

KHẢO SÁT SỰ PHÁT SINH PHÔI THỂ HỆ Ở KHOAI MÌ (*Manihot esculenta* Crantz)

Vũ Văn Kiên, Nguyễn Du Sanh

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 23 tháng 09 năm 2011)

TÓM TẮT: Phôi thể hệ ở khoai mì dòng KM297 từ khúc cắt thùy lá non *in vitro* hay khúc cắt lá mầm phôi thể hệ được cảm ứng trên môi trường MS bổ sung picloram 8mg/l, sau 13 ngày nuôi cấy trong tối. Các giai đoạn phát triển phôi được ghi nhận sau 10 ngày nuôi cấy ở ngoài sáng trên môi trường MS bổ sung BA 0,1mg/l và NAA 0,01mg/l. Hoạt tính AIA và Zeatin nội sinh của giai đoạn phôi hình cầu đã được phân tích.

Từ khóa: khoai mì, *Manihot esculenta*, phôi thể hệ, picloram.

Chữ viết tắt: 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, BA: benzyladenine, CDHTTTV: chất điều hòa tăng trưởng thực vật, MS: Murashige và Skoog, 1962, MT: môi trường, NAA: naphthalene acetic acid, picloram: 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid.

MỞ ĐẦU

Khoai mì cung cấp củ như một nguồn lương thực quan trọng cho cư dân các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, đặc biệt là ở châu Phi. Hiện nay ở Việt Nam, khoai mì đang trong quá trình chuyển đổi nhanh chóng từ cây lương thực truyền thống thành cây công nghiệp [3].

Việc cải tiến các giống hiện có cho mục đích tăng năng suất, tăng hàm lượng protein và giảm acid cyanhydric là vấn đề đang được quan tâm trên toàn thế giới. Điều kiện quan trọng cho quy trình cải tiến giống thông qua các kỹ thuật hiện đại như chuyển gen, dung hợp tế bào, đột biến lý học cần một hệ thống tái sinh cây hoàn chỉnh [11].

Trong những năm gần đây, bộ môn Sinh lý Thực vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên thành phố Hồ Chí Minh đã tiến hành một số nghiên cứu trên cây khoai mì như: ghép giữa

mì cao su và khoai mì, tạo mô sẹo và dịch treo tế bào, phát sinh chồi, phát sinh hình thái phôi thể hệ từ mô sẹo có nguồn gốc lá khoai mì dòng Cuồng Trầu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục khảo sát các biến đổi hình thái, sinh lý trong quá trình phát sinh phôi thể hệ trên đối tượng KM297 và tiến hành các thí nghiệm bước đầu nhằm nâng cao hệ số phát sinh phôi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây khoai mì (*Manihot esculenta* Crantz), dòng KM297 được trồng tại vườn thực nghiệm, bộ môn Sinh lý Thực vật, trường Đại học Khoa Học Tự nhiên thành phố Hồ Chí Minh, cơ sở phường Linh Trung, quận Thủ Đức. Khúc cắt đốt thân mang một chồi ngủ được đưa vào *in vitro* sau khi khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 1,5% trong 20 phút. Cây được giữ trong *in*

in vitro bằng phương pháp cấy chuyển chồi ngọn và chồi ngủ trên môi trường MS cơ bản, sucrose 20g/l. Thụ thể lá trên phiến lá non (dài từ 3- 8mm) của cây *in vitro* được cắt vuông góc với gân chính thành các mảnh cách nhau 2mm và đặt ngửa trên MT nuôi cấy.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường MS bổ sung thêm sucrose 20g/l, CuSO₄ 0,3 mg/l, agar 6g/l, bổ sung các CĐHTTTV (2,4-D, BA, NAA, picloram) theo các thí nghiệm khác nhau, pH được chỉnh ở $5,7 \pm 0,1$. Môi trường được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C và áp suất 1 atm trong thời gian 18 phút.

Điều kiện nuôi cấy: các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm bộ môn Sinh lý Thực vật, cơ sở phường Linh Trung, quận Thủ Đức; quang kỳ 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2500 ± 500 lux, nhiệt độ $27 \pm 3^\circ\text{C}$, độ ẩm $75 \pm 10\%$. 6 mẫu cây được đặt trong erlen 50ml có chứa 15ml môi trường cảm ứng. Các mẫu cấy sau đó được chuyển sang erlen 100ml chứa 30ml môi trường cho sự phát triển của phôi.

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Khảo sát loại, nồng độ auxin lên hiệu quả cảm ứng phát sinh phôi từ vật liệu khúc cắt thùy lá non *in vitro*

Khúc cắt thùy lá non được đặt trên các môi trường cảm ứng khác nhau, là môi trường MS bổ sung 2,4-D (2, 4, 8) mg/l hoặc picloram (2, 4, 8) mg/l trong tối 21 ngày. Sau đó, mẫu cấy được chuyển sang môi trường MS cơ bản, đặt ngoài sáng.

Thí nghiệm 2: Khảo sát thời gian cảm ứng lên hiệu quả phát sinh phôi

Khúc cắt thùy lá non được đặt cảm ứng trên môi trường MS bổ sung picloram 8mg/l sau 6, 10, 13, 21 ngày rồi lần lượt chuyển mẫu cấy sang môi trường MS bổ sung NAA 1mg/l trong tối cho đủ 21 ngày. Sau đó, tất cả các mẫu cấy ở các nghiệm thức khác nhau được chuyển sang môi trường MS bổ sung BA 0,1mg/l + NAA 0,01mg/l.

Thí nghiệm 3: Khảo sát môi trường thích hợp cho sự phát triển của phôi

Khúc cắt thùy lá non được đặt cảm ứng trên môi trường MS bổ sung picloram 8mg/l trong tối sau 21 ngày. Sau đó, mẫu cấy được chuyển sang các môi trường khác nhau gồm môi trường MS cơ bản (đối chứng) và MS bổ sung BA (0,1; 0,5; 1) mg/l + NAA 0,01mg/l, đặt ngoài sáng theo dõi sự phát triển của phôi.

Thí nghiệm 4: Khảo sát loại, nồng độ auxin lên hiệu quả cảm ứng phát sinh phôi từ vật liệu khúc cắt từ diệp phôi thể hệ

Phôi thể hệ thu được từ thí nghiệm 1 sau khi chuyển mẫu cấy sang môi trường MS cơ bản 21 ngày. Các tử diệp phôi thể hệ được cắt vuông góc với gân chính thành các mảnh cách nhau 2mm và đặt ngửa trên MT cảm ứng khác nhau: MS bổ sung 2,4-D (4, 8) mg/l và picloram (4, 8) mg/l. Sau 21 ngày trong tối mẫu cấy được chuyển sang MT MS bổ sung BA 0,1mg/l + NAA 0,01mg/l, đặt ngoài sáng cần cho sự phát triển của phôi.

Thí nghiệm 5: Phân tích hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Khúc cắt thùy lá non đặt trên môi trường MS bổ sung picloram 8mg/l ở ngày 0, 10, 13, 21

được đo hoạt tính CDHTTV bằng sinh trắc nghiệm theo cải tiến của Bùi Trang Việt, 1992.

KẾT QUẢ

Thí nghiệm 1: Khảo sát loại, nồng độ auxin lên hiệu quả cảm ứng phát sinh phôi từ vật liệu khúc cắt thùy lá non in vitro

Mẫu cấy sau 3 ngày cảm ứng có sự giãn nở về kích thước và bắt đầu tạo sẹo ở vị trí các vết cắt. Sau 8 ngày, có sự xuất hiện của khối mô sẹo có khả năng sinh phôi; sau 13 ngày, có sự xuất hiện phôi hình cầu. Sau 21 ngày trên các

môi trường cảm ứng, có sự xuất hiện của phôi ở các giai đoạn khác nhau trên bề mặt khối mô sẹo (Hình 1.1).

Sau 10 ngày chuyển mẫu cấy sang môi trường MS cơ bản, tất cả các nghiệm thức đều có sự xuất hiện phôi, trên môi trường cảm ứng MS bổ sung picloram 8mg/l trước đó cho tỉ số mẫu cấy xuất hiện phôi cao nhất (Bảng 1). Cấu trúc giải phẫu phôi ở giai đoạn có hai tử diệp cũng được quan sát thấy được cực chồi và cực rễ phát triển (Hình 1.2).

