

# 不同氮源濃度對毛柿體胚發生及後期發育之影響

吳宗賢<sup>1</sup> 王亞男<sup>2</sup>

(收件日期：民國 92 年 5 月 10 日、接受日期：民國 92 年 6 月 10 日)

【摘要】毛柿成熟胚之胚軸培養於添加 0.1 ppm 2,4-D 及 0.1 ppm TDZ 且修飾氮源之 MS 培養基，以  $\text{KNO}_3$  濃度為 28.2 mM 及降低  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  濃度為 10.3 mM， $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  比值為 3.7，可得較佳球型期體胚誘發效果；發育至球型階段之體胚繼代培養於不含植物生長調節劑之培養基，MS 培養基氮濃度減半具促進體胚發芽之作用，維持原氮濃度，體胚可發芽、發根及胚軸伸長，提高氮濃度至原 MS 培養基之 3/2 倍，可促進體胚胚軸伸長。

【關鍵詞】毛柿、體胚發生、氮源。

## EFFECTS OF NITROGEN SOURCES ON EMBRYOGENESIS AND EMBRYO GROWTH OF *DIOSPYROS DISCOLOR*

Zong-Xian Wu<sup>1</sup> Ya-Nan Wang<sup>2</sup>

(Received May 10, 2003; Accepted June 10, 2003)

【Abstract】Hypocotyls of mature embryos of *Diospyros discolor* were cultured on modified nitrogen sources of MS medium supplemented with 0.1 ppm of 2,4-D and TDZ. High frequency of somatic embryogenesis could be obtained while explants cultured on modify MS medium with 28.2 mM  $\text{KNO}_3$  and 10.3 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3.7  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Globular embryos were transferred on hormone-free modify MS medium for further development. In 1/2 nitrogen strength of MS medium, germination of somatic embryos occurred. Germination, rooting and elongation of somatic embryos were observed in normal nitrogen strength MS medium. In 3/2 nitrogen strength MS medium, somatic embryos could be elongated.

【Key words】*Diospyros discolor*, somatic embryogenesis, nitrogen sources.

培養基是否適於植物生長及分化之關鍵因素為離子強度、氮含量、銨態氮與硝酸態氮之比例、鈣離子是否缺乏及植物組織對氮離子之

### I、前言

<sup>1</sup> 國立台灣大學森林系碩士班研究生。  
Graduate Student, Department of Forestry, National Taiwan University.

<sup>2</sup> 國立台灣大學森林系教授，通訊作者。  
Professor, Department of Forestry, National Taiwan University, Corresponding Author.

敏感度等 (McCown and Sellmer, 1987)。氮為影響植物型態發展之主要因子 (Halperin, 1995)，氮為合成蛋白質之主要元素，許多存在細胞內的蛋白質，則是體胚誘導或使體胚發展正常化的關鍵 (Sreedhar and Bewley, 1998)。

培養基中鉍態氮與硝酸態氮之比例與含量為影響植物體胚發生之重要因子；Vesco and Guerra (2001) 對 *Feijoa sellowiana* 體胚發生之研究指出，無論是單以鉍態氮或硝酸態氮為氮源之培養基體，胚誘導率皆很低，當鉍態氮比硝酸態氮為 15:34，可提高體胚發生率。類似之情形在野生葫蘿蔔 (Halperin and Wetherell, 1965)、*Sorghum bicolor* (Elkonin and Pakhomova, 2000)、*Avena sativa* L. (Nuutila *et al.*, 2002) 及 *Hordeum vulgare* L. (Nuutila *et al.*, 2000) 之體胚發生研究出現，不同的是各物種有其特定之最適比例。培養基之氮含量亦可影響體胚發生。在 *Citrus sinensis* 胚性癒合組織之研究中，當培養基添加 BA 時，硝酸態氮與鉍態氮比例相同時，培養基氮含量較高者可獲得較高之胚性癒合組織 (Niedz, 1994)。

