطعمة على أصول تحتوي *rolB* (168، 213، 214) وبأخذ الهدف نفسه في الاعتبار، أنتجت طعوم الصنف Greensleeves المقصر (قصر طول السلاميات) من خلال إسكات (إخماد) الإنزيم الداخلي فيه GA-20 أوكسيديز (23). تراوح حجم الأشجار المحورة بين 50–80% من الشاهد غير المحور واستدام التأثير المقصر بعد التطعيم على أصول قوية النمو بشكل طبيعي (M.25 و MM.106).

4.2. نضج الثمرة

تعد إمكانية التخزين الجيد 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 (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 وطراوة الثمار، ولكن لا يزال الإثيلين العامل الرئيس 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 الى 1-amino-cyclopropane carboxylic acid (ACC) والإنزيم الثاني هو: (ACO) 1-aminocyclopropane carboxylic acid oxidase الذي يؤكسد ACC إلى الإثيلين. ينخفض تنظيم التعبير الوراثي في أصناف التفاح غالا وماكينتوش و Greensleeves عندما ينتج أي من ACS أو ACO (38، 77، 158). وبتحليل الثمار من سلالات التفاح المحورة نفسها والتي نميت في ظروف تقليص التصنيع الحيوي للايثيلين إلى حد كبير، لوحظت زيادة كبيرة في عمر تخزين الثمار وزيادة تماسكها مقارنة مع الشاهد (36، 38). وقد وجدت 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 بالاثيلين ولكنها لم تختلف عن الشاهد بالنسبة للثمار المعاملة بالايثيلين (35، 36، 39). تم كبح إنتاج الاستر الطيار، وهذه الاسترات الطيارة هي من العناصر المهمة في تركيب نكهة الفاكهة. ولكن لوحظ وجود مستوى مماثل من الكبح لإنتاج استر طيار عند معاملة الثمار الشاهد بـMCP. تتيح المعاملة بالايثيلين تصنيع الاستر والكحول لاسترداد 70% من قيم الثمار الشاهد، في حين يسترد فقط تصنيع الاستر والكحول بشكل طفيف في الثمار المعاملة بـ MCP (37، 38). في دراسة منفصلة، وجد أن منظم خفض التعبير ACC أوكسيديز في الصنف رويال غالا، أدى الى استرداد مستوى الاستر والكحول تماماً بعد المعاملة بالاثيلين. وكشفت معطيات المصفوفات الدقيقة الخاصة بها أن الاثيلين يتحكم فقط في الخطوات الأخيرة للتصنيع الحيوي للنكهة. قد تفسر عوامل النمط الوراثي، مثل الحساسية للايثيلين، الاختلافات في استرداد تصنيع الاستر والكحول. أن إمكانية استخدام الإيثيلين للتحكم بالنضج يقدم حالة مماثلة لتلك التي تستخدم فعليا للموز، وزيادة فترة التخزين دون تبريد قد تتيح توفيرات كبيرة في الطاقة (32، 158). 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 تسهم في معرفة العمليات الفيزيولوجية في التفاح (27)، وتمكن الباحثون من تحديد أن مورثة السوربيتول 6 فوسفات ديهيدروجينيز (S6PDH) sorbitol 6 phospahte dehydrogenase هي الإنزيم الرئيس الذي ينظم توزع السوربيتول والسكروز في أوراق التفاح (90). وتم تعبير مورثة بولي غالاكتورونيز polygalacturonase بشكل مفرط والحصول على مجموعة من الظواهرالجديدة، كتغيير شكل الورقة والعلاقات المائية في النبات وبنية ووظيفة خلايا المسامات، فضلاً عن التصاق الورقة بالنبات (9). أدى التعبير الضعيف للأنزيم polyphenoloxidase (PPO) وهو الإنزيم المسؤول عن الاسمرار الإنزيمي في التفاح من خلال استخدام مورثة PPO بالاتجاه المعاكس التي أدت بشكل واضح إلى انخفاض اسمرار الكالس (124) وكانت الطرود أقل ميلاً نحو اسمرار مماثل من خلال نشاط PPO (125). ستكون مثل هذه الفاكهة جذابة لكل من المستهلكين ومصنعي الأغذية. تم تحوير أصناف تفاح تجارية متنوعة بمورثات كيميرية (مصنعة) بهدف إنتاج أنماط وراثية لا تتصف بظاهرة الاسمرار. تكونت هذه المورثة الكيميرية 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 وثمارهذه السلالات المحورة (>90%) والحصول على أنماط ظاهرية لا تبدي ظاهرة الاسمرار 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 في الصفات البستانية، أو في مقاومة الأمراض والحشرات عندما نمت في ظل الظروف الحقلية (136).

5.2. الخصائص الصحية الفريدة

تعد مكونات البوليفينول المشتقة من الفواكه مثل التفاح 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 (107، 149). في التفاح، قد يكون المركب كيرسيتين quercetin الشبيه بالفلافونول والمركب rutin الشبيه بالفلافونات مهمين أيضاً (149). 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 اللاحيوية (29، 151) 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 (162). بالإضافة إلى هذه الآثار المترتبة على مقاومة الأمراض، جذب الـ 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 الأصناف نفسها (174). 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 الـ رسفيراترول resveratrol، فان تصنيعه في التفاح يسهم في جودة الثمار، وربما تكون له آثار إيجابية أيضاً في ثبات قوام الثمار أثناء التخزين (152). وقد أدخلت مورثة عامل نسخ Lc من الذرة المسؤولة عن التحكم بتعبير مورثات بنيوية في مسار التصنيع الحيوي للفلافونيدات في الذرة. وأظهرت السلالات المحورة مستويات متزايدة في نسخ العديد من الفلافونيدات. كما أدخلت أيضاً تسلسلات اخماد RNAi لمورثة انثوسيانين سينثاز (ANS) حيث أدى التحوير بهذه المورثة الى زيادة التصنيع الحيوي للفلافونول و كاتيشين وابيكاتيشين والتي تلعب دوراً هاماً في مقاومة الأمراض النباتية (107).

6.2. الحساسية لثمار التفاح

تعد الحساسية لثمار التفاح ظاهرة شائعة في المرضى الذين يعانون من حساسية حبوب لقاح شجرة البتولا. حوالي 90% من المرضى الذين يعانون حساسية من حبوب لقاح البتولا لديهم الأجسام المضادة ضد حساسية حبوب لقاح البتولا Betv1 (49). ينتمي مسبب الحساسية هذا

إلى مجموعة من البروتينات المتعلقة بالمسبب المرضي، وبشكل أكثر تحديداً بروتينات PR10 (145). تحتوي العديد من الأغذية النباتية، وخصوصا ثمار الفواكه والمكسرات (الجوزيات) على بروتينات متجانسة والتي تدركها الاجسام المضادة الخاصة بـ BetV1 نفسها. في التفاح، حدد مسبب الحساسية هذا باسم Mald1 (135، 186). وقد تم نشر أن حوالي70 % 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 (60). يمكن لفواكه أخرى أيضاً مثل الكمثرى، والكرز والدراق أيضاً أن تحرض ردود فعل سلبية على أساس الأجسام المضادة نفسها عبر التفاعلية (135). لذلك، غالباً ما يؤدي تجنب ثمار التفاح الى حرمان النظام الغذائي من مجموعة واسعة من الأغذية النباتية الشائعة التي لها قيمة غذائية هامة. يبدو أن إنتاج تفاح يتصف بانخفاض كبير في التعبير الاجمالي للمورثة *Mald1* من الأصناف الناجحة اقتصادياً سيكون نهجاً جذاباً. واختيرت طريقة ادخال الحمض النووي الريبي المتداخل (رنا) RNAinterference (RNAi) للإسكات ما بعد النسخ (post-transcriptional silencing) للمورثة*Mald1*. حيث تم عزل مورثة واحدة *Mald1* من الصنف غالا وتم تحوير صنف التفاح ايلستار Elstar بالناقل *Mald1* RNAi (60). 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 اسكات (تعطيل عمل) المورث*Mald1* في أوراق طرود التفاح الفتية النامية في الأنابيب بالزراعة المخبرية. وأظهرت نتائجهم انخفاض تعبير المورثة *Mald1* بوساطة 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 *Mald1*. سوف تحتاج هذه البيانات لمزيد من التأكيد من خلال تحليل تعبير المورثة *Mald1* في الثمار المعدلة وراثياً وعن طريق اختبار الحساسية الخاصة بها. نظراً لأن المورثة *Mald1* هي بروتين مرتبط بالمسبب المرضي، فانه يجب تقويم النباتات التي تم تعطيل عمل المورثة فيها (gene silencing) أيضاً من حيث الانخفاض غير المرغوب فيه في مقاومة الأمراض (60).

