Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره سوم ، شماره۳ ، پاییز ۱۳۸۷
صفحه۱٤-٥

مروری بر روش های بهنژادی مدرن گل و گیاهان زینتی

مریم جعفرخانی کرمانی[۱]*، ابوالفضل جوکار[۲،۱]، علی اکبر حبشی[۱]
۱- به ترتیب استادیار، دانشجوی دکتری، استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
۲- دانشجوی دکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : m.j.kermani@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۶ - تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۹)

چکیده

روش های بهنژادی مدرن ابداع شده اند تا نیاز به ایجاد تنوع در گل و گیاهان زینتی که صنعتی جهانی است را برطرف سازند. این روش ها از طرفی طول دوره اصلاحی را به طور قابل توجهی کاهش می دهند و از طرف دیگر می توانند در بهنژادی گیاهانی که با روش های سنتی اصلاح آنها امکان پذیر نیست نقش مؤثر داشته باشند. ایجاد تغییرات ژنتیکی برای بهبود کیفیت در هر برنامه اصلاحی لازم و ضروری است. استفاده از جهش های طبیعی و القایی در بهبود منابع ژنی بسیار مؤثر بوده و بطور موفقیت آمیزی به توسعهٔ ارقام اصلاح شده و جدید گیاهان زینتی کمک نموده است. ایجاد گیاهان هاپلوئید به طور قابل ملاحظه ای زمان لازم جهت تولید رگه های خویش آمیخته برای بهنژادی دورگه های نسل اول را کوتاه نموده و از طرف دیگر انتخاب صفات مغلوب را تسهیل می سازند. گیاهان پلی پلوئید هم به صورت منفرد و هم در جمعیت ها در مقایسه با والدین دیپلوئید خود معمولاً دارای سطح بالایی از هتروزیگوستی بوده و پلی فیلتیک(polyphyletic) می باشند. گیاهان هاپلوئید، دابل هاپلوئید و پلی پلوئید منابع جدید ژرم پلاسم بوده که می توانند به صورت ارقام جدید معرفی گردند و یا اینکه در برنامه های بهنژادی مورد استفاده قرار گیرند. با دستیابی به تکنیکهای نوین نظیر مهندسی ژنتیک می توان با تغییرات جزئی در ساختار ژنتیکی گیاه و حفظ سایر صفات مطلوب آن، ضمن ایجاد تغییرات لازم به منظور دستیابی به صفات مورد نظر مصرف کننده در وقت و هزینه بهنژادگران به میزان قابل ملاحظه ای صرفه جویی نمود. مهندسی ژنتیک صفات جدید در یک رقم به قابلیت باززایی از گیاه تراریخته بستگی دارد که خوشبختانه در حال حاضر این تکنیک به طور قابل توجهی خصوصاً در گیاهان زینتی رو به گسترش است. مقاله حاضر مروری بر پیشرفتهای اخیر در اصلاح نوین گیاهان زینتی از جمله ایجاد تنوعات سوماکلونالی، جهش های القایی، تولید گیاهان پلی پلوئید و هاپلوئید و مهندسی ژنتیک به منظور ایجاد تنوع در رنگ، افزایش ماندگاری و عطر گل و نیز افزایش مقاومت گیاه در برابر بیماری ها و آفات می باشد.

واژه های کلیدی
بهنژادی ،
پلی پلوئیدی ،
تنوعات سوماکلونی ،
جهش زایی ،
گل و گیاهان زینتی ،
مهندسی ژنتیک ،
هاپلوئیداسیون

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گردش مالی صنعت گل شاخه بریده در جهان سالانه حدود ۲۷ میلیارد دلار تخمین زده شده (Chandler, 2003) که رونق این صنعت منحصراً با ورود ارقام جدید محقق شده است. مهمترین تولید کنندگان جهانی گیاهان زینتی به ترتیب هلند (۳۳٪)، ژاپن (۲٤٪)، ایتالیا (۱۱٪)، آمریکا (۱۲٪) و تایلند (۱۰٪) هستند در حالیکه سایر کشور ها حدود ۱٤٪ از گیاهان زینتی جهانی را تولید می کنند. عمده ترین صادر کنندگان جهانی گیاهان زینتی به ترتیب هلند (۵۹٪)، ایتالیا (۱٦٪)، کلمبیا (۱۰٪)، فلسطین اشغالی (٤٪) و اسپانیا (۲٪) بوده، و سهم صادرات سایر کشور های جهان ۱۸٪ می باشد (Rajagopalan, 2000; Schiva 2000). تا کنون ۱٥٦ نوع گیاه زینتی از طریق کشت بافت در آزمایشگاه های مختلف دنیا تولید و تکثیر شده اند (Rout *et al*., 2006). بطور کلی کشت سلول، بافت و اندام های گیاهی برای سه هدف عمده انجام می گیرد: الف) سالم سازی و تکثیر در سطح انبوه، ب) نگهداری ژرم پلاسم و ج) تهیه مواد آزمایشی مورد نیاز جهت برنامه های اصلاحی. صفات اصلاحی مورد توجه در گیاهان زینتی به دو دسته تقسیم می شوند: صفات مورد توجه مصرف کننده و صفات مورد توجه پرورش دهنده. هر دو دسته این صفات از اهداف برنامه های اصلاحی سنتی بوده و هستند، لیکن در برنامه های اصلاحی مدرن به دلیل هزینه بر بودن روش ها، به صفات مورد توجه مصرف کنندگان بیشتر پرداخته شده است. تنوع در صفاتی همچون رنگ، فرم و عطر گل از مهمترین اهداف اصلاحی گیاهان زینتی می باشند. مقاله حاضر مروری بر پیشرفتهای اخیر در اصلاح نوین گیاهان زینتی از جمله ایجاد تنوعات سوماکلونالی، جهش های القایی، تولید گیاهان پلی پلوئید و هاپلوئید و مهندسی ژنتیک به منظور ایجاد تنوع در رنگ، افزایش ماندگاری و عطر گل و نیز افزایش مقاومت گیاه در برابر بیماری ها و آفات است.

