

文章编号:1674-7054(2011)03-0230-07

影响木薯再生系统的几个因素的研究

郭军辉^{1,2}, 张健^{1,2}, 陈雄庭², 王颖², 吴坤鑫², 倪彦艳^{1,2}, 黄琴^{1,2}

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101)

摘要:以木薯7个优良品种 SC6, SC7, SC8, SC124, NZ188, C3 以及 C4 为实验材料, 对木薯再生体系中的几个重要影响因素进行了研究。结果表明: 6-BA 对抑制木薯的顶端优势有明显的效果, 浓度越高抑制作用越强; 2,4-D 和 picloram 能促进木薯初级体胚的形成, 两者效果相当, 在初级体胚诱导过程中, 所有品种的产胚率都能达到 100%; 在初级体胚继代过程中, SC7 产胚率很低, 其他品种初级体胚继代产胚率都达到 90% 以上; 体胚成熟时间对木薯子叶器官发生影响很大, 成熟 2 周左右的子叶器官发生率较高, 诱导频率达到 70% 以上; 基因型不同的木薯的体细胞胚发生频率和成熟子叶胚器官发生频率差异较大, 其中 SC8 最高, NZ188 次之, SC7 最低; 在培养基中, 加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AgNO_3 能提高成熟子叶胚的器官发生能力。

关键词: 木薯; 体细胞胚发生; 再生体系; 继代培养; 基因型

中图分类号: S 533

文献标志码: A

木薯(*Manihot esculenta* Crantz) 是双子叶大戟科植物, 是 *Manihot* 属中惟一有经济栽培价值的一个种。木薯是原产于南美亚马逊河流域的重要淀粉类块根作物, 是非洲地区 2 亿人的主要口粮^[1]。目前, 已成为我国华南地区最有开发前景的能源作物和国家粮食战略储备。要满足国内市场需求, 需要继续扩大木薯种植面积, 改进育种和种植技术^[2]。基因工程是针对特定性状为目标的育种手段, 利用该技术可快速实现木薯品质的定向改良^[3]。木薯的遗传转化难度较大, 进展缓慢, 其转化方法多采用农杆菌介导法和基因枪转化法, 以前者为主。木薯遗传转化率偏低, 究其原因, 除了与转化方法、筛选培养的条件有关外, 主要还是再生体系不够高效, 并且再生体系的研究大多集中在少数几个品种上。近几年, 随着植物转基因方法的不断改良, 木薯育种工作者们也在木薯的转基因研究方面做了大量的工作, 并取得了可喜的成果。由于木薯现有的遗传转化体系都需要经过体细胞胚发生和茎器官发生过程准备受体材料和植株再生, 因此, 建立良好的再生体系是提高转化效率的必要途径。现有的木薯再生体系虽然可以给木薯转基因提供所需的受体材料, 但受基因型的限制, 不同品种建立的体系效果差异较大。因此, 建立木薯不同品种体细胞胚胎再生体系是木薯基因工程改良的首要任务。笔者通过对影响木薯转化再生系统的几个重要条件做了对比研究, 旨在为寻找木薯高效的遗传转化体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 供试的 7 个木薯(*Manihot esculenta* Crantz) 品种 SC6, SC7, SC8, SC124, NZ188, C3, C4 均由中国热带农业科学院热带生物技术研究所王文泉课题组提供。

1.2 方法

1.2.1 木薯无菌材料的获得与保存 以室内栽培 60~80 d 生长良好的木薯植株的幼嫩茎段为外植体。

收稿日期: 2011-07-08

基金项目: 国家高科技研究计划(863 计划, 编号 2009AA10Z103)

作者简介: 郭军辉(1984-) 男, 陕西西安人, 海南大学农学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 陈雄庭(1957-) 男, 广东高州人, 研究员, 博士, 博士生导师. E-mail: ext669888063@163.com

将采回的幼嫩茎段去除叶片,切成5~6 cm带芽茎段,用 $\varphi=75\%$ 的酒精浸泡40 s后,转入 $w=0.1\%$ 的 HgCl_2 浸泡10 min,用无菌水冲洗3~4次,再切取单芽茎段接种于MS基础培养基上进行培养(26~28℃,每天连续光照16 h,下同略),获取无菌苗,每8周继代1次。将木薯无菌组培苗单芽茎段分别接种到含有6-BA:0,0.1,0.5,1.0,4.0,10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MS培养基上,培养30 d后观察生长状况。