7.2. الصفات الأخرى

شملت الصفات الأخرى التي تم تحسينها وبدرجات متفاوتة من النجاح: مقاومة الإجهاد البيئي (138، 179) ومقاومة مبيدات الأعشاب (44، 174) ووقت الإزهار(101، 203) واللون (51) والتصاق الخلية (9) وغيرها (3، 29، 64، 86، 105، 106، 107، 146، 149، 176، 213، 214).

3. حدود التكنولوجيا والتطورات الجديدة

1.3. القبول والوعي الشعبي حول التعديل الوراثي في التفاح والنباتات المحورة وراثياً

على الرغم من التطورات الكبيرة التي تم اكتسابها في عملية التحوير الوراثي في التفاح، لا يزال استخدام المضادات الحيوية ومبيدات الأعشاب كمورثات انتخاب يفرض قيوداً لقبول المستهلك (41، 113، 127، 141). وهكذا فان المشكلة الرئيسية للتفاح المعدل وراثياً (GM) هو استخدام المورثة *nptII* كمورثة معلمة للانتخاب. اعتمدت كل البحوث المنشورة عن التحويرات الوراثية للتفاح التي تم استعراضها، مع استثناءات قليلة، 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 في 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 المحورة وراثياً. حالياً، إحدى بدائل مقاومة المضادات الحيوية الواعدة جداً، وربما تكون أكثر قبولاً، استخدام مورثة فوسفو مانوزايزميريز phosphomanose isomerase (PMI). الخلايا المحورة بهذه المورثة قادرة على استخدام المانوز كمصدر للكربون، بينما لا يمكن لخلايا التفاح غير المحور القيام بذلك وقد نشرت النجاحات الأولى التي تستخدم هذه التكنولوجيا (40، 41، 42، 56، 211). من الواضح أن تطوير التكنولوجيا النظيفة من الناقل من أجل نبات محور وراثياً خالٍ من الواسمات في التفاح وغيره من المحاصيل هو الهدف النهائي. فقد طورت واقترحت في هولندا مؤخرا استخدام هذه التكنولوجيا (103، 104، 156) التي تتيح الحصول على نباتات تفاح مهندسة وراثياً خالية من مورثات واسمات الانتخاب. عموماً، لا توجد دراسات منشورة عن المخاطر البيئية للتفاح المحور وراثياً. فربما لا يزال الباحثون يركزون اهتماماتهم على إنتاج أصناف تفاح معدلة وراثياً هامة تجاريا مقبولة وذات منافع بيئية، مثل الحد من استخدام المبيدات (86). في ظل هذه الظروف، فان تسويق ثمار التفاح المعدلة وراثياً والذي يحتوي حمض نووي ريبي منقوص الاوكسجين (دنا) 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" (3، 143)، حيث مسح هذا المشروع وجمع الآراء بخصوص موقف المستهلكين عن استخدام أو استهلاك النباتات المحورة وراثياً. كان موقف المستهلكين في النرويج والدنمارك والمملكة المتحدة نحو التعديل الوراثي سلبياً نوعا ما، حول نمط نباتات الفريز المعدلة وراثياً والصفات التي تغيرت في عملية التحوير الوراثي. على سبيل المثال، ازداد قبول المستهلك عند النظر الى 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 نفس النوع (81%)، أو من نوع آخر من الخضار (61%)، بالمقارنة مع تلك التي من مصادر أخرى مثل المورثات الفيروسية (14%) (113). وأظهرت الدراسات الاجتماعية 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 (3، 143).

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 الجمهورعندما يتم تهجين داخل وبين التراكيب الوراثية التي تنتمي إلى نفس النوع، 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 ان تكون من منتجات مورثات أي محصول آخر غير التفاح. التفاح هو منتج طازج غالبا 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 المحور وراثياً في المستقبل القريب.

مؤخراً، تم تحديد تسلسلات نيوكليوتيدات جينوم التفاح (187)، وسيتم في المستقبل القريب اكتشاف مورثات المقاومة في التفاح وستنتقل إلى الأصناف الاختبارية، وربما تحت تحكم محفزات خاصة بها، وكما أفادت بعض الدراسات، فإن تكنولوجيا ادخال 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 تعبر المورثات فقط أين ومتى تريد.

باستخدام "تكنولوجيا الناقلات النظيفة" (103، 104، 118) والتي تتيح إنتاج نباتات محورة بدون معلمات انتخاب، سيكون من الممكن إنتاج نباتات "ضمن الجنس" (127) أو أصلية (150) أو من نفس النوع cisgenic (أي النباتات التي يظهر على الصبغي ذاته اما بديلان سائدان أو متنحيان لمورثتين مختلفتين) (160، 161) من أجل تحسين وراثي متخصص جداً.

لا بد من تفادي العديد من المخاوف بشأن المخاطر، سواء كانت ذات أساس تفكيري أوعلمي. إن نظم إنتاج محصول التفاح المعتمدة على التكاثر الخضري الاصطناعي لأنماط وراثية معينة وزراعتها على مساحات واسعة جعل هذا المحصول وراثياً عرضة للكثير من الاجهادات الحيوية واللا حيوية. يمكن استخدام الإمكانية التي تتيحها تكنولوجيا الحمض النووي المؤشوب لاستبدال أليلات المقاومة غير الوظيفية non-functional resistance alleles بأليلات مقاومة وظيفية functional resistance alleles (العلاج بالمورثاتgene therapy). سوف يكون فوائد التفاح المحور وراثياً المقاوم للأمراض المختلفة حقيقياً، ليس فقط بالنسبة لصاحب براءة الاختراع ولكن أيضاً بالنسبة للمستهلك والبيئة. إن الانخفاض في استخدام مبيدات الفطور 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 (3، 143).

2.3. النباتات المعدلة وراثياً التي تحتوي مورثات من النوع النباتي نفسه "Cisgenesis"

من أجل زيادة القبول للنباتات المعدلة وراثياً من قبل المستهلكين، وضعت مجموعة من الباحثين في مختبر البحوث الدولية (جامعة واغننغن، هولندا) وفي مركز البحوث في هولندا سلسلة جديدة من الاستراتيجيات البيوتكنولوجية للحد من القيود المفروضة على طرائق الهندسة الوراثية التقليدية المتاحة (103، 104، 156). يتضمن هذا الابتكار استخدام مورثات من النوع أو الأنواع نفسها 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 المحورة وراثياً (160، 161). ويتوقع أن تسهل كل هذه الابتكارات قبول

