

Genetička transformacija biosinteze terpena i modifikacija okusa citrusa

Blajić, Ante

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:166:548417>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
ODJEL ZA BIOLOGIJU

ZAVRŠNI RAD

**GENETIČKA TRANSFORMACIJA BIOSINTEZE TERPENA I MODIFIKACIJA
OKUSA CITRUSA (engl. *Genetic transformation of terpene biosynthesis and citrus taste
modification*)**

Ante Blajić

Split, rujan 2021.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom doc.dr.sc. Ivice Šamanića, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnika biologije i kemije.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu
Studij: Biologija i kemija
Odjel za biologiju
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

GENETIČKA TRANSFORMACIJA BIOSINTEZE TERPENA I MODIFIKACIJA OKUSA *CITRUSA*

Ante Blajić

SAŽETAK

Plodovi agruma predstavljaju važan prehrambeni proizvod diljem svijeta. Raznolikost mirisa i okusa odlika su mješavine hlapljivih terpena koji oplemenjuju njihovu koru. Budući da je limonen najzastupljeniji terpen roda *Citrus*, koristeći tehnike genetičke manipulacije utjecalo se na ekspresiju gena koji kodira za limonen sintazu u obrnutoj (engl. *antisense*) i usmjerenom (engl. *sense*) orijentaciji integrirane sekvence u plazmidu. Ovaj rad daje pregled utjecaja transgenih linija koje sadrže snižene i povišene koncentracije limonena na ljudsko osjetilo mirisa i odgovor na biljne patogene.

Ključne riječi: agrumi, limonen, monoterpenska sintaza, ttransgeneza, plazmid, transgenične biljke
Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 36 stranica, 36 slika, 2 tablice, 13 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Mentor: Dr. sc. Ivice Šamanić, *docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Ocjenjivači: Dr. sc. Ivice Šamanić, *docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Dr. sc. Željana Fredotović, *docentica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Dr. sc. Ana Maravić, *izvanredna profesorica Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Rad prihvaćen: **rujan, 2021.**

Basic documentation card

University of Split
Faculty of Science
Study: Biology and chemistry
Department of biology
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Bachelor's thesis

Genetic transformation of terpene biosynthesis and *citrus* taste modification

Ante Blajić

ABSTRACT

Citrus fruits represent an important food product worldwide. The variety of aromas and flavors are characterized by mixtures of volatile terpenes that refine their peel. Limonen being the most abundant terpene in the genus *Citrus*, genetic manipulation techniques were used to influence the expression of the gene encoding for limonen synthase when integrated either in sense or antisense orientation. This thesis provides an overview of the influence of transgenic lines of citrus fruits that either have reduced or elevated concentrations of limonen on the human sense of smell and the interaction of the plant with insect herbivores and pathogens.

Key words: Genus *Citrus*, limonen, monoterpene synthase, transgenesis, plasmid, transgenic plants

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

Thesis consists of: 36 pages, 36 figures, 2 tables and 13 references

Original language: Croatian

Mentor: Ilica Šamanić, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Reviewers: Ilica Šamanić, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Željana Fredotović, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Ana Maravić, PhD, Associate Professor of Faculty of Science, University of Split

Thesis accepted: **September 2021.**

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom

**GENETIČKA TRANSFORMACIJA BIOSINTEZE TERPENA I
MODIFIKACIJA OKUSA *CITRUSA* (engl. *Genetic transformation of
terpene biosynthesis and citrus taste modification*)**

izradio samostalno pod voditeljstvom doc.dr.sc. Ivice Šamanića U radu sam primijenio metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristio literaturu koja je navedena na kraju diplomskog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući naveo u diplomskom radu na uobičajen, standardan način citirao sam i povezao s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Student

Ante Blajić

ZAHVALA

Prije svega se želim zahvalit dragom Bogu. Njegovo svjetlo moj je putokaz.

Dalje se želim zahvalit svima koji su doprinijeli pisanju ovog znanstveno-istraživačkog rada, profesorima i profesoricama koji/koje su svojim predavanjima kroz posljednje četiri godine širili i oblikovali moje znanje.

Neizmjereno sam zahvalan svom mentoru doc. dr. sc. Ivici Šamaniću bez čijeg povjerenja ovaj rad ne bi ugledao svjetlo dana. Njegovi savjeti dali su mi dodatnu motivaciju, a njegova spremnost pomoći je neprikosnovena.

Zahvaljujem se obitelji i prijateljima bez čije podrške ne bih bio osoba koja sam danas.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Cilj rada.....	2
1. RAZRADA TEME.....	3
2.1 Rod citrusa.....	3
2.2 Terpeni.....	5
2.2.1 Uloga terpena	5
2.2.3 Limonen	7
2.3 Pregled metoda genetičke transformacije.....	9
2.3.1 Tradicionalno križanje	9
2.3.2 Mutacije uzrokovane zračenjem.....	10
2.3.3 Odabir uz pomoć markera	11
2.3.4 Transformacija protoplasta	12
2.3.5 Unošenje gena u biljni genom genskom puškom – engl. <i>gene gun</i>	13
2.3.6 Transformacija biljaka pomoću bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
2.4 Tehnike potvrde integracije transgena	18
2.4.1 Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	18
2.4.2 Southern hibridizacijska analiza	19
2.5 Modifikacija biosinteze terpena.....	22
2.5.1 Utjecaj modifikacije na osjetilo mirisa.....	23
2.5.2 Utjecaj modifikacije na odnos biljke i nametnika.....	28
2.5.2.1 <i>Penicilium digitatum</i>	29
2.5.2.2 <i>Xanthomonas citri</i> <i>sups. Citri</i>	31
2.5.2.3 <i>Ceratitidis capitata</i>	32
3. ZAKLJUČAK	34
4. LITERATURA	35

1. UVOD

Percepcija stvarnosti određena je osjetilima, a miris citrusnog voća rezultat je kompleksne mješavine hlapljivih spojeva – terpena [4]. Terpeni su sekundarni metaboliti koji se nakupljaju u specijaliziranim uljnim žlijezdama u kori agruma. Služe u komunikaciji između biljke i okoline. Privlače predatore biljojeda i oprašivače te brane biljku od nametnika i patogena. Prilikom sazrijevanja mesnati plodovi mijenjaju boju, okus, teksturu i otpuštaju hlapljive spojeve kojima intenziviraju aromu čime postaju privlačniji frugivornim životinjama koje raspršuju sjemenje nakon hranjenja [2]. Osim toga, kore agruma koje sadrže obilje mirisnih supstanci široko su korištene za ekstrakciju eteričnih ulja koja su komercijalizirana za aromatiziranje hrane, pića, parfema, kozmetike, itd.

Uzgajivači se, međutim, suočavaju s važnim izazovima održavanja i poboljšanja prinosa: bolesti, suša, hladnoća i slana tla mogu ograničiti proizvodnju što ima važan gospodarski utjecaj na uzgajivače. Tradicionalne metode križanja tijekom godina uspješno su korištene za poboljšanje osobina citrusa, no poteškoće se javljaju zbog sporog rasta i sazrijevanja takvog usjeva: nekompatibilnost, poliembriji, partenokaprija nezaobilazne su prepreke ovakve vrste genetičke manipulacije. Budući kako tradicionalni uzgoj traje dugo, brza ugradnja poželjnih osobina (gena) nije moguća. Alternativna metoda pronalazi se u genetičkom inženjerstvu. Postupak genetičke transformacije uključuje dva glavna procesa. Prvi je ugradnja stranog gena od interesa u biljni genom, dok drugi zahtjeva regeneraciju transformirane stanice u čitavu transgeničnu biljku. Uspjeh transformacijske tehnike ovisi o učinkovitom i pouzdanom procesu jer je učinkovitost prihvaćanja samog stranog gena često niska [6].

Postoji nekoliko različitih tehnika koje znanstvenici koriste u svrhu dobivanja genetički modificiranih citrusa:

- Tradicionalno križanje
- Mutacije uzrokovane zračenjem
- Selekcija uz pomoć markera
- Transformacija protoplasta
- Bombardiranje česticama
- Transformacija biljaka pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens*

1.1 Cilj rada

Cilj ovog rada je:

- Sistematski opisati rod citrusa i njihov značaj u svakodnevnom životu.
- Prikazati segment sekundarnog biljnog metabolizma.
- Objasniti podjelu i ulogu terpena kod biljaka.
- Opisati metode genetičke transformacije biljaka.
- Približiti tehnike kojima potvrđujemo integraciju transformiranih gena.
- Analizirati rezultate transformacije gena za biosintezu monoterpena limonena i utjecaj na modifikaciju okusa i mirisa te promjenu načina na koji transgenična biljka reagira na određene nametnike.

1. RAZRADA TEME

2.1 Rod citrusa

Citrusno voće važan je dodatak svakom kućanstvu. Boje i mirisi kojima oplemenjuju prostoriju samo jedna je njihova uloga, uvriježen je savjet pri svakom padu imuniteta uzeti “čaj s medom i limunom”. Mandarine, grejpovi i naranče uz limun poznati su predstavnici roda Citrus (slike 1,2,3,4).

Limun (slika 1), lat. *Citrus limon* zauzima sljedeći sistematski položaj u biljnom carstvu:

CARSTVO: Plantae - biljke

ODJELJAK: Magnoliophyta (spermatophyta) - sjemenjače

RAZRED: Magnoliopsida - dvosupnice

RED: Sapindales – sapindolike

PORODICA: Rutaceae – rutovke

POTPORODICA: Aurantioideae

ROD: Citrus - agrumi

VRSTA: *Citrus limon* L. – limun



Slika 1. *Citrus limon* - limun (izvor: web 1)

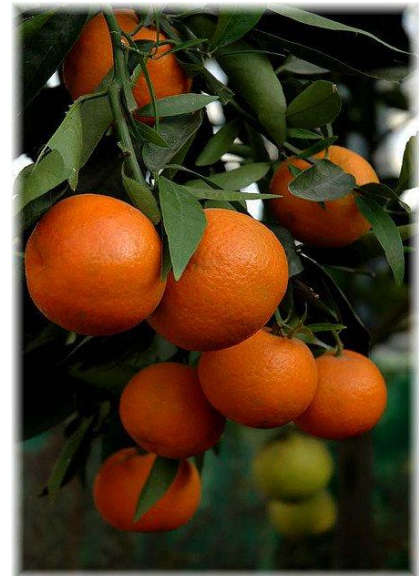


Slika 2. *Citrus paradisi* - grejp (izvor: web 2)

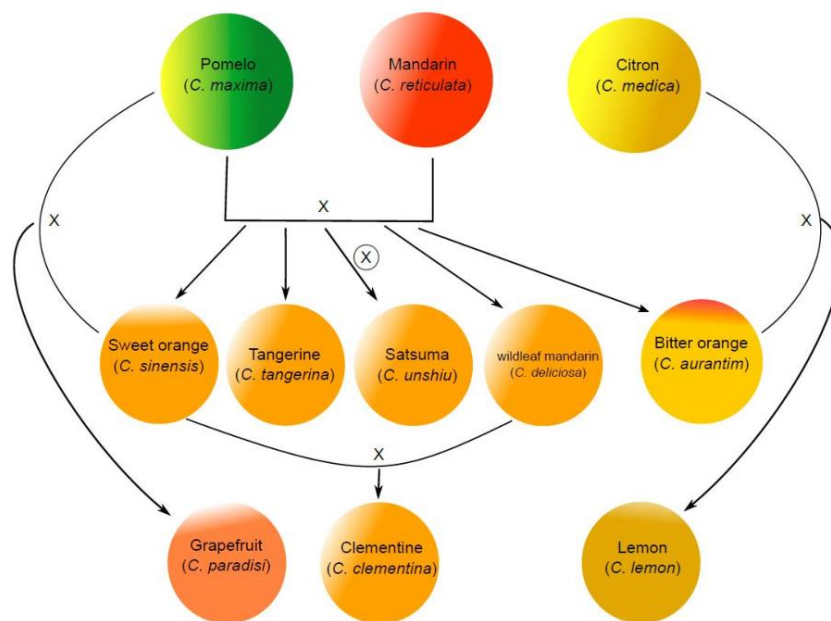
Smatra se da rod Citrus potječe iz malajskog arhipelaga i jugoistočne Azije. Sorte jestivih tržišnih agruma nastaju hibridizacijom predaka roda Citrus (slika 5), prirodnim ili umjetnim mutacijama te ljudskim odabirom [7]. Citrusi su bogati vitaminima, posebno vitaminom C, odličan su izvor mineralnih tvari i vlakana. Fitokemikalije kao monoterpeni, triterpeni, flavonoidi, karotenoidi i hidroksicimena kisela imaju sjajan potencijal u zaštiti protiv kroničnih bolesti i raka [7]. Konzumiramo ih najčešće kao svježe voće, sokove ili koncentrate.



Slika 3. *Citrus sinensis* – naranča (izvor: web 3)



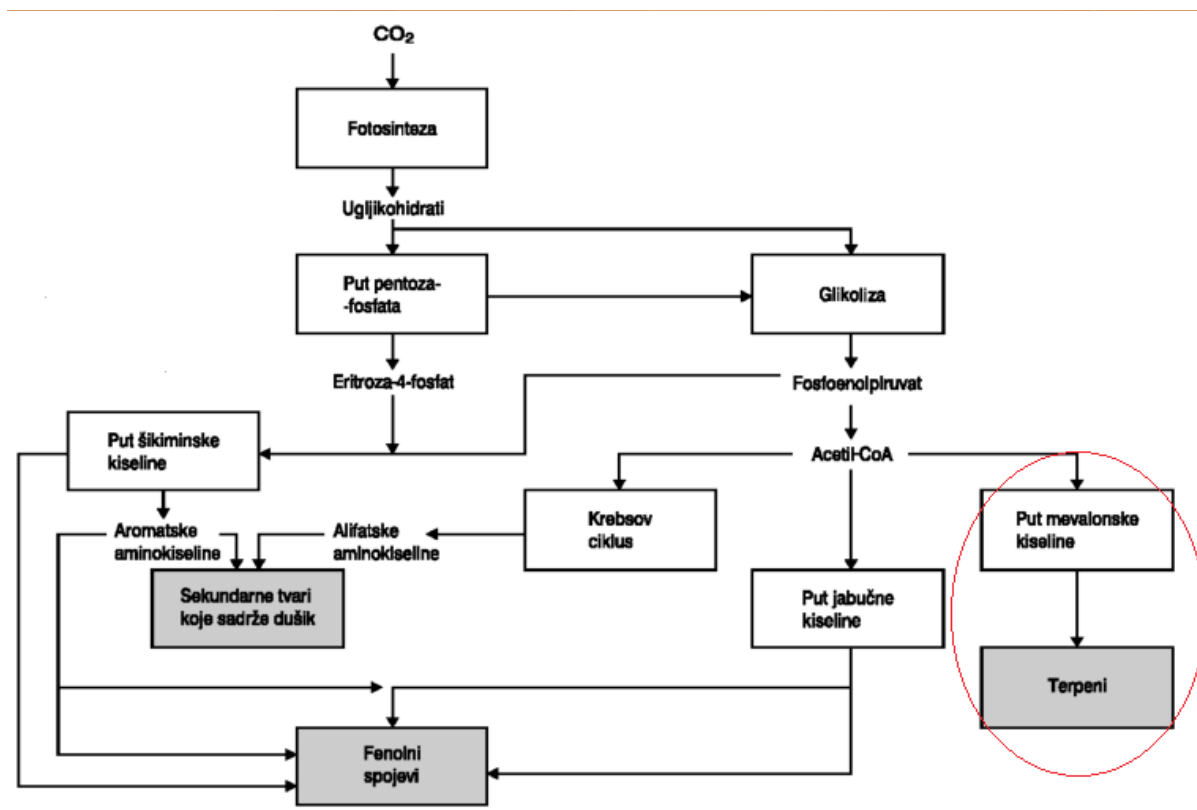
Slika 4. *Citrus reticulata* – mandarina (izvor: web 4)



Slika 5. Predloženo obiteljsko stablo agruma. Tri su predka ključna u razvoju današnjih citrusa: *C. maxima*, *C. reticulata* i *C. medica* (izvor: [7])

2.2 Terpeni

Terpeni ili terpenoidi (oksidirani oblik terpena) čine najveću klasu proizvoda sekundarnog metabolizma (za razliku od primarnih, oni nemaju ulogu u rastu i razvoju). Raznolike tvari ovog razreda metabolita najčešće nisu topljive u vodi. Vrlo su hlapljive te pridaju biljkama njihove karakteristične mirise. Biosintetizirani su iz acetil-CoA ili glikolitičkih međuprodukata kroz dva puta (slika 6): put mevalonske kiseline (u citosolu) i piruvatni put (u plastidima).



