

BÀI TỔNG QUAN

KỸ THUẬT DI TRUYỀN TRONG CÔNG NGHỆ CHỌN TẠO GIỐNG HOA

Dương Tân Nhật<sup>1</sup>, Bùi Văn Thế Vinh<sup>2</sup>, Trần Trọng Tuấn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Sinh học Tây Nguyên

<sup>2</sup>Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Ngành công nghiệp trồng hoa trên thế giới hiện đang phát triển rất mạnh mẽ, nhu cầu tiêu thụ hoa là rất lớn, vì thế vấn đề nghiên cứu chọn tạo giống hoa mới, năng suất cao nhằm đáp ứng nhu cầu hiện nay là vấn đề cấp thiết. Kỹ thuật di truyền là phương cách quan trọng trong việc mở rộng nguồn gen nhằm thúc đẩy việc tạo ra các giống cây hoa thương mại mới. Sự thương mại hóa đối với các loại hoa được biến đổi di truyền hiện nay chỉ hạn chế ở các loại hoa cắm chướng có màu sắc khác lạ. Những kiến thức này đang được ứng dụng để đạt được sự hiểu biết toàn diện hơn ở phạm vi rộng hơn đối với nhiều loài hoa khác nhằm mục tiêu hướng vào sự biến đổi màu sắc ở các loài hoa đó. Các tính trạng khác cũng đã thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học bao gồm hương thơm của hoa, hình dạng của cây và hoa, quá trình lão hóa (tàn) cả khi hoa ở trên cây cũng như sau khi thu hoạch và tính kháng bệnh của hoa. Những ứng dụng của kỹ thuật di truyền trên những đặc tính mới trong sự đa dạng đã có dựa vào khả năng chuyển gen thực vật và điều này đang được tiếp tục mở rộng nghiên cứu với tốc độ nhanh.

**Từ khóa:** Gen, hoa, kỹ thuật di truyền, màu sắc, *Torenia*

SỰ THAY ĐỔI MÀU SẮC HOA

Sinh tổng hợp flavonoid và màu sắc hoa

Màu sắc hoa chủ yếu phụ thuộc vào ba loại sắc tố: flavonoid, carotenoid và betalain. Betalain chiếm số lượng ít nhất trong ba sắc tố trên và tạo ra các màu sắc khác nhau như màu ngà, vàng, cam, đỏ và tím (Forkmann, 1991). Carotenoid là những tetraterpenoid 40C có thể hòa tan trong lipid và khu trú trong các thể hạt đồng thời tạo ra phần lớn sắc vàng trong một số loại hoa (Forkmann, 1991). Carotenoid, cùng với anthocyanin đỏ hay đỏ tươi, cũng tạo ra màu cam/đỏ, màu đồng thối hay nâu được nhìn thấy ở các loài hoa như hoa hồng và hoa cúc. Flavonoid là nhóm thông dụng nhất trong ba loại sắc tố góp phần tạo ra một dải các màu sắc từ vàng đến đỏ và xanh. Chúng là các hợp chất hòa tan trong nước và có ở rất nhiều loài thực vật. Các phân tử flavonoid đóng góp chính vào sự tạo nên màu sắc của hoa là anthocyanin, đó là tất cả các O-glycoside (Stafford, 1990) và thường khu trú trong các không bào của các tế bào biểu bì cánh hoa. Các phân tử flavonoid là chất chuyển hóa thứ cấp của con đường phenylpropanoid. Con đường flavonoid tạo ra các anthocyanin có màu sắc đầu tiên, anthocyanidin 3-O-glucoside, được bảo tồn ở hầu hết các loại thực vật.

Các anthocyanin có màu sắc đầu tiên, anthocyanidin 3-O-glucoside, có thể được bổ sung thêm đường, các acid béo, các acid thơm và các nhóm methyl. Có sự khác biệt cả về tính chuyên biệt giống, loài trong phạm vi của sự biến đổi và loại nhóm acyl và glycosyl gắn vào lõi phân tử anthocyanidin. Tuy nhiên, màu sắc có thể nhận biết được cuối cùng của một hoa thường là sự kết hợp của một số các nhân tố bao gồm kiểu tích lũy anthocyanin, sự biến đổi thành phân tử anthocyanidin, pH không bào và đồng sắc tố. Mỗi một nhân tố đều được điều hòa bởi một số gen và nhiều gen trong số chúng đã được tạo dòng và xác định.

Sự điển **anthocyanin**

Anthocyanin có thể xuất hiện như 3-O-monoside, 3-O-bioside và 3-O-trioside cũng như là 3,5-O-diglycoside và 3,7-O-diglycoside kết hợp với các đường glucose, galactose, rhamnose, arabinose và xylose (Strack, Wray, 1993). Ở một vài loài như hoa hồng, anthocyanidin 3-O-glucoside thường bị đường hóa ở vị trí 5- bởi UDP (glucose anthocyanin 5-O-glucosyltransferase-5GT) để tạo ra anthocyanidin 3,5-O-diglucoside. Các loài như *Petunia* và cây hoa bướm, chứa một UDP rhamnose là anthocyanidin 3-O-glucoside rhamnosyltransferase gắn một nhóm

## BÀI TỔNG QUAN

# KỸ THUẬT DI TRUYỀN TRONG CÔNG NGHỆ CHỌN TẠO GIỐNG HOA

Dương Tấn Nhựt<sup>1</sup>, Bùi Văn Thế Vinh<sup>2</sup>, Trần Trọng Tuấn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Sinh học Tây Nguyên

<sup>2</sup>Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

Ngành công nghiệp trồng hoa trên thế giới hiện đang phát triển rất mạnh mẽ, nhu cầu tiêu thụ hoa là rất lớn, vì thế vấn đề nghiên cứu chọn tạo giống hoa mới, năng suất cao nhằm đáp ứng nhu cầu hiện nay là vấn đề cấp thiết. Kỹ thuật di truyền là phương cách quan trọng trong việc mở rộng nguồn gen nhằm thúc đẩy việc tạo ra các giống cây hoa thương mại mới. Sự thương mại hóa đối với các loại hoa được biến đổi di truyền hiện nay chỉ hạn chế ở các loại hoa cắm chướng có màu sắc khác lạ. Những kiến thức này đang được ứng dụng để đạt được sự hiệu biết toàn diện hơn ở phạm vi rộng hơn đối với nhiều loài hoa khác nhằm mục tiêu hướng vào sự biến đổi màu sắc ở các loài hoa đó. Các tính trạng khác cũng đã thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học bao gồm hương thơm của hoa, hình dạng của cây và hoa, quá trình lão hóa (tàn) cả khi hoa ở trên cây cũng như sau khi thu hoạch và tính kháng bệnh của hoa. Những ứng dụng của kỹ thuật di truyền trên những đặc tính mới trong sự đa dạng đã có dựa vào khả năng chuyển gen thực vật và điều này đang được tiếp tục mở rộng nghiên cứu với tốc độ nhanh.

**Từ khóa:** Gen, hoa, kỹ thuật di truyền, màu sắc, *Torenia*

## SỰ THAY ĐỔI MÀU SẮC HOA

### Sinh tổng hợp flavonoid và màu sắc hoa

Màu sắc hoa chủ yếu phụ thuộc vào ba loại sắc tố: flavonoid, carotenoid và betalain. Betalain chiếm số lượng ít nhất trong ba sắc tố trên và tạo ra các màu sắc khác nhau như màu ngà, vàng, cam, đỏ và tím (Forkmann, 1991). Carotenoid là những tetraterpenoid 40C có thể hòa tan trong lipid và khu trú trong các thể hạt đồng thời tạo ra phần lớn sắc vàng trong một số loại hoa (Forkmann, 1991). Carotenoid, cùng với anthocyanin đỏ hay đỏ tươi, cũng tạo ra màu cam/đỏ, màu đồng thếp hay nâu được nhìn thấy ở các loài hoa như hoa hồng và hoa cúc. Flavonoid là nhóm thông dụng nhất trong ba loại sắc tố góp phần tạo ra một dải các màu sắc từ vàng đến đỏ và xanh. Chúng là các hợp chất hòa tan trong nước và có ở rất nhiều loài thực vật. Các phân tử flavonoid đóng góp chính vào sự tạo nên màu sắc của hoa là anthocyanin, đó là tất cả các O-glycoside (Stafford, 1990) và thường khu trú trong các không bào của các tế bào biểu bì cánh hoa. Các phân tử flavonoid là chất chuyển hóa thứ cấp của con đường phenylpropanoid. Con đường flavonoid tạo ra các anthocyanin có màu sắc đầu tiên, anthocyanidin 3-O-glucoside, được bảo tồn ở hầu hết các loại thực vật.

Các anthocyanin có màu sắc đầu tiên, anthocyanidin 3-O-glucoside, có thể được bổ sung thêm đường, các acid béo, các acid thơm và các nhóm methyl. Có sự khác biệt cả về tính chuyên biệt giống, loài trong phạm vi của sự biến đổi và loại nhóm acyl và glycosyl gắn vào lõi phân tử anthocyanidin. Tuy nhiên, màu sắc có thể nhận biết được cuối cùng của một hoa thường là sự kết hợp của một số các nhân tố bao gồm kiểu tích lũy anthocyanin, sự biến đổi thành phân tử anthocyanidin, pH không bào và đồng sắc tố. Mỗi một nhân tố đều được điều hòa bởi một số gen và nhiều gen trong số chúng đã được tạo dòng và xác định.

