

ГЕНЕТСКИ ТРАНСФОРМАЦИИ КАЈ ДЕКОРАТИВНИ РАСТЕНИЈА

Сандева Надица

Факултет за земјоделски нуаки и храна- Скопје

Апстракт

Една од главните цели на селекционерите на цвеќарски култури е создавање на нови бои кај цветовите. Конвенционалните селекциски методи, кои ги користат постоечките генетски ресурси од цвеќарските видови, се ограничени поради отсуството на клучните гени за биосинтеза на нови пигменти. Токму поради оваа причина по пат на селекцијане можат да се создадат генотипови на роза со сина боја.

Генетското инженерство е процес на бришење, модифицирање или додавање на гени во молекулот на ДНК, со цел промена на информациите што ги содржи.

Цел на модерната растителна биотехнологија е подобрување на одредени својства кај растенијата, животните и микроорганизмите со внесување на одреден ген. Генетските модификации овозможуваат подобрување (промена) на употребните карактеристики кај цвеќарските видови.

Клучни зборови: генетска трансформација, цвеќиња, нови бои

GENETIC TRANSFORMATION IN DECORATIVE PLANTS

Sandeva Nadica

Faculty for agricultural sciences and food-Skopje

Abstract

One of the main goals of floricultural breeders is creation of new colors in flowers. Conventional breeding methods that use existing genetic resources of floricultural species are limited by the absence of key genes for biosynthesis of new pigments. This is one of the reasons why by using of classical breeding can not be created rose genotypes with blue color.

Genetic engineering is the process of deleting, modifying or adding genes into the DNA molecule, in order to change the information they contain.

Goal of modern plant biotechnology is to improve certain traits in plants, animals and microorganisms with the introduction of a certain gene. Genetic modifications allow improvement (change) of use-features in floricultural species.

Keywords: genetic transformation, flowers, new colors

Вовед

Важна движечка сила во цветнодекоративната индустрија е создавањето на нови растенија и цвеќиња. Новите видови остваруваат маркетинг можности за трговците и правилната селекција на цвеќиња и декоративни растенија влијае на зголемувањето на продуктивноста кај одгледувачите, како и подобрување на квалитетот на финалниот производ во корист на потрошувачите. Иако растителните истражувања и конвенционалните селекциски програми на одгледување успешно ги остваруваат овие цели, генетските модификации нудат дополнителни правци во создавањето на

нови видови цвеќиња и декоративни растенија. Тоа се постигнува со инкорпорација на гени од достапни генетски ресурси. Со користење на генетско инженерство и генетски модификации можно е вметнувањето на одреден ген кој ја регулира биосинтезата на пигменти и овозможува создавање на генотипови со нова боја на цветовите кај одредени цвеќарски видови. На овој начин, со користење на биотехнологија се создадени цветови со две или повеќе бои, а има и примери каде обојувањето е на одредени делови од цветот. Комерцијалната употреба на генетски модифицирани растенија бара придржување до специфични

регулаторни режими и усогласување со правата за интелектуална сопственост. Овие додатни комплексности се значително поскапи и ја отежнат примената на генетската технологија од страна на одгледувачите на цветни култури. Друг фактор може да биде гледиштето дека јавноста и трговците не ги прифаќаат генетски модифицираните цветно-декоративни производи.

1. Генетско инженерство кај растенијата

Генетското инженерство е процес на бришење, модифицирање или додавање на гени во молекулот на ДНК, со цел промена на информациите што ги содржи.

Цел на модерната растителна биотехнологија е подобрување на одредени својства кај растенијата, животните и микроорганизмите со внесување на одреден ген. Развојот на молекуларната генетика, културата на ткиво и методите на трансформации овозможуваат идентификација и изолација на гени од различни организми (бактерии, вируси, габи, растенија и животни) и нивно внесување во растителниот геном.

За внесување на нуклеинската киселина во растенијата се употребуваат култура на протопласти, култура на ткиво (пр. лисно ткиво, калусна култура) или организирани структури, како што се изданоци, ембриони и аксенични култури од целото растение. Внесувањето на ДНК во растителните клетки може да се постигне на повеќе начини:

- со употреба на природни патогени организми, како што се бактериите *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* и вируси кои содржат ДНК или РНК, и

- со физички пренос на фрагменти од ДНК во растението како што се постапките: микроинјектирање, непосредно примање и погодување со микропроектили.

Поимот генетска трансформација или генетски инженеринг ги опфаќа сите процеси на преносот на ДНК од еден организам во друг и експресија во растението домаќин. Генетската трансформација е постапка за подобрување (облагородување) со која се овозможува пренесување на генетските информации помеѓу видовите, без разлика на нивната

сродност и број на хромозоми. При селекција на растенијата со класични методи на хибридизација постојат одредени бариери. Генетското инженерство ги надминува тие бариери. Времето потребно за добивање на нови сорти и хибриди се скратува, а целата работа не бара големи површини на опитно земјиште. Генетската трансформација денес претставува и значаен методолошки пат за изучување на основните биолошки законitosti во растенијата, овозможувајќи анализи на структурата на гените и нивните регулаторни механизми.

