



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Anka ZUPAN

**GENSKO SPREMINJANJE BARVE PRI
NAGELJČKU (*Dianthus caryophyllus* L.)**

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij – 1. stopnja

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Anka ZUPAN

GENSKO SPREMINJANJE BARVE PRI NAGELJČKU
(Dianthus caryophyllus L.)

DIPLOMSKI PROJEKT
Univerzitetni študij – 1. stopnja

GENETIC MODIFICATION OF COLOUR IN A CARNATION
(Dianthus caryophyllus L.)

B.Sc. Thesis
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2010

Diplomski projekt je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Branko Javornik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut Bohanec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor Osterc
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 5. julij 2010

Diplomski projekt je rezultat lastnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega diplomskega projekta na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Anka Zupan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 604.6:635.9:582.661.51(043.2)
KG	biotehnologija/gensko spremenjen organizem/nagelj/ <i>Dianthus caryophyllus</i> /barva cveta
AV	ZUPAN, Anka
SA	JAVORNIK, Branka (mentor)
KZ	SI - 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2010
IN	GENSKO SPREMINJANJE BARVE PRI NAGELJČKU (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij – 1. stopnja)
OP	VI, 18 str., 8 sl., 13 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Uporaba sodobnih biotehnoloških pristopov v industriji rezanega cvetja, je prinesla veliko rezultatov. Proizvajalci iščejo in ustvarjajo nove lastnosti, kot so barva cveta, spremenjene oblike rastlin, cvetovi z boljšim vonjem ter daljšo vzdržljivostjo rezanega cvetja. V nalogi bom predstavila spreminjanje barve cveta pri nageljčku. Glavni trije cvetni pigmenti so flavonoidi, karotenoidi in betalaini. Antocijanini so ena izmed sestavin flavonoidov, ki dajejo cvetu oranžno, rdečo, magenta, vijolično in modro barvo. Cvetovi, ki jim primanjkuje modre barve, ne vsebujejo delphinidina in njegovih derivatov, ki je eden od treh glavnih antocijaninov. Tehnike genskega inženiringa so usmerjene predvsem v sintezo flavonoidov, kot način spreminjanja barve. Nagelj s pomembno spremembo barve proti modrim odtenkom FLORIGENE®Moondust™ je bil prvi gensko spremenjen cvetličarski proizvod prodan na trgu. Gensko spremenjeni nageljni za rezano cvetje s spremenjeno barvo cvetov so sedaj na voljo na tržišču že skoraj deset let.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 604.6:635.9:582.661.51(043.2)
- CX Biotechnology/genetically modified organism/carnation/*Dianthus caryophyllus*/
colour flower
- AU ZUPAN, Anka
- AA JAVORNIK, Branka (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2010
- TI GENETIC MODIFICATION OF COLOUR IN A CARNATION (*Dianthus caryophyllus* L.)
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 18 p., 8 fig., 13 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The application of modern biotechnological approaches to cut flowers industry has shown many results. The breeders search and create novel traits such as new colours, altered flower form, flowers with better fragrance and longer vase life. I will concentrate on flower colour in carnations. Three major floral pigments are flavonoids, carotenoids and betalains. One of the compounds of flavonoids are antocyanins which confer orange, red, magenta, violet and blue colours. Flowers which have lack of blue colour, do not have delphinidin and its derivatives, which is one of three major antocyanins. Genetic engineering techniques have primarily targeted the flavonoid pathway as a means to alter flower colour. A carnation with significant colour change toward blue FLORIGENE®Moondust™ was the first genetically modified floricultural crop to be sold in the world. Genetically-modified, colour-altered cut flower crop carnation have now been commercially available for nearly ten years.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
1.1 IZHODIŠČE	1
2 BIOTEHNOLOGIJA IN GENSKO SPREMENJENE RASTLINE	1
2.1 VNOS GENOV V RASTLINE (GENSKE TRANSFORMACIJE)	2
3 REZANO CVETJE IN BIOTEHNOLOGIJA	5
4 NAGELJ	6
4.1 RASTLINSKE TKIVNE KULTURE	6
4.2 TRANSFORMACIJSKI SISTEMI	7
5 BARVA CVETA	8
5.1 ANTOCIANINI – STRUKTURA IN BARVA	8
5.2 MODIFIKACIJA ANTOCIANINOV	9
5.2.1 Glikozilacija antocianinov	9
5.2.2 Acilacija antocianinov	10
5.2.3 Metilacija antocianinov	10
5.3 KOVINSKI IONI	10
5.4 REGULACIJA VAKUOLNE REAKCIJE	10
5.5 HIDROKSILACIJA B-OBROČA FLAVONOIDOV	11
6 SPREMINJANJE BARVE CVETOV S POMOČJO GENSKEGA INŽENIRINGA	11
6.1 RAZVOJ MOON® SERIJE NAGELJNOV	11
6.1.1 Podjetje FLORIGENE Ltd.....	12
6.2 POGOJI ZA PRODAJO GENSKO SPREMENJENIH NAGELJNOV	14
7 SKLEPI	16
8 VIRI	17
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Biosinteza antocianidinov	9
Slika 2: FLORIGENE Moonshadow™	13
Slika 3: FLORIGENE Moonvista™	13
Slika 4: FLORIGENE Moonlite™	13
Slika 5: FLORIGENE Moonshade™	13
Slika 6: FLORIGENE Moondust™	13
Slika 7: FLORIGENE Moonaqua™	13
Slika 8: Spletna stran GMO Compas za gensko spremenjene rastline – primer nageljnov blagovne znamke Moonlite.	15

1 UVOD

Z gojenjem okrasnih rastlin so ljudje začeli odbirati in izbirati tiste rastline z najbolj atraktivnim izgledom. Prisotnost različnih barvnih odtenkov je pomembna lastnost, ki doprinaša k privlačnemu izgledu rastline. Pomanjkanja barvnih odtenkov pri nekaterih vrstah rastlin ni možno rešiti le z naravnim križanjem in selekcijo. Najbolj poznan primer je modra vrtnica, ki jo cvetličarji že vrsto let poskušajo ustvariti, vendar so tu še druge vrste, kot so nageljni, gerbere in krizanteme, ki prav tako nimajo modrega barvnega spektra cvetov. Poleg naravne selekcije in klasičnega žlahtnjenja zato v okrasnem vrtnarstvu uporabljajo tudi metode biotehnologije.