Slika 6. Sekundarni metabolizam biljaka (izvor: web 5)

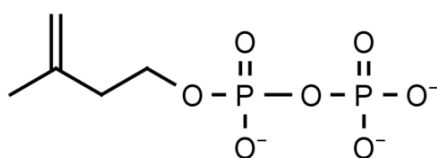
2.2.1 Uloga terpena

Svrha terpena očituje se u interakciji između biljke koja ih proizvodi i staništa u kojem se nalazi. Spojevi koji se proizvode tijekom prvog razdoblja razvoja plodova, hranjenje istima pretvaraju u neugodno iskustvo za kralježnjake. Opće je prihvaćeno kako je primarna funkcija sekundarnih metabolita zaštita nezrelih plodova od raznih patogena i predatora koji bi konzumiranjem nezrelog voća, koje nije spremno za raspršivanje sjemenja, uništili potencijalno razmnožavanje same biljke. Pred kraj prvog razdoblja razvoja ploda cilj je isti napraviti što privlačnijim u svrhu širenja sjemenja. Tada hlapljive tvari igraju svoju ulogu

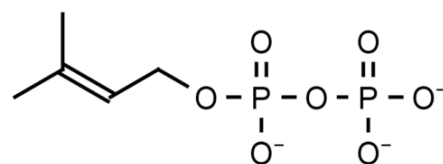
čineći plodove izrazito privlačnim za životinje, što je svojevrsni signal spremnosti za rasipanje sjemenja. Hlapljive tvari koje biljke emitiraju uvelike doprinose reprodukcijom uspjehu i opstanku u prirodnim ekosustavima. U golosjemenjača, kao što je velika jela (*Abies alba*), terpeni se proizvode u smolnim kanalima. Biosinteza je inducirana nakon ranjavanja što ukazuje na njihovu ulogu u obrani od najezde potkornjaka [9]. Pojačana ekspresija gena preteča za linalool sintazu iz jagode (*Fragaria ssp.*) u transgeničnih biljaka *Arabidopsis thaliana* dovela je do nakupljanja visoke razine linalool-a što je za posljedicu imalo indukciju otpora protiv lisnih uši [3]. Također pojačana ekspresija istog gena u mitohondrijima *Arabidopsis thaliana* dovela je do nakupljanja nerolidola i njegova derivata homoterpen 4,8-dimetil-1,3(E),7-nonatriena koji privlači karnivorne predatore rješavajući problem grinja putem hranidbenog lanca [3]. U novije vrijeme pojačana ekspresija gena za (E)- β -kariofilen sintazu iz origana (*Origanum vulgare*) u kukuruzu (*Zea mays*) čini da korijenje privlači nematode koji štite biljku od kornjaša [3]. Transgenična pojačana ekspresija gena za preteču pačulol sintaze u duhanu (*Nicotiana tabacum*) zajedno s farnezil difosfat sintazom koja je preteča seskviterpena, dovodi do visoke koncentracije pačulola i 13 drugih seskviterpena koji biljku čine jako otpornom na ličinke nametnika [3]. Uloga različitih terpenoidnih spojeva u rezistenciji prema patogenima dobro je dokumentirana, osobito u šumskom drveću, ali prekomjerna ekspresija gena za prekursore ovih spojeva kao biotehnoška strategija u svrhu zaštite biljaka još čeka svjetlo dana. Sažeto, korištenje metaboličkog inženjerstva kako bi inducirali otpornost na biotičke agense predstavlja alternativnu tehnologiju naspram korištenja skupih i visoko toksičnih fungicida, baktericida i pesticida. Ovakvo korištenje dostupne tehnologije vrlo lako može rezultirati poboljšanjem same kvalitete proizvoda i zdravlja ljudi koji ih proizvode.

2.2.2 Podjela terpena

Izopentenil difosfat (slika 7) (IPP) i njegov izomer, dimetilalil difosfat (DPP) (slika 8) molekule su od 5 ugljikovih atoma koje predstavljaju građevne blokove (prekursore) biosinteze terpena [9].



Slika 7. Lewis-ova struktura IPP-a
(izvor: web 6)



Slika 8. Lewis-ova struktura DPP-a
(izvor: web 7)

Njihovim spajanjem formiraju se veće molekule, a prema veličini su terpeni i podijeljeni.

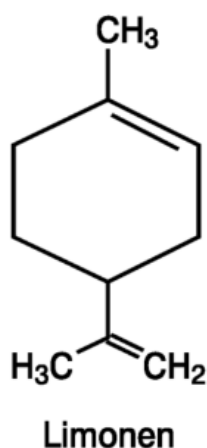
Vrste terpena prema broju izoprenih jedinica [9]:

- Monoterpeni – dvije C5 jedinice = 10 C atoma
 - predstavnici: limonen, mentol, pinen
 - uloga: insekticidno djelovanje
- Seskviterpeni – tri C5 jedinice = 15 C atoma
 - predstavnici: kostunolid, gosipol
 - uloga: antiherbivorni agensi
- Diterpeni – četiri C5 jedinice = 20 C atoma
 - predstavnici: abietinska kiselina, forbol, taksol
 - uloga: herbivorni otrovi, taksol korišten za inhibiciju rasta tumora
- Triterpeni – šest C5 jedinica = 30 C atoma
 - predstavnici: steroli, limonoidi
 - uloga: sterol je dio plazmaleme, a limonoid je otrovan za kukce
- Tetraterpeni – osam C5 jedinica = 40 C atoma
 - predstavnici: likopen, β -karoten, lutein
 - uloga: pigmenti
- Politerpenoidi – $[C_5]_n$, $n > 8$
 - predstavnici: guma
 - uloga: zaštitna (zacjeljivanje), obrambena (herbivorna zaštita)

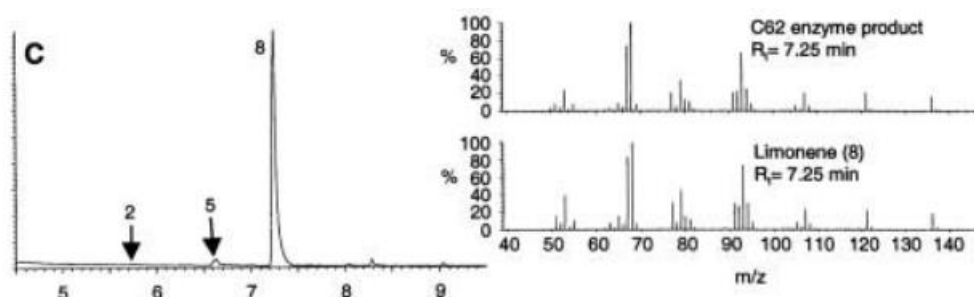
2.2.3 Limonen

Pigmentirani egzokarp agruma poznatiji kao flavedo obilježen je tisućama uljnih žlijezda koje u sebi sadrže hlapljive spojeve terpene. Limonen je najobilnija hlapljiva komponenta prisutna

u svim komercijalno uzgojenim plodovima agruma (slika 9). Od ukupnog broja terpena pronađenih u plodu naranče 97% pripada limonenu [2]. Izuzetno velika količina limonena navodi veliku važnost ovog monoterpena u aromi ploda, a uzročno-posljedično i u interakcijama između same biljke i ekosustava (slika 10). U prirodnim uvjetima limonen se gotovo isključivo proizvodi u svom (+) - limonen enantiomeru (99%) [5]. Uspoređujući monoterpenске sintaze, najniža K_m vrijednost (kinetička vrijednost) pridaje se limonen-sintazi naspram β -pinen sintaze i γ -terpinen sintaze [5]. Niža K_m vrijednost ukazuje na veći afinitet prema supstratu, što dovodi do veće proizvodnje produkta odnosno veće koncentracije limonena u usporedbi s ostalim terpenima. Zaključno, razlika u K_m vrijednostima monoterpenских sintaza može djelomično objasniti zašto je razina limonena prema drugim terpenima u kori citrusa toliko veća [5].



Slika 9. Lewis-ova struktura limonena (izvor: web 8)



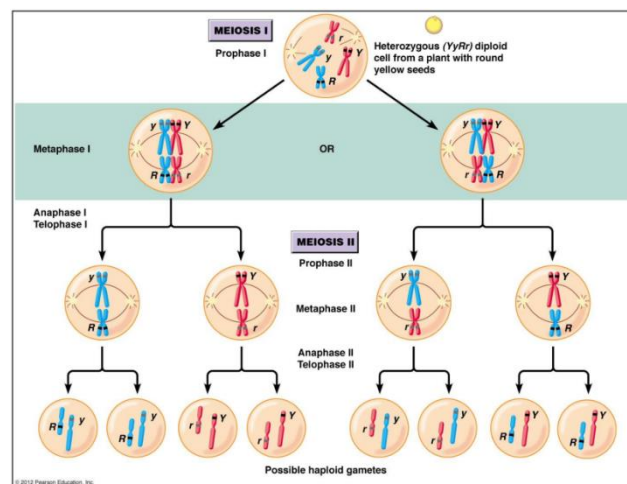
Slika 10. GC-MS profil terpenских produkata: 2, α -pinen; 5, mircen; 8, limonen (izvor: [5])

2.3 Pregled metoda genetičke transformacije

Uzgoj biljaka općenito se može definirati kao promjene uzrokovane u genetskom materijalu biljaka uslijed njihove uporabe od strane ljudi, u rasponu od nenamjernih promjena nastalih pojavom poljoprivrede do primjene molekularnih alata za precizno mijenjanje genoma. Veliku raznolikost metoda promjene genetičkog sadržaja biljaka možemo pojednostavniti podjelom u dvije kategorije: 1) Uzgoj biljaka temeljen na kontroliranom razmnožavanju, odabirom biljaka koje predstavljaju rekombinaciju poželjnih gena različitih roditelja; 2) Uzgoj biljaka temeljen na praćenju rekombinaciji odabirom specifičnih gena ili profila markera, pomoću molekularnih alata za praćenje varijacija unutar genoma [10].

2.3.1 Tradicionalno križanje

U konvencionalnom uzgoju agruma, znanstvenici miješaju dva seta DNA – jedan od majke, a drugi od oca – za proizvodnju hibridnih embrija dobivenih kroz proces koji se zove mejoza (slika 11).

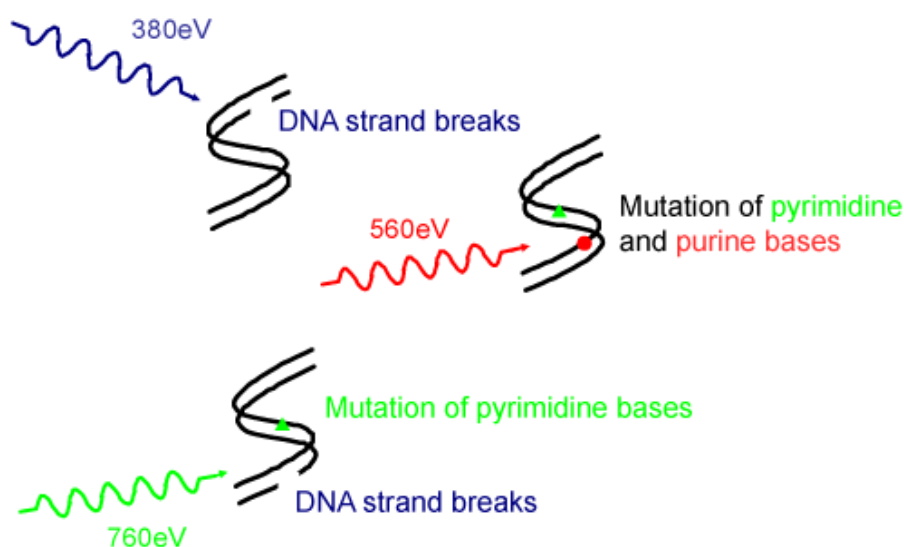


Slika 11. Mejoza (izvor: web 9)

Ovi embriji daju hibridno sjeme za koje je malo vjerojatno da bi se u prirodi slučajno kombinirali. Velike populacije takvog sjemenja moraju se u naknadnim generacijama rigorozno ocjenjivati radi identifikacije potomaka koji ukazuju industrijski povoljne karakteristike. Ograničenje pronalazimo u sporom procesu razvoja jedinki.

2.3.2 Mutacije uzrokovane zračenjem

Osim tradicionalnog križanja priroda nukleinskih baza citrusa može se mijenjati utjecajem zračenja sunčeve svjetlosti na DNA. Ova radnja rezultira mutacijama ili genetskim promjenama (slika 12). Ružičasti endokarp prisutan u naranči *Cara cara* (slika 13) nastao je kao posljedica zračenja stabla Washingtonske slatke naranče [8]. Zračenjem citrusnih pupoljaka simulirajući sunčevo svjetlo također možemo utjecati na genetske promjene, inače, pristup koji su znanstvenici koristili za stvaranje mandarina s niskom količinom sjemenja [8].



