

## 三、種子(苗)檢查、檢測及驗證

### 一 絲瓜抗萎凋病及食用玉米之耐旱與其他重要性狀關聯分子標誌的開發與利用

龔美玲、曾一航、張勝智、蘇士閔

本計畫在「食用玉米耐旱及其他重要性狀關聯分子標誌之利用及開發」部分，113年利用先前植株實測耐旱表現較佳之2個品種進行雜交(ZM-00003 × ZM-00004)，並收穫混合其成功雜交籽實(圖3-1)形成混合族群，並供後續單株自交世代推展及相關分析使用。另為擴大潛在耐旱玉米育成材料構成，已針對47份新蒐集玉米品種材料，進行耐旱關聯基因(*dhn1*、*rsp41*)之SNP多型性分析，可供後續新雜交組合構成選擇之評估參考。

在「絲瓜抗萎凋病分子標誌開發」部

分，113年進行圓筒絲瓜抗感病品系雜交F<sub>2</sub>分離族群之萎凋病接種調查，從外表型分離比推測可能存在1個隱性抗病基因，以ddRAD-seq進行基因型分析，以經過篩選後以剩下的1,151個SNP進行連鎖群分析及基因型定位，推測可能存在第6條染色體上(圖3-2)。



圖 3-1、潛在耐旱玉米品種之雜交組合 (ZM-00003 × ZM-00004) 授粉結實情形

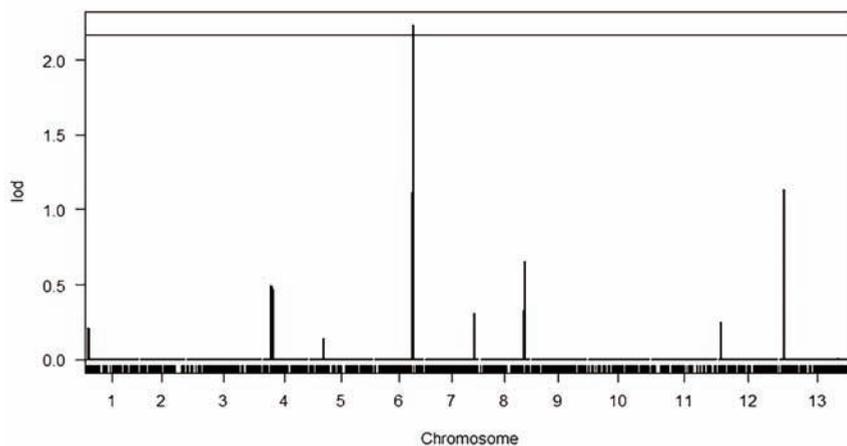


圖 3-2、絲瓜抗萎凋病基因定位結果

## 二 基因編輯及基因改造作物檢監測體系之研究

曾一航、陳靜欣、張郁菁

本計畫主要目標係在提升我國對於農業生技作物之檢監測量能。在基因改造作物品項檢測方法建立上，已完成基因改造大豆品項 (DBN-09004-6) 之定性 / 定量檢測技術建立，其定性偵測極限可達 0.05%。在馬鈴薯基改檢測系統優化部分，4 種參試核酸萃取方法中以「CTAB 萃取」者表現較佳，另「自動萃取 - 試劑 2」在核酸萃取濃度表現上有明顯增進，可作為

目前核酸自動萃取系統之替代試劑考量。在基因改造品項檢測能力試驗方面，團隊所屬多數實驗室對於木瓜、玉米及大豆盲樣之最終檢測正確率為 100%，僅實驗室 B 在木瓜盲樣檢測結果上出現偽陰性 (NPTII、PRSV-CP) 情形；而參與外部機構 (FAPAS) 相關能力試驗之檢測結果則均為正確。另在 113 年度基因改造作物檢監測作業執行結果中，國內生產田區抽樣檢測數共 36 件 (馬鈴薯 31 件、玉米 4 件、大豆 1 件)；國外進口作物 (硬質玉米、大豆、棉子) 抽樣檢測數則合計 100 件 (大豆 56 件、玉米 43 件、棉子 1 件)。

