

花生未熟胚培養的研究

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¹

葉茂生 賴媛敏²⁾

(接受刊載日期：中華民國83年9月27日)

摘要：本研究以栽培種花生台南選9號(TNS9)及台南11號(TN11)為材料，取受精後子房柄伸入土表後9~24天不同胚齡之未熟胚為培植體，以L2為基礎培養基，添加2 mg/l NAA+1 mg/l BA(代號A2)，以MSB為基礎培養基，添加2.5 mg/l 2,4-D(A4)，以及MS為基礎培養基，添加1 mg/l 2,4-D(A5)；1 mg/l 2,4-D+1 mg/l NAA(A6)等四種培養基，探討比較不同胚齡及種子大小之未熟胚培養時對癒合組織及體胚形成的影響，結果如下：

就胚齡而言，11天以下的未熟胚其體胚形成率普遍低落，只在培植體表面有切刻的部位形成白色或淺綠色疏鬆的癒合組織，無進一步分化；12~16天左右的未熟胚，在伸展開的子葉或原生的胚芽旁長出1~數個體胚，17天至20天左右的胚軸之體胚形成率亦相當高。

種子長度3 mm以下的未熟種子不適於胚培養，體胚形成率幾乎為零，4~6 mm左右者取出整個未熟胚培養，則可得較高的體胚形成率，而6 mm以上，則因培養基的不同而有所差異，除A2培養基外，其餘三種培養基對較長之未熟種子形成體胚的誘導效果不大。

就四種培養基而言，A2培養基的體胚形成率較高，產生多量且正常的體胚，並進而發育成芽體；A4~A6培養基均能誘導出多量的癒合組織，及少量的體胚。最適合花生未熟胚培養的胚齡是在子房柄伸入地下後14~20天，而種子長度約5~8 mm。

關鍵詞：花生，未熟胚培養，體胚形成，胚齡，種子大小。

前 言

花生原產於南美洲，目前廣泛地在熱帶及亞熱帶地區栽植，其子粒含有豐富的蛋白質、油分，以及多種人類必需的養分，為僅次於大豆極具經濟價值的豆類作物。然而，單以傳統

的育種方法進行，已不敷所需；利用植物組織培養技術進行品種改良，已成為突破瓶頸的手段之一，花生當然也不例外。

近年來因組織培養技術的快速發展，使得植物體之部分組織，甚至單一的細胞，只要在適當的環境下培養都可能再分化，再生為一完整的植株。其形成過程有二：即器官形成

1) 本研究承蒙行政院農業委員會82科技-1.1-糧-56(23)計畫補助經費，謹申謝忱。

2) 中興大學農藝學系教授及前研究生。

(organogenesis)，及體胚形成(somatic embryogenesis)^(1·14)。就花生的組織培養而言，其培植體可分為子房柄^(19·25·33)、花藥^(8·48)、未熟小葉^(24·26·35)、成熟葉^(14·21)、未熟胚或胚軸^(6·7·20·32)、未熟子葉^(15·16)及成熟種子之胚軸和子葉^(12·13·23·28·29·39)等，這些培植體大多經由器官形成再生植株，而經由體胚形成再生為植株者較少。最近，經由體胚形成而誘導植株再生者有未熟子葉^(9·15·16·23·30·31·37·40)、未熟胚軸^(5·15·20·32)、成熟胚軸⁽²²⁾和幼葉^(10·18·36)。然而，組織培養除了培養基的成分，尤其是生長調節劑的種類及濃度，也必須注意培植體的選取、部位及時期，此等均為影響培養結果的主要因素。本研究以台灣栽培種小粒種花生台南選9號及大粒種花生台南11號為材料，繼作者在前報時篩選所得之A2、A4、A5及A6四種不同培養基⁽⁵⁾，探討不同胚齡及種子大小之未熟胚培養時對癒合組織誘導及體胚形成的影響，以瞭解最佳的培植時期，建立花生未熟胚培養技術，以做為拯救雜交胚培養時之參考。

材料與方法

一、材料：

以栽培種花生台南選9號(TNS9)及台南11號(TN11)種子為材料，於1992年春作、夏作、秋作分批種植於直徑30公分、高30公分的塑膠盆內，每盆種3粒，放置於室外，待其發芽後即行間苗，每盆留兩株，植株生長開花、結莢後，以不同胚齡及種子大小的未熟胚為培植體，進行培養。

二、方法：

(一)培養基的成分與配製

本試驗使用第一報⁽⁵⁾所得的4種培養基：以L2⁽³⁴⁾為基礎培養基，添加2 mg/l NAA (1-naphthaleneacetic acid)及1 mg/l BA

(6-benzyl-aminopurine)之A2培養基；以MSB⁽¹⁷⁾為基礎培養基，添加2.5 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)及0.25 g/l酪素水解物的A4培養基；另以MS⁽²⁷⁾為基礎培養基，添加1 mg/l 2,4-D的A5培養基；以及添加1 mg/l 2,4-D+1 mg/l NAA的A6等4種培養基(表1)。將培養基分裝於2.5×10 cm的試管中，每支裝5 c.c.，行高溫高壓蒸氣殺菌15分鐘後，取出斜置，冷卻備用。

(二)未成熟種子的選取及消毒，培植體的切取、接種與培養

花生受粉後，子房柄往地下伸長，待其接觸伸入土表之日開始掛牌，並以當日開始計算其胚齡，數日後整株拔起，摘取不同日齡的果莢。取下的未熟莢果先用肥皂水洗淨，隨後以95%酒精消毒1分鐘，再以2.1%次氯酸鈉，加入1~2滴Tween 20消毒5分鐘，並移入無菌箱內用無菌水沖洗2~3次。

消毒完成後，剝開莢果，取出未熟種子，以游標尺計量種子長度並記錄之。胚齡11天及種子長度在3 mm以下者，由於胚太小不易由肉眼辨識，取出不易，故將子粒橫切，取含有胚的半邊，在種皮上刻劃傷口，以橫切面接觸培養基並將1/3培植體埋入培養基中，以利其固著及吸收養分；胚齡12~16天及種子長度在3~6 mm者，由於不易切出胚軸，故以完整未熟胚為培植體，將胚根朝下接觸培養基；胚齡17天以上及種子長度大於6 mm者，橫切種子、剔除種皮、剝開子葉、切除胚芽與胚根，以約1 mm之胚軸為培植體，將近胚根側接觸培養基，接種於四種不同培養基內以進行癒合組織及體胚形成的誘導。每處理接種40支。

接種後置於27±1°C的恆溫、黑暗環境下進行培養，四週後取出調查並記錄分化狀

表1. 參試的四種培養基成分

Table 1. The compositions of four media

培養基代號 Medium code	基礎培養基 Basal media	植物生長調節劑 PGR (mg/l)	其他營養成分 Other nutrient (mg/l)
A2	L2	(2)NAA、(1)BA	(25)sucrose
A4	MSB	(2.5)2,4-D	(0.25)CH、(30)sucrose
A5	MS	(1)2,4-D	(30)sucrose
A6	MS	(1)2,4-D、(1)NAA	(30)sucrose

A2 : According to Sellars *et al.*⁽³⁷⁾

A4 : According to Yeh and Chyuan⁽⁴⁾

A5、A6 : According to Lai and Yeh⁽⁵⁾

NAA : 1-naphthaleneacetic acid

BA : 6-benzyl-aminopurine

2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

CH : Casein hydrolysate

PGR : Plant growth regulator

況，且移至 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光度1500 lux、每日16小時冷白光照的環境下培養，每30天調查、記錄體胚、癒合組織、芽體、根及小植株形成的頻率及個數，並更換至相同的新培養基內，直至120天為止。