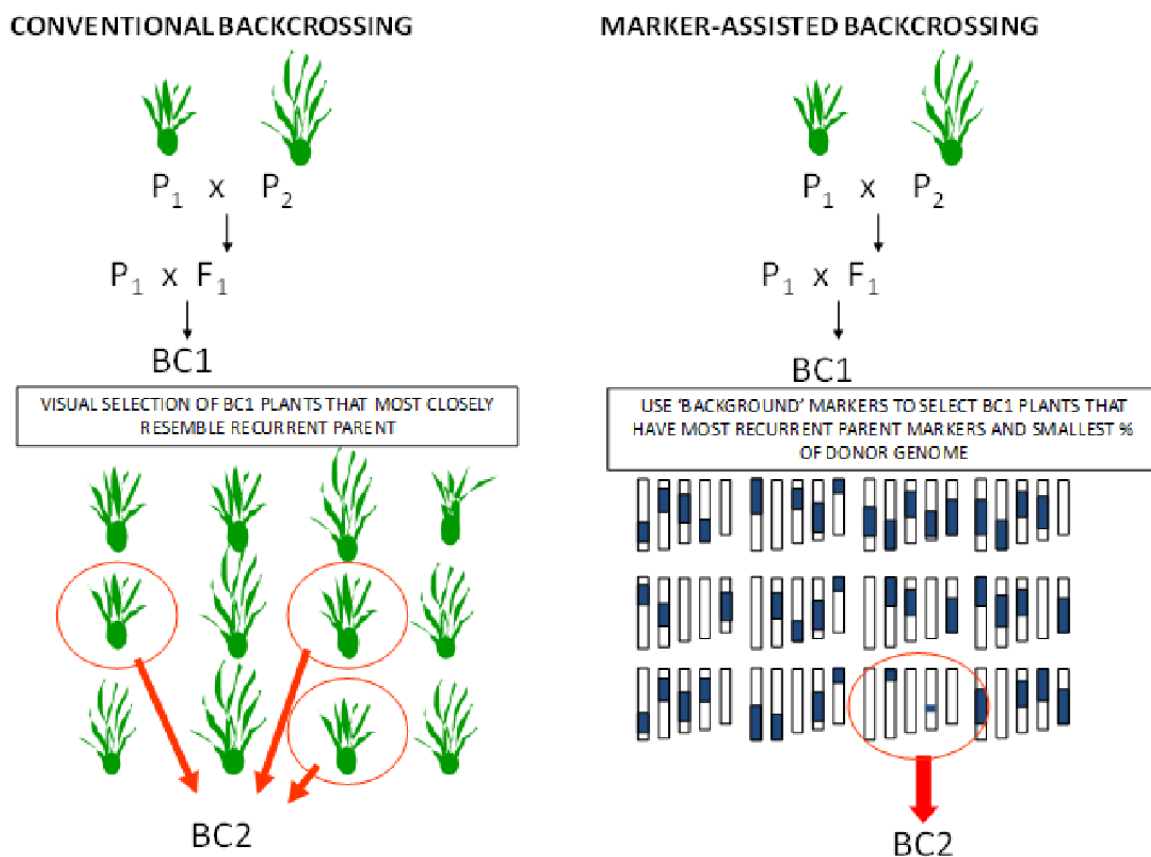
Slika 12. Utjecaj raznog zračenja na DNA (izvor: web 10)



Slika 13. Naranča *Cara cara* (izvor: web 11)

2.3.3 Odabir uz pomoć markera

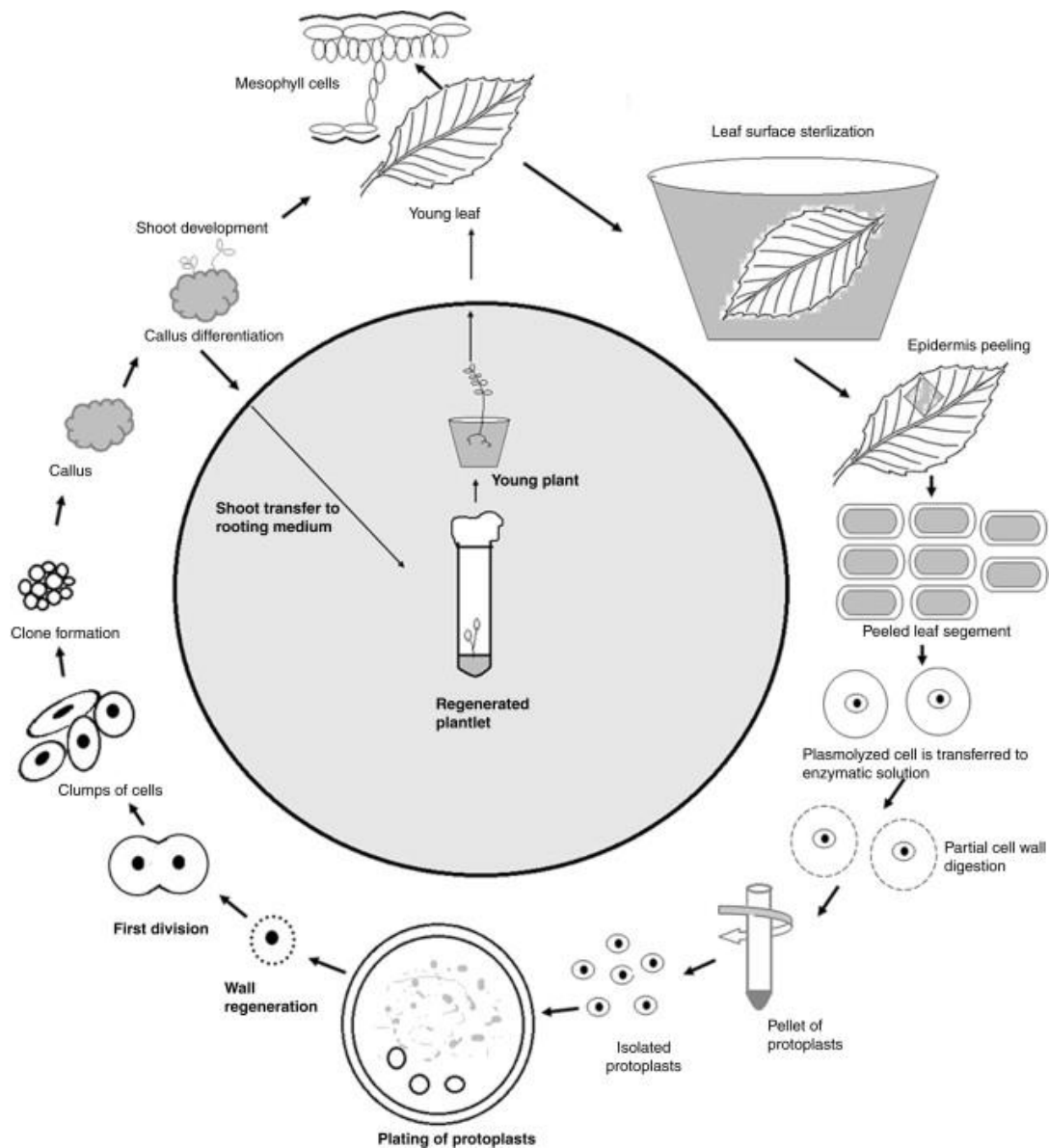
U novije vrijeme uzgajivači koriste metodu zvanu “Marker-assisted selection” (MAS), proces korištenja morfoloških, biokemijskih ili DNA markera kao neizravnih kriterija odabira važnih svojstava u oplemenjivanju usjeva (slika 14). Ovaj se postupak koristi za poboljšanje učinkovitosti ili djelotvornosti odabira osobina od interesa u uzgojnim programima. Uključuje stvaranje “tablice sadržaja” s oznakama za lokacije gena zaslužnih za ekspresiju određenih osobina. U citrusima se MAS koristio u ograničenim slučajevima, primjerice, u programima uzgoja podloga/debla/rizoma koje uvode otpornost prema nematodama [8].



Slika 14. Usporedba odabira jedinki putem konvencionalne vizualne selekcije i DNA markera (izvor: web 12)

2.3.4 Transformacija protoplasta

Biljna stanica građena je od stanične stijenke i protoplasta. Protoplast uključuje protoplazmu koja je od stanične stijenke odvojena plazmatskom membranom (plazmalemom), a dijeli se na jezgru i citoplazmu [9]. Transformacija protoplasta temelji se na fuziji dvaju različitih protoplasta koji sadrže gene od interesa, obično se fuziraju dva protoplasta (iako je moguće koristiti i više od dva) koristeći naboj ili kemijske medijatore (slika 15). Ideja fuziranja protoplasta zasniva se na genetičkoj modifikaciji željene biljke za razvoj sojeva hibrida bolje kvalitete. Primjerice, bolest kovrčavosti lista krumpira uzrokovana virusom (*engl. Potato leaf roll virus*) pojavljuje se početkom sezone kada je virus prenesen u komadu sjemena. Posljedice zaraze virusom su suhi, kožasti debeli listovi, uvrnuti prema gore. Rješenje problema zaraze virusom pronalazi se u fuziranju stanice koja je rezistentna na spomenuti virus, ali daje slabiji usjev sa stanicom koja je ranjiva prema istom, ali npr. ima kvalitetniji usjev. Rezultat takvog fuziranja je stanica koja je istovremeno rezistentna na virus i daje kvalitetniji usjev. Prvi stadij je formiranje protoplasta, odnosno odvajanje protoplasta od stanične stijenke koja je građena od celuloze koristeći enzim celulazu. Djelovanjem celulaze raspada se stanična stijenka i ostaje goli protoplast spreman za manipulaciju. Drugi stadij je fuzija dvaju protoplasta pod utjecajem električne struje niskog napona. Fosfolipidne stanične membrane se orijentiraju na način sličan procesu elektroporacije (metoda fizičke transfekcije koja koristi električni impuls za stvaranje privremenih pora u staničnim membranama kroz koje tvari poput nukleinskih kiselina mogu proći u stanice) i njihove se membrane stapaju te počinju dijeliti tvari između sebe, tada hibridna stanica poprima oblik sličan početku telofaze stanične diobe. Osim fuziranja citoplazme dolazi i do fuzije jezgara stanica te nastaje heterokarion (lat. *Hetero* – različiti, *Karyon* – jezgra) koji sadrži genetski materijal obje stanice. Sljedeći cilj je iz dobivenog heterokariona proizvest biljni kalus (nediferencirana masa stanica) iz kojeg potpuno regeneriramo novu biljku s genom rezistencije protiv virusa i genom za kvalitetniji usjev (slika 15). Ovom metodom uspješno su regenerirane transgenični limuni (*C. limon*), grejp (*C. paradisi*), slatka naranča (*C. sinensis*) i gorka naranča (*C. aurantium*) [6].

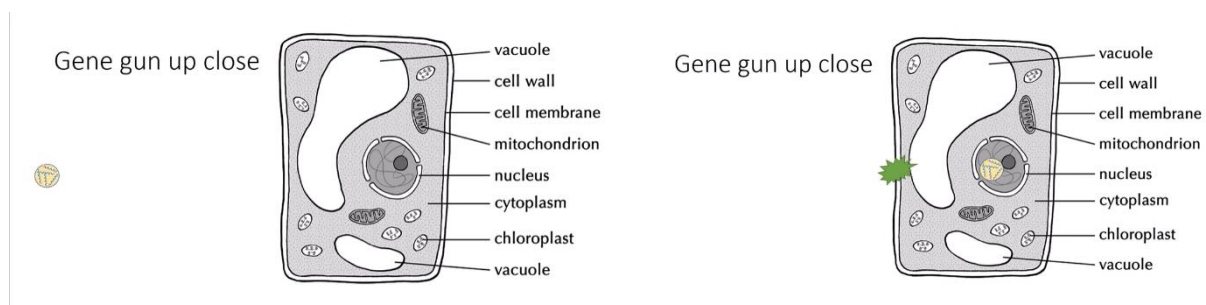


Slika 15. Transformacija protoplasta (izvor: web 13)

2.3.5 Unošenje gena u biljni genom genskom puškom – engl. *gene gun*

Kako bi napravili transgeničnu biljku najvažnije komponente su DNA koja kodira za željenu osobinu sa promotorom koji će transkribirati i translirati sekvencu od interesa. Također, potreban je način provođenja selekcije stanica koje sadrže željeni DNA – plazmid s antibiotskom rezistencijom. Zatim, potreban je način kojim ćemo željenu DNA ubaciti u biljnu stanicu. Prva metoda je grube naravi, unošenje gena u biljni genom genskom puškom. U biljne stanice „ispaljuju“ se pod visokim pritiskom čestice zlata ili volframa obložene s promotorom,

sekvencom za određenu osobinu i selekcijskim markerom. Čestice su ispaljene s dovoljno sile da probiju staničnu stijenkku i staničnu membranu s nadom da će ući u jezgru (slika 16). Ova metoda (slike 17,18) koristi se kao alternativa kada genotipovi citrusa nisu podložni infekciji Agrobakterijumom [6].

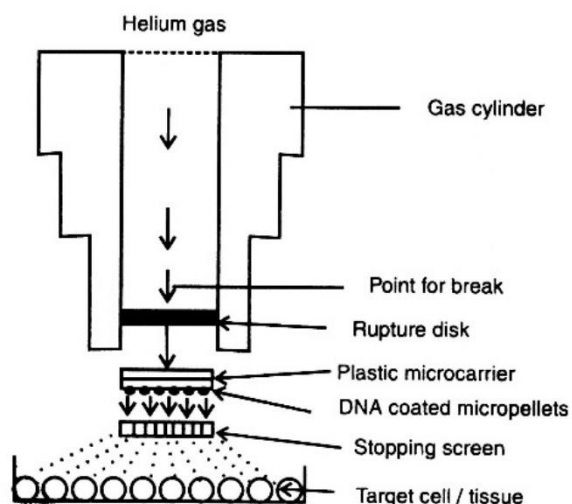


Slika 16. Čestice ispaljene „genskom puškom“ na biljne stanice (izvor: web 14)

Prednost metode je nepotreban dodatni plazmidni DNA, no nedostaci su mehaničko oštećenje stanice prilikom penetracije čestice zlata i teška kontrola integracije same DNA u nukleus. DNA je nasumično uključena u kromosome putem mehanizama DNA popravka zbog čega može promijeniti ekspresiju nužnih biljnih gena, završiti u mitohondrijskom ili kloroplastnom genomu umjesto u nukleusu. Očigledno bi drugačiji pristup bio koristan.