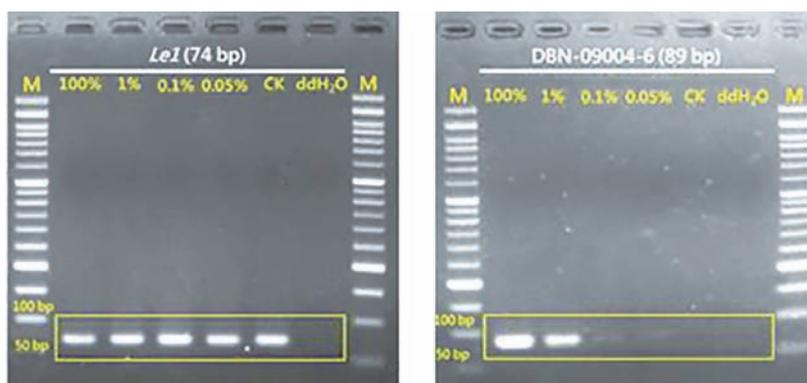


圖 3-3、基因改造大豆品項 (DBN-09004-6) 之定性檢測分析結果  
備註：上圖中「M」為 marker，「ddH<sub>2</sub>O」為二次水；圖 3-3(左) 依序為不同濃度 (100%、1%、0.1%、0.05%) 之基因改造大豆品項 (DBN-09004-6) PCR 擴增產物 (擴增標的：Le1；74 bp)；圖 3-3(右) 依序為不同濃度 (100%、1%、0.1%、0.05%) 之基因改造大豆品項 (DBN-09004-6) PCR 擴增產物 (擴增標的：DBN-09004-6 偵測片段；89 bp)

## 三 加強基因轉殖植物安全管理 - 基因轉殖植物之檢測

周明燕、曾一航、邱燕欣

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，現階段採行邊

境管制及境內源頭管理措施，針對可能進口之基因轉殖作物包括大豆、玉米、水稻、馬鈴薯、油菜及木瓜等作物種子／種薯，在進出邊境時採樣偵測，同時針對高風險作物對國內種苗業者進行源頭抽檢，以確保我國作物生產不受基改作物污染。本年度國內業者及田間監控部分共抽檢 7 縣市、12 家種苗業者，累積採樣木瓜種苗 15 件、玉米種子 10 件，合計 27 件。進出口種子監測部分共完成出口木瓜種子 15 件、進口玉米種子 28 件、進口大豆種子 3 件，總計 41 件抽檢樣品，皆無檢出目標基改片段，確保我國田間無基因轉殖作物種植及被污染風險。各小組成員檢測能力維持測試，針對木瓜葉片、木瓜種子、大

豆、玉米、馬鈴薯進行盲樣能力試驗，團隊定性檢測結果皆 100% 符合。

表 3-1、113 年度種苗業者基因轉殖作物安全管理抽檢樣品數量統計表

	木瓜苗	玉米種子
臺北	0	0
新竹市	2	3
新竹縣	0	3
臺中市	0	3
彰化	6	2
嘉義	2	0
屏東	5	1
合計	15	12

表 3-2、進出口種子邊境監控抽查樣品統計表

	樣品數(件)	抽檢母體總量(kg)	佔總體比例(%)
木瓜種子	10	292.035	13
玉米種子	28	141,788	17
大豆種子	3	220,000	100

#### 四 茄科作物土傳病害抗、感病品系根部微生物群分析與應用

林如玲、周明燕、薛道原、邱燕欣

番茄是深受消費市場喜愛的作物，但由於土傳性病害的影響，每年造成約 10-20% 的番茄產量損失，尤其在密集栽培環境下，病害發生率更顯著提高。研究顯示，透過微生物資源的應用與調整，可為提

升作物抗逆境與促進環境韌性提供有效方案。在去年度研究中，我們針對市面常用的根砧及抗病、感病番茄品系，進行根圈土壤的 16S rRNA 全基因組定序分析，探討不同生長階段下的菌種組成與相對豐度差異。結果發現，相較於感病品系，抗病品系與根砧在根圈土壤中擁有較高豐度的 *Sphingobium* 及固氮細菌群。本年度研究進一步針對上述兩類微生物，採用選擇性

培養基進行分離與增殖，並對分離菌株進行功能性測試，包括固氮、磷酸鹽溶解、螯鐵生成及 ACC 脫氨酶活性篩選 (圖 3-4)。最終篩選出 10 株具促進植物生長潛力的菌株。在青枯病菌的拮抗活性測試中，發現其中 6 株表現出良好的拮抗效果；進一步以番茄苗期青枯病防治試驗評估其應用潛力 (圖 3-5)，結果顯示有 3 株菌株能顯著提升番茄對青枯病的抗性 (圖 3-6)。未來研究將聚焦於這些具潛力菌株的拮抗機制解析與培養條件優化，並結合田間試驗評估其實際應用價值。期望本研究成果可推廣至病害防治及促進植物生長的環境友善栽培模式，為永續農業提供創新解決方案。



