

# 장기간 계대배양 된 장미 배발생 캘러스로부터 식물체 재분화 및 비정형체로부터 새로운 배발생캘러스 재생

이수영 · 도경란 · 천경성 · 김원희 · 권오현 · 이혜진

## New embryogenesis from atypical bodies and plant regeneration from long-term subcultured embryogenic callus in rose

Su Young Lee · Kyoung Ran Do · Kyeong-Seong Cheon · Won Hee Kim · O Hyeon Kwon · Hye Jin Lee

Received: 12 May 2014 / Revised: 20 May 2014 / Accepted: 20 June 2014

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Long-term subcultured rose embryogenic calluses, which had been maintained for more than 5 to 6 years since the first embryogenesis from calluses induced from in vitro roots of rose, were identified as potential material for the development of transgenic plants. The first embryogenic calluses from ‘Sweet Yellow’ and two breeding lines (KR056002 and KR056006) were obtained in 2007 and 2009, respectively. Subsequently, we found that plants regenerated from long-term embryogenic calluses (LEC). Whereas the LEC from ‘Sweet Yellow’ takes 3 to 4 months to regenerate plants, those of the two breeding lines take 4 to 5 months. This period of time is the same as that taken for plants to regenerate from the first embryogenic callus. New embryogenesis was observed from atypical bodies (ABs) that appeared during the process of long-term subculture. We found that it is possible to use the AB as a material for new embryogenesis.

**Keywords** Atypical body, Embryogenic callus, Long-term subculture, New embryogenesis regeneration, Rose

### 서 언

형질전환 기술을 이용하여 개발된 품종이 처음 실용화되었던 1996년에 1.7백만 ha 이었던 GMO품종의 전세계 재

배면적이 2012년에는 1996년의 100배인 170백만 ha로 증가되었고, 2009년 말 세계 3대 절화류의 하나인 장미에서 화색변형 형질전환 품종 ‘APPLAUSE’가 일본의 Suntory사에서 상업화되어 2013년 3월 현재 일본의 홋카이도 등 8개 지역 240개 점포에서 시판될 정도로(Lee 2013) 이제는 형질전환 기술이 신품종 개발을 위한 육종기술의 하나로 정착되었다고 단언해도 과하지 않을 것이다. 그런데 이 형질전환 기술을 이용하여 신품종을 개발하기 위해서는 식물체 재분화 기술이 확립되어야만 하는데 장미의 경우 잎이나 뿌리 등 기관 절편체로부터 직접 식물체를 재분화시키거나 체세포배발생캘러스를 경유하여 식물체를 재분화시키는 많은 연구 보고가 있다(Dubois and de Vries 1995; Dohm et al. 2001; Hsia and Korban 1996; Ibrahim and Debergh 2001; Kamo et al. 2005; Kim et al. 2003; Marchant et al. 1996; Pati et al. 2004; Zakizadeh et al. 2008). 본 연구팀에서도 장미 기내 뿌리로부터 배발생캘러스의 유도 및 증식에 관한 연구 보고를 한 바 있고(Lee et al. 2008, 2010a), 이 체세포배(배발생캘러스 포함)를 절편체로 이용한 형질전환 기술을 개발한 바 있다(Lee et al. 2010b, 2013). 유전자가 전이된 장미 형질전환 식물체를 획득하고자 할 때 현재까지 알려진 가장 효율적인 재료는 체세포배발생캘러스이다(Firozabady et al. 1994; Tanaka 2009). 이는 체세포배발생캘러스를 구성하고 있는 각각의 세포가 독립적으로 행동하여 세포 하나하나가 체세포배로 발달할 수 있고, 기관분화나 조직으로부터 분화된 캘러스로부터 획득된 식물체와는 달리 식물체 일부분만 유전자가 전이된 키메라 형질전환체를 획득할 가능성이 매우 낮을 뿐 아니라(Li et al. 2002) 유전자가 전이된 체세포배발생캘러스가 2차 배발생캘러스를 분화시킬 수 있어 형질전환체를

