

落花生栽培種未熟胚誘導體胚及 植株再生之研究

胡澤寬¹⁾ 徐敏洲²⁾

(接受刊載日期：中華民國 91 年 9 月 11 日)

摘要：本試驗以落花生栽培種之未熟胚為材料，探討 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)誘導體胚，及 naphthaleneacetic acid(NAA)與抗壞血酸促進發根的效果，期望建立經由體胚形成再生植株之方法。將臺南 11 號之上胚芽與子葉基部組織培養於添加 0.5, 1, 2, 4, 8 及 16 mg/l 2,4-D 的 MS 培養基中 45 天，結果顯示上胚芽之體胚誘導率及體胚形成數均高於子葉基部培植體。就 2,4-D 濃度而言，上胚芽培養於添加 4 mg/l 2,4-D 培養基有最高的體胚誘導率(57.39%)，且大多為正常之體胚；8 mg/l 以上的 2,4-D 則會提高培植體褐化率而降低體胚誘導率，且所形成的體胚大多為不正常的融合胚。又以 8 個品種(系)之未熟上胚芽培養於 MS + 4 mg/l 2,4-D 培養基得知，體胚誘導率在品種(系)間有顯著的差異。將體胚移入添加 50 mg/l 抗壞血酸及 0.5 mg/l NAA 之培養基中，可獲致根系旺盛的再生幼株，該等再生植株經健化後，移植至土壤中均生長健旺及可正常開花。

關鍵詞：落花生、未熟胚、體胚形成、2,4-D、NAA、抗壞血酸

前言

落花生種間雜交時，常受限於雜交不親和性(cross incompatibility)、雜種不育性(hybrid inviability)及雜種不稔性(hybrid sterility)等障礙(Bajaj *et al.*, 1982; Halward and Stalker, 1987)，故有學者建議利用胚培養(embryo culture)及子房柄培養(peg tip

culture)進行雜交胚的拯救(Moss and Stalker, 1987; Moss *et al.*, 1988; Stalker and Eweda, 1988; Ozias-Akins, 1989; Feng *et al.*, 1996)。然而，不管胚培養或子房柄培養，通常皆須建立一套有效的植物組織培養及再生系統(McKently *et al.*, 1991; Kanyand *et al.*, 1994; Livingstone and Birch, 1999)。

經由植物組織培養再生植株的過程有二：一是器官形成(organogenesis)，包括不定根和不定芽的分化；二是體胚形成(somatic embryogenesis)。器官形

1) 國立中興大學農藝學系副教授。

2) 國立中興大學農藝學系畢業研究生。

成的路徑有操作簡單及成功率高的優點(胡和徐, 2002), 但體胚形成因擁有單一細胞來源(single-cell origin), 在遺傳上能穩定地再生, 此外具有高增殖率及雙極性(bipolar)構造等特性, 因此有較優越的利用潛力(Chengalrayan *et al.*, 1997)。有關落花生體胚形成之研究大多以未熟葉或成熟種子為材料(Kartha *et al.*, 1981; Mroginski *et al.*, 1981; Johson and Pittman, 1986; McKently *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1992), 在國內雖曾探討未熟胚誘導體胚的技術(賴和葉, 1994; 葉和賴, 1995; 鄭和葉, 1997, 1998), 但在正常體胚誘導率及由體胚轉化成植株的效率上仍有改進的空間, 而且在基因型間的差異也無完整的參考資料。

體胚的誘導效果已知與培養基中所添加生長素類(auxin)與細胞分裂素類(cytokinin)生長調節劑的組合比例有非常密切的關係(Komamine *et al.*, 1992; Hutchinson and Saxena, 1996; 鄭和葉, 1997, 1998), 但有研究報告指出, 單獨添加 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)對體胚誘導率及體胚形成數有極佳的效果(Wetzstein and Baker, 1993; Baker and Wetzstein, 1995; Chengalrayan *et al.*, 1997, 1998)。落花生體胚分化及植株再生的培養基通常以添加低濃度 BA(N^6 -benzyladenine), TDZ(thidiazuron)和 kinetin 為主(Chengalrayan *et al.*, 1994, 1997), 但正常植株的生成率並不理想。落花生組培芽體大多以添加 NAA(naphthaleneacetic acid)或 IBA(indolebutyric acid)的 MS 培養基誘導根系(Pittman *et al.*, 1983; Stalker and Eweda, 1988), 近期也有研究報導抗壞血酸(ascorbic acid)與細胞分裂增殖有密切關係(Liso *et al.*, 1984, 1988; Innocenti *et al.*, 1990; Arrigoni *et al.*, 1992), 具促進生根(Innocenti *et al.*, 1993; 洪和胡, 2002), 以及提高體胚形成率、改善體胚結構及提高植株再生率的效