Со примена на генетското инженерство и создавање на генетски трансформирани растенија, доаѓа и до промена на количеството на протеини што се синтетизираат од една клетка на еден организам. На пример: некои растенија продуцираат протеин во поленот што предизвикува алергија кај луѓето. Со генетското инженерство можно е таканаречено исклучување на генот на синтеза на алергии и добивање на сорти кои продуцираат полен кој не содржи протеини за предизвикување на алергии.

Со цел добивање генетски трансформирани растенија потребно е да се изолира ген за одредено својство од соодветен организам (донор на ген-својство), и негово внесување, интегрирање и експресија во растение (реципиент).

2. Биотехнологијата во цвеќарската индустрија

Техниките на биотехнологијата долго време се применуваат во цвеќарската индустрија како во размножувањето така и во одгледувањето. Во генетиката и селекцијата на цвеќе со цел подобрување на класичните селекциски методи се користат многу современи техники. Култура на мерсистем и микропропагација се употребуваат со цел размножување и добивање на безвирусни растенија. Освен култура на меристем и микропропагација, се почесто се користат и други техники, како култура на прашник и култура на ембрион (Davies, 1981). Покрај класичните методи и култура на ткиво, селекцијата и подобрувањето на растенијата (цвеќињата) се комбинира (или дополнува) со селекција со помош на молекуларни маркери (MAS – Marker Assisted Selection).

Голем број техники во молекуларната генетика, како, SSR, RFLP и др. се користат за проучување на геномот кај одредени цвеќарски видови, со цел генетско и физичко мапирање на гени, и клонирање на гени (*Han and Lee, 2002*).

2.1 Својства подложни на генетски трансформации

Иако цветните култури имаат многу потенцијални својства кои можат да бидат наменети за генетска модификација, многу малку од големиот број истражувања за генетски модификации довеле до комерцијализација на новите видови.

Со примена на генетските трансформации во истражувањата кај цвеќарските видови може да се придонесе за подобрување на нивните производни и употребни својства.

2.1.1 Производствени својства

Производителите на цвеќарски растенија и резан цвет се соочуваат со многу трошоци и проблеми кои се одразуваат на квалитетот на финалниот производ. Генетските модификации нудат можности за решавање на некои од тие проблеми со подобрувања на видовите кои не е возможно да се остварат со конвенционално одгледување. Генетските трансформации можат успешно да се користат за подобрување на производствените карактеристики како: отпорност на некои инсекти, болести, вируси и хербициди, толерантност на абиотски фактори, постбербен квалитет, управување со регулацијата на хормоните, како и подобрување на метаболитичките активности.

2.1.2 Употребни карактеристики

Генетските модификации овозможуваат подобрување (промена) на употребните карактеристики кај цвеќарските видови. Најзначајни примени на генетските трансформации се во подобрувањето или промената на бојата на цветот, мирисот на цветот и др.

- **Боја на цвет** – Една од главните цели на селекционерите на цвеќарски култури е создавање на нови бои кај цветовите. Конвенционалните селекциони методи, кои ги користат постоечките генетски ресурси од цвеќарските видови, се ограничени поради отсуството на клучните гени за

биосинтеза на нови пигменти. Токму поради оваа причина не може да се создадат генотипови на роза, хризантема и каранфил со сина боја, како и жолти цветови кај некои видови на саксиско цвеќе како што е пеларгониумот. Со користење на генетско инженерство и генетски модификации можно е вметнувањето на одреден ген кој ја регулира биосинтезата на пигменти и овозможува создавање на генотипови со нова боја на цветовите кај одредени цвеќарски видови. На овој начин, со користење на биотехнологија се создадени цветови со две или повеќе бои, а има и примери каде обојувањето е на одредени делови од цветот.

- **Мирис на цветот** – Мирисот на резаниот цвет е важен за потрошувачите, а најнов тренд во овој сектор од цвеќарската индустрија е внесување на “старовреmsките видови”, кои се со специфичен силен мирис. Повторното воведување на дополнителен мирис во видовите кои немаат доволно мирис, или пренос на мирис од еден вид во друг вид е интересна потенцијална апликација за генетските модификации (*van Schie et al., 2006*).

3. Моментална состојба на генетските модификации во цвеќарската индустрија

Можноста која ја нуди технологијата за генетски модификации кај цвеќарските култури е ист или сличен со трансформациониот процес кој што сепримува кај многу растителни култури (*Gelvin, 2003*). Основна цел на генетските трансформации е трансфер на гени, кои при процесот на култура на ткиво се регенерираат и селектираат со цел соодветна експресија на соодветниот ген. Денес познати се и техники т.к.н. “transient gene expression” за кои не е потребна култура на ткиво (*Feldmann and Marks, 1987*).