### Sự biến đổi anthocyanin

Anthocyanin có thể xuất hiện như 3-O-monoside, 3-O-bioside và 3-O-trioside cũng như là 3,5-O-diglycoside và 3,7-O-diglycoside kết hợp với các đường glucose, galactose, rhamnose, arabinose và xylose (Strack, Wray, 1993). Ở một vài loài như hoa hồng, anthocyanidin 3-O-glucoside thường bị đường hóa ở vị trí 5- bởi UDP (glucose anthocyanin 5-O-glucosyltransferase-5GT) để tạo ra anthocyanidin 3,5-O-diglycoside. Các loài như *Petunia* và cây hoa bươm, chứa một UDP rhamnose là anthocyanidin 3-O-glucoside rhamnosyltransferase gắn một nhóm

rhamnose vào vị trí gắn glucose của phân tử anthocyanin để tạo ra anthocyanidin 3-O-rutinoside. Một UDP-glucose có hoạt tính anthocyanin 3'-glucosyltransferase được phát hiện trong cây long đóm chuyển nhóm glucose một cách chuyên biệt đến vị trí 3' của delphinidin 3,5-O-diglucoside. Khi cDNA mã hóa cho enzyme đồng biểu hiện với một cDNA 5GT của cây *Torenia* ở một dòng *Petunia* mà dòng này tích tụ các sắc tố delphinidin 3-O-glucoside một cách bình thường, delphinidin 3,5,3'-O-triglucoside đã được tổng hợp. Tuy nhiên, tác động delphinidin 3,5,3'-O-triglucoside của nó lên màu sắc hoa không thể quan sát được do hàm lượng thấp (Fukuchi-Mizutani *et al.*, 2003). Nhiều anthocyanidin glycoside tồn tại ở dạng các dẫn xuất của acylated (Many anthocyanidin glycoside exist in the form of acylated derivatives). Các nhóm acyl bổ sung anthocyanidin glycoside có thể được chia ra thành hai nhóm chính dựa vào cấu trúc của chúng. Các nhóm acyl béo (aliphatic) bao gồm malonic acid hay succinic acid và nhóm acyl thơm (aromatic) bao gồm hydroxy cinnamic acid như *p*-coumaric acid, caffeic acid và ferulic acid. Các aromatic acyl transferase cDNA xúc tác sự chuyển một nhóm acyl thơm đến vị trí 3 hay 5-O-glucose của anthocyanin đã được phân lập từ cây tía tô (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2000), cây long đóm (Fujiwara *et al.*, 1998) và cây *Torenia*. Một gen của cây *Petunia* mã hóa aromatic acyl transferase xúc tác sự chuyển một nhóm thơm đến 3-rutinoside của anthocyanin 3-O-glucoside đã được phân lập. Các enzyme này chuyển hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid hay cinnamic acid) đến các vị trí glucose chuyên biệt của các anthocyanin. Sự acyl hóa chất thơm góp phần tạo nên sự hóa xanh và sự ổn định các anthocyanin do đó tạo nên màu sắc hoa (Honda, Saito, 2002).

Gần đây, một dòng cDNA mã hóa cho malonyl CoA (anthocyanidin 3-O-glucoside-6"-O-malonyl-transferase) đã được tạo dòng từ các cánh hoa thực được, sau đó cho biểu hiện trong một dòng *Petunia* tích lũy cyanidin 3-glucoside. Mặc dù có đến 60% anthocyanin đã bị malonate hóa nhưng không có sự thay đổi màu sắc đáng kể nào được ghi nhận (Suzuki *et al.*, 2002). Kết quả này không làm thay đổi phổ anthocyanin nhưng ảnh hưởng đến sự ổn định và sự hòa tan của các anthocyanin. Ngoài ra, một malonyl CoA (anthocyanidin 5-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase) cDNA đã được tạo dòng từ hoa của cây xô đỏ (*Salvia splendens*) (Suzuki *et al.*, 2001). Sự biểu hiện của nó trong thực vật cho đến nay vẫn chưa được báo cáo nhưng người ta nghĩ rằng

sẽ không có tác động đáng kể nào đến màu sắc hoa. Sự methyl hóa ở vị trí 3' và 5' của vòng anthocyanidin glycoside cũng có thể xảy ra. Sự methyl hóa của các hạt sắc tố có nguồn gốc từ cyanidin dẫn đến sự tạo thành peonidin. Sự methyl hóa ở vị trí 3' của các sắc tố có nguồn gốc từ delphinidin dẫn đến sự tạo thành petunidin; trong khi đó, sự methyl hóa ở các vị trí 3' và 5' dẫn đến sự tạo thành malvidin. Thêm vào đó, sự methyl hóa malvidin ở các vị trí 5-O và 7-O để tạo capensinin (5-O-methyl malvidin) và 5,7-di-O-methyl malvidin cũng xảy ra ở một vài loại thực vật (Harborne, 1967). Một nhóm lớn các gen mã hóa cho methyltransferase đã được phân lập (Ibrahim, Muzac, 2000); tuy nhiên, các gen đặc trưng dẫn đến sự biến đổi anthocyanin đã được tạo dòng từ cây *Petunia* và cây *Torenia* (Quattrocchio *et al.*, 1993).

### Các đồng sắc tố

Flavonol và flavone là các đồng sắc tố thông dụng tạo nên sự ổn định và góp phần vào sự hóa xanh các anthocyanin bằng cách hình thành các phức hợp với chúng (Goto, Kondo, 1991). Flavonol được tạo ra từ dihydroflavonol do hoạt động của flavonol synthase (FLS). Các gen mã hóa FLS đã được tạo dòng từ nhiều loại thực vật khác nhau. Flavone được tổng hợp từ flavanone nhờ flavone synthase (FNS). Có đến hai loại FNS, một loại dioxygenase (FNSI) và một loại cytochrome P-450 (FNSII). Gen FNSII đã được tạo dòng từ cây *Torenia* (Akashi *et al.*, 1999), hoa đồng tiền (Martens, Forkmann, 1999) và cây tía tô (Kitada *et al.*, 2001). Một gen FNSI ở cây mùi tây cũng đã được tạo dòng (Martens *et al.*, 2003).

### Giá trị pH không bão

Giá trị pH không bão, hầu hết thường được duy trì ở dạng acid yếu, quyết định sự ổn định và màu sắc anthocyanin. Mặc dù pH cao hơn (pH trung tính) thường làm cho các màu sắc hoa hóa xanh hơn, nhưng các anthocyanin sẽ càng kém ổn định ở pH càng cao và phải được ổn định với nhiều hơn một nhóm glycosyl và acyl thơm (Honda, Saito, 2002). Sự kiểm soát di truyền của pH không bão ở cánh hoa đã được xác định ở cây *Petunia* và cây bìm bìm hoa tía. Chỉ có gen cấu trúc hoạt hóa sự điều hòa pH không bão để mã hóa một  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter (màu tía) ở những hoa nở buổi sáng (Fukada-Tanaka *et al.*, 2000). Gen biểu hiện hoạt động ở mức độ cao tại thời điểm ngay trước khi hoa nở, đồng thời có sự gia tăng pH từ 6,5 đến 7,5 và sự thay đổi màu sắc từ tím sang xanh. Các chất đồng phân đã được phân lập từ

cây *Petunia*, *Torenia* và *Nierembergia* (Yamaguchi *et al.*, 2001) nhưng người ta vẫn chưa biết chức năng của chúng trong cơ thể sống. pH không bào thường cao hơn ở các tế bào biểu bì nơi mà các anthocyanin tích lũy (Yoshida *et al.*, 1995). Điều này cho thấy rằng, tính nội cân bằng tế bào chất có khả năng là một yếu tố quyết định trạng thái không ổn định của pH không bào và có thể gây ra bất lợi đối với sự sống của tế bào. Sự gia tăng của pH không bào nhờ một antiporter gen trong các thực vật chuyển gen vẫn chưa được báo cáo.

Một số lượng lớn các dòng cDNA mã hóa cho các enzyme có trong các chu trình anthocyanin và flavonoid đã được tạo dòng và có thể sử dụng trong các kỹ thuật phân tử để điều khiển màu sắc hoa. Các chiến lược sử dụng antisense thường được áp dụng để điều khiển ngược đối với sự biểu hiện gen ở thực vật. Gần đây, một dạng lai của hai RNAi đã được phát triển như một công cụ mạnh mẽ cho sự điều hòa âm đối với một trình tự đích ở thực vật (Wang, Waterhouse, 2001). Trong một vài trường hợp, tần số xuất hiện những biến đổi kiểu hình là lớn hơn 50% và kiểu hình ổn định hơn kiểu hình thu được khi sử dụng antisense hay nhân tố đồng kim hãm (Mizutani *et al.*, 2003).

#### Các nhân tố điều hòa của các gen flavonoid và ứng dụng của chúng để biến đổi màu sắc hoa

Sự biểu hiện của các gen cấu trúc hay các enzyme của quá trình sinh tổng hợp flavonoid ở hoa, lá và cây con của nhiều loại thực vật như *Petunia*, hoa mồm chó, hoa đồng tiền, cẩm chướng, hoa hồng, cát tường, *Arabidopsis*, nho và cây tía tô đều được điều khiển về mặt không gian (Mol *et al.*, 1998). Hai họ gen, dạng xoắn vòng xoắn cơ bản và các nhân tố phiên mã kiểu Myb, chủ yếu điều khiển sự biểu hiện của các gen cấu trúc (Springob *et al.*, 2003). Sự xuất hiện của protein WD40 trong quá trình điều hòa cũng rất phổ biến. Chúng đã được xác định rõ ở cây hoa mồm chó, *Petunia*, *Arabidopsis*, bắp và cây tía tô (Springob *et al.*, 2003). Các gen điều hòa kết hợp với chu trình anthocyanin được bảo tồn về mặt chức năng trong các loài thực vật nhưng giữa chúng cũng có sự khác biệt về tập hợp các gen đích, điều này ít ra có thể lý giải được tính đa dạng chuyên biệt ở một vài loài.

