

黑豆及毛豆花藥培養之研究¹

王瑞章、謝桑煙²、葉茂生³

摘 要

王瑞章、謝桑煙、葉茂生。2003。黑豆及毛豆花藥培養之研究。台南區農業改良場研究彙報 41：35-43。

利用栽培種大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 黑豆台南 3 號 (TN3)、台南 5 號 (TN5)，及毛豆高雄選 1 號 (KS1)、高雄 5 號 (KS5) 四個品種為材料。觀察花粉發育與利用 MS 為基礎培養基，各添加 1 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l TDZ (代號 D101)，2 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l TDZ (D201)，3 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l TDZ (D301)，1 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ (D105)，2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ (D205)，3 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ (D305)，1 mg/l 2,4-D+1.0 mg/l TDZ (D110)，2 mg/l 2,4-D+1.0 mg/l TDZ (D210)，3 mg/l 2,4-D+1.0 mg/l TDZ (D310) 等 9 種培養基，探討對黑豆及毛豆花藥癒合組織之誘導及體胚分化之效果，期建立黑豆及毛豆花藥培養技術，其結果如下：1. 花藥發育階段中單核期之花蕾長度黑豆台南 3 號、台南 5 號為 1.98-2.01mm，毛豆高雄選 1 號為 1.96-1.98mm，高雄 5 號為 1.98-2.0mm，因此黑豆及毛豆花藥培養最適宜之花蕾長度為 1.96-2.0mm。2. 黑豆及毛豆花藥癒合組織以 D201 培養基所誘導之形成率最高。D201 培養基對 TN3、TN5、KS1 及 KS5 的平均誘導率為 31.6%，皆高於其它八種培養基，其次依序為 D210 培養基 (30.2%)，D310 培養基 (27.0%)，D110 培養基 (26.8%)，D301 培養基 (25.3%)，D105 培養基 (20.3%)，D101 培養基 (18.8%)，而 D305 培養基最低 (17.5%)。3. TN3 於 D101 培養基中誘導體胚形成率為 1.7%，KS1 於 D201 培養基誘導體胚形成率為 1.6%。

關鍵詞：黑豆、毛豆、花藥培養、體胚形成。

接受日期：2002 年 12 月 27 日。

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、降膽固醇、預防新血管疾病，為一食醫俱佳的保健養生食品；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。利用花藥培養產生單倍體

1. 行政院農業委員會台南區農業改良場研究報告第 285 號。

2. 台南區農業改良場雲林分場助理研究員、研究員兼主任。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。

植株經由染色體組倍加，形成同質雙倍體的育種方式，可縮短育種時間，提高選拔效率，更是獲得單倍體植株最直接有效的方法^(3,5)。

自 1960 年代中期利用花藥培養誘導單倍體胚狀體以來，花藥培養單倍體育種即受到相當的重視，不僅可作為育種之方法，更為遺傳及形態發生學研究之良好材料。但因自然界中單倍體植物發生的頻度非常低，大約在 0.001-0.01% 間，因此限制了這種方法被廣泛的利用。過去雖有以大豆花藥培養誘導出體胚⁽¹³⁾，芽狀物 (shoot-like-body)⁽¹¹⁾，及單元體植株⁽¹⁾但頻率並不高。國內有關毛豆花藥培養的研究也僅限於癒合組織之誘導^(6,7)。

TDZ (1-phenyl-3-(1,2,3- thiadiazol-5-yl) urea, Thidiazuron) 是德國 Schering 公司於 1976 年合成的高效低毒之棉花落葉劑⁽⁶⁾。其具有 cytokinin 之活性，生物特性與 adenine-type cytokinin 相似，可促進癒合組織生長、誘導器官形成及刺激乙烯之產生⁽¹⁷⁾。TDZ 在花生不同培植體如子葉、葉柄、上胚軸、未熟胚軸^(9,10,12,16,19,20)，花藥⁽²⁾及大豆之下胚軸、子葉節等⁽¹⁴⁾均已成功地誘導出芽體。但 TDZ 在大豆花藥培養之效果，則尚無報告。本試驗以栽培種黑豆、毛豆花藥為材料，先觀察花粉發育過程，再利用含不同種類和濃度之 2,4-D (2,4 - dichlorophenoxyacetic acid) 及 TDZ 等生長調節劑之培養基，探討對黑豆和毛豆花藥癒合組織之誘導、體胚形成、分化之效果，期能建立黑豆和毛豆花藥培養體胚形成之技術，進而供作大豆單倍體育種之參考利用。

