



Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten, SLU
Hortonomprogrammet
15 hp



Inverkan av transgena grundstammar på fruktkvaliteten hos icke-transgena äppelsorten 'Jonagold'

Catrin Heikefelt

Området för växtförädling och bioteknik
Fakulteten för landskapsplanering, trädgårds- och jordbruksvetenskap
Sveriges lantbruksuniversitet, Alnarp
2009

Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för landskapsplanering, trädgårds- och jordbruksvetenskap
Området för växtförädling och bioteknik

Författare Catrin Heikefelt

Titel Inverkan av transgena grundstammar på fruktkvaliteten hos icke-transgena äppelsorten 'Jonagold'

Engelsk titel Fruit quality of the non-transgenic apple cultivar 'Jonagold' affected by transgenic rootstocks

Nyckelord fruktkvalitet, 'Jonagold', M9, M26, transgen grundstam, *roIB*-genen, äpple

Handledare Li-Hua Zhu
 Området för växtförädling och bioteknik, SLU

Examinator Marie Olsson
 Området för hortikultur, SLU

Kurstitel Examensarbete inom Hortonomprogrammet
Kurskod EX0369
Poäng 15 hp
Nivå Grund C

Alnarp
2009

SAMMANFATTNING

Användning av genteknik inom växtförädlingen har under de senaste tjugo åren blivit allt vanligare och insättning av ett fåtal gener för att förbättra enstaka egenskaper i för övrigt bra växtmaterial är ett bra verktyg för att få en mer effektiv förädling.

I den här studien undersöktes hur fruktkvaliteten i äpplen av den icke-transgena sorten 'Jonagold' påverkades av grundstammar transformerade med den rotningsförbättrande genen *rolB*. Äpplena kom från grundstammarna M26-*rolB*, M9-*rolB1* och M9-*rolB2* samt icke-transgena kontroller av M9 och M26. Kvalitetsparametrarna som analyserades var vikt, storlek, färg, fasthet, socker- och syrainnehåll, kvoten TSS/TA, vitamin C samt totala fenoler i fruktköttet respektive skalet.

Den transgena grundstammen M26-*rolB* gav större äpplen än den icke-transgena M26. Klonen M9-*rolB1* gav fastare och sötare frukter än kontrollen, medan M9-*rolB2* enbart gav sötare frukter än kontrollen och dessa skillnader är bara positiva för fruktkvaliteten. Övriga analyserade parametrar i äpplena skiljde sig inte signifikant mellan kontrollerna och de transgena grundstammarna. De skillnader som fanns mellan transgen och icke-transgen grundstam kan bero på genen *rolB*, men även andra faktorer som skördestorlek och varierande mikroklimat kan vara orsaker, men har inte tagits med i beräkningarna i denna studie.

Utifrån resultaten kan slutsatsen dras att fruktkvaliteten i 'Jonagold' inte i någon större utsträckning påverkas av *rolB*-transformerade grundstammar av M9 och M26. Användandet av genen skulle därför kunna vara ett bra sätt att för att förbättra rotningen och därmed ge en effektivare produktion av svagväxande äppelgrundstammar utan negativa effekter i äpplena.

ABSTRACT

Gene technology has become more and more attractive in plant breeding during the last twenty years. This is probably because it can readily improve the existing commercial cultivars that have only one or a few drawbacks by modifying one or a few genes without changing the main genetic constitution. In this regard, gene technology is more effective than conventional breeding.

The aim of this project was to analyze the fruit quality of the non-transgenic apple scion 'Jonagold' grafted on non-transgenic and *rolB*-transgenic apple rootstocks. The rootstocks used were M9-*rolB1*, M9-*rolB2*, M26-*rolB* and non-transgenic controls M9 and M26. The fruit quality parameters analyzed were size, weight, colour, firmness, total soluble sugar (TSS), acid (TA) content, the ratio of TSS to TA, vitamin C and total phenols.

The results showed that M26-*rolB* had larger fruits than the control M26, while M9-*rolB1* and M9-*rolB2* had higher sugar content, and M9-*rolB1* showed higher firmness. These differences are positive for the fruit quality. The rest of the analyzed parameters did not differ significantly between the transgenic rootstocks and the control. It is uncertain that the differences observed are due to *rolB* or other factors such as crop load and micro climate. Further studies are required to confirm this.

The conclusion from this study is that *rolB* does not obviously influence the fruit quality of apple cultivar 'Jonagold' grafted on the transgenic rootstocks of M9 and M26. Therefore the gene could be used for improving the rooting capacity of rootstocks for commercial production, consequently increasing the production efficiency.

TACK TILL

Jag skulle vilja tacka de personer som på olika sätt hjälpt till och bidragit under detta projekt. Först och främst vill jag tacka min handledare Li-Hua Zhu för att hon togs sig tid att instruera vid laborationer och gav värdefulla kommentarer under skrivandet. Sedan vill jag tacka Karl-Erik Gustavsson för vänlig hjälp med HPLC-analysen och Annelie Ahlman för att ha bistått i labbet. Slutligen tackar jag Carin Emanuelsson för att hon fyllt i några av mina luckor vad gäller datorkunskap.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1	INTRODUKTION	7
1.1	Äpplen	7
1.1.1	Ursprung	7
1.1.2	Förökning	7
1.1.3	Grundstammar	8
1.1.4	Sorten 'Jonagold'	9
1.2	Fruktkvalitet	9
1.2.1	Vikt, storlek och färg	10
1.2.2	Fasthet	10
1.2.3	Socker och syra	11
1.2.4	Vitamin C	11
1.2.5	Fenoler	12
1.3	Växtförädling med hjälp av genteknik	13
1.3.1	Transformerering med Agrobacterium	13
1.3.2	Genen rolB	14
1.4	Syfte	15
2	MATERIAL OCH METODER	16
2.1	Växtmaterial	16
2.2	Metoder	16
2.2.1	Vikt och storlek	16
2.2.2	Färg	16
2.2.3	Fasthet	17
2.2.4	Socker	17
2.2.5	Syra	17
2.2.5.1	Beräkning av syra	17
2.2.6	Socker/syra	17
2.2.7	Vitamin C	17
2.2.7.1	Standardkurva för askorbinsyra	18
2.2.7.2	Beräkning av vitamin C	18
2.2.8	Fenoler	19
2.2.8.1	Fruktköttet	19
2.2.8.2	Skalet	19
2.2.8.3	Standardkurva för fenoler	19
2.2.8.4	Beräkning av fenoler	19
2.2.9	Statistiska analyser	20
3	RESULTAT	21
3.1	Vikt	21
3.2	Storlek	22
3.3	Färg	23
3.4	Fasthet	24

3.5 Socker.....	25
3.6 Titrerbar syra.....	26
3.7 Socker/syra.....	27
3.8 Vitamin C.....	28
3.8.1 Standardkurva för askorbinsyra.....	28
3.9 Fenoler.....	29
3.9.1 Fruktköttet.....	29
3.9.2 Skalet.....	30
3.9.3 Standardkurva för fenoler.....	30
4 DISKUSSION.....	31
4.1 Vikt och storlek.....	31
4.2 Färg.....	32
4.3 Fasthet.....	32
4.4 Socker.....	33
4.5 Titrerbar syra.....	34
4.6 Socker/syra.....	34
4.7 Vitamin C.....	35
4.8 Fenoler.....	35
5 SLUTSATSER.....	36
6 REFERENSER.....	37

1 INTRODUKTION

Idag odlas äpplen på alla kontinenter och 2007 uppgick världsproduktionen till drygt 64 miljoner ton (FAO, 2008). I Sverige dominerar äpplen den totala fruktproduktionen med 24 000 ton under 2006 (Jordbruksverket, 2008a). Den stora produktionen leder till att det pågår en ständig förädling för att förbättra växtmaterialet så att det passar för en modernare och allt mer effektiviserad odling.

Vid traditionell växtförädling kan det finnas problem med att få fram en önskad egenskap utan att påverka andra egenskaper. Med hjälp av genteknik är det däremot möjligt att förändra i enbart en gen som styr en speciell egenskap. Vid förädling med genteknik är det dock nödvändigt att utvärdera att övriga egenskaper inte påverkas. Fruktkvaliteten är en av de viktigaste egenskaperna i äpple och i de sorter som finns idag anses kvaliteten vara hög. Vid förädling av andra egenskaper än fruktkvaliteten är det därför viktigt att denna bibehålls.

1.1 Äpplen

1.1.1 Ursprung

Produktionen av äpple utgörs idag främst på träd av arten *Malus x domestica* Borkh. vilket är en korsning mellan *Malus sieversii* och någon annan art av *Malus*-släktet (Luby, 2003). *Malus sieversii*, vars ursprung är Centralasien, spreds över norra halvklotet för ca 10 000 år sedan i och med att människor började förflytta sig över större landområden. På de nya platserna uppkom hybrider som utvecklades till nya arter (Harboe, 2001).

1.1.2 Förökning

Äppelträd för kommersiell produktion består vanligen av en grundstam där en sort ympas eller okuleras (Wertheim & Webster, 2003). Grundstammarna förökas vegetativt med nedläggning eller sticklingar.

Nedläggning innebär att 1 år gamla moderplantor skärs tillbaka en bit ovanför jorden så att nya skott växer ut. Dessa täcks successivt med jord varefter de växer, vilket gör att skotten rotar sig och kan avlägsnas från moderplantan och användas som nya plantor (Lal Kausal & Sharma, 1995).

Förökning med sticklingar, antingen vedartade eller örtartade, är inte lika utbrett som nedläggning. Anledningarna är att produktionen tar längre tid samt att det är svårare att få sticklingarna att rota sig när moderträden uppnått adultfasen (Wertheim & Webster, 2003).

Vedartade sticklingar tas vintertid och örtartade under våren eller sommaren. Sticklingarna doppas i växthormonet auxin för att få bättre rotning (Wertheim & Webster, 2003).

När de förökade grundstammarna uppnått tillräcklig storlek ympas eller okuleras den önskade äppelsorten. Okulering, som sker på sensommaren, används mest och innebär att grundstammen snittas i barken och en vilande knopp av sorten placeras in under barken, binds fast och växer samman med grundstammen. Ympning brukar utföras under vårvintern genom att binda fast en hel kvist av sorten i en skåra i grundstammens bark så att de växer samman (Wertheim & Webster, 2003).

1.1.3 Grundstammar

Den ursprungliga anledningen till att använda grundstammar istället för att ha rotäkta sorter var att sorterna kunde vara svåra att föröka då de hade dålig rotning (Webster & Wertheim, 2003). Fördelar med grundstammen är den kan ge en kontroll av tillväxten av den ympade sorten, påverka fruktsättningen och skördestorleken samt ge resistens mot sjukdomar. Det finns även grundstammar som är anpassade utifrån olika jordförutsättningar och klimat (Lal Kausal & Sharma, 1995).

I den moderna produktionen används vanligtvis svagväxande grundstammar eftersom de ger låga träd som är enkla att skörda, snabbt ger frukt efter plantering och ger kontinuerligt frukt varje år och därmed blir odlingarna effektivare (Webster & Wertheim, 2003). Utbudet av svagväxande grundstammar är relativt stor, men ett vanligt förekommande problem med dem, främst med M9 men ibland också med M26, är att de ofta är svårt att få dem att rota sig (Webster & Wertheim, 2003)

M9 är en svagväxande grundstam ursprungligen från the Malling Apple Rootstock Series, och selekterades i Frankrike redan 1879, men har sedan dess selekterats ytterligare (Ferree & Carlson, 1987). Idag är det den mest använda svagväxande grundstammen för kommersiell äppelproduktion i Västeuropa (Webster & Wertheim, 2003). Nackdelen med M9 är den dåliga rotutvecklingen som gör att träden riskerar att falla omkull vid kraftig blåst om de inte pålas upp ordentligt.

