

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TÁI SINH CÂY TỪ LÁ MÀM PHÔI HẠT NON Ở MỘT SỐ GIỐNG CÂY ĐẬU TƯƠNG [*GLYCINE MAX (L) MERRILL*] VIỆT NAM

Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Thị Quyên, Nguyễn Thị Tình, Ngô Xuân Bình*

TÓM TẮT

Năm giống đậu tương của Việt Nam bao gồm VX93; DT96; DT2001; DT2003; DT2008 được nuôi cấy invitro nhằm đánh giá khả năng tái sinh cây. Nghiên cứu quá trình hình thành mô sẹo sử dụng 2,4D với các nồng độ: 0, 10, 20, 30, 40, 50mg/l; nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng phát sinh mô sẹo sử dụng mẫu quả non thu hái 15, 20, 25, 30 và 35 ngày sau khi nở hoa; nghiên cứu ảnh hưởng ở các nồng độ khác nhau của BAP (nồng độ 0, 0,5, 1, 1,5 và 2 mg/l) đến khả năng tái sinh chồi, GA3 (nồng độ 0, 0,5, 1, 1,5 và 2 mg/l) đến khả năng kéo dài chồi và của IBA (nồng độ 0, 0,5, 1, 1,5 và 2 mg/l) đến khả năng ra rễ. Kết quả nghiên cứu cho thấy: (i) nồng độ 2,4D thích hợp cho phát sinh mô sẹo là 40 mg/l (tỷ lệ phát sinh mô sẹo dao động từ 68,68 đến 90,67%); (ii) quả non thu hái sau ra hoa 15 ngày (kích thước hạt 3-4mm) cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo tốt nhất, tỷ lệ hình thành mô sẹo từ 80,00 đến 98,67%; (iii) nồng độ BAP 1,5 mg/l thích hợp cho khả năng tái sinh chồi, tỷ lệ tái sinh từ 14,00 đến 24,00%. Trong đó giống đậu tương VX93 có khả năng tái sinh chồi cao hơn các giống khác (24,00%); (iv) Khả năng kéo dài chồi và ra rễ thích hợp trên môi trường bổ sung lần lượt GA₃ 0,5 mg/l và IBA 1,0 mg/l.

Từ khóa: Đậu tương, chất kích thích sinh trưởng, phôi vô tính, tái sinh chồi, phôi non

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu tương [*Glycine max (L.) Merrill*] là cây trồng quan trọng của nhiều quốc gia trên thế giới. Hiện nay, đậu tương biến đổi gen đang được trồng rộng rãi và chiếm tới 70% diện tích cây trồng biến đổi gen [2]. Kết quả nghiên cứu phản ứng của kiểu gen với điều kiện tái sinh và khả năng tiếp nhận gen lạ là hạn chế rất lớn trong việc tạo các dòng đậu tương biến đổi gen. Hai hệ thống tái sinh ở cây đậu tương phục vụ cho chuyển gen đang được ứng dụng là: (i) kỹ thuật tái sinh cây thông qua nuôi cấy nốt lá mầm phôi hạt chín và (ii) tái sinh cây thông qua nuôi cấy phôi hạt non. Tái sinh thông qua nuôi cấy lá mầm phôi hạt non lần đầu tiên được Christianson và cộng sự nghiên cứu năm 1983 [3]. Sau đó nhiều nhóm nghiên cứu đã cải tiến tối ưu môi trường và xây dựng phương pháp tái sinh thông qua phôi vô tính ở giai đoạn quả non [5, 7, 8]. Các kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng phát sinh chịu sự chi phối từ nhiều yếu tố như môi trường, kích thích hạt, nồng độ chất kích thích sinh trưởng, pH,... Ở Việt Nam, đậu tương là một trong ba loại cây trồng được ưu tiên trong các nghiên cứu chuyển gen. Các nghiên cứu tiên hành trên hệ thống tái sinh nốt lá mầm phôi hạt chín đã đạt được một số kết quả nhất định [1]. Việc nghiên cứu nghiên cứu khả năng tái sinh chồi từ phôi hạt non ở trên các giống đậu tương của Việt Nam chưa được khảo sát cụ thể. Phạm vi của bài báo trình bày kết quả “**Nghiên cứu khả năng tái sinh cây từ lá mầm phôi hạt non ở một số giống đậu tương của Việt Nam**”

