



Elma da Genetik Transformasyon Alanındaki Gelişmeler

Fatih Ali CANLI^{1*} Mustafa PEKTAŞ² Nurettin TEMURTAŞ²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, 32260, Isparta, TÜRKİYE

²Egirdir Bahçe Bitkileri Araştırma Enstitüsü, Egirdir, Isparta, TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar
e-posta: canlifat@ziraat.sdu.edu.tr

Geliş Tarihi : 24.11.2009
Kabul Tarihi : 16.12.2009

Özet

Meyve ağaçlarının ıslahı uzun gençlik kısırlık dönemleri, heterozigot yapıları ve karmaşık döllenme biyolojilerinden dolayı zor bir işlemdir. Genetik transformasyon teknolojisi bu bitkilerde ıslah süresinin kısaltılması ve çok yıllık bitkilerin diğer özelliklerini etkilemeden sadece bir karakter yönünden geliştirilebilmelerine olanak sağlayabilmektedir.

Elmada ilk genetik transformasyon 1989 yılında başarılmış ve bu güne kadar 30 a yakın elma çeşidine gen aktarılmıştır. Elmada karaleke ve ateş yanığı gibi hastalıklara dayanım, zararlılara dayanım, anaçların çeşitli özelliklerinin geliştirilmesi ve meyve kalitesinin iyileştirilmesi gibi önemli özelliklerde genetik transformasyonla kayda değer başarılar elde edilmiştir. Bununla birlikte, diğer meyve türlerinde olduğu gibi elmada da gen transferi çalışmaları daha çok bu türlerin rejenerasyon kabiliyetlerinin düşük olmasından dolayı otsu türlerden geri kalmıştır. Ayrıca elmada gen transfer frekansı otsu bitkilerle kıyaslandığında oldukça düşüktür. Elma da gen transfer frekansının yükseltilmesi biyoteknolojinin getirdiği imkânlardan daha iyi faydalanılması için gereklidir.

Meyve türleri içerisinde elma en çok ilaçlama yapılan türlerden birisi olması nedeniyle, bu türde genetik transformasyon yolu ile biyotik stress faktörlerine karşı daha toleranslı çeşitlerin geliştirilmesi üreticiler, tüketiciler ve de çevre açısından büyük önem taşımaktadır. Bu derlemede elmanın gen transfer teknolojisindeki gelişmeler, sorunlar ve araştırmaların gelecekteki eğilimleri irdelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Genetik mühendisliği, hastalıklara dayanım, karaleke, ateş yanığı, biyotik stres.

Advances in Genetic Transformation of Apple

Abstract

Breeding fruit trees is constrained by their long juvenile period, high level of heterozygosity and complex reproductive biology. Genetic transformation technology emerged as a useful tool for shortening breeding time in these plants and also allowed the improvement of perennials by only one single character without changing their phenotype.

The first successful genetic transformation of apple was reported in 1989 and since then about 30 different apple cultivars have been transformed. There have been considerable successes in the development of disease resistant apples [such as scab and fire blight resistance], insect resistance apples, in the modification of rootstock characteristics, and in the improvement of fruit characteristics by using genetic transformation. However, like most other perennials, genetic transformation studies in apple lacked behind as compared to those of herbaceous species due mostly to its low regeneration capacity. The transformation efficiency in apple is also very low as compared to those of herbaceous ones. The improvement of genetic transformation frequency in apple is necessary to make use of the potentials offered by the biotechnology.

Besides, apple is among the fruits that are subjected to many chemical applications; therefore the development of new apples resistant to biotic stress factors is very important for growers, consumers and the environment. In this review, progress in genetic transformation of apple, current problems and future prospective were examined.

