

# NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG TÁI SINH CHỒI CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG (*GLYCINE MAX (L.) MERRILL*) VIỆT NAM

Nguyễn Tiên Dũng<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Hồng<sup>1</sup>, Bùi Tri Thức<sup>1</sup>, Ngô Xuân Bình<sup>1\*</sup>

## TÓM TẮT

Nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi được tiến hành trên 10 giống đậu tương của Việt Nam. Bằng phương pháp nuôi cấy nốt lá mầm, mảnh lá mầm được nuôi cấy trên môi trường bổ sung chất kích thích sinh trưởng BAP hoặc kinetin ở các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l). Sau 14 ngày nuôi cấy, khả năng tái sinh và tạo đa chồi của các giống đậu tương có sự khác biệt rất lớn. Bổ sung BAP cho hiệu quả tái sinh, tạo đa chồi tốt hơn kinetin ở cùng nồng độ. Nồng độ BAP -1,5mg/l thích hợp cho khả năng tái sinh tạo đa chồi ở hầu hết các giống đậu tương nghiên cứu (số chồi TB/mẫu dao động từ 2,10 đến 3,57 chồi); giống Đ9602, ĐVN10 có khả năng tạo đa chồi tốt trên môi trường bổ sung BAP-2,0mg/l (số chồi TB/mẫu lần lượt 2,30 và 2,42 chồi).

**Từ khóa:** *Chất kích thích sinh trưởng, đậu tương, nốt lá mầm, tái sinh chồi.*

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khả năng tái sinh là yếu tố quan trọng khi xây dựng quy trình chuyển gen trên cây trồng. Ở đậu tương, đã có nhiều báo cáo về hệ thống tái sinh như: hệ thống tái sinh từ phôi vô tính [2] và tái sinh thông qua hình thành chồi bất định [10] .... Tuy nhiên, mỗi phương pháp có ưu, nhược điểm riêng và hiệu quả chuyển gen phụ thuộc nhiều vào hệ thống tái sinh. Nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh nhằm nâng cao hiệu quả chuyển gen bằng cách cải tiến phương pháp hay xác định các yếu tố tối ưu cho quy trình [6], [9]. Phương pháp chuyển gen thông qua nốt lá mầm được Hinchee và cộng sự xây dựng năm 1988 [3], cho đến nay phương pháp này vẫn mang lại hiệu quả cao hơn các phương pháp khác và được nhiều nhà khoa học áp dụng. Hạn chế lớn nhất khi chuyển gen vào cây đậu tương là khả năng tái sinh chồi ở giai đoạn sau biến nạp và sự tiếp nhận gen lạ của cây. Sự khác biệt về giống (kiểu gen) là yếu tố gây trở ngại lớn khi tiến hành chuyển gen ở đậu tương [1], [8]. Để nâng cao hiệu quả chuyển gen, ngoài việc lựa chọn giống, một số nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu cải tiến phương pháp cho phù hợp [5], [6], [7], [9]. Ở Việt Nam, đậu tương là cây trồng được xếp sau lúa, ngô về tầm quan trọng và là cây trồng trong nhóm ưu tiên nghiên cứu chuyển gen của Việt Nam (cùng với ngô, bông). Những năm gần đây, nghiên cứu chuyển gen ở đậu tương đã được tiếp cận triển khai ở một số phòng thí nghiệm và bước đầu đã thu được kết quả [1]. Tuy nhiên để chuyển gen hiệu quả cho các giống đậu tương của Việt Nam trước hết phải xác định khả năng tái sinh của mỗi giống. Vì vậy, việc xác định quy trình chuyển gen phù hợp cần phải xây dựng một cách hệ thống. Trong phạm vi bài báo tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của BAP và kinetin đến khả năng tái sinh chồi của một số giống đậu tương của Việt Nam.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu dùng cho các thí nghiệm là hạt trưởng thành (hạt chín) của 10 giống đậu tương do Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Nghiên cứu Ngô cung cấp.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

- **Phương pháp khử trùng hạt:** hạt đậu tương được đưa vào bình tam giác đã khử trùng. Dùng cồn 70% bổ sung ngập hạt, lắc nhẹ liên tục trong 3 phút. Tiếp đến, hạt được chuyển sang khử trùng 13 phút trong dung dịch NaOCl\* 15% (Natri hypochlorite). Rửa sạch hạt bằng nước cất khử trùng 4-5 lần. Đưa hạt ra đĩa petri, dùng dao tách bỏ vỏ hạt và nuôi cấy nảy mầm trên môi trường GM (bảng 1) 3-5 ngày. Điều kiện chiếu sáng 18h/ngày, ẩm độ 70-75%, nhiệt độ 25<sup>0</sup>C ±2.

