

玫瑰叶片直接再生及其影响因素

邢文包颖丁萌傅小鹏包满珠宁国贵

华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 以‘唐白’、‘紫枝’、‘唐红’和‘朱龙游空’4个玫瑰品种为试材研究不同的外植体、暗培养时间和激素组合对玫瑰不定芽直接诱导和植株再生的影响。结果表明:4个玫瑰品种在不定芽诱导培养基上黑暗培养10~15 d转入光照培养15~20 d,而后转入含有0.5 mg/L BA和0.01 mg/L NAA的MS培养基光下培养,再生效果最好;不同外植体间存在显著差异,未展开小叶的再生能力最好;不同基因型之间存在显著差异,‘唐白’在添加1.0 mg/L TDZ、0.05 mg/L NAA的1/2MS培养基中再生率最高,达到70.6%;‘紫枝’和‘唐红’在添加1.5 mg/L TDZ、0.05 mg/L NAA的1/2MS培养基中再生率最高,分别为47.9%和36.5%;‘朱龙游空’在添加1.0 mg/L BA、0.3 mg/L TDZ和0.05 mg/L NAA的1/2MS培养基中再生率最高,达到60%。黑暗培养对不定芽分化有一定的促进作用,但不利于不定芽再生,‘唐白’、‘紫枝’和‘朱龙游空’的最佳暗培养时间为10 d,而‘唐红’的最佳暗培养时间为15 d。另外,4个玫瑰品种在添加有IBA 0.5 mg/L的1/2MS培养基上生根率最高。

关键词 玫瑰;未展开小叶;不定芽分化;植株再生

中图分类号 S 685.12 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0029-06

玫瑰(*Rosa rugosa*)是蔷薇科(Rosaceae)蔷薇属落叶丛生灌木,香气宜人、含精油量高,是我国重要的经济植物。它既能提炼精油,又是珍贵的中药材和食品工业的重要原料。过去10年中,虽然已有很多关于蔷薇属植物的组织离体培养并成功诱导植株再生的报道^[1-4],但对玫瑰的离体培养和植株再生的研究报道相对较少,Kunitake等^[5]和Kim等^[6]分别以未成熟种子和合子胚为外植体,对玫瑰体细胞胚发生途径进行了研究,但是再生效率并不高,而且以未成熟种子为外植体并不能保持母父本的优良性状,也不能为特定基因型的玫瑰品种基因改良提供基础。因此,不定芽直接再生途径具有明显的优越性,而不定芽直接再生在玫瑰中还未见报道。笔者对玫瑰叶片不定芽直接再生途径的主要影响因素进行研究,建立离体叶片再生植株体系,以期对玫瑰的遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及培养条件

试验材料取自华中农业大学园林植物细胞生物

学实验室增殖保存的试管苗,包括‘唐白’、‘唐红’、‘紫枝’和‘朱龙游空’4个品种,均由带芽茎段萌发增殖而来^[7]。试管苗在增殖培养基MS+0.5 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA中继代保存,每4周继代1次,取无菌苗的叶片进行再生试验。

所有培养基pH值调至5.8~6.0,于121℃、1.1 kg/m²压力下灭菌20 min。培养温度为(24±2)℃,光照强度1 000~1 200 lx,每天光照14 h(暗培养除外)。

1.2 外植体对不定芽再生的影响试验

取4个玫瑰品种的未展开小叶、展开小叶和复叶为外植体,以远轴面朝下接种于诱导培养基上(1/2MS+3%葡萄糖+0.3%植物凝胶+1.5 mg/L TDZ+0.05 mg/L NAA+10 mg/L AgNO₃+100 mg/L 水解酪蛋白),黑暗条件下培养,10~15 d后转入光照培养15~20 d,统计再生率(再生率=再生不定芽的外植体数/供试外植体数×100%,下同)。

1.3 植物生长激素对不定芽再生的影响试验

1)TDZ质量浓度试验。以4个玫瑰品种为试验材料,将其未展开小叶分别接种于含有不同质量

收稿日期:2013-02-15

基金项目:科技部“十二五”“863”项目(2011AA100208)和中央高校基本科研业务费专项(2011PY103)