1.2.2 木薯初级体胚的诱导及体胚继代 以在MS基础培养基上培养6~8周的组培苗为材料,将其切成1.5~2 cm长的带侧芽茎段,侧芽向上,平放接种至含有MS+6-BA 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基的培养皿上,培养皿直径为9 cm(下同),每皿接侧芽30个。培养4~6 d后,芽开始膨大。将膨大的侧芽放在20倍体视显微镜下,挑取芽尖生长点,分别转移至MS+2,4-D 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和MS+picloram 12 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上,培养2周后,在体视显微镜下观察统计初级体细胞胚诱导情况。每个处理4皿,每皿取30个膨大芽点。

在体视显微镜下,将诱导出的体胚从愈伤组织中挑出,转移到新的MS+2,4-D 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 或MS+picloram 12 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基中,暗培养2周后,在体式显微镜下观察统计体细胞胚继代生长情况。每个处理4皿,每皿取25块初生体胚。

初级体胚诱导率 = 诱导出体胚的组织数/接种的芽点数 $\times 100\%$

继代体胚产率 = 产胚的组织数/转接的体胚数 $\times 100\%$

1.2.3 体胚子叶成熟及器官发生 将继代培养2~3代的木薯体胚转接到不含激素的MS培养基上,进行体胚成熟培养。将成熟培养5,10,15,20,25,30 d的体胚绿色子叶分别切成约2~3 mm^2 碎块,转接到MS+6-BA 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上进行芽器官诱导。先暗培养10 d,再光照培养20 d,然后观察统计不定芽发生情况。每个处理4皿,每皿取30块子叶碎块。

将成熟体胚10~15 d的绿色子叶切成约2~3 mm^2 的碎块,转到含5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 的MS+6-BA 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上进行芽器官诱导,以未加 AgNO_3 的MS+6-BA 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基处理作对照。先暗培养10 d,再光照培养20 d,然后观察统计不定芽发生率。每个处理4皿,每皿取30块子叶碎块。

不定芽发生率 = 产生不定芽外植体数/接种的外植体数 $\times 100\%$

1.2.4 成苗培养及移栽 将经过器官发生产生的幼芽切下,转接至MS+6-BA 0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上,培养30~50 d后,切取单株转至MS+NAA 0.02 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生根培养基上,进行生根成苗培养。1~2个月后,将小植株取出,用自来水冲掉根部的培养基,根部用1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多菌灵液浸泡10 min,直接移栽至花盆里。移栽后,在花盆上覆盖保鲜膜以保持湿度,1周后揭开。

2 结果与分析

2.1 6-BA对木薯组培苗单芽茎段继代生长的影响 将木薯单芽茎段转接到添加不同质量浓度6-BA的MS培养基上,15 d后均有新芽萌发。未加6-BA的MS培养基,木薯根茎叶都生长正常,叶片浓绿,但茎秆较细,节间明显(图1-A)。相比之下,添加6-BA的MS培养基,木薯节间变短,基部增粗,并且产生愈伤组织。低质量浓度的6-BA,明显促进了芽的生长(图1-B,图1-C)。随着6-BA质量浓度的增加,芽的生长出现了抑制,并伴有膨大现象(图1-D)。当6-BA质量浓度大于4.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,芽出现膨大现象,并且基部产生愈伤组织,茎间芽萌发,但未长出完整叶片,无明显节间,顶端优势明显被抑制(图1-E)。当6-BA质量浓度为10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,木薯的生长几乎完全被抑制,培养15 d,芽点膨大,但无叶片生长(图1-F)。可见6-BA对抑制木薯顶端优势有明显的效果。

培养1个月后,培养基中未添加6-BA处理的木薯根茎叶生长正常(图2-A),叶片偏大,叶柄长,每个外植体都能生根,且根系生长旺盛。添加6-BA的培养基对木薯顶端优势有明显的抑制作用,质量浓度不同,抑制效果不同。随着6-BA质量浓度的增加,木薯植株形成速度减慢,叶片生长随之减慢。当6-BA质量浓度为0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,木薯植株腋芽明显伸长,基部有少量愈伤产生,部分植株生根,但量很