果(Guo *et al.*, 1999; Stasolla and Yeung, 1999)。

因此, 本試驗以 8 個落花生栽培種之未熟胚為材料, 探討 2,4-D 誘導體胚, 及 NAA 和抗壞血酸促進根系發育的效果, 期望建立經由體胚形成再生植株之方法, 供作克服花生種間雜交障礙之參考。

材料與方法

一、供試材料培育及莢果消毒

將臺南選 9 號(TNS9)、臺農 4 號(TNG4)、臺南 11 號(TN11)、臺南 12 號(TN12)、澎湖 2 號(PH2)、NCACC17127·VA196 及 VB104 等 8 個落花生栽培品種(系)於 2000 年春、夏作種植於中興大學試驗田, 行株距 20×10 公分, 生育期的栽培管理按一般慣行法行之。於結莢期將植株拔取, 依賴和葉(1994)之方法選取 R5 期之未熟莢果為材料, 先用肥皂水將其外表洗淨, 接著以 75%之乙醇消毒 1 分鐘, 再放入每 100 ml 滴有 1 滴 Tween20 的 2%次氯酸鈉溶液中, 振盪消毒 10 分鐘後移入無菌操作台內, 再以無菌水清洗 4~5 次。

二、培養基的成份與配製

所有試驗均以 MS 為基礎培養基, 添加 30 g/l 蔗糖及 8.2g/l 洋菜粉, pH 調至 5.75。植物生長調節劑之添加種類及濃度則因試驗目的而異, 體胚誘導的培養基分別加入 0.5、1、2、4、8 及 16 mg/l 2,4-D, 共 6 種處理培養基; 發根培養基則於 MS 基礎培養基中添加 0.5 mg/l NAA 和 50 mg/l 抗壞血酸。

三、培植體之切取、接種及培養

依鄭和葉(1997)的方法, 將消毒過之無菌莢果

切開，選取長度 4~6mm 之未熟種子，再沿種皮縱切取出未熟胚，隨後切取上胚芽及子葉基部作為培植體。將上胚芽之切離面與培養基接觸，子葉基部則以向軸面與培養基接觸，分別接種於添加不同濃度植物生長調節劑之 MS 培養基中。體胚及根系誘導試驗均經 21 天的黑暗培養，再移至溫度 27 ± 1 °C，光週期為 16 小時/天，光強度為 1500 lux 之白冷光照環境繼續培養，45 天後調查體胚和癒合組織之誘導狀況，體胚發芽和根系的生長情形。

四、統計分析

本試驗所調查之資料與數據，若屬於二項分佈時，則先作角度轉換後再分析，資料分析則是利用 SAS 程式中 GLM 分析程序(General Linear Model procedure)，判定其 F 值是否達顯著差異水準，若有顯著差異，則再進一步以 5% 最小顯著差異水準 (least significant difference test, LSD)，進行兩兩比較。

結果

一、不同濃度 2,4-D 對體胚誘導效果之差異

以台南 11 號之未熟上胚芽及子葉基部為培植體，分別培養於添加 0.5, 1, 2, 4, 8 及 16 mg/l 等 6 種不同濃度 2,4-D 之 MS 培養基，培養 45 天後調查體胚及癒合組織誘導率得結果如表 1。就培植體種類而言，以上胚芽誘導體胚之效果顯著優於子葉基部。依不同濃度 2,4-D 之誘導效果而論，以未熟上

胚芽為培植體時，1~4 mg/l 的 2,4-D 對體胚的誘導效果顯著優於其他濃度，尤其以添加 4 mg/l 2,4-D 時有最高的體胚誘導率(57.39%)。當 2,4-D 濃度高達 8 mg/l 以上，體胚誘導率即有下降的趨勢，且培植體的褐化程度也隨之增加；尤其是 16 mg/l 2,4-D 時，培植體約在培養後 15 天時，即開始出現有褐化現象，45 天時褐化率高達 25% 以上。至於以子葉基部為培植體時，添加 1 mg/l 2,4-D 有較好之誘導效果，但其體胚誘導率僅有 10.71%；至於 8 mg/l 及 16 mg/l 2,4-D 則會增加培植體的褐化率，甚少形成體胚。

癒合組織的形成，以子葉基部為培植體之癒合組織誘導率顯著高於以上胚芽為培植體之誘導率。就 2,4-D 濃度間之差異而言，子葉基部為培植體時，高濃度 2,4-D 之癒合組織誘導率則因褐化率提高而有下降之趨勢。上胚芽為培植體之癒合組織誘導率約在 24.01~39.59 % 之間，不同 2,4-D 濃度間無顯著的差異。

