

27

Embryogenèse somatique chez la patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) : caractérisation et régénération des plantes

D. SIHACHAKR¹, J.M. CAVALCANTE-ALVES¹, S. TIZROUTINE¹,
M. ALLOT¹, I. MUSSIO¹, A. SERVAES¹, D. NZOGHÉ², G. DUCREUX¹

1. Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bâtiment 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.

2. Laboratoire de culture in vitro, CIAM, BP 2183, Libreville, Gabon.

La patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulacées) est une plante d'intérêt économique considérable dans les zones tropicales et même dans certaines zones tempérées d'Europe du Sud et des États-Unis d'Amérique [22]. La production mondiale de tubercules est estimée à 133,3 millions de tonnes pour l'année 1989, avec un rendement moyen de 14,4 t/ha [5]. La Chine (114,0 Mt), l'Indonésie (2,1 Mt), l'Ouganda (1,8 Mt), l'Inde (1,4 Mt), le Japon (1,3 Mt), le Rwanda (0,8 Mt), le Brésil (0,75 Mt) et les États-Unis d'Amérique sont parmi les plus grands producteurs [5]. Le tubercule de patate douce est très riche en calories et vitamines, ainsi qu'en protéines dont la teneur varie entre 2 % et 10 % selon les cultivars [11, 25].

La patate douce est originaire d'Amérique du Sud (Colombie, Équateur et Nord Pérou) où existe encore une grande diversité d'*Ipomoea batatas*. Elle a été introduite en Europe par Christophe Colomb au XV^e siècle. La patate douce, ou *Ipomoea batatas* (L.) Lam., est une dicotylédone gamopétale, de l'ordre des polémoniales et de la famille des convolvulacées.

Bien que des progrès aient été obtenus par les méthodes de sélection classique pour l'introduction des caractères de résistance aux maladies, aux nématodes et aux insectes, ainsi que pour l'amélioration de la teneur en protéines et de la qualité du tubercule, le processus de sélection est un travail de longue haleine, et nécessite la manipulation d'un très grand nombre d'individus et des techniques améliorées de croisements. De

plus, l'incompatibilité sexuée et la stérilité de certains génotypes et des hybrides rendent encore plus difficiles les méthodes de sélection classique [22].

Afin de mener le programme de sélection de la patate douce avec efficacité, des nouvelles techniques, comprenant notamment la variation somaclonale, la fusion de protoplastes et la transformation, peuvent être utilisées en conjonction avec les méthodes classiques de sélection. Cependant, l'accès à ces nouvelles techniques nécessite la mise au point de protocoles reproductibles de régénération de plantes à partir de cultures de tissus de patate douce.

Cette plante est considérée comme une espèce récalcitrante en ce qui concerne la régénération. L'objet de cet article est de passer en revue divers systèmes de régénération chez la patate douce. Une attention particulière portera sur l'embryogenèse somatique qui constitue la voie la plus efficace concernant la régénération chez cette plante. En effet, l'embryogenèse somatique permet d'obtenir un taux élevé et inégalable de multiplication, et la capacité de régénération peut être effectivement maintenue pendant longtemps. En plus, le processus de l'embryogenèse aboutit à la production de structures bipolaires, c'est-à-dire comprenant un axe apical et racinaire.

Régénération de plantes à partir de cultures d'explants

Une méthode de propagation accélérée par bouturages successifs de nœuds de tiges a été mise au point afin de disposer d'un grand nombre d'individus sains qui constituent un matériel de départ physiologiquement homogène et juvénile pour des expérimentations *in vitro* [19].

Des investigations concernant la régénération à partir de culture d'organes ou de fragments d'organes de patate douce ont été entreprises par plusieurs auteurs [2, 9, 18, 19]. Ainsi des fragments de tiges repiqués sur du milieu MS additionné de 1 mg/l d'acide indole acétique (AIA) peuvent donner naissance à des régénérations de bourgeons [19]. Des études comparatives plus détaillées de milieux de culture ont permis de montrer que les meilleures réponses concernant la précocité (2 semaines de culture) et la fréquence de régénération (22 %) ont été obtenues avec la combinaison de 0,01 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) avec 0,01 mg/l de kinétine [2]. Les bourgeons peuvent apparaître (a) le plus fréquemment au niveau de cals cicatriciels, (b) directement sur les explants à proximité des zones traumatisées, et enfin (c) à la base des racines néoformées [19].

