

五、生物技術之開發與應用

一 基因轉殖與非基因轉殖玉米共存栽培制度之研究

沈翰祖、郭寶錚

玉米（*Zea mays*）是雌雄同株（monoecious）異花授粉（allogamous）作物，花粉是造成基因流動（gene flow）的主因。影響異花授粉比例的因子有：花粉貢獻親與接受親間距離；花粉貢獻親與接受親田區大小、形狀及相對方位；風的強度與風向；雨量；花粉生命力及其含水量；其他氣候狀況；雄不稔程度。所有的研究顯示，在最遠距離 30m 時異花授粉比例可維持 1% 以下。雄花與雌花開花期的同步與否是決定異花授粉比例的重要因子。大部分的花粉都落在距來源處 30 m 內，30-50 m 處花粉飄散的量已非常的少但仍可發現。

爲了達到整個花粉接受田區 0.9% 的歐盟門檻值，國內外研究顯示：依據花粉接受區的面積大小，以下三種不同的案例可供參考：

1. 當花粉來源與花粉接受區相鄰或被完全環繞時，發現當接受花粉田區面積大於 5 ha 時，整個異花授粉率仍可維持在 0.9% 的門檻值以下。主要由於在接受花粉田區上空形成大量的花粉雲，因此不需要隔離距離。
2. 當面接受花粉田區積在 1 到 5 ha 時，可

能就必須考慮一些防堵（containment）措施。可以考慮以下策略或混合使用。

- (1) 當花粉接受田區面積減少時，隔離距離應增加，有必要保留 10 到 50 m 的隔離距離。如無法提供適當的隔離距離，則可考慮設置花粉藩籬。
- (2) 可以將在花粉接受田區外圍的玉米視爲花粉藩籬。收穫時，如果所含基因轉殖物質比例超過門檻值，可將花粉接受區外圍玉米行拋棄或當成基因轉殖玉米。
3. 對面積小於 1 ha 或較窄的花粉接受田區，推薦的隔離距離至少 50 m，特別是位在主要風向處。

在現行的農業操作下，使用隔離距離、花期隔離、利用花粉藩籬或同時使用是降低異花授粉的最重要方法。另外農民間彼此協調作物順序及播種期，選擇不同成熟期的品種等，均可改善共存的成果，而基因轉殖專區亦是最終的考量辦法。

二 生技種苗檢測服務建置與產業推動

鍾文全、沈翰祖、文紀鑒、蔡瑜卿
張正、廖玉珠、袁雅芬、陳哲仁

利用 multiplex PCR 技術進行基因轉殖木瓜檢測，得知 Multiplex PCR 可取代一般

PCR 進行基因轉殖木瓜檢測，以達到降低檢測成本，並提升檢測能量之目的。評估 SYBR Green、Safe view 等 2 種螢光試劑對基因轉殖大豆與玉米檢測效能，結果顯示 SYBR Green 分出基因轉殖及非基因轉殖大豆和玉米的能力優於 Safe view。訪視 6 家文心蘭組培場，瞭解其設備規模、生產流程及瓶苗出貨標準，並蒐集市售瓶苗進行調查，探討影響瓶苗品質之外部型態指標，包括葉數、根數、株高、根長、鮮乾重，分析 810 個樣品發現瓶苗間葉片數並無顯著差異，根數及根長則有較高的變異程度，推測可能是子瓶移植操作的影響，株高仍是較為簡便可靠的分級標準，初步結果建議以區分大中兩級為可出貨品質，小等級植株管理模式還需進一步評估。度拜訪 16 家蝴蝶蘭組培場，與經營者訪談組培設備、生產流程及瓶苗出貨標準。從 11 家組培場中蒐集 12 份蝴蝶蘭 V3 瓶苗，每份有 6 瓶子瓶，共計 72 份樣品。這些瓶苗經合格率調查、莖葉及根的數量與重量調查後，分為 4 個瓶苗品質等級。取樣品進行植體成份分析，其餘植株上盆栽植，並移到專業的蝴蝶蘭中小苗栽培場栽培到中苗。取中苗再進行合格率、莖葉及根數量與重量調查，並分成 4 個中苗品質等級，並進行中苗植體分析。優良蝴蝶蘭瓶苗為株型端正、葉型與根正常、三葉以上葉片、二條以上有效根、株重 3 公克以上。葉的氮素含量中等（乾重 1.5-4%），高量的鉀含量（乾重 5% 以上）、磷含量介於乾重 0.4-0.8% 之間，鈣含量 0.4% 以上，鎂的含量在 0.15%

