

文章编号: 1674-7054(2013)01-0088-06

光裸方格星虫人工繁殖及苗种培育技术

刘天密¹, 冯全英¹, 杨明秋¹, 符一凡¹, 吴鹏飞²

(1 海南省水产研究所, 海南 海口 570206; 2 海口南吉水产开发有限公司, 海南 海口 570206)

摘要: 对光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*) 亲虫培育习性进行观察、人工催产及育苗研究。结果表明, 光裸方格星虫在自然海区分布的雌雄比例约为 1:1.1; 其亲虫在中细沙质(粒径 0.1~2.0 mm) 底质环境下培育的成活率最高; 采用阴干刺激 3 h + 流水刺激 + 精液诱导相结合的诱导方法进行催产, 催产效果最佳; 胚胎发育在 26.5~31.5 °C 的范围时, 随着温度的升高, 受精卵孵化出初期海球幼虫所需的时间逐渐变短。人工育苗试验共获得光裸方格星虫苗 15.2 万条, 平均体长 2.8 cm。

关键词: 光裸方格星虫; 亲虫培育; 人工催产; 胚胎发育; 苗种培育

中图分类号: S 966.9

文献标志码: A

光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*) 俗称沙虫, 属星虫动物门、方格星虫纲、方格星虫科、方格星虫属, 为世界广泛分布的种类^[1], 我国的山东、福建、广东、广西及海南等省区均有分布, 其中以北部湾沿海资源量较大。光裸方格星虫体型呈长筒形, 形状略似蚯蚓, 体长一般在 10~25 cm, 雌雄异体, 栖息于沿海沙质滩涂的中、低潮区及潮下带。其肉质脆嫩, 味道鲜美, 营养丰富, 富含蛋白质、脂肪和钙、磷、铁等多种营养成分, 是海产珍品之一, 其鲜品及干品都十分畅销^[2]。此外, 该虫还具有较高的药用功效和食疗价值, 为老少皆宜的营养滋补和食疗佳品, 深受广大消费者的青睐。国外学者对光裸方格星虫繁殖生物学的研究较早且做了不少工作, 主要进行了性腺发育、胚胎及早期幼虫发育的组织学、形态学等方面的研究^[3-8]。近年来, 我国学者也对光裸方格星虫开展了生殖周期、生殖细胞、胚胎发育、繁殖习性及其人工育苗等方面的研究^[2, 9-14]。2012 年, 在海南省科学事业费支持下, 笔者开展了光裸方格星虫人工繁殖及苗种培育技术方面的研究, 并取得了一定的效果, 为下一步开展规模化人工育苗及产业化养殖提供了科学依据。

1 材料与方

1.1 地点和设施条件 试验地点为海南省水产研究所琼海科研基地。设施条件: 亲虫培育池 6 口, 规格为 10 m × 1 m × 1.2 m (长 × 宽 × 深), 上方用帆布遮盖, 防雨防晒, 四周用黑布遮光, 可调节光照强度; 室内育苗池为 4 口, 规格为 9 m × 5 m × 1.2 m (长 × 宽 × 深)。池内设有充气石, 培育时不间断地充气。配有单胞藻饵料培养池 4 口, 规格为 10 m × 1 m × 1.2 m (长 × 宽 × 深), 二级单胞藻饵料培养桶为 200 L 白色塑料桶 40 个。

1.2 亲虫的来源与营养强化

1.2.1 亲虫的来源 分别于 2012-04-20, 2012-06-18, 2012-08-20, 在海南省儋州市光村镇附近的滩涂采集光裸方格星虫亲虫 30, 40, 50 kg。每批次采集回来的亲虫, 先挑选 100 条进行解剖观察其雌雄的数量, 再进行消毒处理; 选择健康的亲虫进行营养强化。亲体大小规格为 6~20 g · 条⁻¹, 星虫亲体的健康状况以其潜沙穴居能力的强弱作为判断依据。

收稿日期: 2012-12-13

基金项目: 海南省科学事业费项目(10-20410-005, 11-20410-0012)

