

提高木薯循环培养的次生体胚再生植株频率研究

祝 骥 黄毓文 梁承邺

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 用木薯成熟体胚子叶作外植体诱导次生体胚, 接种 7 d 或 15 d 后分别在诱导培养基或成熟培养基中加入 AgNO_3 , 可明显提高植株再生频率。前者可使体胚再生植株频率由对照的 40.5% 提高到 58.1%; 后者可使植株再生频率由对照的 36.1% 提高到 61.3%。用 ABA 进行上述处理, 效果更加显著。诱导期处理, 可使植株再生频率由对照的 40.5% 提高到 72.6%; 成熟期处理, 植株再生频率由对照的 36.1% 提高到 81.3%。若诱导 7 d 后, 将 2,4-D 浓度由 4.0 mg L^{-1} 降至 2.0 mg L^{-1} , 并加 AgNO_3 , 继续诱导 15 d, 转到附加 0.25 mg L^{-1} ABA 的成熟培养基中培养至 30 d, 能极显著地促进体胚的发育和成熟, 使植株再生频率达到一个相当高的水平, 最高达 95%, 平均每个外植体产生的植株数达 39.6 个, 分别相当于对照的 2.38 倍和 2.46 倍。

关键词 木薯; 循环培养; 次生体胚; 再生植株频率

分类号 Q945.39

IMPROVEMENT OF PLANT REGENERATION FROM CYCLIC SECONDARY SOMATIC EMBRYOS IN CASSAVA (*MANIHOT ESCULENTA CRANTZ*)

Zhu Ji Huang Yuwen Liang Chengye

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract Cotyledons from mature embryos of cassava cultivar Nanzhi 188 selected from cultivar CM321-188, which was provided by CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), were used as explants. AgNO_3 could obviously promote the plant regeneration frequency (PRF) in the induction medium (MS I) with $16 \text{ mg L}^{-1} \text{AgNO}_3$ added at the 7th day, and in maturation medium (MS II) with $20 \text{ mg L}^{-1} \text{AgNO}_3$ added at the 15th day, the PRF being from 40.5% (control) to 58.1%, and from 36.1% (control) to 61.3%, respectively. 0.25 mg L^{-1} ABA adding to MS I and to MS II could markedly improve PRF by 32.1% and 45.2%, respectively. An decreasing concentration of 2,4-D at 2.0 mg L^{-1} plus $16 \text{ mg L}^{-1} \text{AgNO}_3$ and 0.25 mg L^{-1} ABA in combination significantly improved somatic embryo maturation and promoted to form normal shoots, the highest PRF was 95%, and the number of plantlets produced reached 39.6 per explant.

Key words Cassava; Cyclic culture; Secondary somatic embryos; Plant regeneration frequency

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 属大戟科植物, 其块根富含淀粉, 其含量占干物质重的 75—85%, 是热带地区的第四大农作物, 仅次于水稻、甘蔗和玉米, 在热带非洲作为主要粮食作物。我国木薯种植面积为 2.3 万 ha, 占全球 5.8%, 主要集中在华南的广东、海南和广西等地^[1]。

木薯体胚培养已有许多报道^[2-4], 大多数木薯品种或基因型都可以诱导体细胞胚胎发生, 但不同品种其体胚的诱导能力有很大差异。一些较容易诱导的品种, 其初生体胚的诱导频率一般在 60% 左右, 次生体胚的诱导频率可达到 80% 以上^[4,5]。

木薯的体胚再生植株比体胚的诱导更为困难, 目前仅少数品种能有效地从体胚再生植株, 例如 M Col 22、M Col 1505、CMC 76、TMS 90853 等, 这些品种的植株再生频率一般为 50—60%^[2,4,5], 而其它品种的再生能力多数在 20% 以下^[6]。所以, 植株再生频率低是限制应用转化技术改造木薯的主要因素^[6]。