除體胚發生外，體胚發育亦受培養基中之硝酸態氮與鉍態氮影響。Nuutila *et al.* (2000) 認為體胚分化之每階段對氮需求皆不同。Choi *et al.* (1998) 在 Korean ginseng 體胚分化之研究中指出，鉍態氮會抑制體胚之根分化，鉍態氮與硝酸態氮同時存在下可促進體胚發芽。

$KNO_3$  及  $NH_4NO_3$  為最常見之培養基無機氮源，本研究之目的在以 MS 為基礎培養基，改變其  $KNO_3$  及  $NH_4NO_3$  含量，探討此兩成分對毛柿體胚發生及體胚分化之影響。

## II、材料與方法

### (I) 材料

毛柿成熟果實於民國 91 年 8 月採自屏東縣林邊鄉崎峰國小校園內約 30 年生之母樹，果實剝開，將成熟種子取出，並以菜瓜布去除種皮

不同氮源濃度對毛柿體胚發生及後期發育之影響

表面之黏膜，4°C 收藏以備使用。

1. 體胚發生試驗之培植體：毛柿成熟胚之胚軸，長度約 0.5~0.8 cm。
2. 體胚發育試驗之培植體：體胚發生試驗所誘導出之球型體胚團。

### (II) 方法

#### 1. 種子表面消毒

種子進行流水處理 24 小時。以稀釋 1/400 安期-A 消毒液 (中國化學製藥公司) 浸泡 5 分鐘、70% 酒精處理 5 分鐘、3% NaOCl (100 ml 加一滴 Tween20) 殺菌 30 分鐘，所有過程均配合超音波震盪器震盪。種子表面消毒後於無菌操作檯上以無菌水沖洗三次。

#### 2. 體胚誘導

種子於無菌操作檯中將胚取出，切取胚軸部分做為培植體，水平放置於培養基上，培養基為修飾過之 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培養基 (詳見表 1)，添加 0.1 ppm 2,4-D、0.1 ppm TDZ、3% (w/v) Sucrose、0.2% (w/v) PVP [Polyvinyl pyrrolidone, 40,000 wt, K value (intrinsic viscosity: 26-35)]，洋菜 0.7% (w/v) (Pronadisa)，pH 值 5.7，在 120°C，壓力 1.2 kg/cm<sup>2</sup> 下滅菌 15 分鐘。本體胚誘導試驗於 125 ml 三角錐型瓶 (Kimax) 培養，每瓶倒入約 50 ml 培養基，接種 4 個培植體，重複 5 次，培養環境為 25±1°C，27 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 日光燈照，16 hr 光週期，50 天後計算體胚誘導率。

#### 3. 體胚後期發育

將發育至球型階段之體胚團由原培養基取出，以鑷子分成數小團，每團約 4~10 個球型體胚 (圖 1)，接種於體胚分化用之培養基，其為修飾過之 MS 培養基 (詳見表 2)，培養基添加 0.5% (w/v) 活性炭 (sigma)、4% (w/v) Sucrose、0.7% (w/v) Agar，不添加植物生長調節劑，pH 值 5.7，高溫高壓滅菌 15 分鐘，待培養基冷卻，倒入無菌培養皿。體胚分化試驗於直徑 9 cm 之塑膠培養皿進行，每培養皿倒入

約 30 ml 培養基，接種 6 個培植體，重複 3 次， 培養環境為  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ， $27 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  日

表 1 體胚發生試驗之培養基設計

Table 1 Modify MS medium for somatic embryogenesis

代號	KNO <sub>3</sub> 濃度 (mM)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 濃度 (mM)	原 MS KNO <sub>3</sub> 濃度之倍數	原 MS NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 濃度之倍數
M1	9.4	0	1/2	0
M2	9.4	10.3	1/2	1/2
M3	9.4	20.6	1/2	1
M4	9.4	30.9	1/2	3/2
M5	18.8	0	1	0
M6	18.8	10.3	1	1/2
M7 (MS)	18.8	20.6	1	1
M8	18.8	30.9	1	3/2
M9	28.2	0	3/2	0
M10	28.2	10.3	3/2	1/2
M11	28.2	20.6	3/2	1
M12	28.2	30.9	3/2	3/2

