

## 月季体细胞无性系及其在品种选育中的可能应用

瞿素萍<sup>1</sup> 王继华<sup>1</sup> 张颢<sup>2</sup> 王丽花<sup>1</sup> 唐开学<sup>1,\*</sup>

云南省农业科学院<sup>1</sup>农业部花卉产品质量监督检验测试中心(昆明), <sup>2</sup>花卉研究所, 昆明 650205

### Somaclone and Its Potential Application in Breeding of Roses

QU Su-Ping<sup>1</sup>, WANG Ji-Hua<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>2</sup>, WANG Li-Hua<sup>1</sup>, TANG Kai-Xue<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Supervision and Testing Centre for Flowers, Ministry of Agriculture; <sup>2</sup>Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China

**摘要** 文章介绍月季的体细胞无性系诱导和植株再生, 主要包括月季体细胞无性系再生的类型、影响因素及其在育种中应用的研究进展。

**关键词** 月季; 体细胞无性系; 诱导; 再生; 变异; 育种

月季(*Rosa*)是最具经济效应的观赏植物之一, 素有“花中皇后”之美誉。在2003年荷兰切花拍卖额中, 月季排名第一, 达6.8亿美元, 是排名第二的菊花(3.4亿美元)的2倍, 居世界四大切花之首。同时, 月季也是我国的十大名花之一。据农业部统计, 2003年我国月季的种植面积为7.1万亩, 销售量为19.8亿枝, 在切花中排名第一, 具有很高的商业价值(唐开学2005)。

Hill于1967年成功地从藤本杂种茶香月季的愈伤组织中诱导出胚性组织, 这不仅标志着生物技术能在月季育种中应用, 也意味着月季育种跨入了第3个演化时期(孙宪芝和赵惠恩2003)。Larkin和Scowcroft(1981)首次将细胞培养或组织培养形成的再生植株统称为体细胞无性系(somaclone), 其变异称为体细胞无性系变异(somaclonal variation)。由于体细胞无性系变异具有变异频率高(30%~40%, 最高可达100%, 某一具体性状的变异率为0.2%~3%)、变异谱广、显性突变多和变异稳而快的优点(Orton 1983; Evans等1984; 朱至清2003), 因而体细胞无性系变异可作为一种现代的生物技术手段来获得新变异源或育成新品种(朱至清2003)。但总体来讲, 人们对月季这方面的研究和讨论较少, 本文介绍其研究现状。

#### 1 月季体细胞无性系的诱导与再生方式

一般而言, 体细胞无性系的诱导和再生可分为器官发生途径和体细胞胚发生途径, 又依据是

否经过愈伤组织阶段而进一步分为直接再生和间接再生2种(朱至清2003; 高莉萍和包满珠2005a)。

**1.1 直接再生** Lloyd等(1988)从*R. persica*和*R. xanthina*的杂交后代的叶和根、金樱子(*R. laevigata*)和光叶蔷薇(*R. wichuraiana*)的叶诱导出不定芽, 但未报道诱导率。Dubois等(1996, 1997)以田间未展开的幼嫩复叶为材料, 用两步法直接再生, 再生率为65%~100%。Ibrahim和Pierre(2001)改进了Dubois等的方法, 他们用组培苗叶片得到的再生率为76.5%~93.5%。在任桂芳等(2004)建立的月季叶片再生体系中, 所诱导的24个品种仅有12个品种能成功再生, 再生率为10.9%~46.5%, 其中切花品种的再生率为10.9%~22.2%。高莉萍和包满珠(2005b)用月季切花品种的‘萨蔓莎’叶片直接再生, 小叶和复叶柄的再生率分别为51.8%和10%。上述结果证明直接再生方式在月季中是可行的, 不定芽的再生率较高, 但由于激素的影响, 有些不定芽因产生畸形而无法伸长大, 这就在一定程度上降低了再生率(Lloyd等1988), 有部分品种甚至不能成功再生。因此, 为了更好地利用体细胞无性系, 需针对不同品种进行深入研究, 以得到其高效的再生体系。

