

TÁI SINH CÂY *IN VITRO* QUA PHÔI SOMA TỪ LÁ MẦM HẠT CHƯA CHÍN Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG (*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL)

Nguyễn Thị Thu, Đỗ Tiến Phát, Lê Thị Muội, Đinh Thị Phòng

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Ba giống đậu tương ĐT12, VX93 (của Việt Nam) và giống Thome (của Hoa Kỳ) đã được dùng trong nghiên cứu hệ thống tái sinh cây *in vitro* qua phôi soma từ lá mầm hạt chưa chín. Lá mầm non từ các mẫu quả non có các ngày tuổi khác nhau (5 ngày, 10 ngày, 15 ngày và 20 ngày) được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo phôi soma: MS cơ bản + vitamin B₅ + 2,4 D (20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l, 50 mg/l) + 40 g/l sucrose. Sau 4 tuần cảm ứng các mẫu vật có màu xanh sáng, dạng bó chặt được chọn để cấy chuyển sang môi trường phát triển phôi soma: MS cơ bản + vitamin B₅ + 2,4 D (20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l, 50 mg/l) + 40 g/l sucrose. Cấy chuyển các cụm phôi trưởng thành được cấy chuyển sang môi trường này mầm phôi soma: MS cơ bản + vitamin B₅ + 60 g/l maltose + 2 g/l than hoạt tính. Các phôi đã này mầm được cấy chuyển sang môi trường MS cơ bản + vitamin B₅ + 30 g/l sucrose cho đến khi hình thành cây xanh hoàn chỉnh (lá xanh và bộ rễ phát triển). Trong quá trình nghiên cứu hệ thống tái sinh cây *in vitro* qua phôi soma từ lá mầm hạt non đối với hai giống đậu tương ĐT12 và VX93 chỉ có giống ĐT12 có phản ứng tạo phôi soma. Tuổi quả non thích hợp để tạo phôi soma là 10 - 15 ngày sau khi hoa nở. Hiệu suất tái sinh cây giống ĐT12 đạt 39% và số phôi trung bình là 7,5.

Từ khóa: Đậu tương, lá mầm hạt chưa chín, nuôi cấy *in vitro*, phôi soma, tái sinh cây

MỞ ĐẦU

Đậu tương *Glycine max* (L.) Merrill là cây thực phẩm ngắn ngày có giá trị kinh tế cao. Hạt đậu tương là nguồn thực phẩm quý chứa các thành phần chất béo, protein, vitamin và hàm lượng canxi cần thiết cho khẩu phần ăn hàng ngày của con người, đặc biệt đối với người bệnh cao huyết áp và tim mạch. Đậu tương là loại cây dễ canh tác, thích hợp với nhiều hệ sinh thái và có khả năng cải tạo đất rất tốt (Ngô Thế Dân *et al.*, 1999). Đậu tương được trồng trên 200 quốc gia, với sản lượng trung bình hàng năm khoảng hơn 200 triệu tấn. Ở Việt Nam, diện tích trồng cây đậu tương chỉ đứng sau lúa, ngô và cây lạc. Tính đến 2005, diện tích trồng đậu tương ở Việt Nam là khoảng 203600 ha và sản lượng đạt 291500 tấn (<http://www.gso.gov.vn>). Cây đậu tương đã được đưa vào nhóm các cây trồng được ưu tiên của ngành nông nghiệp và đang được khuyến khích sản xuất ở trong nước.

Tạo giống đậu tương mới có năng suất cao, kháng bệnh, chống chịu tốt với các điều kiện bất lợi luôn được các nhà tạo giống quan tâm. Bên cạnh các phương pháp chọn tạo giống truyền thống đã và đang được sử dụng, phương pháp tạo giống mới bằng công nghệ gen cũng đang là phương pháp mang lại

hiệu quả cao trong công tác tạo giống đậu tương với các tính trạng mong muốn (Krishnan, 2005). Theo thống kê của USDA, diện tích trồng cây đậu tương chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ chiếm 81% ở Mỹ, 99,1% ở Argentina và 34% ở Brazil (Letster, 2004). Tuy nhiên ở Việt Nam, tạo giống cây trồng mới bằng công nghệ gen đối với cây đậu tương mới bắt đầu quan tâm nghiên cứu.

