NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TÁI SINH VÀ BIẾN NẠP GEN Ở CÂY LẠC (*Arachis hypogaea* L.) THÔNG QUA MÔ SẸO HÓA VÀ PHÔI SOMA

Nguyễn Thị Thu Ngà[1], Lê Trần Bình[2*]

[(1)]Đại học Thái Nguyên
[(2*)] Viện Công nghệ sinh học, binh@ibt.ac.vn

TÓM TẮT: Nghiên cứu xây dựng và hoàn thiện qui trình chuyển gen trên cây lạc nhằm chuyển những gen kháng bệnh hay gen chống chịu ngoại cảnh bất lợi là một trong những hướng được quan tâm trong công nghệ sinh học thực vật phục vụ công tác tạo giống lạc. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng giống lạc L12 là giống đang được trồng phổ biến để thử nghiệm khả năng nuôi cấy tái sinh đa phôi/đa chồi và sử dụng hệ thống phôi soma để tiến hành thử nghiệm biến nạp gen chỉ thị (*gus*). Kết quả thu được cho thấy, trên môi trường MS bổ sung 2,4D, nồng độ 20 mg/l cho tỷ lệ mô sẹo tạo phôi cao nhất (trung bình 14,9 phôi/1 phôi nuôi cấy); trên môi trường có bổ sung BAP, nồng độ 2 mg/l, tỷ lệ tạo đa chồi cao nhất; rễ phát triển mạnh nhất trên môi trường chứa IBA, nồng độ 0,3 mg/l. Với gen *gus* và nhuộm X-Gluc, kết quả chuyển gen thông qua *Agrobacerium* ở giống lạc L12 đã thu được kết quả. Chúng tôi đã thu được mẫu phôi soma và cây lạc *in vitro* có biểu hiện dương tính với gen *gus*. Như vậy, dựa trên hệ thống nuôi cấy tái sinh phôi soma và chuyển gen *gus* qua phôi soma, việc biến nạp các gen có ích trên giống L12 sẽ được tiến hành.

Từ khóa: Arachis hypogaea, cây lạc, chuyển gen gus, cụm chồi, mô sẹo, phôi soma.

MỞ ĐẦU

Lạc (*Arachis hypogaea* L.) là một loại cây trồng có hiệu quả kinh tế cao và có giá trị đa dạng về các mặt dinh dưỡng, chăn nuôi, trồng trọt cũng như trong công nghiệp. Trong hạt lạc có đầy đủ các thành phần như: lipid, protein, glucid, vitamin (A, B, D, PP), là nguồn bổ sung dinh dưỡng quan trọng cho con người. Protein của hạt lạc có đủ 8 loại axit amin không thay thế. Lạc là loại thực phẩm cung cấp năng lượng cao, 100 g hạt lạc cung cấp 590 cal. Hạt có thể sử dụng trực tiếp hoặc ép dầu thực vật, sữa lạc, bơ lạc, phomat lạc. Ngoài ra, khô dầu lạc, các sản phẩm phụ dầu lạc, cám lạc, thân, lá còn được sử dụng làm thức ăn trong chăn nuôi và làm phân bón cũng rất tốt. Trong công nghiệp, lạc phục vụ cho công nghiệp ép dầu, công nghiệp thực phẩm và trong nhiều ngành công nghiệp khác (chất dẻo, mực in...). Hạt lạc là mặt hàng có giá trị xuất khẩu cao. Không chỉ mang lại hiệu quả kinh tế cao, trồng lạc còn có tác dụng cải tạo đất chống xói mòn [12].

Cây lạc được gieo trồng phổ biến ở hơn 100 nước với diện tích khoảng 22 triệu ha, là cây trồng quan trọng đối với các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới ở châu Á, châu Phi, Bắc và Nam châu Mỹ [11]. Có thể thấy hạt lạc là một trong những nguồn thực phẩm quý, chứa nhiều loại chất béo và có hàm lượng protein cao chiếm 25-43%. Dầu lạc chứa hàm lượng acid béo không no cao, tới 80% [6].