材料與方法

一、材料：

本試驗以栽培種黑豆台南 3 號、台南 5 號，及毛豆高雄選 1 號、高雄 5 號四個品種為材料。於 2001 年春、夏作分批種植於溫室內，播種於直徑 30cm 高 30cm 的塑膠盆，待其開花後取不同長度之花蕾為材料，以花藥為培植體。

二、方法：

(一)花粉發育之觀察

取不同大小之大豆花蕾，以游標尺測量記錄不同花蕾之長度後，依韓等⁽⁷⁾塗抹法 (smear method) 適度修正之染色製片，其步驟如下：

1. 將花蕾浸置於 Farmer 固定液 (酒精：冰醋酸 = 3：1) 中 12 小時以上。
2. 從花蕾中挑出花藥，置於乾淨的載玻片上。
3. 以 Aceto-Orcein 染劑滴於花藥上，用玻棒輕輕搗碎花藥，將較大的殘渣挑出。

將載玻片在酒精燈稍微加熱。當染劑有蒸發時再添加入，這樣持續 5-10 分鐘之後，使細胞核染色。加熱後靜置 5-10 分鐘，再蓋上蓋玻片。以 Nikon OPTIPHOT-2 顯微鏡觀察，調查黑豆、毛豆小孢子之發育與花蕾大小之關係，並以 Nikon 數位相機 COOLPIX 990 照相拍攝記錄之，以作為選取最適培植體之參考。

(二)黑豆和毛豆花藥癒合組織誘導、體胚形成之研究

由上一試驗結果取長度約 1.96-2.0mm 之花蕾，花藥顏色為淡綠色，具單核期之花藥，於無菌操作檯內先以 70% 酒精溶液消毒 10 秒，再以 0.5% 次氯酸鈉 (Sodium hypochloride) 消毒 5 分鐘，然後用無菌水清洗三次，取出花藥為培植體。以 MS⁽¹⁸⁾ 為基礎培養基，添加 1 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l TDZ (代號 D101)，2 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l TDZ (D201)，3 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l TDZ

(D301), 1 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ (D105), 2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ (D205), 3 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ (D305), 1 mg/l 2,4-D+1.0 mg/l TDZ (D110), 2 mg/l 2,4-D+1.0 mg/l TDZ (D210), 3 mg/l 2,4-D+1.0 mg/l TDZ (D310), 另外各添加 60g/l sucrose 及 11g/l agar 之 9 種培養基 (表 1), pH 值 5.8±0.1。每支試管接種 3 個花藥。

接種後將培植體置於 27±1 的培養室中進行暗處理培養 30 天, 一個月後調查花藥癒合組織形成率, 再更換新的培養基, 繼代後置於 25 μmol·m⁻²·s⁻¹、每日光照 16 小時冷白光的環境中培養, 期間每 30 天更換一次新的培養基, 調查體胚之形成率。並以 Nikon MSZ-2T 解剖顯微鏡觀察, 並以 HFX-DX 系統照相拍攝紀錄之。

表 1.黑豆及毛豆花藥癒合組織誘導、分化培養基之成分

Table1. The composition of media for callus induction and differentiation from anthers of black soybean and vegetable soybean.

Medium	2,4-D (mg/l)	TDZ (mg/l)
D101	1	0.1
D201	2	0.1
D301	3	0.1
D105	1	0.5
D205	2	0.5
D305	3	0.5
D110	1	1.0
D210	2	1.0
D310	3	1.0

Basal medium : MS medium (Murashige and Skoog⁽¹⁸⁾)

All media contained 60 g/l sucrose and 11 g/l agar.

