

## 五、生物技術之開發與應用

### 一 番木瓜兩性株苗期分子鑑定技術

陳哲仁、張惠如、李美娟、鍾文全

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 俗名木瓜，根據農業統計資料顯示，國內栽培面積約在 2,600 公頃左右，以臺南及屏東為主要產區，番木瓜依據其開花特性可分為雄株 (staminate)、雌株 (pistillate)、兩性株 (hermaphrodite) 等三種性型，商業栽培多

採用兩性株，因其可自交受粉果型優良，最具經濟價值。在眾多性別鑑定標誌中，以木瓜 SVP-like 基因與目前因番木瓜性別相關性最為顯著，根據不同性別株該基因序列差異，新設計可同時增幅 X 及 Y(Yh) 染色體標誌作為雌株鑑定，並結合無有機溶劑單一核酸萃取試劑，整合為苗期簡易 DNA 性別鑑定技術，已公告予國內業者非專屬技術授權。

#### 單一溶劑簡易核酸萃取



#### PCR增幅及電泳

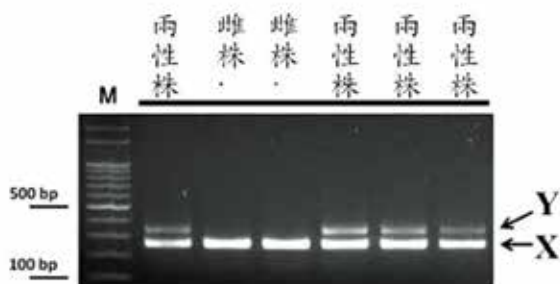


圖 5-1、本場開發改良之木瓜苗期簡易 DNA 性別鑑定技術流程，結合安全無毒簡易核酸萃取技術，可同時增幅 X 及 Y 染色體，能降低現有標誌偽陰性問題並提升檢測精確性。

## 二 基因改造馬鈴薯 AV436-G7 定性檢測技術開發

陳哲仁、張惠如、周明燕、鍾文全

根據 ISAAA 組織統計全球已登記開發 42 項基因改造馬鈴薯品種 (系)，基因改造品種 (系) 數量僅次於玉米 (141) 及棉花 (56)，且國內目前尚未核可任何基因改造馬鈴薯作為食品或飼料用途，為了協

助管理國內農產品品質，已陸續蒐集 4 件基因改造馬鈴薯認證等級標準樣品及相應檢測技術，本年度繼續針對未有公告或建議檢測方法之基因改造馬鈴薯 AV43-6-G7 品系，參考原始構築文獻資料，進行外源序列分析，根據定序結果新設計 4 條檢測引子，經過測試後選出 P3F/P6R 引子組可作為定性檢測用途，建立我國自主檢測能力。

