



III KONGRES  
BIOTECHNOLOGII



## Modyfikacja genetyczna roślin sadowniczych – kierunki, sukcesy i problemy

Małgorzata Korbin

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

### Genetic modification of fruit plants – directions, successes and obstacles

#### Summary

Genetically engineered plant products are entering their twelfth year of significant presence on the world's marketplace. Most of them represent major agronomic crops and in spite of the genetic engineering potential for plant improvement, the technology has not been widely exploited in fruit plants. There are three reasons of this situation: economical relations (high cost of the study in comparison with low demand for the products), public opinion concerning "safe food", and real scientific obstacles such as problems with successful plant transformation or post-transformational regeneration). Despite those facts, studies on transformation of fruit and ornamental species are conducted in many laboratories in the world, and their directions can be summarized as following: a) improvement of pest-resistance (fire blight and scab resistant apple; virus-resistant plum, papaya, citrus pest-resistant date palm, pineapple, almond, passion fruit, olive), b) enhanced tolerance to abiotic stress with dehydrin protein genes and by over-expression of antioxidant enzyme (APX or SOD) genes; c) improvement of fruit quality (health-benefits compounds) based on genomics and proteomics. Due to consumers and growers concerns, considerable effort is put into developing a suite of strategies to eliminate non-acceptable genes (marker genes after plant selection by site-specific recombination, homologous, transposition, and original transgene from fruits by the use of GM-rootstocks and non-fruit-specific promoters) and to avoid uncontrolled gene transfer.

#### Adres do korespondencji

Małgorzata Korbin,  
Instytut Sadownictwa  
i Kwiaciarstwa,  
ul. Pomologiczna 18,  
96-100 Skierniewice;  
e-mail:  
mkorbin@insad.pl

**biotechnologia**

2 (81) 9–19 2008

#### Key words:

fruit plants, genetic engineering, directions of transformation, commercialization of GM-fruit plants.

## 1. Wprowadzenie

Rośliny sadownicze są niewdzięcznym obiektem dla inżynierii genetycznej. Ze względu na stosunkowo długi cykl rozwojowy uzyskania transgenicznej rośliny z tej grupy wymaga znacznie dłuższego czasu niż ma to miejsce w przypadku modelowych roślin zielnych, a występowanie okresu juvenilnego typowego dla sadowniczych roślin drzewiastych dodatkowo opóźnia ocenę fenotypową uzyskanych transformantów (1). Ponadto owoce, będące naturalnym źródłem wielu substancji prozdrowotnych, zawierają również alergeny, co może wpływać na zafalszowanie opinii o produkcie modyfikacji (2). Względy ekonomiczne (wysoki koszt badań), społeczne (opinia publiczna i „zdrowa” żywność, konserwatywny rynek) oraz trudności natury badawczej (np. niska efektywność regeneracji posttransformacyjnej roślin niektórych gatunków) sprawiają, że rośliny sadownicze stanowią poniżej 1% upraw transgenicznych, testowanych w warunkach polowych. Pomimo tych niedogodności prace nad modyfikacją genetyczną roślin sadowniczych są prowadzone w wielu ośrodkach naukowych od końca lat 80. ubiegłego wieku i nadal cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem. Podczas Międzynarodowego Sympozjum Biotechnologii Roślin Sadowniczych Klimatu Umiarkowanego i Gatunków Tropikalnych w 2005 r. sześćdziesiąt osiem spośród 165 przedstawianych prezentacji dotyczyło GMO, a wyniki badań były omawiane przez naukowców z 22 państw.

Badania nad roślinami sadowniczymi GM są realizowane w dwóch płaszczyznach. Obok badań podstawowych, ukierunkowanych na wykorzystanie zjawiska transgenezy do rozpoznania mechanizmów sterujących procesami życiowymi roślin sadowniczych, prowadzone są badania mające na celu udoskonalanie roślin z tej grupy. Prace te są obecnie realizowane z uwzględnieniem wymogów konsumenta i obejmują m.in. wytwarzanie udoskonalonych roślin bez genów markerowych, kodujących oporność na antybiotyki, pozyskiwanie owoców nie zawierających transgenów czy zastosowanie do modyfikacji transgenów pochodzących z biorcy.

Wprowadzenie nowych, bezpiecznych strategii inżynierii genetycznej sprawiło, że transgeniczne rośliny sadownicze zaczynają być uznawane jako znaczące źródło zmienności dla hodowli twórczej w zrównoważonym rolnictwie (3).