少,茎段纤弱,不利于后续实验(图2-B)。当6-BA质量浓度为 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,基部产生大量愈伤组织,叶片多而小,节间明显缩短,分枝较多(图2-C)。随着6-BA质量浓度的不断增加,抑制作用越来越明显。6-BA质量浓度为 $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,叶片少且偏小,有少量愈伤组织;6-BA质量浓度为 $4.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,茎段无明显节间形成,叶片极小,且聚在一起成花状;6-BA质量浓度为 $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,木薯植株生长几乎完全被抑制,基部和顶部出现膨大(图2-D~F)。

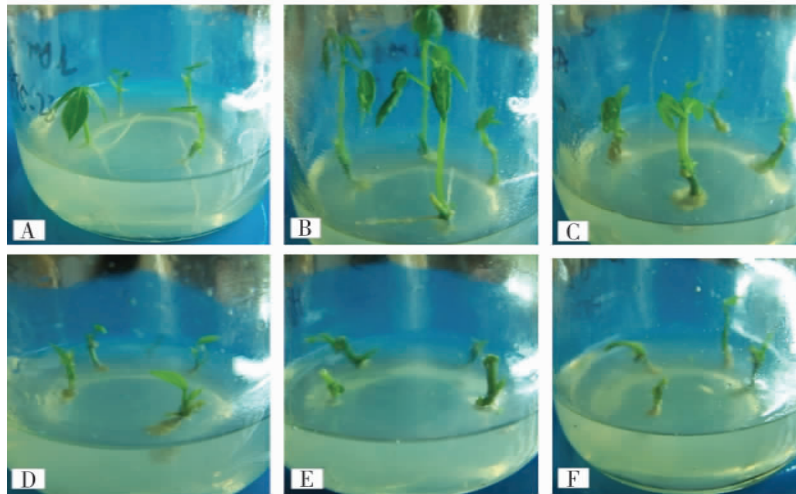


图1 不同质量浓度6-BA处理对木薯单芽茎段的影响(15 d)

A~F分别为 $0, 0.1, 0.5, 1.0, 4.0, 10.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA

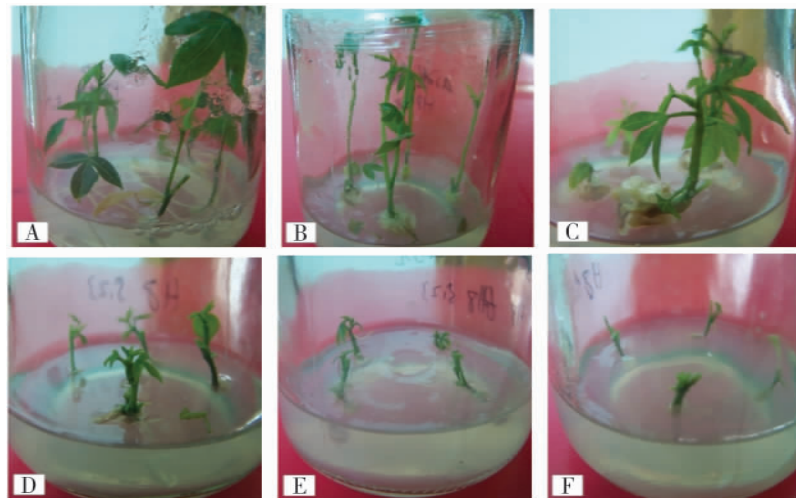


图2 不同质量浓度6-BA处理对木薯单芽茎段的影响(30 d)

A~F分别为 $0, 0.1, 0.5, 1.0, 4.0, 10.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA

2.2 2,4-D和picloram诱导木薯初级体胚及体胚继代的影响 2,4-D和picloram是常用于诱导木薯体胚的2种植物生长调节剂。笔者对2种植物生长调节剂木薯体胚诱导率做了深入研究。膨大后侧芽生长点在 $\text{MS} + 2,4\text{-D } 8\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (或 $\text{MS} + \text{picloram } 12\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)培养基上培养2周后,即可在体视显微镜下观察到体胚的形成(图3-A),此时,体胚呈鱼雷状。将鱼雷形体胚接种到新的 $\text{MS} + 2,4\text{-D } 8\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (或 $\text{MS} + \text{picloram } 12\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)培养基上,随着培养时间的延长,体胚慢慢长大,2周后分化出新的簇状体胚团(图3-B~D)。将簇状体胚分成单个,再接种至新的 $\text{MS} + 2,4\text{-D } 8\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (或 $\text{MS} + \text{picloram } 12\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)培养基上,随着培养时间的延长,体胚继续生长,发育为子叶型体胚,2周后成为簇状子叶型体胚(图3-E~G)。研究结果表明 $8\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的2,4-D或 $12\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的picloram对7个品种木薯的体胚

