

分子生物学技术在观赏植物上的应用

高志民¹ 李雪平¹ 李 岚¹ 蔡春菊¹ 王 进¹ 潘会堂^{2*}

(1 国际竹藤网络中心, 北京 100102; 2 北京林业大学园林学院, 北京 100083)

摘要: 观赏植物在改善人居环境中发挥着重要作用, 培育具有高观赏价值的新奇植物品种是观赏植物育种的主要方向。分子生物学技术为观赏植物的基础研究和种质创新带来了全新的思路和途径, 文中重点介绍了国内外分子标记、基因克隆、基因工程等分子生物学技术在观赏植物上的应用研究进展。

关键词: 分子生物学技术, 分子标记, 基因克隆, 基因工程, 观赏植物

中图分类号: S731.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4241(2005)02-0036-5

The Application of Molecular Biotechnology in Ornamental Plants Culture

Gao Zhimin¹ Li Xueping¹ Li Lan¹ Cai Chunju¹ Wang Jin¹ Pan Huitang²

(1 International Center for Bamboo and Rattan, 100102 Beijing; 2 Beijing Forestry University, 100083 Beijing)

Abstract: Ornamental plants play an important role in improving environment, and have been a necessary part of human's spiritual life. To create novel species with high ornamental value is the primary direction of ornamental breeding. Biotechnology shows new approaches and ways to the basic research and the germ plasm creating of ornamental plants. The advances of ornamental plants made by molecular biotechnology were reviewed in this paper.

Key words: molecular biotechnology, molecular marker, gene cloning, genetic engineering, ornamental plants

分子生物学技术已经在动植物的基础研究和常规育种等领域得到了广泛应用, 其在观赏植物上的应用虽起步比较晚, 但一些园艺学家和分子生物学家也已开展了许多有意义的基础性研究工作, 主要集中在分子标记技术、基因克隆和基因工程等方面。

1 分子标记技术

分子标记是以生物大分子的多态性为基础的遗传标记, 它可用于植物遗传图谱的构建、基因定位、比较基因组学、标记辅助育种等。分子标记技术的发展为观赏植物的系统发育学研究、花卉品系的鉴别、构建指纹图谱、基因定位等开辟了有效的途径, 从而为准确地研究观赏植物提供了强有力的手段。

1.1 遗传多样性与系统学演进研究

目前, 应用分子标记技术已对一些观赏植物的系统发育进行了研究。

矮牵牛是研究比较早的观赏植物之一, Peltier-D 等对 10 个矮牵牛花杂交系和 7 个野生种进行了

RAPD 分析, 来研究其遗传多样性及这些杂交系可能的起源祖先^[1]。陈向明等利用 RAPD 对 7 种花色系的 35 个牡丹栽培品种进行了分析, 34 个随机引物共扩增出 418 个位点, 其中有 337 个多态位点, 充分说明了品种之间丰富的多态性^[2]。戴思兰等对菊花起源问题进行了 RAPD 分析、探讨, 并提出栽培菊花主要起源于 *D. indium*、*D. vestitum* 和 *D. nankingense*^[3]。Kobayashi 等应用 AFLP 技术揭示了日本野生常绿杜鹃 *Rhododendron kiusianum*, *R. kaempferi* 及其自然杂种种群之间的遗传变化^[4]。Dendauw 等对起源于远东的盆栽杜鹃和来自中国昆明山区海拔 250~3 500 m 的 33 个野生杜鹃种群用 AFLP 和标记基因 *matK* 进行了分析, 并对 2 种分类方法进行了比较, 结果表明, 2 种方法对于杜鹃的系统分类可以相互补充^[5]。