Денес со релативно посовремена технологија возможно да се трансформираат многу цвеќарски култури и да се внесат разни гени за подобрување на одредени производни и употребни карактеристики кај цвеќарските видови. Кај цвеќарските видови најчесто се користат

дикотиледоните растенија (каранфил, роза, хризантема и гербер) за трансформација кои се подложни на инфекција со соодветни соеви на *Agrobacterium* трансформациони вектори (Tzfira and Citovsky, 2006). Додека кај монокотиледоните, како што се крикот и лалето, за трансфер на гени најчесто се користи бомбардирање со микропроектили (Men et al., 2003b). Сепак, има регистрирано и некои монокотиледони цвеќарски видови кои успешно се трансформирани со помош на *Agrobacterium tumefaciens* (Akutsu et al., 2004). Покрај користењето на двата гореспоменати методи за трансформација, можна е и нивна комбинација, т.к.н посредна трансформација, прво со бомбардирање со микропроектили со што се постигнува повреда на експлантот или ткивото подложно за трансформација, а потоа со *Agrobacterium*, со што се зголемува неговата инфективноста и ефикасност (Zuker et al., 1999).

Селективни маркер гени. Трансформационите системи се потпираат на употребата на селективни маркер гени во текот на регенерацијата, со цел да се одберат трансформирани клетки и потоа регенерираните растенија. Потребна е нивна правилна употреба со соодветна концентрација како и нивна примена во соодветен развој во текот на регенерацијата на растенијата во *in vitro* услови. *B-glucuronidase* (GUS) генот е маркер-ген кој често се користи за визуелизирање на промените во текот на инфекцијата и експресијата на генот во растителното ткиво (Boase et al., 2002). Откривањето и апликацијата на зелениот флуоросцентен протеин (GFP) како маркер-ген е алтернатива на GUS маркерот. Со користење на GFP маркерот експресијата може да се набљудува во фаза на цвет под UV микроскоп, овозможувајќи следење на инфекцијата и генетската експресија во живо (*in vivo*) (Wenck et al., 2003). Експресијата на GFP била применета како корисен маркер кај некои цвеќарски култури (Kim et al., 2004).

Промотори. При генетски трансформации кај растенијата многу е важно избор на соодветен промотор, кој би овозможил високо ниво на експресија на генот. (Outchkourof et al., 2002). Најчесто

користениот промотор CaMV35S дава соодветна експресија на генот кај каранфилот, розата и торенијата. Равојот на соодветни промотори е важен за развојот на некои цветни култури во иднина. Последните примери од соодветни и непотиснати промотори се промотори од гени на хризантема кои кодираат протеин убиквитин (ubiquitin extension protein) (Annadana et al., 2002) и хлорофилот а/бврзувачки протеин (Aida et al., 2004).

3.1 Модификација на бои

Се до денес модификацијата на боите на цветовите е најшироко распространет тип на генетска модификација кај цвеќарските култури, бидејќи биосинтетските процеси кои се одговорни за бојата на цветовите се добро

истражени. Флавоноидите, каретоноидите и беталините се три главни класи на пигменти кои придонесуваат за бојата на цветовите (Grotewold, 2006). Флавоноидите се одговорни за разновидните бои на цвеќиња од жолта па се до црвена и сина. Антоцијаните, одредена класа на флавоноиди, се главен составен дел на портокаловата, црвентата, виолетовата и сината боја на цветовите кај цвеќињата. Разновидните хемиски структури на антоцијаните и нивната коегзистентност со другите флавоноиди (флаволи или флавоноли) го зголемуваат спектарот на бои кај цветовите во природата (Tanaka and Brugliera, 2006). Растенијата често содржат и флавоноиди и каротеноиди, а комбинацијата на различни количества и типови од овикомоненти дава широк опсег на бои.

И покрај нивното влијание врз бојата на цвеќињата, регулацијата на вакуоларната pH, преносот на металните јони и создавањето на супер-молекуларен комплекс сеуште не се детално проучени. За разлика од нив, хидроксилацијата е регулирана на многу поедноставен начин и е добро проучена и е најизводлив и универзален начин за дизајнирање на бојата кај цвеќињата.