結 果

(一)不同胚齡的未熟胚培養

取子房柄伸入土壤後9—24天的未熟胚接於A2、A4、A5、A6四種培養基內進行胚培養，其體胚、芽體、癒合組織及根的形成率分別如圖1~4。胚齡在11天以下，切取子粒含胚的半邊為培植體者，二品種在四種培養基中，體胚形成率普遍低落，都在6.1%以下，尤以A2及A6兩培養基，對於胚齡太小的培植體，除經A5培養之TNS9的11天及

TN11之9~11天，及經A6培養TNS9之9天的未熟胚外，其餘體胚形成率均為0（圖1），且多為不正常體胚，呈團狀或不規則狀，僅有少部分可進一步分化成芽體，故芽體形成率非常低（圖2）；而二品種中，除TN11號在A5培養基之癒合組織形成率較低（66.7%）外，其餘之癒合組織的誘導則維持相當高的頻度，可達80%以上至100%（圖3），但大多是在種皮的切口上長出少量白色疏鬆的癒合組織，經更換培養基後，僅能長成外緣黃褐，內層白綠的癒合組織，沒有進一步分化的能力；二品種之培植體在四種培養基之根的形成率都是0，無法誘導出根（圖4）。

12~16天去掉種皮的未熟胚為培植體者，接種後數日，培植體膨大、子葉張開，露出原未熟胚上的胚芽，隨後即可在原來的胚芽或子葉上形成1~數個體胚（圖5）。在此

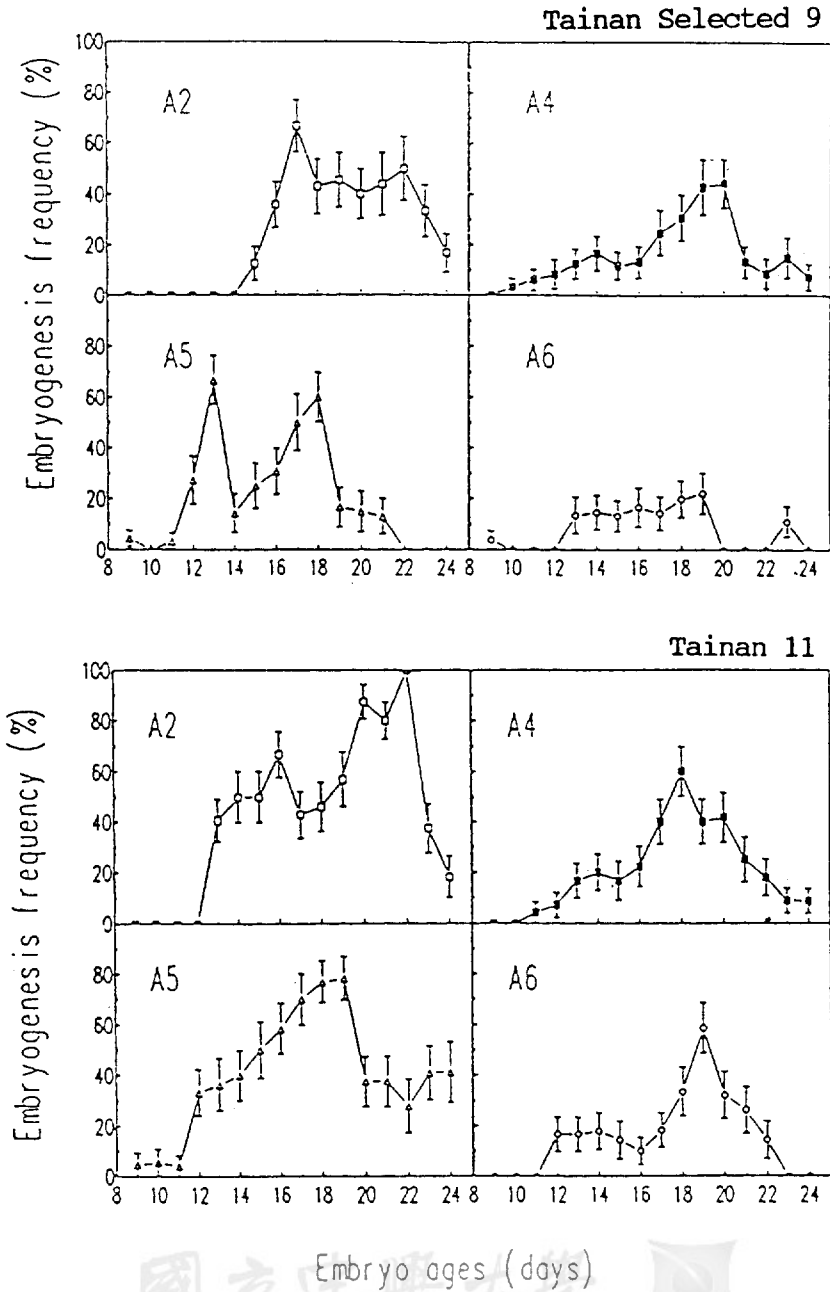


圖 1. 兩花生品種不同胚齡的未熟胚在4種培養基內的體胚形成率。

Fig. 1. The somatic embryogenesis frequency of two peanut varieties with different embryo ages induced in four media.

(A2、A4、A5、A6等四種培養基成分請參照表1.)

The compositions of A2、A4、A5、A6 media see Table 1.)