次生体胚的诱导受基因型的影响相对要小些, 非洲的一些地方品种诱导初生体胚较困难, 通过循环培养两三代后, 其次生体胚的诱导频率有明显的提高^[6]。本文研究了不同浓度的 2,4-D、AgNO₃ 和 ABA 及其处理时间, 以及循环培养代数等对木薯品种 Nanzhi 188 细胞胚胎发生和植株再生的影响。

1 材料与方 法

材料 木薯品种 Nanzhi 188, 由国际热带农业研究中心 (CIAT) 引进的 CM321-188 品种经选育而得, 它已在广东和广西两省区大面积推广。

外植体 初生体胚诱导的外植体取自试管苗继代培养 20 d 左右的幼嫩叶裂片, 长度 3—6 mm; 次生体胚诱导的外植体取自循环培养中各代成熟体胚的幼嫩子叶。

培养基 基本培养基 (MS0): MS 培养基的大量元素和微量元素, 木薯维生素^[7], 附加 2 μmol L⁻¹ CuSO₄, 30 g L⁻¹ 蔗糖, pH5.8, 除诱导培养基外, 均加 8 g L⁻¹ 琼脂。体胚诱导培养基 (MS I): MS0 + 4 mg L⁻¹ 2,4-D。体胚成熟培养基 (MS II): MS0 + 0.1 mg L⁻¹ BA。植株再生培养基 (MS III): MS0 + 0.4 mg L⁻¹ BA + 0.25 mg L⁻¹ GA₃。生根培养基 (MS IV): 1/2 MS0 + 0.05 mg L⁻¹ NAA。

循环培养 参照 H. Q. Li 等^[4] 的方法略加修改。将每 5 个成熟体胚的子叶切成小块, 接种于一个 50 ml 的三角瓶中, 加入 15 ml 灭菌的 MS I, 100 r min⁻¹ 振荡培养, 每 7 d 换一次培养基, 进行次生体胚诱导, 15 d 后每瓶悬浮培养细胞团分装入 15 瓶 MS II 中培养 15 d 使体胚成熟。一部分成熟体胚用于循环诱导次生体胚, 另一部分则在 MS III 中培养 30 d 使其再生植株, 最后在 MS IV 培养 30 d 生根。以上除体胚诱导是暗培养外均光照 16 h d⁻¹, 28 ± 2 °C。

统计时间 胚性愈伤诱导频率和成熟体胚数在培养 30 d 转再生培养基时统计, 凡有成熟体胚产生的愈伤块才统计为胚性愈伤组织。植株再生频率及植株再生数均在培养 60 d 时统计, 再生植株以出现第 1 片叶为准。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 浓度的作用

木薯体胚的诱导需 2,4-D 作为调节物。不加 2,4-D 时, 没有体细胞胚发生。2,4-D 浓度在

0.1–2.0 mg L⁻¹ 范围内, 随浓度上升, 体胚诱导频率由 55% 上升至 100%; 浓度在 2–8 mg L⁻¹ 范围内, 体胚诱导频率维持在 97–100% 的高水平; 浓度超过 8 mg L⁻¹ 时, 则呈下降趋势。浓度由 0.1 mg L⁻¹ 升至 4 mg L⁻¹, 每个外植体产生的体胚数由 5.3 个增加到 42.7 个, 相差达 8 倍, 超过 8 mg L⁻¹ 时, 又呈下降趋势。植株再生频率则完全随 2,4-D 的上升而下降, 浓度由 0.1 mg L⁻¹ 升到 16 mg L⁻¹, 再生频率由 61.9% 下降至 5.9%, 相差达 10.4 倍(表 1)。说明木薯次生体胚的诱导需较高浓度的 2,4-D, 但高浓度 2,4-D 持续存在对植株再生产生明显的抑制作用。所以, 2,4-D 浓度的确定, 必须同时考虑它对体胚诱导和植株再生的综合影响。