Với tình trạng khí hậu trên trái đất đang biến đổi không ngừng, nhiệt độ trên trái đất đang ngày càng tăng cao, dẫn đến các hiện tượng lũ lụt, hạn hán, dịch bệnh, gây ảnh hưởng không nhỏ đến sự sinh trưởng, phát triển của các loại cây trồng nói chung và cây lạc nói riêng. Vì thế, để tăng năng suất và chất lượng cây trồng, ngoài việc chăm sóc, gieo trồng tốt còn cần ứng dụng công nghệ sinh học hiện đại trong nghiên cứu nhằm cải thiện các loại giống để chúng có thể cho năng suất cao, chống chịu được tốt các điều kiện ngoại cảnh bất lợi tốt.

Trong hơn mười năm vừa qua, công nghệ sinh học đã có những bước phát triển vượt bậc trong việc tạo ra cây trồng biến đổi gen. Từ khoảng một triệu ha đầu tiên năm 1996 trồng tại châu Mỹ, đến tháng 12 năm 2009, toàn thế giới đã có 134 triệu ha cây trồng biến đổi gen. Trong khoảng thời gian từ năm 1996 đến năm 2008, lợi ích kinh tế trị giá 51,9 tỷ USD mà cây biến đổi gen mang lại được tạo ra từ 2 nguồn: giảm chi phí sản xuất (50%) và tăng năng suất thu hoạch bền vững (50%). Công nghệ sinh học

giúp tiết kiệm diện tích trồng trọt, giảm lượng thuốc trừ sâu được sử dụng [7].

Với những lợi ích thiết thực đối với cây lạc, trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu chọn cây lạc làm đối tượng chuyển gen để sản xuất các loại vaccine phòng bệnh cho người và động vật [8]. Nhiều nhà khoa học đã và đang tập trung nghiên cứu chuyển các gen giá trị vào cây lạc nhằm tăng năng suất, chất lượng và khả năng chống chịu [4, 10, 11].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu tái sinh và chuyển gen thông qua mô sẹo hóa và phôi soma vào giống lạc L12, đây là giống có năng suất cao và được trồng phổ biến tại các địa phương. Kết quả của nghiên cứu được sử dụng làm cơ sở để chuyển gen có ích trong chọn tạo giống lạc.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Hạt lạc giống L12 của Trung tâm Nghiên cứu phát triển cây đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm được sử dụng trong các thí nghiệm, giống lạc này được trồng phổ biến, sản xuất trên diện tích rộng và cho năng suất cao (khoảng 40 tạ/ha).

Chủng *A. tumefaciens* CV58C1 do phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Phương pháp

Khử trùng hạt

Củ lạc sau khi phơi khô bóc bỏ vỏ gỗ thu lấy hạt. Hạt lạc được khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 1 phút, Javen 60% lắc đều trong 15-20 phút, sau đó rửa sạch bằng nước cất khử trùng 3 đến 4 lần.

Tạo mô sẹo

Hạt lạc đã khử trùng đặt lên giấy thấm vô trùng để tách lấy phôi trục khỏi 2 lá mầm. Cấy phôi lạc lên môi trường MS cơ bản, bổ sung 2,4-D (6 mg/l), đường sucrose 3%, agar 0,8%, pH từ 5,8- 6,0. Số lượng 20 phôi/bình tam giác. Nuôi cấy mô sẹo trong tối một tuần, sau đó đưa ra ngoài sáng tại phòng nuôi cấy với cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 10/24h, nhiệt độ 25ºC trong 3 ngày.

Tạo phôi soma

Mô sẹo sau thời gian nuôi cấy được chuyển sang môi trường tạo phôi soma: MS cơ bản, bổ sung 2,4-D (6-30 mg/l), đường sucrose 3%, agar 0,8%, pH từ 5,8-6,0. Số lượng 15 mô sẹo/bình tam giác. Tạo phôi soma trong 7 tuần.