诱导率都达到了 90% 以上(表 1)。其中,SC6 和 NZ188 2 个品种木薯 Picloram 诱导体胚的诱导率均为 100%,但是在继代培养过程中 SC7 的体胚继代产率很低,并出现褐化逐渐死亡的现象,生活力大大降低,体胚存活率不足 40% 2 种激素表现基本一致(表 2)。其他品种生长正常,并且有相当高的体胚继代产率。

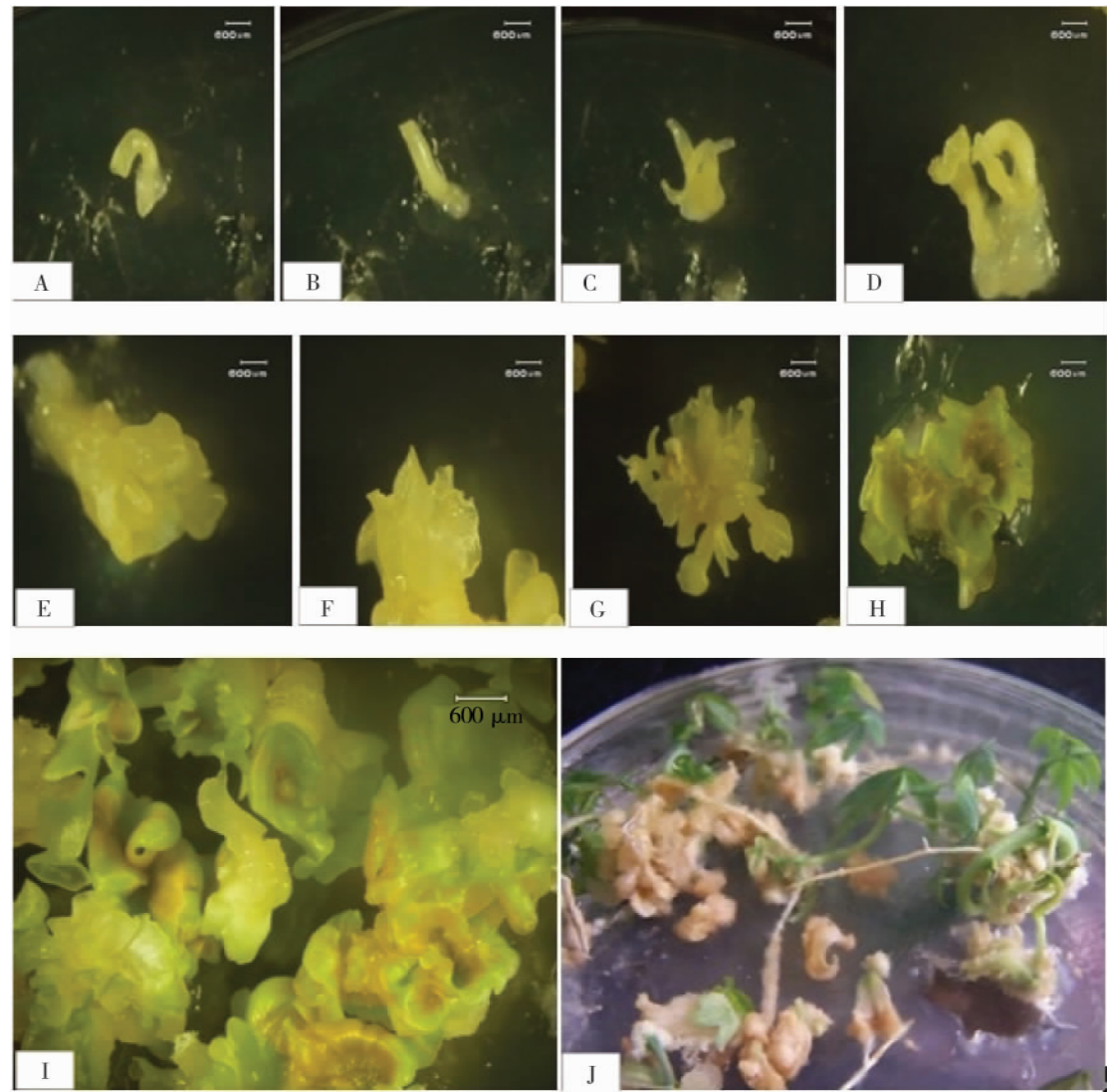


图 3 木薯体胚发育过程及植株再生

A ~ H: 木薯体胚发育过程; I: 簇状的成熟子叶胚; J: 不定芽再生植株

表 1 2,4-D 和 picloram 对木薯初代培养体胚产生的影响

品种	Picloram			2,4-D		
	接种芽数/个	产胚芽数/个	诱导率/%	接种芽数/个	产胚芽数/个	诱导率/%
SC6	120	120	100.0	120	119	99.2
SC7	120	113	94.2	120	107	89.2
SC8	120	117	97.5	120	109	90.8
SC124	120	115	95.8	120	112	93.3
NZ188	120	120	100.0	120	110	91.7
C3	120	117	97.5	120	118	98.3
C4	120	119	99.2	120	109	90.8

表2 2,4-D 和 picloram 对木薯体胚继代培养的影响

品种	Picloram			2,4-D		