تنوعات سوماکلونالی و جهش های القایی

تغییرات ژنتیکی از جمله تغییر در توالی DNA (مانند جهش های نقطه ای و فعال ساختن ترانسپوزون ها)، تغییر در ساختار کروموزوم ها (مانند جابجایی) و تغییر در تعداد کروموزوم ها (مانند پلی پلوئیدی و آنوپلوئیدی) می توانند تنوعات سوماکلونالی را ایجاد نمایند. اگر چه گروه های تحقیقاتی زیادی به دنبال نظریه Larkin و Scowcroft (۱۹۸۱) مبنی بر اینکه تنوعات سوماکلونالی می توانند یکی از منابع ایجاد تنوع در اصلاح گیاهان باشند، برنامه های اصلاحی را شروع نموده و گیاهان زینتی جدیدی را با استفاده از این روش بو جود آورده اند، لیکن ایجاد تنوعات سوماکلونالی هنوز به عنوان روش قابل اطمینان اصلاحی، که بتوان از آن به طور گسترده استفاده نمود، مورد توجه قرار نگرفته است. از جمله گیاهان زینتی که پس از ایجاد تنوعات سوماکلونالی به عنوان گیاهان زینتی جدید معرفی شده اند می توان به دو گل داوودی تولید شده توسط Khalid و همکاران در سال ۱۹۸۹ اشاره کرد. بطور کلی بیشترین تنوعات ژنتیکی که امروزه در گیاهان مشاهده می شود حاصل تغییرات خود به خودی است که به مرور زمان در ژرم پلاسم های مختلف ایجاد شده است.

دورگ گیری بین و درون گونه ای در گیاهان به بروز صفات مطلوب کمک نموده است، اما ژرم پلاسم های موجود هنوز نمی توانند جوابگوی نیاز مصرف کنندگان تنوع طلب، باشند. بنابراین بهنژادگران و محققان همواره در صدد استفاده از منابع دیگر ایجاد تنوع هستند. از آنجا که جهش های خود به خودی به ندرت اتفاق می افتند، تولید جهش یافته های القایی راه مناسبی برای ایجاد تنوع در گیاهان محسوب می شود. کشت درون شیشه ای امکان استفاده از تکنیک موتاسیون را به خوبی برای گیاهانی که از طریق جنسی و غیر جنسی تکثیر می شوند فراهم آورده است. طبق گزارش آژانس بین المللی انرژی اتمی از میان ۲۳۰۰ رقم جهش یافته ای که تاکنون بطور رسمی در سرتاسر دنیا عرضه شده اند، ٦۲٥ رقم به گیاهان زینتی تعلق دارد (http://www-mvd.iaea.org). برخی از مهمترین گیاهان زینتی که به صورت گل بریدنی و یا گیاه گلدانی برای اصلاح از طریق جهش مورد

Archive of SID

استفاده قرار گرفته اند عبارتند از: رز، داوودی، میخک، ارکیده، شمعدانی و اختر (Jain 2006). در رزها، ایجاد جهش با استفاده از ماده شیمیایی اتیل متان سولفونات توسط Kaicker در سال ۱۹۸۲ و با استفاده از اشعه X توسط Walther و Sauer در سال ۱۹۸٦ انجام گرفته است. در داوودی ایجاد تنوع هم با موتانت های شیمیایی وهم با موتانتهای فیزیکی انجام گرفته است (Huttema *et al.*, 1986). ایجاد جهش سوماتیکی جهت تغییر رنگ گل داوودی با استفاده از اشعه گاما در سال ۲۰۰۰ توسط Mandal و همکاران گزارش گردید. Sun و همکاران در سال ۲۰۰۷ با تلفیق کردن کشت درون شیشه ای با تابش پرتوهای الکترون، یک روش جدید اصلاحی برای گل داوودی از طریق ایجاد جهش توسعه دادند. Lu و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند که استفاده از اشعه گاما (با دوز ۱۰ گری) برای ایجاد جهش و زنده مانی در نرگس چینی رقم 'Jinzhanyantai' موفقیت آمیز بوده است .

هاپلوئیدی و پلی پلوئیدی

در اصلاح جمعیت های دگر گرده افشان به منظور داشتن قابلیت ترکیب، استفاده از خود گشنی می تواند بازدهی گزینش در هر نسل را افزایش دهد، اما انجام خود گشنی مدت زمان دوره اصلاحی را طولانی می کند. با تولید لاین های دابل هاپلوئید هموزیگوت، طول دوره اصلاحی به طور قابل توجهی کاهش می یابد. از طرف دیگر، کشت بساک می تواند نوترکیبی های حاصل از تقسیمات میوزی را بطور همزمان تثبیت کند (Bhojwani *et al.*, 2001). برای تولید گیاهان عاری از ویروس علاوه بر کشت مریستم، می توان از کشت بساک نیز استفاده کرد. Han و همکاران لیلیوم های هاپلوئید عاری از ویروس را در سال ۱۹۹۷ از طریق کشت بساک تولید نمودند. با توجه به اینکه در اکثر تک لپه ای ها و تعدادی از دو لپه ای ها، باززایی گیاه از سلول ها یا پروتوپلاست های تراریخته مشکل است، در چنین مواردی می توان از تکنیک نجات جنین نارس حاصل از میکروسپور استفاده کرد. Bhojwani و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند به دلیل هاپلوئید بودن جنین های حاصل از میکروسپور، گیاهان حاصله به راحتی موفقیت انتقال ژن را نشان می دهند. شناسایی و جداسازی جهش یافته های خود بخودی مغلوب در مرحله هاپلوئیدی و به دست آوردن سریع ژن جهش یافته به صورت هموزیگوت، از دیگر مزایای ویژه ایجاد لاینهای هاپلوئید در گیاهان عالی می باشد. استفاده از مواد جهش زا در مرحله میکروسپور، که ساختاری تک سلولی دارد، می تواند از تولید گیاهان بافت ناهمسان جلوگیری کند (Sopory and Munshi, 1996). از خصوصیات دیگر استفاده از تکنیک هاپلوئید سازی، تظاهر ژن های جهش یافته مغلوب در تنوعات گامتوکلونالی می باشد که در بسیاری از غلات گزارش شده ، اما تا کنون در گیاهان زینتی گزارش نگردیده است. از آنجا که گیاهان دابل هاپلوئید، جمعیتی پایدار، بدون ریسک هتروزیگوتی، قابل تکرار در هر زمان و قابل استفاده در آزمایشگاه های مختلف هستند، می توان از آنها در ترسیم نقشه های لینکاژی نیز استفاده کرد. Meynet و همکاران در سال ۱۹۹٤ با استفاده از پارتنوژنز از طریق گرده افشانی و تلقیح با گرده های پرتو دهی شده عقیم و سپس استفاده از تکنیک نجات جنین، موفق به تولید یک رز دی هاپلوئید شدند که قادر به تولید گل و گرده بارور بود. بنابراین تولید گیاهان هاپلوئید و دی هاپلوئید به تنهایی می تواند به عنوان یکی از منابع ایجاد تنوع در برنامه های اصلاحی گل و گیاهان زینتی مورد استفاده قرار گیرد.