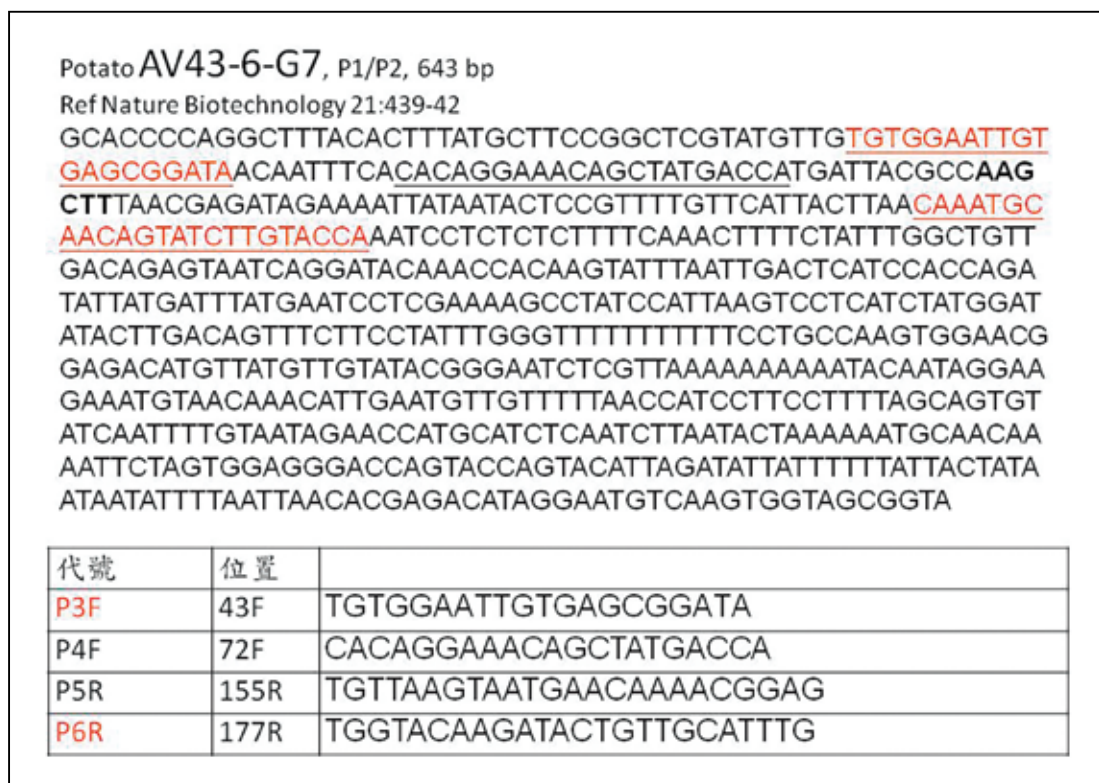


圖 5-2、基因改造馬鈴薯 AV43-6-G7 部分外源序列分析，底線標示引子位置，紅色字體表示選出定性檢測引子位置及序列。

### 三 番茄抗黃萎病 (*Ve-1*) 及抗晚疫病 (*Ph-2*、*Ph-3*) SNP 分子標誌建立與優化 PCR 條件

周明燕、孫永偉

分子標誌技術提供抗病基因早期篩選有利工具，利用分子標誌輔助育種技術，可加速抗病番茄育種材料的大量篩選，縮短育種時程，對於提升產業助益相當大，隨著產業抗病育種材料檢測需求量大增，需調整分子標誌引子以因應高通量 qPCR 需求。本研究進行番茄黃萎病抗病基因 (*Ve-1*) 及番茄抗晚疫病基因 (*Ph-2*、*Ph-3*) Real Time PCR 之 SNP 螢光分子標誌設計開發。SNP *Ve-1* 螢光分子標誌可將番茄黃萎病抗感病材料依基因 (RR)、感病型基因 (SS) 及共顯性型基因 (RS) 區

分成三群，與 SCAR *Ve1*-RS#15 引子將感病材料增幅出 1526bp 條帶、抗病材料增幅出 790bp 條帶之結果相符合。SNP *Ph-2* 螢光分子標誌可將番茄晚疫病抗感病材料依基因 (RR)、感病型基因 (SS) 及共顯性型基因 (RS) 區分成三群，與 SCAR *Ph-2*-TG422 引子將感病材料增幅出 570bp 條帶、抗病材料增幅出 400bp 條帶之結果相符合。SNP *Ph-3* 螢光分子標誌可將番茄晚疫病抗感病材料依基因 (RR)、感病型基因 (SS) 及共顯性型基因 (RS) 區分成三群，與 SCAR *Ph-3* M67 引子將感病材料增幅出 250bp 條帶、抗病材料增幅出 350bp 條帶之結果相符合。Real Time PCR 條件 DNA 使用濃度 SNP *Ve-1* 螢光分子標誌以 5ng 濃度、SNP *Ph-2* 及 SNP *Ph-3* 以 10ng 濃度 PCR 結果最理想。

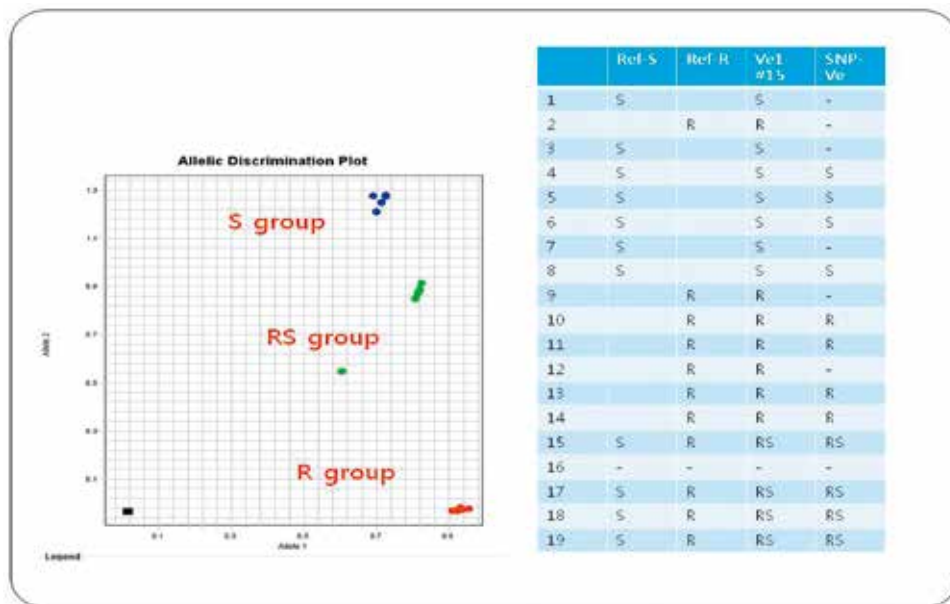


圖 5-3、Real-Time PCR SNP-*Ve1* 引子及探針可以將番茄黃萎病抗感病材料基因型 (R/S/RS) 分群，檢測結果與文獻引子及 SCAR *Ve1*-RS#15 引子結果相符。