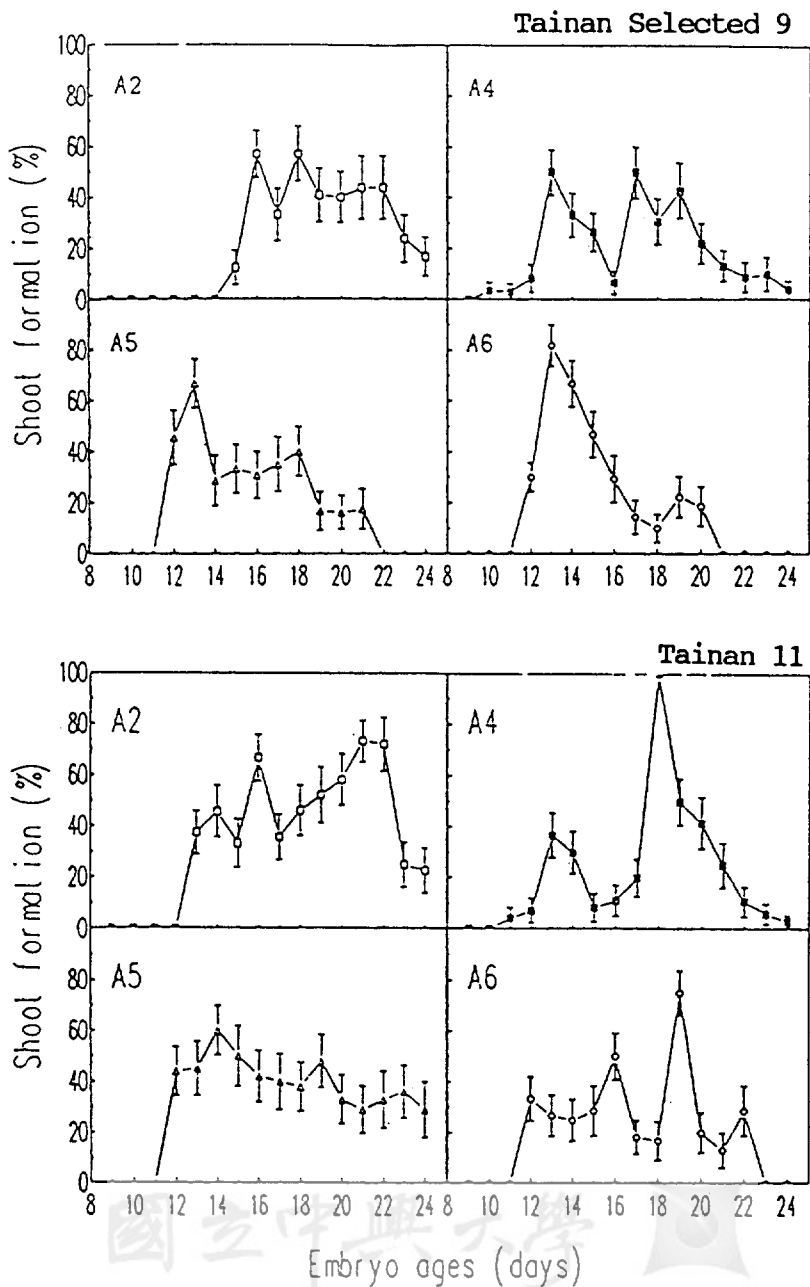


圖2. 兩花生品種不同胚齡的未熟胚在4種培養基內的芽體形成率。
Fig. 2. The shoot formation of two peanut varieties with different embryo ages induced in four media.

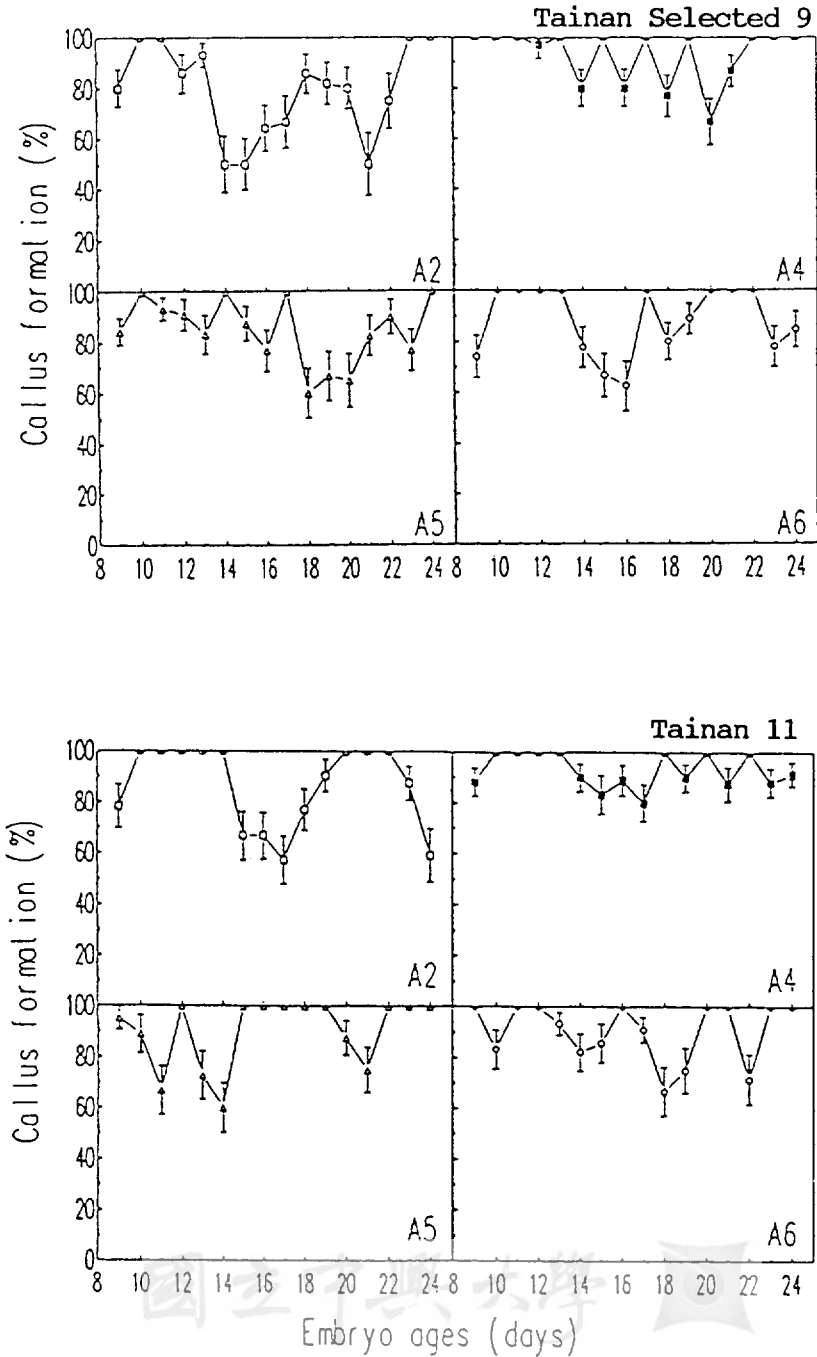


圖3. 兩花生品種不同胚齡的未熟胚在4種培養基內的癒合組織形成率。

Fig. 3. The callus formation of two peanut varieties with different embryo ages induced in four media.

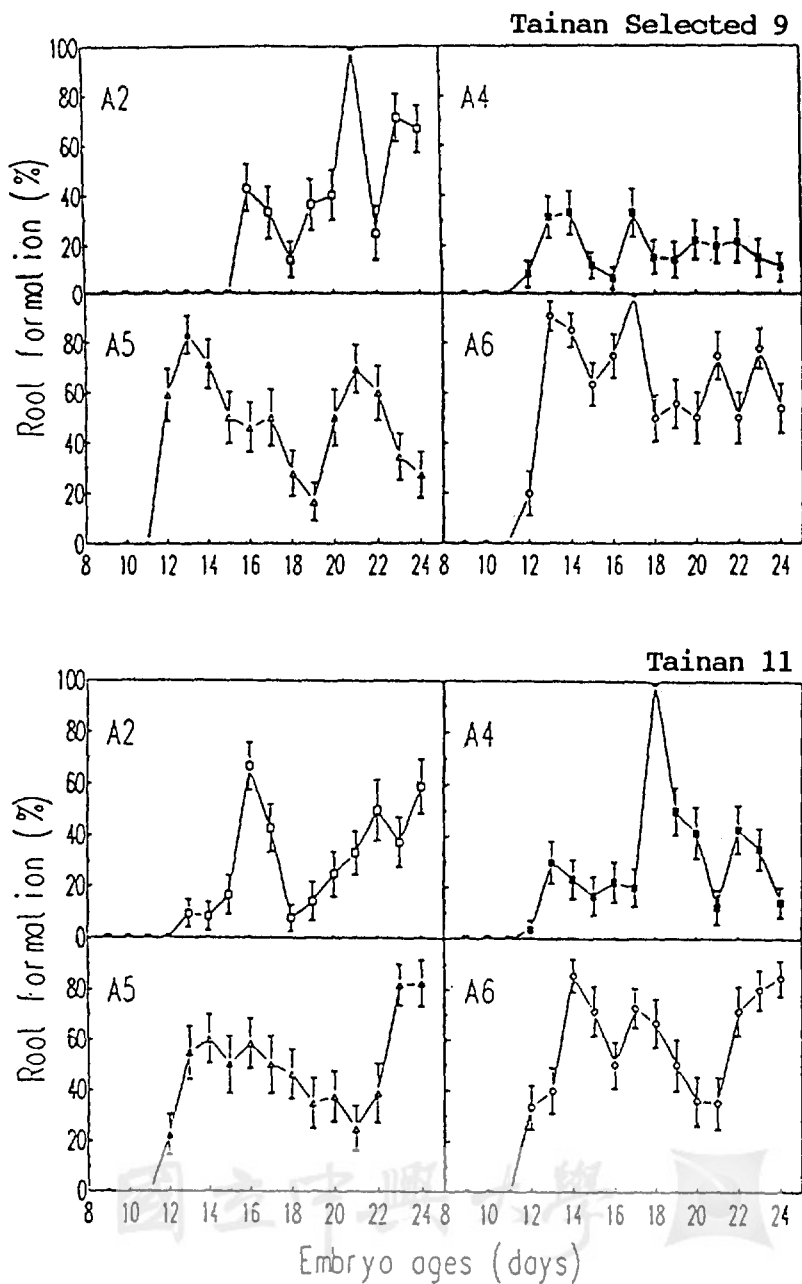


圖4. 兩花生品種不同胚齡的未熟胚在4種培養基內的根形成率。

Fig. 4. The root formation of two peanut varieties with different embryo ages induced in four media.

