

Nhóm 1 gồm giống số 3 và 19; Nhóm 2 gồm giống số 34; Nhóm 4 gồm giống số 8, 15, 13, 12, 4, 5, 8, 17 và 16; Nhóm 5 gồm hai giống 9 và 6. Nhóm 3 chiếm phần lớn các giống dùng trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lưu Minh Cúc, 2009. *Sử dụng chỉ thị vi vệ tinh trong lập bản đồ gen kháng bệnh đốm lá muộn ở lạc (*Arachis hypogaea* L.) phục vụ công tác chọn tạo giống*. Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp. 159 trang.
2. Saal B., Wricke G., 1999. *Development of simple sequence repeat makers in rye (*Secale cereale* L.)*. Genome, 42(5): 964-972.
3. Saghai-Marouf M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W., 1984. *Ribosomal DNA spacer-length*

polymorphisms in barley: Medelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:8014-8018.

4. Varshney R.K., Hoisington D.A., Upadhyaya H.D., Gaur P.M., Nigam S.N., Saxena K., Vadez V., Sethy N.K., Bhatia S., Aruna R., Gowda M.V.C., Singh N.K. (2007), *Molecular genetics and breeding of grain legume crops for the semi-arid tropics*. In: Genomic Assisted Crop Improvement Vol II: Genomics Applications in Crops Edited by: Varshney RK, Tuberosa R. Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 207-242.

Ngày nhận bài: 115/4/2013

Người phản biện: TS. Lã Tuấn Nghĩa,
ngày 8/5/2013

Ngày duyệt đăng: 3/6/2013

NGHIÊN CỨU TÁI SINH GIỐNG ĐẬU TƯƠNG DT2008 VÀ ĐT26 PHỤC VỤ CHO CÔNG TÁC CHỌN TẠO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GEN

Đặng Trọng Lượng, Trần Minh Hoa,
Nguyễn Thúy Điệp, Trần Thị Thúy, Nguyễn Thị Liễu

SUMMARY

Study on plant regeneration from cotyledon and hypocotyls of two soybean cultivars, DT2008 and ĐT26 for gen transformation purpose

Regeneration from cotyledon and hypocotyl of two soybean cultivars, DT2008 and ĐT26, were studied. Regeneration ratio, shoot induction, shoot elongation and root induction were evaluated on MS media (Murashige Skoog, 1962) supplemented with different concentrations and combinations of phytohormones. MS medium supplemented with 2mg/l BAP and 0,1 mg/l IBA was the most effective on shoot induction of both DT2008 and ĐT26. The regeneration ratio of cotyledon material was 86% with DT2008 cultivar and 88% with ĐT26 cultivar. Regeneration of hypocotyls has ratio of 78,33% and 81,67% for DT2008 and ĐT26, respectively. The induced shoots of the two cultivars were elongated best in MS medium adding 0,5 mg/l GA3 and 0,1 mg/l IAA. Healthy and uniform shoots were rooted in MS medium supplemented with 0,5 mg/l α -NAA.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merr., soybean, cotyledon, hypocotyls, regeneration, *in vitro*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merr) là loại cây trồng phổ biến có vai trò quan trọng trong hệ thống sản xuất nông nghiệp của nhiều quốc gia. Đậu tương là nguồn cung cấp protein và dầu thực vật chủ lực cho toàn thế giới. Hạt đậu tương chứa gần như đầy đủ các axit amin cơ bản như isoleucin, leucin, methyonin, phenylalanin, tryptofan, valin. Hiện nay, đậu tương được trồng ở khắp các châu lục. Ở Việt Nam, diện tích trồng đậu tương chỉ đứng sau lúa, ngô và lạc. Năm 2011, diện tích trồng đậu tương ở nước ta theo ước tính của FAS đạt 215 nghìn ha và sản lượng đạt 350 nghìn tấn.