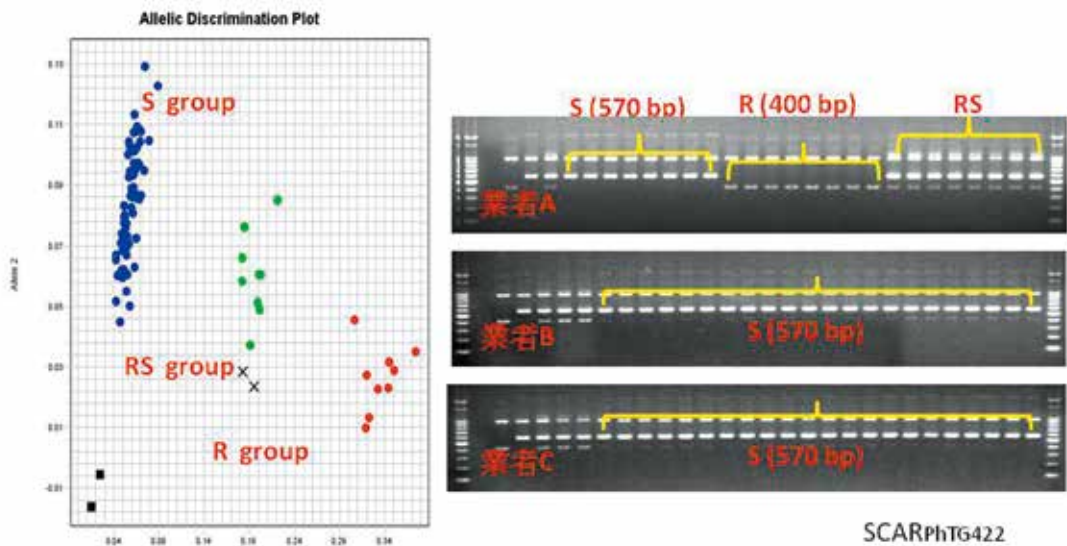


圖 5-4、以 SNP-*Ph-2* 引子及探針測試不同業者材料來源 (業者 A、B、C) 晚疫病抗感病基因型，Real-Time PCR SNP-*Ph-2* 引子可以將番茄晚疫病抗病基因 *Ph-2* 抗感病材料依基因型 R/S/RS 分群。

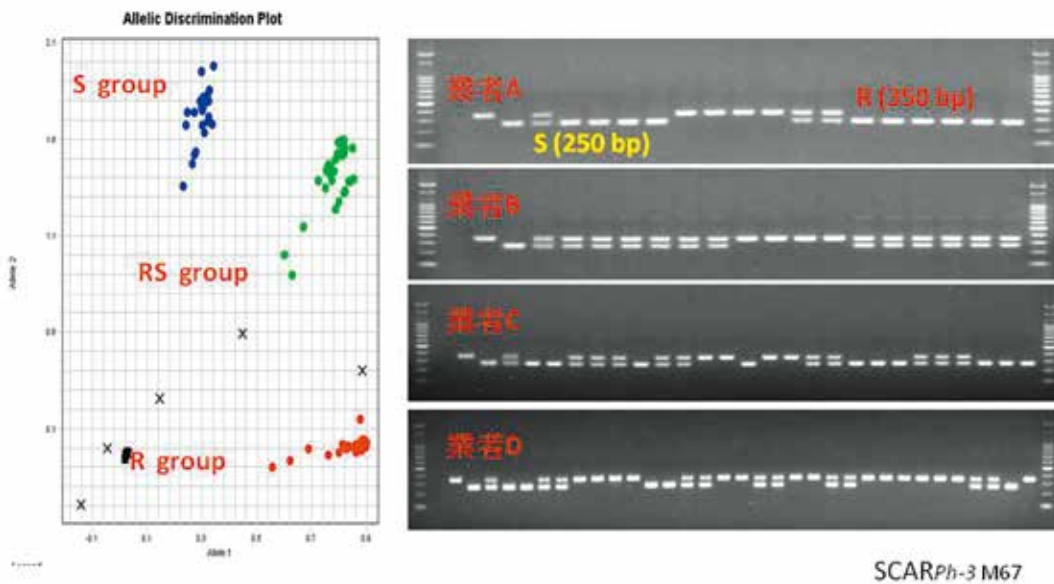


圖 5-5、以 SNP-*Ph-3* 引子及探針測試不同業者材料來源 (業者 A、B、C、D) 晚疫病抗感病基因型，Real-Time PCR SNP-*Ph-3* 引子可以將番茄晚疫病抗病基因 *Ph-3* 抗感病材料依基因型 R/S/RS 分群。

