

開發青蔥之高效率試管內再生系統

葉賢舜 尤進欽*

國立宜蘭大學園藝學系

摘要

組織培養再生系統是農桿菌媒介基因轉殖法的重要操作平台。本試驗以‘黑葉’品種青蔥為材料，評估三種組織培養再生流程誘得之癒合組織，經農桿菌感染及低濃度抗生素(10 mg L⁻¹ G418)篩選 7 週後的擬轉殖類芽鞘組織分化能力。結果顯示，以 MS 培養基含 1 mg L⁻¹ 2,4-D 及 1 mg L⁻¹ BA 培養莖盤所誘導出的緊實、球狀型癒合組織可轉綠並分化出類芽鞘組織，為最佳的農桿菌感染目標組織。為提高再生率，在農桿菌感染前切除癒合組織上一半長度的類芽鞘組織，可提高擬轉殖枝梢再生率至約 34.3%。感染後，在癒合組織轉綠階段剖切培植體可維持正常增殖；延至形成叢生枝梢團後施以剖切，28.6~47.3%的培植體則會誘導絨狀根發生。枝梢根系形成階段，置於含有 50 或 80 mg L⁻¹ G418 和 500 mg L⁻¹ carbenicillin 的發根篩選培養基上皆無法發根。為克服此問題，藉由移除培養基中的 G418 及減半 carbenicillin 濃度，發根率最高可達 88.9%。本試驗證明青蔥經農桿菌轉殖法，透過組織培養系統可成功再生擬轉殖株。

【關鍵詞】青蔥、組織培養、抗生素篩選、發根

Development of a Highly Efficient *in vitro* Plant Regeneration System in Welsh Onion

Hsien-Shun Yeh Jinn-Chin Yiu*

Department of Horticulture, National Ilan University

Abstract

Tissue culture regeneration is a key platform for *Agrobacterium tumefaciens* -mediated gene transformation. In this study, the Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) variety “Hak-ip” was used to evaluate callus proliferation after transformation. After inoculation with *A. tumefaciens* and a selected low-concentration antibiotic (G418 at 10 mg L⁻¹) for 7 weeks, the coleoptile-like tissue differentiation of the putative transformant plants was studied. The results show that MS medium containing 1 mg L⁻¹ 2,4-D and 1 mg L⁻¹ BA induced the stem discs of the Welsh onion to form compact and nodular calli, which turned green and regenerated coleoptile-like tissue, indicating that tissue cultured under these conditions is an excellent material for use in *A. tumefaciens* transformation. Removal of at least half the length of the coleoptile-like tissue increased the regeneration rate to 34.3% in the putative transformant shoots. After transformation, dissection of the calli until they turned green maintained normal proliferation; while

upon later dissection, when a shoot clump had formed, a fluffy rooting formation was induced in 28.6~47.3% of the explants. During root formation, rooting was completely inhibited when the shoots were rooted in medium containing 50 or 80 mg L⁻¹ G418 and 500 mg L⁻¹ carbenicillin, and was boosted up to 88.9% by elimination of G418 and reduction of the carbenicillin concentration by half in the medium. In conclusion, this study demonstrated that *A. tumefaciens*-transformed putative Welsh onion plants can be successfully regenerated using a tissue culture regeneration system.

Keywords: Welsh onion, tissue culture, antibiotics selection, rooting

*Corresponding author E-mail: jcyiu@niu.edu.tw

前 言

青蔥(*Allium fistulosum* L.)為台灣民眾日常佐餐必備的辛香蔬菜。2008 年台灣青蔥總栽培面積達 4,926 公頃，主要栽培地區以雲林縣最多(1,832 公頃)，其次為彰化縣(1,124 公頃)及宜蘭縣(628 公頃)(行政院農業統計年報, 2008)。由於青蔥生長不耐熱且不耐淹水的特性(楊, 2006)，所以每逢夏季颱風豪雨，常造成 8 月至 10 月的受災、復耕期間出現蔥價飆漲的現象。此外，青蔥生育期間甜菜葉蛾危害嚴重，因幼蟲藏匿在蔥管內咀嚼蔥葉，所以採用一般農藥防治效果不佳(林與呂, 1991)。為解決這些困境，雖可利用傳統育種方式，培育耐逆境青蔥品種；或從生產面來著手改進。然而卻是曠時費日不易快速達到顯著的成效。而利用植物基因轉殖技術快速賦予青蔥抵禦環境逆境能力則是一個理想的策略。

早在 1993 年 Wijbrandi 與 de Both 的報告中即曾指出，當時所有主要作物的再生系統都已建構完成，除了蔥屬作物外，皆已可利用農桿菌進行轉殖(Wijbrandi and de Both, 1993)。然而，在 1984 年第一個轉殖植物開發 16 年後，蔥屬作物才獲得突破。在此之前，Eady 等(1996)形容蔥屬作物是一種頑固難以轉殖和再生的種類。經過這些年來，洋蔥(Eady *et al.*, 2000)、大蒜(Kondo *et al.*, 2000)、分蔥(Zheng *et al.*, 2001)及韭菜(Eady *et al.*, 2005)等作物的轉殖系統都被逐一完成。至今唯獨青蔥未有成功的轉殖研究，僅 Peffley 等(1995)及 Dong 等(1997)曾報導癒合組織階段的 *gus* 基因短暫表現之初步結果。可見青蔥轉殖尚有許多技術瓶頸仍待克服。

組織培養再生系統是農桿菌媒介基因轉殖法的重要操作平台。目前國內外已有諸多青蔥組織培養再生的研究。這些報告皆指向組織或器官經由逆分化與再分化過程後，可達成植株再生目的。但轉殖操作過程中，加入了不同培植體選擇、

農桿菌共培養、外源基因整合，以及長期抗生素篩選等，對於轉殖株再生則是一項項未知的變數。

其中，轉殖後枝梢難以再生根系的現象，對於部份作物的轉殖工作而言是一項嚴峻的挑戰。許多研究都曾報導擬轉殖枝梢發根率偏低的現象，如轉殖油菜的發根率低於 50% (Cardoza and Stewart 2003; Fry *et al.*, 1987)。轉殖苜蓿的平均發根率僅 39% (Zhou *et al.*, 2004)。以及轉殖草莓發根率只有 30% (Nehra *et al.*, 1990a)等。Crane 等(2006)甚至報導苜蓿 R108 品系的再生枝梢，在發根培養基上繼代培養超過 8 個月都無法發根的窘境。透過轉殖、篩選程序所獲的再生枝梢，若無法順利發根產生完整植株，即便再精良的轉殖技術抑或再多的轉殖操作亦屬枉然。因此，本試驗的目的為建立高再生率的青蔥轉殖後組織培養操作平台，並克服該體系再生過程中所面臨的瓶頸，使青蔥在轉殖後可順利再生植株，以作為發展青蔥基因轉殖系統的基礎。