Để tạo được giống đậu tương mới bằng công nghệ gen thì trước hết cần phải nghiên cứu cho được hệ thống tái sinh cây *in vitro*, trong đó kỹ thuật tái sinh cây qua phôi soma có ưu việt hơn việc tái sinh qua đa chồi bởi cây tái sinh hình thành từ một tế bào. Xuất phát từ cơ sở trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu khả năng tái sinh cây qua phôi soma đối với 2 giống đậu tương Việt Nam làm cơ sở cho nghiên cứu tạo giống cây trồng mới bằng công nghệ gen.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu thực vật

Ba giống đậu tương được sử dụng trong nghiên cứu là:

Hai giống đậu tương Việt Nam ĐT12 và VX93 do Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm cung cấp.

Giống ĐT12 và VX93 có thể trồng 3 vụ trong năm, phổ thích ứng rộng, được trồng đại trà ở phía Bắc vì có ưu điểm: thời gian sinh trưởng ngắn (85 - 90 ngày đối với giống VX93 và 70 - 75 ngày đối với giống ĐT12), độ thuần khá, năng suất đạt 2 - 2,3 tấn/ha, chống chịu khá với nóng và hạn.

Giống đậu tương Thorne do trường Đại học Tổng hợp Nebraska, Hoa Kỳ cung cấp. Giống đậu tương "Thorne" có khả năng tái sinh cây từ phôi soma rất tốt và được sử dụng như giống đối chứng trong nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Tạo nguyên liệu nuôi cấy *in vitro*: Hạt của 3 giống đậu tương ĐT12, VX93 và Thorne, được gieo trồng ngoài nhà lưới tại Trại Thực nghiệm sinh học, Cổ Nhuế, Từ Liêm, Hà Nội. Khi cây bắt đầu ra hoa tiến hành đánh dấu các hoa nở. Thu quả sau hoa nở 5 ngày, 10 ngày, 15 ngày và 20 ngày. Buộc kín quả trong túi nilon và bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Lau sạch quả bằng bông tẩm cồn 70%, tước vỏ quả, tách đôi 2 lá mầm, loại bỏ phôi thu hai mảnh lá mầm. Lựa chọn lá mầm non có màu xanh sáng, còn tươi, không bị dập nát để nuôi cấy tạo phôi soma.

Cảm ứng tạo phôi soma: Lá mầm non từ các mẫu quả non có các ngày tuổi khác nhau (5 ngày, 10 ngày, 15 ngày và 20 ngày) được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo phôi soma: MS cơ bản + vitamin B₅ + 2,4 D (20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l, 50 mg/l) + 40 g/l sucrose + 7 g/l phytoagar.

Đánh giá tỷ lệ mẫu tạo cụm phôi soma sau 6 tuần nuôi cấy theo công thức sau:

$$C = \frac{N_{cp}}{N_t} \times 100$$

C : Tỷ lệ mẫu tạo phôi soma (%)

N_{cp}: Số mẫu tạo phôi soma

N_t: Tổng số mẫu nuôi cấy

Phát triển phôi soma: Sau khi cảm ứng tạo phôi, lựa chọn các cụm phôi có màu xanh sáng, dạng bó chặt cấy chuyển sang môi trường phát triển phôi soma: MS cơ bản + vitamin B₅ + 2,4 D (20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l, 50 mg/l) + 40 g/l sucrose + 7 g/l phytoagar. Sau 2 tuần nuôi cấy, theo dõi số cụm phôi sống sót trên tổng số cụm phôi cấy chuyển.

Nảy mầm phôi soma: Cấy chuyển cụm phôi trưởng thành sang môi trường MS cơ bản + vitamin B₅ + 60 g/l maltose, 7 g/l phytoagar + 2 g/l than hoạt tính. Đánh giá tỷ lệ cụm phôi nảy mầm và số phôi nảy mầm/cụm phôi.

Tái sinh cây hoàn chỉnh: Các phôi đã nảy mầm được cấy chuyển sang môi trường MS cơ bản + vitamin B₅ + 30 g/l sucrose cho đến khi hình thành cây xanh hoàn chỉnh (lá xanh, bộ rễ phát triển).