#### 四 花椰菜自交不親和性及雄不稔性基因之分子標誌建立

張惠如、施任青、施辰東、鍾文全

花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L) 起源於地中海至北海沿岸，為十字花科芸薹屬甘藍菜類植物，為異花授粉作物，其形質之整齊性很難一致。目前商業品種的育種工作上，常先育成親本自交不親和系，生產天然異交的一代雜交種子，不僅性狀整齊性一致，增加了雜種優勢同時也降低採種成本。另外，利用細胞質雄不稔 (cytoplasmic male sterility, CMS) 系進行花椰菜的雜交育種，也可免去人工去雄並提高雜交 F1 種子純度。

本試驗利用分子標誌技術開發可判別花椰菜育種材料的自交不親和基因型類型或雄不稔性性狀，可協助育種者進行花椰菜雜交育種選育工作，減少新品種育成所花費之時間與人力。試驗結果已建立有 2 組 SCAR 引子具有自交不親和性基因型鑑別能力，可將 25 個育種親本材料分為兩群 (圖 5-6)。進一步將這些專一性條帶進行序列分析後設計 SNP 引子組，經過 SNP-PCR 分析，可將此 25 個試驗材料分為 12 種自交不親和性 S 基因型。另外，也已建立一組 SCAR 分子標誌可以識別來自 gura 型 CMS 蘿蔔的 orf138 基因。

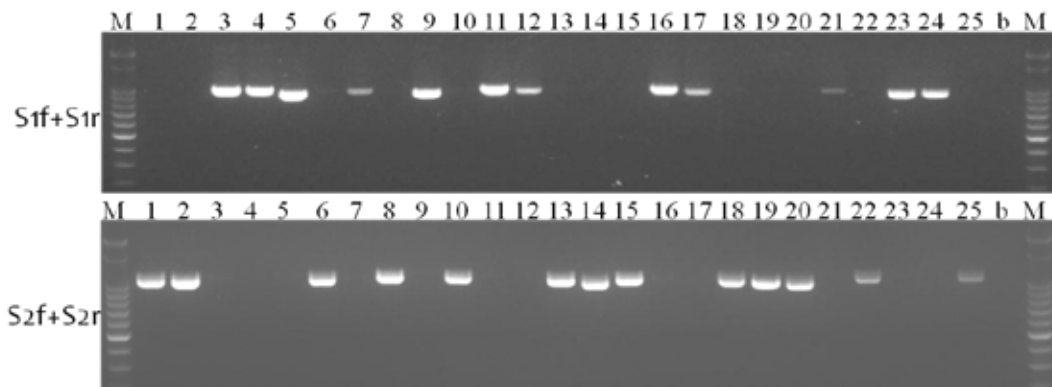


圖 5-6、可鑑別花椰菜自交不親和基因型之專一性 SCAR 引子組 M 為 100bp ladder；1-25: 花椰菜不同品系試驗材料；b:DEPC-Water(空白對照組)

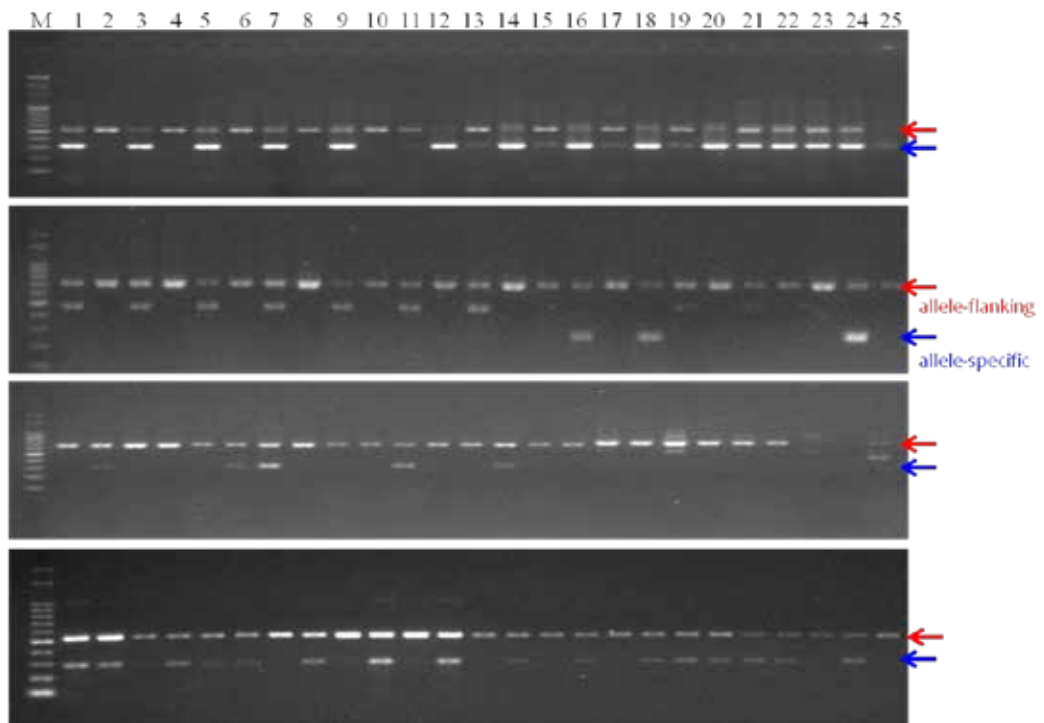
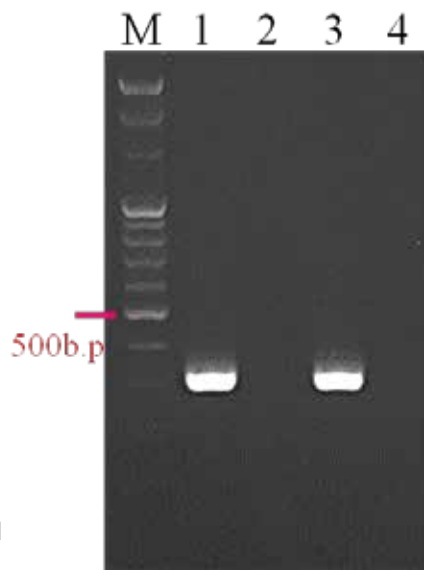


