

五、生物技術開發之應用

一 番木瓜種苗七號全兩性株 調控基因分析與產業應用

簡怡文、李美娟、邱展臺、張惠如

鍾文全

木瓜為熱帶及亞熱帶地區栽培的重要經濟果樹之一，具雌株、雄株及兩性株三種性型植株。由本場所育成的種苗七號木瓜為全兩性株，其後代皆為兩性株，可以減少生產成本。為了找出控制木瓜全兩性生理現象之相關分子基因，發展木瓜全兩性株全基因體定序 (whole genome sequencing) 是不可或缺的重要環節。本年度已進行日陞種 × 種苗七號回交至日陞種 (BC1F1)，並利用染色體定位，配合番木瓜不同株性，分析番木瓜 9 條

染色體，期能找出 X 及 Y 染色體，藉以做為選殖性別控制基因之主要目標染色體及 DNA 序列區，以提供育種上早世代選拔之分子標誌及未來利用基因轉殖技術產生全兩性株新品系。目前已完成番木瓜染色體之壓片技術，同時建立番木瓜染色體螢光原位雜交技術 (圖 5-1-1、圖 5-1-2)。

木瓜全兩性株基因體定序研究方面，針對全球惟一之全兩性株木瓜種苗七號進行基因體高通量定序，完成為 200 倍 coverage(82G) 高解析度之基因體序列，為全球解析度最高之木瓜基因體序列。並使用 5 個木瓜花器 RNA-seq 的數據 (全兩性，雌性，全雄性，一般兩性，雄性) 對應到我們所建構的種苗七號木瓜基因體上，同時完成木瓜

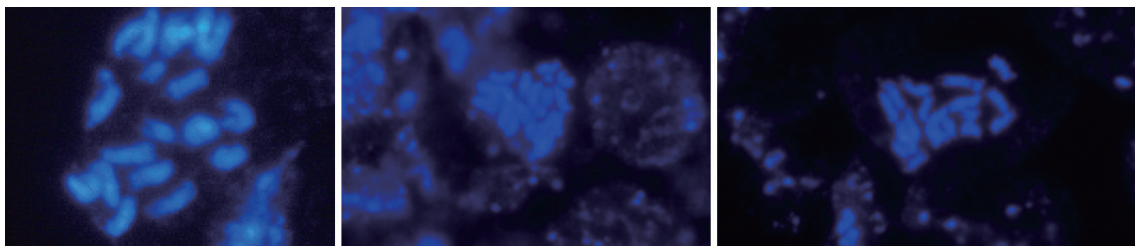


圖 5-1-1、番木瓜以 DAPI 螢光染色之染色體

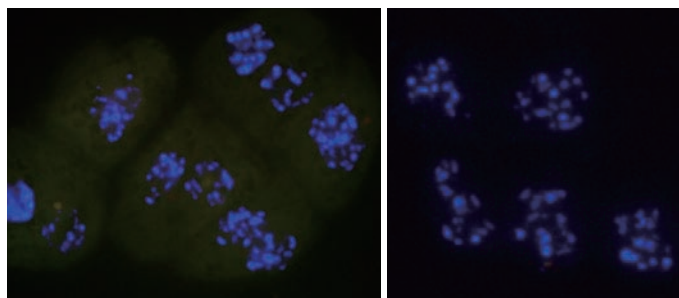


圖 5-1-2、番木瓜以染色體螢光原位雜交結果

性別相關之基因體功能性分析。已建構可供搜尋之全兩性木瓜網路資料庫一式，這個網站不僅可以讓使用者查詢基因註解與 KEGG Pathway 註解，也提供了種苗七號的差異表現基因的資料庫。在 BAC library 建構方面，以全兩性木瓜 - 種苗七號基因體為材料，目前已完成 2000 菌株之選殖。

控制木瓜全兩性株分子機制方面，已建立木瓜受精後胚敗育（致死）時期之技術，及建立種苗七號全兩性及日陞一般兩性自交後胚發育形態，與成熟果實中之種子胚發育型態統計分析（圖 5-1-3）。

利用高通量定序結果，挑選 17 個與花性相關之差異表現基因，進行基因體解碼基因 (ORF) 比對，結果共可找出 281 個具有單一核苷多型性 (SNP)。種苗七號及日陞自交 19 天胚之轉錄體，經定序由軟體分析後找出 6 千多個差異表現基因，挑選其中可能參與胚致死且表現量差一兩倍以上基因，包括細胞分裂、荷爾蒙、DNA 複製或修補功能等，以待進一步分析確認。

