

# **Geny szlaku metabolicznego karotenoidów i ich wykorzystanie w inżynierii genetycznej**

**Joanna Sztangret-Wiśniewska<sup>1</sup>, Katarzyna Niemirowicz-Szczytł<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Oddział Młochów*

*ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów*

*e-mail: j.sztangret@ihar.edu.pl*

<sup>2</sup> *Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,*

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego*

*ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa*

*e-mail: niemirowicz@alpha.sggw.waw.pl*

**Słowa kluczowe:** karotenoidy, biosynteza, geny, inżynieria genetyczna

## **Wstęp**

Do grupy karotenoidów zalicza się ponad 600 związków. Występują one w roślinach, grzybach, bakteriach i organizmach zwierzęcych. Obecne w błonach tylakoidów, pełnią rolę barwników pomocniczych w procesach fotosyntezy lub spełniają funkcję ochronną absorbując selektywnie niepożądane zakresy widma. Karotenoidy przyczyniają się do całego bogactwa barw występujących w przyrodzie nadając barwę żółtą, pomarańczową lub czerwoną kwiatom, owocom i korzeniom spichrzowym. Pełnią rolę atraktantów przywabiających zapylacze oraz zwierzęta rozsiewające nasiona [10, 23]. Związki karotenoidowe występujące w świecie zwierząt wpływają na ubarwienie np. ptaków i ryb, ale przede wszystkim umożliwiają rozwój i prawidłowe funkcjonowanie organizmów zwierzęcych, jednakże ich pochodzenie jest w całości roślinne. Spośród związków karotenoidowych dziesięć uznawanych jest za prowitaminę A [52]. Karotenoidy znalazły zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym oraz spożywczym [10, 30].

Warzywa i owoce stanowią cenne źródło związków karotenoidowych. Zawartość karotenoidów (kompozycja i ilość) zależy m.in. od gatunku i odmiany. Znaczne ilości  $\alpha$ -karotenu stwierdzono w korzeniach marchwi, związek ten występuje również w owocach dyni, melona i grejpfruta oraz w nasionach kukurydzy [27]. Inny karotenoid –  $\beta$ -karoten – występuje m.in. w korzeniach marchwi, owocach dyni olbrzymiej

i dyni zwyczajnej oraz liściach szpinaku [44, 55]. Niewielkie ilości  $\beta$ -karotenu i luteiny stwierdzono w warzywach takich jak kapusta, sałata, seler oraz w owocach melona i brzoskwini [27].

Owoce dyni olbrzymiej mogą stanowić cenne źródło związków karotenoidowych w pożywieniu. Badania mające na celu otrzymanie nowych odmian dyni olbrzymiej o podwyższonej zawartości karotenoidów w mięszu przeznaczonych dla konsumentów indywidualnych i przemysłu przetwórczego prowadzone są w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW od wielu lat [33, 41, 42, 62, 63]. Prace te zaowocowały wprowadzeniem na rynek kilku odmian dyni olbrzymiej (Aga F1, Aura F1, Ambar i Amazonka) oraz uzyskaniem nowej odmiany WPR 2002 (Karowita, w badaniach). Prezentowany artykuł przeglądowy powstał przy okazji opracowywania pracy doktorskiej wykonanej w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii, SGGW w Warszawie [64].

## Biosynteza związków karotenoidowych

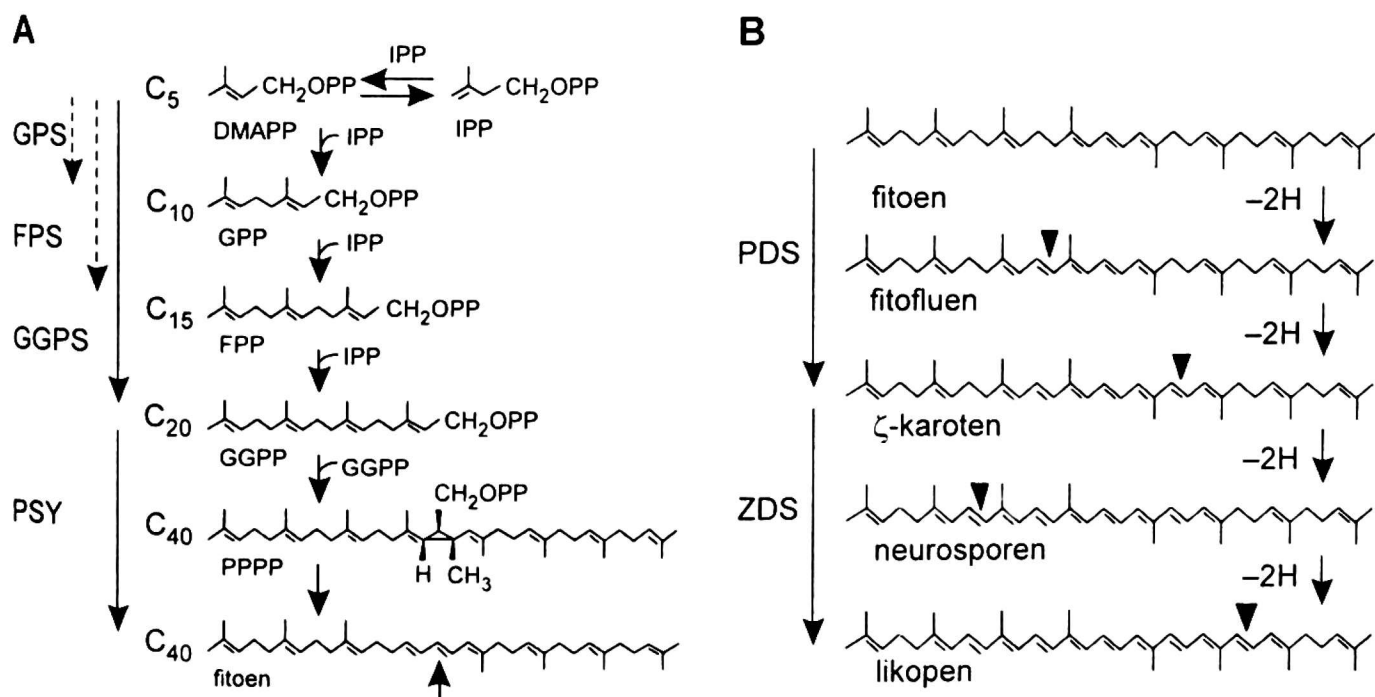
---

Związki karotenoidowe są 40-węglowymi substancjami należącymi do grupy tetraterpenów. Wspólną cechą budowy karotenoidów jest łańcuch alifatyczny z grupami metylowymi i układem sprzężonych wiązań podwójnych odpowiedzialnych za intensywność zabarwienia od żółtego do czerwonego.