Môi trường nuôi cấy

Các thành phần trong môi trường nuôi cấy được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần các môi trường trong tái sinh cây lạc

Môi trường	Thành phần
Tạo mô sẹo	MS + sucrose 30 g/l + agarose 8 g/l + 2,4D (6 mg/l)
Tạo phôi soma	MS + sucrose 30 g/l + agarose 8 g/l + 2,4D (6-30 mg/l)
Môi trường đồng nuôi cấy (CCM)	Muối B5, sucrose, vitamin B5, BAP, acetosyringon, L-cystein, sodium thiosulfat, DTT, GA3
Môi trường cảm ứng đa chồi (SIM 1)	Muối B5, sucrose, vitamin B5, BAP (1,0-2,5 mg/l), cefotaxim, kanamycin
Môi trường cảm ứng đa chồi (SIM 2)	MS, sucrose, agar, vitamin B5, BAP 2 mg/l, L-asparagine, L-pyronglutamic acid, cefotaxim, kanamycin
Môi trường ra rễ	MS + IBA 0,3 mg/l

Tạo dịch huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium*

Lấy một khuẩn lạc mang gen gus cấy vào 2 ml LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin và rifamycin. Bình nuôi lỏng được lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 28ºC trong 7-8 h. Sau đó hút 1-2 ml dịch khuẩn nuôi lỏng vào 15 ml LB có bổ sung kháng sinh như trên, nuôi qua đêm (16-20 h), cho đến khi OD_{600} = 0,7-1,0.

Chuẩn bị vật liệu và biến nạp

Phôi trục sau 1 tuần nuôi cấy đã phát triển thành khối mô sẹo. Chia tách mô sẹo và lây

nhiễm trong 35 ml dịch huyền phù vi khuẩn từ 30-40 phút. Đặt mẫu đã lây nhiễm trên mặt môi trường CCM, đồng nuôi cấy 5 ngày trong tối ở 25°C.

Chuyển mô sẹo lên môi trường tạo phôi soma

Rửa nhanh mẫu trong môi trường SIM lỏng có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn cefotaxim, sau đó thấm khô, cấy mẫu lên môi trường tạo phôi soma trong 7 tuần.

Tái sinh cây

Chuyển phôi soma sang môi trường tái sinh cây SIM1 có chứa kháng sinh chọn lọc kanamycin 75 mg/l và kháng sinh diệt khuẩn cefotaxim.

Sau 2 tuần, chuyển các mẫu tạo chồi lên môi trường tạo chồi SIM2 có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn cefotaxim và kháng sinh chọn lọc kanamycin 100 mg/l, nuôi tiếp trong 2 tuần để tăng hiệu quả chọn lọc. Chồi đạt chiều cao từ 3-4 cm trở lên được chuyển sang môi trường ra rễ. Cây T_0 hoàn chỉnh được trồng trên giá thể trấu hun trong 2 tuần, sau đó chuyển ra đất và chăm sóc trong nhà lưới.

Phân tích biểu hiện gen gus bằng nhuộm hóa mô tế bào

Mẫu phôi soma được ngâm trong dung dịch X-gluc (50 mM Na_2HPO_4 và NaH_2PO_4; pH = 7,0; 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$; 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$; 10 mM Na_2EDTA; 0,1% Triton-100; 1,5 mM X-glucuronide) và ủ trong tủ ổn nhiệt ở nhiệt độ 37°C, thời gian ủ từ 24-48h. Sau thời gian ủ, mẫu được rửa sạch bằng nước cất khử trùng và ngâm vào dung dịch cồn 70% nhằm loại bỏ diệp lục. Sau khi loại bỏ diệp lục, mẫu được đưa lên kính lúp soi nổi, quan sát chụp ảnh.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo mô sẹo và đa phôi

Chúng tôi nhận thấy, L12 là giống lạc sinh trưởng, phát triển rất tốt trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Khả năng tạo mô sẹo, tạo đa phôi và tái sinh cây thu được kết quả với tỷ lệ cao. Đây còn là giống có năng suất cao và được trồng phổ biến tại các địa phương. Vì vậy chúng tôi đã chọn giống lạc này để thử nghiệm tạo đa phôi và chuyển gen chỉ thị *gus*.

Sau một tuần nuôi tối, phôi trục cảm ứng tạo thành một khối mô sẹo có màu vàng hơi xanh, không nhớt hoặc trắng xốp (hình 1A). Đã có nhiều công trình nghiên cứu cho thấy khả năng tạo cụm phôi soma từ phần phôi trục đều chịu ảnh hưởng lớn của nồng độ 2,4-D [2, 3, 5].