邢文,博士研究生,研究方向:园林植物遗传育种与生物技术。E-mail:18229737095@qq.com

通信作者:宁国贵,博士,副教授,研究方向:园林植物遗传育种与生物技术。E-mail:ggning@mail.hzau.edu.cn

浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L) TDZ 的诱导培养基 (1/2MS+3% 葡萄糖+0.3% 植物凝胶+0.05 mg/L NAA+10 mg/L AgNO₃+100 mg/L 水解酪蛋白+0.5~2.0 mg/L TDZ) 上。

2) 6-BA 质量浓度试验。以‘朱龙游空’为试验材料, 将其未展开小叶分别接种于含有不同质量浓度 (0.3、0.5 mg/L) TDZ 和 6-BA (0、1.0 mg/L) 的诱导培养基 (1/2MS+3% 葡萄糖+0.3% 植物凝胶+0.05 mg/L NAA+10 mg/L AgNO₃+100 mg/L 水解酪蛋白+(0.3、0.5 mg/L) TDZ+(0、1.0 mg/L 6-BA) 上。暗培养 10 d 后转入光下培养 30 d 后统计再生率。

1.4 暗培养时间对不定芽再生的影响试验

取 4 个品种的未展开小叶叶片, 将其接种于诱导培养基 (1/2MS+3% 葡萄糖+0.3% 植物凝胶+0.5~1.5 mg/L TDZ+0.05 mg/L NAA+10 mg/L AgNO₃+100 mg/L 水解酪蛋白) 上, 分别暗培养 5、10、15、20 d, 然后转入光照培养 15~20 d, 统计再生率。

1.5 不定芽的生长与生根试验

将诱导得到的不定芽转接到 MS+3% 葡萄糖+0.75% 琼脂+0.5 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA 增殖培养基上进行芽体的生长和增殖。

将生长到 1~2 m 的枝条转入生根培养基 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 中生根培养。

1.6 炼苗及移栽

当幼苗高至 2~3 cm 并具有 4 条以上的根 (根长大于 1 cm) 时, 开瓶在散射光下炼苗 2 d, 然后移栽至经高温灭菌的泥炭土与珍珠盐混合土中室内种植, 待成活后移到室外。

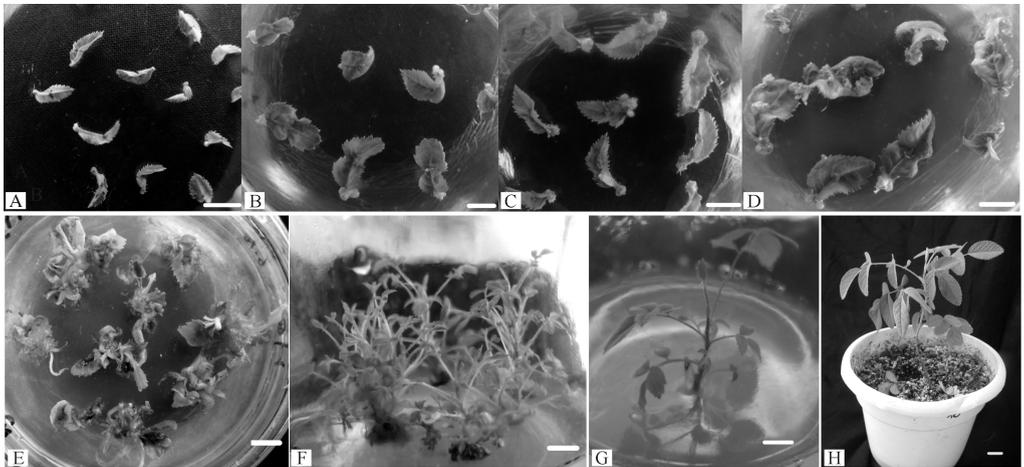
1.7 数据统计与分析

以上试验均设有 3 次重复, 每次重复为 30 个外植体。所得数据采用 SAS 软件进行方差分析和多重比较分析 (Duncan's 法)。百分数数据分别经反正弦 ($y = \arcsin x^{1/2}$) 转换后, 再进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 基因型与外植体对不定芽诱导的影响

