

五、生物技術之開發與應用

作物特定性狀分子標誌之建立與應用 - 番茄抗頸腐根腐病分子標誌建立與應用

周明燕、陳哲仁、張惠如、鍾文全

由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) 所引起的番茄頸腐根腐病 (Tomato Crown rot) 是溫室栽培番茄最易發生的病害，植株感染後，下位葉開始出現黃化，植株在每日最高溫期間萎凋，晚上回復，此現象可重複出現數日，最後枯萎死亡；病株根尖完全腐爛，縱剖莖基部，會發現莖基微管束及根系褐變腐爛 (圖 5-1)，導致植株枯萎死亡或降低果實品質。番茄頸腐根腐病最早發現於日本，之後在很多國家發生並漸漸形成威脅，番茄頸腐根腐病好發於冷涼地區 (18°C 左右) 是大陸型氣候地區常見的重要病害，臺

灣目前尚未發現該病害為害，不過因應我國番茄種子國際化需求，特別是大陸華北地區，如山東壽光的設施生產複作指數高，發病率達 80% 以上，致死率達 30%，嚴重影響產量，已成為山東地區重要且普遍性番茄病害，抗頸腐根腐病已經是番茄品種必要特性，我國番茄育種導入抗病品種勢在必行。目前文獻報告所公開之 CAPS 標誌需要經過酶切反應，SCAR 標誌則因片段差異太小不易判讀，本研究進行引子改善，重新設計成 SCAR-TSS-Fr1#20、SCAR-TSS-Fr1#22 標誌。透過不同來源抗感病材料測試，抗病材料增幅出 750 bp 條帶、感病材料增幅出 200 bp 條帶 (圖 5-2)，測試結果與 SCARFr1 之判讀結果相關係數 94%，條帶清晰穩定，容易判讀，適合業界運用。



<http://www.growgardentomatoes.com/image-files/fusarium-root-rot-1.jpg>

<http://erec.ifas.ufl.edu/tomato-scouting-guide/images/diseases/fusarium-crown-rot104.JPG>

圖 5-1、番茄頸腐根腐病 (Tomato Crown Rot) 由真菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) 所引起，藉土壤傳播。最適宜的菌體生長溫度為 18°C。植株感染後，莖基部及根系褐化腐爛，導致植株枯萎死亡或降低果實品質。

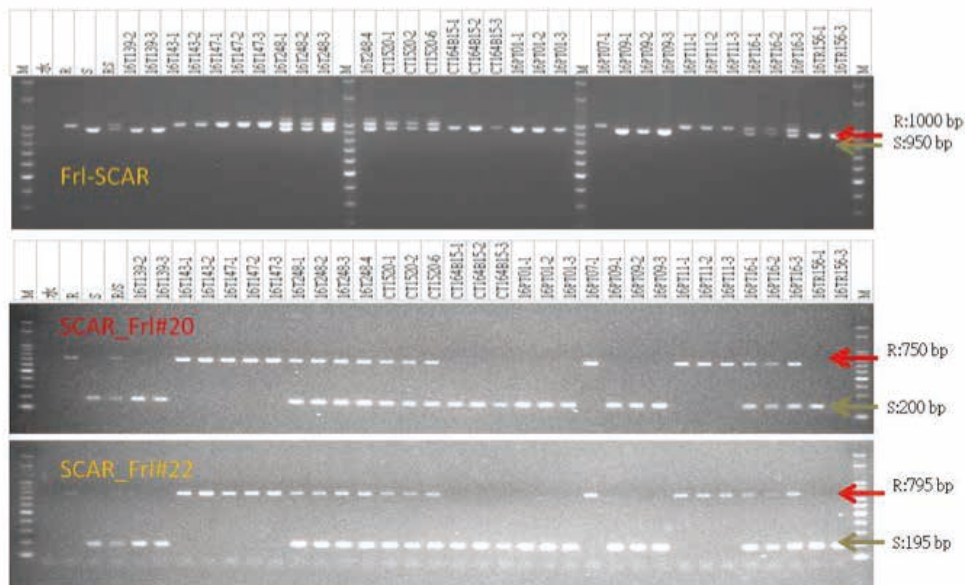


圖 5-2、重新設計之番茄頸腐根腐病抗病基因 Frl SCAR 標誌 #20、#22，改善原有標誌抗感病條帶太靠近，判讀不易等缺點，與原有標誌相關係數達 0.94，可取代原有標誌提供產業運用。

