

NGHIÊN CỨU HỆ THỐNG TÁI SINH CÂY SẴN (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ) THÔNG QUA PHÔI SOMA TỪ ĐỈNH CHỖI

Đỗ Xuân Đồng¹, Đỗ Hải Lan^{1,2}, Phạm Bích Ngọc¹, Lê Văn Sơn¹, Lê Trần Bình¹, Chu Hoàng Hà^{1,3}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Tây Bắc

³Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Hệ thống tái sinh cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz) thông qua phôi soma (somatic embryos) từ đỉnh chồi đã được nghiên cứu hoàn thiện. Các mẫu cây được sử dụng là các đỉnh chồi được tách ra từ cây *in vitro* và những chồi được cắt ra từ thân. Sự phát sinh phôi soma đạt được với tỷ lệ cao bằng cách bổ sung vào môi trường cam ỨNG các nồng độ picloram khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ hình thành phôi soma đạt cao nhất ở cả hai giống trên môi trường MS bổ sung 12 mg/l picloram. Sau 4 tuần, mặc dù số phôi/mẫu cây tương tự nhau giữa hai giống nhưng giống KM94 cho tỷ lệ hình thành phôi ($82 \pm 1,7\%$) cao hơn 22,4% so với giống KM140 ($59,6 \pm 2,9\%$). Cụm phôi tiếp tục được chuyển sang môi trường này nhằm tạo cây con bổ sung 0,3 mg/l BAP cho tỷ lệ tạo cây con là $81 \pm 3,2\%$ với giống KM140 và $79 \pm 2,3\%$ với giống KM94. Chồi cây có 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%. Những cây tái sinh *in vitro* có bề rễ hoàn chỉnh được trồng trong bầu giá thể trấu hun: đất cát (4:6) đạt tỷ lệ cây sống 100%. Cây non hoàn chỉnh được tạo ra trong 16-18 tuần và quy trình này hoàn toàn thích hợp cho các nghiên cứu tiếp theo về chuyển gen ở cây sắn.

Từ khóa: Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz), đỉnh chồi, nuôi cấy mô, phôi soma, tái sinh

MỞ ĐẦU

Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là một trong những loại cây lương thực chủ lực quan trọng nhất đối với nhiều nước do khả năng cung cấp carbohydrate cao, thậm chí trong các điều kiện ngoại cảnh bất lợi như lượng mưa thấp, hạn hán hoặc đất nghèo dinh dưỡng (De Bruin, Fresco, 1989). Hiện nay nhu cầu sử dụng sắn trong công nghiệp thực phẩm và chăn nuôi đang tăng lên đáng kể, hơn nữa, sắn là nguồn cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp sản xuất nhiên liệu sinh học nên được coi là cây trồng đem lại giải pháp kép đạt cả hai mục tiêu: đảm bảo an ninh lương thực và cung cấp nhiên liệu sinh học, từng bước thay thế nhiên liệu hóa thạch. Trong bối cảnh biến đổi khí hậu làm trái đất nóng lên, các chương trình cây sắn chủ yếu tập trung vào chọn tạo các giống sắn cho sản lượng cao và có khả năng thích ứng tốt với điều kiện ngoại cảnh (Fukuda *et al.*, 2003).

Hiện nay, công nghệ chuyển gen đã và đang mở ra nhiều hứa hẹn để tạo ra những giống sắn chất lượng cao bằng cách kết hợp các tính trạng mong muốn vào một số giống sắn vốn được nông dân ưa thích (Kawano *et al.*, 2003). Siritunga và đồng tác giả (2004) đã chứng minh được các kỹ thuật chuyển

gen có thể được áp dụng để cải tạo nhiều giống sắn khác nhau. Nhóm nghiên cứu này đã tạo được một giống sắn chuyển gen có khả năng tạo một lượng lớn hydroxynitrile lyase (HNL) ở rễ và lá. Lượng HNL tăng còn đi đôi với lượng acetone cyanohydrin giảm và tăng lượng cyanide bay hơi trong quá trình cắt nghiền hoặc chế biến sắn. Không giống như giống sắn không có cyanogens của Siritunga và đồng tác giả (2003), các giống sắn chuyển gen mới này vẫn giữ một lượng cyanogens để ngăn cản động vật ăn cỏ nhưng vẫn là thực phẩm an toàn cho con người.