وتسويق النباتات المهندسة وراثياً من قبل المستهلكين والمزارعين والسلطات التنظيمية المسؤولة. تمت تسمية هذا الابتكار الجديد "Cisgenesis"، وهو يعتبر تقنية صديقة واستراتيجية ممتازة لتحسين مقاومة النبات وتكمل برامج التربية التقليدية (80، 81، 145، 150، 156، 159، 160، 161، 167، 175، 185). 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 طور حتى الآن، عدد محدود من النباتات cisgenic وقدمت للحصول على الموافقة عليها. وتعد كندا البلد الوحيد 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 (161). حيث تختلف النباتات Cisgenic جوهريا عن النباتات المعدلة وراثياً. في حالة نقل المورثات، تدخل الى النبات المحور وراثياً مورثة أجنبية جديدة، من نوع أو جنس مختلف. لذلك، يفترض أن النبات المحور وراثياً يمتلك نمطاً ظاهرياً لا يوجد في هذه الأنواع (البرية والمزروعة) ولا يؤثر إدخاله من خلال الصفات ذاتها أو من خلال انتقال المورثات من النبات المحور المزروع الى أقاربه البرية (159). على النقيض من ذلك، في نباتات الـ cisgenesis، يكون المورث المدخل مع محفزه الأصلي موجود بالأساس في الأنواع المستأنسة أو البرية منذ عدة قرون. وبالتالي، لايضيف الـ cisgenesis سمة إضافية إلى الأنواع. كونها لا تحرض على تغيير التأقلم والتي لا يمكن أن تحدث أيضاً من خلال التربية التقليدية أو في الطبيعة. ينطبق الشيء نفس على المخاطر البيئية الأخرى، مثل التأثيرات في الكائنات المستهدفة أو غير المستهدفة أو نظم التربة الإيكولوجية، وللاستخدام في الأغذية أو الأعلاف. ونتيجة لذلك، فان الاطلاق المتعمد لنباتات cisgenic في البيئة يمكن أن يكون آمناً مثله مثل الإطلاق المتعمد للنباتات التقليدية (81، 160، 161). لقد وصفت طرائق عديدة لتطوير تفاح cisgenic بإدخال مورثات من الأصناف البرية للتفاح وتجميع مورثات مقاومة في التفاح (89). كما طور تفاح غالا محور بمورثة من التفاح *Hcrv2* أي cisgenic مقاوم للجرب (182). يتطلب إنتاج الفاكهة الحديثة ومتطلبات المستهلك العالية، في الوقت الحاضر، أصنافاً ذات إنتاجية أفضل ومتماثلة، ولها امكانية 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 سميث cisgenic لتحسين مقاومتها لفطر الجرب (3، 143).

3.3. الإستنتاجات والمنظورات المستقبلية

من عام 1996 إلى 2012، أسهمت محاصيل التكنولوجيا الحيوية في الأمن الغذائي والانتاج المستدام وتغير البيئة/ المناخ عن طريق زيادة إنتاج المحاصيل، وتوفير بيئة أفضل من خلال توفير استخدام 497 مليون كيلوغرام من المبيدات في عام 2012 وحده، كما أسهمت في الحد من انبعاثات غاز ثاني أوكسيد الكربون CO_2 بنسبة 26.7 مليار كيلوغرام، والمحافظة على التنوع البيولوجي من خلال توفير 123 مليون هكتار من الأراضي، وساعدت في تخفيف حدة الفقر لـ 16500000 من صغار المزارعين وأسرهم مجموعها 65 مليون شخص. إن محاصيل التكنولوجيا الحيوية ضرورية ولكنها ليست حلاً سحرياً والالتزام بالممارسات الزراعية الجيدة ضروري لمحاصيل التكنولوجيا الحيوية كما هي الحال بالنسبة للمحاصيل التقليدية (82). البحث الوراثي في محاصيلِ العائلة الوردية *Rosaceae* والتي ينتمي لها التفاح عموماً موجه نحو فهم التحكم الوراثي بالصفات الزراعية الهامة بهدف تحسين هذه المحاصيل. تزداد المعرفة الوراثية كل يوم وتقدم معلومات هائلة والتي يمكن استخدامها في التحسين الوراثي للأصناف بواسطة طرائق التربية التقليدية أو بطرائق التعديل الوراثي. من كل هذه المعلومات، بدءاً من المعطيات الكثيرة الناتجة من البحوث الوراثية الى المعلومات الخاصة بمورثات معينة المسؤولة عن صفة معينة، كلها أساسيات لتحسين المحصول. حتى الآن، حاولت طريقة المورثة المستهدفة استعمال المعرفة الناتجة من علوم الوراثة المقارنة والوراثة الوظيفية والبنيوية. بتوفر كل التسلسلات الوراثية سيكون ممكناً تحديد مناطق تشفير تلك المورثات ضمن مواقع الصفات الكمية QTLs المعروفة لتعريف المورثات المستهدفة المحتملة. كما أن إثبات فعالية هذه المورثات سيتطلب طرائق تحوير فعالة كما وصفت أعلاه للتفاح. الكلفةُ العاليةُ لتطوير سلالات معدلة وراثياً فيها تعبير مفرط او إسكات لهذه المورثات هو العامل المحدد لفائدتها في التحليلِ الوراثي لعدد محدود من المورثات المهمة المستهدفة.

قبل أن يصبح التحوير الوراثي لمحاصيل العائلة الوردية متوفر بشكل تجاري، يجب أن يتم اجراء تقويم لأخطارها المحتملة على البيئة (تدفق المورثات وتأثير المورثات في الكائنات الحيّة الدقيقة الأخرى) ومنافعها للممارسات الزراعية (تخفيض كلفة الإنتاج، تحسين

المحصول، زيادة القيمةَ الغذّائيةَ). لا بد من معالجة مخاوف السلطات المنظمة والمستهلكين حول الأمان البيئي وتأثير أصناف فاكهة العائلة الوردية المعدلة وراثياً في الصحة العامة بطريقة مقنعة. يعتقد بأن التطورات الحديثة في التقنية المذكورة هنا ستزودنا بحلول تقضي على هذه المخاوف.

السؤال المطروح هو لماذا لم تطرح نباتات التفاح هذه بعد تجاريا؟ من المرجح أن بعض هذه الأصناف سوف يطرح تجارياً، لكن حتى الآن لا تزال محدودة وقيد التجارب المخبرية والحقلية. وربما تكون المشكلة هو إمكانية قبول المجال الواسع للمقاومة في السلالات النباتية من قبل المزارعين أكثر منه في حال المقاومة لمسبب مرضي واحد. النظرة البديلة المتمثلة باللفحة النارية هي أن بعض الأمراض خطيرة جدا وتبرر قبول الاستراتيجيات التي تعالجها لوحدها. وتجدر الاشارة الى أن الطرائق المضادة للفطور المذكورة أعلاه لا تحمي النبات من المرض فقط إنما تحمي المستهلكين أيضاً من السموم النباتية (ميكوتوكسين) في الغذاء. لذلك تستخدم طرائق الهندسة الوراثية لمكافحة تأثيرات العدوى بالفطور أكثر منها من العدوى نفسها. في الوقت الحاضر، هناك طلبات متزايدة في السوق لأصناف تفاح ذات إنتاجية عالية وجودة ثمار جيدة ومقاومة للأمراض مع تقليل استخدام المبيدات حيث أن التطورات الحديثة في التكنولوجيا الحيوية النباتية يمكن أن تساعد على تلبية متطلبات المستهلكين هذه. لتكنولوجيا التحوير الوراثي في التفاح تاريخ قديم لكنها محدودة التطبيق العملي بسبب قلة قبولها من قبل المستهلك. إن تطوير التقنية الجديدة "تكنولوجيا خالية من الناقل"، حيث تسلسل المورثات المسيطرة على الصفات الزراعية هو تحت سيطرة المحفزات الخاصة بها، سيسمح بإنتاج النباتات المحورة مع قبول أفضل من المستهلك. يمكن أن يدعم تطبيقات هذه التكنولوجيا ويكمل برامج تربية التفاح في تطوير إنتاج تفاح أكثر استدامة وتحسين الإنتاجية والقدرة التنافسية في السوق العالمية (3، 143).

Abstract

Ali Bacha, N.M., M. Battha, A.M. Abdul Kader and F. Hassan. 2015. Advances in using genetic transformation to produce apple cultivars and rootstocks *(Malus domestica* Borkh.) resistant to fungal and bacterial diseases: a scientific review. Arab Journal of Plant Protection, 33(1): 1-35.