二 番茄抗青枯病分子標誌建立與應用

周明燕、周佳霖、陳哲仁、邱燕欣、鍾文全

青枯病 (Bacterial wilt) 係由 *Ralstonia solanacearum* (Smith) 所引起的一種細菌性病害，病原菌可經由植物體自然開口及任何部位出現之傷口侵入，並快速蔓延維管束內，堵塞水分輸送，造成植株萎凋枯死。青枯病菌可以細菌狀態存在土壤數年，於高溫、多溼季節最適宜發病。將罹病株莖部橫切，可見維管束變褐色，以手擠壓，有乳白色黏性的菌液溢出是本病最明顯的病徵 (圖 5-3)。青枯病是我國重要番茄病害外，也嚴重危害主要目標市場如大陸華南、東南亞等地區，抗病品種需求殷切。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。

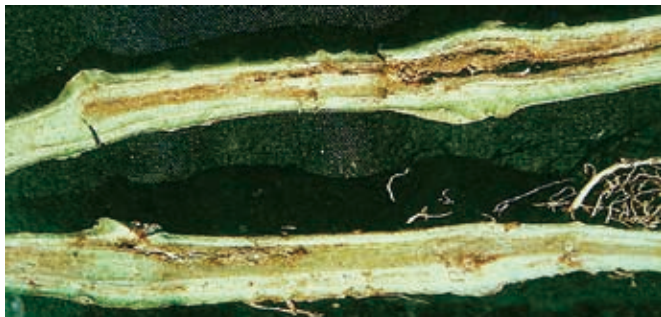
目前業界所使用之青枯病文獻公開引子 SLM 12-2、SLM 12-10 及 SLM 6-94 引子組皆屬於 SSR 標誌，抗感病條帶僅 50 bp 差異，膠片電泳結果很容易誤判。本研究重新設計篩選出之 SLM12-2#49 及 SLM 12-10#30 兩組 SCAR 引子組對抗感病材料具有多型性，SLM 12-2#49 可將抗 / 感病材料分別增幅出 600 bp 及 700 bp 條帶；SLM 12-10#30 可將抗 / 感病材料分別增幅出 520 bp 及 350 bp 條帶，條帶清晰穩定，對不同來源材料亦具增幅穩定性 (圖 5-4)。透過 354 件樣品測試結果，分析 SCAR 標誌與 SSR 標誌之相關性，SLM12-2#49 與 SLM12-2 之相關係數 $R=0.9305$ ；SLM 12-10#30 與 SLM 12-10 之相關係數 $R=0.9680$ ，顯示本研究所開發之 SCAR 可以取代原有之 SSR 標誌，提供產業運用。



<http://extension.msstate.edu/sites/default/files/topic-files/greenhouse-tomatoes/broken-stem-1.jpg>



<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRGqF0eHVuf0u2kidudCJefkINr9O7CiUT48ZQ9wg9jR4af4oht>



<http://4.bp.blogspot.com/-RwyurQUNYAg/VOzPBaorXGI/AAAAAAAW-U/vLjkoRdoQUM/s1600/Tomato%2BStem%2BBacterial%2BWilt.jpg>

圖 5-3、番茄青枯病由細菌 *Ralstonia solanacearum* (Smith) 引起，屬土壤傳播性病害，罹病株雖保持綠色，但快速萎凋而枯死，莖部橫切可觀察到維管束變褐色，以手壓之，有乳白色粘性的細菌菌泥溢出。