Các hệ thống tái sinh cây sắn thông qua quá trình tạo phôi soma đã được nghiên cứu cải tiến (Schopke *et al.*, 1996). Những nghiên cứu tiếp theo tập trung vào việc chứng minh các phôi soma của sắn có thể là nguồn cung cấp chồi non để sản xuất lượng lớn các đồng trội sạch bệnh, đây cũng là những dòng lý tưởng cho công tác bảo tồn giống (Mycok *et al.*, 1995). Đối với bất cứ quá trình vi nhân giống nào, giai đoạn sinh trưởng cũng quyết định hiệu suất của quá trình. Những năm trước đây, một số hướng khác nhau đã được thực hiện nhằm nhân dòng phôi soma từ các mô sắn. Ví dụ, bằng quá trình chuyển đổi tuần hoàn và lặp lại từ các dạng môi trường rắn và lỏng, Raemakers và đồng tác giả (1993) đã cam ỨNG các phôi soma bằng chất cam ỨNG

2,4-D, sau đó quá trình cảm ứng lại được thay thế bằng NAA. Phương pháp nhân nhanh mô sẹo từ các mô sần trên môi trường bổ sung picloram đã được Taylor và đồng tác giả (1996) chứng minh là có khả năng tạo một lượng lớn phôi soma. Tuy nhiên chưa có bằng chứng rõ ràng chứng tỏ sự phát triển từ phôi thành cây con có hiệu suất cao.

Có nhiều phương pháp để tạo phôi soma như là thay đổi nồng độ auxin và môi trường nuôi cấy, nồng độ tỉ lệ sống sót của phôi soma trong các bước nuôi cấy tiếp theo phụ thuộc vào chất lượng của phôi sơ cấp được tạo ra ban đầu và quá trình chuyển đổi môi trường giữa lỏng và rắn (Sofiani *et al.*, 1997). Một loạt các yếu tố ảnh hưởng đến các bước của quá trình tạo phôi cho cây sần đã được nghiên cứu: 1) Bước cảm ứng: nghiên cứu ảnh hưởng của các muối bazơ khác nhau, sử dụng môi trường rắn và lỏng và hai nồng độ picloram; 2) Bổ sung picloram vào môi trường khi bắt đầu thấy sự biệt hóa phôi; 3) Vai trò của quá trình làm khô khi phôi trưởng thành; 4) Bổ sung BAP vào môi trường này mầm. Hiện nay, chưa có công trình nghiên cứu chi tiết nào về tạo phôi soma và chuyển gen vào giống sần ở Việt Nam. Do đó, trong bài báo này chúng tôi nghiên cứu thiết lập tài sinh hoàn chỉnh của hai giống sần KM94 và KM140.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thực vật

Hai giống sần KM94 và KM140 có nguồn gốc từ Trung tâm lai nguyên thực vật, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam, An Khánh, Hoài Đức, Hà Nội.

Phương pháp

Thân cây của hai giống sần KM94 và KM140 sần được cắt thành các đoạn có độ dài từ 3 đến 4 cm, sau đó rửa sạch dưới vòi nước 30 phút và bề mặt mẫu cây được sát trùng bằng ethanol 70% trong 1 phút và 0,1% (w/v) HgCl_2 trong 7 phút, tiếp theo loại bỏ HgCl_2 và rửa sạch bằng nước cất vô trùng 5 lần. Mẫu cây sau khi đã khử trùng được nuôi cấy trên môi trường MS đặc bổ sung thêm 3% sucrose với mật độ 5 đoạn cắt/bình tam giác 250 ml (50 ml môi trường/bình). Đỉnh chồi của cây con sau 4 tuần tuổi được sử dụng làm mẫu cây. Mẫu cây được cắt thành các đoạn có độ dài 1,5 cm và được đặt trong đĩa Petri bao gồm 25 ml môi trường MS đặc bổ sung 3% sucrose, 1 mg/l CuSO_4 (2 mM), 2,4-D hoặc picloram ở các nồng độ 3, 6, 9, 12, 15 mg/l để tạo mô