Key words: Genetic engineering, disease resistance, scab, fire blight, biotic stress

GİRİŞ

Ilıman iklim meyve türlerinden olan elma (*Malus communis* L.) *Rosales* takımı, *Rosaceae* familyası, *Pomoideae* alt familyasının *Malus* cinsine aittir. Dünya üzerinde çok geniş alanlara yayılmış ve pek çok bölgeye kolay adapte olabilmiş bir meyve türüdür. Dünya üzerinde 6000 kadar çeşidi olan elmanın ülkemizde 450–500 çeşidinin olduğu bilinmektedir [38]. Orijini, Anadolu da dâhil olmak üzere Güney Kafkasya'ya kadar uzanan bir coğrafyayı içeren elmanın çok değişik bölgelerde geniş plantasyonları bulunmaktadır [40].

Dünyada geniş bir üretim [65.970.706 ton] potansiyeli olan elma, ülkemizde [2.457.845 ton] de en fazla yetiştiriciliği yapılan meyve türlerinden biridir. Türkiye üre-

tim bakımından Çin, ABD, İran'dan sonra 4. sırada yer almakta [3], fakat birim alandan alınan verim ve dışsattım miktarları bakımından istenen düzeyin çok altında kalmaktadır [40]. Elma dış satımımızın yok denecek düzeyde olmasının başlıca nedeni, dış pazarın talep ettiği çeşitlerle ve arzu ettiği yeme kalitesinde bir üretimin yapılamamasıdır. Elmada, tüketiciler tat ve yeme kalitesinin yanı sıra, görünüş ve yapısal kaliteye de önem vermektedirler.

Bitkilere gen aktarma çalışmaları yüzyıllardır bitki ıslahı adı altında geleneksel yöntemlerle yapılmaktadır [35]. Klasik ıslah metodları, üstün niteliklerin aynı bitki- de toplanmasını sağlayacak şekilde melezlemeler yapılması ve elde edilen döllere arzu edilenlerin seçimi, istenmeyen tiplerin elemine edilmesini içermektedir.

Günümüz bitki ıslahında halen geleneksel yöntemler etkin bir şekilde kullanılmakta ise de geniş bitki popülasyonlarına ihtiyaç duyulması ve dolayısıyla arazi, zaman, işgücü ve finansman ihtiyacını artırması gibi olumsuz yönleri bulunmaktadır. Özellikle ılıman iklim meyvelerinde klasik ıslah metodlarının kullanımı, bu türlerin uzun gençlik kısırlığı, karmaşık kalıtım mekanizmaları ve yüksek heterozigot yapıları nedeniyle zor bir işlemdir. Yine klasik bitki ıslahı ile istenen özelliklerin yanında istenmeyen özelliklerde kendisini göstermektedir. Belirli özelliklere sahip bir çeşidin, diğer özelliklerinde değişiklik yapmadan belli bir karakter yönünden geliştirilmesi, ancak genetik transformasyon ile sağlanabilmektedir [14, 56].

Genetik transformasyon, klasik ıslah metodlarından farklı olarak, sadece kazandırılmak istenen karakterin herhangi bir organizmadan- taksonomik sınıfları dikkate almadan -gen olarak izole edilmesini ve sadece istenilen genin bitkilere aktarılabilmesini mümkün hale getirmiştir. Bu işlemin laboratuvar koşullarında, daha kısa sürede ve mevsime bağlı olmaksızın istenilen bitkiye uygulanabilir olması da biyoteknolojik uygulamaların yararlılığını artırmaktadır. Son yıllarda hızla gelişen modern biyoteknoloji metodları ile bitki çeşitleri kolaylıkla geliştirilebilmekte yapıları değiştirilmekte ve bitkilere hastalık ve zararlılara dayanıklılık, herbisitlere dayanıklılık, raf ve depo ömrünün uzatılması, abiotik stres koşullarına dayanıklılık, köklenme kabiliyetinin geliştirilmesi ve gençlik kısırlığı döneminin kısaltılması gibi özellikler kazandırılmaktadır.

