

五、生物技術之開發與應用

一 番茄抗葉霉病分子鑑定技術建立

孫永偉、周明燕、周佳霖、
張惠如、陳哲仁、鍾文全

本研究目的在開發抗葉霉病基因 *Cf-5* 與 *Cf-9* 專一性分子標誌，可輔助育種者篩選番茄抗病品種(系)及確認植株基因型。結果顯示分子標誌 *Cf5-1.5k* 可擴增 *Cf-5* 基因 1.5 kb DNA 條帶，感病與其他基因則無 DNA 條帶，可作為 *Cf-5* 專一性分子標誌(圖 5-1)。分子標誌 *Cf9-1k* 可擴增 *Cf-9* 基因 1 kb DNA 條帶，感病與其他基因則無 DNA 條帶，可作為 *Cf-9* 專一性

分子標誌(圖 5-2)。分子標誌 *Cf5/9-CAPS* 擴增之 PCR 產物，利用 *TaqI* 限制酶切反應後，*Cf-5* 基因出現 0.3 kb DNA 條帶，*Cf-9* 基因出現 0.2 kb DNA 條帶，感病品種無 DNA 條帶出現，故可同時鑑別 *Cf-5* 與 *Cf-9* 基因。引子組 AVR2-KC132845 可擴增葉霉病原菌 0.5 kb DNA 條帶，可判別植株是否感染葉霉病菌。上述分子標誌為番茄抗病育種工作者提供了有利的輔助工具，可協助育種者早期篩選抗病植株、確認抗病基因型(R/R、R/S、S/S)及病毒感染情形，提高育種效率及培育優良的抗病品種。

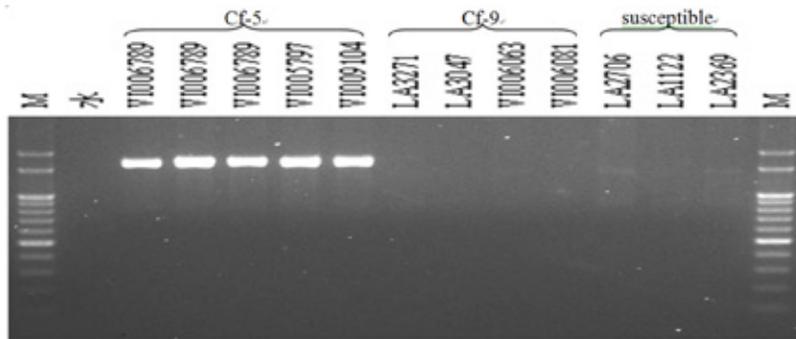


圖 5-1、利用分子標誌 *Cf5-1.5k* 檢測番茄抗感病品種之 PCR 結果。

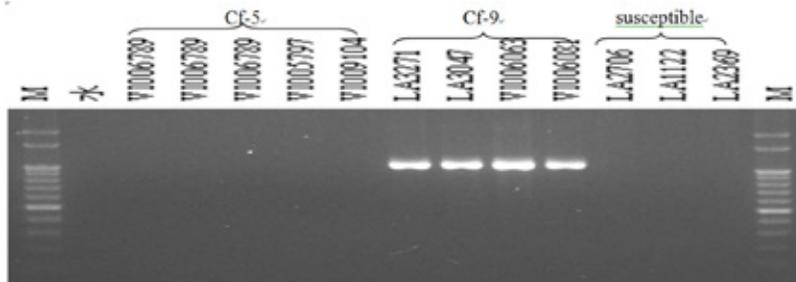


圖 5-2、利用分子標誌 *Cf9-1k* 檢測番茄抗感病品種之 PCR 結果。

二 番茄抗萎凋病與抗嵌紋病毒分子標記快速檢測技術應用

孫永偉、周佳霖、周明燕、

張惠如、陳哲仁、鍾文全

番茄萎凋病為重要真菌性病害，本試驗建立抗萎凋病基因 *I-1*、*I-2* 及 *I-3* 之分子標記。利用 I1-A12 引子組可同時擴增番茄抗病 (*I-1*) 與感病 (*i-1*) 基因 150 bp 之 DNA 條帶，進一步進行 PCR 產物解序後，於序列位置 80 出現差異點，該位置感病品種的核苷酸序列為 C，而抗病品種核苷酸序列為 G，應可作為判斷番茄抗感萎凋病基因 *I-1* 之 SNP 標誌 (圖 5-3)。利用 I2/Fu 引子組可擴增抗病基因 (*I-2*) 0.7 kb、擴增感病基因 (*i-2*) 2.3 kb 及萎凋病原菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercii*) 1.1 kb 之 DNA 條帶 (圖 5-4)。利用 I3PTG190-SCAR 引子組可擴增抗病基因 (*I-3*) 210 bp、感病基因 (*i-3*) 310 bp 之 DNA 條帶 (圖 5-5)。菸草嵌紋病毒 (TMV) 為菸草鑲嵌病毒屬 (*Tobamovirus*)，番茄三大病毒之一。本研究利用亞洲蔬菜中心提供番茄抗感病品種進行研究，本試驗針對抗病基因 (*Tm-1*、*Tm-2* 及 *Tm-2²*) 與 TMV 病毒各篩選專一性分子標記。利用 Tm1-SCAR 引子組可擴增抗病基因 (*Tm-1*) 0.8 kb、擴增感病基因 (*tm-1*) 1.3 kb 之 DNA 條帶 (圖 5-6)。利用 Tm22-SCAR 引子組可擴增 *Tm-2* 抗病基因 1.0 kb、擴增 *Tm-2²* 抗病基因 2.5 kb 與 *tm-2* 感病基因 0.4 kb 之 DNA 條帶。TMV-012 引子組可擴增嵌紋病毒株 (TMV-0、TMV-1、TMV-2) 2.2 kb 之 DNA 條帶 (圖