Grundstammen M26 är resultat av en korsning av M9 och en annan av the Malling series, M16, och började användas kommersiellt 1959 (Ferree & Carlson, 1987). M26 är svagväxande, om än lite starkare än M9 och har en lite bättre rotning samt högre vinterhärdighet än M9, vilket möjliggör användning även i nordligare delar av Europa (Ferree & Carlson, 1987).

1.1.4 Sorten 'Jonagold'

Äppelsorten 'Jonagold' är en kontrollerad korsning mellan 'Golden Delicious' och 'Jonathan', som utfördes 1943 på New York State Agricultural Experiment Station, USA (Svensson, 2003). Efter tio år selekterades 'Jonagold' och släpptes på marknaden 1968 (Hampson & Kemp, 2003). Till Sverige kom sorten på 1970-talet och är idag särskilt populär i Belgien där den står för 60 % av produktionen, men odlas även i andra europeiska länder samt Japan, Nordamerika och Australien (Hampson & Kemp, 2003).

Specifika egenskaper för 'Jonagold' är en tidig och riklig fruktsättning som oftast sker varje år och sorten trivs bäst i lite kallare klimat, vilket är anledningen till att den är populär i norra Europa (Hampson & Kemp 2003). Korsningen är triploid och behöver därför en annan äppelsort som pollinatör, t ex 'Aroma' eller 'Discovery' (Svensson (2003).

Äpplen av 'Jonagold' beskrivs som medelstora till stora med lätt konisk form (Hampson & Kemp, 2003). Grundfärgen på skalet är gult, med strimmor av den klarröda täckfärgen och skalet har en förmåga att bli fett och blankt under lagringen av frukten. Fruktköttet är ljusgult och saftigt, ganska fast men med viss grynighet och smaken är aromatisk med lite syrlighet (Hampson & Kemp, 2003).

1.2 Fruktkvalitet

Kvalitet i plantprodukter är ett svårdefinierat begrepp och som innebär olika saker beroende på vem som tillfrågas. Vilka kvalitetsparametrar som anses viktigast förändrar sig även genom produktionskedjan från odlaren fram till konsumenten. Produktkvaliteten för odlare, grossister och inom forskningen definieras ofta med egenskaper som är enkla att mäta instrumentellt och objektivt. Konsumenten lägger större vikt på sensoriska attribut, däribland arom, doft och munkänsla som till följd av individuella önskemål är svårare att bedöma (Abbott, 1999).

Flera av de instrumentella metoderna för att mäta kvaliteten i äpplen har ursprungligen tagits fram som verktyg för odlare för att avgöra mognadsgraden och därmed skördetidpunkten. Dessa omfattar främst storlek, fasthet, färg, socker- och syrainnehåll. Metoderna måste vara enkla och snabbt ge svar för att vara praktiskt tillämpbara. Under senare år har även den nutritionella kvaliteten fått större betydelse, varför kvalitetsanalyser inom forskning på äpplen ofta även omfattar ämnen som kan ge bättre hälsa och förebygga sjukdomar (Boyer & Liu, 2004).

Eftersom kvalitet i frukt är ett så komplext begrepp som byggs upp under hela tillväxten, så är de påverkande faktorerna lika komplexa. I äpple ger den valda sorten vissa

grundförutsättningar för vilken kvalitet som kan förväntas. Faktorer förknippade med produktionen är val av sort, grundstam och odlingsplats, abiotiska förhållanden som temperatur, ljus, och nederbörd samt odlingsåtgärder i form av beskärning, mineralnäring, bevattning, gallring och skördetidpunkt (Lal Kaushal & Sharma, 1995; Johnston m fl, 2002). Kvalitetsparametrar påverkas dock av olika faktorer i olika hög grad. Efter skörd är förhållandena vid lagringen avgörande för om hur länge kvaliteten bibehålls. En låg temperatur, hög relativ luftfuktighet och hög halt CO₂ är de viktigaste åtgärderna för att minimera kemiska förändringar som kan ge sämre hållbarhet (Johnston m fl, 2002).

1.2.1 Vikt, storlek och färg

För handel med äpplen finns EU-normer som klassificerar enbart utifrån färg och storlek eller vikt (Jordbruksverket, 2008b). Klasserna ligger till grund för prissättningen till odlaren och avgör om frukten kan säljas till konsument eller till industrin. Att äpplena lever upp till dessa krav är därför en förutsättning för att de ska kunna föras ut på marknaden. Storleken och färgen på äpplet har också betydelse för hur lätt såld frukten är till konsumenten som tenderar att köpa de större och rödare frukterna (Vangdal, 1985).

Färgen i äppelskalet består av flera olika pigment. Den grön-gula grundfärgen utgörs av klorofyll och karotenoider, medan den röda täckfärgen som de flesta äpplen får under mognaden bildas av antocyaniner och flavonoler (Lancaster, 1992). Skalets färg förändras under mognaden när klorofyllet bryts ned till följd av enzymatisk aktivitet, samtidigt som syntesen av de röda och gula pigmenten ökar (Rana, 2006).

1.2.2 Fasthet

Ur kvalitetsperspektiv har fastheten betydelse på flera sätt. En fastare frukt har en längre hållbarhet på lagret och är mindre mottaglig för sjukdomar, men framförallt har fastheten stor betydelse för om konsumenten uppskattar produkten (Rana, 2006). För äpplen är rätt fasthet en kvalitetsparameter som gör att frukten upplevs som krispigare, saftigare och mindre mjölig (Johnston m fl, 2002).

Fastheten beror cellväggens stabilitet och styrka och är beroende av den kemiska sammansättningen. Cellväggen är uppbyggd av ett nätverk av cellulosa, sammanbundet av hemicellulosa och pektin (Johnston m fl, 2002). Pektin finns även i mittlamellen och bidrar till att cellerna fäster till varandra. På grund av enzymatisk aktivitet under mognadsprocessen omvandlas protopektin till lösligt pektin. Då blir cellväggen blir mindre stabil och adhesionen mellan cellerna försämras, vilket gör fruktköttet mjukare (Johnston m fl, 2002). Fastheten

påverkas också av turgortrycket i cellerna och främst under lagring riskerar frukten att bli mjukare till följd av vattenförlust (Rana, 2006).

1.2.3 Socker och syra

Smak och arom i frukt påverkas av innehållet av socker, syra och balansen dem emellan (Daillant-Spinnler m fl, 1996).

Mängden lösliga sockerarter ökar under mognadsprocessen på grund av att stärkelse och hemicellulosa i cellväggen hydrolyseras till lösliga sockerarter. Kvalitetsparametern TSS (totable soluble solids) ger mängden lösta ämnen i frukten och består av lösliga sockerarter, mineraler och syror (Rana, 2006). TSS brukar användas för att ange sockerinnehållet, eftersom sockerarterna dominerar värdet på TSS. I mogna äpplen består sockerarterna till största delen av fruktos, följt av sukros och glukos samt även en liten mängd sorbitol (Harker m fl, 2002).

Syran i frukten avtar med mognadsgraden och under lagringen eftersom de organiska syrorna bryts ned till socker (Rana, 2006; Kingston, 1993). I äpplen är äppelsyra den dominerande syran, men det finns även bland annat mjölksyra, citronsyra och oxalsyra (Lal Kausal & Sharma, 1995). Mängden syra anges ofta i mg äppelsyra/100 g friskvikt eller som den titrerbara syran i fruktsaften i % (TA) och kvoten mellan TSS och TA i frukten visar på balansen mellan sött och surt. Kvoten är en viktig parameter för fruktkvaliteten då den har betydelse för smaken och aromen (Vangdal, 1985; Kingston, 1993; Rana, 2006).

1.2.4 Vitamin C

Vitamin C är ett samlingsnamn för de olika ämnen som har biologisk aktivitet som L-askorbinsyra (AA), bland annat den oxiderade formen dehydroaskorbinsyra (DHA) (Deutsch, 2000). AA syntetiseras i växter från olika enkla sockerarter och har viktiga funktioner i växtens försvar mot olika stressituationer (Davey m fl, 2000).

En av de mest väsentliga funktionerna hos AA är som antioxidant och därmed skydd mot fria syreradikaler i både växter och i djur. Fria syreradikaler är skadliga ämnen som påverkar lipider, proteiner och DNA negativt (Davey m fl, 2000). Den antioxidativa egenskapen innebär att ämnena kan omvandla de fria syreradikalerna till mindre skadliga ämnen. I växter är det av stor betydelse för att minska de skadliga effekterna av fotooxidation vid höga ljusintensiteter, medan hos människan kan antioxidanter förebygga olika kroniska sjukdomar och minska risken för cancer, hjärt-kärlsjukdomar och gråstarr (Davey m fl, 2000).

Människan kan inte själv syntetisera vitamin C utan det är ett essentiellt näringsämne som vi främst får i oss från frukt och grönsaker. Brist på vitamin C kan orsaka den allvarliga

sjukdomen skörbjugg, som yttrar sig som bland annat blödningar i hud och tandkött (Olmedo m fl, 2006). I förhållande till hur mycket som konsumeras så kommer den största delen av vitamin C i människans diet från potatis och apelsiner. Äpplen innehåller relativt lite vitamin C, men eftersom det är en av de mest konsumerade frukterna i världen är innehållet därför inte helt irrelevant (Davey m fl, 2000).

Innehållet av vitamin C i frukter och grönsaker påverkas av faktorer som gödsling och solinstrålning, men även sort, storlek, mognadsgrad och framför allt hantering och lagring (Davey m fl, 2000). Under lagring pågår en ständig enzymatisk aktivitet som oxiderar vitamin C, men oxidationen minskar betydligt genom kylförvaring och minskar ännu mer vid frysning. Vid processning av produkter, till exempel vid kokning, förloras mycket vitamin C eftersom det är löser ut sig i kokvattnet (Davey m fl, 2000). Förlust kan också ske när vitamin C utsätts för ljus, höga temperaturer, högt pH, syre, olika enzymer och metalljoner (Nováková m fl, 2008).

1.2.5 Fenoler

Fenoler är vanligt förekommande sekundära metaboliter i växter som kännetecknas av att de innehåller en aromatisk ring med en hydroxylgrupp, en så kallad fenolgrupp (Taiz & Zeiger, 2006). I växten fungerar de fenoliska ämnena som en del av försvaret mot patogener och stark ultraviolett strålning, men kan också ge färg och locka pollinatörer. De fenoliska ämnena delas in i tre huvudsakliga grupper, flavonoider, fenoliska syror och polyfenoler (King & Young, 1999).

Innehållet av fenoler i växter påverkas av olika faktorer under odlingen, så som ljus, näringstillförsel, vattentillgång och temperatur, men det finns även variation mellan olika sorter av samma gröda samt för olika vävnader i samma växt (King & Young, 1999).

De fenoliska ämnena är biologiskt aktiva och det finns indikationer på att de kan ha en hälsofrämjande effekt hos människan genom att vara antioxidanter och förebygga cancer, hjärt-kärlsjukdomar, astma och diabetes (Boyer & Liu, 2004). Människans viktigaste källor för fenoler är te, rött vin och kaffe, men även färska bär och frukter (Manach m fl, 2004).

Äpplen, framförallt skalet, är en källa för fenoler och innehåller i synnerhet olika flavonoider, som quercetin och catechin, men också den fenoliska syran klorogensyra, och dessa har visat på goda antioxidativa egenskaper (Boyer & Liu, 2004).