Genomic knowledge is increasing day-by-day and provides tremendous information that can be used for genetic improvement of cultivars through conventional breeding or genetic engineering approaches. Apple *(Malus domestica* Borkh.) is one of the most consumed fruit in the world. At present, modern fruit production and high consumer demands require developing cultivars of high productivity, resistant to diseases and pests, have longer shelf life, with good fruit quality and novel health properities for assuring successful commercial sustainable production. In most apple producing countries, apple is one of the most exported fruits where it plays an important socio-economic role in agriculture and economic sectors. However, diseases are the main constratint limiting the growth of this vital export industry. Genetic transformation is one approach to provide these requirements through enhancing potentials of improving the existing varieties and developing new ones resistant to pests and diseases and cope with storage problems in the main production areas. Besides its economic importance, apple has become a woody perennial angiosperm model for genomic research due to many reasons including the development of a robust genetic transformation systems. Because of the high susceptibility to fungal and bacterial diseases of the most important commercial apple cultivars and rootstocks, genetic transformation has been one appropriate method for the development of resistant cultivars. Accordingly, apple was an early target for the emerging genetic engineering (recombinant DNA) technology. Nowadays, genetic transformation of apple is a common practice in several laboratories to genetically modify existing varieties and rootstocks with desirable altered characters to produce new varieties that would be superior in taste, healthier, easier to grow and pest resistant which could be produced within a shorter time frame compared to conventional breeding. This review serves as an up-to-date synopsis of the genetic engineering applications and resources available to improve apple mainly for disease resistance with emphasis on apple scab *Venturia inaequalis* (Cooke) G.Winter, and fire blight *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al*. which are the main diseases affecting apple production in most producing countries worldwide. In addition, and for the sake of improving other characteristics of apple fruit, recent advances of the technology and its limitations as well as public perception and awareness of GM apple, with future perspectives are also discussed.

Keywords: Genetic transformation, fungal & bacterial diseases, apple scab, fire blight, genetically engineered plants, cisgenesis.

Corresponding author: Ahmad Abdul Kader, General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Biotechnology Department, Damascus, P.O.Box 12573, Damascus, Syria, Email: ahmadabdulkader2@gmail.com

References

المراجع

1. **Abdul Kader, A.M., J.L. Norelli, H.S. Aldwinckle, W.B. Bauer and S.V. Beer.** 1998. Transfer of *prp1-1* promoter expressing *uidA* to M.26 apple rootstock. Phytopathology, 88: S134.
2. **Abdul-Kader, A.M., D.W. Bauer, S.V. Beer, J.L. Norelli and H.S. Aldwinckle.** 1999. Evaluation of the *hrpN* gene for increasing resistance to fire blight in transgenic apple. Acta Horticulturae, 489: 247-250
3. **Aldwinckle, H.S. and M. Malnoy.** 2009. Plant Regeneration and Transformation in the *Rosaceae*. Transgenic Plant Journal, 3:1-39.
4. **Aldwinckle, H.S., J.L. Norelli, J.P. Bolar, K.S. Ko, G.E. Harman and S.K. Brown.** 1999. Genetic engineering of disease resistance in apple fruit cultivars and rootstocks, Pages 449-452. In: Plant biotechnology and *in vitro* biology in the 21st Century.

A. Altman, M. Ziv and S. Izhar (eds.). Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
5. **Aldwinckle, H.S., E.E. Borejsza-Wysocka, M. Malnoy, S.K. Brown, J.L. Norelli, S.V. Beer, X. Meng, S.Y. He and Q.L. Jin.** 2003. Development of fire blight resistant apple cultivars by genetic engineering. Acta Horticulturae, 622: 105-111
6. **Ali Bacha, N.M., A. Abdul Kader, H.-J. Jacobsen and F. Hassan.** 2012. Production of Transgenic Apple (*Malus domestica* Borkh.) for Improvement of Fungal Resistance. Acta Horticulturae, 961: 195-203.
7. **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.
8. **Antofie, A., M. Lateur, R. Oger, A. Patocchi, C.E. Durel, and W.E. van de Weg.** 2007. A new versatile database created for geneticists and breeders to link molecular and phenotypic data in perennial crops: the Apple Breed Data Base. Bioinformatics, 23: 882-891.
9. **Atkinson, R.G., R. Schoröder, I.C. Hallet, D. Cohen and E.A. MacRae.** 2002. Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. Plant Physiology, 129:122-133.
10. **Barbieri, C. and S. Morini.** 1987. *In vitro* regeneration from somatic tissues and seed explants of apple. Advances in Horticultural Science 1: 8-10.
11. **Barbieri, M., E. Belfanti, S. Tartarini, B.A. Vinatzer, S. Sansavini, E. Silverberg Dilworth, L. Gianfranceschi, D. Hermann, A. Patocchi and C. Gessler.** 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
12. **Belfanti, E., M. Barbieri, S. Tartarini, B. Vinatzer, F. Gennari, R. Paris, S. Sansavini, E. Silfverberg-Dilworth, A. Patocchi, D. Hermann, L. Gianfranceschi and C. Gessler.** 2004a**.** Gala apple transformed with the Putative Scab Resistance Gene *HcrVf2*. Proceedings of the Eleventh Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, Angers, France, 1-5 September 2003. Acta Horticulturae, 663: 453-456.
13. **Belfanti, E., E. Silverberg-Dilworth, S. Tartarini, A. Patocchi, M. Barbieri, J. Zhu, B.A. Vinatzer, L. Gianfranceschi, C. Gessler and S. Sansavini.** 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.
14. **Bent, A.F.** 2003. Crop diseases and strategies for their control. Pages 390-413. In: Plants, genes and crop biotechnology. Second edit. M.J. Chrispeeels and DE. Sadavo (eds.). Jones and Bartlett Publishers, Canada.
15. **Bolar, J.P, S.K.Brown, J.L. Norelli and H.S. Aldwinckle**. 1999. Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by Agrobacterium tumefaciens. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55, 31-38
16. **Bolar, J.P., J.L. Norelli, K.W. Wong, C.K. Hayes, G.E. Harman and H.S. Aldwinckle**. 2000. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. Phytopathology, 90: 72-77
17. **Bolar, J.P., J.L. Norelli, G.E. Harman, S.K. Brown and H.S. Aldwinckle.** 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
18. **Borejsza-Wysocka, E.E., M. Malnoy, J.L. Norelli and H.S. Aldwinckle**. 2003. Genetic engineered resistance to Fire Blight: from Moth, chicken, and phage genes to apple genes. International Plant & Animal Genome XI Conference, January 10-15, San Diego, USA.
19. **Borejsza-Wysocka, E.E., M. Malnoy, X. Meng, J.M. Bonasera, R.M. Nissinen, J.F. Kim, S.V. Beer and H.S. Aldwinckle**. 2006. The fire blight resistance of apple clones in which DspE-interacting proteins are silenced. Acta Horticulturae, 704: 509-513
20. **Borejsza-Wysocka, E.E., M. Malnoy, W.S. Kim, K. Geider, S.V. Beer and H.S. Aldwinckle.** 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
21. **Broothaerts, W., K. De Cubber, S. Zaman, S. Coppens and J. Keulemans**. 2000. The feasibility of fungal disease resistance in apple by expression of antimicrobial peptide genes. Acta Horticulturae, 521: 91-94
22. **Brown, S.K. and K.G. Malony**. 2003. Genetic Improvement of apple: Breedings, markers, mapping and biotechnology. Pages 31-60. In: Apples: Botany, Production and Uses. D.C. Ferree and I.J. Warrington (eds.). CAB Inter. UK.
23. **Bulley, S.M., F.M. Wilson, P. Hedden, A.L. Phillips, S. Croker and D. James**. 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
24. **Caffier, V. and L. Parisi**. 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: 319-322.
25. **Calenge, F., A. Faure, M. Goerre, C. Gebhardt, W.E. Van de Weg, L. Parisi, and C.E. Durel.** 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.
26. **Cheng, F.S., N.F. Weeden, S.K. Brown, H.S. Aldwickle, S.E. Gardiner, and V.G. Bus.** 1998.

Development of a DNA marker for Vm, a gene conferring resistance to apple scab. Genome, 41: 208-214.