材料與方法

一、試驗材料

轉殖目標植物材料為青蔥(*Allium fistulosum* L.) `黑葉` 品種。試驗所使用的農桿菌品系為 LBA4404，攜帶 pBI121 質體。質體上構築有胭脂鹼合成酶基因之啟動子(*nopaline synthase gene / nos*)驅動抗抗生素基因新黴素磷酸轉移酶基因(*neomycin phosphotransferase gene / npt II*)與 *nos* 終止子。質體含有以花椰菜嵌紋病毒(*cauliflower mosaic virus / CaMV*) 35S 啟動子驅動 β-葡萄糖苷酸酶報導基因(*β-glucuronidase gene / gus or uidA*) 及 *nos* 終止子。

二、試驗方法

(一)農桿菌感染目標組織

選取新鮮、外型完整無缺陷的`黑葉`青蔥種子，以 75%的酒精充分滌洗 20 秒。經一次蒸餾水沖洗 3 次後，加入 1 倍稀釋的市售漂白水(成分為

3%次氯酸鈉)，並添加適量的 Tween-20 展著劑，震盪殺菌 20 分鐘。接著在無菌操作台內將種子以無菌蒸餾水沖洗浸泡 3 次，每次 10 分鐘。表面滅菌後播種於含有 30 g L⁻¹蔗糖及 8 g L⁻¹洋菜的半量 MS 培養基上。於 25°C 黑暗中培養所獲的實生小苗為材料，依循 Kim 與 Soh (1996) (以下稱途徑 1)、Lee 與 Ono (1999) (以下稱途徑 2)，以及盛等 (2004) (以下稱途徑 3) 的青蔥組織培養再生報告記載的操作流程與培養基配方，經誘導 4 或 7 週後所得之癒合組織用於農桿菌感染。各途徑的培植體選用及癒合組織誘導培養基配方分述如下。

途徑 1: 修改自 Kim 與 Soh (1996)。將播種後 3~4 天發芽蔥苗去除葉身及根尖，僅切取 1 cm 長的中段胚根培養於含有 1 mg L⁻¹ 2,4-D、30 g L⁻¹ 蔗糖、8 g L⁻¹ 洋菜的 MS 培養基 (Sigma, M5524)，pH 值為 5.7。於 25°C 黑暗中培養，於第 4 週時進行一次繼代，總共培養 49 天 (7 週)。

途徑 2: 修改自 Lee 與 Ono (1999)。將播種後 5~6 天，長約 1.5 cm 的蔥苗以解剖刀分切成葉身、葉身帶莖盤、胚根三段，平均每段約 5 mm 長。培養在添加 0.1 mg L⁻¹ 2,4-D、30 g L⁻¹ 蔗糖、4 g L⁻¹ 水晶洋菜 (Gelrite) 的 MS 培養基 (Sigma, M0404 含維他命)，培養 28 天 (4 週)。

途徑 3: 修改自盛等 (2004)。播種 3~4 天胚根萌發 1 cm 長時，直接將蔥苗全株 (特別是莖盤部位) 埋入含有 1 mg L⁻¹ 2,4-D、1 mg L⁻¹ BA、30 g L⁻¹ 蔗糖、8 g L⁻¹ 洋菜的 MS 培養基 (Sigma, M5524)。總培養時間為 28 天 (4 週)。途徑 2、3 的培養基 pH 值及環境條件皆與途徑 1 相同。誘導過程均不予繼代。

(二) 農桿菌感染與共培養

挑取單一農桿菌菌落，置於含 100 mg L⁻¹ streptomycin 及 50 mg L⁻¹ kanamycin 之 Luria-Bertani (LB) 液態培養基中。於 28.5°C，150 rpm 搖動培養 48~72 小時後，取部份菌液以光電比色計判定吸光值 OD₆₀₀ 為 0.8 至 1.0 時，用以感染。感染前，取 1 mL 菌液於常溫下，以 4500 rpm 高速離心 10 分鐘。去除上清液後，以含 20 g L⁻¹ 蔗糖，pH 5.4 的等量液態癒合組織誘導培養基回溶。之後將回溶菌液與前述培養基於無菌培養皿中以 1:9 的比例混合，並添加 100 μM 的 acetosyringone (AS)。

在農桿菌感染前，將途徑 2 由葉片基部形成的癒合組織，及途徑 3 從莖基盤部位膨大的癒合組織以解剖刀自植株或葉片上切取下。其中途徑 3 誘得之癒合組織，著生有少數不定類芽鞘組織。因此比較類芽鞘組織切除與否對於共培養後第 5

週培植體的擬轉殖枝梢分化率影響。以較佳的切除方式供作後續試驗使用。切除策略可分成三種。第一種為完整摘除癒合組織上的類芽鞘組織。第二種方式亦為完整切除類芽鞘組織，但用於共培養後滅除農桿菌的殺菌液 (含 1000 mg L⁻¹ carbenicillin、pH 5.7 的液態癒合組織誘導培養基) 增加兩倍體積 (40 mL)，並以無菌水二度洗滌。第三種為切除類芽鞘組織長度的一半，以抑制其萌發。

隨後將組織浸泡於含農桿菌及 AS 的液態癒合組織誘導培養基，感染 5 分鐘。再以無菌紙巾吸除多餘菌液。之後繼代至添加洋菜的前述培養基中。於 25°C 黑暗中共同培養 3 天後。將癒合組織以殺菌液浸泡 20 分鐘，以去除殘存農桿菌，最後以無菌紙巾吸乾。

為測試較適之青蔥轉殖後組織培養再生平台。因此評估前述三種不同組培途徑經農桿菌感染與低濃度抗生素 (10 mg L⁻¹ G418) 篩選 7 週後的枝梢分化情況，及抗生素長期篩選後的植株再生率。以試驗表現較佳的途徑作為本轉殖系統的操作平台。

(三) 轉殖後植株再生與抗生素篩選

1. 枝梢誘導及發根培養基配方

途徑 1 以含有 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D 及 BA 的 MS 培養基誘導產生綠色癒合組織。接著運用低濃度 2,4-D (0.1 mg L⁻¹) 的液態 MS 培養基，懸浮培養獲得原胚。再去除生長調節劑使體胚成熟。最終以固態 MS 培養基促使植株再生。