1.3 Växtförädling med hjälp av genteknik

Växtförädling på traditionellt vis är tidskrävande och ineffektivt för att få fram en önskad egenskap utan att påverka andra egenskaper. Med hjälp av genteknik kan förädlingen göras enklare genom att utgå från redan relativt bra material och förändra i enbart en gen, vilket gör att andra egenskaper kan förbli opåverkade (Zhu & Welander, 1999).

Tillämpning av genteknik på växter innebär att fragment av DNA med önskade gener, antingen från andra växter eller från helt andra organismgrupper, förs in i växtceller eller växtvävnader. Införandet sker med hjälp av bakterie- eller virusvektorer eller direkt med partikelkanon eller elektroporering och följs av vävnadsodling och mikroförökning för att producera hela plantor (Chawla, 2002).

Första gången främmande gener, introducerade med hjälp av genteknik, uttrycktes i växter var 1984 i tobak. Den första kommersiella grödan lanserades 1995 och var en potatis med resistens mot Coloradoskalbaggen, till följd av *Bt*-genen från bakterien *Bacillus thuringiensis* (Chawla, 2002). Idag omfattar odlingen med genetiskt modifierade grödor 125 miljoner hektar fördelade på 25 länder världen över och utgörs främst av sojabönor, majs och bomull, men även hortikulturella grödor som tomat och squash förekommer (ISAAA, 2009).

De egenskaper som introduceras är främst tolerans mot herbicider, resistens mot insekter, virus och olika sjukdomar men på senare tid även gener som skall ge skydd mot abiotiska stressfaktorer och för produktion av ämnen som omega-3 och vitamin A (Chawla, 2002; ISAAA, 2009).

1.3.1 Transformerings med *Agrobacterium*

Transformerings är en välanvänd och effektiv metod för att föra in främmande gener i växter för att därmed kunna studera biologiska processer, ge nya egenskaper eller producera sekundära metaboliter (Darbani m fl, 2008b). För överföringen av gener används ofta jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens* som naturligt har egenskapen att kunna infektera växtvävnader och ge karaktäristiska tumörer (Zupan m fl, 2000). Tillväxten av tumören beror på att *A.tumefaciens* sätter in egna DNA-sekvenser (T-DNA) i växtens DNA och T-DNA innehåller gener som kodar för auxin och cytokinin som inducerar celledelning. Bakterien har en tumörinducerande plasmid (Ti-plasmid) som omfattar T-DNA och virulensregionen (*vir*). Generna i *vir* stimuleras av fenoler från växter och transkriberar för proteiner som kan överföra T-DNA till plantcellerna och transportera vidare in i cellkärnan och sätta in T-DNA i växtens kromosomer (Darbani m fl, 2008b).

När *A. tumefaciens* används som verktyg för att sätta in främmande gener i växter har den tumörinducerade regionen tagits bort och ersatts med de gener som ska överföras. Generna sätts under en promotor som måste kunna uttryckas av växten. Dessutom används ofta en markör gen för att kunna identifiera plantorna där transformeringen lyckats (Darbani m fl, 2008a). Användningen av *A. tumefaciens* är välutbredd, vilket beror på att metoden fungerar på många olika växtslag och vävnader samt att det ger en hög och stabil överföring av generna (Darbani m fl, 2008b).

1.3.2 Genen rolB

Agrobacterium rhizogenes är en vanligt förekommande jordbakterie nära besläktad med *A. tumefaciens* och som identifierades då den gav håriga rötter i äppelträd (Welander & Zhu, 2006). Bakterien innehåller en rotinducerade (Ri) plasmid med en sekvens av gener (T-DNA) som kan överföras till växtens genom på samma sätt som T-DNA i *A. tumefaciens*. På T-DNA-sekvensen i Ri-plasmiden har lokusen *rolA*, *B*, *C* och *D* identifierats och dessa har använts vid transformering i försök att förbättra olika egenskaper i växter, främst rotningens förmågan. Vid transformering av växter med *rolB* förbättras både rotningens procent och antalet rötter (Welander & Zhu, 2006).

Ännu är det inte helt säkert vad *rolB* har för funktion men studier tyder på att genen antingen kan påverka signaleringsvägen för auxin, ändra på känsligheten för auxin eller påverka bindningskapaciteten för auxin (Welander & Zhu, 2006).

Idag är *rolB* välanvänd inom både agrikultur och hortikultur i främst vedartade växter för att förbättra rotningen, men kan även påverka andra egenskaper som stamlängd och antal noder (Welander & Zhu, 2006).

En forskargrupp vid området för växtförädling och bioteknik, SLU Alnarp, har använt sig av *rolB* och transformering med *Agrobacterium* i ett försök att förbättra rotningen i grundstammar av fruktträd som för övrigt har bra egenskaper. De transformerade plantornas rotningens förmåga förbättrades samtidigt som stamlängden minskade (Zhu m fl, 2007).

Projektet fortsatte med att de två äppelgrundstammarna M9 och M26 ympades med fem äppelsorter ('Aroma', 'Discovery', 'Elise', 'Elstar' och 'Jonagold') för att utvärdera hur den transgena grundstammen påverkar den icke-transgena sorten och om det kan ske en transport av genen över ympstället (Zhu m fl, 2007). Överlevnaden av ympkvisten och blomningen har utvärderats, men ingen påverkan av transgenen har visats (Zhu m fl, 2007). Nästa steg är att analysera om frukt kvaliteten i de inympade sorterna har påverkats av transgenen i grundstammen.

1.4 Syfte

Syftet med detta arbete var att undersöka om fruktkvaliteten i den icke-transgena äppelsorten 'Jonagold' påverkades av grundstammarna M9 och M26 som blivit transformerade med genen *rolB*.

2 MATERIAL OCH METODER

2.1 Växtmaterial

Äpplen av sorten 'Jonagold' ympade på icke-transgena grundstammarna M26 och M9 samt de transformerade klonerna M26-*rolB*, M9-*rolB1* och M9-*rolB2* användes i detta projekt.

Träden planterades 2005 på ett försöksfält vid SLU i Alnarp i södra Sverige. Frukterna plockades den 10 oktober 2008, slogs in i hushållspapper och lades i papperspåsar omslutna av plast. Därefter lagrades de i kylrum, 4°C, i 24 veckor till 24 mars 2009.

2.2 Metoder

För analys av vikt, diameter och färg användes tio frukter per grundstam. För att få tillräcklig mängd äpple till de olika kemiska analyserna delades de tio äpplena från varje grundstam upp i fem prov med två äpplen i varje. Varje äpple halverades och halvan skars i tre klyftor. Sedan slogs en klyfta från var och en av de fyra halvorna och slogs ihop till ett prov. Äpplena till analyserna av vitamin C och av fenoler frystes in i -80°C. Proven för fenolanalysen skalades och skalén placerades i en egen påse. Materialet för analysen av titrerbar syra togs om hand samma dag, utan att frysas in.

2.2.1 Vikt och storlek

Äpplena för varje kombination vägdes var och ett för sig och storleken erhöles genom mätning med ett skjutmått på den största diametern.

2.2.2 Färg

För analys av skalets färg användes Minolta Chroma Meter CR-200, som beräknade färgen med färgsystemet L*C*H°. Systemet bygger på färgsystemet L*a*b* framtaget 1976 av CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) (McGuire, 1992). L* står för ljusstyrkan och anges på en skala från 0 (svart) till 100 (vitt), ett högre värde ger därmed en ljusare färg. C* beskriver färgens intensitet eller mättnad och beräknas ur ett cirkelformat färgsystem där a* är röd/grön koordinat och b* är gul/blå koordinat och kan beräknas genom $C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$. H° är vinkeln i färgsystemet och anger färgtonen, $H^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$. Det ger att om $H^\circ = 0^\circ$ är färgen röd, 90° ger gult, 180° är grönt samt 270° ger blått (Lancaster m fl, 1997).

Colourimetern analyserade tre olika punkter på skalet på varje äpple och kalkylerade ett medelvärde för L*, C* och H°.

2.2.3 Fasthet

Fastheten på äpplena analyserades med Effigy penetrometer FT 327 med 11,1 mm kolv på två ställen på varje äpple, där skalet först hade avlägsnats. Fastheten mättes en gång på solsidan av äpplet (mest röd) och en gång på skuggsidan (mest gul) och ett medelvärde beräknades.

2.2.4 Socker

Analysen för socker i form av TSS (total soluble solids) genomfördes med Precision Instruments digitala refraktometer RFM 80, med möjlighet att ange TSS i intervallet 0-95 %. En droppe av juicen från titreringen av syra (se 2.2.5) som varit infrysad i -20°C, placerades på linsen med en pipett. Refraktometern gav den totala torrsubstansen i provet och användes som ett ungefärligt mått på andelen socker i provet. För varje prov gjordes analysen två gånger och ett medelvärde beräknades.

2.2.5 Syra

Syrainnehållet i analyserades genom titrering av fruktsaften. Äppelklyftorna vägdes, skars i bitar och finfördelades i Melissa Minihackare tillsammans med 30 ml milliporevatten. Det homogeniserade provet centrifugerades 20 minuter i 4°C vid 10 000 rpm. Därefter hälldes supernatanten över till ett mindre centrifugrör som centrifugerades ytterligare en gång i 20 minuter i 4°C vid 15 000 rpm. Av den klara juicen pipetterades 5 ml och användes till titreringen efter spädning med 10 ml milliporevatten. Titreringen utfördes under magnetomrörning till pH 8,1 med NaOH 0,05 M som titrant och med Metrohm 691 pH Meter. Åtgången volym titrant noterades och användes för beräkning av fruktsaftsyra.

2.2.5.1 Beräkning av syra

Innehållet av syra, uttryckt i mg äpplesyra/100 g friskvikt (c) beräknades med formeln $c = a \cdot t \cdot c \cdot 100 \cdot 67,05 / (j \cdot p)$ där a är volymen titrant, t är totalvikten av det homogeniserade provet med vatten, j är volymen fruktsaft uttagen för titrering, p är friskvikten av provet och 67,05 ekvivalensvikten för äpplesyra (Gustavsson, pers. medd., 2009).

2.2.6 Socker/syra

Förhållandet mellan socker och syra beräknades som kvoten mellan TSS och syrainnehållet uttryckt som titrerbar syra (TA) i procent.

2.2.7 Vitamin C

Prepareringen av provet inför analysen av vitamin C med HPLC utfördes i grönt ljus för att förhindra nedbrytning av den känsliga askorbinsyran. De frusna äppelklyftorna tinades snabbt i plastpåsar i vattenbad och hackades i småbitar. För varje prov vägdes 5 g in, upprepat tre

gångar. Proverna mixades med Ultra-Turrax stavmixer tillsammans med 25 ml metafosforsyra 1,5 % i 50 ml plastburkar och extraktionerna frystes in direkt i -80°C i väntan på HPLC-analysen.

Extraktionerna tinades i vattenbad och skakades om innan 1 ml pipetterades till eppendorfrör och centrifugeras 10 minuter i 4°C vid 13 000 rpm. Av supernatanten pipetterades 500 µl till eppendorfrör. För att reducera dehydroaskorbinsyra (DHA) till askorbinsyra (AA) tillsattes 550 µl av en lösning av DTT, 11 mg/ml, pH-justerad med K₂HPO₄. Proven fick reagera i drygt 30 minuter innan rören centrifugerades i 5 minuter i 4°C vid 10 000 rpm. Därefter fördes 600 µl över till HPLC-vialer och analyserades med HPLC-systemet LaChrome Merck Hitachi, dataprogrammet D-7000 HSM HPLC och kolonnen Phenomenex Synergi 4u polar RP. Analysen genomfördes i rumstemperatur. Till den mobila fasen användes buffert med 20 mM KH₂PO₄ och 4 % metanol, justerad till pH 2,3 med H₃PO₄. Detektorn var inställd på 248 nm och tiden för varje prov var 15 minuter med flödet 1 ml/minut. Injektionsvolymen var 10 µl. Provens areor jämfördes med en standardkurva med kända koncentrationer av askorbinsyra.