收稿 2006-05-15 修定 2006-09-13

资助 云南省自然科学基金(2005C0037Q)。

\* 通讯作者(E-mail: kxtang@public.km.yn.cn, Tel: 0871-5120870)。

**1.2 间接再生** Lloyd等(1988)从*R. persica*和*R. xanthina*杂交后代的节间愈伤组织诱导出不定芽, 但具器官发生能力的愈伤组织经3次继代后便失去再生能力。Burger等(1990)用4个杂交组合产生的未成熟胚为外植体, 从子叶愈伤组织诱导出不定芽, 再生率达53%。Rosu等(1995)用膨大的侧芽多次继代后, 成功诱导出愈伤组织和不定芽。Hsia和Korban(1996)以及Li等(2002a)从品种‘Carefree Beauty’的叶和节间诱导形成带根的愈伤组织并分化出不定芽, 再生率最高达53%。高莉萍和包满珠(2005c)用他们建立的品种‘萨蔓莎’叶片经愈伤组织形成假珠芽再生不定芽的方法, 获得可长期继代的愈伤组织。虽然月季从愈伤组织间接诱导不定芽的再生率通常不高, 并且受基因型的影响较大, 限制了此再生途径的应用, 但高莉萍和包满珠(2005d)认为对农杆菌介导的转化体系而言, 间接再生体系要比直接再生体系有效得多, 在试验的5 893个直接再生叶片中, 未获得任何阳性小叶和抗性植株, 而间接再生的胚性愈伤组织则得到了70%表达率。由此看来, 月季间接再生体系的构建对于转基因和体细胞无性系变异等研究可能有较高的应用价值。

**1.3 体细胞胚发生** 体细胞胚发生一般包括体细胞胚的诱导、增殖与成苗3个环节(朱至清2003; 高莉萍和包满珠2005a)。月季体细胞胚发生途径的研究较多, 已研究过体细胞胚发生途径的月季种或品种约有30多个, 而成功诱导的约有17个。用来诱导体细胞胚的外植体有叶片(Kintzios等1998, 1999, 2000; Li等2002a; Dohm等2001; 高莉萍和包满珠2005c)、节间(Rout等1991)、根(Yokoya等1996; Van der Salm等1996a, b)、花丝(Noriega和Sondahl 1996)、花瓣(Murali等1996)和花萼、花座和子房等(Arene等1993), 均成功获得了再生植株。目前, 次级体细胞胚和胚性愈伤组织因能长期保存, 且再生能力持久, 已成为月季转基因的主要受体材料。

## 2 影响体细胞无性系的诱导、再生和变异的因素

**2.1 影响体细胞无性系诱导和再生的因素** 影响体细胞无性系诱导和再生的主要因素有基因型(品种)、生长调节物质、外植体类型、培养基成分、碳源和培养条件等(袁澍等2003)。

**2.1.1 基因型(品种)** 基因型对体细胞无性系诱导和再生的影响最大。Dubois等(1996, 1997)研究的月季直接再生体系中, 有24个品种的再生率存在差异, 为65%~100%, 其中15个品种再生效率非常好, 5个较好, 4个中等。任桂芳等(2004)在诱导的24个基因型中, 仅有12个基因型能成功再生, 且再生率的差异较大, 为10.9%~46.5%。Lloyd等(1988)研究的5个基因型, 仅有1个基因型的节间能形成愈伤组织。Kintzios等(1999)报道的4个品种中, ‘Ronto’和‘Soraya’比‘Baccara’和‘Mercedes’更易产生愈伤组织, 仅有‘Soraya’形成体细胞胚, 并分化成芽。在体胚诱导中, Murali等(1996)研究的22个品种, 只有2个品种形成体细胞胚。De Wit等(1990)研究的7个品种, 只有‘Domingo’和‘Victory Brown’具有产生体细胞胚的能力。