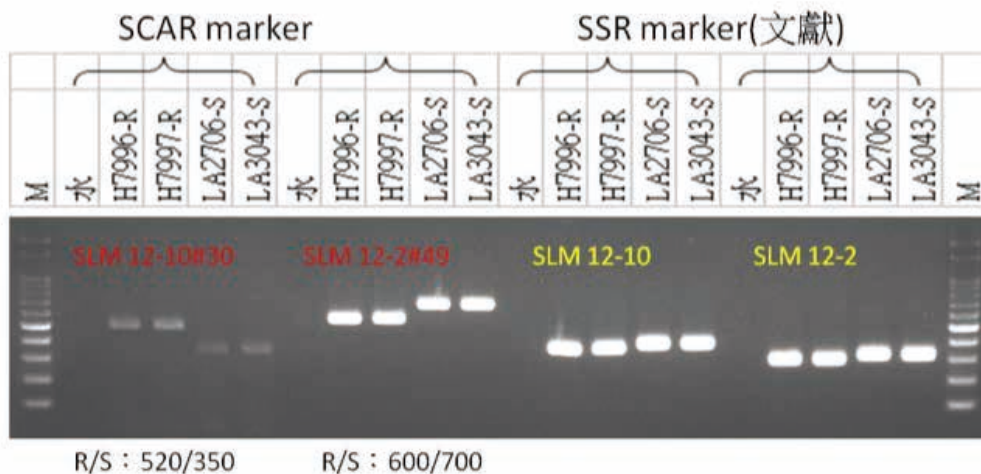


圖 5-4、新設計之 SCAR 標誌 Scar#30、Scar#49 改善 SSR 標誌不易判讀缺點，相關性 0.93 以上，可取代原有標誌，提供產業運用。

建立番茄抗病 SNP 分子標誌檢測技術平臺

張惠如、周明燕、陳學文、羅英妃

劉芳怡、鍾文全

本場過去已陸續開發多種番茄抗病基因之 SCAR 分子標誌，為了進一步利用於大量篩選檢測平台，配合業者實務檢測的需求擬進行改進，其中單一核苷酸多型性（Single Nucleotide Polymorphic, SNP）標誌在同一物種內較具通用性及多型性，也有很好的穩定性及再現性，並具有多種偵測方式。因此，本計畫利用番茄基因組資料分別進

行抗病基因 SNP 分子標誌篩選開發，針對番茄抗斑點萎凋病毒基因（*Sw-5*）、抗嵌紋病毒基因（*Tm-1*、*Tm-22*）、抗晚疫病基因（*Ph-2*、*Ph-3*）序列資料，進行 SNP 位點探勘並設計引子組，以已知抗 / 感病材料篩選具識別性引子，並將此片段進一步設計可應用於即時聚合酶連鎖反應儀的 TagMan 系統 SNP 引子組，經過 real-time PCR 分析後，分析結果顯示針對 *Sw-5*、*Tm-1*、*Tm-22*、*Ph-2*、*Ph-3* 基因各有一組 SNP 分子標誌，可將抗感病材料完全分群（圖 5-5）。