sẹo. Tiếp tục các mô sẹo được chuyển sang môi trường có bổ sung picloram ở các nồng độ 1, 3, 6, 9, 12 và 15 mg/l và 0,7% agar để hình thành phôi soma sau 4 tuần nuôi cấy trong điều kiện tối ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và đánh giá sự xuất hiện của phôi soma. Phương pháp được mô tả bởi Zhang và đồng tác giả (2001), những cụm phôi soma chín (10 cụm phôi) được chuyển sang đĩa petri có 25 ml môi trường bao gồm MS và các vitamin, 3% sucrose, 1 mg/l CuSO_4 (2 mM), N6-benzylaminopurine (BAP) ở các nồng độ 0, 0,3, 0,6, 0,9; 1,2, 1,5, pH 5,8 và 0,7% agar và đặt ở điều kiện $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 giờ chiếu sáng trong thời gian 3 đến 4 tuần, đánh giá số phôi tạo thành cây con.

Tạo rễ và ra cây: các chồi đạt chiều dài từ 1 - 1,5 cm được cấy chuyển sang môi trường MS không có chất kích thích sinh trưởng trong thời gian 4 tuần. 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 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng 3000 lux với thời gian chiếu sáng 16 h/ngày.

Các số liệu được xử lý bằng chương trình IRRISTAT.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Anh hưởng nồng độ 2,4-D và picloram đến quá trình tạo mô sẹo từ đỉnh chồi

Cả hai giống sần đều cho thấy sự phát triển mô sẹo trên môi trường có 2,4-D và picloram trong thời gian từ 15 - 21 ngày. Khoảng thời gian hình thành mô sẹo biến đổi phụ thuộc vào nồng độ auxin bổ sung vào môi trường nuôi cấy (Bảng 1). Ở nồng độ 9 hoặc 12 mg/l picloram cho thấy sự hình thành mô sẹo sớm (trong khoảng thời gian 1 tuần nuôi cấy) trong khi đó ở cùng nồng độ 2,4-D mô sẹo hình thành chậm hơn (khoảng 2 tuần). Ngược lại nồng độ 6 hoặc 15 mg/l cả hai loại auxin đều hình thành mô sẹo chậm, lần lượt 14 hoặc 13 ngày. Nồng độ auxin thích hợp cho sự hình thành mô sẹo thay đổi phụ thuộc vào sự tham gia của auxin và giống sần, ở nghiên cứu này, 2,4-D và picloram ở nồng độ 9 hoặc 12 mg/l thích hợp cho sự hình thành mô sẹo. Sự xuất hiện hình thái mô sẹo cũng bị ảnh hưởng bởi auxin

trong môi trường nuôi cấy. 2,4-D tạo thành mô sẹo dạng rắn chắc hoặc nhiều mẫu với màu nâu đặc trưng. Ngược lại, picloram tạo thành dạng mô sẹo ròn, mềm với màu kem hoặc hơi vàng (Hình 1B và 1C). Căn cứ vào picloram bổ sung vào môi trường

nuôi cấy cho thời gian hình thành mô sẹo nhanh trong thời gian 7 ngày, chúng tôi tiếp tục chuyển tất cả các mô sẹo cây trên môi trường có bổ sung các nồng độ khác nhau của picloram (Bảng 2) để hình thành các phôi sơ cấp và thứ cấp