پلی‌پلوئیدی به طور کلی به دو گروه اتوپلی‌پلوئیدی و آلوپلی‌پلوئیدی تقسیم می‌شود. یک گیاه اتوتتراپلوئید دارای چهار نسخه یکسان از یک سری کروموزومی می‌باشد. در مقابل، یک گیاه آلوتتراپلوئید (آمفی‌دیپلوئید) دو سری کروموزومی دیپلوئید، بدست آمده از گونه‌های مجزا را داراست. این تمایز در اتوپلی‌پلوئیدی و آلوپلی‌پلوئیدی، نتایج ژنتیکی با ارزشی را به همراه دارد. به طور کلی اتوپلی‌پلوئیدی هیچ نوع آلل جدیدی نداشته و برتری ژنتیکی زیادی نسبت به اجداد دیپلوئیدش ندارد. به عنوان مثال باروری اتوتتراپلوئیدها اغلب به خاطر کروموزومهای چندتایی وابسته به میوز I کاهش می‌یابد. در گیاه آلوتتراپلوئید با ترکیب دو گونه متفاوت از نظر ژنتیکی، کروموزومها در میوز I بطور مرتب به صورت دوتایی جفت

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شوند. در نتیجهٔ قدرت دورگه و باروری بالای آلوتتراپلوئیدها نسبت به اجداد دیپلوئیدشان، به آنها امکان رقابت با اجدادشان را می‌دهد (Byrne and Carne, 2003). موفقیت القای پلی پلوئیدی به ژنوتیپ و سطح پلوئیدی گیاه اولیه بستگی دارد. Khosravi و همکاران (۲۰۰۸) به منظور افزایش سطح پلوئیدی رزها و ایجاد اتوپلی‌پلوئیدی در آنها از سه ماده اورایزالین، تریفلورالین و آمی‌پروفوزمتیل استفاده کردند و نشان دادند که میزان موفقیت در دو برابر کردن تعداد کروموزوم رزهای دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید در شرایط یکسان به ترتیب ۶۰٪، ۶/۳٪ و ۰٪ بود و تفاوت معنی داری در کارایی مواد افزاینده سطح پلوئیدی وجود نداشت.

پلی پلوئیدی معمولاً منجر به ایجاد گیاهان درشت تر، با برگ های ضخیم و تیره‌تر می شود. Kermani و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که گل های رز با کروموزومهای دو برابر شده تعداد گلبرگ های بیشتر، تعداد گرده زنده بیشتر، طول ساقه بلندتر و نسبت عرض به طول بیشتری در برگچه ها داشتند. همچنین Kermani (۲۰۰۱) نشان داد که برگهای گیاهانی که کروموزومهای آنها دو برابر شده بود نسبت به بیماری قارچی لکه سیاه رز از لحاظ مقاومت، تفاوت معنی‌داری با گیاهان مادری داشتند. در بعضی از گیاهان میزان مقاومت افزایش یافت و در بعضی دیگر کاهش داشت. وی این تفاوتها را به صفات مرفولوژیکی همچون ضخامت برگ نسبت داد و بیان کرد که اگرچه گیاهانی که دارای کروموزوم دو برابر شده هستند، دارای ژنهای جدید نمی باشند اما با افزایش سطح پلوئیدی قدرت گیاهان هتروزیگوت می تواند به صورت افزایش مقاومت به بیماریها بیان گردد. Nimura و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که آمفی دیپلوئید های حاصل از دو برابر شدن کروموزومهای گل میخک دارای گل هایی بزرگتر و دانه های گرده و بذر با باروری بیشتر بودند. Fukui و Yokota (۲۰۰۷) نشان دادند که رز *Rosa multiflora* با سطح پلوئیدی دو برابر شده، دارای سلولهای محافظ روزنه بزرگتر و گلهای درشت تر بودند.

مهندسی ژنتیک

مهندسی صفات جدید در گیاهان به امکان باززایی از گیاه تراریخته بستگی دارد که خوشبختانه در حال حاضر این تکنیک به طور قابل توجهی خصوصا در گیاهان زینتی رو به گسترش است. بیان ژن ها در گونه های مختلف گیاهی همیشه قابل پیش بینی نیست و نیاز به آزمایش و خطا دارد تا بهنژادگر را به صفت تجاری پایدار در گیاه مورد نظر برساند. دستکاری در مسیرهای متابولیکی معمولاً نیازمند انتقال ژن های چند گانه است که خود می تواند مشکل ساز باشد و نشانگر پیچیدگی برهمکنش های درون و بین سلولها در سطح ژن و محصول ژن می باشد (Tanaka *et al.*, 2005). در برنامه های مهندسی ژنتیک اولین قدم داشتن اطلاعات در مورد کاربرد ژن های خاص است. از جمله موفقیت های حاصل از به کار گیری این تکنیک در اصلاح گیاهان زینتی، می توان به ایجاد رنگ های ویژه در گل های زینتی اشاره کرد. صفات دیگری که توجه خاصی را به خود جلب نموده اند شامل ساختار و شکل گل و گیاه، عطر گل، ماندگاری پس از برداشت و مقاومت به بیماری ها و آفات می باشد.