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật- Khoa Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Năm giống đậu tương của Việt Nam (VX93; DT96; DT2001; DT2003; DT2008) được trồng trong nhà lưới và theo dõi thời điểm ra hoa, hình thành quả. Phương pháp thí nghiệm được tiến hành theo Finer và Nagasawa (1988) [5] có một số thay đổi điều kiện tối ưu. Khi cây ra hoa đánh dấu theo dõi và thu hái quả non sau 15-35 ngày tuổi (theo các công thức thí nghiệm). Quả non được khử trùng bằng dung dịch NaOCl 15% (bổ sung 2-3 giọt Tween 20) trong 30 phút. Mẫu được rửa sạch bằng nước cất khử trùng 3-4 lần. Sử dụng dao (lưỡi dao số 11) loại bỏ vỏ quả, hạt non được tách làm hai phần

* Khoa Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường ĐH Nông Lâm Thái Nguyên
Corresponding author: ngobinh2000@yahoo.com

theo lá mầm (mẫu cấy và được nuôi cấy phát sinh mô sẹo trên đĩa petri có chứa môi trường nuôi cấy đã chuẩn bị. Mỗi đĩa nuôi cấy 5 mảnh lá mầm, nuôi cấy 50 mẫu cho một công thức thí nghiệm.

Phát sinh phôi và tái sinh chồi

Mảnh lá mầm được nuôi cấy trên môi trường MS + B5 vitamin và bổ sung 2,4D ở các nồng độ 10, 20, 30, 40, 50 mg/l. Sau 4 tuần nuôi cấy, chọn khối mô sẹo, cấy chuyển sang môi trường có nồng độ 2,4D thấp hơn để phát sinh phôi vô tính. Nồng độ 2,4D thích hợp ở thí nghiệm trên được sử dụng cho thí nghiệm xác định ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng phát sinh mô sẹo ở các giống đậu tương nghiên cứu. Phôi vô tính có dạng hình cầu, màu xanh được cấy chuyển sang môi trường tái sinh chồi (môi trường MS bổ sung BAP ở các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l và than hoạt tính 2g/l). Sau 6-8 tuần tiến hành đánh giá khả năng tái sinh chồi.

Kéo dài chồi và ra rễ

Chồi cây sau khi hình thành được nuôi cấy kéo dài trên môi trường MS có bổ sung GA₃ ở các nồng độ 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0mg/l. Khả năng kéo dài chồi được đánh giá sau 2 tuần nuôi cấy. Lựa chọn chồi có chiều dài trên 4cm cấy chuyển sang môi trường tạo rễ. Khả năng ra rễ của các giống đậu tương được thử nghiệm ở các nồng độ IBA khác nhau (0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0mg/l), đánh giá khả năng ra rễ sau 6 tuần nuôi cấy.

Số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 4.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của 2,4D đến khả năng phát sinh mô sẹo

Khả năng phát sinh mô sẹo của các giống đậu tương nghiên cứu có sự khác biệt rõ rệt. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mô sẹo hình thành dao động từ 68,67 đến 90,67%. Trong đó giống đậu tương DT2003 có tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao hơn các giống khác (90,67%). Giống DT2001 có tỷ lệ phát sinh mô sẹo 78,67%, giống VX93 và DT96 lần lượt là 72,67 và 70,00%. Giống DT 2008 có tỷ lệ mô sẹo thấp hơn các giống còn lại (68,67%). Khả năng phát sinh mô sẹo ở các giống phụ thuộc vào nồng độ 2,4D trong môi trường. Ở nồng độ 2,4D 40mg/l, các giống đậu tương (loại trừ giống DT96) có tỷ lệ mô sẹo hình thành cao nhất (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của 2,4D đến khả năng phát sinh mô sẹo (sau 4 tuần nuôi cấy)

Hàm lượng 2,4D (mg/l)	Số mẫu cấy	Tỷ lệ phát sinh mô sẹo (%)				
		VX93	DT96	DT2001	DT2003	DT2008
0	50	8,67	13,33	4,67	5,33	2,67
10	50	18,00	70,00	19,33	35,33	16,67
20	50	34,67	40,67	40,00	67,33	39,33
30	50	50,67	35,33	53,33	80,67	48,00
40	50	72,67	30,67	78,67	90,67	68,67
50	50	47,33	18,67	64,67	74,67	52,00
CV (%)		3,40	4,50	4,50	2,00	4,00
LSD ₀₅		2,37	2,78	3,46	2,05	2,65