总之, 许多观赏植物的遗传多样性与系统学演进研究都应用了分子标记技术, 这使人们对观赏植物的认识从宏观形态深入到了分子水平的微观世

* 收稿日期: 2004-11-22
潘会堂为通讯作者

界,并对准确把握观赏植物种质资源,实现观赏植物种质资源的可持续利用有着极其重要的意义。

1.2 DNA 指纹图谱的构建与商品鉴别

对园艺植物品种的鉴定以往主要采用形态观察和同工酶分析的方法,但由于形态观察受到环境条件和观察者主观性的影响,而同工酶分析又受到可使用的酶种的限制,从而使品种鉴定效率较低、误差较大、一些性状相近的品种难以鉴定。而分子标记可以在 DNA 水平提供大量的遗传标记,构成 DNA 指纹图谱,用于鉴定品种的真实性和纯度、确定品种的亲缘关系,以及用于新品种登记和品种知识产权保护等^[6]。梁红健等用 10 对引物对 19 个中国兰花品种进行了 RAPD 分析,共产生 83 条扩增带型,其中有 80 条为多态性带,每个兰花品种都有其特有的带型和可与其它品种相区别的带型,从而可将不同的品种区分开来^[7]。牡丹是日本岛根县的县花,运用 RAPD 技术可以识别其 12 个主要品种,另外 20 多个品种的区别正在研究中。通过优良品种的选定和品质管理,可生产出高品质的牡丹苗(原载[日]《农业技术》Vol. 54, No. 8, 1999)。Wiejacha 等用 RAPD 技术对虎耳草科酷栗属植物杂交育种亲本及后代进行了鉴定。因此,高质量的指纹图谱可作为新品种登记、注册和产权保护的重要依据^[8]。

1.3 分子遗传物理图谱的构建

分子标记技术的出现和发展大大推动了观赏植物遗传图谱的构建。RAPD 技术应用于遗传作图,不需要预先克隆标记或进行序列分析,而是直接完成多态性 DNA 标记的寻找,并同时完成对这些标记的遗传作图,从中找出不同 DNA 序列之间的连锁遗传关系和相关位置。

目前,观赏植物遗传图谱的构建工作已经展开。亚洲百合‘Connecticut King’具有抗 *Fusarium* 和不受郁金香破裂病毒(TBV)侵染的优良特性, Van Heusden 等研究认为, TBV 抗性可能是由单基因控制,用 QTL 作图的方法对‘Connecticut King’的 100 个回交群体进行了遗传作图,结果表明:百合($2n=2X=24$)遗传图包括 24 个连锁群,有 251 个分子标记,覆盖 1 367 cm,约有 25% 的分子标记不能连锁。4 个抗 *Fusarium* 数量性状位点分别位于第 1、第 5、第 13 和第 16 条染色体上,而抗 TBV 的基因则位于第九条染色体上^[9]。Chaparro 等利用桃树(*Prunus persica*)F2 群体进行作图,其中包括 83 个 RAPD 标记,1 个等位酶标记和 4 个形态标记,从而

构建了 1 个具有 15 个连锁群的图谱^[10]。Peltier-D 等利用 RAPD 标记和形态学标记构建了矮牵牛(*Petunia*)连锁图谱,他们利用 BC1 群体构建出具 7 个连锁群的连锁图,其中包括 35 个 RAPD 位点,它覆盖了整个基因组 262.9 cm,平均图距为 8.2 cm^[11]。Dunemann-F 等利用 239 个 RAPD 标记, 38 个 RFLP 标记和 2 个微卫星标记构建了北美杜鹃(*Rhododendron*)的分子连锁图谱。遗传连锁图谱可为以后检测具有重要经济性状的基因位点提供一个框架图^[12]。