Một sự gia tăng hàm lượng anthocyanin đã được ghi nhận thông qua sự biểu hiện vượt ngưỡng của các gen mã hóa các nhân tố phiên mã. Ví dụ, Lc allele gen (bHLH) ở bắp dưới sự kiểm soát của một promoter (CaMV35S) dẫn đến sự gia tăng hàm

lượng anthocyanin trong hoa của cây thuốc lá (Lloyd *et al.*, 1992). Sự biểu hiện của các gen giống nhau cũng dẫn đến sự gia tăng hàm lượng anthocyanin trong các mô hoa và mô sinh dưỡng, bao gồm lá của các cây *Petunia* chuyển gen. Các lá này sẽ có màu tía do sự tích tụ của anthocyanin, và có thể đặc trưng cho một loại cây mang tính trạng mới có giá trị thương mại (Bradley *et al.*, 1998). Tuy nhiên, các nỗ lực tương tự để làm tăng cường quá trình sinh tổng hợp anthocyanin ở cây cẩm chướng và hoa hồng sử dụng các gen tương tự đều thất bại trong việc tạo ra các cây hoa có sự gia tăng một cách đáng kể quá trình sinh tổng hợp anthocyanin hay dẫn đến sự giảm quá trình sinh tổng hợp anthocyanin. Các kết quả cho thấy sự hạn chế trong việc ứng dụng rộng rãi chiến lược này để tạo ra các tính trạng lạ. Các tương tác đa yếu tố giữa các nhân tố phiên mã có thể gây ra các hậu quả không lường trước được như sự cạnh tranh giữa các nhân tố với nhau để kết hợp với các nhân tố di truyền.

#### NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI MÀU SẮC HOA

##### Các nghiên cứu tạo ra hoa màu trắng

Sự điều khiển ngược của gen cấu trúc sinh tổng hợp anthocyanin đã được ghi nhận ở nhiều loài thực vật. Vì hiện tượng lai và chọn giống đột biến cũng dẫn đến sự phát triển của các giống hoa trắng; các giống hoa trắng là kết quả của các thí nghiệm mô hình sử dụng kỹ thuật chuyển gen thường đắt tiền hơn chọn giống truyền thống. Vì vậy, sử dụng công cụ phân tử để chọn một giống trắng chỉ có thể được thương mại hóa khi màu sắc hoa mong muốn được tạo ra đồng thời với việc không làm mất đi bất cứ đặc điểm có lợi nào khác. Đặc biệt, khi các cây đích là cây bắt thụ hay các cây trồng chuyển gen được tạo ra có kiểu màu sắc lạ, các thao tác kỹ thuật di truyền có thể được sử dụng kết hợp với phương pháp chọn giống truyền thống.

Các loại hoa màu trắng có thể được tạo ra từ các loài hoa sản sinh anthocyanin bằng cách điều khiển giảm quá trình biểu hiện của một trong số nhiều gen điều hòa hay gen cấu trúc. Sự làm giảm quá trình sinh tổng hợp anthocyanin đã được thực hiện thành công ở cây *Petunia* (Van der Krol *et al.*, 1988), hoa đồng tiền (Elomaa *et al.*, 1993), hoa cúc (Courtney-Gutterson *et al.*, 1994), hoa hồng (Gutterson, 1995), hoa cẩm chướng (Gutterson, 1995), *Lisianthus* (Kato *et al.*, 2001) và *Torenia* (Mizutani *et al.*, 2003). Gần đây, Nishihara và đồng tác giả (2003) đã sử dụng một antisense ức chế gen

*CHS* của cây long đờm màu xanh (*Gentian triflora*) và thu được các cây long đờm chuyển gen màu xanh xám. Công ty Hokko Chemical Industry (Nhật Bản) cũng đã tạo ra cây hoa anh thảo chuyển gen với các mức độ điều khiển giảm của *CHS*. Các màu sắc hoa thu nhận được là trắng, đỏ, hồng và một màu phối trộn của đỏ và trắng.

Gen *CHS* là gen đích thông dụng nhất cho sự điều khiển giảm của quá trình sinh tổng hợp anthocyanin. Tuy nhiên, vì tình trạng bị kìm hãm của *CHS* có thể dẫn đến việc tạo ra các cây trồng chuyển gen không có flavonoid và người ta nhận thấy rằng flavonoid đóng vai trò quan trọng trong bảo vệ cây dưới tác động của tia UV, sự phòng vệ và truyền tín hiệu của các loại thực vật nói chung (Winkel-Shirley, 2002); do đó, sự điều khiển giảm của gen *CHS* không thể là chiến lược lý tưởng để phát triển các giống hoa trắng. Thật vậy, người ta đã quan sát các cây có gen *CHS* bị ức chế và nhận thấy các cây này nhạy cảm hơn đối với stress. Sự điều khiển giảm của các gen khác trong chu trình, như *DFR* hay *F3H*, có thể là một sự thay thế hợp lý hơn để tạo ra các giống cây hoa trắng mà không có các tác động có hại. Tuy nhiên, khi Zuker và đồng tác giả (2002) điều khiển giảm *F3H* ở cây hoa cẩm chướng, tác giả đã phát hiện ngoài sự biến đổi hàm lượng anthocyanin còn có sự gia tăng hàm lượng methylbenzoate làm cho hoa thơm hơn, đây có thể xem là một kết quả tích cực trong việc thương mại hóa các cây hoa này. Jorgensen và đồng tác giả (2002) khám phá rằng sự đồng ức chế của *F3'5'H* hay *DFR* trong cây *Petunia* có thể dẫn đến sự bắt đục cái, điều này có thể do sự tích tụ của dihydroflavonol trong lớp vỏ hạt.

### Các nghiên cứu tạo ra hoa màu xanh

Hầu hết các loại hoa màu xanh đều chứa dẫn xuất thơm acylated delphinidin. Hoa hồng, hoa cúc và hoa cẩm chướng chiếm hơn 50% thị trường hoa cắt cành trên toàn thế giới nhưng chúng chỉ chứa các dẫn xuất pelargonidin và cyanidin, các dẫn xuất này không kết hợp với nhóm acyl thơm. Vì vậy, chúng trở thành mục tiêu cho các nỗ lực nghiên cứu tổng hợp các dẫn xuất delphinidin với hy vọng cuối cùng là có thể tạo ra các loại hoa màu xanh. Sự hấp thụ của anthocyanin hướng về các bước sóng dài (màu xanh), khoảng 10 nm (trong quá trình hydroxyl hóa vòng B) và 4 nm (trong quá trình acyl hóa thơm) (Goto, Kondo, 1991).

Enzyme chính trong quá trình sinh tổng hợp delphinidin là *F3'5'H*. Người ta nhận thấy rằng các

gen *F3'5'H* ở cây *Petunia* và *Lisianthus* có tác động trực tiếp đến sự tạo ra màu sắc xanh ở hoa của cây *Petunia* và cây thuốc lá (Shimada *et al.*, 1999). Việc đưa vào gen *F3'5'H* được tách chiết từ các tràng hoa của cây canterbury dẫn đến kết quả là các hoa có tỷ lệ delphinidin lớn hơn (99% delphinidin) so với khi các gen *F3'5'H* của cây *petunia* hay *Lisianthus* được đưa vào (Okinaka *et al.*, 2003). Điều này xảy ra có thể do hoạt tính enzyme của *F3'5'H* Campanula hiệu quả hơn.

Thực hiện chuyển gen trên cây *Lobelia erinus* màu hồng với một gen *F3'5'H* *Lisianthus* dưới sự kiểm soát của một promoter CaMV35S tạo ra hoa có màu xanh. Cây *Lobelia* là một loại cây mô hình hữu ích cho các nghiên cứu về biến đổi màu sắc vì nó dễ dàng thực hiện chuyển gen và hoa xuất hiện trong một thời gian ngắn chỉ sau 3 - 4 tháng đồng nuôi cấy với *Agrobacterium* mang các vector chuyển gen (Kanno *et al.*, 2003).

Sự biểu hiện của *F3'5'H* *Petunia* trong một dòng hoa cẩm chướng tích tụ các sắc tố có nguồn gốc từ cyanidin dẫn đến sự tạo thành delphinidin ở mức độ rất thấp và không có ảnh hưởng đáng kể nào đến màu sắc của hoa (Brugliera *et al.*, 2000). Điều này cho thấy rằng *F3'5'H* *Petunia* được đưa vào không thể cạnh tranh một cách hiệu quả với các enzyme *DFR* và *F3'H* nội bào của cây cẩm chướng. Tuy nhiên, khi một gen *cytochrome b5* *Petunia* và gen *F3'5'H* *Petunia* được biểu hiện trong cùng một dòng cẩm chướng thì có sự cải thiện đáng kể về mức độ sản xuất delphinidin và có sự thay đổi màu sắc của hoa từ màu đốm hồng và đỏ sang màu đốm hoa cà và tia.

Công ty Florigene và công ty Suntory đã nghiên cứu thành công một loạt những cây cẩm chướng tím chuyển gen bằng cách đưa một gen *F3'5'H* với một gen *DFR* *petunia* vào một cây cẩm chướng màu trắng thiếu *DFR* (Mol *et al.*, 1998). Các cánh hoa của cây cẩm chướng đã qua xử lý chứa chủ yếu delphinidin trong khi các cây cẩm chướng tự nhiên không có. Màu sắc hơi xanh trong các hoa chuyển gen không bao giờ có được ở cây cẩm chướng bằng phương pháp chọn giống truyền thống.

Flavonoid của các cánh hoa Florigene Moonshadow<sup>TM</sup> đã được phân tích một cách chi tiết (Fukui *et al.*, 2003). Các cánh hoa cẩm chướng tự nhiên chủ yếu chứa pelargonidin hay cyanidin 3,5-O-diglucoside-6''-O-4, 6'''-O-1-cyclic-malyl diester. Hoa chuyển gen chứa delphinidin 3,5-O-diglucoside-6''-O-4,6'''-O-1-cyclic-malyl diester như sắc tố chính. Các kết quả này cho thấy các enzyme tham

gia vào quá trình sinh tổng hợp anthocyanin ở cây hoa cẩm chướng đủ linh hoạt để có thể biến đổi các sắc tố có nguồn gốc từ delphinidin. Các cánh hoa cũng chứa apigenin 6-C-glucosyl-7-O-glucoside-6''-malyl ester, người ta từng cho rằng chất này có hiệu quả đồng sắc tố mạnh. pH không bào của hoa Moonshadow đã được thống kê nằm trong khoảng 5,5 bằng cách đo pH của nước ép cánh hoa. Vì vậy, màu sắc xanh có thể được giải thích là do sự tích tụ của những anthocyanin dạng delphinidin thông qua sự biểu hiện của gen *F3'5'H*, sự hiện diện của flavone, một đồng sắc tố mạnh và pH không bào cánh hoa tương đối cao là 5,5. Các điều kiện này rất thuận lợi cho việc xử lý để tạo ra hoa màu xanh ở các loài khác.

