

# 月季的组织培养和基因转化研究进展

李美茹<sup>1</sup>, 李洪清<sup>2</sup>, 孙梓健<sup>1</sup>, 陈贻竹<sup>1</sup>

(1. 中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650; 2. 华南师范大学生命科学院, 广东广州 510631)

**摘要:** 分子生物学技术在花卉产业中展示了巨大的、潜在的应用前景。月季是世界性的重要观赏花卉, 其生物技术研究一直是国际的热点。综述了多年来月季的组织培养和基因转化的研究进展。

**关键词:** 月季; 胚状体发生; 器官发生; 基因转化

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2003)03-0243-07

## Advance in tissue culture and genetic transformation of rose

LI Mei-ru<sup>1</sup>, LI Hong-qing<sup>2</sup>, SUN Zi-jian<sup>1</sup>, CHEN Yi-zhu<sup>1</sup>

(1. *South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;*

*2. Life College, South China Normal University, Guangzhou 510631, China*)

**Abstract:** Molecular biological techniques have been developed to meet the demands of the flower industry. Rose is one of the most important ornamental plants grown worldwide. Biotechnology of the rose is always the research hot spots in the world. Tissue culture and gene transformation of rose are reviewed.

**Key words:** rose; embryogenesis; organogenesis; genetic transformation

月季是蔷薇科(Rosaceae)蔷薇属(*Rosa* L.)植物,是泛指在蔷薇属植物中各个种类的总称。月季花色艳丽、香气宜人,是世界重要的切花和各类高级食品、化妆品的重要香料原料。当前,月季的育种是花卉育种中最活跃领域之一。育种目标主要集中在对花色、花香、花形、开花习性、鲜切花寿命、株型、抗病性等的改良上(黄善武,2000)。由于月季基因型的高度杂合性,因此很难通过传统育种方法进行单一性状的改良,而分子育种技术由于是直接有目的地操作基因,使该技术具有能达到只改变月季的某一单一性状而保持其它性状不变的特点。因此,分子育种技术被越来越多地应用于改良观赏植物研究上,在月季的改良上显示了很大的应用潜力。建立月季组培和遗传转化系统是通过体细胞克隆变异

进行育种和通过基因工程育种的重要前期工作。本文综述近年来在这方面的研究进展,为进行月季基因工程改良提供借鉴。

### 1 月季的组织培养研究进展

建立植株再生系统是为了进行基因转化、突变育种、快速繁殖和保种。首次报道月季的组培再生器官研究是 Hill(1967),随后又有多篇论文报道在多个品种上实现了通过体细胞胚状体发生和器官发生途径再生完整植株直至开花(表 1、2)。Rout 等(1999)综述了近年来月季生物技术的研究成果,但是,在国内极少见到有关月季植株再生论文或资料的报道。植株的再生一般经历从愈伤诱导、愈伤分

收稿日期: 2002-04-22 修订日期: 2002-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170667); 全国 100 篇优秀博士论文作者专项基金资助项目; 广东省自然科学基金(团队项目 003062)。

作者简介: 李美茹(1966-),女,广东汕头市人,博士,从事植物逆境生理、花卉基因工程的研究。

化(体细胞胚状体发生或器官发生)、胚状体成熟萌发或芽的发育、到植株再生、完整植株的移植等步骤。下面将从影响植株快繁、愈伤诱导、体细胞胚状体和器官发生、植株再生等因素介绍月季的组织培养研究进展。

