

## 五、生物技術之開發與應用

### 一 基因轉殖木瓜種苗快速檢測方法之研究

路曜聲、陳靜欣、李紀漢、沈翰祖

為落實國內基因轉殖 (GM) 植物之生物安全管理，自2004年起農糧署委託本場邀集桃改場、臺南場、花蓮場、農試所與中興大學等建立GM作物檢測監測小組。由於每批檢測樣品數量龐大，檢測的DNA片段或基因不只一個，且開具結果報告有其時效性。故「縮短檢測時間」、「減少實驗步驟」、「降低檢測成本」與「維持原有品質」為GM木瓜快速檢測技術的四大研發目標。

GM木瓜試驗材料包括「轉殖抗輪點病毒病鞘蛋白基因 (Papaya ring spot virus coat protein gene, PRSV CP gene) 木瓜」，簡稱「單抗木瓜」；「雙重抗木瓜輪點病毒及木瓜畸葉嵌紋病毒性狀基因轉殖木瓜 (Papaya ring spot virus coat protein gene, PRSV CP gene；papaya leaf distortion mosaic virus, PLDMV~PY16-CP gene)」，簡稱「雙抗木瓜」。利用聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 方法擴增後，以電泳分析核酸擴增產物所呈現之條帶位置。檢測「單抗木瓜」，先檢測內部對照之*papain* gene，PCR增幅211bp；再檢測*nptII* gene，PCR增幅1039 bp；以鑑定是否為GM木瓜，再

檢測*prsv-cp* gene具有預期PCR增幅840bp。檢測「雙抗木瓜」，亦先檢測*papain* gene及*nptII* gene；再檢測PRSV與PLDMV鞘蛋白的基因 (合稱為*py16-cp*)，PCR 增幅為1304bp。

本研究利用ELISA取代傳統PCR (如圖5-1)；以及毛細管電泳 (如圖5-2)、快速螢光分子檢測 (如圖5-3) 取代後續電泳分析與膠片照相程序；利用Multiplex PCR (如圖5-4) 縮短一般PCR檢測時間。各方法的檢測成本均低於傳統PCR的四分之一。開發免疫呈色 (ELISA) 方式可在6小時內完成檢測，並可以肉眼區分GM與非GM木瓜樣品，Multiplex PCR技術同時鑑別單雙抗木瓜，可節省檢測約50%的直接成本，檢測敏感度最高，最符合GM木瓜快速檢測的四大研發目標。

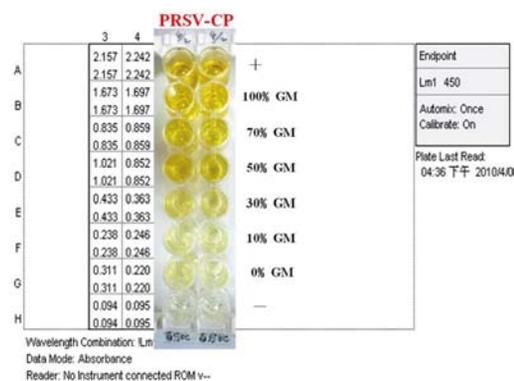


圖5-1、利用ELISA法檢測GM木瓜*nptII*基因之結果。+為試劑提供的正對照；100%、70%、50%、30%、10%、0% GM為不同GM與非GM木瓜葉片重量百分比混合樣品；-為水。左方數字為利用ELISA reader進行2次分析之讀值

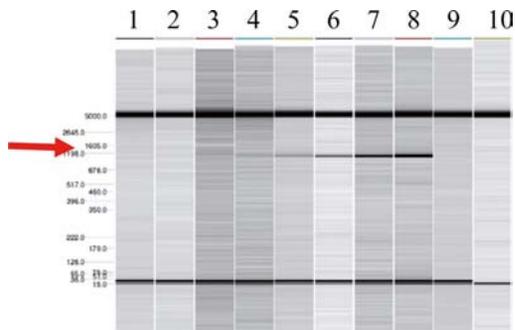


圖5-2、GM木瓜經PCR反應後以毛細管電泳進行分析。Lane1, 1%; 2, 3%; 3, 5%; 4, 10%; 5, 25%; 6, 50%; 7, 75%; 8, 100%; 9, 0% (ck); 10, H<sub>2</sub>O



圖5-3、利用快速螢光分子偵測法檢測GM木瓜。Tube 1、2為GM木瓜樣品；Tube 3、4為非GM木瓜 (負對照)；background為H<sub>2</sub>O