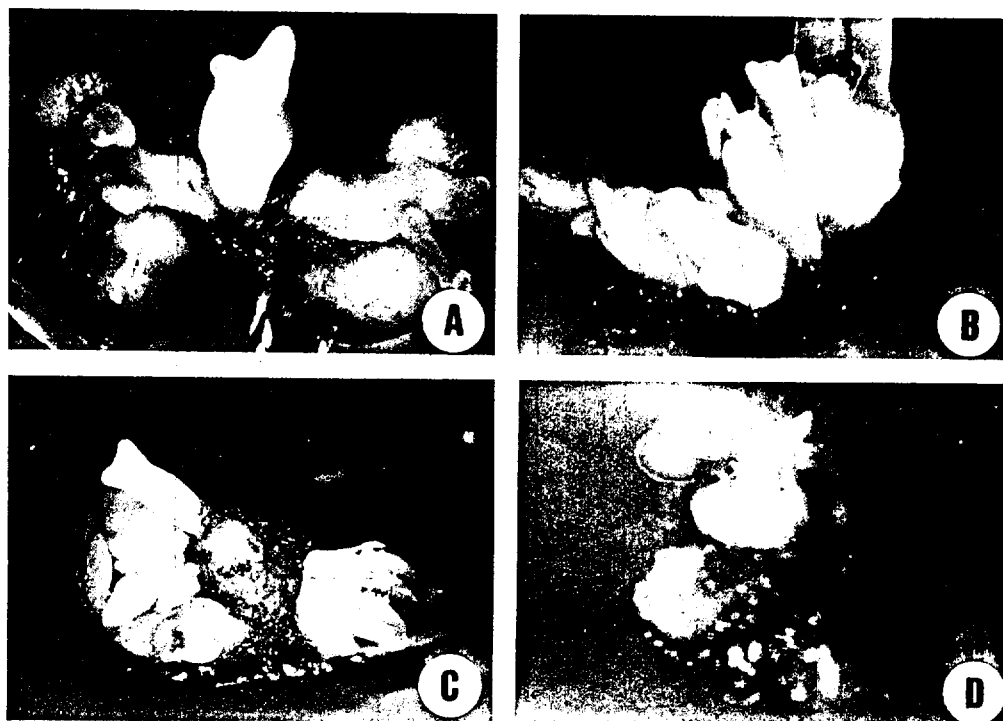


圖5. 台南11號花生16天未熟胚在四種培養基內的生長情形。

Fig. 5. Embryogenesis induced from 16-day immature embryos of peanut (TN11) cultured in four media.

A. A2 medium. B. A4 medium. C. A5 medium. D. A6 medium.

時期，參試的兩品種在四種培養基中培養，體胚形成率隨著胚齡的增加而提高，不過在A4培養基中培養的TNS9及A6培養基內的TN11，胚齡為14天時兩者較高的體胚形成率分別為16.7%及17.9%，A5培養基的TNS9則在13天時具有較高的體胚形成率（66.7%）（圖1）。兩品種胚齡為13~16天時可達較高的芽體形成率；在A4、A5、A6培養基內的TNS9在13天時得到最高的芽體形成率，而A5培養基內的TN11則是在14天時達到40%（圖2）。至於兩品種之癒合組織的形成率則有高有低，大致上，胚齡為12、13天

的未熟胚，其癒合組織形成較高（圖3），但每支試管內的量不多。根的形成方面，兩品種在A5、A6兩培養基均較A2、A4培養基有較高的形成率（圖4）。

至於17~24天，以切除胚芽、胚根的未熟胚軸為培植體者，其體胚形成率因培養基不同而有不同的趨勢，17~20天有較高的形成率；A2培養基內的TNS9未熟胚其體胚形成率在胚齡為17天時可達66.7%，隨後逐漸下降，但彼此間差距不大，而TN11則自17天起逐漸上升，20天達85%，21天下降，但22天時最高100%，23天時急速下降，和

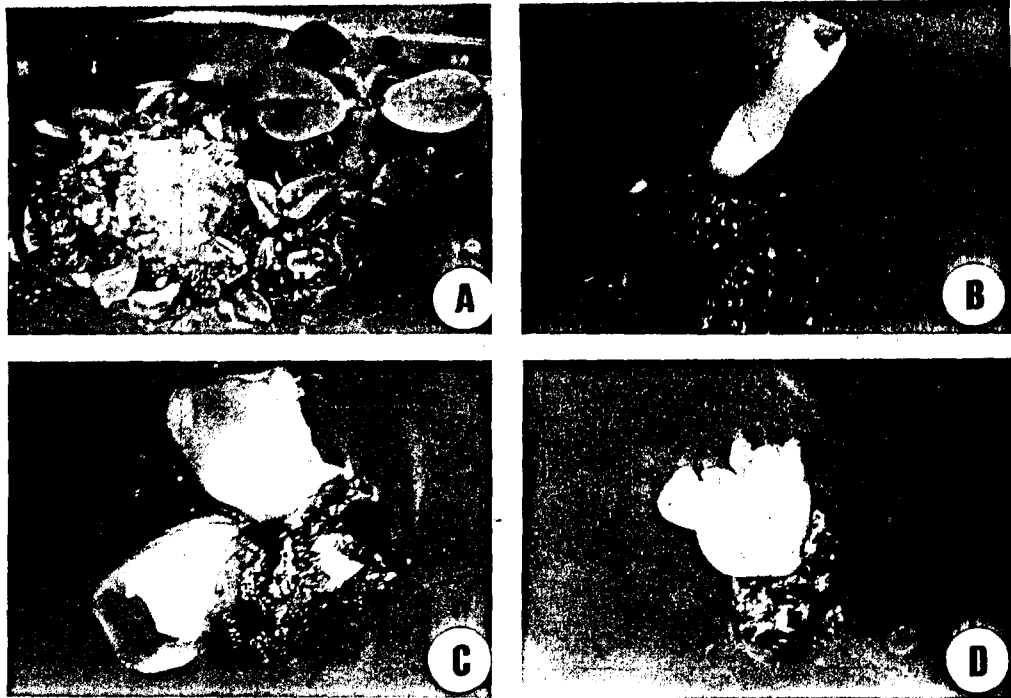


圖6. 台南選9號花生19天的未熟胚軸在四種培養基內體胚及芽體的形成。
 Fig. 6. Embryogenesis and shoot formation induced from 19-day immature embryos axis of peanut (TNS9) cultured in four media.

