Vietnam J. Agri. Sci. 2017, Vol. 15, No. 1: 1 - 6 Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2017, tập 15, số 1: 1 - 6
www.vnua.edu.vn

NGHIÊN CỨU HỆ THỐNG TÁI SINH CÂY SẮN (*Manihot esculenta* Crantz) THÔNG QUA PHÔI SOMA TỪ LÁ CHƯA TRƯỞNG THÀNH

Đỗ Hải Lan[1*], Lê Trần Bình[2], Lê Văn Sơn[2], Chu Hoàng Hà[2]

[1]Đại học Tây Bắc, [2]Viện Công nghệ sinh học,
[2]Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Email[*]: dohailan.vn@gmail.com

Ngày gửi bài: 25.07.2014 Ngày chấp nhận: 08.11.2016

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm mục đích tái sinh cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz) thông qua phôi soma từ lá chưa trưởng thành. Vật liệu được sử dụng là các mảnh lá chưa trưởng thành của các cây *in vitro* từ 2-3 tuần tuổi. Phôi soma được cảm ứng tạo thành trên môi trường MS có bổ sung picloram với các nồng độ khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trên môi trường MS bổ sung 12 mg/l picloram, cả hai giống đều cho tỉ lệ hình thành phôi soma cao nhất. Sau 4 tuần, giống KM94 cho tỷ lệ hình thành phôi cao hơn 11,4% so với giống KM140. Tuy nhiên, khi cụm phôi được chuyển sang môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BAP để nảy mầm tạo cây con, tỷ lệ tạo cây con ở giống KM140 lại cao hơn với giống KM 94. Chồi cây được tạo ra đạt chiều dài khoảng 1,0 - 1,5 cm được chuyển sang môi trường MS không có chất kích thích sinh trưởng cho tỷ lệ ra rễ đạt 100%, rễ sinh trưởng tốt nhất. Những cây tái sinh *in vitro* có bộ rễ hoàn chỉnh được trồng trong bầu giá thể trấu hun: đất cát (4: 6) đạt tỷ lệ cây sống 100%. Quy trình tạo cây non hoàn chỉnh trong 16 - 18 tuần là cơ sở quan trọng cho xây dựng quy trình chuyển gene ở cây sắn.

Từ khóa: Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz), nuôi cấy mô, lá chưa trưởng thành, phôi soma, tái sinh.

Establishment of Plant Regeneration Protocol for Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) via Somatic Embryogenesis from Immature Leaves

ABSTRACT

The present study aimed at regenerating cassava (*Manihot esculenta* Crantz) via somatic embryogenesis. The explants used were immature leaves harvested from 2-3-week old *in vitro* plants derived from two cassava cultivars, KM94 and KM140. Somatic embryogenesis was achieved with high frequencies using MS medium supplemented with a wide range of picloram concentrations. The results showed that the highest rate of somatic embryo formation for both cultivars was obtained when cultured in MS medium containing 12 mg/l picloram. Although the number of embryos per explant was similar between two cultivars at 4 weeks of culture, KM94 cultivar gave a higher rate (81,4 ± 1,7%) than KM140 cultivar (70,4 ± 2,9%). Somatic embryos were subsequently transferred to MS medium supplemented with 0.3 mg/l BAP for plantlet regeneration. All shoots with 1.0 - 1.5 cm in length transferred to - hormone-free MS medium formed roots in 2 weeks. Rooted plantlets were transplanted to a mixture of rice husk (40%) and sandy soil (60%) in greenhouse. This protocol required 16 to 18 weeks and was entirely appropriate for mass production of various cassava genotypes and further genetic transformation experiments.

Keywords: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), callus culture, immature leaf, somatic embryos, regeneration..