27. **Cheng, L., R. Zhou, E.J. Reidel, T.D. Sharkey, and A.M. Dandekar**. 2005. Antisense inhibition of sorbitol synthesis leads to up-regulation of starch synthesis without altering CO2 assimilation in apple leaves. Planta, 220: 767-776.
28. **Chevreau, E., J.P. Taglioni, C. Cesbron, F. Dupuis, S. Sourice and K. Loridon**. 2007. Feasibility of alternative selection methods for transgenic apple and pear using the detoxification gene Vr-ERE. Acta Horticulturae, 738: 277-281
29. **Chung, E.Y., B.H. Kim, M.K. Lee, Y.P. Yun, S.H. Lee, K.R. Min and Y. Kim**. 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
30. **Crosby, J.A., J. Janick, P.C. Pecknold, S.S. et al.** 1992. Breeding apples for scab resistance: 1945-1990. Acta Horticulturae, 317:43-70.
31. **Dandekar, A.M.** 1992. Transformation. Pages 141-168. In: Biotechnology of Perennial Fruits Crops. Hammerschlag F.A. and R.E. Litz (eds). CAB Inter., Wallingford, UK.
32. **Dandekar, A.M., G. Teo, B.G. Defilippi, S.L. Uratsu, A.J. Passey, A.A. Kader, J.R. Stow, R.J. Colgan and D.J. James.** 2004. Effect of down regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. Transgenic Research, 13: 373-384.
33. **De Bondt, A., K. Eggermont, P. Druart, I. De Vil M., Goderis, J. Vanderleyden and W.F. Broekaert**. 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
34. **De Bondt A., K. Eggermont, I. Penninckx, I. Goderis and W.F. Broekaert**. 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
35. **De Bondt, A., S. Zaman, W. Broekaert, B. Cammue and J. Keulemans**. 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
36. **Defilippi, B., A.M. Dandekar and A.A. Kader.** 2004. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 5694-5701.
37. **Defilippi, B., A.M. Dandekar and A.A. Kader**. 2005a. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 3133-3141.
38. **Defilippi B., A.M. Dandekar and A.A. Kader**. 2005b. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. Plant Science, 168: 1199-1210
39. **Degenhardt, J., A.N. Al-Masri, S. Kürkcüoglu, I. Szankowski, and A.E. Gau.** 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.
40. **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.
41. **Degenhardt, J. and I. Szankowski**. 2006. Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) using the phosphomannose isomerase gene as a selectable marker. Acta Horticulturae, 725: 811-816.
42. **Degenhardt, J., A. Poppe, J. Montag and I. Szankowski.** 2006. The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. Plant Cell Reports, 25: 1149-1156.
43. **Dolgov, S.V., D.N. Morishnichenko and K.A. Schestibratov**. 2000. *Agrobacterium* transformation of apple cultivar and rootstock. Acta Horticulturae, 538: 619-624
44. **Dolgov, S.V. and K.G. Skryabin**. 2004a. Transgenic apple clonal rootsock resistant to Basta herbicide. Acta Horticulturae, 663: 499-502.
45. **Dolgov, S.V., K.A. Schestibratov and D.N. Morishnichenko**. 2004b. Apple transformation with the gene of supersweet protein thaumatin II. Acta Horticulturae, 663: 507-510
46. **Durel, C.E., W.E. van de Weg, J.S. Venisse and L. Parisi**. 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.
47. **Durel, C.E., L. Parisi, F. Laurens, W.E. Van de Weg, R. Liebhard and M.F. Jourjon**. 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia* inaequalis in apple. Genome, 46: 224-234.
48. **Durel, C.E., F. Calenge, L. Parisi, W.E. van de Weg, L.P. Kodde, R. Liebhard, C. Gessler, M. Thiermann, F. Dunemann, F. Gennari, S. Tartarini and Y. Lespinasse.** 2004. An overview of the position and robustness of scab resistance QTLs and major genes by aligning genetic maps of five apple progenies. Acta Horticulturae, 663:135-139.
49. **Ebner, C., R. Hirschwehr, L. Bauer, H. Breiteneder, R. Valenta and H. Ebner**. 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.
50. **Erdin, N., S. Tartarini, G.A. Broggini, F. Gennari, S. Sansavini, C. Gessler and A. Patocchi**. 2006. Mapping of the apple scab-resistance gene Vb. Genome, 49: 1238-45.

51. **Espley, R.V., RP. Hellens, J. Putterill, D.E. Stevenson, S. Kutty-Amma and A.C. Allan.** 2007. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. The Plant Journal, 49: 414-427.
52. **Faize, M., M. Malnoy, F. Dupuis, M. Chevalier, L. Parisi and E. Chevreau**. 2003. Chitinases of Trichoderma atroviridae induce scab resistance and some metabolic changes in two cultivars of apple. Phytopathology, 93: 1496-1504.
53. **Faize, M., S. Sourice, F. Dupuis, L. Parisi, M.F. Gautier and E. Chevreau.** 2004. Expression of wheat puroindoline b reduces scab susceptibility in transgenic apple (*Malus X domestica* Borkh.). Plant Science, 167: 347-354.
54. **FAO**. 2012. http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor
55. **Fasolo, F., R.H. Zimmermann and I. Fordham**. 1989. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 16: 75-87.
56. **Flachowsky, H., T. Birk and V. Hanke**. 2004. Preliminary results to establish an alternative selection system for apple transformation. Acta Horticulturae, 663: 425-430.
57. **Flachowsky, H., K. Richter, W.-S. Kim, K. Geider and V. Hanke**. 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.
58. **Gessler, C. and A. Patocchi**. 2007. Recombinant DNA technology in apple. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 107:113-132.
59. **Gessler, C., A. Patocchi, S. Sansavini, S. Tartarini, and L. Gianfranceschi**. 2006. Venturia inaequalis resistance in apple. Critical Reviews in Plant Sciences, 25:1-31.
60. **Gilissen, L.J.W.J., S.T.H.P. Bolhaar, C.I. Matos, G.J.A. Rouwendal, M.J. Boone, F.A. Krens, L. Zuidmeer, A. van Leeuwen, J. Akkerdaas, K. Hoffmann-Sommergruber, A.C. Knulst, D. Bosch, W.E. van de Weg and R. van Ree.** 2005. Silencing the major apple allergen Mald1 by using the RNA interference approach. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 115: 364-369.
61. **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.
62. **Gittins, J.R, E.R. Hiles, T.K. Pellny, S. Biricolti and D.J. James**. 2001. The *Brassica napus* extA promoter: A novel alternative promoter to *CaMV35S* for directing transgene expression to young stem tissues and load bearing regions of transgenic apple trees (*Malus pumila* Mill). Molecular Breeding, 7: 51-62.
63. **Gittins, J.R, T.K. Pellny, S. Biricolti, E.R. Hiles, A.J. Passey and D.J. James**. 2003. Transgene expression in the vegetative tissues of apple driven by the vascular specific rolC and CoYMV promoters. Transgenic Research, 12: 91-402.
64. **Gygax, M., L. Gianfranceschi, R. Liebhard, M. Kellerhals, C. Gessler and A. Patocchi**. 2004. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene Vbj derived from Malus baccata jackii. Theoretical and Applied Genetics, 109: 1702-1709.
65. **Hammerschlag, F.A., R.H. Zimmermann, U.L. Yadava, S. Hunsucker and P. Gercheva**. 1997. Effect of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf explants and on shoot regeneration. Journal of American Society of Horticultural Science, 122:758-763.
66. **Hammerschlag, F.A., Q. Liu, R.H. Zimmerman and P. Gercheva**. 2000. Generating apple transformants free of *Agrobacterium tumefaciens* by vacuum infiltrating explants with an acidified medium and without antibiotics. Acta Horticulturae, 530: 103-111
67. **Han, Y., K. Gasic, F. Sun, M. Xu and S.S. Korban**. 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. Molecular Phylogenetics and Evolution, 43: 852-863.
68. **Hanke, V., I. Hiller, G. Klotzsche, K. Richter, J.L. Norelli and H.S. Aldwinckle**. 2000. Transformation in apple for increased disease resistance. Acta Horticulturae, 538: 611-616
69. **Hanke, V., W.S. Kim and K. Geider.** 2002 Plant transformation for induction of fire blight resistance: transgenic apples expressing viral EPS depolymerase. Acta Horticulturae, 590: 393-395.
70. **Hanke, V.,K. Geider and K. Richter**. 2003. Transgenic apple plants expressing viral EPS-depolymerase: evaluation of resistance to the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora*. Pages 153-157. In: Plant Biotechnology: 2002 and Beyond. I.K. Vasil (ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
71. **Haris, S.A., J.P. Robinson and B.E. Juniper**. 2002. Genetic clues to the origin of apple. Trends in Genetics, 18: 426-430.
72. **Hassan, F., J. Meens, H.J. Jacobsen and H. Kiesecker**. 2009. A family 19 chitinase (Chit30) from Streptomyces olivaceoviridis ATCC 11238 expressed in transgenic pea affects the development of *T. harzianum in vitro*. Journal of Biotechnology, 143: 302-308.
73. **Hemmat, M., S.K. Brown and N.F. Weeden**. 2002. Tagging and mapping scab resistance genes from R12740-7A apple. Journal of American Society of Horticultural Science, 127: 365-370.
74. **Hemmat, M., S.K. Brown., H.S. Aldwinckle, S.A. Mehlenbacher, and N.F. Weeden**. 2003. Identification and mapping of markers for resistance to apple scab from ‘Antonovka’ and ‘Hansen’s’ baccata #2. Acta Horticulturae, 622:153-161.
75. **Holefors A., Z.T. Xue and M. Welander**. 1998.