### 1.1 丛生芽的诱导(分生组织的培养)

以往月季的繁殖方式主要靠嫁接、扦插和压条等,繁殖系数低,远远满足不了市场的需要。80年代初,采取组织培养方法快速繁殖月季苗,从分生组织(取材于侧芽、顶芽、顶端分生组织或侧生分生组织)诱导出丛生芽,并诱导生根。这个过程包括丛生芽的诱导、壮苗的培养、幼苗生根培养和移植等等。第一篇报道月季的芽快繁论文见 Elliott(1970)在聚花月季(*Rosa multiflora*)上成功地进行了芽的繁殖和诱导幼苗生根。Zieslin 和 Halevy(1976)报道细胞分裂素有利于提高丛生芽的数量,但也增加了诱发花器官败育或退化的频率。芽器官的快速繁殖与供试材料的基因型有关,同时还与外植体的取材部位有关,来源于枝条中部的侧芽的繁殖速率最快(Bressan 等,1982)。培养基中添加蔗糖有增加丛生芽数量的作用(Langford 和 Wainwright,1987),加入低浓度的  $GA_3$  能进一步改善芽繁殖,95%的外植体产生 7 个以上的小芽(Rout 等,1990)。能提高芽繁殖数量的物质还有月桂酸甲酯(Voyiatzi 等,1995)、Chloropromazine(2-chloro-10-3-dimethyl amino propyl phenothiazine)(Rout 等,1992)、乙烯(Kevers 等,1992)等。诱导丛生芽的培养基主要是 MS 培养基添加低浓度的激素(0.3~0.5 mg/L benzylaminopurine(BAP),0.004~0.3 mg/L naphthaleneacetic acid(NAA)或 0.05~2.0 mg/L indoleacetic acid(IAA)或  $GA_3$ )。壮苗培养基一般是在 MS 培养基中添加更低浓度的 BAP 和 NAA。生根培养基多采用低盐成份的 MS 培养基添加低浓度 NAA。移植植株生长均一,保留母本的优良性状,Martin 等(1981)调查了 2 125 个无菌苗三年间在大田生长的情况,没有发现变异植株,这说明通过侧芽方式繁殖的植株性状很稳定。目前已在多个品种上成功地进行月季微繁殖的快繁技术。沈允权等(1995)证明,从月季腋芽接种至第一批完整苗培育需要 30~35 d,经 60 d 可以培养出 8~10 倍的完整苗。一个腋芽一年内可增殖 10 万多苗,达到了快速繁殖的目的,为月季的大批量生产,特别是鲜切花生产提供优质材料。

### 1.2 愈伤组织的诱导

Hill(1967)最早报道从杂交茶香月季(hybrid tea rose)的茎上诱导了愈伤组织,但实验结果只到芽原基(shoot primordia)。该实验证明在培养基中添加 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)或添加 NAA 和激动素(kinetin; Kin)均能很快诱导出愈伤组织。随后不同实验以不同品种为试验材料,从叶、叶柄、根、茎、原生质体、合子胚、花药、子房、花瓣、花萼和花托成功地诱导了愈伤组织(表 1、2)。愈伤组织的成功诱导与品种的基因型有关,Lloyd 等(1988)曾研究 *R. persica* × *xanthina*, *R. hybrida* 'Clarissa', *R. hybrida* 'Dame of Sark' 和 *R. rugosa* 'Scabrosa' 的愈伤发生能力,发现只有 *R. persica* × *xanthina* 的节间能产生愈伤,愈伤组织脆性,呈淡黄绿色,该实验是以 MS 为基本培养基,添加低浓度的 BAP 和 NAA。Kunitake 等(1993)研究了 *Rosa rugosa* Thunb., *Rosa multiflora*, *R. × alba* cv. Semiplena, *R. hybrida* cv. Duples, *R. harisonii* × *R. spinosissima* 的未成熟种子的愈伤发生能力,发现只有 *Rosa rugosa* Thunb. 的能产生愈伤组织。Ronto 和 Soraya 比品种 Baccara 和 Mercedes 更易产生愈伤(Kintzios 等,1999)。激素、糖和外植体类型也是影响愈伤生成的重要因素。Rout 等(1991)以 Landora 材料,在添加 benzyladenine(BA)和 NAA,2,4-D 的 MS 培养基上,外植体叶在接种的 7~12 d 后,在近轴面的叶柄和中脉处产生愈伤,愈伤组织诱导频率高达 92%。在接种的 15~20 d,外植体茎切端处产生愈伤,频率为 76%。Aren 等(1993)详细地调查了 *R. hybrida* cv. Meirutral 不同外植体的愈伤诱导率,不同外植体愈伤产生的能力不同,叶为 90%,根为 70%,节间为 55%,花药为 19%,其它花器官部位如花瓣、花萼、子房和花托为 16%,合子胚的发育时期对愈伤的形成能力也有影响,如处于心形胚的合子胚,其愈伤产生频率只有 2%,子叶胚时的合子胚,频率达到 85%。生长素种类和浓度对愈伤产生能力的影响同样很大。早期实验多采用 NAA 结合 BAP 或 BA 等,近年来多采用 2,4-D,并证明 2,4-D 是诱导愈伤的必要因素(Kintzios 等,1999;Rout 等,1991;Hsia 和 Korban,1996;Marchant 等,1996;van der Salm 等,1996;Visessuwan 等,1997)。2,4-D 对愈伤的诱导效果依赖于月季的基因型,如 2,4-D 浓度从 11.3  $\mu\text{mol/L}$  增加到 181  $\mu\text{mol/L}$ ,降低了 *Rose hybrida* 栽培种“Carefree