Związki karotenoidowe podzielić można na cztery grupy:

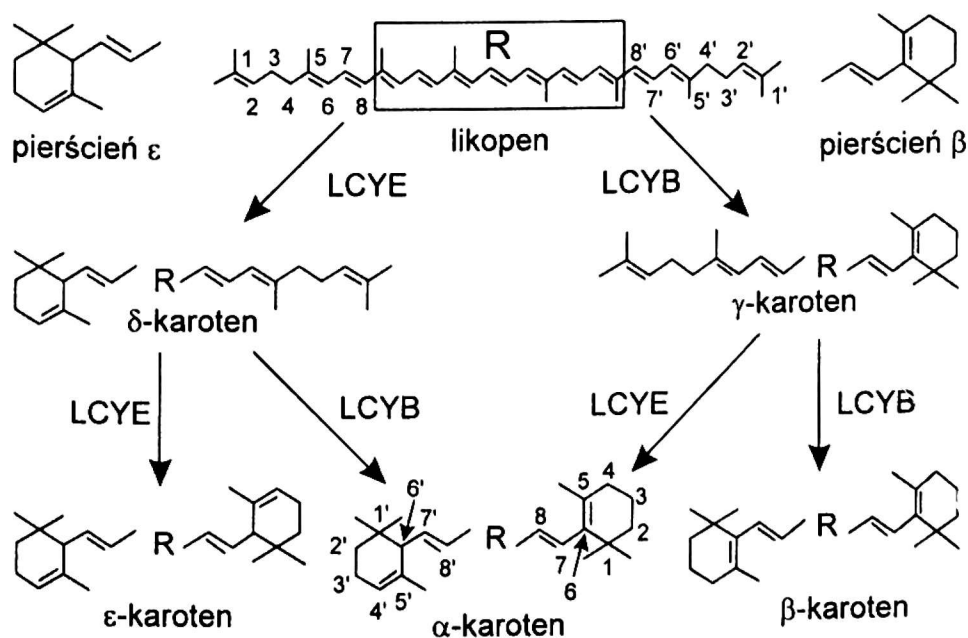
- 1) karoteny – węglowodory karotenoidowe, do których zalicza się  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -karoteny oraz likopen,
- 2) ksantofile – oksy- i hydroksypochoodne karotenów, do których należą między innymi zeaksantyna,  $\beta$ -kryptoksantyna i luteina,
- 3) estry ksantofili (z kwasami tłuszczowymi),
- 4) kwasy karotenoidowe – karboksylowe pochodne karotenów.

Prekursorem karotenoidów jest difosforan izopentenyłu (IPP), który może powstać niezależnie z dwóch związków metyloerytrytolu lub 1-deoxy-D-xylulozy. Izomeryzacja IPP do difosforanu dimetyloallilu (DMAPP), katalizowana jest przez izomerazę izopentenylo-difosforanową (IPI). Kolejne kondensacje typu „głowa-ogon” IPP z DMAPP prowadzą do powstania: difosforanu geranyłu (GPP), difosforanu farnezyłu (FPP), difosforanu digeranyłu (GGPP), difosforanu prefitoenu (PPPP) i fitoenu (rys. 1A). Pierwszym związkiem C<sub>40</sub> jest fitoen, który zawiera podwójne wiązanie przy C<sub>15</sub> w konfiguracji *cis*, w związku z czym jego łańcuch jest zagięty. Wiązanie to ulega na poziomie fitofluenu izomeryzacji do konfiguracji *trans*, po czym następują kolejne odwodowania, prowadzące do sukcesywnego powstawania wiązań podwójnych w konfiguracji *trans* (rys. 1B). Fitofluen ulega przekształceniu w  $\zeta$ -karoten następnie w neurosporen i likopen, który jest ostatnią formą otwartą.



**Rysunek 1.** Przemiany związków karotenoidowych: A) schemat powstawania cząsteczki fityenu z difosforanu izopentenyli (IPP); B) mechanizm przekształcenia fityenu w likopen; wg Cunningham i Gantt [23], zmodyfikowany

Po zmianach w wysyceniu łańcucha (lub równolegle) następuje cyklizacja końcowych jego fragmentów z utworzeniem układów o nazwie jononów (rys. 2). Polega ona na przyłączeniu protonów do C-3 (lub C-2) i wytworzeniu wiązań pomiędzy C-1 i C-6, po czym następuje odłączenie atomów wodoru od C-6, czemu towarzyszy wytworzenie β-jononu, lub od C-4, co prowadzi do powstania α-jononu. W naturze występują zarówno formy otwarte (np. likopen), jak i zawierające jeden lub dwa układy jononów. W wyniku wprowadzenia tlenu do pierścienia powstają ksantofile. Związki te są pochodnymi utlenionymi karotenów, zawierającymi grupy alkoholowe, aldehydowe, ketonowe, karboksylowe i epoksydowe. Najprostszym z nich jest luteina



**Rysunek 2.** Schemat powstawania karotenów, cyklizacja likopenu, powstanie cząsteczek β-karotenu zawierającej dwa pierścienie β-jononu oraz α-karotenu zawierającej po jednym pierścieniu β- i α-jononu; wg Cunningham i Gantt [23], zmodyfikowany

(ksantofil) będąca pochodną  $\alpha$ -karotenu. Przykładem ksantofili wywodzących się od likopenu są likoksantyna i likofil [23, 30].

Związki karotenoidowe (ksantofile) są bezpośrednimi prekursorami kwasu abscyzynowego (ABA), fitohormonu związanego z rozwojem roślin oraz ich odpowiedzią na warunki stresowe [65]. Difosforan izopentenylu (IPP) jest także prekursorem innych związków, takich jak np. chlorofile, cytokininy, gibereliny, monoterpény cykliczne, sterydy, fitoaleksyny, ubichinony i triterpény [5, 23, 60].

## Metody identyfikacji genów warunkujących zawartość karotenoidów

---

Pierwszą, stosowaną również obecnie, techniką identyfikacji genów jest metoda klasycznej analizy genetycznej polegająca na analizie segregacji badanej cechy w pokoleniu segregującym (np.  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $Bc_1$  lub  $Bc_2$ ). Osobniki tego pokolenia otrzymuje się przez krzyżowanie odpowiednio dobranych form rodzicielskich, najczęściej wykazujących wyraźne zróżnicowanie pod względem analizowanej cechy. Analiza segregacji cechy w potomstwie stanowi podstawę do określenia liczby genów oraz występujących między nimi zależności. Klasyczną analizę genetyczną zastosowano, z powodzeniem do identyfikacji genów warunkujących zawartość związków karotenoidowych, np. w owocach pomidora [61, 68] oraz w korzeniu marchwi [16, 70].

