

木薯的组织培养和基因转化

5533.03

李洪清, 李美茹, 梁承邺, 黄毓文

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘要: 木薯是重要的热带作物之一, 其块根富含淀粉, 是热带、亚热带地区近 5 亿人粮食的主要来源。简单介绍近年来运用生物技术改良木薯的研究进展。

关键词: 木薯; 组织培养; 基因转化; 改良; 育种; 粮食作物

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A

Tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava

LI Hong-qing, LI Mei-ru, LIANG Cheng-ye, HUANG Yu-wen

(South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Cassava is one of the most important tropical crops, its starchy tuberous roots are the main calorie source of nearly 500 million people living in the tropics and subtropics. In this paper, we simply give an overview of molecular approaches that have been taken to improve cassava breeding.

Key words: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz); Tissue culture; gene transformation

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 是仅次于水稻、玉米、高粱的第四大热带作物, 其块根含有丰富的淀粉, 是热带、亚热带地区近 5 亿人粮食的主要来源^[1]。尽管传统的育种方法在木薯研究上取得了一定的进展, 但由于木薯自身的特性 (如植株的高度杂合、花粉育性低、有性子代严重分离等) 及种质资源的局限性 (如抗性基因资源贫乏、已知的品种均含有氰化物等) 使传统育种方法的进一步应用受到限制。生物技术能将一些具有重要农艺性状的基因 (如抗病、抗虫基因, 与产量、品质有关的基因等) 导入作物, 而不改变转基因植物的原有特性。在木薯的改良上显示了很大的应用潜力。近年来, 运用生物技术改良木薯的研究已取得了很大的进展。本文将结合我们最新的研究结果介绍木薯组织培养和转化的研究进展及今后的研究方向。

1 木薯的经济价值及其特性

木薯是大戟科 (Euphorbiaceae) 植物, 染色体数为 $2n=36$ ^[2,3]、多年生灌木, 高 1~5 m, 其

收稿日期: 1999-01-25

作者简介: 李洪清 (1966-), 男, 博士, 助理研究员, 从事植物遗传转化研究。

基金项目: 中国科学院留学基金、中国科学院“九五”育种资助项目。

块根含有丰富淀粉,既可作粮食,也可作为工业原料或饲料,木薯起源于南美,于16~18世纪传入非洲、亚洲及大洋洲,现在木薯已广泛地分布于全球的热带及部分亚热带地区^[4],1996年,世界木薯产量为1.64亿t,其中非洲占0.85亿t、亚洲占0.47亿t、拉美占0.32亿t,以35%干物质计,木薯的年产量相当于0.6亿t谷物(以能量换算),占世界根茎作物产量的1/3,占块根作物产量的70%^[5],木薯于1820年前由东南亚华侨引入我国,至今已有180多年的栽培历史,目前木薯产区包括海南、广东、广西、福建、云南等省区,四川、贵州、湖南、江西、浙江等地也有种植。

木薯主要的优点是具有很高的产量潜力,它是一种C₃-C₄中间型作物,在适宜的条件下具有很高的光合作用效率,而在干旱和高温的胁迫下,也能保持较高的光合效率,木薯的最高产量可达80t/hm²(生长期为一年)^[6],其次,木薯能耐贫瘠的土壤及干旱的气候,它能生长在酸度很高的贫瘠土壤,这一点没有其它作物能与之相比,此外,木薯的种植和收获的时间灵活,木薯能在一年中的任何时间种植,便于与其它作物间种,木薯的块根可在种植8个月后收获,但块根也可保存在地下直到需要时取用,因此它有饥荒“储粮库”的美称。