- رنگ گل

رنگ گل تحت تاثیر سه نوع رنگدانه، فلاونوئید ها، کاروتنوئیدها و بتالائین ها است که از این میان فلاونوئیدها معمولترین بوده و طیف رنگی زیادی از زرد تا قرمز تا آبی را ایجاد می کنند. از فلاونوئیدهای مهم در ایجاد رنگ گل، آنتوسیانین ها هستند که در سلولهای اپیدرمی گلبرگ یافت می شوند. کاروتنوئیدها در پلاستید سلولی قرار گرفته و رنگ های زرد را ایجاد می کنند. این رنگدانه ها همراه با آنتوسیانین ها رنگهای برنز، قهوه ای و نارنجی و یا قرمز را در گلبرگ موجب می شوند. بتالائین ها به ندرت یافت شده و رنگ های شیری، زرد، نارنجی و بنفش را ایجاد می نمایند. تنوع در رنگ گل با استفاده از مهندسی ژنتیک بر ایجاد تغییر در مسیرهای متابولیکی تولید فلاونوئیدها متمرکز شده است. ژنهای مسئول تولید آنزیم های مسیر ذکر شده درگیاهان زیادی از جمله گیاهان زینتی کلون شده اند و در مراکز اطلاعاتی عمومی DNA مانند National Centre for Biotechnology Information

Archive of SID

موجود می باشند. تغییر در آنتوسیانینهای اولیه-3 (anthocyanidin *O*- glucosides) در مسیر متابولیکی تولید فلاونوئیدها با تغییر در تولید قندها، اسیدها و متیل های مربوطه انجام پذیر است اما رنگ نهایی قابل مشاهده در گل معمولا متاثر از چند عامل از جمله ملکول های آنتوسیانین اولیه، رنگدانه های دیگر و pH واکوئل می باشد(Tanaka *et al.*, 2005). هیبریدهای مختلف گونه آناغالیس (*Anagallis monelli*) توسط Quintana و همکاران در سال ۲۰۰۷ بررسی شدند، آنها نشان دادند که pH واکوئل سلول های سطح برگ بر اساس رنگ هیبریدها متفاوت بود.

ایجاد تنوع رنگ در انواع گیاهان زینتی از طریق روشهای دورگ گیری و ایجاد جهش انجام گرفته است و بعضی از این روش ها تبدیل به مدل های آزمایشی شده اند. اما استفاده ار مهندسی ژنتیک برای تغییر رنگ گل از آن جهت حائز اهمیت است که سایر صفات مطلوب گیاه، که ممکن است سالها برای ایجاد آنها زحمت کشیده شده باشد، تغییر نکرده و فقط رنگ گل تغییر می کند. این روش به ویژه در زمانی که گیاه والد عقیم بوده و یا یک گل با طرحهای رنگی جدید ایجاد شده باشد، به عنوان بهترین مکمل روش های اصلاح سنتی به شمار می رود.

رنگ طبیعی گلبرگهای گل رز رقم Charleston طی یک دوره ۱۲-۱۰ روزه از زرد تا قرمز تغییر می کند. این تغییر رنگ به دلیل تجمع دو آنتوسیانین سیانیدین ۳-گلوکوزید (chrysanthemin) و سیانیدین ۳ و ۵-دی گلوکوزید (cyanin) است. تولید آنتوسیانین بوسیله بیان حداقل چهار ژن دی هیدروفلاونول ٤-ردوکتاز (*DFR*)، آنتوسیانیدین سنتاز (*ANS*)، فلاونوئید ۳-اکسی-گلوکوزیل ترانسفراز (*UF3GT*) و فلاونوئید ۵-اکسی-گلوکوزیل ترانسفراز (*UF5GT*) کنترل می شود. بیان ژن *DFR* طی مراحل اولیه باز شدن گل تشخیص داده شد و بیشترین مقدار بیان ژنهای *ANS*، *UF3GT* و *UF5GT* طی نیمه پایانی باز شدن گل توسط Hennayake و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش گردید. با خاموش کردن و یا کاهش بیان ژنهای ساختاری و یا کنترل کننده مسیر متابولیکی تولید آنتوسیانین، می توان به ایجاد گل های سفید اقدام نمود. کاهش بیوسنتز آنتوسیانین در گیاهان مختلف با موفقیت گزارش شده است. از جمله در اطلسی توسط van der Krol و همکاران در (۱۹۸۸)، در ژربرا توسط Elomaa و همکاران (۱۹۹۳)، در داوودی توسط Courtney-Gutterson و همکاران (۱۹۹٤) و در رز و میخک توسط Gutterson (۱۹۹۵). Nishihara و همکاران در سال ۲۰۰۳ رنگ آبی گیاه جنتیانا (*Gentiana triflora*) را با ژن آنتی سنس چالکون ستتاز جنتیانا (CHS) تراریخته کرده و گل هایی با تنوع رنگی سفید تا آبی کمرنگ ایجاد نمودند. ژن *CHS* از ژن هایی است که آنتی سنس آن برای کنترل منفی و کاهش بیوسنتز آنتوسیانین مورد استفاده قرار می گیرد. اما بر طبق نظریه Winkel-Shirley (۲۰۰۲) از آنجا که گیاهان تراریخته با آنتی سنس این ژن بدون فلاونوئید هستند و فلاونوئیدها نقش مهمی در محافظت گیاهان در برابر اشعه ماوراء بنفش و سایر تنشهای محیطی دارند، این گیاهان عموماً از مقاومت کمی برخوردار می باشند. کنترل منفی سایر ژن های مسیر متابولیکی تولید آنتوسیانین از جمله *DFR* یا *F3H* از راههای دیگر ایجاد گل های سفید بدون پایین آوردن میزان مقاومت است. Zuker و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که با کنترل منفی ژن *F3H* در میخک میزان آنتوسیانین تغییر کرد ولی همزمان با افزایش میزان متیل بنزوات، میزان عطر گیاه نیز افزایش یافت.