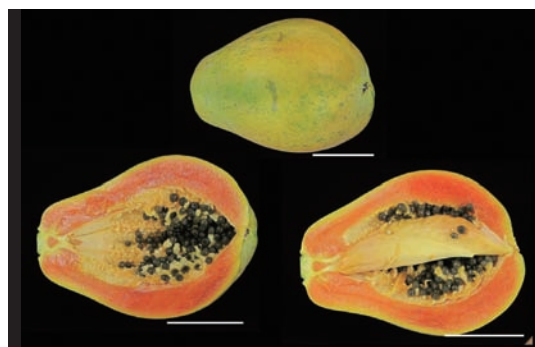


圖 5-1-3、種苗七號 (NO.36) 自交成熟果實外觀及內部胎座、種子型態。(Bar = 5cm)

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

1915 年斑點萎凋病首次於澳洲的番茄植株被發現，並證實為病毒性病害，於 1930 年定名為番茄斑點萎凋病毒 (Tomato spotted wilt virus, TSWV)。接著在許多地區陸續發生而成為世界性的病毒，並廣泛侵害於熱帶、亞熱帶及溫帶地區的許多作物種類，如葫科作物、茄科作物、豆科作物及花卉作物等，且造成非常嚴重的損害，進而嚴重影響作物經濟的收益，已成為作物生產的限制因子之一。

番茄斑點萎凋病毒病，除了在田間為害及傳播外，也為番茄溫室栽培的主要病害之一，近年更有蔓延的趨勢。危害症狀變化大，從苗期到成株各部位均可感染呈現症狀，Sw5 抗性基因控制下接種 TSWV 的反應呈現無病斑或僅限制性過敏反應。本試驗完成在 Sw5 基因位置上建立分子標誌，並建立 Multiplex

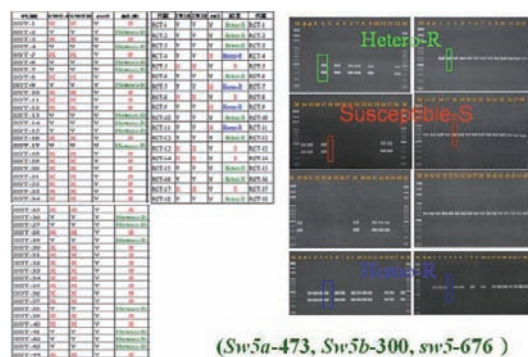


圖 5-2-1. 番茄 63 個盲樣樣品 Sw5a、Sw5b 及 sw5 基因型分子鑑定電泳圖。

RT-PCR (含 TSWV/Sw5)，可同時檢定番茄抗斑點萎凋病毒病的同質抗性、異質抗性或感病性及是否帶有 TSWV 的病毒。利用 F2 族群分析抗性基因之分離情形，結果栽培種中之 Sw5a 與 Sw5b 抗性基因表現在栽培種中呈現不分離情形，分離比為 1:2:1 並已運用於大量樣品基因型檢定 (圖 5-2-1)。利用 ELISA 及 RT-PCR 檢測接種 TSWV 病原植株，以檢定番茄抗斑點萎凋病毒病的同質抗性、異質抗性或感病性的抗病能力，結果同質抗性、異質抗性或感病性檢出病原的比例分別為 0%、1.26% 及 41% (表 5-2-1)。

三 植物種苗團隊 - 作物特定性狀分子標誌建立及選殖

張惠如、孫永偉、莊淑貞、鍾文全

1. 木瓜性別相關基因及其分子標誌之建立：

經由多組 SSR 及 SCAR 引子 PCR 試驗

篩選，目前並無篩選出具可鑑別全兩性性狀之差異性條帶。進一步將增幅出的條帶進行序列分析，由序列上發現全兩性株與一般兩性株 / 雄株之間，同個增幅條帶內具有單個核苷酸的差異。這些單個核苷酸的差異是否可發展為 SNP 或 CAPS 分子標誌，而應用於全兩性性狀的判定，則需再進行試驗進行篩選測試。(圖 5-3-1)

2. 番茄抗黃化捲葉病毒分子標誌之建立：

番茄黃化捲葉病毒是由粉蝨傳播的嚴重病害，台灣主要有 2 種，ToLCTWV (mono-partite, 台灣種) 及 TYLCTHV (bi-partite, 泰國種)，主要抗病基因有 Ty-1、Ty-2、Ty-3、Ty-4、Ty-5。本研究與亞蔬中心合作已開發病毒 (*Begomovirus* 屬、ToLCTWV 及 TYLCTHV) 與抗病基因 (Ty-1、Ty-2、Ty-3 及 Ty-5) 專一性分子標誌，可協助育種者早期篩選抗病植株、確認抗病基因型 (R/R、R/S、S/S) 及病毒感染情形，提高育種效率。(圖 5-3-2)

表 5-2-1. 番茄抗斑點萎凋病毒病遺傳型 (2 個 F2 族群) 的抗病能力調查。

基因型	Sw5aSw5b/ Sw5aSw5b	Sw5aSw5b/ sw5	sw5/ sw5
第1個F2族群	0/13株(0%)	1/46株(0%)	5/20株(25%)
第2個F2族群	0/20株(0%)	0/33株(0%)	11/20株(55%)
總株數	33株	79株	40株
病毒檢出率	0% (0/33+8株) (0%)	1/79株(1.26%)	41% (16+2/40+4株)
病癥	接種葉檢出 TSWV，接種葉黃化後枯萎掉落。後續新葉無檢出 TSWV 及無病癥出現。1F2-21 檢出 TSWV 但無出現病癥。		接種葉檢出 TSWV，後續新葉亦檢出 TSWV 並出現黃化、黃斑及壞疽病癥或死亡。

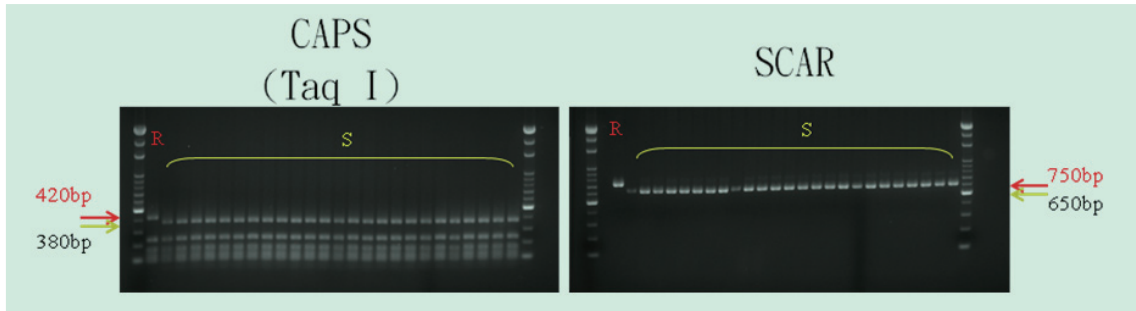


圖 5-3-2、本研究設計 1 組 SCAR 分子標誌 (Ty5) 可檢測抗病基因 Ty-5 (750 bp) 與感病基因 ty-5 (650 bp)，可作為番茄抗病基因 Ty-5 之專一性分子標誌。Anbinder 等人 (2009) 使用 CAPS 標誌，利用 TaqI 限制酶經酶切反應後，可判斷抗病基因 Ty-5 (420 bp)、感病基因 ty-5 (380 bp)。

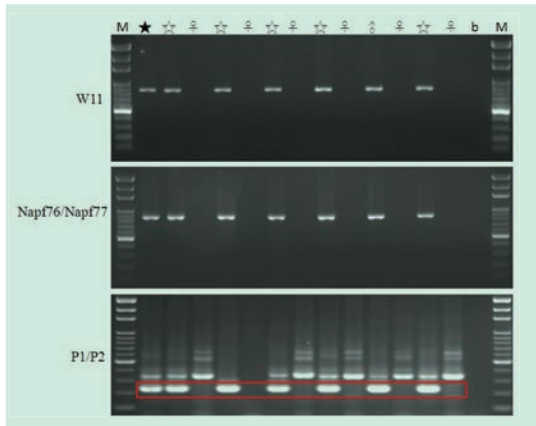


圖 5-3-1、SCAR 引子對電泳分析圖，由上而下三組引子分別是：W11、Napf76/Napf77 及 P1/P2。M: marker; 種苗 7 號全兩性株 (★)、mu7 兩性株 (☆)、mu7 雌株 (♀)(lane 2-3); Solo 兩性株、雌株 (lane 4-5); KL 兩性株、雌株 (lane 6-7); SR-3 兩性株、雌株 (lane 8-9); 佛羅里達雄性株 (♂)、雌株 (lane 10-11); 黃皮種兩性株、雌株 (lane 12-13)、blank 水 (lane 14)

本試驗以蝴蝶蘭 (含朵麗蝶蘭) 為目標作物，與委辦廠商 -- 成功大學生物科學系吳文鑾副教授，將桃園場、臺南場、成功大學及本場所開發之多組可應用於蝴蝶蘭商業品種之 SSR 引子，以 12 個蝴蝶蘭原生種及 12 個商業品種 (材料名單如表 5-4-1、表 5-4-2) 作為共同試驗材料，進行已開發之 SSR 分子標誌的篩選及整合。期所開發的分子標誌，能在遺傳歧異度高的 24 個試驗材料中，皆能增幅出目標條帶；若這些目標條帶具有多型性，未來可進一步應用於品種鑑別之 SSR 分子標誌。透過雙方分別以上述 24 個試驗材料完成共 33 組 SSR-PCR 的分析試驗，並以 ABI3730 儀器之系統進行毛細管電泳 (其解析度高達 1 bp.) 分析，並分別分析原始數據後討論比較各組 SSR 分子標誌之鑑別力，在經比對過雙方的試驗結果，從 33 組引子對中挑選出 16 組引子對，其相關分析資料如表 5-4-2。為進一步確認這 16 組引子對的鑑別能力，另挑選 20 組高外表性狀相似度之品種權品種及其對照品種，進行品種鑑別力測試。由分析的結果經討論後，淘汰 1. 無法有效在不同試驗材料中增幅出條帶的 SSR 引子對；2. 容

四

整合蝴蝶蘭及朵麗蝶蘭商業品種 SSR 分子標誌技術

張惠如、吳文鑾、安志豪、劉明宗

鍾文全

易造成判讀誤差的引子對，最後保留了 14 組 SSR 引子對（表 5-4-4）。後續將進一步調整 PCR 試驗分析條件、建立本 SSR 分子鑑別方

法的參考品種、進行實驗室間能力測試，並將試驗方法撰寫為成熟的標準試驗方法。

表 5-4-1、共同試驗材料：12 個蝴蝶蘭原生種

Phalaenopsis species		代號
1	<i>Phal. amabilis</i> 'Tual Is'	ama
2	<i>Phal. aphrodite</i> '大武'	aph
3	<i>Phal. schilleriana</i> 'Quezon'	sch
4	<i>Phal. stuartiana</i> 'Lcyte'	stu
5	<i>Phal. equestris</i> 'Samar'	equ
6	<i>Phal. lueddemanniana</i> 'Quezon'	lue
7	<i>Phal. amboinensis</i> 'Sulawesi'	amb
8	<i>Phal. pulcherrima</i>	pul
9	<i>Phal. venosa</i> 'Sulawesi'	ven
10	<i>Phal. sumatrana</i> 'Sarawak'	sum
11	<i>Phal. violacea</i> 'Sumatra'	vio
12	<i>Phal. mannii</i> 'Vietan'	man

表 5-4-2、共同試驗材料：12 個商業品種

Phalaenopsis cultivars			代號	
1	SogoF1302	<i>Dtps.</i> Sogo Yoshida' SOGO F1302'	463	紅花
2	天使之音	<i>Dtps.</i> Joy Angel Voice' Angel Voice'	452	紅花
3	台大小可愛	<i>Phal.</i> Zuma's Pixie' Taida Little Cutie'	930	紅花
4	台糖 K41731	<i>Dtps.</i> Taisuco Gloria' Taisuco K41731'	799	黃花
5	育品黃金	<i>Dtps.</i> Sogo Golden' Yu Pin Gold'	522	黃花
6	安慶綠蘋果	<i>Phal.</i> Brother Sweet Sugar' An Ching Green Apple'	500	黃花
7	中營恩典	<i>Phal.</i> Join Grace' TH.288-4'	437	白花
8	台糖 k52202	<i>Dtps.</i> Taisuco Flourish' Taisuco K52202'	924	白花
9	鉅寶貴妃	<i>Dtps.</i> Gu Keng Beauty' Jiuhbao Guifei'	863	白花
10	SogoF1138	<i>Dtps.</i> Leopard Prince' SOGO F1138'	279	斑花
11	鉅寶 2033	<i>Dtps.</i> Jiuhbao Fairy' JB2033'	628	斑花
12	SogoF1555	<i>Phal.</i> Sogo Lawrence' SOGO F1555'	758	斑花

表 5-4-3、SSR markers 於 24 個蝴蝶蘭共同材料之鑑別力分析

	SSR marker	Fluorescent dye	Size range (bp)	No. of unique allele	No. of unique genotype	PIC value	Transferability (%)	
							Species	Cultivar
成功大學與種苗場	NCKU1	HEX	142-200	21	20	0.92	100	100
	NCKU2	FAM	282-336	22	24	0.94	100	100
	NCKU3	HEX	135-190	24	24	0.94	100	100
	NCKU4	NED	208-269	16	20	0.88	100	100
	NCKU5	HEX	244-288	19	21	0.93	100	100
	NCKU6	FAM	194-220	13	18	0.89	50	100
	NCKU7	FAM	135-279	21	20	0.93	91.67	100
	NCKU9	FAM	163-269	24	22	0.94	100	100
	NCKU10	FAM	218-290	22	22	0.91	100	100
	V31-2	HEX	93-165	17	16	0.88	50	100
台南農改場與桃園	pH053	FAM	141-157	5	10	0.71	100	100
	Pm4007	FAM	431-464	11	15	0.86	100	100
	Pm4008	VIC	122-155	9	16	0.84	100	100
	Pm4077	NED	221-272	6	8	0.69	83.33	100
	Pm6009	NED	220-250	10	10	0.81	100	100
	Pm6015	PET	255-274	10	15	0.80	100	100

* 16組 SSR 分子標誌於 12 個蝴蝶蘭原生種與 12 個蝴蝶蘭栽培品種基因型鑑定結果之鑑別力分析
 * PIC: Polymorphism information content

五 利用地理資訊系統輔助基因轉殖作物監測之研究

沈翰祖、郭寶錚

全球定位系統 (Global Position System, GPS)、遙感探測 (Remote Sensing, RS) 與地理資訊系統 (Geographic Information System, GIS) 合稱為 3S 技術。其中 GPS 賦予每一空間資訊參考的地理座標，記錄相關位置；GIS 是結合儲存、查詢、分析平台與展示空間資料的系統，可做為農業研究與決策支援的工具。本研究針對如何運用 GPS 及 GIS 技術發展 GM 作物調查與監測系統 (圖 5-5-1)，以提升實地調查作業之效率，並統一管理檢

監測資訊，監控 GM 作物之分佈，並結合花粉飄散模式進一步評估非 GM 作物受到 GM 作物之影響。

GM 作物監測系統規劃分四個階段來建立，第一階段以基礎資料建構流程的訂定與資料庫之建置為主，同時搭配 GIS 基礎訓練，強化操作人員之空間資料處理與分析能力；第二階段建構自動化資料處理程序，並結合花粉飄散模式與行動化 GIS；第三階段將建立花粉飄散分析模式示範區域，並結合網際網路 GIS，建置 GM 作物監測與分析之平台；第四階段為建立 GM 作物監測資訊系統。

行動化 GIS 利用智慧型手機輕便、小巧、

表 5-4-4、SSR markers 於 20 組登錄品種與對照品種間之可鑑別性

蝴蝶蘭品種		NCKU1	NCKU2	NCKU3	NCKU4	NCKU5	NCKU6	NCKU7	NCKU9	NCKU10	V31-2	Pm4007	Pm4008	Pm4077	Pm6015
嘉大美紅唇		X	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X
嘉大雅紅唇		0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X
YPM4006		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
雲霞(TM0678)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0
火星王(N41)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	X	0
大月亮(N36)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0
大太陽(N26)		0	0	0	X	0	X	0	0	0	0	X	0	X	X
北極光		0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
台露皇后		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X
旭東威士忌		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
香園美人		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	X
明星M20		X	0	0	X	0	X	0	0	X	0	X	0	0	0
科隆茉莉CL331		X	0	0	X	X	X	0	0	0	0	0	0	X	X
科隆白絲帶		X	0	0	X	X	X	0	0	0	0	X	X	X	X
青鶴		0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	X	0
V3		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
立匠火鳥		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0
Sinica Sunday		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
紅玫瑰		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jiubao Red Rose		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
牛魔王187		0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0
OX1191		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
一心愛安娜		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0
DC3011		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
SOGO F1621		X	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	X	0	0
SOGO F2292		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
SOGO F846		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0
SOGO F862		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
可鑑別之樣品數		14	19	19	13	17	15	18	18	18	18	12	17	10	17

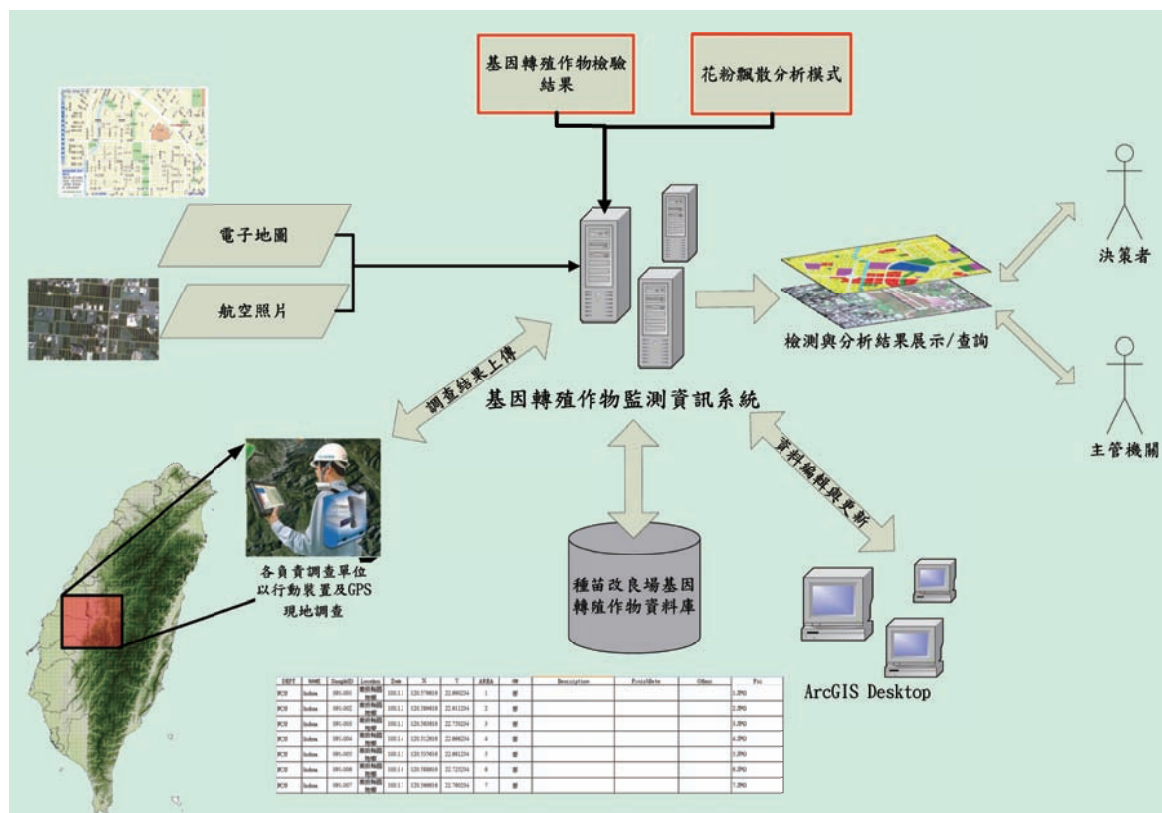


圖 5-5-1、基因轉殖作物監測系統整體架構圖

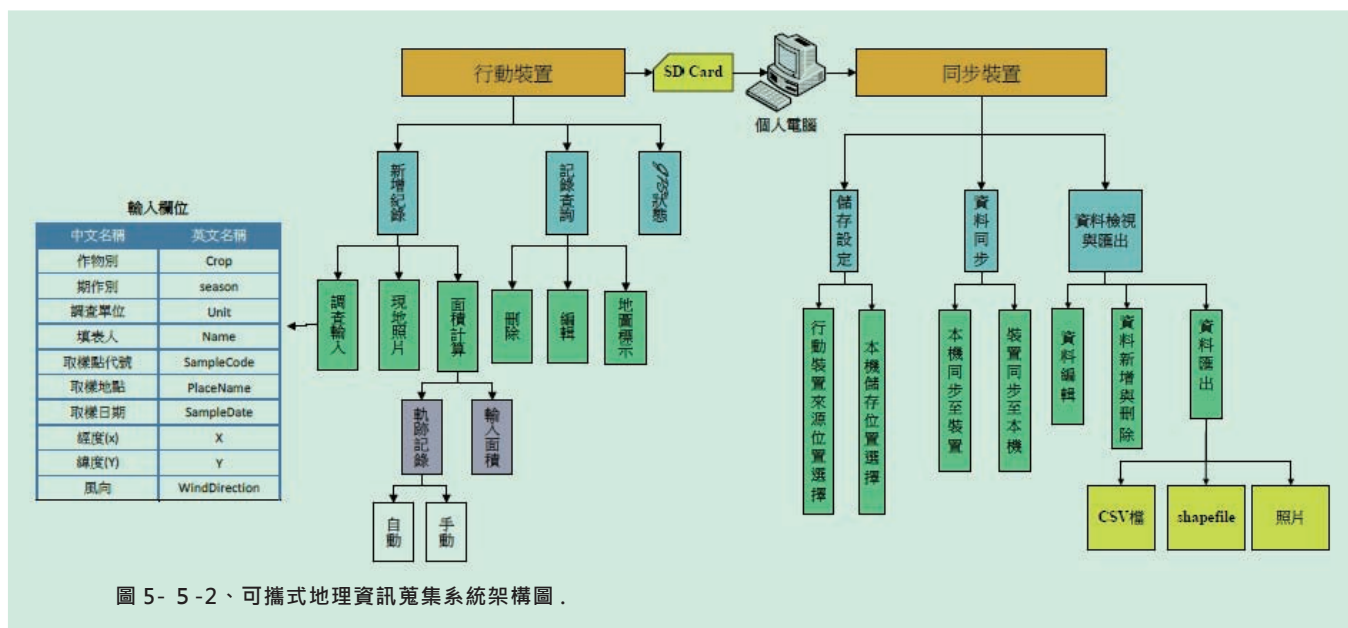


圖 5-5-2、可攜式地理資訊蒐集系統架構圖。



圖 5-5-3、可攜式地理資訊蒐集系統操作介面

移動性、運算功能強等優點，且與個人電腦相似，大多數都具有紅外線和藍芽無線傳輸介面，而 Wi-Fi 及 GPS 也都成為標準的功能。已完成可攜式地理資訊蒐集系統，本系統是針對 Android 作業系統之「行動裝置」均可安裝，例如安裝於智慧型手機或平板電腦等，系統架構如圖 5-5-2、操作介面如圖 5-5-3，並可搭配 GIS 軟體可進行作物圖資編輯、資料分析、查詢、圖資展示與製圖等功能。

六 種子(苗)品質純度分子檢測技術研發

莊淑貞、孫永偉、鍾文全

因應 WTO 全球化的挑戰種子(苗)產業需高度精密之技術及高額之資本投入，才更有競爭力，2012 年除了五大農業生技園區總值即上看 290 億外加上台灣幾大種子公司公司的種子(苗)產值則更不止於此。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。

分子標誌技術結合在種子(苗)產業的品質管理模式，應用於組織培養及田間的量產純度管理，有助於種子(苗)產業在台灣的深耕及隨科技進步而達不同面向的品質提升。種子(苗)產業的各個階段結合嚴謹的技術管理，除有助於提升產業永續的發展也提高消

費者對產業的信，並對結合技術管理的新種苗產業寄予厚望。本計畫擬以茄科如番茄及番椒等作物為基礎，逐年建立雜交種子(苗)品質純度分子檢測管理體系以營造優質種子產業環境，提昇產業國際化競爭力。

茄科如番茄及番椒等作物之雜交一代種子純度分子識別標誌資料庫之建立，101 年度以種子公司番茄品種植體材料(雜交一代及父、母本親)，及種苗場番椒新品種種苗 2

號及 4 號，共 3 組 9 個材料。番椒共篩選出 8/100 組有用引子，11 個識別片段。番茄共篩選出 7/100 組有用引子，7 個識別片段。經回收、定序、解序及重新設計條帶專一性引子，本年度增加番茄 SCAR 標誌 7 組增幅出 6 個專一性條帶(圖 5-6-1)，及番椒 SCAR 標誌 10 組增幅出 6 個專一性條帶(圖 5-6-2、圖 5-6-3)，可供業界客制化應用。