途徑 2 以不添加植物生長調節劑的 MS 培養基 (含維他命) 誘導產生枝梢，接著形成完整植株。

途徑 3 以含 1 mg L⁻¹ BA、0.5 mg L⁻¹ NAA 的 MS 培養基誘導出枝梢，再以不含生長調節劑的 MS 培養基誘導發根。以上各培養階段配方之蔗糖 (30 g L⁻¹)、洋菜 (8 g L⁻¹) (途徑 2 為 4 g L⁻¹ 水晶洋菜) 及 pH (5.7) 皆相同。枝梢誘導及發根階段的培養環境為光強度 60 μmol m⁻² s⁻¹，光週期 D/N=16/8 小時，日夜溫 25/23°C。

2. 抗生素篩選與植株再生

共培養後將培植體繼代於添加 10 g L⁻¹ 蔗糖、500 mg L⁻¹ carbenicillin、10 mg L⁻¹ G418、7 g L⁻¹ 洋菜，pH 5.7 的癒合組織誘導培養基上，於 25°C 黑暗中培養 7 天。之後提高蔗糖 (30 g L⁻¹) 及洋菜 (8 g L⁻¹) 濃度再篩選 14 天後，進入枝梢誘導階段篩選。

枝梢誘導階段篩選策略設計可分成 1 至 4 階段篩選流程。1 階段篩選流程包括以 25 mg L⁻¹ 或 50 mg L⁻¹ G418 篩選 30~120 天 (表 1，篩選流程

C-1、C-2、D、E)。2 階段篩選流程包含以 10 mg L⁻¹ G418 篩選 30 天，再以 50 mg L⁻¹ G418 篩選 60 或 90 天(表 1, 篩選流程 B-1、B-2)。3 階段篩選為使用 10 mg L⁻¹、50 mg L⁻¹ 及 80 mg L⁻¹ G418 各篩選 30 天(表 1, 篩選流程 A-1)。以及運用 10 mg L⁻¹、50 mg L⁻¹、80 mg L⁻¹ 及 50 mg L⁻¹ G418 各篩選 30 天的 4 階段篩選流程(表 1, 篩選流程 A-2)。另設提早篩選組為共培養後 7 天內不予篩選，之後以含有 30 mg L⁻¹ G418 的癒合組織誘導培養基篩選 50 天，方以相同篩選濃度誘導枝梢產生(表 1, 篩選流程 E)。

為使擬轉殖組織能夠大量增殖。癒合組織轉綠之際(約共培養後 4~5 週)及形成叢生枝梢團，平均枝梢長 1~3 cm 時(約為共培養後 10~11 週)。將培植體以解剖刀對半剖切後繼代培養。剖切前枝梢誘導培養基的抗生素濃度為 10 或 30 mg L⁻¹ G418，剖切後培養基所含的抗生素濃度為 30 或 50 mg L⁻¹ G418。評估不同剖切時間點及抗生素篩選濃度對於剖切後第 3 週培植體增殖的影響。

最後在發根階段評估抗生素篩選(表 1, 篩選流程 A-1、B-1、C-1)或不篩選策略(表 1, 篩選流程 A-2、B-2、C-2、D、E)對於枝梢發根率之影響。

表 1 G418 施用濃度、模式及時間

Table 1 G418 concentration (mg L⁻¹), mode and time of application.

篩選 流程 Selection schemes	枝梢再生 Shoot regeneration				發根 Root regeneration		
	carbenicillin conc. (mg L ⁻¹)				carbenicillin conc. (mg L ⁻¹)		
	500				500		250
	G418 conc. (mg L ⁻¹)				G418 conc. (mg L ⁻¹)		
	10	25	30	50	80	50	0
A-1	<i>30</i> ^a		30	30		60	30
A-2	30		30	30	30		45
B-1	30		60			30	30
B-2	30		90				45
C-1			90			30	30
C-2			120				45
D	90						45
E ^b			30				

^a 斜體數字表示篩選天數。

^a Italic number indicate selection days.

^b 早期篩選流程: 第 1 週培養在不含 G418 的癒合組織誘導培養基，之後轉移癒合組織至添加 30 mg L⁻¹ G418 的新癒合組織誘導培養基另篩選 50 天後，具 G418 抗性組織繼代至含有 30 mg L⁻¹ G418 枝梢再生培養基 30 天。

^b Early selection scheme: The callus induction medium was used at the first week without G418, and then, the callus were transferred to the new

callus induction medium supplemented with 30 mg L⁻¹ of G418 for another 50 days, the G418-resistant callus were subcultured to shoot regeneration medium containing 30 mg L⁻¹ of G418 for 30 days.

結果

一、三種青蔥組織培養再生流程經轉殖篩選後之再生能力評估

途徑 1 是以胚根為培植體，培養在癒合組織誘導培養基於黑暗下 7 週後，可誘得外形呈條狀，組織鬆散質軟，色淡黃至偏白的癒合組織(圖 1a)。

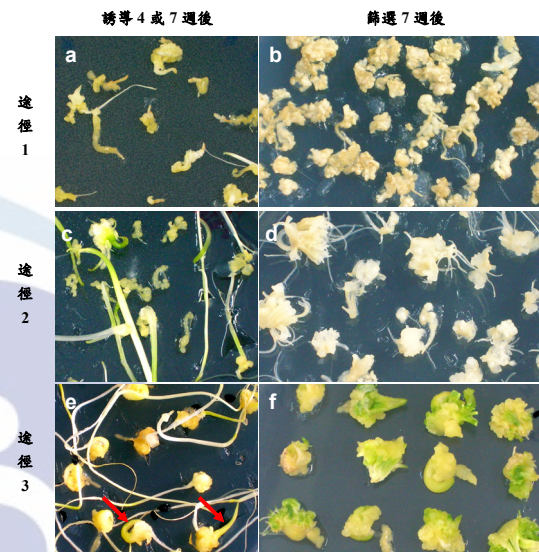


圖 1 不同組織培養途徑誘導 4 或 7 週之癒合組織(a、c、e)及轉殖組織在含有 10 mg L⁻¹ G418 的篩選培養基培養 7 週之形態(b、d、f)。

Fig. 1 The morphology of callus was induced by different *in vitro* culture protocol after 4 or 7 weeks (a, c, e) and transformed callus after 7 weeks on selection medium containing 10 mg L⁻¹ of G418 (b, d, f).

