

## 建立小白菜農桿菌浸花法之基因轉殖系統

陳柏亨<sup>1)</sup> 紀銘坤<sup>2)</sup> 陳俊麟<sup>3)</sup> 曾夢蛟<sup>4)</sup>

關鍵字：農桿菌浸花法、小白菜、基因轉殖

**摘要：**植物基因轉殖技術發展至今，大多採用農桿菌介導及基因槍的方法來獲得轉殖植物。但由於該方法過程繁瑣，需要相當的設備及人力操作，且轉殖後續在組織培養期間，視植物材料的不同，尚存在著轉殖植株再生困難、體細胞變異、轉殖率低等諸多問題。有鑒於此，後來發展出許多以農桿菌介導為理論基礎的研究，旨在嘗試能排除組織培養過程為前提下的農桿菌基因轉殖，真空滲入法及浸花法為當時的兩大發展方向，在阿拉伯芥的轉殖率上皆有所突破，但在其他作物上的應用至今仍不普遍，小白菜的相關報告至今仍不多，尚無廣泛及實際的應用在基因轉殖的操作。本研究目的為探討農桿菌浸花法技術應用在台灣小白菜品種之基因轉殖的可行性。

### 前 言

植物的基因轉殖，主要是將一段外源 DNA 導入植物細胞中，該段 DNA 能整合入植物基因組中並穩定表現。近年來，透過農桿菌進行植物基因轉殖為一普遍的方法，使用農桿菌感染離體組織或培植體，再經由組織培養篩選及再生，獲得轉殖植株。除此之外，也可使用其他物理方法，包括聚二乙烯(PEG)、電穿孔、基因槍轟擊、顯微注射、超音波等方法，直接將外源 DNA 導入植物基因組中。上述轉殖方法，必須經過組織培養的階段來獲得轉殖植物，過程仍存在著轉殖率低、轉基因培植體再生困難、誘導再生時間長、需要無菌操作設備進行組織培養等諸多問題，相當費時耗力。

- 
- 1) 國立中興大學園藝學系大學部學生。
  - 2) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。
  - 3) 中州科技大學景觀系助理教授。
  - 4) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

在植物體上的農桿菌介導方法最早被應用於阿拉伯芥上，使用萌芽種子與農桿菌共培養，能獲得穩定的轉殖植株 (Feldmann and Marks, 1987)。後來發展出的真空滲入法，將阿拉伯芥全株直接浸泡農桿菌液，並抽真空幫助農桿菌進入植物組織感染，該方法增加了農桿菌介導的轉殖率 (Bechtold, 1993)。浸花法(Floral dip)亦為另一種農桿菌介導之簡化技術(Clough and Bent, 1998)，近年來在阿拉伯芥的基因轉殖上被廣泛地應用，不同於真空滲入法，浸花法只感染植株的花，並且無真空處理。由於此方法排除組織培養的過程，能將嵌合體或細胞變異的發生機率降至最低，減少了基因轉殖後續的組織培養的時間，同時增加技術操作上的簡易性、具有可重複性及便捷性。

除了阿拉伯芥以外，浸花法的研究在其他植物如十字花科作物上有成功的報告發表(徐等, 2005)，另外真空滲入法也有結球白菜(Liu *et al.*, 1998)、芥菜(金等, 2003)及油菜(Wang *et al.*, 2003)等作物的轉殖報告。小白菜生長快速，經品種改良可全年生產，為台灣主要蔬菜作物之一。雖然真空滲入法也有針對小白菜的花之轉殖研究(Cao *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2008)，但尚無廣汎及實際的應用在基因轉殖的操作。本研究目的主要為探討農桿菌浸花法技術應用在台灣小白菜品種之基因轉殖的可行性。

## 材料與方法

### 一、植物材料

以'台農 1 號'(Tainung No. 1) 和'台農 3 號'(Tainung No. 3) 品種的小白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino) 作為基因轉殖的材料。此二品種具有耐熱性佳、生長勢強之優良性狀，容易於設施中誘導花芽分化與控制開花時間，且能生產出大量種子，利於進行基因轉殖後的種子篩選及分析。

### 二、轉殖基因材料

本試驗作為農桿菌浸花法所使用的農桿菌品系為 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404，其所攜帶的質體有抗 hygromycin 的 *hptIII* 基因及  $\beta$ -glucuronidase 基因(*gus*)之 pECa-Gus (圖 1A)及 pRECa-Gus (圖 1B)，與抗 kanamycin 之 *npt II* 基因及抗 D-alanine 的 *daao* 基因之 pCaNDAO (圖 1C)及 pRNDAO (圖 1D)，分別以 CaMV35S 和 *rbcS* 為啟動子的四個農桿菌轉殖載體進行轉殖。