表 2 體胚分化試驗之培養基設計

Table 2 Modified MS medium for the development somatic embryos

代號	KNO <sub>3</sub> (mM)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (mM)	原 MS KNO <sub>3</sub> 濃度之倍數	原 MS NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 濃度之倍數
Ma (M2)	9.4	10.3	1/2	1/2
Mb (MS)	18.8	20.6	1	1
Mc (M12)	28.2	30.9	3/2	3/2

光燈照，16 hr 光週期，培養 30 天，觀察體胚發展之情形，並記錄。

#### 4. 統計分析

所有試驗皆為完全隨機設計，觀測值將百分比轉換成角度值後以 SAS 提供之 PROC GLM 分析，當處理間達顯著水準 ( $\alpha = 0.05$ )，以鄧肯氏新多變域檢定法 (Duncan's New Multiple Range Test) 比較。

### III、結果

#### (I) KNO<sub>3</sub> 及 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 濃度對體胚誘導之影響

在 12 種不同濃度之氮源組合之培養基中，體胚誘導效果以 M10 最佳，M9、M1 及

M5 最差，試驗結果顯示不含 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 之培養基 (M9、M1、M5)，體胚發生率皆很低。以 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 比例觀之，NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 比例在 3.7 最適合體胚誘導，高比例之 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (M10、M11、M6) 明顯較低比例 (M7、M2、M12、M8、M3、M4) 適合誘導體胚發生。M7、M2 及 M12 之 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 比例相同，皆為 1.9，故可以之比較培養基鉀離子強度對體胚發生之影響，提高鉀離子濃度對體胚發生具正面效果(表 3)。

體胚發生之類型以直接體胚發生為主(圖 2)，培養終了體胚大多發展至球型胚階段，未接觸培養基之體胚即不再發展，且已有部分體胚呈褐化現象(圖 3)。M7 培養基有黃色、類似胚性癒合組織發生(圖 4)，但機率很低，20 個培植體只有 1 個發生，且至培養終了癒合

組織無明顯分化現象。

表 3 不同濃度  $\text{KNO}_3$  與  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  組合對毛柿體胚發生之影響

Table 3 Effects of different concentration of  $\text{KNO}_3$  combined with different concentration of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  on somatic embryogenesis of *Diospyros discolor*

培養基代號	$\text{KNO}_3$ (mM)	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mM)	$\text{NO}_3^-$ (mM)	$\text{NH}_4^+$ (mM)	$\text{K}^+$ (mM)	$\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$	誘發率 (角度轉換值)
M10	28.2	10.3	38.5	10.3	28.2	3.7	72±7.3 <sup>a</sup>
M11	28.2	20.6	48.8	20.6	28.2	2.4	57±3.0 <sup>b</sup>
M6	18.8	10.3	29.1	10.3	18.8	2.8	54±3.7 <sup>c</sup>
M12	28.2	30.9	59.1	30.9	28.2	1.9	48±5.6 <sup>d</sup>
M7 (MS)	18.8	20.6	39.4	20.6	18.8	1.9	42±5.6 <sup>e</sup>
M2	9.4	10.3	19.7	10.3	9.4	1.9	33±3.0 <sup>f</sup>
M8	18.8	30.9	49.7	30.9	18.8	1.6	27±7.3 <sup>g</sup>
M3	9.4	20.6	30	20.6	9.4	1.5	24±6.0 <sup>h</sup>
M4	9.4	30.9	40.3	30.9	9.4	1.3	15±9.5 <sup>i</sup>
M9	28.2	0	28.2	0	28.2	--	6±6 <sup>j</sup>
M1	9.4	0	9.4	0	9.4	--	0±0 <sup>j</sup>
M5	18.8	0	18.8	0	18.8	--	0±0 <sup>j</sup>