Sau 7 tuần tạo phôi soma ngoài sáng chỉ các khối mô sẹo màu vàng, không nhớt mới có khả năng tạo cụm phôi soma (hình 1B). Các phôi màu trắng xốp hoặc nâu đen chỉ phân hóa thành khối mô sẹo nhớt, kích thước tăng dần theo thời gian nuôi cấy.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến sự hình thành phôi soma của giống lạc L12 được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến sự hình thành phôi soma

2,4-D (mg/l)	Số phôi nuôi cấy	Số mô sẹo tạo phôi soma (%)	Số phôi soma tế bào/phôi nuôi cấy
6	90	62,4	6,5
10	90	86,7	9,8
20	90	97,8	14,9
30	90	75,7	4,7

Ở nồng độ 20 mg/l, tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất (97,8%), tỷ lệ này giảm xuống khi nồng độ 2,4-D thấp hoặc cao hơn mức này. Kết quả thu được tương tự như của Baker và Wetzstein (1992) [2], nồng độ 20 mg/l cho khả năng tạo phôi soma cao hơn so với nồng độ 2,4-D 40 mg/l. Nhóm tác giả Bùi Văn Thắng và nnk. (2006) [12] nghiên cứu khả năng tạo phôi soma của giống lạc MD7 dưới ảnh hưởng của các nồng độ 2,4-D khác nhau thấy rằng, tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất đạt 95,8% ở nồng độ 20 mg/l [13]. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi trên giống L12 cho thấy khả năng tạo phôi soma thu được là cao hơn so với nghiên

cứu của nhóm tác giả này. Theo Akins et al. (1992) [1], Little et al. (2000) [9] kiểu gen của từng giống phản ứng khác nhau với khả năng tạo phôi soma.

Số phôi soma trung bình thu được cao nhất là 14,9 phôi (20 mg/l 2,4-D) trên một phôi trục ban đầu và thấp nhất là 4,7 (30 mg/l 2,4-D). Phôi soma có nhiều hình dạng khác nhau, nhưng đa số có hình trụ và nhiều phôi đính chung ở phần rễ mầm.

Tái sinh cây

Nồng độ BAP có ảnh hưởng quan trọng đến khả năng cảm ứng tạo chồi. Mỗi giống lạc thích hợp với nồng độ BAP nhất định cho quá trình tạo đa chồi Trong thí nghiệm này, cụm phôi soma được chuyển lên môi trường SIM chứa BAP ở nồng độ 1; 1,5; 2 và 2,5 mg/l. Kết quả thu được được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh đa chồi

BAP (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ tái sinh 1 chồi (%)	Tỷ lệ tái sinh 2 chồi (%)	Tỷ lệ tái sinh 3 chồi (%)	Tỷ lệ tái sinh 4 chồi (%)
1	60,6	11,5	12,9	32,2	0
1,5	67,8	13,7	12,4	38,2	3,5
2	85,7	15,3	20,9	40,5	9,0
2,5	50,9	8,2	10,1	32,6	0

Kết quả thu được cho thấy, khi bổ sung 2 mg/l BAP vào môi trường SIM, tỷ lệ mẫu tạo chồi (85,7%, 15,3%, 20,9%, 40,5%, 9%) và số chồi thu được là cao nhất tương ứng với 1 chồi, 2 chồi, 3 chồi, 4 chồi. Bằng quan sát, chúng tôi thấy rằng, chất lượng chồi trên môi trường này thu được khỏe, phát triển tốt hơn trên các môi trường còn lại; thân chồi mập, lá xanh, không bị rụng lá trong thời gian nuôi cấy (hình 1C). Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu trước về nồng độ BAP khi tái sinh cây lạc [1, 2, 3].

Dựa vào kết quả trên, chúng tôi lựa chọn môi trường chứa 2 mg/l BAP để bổ sung vào môi trường đa chồi trong các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của NAA, IBA, IAA đến khả năng tạo rễ

Bộ rễ có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sống sót của cây non khi ra cây ngoài nhà lưới. Để tạo được cây lạc *in vitro* có bộ rễ với chất lượng tốt, chúng tôi đã thử nghiệm tạo rễ cho các chồi trên môi trường chứa các nồng độ NAA, IBA, IAA khác nhau. Kết quả được đánh giá theo các chỉ số: tỷ lệ ra rễ, ngày ra rễ, số rễ trung bình và chất lượng của rễ (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA, IBA, IAA khác nhau đến khả năng tạo rễ