**2.1.2 生长调节物质** 生长调节物质是体细胞无性系诱导和再生的重要影响因素之一, 诱导愈伤组织的生长调节物质有6-BA、NAA、2,4-D、ZT等。在愈伤组织诱导中, 若单独用细胞分裂素, 则不易形成愈伤组织; 而用NAA或2,4-D, 则易形成愈伤组织。单独用2,4-D且浓度太大时, 愈伤组织发生率下降。若在2,4-D中添加低浓度的6-BA有利于愈伤组织的诱导, 但6-BA浓度过高, 则抑制愈伤组织的形成。Li等(2002b)报道, 不同品种所使用的2,4-D浓度不同, 产生愈伤组织的颜色和组织结构也不一样。但Kintzios等(1999)认为2,4-D会抑制愈伤组织的诱导。

体细胞胚的诱导与分化受生长调节物质的类型和比例等影响, 一般采用的生长调节物质有TDZ、6-BA、NAA、2,4-D、ZT、ABA和GA<sub>3</sub>等。若细胞分裂素/生长素比值高, 则有利于愈伤组织分化体细胞胚, 比值低则有利于保持脆性的胚性愈伤组织, 细胞分裂素浓度太高易引起愈伤组织的褐化。暗培养中, ABA和GA<sub>3</sub>有利于某些品种的体细胞胚分化成熟。Hsia和Korban(1996)认为TDZ有提高体细胞胚诱导和发生的作用, 二者分别提高6.6%和31%, 效果比6-BA好。Li等(2002b)认为TDZ有利于体细胞胚的产生和萌发, 若不加入TDZ, 则无组织型愈伤组织形成。他们的研究还表明, 品种‘Carefree Beauty’的

体细胞胚在 ABA 作用下的萌发率可提高 5 倍, 因而认为 ABA 对促进体细胞胚的增殖和萌发效果较好。Noriega 和 Söndahl (1996) 指出, 低水平的 NAA/ZT 有利于诱导脆性胚性愈伤组织的形成, 而高水平的 NAA/ZT 则有利于保持, 而 ABA 能促进胚的成熟, 减少不正常胚的发生。

**2.1.3 外植体类型** 不同外植体类型对体细胞无性系的诱导和再生有一定的影响。Arene 等 (1993) 研究品种 ‘Meirutral’ 的不同外植体类型, 其愈伤组织诱导率的结果显示, 叶为 90%, 根为 70%, 节间为 55%, 花药为 19%, 花瓣、花萼、子房和花托等花器官为 16%, 合子胚的发育时期对愈伤组织的形成能力也有影响, 如处于心形胚的合子胚, 其愈伤组织产生频率只有 2%, 子叶胚期合子胚的频率可达 85%。Burger 等 (1990) 也证明, 授粉后 27 d 胚轴刚形成时的胚子叶再生愈伤组织的频率最高, 可达 53%。Rout 等 (1991) 以品种 ‘Landora’ 为材料, 其在近轴面的叶柄和中脉处的愈伤组织诱导率高达 92%, 而茎切端处为 76%。Dubois 等 (1996) 研究不同部位的叶再生率的结果表明, 叶片基部的再生率为 70%~100%, 叶鞘基部为 25%~100%。

**2.1.4 碳源** 培养基中碳水化合物的类型和浓度具有一定影响。Das 等 (1993) 的实验指出, 果糖和蔗糖对体胚发生的效果最好, 麦芽糖则有利于诱导产生正常的体胚。Hsia 和 Korban (1996) 比较蔗糖和葡萄糖在品种 ‘Carefree Beauty’、‘Red Sulblaze’ 和 ‘Baby Katie’ 的体胚发生率, 结果表明, 在品种 ‘Carefree Beauty’ 中,  $111 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的葡萄糖有利于器官型和体细胞型的愈伤组织形成, 如提高浓度, 则抑制其形成;  $111 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的葡萄糖也有利于品种 ‘Baby Katie’ 形成体细胞型愈伤组织, 而对器官型愈伤组织的效果不明显; 蔗糖浓度无明显影响。