Bảng 1 Ảnh hưởng nồng độ 2,4-D và picloram đến quá trình tạo mô sẹo từ đỉnh chồi sau 21 ngày nuôi trong tối

Nồng độ (mg/l)	Số ngày tạo mô sẹo		Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)			
	2,4-D	Picloram	KM140		KM94	
			2,4-D	Picloram	2,4-D	Picloram
3	17	14	60	71	65	90
6	14	13	80	85	80	95
9	11	7	100	90	100	95
12	11	7	90	100	95	100
15	13	11	85	95	90	85

Ảnh hưởng của picloram đến sự hình thành phôi soma từ mô sẹo

Phôi soma thường được tạo ra bằng cách sử dụng auxin trong môi trường nuôi cấy (Williams và Maheswaran, 1986). Giữa các auxin khác nhau, 2,4-D là một trong những chất được áp dụng phổ biến nhất để tạo phôi soma. Tạo phôi soma trên môi trường có bổ sung picloram 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 Kaepler, 2002, Precti and Koithari, 2004).

Trong nghiên cứu này, phôi soma được tạo ra trên môi trường bổ sung picloram. Đỉnh chồi lấy ra từ giống sắn KM94 và KM140 nuôi cấy *in vitro* đã tạo mô sẹo được sử dụng để xác định hiệu quả nồng độ picloram trong việc tạo phôi soma. Các mẫu cây được đặt trên môi trường tạo phôi soma trong vòng 2 tuần, các phôi soma ở giai đoạn hình cầu có thể quan sát được và giữa tuần 3 và tuần 4 các phôi soma ở giai đoạn cao hơn có thể nhìn thấy được (Hình 1D). Kết quả được thể hiện trong bảng 2 cho thấy, tất cả các nồng độ picloram được thử nghiệm trên hai giống đều cho khả năng tạo phôi soma và số phôi/mẫu cây với tần suất cao (Hình 1C và 1D). Giống sắn KM140, tỷ lệ tạo phôi soma và số phôi soma/mẫu cây tỷ lệ thuận theo chiều tăng dần với

nồng độ picloram, tỷ lệ tạo phôi soma ($16,3 \pm 1,2\%$) và số phôi soma/mẫu cây ($9,7 \pm 2,6$) ở nồng độ picloram 1 mg/l là thấp nhất so với ở nồng độ picloram 12 mg/l cho tỷ lệ tạo phôi và số phôi soma/mẫu cây cao nhất lần lượt là $59,6 \pm 2,9\%$ và $26,7 \pm 2,7$ và ở nồng độ picloram 15 mg/l tạo phôi soma và số phôi/mẫu cây bắt đầu có xu hướng giảm. Tương tự như giống KM140, giống KM94 cũng có tỷ lệ hình thành phôi soma và số phôi soma/mẫu cây tỷ lệ thuận theo nồng độ picloram, nhưng tỷ lệ phôi và số phôi soma đều cao hơn giống KM140, tỷ lệ tạo phôi soma ở nồng độ 12 mg/l picloram cao hơn 22,4% so với giống KM140 và số phôi soma/mẫu cây thì sự sai khác không lớn, chỉ là 2,7 phôi/mẫu cây (Bảng 2). Kết quả này cũng phù hợp với công bố của Fentosa và đồng tác giả 2007, khi nghiên cứu tái sinh trên một số giống sắn của Brazil thông qua tạo phôi soma cũng chỉ ra rằng bổ sung ở nồng độ 12 mg/l picloram vào môi trường nuôi cấy cho tỷ lệ tạo phôi và số phôi/mẫu cây cho kết quả tốt nhất. Danso và đồng tác giả (2010) cho rằng cả hai chất 2,4-D và picloram đều cho kết quả hình thành tạo phôi soma cao (90-100%), tuy nhiên môi trường có bổ sung picloram cho quá trình tạo phôi soma nhanh và vượt trội so với môi trường bổ sung 2,4-D bởi vì picloram tác động đến thành tế bào và làm giãn tế bào nhanh hơn 2,4-D.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ picloram tới sự hình thành phôi soma từ đỉnh chồi của hai giống sắn KM94 và KM140 nuôi cấy *in vitro*. Giá trị phôi/mẫu cây là tổng số phôi ở các hình dạng như tròn, tim, cá đuôi 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

