

一、生物技術之開發與應用

一 基因晶片在主要經濟作物品種鑑定之研發與應用

邱燕欣、鍾文全、朱木貴、楊佐琦

在加入WTO之後，台灣農產品面臨大量開放進口的衝擊，本計畫擬針對重要經濟作物，藉由對其DNA序列之分析，設計專一性及靈敏度高的探針，利用核酸點漬及雜合反應技術之操作，建立植物鑑定用生物晶片之技術平台，並與產業界共同發展以應用於建立各重要經濟作物之鑑定系統，以供未來進出口管制工作之所需。傳統上執行植物品種的鑑定工作，不但耗時且易受環境的影響。因此，發展快速準確的鑑定技術來保護本國新品種，是當前刻不容緩的工作。近年來，鑑定品種技術之開發已朝向比對作物功能性基因體的研究，其中以基因晶片的開發最為成熟。由於基因晶片具有反應迅速、大量檢測及低成本的檢測能力，目前已廣泛應用於動植物的生物資訊如品種鑑定、基因庫篩選及毒物偵測與篩選等用途上。本研究主要以開發本國主要經濟作物品種鑑定的生物基因晶片系統為基礎，95年度針對作物為水稻，收集台灣經濟流通之的23個品種，鑑別出其中DNA序列上的些微差異，進一步設計專一性之偵測引子，發展出一套可以快速、精準的鑑別出水稻品種的生物晶片。

二 利用AFLP分子標誌鑑別紫錐菊商用品種之研究

莊淑貞、孫永偉、陳駿季

本試驗結合混合DNA樣品技術及AFLP分析技術，探討紫錐菊引進種/變種/品種的親緣關係。最適混合樣品數的調查

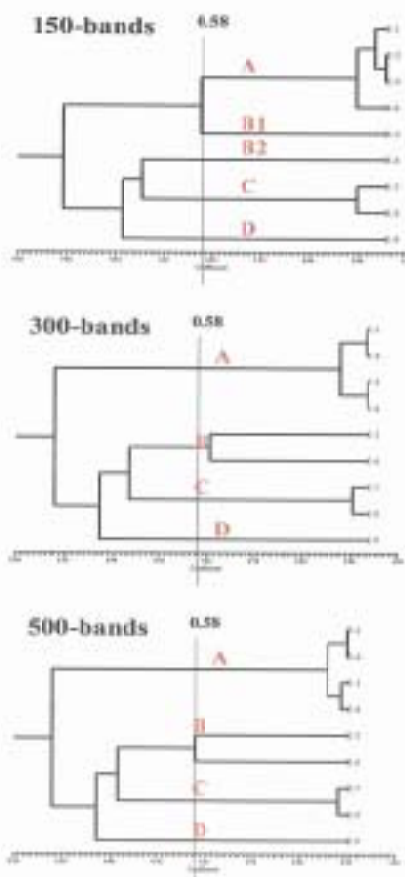


圖1-1、紫錐菊9個商用品種/品種依AFLP分析之不同條帶數群聚分析之樹狀圖變化

表1-1、不同AFLP條帶數分析下，紫錐菊9個種/品種之兩兩間相似性係數的變化

150-bands	1	2	3	4	5	6	7	8
2	0.9494	1						
3	0.9285	0.9587	1					
4	0.8787	0.9081	0.906	1				
5	0.5819	0.5901	0.5573	0.5714	1			
6	0.3307	0.3384	0.317	0.2846	0.5675	1		
7	0.2447	0.2344	0.2152	0.1944	0.3259	0.4587	1	
8	0.279	0.2867	0.2587	0.2377	0.3430	0.4513	0.8988	1
9	0.2954	0.2932	0.2727	0.2313	0.3129	0.3944	0.4017	0.4464
300-bands								
2	0.9347	1						
3	0.8950	0.8972	1					
4	0.8586	0.8716	0.9367	1				
5	0.496	0.4921	0.5	0.5081	1			
6	0.2730	0.2840	0.2784	0.259	0.6081	1		
7	0.2021	0.2049	0.197	0.1934	0.3807	0.4835	1	
8	0.2150	0.2304	0.2145	0.2109	0.393	0.4976	0.9058	1
9	0.2162	0.2234	0.2156	0.1976	0.3115	0.3669	0.3953	0.4299
500-bands								
2	0.9010	1						
3	0.8637	0.8551	1					
4	0.8432	0.8732	0.8892	1				
5	0.4761	0.4922	0.5	0.5	1			
6	0.2518	0.2779	0.2711	0.2555	0.5781	1		
7	0.1981	0.2089	0.2206	0.2133	0.3743	0.4574	1	
8	0.2037	0.2255	0.2177	0.2188	0.3676	0.4660	0.8840	1
9	0.2060	0.2235	0.2213	0.2074	0.3047	0.3601	0.4117	0.4159

