

一、生物技術之開發與應用

基因轉殖木瓜多重聚合酵素鏈鎖反應檢測技術之建立

沈翰祖

基因轉殖木瓜包括「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」與「雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜畸葉嵌紋病毒性病狀基因轉殖木瓜」，建立其鑑別基因轉殖木瓜之檢測能

力與多重聚合酵素鏈鎖反應 (multiplex PCR) 技術，可提高檢測效率。其中為確保檢體DNA品質合乎要求，檢測木瓜Papain gene 作內部對照，PCR 增幅產物大小為211 bp；檢測篩檢標誌 *nprII* 基因，PCR 增幅為1039 bp；檢測雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜畸葉嵌紋病毒性病狀基因轉殖木瓜PRSV與PLDMV鞘蛋白的基因 (合稱為 *PY16-CP* gene)，PCR 增幅產物為1304bp；檢測抗輪點病毒病基因轉殖木瓜PRSV鞘蛋白的基因 (*PRSV-CP* gene)，其PCR 增幅產物大小為537bp。多重聚合酵素鏈鎖反應技術可同時檢出 *nprII* gene 與 *papain* gene；亦可同時檢出 PRSV-CP gene 與 *papain* gene。以及可同時檢出雙抗木瓜 *PY16-CP* gene 與 *papain* gene。

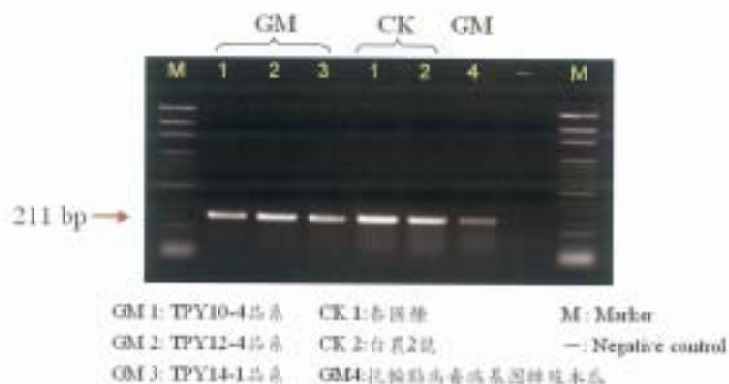


圖1-1、「雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜畸葉嵌紋病毒性病狀基因轉殖木瓜」三個品系TPY10-4、TPY12-4、TPY14-1與「抗輪點病毒病基因轉殖木瓜」檢測木瓜特有的Papain gene。GM為基因轉殖木瓜，CK為非基因轉殖木瓜，-為空白試驗

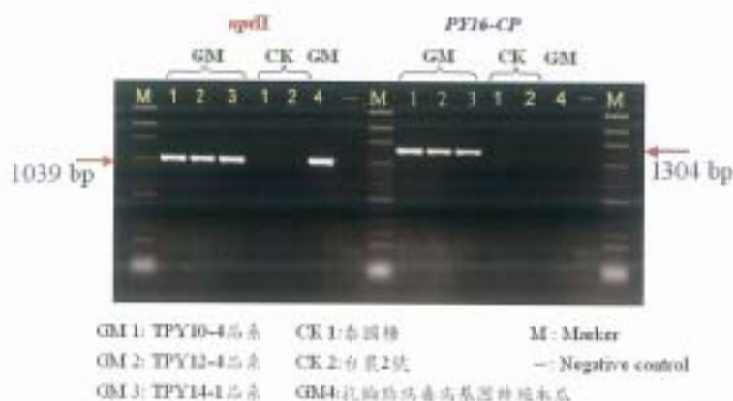


圖1-2、「雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜畸葉嵌紋病毒性病狀基因轉殖木瓜」三個品系TPY10-4、TPY12-4、TPY14-1與「抗輪點病毒病基因轉殖木瓜」檢測 *nprII* gene 與 *PY16-CP* gene。GM為基因轉殖木瓜，CK為非基因轉殖木瓜，-為空白試驗