2.2.7.1 Standardkurva för askorbinsyra

Femtio mg askorbinsyra löstes i 100 ml metafosforsyra 1,5 %. Lösningen späddes 10 gånger med metafosforsyra. Av den spädda lösningen blandades 20 ml med 25 ml DTT-lösning (11 mg/ml) till en koncentration av 40 mg askorbinsyra/ml. Av standarden pipetterades 1 ml till eppendorfrör och frystes in i väntan på analys.

Standarden kördes i HPLC med injektionsvolym 2 µl, 5 µl och 10 µl, vilket gav mängden askorbinsyra 80 ng, 200 ng och 400 ng. Den uppmätta integrationsarean användes för att rita upp standardkurvan.

2.2.7.2 Beräkning av vitamin C

Innehållet av vitamin C, i form av askorbinsyra (AA), beräknades genom att provernas integrationsarea uppmätt med HPLC jämfördes med standardkurvan som följde linjen $y = 1382x$, där x är ng askorbinsyra och y integrationsarean där riktningskoefficienten erhöles genom att tvinga kurvan genom origo. Mängden askorbinsyra/10 µl erhöles av formeln $x = y * 2,1 / 1382$, där 2,1 är en faktor som korrigerar för spädningseffekten som fås vid reduktionen av askorbinsyra (Gustavsson, pers. medd., 2009). Mängden askorbinsyra uttryckt som mg/100g friskvikt (c) beräknades med formeln $c = x * 10^{-7} * (v + 0,85 * m) / m * 100$, där x är ng askorbinsyra i 10 µl, v är volymen metafosforsyra i µl, 0,85 andelen vatten i det invägda provet (torrsubstanshalten uppskattad till 15 %) och m är massan på provet i g.

2.2.8 Fenoler

2.2.8.1 Fruktköttet

Analyserna av fenoler gjordes spektrofotometriskt med Folin-Ciocalteau's metod enligt Dewanto m fl (2002). Äppelklyftorna, som varit frysta i -80°C , tinades i en påse i vattenbad. Provet homogeniserades i Melissa Minihackare. Av äppelmoset placerades 0,2 g i ett eppendorfrör och extraherades med 1 ml etanol 50 % i 10 minuter på en vibrator. Därefter centrifugerades provet i 13 000 rpm i 15 minuter. Av supernatanten pipetterades 63 μl över till 1,5 ml-kyvetter tillsammans med 250 μl milliporevatten och 63 μl Folin-Ciocalteau's reagens, som fick verka i 6 minuter. Proverna färgades gula på grund av en reaktion mellan reagensen och provets innehåll av oxiderbara fenolater (Dewanto m fl, 2002). Därefter tillsattes 625 μl Na_2CO_3 7 % för att höja pH i provlösningen vilket gjorde att fenolerna i provet övergick till fenolater (Dewanto m fl, 2002). Proverna fick reagera i 75 minuter innan absorbansen lästes av i Shimadzu Recording Spectrophotometer UV-240 Grapicord vid våglängden 765 nm. Absorbansen jämfördes med en standardkurva.

2.2.8.2 Skalet

De frysta skalerna tinades i en påse i vattenbad och finhackades. Av det så gott som homogeniserade materialet vägdes 5 g in i centrifugrör och extraherades med 25 ml etanol 50 % i 10 minuter och centrifugerades i 13000 rpm i 15 minuter. Från supernatanten pipetterades 1 ml till eppendorfrör. Före analysen späddes extraktionen till 50 %, genom att 32 μl pipetterades 1,5 ml-kyvetter tillsammans med 32 μl etanol 50 %. För övrigt genomfördes analysen på samma sätt som för fenolinnehållet i fruktköttet.

2.2.8.3 Standardkurva för fenoler

En standardlösning framställdes av 10 mg gallsyra som löstes i 10 ml etanol 50 % och späddes sedan till 40, 20, 10, 5 respektive 0 % i etanol 50 %. Standarderna behandlades på samma sätt som provlösningarna med Folin-Ciocalteau's reagens och utifrån den uppmätta absorbansen ritades en standardkurva upp.

2.2.8.4 Beräkning av fenoler

Det totala innehållet fenoler i beräknades genom att provernas absorbans jämfördes med standardkurvan som följde linjen $y = 0,057x + 0,046$, där y är absorbansen och x är koncentrationen gallsyra i procent. Provernas koncentration erhöles därmed av formeln $x = (y - 0,046) / 0,057$. Totalfenoler uttryckt som mg gallsyraekvivalenter/g fruktkött eller skal (c) beräknades med $c = x / 100 * v / m$, där x är koncentrationen i procent, v är extraktionsvolymen etanol i ml och m är friskvikten av provet i g.

2.2.9 Statistiska analyser

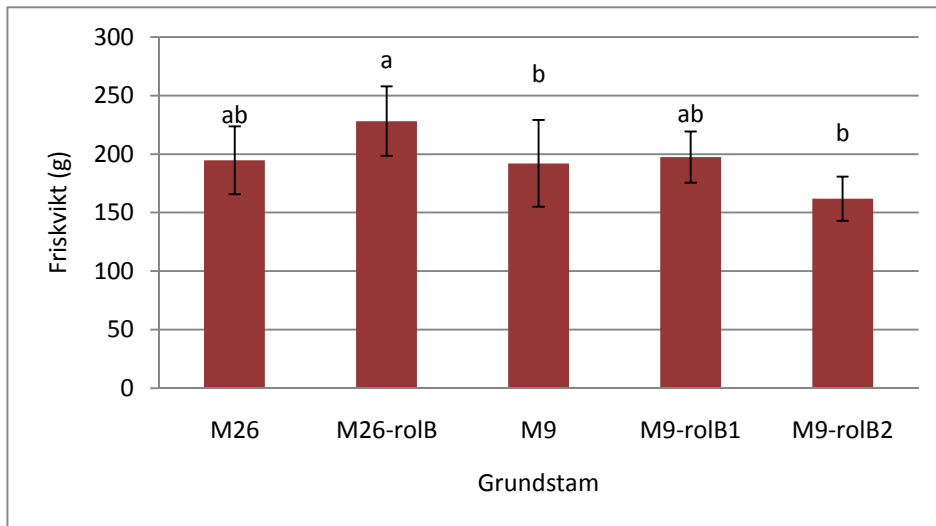
Datamaterialet behandlades i programmet Minitab 15 med en envägs variansanalys (ANOVA) och signifikansnivån $p=0,05$. Då signifikans fanns användes Tukey's test för att avgöra vilka av grundstammarna som skiljde sig åt på nivån $p=0,05$.

Standardkurvorna för analys av fenoler och vitamin C ritades upp som regressionslinjer i programmet Microsoft Excel.

3 RESULTAT

3.1 Vikt

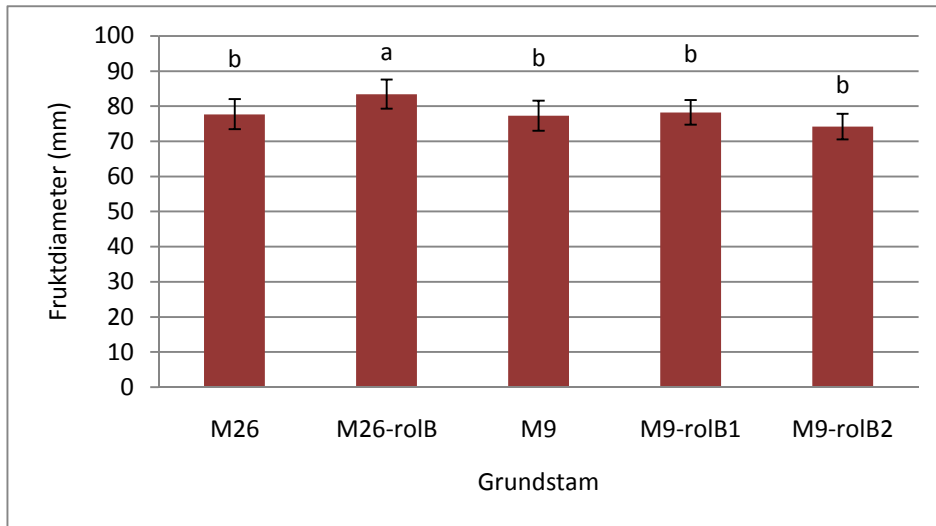
Det fanns ingen signifikant skillnad i fruktvikt mellan transgen och icke-transgen grundstam vare sig i M9 eller i M26 (figur 1). Vikten på äpplena varierade mellan 161,9 g till 228,2 g för de fem olika grundstammarna och M26-*rolB* gav tyngre frukter än M9 och M9-*rolB2*.



Figur 1. Vikten på äpplena av 'Jonagold' ympade på grundstammarna av M26, M26-*rolB*, M9, M9-*rolB1* och M9-*rolB2*. Varje stapel visar medelvärdet och standardavvikelsen. Staplar med samma bokstav var inte signifikant skilda åt, $p=0,05$ ($n=10$).

3.2 Storlek

För M9 fanns ingen skillnad i fruktstorleken mellan transgen och icke-transgen grundstam (figur 2). Den transgena M26-*rolB* gav större frukter än den icke-transgena M26 och även större frukter än de tre grundstammarna av M9. Storleken på äpplena var ändå relativt jämn, med diameter från 74 mm till 83 mm i genomsnitt.

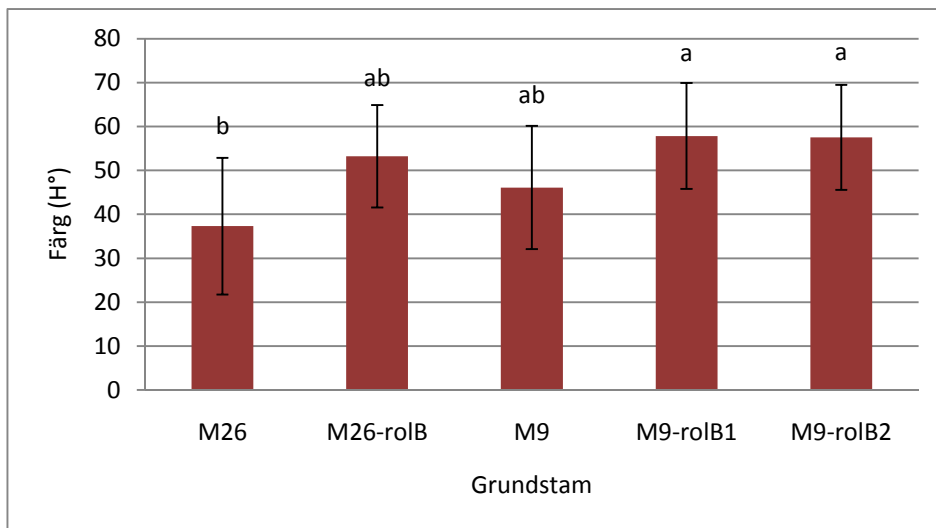


Figur 2. Diameter på äpplena av 'Jonagold' ympade på grundstammar av M26, M26-*rolB*, M9, M9-*rolB1* och M9-*rolB2*. Varje stapel visar medelvärdet och standardavvikelsen. Staplar med samma bokstav var inte signifikant skilda åt, $p=0,05$ ($n=10$).