本試驗所誘得的體胚依外形可區分為四類，第一類為正常體胚(圖 1-A)，第二類為管狀的無芽體胚(圖 1-B)，第三類為具有多芽的融合胚(圖 1-C)，第四類為扇形的融合胚(圖 1-D)。所形成的體胚種類與 2,4-D 的添加濃度有密切關係，由圖 2 之結果得知，當 2,4-D 濃度在 0.5 mg/l 時，大多數培植體僅能誘得芽體(圖 2-A)，1mg/l 的 2,4-D 則誘導出一些管形且無芽的不正常體胚(圖 2-B)，2,4-D 濃度在 2 和 4 mg/l 時所誘導的體胚大多為有芽的正常體胚(圖 2-C,D)，而 8 mg/l 和 16 mg/l 2,4-D 則大多獲得多芽融合胚或扇形的不正常體胚(圖 2-E,F)。

二、體胚誘導效果在不同品種(系)間之差異

將不同花生品種(系)的未熟上胚芽培養在含 4 mg/l 2,4-D 的培養基中，45 天後，調查體胚誘導率及體胚形成個數結果如表 2 所示，由表可看出，VB104 及 TN12 的體胚誘導率最高，分別為 86.13% 及 85.55%，其次則為台農四號的 79.78%，而台南選 9 號及 VA196 分別為 63.34% 及 65.74%。體胚形成個數以台南選 9 號及台南 12 號的 5.50 及 5.48 個為最高，其次為澎湖 2 號的 4.35，而台農 4 號的體胚形成個數為最低，每個培植體上平均僅著生 2.98 個體胚。

三、體胚之根系誘導及植株再生

將上述試驗所誘得的體胚移至 MS 基礎培養基添加 50 mg/l 抗壞血酸及 NAA 的發根培養基中，培養 45 天後顯示，具芽的管狀體胚亦能發育成具良好根系之小苗(圖 3-A)，無正常芽的管狀體胚則僅有伸長及發根的現象(圖 3-B)，多芽的融合體胚經分割成單芽後均能發育成具良好根系之小苗(圖 3-C)。

將發根之小苗轉移至含蛭石與泥炭土(1:1 混合)之膠盆，置於覆蓋透明膠布的塑膠籃中，於室內健化 1 週，再經 3 週室外健化，可獲得生長健旺及正常開花的再生植株(圖 4)。

Table 2. Genotypic effects on peanut somatic embryo production from immature epicotyl, 30d after placed on MS medium with 4 mg/l 2,4-D

Genotype	Botanic type	Somatic embryoogenesis (%)	Embryos No. per explant
TNS 9	spanish	63.34 ^c	5.50 ^a
TNG 4	spanish	79.78 ^{ab}	2.98 ^{cd}
NCACC17127	valencia	72.50 ^{bc}	2.55 ^d
VA196	valencia	65.74 ^c	3.61 ^{bcd}
VB104	virginia bunch	86.13 ^a	3.44 ^{bcd}
PH 2	virginia runner	70.65 ^{bc}	4.35 ^{ab}
TN 11	spanish × virginia	70.58 ^{bc}	3.88 ^{bc}
TN 12	spanish × virginia	85.55 ^a	5.48 ^a

Means followed by the different letter of a column are significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