S. Y. Lee (✉) · K. R. Do · K. S. Cheon · W. H. Kim · O. H. Kwon · H. J. Lee  
농촌진흥청 국립원예특작과학원  
(National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea)  
e-mail: lsy8542224@korea.kr

대량획득할 수 있는 장점 때문이다. 이와 같이 배발생캘러스는 형질전환 식물체를 개발하기 위한 유용한 재료가지만 장미를 비롯하여 배발생캘러스를 이용하여 형질전환체를 개발한 연구에서 이용했던 재료는 새로운 절편체로부터 새롭게 유도한 배발생캘러스이었다. 그런데 매번 절편체로부터 배발생캘러스를 유도하여 형질전환 재료로 사용하는 것은 시간 소모적일 뿐 아니라 형질전환 식물체의 균일한 획득을 어렵게 하므로 최근에는 형질전환체 획득이 보편화된 알팔파 및 잔디 등에서 배발생캘러스를 유지 증식하여 재료로 이용할 필요성이 대두되고 있다(Chai et al. 2011; Liu et al. 2009). 이에 본 연구팀에서도 장미 형질전환체 개발을 위한 재료로서 장기간 유지 증식해 온 배발생캘러스의 이용가능성을 검토하고자 국내 육성 장미 품종 및 계통 유래 기내 뿌리로부터 유도 후 5~6년이상 유지 증식된 배발생캘러스로부터 식물체 재분화 능력 유지 및 유지 증식배지에서 발생된 비정형체로부터 새로운 배발생캘러스의 유도를 확인한 바 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 체세포배발생 캘러스 계대배양

2007년과 2009년에 국내 육성 장미 품종 'Sweet Yellow' 및 KR056002와 KR056006 등 국내 육성 2계통의 기내 식물체 뿌리를 5 또는 11 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D, 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose가 첨가되고 7 g·L<sup>-1</sup> plant agar로 고형화된 Schenk & Hildebrandt (SH) 배지(Schenk and Hildebrandt 1972)(pH 5.7)에서 2~8주 배양한 후 식물생장조절제가 첨가되지 않은 SH배지 또는 3 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 및 300 mg·L<sup>-1</sup> proline, 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose가 첨가되고 2.4 g·L<sup>-1</sup> phytagel로 고형화된 SH배지(pH 5.7)에서 배발생캘러스 유도 후 직경 1.5~2 cm의 원형으로 모아 3~6주 간격으로 계대배양하였고, 계대배양 중 발생된 비정형체는 분리하여 동일한 배지에 배양하였다.

### 장기간 계대배양 된 체세포배발생캘러스로부터 식물체 재분화

장기간 유지 증식해 온 배발생캘러스를 체세포배 발아배지(SH basal salts + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> IBA + 1 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 30 g·L<sup>-1</sup> maltose + 4 g·L<sup>-1</sup> agarose, pH 5.7)나 체세포배 성숙배지(SH basal salts + 1 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg·L<sup>-1</sup> ABA + 1 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 0.3 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose + 4 g·L<sup>-1</sup> agarose, pH 5.7)로 옮겨 신초원기를 유도하였다. 신초원기로부터 건설한 지상부 생장을 위해 신초생장(MS basal salts + 2 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose + 8 g·L<sup>-1</sup> plant agar, pH 5.8) 배지에서 배양하였다.