1.4 园艺性状的定位

应用分子标记构建的遗传连锁图谱为园艺性状的定位提供了有利条件,使得目的基因的克隆更为方便。Iuoras 等利用 RAPD 分析来确定太阳花中那些与分枝隐性基因相关的标记^[13]。Holton 等利用矮牵牛 AFLP 的图谱发现, *FLS* 基因(类黄酮合成基因)和 *F1* 连锁,而 *F1* 位点是控制类黄酮合成的,表明 *F1* 是 *FLS* 的结构基因^[14]。Holton 等利用 AFLP 构建连锁图谱,并把矮牵牛花中控制色素 P-450 酶(flavonoid 3'-hydroxylase 和 3'-hydroxycase)的 *Hf1* 和 *Hf2* 基因进行了定位^[15]。Dunemann-F 利用北美杜鹃的连锁图谱进行 QTL 分析,对缺绿病和花色这些数量性状进行了定位研究^[16],为进一步克隆目的基因奠定了基础。

1.5 其它

DNA 分子标记还可以用于观赏植物的杂种优势预测和辅助选择育种。许多观赏植物的育种是通过有性杂交的手段来实现的,而 DNA 分子标记的应用,使研究人员能够在整个基因组范围内对大量亲本间的遗传距离进行估测,并在此基础上有效地预测具有强优势的组合作^[17],指导杂交组合的选配以及杂种优势的分析和预测。Kanyarat 等对亚洲杂交百合的育种进行研究时,从 278 个 RAPD 标记中找到一个分子标记和一个形态标记(雄性不育)紧密连锁于花的寿命^[18]。

2 基因克隆技术

2.1 基于 PCR 技术的基因克隆

目前,根据同源序列设计引物,应用 PCR 技术直接从观赏植物中已经克隆了许多目的基因片段如, Jánváry 等从天竺葵的 3 个种(*Pelargonium frutetorum*, *P. inquinans*, *P. lanceolatum*)和 3 个杂种 *P. zonale*、*P. peltatum* 和 *P. grandiflorum* 的种

间杂交中分别克隆了查尔酮合成酶基因^[19];刘青林等根据乙烯受体基因 *ETR1* 的保守区设计引物,通过 RT-PCR 方法从月季花瓣中克隆了 *ETR1* cDNA 片段^[20];陆海等用 PCR 方法成功地从木本植物银杏基因组总 DNA 中扩增克隆得到木质部细胞特异性表达的富甘氨酸蛋白质基因 (*GRP1.8*) 的启动子^[21];张建业等克隆了银杏雄株 *LEAFY* 全长基因^[22];汪政科从中国水仙花中克隆对花形态发育有重要调控作用的 *AGAMOUS* 同源基因^[23],等等。

2.2 基于连锁遗传图的基因图谱克隆

又称定位克隆技术,这是建立在拥有 RFLP 等分子标记 (Molecular marker) 的连锁遗传图的基础上,基因产物未知时的新基因克隆技术。Hattendorf 等通过图位克隆的方法克隆了月季抗病基因 (*RGAs*),为解决月季两大病害 (灰霉病和黑斑病),提高月季的产量奠定了基础^[24]。

2.3 基于基因组学方法的基因克隆

Lavid 等通过筛选文库的方法克隆到了编码月季花瓣挥发酚类物质合成的氧—甲基转移酶基因 *OOMT1* 和 *OOMT2*,该基因的表达与月季花的花香密切相关^[25]。Guterman 等人应用基因组学的方法,以四倍体月季 [‘Fragrant Cloud (FC)’ 和 ‘Golden Gate (GG)’] 花瓣为材料,构建了由 2 100 个基因组成的 EST 数据库,并制成 DNA 芯片用于表达分析。从中克隆到的次生代谢相关基因与花香表达一致,并在细菌中进行了该基因的表达研究;同时,还筛选到一些与花香相关的候选基因^[26]。

基于同类物种之间基因组的保守性以及染色体上基因顺序和含量的相似性发展起来的比较基因组学 (Comparative mapping),为进化研究、饱和遗传图谱的建立、同源基因 (Orthologous genes) 的克隆提供了有力手段,一旦某同源基因被克隆和测序,信息可很快用于其它植物上同源基因的克隆,这为进一步开展基因工程研究奠定了基础。