Obecnie coraz częściej stosowane są techniki biologii molekularnej, które umożliwiają nie tylko identyfikację genów, ale także poznanie ich funkcji oraz sekwencji DNA. Sposób identyfikacji genów zależy od możliwości technicznych oraz stanu wiedzy na temat danej rośliny lub genu. Klonując po raz pierwszy gen szlaku metabolicznego karotenoidów wykorzystano fakt podobieństwa szlaków metabolicznych tych związków występujących u roślin i cjanobakterii. Gen bakteryjnej desaturazy fitoenu (Pds), izolowany z mutanta *Synechococcus* sp. PCC7942 odpornego na norflurazon, użyto do izolacji roślinnego ortologa [26]. Tą samą metodę, zastosowano z powodzeniem, do klonowania genu  $\beta$ -cyklazy likopenu [21]. Technikę wyciszania genów wykorzystano do identyfikacji genu syntazy fitoenu (Psy) w transgenicznych roślinach pomidora [11]. Klonowanie oparte na mapowaniu wykorzystano z powodzeniem u pomidora, dla którego wcześniej zidentyfikowano wiele mutantów o zróżnicowanym szlaku biosyntezy związków karotenoidowych [26]. W celu identyfikacji genów szlaku metabolicznego karotenoidów opracowano unikalną technikę funkcjonalnej komplementacji (color complementation), wykorzystującą zmodyfikowane genetycznie szczepy *E. coli* [39].

Analiza cech ilościowych (Quantitative Trait Loci – QTL) związanych z akumulacją związków karotenoidowych, w której wykorzystuje się markery molekularne, staje się skutecznym narzędziem mapowania kluczowych etapów szlaku metabolicznego karotenoidów. Technikę tę zastosowano np. w badaniach nad pomidorem i papryką [20, 28, 54, 67].

## Geny identyfikowane przy użyciu klasycznej analizy genetycznej

Pierwsze wyniki dotyczące sposobu dziedziczenia zawartości  $\beta$ -karotenu w owocach pomidora opublikowali w 1950 roku Lincoln i Porter [61, 73]. Opisali oni jeden gen dominujący  $B$ , pochodzący z *L. hirsutum*. Po jego wprowadzeniu do formy uprawnej *L. esculentum* obserwowano akumulację dużych ilości  $\beta$ -karotenu kosztem likopenu, w wyniku czego owoce przybierały barwę pomarańczową. Zmiany w proporcji  $\beta$ -karotenu i likopenu, w owocach pomidora analizowali także Tomes i in. [68]. Zidentyfikowali oni dwa geny,  $B$  i  $Mo_B$  warunkujące zawartość  $\beta$ -karotenu w owocach. Pierwszy, analogiczny do genu identyfikowanego przez Lincolna i Pottera, warunkował akumulację  $\beta$ -karotenu. Drugi, gen  $Mo_B$ , dziedziczony niezależnie od genu  $B$ , modyfikował stosunek zawartości likopenu i  $\beta$ -karotenu. W roślinach o genotypie  $B/- Mo_B/-$   $\beta$ -karoten stanowił 90% wszystkich związków karotenoidowych. W przypadku roślin o genotypie  $B/- Mo_B+/-$  likopen i  $\beta$ -karoten występowały w równych ilościach.

Tomes i Mark [69] badali zależność między genami  $Del$  i  $B$ , odpowiedzialnymi za zmiany składu karotenoidów w owocach pomidora. Analizując pokolenie  $F_2$  (uzyskane z krzyżowania form  $\beta \times \delta$ ) stwierdzili, że obecność samego genu  $B$  powoduje znaczny wzrost zawartości karotenoidów z pierścieniem  $\beta$ -jononu kosztem likopenu. Obecność samego genu  $Del$  powodowała powstawanie karotenoidów zawierających pierścień  $\alpha$ -jononu, również kosztem likopenu. W owocach roślin o genotypie  $B/- Del/-$  ilość związków zawierających pierścień  $\alpha$ -jononu była mniejsza w porównaniu z roślinami o genotypie  $+/+ Del/-$ .

Stommel i Haynes [61], analizowali sposób dziedziczenia zawartości  $\beta$ -karotenu w owocach dzikiego pomidora, *Lycopersicon cheesmanii*. Osobniki pokoleń:  $F_1$ ,  $F_2$  i  $Bc_1$ , uzyskano w wyniku krzyżowania *L. esculentum* cv. Floradade  $\times$  *L. cheesmanii* f. *minor* La 317. Pomarańczowe zabarwienie owoców dzikiego pomidora *L. cheesmanii* spowodowane było dużą zawartością  $\beta$ -karotenu, natomiast czerwona barwa owoców gatunku uprawnego *L. esculentum* wynikała z dużej zawartości likopenu przy jednocześnie, niewielkiej ilości  $\beta$ -karotenu. Otrzymane wyniki wskazują, że wysoka zawartość  $\beta$ -karotenu i jednocześnie pomarańczowa barwa owoców, warunkowana jest allelem dominującym jednego genu.

Umiel i Gabelman [70] obserwowali zróżnicowanie zawartości związków karotenoidowych w korzeniach marchwi otrzymanych w wyniku krzyżowania form o pomarańczowym i czerwonym zabarwieniu korzeni (pokolenie  $F_2$ ), będące wynikiem segregacji dwóch genów. Allel dominujący ( $A$ ) pierwszego z nich, pochodzący od rodzica o pomarańczowym zabarwieniu korzeni, odpowiedzialny jest za akumulację  $\alpha$ -karotenu. Natomiast allel dominujący ( $L$ ) drugiego genu, pochodzący od rodzica o czerwonym zabarwieniu korzeni, warunkuje akumulację likopenu.

Buishand i Gabelman [16], analizowali potomstwo uzyskane w wyniku krzyżowania form marchwi o zróżnicowanym zabarwieniu korzeni (czerwone × żółte, czerwone × białe). W potomstwie otrzymanym z krzyżowania form czerwone × białe autorzy stwierdzili segregację trzech genów epistatycznych ( $Y$ ,  $Y_1$  i  $Y_2$ ). Dla drugiej populacji (korzenie czerwone × żółte) opisano trzy główne geny warunkujące zawartość karotenoidów gen  $Y_2$  hamujący syntezę karotenoidów,  $L$  stymulujący syntezę likopenu oraz gen  $A_1$ , którego funkcja nie jest jednoznaczna.

Analiza potomstwa otrzymanego w wyniku skrzyżowania form manioku o zróżnicowanej zawartości związków karotenoidowych, charakteryzujących się żółtym i białym zabarwieniem bulw wykazała, że zawartość karotenu w bulwach warunkowana jest dwoma genami [29]. Geny te ( $Y_1$  i  $Y_2$ ) regulują odpowiednio transport karotenoidów do bulw i akumulację związków w bulwach.

Barwa dojrzałych owoców papryki jest efektem akumulacji związków karotenoidowych. W wyniku skrzyżowania linii izogenicznych papryki, 'Lamuro' (owoce czerwone) × 'Lamuga' (owoce żółte), Lefebvere i in. [35] uzyskali pokolenie segregujące. Segregacja osobników pod względem barwy owoców (3 : 1, czerwone : żółte) wskazywała na jednogenowy sposób dziedziczenia cechy. Analizy molekularne wykonane dla roślin o czerwonej i żółtej barwie owoców wykazały, odpowiednio obecność i brak fragmentu DNA kodującego syntazę kapsantyny i kapsorubiny (CCS). Enzym ten związany jest z akumulacją barwników w owocach papryki.