註 I. 採用鄧肯氏新多變域檢驗法，字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

II. 均值 ± 標準誤差

表 4 培養基中不同氮濃度對毛柿體胚分化之影響

Table 4 Effects of different nitrogen concentration on somatic embryo development

培養基代號	$\text{KNO}_3$ (mM)	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mM)	Germination (角度轉換值)	Rooting (角度轉換值)	Elongation (角度轉換值)
Ma (M2)	9.4	10.3	52.7 ± 8.5 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.7 ± 3.7 <sup>b</sup>
Mb (MS)	18.8	20.6	27.9 ± 2.8 <sup>b</sup>	29.8 ± 9.6 <sup>a</sup>	38.7 ± 8.5 <sup>a</sup>
Mc (M12)	28.2	30.9	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	8.9 ± 1.4 <sup>b</sup>	57.0 ± 2.5 <sup>a</sup>

註 I. 採用鄧肯氏新多變域檢驗法，字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

II. 均值 ± 標準誤差

## (II) 體胚後期發育

三種不同  $\text{KNO}_3$  與  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  組合之培養基對毛柿體胚分化之影響具明顯差異 (表 4)，降低 MS 氮源濃度至 0.5 倍有促進體胚發芽的效果，但多屬過早發芽 (Precocious germination) 現象 (圖 5)，體胚無法發根，分化出之子葉數目大多不正常，如單一子葉、多子葉、或成輪狀，少為雙子葉。體胚抽長現象發生機率很低，在 31 個體胚中只有一個抽長，且抽長胚軸成彎曲狀 (圖 6)。

以原 MS 氮源濃度培養，體胚表現發芽、發根及抽長現象 (圖 7)，體胚發芽雖無過早發芽現象，但子葉之大小明顯較小，子葉數目則多屬正常，但很少轉變成綠色；根的發育有明顯之主根優勢，不見側根發生，故胚軸和胚根很難判斷，不過胚根末端有明顯分化根尖現象；體胚抽長亦呈彎曲狀，抽長胚軸多細長，無明顯肥大現象。

氮源濃度提高至 1.5 倍，體胚不發芽且發根現象減少，但抽長現象增加，抽長之胚軸肥大現象明顯，而胚軸彎曲現象則減少 (圖 8)。

降低培養基氮源濃度可促進體胚發芽，提高氮源濃度可增加體胚抽長現象，就促進發根而言以 MS 配方之原氮源濃度較佳 (圖 9)。

三種處理之體胚分化後多具玻璃質化現象，胚軸呈黑色 (圖 10)，在 Mb 及 Mc 培養基中少部分培養體發生二次體胚 (圖 11)。

## IV、討論

### (I) 體胚誘導

試驗顯示培養基缺少  $\text{NH}_4^+$  時體胚發生率為零或很低，表示  $\text{NH}_4^+$  存在與否為毛柿體胚發生之重要因子。Wetherell and Dougall (1976) 對胡蘿蔔體胚誘導試驗中指出，在完全以  $\text{KNO}_3$  為氮源之培養基，體胚發生率極低，但當培養基加入  $0.1\text{mM NH}_4\text{Cl}$ ，可提高體胚誘導率。許多植物體胚發生的研究報告，如 *Feijoa sellowiana* (Vesco and Guerra, 2001)、*Picea glauca* (Barrett et al., 1997)、*Panax ginseng* (Choi et al., 2003) 及 *Digitalis lanata* (Reinbothe et al., 1990)，均證實  $\text{NH}_4^+$  的存在可促進體胚的發生。