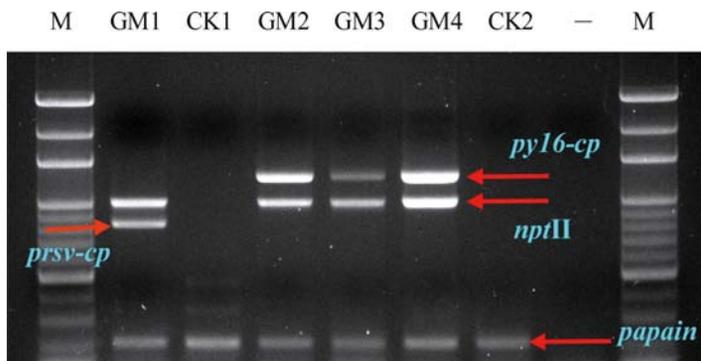


圖5-4、利用multiplex PCR技術進行GM木瓜檢測。GM1: 單抗木瓜、CK1: 臺農2號木瓜、GM2: 品系10-4雙抗木瓜、GM3: 品系12-4雙抗木瓜、GM4: 品系14-1雙抗木瓜、CK2: 泰國種木瓜

## 二 番茄抗斑點萎凋病毒基因型之分子鑑定

莊淑貞、孫永偉、鍾文全

番茄為世界性的重要經濟作物之一，在臺灣栽培面積維持在5000公頃左右。番茄斑點萎凋病毒主要透過薊馬取食病株的途徑傳染，不同作物間亦會造成交叉感染，如1991年臺南地區的番茄受西瓜

TSWV的感染而造成嚴重損失。選育抗病品種一直是番茄育種的重要目標，傳統以接種的方式所進行的抗病性檢定，除了要有一定的設施隔離避免病原外傳污染，並需較長的時間、人力及物力，且因為環境條件、接種技術等的影響而導致鑑定結果不穩定。目前分子標誌技術為抗病基因早期篩選有利的方法之一，因此開發分子標誌不但有利於國內番茄產業的穩定成長也可提高番茄種子外銷的競爭力。

本試驗中番茄斑點萎凋病抗感病基因型 (Sw-5) 分子標誌組Sw5-Tss#1及 sw5-Tss#2，DNA片段大小為1313 bp及676 bp (如圖5-5)，可清楚的判定抗感病性的基因型，且只進行一次PCR反應。Sw5的抗性基因同屬於第九條染色體的尚有Sw5a、Sw5b的區別，本試驗也建立區分番茄斑點萎凋病基因Sw5a及Sw5b的分子標誌

組，Tss-#Sw5a 及Tss-#Sw5b (如圖5-6)，可在進行一次PCR反應即可檢定Sw5a、Sw5b的基因。再配合分子標誌組sw5-Tss#2即再進行另一次PCR反應，結合兩次PCR的結果除可對抗病基因Sw5a及Sw5b作檢定外也可對抗感病性基因型作判定。



圖5-5、分子標誌組Sw5-Tss#1及 sw5-Tss#2，DNA片段大小為1313 bp及676 bp之電泳圖

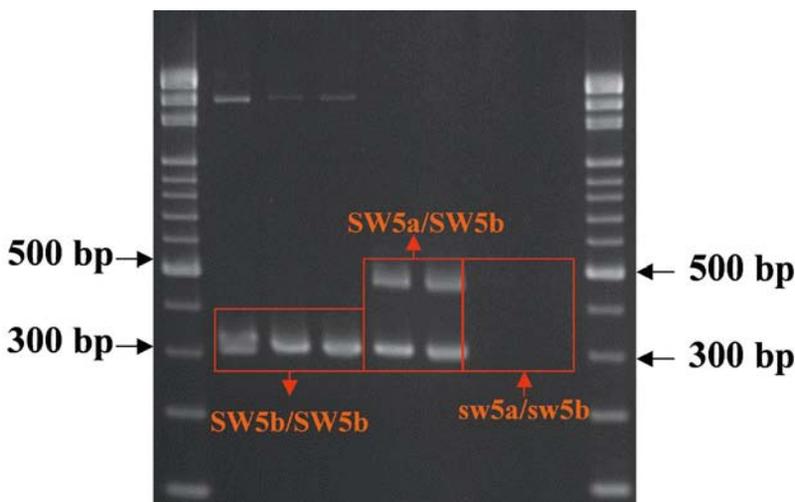


圖5-6、分子標誌組Tss-#Sw5a 及Tss-#Sw5b，DNA片段大小為473 bp及300 bp之電泳圖

### 三 抗番茄黃化捲葉病毒病基因型之分子鑑定

張惠如、孫永偉

番茄捲葉病是因感染番茄黃化捲葉病毒 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 所引起的番茄重大病害，該病毒僅特定以銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii*) 媒介病蟲傳染。而培育優良的抗病品種為解決此病害引起經濟損失的重要目標，利用分子標記技術為番茄抗病育種工作者提供了有利的輔助工具。

本研究係於NCBI基因庫選取番茄 Tomato yellow leaf curl Thailand virus isolate LY3 segment DNA-A (EF577266) 序列，進行引子設計後，以感染TYLCV病毒之番茄植株葉片進行PCR試驗。已建立偵測TYLCV病毒基因引子對一組，於電泳分析後感染病毒之番茄樣品，可於膠圖上出現一條約550b.p之特定條帶。