Các mức độ đồng sắc tố có thể được biến đổi thông qua các kỹ thuật di truyền, vì các gen *FLS* và *FNS* cũng đã được tách chiết. Tuy nhiên, vì flavonol và flavone có chung tiền chất với anthocyanin nên hàm lượng của đồng sắc tố và anthocyanin thường tương quan nghịch với nhau. Sự ức chế antisense của gen *FLS* ở cây thuốc lá dẫn đến sự giảm hàm lượng của flavonol và sự gia tăng hàm lượng của anthocyanin lên đến 3 lần (Holton *et al.*, 1993). Tuy nhiên, sự điều hòa giảm của *FLS* petunia trong một cây *Petunia* tia dẫn đến sự giảm hàm lượng của flavonol nhưng không có sự thay đổi hàm lượng của anthocyanin. Nielsen và đồng tác giả (2001) đã tiến hành điều khiển giảm *FLS* trong cây *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) bằng cách sử dụng antisense. Hoa từ các cây chuyển gen tích lũy dihydroflavonol ở phần tiêu thụ flavonol và dẫn đến kết quả là màu sắc của hoa đỏ hơn. Sự hình thành sắc tố đỏ khác lạ cũng hiện diện ở giai đoạn chồi sớm và nụ hoa cũng có màu sắc đậm, bên cạnh đó, kiểu hình ổn định và được kế thừa ở các thế hệ cây thứ hai.

Aida và đồng tác giả (2000) nhận thấy rằng hoa của cây torenia chứa một gen antisense *DFR* xanh hơn những hoa chứa gen antisense *CHS* vì sự điều khiển giảm không hoàn toàn của *DFR* dẫn đến sự tích tụ flavone và tác động đồng hình thành sắc tố với các anthocyanin còn lại sẽ thay đổi màu sắc hoa theo chiều hướng về màu xanh. Đây có thể là cách hữu ích để tạo ra hoa màu xanh. Khi gen *FNSII* trong torenia màu xanh bị điều khiển giảm, hàm lượng của flavone giảm và hàm lượng của tiền chất flavanone tăng. Tuy nhiên, điều bất ngờ là các mức độ của anthocyanin giảm và màu sắc hoa cuối cùng là màu xanh nhạt (Ueyama *et al.*, 2002).

## Các nghiên cứu tạo ra hoa có màu từ đỏ đến cam

*DFR* petunia không có khả năng làm giảm dihydrokaempferol do đó hoa *Petunia* ít khi chứa anthocyanin dạng pelargonidin và vì vậy không tạo ra màu cam đến đỏ gạch. Các cây *Petunia* chuyển gen màu đỏ gạch tích lũy anthocyanin dạng pelargonidin được tạo ra do sự biểu hiện của các gen *DFR* từ các loài khác nhau như cây bắp, hoa đồng tiền và hoa hồng trong một dòng *Petunia* đột biến tích lũy dihydrokaempferol (thiếu *F3'5'H*, *F3'H* và *FLS*). Việc xác định một dòng tích lũy dihydrokaempferol tương tự trong số các loài thương mại hóa quan trọng là rất khó khăn. Mizutani và đồng tác giả (2003) đã xử lý một dòng *Petunia* đỏ tích lũy các sắc tố có nguồn gốc từ cyanidin một cách bình thường để tạo các sắc tố có nguồn gốc từ pelargonidin (cam) bằng sự điều khiển giảm của gen *F3'H* và sự biểu hiện của một gen *DFR* hoa hồng. Nhiều loài hoa quan trọng bao gồm cây hoa anh thảo, cây phi yến, cây hoa thủy tiên, cây long đóm và cây địa lan được dự đoán là không tích lũy pelargonidin do tính chuyên biệt cơ chất của *DFRs* nội sinh của chúng. Các cách tương tự vì thế cũng có thể được sử dụng để tạo ra hoa có màu cam ở các loài này.

Ueyama và đồng tác giả (2002) đã sử dụng quy trình chuyển gen hai bước để tạo hoa màu hồng đậm từ một cây *Torenia* hoa xanh. Ban đầu, gen *F3'5'H* bị điều khiển giảm để tạo cây *Torenia* có hoa màu hồng. Quá trình chuyển gen tiếp theo đối với cây torenia này được thực hiện với một promoter *CaMV35S* khởi động gen *F3'H* torenia và marker chọn lọc khác để tạo hoa *Torenia* hồng đậm.

## Các nghiên cứu tạo ra hoa màu vàng

Chalcone và aurone góp phần tạo sắc vàng đã được quan sát ở vài loại hoa. Chalcone thông dụng nhất là THC có màu vàng nhưng bị đồng phân hóa một cách tự nhiên thành naringenin ở trong ống nghiệm và bị đồng phân hóa một cách nhanh chóng trong cơ thể bởi *CHI* (Jez *et al.*, 2000). Ở các hoa vàng của cây cẩm chướng, cây hoa mẫu đơn và cây dứa cạn, THC tích lũy như một 2'-glucoside (isosalipurposide). Sự tích lũy của THC 2'-glucoside được cho là do trạng thái thiếu hụt hoạt động của *CHI*. Một nghiên cứu trước đây (Itoh *et al.*, 2002) cho rằng cả gen *CHI* và *DFR* đều bị chèn vào bởi một transposon trong vài cây cẩm chướng có màu vàng lẫn với màu đỏm và hình quạt trắng. Cây hoa anh thảo màu vàng nhạt cũng đã được nhận thấy có tình trạng thiếu hoạt động của *CHI*. Vì vậy nó thiếu

hoạt tính CHI và sự hiện diện của hoạt tính UDP-glucose (THC 2'-glucosyltransferase-C2'GT) cần thiết cho sự tích lũy của isosalipurposide màu vàng. Các gen mã hóa cho hoạt tính C2'GT ở cây cẩm chướng đã được Okuhara phân lập vào năm 2004 (Okuhara *et al.*, 2004). Vì thế các thao tác kỹ thuật di truyền trên isosalipurposide ở hoa bây giờ đã có thể thực hiện được.

Aurone là các flavonoid màu vàng sáng và vì thế cho đến nay vẫn chưa có một gen đích đáng quan tâm nào khác được sử dụng cho các thao tác kỹ thuật di truyền. Aurone được tìm thấy trong các hoa màu vàng của các loài có quan hệ xa với nhau bao gồm cây mỗm chó, cây thược dược, *Limonium*, cúc zinnia, cây bìm bìm hoa tím. Con đường sinh tổng hợp aurone vẫn còn là một trong số những điều bí ẩn chưa được giải quyết của các quá trình sinh tổng hợp flavonoid. Nakayama và đồng tác giả (2000) đã tinh chế được aurone synthase, aureusidin synthase (AS) từ các cánh hoa của cây hoa mỗm chó màu vàng và cDNA mã hóa cho enzyme này cũng đã được tạo dòng.

Ở các giống màu vàng của cây *Asteraceae* như cây cúc vạn thọ tây và cây thược dược, 6'-deoxychalcones là các sắc tố chính (Davies *et al.*, 1998). Quá trình deoxyl hóa ở vị trí 6' của THC được xúc tác bởi polyketide reductase (PKR) (tên gọi chính thức là chalcone reductase) làm ổn định chalcone và tạo màu sắc vàng. Davies và đồng tác giả (1998) đã biểu hiện một PKR cDNA từ cây *Medicago sativa* trong một dòng *Petunia* trắng và thu được hoa màu vàng nhạt tích lũy chalcone butein 3-O-glucoside và butein 4-O-glucoside. Tuy nhiên, màu sắc chỉ có thể thấy được ở các nụ hoa và không đủ mạnh để đại diện cho một giống màu vàng mới có giá trị thương mại. Các kết quả tương tự cũng đã được ghi nhận khi tiến hành chuyển gen cây *petunia* với một gen PKR của cây cam thảo. Joung và đồng tác giả (2001) đã báo cáo rằng sự biểu hiện của gen PKR từ cây *Pueraria montana* trong cây thuốc lá làm thay đổi màu sắc hoa từ hồng sang trắng do sự giảm anthocyanin và sự tổng hợp flavonoid liquiritigenin lạ.

### Các nghiên cứu làm thay đổi màu sắc hoa khác

Các kiểu hình đốm màu ở hoa và lá thường được đánh giá cao đối với các loại cây trang trí và đã được nghiên cứu ở hoa của cây bìm bìm hoa tím trong suốt nhiều năm qua. Dạng đốm trong các hoa này thường được gây ra do một transposon (Iida *et al.*, 1999). Sự chèn của một gen nhảy vào một gen sinh tổng hợp

flavonoid hay một gen điều khiển của quá trình sinh tổng hợp dẫn tới việc tạo thành các hình quạt trắng trong màu nền của hoa.

Sự loại bỏ một transposon như vậy từ một gen chuyên biệt thường dẫn đến sự tạo thành các vùng có màu trên một nền trắng. Liu và đồng tác giả (2001) đã tạo ra các hoa có đốm màu thông qua chuyển gen cây thuốc lá bằng cách sử dụng một vector kép chứa transposon Tag1 của cây *Arabidopsis*, transposon này được chèn giữa promoter CaMV35S và gen R của cây bắp. Trong số các cây *Petunia* chuyển gen được tạo thành, gen R, một gen điều khiển (regulator) dương tính trội của các gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp anthocyanin chỉ được phiên mã khi Tag1 bị cắt bỏ. Một nửa trong số các cây trồng chuyển gen có kiểu hình hoa dạng đốm. Mỗi dòng có một kiểu hình khác nhau, với cường độ màu sắc cũng khác nhau. Việc xử lý cây hoa với transposon có tạo ra hoa mang giá trị thương mại hay không vẫn chưa được xác định, tuy nhiên xu hướng công nghiệp hiện nay vẫn ưa chuộng các dòng ổn định hơn.