以上。以逆轉錄聚合酶鏈式反應（reverse transcription-PCR, RT-PCR）檢測蘭園蘭花常見病毒齒舌蘭輪斑病毒（Odontoglossum ring-spot virus, ORSV）與東亞蘭嵌紋病毒（Cymbidium mosaic virus, CymMV），共檢測 1346 件瓶苗樣品，檢測結果得知健康種苗比例為 92.8%。

三 植物種苗團隊－生物技術於植物品種開發及種苗驗證之應用研究－植物種苗認驗證體系建構

孫永偉、陳哲仁、簡怡文、蘇士閔

魏芊珊、莊淑貞、沈翰祖、袁雅芬

鍾文全、李美娟、黃玉梅

1. 健康種苗之母本檢測與母本園建構及維護：

本計畫目的為落實開發的檢測技術與母本園維護，結果葡萄、草莓以及綠竹皆未特定病原，但馬鈴薯有少數蒐集品種感染單一病毒，且未驗證種薯其帶病風險高，藉由持續的母本園維護、母本檢測及更新，期能支持健康種苗產業化之推動（圖 5-1）。

2. 瓜類退綠黃化病毒及草莓潛隱輪斑病毒驗證體系建構：

完成瓜類退綠黃化病毒（Cucurbit chlorotic yellows virus, CCYV）與草莓潛隱輪斑病毒（Strawberry latent ringspot virus, SLRSV）之檢測技術盤點。瓜類退綠黃化病毒以 RT-

PCR 檢測效果較佳；草莓潛隱輪斑病毒則以 ELISA 檢測效果較佳，挑選最適合的檢測方法建立標準檢測流程，並通過能力試驗。

3.種子（苗）品質純度分子檢測技術研發及標準化：

番椒利用 F2 族群及 ISSR 之 DNA 片段多型性，建立 F1 種子純度分子檢測識別標誌，以充實番椒雜交一代種子純度分子檢測之分子標誌資料庫。結果番椒 13 個多型性 ISSR-DNA 片段成功回收 12 個，經定序、解序共獲得 8 個序列，重新設計條帶專一性引子，其中引子組合 11 組經最適 PCR 反應摻合溫度及配方調整，均具條帶專一性。

4.水稻品種鑑定與遺傳純度分子檢測技術：

水稻品種鑑定與純化分子檢測技術，本研究篩選重複單位為 4 鹼基對的 SSR 分子標誌，建立 12 個 SSR 分子標誌套件，分散於 12 對染色體上。利用 4 種螢光標定方式，全部 12 組 SSR 標誌可於單次多重 PCR 反應（Multiplex PCR）同步增幅，並於單次多重毛細管電泳（Multiplex capillary electrophoresis）完成基因型分析。從篩選品種內選取遺傳距離最大的 12 個台灣品種作為標準樣品，此組標準樣品可涵蓋 95.9% 的對偶基因型。（圖 5-4）



圖 5-1、保存健康綠竹（左上）、葡萄（右上）、草莓（左下）以及馬鈴薯（右下）種苗於溫網室種植情形。

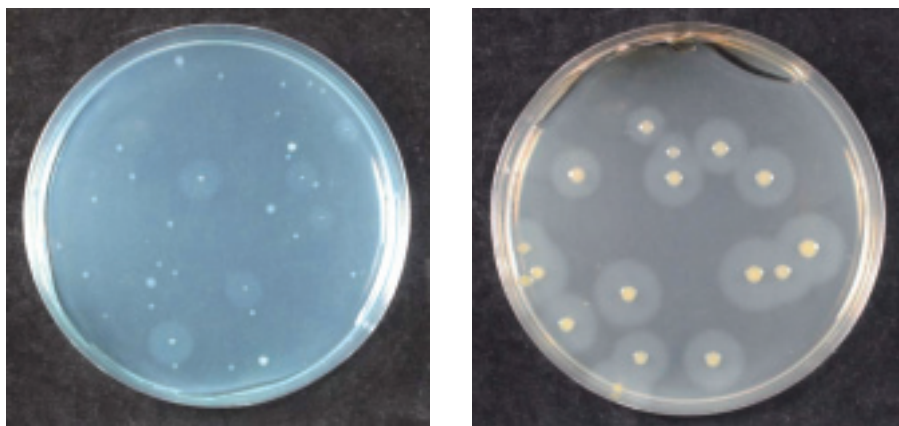


圖 5-2、Xcc 在 FS 選擇性培養基上會呈現淡綠色黏稠狀的小型菌落，周圍會出現澱粉水解透化圈（左圖），在 mCS20ABN 選擇性培養基上會呈現淡黃色黏稠狀的菌落，周圍也會產生澱粉水解透化圈（右圖）。