Transformation of the apple rootstock M26 with rolA gene and its influence on growth. Plant Science, 136: 69-78.

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

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

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

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

80. **Jacobsen, E. and H.J. Schouten**. 2007. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. Trends Biotechnology, 25: 219-223.

81. **Jacobsen, E. and H.J. Schouten**. 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 Research, 51: 75-78.

82. **James, C.** 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.

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

84. **James, D.J., A.J. Passey, A.D. Webster, D.J. Barbara, P. Viss, A.M. Dandekar and S. Uratsu.** 1993. 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.

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

86. **James, D., A. Passey, S. Baker, F. Wilson, J. Stow, R. Colgan, E. Hiles, A. Massiah, S.P. Vaughan, D. Blakesley, D. Simpson, D. Sargent, S. Bulley, P. Hedden, A. Phillips, S. Biricolti, M. Mazzara, S. Uratsu, J. Labavitch and A.M. Dandekar.** 2003. Genetic modification to improve fruit quality: benefits for the grower, the consumer and the environment. Acta Horticulturae, 622: 97-104.

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

88. **Janse, J., J.G. Schaart, K.J. Puite, D.E.A. Florack, R. Groenwold, K. Pelgrom and F.A. Krens**. 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, 2002, Orlando, Florida, USA

89. **Joshi S.J.** 2010. Towards durable resistance to apple scab using cisgenes. Ph.D thesis, Wageningen University. The Netherlands.

90. **Kanamaru, N., Y. Ito, S. Komori, M. Saito, H. Kato, S. Takahashi M. Omura, J. Soejima, K. Shiratake, K. Yamada and S. Yamaki.** 2004. Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. Plant Science, 167:55-61.

91. **Kim, J.H., K.J. Song, L. Dong-Hee, J.E. Cha and J.G. Woo**. 2006. Agrobacterium mediated transformation using disease resistance gene, Rab in 'McIntosh Wijcik' apple. Proceedings of the 1st Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species

92. **Klee, H.J. and S.G. Rogers**. 1989. Plant genetic vectors and transformation: plant transformation systems based on the use of Agrobacterium tumefaciens. Pages 2-25. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants (Vol 6). Molecular Biology of Plant Nuclear Genes. J. Shell and I.K. Vasil (eds). Academic Press, San Diego, CA, USA, pp: 2-25.

93. **Korban, S.S.** 1998. What's new with disease-resistant apple cultivars. Proc. Trans. I ll. Hortic. Soc. 131:74-76.

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

95. **Korban, S.S. and H. Skirvin**. 1984. Nomenclature of the cultivate apple. HortScience 19: 177-180.

96. **Korban, S.S., P.A. O'Connor and A. Elobeidy**. 1992. Effects of thidiazuron, naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from Malus leaves. Journal of the American Society of Horticultural Science, 67: 341-349

97. **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.

98. **Ko, K., J.L. Norelli, J.P. Reynoird, E.E. Boresjza-Wysocka, S. Brown and H.S. Aldwinckle.** 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

99. **Ko, K., J.L. Norelli, J.P. Reynoird, H.S. Aldwinckle and S.K. Brown**. 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.

100. **Kondrak, M., I. van der Meer and Z. Banfalvi**. 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.
101. **Kotoda, N., H. Iwanami, S. Takahash and K. Abe**. 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.
102. **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.
103. **Krens, F.A., K.T.B. Pelgrom, J.G. Schaart, A.P.M. den Nijs, and G.J.A. Rouwendal**. 2004a. Clean vector technology for marker-free transgenic ornamentals. Acta Horticulturae, 651:101-105.
104. **Krens, F.A., K.T.B. Pelgrom, J.G. Schaart, A.P.M. den Nijs, and G.J.A. Rouwendal**. 2004b. Clean vector technology for marker-free transgenic fruit crops. Acta Horticulturae, 663: 431-435.
105. **Krishnamurthy, K., C. Balconi, J.E. Sherwood, and M. Giroux**. 2001. Increased tolerance to fungal diseases of rice plants transformed with puroindoline genes. Molecuar Plant Microbe Interaction, 14:1255-1260.
106. **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.
107. **Li, H.** 2008. Metabolic engineering of flavonoid biosynthesis in apple by genetic transformation. Ph.D thesis, Faculty of Natural Sciences, Leibniz University Hannover, Germany.
108. **Liu, J.R., K.C. Sink and F.G. Jr. Dennis**. 1983a. Adventive embryogenesis from leaf explants of apple seedling. HortScience, 18: 871-873.
109. **Liu, J.R., K.C. Sink and F.G. Jr. Dennis**.1983b. Plant regeneration from apple seedling explants of apple and callus cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2: 293-304.
110. **Liu, Q., S. Salih and F. Hammerschlag**. 1998. Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots promotes high frequency shoot organogenesis and enhanced B-glucuronidase expression from stem internodes. Plant Cell Reports, 18: 32-36.
111. **Liu, Q., J. Ingersoll, L. Owens, S. Salih, R. Meng, and F.A. Hammerschlag**. 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.
112. **Liebhard, R., B. Koller, L. Gianfranceschi, and C. Gessler.** 2003. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. Theoretical and Applied Genetics, 106:1497-1508.
113. **Lusk, J.L., and P. Sullivan**. 2002. Consumers acceptance of genetically modified foods. Food Technology 56: 32-37.
114. **MacHardy, W.E.** 1996. Apple scab: Biology, epidemiology and management. 545 p. APS Press, St. Paul, Minessota, USA.
115. **Maheswaran, G., L. Pridmore, P. Franz and M.A. Anderson**. 2007. A proteinase 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.
116. **Malnoy, M., J.P. Reynoird, E. Borejsza-Wysocka and H.S. Aldwinckle**. 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.
117. **Malnoy, M., Q. Jin, E. Borejsza-Wysocka, S.Y. He, and H.S. Aldwinckle**. 2007a. Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus ×domestica*. Molecuar Plant Microbe Interaction, 20: 1568-1580.
118. **Malnoy, M., E. Borejsza-Wysocka, P. Abbott, S. Lewis, J.L. Norelli, M. Flaishman, D. Gidoni and H.S. Aldwinckle.** 2007b. Genetic transformation of apple without use of a selectable marker. Acta Horticulturae, 738: 319-322.
119. **Malnoy, M., M. Xu, E.E. Borejsza-Wysocka, S.S. Korban and H.S. Aldwinckle.** 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.
120. **Markwick, N.P., L.C. Docherty, M.M. Phung, M.T. Lester, C. Murray, J-L. Yao, D.S. Mitra, D. Cohen, L.L. Beuning, S. Kutty-Amma and J.T. Christeller.** 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.
121. **Maximova, S.N., A.M. Dandekar and M.J. Guiltinan**. 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: 549-559.
122. **Mooney, P.A. and P.B. Goodwin**. 1989. Presumptive transformation of apple by co-cultivation with Agrobacterium tumefaciens. Acta Horticulturae, 240: 5961.
123. **Murashige, T. and F. Skoog**. 1962. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physioloiay Plantarum, 15: 472-497.
124. **Murata, M., M. Haruta, N. Murai, N. Tanikawa, M. Nishimura, S. Homma and Y. Itoh**. 2000. Transgenic apple (*Malus X domestica*) shoot showing low browning potentail. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 5243-5248.