### - Chuẩn bị mẫu thí nghiệm

Hạt đậu tương nảy mầm sau 3-5 ngày tuổi được sử dụng làm mẫu thí nghiệm. Dùng dao cắt bỏ toàn bộ trụ dưới lá mầm. Tách đôi hai lá mầm sao cho mỗi lá mầm chứa ½ chồi đỉnh (sau đây

<sup>1</sup> Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

gọi là mẫu nuôi cấy). Mẫu nuôi cấy được cắt bỏ chồi đỉnh để kích thích khả năng tạo đa chồi khi nuôi cấy, (hình ảnh 1-B, 1- C).

#### - Nuôi cấy tái sinh chồi

Mẫu nuôi cấy được đặt nghiêng 45 độ trên môi trường SIM (bảng 1) có bổ sung chất kích thích sinh trưởng (BAP hoặc kinetin) ở các nồng độ khác nhau (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l) để kích thích tái sinh và tạo đa chồi. Mỗi đĩa petri nuôi cấy 5 mẫu. Thời gian nuôi cấy 14 ngày.

Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 18h/ngày, ẩm độ 70-75%, nhiệt độ  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ .

Ghi nhận các chỉ tiêu: số mẫu phát sinh, số chồi phát sinh/mẫu.

Số mẫu phát sinh chồi (có chồi bật lên) = tổng số mẫu phát sinh chồi/tổng số mẫu ban đầu

Tổng số chồi = Tổng số chồi thu được

Số chồi TB/mẫu = Tổng số chồi thu được/ tổng số mẫu phát sinh chồi.

Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm IRISTAT 4.0.

**Bảng 1. Thành phần các môi trường dùng cho nuôi cấy**

Thành phần	Môi trường nảy mầm (GM)	Môi trường tạo chồi (SIM)
MS (đa lượng, vi lượng)	x	x
B5 vitamin	x	x
Đường	3%	3%
Agar (Việt Nam)	0,6%	0,6%
6-benzyl- aminopurine (Sigma)	-	0,5- 2,0 mg/l
Kinetin (Sigma)	-	0,5- 2,0 mg/l
pH	5,6	5,6

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi từ nốt lá mầm của một số giống đậu tương

Mảnh lá mầm của 10 giống đậu tương nghiên cứu được nuôi cấy nảy mầm trên môi trường bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau. Sau 14 ngày nuôi cấy, hầu hết các giống đều có khả năng tái sinh chồi (bảng 2). Tuy nhiên, khả năng tái sinh có sự khác biệt rất lớn giữa các giống ở cùng nồng độ BAP hay nồng độ BAP khác nhau ở cùng một giống.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy: hầu hết các giống đậu tương nghiên cứu đều có khả năng tái sinh tốt khi bổ sung BAP vào môi trường nuôi cấy với hàm lượng từ 0,5 – 2,0 mg trên một lít môi trường nuôi cấy (tỷ lệ mẫu phát sinh chồi dao động từ 40-100%). Khi không bổ sung BAP (CT1), tỷ lệ mẫu tái sinh chồi thấp hơn, dao động từ 15 đến 42%.

Khả năng tạo đa chồi (số chồi TB/mẫu) ở các giống dao động từ 1,36 đến 3,57 chồi/mẫu khi bổ sung BAP với nồng độ từ 0,5 đến 2,0mg/l. Kết quả cho thấy, ở nồng độ BAP-1,5mg/l cho số chồi trung bình/mẫu cao hơn các nồng độ khác ở hầu hết các giống (số chồi TB/mẫu dao động từ 1,75 đến 3,57 chồi/mẫu). Tuy nhiên, các giống Đ9602, ĐVN10 có khả năng tạo đa chồi cao trên môi trường bổ sung BAP ở nồng độ 2,0mg/l (số chồi TB/mẫu lần lượt đạt 2,30 và 2,42 chồi). Giống ĐVN11 có khả năng tạo đa chồi cao khi bổ sung BAP với hàm lượng từ 1-1,5mg/l (số chồi TB/mẫu trên 2,6 chồi – bảng 2).