中以8組MseI/EcoRI選擇性引子組所進行之AFLP分析中：*E. pallida*混合DNA樣品之AFLP分離條帶表現的比率，依10株、15株及20株的混合情形而分別為92.99%、91.50%及92.30%。*E. purpurea*則分別為97.90%、98.14%及97.51%。試驗結果顯示參試兩個種的混合樣品數以10株、15株

或20株的混合數均不影響分離條帶的表現。紫錐菊引進種/變種/品種之親緣關係AFLP分析中64組AFLP選擇性聯合引子組均能順利跑出產物，其中53組引子表現多型性共501個為多型性DNA片段。條帶數在300條以上所進行Jaccard's相似性係數分析呈穩定，且其分析結果較能代表紫錐菊

種/變種/品種間的親緣關係。參試紫雞菊種/變種/品種的親緣關係為 *E. pallida* > *E. paradoxa* > *E. angustifolia* > *E. purpurea* * (圖1-1、表1-1)

三 建立基因轉殖水稻、馬鈴薯及番茄之檢測技術

沈翰祖

根據我國新修訂之植物品種及種苗法及相關管理法規，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，產品須依規定標示，並接受主管機關監督，以維護國人健康及生態環境之安全。目前國內完成基因轉殖作物隔離田間試驗階段者為抗輪點病毒木瓜，正在隔離田間試驗階段者有六項，包括稻米（生產豬乳鐵蛋白及高效能植酸素二項）、馬鈴薯（生產高效能植酸素）、青花菜（抗老化）、番茄（抗胡瓜嵌紋病毒）、赤松（木質素合成基因），其中抗輪點病毒木瓜已完成檢測監測標準流程。

本場為配合國內基因轉殖植物之生物安全管理，特針對上述作物中「生產高效能植酸素基因轉殖水稻」*aapA*基因、NOS terminator；「生產高效能植酸素基因轉殖馬鈴薯」*aapA*基因、SPO promoter；「抗胡瓜嵌紋病毒基因轉殖番茄」CMV-TCP基因，分別建立聚合酵素鏈鎖反應 (PCR) 檢測技術 (圖1-2)，能完全區分基因轉殖與非基因轉殖植株。

四 蝴蝶蘭新品種之指紋分析系統建立與應用

孫永偉

本試驗以農委會公告之蝴蝶蘭新品種及其對照品種為試驗材料。本試驗設計之專一性引子可複製 *trnL-trnF* intergenic spacer region (IGS) 區域基因序列，將各品種IGS之PCR產物回收、定序及序列比對，比較各品種IGS序列相似度為85-98%，可尋找特定品種之限制酵素切



圖1-2、利用聚合酵素鏈鎖反應 (PCR) 檢測「生產高效能植酸素基因轉殖水稻」*aapA*基因、NOS terminator；「生產高效能植酸素基因轉殖馬鈴薯」*aapA*基因、SPO promoter；「抗胡瓜嵌紋病毒基因轉殖番茄」CMV-TCP基因