125. **Murata, M., M. Nishimura, N. Murai, M. Haruta, S. Homma and Y. Itoh**. 2001. A transgenic apple callus showing reduced polyphenol oxidase activity and lower browning potential. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 65: 383-388.
126. **Newcomb, R.D., R.N. Crowhurst, A.P. Gleave, E.H. Rikkerink, A.C. Allan, L.L. Beuning, J.H. Bowen, E. Gera, K.R. Jamieson, B.J. Janssen, W.A. Laing, S. McArtney, B. Nain, G.S. Ross, K.C. Snowden, E.J. Souleyre, E.F. Walton and Y.K. Yauk.** 2006. Analyses of expressed sequence tags from apple. Plant Physiology, 141: 147-166.
127. **Nielsen K.M.** 2003. Transgenic organisms: time for a conceptual change. Nature Biotechnology, 21: 227-228.
128. **Norelli, J.L., H.S. Aldwinckle, L. Destefano-Beltrán and J. Jaynes**. 1994. Transgenic “Malling 26” apple expressing the attacinE gene has increased resistance to Erwinia amylovora. Euphytica, 77: 123-128.
129. **Norelli, J.L., J. Mills, and H.S. Aldwinckle**. 1996. Leaf wounding increases efficiency of Agrobacterium-mediated transformation of apple. HortScience, 31: 1-2.
130. **Norelli, J.L. J.Z. Mills, M.T. Momol and H.S. Aldwinckle**. 1999. Effect of cecropin like transgenes on fire blight resistance of apple. Acta Horticulturae, 489: 273-278.
131. **Norelli, J.L., E. Borejsza-Wysocka, J.P. Reynoird and H.S. Aldwinckle**. 2000. Transgenic ‘Royal Gala’ apple expressing attacinE has increased field resistance to Erwinia amylovora (fire blight). Acta Horticulturae, 538: 631-633.
132. **Norelli, J.L., A.L. Jones and H.S. Aldwinckle**. 2003. Fire blight management in the twenty-first century. Plant Disease, 87: 756-765.
133. **Norelli, J.L, C.L. Basset, T.S. Artlip, H.S. Aldwinckle, M. Malnoy, E.E. Boresjza-Wysocka, D. Gidoni and M.A. Flaishman.** 2007. Inducible DNA promoters for use in apple. Acta Horticulturae, 738: 329-334.
134. **Oh, C.S. and S.V. Beer**. 2007. AtHIPM, an ortholog of the apple HrpN-interacting 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.
135. **Ortolani, C., M. Ispano, E. Pastorello, A. Bigi and R. Ansaloni**. 1988. The oral allergy syndrome. Annals Allergy, 61: 47-52.
136. **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
137. **Paris, R., V. Cova, G. Pagliarani, S. Tartarini, M. Komjanc and S. Sansavini**. 2009. Expression profiling in Hcrvf2-transfromed apple plants in response to Venturia inaequalis. Tree Genetics and Genomes, 5: 81-91.
138. **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.
139. **Pawlicki-Jullian, N., M. Sedira and M. Welander**. 2002. The use of Agrobacterium rhizogenes transformed roots to obtain transgenic shoots of apple rootstock Jock9. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70: 163-171.
140. **Park, S., N. Sugimoto, M.D. Larson, R. Beaudry, and S. van Nocker**. 2006. Identification of genes with potential roles in apple fruit development and biochemistry through large-scale statistical analysis of expressed sequence tags. Plant Physiology, 141: 811-824.
141. **Penna, S., L. Sági and R. Swennen**. 2002. Positive selectable marker genes for routine plant transformation. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 38: 125-128.
142. **Pichler, F.B., E.F. Walton, M. Davy, C. Triggs, B. Janssen, J.N. Wunsche, J. Putterill and R.J. Schaffer**. 2007. Relative developmental, environmental, and tree-to-tree variability in buds from field-grown apple trees. Tree Genetics & Genomes, 3: 329-339.
143. **Polanco, V., M. Paredes, V. Becerra and E. Pérez**. 2010. Advances in apple transformation technology to confer resistance to fungal diseases in apple crops: a Chilean perspective. Chilean Journal of Agricultural Research, 70: 297-308
144. **Puite, K.J. and J.G. Schaart**. 1996. Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar via an Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation method. Plant Science, 119: 125-133.
145. **Puhringer, H., D. Moll, K. Hoffmann-Sommergruber, B. Watillon, H. Katinger and M.L.D. Machado.** 2000. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mald1, is stress- and pathogen-inducible. Plant Science, 152: 35-50.
146. **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.
147. **Radchuck, V.V. and V.I. Korkhovoy.** 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.
148. **Ratnasiri, M., R.M.W. Fung, I. Weir, H. Ding, J.L. Simons and A.C. Allan**. 2002 Efficient transient transformation of suspension culture-derived apple protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70: 77-82.
149. **Rice-Evans, C.A., J. Sampson, P.M. Bramley and D.E. Holloway**. 1997. Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo? Free Radical Research, 26: 381-398.

150. **Rommens, C.M.** 2004. All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. Trends in Plant Science, 9: 457-464.
151. **Rudolf, J.R. and A.V. Resurreccion**. 2005. Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 10186-10192.
152. **Rühmann, S., D. Treutter, S. Fritsche, K. Briviba, and I. Szankowski**. 2006. Piceid (resveratrol glucoside) Synthesis in stilbene synthase transgenic apple fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 4633-4640.
153. **Salter, A., NW. Scott and MR. Fowler**. 2008. Plant disese resistance. Pages 156-183. In: Plant Biotechnology, the genetic manipulation of plants. Second edition. Oxford Univ. Press.
154. **Sansavini, S., M. Barbieri, E. Belfanti, S. Tartarini, B. Vinatzer, C. Gessler, E. Silfverberg, L. Gianfranceschi, D. Hermann and A. Patocchi.**. 2003. 'Gala' apple transformed for scab resistance with cloned Vf gene region construct. Acta Horticulturae, 622:113-118.
155. **Sansavini, S., M. Barbieri, E. Belfanti, S. Tartarini, B.A. Vinatzer, C. Gessler, E. Silfverberg, L. Gianfranceschi, D. Hermann and A. Patocchi**. 2004. Trasformazione genetica del melo Gala con un gene di resistenza a ticchiolatura. Riv. Frutticoltura, 1: 54-58.
156. **Schaart, J.** 2004. Toward consumer-friendly cisgenic strawberries which are less susceptible to Botrytis cinerea. Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
157. **Schaart, J.G., KJ. Puite, L. Kolova and N. Pogrebnyak**. 1995. Some methodological aspects of apple transformation by Agrobacterium. Euphytica, 85: 131-134.
158. **Schaffer, RJ., E.N. Friel, E.J.F. Souleyre, K. Bolitho, K. Thodey, S. Ledger, J.H. Bowen, J-H. Ma, B. Nain, D. Cohen, A.P. Gleave, R.N. Crowhurst, B.J. Janssen, J-L. Yao and R.D. Newcomb.** 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.
159. **Schouten, H.J. and E. Jacobsen**. 2008. Cisgenesis and intragenesis, sisters in innovative plant breeding. Trends in Plant Science, 13: 260-261.
160. **Schouten, H.J., F.A. Krens and E. Jacobsen**. 2006 a. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. EMBO Reports, 7:750-753.
161. **Schouten, H.J., F.A. Krens, and E. Jacobsen**. 2006 b. Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? Nature Biotechnology, 24:753.
162. **Schulze, K., L. Screiber and I. Szankowski.** 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.
163. **Sedira, M., A. Holefors and M. Welander**. 2001. Protocol for transformation of the apple rootstock Jork9 with the rolB gene and its influence on rooting. Plant Cell Reports, 20: 517-524.
164. **Sedira, M., E. Butler, T. Gallagher and M. Welander**. 2005. Verification of auxin induced gene expression during adventitious rooting in *rolB* transformed and untransformed apple Jork 9. Plant Science, 168: 1193-1198.
165. **Seong, E.S., K.S. Song, S. Jegal, C.Y. Yu and I.M. Chung**. 2005. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect Agrobacterium-mediated apple transformation. Plant Growth Regulation, 45: 75-82.
166. **Silfverberg-Dilworth, E., A. Patocchi, E. Belfanti, S. Tartarini, S. Sansavini and C. Gessler**. 2005a. Hcrvf2 introduced into Gala confers race-specific apple scab resistance. In: Plant & Animal Genome XIII Conference, January 15-19, 2005, San Diego, CA, USA.
167. **Silfverberg-Dilworth, E., S. Besse, R. Paris, E. Belfanti, S. Tartarini, S. Sansavini, A. Patocchi and C. Gessler**. 2005b. Identification of functional apple scab resistance gene promoter. Theoretical and Applied Genetics, 110: 1119-1126.
168. **Smolka, A**. 2009. Understanding of Molecular Mechanisms and Improvement of Adventitious Root Formation in Apple. Ph.D thesis. Faculty of Landscape Planning, Hort. and Agri. Sciences, Dept of Plant Breeding and Biotechnology Alnarp, Sweden.
169. **Sriskandarajah, S., R.M. Skirvin, H. Abu Qaoud and S.S. Korban**. 1990. Factors involved in elongation and growth of adventitious shoots from tree apple scion cultivars in vitro. Journal of Horticultural Science, 65: 113-121.
170. **Sriskandarajah, S., P.B. Goodwin and J. Speirs**. 1994. Genetic transformation of the apple scion cultivar 'Delicious' via Agrobacterium tumefaciens. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 36: 317-329.
171. **Sriskandarajah, S. and P.B. Goodwin**. 1998. Conditionong promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 53: 1-11.
172. **Szankowski, I. and J. Degenhardt**. 2007. Alternative selection for apple transformation. Acta Horticulturae, 738: 287-292.
173. **Szankowski, I., A. Lubke, J. Schoenherr and H.J. Jacobsen**. 2001. Influence of sonication on regeneration and transformation efficiencies in apple. Acta Horticulturae, 560: 505-508.
174. **Szankowski, I., K. Briviba, J. Fleschhut, J. Schoenherr, H.J. Jacobsen and H. Kiesecker**. 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.
175. **Szankowski, I., S. Waidmann, J. Degenhardt and A. Patocchi**. 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.