Bảng 1. Tỉ lệ mẫu cấy khúc cắt thùy lá non *in vitro* trên các môi trường cảm ứng khác nhau trước đó, có xuất hiện phôi sau khi được chuyển sang môi trường MS cơ bản 10 ngày

Môi trường	Tỉ lệ mẫu cấy xuất hiện phôi (%)
MS (đối chứng)	0,0 ± 0,0 ^b
MS bổ sung 2,4-D 2mg/l	10,0 ± 6,7 ^b
MS bổ sung 2,4-D 4mg/l	13,3 ± 6,2 ^b
MS bổ sung 2,4-D 8mg/l	13,3 ± 3,3 ^b
MS bổ sung Picloram 2mg/l	6,7 ± 4,0 ^b
MS bổ sung Picloram 4mg/l	10,0 ± 4,0 ^b
MS bổ sung Picloram 8mg/l	30,0 ± 3,3^a

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Số phôi trung bình/mẫu cấy xuất hiện không khác biệt nhiều ở các nghiệm thức khác nhau, dao động trong khoảng từ 10- 20 phôi. Trên môi trường MS bổ sung picloram 8mg/l, cho trên 30 phôi.

Thí nghiệm 2: Khảo sát thời gian cảm ứng lên hiệu quả phát sinh phôi

Ở nghiệm thức cảm ứng 6 ngày, sau khi chuyển mẫu cấy sang môi trường MS bổ sung NAA 1mg/l, có sự xuất hiện và kéo dài của rễ từ mô sẹo sau 7 ngày trên môi trường này; đến ngày thứ 10, rễ ngưng kéo dài, trên bề mặt rễ

bắt đầu tạo mô sẹo và sau khi chuyển sang môi trường MS bổ sung BA 0,1mg/l + NAA 0,01mg/l các rễ lại tiếp tục kéo dài và không có sự xuất hiện phôi.

Ở các nghiệm thức còn lại, sau 10 ngày chuyển mẫu cấy sang môi trường MS bổ sung BA 0,1mg/l + NAA 0,01mg/l, đều có sự xuất hiện phôi và không có sự có mặt của rễ; nghiệm thức cảm ứng sau 13 ngày cho kết quả tốt nhất (Bảng 2). Số phôi trung bình/mẫu cấy xuất hiện phôi không có sự khác biệt nhiều: từ 20- 30 phôi.

Bảng 2. Tỷ lệ mẫu cây xuất hiện phôi với thời gian cảm ứng khác nhau trên môi trường MS bổ sung picloram 8mg/l

Thời gian cảm ứng trên môi trường picloram 8mg/l	Tỷ lệ mẫu cây xuất hiện phôi (%)
21 ngày (đối chứng)	20,0 ± 6,2 ^b
6 ngày	0,0 ± 0,0 ^c
10 ngày	20,0 ± 3,3 ^b
13 ngày	36,7 ± 3,3^a

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Thí nghiệm 3: Khảo sát môi trường thích hợp cho sự phát triển của phôi

Sau 10 ngày chuyển mẫu cây sang các môi trường khác nhau cho sự phát triển của phôi, tỷ lệ số mẫu cây xuất hiện phôi ở các nghiệm thức thử nghiệm không khác biệt so với đối chứng (môi trường MS cơ bản), dao động trong khoảng 20- 26,7%. Tuy nhiên số phôi trung bình/mẫu cây xuất hiện phôi ở các nghiệm thức thử nghiệm đều cao hơn (20- 30 phôi) so với đối chứng (10- 20 phôi).

Thí nghiệm 4: Khảo sát loại, nồng độ auxin lên hiệu quả cảm ứng phát sinh phôi từ vật liệu khúc cắt từ diệp phôi thể hệ.

Sau 3 ngày cảm ứng trên các môi trường khác nhau, mẫu cây bắt đầu tạo mô sẹo. Sau 14

ngày, có sự xuất hiện phôi đạt đến giai đoạn hình cá đuôi. Sau 21 ngày trên môi trường cảm ứng, phôi ở các giai đoạn khác nhau xuất hiện với tần số cao trên bề mặt khối mô sẹo. Cấu trúc giải phẫu phôi hình cầu được quan sát, phôi chưa phân hóa cực chồi và cực rễ nhưng có dây treo ngắn gắn phôi vào mô sẹo (Hình 1.3).

