

# 黑豆及毛豆未熟子葉培養體胚增殖及分化之研究<sup>1</sup>

王瑞章<sup>2</sup>、葉茂生<sup>3</sup>

## 摘 要

王瑞章、葉茂生·2007·黑豆及毛豆未熟子葉培養體胚增殖及分化之研究。台南區農業改良場研究彙報 50：1-8。

利用栽培種大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 黑豆台南三號(TN3)及毛豆高雄選一號(KS1)之未成熟種子(長度 4-5mm)之子葉，接種於以 MSB 為基礎培養基，各添加 40mg/L 2,4-D 及 8g/L agar(a)或 2g/L gelrite(g)，以及再各添加 30g/L(M2a, M2g)，60g/L sucrose(M3a, M3g)等 4 種培養基誘導的胚性組織與體胚，將胚性組織團塊繼代於 FN Lite 培養基，進行胚性懸浮培養，探討對黑豆及毛豆誘導體胚增殖及分化之影響，期能建立栽培種黑豆及毛豆之體胚培養技術，結果如下：懸浮培養對黑豆及毛豆體胚增殖之效果，球形胚增殖倍率黑豆台南三號為 2.8 倍，優於毛豆高雄選一號之 1.8 倍。每個胚性組織平均形成球形胚數黑豆台南三號為 3.2 個，毛豆 KS1 則為 2.6 個。

**關鍵詞：**黑豆、毛豆、未熟子葉、體胚分化

接受日期：2007 年 12 月 4 日

## 前 言

大豆為重要農藝作物，它不僅是蛋白質源的食用豆類，而且是極重要的油料作物。而黑豆 (black soybean) 富含異黃酮類、皂素、花青素、維生素 E，具有抗衰老、抗氧化、抑癌、降低膽固醇、預防新血管疾病，為一食醫俱佳的養生保健食品；毛豆 (vegetable soybean) 為未成熟的大豆，為亞洲重要蔬菜之一，是本省外銷日本最重要的豆類。

由於植物組織培養技術的進步，使得植物部份的組織，甚至單一細胞，只要在適當的培養條件下，都可以分化，再生成爲一完整的植株。其形式有二：一為器官形成 (organogenesis)，一為體胚形成 (somatic embryogenesis)<sup>(2,16)</sup>；而其來源均有二種：一是直接形成，即由培植體直接形成小植株或體胚，另一是間接形成，即經由癒合組織，再分化形成不定芽或經由體胚分化形成植株。體胚形成亦可經由形成的體胚再形成次生胚<sup>(7,9)</sup>。

---

1.行政院農業委員會台南區農業改良場研究報告第 336 號。

2.台南區農業改良場雲林分場助理研究員。雲林縣斗南鎮石溪里復興路 1-15 號。

3.國立中興大學農藝學系教授。台中市國光路 250 號。

自 1980 年代以後，由於生物技術的進步發展，大豆之組織培養技術已能成功被應用在品種改良上，克服傳統育種時所遭遇的困難。而在大豆體胚懸浮培養中，已可成功有效促進體胚誘導率及增生量<sup>(9,13)</sup>。對大豆的遺傳工程的基因轉殖植物(transgenic plant)，也有合適的組織培養技術<sup>(8,10,14,15)</sup>。

大豆組織培養體胚形成與器官形成的報告很多<sup>(4,5)</sup>，但不同基因型其體胚形成能力差異顯著<sup>(3)</sup>。本研究以台灣栽培種黑豆台南三號(TN3)及毛豆高雄選一號(KS1)之未熟子葉，經體胚形成方式得到之胚性組織及體胚<sup>(1)</sup>，進行胚性懸浮培養，期能建立黑豆及毛豆之體胚形成懸浮培養技術，供作黑豆及毛豆基因轉殖及作物改良研究之參考。

## 材料與方法

### 一、材料

本研究利用黑豆台南三號(TN3)及毛豆高雄選一號(KS1)之未成熟種子之子葉，接種於以 MSB 為基礎培養基，添加 40mg/L 2,4-D 及 8g/L agar(a)，2g/L gelrite(g)，以及再各添加 30g/L(M2a，M2g)，60g/L sucrose(M3a，M3g)等 4 種培養基，所誘導出的胚性組織與體胚為材料<sup>(1)</sup>。

表 1. 黑豆及毛豆未熟子葉維持體胚、分化及成熟培養基之組成分

Table 1. The composition of media used for somatic embryo maintenance, differentiation and maturation from immature cotyledons of black soybean and vegetable soybean.