並利用文獻上及基因庫中發表之序列

資料，設計合成有Ty-1、Ty-2、Ty-3基因偵測引子對，經過電泳分析後，試驗結果顯示在目前材料中，已獲得跟Ty-1、Ty-2、Ty-3基因連鎖之分子標誌。Ty-1之PCR產物在TagI限制酶截切後，在具有Ty-1/Ty-1的樣品中具有一條約400b.p的條帶，ty-1/ty-1則具有一條約300b.p的條帶，Ty-1/ty-1則有兩條各為400b.p及300b.p的條帶 (如圖5-7)；Ty-3之PCR產物在TagI限制酶截切後，在Ty-3/Ty-3的樣品中具有兩條各約320b.p、200b.p的條帶，ty-3/ty-3則具有一條約520b.p的條帶，Ty-3/ty-3則有三條各為520b.p、320b.p及200b.p的條帶 (如圖5-8)；Ty-2之PCR產物，在具有Ty-2/Ty-2的樣品中具有一條約820b.p的條帶，ty-2/ty-2則具有一條約700b.p的條帶，Ty-2/ty-2則有兩條各為820b.p及700b.p的條帶 (如圖5-9)。

另外，將Ty-2及TYLCV之偵測引子對，進行建立Multiplex-PCR測試試驗，已可以在同一PCR條件反應下，同時偵測Ty-2及TYLCV (如圖5-9)。

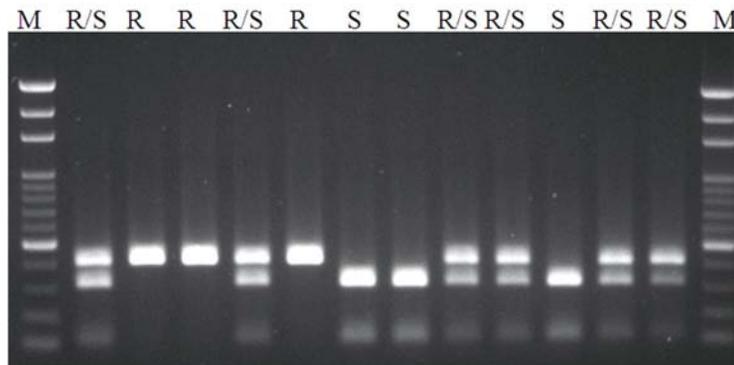


圖5-7、Ty-1 CAPS引子電泳分析結果，M: 100 bp ladder;  
R: Ty-1/Ty-1; R/S: Ty-1/ty-1; S: ty-1/ty-1



圖5-8、Ty-3 CAPS引子電泳分析結果，M: 100 bp ladder; R: Ty-3/Ty-3; R/S: Ty-3/ty-3; S: ty-1/ty-1

## 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、劉明宗、安志豪

本計畫將以朵麗蝶蘭及彩色海芋，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。進行試驗之30個紅花系朵麗蝶蘭商業品種(如表5-1)之花型與花色(如圖5-10)。依據先前研究RAPD解序結果之差異性條帶序列，設計具序列特徵性(SCAR)引子對，將所設計之86組SCAR引子，針對30個紅花系朵麗蝶蘭試驗材料進行篩選，試驗結果發現透過10個SCAR引子組成六個引子對組合，可產生不同的差異性條帶，而可區分30個紅花系朵麗蝶蘭商業品種(如圖5-10)。進一步依據差異性條帶的有無給予0或1的編碼(如圖5-11)，每個試驗材料皆可獲得一組識別條碼。

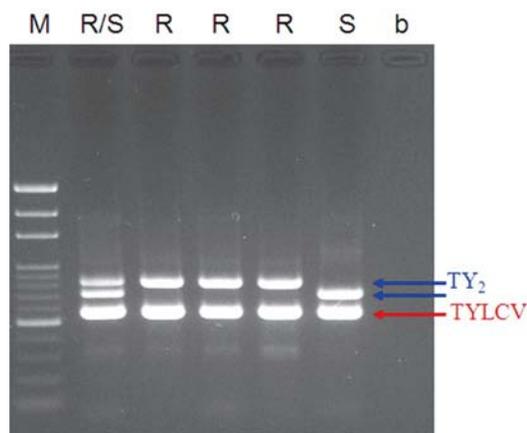


圖5-9、Ty-2 SCAR引子電泳分析結果，M: 100 bp ladder; R: Ty-2/Ty-2; R/S: Ty-2/ty-2; S: ty-2/ty-2，TYLCV特定條帶(約550b.p大小，紅色箭頭指示處)

另由種苗場種原圃取得31個品種(系)參試材料(如表5-2)，包括花色為桔色系的14個品種(系)(含種苗二號-香吉士)，及紅色系的品種(系)(含種苗一號-桃姬)的17個品種(系)共31個品種(系)，外表性狀檢定時彩色海芋品種權品種「種苗一號-桃姬」及「種苗二號-香吉士」品種