**2.1.5 培养基基本成分** 体细胞胚再生的基本培养基有 MS、1/2 MS、 $B_5$ 、SH 等。若除去 Mg、Zn、I 离子或是降低三者的浓度, 或将 Cu 离子浓度提高 10 倍, 则有利于愈伤组织和体细胞胚诱导。但是在体细胞胚萌发时, 提高 Cu 离子浓度对发芽不利, 其他微量元素对发芽的影响较小。有机物中, 肌醇、 $B_{12}$  和  $B_6$  有利于愈伤组织的生

长, 烟酸和半胱氨酸有利于球形胚的生长, 而泛酸、生物素和谷氨酸则抑制球形胚的形成。如果在体细胞胚诱导过程中加入脯氨酸, 则有利于体细胞胚的发育, 否则体细胞胚因不发育而变小 (Kintzios 等 2000)。Rout 等 (1991) 报道, 在诱导体胚发生时加入 L-脯氨酸, 可增加体胚发生率, 但他们认为在体胚萌发培养基中需除去 L-脯氨酸, 才能促进体胚的正常发育。

**2.1.6 培养条件** Kintzios 等 (1999) 认为, 培养时的光照强度对体胚的形成影响很大, 光照强度低于  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  时, 体胚的发生频率最高, 但在发育过程中光照强度的影响不大。适当的暗培养有利于愈伤组织的诱导和芽体的形成, 同样的外植体经黑暗诱导后越易形成突起, 越早地分化不定芽 (Ibrahim 和 Debergh 2001; 任桂芳等 2004; 高莉萍和包满珠 2005b)。Rout 等 (1991) 还报道, 胚性愈伤组织在  $8^\circ\text{C}$  下预处理 4 d 的体胚萌发频率从 0 提高至 12%。Roberts 等 (1995) 报道,  $4^\circ\text{C}$  下预处理 2 d 的体胚萌发率从 12% 提高到 24%。

**2.1.7 其他因素** Ibrahim 和 Debergh (2001) 及高莉萍和包满珠 (2005b) 报道, 在愈伤组织诱导阶段, 添加  $\text{AgNO}_3$  有利于愈伤组织的形成, 但在诱导芽体时, 则需除去  $\text{AgNO}_3$ 。Van der Salm 等 (1996b) 报道, 用卡拉胶代替琼脂, 有利于芽器官的发生, 而缩短愈伤组织的诱导时间也可提高器官分化率。

**2.2 影响体细胞无性系变异的因素** 影响体细胞无性系变异主要有供体材料类型、培养基和培养方式、继代次数等 (朱至清 2003), 但迄今对影响月季体细胞无性系变异因素的报道很少。仅 Arene 等 (1993) 报道了来源于营养器官的愈伤组织, 其再生植株有 21.7% 的变异, 但外植体若为合子胚的再生植株, 其变异高达 70%。培养方式主要有 2 种, 通过芽体快繁的植株或不经愈伤组织阶段直接再生的植株, 一般变异率较低; 而经愈伤组织诱导的体细胞无性系易产生变异, 其变异频率一般随着培养时间的延长和继代次数的增多而明显增加。

### 3 体细胞无性系在月季育种上的应用

**3.1 直接筛选变异株系** 月季育种最早始于我国, 我国的月季花 (*R. chinensis*) 和香水月季 (*R.*

*odorata*)等重要种质资源,对国际的月季育种工作曾起过巨大作用,令世人瞩目(Gudin 2001; 杨增宏 2000)。但自明代起,我国的月季育种就远远落后于花卉发达国家,育种工作基本上处于停滞状态,洋品种严重影响国内市场(陈俊愉 2001)。就月季的品种专利权而言,在目前流行的栽培品种中,90%以上是由法国、德国、美国 and 荷兰培育而成(余树勋 2001),其中仅法国Meilland公司所培育的品种就占30%。目前,云南省农业科学院、华中农业大学园艺林学学院、昆明杨月季园艺有限责任公司等单位已从杂交育种、转基因、芽变选择等领域开展了育种工作,取得了初步进展,得到‘冰清’等的新品种专利权(杨玉勇和郁书君 2004)。