表 2、黑豆 TN3、TN5 及毛豆 KS1、KS5 不同花蕾長度與花藥內花粉發育過程之關係

Table2. The relationship of different bud lengths and development stages of pollens in anthers of black soybean (TN3,TN5) and vegetable soybean (KS1, KS5)

品種 varieties	單核期 uninucleate stage (mm)	雙核期 binucleate stage (mm)
TN3	1.98-2.01	> 2.01
TN5	1.98-2.01	> 2.01
KS1	1.96-2.00	> 2.00
KS5	1.98-2.00	> 2.00

結 果

一、黑豆及毛豆小孢子發育之觀察

調查花粉不同發育時期之花蕾長度結果得知，黑豆台南 3 號及台南 5 號單核期之花蕾長度為 1.98-2.01mm，毛豆高雄選 1 號為 1.96-1.98mm，高雄 5 號為 1.98-2.0mm；雙核期台南 3 號及台南 5 號為 2.01mm 以上，高雄選 1 號及高雄 5 號為 2.0mm 以上 (表 2)。由以上可知黑豆及毛豆花藥培養之最佳單核期花蕾長度為 1.96-2.0mm 之間。

二、黑豆及毛豆花藥癒合組織誘導及體胚形成之研究

調查不同培養基對黑豆 TN3、TN5 及毛豆 KS1、KS5 花藥癒合組織誘導體胚形成之結果列如表 3。由表 3 得知 D201 培養基對 KS5 的花藥癒合組織誘導率最高 53.3%，其次為 D210 培養基對 KS5 的花藥癒合組織誘導率為 46.6%。而 D101、D301、D105、D305 培養基中以 KS1 的誘導率較高。D201、D205、D110、D210、D310 則以 KS5 的誘導率較高。四個品種 TN3、TN5、KS1 及 KS5 的平均誘導率以 D201 培養基 31.6% 最高，其次依序為 D210 培養基 (30.2%)、D310 培養基 (27.0%)、D110 培養基 (26.8%)、D301 培養基 (25.3%)、D105 培養基 (20.3%)、D101 培養基 (18.8%)，而 D205 培養基最低 (14.5%)。將黑暗處理誘導產生的花藥癒合組織移至新鮮培養基，在光照環境中培養後 D101 培養基所誘導出 TN3 癒合組織由白色轉為綠色。而由 D201 培養基所誘導出之 KS1 癒合組織於光照後則由白色或黃色轉為黃綠色至綠色表面產生白粉狀。體胚的誘導情形，TN3 於 D101 培養基中誘導體胚形成率為 1.7%，KS1 於 D201 培養基誘導體胚形成率為 1.6%。體胚的形態，TN3 由 D101 培養基中誘導者，於光照後形成胚狀體 (圖 1A) 及產生叢生之體胚 (圖 1B)；KS1 由 D201 培養基中誘導者，形成不正常體胚 (圖 2A) 及產生魚雷形體胚 (圖 2B) 但亦不太正常。而 TN5 及 KS5 於 D101-D301 培養基誘導之癒合組織僅體積變大，漸次表面產生白粉狀黃褐色老化現象，無體胚形成。

討 論

一、黑豆及毛豆小孢子發育之觀察

小孢子的發育時期是影響花藥培養成功的主要因素之一。在花藥發育過程中，通常只有部分小孢子具有體胚形成的能力，這種小孢子的比例會隨花藥發育不同階段而不同⁽²¹⁾。故不同物種花藥中花粉的不同發育階段是花藥培養中重要的決定性因子之一^(5,11,22,23)。本試驗針對黑豆 TN3、TN5，毛豆 KS1、KS5 四品種的花藥以 Aceto-Orcein 染色壓片觀察結果：TN3、TN5 單核期花蕾長度為 1.98-2.01mm，KS1 單核期花蕾長度為 1.96-1.98mm，KS5 單核期花蕾長度為 1.98-2.0mm，不同花蕾長度與花粉發育時期間有連帶關係。