Trong những năm gần đây, công nghệ sinh học đóng vai trò quan trọng trong cải tiến cây trồng và đang là mối quan tâm hàng đầu của các nhà khoa học bởi khắc phục được những hạn chế của phương pháp chọn giống truyền thống. Nuôi cấy *in vitro* kết hợp với kỹ thuật di truyền thực vật đã trở thành công cụ và biện pháp hữu hiệu trong cải tiến cây trồng, làm thay đổi sự hạn chế trong chọn tạo giống truyền thống và tạo ra tính đa dạng về di truyền. Sự phát triển của kỹ thuật di truyền thực vật đã mở ra một đường hướng mới trong nhân giống đậu tương, đặc biệt là tạo ra các giống đậu tương chịu hạn, kháng thuốc trừ cỏ, kháng sâu hại và đã thu hút được sự quan tâm của các nhà chọn tạo giống. Tính đến năm 2009, diện tích trồng đậu tương chuyển gen trên thế giới đạt khoảng 170 triệu ha (Clive James, 2010). Để tạo giống đậu tương mới bằng công nghệ gen thì trước tiên cần phát triển được hệ thống tái sinh cây *in vitro*. 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. 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 (Finer và Nagasaw, 1988; Barakat, 1995). Ở Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu tiên hành trên hệ thống tái sinh nốt lá mầm phôi hạt chín đã đạt được một số kết quả nhất định (Nguyễn Thúy Diệp và cs., 2005; Nguyễn Thị Thúy Hương, 2009). Đặc biệt, ở cây đậu tương, khả năng tái sinh của các giống có sự khác biệt lớn. Vì vậy, hoàn thiện quy trình tái sinh là một bước bắt buộc trước khi tiến hành nghiên cứu chuyển gen vào một giống đậu tương mới. Bài viết này là kết quả của việc “Nghiên cứu tái sinh giống đậu tương DT2008 và ĐT26 phục vụ cho công tác chọn tạo giống đậu tương bằng phương pháp chuyển gen”.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu thực vật sử dụng trong nghiên cứu là lá mầm và trụ dưới lá mầm của hạt giống đậu tương DT2008 và ĐT26. Giống DT2008 do Viện Di truyền Nông nghiệp chọn tạo từ quần thể phân ly của tổ hợp lai hữu tính giữa 2 giống DT2001 và HC100, kết hợp gây tạo đột biến ở F4 bằng tia γ -Co60/180. Giống ĐT26 do Trung tâm Nghiên cứu và phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam chọn lọc từ tổ hợp lai ĐT2000 \times ĐT12.

2. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm tái sinh được tiến hành trên nền môi trường MS bổ sung 30g/l

sucarose, 7 g/l agar, pH = 5,7. Các thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP + IBA đến khả năng tạo cụm chồi

* *Vật liệu trụ dưới lá mầm*: Trụ dưới lá mầm được tách từ hạt đậu tương nuôi cấy

trên môi trường MS từ 5-7 ngày. Mẫu trụ dưới lá mầm được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung tổ hợp BAP và IBA với các nồng độ BAP 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2mg/l và IBA 0 mg/l; 0,1 mg/l; 0,2 mg/l. Kết quả nghiên cứu sau 5 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP và IBA lên khả năng tạo cụm chồi từ trụ dưới lá mầm

BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	ĐT2008			ĐT26		
		Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Hình thái chồi	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Hình thái chồi
1	0	50,00	2,23	Chồi ngắn, có màu xanh nhạt	51,67	2,52	Chồi ngắn, có màu xanh nhạt
	0,1	61,67	3,24	Chồi ngắn, có màu xanh nhạt	63,33	3,42	Chồi ngắn, có màu xanh nhạt
	0,2	65,00	3,44	Chồi ngắn, có màu xanh nhạt	68,33	3,59	Chồi ngắn, có màu xanh nhạt
1,5	0	63,33	3,16	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm	66,67	3,20	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
	0,1	68,33	4,27	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm	73,33	4,45	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
	0,2	73,33	4,34	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm	75,00	4,24	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
2	0	70,00	3,38	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm	73,33	3,41	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
	0,1	78,33	6,19	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm	81,67	6,61	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
	0,2	71,67	5,14	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm	80,00	5,44	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm

Qua số liệu thu được cho thấy: Bổ sung riêng rẽ BAP ở các nồng độ từ 1; 1,5 và 2 mg/l thì tỷ lệ tạo cụm chồi dao động từ 50-70% (giống DT2008) và 51,67-73,33% (giống ĐT26). Khi sử dụng kết hợp BAP với IBA trong môi trường tái sinh thì khả năng tạo cụm chồi và số chồi/cụm của cả 2 giống đều cao hơn khi sử dụng BAP riêng rẽ. Môi trường có bổ sung 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l IBA cho tỷ lệ tạo cụm chồi cao nhất: 78,33% (đối với giống DT2008) và 81,67% (đối với giống ĐT26) và số chồi/cụm cũng nhiều nhất: Trung bình 6,19

chồi/cụm (giống DT2008) và 6,61 chồi/cụm (giống ĐT26). Các chồi thu được từ công thức này có chất lượng tốt, chồi khỏe, xanh đậm. Tuy nhiên, các chồi trong cụm chồi đều ngắn, chưa đạt tiêu chuẩn để đưa vào môi trường ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.