### 三、農桿菌浸花法及篩選方法

將 10 天苗齡之小白菜幼苗放置於 20°C/17°C(日/夜溫)之生長箱中進行春化處理 1 個月，待抽苔後將植株移至溫室中進行基因轉殖。浸花處理當天，將小白菜花梗頂端部分，即將開放之花朵除去花瓣與雄蕊，同時除去同一花梗上的其餘花朵。之後將帶有除雄花朵之花梗浸入含農桿菌的感染液中 3 分鐘、感染液包含有 2.2g/L MS salt (contain vitamin)、10 $\mu$ l/L 生長素 BA、5g/L 蔗糖及 0.02%展著劑 L-77，pH 5.7。浸泡後的花梗隨即

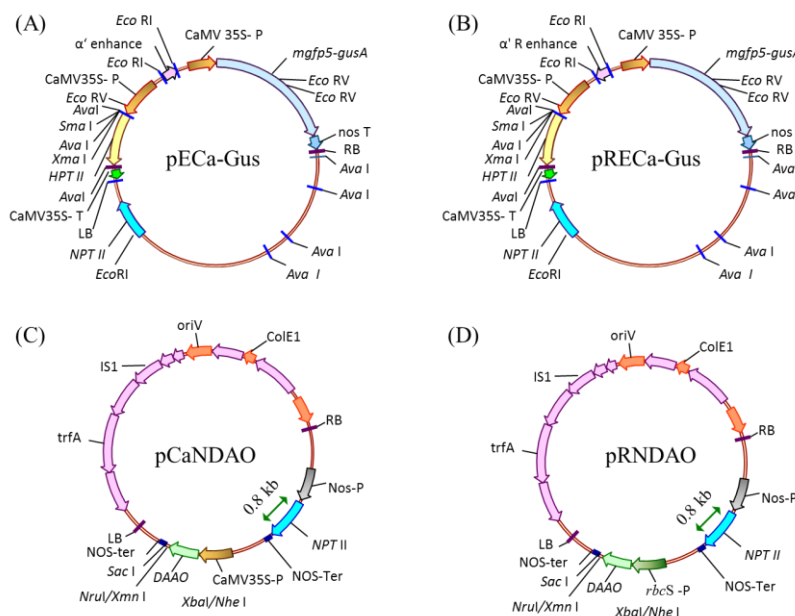


圖 1. pECa-Gus (A)、pRECa-Gus (B)、pCaNDAO (C)、pRNDAO (D) 質體之基因圖譜。  
Fig. 1. Map for the plasmids, pECa-Gus(A), pRECa-Gus(B), pCaNDAO(C), and pRNDAO(D).

以塑膠袋套袋保濕，24 小時後再重複感染 1 次，並再袋套保濕 24 小時 (Zhang *et al.* 2006)。然後以異株授粉方式進行人工授粉並袋套，再採收成熟果莢與種子。

種子採收後經 70% 酒精消毒一分鐘後用無菌水清洗三次、接著以 3% 次氯酸鈉殺菌 15 分鐘同樣以無菌水清洗三次，再依不同的轉殖基因，分別無菌播種於含有 200 ppm kanamycin、7 mM D-alanine 或 25 ppm hygromycin 之 1/2 MS 培養基。成活苗株進行繼代培養，隨後進行轉殖基因之 DNA 及 RNA 分析。

#### 四、植物 DNA 萃取

取小白菜已展開之本葉 1g 剪成小片，於研鉢中加液態氮磨碎，置於室溫下直到解凍，加入 0.6 ml DNA 萃取液均勻磨細 (萃取液使用前加入 2% 2-Mercaptoethanol，並於 65°C 水浴鍋內預熱)。將磨碎後樣品倒至離心管中，於水浴鍋中以 65°C 加熱 15 到 30 分鐘，拿出離心管放至冷卻，加入 0.6 ml Phenol/ Chloroform 1:1 溶液，震盪均勻。接著以 12,000 rpm、4°C 離心 3 分鐘，取上清液，重複加入 0.6 ml Phenol/Chloroform 溶液，震盪，離心等步驟兩次。加入 1 ml 之 2-Propanol，放入 -20°C 環境下沉澱 30 分鐘，再以 12,000 rpm、4°C 離心 15 分鐘後去除上清液。以 0.5 ml 70% 冷凍酒精清洗，12,000 rpm、4°C 離心 3 分鐘後去除酒精，將 DNA 沉澱物倒置瀝乾，最後加入 TE Buffer 回溶。