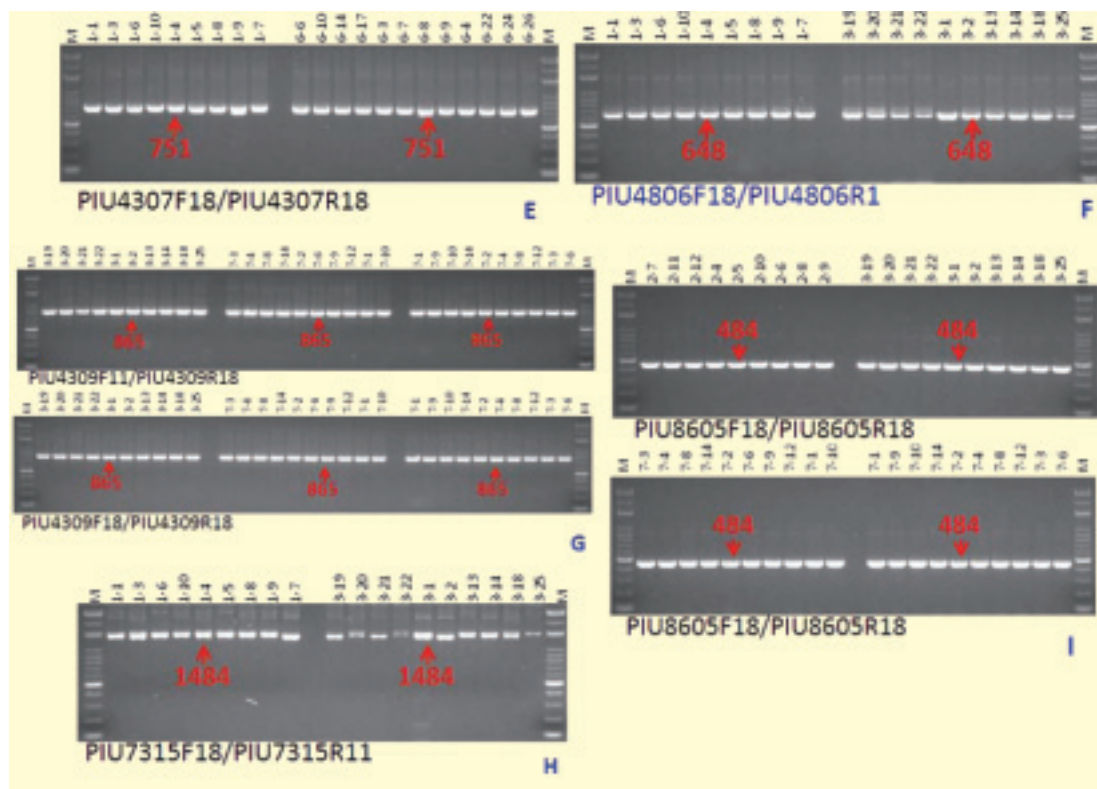


圖 5-3、番椒標誌 SCAR 之單一條帶電泳圖。

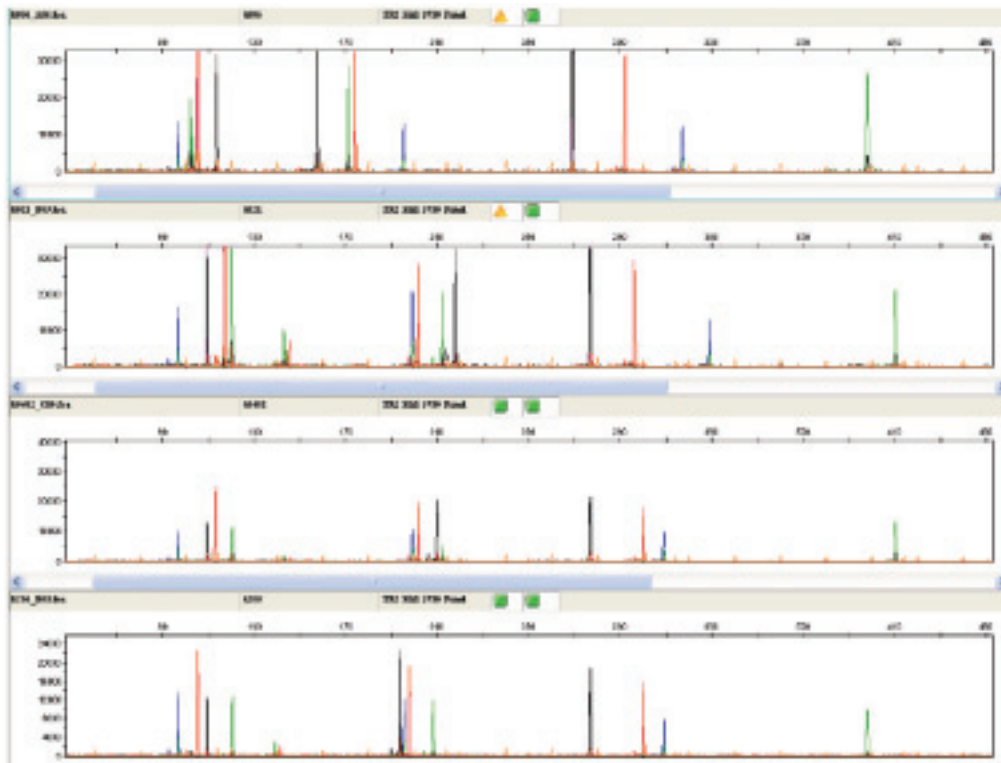


圖 5-4、第二版水稻品種鑑定套件之毛細管電泳結果

四 植物種苗團隊—番茄抗病與花椰菜自交不親和性分子標誌建立與應用

孫永偉、張惠如、莊淑貞、鍾文全

1. 番茄抗萎凋病基因型之分子鑑定：

番茄萎凋病為重要真菌性病害，本試驗建立 multiplex PCR（含 I-2 與 *Fusarium oxysporum*）共顯性分子標誌（I2/Fu），可同時檢定番茄抗萎凋病與病原菌基因。利用此分子標誌可擴增抗萎凋病基因 700 或 852 bp 之 DNA 條帶、擴增感病基因 2320 bp

之 DNA 條帶、擴增萎凋病（race2）基因 1000 bp 之 DNA 條帶。此分子標誌檢測結果與國內育種者或種子公司已知抗感性品種吻合。（圖 5-5）

2. 花椰菜自交不親和性基因型之分子鑑定：

利用花椰菜常用之 6 個育種親本品系為試驗材料，以 Brace 等人在 1994 年建立之 PCR-酶切試驗分類結果為依據，進行具識別性 SCAR 引子對的篩選，六個品系各 6 個單株材料先經 PCR-酶切檢驗，各品系每個單株間並無差異性，而各品系的自交不親和基因型分類結果僅 SP04 與 SP06 為相同類型，其餘品系皆為不同類型。而後

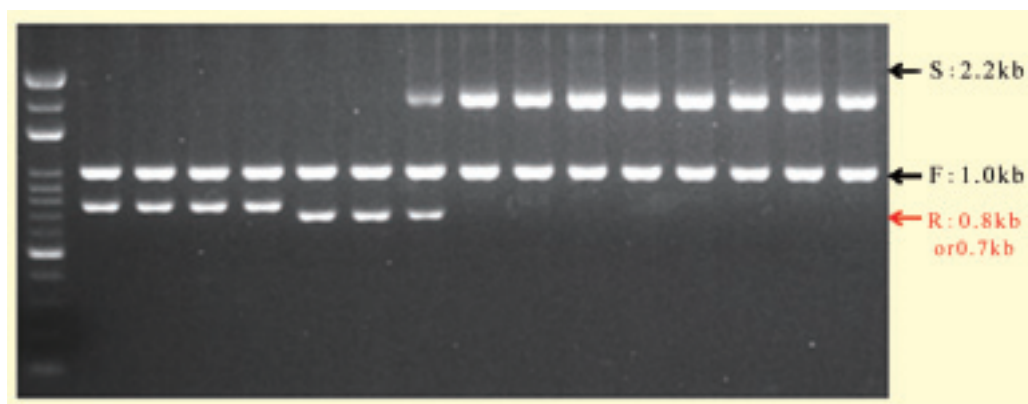


圖 5-5、本研究設計 1 組 SCAR 分子標誌可同時檢測抗病基因與萎凋病原菌之 PCR 反應後電泳圖，此引子對可擴增抗病基因 0.7 或 0.8 kb 之 DNA 條帶、感病基因 2.3 kb 之 DNA 條帶及萎凋病原菌 (race2) 1.0 kb 之 DNA 條帶。