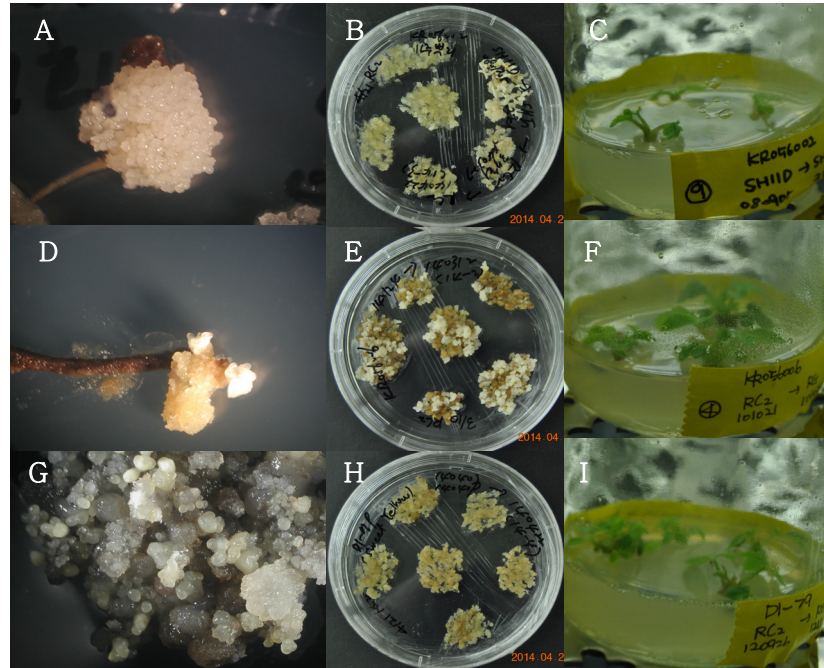
### 비정형체로부터 배 및 배발생캘러스 재생 현미경 관찰

조직 절편을 채취하여 2.5% glutaraldehyde에 넣은 즉시 조직에 포함되어 있는 기포를 제거하였다. 모든 과정은 4°C에서 진행되었으며 90분간 1차 고정 처리 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)로 15분 간격으로 4~5회 세척하였다. 2차 고정으로는 1% osmium tetroxide로 4°C에서 90분간 처리한 후, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)로 20분 간격으로 4~5회 세척한 후 마지막 phosphate buffer에서 하룻밤을 경과하였다. 탈수는 다음날 아침에 시작 한 후 40% ethanol, 60% ethanol, 80% ethanol, 90% ethanol, 95% ethanol로 각각 5분씩 그리고 100% ethanol로 5분, 15분, 30분간 탈수하였다. 탈수 후에는 epon의 조직 내 침투를 더 용이하게 하기 위해 ethanol과 propylene oxide를 1:1로 섞은 용액에 sample을 넣고, 15분간 경과시킨 후 순수 propylene oxide에 15, 15, 30분간 침지하였다. 최종적으로 epon에 매몰(embedding)하기 위하여 propylene oxide와 epon을 2:1 및 1:1로 섞은 용액에 각각 3시간동안 처리한 후 순수 epon에서 하룻밤을 경과시켰다. 다음날 새로운 epon으로 바꾸어 15분간 처리한 후 epon+D.M.P 30 (epon의 1.5% 첨가)을 시료 절편과 함께 silicon mold에 넣어서 60°C에 4일간 처리하였다. 처리구마다 10~15개의 epon block을 만들고, 이 중 임의로 2개의 epon block을 선택하여 초미세절편기(Ultracut R, Leica Co)를 이용하여 1,500 nm의 두께로 시료를 절단하여 slide glass 위에 증류수 1방울을 떨어뜨려 치상하고, 60°C에서 5시간 이상 건조시킨 후 염색하였다. 염색 과정은 제작된 조직절편은 0.5% periodic acid (H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>) 용액에 30분간 담근 후 증류수로 10분간 2~3번 세척, Schiff's reagent에 15분간 처리, 1% sodium bisulfite 용액에 5분간 처리, 흐르는 물로 30분간 세척하는 순서로 실시하였다. 염색이 끝난 시료를 영구보존 하기 위하여 60°C 열판에서 5시간 이상 건조 후 hystomount를 떨어뜨리고 cover glass로 덮고 다시 건조 후 cover glass 주위에 붙어있는 hystomount를 깨끗이 제거하고 광학현미경(Axioskop 2, Carl Zeiss Co.)으로 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 장기간 계대배양 된 체세포배발생 캘러스로부터 식물체 재분화