位或從IGS序列設計特定品種專一性引子，以作為鑑定受權利保護品種之分子標記。

五 番椒細胞質雄不稔品系之DNA鑑定與相關基因之研究

李美娟、陳駿季、楊愛如

利用雄不稔性狀DNA鑑定標誌，於苗期輔助雄不稔育種篩選，可縮短育種時



圖1-3、番椒(a)雄可稔花朵開放，花藥開裂後，產生大量黃色花粉。(b)雄不稔花朵開放，花藥乾扁，不具正常花粉。

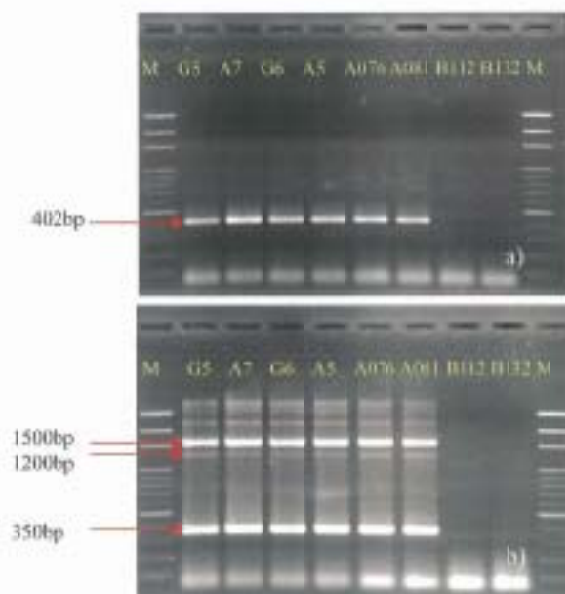


圖1-4、番椒葉片總萃取DNA以CMSP1及CMSP2引子組擴增出之細胞質雄不稔相關DNA片段：a). CMSP1引子組擴增出之DNA片段，b). CMSP2引子組擴增出之DNA片段。不稔系統的G5、A7、A076、及A081的基因型為Sr1rf，G6及A5的基因型為SR1rf；而可稔系統的B112及B132的基因型為Nr1rf

程。本試驗利用番椒細胞質雄不稔相關蛋白基因序列 (DQ116040, ORF456) 設計引子組CMSP1、CMSP2，以番椒第三級花蕾cDNA為模版，CMSP1為引子，可於種苗改良繁殖場建立之核質共作雄不稔品系擴增出預期的402bp雄不稔專一性條帶。此外，利用CMSP1也可鑑定其他蒐集自世界蔬菜中心、農業試驗所以及種苗改良繁殖場其他番椒品系的雄不稔細胞質。以CMSP2為引子時，除350bp之預期片段外，又擴增出約1200bp及1500bp兩明顯雄不稔專一性片段，經選殖及定序分析，結

果顯示這兩片段由粒線體 $coxII$ 基因(DQ126683.1; Cap.coxII)後段及番椒細胞質雄不稔相關蛋白基因序列所組成；雖然引子不在序列兩端，但此二雄不稔專一性條帶可穩定的被擴增出來。此外，根據番椒 $atp6-2$ 基因所設計之引子組ATP-1、ATP-2及ATP-3，也都可於番椒細胞質雄不稔品系正確擴增出預期大小的雄不稔專一性條帶。本試驗引子組的標的基因雖為粒線體基因，由於PCR僅需微量模版DNA，檢定上，萃取苗期葉片總量DNA時所含的殘餘粒線體DNA即足以穩定擴增出雄不稔專一性條帶，因此既可在苗期早期鑑定，也可省去複雜的粒線體DNA

純化步驟，提高了此檢測技術之應用性。(圖1-3、圖1-4、圖1-5)

六 利用特定波長之發光二極體光源調節試管内蝴蝶蘭培植體分化與種苗生長

陳駿季、黃世恩、廖玉珠

本試驗以蝴蝶蘭為材料，利用發光二極體(Light Emitting Diodes, LED)光源之特性，透過三種特定波長組合之光源刺激，並改變明暗生長週期，目的在建立蘭

花植物瓶內PLB同步分化之調節技術，促進試管内培植體分化及植株生育同步化。試驗結果顯示，蝴蝶蘭PLB分化能力受到LED光源刺激所影響。接受特定光源處理之PLB，單一PLB平均可分化出41株完整幼苗，約為未經LED處理之對照組2.76倍。將PLB所誘導之蝴蝶蘭苗置於6小時照光/6小時黑暗之明暗週期下並於每日特定時期給予LED光源刺激，