其對照品種分別為其同色系的‘Chinati’及‘Mango’其性狀檢定對照品種之植株形態與花部外觀特性(如圖5-12)所示。

完成DNA-PCR分析，共篩選出32條再現性及穩定性高之分子標誌具品種(系)

間的多型性(如圖5-13)。DNA-PCR分析運用於親緣相似性分析，桔色花系或紅色花系單獨或合併分析，均有少數品種(系)無法由篩選出的32條再現性及穩定性高之分子標誌作完全區分。

表5-1、30個紅花系朵麗蝶蘭材料其代號與名稱

申請/對照	公開案號	中文品種名	英文品種名
申請品種	463	世芥天使	Dtps. Sogo Yoshida 'Sogo F-1302'
對照品種	C463		Dtps. Kung's Valentine 'Sogo F-600'
申請品種	456	世芥彩蝶	Dtps. Sogo Moonhalo 'Sogo F-1061'
對照品種	C456		Dtps. Tinny Honey 'Sogo F-894'
申請品種	459	世芥歡心	Dtps. Sogo Wedding 'Sogo F-879'
申請品種	436	金車雪莉娜	Dtps. Sinica Cherry 'King Car Shelina'
對照品種	C436		Dtps. Queen Beer 'Mantefon'
申請品種	438	賓友之星	Dtps. Ben You Star
對照品種	C438		Dtps. Ben You Beauty
申請品種	478	立匠火鳥	Dtps. Bread Rose 'Lih Jianq Firebird'
對照品種	C478		Dtps. Sinica Sunday
申請品種	488	臺霖甜心	Dtps. Tai Lin Lady 'N16'
對照品種	C488		Phal. (Tai Lin Angel × New Eagle) × Dtps. Luchia Star 'N60'
申請品種	499	臺大紅玫瑰	Dtps. Taida Firebird 'Taida Red Rose'
對照品種	C499		Dtps. Taida Firebird 'Taida Red Crane'
申請品種	510	春天使	Dtps. Happy News 'Spring Angel'
對照品種	C510		Dtps. I-Hsin Black Jack 'KH5706#077'
申請品種	514	立匠鑽石	Dtps. Mei Dar Diamond 'Lih Jianq Diamond'
對照品種	C514		Dtps. Ruey-Lin Beauty '瑞利'
申請品種	516	維納斯	Dtps. Lih Jianq Venus 'Venus'
申請品種	517	四季紅	Dtps. Leopard Prince 'Season Red'
申請品種	538	臺霖桃絲N92	Dtps. Tai Lin Pink 'Torce N92'
對照品種	C538		Dtps. Luchia Beauty 'TMR0601'
申請品種	552	大觀火狐	Dtps. Tai-Kan Fire Fox 'Fire Fox'
申請品種	571	香斌皇后	Dtps. Taida Pearl 'Champion Queen'
對照品種	C571		Dtps. Ever Spring Prince '75號'
申請品種	572	千大紅玫瑰	Dtps. Rusy-Lih Red Rose 'Chien Da Red Rose'
對照品種	C572	巨寶紅玫瑰	Dtps. Jubo Pao Red Rose '巨寶紅玫瑰'
申請品種	581	臺糖紅珍珠	Dtps. Taisuco Stellar 'Red Pear1'
申請品種	625	紫羅蘭 23	Dtps. Charm Sun Glory 'Violet 23'

表5-2、由種原圃取得之彩色海芋材料共31個參試樣品其代號及名稱

桔色系			紅色系		
Code			Code		
1	21	Crystal Blush	1	32or4	Apricot Glow (粉紅)
2	3	Treasure	2	42	Romeo (桃紅)
3	10	Tahiti	3	43	Celeste (桃紅)
4	24	Scarlet Pimpernel	4	44	Cameo
5	25	Greta	5	45	Sensation (黃紅)
6	26	Mango (36的對照品種)	6	7	Gem Red Dark Eyes
7	15	Neroli	7	2	Lavender Gem (粉紅)
8	31	Red Sax (桔紅)	8	8	Pink Gem (粉紅)
9	29	Best Gold (可能混，場的)	9	50	Dominique
10	30	Hazel Marie	10	23	Pink Pot (粉紅)
11	36	香吉士 (種苗二號) Sunkist	11	9	Rubylite Rose (桃紅)
12	51	Tango	12	12	Pacific Pink (粉紅)
13	55	Flame	13	20	Rehmannii (粉紅)
14	48	Elmaro	14	33	Pink Persuation
			15	35	桃姬 (種苗一號) Burgnudy
			16	53	Chienti (35的對照品種)
			17	18	Majestic Red
14個樣品			17個樣品		