圖 3-4、分離菌株固氮活性重複測試



圖 3-5、土壤分離菌株對蕃茄抗青枯病能力接種測試，由左至右，分別為未接種對照組、僅接種青枯病菌組、僅處理土壤分離菌株組、先處理土壤分離菌株後再接種青枯病菌組。A: 蕃茄品種農友 301；B: 蕃茄品種 H7996。

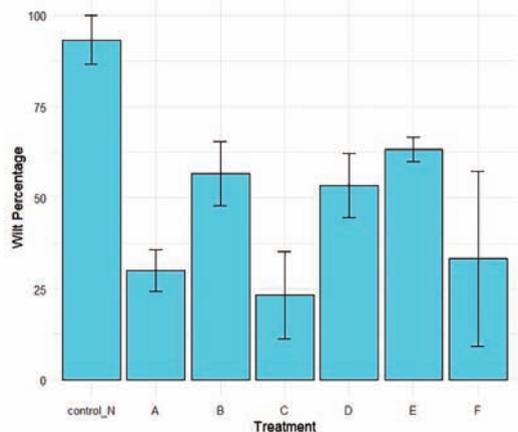


圖 3-6、土壤分離菌株對蕃茄青枯病防治效果評估經單因子變異數分析 (ANOVA) 及 Tukey's HSD 檢定，A、C、F 處理組相較於對照組的萎凋百分比顯著降低，其 p 值分別為 0.024、0.011 和 0.035

## 五 甜瓜之新興輔助作物選育技術開發

林如玲、龔美玲、張惠如、邱燕欣

甜瓜栽培常受到馬鈴薯 Y 病毒屬 (Potyvirus) 感染，導致植株生長受阻，品質下降，造成嚴重減產。抗病育種是控制病毒病害最有效的方法，但因栽培種甜瓜缺乏抗病毒種原，因次無法藉由傳統育種取得抗病毒品系。近期新興植物育種技術如 CRISPR/Cas9 等，提供了對植物本身基因組特定序列進行編輯，可用以剔除植物中參與病毒感染的因子 (例如：eIF4E 蛋白)，提供新的機會以取得具病毒抗性的種原。由於甜瓜再生及基因編輯效率會受基因型影響，因此本年度我們透過靶向甜瓜 PDS 基因的 CRISPR 載體，對 6 個不同品種甜瓜進行基因編輯測試，結果顯示，在 Charentais 和銀輝品種中，白化突變株的獲得率相對較高，顯示這兩個品種具較好的編輯潛力 (圖 3-7)。此外，我們利用

前期構築的 CRISPR 載體進行甜瓜農桿菌介導的轉殖實驗，共得到 206 株再生植株 (圖 3-8)，經轉基因確認並對 104 株轉殖株進行目標基因定序，但尚未得到成功編輯植株。由於根據文獻報導，形態發生相關轉錄因子的過度或誘導表現能提升轉殖效率，並擴大轉殖可適用的基因型範圍，因此本年度，我們進一步構築含有形態調節基因 WUS2 和 AtSTM 的 CRISPR 載體，並進行初步轉殖方法測試 (圖 3-9)。後續我們將持續優化基因編輯技術，並評估形態調節基因的應用潛力，以提升甜瓜基因編輯效率，期望最終獲得具病毒抗性的甜瓜育種材料。



圖 3-7、以靶向甜瓜 PDS 基因的 CRISPR 載體進行不同品種甜瓜的基因編輯測試

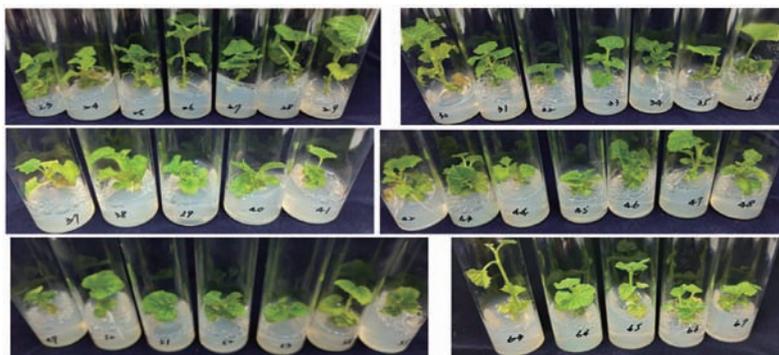


圖 3-8、甜瓜轉殖後再生株



圖 3-9、圓葉菸草及甜瓜發育調節基因載體轉殖方法測試

## 六 番茄嫁接用根砧青枯病抗性研究

周明燕、薛道原、龔美玲、邱燕欣

青枯病 Bacterial wilt(BW) 由 *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) 引起，是影響番茄生產的嚴重土壤傳播疾病。目前商用番茄缺乏強抗病品種，育苗場大量使用對青枯病有較高抗性的茄子作為嫁接根砧，維持番茄正常生產。根砧用茄子種子來源部分購自種子商、部分自行留種，近年茄子根砧抗性逐漸弱化趨勢，本研究針對育苗場常用之茄子根砧進行抗病力測試，同時希望透過世代抗性累積篩選出穩定抗性之優良單株種子，協助產業維持嫁接苗優勢。