本流程共獲得 592 個癒合組織(表 2)。經農桿菌感染及共培養後，以添加 10 mg L⁻¹ G418 的癒合組織誘導培養基，及枝梢誘導培養基再篩選 7 週。結果顯示，癒合組織日漸白化，最終失去活性無法再生植株(表 2、圖 1b)。在途徑 2 方面，以葉身、葉身含莖盤，及胚根三部分為培植體。4 週後，可獲得外形呈顆粒狀或瓣狀，組織鬆散淡黃色的癒合組織(圖 1c)。此部份共誘導出 32 個癒合組織(表 2)。經 7 週篩選後，癒合組織趨於白化，活力殆喪無法再生植株(表 2、圖 1d)。於途徑三，將全株小苗埋入癒合組織誘導培養基中。4 週後，

在偽莖基部的莖盤(disc)部位，可產生球狀外形，組織緊實質硬，鵝黃色的癒合組織(圖 1e)。由於該流程的癒合組織誘導效率較高，因此獲得 1530 個癒合組織(表 2)。經農桿菌共培養及篩選後，可成功再生枝梢(圖 1f)。多次繼代培養後，會形成叢生枝梢團。經不同操作程序後(表 3)，可獲得 73 個再分化枝梢之癒合組織，平均枝梢再生率為 4.8% (表 2)。

表 2 組織培養流程對共培養第 7 週後培植體擬轉殖枝梢再生率之影響

Table 2 Effects of *in vitro* culture protocol on percentage of explants regenerating putative transformed shoots in the seventh weeks after co-cultivation.

流程 Protocol	感染癒合組織數(A) No. of infected callus (A)	再分化枝梢之癒合組織數(B) No. of regenerating shoots of callus (B)	枝梢再生率 ^a (B / A, %) Percentage of regenerating shoots ^a (B / A, %)
途徑 1 Kim and Soh (1996)	592	0	0
途徑 2 Lee and Ono (1999)	32	0	0
途徑 3 盛等(2004)	1530	73	4.8

^a 再生率 = [再分化枝梢的癒合組織數(B) / 農桿菌感染之癒合組織總數(A)] × 100

^a Regeneration efficiency = [No. of regenerating shoots of callus (B) / total No. of infected callus (A)] × 100

比較不同再生流程經農桿菌感染、低濃度抗生素篩選 7 週，及長期篩選後的植株再生率等生育結果顯示，應以途徑 3 為較適之青蔥組培再生流程，因此本文後續試驗皆採此途徑進行。

二、切除癒合組織上之不定類芽鞘組織對擬轉殖枝梢再生的影響

在農桿菌感染前，需將著生在小苗上的球狀癒合組織切取下。由於部分癒合組織上帶有不定類芽鞘組織(圖 1e；箭頭指處)。因此，本試驗探討該不定類芽鞘組織(或綠色組織)切除與否，對農桿菌共培養與篩選後的擬轉殖枝梢再生影響。結果顯示，完全切除培植體上所有不定類芽鞘組織。經 21 天暗培養及篩選後，繼代至枝梢誘導培養基該刻，可觀察發現癒合組織大量白化死亡。共培養後第 5 週，組織白化率達 83.8% (表 3, 策略 A)。見光培養 2 週後，癒合組織可分化出枝梢。149 個黃色癒合組織中，僅 12 個能夠產生枝梢。再生率偏低，僅 8.1% (表 3, 策略 A)。若將不定類芽鞘組織切除，但提高兩倍感染後清洗癒合組織的液態殺菌培養基體積，再經無菌水二度洗滌

後，可明顯減少組織白化情形，白化率降至 54.8%。但仍然無法提高枝梢再生率(表 3, 策略 B)。策略 C 採取保留不具生長能力的類芽鞘組織(自芽鞘頂端往下計，切除類芽鞘組織長度的一半，以抑制其再萌發抽長的能力)。結果顯示，此策略可有效防止癒合組織白化發生。在參試樣本中並無任何組織白化。172 個癒合組織中，59 個可產生枝梢。枝梢再生率達 34.3%，是移除所有綠色組織策略的 4.2 倍(表 3)。

表 3 切除癒合組織上之不定類芽鞘組織對共培養第 5 週後培植體擬轉殖枝梢再生率之影響

Table 3 Effects of excising adventitious coleoptile-like tissue from callus on percentage of explants regenerating putative transformed shoots in the fifth weeks after co-cultivation.

策略 ^a Strategy ^a	農桿菌感染癒合組織數(A) No. of callus infected (A)	黃色癒合組織數(B) No. of yellow callus (B)	再分化枝梢之癒合組織數(C) No. of regenerating shoots of callus (C)	組織白化率 ^b [(A-B) / A, %] Percentage of white callus ^b [(A-B) / A, %]	枝梢再生率 ^c (C / B, %) Percentage of regenerating shoots ^c (C / B, %)
A	918	149	12	83.8	8.1
B	440	199	2	54.8	1.0
C	172	172	59	0.0	34.3

^a 策略 A: 農桿菌感染前完全切除癒合組織上的不定類芽鞘組織組織; 策略 B: 農桿菌感染前完全切除癒合組織上的不定類芽鞘組織組織，共培養後以含有 1000 mg L⁻¹ carbenicillin 的兩倍體積 wash 培養基洗滌，並以無菌水沖洗兩次; 策略 C: 農桿菌感染前切除癒合組織上一半長度的不定類芽鞘組織。

^b 組織白化率 = [經農桿菌感染之癒合組織數(A) - 黃色癒合組織數(B)] / 經農桿菌感染之癒合組織數(A) × 100

^c 枝梢再生率 = [再分化枝梢的癒合組織數(C) / 黃色癒合組織數(B)] × 100

^a Strategy A: adventitious coleoptile-like tissue were completely excised from callus before Agro-infection. Strategy B: adventitious coleoptile-like tissue were completely excised from callus. After co-cultivation, the callus were washed in two-fold volume of wash medium containing 1000 mg L⁻¹ carbenicillin, and then rinsed two times sterile distilled water. Strategy C: excising half length of adventitious coleoptile-like tissue from callus before Agro-infection.