圖 5-7、可鑑別花椰菜自交不親和基因型之專一性 SNP 引子組



►圖 5-8、可鑑別來自 *Ogura* 型雄不穩性基因之專一性 SCAR 引子組

## 五 建立重要蘭花品種分子標誌與蝴蝶蘭 DNA 資料庫

張惠如、安志豪、劉明宗、鍾文全

為確保我國蘭花產業競爭力，除維持育種能量、加強栽培管理、改善儲運技術及推動國際行銷外，維護品種權及保障育種者權利亦是非常重要的工作。目前品種檢定方法仍以形態觀察或測量外表性狀為標準檢定方法，而利用分子標誌技術可直接鑑定植物基因型的遺傳歧異度 (genetic diversity) 特性，可輔助性狀檢定方法，提供分子層次上的鑑定依據，還可達到協助侵權鑑定分析的目的。

本試驗利用先前已建立之蝴蝶蘭品種 SSR 分子標誌標準鑑定流程，新增鑑定 100 個已於臺灣申請並取得植物品種權之蝴蝶蘭商業品種，將其 SSR-PCR 所得螢光分析原始數據以 BioNumerics 軟體進行基因型分析，並儲存建立 DNA 資料庫。結果發現所使用之 10 組 SSR 分子標誌可

以完全識別此 100 個蝴蝶蘭商業品種，分析 SSR 引子的鑑別力，其代表多型性程度的 PIC (polymorphism information content, PIC) 值介於 0.78 (PHS03) 與 0.883 (PHS04) 之間。並進一步將品種權性狀檢定相關資料，附加至蝴蝶蘭 DNA 資料庫中與各品種權品種連結。另外，在 12 個文心蘭黃色切花品種的品種識別分子標誌開發上，本年度使用 SSR 及 SNP 引子組進行識別性分子標誌篩選，經 SSR-PCR 後電泳分析結果發現，其中有 2 組 SSR 分子標誌對於部分文心蘭具有多型性，其他組分子標誌無多型性條帶產生，並無法識別所有的試驗材料。具有多形性的 2 組 SSR 分子標誌，也僅能鑑別文心蘭品種 -- 百萬金幣 (M.D) 與檸檬甜心 (1631) (圖 5-9)。同時也進行 SNP 分子標誌篩選開發，有三組 SNP 分子標誌在 12 個文心蘭黃色切花品種試驗材料中具有多型性 (圖 5-10)，可將 12 種品種分為 6 型。