Ở cùng nồng độ BAP – 1,5mg/l, giống Đ2101 và DT2001 có khả năng tạo đa chồi cao hơn các giống khác (số chồi hình thành lần lượt đạt 3,57 và 3,10 chồi/mẫu); giống ĐT22 có số chồi hình thành thấp nhất (1,75 chồi/mẫu); các giống còn lại đều có nhiều hơn 2 chồi/mẫu (dao động từ 2,10 đến 2,93 chồi/mẫu) (bảng 2).

**Bảng 2 : Ảnh hưởng của BAP đến tái sinh chồi từ nốt lá mầm của các giống đậu tương sau 14 ngày nuôi cấy**

<b>Giống</b>	<b>CT</b>	<b>Nồng độ BAP (mg /l)</b>	<b>Số mẫu ban đầu (mẫu)</b>	<b>Số mẫu tái sinh chồi (mẫu)</b>	<b>Số chồi TB/ mẫu (chồi)</b>	<b>Tổng số chồi</b>
ĐVN11	1	0	100	15	1,13	17
	2	0,5	100	80	2,34	187
	3	1	100	90	2,67	240
	4	1,5	100	65	2,62	170
	5	2	100	54	2,31	125
<i>CV(%)</i>					2,2	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,89	
Đ9602	1	0	100	12	1,25	15
	2	0,5	100	50	1,56	78
	3	1	100	80	1,68	134
	4	1,5	100	65	2,20	143
	5	2	100	40	2,30	92
<i>CV(%)</i>					3,0	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,11	
Vàng MK	1	0	100	15	1,13	15
	2	0,5	100	77	1,6	123
	3	1	100	83	1,87	155
	4	1,5	100	88	2,33	205
	5	2	100	70	2,23	156
<i>CV(%)</i>					2,4	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,11	
ĐT22	1	0	100	13	1,23	16
	2	0,5	100	60	1,53	92
	3	1	100	70	1,60	112
	4	1,5	100	80	1,75	140
	5	2	100	83	1,72	143
<i>CV(%)</i>					3,8	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,12	
Đ2101	1	0	100	20	1,13	28
	2	0,5	100	47	1,57	74
	3	1	100	64	2,06	132
	4	1,5	100	74	3,57	264
	5	2	100	57	3,17	181
<i>CV(%)</i>					2,9	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,96	
ĐVN10	1	0	100	42	1,38	58
	2	0,5	100	58	1,48	86
	3	1	100	69	2,2	152
	4	1,5	100	87	2,33	203
	5	2	100	65	2,42	157
<i>CV(%)</i>					2,6	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,11	
DT2001	1	0	100	36	1,61	58
	2	0,5	100	80	2,23	178
	3	1	100	80	2,64	211
	4	1,5	100	90	3,10	279

	5	2	100	76	2,8	213
<i>CV(%)</i>					1,7	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,36	
	1	0	100	32	1,41	45
	2	0,5	100	100	1,80	180
DT2003	3	1	100	100	2,40	240
	4	1,5	100	100	2,92	292
	5	2	100	100	2,29	229
<i>CV(%)</i>					2,0	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,21	
	1	0	100	18	1,28	23
	2	0,5	100	90	1,36	122
DT2008	3	1	100	100	1,67	160
	4	1,5	100	100	2,10	210
	5	2	100	80	1,78	142
<i>CV(%)</i>					3,4	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,26	
	1	0	100	28	1,54	43
	2	0,5	100	84	2,18	183
DT84	3	1	100	92	2,35	216
	4	1,5	100	98	2,93	287
	5	2	100	87	2,46	214
<i>CV(%)</i>					3,2	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,28	

Thí nghiệm được tiến hành tương tự với kinetin. Sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường có bổ sung kinetin ở các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l) tất cả các giống đều có khả năng tái sinh chồi, dao động từ 76-98%. Khả năng tạo đa chồi của các giống dao động từ 1,9 đến 2,38 chồi/mẫu, cao hơn so với đối chứng (CT1-không bổ sung kinetin, số chồi TB/mẫu dao động 1,07-1,39 chồi). Hầu hết các giống đều có khả năng tạo đa chồi cao hơn trên môi trường có bổ sung Kinetin 2,0 mg/l. Tuy nhiên, các giống Đ9602, ĐVN10, ĐVN11, DT2003 lại thích hợp khi bổ sung kinetin ở nồng độ thấp hơn (1,5 mg/l). Các giống Vàng MK, DT2008, DT84 có khả năng tạo đa chồi tương đương khi được bổ sung kinetin ở các nồng độ 1,5 hoặc 2,0 mg/l.