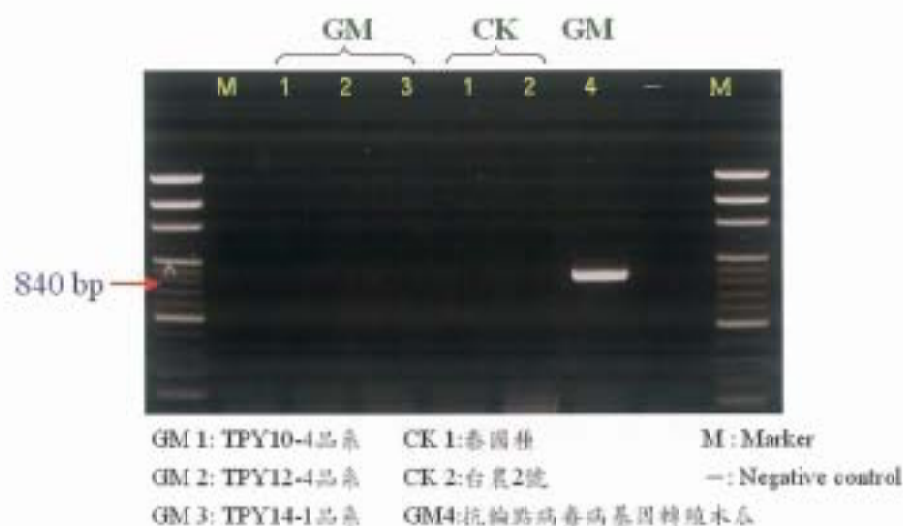


圖1-3、「雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜輪葉嵌紋病毒性狀基因轉殖木瓜」三個品系TPY10-4、TPY12-4、TPY14-1與「抗輪點病毒病基因轉殖木瓜」檢測 PRSV-CP gene。GM為基因轉殖木瓜，CK為非基因轉殖木瓜，-為空白試驗

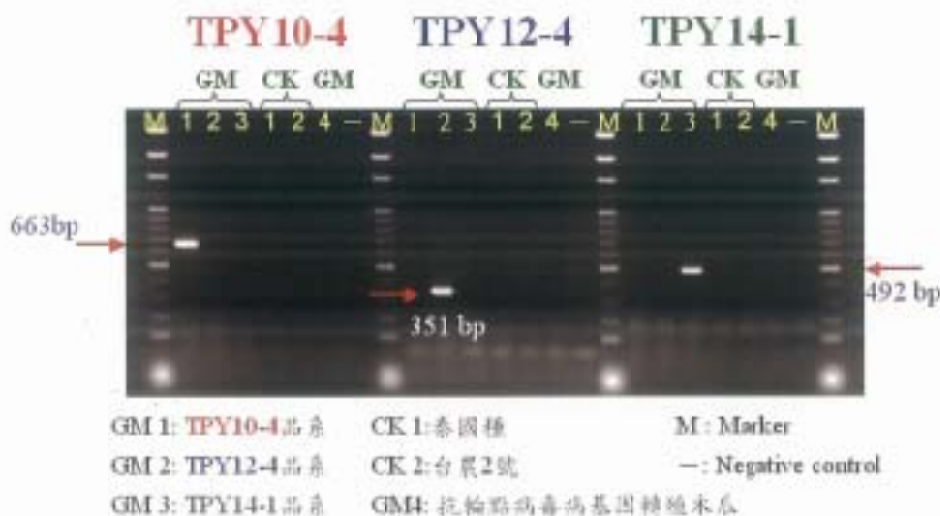


圖1-4、「雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜輪葉嵌紋病毒性狀基因轉殖木瓜」三個品系TPY10-4、TPY12-4、TPY14-1與「抗輪點病毒病基因轉殖木瓜」分別檢測 TPY10-4、TPY12-4、TPY14-1專一性片段。GM為基因轉殖木瓜，CK為非基因轉殖木瓜，-為空白試驗