장미 형질전환체를 개발하기 위한 유전자 도입 재료로서 장기간 유지 증식된 장미 배발생캘러스의 이용 가능성을 조사하고자 2007년 및 2009년에 각각 처음으로 기내 뿌리로부터 유도된 후(Fig. 1A, 1D, 1G) 5~6년 이상 유지 증식배지에서 계대배양 해 온(Fig. 1B, 1E, 1H) 장미 '스위트 옐로우' 품종 및 KR056002와 KR056006 2계통 유래 배



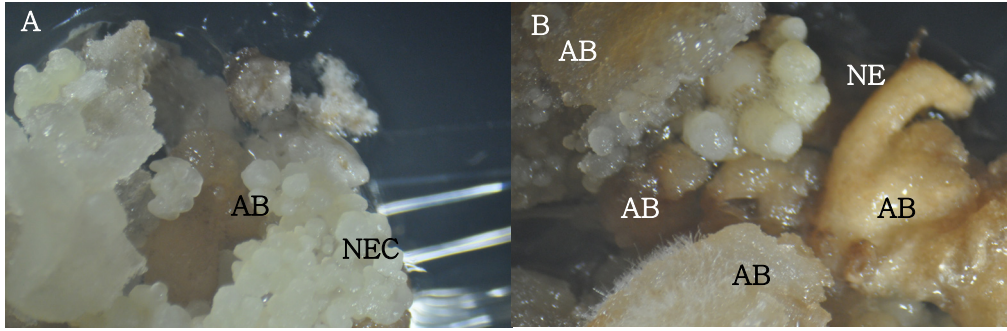
**Fig. 1** Plant regeneration from long-term maintained embryogenic calluses after the first embryogenesis from *in vitro* roots of two breeding lines [KR056002 (A to C) and KR056006 (D to F)] and cv. ‘Sweet Yellow’ (G to I) in *Rosa hybrida* L. A, D, and G: the first embryogenesis from *in vitro* roots; B, E, and H: embryogenic calluses maintained for more than 5 to 6 years; C, F, and I: plant regeneration from embryogenic calluses maintained for more than 5 to 6 years

발생캘러스로부터 식물체의 재분화 능력을 확인하였다. 수수 미숙배 유래 체세포배발생캘러스의 장기간 유지 증식과정에서 캘러스의 형태가 달라진다고 보고한 Lambé 등(1999)의 연구와 같이 본 연구팀에서도 장기간 유지 증식한 장미 배발생캘러스도 계대배양 되면서 캘러스의 형태가 변형되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 배발생캘러스 유지 증식을 위한 배지에 배양했음에도 불구하고 배발생캘러스 외에도 미숙배 또는 성숙 배 및 자엽 전개 배도 관찰할 수 있었다. 장기간 계대배양 된 배발생캘러스로부터 Figure 1C, Figure 1F 및 Figure 1I와 같은 신초의 모습을 갖춘 식물체로 재분화되기까지의 기간은 품종 또는 계통에 따라 차이가 있었다. ‘스위트엘로우’ 품종은 3~4개월, KR056002 및 KR056006은 4~5개월이 소요되었다. 이는 각 품종 및 계통의 기내 뿌리로부터 유도된 캘러스로부터 배발생 이후 최초 재분화 식물체 획득까지 소요된 기간과 동일한 양상이었다(Lee et al. 2010a). 반면, 장기간 계대배양 된 배발생캘러스로부터 재분화 식물체 획득 비율은 각 품종 및 계통의 기내 뿌리로부터 유도된 캘러스로부터 배발생 이후 최초 재분화 식물체 획득할 때와 마찬가지로 품종과 계통간 차이는 없었다.