Chất kích thích sinh trưởng	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Ngày bắt đầu ra rễ	Số rễ trung bình	Chất lượng rễ
NAA	0,1	82,4	10	7,8	+++
	0,3	71,5	9	6,4	++
	0,5	56,7	9	4,6	++
IAA	0,1	88,2	9	5,7	+
	0,3	68,8	9	4,6	+
	0,5	80	8	4,4	+
IBA	0,1	65	9	6,3	+++
	0,3	83,3	8	8,2	+++
	0,5	68,8	8	5,5	+++

(+++): rễ trắng, dài, mập, nhiều rễ thứ cấp; (++): rễ vàng nhạt, ít rễ thứ cấp; (+): rễ xấu, mảnh, nhỏ và ngắn, ít rễ thứ cấp.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, trên cả 3 môi trường chứa NAA, IAA và IBA các chồi đều xuất hiện rễ sau khoảng 8 đến 10 ngày. Tuy nhiên, với các nồng độ khác nhau, tỷ lệ ra rễ có nhiều biến động. Tỷ lệ ra rễ cao nhất quan sát thấy trên môi trường chứa IAA 0,1 mg/l (88,2%). Tuy tỷ lệ ra rễ cao nhưng chất lượng rễ trên môi trường chứa IAA rất kém: rễ xấu, mảnh, nhỏ và ngắn, ít rễ thứ cấp, số lượng rễ trung bình cũng ở mức thấp. Trên môi trường chứa NAA 0,1 mg/l và IBA 0,3 mg/l cho tỷ lệ ra rễ tương ứng 82,4% và 83,3%. Trên cả hai môi trường này, chất lượng rễ đều rất tốt: rễ trắng, mập và dài, có nhiều rễ thứ cấp (hình 1D). Số rễ trung bình đạt cao nhất trên 2 môi trường này tương ứng 7,8% và 8,2%.

Như vậy, trong những nồng độ đã nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy 0,3 mg/l IBA là nồng độ thích hợp nhất cho việc tạo rễ cây lạc.

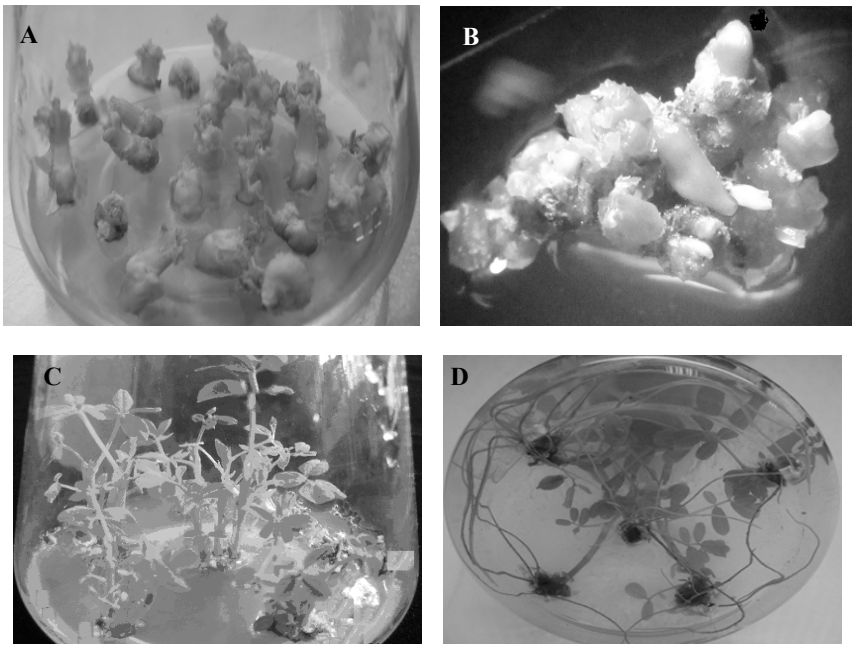
Chuyển gen *gus* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Dựa trên quy trình tái sinh đã hoàn thiện, chúng tôi tiến hành thí nghiệm chuyển gen *gus* (hình 2C, 2D).