Elmada Yapılan Gen Transfer Çalışmaları

İlk transgenik elma çeşidinin [21] bildirilmesinin ardından 20 den fazla elma çeşidine başarılı şekilde gen aktarımı yapılmıştır. Aktarılan özellikler arasında karalekeye dayanıklılık (*pinB*, *HcrVf2*), ateş yanıklığına dayanıklılık (*AMPs*, *attacin E*, *MB39*), köklenme kabiliyetinin artırılması (*rolA*, *rolB*, *rolC*), zararlılara karşı dayanıklılık kazandırılması, herbisite dayanıklılık, kendine verimlilik ve kaliteye yönelik çalışmalar (*PPO*, *ACO*) bulunmaktadır. Rapor edilen transgenik elma çeşitleri arasında Greensleeves [21,22,15,32], Delicious [50], Royal Gala [54], Golden Delicious [42], Marshall McIntosh [8], McIntosh Wijcik [48], Gala [49], Elstar [51], Fuji [46] ve anaçlardan M26 [27,28,19,59] sayılabilir.

Herhangi bir gen aktarım sisteminin esasını, tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının kalıcı olarak entegre edilmesi ve o hücrelerden yeni bitkilerin elde edilmesi oluşturmaktadır [39]. Günümüzde meyve ağaçlarında transformasyon için tercih edilen sistem, *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımıdır [47]. *Agrobacterium* yardımı ile gen aktarım yönteminin, diğer gen aktarım yöntemlerine nazaran daha kolay, daha ucuz olması ve başarı şansının da daha yüksek olması

nedeniyle bu yöntem cazip hale gelmiştir. Elma türünde transformasyonda başarı, transformasyon etkinliğine ve çeşide bağlı olarak % 1,5 ile % 8,7 arasında gerçekleşmektedir [8,46,54]. Bu frekans aralığı ise transformasyon çalışmalarında rutin olarak çok sayıda bitki elde etmek için yeterli seviyede görünmemektedir. Bu oran asetosiringon konsantrasyonu, donör bitkinin yaşı, ko-kültür süresi ve bu süre içinde eksplantta meydana getirilen yaralamalar ve genotip gibi faktörlerden etkilenmektedir. Gen aktarımı yapılan hücrelerin rejenerasyon yeteneği, transformasyon başarısını etkileyen en önemli faktörlerden birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Eksplantın, *Agrobacterium* ile uzun bir süre teması (ko-kültür) transformasyon frekansını arttırmasına rağmen, bu sürenin 3-4 günü geçmesi durumunda bakteri irkinin büyümesi kontrolden çıkarak olumsuz neticeler doğurabilmektedir [12, 1, 41].

Agrobacterium ırkı *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımında başarıyı etkileyen önemli bir faktördür [13]. De Bondt ve ark. [1994]'e göre Jonagold elma çeşidinde *Agrobacterium* EHA105 VE LBA 4404 ırkları için 4 günlük ko-kültür periyodu, 2 ya da 3 günlük periyoda göre daha etkiliyken; *Agrobacterium* C58C1 ırkı için 5 günlük bir ko-kültür süresine gereksinim duyulmaktadır [16,47]. *Vir* geninin uyarılmasında, pH, ısı, osmotik basınç gibi çevresel faktörlerin etkisi de göz önünde bulundurulmalıdır [2].

Ko-kültürasyon periyodunun sonunda eksplant, antibiyotik içeren seçici bileşiklerle aynı rejenerasyon ortamına konulmaktadır. Ortamdaki antibiyotik bakterinin aşırı büyümesini engellerken, seçici bileşik ise yalnızca gen aktarılmış hücrelerin yaşamasına izin vermektedir. *Agrobacterium* enfektesi çoğunlukla bitkilerin yaralanma yerlerinde yani fenolik bileşiklerin salgılandıkları yerde olur. Asetosiringon gibi fenolik bileşiklerin kültür ortamına eklenmesiyle, virülens genin aktivitesi uyarılabilir. Asetosiringon'un transformasyondaki bu etkisi, farklı meyve türleri için tanımlanmıştır [12,22,41].