Picloram (mg/l)	KM140		KM94	
	Tỷ lệ phôi soma (%)	Phôi soma/mẫu cây	Tỷ lệ phôi soma (%)	Phôi soma/mẫu cây
1	16,3 ± 1,2	9,7 ± 2,6	29,6 ± 2,2	13,3 ± 2,6
3	39,3 ± 1,7	17,3 ± 2,0	51,3 ± 2	29,3 ± 2
6	47,3 ± 1,7	18 ± 1,2	71,3 ± 1,2	36,6 ± 1,8
9	40 ± 1,7	20,7 ± 1,5	64 ± 1,5	34,6 ± 1,2
12	59,6 ± 2,9	26,7 ± 2,7	82 ± 1,7	29,3 ± 3
15	56,3 ± 1,2	23,3 ± 1,8	76 ± 2,6	31,6 ± 2

Bảng 3 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	43,6 ± 0,8	50,3 ± 2
0,3	81 ± 3,2	79 ± 2,3
0,6	79 ± 2	77,6 ± 1,2
0,9	67 ± 1,5	71 ± 1,5
1,2	61 ± 2	60,3 ± 1,45
1,5	55,3 ± 0,8	59,3 ± 2,6

Khả năng nảy mầm của phôi soma tạo thành cây con

Các mẫu cây được tạo phôi trên môi trường bổ sung các nồng độ khác nhau của picloram trong thời gian 3 - 4 tuần, các phôi được hình thành và dần chuyển sang giai đoạn phôi chín. 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 BAP) để nảy mầm tạo thành các mầm cây hoàn chỉnh. Giai đoạn này rất quan trọng đối với thí nghiệm tạo phôi và tái sinh cây vì nếu số lượng phôi tạo ra nhiều nhưng khả năng nảy mầm kém thì hầu như không có ý nghĩa đối với các thí nghiệm tiếp theo về chuyển gen vào cây sắn. Tỷ lệ phôi nảy mầm càng cao thì xác suất chọn được cây hiện nạp gen càng lớn. Kết quả được thể hiện bảng 3 cho thấy, trên cả hai giống KM94 và KM140 các cụm phôi soma đều có tỷ lệ nảy mầm nhất định ở tất cả các nồng độ thí nghiệm, giống KM140 có tỷ lệ phôi soma tạo thành cây con cao nhất là 81 ± 3,2% ở nồng độ BAP 0,3 mg/l so với môi trường không bổ sung BAP là 43,6 ± 0,8% và tương tự trên giống KM94 là 79 ± 2,3% so với môi trường không bổ sung BAP là 50,3 ± 2%. Giữa hai giống KM94 và KM140 tỷ lệ phôi soma tạo

thành cây con không có sự sai khác ở cùng nồng độ BAP 0,3 mg/l.

