

四、生物技術之開發與應用

一 基因轉殖玉米與大豆檢測技術之建立

沈翰祖

全球基因轉殖作物栽培面積逐年明顯增加，根據2008年之ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) 統計資料，全球已達1億2千5百萬公頃，我國於植物品種及種苗法下之基因轉殖植物田間試驗管理規範，管理基因轉殖作物進出口及相關試驗研究。種苗改良繁殖場針對蒐集之基因轉殖玉米Bt11、E176、GA21、MON810、NK603、MON863、TC1507、T25品系與基因轉殖大豆RoundUp Ready Soybean等樣品，依據衛生署公告之檢測方式建立聚合酵素鏈鎖反應 (PCR) 檢測技術。檢測轉殖玉米Zein基因 (供作內部對照基因)，PCR增幅產物大小329 bp；檢測35S promoter之PCR增幅產物大小205 bp；檢測Bt11目標片段PCR 增幅產物大小110 bp；檢測MON810目標片段PCR增幅產物大小194 bp；檢測T25目標片段PCR增幅產物大小149 bp；檢測NK603目標片段PCR增幅產物大小131 bp；檢測TC1507目標片段PCR增幅產物大小71 bp；檢測目標片段PCR增幅產物大小135 bp；檢測Event 176目標片段PCR增幅產物大小211 bp；檢測GA21，目標片段PCR增幅產物大小

270 bp。(圖4-1) 轉殖大豆RoundUp Ready Soybean品系檢測Lectin基因 (供作內部對照基因) PCR 增幅產物大小118 bp；檢測35S promoter之PCR 增幅產物大小205 bp；檢測轉殖品項 (GTS 40-3-2) 目標片段，PCR 增幅產物大小172 bp；檢測殖入基因終止子 (NOS terminator) PCR 增幅產物大小180 bp。(圖4-2)



圖4-1、基因轉殖玉米種子Bt11、E176、GA21、MON810、NK603、MON863、TC1507、T25檢測結果.M: Marker.

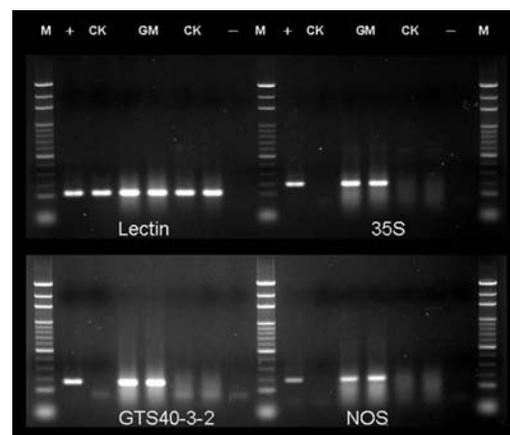


圖4-2、基因轉殖大豆種子RoundUp Ready Soybean檢測結果. M: Marker.

二 種子(苗)品質純度分子檢測技術研發

莊淑貞、張義弘、黃俊杉

種子(苗)是農業產業之母，種子(苗)商品品質純度管控方面，高品質的種用種子除了健康且具高發芽活力外，為了提高推廣品種的商業競爭能力，所供應種子的純度亦為高品質的指標。一般以外表形態進行遺傳純度分析鑑定的時候，除須要廣大的田間種植且須達一定的生長期加上外表形態易受栽培環境的影響等鑑定執行上的困難外加上檢定作業的冗長、繁複且限制種子(苗)即時供銷。如能在種子期或苗期即能由其外表型態特性或生化特性進行純度識別為最佳，因此許多早期快速的檢定方法有期建立的需要。其中分子標誌的機會在於僅用少量的植體材料在植物生長的早期即苗期或種子期即可進行分析鑑定。

1. 分子標誌運用於雜交番茄種子純度識別檢定

本場採種之番茄植體材料(雜交一代及父、母本親)，共8組24個材料。以具多型性的ISSR (10/19組) 及RAPD (25/40組) 引子，建立採種番茄種子純度品質檢定的分子標誌。對各組雜交材料(雜交一代及父、母本親)均已建立多組純度檢定的分子識別標誌，可運用於雜交種子中識別母本自交種子或父本種子。番茄採種種子進行苗期外表性狀檢定，從取樣到穴盤苗期

間約3個星期至1個月左右且須照光。為縮短受檢時間，檢定模式下朝建立DNA的快速萃取技術及種子期建立基因體DNA的快速萃取技術(圖4-3)，獲的高品質的基因體DNA及PCR結果(圖4-4、4-5)。

2. 分子標誌運用於雜交玉米種子純度識別檢定

玉米為異交作物，雌雄同株異花加上具雜種優勢、高產、自交弱勢等特性，目



圖4-3、浸潤3天之番茄種子

	
ng / μ l	260nm/280nm
260~500	1.86~2.02

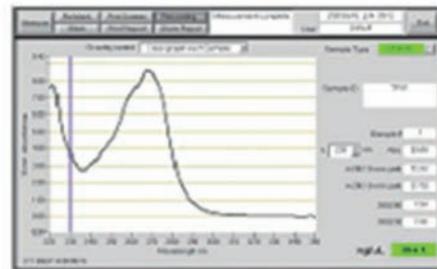


圖4-4、浸潤3天之番茄種子基因體DNA萃取品質

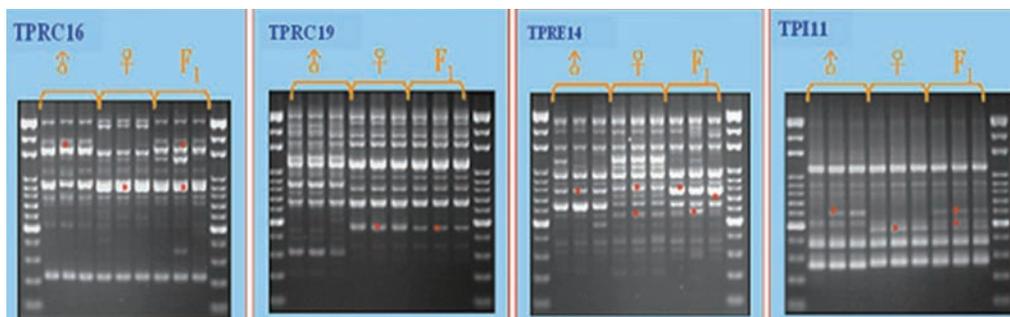


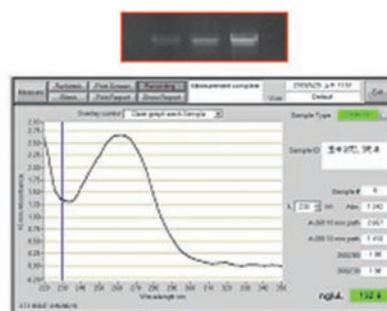
圖4-5、浸潤3天之番茄種子基因體DNA進行PCR結果

前推出的新品種概為雜交種子。雜交玉米臺南20號為單雜交一代種子，採種田每4行母本種植1行花粉親，授粉期過後即進行花粉親植株之砍伐，因此採收的穗即不虞混雜有父本穗，最後雜交一代種子純度的最大問題在於雜交一代種子混有自交之母本種子。