La comparaison de capacité organogène de différents organes mis en culture a montré que les explants de tiges sont les plus aptes à régénérer par rapport aux explants foliaires [2, 19]. Par ailleurs, les meilleures réponses organogènes sont obtenues à partir des explants prélevés sur des plantes *in vitro*. Il est intéressant de noter que le repiquage de fragments de cals organogènes sur du milieu neuf aboutit à la régénération de nouveaux bourgeons. En revanche, le repiquage de cals primaires non organogènes de patate douce, même sur un milieu très favorable, conduit toujours à une callogenèse abondante sans aucune manifestation morphogénétique [2].

Régénération de plantes à partir de protoplastes

Des protoplastes peuvent être isolés à partir de fragments de tiges, de pétioles ou de calcs de patate douce, alors que le mésophylle se montre très récalcitrant à la digestion enzymatique. Les premiers travaux sur l'isolement de protoplastes à partir de calcs de tige de patate douce remontent à l'année 1979 [24]. Ensuite, Bidney et Shepard [1] ont obtenu des calcs à partir de culture de protoplastes issus de germes de tubercules, en utilisant un système de culture comportant un réservoir de milieu. D'autres chercheurs ont abouti également à l'obtention de calcs qui ne manifestent aucune organogenèse [13, 17], ou qui produisent seulement des racines [20]. Cependant, des néoformations sporadiques de bourgeons à partir de culture de protoplastes de patate douce ont été signalées pour le cultivar Chugoku N° 25 [16].

Des résultats intéressants concernant la régénération de bourgeons à partir de culture de protoplastes ont été obtenus chez la patate douce, grâce à des efforts qui ont porté sur la recherche de combinaisons de régulateurs de croissance, de séquences de milieu de culture et en particulier sur le choix du matériel végétal utilisé comme source de protoplastes [21]. En effet, la comparaison de matériel végétal prélevé en serre et *in vitro* montre la nette supériorité de ce dernier concernant la viabilité et le taux de division de protoplastes qui en sont issus, ainsi que la capacité ultérieure à régénérer des bourgeons. Ces performances sont sans doute dues à l'état physiologiquement juvénile et homogène du matériel végétal qui caractérise les plantes *in vitro*. De plus, la grande dilution de la culture, combinée avec le passage sur des milieux successifs riches en cytokinine, de la zéatine en particulier, stimule la croissance des calcs et favorise la régénération de bourgeons [21]. Ainsi, des plantes ont été régénérées à partir de calcs de protoplastes chez 2 cultivars de patate douce, cv. Duclos 11 et Ira. Les plantes régénérées présentent une grande variabilité affectant la morphologie générale de la plante, celle des feuilles, la ramification ainsi que le système racinaire (Figure 1). L'analyse du contenu en ADN de 15 protoclonés d'apparence morphologique normale, par cytométrie en flux, a montré des valeurs similaires ou très proches de celles du clone témoin [22]. Malgré la stabilité du contenu en ADN des clones analysés, leur évaluation en conditions de champs, réalisée au Gabon en collaboration avec Dr Nzoghé, a révélé une variabilité dans la croissance et notamment dans la tubérisation. En effet, certains clones sont très productifs, pouvant donner jusqu'à 2 fois plus de tubercules que le clone témoin, alors que d'autres ne tubérisent pas.

Embryogenèse somatique

Induction

L'embryogenèse somatique chez la patate douce est initiée à partir de calcs de culture d'anthers [23], de feuilles, d'apex, de fragments de tiges ou de racines [14], et de bourgeons axillaires notamment [3, 4, 12].

Le milieu d'induction est composé du milieu de base MS [15] additionné de 30 g/l de saccharose, 10 μ M d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et solidifié par 7 g/l d'agar. Après 6 à 8 semaines d'incubation à l'obscurité et à 27°C, un certain nombre de bourgeons axillaires, prélevés sur des plantes *in vitro* et mis en culture, produisent des calcs mucilagineux blanchâtres à partir desquels émergent des calcs compacts

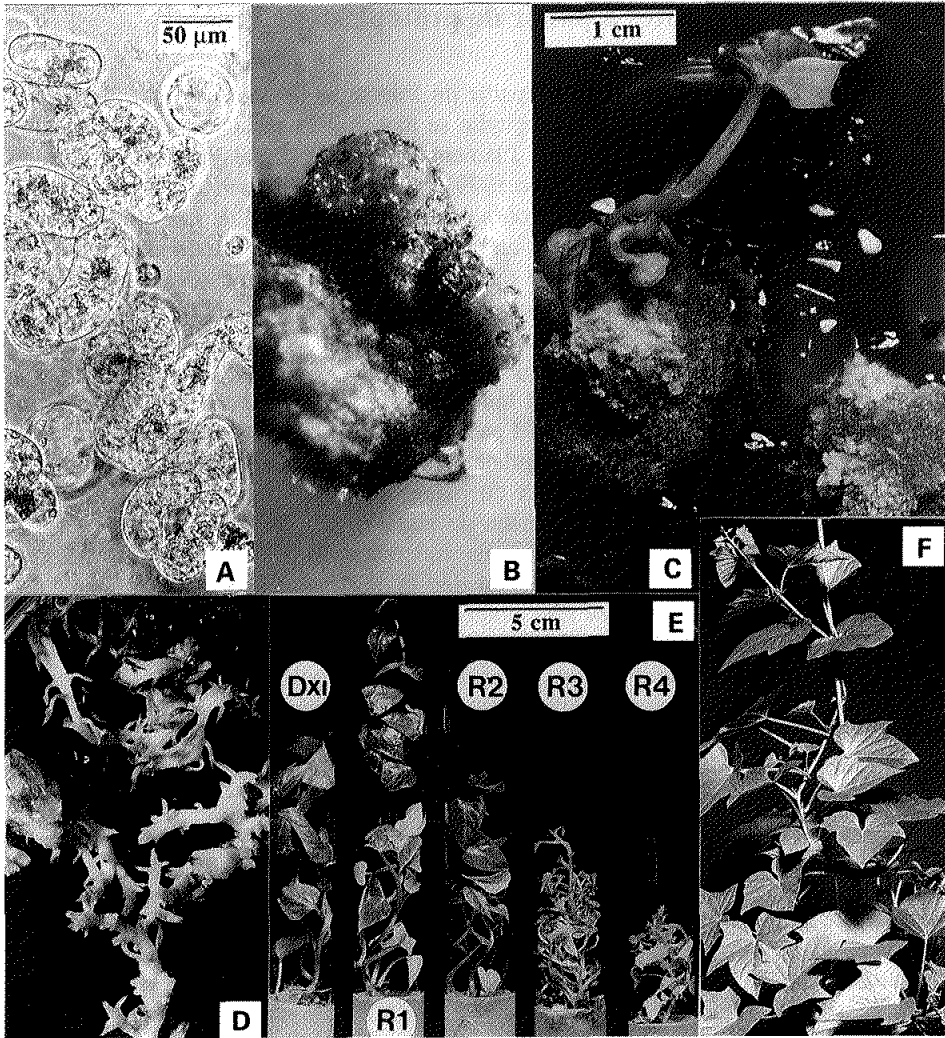


Figure 1. Régénération de protoplastes de patate douce. **A.** Cellules issues de divisions de protoplastes ; **B.** Cals organogènes issus de culture de protoplastes ; **C.** Régénération de plantes ; **D.** Régénération à partir de cals organogènes ; **E.** Plantes régénérées montrant une grande variabilité, DXI (clone témoin), R1 à R4 (clones régénérés) ; **F.** Une plante régénérée plantée en serre.

embryogènes (Figure 2 A). D'autres bourgeons mis en culture donnent naissance soit à des cals de plus petite taille (mais qui brunissent et meurent au bout de quelques semaines), soit à des cals friables non embryogènes et à croissance rapide. Ce dernier type de cals est d'un aspect translucide, d'une couleur variant du blanc au brun, et ne devient jamais embryogène. Les cals compacts embryogènes sont d'une couleur jaune clair et comportent quelquefois des zones plus ou moins anthocyanées chez certains cultivars (Figure 2 B) [3].

L'évaluation du potentiel embryogène chez 10 cultivars de patate douce montre un effet « génotype » très hautement significatif (Tableau I A). Parmi les génotypes testés, les cultivars 90, Zho et 865 donnent les meilleures réponses embryogènes avec respectivement 10 %, 15 % et 17 % de cals embryogènes (Tableau I A). Il est intéressant de noter que le cultivar Duclos 11 n'a donné aucune réponse embryogène quelle que soit la concentration en 2,4-D utilisée (2,5 à 15 μM), alors que ce génotype a produit quelques régénérations de bourgeons à partir de culture de protoplastes [21].