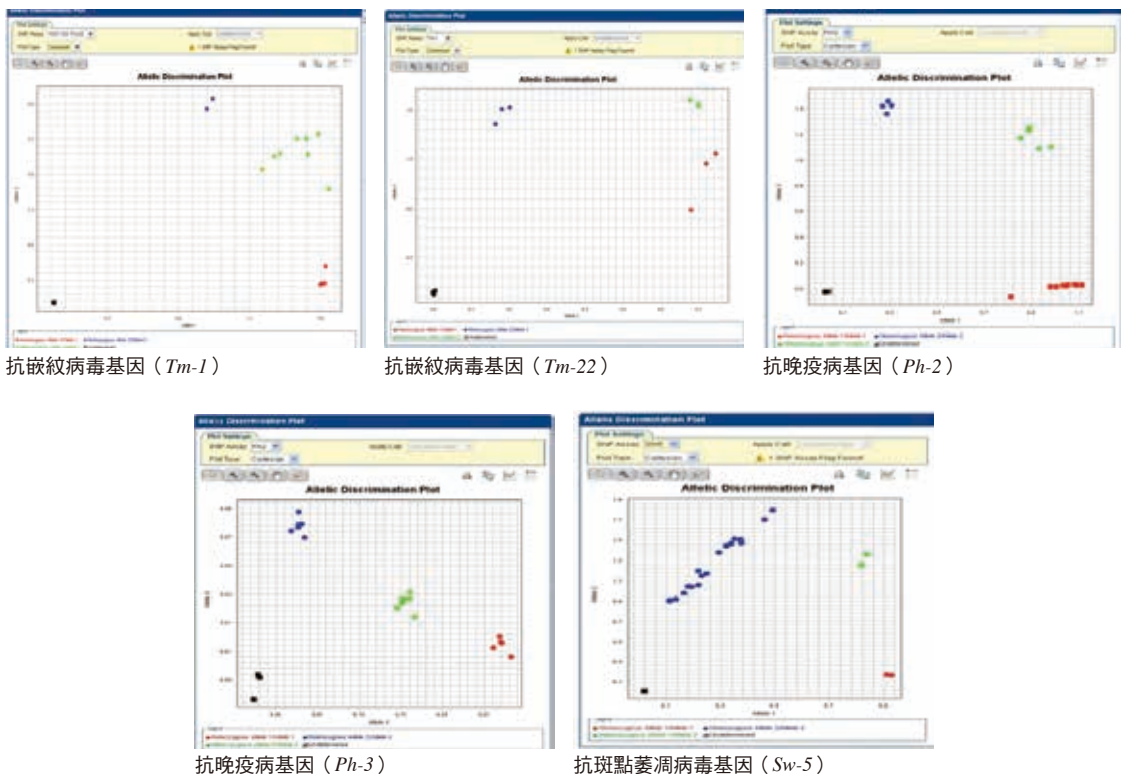


圖 5-5、利用 Real-time PCR 分析番茄抗病基因 SNP 分子標誌識別性

四 雜交種子純度分子標誌檢測技術開發

龔美玲、周佳霖、張惠如、陳哲仁

林延諭、張勝智、鍾文全

利用雜種優勢提高作物產量與品質是現代園藝作物商業品種的育種趨勢，我國種子（苗）產業主力之茄科、葫蘆科等種苗商品也多為雜交一代（F1）品種。在雜交種子的生產中，可能因人工去雄未盡完全或雄不稔基因的不穩定性，導致母本自交種子混入使採種純度下降，因此為確保 F1 商業種子的品質純度，傳統上常以生育特性檢測（grow out test, GOT）作為純度檢定模式，每次檢查極為耗時費工，且需要一定的栽

培空間。然而藉由分子技術檢測種子的遺傳純度，在幼苗期甚至用種子即可進行，具有不受田間環境干擾作物遺傳性狀之優勢，可大幅減少檢測時間及人力。

隨著近年來次世代定序技術的進步，越來越多的作物基因體解序資料可從公開資料庫上取得，包含大量的單一核苷酸多型性（Single Nucleotide Polymorphic, SNP）探勘資料，SNP 散布於植物基因體中，且具有高度的多型性潛力，亦能轉成自動化的高通量分析系統，可迎合產業界於大量樣品的檢測需求。本年度本場即利用分析公開之西瓜 SNP 基因型資訊，設計 857 組對偶基因專一性標誌（Allele-specific marker,

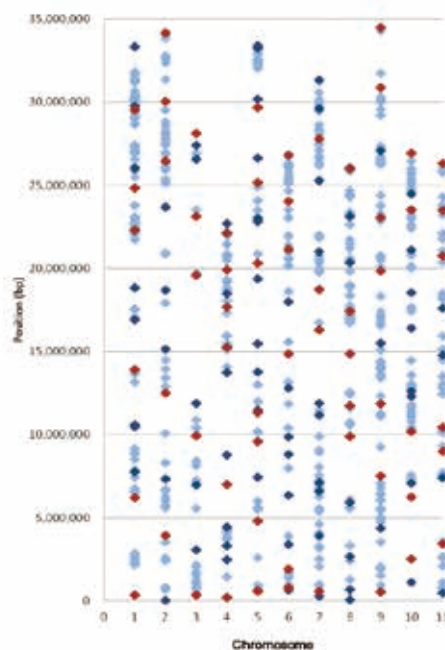


圖 5-6、本場所設計之 857 組 SNP（AS）標誌在西瓜基因體中的分佈情形。深藍色及紅色點為實際合成測試的 140 組標誌，紅色點為本次研究建立之 63 組多型性 SNP 標誌。

AS-marker)，並實際合成測試其中 140 組 SNP（AS）標誌，總共建立 63 組可作為參試品種的純度檢定標誌（圖 5-6），預期這些標誌可廣泛應用在其他西瓜品種的純度檢測上。葫蘆科除了西瓜，本場也完成開發苦瓠的 2 組關鍵 SNP 標誌，可檢測 13 個苦瓠雜交品種純度。另本場身兼番茄採種業務，為確保所生產的番茄採種純度，本年度開發番茄亞蔬 21 號及亞蔬 22 號的 TaqMan 純度檢測系統（圖 5-7），搭配簡易核酸萃取方法，可有效提昇雜交種子生產品質控管的檢測效率與精確度。