体细胞无性系变异作为作物获得新变异源和培育新品种的一种有效途径(朱至清 2003; 韦彦余等 2004),已成为传统杂交育种的有力补充。迄今为止,国内外育种家们已在甘蔗、小麦、马铃薯、水稻等众多的作物中获得了大量的体细胞无性系,其在抗病性、抗逆性以及内在品质上表现出丰富的变异,从中选育出性状稳定,可遗传的新品种、新品系或中间材料。Arene等(1993)以月季根叶等营养器官及合子胚为外植体,经愈伤组织诱导出的体细胞无性系,其变异率分别高达21.7%和70.0%,变异主要体现在花瓣的数量、形状和颜色以及植株的生长高度上,并在以后的扦插试验中也证明这些变异是稳定而可遗传的。Li等(2002a)调查的152个月季再生植株中,有83个植株在花瓣的数量上与原有品种不同,16个植株的株高变矮,4个的叶片变圆,12个花色改变,33个的生长习性和花瓣数量有改变,4个花瓣数量和花色都有改变,高频率的变异说明体细胞无性系变异可能是产生月季新性状的有效方法。Firoozabady等(1994)从品种‘Royalty’的体细胞无性系的自然变异株系中选育出了抗根癌病的优良株系LBA4404。据此,Gudin和Mouchotte(1996)认为体细胞无性系变异已成为选育月季新品种的方法之一,预计这种方法与离体筛选技术相结合将可能大大提高育种效率。

**3.2 基因遗传转化** 构建高效的植株再生体系是遗传转化成功与否的前提条件,除Van der Salm等

(1997)用不定根作为转化受体外,其他所有转化均采用胚性愈伤组织(Firoozabady等1994; Marchant等1998; Li等2002b)或体细胞胚(Derks等1995; Li等2002b)。Firoozabady等(1994)最早用致瘤农杆菌和发根农杆菌2个株系研究基因的遗传转化的结果表明,不同的2个农杆菌株系对基因转化率的影响不大,而转基因受体的选择则是成功的关键,他们用脆的胚性愈伤组织得到了很高转化频率,每克愈伤组织约产生40~60个独立的抗卡那霉素愈伤组织。Li等(2002b)以初级体细胞胚作为转化受体,PCR和印迹杂交法均证实 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(*GUS*)的成功转移。Derks等(1995)曾以15个品种的根本愈伤组织分化形成的体细胞胚作受体进行了农杆菌介导法的转基因研究,只有‘Sonia’1个品种的体细胞胚在转入基因以后恢复过来,说明不同品种间的基因遗传转化结果存在较大差异。Marchant等(1998)用胚性愈伤组织进行基因枪法转化,将几丁质酶基因成功地导入月季栽培种‘Glad Tidning’中,结果转基因植株的黑斑病发病率减少13%~43%,这是目前唯一公开发表的将有用基因成功导入月季,且目的基因有效表达的研究报告。

#### 4 结语

综上所述,近年来月季在体细胞无性系诱导和再生的研究上取得了很大的进展。国外现已从叶、茎、花丝、根和合子胚等多种外植体中获得了再生植株,再生率从10.9%~100%,约有15个种或品种构建起高效的再生体系。国内对月季组织培养和快速繁殖的研究较多,而对再生体系构建的研究较少,外植体类型仅有叶片1种,从有关报道中得出月季叶片的诱导与再生受基因型的影响最大,不同品种的愈伤组织诱导率、胚状体萌发和芽器官发生的差异也很大,仅有品种‘萨蔓莎’获得了较高的再生率。

体细胞无性系变异作为获得新变异源和育成新品种的有效途径,国外在其变异的研究中,已证实月季体细胞无性系不仅存在变异,而且变异率高,已有人用体细胞无性系变异选育出抗根癌病的优良株系,但用体细胞无性系结合离体诱变技术和选择压力进行筛选的研究尚未见报道。在其他作物育种中已证实胚性愈伤组织、体细胞

胚、不定芽和无菌苗比大田植株的诱变效果更好。另外, 离体筛选体系的建立不仅能将所需的变异株系准确地筛选出来, 从而实现变异株系的快速繁殖, 提高育种效率, 这对月季新品种选育而言, 无疑是一种新的思路和技术方法。