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là cây có củ được trồng ở vùng cận nhiệt đới của Châu Phi, Châu Á và Mỹ Latin, đáp ứng nhu cầu lương thực cho 500 triệu người. Củ sắn có hàm lượng chất khô chiếm 20% trong đó 80% là tinh bột. Mục đích sử dụng sắn khác nhau tùy mỗi vùng. Ở Châu Phi, sắn được sử dụng chủ yếu làm lương thực, trong khi đó ở Thái Lan, một

nửa sản lượng 20 triệu tấn sắn hàng năm được sử dụng cho công nghiệp tinh bột (Sriroth *et al.*, 2001). Với sự phát triển kinh tế, lượng tinh bột cần cho công nghiệp tăng lên ở các quốc gia đang phát triển. Mặc dù các nước nhiệt đới có nguồn tinh bột sắn (hoặc khoai tây, củ cải) nhưng vẫn phải nhập khẩu tinh bột ngô đắt đỏ (Sriroth *et al.*, 2001). Để đủ lượng tinh bột sử dụng, tinh bột phải được biến đổi theo nhiều cách khác nhau. Nếu tinh bột sắn với những đặc tính mong muốn được tạo ra, đây sẽ là nguồn tinh bột cạnh tranh với các nguồn tinh bột khác, người nông dân có thể trồng sắn để tăng thu nhập.

Các công nghệ chuyển gene mới đã mở ra các khả năng tạo ra những giống sắn chất lượng tốt bằng cách kết hợp các tính trạng mong muốn vào một số giống sắn vốn được nông dân ưa thích (Kawano *et al.*, 2003). Chuyển gene thành công phụ thuộc hoàn toàn vào hiệu quả của hệ thống tái sinh. Đến năm 1995, hệ thống tái sinh duy nhất ở cây sắn là kiểu biệt hóa phát sinh phôi soma.

Các hệ thống tái sinh cây sắn thông qua quá trình tạo phôi soma đã được cải tiến (Schopke *et al.*, 1996). Đối với bất cứ quá trình vi nhân giống nào, giai đoạn sinh trưởng cũng quyết định hiệu suất của quá trình. Các thùy lá non (chưa trưởng thành) được cảm ứng bởi 2,4-D và NAA để tạo phôi (Guohua Ma and Qiusheng Xu, 2002; Joseph *et al.*, 2001). Thay vì được cảm ứng bằng 2,4-D, mô phân sinh đỉnh và thùy lá chưa trưởng thành được cảm ứng tạo phôi soma sơ cấp bởi picloram (Li *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2001). Các mảnh lá mầm màu xanh được tách từ phôi giai đoạn lá mầm được đặt lên môi trường P-CIM để cảm ứng phôi soma thứ cấp. Cách cấy chuyển phôi soma đối với phát sinh phôi thứ cấp ảnh hưởng tới hình thái của mô phát sinh phôi (Raemakers *et al.*, 1997). Các phôi soma thứ cấp được chuyển sang môi trường bổ sung NAA hoặc BA để phôi trưởng thành (Joseph *et al.*, 2001), hoặc có thể bổ sung thêm $AgNO_3$ vào môi trường đã có BA nhằm kéo dài chồi.

Sự cải tiến các giống sắn chuyển gen đều dựa vào sự cải tiến các hệ thống nuôi cấy mô nhằm tạo ra các tế bào và mô làm nguyên liệu chuyển gen. Vật liệu khởi đầu (lá, đỉnh sinh trưởng) được sử dụng để cảm ứng tạo phôi soma qua tiền phôi sơ cấp. Phôi soma có thể chuyển hóa theo nhiều hướng như phôi soma có thể cho nảy mầm trực tiếp tạo thành cây con, phôi soma chuyển hóa tiếp thành phôi soma thứ cấp, phôi soma được chọn lọc, nuôi cấy tạo thành mô sẹo tiền phôi tơi, được làm trưởng thành để trở lại phôi soma, từ mô sẹo tiền phôi tơi có thể tạo thành tế bào trần và ngược lại. Ở Việt Nam, sự tạo phôi soma và tạo các cơ quan của cây sắn mới chỉ đang được nghiên cứu. Bài báo này trình bày kết quả quá trình xây dựng quy trình cảm ứng tạo phôi soma qua lá chưa trưởng thành để tái sinh hai giống sắn KM 140 và KM 94 của Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hai giống sắn KM94 và KM140 có nguồn gốc từ Trung tâm Tài nguyên thực vật, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam (An Khánh, Hoài Đức, Hà Tây).