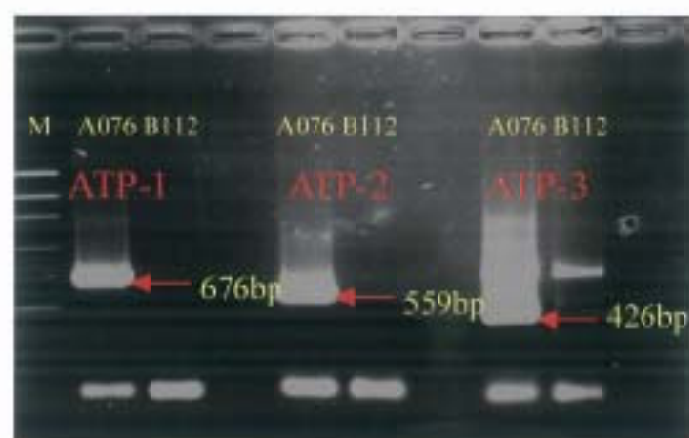


圖1-5、番椒葉片總萃取DNA以引子組ATP-1、ATP-2、ATP-3擴增出之細胞質雄不稔相關DNA片段。A076系統的基因型為Srtrf，B112系統的基因型為Nrtrf

表1-2、發光二極體光源對蝴蝶蘭凝原球體分化與蝴蝶蘭瓶苗生長之影響

處理	分化株數 - No./flask -	分化苗鮮重 - g./flask -	植株鮮重 - g./plant -
對照處理	17	1.36	0.80
LED處理	41	2.71	2.14



圖1-6、蝴蝶蘭試管內培植體生長於LED光照環境之情形

瓶內瓶苗二氧化碳交換能力之顯律有明顯改變，植株生長也有明顯提高現象，平均鮮重提高2.7倍。綜合本試驗結果顯示，蝴蝶蘭組織培養種苗繁殖過程中，PLB的分化能力可藉由LED光源的刺激而提高。縮短明暗週期並配合LED特定光源之刺激則可有效提高瓶內種苗的生長勢與種苗品質。並改變明暗週期可有效提高種苗生產效率。(表1-2、圖1-6)

七 植物性抑菌劑之開發

孫永偉

本試驗係觀察探討天然植物萃取物對於各種病原細菌及真菌之抑菌及殺菌效果。結果顯示多種香草及中草藥植物精油或萃取液對於許多細菌或真菌具有明顯抑菌或殺菌效果。土肉桂、五倍子、及薄荷等對於軟腐病菌、青枯病菌及十字花科黑

腐病菌等抑菌或殺菌效果強。香茅、薰衣草及土肉桂對於抑制黑黴菌、番茄鏽病菌、立枯絲核菌等菌絲伸長效果明顯，香茅油對於抑制真菌孢子發芽有不錯效果。本研究配製之複方殺菌劑「100X AB28-3」稀釋100倍以上，仍對於多種植物病原菌及環境指標細菌具有明顯的殺菌效果。

八 蝴蝶蘭花梗芽生育之控制

張義弘、黃世恩、陳駿季

本試驗以蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) 之大白花、大紅花及小紅花品種成株為供試材料。以光周期 (明期14 hr/暗期10 hr) 之栽培方式並以紅 (660nm) 與藍 (480nm) 色發光二極體 (Light emitting diodes, LED) 燈光於明期 (11:00 am~13:00 pm) 補光二小時、於暗期 (11:00 pm~01:00 am) 中斷照光二小時之處理進行抑梗與催梗之試驗。前者之溫度條件為明期28℃/暗期23℃，後者為明期25℃/暗期20℃。每一LED燈座 (20×20 cm) 裝設600個LED燈泡，紅、藍、紅外光各200個，每一LED燈座下方20cm 置放一品種4株。對照組未施以LED燈光處理。

本試驗初步之結果：前者經100天之處理期間並無花梗芽分化發育之徵象。後者經30天之處理即有5 cm以上之花梗芽萌發，大白花及小紅花品種各有50 %以上之萌發率，至40天則增加到75 %以上；大紅花及各對照組處理30天時約為25 %；至40天則增加到約50 %。