採種種子取樣到穴盤苗期間約1個星期左右，如可直接由種子萃取將又可縮短其間的時間。為縮短受檢時間，檢定模式下朝建立DNA的快速萃取技術，以浸潤隔夜的種子(圖4-6)，分別由種子的胚部及胚乳部進行種子期基因體DNA的快速萃取技術，獲的高品質的基因體DNA及PCR結果(圖4-7、4-8、4-9)。單雜交玉米臺南20號穴盤苗一週齡大小為0.40克至1.4克間，可萃取足夠的基因體DNA，運用於分子標誌識別篩選。ISSR分析中已篩選出3組引子可運用於雜交一代種子混有自交之母本種子之識別。又由識別條帶的識別靈敏度分析中僅1組引子可運用於混合樣品的識別(圖4-10)。



圖4-6、浸潤1天之玉米種子



萃取方法	CTBA
萃取濃度(ng/μl)	150~180
比值 (260nm/280nm)	1.8~1.9

圖4-7、浸潤1天之玉米種子胚部基因體DNA之萃取品質

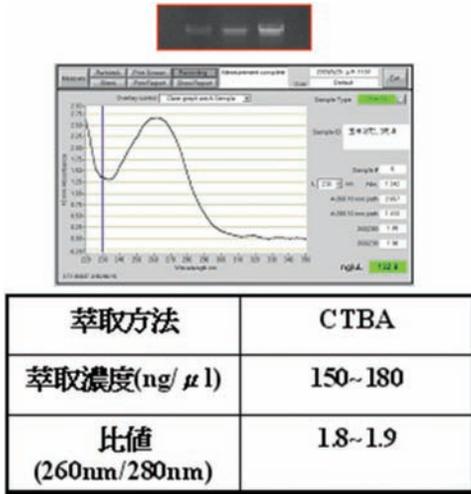


圖4-8、浸潤1天之玉米種子胚乳部基因體DNA之萃取品質

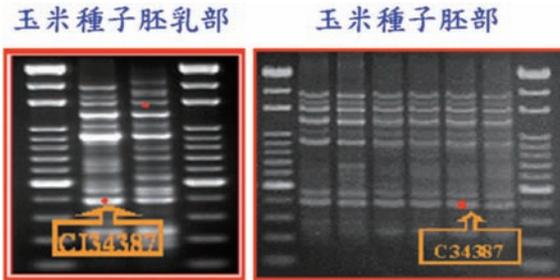


圖4-9、浸潤1天之玉米種子基因體DNA進行PCR結果

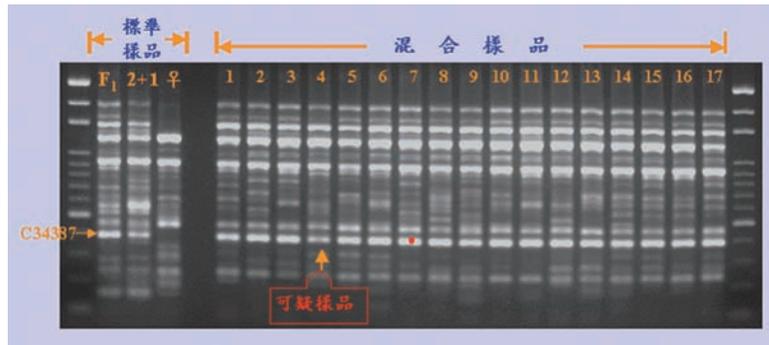


圖4-10、運用混合樣品於單雜交玉米台南20號的種子純度識別鑑定

作物特定性狀分子標誌建立及功能性基因選殖

莊淑貞、張惠如、孫永偉、張義弘

1. 茄科作物新品種鑑定技術之建立

番茄新品種(系)材料共28個品種(系)材料參試(表4-1)，完成620組引子之DNA-PCR分析，共篩選出125組/173標誌其再現性及穩定性高之分子標誌具品種

(系)間的多型性(圖4-11)。以NTSYS軟體進行群叢分析，結果共分成A1，A2及B等3個大群(圖4-12)。識別標誌的品種識別性及鑑定流程分析，結果共使用18組引子及18個分子標誌即可將27/28個參試的番茄新品種(系)材料作完全識別，但其中代號16與17的品種(系)分別為花蓮亞蔬18號及臺中亞蔬10號(愛蘭黑柿)，其Jaccard's相似性係數為0.9725僅3個分子標誌存在多型性可作識別。

表4-1、28個番茄新品種 (系) 參試材料之代號及商品名稱

代號	品種名	代號	品種名
1	崧寶黑柿9號	15	臺農10K
2	崧寶貴夫人	16	花蓮亞蔬18號
3	聖尼斯惠美	17	臺中亞蔬10號 (愛蘭黑柿)
4	聖尼斯Apple Cherry	18	臺農178
5	農友金童	19	臺農桃太郎 (桃農)
6	農友小春	20	豐田NO.30
7	長生AT-613	21	農友3439
8	農友玉女	22	欣樺金寶麗6號 (3656)
9	農友F-3627	23	欣樺紅多多 (3651) 小果
10	欣樺SF-04	24	花蓮亞蔬21號
11	欣樺夏日紅6號 (3706)	25	臺南亞蔬11號
12	臺南亞蔬6號	26	亞蔬13號
13	臺南亞蔬19號	27	亞蔬22號
14	臺農167	28	種苗8號

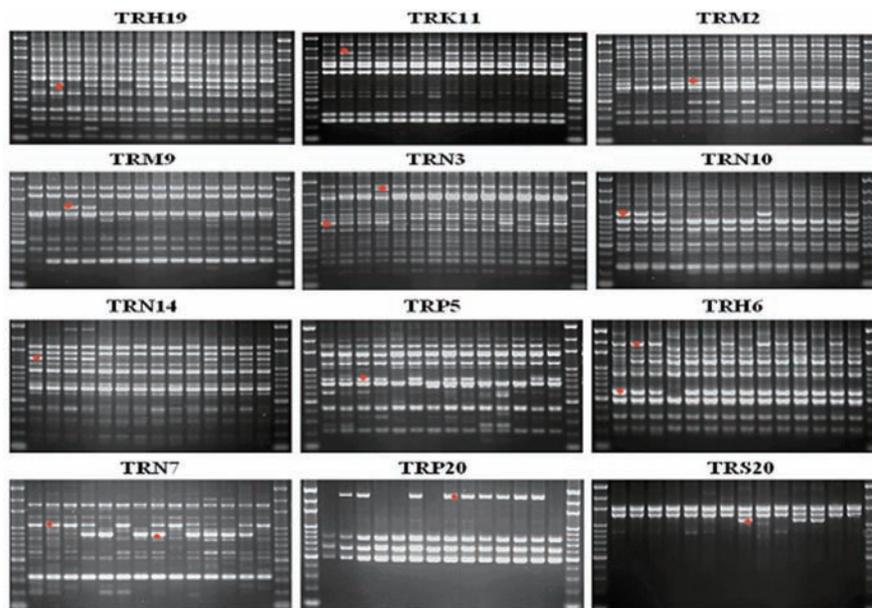


圖4-11、具高度再現性、穩定性及品種多型性之分子標誌

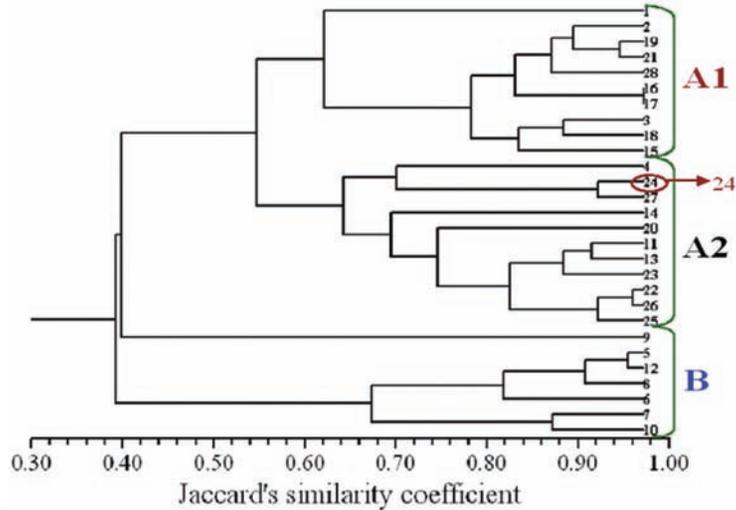


圖4-12、番茄新品種 (系) 參試材料經UPGMA群叢分析後之群叢樹狀圖

品種識別鑑定的技術涵蓋由外表性狀、蛋白質、生化成分鑑定到最直接的DNA分析，而每個層次的方法有其識別鑑定的技術面限制。以DNA-PCR分析而言儀器的穩定度、引子的靈敏度、藥品的廠牌等等都會影響識別鑑定的結果，常常無法以單一的技術即能完成完全的識別鑑定，而必須藉重多個技術的綜合識別鑑定結果作完整的評估，才有可能達成識別鑑定結果的公信。本試驗中雖然大部分的品種 (系) 已有可識別的標誌但仍存在無法識別的的限制，因此外表性狀或其他的識別鑑定技術即可被納入共同應用。

四 朵麗蝶蘭及彩色海芋品種分子標誌技術開發

張惠如、莊淑貞、張珈錡、劉明宗、張義弘

植物新品種為智慧財產權的一種，對農業智財權的保護可視為一個國家農業進步的指標，而新品種不斷地推陳出新則為農業永續發展的基礎。本計畫將以蘭科及球根花卉，應用分子生物原理與技術，建立重要品種 (系) 專一性的分子標誌。將可作為釐清商業品種與智財權保護的客觀依據，進一步保障育種者權利、加速新品種育成、擴展國際市場與提升種苗產值。

朵麗蝶蘭陸續收集有品種權存續的品種27種及其對照品種20種，以及原生種23種，共約有70種的植物葉片材料。初步挑選八個品種權存續之商業品種，已完成500個RAPD引子的分析，在商業品種及其對照品種間篩選具穩定性差異之條帶。八組商業品種與其對照品種間，經過三次確認實驗，皆篩選出較具穩定