#### 五、以聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)偵測轉殖植株基因

萃取出之植物 DNA 針對不同轉殖基因，分別加入不同引子。偵測 *nptII* 基因引子為

5'ATGATTGAACAAGATGGATTGCAC3'和 5'TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGC3'，以小白菜基因組 DNA 做模板，加入 0.1 $\mu$ l *Taq* DNA polymerase、2.5 $\mu$ l 10x buffer、2 $\mu$ l dNTP、2 $\mu$ l 引子再加入去離子水 16.4 $\mu$ l，使最終體積成為 25 $\mu$ l。PCR 反應流程為 95 $^{\circ}$ C 45 秒，58 $^{\circ}$ C 45 秒，72 $^{\circ}$ C 1 分鐘 30 秒，35 個 cycle，再進行 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。偵測 *daao* 基因引子為 5'ATGGCTAAAATCGTTGTTATTGGTGCC3'和 5'CTAAAGGTTTGGACGAGTAGTAAGAGGTCT3'，PCR 反應流程為 95 $^{\circ}$ C 45 秒，55 $^{\circ}$ C 45 秒，72 $^{\circ}$ C 1 分鐘 30 秒，35 個 cycle，再進行 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。

#### 六、GUS 分析

由於轉殖的四個質體基因當中，pECa-Gus 和 pRECa-Gus 皆帶有 *gus* 報導基因，因此使用剛萌芽之種子及篩選後植株本葉作為材料，進行 GUS 酵素活性測試分析。取 100mM phosphate buffer 加入 10mM EDTA、0.5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ 、0.5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ 、0.1% Triton X-100、10% MeOH、0.3%  $\alpha$ -glucuronidase 配成 GUS 藥劑，剪取展開本葉或使用萌芽之種子浸泡溶液，真空處理 15 分鐘，置於 37 $^{\circ}$ C 環境下 12 小時後，再以 95% 酒精退去葉綠素，觀察組織顏色變化。

## 結 果

### 一、Kanamycin、Hygromycin、D-alanine 等篩選藥劑對小白菜種子發芽與生長之影響

本研究轉殖質體攜帶有抗 hygromycin 的 *hptII* 基因、抗 kanamycin 之 *npt II* 基因及抗 D-alanine 的 *daao* 基因，所以利用上述藥劑於花朵浸泡農桿菌感染液後之採收種子，進行種子播種、發芽及生長，以篩選擬轉殖植株。因此本研究先探討小白菜種子於含有不同濃度之 kanamycin、hygromycin、D-alanine 等篩選藥劑之培養基的發芽與生長發育情形，以選取適合的藥劑篩選濃度。

'台農一號'小白菜的篩選濃度測試結果顯示，種子以 5~100ppm kanamycin 處理二週後，抑制芽梢生長的效果並不明顯（圖 2A），然而至 5ppm kanamycin 處理，則明顯抑制根生長（圖 2B），但植株仍可成活生長。若將 kanamycin 濃度範圍提高至 150~200ppm（圖 3），小白菜種子發芽生長二週後，150ppm kanamycin 處理二週後大部分植株出現白化死亡情形（圖 3E），但仍有部分植株存活，將篩選濃度上修至 200ppm，抑制植株生長則更整齊（圖 3F）。根據此結果，200ppm kanamycin 為適用於'台農一號'小白菜的篩選濃度。'台農三號'小白菜的 kanamycin 濃度篩選試驗，其結果與'台農一號'大致相同，故取同樣濃度 200ppm kanamycin 為'台農三號'小白菜的篩選濃度。

'台農一號'及'台農三號'小白菜種子播種於含 hygromycin 的培養基中三週後，幼苗生長情形如圖 4 所示。'台農一號'在 25ppm 之 hygromycin 處理下，並不會強烈抑制種子發芽，但會抑制生長，三至四週時便可觀察到植株葉片出現褐化並逐漸萎凋死亡（圖 4I-C）。'台農

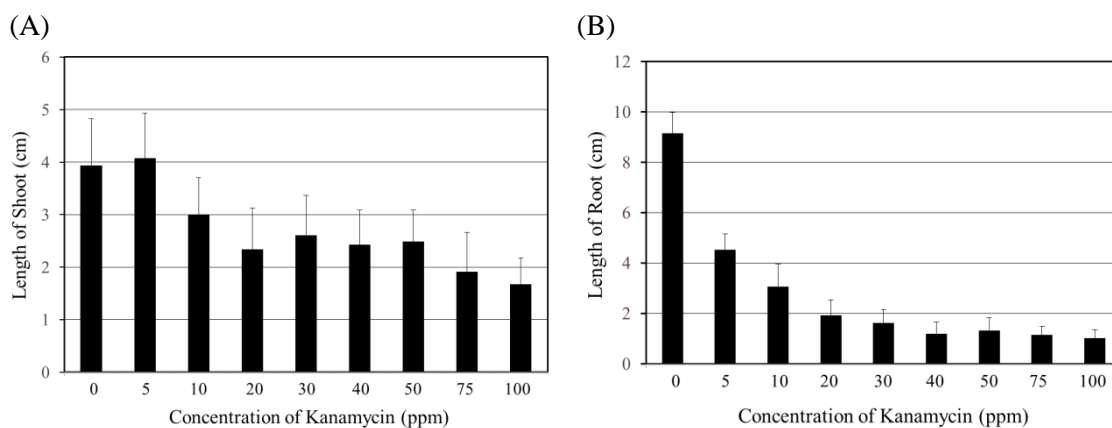


圖 2. 0~100 ppm kanamycin 處理'台農一號'小白菜種子二週後，對幼苗芽梢(A)和根生長之影響。

Fig. 2. Effects of 0~100 ppm kanamycin on the growth of shoot (A) and root (B) of 'Tainung No. 1' pakchoi seedling after two weeks of germination.