	初生胚数/个	次生胚数/个	产率/%	初生胚数/个	次生胚数/个	产率/%
SC6	100	99	99.0	100	96	96.0
SC7	100	32	32.0	100	27	27.0
SC8	100	98	98.0	100	95	95.0
SC124	100	99	99.0	100	96	96.0
NZ188	100	97	97.0	100	99	99.0
C3	100	97	97.0	100	94	94.0
C4	100	100	100.0	100	95	95.0

2.3 体胚子叶成熟时间对木薯子叶器官发生影响 子叶型体胚经过光照成熟培养,得到大量成熟的绿色子叶胚,将其切成小块转接至 $MS + 6 - BA 1\text{ mg} \cdot L^{-1}$ 培养基中进行器官发生培养。分别将成熟 5,10,15,20,25,30 d 的绿色子叶胚切成小块,先暗培养 7 d,再光照培养。光照培养 20 d 后,绿色子叶块体积变大并有部分分化出绿色芽器官。继续培养,芽器官慢慢形成茎叶器官(图 3I~J)。其中,成熟时间 10~15 d 的子叶器官发生频率均在 70% 以上,高于其他培养时间。随着成熟时间的延长,绿色子叶胚老化程度越来越高,颜色越来越重,器官发生频率明显下降,不到 10%(图 4),虽然子叶块继续生长,但却无器官发生,7 个品种器官发生频率曲线趋势相同。因此,木薯体胚子叶成熟最佳时间为 10~15 d。