Tableau I. Réponses de l'embryogenèse somatique de 10 cultivars de patate douce. A) Pourcentage de cals embryogènes obtenus après 6-8 semaines d'incubation de bourgeons axillaires dans du milieu MS contenant 10 μM de 2,4-D ; effectif : 120-160 bourgeons axillaires/génotype ; l'effet « génotype » est très hautement significatif pour $P = 0,001$; B) Pourcentage de réversion de cals embryogènes en cals friables et non-embryogènes après repiquage sur du milieu MS contenant 10 μM de 2,4-D ; effectif : 200 cals/génotype ; l'effet « génotype » est très hautement significatif pour $P = 0,001$.

Génotype	D 11	Qu	Yul	Zho	90	132	209	530	865	953
A) Réponse embryogène (%)	0,0	1,3	1,5	15,0	10,0	5,0	8,0	3,6	17,0	7,0
B) Réversion de cals (%)	-	1,0	1,0	3,0	12,0	2,5	7,0	1,5	10,5	0,5

Les cals embryogènes sont multipliés par repiquages successifs sur du milieu MS contenant 10 μM de 2,4-D et maintenus à l'obscurité. Cependant, après plusieurs repiquages, certains secteurs du cal deviennent friables et non embryogènes (Figure 2 C). Ils ont tendance à envahir complètement la culture car leur croissance est 5 à 8 fois plus rapide que celle des cals embryogènes. De plus, la réversion des cals embryogènes vers un état friable non embryogène est irréversible, et s'accompagne d'une perte définitive de la capacité à régénérer des bourgeons [3]. La comparaison des fréquences de réversion montre un effet « génotype » très hautement significatif avec une probabilité de $P = 0,001$ (Tableau I B). En effet, les cultivars Quangshu, Yulciboi et 953 sont parmi les génotypes qui ont le taux (0,5 % à 1 %) le plus faible de réversion, alors que le cultivar 90 présente le taux le plus élevé (12 %) (Tableau I B).

Les cals embryogènes et non embryogènes sont maintenus à l'obscurité sur du milieu MS contenant 10 μM de 2,4-D pour l'analyse ultérieure des isoenzymes.

Régénération de plantes

Il est intéressant de noter que l'induction et la différenciation d'embryons somatiques chez la patate douce, ainsi que leur maturation nécessite la présence d'un niveau élevé d'auxine, du 2,4-D en particulier. En effet, la différenciation d'embryons somatiques de patate douce est obtenue par repiquage de cals embryogènes dans du milieu MS additionné de 10 μM de 2,4-D et de 1 μM de benzylaminopurine (BAP). La culture est d'abord maintenue à l'obscurité pendant une semaine puis exposée à la lumière. Les embryons globulaires apparaissent après 4 semaines de culture (Figure 2 D). Des exigences nutritionnelles similaires, comprenant notamment des concentrations élevées en auxines, sont requises pour l'induction et la formation d'embryons somatiques chez l'aubergine. Seule la phase de développement d'embryons matures en plantules ne nécessite pas la présence d'auxines [7]. Chez d'autres espèces, telles que la carotte [10] ou le maïs [8], la formation d'embryons somatiques comprend une courte phase d'induction sur un milieu riche en auxines, suivie d'un transfert sur un milieu qui en est dépourvu, ou en contient, mais à faibles concentrations.

Dans cette étude, moins de 5 % d'embryons globulaires de patate douce sont capables de se développer en plantules à la suite de leur transfert dans un milieu dépourvu d'hormones. Cette observation semble indiquer que la plupart des embryons globulaires n'ont pas suffisamment évolué vers des stades plus développés, y compris en particulier les stades cotylédonnaires qui sont plus aptes à germer sur le milieu sans régulateur de croissance. Ainsi, le repiquage des embryons globulaires sur du milieu MS additionné d'une combinaison de 0,01 μM de 2,4-D avec 0,01 μM de kinétine pendant 3 semaines, suivi d'un transfert dans un milieu sans hormones améliore efficacement leur développement en embryons cotylédonnaires (Figure 2 E). Mais la réponse dépend du génotype testé. En effet, pour le cultivar 953, la fréquence de développement d'embryons globulaires en embryons cotylédonnaires est de 95 % ; elle n'est que de 24 % pour le cultivar 90. Les embryons somatiques au stade cotylédonnaire verdissent à la lumière. Ils sont plus aptes à former des plantules à raison de 3-5 plantules par cal comportant des embryons mis en culture (Figure 2 F). Les cals embryogènes ainsi obtenus chez plusieurs cultivars de patate douce, et leur capacité à régénérer des plantes sont constamment maintenus depuis plus de 3 ans de culture.