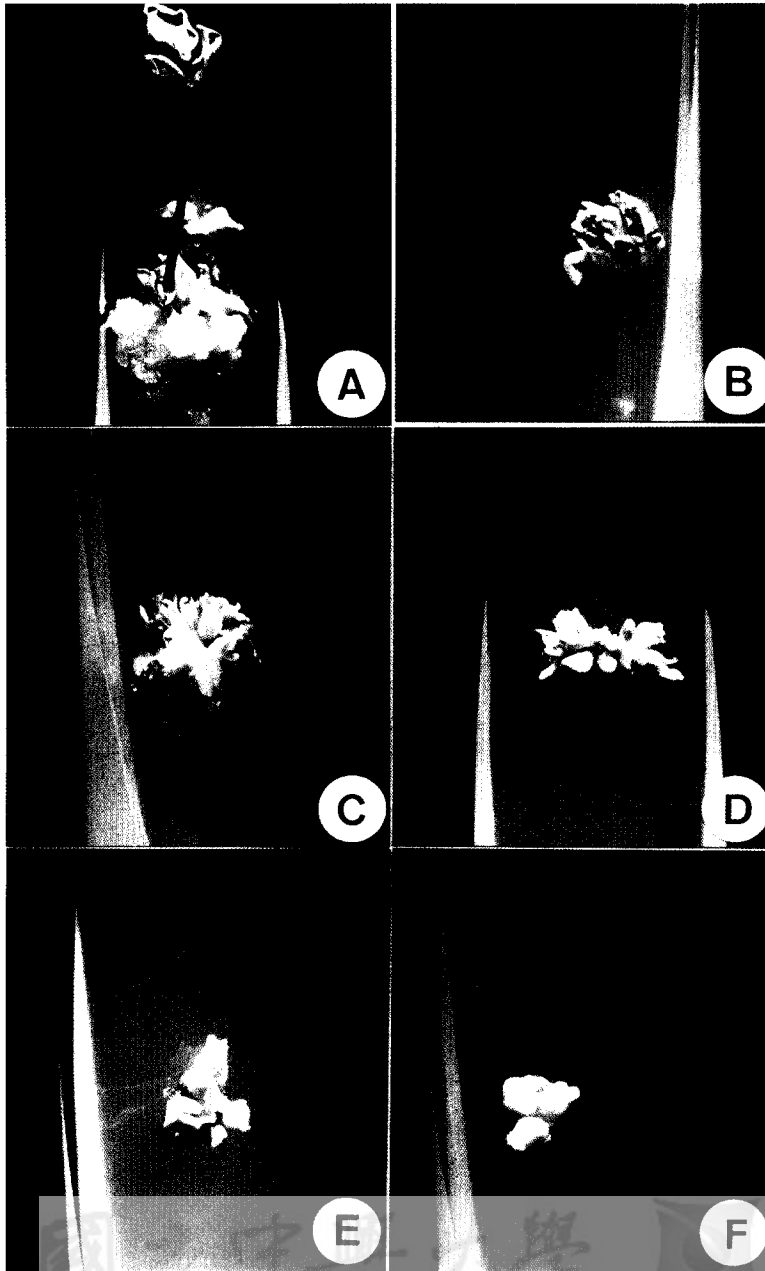


Fig. 2. Somatic embryogenesis induced from immature epicotyle of peanut (cv. TN11) after 45 days of culture on MS medium containing different 2,4-D levels
A:0.5mg/l, B:1mg/l, C:2mg/l, D:4mg/l, E:8mg/l, F:16mg/l

二、體胚誘導效果在不同品種(系)間之差異

將不同花生品種(系)的未熟上胚芽培養在含 4 mg/l 2,4-D 的培養基中，45 天後，調查體胚誘導率及體胚形成個數結果如表 2 所示，由表可看出，VB104 及 TN12 的體胚誘導率最高，分別為 86.13% 及 85.55%，其次則為台農四號的 79.78%，而台南選 9 號及 VA196 分別為 63.34% 及 65.74%。體胚形成個數以台南選 9 號及台南 12 號的 5.50 及 5.48 個為最高，其次為澎湖 2 號的 4.35，而台農 4 號的體胚形成個數為最低，每個培植體上平均僅著生 2.98 個體胚。

Table 2. Genotypic effects on peanut somatic embryo production from immature epicotyl, 30d after placed on MS medium with 4 mg/l 2,4-D

Genotype	Botanic type	Somatic embryogenesis (%)	Embryos No. per explant
TNS 9	spanish	63.34 ^c	5.50 ^a
TNG 4	spanish	79.78 ^{ab}	2.98 ^{cd}
NCACC17127	valencia	72.50 ^{bc}	2.55 ^d
VA196	valencia	65.74 ^c	3.61 ^{bcd}
VB104	virginia bunch	86.13 ^a	3.44 ^{bcd}
PH 2	virginia runner	70.65 ^{bc}	4.35 ^{ab}
TN 11	spanish × virginia	70.58 ^{bc}	3.88 ^{bc}
TN 12	spanish × virginia	85.55 ^a	5.48 ^a

Means followed by the different letter of a column are significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

三、體胚之根系誘導及植株再生

將上述試驗所誘得的體胚移至 MS 基礎培養基添加 50 mg/l 抗壞血酸及 NAA 的發根培養基中，培養 45 天後顯示，具芽的管狀體胚亦能發育成具良好根系之小苗(圖 3-A)，無正常芽的管狀體胚則僅有伸長及發根的現象(圖 3-B)，多芽的融合體胚經分割成單芽後均能發育成具良好根系之小苗(圖 3-C)。

將發根之小苗轉移至含蛭石與泥炭土(1:1 混合)之膠盆，置於覆蓋透明膠布的塑膠籃中，於室內健化 1 週，再經 3 週室外健化，可獲得生長健旺及正常開花的再生植株(圖 4)。