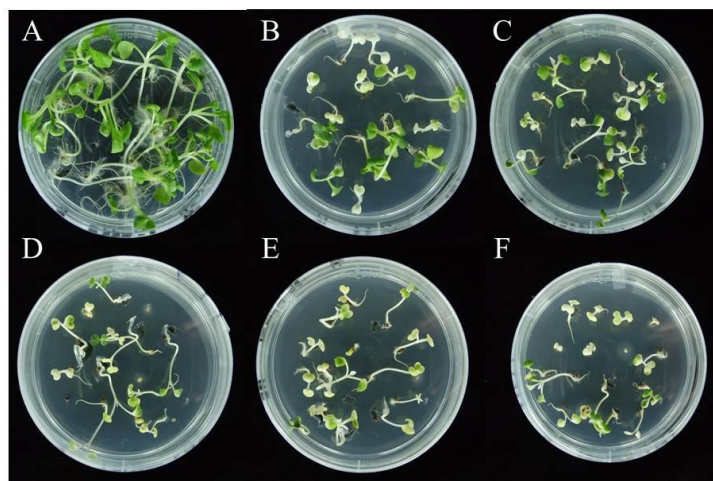


圖 3. '台農一號'小白菜種子播種於含 kanamycin 的培養基中二週後，幼苗生長情形。(A) CK、(B) 75ppm、(C) 100ppm、(D) 125ppm、(E) 150ppm、(F) 200ppm。

Fig. 3. Appearances of 'Tainung No. 1' pakchoi seedling after two weeks of germination on the medium containing kanamycin. (A) CK, (B) 75ppm, (C) 100ppm, (D) 125ppm, (E) 150ppm, (F) 200ppm.

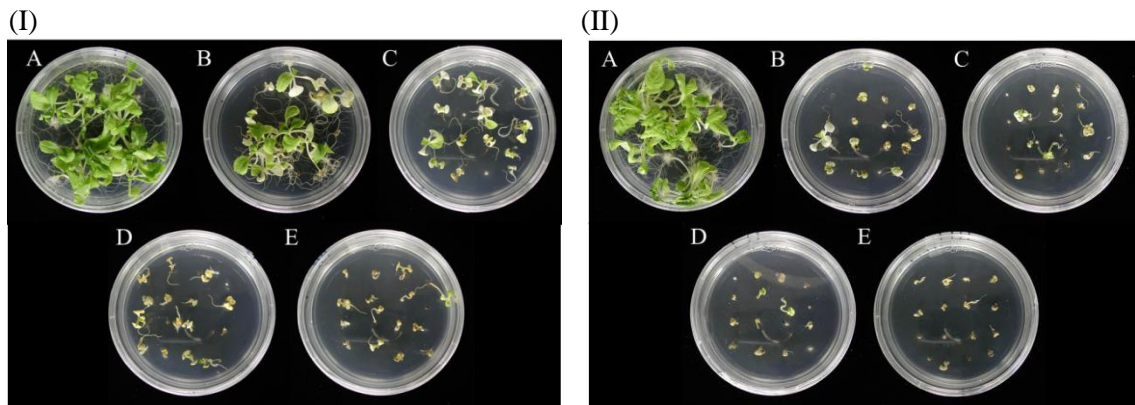


圖 4. '台農一號'(I)及'台農三號'(II)小白菜種子播種於含 hygromycin 的培養基中三週後，幼苗生長情形。(A) CK、(B) 15ppm、(C) 25ppm、(D) 35ppm、(E) 45ppm。

Fig. 4. Appearances of 'Tainung No. 1' (I) and 'Tainung No. 3' (III) pakchoi seedling after three weeks of germination on the medium containing hygromycin. (A) CK, (B) 15ppm, (C) 25ppm, (D) 35ppm, (E) 45ppm.