不同物種各有其最適當的培養時期，一般作物花藥的適當培養時期大多介於四分子至第一次有絲分裂之間的單核期。韓等⁽⁷⁾指出毛豆花蕾長度生長至 2mm 左右時，其花藥內之小孢子發育大多為單核期，花藥顏色為淡綠色稍透明呈柔軟狀態，此時培養毛豆之花藥癒合組織誘導率最高。伊等⁽¹⁾利用大豆花藥小孢子之單核早、中期接種，亦成功誘導癒合組織。本試驗發現黑豆 TN3、TN5 及毛豆 KS1、KS5 花藥培養最佳單核期花蕾長度為 1.96-2.0mm，花藥顏色亦為淡綠色。

二、黑豆及毛豆花藥癒合組織誘導及體胚形成之研究

在大豆花藥培養研究方面，Ivers et al.⁽¹¹⁾ 以 Nitschs 或 Miller 培養基誘導出大豆芽狀物 (shoot-like-body)。伊等⁽¹⁾ 在大豆花藥培養試驗中指出 B5 培養基對癒合組織的誘導效果最好，並可成功誘致單元體植株。韓和陳等⁽⁶⁾ 在毛豆花藥培養中指出癒合組織誘導亦以 B5 培養基較適合。Kaltchuk-Santo et al.⁽¹³⁾ 則以 B5 long 培養基成功誘導出癒合組織和體胚約為 2%。但至目前大豆花藥培養尚無穩定之結果。

低濃度 TDZ (0.0022-0.088 mg/l) 對植物組織培養具極高效應⁽¹⁵⁾。大豆癒合組織經 TDZ 處理後可大大提高細胞內生的 cytokinin 之活性，其提高的活性與所用的 TDZ 濃度 (0.1-1.0 mg/l) 成正相關⁽⁴⁾。Saxena et al.⁽²⁰⁾ 指出 2 mg/l TDZ 對誘導花生器官形成之效果最好。李和葉⁽²⁾ 認為花生花藥培養基以 MS+2 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l TDZ 較佳。本試驗以黑豆 TN3、TN5 及毛豆 KS1、KS5 四品種之單核期花粉之花藥為培植體誘導癒合組織，結果以 D201 培養基 (MS+2 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l TDZ) 對 TN3、TN5、KS1 及 KS5 花藥癒合組織平均誘導率最高 (31.6%)，D210 培養基 (MS+2 mg/l 2,4-D+1.0 mg/l TDZ) 誘導率次之 (30.2%)，誘導出的癒合組織均呈緊密、綠色表面有白粉狀。Kaltchuk-Santo et al.⁽¹³⁾ 指出大豆花藥培養中能以由 B5 long +2.0 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l BA+90 g/l 蔗糖培養基誘導出體胚(形成率 2%)，與本實驗 D201 培養基相比較，得知 2.0 mg/l 2,4-D 為大豆花藥培養最適之 2,4-D 濃度。雖然 TDZ 在大豆不同培植體如下胚軸及子葉節⁽¹⁴⁾ 的使用已能成功地誘導出芽體，但 TDZ 在大豆花藥培養之效果尚無學者提出。本試驗黑豆 TN3 及毛豆 KS5 單核期花藥癒合組織，在光照環境中培養，TN3 於 D101 培養基中體胚形成率為 1.7%，KS5 於 D201 培養基中體胚形成率為 1.6%。由此可知 0.1 mg/l TDZ 對黑豆 TN3 及毛豆 KS5 體胚形成有較好效果。本試驗發現黑豆 TN3 於 D101 培養基中所誘導之胚狀體(圖 1A)及產生叢生之體胚(圖 1B)，並於其周圍有繼續長出癒合組織之情形(圖 1B)，體細胞胚有逆分化現象。而毛豆 KS1 由 D201 培養基中誘導者，則產生不正常體胚(圖 2A)，繼續培養其老化癒合組織迅速褐化，體胚可漸發育分化為魚雷形體胚(圖 2B)亦不太正常。然本試驗所誘導形成之體胚繼續培養皆無法繼續分化，甚至停滯生長。因此黑豆及毛豆花藥之體胚分化及芽體再生，實有待探討的必要。