Đoạn thân trưởng thành của hai giống sắn KM94 và KM140 được giâm trong đất, sau 4 - 6 tuần, các chồi nách phát triển thành đoạn thân màu xanh có đường kính 0,1 - 0,2 cm. Lấy các đoạn thân này cắt thành các đoạn ngắn có độ dài 3 - 4 cm, rửa sạch dưới vòi nước 30 phút; bề mặt mẫu cấy được khử trùng bằng cồn 70% trong 30 giây và trong $HgCl_2$ 0,1% 10 phút, cuối cùng rửa sạch $HgCl_2$ bằng nước cất khử trùng trong 3 phút, rửa lặp lại 5 lần. Mẫu cấy sau khi đã khử trùng được nuôi cấy trên môi trường Murashige - Skoog (MS) bổ sung thêm 3% sucrose với mật độ 5 đoạn cắt/bình tam giác 250 ml (50 ml môi trường/bình), cấy chuyển 2 tháng 1 lần. Lá vừa được tạo thành (chưa trưởng thành) của cây con sau 12 - 14 ngày tuổi được sử dụng làm mẫu cấy. Mẫu cấy được cắt thành các mảnh nhỏ có kích thước 2 × 2 mm được đặt trong đĩa Petri bao gồm 25 ml môi trường MS bổ sung 2% sucrose, 1 mg/l $CuSO_4$ (2 mM) và picloram ở các nồng độ 1, 3, 6, 9, 12 và 15 mg/l để tạo phôi soma. Mỗi đĩa môi trường đặt 10 mảnh mẫu, 5 đĩa/lần thí nghiệm, lặp lại 3 lần. Đầu tiên, thùy lá được đặt trong tối

1 tuần rồi chuyển ra sáng khoảng 3 tuần để tạo phôi soma sơ cấp. Sau khi phôi soma sơ cấp được tạo thành, việc cấy chuyển lặp lại 2 tuần 1 lần trên cùng môi trường để tạo phôi soma thứ cấp. Các lá mầm, được tách từ phôi giai đoạn lá mầm 14 - 15 ngày tuổi, được cắt thành các mảnh nhỏ có kích thước 2 × 2 mm, đặt lên môi trường MS, có bổ sung 2% sucrose và 1 mg/l $CuSO_4$ (2 mM), đồng thời bổ sung BA ở các nồng độ 0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 mg/l trong thời gian 3 đến 4 tuần, đánh giá số phôi tạo thành cây con (Li *et al.*, 1996).

Khả năng nảy mầm của phôi soma tạo thành cây con: Khoảng 3 - 4 tuần sau khi tạo phôi và phôi chín trên môi trường có bổ sung picloram với các nồng độ khác nhau. Để nảy mầm tạo thành các mầm cây hoàn chỉnh, các cụm phôi chín này được chuyển sang môi trường có nồng độ BAP khác nhau (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 mg/l). Mỗi đĩa môi trường đặt 10 mảnh mẫu, 5 đĩa/lần thí nghiệm, lặp lại 3 lần. Tỉ lệ phôi soma được tính theo công thức (số lượng mảnh mẫu có phôi soma: tổng số mảnh mẫu nghiên cứu) × 100

Tạo rễ và ra cây: Các chồi đạt chiều dài từ 1 - 1,5 cm được cấy chuyển sang môi trường MS 0,2% sucrose có bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 mg/l) trong thời gian 4 tuần. Mỗi bình đặt 5 chồi, 10 bình/lần thí nghiệm, lặp lại 3 lần. Cây có bộ rễ hoàn chỉnh được chuyển ra nhà lưới, trồng trên giá thể bao gồm đất cát pha 60% cộng với trấu hun 40%, trong 2 tuần đầu tránh ánh sáng chiếu trực xạ.