作者简介: 刘天密(1973-) 男, 海南琼海人, 海南省水产研究所高级工程师。

1.2.2 亲虫的强化培育 亲虫的营养强化培育于室外水泥池内进行,池底铺沙,沙粒径为0.1~2.0 mm,沙层厚度为5~10 cm,不间断充气,每日换水量约200%。亲虫培育饵料为底栖硅藻、螺旋藻粉和鳗鱼粉,采用与沙粒混合按1:1比例进行投喂,每天投喂3次(分别为上午、下午和晚上)。亲虫培育期间海水密度为1.019~1.020,温度为26~32℃,pH值为7.8~8.2。

在亲虫培育期间,笔者还进行了4组不同底质条件对亲虫暂养效果的比较,即采用中细沙、泥质沙、沙质泥及不铺底质,每组各200条实验亲虫,培育水温为29.0~31.0℃。

1.3 亲虫的人工催产 亲虫经过30 d的促熟培育,便可观察到其性腺发育的成熟情况,依性腺发育的成熟情况及时进行人工催产。

1.3.1 亲虫催产方法 ①阴干刺激:将亲虫放置于阴凉的地方阴干6~8 h进行刺激。②温度刺激:将亲虫放置于阳光下暴晒5~10 min,再置于阴凉的地方,连续2~3次。③流水刺激:利用产卵池进水阀门和排水阀门,用水泵横向向进水处池壁冲水,使水流均匀地流过产卵床,对亲虫进行流水刺激。④精液诱导:解剖数个已经达到成熟的雄性亲虫,取其精液加入催产池中,以诱导待排放的雌性亲虫。

1.3.2 亲虫不同催产方法的比较 设计4个实验组,每组随机挑选20条经过营养强化培育、大小无显著差异的亲虫,经洗刷,用5~10 mg·L⁻¹ KMnO₄浸泡10 min后冲洗干净,在产卵池里诱导排放。产卵完毕,移出亲虫,经1~2次洗卵后进行常规孵化。记录亲虫开始排放时间,比较排放率和受精率。

4个实验组分别为I组:阴干刺激6 h; II组:阴干刺激4 h + 流水刺激; III组:阴干刺激3 h + 流水刺激 + 精液诱导; IV组:阴干刺激3 h + 温度刺激0.5 h + 流水刺激 + 精液诱导。

1.4 受精卵的孵化与幼虫的收集 催产30 min后,亲虫开始有产卵排精现象,此时应注意控制亲虫的排放数量,及时移至另一个孵化桶或孵化池,避免密度过大而影响幼虫孵化率。受精结束后约1 h,开始反复洗卵2~3次,清除多余的精子、死卵及黏液等杂质。在28.5~29.5℃的水温条件下,经过约38 h的孵化发育,形成初期海球幼虫,密集在水表面,采用捞网或虹吸法进行收集,将浮于中上层水体、健壮的幼虫移入室内育苗池进行培育。

1.5 幼虫培育 光裸方格星虫苗种培育过程分为浮游期和附着期2个培育阶段。

1.5.1 浮游期幼虫培育 浮游幼虫密度控制在0.1~0.2个·mL⁻¹。初期海球幼虫开口后投喂适口单胞藻类(小球藻、扁藻等)4~5 d后适当投喂配合饲料,10 d后可添加底栖硅藻。方格星虫幼虫浮游期的培育均采用饱食投喂,投喂量以消化道呈饱满状态为止,并根据幼虫的摄食和生长逐渐增加。培育水温为28.5~29.5℃,海水密度为1.020。每天视水质的情况控制换水量,一般换水1~2次,换水量50%~100%。

1.5.2 附着期幼虫培育 在水温28.5~29.5℃的条件下,经过9~13 d幼虫发育为后期海球幼虫(体长750 μm以上),幼虫即将附着,此时应疏养即将幼虫转移到底部铺有1~2 cm厚细沙的培育池中,密度控制在(2~4)×10⁴个·m⁻²。疏养饵料以底栖硅藻和配合饲料为主。附着期培育水温为28~32℃,培育初期只添水不换水,待幼虫完全变态为附着稚虫,再改用微流水培养,日流量为育苗水体的50%~100%。

1.6 稚虫的中间培育 当稚虫自然体长达到0.5 cm,便可分开置于水泥池中进行中间培育,池底铺中细沙,厚度约为3~5 cm。稚虫投放密度为500条·m⁻²,饵料投喂鳗鱼粉、藻粉、硅藻及单胞藻层积物等,每天投喂2次,投饵时停止充气约1 h。采用流水培育,日流量为总水体的200%~300%。

1.7 单胞藻饵料培养 用200 L白色塑料桶进行二级培养,用10 m³的水泥池进行生产性培养,分别培养出扁藻、小球藻、盐藻,当单胞藻的密度达到50万个·mL⁻¹时,可用于浮游幼虫的投喂。

底栖硅藻则先用塑料薄膜置于水泥池中进行接种培育,加入营养液,培育4~6 d即可采集,用于变态幼虫期投喂。

1.8 水质调控 亲虫培育和人工育苗使用的海水为经沉淀池沉淀、粗沙层过滤、细沙层过滤,进入室内蓄水池再沉淀后的海水。亲虫培育时,通过换水调控水质,在水质良好的前提下可以少换水;水质不佳和水温较高时可多换水。换水前需注意观察水质情况,如测量池内外的水温及水源盐度等。定期投入有益

微生物、氨基酸活藻素及营养源等水质调节剂,维持良好水质。幼虫培育时,可根据水质的变化,换水量逐渐加大,特别是到了后期可适当加入有益微生物来稳定水质环境。

2 结果

2.1 光裸方格星虫的习性观察

2.1.1 光裸方格星虫的雌雄自然比例 从3批次采集回来的亲本中各随机挑选100条进行解剖,观察其雌雄数量,分别为雌46条和雄54条、雌51条和雄49条、雌48条和雄52条,雌雄比例分别为1:1.17, 1:1.04, 1:1.08。由此可推断出,在自然海区星虫分布的雌雄比例约为1:1.1。

2.1.2 不同底质条件对光裸方格星虫暂养效果的影响 光裸方格星虫喜潜入底质洞居生活,摄食时吻端伸出,以触手激水并捕食底栖硅藻及有机碎屑等沉积物,因此星虫对栖息底质有选择性。通过不同底质条件对星虫暂养效果的比较(见表1),光裸方格星虫亲体暂养在中细沙质(粒径0.1~2.0 mm)底质的成活率最高,其次为泥质沙、沙质泥,不铺底质条件下只维持1 d就全部死亡。这说明中细沙底质是暂养星虫较适宜的栖息底质,这与沙底质环境有较大的透气性及星虫喜潜底掘洞的生活习性有关。

表1 不同底质条件对亲虫暂养效果的影响

Tab. 1 The effect of different sediment conditions on the temporary culture of *Sipunculus nudus*

底质 Sediment condition	亲本数量/个 Number of parents	培育水温/°C Water temperature	时间/d Time	成活率/% Survival rate
中细沙 Medium to fine sand	200	29.0 ~ 31.0	5	92.36
泥质沙 Shaly sand	200	29.0 ~ 31.0	5	70.42
沙质泥 Sandy clay	200	29.0 ~ 31.0	5	53.08
不铺底质 None	200	29.0 ~ 31.0	1	0

2.2 光裸方格星虫亲本不同催产方法的比较 从表2可见,在4个实验组中,随着诱导步骤的增加及刺激强度的加强,亲虫从诱导到开始排放精卵所需的时间越短,排放率越高,受精率却降低,幼虫畸形率提高。分析其原因可为: I和II组采取阴干刺激、流水刺激,只有性腺达到排放期的亲虫才排放,其排放速度较迟,排放率也较低,但其排放的精卵成熟度好,受精率较高,幼虫畸形率也较低;而III组增加了精液诱导,IV组在III组的基础上增加了温度刺激,未达到成熟期的亲虫也排放精卵,虽排放率较高,但排放的精卵部分成熟度较差,因此造成受精率较低和幼虫畸形率提高。表2的结果表明,采用阴干刺激3 h + 流水刺激 + 精液诱导相结合的诱导方法效果最佳。

表2 不同催产方法下亲虫的排放率、受精率及幼虫畸形率

Tab. 2 The effect of inducing methods on spawning rate, fertilization rate and larval abnormality of *S. nudus*

实验组 Experimental group	开始排放时间/min The time required for ovulation	排放率/% Spawning rate	受精率/% Fertilization rate	幼虫畸形率/% Larval abnormality
I组	240	30.33	99.74	1.02
II组	156	43.50	98.37	1.33
III组	53	51.20	95.08	3.85
IV组	32	88.43	72.64	15.24

2.3 精卵排放及胚胎发育观察 通过人工催产后,亲虫开始排放精卵,刚产出的卵子呈圆形,滤泡膜、胶质膜及胚泡等均已消失,因卵黄较浓密而使整个卵呈深褐色或黄褐色,卵黄膜较清晰,卵径在160~175 μm;精子呈蝌蚪状,由一块膨大的头部和一段细长的尾鞭组成。

受精卵经过细胞分裂后进入多细胞期和囊胚期,此时,胚体周边丛生短纤毛,胚顶长出数根较长的鞭毛。由于纤毛在不停摆动,胚体便开始做缓慢的自转运动。发育至原肠胚期时,随着胚体的进一步发育,其自转运动也在逐渐地加快。发育至担轮幼虫时,仍在卵膜内发育,形状呈圆形,体表周生纤毛,具有顶端毛束,具有眼点 1 对,依靠发达顶端鞭毛和周边丛生纤毛的摆动而作螺旋曲线运动,且具有趋光性。光裸方格星虫担轮幼虫时期的摄食器官与消化道尚未完全形成,其营养方式为卵黄营养型。

由表 3 可得出,温度范围在 26.5 ~ 31.5 °C 时,随着温度的升高,受精卵发育至初期海球幼体所需的时间逐渐缩短。

表 3 不同温度下光裸方格星虫胚胎发育所需时间

Tab. 3 The time for embryonic development of *S. nudus* under different ambient temperatures

水温/°C Water temperature	发育阶段/发育所用时间 Stages of development/ The time required for development								
	受精卵 Fertilized egg	2 细胞 Two cells division	4 细胞 Four cells division	8 细胞 Eight cells division	16 细胞 Sixteen cells division	多细胞 Multi-cells division	原肠胚 Gastrulation	担轮幼虫 Trochophore stage	初期海球幼虫 Initial hatched larvae
26.5 ~ 27.5	0 h 00 min	1 h 30 min	1 h 55 min	2 h 15 min	2 h 40 min	3 h 23 min	4 h 05 min	5 h 20 min	40 ~ 48 h
28.5 ~ 29.5	0 h 00 min	1 h 10 min	1 h 22 min	1 h 35 min	2 h 12 min	2 h 45 min	3 h 35 min	4 h 36 min	36 ~ 40 h
30.5 ~ 31.5	0 h 00 min	0 h 48 min	1 h 00 min	1 h 10 min	1 h 22 min	1 h 50 min	2 h 38 min	3 h 30 min	30 ~ 35 h

2.4 苗种培育情况 光裸方格星虫受精卵在水温 28.5 ~ 29.5 °C (见表 3),海水密度在 1.020, pH 值为 7.8 ~ 8.2 的条件下,经 36 ~ 40 h 即可孵化出初期海球幼虫(见表 3)。刚孵出的初期海球幼虫,趋光性强,主要靠纤毛在水体中浮游生活,自然伸直时体长为 245 ~ 285 μm。初期海球幼虫饵料以单胞藻投喂为主。初期海球幼虫经过 3 ~ 5 d 的生长发育,进入后期海球幼虫阶段,体长达到 435 ~ 470 μm,后期海球幼虫游泳能力及趋光性均相应的减弱,此时投喂单胞藻的同时,适当添加少量底栖硅藻作为辅助饵料,这有利于提高浮游幼虫的培育成活率。进入附着变态期(由浮游生活转变为底栖生活的稚虫),由于稚虫具有钻沙行为,此时以底栖硅藻的投喂为主,浮游单胞藻投喂为辅,这有利于幼虫能顺利地进行饵料的更换,提高幼虫的变态率。变态后的稚虫经过约 30 d 的水泥池中间培育,自然体长均可达到 1 cm 以上。

2.5 育苗效果 2012 年,共开展 3 批次亲虫营养强化及催产试验,获得了一定数量的初期海球幼虫。在水温为 28.5 ~ 29.5 °C,海水密度为 1.020, pH 值为 7.8 ~ 8.2 的条件下,初期海球幼虫经过约 10 d 时间的培育,由浮游生活的海球幼虫变态为底栖生活的稚虫,稚虫再经过约 30 d 的培育,大多数光裸方格星虫苗的体长均达 1.0 cm 以上。到 11 月 23 日共收获平均体长 2.8 cm 的光裸方格星虫苗 15.2 万条。

3 讨 论

3.1 光裸方格星虫的雌雄自然比例 由解剖结果得出,3 批次亲本的雌雄比例分别为 1 : 1.17, 1 : 1.04, 1 : 1.08, 因此可推断出光裸方格星虫在自然海区分布的雌雄比例约为 1 : 1.1。这与李进寿等^[2]人对光裸方格星虫自然雌雄比例的研究是一致的。

3.2 不同底质条件对光裸方格星虫暂养效果的影响 不同底质条件对星虫暂养效果的比较结果为:光裸方格星虫亲体暂养在中细沙底质成活率最高,其次为泥质沙、沙质泥,不铺底质的效果最差,只维持 1 d 就全部死亡。这说明中细沙底质是暂养光裸方格星虫较适宜的栖息底质,这与光裸方格星虫喜于潜入底质洞居生活、对栖息底质环境具有选择性和沙底质环境有较大的透气性有关。这与李进寿^[2]等人研究光裸方格星虫对培育池底质类型适应性的结果是一致的。

3.3 不同催产方法的效果 光裸方格星虫同其他星虫种类一样,利用阴干刺激、温度刺激、紫外线刺激、流水刺激、化学药物刺激、异性产物(精液或卵子)刺激等催产方法,均对成熟亲本有不同程度的刺激作

用。一般情况下,多种方法结合诱导比单一方法的效果更好。但催产方法只是对亲本外部的刺激作用,最基础、最主要的还在于亲本自身的营养强化程度和性腺成熟度,没有发育成熟的性腺,再复杂的催产方法也很难取得较好的效果。

本试验利用经过营养强化、性腺发育成熟的光裸方格星虫进行几种催产方法的比较结果表明,随着催产步骤的增加及刺激强度的加强,亲虫从催产到开始排放精卵所需的时间越短,排放率越高,受精率则降低,幼虫畸形率提高。几种方法中以阴干刺激 3 h + 流水刺激 + 精液诱导相结合的诱导方法效果最佳。

3.4 注重单胞藻饵料的培育及饵料的更换 单胞藻培育的成败是苗种培育的关键,充足的饵料是幼虫能够正常生长发育的基础,幼虫发育的每一个阶段都需要有适当的充足的饵料,否则,会出现幼虫发育迟缓甚至造成育苗的失败。笔者在进行第一批人工育苗试验时,初期海球幼虫发育至第 9 天时,出现突发性的沉底现象,幼虫全部死亡,究其原因,是实验时正值阴雨天气,培养的单胞藻活饵料生长欠佳,藻细胞密度较低和当时后期海球幼虫的发育即将进入变态阶段(即发育为稚虫)所致。此时期幼虫摄食量开始加大,而且需要补充适量的底栖硅藻等过度饵料,由于饵料供应上的不充足,使幼虫不能够吸收足量的养分,不能顺利变态而最终死亡。

3.5 育苗水质的调控 良好的水质是育苗成功的保障,良好的水质环境会加速幼虫的摄食和营养物质的消化吸收,有利于提高幼虫发育的质量。为此笔者建议,定期投入适量的有益微生物以稳定和净化水体;补水时,注意防止其他浮游动物和敌害生物的进入,以免影响幼虫正常的摄食和生长。

参考文献:

- [1] 李凤鲁,孔庆兰,史贵田,等. 中国沿海方格星虫属(星虫动物门)的研究[J]. 青岛海洋大学学报,1990,20(1): 93-99.
- [2] 李进寿,冯丹青,周时强,等. 光裸方格星虫(*Sipunculus nudus*)人工繁殖及生物学的初步研究[J]. 杭州师范学院学报:自然科学版,2004,2(3): 136-139.
- [3] GONSE P. Lovogenese chez *Phascolosoma vulgare* I. Definition cytologique des stades de croissance des ovoocytes[J]. Acta-Zool,1956,37: 193-224.
- [4] GONSE P. Lovogenese chez *Phascolosoma vulgare* II. Recherches biometriques sur les ovoocytes[J]. ActaZool,1956,37: 225-233.
- [5] SAWADA N, NADA Y, OCHI O. An electron microscope study on the oogenesis of *Golfngia ikedai*[J]. Mem Ehime Univ Sci,1968, B6(1): 25-39.
- [6] RICE M E. Observations on the development of six species of Caribbean *Sipuncula* with a review of development in the phylum [C] // RICE M E, TODOROVIC M. Proceedings of the international symposium on the biology of *Sipuncula* and *Echiura*. Belgrade: Nancno Delo Press,1975: 141-160.
- [7] RICE M E. *Sipuncula*[C] // GIESE A C, PEARSE J S. Reproduction of marine invertebrates. New York: Academic Press,1975: 67-127.
- [8] GREEN W. The annual reproductive cycle of *Phascolosoma lurco* (*Sipuncula*) [C] // RICE M E, TODOROVIE M. Proc Intern Symp Biol *Sipuncula* and *Echiura*. Belgrade: Naucno Delo Press,1975: 161-168.
- [9] 吴斌. 光裸方格星虫(*Sipunculus nudus* L.)生殖细胞及胚胎发育[J]. 广西科学,1999,6(3): 222-226.
- [10] 蒋艳,蔡德建,邹杰,等. 方格星虫苗种池塘中间培育试验研究[J]. 广西科学,2010,17(2): 175-177.
- [11] 兰国宝,阎冰. 方格星虫繁殖生物学研究[J]. 水产学报,2002,26(6): 503-509.
- [12] 兰国宝,阎冰,廖思明. 方格星虫胚胎与幼体发育的研究[J]. 热带海洋学报,2003,22(6): 70-75.
- [13] 林向阳,李雷斌,宁岳,等. 裸体方格星虫规模化人工育苗技术研究[J]. 福建水产,2012,34(1): 61-65.
- [14] 彭慧婧,杨家林,邹杰,等. 光裸方格星虫繁殖习性的初步观察[J]. 海洋渔业,2012,34(2): 231-234.

Artificial Propagation and Seed Breeding Technology of *Sipunculus nudus*

LIU Tianmin¹, FENG Quanying¹, YANG Mingqiu¹, FU Yifan¹, WU Pengfei²

(1. Hainan Fisheries Institute, Haikou 570206, China; 2. Haikou Nanji Fisheries Development Co., Ltd., Haikou 570206, China)

Abstract: Observation on the maternal culture, artificial spawning and breeding of marine worm *Sipunculus nudus* were conducted. The marine worm was distributed in the natural sea waters at the ratio of the male to female of about 1 : 1.1, and the survival rate of the maternal marine worms was the highest when cultured in fine sand (0.1—2.0 mm). Maternal marine worms spawned best when forced by a combined spawning method (drying in the air for 3 hours + running water stimulating + semen inducing) as compared with other different artificial spawning methods. When the temperature for embryonic development fell in the range of 26.5 °C to 31.5 °C, the initial time for larvae to hatch from the fertilized eggs was reduced as the temperature increased. Our artificial breeding tests had produced a total of 152 000 marine worms with an average body size of 2.8 cm long.

Key words: *Sipunculus nudus*; maternal culture; artificial spawning; embryonic development; fry rearing

(上接第 87 页)

Optimization of Major Factors Influencing Cassava Organogenesis

HUANG Qin^{1,2}, WANG Yin², WU Kunxin², WANG Wenquan²,

ZHAO Yiluan^{1,2}, JIA Xian^{1,2}, CHEN Xiongting²

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Factors (genotypes, sucrose, IBA and AgNO₃) affecting organogenesis of 4 cassava cultivars (NZ188, SC8, C3 and C4) were analyzed and optimized for genetic improvement. The results showed significant differences in somatic embryogenesis and organogenesis among the genotypes tested. Axillary buds of the cultivars NZ188, SC8 and C3 swelled in the dark condition and their primary somatic embryos had an inducing frequency of more than 80%, while C4 grew better in the light condition. Somatic embryogenesis and mature somatic embryos were induced best on the medium containing 25—30 g · L⁻¹ sucrose. The inducing frequency of adventitious shoots and the shoot regeneration rate were improved significantly on the shoot organogenesis medium at the presence of 4 mg · L⁻¹ AgNO₃ and 0.3 mg · L⁻¹ IBA.

Key words: *Manihot esculenta* Crantz; somatic embryogenesis; shoot organogenesis; genotype