3 遗传改良技术

3.1 改良观赏植物的品质

观赏植物的品质主要由花色、花型、花期、株形等来体现,通过基因工程技术对其加以改良,是培育新品种的一条捷径。

3.1.1 花色

Van 等将查尔酮合成酶基因 *CHS* 的 cDNA 反向转入矮牵牛中,使原来紫红色的花变为粉红带白,

甚至有的花完全变白^[27]。Courtney 等将 *CHS* 基因以正义和反义 2 个方向分别导入粉红色菊花中,得到浅粉红色和白色花,而对照没有出现白色花^[28]。

Elomaa 等将来自玉米和大丁草的,编码黄烷酮醇还原酶 (DFR) 的 *A1* 基因和 *gdfc* 基因的 cDNA 转入白色矮牵牛中,*A1* 基因的转化植株表现为白色,而且在整个生长过程中色素多变,而 *gdfc* 基因的 DNA 转化植株则表现为非常稳定的红色^[29]。Zuker 等将来自农杆菌的 *rolC* 基因转入香石竹,转基因后代根系生长旺盛,切花产量提高;转黄烷酮羟化酶 (*FHT*) 基因的香石竹后代产生系列花色,并且花的香味增加,经 GC-MS 分析花朵的安息香酸盐含量提高 10~100 倍,经过 2 年栽培证明,转基因获得的性状能够稳定遗传^[30]。

3.1.2 花期

花卉形态包括花器官形态、花枝着生状态、花序类型及植株形态等。花器官的大小、重瓣性、花枝多少、花序类型、植株形态是否优美都直接影响到花卉的观赏价值,而花期的长短则是影响其商业价值的重要因素。人们已经开始利用基因工程手段来培育花型丰富、花期延长的观赏植物新品种。

LFY 基因与调控花分生组织的启动相关,对植物的花期早晚起调控作用。Weigel 等将来自拟南芥的 *LFY* 基因转入杨树,结果使得需要 8 年才能开花的杨树品种提前到 7 个月就能开花^[31]。邵寒霜等将 *LFY* 基因转入菊花,在获得的转基因株系中,有 3 株花期较正常植株分别提早 65、67、70 天,有 2 株分别推迟 78、90 天才开花^[32]。Giovannini 等将来自拟南芥的开花基因 *CONSTANS (CO)* 转入紫菀中,获得的转基因后代花期提前 2 个月,而且花量增加 30%^[33]。

3.1.3 株形

观赏植物植株的形态直接影响其观赏效果,对观赏植物的株形的研究主要集中在矮化方面。Pellegrineschi 等利用发根农杆菌介导法将野生型质粒导入柠檬天竺葵,获得了节间缩短、分枝和叶片增加、植株形态优美的天竺葵品种^[34]。

为了获得矮化的盆栽菊花,Petty 等将来自拟南芥的编码赤霉素抑制因子的基因 *GAI* 转入菊花,获得了不同程度的矮化株系^[35]。Zheng 等 (2001) 将烟草光敏色素 *PHYB1* 基因导入菊花品种 ‘Iridon’ 中,转基因植物与对照相比,株型明显矮化,分枝角度变大,冠幅变宽^[36]。而转 *rolC* 基因菊花品种

‘White Snowdon’表现为丛生、矮化,叶多分裂^[37]。Mercuri等(2001)通过根癌农杆菌将 rol A,B,C 基因导入补血草杂交种 L116 (*Limonium otolepis* × *Limonium latifolium*),获得超压缩类型转基因植株,高度比对照降低 1 m,叶面积变小,叶色加深,花序增多,密度增加,因此可用于盆栽^[38]。Yu 等将 DOH1 基因以反义形式导入石斛 (*Dendrobium nobile*),获得分枝性强且矮化的转基因石斛,表明 DOH1 在改变植株的形态与结构上也具有潜在的利用价值^[39]。理想的株形增加了整株观赏植物的观赏性,使之具有更高的观赏价值。