Beauty”的愈伤诱导频率,但该浓度则对另一个品种“Grand Gala”无影响。对于 *R. chinensis minima* cv. “Red Sunblaze”而言,当浓度从  $11.3 \mu\text{mol/L}$  增加到  $45.2 \mu\text{mol/L}$ ,则表现出愈伤的诱导率提高了,随后当 2,4-D 再增加,则显著地降低愈伤的诱导频率。愈伤组织在诱导愈伤组织的培养基上能得到继代培养(subculture)(Li 等,2002)。van der Salm 等(1996)证明 2,4-D 对诱导 *R. persica* × *xanthina* 和 Moneyway 产生愈伤是非常必要的,进一步添加低浓度的 BAP 有正效应,但如 BAP 浓度过高,则产生抑制作用。与以上实验结果不同,Kintzios 等(1999)则证明 2,4-D 对愈伤诱导有负影响作用,研究者的解释是可能因为实验采用的外植体是成熟的叶片。

### 1.3 体细胞胚状体的发生(Somatic embryogenesis)

成功的体胚发生体系的建立将有助于对月季进行体细胞杂交、冷藏保存、人工种子的生产和基因的转化操作等等。首次从体细胞胚状体得到再生植株是 Valles 和 Boxus(1987),多年的研究已证明体细胞胚状体的发生是月季微繁殖潜在的非常有效的方法。月季的体细胞胚胎发生在多个品种和多个外植体类型上已成功地进行了操作(表 1)。月季的体细胞胚状体发生能力与基因型的关系极大,Murali 等(1996)调查了 22 个品种,发现只有 2 个品种能进行体细胞胚状体的发生诱导。de Wit 等(1990)也发现在供试的 7 个品种中,只有 Domingo 和 Victory Brown 具有产生体细胞胚状体的能力。Kunitake 等(1993)在不加任何激素的 MS 培养基上由起源于未成熟的种子愈伤诱导出胚性愈伤,频率达 5.9%。不加任何激素能诱导体胚发生的实验可见于 van der Salm 等(1996)和 Li 等(2002)文章。绝大多数进行体胚诱导的实验都是在培养基中添加细胞分裂素(BA, BAP, Zeatin 或 Kin)和生长素(2,4-D, NAA)。使用激素的类型及浓度据不同的品种、外植体的类型而变化。体胚发生的频率普遍偏低,为 3%~33%。de Wit 等(1990)在 1/2 MS 培养基中添加 Kin 和 NAA,外植体叶在接种后的 6~12 周后可见到体胚的产生,频率为 3.5%,若用 NOA(2-naphthylxloxyacetic acid)代替 NAA,体胚发生的频率可提高到 5.8%。Hsia 和 Korban(1996)、Li 等(2002)在 Carefree Beauty 上证明 Thidiazuron(TDZ)有提高体细胞胚状体发生的作用,分别达到 6.6%和 31%。在这方面的作用中,TDZ 比 BA 的

效果更好。GA<sub>3</sub> 也被证明有利于提高体细胞胚状体发生的能力。Kintzios 等(1999)则证明在供试材料上使用 NAA、BA 和 GA<sub>3</sub> 对诱导产生体细胞胚状体无效,(-Chlorophenoxyacetic acid( $\rho$ CPA))才是诱导体细胞胚状体的决定因素。Das 等(1993)的实验指出,体胚发生能力的诱导依赖于培养基中碳水化合物的类型和浓度,果糖和蔗糖的效果最好,麦芽糖则有利于诱导产生正常的体胚。Hsia 和 Korban(1996)比较了蔗糖和葡萄糖对 Carefree Beauty、Red Sulblaze 和 Baby Katie 体胚发生频率的影响,发现在培养基中不添加糖类,各品种的体胚发生频率只有 6.6%,但当培养基中加入糖类后,只有 Carefree Beauty 对此有反应,体胚频率提高到 25%。Kintzios 等(1999)认为,培养时的光照强度对体胚的形成影响很大,光强低于  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  光照条件体胚的发生频率最高。