Niewiele wiadomo na temat dziedziczenia zawartości związków karotenoidowych w owocach dyni. Wyniki krzyżowań wykonanych między różnymi formami dyni zwyczajnej (*Cucurbita pepo* L.) wykazały, że geny  $B$  i  $L_2$  opisane wcześniej jako geny warunkujące barwę owoców, wpływają na zawartość związków karotenoidowych w owocach [45]. Zmianę zawartości związków karotenoidowych obserwowano również analizując segreganty pod względem genów:  $B$ ,  $Y$ ,  $L_1$  i  $L_2$  [44, 45, 55]. Jednakże funkcje tych genów oraz ich współdziałanie nie zostało dokładnie określone.

## Geny identyfikowane przy użyciu technik biologii molekularnej

Analizy bakterii, grzybów oraz roślin wykazały, że powstanie likopenu z fitoenu jest w przypadku bakterii i grzybów katalizowane przez jeden enzym będący produktem genu *CrtI* natomiast u roślin przez dwa enzymy desaturazę fitoenu (PDS) i desaturazę  $\zeta$ -karotenu (ZDS), warunkowane genami odpowiednio *Pds* i *Zds* (rys. 1B) [23, 26].

Techniki biologii molekularnej zastosowano z powodzeniem do identyfikacji genów kodujących enzymy szlaku metabolicznego karotenoidów u roślin. Gen izomerazy IPP (*Ipi1*) po raz pierwszy zidentyfikowano dla *Clarkia bewerii* [12]. Dwa geny

kodujące izomerazę IPP (*Ipi1*, *Ipi2*) zidentyfikowano też u *Arabidopsis thaliana* i sałaty [23].

Kolejny etap przemian związków karotenoidowych katalizowany jest przez syntazę GGPP (rys. 1A). Geny kodujące ten enzym opisano m.in. dla: papryki [6] i rzodkiewnika [57, 58]. U rzodkiewnika zidentyfikowano 12 genów wykazujących podobieństwo do genu *Ggps*, nie jest jednak dokładnie wiadomo, które z nich są odpowiedzialne za tworzenie GGPP w plastydach [26]. Obecność produktów genów *GGPS3* i *GGPS1* obserwowano w chloroplastach rzodkiewnika, w mitochondriach stwierdzono obecność enzymu kodowanego przez gen *GGPS6*, natomiast produkty genów *GGPS2* i *GPS4* obserwowano w błonach retikulum endoplazmatycznego [43].

Syntaza fitoenu (PSY) jest enzymem odpowiedzialnym za przemianę GGPP w fitoenu (rys. 1A). Gen kodujący PSY, ulegający ekspresji w kwiatach zidentyfikowano dla narcyza [56]. Karvouni i in. [31] opisali fragment cDNA kodujący syntazę fitoenu, gen ten ulegał ekspresji w owocach melona. W roślinach pomidora zidentyfikowano dwa geny: *psy1* – odpowiedzialny za tworzenie się fitoenu w chloroplastach [7] oraz *psy2* – odpowiedzialny za przemiany karotenoidów w liściach [8]. Dwa geny kodujące PSY zidentyfikowano u tytoniu [18].

W roślinach fitoenu przekształcany jest w likopen w wyniku działania dwóch enzymów PDS i ZDS (rys. 1b). Geny *pds* i *zds* kodujące roślinne desaturazy zidentyfikowano dla: tytoniu [18] i rzodkiewnika [9]. Gen *pds* został zidentyfikowany i opisany m.in. u kukurydzy [36], narcyza [2] oraz soi [7].

Cyklizacja likopenu to kolejny etap przemian karotenoidów (rys. 2). Tworzenie się cząsteczki  $\beta$ -karotenu jest wynikiem działania produktu jednego genu ( $\beta$ -cyklazy). Gen *CrtL*, kodujący  $\beta$ -cyklazę likopenu został zidentyfikowany i opisany u pomidora oraz tytoniu [46]. Sekwencje aminokwasowe obu cyklaz wykazywały wysoki stopień podobieństwa do sekwencji analogicznych cyklaz bakteryjnych. Drugi typ cyklizacji katalizowany jest przez  $\epsilon$ -cyklazę likopenu. Gen *Lycb* kodujący  $\epsilon$ -cyklazę likopenu został opisany u sałaty [23]. Kodowany przez niego enzym okazał się bliskim homologiem (80% podobieństwa sekwencji aminokwasowej) enzymu występującego u rzodkiewnika. W wyniku działania  $\epsilon$ -cyklazy likopenu w roślinach sałaty powstaje laktukaksantyna o dwóch pierścieniach  $\epsilon$ . Produkt działania genu *Lycb* opisanego u rzodkiewnika katalizuje tworzenie się tylko jednego pierścienia  $\epsilon$  na jednym z końców cząsteczki likopenu. Jeżeli na drugim końcu nastąpi cyklizacja katalizowana przez  $\beta$ -cyklazę likopenu powstaje  $\alpha$ -karoten [22]. Bouvier i in. [13] opisali gen syntazy kapsantyny i kapsorubiny (CCS) u papryki. Sekwencja aminokwasowa CCS wykazywała duże podobieństwo do sekwencji  $\beta$ -cyklazy, a produkt genu charakteryzował się podobną aktywnością do  $\beta$ -cyklazy.

W wyniku następnych przekształceń karotenów powstają ksantofile. Geny kodujące enzymy szlaku przemian ksantofili opisano dla wielu roślin. Kim i in. [32] zidentyfikowali geny *CHX1* i *CHX2* kodujące hydroksylazę  $\beta$ -karotenu u cytrusa.

Obecność transkryptu stwierdzono w liściach, owocach i kwiatach. Transkrypcja podczas rozwoju liści i owoców utrzymuje się na stałym poziomie, co według autorów wskazuje na potranskrypcyjny mechanizm regulacji akumulacji  $\beta$ -kryptoksantyny. Al-Babili i in. [3] opisali gen kodujący syntazę neoksantyny u *Solanum tuberosum*. Produkt genu wykazywał 89,6% podobieństwa sekwencji aminokwasowej do syntazy kapsantyny i kapsorubiny pochodzącej z papryki. Gen, kodujący NSY zidentyfikowano również u pomidora [15].