表 1 2,4-D 浓度对木薯次生体胚诱导及植株再生的影响

Table 1 Effect of 2,4-D on the induction of secondary somatic embryo and plant regeneration in cassava

2,4-D 浓度 Concent. (mg L ⁻¹)	外植体数 No. of explants	体胚诱导率 SE Induction rate (%)	成熟体 胚总数 No. of mature SE	体胚数/ 外植体 No. of mature SE per explant	再生植株数 No. of plant regenerated	植株再生频率 Plant regeneration frequency (%)	植株数/ 外植体 No. of plantlets per explant
0.1	20	55.0	105	5.3	65	61.9	3.3
0.2	20	61.7	151	7.6	89	58.9	4.5
0.4	20	66.7	213	10.7	115	54.0	5.8
0.6	20	71.7	325	16.3	173	53.2	8.7
0.8	20	78.3	382	19.1	155	40.6	7.8
1.0	20	90.0	601	30.1	122	20.3	6.1
2.0	20	100	784	39.2	149	19.0	7.5
4.0	20	100	853	42.7	183	21.5	9.2
6.0	20	100	842	42.1	148	17.6	7.4
8.0	20	100	831	41.6	110	13.2	5.5
12.0	20	95.0	684	34.2	89	13.0	4.5
16.0	20	68.3	459	23.0	27	5.9	1.4

每个处理取 20 个循环培养第六代的成熟体胚的子叶作外植体, 切成小块, 分 60 份, 体胚诱导率是指 60 份子叶块中能诱导出体胚的百分数(表 2 同)

Twenty cotyledons from mature somatic embryos of cultivar Nanzhi 188 from the sixth cyclic cultures were used as explants in each treatment. The cotyledons were fragmented into 60 clumps. The induction frequency of embryogenic calli is presented as the percentage of cell clumps producing somatic embryos. SE: Somatic embryos.

2.2 2,4-D 作用时间的影响

2,4-D 作为信号物需要一定时间才能有效诱导体胚发生。为了解 2,4-D 处理的时间对木薯次生体胚诱导和植株再生的影响, 将接种在含有 4 mg L⁻¹ 2,4-D 培养基上的外植体于不同时间分别转入不含 2,4-D 的培养基中, 2,4-D 处理时间在 1–9 d 范围内, 随处理时间的延长, 体胚诱导和植株再生频率均逐渐上升, 前者由 11.7% 上升到 91.7%, 后者由 14.3% 上升至 71.1%。超过 9 d, 体胚诱导频率仍略有增加, 但植株再生频率则明显下降, 由处理 9 d 的 71.1% 降至 15 d 的 32.6% (表 2)。这说明 2,4-D 对木薯体胚的有效诱导需要 9 d 左右时间便足够了, 超过此时间, 2,4-D 的存在便成为抑制体胚正常发育和植株再生的因素。

关于 2,4-D 在体胚诱导中的作用, Yeung 等^[8]认为它只一种诱导信号物, 一旦愈伤组织中细胞

胚性决定了, 就无需 2,4-D 的继续作用, 否则会阻碍体胚后期正常发育。本研究进一步证明了这一点。

表 2 2,4-D 处理时间对木薯次生体胚发生及植株再生的影响

Table 2 Effect of 2,4-D exposed time on secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava

2,4-D 处理天数 Exposed time (d)	外植体数 No. of explants	体胚诱导率 SE induction rate (%)	成熟体 胚总数 No. of mature SE	体胚数/ 外植体 No. of mature SE per explant	再生植株数 No. of plant regenerated	植株再生频率 Plant regeneration frequency (%)	植株数/ 外植体 No. of plantlets per explant
0	10	0	0	0	0	0	0
1	10	11.7	28	2.8	4	14.3	0.4
3	10	20.0	47	4.7	6	12.8	0.6
5	10	46.7	149	14.9	64	42.9	6.4
7	10	80.0	245	24.5	157	64.1	15.7
9	10	91.7	367	36.7	261	71.1	26.1
12	10	98.3	351	35.1	136	38.7	13.6
15	10	100	384	38.4	125	32.6	12.5