배발생캘러스를 장기간 유지 증식했을 때 재분화 능력 유지 가능 기간은 작물, 품종, 계대배양을 거친 캘러스의 상태에 따라 다를 수 있을 것이다. 연구 보고에 의하면 maritime pine은 34주(Breton et al. 2006), alfalfa는 7개월(Tian et al. 2002), durum wheat는 10개월(Borrelli et al. 1991), *Zoysia*

*japonica*는 18개월(Liu et al. 2009), pearl millet은 2년(Lambé et al. 1999), fox grapes은 2년 이상(Motoike et al. 2001), sugarcane은 40개월(Brisbe et al. 1994), Betel nut palm (Wang et al. 2010)과 *Zoysia matrella* (Chai et al. 2011)는 4년, 장미 ‘Kardinal’ 품종은 4~5년 이상(Kamo et al. 2005)까지 배발생캘러스의 식물체 재분화 능력이 유지되었다고 한다. 본 연구에서는 장미 ‘스위트엘로우’의 경우 6년 이상까지 재분화 능력이 퇴화되지 않은 것을 확인하였다. Liu et al. (2009)에 의하면 장기간 계대배양 된 배발생캘러스의 재분화 능력은 계대배양 배지 구성에 따라 달라질 수 있다고 한다. 그들은 18개월까지만 식물체 재분화 능력이 유지되었던 *Zoysia japonica* 종자유래 compact type 캘러스의 경우 계대배양 배지내 CuSO<sub>4</sub> 첨가에 의해 36개월까지 재분화 능력이 향상되었다고 하였다. 본 연구 재료인 ‘스위트엘로우’ 및 KR056002 등 2계통 배발생캘러스는 현재까지 식물체재분화 능력이 퇴화되지 않았지만 향후 재분화 능력이 퇴화될 경우에는 배지조성의 변화를 검토할 필요가 있을 것이다.

유전자 도입 재료로는 체세포배발생캘러스보다는 체세포배가 더 유용하다. 그러므로 체세포배에서 직접 2차 체세포배를 증식하는 기술은 획기적이라 할 수 있을 것이다. Hua et al. (2010)은 자엽전개 단계의 *Hevea brasiliensis* 체세포배의 하부를 잘게 절단하여 2차 배 증식이 가능하였다고 보고한 바 있으므로 장미도 향후의 연구에서는 배발생캘러스 유지 증식과정에서 발생하는 자엽전개 단



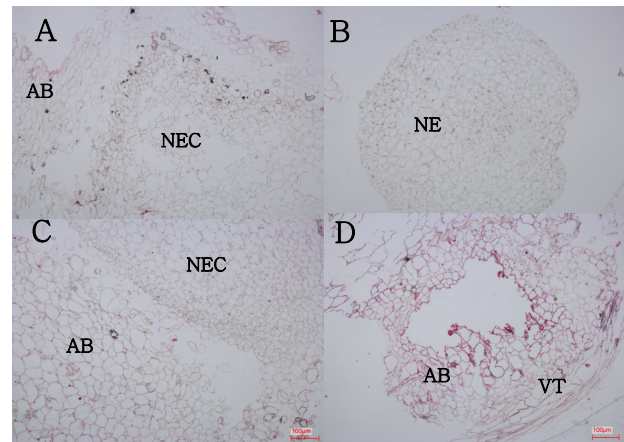
**Fig. 2** New embryogenesis on atypical bodies appeared during the process of long-term subculture of embryogenic calluses *Rosa hybrida* cv. 'Sweet Yellow'. AB, atypical body; NE, new embryo; NEC, new embryogenic callus

계의 배로부터 바로 2차 체세포배를 재생시키는 연구 검토가 필요할 것이다.