5-7)。上述分子標誌可協助育種者早期篩選抗病植株、確認抗感病基因型及病毒感染情形，提高育種效率。

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

1132-S-1  --GATACCTTATAGGG-CGAGCTCGGGTACC099GCAATTCGAAGCTTCGAACTCG 57
1143-S-1  -GATTAGAGCGTATAGGG-CGAGCTCGGGTACC099GCAATTCGAAGCTTCGAACTCG 58
1219-R-1  --SATTACAC--TATAGGG-CGAGCTCGGGTACC099GCAATTCGAAGCTTCGAACTCG 56
1311-R-4  GGGGTAGCAC--TATAGGGCGAGCTCGGGTACC099GCAATTCGAAGCTTCGAACTCG 58
1132-S-1  TATATTACATCGCTGATTTTCCCTTGGATCGATCTATTTGTGGAAGAAATCTCGAAA 117
1143-S-1  TATATTACACCGCTGATTTTCCCTTGGATCGATCTATTTGTGGAAGAAATCTCGAAA 118
1219-R-1  TATATTACATCGCTGATTTTCCCTTGGATCGATCTATTTGTGGAAGAAATCTCGAAA 116
1311-R-4  TATATTACATCGCTGATTTTCCCTTGGATCGATCTATTTGTGGAAGAAATCTCGAAA 118
1132-S-1  TTCATAATATATGATATATGTTGTTGATGCAATTTGATGCACTCGACTATGATCGGATTCGA 177
1143-S-1  TTCATAATATATGATATATGTTGTTGATGCAATTTGATGCACTCGACTATGATCGGATTCGA 178
1219-R-1  TTCATAATATATGATATATGTTGTTGATGCAATTTGATGCACTCGACTATGATCGGATTCGA 176
1311-R-4  TTCATAATATATGATATATGTTGTTGATGCAATTTGATGCACTCGACTATGATCGGATTCGA 178
1132-S-1  CCAGATCTGATCCCTCTAGAGTGCACCTGCAGGCTGCAGGCTTCGAGCTTCGAGTAACTCATG 237
1143-S-1  CCAGATCTGATCCCTCTAGAGTGCACCTGCAGGCTGCAGGCTTCGAGTAACTCATG 238
1219-R-1  CCAGATCTGATCCCTCTAGAGTGCACCTGCAGGCTGCAGGCTTCGAGTAACTCATG 236
1311-R-4  CCAGATCTGATCCCTCTAGAGTGCACCTGCAGGCTGCAGGCTTCGAGTAACTCATG 238
1132-S-1  CATAGCTGTTCCTGTGTGAAATTTGATCCCGTCAGAAATTCACACAAACATAGAGCCG 297
1143-S-1  CATAGCTGTTCCTGTGTGAAATTTGATCCCGTCAGAAATTCACACAAACATAGAGCCG 298
1219-R-1  CATAGCTGTTCCTGTGTGAAATTTGATCCCGTCAGAAATTCACACAAACATAGAGCCG 296
1311-R-4  CATAGCTGTTCCTGTGTGAAATTTGATCCCGTCAGAAATTCACACAAACATAGAGCCG 298
1132-S-1  GAAGCATAAAGTGTAAAGCCGCGGCTGCTAATGAGTGAAGTAACTCAGATTAATTTGCGT 357
1143-S-1  GAAGCATAAAGTGTAAAGCCGCGGCTGCTAATGAGTGAAGTAACTCAGATTAATTTGCGT 358
1219-R-1  GAAGCATAAAGTGTAAAGCCGCGGCTGCTAATGAGTGAAGTAACTCAGATTAATTTGCGT 356
1311-R-4  GAAGCATAAAGTGTAAAGCCGCGGCTGCTAATGAGTGAAGTAACTCAGATTAATTTGCGT 358
1132-S-1  TGCCTCAGCTCCCGCTTTCGAGTCGAGAAACCTGTGTGTGCAAGCTTCGATTAATGAACTG 417
1143-S-1  TGCCTCAGCTCCCGCTTTCGAGTCGAGAAACCTGTGTGTGCAAGCTTCGATTAATGAACTG 418
1219-R-1  TGCCTCAGCTCCCGCTTTCGAGTCGAGAAACCTGTGTGTGCAAGCTTCGATTAATGAACTG 416
1311-R-4  TGCCTCAGCTCCCGCTTTCGAGTCGAGAAACCTGTGTGTGCAAGCTTCGATTAATGAACTG 418
1132-S-1  GCCAACGCGCGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGAGGCGCTTCGCGCTTCCTCGCTACTG 477
1143-S-1  GCCAACGCGCGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGAGGCGCTTCGCGCTTCCTCGCTACTG 478
1219-R-1  GCCAACGCGCGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGAGGCGCTTCGCGCTTCCTCGCTACTG 476
1311-R-4  GCCAACGCGCGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGAGGCGCTTCGCGCTTCCTCGCTACTG 478
1132-S-1  ACTCGCTGCCTCGCTGCTTCGAGTGCAGGCGAGCGATCAAGCTCACTCAAGAGCGGTA 537
1143-S-1  ACTCGCTGCCTCGCTGCTTCGAGTGCAGGCGAGCGATCAAGCTCACTCAAGAGCGGTA 538
1219-R-1  ACTCGCTGCCTCGCTGCTTCGAGTGCAGGCGAGCGATCAAGCTCACTCAAGAGCGGTA 536
1311-R-4  ACTCGCTGCCTCGCTGCTTCGAGTGCAGGCGAGCGATCAAGCTCACTCAAGAGCGGTA 538

```

圖 5-3、將抗感病品種 (AVTO1219-R、AVTO1311-R、AVTO1132-S、AVTO1143-S) PCR 產物進行解序後，序列位置 80 出現差異點，感病品種該位置核苷酸序列為 C，抗病品種核苷酸序列為 G。

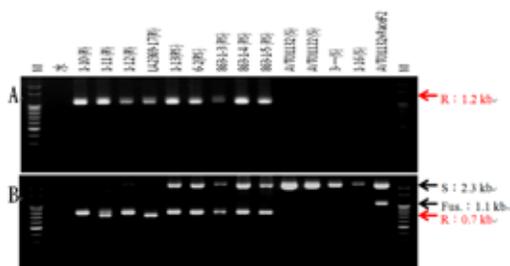


圖 5-4、利用 I2/Fu 引子組 (B) 可擴增番茄抗病基因 (*I-2*) 0.7 kb 之 DNA 條帶，感病基因 (*i-2*) 2.3 kb 之 DNA 條帶，萎凋病原菌 1.1 kb 之 DNA 條帶；A 為國外顯性抗病基因引子組檢測結果。

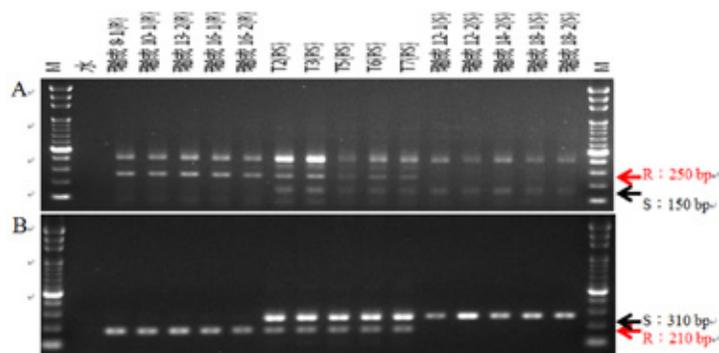


圖 5-5、利用國外 CAPS 分子標誌 (使用限制酶 AluI)(A) 與本場自行開發 I3PTG190-SCAR 引子組 (B) 可擴增番茄抗病基因 (*I-3*) 210 bp 之 DNA 條帶，感病基因 (*i-3*) 310 bp 之 DNA 條帶。

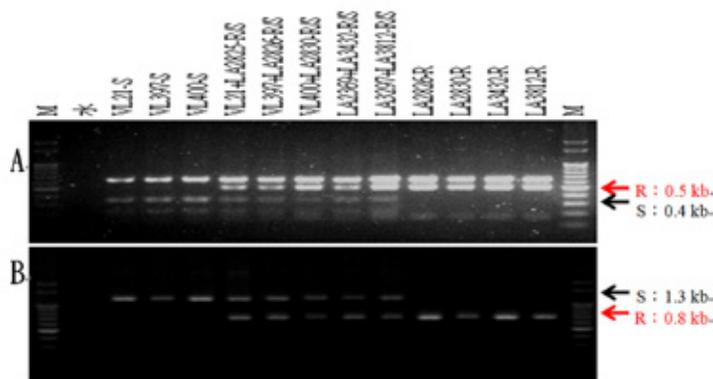


圖 5-6、利用 Tm1-SCAR 引子組 (B) 可擴增番茄抗病 (*Tm-1*) 與感病 (*tm-1*) 基因 0.8 與 1.3 kb 之 DNA 條帶；國外需使用限制酶 (HaeIII) 反應，將出現抗病 (*Tm-1*) 與感病 (*tm-1*) 基因 0.5 與 0.4 kb 之 DNA 條帶 (A)。

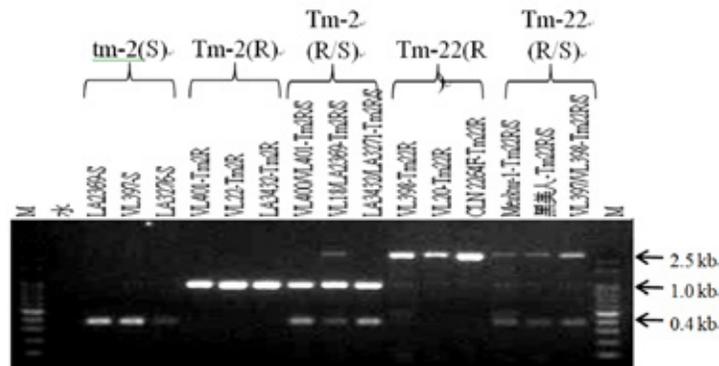


圖 5-7、利用 Tm22-SCAR 引子組可擴增番茄抗病基因 (*Tm-2* 與 *Tm-22*) 1.0 與 2.5 kb 之 DNA 條帶，感病品種 (*tm-2*) 出現 0.4 kb 之 DNA 條帶。

三 建立番茄黃萎病抗病基因 *Ve1* 共顯性分子標誌及優化 PCR 條件

周明燕、孫永偉、陳哲仁、

周佳霖、莊淑貞

本研究目的在開發抗番茄黃萎病基因 *Ve1* 專一性分子標誌，可輔助育種者篩選抗病品種(系)及確認植株基因型。從亞洲蔬菜中心種原庫蒐集抗病品種 L00893(6)、LA3276(6)；感病品種 LA1221(4)、LA2088(3)、LA3130(3)、LA3471(3)、LA3528(1) 及從種苗業者瑞成、稼穡、良種、永三、欣樺收集栽培種材料作為供試材料。透過 NCBI 蒐集 10 條番茄黃萎病抗感病基因 (*Ve1/ve1*) 序列，經序列比對，發現 6 處差異位點，據而設計合成 17 條引子，進行引子組合測試，共找到三組可同時篩選 *Ve1* 抗病基因及感病基因之引子組合；進一步進行優化 PCR 條件(梯溫及引子濃度)測試。篩選出一組可以同時增幅感病基因 (*ve1*) 1526bp 條帶片段及抗病基因 (*Ve1*)690 bp 之 PCR 產物的專一性引子組合(圖 5-8)。上述分子標誌為番茄抗病育種工作者提供了有利的輔助工具，可協助育種者早期篩選抗病植株、確認抗病基因型(R/R、R/S、S/S)及病毒感染情形，提高育種效率及培育優良的抗病品種。

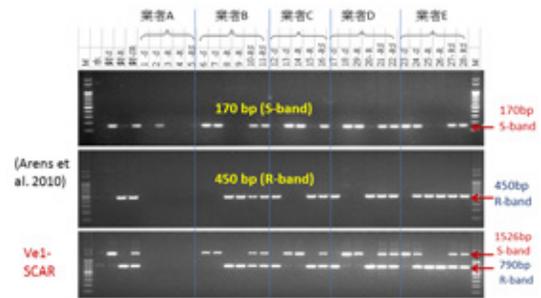


圖 5-8、利用不同來源材料進行 *Ve1*-SCAR 引子組合穩定性測試，皆可增幅出抗感病條帶，證實該組引子對番茄黃萎病抗感病基因具有專一性。

四 分子標記應用於番茄抗晚疫病之鑑定

孫永偉、周佳霖、陳哲仁、邱燕欣、

張惠如、周明燕、黃俊杉、羅英妃、

鍾文全

番茄晚疫病 (late blight) 為國際間冬季濕冷季節重要真菌性病害，目前國外有關抗病基因檢測文獻多需利用耗時且高價限制酶切反應方能鑑別抗感病基因。本研究自亞洲蔬菜中心收集抗病與感病番茄品種，針對抗晚疫病基因 (*Ph-2*、*Ph-3*) 開發共顯性 SCAR 分子標誌。目前已建立快速且便宜的專一性 Ph2TG422-SCAR 分子標誌，可同時擴增抗感晚疫病 *Ph-2* 基因植株 DNA 條帶，大小分別為 400 bp 及 570 bp；專一性 Ph3M67-SCAR 分子標誌則可同時擴增抗感晚疫病 *Ph-3* 基因植株 DNA 條帶，大小分別為 350 及 250 bp；至於 Pi-2 與 Pi-3 分子標誌可鑑定番茄晚疫病病原菌。上述分子標誌檢測結果與亞洲蔬菜中心及國內育種者或種子公司品種已知的

抗感性吻合，可作為育種者判斷番茄育成品系之抗病基因型及育成多基因組合雜交品種，可大幅提升育種效率，具有高市場潛力及產業應用價值。

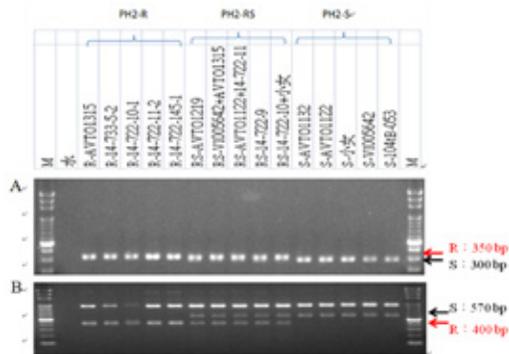