3 种外植体在诱导培养基 (1/2MS+3% 葡萄糖+0.3% 植物凝胶+1.5 mg/L TDZ+0.05 mg/L NAA+10 mg/L AgNO₃+100 mg/L 水解酪蛋白) 上暗培养 7 d 后, 叶柄切口处不同程度地膨大, 以未展开小叶外植体的叶柄处膨大更明显 (图 1A), 没有出现愈伤组织。暗培养 10~15 d 后, 未展开小叶叶柄切口膨大处已经形成了白色的突起 (图 1B), 是已分化的不定芽, 而展开小叶和复叶的大部分叶



A: 未展开小叶在诱导培养基上暗培养 5~7 d, 叶柄切口处开始膨大; B: 未展开小叶在诱导培养基上暗培养 15~20 d, 叶柄切口处出现圆形突起; C: 不定芽形成的早期; D: 不定芽形成的中期; E: 转入光照培养 30 d 高频再生的不定芽; F: 不定芽的生长; G: 不定芽生根; H: 组培苗移栽成活 标尺=0.5 cm A: Leaflets cultured responded by internal swelling around the incision at the petiolar base within 5-7 days in darkness on the adventitious buds induction medium; B: Globular structures, where adventitious buds (arrow) were first observed formed directly on the leaflet surface after 15-20 days of culture on the adventitious buds induction medium in darkness; C: Adventitious buds initiated in early stage; D: Adventitious buds grow in later stage; E: High regeneration rate of multiple shoots developed on leaflets cultured for 30 days at the second stage; F: Shoot elongation; G: Rooting of shoots; H: Hardened regenerated plantlets. Bar=0.5 cm.

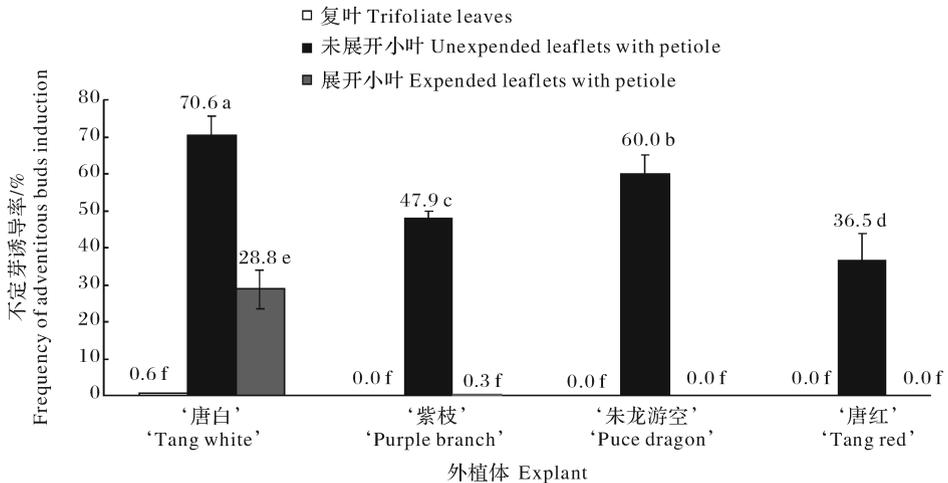
图 1 玫瑰直接诱导不定芽与植株再生

Fig. 1 Adventitious bud induction and plant conversion in *Rosa rugosa*

柄切口不能形成白色的突起。当转入光下培养后,这些白色突起很快变绿(图1C),形成绿色的芽体(图1D),并抽出叶片和枝条(图1E)。

试验结果(图2)表明,4个品种以及不同外植体的不定芽诱导率存在显著差异($P < 0.05$),基因型与外植体之间存在交互作用($P < 0.05$)。‘唐白’、‘朱龙游空’、‘紫枝’和‘唐红’4个品种的3种外植体中,未展开小叶的不定芽诱导率最高,分别为