3.3 Färg

Fruktfärgsanalysen gav tre olika värden för var och en av de fem kombinationerna, L^* för ljusheten, C^* för mättnadsgraden och H° för vilken färgton äpplet hade. Äpplena var inte symmetriskt färgade, utan den solbelysta sidan hade i de flesta fall den rödstimmiga täckfärgen medan skuggsidan hade mer av den gula grundfärgen.

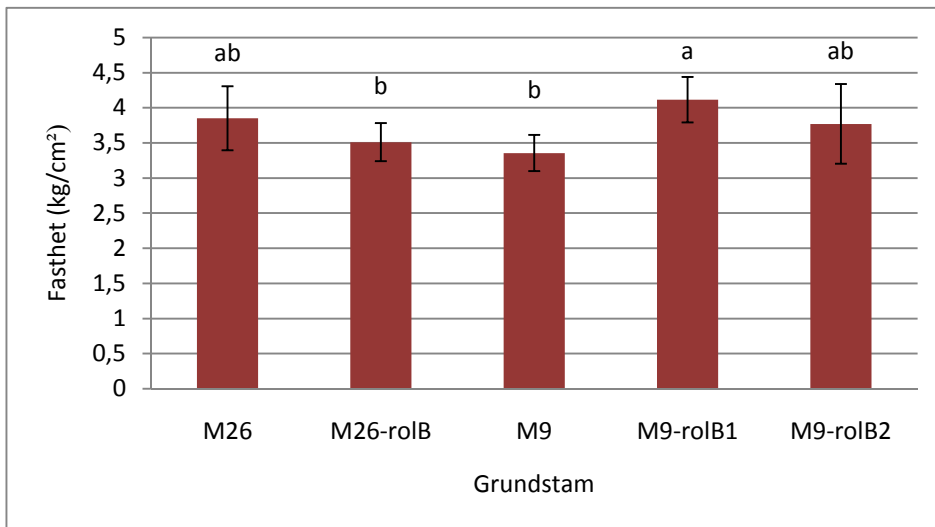
Det fanns ingen skillnad mellan de transgena klonerna och respektive icke-transgen kontroll (figur 3). Äpplen från icke-transgena M26 var rödast av frukterna, med lägst värde på H° (37°). Klonerna M9-*rolB1* och M9-*rolB2* hade högst värden på H° och var därmed gulast och skillnaden var signifikant mot icke-transgen M26.



Figur 3. Färg på äpplen av 'Jonagold' ympade på grundstammar av M26, M26-*rolB*, M9, M9-*rolB1* och M9-*rolB2*. Varje stapel visar medelvärdet och standardavvikelsen. Större H° innebär gulare skal, lägre H° innebär rödare skal. Staplar med samma bokstav var inte signifikant skilda åt, $p=0,05$ ($n=10$).

3.4 Fasthet

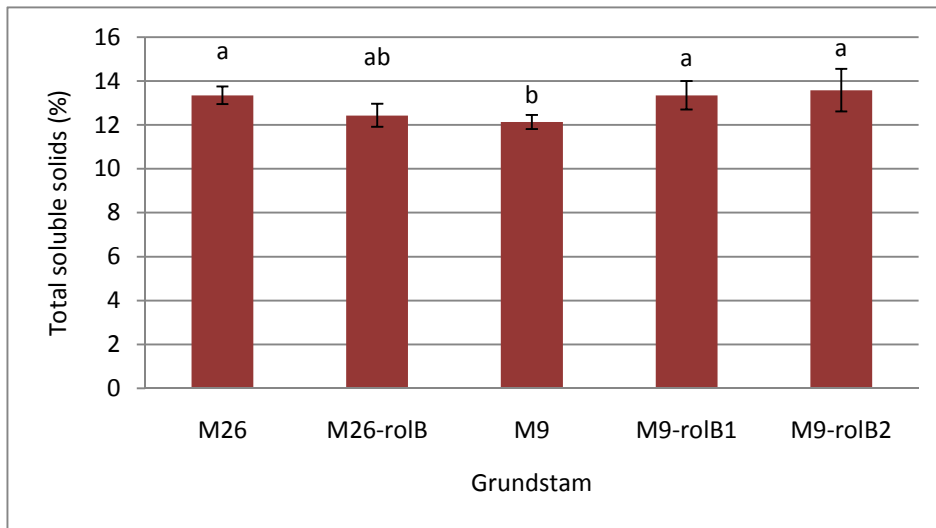
För M26 var det ingen skillnad på fastheten på frukterna från icke-transgen och transgen grundstam (figur 4). Äpplen från transgena M9-*rolB1* hade fastare frukter än icke-transgen M9. Fastheten varierade från 3,4 kg/cm² för M9 till 4,1 kg/cm² för M9-*rolB1*. Eftersom frukterna lagrats relativt länge, är det rimligt att fruktköttet blivit mjukare under tiden. Äpplena hade börjat bli lite skrumpna i skalet, vilket tyder på mindre saftspända frukter och därmed lägre fasthet än vid skörd.



Figur 4. Frukfasthet på äpplen av 'Jonagold' ympade på grundstammar av M26, M26-*rolB*, M9, M9-*rolB1* och M9-*rolB2*. Varje stapel visar medelvärdet och standardavvikelsen. Staplar med samma bokstav var inte signifikant skilda åt, $p=0,05$ ($n=10$).

3.5 Socker

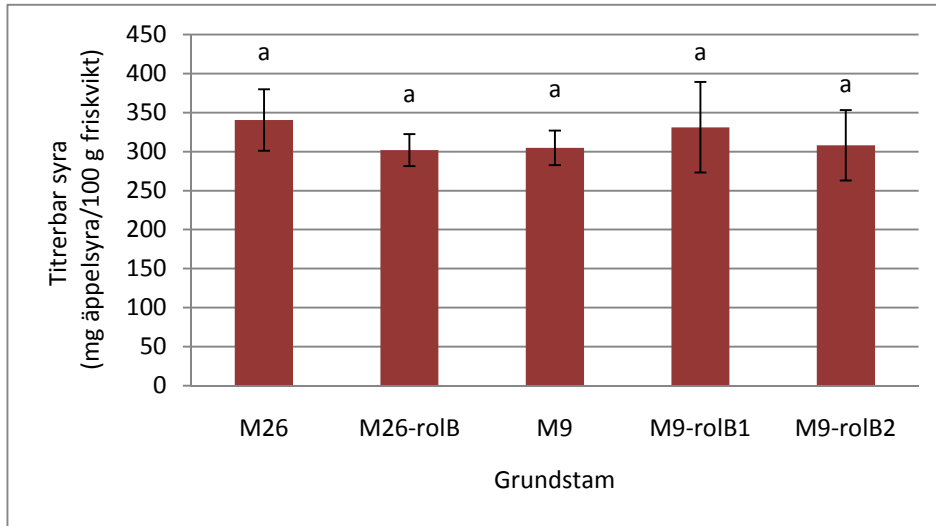
För M26 var det ingen skillnad mellan den transgena grundstammen med *rolB* och den icke-transgena kontrollen i äpplenas halt av socker uttryckt som TSS (figur 5). Kontrollen för M9 hade lägre halt socker än de transgena klonerna M9-*rolB1* och M9-*rolB2*. TSS i äpplena varierade mellan 12,1 % (M9) och 13,6 % (M9-*rolB2*).



Figur 5. TSS (total soluble solids) i äpplen av 'Jonagold' ympade på grundstammar av M26, M26-*rolB*, M9, M9-*rolB1* och M9-*rolB2*. Varje stapel visar medelvärdet och standardavvikelsen. Staplar med samma bokstav var inte signifikant skilda åt, $p=0,05$ ($n=5$).

3.6 Titrerbar syra

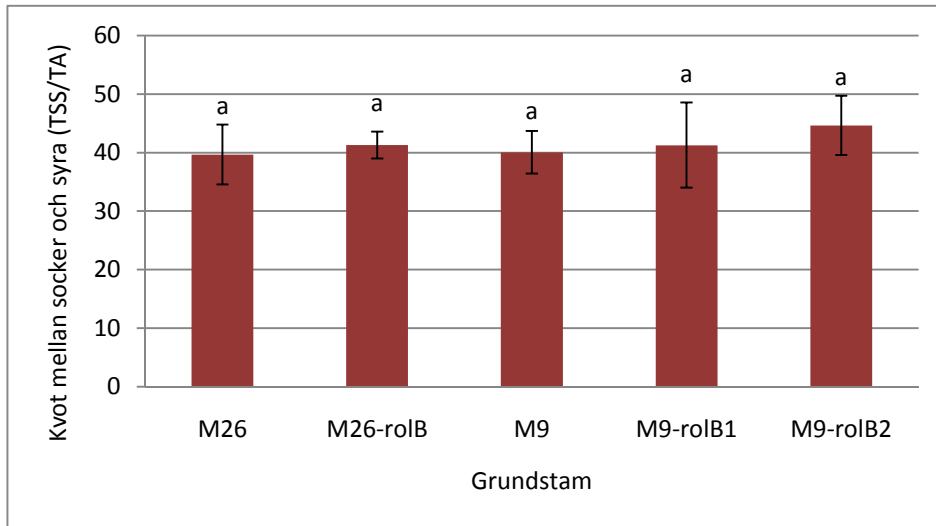
Det fanns inga skillnader i mängden syra i fruktsaften mellan de transgena klonerna och de icke transgena kontrollerna (figur 6). Syrainnehållet varierade från 302 mg äppelsyra/100 g friskvikt i äpplen från M26-rolB, till 341 mg äppelsyra/100 g friskvikt i äpplen från M26.



Figur 6. Mängd syra i fruktsaften från äpplen av 'Jonagold' ympade på grundstammar av M26, M26-rolB, M9, M9-rolB1 och M9-rolB2. Varje stapel visar medelvärdet och standardavvikelsen. Staplar med samma bokstav var inte signifikant skilda åt, $p=0,05$ ($n=5$).

3.7 Socker/syra

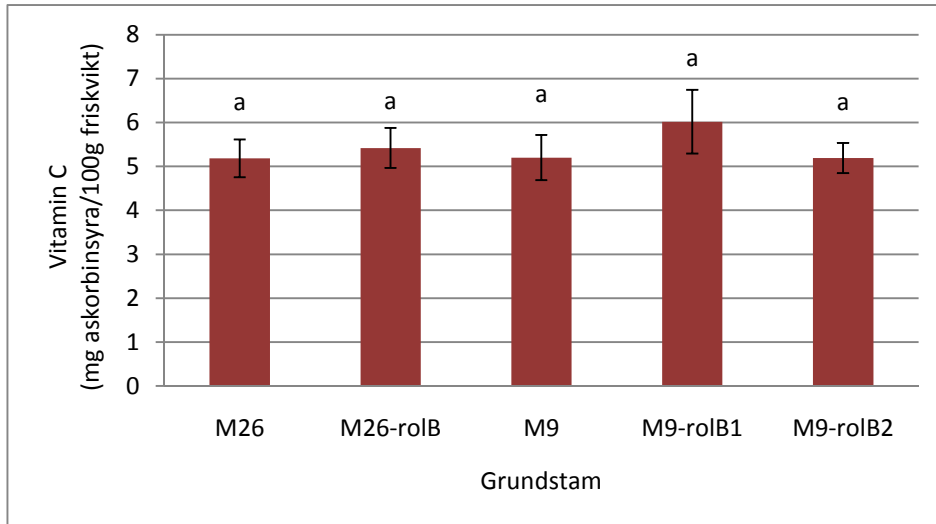
Ingen signifikant skillnad i kvoten mellan socker och syra fanns mellan äpplena från de olika grundstammarna (figur 7). Kvoten varierade från 39,7 för M26 till 44,6 för M9-rolB2.