TNS9一樣，24天時，已降至16%左右。A4培養基內的體胚形成率則均自17天起逐漸上升，到了18~20天時可得較高形成率，隨後即下降。而A5及A6兩培養基則分別在17~19天、18~20天之間達到較高的體胚形成率，超過20天後，其形成率有下降的趨勢（圖1），其誘導情形如圖6。而芽體的誘導大都與體胚的形成有極大的關聯，也是在17~20天左右有較高的形成率（圖2）；此時癒合組織的誘導普遍很高，但呈高低起伏的趨勢，大致而言，並沒有很大的差距，都可在60%以上（圖3）。至於根方面，形成率亦呈

高低起伏的趨勢（圖4）。

(二)不同長度種子的未熟胚培養

以不同長度種子的未熟胚為培植體，接種於A2、A4、A5、A6四種培養基內，其體胚、芽體、癒合組織及根的形成率分別如圖7~10。3 mm以下者取含胚的半邊子粒，且在種皮上刻劃傷口的未熟種子，其體胚、芽體、根的形成率均為0，只可誘導出白色、少量且疏鬆的癒合組織，與前述試驗胚齡為11天以下的培養情況相類似。

3~6 mm以去除種皮的未熟胚為培植體

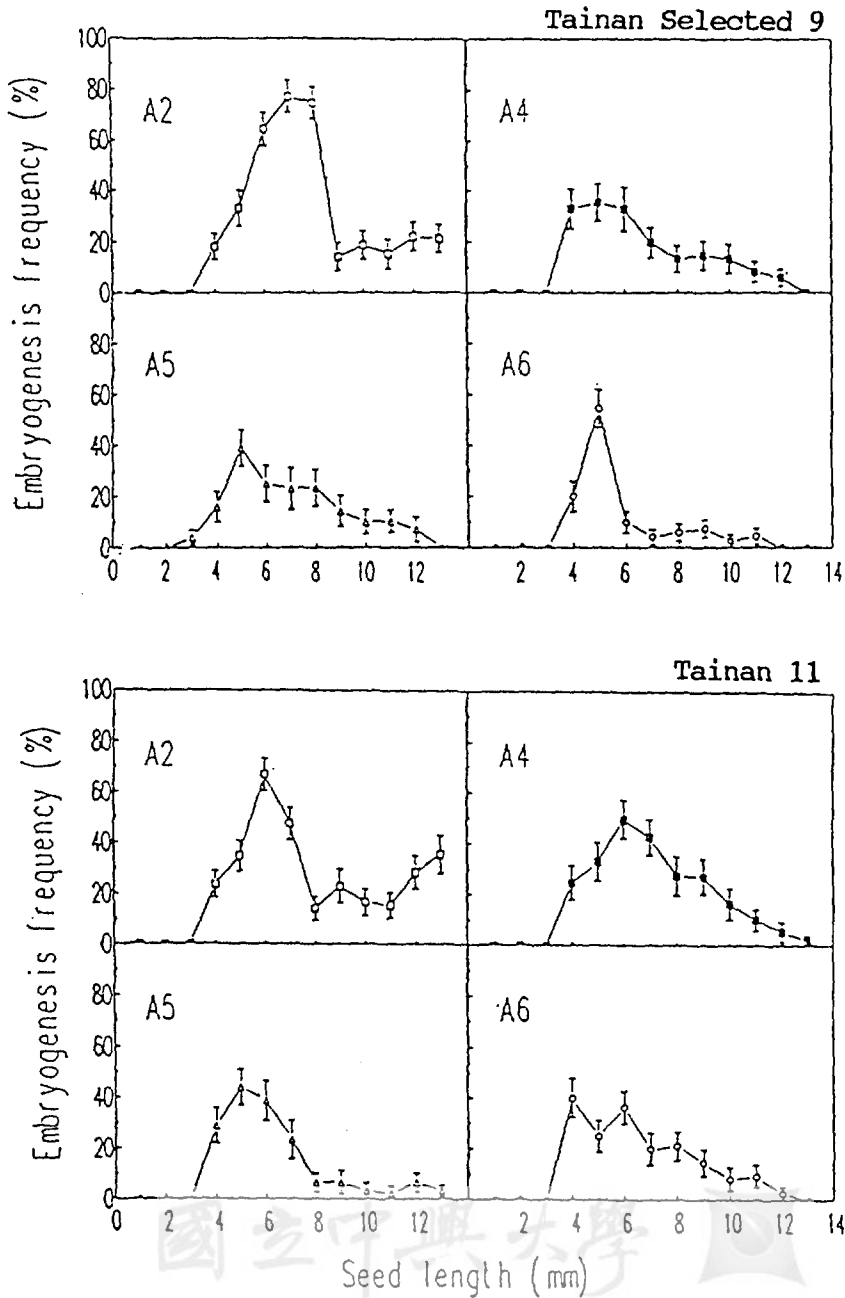


圖7. 兩花生品種不同種子長度的未熟胚在四種培養基內的體胚形成率。
Fig. 7. The somatic embryogenesis frequency of two peanut varieties with different seed lengths induced in four media.

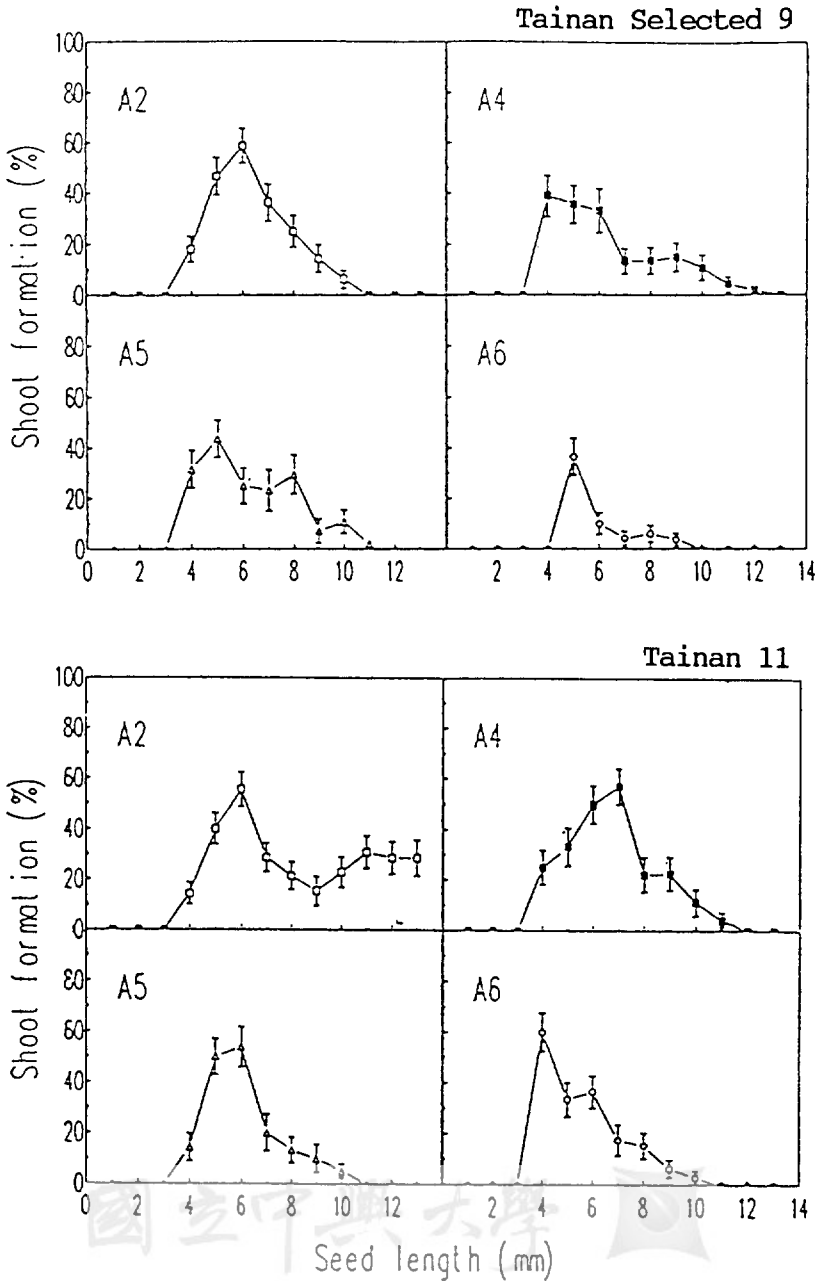


圖8. 兩花生品種不同種子長度的未熟胚在四種培養基內的芽體形成率。
Fig. 8. The shoot formation of two peanut varieties with different seed lengths induced in four media.