Điều kiện nuôi cấy *in vitro* (từ lúc nuôi cảm ứng đến tái sinh cây hoàn chỉnh): Nuôi dưới ánh đèn neon với cường độ 2000 lux, thời gian chiếu sáng 10/24 giờ. Nhiệt độ phòng nuôi 25°C ± 1°C.

Ký hiệu thành phần các môi trường nuôi cấy dùng cho tái sinh cây qua phôi soma từ lá mầm hạt chưa chín như trong bảng 1.

Bảng 1. Thành phần các môi trường nuôi cấy dùng cho tái sinh cây qua phôi soma từ lá mầm hạt chưa chín.

Loại môi trường	Ký hiệu	Thành phần
	D20	MS* + vitamin B ₅ + 20 mg/l 2,4 D + 40 g/l sucrose + 7 g/l phytoagar, pH = 7,0
Cảm ứng tạo phôi soma	D30	MS + vitamin B ₅ + 30 mg/l 2,4 D + 40 g/l sucrose + 7 g/l phytoagar, pH = 7,0
	D40	MS + vitamin B ₅ + 40 mg/l 2,4 D + 40 g/l sucrose + 7 g/l phytoagar, pH = 7,0
	D50	MS + vitamin B ₅ + 50 mg/l 2,4 D + 40 g/l sucrose + 7 g/l phytoagar, pH = 7,0
Phát triển phôi soma	MSD20	MS + vitamin B ₅ + 20 mg/l 2,4 D + 40 g/l sucrose + 7 g/l phytoagar, pH = 7,0
Nảy mầm phôi soma	M6AC	MS + vitamin B ₅ + 60 g/l maltose + 7 g/l phytoagar + 2 g/l than hoạt tính, pH = 5,8
Tái sinh cây hoàn chỉnh	MSO	MS + vitamin B ₅ + 30 g/l sucrose + 7 g/l phytoagar, pH = 5,8

Ghi chú: MS: môi trường Murashige và Skoog (1962); Vitamin B₅: Gamborg và Phillips (1995).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ 2,4 D đến cảm ứng tạo phôi soma

Giai đoạn cảm ứng có vai trò quan trọng đối với quá trình phát sinh phôi soma. Môi trường cảm ứng tạo phôi soma ở đa số thực vật cần nồng độ cao chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin như IAA, NAA, 2,4 D và IBA. Trong đó, 2,4 D được sử dụng phổ biến và có hiệu quả để cảm ứng tạo phôi soma ở nhiều giống đậu tương (Bonacin *et al.*, 2000; Hazel *et al.*, 1998; Murer *et al.*, 2001; Parrott *et al.*, 1988). Tuy nhiên, nồng độ 2,4 D thích hợp để cảm ứng tạo phôi soma ở mỗi giống rất khác nhau. Nghiên cứu của Tomlin và đồng tác giả (2002) về ảnh hưởng của nồng độ 2,4 D trên 19 giống đậu tương đã cho thấy, nồng độ 2,4 D thích hợp cho giai đoạn cảm ứng khác nhau tùy từng giống. Trong số 19 giống, 9 giống có tỷ lệ mẫu tạo cụm phôi và số lượng phôi soma trung bình/mẫu cao nhất khi cảm ứng với 40 mg/l 2,4 D.

Khả năng tạo phôi soma và số lượng phôi soma tạo được là những thông số dùng để đánh giá tính

thích ứng của giống trong hệ thống nuôi cấy nhằm sử dụng cho mục đích chuyển gen sau này. Kết quả ở bảng 2 cho thấy khả năng tạo phôi soma đối với các nồng độ khác nhau của 2,4 D trên ba giống đậu tương như sau:

Giống đậu tương Thorne có khả năng tạo phôi tốt nhất trên môi trường cảm ứng có bổ sung 40 mg/l 2,4 D (D40) với tỷ lệ tạo phôi soma là 64% và số phôi soma trung bình trên mẫu nuôi cấy là 17,5. Sau đó đến giống ĐT12 có khả năng tạo phôi soma là 39% và số phôi trung bình/mẫu là 7,5. Trong khi đó, giống VX93 không có phản ứng tạo phôi soma với tất cả các công thức cùng nuôi cấy. Trong nghiên cứu, chúng tôi cũng nhận thấy hiệu suất tạo phôi soma không tăng tỷ lệ thuận với nồng độ 2,4 D đối với cả hai giống đậu tương Thorne và ĐT12. Kết quả nghiên cứu còn chỉ ra nồng độ 2,4 D không chỉ ảnh hưởng đến khả năng tạo phôi soma mà còn ảnh hưởng đến chất lượng phôi soma ở mỗi giống. Theo nghiên cứu của Tomlin và đồng tác giả (2002), chất lượng phôi được đánh giá dựa trên cả hình thái và màu sắc phôi.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4 D tới khả năng cảm ứng tạo phôi soma.

Giống đậu tương	Nồng độ 2,4 D (mg/l)	Mẫu thí nghiệm	Tỷ lệ mẫu tạo cụm phôi (%)	Số phôi TB/cụm phôi	Chất lượng phôi
Thorne	20	200	5,5	3 ± 2,0	++
	30	200	21,0	7,5 ± 3,5	++
	40	200	64,0	17,5 ± 3,5	+++
	50	200	13,5	2 ± 1,0	+
ĐT12	20	200	27,5	3 ± 2,0	++
	30	200	39,0	7,5 ± 3,5	+++
	40	200	17,5	3,5 ± 2,5	+
	50	200	3,5	2,5 ± 2,5	+
VX93	20	200	-	-	-
	30	200	-	-	-
	40	200	-	-	-
	50	200	-	-	-

Ghi chú: (+++): phôi màu xanh, căng và bó chặt thành khối; (++) : phôi màu vàng, thon dài, rời; (+): phôi màu vàng, xốp, rời; (-): không xuất hiện cụm phôi.

Quan sát khả năng tạo phôi soma của các giống đậu tương trong nghiên cứu, chúng tôi cũng nhận thấy: Cụm phôi soma của hai giống đậu tương Thorne và ĐT12 có 3 dạng: (i) phôi căng, chắc, bó

chặt với nhau thành một khối và có màu xanh sáng (loại +++); (ii) dạng thon dài nhưng rời nhau và có màu vàng (loại ++); và (iii) dạng thứ ba gồm các phôi xốp, rời nhau và có màu vàng (loại +) (Bảng 2,

Hình 2). Theo nghiên cứu của nhiều tác giả, loại phôi soma bó chặt, căng chắc và có màu xanh sáng là tốt nhất để tái sinh cây hoàn chỉnh cũng như trong nghiên cứu chuyển gen (Hazel *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2004; Droste, 2000). Phôi soma thuộc loại này của giống Thorne tạo tốt trên môi trường D40 (bổ sung 40 mg/l 2,4 D), còn giống ĐT12 là môi trường D30 (bổ sung 30 mg/l 2,4 D).

Từ kết quả nhận được trên đây chúng tôi có nhận xét: rõ ràng nồng độ 2,4 D ảnh hưởng khác nhau đối với mỗi giống đậu tương trong nghiên cứu, thể hiện qua tỷ lệ mẫu tạo phôi soma và số phôi trung bình của một cụm phôi.

Sự phát triển của phôi soma

Nồng độ 2,4 D không chỉ ảnh hưởng ở giai đoạn cảm ứng mà còn ảnh hưởng cả đến các giai đoạn tiếp theo như giai đoạn phát triển và nảy mầm phôi soma. Theo kết quả nghiên cứu của một số tác giả, nếu phôi soma không được cấy chuyển sang môi trường phát triển phôi với nồng độ 2,4 D giảm, phôi sẽ khô, ngả màu trắng đục và chết (Parroot *et al.*, 1988; Tomlin *et al.*, 2002). Do tác dụng của 2,4 D với nồng độ cao và trong thời gian dài ở giai đoạn cảm ứng đã ức chế sự phát triển của phôi ở giai đoạn tiếp theo. Thường nồng độ 2,4 D giảm xuống 20

mg/l là tương đối thích hợp cho phát triển phôi soma đối với một số giống đậu tương (Parroot *et al.*, 1988; Tomlin *et al.*, 2002). Với mục đích là xác định nồng độ 2,4 D thích hợp cho tạo phôi soma giống ĐT12, vì thế trong nghiên cứu, những phôi có màu xanh sáng, căng, dạng bó chặt thành khối (loại +++) được lựa chọn cấy chuyển sang môi trường phát triển phôi MSD20 (bổ sung 20 mg/l 2,4 D và môi trường mới có nồng độ 2,4 D giữ nguyên như khi nuôi cảm ứng (30 mg/l đối với giống ĐT12 và 40 mg/l đối với giống Thorne).