Phôi trục sau 1 tuần nuôi cấy đã phát triển thành khối mô sẹo. Chia tách mô sẹo và lây nhiễm trong 35 ml dịch huyền phù vi khuẩn từ 30-40 phút. Đặt mẫu đã lây nhiễm trên mặt môi trường CCM, đồng nuôi cấy 5 ngày trong tối ở 25^{o}C.

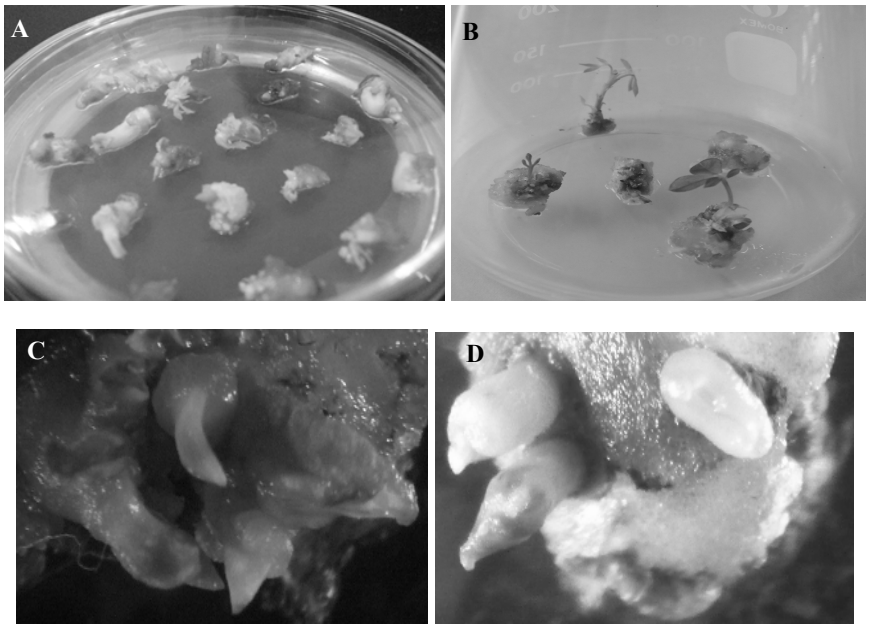
Rửa nhanh mẫu trong môi trường SIM lỏng có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn cefotaxim, sau đó thấm khô, cấy mẫu lên môi trường tạo phôi soma trong 7 tuần. Chuyển phôi soma sang môi trường tái sinh cây SIM1 có chứa kháng sinh chọn lọc kanamycin 75 mg/l và kháng sinh diệt khuẩn cefotaxim. Sau 2 tuần, chuyển các mẫu tạo chồi lên môi trường tạo chồi SIM2 có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn cefotaxim và kháng sinh chọn lọc kanamycin 100 mg/l, nuôi tiếp trong 2 tuần để tăng hiệu quả chọn lọc.

Sau khi đồng nuôi cấy (hình 2A), tạo phôi soma (hình 1B), các chồi sẽ bị sàng lọc trên môi trường cảm ứng tạo đa chồi chứa kháng sinh kanamycin-SIM1-SIM2 (hình 2B). Kết quả thu được 59 chồi phát triển được trên môi trường SIM chứa kháng sinh 100 mg/l. Đã thu được mẫu phôi soma và chồi cho kết quả dương tính, có biểu hiện của gen *gus*: lá có màu xanh lục.



Hình 1. Tái sinh cây phôi soma và cụm chồi từ phôi hạt giống lạc L12

A. Mô sẹo sau một tuần nuôi tối; B. Cụm phôi soma từ mô sẹo hạt lạc sau 7 tuần; C. Tái sinh đa chồi; D. Tạo rễ.



Hình 2. Chuyển gen gus bằng Agrobacterium và hệ thống tái sinh qua phôi soma

A. Đồng nuôi cấy với vi khuẩn *Agrobacterium*; B. Chọn lọc cây chuyển gen trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin; C. Biểu hiện gen gus trên phôi soma chuyển gen; D. Phôi soma không chuyển gen.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công tái sinh đa chồi từ phôi soma của giống lạc L12. Mô sẹo phôi tách từ hạt lạc sau 7 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo phôi soma có bổ sung 2,4-D 20 mg/l được cảm ứng tạo đa chồi trên môi trường có BAP 2 mg/l. Môi trường tạo rễ thích hợp khi bổ sung IBA 0,3 mg/l.