176. **Szankowski, I., H. Flachowsky, H. Li, H. Halbwirth, D. Treutter, I. Regos, M.V. Hanke, K. Stich and T.C. Fischer**. 2009. Shift in polyphenol profile and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple (*Malus* sp.). Planta, 229: 681-692.
177. **Sule, S., W.S. Kim and K. Geider**. 2002. Transformation of SR1 tobacco and JTE-H apple rootstock with the EPS depolymerase gene from Erwinia amylovora phage. Acta Horticulturae, 590: 407-409.
178. **Swartz, H.J., R. Bors, F. Mohamed and S.K. Naess**. 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.
179. **Swietlik, D., C. Vann, M. Wisniewski, T. Artlip, J.L. Norelli and L. Kochian**. 2007. The effect of transporter genes on zinc stress in apple (Malus x domestica Borkh.). Acta Horticulturae, 738: 345-349.
180. **Tartarini, S. and S. Sansavini**. 2003. The use of molecular markers in pome fruit breeding. Acta Horticulturae, 622:129-140.
181. **Tartarini, S., F. Gennari, D. Pratesi, C. Palazzetti, S. Sansavini, L. Parisi, A. Fouillet, V. Fouillet and C.E. Durel**. 2004. Characterisation and genetic mapping of a major scab resistance gene from the old Italian apple cultivar 'Durello di Forlì'. Acta Horticulturae, 663: 129-133.
182. **Tatum, T., S. Stepanovic, D.P. Biradar, A.L. Rayburn and S.S. Korban**. 2005. Variation in nuclear DNA content in Malus species and cultivated apples. Genome, 48: 924-930.
183. **USDA**. 2007. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. World Markets and Trade: World apple situation. Available at http://www.fas.usda.gov/htp/horticulture/Apples/World_Apple_Situation_053107.pdf
184. **Van Nerum, I., F. Incerti, J. Keulemans, and W. Broothaerts.** 2000. Analysis of self-fertility in transgenic apple lines, transformed with an S-allele in sense or antisense direction. Acta Horticulturae, 538: 625-630.
185. **Vanblaere, Th.** 2011. The development of a cisgenic scab resistant apple cv. Gala. Ph.D thesis. ETH Zurich.
186. **Vanek-Krebitz, M., K. Hoffmann-Sommergruber, MLD. Machado, M. Susani, C. Ebner, D. Kraft, O. Scheiner and H. Breiteneder**. 1995. Cloning and sequencing of Mald1, the major allergen from apple (Malus domestica), and its immunological relationship to Betv1, the major birch pollen allergen. Biochemical and Biophysical Research Communications, 214: 538-551.
187. **Velasco, R. et. al.** 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus* × *domestic*a Borkh). Nature Genetics, 42, 833–839.
188. **Vinatzer, B.A., A. Patocchi, L. Gianfranceschi, S. Tartarini, H.B. Zhang, C. Gessler, 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. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14: 508-514.
189. **Vinatzer, B.A., A. Patocchi, S. Tartarini, L. Gianfranceschi, S. Sansavini and C. Gessler.** 2004. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the Vf scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in Malus germplasm. Plant Breeding, 123: 321-326.
190. **Viss, WJ., J. Pitrak, J. Humann, M. Cook, J. Driver and W. Ream**. 2003. Crown gall resistance transgenic trees that silence Agrobacterium tumefaciens oncogenes. Molecular Breeding, 12: 283-295.
191. **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.
192. **Way, R.D., H.S. Aldwinckle, R.C. Lamb, A. Rejman, S. Sansavini, T. Shen, et al.** 1991. Apples (Malus). In: Moore, J.N., and R. Ballington (eds.) Genetic resources of temperate fruit and nuts, Int. Soc. Wageningen. Acta Horticulturae, 290:1-62.
193. **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.
194. **Welander, M., N. Pawlicki, A. Holefors and F. Wilson**. 1998. Genetic transformation of apple rootstock M26 with rolB gene and its influence on rooting. Journal of Plant Physiology, 53: 371-380.
195. **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.
196. **Wilson, F.M. and D.J. James**. 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.
197. **Williams, E.B. and J. Kuc.** 1969. Resistance in Malus to *Venturia inaequalis*. Annual Review of Phytopathology, 7: 223-246.
198. **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.
199. **Xu, M.L., J. Song, Z. Cheng, J. Jiang and S.S. Korban**. 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.
200. **Xu, M.L. and S.S. Korban**. 2002. A cluster of four receptor-like genes resides in the Vf locus that confers resistance to apple scab disease. Genetics, 162: 1995-2006.
201. **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.

202. **Yao, J.L., D. Cohen, R. Atkinson, K. Richardson and B. Morris**. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar 'Royal Gala'. Plant Cell Reports, 14: 407-412.
203. **Yao, J.L., D. Cohen, R. Van den Brink and B. Morris**. 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.
204. **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.
205. **Yepes, L.M. and H.S. Aldwinckle**. 1994. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 37: 257-269.
206. **Yepes, L.M. and H.S. Aldwinckle**. 1993. Pathogenesis of Venturia inaequalis on shoot tip cultures and on greenhouse grown apple cultivars. Phytopathology, 83:1155-1162.
207. **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.
208. **Zhu, L.H., and M. Welander**. 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.
209. **Zhu, L.H., A. Ahlman, X.Y. L and M. Welander**. 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.
210. **Zhu, L.H., A. Holefors, A. Ahlman, Z.T. Xue and M. Welander**. 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.
211. **Zhu, L.H., X.Y. Li, A. Ahlman, Z.T. Xue and M. Welander**. 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.
212. **Zhu, L.H., X.Y. Li and M. Welander**. 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.
213. **Zhu, L.H., X.Y. Li, M. Nyqvist and M. Welander**. 2007. Improvement of rooting and reduction in plant height in apple and pear through gene transfer. Acta Horticulturae, 738: 353-360.
214. **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.

Received: July 1, 2014; Accepted: September 22, 2014

تاريخ الاستلام: 2014/7/1؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2014/9/22