За креирање на виолетови/сини цветови, алтернативна стратегија за генетска модификација при продукција на делфинидин може да биде зголемувањето на концентрацијата на флавонолите и флавонолите. Флавонолите и флавонолите

придонесуваат за поинтензивна боја и стабилизација на антоцијаните преку формирање на интермолекуларен комплекс (Goto,1987). Во текот на изминатите години, истражувачите во Suntory Ltd. и Florigene Pts.Ltd. се фокусирале кон креирање на нови бои кај цвеќињата преку генетско инженерство на културите за резан цвет. Економски најважните резани цвеќиња не можат да произведат виолетово

виолетово сина боја. Модификацијата на биосинтезата на антоцијани се постигнува со експресија на хетероложни гени или / и со потиснување на експресијата на ендегените гени. Конститутивни промотори, како што е промоторот на вирусот на мозаик кај карфиолот 35S (CaMV35S) кој се употребува за регулација на експресијата на хетероложните гени, се употребуваат во векторите за трансформација, како и



син антоцијан делфинидин. Поради тоа, главна цел е со помош на генетско инженерство да се создадат цветови со

промоторите од флавоноидните гени како CHS и DFR.

Слика 1. Фотографии на цвеќиња настанати по природен пат и од трансгенетски растенија.

А. Црвена вербена (1) и виолетова петунија (2) содржат пеларгонидин и делфинидин кои базираат на антоцијани. Жолтата боја кај многу цвеќиња, вклучувајќи роза (3) и хризантема, потекнува од каротеноидите. Цунцулето (*Tagetes sp.*) (4, 5) содржи каротеноиди, како и необични жолти 6-хидрокси флавонол и цијанидин-базиран на антоцијани. Жолтото цунцуле (4) содржи каротеноиди и 6-хидрокси флавонол а портокаловите видови на цунцуле (5) ги содржат сите три типа на пигменти.

В. Трансгенетски каранфил. Трансгенетскиот каранфил *FlorigeneMoonseries*TM произведува делфининин кој базира на антоцијани кој природниот каранфилот не може да го произведе. *Currently spray* (1, 2) и стандардните (3, 4) видови се произведуваат комерцијално. Разликите во интензитетот на бојата помеѓу различни видови се должи на различната содржината на антоцијани.

С. Цветовите од трансгенетска роза. Цветовите од трансгенетска роза кои произведуваат делфининин во листовите се прикажани десно на сликата, и се споредени со цветовите од нетрансформирана роза (родител, користена како почетен материјал за трансформација) (1, лево). Трансгенетските рози (цветовите се прикажани на слика 2) се во фаза на тестирање во Јапонија, Колумбија и САД.

Д. Во не-трансгенетска торенија, цветот акумулира делфининин-базиран на антоцијани (1). Дерегулацијата на генот за антоцијанидин синтаза дава бели или делумно бели видови (2). Дерегулацијата на флавоноид 3', 5' – хидроксилаза и флавоноид 3' – хидроксилаза и потиснувањето на активноста на хетерологната дихидрофлавонол редуказа дале трансгенетско растение со розови цветови (3) акумулирајќи го антоцијанот пеларгонинин. Потиснувањето на тетрахидроксихалкон 4' – глукозилтрансферазата, гените за ауреозидин синтаза и дерегулацијата на антоцијаните, кај торенијата водат до акумулирање на ауреозидин и жолта боја на цветовите (4).

3.1.1 Каранфил.

Генетската трансформација кај каранфилот е направена во 1991 година (*Lu et al.*, 1991). Десетини години подоцна компанијата *Florigene* комерцијално реализирала неколку генетски модифицирани видови со нови цветни бои (*Lu et al.*, 2003). Овие видови можат да се видат на веб страната на *Florigene* (www.florigene.com) а примерите се исто така прикажани во Табела 1.

Биосинтетските процеси на цветните пигменти кај каранфилот се добро познати. Црвениот и розевиот каранфил содржат цијанидин и/или пеларгонинин кој базира на антоцијани кои се во спрега со флавонолите, додека жолтиот каранфил го акумулира халкон халконарингенин 2'-О-глукозит. Исто така познато е дека антоцијаните генерално се макроциклични антоцијани 3,5 ди-О- глукозит (6'', 6'''-малил диестер) (3, 5 di-O- glucoside (6'', 6'''-maly diester) (*Gonner and Fenet*, 2000).

Каранфилот не содржи делфининин, бидејќи нема ген што е одговорен за биосинтеза на супстратите за биосинтезата на овој антоцијанидин (*Tanaka et al.*, 2005). Како почетен материјал за генетски трансформации на каранфилот се користат видови со бели цветови. Биохемиските и молекуларните тестирања докажале дека овие видови немаат DFR и F3'Нактивно и

акумулираат дихидрофлавонол дихидрокаемферол. Гените кај петунијата за F3'5'Н и DFR (кој првенствено делува на ДНМ преку дихидрокерцетин) биле пренесени во каранфил а во цветовите од трансгенетското растение ДНК се конвертира во ДНМ кој тогаш може да биде конвертиран во леукоделфининин. Ендогените каранфили, ANS и 3GT, се во можност да го претворат леукоделфинининот во обоен пигмент делфининин 3-глукозит и овозможуваат синтеза на делфининин (*Holton*, 1996). Деталните анизи за антоцијаните направени во *FlorigeneMoondust*TM и *FlorigeneMoonshadow*TM. Антоцијанот кој преовладува во овие два вида е делфининин 3,5 диглукозид-6''-О-4, 6'''-О-1-циклик малил диестер (*delphinidin 3,5 diglucoside-6''-O-4, 6'''-O-1-cyclic maly diester*) (*Fukui et al.*, покажувааат дека дериватите на делфинининот биле еднакви на природните антоцијани (*Nakamura et al.*, 2004 2003).