### 1. 番茄嫁接用根砧材料抗病力研究

已確定抗性優良單株所採收種子育苗 ( $S_1$ ) 進行青枯病菌接種測試，共 11 個茄砧及 5 個番茄砧合計 16 個抗性材料及日本茄(茄子)、農友 301(番茄)等 2 個感病材料進行接種測試抗病力。以分離自茄子病株之病原菌分別於 6/18 及 9/12 進行接種材料，分別於接種後 7 天、14 天、21 天及 28 天調查受試材料罹病程度，並比較接種後 28 天罹病率進行抗病力評估。18 個受試材料明顯分成三群：第一群罹病率 <10%，表現出高穩定的抗性，在接種後 14 天達到發病高值，包括優良抗病單株自留種子材料都屬於高抗病群；第二群罹病率介於 25%~50% 之間，包括新收集到的茄子材料，在調查期間陸續發病，

屬於耐病材料。第三群罹病率在 75~100% 之間，在接種後 14 天後罹病率已達高值，所有的番茄材料都落在第三群，結果顯示目前番茄材料仍無法有效對抗青枯病原菌(圖 3-10)。抗性材料自留種子抗病力比較：青枯病的抗性屬於多基因數量遺傳，因此本研究希望抗性能透過世代累積，逐漸提升及穩定抗性。收集前期抗性表現優異的茄子健壯單株子代種子，作為本次接種受測材料，採用 2023 年、2024 年接種後第 28 天之結果進行分析，2024 年材料罹病率明顯降低(表 3-3)，其中以 EG203 的罹病率從 20.82% 減少到 4%；EG195 從 11.31% 減少到 4.17%，抗性增加最為明顯。去年表現良好的茄砧 302 在今年罹病率高達 30.33%、EG219 罹病率也微幅增加，由於這兩個材料本年僅接種一次，可能是因為非青枯病菌感染所造成結果。

### 2. 茄子青枯病抗病基因探索研究

透過已標定之目標基因進行 SNP 探勘，尋找適合設計 SCAR 標誌之 SNP，冀望能以最精準有效率方式開發可以供產業應用之分子標誌。透過茄子青枯病文獻中共蒐集到與青枯病抗病性具關連性的 40 組 SSR 和 SCAR 分子標誌進行多型性測試。其中 SSR marker emb01J19(Khapter et al., 2018) 經 PCR 測試結果可以區分出抗感病材料(圖 3-11)，經回收 PCR 產物解序，發現序列裡 GTCTCT 重複序列約 100bp，經過解序及序列資訊分析，發現 2 個 SNP 位點。連續兩年進行茄砧材料接

種及抗病材料世代留種，從初步觀察似乎抗性有穩定提升趨勢，仍需更多世代確證。但從試驗結果顯示抗性能透過逐年世代累積而提高的運作方式似乎是可行的，建議業界在生產自留根砧種子時宜挑選健康且抗性明顯的單株留種，並

且持續維持。本計畫採用兩個 SSR 標誌及一個目標基因進行探勘青枯病抗性之可能區位及模板序列建立，在其中一個區域獲得 2 個 SNP，後續將持續朝建立青枯病高關聯性分子標誌設計方向推進，期待在下一期能獲得具體成果。