2.3 AgNO₃ 对木薯次生体胚诱导和植株再生的影响

2.3.1 体胚诱导时期 AgNO₃ 的作用

外植体先在含有 4 mg L⁻¹ 2,4-D 的诱导培养基中培养 7 d, 然后转入附加有不同浓度 AgNO₃ 的 MSI 诱导培养基上 (2,4-D 浓度不变) 继续培养。在体胚诱导时期, 加入的 AgNO₃ 浓度超过 2-4 mg L⁻¹, 对体胚的诱导有抑制作用, 但对植株再生则在 16 mg L⁻¹ 的浓度范围内均有促进作用。其植株再生频率相当于对照的 143.5%, 但体胚诱导频率则比对照下降 13.7%, 排除体胚诱导率下降的影响, 每个外植体产生的植株数仍比对照提高 51.8% (表 3A)。

2.3.2 体胚成熟时期 AgNO₃ 的作用

在体胚诱导 15 d 后加入 AgNO₃ 于 MSII 成熟培养基中, 胚性愈伤诱导率均达 95% 以上, 每个外植体产生的成熟体胚数在 36-40 个之间, 均与对照接近。而对植株再生的影响则在 20 mg L⁻¹ AgNO₃ 范围内, 均有促进作用, 其中以 20 mg L⁻¹ 的效果最好, 其植株再生频率为 61.3%, 而对照只有 36.1%, 提高了近一倍 (表 3B)。

从上述可见, AgNO₃ 在前期使用对木薯的体胚诱导有抑制作用, 但后期使用则没有影响。对植株再生则不论前期或后期均有促进作用, 后期的作用较前期更为明显。说明加入 AgNO₃ 的作用主要是促进体胚的正常发育和成熟, 使之能再生出正常的植株。

AgNO₃ 已在许多植物中用来促进体胚发生及植株再生, 尤其在针叶类植物体胚发生中应用较多, AgNO₃ 作为一种乙烯生成抑制剂, 可抑制愈伤组织分化过程中乙烯的产生, 而乙烯的产生不利于体胚发育^[9,10]。乙烯可使云杉体胚顶端分生组织发育不正常, 产生大的细胞间隙, 而正常的情况是顶端分生组织的细胞排列紧密、核大、质浓^[11]。我们的研究表明: 在体胚发育的不同时期, AgNO₃ 的作用不同; 不同浓度的 AgNO₃ 其作用效果也不同。

表3 AgNO₃对木薯次生体胚诱导及植株再生的影响Table 3 Effect of AgNO₃ on secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava

AgNO ₃ 处理浓度 Concent. (mg L ⁻¹)	外植体数 No. of explants	体胚诱导率 SE Induction rate (%)	成熟体胚总数 No. of mature SE	体胚数/ 外植体 No. of mature SE per explant	再生植株数 No. of plant regenerated	植株再生频率 Plant regeneration frequency (%)	植株数/ 外植体 No. of plantlets per explant
A 0	8	70.0	163	32.6	66	40.5	8.3
2	8	43.9	117	17.1	51	43.6	6.4
4	8	52.3	138	18.8	65	47.1	8.1
8	8	38.1	97	13.9	53	54.6	6.6
16	8	56.3	174	21.8	101	58.1	12.6
32	8	81.3	192	24.0	78	40.6	9.8
B 0	10	98.3	377	37.7	136	36.1	13.6
5	10	96.7	385	38.5	159	41.3	15.9
10	10	100	369	36.9	181	49.1	18.1
20	10	95.0	401	40.1	245	61.3	24.5
40	10	98.3	397	39.7	87	21.9	8.7

A组实验的外植体略偏老, 体胚诱导率有所降低(表4同)