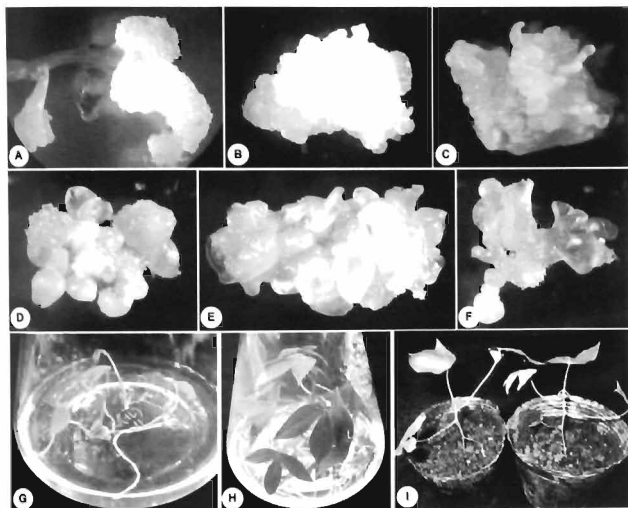
Khả năng tạo rễ và ra cây

Các chồi cây sắn tái sinh của hai giống KM94 và KM140 đạt chiều dài từ 1 cm đến 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) sau 3 tuần nuôi cấy để tạo rễ. Kết quả cho thấy, trên môi trường MS không có chất kích thích sinh trưởng cho khả năng ra rễ nhanh đạt tỷ lệ 100% trên cả hai giống sau 2 tuần nuôi cấy và số lượng rễ dao động từ 3 đến 5 rễ/mẫu cây (Hình 1G và 1H) so với các công thức môi trường có bổ sung chất kích thích sinh trưởng sau khoảng 4 tuần rễ bắt đầu xuất hiện nhưng số lượng rễ ít, rễ ngắn và tù.

Trong điều kiện *in vitro*, cây được cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng, ánh sáng và sống trong điều kiện vô trùng. Với mục đích xây dựng một quy trình tái sinh cây hoàn chỉnh phục vụ cho công tác chuyển gen nên hệ thống tái sinh cây chồi được chỉ dừng lại ở giai đoạn tạo cây *in vitro* mà tiếp tục hoàn thiện chuyển cây ra trồng trong điều kiện nhà lưới.

Khi đưa cây tái sinh từ điều kiện phòng thí nghiệm ra nhà lưới cây con phải trải qua các giai đoạn thích nghi dần dần. Cây sản tái sinh có rễ rễ lớn hơn 2 rễ và chiều dài từ 4 cm đến 6 cm được chuyển ra trồng trên giá thể trấu hun trộn đất cát với tỉ lệ 4:6. Trong 2 tuần đầu cây được nuôi trong phòng nuôi cây với nhiệt độ 27°C, cường độ chiếu sáng 1000 lux -

1500 lux, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày. Sau 2 tuần đầu cây con được đưa ra trồng trong nhà lưới, tuần đầu tránh ánh sáng chiếu trực xạ và chăm sóc cây ở điều kiện cung cấp đầy đủ nước và dinh dưỡng. Cây con ra bầu bằng giá thể trấu hun trộn đất cát đạt tỷ lệ cây sống, sinh trưởng và phát triển bình thường là 100% (Hình 1).



Hình 1. Tái sinh cây sản qua các giai đoạn khác nhau. A. Mô sẹo phát sinh từ đỉnh chồi. B. Mô sẹo đang phân hóa phôi. C và D. Cụm phôi soma. E. Phôi soma đang nảy mầm. F. Phôi soma đang tái sinh thành cây con. G và H. Cây trên một trường ra rễ. I. Cây trồng trên bầu đất.