2 限制木薯生产的因素

尽管在环境条件适宜的试验田中,木薯生长一年的产量可达80t/hm²,在大田生产条件下巴巴多斯和印度的某些地区木薯产量也分别达到27.3t/hm²和23.5t/hm²,然而,在世界其它地区木薯产量明显偏低,世界木薯的主要产地非洲,平均产量从尼日利亚的9t/hm²至坦桑尼亚的5t/hm²,而在苏丹最低产量只有1.8t/hm²^[5],其中的原因除了田间管理、土壤条件之外,主要是由病害和虫害导致的减产,在世界范围内由病害、虫害导致的减产高达20%~50%,局部地区甚至导致绝收,木薯重要的病虫害有以下几种:(1)病毒病 非洲木薯花叶病毒(African cassava mosaic virus, ACMV)和木薯花叶病(Cassava common mosaic virus, CCMV), (2)虫害 木薯粉蚧(*Phenacoccus manihoti*)及木薯绿蚁(*Mononychellus* spp)、螟虫及根癌线虫(*Meloidogyne* spp.)等,培育抗病、抗虫的品种将有助于增加木薯的产量。

除因病虫害导致的减产外,木薯育种中另一重要的方面是提高块根的质量,木薯的块根含有氰化物,食用未经加工或加工不彻底的块根对人畜均有害,木薯淀粉的质量也很大程度上受控于气候和环境,块根的质量影响淀粉的质量及其加工后的食品质量,此外,木薯的块根与其它根茎作物不同,块根收获后,很快会变质,块根收获一天后,即发生生理变化,三天后,块根表面出现黑点、条纹,使食用质量降低,而且木薯的块根只含有少量的蛋白质,且主要集中在不可食用的含有高氰化物的皮层上,对于以木薯为主食的地区,会导致严重的营养不良。

传统的育种方法在木薯育种中遇到的困难主要有:1.木薯的高度杂合特性,经过长时间的无性繁殖,木薯植株已成为一个高度杂合体,花粉育性低,即使获得种子,其有性子代也产生严重分离,因此,很难通过杂交的方法有目的地引入某一性状,而继续保持原有亲本的优良性状,2.种质资源的局限性,现有的木薯品种中没有抗天蛾科幼虫的品种,也没有不含氰酸的品种,生物技术作为一个有力的工具能弥补传统育种方法的不足,能有效地利用不同的种、属,甚至动物、微生物的基因资源来改良植物,它能向植物导入单个或多个具有重要农艺性状的基因,而不象传统育种方法那样会导致原有品种的优良特性的改变,丢失或增加不需要的特性,可以采用不同的策略来培育抗ACMV的品种,如通过转入病毒外壳蛋白基因,反义RNA,核糖体失活蛋白、复制酶及干扰DNAs或RNAs;也可通过导入苏云金杆菌的Bt基因使木薯能抗一些鳞翅目、双翅目、鞘翅目的昆虫及线虫和蚁类;采用正向调节氰化物降解酶类或者降低氰化物合成途径的酶类的活性来培育不含氰化物或氰化物含量

低的木薯品种; 向木薯导入储藏蛋白基因可克服木薯蛋白质含量低的问题; 另外, 应用生物技术还能调控淀粉合成等。

要想成功地应用基因工程改良木薯, 首先应该建立一套高效的植株再生及基因转移系统, 经过 10 多年的努力, 这方面的研究已取得了很大的进展。

3 木薯的组织培养和转化研究进展

3.1 木薯的组织培养研究进展

3.1.1 非不定再生途径 木薯组培的早期工作主要是分生组织培养, 即所谓的非不定再生途径。再生植株来源于高度联系的多细胞团, 如茎尖及侧芽。该方法用于种质资源的保存和交换, 品种的提纯、复壮、脱毒等。Kantha 等^[7]首次进行木薯的分生组织培养, 用该方法获得 5 个品种的再生植株, 所用培养基中加入低浓度的激素 (BAP 0.1 mg/L, GA₃ 0.04 mg/L, NAA 0.2 mg/L)。近年来, 研究发现加入高浓度的激动素 BAP 2~10 mg/L 能促进侧芽分生组织以组织块的形式迅速增殖。将这些丛芽转移到含低浓度 BAP 的培养基上, 即可再生苗。每个外植体经一个培养周期可产生多达 14 条苗^[8], 在丛芽诱导培养基中加入表面活性剂 Pluronic-F68 能增强诱导效果^[9]。另外, 采用低浓度的 Thidiazuron (TDZ) 预处理也可增加丛芽的形成数量^[10]。