圖 5-9、比較番茄抗病 (R)、感病 (S) 與異質結合基因型品種 (RS)，利用國外文獻 CAPS 分子標誌 (使用限制酶 *Alul*) (A) 與本場自行開發 Ph2TG422-SCAR 分子標誌 (B) 進行 PCR 反應之電泳圖譜差異性。

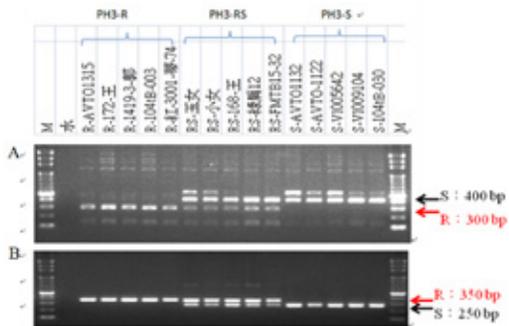


圖 5-10、比較番茄抗病 (R)、感病 (S) 與異質結合基因型品種 (RS)，利用國外文獻 CAPS 分子標誌 (使用限制酶 *MspI*) (A) 與本場自行開發 Ph3M67-SCAR (B) 分子標誌進行 PCR 反應之電泳圖譜差異性。

五 品種純度分子標誌開發建立與檢定

周佳霖、陳哲仁、廖伯基、

曾一航、鍾文全

玉米與番茄的商業品種多屬雜交種，具雜種優勢遺傳質均一的優點，其種子生產常利用兩個自交系親本經雜交而成單交種。在生產一代雜種種子時，須經母本親的去雄及父本親花粉授粉的操作，易有去雄不完善而造成的自花授粉的困擾，以分子標誌輔助檢定商業種子之雜交成功率，可大幅提昇種子品質管理之效率。

本年度本場開發甜玉米品種純度 SSR 分子標誌 (圖 5-11) 與番茄品種純度 SNP 分子標誌 (圖 5-12) 計 21 組，從公開資料庫取得玉米 SSR 與番茄 SNP 資訊，挑選玉米基因相關 SSR 標誌與 SNP 標誌中預期表現較佳的標誌，依參考序列 (reference sequence) 設計專一性引子，並以水平電泳確認開發標誌的清晰度與穩定性，此 21 組標誌目前可檢測國內種苗品種至少 7 個甜玉米雜交品種與 6 個番茄雜交品種。

另本場以自行建立之 ISSR 分子標誌檢測系統，檢測本場自行採種或委外採種之番茄亞蔬 21 號、22 號品種純度，本年度共檢測 2 批種子 (表 5-1)，所有蕃茄種子檢測樣品純度皆符合規定之 98%，有效確保本場生產種子的品質。

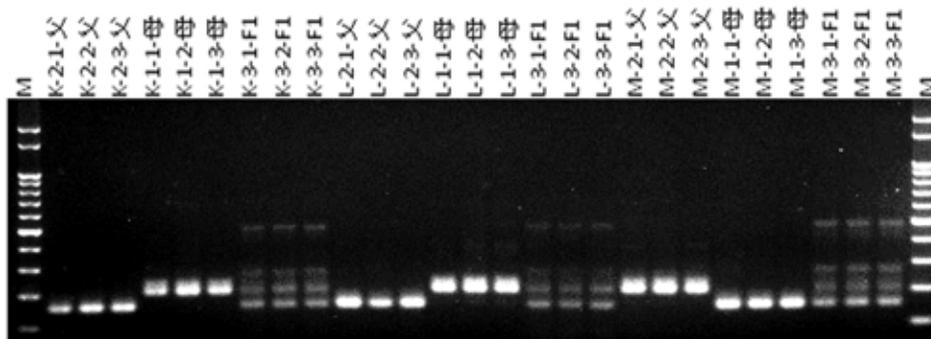


圖 5-11、開發之玉米品種純度分子標誌在三個不同品種之表現，以 SSR-10 標誌為例，SSR 基因型專一性條帶在父本約 170 bp，母本約 210 bp，F1 則同時具備 170 與 210 bp 的條帶。

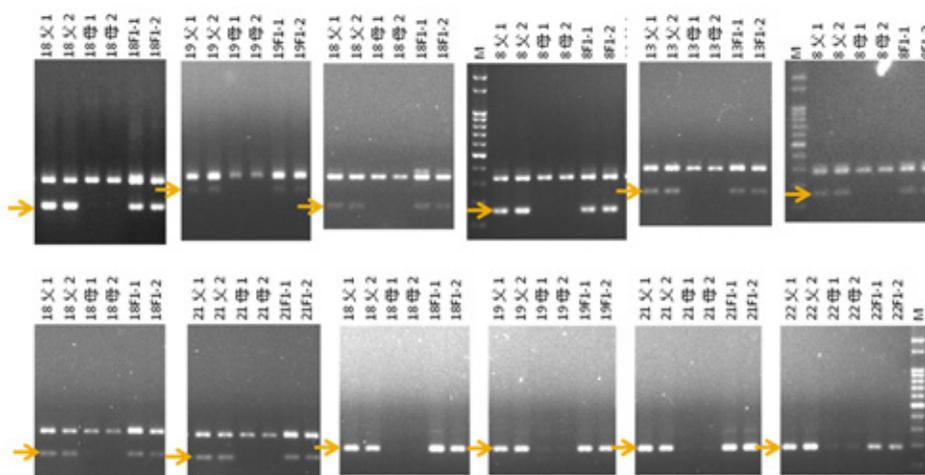


圖 5-12、開發之番茄商業品種雜交一代純度檢定套件父本多型性圖。分子標誌為顯性標誌，單一 PCR 反應可檢測 1 個 SNP 基因型，以父本 SNP 位置具條帶者，可做為純度檢定標誌，黃色箭號為多型性位置。

表 5-1、104 年度番茄雜交種子純度檢測內容與結果

NO.	批號	報告日期	品種	檢定株數	純度 估算結果	申請人
1	103-3BX105-001	104.5.20	亞蔬 22 號	160	98.75%	種苗經營課
2	1035OK402(KASY-188)	104.6.24	亞蔬 21 號	200	100%	農場 (委外採種)

六 建立重要蘭花品種分子標誌與蝴蝶蘭 DNA 資料庫

張惠如、安志豪、劉明宗、鍾文全

利用之前已建立之蝴蝶蘭品種 SSR 分子標誌標準鑑定流程，針對 100 個已於臺灣申請並取得植物品種權之蝴蝶蘭商業品種，鑑定其基因型並將所得原始數據以 BioNumerics 軟體分析並儲存建立 DNA 資料庫。經過 SSR-PCR 及基因型分析後，結果發現 10 組 SSR 分子標誌可以完全識別 100 個蝴蝶蘭商業品種，其代表多型性程度的 PIC (polymorphism information content, PIC) 值介於 0.732 (PHS03) 與 0.879 (PHS04) 之間，其中一組 SSR 分子標誌 PHS04 即可產生 60 個相異的基因型。10 組 SSR 分子標誌在該 100 個蝴蝶蘭商業

品種中，其中二組 SSR 分子標誌 PHS02 與 PHS09 皆可得到 22 個相異對偶基因 (allele)(表 5-2)。此外，分析 10 組 SSR 分子標誌於 DNA 資料庫 200 個蝴蝶蘭品種中出現的所有對偶基因及出現頻度，每個 SSR 分子標誌分別挑選 5-10 個出現頻率較高之對偶基因，共挑出 61 個對偶基因，經比對分析發現每個蝴蝶蘭品種可包含 14-21 個對偶基因(表 5-3)。在 12 個文心蘭黃色切花品種的品種識別分子標誌開發上，經 SSR-PCR 後電泳分析結果發現，其中有 3 組 SSR 引子組僅能鑑別文心蘭品種 -- 百萬金幣 (M.D) 與檸檬甜心 (1631)，其餘 17 組分子標誌並無差異性條帶產生(圖 5-13)，顯然此 20 組 SSR 引子組並無法識別所有的試驗材料。

表 5-2、利用 10 組 SSR 引子組於 100 個蝴蝶蘭商業品種之鑑別力分析

SSR marker	No. of unique allele	No. of unique genotype	PIC value
PHS01	20	55	0.872
PHS02	22	51	0.835
PHS03	8	21	0.732
PHS04	19	60	0.879
PHS05	11	44	0.810
PHS06	19	46	0.864
PHS07	19	56	0.814
PHS08	19	50	0.843
PHS09	22	49	0.867
PHS10	10	41	0.839

表 5-3、利用 10 個蝴蝶蘭參考品種與其所包含 61 個 SSR 分子標誌對偶基因

SSR-allele	Phalaenopsis Variety									
	463	930	799	924	279	628	483	513	478	368
PHS01-142	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