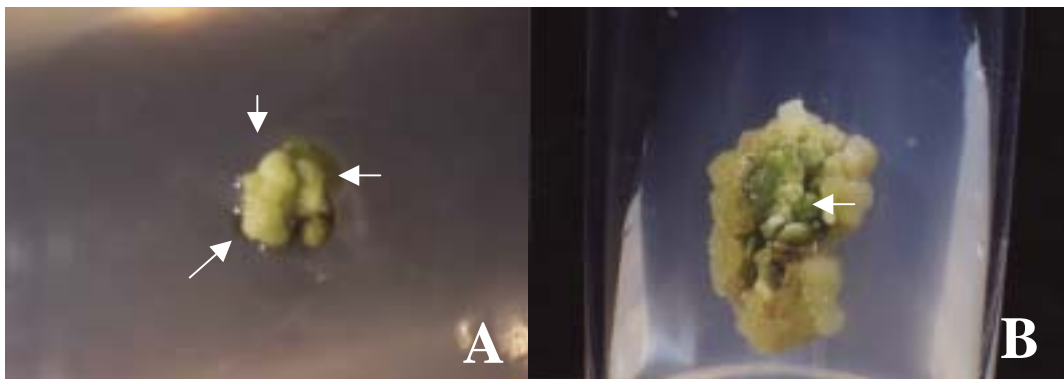


圖 1. TN3 在 D101 培養基體胚形成之情形

A. 胚狀體(箭頭) B. 叢生之體胚(箭頭)

Fig.1. Somatic embryogenesis of callus derived from TN3 anther cultured on D101 medium.

A. Embryoid structure(arrowhead) B. Mutiple embryos(arrowhead)

表 3.不同培養基對不同品種黑豆及毛豆花藥培養體胚誘導之效果

Table3.The effect of different media on somatic embryogenesis of anther culture of black soybean and vegetable soybean .

培養基代號 Medium code	品種 Variety	接種數 No. of Cultured	癒合組織形成		體胚形成	
			Callus	formation	Somatic	embryogenesis
			形成數 No	百分率 %	形成數 No	百分率 %
D101	TN3	57	2	3.5	1	1.7
	TN5	60	9	15	0	0
	KS1	60	18	30	0	0
	KS5	60	16	26.6	0	0
D201	TN3	60	11	18.3	0	0
	TN5	60	19	31.6	0	0
	KS1	60	14	23.3	1	1.6
	KS5	60	32	53.3	0	0
D301	TN3	57	13	22.7	0	0
	TN5	60	12	20	0	0
	KS1	60	24	40	0	0
	KS5	60	11	18.3	0	0
D105	TN3	57	7	12.2	0	0
	TN5	57	10	17.5	0	0
	KS1	60	17	28.3	0	0
	KS5	60	14	23.3	0	0
D205	TN3	57	7	12.2	0	0
	TN5	57	9	15.7	0	0
	KS1	60	6	10	0	0
	KS5	60	12	20	0	0
D305	TN3	60	8	13.3	0	0
	TN5	57	9	15.7	0	0
	KS1	57	12	21	0	0
	KS5	60	12	20	0	0
D110	TN3	51	3	5.8	0	0
	TN5	48	11	22.9	0	0
	KS1	60	20	33.3	0	0
	KS5	60	27	45	0	0
D210	TN3	54	12	22.2	0	0
	TN5	48	9	18.7	0	0
	KS1	60	20	33.3	0	0
	KS5	60	28	46.6	0	0
D310	TN3	45	7	15.5	0	0
	TN5	48	17	35.4	0	0
	KS1	57	7	12.2	0	0
	KS5	60	27	45	0	0