Figur 7. Kvoten mellan TSS och TA i äpplena av 'Jonagold' ympade på grundstammar av M26, M26-rolB, M9, M9-rolB1 och M9-rolB2. Staplarna visar medelvärdet och standardavvikelse. Staplar med samma bokstav var inte signifikant skilda åt, $p=0,05$ ($n=5$).

3.8 Vitamin C

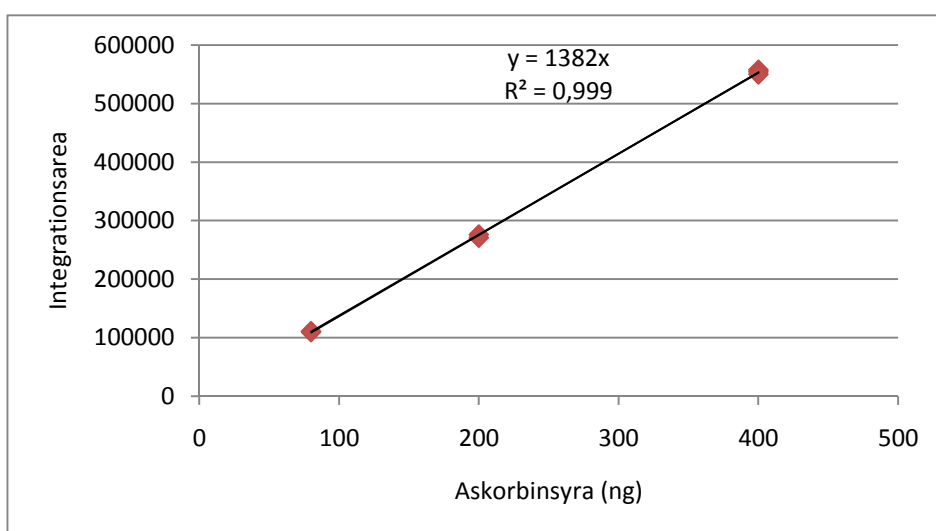
För innehållet av vitamin C i frukten fanns ingen skillnad mellan transgena kloner och respektive icke-transgen kontroll (figur 8). Vitamin C var lägst i äpplena från M26 och M9, med 5,2 mg/100 g friskvikt och högst, 6,0 mg/100g friskvikt från M9-rolB1.



Figur 8. Mängd vitamin C (askorbinsyra) i äpplen av 'Jonagold' ympade på grundstammar av M26, M26-rolB, M9, M9-rolB1 och M9-rolB2. Varje stapel visar medelvärdet av fem prov med standardavvikelse. Staplar med samma bokstav var inte signifikant skilda åt, $p=0,05$ ($n=5$).

3.8.1 Standardkurva för askorbinsyra

Standardkurvan för koncentrationen askorbinsyra i förhållande till integrationsarean hade en residualkvadrat (R^2) på 0,999 (figur 9).

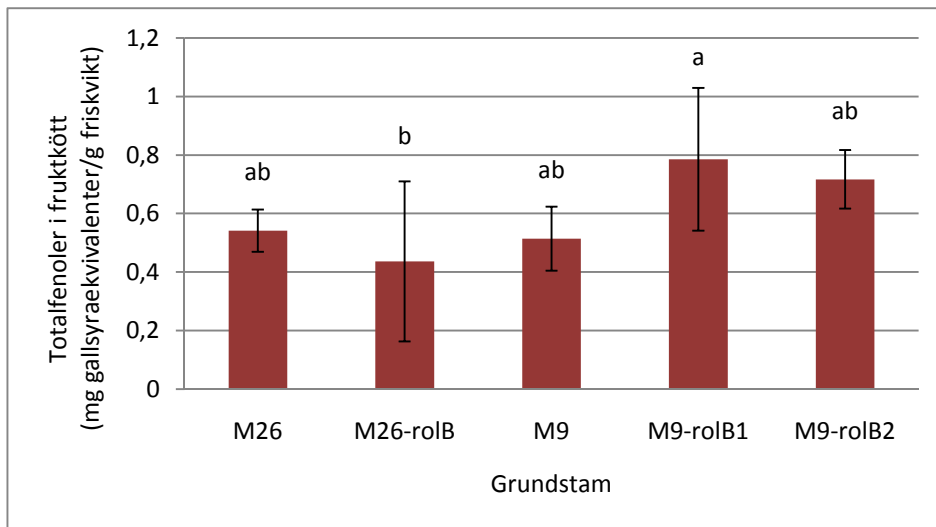


Figur 9. Standardkurva för mängden askorbinsyra i förhållande till integrationsarean från HPLC-analys.

3.9 Fenoler

3.9.1 Fruktköttet

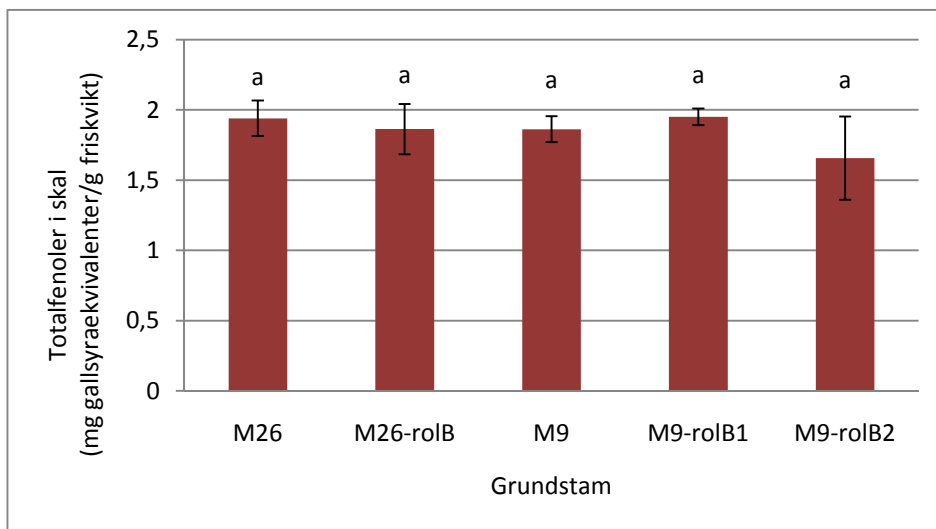
Mellan kontrollerna och motsvarande transgena kombinationer fanns inga signifikanta skillnader i mängden fenoler i fruktköttet (figur 10). Mängden totalfenoler varierade från 0,44 till 0,79 mg gallsyraekvivalenter/g fruktkött och innehållet i *M9-rolB1* var signifikant högre än i *M26-rolB*.



Figur 10. Totalfenoler i fruktköttet i äpplen av 'Jonagold' ympade på grundstammar av M26, M26-rolB, M9, M9-rolB1 och M9-rolB2. Staplarna visar medelvärdet i och standardavvikelse. Staplar med samma bokstav var inte signifikant skilda åt, $p=0,05$ ($n=5$).

3.9.2 Skalet

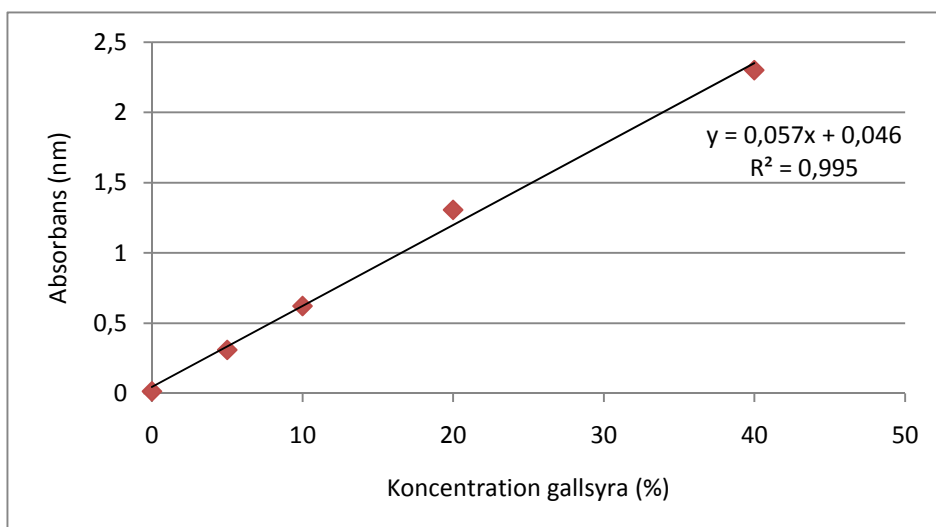
I äpplenas fruktskal fanns inga signifikanta skillnader mellan de icke transgena kontrollerna och de transgena grundstammarna (figur 11). Mängden fenoler var betydligt högre än i fruktköttet, 1,66-1,95 mg gallsyraekvivalenter/g skal. Medelvärdet för M9-rolB2 var lägre än de övrigas, men inte signifikant på grund av en stor spridning av datamaterialet.



Figur 11. Totalfenoler i fruktskalet i äpplen av 'Jonagold' ympade på grundstammarna av M26, M26-rolB, M9, M9-rolB1 och M9-rolB2. Varje stapel visar medelvärdet och standardavvikelsen. Staplar med samma bokstav var inte signifikant skilda åt, $p=0,05$ ($n=5$).

3.9.3 Standardkurva för fenoler

Standardkurvan för totala fenoler, med koncentrationen gallsyra i förhållande till absorbansen hade en residualkvadrat (R^2) på 0,995 (figur 12).



Figur 12. Standardkurva för koncentrationen gallsyra i förhållande till absorbansen i spektrofotometer.

4 DISKUSSION

Fruktkvaliteten i äpple är framförallt kopplat till vilket sort det är, men också klimatfaktorer, odlingsåtgärder och skördemängd påverkar. Även grundstammen skulle kunna ha en inverkan på fruktkvaliteten (Castle 1995). Den här studien visade på hur en transgen grundstam kan påverka fruktkvaliteten i en icke-transgen sort av äpple, en aspekt som inte tidigare undersökts på djupet.

Hur en transgen grundstam, transformerad med generna *rolA*, *rolB* och *rolC*, kunde påverka sorten undersöktes i rosor och där förbättrades tillväxten i ympen genom att fler skott bildades från den basala delen och bladarean var större (van der Salm m fl, 1998). Zhu & Welander (1999) utvärderade tillväxten av äppelsorten 'Gravenstein' som var ympad på en transgen grundstam med *rolB*, men kunde inte påvisa att transgenen påverkade tillväxten, bladytan eller fördelningen av torrsubstans i den icke-transgena ympen.

Flera studier har jämfört fruktkvaliteten från olika icke-transgena grundstammar och visat på att det kan finnas en skillnad i kvaliteten beroende på om äpplena odlats på M9 eller M26 (Banach & Gastol 2006; Skrzyński, 2007a; 2007b). I andra rapporter drogs slutsatsen att grundstammen inte direkt påverkade fruktkvaliteten utan eventuella skillnader mellan olika grundstammar kunde förklaras av andra faktorer (Autio m fl, 1991; Castle, 1995; Al-Hinai & Roper; 2004; Barritt m fl, 1997).

4.1 Vikt och storlek

Utifrån de EU-normer för kvalitetsklassning av äpplen, uppnådde alla frukterna med god marginal gränserna för vikt och storlek, minst 90 g respektive 60 mm i diameter (Jordbrukverket, 2008a). En lämplig vikt för 'Jonagold' är 200-220 g (Skrzyński, 2007b), men i denna studie var äpplena från fyra av grundstammarna lättare än 200 g, vilket kan bero på relativt unga träd som ännu inte ger maximal fruktvikt.