圖5-10、30個受品種權保護品種及其對照品種之SCAR篩選差異性條帶電泳圖，紅色標示處為差異性條帶

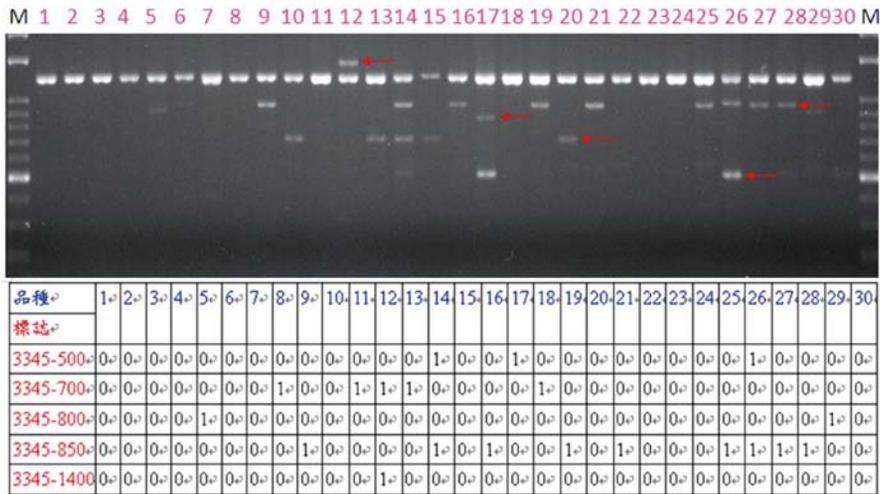


圖5-11、將一組SCAR分析之差異性片段轉換成數字編碼



圖5-12、彩色海芋品種權品種「種苗一號一桃姬」及「種苗二號一香吉士」品種及其性狀檢定對照品種之植株形態與花部外觀特性

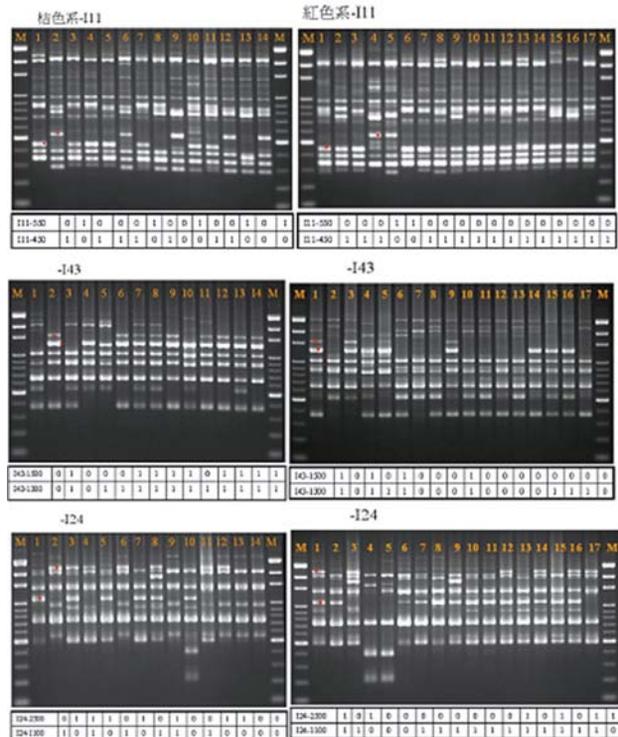


圖5-13、彩色海芋桔色系及紅色系的31個參試材料，其DNA-PCR分析中，穩定性及再現性高之多型性分子標誌電泳圖

## 五 種子 (苗) 品質純度分子檢測 技術研發

莊淑貞、黃俊杉

種子 (苗) 是農業產業之母，為了提高推廣品種的商業競爭能力，種用種子除了健康且具高發芽活力外，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並限制種子 (苗) 的即時供銷。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其建立的需要。其中利用分

子標誌可僅用少量的植體材料在植物生長的早期即苗期或種子期進行分析鑑定。

### 1. 分子標誌運用於雜交番茄種子純度識別檢定

本場採種之番茄品種，已建立各番茄品種雜交種子純度品質檢定的分子標誌及番茄種子期基因體DNA快速萃取技術，配合種子產銷時效並已運用於採種之番茄雜交種子中識別母本自交種子或父本種子 (如圖5-14)。