1.1 IZHODIŠČE

Nagelj spada med najbolj pogosto rabljene oziroma gojene vrste rezanega cvetja. Nagelj iz rodu *Dianthus* je bil prvi tržno uspešen primer uvedbe cvetov modre barve. Danes imamo na trgu že deset let nageljne obarvane v modrih spektrih. V diplomskem seminarju bom predstavila nekaj o rastlinski biotehnologiji, opisala bom tvorbo antocianinov v rastlinskih cvetovih ter gensko spreminjanje barve pri nageljnu.

2 BIOTEHNOLOGIJA IN GENSKO SPREMENJENE RASTLINE

O tem, kaj spada pod pojem biotehnologija, so mnenja deljena tudi med strokovnjaki. V ožjem smislu pod biotehnologijo razumemo predvsem »Uporabo metod rekombinantne DNK za genetsko spreminjanje ali karakterizacijo živih organizmov«. Ožja definicija ne zajema nekaterih pomembnih biotehnoloških metod. Širše gledano v biotehnologijo lahko uvrstimo že dolgo znane postopke, kakršna je uporaba bakterij, kvasovk ali gliv v raznih fermentacijah, če pa gledamo ožje, s tem izrazom opisujemo le tehnologijo spreminjanja dednine na molekularnem nivoju. Tudi pri rastlinski biotehnologiji običajno poznamo dve področji, prvo se nanaša na tako imenovane tehnike rastlinskih tkivnih kultur, ki so lahko končni produkt, lahko pa so osnova za uporabo na drugem področju, pri biotehnološkem žlahtnjenju rastlin. V primeru, da rastline spremenimo s pomočjo genskega inženiringa, rastline praviloma označujemo kot gensko spremenjene organizme (GSO), gensko spremenjene rastline (GSR) oziroma iz njih pridobljeno živilo – gensko spremenjena hrana (GS hrana) (Bohanec in sod., 2004).

Po zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (2002) je gensko spremenjen tisti organizem (GSO), z izjemo človeka, ali mikroorganizem, katerega genski material je spremenjen s postopki, ki spreminjajo genski material drugače kot to poteka v naravnih razmerah s križanjem ali naravno rekombinacijo.

Osnovne metode genskega inženiringa so bile razvite najprej pri bakterijah, in sicer že v šestdesetih letih prejšnjega stoletja, seveda pa se še danes neprestano dopolnjujejo. Od sredine osemdesetih let metode niso več omejene le na bakterije, temveč jih je možno z manjšimi modifikacijami uporabljati pri praktično vseh živih organizmih (Bohanec in sod., 2004).

Osnova genskega inženiringa je tehnologija rekombinantne DNA s katero lahko kloniramo gene. Osnovne tehnike genske tehnologije vključujejo izolacijo molekul DNA in RNA; ponovljivo rezanje molekul DNA na definiranih mestih; preurejanje in združevanje – ligacijo molekul DNA; vnos rekombinantnih molekul DNA v genom celice; opazovanje zgoraj navedenih postopkov in dogotkov po vnosu rekombinantne DNA v celice gostiteljskega organizma (selekcija transformant in analiza klonirane DNA) (Gasparič in Komel, 1996).

2.1 VNOS GENOV V RASTLINE (GENSKE TRANSFORMACIJE)

Pri genskem inženiringu nas zanimajo določeni geni, ki pogojujejo posamezne lastnosti. Ko kloniramo tarčni gen iz določenega organizma, ga moramo za delovanje v rastlinah ustrezno opremiti (dodamo rasilnske regulatorne sekvence) ter vnesti v tiste rastlinske celice, iz katerih se rastlina regenerira. Gene, ki jih želimo vnesti v rastline, pripravimo v obliki plazmidne DNK, ki se namnožuje v bakterijah, največkrat v bakteriji *Escherichia coli*. Namnožen genski material vnesemo v rastlinsko celico, kjer želimo, da se vgradi v jedrno DNK. Rastlinsko celico za razliko od živalskih obdaja tudi trdna celična stena, ki lahko vnos močno ovira (Bohanec in sod., 2004).

Postopke vnosa ponavadi delimo v dve vrsti: neposredni način (vnos gole DNK) in posredni način (vnos s pomočjo vektorjev) (Bohanec in sod., 2004).

Z neposrednim načinom mislimo postopke, ko "golo" DNK molekulo (v obliki plazmida) vnašamo v rastlinske celice. Prehod preko rastlinske celične stene je možno omogočiti na več načinov. Prva možnost je izolacija protoplastov, torej celic, ki smo jim celulozno-pektinsko steno razgradili, vnos DNK je sedaj mogoč denimo z elektroporacijo. Tovrstne postopke so razvijali skoraj celo desetletje predvsem pri najpomembnejših vrstah žit, dokler niso bili razviti uspešnejši postopki neposrednega vnosa, obstreljevanje z delci težkih kovin – biolistika. Največji uspehi neposrednega vnosa so bili doseženi, ko je skupina znanstvenikov iz ameriške univerze Stanford razvila postopek biolistike z aparaturo, ki ji v žargonu pravijo genska pištola. Postopek temelji na nanosu DNK na drobne (0,1 -1,5 μm) delce zlata ali volframa. Delce nanesimo na membrane ali na plastične "iztrelke", jih nato s pomočjo potisnega plina (helij ali dušik) močno pospešimo in "ustrelimo" v tarčno tkivo. Delci zlata predrejo celične stene in omogočijo vstop DNK. Ta metoda je trenutno najbolj konkurenčna metoda posrednemu vnosu s pomočjo vektorjev in

se uporablja predvsem tam, kjer drugi načini (predvsem posredna transformacija z *Agrobacterium tumefaciens*) še niso uspeli (Bohanec in sod., 2004).

Posredni način pri transformacijah rastlinskih tkiv omogoča predvsem omenjena bakterija *Agrobacterium tumefaciens* oziroma njeni sorodniki npr. *A. rhizogenes*. *A. tumefaciens* je talna bakterija, ki v naravi okuži rastline na ranjenem mestu ter na njih izzove nastanek tumorjev (kalusnega tkiva) (Bohanec in sod., 2004). Ta njena lastnost je zapisana na večjem plazmidu, imenovanem Ti-plazmid (Angl. tumor – inducing). Del na Ti-plazmidu, ki se vključi v rastlinski genom, imenujemo T-DNA. Ta vsebuje onkogene (*onc* geni), katerih ekspresija povzroči višji nivo rastlinskih avksinov in citokininov. Za prenos T-DNA v rastlinsko celico so pomembni *vir* geni (angl. virulence), ki so na plazmidu, in geni *chv* (angl. chromosomal virulence), ki so na bakterijskem kromosomu. Ob robu T-DNA se nahajata desna in leva robna sekvenca, ki sta tudi pomembni za prenos T-DNA (Žel, 1996).