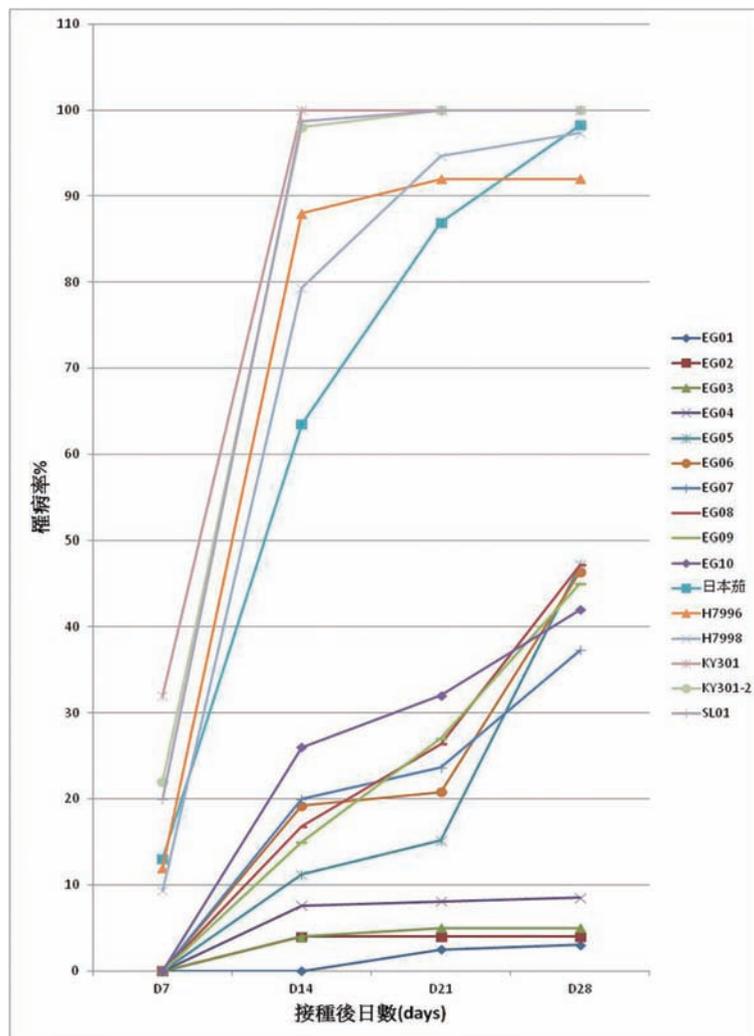


圖 3-10、番茄嫁接用根砧材料對青枯病菌抗病力測試，6月18日接種，分別於接種後7、14、21及28日調查罹病程度。  
註：發病級數：0=無病徵、1=一片葉萎凋、2=二片葉萎凋、3=三片葉萎凋、4=4片葉或以上萎凋、5=植株萎凋死亡(王等，2014)；罹病率以  $[(0 \times N_0 + 1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4 + 5 \times N_5) / 5 \times N_s] \times 100\%$  表示。

表 3-3、番茄嫁接用根砧材料接種後抗性表現比較

2023		2024	
品種	罹病率%	品種	罹病率%
EG195	11.31	EG195 S1	4.17
EG203_A	20.82	EG203 S1	4.00
EG219	28.06	EG219 S1	37.27
H7996	91.20	H7996 S1	78.72
KS2018	18.91	KS2018 S1	11.00
茄砧 302	7.50	茄砧302 S1	30.33
鳳山3號S1	13.29	鳳山3號S2	7.44
KY301	99.89	KY301	97.72
日本茄	97.16	日本茄	98.46

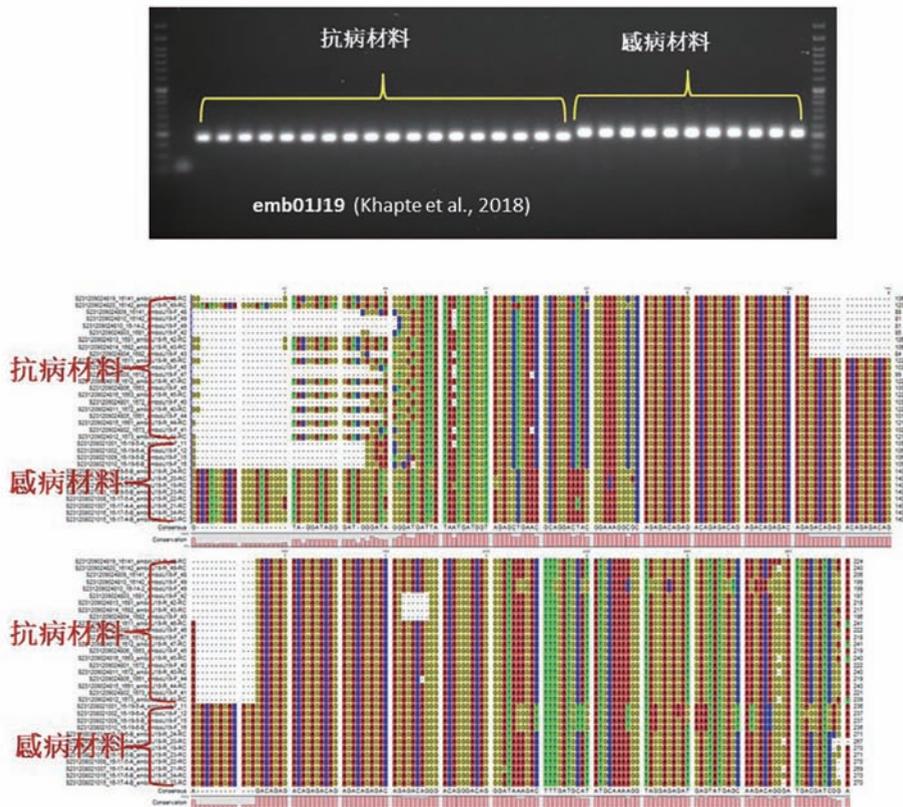


圖 3-11、SSR marker emb01J19(Khapte et al., 2018) 經 PCR 測試結果可以區分出茄子抗感病材料 (上圖) · 回收 PCR 產物解序 · 發現序列裡 GTCTCT 重複序列約 100bp(下圖)