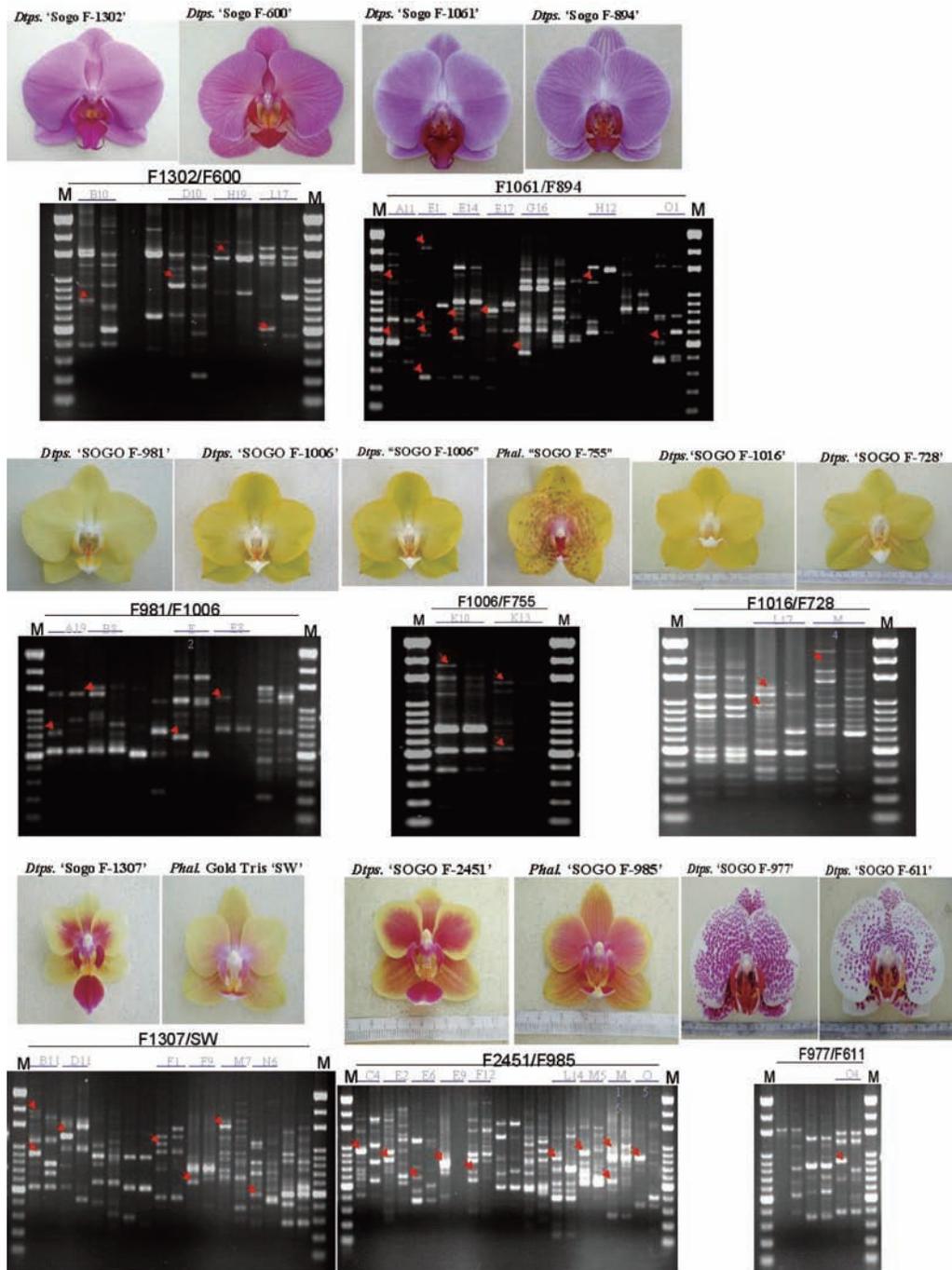


圖4-13、八個受品種權保護品種及其對照品種之RAPD篩選差異性條帶電泳圖：每組左方花朵圖片品種為受品種權保護品種；右方為其對照品種，紅色箭頭處為出現在受保護品種之差異性條帶

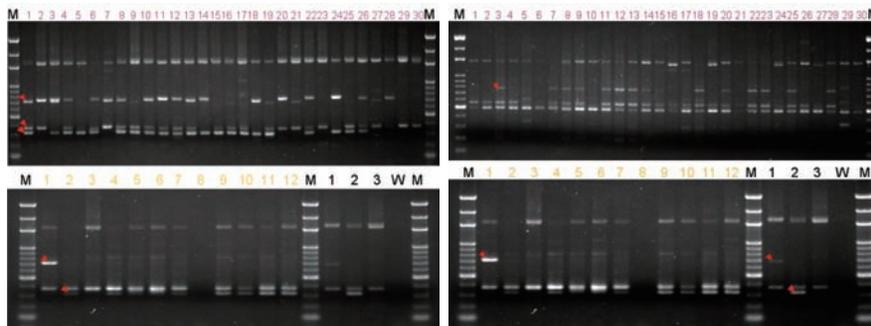


圖4-14、利用SACR引子針對三個花色分群進行差異性篩選：上圖編號1-30為紅花系；下圖左編號1-12為黃花系；下圖右編號1-3為斑花

表4-2、由種原圃取得之彩色海芋材料共50個參試樣品其代號及名稱

代號	名稱	代號	名稱	代號	名稱
1	Florex Gold	18	Majestic Red	35	桃姬 (種苗一號) Burgnudy Lady
2	Lavender Gem	19	Antique	36	香吉士 (種苗二號) Sunkist
3	Treasure (C43)	20	Rehmannii	40	Purple Hazel
4	Schwarzwald	21	Crystal Blush	42	Romeo
5	Butter Scotch	22	Starlight (C13)	43	Celeste
6	Eveline	23	Pink Pot (粉佳人)	44	Cameo
7	Gem Red Dark Eyes	24	Scarlet Pimpernel	45	Sensation
8	Pink Gem	25	Greta	47	Anneke
9	Rubylite Rose	26	Mango (36的對照)	48	Elmara
10	Tahiti	27	Captain Volante	49	Pentilanddii
11	Goldilocks	28	Harmony	50	Dominique
12	Pacific Pink	29	Best Gold	51	Tango
13	Millennium Gold	30	Hazel Marie	52	Golden Sun (C23)
14	Picasso	31	Red Sox	53	Chianti (35的對照)
15	Neroli	32	Apricot Glow	54	Vanity Fair (C25)
16	Blank Eyed Beauty	33	Pink Persuasion	55	Flame
17	Albomaculate	34	Black Magic		

性之差異性條帶(圖4-13)。進一步在每組先挑一個差異性條帶進行序列分析。依據解序結果設計具序列特徵性(SCAR)引子對，將所設計之200組SCAR引子，擴大篩選依花色初分成三群之45種商業品種(品種權保護或對照之品種)，可得到一些差異性條帶(圖4-14)。

彩色海芋由種苗場種原圃取得50個品種(系)材料參試(表4-2)，完成620組引子之DNA-PCR分析，共篩選出149組再現性及穩定性高之分子標誌具品種(系)間的多型性(圖4-15)。以NTSYS軟體進行群叢分析，結果共分成A、B及C等3個大群(圖4-16)。