### NGHIÊN CỨU TẠO RA HOA LÂU TÀN

Tuổi thọ của hoa sau thu hoạch bị ảnh hưởng đầu tiên bởi chất dinh dưỡng, sự phát triển của vi sinh vật, ethylene, các đáp ứng khác và quá trình lão hóa. Loại hoa cắt cành phổ biến nhất trên thị trường toàn cầu là hoa hồng, hoa cẩm chướng và hoa cúc. Sự tạo thành ethylene nội sinh của các loài hoa này làm đẩy nhanh quá trình lão hóa hoa ở riêng cây cẩm chướng. Sự rụng cánh ở hoa hồng, ở một vài giống, có thể được thúc đẩy bởi một loại ethylene ngoại sinh đặc biệt trong quá trình vận chuyển và tồn trữ hoa, quả. Tất cả các loại hoa cắt cành đều nhạy cảm với sự phát triển của vi sinh vật trong nước cắm hoa ở những nhiệt độ khác nhau dẫn đến tình trạng bao vây của mô mạch làm ngăn cản sự di chuyển của nước trong thân, và vì vậy sự héo tàn xảy ra làm giảm tuổi thọ của hoa ở trong bình. Các vi sinh vật thường bám vào hoa trong quá trình sản xuất nên có thể xử lý bằng cách làm sạch trong tất cả các công đoạn của quá trình xử lý sau thu hoạch, bao gồm cả việc chuẩn bị nước cắm. Thiếu chất dinh dưỡng, chủ yếu là đường, cũng có thể thúc đẩy quá trình lão hóa. Sự thiếu chất như vậy có thể được cải thiện bằng cách bổ sung các chất dinh dưỡng vào dung dịch nước cắm.

Hoa cẩm chướng được xử lý sau thu hoạch một cách đặc biệt với thiosulfate bạc (STS). Việc xử lý

này có hiệu quả khác nhau phụ thuộc vào thời gian, nồng độ dung dịch xử lý và loại hoa được xử lý. Ag<sup>+</sup> cản trở một cách hữu hiệu sự nhận biết ethylene của hoa (thông qua việc gắn kết với ethylene receptor trên màng tế bào), vì vậy hoa không có phản ứng với ethylene nội bào và ngoại bào. Ở các cây hoa cảm ứng dạng cành chùm với nhiều hoa trên mỗi thân, thông thường ở các giai đoạn khác nhau của sự phát triển, xuất hiện bất lợi là một vài hoa sẽ được tiếp xúc với ít Ag<sup>+</sup> hơn các hoa khác khi xử lý với STS. STS là một hóa chất độc hại; khi áp lực đòi hỏi phải giảm việc sử dụng các loại hóa chất độc hại trong nông nghiệp đang ngày càng gia tăng, cũng như các tiến bộ trong nhận thức về sự lão hóa của hoa đã tạo cơ hội cho các nhà di truyền học nghiên cứu để làm cho quá trình nâng cao tuổi thọ sống trong bình của cây hoa cảm ứng được kéo dài hơn mà không cần có hóa chất. Tuy nhiên, sự thương mại hóa sản phẩm như vậy vẫn chưa thực hiện được chủ yếu là do chi phí ứng dụng trong kỹ thuật cũng như kiến thức về tác hại của độc chất vẫn còn hạn chế, vì vậy hoa đã được xử lý trong thời gian dài nhưng khó có thể thuyết phục người tiêu thụ mua sản phẩm với giá thành cao và sự an toàn chưa được thẩm định.

Đã có một số cách khác nhau nhưng lại có liên quan với nhau được sử dụng để làm cho thời gian cảm trong bình của hoa cảm ứng được kéo dài hơn mà không cần phải xử lý hóa chất. Đầu tiên liên quan đến sự điều hòa giảm quá trình tổng hợp ethylene ở hoa cảm ứng thông qua việc bất hoạt gen đặc trưng của hoa sau phiên mã là gen mã hóa ACC Oxidase (ACO) (Savin *et al.*, 1995) hay ACC Synthase (ACS); là những enzyme xúc tác hai bước cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp ethylene. Điều này làm hoa mất độ nhạy cảm đối với ethylene ngoại bào mặc dù thời gian sống trong bình có thể so sánh được với thời gian khi thân được xử lý với STS sau thu hoạch. Tuy các hàm lượng ethylene ngoại bào chưa được xem là một hậu quả trong chuỗi vận chuyển hoa cảm ứng nhưng người ta vẫn cho rằng sản phẩm kém hấp dẫn hơn các thân cây đã được xử lý hóa chất. Sự di truyền về con đường dẫn truyền ethylene ở *Arabidopsis* (Fluhr, 1998) giúp phân lập một gen mã hóa ethylene receptor từ *Arabidopsis* (Etr1), sau đó quá trình sản xuất hoa cảm ứng với thời gian cảm kéo dài không cần hóa chất và không nhạy cảm đối với cả ethylene nội bào và ngoại bào đã được thực hiện thông qua việc đưa vào một gen mã hóa ethylene receptor *Arabidopsis* đã bị đột biến (Etr1-1).

Các cây hoa cảm ứng chuyển gen chứa *Etr1-*

*1* gen dưới sự kiểm soát promoter của chính nó, promoter CaMV35S là chủ yếu hay promoter *FBP1* (protein liên kết với cây hoa), cũng đã được tạo ra. Khoảng nửa trong số các cây hoa này có quá trình lão hóa xảy ra chậm hơn ít nhất là 6 ngày, thời gian chậm hơn cao nhất là 16 ngày, tăng gấp 3 lần thời gian sống trong bình. Thời gian sống trong bình thậm chí là dài hơn so với hoa đã được xử lý với hóa chất ức chế quá trình sinh tổng hợp ethylene hay sự phản ứng đối với ethylene (STS) (Bovy *et al.*, 1999). Các kết quả tương tự được thu nhận bằng cách sử dụng gen *Etr1-1* được điều khiển bởi promoter *CMB2* (*CMB2* là một MADS box gen ở cây cảm ứng) (Baudinette *et al.*, 2000).

Sự kim hãm quá trình biểu hiện của gen *Etr1-1* ở nhiều hoa đã được chứng minh tạo ra cùng kiểu hình và có một thuận lợi về mặt lý thuyết là sự can thiệp vào quá trình nhận biết ethylene sẽ làm giảm đáp ứng phòng vệ ở thực vật. Người ta vẫn chưa biết liệu rằng đây có phải là một vấn đề đối với các cây biểu hiện *Etr1-1* chuyên biệt ở hoa hay không nhưng điều này xem ra ít có khả năng.

Một số cây trồng trong chậu có hiện tượng rụng cánh hoa để đáp ứng đối với ethylene và một chiến lược đã được thử nghiệm nhằm cải thiện hiệu ứng này. Sự biểu hiện mô đặc hiệu của gen bị đột biến chắc chắn sẽ là một thuận lợi. Aida và đồng tác giả (2000) đã báo cáo về sự điều khiển giảm của ACO trong hai giống *Torenia fournieri*. Tuổi thọ hoa trung bình của cây *Torenia* chuyển gen với ACO được điều khiển giảm là 2,7 - 7,1 ngày; trong khi tuổi thọ hoa trung bình của các cây hoang dại là 2,0 ngày. Hơn nữa, các cây *Torenia* chuyển gen với đời sống hoa được kéo dài tạo nhiều hoa cùng một lúc trên mỗi thân hơn loại cây hoang dại. Đặc tính thời gian sống của hoa kéo dài sang thế hệ con cháu liên hệ đến sự tồn tại của gen.

Khi gen *Etr1-1* được chuyển vào cây *Petunia* dưới sự kiểm soát của một promoter CaMV35S được tăng cường, các hoa *Petunia* chuyển gen có thời gian sống kéo dài (dài hơn từ 2 đến 4 lần) và trì hoãn sự rụng cánh so với các đối chứng không chuyển gen. Chúng cũng không nhạy cảm đối với ethylene ngoại bào mà tổng hợp nhiều ethylene hơn (Wilkinson *et al.*, 1997). Gen *Etr1-1* dưới sự kiểm soát của một protein liên kết của cây hoa (FBP1) hay một promoter *apetala* (AP3) đã được đưa vào cây *petunia*. Hơn 60 cây *Petunia* chuyển gen đã thu được ứng với mỗi loại trên. Lần lượt khoảng 70% và 30% cây có thời gian sống của hoa gấp hai lần thời gian sống của hoa *Petunia* không chuyển gen. Một số cây



có gen *Etr1-1* được điều hòa bởi FBPI promoter có hoa nở đều đặn trong suốt 14 ngày trong khi hoa không chuyển gen chỉ nở trong 3 ngày (Cobb *et al.*, 2002).

Khi cây *Petunia* được thực hiện chuyển gen với một gen *ERS* bị đột biến (một ethylene receptor gen) của cây *Brassica oleracea*, hoa của các cây chuyển gen giữ được độ căng và sắc tố lâu hơn hoa của các cây không chuyển gen và không nhạy cảm đối với ethylene ngoại bào. Cây chuyển gen tạo ra hoa to hơn nhưng có tỉ lệ chết cao hơn; điều này cho thấy các cây *Petunia* không nhạy cảm đối với ethylene thì nhạy cảm hơn đối với dịch bệnh (Shaw *et al.*, 2002).

## NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI HÌNH THÁI HOA

Nhiều gen tiềm năng có lợi liên quan đến các con đường phát sinh hình thái của hoa và cây đã được tạo dòng. Các nhân tố phiên mã điều khiển quá trình sinh tổng hợp và phát triển ở thực vật hay các gen điều khiển bao gồm các hormone thực vật là các gen thường được quan tâm. Tuy nhiên, chỉ một vài gen trong số này đã được ứng dụng thực sự vào các cây hoa. Thậm chí trong vài trường hợp này, các promoter thiết yếu được sử dụng, thường tạo ra các loại cây không được ưa thích. Sự điều khiển phức tạp hơn trong sự biểu hiện của các gen này có thể tạo ra các cây hoa với hình thái lạ có tiềm năng thương mại.

Kiểm soát sự phân nhánh được xem là một cách tốt nhất để tạo cây có đặc tính lạ hấp dẫn. Sự biểu hiện quá ngưỡng của nhân tố phiên mã có dạng ngón tay kềm ở cây *Petunia*, nhân tố cảm ứng chồi bên (LIF) trong cây *Petunia* dưới sự kiểm soát của một CaMV35S promoter dẫn đến sự gia tăng đáng kể số lượng nhánh. Các nhánh thứ cấp ít khi hình thành trong các cây *Petunia* hoang dại lại xuất hiện trong các cây chuyển gen này. Hàm lượng các cytokinin tự do thấp hơn trong khi các thể nucleotide và nucleoside của chúng cao hơn ở thân và lá. Sự điều khiển cytokinin thực sự quan trọng nếu mục đích là gia tăng số lượng hoa. Cây thuốc lá chuyển gen được thực hiện với một gen *Agrobacterium ipt* (isopentenyl transferase) dưới sự kiểm soát của một promoter liên quan đến sự lão hóa ở lá *Arabidopsis* tạo ra nhiều hoa hơn do sự lão hóa lá bị trì hoãn (Gan, Amasino, 1995). Sự trì hoãn quá trình lão hóa tràng hoa ở cây *Petunia* đã được báo cáo với một cấu trúc gen xác định (Chang *et al.*, 2003).

Gen *rolC* từ *Agrobacterium rhizogenes* mã hóa cho cytokinin  $\beta$ -glucosidase. Cây *Petunia* cv Mitchell chuyển gen biểu hiện *rolC* được điều khiển

bởi CaMV35S promoter tạo ra các biến đổi hình thái khác nhau như chiều cao cây, kích thước lá và hoa giảm, sự phân nhánh tăng (Winefield *et al.*, 1999). Các gen *rolA*, *B* và *C* được chuyển vào cây *Rosa hybrida* cv. Moneyway làm các đặc điểm ra rễ của cây được cải thiện (Van der Salm *et al.*, 1997).

Gen CENTRORADIALIS (*CEN*) của cây hoa mồm chó mã hóa cho một protein tương đồng liên kết với phosphatidyl ethanolamine và cần cho sự phát triển vô hạn của rễ. Mặt khác, cây thuốc lá có các mô phân sinh rễ giới hạn do sự chuyển hóa thành các mô phân sinh hoa. Các cây thuốc lá biểu hiện vượt ngưỡng *CEN* có một pha sinh trưởng kéo dài với nhiều lá hơn và kiểu phát triển cao hơn, trì hoãn sự phát sinh hoa trong suốt hơn 10 tháng (Amaya *et al.*, 1999). Các hoa hồng hiện đại như các giống cây thảo mộc và trà lai thường xác định nhưng các thay đổi đột biến không xác định thường phát sinh ở các cây hoa hồng leo. Iwata (2003) đã xác định một gen nhảy được chèn vào một thể tương đồng trong bộ gen của các hoa hồng xác định. Sự loại bỏ transposon dẫn đến sự chuyển đổi các hoa hồng xác định thành các loại hoa hồng leo không xác định. Các kết quả này cho thấy rằng sự điều hòa tăng hay giảm của *CEN* và các thể không tương đồng của nó có thể được ứng dụng để thay đổi chiều cao và kiến trúc của cây.

Các hóa chất như uniconazole được sử dụng rộng rãi để tạo ra các cây lùn. Nhiều gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp và nhận biết gibberellin đã được phân lập (Olszewski *et al.*, 2002). Trong số chúng, một alen đột biến có chung tính trạng trội của GAI là gai-1 làm giảm đáng kể sự đáp ứng đối với gibberellic acid trong suốt quá trình phát triển sinh trưởng. Gen này có thể được sử dụng để tạo ra các cây lùn như Suntory Ltd. đã thành công trong việc tạo ra các cây lùn bằng cách đưa các trình tự gai-1 vào cây *Petunia*.

## NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI MÙI HƯƠNG CỦA HOA

Mùi hương của hoa đóng vai trò quan trọng trong việc hấp dẫn các loại côn trùng thụ phấn. Nó cũng quan trọng đến sự lựa chọn hoa của khách hàng do nó liên quan đến sở thích của khách hàng. Mùi hương của hoa được tạo thành từ nhiều hợp chất khác nhau. Hơn 700 hợp chất đã được xác định ở 60 họ thực vật (Knudson *et al.*, 1993). Chúng là các dẫn xuất acid béo như benzenoid, phenylpropanoid và terpenoid (monoterpene và sesquiterpene). Các cấu trúc của

hàng trăm hợp chất thơm này đã được xác định. Mặc dù số lượng các gen được tạo dòng liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các hợp chất tạo mùi hương gia tăng một cách liên tục nhưng những kiến thức sinh học phân tử và sinh hóa của quá trình sinh tổng hợp các hợp chất này vẫn rất hạn chế (Dudareva *et al.*, 2003). Các báo cáo về sự biến đổi của mùi hương ở hoa bằng cách sử dụng kỹ thuật di truyền thậm chí còn hiếm hơn. Nói chung, các hợp chất mùi hương ở hoa được tổng hợp *de novo* trong các cánh hoa. Các enzyme liên quan đến quá trình sinh tổng hợp mùi hương hoa biểu hiện một cách mạnh mẽ trong các tế bào biểu bì cánh hoa và quá trình biểu hiện của chúng được điều hòa ở mức độ phiên mã phụ thuộc vào giai đoạn phát triển cánh hoa.

Các hoa *Petunia* trưởng thành chủ yếu giải phóng benzoids. Sự tỏa hương này xuất hiện nhịp nhàng 1 lần/ngày, tiến tới cực đại vào lúc tối. Các chất bay hơi này không được bảo tồn trong các thời kỳ lan tỏa thấp nhưng phần nào được tổng hợp *de novo*. Phân tích DNA-microarray cho thấy rằng các gen của chu trình dẫn đến sự tạo thành benzoid được điều hòa tăng trong ngày trước khi gia tăng sự lan tỏa của chúng (Verdonk *et al.*, 2003). Sự tổng hợp các chất bay hơi ở hoa cẩm chướng được điều hòa một cách diễn biến và người ta nhận thấy rằng quá trình tổng hợp được liên kết với màng tế bào và sự phân chia vào cytosol diễn ra một cách phù hợp với các hệ số phân chia (Schade *et al.*, 2001). Các lớp cutin ở cánh hoa cây hoa mồm chó hầu như không tạo ra bất cứ khả năng kháng khuếch tán nào đối với các chất bay hơi và vì vậy cho phép lan tỏa một cách nhanh chóng các hợp chất này (Goodwin *et al.*, 2003). Các kết quả này cho thấy sự biểu hiện của gen sinh tổng hợp mùi hương ở cây chuyển gen có thể dẫn đến sự biến đổi hương thơm của hoa.

Gen cấu trúc đầu tiên được phân lập mã hóa cho một enzyme sinh tổng hợp mùi hương hoa là S-linalool synthase (LIS) từ *Clarkia breweri*, một cây tự nhiên ở California tỏa mùi thơm mạnh có S-Linalool là một thành phần chính của nó. S-Linalool được sinh tổng hợp từ geranyl pyrophosphate, một chất trung gian của nhiều terpenoids khác nhau nhờ LIS. Gen LIS được biểu hiện cao trong các tế bào biểu bì của các cánh hoa và trong các tế bào của vùng truyền ở đầu nhụy và vòi nhụy; lượng protein tạo ra được sử dụng vào điều hòa phiên mã. Người ta cũng nhận thấy rằng các tuyến thơm chuyên biệt và các cơ quan liên quan không cần thiết đối với sự tạo thành mùi hương ở hoa (Dudareva *et al.*, 2003), điều này cho thấy mùi hương ở hoa có thể bị biến đổi mà

không cần sự hiện diện của các cấu trúc này.

Thế lai petunia W115 được biến đổi với *Clarkia* LIS cDNA dưới sự kiểm soát của promoter CaMV35S. Hoạt tính enzyme thích hợp đã được tìm thấy trong lá và cánh hoa của cây chuyển gen. Tuy nhiên, chỉ có một số lượng rất nhỏ S-linalool được phát hiện trong hoa. Điều này cho thấy hầu hết S-linalool được tổng hợp bị biến đổi thành S-linalyl- $\beta$ -D-glucopyranoside không bay hơi, có thể là do hoạt động của glucosyltransferase nội sinh ở cây petunia. Lượng S-linalool và glycoside của nó dường như phụ thuộc vào khả năng của cơ chất GDP nhiều hơn mức độ biểu hiện của gen LIS (Lucker *et al.*, 2001). Gen tương tự dưới sự kiểm soát của CaMV35S promoter được đưa vào cây cẩm chướng (*Carnation cv. Eilat*) tạo các dẫn xuất benzoic acid và sesquiterpene nhưng không tạo monoterpene một cách bình thường. Các cây chuyển gen tạo thành sản phẩm xuất linalool và các dẫn xuất của nó, cis- và trans-linalool oxide. Tuy nhiên, sự lan tỏa của linalool không xảy ra ở một mức độ mà có những biến đổi mùi hương ở hoa được ghi nhận bởi thính giác của con người (Lavy *et al.*, 2002). Khi gen tương tự được biểu hiện trong trái cà chua, lượng S-linalool tạo ra đủ để thính giác con người có thể phát hiện được (Lewinsohn *et al.*, 2001). Các báo cáo này cho thấy rằng sự biến đổi mùi hương có thể thực hiện được bằng cách chuyển một gen mã hóa cho một enzyme sinh tổng hợp và một chu trình hoạt động của enzyme đó, để cung cấp một hàm lượng vừa đủ các chất tham gia cần thiết (trong trường hợp này là geranyl pyrophosphate).