## Markery cech ilościowych – QTL

Szybki rozwój map sprzężeń opartych na markerach molekularnych, opracowanych dla wielu gatunków, umożliwia identyfikację regionów chromosomów zawierających loci cech ilościowych (QTL) [19]. Poprzez dokładną analizę ciągłej zmienności fenotypowej, charakterystycznej dla rozkładu cechy warunkowanej wielogenowo, badania loci cech ilościowych umożliwiają: wnikliwą analizę dziedziczenia tych cech, analizę organizacji genomu oraz przyczyniają się do rozwoju metod selekcji z użyciem markerów molekularnych (Marker Assisted Selection – MAS). Prawidłowa interpretacja otrzymanych QTL jest wielokrotnie utrudniona ze względu na braki w znajomości genetycznych, biochemicznych i fizjologicznych podstaw ekspresji badanych genów [19]. Dlatego też znajomość podstaw genetycznych szlaków biochemicznych warunkujących ważne ekonomicznie cechy jest niezbędna przy prowadzeniu badań tego typu.

Zwykle analizy QTL polegają na ocenie fenotypowej oraz charakterystyce molekularnej odpowiednio dobranej populacji wykazującej zmienność genetyczną pod względem analizowanej cechy [66, 72]. W analizach QTL wykorzystuje się techniki molekularne, takie jak RAPD [67], RFLP [19, 20] oraz AFLP [28, 54].

Chen i in. [20] poszukiwali QTL zawartości likopenu w owocach pomidora. Badania prowadzono na roślinach pokolenia Bc1 otrzymanym po krzyżowaniu wysokocewnych linii NC84173 (*Lycopersicon esculentum* MILL.) z LA722 (*Lycopersicon pennellifolium* MILL.). Zidentyfikowano osiem QTL warunkujących zawartość likopenu w owocach. Siedem z nich zlokalizowana była na chromosomie pierwszym, jeden warunkujący wzrost zawartości likopenu, na chromosomie piątym.

Thorup i in. [67] analizowali QTL skorelowane z zawartością związków karotenoidowych u papryki. Do mapowania użyli 75 roślin pokolenia F<sub>2</sub>, otrzymanych w wyniku skrzyżowania *Capsicum annuum* cv. NuMexRNaky z *Capsicum annuum* PI 159234. W reakcji PCR użyto starterów, o sekwencjach opracowanych wcześniej dla genów: *Ggpps*, *Psy*, *Pds*, *Zds* i *Ze* pochodzących z banku genów. W wyniku tych analiz zidentyfikowano QTL dla: syntazy GGPP (chromosom 4), syntazy fitoenu (chromosom 4), desaturazy fitoenu (chromosom 3), desaturazy  $\zeta$ -karotenu (chromo-



som 1), cyklaz likopenu (chromosom 9 i 10), hydroksylazy  $\beta$ -karotenu (chromosom 3 i 6), epoksydazy zeaksantyny (chromosom 2) oraz syntazy kapsaicyny (chromosom 6).

Huh i in. [28] mapowali QTL warunkujące zawartość barwników karotenoidowych w dojrzałych owocach papryki (*Capsicum* spp.). Analizy QTL wykonano na pokoleniu  $F_2$ , liczącym 103 osobniki, otrzymanym z krzyżowania *Capsicum annuum* cv TF68 (owoce czerwone) z *Capsicum chinense* cv Habanero (owoce pomarańczowe). Otrzymane wyniki wskazują, że lokus *Psy* (kodujący syntazę fitoenu) może być odpowiedzialny za zawartość karotenoidów w owocach oraz za różnice w barwie między owocami TF68 i Habanero. Lokus ten nie jest warunkowany przez QTL.

Santos i Simon [54] poszukiwali QTL związanych z zawartością likopenu oraz karotenoidów stanowiących prowitaminę A w korzeniach marchwi. W doświadczeniach użyto roślin pokolenia  $F_2$  należących do dwóch populacji [B493 (uprawna, pomarańczowa)  $\times$  QAL (dzika, biała) oraz Brasilia (uprawna, pomarańczowa)  $\times$  HCM (uprawna, ciemno-pomarańczowa)] liczących odpowiednio 160 oraz 180 osobników. Do stworzenia grup sprzężeń dla obu populacji wykorzystano odpowiednio 250 i 287 markerów molekularnych. Dla pierwszej populacji uzyskano jeden marker skorelowany z cechą zawartości związków karotenoidowych. W przypadku drugiej populacji otrzymano cztery, osiem, trzy, jeden i pięć potencjalnych QTL związanych z akumulacją odpowiednio:  $\zeta$ -karotenu,  $\alpha$ -karotenu,  $\beta$ -karotenu, likopenu i fitoenu. QTL warunkujące zawartość karotenoidów znajdowały się w dwóch grupach sprzężeń: trzeciej ( $\zeta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, likopen) i dziewiątej (fitoen). Autorzy uważają, że takie rozmieszczenie QTL sugeruje, że w trakcie ewolucji geny należące do jednego szlaku metabolicznego utrzymywane są w jednej grupie i nie jest łatwo rozdzielić je w wyniku rekombinacji.

## Regulacja biosyntezy związków karotenoidowych

Sposób regulacji przemian związków karotenoidowych w owocach i kwiatach różni się od systemu funkcjonującego w tkankach zielonych. Obszerne badania przeprowadzone na licznych mutantach pomidora o zróżnicowanej barwie owoców sprawiły, że przemiany karotenoidów zachodzące w owocach tej rośliny stanowią system modelowy dla innych tkanek zawierających chromoplasty [26].

W zielonych owocach i liściach pomidora skład związków karotenoidowych jest podobny. Zmiana barwy z zielonej na pomarańczową spowodowana jest akumulacją likopenu w wyniku zwiększenia syntezy enzymów szlaku metabolizmu karotenoidów. Udokumentowano wysoki poziom ekspresji genów kodujących enzymy środkowej części szlaku przemian izoprenoidów we wczesnych etapach rozwoju owoców [38]. Poziom mRNA genów, kodujących enzymy (PSY, PDS) katalizujące przemiany prowadzące do powstania likopenu, wzrasta 10–20-krotnie w stadium owoców zapalnych (różowa barwa owocu) [47]. W tym samym czasie mRNA obu cyklaz likopenu, *Lyc-b* (*CrtL-b*) i *Lyc-e* (*CrtL-e*), zanika [46, 49]. Hipotezę, według której główną przyczyną akumulacji likopenu jest zróżnicowana ekspresja genów, potwierdzają wy-

niki otrzymane dla mutantów *Delta* [49] i *Beta* [50]. Akumulacja  $\delta$ -karotenu w owocach mutantu *Delta* była wynikiem podwyższonego poziomu transkrypcji genu *Crt-L-e* (*Lyc-e*) natomiast synteza  $\beta$ -karotenu w owocach mutantu *Beta* była efektem transkrypcji genu drugiej cykazy likopenu, *Cyc-b* (*B*). Podobny mechanizm regulacji ekspresji genów stwierdzono u: papryki [34] i melona [1]. Bouvier i in. [14] stwierdzili wzmożoną ekspresję genów szlaku metabolicznego karotenoidów, w owocach papryki, w następstwie stresu oksydacyjnego, który ułatwiał syntezę karotenoidów podczas różnicowania się chromoplastów.