#### 비정형체로부터 새로운 배발생캘러스 재생

본 연구에서 장미 체세포배발생캘러스의 유지 증식을 위한 계대배양 과정에서 배지 내 첨가된 2,4-D의 영향 때문인지 새로운 배발생캘러스 외에도 부정근 및 뿌리가 비대한 형태의 비정형체가 간간히 발생하는 것을 관찰할 수 있었다. 이 비정형체의 정확한 조직학적 특성을 파악하고자 현미경 관찰을 실시한 결과 Figure 3D의 오른쪽 하단과 같이 뿌리 및 잎 등과 같은 기관에서 나타나는 통도조직이 잘 발달하고 있었다. 이들을 배발생캘러스 유지 증식배지와 동일한 배지에 배양한 결과, Figure 2A, 2B, 3A 및 3C와 같이 비정형체 위에 새로운 배 및 배발생캘러스가 유도되는 것이 확인되었고, 현미경하에서도 새로운 배의 관찰을 확인할 수 있었다. 본 연구팀이 이전에 보고한 장미 체세포배발생캘러스 유도 연구에서 기내 식물체 뿌리보다 배발생캘러스에서 유도된 뿌리 즉 부정근이 새로운 배발생캘러스 유도에 효과적이라는 것을 보고한 바 있다(Lee et al. 2010a). 그런데 비정형체가 부정근이 비대한 형태의 모양인 것으로 볼 때 비정형체를 배발생캘러스 유도배지에 배양하여 배발생캘러스 유도 효율 증진에 대한 검토가 이루어질 필요가 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 Kamo et al. (2005)이 4~5년 이상 장기간 유지해 온 장미 배발생캘러스 재분화 능력에 관한 보고보다 더 장기간인 5~6년 이상 계대배양된 장미 배발생캘러스의 재분화에 관한 보고로서 6년 이상 장기간 계대배양된 체세포배발생캘러스로부터 식물체 재분화 능력을 확인한 보고로서는 세계 최초이며, 계대배양 중 발생하는 비정형체가 배 및 배발생캘러스를 재생시킬 수 있는 재료로 이용가능함을 제시하였다. 또한 본 연구에서 보고된 장기간 계대배양된 장미 배발생캘러스는 장미 형질전환 기술을 이용하여 전통적인 육종방법으로 개발하기 어려운 장미 신품종을 개발할 수 있는 유용한 재료가



**Fig. 3** Microscopic observation of new embryogenesis from atypical bodies appeared during the process of long-term subculture of embryogenic calluses *Rosa hybrida* cv. 'Sweet Yellow'. AB, atypical body; NE, new embryo; NEC, new embryogenic callus; VT: vascular tissue

될 수 있을 것으로 기대한다.

#### 적 요

장미 형질전환체를 개발하기 위한 유전자 도입 재료로서 5~6년 이상 장기간 유지 증식된 장미 배발생캘러스의 이용 가능성이 확인되었다. 2007년 및 2009년에 각각 처음으로 기내 뿌리유래 캘러스로부터 유도된 후 유지 증식배지에서 계대배양해 온 장미 '스위트 옐로우' 품종 및 KR056002와 KR056006 2계통 유래 배발생캘러스로부터 식물체의 재분화 능력을 확인하였다. 장기간 계대배양된 배발생캘러스로부터 신탁의 모습을 갖춘 식물체로 재분화 되기까지 소요기간 및 재분화율은 '스위트옐로우' 품종은 3~4개월, KR056002 및 KR056006은 4~5개월로, 이들 배발생캘러스가 기내뿌리로부터 처음으로 배발생된 후 최초 신탁 재분화 때와 동일한 양상이었다. 또한 체세포배발생캘러스의 유지 증식을 위한 계대배양과

정에서 발생하는 비정형체 위에 새로운 배 및 배발생캘러스가 유도되었다. 이 비정형체는 새로운 배발생캘러스를 유도할 수 있는 재료로서 이용될 수 있을 것이다.

## 사 사

본 연구는 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ0081672014)의 지원으로 수행되었습니다.