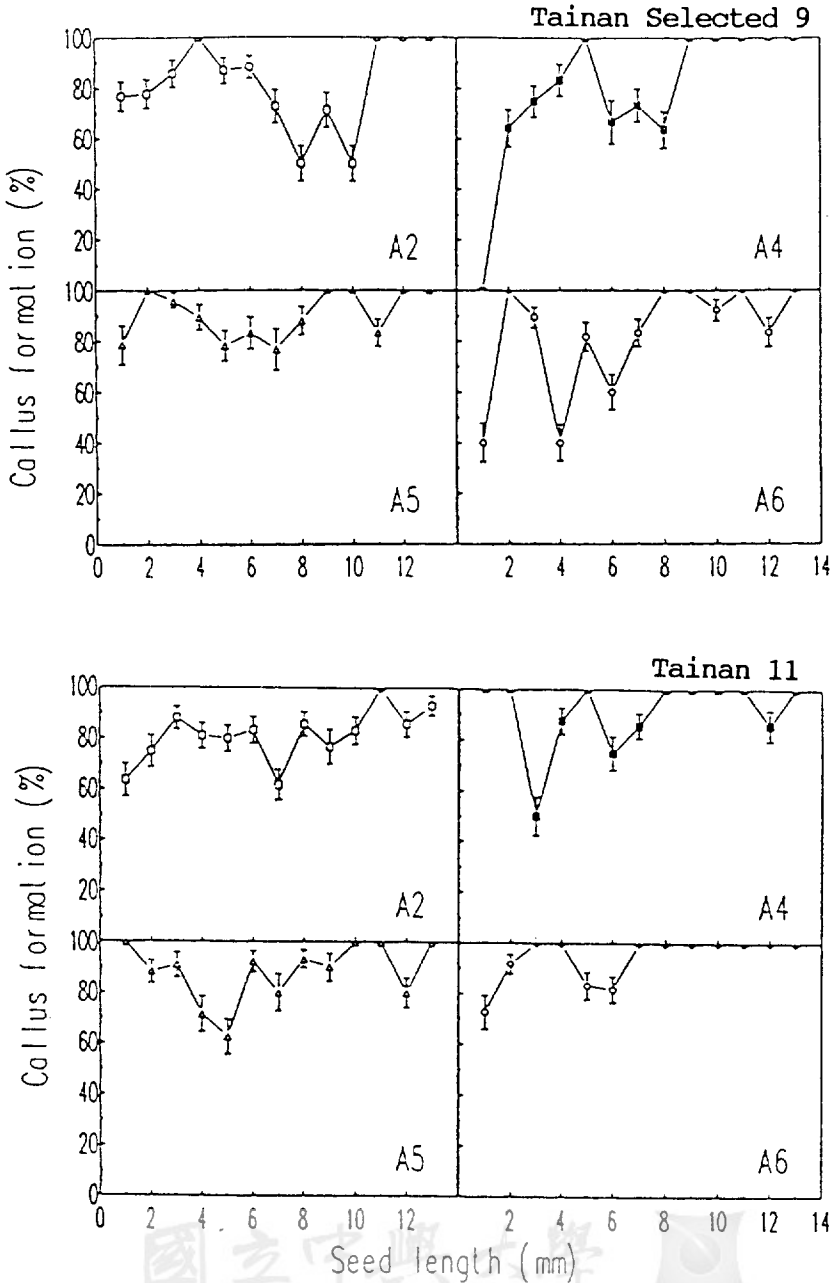


圖9. 兩花生品種不同種子長度的未熟胚在四種培養基內的癒合組織形成率。

Fig. 9. The callus formation of two peanut varieties with different seed lengths induced in four media.

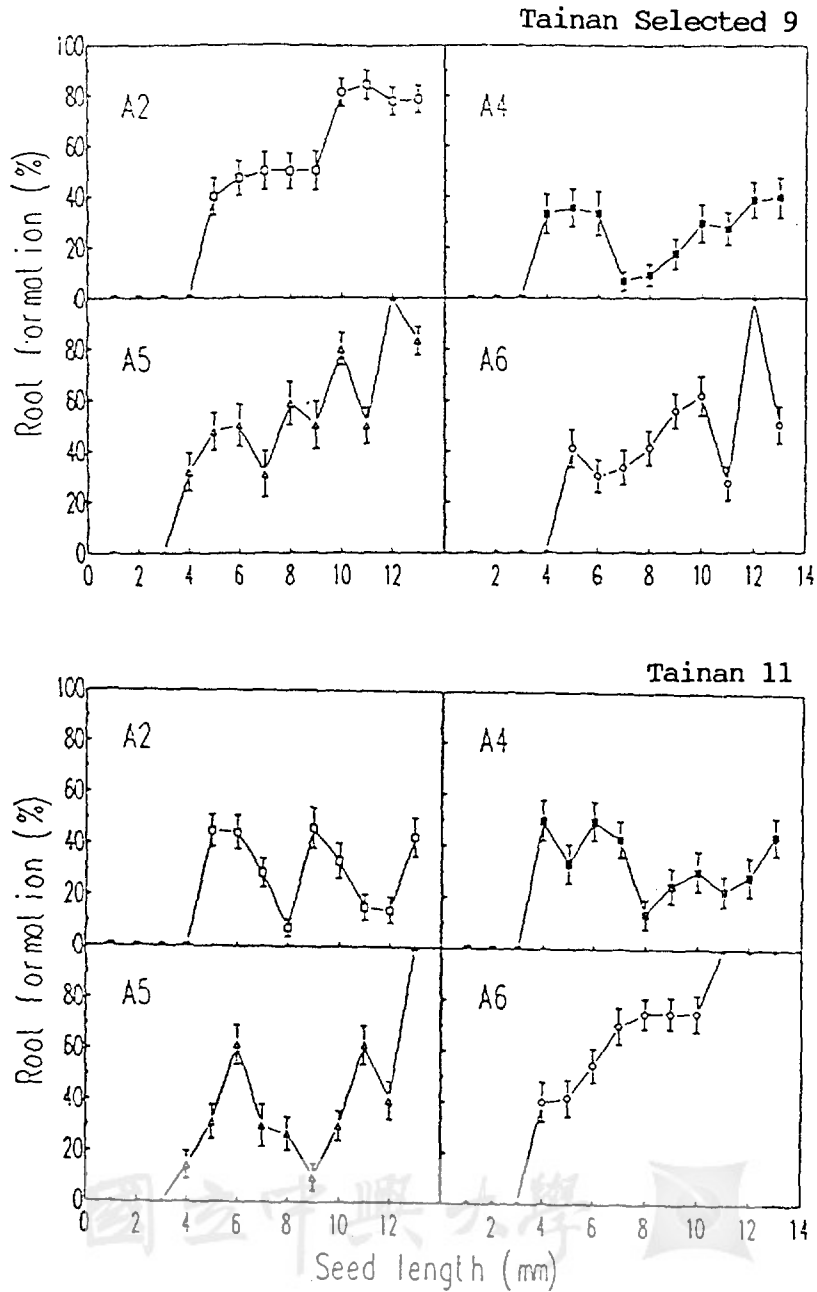


圖 10. 兩花生品種不同種子長度的未熟胚在四種培養基內的根形成率。
Fig. 10. The root formation of two peanut varieties with different seed lengths induced in four media.