### 1.4 次生胚状体的发生(Secondary somatic embryogenesis)

Rout 等(1991)观察到了次生胚状体的产生。当胚性愈伤置于含有  $2.2 \mu\text{M}$  BA,  $0.05 \mu\text{M}$  NAA 和  $0.05 \mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> 培养基中,每个月转培养基 1 次,次生胚状体的发生能力可以维持 16 个月。培养基中添加 2,4-D 有助于使愈伤组织在长时间内保持具胚性的能力。Li 等(2002)成功地报道了次生胚状体的繁殖和萌发,指出 ABA 是进行次生胚状体发生的关键因子。在供试的 4 个品种中, Carefree Beauty 具有最高的次生胚状体的繁殖和萌发频率。

### 1.5 体细胞胚状体的萌发(Germination of somatic embryos)

胚状体发育和萌发是再生植株的关键。在多数品种的试验上表明,降低或取消 2,4-D 有助于体胚的发育和萌发。de Wit 等(1990)实验表明,约有 60%的体胚萌发成正常植株,植株移植到温室后能开花。Matthews 等(1991)报道将体胚移到不含激素的 SH 培养基中,约 30%的体胚萌发成植株。Noriega 和 Sondahl(1991)、Roberts 等(1995)证明 ABA 和 GA<sub>3</sub> 有助于体胚的萌发。山梨醇也有改善体胚萌发的作用。Rout(1991)在诱导体胚发生时加 L-脯氨酸,增加体胚发生频率,但在体胚萌发培养基中消除 L-脯氨酸,才能刺激体胚的正常发育。他们还报道胚性愈伤在 8 °C 下进行 4 d 的预处理,体胚萌发频率从 0 提高至 12%。Roberts 等(1995)证明 4 °C 下预处理 2 d,体胚萌发频率从 12%提高

到 24%。Muralis 等(1996)认为 ABA 和间苯三酚明显促进体胚的发育和成熟,其中间苯三酚的作用最显著,将频率从 33.3% 提高到 93%。Kunitake 等(1993)报道 Picloram 能抑制体胚的发育。光照强度也是影响体胚成发育的一个重要因素,Kintzios 等(1999)证明光强  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  光照是体胚成熟和萌发的必要因素。

### 1.6 器官发生(Organogenesis)

月季的芽器官(Shoot)发生表现为直接(不需经过愈伤组织阶段)起源于外植体和需要经历愈伤阶段的过程。Hill(1967)首次报道从愈伤组织再生了芽原基,但最终得不到真正的芽。Tweddle 等(1984)、Llody 等(1988)分别报道 *R. persica* × *xanthina* 的愈伤在含 BA 和 NAA 的 MS 培养基中能再生不定芽。Llody 等(1988)还进一步报道在只加 BA 的培养基中,外植体叶和根的表面直接再生出

芽。Dubois 和 Vries 也指出在 1/2 MS 培养基中添加 TDZ 和 NAA 中,叶表面直接再生了不定芽。Arene 等(1993)证明在 MS 培养基中添加 BAP 也能诱导直接长芽。Rosu 等(1995)则以增殖的无菌丛生芽为外植体,在含 BA 和 NAA 的培养基上直接再生了芽,当这些不定芽移至含 NAA, GA<sub>3</sub> 和硝酸银的培养基中,能诱导出丛生芽。Hsia 和 Korban(1996)证明,把来源于 Carefree Beauty、Red Sulblaze 和 Baby Katie 的体细胞组织置于含 2,4-D 中,结果诱导了生根的愈伤,当该愈伤移至含 TDZ 和 GA<sub>3</sub> 的培养基中,3.3% 的愈伤长出再生芽。在 Red Sunblaze 上,他们证明来源于叶、茎间的外植体,其器官的发生频率高于来源于节间的,同时 TDZ 诱导了 *R. hybrida*, *R. chinensis minima* 的体细胞发生和器官发生。Ishioka 和 Tanimoto(1990)证明,在 MS 培养基中只添加硝酸铵,70% 的外植体