بسیاری از گل های آبی دارای مشتقات دلفینیدین هستند که بطور آروماتیکی آسیله شده اند (acylated delphinidin). سه گیاه رز، میخک و داوودی تنها مشتقاتی از پلارگونیدین و سیانیدین را در خود انباشته می کنند که به وسیله گروههای آسیلهٔ آروماتیکی تغییر نیافته اند. بنابراین یکی از اهداف برنامه های مهندسی ژنتیک سعی بر القای سنتز مشتقات دلفینیدین به منظور ایجاد گلهای آبی در این گیاهان بوده است. آنزیم کلیدی در بیوسنتز دلفینیدین F3'5'H است. نشان داده شده است که ژن *F3'5'H* بدست آمده از اطلسی و لیزیانتوس، سبب تولید مستقیم رنگ آبی در گلهای اطلسی و تنباکو می شود (Holton *et al.*, 1993, Shimada *et al.*, 1999). تغییر رنگ صورتی به آبی در گیاه لوبلیا (*Lobelia erinus*) با ژن *F3'5'H* لیزیانتوس توسط Kanno و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام گرفت. شرکت های فلوریژن (Florigene Ltd.) و سانتوری (Suntory Ltd.) میخک های بنفش را با انتقال ژنهای *F3'5'H* و *FDR* اطلسی ایجاد نموده و نشان داده اند که گلبرگ

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهان تراریخته دارای ماده دلفینیدینی است که در میخک های بومی وجود ندارد (Mol و همکاران ۱۹۹۹). گلهای اطلسی به ندرت دارای آنتوسیانین های نوع پلارگونیدین هستند بنابرین نمی توانند رنگ های نارنجی یا قرمز آجری را تولید کنند. Mizutani و همکاران در سال ۲۰۰۳ موفق به مهندسی ژنتیک و تولید لاین اطلسی های گل قرمز با کاهش بیان ژن *F3'H* و بیان ژن *DFR* گردیدند. اخیراً Schlangen و همکاران (۲۰۰۷) راهبردهای لازم جهت ایجاد رنگ زرد در گیاهان زینتی را توسط کلون کردن و تعیین ویژگی ژن های مخصوص هیدروکسیلاز چالکون ها بیان نمودند.

ایجاد طرح های ابلق در گل و برگ گیاهان زینتی اغلب ارزش بالایی داشته است و برای سالهای زیاد در گلهای نیلوفر پیچ مورد مطالعه قرار گرفته است. Iida و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که ایجاد ابلقی در گلهای این گیاه توسط ترانسپوزون ها انجام پذیر است. اضافه نمودن یک ترانسپوزون به ژن بیوسنتزی فلاونوئید یا ژن تنظیم کننده مسیر بیوسنتزی، منجر به تشکیل بخش های سفید در زمینه رنگی می گردد. جدا ساختن یک چنین ترانسپوزون از یک ژن بخصوص اغلب منجر به تشکیل بخش های رنگی در زمینه سفید می گردد.

- ماندگاری گل

یکی دیگر از اهداف اصلاحی گیاهان زینتی ایجاد ارقامی با ماندگاری بیشتر گل در مرحله پس از برداشت است. عمر پس از برداشت گلها عمدتاً تحت تاثیر تغذیه، آلودگی باکتریایی و میزان اتیلین تولید شده در گیاه قرار می گیرد. مهمترین گلهای شاخه بریده جهان رز، میخک و داوودی هستندکه از بین این سه گل تنها تولید درون زای اتیلین در میخک به پیری گل های آن می انجامد (Tanaka, 2005). همه گلهای شاخه بریده به درجات مختلف به آلودگی های باکتریایی موجود در آب گلجای حساسیت دارند. این آلودگی به بسته شدن آوندها و متوقف شدن حرکت آب در ساقه و در نتیجه پژمردگی و کاهش عمر پس از برداشت گلها می انجامد. رعایت موازین بهداشتی در مراحل پس از برداشت می تواند در حل این معضل کمک نماید. کمبود مواد غذایی، عمدتاً قندها، یکی دیگر از عوامل تسریع در بروز پیری است که می توان با اضافه نمودن افزودنی های غذایی به آب گلجای به طول عمر پس از برداشت گلها افزود.

تیمار میخک با تیوسولفات نقره یکی از راه های افزایش طول عمر گلهای شاخه بریده محسوب می شود، اما از آنجا که نقره ماده ای سمی است بهنژادگران بر آنند تا با استفاده از روش های دیگر پیری را در میخک متوقف سازند. کاهش بیان تولید اتیلین با خاموش کردن ژن مخصوص تولید آنزیم های ACC Oxidase و ACC Synthase که کاتالیزورهای تولید درون زای اتیلین محسوب می شوند توسط Savin و همکاران (۱۹۹۵) انجام گرفته است. اگرچه وجود اتیلین برونی در زنجیرهٔ نقل و انتقالات میخک به عنوان موضوعی مهم مطرح نبوده است اما همیشه این احساس وجود داشته که محصول تراریخته تولید شده نسبت به گل های تیمار شده با مواد شیمیایی از جذابیت کمتری برخوردار است. با روشن شدن مسیر متابولیکی تولید اتیلین در گیاه مدل آرابیدوپسیس (Bleecker and Schaller, 1996: Fluhr, 1998) ، ژن رمز کننده پذیرنده اتیلین از آرابیدوپسیس (*Etr1*) جداسازی و به دنبال آن ژن جهش یافته پذیرنده اتیلین(*Etr1-1*) معرفی شد. با انتقال این ژن به میخک، گل هایی با عمر گلجای بالا و غیر حساس به اتیلین درونی و برونی وعاری از مواد شیمیایی تولید شد. Shaw و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند هنگامی که گل اطلسی با ژن جهش یافته پذیرنده اتیلین، بدست آمده از کلم (*Brassica oleracea*)، ترا ریخته شد، گلهای گیاهان حاصله نسبت به اتیلین برونی غیر حساس بوده و شادابی و رنگ خود را نسبت به گیاهان غیر تراریخته به مدت طولانی تری حفظ کردند. همچنین این گیاهان گل های بزرگتری تولید نمودند، اما مرگ و میر آنها افزایش یافت که می تواند به علت حساسیت بیشتر اطلسی های تراریخته به بیماری ها باشد. Zheng و همکاران (۲۰۰۷) به منظور افزایش ماندگاری گلها در برابر اتیلین، پلاسمید pBinETR1D3 حاوی آنتی سنس cDNA *ETR1* از گل رز رقم Texas را ساخته و به کمک *Agrobacterium tumefaciens* به گل اطلسی منتقل و گیاهان تراریخته ای تولید کردند که حساسیت

Archive of SID

کمتری به اتیلین داشته و پس از به کار بردن اتیلین پژمرده نگردیدند.