三號'則於濃度 15ppm 篩選下，大部分植株死亡(圖 4II-B)，但仍有少部分存活，考慮到篩選嚴格度，將 hygromycin 濃度調高至與'台農一號'相同的 25ppm。

'台農一號'及'台農三號'小白菜種子播種於含 D-alanine 的培養基中三週後，幼苗生長情形如圖 5 所示。試驗結果顯示，無論為'台農一號'或'台農三號'小白菜，5mM D-alanine 處理濃度抑制芽梢及根部之生長非常嚴重，但植株並不會死亡(圖 5I-F、圖 5II-F)，將 D-alanine 濃度提高至 7mM，其結果與 5mM 幾無差異，故取 7mM D-alanine 為小白菜的篩選濃度。

## 二、農桿菌浸花法、篩選、PCR 及 GUS 染色分析

農桿菌浸花法轉殖基因到小白菜的過程如圖 6 所示。本研究初步採用傳統阿拉芥之農桿菌浸花法，將整個花梗浸泡到含農桿菌感染液，進行基因轉殖，但無論改進浸泡溶液、浸泡時間、浸泡次數、不同花朵成熟階段等方法，最終花朵或花蕾掉落，或花梗萎凋死亡，無法獲得種子。本研究改採於浸花處理當天，將小白菜花梗頂端部分，即將開放之花朵除去花瓣與雄蕊(圖 6A~C)，同時除去同一花梗上的其餘花朵，再進行浸花處理(圖 6D)。浸泡後的花梗隨即以塑膠袋套袋保濕(圖 6E)，24 小時後再重複感染 1 次，並再袋套保濕 24 小時。然後以異株授粉方式進行人工授粉並袋套，再採收成熟果莢與種子(圖 6E)。

種子採收後依不同的轉殖基因，分別無菌播種於含有 200 ppm kanamycin、7 mM D-alanine 或 25 ppm hygromycin 之 1/2 MS 培養基。圖 7 為經農桿菌浸花法處理之'台農 1 號'小白菜的種子，以 hygromycin、kanamycin、D-alanine 篩選擬轉殖植株的一例。大致上，

篩選經農桿菌浸花處理之種子，以 hygromycin 能快速及明確地區別死亡及成活苗株(圖 7A~C)，kanamycin 及 D-alanine (圖 7D~E)則較不明顯，但若先經 D-alanine 篩選再移到 kanamycin 則有加成效果 (圖 7F)。

以攜帶 pCaNDAO 及 pRNDAO 質體之農桿菌進行試驗並進行藥劑篩選之後，將成活具明顯生長優良的小白菜植株，萃取其葉片 DNA，以偵測 *nptII* 基因的引子進行 PCR 反應。試驗結果顯示，CD1 (轉殖 pCaNDAO)與 RD1 (轉殖 pRNDAO) 轉殖系皆偵測到帶有約 800bp 大小的 *nptII* 基因片段。未轉殖對照組(CK)則無此條帶出現，另以農桿菌質體 DNA 作為 positive，如預期的出現 *npt II* 800bp 的條帶 (圖 8)。pECa-Gus 及 pRECa-Gus 質體各帶有一段 *gus* 基因，以攜帶上述二個質體之農桿菌進行浸花處理，授粉結莢後獲得的種子，去除種皮後以 GUS 染色後情形如圖 9 所示。GUS 分析結果顯示，農桿菌浸花法處理後採收之種子，部份'台農一號'(圖 9A、圖 9B)及'台農三號'(圖 9C)小白菜種子呈現 GUS 活性之藍色反應，未感染之對照組(圖 9C)則無此表現。

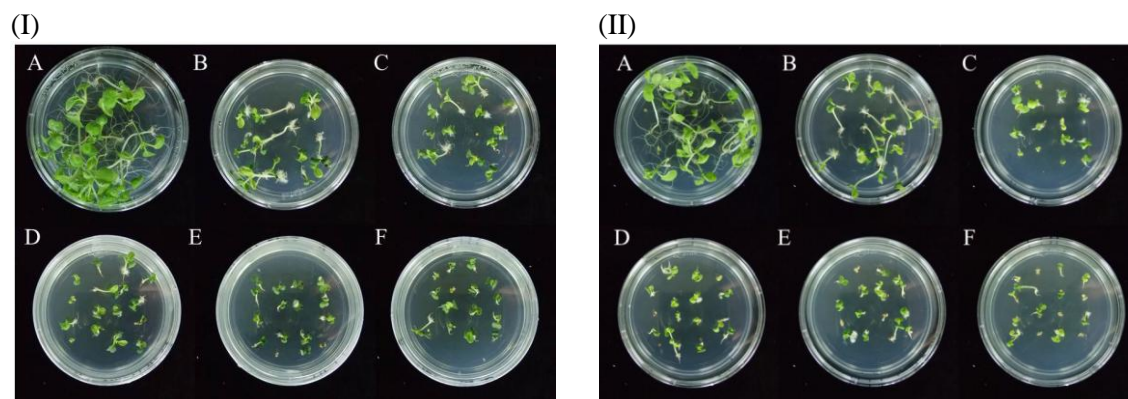


圖 5. '台農一號'(I)及'台農三號'(II)小白菜種子播種於含 D-alanine 的培養基中三週後，幼苗生長情形。(A) CK、(B) 1mM、(C) 2mM、(D) 3mM、(E) 4mM、(F) 5mM。

Fig. 5. Appearances of 'Tainung No. 1' (I) and 'Tainung No. 3' (III) pakchoi seedling after three weeks of germination on the medium containing D-alanine. (A) CK, (B) 1mM, (C) 2mM, (D) 3mM, (E) 4mM, (F) 5mM.