Caractérisation par l'analyse des isoenzymes

Les isoenzymes sont facilement détectables et la variation de leurs activités est souvent associée à des différences génétiques et des modifications morphogénétiques, alors que l'évaluation du potentiel embryogène par observations morphologiques est toujours subjective. C'est pourquoi, dans cette étude, nous avons utilisé 4 systèmes d'isoenzymes pour caractériser les différents événements morphogénétiques survenus au cours de l'embryogenèse somatique chez la patate douce. Ce sont les estérases (Est, E.C.3.1.1.2), les peroxydases (Prx, E.C.1.11.1.7), les phosphatases acides (Acp, E.C.3.1.3.2) et les glutamates oxaloacétates transaminases (Got, E.C.2.6.1.1).

Quatre types de matériel végétal (la feuille, les cals embryogènes et non embryogènes, et les embryons somatiques au stade globulaire) issus de 3 génotypes (les cultivars 90, 953 et Quangshu) ont été caractérisés à l'aide des isoenzymes.

Chacun des 4 systèmes d'isoenzymes analysés permet de distinguer les 3 génotypes étudiés. De plus, ils montrent des différences dans leurs activités entre les différents types d'organisation, et en particulier entre les cals embryogènes et non embryogènes.

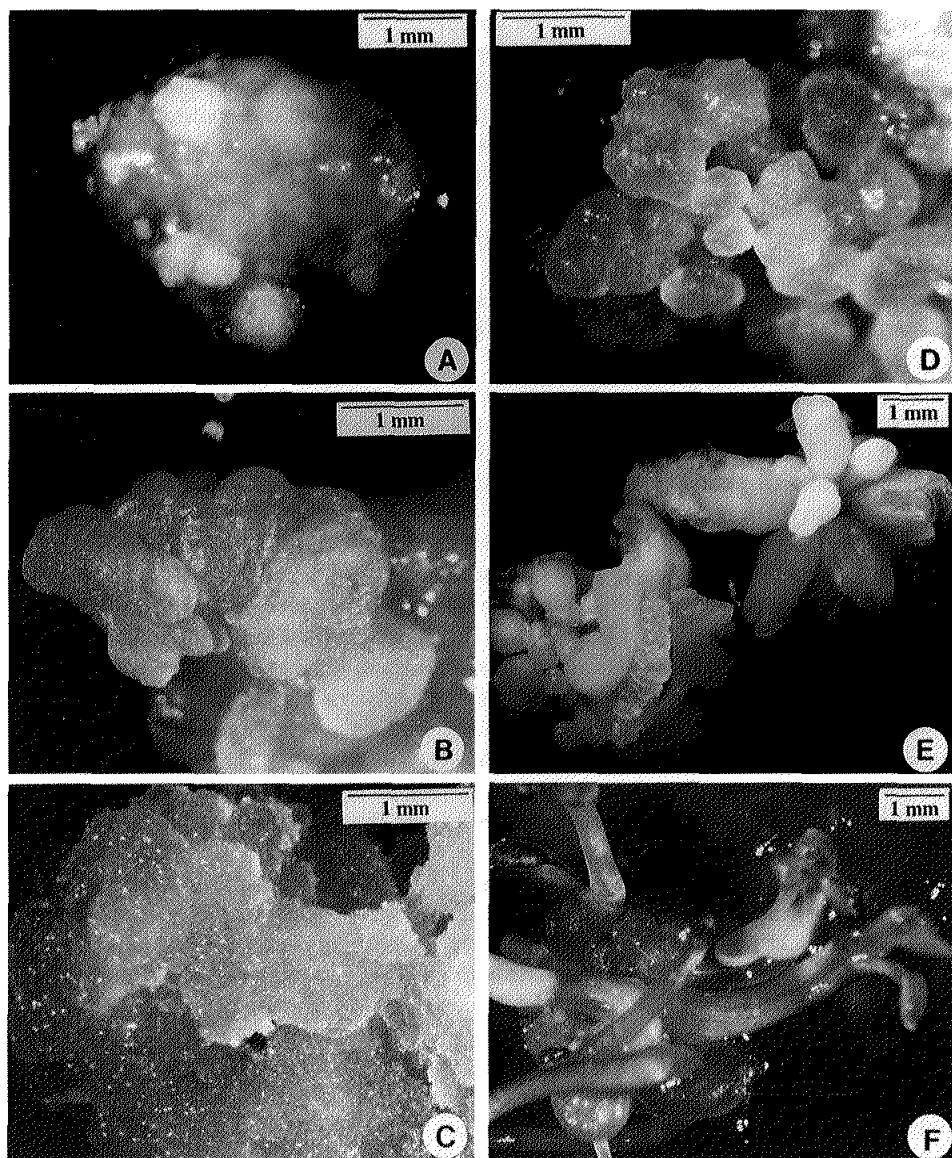


Figure 2. Embryogenèse somatique chez la patate douce. **A.** Cal mucilagineux à partir duquel émergent des cals compacts embryogènes ; **B.** Cal compact embryogène ; **C.** Cal friable non-embryogène ; **D.** Embryons somatiques globulaires ; **E.** Embryons somatiques cotylédonnaires ; **F.** Germination des embryons somatiques.

Le profil de bandes des estérases est complexe. Il comprend un très grand nombre de bandes, sans doute lié à l'état allohexaploïde de la patate douce (Figure 3 A). La feuille est caractérisée essentiellement par des bandes situées dans la zone de migration lente, c'est-à-dire les plus proches de la cathode. Les cals friables non embryogènes, à croissance rapide se distinguent des cals embryogènes par l'absence d'activité des estérases. Cependant, des activités sont observées au niveau de la zone de migration rapide chez les cals non embryogènes du cultivar 953. Elles sont toutefois différentes de celles des cals embryogènes du même génotype (Figure 3 A) par un nombre moins élevé de bandes. Peu de différence existe entre les cals embryogènes et les embryons globulaires, sauf pour le cultivar Quangshu dont le profil des estérases des cals embryogènes se distingue de celui des embryons globulaires par la présence de plus de bandes au niveau de la zone de migration rapide.