^b Percentage of white callus = [total No. of infected callus (A) - No. of yellow callus (B)] / total No. of infected callus (A) × 100

^c Percentage of regenerating shoots = [No. of regenerating shoots of callus (C) / No. of yellow callus (B)] × 100

三、剖切培植體對共培養後增殖之影響

為提高擬轉殖組織的增殖效率，本試驗於不同培植體發育階段，將培植體剖切後培養，觀察其對於培植體增殖之影響。結果如表 4 及圖 2 所示。若於癒合組織產生葉綠素之際(轉綠期)進行剖切，經繼代至含 30 mg L⁻¹ G418 的相同培養基 3 週後，組織仍可持續發育膨大(圖 2a)。35 個剖切後培植體中，僅 1 個會朝向絨狀根分化，發生率極低，僅 2.9% (表 4, 策略 A)。但延至叢生枝梢團形成後再剖切者，則極易誘發生絨狀根分化。比率約在 28.6%~47.3%間，是轉綠期剖切者的 9.9~16.3 倍之高。且絨狀根的發生似能阻礙枝梢生長。一旦培植體轉向絨狀根發生者，其枝梢都無法再抽長及分化，最終培植體會完全趨向絨狀根分化(表 4, 策略 B、C、D；圖 2b、c)。

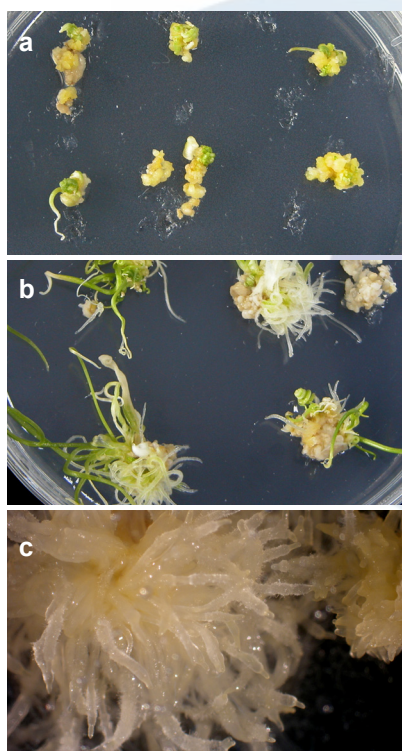


圖 2 剖切癒合組織導致絨狀根形成。a: 在綠色癒合組織階段剖切，培植體可保持正常生長；b~c: 在枝梢團階段剖切導致絨狀根形成。

Fig. 2 Bisecting callus resulted in fluffy root formation. a: Bisecting explant could remain growth normally at green callus stage. b~c: Bisecting resulted in fluffy root formation at shoot clumps stage.

表 4 癒合組織剖切對共培養第三週後培植體絨狀根形成之影響

Table 4 Effects of bisecting callus on fluffy root formation of explant in the third weeks after co-cultivation.

策略 Strategy	剖切時間點 Bisecting time of application	枝梢誘導培養基 G418 濃度(mg L ⁻¹) G418 concentration (mg L ⁻¹) of shoot induction medium		剖切後培植 體總數(A) No. of explant after bisecting (A)	產生絨狀根 之培植體數 (B) No. of explant with fluffy root (B)	絨狀根發生 率 ^a (B/A, %) Formation rate of explant with fluffy root ^a (B/A, %)
		剖切前 Before bisected	剖切後 After bisected			
		A	癒合組織產 生葉綠素 green callus			
B		10	30	63	18	28.6
C	形成枝梢團 shoot clumps	30	30	32	13	40.6
D		30	50	74	35	47.3

^a 絨狀根發生率 = [產生絨狀根之培植體(B) / 剖切後之培植體數(A)] × 100

^a Formation rate of explant with fluffy root = [No. of explant with fluffy root (B) / No. of explant after bisecting (A)] × 100

此外，絨狀根分化率似乎與培養基所含篩選抗生素之濃度呈梯度關係。培養在 10 mg L⁻¹ G418 培養基上的培植體，剖切後繼代到含有 30 mg L⁻¹ G418 的培養基上，3 週後絨狀根分化率為 28.6% (表 4, 策略 B)。剖切前後皆為 30 mg L⁻¹ G418 者，絨狀根分化率較低濃度起始者為高(40.6%) (表 4, 策略 C)。剖切前為 30 mg L⁻¹ G418，剖切後提高至 50 mg L⁻¹ G418 的策略 D，絨狀根分化率更達 47.3%，是低濃度培養者的 1.7 倍(表 4, 策略 B)。

四、抗生素篩選策略對擬轉殖枝梢發根之影響

抗生素與青蔥枝梢團發根關係如表 4 所示。將枝梢團繼代於含 50 mg L⁻¹ 或 80 mg L⁻¹ G418 (carbenicillin 皆為 500 mg L⁻¹) 的發根培養基 30 或 60 天。結果顯示，凡發根培養基中含有 G418 者，此時皆無法發根，且枝梢無法持續發育抽長(表 5, 流程 A-1、B-1、C-1；圖 3a)。直接繼代於不含 G418 的發根培養基(carbenicillin 為 250 mg L⁻¹) 45 天後，可順利產生完整根群。發根率在 57.6%至 88.9%間，平均發根率為 78%。且伴隨根系之發育，枝梢可持續抽長健壯(表 5, 流程 A-2、B-2、C-2、D；圖 3b)。

將流程 A-1、B-1、C-1 無法發根的枝梢團重新繼代於前述培養基時，對此發根抑制效應具有部分的可逆性。亦即曾於高濃度 G418 (80 mg L⁻¹) 誘導發根者，仍無法發根(表 5, A-1；圖 3c 右)。而低濃度(50 mg L⁻¹)者，則仍具根系形成能力。但發根率偏低，約在 17.5%至 25%間，平均發根率為 22.3%。(表 5, B-1、C-1；圖 3c 左、圖 3d 箭頭所指處)。採取發根階段不予篩選的平均發根率是

篩選後再去除者的 3.5 倍之高(表 4)。

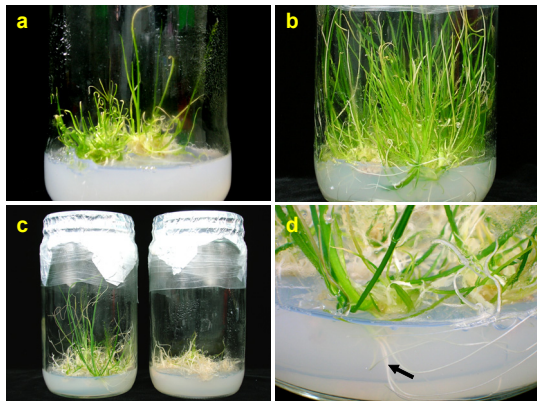


圖 3 抗生素對擬轉殖枝梢團根系形成之影響。枝梢團在含有 50 或 80 mg L⁻¹ G418 及 500 mg L⁻¹ carbenicillin 的發根培養基上無法發根(a);枝梢團在不含 G418 及減半 carbenicillin 濃度的培養基上順利發根(b);曾在添加高濃度 G418 (80 mg L⁻¹) 的培養基上誘導生根 1 個月的枝梢團,在移除培養基中的 G418 後無法發根(圖 c 右);曾在添加相對較低濃度 G418 (50 mg L⁻¹)的培養基上誘導生

根 1 個月的枝梢團,在移除培養基中的 G418 後迅速發根,但發根能力較差(圖 c 左;圖 d)。

Fig. 3 The effects of the root formation of putative transformed shoot clumps were in response to antibiotic. Shoot clumps failed to root on rooting medium containing 50 or 80 mg L⁻¹ G418 and 500 mg L⁻¹ carbenicillin (a), Shoot clumps rooted successfully on the medium without G418 and the carbenicillin concentration was reduced by half (b), Shoot clumps rooted on medium supplemented with high concentration of G418 (80 mg L⁻¹) for 1 month and failed to root when G418 was removed from the medium (c, right), Shoot clumps rooted on medium supplemented with relatively low concentrations of G418 (50 mg L⁻¹) for 1 month and rooted readily when G418 was removed from the medium, but exhibited poor rooting ability (c, left ; d).