体细胞无性系诱导和再生是遗传转化工作的前提和基础, 只有具备了成熟的再生体系才能有效地进行基因转化。目前, 月季基因遗传转化研究多数还停留在报告基因转化的水平上, 而有关外源基因在转基因植株中的表达和稳定性的报道并不多, 至今还没有能在生产中推广的转基因品种。当前具备高效再生系统的品种也非常有限, 因而再生体系不够完善已成为制约月季转基因的主要因素之一。

所以, 进一步针对一些商业价值高的品种, 研究其高效的体细胞无性系再生体系是必要的, 因为不仅可直接利用其有利变异, 还可结合离体诱变和筛选技术, 加快新品种的选育。同时作为转基因基础的体细胞无性系, 通过高效再生体系的建立并结合转基因方法, 可对月季的花色、花期、瓶插寿命等进行研究, 在月季生产的需求和发展上, 也是值得考虑的。

### 参考文献

陈俊愉(2001). 中国花卉品种分类学. 北京: 中国林业出版社, 58~65  
高莉萍, 包满珠(2005a). 月季的植株再生及遗传转化研究进展. 植物学通报, 22: 231~237  
高莉萍, 包满珠(2005b). 月季萨蔓莎不定芽的直接诱导和植株再生的研究. 中国农业科学, 38: 784~788  
高莉萍, 包满珠(2005c). 月季‘萨蔓莎’愈伤组织的诱导及植株再生. 园艺学报, 32: 534~536  
高莉萍, 包满珠(2005d). 优化农杆菌介导的月季遗传转化系统的研究. 北京林业大学学报, 27: 60~64  
任桂芳, 王建红, 冯慧, 李毅, 李燕, 施雪波(2004). 现代月季(*Rosa hybrida*)叶片植株再生体系的建立. 园艺学报, 31: 533~536  
孙宪芝, 赵惠恩(2003). 月季育种研究现状分析. 西南林学院学报, 23: 65~69  
唐开学(2005). 关于云南花卉产业发展战略的思考. 西南农业学报, 18: 92~98  
韦彦余, 赵民安, 王晓军(2004). 植物体细胞无性系变异在植物性状改良中的应用. 植物生理学通讯, 40: 763~771  
杨玉勇, 郁书君(2004). 切花月季新品种‘冰清’. 园艺学报, 31: 840  
杨增宏(2000). 中国作物遗传资源. 北京: 中国农业出版社, 18~26  
余树勋(2002). 月季. 北京: 金盾出版社, 17~20  
袁澍, 贾勇炯, 林宏辉(2003). 诱导植物体细胞胚发生的几个生理

因素. 植物生理学通讯, 39: 508~512  
朱至清(2003). 植物细胞工程. 北京: 化学工业出版社, 94~107  
Arene L, Pellegrino C, Gudin S (1993). A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. cv. Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissue. Euphytica, 71: 83~90  
Burger DW, Liu L, Zary KW, Lee CI (1990). Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* L.. Plant Cell Tiss Org Cult, 21: 147~152  
Das P, Rout GR, Samantaray S (1993). Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* cv. Landora. Biome, 6: 73~77  
De Wit JC, Esendam HF, Horkamen JJ, Tuominen U (1990). Somatic embryogenesis and regeneration of flowering plants in rose. Plant Cell Rep, 9: 456~458  
Derks FHM, Van Dijk AJ, Hänisch ten Cate CH, Florack DEA, Dubois LAM, de Vries DP (1995). Prolongation of vase life of cut roses via introduction of genes coding for antibacterial activity, somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. Acta Hort, 405: 205~209  
Dohm A, Ludwig C, Nehring K, Debener T (2001). Somatic embryogenesis in roses. Acta Hort, 547: 341~348  
Dubois LAM, de Vries DP (1996). The direct regeneration of adventitious bud on leaf explants of glass house-grown cut rose cultivars. Acta Hort, 424: 327~331  
Dubois LAM, de Vries DP, Koot A (1997). Genetic variation of rose cultivars for direct shoot organogenesis. Acta Hort, 447: 79~83  
Evans DA, Sharp WR, Medina-Filho HP (1984). Somaclonal and gametoclonal variation. Am J Bot, 71: 759~774  
Firoozabady E, Moy Y, Courtney-Gutterson N, Robinson K (1994). Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue. Bio/Technol, 12: 609~613  
Gudin S (2001). Rose breeding technologies. Acta Hort, 547: 23~26  
Gudin S, Mouchotte J (1996). Integrated research in rose improvement—a breeder’s experience. Acta Hort, 424: 284~292  
Hsia C, Korban SS (1996). Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis* Minima. Plant Cell Tiss Org Cult, 44: 1~6  
Ibrahim R, Debergh PC (2001). Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). Sci Hort, 88: 41~57  
Kintzios S, Drssopoulos JB, Lympelopoulos C (2000). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from young mature leaves of rose. J Plant Nutr, 23: 1407~1420  
Kintzios S, Hiureas G, Shortsiianites E, Sereti E, Blouhos P, Manos C, Makri O, Taravira N, Drossopoulos JB, Holevas CD (1998). The effect of light on the induction development and maturation of somatic embryos from various horticultural and ornamental species. Acta Hort, 461: 427~432  
Kintzios S, Manos C, Makri O (1999). Somatic embryogenesis