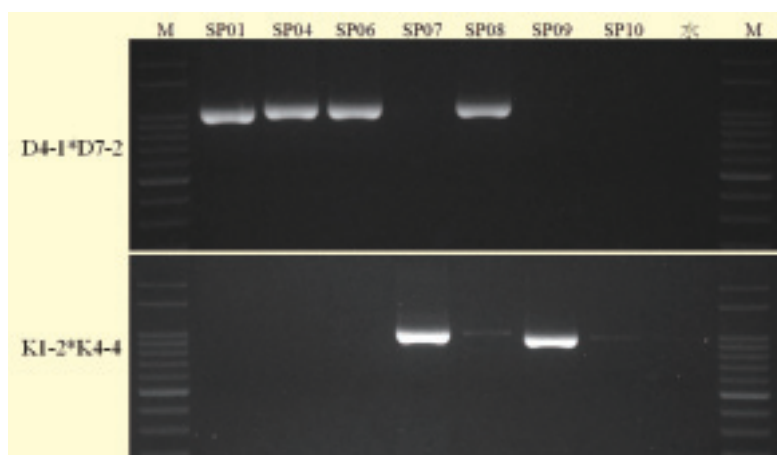


圖 5-6、可鑑別不同自交不親和基因型之花椰菜專一性 SCAR 引子組。

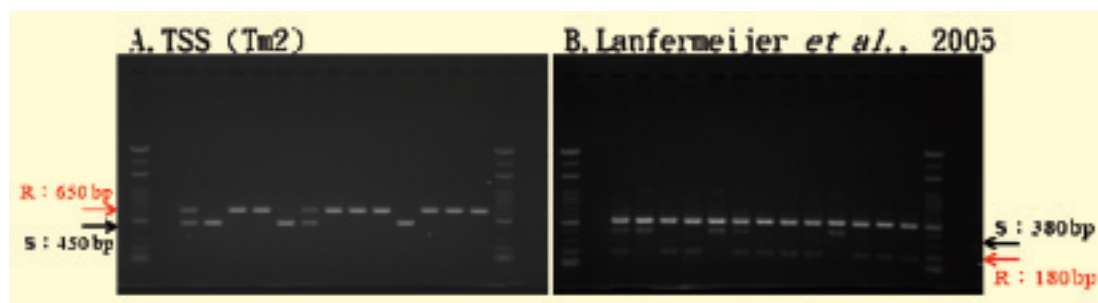


圖 5-7、比較國外文獻引子對與本研究設計 1 組 Tm2 分子標誌檢測抗病基因 Tm-2 之 PCR 反應後電泳圖。A.本研究設計 1 組 SCAR 引子對可擴增抗病基因 650 bp 之 DNA 條帶及感病基因 450 bp 之 DNA 條帶；B.由 Lanfermeijer 等人 (2005) 開發引子對可同時擴增抗病基因 180 bp 之 DNA 條帶及感病基因 380 bp 之 DNA 條帶。

進行花椰菜 SCAR 專一性引子的篩選，經 PCR 試驗結果後發現，有 2 組 SCAR 引子：D4-1*D7-2 可鑑別品系 SP01、SP04/SP06、SP08;K1-2*K4-4 可鑑別品系 SP07、SP09。

3. 番茄抗菸草嵌紋病毒分子標誌之建立：

菸草嵌紋病毒為菸草鑲嵌病毒屬 (Tobamovirus)，為番茄三大病毒之一。本試驗針對抗病基因 (Tm-2) 與病毒各開發專一性分子標誌 (Tm-2 與 TMV)。目前已開發一組共顯性分子標誌，可同時擴增番茄抗嵌紋病毒基因 (Tm-2 或 Tm-22) 650 bp 之 DNA 條帶、擴增感病基因 (tm-2) 450 bp 之 DNA 條帶。本研究與亞蔬中心合作開發一組分子標誌可檢測臺灣常見 3 種嵌紋病毒 strains (TMV-0、TMV-1、TMV-2)，可擴增 2.2 kb 之 DNA 條帶。上述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。