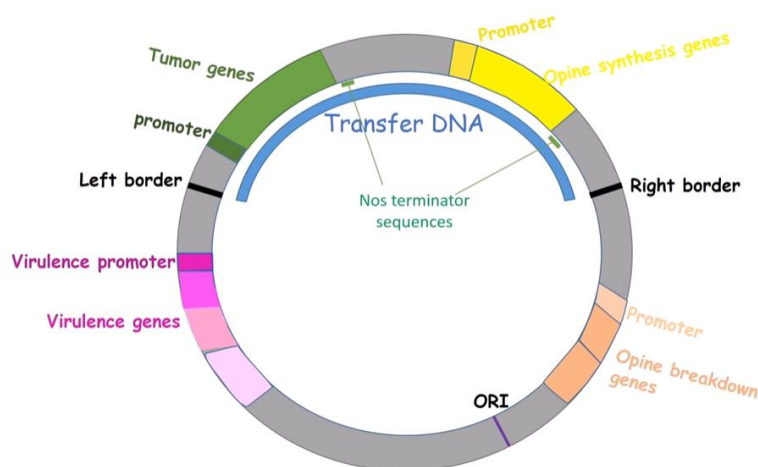
Slika 17. Ispucavanjem gena „genskom puškom“ (izvor: web 15)



Slika 18. Shematski prikaz „genske puške“ (izvor: web 16)

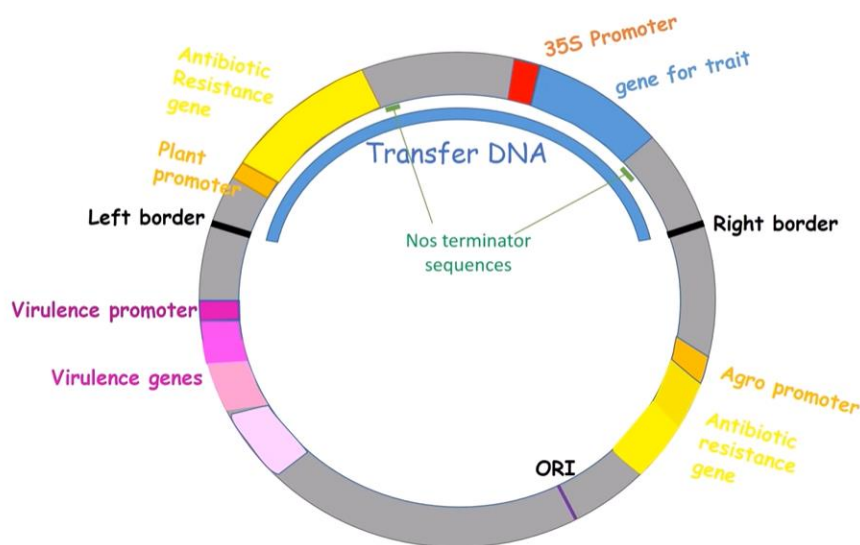
2.3.6 Transformacija biljaka pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens*

Kao za mnoge sofisticirane laboratorijske tehnike, priroda pruža modelni sustav genetičke manipulacije. Tumori prisutni na deblima stabala (engl. *crown gall plant tumor*) uzrokovani su infekcijom bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Agrobakterium često je okarakterizirana kao “prirodni genetički inženjer” [1]. Bakterija živi u tlu na korijenju biljaka putem kojeg inducira spomenute tumore. Agrobakterija prenosi segment DNA, T-DNA (engl. *transfer DNA*), s plazmida u biljnu stanicu izazivajući nekontrolirani rast stanica koji rezultira tumorom i tjera biljku da proizvodi prehrambene proizvode zvane opini kojima se hrani (slika 19). Tumor inducirajući (Ti) plazmid je veliki plazmid, sadrži malo manje od 200 gena i preko 200000 parova baza [11]. Kao svi plazmidi sadrži izvorište replikacije (engl. *Origin of replication*) da bi se plazmid mogao kopirati. Slično većini bakterija, velik broj gena je organiziran u operone tako da aktivacija jednog promotora služi kao okidač transkripcije i translacije nekoliko genskih produkata uključenih u istom procesu. Unutar plazmida nalazi se i set virulencijskih gena (engl. *Virulence genes*) potrebnih da bi zarazili i prenijeli DNA u biljku. Postoji i odvojeni operon koji sadrži gene potrebne za metaboliziranje opina (engl. *Opine breakdown genes*) koje će biljka proizvoditi kao hranu za bakteriju. Dio plazmida sadrži sekvencu DNA koja će se prenijeti u biljku, ovaj segment se zove transfer ili T-DNA i definirana je lijevom i desnom graničnom sekvencom. T-DNA sadrži dva glavna odjeljka: jedan koji sadrži gene koji potiču formaciju tumora (engl. *Tumor genes*) i drugi koji sadrži gene za stvaranje opina (engl. *Opine synthesis genes*) koji hrane Agrobakteriju.[13] Krajevi sekvenci koji će se transkribirati u biljku su označeni NOS terminatorskim sekvencama (engl. *Nopaline synthase terminator sequences*).



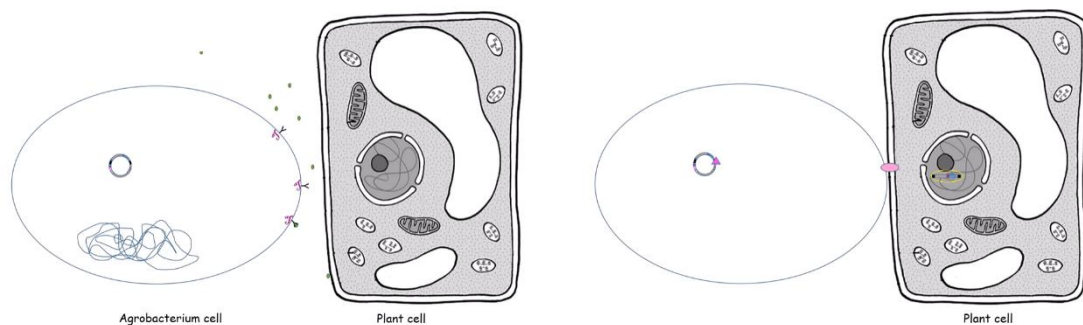
Slika 19. Ti (Tumor inducirajući) plazmid (izvor: web 17)

Za korištenje spomenutog plazmida, u svrhu proizvodnje transgeničnih biljaka, odjeljke koji su štetni za biljku potrebno je ukloniti te dodati željene gene ("razoružani" Ti – plazmid, engl. *disarmed Ti plasmid*). Geni koji uzrokuju sintezu i razgradnju opina te indukciju tumora se uklanjaju (slika 20). Geni za osobinu od interesa kao i biljni promotor se dodaju. Većinom, vrlo jaki promotor kao 35S promotor virusa mozaika cvjetače (engl. *Cauliflower mosaic virus*) koristi se da bi osigurao visoku ekspresiju gena od interesa. Također se dodaje selektivni marker uveden s bakterijskim promotorom kako bi olakšao odabir transformiranih stanica Agrobakterija koje sadrže Ti plazmid. Virulencijski geni ostaju jer su potrebni za prijenos T-DNA iz Agrobakterije u stanicu.



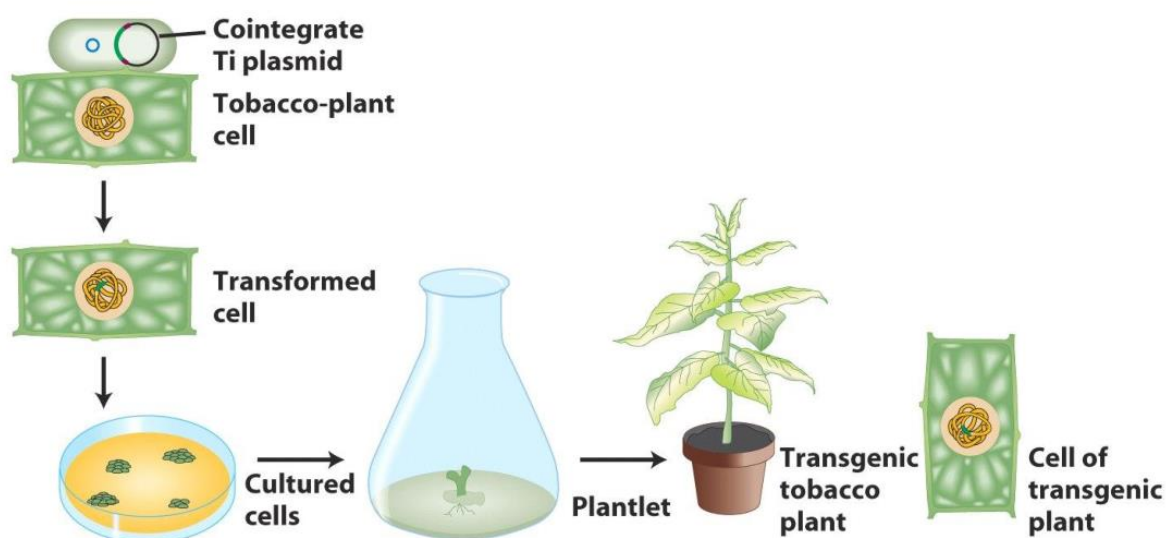
Slika 20. "razoružani" Ti - plazmid (engl. *disarmed Ti plasmid*) s regijom virulencije iz kojeg su izdvojeni onkogeni geni (izvor: web 18)

Prijenos Ti- plazmida iz Agrobakterijuma uključuje ekspresiju brojnih gena unutar stanice Agrobakterijuma. Biljne stanice oslobađaju raznolike male molekule. Kada je jedna od ovih molekula prepoznata od strane Agrobakterijuma potiče se ekspresija transkripcijskog faktora koji inicira transkripciju virulencijskih gena na Ti plazmidu. Jedan od tih genskih produkata vodi do proizvodnje T-DNA sekvence koja onda prolazi kroz drugi virulencijski protein u biljnu stanicu. Kao i kod metode „genske puške“, T-DNA je nasumično uključena u kromosomsku DNA, ali je puno manje štete za stanicu i ne postoji šansa da završi u kloroplastnoj ili mitohondrijskoj DNA (slika 21).



Slika 21. Prijenos gena u biljne posredstvom bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (izvor: web 19)

Kada su geni od interesa uspješno unijeti u genom biljke, biljka je opisana kao transgenična. Sljedeći korak je uzgoj transgeničnih biljaka (slika 22). U sterilnim uvjetima transgenične biljne stanice su uzgojene u kulturama koje sadrže antibiotike i biljne hormone (auksin, giberilin, citokinin i sl.). Antibiotici osiguravaju da će samo rasti transformirane stanice, a hormoni dozvoljavaju stvaranje čitave biljke iz nekolicine transformiranih biljnih stanica. Nakon što je biljka razvila korijen i izdanak može se prenijeti u zemlju i nove osobine biljke spremne su za testiranje. Generalno, transformacijska efikasnost dobivena koristeći Agrobakterijum kod većine citrusnih kultivara iznosi između 0 i 45% [6].

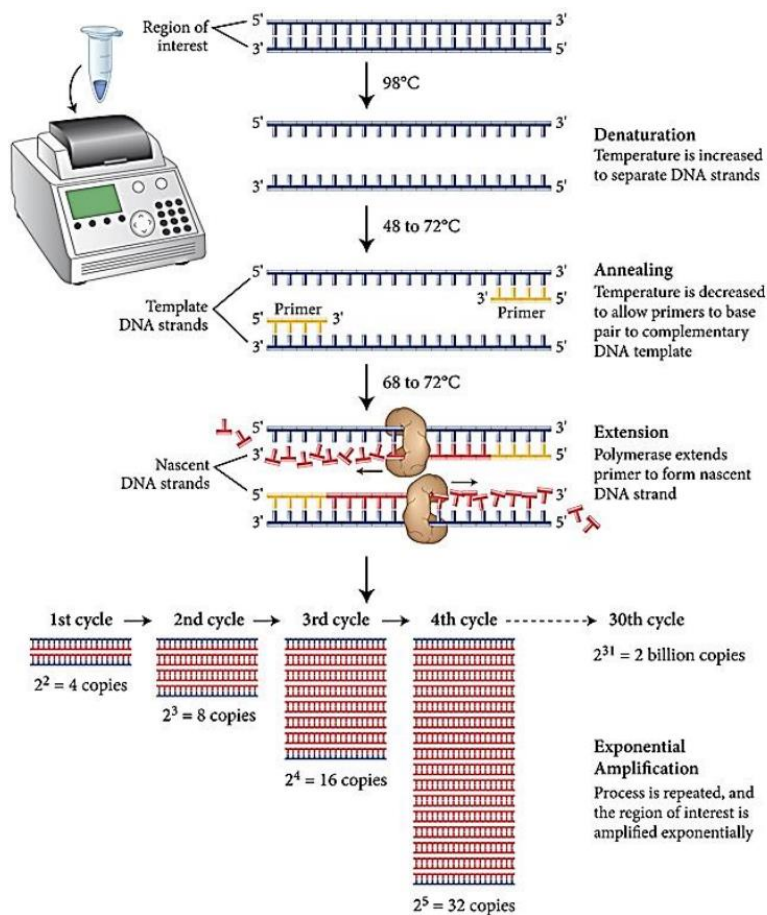


Slika 22. Prikaz procesa proizvodnje transgeničnih biljaka posredstvom bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (izvor: web 20)

2.4 Tehnike potvrde integracije transgena

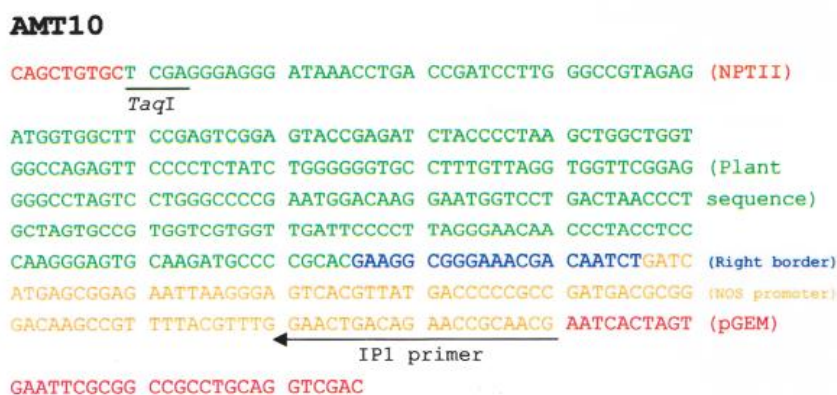
2.4.1 Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR)