Трансгенетскиот каранфил со модифицирана боја исто така бил произведен и од друга група на истражувачи. *Zucker et al.* (2002) создале трансгенетски каранфил во кој портокаловата боја (од родителот користен како почетен материјал за трансформација) ја претвориле во кремаста (шампањ).

Табела 1. Генетски трансформации кај каранфил. Приказ на начинот како е направена трансформацијата

КАРАНФИЛ						
Вид	Инсериран ген	Потекло на ген	Функција на ген	Начин на трансформација	Година	Компанија
Каранфил Moonaqua	DFR, BP40	<i>Petunia hybrida</i>	Генот е инсериран во бел каранфил кој продуцира сино виолетова боја	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1996	Florigen
Каранфил Moonshadow 1	ACC	Каранфил (<i>Dyanthus caryophyllus</i>)	Со скратување на генот <i>Aminocyclopropane Cyclase (ACC) synthase</i> растението произведува помалку етилен со што се забавува зреењето	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1997	Florigene



3.1.2 Роза

Култивираната роза (*Rosa hybrida*) се одгледува со векови а видовите кои најчесто се користат во цвеќарската индустрија се добиени од осум видови на дива роза (*Gudlin, 2000*).

Немањето на сина/виолетова боја кај розите се објаснува со едноставната структура на антоцијаните во розата, кои главно произведуваат пеларгонидин или цијанидин 3,5-диглукозид во цветните листови, а немаат делфинидин базиран на антоцијани. Досега многу мала количината на ароматични киселински антоцијани се пронајдени, и тоа само кај видот *Rosa*

rugosa (*Mikanagi et al., 2000*). Розите исто така немаат силни ко-пигменти како што се флавононите а и вакуоларната рН им е слаба. Комбинацијата на сите овие ограничувања укажува дека сино/виолетовите бои на цветовите не можат да се постигнат со конвенционално селекционирање. Стратегијата на генетските модификации е да се користат и вклучат F3'5'H гени, со цел да се овозможи производството на делфинидин во цветовите. Првите експерименти со експресијата на генот F3'5'H од петунија, генцијана и други видови, регулирани со различни промотори не биле успешни за добивање на

трансгенетска роза со променета боја. Сепак подоцна со модификација на F3'5'H генот добиена е успешна трансформација кај розата каде била забележана зголемена концентрација на делфинидин во венечните лифчиња (Сл.1 С) (*Brugliera et al.*,2004). Според истражувањата направени во Јапонија и Австралија, делфинидинот учествува со повеќе од 90 % од вкупните антоцијани во цветовите (Сл.1 С) (*Tanaka*,2006). Покрај трансформациите со F3'5'H генот, добиени се успешни генетски трансформации каде DFR генот од розата е потиснат со RNAi технологијата, со цел да се дерегулира (измени) процесот на биосинтеза на цијанидинот (*Tanaka*,2006). Добиените трансгенетски рози имаат сини/виолетови цветни бои кои никогаш не би можеле да се добијат со конвенционално одгледување на розите. Кај трансгенетските рози, биосинтезата на делфинидинот е наследна и потомството содржи трансгени кои исто така произведуваат делфинидин во листовите. Клонирани се многу гени кои се вклучени во ароматичната ацилација (*acylation*) на антоцијаните, ко-пигментацијата и контролирањето на вакуоларната рН (*Tanaka and Brugliera*,2006), и се корисни во сегашните и понатамошните истражувања за напредок во промените кај бојата на розите во сини нијанси.

3.1.3 Торенија

Торенијата е саксиски растителен вид кој веќе неколку години се користи како модел за модификација на бојата кај цвеќињата (*Ueyama et al.*, 2002). Торенијата е и драгоцено саксиско растение, со модерни видови кои се многу погодни за користење како висечки кошници. Еден од комерцијалните видови, *Torenia hybrida cultivar summerwave®*, е интерспецифичен хибрид, со виолетово-пурпурни цветови од кои и машките и женските се стерилни, и овие карактеристики ги прават идеален кандидат за генетски трансформации. Торенијата е релативно лесна за трансформирање, расте и цвета брзо, што овозможува брза проценка на ефектите од внесените гени во трансгенетското растение. Со примена на некои од стратегиите за добивање на нови цветни обојувања, произведени се генетски

модифицираните линии од „*summerwave*” форми на торенија (Сл. 1D).