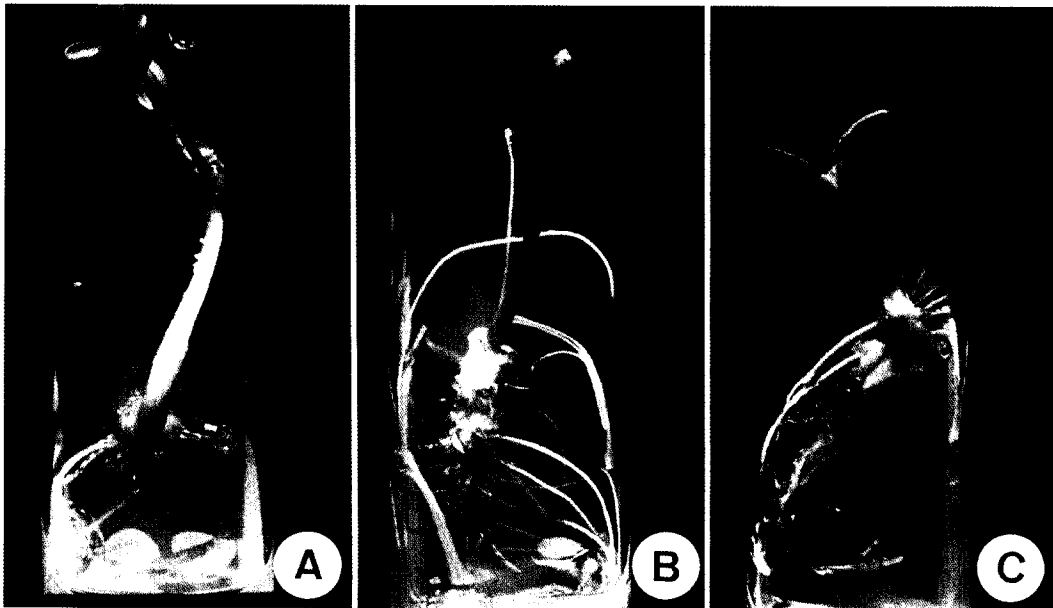


Fig. 3. Germination of somatic embryo of peanut (cv. TN11) after 45 days of culture on MS meaium containing 50mg/l ascorbic acid and 0.5mg/l NAA

A:Normal embryo, B:Tubular-shaped embryo with stunted shoot C:Multiple fused embryo normal shoot.



Fig. 4. The regenerated plants of peanut via embryogenesis

討論

植物組織培養再生植株的途徑中，利用器官形成或原生質體培養所得的再生植株在遺傳上及細胞學上較容易產生變異，而利用體胚形成則可得到較一致的正常植株(Hazra *et al.*, 1989)。關於體胚形成的研究報告指出，單獨添加 auxin 類生長調節劑之培養基對於體胚誘導效果優於同時添加 auxin 類與 cytokinin 類生長調節劑之組合培養基，而體胚形成率與 auxin 類生長調節劑的種類及濃度又有很密切的關係(Eapen and George, 1993)。Hazra 等 (1989) 指出添加 2,4-D 可誘導體胚形成，但添加 NAA 時則無法誘導任何體胚的形成。McKently (1991) 也發現不同類型 auxin 類生長調節劑顯著地影響體胚形成率，其中以 2,4,5-T 和 2,4-D 誘導體胚的效果優於 NAA，而 2,4-D 誘導體胚形成的最適濃度為 1~3 mg/l。Eapen and George (1993) 進一步指出，在 11 種不同 auxin 類生長調節劑中，以 2,4-D 對體胚的誘導效果最好，2,4,5-T 無法誘導體胚形成。由一些研究結果顯示，2,4-D 誘導體胚最適濃度為 20 mg/l (Chengalrayan *et al.*, 1994; Baker and Wetzstein, 1995; Eapen and George, 1993; Venkatachalam *et al.*, 1999)。本試驗以 0.5, 1, 2, 4, 8 及 16 mg/l 等 5 個濃度的 2,4-D 誘導未熟胚芽形成體胚，結果顯示添加 2 mg/l 及 4 mg/l 2,4-D 誘導體胚形成的效果最佳；2,4-D 濃度為 8 mg/l 時，體胚形成率即下降，培植體的褐化程度升高；當濃度高達 16 mg/l 時，培植體的褐化率更高達 25% 以上。此結果與 McKently (1991) 的結果相似，顯示高濃度 2,4-D 將導致體胚誘導率下降。

Baker 等(1995)利用成熟胚軸為培植體誘導體

胚，發現 2,4-D 濃度 60 mg/l 以下時，體胚形成個數在濃度間並沒有顯著的差異。Venkatachalam 等 (1999) 則指出，未熟小葉在 2,4-D 濃度提高至 25 mg/l 時，體胚形成個數會隨之下降。本試驗所使用的 2,4-D 濃度均低於上述研究，2,4-D 濃度雖然提高至 16 mg/l，平均體胚形成數亦無明顯下降趨勢，添加 4 mg/l 2,4-D 時有最高的平均體胚數，每一個培植體約產生 6.33 個體胚。不過本試驗也發現，隨著 2,4-D 濃度升高，不正常體胚形成數卻有增加的趨勢；如添加 2, 4-D 濃度為 2 及 4 mg/l 時，所形成的體胚大多為子葉期之正常體胚；當濃度高達 8 mg/l 及 16 mg/l 時，則產生較多量的畸形融合胚。McKently (1991) 也曾發現，隨著 2,4-D 濃度升高，正常體胚形成個數也隨著大量減少，其中以添加 1~3 mg/l 2,4-D 的正常體胚形成率為最高，與本試驗所得之趨勢相似。綜合體胚誘導率及形成個數之結果得知，2,4-D 誘導落花生未熟胚芽形成體胚之最適濃度為 4 mg/l，可作為後續研究及利用上之參考。