PCR je metoda amplificiranja određene DNA sekvence za brzu i efikasnu proizvodnju milijuna kopija ciljane DNA sekvence (slika 23). Sastojci za uspješnu reakciju amplifikacije su sljedeći: 1) točna sekvenca DNA koju želimo replicirati; 2) DNA početnice (engl. *primers*) korištene za inicijaciju procesa DNA sinteze; 3) DNA polimeraza, proteinski kompleks koji se kreće preko jednolančane DNA i replicira istu - polimeraza mora biti termostabilna zato što se sama reakcija izvodi pri relativno visokim temperaturama; 4) 4 tipa deoksiribonukleozid trifosfata (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) koji služe kao građevni blokovi koje DNA polimeraza koristi u sintezi DNA. Koraci za provođenje jednog ciklusa PCR-a: 1) Razdvajanje DNA lanaca – potrebno je povisiti temperaturu otopine u kojoj se nalazi DNA sekvenca od interesa do 95 °C u svrhu razdvajanja dvaju komplementarnih lanaca DNA denaturacijom vodikovih veza koje ih spajaju; 2) Kada su lanci razdvojeni potrebno je sniziti temperaturu na 54 °C u svrhu vezanja početnica na 3' krajeve poznatih sljedova nukleotida koji omeđuju ciljni fragment - razlog vezanja početnica na 3' krajeve je sposobnost DNA polimeraze da produžuje lance isključivo u smjeru 5' → 3'; 3) kada su početnice vezane na 3' sljedove nukleotida koji omeđuju DNA sekvencu od interesa potrebno je povisiti temperaturu na 72 °C, ta temperatura ostvaruje optimalne uvjete za aktivnost *Taq* polimeraze (termostabilna DNA polimeraza) koja počinje dodavati deoksiribonukleozid trifosfatne molekule i tim produžuje odnosno sintetizira DNA. Na kraju ciklusa smo od jedne dvolančane DNA dobili dvije identične kopije iste. Ukupni broj kopija poslije n-broja ciklusa je jednak 2^n . U sat vremena odvije se između 20 i 30 ciklusa što rezultira milijunima kopija DNA sekvence od interesa. Nakon završetka PCR reakcije, pregledavaju se rezultati. Uzorci se nanose na agarozni gel, provodi se gel elektroforeza, te se gel fotografira i analizira. Također, nakon analize DNA fragmente je moguće izrezati s gela i otopiti (npr. radi sekvenciranja).[13]



Slika 23. PCR metoda amplifikacije ciljane DNA sekvence (izvor: web 21)

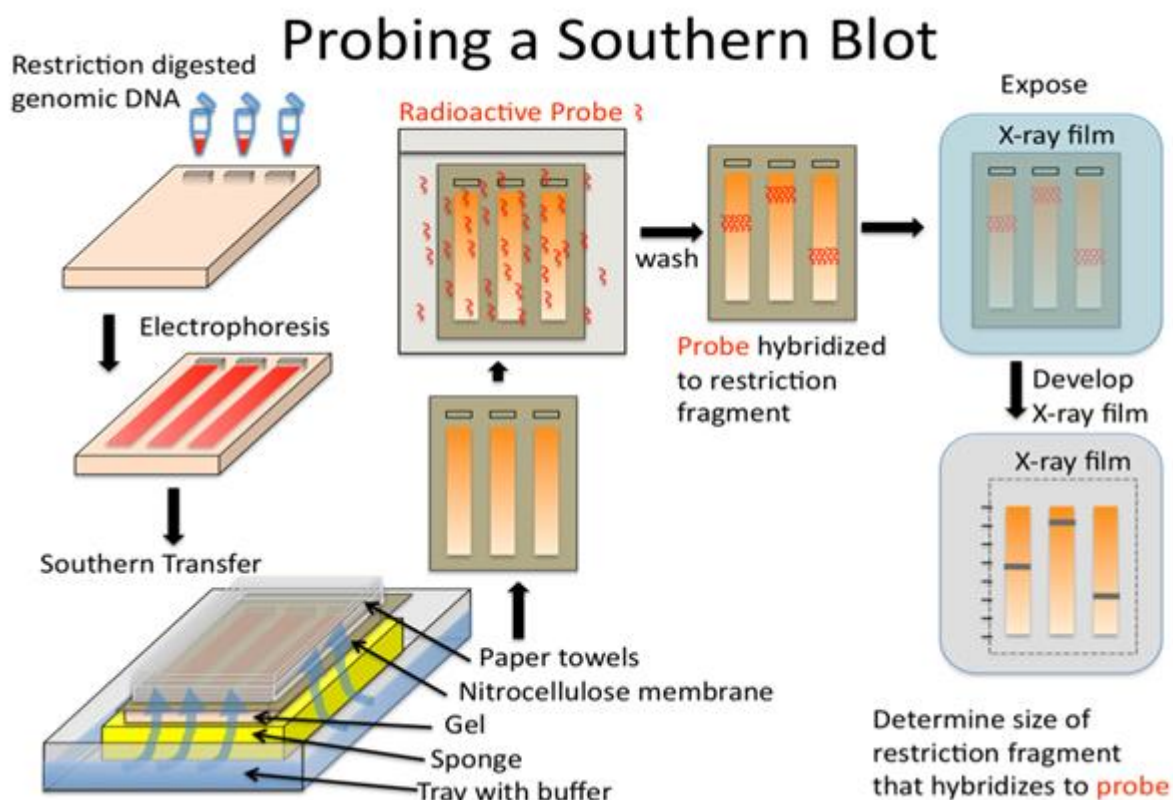
Pomoću PCR reakcije umnažanjem sekvence plazmida pBI121 moguće je odrediti mjesto integracije T-DNA u genom transgenične biljke. Tom metodom određena je jedinstvena biljna sekvenca blizu granice desnog kraja T-DNA (engl. *right border*, RB) integrirane u genom transgeničnog duhana (slika 24).



Slika 24. Analiza slijeda nukleotida na mjestu ugradnje T-DNA u genom transgenične linije duhana AMT10 (izvor: [12]).

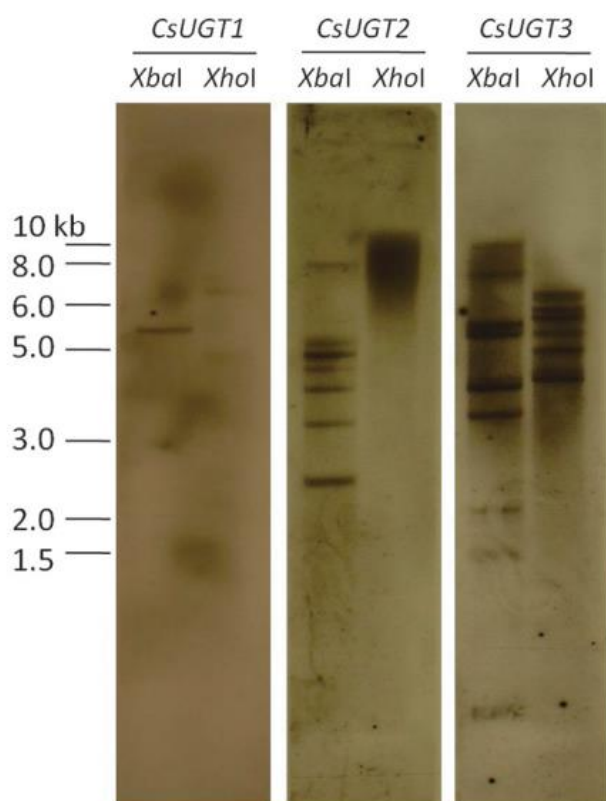
2.4.2 Southern hibridizacijska analiza

Hibridizacija po Southernu (engl. *Southern blotting*) je laboratorijska metoda korištena za prepoznavanje specifičnih gena (ili DNA sekvenci) u ukupnoj staničnoj (genomskoj) DNA. Enzim restrikcijske endonukleaze koristi se za rezanje uzorka DNA na fragmente koji se odvajaju gel elektroforezom prema veličini i naboju (slika 25). Fragmenti DNA se denaturiraju i prenose sa gela na površinu membrane otopinom soli koja prolazi kroz gel. Membrana se inkubira s radioaktivnom sondom koja se veže na komplementarne DNA molekule od interesa. Ako se sonda veže za membranu, tada je sekvenca od interesa prisutna u analiziranom uzorku. Sonda vezana za membranu detektira se autoradiografijom, a mjesto vezanja sonde otkriva tražene fragmente DNA.



Slika 25. Prikaz Southern hibridizacijske analize (izvor: web 22)

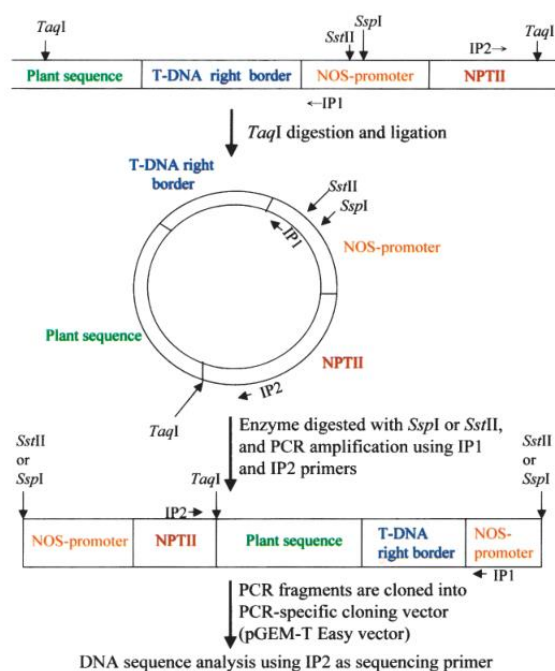
Metodom Southern hibridizacije potvrđeno je postojanje triju gena za terpenoid UDP glikoziltransferazu (UGT) u vrste *Citrus sinsnsis* L. Osbeck (slika 26). Geni *CsUGT1*, *CsUGT2*, *CsUGT3* konstitutivno su eksprimirani u listovima, cvjetovima i plodovima slatke naranče sorte Valencia [14].



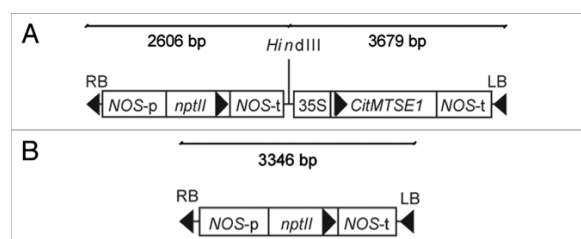
Slika 26. Detekcija triju gena za terpenoid UDP glikoziltransferazu (UGT) u uzorku genomske DNA vrste *Citrus sinsnsis* L. Osbeck (*CsUGT1*, *CsUGT2*, *CsUGT3*) [14].

2.5 Modifikacija biosinteze terpena

Soj *A. tumefaciens* EHA 105 koji sadrži binarni plazmid pBI121FLM (slika 27) sa genom CitMTSE1 (slika 28) koji kodira za D-limonen sintazu iz Satsuma mandarine (*Citrus unshiu* Mark) u smislenoj (engl. *sense*, S) i protusmislenoj (eng. *antisense*, AS) orijentaciji pod kontrolom 35S promotora iz mozaičnog virusa cvjetače i terminatora sekvence nopalin sintaze bakterije *A. tumefaciens* (NOS) je korišten u različitim eksperimentima kao transformacijski vektor dviju vrsta naranče: *Navelina sweet orange* i *Pineapple sweet orange* (*C. sinensis* L. Osb.). Linije transgeničnih naranči su sljedeće: AS3, AS5 i EV (engl. *Empty vector*) za Navelinu te AS11, S13 i EV za Pineapple (slika 29). Ove linije odabrane su na temelju njihove učinkovite i stabilne snižene (AS) i povišene ekspresije (S) gena limonen sintaze i niskog broja lokusa transgena. U slučaju Naveline odabrane su dvije AS linije jer se nije mogao proizvest stabilan S fenotip. Deset biljaka po transgeničnoj liniji prenesene su u uvjete voćnjaka zajedno s odgovarajućim kontrolnim biljkama (EV; biljke transformirane samo s pBI121FLM plazmidom).[4]

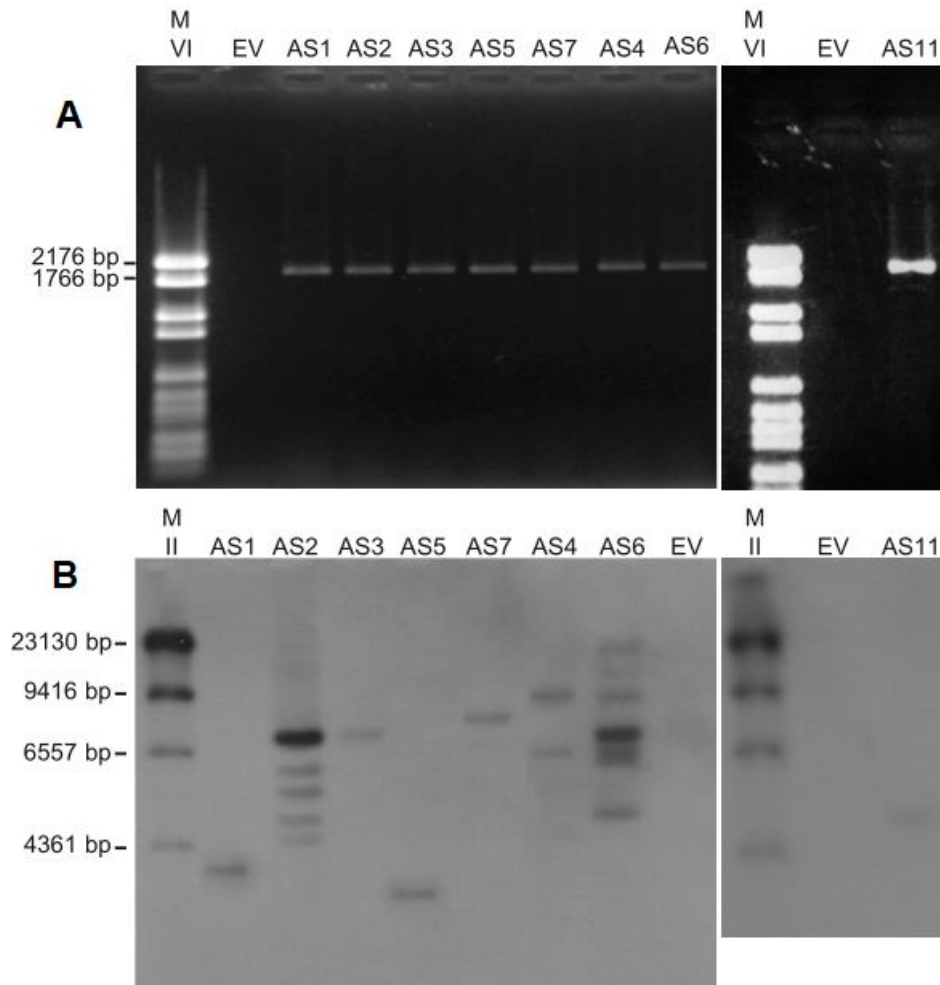


Slika 27. Prikaz plazmida pBI121 (izvor: [12])