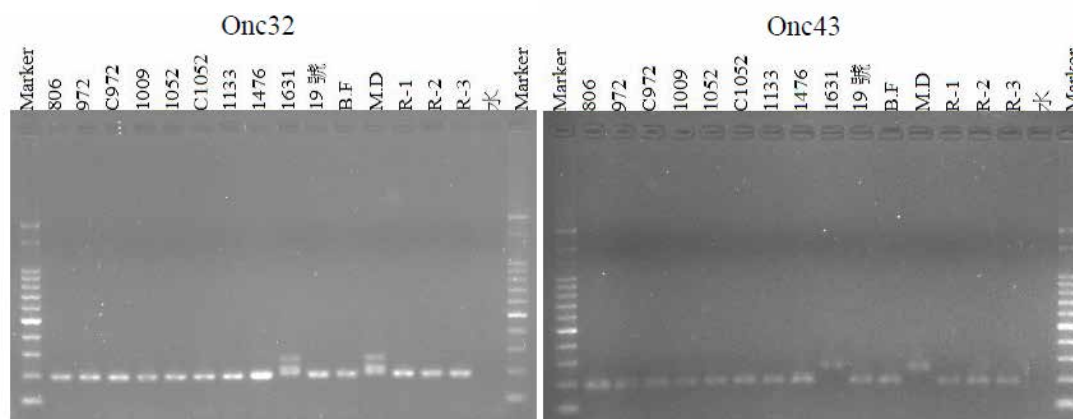


圖 5-9、電泳分析結果，利用 SSR 分子標誌篩選 12 個黃色切花系文心蘭品種之差異性條帶。

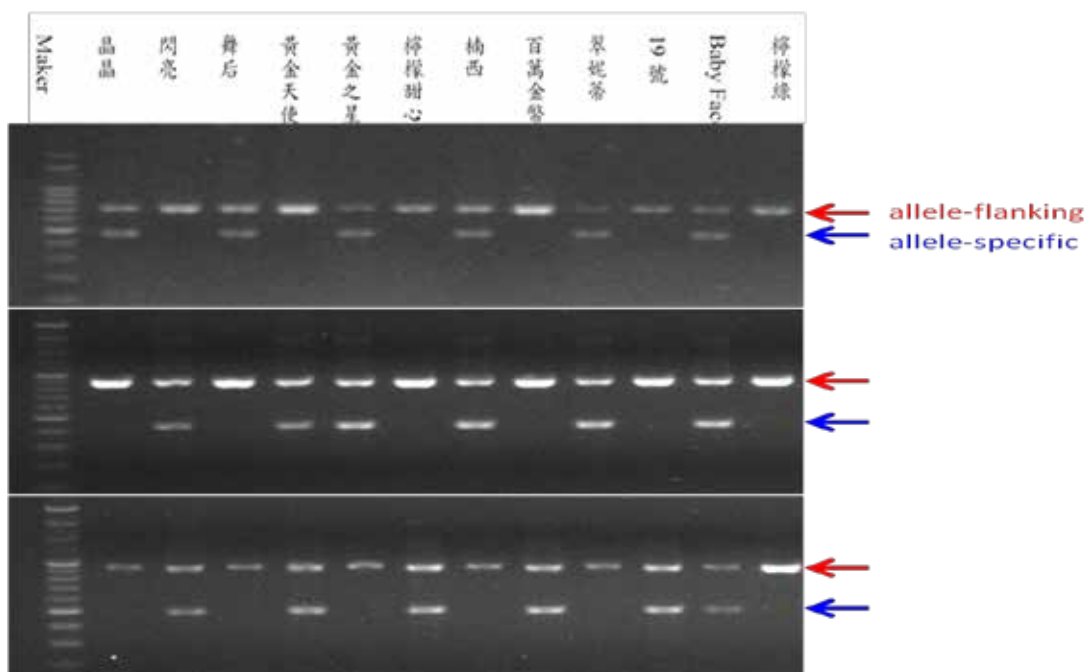


圖 5-10、電泳分析結果，利用 SNP 分子標誌篩選 12 個黃色切花系文心蘭品種之差異性條帶。

## 六 品種純度分子標誌開發建立與檢定

周佳霖、陳哲仁、何智容、詹詩瑜、  
廖伯基、林上湖

我國種子(苗)產業佈局全球，西瓜與番茄種子是我國種子產業主力商品之一，其商業品種多為雜交種子，利用雜種優勢提高果品產量與品質是現代園藝作物商業品種的育種趨勢，為確保採種親本與雜交一代( $F_1$ )商業種子的品質純度，避免採種親本交叉汙染並確認商業種子為雜交種子，傳統上以田間外表型檢查親本與商業種子純度，每次檢查需費時一年，然而

藉由分子技術檢測西瓜遺傳純度，於西瓜幼苗期甚至種子即可進行，且具有不受田間環境因素干擾作物遺傳性狀之優勢，亦不需大面積栽種觀察外表性狀是否一致，於實驗室中即可進行，可大幅縮短檢測時間，提昇檢測效率與品質。

本年度本場接續前期研究成果，以先前開發的 16 組西瓜 SNP 標誌為基礎，挑出最佳的 3 個 SNP，建立西瓜 TaqMan 純度檢測系統，結果挑到的 3 個 SNP 至少可檢測 20 個西瓜雜交品種，並全數成功建立 TaqMan 檢測系統分子標誌。以 TagMan 系統分析 SNP 基因型，準確度較對偶基因專一性 (Allele Specific) 標誌高，