- صفات مرفولوژیکی

تا کنون بسیاری از ژن های بالقوه مفید در فرم و شکل گل و گیاه کلون شده اند. عوامل نسخه برداری تنظیم کننده نمو گیاه و ژنهای بیوسنتزی یا تنظیم کننده دخیل در هورمونهای گیاهی کاندیداهای متعارفی هستند. اما فقط تعداد بسیار کمی از این ژن ها در برنامه های اصلاحی گیاهان زینتی به کار گرفته شده اند. بیان این ژن ها ی مفید در بعضی از موارد با ایجاد گیاهانی همراه بوده است که از لحاظ بازار پسندی از پتانسیل بالایی برخوردار نبوده اند. به عنوان مثال Winefield و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که بیان ژن *rolC* از آگروباکتریوم ریزوژنز باعث تولید آنزیم cytokinin-β-glucosidase می شود. اطلسی های تراریخته با ژن مذکور تغییرات مرفولوژیکی از جمله کاهش ارتفاع گیاه، اندازه برگ و گل و تولید شاخه های جانبی متعدد را نشان دادند. اما بر طبق مطالعات van der Salm و همکاران (۱۹۹۷) انتقال ژن های *C* و *rol A, B* در رقم رز *R. hybrida* cv. Money way منجر به تولید ریشه های بهتر در این گیاهان شد. از مواد شیمیایی مانند uniconazole به طور گسترده برای پاکوتاه نمودن گیاهان استفاده می شود اما امروزه بسیاری از ژن های دخیل در بیوسنتز جیبرلین و علامت دهی جداسازی شده اند و بعضی از مراکز اصلاحی مانند شرکت سانتوری بطور موفقیت آمیزی از ژن *gai-1* برای تولید گلهای اطلسی پاکوتاه استفاده می نماید (Tanaka *et al*. 2005).

- عطر گل

عطر گل در جذب گرده افشانها و برای مصرف کنندگان بازار گل و گیاه از اهمیت ویژه برخوردار است. ماده معطره گلها از ترکیبات مختلفی تشکیل شده است، بیش از ۷۰۰ ترکیب در ۶۰ خانواده گیاهی شناسایی شده اند، که عمدتاً مشتقات اسیدهای چرب نظیر بنزوئیدها، فنیل پروپانوئیدها و ترپنوئیدها می باشند. اگر چه تعداد ژن های کلون شده برای بیوسنتز مواد معطره روز به روز افزایش می یابد اما اطلاعات بیوشیمی و بیولوژی مولکولی در مورد مکانیزم بیوسنتز این مواد بسیار کم است. این ترکیبات در گلبرگ ها و تحت تاثیر آنزیم های سلولهای اپیدرم گلبرگ ها و متأثر از مرحله نموی آنها تولید می شوند. اولین ژن ساختاری جداسازی شده برای بیوسنتز آنزیم مواد معطره، S-linalool synthase (*LIS*) ، از یک گیاه بومی منطقه کالیفرنیا به نام *Clarkia breweri* بدست آمد که ترکیب اصلی ماده معطره آن S-linalool بود. Lucker و همکاران در سال ۲۰۰۱ این ژن را به گیاه اطلسی واریته *Petunia hybrida* W115 منتقل کردند. با تنظیم منفی ژن *F3H* در میخک به منظور کاهش آنتوسیانین و کمرنگ تر نمودن گل، Zuker و همکاران (2002) به گیاهانی با مقدار متیل بنزوات تولیدی بیشتر و در نتیجه رایحه بیشتری دست یافتند. آنها نتیجه گیری کردند که مسدود کردن مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین ممکن است جریان متابولیکی را از طریق مسیر فنیل پروپانوئید تغییر داده باشد.

- مقاومت به بیماری ها

بازار تجاری گل و گیاه همواره در معرض بیماری ها قرار داشته و سالانه خسارات زیادی را متحمل می شود. همواره روش های متعددی به کار گرفته شده تا با هجوم و منتشر شدن آنها مبارزه نمایند. مواد شیمیایی بطور معمول برای مقابله با عوامل بیماریزا و حاملین آنها چه در سطح کم و چه در سطح تجاری مورد استفاده قرار می گیرند. این مواد هم گران قیمت بوده و هم برای محیط زیست خطر ناک می باشند. گاهی اوقات ایجاد تغییر در مدیریت محصول می تواند برای مبارزه با آفات و بیماریها مؤثر باشد. برای مثال استفاده از سیستم های کشت هیدروپونیک در گلهای شاخه بریده از جمله میخک به کنترل آفات و بیماریها کمک کرده است، اما این تغییرات عمدتاً هزینه برند. یکی از راه های پایین آوردن هزینه های تولید، اصلاح گیاهانی است که به مواد شیمیایی کمتری نیاز داشته و مقاوم به انواع قارچ ها، باکتری ها، ویروس ها، نماتد ها و حشرات باشند. اصلاح سنتی گیاهان زینتی به دلیل عدم وجود ژن های مقاوم در بعضی از ارقام مهم تجاری، محدودیت تلاقی های بین گونه ای ، زمان بر بودن برنامه های اصلاحی، همچنین عدم پایدار بودن مقاومت در گیاهان اصلاح

www.SID.ir

Archive of SID

شده به دلیل روابط پیچده میزبان و آفات و بیماری ها از محدودیت های خاص برخوردار است.