## 2. Kierunki modyfikacji genetycznych roślin sadowniczych

Badania nad transformacją roślin sadowniczych rozpoczęto na przełomie lat 80. i 90. ubiegłego wieku. Ich przedmiotem były m.in. jabłoń (1,4), truskawka (1,5), papaja (6), cytrusy (7), śliwa (8), winorośl (9), kiwi (10) i żurawina (11). Pierwsze prace z dziedziny inżynierii genetycznej roślin sadowniczych poświęcone były optymalizacji metodyki transformacji i posttransformacyjnej regeneracji roślin oraz adaptacji metod do szerokiego spectrum odmian (12). W przypadku roślin niektórych gatunków prace te są wciąż kontynuowane, głównie ze względu na nieefektywny system



regeneracji. Na przykład, w rodzaju *Ribes* zregenerowane rośliny uzyskano tylko w pojedynczych odmianach (13). Uzyskanie zregenerowanych transformantów okazało się także bardzo trudne w przypadku brzoskwini (*Prunus persica* L) (14), rośliny stosunkowo łatwo transformowanej zarówno przy użyciu metod bezpośrednich jak i pośrednich (15-17). Udoskonalanie metodyk transformacji i optymalizacja warunków regeneracji jest nadal przedmiotem badań nad roślinami migdałowca (*Amygdalus* sp.), moreli (*Prunus Armeniach* L), ananasa (*Ananas* sp.), męczennicy (*Passiflora* sp. L.) i oliwki (*Olea* sp. L) (18-23).

Głównym celem modyfikacji genetycznej roślin sadowniczych było i nadal jest ich udoskonalanie. Obejmowało ono pozyskiwanie genotypów odpornych na choroby o dużym znaczeniu ekonomicznym (*gros* transformowanych roślin), zwiększenie tolerancji na niektóre czynniki abiotyczne oraz poprawa jakości rośliny (m.in. zwiększenie zawartości substancji prozdrowotnych, ułatwienie przechowywania owoców, skrócenie cyklu juvenilnego oraz przyspieszenie procesu ukorzenia).

## 2.1. Odporność na choroby

Spektrum genów stosowanych do transformacji roślin sadowniczych w celu uzyskania genotypów odpornych na choroby wywoływane przez organizmy patogeniczne było szerokie, a strategie stosowane do realizacji tego celu zmieniały się w czasie. Pierwsze modyfikacje, zgodnie z przyjętą także dla innych roślin strategią PDR (ang. *Pathogen Derived Resistance*), były oparte na wykorzystaniu do transformacji genów patogena, w tym stosunkowo najlepiej rozpoznanych genów wirusów.

Największą popularnością wśród roślin sadowniczych stransformowanych genami wirusowymi cieszyły się śliwa odporna na PPV (*Plum Pox Virus*, szarka), papaja odporna na PRSV (*Papaya Ringspot Virus*) i cytrusy odporne na CTV (*Citrus Tristeza Virus*). Badania nad uzyskaniem śliwy odpornej na szarkę podjęto pod koniec lat 80. ubiegłego wieku (8). Transformacja roślin genem białka płaszczka CP-PPV pod promotorem 35 S CaMV zaowocowała uzyskaniem kilku klonów różniących się poziomem wirusowego RNA i wytwarzanego białka (24), spośród których klon C-5 charakteryzujący się niskim stężeniem PPV-RNA i stężeniem białka CP poniżej poziomu detekcji, był odporny na zakażenie wirusem (25). Stosując tę samą strategię, opartą na użyciu genu kodującego białko płaszczka wirusa, uzyskano także rośliny papai odpornej na PRSV (26) i cytrusy odporne na tristetę (27,28).

W kolejnych latach podjęto badania nad wytwarzaniem odpornych roślin sadowniczych poprzez transformację biorców genami sterującymi procesami metabolicznymi i obronnymi rośliny. Strategię tę zastosowano m. in. w celu uzyskania truskawki (*Fragaria x ananassa*) odpornej na szarą pleśń (*Botrytis cinerea*), wertycyliozę (*Verticillium dahliae*), mączniaka (*Sphaerotheca macularis*) i antraknozę (*Colletotrichum acutatum*).

Wprowadzenie do genomu truskawki genu taumatyny (*Thau II* z *Thaumatococcus danielli*) pod promotorem 35 S CaMV pozwoliło na uzyskanie klonów o mniejszej niż



rośliny kontrolne podatności na zakażenie przez *B. cinerea* w warunkach sztucznej inokulacji (29). W wyniku transformacji truskawki innymi genami z grupy PR – genem chitynazy, *chit 42* i genem  $\beta 1,3$ -glukanazy z *Trichoderma* sp. (grzyb stosowany do biologicznej ochrony roślin) uzyskano również kilka klonów mniej podatnych na porażenie przez *C. acutatum* niż rośliny nietransformowane (30). Także transformacja genem *RCC2* chitynazy wyizolowanym z ryżu oraz genem *pcht28* chitynazy z *Lycopersicon chilense* umożliwiła uzyskanie roślin truskawki o mniejszej podatności na mączniaka (31) i wertycyliozę (32). Geny innych białek blokujących aktywność grzybów patogennych (*SAM* hydrolazy, *AFP* oraz *GAFT* z *Gastrodia elata*) były natomiast użyte do generowania transgenicznych klonów awokado odpornych na choroby grzybowe (33) oraz do wytwarzania genotypów odpornych na choroby systemu korzeniowego i przeznaczonych do wykorzystania jako podkładki śliwy (34).