Vai trò của 2,4D trong quá trình tái sinh mô sẹo ở đậu tương đã được một số tác giả nghiên cứu trước đây. Nghiên cứu của Ranch và cộng sự (1985) [9] thử nghiệm ở nhiều nồng độ 2,4D khác nhau (thử nghiệm đến 100mg/l). Kết quả thử nghiệm cho thấy, mô sẹo và phôi vô tính hình thành ở trạng thái bình thường chủ yếu trên môi trường có nồng độ 2,4D từ 20mg đến 40mg/l. Tác giả Finer John (1988) [4] nuôi cấy mảnh lá mầm phôi hạt non nhận thấy phôi vô tính được hình thành trên môi trường có nồng độ 2,4D (40mg/l), cao hơn so với các báo cáo của Lazzeri và cộng sự 1985 [7]. Finer, J.J. và A. Nagasawa (1988) [5] tối ưu hóa môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo trên cây đậu tương ở nồng độ 2,4D 40mg/l. Kết quả nghiên cứu của Young Jin Kim và cộng sự (2004) [12] đã chỉ ra nồng độ 2,4D khác nhau có ảnh hưởng lớn đến khả năng phát sinh mô sẹo và phôi vô tính, nhóm

ngiên cứu tiến hành thử nghiệm trên 11 giống đậu tương của Hàn Quốc và thu được tỷ lệ phát sinh mô sẹo 13,3 đến 86,7% (ở nồng độ 2,4D 40mg/l. Susumu Hiraga và cộng sự (2007) [10] thử nghiệm trên 4 giống đậu tương của Nhật Bản cho thấy tỷ lệ phát sinh mô sẹo từ 30-50% trên môi trường có bổ sung 2,4D 40mg/l. Các nghiên cứu trên cho thấy, nồng độ 2,4 D phù hợp cho phát sinh mô sẹo là 40 mg/l, tuy nhiên việc phát sinh mô sẹo còn tùy thuộc vào từng giống cụ thể. Ở các giống đậu tương nghiên cứu, khả năng phát sinh mô sẹo tương đối tốt nhất trên môi trường 2,4D 40mg/l (hình 1-f). Tuy nhiên, giống DT96 có tỷ lệ mô sẹo cao nhất ở nồng độ 10 mg 2,4 D/l. Điều này cho thấy tính đa dạng của phản ứng giữa kiểu gen và môi trường nuôi cấy trong phát sinh mô sẹo ở đậu tương.

Ảnh hưởng của tuổi quả (tuổi phôi lá mầm) đến khả năng phát sinh mô sẹo

Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở các độ tuổi khác nhau từ 15 đến 35 ngày tuổi, khả năng hình thành mô sẹo giảm dần. Bốn giống đậu tương nghiên cứu có tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao khi thu hái quả ở giai đoạn 15 ngày tuổi (dao động từ 80,00 đến 98,67%). Duy nhất giống VX93 có tỷ lệ mô sẹo hình thành cao nhất khi thu hái quả ở 20 ngày tuổi (84,67%) (bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng phát sinh mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy

Tuổi quả (ngày)	Số mẫu cấy	Tỷ lệ phát sinh mô sẹo (%)				
		VX93	DT96	DT2001	DT2003	DT2008
15	50	78,67	93,33	96,67	98,67	80,00
20	50	84,67	88,67	92,00	94,00	66,00
25	50	73,33	80,00	84,67	89,33	60,00
30	50	63,33	69,33	79,33	80,00	53,00
35	50	58,67	54,00	64,67	69,33	48,00
CV (%)		3,10	2,80	2,70	2,30	3,40
LSD ₀₅		4,01	3,99	4,10	3,64	3,76