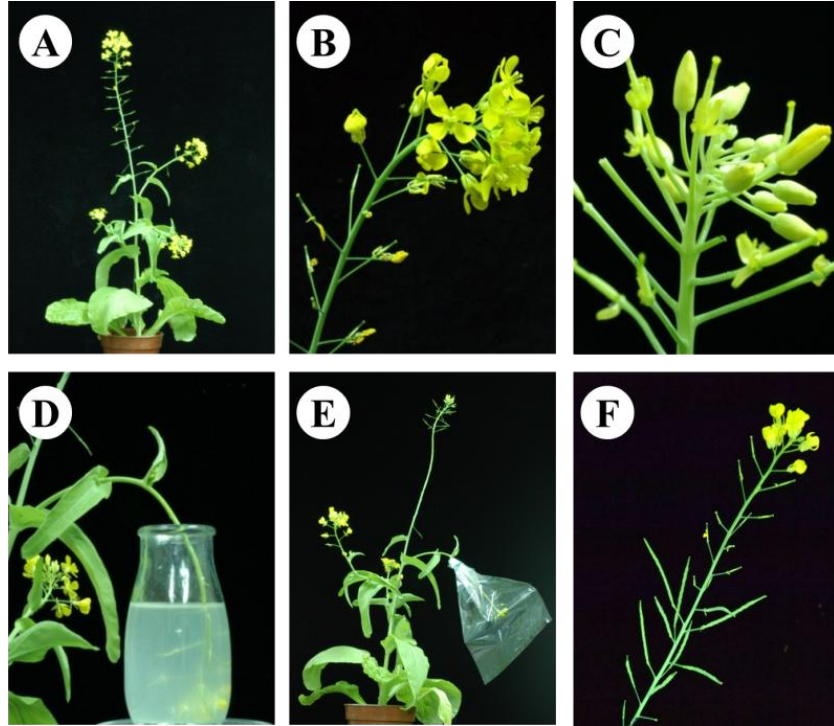


圖 6. 農桿菌浸花法轉殖基因到小白菜的過程。(A)轉殖前抽苔植株生長情形、(B)開花情形、(C) 除雄後、(D) 浸泡含農桿菌感染液 3 分鐘、(E) 套袋保濕一天、(F) 人工授粉後結莢情形。

Fig 6. The process of *Agrobacterium*-mediated floral-dip transformation in pakchoi. (A) Flower stalk of pakchoi before floral dip. (B) Flowers on the inflorescence. (C) After emasculation. (D) Dipping the flower stalk into the transformation solution containing *Agrobacterium tumefaciens*. (E) Bagging flower stalk to keep the moisture. (F) Siliques after artificial pollination.



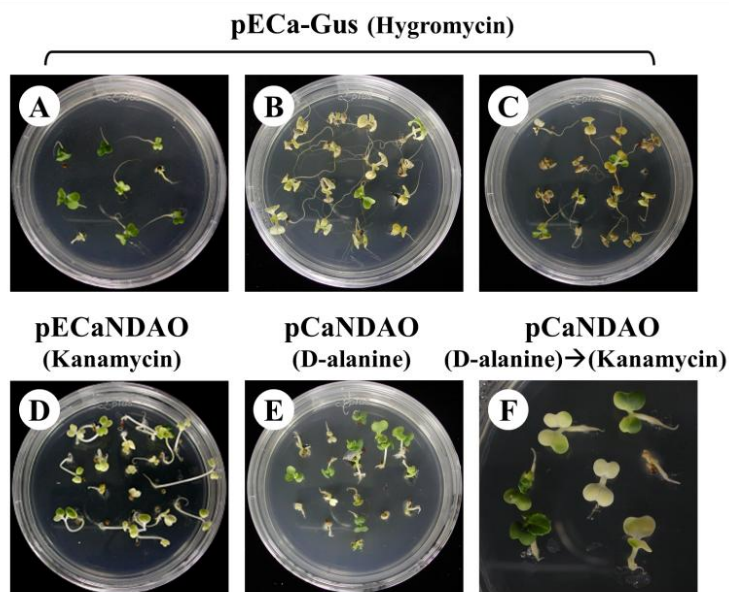


圖 7. 經農桿菌浸花法處理之‘台農 1 號’小白菜的種子，在 hygromycin (A~C)、kanamycin (D)、D-alanine (E) 或由 D-alanine 再換到 kanamycin 中 (F) 之發芽及生長的情形。

Fig. 7. Germination of 'Tainung No. 1' pakchoi seeds in the medium containing hygromycin (A~C), kanamycin (D), D-alanine (E), or D-alanine/kanamycin for screening of putative transgenic plants.