表 1 离体月季体细胞胚状体发生  
Table 1 In vitro somatic embryogenesis of roses

品种 Species	外植体 Explants	体细胞胚 状体发生 Somatic em- bryogenesis	再生植株 Plant re- generation	参考文献 References
<i>Rosa hybrida</i> cv. Landora	茎;叶 Stem; leaf	++;+	-;-	Rout <i>et al</i> (1989)
<i>Rosa hybrida</i> cvs. Domingo; Vickey Brown	叶 Leaf	+	+	de Wit <i>et al</i> (1990)
	叶 Leaf	+	+	
<i>Rosa hybrida</i> L. cv. Landora	叶;茎 Leaf; stem	++;+	-;-	Rout <i>et al</i> (1991)
Hybrida Tea Roses	花药丝 Anther filament	+	-	Noriega & Sondahl(1991)
<i>R. persica</i> × <i>xanthina</i>	来源于根的原生质体 Protoplasts from root	+	+	Matthews <i>et al</i> (1991)
<i>Rosa hybrida</i> cv. Meirutral	叶;根;合子胚 Leaf; root; embryos	+	+++	Arene <i>et al</i> (1993)
<i>Rosa rugosa</i> Thurb.	合子胚 Embryos	+	+	Kunitake <i>et al</i> (1993)
<i>Rosa hybrida</i> cv. Royalty	花药丝 Anther filament	+	+	Firoozabady <i>et al</i> (1994)
<i>Rosa hybrida</i> cv. Moneyway	不定根 Adventitious root	+	+	van der Salm <i>et al</i> (1996)
<i>Rosa hybrida</i> cvs. Glad Tiding; Trumpeter	根;叶柄 Root; petiole	++;+	++;+	Marchant <i>et al</i> (1996)
<i>Rosa hybrida</i> cv. Arizona	花瓣 Petal	+	+	Murali <i>et al</i> (1996)
<i>Rosa hybrida</i> cv. Carefree Beauty;	叶;根 Leaf; root	++;+	++;+	Hsia & Korban(1996)
<i>Rosa chinensis minima</i> cv. 'Red Sunblaze'	叶;根 Leaf; root	++;+	++;+	
<i>Rosa hybrida</i> L. 'Soraya'	成熟叶 Mature leaf	+	+	Kintzios <i>et al</i> (1999)
<i>Rosa</i> Heritage × Alister Stella Gray	根 Root	+	+	Sarasan <i>et al</i> (2001)
<i>Rosa hybrida</i> cv. 'Carefree Beauty'	叶 Leaf	+	+	Li <i>et al</i> (2002)
<i>Rosa chinensis minima</i> cv. 'Red Sunblaze'	叶 Leaf	+	+	

“+”为能进行体细胞胚状体发生的诱导;“-”为不能得到完整的再生植株。

“+” as success in induction of somatic embryogenesis;“-” as fail to induce plant regeneration.

产生不定芽。Rout 等(1991)报道 GA<sub>3</sub> 和 adenine sulfate 加速了再生芽的产生。van der Salm 等(1996)认为,根是理想的进行诱导体细胞胚或芽器官再生的外植体,在培养基中用 Gelrite 代替琼脂,非常有利于刺激芽器官的发生。Kintzios 等(1999)认为,以茎为外植体可能更适合于进行芽器官再生

的诱导。

### 1.7 再生植株的生长特性

一般无菌苗移植到室外的成活率达 80% 以上。通过芽快繁途径得到的植株或不经愈伤阶段直接起源于叶、根的植株,生长情况与对照相同,无变异发生。相反,来源于营养器官的愈伤组织再生的植株

存在着 21.7% 的变异,外植体若为合子胚的,再生植株的变异高达 70%,变异性状体现在花瓣的数量、形状和颜色,植株的生长高度上。在调查的 152 个再生植株中,83 个植株在花瓣的数量上与对照不同,16 个植株株高变矮,4 个的叶片变圆,12 个改变

了花色,33 个改变了生长习性和花瓣的数量,4 个改变了花瓣的数量和花的颜色。这么高频率的变异说明组织培养过程中体细胞变异是产生月季新品种的有效方法(Li 等,2002)。van der Salm 等(1996)调查了解 13 个再生植株,发现其中 12 株的倍性与对