通常用來誘導花生體胚形成的培植體種類有未熟小葉(Chengalrayan *et al.*, 1994; Chengalrayan *et al.*, 1997)、未熟胚軸(Eapen and George, 1993)、成熟胚軸(Baker *et al.*, 1995)、未熟子葉(Barker and Wetzstein, 1995)、整個未熟胚(Sellars *et al.*, 1990)及成熟種子等(Murch *et al.*, 1999; Victor *et al.*, 1999)，培植體種類對體胚形成效果有很大的影響，McKently (1991) 發現成熟種子上胚軸前段為培植體有最高的體胚誘導率，Eapen and George (1993) 指出未熟胚軸產生的體胚數多於子葉為培植體的體胚數，鄭和葉(1998) 則發現未熟胚軸所誘導體胚數及誘導率均較子葉為高。由本試驗之結果也顯示，未熟胚芽的體胚誘導率及體胚形成數均高於子

葉基部者，可知未熟胚芽為較適合誘導體胚的培植體。

由體胚誘導至再生完整植株之過程中，各時期的反應因基因型不同而有顯著差異。Ozias-Akins 等 (1992b) 以落花生之未熟子葉及胚軸為培植體時發現，體胚形成、繼代之生長及植株再生率等在不同基因型間均有顯著差異。Baker 等 (1995) 利用 14 種不同基因型的胚芽為培植體誘導體胚，結果顯示不同基因型的體胚形成率介於 10~40%，但體胚形成個數則與基因型無顯著相關。但 Chengalrayan 等 (1997) 以 16 個不同基因型落花生之小葉誘導體胚，結果顯示體胚誘導率及形成個數在基因型間有顯著差異，再生植株率也因基因型不同而異。本試驗以 8 個品種(系)之未熟胚芽為材料，培養於含有 4 mg/l 2,4-D 的 MS 培養基，也得到體胚誘導率及平均體胚形成數在不同品種(系)間均有顯著的差異。若按 spanish、valencia、virginia bunch、virginia runner 及 spanish × virginia 等 5 種植物型(botanic type)加以比較，發現各植物型間的培養反應也有差異，spanish × virginia 型的台南 12 號及 virginia bunch 型的 VB104 有較高的體胚誘導率，valencia 型的 VA196 則有最低的體胚誘導率。

由於體胚誘導率及平均體胚形成數與各品種(系)間有顯著的交感作用，因此一種培養基並不能完全適用於各種品種(系)，此點在將來要應用時需加以注意。

利用 2,4-D 所誘導體胚經常產生缺少頂芽或頂芽發育不完全的不正常體胚，導致體胚無法正常分化，而影響植株的再生成功率。Chengalrayan 等 (1994) 將體胚轉移到半量濃度的 MS 培養基時亦只有 0.59% 的植株再生率，即使添加 0.5 mg/l BA 與 0.5 mg/l KN 後，體胚再生成小植株的成功率亦僅有 24.7%。Chengalrayan 等 (1997) 雖然發現 TDZ 對體胚再生成植株有很好的促進效果，然而亦指出體胚培養在含有 cytokinin 的培養基中，根系生長會受到抑制，殘留在根尖的 cytokinin 經過 8 週後仍會阻礙根的生長。Innocenti 等 (1993) 指出，外加 ascorbic acid 會活化蠶豆根之中柱鞘細胞長成側根。Stasolla 與 Yeung (1999) 則發現，在白赤松的體胚再生成植株過程中，添加抗壞血酸可將再生率由原來的 34% 提升至 58%。本試驗將體胚轉移至添加 50 mg/l 抗壞血酸及 0.5 mg/l NAA 的 MS 培養基中，結果亦證實抗壞血酸可增進根系的生長，對提高植株再生率有很大的助益。

誌 謝

本試驗承蒙農委會經費補助【89 生技-2.1-糧-63(18)】，謹表謝忱。

國立中興大學 參考文獻

1. 洪崇文、胡澤寬。2002。落花生幼齡子房柄的體外培養 IV. 添加抗壞血酸與酪素水解物對莢果形成及胚發育之效應。中華農學會報 3(3) : 201-215。