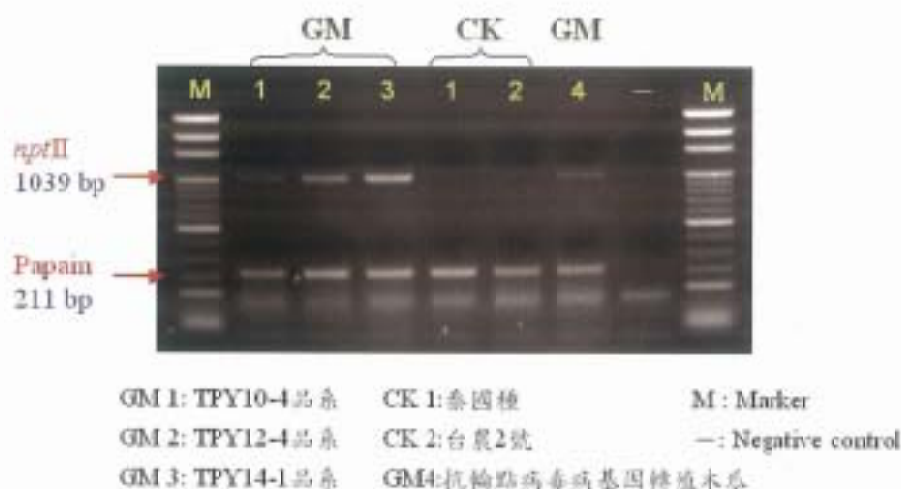


圖1-5、「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」與「雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜葉嵌紋病毒性狀基因轉殖木瓜」針對篩檢標誌 *nptII* gene 與 *papain* gene，利用專一性引子進行多重聚合酶鏈鎖反應 (multiple PCR)，可同時檢出 *nptII* gene 預期之 1039bp，與 *papain* gene 預期之 211bp 片段。GM 為基因轉殖木瓜，CK 為非基因轉殖木瓜，- 為空白試驗

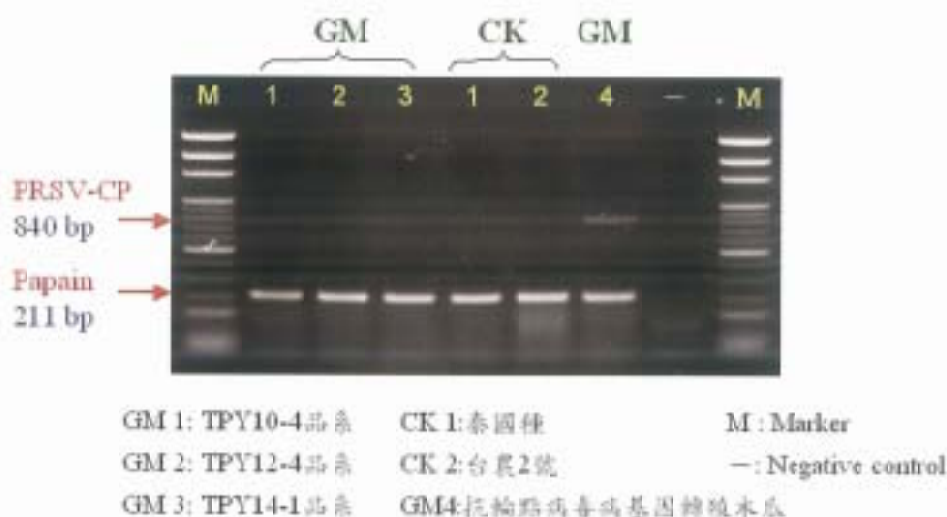


圖1-6、「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」與「雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜葉嵌紋病毒性狀基因轉殖木瓜」針對目標基因 (木瓜輪點病毒外鞘蛋白基因, *PRSV-CP* gene) 與 *papain* gene，利用專一性引子進行多重聚合酶鏈鎖反應 (multiple PCR)，可同時檢出 *PRSV-CP* gene 預期之 840bp，與 *papain* gene 之 211bp 片段。GM 為基因轉殖木瓜，CK 為非基因轉殖木瓜，- 為空白試驗