五 建立蝴蝶蘭及朵麗蝶蘭商業品種 SSR 分子鑑別方法

張惠如、吳文鑾、安志豪、劉明宗
鍾文全

本年度透過委辦計畫與成功大學生物科學系吳文鑾副教授，以先前整合的 14 組蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) SSR 分子標誌，根據其可擴增性、多型性程度與結果分析難易度，共同討論後選定 10 組 SSR 分子標誌用於蝴蝶蘭品種鑑別，並將此 10 組 SSR 分子標誌依據其 PCR 擴增片段大小分別標定不同螢光試劑，將 10 組 SSR 分子標誌兩兩組合，以降低蝴蝶蘭基因型鑑定的分析成本，並將技術方法撰寫成標準試驗流程。根據此標準試驗流程，選定 Dtps. Leopard Prince '世芥鑽石 F-1138' 與 P. Zuma's Pixie '臺大小可愛' 兩個蝴蝶蘭商業品種作為標準試驗流程之參考品種。未來可藉由確認參考品種於 10 組 SSR 分子標誌的分析結果是否

表 5-1、10 組 SSR 引子組於 100 個蝴蝶蘭商業品種之鑑別力分析

SSR marker	Size range (bp)	NO. of unique allele	NO. of unique genotype	PIC value
PHS01	142-200	20	60	0.872
PHS02	208-272	22	51	0.835
PHS03	253-281	8	21	0.716
PHS04	193-245	19	63	0.857
PHS05	132-216	11	44	0.81
PHS06	215-278	19	46	0.864
PHS07	175-228	19	63	0.893
PHS08	89-134	19	50	0.866
PHS09	400-439	22	49	0.867
PHS10	90-102	10	41	0.839

有具可重複性與穩定性，以確認每一批品種基因型分析結果的可信度。再依據已建立之蝴蝶蘭品種 SSR 分子標誌標準鑑定流程，針對 100 個蝴蝶蘭商業品種，進行 SSR-PCR 試驗並將所得原始數據以 BioNumerics 軟體進行基因型分析 (genotyping) 與儲存。十組 SSR 分子標誌可完全鑑別 100 個蝴蝶蘭商業品種，其 PIC (polymorphism information content) 值介於 0.716 (PHS03) 與 0.893 (PHS07) 之間，平均約 0.84 (表 5-1)。並進行多方實驗室之能力試測試與 12 個蝴蝶蘭商業品種的盲樣試驗，確認所建立標準試驗流程之結果可再現性與穩定性，顯示此套蝴蝶蘭 SSR 分子標誌品種鑑定系統可有效率協助鑑別蝴蝶蘭品種與國際間相關技術之應用交流。