Slika 28. Prikaz T-DNA regije koja se ubacuje u plazmid pBI121 (engl. *Plant sequence*). A) T-DNA koja sadrži smisleni (S) ili protusmisleni (AS) gen limonen sintazu CitMTSE1 B) T-DNA kontrolne grupe (EV) (izvor: [4])

Usporedba transgeničnih linija AS3, AS5 i EV Naveline i AS11, S13 i EV Pineapple pokazala je da ekspresija D-limonen transgena nije uzrokovala nikakvu izmjenu glavnih fenotipskih i agronomskih karakteristika biljke i ploda. Stoga izmjena koncentracije D-limonena u kori voća sama po sebi nije utjecala na morfološki izgled i fenološki ciklus stabla.[4]

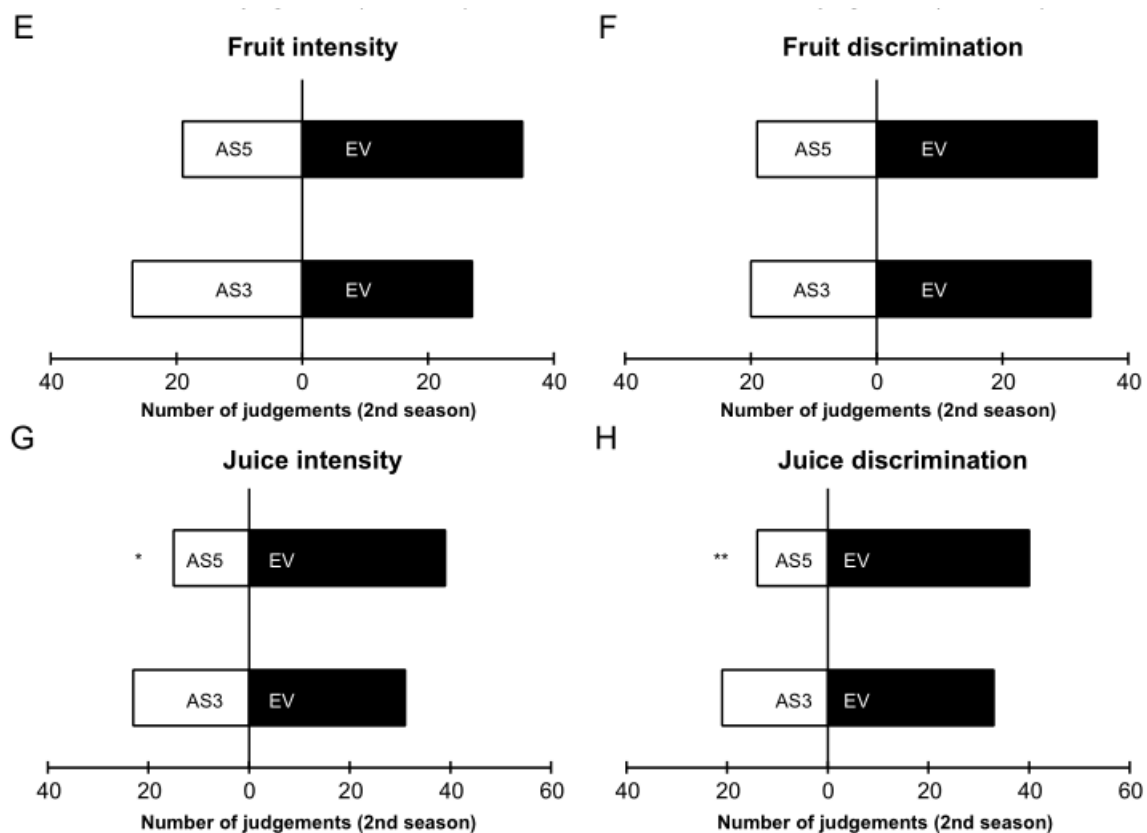


Slika 29. Potvrda integracije transgena CitMTSE1 putem A) PCR analize i B) Southern blot analize (izvor: [4])

2.5.1 Utjecaj modifikacije na osjetilo mirisa

Žiri se sastojao od volontera ($n = 54 - 70$, muškaraca i žena u dobi od 20 do 60 godina) s dva istraživačka instituta: *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias* (IVIA, Moncada, Španjolska) i *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* (IATA, Paterna, Španjolska). Svi članovi žirija bili su redoviti potrošači citrusnog voća i soka. Također su svi

morali testiranje provoditi u pojedinačnim kabinama pod bijelim svjetlom pri sobnoj temperaturi, obično od 10:00 do 14:00 sati. Uzorci su pripremljeni jedan sat prije evaluacije, žiri je mišljenje dao nakon evaluacije. Provodila se analiza dviju stavki: 1) miris svježeg voća (slike 30E,F) i 2) miris soka s pulpom (slike 30 G,H). Odmah nakon berbe, naranče su rezane poprečno i stavljene okrenute endokarpom prema dolje u bijelu posudu bez mirisa i okusa. Sok je iscijeđen rotacijskim sokovnikom (Lomi model 4). Sok je u alikvotima od 15 mL prenesen u tikvice od 40 mL identificirane s nasumičnim troznamenkastim brojem. Za svježe voće žiriju su predstavljene dvije polovine različitih Navelina naranči, jedna od njih je kontrola (EV), a druga jedna od transgeničnih linija (AS3 ili AS5). Zamoljeni su da biraju uzorak koji predstavlja proizvod intenzivnijeg mirisa. Učesnici su prvo dobili upute da oljušte komad kore svakog uzorka, pomirišu oba i odgovore na pitanja. Ako nakon što osjete mirise uzoraka ne uočavaju razliku, dobili su uputu da pogađaju (prisilni izbor). Za sok s pulpom ocjenjivačima su predstavljene tri tikvice, koje odgovaraju soku iz kontrolne linije (EV) i transgeničnih linija (AS3, AS5 za Navelinu i AS11, S13 za Pineapple). Učesnici su dobili uputu da otvore čepove tikvica u odgovarajućem redoslijedu blizu njihova nosa i osjete mirise sokova.[4]



Slika 30. Rezultati odabira žirija za miris svježeg voća (E, F) i soka (G, H) naranče Navelina (izvor: [4])

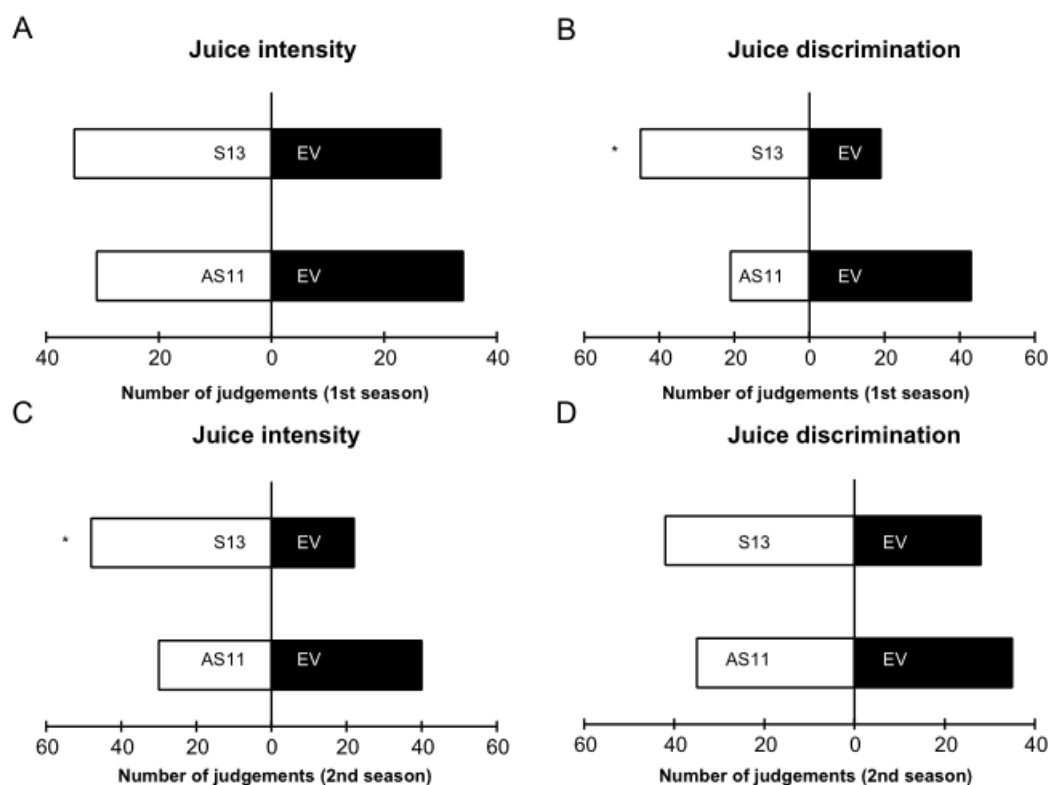
Žiri je otkrio veći intenzitet mirisa soka s pulpom EV linije u drugoj sezoni u usporedbi s AS5 transgeničnom linijom Naveline i bili su ih u mogućnosti razlikovati (slika 31 C,D). Te sezone, sok AS5 linije okarakteriziran je većim doprinosom linaloola u ukupnom OAV-u (engl. *Odor activity value* – omjer koncentracije spoja i njegovog praga mirisa) (tablica 1). Pretpostavlja se kako OAV veći od 1 doprinosi aromi soka u usporedbi s AS3. Dodatno, D-limonen i β -mircen su nedostajali u ukupnom OAV-u AS5 naspram EV linije, dok je obrnuto bilo za alifatske aldehide što može objasniti diskriminaciju sokova. Međutim, smatra se da su plodovi svih linija: AS3, AS5 i EV prihvatljive kvalitete. Dio članova žirija prepoznao je miris sličan limunu ili gorkoj naranči što je vjerojatno povezano s povećanom koncentracijom linalool-a u kori i soku AS transgeničnih linija. Većina učesnika je mirise plodova AS transgeničnih linija povezoao s mirisnim notama ruže.[4]

Compound	Concentration (ng/g)						Odor threshold (ppb)	o-OAVs					
	AS3		AS5		EV			AS3		AS5		EV	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Monoterpene hydrocarbons													
β -Myrcene	122.8a	20.5	102.5a	34.8	3667.8b	375.5	773	0.16	0.03	0.13	0.04	4.74*	0.49
Limonene	1976.7a	330.3	2505.3a	15.9	101617.8b	9975.2	13700	0.14	0.02	0.18	0.00	7.42*	0.73
Monoterpene alcohols													
Linalool	1049.7b	76.8	1277.6b	203.1	400.0a	30.1	113	9.29*	0.68	11.31*	1.80	3.54*	0.27
Monoterpene aldehydes													
(Z)-citral	19.3a	0.6	22.2a	3.1	9.9a	4.3	1230	0.02	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00
(E)-citral	0.0a	0.0	0.0a	0.0	37.7b	6.4	1230	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01
Nonanal	22.3a	1.1	27.7a	0.2	36.8a	16.9	312	0.07	0.00	0.09	0.00	0.12	0.05
Decanal	69.9a	6.0	74.6a	4.6	123.0a	32.1	204	0.34	0.03	0.37	0.02	0.60	0.16
Ethyl esters													
Ethyl hexanoate	0.0a	0.0	10.8a	4.3	0.0a	0.0	3.3	0.00	0.00	3.26*	1.29	0.00	0.00
Aliphatic esters													
Octyl acetate	19.8a	0.6	13.2a	2.0	25.2a	7.9	2767	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
Sesquiterpene hydrocarbons													
Valencene	190.0a	7.2	331.1ab	58.0	501.4b	82.7	4756	0.04	0.00	0.07	0.01	0.11	0.02
Others/irregular													
β -Cyclocitral	8.3a	0.9	9.7ab	2.1	17.4b	2.2	190	0.04	0.00	0.05	0.01	0.09	0.01

Tablica 1. Pregled o-OAV-a (engl. *Orthonasal odor activity values*) izračunatih kao omjer između koncentracije spoja i njegovog mirisnog praga za sok *Navelina sweet orange* (izvor: [4])

U slučaju naranče Pineapple članovi žirija uspjeli su razlikovati miris S13 transgene linije u usporedbi sa EV linijom u prvoj sezoni (slika 31 A, B), dok su u drugoj sezoni osjetili intenzivniji miris S13 linije (slika 31 C ,D). Također značajna razlika je primijećena na hedonističkoj skali S13 linije u usporedbi s AS11 i EV linije u obje sezone. Neki od članova prijavili su poseban miris povezan s S13 linijom (tablica 2). Relativno povećanje koncentracija estera etil heksanoata i etil butirata te njihov kvalitativni i kvantitativni doprinos vjerojatno su

utjecali na organoleptičke osobine ovog soka, objašnjavajući njegovo hedonističko ocjenjivanje.[4]

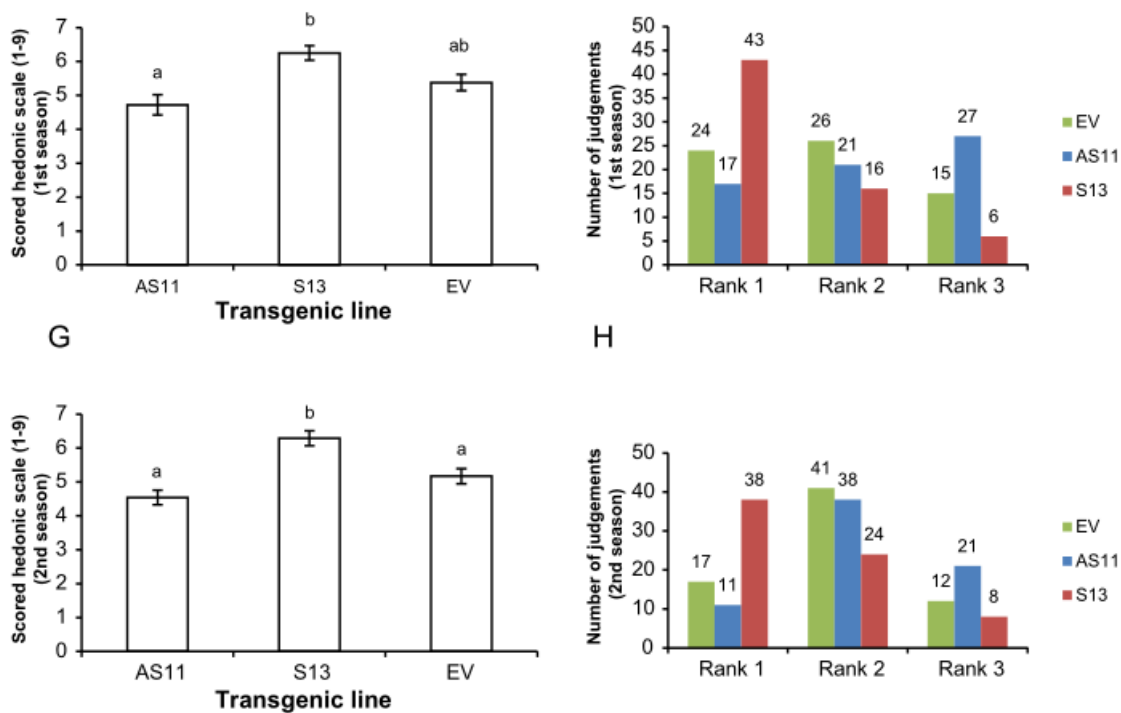


Slika 31. Rezultati odabira žirija za sok naranče Pineapple u prvoj sezoni (A, B) i drugoj sezoni (C, D) (izvor: [4])