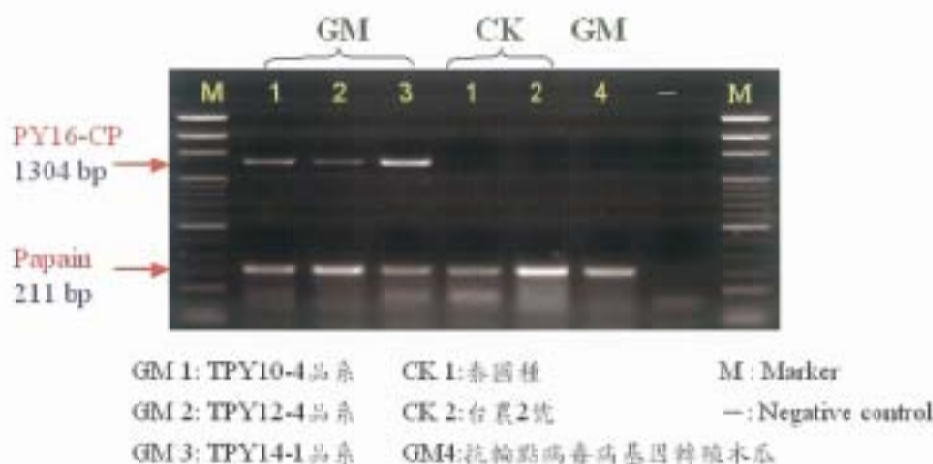


圖1-7、「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因木瓜」與「雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜葉嵌紋病毒性病基因轉殖木瓜」針對目標基因(木瓜輪點病毒外鞘蛋白基因, *PY16-CP* gene)與papain gene, 利用專一性引子進行多重聚合酶鏈鎖反應(multiple PCR), 可同時檢出*PY16-CP* gene預期之1304bp, 與papain gene預期之211bp片段。GM為基因轉殖木瓜, CK為非基因轉殖木瓜, -為空白試驗

作物品種指紋分析系統之建立 與應用—作物特定性狀分子標 誌之建立

莊淑貞、孫永偉、張義弘、陳駿季

本試驗以多組單倍結果性及非單倍結果性之全雌株為材料, 初步篩選有用引子(參試引子共有UBC 1-500, operon A-C, SE 1-100 (吉恩馬克), 等RAPD-引子共660組及GA-1AA-primer-14組) 共篩選出47組引子(op-8組, ubc-35組, s-4組) 具多型性引子。有17條RAPDs在各個材料表現不同的出現比率, 顯示胡瓜具有不同程度的單倍結果性表現。苦瓜兩性株與全雌株之比較, 係利用RAPD及AFLP方式篩選有用引子。結果顯示RAPD方式無法找出兩性

株或全雌株特異性之分子標誌, 目前從AFLP方式以篩選數組特異性分子標誌, 待進一步解序並設計專一性引子確認之(圖1-8、1-9)。

木瓜性別及花器分化相關基因 選殖

李美娟

已選殖出之番木瓜花器分化基因*CpMADS1*、*CpMADS2*、*CpMADS3*進行DNA親緣及RNA層次之基因分析。*CpMADS1*、*CpMADS3*氨基酸1-60區為MADS-box domain, 80-170區氨基酸為K-box domain。*CpMADS2*氨基酸1-60區為