Khả năng tạo đa chồi của các giống Đ9602, ĐVN10, ĐVN11, DT2003 cao hơn các giống khác, số chồi tạo thành lần lượt đạt 2,43; 2,39; 2,38 và 2,38 chồi (bảng 3).

**Bảng 3 : Ảnh hưởng của Kinetin đến tái sinh chồi từ nốt lá mầm sau 14 ngày nuôi cấy**

Giống	CT	Nồng độ kinetin (mg/l)	Số mẫu ban đầu (mẫu)	Số mẫu phát sinh chồi (mẫu)	Số chồi TB/mẫu (chồi)	Tổng số chồi
	1	0	100	17	1,12	19
	2	0,5	100	95	1,19	113
ĐVN11	3	1	100	98	1,79	175
	4	1,5	100	93	2,13	198
	5	2	100	90	2,38	214
<i>CV(%)</i>					3,6	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					0,14	
	1	0	100	15	1,27	19
	2	0,5	100	78	1,24	97
Đ9602	3	1	100	85	1,81	154
	4	1,5	100	88	2,30	202
	5	2	100	80	2,34	187
<i>CV(%)</i>					4,0	

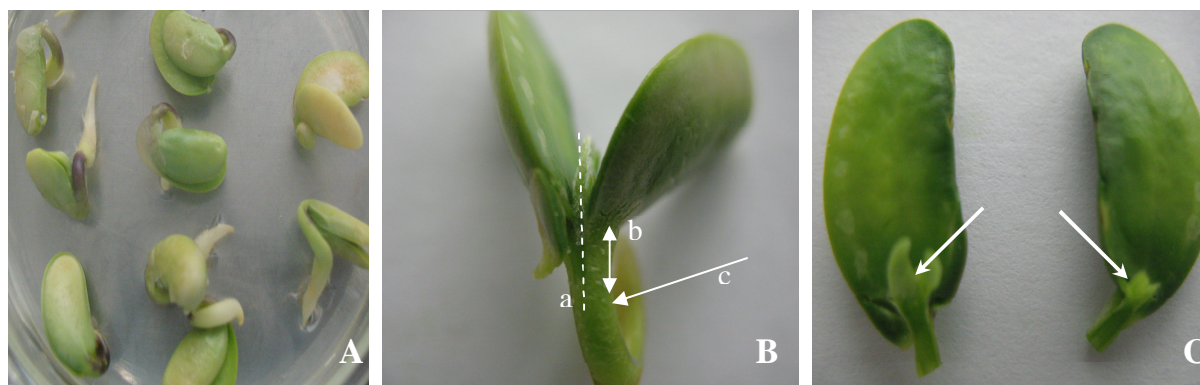
<i>LSD<sub>05</sub></i>					<i>0,12</i>	
Vàng MK	1	0	100	13	1,15	15
	2	0,5	100	95	1,39	132
	3	1	100	93	1,91	178
	4	1,5	100	93	2,29	213
	5	2	100	98	2,3	225
<i>CV(%)</i>					2,7	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					<i>0,11</i>	
ĐT22	1	0	100	19	1,11	21
	2	0,5	100	88	1,27	112
	3	1	100	90	1,26	114
	4	1,5	100	88	1,90	167
	5	2	100	85	1,88	160
<i>CV(%)</i>					4,6	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					<i>0,14</i>	
Đ2101	1	0	100	54	1,07	58
	2	0,5	100	80	1,23	98
	3	1	100	88	1,27	112
	4	1,5	100	93	1,32	123
	5	2	100	95	2,08	198
<i>CV(%)</i>					3,1	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					<i>0,9</i>	
ĐVN10	1	0	100	31	1,39	43
	2	0,5	100	88	1,35	119
	3	1	100	95	1,53	145
	4	1,5	100	95	2,24	213
	5	2	100	98	2,39	234
<i>CV(%)</i>					2,9	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					<i>0,11</i>	
DT2001	1	0	100	57	1,44	82
	2	0,5	100	76	1,64	125
	3	1	100	87	1,79	156
	4	1,5	100	82	2,15	176
	5	2	100	92	2,3	212
<i>CV(%)</i>					2,5	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					<i>0,21</i>	
DT2003	1	0	100	45	1,31	59
	2	0,5	100	68	1,65	112
	3	1	100	73	1,68	123
	4	1,5	100	89	2,38	212
	5	2	100	82	2,28	187
<i>CV(%)</i>					4,2	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					<i>0,39</i>	
DT2008	1	0	100	13	1,31	17
	2	0,5	100	83	1,42	118
	3	1	100	78	1,83	143
	4	1,5	100	81	1,9	154
	5	2	100	84	1,94	163
<i>CV(%)</i>					3,7	
<i>LSD<sub>05</sub></i>					<i>0,28</i>	