Các môi trường sử dụng trong nghiên cứu này được chỉnh pH = 5,8 và bổ sung thêm 7 g/l agar. Khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1,5 atm trong thời gian 15 phút. Nuôi cấy ở nhiệt độ 25 ± 2°C, cường độ ánh sáng 3.000 lux với thời gian chiếu sáng 16 h/ngày.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cảm ứng tạo phôi soma từ lá chưa trưởng thành của cây sắn nuôi cấy *in vitro*

Vật liệu ban đầu được cảm ứng tạo phôi soma bởi các chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin (2,4-D, picloram, dicamba) (Stamp and Henshaw, 1987a; Szabados *et al.*, 1987; Mroginsky and Scocchi, 1993; Raemakers *et al.*, 1993a; Li *et al.*, 1995; Narayanaswamy *et al.*,1995 (trích từ Hillocks, 2001). Trong nhóm auxin, 2,4D được áp dụng phổ biến nhất để tạo phôi soma. Tạo phôi soma trên môi trường có bổ sung picloram, dicamba cũng đã được báo cáo ở nhiều loài cây khác nhau (Raemakers *et al.*, 1997; Castillo *et al.*, 1998; Groll *et al.*, 2001; Mendoza and Kaeppler, 2002; Preeti and Kothari, 2004).

Trong nghiên cứu này, phôi soma được tạo ra trên môi trường MS bổ sung picloram với các nồng độ khác nhau. Lá chưa trưởng thành của hai giống sắn KM94 và KM140 nuôi cấy *in vitro* được sử dụng để xác định hiệu quả nồng độ picloram trong việc tạo phôi soma. Các mẫu cấy được đặt trên môi trường tạo phôi soma trong vòng 2 tuần, giai đoạn đầu của quá trình tạo phôi (phôi hình cầu) quan sát được ở tuần thứ 3, giai đoạn sau của quá trình tạo phôi (hình chùy) có thể quan sát được ở tuần thứ 4 (Hình 1B).

Kết quả trong bảng 1 cho thấy, khả năng tạo phôi soma và số phôi/mẫu trên tất cả các nồng độ picloram được thử nghiệm ở hai giống tương đối cao. Ở cả hai giống sắn, với phạm vi nồng độ picloram tăng dần từ 1 - 15 mg/l, tỷ lệ tạo phôi soma và số phôi soma/mẫu cấy tăng dần, đều thấp nhất ở nồng độ picloram 1 mg/l, đều đạt tỉ lệ cao nhất ở nồng độ 12 mg/l. Mặc dù cùng tỉ lệ thuận với nồng độ auxin, hai giá trị này ở KM 94 với bất kì nồng độ picloram thí nghiệm nào cũng đều cao hơn ở KM 140, đặc biệt là ở nồng độ 12 mg/l, KM 94 có tỷ lệ tạo phôi soma và số phôi soma/mẫu cấy lần lượt là 81,4 ± 1,7% và 42,3 ± 3,0 cao hơn KM 140 với hai giá trị lần lượt là 70,4 ± 2,9% và 27,9 ± 2,5, trong đó tỉ lệ tạo phôi soma của KM 94 cao hơn KM 140 là 11% và số phôi trên mẫu cấy cao hơn 14,4. Kết quả này cũng phù hợp với công bố của Zhang *et al.* (2001), cũng chỉ ra ở nồng độ picloram 12 mg/l, tỷ lệ tạo phôi và số phôi/mẫu cấy cho kết quả tốt nhất. Danso *et al.* (2010) cho rằng cả hai chất 2,4D và picloram đều cho hiệu quả cao (90 - 100%), tuy nhiên môi trường có bổ sung picloram quá trình tạo phôi soma nhanh và vượt trội so với môi trường bổ sung 2,4D bởi vì picloram tác động đến thành tế bào và làm giãn

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ picloram tới sự hình thành phôi soma từ lá chưa trưởng thành của hai giống sắn KM94 và KM140 nuôi cấy *in vitro*

Picloram (mg/l)	KM140		KM94	
	Tỷ lệ phôi soma (%)	Phôi soma/mẫu cấy	Tỷ lệ phôi soma (%)	Phôi soma/mẫu cấy
1	23,2 ± 1,2	10,3 ± 2,1	28,6 ± 2,2	15,3 ± 2,6
3	41,3 ± 1,7	18,4 ± 2,0	49,3 ± 2,0	31,3 ± 2,0
6	56,7 ± 1,9	19,2 ± 1,2	70,3 ± 1,2	37,6 ± 1,8
9	61,5 ± 1,7	21,4 ± 1,5	72,5 ± 1,5	39,6 ± 1,2
12	70,4 ± 2,9	27,9 ± 2,5	81,4 ± 1,7	42,3 ± 3,0
15	62,8 ± 1,2	24,2 ± 1,8	77, 8 ± 2,6	31,6 ± 2,0