3.1.3.1 Создавање на бела боја кај торенија

Со регулацијата (потиснувањето) на клучните гени за биосинтеза на флавоноидите: CHS, F3H или DFR се попречува акумулацијата на антоцијаните во цветовите на трансгените растенија кај бројни видови цвеќиња: петунија, роза, хризантема, гербер, генцијана и лизијантус (*Eustoma grandiflorum*). Бидејќи овие гени (посебно CHS) се вклучени во раната фаза на биосинтезата, а се клучни во производството на многу есенцијални метаболити, потиснатата регулација на овие гени може да предизвика негативни промени во составот на флавоноидот кај трансгенетските растенија. Со цел надминување на овие негативности се користи ANS генот, кој го катализира последниот чекор од обојувањето при процесот на биосинтезата на антоцијаните (Сл. 2). RNAi методот на потиснување е најдобар во регулирањето на генетската експресија и приближно половина од трансгенетските растенија на торенија произведуваат бели цветови кога се употребува потиснување со RNAi (*Nakumra et al.*, 2006). Другите методи на потиснување (т.к.н. *antisense* и *sense* технологијата) дава далеку помал процент на бели линии. Добиените растенија со бели цветови кај трансгенетските видови во испитувањата во заштитени простори покажале фенотипска стабилност после нивното вегетативно размножување.

3.1.3.2 Создавање на розова боја кај торенија

Со потиснување на F3'5'H генот кај „*summerwave Blue®*“ торенијата, возможно е да се генерираат бледо розеви цветови од родителски сини или темновиолетови видови кои се користат како почетен материјал за трансформација. Ова е како резултат на акумулацијата на антоцијаните кои базираат на цијанидин. Розевата боја кај трансгените се добива како резултат на акумулација на антоцијани кои базираат на пеларгонидин. Со додавање на DFR генот од роза или пеларгониум се добива светлорозева боја кај трансгенетска торенија. Може да се заклучи дека и двата начина на трансформации (потиснување на F3'5'H генот и додавање на DFR генот од

роза или пеларгониум) водат до синтеза на соединенија за добивање на розева боја (во првиот случај со блокирање на биосинтезата, а вториот со акумулација на антоцијани кои базираат на пеларгонидин (Ueyama et al., 2002).

3.1.3.3 Создавање на жолта боја кај торенија

Жолтата боја кај *Antirrhinum* е поради акумулацијата на класа пигменти наречени аурони (Сл. 2) (Boumendjel, 2003). Гените одговорни за биосинтезата на жолтиот пигментот аурон, аурузидин-глукозид, се откриени и изолирани (Ono et al., 2006).

Кај торенијата („summerwave blue“) е направена успешна генетска модификација со жолта боја. При првиот обид за генетска трансформација кај торенијата, поради присуството на ендегените антоцијани во ливчињата кои биле доминантни, жолтото обојување не било видно во цветовите. Со цел инхибирање на акумулација на антоцијаните се користат додатни гени, најчесто THC-4'GT и AS гените кои ја потиснуваат активноста на ендегените F3H и DFR гени, со што се овозможува експресија на жолта боја кај трансгенетските растенија (Сл. 1D) (Ono et al., 2006). Со креирањето на генетски модифицирана торенија со жолта боја на цветови, се отвара можност за апликација на оваа метода и кај други цвекарски видови кои немаат жолта боја на цветовите, како пеларгониум, бегонија и циклама. Иако стратегијата употребувана кај торенија не била успешна кај петунијата, се очекува истата да биде подобрена и успешна во блиска иднина.

3.2 Модифицирање на метаболизмот (структурата и градбата) на растенијата

Трансгенетската контрола врз хормоналната регулација на саксиските растенија е ефикасна во менувањето на фенотипот на растенијата. Трансформацијата со *rol* гени од бактеријата *Agrobacterium rhizogenes*, (*rol* гените го регулираат развојот и клеточната диференцијација), е со цел добивање на цуести растенијата. Со генетска трансформација и експресија на *rol* гени добиени се цуести форми кај пеларгониум (Boase et al., 2004), *Antirrhinum* (Handa, 1992), бегонија (Kiyokawa, 1996), и генцијана (Mishiba et al., 2006). Van der

Salm et al., (1997) демонстрирале напредна апликација за експресија на *rol* гените во роза, при што е добиено подобрување на непожелните коренови формации. Со трансформација на хризантемата со мутиран GAI ген (*gibberellic acid insensitive gene*), кој влијае на хормоналната синтеза на гибералин, добиени се пониски форми кој порано цветаат (Petty et al., 2003). Компанијата *Novaflo*, има развиено неколку линии на трансгенетски цвекарски култури, со исклучок на хризантемата, која стабилно покажуваат цуест фенотип поради внесувањето на GAI генот од *Arabidopsis thaliana*. Покрај горенаведените примери на генетски трансформации каде се регулира хормоналниот развој и морфологијата на растенијата кај хризантемата добиени се генетски трансформаци и со други гени кои покажале дека влијаат врз архитектура на хризантема, *phytochrome B1* генот (Zheng et al., 2001) *LS-like* генот (Lee et al., 2003) и *MADS box* генот (Aswath et al., 2004).