Medium	Basal medium	2,4-D (mg/L)	asparagines (g/L)	Sucrose (g/L)	Maltose (g/L)	Activated charcoal (g/L)	Gelrite charcoal (g/L)
Maintenance media							
(Proliferation)							
MSD20	MSB	20		30	0	0	2
FN Lite	FN Lite basal	5	1	10	0	0	0
Histodifferentiation medium							
MSM6AC	MSB	0		0	60	5	2
Maturation medium							
MSM6	MSB	0		0	60	0	2

FN Lite basal : Finer and Nagasawa Lite macro salts, Murashige and Skoog micro salts, B5 vitamins (Samolov *et al.*,1998b)<sup>(13)</sup>

MSD20 : Wright *et al.* (1991)<sup>(17)</sup>

FN Lite : Samoylov *et al.* (1998b)<sup>(13)</sup>

MSM6AC : Bailey *et al.* (1993a)<sup>(6)</sup>

MSM6 : Finer and McMullen (1991)<sup>(8)</sup>

二、方法

(一)懸浮培養對胚性組織及體胚增殖之影響

將黑豆台南三號(TN3)及毛豆高雄選一號(KS1)之未熟子葉，經接種於 M2a、M2g 及 M3a、M3g 等 4 種培養基，所誘導出之胚性組織或球形胚<sup>(1)</sup>，繼代培養到以 MSB 為基礎培養基，添加 20mg/L 2,4-D，30g/L 蔗糖及 2g/L gelrite，pH 值 5.8，代號為 MSD20 培養基<sup>(17)</sup> (表 1)，置於光度  $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，每日 16 小時照光，溫度  $27 \pm 1^\circ \text{C}$ ，培養 4 週後，選取直徑約 3mm 含胚性組織及球形胚之組織團塊，繼代至使用 Finer & Nagasawa Lite basal 培養基<sup>(13)</sup> 之大量鹽類，MS 培養基之微量鹽類及 B5 培養基的維他命為基礎培養基，添加 5mg/L 2,4-D，10g/L 蔗糖及 1g/L 天門冬酰胺(asparagine)之“FNLite”，pH 值 5.8 之液體培養基<sup>(13)</sup> (表 1)，每一三角瓶接種 2 個，培養於光度  $10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，每日 24 小時照光，130rpm，溫度  $26^\circ \text{C}$  環境下懸浮培養 3 週，3 週後調查其球形胚之增殖數目，並拍攝紀錄之。

(二)體胚分化及發育之觀察

將上述懸浮培養之球形胚繼代於以 MSB 為基礎培養基，添加 60g/L 麥芽糖 (maltose)，2g/L gelrite 及 5g/L 活性碳 (active charcoal)，pH 值 5.8，代號為 MSM6AC 培養基<sup>(6)</sup> (表 1) 為分化的培養基。培養 4 週誘導體胚分化，之後再繼代於以 MSB 為基礎培養基，添加 60g/L 麥芽糖及 2g/L gelrite，pH 值 5.8，代號為 MSM6 培養基<sup>(8)</sup> (表 1) 為成熟培養基。培養 4 週，促使體胚成熟。培養條件為光度  $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，16 小時照光， $27 \pm 1^\circ \text{C}$ ，8 週後調查體胚之形成數目及分化情形，其步驟如圖 1 所示。