Kết quả trong bảng 3 chỉ ra là sau khi nuôi cấy cảm ứng tạo phôi, các mẫu được cấy chuyển sang môi trường phát triển soma (bổ sung 20 mg/l 2,4 D), tỷ lệ cụm phôi phát triển đạt 100% đối với giống Thorne và 92,3% đối với giống ĐT12. Ngược lại, khi các phôi soma không được chuyển sang môi trường phát triển phôi (giữ nguyên nồng độ 2,4 D như trong môi trường cảm ứng), thì tỷ lệ cụm phôi phát triển chỉ đạt 67,2% (đối với giống Thorne) và 74,4% (đối với giống ĐT12).

Như vậy, mặc dù nồng độ 2,4 D cảm ứng tạo phôi là khác nhau đối với giống Thorne và giống ĐT12, nhưng cả hai giống đều có phản ứng phát triển phôi tốt trên môi trường nuôi cấy có bổ sung 20 mg/l 2,4 D.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4 D đến khả năng phát triển và nảy mầm phôi soma đối với giống đậu tương Thorne và ĐT12.

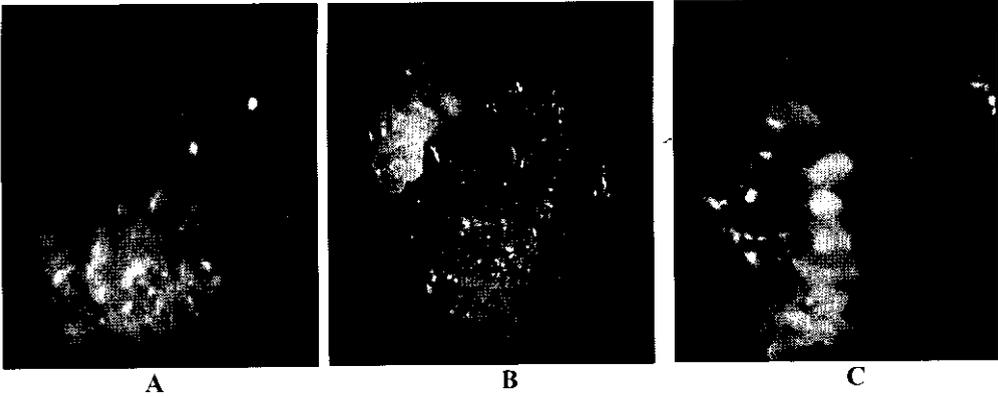
Giống đậu tương	Nồng độ 2,4 D (mg/l)	Số cụm phôi cấy chuyển	Tỷ lệ cụm phôi phát triển (%)	Tỷ lệ cụm phôi soma nảy mầm (%)	Số phôi trung bình	Tỷ lệ tái sinh cây hoàn chỉnh (%)
Thorne	20	64	100	75	11	84,8
	40	64	67,2	43,8	6,5	76,4
ĐT 12	20	39	92,3	56,4	5,5	79,3
	30	39	74,4	38,5	3	75,6