PHS01-164	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
PHS01-165	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
PHS01-176	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
PHS01-200	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
PHS02-284	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
PHS02-296	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
PHS02-298	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
PHS02-304	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
PHS02-308	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
PHS02-336	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
PHS03-138	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
PHS03-144	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
PHS03-153	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
PHS03-162	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
PHS03-165	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
PHS03-192	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
PHS04-210	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
PHS04-212	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
PHS04-214	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
PHS04-216	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
PHS04-220	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
PHS04-268	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
PHS05-246	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
PHS05-252	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PHS05-256	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
PHS05-258	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
PHS05-260	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
PHS05-264	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
PHS05-266	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
PHS05-268	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PHS05-272	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
PHS05-280	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
PHS06-196	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
PHS06-200	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
PHS06-204	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1
PHS06-210	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
PHS06-214	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
PHS07-224	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
PHS07-226	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
PHS07-230	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
PHS07-232	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1
PHS07-246	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
PHS07-250	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
PHS08-99	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
PHS08-103	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
PHS08-107	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
PHS08-111	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
PHS08-122	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
PHS09-206	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
PHS09-216	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
PHS09-222	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
PHS09-224	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
PHS09-228	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
PHS09-234	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
PHS09-240	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
PHS10-246	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
PHS10-252	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
PHS10-258	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
PHS10-266	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
PHS10-272	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Total NO. of alleles	14	15	19	21	19	19	18	20	19	19

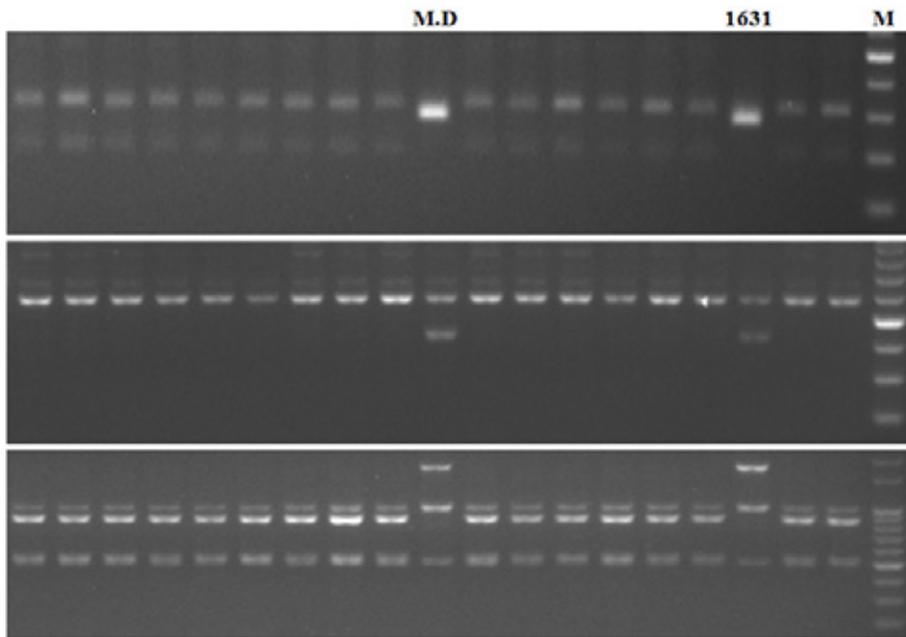


圖 5-13、利用 SSR 分子標誌篩選 12 個黃色切花系文心蘭品種之電泳圖譜差異性條帶。

七 番木瓜兩性株苗期分子鑑定技術

陳哲仁、張惠如、李美娟、鍾文全

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 俗名木瓜，根據農業統計資料顯示，國內栽培面積約在 3,000 公頃左右，以臺南及屏東為主要產區，番木瓜依據其開花特性可分為雄株 (staminate)、雌株 (pistillate)、兩性株 (hermaphrodite) 等三種性型，商業栽培多採用兩性株，因其可自交受粉果型優良，最具經濟價值。但無法早期鑑別種苗性別，傳統上以每穴種植 3 苗，後俟再摘除留存兩性株。目前因番木瓜性別決定基因尚未確認，且現有鑑定標誌仍不夠理想及成本高等缺點，本計畫針對番木瓜進行性別鑑定標誌改進開發，並配合葉片 DNA 快速萃

取技術，達成苗期株性鑑別目標。結果顯示本場開發改良之分子標誌，可完全對應木瓜雄株 (♂)、雌株 (♀) 以及兩性株 (♀) 三種性別株，並降低現有標誌偽陽性問題 (圖 5-14)。

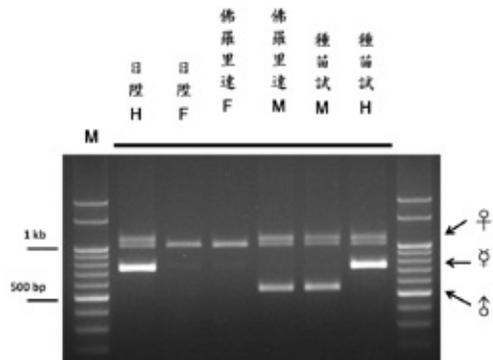


圖 5-14、本場開發改良之分子標誌，可完全對應木瓜雄株 (♂)、雌株 (♀) 以及兩性株 (♀) 三種性別株。

八 番木瓜種子不同部位所萃取核酸之 PCR 擴增效果

陳哲仁、周明燕、周佳霖、
張惠如、孫永偉、鍾文全

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 俗名木瓜，在 1950 年代，世界木瓜產區陸續遭受木瓜輪點病毒 (papaya ring-spot virus, PRSV) 嚴重危害，造成果實發育不良或畸形，表面出現同心輪紋，果肉硬且甜度降低，全無商品價值，重創全球木瓜產業。美國康乃爾大學及夏威夷大學研究團隊，自 1987 年起，將夏威夷致病性 HA5-1 株系之鞘蛋白及其他外源基因導入木瓜植株，

開發出首件抗 PRSV 之基因改造木瓜品系 Event55-1，後續通過生產及食用許可，開啟全球各地基改抗病毒木瓜應用研究。基改作物在外觀上與傳統作物並無決定性差異，因此，最常見的方法是利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 擴大偵測樣品核酸中是否存在人為插入外源基因。為了加強基改番木瓜檢測技術可靠性，本試驗主要目的在於比較番木瓜種子不同部位 (種子、種胚和種皮) 核酸萃取品質，並建立在 25 ul 反應體積以 15-25 ng DNA 模板可獲得最佳 PCR 增幅效果，提供後續基改番木瓜種子 DNA 檢測之用 (圖 5-15)。