Walendar [1988], yaprak üst [adaxial] yüzeyinin rejenerasyon ortamına temasının, morfogenezde bir artış sağladığını gözlemiş ve palisat parankima hücrelerinde bölünmenin aktive olduğunu ve ortamdaki mineral maddelere daha iyi yanıt verdiğini ileri sürmüştür [52]. Yine bazı araştırmacılar, yaprak alt ve üst yüzeyinin rejenerasyon ortamına teması, ko-kültür periyodu ve yaprak oryantasyonlarının etkilerini araştırmışlardır [37,51]. Donör bitkinin yaşının da transformasyon etkinliğinde rol oynadığı düşünülmektedir. De Bondt ve ark. [1994, 1996], Jonagold elma çeşiti için transformasyonda eksplant olarak kullanılan sürgün yaşının, anahtar faktör olabileceğini bildirmiş [16,17]. Yaprak eksplantında yapılan yaralama transformasyon etkinliğini etkileyen bir diğer faktör olarak karşımıza çıkmaktadır [47].

Ticari elma bahçelerinde en tahripkâr hastalık, *Venturia inaequalis*'in neden olduğu karaleke hastalığıdır. Bu hastalık, ağacın yapraklarında ve meyvelerinde zarar ya-

Çizelge 1. Elmada (*Malus domestica* L.) yapılmış gen transfer çalışmaları

Çeşit	Gen	Karakter	Kaynak
Jonagold	<i>bar</i>	'Basta' herb. dayanım	[17]
	<i>Rs-AFP2 AMP1</i>	Antimikrobiyal-Antifungal aktivite	[17]
Fuji	<i>AMPs</i>	Antifungal aktivite	[33]; [34]
Galaxy	<i>attE MpNPR1</i> <i>pinB</i>	Ateş yanıklığına dayanım Karalekeye dayanım	[27], [19],[20]
	<i>Ech42</i> <i>nag70</i>	Karalekeye dayanım	[18]
Ariane	<i>pinB</i>	Karalekeye dayanım	[20]
Gala	<i>Hcrvf2</i>	Karalekeye dayanım	[49];[6]
Elstar	<i>S3 RNase</i>	Kendine verimlilik	[11]
Greensleeves	<i>ACC synthase</i> <i>ACC oxidase</i>	Depolama ömrü	[21], [22], [15]
	<i>HcrVf2</i> <i>streptavidin</i>	Karalekeye dayanım İnsektisite dayanım	
Royal Gala	<i>acetolactate synthase</i> <i>cecrobin MB39</i> <i>polygalacturonases</i>	Herbisite dayanım Ateş yanıklığına dayanım Meyve kalitesi	[54]; [29]; [5]; [6]
Marshall McIntosh	<i>exochitinase</i>	Karalekeye dayanım	[9];[10]
Florina	<i>rolB</i>	Kök gelişimi	[44]
Orin	<i>S6PDH</i>	Tuza tolerans	[26]
Elstar	<i>Vst</i>	Kuru madde içeriği	[51]
Holsteiner Cox	<i>Vst1</i>	Kuru madde içeriği	[51]; [18]
M26	<i>gai</i>	Marker gen	[59]
M26	<i>attE</i>	Ateş yanıklığı day.	[27]
M26	<i>A.rizogenes</i> A4	Kök gelişimi	[28]
M26	<i>Ech42 ve nag70</i>	Karalekeye dayanım	[19]
M26	<i>rolA</i>	Gövde büyümesinin azaltılması	[25]; [57]
M26	<i>rolB</i>	Kök gelişimi	[53]; [57]
M26	<i>MpNPR1</i> <i>attE</i>	Ateş yanıklığına dayanım	[31]; [36]
Alnarp 2	<i>phyB</i>	Bodur büyüme	[59]
M9/29	<i>rolB</i>	Köklenme kabiliyeti	[59]; [45]
Jork 9	<i>rolB</i>	Köklenme kabiliyeti	[45]
Maruba-kaidou	<i>rolC</i>	Bodur büyüme	[24]
Makino	<i>rolC</i>	Bodur büyüme	[55]