Giai đoạn thu hái chủ yếu liên quan đến kích thước của hạt. Các nghiên cứu trước đây đều khẳng định, mẫu quả được thu hái sau khi ra hoa 2 tuần cho tỷ lệ phát sinh phôi cao, kích thước mảnh lá mầm ở giai đoạn này đạt khoảng 3-5mm. Young Jin Kim và cộng sự (2004) [12] tiến hành thí nghiệm với các kích thước hạt từ 2mm đến 6mm ở 10 giống đậu tương khác nhau và nhận thấy 1% có tỷ lệ phát sinh mô sẹo tốt với kích thước 3mm, 1% ở kích thước 4mm; 90% mô sẹo được phát sinh ở kích thước khoảng 3-4mm (mức +++). Kết quả thí nghiệm ở bảng 2 cho thấy, ở giai đoạn quả thu hái 15 ngày sau khi ra hoa cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo cao hơn ở các giai đoạn thu hái sau đó (ngoại trừ giống VX93). Kích thước hạt đo được ở giai đoạn 15 ngày sau ra hoa khoảng 4mm (hình 1-a). Ở các giai đoạn thu mẫu sau 20-35 ngày, phần lớn kích thước hạt đều trên 5mm (hình 1b-e), tỷ lệ phát sinh mô sẹo có chiều hướng giảm xuống cùng với quá trình tăng kích thước của mảnh lá mầm (bảng 2). Kích thước của hạt phần lớn chịu sự chi phối của kiểu gen và đặc trưng của giống. Ở giai đoạn hình thành quả, trong cùng điều kiện chăm sóc, phần lớn các giống đều có tốc độ hình thành quả như nhau. Tuy nhiên ở giống VX93 kích thước hạt đạt 3-5mm sau 20 ngày ra hoa. Mỗi tương quan giữa kích thước hạt và khả năng phát sinh mô sẹo cũng được Young Jin Kim và cộng sự (2004) [12] nghiên cứu tỷ mỉ, hạt có kích thước nhỏ hơn 3mm và lớn hơn 4mm đều có khả năng phát sinh mô sẹo không cao. Cho tới nay chưa có nghiên cứu giải thích về cơ chế phát sinh mô sẹo liên quan đến kích thước hạt. Nhưng các báo cáo đều cho thấy kích thước hạt khoảng 3-5mm (sau ra hoa 2 tuần) là phù hợp nhất.

Ảnh hưởng của hàm lượng BAP đến khả năng phát sinh chồi

Mô sẹo sau khi phát sinh phôi vô tính có dạng hình cầu, màu xanh sang được nuôi cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung BAP (bảng 3). Kết quả cho thấy, tỷ lệ phát sinh chồi thu được từ 14,00 đến 24,00%. Đa số các giống đều có tỷ lệ phát sinh chồi cao nhất ở nồng độ BAP 1,5mg/l (ngoại trừ giống DT96 thích hợp ở nồng độ BAP 1,0 mg/l).

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng BAP đến khả năng phát sinh chồi sau 8 tuần nuôi cấy

Hàm lượng (mg/l)	Số mẫu cấy	Tỷ lệ phát sinh chồi (%)				
		VX93	DT96	DT2001	DT2003	DT2008
0	50	12,67	6,00	10,67	8,00	6,00
0,5	50	18,00	11,33	13,33	10,67	8,67
1,0	50	21,33	14,00	18,67	13,33	12,67
1,5	50	24,00	10,00	21,33	15,33	14,00
2,0	50	16,67	8,67	15,33	10,00	10,67
CV (%)		4,8	7,3	7,2	7,8	8,6
LSD ₀₅		1,63	1,33	2,10	1,63	1,63

Finer, J.J. and A. Nagasawa (1988) [4] thử nghiệm BAP ở các nồng độ từ 0,1 đến 10mg/l và nhận thấy, mẫu có khả năng tái sinh trên môi trường có nồng độ BAP rất thấp (0,1mg). Nhiều nhóm tác giả đã sử dụng quy trình trên và thành công trên nhiều giống đậu tương khác nhau [9, 10]. Nghiên cứu trên 5 giống đậu tương của Việt Nam cho thấy, trên môi trường không bổ sung BAP, khả năng phát sinh phôi ở tỷ lệ thấp (6-12,67%). Khi bổ sung BAP khả năng tái sinh nhanh hơn, nồng độ BAP 1,0-1,5mg/l đã tăng khả năng hình thành và tái sinh chồi ở các giống đậu tương nghiên cứu (bảng 3, hình 1 g-k). Kết quả nghiên cứu (bảng 3) cho thấy có sự sai khác về khả năng tái sinh so với các nghiên cứu trước đây [4], [9], [10], sự sai khác có thể giải thích là phản ứng giữa kiểu gen (của các giống đậu tương khác nhau) với môi trường nuôi cấy [6].