In experiment A, ABA was added in MSI induction medium at the 7th day after inoculation; In experiment B, ABA was added in MSII maturation medium at the 15th day. Somatic embryo induction rate in experiment A somewhat decreased due to the explants being a little overgrown (Same for Tab. 4)

2.4 ABA对木薯次生体胚诱导和植株再生的影响

2.4.1 体胚诱导时期 ABA 的作用

外植体在含有 4 mg L⁻¹ 2,4-D 的培养基中培养 7 d 后, 分别转入附加不同浓度 ABA 的 MSI 诱导培养基中(2,4-D 浓度不变)继续培养, ABA 浓度超过 0.5 mg L⁻¹, 对体胚诱导和植株再生均有抑制作用, 但低于 0.5 mg L⁻¹ 则对植株再生有促进作用, 其中以 0.25 mg L⁻¹ 的处理效果较为明显, 其植株再生频率为 72.6%, 每个外植体再生植株数为 20.3 个, 分别相当于对照的 1.79 和 2.45 倍(表 4)。

表4 ABA对木薯次生体胚发生及植株再生的影响

Table 4 Effect of ABA on secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava

ABA浓度 Concent. (mg L ⁻¹)	外植体数 No. of explants	体胚诱导率 SE induction rate (%)	成熟体胚总数 No. of mature SE	体胚数/ 外植体 No. of mature SE per explant	再生植株数 No. of plant regenerated	植株再生频率 Plant regeneration frequency (%)	植株数/ 外植体 No. of plantlets per explant
A 0.0	8	70.0	163	32.6	66	40.5	8.3
0.25	8	76.6	223	31.3	162	72.6	20.3
0.5	8	72.9	245	30.6	122	49.8	15.3
1.0	8	58.3	196	24.5	72	36.7	9.0
2.0	8	47.9	161	20.1	49	30.4	6.1
B 0.0	10	98.3	377	37.7	136	36.1	13.6
0.25	10	100	412	41.2	335	81.3	33.5
0.5	10	98.3	405	40.5	273	67.4	27.3
1.0	10	100	388	38.8	214	55.2	21.4
2.0	10	95.0	391	39.1	199	50.9	19.9

2.4.2 体胚成熟时期 ABA 的作用

在 MSII 成熟培养基中加入 0.25–2.0 mg L⁻¹ 的 ABA, 体胚诱导频率在 95–100% 之间 (表 4), 与对照接近, 每个外植体诱导的成熟体胚数在 38.8–41.2 个之间, 均略高于对照的 37.7 个, 植株再生频率和每个外植体再生的植株数均明显高于对照。其中 ABA 浓度为 0.25 mg L⁻¹ 的处理其植株再生频率达到 81.3%, 每个外植体再生的植株数达到 33.5 个, 而对照分别只有 36.1% 和 13.6 个, 即加入 ABA 后其植株再生频率和每个外植体再生的植株数分别相当于对照的 2.25 和 2.46 倍, 达到极显著水平。可见在体胚成熟时期的培养基中加入适当浓度的 ABA 对木薯体胚的发育成熟和植株再生有极显著的促进作用。

ABA 是体胚成熟过程中研究得较多的因素之一。彭艳华等^[12]发现黄莲体胚发育中内源 ABA 含量由胚性细胞、球形胚至子叶期逐渐增加, 且子叶期上升很快。ABA 能诱导有关贮藏蛋白及脂类的基因表达, 提高转录及翻译水平, 并抑制体胚过早萌发, 使体胚在形态结构尤其是胚芽顶端分生组织及细胞内物质积累均接近合子胚^[11,13,14], 从而使体胚成熟。