Ghi chú: Giá trị phôi/mẫu cấy là tổng số phôi ở các hình dạng như tròn, tim, cá đuối và lá mầm. Đánh giá được thực hiện sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung picloram ở các nồng độ khác nhau.

tế bào nhanh hơn 2,4D. Tuy nhiên, sự phát triển của phôi được cảm ứng bởi NAA nhanh hơn 2,4-D, dicamba hoặc picloram (Sofiari, 1996).

3.2. Khả năng nảy mầm của phôi soma tạo thành cây con

Giai đoạn nảy mầm của phôi soma thành cây con đóng vai trò quyết định đối với đánh giá hiệu quả của quá trình tái sinh cây, đặc biệt là trong quá trình chuyển gene vì nếu tái sinh cây kém trong khi số lượng phôi tạo ra nhiều, gene có chuyển vào mô, phôi được thì tỉ lệ cây chuyển gene cũng rất thấp.

Kết quả được thể hiện bảng 2 cho thấy, ở tất cả các nồng độ BAP thí nghiệm, các cụm phôi soma ở cả hai giống KM 140 và KM 94 đều nảy mầm với tỉ lệ tương đối cao. Ngay cả môi trường không bổ sung BAP, phôi vẫn nảy mầm với tỉ lệ 45,6 ± 0,7 và 51,4 ± 2% lần lượt ở giống KM 140 và KM 94. Cả hai giống đều đạt tỉ lệ nảy mầm cao nhất ở nồng độ BAP 0,3 mg/l, tuy nhiên giá trị này ở giống KM 140 (82,1 ± 3,1%) cao hơn ở giống KM 94 (79,2 ± 2,3%), sự sai khác về giá trị này ở hai giống hầu như không đáng kể. Tỉ lệ nảy mầm giảm dần ở cả hai giống khi nồng độ BAP tăng dần từ 0,6 - 1,5 mg/l.

3.3. Khả năng tạo rễ và ra cây

Sau 3 tuần nuôi cấy để tạo rễ, các chồi cây sắn mới được nảy mầm của hai giống KM94 và KM140 đạt chiều dài từ 1 - 1,5 cm được chuyển sang môi trường MS bổ sung các nồng độ IBA khác nhau (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 mg/l).

Kết quả cho thấy, ở tất cả các nồng độ thí nghiệm, các chồi đều xuất hiện rễ (tỉ lệ đạt 100%). Tuy nhiên, trên môi trường MS không có chất kích thích sinh trưởng IBA cho khả năng ra rễ nhanh hơn, số lượng từ 3 - 4 rễ/mẫu cấy, các công thức bổ sung IBA ra rễ chậm hơn khoảng 1 - 2 tuần với số lượng rễ ít, kích thước ngắn.

Cây sắn tái sinh có số lượng 2 - 3 rễ và chiều dài từ 6 - 8 cm được chuyển ra trồng trên giá thể trấu hun trộn đất cát với tỉ lệ thể tích 4: 6. Trong 2 tuần đầu cây được nuôi trong phòng nuôi cấy với nhiệt độ 27°C, cường độ chiếu sáng 1000 - 1500 lux, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày. Sau đó, cây con được đưa ra trồng trong nhà lưới, tuần đầu tránh ánh sáng chiếu trực xạ, cung cấp đầy đủ nước. Tỉ lệ cây sống đạt 100%.