KẾT LUẬN

Thông qua các bước: Cảm ứng tạo mô sẹo, phôi soma, nảy mầm phôi, tái sinh, ra rễ và trồng cây trong bầu đất, một hệ thống tái sinh cây sản hoàn chỉnh thông qua phôi soma đã được nghiên cứu thành công.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng kinh phí của đề tài: "Khảo thác và phân lập nguồn gen co sản của tập đoàn giống sản Việt Nam nhằm phát triển các giống sản có khả năng chống chịu bệnh và năng suất cao bằng công nghệ gen" thuộc chương trình nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học công nghệ. Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Castillo AM, Egana B, Sanz J, Cistue I. (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Rep* 17: 902-906.
- Danso FK, Elegba W, Oduro V, Kpentey P (2010) Comparative study of 2,4-D and picloram on friable embryogenic calli and somatic embryos development in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *IGJB* 10(2): 94-100.
- De Bruin GH, Fresco LO (1989) The importance of cassava in world food production. *Veth J Agr Sci* 37: 21-34.
- Feitosa T, Bastos JLP, Ponte LFA, Campos PAF, JLT (2007) Somatic Embryogenesis in Cassava Genotypes from the Northeast of Brazil. *Braz Arch Biol Technol* 50(2): 501-506.
- Fukuda C (2003) Mandioca, raiz de respeito. *Agro Anal* 22 (10): 43-46.
- Groll J, Mycock DJ, Gray VM, Laminski S (2001) Secondary somatic embryogenesis of cassava on picloram supplemented media. *Plant Cell Tiss Org Cult* 65: 201-210.
- Kawano K (2003) Thirty years of cassava breeding for productivity-biological and social factors for success. *Crop Sci* 43: 1325-1335.
- Mendoza MG, Kaeppler HF (2002) Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38: 39-45.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Mycock DJ, Wesley-Smith J, Berjak P (1995) Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. *Ann Bot* 75: 331-336.
- Preeti K, Kothari SL (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 Tiss Org* 77: 73-79.
- Raemakers CJM, Jacobsen E (1997) Micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In *Biotechnology in agriculture and forestry. High tech and micropropagation* Springer, Berlin Heidelberg New York, ISBN.
- Sirtunga D and Sayre RT (2003) Generation of cyanogen-free transgenic cassava. *Planta* 217: 367-373.
- Sirtunga D, Arias-Garzon D, White W, Sayre RT (2004) Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification. *Plant Biotechnol J* 2: 37-43.
- Sofari E, Raemakers CJM, Kanju E, Danso K, van Lammeren AM, Jacobsen F, Visser RGF (1997) Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in Cassava. *Plant Cell Tiss Org Cult* 50: 45-56.
- Taylor NJ, Edwards M, Kiernan RJ, Davey CDM, Blakesley DJ, Henshaw GG (1996) Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nat Biotechnol* 14: 726-730.
- Williams EG, Maheswaran G (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. *Ann Bot* 57: 443-462.
- Zhang P, Phansiri S, Puonti-Kaerlas J (2001) Improvement of cassava organogenesis by the use of silver nitrate in vitro. *Plant Cell Tiss Org Cult* 67: 47-54.

AN EFFICIENT PROTOCOL FOR PLANT REGENERATION OF CASSAVA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ) VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION

Đỗ Xuân Đông¹, Đỗ Hải Lan^{1,2}, Phạm Bích Ngọc, Lê Văn Sơn¹, Lê Trần Bình¹, Chu Hoàng Hà^{1,3,*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Tay Bau University

³National Key Laboratory of Gene Technology, Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

A method for the induction of somatic embryogenesis in two cassava genotypes from Vietnam is described. Shoot apices isolated both from *in vitro* plants and from *in vivo* stem cuttings were used as samples

Somatic embryogenesis was achieved in high frequencies by the addition to the induction medium of the auxin picloram over a wide range of concentrations. Our results show that the highest rate of somatic embryos formation for both cultivars was obtained by using 12 mg/l picloram supplemented to MS media. Although the number of embryos per explant was similar between two cultivars for 4 weeks, the KM94 cultivar gave a higher rate of somatic production ($82 \pm 1.7\%$) than the KM140 cultivar ($59.6 \pm 2.9\%$). Somatic embryos were subsequently transferred onto media (MS supplemented with 0.3 mg/l BAP) for the highest frequency of plantlet regeneration (KM140 - $81 \pm 3.2\%$ and KM94 - $79 \pm 2.3\%$). Shoots with the length of about 1 - 1.5 cm were transferred onto free - hormone MS media for 100% of rooting for 2 weeks. Complete plantlets were cultivated on a mixture of rice husk and sand-soil under ratio 4:6 in greenhouse. This protocol required 16 to 18 weeks and is entirely appropriate for mass production of various cassava genotypes and further genetic transformation experiments.

Keywords: Apical shoots, Callus culture, *Manihot esculentum* Crantz, Regeneration, Somatic embryos