Compound	Concentration (ng/g)						Odor threshold (ppb)	o-OAVs					
	AS11		S13		EV			AS11		S13		EV	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Monoterpene hydrocarbons													
α-Pinene	556.3a	71.2	3252.3b	14.9	3217.5b	10.9	1650	0.34	0.04	1.97*	0.01	1.95*	0.01
β-Myrcene	707.4a	20.8	3022.0b	72.4	3058.3b	43.1	773	0.92	0.03	3.91*	0.09	3.96*	0.06
β-Pinene	0.0a	0.0	445.4c	4.3	739.0b	20.1	37200	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00
Limonene	50407.7a	2710.0	139206.6b	4152.0	131557.5b	2745.5	13700	3.68*	0.20	10.16*	0.30	9.60*	0.20
Monoterpene alcohols													
Linalool	1663.0c	51.3	321.4a	45.9	884.2b	45.9	113	14.72*	0.45	2.84*	0.41	7.82*	0.41
α-Terpineol	35.2a	1.3	98.3b	3.8	123.7b	10.9	25900	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Monoterpene aldehydes													
(E)-citral	0.0a	0.0	0.0a	0.0	33.8b	1.8	1230	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
Aliphatic aldehydes													
Nonanal	581.2b	95.3	302.5a	22.0	388.4ab	10.6	312	1.86*	0.31	0.97	0.07	1.24*	0.03
Decanal	131.4a	22.9	365.2b	6.9	451.1c	4.4	204	0.64	0.11	1.79*	0.03	2.21*	0.02
Ethyl esters													
Ethyl butyrate	0.0a	0.0	27.4b	2.4	4.9a	0.3	1.71	0.00	0.00	16.01	1.39	2.88*	0.20
Ethyl hexanoate	0.0a	0.0	717.7c	39.6	397.3b	16.0	3.3	0.00	0.00	217.47*	11.99	120.39*	4.84
Ethyl-3-hydroxyhexanoate	0.0a	0.0	31.6b	2.8	7.2a	0.6	10716	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Aliphatic esters													
Octyl acetate	0.0a	0.0	281.8c	24.6	202.5b	9.6	2767	0.00	0.00	0.10	0.01	0.07	0.00
Sesquiterpene hydrocarbons													
Valencene	921.3a	36.9	5154.1b	1.7	5293.0c	15.4	4756	0.19	0.01	1.08*	0.00	1.11*	0.00
Others/irregular													
Nootkatone	0.0a	0.0	29.8b	5.0	24.5b	0.4	2240	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00

Tablica 2. Pregled o-OAV-a (*engl. Orthonasal odor activity values*) izračunatih kao omjer između koncentracije spoja i njegovog mirisnog praga za sok *Pineapple sweet orange* (izvor: [4])

Pojačana ili utišana ekspresija gena koji kodira za D-limonen sintazu nudi jedinstven alat za proučavanje utjecaja D-limonena i srodnih terpenkih spojeva (uglavnom kvalitativne i kvantitativne promjene) u kvaliteti svježeg voća ili soka percipiran od strane članova žirija. D-limonen je najzastupljeniji terpen u slatkoj naranči kao i u većini plodova agruma. U transgeničnim linijama transformiranim genom obrnute (AS) orijentacije koncentracija D-limonena je smanjena barem 90 puta u kori i 6 puta u soku, dostižući vrlo niske OAV vrijednosti u usporedbi sa EV linijama. Međutim, ispitanici nisu pronalazili razlike u intenzitetu mirisa između AS i EV transgeničnih fenotipova u oba kultivara, Navelini i Pineapple-u. Osim drastično snižene koncentracije D-limonena, AS sokovi su pokazali veće nakupljanje monoterpenkih alkohola, uglavnom linalool-a, koji je snažno kvalitativno i kvantitativno pridonosio ukupnim OAV-evima. Ostali alkoholi kao nerol, b-citronellol i geraniol su pokazali povećane koncentracije u AS transgeničnoj liniji, no nijedan nije prešao OAV veći od 1. Neovisno o tome, većina ispitanika percipirala je cvjetne note slične ruži kod takvih linija. Moguće je da smanjena količina D-limonena kao otapala u AS sokovima povećava hlapljivost spomenutih spojeva čime bi utjecala na njihovu percepciju. Ipak, tipičan miris AS linije nije utjecao na razlikovanje, intenzitet mirisa i hedonističko rangiranje ukazuju na sličnu stopu odabira ispitanika s obzirom na EV liniju. Međutim, u konkretnom slučaju uzorka Navelina AS5, žiri je liniju doživio kao različitu, manje intenzivnu od EV linije, u prvoj sezoni u obliku svježeg voća, a u drugoj u obliku soka s pulpom. Takav rezultat poklapa se s važnim doprinosom linalool-a zajedno s etil heksanoatom. No, ispitanici nisu percipirali miris AS5 linije neugodnim, već drugačijim, sličnijim mirisu limuna. S13 linija Pineapple naranče karakterizirana je povećanim OAV-em za estere etil heksanoat i etil oktanoat zajedno s blago povećanim razinama D-limonena i drugih srodnih monoterpenkih ugljikovodika. Ispitanici su ga preferirali i dali su mu značajno veće ocjene hedonističkim rangiranjem (slika 32). Etilni esteri, uključujući estere razgranatog lanca općenito su opisani kao „slatki“ ili „voćni“ pri koncentracijama iznad praga mirisa. Etil heksanoat percipiran je kao voćni pri niskim koncentracijama. Vrednovanje mirisa aktivnih tvari u soku naranče pokazalo je da su velik doprinos svježoj, voćnoj noti mirisa soka naranče dali upravo esteri zajedno sa aldehydima. Utvrđeno je da etil heksanoat kao i etil butirat imaju značajnu pozitivnu korelaciju s hedonističkim ocjenama okusa. Prisutnost malo veće (ali značajne) koncentracije ovih estera u S13 transgenim linijama vjerojatno je bila zaslužna za višu ocjenu na hedonističkoj skali u usporedbi s AS13 i EV uzoraka.[4]

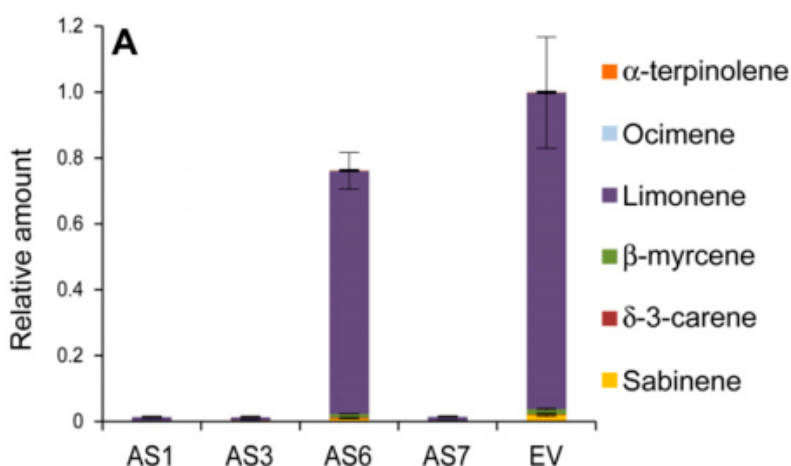


Slika 32. Rangiranje transgeničnih linija naranče Pineapple: AS11, S13 i EV prema hedonističkoj skali (izvor: [4])

2.5.2 Utjecaj modifikacije na odnos biljke i nametnika

Kako bi se utvrdilo ima li nakupljanje limonena u plodovima citrusa obrambenu funkciju, umanjila se koncentracija spomenutog monoterpena u uljnim žlijezdama s protusmislenim slijedom (AS), koji utišava ekspresiju kodirajućeg gena za limonen sintazu, rezultirajući manjom koncentracijom samog limonena u zrelih plodovima biljke slatke naranče kultivara Navelina (slika 29). Neočekivano, transgenično voće bilo je otporno na ekološki nominalno važne gljivične i bakterijske patogene te je pokazalo odbijanje važnog insekta štetočine. Transgene linije AS1, AS3, AS6 i AS7 dodatno su istražene (slika 33). Ukupni terpenški profil u kori plodova AS linija pokazao je niz fenotipova. AS6 predstavlja fenotip sa blagim smanjenjem koncentracije limonena dok AS1, AS3 i AS7 predstavljaju fenotipove s jakim smanjenjem koncentracije limonena u usporedbi s kontrolnom linijom EV. Nakupljanje drugih monoterpena, seskviterpena i monoterpenkih aldehida također je smanjeno, dok je razina monoterpenkih alkohola poboljšana (slika 29). Tako su linije AS1, AS3 i AS7 bilježile između 50 i 85 puta manju koncentraciju limonena naspram kontrolne EV linije. Proizvodnja

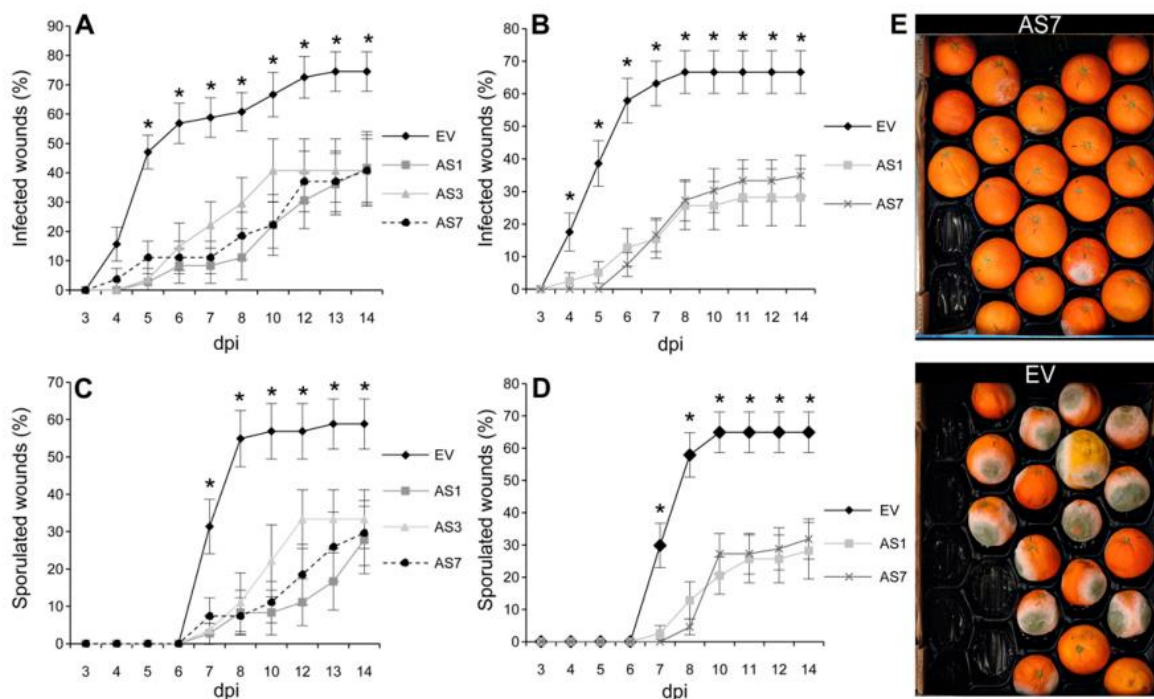
monoterpenskih alkohola nerola i b-citronellola bila je 10 puta veća, a proizvodnja estera geranil acetata 3 puta veća u AS transgenim linijama u usporedbi sa kontrolnom EV linijom. Uzrok je vjerojatno u djelomičnom preusmjerenju metaboličkog puta. Promjene u navedenim koncentracijama mogu pronaći objašnjenje u mogućnosti formacije više različitih produkata iz jedne monoterpenske sintaze.[3]



Slika 33. Transgenične linije AS1, AS3 i AS7 pokazuju veliki, a AS6 linija blagi pad koncentracije limonena prema kontrolnoj EV liniji (izvor [3])

2.5.2.1 *Penicilium digitatum*

Gljivica *P. digitatum* uzrokuje bolest koja prouzroči najveću štetu nakon berbe citrusnih plodova – truljenje zelene plijesni (slika 34). Ne uzrokuje propadanje drugog necitrusnog voća ili povrća. Etiologija bolesti dobro je poznata. Uspavane spore *Peniciliuma* prisutne na površini ploda aktiviraju se ako dođe do mehaničke ozljede kore. Spore krenu klijeti i brzo koloniziraju ozlijeđeno tkivo. Hlapljive tvari igraju važnu ulogu u prepoznavanju domaćina od strane *P. digitaruma*. Produkti uljnih žlijezda raznih citrusa stimuliraju *in vitro* klijanje spora. Zreli plodovi AS i EV linija cijepljeni su s *P. digitarum*, postotak zaraženih rana i rana sa sporama u EV plodovima 8 dana poslije cijepljenja iznosio je 60.8%, dok je u AS7 plodovima ta brojka bila 7.4% (slika 30). Rezultati za AS1 i AS3 linije podudaraju se s AS7. Da bi procijenili uzrokuje li smanjenje koncentracije limonena povećanu osjetljivost prema drugim nepatogenim gljivičnim infekcijama, cijepile su se AS i EV plodovi s *Penicillium minoluteum*. Nije postojala infekcija nijedne linije, što ukazuje na to da utišavanje ekspresije terpen sintaze ne mijenja interakciju s drugim nespecijaliziranim mikroorganizmima.[3]

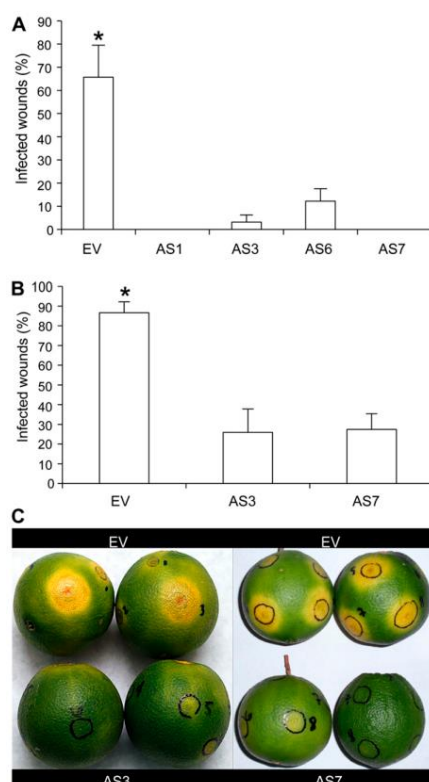


Slika 34. Prikaz etiologije bolesti uzrokovane gljivičnom infekcijom *P. digitatum*. A i B prikazuju postotak infekcije dok C i D prikazuju postotak sporuliranih rana Transgenih AS1, AS3, AS7 linija i kontrolne EV linije (izvor: [3])