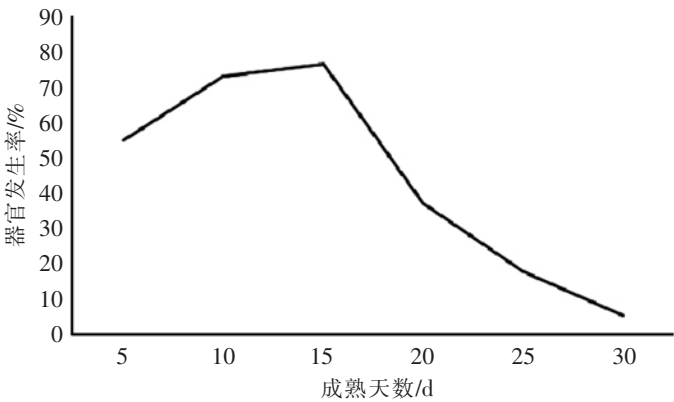


图4 成熟时间对 SC8 木薯成熟子叶胚器官发生能力的影响

2.4 $AgNO_3$ 对成熟子叶胚器官发生的影响 $AgNO_3$ 作为乙烯合成抑制剂,可有效防止植物组织培养过程中乙烯的积累对外植体生长和不定芽分化的影响。在培养基中添加 $AgNO_3$,可以明显促进器官发生、体细胞胚胎形成和完整植株的再生,并且适当浓度 $AgNO_3$ 的加入,可有效地降低非胚性愈伤组织的产生。实验结果表明(表 3),当 $AgNO_3$ 质量浓度为 $5\text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时,除 SC7 外,其他品种不定芽发生率普遍达到最高值;当 $AgNO_3$ 质量浓度为 $10\text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时,虽大部分品种不定芽发生率与 $AgNO_3$ 质量浓度为 $5\text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时近似,但在后期的不定芽成苗过程中生长缓慢,出现钝化现象。所以,本研究证明,木薯器官发生过程中 $AgNO_3$ 的添加质量浓度以 $5\text{ mg} \cdot L^{-1}$ 为宜。

表3 $AgNO_3$ 对不定芽发生率的影响

$AgNO_3 / (mg \cdot L^{-1})$	不定芽产生频率/%						
	SC6	SC7	SC8	SC124	NZ188	C3	C4
0	70.8	70.2	76.7	73.3	75.0	72.5	72.5
2	75.0	71.8	78.3	75.8	77.5	76.7	78.3
5	79.2	72.5	80.8	82.5	84.2	82.5	85.8
10	77.5	79.2	79.2	78.3	75.0	80.8	77.5
15	66.7	69.2	62.5	66.7	68.3	80.8	73.3

2.5 成苗培养及移栽 转接至 MS 培养基中的伸长小芽,在培养 20 d 后,开始生根,长势加快,30 d 后,即可移栽。移栽的成活率取决于小苗移栽时的生长状况,一般粗壮的小苗易于成活。由于移栽后小苗的生长环境发生了明显的改变,所以要注意移栽小苗环境的湿度和温度。移栽后,在花盆上覆盖保鲜膜可以很好地保温保湿,1 周后去掉。多菌灵的使用能有效防止发霉。同时,要注意土壤的透气性。本研究中 SC8 的成活率最高,达到了 85% 以上,其他品种的成活率也达到 70% ~ 80%。

3 讨 论

笔者在准备无菌组培苗过程中发现,不添加任何植物生长调节剂的 MS 培养基,可使木薯单芽茎段迅速成苗,但节间较长,有明显的顶端优势,优点是成苗时间短并且根茎叶发育都正常,可在短时间内得到大量实验材料。6-BA 是组织培养中最常用的细胞分裂素之一,常用于丛生芽诱导。本研究发现 6-BA 可抑制木薯生长过程中的顶端优势,质量浓度越高,抑制效果越明显。接种在添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 培养基上的木薯单芽茎段,30 d 后仍不能看到新芽明显的节间。在未加任何植物生长调节剂的 MS 培养基上的单芽茎段,新芽已经有明显节间,并有完全伸展开的叶片。MS 添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA,可使木薯产生丛生芽,并且明显粗于未加激素的木薯新芽,将此丛生芽切下,转接到添加到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下质量浓度 6-BA 的 MS 培养基上,可使木薯成苗,并且通过此法得到的组培苗明显比 MS 直接得来的组培苗粗壮,节间适中,有利于后续实验的进行。但此过程多了一个丛生芽诱导的过程,所以时间周期较长。因此,此法适合短期内不需使用材料,但后期需要大量材料的情况下使用。

有研究表明,生长素的种类和浓度是诱导木薯体胚发生的最重要因素^[4]。2,4-D 和 picloram 被应用于木薯体细胞胚的诱导中,前人研究结果表明 $6 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 和 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 picloram 是木薯体细胞胚诱导的最适浓度^[5-7]。本实验研究证明,对于大多数木薯品种 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 和 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 picloram 诱导胚状体发生效果最佳。由于基因型不同,品种间体胚诱导率和继代产胚率存在差异^[8-9]。对我国 7 个主要木薯栽培品种的研究表明,体胚发生和器官发生对基因型的依赖性明显,体胚成熟后植株再生能力取决于基因型和体胚生长的质量,器官发生能力最高的是 SC8, NZ188 次之, SC7 最低。