Za namene genskih transformacij je bil naravni plazmid seveda povsem modificiran, tako da so ostale ohranjene mejne sekvence ter *vir* regija, ki omogočajo replikacijo in vnos tarčne DNK na mesto. Kjer so bili prej kodirani bakterijski koristni geni, pa sedaj vstavimo naš genski konstrukt. Metoda ima prednost pred neposrednim vnosom tudi v tem, da vnesemo manjše število kopij genov (Bohanec in sod., 2004). Najpomembnejši vektorski sistem je binarni tip, kjer bakterija vsebuje dva plazmida. Eden se imenuje pomožni vektor, ki je sestavljen iz skoraj celotnega Ti plazmida brez T-DNK in drugi je binarni vektor, ki je manjši plazmid z vključenimi T-DNK mejnimi regijami, kjer so vstavljeni željeni geni.

Pri genskih transformacijah rastlin, potrebujemo metodo, s katero lahko preverimo vključenost genov v genom (Bohanec in sod., 2004). V prvih poskusih so razločili transformirane celice s presejalnimi testi, glede na produkcijo nopalina (Banta in Montenegro, 2007). Danes se najpogostejše uporablja vnos selekcijskega gena za odpornost na antibiotike, na gojišču, ki vsebuje določene antibiotike, preživijo le tiste rastlinske celice z vključenim genom. Najpogosteje uporabljen selekcijski gen pri transformiranih rastlinah je *nptII*, ki pogojujeje odpornost na kanamicin. Odpornost na antibiotike je v zadnjem času v tržni aplikaciji omejena, vendar pa so možni še drugi selekcijski geni. Geni, ki pogojujejo odpornost na določene herbicide, so lahko hkrati selekcijski geni. Sodobni selekcijski geni so denimo gen '*xylA*', ki kodira ksilozno izomerazo (selekcijski agens je D-ksiloz), gen '*manA*', ki kodira fosfomanozno izomerazo (selekcijski agens je manoza 6-fosfat) ter spinačni gen '*BADH*', ki kodira betain aldehyd dehidrogenazo (selekcijski agens je betain aldehyd). Ti trije geni omogočajo metabolno prednost celicam na gojišču, na katerem netransformirane celice ne uspevajo (Bohanec in sod., 2004).

Markerski geni so geni, pri katerih je možno genski produkt vizualno prepoznati. Starejši markerski del je denimo gen za beta-glukuronidazo (GUS), kjer se tkivo, z izraženim markerskim genom, obarva temno modro ob dodatku X-gal. Slabost tega markerskega

gena je ta, da pri tem preučevano tkivo uničimo. Novejši markerski gen "zeleno fluorescenčni protein" (GFP) je pridobljen iz meduze *Aequorea victoria* in povzroča fluorescenco živega transformiranega tkiva, kar lahko opazujemo pod fluorescentnim mikroskopom. Markerski geni se večinoma uporabljajo pri študijah ekspresije genov, GFP gen pa lahko tudi nadomesti selekcijski gen, ker preprosto regenerante odberemo na osnovi izražene fluorescence. Razvitih je tudi nekaj strategij, s katerimi je mogoče naknadno selekcijski gen izločiti iz genoma, da v naslednjih generacijah ostane vključen le tarčni gen (Bohanec in sod., 2004).

Po vnosu transgena v gostiteljsko celico lahko že v nekaj urah pride do ekspresije vnesenega gena. S tem sicer še nismo dosegli trajne vključenosti v genom, temveč morda le prehodno transformacijo. Stabilnost vključitve in nehimernost – genetsko izenačenost tkiv regenerantov preverimo zato kasneje. Na voljo nam je več genskih testov, med njimi je poleg eventuelnega vizuelnega spremljanja markerskih genov predvsem testiranje prisotnega gena z metodo, temelječo na polimerazni verižni reakciji (PCR). Navadno izvedemo še več drugih testov, z analizo po Southernu ugotovimo število kopij ter dokažemo vključenost v genom, s testi izražanja mRNK in proteina pa dokažemo delovanje vnesenega gena (Bohanec in sod., 2004).

Posledica transformacije je, z izjemo plastidne transformacije, naključna vključitev genskega konstrukta v genom rastline. Na mesto vključitve oziroma na število vnesenih kopij v jedrni genom sicer nimamo neposrednega vpliva, vendar pa naknadno izmed številnih regenerantov odberemo tiste, ki imajo vneseno čim manjše število kopij (najboljše le eno). Želimo tudi, da je gen vnesen v genom na tisto mesto, ki mu zagotavlja ustrezno delovanje (Bohanec in sod., 2004).

3 REZANO CVETJE IN BIOTEHNOLOGIJA

Vsako leto žlahtnitelji ustvarijo veliko novih in privlačnih sort rezanega cvetja. Potrošnik išče vedno nove produkte in s tem vzbuja potrebo po novih lastnostih, kot so nove barve, drugačne oblike cvetov, cvetje z lepšim vonjem in daljšo vzdržljivostjo rezanega cvetja. Agronomske lastnosti so pomembne tudi za pridelovalce, temeljni lastnosti poleg donosnosti sta odpornost na bolezni in škodljivce (Zuker in sod., 1998).

Klasično križanje, ki temelji na križanju sorodnih vrst in selekcija najbolj obetavnih potomcev ali iskanje mutacij, je dolg in zahteven proces. Vendar pa so tudi s klasičnimi žlahtniteljskimi metodami uspeli vnesti veliko novih lastnosti in produktov pri mnogih vrstah rezanega cvetja. Čeprav je klasično žlahtnjenje še vedno zelo pomembno, pa je vir genov z novimi lastnostmi omejen. Še več, želeno novo lastnost moramo dobiti ob križanju dveh staršev z različnim genetskim ozadjem ter genetsko variabilnostjo potomcev (Zuker in sod., 1998).

Razvoj novih orodij za introdukcijo tujih genov v rastlino združenih z znanjem pridelave rastlin ter tehnologijo v povezavi z identifikacijo in izolacijo genov, so omogočili specifično spremembo posameznih lastnosti v sicer uspešnih kultivarjih. Te raziskave so tudi omogočile širši krog izbire genov za posamezno rastlinsko vrsto (Zuker in sod., 1998).