Kako bi se proučilo je li fenotip rezistencije povezan s snižavanjem limonena ili je posredno inducirana kao posljedica povećanja monoterpenkih alkohola, provedeno je testiranje stimuliranja klijanja spora *in vitro* s čistim limonenom. Rezultati su pokazali da je klijanje direktno povezano s koncentracijom monoterpena. Kako bi se pružio dodatni dokaz da je limonen izravno odgovoran za rezistenciju, plodovima AS i EV linija dodan je čisti limonen na površinu kore te su ponovno cijepljeni *P. digitatum-om*. Postotak zaraženih rana u EV i AS3 plodovima 4 dana poslije cijepljenja bio je 77.3% i 80.0%. [3]

2.5.2.2 *Xanthomonas citri* sups. *Citri*

Bakterija *Xanthomonas citri* sups. *citri* uzrokuje citrusni rak (engl. *Citrus canker disease*). Ekonomski važan patogen uzrokuje bolest koja smanjuje prinos i kvalitetu voća, te uzrokuje zabranu kretanja svježeg voća iz zahvaćenih područja. Ova bakterija ulazi u tkiva domaćina kroz pore i rane množeći se u lezijama na lišću, stabljikama i uglavnom u plodovima. Sva nadzemna tkiva biljke citrusa su maksimalno osjetljiva na infekciju *X. citri* sups. *citri* tijekom kraja druge polovice faze rasta. Postotak zaraženih rana u plodovima cijepljenim sa bakterijom nakon 4 tjedna za EV liniju bila je 65.7%, dok je jako malo infekcija zabilježeno kod AS linija (slika 35).[3]



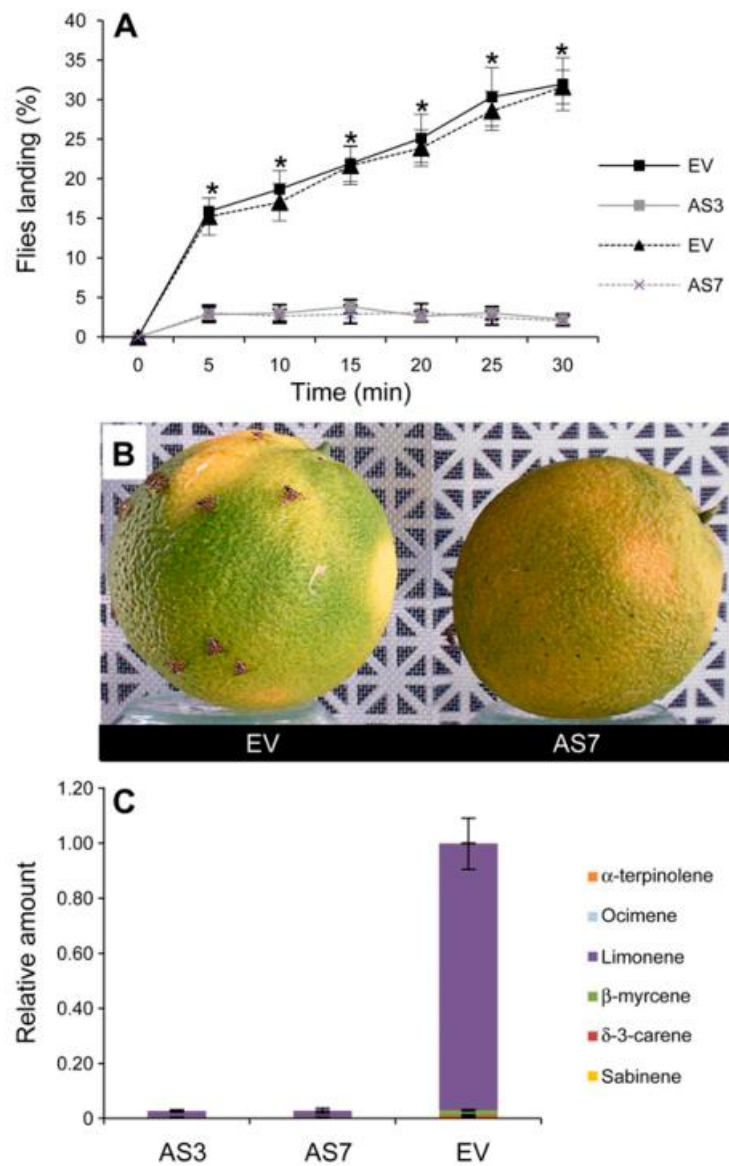
Slika 35. Prikaz postotka zaraženih rana nakon cijepljenja bakterijom *Xanthomonas citri* sups. *citri* u dvije sezone, u prvoj (A), drugoj (B). (izvor: [3])

Kako bi se procijenilo je li ovaj odgovor ovisan o genotipu, oba patogena (*P. digitatum* i *X. citri* sups. *citri*) unesena su u AS i EV linije plodova kultivara *Pineapple sweet orange*. Rezultati su usporedivi onima iz kultivara *Navelina sweet orange*. Ovaj nalaz sugerira kako je

otpornost na bolesti izravno u korelaciji s utišavanjem ekspresije gena koji kodira za limonen sintazu, odnosno s manjom koncentracijom limonena u kori plodova. Dakle, ova strategija stvaranja rezistencije na patogene mogla bi se proširiti i na druge agrume koji nakupljaju veliku količinu monoterpena limonena u kori poput mandarine (*C. reticulata*), grejpa (*C. paradisi*) i njihovih hibrida.[3]

2.5.2.3 *Ceratitis capitata*

Postoje dokazi koji ukazuju na to da limonen i drugi terpeni spojevi kore agruma daju djelomičnu rezistenciju plodova na sredozemnu voćnu muhu (*C. capitata*), velikog štetnika roda citrusa širom svijeta. Procijenjeno je ponašanje voćnih muha prema AS linijama u slatkoj naranči putem odabira „bez izbora“ i odabira sa dva izbora koristeći tunele leta. Testovi bez izbora pokazali su da je odgovor ženki voćnih muha nakon tri dana izlaganja plodovima AS i EV linija sličan. Rezultat je potvrdio da su ženke muha sposobne suprotstaviti se hipotetskom učinku odvratanja AS linija. Tunelski testovi s mužjacima voćnih muha izloženih različitim sintetskim spojevima (limonen, nerol i citronelol) pokazali su sklonost mužjaka prema monoterpenima u usporedbi sa kontrolom u obliku čiste vode. Limonen je mužjacima bio najprivlačniji. U skladu s tim, ponašanje mužjaka mijenja se prema terpenskim profilima AS linija (slika 36). Pokazalo se da su mužjaci u slučaju zelenih plodova u 19% slučajeva slijetali na EV liniju, dok su na AS liniju slijetali u 5% slučajeva. Kod zrelih plodova je postotak slijetanja na EV liniju iznosio 32%, a AS liniju 2%. Što sugerira da je emisija limonena vuče slijetanje mužjaka sredozemnih voćnih muha na plod agruma. Štoviše, kada su mužjaci izloženi voćnjaku koji sadrži AS linije i EV linije, prvenstveno su slijetali na plodove EV linija. Dodatak čistog limonena na koru zrelih plodova AS linija potvrdio je da je ovaj spoj odgovoran za ponašanje mužjaka, jer su tada AS linije bile jednako privlačne kao i EV linije. Predloženo je da je stjecanje određene arome hlapljivih terpena odgovorno za povećanje uspjeha parenja mužjaka. U takvom slučaju bi mužjacima sredozemne voćne muhe mogao biti smanjen uspjeh parenja u okruženju koje sadrži plodove AS linija transgeničnih naranči.[3]



Slika 36. Prikaz postotka slijetanja mužjaka *C. capitata* prema AS i EV linijama (izvor: [3])

3. ZAKLJUČAK

Uloga različitih terpenoidnih spojeva u rezistenciji prema patogenima dobro je dokumentirana, ali prekomjerna ekspresija gena za prekursore ovih spojeva kao biotehnoška strategija manipulacije metabolizma u svrhu zaštite biljaka predstavlja intuitivan način obrane. Korištenje metaboličkog inženjerstva kako bi inducirali otpornost na biotičke agense predstavlja alternativnu tehnologiju naspram korištenja skupih i visoko toksičnih fungicida, baktericida i pesticida. Ovakvo korištenje dostupne tehnologije vrlo lako može rezultirati poboljšanjem same kvalitete proizvoda i zdravlja ljudi koji ih proizvode. Pigmentirani egzokarp agruma poznatiji kao flavedo obilježen je tisućama uljnih žlijezda koje u sebi sadrže hlapljive spojeve terpene. Limonen je najobilnija hlapljiva komponenta prisutna u svim komercijalno uzgojenim plodovima agruma. Pojačana ili utišana ekspresija gena koji kodira za D-limonen sintazu nudi jedinstven alat za proučavanje utjecaja D-limonena i srodnih terpenkih spojeva. Izmjena koncentracije D-limonena u kori voća sama po sebi nije utjecala na morfološki izgled i fenološki ciklus biljke. Neočekivano, transgenično voće bilo je otporno na ekološki nominalno važne gljivične i bakterijske patogene te je pokazalo odbijanje važnog insekta štetočine. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se objasnio utjecaj monoterpenkih alkohola, aldehida, etilnih estera te samog terpena limonena na ljudsku percepciju mirisa. Manipulacije monoterpenkih sintaza korak su u pravom smjeru rasvjetljavanja misterije subjektivnog doživljaja plejade predivnih mirisa uzrokovanih prijenosom akcijskog potencijala s olfaktornih stanica nosa na koru velikog mozga.

4. LITERATURA

1. Dutt, M., & Grosser, J. (2015). *Citrus Industry*.
2. Rodríguez, A., Andrés, V. S., Cervera, M., Redondo, A., Alquézar, B., Shimada, T., Gadea, J., Rodrigo, M., Zacarías, L., Palou, L., López, M. M., Castañera, P., & Peña, L. (2011). The monoterpene limonene in orange peels attracts pests and microorganisms. *Plant Signaling and Behavior*, 6(11), 1820–1823. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.16980>
3. Rodríguez, A., Andrés, V. S., Cervera, M., Redondo, A., Alquézar, B., Shimada, T., Gadea, J., Rodrigo, M. J., Zacarías, L., Palou, L., López, M., Castañera, P., & Peña, L. (2011). Terpene down-regulation in orange reveals the role of fruit aromas in mediating interactions with insect herbivores and pathogens. *Plant Physiology*, 156(2), 793–802. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176545>
4. Rodríguez, A., Peris, J. E., Redondo, A., Shimada, T., Costell, E., Carbonell, I., Rojas, C., & Peña, L. (2017). Impact of D-limonene synthase up- or down-regulation on sweet orange fruit and juice odor perception. *Food Chemistry*, 217, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.076>
5. Lücker, J., el Tamer, M. K., Schwab, W., Verstappen, F. W. A., van der Plas, L. H. W., Bouwmeester, H. J., & Verhoeven, H. A. (2002). Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *European Journal of Biochemistry*, 269(13), 3160–3171. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02985.x>
6. Febres, V., Fisher, L., Khalaf, A., & Moore, G. A. (n.d.). *5 Citrus Transformation: Challenges and Prospects*. www.intechopen.com
7. Li, L. J., Tan, W. S., Li, W. J., Zhu, Y. B., Cheng, Y. S., & Ni, H. (2019). Citrus taste modification potentials by genetic engineering. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20246194>

8. *Genes, Genomes and Genetic Engineering in Citrus* Written by Drs. Peggy Lemaux (UC Berkeley) and Elizabeth Grafton-Cardwell (UC Riverside). (2018). <http://ucanr.edu/sites/scienceforcitrushealth/>

9. LAZAR, T. (2003). Taiz, L. and Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. *Annals of Botany*, 91(6), 750–751. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>

10. Breseghello, F., & Coelho, A. S. G. (2013). Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (*Oryza sativa* L.). In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 61, Issue 35, pp. 8277–8286). <https://doi.org/10.1021/jf305531j>

11. Suzuki, K., Hattori, Y., Uraji, M., Ohta, N., Iwata, K., Murata, K., Kato, A., & Yoshida, K. (2000). Complete nucleotide sequence of a plant tumor-inducing Ti plasmid k. In *Gene* (Vol. 242). www.elsevier.com/locate/gene

12. Chen, P.-Y., Wang, C.-K., Soong, S.-C., & To, K.-Y. (2003). *Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants.*

13. *Tamarin: Principles of Genetics, Seventh Edition Front Matter Preface.* (n.d.). www.mhhe.com/tamarin7.

14. Fan, J., Chen, C., Yu, Q., Li, Z. G., & Gmitter, F. G. (2010). Characterization of three terpenoid glycosyltransferase genes in “Valencia” sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genome*, 53(10), 816–823. <https://doi.org/10.1139/G10-068>

POPIS SLIKA

LITERATURA S INTERNETA

- Web 1 - <https://tinyurl.com/y4r37kfh>
Web 2 - <https://tinyurl.com/3b8nzan8>
Web 3 - <https://tinyurl.com/3kp7n4fy>
Web 4 - <https://tinyurl.com/2b6wfzr2>
Web 5 - <https://tinyurl.com/t6w5wr23>
Web 6 - <https://tinyurl.com/2yap3c3t>
Web 7 - <https://tinyurl.com/9323dc7m>
Web 8 - <https://tinyurl.com/2ypfu3jw>
Web 9 - <https://tinyurl.com/4627ytdy>
Web 10 - <https://tinyurl.com/4ukzwwj23>
Web 11 - <https://tinyurl.com/kt93zcc5>
Web 12 - <https://tinyurl.com/jabyamtb>
Web 13 - <https://tinyurl.com/2zdc6ryc>
Web 14 – <https://tinyurl.com/fu94z4vy>
Web 15 – <https://tinyurl.com/yu2hjm62>
Web 16 – <https://tinyurl.com/y56j6ak5>
Web 17 – <https://tinyurl.com/az5bmbjv>
Web 18 – <https://tinyurl.com/4nsxyeb8>
Web 19 – <https://tinyurl.com/ysbyfzta>
Web 20 – <https://tinyurl.com/f5n9sr94>
Web 21 – <https://tinyurl.com/338cad25>
Web 22 – <https://tinyurl.com/hdc9zhe8>