Truskawkę odporną na szarą pleśń próbowano także wytworzyć poprzez sterowanie metabolizmem ściany komórkowej. Białko inhibitora poligalakturonazy (PGIP) jest wytwarzane w odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne, którym poddawana jest roślina (35-37). Jedną z jego funkcji jest blokowanie aktywności poligalakturonaz grzybowych, macerujących ścianę komórkową gospodarza w pierwszym etapie zakażenia (38). Gen *PGIP* występuje w genomie truskawki, jednak poziom jego ekspresji jest zbyt niski, aby zapobiec zakażeniu roślin przez *B. cinerea* (39). Pierwsze próby uzyskania truskawki odpornej na szarą pleśń poprzez wprowadzenie genu *PGIP* zakończyły się niepowodzeniem. Rośliny transformowane konstrukcją z genem pochodzącym z jabłoni i śliwy pod promotorem 35 S CaMV (40) wykazywały objawy silnego zahamowania wzrostu, a niekiedy zamierały (Korbin, Komjanc, dane nie publikowane), co potwierdzało teorię, że gen *PGIP* reguluje równolegle wiele procesów metabolicznych (41). Zmniejszenie podatności truskawki na zakażenie przez *B. cinerea* uzyskano dopiero po zastosowaniu konstrukcji opartej na genie własnym *Fragaria x ananassa* pod specyficznym promotorem 1.6 *FaExp2* (42), którego rolą było wzmocnienie podprogowej ekspresji genu *Fa-PGIP* (43).

Jabłoń (*Malus domestica*) była modyfikowana pod kątem uzyskania roślin odpornych na parcha jabłoniowego (*Venturia inaequalis*), zarazę ogniową (*Erwinia amylovora*) oraz mączniaka jabłoni (*Podosphaera leucotricha*). Wprowadzenie do genomu jabłoni genów endochitynaz z *T. herzianum* spowodowało wzrost odporności rośliny na parcha jabłoniowego (44). Zarówno w przypadku transgenicznej jabłoni jak i opisywanej uprzednio truskawki wzrost odporności był związany z wytworzeniem i uaktywnieniem się enzymów hydrolitycznych (chitynaz i glukanaz), wpływających na degradację ściany komórkowej patogena. Zależność ta nie miała jednak charakteru ilościowego (30). Zmniejszenie podatności roślin na zakażenie przez *V. inaequalis* obserwowali także badacze amerykańscy i włoscy w eksperymentach, w których rośliny odmian wrażliwych były transformowane genem *Vf* występującym w odpornych roślinach niektórych gatunków dzikich i odmian hodowlanych (45,46).

W celu uzyskania genotypów odpornych na zarazę ogniową, jedną z najbardziej destrukcyjnych chorób jabłoni, rośliny transformowano konstrukcjami zawie-



rającymi gen lizozymu z bakteriofaga T4 i gen *AttacinE* z *Hyalophora cekropia* (produkty zabójcze dla szerokiego spektrum bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych) (47) oraz gen kodujący EPS-depolimerazę z Ea1h (bakteriofag *E. amylovora*) (48). Gen kodujący EPS-depolimerazę, która odpowiada za degradację cukrów bakteryjnych, został wprowadzony pod konstytutywnym promotorem 35 S CaMV do genomu roślin kilku odmian *M. domestica* oraz roślin używanych jako podkładki jabłoni, a efektywność tej transformacji została określona w warunkach *in vitro* i *ex vitro* (49,50). Badania nad przydatnością genów, których produkty powodują destrukcję ściany komórkowej grzybów w warunkach naturalnych, do wytwarzania jabłoni odpornej na patogeny wnikające przez zranienia prowadzono także w Korei (51).

## 2.2. Tolerancja na czynniki abiotyczne i herbicydy

Stresy abiotyczne mają decydujący wpływ na plon, jakość owoców i przeżywalność roślin. W przypadku roślin sadowniczych szczególnie niesprzyjającym czynnikiem stresowym jest niska temperatura, wywołująca objawy określane jako uszkodzenia mrozowe. W badaniach nad genami regulującymi reakcję rośliny na obniżenie temperatury (geny *cor*) oraz czynnikami indukującymi ich transkrypcję wykazano, że zjawisko tolerancji na niską temperaturę jest niezwykle złożone (52). Możliwości stymulowania odporności na ten rodzaj stresu poprzez transformację rośliny genami dehidryny, czynników transkrypcyjnych, a także poprzez nadekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (APX, SOD) zostały opisane dla brzoskwini, jabłoni i winorośli (53,54). W badaniach na podwyższeniu stopnia tolerancji papai na niską temperaturę zastosowano transformację rośliny genami z rośliny *Vasconella*, wykazującej tolerancję na chłód i równocześnie blisko spokrewnionej z *Carica papaya* (55). Wyniki badań nad uzyskaniem roślin sadowniczych tolerancyjnych na niskie temperatury za pomocą metod inżynierii genetycznej są w dużej mierze objęte patentami (m.in. WO/2002/048378).