Obširne raziskave na področju mikropropagacije okrasnih rastlin, so bile povod za številna poročila o postopkih regeneracije okrasnih rastlin. Tkivne kulture igrajo kritično vlogo pri genskem inženiringu rastlinskih vrst, pri tem pa je prva naloga večine genskih prenosov uspešna regeneracija rastlin iz celic z vstavljenim tujim genom. Najbolj pogosta uporaba je formiranje novih poganjkov z uporabo listnih izsečkov (Zuker in sod., 1998).

Najpomembnejša metoda transformacije *A. tumefaciens* ni pri vrstah rastlin enako učinkovita oziroma uspešna. Velika variabilnost ni opažena le med vrstami, vendar tudi med posameznimi kultivarji, kot tudi posameznimi organi in tkivi rastlin (Zuker in sod., 1998).

Najbolj pogoste vrste za rezano cvetje so: vrtnice, tulipani, krizanteme, lilije in nageljni (Michaels, 2009). Tulipan, lilija in tudi orhideja so enokaličnice in so zato manj dovzetne za spreminjanje oziroma okužbo z *A. tumefaciens*. Medtem, ko so vrtnica, nagelj, krizantema in gerbera zelo dovzetne za gensko spreminjanje z *A. tumefaciens* in so zato tudi bolj zanimive za gensko spreminjanje (Zuker in sod., 1998).

V nadaljevanju bom obravnavala le nagelj.

4 NAGELJ

Nagelj ljudje že tako dolgo cenijo, da začetki njegove zgodovine niso povsem znani. Rodovno ime *Dianthus* izvira iz stare grške oznake, ki pomeni »božanska cvetlica« (Bird, 1994). Nagelj sodi v družino Caryophyllaceae oziroma klinčnice in v poddružino Silenoideae (Heywood, 1995).

V Angliji gojijo nageljne že vsaj od normanskih časov, ko so začeli saditi vrtni nagelj, *Dianthus caryophyllus*. Ta vrsta in *D. plumarius* sta dve osnovni vrsti zelo heterogenega starševstva sodobnih nageljnov in klinčkov, ki so se neprestano razvijali. V 16. stoletju so jih razdelili v dve skupini: obrobne nageljne in staromodne klinčke. Najbolj so bili priljubljeni v 17. stoletju; proti koncu 18. stoletja pa se je z razvojem novih sort obrobjenih klinčkov zanimanje zanje spet povečalo. Po 19. stoletju smo dobili nageljne, ki cvetijo večkrat na leto, to so predniki trajno cvetočih nageljnov. Njihova priljubljenost se tudi v 20. stoletju ni zmanjšala. Montagu Allwood je uvedel slovite Allwoodove klinčke, ki so nova generacija klinčkov. Tudi drugi gojitelji so prispevali vedno več znamenitih novih sort v vse skupine nageljnov (Bird, 1994). Center biodiverzitete za rod *Dianthus* je južna Evropa in največji obseg vrst nageljnov najdemo v jugovzhodnih Evropskih državah (Tanaka in sod., 2009).

Nagelj ima veliko zanimivih tržnih karakteristik, zaradi katerih je kljub velikemu številu vrst okrasnega cvetja zanimiv, tako za proizvajalce, kot potrošnike. Zelo raznolika barva cvetov, vonj, dobro prenašanje transporta ter različni tipi, so najpomembnejše prednosti. Od leta 1980 so pridelavo nageljnov preselili iz Amerike, Nemčije in Japonske, v dežele, kjer je njihova pridelava cenejša. Trenutno so glavne pridelovalke Kolumbija, Kenija, Izrael ter Španija. Nageljne za prodajo, kot rezano cvetje razmnožujemo s potaknjenci iz brezvirusnih matičnih rastlin. Za sajenje uporabljamo le zdrave in kakovostne potaknjence (Ball, 1997).

Gensko sprememinjajo predvsem nageljne za rezano cvetje, in sicer dvobarvne kultivarje hibridov, ki vsebujejo dve ali več *Dianthus* vrsti od katerih je ena zagotovo *Dianthus caryophyllus* (Tanaka in sod., 2009).

4.1 RASTLINSKE TKIVNE KULTURE

Nageljne množijo s tkivnimi kulturami. Regeneracija rastlin je bila dosežena tako iz vegetativnih kot iz cvetnih tkiv. Uspešno so uporabili dele stebel, liste ter stranske brste. Stadij razvoja stebela in listov pomembno vpliva na učinkovitost regeneracije. Mlajši kot so izsečki, večje je število regenerantov. Pri regeneraciji rastlin iz stranskih brstov, starost stranskih brstov ni imela vpliva (Zuker in sod., 1998).

Venčni listi so najbolj pogosto uporabljen del rastline za regeneracijo rastlin. Različna poročila raziskav o regeneraciji rastlin iz venčnih listov so bila objavljena od leta 1979. Isti gojitveni medij so uporabili za regeneracijo več kultivarjev. V vseh primerih je bilo največ regeneriranih poganjkov iz zelenih bazalnih delov ter venčnih listov. Za regeneracijo poganjkov so uporabili tudi semenske zasnove, antere ter cvetišča, prav tako so uporabili hipokotile, internodije ter listne izsečke, kjer so dosegli tvorbo kalusa, a le v omejenem obsegu (Zuker in sod., 1998).

4.2 TRANSFORMACIJSKI SISTEMI

Transgene nageljne pridobivajo z uporabo stebel, listov ter izsečkov venčnih listov. Lu in sod. (1991) so bili prvi, ki so opisali transformacijski proces, kjer so uporabili stebelne izsečke. Za vzpostavitev splošnih transformacijskih razmer so uporabili divji tip seva *Agrobacterium* ICMP8302, ki je vseboval binarni plazmid 'pKIWI110'. S kokultivacijo listnih izsečkov iz treh 'Sim' tipov nageljnov (nagelj z enim cvetom), so pridobili gensko spremenjene rastline. Uspešnost transformacije je bila zelo visoka: približno 11% uspešnost. Ko so namesto divjega tipa *A. tumefaciens* uporabili sev AGLO, je bila uspešnost transformacij 3 %. Učinkovitost pristopa se je izboljšala, ko so namesto binarnega vektorja uporabili ko-integrirani vektor. Frekvenco transformacij so še povečali z uporabo daljšega časa kokultiviranja ter z visoko koncentracijo avksina (Zuker in sod., 1998).

Listne izsečke so prav tako uporabili Zuker in sod. (1995) pri ustvarjanju gensko spremenjenih nageljčkov z uporabo bombardiranja z mikroprojektili. Gensko spremenjeni poganjki so bili selekcionirani s pomočjo 'bar' gena (odpornost na glufosinat). S tem postopkom so dosegli 2% učinkovitost transformacije (Zuker in sod., 1998).