parak verimin düşmesine yol açmaktadır. 'Gala', 'McIntosh', 'Galaxy' gibi karaleke hastalığına hassas olan çeşitlere genetik transformasyon yoluyla hastalığa dayanım geni aktarılmıştır [49,6,9,10,27,19,20]. Bunun yanı sıra 'M26', 'M7', 'A2', 'Jork9' ve 'Marubakaidou' gibi anaçlarda da transformasyon yoluyla köklenme zorlukları aşılmış, böylece hem üretkenlikleri artırılmış, hem de bodurluk sağlanmıştır [28,25,53,59,45,24,55]. Transgenik 'Greensleeves' elma çeşidinin etilen sentezi bloke edilerek raf ve depolama ömrünün artırılması da yapılan çalışmalar arasındadır (Çizelge 1) [21,22,15].

SONUÇ

1980'lerin sonunda elde edilen ilk transgenik meyveyle birlikte genetik transformasyon çalışmalarında büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Ancak meyve türleri endüstriye dönük sağlanan ilerleme, tek yıllık transgenik ürünlere kıyasla çok gerilerde kalmıştır. Bunun çeşitli sebepleri vardır. Çoğu meyvenin yıllar süren gençlik kısırlık dönemi, *in vitro* rejenerasyon kabiliyetlerinin düşük olması, çoğu meyve türü için tamamlanmış gen haritalarının ve tanımlanıp klonlanmış gen bilgilerinin otsu bitkilere nazaran daha yavaş gelişmesi sayılabilir.

Transform olan bitkilerin seçimine izin vermesi nedeniyle, transgenik bitkilere antibiyotik direnç genleri aktarılmaktadır. Transfer edilen genlerin hedeflenmeyen organizmaları etkilemelerinden kaçınılmalıdır [43]. Transgenik ürünleri tüketen canlıların sindirim sisteminde bulunan bakterilerin, transgenik ürünlerin yapısında bulunan antibiyotik direnç genini alması ihtimal dâhilindedir. Çünkü bakteriler arasında doğal yollarla genetik materyal değişimi yapıldığı bilinmektedir. İnsan ve hayvanların sindirim sisteminde bulunan bakterilerin, transgenik ürünlerin tüketilmesi neticesinde antibiyotiğe direnç özelliği kazanabilme ihtimaline karşın pozitif seleksiyon markerleri gibi alternatif yöntemler kullanılmaya başlanmıştır.

Alternatif olarak *pmi* [phosphomannose-isomerase] geni kullanılarak transform olan bitkiler seçilebilme ve yine cre/lox sistemleri gibi seleksiyon markerleri geliştirilmektedir. 'M. 26' elma anacının ve 'Galaxy' elma çeşidinin transformasyonu *pwatt35Sgus-intron* ve *pin2MpNPR1* yardımı ile kanamycin dayanıklılık genini kullanılmaksızın başarı ile yapılmıştır [31].