$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  比例對體胚發生之影響因植物種類不同而有差異，如 *Hordeum vulgare* L. 在培養基之  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  為 4 時最適合體胚發生 (Nuutila et al., 2000)，*Avena sativa* L. 之最適  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  比為 6 (Nuutila et al., 2002)，而 *Medicago sativa* 體胚發生，當  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  為 4 最佳 (Meijer and Brown, 1987)。在本研究中毛柿體胚發生之最佳  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  比為 3.7。

研究顯示高  $\text{K}^+$  濃度較低  $\text{K}^+$  濃度可獲得較高之體胚誘發率，Brown et al. (1976) 研究  $\text{K}^+$  對胡蘿蔔體胚發生之影響，指出培養基  $\text{K}^+$  濃度需高於  $20\text{ mM}$  方可獲得最大體胚發生率。 $\text{K}^+$  為培養基之巨量元素之一，含量多寡可影響培養基之滲透壓強度 (Clarkson and Hanson, 1980)，培養基之滲透壓為影響植物體胚發生之重要因子 (Lou and Kako, 1995；

May and Trigiano, 1991)。

培養後期時顯示部分體胚有褐化現象，表

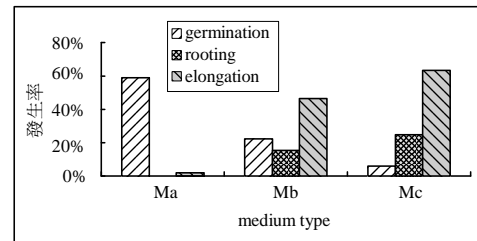


圖 9 三種不同濃度之培養基氮原對毛柿體胚發育之影響

Fig. 9 Effects of three different concentrations of nitrogen on somatic embryos development of *Diospyros discolor*

示體胚誘導之培養時間過長。體胚多發育至球形胚階段即停止，但將體胚移至不含生長調節素之活性炭培養基後，體胚開始即進行發育，造成此現象之可能原因有二：

1. 可能為誘導體胚發生培養基內之 2,4-D 影響所致，2,4-D 被為最常被使用來誘導體胚發生之 Auxin (Bonga and Aderkas, 1993)，但對體胚後續之發育則有抑制作用 (Zimmerman, 1993)，故將體胚移至無 auxin 及添加活性炭之培養基，使活性炭吸收殘餘在培養體之 2,4-D (Ebert and Taylor, 1990)，故可促進體胚發展。
2. 可能為養分供應不足或相互競爭所致，由於同一培養體上誘導出之體胚個數很多，且有些體胚發生於培養體表面未接觸培養基部分，體胚與培養體屬獨立之個體，並無維管束相連，因此未接觸培養基部分之體胚由於養分供應不理想，故呈褐化現象。在體胚發展試驗中，將體胚團分成數小團，使降低競爭作用且增加體胚接觸培養基之機會，則體胚少褐化發生。

### (II) 體胚後期發育

降低培養基氮濃度對毛柿體胚發芽具促進作用，提高 MS 氮濃度有利體胚之胚軸伸長，

維持原 MS 氮濃度則提高根分化效率，可見毛柿體胚發展之每階段所需之氮濃度皆不盡相同。Choi *et al.* (1998) 在研究 Korean ginseng 指出  $\text{NO}_3^-$  與  $\text{NH}_4^+$  濃度變化會影響體胚莖及根生長，Nuutila *et al.* (2000) 認為此種不同發展階段需不同濃度或不同形式氮源的現象，可能和形態發生時植物體內部不同胺基酸代謝有關。

子葉融合（呈輪狀）、多子葉、重複頂芽及其他不正常構造為體胚發育失敗常見之現象（Merkle *et al.*, 1990），畸型胚不易發展成正常植物，促使體胚發展正常化為植物體胚培養之重要關鍵。在本研究中，毛柿體胚雖有發展現象但其型態多屬不正常，此現象可能和培養基之滲透壓與 ABA 有關，且 ABA 具有抑制過早發芽之作用（Roberts *et al.*, 1990），故培養基添加 ABA 或提高滲透壓，如提高培養基蔗糖濃度或使用 PEG 或可促使毛柿體胚發展正常，此仍需進一步的實驗證明。