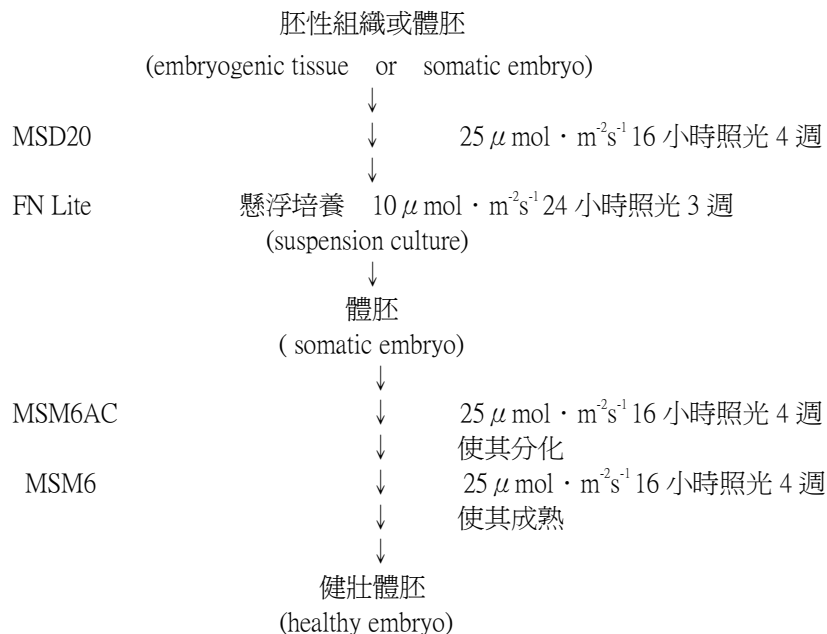


圖 1. 黑豆及毛豆胚性組織培養體胚形成培養之步驟

Fig. 1. The scheme of somatic embryo formation from embryogenic tissue of black soybean and vegetable soybean.

(c.f. Parrott Lab. at UGA) <sup>(11)</sup>

## 結果與討論

### 一、懸浮培養對胚性組織及體胚增殖之影響

由未熟子葉誘導出之胚性組織或球形胚經繼代培養到含 20mg/L 2,4-D，3%蔗糖濃度及 2g/L gelrite 之 MSD20 培養基，增殖培養 4 週後，選取直徑約 3mm 含胚性組織及球形胚之組織團塊(圖 2-A，3-A)，繼代至含 5mg/L 2,4-D，1%蔗糖濃度及 1g/L 天門冬酰胺之 FNLite 液體培養基，進行胚性組織懸浮培養，3 週後調查球形胚增殖結果如表 2、3，圖 2-B，3-B。

每個胚性組織平均形成球形胚數黑豆台南三號為 3.2 個，毛豆高雄選一號則為 2.6 個。球形體胚增殖倍率黑豆台南三號為 2.8 倍，優於毛豆高雄選一號之 1.8 倍。

由於胚性組織的生長在液體培養基較固體培養基獲得更多的接觸能更快速增殖。最近在大豆體胚懸浮培養中，已可成功有效促進體胚的增殖量<sup>(13)</sup>。大豆擬胚化培養，體胚增殖主要受培養基成分中醣類、氮含量、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 及 auxin 類型和濃度等因素的影響<sup>(12)</sup>。本試驗以 Samoylov *et al.*<sup>(12)</sup>發表之 FNLite 為增殖培養基，進行黑豆及毛豆之胚性組織及球形胚之增殖懸浮培養，3 週後黑豆及毛豆之胚性組織及球形胚均能有效的增殖 2~3 倍，此與 Samoylov *et al.*<sup>(12)</sup>所得結果一致。由本試驗再度證明降低培養基中蔗糖及氮濃度確可促進胚性組織及球形胚增殖。

### 二、體胚分化及發育之觀察

球形胚經胚性增殖懸浮培養後，繼代至含有 6% 麥芽糖，0.5% 活性碳，0.2% gelrite 之 MSM6AC 分化培養基 4 週，再繼代至含 6% 麥芽糖，0.2% gelrite 之 MSM6 成熟培養基培養 4 週後，經增殖之球形體胚大多無法繼續分化，甚至停滯發育(圖 2-C，3-C)，經由含 6%蔗糖及 8g/L agar 之 M3a 培養基誘導之毛豆高雄選一號球形體胚雖有 2 支試管可漸發育分化為子葉期體胚，但不太正常(圖 4-B)。繼續繼代至含 6% 麥芽糖，0.2% gelrite 之 MSM6 成熟培養基則漸褐化。Bailey *et al.*<sup>(6)</sup>，Samoylov *et al.*<sup>(13)</sup>以含 40mg/L 2,4-D 誘導之胚性組織或球形胚團塊，繼代至含有 6% 麥芽糖，0.5% 活性碳，0.2% gelrite 之 MSM6AC 分化培養基，誘導球形胚之分化生成子葉期胚；並將子葉期胚繼代於不含 0.5% 活性碳之 MSM6 之成熟培養基，使其成熟。本試驗將懸浮培養增殖後之黑豆台南三號及毛豆高雄選一號之球形胚繼代至含有 6% 麥芽糖，0.5% 活性碳，0.2% gelrite 之 MSM6AC 分化培養基<sup>(6)</sup>，但繼代培養 4 週，發現除了毛豆高雄選一號有 2 支試管可漸發育為不太正常子葉期胚(圖 4-B)外，其餘皆無分化現象，甚至停滯發育。再將其分化之不正常子葉期胚繼代至含有 6% 麥芽糖，0.2% gelrite 之 MSM6 成熟培養基，則漸褐化最後死亡。此結果與 Bailey *et al.*<sup>(6)</sup>，Samoylov *et al.*<sup>(13)</sup>完全不同，其原因可能是參試的品種不同所致，但真正原因仍有待進一步的探討。

本試驗所進行之黑豆及毛豆未熟子葉培養誘導體胚形成研究，在液體/固體培養方式，係仿 Parrott Lab. at UGA<sup>(11)</sup>對大豆體胚發生之培養方法適度修正。然其試驗所得結果，除在液體懸浮培養增殖胚性組織、球形胚方面，與原報告相符外，經進一步繼代至固體分化培養基進行分化則受到抑制，究其原因，可能是所用之品種不同，而造成品種間差異所致。針對本土性黑豆及毛豆品種之未熟胚培養體胚形成的研究，實有再探討的必要。

表 2. 懸浮培養對黑豆台南三號及毛豆高雄選一號胚性組織增殖之影響

Table 2. The effect of suspension culture on embryogenic tissue proliferation of black soybean TN3 and vegetable soybean KS1.

品種 Variety	接種數 No. of cultured	形成球形胚總數 Total of globular embryos		平均每個胚性組織 形成球形胚數 Average globular of per embryogenic tissue
		0 day	21days	
TN3	58	0	187	3.2
KS1	20	0	52	2.6

表 3. 懸浮培養對黑豆台南三號及毛豆高雄選一號球形胚增殖之影響

Table 3. The effect of suspension culture on globular embryos proliferation of black soybean TN3 and vegetable soybean KS1.

品種 Variety	接種數 No. of cultured	形成球形胚總數 Total of globular embryos		增殖倍率 Fold increase
		0 day	21days	
TN3	52	106	297	2.8
KS1	14	19	34	1.8

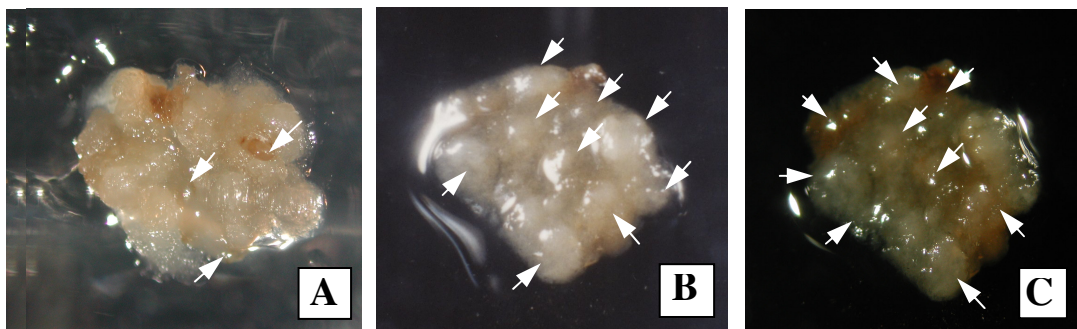


圖 2. 黑豆台南三號由 M3g 培養基誘導之胚性組織及球形胚（箭頭）經不同培養基繼代後球形胚（箭頭）增殖生長之情形

A : M3g 繼代至 MSD20    B : MSD20 繼代至 FNLite    C : FNLite 再繼代至 MSM6AC

Fig.2. Development of embryogenic tissue and globular embryo of cv. TN3 induced from immature cotyledons in M3g medium, then subcultured in various media.

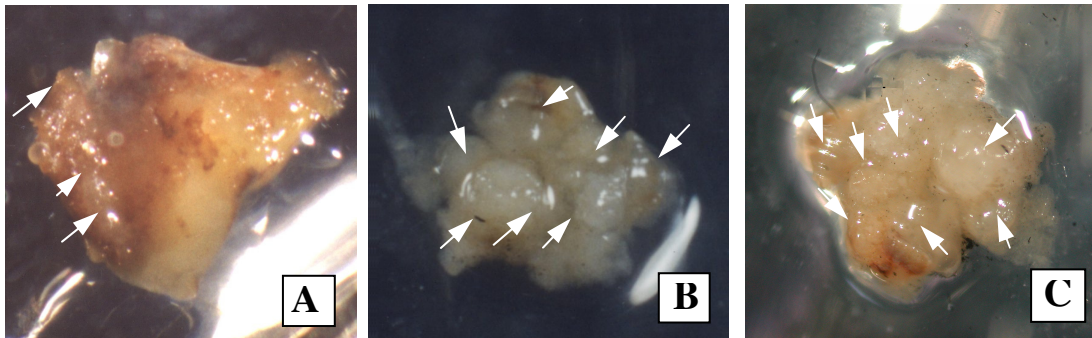


圖 3. 毛豆高雄選一號由 M2g 培養基誘導之胚性組織及球形胚（箭頭）經不同培養基繼代後球形胚（箭頭）增殖生長之情形

A：M2g 繼代至 MSD20    B：MSD20 繼代至 FNLite    C：FNLite 再繼代至 MSM6AC

Fig.3. Development of embryogenic tissue and globular embryo of cv. KS1 induced from immature cotyledons in M2g medium ,then subcultured in various media

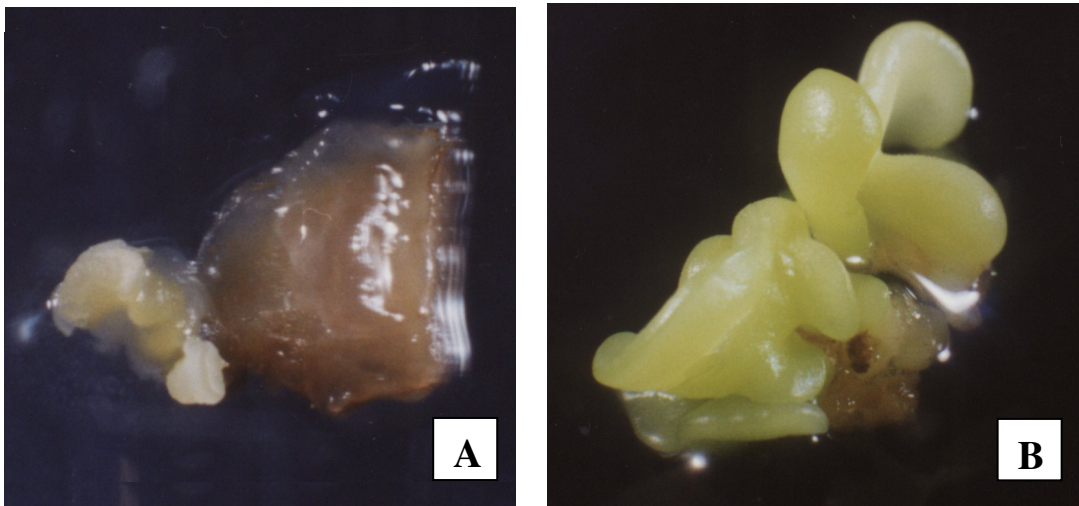


圖 4. 毛豆高雄選一號由 M3a 培養基誘導之體胚經不同培養基繼代後體胚生長之情形

A：M3a 繼代至 MSD20

B：MSD20 繼代至 FNLite 再繼代至 MSM6AC

Fig.4. Development of somatic embryo of cv. KS1 induced from immature cotyledons in M3a medium, then subcultured in various media .