1990'lı yıllardaki herbisitlere, hastalık ve zararlılara dayanıklı bitki üretme amaçlı olan ağırlıkla üreticilere yönelik gen transfer çalışmalarının, yakın gelecekte ağırlıkla stres direnci [özellikle kurağa dayanıklılık [23]], kalitenin iyileştirilmesi ve biyomolekül üretimi gibi konuları da kapsayacak şekilde genişleyeceği beklenmektedir. Biyotik ve abiyotik stres koşullarına tolerans, ana özellikleri gibi karakterlerin de geleceğe yönelik çalışmalarında önemli rol oynayacağı görülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Ainsley PJ, Collins GG, Sedgley M, 2002. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated gene transfer and the selection of transgenic calli in paper shell almond [*Prunus dulcis* Mill.]. J Hort Sci Biotech 76: 522–528.
- [2]. Alt-Mörbe J, Kühlmann H, Schröder J, 1989. Differences in induction of Ti plasmid virulence genes *virG* and *virD* and continued control of *virD* expression by four external factors. Mol Plant-Microbe Interact 2: 301–308.
- [3]. Anonim, 2009a. <http://www.fao.org>.
- [4]. Anonim, 2009b. <http://www.isaaa.org>
Özet 39., Brief 39.
- [5]. Atkinson RG, Schroeder R, Hallett IC, Cohen D, MacRae EA, 2002. Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. Plant Physiol 129:122–133.
- [6]. Belfanti E, Silfverberg-Dilworth E, Tartarini S, Patocchi A, Barbieri M, Zhu J, Vinatzer BA, Gianfranceschi L, Gessler C, Sansavini S, 2004. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. P Natl Acad Sci USA 101: 886–890.
- [7]. Bolar JP, Norelli JL, Harman GE, Brown SK, Aldwinckle HS, Altman A, Ziv M, Izhar S, 1999. Expression of fungal chitinolytic enzymes in transgenic apples confers high levels of resistance to scab. Curr Plant Sci Biotechnol Agric 36:465–468.
- [8]. Bolar JP, Brown SK, Norelli JL, Aldwinckle HS, 1999. Factors affecting the transformation of Marshall McIntosh apple by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue Organ Cult 55:31–38
- [9]. Bolar JP, Norelli JL, Wong KW, Hayes CK, Harman GE, Aldwinckle HS, 2000. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. Phytopathology 90:72–77.
- [10]. Bolar JP, Norelli JL, Wong KW, Hayes K, Harman GE, Brown SK, Aldwinckle HS, 2001. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* [*T.harzianum*] against the pathogenic fungus [*Venturia inaequalis*] in transgenic apple plants. Transgenic Res 10:533–543.
- [11]. Broothaerts W, Keulemans J, Van Nerum I, 2004. Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing. Plant Cell Rep 22: 497–501.
- [12]. Cervera M, Pina JA, Juarez JA, Navarro L, Pena L, 1998. *Agrobacterium* mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. Plant Cell Rep 18: 271–278.
- [13]. Cervera M, Lopez MM, Navarro L, Pena L, 1998b. Virulence and supervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants. Physiol Molec Plant Pathol 52: 67–78.
- [14]. Canlı FA, Tian L, 2009. Regeneration of adventitious shoots from mature stored cotyledons of Japanese plum [*Prunus salicina* Lindl]. SciHort 120: 64-69.
- [15]. Dandekar AM, Teo G, Defilippi BG, Uratsu SL, Passey AJ, Kader AA, Stow JR, Colgan RJ, James DJ [2004] Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. Trans Res 13:373–384
- [16]. De Bondt A, Eggermont K, Druart P, De Vil M, Goderis I, Vanderleyden J, Broekaert WF, 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple [*Malus domestica* Borkh.]: an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. Plant Cell Rep 13:587–593.
- [17]. De Bondt A, Eggermont K, Penninckx I, Goderis I, Broekaert WF, 1996. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple [*Malus domestica* Borkh.]: an assessment of factors affecting regeneration of transgenic. Plant Cell Rep 15:549–554.
- [18]. Degenhardt J, Al-Masri AN, Kürkcüoğlu S, Szankowski I, Gau AE, 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.
- [19]. Faize M, Malnoy M, Dupuis F, Chevalier M, Parisi L, Chevreau E, 2003. Chitinases of *Trichoderma atroviride* induce scab resistance and some metabolic changes in two cultivars of apple. *Phytopathology* 93:1496–1504.