Wydaje się, że regulacja biosyntezy karotenoidów na poziomie transkrypcji jest również głównym mechanizmem regulującym zawartość tych związków w kwiatach pomidora [46, 49, 50] i narcyza (*Narcissus pseudonarcissus*) [56].

Stosunkowo niewiele wiadomo jest na temat regulacji przemian związków karotenoidowych w liściach. W przypadku etiolowanych roślin obserwuje się ekspresję genów szlaku metabolizmu karotenoidów, jednakże biosynteza karotenoidów warunkowana jest działaniem światła [26]. Albrecht i Sandmann [4] obserwowali stymulujący wpływ światła na wzrost aktywności PSY (syntaza fitoenu) w etioplastach kukurydzy. W rozwijających się siewkach gorczycy (*Sinapis alba* L.) stwierdzono wzrost poziomu mRNA genu *Psy* pod wpływem światła, podczas gdy poziom mRNA genów *Pds* i *Ggps* pozostał niezmienny [37]. U wielu gatunków roślin, pod wpływem działania intensywnego światła, wzrasta całkowita zawartość ksantofili, zmienia się także proporcja między zawartością luteiny i ksantofili takich jak: zeaksantyna, anteraksantyna i wiolaksantyna [26]. Pięciokrotny wzrost proporcji między poziomem mRNA genów *Lyc-b* i *Lyc-e* obserwowano w liściach *Arabidopsis* i pomidora w efekcie zmiany warunków oświetlenia z niskiej intensywności światła na wysoką [26].

## Inżynieria genetyczna

Szybki rozwój technik inżynierii genetycznej, umożliwiający przenoszenie genów między różnymi gatunkami a nawet królestwami (rośliny, grzyby, bakterie), pozwolił nie tylko na modyfikację zawartości karotenoidów już istniejących w roślinie [59, 48, 51], ale także na indukcję produkcji nowych, nie występujących wcześniej w roślinie związków [71]. Interesująca wydaje się też możliwość modyfikacji genetycznej prostych organizmów takich jak bakterie [53] oraz drożdże [10] w celu wykorzystania ich jako źródła naturalnych karotenoidów.

W literaturze znaleźć można wiele informacji na temat zmian zawartości związków karotenoidowych będących efektem modyfikacji genetycznych roślin pomidora. Konstytutywna ekspresja genu bakteryjnej desaturazy fitoenu (*ctr1*), wprowadzonego pod kontrolą promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora, spowodowała trzykrotny wzrost zawartości  $\beta$ -karotenu w owocach, ale zmniejszyła o połowę zawartość wszystkich karotenoidów [48]. W wyniku ekspresji natywnego genu *Lcy-b*, w owocach pomidora, uzyskano 3,8-krotny wzrost zawartości  $\beta$ -karotenu podczas gdy całkowita zawartość związków karotenoidowych pozostała niezmienną bądź

też uległa nieznacznemu podwyższeniu [51]. Znaczący wzrost zawartości:  $\beta$ -karotenu,  $\beta$ -kryptoksantyny oraz zeaksantyny w owocach pomidora zaobserwowano w efekcie nadekspresji genów kodujących  $\beta$ -cyklazę likopenu (*b-Lcy*) oraz hydroksylazę  $\beta$ -karotenu (*b-Chy*) [51]. Jest to pierwszy przykład udanego wprowadzenia genów warunkujących zawartość ksantofili w owocach pomidora.

Syntaza fitoenu to enzym katalizujący pierwszy etap syntezy związków karotenoidowych, dlatego też stanowi priorytetowy cel manipulacji genetycznych. Konstytutywna ekspresja cDNA kodującego *Psy*, w transgenicznym pomidorze, spowodowała zmniejszenie wzrostu roślin, skarlenie było wynikiem przekierowania GGPP (difosforanu digeranylu) z szlaku metabolizmu giberelin na ścieżkę przemian karotenoidów [24]. Produkcja likopenu, w rozwijających się owocach roślin transgenicznych, rozpoczynała się wcześniej jednakże końcowa zawartość tego związku była niższa w porównaniu do roślin nie poddanych transformacji. Dwukrotny wzrost zawartości związków karotenoidowych ogółem w owocach pomidora, uzyskano w wyniku ekspresji w owocach genu (*crtB*) bakteryjnej syntazy fitoenu [6]. Ten sam gen *crtB*, pochodzący z *Erwinia*, wykorzystano z powodzeniem do transformacji rzepaku (*Brassica napus*) [59]. Organospecyficzna ekspresja genu syntazy fitoenu spowodowała 50-krotny wzrost zawartości związków karotenoidowych (głównie  $\alpha$ -i  $\beta$ -karotenu) w dojrzałych nasionach. Zawartość związków karotenoidowych w nasionach wynosiła  $1600 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  świeżej masy.

Jednym z najbardziej spektakularnych osiągnięć inżynierii karotenoidów jest uzyskanie transgenicznych roślin ryżu mających zdolność akumulacji karotenoidów w bielmie nasion [17, 71]. W dojrzałym bielmie ryżu stwierdzono obecność GGPP (difosforan digeranylu), nie odnotowano jednak występowania związków karotenoidowych. Stosując technikę transformacji przy użyciu *Agrobacterium*, do japońskiej odmiany uprawnej ryżu, przeniesiono geny: *Psy* i *Lycb*, pochodzące z narcyza oraz bakteryjny gen *crtI*. Obecność enzymów szlaku metabolicznego karotenoidów kodowanych przez wprowadzone geny umożliwiła przekształcenie GGPP do  $\beta$ -karotenu. Jedynie ekspresja wszystkich trzech genów warunkowała powstawanie znacznej ilości  $\beta$ -karotenu w bielmie. Maksymalna zawartość karotenoidów w bielmie transformantów wynosiła  $1,6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Warto również wspomnieć o wynikach badań nad transformacją tytoniu przy użyciu genu *CtrO*, pochodzącego z glonu *Haemaococcus pluvialis*, kodującego jeden z enzymów warunkujących powstawanie pochodnych ketonowych karotenoidów [40]. W efekcie ekspresji genu *CtrO* stwierdzono akumulację dużych ilości pochodnych ketonowych, w tym astaksantyny, w chromoplastach nektarników. Zmiany barwy tych tkanek spowodowały zmianę barwy kwiatów tytoniu z żółtej na czerwoną.