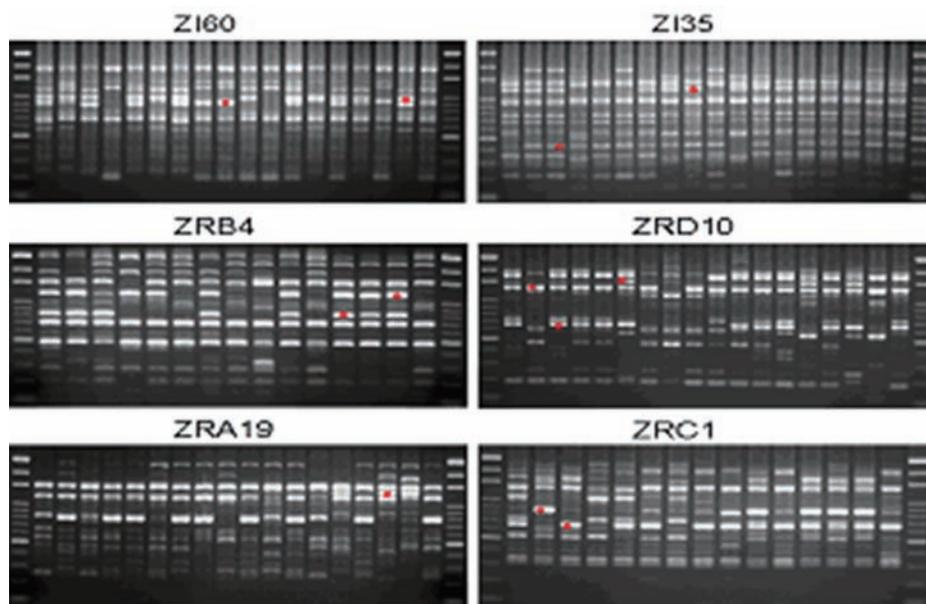


圖4-15、彩色海芋DNA-PCR分析中，穩定性及再現性高之多型性部分分子標誌

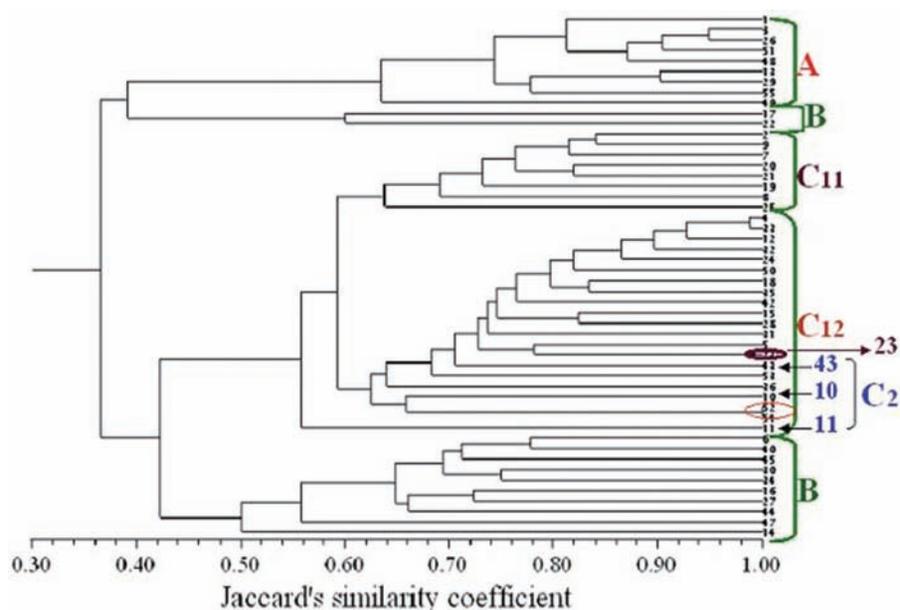


圖4-16、彩色海芋UPGMA群叢分析，參試材料間親緣及分群關係

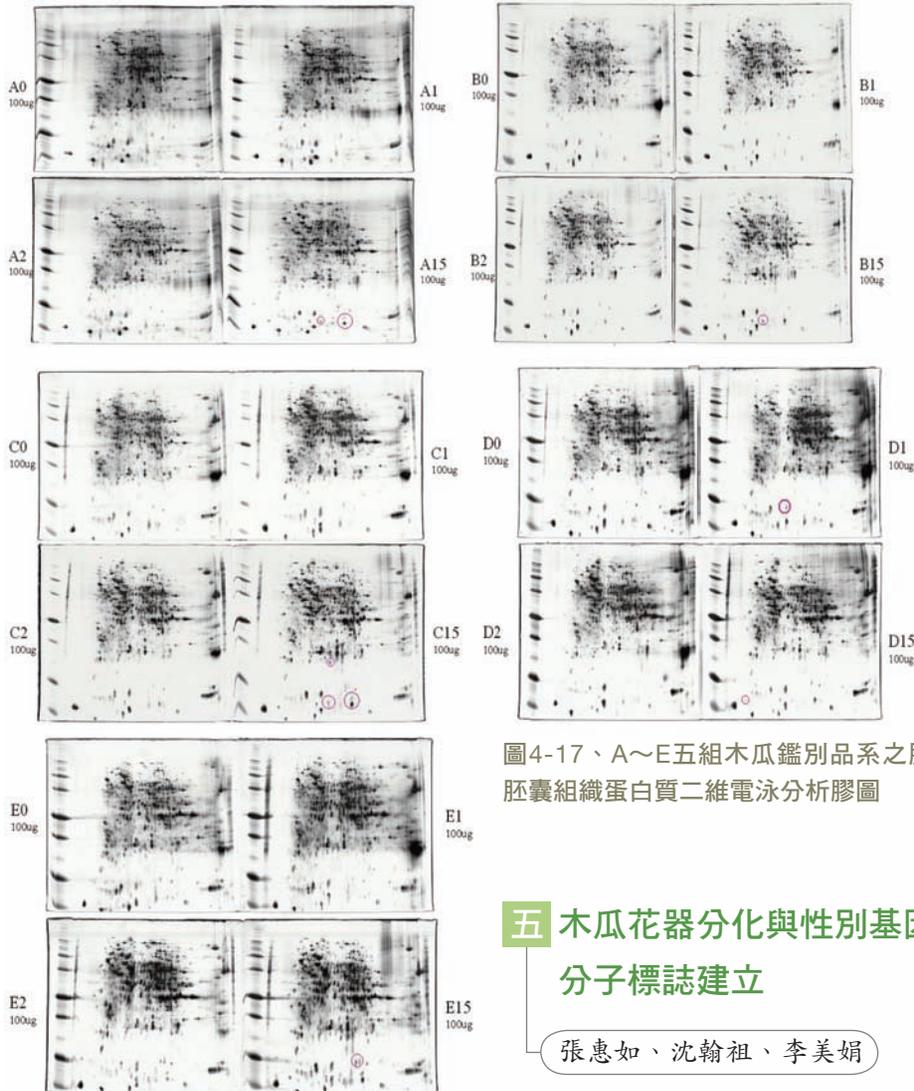


圖4-17、A~E五組木瓜鑑別品系之胚株與胚囊組織蛋白質二維電泳分析膠圖

五 木瓜花器分化與性別基因及其分子標誌建立

張惠如、沈翰祖、李美娟

識別標誌的品種識別性及鑑定流程分析，結果共使用17組引子及19個分子標誌即可將50個參試的彩色海芋材料中的49個作完全識別，但其中代號52與54的品種(系)，為同為黃色系則無法由建立的分子標誌作識別(圖4-16)。

已完成建立木瓜性別鑑別品系共5組，並依試驗設計完成各品系5個胚胎發育時期之取樣及蛋白質抽取，並透過所建立的蛋白質二維電泳技術進行分析。每組皆完成了對照組與實驗組的電泳膠片分析，觀察各電泳膠片結果：發現經肉眼觀察可在各組間均發現有差異性蛋白質點的存在(圖4-17)。

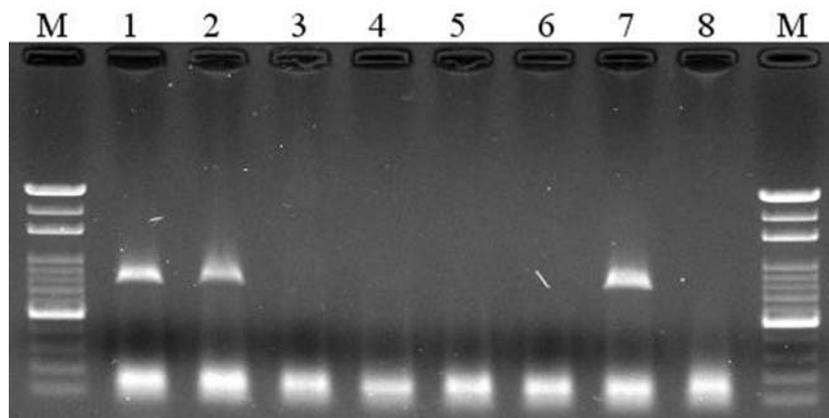


圖4-18、利用RAPD引子進行木瓜全兩性性狀篩選。M：marker；1. 種苗7號全兩性木瓜；2. 種苗七號全兩性木瓜雜交後代；3. 全雄株；4. 雌株；5. 佛羅里達雄株；6. 兩性株；7. 全兩性木瓜雜交後代；8. 水

除了蛋白質的分析外，另外由DNA層次進行專一性標誌的篩選工作，希望能獲得與全兩性性狀相關之分子標誌。經過多組的RAPD引子篩選工作，目前發現有一引子可以區分全兩性性狀(圖4-18)。將此差異性的條帶進行商業載體的選殖後，進行定序分析與基因庫比對，發現目前並無相關序列的發表，僅搜尋到兩個木瓜BAC載體。將此序列進一步設計約20組的SCAR引子對，後續將以這些SCAR引子對篩選不同品種不同性別的木瓜樣品。

六 春石斛微體繁殖技術之建立

張珈錡、廖玉珠

春石斛 (*Dendrobium*) 為蘭科石斛屬多年生草本植物，於春季3-5月間開花，花為總狀花序，花開於假鱗莖節兩側，花

朵數多且色彩鮮豔，頗具觀賞價值。其種苗之繁殖多採行以假鱗莖高芽或莖段進行扦插之無性繁殖法，唯此種繁殖方法常導致種苗品質不易均一。因此，為獲得大量且品質一致之健康種苗，提昇春石斛外銷之競爭力。本試驗以三個春石斛品系(9701、9705、9714)開花株之側芽或高芽切成數個含芽之莖段，試驗不同芽節位以及植物生長調節劑NAA、BA不同濃度組合之培養基對春石斛分生芽增殖之影響，以建立春石斛之分生芽繁殖體系。(圖4-19)為以NAA、BA不同濃度比例培養春石斛頂芽部位和芽基部之分生芽增殖倍率，試驗結果顯示，不同節位之分生芽增殖率，以培養芽基部較頂芽部位為佳，其中頂芽部位增殖倍率高時，常形成叢生狀之芽體(如圖4-20a)，反不利於後續的培養。(圖4-20b、c)為以芽基部作為培殖體經增殖培養2個月後之生長情形，其於發根培養後亦可獲得良好之根系。

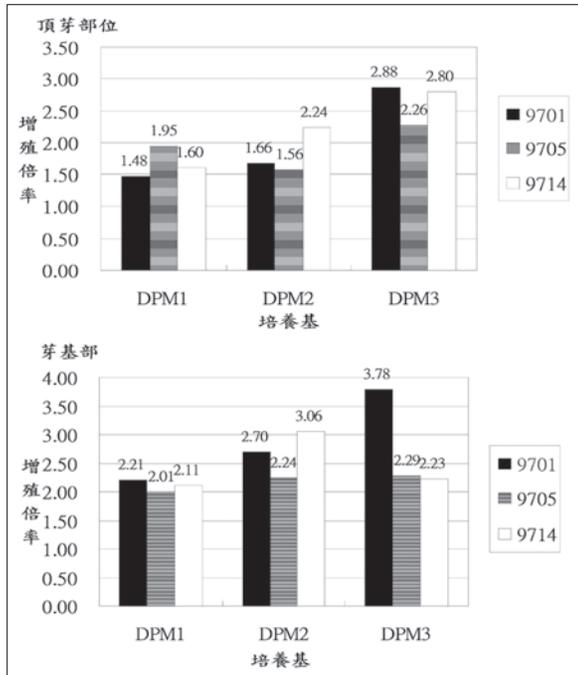


圖4-19、春石斛不同芽節位之分生芽增殖倍率

七 仙履蘭組織培養技術之建立

廖玉珠、張珈綺

仙履蘭 (Slipper Orchids) 屬於蘭科，因種類眾多、花色、花型獨特多變，世界各地均擁有特定的愛好者。臺灣地區自九〇年代開始有業者積極引進，幾年來仙履蘭成為多項蘭展比賽的常勝軍，逐漸受到國內蘭界的重視。不僅由歐美、日本引進優秀的得獎個體或親本，更因無菌播種、栽培各項技術設備的改進，臺灣業者栽培的雜交品種、數量與品質，獲得國外業者的青睞。目前種苗生產大多以無菌播種為主。組織培養分生苗繁殖技術尚無法大量