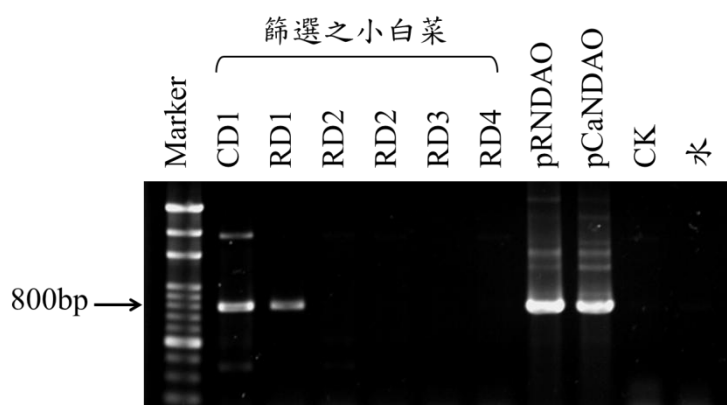


圖 8. 以 PCR 檢測篩選成活之小白菜苗株之 *nptII* 基因之情形。CD: 轉殖 pCaNDAO; RD: 轉殖 pRNDAO; CK: 未轉殖對照組。

Fig 8. PCR analysis of *npt II* gene in putative transgenic pakchoi plants. CD: pCaNDAO transformed; RD: pRNDAO transformed; CK: non-transformed controls.

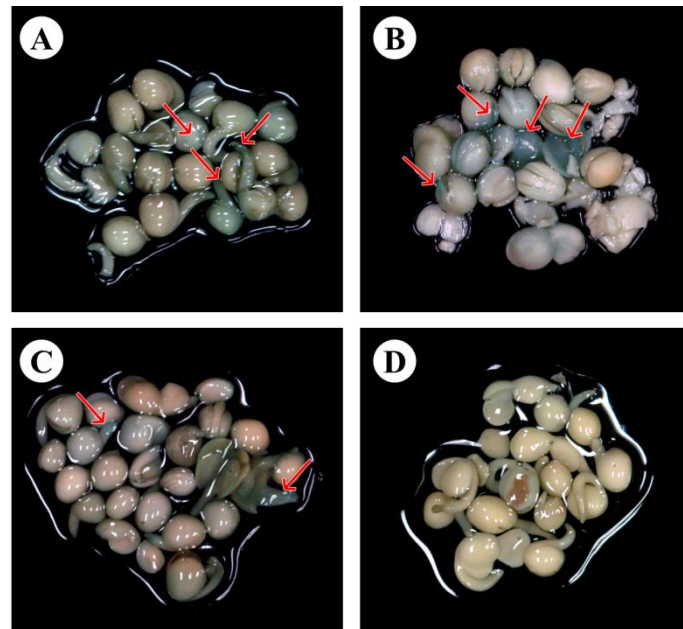


圖 9. 經農桿菌浸花法處理後採收之小白菜種子，進行 GUS 活性化學染色分析的情形。(A) '台農一號'—pECa-Gus、(B)'台農一號'—pRECa-Gus、(C)'台農三號'—pRECa-Gus、(D) '台農一號'—CK (未轉殖對照組)。

Fig. 9. GUS histochemical assay of pakchoi seeds harvested from *Agrobacterium*-mediated floral-dip transformation. (A) 'Tainung No. 1'—pECa-Gus, (B) 'Tainung No. 1'—pRECa-Gus, (C) 'Tainung No. 3'—pRECa-Gus, (D) 'Tainung No. 1'—CK (non-transformed controls).

## 討 論

轉殖植株篩選藥劑之研究，比較'台農一號'及'台農三號'小白菜兩品種，在 hygromycin 部分，低濃度即能抑制兩個品種之小白菜種子發芽，植株並於三週後陸續出現褐化死亡現象；而 kanamycin 則必須高至 200 ppm 才能抑制苗株生長，使葉片白化殺死植株；D-alanine 迨 7 mM 時僅出現抑制生長之情形，根極短，地下部抑制情形相較於地上部則相當明顯，但受抑制苗株並不會白化死亡。我們建議可用 7 mM D-alanine 作初步篩選，再挑選生長相對旺盛的植株，繼代至 200ppm kanamycin 培養基中進行二次篩選，可獲得不錯的篩選效果。比較三種篩選藥劑，以 hygromycin 最能快速極明確地區別及成活苗株，kanamycin 與 D-alanine 篩選結果則較不明顯，但若先以 D-alanine 篩選再移到 kanamycin 篩選培養基