## V、結論

將 MS 培養基中之  $\text{KNO}_3$  濃度提高為原來之 1.5 倍並將  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  濃度降低為原 0.5 倍可以提高體胚發生效率，體胚發生率和培養基之  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  比例相關，後續之研究可以培養基之  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  比為主題，做更詳細之探討。

毛柿體胚發育隨培養基氮源濃度不同呈顯著之不同形態發展，但所得結果大多屬不正常體胚發展現象，因此除培養基養分改變外，應可嘗試使用處使體胚發展正常化之方法，如 ABA 及乾燥處理等。

## VI、引用文獻

Barrett, J. D., Y. S. Park and J. M. Bonga (1997) The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. *Plant Cell*

Reports 16: 411-415.

Bonga, J. M. and P. V. Aderkas (1993) *In vitro* culture of tree, Kluwer Academic Publishers, London. 36 pp.

Brown, S., D. F. Wetherell and D. K. Dougall (1976) The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. *Physiol. Plant.* 37: 73-79.

Choi, Y. E., D. C. Yang, J. C. Park, W. Y. Soh, and K. T. Choi (1998) Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of *Korean ginseng* on hormone-free medium. *Plant Cell Reports* 17: 544-551.

Choi, Y. E., J. H. Jeong and C. K. Shin (2003) Hormone-independent embryogenic callus production from ginseng cotyledons using high concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and progress towards bioreactor production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 229-235.

Clarkson, D. T. and J. B. Hanson (1980) The mineral nutrition of high plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 239-298.

Ebert, A. and H. F. Taylor (1990) Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 165-172.

Elkonin, L. A. and N. V. Pakhomova (2000) Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 145-151.

Halperin, W. and D. F. Wetherell (1965) Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. *Nature* 205: 519-520.

Halperin, W. (1995) *In vitro* embryogenesis: Some historical issues and unresolved problems. In: Thorpe T. A. (ed) *In vitro* embryogenesis in Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1-16 pp.

- ers, Dordrecht. 1-16 pp.
- McCown, B. H. and J. C. Sellmer (1987) General media and vessels suitable for woody plant culture. In: Bong, J. M. and D. J. Durzan (eds) Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 1, General Principles and Biotechnology, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1-16 pp.
- Meijer, G. M. and D. C. W. Brown (1987) Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 11-19.
- Merkle, S. A., A. T. Wiecko, R. J. Sotak, and H. E. Sommer (1990) Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 26: 1086-1093.
- Murasshige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- May, R. A. and R. N. Trigiano (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116: 366-371.
- Niederbuisson, P. (1994) Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39: 1-5.
- Nuutila, A. M., J. Hamalainen and L. Mannone (2000) Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Science* 151: 85-92.
- Nuutila, A. M., C. Villiger and K.-M. Oksman-Caldentey (2002) Embryogenesis and regeneration of green plantlets from oat (*Avena sativa* L.) leaf-base segments: influence of nitrogen balance, sugar and auxin. *Plant Cell Reports* 20: 1156-1161.
- Reinborthe, C., B. Diettrich, and M. L. Luckner (1990) Regeneration of plants from somatic embryos of *Digitalis lanata*. *Journal of Plant Physiology*. 137: 224-228.
- Roberts, D. R., B. S. Flinn, D. T. Webb, F. B. Webster and B. C. S. Sutton (1990) Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum*. 78: 355-360.
- Sreedhar, L. and J. D. Bewley (1998) Nitrogen- and sulfur-containing compounds enhance the synthesis of storage reserves in developing somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Plant Science* 134: 33-44.
- Vesilind, D. and M. P. Guerra (2001) The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 19-25.
- Wetherell, D. F. and D. K. Dougall (1976) Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiologia Plantarum*. 37: 97-103.
- Zimmerman, J. L. (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5: 1411-1423.