70.6%、60.0%、47.9%和36.5%。‘唐白’和‘紫枝’的展开小叶能诱导出不定芽,但诱导率很低,分别只有28.8%和0.3%,而‘朱龙游空’和‘唐红’的未展开小叶无法诱导出不定芽。3种外植体中,复叶诱导不定芽的能力最差,‘朱龙游空’、‘紫枝’和‘唐红’均无法诱导出不定芽,‘唐白’的不定芽诱导率仅有0.6%。



图中数据为平均值±标准差,不同小写英文字母表示数据间差异显著($P < 0.05$) Values shown are mean±standard errors. Values that are significantly different within columns at the 5% level of significance are indicated with different letters.

图2 不同外植体对玫瑰不定芽诱导的影响

Fig. 2 Effects of explants on adventitious bud induction

2.2 基因型与植物生长激素对不定芽诱导的影响

1) 基因型与 TDZ。由表1可以看出,4个品种的不定芽诱导率存在显著差异,在培养基中添加 TDZ 对不定芽的诱导有显著影响,且基因型与 TDZ 之间存在交互作用。4个品种中,‘唐白’的不定芽诱导能力最强,再生率最高,为70.6%;而‘唐红’的不定芽诱导能力最弱,再生率最低,为36.5%。4个品种不定芽诱导的最适 TDZ 质量浓度并不相同,不定芽诱导率与 TDZ 的质量浓度之间不存在正相关,高质量浓度(2.0 mg/L)的 TDZ 对不定芽的生成有抑制作用,‘唐白’在1.0 mg/L TDZ 的培养基中不定芽诱导率最高,为70.6%;‘紫枝’和‘唐红’均在1.5 mg/L TDZ 的培养基中不定芽诱导率最高,分别为47.9%和36.5%;而‘朱龙游空’在0.5 mg/L TDZ 的培养基中不定芽诱导率最高,为50.6%。在没有添加 TDZ 的培养基上4个品种均无法诱导出不定芽。由此可见,TDZ 在玫瑰叶片不定芽的分化中起着重要作用。

2) 6-BA 和 TDZ 组合。将玫瑰品种‘唐白’、‘唐

红’、‘紫枝’和‘朱龙游空’的未展开小叶分别接种到加有不同质量浓度的 TDZ 和 6-BA 的培养基上,发现 6-BA 在‘朱龙游空’的不定芽诱导中有一定的作用,而对其他几个品种没有明显作用。经过方差分析发现,是否添加 6-BA 对‘朱龙游空’的不定芽诱导有显著影响($P < 0.05$),6-BA 与 TDZ 之间存在交互作用($P < 0.05$)。

由表2可以看出,不同 6-BA 与 TDZ 组合培养基之间存在显著差异,在只添加低质量浓度(0.3 mg/L) TDZ 的培养基与同时添加高质量浓度的 6-BA(1.0 mg/L)和 TDZ(0.5 mg/L)的培养基上,‘朱龙游空’不定芽诱导率分别只有28.3%和35.0%;而在同时添加1.0 mg/L 6-BA 和 0.3 mg/L TDZ 的培养基与只添加0.5 mg/L TDZ 的培养基上不定芽诱导率高,分别可达到60.0%和50.0%。但在只添加0.5 mg/L 的培养基上有畸形芽出现,无法正常生长,而在添加1.0 mg/L 6-BA 和 0.3 mg/L TDZ 的培养基上没有畸形芽出现,所有不定芽均可正常生长成苗。