All media contained 60g/l sucrose and 11g/l agar

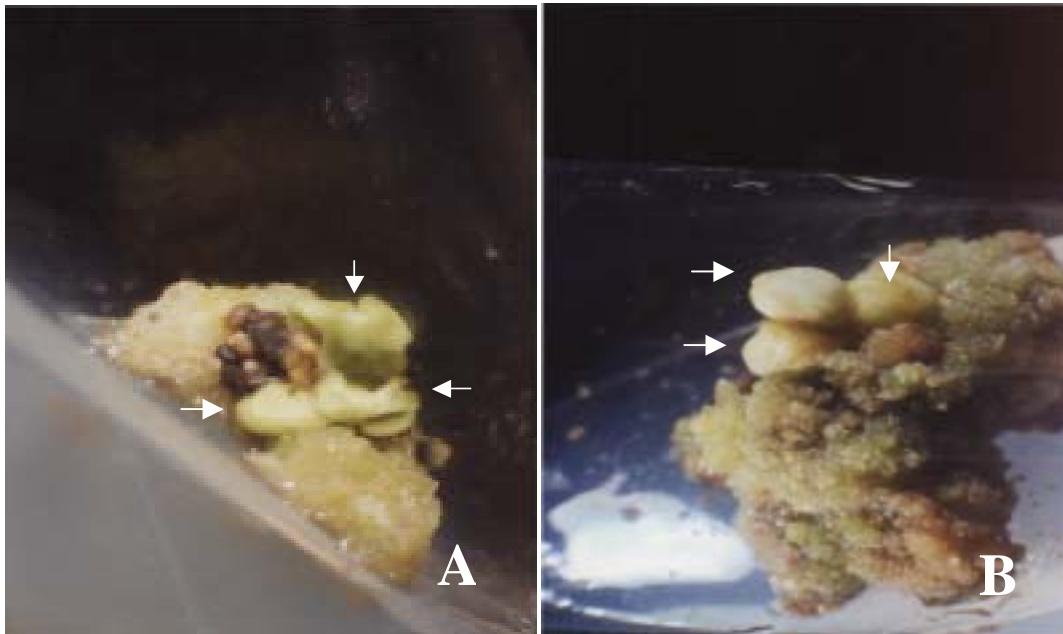


圖 2.KS1 在 D201 培養基體胚形成之情形

A.不正常體胚(箭頭) B.魚雷形體胚(箭頭)

Fig.2. Somatic embryogenesis of callus derived from KS1 anther cultured on D201 medium.

A. Abnormal somatic embryo(arrowhead) B. torpedo embryo(arrowhead)

引用文獻

- 1.尹光初、朱之根、徐振、陳力、李學湛、柴風雲。1982。大豆花 粉植株的誘導及其雄核發育的研究。大豆科學 1：69-75。
- 2.李俊寬、葉茂生。2001。花生花藥培養的研究 IV.花粉發育與體胚形成及芽體再生的研究。農林學報 50 (2)：65-79。
- 3.陳其昌、張顯。1974。花藥培養與單原體育種。科學農業 22：95-103。
- 4.黃學林、李筱菊。1995。高等植物組織離體培養的形態建成及其調控。300pp。科學出版社。北京。
- 5.蔡新聲。1986。禾本科作物之花藥培養與品種改良。中華農學會報 新 134：1-23。
- 6.韓青梅、陳庚鳳。1996。毛豆花藥癒合組織形成之最適培養基。高雄區農業改良場研究彙報 7(2)：1-8。
- 7.韓青梅、陳庚鳳、洪啟善。1995。毛豆花藥培養癒合組織之切片觀察及繼代培養。高雄區農業改良場研究彙報 6(2)：1-9。