Potrzeba wytwarzania roślin sadowniczych, tolerancyjnych na herbicydy jest ograniczona do kilku gatunków. Badania tego rodzaju prowadzono m.in. dla bananowca, borówki amerykańskiej oraz dla gatunków stanowiących podkładki wiśni. Generowanie odporności tych roślin na herbicyd BASTA było oparte na wykorzystaniu konstrukcji z genem *bar*, kodującym transferazę substancji czynnej herbicydu (56-58). Została także opisana stymulująca rola genu *bar* i genu *roll* w procesie ukorzenia transgenicznych podkładek wiśni (56).

## 2.3. Cechy jakościowe

Celem hodowli roślin sadowniczych jest wytwarzanie odmian o wysokiej jakości owoców. Tymczasem, w przeciwieństwie do innych cech, jakość owoców jest indywi-



dualnie definiowana dla każdego gatunku, zawierając w tej definicji wielkość, zapach, barwę, jędrność czy teksturę. Dla niektórych gatunków wymagany jest balans między kwasowością i zawartością cukrów, dla innych ich wysoka jakość jest określana w skali zawartości poszczególnych cukrów. Podobnie owoce niektórych gatunków powinny być miękkie, podczas gdy od innych oczekuje się kruchości, soczystości i jędrności. Zależności te powodują, że prace nad poprawą jakości owoców (także metodami inżynierii genetycznej) muszą uwzględniać indywidualne zasady dla każdego przypadku (59).

Istnieją dwa aspekty badań nad polepszaniem jakości owoców – jakość owoców z punktu widzenia konsumenta (np. zawartość substancji prozdrowotnych, cechy sensoryczne) i jakość owoców oglądana oczami producenta (np. zdolność przechowalnicza). W ramach tych badań prowadzone były eksperymenty nad zwiększeniem zawartości cukrów i zmianą ich profilu (glukoza/fruktoza/skrobia) w jabłkach poprzez wyłączanie lub nadekspresję genu dehydrogenazy sorbitolu (60). Regulacja szlaku biosyntezy karotenoidów była przedmiotem badań mających na celu uzyskanie pożądanej barwy owoców i pożadanego stężenia likopenu (61,62). Badane były także zależności między aktywnością czynnika transkrypcyjnego MdMYB10 a zawartością antocyjanów w jabłkach pochodzących z transgenicznych roślin (63).

Problemem dla producentów jest utrata jędrności owoców pestkowych, związana z wytwarzaniem się etylenu podczas ich przechowywania. Poprawę jakości przechowywanych owoców osiągnięto wprowadzając do genomu śliwy gen *ACC* oksydazy (orientacja antysensowa, dawca *Prunus persica*), odpowiedzialny za ostatni etap w szlaku metabolicznym etylenu (64). Badania nad tym kierunkiem modyfikacji, jak się wydaje, są szczególnie interesujące, gdyż w owocach pochodzących z roślin, w których wyłączono aktywność genów *ACC* syntazy i *ACC* oksydazy zaobserwowano równocześnie znaczące zmiany w profilu cukrów (65).

Występowanie fazy juwenilnej w sadowniczych roślinach drzewiastych jest jednym z czynników limitujących badania nad poprawą jakości. Wieloletni (6-20 lat) okres oczekiwania na ocenę fenotypową wytworzonych roślin potomnych (potencjalnych nowych odmian) sprawia, że skrócenie fazy juwenilnej jest jednym z priorytetów hodowli. Możliwość osiągnięcia tego celu przez nadekspresję genu *APETALA 1* indukującego wczesne zakwitanie *Arabidopsis thaliana* (66) zostało udokumentowane w badaniach nad transformacją cytrusów i ananasa (67,68). Skrócenie fazy wegetatywnej uzyskano także w wyniku transformacji jabłoni genami *APETALA1*, *TFL1* (TERMINAL FLOWER) i *MdFTL1* z *A. thaliana* (w orientacji sensowej i antysensowej) (69,70) oraz w wyniku nadekspresji genu *BpMADS4j* (71).

## 2.4. Badania podstawowe

Rośliny nielicznych gatunków sadowniczych stanowiły również obiekt badań podstawowych, mających na celu wyjaśnienie mechanizmów zmian fizjologiczno-biochemicznych zachodzących w roślinie. Przykładami takiego zastosowania transfor-



macji genetycznej były badania prowadzone na roślinach truskawki i banana. Badania truskawki transformowanej genami celulazy truskawki (72) i liazy pektynowej (73) przyczyniły się do wyjaśnienia mechanizmu spadku jędrności owoców obserwowanego podczas ich dojrzewania, a zmodyfikowanie tej rośliny genem *iaglu*, którego produkt uczestniczy w syntezie kwasu indolilo-octowego (IAA), do wyjaśnienia roli IAA podczas dojrzewania truskawek (74). Na podstawie wyników badań nad roślinami banana transformowanymi genami *MAD* wyizolowanymi z roślin kilku gatunków określono rolę czynnika transkrypcyjnego *MAD-box* w regulacji procesu kwitnienia (75).