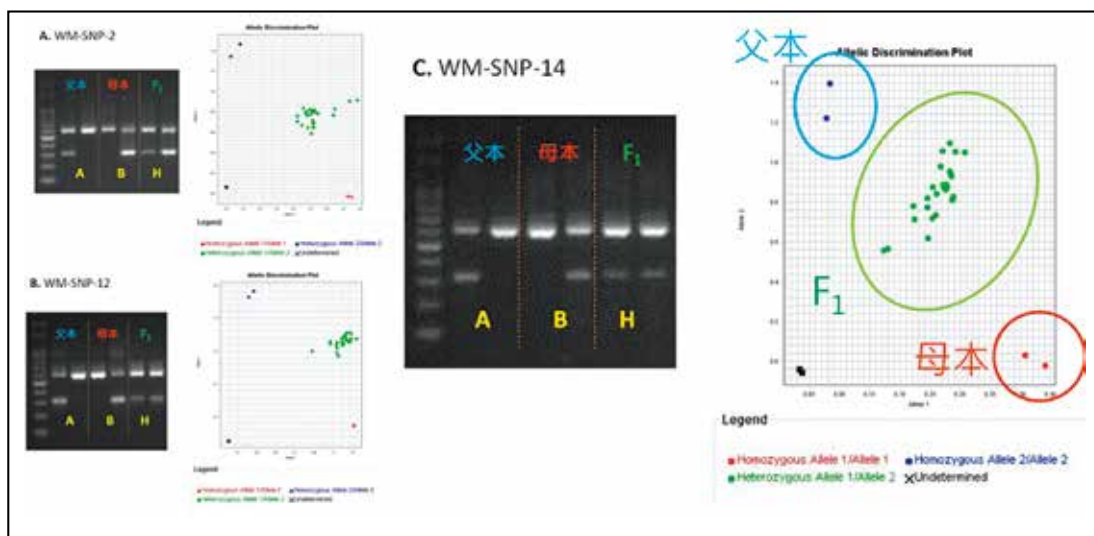


圖 5-11、原水平電泳對偶基因座專一性 (Allele Specific) 系統皆成功轉換為 TaqMan 系統。水平電泳對偶基因座專一性系統檢測純度時，需以 2 個 PCR 反應才能確定其 SNP 基因型，以 TaqMan 系統可於 1 反應偵測 SNP 基因型，且系統可以動分析判讀未知樣品之分群係父、母本或雜交一代 ( $F_1$ )。

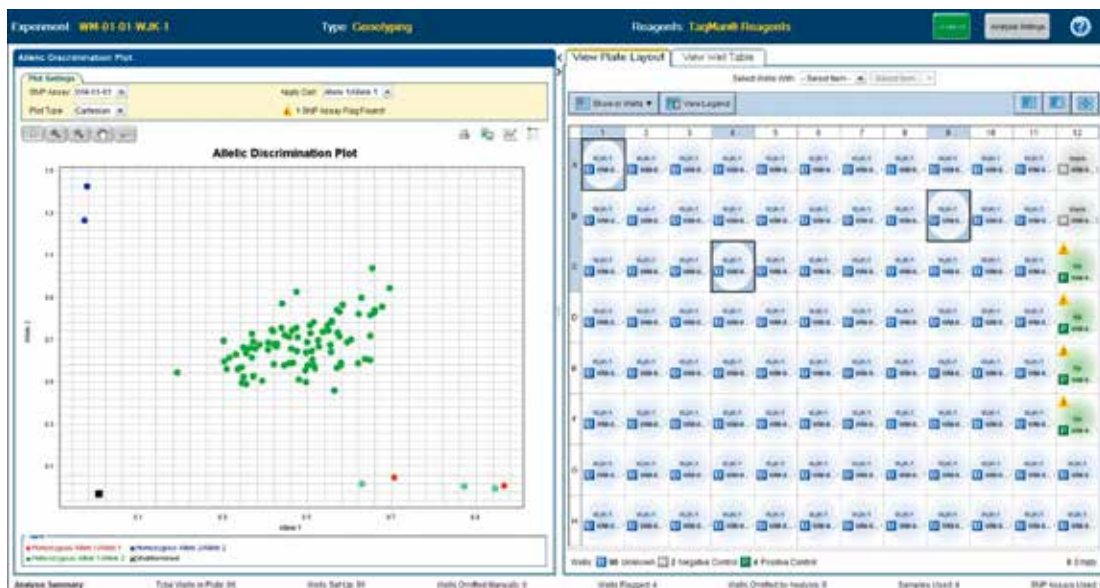


圖 5-12、單次萃取大量樣品，結果可穩定分成群。圖中藍點為父本，紅點為母本，綠點和天藍色點為  $F_1$ ，其中綠點為雜交成功的  $F_1$ ，天藍色點為母本自交的不純  $F_1$ 。

且效率較高，不需跑膠即可讀值，有效節省檢測時間，提高檢測精準度與效率。

另本場以自行建立之 ISSR 分子標誌檢測系統，檢測本場自行採種之番茄亞蔬

22 號品種純度，本年度共檢測 1 批種子，結果番茄種子檢測樣品純度符合規定之 98% 以上 (表 5-1)，有效確保本場生產種子的品質。

表 5-1、105 年度番茄雜交種子純度檢測內容與結果

| NO. | 批號             | 報告日期     | 品種      | 檢定株數 | 純度估算結果  | 申請人   |
|-----|----------------|----------|---------|------|---------|-------|
| 1   | 104-3KK413-001 | 105.6.16 | 亞蔬 22 號 | 160  | 98.125% | 種苗經營課 |