3.1.2 体细胞胚胎发生途径 体细胞胚胎发生 木薯体细胞胚胎发生首次报道于 1982 年, Stamp 和 Henshaw^[11]以木薯合子胚的子叶和胚轴为外植体成功诱导出胚状体, 该方法现已广泛地用于木薯的组培及再生。木薯的体细胞胚胎发生能从多种外植体类型获得, 它们主要位于分生组织及胚性组织区域, 如合子胚的子叶及胚轴^[8,11,12]、幼叶^[13~20]、茎尖分生组织^[14,21]等等。木薯初生胚状体的诱导可采用 Picloram 1~12 mg/L, dicamba 1~66 mg/L 及 2,4-D 1~16 mg/L, 使用生长素的类型及浓度据不同的品种、外植体的类型而变化^[18,20,22,23,24]。木薯的胚状体发生能力总的说来与基因型的关系很大, 模式品种 M Col 22 具有较高的胚状体发生频率及成熟胚状体的产量。而有些品种, 尽管经过大量的实验, 仍然不能诱导出胚状体。对外植体用 2, 4-D 或 ABA 进行预处理, 以及在诱导培养基中补充少量的硫酸铜, 能提高胚状体的诱导效率^[18,20,22,23,24]。通常情况下, 外植体在诱导初期能产生颗粒状结构及球形胚, 但随后愈伤化, 以至获得成熟胚状体的频率较低^[27,28]。诱导的胚性愈伤块, 如果继续培养在含生长素的培养基上, 一部分胚状体会发育至带有绿色子叶的成熟胚状体, 而如果将胚性愈伤转入不含激素或含低浓度的 BAP 0.1 mg/L 上, 胚状体的成熟会加快。成熟胚状体的萌发 (即再生植株) 频率一般很低, 且根极的发育不完全。因此, 通常需采用两个步骤, 先将萌发胚状体培养在含 BAP 的培养基上促进芽的生长, 然而转移到含低浓度 NAA 上长根。Matthews 等^[15]为了提高胚状体的再生植株的频率, 先将诱导胚状体转到含 0.5% 活性炭的培养基上成熟, 然后进行脱水处理, 最后转到不含激素的培养基上萌发, 使初生胚状体的再生频率达到 85.4%。其它的处理, 如加入 GA₃ 也有利于胚状体的萌发^[14]。次生胚状体及循环胚状体诱导 木薯初生胚状体也能经继代培养诱导出次生胚状体^[29]。某些品种初生胚状体的发育阶段对次生胚状体的诱导效率影响很大, 如在 M Col 22 中, 成熟胚状体 (带绿色子叶) 比早期胚状体产生更多的次生胚状体, 因此在进行次生胚状体诱导之前, 增加了一个培养过程 (胚状体的成熟), 将培养方法改为循环胚状体诱导^[30], 大大提高了胚状体的增殖效率。次生胚状体诱导除可采用前述的生长素外, 还可采用高浓度的 NAA, 且由 NAA 诱导的胚状体其根极发育完全, 植株再生频率有所提高^[31,32]。将次生胚状体诱导培养方式由液体培养代替固体培养也能显著提高诱导频率, 脱水处理对次生胚状体的植株再生也有一定的效果, 但较初生胚状体差^[15]。一般认为脱水至原重量的 60% 时效果较好^[33]。我们实

验(未发表)表明以麦芽糖代替蔗糖,能同时提高次生胚状体的产量和植株再生频率,2,4-D与PP₃₃₃配合使用能显著提高植株的再生频率。**脆性胚性愈伤及其悬浮培养** 研究发现连续继代培养在MS基本培养基(含12 mg/L Picloram)上的胚性愈伤能产生一种主要由细小的球形胚组成的结构,即所谓脆性胚性愈伤,将这种愈伤分离出来,就可进行迅速扩增⁽³⁴⁾。以GD培养基⁽³⁵⁾代替MS培养基可提高胚性愈伤的产量,一旦获得纯的脆性愈伤,即可进行悬浮培养,在SH培养基中(含6%蔗糖,12 mg/L Picloram)进行迅速扩增。当将培养物转入不含激素的培养基时,就可得到成熟的胚状体,但效果很差。如果将培养物继续培养在含低浓度的Picloram(1.2 mg/L)或1 mg/L NAA上,球形胚状体到鱼雷型胚状体转变的频率有一定的提高,但球形胚向鱼雷胚的转变仍是植株再生的瓶颈,只有极少数的胚状体能发育至鱼雷胚。另外,采用该方法由于组培时间太长可能产生较高的体细胞变异,导致再生能力下降⁽³³⁾。