表 5 篩選策略對擬轉殖枝梢團發根率之影響

Table 5 Effects of selection strategies on rooting efficiency of putative transformed shoot clumps.

篩選 流程 Selection schemes	枝梢誘導及再生 Shoot induction and elongation						發根誘導及再生 Root induction and elongation			發根誘導 之枝梢團 數(A) No. of shoot clumps (A)	發根枝梢 團數(B) No. of rooted shoot clumps (B)	枝梢團 發根率 ^c (B / A, %) Rooting efficiency (B / A, %)
	carbenicillin conc. (mg L ⁻¹)						carbenicillin conc. (mg L ⁻¹)					
	500						500 250					
	G418 conc. (mg L ⁻¹)						G418 conc. (mg L ⁻¹)					
	10	25	30	50	80	50	80	50	0			
A-1	<i>30</i> ^a			<i>30</i>	<i>30</i>		<i>60</i>	<i>30</i>		111	0	0.0
A-2	<i>30</i>			<i>30</i>	<i>30</i>	<i>30</i>			<i>45</i>	33	19	57.6
B-1	<i>30</i>			<i>60</i>			<i>30</i>	<i>30</i>		40	7	17.5
B-2	<i>30</i>			<i>90</i>					<i>45</i>	18	16	88.9
C-1				<i>90</i>			<i>30</i>	<i>30</i>		4	1	25.0
C-2				<i>120</i>					<i>45</i>	7	6	85.7
D		<i>90</i>							<i>45</i>	20	16	80.0
E ^b			<i>30</i>							0	0	0.0
合計或平均值										233	65	27.9

^a 斜體數字表示篩選天數。

^a Italic number indicate selection days.

^b 提早篩選流程: 第 1 週培養在不含 G418 的癒合組織誘導培養基, 之後轉移癒合組織至添加 30 mg L⁻¹ G418 新的癒合組織誘導培養基另 篩選 50 天後, 具 G418 抗性組織繼代至含有 30 mg L⁻¹ G418 枝梢誘導培養基 30 天。

^b Early selection scheme: The callus induction medium used at the first week without G418, and then, the callus were transferred to the new callus induction medium supplemented with 30 mg L⁻¹ of G418 for another 50 days, the G418-resistant callus were subcultured to shoot induction medium containing 30 mg L⁻¹ of G418 for 30 days.

^c 發根率= [發根枝梢團數(A) / 枝梢團數(B)] × 100

^c Rooting efficiency= [No. of rooted shoot clumps (A) / No. of shoot clumps (B)] × 100

討 論

一、三種青蔥組織培養再生流程經轉殖篩選後之再生能力評估

不同流程誘得之癒合組織，經農桿菌感染和低濃度 G418 (10 mg L^{-1}) 篩選 7 週後的外觀形態，結果發現途徑 1、2 皆呈現鬆散偏白的質地色澤，最終皆無法再生植株；只有途徑 3 能獲得緊實鵝黃色的癒合組織，並能再生完整植株(圖 1、表 2)。顯示組織的質地及色澤與日後再生可能具有的關聯性，紮實偏黃的組織一般都被認為是具有再生能力的組織。一些學者曾提出相似的報導。Van der Valk 等(1992)利用青蔥成熟胚可誘得水浸狀易碎型(watery and friable type)以及乾燥緊實型(dry, compact and lobate type)兩種不同形態的癒合組織，其中以緊實型再生能力較高。Lee 與 Ono (2000)報導青蔥的白色癒合組織無法進行形態分化再生植株。Aswath 等(2006)轉殖洋蔥時，只使用緊實型(compact type)的癒合組織，白色結節型(white and nodular type)和水浸狀透明型(watery and transparent type)的癒合組織則俾棄不用。

因考量途徑 1 原始報告以小花蕾作為培植體，易受季節氣候影響取得不易，及田間材料污染率偏高等因素。故本試驗改切取無菌播種小苗的胚根進行癒合組織誘導。雖使用胚根作為培植體已在青蔥組織培養(Shahin and Kaneko, 1986)及洋蔥(Aswath *et al.*, 2006)和大蒜(Zheng *et al.*, 2004)的轉殖上，成功獲得再生植株。然而，途徑 1 的配方起初並非為胚根培植體再生所設計，不同培植體對培養基配方可能會有不同的反應。推測這可能是造成該途徑無法再生的原因之一。

途徑 3 為參試流程中唯一能再生植株者(表 2)。其利用無菌播種苗株誘導癒合組織，具備轉殖材料週年可得的優勢。此外，該途徑擁有良好的再生效率，八成以上的癒合組織都可分化枝梢。且再生週期只需 4 個月，經過癒合組織誘導、枝梢再生和發根三階段共三種培養基更換(盛等, 2004)，操作十分簡捷。基於前述優點，因此本試驗以途徑 3 的青蔥組織培養再生流程為基礎，結合農桿菌基因轉移技術及抗生素篩選程序，作為青蔥轉殖的操作平台。

二、切除癒合組織上之不定類芽鞘組織對擬轉殖枝梢再生的影響

農桿菌感染前，完全移除癒合組織上的不定類芽鞘組織，會造成光照培養該刻的組織大量白

化死亡，且不易再分化出枝梢(表 3, 處理 A)。若增加共培養後的液態殺菌培養基體積，配合無菌水多次清洗培植體後，可明顯減低組織白化率(表 3, 處理 B)。顯示培植體上殘存的農桿菌對於日後癒合組織白化具一定程度的影響。然而這項處理，卻對枝梢再生並無助益(表 3, 處理 B)。留存不具生長能力的綠色組織可解除白化現象發生，並增加後續的枝梢再生率(表 3, 處理 C)。這暗示癒合組織的存活及分化主要是與所留存的類芽鞘組織關係密切，適度保留類芽鞘組織有利於枝梢的正常分化。