	1	0	100	11	1,36	15
	2	0,5	100	91	1,71	156
DT84	3	1	100	95	1,65	157
	4	1,5	100	87	2,05	178
	5	2	100	89	2,11	188
CV(%)					4,1	
LSD <sub>05</sub>					0,32	

Khả năng tái sinh là yêu cầu quan trọng trong nghiên cứu tạo ra cây trồng chuyển gen. Ở đậu tương, khả năng tái sinh và tạo đa chồi ảnh hưởng nhiều đến hiệu quả chuyển gen [1]. Olhoft và cộng sự (2003) [8] cho rằng, việc cắt bỏ chồi ngọn và chồi bên nhằm tạo đa chồi có thể góp phần làm tăng thêm số lượng chồi chuyển nạp gen. Điều này cũng được khẳng định trong các kết quả nghiên cứu sau đó [1]. Tuy nhiên, khả năng tạo đa chồi phụ thuộc rất nhiều vào giống [1], [2]. Trần Thị Cúc Hòa (2007) [1] khi khảo sát khả năng tạo đa chồi của 91 giống đậu tương trồng ở Việt Nam đã phân loại các giống có đặc tính đa chồi khác nhau (loại 1, 2, 3, 4) dựa vào số chồi trung bình trên mẫu nuôi cấy.

Kết quả thí nghiệm ở bảng 2 và 3 cho thấy, khả năng tạo đa chồi có sự khác biệt rất lớn ở các giống khi bổ sung BAP hoặc kinetin vào môi trường nuôi cấy. Nhìn chung, khi bổ sung BAP các giống có khả năng tạo đa chồi tốt hơn trên môi trường được bổ sung kinetin. Điều này chứng tỏ BAP có vai trò tích cực để tạo đa chồi của các giống đậu tương. Li Haiyan và cộng sự (2010) [4] đã nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi từ đỉnh phôi và nốt lá mầm của giống Peking cho thấy, nồng độ BAP 1,0 mg/l cho khả năng tái sinh chồi tốt nhất (3,56 chồi/nốt lá mầm). Young Jin Kim và cộng sự (2004) [9] nghiên cứu trên 4 giống đậu tương (Lx16; Ilpumgeomjeongkong, Pungsannamulkong, Alchankong) thấy rằng, khi bổ sung BAP 2 mg/l vào môi trường nuôi cấy số chồi trung bình trên một lá mầm là 2,6 chồi. Rất nhiều kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy, khi bổ sung 1,67 mg BAP vào một lít môi trường tái sinh chồi sau khi biến nạp gen cho kết quả tốt [1],[8].

Ngoài yếu tố giống, chất kích thích sinh trưởng thì khả năng tạo đa chồi phụ thuộc vào mẫu cấy. Để kích thích tạo đa chồi mẫu cấy phải được loại bỏ chồi đỉnh trước khi nuôi cấy [8]. Nếu loại bỏ chồi đỉnh không triệt để, mẫu cấy không hoặc ít có khả năng tạo đa chồi. Ngược lại, nếu gây tổn thương quá nhiều trong quá trình loại bỏ chồi đỉnh có thể làm chết mẫu hoặc khả năng tái sinh, tạo đa chồi kém. Vì thế, tỷ lệ tái sinh của các giống ít bị chi phối bởi chất kích thích sinh trưởng (bảng 2, 3). Do đó, sử dụng BAP với nồng độ 1,5-2,0 mg/l có vai trò quan trọng tạo đa chồi của các giống đậu tương nghiên cứu.