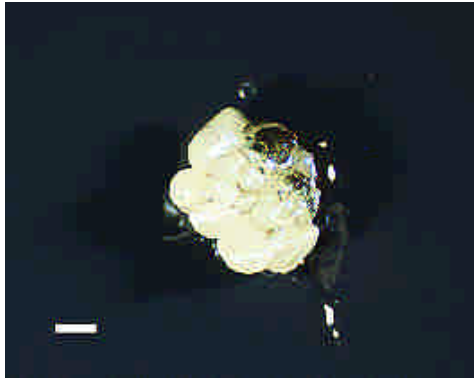


圖 1 球形體胚團 (bar = 1 mm)  
Fig. 1 Globular embryos cluster (bar = 1 mm)

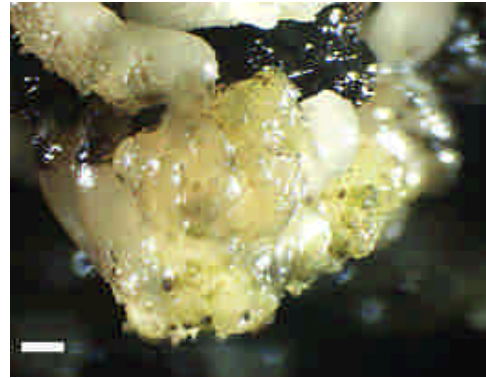


圖 4 胚性癒合組織 (bar = 1 mm)  
Fig. 4 Embryogenic callus on MS medium (bar = 1 mm)



圖 2 直接體胚發生 (bar = 1 mm)  
Fig. 2 Direct embryogenesis (bar = 1 mm)



圖 5 體胚過早發芽現象 (bar = 1 mm)  
Fig. 5 Precocious germination of somatic embryos (bar = 1 mm)



圖 3 培養 50 天後，部分體胚出現褐化現象 (bar = 1 mm)  
Fig. 3 Some globular embryos became browning after 50 days (bar = 1 mm)



圖 6 多子葉分化之植株 (bar = 1 cm)  
Fig. 6 A multiple cotyledons plantlet (bar = 1 cm)



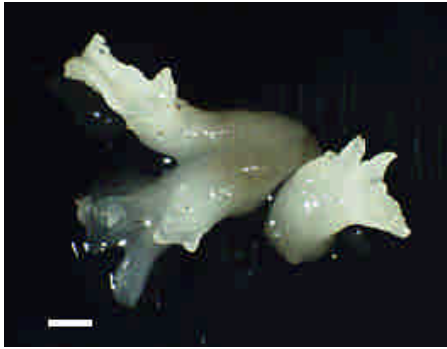


圖 7 體胚發芽且抽長 (bar = 1 mm)  
Fig. 7 Germination and elongation of somatic embryos (bar = 1 mm)



圖 10 不同氮濃度培養下，體胚之不正常發展 (bar = 1 cm)

Fig. 10 Abnormal somatic embryo development cultured on different concentration of nitrogen medium (bar = 1 cm)



圖 8 體胚抽長但不發芽 (bar = 1 mm)  
Fig. 8 Elongation and no germination of somatic embryos (bar = 1 mm)

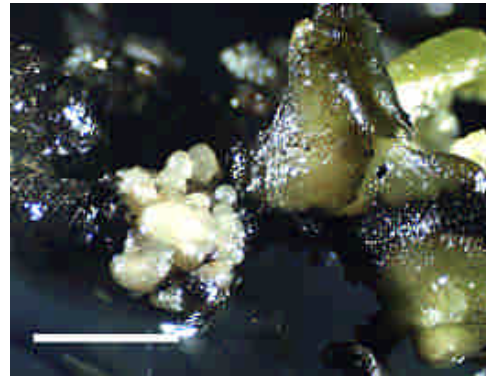


圖 11 二次體胚發生 (bar = 0.5 cm)  
Fig. 11 Secondary somatic embryogenesis (bar = 0.5 cm)