## 七 加強基因轉殖植物安全管理 - 基因轉殖植物之檢測

周明燕、陳哲仁、張惠如、鍾文全

根據國際農業生物技術應用服務組織 (International Service for the Acquisition of Agri-biothech Applications, ISAAA) 統計，2015 年全球共有 28 個國家、共計 1800 萬農民栽種基因改造作物，栽培面積總計 1.797 億公頃，較 1996 年的 170 萬公頃，成長了 100 倍。栽培面積全球分布情形：美洲 87%、亞、澳 11%，中東、非、歐僅佔 2%；前五名生產國家分別是美國 7,090 萬公頃，巴西 4,420 萬公頃，阿根廷 2,450 萬公頃，印度 1,160 萬公頃，加拿大 1,100 萬公頃，其中巴西從 3,670 萬公頃成長上升至 4,220 萬公頃，成長 15%，為全球栽種 GMO 作物年度成長增幅最大的國家。商業使用基因改造作物種類仍集中在大豆，玉米，棉花和油菜，ISAAA 統計資料顯示主要基因改造作物及所佔種植面積比依序為基改大豆 82%、棉花 68%、玉米 30%、油菜 25%。美國是主要的 GMO

作物生產國，主要栽培基改作物分別為玉米，佔玉米總栽培面積 88%、大豆 (93%)、棉花 (94%)、木瓜 (75%) 及油菜 (90%)。基因轉殖生物及其產品對生態環境與人體健康所可能產生的衝擊，廣泛的受到世界各國關切並重視，並各自訂有基因轉殖生物與其產製品之相關管理法規及相關農產品建構檢測及監測平台。

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，現階段採行境內管理措施，針對較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，由相關試驗研究單位研發取樣及檢測技術，實際檢測種子或種苗是否為基因轉殖作物，並採取適當管理措施，而建立一套標準化且具公信力之檢測技術與流程，進而取得符合國際標準的檢測實驗室認證，亦是國內所有從事相關工作的實驗室需要努力的方向。我國對於

農業基因科技秉承程積極研發、有效管理之政策。基因改造作物隨著生物技術不斷進化，產品樣態也推陳出新，而隨著國際貿易發達，物流通暢，貨物流動越來越容易且頻繁，對於基因改造作物的安全管理更需積極落實，以兼顧國家整體利益、生態環境維護及農產品國際貿易發展，並確保國人消費安全。

本計畫將針對可能種植之國內外基因轉殖作物，透過檢測能力建構模式，結合各檢測單位建立聯合檢測監測機制，配合管理單位執行基因轉殖作物管理及檢測，透過種苗生產與販售業者抽樣調查，逐年建立動態資料，落實基因轉殖作物之檢測監測制度。

105 年度維持各小組成員之檢測能力，共進行 2 次基因轉殖木瓜檢測能力試驗、基因轉殖棉花、大豆與玉米各 1 次能

力試驗。完成棉花種子核酸萃取技術研發及基因轉殖木瓜種子檢測操作流程手冊。配合農糧署執行基因轉殖栽培管控，本年度共抽檢木瓜種苗生產業者 35 家皆無轉殖標的基因檢出。木瓜田間栽培區不定期抽檢 15 區，其中南投 1 區，彰化 4 區檢出轉基因木瓜片段，已送請主管機關進行後續處理。木瓜邊境管制業務共完成 81 件抽檢檢測，其中鮮果 23 件、種子 57 件、種苗 1 批，皆無檢出目標基因片段。完成木瓜優良種苗商申請審核查驗一件。

表 5-2、基改木瓜邊境管制檢驗一覽表

|      | 果實 | 種子 | 種苗 | 總計 |
|------|----|----|----|----|
| 桃園場  | 4  | 12 |    | 16 |
| 種苗場  |    | 5  |    | 5  |
| 鳳山分所 | 19 | 40 | 1  | 60 |
| 總計   | 23 | 57 | 1  | 81 |

表 5-3、105 年度基因改造木瓜檢監測採樣統計表

|     | 栽培園 | 種苗業者 | 總計 |
|-----|-----|------|----|
| 桃園縣 |     | 2    | 2  |
| 新竹市 |     | 1    | 1  |
| 新竹縣 |     | 2    | 2  |
| 南投縣 | 2   | 3    | 5  |
| 臺中市 |     | 5    | 5  |
| 彰化縣 | 13  | 6    | 19 |
| 雲林縣 |     | 3    | 3  |
| 嘉義市 |     | 1    | 1  |
| 嘉義縣 |     | 5    | 5  |
| 臺南市 |     | 1    | 1  |
| 高雄市 |     | 2    | 2  |
| 屏東縣 |     | 4    | 4  |
| 總計  | 15  | 35   | 50 |