2.5 AgNO₃, ABA 及降低 2,4-D 浓度的配合作用

木薯体胚诱导培养 7 d 后, 将 2,4-D 浓度由 4 mg L⁻¹ (对照) 降至 2 mg L⁻¹, 同时配合使用 AgNO₃ (16 mg L⁻¹), 第 15 天在成熟培养基中加入 ABA (0.25 mg L⁻¹), 结果见表 5。未加 AgNO₃ 或 ABA 的对照, 其植株再生频率为 40.5%, 每个外植体产生 16.1 个植株, 若单独将 2,4-D 浓度降低, 可使再生频率提高至 59.0%, 每个外植体再生的植株数提高至 20.0 个, 若降低 2,4-D 浓度与 AgNO₃ 二者配合使用, 可使再生频率和植株数进一步分别提高到 67.7% 和 28.7 个。若降低 2,4-D 浓度与 AgNO₃ 和 ABA 三者配合作用, 则再生频率和植株数再进一步分别提高至 95.1% 和 39.6 个, 即使 2,4-D 浓度保持不变 (4 mg L⁻¹), 若在培养基中加入 AgNO₃, 或者再加入 ABA, 其植株再生频率和每个外植体产生的植株数也比对照明显提高, 只是 2,4-D 浓度降低后其作用更加显著。以作用大小为序, ABA + AgNO₃ + 2,4-D > AgNO₃ + 2,4-D > 2,4-D。可见, 在木薯体胚诱导启动后, 把 2,4-D 浓度降低至原量的 1/2 或 1/3, 配合使用适当浓度的 AgNO₃ 和 ABA, 对木薯体胚的正常发育和植株再生有极显著的促进作用。可大大提高植株再生频率。

表 5 降低 2,4-D 浓度配合 AgNO₃ 和 ABA 对木薯次生体胚发生和植株再生的影响

Table 5 Effects of decreasing 2,4-D concentration in combination with AgNO₃ or and ABA on secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava

处理浓度 Concentration (mg L ⁻¹)			外植体数 No. of explants	体胚诱导率 SE induction rate (%)	成熟体 胚总数 No. of mature SE	体胚数/ 外植体 No. of mature SE per explant	再生植株数 No. of plant regenerated	植株再生频率 Plant regeneration frequency (%)	植株数/ 外植体 No. of plantlets per explant
2,4-D	AgNO ₃	ABA							
4	—	—	20	95.0	792	39.6	321	40.5	16.1
2	—	—	8	100	271	33.9	160	59.0	20.0
4	16	—	20	91.7	794	39.7	481	60.0	24.1
2	16	—	20	90.0	846	42.3	573	67.7	28.7
4	16	0.25	20	85.0	731	36.6	609	83.3	30.5
2	16	0.25	20	83.3	833	41.7	792	95.1	39.6

AgNO₃ 在第 7 天加入 MSI 诱导培养基, ABA 在第 15 天加入 MSII 成熟培养基中。AgNO₃ was added in MSI induction medium at the 7th day after inoculation, while ABA was added in MSII maturation medium at the 15th day.

2,4-D, AgNO₃, ABA 三者相互作用的不同时期, 浓度可以有多种组合, 本文仅就体胚诱导启动后降低 2,4-D 浓度, 并附加 AgNO₃, 成熟培养时加入 ABA 的结果进行了研究。从实验结果看, 三者配合可显著促进体胚的正常发育, 高植株再生频率。在最佳配合中(诱导启动后, 2,4-D 浓度降到 2 mg L⁻¹ 并附加 16 mg L⁻¹ AgNO₃, 成熟培养时附加 0.25 mg L⁻¹ ABA), 可使每个外植体再生植株数, 植株再生频率分别比对照提高 1.46 和 1.35 倍, 差异相当显著。对三者相互作用的分析可见, 降低 2,4-D 浓度与 AgNO₃ 的配合使用, 有相加效应, 但 AgNO₃ 与 ABA 配合的使用则与 ABA 单独作用的效果差异不显著。Walker Simmons^[15] 等人研究发现 AgNO₃ 可提高内源 ABA 的水平。因此笔者认为在加入较高浓度 ABA 后, AgNO₃ 的作用可能被掩盖了。