者，在A2培養基內，兩品種的體胚形成率均隨種子增長而增加，在6 mm時急速上升，分別可達64.7%及66.7%；A4培養基內兩品種不同種子長度間的形成率差異大，僅TN11在6 mm時略為上升（50%）；而A5培養基，兩品種在3~5 mm時，亦隨種子增長而上升，均在5 mm時達最高（40%左右）；至於A6培養基TNS9、TN11兩品種較高形成率分別出現在5 mm及4 mm時，可達40%以上（圖7）。由此可知4~6 mm的未熟胚培養，其體胚形成率在A2、A6培養基內的差異較大，而A4、A5培養基差異較小，而此時期所得的體胚與前述試驗一樣，均是由膨脹、伸展開的子葉上或是原未熟胚芽旁長出1~數個未熟胚。在此長度範圍下，芽體的形成率則與體胚形成的趨勢相似（圖8）；癒合組織的形成率均相當高，但大都僅在子葉旁長出光亮鬆軟的癒合組織（圖9）；而根的形成率隨種子的增長而增加（圖10）。

至於7~13 mm的未熟種子，就體胚形成率而言，在不同培養基內有不同的反應，在A2培養基內，TNS9在7~8 mm之間可達75%以上，但至9 mm時急速下降，隨後趨於緩和，而TN11則自6 mm起漸次下降，8 mm之後，形成率的高低才漸漸緩和，彼此間的差異起伏不大。而A4培養基內，兩品種種子長度自6 mm開始，體胚形成率逐漸下降，到了12 mm時，已降至10%以下。A5培養基內，TNS9 6~8 mm的形成率相近（23.1~25%），8 mm以後逐漸下降，13 mm時形成率已為0，而TN11則自7 mm開始下降，8 mm以後，形成率均已降至10%以下。至於A6培養基，7 mm後的體胚形成率普遍低落，以TNS9而言（圖9），只維持在10%以下的形成率，而TN11則可維持略高的形成率。芽體的形成，除了在A2培養基下的TN11能在任何

長度下形成芽體（圖8）。在此範圍下，癒合組織的形成率均相當高，且大致而言，有隨著未熟種子長度增加而增加的趨勢（圖9）。至於根的形成率則起伏不定，除TN11在A2培養基外，均隨種子增長，根的形成率較高（圖10）。

綜而言之：以體胚形成率而言，3 mm以下的形成率為0，4~8 mm在各培養基內無很大差異，且有很高的形成率，而8~13 mm時體胚形成趨於下降。所以較適合胚培養的未熟種子長度應為4~8 mm。

討 論

(一)不同胚齡的未熟胚培養

參試的四種培養基的經由前報，所獲得對花生未熟胚之體胚形成效果佳之培養基⁽⁸⁾。在本試驗中仍以A2培養基對體胚的形成效果最佳，其體胚數多且正常，並進而發育成芽體。其次為A5培養基，體胚及癒合組織之誘導效果亦佳。而A4培養基對癒合組織形成率最高，但其體胚形成率不如A2及A5。而A6培養基的體胚形成率為四種培養基最差者，但其對癒合組織形成率高。此與前報的結果完全相同。

本試驗依胚齡將未熟胚分成三種不同方式接種，不同培植方式間有差異，造成誘導的百分率呈高低起伏，但綜合以上結果可知：就體胚的誘導而言，胚齡為11天以下的未熟胚，其體胚形成率非常低，且多為團狀或不規則狀的不正常體胚，僅有較少部分可進一步分化成芽體。而12~16天的未熟胚於接種後，可在張開的子葉或原未熟胚的胚芽旁長出1~數個體胚，由兩品種在四種培養基內的反應來看胚齡為14~16天的未熟胚較適培養。至於17~24天的未熟胚培養，22天以

前的未熟胚比較易得到較高的體胚形成率。由此觀之，花生未熟胚培養較適的胚齡應為14~20天左右，即子房柄伸入土壤後2~3週。

適當的胚齡是未熟胚培養成功的必要條件，葉⁽⁸⁾指出大豆未熟胚胚齡在14~21天者所誘導的結果最佳，太早的胚發育不良或誘導出不正常的芽體或產生白苗，而太晚者則誘導的芽體數有減少的趨勢。花生胚的發育乃於子房柄伸入土壤後才由靜止狀況進一步分化^(19, 25, 33)，11天以下的未熟胚因胚齡太小，仍屬異營期，必要吸收由胚乳及其周圍組織所供給養分，故形成率不高；而12~16天者，已漸趨進入自營期，可由胚根吸收養分，故形成率提升，然而胚齡過大者又因幾近成熟，所以芽體數有下降的趨勢。如上所述，由於花生具有地上開花，地下結莢的特性，故不易獲知未熟胚的正確胚齡⁽¹⁰⁾，星川⁽²⁾指出，一般受精後第五天子房與花柱之間的部分形成子房柄（gynophore），而向地面伸長，侵入地下後，約五日後，先端的子房柄開始肥大形成莢。而Smith⁽³⁸⁾指出約在受精後14~21天莢開始肥大，而稱受精後約一個月者為莢發育早期（early stage in pod development）。故本試驗以子房柄伸入土壤後，開始計算胚齡。但在以子房柄伸入土壤後開始掛牌並計算胚齡，是否會因人為的碰觸而阻礙莢果原有的生長發育而導致誤差，此乃必須進一步探討及克服的問題。

(二)不同長度種子的未熟胚培養

種子大小對大豆組織培養的影響，綜合言之，胚長在4~6 mm時的未熟胚誘導效果

最好，太小或太大均不利於培養^(4, 11)，而葉與全⁽⁴⁾則指出：在5.5~12.5 mm範圍內，種子愈大對芽體形成愈有利且愈正常。Moss⁽²⁶⁾以3 mm左右的花生胚珠進行培養，有71%的原胚變綠、膨大或者是生長，並進一步指出培養愈小的胚珠需要愈多的化合物以供生長，故愈不易培養；Harra *et al.*⁽²⁰⁾指出：未熟胚軸的大小是決定直接體胚形成的因素之一，3~6 mm的未熟胚軸是最佳的培養體。本試驗中以3 mm以下的未熟胚進行培養時，誘導率非常低，此乃因培植體太幼小，3~6 mm時可能已進入自營期，故誘導率有上升的趨勢，而6 mm以上的未熟胚，由於切除胚根及胚芽，且愈來愈接近成熟期，故誘導率並不高。本試驗與上述結果大致相符。由此可知，種子大小亦是花生未熟胚培養時應考量的因子之一。

綜合上述，胚齡及種子大小亦是花生未熟胚培養時應考慮的因子之一。就此二者而言，胚齡11天以下或種子長度在3 mm以下的未熟胚，因胚齡太小，仍屬異營期，無法自培養基吸收養分，故體胚形成率普遍低落，僅於培植體表面切刻部分形成少量癒合組織，不具分化能力；12~16天或種子長度3~6 mm的未熟胚，因進入自營期，可於伸展開的子葉或原生的胚芽旁長出1~數個體胚；17~24天或種子長度6 mm以上者，亦有相當高的形成率，但至20天以上時，因漸成熟，故體胚形成率反而下降。但如上所述，由於花生具有地上開花，地下結實的特性，實不易獲知未熟胚的正確胚齡，而改由種子大小為判斷基準就顯得十分容易方便。