### 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，目前推出的新品種概為雜交種子。雜交玉米

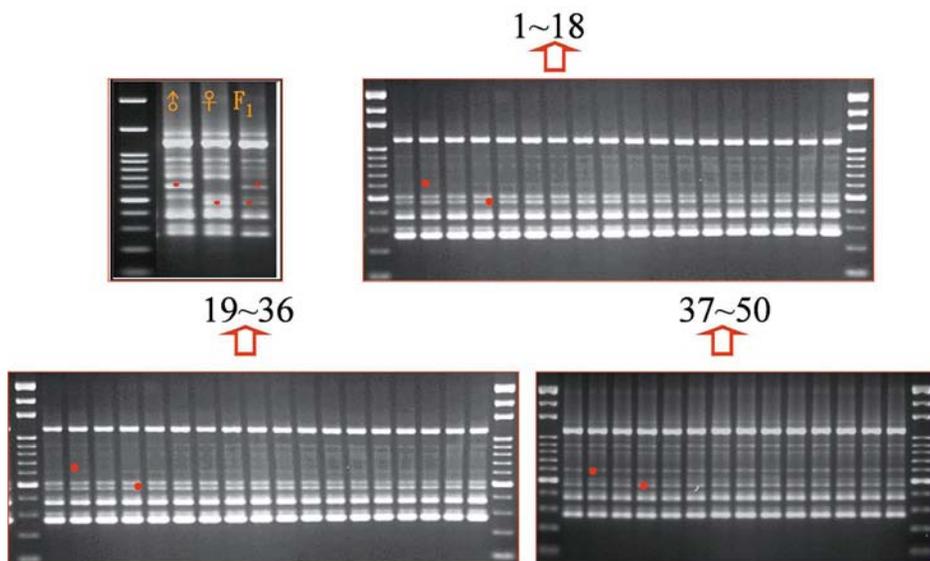


圖5-14、雜交番茄亞蔬22號，雜交一代種子純度檢定電泳圖

98-3kk413-001  
990331~0407

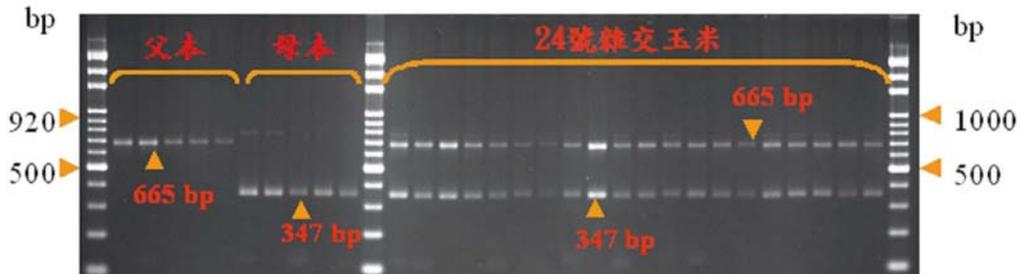


圖5-15、三系雜交玉米新品種臺南24號，雜交一代種子純度檢定分子標誌電泳圖

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。本場歷年來進行雜交玉米採種工作，目前除了已建立雜交玉米臺南20號之雜交一代種子純度的分子識別標誌外也建立玉米種子期基因體DNA快速萃取技術。並開發三系雜交玉米新品種臺南24號的ISSR-SCAR分子標誌，於進行1次PCR反應後即可檢定雜交一代種子的純度(如圖5-15)。

## 六 春石斛微體繁殖技術之建立

張珈錡、廖玉珠

春石斛為臺灣具外銷潛力之盆栽花卉，為加強春石斛種苗外銷之競爭力，本研究擬建立春石斛組織培養量產繁殖體

系，以獲得大量且品質一致之健康種苗。

以春石斛9203品種高芽消毒後所誘導之芽體作為試驗材料，將芽體分切為莖頂和基部，培養於添加不同濃度BA (1、2、5 mg/L) 之1/2MS培養基中。結果顯示，芽體基部分生芽增殖倍率顯著高於莖頂，且隨BA濃度提高呈顯著的增加(如表5-3)。以春石斛9203和8604兩品種之芽體基部，培養於BA濃度2、3、5 mg/L之培養基中。結果顯示：9203品種之芽體增殖倍率顯著高於8604品種，其於3 mg/L BA處理下達3.7為最佳，與5 mg/L BA處理之3.6無顯著差異；而8604品種則顯示3種濃度處理間皆無顯著差異(如表5-4)。以8個品種之春石斛芽體基部，培養於含有3 mg/L BA之1/2MS培養基中。結果顯示：各品種間之芽體增殖倍率存在顯著差異，以9123品種增殖倍率達3.12為最佳，9219品種增殖倍率1.94為最低(如圖5-16)。經增殖培養2個月後之芽體皆可發育成正常之植株(如圖5-17)。

表5-3、不同芽節位和BA濃度對春石斛 9203品種分生芽增殖倍率之影響

BA (mg/L)	Proliferation rate of shoots <sup>z</sup>	
	Shoot tip	Stem base
1	1.6	2.6
2	2.0	2.8
5	3.0	4.0
LSD <sub>0.05</sub>		0.945

<sup>z</sup> Proliferation rate was determined as final numbers of shoots divided by initial numbers of shoots. Statistical analysis was done with Least Significant Difference (LSD) test.

表5-4、不同品種和BA濃度對春石斛分生芽增殖倍率之影響

BA (mg/L)	Proliferation rate of shoots <sup>z</sup>	
	9203	8604 <sup>y</sup>
2	3.2	2.4
3	3.7	2.6
5	3.6	2.5
LSD <sub>0.05</sub>		0.2977

<sup>z</sup> Proliferation rate was determined as final numbers of shoots divided by initial numbers of shoots. Statistical analysis was done with Least Significant Difference (LSD) test.