Hai gen mã hóa cho acetyl CoA (benzylalcohol acetyltransferase) và benzyl CoA (benzylalcohol benzoyl transferase), là hai enzyme chịu trách nhiệm tổng hợp benzylacetate và benzylbenzoate, liên quan đến quá trình sinh tổng hợp mùi hương đã được tạo dòng từ *C. breweri* và sau đó 2 gen này đã được xác định (Dudareva *et al.*, 2003). Gen mã hóa cho một acetyl CoA (alcohol acetyltransferase) từ cây dâu tây đóng vai trò chủ yếu trong việc sản sinh mùi vị trong suốt quá trình chín của quả (Aharoni *et al.*, 2000) và một acetyl CoA (geraniol acetyltransferase) từ cây hoa hồng cũng nhận nhóm alcohol như citronellol và 1-octanol làm cơ chất (Shalit *et al.*, 2003) đã được tạo dòng.

Các hoa của cây hoa *Torenia* tỏa ra một thành phần tạo mùi hoa phenylpropanoid chủ yếu, methylbenzoate. SAdenosyl-L-methionine:benzoic acid carboxyl methyl transferase (BAMT) xúc tác bước cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp methyl

benzoate và cDNA tương ứng đã được tạo dòng (Dudareva *et al.*, 2003). Sự lan tỏa của methyl benzoate trong các hoa của cây hoa mồm chó diễn ra một cách nhịp nhàng với mức lan tỏa cao nhất trong ngày. Lượng benzoic acid có phần hơn mức BAMT quyết định sự nhịp nhàng. Một cơ chế phân tử tương tự liên quan đến sự tạo mùi hương ở các loại cây tỏa hương về ban đêm (cây thuốc lá và petunia) (Kolosova *et al.*, 2001). Các kết quả này cho thấy rằng việc biến đổi mùi hương của hoa có thể thực hiện thành công bằng cách tối ưu hóa cả sự biểu hiện của các gen sinh tổng hợp *de novo* và tính hiệu quả của các cơ chất của chúng. Cây hoa mồm chó cũng tỏa ra monoterpene, myrcene và (E)-bocimene, chúng được sinh tổng hợp từ geranyl pyrophosphate. Hai cDNA có quan hệ gần của hai myrcene synthase và một (E)-b-ocimene đã được tách chiết từ cây hoa mồm chó. Chúng hình thành một phân nhóm phụ mới của phân nhóm terpene synthase. Sự điều hòa phối hợp của phenylpropanoid và sự sản sinh mùi isoprenoid đã được quan sát ở các hoa của cây hoa mồm chó (Dudareva *et al.*, 2003). Thậm chí các cánh hoa của cây *Arabidopsis*, một loại cây tự thụ phấn, sản xuất lượng nhỏ terpene và chứa terpene synthase (Chen *et al.*, 2003).

Nhờ có các dự án giải trình tự EST quy mô lớn, hoa hồng bây giờ là nguồn còn lại của các gen tạo mùi hương ở hoa (Channeliere *et al.*, 2002). Hoa hồng tổng hợp hơn 400 hợp chất bay hơi và được xem là một nguồn gen có liên quan đến mùi hương tốt, chẳng hạn như chúng mã hóa S-adenosylmethionine: orcinol O-methyltransferase (Scalliet *et al.*, 2002) và các enzyme sinh tổng hợp terpenoid. Một vài gen tiềm năng hữu ích, chẳng hạn như limonene synthase, cho sự biến đổi các mùi hương ở hoa đã được tách chiết từ hoa hồng (Lucker *et al.*, 2001). Như đã được đề cập ở trên, sự biến đổi không định trước mùi hương của hoa đã được báo cáo ở cây hoa cẩm chướng. Sự điều hòa giảm của gen *F3H* dẫn đến sự giảm hàm lượng anthocyanin và màu sắc hoa tạo ra nhạt hơn và có sự gia tăng methylbenzoate và vì thế hương thơm hơn so với hoa ở các cây đối chứng. Sự ngăn chặn quá trình sinh tổng hợp anthocyanin có thể làm thay đổi chiều chuyển hóa thông qua chu trình phenylpropanoid (Zuker *et al.*, 2002).

**Lời cảm ơn:** Các tác giả xin cảm ơn Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Sinh học Tây Nguyên) đã hỗ trợ chúng tôi chỉnh sửa và hoàn thiện bài tổng quan này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aharoni A, Keizer LC, Bouwmeester HJ, Sun Z, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, van Houwelingen AM, De Vos RC, van der Voet H, Jansen RC, Guis M, Davis RW, Schena M, van Tunen AJ, O'Connell AP (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12: 647-662.
- Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y, Shibata M (2000) Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Sci* 153: 33-42.
- Akashi T, Fukuchi-Mizutani M, Aoki T, Ueyama Y, Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, Kusumi T, Ayabe S (1999) Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cytochrome P450, flavone synthase II, that catalyzes direct conversion of flavanones to flavones. *Plant Cell Physiol* 40: 1182-1187.
- Amaya I, Ratcliffe OJ, Bradley DJ (1999) Expression of CENTRORADIALIS (CEN) and CEN-like genes in tobacco reveals a conserved mechanism controlling phase change in diverse species. *Plant Cell* 11: 1405-1418.
- Baudinette SC, Stevenson TW, Savin KW (2000) Isolation and characterisation of the carnation floral-specific MADS box gene, CMB2. *Plant Sci* 155: 123-131.
- Bovy AG, Angenent GC, Dons HJM, van Atvorst A-G (1999) Heterologous expression of the Arabidopsis *etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers. *Plant Sci* 5: 301-308.
- Bradley JM, Davies KM, Deroles SC, Bloor SJ, Lewis DH (1998) The maize Lc regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*. *Plant J* 13: 381-392.
- Brugliera F, Kalc-Wright G, Hyland C, Webb L, Herbert S, Sheehan B, Mason JG (2000) Improvement of Fusarium wilt tolerance in carnations expressing chitinase. Supplement to *Int. Plant Mol Biol Repr* 18(2).
- Chang H, Jones ML, Nanowitz GM, Clark DG (2003) Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with PSAG12-IPT delay corolla senescence and decrease sensitivity to ethylene. *Plant Physiol* 132: 2174-2183.
- Channeliere S, Riviere S, Scalliet G, Szecsi J, Jullien F, Dumas C, Bendahmane M, Huguene P, Cock JM (2002) Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags. *FEBS Lett* 2002: 35-38.
- Chen F, Tholl D, D'Auria JC, Farooq A, Pichersky E, Gershenzoh J (2003) Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from arabidopsis flowers. *Plant Cell* 15: 481-494.
- Cobb D, Schneider N, Guo S, Humiston GA, Harrison B, Bolter J (2002) Flower specific expression of an ethylene

- receptor (etr1-1) confers ethylene insensitivity in transgenic petunia. In: *The Abstract of XVI International Horticultural Congress*, Toronto, Canada: 68.
- Courtney-Gutterson N, Napoli C, Lemieux C, Morgan A, Firoozabady E, Robinson KEP (1994) Modification of flower color in Florist's *Chrysanthemum*: production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Bio/Technol* 12: 268-271.
- Davies KM, Bloor SJ, Spiller GB, Deroles SC (1998) Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in Petunia. *Plant J* 13: 259-266.
- Dudareva N, Martin D, Kish CM, Kolosova N, Gorenstein N, Faldt J, Miller B, Bohlmann J (2003) (E)-  $\beta$ -ocimene synthase and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell* 15: 1227-1241.
- Elomaa P, Honkanen J, Puska R, Seppanen P, Helariutta Y, Mehto M, Kotilainen M, Nevalainen L, Teeri TH (1993) Agrobacterium-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *Bio/Technology* 11: 508-511.
- Fluhr R (1998) Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction. *Trends Plant Sci* 3: 141-145.
- Forkmann G (1991) Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breed* 106: 1-26.
- Forkmann G, Heller W (1999) Biosynthesis of flavonoids. In: Sankawa U (ed) *Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acid and Their Derivatives*. Elsevier, Amsterdam: 713-748.
- Fujiwara H, Tanaka Y, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Nakao M, Fukui Y, Yamaguchi M, Ashikari T, Kusumi T (1998) cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant J* 16: 421-431.
- Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Yamaguchi T, Saito N, Iida S (2000) Colouring-enhancing protein in blue petals. *Nature* 407: 581.
- Fukuchi-Mizutani M, Okuhara H, Fukui Y, Nakao M, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Kusumi T, Hase T, Tanaka Y (2003) Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose: anthocyanin 3'-O-glucosyl-transferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian. *Plant J* 132: 1652-1663.
- Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Iwashita T, Nomoto K (2003) A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene. *Phytochemistry* 63: 15-23.
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270: 1986-1988.
- Goodwin SM, Kolosova N, Kish CM, Wood KV, Dudareva N, Jenks MA (2003) Cuticle characterization and volatile emissions of petals in *Antirrhinum majus*. *Plant Physiol* 117: 435-443.
- Goto T, Kondo T (1991) Structure and molecular stacking of anthocyanins-flower color variation. *Angew. Chem Int Ed Engl* 30: 17-33.
- Gutterson N (1995) Anthocyanin biosynthetic genes and their application to flower colour modification through sense suppression. *Hort Sci* 30: 964-966.
- Harborne JB (1967) Comparative biochemistry of the flavonoids-IV. Correlations between chemistry, pollen morphology and systematics in the family Plumbaginaceae. *Phytochemistry* 6: 1415-1428.
- Holton TA, Brugliera F, Tanaka Y (1993) Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *Plant J* 4: 1003-1010.
- Honda T, Saito N (2002) Recent progress in the chemistry of polyacylated anthocyanins as flower color pigment. *Heterocycles* 56: 633-692.
- Ibrahim RK, Muzac I (2000) The methyltransferase gene superfamily: a tree with multiple branches. In: Ibrahim R, Varin L, de Luca V, Romeo JT (eds) *Recent Advances of Phytochemistry. Evolution of Metabolic Pathways*. Elsevier Science, Amsterdam, 34: 349-385.
- Iida S, Hoshino A, Johzuka-Hisatomi Y, Habu Y, Inagaki Y (1999) Floricultural traits and transposable elements in the Japanese and common morning glories. *Ann N Y Acad Sci* 870: 265-274.
- Itoh Y, Higeta D, Suzuki A, Yoshida H, Ozeki Y (2002) Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiol* 43: 578-585.
- Iwata H (2003) Modern perpetual roses were generated by transposon. In: Morning Glory Workshop, Okazaki James C (2002) Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2002. ISAAA Briefs No. 27. ISAAA, Ithaca.
- Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP (2000) Structure and mechanism of the evolutionary unique enzyme chalcone isomerase. *Nat Struct Biol* 7: 786-791.
- Jorgensen RA, Que Q, Napoli CA (2002) Maternally controlled ovule abortion results from cosuppression of dihydroflavonol-4-reductase or flavonoid-3',5'-hydroxylase genes in *Petunia hybrida*. *Funct Plant Biol* 29: 1501-1506.