## 七 大豆種子庫存條件研究

陳易徵、許鑄云、林上傑

大豆是全球重要的糧食與油料作物之一，在我國的農業政策推動下，種植面積逐年增加，並且對於國內食用大豆的需求也不斷增長。為了確保大豆種子的品質在長期儲藏過程中保持穩定並提高其利用效率，本研究針對不同馴化條件和儲藏條件對大豆種子品質的影響進行了深入探討。研究選用了三個主要的國產大豆品種：‘臺南 3 號’、‘臺南 5 號’和‘高雄選 10 號’，這些品種是基於「綠色環境給付政策」推

動的國產食用大豆，具有一定的市場價值。本研究主要的目的是了解大豆種子在不同儲藏條件下的品質變化，並利用電導度與發芽率作為品質指標。電導度是一種常用來測量種子細胞損傷的指標，當種子儲存不當或受損時，細胞膜會受損，導致溶解物質釋放，進而影響電導度的數值。發芽率則直接反映種子的生長活力和健康狀況。實驗結果表明不同的馴化處理對大豆種子發芽率並無顯著影響(圖 3-12)。較低的儲藏溫度與較長的儲藏時間會使種子的電導度數值上升，但對於大豆種子發芽率則無顯著影響(圖 3-13)。

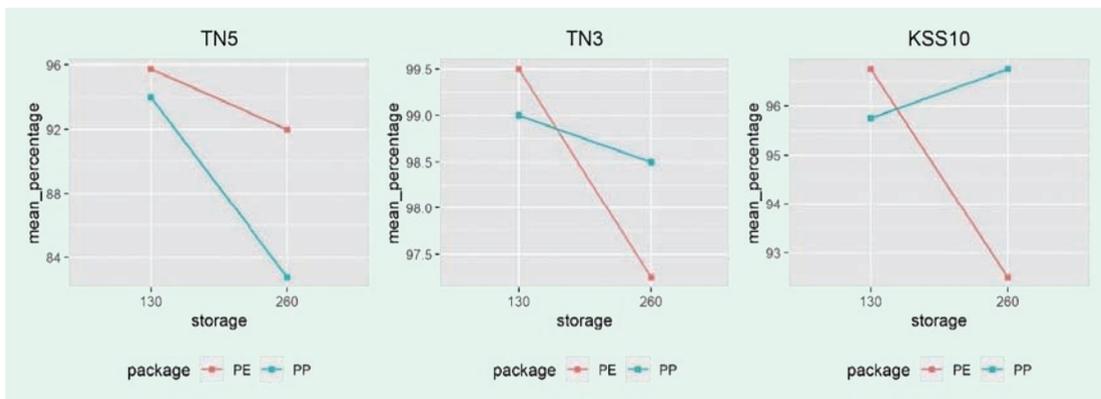


圖 3-12、大豆‘臺南 5 號’(TN3)、「臺南 3 號’(TN5)及‘高雄選 10 號’(KSS10) 在不同儲藏時間及包裝材質下種子發芽率的變化

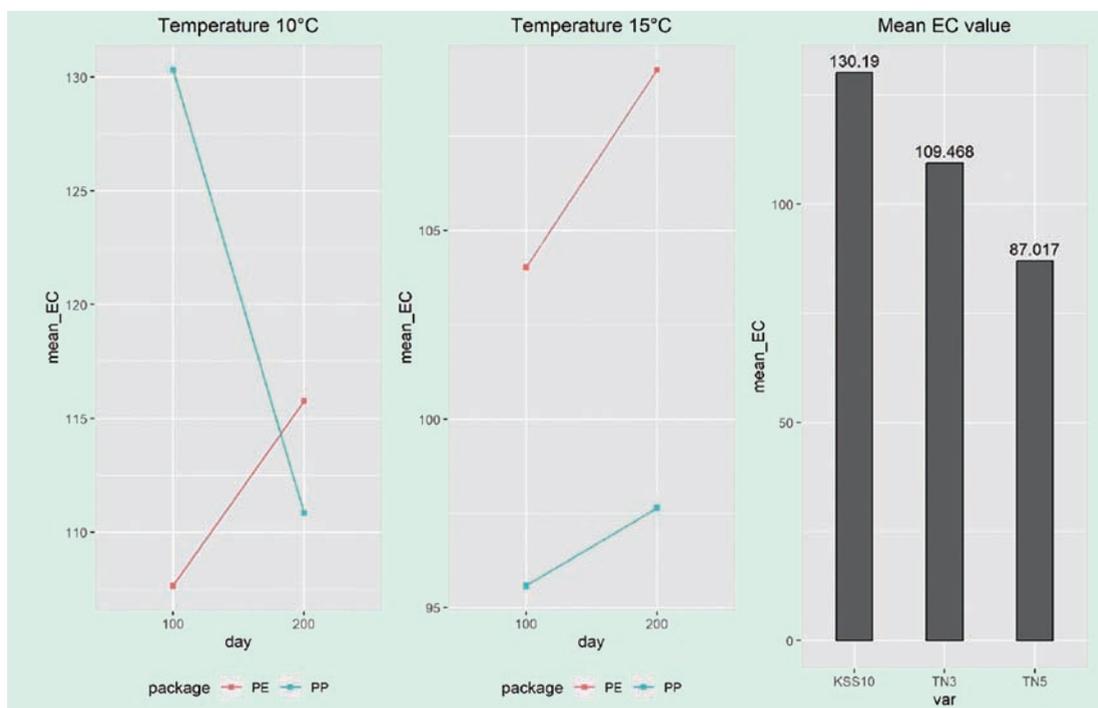


圖 3-13、不同儲藏溫度、包裝、儲藏時間下大豆種子的平均電導度 (左、中) 及不同品種的平均電導度 (右)

## 八 葡萄重要病毒檢定技術建立

馮雅智、王慧如、邱燕欣