3.2 提高观赏植物的抗逆性

3.2.1 抗病

植物病害一直是影响观赏植物观赏效果的主要因素之一,人们已经通过转基因手段开展了抗病植物的培育。

Korbin 等用番茄斑点枯萎病毒核蛋白 (TSWV) 基因转化大丁草,获得了抗 TSWV 的大丁草转基因植株。傅荣昭等将兔防御素 NP-1 基因导入菊花品种 ‘001’ 中,并获得了抗性植株^[40]。Zuker 等将抗真菌基因 (osmotin, PR-1、几丁质酶基因) 转入香石竹并获得了抗病原菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*) 的株系^[41]。Dohm 等用农杆菌侵染法研究了几种抗真菌蛋白基因过量表达对月季品种 Heckenzauber 和 Pariser Charme 抗黑斑病的影响,结果表明,转化效率最高为 3%,在获得的转基因株系中有 80 个为抗黑斑病株系^[42]。Seetharam 等用 PCR 的方法获得了编码 85KD 的转半胱氨酸蛋白酶抑制基因 *PMC*,并以 *UEP1* 为启动子转化菊花,获得了 30 个株系,植株中 *PMC* 基因的高效表达,降低了 ‘western flower thrips’ 的发病率^[43]。

3.2.2 抗逆境

全球环境的变化,使得许多植物都面临着更多的逆境胁迫,能够在逆境下正常生长的观赏植物越来越受到园林绿化的重视。Dunemann 等将来自农杆菌的 rol 基因转入杜鹃,获得了 14 个转基因株系,又将其其中 11 个株系用 rolABC 基因转化,在转基因后代中部分株系根系生长增强,在富含石灰质的培养基中根系明显生长强健,这将有助于杜鹃适应钙质土壤。同时他们还将 Fro2 基因转入杜鹃,将有利于杜鹃对土壤中鉄的吸收,从而提高杜鹃的抗碱能力^[44]。

4 结束语

分子生物技术与观赏植物的有机结合,为人们充分了解、认识以及更好地改良、应用观赏植物创造了有利条件。特别是基因工程技术,为观赏植物的性状改良提供了全新的思路,使得人为定向修饰某个或某些目标性状并保留其它原有的优良性状,培育出新、奇、特的观赏植物品种变得更具有可操作性,加之观赏植物绝大多数只供观赏而非食用,较其他转基因作物更安全,更容易被批准推广,一旦有突破并成功应用于生产实践,将会产生良好的经济效益、生态效益和社会效益。