**Vật liệu lá mầm*: Mẫu lá mầm được tách từ hạt giống nuôi cấy trên môi trường MS từ 5-7 ngày. Tương tự như mẫu trụ dưới lá mầm, các mẫu lá mầm được chuyển sang môi trường tái sinh tổ hợp BAP và IBA ở các nồng độ khác nhau. Bảng 2 tổng

hợp kết quả nghiên cứu tái sinh từ lá mầm của 2 giống DT2008 và DT26 sau 5 tuần.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA lên khả năng tạo cụm chồi từ lá mầm

Giống	BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	Số mẫu cấy	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Hình thái chồi
DT2008	1	0,1	100	60	3,13	Chồi ngắn, có màu xanh
		0,2	100	68	3,4	Chồi ngắn, có màu xanh
	1,5	0,1	100	73	4,36	Chồi ngắn, có màu xanh đậm
		0,2	100	76	4,89	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
	2	0,1	100	86	6,22	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
		0,2	100	81	5,2	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
ĐT26	1	0,1	100	62	3,26	Chồi ngắn, có màu xanh
		0,2	100	69	3,52	Chồi ngắn, có màu xanh
	1,5	0,1	100	76	4,67	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
		0,2	100	80	4,88	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
	2	0,1	100	88	6,46	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm
		0,2	100	82	5,31	Chồi khỏe, ngắn, có màu xanh đậm

Kết quả bảng 2 cho thấy phản ứng tái sinh từ vật liệu lá mầm của 2 giống đậu tương nghiên cứu tương đối giống nhau. Tỷ lệ tạo cụm chồi của giống DT2008 dao động từ 60-86%, giống ĐT26 dao động từ 62-88%. Giống như vật liệu trụ dưới lá mầm, mẫu lá mầm cũng phản ứng tạo cụm chồi tốt nhất trên môi trường có bổ sung 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l IBA. Trên môi trường

này, mẫu có tỷ lệ tạo cụm chồi cao nhất và số chồi/mẫu cũng nhiều nhất: Trung bình 6,22 chồi/mẫu (giống DT2008) và 6,46 chồi/mẫu (giống ĐT26). Tuy nhiên, giống như các chồi tái sinh từ mẫu trụ dưới lá mầm, các chồi tái sinh từ lá mầm còn ngắn do đó cần được chuyển sang môi trường kéo dài trước khi ra rễ.



Hình 1: Hình ảnh cụm chồi trên môi trường có bổ sung tổ hợp 2mg/l BAP + 0,1mg/l IBA sau 5 tuần nuôi cấy

2. Ảnh hưởng của GA3 đến khả năng kéo dài chồi

Để tăng chiều dài các chồi tái sinh nhằm đạt tiêu chuẩn để ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, các chồi tái sinh này được chuyển sang môi trường bổ sung tổ hợp chất kích

thích sinh trưởng GA3 và IAA. GA3 thuộc nhóm kích thích sinh trưởng gibberellin, hiệu quả sinh lý rõ nhất của GA3 là kích thích mạnh mẽ sự sinh trưởng kéo dài của thân. IAA thuộc nhóm kích thích sinh

trưởng auxin, là dạng auxin chủ yếu và quan trọng nhất của tất cả các thực vật. Vì vậy, bổ sung tổ hợp GA3 và IAA trong môi trường sẽ tạo thuận lợi cho sự phát triển của chồi và chuẩn bị cho cây ra rễ.

Bảng 3. Khả năng kéo dài chồi của hai giống đậu tương DT2008 và ĐT26

Công thức	GA3 (mg/l)	IAA (mg/l)	Số mẫu cây	Chiều cao chồi (cm)	
				DT2008	ĐT26
1	0,1	0,1	100	3,8	3,2
2	0,5	0,1	100	6,2	7,4
3	1	0,1	100	5,8	6,6

Kết quả kéo dài chồi sau 3 tuần theo dõi hai giống DT2008 và ĐT26 được thể hiện ở bảng 3. Kết quả cho thấy, khả năng kéo dài chồi của hai giống đậu tương nghiên cứu có sự khác biệt rõ rệt. Chiều cao chồi dao động từ 3,2 cm đến 7,4 cm. Trong đó, giống ĐT26 có khả năng kéo dài chồi tốt hơn giống DT2008. Hai giống DT2008 và ĐT26 đều có kết quả kéo dài thân tốt ở nồng độ GA3 là 0,5 mg/l kết hợp với 0,1 mg/l IAA (chiều cao chồi đạt 6,2 và 7,4 cm).

3. Ảnh hưởng của α -NAA khả năng hình thành rễ

Để tìm nồng độ phù hợp của α -NAA ảnh hưởng đến sự hình thành rễ của hai giống đậu tương DT2008, ĐT26, trong thí nghiệm này bố trí 3 nồng độ khác nhau: 0,1; 0,5 và 1 mg/l. Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả quan sát và ghi nhận được thể hiện ở bảng 4.