2. 胡澤寬、徐敏洲。2002。落花生栽培種未熟胚經器官形成再生植株之研究。農林學報 51(3)：1-12。
3. 黃惠娟、曹文隆、楊金興、蔡志濃。1996。引進落花生野生種源之特性評估。中華農藝研究 45(1)：15-25。
4. 葉茂生、賴媛敏。1995。花生未熟胚培養之研究 II。不同胚齡及種子大小之未熟胚培養對癒合組織及體胚形成的影響。農林學報 44(1)：67-85。
5. 鄭皓鴻、葉茂生。1997。花生未熟胚培養的研究 III。未熟胚軸及子葉不同部位培養器官形成之探討。農林學報 46(3)：39-51。
6. 鄭皓鴻、葉茂生。1998。花生未熟胚培養的研究 IV。未熟胚軸及子葉不同部位培養器官形成之探討。農林學報 47(1)：91-105。
7. 賴媛敏、葉茂生。1994。花生未熟胚培養的研究 I。不同生育期末熟胚培養體胚形成之比較。農林學報 43(3)：1-13。
8. Arrigoni, O., L. D. Gara, F. Tommasi and R. Liso. 1992. Changes in ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* 99: 235-238.
9. Bajaj, Y. P. S., P. Kumar, M. M. Singh, and K. S. Labana. 1982. Interspecific hybridization in the genus *Arachis* through embryo culture. *Euphytica* 31:365-370.
10. Baker, C. M., and H. Y. Wetzstein. 1994. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36:361-368.
11. Baker, C. M., and H. Y. Wetzstein. 1995. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continual exposure to 2,4-D. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40:249-254.
12. Baker, C. M., R. E. Durham, J. A. Burns, W. A. Parrott, and H. Y. Wetzstein. 1995. High frequency somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using mature, dry seed. *Plant Cell Rep.* 15:38-42.
13. Cheng, M., D. C. H. His, and G. C. Phillips. 1992. *In vitro* regeneration of valencia-type peanut (*Arachis hypogaea* L.) from cultured petiolules, epicotyl sections and other seedling explants. *Peanut Sci.* 19:82-87.
14. Chengalrayan, K., S. S. Sathaye, and S. Hazra. 1994. Somatic embryogenesis from mature embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep.* 13:578-581.
15. Chengalrayan, K., V. B. Mhaske, and S. Hazra. 1995. *In vitro* regulation of morphogenesis in peanut. *Plant Sci.* 110:259-268.
16. Chengalrayan, K., V. B. Mhaske, and S. Hazra. 1997. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. *Plant Cell Rep.* 16:783-786.
17. Chengalrayan, K., V. B. Mhaske, and S. Hazra. 1998. Genotypic control of peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17:522-525.
18. Eapen, S., and L. George. 1993a. Somatic embryogenesis in peanut: Influence of growth regulators and sugar. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35:151-156.
19. Feng, Q. L., H. E. Pattee and H. T. Stalker. 1996. Plant recovery of selfs and interspecific hybrids of *Arachis* by invitro culture of peg tips. *Crop Sci.* 36:1660-1666.
20. Guo, Y., P. Sewon, and S. Pulli. 1999. Improved embryogenesis from anther culture and plant regeneration in

- timothy. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57:85-93.
21. Halward, T. M., and H.T. Stalker. 1987. Incompatibility mechanisms in interspecific peanut hybrids. *Crop Sci.* 27:456-460
 22. Hazra, S., S. S. Sathaye, A. F. Mascarenhas. 1989. Direct somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea*). *Bio/Technology* 7:49-51.
 23. Hutchinson, M. J., and P. K. Saxena. 1996. Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures. *Plant Cell Rep.* 15:512-515.
 24. Innocenti, A. M., M. B. Bitonti, O. Arrigoni, and R. Liso. 1990. The size of quiescent centre in roots of *Allium cepa* L. grown with ascorbic acid. *New Phytol.* 114:507-509.
 25. Innocenti, A. M., B. Bitonti, S. Mazzuca, R. Liso and O. Arrigoni. 1993. Histochemical localization of exogenous ascorbic acid in the pericycle nuclei of *Vicia faba*. *Caryologia* 46: 1-4.
 26. Johnson, B. B., and R. Pittman. 1986. Factors affecting *in vitro* differentiation of explant from mature leaves of *Arachis villosulicarpa* honene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 22:713-715.
 27. Kanyand, M., A. P. Dessai, and C. S. Prakash. 1994. Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 14:1-5.
 28. Kanyand, M., C. M. Peterson, and C. S. Prakash. 1997. The differentiation of emergences into adventitious shoots in peanut, *Arachis hypogaea* (L.). *Plant Sci.* 126:87-95.
 29. Kartha, K. K., K. Pahl, N. L. Leung, and L. A. Mroginski. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. *Can. J. Bot.* 59:1671-1679.
 30. Komamine, A., R. Kawara, M. Matsumoto, S. Sunabori, T. Toya, and T. Fujimura. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 28:11-14.
 31. Liso, R., G. Calabrese, M. B. Bitonti and O. Arrigoni. 1984. Relationship between ascorbic acid and cell division. *Exp. Cell Res.* 150:314-320.
 32. Liso, R., A. M. Innocenti, M. B. Bitonti and O. Arrigoni. 1988. Ascorbic acid-induced progression of quiescent center cells from G1 to S phase. *New Phytol.* 110:469-471.
 33. Livingstone, D. M., and R. G. Birch. 1999. Efficient transformation and regeneration of diverse cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by particle bombardment into embryogenic callus produced from mature seeds. *Molecular Breeding.* 5:43-51.
 34. McKently, A. H. 1991. Direct somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27P:197-200.
 35. McKently, A. H., G. A. Moore, and F. P. Gaardner. 1991. Regeneration of peanut and perennial from cultured leaf tissue. *Crop Sci.* 31:833-837.
 36. Moss, J. P., and H. T. Stalker. 1987. Embryo rescue in wide crosses in *Arachis*. 3. *In vitro* culture of peg tips of *A. hypogaea* selfs and interspecific hybrids. *Peanut Sci.* 14:70-74.