於葡萄產區採集自 3 個縣市 5 個地區 21 果園共 116 個葡萄樣本 (50 個夏季葡萄病材料及 66 個冬季葡萄病材料) 發現各產區的栽種皆以巨峰為主要葡萄品種，種植面積最大，在少許農戶園中也有栽種不同葡萄品種但仍為少數。葡萄葉片因含多酚化合物褐化成分常會干擾葡萄病毒 RNA 之萃取，因此建立葡萄病毒核酸萃取技術為入門首要。試驗選用 2 種常用的核酸萃取方法 - 半自動萃取儀 (TANBead) 與核酸萃取套組 RNeasy Plant Mini Kit

(Qiagen) 進行評估，選擇 6 個葡萄樣本萃取核酸後再以 RNA 260/280 及 260/230 比值及葡萄植物之內生基因增幅評估核酸品質及濃度，結果顯示以半自動萃取儀 (TANBead) 萃取之核酸效果為佳。最終將純化所得之樣本 RNA 合併以進行小分子核酸 NGS 定序。此外，同時將收集之樣本材料以實驗室先前建立之 5 種常見葡萄病毒血清包含葡萄 A 病毒 (GVA)、葡萄扇葉病毒 (GFLV)、葡萄捲葉病毒品系 1 與品系 3 (GLRaV-1、GLRaV-3) 及葡萄斑點病毒 (GFkV) 進行 ELISA 初檢，做為病毒感染之初步調查與瞭解。檢測結果顯示大村葡萄的檢出率為 23%，埔心葡

萄的檢出率為 38%，溪湖葡萄的檢出率為 36%，新社葡萄的檢出率為 21% 及豐丘葡萄的檢出率為 100%（圖 3-14）。其中可見每區的葡萄樣本檢出最多為 GfKv，不論單獨感染或與其他病毒複合感染，而 GFLV 在樣本中皆未檢出，然豐丘地區的 21 樣本皆檢出病毒，7 例為單一病毒感染、13 例為複合感染與 1 例為三種病毒

感染（圖 3-15），推測該地區的栽種及管理方式可能造成病毒感染頻繁。另比較楊等（2000）二年調查組培苗病毒於田間再感染情形，其結果顯示台灣除了 GLRV-1 之發生外，尚可檢出 GFLV 與 GVA，而 2024 所採集之樣本均未檢出 GFLV 但新增檢出 GLRaV-3，由此可知田間葡萄病毒相已有更迭之現象。