六 番木瓜種苗七號全兩性株調控基因分析與產業應用

李美娟、簡怡文、邱展臺、張惠如

鍾文全、劉俊吉、陳福旗、金石文

李鎮宇

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。利用染色體

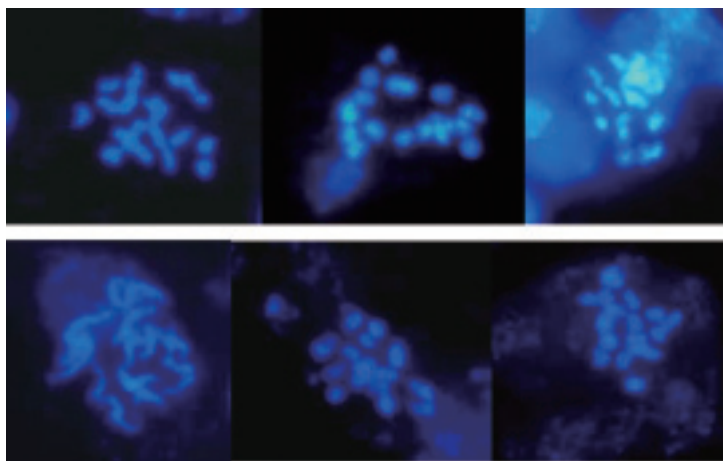


圖 5-8、番木瓜以 DAPI 螢光染色之染色體

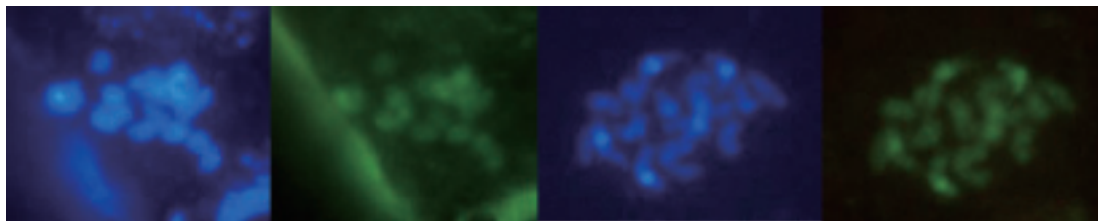


圖 5-9、番木瓜以染色體螢光原位雜交結果

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 5-8、圖 5-9），並完成搜索番木瓜基因體或相關基因序列。完成定植種苗七號、日陞種、羅里達種及全兩性株近同源系至 BC1F1 等木瓜植株供各階段花器發育及形態觀察及供給各項試驗材料。

為了找出控制木瓜全兩性生理現象之

相關基因，我們將種苗七號全兩性株作全基因體定序（whole genome sequencing）得到總長 389Mb 的基因組（2109 contigs, N50 565,365 bp）；並以 RNA-seq 的數據對應到種苗七號基因體上，建立了種苗七號花器轉錄體（transcriptome）與胚轉錄體，木瓜授粉後 20、40 及 60 天胚囊轉錄體分析，共得到 19938 條之差異表現基因，挑選具有表現差異基因進行 Real-time 檢測，大部份基因在種苗七號自交 60 天之大批子中表現最高；比對胚囊差異性表現基因與基因體序列，找出具有差異性 SNP 之序列，並分別選殖出全長為 1600 bp 及 1170 bp 之 cDNA。此外亦自種苗七號早期胚囊選殖其他與胚