<sup>y</sup> Cultivars of Dendrobium (NO.9203 and NO.8604).

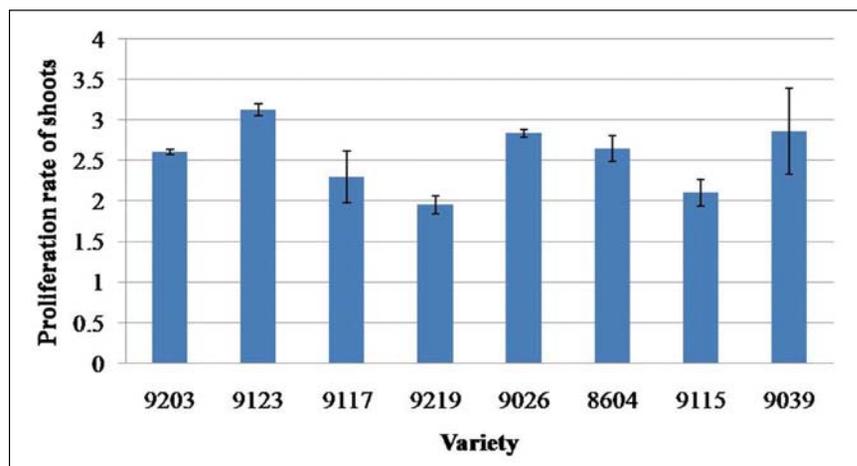


圖5-16、8個春石斛品種之芽體增殖倍率

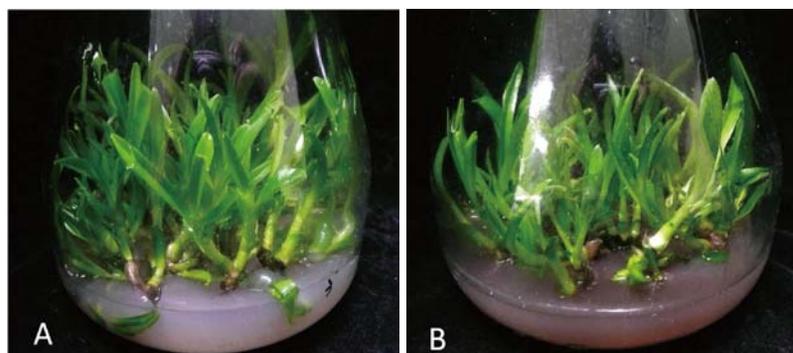


圖5-17、春石斛增殖培養2個月後之芽體生長情形。

A. 9203品種；B. 9123品種

## 七 仙履蘭微體繁殖技術之建立

廖玉珠、張珈琦

以組織培養技術切取仙履蘭開花株88個側芽無菌培養，其中8個芽污染6個芽褐化，成活率84%。每2個月繼代一次，繼代8次後以Paph. Delrosi (多花×單花) 品種增殖倍率最高，前幾代增殖速度較慢至第五代開始才有逐漸增加之趨勢，最多可至400個芽。紅Maudiae Type最多只增殖至

50個芽。單花短瓣亞屬類增殖速度最慢只有28個芽，但同品種各單株間之差異性極大(如圖5-18)。

以仙履蘭*Paphiopedilum Avmeni White*及*Paphiopedilum Deperle*三種不同發育階段之幼嫩花苞，經無菌處理後，培養於含有1/4 MS之基本塩類、添加四種不同濃度之植物生長調節劑。在花苞靠近花梗基部的部位可誘導出植株(如圖5-19)。二品種皆以花苞2.5-3cm之誘導成功率最高達75%(如表5-5)。