Ảnh hưởng của GA₃ đến khả năng kéo dài chồi

Sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung GA₃ khả năng kéo dài chồi của các giống đậu tương có sự khác biệt rõ rệt (bảng 4). Chiều dài chồi dao động từ 2,44 đến 8,24cm. Trong đó, giống VX93 DT96 và DT2003 có khả năng kéo dài chồi tốt ở nồng độ 0,5mg GA₃/l, lần lượt đạt 7,43; 8,24 và 6,53cm. Hai giống DT2001 và DT2008 thích hợp hơn ở nồng độ GA₃ là 1,5 mg/l và 1,0 mg/l (chiều dài chồi đạt 6,26 và 6,02cm).

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng GA₃ đến khả năng kéo dài chồi sau 4 tuần nuôi cấy

Hàm lượng (mg/l)	Số mẫu cấy	Chiều dài chồi (cm)				
		VX93	DT96	DT2001	DT2003	DT2008
0	50	4,22	5,20	2,44	4,96	3,87
0,5	50	7,43	8,24	3,09	6,53	4,86
1,0	50	5,39	6,57	4,24	5,17	6,02
1,5	50	3,95	5,09	6,26	4,33	5,10
2,0	50	3,12	4,11	5,34	4,01	4,25
CV(%)		4,60	4,60	5,00	3,90	4,10
LSD ₀₅		0,41	0,49	0,39	0,36	0,38

Một nghiên cứu trước đây sử dụng GA₃ với nồng độ tốt nhất 0,5mg/l ở giai đoạn kéo dài chồi [11]. Kiểu gen được xem là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng tái sinh hay hiệu quả chuyển gen ở đậu tương [11,13]. Vì vậy, việc kéo dài chồi ngoài yếu tố GA₃ còn do đặc điểm của từng giống quyết định. Kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy sự khác biệt rõ rệt về khả năng kéo dài chồi của các giống đậu tương khi được nuôi cấy trên cùng một nồng độ GA₃ như nhau. Ba trong

năm giống nghiên cứu thích hợp ở nồng độ GA₃ 0,5mg/l. Hai giống còn lại khả năng kéo dài chồi tốt hơn ở nồng độ GA₃ 1,5 mg/l (bảng 4).

Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ

Chồi mầm có chiều dài trên 4cm được tách và cấy chuyển sang môi trường tạo rễ. Kết quả bảng 5 cho thấy, hầu hết các giống đều có khả năng phát sinh rễ khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung IBA. Sau 6 tuần nuôi cấy, tỷ lệ phát sinh rễ tương đối cao ở nồng độ IBA 1,0 mg/l, dao động từ 83,33 đến 99,33% tùy thuộc từng giống. Kết quả này phù hợp với các kết quả nghiên cứu của Xinping YI và Deyue YU (2006) [11], WU Xiaoxia và cộng sự (2010) [13].

Bảng 5. Ảnh hưởng của hàm lượng IBA đến khả năng ra rễ sau 6 tuần nuôi cấy

Hàm lượng (mg/l)	Số mẫu cây	Tỷ lệ ra rễ (%)				
		VX93	DT96	DT2001	DT2003	DT2008
0	50	6,67	8,67	9,67	12,67	6,67
0,5	50	82,67	90,00	75,33	98,67	80,67
1,0	50	90,00	83,33	87,33	99,33	97,33
1,5	50	85,33	79,33	82,67	94,67	88,00
2,0	50	73,33	74,67	76,00	88,67	82,67
CV(%)		2,90	2,00	2,40	2,00	2,50
LSD ₀₅		2,49	2,97	3,39	3,12	3,76