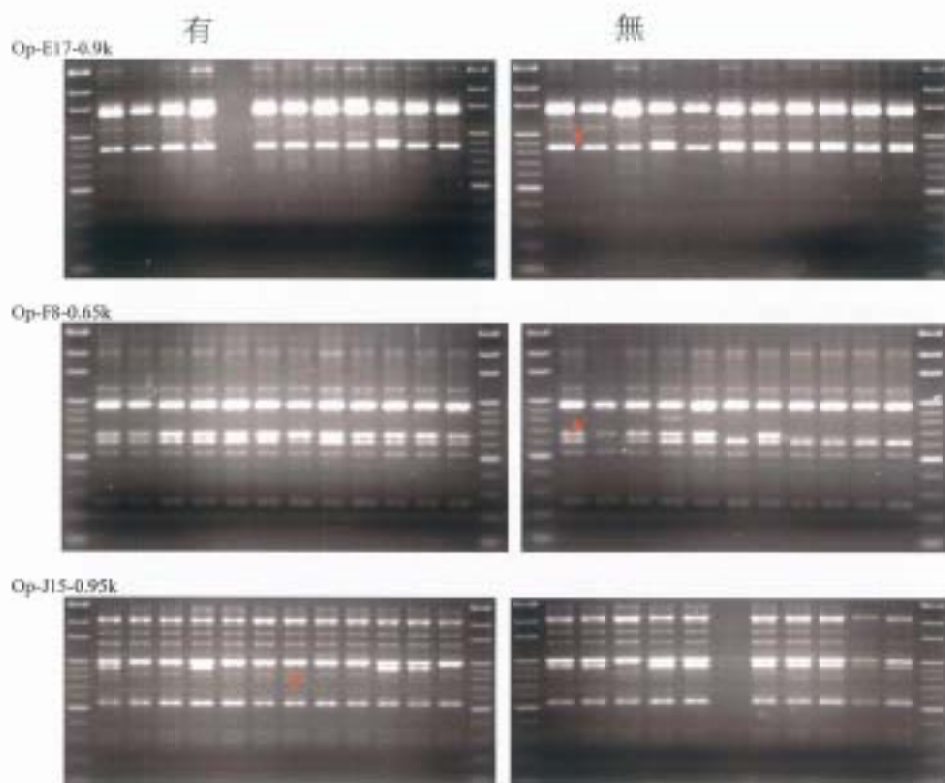
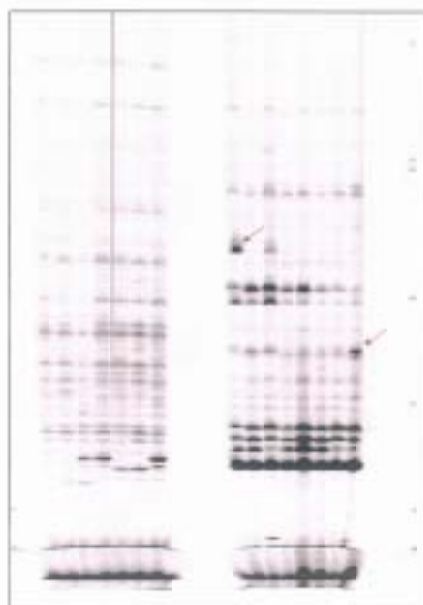


圖1-8、進一步復篩胡瓜多型性識別標誌，在有單偽及無單偽的表現情形

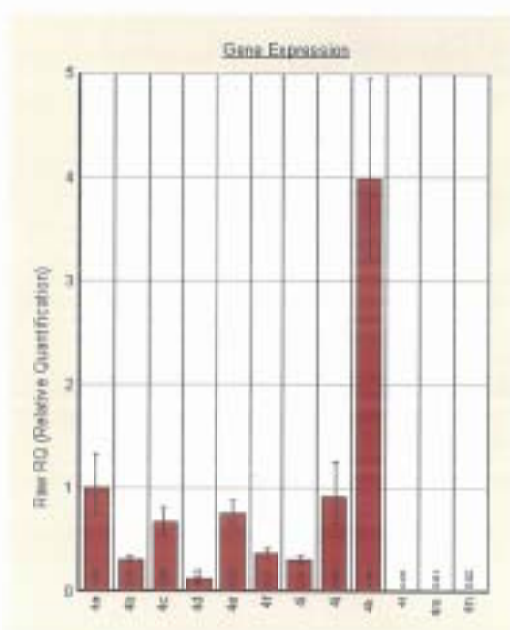
MADS-box domain，70-170區氨基酸為K-box domain。real-time PCR組織分析結果，3花器分化基因都專一性地表現在花芽及花朵器官，於營養組織根、莖、葉偵測不到此3花器分化基因之表現。將花器基因構築於農桿菌中，以農桿菌轉殖方法轉至煙草中，已得到擬轉植株。以木瓜體胚蛋白質二維電泳分析不同性別之木瓜，也已建立不同遺傳背景之鑑別品系5種及電泳分析之方法(表1-1，圖1-10)。