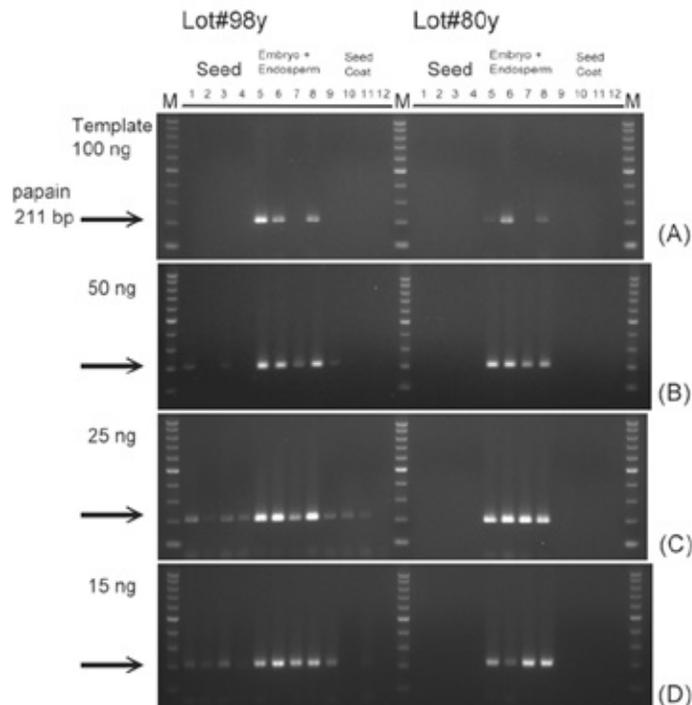


圖 5-15、不同批次 (Lot#98y 與 Lot#80y) 及不同種子部位 PCR 測試結果，顯示以種仁核酸品質最佳，且在 25 ul 反應體積以 15-25 ng DNA 模板可得最佳擴增效果。

九 基因轉殖棉花、番茄、小麥檢測技術之研究

張惠如、陳哲仁、周明燕、

周佳霖、孫永偉、鍾文全

以具 ERM 認證的轉基因棉花標準參考物質，包括：單一轉殖品項 T304-40(0%、1%、10%)(ERM-BF429)、GHB119(0%、1%、10%)(ERM-BF428) 及 281-24-236x3006-210-23(0%、1%、10%、98%)(ERM-BF422) 為試驗材料。根據歐盟聯合研究中心 (Joint Research Centre, JRC) 所發表的報告進行定性檢測方法條件測試 (圖 5-16)，建立檢測標準作業流程方法，並配置檢測樣品供基因轉殖作物檢監測團隊之相關實驗室 (農試所、鳳試所、桃園場、臺南場)，進行檢測樣品檢出能力試驗，確認標準作業流程方法的穩定性及可信性，而可納入實驗室認證體系中。

基因轉殖小麥 (MON71800) 及基因轉殖番茄 (FLAVR SAVR™) 之標準參考物質或商業種子因無法取得，而參考 JRC 針對 MON71800 開發檢測技術的報告，其報告指出：因 NK603 轉殖基因片段與 MON71800 相同，應該使用 ERM-BF415 (NK603 maize, IRMM) 做為正對照樣品。故以 NK603 標準參考物質與一般小麥種子為試驗材料，利用歐盟所公告之檢測方法，進行 CTP2-CP4epsps、T-nos 與 P-35 序列片段定性檢測方法試驗，結果顯示 CTP2-CP4epsps、T-nos、P-35 與小麥管家基因 (acc) 之序列，可分別得到符合預期 88 bp、84 bp、82 bp 與 54 bp 大小的目標片段 (圖 5-17)。

在建立基因轉殖番茄 (FLAVR SAVR™) 定性檢測方法方面，根據 GMO Detection method Database (GMDD) 網站資料與 JRC 檢測方法，合成基因片段 (X05656, NCBI 序列資料庫) 作為 pg

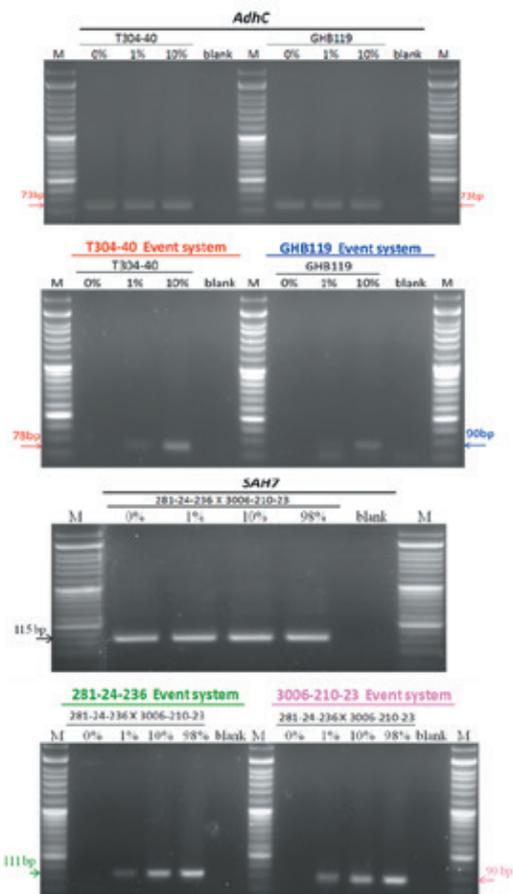


圖 5-16、轉殖品項 T304-40、GHB119、3006-210-23X281-24-236 之標準參考物質 PCR 定性檢測。

M : Gen50-Plus DNA Ladder ; T304-40(0%、1%、10%)(ERM-BF429)、GHB119(0%、1%、10%)(ERM-BF428) 及 281-24-236x3006-210-23(0%、1%、10%、98%)(ERM-BF422)：為標準參考物質 DNA ; blank:DEPC-WATER(空白對照組)

轉殖片段之正對照，也進行 35S 啟動子 (和轉殖品項 Bt176 相同) 及 nptII (來自 *Escherichia coli* Tn5 transposon, 和 MON863 x MON810 轉殖品項相同) 序列的定性檢測方法測試，做為檢測基因轉殖番茄 (FLAVR SAVR™) 的初步方法。電泳分析結果顯示，轉殖序列 CaMV 35S、nptII、pg 基因 cDNA(X05656) 與番茄管家基因 (LAT52) 中，可各自得到預期 195 bp、173bp、180bp、92 bp 大小的目標片段 (圖 5-18)。

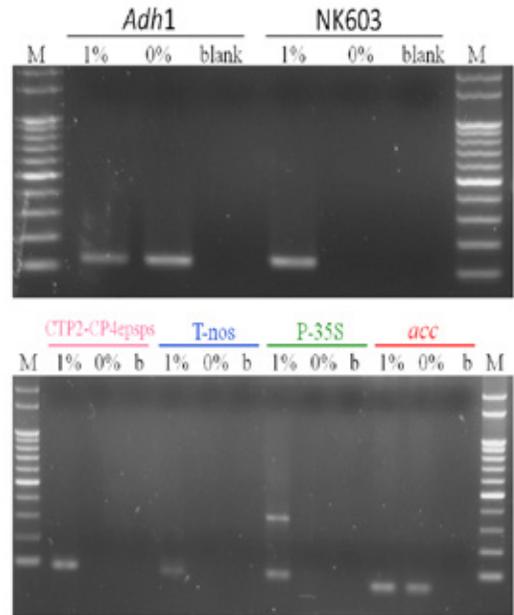


圖 5-17、基因轉殖小麥 (MON71800) 的 PCR 定性檢測。

M : Gen100-Plus DNA Ladder ; 0%、1% : NK603(ERM-BF415) 標準參考物質 DNA ; blank:DEPC-WATER(空白對照組)

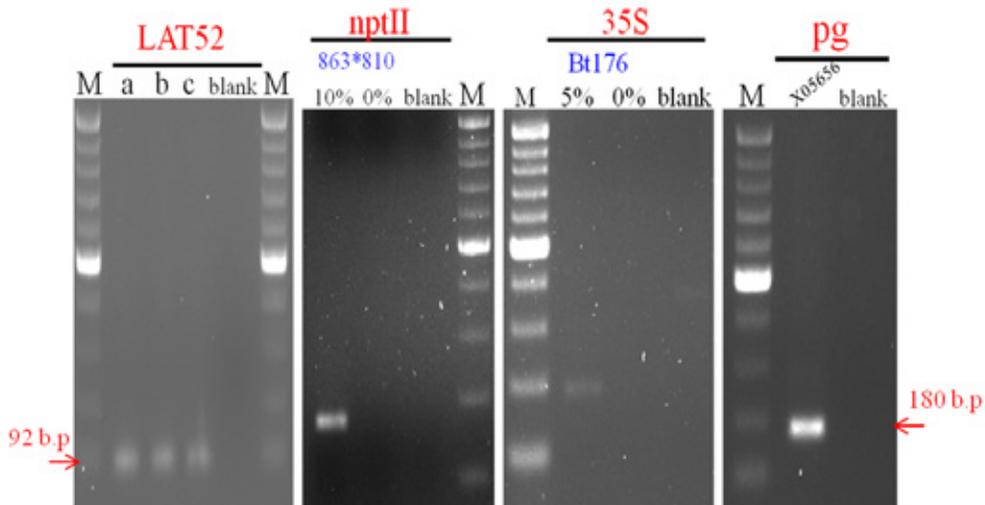


圖 5-18、基因轉殖番茄 (FLAVR SAVR™) 的 PCR 定性檢測。

M : Gen100-Plus DNA Ladder ; a.b.c 為不同品種之番茄種子 DNA ; 863 X 810 : 1 0%、0% 標準參考物質 DNA ; Bt176 : 5%、0% 標準參考物質 DNA ; X05656 合成序列 plasmid DNA ; blank:DEPC-WATER(空白對照組)

十 加強基因轉殖植物安全管理 - 基因轉殖植物之檢測

周明燕、陳哲仁、張惠如、鍾文全

根據 2012 年之 ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) 統計資料，全世界種植基因轉殖作物 (Genetically Modified Crops, 簡稱 GM 作物) 之面積已達 1 億 7 千萬公頃，主要栽培之作物依序為大豆、玉米、棉花、油菜。基因轉殖生物及其產品對生態環境與人體健康所可能產生的衝擊，廣泛的受到世界各國關切與重視，各國自訂有基因轉殖生物與其產製品之相關管理法規及建構相關農產品檢測及監測平台。根據我國植物品種及種苗法與其相關管理法規，有關基因轉殖作物在上市前除須進行生物安全評估外，上市後，產品除須標示外，亦須接受主管機關監控，以維護國內生態環境與消費者之安全。有關基因轉殖作物之進出口管理，現階段將採行境內管理措施，針對較可能進口之基因轉殖作物，包括大豆、玉米、水稻、馬鈴薯、油菜及木瓜等作物，由相關試驗研究單位研發取樣及檢測技術，實際檢測種子或種苗是否為基因轉殖作物，並採取適當管理措施，進而建立一套標準化且具公信力之檢測技術與流程，以取得符合國際標準的檢測實驗室認證，亦是國內所有從事相關工作的實驗室需要努力的方向。雖然我國目前尚未有任何基因轉殖作物可合法種植於開放農業區內，但在未來的狀態尚未可知，因此