### 3. Komercjalizacja i nowe rozwiązania dla inżynierii genetycznej roślin sadowniczych

Dotychczasowe działania w sferze inżynierii genetycznej roślin sadowniczych wskazują na wielki potencjał do wykorzystania w hodowli roślin tych gatunków. Mimo dużych możliwości (i potrzeb) technologia ta nie jest szeroko rozpowszechniona w gatunkach sadowniczych. Zgodnie z danymi USDA, rośliny sadownicze stanowią mniej niż 1% wśród 11 000 eksperymentów polowych z transgenicznymi roślinami uprawnymi. Także wśród transgenicznych roślin wprowadzonych do komercyjnej uprawy na świecie niewiele jest roślin sadowniczych (papaja, maniok i cytrusy) (26,28,76). Starania o formalne wprowadzenie na rynek amerykański i europejski genetycznie zmodyfikowanej śliwy 'HoneySweet', odpornej na PPV napotyka na ogromne przeszkody, mimo znaczących strat powodowanych przez wirusa ospowatości śliwy w wielu państwach, w tym także krajach UE (76). Problem dotyczy nie tylko roślin transformowanych genami wirusowymi, choć według analiz opinii publicznej w USA (2000-2002) większość respondentów wyrażała akceptację co do spożywania produktów rolnych z dodatkowymi genami, pochodzącymi z roślin z tego samego gatunku (81%) lub innych gatunków roślinnych (61%), podczas gdy tylko 14% akceptowała wprowadzane do genomu roślin geny wirusowe (77). Nielsen zaproponował nawet klasyfikację organizmów genetycznie zmodyfikowanych opartą na zależnościach między dawcą i biorcą genów, w myśl której dystans genetyczny między tymi organizmami wskazywałby na potencjał modyfikowanej cechy do spontanicznych, „niebezpiecznych” zmian (78). W obliczu takich teorii istnieje szansa na szybkie zaakceptowanie sadowniczych produktów cis-genezy, takich choćby jak truskawka odporna na szarą pleśń w wyniku wprowadzenia kopii własnego genu pod promotorem ekspansyjnym, również wyizolowanym z rośliny *Fragaria x ananassa* (42,79). Projekt wprowadzenia cis-genezy do grupy hodowlanych technik konwencjonalnych jest rozpatrywany na forum Komisji Europejskiej.

Specyfika gatunków sadowniczych sprawiła, że tzw. bezpieczne metody transformacji tych roślin były specjalnie pożądane przez opinię publiczną. Tematyka ta stała się przedmiotem intensywnych badań w ostatnich latach. Skutkiem tego sa-



downicze rośliny transgeniczne nowej generacji mogą być już wytwarzane z pominięciem selekcji opartej na genach warunkujących oporność na antybiotyki. Do selekcji sadowniczych transformantów używane są innego rodzaju markery (np. mannozowe) (29,82) lub stosuje się transformację z pominięciem jakichkolwiek genów markerowych (45), a w przypadku zastosowania do transformacji tradycyjnych genów markerowych są one usuwane po selekcji na drodze specyficznej rekombinacji, transpozycji, kotransformacji (80,81). Geny markerowe mogą być także usuwane z genomu roślin sadowniczych w systemie *detox* i systemie MAT (83,84).

Odpowiedzią na żądania opinii publicznej były także nowe strategie: transformacja roślin stanowiących podkładki drzew owocowych (co wykluczało obecność genu w organach wytwarzających owoce) (34,50,56,67,68), zastosowanie specyficznych promotorów (42,85) i technologii wyłączania genów (60,64,86). Prowadzone były również badania nad ograniczeniem przepływu genów z transgenicznych roślin sadowniczych (87,88).

#### 4. Podsumowanie

Rośliny sadownicze stanowią bardzo zróżnicowaną grupę, obejmującą przedstawicieli wielu niespokrewnionych gatunków, a ich rynek charakteryzuje się znacznym konserwatyzmem nawet wobec produktów uzyskiwanych technikami konwencjonalnymi. Badania nad modyfikacjami genetycznymi roślin z tej grupy podjęto już w latach 80. ubiegłego wieku i pomimo licznych trudności wynikających z cech biologicznych materiału roślinnego, problemów eksperymentalnych i braku akceptacji społecznej kontynuowano je przez dalsze dwadzieścia lat. Celem modyfikacji było doskonalenie roślin na potrzeby człowieka – producenta (odporność/tolerancja rośliny na czynniki biotyczne i abiotyczne, ułatwienia w uprawie roślin i przechowywania owoców) oraz konsumenta (jakość owoców, bezpieczeństwo produktu). Podczas dwudziestoletniego okresu badań doskonalono także metody transformacji i zmieniano strategie inżynierii genetycznej roślin sadowniczych, wprowadzając wszystkie nowości uwzględniające bezpieczeństwo człowieka i jego środowiska.