Pour les peroxydases, les cals friables non embryogènes se distinguent des cals embryogènes essentiellement par la présence d'activités au niveau de la zone de migration lente (Figure 3 B). Il y a peu de différence entre les cals embryogènes et les embryons globulaires. Ils sont essentiellement caractérisés par des bandes de migration rapide (Figure 3 B).

Pour les glutamates oxaloacétates transaminases (Got), la feuille est caractérisée par des bandes situées dans la zone de migration rapide. Les cals friables non embryogènes du cultivar Quangshu ne présentent aucune activité. En revanche, les génotypes 90 et 953 ont respectivement une faible et une intense activité au niveau de la zone de migration lente (Figure 3 C). Par ailleurs, les cals embryogènes et les embryons globulaires ont le même profil isozymique pour les 3 génotypes étudiés (Figure 3 C).

En ce qui concerne les phosphatases acides, les cals non embryogènes sont caractérisés par l'absence d'activités notamment chez les cultivars 90 et Quangshu, ou par une très faible activité chez le cultivar 953. Il y a peu de différence entre les cals embryogènes et les embryons globulaires. Les feuilles ont des activités intenses dans la zone de migration lente.

Dans cette étude, l'analyse des isozymes montre de grandes différences dans leurs activités entre les cals embryogènes et non embryogènes. En revanche, peu de changements ou aucune modification spécifique n'ont été observés entre les cals embryogènes et les embryons globulaires. Cela semble indiquer que les isozymes étudiées sont probablement impliquées dans l'organisation de cals plutôt que dans le processus de différenciation des embryons somatiques.

Il est également intéressant de noter que les activités des isozymes sont plus faibles ou absentes chez les cals friables non-embryogènes, comparées à celles des cals embryogènes. Cette situation est non seulement due à la différence de quantité de protéines qui est de 20 % à 30 % plus faible dans les cals friables non-embryogènes (Tableau II), mais elle peut être aussi liée à une activité faible ou nulle des isozymes dans les cals non embryogènes. Des résultats similaires ont été constatés chez les cals embryogènes et non embryogènes de maïs [6].