Trên cơ sở quy trình tái sinh này, giống L12 đã được thử nghiệm chuyển gen *gus*. Kết quả này là cơ sở phục vụ cho những nghiên cứu chuyển gen mang tính trạng có lợi, phục vụ sản xuất và chọn tạo giống lạc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akin P. O., Anderson W. F., Holbrook C. C., 1992. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea* L.: genotype comparison. Plant Sci., 83: 103-111.
2. Baker C. M., Wetzstein H. Y., 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaftets of peanut, *Arachis hypogaea* L. Plant Cell Rep., 11: 71-75.
3. Baker C. M., Durham R. E., Burns J. A., 1995. High-frequency somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L) using mature, dry seed. Plant Cell Rep., 15: 38-42.
4. Bhatnagar M., Prasad K., Bhatnagar-Mathur P., Narasu M., Waliyar F., Sharma K. K., 2010. An efficient method for the production of marker-free transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Rep., 9: 51-57
5. Chengalrayan K., Hazra S., Meagher M. G., 2001. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryoderived leaftets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Sci., 161: 415-421
6. Nguyễn Xuân Hồng, Đỗ Thị Dung, Nguyễn Thị Chính, Vũ Thị Đào, Phạm Văn Toàm, Trần Đình Long, Gowda C., 2000. Kỹ thuật đạt năng suất lạc cao. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, 89 trang.
7. James C., 2011. Tình trạng cây chuyển gen/cây trồng công nghệ sinh học được đưa

vào canh tác đại trà trên toàn thế giới trong năm 2005. Báo cáo tóm tắt số 43 của ISAAA: Ithaca, NY.

8. Khandelwal A., Sita G. L., Shaila M. S., 2003. Oral immunization of cattle with hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in transgenic peanut induces specific immune responses. Vaccine, 21: 3282-3289.
9. Little E. L., Magbanua Z. V., Parrott W. A., 2000. Aprotocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. Plant Cell Rep., 19: 351-357.
10. Rohini V. K., Rao K. S., 2000. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.): A non-tissue culture based approach for generating transgenic plants. Plant Sci., 150: 41-49.
11. Sharma K. K., Anjaiah V., 2000. An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation. Plant Sci., 159: 7-19.
12. Bùi Văn Thắng, Đỗ Xuân Đồng, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình, 2006. Nghiên cứu quy trình tái sinh cây lạc nhằm phục vụ chuyển gen (*Arachis hypogaea* L). Tạp chí Công nghệ sinh học, 2: 26-31.
13. Nguyễn Văn Viết, Tạ Kim Bính, Nguyễn Thị Yến, 2006. Kỹ thuật trồng một số giống lạc và đậu tương trên đất cạn miền núi. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, 121 trang.

ESTABLISHMENT OF A SYSTEM FOR REGENERATION AND TRANSFOR - MATION IN PEANUT (*Arachis hypogaea* L.) USING SOMATIC EMBRYO

Nguyen Thi Thu Nga[1], Le Tran Binh[2]

[(1)]Thai Nguyen University
[(2)]Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Currently, plant cell biotechnology has providing advanced method, especially systems for development of transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*, to develop plant varieties with improved resistance to diseases and pests and better tolerance to abiotic stresses. In the case of peanut (*Arachis hypogaea* L.) methods for *in vitro* plant regeneration and gene transfer using callus tissue have been reported. In this study, peanut cultivar L12 was used for development of an effective system generation for somatic embryos, multiple shoots, rooting of regenerated plantlets and then for testing the efficiency of transformation using gus gene and somatic embyos. Our results showed that the MS medium supplemented with 20 mg/l of 2,4 D proved to be most suitable for somatic embryo induction (14.9 embryos/1 embryos); and the MS medium supplemented with 2 mg/l of BAP was most effective in multiple shoot regeneration; rooting of regerated shoots was succesfull in MS medium containing 0.3 mg/l of IBA; The use of the developed generation system for transfer of *gus* gene via Agrobacterium - mediated method has resulted gus positive transformed plants. Thus, the system could be asseful for the transfer of valuable genes in peanut.

Keywords: *Arachis hypogaea, gus* transformation, multiple shoots, peanut, somatic embryos.

Ngày nhận bài: 12-6-2012