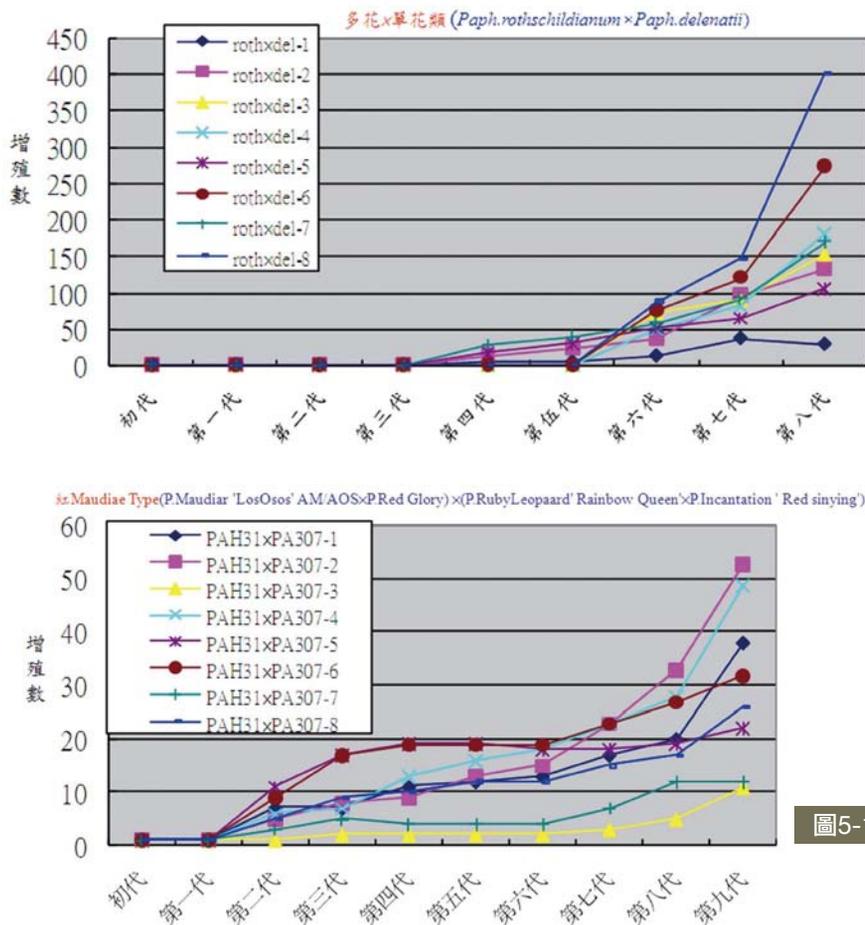


圖5-18

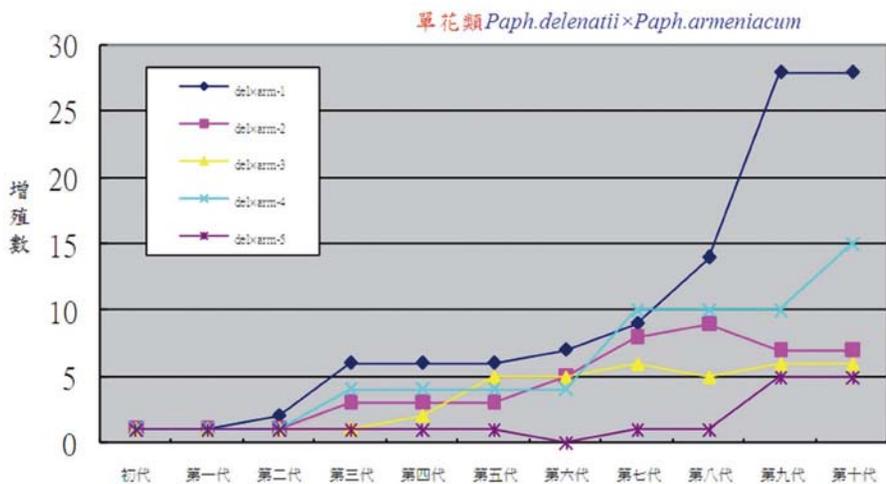


圖5-18、仙履蘭品種間或同品種單株繼代培養對芽體增殖數之影響

表5-5、不同發育階段之花苞對仙履蘭 *Paphiopedilum Armeni White* 及 *Paphiopedilum Deperle* 誘導芽體之影響

花苞部位	花苞大小 成活率	2.5-3cm			2-2.5cm			1.5-2cm		
		接種數	成活數	成活率 %	接種數	成活數	成活率 %	接種數	成活數	成活率 %
<i>Paphiopedilum Armeni White</i>	花苞	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	基部	5	3	60	5	0	0	5	0	0
	花梗	5	0	0	5	0	0	5	0	0
<i>Paphiopedilum Deperle</i>	花苞	8	0	0	7	0	0	5	0	0
	基部	8	6	75	7	4	57	5	3	60
	花梗	8	0	0	7	0	0	5	0	0

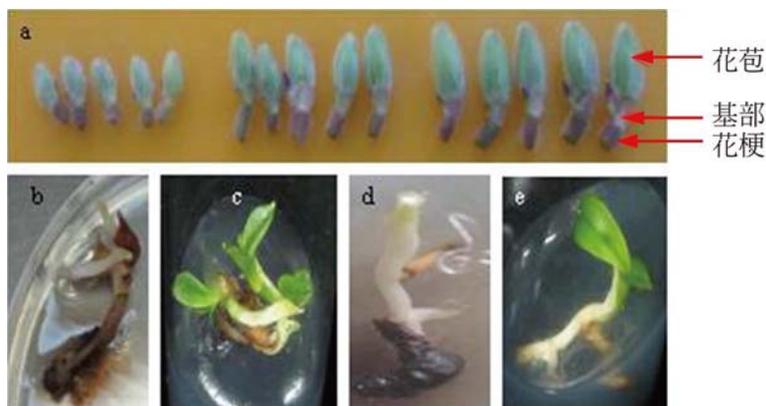


圖5-19、仙履蘭 *Paphiopedilum Armeni White* 不同大小花苞基部植株誘導