Qua bảng 4 cho thấy, tỷ lệ ra rễ của giống đậu tương DT2008 trong tất cả các

công thức môi trường đạt từ 47% -100%. Số rễ TB/cây dao động từ 1,26 - 4,15. Trong 3 công thức thí nghiệm với α -NAA thì công thức môi trường có bổ sung 0,5 mg/l α -NAA cho tỷ lệ ra rễ và số rễ TB/cây cao nhất, chiều dài rễ trung bình đạt 7,12 cm, chất lượng rễ tốt (rễ nhiều, to, có màu trắng, khỏe), thân cây mập, khỏe, phù hợp khi ra cây ngoài giá thể.

Đối với giống đậu tương ĐT26, tất cả các công thức bổ sung α -NAA đều tạo rễ. Trong đó, các chỉ tiêu theo dõi ở môi trường có bổ sung 0,1 mg/l α -NAA là thấp nhất: Tỷ lệ ra rễ chỉ đạt 45%, chất lượng rễ xấu. Môi trường có bổ sung 0,5 mg/l α -NAA đạt các chỉ tiêu theo dõi đều cao nhất: Tỷ lệ ra rễ đạt 98%, số rễ trung bình/cây đạt 4,36 rễ, chiều dài rễ đạt 7,65cm, chất lượng rễ tốt, thân cây mập, khỏe. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ α -NAA lên 1 mg/l tỷ lệ ra rễ lại giảm (86%), rễ nhỏ, thân cây nhỏ.

Bảng 4. Ảnh hưởng của α -NAA đến khả năng ra rễ của giống DT2008 và ĐT26

Giống	α -NAA (mg/l)	Số cây cấy	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ	Đặc điểm hình thái cây con
DT2008	0,1	100	47	1,26	2,05	Xấu	Thân cây nhỏ, khỏe, có 2-3 lá xanh đậm
	0,5	100	100	4,15	7,12	Tốt	Thân cây mập, khỏe, có 2-3 lá xanh đậm
	1	100	90	3,22	4,30	Xấu	Thân cây nhỏ, có 2-3 lá xanh nhạt.
ĐT26	0,1	100	45	1,50	2,82	Xấu	Thân cây nhỏ, có 3-4 lá xanh nhạt
	0,5	100	98	4,36	7,65	Tốt	Thân cây mập, khỏe, có 3-4 lá xanh đậm
	1	100	86	3,45	5,20	Xấu	Thân cây nhỏ, có 3-4 lá xanh đậm

Chất lượng rễ: - Rễ tốt: Rễ nhiều, to, có màu trắng, khỏe;
- Rễ xấu: Rễ nhỏ, có màu vàng

Từ kết quả trên cho thấy, hầu hết các giống đều có khả năng phát sinh rễ khi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung α -NAA. Tỷ lệ phát sinh rễ tương đối cao ở nồng độ α -NAA 0,5 mg/l tùy thuộc từng

giống, với giống DT2008 đạt 100%, giống ĐT26 đạt 98%. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Zhanyuan Zhang và cộng sự, (1999).



Hình 2: Hình ảnh ra rễ của cây đậu tương trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l α -NAA

IV. KẾT LUẬN

- Môi trường tái sinh tạo cụm chồi tốt nhất từ lá mầm và trụ dưới lá mầm của 2 giống DT2008 và ĐT26 là môi trường MS bổ sung 2 mg/l BAP và 0,1 mg/l IBA.

- Môi trường kích thích kéo dài chồi cho 2 giống đậu tương nghiên cứu là môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l GA3 và 0,1 mg/l IAA.

- Các chồi tái sinh của 2 giống đậu tương DT2008 và ĐT26 phản ứng ra rễ tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l α -NAA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M.N.Barakat (1995). *Somaclonal variation in Soybean: I-genotype and Media effects on somatic embryogenesis*. Agric.Sci. (1).pp. 61-72

2. Clive Jame (2010). *Báo cáo tóm tắt hiện trạng cây trồng biến đổi gen trên toàn cầu năm 2010*. ISAAA.
3. Nguyễn Thuý Điệp, Kiều Thị Dung, Đặng Minh Trang, Lê Việt Chung, Đặng Trọng Lương (2005), “*Kết quả nghiên cứu ban đầu về khả năng tái sinh của một số giống đậu tương phục vụ cho kỹ thuật chuyển gen*”, Tạp chí Nông nghiệp & PTNT, số 20: 35-38.
4. Nguyễn Thị Thuý Hương, Trần Thị Ngọc Diệp, Nguyễn Thu Hiền, Chu Hoàng Mậu, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2009). *Phát triển hệ thống tái sinh invitro cây đậu tương (Glycine max L., Merrill) phục vụ chuyển gen*. Tạp chí Khoa học và công nghệ. Số 52(4): 89-93.
5. Christianson M.L., Warnick D.A and Calson. P.S., 1983. “*A morphogenetically competent*

soybean suspension culture". Science
222: 632 - 634.

ngày 6/5/2013
Ngày duyệt đăng: 3/6/2013

Ngày nhận bài: 15/4/2013

Người phân biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý,