

***In Vitro* Embryogenic Tissue and Somatic Embryogenesis of Immature Cotyledon of Black Soybean and Vegetable Soybean¹**

黑豆及毛豆未熟子葉培養胚性組織及體胚形成之研究¹

Rei-Cheng Wang¹ Mau-Shing Yeh²

王瑞章

葉茂生

Abstract

The purposes of the experiments that 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 40mg/l 2,4-D and other nutrients to induce somatic embryo. The results are summarized as follows:

1. The formative rates of embryonic tissue of cv. TN3 was significantly higher than it of cv.KS1 . The formative rates of embryonic tissue from immature cotyledons cultured on both M3g and M2g media were significantly higher than others.
2. There were significant interaction between medium and variety on formative rates both embryonic tissue and globular embryo. As to interaction between medium and light was also significantly influential on formation both embryonic tissue and globular embryo.
3. Most of immature cotyledons both cv. TN3 and cv.KS1 cultured in media formed embryonic tissue and globular embryo at 8 weeks olds of explant. However, embryonic tissue, globular embryos and monocotyledonous embryos were only induced with M2g, M3g and M3a media.

Key words : Black soybean , vegetable soybean , immature cotyledon , embryogenesis, somatic embryo

1)Former graduate student, Department of Agronomy, National Chung Hsing University.

(Present : Asistant researcher, Yuinlin Branch of Tainan DARES.) 國立中興大學農藝學系前研究生 (現台南區農業改良場雲林分場助理研究員)

2)Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University. (Corresponding Author) 國立中興大學農藝學系教授(通訊作者)

摘要

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)之子葉為材料，接種於以 MSB 為基礎培養基，各添加 40mg/l 2,4-D 及 8g/l agar(代號 M0a)，2g/l gelrite(M0g)，以及再各添加 10g/l (M1a, M1g)，30g/l(M2a, M2g)，60g/l sucrose(M3a, M3g)等 8 種培養基；再兩種照光處理下進行黑豆及毛豆未熟子葉胚性組織與體胚之誘導，探討對黑豆及毛豆未熟子葉誘導胚性組織形成之影響。期建立黑豆及毛豆之體胚培養技術，結果如下：

1. 黑豆台南三號及毛豆高雄選一號之胚性組織形成率有極顯著差異，黑豆台南三號胚性組織形成率顯著高於毛豆高雄選一號。在不同培養基間，胚性組織形成率亦達極顯著差異，M3g 培養基與 M2g 培養基顯著高於其他培養基，未添加蔗糖之 M0a 及 M0g 對胚性組織誘導則皆無反應。
2. 胚性組織及球形胚之誘導在培養基與光照處理及品種之交感效應上均呈極顯著，而培養基之組成分的蔗糖及凝膠除在球形胚形成之誘導上與光照處理之交感效應不顯著外，與品種之交感作用及在胚性組織之誘導上均呈極顯著。黑豆台南三號之胚性組織形成率以 M3g 培養基，於暗處理 2 週後 $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 16 小時照光 6 週環境下，其所誘導之胚性組織之形成率 71.67% 及球形胚 46.67%(2.36 個)最高，其次為 M2g 培養基所誘導胚性組織之形成率 33.33% 及球形胚 23.33%(2.5 個)。毛豆高雄選一號則以 M2g 培養基，於 $5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 24 小時照光 8 週環境下，誘導胚性組織形成率 50% 及球形胚 36.67%(1.68 個)最高。
3. 培養 8 週後，黑豆台南三號於不同培養基下，其所誘導體胚形態多為胚性組織及球形期胚。毛豆高雄選一號則由 M3a 培養基、M2g 培養基及 M3g 培養基誘導結果可看到胚性組織、球形期胚、魚雷期及子葉期胚。

關鍵詞：黑豆、毛豆、未熟子葉、胚性組織、體胚

前言

大豆為重要農藝作物，它不僅是高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，實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作物。

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，再生成為一完整的植株。其形式有二：一為器官形成 (organogenesis)，一為體胚形成 (somatic embryogenesis) (Willjams and Maheswaran, 1986; 全和葉, 1991); 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 (Finer, 1988; Finer and Nagasawa, 1988)。

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。1991 年以後，利用基因轉殖技術從事大豆品種的改良亦有合適的組織培養系統 (Finer and Mc Mullen, 1991; Sato *et al.*, 1993; Parrott *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1996)。

大豆組織培養體胚形成與器官形成的報告很多 (葉和全, 1991, 1992)，但不同基因型其體胚形成能力差異顯著 (張和葉, 1992)。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) 之未熟子葉為材料，探討不同培養基及培養條件對黑豆及毛豆誘導胚性組織及體胚形成之影響。期能建立黑豆及毛豆之體胚形成培養技術，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

以栽培種黑豆台南三號 (TN3) 及毛豆高雄選一號 (KS1) 等二品種為材料。將此二品種於 89 和 90 年之夏、秋作種植於中興大學農藝學系試驗田，至開花結莢後，取外表豐滿、無病蟲害感染之未成熟莢，以未熟種子 (4~5mm) 的子葉為材料。

二、方法

(1) 材料之選取與消毒

將莢取回後剝開豆莢，以游標尺計量種子長度，取 4-5mm 之種子，置於 50ml 之小燒杯內，以 70% 酒精消毒 30 秒鐘，再以 1% 次氯酸鈉消毒 10 分鐘，最後以無菌水沖洗 3 次，放入培養皿並保持濕潤備用。

(2) 體胚誘導的培養基

使用 MSB 培養基 (Evans, 1981)，即利用 MS 培養基 (Murashige and Skoog, 1962) 之無機鹽類及 B5 培養基 (Gamborg *et al.*, 1968) 的維他命類為基礎培養基，各添加 40mg/l 2,4-D 及 8g/l 洋菜 (Difco-agar) (代號 M0a) 或 2g/l 凝膠 (gelrite) (M0g)，以及再各添加 10g/l (M1a, M1g)，30g/l (M2a, M2g)，60g/l 蔗糖 (sucrose) (M3a, M3g)，pH 值 7 等 8 種胚性組織和體胚誘導之培養基 (表 1)。

表 1. 黑豆及毛豆未熟子葉培養體胚誘導之培養基成分

Table 1. The composition of media of immature cotyledons cultured to induce somatic embryo of black soybean and vegetable soybean

Medium	Sucrose (g/l)	Agar(g/l)	Gelrite(g/l)
M0a	0	8	0
M1a	10	8	0
M2	30	8	0
M3a	60	8	0
M0g	0	0	2
M1g	10	0	2
M2g	30	0	2
M3g (MSD40)	60	0	2

Culture medium : MSB basal medium with 40 mg/l 2,4-D

MSD40 : Finer and Nagasawa (1988)

(3) 培植體的切取、接種

將已消毒之未熟種子，在無菌台上以解剖刀將種子切半後，取基部不含胚軸之兩半片子葉為培植體，接種在 M0a~M3g 等 8 種培養基，接種時以培植體腹面微壓入培養基，每一試管接 1 培植體，每一處理組合各接 20 支，重複 3 次，即每一品種，每一處理共接 60 支。

(4) 胚性組織和體胚誘導之培養、調查與統計分析

將上述接種在 8 種不同體胚誘導培養基之試管，仿 Parrott Lab. at UAG (2000) 之方法分別置於光度 $5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，每日 24 小時照光 8 週（光處理 1），及黑暗環境下培養 2 週，再移至光度 $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，每日 16 小時照光環境下 6 週（光處理 2），培養溫度 $27 \pm 1^\circ \text{C}$ ，8 週後分別利用解剖顯微鏡觀察，調查形成之癒合組織，胚性組織及球形胚（體胚）之試管數，及調查每試管之胚性組織或球形胚（體胚）之數目，其步驟如圖 1 所示並以 Nikon Coolpix 990 數位相機拍攝誘導情形。

所得試驗資料整理及分析均於 SAS (6.12 版)統計軟體中進行，因本試驗數據均為比例型式，故以 SAS 軟體之分析程序 PROC GENMOD 進行試驗數據之變方分析。

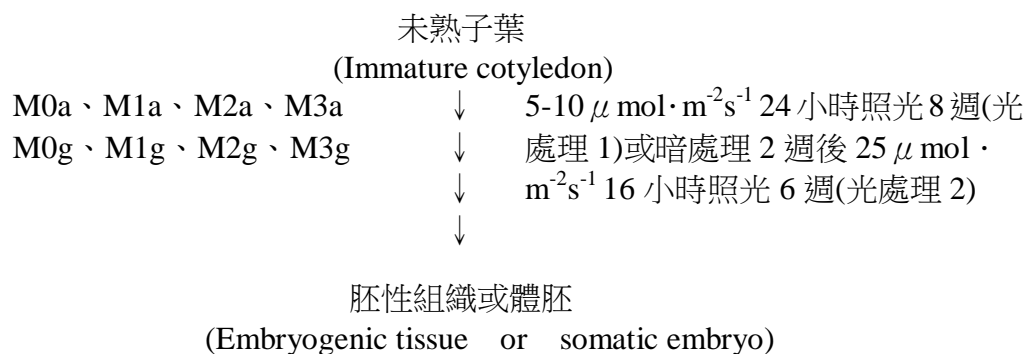


圖 1. 黑豆及毛豆未熟子葉體胚誘導培養之步驟

Fig. 1. The scheme of somatic embryo formation from immature cotyledons of black soybean and vegetable soybean

結果

黑豆台南三號(TN3)及毛豆高雄選一號(KS1)未熟子葉在不同培養基及光照處理下誘導胚性組織及球形胚（體胚）形成之變方分析結果如表 2 所示。胚性組織的誘導情形由變方分析結果可知培養基、光照處理、品種，培養基與光照處理，培養基與品種，光照處理與品種之間均呈極顯著差異。另培養基之組成分—蔗糖及凝膠與其他處理因子間的交感效應亦均呈極顯著差異。台南三號和高雄選一號兩品種所誘導胚性組織和球形胚

形成的結果分別如表 3、4 所示。黑豆台南三號(TN3)於暗處理 2 週後 $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 16 小時照光 6 週環境下(光處理 2)以 6%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M3g 培養基培養的胚性組織之形成率最高(71.67% \pm 0.076)，其次為含 3%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M2g 培養基培養的胚性組織之形成率(33.33% \pm 0.104)，再次為含 3%蔗糖濃度及 8g/l agar 之 M2a 培養基(26.67% \pm 0.076)，6%蔗糖濃度及 8g/l agar 之 M3a 培養基(13.33% \pm 0.058)，而不含蔗糖濃度之 M0a 及 M0g 培養基則全無反應(表 3)。毛豆高雄選一號則在 $5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 24 小時照光 8 週環境下(光處理 1)以 3%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M2g 培養基進行培養的結果較佳(50% \pm 0.10)，其次為 6%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M3g 培養基(10% \pm 0.17)(表 4)。不同光照之處理結果，胚性組織形成率黑豆台南三號光處理 2(暗處理 2 週後再移置 $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 16 小時照光 6 週)較光處理 1($5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 24 小時照光 8 週)為佳(表 3)。而毛豆高雄選一號則以光處理 1 較光處理 2 為佳(表 4)。不同培養基間以 6%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M3g 培養基及以 3%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M2g 培養基其胚性組織誘導形成率顯著高於其他培養基(表 3、4)。

培養基不同蔗糖濃度間，黑豆台南三號胚性組織的形成率以 6% 最佳，3% 次之，而 1% 最差(表 3)，毛豆高雄選一號則以 3% 最佳，次為 6% (表 4)。培養基不同凝膠處理間，其所誘導胚性組織的形成率以 2g/l gelrite 顯著高於 8g/l agar，黑豆台南三號優於毛豆高雄選一號(表 3、4)。

觀察不同培養條件下誘導球形胚形成的情形，培養基、光照處理，培養基與光照處理，培養基與品種及光照處理與品種間交感效應差異均呈極顯著。另培養基之組成分一蔗糖與凝膠及其與品種之交感效應亦呈極顯著(表 2)。由表 3 可知，黑豆台南三號之球形胚形成率以 6%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M3g 培養基，於暗處理 2 週後再移置 $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 16 小時照光 6 週環境下(光處理 2)培養，其所誘導之球形胚形成率為 46.67% (平均體胚數為 2.36 個) 最高，其次為以 3%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M2g 培養基所誘導球形胚形成率 23.33% (2.5 個)，再次為含 3%蔗糖濃度及 8g/l agar 之 M2a 培養基(8.33% ，2.8 個)，含 6%蔗糖濃度及 8g/l agar 之 M3a 培養基(6.67% ，4 個)，而不含蔗糖之 M0a 及 M0g 之培養基則全無反應。毛豆高雄選一號則以 3%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M2g 培

養基，於 $5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 24 小時照光 8 週(光處理 1)環境下，誘導球形胚形成率為 36.67% (平均體胚數 1.68 個) 最高；6%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M3g 培養基誘導球形胚形成率 8.33% (1.2 個) 次之(表 4)。

不同光照之處理結果球形胚形成率黑豆台南三號光處理 2(暗處理 2 週後再以 $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 16 小時照光 6 週)較光處理 1($5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 24 小時照光 8 週)為佳(表 3)。而高雄選一號則以光處理 1 較光處理 2 為佳(表 4)。不同培養基間亦以 6%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M3g 培養基及 3%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M2g 培養基其球形胚誘導形成率顯著高於其他培養基(表 3、4)。

兩種不同凝膠處理間，球形胚的形成率亦以 添加 gelrite 顯著高於 agar。

體胚形成，培養 8 週後，黑豆台南三號除由含 3%蔗糖濃度及 2g/l gelrite 之 M2g 培養基於 $5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 24 小時照光 8 週環境下，可誘導胚性組織，球形期及少數子葉期胚(圖 2)產生外，其餘不同培養基所誘導體胚形態多為胚性組織及球形期胚(圖 2、3)。毛豆高雄選一號則由含 6%蔗糖及 8g/l agar 之 M3a、含 3%蔗糖及 2g/l gelrite 之 M2g、含 6%蔗糖及 2g/l gelrite 之 M3g 培養基於暗處理 2 週後 $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 16 小時照光 6 週環境下，可誘導形成胚性組織，球形期及少數魚雷期、心形期、子葉期胚(圖 5)外，其餘含 1%蔗糖及 8g/l agar 之 M1a、含 1%蔗糖及 2g/l gelrite 之 M1g、含 3%蔗糖及 8g/l agar 之 M2a 培養基誘導者多為胚性組織及球形期胚(圖 4、5)。一般由含 6%蔗糖之 M3a、M3g 培養基及 3%蔗糖之 M2a、M2g 培養基培養者，其胚性組織及球形期胚多由培植體直接產生。而由含 1%蔗糖之 M1a、M1g 培養基誘導之胚性組織及球形期胚數量少，產生方式有直接和間接形成。

癒合組織形成的情形，由低濃度(1%)蔗糖之 M1a、M1g 培養基誘導產生者為白色或黃棕色，質地鬆軟，生長較快，量亦較多，表面有平滑及粗糙型。由 3%蔗糖之 M2a、M2g 培養基誘導產生者為白色或黃棕色，質地鬆軟，表面多為球形突起粗糙型。由 6%蔗糖之 M3a、M3g 培養基者，癒合組織由培植體邊緣產生，生長速度慢且量少，多為金黃色或棕褐色，表面粗糙型。

表 2. 不同培養基及不同光照處理對黑豆及毛豆品種之胚性癒合組織及球形胚形成率的變方分析表

Table 2. ANOVA of the percentage of embryogenic tissue and globular embryo formation for black soybean and vegetable soybean cultured in different media and light treatments.

Source	df	χ^2	
		Embryogenic tissue	Globular embryo
Medium(M)	7	88.40**	35.04**
Sugar(S)	(3)	24.98**	19.86**
Gel(G)	(1)	20.99**	15.33**
S x G	(3)	4.61	14.41**
Light(L)	1	112.42**	78.17**
Variety(V)	1	31.67**	1.84
M x L	7	2670.21**	1436.21**
S x L	(3)	24.84**	6.40
G x L	(1)	56.83**	10.72**
S x G x L	(3)	132.28**	28.08**
M x V	7	65.77**	2040.28**
S x V	(3)	73.50**	3222.84**
G x V	(1)	45.55**	3443.15**
S x G x V	(3)	94.27**	1117.41**
L x V	1	26.49**	42.42**
M x L x V	7	9.81	0.0941

** : significance at 1% level.

表 3. 不同培養基對黑豆台南三號體胚誘導形成之效果

Table 3. The effect of different media on somatic embryogenesis of black soybean TN3

培養基代號 Medium code	接種支數 No. of cultured	癒合組織形成 Callus formation		胚性組織形成 Embryogenic tissue formation		球形胚形成 Globular embryo formation		平均 球數 No.
		試管數 No.	百分率 %	試管數 No.	百分率 %	試管數 No.	百分率 %	
Light treatment 1*								
M0a**	60	0	0	0	0	0	0	0
M1a	60	57	95	4	6.67	1	1.67	1
M2a	60	55	91.67	8	13.33	5	8.33	1.4
M3a	60	58	96.67	9	15	4	6.67	1.75
M0g	60	0	0	0	0	0	0	0
M1g	60	58	96.67	7	11.67	6	10	1
M2g	60	60	100	18	30	13	21.67	1.38
M3g	60	53	88.33	16	26.67	7	11.67	2
Light treatment 2								
M0a	60	0	0	0	0	0	0	0

M1a	60	58	96.67	0	0	0	0	0
M2a	60	58	96.67	16	26.67	5	8.33	2.8
M3a	60	56	93.33	8	13.33	4	6.67	4
M0g	60	0	0	0	0	0	0	0
M1g	60	57	95	1	1.67	0	0	0
M2g	60	58	96.67	20	33.33	14	23.33	2.5
M3g	60	60	100	43	71.67	28	46.67	2.36

*Light treatment 1 : 5-10 μ mol \cdot m⁻²s⁻¹ lighting 24 hours

Light treatment 2 : darking 2 weeks after treatment 25 μ mol \cdot m⁻²s⁻¹ lighting 16 hours

**M0a , M1a , M2a , M3a , M0g , M1g , M2g , M3g : as in table 1

表 4. 不同培養基對毛豆高雄選一號體胚誘導形成之效果

Table 4. The effect of different media on somatic embryogenesis of vegetable soybean KS1

培養基代號 Medium code	接種支數 No. of cultured	癒合組織形成 Callus formation		胚性組織形成 Embryogenic tissue formation		球形胚形成 Globular embryo formation		平均 球數 No.
		試管數 No.	百分率 %	試管數 No.	百分率 %	試管數 No.	百分率 %	
Light treatment 1*								
M0a **	60	0	0	0	0	0	0	0
M1a	60	45	75	2	3.3	0	0	0
M2a	60	51	85	2	3.3	0	0	0
M3a	60	54	90	6	10	0	0	0
M0g	60	0	0	0	0	0	0	0
M1g	60	44	73.33	3	5	3	5	2
M2g	60	59	98.33	30	50	22	36.67	1.68
M3g	60	54	90	6	10	5	8.33	1.20
Light treatment 2								
M0a	60	0	0	0	0	0	0	0
M1a	60	51	85	3	5	3	5	1.33
M2a	60	59	98.33	3	5	2	3.33	1
M3a	60	59	98.33	3	5	0	0	0
M0g	60	0	0	0	0	0	0	0
M1g	60	48	80	0	0	0	0	0
M2g	60	57	95	9	15	2	3.33	1
M3g	60	39	65	6	10	2	3.33	2

*Light treatment 1 : 5-10 μ mol \cdot m⁻²s⁻¹ lighting 24 hours

Light treatment 2 : darking 2 weeks after treatment 25 μ mol \cdot m⁻²s⁻¹ lighting 16 hours

**M0a , M1a , M2a , M3a , M0g , M1g , M2g , M3g : as in table 1

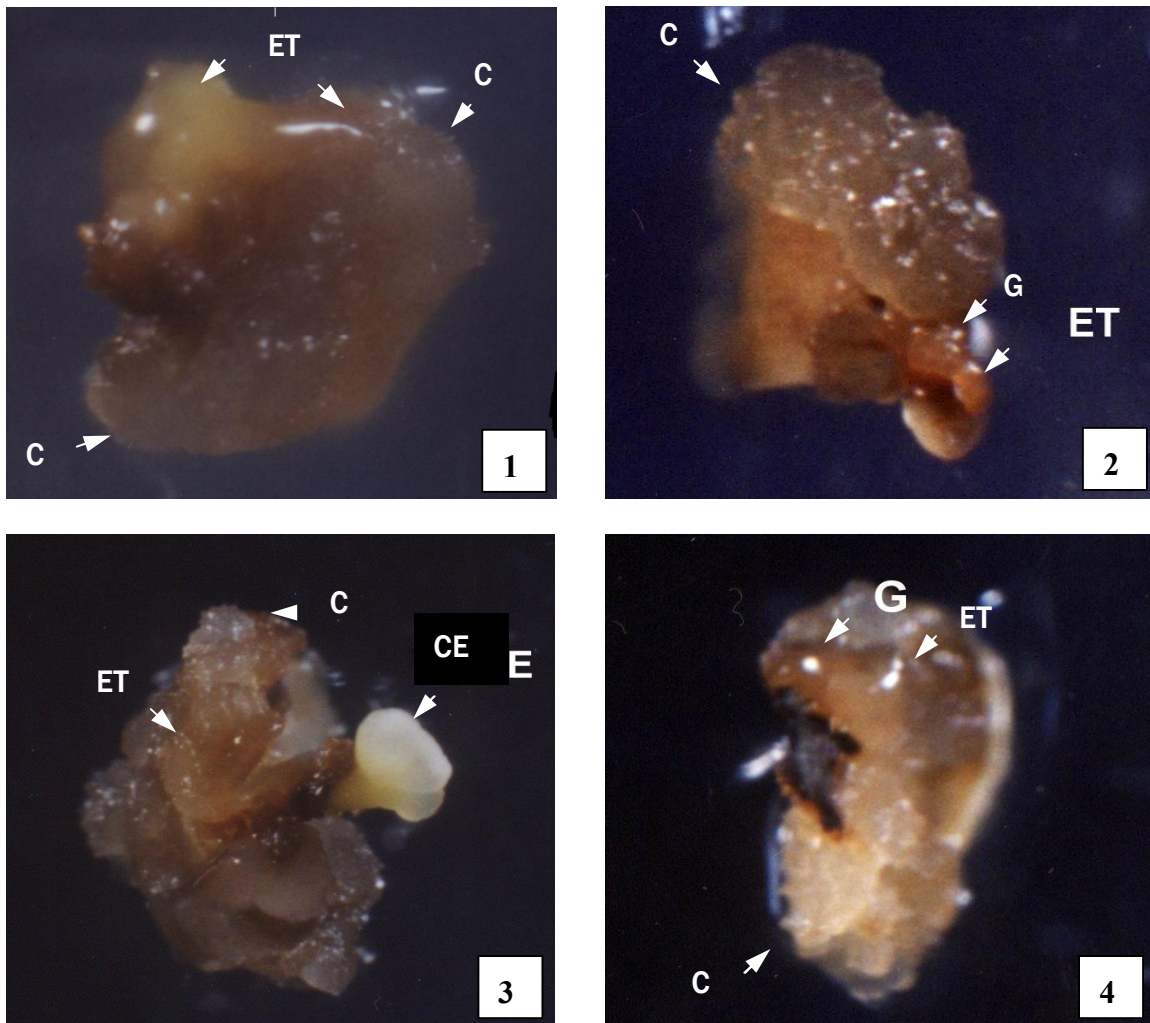


圖 2. 黑豆台南三號未熟子葉培養於 4 種不同蔗糖濃度之洋菜或凝膠培養基於 $5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 24 小時照光下誘導的胚性組織及體胚

Fig. 2. Embryogenic tissue and somatic embryo induced from immature cotyledons of black soybean cv. TN3 cultured on agar or gelrite media containing various sucrose level and lighted 24 hours

1 : M2a, 2 : M3a, 3 : M2g, 4 : M3g medium

G : globular embryo, CE : cotyledonary stage embryo, C : callus

ET : embryogenic tissue

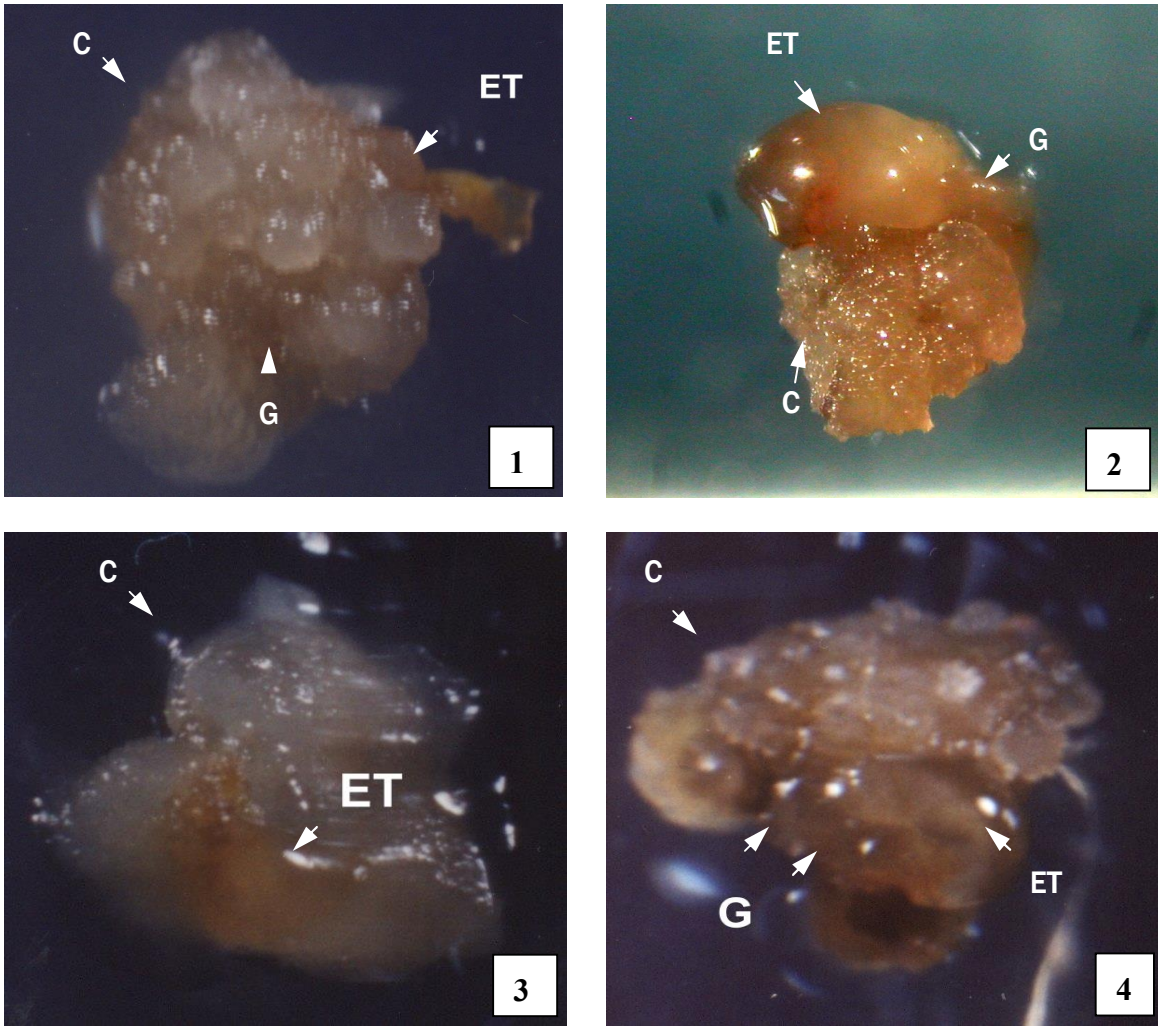


圖 3. 黑豆台南三號未熟子葉培養於 4 種不同蔗糖濃度之洋菜或凝膠培養基於暗處理 2 週後 $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 16 小時照光下誘導的胚性組織及體胚

Fig. 3. Embryonic tissue and somatic embryo induced from immature cotyledons of black soybean cv. TN3 cultured on agar or gelrite media containing various sucrose level and cultured at dark room for 2 weeks before lighted 16 hours
1 : M2a , 2 : M3a , 3 : M2g , 4 : M3g medium
ET : embryonic tissue, G : globular embryo, C : callus

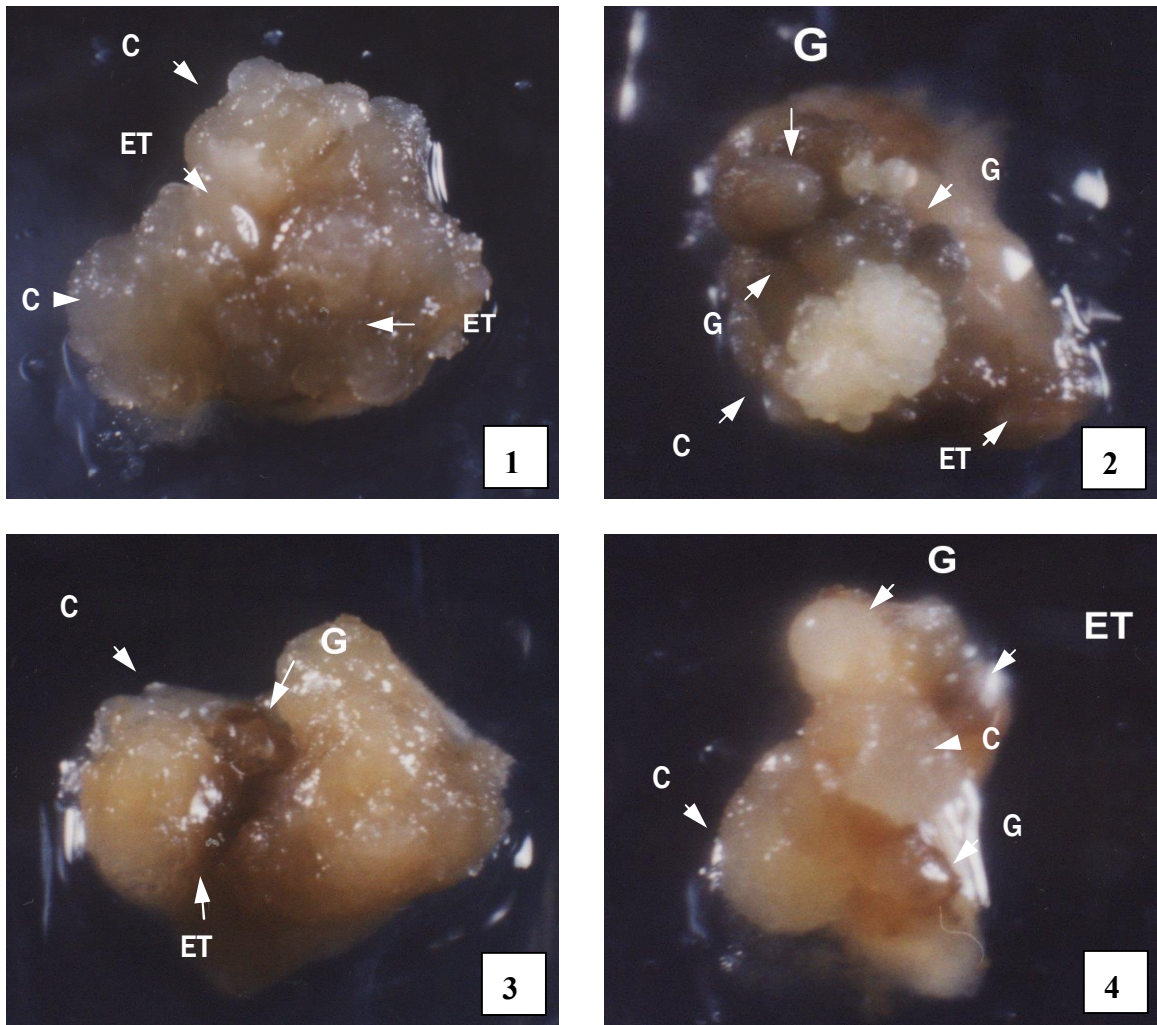


圖 4. 毛豆高雄選一號未熟子葉培養於 4 種不同蔗糖濃度之洋菜或凝膠培養基於 $5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 24 小時照光下誘導的胚性組織及體胚

Fig. 4. Embryogenic tissue and somatic embryo induced from immature cotyledons of vegetable soybean cv. KS1 cultured on agar or gelrite media containing various sucrose level and lighted 24 hours

1 : M2a, 2 : M3a, 3 : M2g, 4 : M3g medium
 ET : embryogenic tissue, G : globular embryo, C : callus

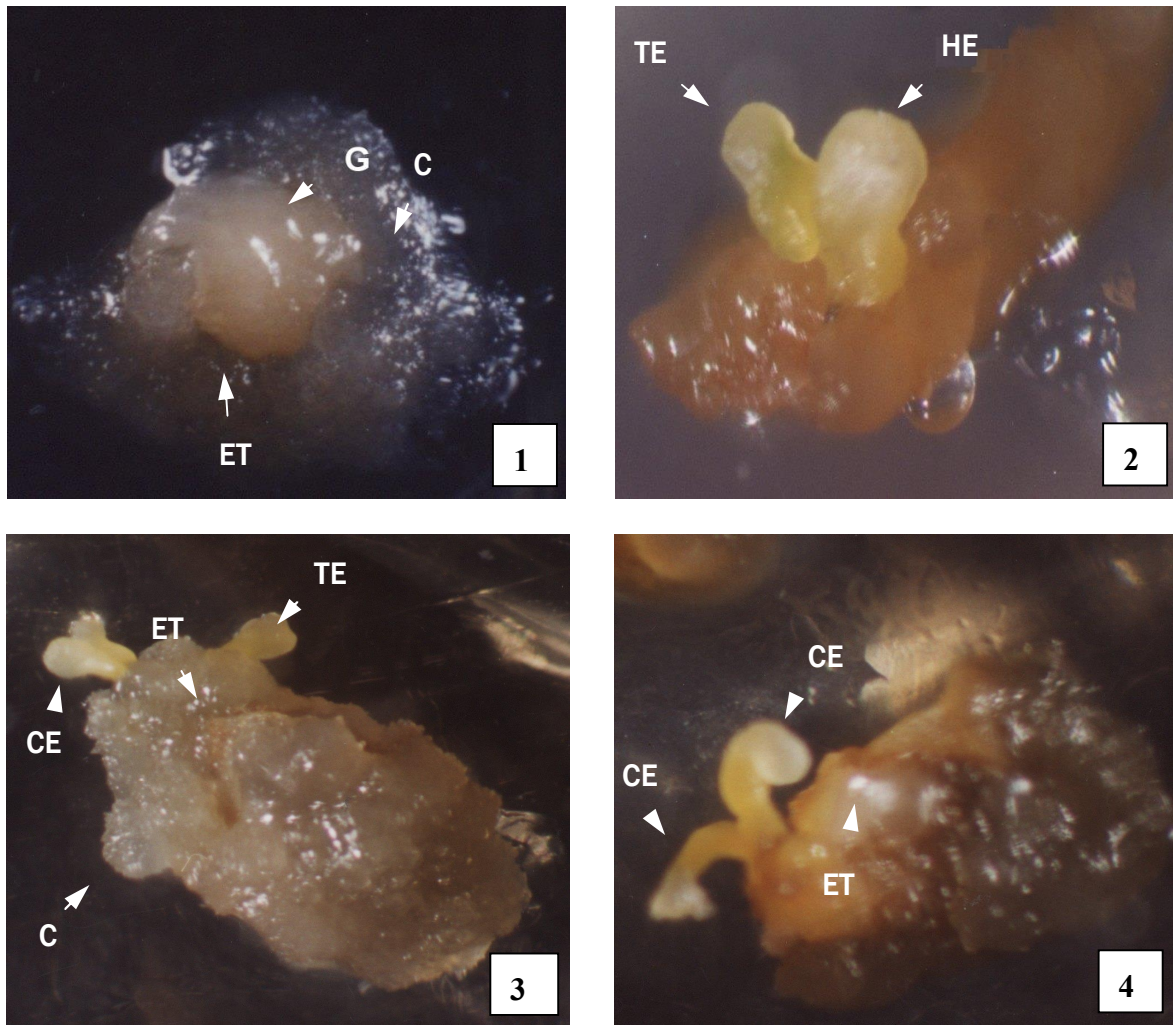


圖 5. 毛豆高雄選一號未熟子葉培養於 4 種不同蔗糖濃度之洋菜或凝膠培養基於暗處理 2 週後 $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 16 小時照光下誘導的胚性組織及體胚

Fig. 5. Embryogenic tissue and somatic embryo induced from immature cotyledons of vegetable soybean cv. KS1 cultured on agar or gelrite media containing various sucrose level and cultured at dark room for 2 weeks before lighted 16 hours

1 : M2a, 2 : M3a, 3 : M2g, 4 : M3g medium

ET : embryogenic tissue, TE : torpedo embryo, HE : heart embryo, CE : cotyledonary stage embryo, G : globular embryo, C : callus

討論

培養基中生長素的類型、濃度與蔗糖濃度對大豆體胚形成及植株再生已有很多的研究 (Lazzeri *et al.*, 1987 a, b; Finer and Nagasaw, 1988; Samoylov *et al.*, 1998 a, b)。一般來說，大豆之再生能力是較低的。許多報告指出誘導大豆體胚形成最有效的生長素為 NAA 和 2,4-D。

2,4-D 應用於誘導大豆體胚方面，Ranch *et al.* (1986)，Buchheim *et al.* (1989) 均指出培養基中添加 20 到 40mg/l 2,4-D 對大豆體胚形成和植株的再生有高效率的效果。Bailey *et al.* (1993 a, b)，Tian *et al.* (1994)，Li and Grabau (1996)，Santarem *et al.* (1997)，Santarem and Finer (1999)，用 40mg/l 2,4-D 的高濃度 2,4-D 行大豆未熟子葉的培養，皆得到球形胚和胚性組織的形成。Wright *et al.* (1991) 以 20mg/l 2,4-D 誘導大豆未熟子葉成功產生球形、魚雷形或子葉期之體胚。Hepher *et al.* (1998) 以 22 μ M (5mg/l) 2,4-D 誘導大豆未熟胚產生球形體胚，全和葉 (1991) 用 2.5mg/l 2,4-D，皆得到正常或不正常體胚。Lippmann and Lippmann (1984) 指出，5 μ M (1mg/l) 的 2,4-D 濃度對大豆體胚誘導效果最佳，但體胚較不正常。本試驗以含 40mg/l 高濃度之 2,4-D 培養黑豆及毛豆未熟子葉誘導體胚形成，大多為胚性組織和球形胚。黑豆台南三號高於毛豆高雄選一號，此與 Shoemaker *et al.* (1991) 指出在較高 2,4-D 濃度下會抑制體胚的形成，而僅使其發育至球形胚相一致。2,4-D 為目前大豆未熟子葉培養最常使用的生長素類，其濃度由 1~40mg/l 均有不同的效果，高濃度 (20~40mg/l) 有利於胚性組織及球形胚形成，但也會抑制體胚的分化。低濃度 (2.5~5mg/l) 可誘導體胚的形成及再生，但形成的體胚數較少，且基因型的不同其誘導效果差異顯著，因此針對本土性的黑豆、毛豆之未熟胚培養，實有待探討的必要。

醣類不僅為培養基中的主要碳源，還具有調節培養基滲透壓的功能，在大豆組織培養之體胚形成之研究一般多使用蔗糖，其用量因不同品種、不同培養條件對其需求亦不同。Lazzezi *et al.* (1987 a) 以 1.5% ~12% 蔗糖對大豆體胚誘導作比較，發現對體胚誘導形成率以 3% 為最高，到 6% 即下降，達 12% 時，則無體胚產生。Komatsuda and Ko (1990)

以 3% 蔗糖誘導大豆體胚發現不同基因型體胚形成能力有所不同。全和葉 (1991) 以 3% 和 6% 濃度蔗糖添加至含 40mg/l 2,4-D 的培養基發現子葉的反應，在台農 15 號 (TN15)、高雄 8 號 (KS8)、高雄 10 號 (KS10) 均以 6% 蔗糖對體胚的誘導為佳，但胚軸則以 3% 較佳，其所誘導之體胚多為球形胚。

本試驗以 3% 及 6% 濃度蔗糖添加至含 40mg/l 2,4-D 的培養基誘導黑豆及毛豆未熟子葉體胚，發現黑豆台南三號以 6% 蔗糖對胚性組織誘導效果最佳，所誘導的體胚多為球形胚，此與 Finer (1988)、全和葉 (1991) 結果相似。而毛豆高雄選一號則以 3% 蔗糖胚性組織及球形胚誘導較佳。由此可知，品種不同、其蔗糖用量亦所不同。本試驗毛豆高雄選一號以 6% 蔗糖添加含 40mg/l 2,4-D 之 M3g 培養基，所誘導之球形胚經繼續培養所產生之不正常子葉期胚(圖 5 - 4)，與 Komatsuda *et al.*(1991) 指稱培養基中含較高濃度(3%) 蔗糖誘導之體胚較不完全之結果相符。比較高濃度蔗糖較易誘導分化不完全體胚，學者認為基因型與不同蔗糖濃度的反應有關。

Lippmann and Lippmann. (1984), Ranch *et al.*, (1986) 指出蔗糖濃度在 0.5~6% 時對大豆體胚形成最有利。但 Lippmann and Lippmann (1984) 認為使用 1mg/l 2,4-D + 1% 蔗糖最好。而 Ranch *et al.* (1986) 指出，誘導大豆體胚形成之最佳組合為 6% 蔗糖 + 5mg/l 2,4-D。Lazzeri *et al.* (1986) 指出，auxin 和蔗糖之相互交感對大豆體胚形成有顯著的差異，蔗糖濃度在 5~10g/l 下其癒合組織會呈現些微褐色。同時指出大豆最高正常體胚的產生是培養基中蔗糖濃度在 (1 或 2%) 並配合 NAA (6.25 或 12.5mg/l)。

本試驗以 0%、1%、3%、6% 濃度蔗糖添加至 40mg/l 2,4-D 的培養基誘導黑豆及毛豆未熟子葉之體胚形成，發現培養基中 1% 蔗糖濃度時，其癒合組織產生的量較多，大多呈鬆軟型、白色至黃棕色；3% 及 6% 時胚性組織或球形胚直接由培植體產生。0% 時培植體則皆無反應，可知糖類確為培養基中的主要碳源。黑豆台南三號以含 6% 蔗糖及 2g/l gelrite 之 M3g 培養基其所誘導之胚性組織形成率較多，而毛豆高雄選一號則以含 3% 蔗糖及 2g/l gelrite 之 M2g 培養基其所誘導者較佳，可知黑豆在高蔗糖 (6%) 濃度及高 2,4-D 濃度下較適宜體胚的產生，而毛豆則以 3% 蔗糖濃度及高 2,4-D 濃度下較合適，推測基因型不同其所適的蔗糖濃度也有所不同。

凝膠在培養基中除了可提供支持力量外，並可維持滲透壓，Komatsuda and Ohyama (1988)分別以 agar 和 gelrite 添加於含 2,4-D 及 NAA 的培養基進行大豆品種間未熟子葉之體胚誘導。全和葉 (1991) 為探討 gelrite 與 agar 和 auxin 間之關係，亦分別以 gelrite 和 agar 添加到含 2.5mg/l 2,4-D 的培養基誘導體胚指出，二種凝膠與 2,4-D 間對各品種之體胚誘導無關，但胚軸反應以添加 gelrite 的培養基對體胚的誘導較好，子葉的反應則以添加 agar 的培養基較佳。Santarem *et al.* (1977) 以 agar 和 gelrite 分別添加到 40mg/l 2,4-D 及 60g/l sucrose 之 MSB 培養基誘導大豆不同品種未熟子葉之體胚，指出 Jack 品種以背面接觸培養基，pH 7.0 和 2g/l 之 gelrite 培養基效果最佳。本試驗以含 6%蔗糖及 2g/l gelrite 之 M3g，含 3%蔗糖及 2g/l gelrite 之 M2g 培養基和含 6%蔗糖及 8g/l agar 之 M3a，含 3%蔗糖及 8g/l agar 之 M2a 培養基相比較，得知培養基中之 gelrite 對黑豆及毛豆較 agar 有效，可促進胚性組織及球形胚之形成率。此結果與 Santarem *et al.* (1997) 相一致。即培養基中含高濃度 2,4-D 和 gelrite，pH 調至 7 可有效增進大豆之體胚形成率。

使用適宜的光源有助於培養基中之體胚誘導效果，所需的光線也各有不同，Komatsuda *et al.* (1991) 指出，大豆品種的再生能力不同與在組織培養中不同營養或其環境因素有關。Lazzeri *et al.* (1987 b) 認為光強度和光質會影響大豆合子胚之體胚的形成，在黑暗及光照下皆可形成，但強光 ($80 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) 會傷害體胚。體胚形成不受白光光照的影響，但黑暗環境下體胚的生長會受到抑制。

本試驗黑豆台南三號以在光處理 2(暗處理 2 週後 $25 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 16 小時照光 6 週) 的光照下其胚性組織及球形胚形成率均高於光處理 1($5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 24 小時照光 8 週)，而毛豆高雄選一號則以在光處理 1($5-10 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 24 小時照光 8 週) 的光照下其胚性組織及球形胚形成率較佳，由此可知品種不同其所適應的培養之光照條件也有所不同。

參考文獻

- 1.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 1：237~249。
- 2.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。
- 3.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。
- 4.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。
- 5.Bailey, M. A., H. R. Boerma, and W. A. Parrott. 1993a. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29P:102-108.
- 6.Bailey, M. A., H. R. Boerma, and W. A. Parrott. 1993b. Genotype-specific optimization of plant regeneration from somatic embryos of soybean. *Plant Sci.* 93:117-120.
- 7.Buchheim, J. A., S. M. Colburn, and J. P. Ranch. 1989. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* 89:768-775.
- 8.Evans, D. A. 1981. Soybean tissue culture. *Soybean Genet. Newsl.* 8:27~29.
- 9.Finer, J. J. 1988. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep.* 7:238-241.
- 10.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.
- 11.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.
- 12.Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50 : 151-158.
- 13.Hepher, A., M. E. Boulter, N. Harris, and R. S. Nelson. 1988. Development of a superficial

- meristem during somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L.). *Ann. Bot.* 62 : 513-519.
14. Komatsuda, T. and K. Ohyama. 1988. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. *Theor. Appl. Genet.* 75:695-700.
 15. Komatsuda, T., K. Kaneko, and S. Oka. 1991. Genotype x sucrose interactions for somatic embryogenesis in soybean. *Crop Sci.* 31:333-337.
 16. Komatsuda, T. and S. W. Ko. 1990. Screening of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] genotypes for somatic embryo production from immature embryo. *Japan J. Breed.* 40:249-251.
 17. Lazzeri, P. A., D. F. Hildebrand, and G. B. Collins. 1987a. Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:209-220.
 18. Lazzeri, P. A., D. F. Hildebrand, and G. B. Collins. 1987b. Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. *Plant Mol. Biol. Rep.* 10:197-208.
 19. Lazzeri, P. A., D. F. Hildebrand, J. Sunega, E. G. Williams, and G. B. Collins. 1988. Soybean somatic embryogenesis: interactions between sucrose and auxin. *Plant Cell Rep.* 7:517-520.
 20. Li, J., and E. A. Grabau. 1996. Comparison of somatic embryogenesis and embryo conversion in commercial soybean cultivars. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 44:87-89.
 21. Lippmann, B. and G. Lippmann. 1984. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell Rep.* 3:215-218.
 22. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473~479.
 23. 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.
 24. Parrott Lab. at UGA. 2000. Somatic embryogenesis of soybean. <http://mars.cropsoil.uga.edu/homesoybean/somprot.htm> 11pp.

25. Ranch, J. P., L. Oglesby, and A. C. Zielinski. 1986. Plant regeneration from tissue cultures of soybean by somatic embryogenesis. pp. 97-110. In: I. K. Vasil (ed.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press, New York.
26. 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.
27. 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.
28. Santarem, E. R., B. Pelissier, and J. J. Finer. 1997. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent, and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 33:13-19.
29. Santarer, E. R., and J. J. Finer. 1999. Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 35:451-455.
30. 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.
31. Shoemaker, R. C., L. A. Amberger, R. G. Palmer, L. Oglesby, and J. P. Ranch. 1991. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:84-88.
32. 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.
33. Tian, L. N., D. C. W. Brown, H. Voldeng, and J. Webb. 1994. *In vitro* response and

pedigree analysis for somatic embryogenesis of long-day photoperiod adapted soybean.
Plant Cell Tiss. Organ Cult. 36:269-273.

34. Williams, E. G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis : Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Ann. Bot. 57 : 443-462.

35. 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.