4. Заклучок

Една од главните цели на селекционерите на цвекарски култури е создавање на нови бои кај цветовите. Конвенционалните селекциони методи, кои ги користат постоечките генетски ресурси од цвекарските видови, се ограничени поради отсуството на клучните гени за биосинтеза на нови пигменти. Токму поради оваа причина не може да се создадат генотипови на каранфил со виолетова боја или роза со сина боја. Со користење на генетско инженерство и генетски модификации можно е вметнувањето на одреден ген кој ја регулира биосинтезата на пигменти и овозможува создавање на генотипови со нова боја на цветовите кај одредени цвекарски видови. На овој начин, со користење на биотехнологија се создадени цветови со две или повеќе бои, а има и примери каде обојувањето е на одредени делови од цветот.

Економски најважните резани цвеќиња не можат да произведат виолетово син антоцијан делфинидин. Поради тоа, главна цел е со помош на генетско инженерство да се создадат цветови со виолетово сина боја. Модификацијата на биосинтезата на антоцијани се постигнува со експресија на хетероложни гени или / и со потиснување на

експресијата на ендегените гени. Конститутивни промотори, како што е промотерот на вирусот на мозаик кај карфиолот 35S (CaMV35S) кој се употребува за регулација на експресијата на хетерологните гени, се употребуваат во векторите за трансформација, како и поромторите од флавоноидните гени како CHS и DFR.

5. Литература

- Aida, R., Ohira K, Tanaka Y, Yoshida K, Kishimoto S, Shibata M., and A, O.2004. Efficient transgene expression in chrysanthemum, *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura, by using the promoter of a gene for chrysanthemum chlorophyll-a/b-binding protein. *Breeding Sci.* 54: 51–58.
- Annadana, S., Beekwilder, M. J., Kuipers, G., Visser, P. B., Outchkourov, N., Pereira, A., Udayakumar, M., De Jong, J., and Jongsma, M. A. 2002. Cloning of the chrysanthemum UEP1 promoter and comparative expression in florets and leaves of *Dendranthema grandiflora*. *Transgenic Res.* 11: 437–445.
- Aswath, C. R., Mo, S. Y., Kim, S.-H., and Kim, D. H. 2004. *IbMADS4* regulates the vegetative shoot development in transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ramat.)). *Plant Sci.* 166: 847–854.
- Akutsu, M., Ishizaki, T., and Sato, H. 2004. Transformation of the monocotyledonous *Alstroemeria* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 22:561–568.
- Boase, M. R., Marshall, G. B., Peters, T. A., and Bendall, M. J. 2002. Long-term expression of the *gusA* reporter gene in transgenic cyclamen produced from etiolated hypocotyls explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70: 27–39.
- Boase, M. R., Winefield, C. S., Lill, T. A., and Bendall, M. J. 2004. Transgenic regal pelargonium that express the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes* exhibit a dwarf floral and vegetative phenotype. *In Vitro Plant.* 40: 46–50.
- Boumendjel, A. 2003. Aurones: A subclass of flavones with promising biological potential. *Current Medicinal Chem.* 10: 2621–2630.
- Brugliera, F., Tanaka, Y., and Mason, J. 2004. Flavonoid 3', 5' hydroxylase gene sequences and uses therefor. Patent publication number WO 2004/020637. Tanaka, 2006
- Davies, D. R. 1981. Cell and tissue culture: Potentials for plant breeding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sci.* 292: 547–556.
- Feldmann, K. A., and Marks, M. D. 1987. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genetics* 208: 1–9.
- Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene jockeying” tool. *Microbiology and molecular Biology Rev.* 67: 16–37.
- Gonnet, J.-F., and Fennet, B. 2000. “Cyclamen Red” colors based on a macrocyclic anthocyanin in carnation flowers. *J. Agric. Food Chem.* 48: 22–26.
- Grotewold, E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 761–780.
- Gudin, S. 2000. Rose: genetics and breeding. *Plant Breeding Res.* 17: 159–190.
- Han, T., and Lee, J.-H. 2002. Prospect of molecular markers for the breeding of ornamentals: a case study on *Alstroemeria*. *J. Kor. Flower Res. Soc.* 10: 1–4.
- Handa, T. 1992. Genetic transformation of *Antirrhinum majus* L. and inheritance of altered phenotype induced by *Ri* T-DNA. *Plant Sci.* 81: 199–206.
- Holton, T. A. 1996. Transgenic plants exhibiting altered flower color and methods for producing same. *International Patent Publication Number WO96/36716*.
- Kim, C. K., Chung, J. D., Park, S. H., Burrell, A. M., Kamo, K. K., and Byrne, D. H. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Rosa hybrida* using the green fluorescent protein