一般认为, AgNO_3 促进植物器官发生的机制是外植体受创伤后在伤口位置会产生大量的乙烯来自我保护,乙烯抑制细胞分化,而 Ag^+ 是一种较好的乙烯抑制剂,通过竞争性结合细胞膜上的乙烯受体蛋白,从而达到抑制乙烯产生的作用,缓解乙烯对细胞分化的抑制作用^[10]。虽然高浓度 AgNO_3 的加入,有助于抑制非胚性愈伤组织的产生,但当质量浓度高于 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,器官发生频率并未随之升高,不定芽后期成苗过程反而表现出钝化现象。这可能是由于高浓度的 AgNO_3 对植物本身产生的胁迫作用,从而细胞分化受到抑制。由此可见,适当浓度 AgNO_3 的加入对木薯器官发生具有十分明显的积极作用。

在本研究中,木薯在相应的条件下虽然可得到较高的再生率,但在后期的转化工作中由于农杆菌侵染对木薯本身的伤害,加上抗生素对木薯生长的抑制,转化效率还是很低。所以,针对不同的品种结合转化过程,建立相应行之有效的再生体系还需进一步的优化研究。

参考文献:

- [1] COCK J H. Cassava: a basic energy source in the tropics [J]. Science, 1982, 218: 755 - 762.
- [2] 张鹏. 木薯燃料乙醇产业化在种质资源上面临的机遇与挑战 [G]. 中国科学院生命科学与生物技术局. 2008 工业生物技术发展报告. 北京: 科学出版社, 2008: 66 - 73.
- [3] 赵珊珊, 李海霞. 我国主要栽培木薯品种体细胞胚胎发生与芽器官发生的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(1): 37 - 44.
- [4] 马国华, 许秋生, 姜蕴兰. 几种生长素对木薯体细胞胚发生和植株再生的作用 [J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7(1): 75 - 80.
- [5] 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.

- [6] MATHEWS H ,SCHOPKE C ,CERCAMO R. Improvement of sommic embryogenesis and plant recovery in cassava [J]. Plant Cell Rep ,1993(12) : 328 – 333.
- [7] 马国华 ,许秋生 ,蒺蕴兰. 从木薯嫩叶直接诱导初生体细胞胚胎发生和芽的形成[J]. 植物学报 ,1998 ,40(6) : 503 – 507.
- [8] 李洪清 ,梁承邺 ,黄毓文 ,等. 影响木薯次生体细胞胚发生及植株再生因素的研究[J]. 广西植物 ,1999 ,19(3) : 246 – 250.
- [9] HANKOUA B B ,NG B Y S ,FAWOLE I et al. Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants [J]. Plant Cell Tisscult , 2005 ,82: 221 – 231.
- [10] FERNANDEZ S ,MICHAUX-FERRIERE N ,COUMANS M. The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat(*Triticum durum* Des.) : histology and improvement by AgNO_3 [J]. Plant Growth Regulation ,1999 ,28(3) : 147 – 155.

Studies on Influencing Factors of Cassava Regeneration System

GUO Jun-hui^{1,2} , ZHANG Jian^{1,2} , CHEN Xiong-ting² , WANG Yin² , WU Kun-xin² ,
NI Yan-yan^{1,2} , HUANG Qin^{1,2}

(1. College of Agriculture , Hainan University , Haikou 570228 , China;

2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , Haikou 571101 , China)

Abstract: In this report , Varieties of SC6 , SC7 , SC8 , SC124 , NZ188 , C3 and C4 were used as experimental materials , several significant factors which influence the regeneration system of cassava were studied. The results indicated that 6 – BA had a significant inhibitory effect on apical dominance of cassava , the higher the concentration was , the stronger the inhibition effects was; 2 , 4 – D and picloram had almost equal effects for promoting somatic embryogenesis , in the process of induction of primary somatic embryos , embryogenesis rate of all breeds reached 100% , except SC7 remained a low embryogenesis rate of secondary somatic embryos , embryogenesis rate of secondary somatic embryos of other varieties went up to 90% ; the ripening time of somatic embryos had a great influence on the organogenesis of cotyledon , frequency of cotyledon organogenesis was higher around 2 weeks after embryo maturation and the induction frequency could be more than 70% ; the somatic embryogenesis ratio and cotyledon organogenesis frequencies were very different among distinct genotypes , SC8 and NZ188 cultivar had the highest and second-highest frequency respectively , SC7 cultivar displayed the lowest frequency; The addition of AgNO_3 ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) into subculture could help improving the organogenesis capacity of mature cotyledonary.

Key words: cassava; somatic embryogenesis; regeneration system; subculture; genotype