**Hình ảnh 1: mô tả các bước tiến hành thí nghiệm**

A- Hạt nảy mầm sau 3 ngày nuôi cấy; B- Tạo vật liệu nuôi cấy (a- đường cắt chia đôi làm hai mảnh lá mầm, b- khoảng cách từ nốt lá mầm đến điểm cắt (c) tại trụ dưới 3mm); C- Mẫu cấy được loại bỏ chồi đỉnh

#### IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của BAP và kinetin đến khả năng tái sinh chồi của 10 giống đậu tương cho thấy: Sử dụng BAP cho hiệu quả tạo đa chồi tốt hơn sử dụng kinetin ở cùng nồng độ; sử dụng BAP với nồng độ 1,5 mg/l thích hợp cho tái sinh, tạo đa chồi ở hầu hết các giống đậu tương nghiên cứu (số chồi TB/mẫu dao động từ 2,10 đến 3,57 chồi); giống Đ9602, ĐVN10 có khả năng tạo đa chồi tốt trên môi trường bổ sung 2,0 mg/l (số chồi TB/mẫu lần lượt 2,30 và 2,42 chồi).

#### SUMMARY

### STUDY ON THE EFFECT OF GROWTH REGULATIONS ON BUD REGENERATION CAPACITY OF VIETNAMESE SOYBEAN (*GLYCINE MAX (L.) MERRILL*) CULTIVARS

**Nguyen Tien Dung, Nguyen Van Hong, Bui Tri Thuc, Ngo Xuan Binh**

Study on the effect of growth regulations on bud regeneration capacity of 10 Vietnamese soybean cultivars were based on cotyledons method. Cotyledons were planted on culture medium which containing BAP or Kinetin at difference of concentrations (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/l). Buds regeneration ability of soybean cultivars were difference after 14 days on culture medium. Most of soybean cultivars were good response to bud regeneration and multiple shoots at BAP-1.5mg/l (2.10 to 3.57 buds/explant); exception are Đ9602 and ĐVN10 cultivars that resulted in highly bud regeneration (1.90 to 2.39 buds/explant) at concentrations of BAP as 2.0mg/l.

**Key words:** *bud regeneration, cotyledon node, growth regulation, soybean.*

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Cúc Hoà (2007), Nghiên cứu khả năng đáp ứng chuyển nạp gen của các giống đậu tương trồng ở Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 18: 9-14.
2. Finer, J.J., and Nagasawa, A.(1988), Development of an embryo suspension culture of soybean (*Glycine max (L.) Merrill*). *Plant cell tissue organ cult.* 15: 125-136
3. Hinchee, M.A.W., Connor-Ward, D.V., Newell, C.A., McDonnell, R.E., Sato, S.J., Gasser, C.S., Fischhoff, D.A., Re, D.B., Fraley, R.T., and Horsch, R.B (1988), Production transgenic soybean plants using *Agrobacterium-mediated* gene transfer. *Bio/technology.* 6: 915-922.
4. Li Haiyan, Liu Mio, Song xiaohui, Han Yingpeng, Wu Xiaoxia, Zang Dayong and Li Wenbin (2010), Effect of 6-BA and 2,4-D on soybean transformatin. *Journal of Northeast Agricultural University.*Vol 17, No1: 16-19
5. Margine M.Paz, Juan Carlos Martinez, Andrea B.Kalvig, Tina M.Fonger, Kan Wang (2006), Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium-mediated* soybean transformation *Plant Cell Rep*, 206-213
6. Margie M.Paz, Huixia Shou, Zibiao Guo, Zhanyuan Zhang, Anjan K.Banerjee, Ka Wang (2004), Assessment of conditions affecting *Agrobacterium* – mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136: 167-179.
7. Margine M.Paz and Kan Wang (2009), Soybean transformation and Regeration using half seed explant, US Patent No 7,473,822B1.
8. Olhoft PM, Flagel LE, Christopher MD and Somers DA. (2003), Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta.* 216: 723-735
9. Young Jin Kim, Tae Il Park, Hyun Soon Kim, Ho Ki Park, Sang Uk Chon, Song Joong Yun (2004). Factors affecting Organogenesis from Mature cotyledon Explants and Regeneration in soybean. *J.Plant Biotechnology.* Vol. 6(1).pp.39-43
10. Wright, M.S. (1991), Method of regenerating soybean from cultured soybean cotyledonary nodes, US Patent No: 4,992,375.