Sự nảy mầm của phôi soma

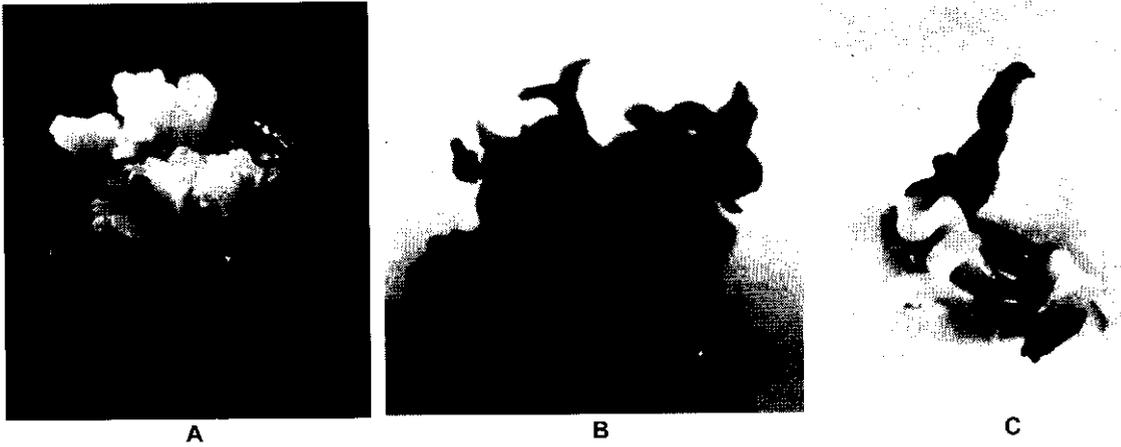
Sự nảy mầm của phôi soma được xem là giai đoạn quan trọng quyết định khả năng thành công của hệ thống nuôi cấy.

Sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường phát triển phôi, các cụm phôi soma được cấy chuyển sang môi trường nảy mầm (môi trường MS cơ bản + vitamin B₅ + 60 g/l maltose + 7 g/l phytoagar + 2 g/l than hoạt tính)

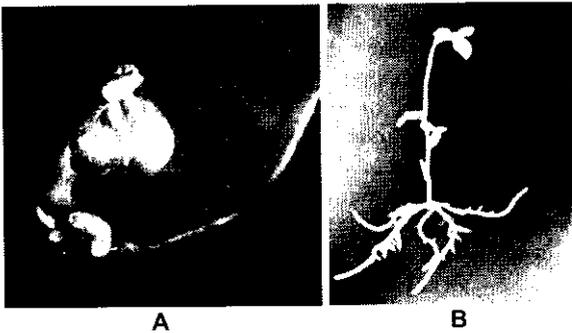
Kết quả ở bảng 3 cho thấy: tỷ lệ cụm phôi nảy mầm và số phôi trung bình/cụm cao nhất khi bổ sung 20 mg/l 2,4 D ở giai đoạn phát triển phôi đối với cả hai giống Thorne và ĐT12. Tuy nhiên, giữa 2 giống có sự chênh lệch khá lớn về tỷ lệ cụm phôi nảy mầm. Tỷ lệ cụm phôi nảy mầm đạt 75% và số phôi trung bình/cụm là 11 phôi đối với giống Thorne và 56,4% và số phôi trung bình/cụm là 5,5 đối với giống ĐT12.



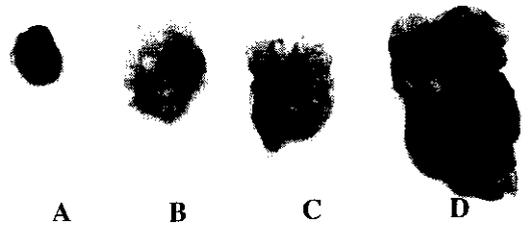
Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4 D đến chất lượng phôi soma của giống DT12. A: Phôi soma loại (+++); B: Phôi soma loại (++); C: Phôi soma loại (+).



Hình 2. Hình thái phát triển của phôi soma giống DT12 trên môi trường này mầm theo thời gian nuôi cấy. A: 3 tuần; B: 6 tuần và C: 8 tuần.



Hình 3. Tái sinh cây hoàn chỉnh từ phôi soma giống DT12. A: Phôi nảy chồi; B: Cây con.