Leta 1997 so poročali o izboljšanjem procesu transformacije, ko so združili obe metodi, obstreljevanje ter *Agrobacterium*. Pristop temelji na tem, da se z mikroprojektili poškoduje stebelno tkivo, ki se ga kokultivira z supervirulentnim sevom *Agrobacterium* AGLO. Pri kultivarju 'White Sim' je bila učinkovitost transformacije 25 %, za kultivar 'Desio' pa 8 %. Obstreljevanje z mikroprojektili ter izbira mladega tkiva (prvi in drugi internodij) sta bila pomembna za tako visok delež uspešnosti transformacije (Zuker in sod., 1998).

Listne izsečke je uspešno uporabil van Altvorst s sod. (1995), ki je transgene nageljne proizvedel iz 'spray' nageljna (nagelj z večjim številom cvetnih stebelj) in treh standardnih 'Sim' tipov kultivarjev. Transgene rastline so bile odbrane s pomočjo kanamicina, gen pa so vnesli s kokultivacijo s supervirulentnim sevom *Agrobacterium* AGLO. Rezultati z GUS analizo po štirinajstih dneh po inokulaciji so pokazali, da so bili najmlajši listi najbolj dovzetni za transformacijo. Še več, največje število transgenih rastlin so pridobili iz teh izsečkov. Ugotavljajo tudi pomembnost binarnega tipa plazmida na uspešnost transformacije. Listne izsečke so za pridobitev transgenih nageljnov prav tako uporabljali

Firoozabady in sod. (1995). Njihov pristop je temeljil na visoki dovtetnosti vitrificiranih listov za transformacijo z *Agrobacterium*. Listne izsečke so nabrali iz rastlin, ki so bile v tkivni kulturi od 4 do 6 mesecev. Za povečanje števila transformacij so uporabili supervirulentni sev *Agrobacterium* EHA101 in petdnevno kokultivacijo. Postopek ugotavljanja števila gensko spremenjenih rastlin so izvedli v dveh delih. Poganjki so bili najprej regenerirani v selektivnem agensu, katerega stopnja selekcije je bila majhna. Nato pa so bili listi teh poganjkov postavljeni v ponoven cikel regenreacije poganjkov, ki pa so bili pod visokim pritiskom selekcije. Po uporabi klorosulfurona je bila uspešnost transformacije 6,7 % vitrificiranih listnih izsečkov. Selekcija s pomočjo genetica® je bila približno štirikrat manj uspešna, medtem ko pri kanamicinu ni bilo nobenih gensko spremenjenih rastlin (Zuker in sod., 1998).

5 BARVA CVETA

Gojitelji okrasnih rastlin iščejo vedno nove lastnosti. Z različnimi tehnikami genskega spreminjanja, lahko spremenijo nekatere lastnosti, kot so barva cveta, oblika rastlin, svežost rezanega cvetja ter odpornost na škodljivce ter bolezni. V nalogi se bom osredotočila na gensko spreminjanje barve pri nageljčku.

Flavonoidi, karotenoidi in betalaini so najpomembnejši cvetni pigmenti. Med temi tremi skupinami flavonoidi največ prispevajo k obsegu in vrsti barvnih pigmentov v rastlinah. Flavonoidi so sestavljeni iz več kot deset skupin spojin. Nekatere izmed njih so antocianini, ki pogojujejo oranžno, rdečo, škrlatno, vijolično in modro barvo. Auroni in halkoni so rumeni pigmenti, medtem ko so flavoni in flavonoli brezbarvni ali zelo blede rumeni, vsaj za človeško oko. Biosinteza flavonoidov, ki vodi do cvetne akumulacije pigmentov, je dobro opisana, izolirani so bili transkripcijski faktorji ter geni, ki kodirajo pomembne encime (Tanaka in sod., 2009).

5.1 ANTOCIANIN – STRUKTURA IN BARVA

Pri tistih vrstah, kjer je barva cveta primarno pridobljena iz antocianinov, na končno obarvanje cveta vpliva več različnih faktorjev. Na končno barvo cveta vplivajo antocianinska struktura, tip, koncentracija, so-obstoječi pigmenti, kovinski ioni in koncentracija, pH vakuole, lokalizacija antocianina in oblika vrhnjih celic. S kombinacijo teh faktorjev so rastlinske vrste razvile barve cvetov, ki privabljajo opraševalce. Čeprav so odkrili več sto antocianinov, so primarno osnovani na šestih antocianidinih (kromofori antocianinov): pelargonidin, cianidin, peonidin, delfinidin, petunidin in malvidin. Ker je peonidin pridobljen iz cianidina, petunidin in malvidin pa iz delfinidina, obstajajo trije glavni antocianidini: pelargonidin, cianidin in delfinidin (Slika 1). Modro obarvano cvetje vsebuje delfinidin in njegove derivate in intenzivno rdeče vsebujejo pelargonidin. Povečano število hidrosilnih skupin na B obroču (Slika 1) širi modrejšo barvo pri

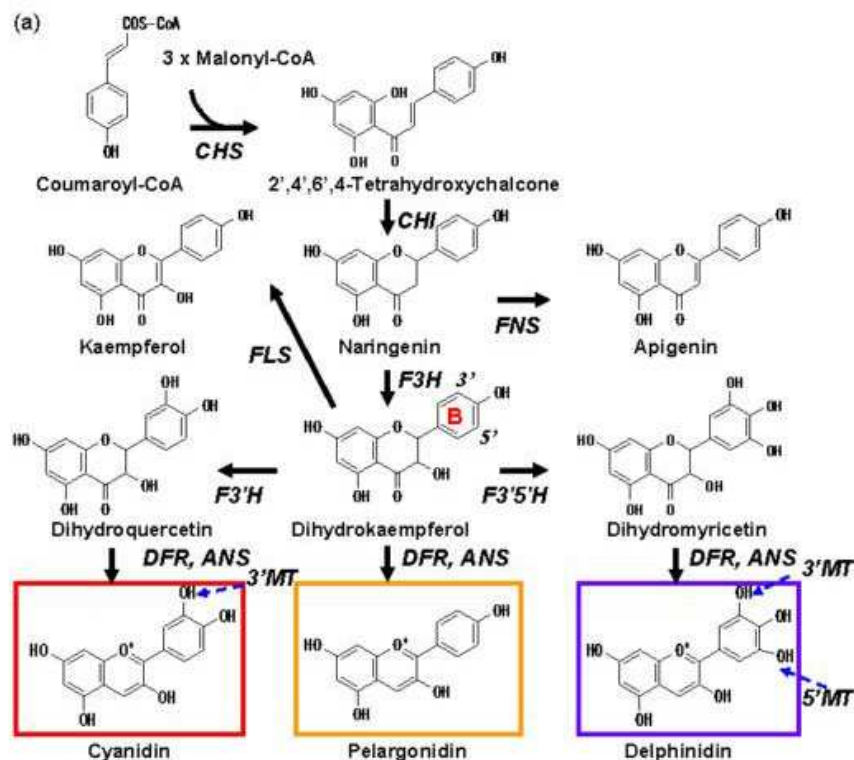
antocianinih pridobljenih iz antocianidinov, medtem ko metilacija 3' ali 5'-hidroksi skupine (Slika 1) povzroči bolj rdeče obarvanje (Tanaka in sod., 2009).