3. KẾT LUẬN

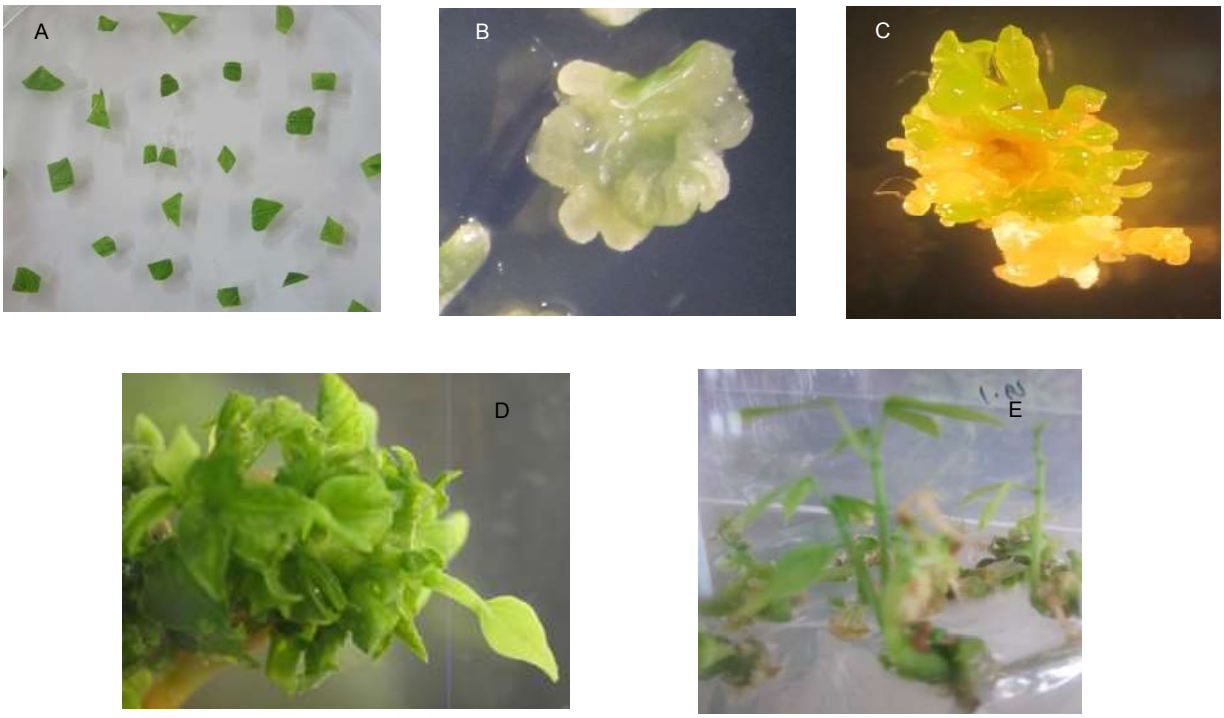
Một hệ thống tái sinh cây sắn hoàn chỉnh thông qua phôi soma từ lá chưa trưởng thành trong 16 - 18 tuần đã được nghiên cứu thành công qua các bước: Cảm ứng tạo phôi soma từ lá chưa trưởng thành trên môi trường MS bổ sung picloram 12mg/l sau 4 tuần, giống KM94 cho tỷ lệ hình thành phôi (81,4 ± 1,7%) so với giống KM140 (70,4 ± 2,9%). Cụm phôi được chuyển sang môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BAP để nảy mầm tạo cây con, tỷ lệ tạo cây con ở giống KM140 (82,1 ± 3,1%) lại cao hơn với giống KM

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến quá trình tạo cây con từ phôi soma sau 4 tuần nuôi cấy

BAP (mg/l)	Phôi soma tạo thành cây con (%)	
	KM140	KM94
0,0	45,6 ± 0,7	51,4 ± 2,0
0,3	82,1 ± 3,1	79,2 ± 2,3
0,6	78,7 ± 2,2	77,3 ± 1,2
0,9	65,2 ± 1,4	71,4 ± 1,5
1,2	63,4 ± 2,0	61,3 ± 1,5
1,5	54,2 ± 0,7	58,3 ± 2,6

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến quá trình tạo rễ

IBA (mg/l)	Tỉ lệ tạo rễ (%)	
	KM140	KM94
0,0	100	100
0,3	100	100
0,6	100	100
0,9	100	100
1,2	100	100



Hình 1. Tái sinh cây sắn qua các giai đoạn khác nhau

Ghi chú: A: Mảnh lá; B: Mô sẹo phát sinh từ lá chưa trưởng thành; C: Mô sẹo đang phân hoá phôi; D: Phôi soma tái sinh thành cây con; E: Cây trên môi trường ra rễ.