37. Moss, J.P., H. T. Stalker and H. E. Pattee. 1988. Embryo rescue in wide crosses in *Arachis*. 1. Culture of ovules in peg tips of *Arachis hypogaea*. *Ann. Bot.* 61:1-7.
38. Mroginski, L. A., K. K. Kartha, and J. P. Shyluk. 1981. Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by *in vitro* culture of immature leaves. *Can. J. Bot.* 59:826-830.
39. Murch, S. J., J. M. R. Victor, S. Krishnaraj, and P. K. Saxena. 1999. The role of proline in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 35:102-105.
40. Ozias-Akins, P. 1989. Plant regeneration from immature embryos of peanut. *Plant Cell Rep.* 8:217-218.
41. Ozias-Akins, P., C. Singsit, and W. D. Branch. 1992a. Interspecific hybrid inviability in crosses of *Arachis hypogaea* X *A. stenosperma* can be overcome by *in vitro* embryo maturation or somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 140:207-212.
42. Ozias-Akins, P., W. F. Anderson, and C. C. Holbrook. 1992b. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea* L. :genotype comparison. *Plant Sci.* 83:103-111.
43. Pittman, R. N., D. J. Banks, J. S. Kirby, E. D. Mitchell, and P. E. Richardson. 1983. *In vitro* culture of immature peanut (*Arachis* spp.) leaves: Morphogenesis and plantlet regeneration. *Peanut Sci.* 10:21-25.
44. Sellars, R. M., G. M. Southward, and G. C. Phillips. 1990. Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean. *Crop Sci.* 30:408-414.
45. Stalker, H. T., and M. A. Eweda. 1988. Ovule and embryo culture of *Arachis hypogaea* and hybrids. *Peanut Sci.* 15:98-104.
46. Stasolla, C., and E. C. Yeung. 1999. Ascorbic acid improves conversion of white spruce somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 35:316-319.
47. Venkatachalam, P., P. B. K. Kishor, N. Geetha, M. Thangavelu, and N. Jayabalan. 1999. A rapid protocol for somatic embryogenesis from immature of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 35:409-412.
48. Victor, J. M. R., S. J. Murch, S. KrishnaRaj, and P.K. Saxena. 1999. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: The role of thidiazuron and N6-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis. *Plant Growth Regulation* 28:9-15.
49. Wetzstein, H. Y., and C. M. Baker. 1993. The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Sci.* 92:81-89.

Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of peanut(*Arachis hypogaea*)

Tzer-Kaun Hu¹⁾ Min-Chou Hsu²⁾

(Accepted for publication: September. 5, 2002)

Abstract

In this study, the peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars were used as materials to investigate the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) on somatic embryogenesis and of naphthaleneacetic acid(NAA) and ascorbic acid on rooting, then to find a efficient protocols for regeneration of plantlet via somatic embryogenesis.

As immature epicotyle and the half proximal cotyledon of TN11 were cultured on MS basal medium supplemented with 2,4-D at 0.5, 1, 2, 4, 8 and 16 mg/l, the results indicate that the induced rates of somatic embryo from epicotyle was better than from the half proximal cotyledon. Of all media with 2,4-D used, 4mg/l 2,4-D had the highest rate (57.93 %) at embryogenesis and produced a more number of normal somatic embryo. As 2,4-D level in induction medium increased to 8 mg/l or more, the percentage of embryogenesis decreased and was associated with browning of explants, and most of somatic embryo morphology was abnormal. The genotypic effect on embryogenesis was significant. Somatic embryos germinated on the medium with 50 mg/l ascorbic acid and 0.5 mg/l NAA could develop to the well-rooted plantlets, and develop into healthy and fertile plants when planted in soil.

Keywords : *Arachis*, Immature embryo, Somatic embryogenesis, 2,4-D, NAA, Ascorbic acid



1) Associate Professor, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taiwan, R.O.C.

2) Graduated student, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taiwan, R.O.C.