Resultaten visade att vikten och storleken på äpplena inom de olika grundstammarna följde samma mönster, där den tyngsta, M26-*rolB* även var störst och den lättaste, M9-*rolB2* var minst (figur 1 och 2). Ett samband mellan fruktvikt och diameter i äpplena rapporterade Dobrzański m fl (2001) i en undersökning av nio olika lagrade äppelsorter och föreslog därför att enbart en av dessa två parametrar skulle behöva mätas för att storleksklassificera äpplen.

Diametern var signifikant större i den transgena M26-*rolB* än kontrollen, men eftersom ingen av de transgena M9 var större än den icke-transgena grundstammen beror skillnaden troligen inte på *rolB*. Banach & Gastol (2006) och Skrzyński (2007a) som analyserade äpplen

av 'Jonica' respektive 'Jonagold' ympade på M9 och M26 rapporterade om att M9 gav signifikant tyngre frukter än M26. Det stämmer inte överens med denna studie, där resultaten visade på en högre vikt i transgena M26-*rolB* än M9 och M9-*rolB2*.

En variation i fruktstorlek mellan grundstammar beror enligt Castle (1995), Al-Hinai & Roper (2004) och Stopar m fl (2002) på antalet frukter i kronan, där färre frukter ger större storlek, men att den egenskapen i sin tur påverkas av grundstammen som därmed kan ge en indirekt effekt på fruktstorleken.

4.2 Färg

Mellan de transgena grundstammarna och kontrollerna fanns ingen skillnad i färg i fruktskalet. Äpplen från de icke-transgena M9 och M26 hade inte heller någon skillnad i färg, vilket stämmer överens med Banach & Gastol (2006) i 'Jonica'. Däremot skiljde sig den rödaste frukten, från M26, signifikant från de gulare frukterna från grundstammarna M9-*rolB1* och M9-*rolB*. Enligt Robinson m fl (1983) påverkas inte fruktfärgen av grundstammen utan mikroklimatet i kronan är av större betydelse. Ett mindre antal frukter kronan och variation i kronans storlek påverkas av grundstammen och kan därför indirekt ge skillnad i färg i olika grundstammar (Stopar, 2002, Skrzyński, 2007a). Färgningen av skalet beror till stor del på temperaturen och solinstrålningen (Inglesias m fl, 2002). Mycket sol i kombination med låg temperatur ger den starkaste rödfärgningen och en skillnad i färg mellan äpplena kan uppstå om de har haft olika placering i kronan och därmed blivit solbelysta i olika hög grad. Under lagringen sker en förändring av äpplenas färg till följd av metaboliska aktivitet (Magdic & Dobricevic, 2007). Eftersom denna studie enbart analyserade frukternas färg efter lagring, finns det en möjlighet att skillnaderna i färg var annorlunda vid skördetillfället.

4.3 Fasthet

Fastheten var signifikant högre för M9-*rolB1* än kontrollen M9 och även M26-*rolB* men eftersom de två andra transgena klonerna inte visade på någon skillnad mot de icke transgena grundstammarna kan skillnaden bero på andra faktorer än *rolB*. Att fastheten inte påverkas negativt är viktigt i äpple eftersom den är av stor betydelse för hållbarheten.

Överlag var fastheten relativt låg och levde inte upp till en fasthet på minst 5,2 kg/cm² som enligt Plocharski & Konopacka (1999) är optimalt för att 'Jonagold' ska accepteras av konsumenten som bra kvalitet. Anledningen till den mjuka frukten var den förhållandevis långa lagringen (165 dagar). En lägre lagringstemperatur, högre luftfuktighet eller lagring i modifierad atmosfär kunde ha gett bättre fasthet (Johnston m fl, 2002). Fastheten var även

lägre än de 4,7-4,8 kg/cm² som rapporterades av Skrzyński (2007b) i 'Jonagold' som visserligen lagrats längre, men vid lägre temperatur och högre relativ luftfuktighet.

Skillnad i fasthet i äpplen från olika grundstammar har rapporterats av Skrzyński & Gastol (2007) som fann att 'Jonica' från M9 var fastare än M26 både före och efter lagring. Skrzyński (2007a, 2007b) analyserade 'Jonagold' och angav att äpplen från M26 var fastare vid skörd medan de från M9 var något fastare efter lagring, vilket visar på att fastheten kan förändras olika mycket i äpplen som lagrats under samma förhållanden. I denna studie fanns bara möjlighet till att analysera fastheten efter lagring och det går därför inte att utesluta att det var andra skillnader i fasthet mellan de olika grundstammarna vid skördetillfället. Andra studier (Brown & Wolfe, 1992, Al-Hinai & Roper, 2004) fann däremot ingen skillnad i fasthet i äpplen från olika grundstammar. Riesen & Husistein (1998) förklarade att en skillnad i fasthet kan bero på olika mognadsgrad, vilket i sin tur kan bero på grundstammen.

4.4 Socker

Innehållet av socker, uttryckt i TSS (total soluble solids) skiljde signifikant mellan de transgena grundstammarna av M9 gentemot kontrollen, som hade lägst TSS av alla undersökta kombinationer. Högre TSS skulle kunna ge en sötare smak för de transgena äpplena. Dock hade inte äpplen från den transgena M26 högre TSS än kontrollen, vilket ger en tveksamhet om det är *rolB* som gett det högre innehållet av socker eller om andra faktorer gett skillnaden. Sockerinnehållet förändras under lagringen till följd av en ökad mognadsgrad för äpplena (Rana, 2006). Det går därför inte att utesluta att jämförelsen mellan transgen och icke-transgen grundstam skulle kunna ha gett ett annat resultat om TSS istället analyserats vid skördetidpunkten.

I studier av Skrzyński (2007b) och Skrzyński & Gastol (2007) uppmättes TSS i lagrade äpplen till 12,1-12,2% i 'Jonagold' respektive 12,0-12,1 % för 'Jonica', vilket är lägre än alla äpplen utom från M9 i denna studie.

Den icke-transgena M26 hade högre TSS än icke-transgena M9, vilket inte stämmer överens med vad Skrzyński (2007a; 2007b) och Skrzyński & Gastol (2007) rapporterade om både direkt efter skörd och efter lagring. I dessa undersökningar fanns inga skillnader mellan M9 och M26 men det fanns dock en signifikant skillnad mellan M9 och M26 gentemot andra grundstammar. I andra studier har dock påverkan av grundstammen inte kunnat visas (Al-Hinai & Roper, 2004; Autio m fl, 1991; Kvikliene & Kviklys, 2006).

Enligt Robinson m fl (1983) och Kingston (1993) så kan en skillnad i TSS bero på att äpplena utsatts för olika mycket ljus under odlingsperioden och att mer ljus ger högre TSS.

Den förklaringen passar inte i denna studie eftersom *M9-rolB1* och *M9-rolB2* med högst TSS även var gulast, vilket tyder på att de inte varit lika solbelysta som äpplen från de andra grundstammarna.

4.5 Titrerbar syra

Flera studier där M9 och M26 ingått har visat på att titrerbar syra i äpplena inte beror på vilken grundstam som används (Skrzyński, 2007b; Barritt m fl, 1997) i vare sig 'Jonagold', respektive 'Golden Delicious'. Det stämmer med resultaten i denna studie där inga signifikanta skillnader förekom, varken mellan transgen och icke-transgen grundstam eller mellan M9 och M26. Skrzyński (2007a) och Skrzyński & Gastol (2007) kunde påvisa en effekt av olika grundstammar på syrainnehållet, dock ingen signifikant skillnad mellan M9 och M26.

I en studie av Skrzyński (2007b) uppmättes mängden syra i 'Jonagold' till 258 mg/100 g friskvikt i äpplen från M9 och 263 mg/100 g friskvikt i äpplen från M26, vilket är något lägre än äpplena i denna studie. Skillnaderna kan förklaras av olika lagringsperioder med också av att syrainnehållet kan variera mycket med odlingsplatsen och säsongen (Kingston 1993). Innehållet av syra i 'Jonagold' kan dessutom förändras mycket under lagringen, vilket rapporterades av Erturk m fl (2003). Det gör att det är möjligt att det fanns skillnader mellan transgen och icke-transgen grundstam eller skillnad mellan M9 och M26 när äpplena skördades men att förändringen av syrainnehållet under lagringen inte varit densamma för äpplena.

4.6 Socker/syra

Kombinationen av socker och syra uttryckt som kvoten mellan TSS och TA har stor betydelse för smaken och aromen i frukt (Kingston, 1993; Rana, 2006). Kvoten i äpplena skiljde sig inte mellan någon av grundstammarna, vilket skulle kunna göra att den högre sockerhalten som uppmättes i äpplen från *M9-rolB1* och *M9-rolB2*, balanseras upp av syran och därmed inte borde påverka smaken i någon större grad.

I äpple bör kvoten vara över 16 för en acceptabel kvalitet (Vangdal, 1985), vilket alla äpplena i denna studie med god marginal översteg. Den höga kvoten kan förklaras med den långa lagringsperioden under vilken de organiska syrorerna bryts ned samtidigt som mängden socker ökar. Kvoterna var något lägre än vad Skrzyński (2007b) rapporterade om i lagrade 'Jonagold' (47,4-49,2), men stämde relativt bra överens med en kvot på 43 som angavs av Skrzyński & Gastol (2007) i 'Jonica'.

4.7 Vitamin C

Innehållet av vitamin C, i form av askorbinsyra, skiljde sig inte mellan någon av grundstammarna. Värdena låg kring det generella värdet för äpplen på 5,7 mg/100 g friskvikt som angavs av Lal Kaushal & Sharma (1995), men lägre än de 7,8-10,0 mg/100 g som Stopar m fl (2002) uppmätte i 'Jonagold' som lagrats i tre månader. Eftersom den enzymatiska nedbrytande aktiviteten på askorbinsyra inte helt stoppas vid kylförvaring (Davey m fl, 2000) kan de lägre värdena i denna studie bero på den längre lagringsperioden men även odlingsfaktorer kan ha påverkat.

4.8 Fenoler

Ingen variation av totala fenoler var mätbar mellan de transgena grundstammarna och kontrollerna vare sig i skalet eller i fruktköttet, men det fanns en skillnad mellan *M26-rolB* och *M9-rolB1* i fruktköttet. Enligt Scalzo m fl (2005) så påverkades fenolinnehållet i aprikoser av grundstammen, så en variation mellan grundstammar är möjligt, men beror på andra faktorer än den transformerade genen.

Analysen av totala fenoler visade på att innehållet var betydligt högre i skalet än i fruktköttet. Veberic m fl (2005), Stopar m fl (2002) och Tsao m fl (2003) rapporterade om ett innehåll av fenoler i skalet på 1,5 mg/g och 1320 µg/g friskvikt i 'Jonagold Decosta' respektive ett genomsnitt för åtta olika sorter, vilket var lägre än de 1,7-1,9 mg/g friskvikt som uppmättes i denna studie. I fruktköttet uppmätte Tsao m fl (2003) 430 mg/g friskvikt som var jämförbart med *M26-rolB*, men lägre än de övriga grundstammarna. I studien av Veberic m fl (2005) var fenolinnehållet däremot betydligt lägre, 0,09 i mg/g friskvikt.

5 SLUTSATSER

Generellt så visade analyserna i denna studie liten effekt av de transgena grundstammarna på fruktkvaliteten i äpplen av sorten 'Jonagold', eftersom enbart ett fåtal parametrar skiljde sig mot de icke-transgena kontrollerna. Då alla fem grundstammarna jämfördes mot varandra, förekom en viss variation av storlek, vikt, färg, fasthet och TSS, men som skulle kunna förklaras av andra faktorer. Dessa parametrar är starkt beroende av mognadsgrad, vilket kan påverkas av olika mikroklimat i trädkronan, en skillnad i ljusintensitet för olika äpplen och antalet frukter i trädkronan. De nämnda faktorerna beror i sin tur på kronstorlek, som är en egenskap som påverkas direkt av grundstammen.