- [1] Aggelis A., John I., Karvouni Z., Grierson D. 1997. Characterizations of two cDNA clones for mRNA expressed during ripening of melon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant. Mol. Biol.* 33: 313–322.
- [2] Al-Babili S., V. Linting J., Haubruck H., Beyer P. 1996. A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplast is Hsp 70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *The Plant Journal* 9(5): 601–612.
- [3] Al-Babili S., Hugueney P., Scheldz M., Welsh R., Frohnmeyer H., Laule O., Beyer P. 2000. Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Letters* 485: 168–172.
- [4] Albrecht M., Sandmann G. 1994. Light-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increased activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant Physiology* 105: 529–534.
- [5] Arigoni D., Sagner S., Latzel C., Eisenreich W., Bacher A., Zenk M. 1997. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10600–10605.
- [6] Badillo A., Steppuhn J., Deruere J., Camara B., Kuntz M. 1995. Structure of functional geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Capsicum annuum*. *Plant. Mol. Biol.* 27: 425–428.
- [7] Bartley G.E., Viitanen P.V., Pecker I., Chamovitz D., Hirschberg J., Scolnik P.A. 1991. Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6532–6536.
- [8] Bartley G.E., Scolnik P.A. 1993. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *psy2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J. Biol. Chem.* 268: 25718–25721.
- [9] Bartley G.E., Scolnik P.A. 1993. Phytoene desaturase from *Arabidopsis*. *The Plant Physiology* 103: 1475.
- [10] Bartley G.E., Scolnik P.A. 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attractant and human health. *The Plant Cell* 7: 1027–1038.
- [11] Bird C.R., Ray J.A., Fletcher J.D., Boniwell J.M., Bird A.S., Teulieres C., Blain I., Bramblay P.M., Schuch W. 1991. Using antisense RNA to study gene function: inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. *Bio/Technology* 9: 635–639.
- [12] Blanc V. M., Pichersky E. 1995. Nucleotide sequence of a *Clarkia bewerii* cDNA clone of *Ipil*, a gene encoding isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant Physiology* 108: 855–856.
- [13] Bouvier F., Hugueney P., D'harlingue A., Kuntz M., Camara B. 1994. Xanthophyll biosynthesis in chromoplast: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoids into ketocarotenoids. *The Plant Journal* 6: 45–54.
- [14] Bouvier F., Backhaus R.A., Camara B. 1998. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 273: 30651–30659.

- [16] Buishand J.G., Gabelman W.H. 1980. Studies of the inheritance of root color and carotenoid content in red x yellow and red x white crosses of carrot, *Daucus carota* L. *Euphytica* 29: 241–260.
- [17] Burkhardt P.K., Beyer P., Wünn J., Klöti A., Armstrong G.A., Schledz M., Von Lintig J., Potrykus I. 1997. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Nacissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamine A biosynthesis. *The Plant Journal* 11(5): 1071–1078.
- [18] Busch M., Seuter A., Rüdiger H. 2002. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *The Plant Physiology* 128: 439–453.
- [19] Byrne P.F., Mc Mullen M.D., Snook M.E., Musket T.A., Theuri J.M., Widstrom N.W., Wiseman B.R., Coe E.H. 1996. Quantitative trait loci and metabolic pathways: Genetic control of the concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8022–8025.
- [20] Chen F.Q., Foolad M.R., Hyman J., St. Clair D.A., Beelman R.B. 1999. Mapping of QTLs for lycopene and other fruit traits in a *Lycopersicon esculentum* × *L. pimpinellifolium* cross and comparison of QTLs across tomato species. *Molecular Breeding* 5: 283–299.
- [21] Cunningham F.X., Chamovitz D., Missava N., Gantt E., Hirschberg J. 1993. Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of  $\beta$ -carotene. *FEBS Lett.* 328: 130–138.
- [22] Cunningham F.X., Pogson B., Sun Z.R., McDonald K.A., Della Penna D., Gantt E. 1996. Functional analysis of  $\beta$  and  $\epsilon$  lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell* 8: 1613–1626.
- [23] Cunningham F.X., Gantt E. 1998. Carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49: 557–583.
- [24] Fray R.G., Wallace A., Fraser P.D., Valero D., Hedden P., Bramley P.M., Grierson D. 1995. Constitutive expression of fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes caused dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant Journal* 8: 693–701.
- [25] Heber D. 2000. Colorful cancer prevention:  $\alpha$ -carotene, lycopene and lung cancer. *American Journal of Clinical Nutrition* 72: 901–902.
- [26] Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 210–218.
- [27] Holden J.M., Eldrige A.L., Beecher G.R., Buzzard I.M., Bhagwat S.A., Davis C.S., Douglas L.W., Gebhardt S.E., Haytowitz D.B., Schakel S. 1999. Carotenoid content of U.S. foods: An update of the database. *J. Food Comp. Anal.* 12: 169–196.
- [28] Huh J.H., Kang B.C., Nahm S.H., Kim S., Ha K.S., Lee M.H., Kim B.D. 2001. A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* ssp.). *Theor. Appl. Genet.* 102: 524–530.
- [29] Iglesias C., Mayer J., Chavez L., Calle F. 1997. Genetic potential and stability of carotene content in cassava roots. *Euphytica* 94: 367–373.
- [30] Isler O. 1971. Carotenoids as natural coloring matters. W: Carotenoids. Birkhauser Verlag Basel und Stuttgart: 12–55.
- [31] Karvouni Z., John I., Taylor J.E., Watson C.F., Turner A.J., Grierson D. 1995. Isolation and characterization of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Molecular Biology* 27: 1153–1162.
- [32] Kim I., Ko K., Kim C., Chung K. 2001. Isolation and characterization of cDNAs encoding  $\beta$ -carotene hydroxylase in Citrus. *The Plant Science* 161: 1005–1010.
- [33] Kubicki B., Walczak B. 1976. Variation and heritability of  $\beta$ -carotene content on some cultivars of the *Cucurbita* species. *Genet. Pol.* 17: 531–544.