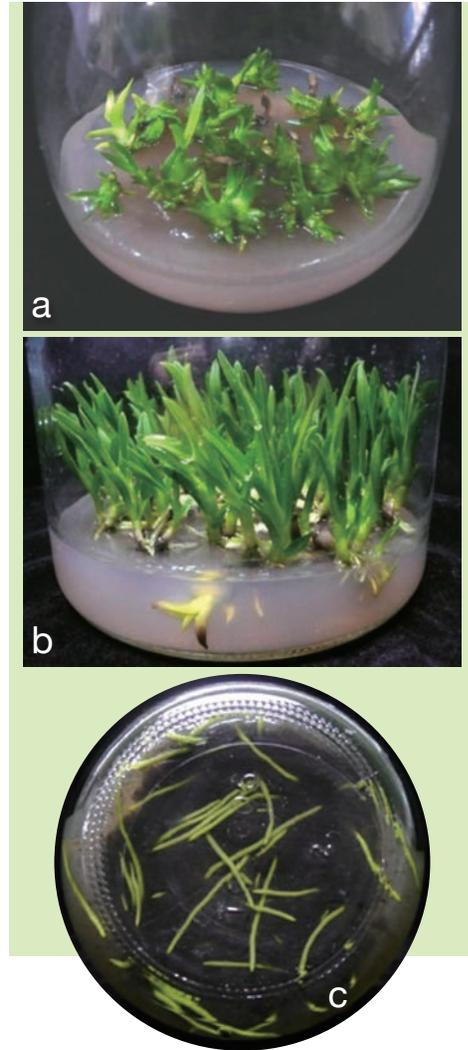


圖4-20、春石斛不同節位增殖培養後之生長情形。a：頂芽部位經培養後易呈叢生狀；b：培養芽基部之生長情形；c：經發根培養可形成良好之根系

生產種苗，為其產業無法商業化之最主要因素。本試驗即以仙履蘭開花株之側芽為材料，研發組培量產技術。結果顯示：

1. *Phrah. Mem. Dick elements* 品種可獲得叢生之分生芽，繼代培養亦可



圖4-21、Phrah. Mem. Dick clements 品種可獲得大量分生芽種苗及開花情形



圖4-22、仙履蘭開花株側芽繼代繁殖情形



圖4-23、仙履蘭不同大小花苞基部誘導植株

獲得大量種苗 (圖4-21)。*Paphiopedilum*屬之maudiae type、Complex及多花交單花品系，開花株之側芽後切取莖頂培養，成活率可提高至70%-80%每兩個月可繼代一次 (圖4-22)。繁殖倍率因品種間之差異很大，以多花與單花雜交品種增殖倍率最高為。至第四代芽數最高為16個，最低為1個。

2. 取不同大小花苞基部，於黑暗處理後6個月可誘導出植株，將培植體照光葉片轉綠後可發育成小芽體 (圖4-23)。

八 利用分子標誌輔助育種技術平臺

孫永偉

由於acyltransferase (*Pun1*基因編碼) 為控制辣椒素合成之關鍵酵素之一，本研究希望藉由*Pun1*基因建立可快速鑑定番椒辣椒素之DNA分子標誌。研究結果顯示，於番椒 (辣椒、甜椒、辣椒×甜椒之雜交一代) 幼苗期取少許葉片萃取DNA，利用3條專一性引子26F、54F、1305R進行PCR反應，可將具有辣味之辣椒擴增出1.7 kb DNA條帶，無辣味之甜椒擴增出1 kb DNA條帶，辣椒與甜椒之雜交種可同時擴增出1及1.7 kb二條DNA條帶。此分子標誌無法顯示番椒屬辣椒素含量，但可協助育種者於番椒雜交後代分離品種之幼苗期快速且大量判別辣椒素存在情形，無須等待至果實成熟，再以口嚐或HPLC方式判別。

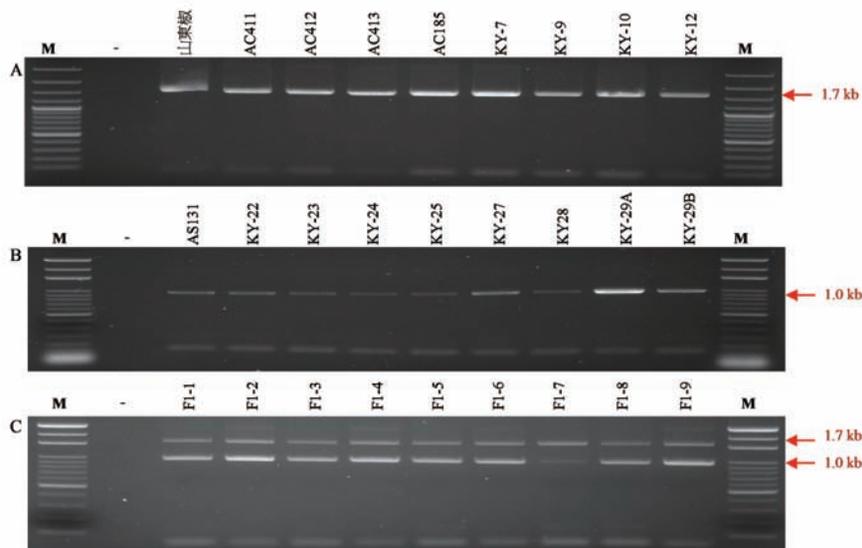


圖4-24、利用26F1/54F2/1305R引子組檢測番椒不同品種之辣椒素。有辣味者具有1.7 kb條帶(A)，無辣味者具有1 kb條帶(B)，辣椒與甜椒雜交種同時具有1及1.7 kb條帶(C)

九 仙履蘭生技產業之開發與應用

孫永偉

由於目前市場上仙履蘭屬栽培品種親本均有原生種血緣，若能建立仙履蘭屬原生種可遺傳性分子標誌，將有助於協助育種者鑑定其親本及雜交種親緣性。本研究利用比對仙履蘭屬各原生種ITS序列，找出原生種-金童 (*Paphiopedilum armeniacum*)、玉女 (*P. micranthum*)、及越南美人 (*P. delenatii*) 與其他原生種差異性序列，各自設計專一性引子組。利用此個別引子組鑑定各種仙履蘭屬原生種及雜交種，分別只有金童、玉女、及越南美人及