Sau 10 ngày chuyển mẫu cây sang môi trường MS bổ sung BA 0,1mg/l + NAA 0,01mg/l. Tất cả các nghiệm thức đều xuất hiện phôi, môi trường MS bổ sung picloram 8mg/l trước đó cho 91,7% mẫu cây xuất hiện phôi (Bảng 3). Số lượng phôi trung bình/mẫu cây từ khúc cắt từ diệp phôi thể hệ cao hơn so với vật liệu khúc cắt từ lá non *in vitro* (Hình 1.4, Bảng 4).

Bảng 3. Tỷ lệ mẫu cây có xuất hiện phôi ở các nghiệm thức khác nhau với khúc cắt từ diệp phôi thể hệ

Môi trường	Mẫu cây có xuất hiện phôi (%)
MS (đối chứng)	0,0 ± 0,0 ^c
MS bổ sung 2,4-D 4mg/l	75,0 ± 9,7 ^{ab}
MS bổ sung 2,4-D 8mg/l	70,8 ± 8,3 ^b
MS bổ sung Picloram 4mg/l	79,2 ± 16 ^{ab}
MS bổ sung Picloram 8mg/l	91,7 ± 8,3 ^a

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Bảng 4. Số lượng phôi trung bình/mẫu cấy khúc cắt từ diệp phôi thể hệ xuất hiện phôi ở các nghiệm thức khác nhau sau khi mẫu cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung BA 0,1 mg/l + NAA 0,01mg/l 10 ngày

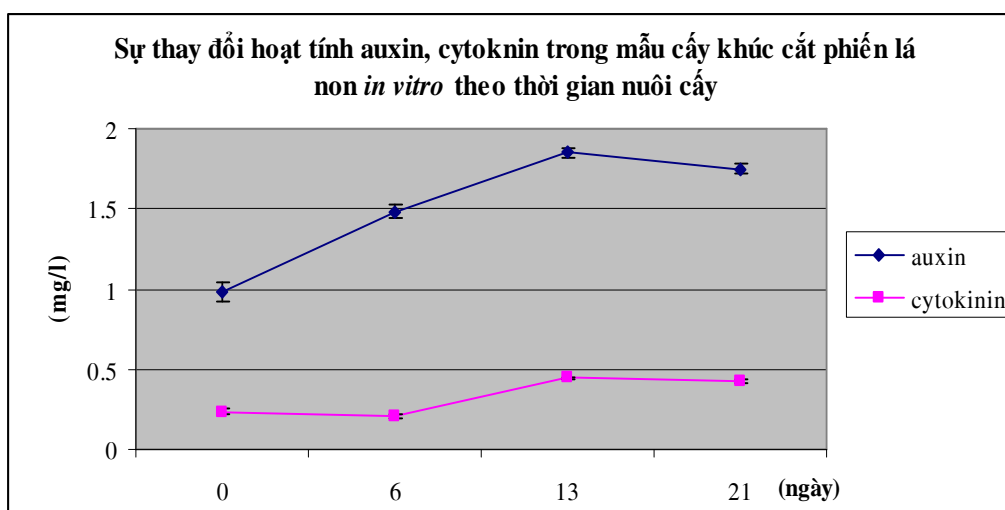
Môi trường	Số phôi trung bình trên một mẫu cấy xuất hiện phôi
MS bổ sung 2,4-D 4mg/l	+++++
MS bổ sung 2,4-D 8mg/l	+++++
MS bổ sung Picloram 4mg/l	+++++
MS bổ sung Picloram 8mg/l	+++++

Quy ước: +, số lượng phôi ít (1-10); ++, số lượng phôi tương đối ít (11-20); +++, số lượng phôi trung bình (21-30); +++++, số lượng phôi tương đối nhiều (31-40); ++++++, số lượng phôi nhiều (41-50); ++++++, số lượng phôi rất nhiều (> 50)

Thí nghiệm 5: Phân tích hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật

gian đặt trên môi trường cảm ứng (MS bổ sung 8mg/l picloram) được ghi nhận theo hình 2.

Sự thay đổi hoạt tính auxin, cytokinin trong mẫu cấy khúc cắt phiến lá non *in vitro* theo thời

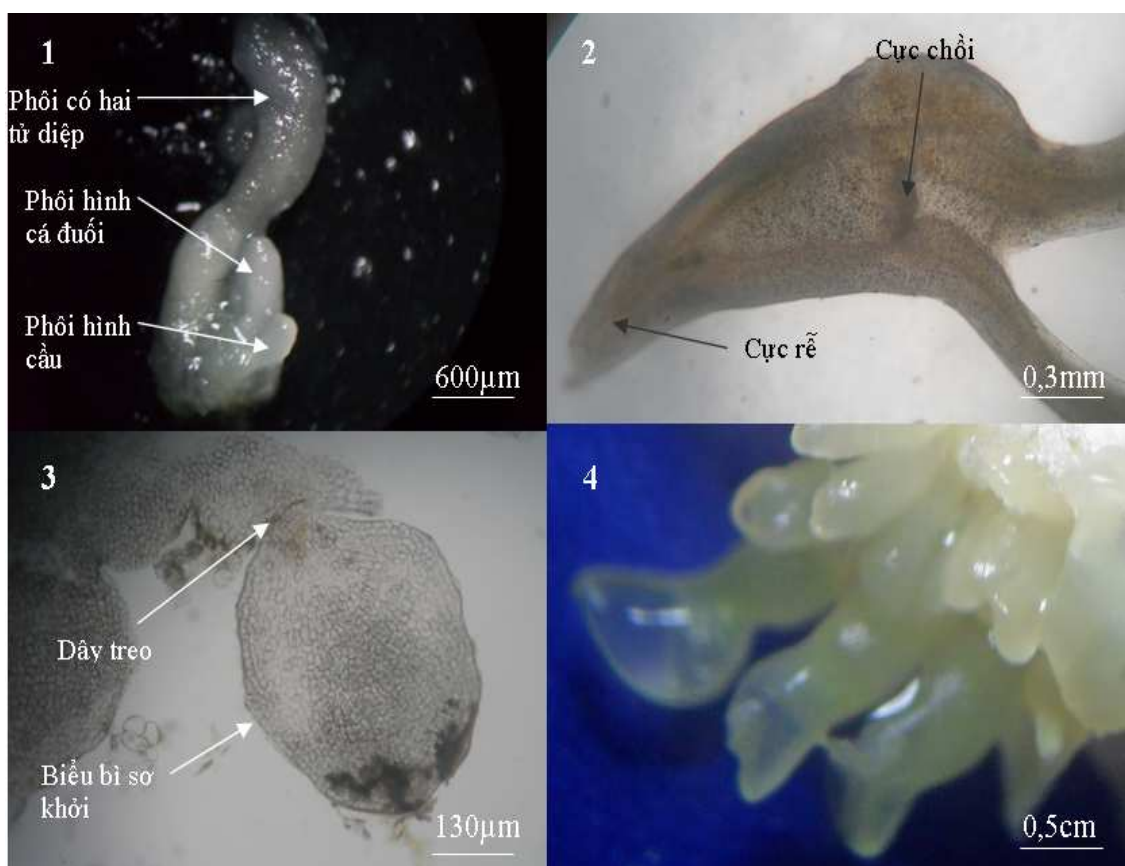


Hình 1. Sự thay đổi hoạt tính auxin, cytokinin trong mẫu cấy khúc cắt phiến lá non *in vitro* theo thời gian đặt trên môi trường cảm ứng MS bổ sung picloram 8mg/l

Hoạt tính auxin và cytokinin đều tăng trong quá trình cảm ứng tạo phôi đạt cao nhất vào ngày thứ 13.

hay nhiều phôi dính nhau, phôi hình tách (cup shape).