W efekcie tych prac transgeniczne rośliny sadownicze zaczęły być postrzegane jako znaczące źródło zmienności dla hodowli twórczej, zwłaszcza przy braku naturalnych donorów wielu pożądanых cech. Owoce pochodzące z transformowanych roślin nie są w dalszym ciągu – poza nielicznymi wyjątkami – akceptowane na rynku, ale równocześnie rozpatruje się możliwość wprowadzenia roślin sadowniczych na transgenicznych podkładkach i roślin *cis-genicznych* do produkcji owoców nawet w nowoczesnych sadach ekologicznych. Badania nad transgenicznymi roślinami sadowniczymi mogą zatem zaowocować pełną komercjalizacją.



## Literatura

1. James D. J., Passey A. J., Barbara D. J., (1990), *Genetic Engineering of Crop Plants*, Ed. EdsG & Grieson D., Lycett, London, 239-248.
2. Weg van de W. E., Gao Z. S., Glissen L. J. W. J., Schaart J. G., Kodde L., Zudmer L., Ree van R., Bolhar S. T. H. P., Knulst A. C., Mill S. C., Rigby N., Jenkins J., Puehringer H., Laimer da Camera Machado M., Hoffman-Sommergruber K., Breitenfer H., Ma Y., (2003), *Proc. Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetic*, 54.
3. Ronald P., Hake S., Murch D., (2004), *Natural choices – The Davis food co-op newsletter*, 4, 4-5.
4. James D. J., Passey A. J., Barbara D. J., Bevan M., (1989), *Plant Cell Reports*, 7, 658-661.
5. Nehra N. S., Chibbar R. N., Kartha K. K., Datla R. S. S., Crosby W. L., Stushnoff C., (1990), *Plant Cell Reports*, 9, 10-13.
6. Fitch M. M. M., Manshardt R. M., Gonsalves D., Slightom J. L., Sanford J. C., (1992), *BioTechnology*, 10, 1466-1472.
7. Vardi A., Bleichman S., Aviv D., (1990), *Plant Science*, 69, 199-206.
8. Mante S., Morgens P. H., Scorza R., Cordts J. M., Callahan A. M., (1991), *BioTechnology*, 9, 853-857.
9. Mullins M. G., Tang F. C. A., Facciotti D., (1990), *BioTechnology*, 8, 1041-1045.
10. Uematsu C., Murase M., Ichikawa H., Imamura J., (1991), *Plant Cell Reports*, 10, 286-290.
11. Serres R. A., McCown B. H., Zeldin E., McCabe D. E., Stang E. J., (1990), *Proc. 23<sup>rd</sup> Intern. Hort. Congress*, 127.
12. James D. J., Dandekar A. M., (1991), *Plant Tissue Culture Manual*, Ed. K. Lindsey, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, B8, 1-18.
13. Graham J., McNicol R. J., (1991), *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 24, 91-95.
14. Perez-Clemente R., Perez-Sanjuan A., Farcia-Ferriz L., Beltran J-P., Canas L., (2005), *Mol. Breeding*, 14, 419-427.
15. Scorza R., Morgens P. H., Cordts J. M., Mante S., Callahan A. M., (1990), *In Vitro Cellular and Developmental Biol.*, 26, 829-834.
16. Xiaojian Y. E., Scorza R., Sanford J., (1994), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119, 367-373.
17. Nagaty A. M., Abd El-Fatah H. Belal, El-Debab M. D., Sourour M. M., Metry E. A., (2007), *J. Appl. Sci. Res.* 3(11), 1600-1608.
18. Gomez-Lim M. A., Litz R. E., (2004), *In Vitro Cellular and Developmental Biol.*, 40 (5), 442-449.
19. Mhatre M., Nagi L., Ganapathi T. R., (2005), *Proc. Int. Symp. On Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species*, Univ. Florida, 99.
20. Costa M., Oliveira M. M., (2007), *Acta Hort.*, 738, 575-581.
21. Reis L. B., Silva M. L., Oliveira M. L. P., Lima A. B. P., Lani E. R. G., Otoni W. C., (2007), *Acta Hort.*, 738, 425-431.
22. Petri C., Alburqueque N., Garcia-Castillo S., Egea J., Burgos L., (2004), *J. Hort. Sci. and Biotech.*, 74, 704-712.
23. Pliego-Alfaro F., Perez-Barranco G., Sanchez-Romero C., Mercado J. A., (2007), *Acta Hort.*, 738, 473-477.
24. Scorza R., Ravelonandro M., Callahan A., Cordts J. M., Fuchs M., Dunez J., Gonsalves D., (1994), *Plant Cell Rep.*, 14, 18-22.
25. Ravelonandro M., Scorza R., Bachelier J. C., Labonne G., Levy L., Damsteegt V., Callahan A. M., Dunez J., (1997), *Plant Dis.*, 81, 1231-1235.
26. Gonsalves C., Wengi T., Tennant P., Gonsalves D., (1998), *Acta Hort.*, 461, 311-314.
27. Dominguez A., Guerri J., Cambra M., Navarro L., Moreno P., Pena L., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19 (4), 427-433.
28. Moore G. A., Febres V. J., Niblett C. L., Luth D., McCaffery M., Garsney S. M., (2000), *Acta Hort.*, 535, 273-344.
29. Schestibratov K. A., Dolgov S. V., (2005), *Scientia Hort.*, 106, 177-189.
30. Mercado J. A., Yubero\_Serrani E. M., de los Santos B., Rey M., Martino-Pizarro C., Pascual L., Galvez J., de la Vino G., Quesada M. A., Llobell A., Munoz-Blanco J., Romero F., Plego-Afaro F., Caballero J. L., (2007), *Acta Hort.*, 738, 383-388.