為及早因應基因轉殖作物釋出後對傳統農業產生可能的衝擊，並維護傳統農業之永續發展，我國農業研究單位宜加速引進並研究相關檢測技術與管理體系，以供建立我國生物安全管理體系之前置研究。

本計畫將針對可能種植之國內外基因轉殖作物，透過檢測能力建構模式，結合各檢測單位建立聯合檢測監測機制，配合管理單位執行基因轉殖作物管理及檢監測，透過種苗生產與販售業者抽樣調查，逐年建立動態資料，落實基因轉殖作物之檢測監測制度。本計劃為維持各小組成員之檢測能力，共進行 2 次基因轉殖木瓜檢測能力試驗、基因轉殖大豆與玉米各 1 次能力試驗。完成木瓜種子核酸萃取技術研發及基因轉殖木瓜種子檢測作業標準流程草案研擬；完成基改水稻 LLRice601 轉殖品項標準樣品之建立。配合農糧署執行基改作物管控，本年度共抽檢木瓜種苗生產業者 30 家、木瓜田間栽培區不定期抽檢 16 區、大豆、玉米小地主大佃農耕作戶種子抽驗共 10 批，皆無轉殖標的基因檢出 (表 5-4)。104 年度新增木瓜邊境管制業務，完成「基因改造木瓜邊境管制抽檢樣品處理作業流程」，由農糧署函示執行，基改木瓜邊境管制抽檢共完成 29 件樣品檢測，皆無檢出標的基因。

表 5-4、國內作物 GMO 檢監測採樣批次一覽表

	玉米種子 (增)	大豆種子 (增)	木瓜		小計
			種苗業者	田間監測	
臺中市			1		1
臺東縣			3	1	4
臺南市	5	1	1		7
宜蘭縣					0
花蓮縣					0
南投縣			3	6	9
屏東縣			4		4
苗栗縣			4		4
桃園縣					0
高雄市			2	6	8
雲林縣			3		3
嘉義市			1		1
嘉義縣	3	1	5	3	12
彰化縣			3		3
總計	8	2	30	16	56

十 大豆契作田基因改造大豆檢監測調查

周明燕、陳哲仁、張惠如、鍾文全

大豆具有高油脂及高蛋白質含量，營養豐富且具保健功能，國內產量不足 200 公噸，仰賴進口補充需求缺口，每年進口量 200-250 萬公噸，進口依存度高於 99%。據 ISAAA 統計基改大豆佔全球栽培量 79% (2013)，根據行政院衛生福利部食品藥物管理署資料顯示我國進口大豆 90% 以上屬基因改造黃豆。國產大豆不需經長途運輸，具有新鮮、品質佳的優勢，且因臺灣並未開放基因改造植物商品化種植，國產大豆皆為非基因改造產品，雖然生產成本高，但可與進口大豆做產品區隔。

行政院農委會為推廣國產大豆，101 年起配合小地主大佃農政策積極輔導大佃農及農民契作生產非基改優質大豆，102 年種植面積為 862 公頃。活化農地推廣種植進口替代作物 - 非基改大豆從 100 年 55 公頃至本 (103) 年倍增達 1,203 公頃，為確保國產即非基改並落實源頭管控，102 年起農糧署與各試驗改良場共同推動繁殖，本 (103) 年並會同縣市政府及農會抽檢花蓮、苗栗、雲林、嘉義、臺南、高雄及屏東等 20 處大豆契作田區進行檢測共採樣樣品 62 批 (表 5-5)，檢測結果皆無檢出標的基因片段。為確保國產大豆品質，不論有機或慣行栽培，應於種植過程中進行抽檢監測，確保國產大豆不受基改汙染，讓消費者更安心消費。

表 5-5、配合轉契作大豆栽培田檢監測採樣批次一覽表

	採樣批次
臺東縣	0
臺南市	18
宜蘭縣	1
花蓮縣	4
南投縣	0
屏東縣	15
苗栗縣	3
桃園縣	3
高雄市	4
雲林縣	12
嘉義市	0
彰化縣	2
總計	62

本年度契作大豆田非基因改造檢監測計畫，共執行 20 處契作大豆田間 62 批次採樣及檢驗分析，結果皆無檢出目標基因改造片段。

十二 赴日本研習利用分子標誌技術進行作物品種鑑定

陳哲仁

本次研習主要是至日本品種檢定機構「獨立行政法人種苗管理中心 (National Center for Seed and Seedlings, NCSS)」(圖 5-19) 研習有關利用微衛星序列進行作物品種鑑定工作之有關內容，包括自核酸樣品備製、反應物調配、自動化毛細電泳分析以及最終檢測結果判讀(圖 5-20)，另說明採用之分子檢測分析方法之妥適性評估方法，交流學習日本品種分子鑑定技術，以利未來進一步交流與鑑定技術調和。瞭解日本植物品種保護者 (PVP G-men) 在品種侵權疑義上對育種權利者之支援，在

不同進行階段給予不同之諮詢建議和實際檢測作為，可作為未來我國在侵權案例輔導協助之參考。另參訪花藝科學中心瞭解康乃馨分子標誌開發過程及最新研究進展；此外，參訪食品總合研究所 GMO 分析實驗室，會同種苗管理中心交流 GMO 檢測相關規範與檢測技術，在品種鑑定標準樣品保存除了參觀種苗管理中心樣品庫，還前往 NIAS 植物中、長期儲存庫，瞭解標準樣品管理策略及相關作為。此外，也至食農館蒐集日本農業生產最新進展。經由此次參訪，可將所學經驗應用於國內檢測實驗室流程設計參考及檢測方法改進，提昇分子檢測結果品質及管理效益，同時作為未來與日本深入合作品種分子鑑定相關議題的良好基礎。

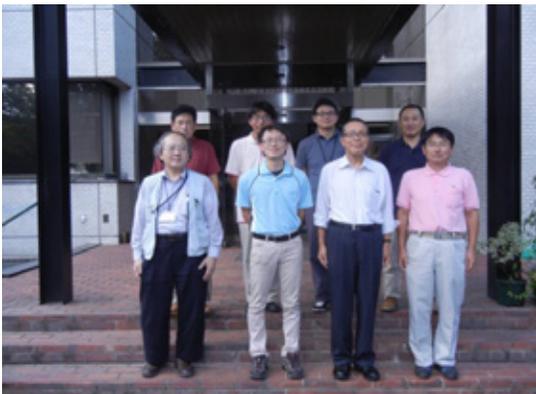


圖 5-19、種苗管理中心竹森三治理事長及品種保護對策課同仁團體合照。

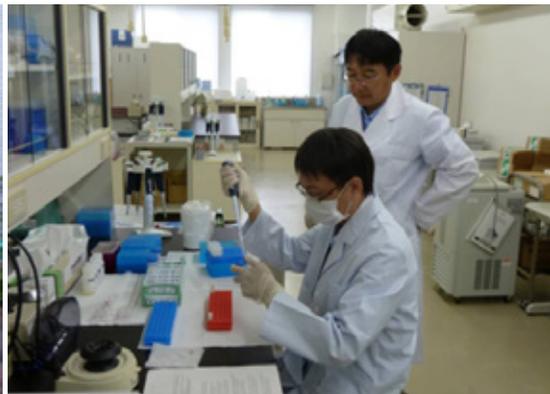


圖 5-20、種苗管理中心品種保護對策課長木村鐵也博士親自指導實驗操作過程。