- (GFP). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 78: 107–111.
- Kiyokawa, S., Kikuchi, Y., Kamada, H., and Harada, H. 1996. Genetic transformation of *Begonia tuberhybrida* by *Ri rol* genes. *Plant Cell Rep.* 15: 606–609.
- Lee, S. Y., Han, B. H., Yoo, H. J., Shin, H. K., Mok, I. G., Woo, J. G., Suh, E. J., and Lim, Y. P. 2003. Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* cv. Subangyuk) with *Ls like* gene expresses branchlessness habit. In *Vitro Congress on In Vitro Biology Abstracts* 39: 43A.
- Lu, C., Chandler, S. F., Mason, J. G., and Brugliera, F. 2003. Florigene flowers: from laboratory to market. In: *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*. pp. 333–336. Vasil, I. K., Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Men, S., Ming, X., Wang, Y., Liu, R., Wei, C., and Li, Y. 2003b. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. *Plant Cell Rep.* 21: 592–598.
- Mikanagi, Y., Saito, N., Yokoi, M., and Tatsuzawa, E. 2000. Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections Cinnamomeae (= *Rosa*), Chinensis, Gallicanae and some modern garden roses. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 887–902.
- Mishiba, K., Nishihara, M., Abe, Y., Nakatsuka, T., Kawamura, H., Komada, K., Takesawa, T., Abe, J., and Yamamura, S. 2006. Production of dwarf potted gentian using wild-type *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Biotechnology*. 23: 33–38.
- Nakamura, N., Fukuchi-Mizutani, M., Suzuki, K., Miyazaki, K., and Tanaka, Y. 2006. RNA suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression. *Plant Biotechnol.* 23: 13–17.
- Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., Tanaka, T., Kusumi, T., and Tanaka, Y. 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 11075–11080.
- Outchkourov, N. S., Peters, E. J., de Jong, E. J., Rademakers, W., and Jongsma, E. M. A. 2003. The promoter–terminator of chrysanthemum *rbcS1* directs very high expression levels in plants *Planta.* 216: 1003–1012.
- Petty, L. M., Harberd, N. P., Carre, I. A., Thomas, B., and Jackson, S. D. 2003. Expression of the *Arabidopsis gai* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response. *Plant Sci.* 164: 175–182.
- Tanaka, Y., and Brugliera, F. 2006. Flower color. In: *Flowering and Its Manipulation*. PP. 201–239. Ainsworth, C., Ed., Blackwell, London. Goto, 1987
- Tanaka, Y., and Brugliera, F. 2006. Flower color. In: *Flowering and Its Manipulation*. PP. 201–239. Ainsworth, C., Ed., Blackwell, London. Tanaka, T., Katsumoto, Y., Brugliera, F., and Mason, J. 2005. Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 80: 1–24.
- Tzfira, T., and Citovsky, V. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 147–154.
- Ueyama, Y., Suzuki, K., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Miyazaki, K., Ohkawara, H., Kusumi, T., and Tanaka, Y. 2002. Molecular and biochemical characterization of *torenia* flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression of these genes. *Plant Sci.* 163: 253–263.
- van der Salm, T. P. M., van der Toorn, C. J. G., Bouwer, R., Hanisch ten Cate, C. H., and Dons, H. J. M. 1997. Production of ROL gene transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterization of their rooting ability. *Mol. Breed.* 3: 39–47.

- van Schie, C., Haring, M., and Schuurink, R. 2006. Regulation of terpenoid and benzenoid production in flowers. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 203–208.
- Wenck, A., Pugieux, C., Turner, M., Dunn, M., Stacy, C., Tiozzo, A., Dunder, E., van Grinsven, E., Khan, R., Sigareva, M., Wang, W. C., Reed, J., Drayton, P., Oliver, D., Trafford, H., Legris, G., Rushton, H., Tayab, S., Launis, K., Chang, Y.-F., Chen, D.-F., and Melchers, L. 2003. Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation. *Plant Cell Rep.* 22: 244–251.
- Zheng, Z. L., Yang, Z. B., Jang, J. C., and Metzger, J. D. 2001. Modification of plant architecture in chrysanthemum by ectopic expression of the tobacco phytochrome B1 gene. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 19–26.
- Zuker, A., Ahroni, A., Tzfira, T., Ben-Meir, H., and Vainstein, A. 1999. Wounding by bombardment yields highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Mol. Breed.* 5: 367–375.
- Zuker, A., Tzfira, T., Ben-Meir, H., Ovadis, M., Shklarman, E., Itzhaki, H., Forkmann, G., Martens, S., Nata-Sharir, I., Weiss, D., and Vainstein, A. 2002. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. *Mol. Breed.* 9: 33–41.