其雜交種可出現專一性DNA條帶。目前有關仙履蘭屬品種可遺傳之分子標誌幾乎無相關研究，本研究開發之引子組可作為仙履蘭育種者選育及鑑別雜交品種參考依據，利用此技術亦可逐步開發具遺傳性之各種仙履蘭屬原生種分子標誌。

十 番茄抗根瘤線蟲基因型之分子鑑定

孫永偉

目前對於番茄抗根瘤線蟲基因型之分子鑑定技術，均為以一組專一性引子進行PCR反應後，再配合限制酶切反應，方能得知番茄植株之抗根瘤線蟲基因型。本研究藉由分析抗病株 (R) *REX-1*與感病株 (S) 基因序列差異性，設計特殊專一性primer sets，primer set，直接進行PCR反應，無須再使用限制酶作用，即可快速鑑定番茄抗根瘤線蟲之基因型。研究結果顯示，利用primer set進行PCR反應，可將同質結合基因型抗病株 (R) 擴增出680 bp之DNA條帶，可將同質結合基因型感病株 (S) 擴增出170 bp之DNA條帶，可將異質結合基因型抗病株 (R) 擴增出170及680 bp之二條DNA條帶。本研究開發此特殊專一性primer set，於番茄幼苗期取少許葉片萃取DNA後進行PCR反應，無須再進行限制酶反應，即可獲知植株抗根瘤線蟲基因型，可縮短檢測時間、降低檢測成本、雙重檢測可確保檢測結果正確性，對於協助育種者快速篩選抗病株將有非常大助益。

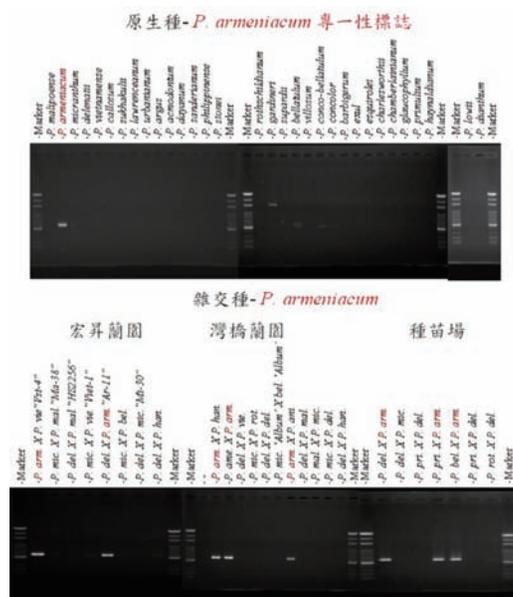


圖4-25、利用金童 (*P. armeniacum*) 專一性引子進行PCR反應測試各原生種，只有金童出現DNA條帶，且雜交種之父母本之一為金童，亦出現該DNA條帶

植物種苗團隊-蘭科作物重要病害之早期分子監測及管理

孫永偉、鍾文全

評估蝴蝶蘭黃葉病菌對蘭科寄主的專一性，得知該菌僅可為害蝴蝶蘭。評估各地區蝴蝶蘭園品種對細菌性軟腐病、*Burkholderia*和真菌性黃葉病 (*Fusarium solani*) 的抗性，結果顯示目前各蘭園所培育的蝴蝶蘭品種對此三種病原均非常感病。網室評估木黴菌防治黃葉病菌的效果，結果顯示木黴菌混拌至水草的防治的

效果比覆蓋木黴菌的防治效果較佳，但根的生長則以覆蓋木黴菌最好。已設計1組專一性引子可鑑定蝴蝶蘭*F. solani*菌，將測試用於蝴蝶蘭早期黃葉病鑑定之可行性。

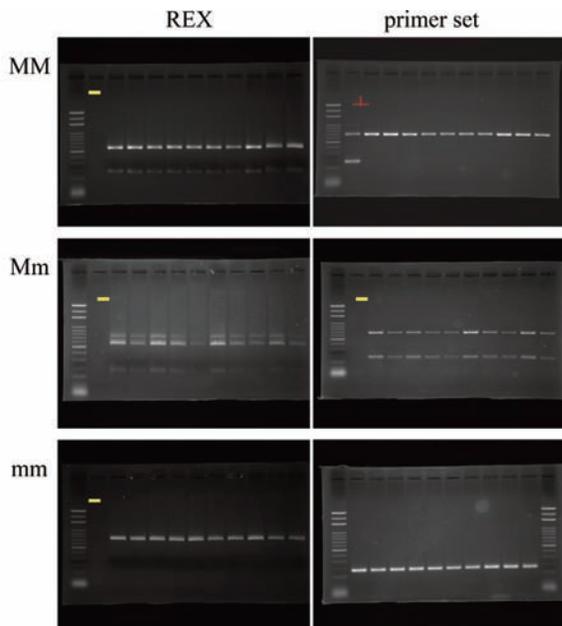


圖4-26、利用primer REX (Williamson等人, 1994開發) 與primer set將抗病株 (MM, Mm) 與感病株 (mm) 進行PCR反應後之電泳圖譜結果

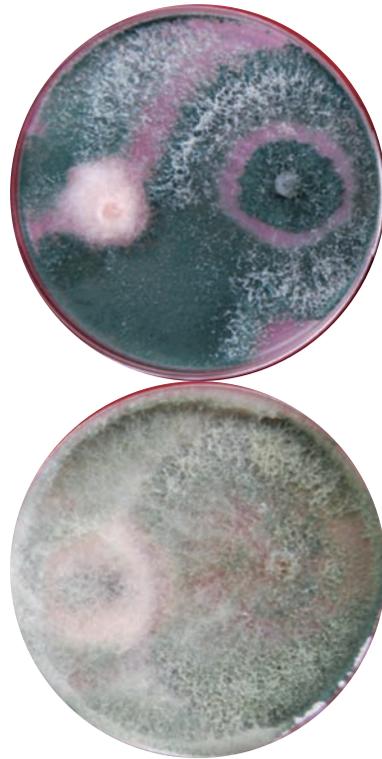


圖4-27、木黴菌拮抗蝴蝶蘭黃葉病菌的情形



圖4-28、建立蝴蝶蘭黃葉病 (*Fusarium solani*) 專一性分子標誌