参考文献

- 1 Peltier D. Utilisation de fragments d'ADN polymorphes amplifiés au hasard (RAPD) pour la réalisation d'une cartographie génétique de *Petunia Hybrida Hort.* et d'une phylogénie du genre *Petunia*. Thèse de Doctorat. 1993
- 2 陈向明,郑国生,张圣旺. 牡丹栽培品种的 RAPD 分析. 园艺学报, 2001, 28(4): 370~372
- 3 戴思兰,陈俊愉,李文彬. 菊属植物 RAPD 反应体系的建立. 北京林业大学学报, 1996, 18(1): 46~51
- 4 Kobayashi N, Handa T, Eto J, Kita K. Genetic diversity of Japanese wild evergreen azaleas in Kyushu (south main island of Japan) characterized by AFLP. SHS Acta Horticulturae 572: XX International Eucarpia Symposium Section Ornamentals-Strategies for New Ornamentals II, 2002
- 5 Dendauw J, J De Riek, M De Loose, Van Bockstaele E. Identification of 33 chinese rhododendron species using matk sequences and AFLP data. ISHS Acta Horticulturae 572: XX International Eucarpia Symposium Section Ornamentals-Strategies for New Ornamentals II
- 6 张德水,陈受宜. DNA 分子标记、基因组作图及其在植物遗传育种上的应用. 生物技术通报, 1998, (5): 15~22
- 7 梁红健,刘敏,钟志宇. 中国部分兰花品种 RAPD 分析. 园艺学报, 1996, 23(4): 365~370
- 8 Wiejacha K, Pluta S, Golis A, Orlikowska T. Investigation on molecular markers for characterization of parental genotypes used in ribes sexual hybridization. ISHS Acta Horticulturae 560: IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 2001
- 9 Van Heusden A W, Jongerius M C, van Tuyl M, et al. Molecular assisted breeding for disease resistance in lily. ISHS Acta Horticulturae 572: XX International Eucarpia Symposium Section Ornamentals-Strategies for New Ornamentals II, 2002
- 10 Chaparro E, Werner D J, O'Malley D, et al. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. Theor Appl Genet 1994, 83: 194~200
- 11 Peltier D, Farcy E, Dulieu H, et al. Origin, distribution and mapping of RAPD markers from wild *Petunia* species in *Petunia hybrida hort* lines. Theor Appl Genet, 1994, 88: 637~645
- 12 Dunemann F, Kahnau R, Stange I. Analysis of complex leaf and flower characters in *Rhododendron* using a molecular linkage map. Theor Appl Genet 1999, 98: 1146~1155
- 13 Iuoras M, Patrascu M, Vasile C, et al. A marker genes collection and RAPD markers for recessive branching in sunflower. Helia, 1999, 22: 29~35
- 14 Holton T A, Brugliera F, Lester D R, et al. Cloning and expres-