94 (79,2 ± 2,3%). Chồi cây được tạo ra đạt chiều dài khoảng 1,0 - 1,5 cm được chuyển sang môi trường MS không có chất kích thích sinh trưởng cho tỷ lệ ra rễ đạt 100%, rễ sinh trưởng tốt nhất. Những cây tái sinh *in vitro* có bộ rễ hoàn chỉnh được trồng trong bầu giá thể trấu hun: đất cát (4: 6) đạt tỷ lệ cây sống 100%.

LỜI CẢM ƠN

Công trình hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Castillo A.M., Egana B., Sanz J.M. and Cistue L. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. Plant Cell Rep., 17: 902-906.

Danso EK, Elegba W, Oduro V and Kpentey P (2010). Comparative study of 2,4D and picloram on friable embryogenic calli and somatic embryos development in cassava (*Malihot esculenta* Crantz). International journal of intergrative biology, 10(2): 94-100.

Guohua Ma and Qiusheng Xu (2002). Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70: 281-288.

Groll J., Mycock D.J., Gray V.M. and Laminski S. (2001). Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 65: 201-210.

Raemakers C.J.J.M., Sofiari E., Jacobsen E. and Visser R.G.F. (1997). Regeneration and transformation of cassava. Euphytica, 96: 153-161.

Hillocks R. J., Thresh J. M., Anthony B. (2001). Cassava: Biology, Production and Utilization. CABI Publising.

Joseph T., Yeoh H. -H., Loh C. -S. (2001). Somatic embryogenesis, plant regeneration and cyanogenesis in *Manihot glaziovii* Muell. Arg. (ceara rubber) Plant Cell Reports, 19(5): 535-538

Kawano K (2003). Thirty years of cassava breeding for productivity-biological and social factors for success. Crop Science, 43: 1325-1335.

Li, H.Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Puonti-Kaerlas, J. (1996). Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Nature Biotechnology, 14: 736-740.

Mendoza, M.C. and H.F. Kaeppler (2002). Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 38: 39-45.

Mycock DJ, Wesley-Smith J and Berjak P (1995). Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. Ann Bot., 75: 331-336.

Nigel J. Taylor, Munyaradzi V. Masona, Rosa Carcamo, Thao Ho, Christian Schöpke and Claude M. Fauquet (2001). Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Euphytica, 120: 25-34.

Preeti and Kothari (2004). *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on tissue initiation and regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 73-79.

Sofiari E, Raemakers CJJM, Kanju E, Danso K, van Lammeren AM, Jacobsen E and Visser RGF (1997). Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in Cassava. Plant Cell Tiss Org Cult., 50: 45-56.

Schopke, C., Taylor, N., Carcamo, R., Konan, N.K., Marmey, P., Henshaw, G.G. (1996). Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. Nature Biotechnology, 14: 731-735.

Sriroth, K., R. Chollakup, K. Piyachomkwan and C.G. Oates. (2001). Biodegradable plastics from cassava starch in Thailand. *In:* Howeler R.H. and S.L. Tan (Eds.). Cassava's Potential in Asia in the 21st Century: Present Situation and Future Research and Development Needs. Proc. 6th Regional Workshop, held in Ho Chi Minh city, Vietnam. Feb 21-25, 2000. pp. 538-552.

Stamp JA, Henshaww GG (1987a). Somatic embroygenesis and plant regeneration in cassava. Plant Cell Tissue Organ Cult., 10: 227-233

Taylor NJ, Edwards M, Kiernan RJ, Davey CDM, Blakesley D and Henshaw GG (1996). Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Nat Biotech., 14: 726-730.

Williams EG and Maheswaran G (1986). Somatic embryogene-sis: factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. Annals of Botany, 57: 443-462.

Zhang Peng, Salak Phansiri and Johanna Puonti-Kaerlas (2001). Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate *In vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 47-54.