表 2 离体月季器官发生  
Table 2 *In vitro* organogenesis of roses

品种 Species	外植体 Explant	器官发生 Organogenesis	再生植株 Plant re- generation	参考文献 References
Hybrid tea rose 'The Doctor'	茎 Stem	芽原基 Shoot primordial	-	Hill(1967)
<i>R. persica</i> × <i>xanthina</i>	茎; 叶; 根 Stem; leaf; root	从愈伤诱导长芽; 直接再生芽; 直接再生芽 Shoot from callus; shoot regenerated from leaf; shoot regenerated from root	-; -; -	Lloyd <i>et al</i> (1988)
<i>Rosa hybrida</i> 'Clarissa'; 'Dame of Sark'; <i>Rosa rugosa</i> 'Scabrosa'	茎; 茎; 茎 Stem; stem; stem	-; -; -	-; -; -	
<i>R. laevigata</i> ; <i>R. eichuraiana</i>	叶; 叶 Leaf; leaf	直接再生芽; 直接再生芽 Shoot regenerated from leaf; shoot regenerated from leaf	-; -	
<i>Rosa hybrida</i> cv.	茎 Stem	芽 Stem	+	Valles & Boxus (1987)
<i>Rosa hybrida</i> cvs. Domingo; Vick- ey Brown	叶柄; 叶柄 Petiole; petiole	根; 根 Root; root	-; -	de Wit <i>et al</i> (1990)
<i>Rosa hybrida</i> cv. Brida Pink	胚状体 Embryo	芽 Shoot	+	Burger <i>et al</i> (1990)
<i>Rosa damascena</i>	叶 Leaf	芽 Shoot	+	Ishioka & Tanimo- to(1990)
<i>Rosa hybrida</i> cv. Meirutral	叶; 根; 花瓣; 花萼; 花 药; 子房; 花托 Leaf; root; petal; sepal; an- ther; ovary; receptacle	芽; 芽; 根状茎; 根状茎; 根状 茎; 根状茎; 根状茎 Shoot; Shoot; rhizome; rhizome; rhi- zome; rhizome	+; +; +; +; +; +; +	Arene <i>et al</i> (1993)
<i>Rosa hybrida</i> cvs. Madelon	叶; 叶柄 Leaf; petiole	芽; 芽 Shoot; shoot	+; +	Dubois & de Vries (1995)
<i>Rosa chinensis</i> minima 'Baby Ka- tie'	叶; 根 Leaf; root	芽; 芽 Shoot; Shoot	+; +	Hsia & Korban (1996)
'Carefree Beauty'	叶; 茎 Leaf; Stem	根; 根 Root; root	+; +	
<i>Rosa hybrida</i> cv. Moneyway	不定根 Adventitious root	芽 Stem	+	van der Salm <i>et al</i> (1996)
<i>Rosa hybrida</i> cvs. Carefree Beau- ty; Grand Gala	叶; 叶 Leaf; leaf	芽; 芽 Shoot; shoot	+; +	Li <i>et al</i> (2002)

"+"为能进行器官的发生的诱导; "-"为不能得到完整的再生植株。

"+" as success in induction of organogenesis; "-" as fail to induce plant regeneration.

照一样都是二倍体,但其中有一株的叶色变为嵌合色,13 株中的 1 株为六倍体。一般再生的植株移植到温室后,约 2~3 个月后就就能开花。

## 2 月季的基因转化研究

Firoozababy 等(1991)首次成功地进行了农杆菌介导的月季转化。他们以 *R. hybrida* cv. Royalty 为供试材料,将其胚性愈伤与含有 pnos NPT II/p35S LUC 质粒的致瘤农杆菌(*Agrobacterium tu-*

*meffaciens*)LBA4404 或与含有 pnos NPT II/p35S GUS 质粒的发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenesis*)15834 共培养,得到了很高转化愈伤频率,即每克愈伤约产生 40~60 个独立的抗卡那霉素愈伤,通过 LUC 或 GUS 和 PCR 技术检测,几乎 100% 的抗性愈伤为转化愈性。Firoozabady 等(1994)又报道,1 g 愈伤约产生 50~60 个转化的胚性愈伤系,这些转化的胚性愈伤转移到成熟培养基后产生转基因植株,约 100 多株转基因植物移植温室,生长正常,能开花。Matthews 等(1994)报道 *R. persica* × *xan-*

thina 的原生质体与 LBA4404 共培养后,产生 GUS 表达的转化愈伤,诱导转化愈伤再生不定芽。van der Salm 等(1996)成功地进行 *R. hybrida* cv. Moneyway 的基因转化,根、茎与致瘤农杆菌 GV3101 (与含有 npt II 基因)或与发根农杆菌(含有 rol 基因)共培养,结果得到再生的转基因植株。Marchant 等(1998a)通过基因枪法转化 *R. hybrida* cv. Glad Tidings 的胚性愈伤的体系,得到转基因株。同年, Marchant 等(1998b)成功地将几丁质酶基因导入月季,减少黑斑病发生率 13%~43%。这是目前唯一的一篇公开发表地将有用基因成功导入月季和目的基因有效表达的研究论文。Forigene 公司曾计划于 1994 年 8 月至 1995 年 8 月向大田投放 150 株转编码查尔酮酶基因的杂交茶香月季植株,计划在 1994 年或 1995 年的秋天至 1997 年年底向大田投放 1 200 株转蓝色基因的月季(*Rosa hybrida*)植株。可能由于商业上的秘密,有效的月季转基因方法还处于保密状态。但不管怎样,成功地进行月季转基因例子为进一步进行月季品种的改良开拓了广阔的前景。