5.2 MODIFIKACIJA ANTOCIANINOV

Antocianidini se lahko modificirajo z glikozilom in acilom, odvisno od posamezne rastlinske vrste, ki imajo specifične glikoziltransferaze in aciltransferaze. Aromatska acilacija antocianinov spremeni barvo cvetov proti modri in poveča njeno stabilnost. Antocianini, ki vsebujejo več aromatičnih acilnih skupin, se imenujejo poliacilirani antocianini in izrazijo modro barvo kot rezultat intramolekularnega nalaganja (Tanaka in sod., 2009).

5.2.1 Glikozilacija antocianinov

Biosinteza antocianinov do antocianidin 3-glukozida je dobro ohranjena in mnoge rastline proizvajajo antocianidin 3,5-diglukozid in njegove derivate. Na splošno se 3-glukozilacija pojavi pred 5-glukozilacijo in obe sta posebej katalizirani z antocianidin 3-glukoziltransferazo (3GT) in antocianidin 5-glukoziltransferazo, ki sta odvisni od UDP-glukozila (Tanaka in sod., 2009).



Slika 1: Biosinteza antocianidinov (Tanaka in sod., 2009)

5.2.2 Acilacija antocianinov

Encim, ki katalizira transformacijo skupine aromatičnega acila v antocianine, so prvič izolirali iz encijana; tako imenovani hidroksicinamoil CoA; antocianin 5-glucozid hidroksicinamoil CoA transferaza (5AT). Pred kratkim so izolirali še nekaj genov antocianin transferaze odvisnih od acilglukoze. Venčni listi nageljna ponavadi akumulirajo makrociklične antocianine 3,5-di-*O*-glukozid-(6''6'-malil diester) pelargonidin ali cianidin. Antocianin maliltransferaza, ki je odvisna od malilglukoze, so delno prečistili iz nageljnovih venčnih listov, ki imajo malilirane antocianine; ustrezen gen je bil prav tako izoliran (Tanaka in sod., 2009).

5.2.3 Metilacija antocianinov

Metilacija antocianinov doda strukturno in barvno diverzitetu antocianinom. Gen, ki ustreza *S*-adenozil metioninu odvisnemu od antocianin metiltransferaze (MT), so izolirali iz petunije in torenije ter grozdnih jagod. Zanimivo je, da ti geni pripadajo kationsko odvisnemu tipu II MT skupini, medtem, ko flavoni in flavonoli ponavadi sodijo v tip I MT (Tanaka in sod., 2009).

5.3 KOVINSKI IONI

Vloga kovinskih ionov pri modri barvi cvetov je bila pojasnjena v zadnjih letih. Obširne kemijske študije so pokazale, da čašni listi hortenzije, ki so podobni venčnim listom, vsebujejo antocianine na osnovi delfinidina, 5-*O*-acilkininska kislino in Al^{3+} ione. Za modro obarvanje je potreben visok vakuolni pH. Nižji deli venčnih listov pri nekaterih kultivarjih tulipanov so modri, medtem ko je ostal del venčnih listov vijoličen. Ugotovili so, da celice, ki so modro obarvane vsebujejo približno 9.5 mM Fe^{3+} (25krat več kot vijolično obarvane celice), medtem ko ni velikih razlik v tipu ali koncentraciji antocianinov (definidin 3-rutinosid), flavonolov (kvercetin glucozidi) ali vakuolnem pH. To nakazuje, da imajo Fe^{3+} ioni kritično vlogo pri razvoju modre barve (Tanaka in sod., 2009).

5.4 REGULACIJA VAKUOLNE REAKCIJE

Antocianini so rdeče obarvani v nizkem pH in modro obarvani v nevtralnem ali rahlo alkalnem pH. Ker se antocianini nahajajo v vakuoli, je vakuolni pH pomemben pri obarvanju antocianinov. V vakuoli je pH določena z vakuolnimi ATP-azami in pirofosfatazami v rastlinskih celicah (Tanaka in sod., 2009).

5.5 HIDROKSILACIJA B-OBROČA FLAVONOIDOV

Na voljo je vedno več potencialno uporabnih orodij za spreminjanje barve cvetov v modro in rdečo barvo. Vendar, pa je bila za spreminjanje barve praktično uporabljena le modifikacija hidroksilacije B-obročja flavonoidov. Hidroksilacija B-obročja flavonoidov je katalizirana z dvema citokromomono-oksigenazama tipa P450, flavonoid 3-hidroksilaza (F3'H) in flavonoid 3',5'-hidroksilaza (F3',5'H). Geni, ki kodirajo ta dva encima so bili najprej izolirani pri petuniji, nato pa so sledile še mnoge druge vrste. Dokazali so tudi, da le nekaj zamenjav aminokislilin v C-terminalni regiji, lahko funkcionalno spremeni F3'H v F3',5'H, kar kaže relativno visoko plastičnost biosinteze flavonoidov (Tanaka in sod., 2009).

6 SPREMINJANJE BARVE CVETOV S POMOČJO GENSKEGA INŽENIRINGA

Modelne rastline pri študijah modifikacije barve cvetov s pomočjo genskega inženiringa so najpogosteje petunija, tobak in torenija, ker genska transformacija ni zahtevna. Petunija ne akumulira antocianinov osnovanih na pelargonidinu, ker njen DFR (dihidroflavonol 4-reduktaza) ne katalizira dihidrokacemfarola. Prvi uspešni eksperiment, ki je bil namenjen manipulaciji metabolizma antocianinov pri rastlinah, je bila produkcija antocianinov osnovanih na pelargonidinu dosežena pri izražanju koruznega DFR pri petuniji, ki ni imela F3'H in F3',5'H aktivnosti (Tanaka in sod., 2009).