表 1 基因型与 TDZ 对不定芽诱导的影响¹⁾

Table 1 Effects of genotype and TDZ on direct adventitious bud induction

%

TDZ/ (mg/L)	NAA/ (mg/L)	不定芽诱导率 Frequency of adventitious buds differentiation			
		‘唐红’ ‘Tang Red’	‘唐白’ ‘Tang White’	‘朱龙游空’ ‘Puce Dragon’	‘紫枝’ ‘Purple Branch’
0.0	0.05	0.0±0.0 b	0.0±0.0 b	0.0±0.0 b	0.0±0.0 b
0.5	0.05	31.7±16.1 a	55.4±8.3 a	50.6±1.3 a	41.3±5.7 a
1.0	0.05	28.3±18.9 a	70.6±5.1 a	32.5±5.0 a	37.4±20.9 a
1.5	0.05	36.5±7.3 a	67.9±8.3 a	26.5±4.2 a	47.9±1.8 a
2.0	0.05	14.1±5.8 b	63.8±27.1 a	19.4±1.0 a	30.7±7.0 a
均值 Mean		22.1 b	51.5 a	25.8 b	31.5 b
F_{Genotype}			19.23*		
F_{TDZ}				35.18*	
$F_{\text{Genotype} \times \text{TDZ}}$					1.35*

1)表中数据为平均值±标准误;同一栏中不同小写英文字母表示数据间差异显著($P<0.05$);*表示 F 值检验差异显著($P<0.05$),下同 Values represent the means±SE. Means followed by different letters are significantly different at $P=0.05$; * indicates statistically significant between TDZ and genotype at $P=0.05$. The same as follows.

表 2 不同 6-BA 与 TDZ 配比对‘朱龙游空’不定芽诱导的影响

Table 2 Influences of 6-BA and TDZ combinations on induction of direct adventitious bud of ‘Puce Dragon’ cultivar

6-BA/ (mg/L)	TDZ/ (mg/L)	不定芽诱导率/% Frequency of adventitious buds differentiation
0.0	0.3	28.3±7.6 b
1.0	0.3	60.0±5.0 a
0.0	0.5	50.0±5.0 a
1.0	0.5	35.0±5.0 b

2.3 培养时间对不定芽诱导的影响

试验结果(图 3)表明,4 个品种暗培养 5、10、15 和 20 d 的不定芽诱导率均存在显著差异($P<0.05$)。‘唐白’、‘紫枝’和‘朱龙游空’暗培养 10 d 不定芽诱导率最高,分别为 70.6%、47.9%和 60.0%;而‘唐红’暗培养 15 d 不定芽诱导率最高,为 36.5%。暗培养时间过短和过长都对不定芽诱导不利,时间太短(5 d)诱导效果没有达到,而时间太长(20 d)会导致芽体的白化和促进愈伤的形成。

2.4 不定芽的生长与生根

将不定芽切下,转入添加有 0.5 mg/L 6-BA 和 0.05 mg/L NAA 的 MS 培养基上增殖培养,所有不定芽均能抽枝成苗(图 1F)。

待不定芽生长到 1~2 cm,将其转入生根培养基(1/2MS+0.5 mg/L IBA)上生根培养^[7],1 个月,生根数大于 4,根长大于 2 cm(图 1G),经炼苗

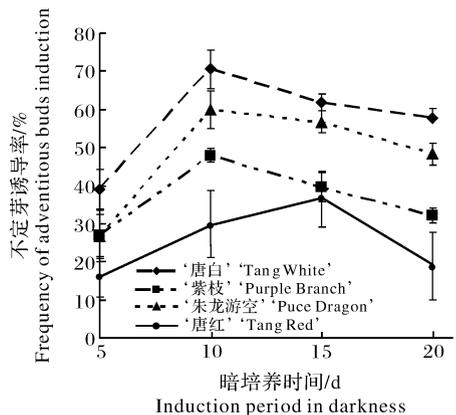


图 3 暗培养时间对玫瑰不定芽诱导的影响

Fig. 3 Effects of duration of darkness during induction period on adventitious bud induction

后种植在泥炭土和珍珠盐混合土中,在小苗上部倒扣透明塑料杯保证一定空气湿度,2 周后,90%的植株可移栽成活(图 1H)。

3 讨论

叶片直接分化不定芽发育成植株是一个非常复杂的脱分化再分化的过程,在整个过程中影响叶片再生能力的因素有很多,本试验对其中几个主要的因素进行了研究。

在有关植株再生的研究中,外植体对不定芽的诱导起着重要作用。Pati 等^[2]利用 *Rosa damask* Mill. 的复叶直接诱导出不定芽,诱导率达到 69%。而我们的研究结果与之相反,我们发现复叶和展开小叶的诱导能力很差,而未展开小叶的不定芽诱导