3.1.3 器官发生系统 Tilquin⁽³⁶⁾曾经报道以木薯的茎切段为外植体,通过器官发生途径获得再生植株,但该实验结果一直没有得到重复。Sharin等⁽³⁷⁾也报道从木薯幼叶分离原生质体,诱导愈伤而再生植株,其结果也是没有得到重复。最近,我们^(18,20)以木薯体细胞胚的子叶为外植体,成功地进行了高频率器官发生诱导并再生植株。将诱导的次生胚状体转入成熟培养基(MS附加0.1 mg/L BAP)培养一定的时间后,取子叶,切碎;在MS附加BAP上诱导器官发生。一般诱导20 d后,可见叶状结构,芽原基及愈伤组织的形成。通过对多种激素配比的试验表明,培养基中含1 mg/L BAP及0.5 mg/L IBA有利于获得高频率器官发生。将培养物进一步转移到含BAP 0.40 mg/L的MS培养基上进行扩增,即可获得再生的苗,苗的长根可在含低浓度NAA或不含NAA的培养基上形成。对不同木薯品种的研究表明,该系统适合于多个木薯品种。与经体细胞胚胎发生再生植株相比,该方法植株再生快,(60~65 d),操作简便。对再生植株的细胞起源研究表明:植株的再生可起源于子叶的各部位,切口、叶面、叶柄等,即有起源于表层细胞,也有起源于深层维管束细胞。我们的实验还表明全量MS培养基诱导器官发生频率最高,而GD培养基诱导器官发生频率最低。AgNO₃具有促进器官发生的作用,但长时间培养在含高浓度AgNO₃培养基上的组织会产生生长钝化。麦芽糖和蔗糖在器官发生诱导及植株再生方面优于其它碳源(山梨醇、乳糖、葡萄糖、果糖或纤维素)。木薯的器官发生能力也与其品种基因型有关。木薯的组培及植株再生途径如下图所示:

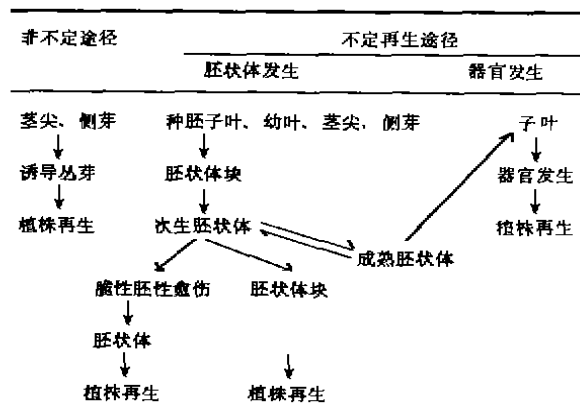
3.2 木薯遗传转化研究进展

随着对木薯组培研究的深入,结合现有的植物基因转移的方法,木薯的转化先后进行了下列方面的研究:

3.2.1 以分生组织培养系统为基础的转化 以分生组织(茎尖及侧生分生组织)诱导的体细胞胚状体及丛芽为材料,以基因枪及农杆菌的方法进行转化,相继得到瞬时表达及稳定表达的GUS及萤火虫萤光素酶,但没有再生植株的报道⁽²¹⁾。

3.2.2 以体细胞胚胎发生为基础的转化 木薯的体细胞胚胎发生无论是初生还是次生均属于多细胞起源,通常这些细胞位于或接近维管束部分^(29,38)。多细胞的起源给转化体的筛选带来一定的困