31. Asao H. G., Nishizawa Y., Arai S., Sato T., Hirai M., Oshida K., Shinmyo A., Hibi T., (1997), *Plant Biotech.*, 14(3), 145-149.
32. Chalavi V., Tabaeizadeh Z., Thibodeau P., (2003), *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 128, 747-753.
33. Litz R. H., Rohajarjo S. H. T., Efendi D., Witjaksono M., Gomez-Lin M., (2004), *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 40, 442-449.
34. Layne D. R., Schnabel G., Scorza R., Cox K. D., Bussey K., (2005), *Hortscience*, 40, 1026-1029.
35. Cervone F., Hahn M. G., Lorenzo G., Darwill A. G., Albersheim P., (1989), *Plant Physiology*, 90, 542-548.
36. Cervone F., Lorenzo G., Pressey R., Darwill A.G., Albersheim P., (1999), *Phytochemistry*, 29, 447-449.
37. Yao C. L., Conway W. S., Ren R. H., Smith D., Ross G. S., Sams C. E., (1999), *Plant Mol. Biol.*, 39, 1231-1241.
38. Devoto A., Leckie F., Lupotto E., Cervone F., Lorenzo G., (1998), *Planta*, 205, 165-174.
39. Mehli L., Schaart J. G., Kjellsen T. D., Tran D. H., Salentijn E. M. J., Schouten H. J., Iversen T-H., (2004), *New Phytologist*, 163, 99-110.
40. Korbin M., Majka J., Żurawicz E., (2004), *Biotechnologia*, 2(65), 22-28.
41. Jang S., Lee B., Kim C., Kim S-J., Yim J., Han J-J., Lee S., Kim S-R., An G., (2003), *Plant Mol. Biol.*, 53, 357-369.
42. Salentijn E. M. J., Ahroni A., Schaart J. G., Boone M. J., Krens F. A., (2003), *Physiol. Plantarum*, 118, 571-578.
43. Schaart J. G., Krens F. A., Pelgrom K. T. B., Mrndes O., Rouwendal G. J. A., (2004), *Plant Biotechnology J.*, 2, (B), 233-240.
44. Bolar J. P., Norelli J. L., Wong K-W., Hayes C. K., Harman G. E., Aldwinckle H. S., (2000), *Phytopathology*, 9, 72-77.
45. Malnoy M., Xu M., Borejsza-Wysocka E. E., Korban S. S., Aldwinckle H. S., (2007), *Acta Hort.*, 738, 323-326.
46. Zhu J., Zhu A., Andruciolli E., Granozio S., Belfanti E., Barbieri M., Tartarini S., Sansavini S., (2007), *Acta Hort.* 738, 361-367.
47. Ko K., Brown S. K., Norelli J., During K., Aldwinckle H. S., (1997), *Phytopathology*, 87, 53-55.
48. Hanke V., Kim W. S., Geider K., (2002), *Acta Hort.*, 590, 393-395.
49. Hanke V., Geider K., (2002), *Acta Hort.*, 590, 397-399.
50. Weber G., Hoehnele M., (2005), *Procc. Int. Symp. On Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species*, Univ. Florida, 69.
51. Kim J-H., Song K. J., Dong-Hee L., Cha J. E., Woo J-G., (2005), *Proc. Int. Symp. On Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species*, Univ. Florida, 83.
52. Bassett C. L., Wisniewski M. E., Farrell I. R., Artip T. S., Norelli J. L., (2006), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 131, 551-563.
53. Wisniewski M. E., Bassett C. L., Norelli J. L., Artip T. S., Renaut J., (2007), *Acta Hort.*, 738, 145-156.
54. Artlip T. S., Wisniewski M. E., Norelli J. L., Cui M., Fuchigami L., (2005), *Proc. Int. Symp. On Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species*, Univ. Florida, 10.
55. Dhekney S., Litz R. E., Moraga D., Yadav A., (2007), *Acta Hort.*, 738, 159-164.
56. Druart P., Delporte F., Brazda M., Ugarte-Ballon C., Machado A. C., Machado M. L. C., Jacquemin J., Waitillon B., (1998), *Acta Hort.*, 468, 71-76.
57. Song G-Q., Sink K. C., Particka M., Zandstra B., (2005), *Proc. Int. Symp. On Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species*, Univ. Florida, 145.
58. Garcia E., de Villarreal C., (2007), *Acta Hort.*, 738, 509-514.
59. Callahan. A., (2003), *Acta Hort.*, 622, 295-302.
60. Teo G., Suzuki Y., Uratsu S. L., Lampinen B., Ormonde N., Hu W. K., DeJong T., Dandekar A. M., (2006), *PNAS*, 103 (49), 18842-18847.
61. Rodrigo M. J., Marcos J. F., Zacarias L., (2004), *J. Agric. Food Chem.*, 52 (22), 6724-6731.
62. Rodrigo M. J., Alvarez B., Zacarias L., (2005), *Proc. Int. Symp. On Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species*, Univ. Florida, 162.
63. Espley R. V., Hellens R. P., Putterill J., Stevenson D. E., Kutty-Amma S., Allan A. C., (2007), *Plant J.*, 49 (3), 414-427.