能力最强。这一点与 Dubois 等^[7]的报道相似,可能由于未展开小叶处于叶片的幼嫩时期,叶柄基部的细胞相对比较原始,对激素的诱导更加敏感,更容易分化形成有序结构,而展开小叶和复叶处于叶片的成熟阶段,叶柄基部的细胞对激素已经不再敏感,失去了分化能力。

基因型也是影响植株再生的重要因素。李敬蕊^[9]对 15 个切花月季品种小叶不定芽诱导能力进行了研究,结果表明在同一培养基上,不同月季品种的小叶不定芽诱导能力存在着显著差异。任桂芳等^[10]对 13 个月季品种的叶片再生能力进行了研究,仅有 6 个品种能够再生植株。我们以 4 个玫瑰品种‘唐白’、‘唐红’、‘紫枝’和‘朱龙游空’未展开小叶为外植体进行了研究,结果表明,这 4 个品种均能实现不定芽的直接再生,但是不同基因型间不定芽诱导能力存在着显著差异,‘唐白’的不定芽诱导率最高,而‘唐红’最低。

Huettelman 等^[11]研究发现,TDZ 是木本植物离体组织培养中活性最强的细胞分裂素类似物质,这一点在很多蔷薇属植株中也得到了证实^[2-4,8]。本研究发现,TDZ 也是玫瑰不定芽直接再生的重要影响因素,在没有添加 TDZ 的培养基中无法实现不定芽的诱导。然而,TDZ 的质量浓度与不定芽的诱导率并不一定成正比例关系的,高质量浓度的 TDZ 会抑制不定芽的形成,还会导致畸形芽的产生。

在以往蔷薇属植物叶片再生的研究中,TDZ 是主要的植物生长调节剂,而对 BA 的报道较少。瞿素萍等^[12]的研究结果表明 TDZ 在切花月季再生中的效果要优于 BA,但本研究表明 BA 对于玫瑰‘朱龙游空’不定芽的诱导有显著影响,而高质量浓度的 TDZ 会抑制该玫瑰品种的不定芽诱导,导致畸形芽的产生,诱导得到的不定芽在后期无法抽枝。这一结果与 Ning 等^[13]对蔷薇科植物梅花的研究结果相似。

在很多蔷薇属植物叶片再生的研究中,黑暗培养对不定芽的诱导起到了重要作用,最适合的暗培养时间为 3~7 d^[1-2,7,14]。高莉萍等^[15]以‘萨蔓莎’叶片为外植体进行研究时发现暗培养 8 d 对小叶片不定芽的诱导效果最好。而本研究表明,最适合玫瑰不定芽诱导的暗培养时间为 10~15 d,时间过短,叶柄基部无法形成突起,而时间过长则会导致愈伤的形成。另一方面,在前人对蔷薇属植物的研究中,

大多数在暗培养结束后直接将外植体从诱导培养基转入增殖培养基进行光照条件下培养^[1,7,14-15]。而本试验在暗培养结束后,外植体继续在诱导培养基上转入光照培养,15~20 d 后再转入增殖培养基培养效果最好,这一点与 Pati 等^[2]对 *Rosa damask* Mill. 的叶片再生研究结果类似:诱导培养 21 d 效果最好,诱导率可达到 69%。