► 圖1-9、不同花性苦瓜進行AFLP (E-ACT/M-CTA)反應之電泳結果

表1-1、*CpMADS1*基因於木瓜台農2號兩性株之real-time PCR組織分析

Sample	Target Average C_T	Papain Average C_T	ΔC_T Target-(Papain) ^a	$\Delta \Delta C_T$ $\Delta C_T - \Delta C_{T,a}$ ^b	Rel. to a
4a (1-1)	24.00 ± 0.03	25.90 ± 0.12	-1.89 ± 0.13	0.00 ± 0.13	1
4b (1-2)	24.45 ± 0.04	24.67 ± 0.03	-0.21 ± 0.05	1.67 ± 0.05	0.31
4c (1-3)	23.92 ± 0.04	25.26 ± 0.07	-1.33 ± 0.09	0.56 ± 0.09	0.67
4d (2)	21.79 ± 0.08	20.68 ± 0.04	1.11 ± 0.09	3.01 ± 0.09	0.12
4e (3)	24.51 ± 0.04	26.02 ± 0.04	-1.50 ± 0.06	0.39 ± 0.06	0.76
4f (4)	24.77 ± 0.03	25.24 ± 0.04	-0.47 ± 0.05	1.42 ± 0.05	0.37
4i (瓣)	24.32 ± 0.05	24.51 ± 0.02	-0.19 ± 0.06	1.70 ± 0.06	0.30
4j (雄蕊)	22.07 ± 0.02	23.84 ± 0.14	-1.76 ± 0.14	0.12 ± 0.14	0.91
4k (雌蕊)	22.40 ± 0.05	26.29 ± 0.08	-3.89 ± 0.09	-1.89 ± 0.09	3.89
4l (梗)	33.36 ± 0.16	27.57 ± 0.02	5.79 ± 0.16	7.69 ± 0.16	0.005
4m (莖)	31.63 ± 0.08	27.06 ± 0.04	4.56 ± 0.09	6.46 ± 0.09	0.01
4n (葉)	31.55 ± 0.05	27.42 ± 0.13	4.12 ± 0.14	6.01 ± 0.14	0.01

圖1-10、*CpMADS1*基因於木瓜台農2號兩性株之real-time PCR組織分析

四 辣椒雄不稔基因分子標記之建立

李美娟

利用番椒細胞質雄不稔相關蛋白基因序列設計引子組CMSP1、CMSP2，可正確地鑑定出番椒細胞質雄不稔品系。且分析出雄不稔DNA片段與粒線體coxII基因(DQ126683.1；Cap.coxII)，及番椒細胞質雄不稔相關蛋白基因序列(DQ116040；Cap.cms)有關，且顯示番椒粒線體上Cap.coxII與Cap.cms相連。另以番椒CRF引子可專一地於G6、A5 (SR/Rf)擴增出預期870bp之DNA條帶，故以此引子可成功鑑別具雌性回復基因之番椒品系。

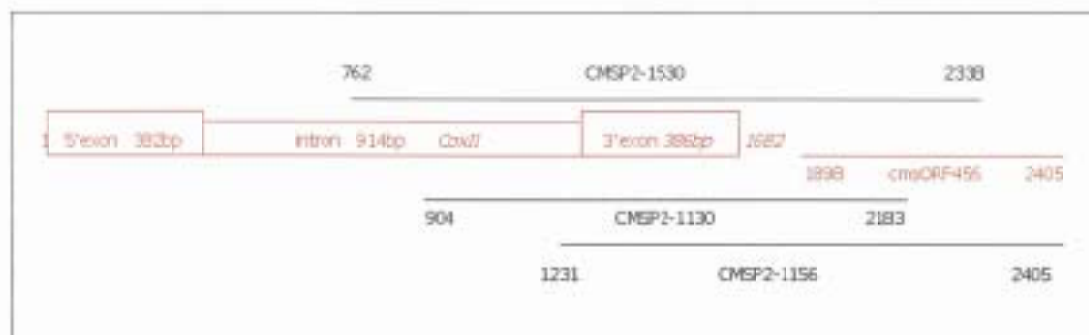


圖1-11、番椒葉片基因組DNA以CMS2引子組擴增出之DNA片段與番椒 $coxII$ 、 cms (ORF456) 相關蛋白基因之序列比對示意圖



圖1-12、番椒葉片萃取DNA擴增出之細胞核穩定性恢復之DNA片段，於細胞核穩定性恢復品系可擴增出約870bp之DNA條帶。G5、A7、A076、及A081的基因型為 $Srfrf$ ，G6及A5的基因型為 $SRfrf$ ；B112及B132的基因型為 $Nrfrf$