64. Callahan A., Scorza R., (2007), *Acta Hort.*, 738, 567-572.
65. Dandekar A. M., Teo G., Defilippi B. G., Uratsu S. L., Passey A. J., Kader A. A., Slow J. R., Colgan R. J., James D. J., (2004), *Transgenic Res.*, 13 (4), 373-384.
66. Katoda N., Wada M., Kasuba S., Kana-Murakami Y., Masuda T., Soejima J., (2002), *Plant Science*, 162 (5), 679-687.
67. Pena L., Martin-Trillo M., Juarez J., Pina J. A., Navarro L., Martinez-Zapater J. M., (2001), *Nat. Biotech.*, 19, 263-267.
68. Cervera M., Navarro L., Pena L., (2005), *Proc. Int. Symp. On Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species*, Univ. Florida, 116.
69. Katoda N., Wada M., Masuda T., Soejima J., (2003), *Acta Hort.*, 625, 337-343.
70. Katoda N., Wada M., (2004), *Plant Science*, 168, 95-104.
71. Flachovsky H., Peil A., Sopanen T., Elo A., Hanke M. V., (2007), *Plant Breeding*, 126, 137-145.
72. Woolley L. C., James D. J., Manning K., (2001), *Planta*, 214, 11-21.
73. Jimenez-Bermudez S., Redondo-Navado J., Munoz-Blanco J., Caballero J. L., Lopez-Aranda J. M., Valpuesta V., Pliego-Alfaro F., Quesada M. A., Mercado J. A., (2002), *Plant Physiol.*, 128 (2), 751-759.
74. Wawrzyńczak D., Sowik I., Michalczyk L., (2000), *Biotechnologia*, 4(51), 103-105.
75. Othman R. Y., Wong W. C., (2005), *Proc. Int. Symp. On Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species*, Univ. Florida, 110.
76. Scorza R., Hily J. M., Callahan A., Malinowski T., Cambra M., Capote N., Zagrai I., Damsteegt V., Briard P., Ravelonandro M., (2007), *Acta Hort.*, 738, 669-673.
77. Lusk J. L., Sullivan P., (2002), *Food Technology*. 56, 32-37
78. Nielsen K. M., (2003), *Nat. Biotech.*, 21, 227-228.
79. Schaart J., Salentijn E. M. J., Pelgrom K. T. B., Boone M. J., Ahroni A., Krens F. A., (2004), PhD Thesis, *Towards consumer-friendly cisgenic that are less susceptible to Botrytis cinerea*, Wageningen University, the Netherlands, (A), 62-74.
80. Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J., Guldarger Peterson S., Brunstedt J., Okkels F. T., (1998), *Mol. Breeding*, 4, 111-117.
81. Puchta H., (2003), *Plant Cell Tiss. Org.*, 74, 123-134.
82. Degenhardt J., Poppe A., Montag, Szankowski I., (2006), *Plant Cell Rep.*, 25 (11), 1149-1156.
83. Chevreau E., Taglioni J. P., Cesbron C., Dupuis F., Sourice S., Berry I., Bersegeat A., Descombin J., Loridon K., (2007), *Acta Hort.*, 738, 277-281.
84. Lopez-Noguera S., Petri C., Burgos L., (2007), *Acta Hort.*, 738, 607-612.
85. Borejsza-Wysocka E. E., Malnoy M., Kim W. S., Geider K., Beer S., Advinckle H. S., (2007), *Acta Hort.*, 738, 273-276
86. Tian L., Zhang S., SanfaHon H. J. I. P., Svircev A., Brown D. C., Wen R., (2007), *Biotech. And sustainable Agri.*, Springer, Pacific Agri-food Res. Centre, Summerland BC, Canada, 103-106.
87. Flachowsky H., Hanke V., (2006), *J. Fruit and Ornamental Res.*, 14 (1), 77-83.
88. Soejima J., (2007), *Acta Hort.*, 738, 341-345.