- sion of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature*, 1993, 366: 276~279
- 15 Holton T A, Brugliera F, Tanaka Y. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *Plant J.*, 1993, 4: 1003~1010
 - 16 Dunemann F, Illgner R, Stange I. Transformation of *Rhododendron* with genes for abiotic stress tolerance. *ISHS Acta Horticulturae* 572; XX International Eucarpia Symposium Section Ornamentals-Strategies for New Ornamentals II, 2002
 - 17 Bernardo R. Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. *Crop Sci*, 1994, 34: 20~25
 - 18 Kanyarat SUPAIBULWATANA, Masahiro MII, Takato KOBA. Cytological and RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Analysis of somaclonal variation in *Lilium longiflorum* Thunb. AZIZ-PURWANTORO. *Plant Biotechnology*, 1999, 16 (3), 247~250
 - 19 Jánváry L, Forkmann G. Cloning of divergent chalcone synthase sequences from *pelargonium*. *ISHS Acta Horticulturae* 651; XXI International Symposium on Classical versus Molecular Breeding of Ornamentals — Part II. 2004
 - 20 刘育林, 白双义, 欧阳青, 屈浩, 蔡文启. 月季切花乙烯受体 ETR1 cDNA 克隆及其序列分析. *园艺学报*, 2002, 29(4): 363~366
 - 21 陆海, 王沙生, 李义, 蒋湘宁, 李凤兰. 银杏木质部特异定位表达基因启动子克隆. *北京林业大学学报*, 2001, 23(4): 10~12
 - 22 张建业, 陈力耕, 胡西琴, 何新华. 银杏 LEAFY 同源基因的分离与克隆. *林业科学*, 2002, 38(4): 167~170
 - 23 汪政科. 水仙 agamous 基因的克隆与油菜素内酯应答基因研究: [博士论文], 2000
 - 24 Hattendorf A, Linde M, Mattiesch L, Debener T, Kaufmann H. Genetic analysis of rose resistance genes and their localization in the rose genome. *ISHS Acta Horticulturae* 651; XXI International Symposium on Classical versus Molecular Breeding of Ornamentals-Part II. 2004
 - 25 Lavid N, et al. O-Methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1899~1907
 - 26 Guterman I, Shalit M, Menda N, et al. Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell*, 2002, 14(10): 2325~2338
 - 27 Van Der Krol A R, et al. Antisense chalcone synthase genes in *petunia*: Visualization of variable transgene expression. *Mol Gen Genet*, 1990, 220: 204~212
 - 28 Courtney G N, et al. Modification of flower color in florist's chrysanthemum: Production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Bio/Technology*, 1994, 12: 268~271
 - 29 Elomaa P, Helariutta Y, Griesbach R J, et al. Transgene inactivation in *Petunia hybrida* is influenced by the properties of the foreign gene. *Mol Gen Genet*, 1995, 248(6): 649~56
 - 30 Zuker A, Shklarman E, Scovel G, et al. *ISHS Acta Horticulturae* 560; IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 2001
 - 31 Weigel D, Coupland G. LEAFY blooms in aspen. *Nature*, 1995, 377: 482~483
 - 32 邵寒霜, 李继红, 郑学勤, 陈守才. 拟南芥 LFY cDNA 的克隆及转化菊花的研究. *植物学报*, 1999, 41(3): 268~271
 - 33 Giovannini A, Morreale G, Berio T, Allavena A. Modification of flowering onset in *Osteospermum eklonis* L. by *CONSTANS* gene. *Atti International Symposium "Strategies for New Ornamentals" EUCARPIA Section Ornamentals*, Melle (Belgium), 2001, 3~6 luglio
 - 34 Pellegrineschi A, et al. Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon-scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Bio/Technology*, 1994, 12: 64~68
 - 35 Petty (Lisa M), Harberd (Nicholas P), Carre (Isabelle A), Thomas (Brian), Jackson (Stephen D.). Expression of the *Arabidopsis gai* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response. *Plant Science: (Limerick)*, 2003, 164(2): 175~182
 - 36 Zheng Z L, Yang Z B, Jang J C, Metzger J D. Modification of plant architecture in chrysanthemum by ectopic expression of the tobacco phytochrome B1 Gene. *J Amer Soc Sci*, 2001, 126(1): 19~26
 - 37 Mitiouchkina T Y, Dolgov S V. Modification of chrysanthemum plant and flower architecture by *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes* introduction. *Acta Hort*, 2000, 508: 163~169
 - 38 Mercuri A, Bruna S, Benedetti L D, Burchi G, Schiva T. Modification of plant architecture in *Limonium* spp. induced by *rol* genes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, 65: 247~253
 - 39 Yu H, Yang S H, Goh C J. *Agrobacterium*-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the class 1 *knox* gene *DOH1*. genetics, breeding and biotechnology of cut flowers. *Plant Cell Rep*, 2001, 20(4): 301~305
 - 40 Korbin M, Podwyszynska M, Komorowska B, Wawrzynczak D. Transformation of gerbera plants with tomato spotted wilt virus (TSWV) nucleoprotein gene. *ISHS Acta Horticulturae* 572; XX International Eucarpia Symposium Section Ornamentals-Strategies for New Ornamentals II. 2002
 - 41 Zuker A, Shklarman E, Scovel G, et al. Genetic engineering of agronomic and ornamental traits in carnation. *ISHS Acta Horticulturae* 560; IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. 2001
 - 42 Dohm A, Ludwig C, Schilling D, Debener T. Transformation of roses with genes for antifungal proteins to reduce their susceptibility to fungal diseases. *ISHS Acta Horticulturae* 572; XX International Eucarpia Symposium Section Ornamentals-Strategies for New Ornamentals II. 2002
 - 43 Seetharam A, Kuiper G, Visser P B. Expression of potato multicycstatin in florets of chrysanthemum and assessment of resistance to western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *ISHS Acta Horticulturae* 572; XX International Eucarpia Symposium Section Ornamentals-Strategies for New Ornamentals II. 2002
 - 44 Dunemann F, Illgner R, Stange I. Transformation of *Rhododendron* with genes for abiotic stress tolerance. *ISHS Acta Horticulturae* 572; XX International Eucarpia Symposium Section Ornamentals-Strategies for New Ornamentals II. 2002