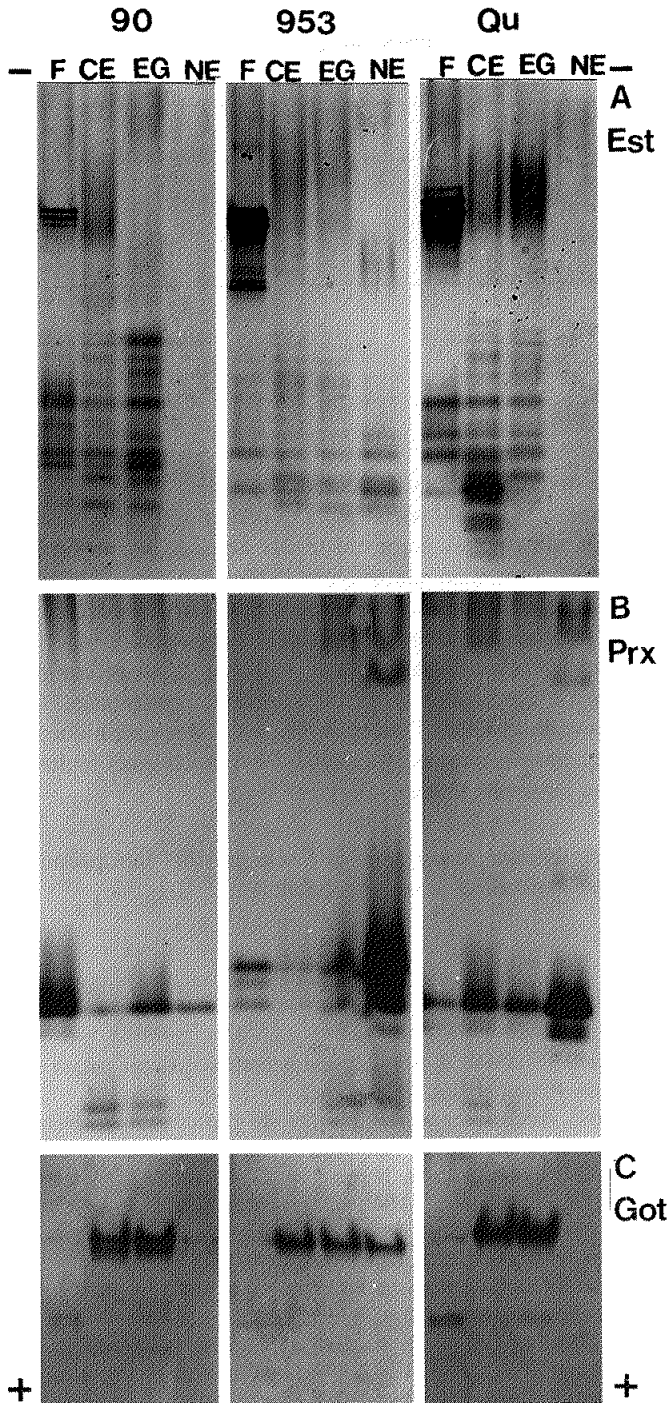


Figure 3. Les profils isozymiques de feuille (F), de cals embryogènes (CE), non embryogènes (NE), et d'embryons globulaires (EG) de 3 cultivars de patate douce (90, 953 et Quangshu). **A.** Les estérases (Est) ; **B.** Les peroxydases (Prx) ; **C.** Les glutamates oxaloacétates transaminases (Got).

Tableau II. Teneur en protéines (mg / 100 mg de MF) dans la feuille (F), les cals embryogènes (CE), non embryogènes (NE), et les embryons globulaires (EG) chez les cultivars 90, 953 et Quangshu.

Génotype	90				953				Quangshu			
	F	CE	EG	NE	F	CE	EG	NE	F	CE	EG	NE
Teneur en protéines	1,5±0,2	1,5±0,3	1,3±0,2	1,1±0,2	1,3±0,2	1,4±0,2	1,6±0,3	1,2±0,1	1,3±0,2	1,6±0,3	1,5±0,4	1,0±0,2

Conclusion

Cette étude présente divers systèmes de régénération chez la patate douce. Bien que la micropropagation soit très bien maîtrisée, la régénération chez cette plante montre encore des difficultés affectant la culture des cals secondaires ou des protoplastes. La voie de l'embryogenèse somatique paraît alors la plus reproductible et efficace pour la régénération chez la patate douce, car elle permet d'assurer en permanence un taux élevé et inégalable de multiplication d'individus sains, juvéniles et homogènes. En plus, les tissus embryogènes constituent sans doute un matériel compétent, possédant un potentiel organogène élevé pour la régénération des protoplastes. Cette potentialité morphogénétique devrait faciliter l'accès à de nouvelles techniques, notamment la fusion cellulaire et la transformation, qui doivent être désormais incluses dans les programmes de sélection de patate douce.