Số phôi bất thường ghi nhận được trong nghiên cứu này cao (80%), chủ yếu là phôi có số lượng từ diệp bất thường, cụm phôi với hai



Hình 1. 1. Phôi ở các giai đoạn khác nhau từ khúc cắt thùy lá non *in vitro* sau 21 ngày đặt trên môi trường cảm ứng MS bổ sung 2,4-D 4mg/l sau 21 ngày; 2. Phôi giai đoạn hai từ diệp với cực chồi và cực rễ sau 10 ngày chuyển sang môi trường MS cơ bản; 3. Phôi hình cầu với biểu bì sơ khởi từ vật liệu khúc cắt từ diệp phôi thể hệ sau khi đặt trên môi trường cảm ứng MS bổ sung picloram 4mg/l 21 ngày; 4. Một phần cụm phôi từ vật liệu khúc cắt từ diệp phôi thể hệ sau khi chuyển sang môi trường phát triển của phôi 10 ngày, trước đó đặt cảm ứng trên MT MS bổ sung picloram 8mg/l

THẢO LUẬN

Trên đối tượng khoai mì, phôi đạt tới giai đoạn có hai từ diệp sớm với hình thái bình thường có thể thu nhận được ngay trên môi trường có bổ sung auxin mạnh (2,4-D, picloram) ở nồng độ cao trong môi trường nuôi cấy (8mg/l). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu khác [4], [5], [6], [8], [9], [10], [11].

Theo nghiên cứu của Bùi Trang Việt và cs. (2004) [1], trên đối tượng cây lúa dòng Bằng Ngọc, sau khi chuyển khối mô sẹo có khả năng

sinh phôi được tạo ra trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 2mg/l + NAA 1mg/l + BA 0,5mg/l sang môi trường MS cơ bản, auxin ngoại sinh (NAA, 2,4-D) giảm nhẹ trong mẫu cấy. Tuy nhiên, diễn tiến quá trình phát sinh phôi có sự liên quan chặt chẽ đến sự thay đổi auxin nội sinh; auxin nội sinh đạt đến đỉnh trong giai đoạn phôi hình cầu và sau đó giảm mạnh ở giai đoạn phôi hình chùy. Trong nghiên cứu này, hoạt tính auxin và cytokinin nội sinh tăng ở ngày thứ 13 khi đặt mẫu cấy là khúc cắt phiến lá non *in vitro* trên môi trường cảm ứng bổ

sung picloram 8mg/l. Ngày thứ 13 là thời điểm xuất hiện phôi hình cầu. Có lẽ chính sự tăng hoạt tính auxin và cytokinin nội sinh ở giai đoạn này đã giúp cho sự phát triển tiếp theo của phôi tới các giai đoạn sau đó.

Auxin nội sinh giảm mạnh trong quá trình tạo cơ quan phôi [1]. Tuy nhiên, sau 21 ngày nuôi cấy, ứng với thời điểm xuất hiện phôi hình cá đuôi và phôi có hai tử diệp, hoạt tính auxin nội sinh không giảm so với ngày thứ 13. Kết quả này do sự xuất hiện không đồng thời của phôi ở các giai đoạn khác nhau sau 21 ngày trên môi trường nuôi cấy (Hình 1.1). Có thể phôi hình cầu tiếp tục xuất hiện trong ngày thứ 21 giúp cho hoạt tính auxin nội sinh trong mẫu cấy cao. Mẫu cấy còn đặt nuôi trên môi trường auxin cao có lẽ cũng kích thích gia tăng hoạt tính auxin nội sinh trong mô sẹo.

Tóm lại, có thể do sự thu hút auxin từ khối mô sẹo vào các tế bào ở giai đoạn tiền phôi và khả năng sản xuất auxin cao từ các tế bào phía trên phôi hình cầu giúp hoạt tính auxin nội sinh cao ở ngày thứ 13. Sau đó, sự định hướng của các PIN protein (protein vận chuyển auxin đi ra) giúp cho sự di chuyển hữu cực của auxin nội sinh từ phôi qua dây treo để vào khối mô sẹo; auxin nội sinh từ mô sẹo sẽ đi vào môi trường theo cơ chế khuếch tán. Chính dòng auxin nội sinh di chuyển hữu cực theo hướng từ phôi hình cầu qua mô sẹo rồi vào môi trường nuôi cấy cùng với sự gia tăng hoạt tính của

cytokinin là nhân tố quan trọng giúp cho phôi hình cầu tiếp tục phát triển trên môi trường có bổ sung auxin ngoại sinh cao.

Trong nghiên cứu này, số lượng phôi bất thường là cao (80%). Tần số phôi thể hệ bất thường cao đã được ghi nhận trong báo cáo của Trịnh Ngọc Nam và Nguyễn Du Sanh, 2009 trên đối tượng cây cà tím (*Solanum melongena* L.) [12].