本研究通过器官发生的直接途径,建立了 4 个玫瑰品种叶片不定芽直接再生体系,可为今后玫瑰优株保存和品种改良奠定基础。

参 考 文 献

- [1] IBRAHIM R, DEBERGH P C. Improvement of adventitious bud formation and plantlet regeneration from *in vitro* leaflet explants of roses (*Rosa hybrida* L.) [J]. Acta Horticulturae, 2000, 520: 271-280.
- [2] PATI P K, SHARMA M, SOOD A, et al. Direct shoot regeneration from leaf explants of *R. damascena* Mill [J]. In Vitro Cell Dev Biol -Plant, 2004, 40: 192-195.
- [3] TIAN C W, CHEN Y, ZHAO X L, et al. Plant regeneration through protocorm-like bodies induced from rhizoids using leaf explants of *Rosa* spp. [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 823-831.
- [4] 丁萌, 申玉晓, 傅小鹏, 等. 野蔷薇叶片直接再生的影响因素 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(1): 29-33.
- [5] KUNITAKE H, IMAMIZO H, MII M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.) [J]. Plant Science, 1993, 90: 187-194.
- [6] KIM W S, OH J M, LIU J R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo explant cultures of rugosa rose [J]. Plant Biotechnol Rep, 2009, 3(3): 199-203.
- [7] XING W, BAO M Z, QIN H D, et al. Micropropagation of *Rosa rugosa* through axillary shoot proliferation [J]. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 2010, 52(2): 69-75.
- [8] DUBOIS L A M, DE-VRIES D P. The direct regeneration of adventitious bud on leaf explants of glasshouse-grown cut rose cultivars [J]. Acta Horticulturae, 1998, 424: 327-331.
- [9] 李敬蕊. 月季再生体系的建立及叶盘法转化月季‘萨蔓莎’的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学园艺林学学院, 2006.
- [10] 任桂芳, 王建红, 冯慧, 等. 现代月季 (*Rosa hybrida*) 叶片植株再生体系的建立 [J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 533-536.
- [11] HUETTEMAN C A, PREECE J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant cell tissue culture [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1993, 33: 105-121.
- [12] 瞿素萍, 王继华, 唐开学, 等. 5 个切花月季品种的叶片离体培养和再生能力的基因型效应 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(12): 108-112.
- [13] NING G G, BAI S P, BAO M Z, et al. Factors affecting plantlet regeneration from *in vitro* cultured immature embryos and cot-

yledons of *Prunus mume* "Xue mei" [J]. In Vitro Cellular and Developmental, 2007, 43: 95-100.

[14] IBRAHIM R, DEBERGH P C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from

in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2001, 88: 41-57.

[15] 高莉萍, 包满珠. 月季, '萨蔓莎'不定芽的直接诱导和植株再生的研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(4): 784-788.

Factors affecting direct organogenesis from unexpanded leaflets of *Rosa rugosa*

XING Wen BAO Ying DING Meng FU Xiao-peng BAO Man-zhu NING Guo-gui

College of Horticulture and Forestry Sciences/Key laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract A protocol of direct organogenesis from unexpanded leaflets of four *Rosa rugosa* (*Rosa rugosa* Thunb.) cultivars was developed. Effects of explants, induction period under dark condition, combinations of plant growth regulators were investigated. The results showed that the highest frequency of adventitious buds induction and plant regeneration were obtained by using a three-stage procedure: initially excised unexpanded leaflets were incubated on half-strength MS (1/2 MS) medium supplemented with 0.05 mg/L NAA and certain concentration TDZ and BA adjusted for each cultivar under the dark condition for 10-15 d and subsequently transferred into light condition for 20 d, adventitious buds excised from the leaves were finally transferred to the MS medium with 0.5 mg/L BA, 0.01 mg/L NAA in the light for elongation. Bud formation capacity was also significantly affected by the genotype. Among the four cultivars, the highest shoot regeneration response (70.6%) was obtained for 'Tang White'. For cultivar 'Puce Dragon', there were significant effects on adventitious bud induction when incorporating of 1.0 mg/L BA and 0.3 mg/L TDZ on the basic medium. For cultivar 'Tang White', 'Puce Dragon' and 'Purple Branch', keeping the cultures under darkness for 10 d promoted shoot induction of leaflets explants, while for 'Tang Red', the best results were obtained in darkness for 15 d. Elongated shoots were excised and rooted best on 1/2 MS medium supplemented with 0.5 mg/L IBA. Rooted plantlets, more than 4 roots and longer than 1 cm, were successfully transplanted to soil for acclimatization.

Key words *Rosa rugosa*; unexpanded leaflet; the differentiation of adventitious buds; plant regeneration

(责任编辑: 张志钰)