- [34] Kuntz M., Römer S., Suire C., Huguency P., Weil J.H., Schantz R., Camara B. 1992. Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *The Plant Journal* 2: 25–34.
- [35] Lefebvre V., Badillo A., Daubeze A.M., Balattes A., Ferriere C., Kuntz M., Camara B., Palloix A. 1998. Genetic linkage between the y locus and the capsanthin-capsorubin synthase gene: a discriminating tool of red and yellow fruited peppers. W: materiałach z X Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant, 1998-Avignon, France: 253–256.
- [36] Li Z.H., Matthews P.D., Burr B., Wurtzel E.T. 1996. Cloning and characterization of maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Molecular Biology* 30: 269–279.
- [37] Lintig J., Welsch R., Bonk M., Giuliano G., Batschauer A., Kleining H. 1997. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Journal* 12: 625–634.
- [38] Lois L.M., Rodriguez-Concepcion M., Gallego F., Campos N., Boronat A. 2000. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant Journal* 22: 503–513.
- [39] Lotan T., Hirschberg J. 1995. Cloning and expression in *Escherichia coli* of gene encoding b-C-4-oxygenase that converts  $\beta$ -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Lett.* 364: 125–128.
- [40] Mann V., Harker M., Pecker I., Hirschberg J. 2000. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat. Biotechnol.* 18: 888–892.
- [41] Niemirowicz-Szczytt K., Korzeniewska A. 1992. Nowe półkrzaczaste odmiany dyni olbrzymiej. *Ogrodnictwo* 2: 20–21.
- [42] Niemirowicz-Szczytt K., Korzeniewska A., Gałęcka T. 1996. Nowe odmiany dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima* DUCH.) o podwyższonej zawartości suchej masy, białka i karotenoidów. Materiały Konferencyjne, Zjazdu Hodowców Roślin Ogrodniczych, Kraków 1996: 48–51.
- [43] Okada K., Saito T., Nakagawa T., Kawamukai M., Kamiya Y. 2000. Five geranylgeranyl diphosphate synthase expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *The Plant Physiology* 122: 1045–1056.
- [44] Paris H. S. 1994. Genetic analysis and breeding of pumpkin and squash for high carotene content. W: Modern methods in plant analysis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 16: 94–115.
- [45] Paris H. S., Burger Y. 1989. Complementary genes for fruit striping in summer squash. *J. Hered.* 80: 490–493.
- [46] Pecker I., Gabbay R., Cunningham F.X., Hirschberg J. 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 30: 807–819.
- [47] Pecker I., Chamovitz D., Linden H., Sandmann G., Hirschberg J. 2000. A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to  $\gamma$ -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 4962–4966.
- [48] Römer S., Fraser P.D., Kiano J.W., Shipton C.A., Misawa N., Schuch W., Bramley P.M. 2000. Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat. Biotechnol.* 18: 666–669.
- [49] Ronen G., Cohen M., Zamir D., Hirschberg J. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant delta. *Plant Journal* 17: 341–351.

- [50] Ronen G., Carmel-Goren L., Zamir D., Hirschberg J. 2000. An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chloroplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11102–11107.
- [51] Rosati C., Aquilani R., Dharmapuri S., Pallara P., Marusic C., Tavazza R., Bouvier F., Camara B., Giuliano G. 2000. Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant Journal* 24: 413–420.
- [52] Rutkowska U. 1981. Witamina A i prowitamina A. W: Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej żywności. PZWL Warszawa: 302–331.
- [53] Sandmann G. 2001. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends in Plant Science* 6(1): 14–17.
- [54] Santos C.A.F., Simon P.W. 2002. QTL analyses reveal clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenes and lycopene in carrot roots. *Molecular Genetics and Genomics* 286: 122–129.
- [55] Schaffer A.A., Boyer C.D. 1984. Effect of gene B on fruit development in *Cucurbita pepo*. *Am. Soc. Hortic. Sci.* 109: 432–437.
- [56] Schledz M., Al-Babili S., Von Liting J., Haubruck H., Rabbani S., Kleining H., Beyer P. 1996. Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant Journal* 10: 781–792.
- [57] Scolnik P.A., Bartley E. 1995. Nucleotide sequence of putative geranylgeranyl pyrophosphate synthase (Gen Bank accession no. L40577) from *Arabidopsis* (PGR 95-018). *Plant Physiology* 108: 1343.
- [58] Scolnik P.A., Bartley E. 1996. Two more members of Arabidopsis geranylgeranyl pyrophosphate synthase family (PGR 96-014). *Plant Physiology* 110: 1435.
- [59] Shewmaker C.K., Sheehy J.A., Daley M., Colburn S., Ke D.Y. 1999. Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoid and other metabolic effects. *The Plant Journal* 20: 401–412.
- [60] Smith M.W., Yamaguchi S., Ait-Ali T., Kamiya Y. 1998. The first step of gibberellin biosynthesis in pumpkin is catalyzed by at least two copalyl diphosphate synthases encoded by differentially regulated genes. *Plant Physiology* 118: 1411–1419.
- [61] Stommel J. R., Haynes K. G. 1994. Inheritance of beta carotene content in the wild tomato species *Lycopersicon cheesmanii*. *The Journal of Heredity* 85: 401–404.
- [62] Sztangret J., Korzeniewska A., Niemirowicz-Szczytt K. 2001. Ocena plonowania oraz zawartości suchej masy i związków karotenoidowych w nowych mieszańcach dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima* Duch.). *Folia Horticulturae Ann.* 13/1A: 437–443.
- [63] Sztangret J., Korzeniewska A., Lewandowska M., Niemirowicz-Szczytt K. 2003. Identyfikacja markerów związków karotenoidowych w owocach dyni olbrzymiej – analiza RAPD. *Folia Horticulturae Supl.* 1: 129–132.
- [64] Sztangret J. 2003. Podstawy analizy genetycznej zawartości związków karotenoidowych w owocach dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima* DUCH.). Perspektywy wykorzystania mieszańców F<sub>1</sub>. Rozprawa doktorska. SGGW. Warszawa 2003.
- [65] Tan B. C., Schwartz S. H., Zeevaart J. A., Mccarty D. R. 1997. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12235–12240.
- [66] Tanksley S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics.* 27: 205–233.
- [67] Thorup T.A., Tanyolac B., Livingstone K.D., Popovsky S., Paran I. Jahn M. 2000. Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the *Solanaceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(21): 11192–11197.

- [68] Tomes M. L., Quackenbush F. W., Mc Quistan M. 1954. Modification and dominance of the gene governing formation of high concentration of beta-carotene in the tomato. *Genetics* 39: 810–817.
- [69] Tomes M., Mark L. 1967. The competitive effect of the beta- and delta-carotene genes on alpha or beta-ionone ring formation in the tomato. *Genetics* 56: 227–232.
- [70] Umiel N., Gabelman W.H. 1972. Inheritance of root color and carotenoid synthesis in carrot, *Daucus carota* L. orange vs. red. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 453–460.
- [71] Ye X., Al Babili S., Kloti S., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. 2000. Engineering of provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303–305.
- [72] Young N.D. 1993. Applications of DNA genetic markers to the study of plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 12: 229–236.
- [73] Zhang Y., Stommel J. R. 2000. RAPD and AFLP tagging and mapping of Beta (B) and Beta modifier (MoB), two genes which influence  $\beta$ -carotene accumulation in fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* MILL.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 368–375.

## **Genes of carotenoid metabolic pathway and their usefulness in genetic engineering**

---

**Key words:** carotenoids, biosynthesis, genes, genetic engineering

### **Summary**

Carotenoids play an essential role especially in human nutrition. Single or a few carotenoid genes have been identified for different organisms including plants. There are some informations in the literature about regulation of carotenoid biosynthesis. While analyzing the complexity of carotenoid metabolic pathway, it is clearly visible that our knowledge about genetic background of carotenoid changes is still fragmentary. This publication presents the review of techniques used for identification of carotenoid biosynthesis genes and examples of genes identified by those techniques. We also described the regulation mechanisms of carotenoid biosynthesis in plants and the practical use of carotenoid genes in genetic engineering.