KẾT LUẬN

Có thể thu nhận được phôi thể hệ khoai mì dòng KM297 từ khúc cắt lá non *in vitro* và khúc cắt tử diệp phôi thể hệ đạt tới giai đoạn có hai tử diệp trên môi trường MS bổ sung 2,4-D và picloram từ 4- 8mg/l.

Môi trường MS bổ sung picloram 8mg/l cho hiệu quả cao nhất trong cảm ứng phát sinh phôi từ vật liệu lá non *in vitro* ở các nồng độ được nghiên cứu.

Thời gian cảm ứng trên môi trường MS bổ sung picloram 8mg/l sau 13 ngày (sau đó chuyển sang MT MS bổ sung NAA 1mg/l) cho hiệu quả phát sinh phôi cao hơn khi cho cảm ứng sau 21 ngày, với vật liệu là khúc cắt lá non *in vitro*.

Vật liệu khúc cắt lá mầm phôi thể hệ cho hiệu quả phát sinh phôi cao hơn so với vật liệu lá non *in vitro*.

Hoạt tính auxin và cytokinin nội sinh tăng trong giai đoạn phôi hình cầu.

**SOMATIC EMBRYOGENESIS OF CASSAVA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ)
VAR. KM297**

Vu Van Kien, Nguyen Du Sanh

University of Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT: *Somatic embryos of cassava var. KM297 received from pieces of in vitro immature leaf lobes or cotyledon of somatic embryos, were induced on the MS medium supplemented with 8mg/l picloram after 13 days inoculation in the dark condition. Different states of embryo were obtained after 10 days cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/l BA and 0.01mg/l NAA, in the light condition. Role of endogenous AIA and Zeatin of the globular state of embryos was studied.*

Keywords: *Callus, cassava, induction, picloram, somatic embryos.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bùi Trang Việt, Phan Ngô Hoang, Nguyễn Thị Huệ, Trần Thanh Hương, Trần Thị Bích Trinh, Đoàn Thị Phương Thùy, Trịnh Cẩm Tú, Cao Minh Phương. Vai trò của auxin và cytokinin trong quá trình sinh phôi thể hệ ở khoai tây, lúa, chuối. *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp*, số 2: 64- 67 (2004).
- [2]. Đoàn Thị Phương Thùy và Bùi Trang Việt. Tìm hiểu sự phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo có nguồn gốc lá khoai mì (*Manihot esculenta* Crantz.) dòng cuống trầu. *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp*, số 1: 19- 23 (2006).
- [3]. Hoàng Kim Anh, Ngô Kế Sương, Nguyễn Xích Liên. *Tinh bột sắn và các sản phẩm từ tinh bột sắn*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật (2005).
- [4]. Le, B.V., Anh, B.L., Soyong, K., Danh, N.D. and Anh Hong, L.T.. Plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) plants. *Journal of Agricultural Technology* 3(1): 121- 127 (2007).
- [5]. Ma, G., and Xu, Q.. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 281– 288 (2002).
- [6]. Raemakers, C.J.J.M., Amati, M., Staritsky, G., Jacobsen E., and Visser, R.G.F.. Cyclic Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Cassava. *Annals of Botany* 71: 289- 294 (1993).
- [7]. Stamp, J.A. and Henshaw, G.G.. Somatic embryogenesis in cassava. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* 105: 183- 187 (1982).
- [8]. Stamp, J.A. and Henshaw, G.G.. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10: 27- 33 (1987).

- [9]. Stamp, J.A. and Henshaw, G.G. Somatic embryogenesis from clonal leaf material of cassava. *Annals of Botany* 59: 45- 50 (1987).
- [10]. Szabados, L., Hoyos, R., Roca, W.. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Plant Cell Reports* 6: 248- 251 (1987).
- [11]. Taylor, N.J., Edwards, M., Kiernan, R.J., Davey, C.D.M., David Blakesley, D., and Henshaw, G.G. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Natural Biotechnology*, volume 14: 721-230 (1996).
- [12].Trình Ngọc Nam, Nguyễn Du Sanh. Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh phôi thể hệ cà tím (*Solanum melongena* L.). *Tạp chí Phát triển Khoa Học & Công nghệ*. Đại Học Quốc Gia Tp.HCM, Tập 12 (17): 71-80 (2009).