Za preusmeritev biosinteze flavonoidov za spremembo barve, ni potrebna le večja ekspresija gena ključnega encima, ampak tudi selekcija pravega gostitelja, ki ima primerno genetsko ozadje. Ta selekcija je pomembna zato, da se zmanjša biosintetske poti introduciranim encimom ali da se zagotovi regulacija kompetitivnih poti. Pomembno je tudi, da se izbere gostitelja, ki ima dobre komercialne lastnosti (Tanaka in sod., 2009).

6.1 RAZVOJ MOON® SERIJE NAGELJNOV

Ekspresija gena petunije F3',5'H pod kontrolo konstitutivnega promotorja pri varieteti nageljna, ki proizvaja pelargonidin, proizvaja venčne liste, kjer delfinidinovi derivati prispevajo do približno 70 % vseh antocinonov. Vendar, pa je bila sprememba barve proti modremu odtenku majhna. Da bi povečali antocianine iz delfinidinov se je bilo potrebno izogniti kompeticiji za substrate med dvema ključnima encimoma na antocianinski poti (DFR in F3'H) in vpeljanim encimom (F3',5'H). Da bi to dosegli, so selekcionirali bele nageljne, ki so imeli pomanjkliv DFR gen. Ekspresija petunijinega gena F3',5'H (pod kontrolo promotorja gena CHS navadnega odolina) in petunijin gen DFR (pod kontrolo konstitutivnega promotorja), so pri enem DFR mutantu povzročili močno akumulacijo delfinidinovih derivatov in veliki spremembi barve v smeri modre barve

(FLORIGENE@Moondust™, ki je prvi gensko spremenjen cvetličarski pridelek prodajan po svetu). Ekspresija gena F3'5'H iz mačehe (pod kontrolo promotorja gena CHS navadnega odolina) in DFR gen petunije (pod kontrolo lastnega promotorja ter terminalnih sekvenc) je povzročila gensko spremenjene rastline, ki so prav tako močno akumulirale delfinidin vendar v večjih količinah. Te rastline so imele temno vijolično barvo cvetov (FLORIGENE@Moonshadow™) (Tanaka in sod., 2009).

Enake kombinacije genov so kasneje uvedli v beli standardni tip nageljna (prav tako mutant DFR). V venčnih listih teh gensko spremenjenih rastlin se kopičijo različne količine pigmentov osnovanih na delfinidinu, ki so odvisne od transformacijskih procesov. V štirih primerih kjer je nastala stabilna barva so odbrali rastline, ki so sedaj že 8 let na trgu, in sicer FLORIGENE@Moonvista™, FLORIGENE@Moonshadow™, FLORIGENE@Moonlite™, FLORIGENE@Moonqua™ (Tanaka in sod., 2009).

Petunija ima citokrom b₅, ki specifično prenese elektrone do F3'5'H, s tem pa lahko petunija učinkovito sintetizira 3'5'-hidroksilirane flavonoide. Ekspresija petunijinega gena F3'5'H (*Hf1*) hkrati z petunijinim genom citokrom b₅ v nageljnovih kultivarjih pomeni produkcijo cianidinovih derivatov, kar se kaže kot učinkovita tvorba antocianinov osnovanih na delfinidinu in nato spremembo barve venčnih listov. V tem primeru uporaba mutantov DFR ni bila nujna, za doseganje akumulacije delfinidina. Rezultat je pokazal, da izboljšanje sistema prenosa elektronov do F3'5'H, uspešno premaga endogeni F3'H (in DFR) aktivnosti (Tanaka in sod., 2009).

Gensko spremenjene nageljne pridelujejo v Ekvadorju, Kolumbiji in Avstraliji in danes je za nami že desetletna varna uporaba teh nageljnov. Trženje je danes vzpostavljeno v Južni Ameriki, od kjer so dobre letalske povezave do Evrope, Japonske in Severne Amerike (Tanaka in sod., 2009).

6.1.1 Podjetje FLORIGENE Ltd

Vse gensko spremenjene nageljne, ki so registrirani za prodajo je ustvarilo podjetje Florigene Ltd iz Avstralije (<http://www.florigene.com/>). Podjetje Florigene je bilo ustanovljeno leta 1986 v Melbournu. Danes so vodilno podjetje v genskem spreminjanju barve okrasnega cvetja na svetu. Prvoten namen podjetja je bil ustvariti prvo modro vrtnico na svetu. Poleg vrtnice pa so se osredotočili še na ostale pomembne skupine okrasnega cvetja, ki ne vsebujejo gena za modro barvo in sicer nageljne, gerbere ter krizanteme. Osredotočili se niso le na modro barvo, temveč na cel modri spekter. Leta 1991 so uspešno izolirali gen za modro obarvanje cvetov iz cvetov petunije. Leta 1994 je znanstvenikom tega podjetja uspelo vstaviti "modri gen" v nagelj in tako so ustvarili prvi nagelj, katerega cvet je obarvan v modrih spektrih. Leta 1996 so predstavili prvi slezovo-modro obarvan nagelj FLORIGENE Moondust™, ki je prvi predstavnik gensko spremenjenega okrasnega cvetja na trgu. Ustvarili so linijo nageljev FLORIGENE Moon® carnations, ki vsebuje šest različnih linij nageljnov (Slike 2 -7). Produkti podjetja:



Slika 2: FLORIGENE Moonshadow™
(Florigene, 2010)



Slika 3: FLORIGENE Moonvista™
(Florigene, 2010)



Slika 4: FLORIGENE Moonlite™
(Florigene, 2010)



Slika 5: FLORIGENE Moonshade™
(Florigene, 2010)



Slika 6: FLORIGENE Moondust™
(Florigene, 2010)



Slika 7: FLORIGENE Moonaqua™
(Florigene, 2010)

6.2 POGOJI ZA PRODAJO GENSKO SPREMENJENIH NAGELJNOV

Da se transgeni nageljni lahko prodajajo, morajo ustrezati standardom in predpisom o gensko spremenjenih organizmih. Pred uporabo gensko spremenjenih organizmov je potrebno opraviti številne teste, med njimi tudi oceno tveganja oziroma biološke varnosti. Ocena tveganja vsebuje vrednotenje možnih škodljivih vplivov na okolje (prenos (trans)gena, invazivnost GSR, vpliv na ne-ciljne organizme...) ter vrednotenje možnih škodljivih vplivov na zdravje ljudi in živali (toksičnost in alergičnost novih proteinov). Ravnanje z gensko spremenjenimi organizmi določa zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi. Podatki o gensko spremenjenih organizmih so javno dostopni in ena od strani na kateri lahko preverimo bazo gensko spremenjenih rastlin, je Evropska internetna stran o gensko spremenjenih rastlinah – GMO Compass (2010). Na tej strani najdemo tudi zgoraj naštetih nageljne, za katere je bila podana vloga za prodajo v Evropi. Na GMO Compass lahko preverimo na primer nagelj Moonlite (Slika 2). Na spletni strani lahko pogledamo vso dokumentacijo v zvezi z gensko spremenjenimi nageljni: povzetek prošnje za odobritev dovoljenja, poročilo o vplivu, znanstveno poročilo in odločitev komisije.