- from mature leaves of rose (*Rosa* sp.). *Plant Cell Rep*, 18: 467~472
- Larkin PT, Scowcroft WR (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet*, 60: 197~214
- Li X, Krasnyanski SF, Korban SS (2002a). Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis and shoot organogenesis in *Rosa*. *J Plant Physiol*, 159: 313~319
- Li X, Krasnyanski SF, Korban SS (2002b). Optimization of the *uidA* gene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol Biochem*, 40: 453~459
- Lloyd D, Roberts AV, Short KC (1988). The induction *in vitro* of adventitious shoots in *Rosa*. *Euphytica*, 37: 31~36
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Lamb CJ, Dixon RA, Power JB (1998). Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Mol Breed*, 4: 187~194
- Murali S, Sreedhar D, Lokeswari TS (1996). Regeneration through somatic embryogenesis from petal-derived calli of *Rosa hybrida* L. cv 'Arizona' (hybrid tea). *Euphytica*, 91: 271~275
- Noriega C, Söndahl MR (1996). Somatic embryogenesis in hybrid tea roses. *Bio/technol*, 9: 991~993
- Orton TJ (1983). Experimental approaches to the study of somaclonal variation. *Plant Mol Biol Rep*, (1): 67~76
- Roberts AV, Yoloya K, Walker S, Mottley Y (1995). Somatic embryogenesis in *Rosa* spp. In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Dordrecht: The Netherlands Kluwer Academic Publishers, 277~289
- Rosu A, Skirvin RM, Bein A, Norton MA, Kushad M (1995). The development of putative adventitious shoots from a chimeral ornless rose (*Rosa multiflora* Thunb. ex J. Murr.) *in vitro*. *J Hort Sci*, 70: 901~907
- Rout GR, Debata BK, Das P (1991). Somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 27: 65~69
- Van der Salm TPM, van der Toorn CJG, ten Cate Hänisch CH, Dons HJM (1996a). Somatic embryogenesis and shoot regeneration from excised adventitious roots of the rootstock *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'. *Plant Cell Rep*, 15: 522~526
- Van der Salm TPM, Van der Toorn CJG, ten Cate Hänisch CH, Van der Krieken WM, Dons HJM (1996b). The effects of exogenous auxin and rol genes on root formation in *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'. *Plant Growth Regul*, 19: 123~131
- Van der Salm TPM, Van der Toorn CJG, Bouwer R, ten Cate Hänisch, Dons HJM (1997). Production of ROL gene transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterization of their rooting ability. *Mol Breed*, 3: 39~47
- Yokoya K, Walker S, Sarasam V (1996). Regeneration of rose plants from cell and tissue cultures. *Acta Hort*, 424: 333~337