Fruktkvaliteten i äpplena i denna studie kunde enbart analyseras efter lagringen. Därför går det inte att dra några slutsatser om huruvida det fanns skillnader i olika kvalitetsparametrar vid skörd och om kvaliteten har förändrats på varierande sätt i de olika grundstammarna under lagringsperioden.

För en tydligare bild om kvaliteten i äpple påverkas av *rolB*, behövs fler studier som undersöker de övriga äppelsorterna i försöket på fältet och som även sträcker sig över flera säsonger. Dessa studier skulle då kunna ta med parametrar som kronstorlek och skördemängd, eftersom det är viktiga faktorer för vilken kvalitet frukterna får, men också skillnader i kvalitet före och efter lagring.

Eftersom *rolB* inte har påverkat fruktkvaliteten i 'Jonagold' negativt och i tidigare studier visats kunna ge bättre rotning i äppelgrundstammar, så skulle genen i framtiden kunna bli användbar i arbetet med att förbättra rotningen i grundstammar i kommersiell äppelproduktion.

6 REFERENSER

- Abbott, J.A. (1999).** Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 15:207–225
- Al-Hinai, Y.K., Roper, T.R. (2004).** Rootstock effects on growth and quality of ‘Gala’ apples. *HortScience*. 39:1231-1233
- Autio, W.R., Barden, J.A., Brown, G.R. (1991).** Rootstock affects ripening, size, mineral composition, and storability of ‘Starkspur Supreme Delicious’ in the 1980-81 NC-140 cooperative planting. *Fruit Varieties Journal*. 45:247-251
- Banach, P., Gastol, M. (2006).** Growth and fruiting of apple tree cv. ‘Jonica’ on different rootstocks. *Sodininkyste Ir Darzininkyste*. 25:54-61
- Barritt, B.H., Drake, S.R., Konishi, B.S., Rom, C.R. (1997).** Influence of sunlight level and rootstock on apple fruit quality. *Acta Horticulturae*. 415:569-577.
- Boyer, J., Liu, R.H. (2004).** Review: Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*. 3:5
- Brown, G.R., Wolfe, D. (1992).** Rootstock affects maturity of ‘Starkspur Supreme delicious’ Apples. *HortScience*. 27:76
- Castle, W.S. (1995).** Review: Rootstock as a fruit quality factor in citrus and deciduous tree crops. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 23:383-394
- Chawla, H.S. (2002).** *Introduction to Plant Biotechnology 2nd Edition*. Sciences Publishers Inc. Enfield, USA
- Daillant-Spinnler, B., MacFie, .H.J.H, Beyts, P.K., Hedderley, D. (1996).** Relationships between perceived sensory properties and major preference directions of 12 varieties of apples from the southern hemisphere. *Food Quality and Preference*. 7:113-126
- Darbani, B., Farajnia, S., Noeparvar, S., Stewart, C.N. Jr, Mohammadi, S.A., Zakerbostanabad, S. (2008a).** Plant transformation: Needs and futurity of the transgenes. *Biotechnology*. 7:403-412
- Darbani, B., Farajnia, S., Toorchi, M., Zakerbostanabad, S., Noeparvar, S., Stewart, C.N. Jr. (2008b).** DNA-delivery methods to produce transgenic plants, *Biotechnology* 7:385-402

- Davey, M.W., Van Montagu, M., Dirk Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., John J Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, J. (2000).** Review: Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:825-860
- Deutsch, J.C. (2000).** Review: Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A*. 881:299-307
- Dewanto, V., Wu, X., Liu, R.H. (2002).** Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:4959-4964
- Dobrzański, B., Rybczyński, R., Dobrzańska, A., Wójcik, W. (2001).** Some physical and nutritional quality parameters of storage apple. *International Agrophysics*. 15:13-18
- Erturk, U., Akbudak, B., Ozer, M.H. (2003).** Quality changes of some apple cultivars stored in normal atmosphere for long periods. *Acta Horticulturae*. 599:665-672
- FAO (2008).** Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT Statistic Database. Hemsida, tillgänglig: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (2009-04-20)
- Ferree, D.C., Carlson, R.F., (1987).** Apple rootstocks, Rom, R.C., Carlson, R.F. (red): *Rootstocks for fruit crops*. 109-138. John Wiley & Sons, New York, USA
- Gustavsson, K.E.** Forskningsingenjör, SLU, området för Hortikultur. Personligt meddelande 2009-04-24
- Hampson, C.R., Kemp H. (2003).** Characteristics of important commercial apple cultivars. Ferree, D.C., Warrington I.J. (red): *Apples Botany, Production and Uses*. 61-89. CABI Publishing, Oxon, UK
- Harboe, J. (2001).** Äpplets ursprung. *Pomologen*. 3/4:4-5
- Harker, F.R., Marsh, K.B., H. Young, H., Murray, SH., Gunson, F.A., Walker, S.B. (2002).** Sensory interpretation of instrumental measurements 2: sweet and acid taste of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 24: 241–250
- ISAAA (2009).** The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Executive summary Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008, Hemsida, tillgänglig: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/39/executivesummary/default.html> (2009-04-30)
- Inglesias, I., Salvia, J., Torguet, L., Cabús, C. (2002).** Orchard cooling with overtree sprinkler irrigation to improve colour and quality of ‘Topred Delicious’ apples. *Scientia Horticulturae*. 93:39-51

- Johnston, J.W., Hewett, E.W., Hertog, M.L.A.T.M. (2002).** Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 30:145-160
- Jordbruksverket (2008a).** Statistikrapport 2008:3, Trädgårdsundersökningen 2006. Hemsida, tillgänglig:
http://www.sjv.se/webdav/files/SJV/Amnesomraden/Statistik%2C%20fakta/Tradgardsodling/Statistikrapport/20083/20083_tabeller4.htm (2009-04-20)
- Jordbruksverket (2008b).** Enheten för handel och marknad, Normer för äpplen juni 2008. Hemsida, tillgänglig:
http://www2.sjv.se/webdav/files/SJV/trycksaker/Pdf_kvalitetsnormer/kv12.pdf (2009-04-16)
- King, A., Young, G. (1999).** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*. 99:213-218
- Kingston, C.M. (1993).** Maturity indices for apple and pear. *Horticultural Reviews*. 13:407-432
- Kvikliene, N., Kviklys, D. (2006).** Rootstock effect on maturity and quality of ‘Auksis’ apples. *Sodininkyste ir Darzininkyste*. 25:258-263
- Lal Kaushal, B.B., Sharma, P.C. (1995).** Apple, Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. (red): *Handbook of Fruit Science and Technology. Production, Composition, Storage and Processing*. 91-122. Marcel Dekker Inc., New York, USA
- Lancaster, J.E. (1992).** Regulation of skin color in apples. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 10:487-502
- Lancaster, J.E., Lister C.E., Reay P.F., Triggs, C.M. (1997).** Influence of pigment composition on skin colour in a wide range of fruit and vegetables. *Journal of the American Society of Horticultural Science*. 122:594–598
- Luby, J.J. (2003).** Taxonomic classification and brief history, Ferree, D.C., Warrington, I.J. (red): *Apples Botany, Production and Uses*. 1-14. CABI Publishing, Oxon, UK
- Magdic, D., Dobricevic, N. (2007).** Statistical evaluation of dynamic changes of ‘Idared’ apples colour during storage. *Agriculture Conspectus Scientificus*. 72:311-316
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79:727-747
- McGuire, R.G. (1992).** Reporting of objective color measurements. *HortScience*. 27:1254-1255

- Nováková, L., P. Solich P., Solichová, D. (2008).** HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *The Trends in Analytical Chemistry*. 27:942-958
- Olmedo, J.M., Yiannias, J.A., Windgassen, E.B., Gornet, M.K. (2006).** Scurvy: a disease almost forgotten. *International Journal of Dermatology*. 45:909-913
- Plocharski, W.J., Konopacka, D. (1999).** The relation between mechanical and sensory parameters of apples and pears. *Acta Horticulturae*. 485:309-317.
- Rana, M.K. (2006).** Ripening changes in fruits and vegetables - a review. *Journal of Horticultural Science*. 35:271-279
- Riesen, W., Husistein, A. (1998).** Influence of rootstocks on apple fruit quality. *Acta Horticulturae*. 466:161-166
- Robinson, T.L., Seeley, E.J., Barritt, B.H. (1983).** Effect of light environment and spur age on 'Delicious' apple fruit size and quality. *Journal of the American Society of Horticultural Science*. 108:855-861
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M. (2005).** Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruits. *Nutrition*. 21:207-213
- Skrzyński, J. (2007a).** Growth and productivity of apple trees and fruit quality at harvest as affected by rootstocks. *Acta Horticulturae*. 732:151-154
- Skrzyński, J. (2007b).** The effect of rootstocks on the retention of apple quality. *Acta Horticulturae*. 732:155-158
- Skrzyński, J., Gastol, M. (2007).** The effect of rootstocks on the fruit characteristics attributes of 'Jonica' apples. *Vegetable Crops Research Bulletin*. 66:171-176
- Stopar, M., Bolcina, U., Vanzo, A., Vrhovsek, U. (2002).** Lower crop load for Cv. Jonagold apples (*Malus domestica* Borkh.) increase polyphenol content and fruit quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:1643-1646
- Svensson, H., (2003).** *Äpplen i Sverige, 224 äppelsorter i text och bild*. Prisma, Stockholm, Sverige
- Taiz, L., Zieger, E. (2006).** *Plant Physiology 4th Edition*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., Zhu, H. (2003).** Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:6347-6353

- Van der Salm, T.P.M, Bouwer, R., van Dijk, A.J., Keizer, L.C.P. Hänisch ten Cate, C.H., van der Plas, L.H.W, Dons, J.J.M. (1998).** Stimulation of scion bud release by *rol* gene transformed rootstocks of *Rosa hybrida* L. *Journal of Experimental Botany*. 49:847–852
- Vangdal, E. (1985).** Quality criteria for fruit for fresh consumption. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 35:41-47
- Veberic, R., Trobec, M., Herbinger, K., Hofer, M., Grill, D., Stampar, F. (2005).** Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85:1687–1694
- Webster, A.D., Wertheim, S.J. (2003).** Apple rootstocks, Ferree, D.C., Warrington I.J. (red): *Apples Botany, Production and Uses*. 91-124. CABI Publishing, Oxon, UK
- Welander, M., Zhu, L.H. (2006).** Rol genes: molecular biology, physiology, morphology, breeding uses. *Plant Breeding Reviews*. 26:79-103
- Wertheim, S.J., Webster, A.D. (2003).** Propagation and nursery tree quality, Ferree, D.C., Warrington I.J. (red): *Apples Botany, Production and Uses*. 125-151. CABI Publishing, Oxon, UK
- Zhu, L.H., Holefors, A., Ahlman, A., Zhong-Tian Xue, Z.T., Welander, M. (2001).** Transformation of the apple rootstock M.9:29 with the *rolB* gene and its influence on rooting and growth. *Plant Science*. 160:433–439
- Zhu, L.H., Li, X.Y., Nyqvist, M., Welander, M. (2007).** Improvement of rooting and reduction in plant height in Apple and Pear through Gene Transfer. *Acta Horticulturae*. 738:353-360
- Zhu, L.H., Welander, M. (1999).** Growth characteristics of apple cultivar Gravenstein plants grafted onto the transformed rootstock M26 with *rolA* and *rolB* genes under non-limiting nutrient conditions. *Plant Science*. 147:75-80
- Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., Zambryski, P. (2000).** Review: The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*. 23:11-28