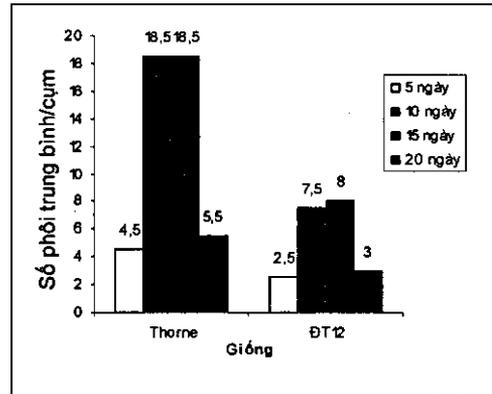
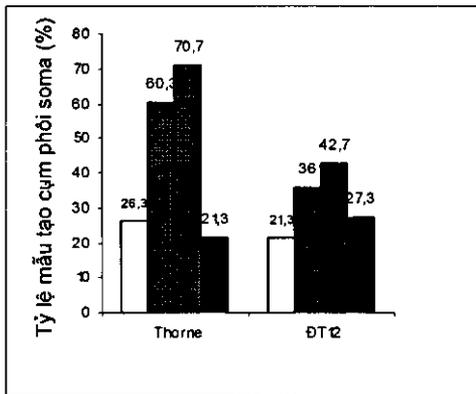
Hình 5. Khả năng tạo phôi soma của các mảnh mầm có độ tuổi khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường cảm ứng. A: 5 ngày; B: 10 ngày; C: 15 ngày; D: 20 ngày (tuổi quả tính từ sau khi hoa nở).

Khả năng tái sinh cây hoàn chỉnh của hai giống đậu tương Thorne và ĐT12

Phôi soma phát triển đến giai đoạn có 2 lá mầm được chuyển sang môi trường MS cơ bản bổ sung vitamin B₅ để tạo cây xanh *in vitro* hoàn chỉnh. Quan sát sự phát triển của phôi cho thấy, sau 1 tuần trên môi trường này, phôi soma bắt đầu nảy chồi và hình thành rễ, 2 tuần tiếp theo xuất hiện lá thật và có rễ (Hình 3). Kết quả ở bảng 3 cũng chỉ ra, khả năng tái sinh cây hoàn chỉnh cũng bị ảnh hưởng bởi nồng độ 2,4 D trong giai đoạn cảm ứng tạo phôi soma, cụ thể tỉ lệ tái sinh cây đạt 84,8% đối với giống Thorne và 79,3% đối với giống ĐT12 khi nồng độ 2,4 D duy trì là 20 mg/l trong môi trường phát triển phôi, trong khi đó tỉ lệ tái sinh là 76,4 % ở giống Thorne (duy trì nồng độ 2,4 D 40mg/l) và 75,6 % ở giống ĐT12 (duy trì nồng độ 30 mg/l 2,4 D).

Ảnh hưởng của tuổi quả non tới khả năng cảm ứng tạo phôi soma

Để nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi quả non tới khả năng tạo phôi soma, các mẫu quả được thu hái sau khi hoa nở 5, 10, 15 và 20 ngày. Kết quả nhận được ở hình 4 cho thấy tuổi mẫu có ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ mẫu tạo cụm phôi và số lượng phôi trung bình/cụm nhưng sự khác nhau này không rõ rệt giữa 2 giống. Tỷ lệ mẫu tạo phôi soma và số lượng phôi trung bình ở cả 2 giống có giá trị cao nhất khi tuổi quả từ 10 ngày đến 15 ngày (Hình 5). Đối với giống Thorne, tỷ lệ mẫu tạo cụm phôi soma đạt 69,3% và số phôi trung bình/cụm đạt 18,5 khi tuổi quả là 10 ngày, 70,7% mẫu tạo phôi và 18,5 phôi trung bình/cụm khi tuổi quả là 15 ngày. Giống ĐT12 có tỷ lệ mẫu tạo phôi là 36 %, số phôi trung bình/cụm là 7,5 khi tuổi quả là 10 ngày, 42,7% mẫu tạo phôi và 8 phôi trung bình/cụm khi tuổi quả là 15 ngày (Hình 4).



Hình 4. Ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng tạo phôi soma của giống ĐT12 và Thorne.

KẾT LUẬN

Trong quá trình nghiên cứu hệ thống tái sinh qua phôi soma từ lá mầm hạt non đối với hai giống đậu tương ĐT12 và VX93, chỉ có giống ĐT12 có phản ứng tạo phôi soma.