بیش از ۱۰۰،۰۰۰ گونه قارچ در دنیا وجود دارند که حدود ۸۰۰۰ گونه از آنها قادر به ایجاد بیماری در گیاهان هستند. همه گیاهان مستعد آلودگی به بیماری های قارچی می باشند و معمولا یک قارچ می تواند افراد بیش از یک گونه گیاهی را آلوده نماید (Agrios, 1988). دیواره سلولی قارچ ها معمولاً از پلیمر های کیتین (chitin) و گلوکان (β-1, 3-glucan) تشکیل شده و بنابراین در برابر تجزیه آنزیم های کیتیناز یا گلوکاناز (β-1, 3-glucanases یا chitinases) آسیب پذیر می باشند. این آنزیم ها در گیاهان وجود دارند و در تنباکو بخوبی تشریح شده اند. راهبردهای به کار گرفته شده برای افزایش مقاومت در گیاهان زینتی بطور کلی محدود به بیان آنزیم های هیدرولیتیکی و ترکیبات ضد میکروبی شده است (Punja 2001). با انتقال ژن کیتیناز *Chi*A، از باکتری *Serratia marsecens*، به تعدادی از ارقام میخک لاین های جدیدی پدید آمد که تاخیر در بروز علایم بیماری و در نتیجه تاخیر در مرگ گیاه را موجب شدند (Tanaka *et al*. 2005). حساسیت رزها به انواع بیماری های قارچی از جمله سفیدک دروغی، سفیدک سطحی و لکه سیاه خسارات زیادی به بازار تجاری این گیاه وارد نموده است. Marchant در سال ۱۹۹۸ با انتقال ژن کیتیناز به *R. hybrida* cv. Glad Tidings حساسیت این گیاه را به بیماری لکه سیاه کم نمود . Li و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ گزارش نمودند که با انتقال ژن پروتئین ضد باکتریایی (*Ace*-AMP1) به رز *R. hybrida* cv. Carefree Beauty مقاومت به بیماری سفیدک سطحی در این گیاه افزایش یافت. پپتیدها و پروتئین های ضد باکتریایی از گیاهان استخراج شده و یا در آزمایشگاهها سنتز می شوند. این مواد با هضم قارچها و یا مختل کردن ساخت دیواره سلولی به ایجاد مقاومت در گیاهان کمک می کنند .(Punja 2001) Bi و همکاران در سال ۱۹۹۹ با انتقال پروتئین ضد باکتریایی به شمعدانی مقاومت به بوتریتس (*Botrytis cinerea*)را در این گیاه افزایش دادند. گل داوودی به دلیل تکثیر از طریق رویشی همواره در معرض آلودگیهای ویروسی و شبه ویروسی بوده است. یکی از مهمترین این ویروسها، ویروس B گل داوودی (CVB) است. Skachkova و همکاران در سال ۲۰۰۶ به منظور بهبود مقاومت به این ویروس، حاملهایی حاوی آنتی سنس پوشش پروتئینی ویروس را ساختند و از طریق آگروباکتریوم رقم White Snowdon گل داوودی را تراریخته کرده و لاینهای مقاومی از آن بدست آوردند. همچنین ژن *cry1Ab*، بدست آمده از *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 که سمی درونزاد را تولید می کند، به منظور کاهش خسارات حشرات فلس بال به ۵ رقم گل داوودی منتقل و گیاهان تراریخته مقاوم تولید گردید (Mochizuki 2006 Shinoyama and).

نتایج و بحث

استفاده از روش های نوین بهنژادی گل و گیاهان زینتی در جهان رو به گسترش است. از آنجا که در روش های سنتی علیرغم صرف وقت و هزینه بالا، محصولات تولید شده اغلب فاقد شاخص های مورد نظر بهنژادگران بوده و همچنین این روش ها به تنهایی قادر به پاسخگویی نیاز بازار تنوع طلب مصرف کنندگان نمی باشند، بنابراین استفاده از روش های نوین به عنوان مکمل و حتی جایگزین روش های سنتی اصلاحی امری ضروری و اجتناب ناپذیر به نظر می رسد. با دستیابی به تکنیکهای نوین اصلاحی نظیر القا جهش، پلی پلوئیدی و یا مهندسی ژنتیک می توان با تغییرات جزئی در ساختار ژنتیکی گیاه و حفظ سایر صفات مطلوب آن، ضمن ایجاد تغییرات لازم به منظور دستیابی به صفات مورد نظر مصرف کننده در وقت و هزینه اصلاحگران به میزان زیاد صرفه جویی نمود. با توجه به پیشرفت تکنولوژی های مدرن هزینه ها و زمان مورد نیاز جهت بهینه سازی این روش ها روزبه روز در حال کاهش بوده و اصلاح گیاهان زینتی از طریق روش های نوین در بسیاری از موارد از نظر اقتصادی توجیه پذیر است. از طرف دیگر قوانین آزاد سازی گیاهان تراریخته خصوصا در مورد گیاهان زینتی در بعضی از کشورها تصویب و در بعضی دیگر در حال تصویب می باشند، لذا در آینده شاهد نقش موثرتر استفاده از تکنیک های نوین در اصلاح گل و گیاهان زینتی خواهیم بود.