三、剖切培植體對共培養後增殖之影響

癒合組織在產生葉綠素之際予以剖切，經繼代培養後可持續發育膨大，絨狀根發生率低(表 4, 處理 A；圖 2a)。但延至形成叢生枝梢團後再予剖切，則極易誘發生絨狀根分化(表 4, 處理 B~D；圖 2b、c)。顯示絨狀根的表現與施行剖切時的培植體發育程度有關。由組織轉向根分化的情形亦曾在韭菜的轉殖上報導。經抗生素篩選後的韭菜未熟胚組織，轉移到枝梢誘導培養基後，會產生帶有大量毛絨狀蓬鬆根毛的根狀結構(Eady *et al.*, 2005)。

在組織培養上，培植體的形態分化主要是受到培養基中的植物生長調節劑種類及濃度所影響。生長素(auxin)與細胞分裂素(cytokinins)兩者濃度比值低時，會趨向芽體發生(郭等, 2004)。雖本試驗的枝梢誘導培養基中，auxin 與 cytokinins 的濃度比值符合枝梢分化條件，但培植體在剖切後卻依然轉向絨狀根分化。值得注意的是，未經剖切處理者卻不會產生這種絨狀根(結果未呈現)。顯示絨狀根的發生與剖切具有關聯性。Holford 與 Newbury (1992)發現用於去除農桿菌的 carbenicillin 抗生素其分解後能夠提供苯乙酸(phenylacetic acid / PAA)的生理活性。由此推測，剖切可能會增加培植體對於生長素及其類似生理活性物質之吸收與積累，因而導致濃度平衡發生改變。因此，欲利用剖切培植體增殖再生的數量需注意分切的時機。

有趣的是，絨狀根的發生似乎具有阻礙枝梢生長的趨勢，最終培植體會完全導向絨狀根分化(圖 2b、c)。類似的報導如青蔥懸浮培養細胞團，繼代到再生培養基後，會形成長綠芽和長根兩種癒合組織。這種長根的癒合組織在轉移到不含生長調節劑的培養基後，只會繼續長根(Song and Peffley, 1994)。至於絨狀根的分化率伴隨培養基所含的篩選性抗生素濃度提高而攀升的原因尚不清楚，仍待進一步研究。

四、抗生素篩選策略對擬轉殖枝梢發根之影響

經篩選的枝梢團，繼代至不含任何植物生長調節劑的發根培養基誘導發根，以進一步誘導根系產生。本試驗循多數轉殖報告慣行流程，在此階段持續對枝梢團篩選。初步試驗結果發現，枝梢團繼代於發根培養基經長期培養後，無法再生根群。且生長逐漸衰弱，最後死亡(結果未呈現)。對照本試驗採用的原始組織培養報告(盛等, 2004)，則未見有關於此問題之相關論述。因此，本試驗假設發根階段所額外施加的篩選性抗生素(G418)可能是影響的因子之一。

不同篩選流程所獲的枝梢團，在含有50 mg L⁻¹或80 mg L⁻¹ G418的發根培養基培養30-60天後，均無法發根(表5, 流程A-1、B-1、C-1; 圖3a)。良好的發根率被認為是影響轉殖植物再生效率的重要因子之一(Cardoza and Stewart, 2003)。但發根不易或不發根的現象，卻是許多研究者所經常碰到的一項難題。這在油菜(Cardoza and Stewart, 2003; Fry *et al.*, 1987)、苜蓿(Crane *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2004)、草莓(Nehra *et al.*, 1990a; 1990b)、水稻(Lucca *et al.*, 2001)及文心蘭(You *et al.*, 2003)的轉殖上都曾報導。學者們突破困境的方法則不盡相同。像是芽鞘基部沾著發根粉(Crane *et al.*, 2006)、發根培養基中添加BA (Joersbo *et al.*, 1998)、發根培養基中添加NAA及kinetin (Gonzalez-Padilla *et al.*, 2003)。更值得注意的報導則是，去除發根培養基中的篩選藥劑。如去除氨基糖苷類抗生素的kanamycin (Moloney *et al.*, 1989; Nehra *et al.*, 1990a; 1990b)。去除氨基環醇類抗生素的hygromycin (You *et al.*, 2003)。以及去除用於正向篩選的mannose (Lucca *et al.*, 2001)。這些訊息意味著篩選藥劑對部份作物的根系重建可能有不利的影響。

將青蔥枝梢團直接培養在不含G418及250 mg L⁻¹ carbenicillin的發根培養基上。結果顯示，枝梢團可順利發根(表5, 流程A-2、B-2、C-2、D)。此與前述的氨基糖苷類抗生素會抑制或降低發根率的報導極為類似，都呈現出抗生素的去除是發根與否的關鍵。這可能是因該作物的根系形成對於篩選藥劑較為敏感所致(Lucca *et al.*, 2001; Nehra *et al.*, 1990a)。儘管“發根篩選”目前已廣泛在蔥屬作物轉殖上使用。反觀，去除發根培養基中的篩選藥劑的流程也會在大蒜轉殖上施行(Park *et al.*, 2002)。顯示發根階段的抗生素篩選並非絕對必要。

不同篩選流程對發根率的影響方面。於枝梢誘導階段，總篩選週期皆為120天的流程A-2、

B-2、C-2，其發根率卻大不相同(表5)。採取50 mg L⁻¹ G418篩選120天的1階段篩選濃度(表5, 流程C-2)，以及10 mg L⁻¹ G418篩選30天，之後再以50 mg L⁻¹ G418篩選90天的2階段篩選濃度(表5, 流程B-2)，發根率皆在85.7%及88.9%間(表5)。此外，以25 mg L⁻¹ G418篩選90天的1階段篩選濃度，發根率也在八成左右(表5, 流程D)。但採取10 mg L⁻¹、50 mg L⁻¹、80 mg L⁻¹及50 mg L⁻¹ G418各篩選30天的4階段篩選濃度，發根率卻只有57.6% (表5, 處理A-2)。顯示枝梢誘導階段的篩選流程與時間並不影響根系形成與否，但過於冗雜的篩選篩流程可能不利於根系產生。若將無法發根的枝梢團重新繼代於不含G418的培養基時。發根階段曾於高濃度G418 (80 mg L⁻¹)長期篩選者，仍無法發根(表5, 流程A-1)。以低濃度者(50 mg L⁻¹)短期篩選者，仍具17.5%至25%間的發根率(表5, 流程B-1、C-1)。因此推測，高濃度抗生素可能在培植體內產生累積，進而對於根系再生造成不良的影響。

結 論

農桿菌轉殖及抗生素篩選等因子明顯影響青蔥的組織培養再生。感染目標組織的質地色澤可作為判斷植株能否再生的粗略指標，建議採用鵝黃色、緊實的球狀型癒合組織進行轉殖。感染前，切除該組織上一半長度的芽鞘；以及在組織轉綠時予以剖切培養，皆有助於擬轉殖枝梢的正常分化。篩選抗生素(G418)是影響枝梢發根與否的關鍵。解除篩選壓力並降低 carbenicillin 濃度是克服發根困境的有效策略。利用前述方法可使青蔥於轉殖後順利再生擬轉殖株。