8. Arndt, F., R. Rusch, and H.V. Stillfied. 1976. A new cotton defoliant. *Plant Physiol. Suppl.* 57 : 99.
9. Cheng, M., 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.
10. Gill, R., and P. K. Saxena. 1992. Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanut (*Arachis hypogaea*) : promotive role of thidiazuron. *Can. J. Bot.* 70 : 1186-1192.
11. Ivers, D. R., R. G. Palmer, and W.K. Fech. 1974. Anther culture in soybean. *Crop Sci.* 14:891-893.
12. Kanyand, M., A. P. Ddessai, and C. S. Prakash. 1994. Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants in vitro. *Plant Cell Rep.* 14 : 1-5.
13. Kaltchuk-Santos, E., J. E. Mariath, E. Mundstock, C. Y. Hu, and M. H. Bodanese-Zanettini. 1997. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 49 : 107-115.
14. Kaneda, Y., Y. Tabei, S. Nishimura, K. Harada, T. Akihama, and K. Kitamura. 1997. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Rep.* 17 : 8-12.
15. Lu, C. Y. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 29 : 92-96.
16. Mckently, A. H., G. A. Moore, and F. P. Gardner. 1990. In vitro plant regeneration of peanut from seed explants. *Crop Sci.* 30 : 192-196.
17. Mok, M.C., D. W. S. Mok, K. Shudo, Y. Isoga, and T. Okamoto. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N-1,2,3-Thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochem.* 21 : 1509-1511.
18. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-479.
19. Ozias-Akins, P., G. Singsit, and W.D. Branch. 1992. Interspecific hybrid inviability in crosses of *Arachis hypogaea* x *A. stenosperma* can be overcome by in vitro embryo maturation or somatic embryogenesis. *J. Plant Physiol.* 140 : 207-212.
20. 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.
21. Telmer, C. A., D. H. Simmonds, and W. Newcomb. 1992. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant.* 84:417-424.
22. Willcox, M. C., S. M. Reed, J. A. Burns, and J. C. Wynne. 1990. Microsporegenesis in peanut (*Arachis hypogaea*). *Amer. J. Bot.* 77:1257-1259.
23. 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, Tiss. Org. Cult.* 24:25-28.

Studies on the Anther Culture of Black Soybean and Vegetable Soybean¹

Wang R. C., S. Y. Hsieh,² and M. S. Yeh³

Summary

In order to develop the method of anther culture to produce haploid plants of black soybean and vegetable soybean, We investigated pollen development, callus induction and somatic embryogenesis. Anthers from black soybean cultivars TN3, TN5, and vegetable soybean cultivars KS1, KS5 were cultured on MS basal medium with nine different treatments, i.e., by the addition of (1) 1mg/l 2,4-D+0.1mg/l TDZ (D101 Medium), (2) 2mg/l 2,4-D+0.1mg/l TDZ (D201 Medium), (3) 3mg/l 2,4-D+0.1mg/l TDZ (D301 Medium), (4) 1mg/l 2,4-D+0.5mg/l TDZ (D105 Medium), (5) 2mg/l 2,4-D+0.5mg/l TDZ (D205 Medium), (6) 3mg/l 2,4-D+0.5mg/l TDZ (D305 Medium), (7) 1mg/l 2,4-D+1.0mg/l TDZ (D110 Medium), (8) 2mg/l 2,4-D+1.0mg/l TDZ (D210 Medium) or (9) 3mg/l 2,4-D+1.0mg/l TDZ (D310 Medium) respectively. Results were summarized as follow:

The lengths of buds of TN3, TN5, KS1 and KS5 at uninclate stage were about 1.98-2.01mm, 1.98-2.01mm, 1.96-1.98mm and 1.98-2.0mm, respectively. The results indicated that buds about 1.96-2.0mm in length was appropriate for culture.

The rate of callus induction on the D201 medium was the highest. When average over the four test cultivars, rate of callus induction on the D201 medium was the highest (31.6%), followed by that on the D210 medium (30.2%), D310 medium (27.0%), D110 medium (26.8%), D301 medium (25.3%), D105 medium (20.3%), D101 medium (18.8%), and the D305 medium (17.5%), respectively.

For somatic embryos, the rates of induction on D101 media of TN3 and D201 media of KS1 were 1.7% and 1.6%, respectively.

Key words : black soybean, vegetable soybean, anther culture,
somatic embryogenesis.

Accepted for publication : 27 December, 2002.

1. Contribution NO.285 from Tainan District Agricultural Improvement Station.

2. Assistant researcher, Senior 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.