## 引用文獻

- 1.王瑞章、葉茂生。2005。黑豆及毛豆未熟子葉培養胚性組織及體胚形成之研究。農林學報 54 (2)：77~91。
- 2.全中和、葉茂生。1991。大豆未熟胚培養之研究 IV、不同培養基對大豆未熟胚軸及子葉之

- 體胚與器官形成的影響。中華農藝：237~249。
- 3.張平順、葉茂生。1992。大豆未熟胚培養之研究 VI、大豆 *Soja* 亞屬不同基因型體胚形成能力的研究。農林學報 41 (1)：23~36。
  - 4.葉茂生、全中和。1991。大豆未熟胚培養之研究 III、未熟胚軸培養器官形成之探討。農林學報 40 (1)：77~90。
  - 5.葉茂生、全中和。1992。大豆未熟胚培養之研究 V、瓊脂或凝膠及酪素水解物對大豆未熟胚軸及子葉之體胚與器官形成的影響。農林學報 41 (1)：13~22。
  - 6.Bailey, M. A., H. R. Boerma, and W. A. Parrott. 1993. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29P:102-108.
  - 7.Finer, J. J. 1988. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep.* 7:238-241.
  - 8.Finer, J. J. and M. D. McMullen. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27P : 175-182.
  - 9.Finer, J. J. and A. Nagasawa. 1988. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 15:125-136.
  - 10.Parrott, W. A., J. N. All, M. J. Adang, M. A. Bailey, H. R. Boerma, and C. N. Stewart, Jr. 1994. Recovery and evaluation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30P:144-149.
  - 11.Parrott Lab. at UGA. 2000. Somatic embryogenesis of soybean. <http://mars.cropsoil.uga.edu/homesoybean/somprot.htm> 11pp.
  - 12.Samoylov, V. M., D. M. Tucker, and W. A. Parrott. 1998a. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant* 34:8-13.
  - 13.Samoylov, V. M., D. M. Tucker, F. Thibaud-Nissen, and W. A. Parrott. 1998b. A liquid medium-based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures. *Plant Cell Rep.* 18:49-54.
  - 14.Sato, S., C. Newell, K. Kolacz, L. Tredo, J. Finer, and M. Hinchee. 1993. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Rep.* 12:408-413.
  - 15.Stewart, C. N., Jr., M. J. Adang, J. N. All, H. R. Boerma, G. Cardineau, D. Tucker, and W. A. Parrott. 1996. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean (*Glycine max* L.) Merrill transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* CRYIA (c) gene. *Plant Physiol.* 112:121-129.
  - 16.Williams, E. G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis : Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57 : 443-462.
  - 17.Wright, M. S., K. L. Launis, R. Novitzky, J. H. Duesing, and C. T. Harms. 1991. A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27P:153-157.

# ***In Vitro* Somatic Differentiation of Immature Cotyledon of Black Soybean and Vegetable Soybean <sup>1</sup>**

Wang, R.C. <sup>2</sup> and M. S. Yeh<sup>3</sup>

## **Summary**

The purposes of the experiments that are to establish a tissue culture system for somatic embryogenesis from immature cotyledon of soybean, and the results will be applied on inducing transgenic plant from explant and embryonic rescue of plant breeding. The explants, immature cotyledons of cv. TN3 of black soybean and cv.KS1 of vegetable soybean, were cultured on modified MSB basal medium containing 2,4-D and other nutrients to induce somatic embryo. The results are summarized as follows : The formations ratios of somatic embryos with suspension culture of cv. KS1 and cv. TN3 were 2.8 and 1.8, respectively, and the formations ratios of globular embryos were 2.6 and 3.2, respectively.

Key words : black soybean , vegetable soybean , immature cotyledon , somatic differentiation

Accepted for publication : 4 December,2007

- 
1. Contribution No.336 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture.
  2. Assistant researcher, Yulin Branch Station of Tainan, DAIS, 1-15, Fushing Road, Shihshi Village , Tounan, Yulin, Taiwan, R.O.C.
  3. Professor of Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung , Taiwan, R.O.C.