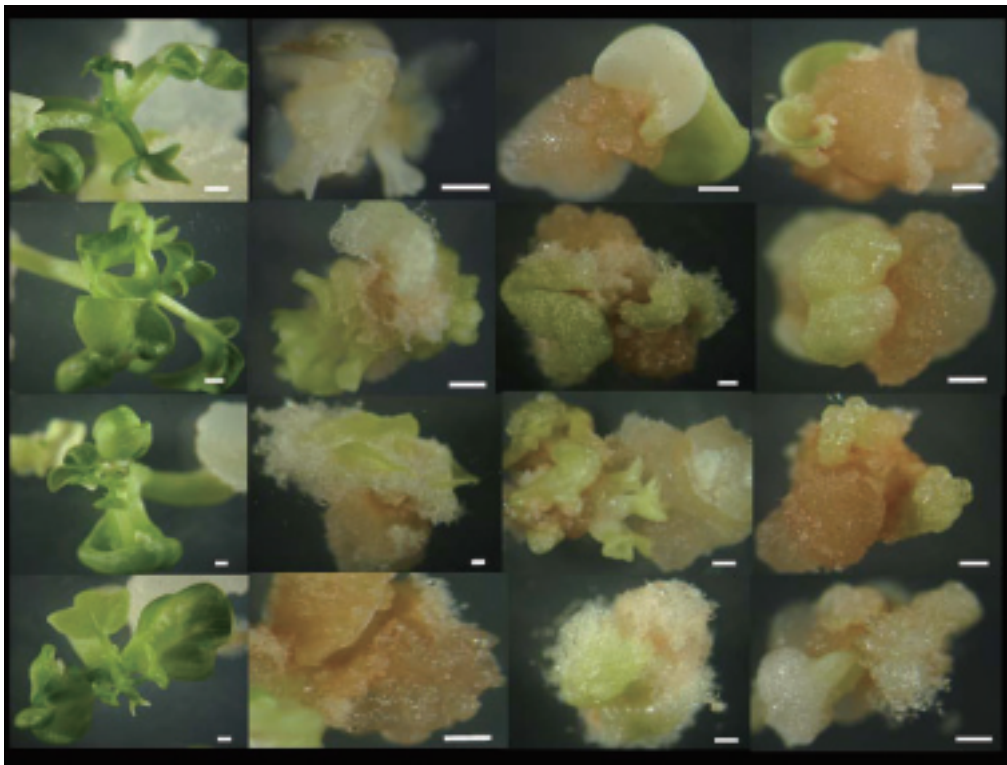


圖 5-10、不同 2,4-D 及 BA 濃度對木瓜體胚誘導之影響

發育相關之基因 cDNA 全長，全長核苷酸序列分別為 2497 bp、2139 bp 及 2115 bp。

將種苗七號全兩性木瓜全基因體與 sex chromosome BAC 序列進行序列比對，我們發現了 131 個性別相關的 contig，並找出在全兩性與雌性間有顯著差異表達的 Embryogenesis 相關基因。我們建構了種苗七號基因體 BAC library。在基因型分析中可將基因體分析所得 247 個相關 SNP 再選出 20 符合全兩性遺傳假說之分子標記，其中

部分分子標記經由 HRM 分析不同親本與子代，可以發現與全性狀有 100% 相關正確率。

本計畫同時進行體胚發生之誘導，一期未來供基因轉殖用途，利用不同生長調節劑（2,4 D、BA 及 TDZ）誘導木瓜體胚，培養基中單獨添加 BA，其癒合組織及體胚發生率低；添加不同濃度 TDZ 皆可誘導癒合組織、體胚及不定芽發生，但各濃度間沒有顯著差異（圖 5-10、圖 5-11）。

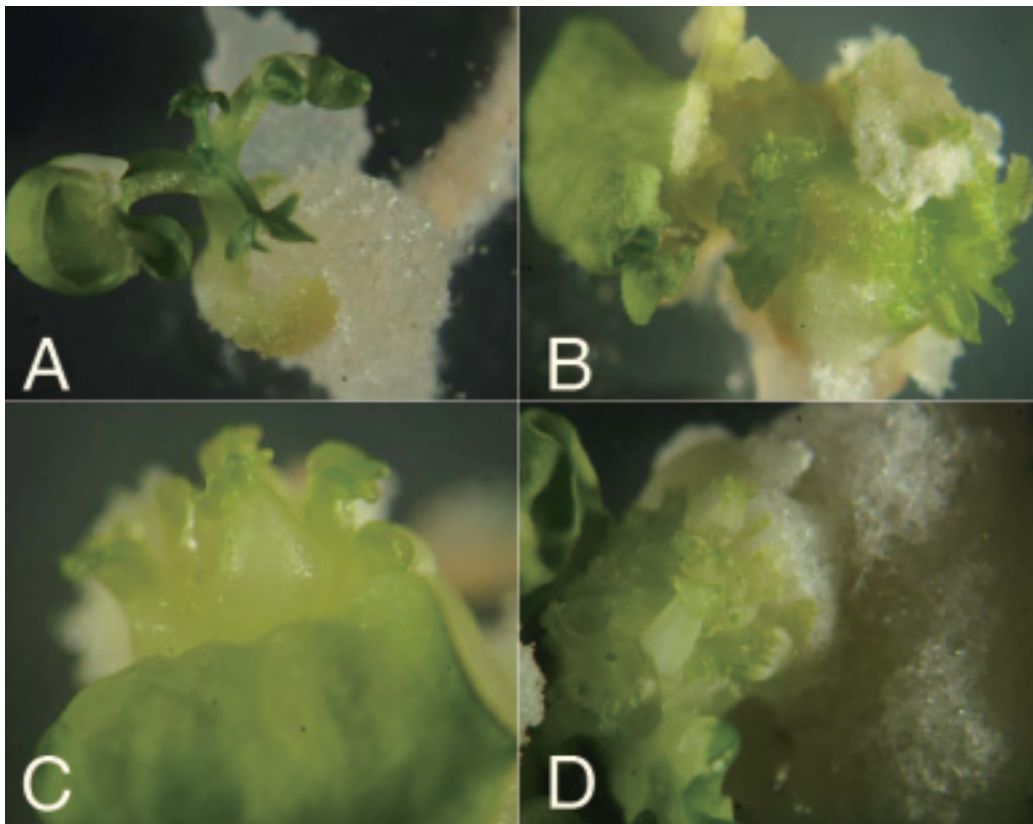


圖 5-11、不同 TDZ 濃度對木瓜體胚發生之影響 A. CK；B. 0.1 mg/l；C. 0.5 mg/l；D. 1 mg/l