Đã nghiên cứu được hệ thống tái sinh cây qua phôi soma đối với giống ĐT12 như sau: tuổi quả thích hợp để tạo phôi soma là 10 - 15 ngày sau khi hoa nở. Môi trường cảm ứng tạo phôi có hiệu quả là môi trường D30 (MS cơ bản + vitamin B₅ + 30 mg/l 2,4 D + 40 g/l sucrose, pH = 7,0). Nồng độ 2,4 D tối thích để phát triển phôi soma là 20 mg/l. Môi trường này mầm phôi và tạo cây hoàn chỉnh thích hợp là môi trường MS cơ bản không có chất kích thích sinh trưởng. Hiệu suất tái sinh cây giống ĐT12 đạt 39% và số phôi trung bình là 7,5.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài Nghiên cứu cơ bản cấp Nhà nước “Nghiên cứu và hoàn thiện phương pháp chuyển gen vào một số giống đậu tương triển vọng ở Việt Nam thông qua *Agrobacterium tumefaciens*”, mã số: 6 134 06.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bonacin GA, Antonio ODM, Roberto CO (2000) Induction of somatic embryogenesis in soybean: physicochemical factors influencing the development of somatic embryos. *Genet Mol Biol* 23(4): 865-868.

Droste A (2000) Intergrate bombardment and *Agrobacterium* transformation system: an alternative method for soybean transformation. *Plant Mol Biol*

Rep 18: 51-59.

Gamborg OL, Phillips GC (1995) *Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, USA.

Hazel CB, Klein TM, Anis M, Parrott WA (1998) Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures. *Plant Cell Rep* 17: 765-772.

<http://www.gso.gov.vn/default.aspx> (trang thông kê diện tích và sản lượng cây nông nghiệp phân theo địa phương).

Ko TS, Korban SS (2004) Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 552-558.

Krishnan HB (2005) Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content. *Crop Sci* 45: 454-461.

Letster MC (2004) Understanding biotechnology in Agriculture 8(3): 21-29.

Liu HK, Yang C, Wei ZM (2004) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

of soybeans using an embryonic tip regeneration system. *Planta* 219: 1042-1049.

Murer CA, Dinkins RD, Redmond CT (2001) Embryogenic response of multiple soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars across three locations *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 62-67.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Ngô Thế Dân, Trần Đình Long, Trần Văn Lại, Đỗ Thị Dung, Phạm Thị Đào (1999) *Cây đậu tương*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Hà Nội.

Parrott WA, Dryden G, Vogt S, Hildebrand DF, Collins GB, Williams EG (1988) Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 24: 817-820.

Tomlin ES, Branch SR, Chamberlain D, Gabe H, Wright MS, Stewart CN (2002) Screening of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, lines for somatic embryo somatic induction and mature capability from immature cotyledons. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38: 543-548.

PLANT REGENERATION VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM IMMATURE COTYLEDONS IN SOYBEAN (*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL)

Nguyen Thi Thu, Do Tien Phat, Le Thi Muoi, Dinh Thi Phong*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Three varieties of soybean DT12, VX93 (Vietnamese varieties) and Thorne (American variety) were used to establish a plant regeneration system via embryogenesis from immature cotyledons explants. Firstly, cotyledons of immature seeds collected from different stages at 5, 10, 15 and 20 days after flowering were cultured on somatic embryo induction medium containing the basic MS supplemented B5 vitamins, 30 mg/l sucrose, 2,4 D with different doses 20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l and solidified with agar. The induced embryos with solid bright green form were transferred to the new somatic embryo induction medium every 4 weeks for further development. Secondly, matured embryos were then transferred to somatic embryo germination medium including the basic MS, B5 vitamins supplemented 60 g/l maltose and 2 g/l activated charcoal for somatic embryo germination. Finally, germinated embryos were transferred to medium including the basic MS, B5 vitamins, 30 g/l sucrose for shoot and root elongation. In this research, embryos were only induced from DT12, but not from VX93. The proper stages for immature seeds for effective initiation of embryos were the seeds of 10 - 15 days after flowering. The efficiency of regeneration of DT12 variety was 39% and the average number of embryos were 7.5 per explants.

Keywords: *embryogenesis, immature cotyledons, in vitro culture, regeneration, soybean*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-2165676; E-mail: phongibt@ibt.ac.vn