參考文獻

- 行政院農業委員會。2008。農業統計年報。行政院農業委員會統計處。
- 林慶元、呂文通。1991。利用蟲生真菌(黑殭菌)防治青蔥甜菜夜蛾。花蓮區農業改良場研究彙報 7: 127-130。
- 盛艷萍、楊建平、齊憲磊、張松、姜璐琰。2004。大蔥成熟胚離體培養植株再生。生物技術 14: 54-55。
- 郭昭麟、羅淑芳、李鎮宇、蔡新聲。2004。植物組織培養再生技術與基因轉殖。pp.25-46。刊於：植物基因轉殖之原理與應用。植物生物技術教學資源中心。台中。

- 楊宏瑛。2006。蔥。台灣農家要覽農作篇(二)。pp.345-348。豐年社。台北。
- Aswath, C. R., S. Y. Mo, D. H. Kim, and S. W. Park. 2006. *Agrobacterium* and biolistic transformation of onion using non-antibiotic selection marker phosphomannose isomerase. *Plant Cell Rep.* 25: 92-99.
- Cardoza, V. and C. N. Stewart. 2003. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. *Plant Cell Rep.* 21: 599-604.
- Crane, C., E. Wright, R. A. Dixon, and Z. Y. Wang. 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 223: 1344-1354.
- Dong, N., J. Hubstenberger, and G. C. Phillips. 1997. Apparent transformation of *Allium fistulosum* suspension cultures by *Agrobacterium tumefaciens*. *Allium Improvement Newsletter* 7: 12-14.
- Eady, C. C., C. E. Lister, Y. Suo, and D. Schaper. 1996. Transient expression of *uidA* constructs *in vitro* onion (*Allium cepa* L.) cultures following particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. *Plant Cell Rep.* 15: 958-962.
- Eady, C. C., R. J. Weld, and C. E. Lister. 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Rep.* 19: 376-381.
- Eady, C. C., S. Davis, A. Catanach, F. Kenel, and S. Hunger. 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leek (*Allium porrum*) and garlic (*Allium sativum*). *Plant Cell Rep.* 24: 209-215.
- Fry, J., A. Barnason, and R. B. Horsch. 1987. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors. *Plant Cell Rep.* 6: 321-325.
- Gonzalez-Padilla, I. M., K. Webb, and R. Scorza. 2003. Early antibiotic selection and efficient rooting and acclimatization improve the production of transgenic plum plants (*Prunus domestica* L.). *Plant Cell Rep.* 22: 38-45.
- Holford, P. and H. J. Newbury. 1992. The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Rep.* 11: 93-96.
- Joersbo, M., I. Donaldson, J. Kreiberg, S. G. Petersen, J. Brunstedt, and F. T. Okkels. 1998. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Breed.* 4: 111-117.
- Kim, J. W. and W. Y. Soh. 1996. Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of *Allium fistulosum* L. *Plant Sci.* 114: 215-220.
- Kondo, T., H. Hasegawa, and M. Suzuki. 2000. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 19: 989-993.
- Lee, K. S. and K. Ono. 1999. Chromosomal variation in callus lines and regenerated plantlets from three cultivars of *Allium fistulosum* L. (2n=16). *Cytologia* 64: 465-478.
- Lee, K. S. and K. Ono. 2000. Somatic embryogenesis pathways in cultured *Allium fistulosum* cells. *Cytologia* 65: 343-349.
- Lucca, P., X. Ye, and I. Potrykus. 2001. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Mol. Breed.* 7: 43-49.
- Moloney, M. M., J. M. Walker, and K. K. Sharma. 1989. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Rep.* 8: 238-242.
- Nehra, N. S., R. N. Chibbar, K. K. Kartha, R. S. S. Datla, W. L. Crosby, and C. Stushnoff. 1990a. *Agrobacterium*-mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 9: 10-13.
- Nehra, N. S., R. N. Chibbar, K. K. Kartha, R. S. S. Datla, W. L. Crosby, and C. Stushnoff. 1990b. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep.* 9: 293-298.
- Park, M., N. Yi, H. Lee, S. Kim, M. Kim, J. Park, J. Kim, J. Lee, J. Cheong, and Y. Choi. 2002. Generation of chlorosulfuron-resistant transgenic garlic plants (*Allium sativum* L.) by particle bombardment. *Mol. Breed.* 9: 171-181.

- Peffley, E. B. M. A. Hart, T. A. Wheeler, Z. Xiang, A. El-Sharif, N. Dong, and G. C. Phillips. 1995. Progress towards transformation of onion, *Allium cepa* and *A. fistulosum*, via particle bombardment. *Allium Improvement Newsletter* 5: 14-16.
- Shahin, E. A. and K. Kaneko. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of nonbulbing onions. *Hortsci.* 21: 294-295.
- Song, P. and E. B. Peffley. 1994. Plant regeneration from suspension cultures of *Allium fistulosum* and an *A. fistulosum* × *A. cepa* interspecific hybrid. *Plant Sci.* 98: 63-68.
- Van der Valk, P., O. E. Scholten, F. Verstappen, R. C. Jansen, and J. J. M. Dons. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 30: 181-191.
- Wijbrandi, J. and M. T. J. de Both. 1993. Temperate vegetable crops. *Sci. Hortic.* 55: 37-63.
- You, S. J., C. H. Liao, H. E. Huang, T. Y. Feng, V. Prasad, H. H. Hsiao, J. C. Lu, and M. T. Chan. 2003. Sweet pepper ferredoxin-like protein (*pflp*) gene as a novel selection marker for orchid transformation. *Planta* 217: 60-65.
- Zheng, S. J., B. Henken, Y. Ahn, F. Krens, and C. Kik. 2004. The development of a reproducible *Agrobacterium tumefaciens* transformation system for garlic (*Allium sativum* L.) and the production of transgenic garlic resistant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner). *Mol. Breed.* 14: 293-307.
- Zheng, S. J., L. Khrustaleva, B. Henken, E. Sofiari, E. Keizer, E. Jacobsen, C. Kik, and F. A. Krens. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. *Mol. Breed.* 7: 101-115.
- Zhou, X., M. B. Chandrasekharan, and T. C. Hall. 2004. High rooting frequency and functional analysis of GUS and GFP expression in transgenic *Medicago truncatula* A17. *New Phytol.* 162: 813-822.

98年7月23日投稿
98年11月20日接受