关于这三者之间的相互关系及作用机制, 尚无全面的看法, 但有研究发现: (1) 2,4-D 在较高浓度下诱导的苜蓿体胚其贮藏蛋白积累较少, 而在低浓度时则贮存蛋白增加。2,4-D 还可增加胡萝卜悬浮细胞 ACC 的产生^[10], 在其他组织中 2,4-D 也通常促进乙烯生成, 可能 2,4-D 对体胚发育后期的抑制作用是通过乙烯而起作用。(2) ABA 在体胚成熟中的作用主要是通过提高贮存蛋白和脂类等的基因表达水平, 增加物质积累, 从而使体胚的发育与合子胚接近^[11,16]。(3) AgNO₃ 主要是作为乙烯活性抑制剂, 通过抑制乙烯的产生而对体胚发育起作用, 同时 AgNO₃ 还可促进内源 ABA 含量的提高, Skwier^[17] 认为 ABA 在胁迫条件下可诱导基因表达。

从这些研究中可见, 外源 AgNO₃、2,4-D、ABA 一定都是直接或间接地控制着某些基因的表达, 调节内源激素的平衡, 从而对体胚的发育调节作用。三者的关系有待进一步的探讨。

参考文献

- 1 黄毓文, 刘殷勤. 国际热带农业中心的木薯研究. 热带亚热带植物学报, 1994, 3(2):93-100
- 2 Cabral G B, Aragao F J L, Montenesich D C et al. Cassava tissue culture: Multiple shoots and somatic embryogenesis (poster presentation). In: First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network (CBN), Catagena Colombia, 1992, 180-184
- 3 Sofiari E, Raemakers C J J M, Kanju E et al. Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 50(1):45-56
- 4 Li H Q, Huang Y W, Liang C Y. Improvement of plant regeneration from secondary embryos of cassava. In: Second International Scientific Meeting, CBN II, Bogor Indonesia, 1994, 289-302
- 5 Szabados L J, Hayos R, Roca W. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. Plant Cell Report, 1987, 6:248-251
- 6 Taylor N J, Henshaw G G. The induction of somatic embryogenesis in fifteen African and one South American cassava cultivars. In: First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network (CBN), Catagena Colombia, 1992, 134-439
- 7 Mathews H, Schopke C, Carcamo R et al. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in casava. Plant Cell Report, 1993, 12:328-333
- 8 Yeung E C. Structural and developmental pattern in somatic embryogenesis. In: Fl. Thorpe ed. *In vitro* Embryogenesis in Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1995, 205-247
- 9 Songstad D, Armstrong C L, Peterson W L. AgNO₃ increase type I callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. Plant Cell Report, 1991, 9:699-702

- 10 Tisserat B, Murashige T. Effects of ethephon, ethylene and 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid in asexual embryogenesis *in vitro*. *Plant Physiol*, 1977, 60:437-439
- 11 Kong L S, Yeung E C. Effects of silver nitrate and polyethylene glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content. *Physiologia plantarum*, 1995, 93:298-304
- 12 彭艳华, 刘成运, 柯善强等. 脱落酸对黄连体细胞胚胎发育的影响. *植物学报*, 1993, 35(增刊):71-76
- 13 崔红, 郭仲琛, 桂耀林. 芹菜体细胞胚胎发生及干化体细胞胚的研究. *植物学报*, 1993, 35(增刊):94-100
- 14 韩碧文, 刘淑美. 植物离体体细胞胚胎发生. *植物生理学通讯*, 1988, (1):9-15
- 15 Walker-Simmons M, Sesing J. Temperature effects on embryonic abscisic acid levels during development of wheat grain dormancy. *J Plant Growth Regul*, 1990, 9:51-56
- 16 Gupta P K, Pllman G S. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid osmotic potential variation. US Patent, 1991, 5:006-007
- 17 Skriver K, Muddy J. Gene expression in response to ABA and osmotic stress. *Plant Cell*, 1990, 2:503-512