The screenshot shows the GMO Compass website interface. At the top, there is a navigation menu with categories: News/Current Affairs, Grocery Shopping, Agri-Biotechnology, GMO Database, Safety, Regulation, and Service. The date and time are displayed as May 16, 2010 | 8:34 pm.

The main content area is titled "Carnation Moonlite" under the "Flowers" category. It includes a small image of the plant and the following details:

- ID-Number: FLO-40644-4
- International:
- Scope:
- Trait: modified flower color
- Status: Valid authorisation

The "Application" section provides the following information:

Company	Florigene Ltd
Presented in	The Netherlands
Date	September 2004
Legislation	The application was submitted according to the directive 2001/18.
Scope of application	Import and marketing
GM plant	<input checked="" type="checkbox"/> Brief description <input checked="" type="checkbox"/> Summary of application

The "Assessment" section includes:

National authority	First examination by responsible authority in the Netherlands <input checked="" type="checkbox"/> Assessment report
Current status	Scientific safety assessment completed.
EFSA opinion	Scientific report of EFSA's safety assessment dated May 17, 2006. A final statement from EFSA is available. Conclusion: Carnations of the Event Moonlite are as safe as conventional carnations. <input checked="" type="checkbox"/> Brief description <input checked="" type="checkbox"/> EFSA: Scientific Opinion

On the right side, there is a "GMO Database" section with a search bar set to "All Plants (115)" and a link to "Advanced Search". Below it is the "EU Regulation on GM Food and Feed" section, which lists several topics: "The European regulatory system: GM plants, GM food and feed", "The long road from application to approval", "Labelling of GM food: A consumer's guide", and "Freedom of choice: Products with or without genetic engineering". At the bottom right is the "EU Authorities" section, listing: "European Food Safety Authority (EFSA)", "EFSA: Panel on genetically modified organisms", "EFSA: GM Food and Feed applications", "EFSA: Role of EFSA in the regulatory framework for authorisation of GMOs", "EU-Commission: Biotechnology / GM Food and Feed", and "Community Register of GM Food and Feed".

On the left side, there is a "Site Search" section with a search bar and a "Database search" section with another search bar. Below these are links for "Glossary", "New on GMO-Compass", "New database entries", and "Imprint". A "See what's what." section features an image of vegetables and text about the "GMO Food Database".

Slika 8: Spletna stran GMO Compass za gensko spremenjene rastline – primer nageljnov blagovne znamke Moonlite (GMO Compass, 2010)

Kljub desetletjem gojenja in sajenja v vrtove in parke, nagelj ni postal neželena (plevelna) rastlina in nikjer v svetu ni 'ušel v naravo'. Narejene so bile detajlne raziskave na in okoli gojitvenih območij v Kolumbiji, tudi na lokaciji, kjer trenutno gojijo in kompostirajo odpadke gensko spremenjenega nageljna. Zunaj območja gojenih nageljnov niso našli nobenega primerka. Možnost pobega genov pri kultiviranem gensko spremenjenem nageljnu ni realno možna (Tanaka in sod., 2009).

7 SKLEPI

Danes lahko s pomočjo genskega inženiringa naredimo spremembe, ki jih odbira, selekcija in klasično križanje ne omogočajo. Na svetu je vedno več gensko spremenjenih rastlin, največ v kmetijski pridelavi, vendar se njihovo število povečuje tudi v okrasnem vrtnarstvu. Genski inženiring se uporablja za spreminjanje barve, oblike in vzdržljivostjo rezanega cvetja ter za pridobivanje odpornosti na bolezni in škodljivce. Dodajanje novih barvnih odtenkov je kljub nekaterim uspehom še vedno velik izziv za žlahtnitelje, vendar pa dosežki pri nageljnu niso zanemarljivi. Iz petunije so uspešno vnesli gen za modro obarvanje, ki se je v nageljnu izrazil v vijolično-modrih odtenkih. Po desetih letih prisotnosti na tržišču ni poročil o negativnih vplivih na okolje in človeka.

8 VIRI

- Ball V. 1997. Ball Redbook. 16th edition. Batavia Illinois, Ball publishing., USA: 802 str.
- Banta L., Montenegro M. 2007. *Agrobacterium* and plant biotechnology V: *Agrobacterium: From Biology to biotechnology*. Tzfira T., Citovsky V. (eds.). New York, Springer New York: 73-143
- Bird R. 1994. Naglejni in klinčki. Ljubljana, Založba mladinska knjiga: 48 str.
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Gensko spremenjena hrana. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 167 str.
- Cvetnice, Kritosemenke sveta. 1995. Heywood V. H., Moore D. M., Richardson I. B. K., Stearn W. T. (ur.). Ljubljana, DZS: 335 str.
- Florigene Pty Ltd:
<http://www.florigene.com/> (maj 2010)
- Gasparič A., Komel R. 1996. Metode izboljšanja delovnih mikroorganizmov. V: Biotehnologija. Osnova znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 185-212
- GMO Compass:
<http://www.gmo-compass.org/eng/home/> (maj 2010)
- Michaels P. A. 2009. Top Ten Cut Flowers:
<http://greennature.com/article202.html> (maj 2010)
- Tanaka Y., Brugliera F., Chandler S. 2009. Recent progress of flower colour modification by biotechnology. International Journal of Molecular Sciences, 10: 5350-5369
- Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO).
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200267&stevilka=3235> (maj 2010)
- Zuker A., Tzfira T., Vainstein A. 1998. Genetic engineering for cut-flower improvement. Biotechnology Advances, 16, 1: 33-79
- Žel J. 1996. Specifične metode genske tehnologije pri rastlinah – vnos genov. V: Biotehnologija. Osnova znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 299-308

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Branki Javnornik ter recenzentu prof. dr. Gregorju Ostercu za vse konstruktivne kritike, strokovnost ter spodbude in pripombe pri pisanju diplomskega projekta.