則有加成效果。

本研究初步採用傳統阿拉芥之農桿菌浸花法，但無法獲得種子。本研究改採浸花處理前先除雄，再進行浸花處理，然後以異株授粉方式進行人工授粉，如此可獲得成熟果莢與種子。探討浸花法整體流程的關鍵，在於展著劑濃度及花浸泡於感染液中的時間長短。展著劑 L-77 濃度為 0.05%，在阿拉伯芥的相關研究中被使用 (Das and Joshi, 2011)，然而小白菜使用相同濃度處理下卻造成花梗萎凋死亡，故將濃度降低至 0.02%，此為適合以小白菜作為感染材料的展著劑濃度。除此之外，浸泡時間為另一關鍵，浸泡約 3 至 5 分鐘，不至對小白菜的花朵造成傷害，浸泡過程中，需每隔 1 分鐘攪拌一次感染液，使容器底下農桿菌沉澱再懸浮，以增加轉殖率。

本研究已建立小白菜之農桿菌浸花技術，二個品種的小白菜進行農桿菌的感染後，再經人工授粉皆能結莢並獲得到種子。農桿菌浸花法處理後採收之種子，部份種子呈現 GUS 活性之藍色反應。藥劑篩選成活的苗株，可偵測到轉殖之 *nptII* 基因。本研究初步結果顯示，以農桿菌浸花法技術應用在小白菜基因轉殖是可行的。轉殖過程簡易快速，不需儀器設備輔助即可進行轉殖，唯其轉殖效率有待進一步深入研究及評估。

## 參 考 文 獻

- 金萬梅、鞏振輝、宋正旭等。2003。通過植株原位真空滲入遺傳轉化獲得轉基因芥菜。西北農林大學學報(自然科學版) 31: 39-42。
- 徐芳、熊愛生、彭日荷、侯喜林、姚泉洪。2005。植物遺傳轉化的新方法：Floral Dip。中國蔬菜(3): 29-31。
- Bechtold, N., J. Ellis, and G. Pelletier. 1993. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci. 316: 1194-1199.
- Cao, M. Q., F. Liu, L. Yao, D. Bouchez, C. Tourneur, Y. Li, and C. Robaglia. 2000. Transformation of Pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. Mol. Bre. 6: 67-72.
- Clough, S. J. and A. F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 16(6): 735-743.
- Das, P. and N. C. Joshi. 2011. Minor modifications in obtainable *Arabidopsis* floral dip method enhances transformation efficiency and production of homozygous transgenic lines harboring a single copy of transgene. Adv. Biosci. Biotech. 2: 59-67.
- Feldmann, K. A. and M. D. Marks. 1987. *Agrobacterium*-mediated transformation of

- germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* 208 : 1-9.
- Liu, F., M. Q. Cao, and L. Yao. 1998. *In planta* transformation of Pakchoi (*Brassica campestris* L. spp *chinensis*) by transformation of adult plants with *Agrobacterium*. *Acta Hort.* 467: 187-192.
- Wang, W. C., G. Menon, and G. Hansen. 2003. Development of a novel *Agrobacterium* – mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants. *Plant cell Rep.* 22: 274-281.
- Xu, H., X. Wang, H. Zhao, and F. Liu. 2008. An intensive understanding of vacuum infiltration transformation of pakchoi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*). *Plant Cell Rep.* 27: 1369-1371.
- Zhang, X., R. Henriques, S. S. Lin, Q. W. Niu, and N. H. Chua. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Protoc.* 1(2): 1-6.

## Development of *Agrobacterium*–Mediated Floral-Dip Transformation Method in Pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino)

Po-Heng Chen<sup>1)</sup>    Ming-kun Chi<sup>2)</sup>    Jiun-Lin Chen<sup>3)</sup>    Menq-Jiau Tseng<sup>4)</sup>

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, Floral dip, Pakchoi, Gene transformation

### Summary

Nowadays, *Agrobacterium*-mediated transformation is the most commonly used technology for obtaining transgenic plants. However, *Agrobacterium*-mediated transformation is laborious and time-consuming in transformation procedures. Furthermore, regeneration of transformed tissues, depending on the plant species, had often caused the failure of transformed plants, somatic cell mutation, and low transformation efficiency. Thus, plant transformation technology based on *Agrobacterium*-mediated transformation without plant tissue culture process had been developed. Both *Agrobacterium* vacuum infiltration and floral dip methods were two major improvements in plant transformation technology. This breakthrough technology was most suitable for *Arabidopsis thaliana* transformation, but was not popular in most of other plants with the exception of some cruciferous vegetables. An effort was made in this study to develop the *Agrobacterium*–mediated floral-dip transformation method in pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino) using Taiwan's varieties. Our results indicated that the system of *Agrobacterium*–mediated floral-dip transformation of Pakchoi transformation, which had several advantages over the conventional used transformation methods, offered new possibilities for Pakchoi improvement by biotechnology.

- 
- 1) Undergraduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 2) Student in Ph.D. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 3) Assistant Professor, Department of Landscape Architecture, Chung Chou University of Science and Technology.
  - 4) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author