### 3 展 望

综上所述,近年来在月季的组培和转化方面取得了很大的进展,但从中也可看到,月季的再生受基因型的影响很大,不同的品种在愈伤诱导、胚状体萌发及芽器官等的发生方面差异很大,且只有少数的品种能获得相对高频率的再生植株,并进行基因工程操作。进一步对一些具有商业价值的月季品种进行组培再生系统的研究,及应用转基因方法对月季的花色、花期、鲜切花寿命等进行研究,将有助于不断满足月季鲜花业的需求,提高月季的商品价值。

#### 参考文献:

- 黄善武. 2000. 月季育种[A]. 见:程金水. 园林植物遗传育种学[C]. 北京:中国农业出版社, 385-401.
- Arene L, Pellegrino C, Gudin S. 1993. A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* cv. Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues [J]. *Euphytica*, **71**: 83-92.
- Bressan PH, kim YJ, Hydman SE, et al. 1982. Factors affecting *in vitro* propagation of rose [J]. *J Am Soc hort Sci*, **107**: 979-990.
- Burger DW, Liu L, Zary KW, et al. 1990. Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* L. [J]. *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 [J]. *Biome*, **6**: 73-77.
- de Wit JC, esendam HF, Horkamen JJ, et al. 1990. Somatic embryogenesis and regeneration of flowering plants in rose [J]. *Plant Cell Rep*, **9**: 456-458.
- Dubois LAM, de Vries DP. 1995. Preliminary report on the direct regeneration of adventitious buds on leaf explants of *in vitro* grown glass house rose cultivars [J]. *Gartenbauwissenschaft*, **60**: 249-253.
- Elliott RF. 1970. Axenic culture of meristem tips of *Rosa multiflora* [J]. *Planta*, **95**: 183-186.
- Firoozabady E, Lemieux CS, Moy YS, et al. 1991. Genetic engineering of ornamental crops [J]. *In Vitro*, **27**: 96.
- Firoozabady E, Moy YS, Courtneygutterson N, et al. 1994. Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue [J]. *Biotechnology*, **12**: 609-613.
- Hill GO. 1967. Morphogenesis of shoot primordial in cultured stem tissue of a garden rose [J]. *Nature*, **216**: 596-596.
- Hsia CN, Korban SS. 1996. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis* Minima [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **44**: 1-6.
- Ishioka N, Tanimoto S. 1990. Plant regeneration from Bulgarian rose callus [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **22**: 197-199.
- Kevers C, Boyer N, Courduroux J. 1992. The influence of ethylene on proliferation and growth of rose shoot culture [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **28**: 175-181.
- Kintzios S, Manos C, Makri O. 1999. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sp.) [J]. *Plant Cell Rep*, **18**: 467-472.
- Kunitake H, imamizo H, Mii H. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rugosa rose (*Rosa rugosa* Thurb.) [J]. *Plant Sci*, **90**: 187-194.
- Langford PJ, Wainwright H. 1987. Effect of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro* [J]. *Ann Bot*, **60**: 633-639.
- Li X, krasnyanski SF, Korban SS. 2002. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot

- organogenesis in *Rosa* [J]. *J Plant Physiol*, **159**(3): 313—319.
- Lloyd D, Roberts AV, Short KC. 1988. The induction in vitro of adventitious shoots in *Rosa* [J]. *Euphytica*, **37**: 31—36.
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, et al. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in floribunda rose (*Rosa hybrida* L. cv. Thumpeter and Glad Tidings) [J]. *Plant Sci*, **120**: 95—105.
- Marchant R, Power JB, Lucas A, et al. 1998a. Biolistic transformation of rose (*Rosa hybrida* L.) [J]. *Ann Bot*, **81**: 109—114.
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, et al. 1998b. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf.) [J]. *Mol Breeding*, **4**: 187—194.
- Martin C, Carre M, Vernoy R. 1981. La multiplication vegetative in vitro des vegetaux ligneux cultives: Cas des Rosiers [J]. *Comp Rend Acad Sci Paris III*. **293**: 175—177.
- Matthews D, Motley J, Horan I, et al. 1991. A protoplast to plant system in roses [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **24**: 173—180.
- Matthews D, Mottley J, Yokoya K, et al. 1994. Regeneration of plants from protoplasts of *Rosa* species (Roses) [A]. In: Bajaj, Y P S (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry (Plant protoplasts and Genetic Engineering)* [C]. Springer, Heidelberg, **29**: 146—160.
- Murali S, Sreedhar D, Loieswari TS. 1996. Regeneration through somatic embryogenesis from petal-derived calli of *Rosa hybrida* L. cv Arizona (hybrida tea) [J]. *Euphytica*, **91**: 271—275.
- Noriega C, Sondahl MR. 1991. Somatic embryogenesis in hybrid tea roses [J]. *Biotechnology*, **9**: 991—993.
- Roberts AV, Yoloya K, Walker S, et al. 1995. Somatic embryogenesis in *Rosa* spp [A]. In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants* [C]. Kluwer, The Netherlands, **2**: 277—289.
- Rosu A, Skirvin RM, Bein A, et al. 1995. The development of putative adventitious shoots from a chimeral thornless rose (*Rosa multiflora* Thurb. ex J Murr.) in vitro [J]. *J Hort Sci*, **70**: 901—907.
- Rout GR, Debata BK, Das P. 1989. Induction of somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* cv. Landora [J]. *Orissa J Hort*, **17**: 46—49.
- Rout GR, Debata BK, Das P. 1990. In vitro clonal multiplication of roses [J]. *Proc Natl Acad Sci*, **60**: 311—318.
- Rout GR, Debata B K, Das P. 1991. Somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, **27**: 65—69.
- Rout GR, Samantaray S, Das P. 1992. Chloropromazine induced in vitro bud break in *Rosa hybrida* cv. Landora Orissa [J]. *J Hort*, **20**: 8—16.
- Rout GR, Samantaray S, Mottlay J, et al. 1999. Biotechnology of the rose: a review of recent progress [J]. *Sci Hort*, **81**: 201—228.
- Sarasan V, Roberts AV, Rout GR. 2001. Methyl laurate and 6-benzyladenine promote the germination of somatic embryos of a hybrid rose [J]. *Plant Cell Rep*, **20**: 183—186.
- Shen YQ (沈允权), Piao RZ (朴日子), Cao HN (曹后男). 1995. The quickly breeding and transplanting of test-tube bacterium in Chinese rose (月季试管苗快速繁殖和移栽) [J]. *Journal of Yanbian Agricultural College (延边农学院学报)*, **17**: 33—36.
- Tweddle D, Roberts AV, Short KC. 1984. In vitro culture of roses [A]. In: Novak F J, Havel L, Dolegal J, (Eds.). *Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement* [C]. Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 529—530.
- Valles M, Boxus PH. 1987. Regeneration from *Rosa callus* [J]. *Acta Hort*, **212**: 691—696.
- van der Salm TPM, van der Toorn CJG, Hanischten CH, et al. 1996. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from excised adventitious roots of the root stock *Rosa hybrida* cv. money Way [J]. *Plant Cell Rep*, **15**: 522—526.
- van der Salm TPM, Bouwer R, van Dijk AJ, et al. 1998. Stimulation of scion bud release by rol gene transformed rootstocks of *Rosa hybrida* L. [J]. *J Exp Bot*, **49**: 847—852.
- Visessuwan R, Kawai T, Mii M. 1997. Plant regeneration systems from leaf segment culture through embryogenic callus formation of *Rosa hybrida* and *R. canina* [J]. *Breed Sci*, **47**: 217—222.
- Voyiatzi C, Voyiatzis DG, Tsiakmaki V. 1995. In vitro shoot proliferation rates of the rose cv. (Hybrid Tea) 'Dr Verhage', as affected by apical dominance regulating substances [J]. *Sci Hort*, **61**: 241—249.
- Zieslin N, Halevy AH. 1876. Components of axillary bud inhibition in rose plants. I. The effect of different plant parts correlative inhibition [J]. *Bot Gaz*, **137**: 291—296.