木薯的组培及植株再生



难。另外, 对体细胞胚胎发生的组织学研究表明, 再生的细胞起源于深层的细胞, 采用现有的转化方法, 包括基因枪法, 农杆菌法及电激法, 较难将外源基因高效导入目的细胞。采用电激胚状体的方法也曾获得转化的组织块, 但没有再生植株的报道^[29]。采用基因枪的方法, 几个实验室已获得报道基因的高效表达, 但在最好的情况下, 也只是获得转化的嵌合体, 尽管以循环胚状体为材料很容易获得转化的愈伤, 但经抗生素筛选后, 培养物体细胞胚胎发生能力下降^[40,41]。

采用胚状体发生系统成功获得转基因的例子只有一例, 且转化株的分子证据只有 PCR 结果^[42]。他们以 M Per 183 的次生胚状体的子叶为外植体, 与农杆菌 CIAT 1182 共培养 (CIAT 1182 中的双元载体带有 *gus* 及 *bar* 基因)。在含 16~32 mg/L Basta 上进行胚状体的诱导并再生植株。木薯品种 M Per 183 及农杆菌菌株 CIAT 1182 是经过大量的瞬时表达试验筛选出的最好组合^[43]。有关此方法的重复性还需进一步试验, 尤其是 Southern 方面的证据。另外 CIAT 1182 是一个未经改造的野生农杆菌, 其 Ti 质粒上的编码激素的基因会影响植株的再生。

3.2.3 以胚性悬浮细胞为基础的转化 与初生及次生胚状体不同的是, 如果将胚状体连续继代会发现培养物中除胚状体, 非胚性愈伤, 还有出现一些脆性胚性愈伤。以 GD 培养基代替一直用于木薯的体胚诱导的 MS 培养基, 并以 Picloram 代替 2, 4-D, 胚性愈伤的数量会大量增加, 进而可在 SH 液体培养基中进行悬浮培养并大量扩增^[24]。该方法由于培养物细小 (一般由几十个细胞构成), 相应的转化方法一般能将外源基因导入具有再生能力的细胞, 同时小的细胞团也方便转化体的筛选, 以此系统为基础, 采用 Paramomycin 为选择时, schopke 等^[44]以基因枪法获得转化植株。他们将转化了的细胞先在含 12 mg/L Picloram 的液体培养基中培养 2 周, 然后转入液体培养基含 15 mg/L 的 paramomycin 进行选择, 4~5 星期后将液体培养物转入固体培养 (同样条件下) 4 星期。由于选择压会干扰再生, 所以再生阶段去掉筛选压, 将固体培养的材料依次转入不同的培养基来诱导球形胚向鱼雷胚发育 (培养基中加 1.2 mg/L Picloram), 然后经成熟培养 (0.5% 活性炭的 MS 培养基) 发育至成熟胚状体。成熟胚状体经干燥处理后在 1 mg/L BAP 培养再生植株。不同的悬浮系再生植株能力差异很大, 在某些悬浮系中没有再生植株, 采用该方法只有一个品种 (TMS 60444), 转化株经 Southern 证实是外源基因的导入。

3.2.4 建立于木薯器官发生系统上的基因转化 以木薯次生胚状体的子叶为外植体, 在含 BAP 的培养基上能诱导高效率的器官发生及植株再生, 且器官发生主要起源于切口及表皮细胞, 为采用现有的基因转化方法提供了较为有利的条件, 同时与建立了胚状体途径的筛选方式相比, 几种常用的转化体筛选标志基因均可用于转化操作^[19,21]。以农杆菌介导的转化通过 GUS 基因瞬时表达研究几个品种对农杆菌的亲合性试验也表明, 木薯细体胚子叶对 LBA4404 (pTOK233)^[45,46]和 LBA4404 (pBin9GusInt)^[47]表现出很高的瞬时表达效果。我们以次生胚状体子叶为外植体, 与农杆菌 LBA4404 (pTOK233) 共培养后, 在含 15 mg/L 的选择培养基上可诱导抗性愈伤、芽原基的形成。GUS 染色表明: 30 株 hygromycin 抗性芽中, 6 株表现为 GUS 阳性。转基因的芽经进一步培养后, 移入温室 (Li 等 1996), 与此同时我们还以试管苗繁殖的转基因材料研究了 35S 启动子驱动下的 GUS 基因在木薯中的表达情况。与早期基因枪的瞬时表达对比^[48], 转基因株的各部位均表现为较强的 GUS 染色, 包括根的各部分。表达最强的部分在最幼嫩的组织、顶端、侧生分生组织、根尖等^[21]。有关转基因株的检测经 PCR、Southern、Northern 等检测, 最近我们又运用农杆菌介导方法将一个抗叶片衰老的基因成功地导入木薯 (未发表)。