## References

- Borrelli GM, Lupotto E, Locatelli F, Wittmer G (1991) Long-term optimized embryogenic cultures in drum-wheat (*Triticum drum* Desf). *Plant Cell Rep* 10:296-299
- Breton D, Harvengt L, Trontin JF, Bouvet A, Favre JM (2006) Long-term subculture randomly affects morphology and subsequent maturation of early somatic embryos in maritime pine. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2006) 87:95-108
- Brisibe EA, Miyake H, Taniguchi T, Maeda E (1994) Regulation of somatic embryogenesis in long-term callus-cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *New Phytol* 126:301-307
- Chai M, Jia YF, Chen S, Gao ZS, Wang HF, Liu LL, Wang PJ, Hou DQ (2011) Callus induction, plant regeneration, and long-term maintenance of embryogenic cultures in *Zoysia matrella* [L.] Merr. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:187-192
- Dohm A, Ludwig C, Nehring K, Debener T (2001) Somatic embryogenesis in roses. *Acta Hort* 547:341-347
- Dubois LAM, de Vries DP (1995) Preliminary report on the direct regeneration of adventitious buds on leaf explants of in vivo grown glasshouse rose cultivars. *Garrenbauwissenschaft* 60:249-253
- Firozabady E, Moy Y, Courtneygutterson, N, Robinson K (1994) Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissues. *Bio/Technology* 12:609-613
- Hsia C, Korban SS (1996) Organogenesis and somatic embryogenesis in callus of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 44:1-6
- Hua YW, Huang TD, Huang HS (2010) Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant breeding* 129:202-207
- Ibrahim R, Debergh PC (2001) Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). *Sci Hort* 88:41-57
- Kamo K, Jones B, Bolar J, Smith F (2005) Regeneration from long-term embryogenic callus of the *Rosa hybrida* cultivar Kardinal. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41:32-36
- Kim CK, Chung JD, Lee SO, Oh JY (2003) Somatic embryogenesis from *in vitro* grown leaf explants of *Rosa hybrida* L. *J Plant Biotechnol* 5:169-172
- Lambé P, Mutambel HSN, Deltour R, Dinant M (1999) Somatic embryogenesis in pearl millet (*Pennisetum glaucum*): Strategies to reduce genotype limitation and to maintain long-term totipotency. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 55:23-29
- Lee SY (2013) Review in research and the related industry on the recent transgenic flowers. In: KBCH, KRIBB (eds) Biosafety white paper 2013:260-269
- Lee SY, Han BH, Kim YS (2010a) Somatic embryogenesis and shoot development in *Rosa hybrida* L. *Acta Hort* 870:219-225
- Lee SY, Jung JH, Kim JH, Han BH (2008) In vitro multiple shoot proliferation and plant regeneration in rose. *J Plant Biotechnol* 35:223-228
- Lee SY, Lee JL, Kim JH, Ko JY, Kim ST, Lee EK, Kim WH, Kwon OH (2013) Production of Somatic Embryo and Transgenic Plants Derived from Breeding Lines of *Rosa hybrida* L. *Hort Environ Biotechnol* 54:172-176
- Lee SY, Lee JL, Kim WH, Kim ST, Lee EK (2010b) Acquirement of transgenic rose plants from embryogenic calluses via *Agrobacterium tumefaciens*. *J Plant Biotechnol* 37:511-516
- Li, X., S.F. Krasnyanski, and S.S. Korban. 2002. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. *J. Plant Physiol.* 159:313-319.
- Liu L, Fan XL, Zhang JW, Yan ML, Bao MZ (2009) Long-term cultured callus and the effect factor of high-frequency plantlet regeneration and somatic embryogenesis maintenance in *Zoysia japonica* In Vitro Cell Dev Biol Plant 45:673-680
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Power JB (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in floribunda rose (*Rosa hybrida* L.) cvs. Trumpeter and Glad Tidings. *Plant Sci* 120:95-105
- Motoike SY, Skirvin RM, Norton MA, Otterbacher AG (2001) Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from fox grapes. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 66:121-131
- Pati PK, Sharma M, Sood A, Ahuja PS (2004) Direct shoot regeneration from leaf explants of *Rosa damascena* Mill. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40:192-195.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50:199-204
- Tanaka Y (2009) Flower color modification by genetic engineering. 2009 Plant Science Conference: 9
- Tian LN, Brown DCW, Watson E (2002) Continuous long-term somatic embryogenesis in alfalfa. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38:279-284
- Wang HC, Chen JT, Chang WC (2010) Morphogenetic routes of long-term embryogenic callus culture of *Areca catechu*. *Biologia Plantarum* 54:1-5
- Zakizadeh H, Debener T, Sriskandarajah S, Frello S, Serek M (2008) Regeneration of miniature potted rose (*Rosa hybrida* L.) via somatic embryogenesis. *Eur J Hort Sci* 73:111-117