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. 星川清親。1980。新編食用作物學。第26章ラッカセイ。pp.502~518。養賢堂，東京。
3. 葉茂生。1990。大豆未熟胚培養之研究 III、大豆屬種間不同胚齡未熟胚培養之器官形成與植株再生能力的比較。農林學報39(2)：73~87。
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及器官形成的影響。農林學報41(1)：13~22。
5. 賴媛敏、葉茂生。1994。花生未熟胚培養的研究 I、不同生育期未熟胚培養體胚形成之比較。農林學報43(3)：1~13。
6. Atreya, C. D., J. P. Rao, and N. C. Subrahmanyam. 1984. *In vitro* regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plantlets from embryo axes and cotyledons segments. Plant Sci. Lett. 34: 379 ~ 383.
7. 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.
8. Bajaj, Y. P. S., A. K. Ram, K. S. Labana, and H. Singh. 1981. Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*. Plant Sci. Lett. 23: 35 ~ 39.
9. Baker, C. M., J. A. Burns, and H. Y. Wetzstein. 1994. Influence of photoperiod and medium formulation on peanut somatic embryogenesis. Plant Cell Rep. 13: 159 ~ 163.
10. Baker, C. M. and H. Y. Wetzstein. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of peanut *Arachis hypogaea*. Plant Cell Rep. 11: 71 ~ 75.
11. Barwale, U. B., H. R. Kerns, and J. M. Widholm. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta 167: 473 ~ 481.
12. Cheng, M., D. C. H. Hsi, 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.
13. Daimon, H. and M. Mii. 1991. Multiple shoot formation and plantlet regeneration from cotyledonary node in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Jap. J. Breed. 41: 461 ~ 466.
14. Dunbar, K. B. and R. N. Pittman. 1992. Adventitious shoot formation from mature leaf explants of *Arachis* species. Crop Sci. 32: 1353 ~ 1356.
15. Durham, R. E. and W. A. Parrott. 1992. Repetitive somatic embryogenesis from peanut culture in liquid medium. Plant Cell Rep. 11: 122 ~ 125.

16. Eapen, S. and L. George. 1993. Somatic embryogenesis in peanut: Influence of growth regulators and sugars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 35: 151~156.
17. Evans, D. A. 1981. Soybean tissue culture. *Soybean Genet. News.* 8: 27~29.
18. Gill, R. and P. K. Saxena. 1992. Direct somatic embryogenesis and regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*): promotive role of thidiazuron. *Gan. J. Bot.* 70: 1186~1192.
19. Halward, T. M. and H. T. Stalker. 1987. Comparison of embryo development in wild and cultivated *Arachis* species. *Ann. Bot.* 59: 9~14.
20. Hazra, S., S. S. Sathary, and A. F. Mascarenhas. 1989. Direct somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea*). *Bio/Tech.* 7: 949~951.
21. Johnson, B.B. and R.N. Pittman. 1986. Factors affecting *in vitro* differentiation of explants from mature leaves of *Arachis villosulicarpa* Hoehne. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 22: 713~715.
22. McKently, A. H., 1991. Direct somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27: 197~200.
23. McKently, A. H., G. A. Moore, and F. P. Gandner. 1990. *In vitro* plant regeneration of peanut from seed explants. *Crop Sci.* 30: 192~196.
24. McKently, A. H., G. A. Moore, and F. P. Gandner. 1991. Regeneration of peanut and perennial peanut from cultured leaf tissue. *Crop Sci.* 31: 833~837.
25. 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.
26. 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.
27. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473~479.
28. Narasimhulu, S. B. and G. M. Reddy. 1983. Plantlet regeneration from different callus cultures of *Arachis hypogaea* L. *Plant Sci. Lett.* 31: 157~163.
29. Narasimhulu, S. B. and G. M. Reddy. 1984. *In vitro* flowering and pod formation from cotyledons of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 69: 87~91.
30. Ozias-Akins, P. 1989. Plant regeneration from immature embryos of peanut. *Plant Cell Rep.* 8: 217~218.
31. Ozias-Akins, P., W. F. Anderson, and C. C. Holbrook. 1992. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea* L.: genotype comparison. *Plant Sci.* 83: 103~111.
32. Ozias-Akins, P., C. Sinlgsit, and W. D. Branch. 1992. Interspecific hybrid inviability in crosses of *Arachis hypogaeae* x *A. stenoperma* can be overcome by *in vitro* embryo maturation or somatic embryogenesis. *J. Plant Physiol.* 140: 207~212.
33. Pattee, H. E., H. T. Stalker, and J. P. Moss. 1988. Embryo rescue in wide crosses in

- Arachis*. 2. Embryo development in cultured peg tips of *Arachis hypogaea*. Ann. Bot. 61: 103 ~ 112.
34. Phillips, G. C. and G. B. Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci. 19: 59 ~ 64.
 35. 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.
 36. Saxena, P. K., K. A. Malik, and R. Gill. 1992. Induction by thidiazuron of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. Planta 187: 421 ~ 424.
 37. 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.
 38. Smith, Ben W. 1950. *Arachis hypogaea* aerial flower and subterranean fruit. Amer. J. Bot. 37: 802 ~ 815.
 39. Still, P. E., M. I. Plata, R. J. Campbell, L. C. Bueno, E. A. Chichester, and C. C. Niblett. 1987. Regeneration of fertile *Arachis paraguariensis* from callus and suspension culture. Plant Cell Tissue Organ Cult. 9: 37 ~ 43.
 40. Willcox, M. C., S. M. Reed, J. A. Burns, and J. C. Wynne. 1991. Effect of microspore stage and media on anther culture of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 24: 25 ~ 28.
 41. Williams, E. G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. Ann. Bot. 57: 443 ~ 462.

**Studies on immature embryo culture of peanut
(*Arachis hypogaea* L.)
II. Callus formation and somatic embryogenesis of
different embryo ages and seed length¹⁾**

Mau-Shing Yeh Yan-Min Lai²⁾

(Accepted for publication: Sep. 27, 1994)

Summary

The object of this study is to investigate the effect of embryo ages and seed length on callus formation and somatic embryogenesis from immature embryos of peanut. Two cultivars, Tainan Selected 9 (TNS9) and Tainan 11 (TN11), and four media were used in the experiment. An A2 medium using L2 medium as the basis, were supplemented with 2 mg/l NAA and 1 mg/l BA. An A4 medium was prepared by adding 2.5 mg/l 2,4-D into the MSB basal medium. The medium A5 and A6 were prepared by using MS medium as the basis and adding 1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA, respectively. The results are summarized as follows:

Immature embryos with an age under 11 days showed low somatic embryogenesis frequency. They produced white or light green calli which no any differentiation were found. However, one or several somatic embryos were observed beside the cotyledons or the original embryo axes derived from 12~16-day immature embryos. And the 17~20-day immature axes got rather high somatic embryogenesis frequency.

The immature seed shorter than 3 mm scarcely gave somatic embryogenesis frequency. However, the intact immature embryos cut from seeds with 4~6 mm in length had high frequency of embryogenesis. As to the 6 mm or longer seeds, their somatic embryogenesis rate depended on the media.

Of the four media used in this study, A2 medium that induced a large amount of normal somatic embryos was a suitable medium for embryogenesis. The other media, A4, A5 and A6, induced a great amount of callus but a few somatic embryo. For peanut embryogenesis, immature embryos must develop in 14~20 days after gynophore penetrating into the soil or get from seeds with 5~8 mm in length.

1) This study was supported by the Council of Agriculture of Executive Yuan. (82-ST-1.1-F-56(23)).

2) Professor and former graduate student respectively, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.