4 木薯的基因工程育种的研究方向

4.1 提高转化效率

从已发表的两个转化系统来看, 转化频率都偏低。Schopke 等^[44]报道采用基因枪的方法获得转化株, 而具有确切分子证据的只有 2 株。造成这种情况的原因除与转化方法、筛选条件有关外, 重要的是再生植株途径。虽然脆性胚性愈伤途径能使得培养物更分散, 细小化, 扩增效率更高 (4 天增殖 1 倍), 便于转化。但由胚性愈伤再生植株需要的周期长, 且再生效率很低, 其中由球形胚至成熟胚状体的转变仍是一个瓶颈, 由胚状体再生植株也有一定的难度。脆性胚性愈伤与胚状体发生途径都属于体细胞胚胎发生途径, 只是由于改了培养基而使得培养物的细小化, 从而只是部分解决“转化”与“再生”的矛盾, 这也可能是导致转化频率较低的原因。我们^[19]采用的农杆菌介导结合器官发生系统的方法虽然获得多个转化株, 但其频率也只有 0.2%~0.4%。虽然我们的实验没有受再生植株方面的限制, 但该再生方法由于其自身的特点, 很难避免假阳性、嵌合体的存在, 且由于植株再生时间相对较短, 难以通过连续扩增来对转化体进行严格筛选。解决转化频率低的方法除了进一步研究转化过程中的各个环节外, 仍需提高组培效率。对于前者, 必须提高球形胚状体的成熟、萌发及植株再生效率, 对后者需采取更有效的扩增方法。

4.2 将已有的转化系统推广到多个品种

基因转化作为基因工程育种的基础, 最终必须用于改造一些生产上应用广泛的品种, 现有的两个系统均建立于模式品种 (M Col 22 和 TMS 60444) 上。尽管在上述转化系统建立的同时, 也报道了脆性胚性愈伤途径 (Taylor 等 1996) 及器官发生途径能诱导适用于多个品种, 但至今没有转化其它品种的报道, 这有待于进一步的研究。

4.3 向木薯导入有用基因

要充分利用基因工程改良木薯, 必须针对木薯上的重要的病虫害, 营养成分, 氰化物, 淀粉合成等, 利用已有的基因进行大量的转化工作, 如: 通过导入抗病毒基因, 抗虫基因, 控制氰化物的合成及代谢酶类的基因, 淀粉合成酶基因等来培养优质、高产的木薯品种, 为生产服务。

参考文献:

- (1) FAO. Food and agricultural organization of the United Nations [M]. *Production yearbook*, Rome, 1989.
- (2) Rogers D J. Studies on *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and related species [J]. *Bull Torrey Bot*, 1963, 90: 42~54
- (3) Jennings D L. Cassava *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) [C]. In: *Evolution of crop plants* (edited by Simmonds NW), 1976, 81~84
- (4) Greenway P J. Origins of some East African food plants [J]. *E. African Agri J*, 1994, 10: 34~39
- (5) FAO. FAOSTAT Database <http://apps.fao.org/>, 1997
- (6) CIAT. Cassava program [C]. CIAT, Cali Colombia, *Annual Report* 1989, 1980
- (7) Kartha K K. Regeneration of cassava plants from apical meristems [J]. *Plant Sci Lett*, 1974, 2: 107~113
- (8) Konan N K, Sangwan R S, Sangwan-Norreeel B S. Efficient *in vitro* shoot regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Plant Breed*, 1994a, 113: 227~236
- (9) Konan N K, Schopke C, Carcamo R *et al*. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud derived meristems [J]. *Plant Cell Rep*, 1997, 16: 444~449
- (10) Bhagwat B, Vierra L G E, Erickson L R. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1996, 46: 1~7
- (11) Stamp J A, Henshaw G G. Somatic embryogenesis in cassava [J]. *Z Pflanzenphys*, 1982, 105: 183~187