Archive of SID

منابع

1. Agrios GN (1988) Plant Pathology. 3rd edn. Academic Press, San Diego.
2. Bhojwani SS, Pande H & Raina A (2001) Factors affecting androgenesis in indica rice. Cited at: http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2003/1238/pdf/FestschriftNeumann_06.pdf.
3. Bi YM, Cammue BPA, Goodwin PH, Krishna Raj S & Saxena PK (1999) Resistance of *Botrytis cinerea* in scented geranium transformed with a gene encoding the antimicrobial protein Ace-AmP1. Plant Cell Rep. 18: 835–840.
4. Bleecker AB & Schaller GE (1996) The mechanism of ethylene perception. Plant Physiol. 111: 653–660.
5. Byrne DH & Carne YM (2003). Amphidiploidy. In: Encyclopedia of rose science. Eds: Roberts, A. V., Debener, T. and Gudin, S. Elsevier Academic Press. 1: 11-15.
6. Courtney-Gutterson N, Napoli C, Lemieux C, Morgan A, Firoozababy E & Robinson KEP (1994) Modification of flower color in Florist's Chrysanthemum: production of a white-flowering variety through molecular genetics. Biotech. 12: 268–271.
7. 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. Biotech. 11: 508–511.
8. Fluhr R (1998) Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction. Tre. Pl. Sci. 3: 141–145.
9. Fukui H & Yokota T (2007) Tetraploid induction by cholchicine and oryzaline in *Rosa multiflora*. Acta Hort. 751: 313-322.
10. Gutterson N (1995) Anthocyanin biosynthetic genes and their application to flower color modification through sense suppression. Hort. Sci. 30: 964–966.
11. Han DS, Niimi Y & Nakano M (1997) Regeneration of haploid plants from anther cultures of the Asiatic hybrid lily 'Connecticut King'. Pl. Cell Tiss. Org. Cul. 47: 153-158.
12. Hennayake CK, Kanechi M, Uno Y & Inagaki N (2007). Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in 'Charleston' roses. Acta Hort. 760: 643-650.
13. Holton TA, Brugliera F & Tanaka Y (1993) Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. Pl. J. 4: 1003–1010.
14. Huttema JBM, Gussenhoven G, Dons JJM & Broertjes C (1986) Induction and selection of low temperature tolerant mutants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Nuclear techniques and in vitro culture plant improvement. Vienna, Austria, IAEA: 321–7.
15. 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.
16. Kaicker US (1982) Mutation breeding in roses. Indian Rose Ann Rep. 2: 35–42.
17. 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 Japan. Soc. Pl. Cell Mol. Biol. 121 pp.
18. Kermani MJ (2001) Chromosome doubling and the breeding of disease resistant roses. PhD Thesis University of East London, London, UK.
19. Kermani MJ, Sarasan V, Roberts AV, Yokoya A, Wentworth J & Sieber VK (2003) Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effects on plant morphology and pollen viability. Theor. Appl. Genet. 107: 1195-120.
20. Khalid N, Davey MR & Power JB (1989) An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of commercial value. Sci. Hortic. 38: 287–294.
21. Khosravi P, Kermani MJ, Nematzadeh GA, Bihamta MR & Yokoya K (2008) Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. Euphytica. 160: 267-275
22. Larkin PJ & Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.
23. Li X, Gasic K, Cammue B, Broekaert W & Korban SS (2003) Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, Ace-AMP1, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*) Planta 24 September Online.
24. Lu G, Zhang X, Zou Y, Zou Q, Xiang X & Cao J (2007) Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. Pl. Cell Tiss. Org. Cult. 88: 319–327.
25. Lucker J, Bouwmeestar 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. Pl. J. 27: 315–324.
26. Mandal AKA, Chakrabarty D & Datta SK (2000) *In vitro* isolation of solid novel flower color mutants from induced chimeric ray florets of chrysanthemum. Euphytica. 114: 9–12.
27. Marchant R (1998) Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). Mol. Breed. 4: 187–194.
28. Meynet J, Barrade R, Dulos A & Siadous R (1994) Diploid plants of roses obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds. Agronomie. 2: 169-175.
29. Mizutani M, Tsuda S, Suzuki K, Nakamura N, Fukui Y, Kusumi T & Tanaka Y (2003) Evaluation of post

www.SID.ir

transcriptional gene silencing methods using flower color as the indicator. Pl. Cell Physiol. 44: 122.
30. Mol J, Cornish E, Mason J & Koes R (1999) Novel coloured flowers. Curr. Opin. Biotech. 10: 198–201.
31. Jain, SM (2006). Mutation-assisted breeding for improving ornamental plants. Acta Hort. 714: 85-98.
32. Nimura M, Kato J, Horaguchi H, Mii M, Sakai K & Katoh T (2006) Induction of fertile amphidiploids by artificial chromosome-doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. Br. Sci. 56: 3: 303-310.
33. Nishihara M, Nakatsuka T, Mishiba K, Kikuchi A & Yamamura S (2003) Flower color modification by suppression of chalcone synthase gene in gentian. Pl. Cell Physiol. 44: s159.
34. Punja ZK (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens-a review of progress and future prospects. Can. J. Pl. Pat. 23: 216–235.
35. Quintana A, Albrechtova J, Griesbach RJ & Freyre R (2007) Anatomical and biochemical studies of anthocyanidins in flowers of *Anagallis monelli* L. (Primulaceae) hybrids. Sci Hort. 112: 413–421.
36. Rajagopalan C (2000) Export potential of Indian floriculture and need of policy environment. Floric. Today. 9: 29-33.
37. Rout GR, Mohapatra A & Mohan Jain S (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotech. Advances. 24: 531–560
38. 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.
39. Schiva T (2000) Strategies for development of commercial floriculture in Asia and Pacific. Report of the APO seminar, 2nd-6th may. New Delhi, India: 27-38.
40. Schlangen K, Halbwirth H, Topuz F, Miosic S, Seitz C & Stich K (2007) Breeding for yellow flower colour. Abstracts / J. Biotech. 131S (2007) S32–S35.
41. 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.
42. 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.
43. Shinoyama H & Mochizuki A (2006) Insect resistant transgenic chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura]. Acta Hort. 714:177-184.
44. Skachkova TS, Mitiouchkina TY, Taran SA & Dolgov SV (2006). Molecular biology approach for improving chrysanthemum resistance to virus B. Acta Hort. 714:185-192.
45. Sopory SK & Munshi M (1996) Anther culture. In: *In vitro* haploid production in higher plants eds: Jain I S M, Sopory S K & Veilleux. 1: 145-176.
46. Sun M, Li P & Zhang Q-X (2007). Flower color and florescence mutants obtained using electron beam irradiation of chrysanthemum buds. Acta Hort. 760:667-672.
47. Tanaka Y, Katsumoto Y, Brugliera F & Mason J (2005) Genetic engineering in floriculture. Pl. Cell. Tiss. Org. Cult. 80: 1-24.
48. 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.
49. 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.
50. Walther F & Sauer A (1986) In vitro mutagenesis in roses. Acta Hort. 189: 37–46.
51. 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.
52. Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Curr. Opin. Pl. Biol. 5: 218–223.
53. Zheng Y, Ma Y, Liu Q & Cai W (2007). An antisense *ETR1* cDNA from rose can reduce the ethylene sensitivity of petunias. Acta Hort. 751:473-479.
54. 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.