- [20]. Faize M, Sourice S, Dupuis F, Parisi L, Gautier MF, Chevreau E, 2004. Expression of wheat puroindoline-b reduces scab susceptibility in transgenic apple [*Malus domestica* Borkh.]. *Plant Sci* 167: 347–354.
- [21]. James DJ, Passey AJ, Barbara DJ, Bevan MW, 1989. Genetic transformation of apple [*Malus pumila* Mill.] using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Rep* 7:658–661.
- [22]. James DJ, Uratsu SL, Cheng J, Negri P, Viss P, Dandekar AM, 1993. Conditions that induce *Agrobacterium Vir* genes also enhance apple cell transformation. *Plant Cell Rep* 12:559–563.
- [23]. James C, 2008. International Service for the Acquisition of Agri-Biotechnology Applications ISAAA.
- [24]. Igarashi M, Ogasawara H, Hatsuyama Y, Saito A, Suzuki M, 2002. Introduction of *rolC* into Marubakaidou [*Malus prunifolia* Borkh.var. ringo Asami Mo 84-A] apple rootstock via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci* 163:463–473.
- [25]. Holfors A, Xue ZT, Welander M, 1998. Transformation of the apple rootstock M26 with the *rolA* gene and its influence on growth. *Plant Sci* 136:69–78.
- [26]. Kanamaru N, Ito Y, Komori S, Saito M, Kato H, Takahashi S, Omura M, Soejima J, Shiratake K, Yamada K, Yamaki S, 2004. Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA: switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. *Plant Sci* 167:55–61.
- [27]. Ko K, Norelli JL, Reynoird JP, Borejsza-Wysocka E, Brown SK, Aldwinckle HS, 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. *Biotechnol Lett* 22: 373–381.
- [28]. Lambert C, Tepfer D, 1992. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. *Theor Appl Genet* 85:105–109.
- [29]. Liu Q, Ingersoll J, Owens L, Salihx S, Meng R, Hammerschlag F, 2001. Response of transgenic Royal Gala apple [*Malus × domestica* Borkh.] shoots carrying a modified cecropin MB39 gene, to *Erwinia amylovora*. *Plant Cell Rep* 20:306–312.
- [30]. Maheswaran G, Welander M, Hutchinson JF, Graham MW, Richards D, 1992. Transformation of apple rootstock ‘M26’ with *Agrobacterium tumefaciens*. *J Plant Physiol* 39:560–568.
- [31]. Malnoy, M., Borejsza-Wysocka, E.E., Abbott, P., Lewis, S., Norelli, J.L., Flaishman, M., Gidoni, D., Aldwinckle, H.S. 2007. Genetic transformation of apple without use of a selectable marker. *Acta Horticulturae*. 738:319-322.
- [32]. Maximova SN, Dandekar AM, Guiltinan MJ, 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 Mol Biol* 37:549–559.
- [33]. Murata M, Haruta M, Murai N, Tanikawa N, Nishimura M, Homma S, Itoh Y, 2000. Transgenic apple [*Malus × domestica*] shoot showing low browning potential. *J Agric Food Chem* 48:5243–5248
- [34]. Murata M, Nishimura M, Murai N, Haruta M, Homma S, Itoh Y, 2001. A transgenic apple callus showing reduced polyphenol oxidase activity and lower browning potential. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:383–388.
- [35]. Murray DR, 1993. Breeding plants for the twenty-first century. In: Murray DR. [ed], *Advance Methods in Plant Breeding ve Biotechnology*, C.A.B. Internatiol, Midsomer Norton, Bath.
- [36]. Norelli JL, Aldwinckle HS, Destefano Beltran L, Jaynes JM, 1994. Transgenic ‘Malling 26’ apple expressing the *attacin E* gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* 77:123–128.
- [37]. Norelli J, Mills JA, Aldwinckle H, 1996. Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *HortSci* 31:1026–1027.
- [38]. Özbek S, 1978. Özel Meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay. No:128, Ders Kitabı, Adana.
- [39]. Özcan S, Özgen, M, 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. Kükem Dergisi, 1:69–95.
- [40]. Özgün Ş, Dolunay, E. M, Öztürk, G, Karakuş, A, Kankaya A, Küden A, 2004. Elma Adaptasyon Denemesi 1. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Isparta, 54s.
- [41]. Petri C, Albuquerque N, Garcí a-Castillo S, Egea J, Burgos L, 2004. Factors affecting gene transfer efficiency to apricot leaves during early *Agrobacterium*-mediated transformation steps. *J Horti Sci Biotech* 79: 704–712.
- [42]. Puite KJ, Schaart JG, 1996. Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden

- Delicious and Elstar via an *Agrobacterium*-mediated transformation method. *Plant Sci* 119:125–133.
- [43]. Puterka GJ, Bocchetti C, Dang P, Bell RL, Scorza R, 2002. Pear transformed with a lytic peptide gene for disease control affects nontarget organism, Pear Psylla [Homoptera: psyllidae]. *J Econ Entomol* 95: 797–802.
- [44]. Radchuk VV, Korkhovoy VI, 2005. The *rolB* gene promotes rooting in vitro and increases fresh root weight in vivo of transformed apple scion cultivar ‘Florina’. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 81:203–212.
- [45]. Sedira M, Holefors A, Welander M, 2001. Protocol for transformation of the apple rootstock Jork 9 with the *rolB* gene and its influence on rooting. *Plant Cell Rep* 20:517–524.
- [46]. Seong ES, Song KJ, Jegal S, Yu CY, Chung IM, 2005. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect *Agrobacterium*- mediated apple transformation. *Plant Growth Regul* 45:75–82.
- [47]. Seong ES, Song KJ, 2008. Factors affecting the early gene transfer step in the development of transgenic ‘Fuji’ apple plants. *Plant Growth Regul* 58:89-95.
- [48]. Song KJ, Ahn SY, Hwang JH, Shin YU, Park SW, An G, 2000. *Agrobacterium* mediated transformation of McIntosh Wijcik apple. *J Kor Soc Hort Sci* 41:541–544.
- [49]. Song KJ, Seong ES, Hwang JH, Jegal S, Cha JE, Kim JH, Shin YU , 2001. Factors affecting the *Agrobacterium*-mediated transformation of Gala apple [In Korean]. *Kor J Plant Tissue Cult* 28: 221–225.
- [50]. Sriskandarajah S, Goodwin PB, Speirs J, 1994. Genetic transformation of the apple cultivar Delicious via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 36: 317–329.
- [51]. Szankowski I, Briviba K, Fleschhut J, Schonherr J, Jacobsen H-J, Kiesecker H, 2003. Transformation of apple [*Malus domestica* Borkh.] with the stilbene synthase gene from grapevine [*Vitis vinifera* L.] and a PGIP gene from kiwi [*Actinidia deliciosa*]. *Plant Cell Rep* 22: 141–149.
- [52]. Welander M, 1988. Plant regeneration from leaf and segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. *J Plant Physiol* 132: 738–744.
- [53]. Welander M, Pawlicki N, Holefors A, Wilson F, 1998. Genetic transformation of the apple rootstock M26 with the *Ro/B* gene and its influence on rooting. *J Plant Physiol* 153: 371–380.
- [54]. Yao J, Cohen D, Atkinson R, Richardson K, Morris B, 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Rep* 14: 407–412. 59.
- [55]. Zhang, Z., Sun, A., Sheng, B., Yao, Q., Cheng, Z., 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of the apple rootstock Malus Mikromalus Makino with the *rolC* gene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 42:491-497.
- [56]. Zhu LH, Li XY, Ahlman A, Welve er M, 2003. The rooting ability of the dwarfing pear rootstock BP10030 [*Pyrus communis*] was significantly increased by introduction of the *rolB* gene. *Plant Sci* 165: 829-835.
- [57]. Zhu LH, Welve er M, 2000. Growth characteristics of the untransformed ve transformed apple rootstock M26 with *rolA* ve *rolB* genes under steady-state nutrient supply conditions. *Acta Hort.* 521: 139-146.
- [58]. Zhu LH, Li XY, Ahlman A, Welander M, 2003. The rooting ability of the dwarfing pear rootstock BP10030 [*Pyrus communis*] was significantly increased by introduction of the *rolB* gene. *Plant Sci* 165: 829–835.
- [59]. Zhu LH, Welander M, 2001. Growth characteristics of apple cultivar Gravenstein plants grafted onto the transformed rootstock M26 with *rolA* and *rolB* genes under non-limiting nutrient conditions. *Plant Sci* 147: 75–80.