- (12) Konan N K, Sangwan R S, Sangwan-Norree B S. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Identification of parameters influencing the frequency of embryogenesis [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1994 b, 37: 91~102
- (13) Stamp J A, Henshaw G G. Somatic embryogenesis from clonal leaf tissues of cassava [J]. *Ann Bot.* 1987 a, 59: 445~450
- (14) Szabados L, Hoyos R, Roca W. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava [J]. *Plant Cell Rep.* 1987 b, 6: 248~251
- (15) Mathews H, Schopke C, Carcamo R. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava [J]. *Plant Cell Rep.* 1993, 12: 328~333
- (16) Raemakers C J J M. Primary and cyclic somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). [D]. PhD thesis. Agricultural University of Wageningen, Netherlands, 1993
- (17) Raemakers C J J M, Bessembinder J J E, Startsky G. Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1993 a, 33: 151~156
- (18) Li H Q, Huang Y W, Liang C Y *et al.* Improvement of plant regeneration from cyclic somatic embryos in cassava [R]. In: Cassava Biotechnology Network: Proceedings of the 2nd International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia, *CIAT working document*, 1995, 150: 289~302
- (19) Li H Q, Sautter C, Potrykus I *et al.* Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Nature Biotech.* 1996, 14: 736~740
- (20) Li H Q, Huang Y W, Liang C Y *et al.* Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis [J]. *Plant Cell Rep.* 1998, 17: 410~414
- (21) Puonti-Kaerlas J, Frey P, Sautter C *et al.* Development of meristem gene transfer techniques for cassava [R]. In: Proceedings of the 3rd International Scientific Meet of the Cassava Biotechnology Network, Kampala, Uganda. *African Crop Sci J* (in press), 1997
- (22) Ng S Y C. Tissue culture of root and tuber crops at IITA [C]. In: *Biotechnology: enhancing research on tropical crops in Africa* (edited by Thotapilly G, Monti LM, Mohan Raj DR, Moore AW) 1992, 135~141
- (23) Sudarmonowati E, Henshaw G G. The induction of somatic embryogenesis of recalcitrant cassava cultivars using picloram and dicamba [R]. In: Proceedings of the 1st International Scientific Meet of the Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia (edited by Roca WM, Thro AM), *CIAT working document*, 1993, 123: 128~133
- (24) Taylor N J, Clarke M, Henshaw G G. The induction of somatic embryogenesis in fifteen African and one south American cassava cultivars expression in cassava root and leaf tissues [R]. In: Proceedings of the 1st International Scientific Meet of the Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia (edited by Roca WM, Thro AM), *CIAT working document*, 1993, 123: 134~139
- (25) Matsumoto K, Cabral G B, Teixeira J B *et al.* Embriogênese somática a partir de folhas imaturas de mandioca *in vitro* [J]. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 1991, 3: 107~110
- (26) Schopke C, Chavarriga A P, Fauquet C M *et al.* Cassava tissue culture and transformation: improvement of culture media and the effect of different antibiotics on leaf tissues [R]. In: Proceedings of the 1st International Scientific Meet of the Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia (edited by Roca WM, Thro AM), *CIAT working document*, 1993, 123: 140~145
- (27) Sudarmonowati E, Bachtiar A S. Induction of somatic embryogenesis in Indonesian cassava genotypes [R]. In: Cassava Biotechnology Network: Proceedings of the 2nd International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia, *CIAT working document*, 1995, 150: 324~335
- (28) Raemakers C J J M, Sofiari E, Jacobsen E *et al.* Regeneration and transformation of cassava. [C]. *Euphytica* (in press), 1997 a
- (29) Stamp J A, Henshaw G G. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1987 b, 10: 227~233
- (30) Raemakers C J J M, Amati M, Startsky G *et al.* Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava [J]. *Ann Bot.* 1993 b, 71: 289~294
- (31) Raemakers C J J M, Sofiari E, Kanju E *et al.* NAA-induced somatic embryogenesis in cassava [R]. In: Cassava