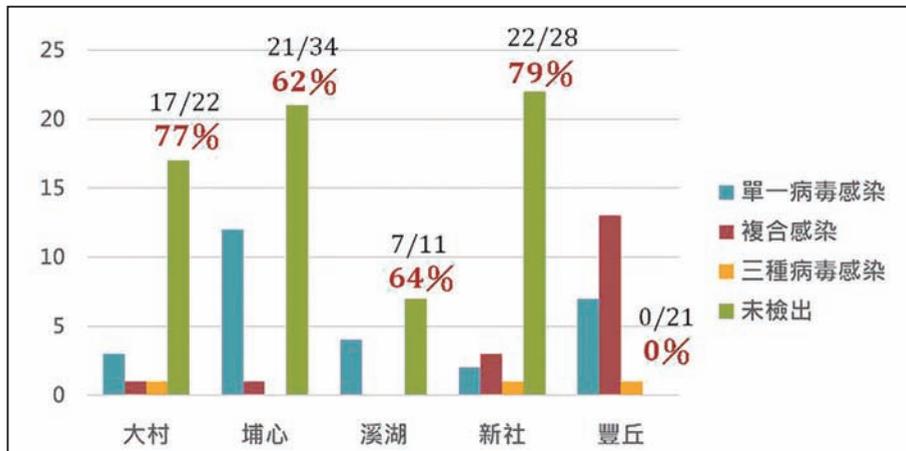


圖 3-14、各葡萄產區樣本以 5 種病毒血清進行檢測

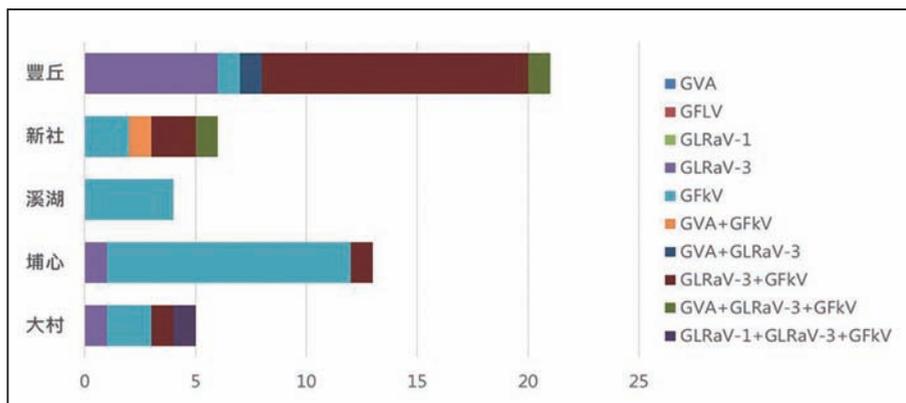


圖 3-15、各葡萄產區樣本以 5 種病毒血清檢測之病毒相

## 九 因應 CPTPP 開發重要農產品病原經濟快速型通量病害檢疫技術

邱燕欣、馮雅智、薛道原、蘇士閔

運用 NGS 技術於植物病害之相關研究，不僅可作為病原檢測、植物病理研究、流行病學族群分析等，也可藉由 RNA 定序分析病原菌感染植物之發病進程中，寄主與病原微生物的交互作用，寄主植物病程各階段的基因表現與病徵相關性。病原檢測上，可藉由單一物種複合材料的 RNA 全定序、DNA 定序與病原資料庫比對，瞭解該作物植物病原的族群相，並可在多樣品的集合下，瞭解特定作物的病原相與區域的演化差異。針對輸往 CPTPP 會員國的瓜類種子所可能遭遇的細菌性或真菌性病害，建立了一個系統來分析病原感染植物後所產生的小分子核酸 (small

RNA)。目標之一是完成病原感染後的小分子核酸 (small RNA) 建庫，並研究適合的病原檢測和分析小分子核酸片段大小，以提升未來後續資料庫比對的效率。113 年完成資料庫建構，對瓜類種子 (如西瓜和甜瓜) 感染的 *Paracidovorax citrulli* 進行共培養，成功萃取並測序了小型 RNA。西瓜和甜瓜的數據庫分別獲得了 1020 萬和 750 萬讀數。功能基因比對方面，萃取自 *P. citrulli* (Aac) 11079 菌株的 sRNA 序列並使用 BLASTN 與 NCBI 網站的基因序列比對，比對結果顯示，與 PilA 和 ClpA 相關的比對筆數最多，佔可辨識的小分子核酸的 23-34% 和 32-36%。這些研究成果不僅能夠快速檢測已知病原，未來也將作為比對未知病原的平台，為我國輸往 CPTPP 成員國的種子病害檢測工作提供重要支持。



圖 3-16、*P. citrulli* 與瓜類種子液態培養後產生的小分子核酸，經解序比對可對應到 *P. citrulli* 的重要致病基因 PilA 和 ClpA 基因