Remerciements : Les auteurs remercient la Communauté Européenne et l'AUPELF pour l'intérêt porté à ce travail et le soutien financier.

Références

1. Bidney DL, Shepard JF (1980). Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells. *Plant Sci Lett* 18 : 335-342
2. Bouhassan A (1984). Analyse du polymorphisme des néoformations obtenues *in vitro* à partir de divers tissus de patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Convolvulacées). Thèse 3^e Cycle, Université Paris-Sud, Orsay, 167p.
3. Cavalcante Alves JM, Sihachakr D, Allot M, Tizroutine S, Mussio I, Servaes A, Ducreux G (1993). Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Plant Cell Rep* 13 : 437-441.
4. Chée RP, Cantliffe DJ (1988). Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. *In vitro Cel Dev Bot* 24 : 955-958.
5. FAO (Food and Agriculture Organization) (1989). *Production yearbook*, Rome, Italy : 139.
6. Fransz PF, De Ruijter NCA, Schel JHN (1989). Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maiz (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep* 8 : 67-70.
7. Gleddie S, Keller WA, Setterfield G (1986). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Solanum melongena* (eggplant). *Can J Bot* 64 : 355-361.

8. Green CE, Phillips RL (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci* 15 : 417-421.
9. Gunckel JE, Sharp WR, Williams SB, West WC, Dinkwater WO (1972). Root and shoot initiation in sweet potato explants as related to polarity and nutrient media variation. *Bot Gaz* 133 : 254-262.
10. Halperin W, Wetherell D (1964). Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. *Am J Bot* 51 : 274-283.
11. Hattori T, Nakagawa T, Maeshima M, Nakamura K, Asahi T (1985). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. *Plant Mol Biol* 5 : 313-320.
12. Jarret RL, Salazar S, Fernandez ZR (1984). Somatic embryogenesis in sweet potato. *Hort Science* 19 : 397-398.
13. Kokubu T, Sato M (1988). Isolation and culture of petiole protoplasts of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and its related species. *Mem Fac Agr Kagoshima Univ* 24 : 83-89.
14. Liu JR, Cantliffe DJ (1984). Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). *Plant Cell Rep* 3 : 112-115.
15. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
16. Murata T, Hoshino K, Miyazi Y (1986). Plant regeneration from protoplasts of sweet potato. *Japan Breed* 36 : 236-237.
17. Otani M, Shimada T, Niizeki H (1987). Mesophyll protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Sci* 53 : 157-160.
18. Sehgal CB (1978). Regeneration of plants from anther cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). *Z Pflanzenphysiol* 88 : 349-352.
19. Sihachakr D (1982). Premiers résultats concernant la multiplication végétative *in vitro* de la patate douce (*Ipomoea batatas* Lam., Convolvulacées). *Agr Trop* 37 : 142-151.
20. Sihachakr D, Ducreux G (1987). Isolement et culture de protoplastes de deux variétés de patate douce (*Ipomoea batatas* Lam.). *Can J Bot* 65 : 192-197.
21. Sihachakr D, Ducreux G (1987). Plant regeneration from protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Plant Cell Rep* 6 : 326-328.
22. Sihachakr D, Ducreux G (1993). Regeneration of plants from protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry* Vol. 23, Plant protoplast and genetic engineering IV, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg : 43-59.
23. Tsay HS, Tseng MT (1979). Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. *Bot Bull Acad Sinica* 20 : 117-122.
24. Wu YW, Ma TP (1979). Isolation, culture and callus formation of *Ipomoea batatas* protoplasts. *Acta Bot Sinica* 21 : 335-338.
25. Yang TH, Tsai YC, Hseu CT, Ko HS, Chen SW, Blackwell RQ (1975). Protein content and its amino acid distribution of locally produced rice and sweet potato in Taiwan. *J Chinese Agric Chem Soc* 13 : 132-138.