- Biotechnology Network: Proceedings of the 2nd International Scientific Meeting, Bogor, Insonwaia, *CIAT working document*, 1995 a, 150 : 355~363
- (32) Sofiari E, Raemakers C J J M, Kanju E *et al.* Comparison of NAA and 2, 4-D induced somatic embryos in cassava [R]. In: Proceedings of the 3rd International Scientific Meet of the Cassava Biotechnology Network, Kampala, Uganda. *African Crop Sci J* (in press), 1997
- (33) Raemakers C J J M, Rozemboom M G M, Danso K *et al.* Regeneration of plants from somatic embryos and friable embryogenic callus of cassava *Manihot esculenta* (Crantz) [R]. In Proceedings of the 3rd International Scientific Meet of the Cassava Biotechnology Network, Kampala, Uganda. *African Crop Sci J* (in press), 1997 C
- (34) Taylor N J, Edwards M, Kiernan R J *et al.* Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Nature Biotech.* 1996, 14 : 726~730
- (35) Gresshoff P, Doy C. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of the anthers for haploid culture of this and other genera [J]. *Zpflanzenphys.* 1974, 73 : 132~141
- (36) Tilquin J P. Plant regeneration from stem callus of cassava [J]. *Can J Bot.* 1979, 57 : 1761~1763
- (37) Shahin E A, Shepard J F. *Plant Science Lett.* 1980, 17 : 459~465
- (38) Raemakers C J J M, Jacobsen E, Visser R G F. Histology of somatic embryogenesis and evaluation of somaclonal variation [R]. In Cassava Biotechnology Network: Proceedings of the 2nd International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia. *CIAT working document* 1995 b, 150 : 336~354
- (39) Luong H T, Shewry P R, Lazzeri P A. Transient gene expression in cassava somatic embryos by tissue electroporation [J]. *Plant Sci.* 1995, 107 : 105~115
- (40) Chavarriaga-Aguirre P, Schopke C, Sangare A *et al.* Transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) embryogenic tissues using *Agrobacterium tumefaciens* [R]. In: Proceedings of the 1st International Scientific Meet of the Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia (edited by Roca WM, Thro AM), *CIAT working document*, 1993, 123, 222~228
- (41) Schopke C, Franche C, Bogusz D *et al.* Transformation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [M]. in *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Bajjai, Y. P. S. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, 1993, 273~289
- (42) Sarria R A, Torres E, Balcazar N *et al.* Progress in *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava *Manihot esculenta* (Crantz) [R]. In: Cassava Biotechnology Network: Proceedings of the 2nd International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia. *CIAT woking document*, 1995, 150 : 241~244
- (43) Sarria R, Gomez A, Catano M *et al.* Towards the development of *Agrobacterium tumefaciens* and Particle bombardment-mediated cassava transformation [R]. In: Proceedings of the 1st International Scientific Meet of the Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia (edited by Roca WM, Thro AM), *CIAT working document*, 1993 a, 123 : 216~221
- (44) Schopke C, Taylor N, Carcamo R *et al.* Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures [J]. *Nature Biotech.* 1996, 14 : 731~735
- (45) Hoekema A, Hoykaas P, Schilperoot R. Transfer of octopine T-DNA segment to plant cells mediated by different types of *Agrobacterium tumor* of root inducing plasmids: generality of virulence systems [J]. *J Bact.* 1984, 158 : 383~385
- (46) Hiei Y, Ohta S, Komari T *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. *Plant J.* 1994, 6 : 271~282
- (47) Holtorf S, Apel K, Bohlmann H. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol.* 1995, 29 : 637~646
- (48) Arias-Garzon D I, Sarria R, Gelvin S *et al.* New *Agrobacterium tumefaciens* Plasmids for cassava transformation [R]. Second International Scientific Meeting, *Cassava Biotechnology Network (CBNI)*, 1995, 48