- Joung Y, Roh M, Kamo K, Song J (2001) Agrobacterium mediated transformation of *Campanula glomerata*. *Plant Cell Rep* 20: 289-295.
- Kanno Y, Noda N, Kazuma K, Tsugawa H, Suzuki M (2003) Transformation of *Lobelia erinus*. (in Japanese). In: *The Abstract of 21st Annual Meeting of Japanese Society Plant Cell Molecular Biology*, Kagawa: 121.
- Kato N, Shikanai Y, Kanno Y, Suzuki M (2001) Flower colour modification of *lisianthus* via *Agrobacterium* (in Japanese). *J Jpn Soc Hort Sci* 70s2: 436.
- Kitada C, Gong Z, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K (2001) Differential expression of two cytochrome P450s involved in the biosynthesis of flavones and anthocyanins in chemovarietal forms of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol* 42: 1338-1344.
- Knudsen JT, Tollsten L, Gunnar Bergstrom L (1993) Floral scents - A checklist of volatile compounds isolated by headspace techniques. *Phytochemistry* 33: 253-280.
- Kolosova N, Gorenstein N, Kish CM, Dudareva N (2001) Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *Plant Cell* 13: 2333-2347.
- Lavy M, Zuker A, Lewinsohn E, Larkov O, Ravid U, Vainstein A, Weiss D (2002) Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. *Mol Breed* 9: 103-111.
- Lewinsohn E, Schalechet F, Wilkinson J, Matsui K, Tadmor Y, Nam K-H, Amar O, Lastochkin E, Larkov O, Ravid U, Hiatt W, Gapstein S, Pichersky E (2001) Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiol* 127: 1256-1265.
- Liu D, Galli M, Crawford NM (2001) Engineering variegated floral patterns in tobacco plants using the *Arabidopsis* transposable element Tag1. *Plant Cell Physiol* 42: 419-423.
- Lloyd AM, Walbot V, Davis RW (1992) *Arabidopsis* and *Nicotiana anthocyanin* production activated by maize regulators R and C1. *Science* 258: 1773-1775.
- Lucker J, Bouwmeester HJ, Schwab W, Blaas J, van der Plas LH, Verhoeven HA (2001) Expression of *Clarkia* S-linalool synthase in transgenic *petunia* plants results in the accumulation of S-linalyl-b-D-glucopyranoside. *Plant J* 27: 315-324.
- Martens S, Forkmann G (1999) Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera hybrida*. *Plant J* 20: 611-618.
- Martens S, Forkmann G, Britsch L, Wellmann F, Matern U, Lukacin R (2003) Divergent evolution of flavonoid 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in parsley. *FEBS Lett* 544: 93-98.
- Mizutani M, Tsuda S, Suzuki K, Nakamura N, Fukui Y, Kusumi T, Tanaka Y (2003) Evaluation of post transcriptional gene silencing methods using flower color as the indicator. *Plant Cell Physiol* 44: s122.
- Mol J, Grotewold E, Koes R (1998) How gene paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci* 3: 212-217.
- Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Sato T, Kikuchi S, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani M, Ueda T, Nakao M, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T (2000) Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* 290: 1163-1166.
- Nielsen K, Derolles SC, Markham KR, Bradley MJ, Podivinsky E, Manson D (2001) Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower colour in *Lisianthus*. *Mol Breed* 9: 217-229.
- Nishihara M, Nakatsuka T, Mishiba K, Kikuchi A, Yamamura S (2003) Flower color modification by suppression of chalcone synthase gene in gentian. *Plant Cell Physiol* 44: s159.
- Okinaka Y, Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Kiyokawa S, Kikuchi Y (2003) Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNA from *Campanula medium*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 161-165.
- Okuhara, H, Ishiguro K, Hirose C, Gao M, Togami J, Nakamura N, Ono E, Ochiai M, Fukui Y, Yanaguchi M, Tanaka Y (2004) Molecular cloning and functional expression of tetrahydrochalcone 2'-glucosyltransferase genes. *Plant Cell Physiol* 45: s133.
- Olzewski N, Sun T-P, Gubler F (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* S61-S80.
- Quattrocchio F, Wing JF, Leppen HTC, Mol JNM, Koes R (1993) Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *Plant Cell* 5: 1497-1512.
- Savin KW, Baudinette SC, Graham MW, Michael MZ, Nugent GD, Lu C, Chandler SF, Cornish EC (1995) Antisense ACC Oxidase RNA delays carnation petal senescence. *Hort Sci* 30: 970-972.
- Scalliet G, Journot N, Jullien S, Baudino S, Magnard J-L, Channeliere S, Vergne P, Dumas C, Bendahmane M, Cock JM, Huguency P (2002) Biosynthesis of the major scent components 3,5-dimethoxytoluene and 1,3,5-trimethoxybenzene by novel rose O-methyltransferases. *FEBS Lett* 2002: 113-118.
- Schade F, Legge RL, Thompson JE (2001) Fragrance

volatiles of developing and senescing carnation flower. *Phytochemistry* 56: 703-710.

Shalit M, Guterman I, Volpin H, Bar E, Tamari T, Menda N, Adam Z, Zamir D, Vainstein A, Weiss D, Pichersky E, Lewinsohn E (2003) Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl coenzyme A:geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals. *Plant Physiol* 131: 1868-1876.

Shaw J-F, Chen H-H, Tsai M-F, Kuo C-I, Huang L-C (2002) Extended flower longevity of *Petunia hybrida* plants transformed with boers, a mutated ERS gene of *Brassica oleracea*. *Mol Breed* 9: 211-216.

Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Okinaka Y, Kiyokawa S, Kikuchi Y (1999) Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3', 5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants. *FEBS Lett* 461: 241-245.

Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K (2003) Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep* 20: 288-303.

Stafford HA (1990) Flavonoid Metabolism. CRC Press, Florida.

Strack D, Wray V (1993) The anthocyanins. In: Harborne JB (ed) The Flavonoids - Advances in Research Since 1986. Chapman and Hall, London: 1-22.

Suzuki H, Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Fukui Y, Nakamura N, Nakao M, Tanaka Y, Yamaguchi MA, Kusumi T, Nishino T (2001) Malonyl CoA:anthocyanidin 5-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase gene from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers. Enzyme purification, gene cloning, expression, and characterization. *J Biol Chem* 276: 49013-49019.

Suzuki H, Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Fukui Y, Nakamura N, Yamaguchi MA, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T (2002) cDNA cloning, heterologous expressions, and functional characterization of malonyl CoA:anthocyanidin 3-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase from dahlia flowers. *Plant Physiol* 130: 2142-2151.

Ueyama Y, Suzuki K, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Miyazaki K, Ohkawa H, Kusumi T, Tanaka Y (2002) Molecular and biochemical characterization of torenia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression

of these genes. *Plant Sci* 163: 253-263.

van der Krol AR, Lenting PE, Veenstra J, van der Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR (1988) An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333: 866-869.

van der Salm TPM, van der Toorn CJG, Bouwer R, Hanisch ten Cate CH, Dons HJM (1997) Production of ROL gene transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterization of their rooting ability. *Mol Breed* 3: 39-47.

Verdonk JC, de Vos CHR, Verhoeven HA, Haring HA, van Tunen AJ, Schuurink RC (2003) Regulation of floral scent production in petunia revealed by target metabolites. *Phytochemistry* 62: 997-1008.

Wang M-B, Waterhouse PM (2001) Application of gene silencing in plants. *Curr Opin Plant Biol* 5: 146-150.

Wilkinson JQ, Lenahan MB, Clark DG, Bleecker AB, Chang C, Meyerowitz EM, Klee HJ (1997) A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nat Biotechnol* 15: 444-447.

Winefield C, Lewis D, Arathoon S, Deroles S (1999) Alteration of *Petunia* plant form through the introduction of the rolC gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *Mol Breed* 5: 543-551.

Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5: 218-223.

Yamaguchi T, Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Saito N, Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, Kusumi T, Iida S (2001) Genes encoding the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol* 42: 451-461.

Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, Fukuchi-Mizutani M, Fujiwara H, Fukui Y, Ashikari T, Murakami Y, Yamaguchi M, Kusumi T (2000) Molecular and biochemical characterization of hydroxycinnamoyl-CoA: anthocyanin 3-O-glucoside-6''-O-hydroxycinnamoyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol* 132: 1652-1663.

Yoshida K, Kondo T, Okazaki Y, Katou K (1995) Cause of blue petal colour. *Nature* 373: 291.

Zuker A, Tzfira T, Ben-meir H, Ovadis M, Shklarman E, Itzhaki H, Forkmann G, Martens S, Nata-Sharir I, Weiss D, Vainstein A (2002) Modification of flower colour and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. *Mol Breed* 9: 33-41.