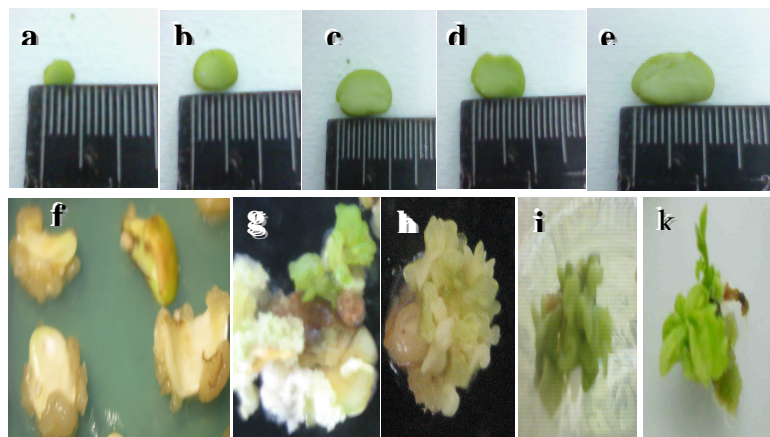
KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu có thể rút ra một số kết luận sau:

Nồng độ 2,4D thích hợp cho phát sinh mô sẹo là 40 mg/l (tỷ lệ phát sinh mô sẹo dao động từ 68,68 đến 90,67%).

Quả non thu hái sau ra hoa 15 ngày (kích thước hạt 3-4mm) cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo tốt nhất, tỷ lệ hình thành mô sẹo từ 80,00 đến 98,67%.

Nồng độ BAP 1,5 mg/l thích hợp cho khả năng tái sinh chồi, tỷ lệ tái sinh từ 14,00 đến 24,00%. Trong đó giống đậu tương VX93 có khả năng tái sinh chồi cao hơn các giống khác (24,00%). Khả năng kéo dài chồi và ra rễ thích hợp trên môi trường bổ sung lần lượt GA₃ 0,5 mg/l và IBA 1,0 mg/l.



Hình 1: Hình thái hạt và một số giai đoạn nuôi cấy tái sinh thông qua phôi vô tính

Kích thước hạt: **a-** sau 15 ngày ra hoa; **b-** sau 20 ngày ra hoa; **c-** sau 25 ngày ra hoa; **d-** sau 30 ngày ra hoa; **e-** sau 35 ngày ra hoa.

f- mô sẹo trên môi trường 2,4D 40mg/l; **g-i:** phát sinh phôi vô tính trên môi trường BAP 1,5mg/l; **k-** chồi hình thành

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. Clive Jame (2007). *Báo cáo tóm tắt hiện trạng cây trồng biến đổi gen trên toàn cầu năm, ISAAA*
3. Christianson, M.L, D.A. Wamick and P.S. Carlson (1983). A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science* 222:632-634
4. Finer,J.J (1988). Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [Glycine max (L.) Merrill]. *Plant Cell Reports* 7:238-241
5. Finer,J.J. and A. Nagasawa (1988). Development of an embryogenic suspension culture of soybean. *Plant cell tissue Organ cult.* 15: 126-136
6. Komatsuda T, Ohyama K (1988). Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean (*Glycine max*). *Theor Appl Genet* 75: 695–700
7. Lazzeri PA, Hildebrand DF, Collins GB (1985). A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol Biol Rep* 3:160-167
8. M.N.Barakat (1995). Somaclonal variation in Soybean: I-genotype and Media effects on somatic embryogenesis. *Agric.Sci.* (1),pp. 61-72
9. Ranch JP, Oglesby L, Zielinski AC (1985). Plant regeneration from embryo derived tissue cultures of soybean. *In Vitro Cell and Dev Biol* 21:653-658
10. Susumu Hiraga, Hiroshi Minakawa, Koji Takahashi, Ryoji Takahashi, akita Hajika, Kyuya Harada, Norihiro Ohtsubo (2007). Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. *Plant Biotechnology* 24, 435-440
11. Xinping YI and Deyue YU (2006). Transformation of multiple soybean cultivars by infecting cotyledonary-node with *Agrobacterium tumefaciens*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (20), pp. 1989-1993.
12. Young Jin Kim, Tae Il Park, Hyun Soon Kim, Ho Ki Park, Sang Uk Chon, Song Joong Yun (2004). Factors affecting soma embryogenesis from immature cotyledon of soybean. *Journal of plant biotechnology.* Vol.6, pp 45-50
13. WU Xiaoxia, LIU Weiting, LI Jing, LIU Shanshan, WANG Zhikun, and LI Wenbin (2010). Strain Cultivation Stage and Infectious Concentration on Soybean Cotyledonary Node via *Agrobacterium*-mediated Transformation System. *Journal of Northeast Agricultural University.* Vol. 17 No. 2 1-6