五 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，現階段採行邊境管制及境內源頭管理措施，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，在進出邊境時採樣偵測，同時針對高風險作物對國內種苗業者進行源頭抽檢，以確保我國作物生產不受基改作物污染。

本計畫將針對可能種植之國內外基

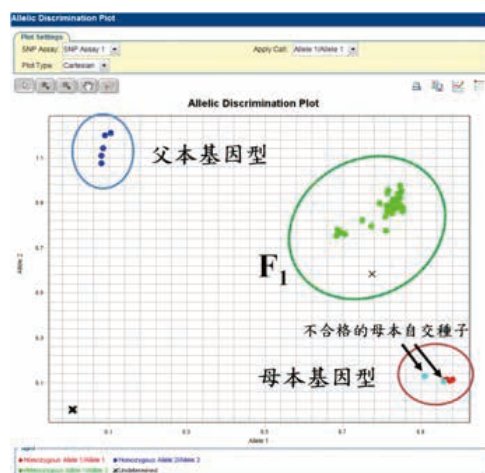


圖 5-7、利用 TaqMan 螢光探針即時聚合酶連鎖反應（Real-time PCR）系統偵測番茄 SNP 基因型，單次可自動分析 96 個樣品，箭頭指向之淡藍色點代表不合格的母本自交種子。

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監測，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。配合農糧署執行基因轉殖作物安全監控，106 年度共抽檢木瓜種苗生產業者 23 家皆無轉殖標的基因檢出；木瓜邊境管制業務共完成 89 件抽檢檢測，其中木瓜鮮果 20 件、木瓜種子 63 件、玉米種子 3 件、木瓜種苗 3 批，皆無檢出目標基因片段。各小組成員檢測能力維持測試，針對木瓜葉片、木瓜種子、棉花、大豆與玉米盲樣樣品各舉辦一次能力試驗，其中木瓜種子及大豆皆 100% 符合，木瓜葉片、棉花與玉米有部分品項檢測結果偽陽性。

六 基因轉殖作物高效能監測體系之建立 - 進口種子抽檢追蹤模式

陳哲仁、張惠如、周明燕、鍾文全

本年度收到農糧署轉來紫色基改康乃馨 Moonaqua 及 Moonlite 兩品種切花樣品（圖 5-8），據查為日本 Suntory 公司所屬出品 Florigene 出品系列產品，共計有 11 個販售品種，外觀上 Moonlite 顏色較 Moonaqua 更為飽和，由於已知自然界康乃馨未有紫色花色，因此，可直接由花色直接預判是否為基改作物，但對於尚未開花的植體組織則仍需仰賴基因型檢測。歐盟公告定性檢測方法，以 rB7-26/123-8-12-2-1R 引子檢測 Moonaqua 品種，以 LBinR / LB123-2-38-R 引子檢測 Moonlite 品種，經過測試後確認可以在品種間測得應有

的訊號，初步建立兩品種的定性檢測方法。此外，本年 5 月間 Science 期刊報導，4 月下旬芬蘭首先在市售矮牽牛花中確認發現未經許可之橘色基改矮牽牛花，稍後歐盟及美國也確認此一發現，後續日本農林水產省則公布有 14 個品種確認為未經許可基改品種，其中並包括國際知名 Takii 種子公司出品的數個 F1 品種（圖 5-9），我們根據美國農部調查報告以 CaMV35S 啟動子、Nos 啟動子以及 Nos-P-NptIIjunction 三處構築結構作為偵測標的建立檢測能力。



圖 5-8、紫色基改康乃馨 Moonaqua 及 Moonlite 品種切花乾燥樣品，根據歐盟公告定性檢測方法，初步建立兩品種的定性檢測方法。



圖 5-9、日本農林水產省公布召回 Takii 種子公司出品基改矮牽牛花朵及種子包裝外觀。

七 進口基因改造農糧產品產業應用 追溯與出口邊境管理措施研究

陳哲仁、周明燕、張惠如、鍾文全

有關基改農產品快速篩檢方法，市面已有販售基改作物蛋白質檢測試片（lateral flow immunochromatographic strip），可以快速簡便作為大宗穀物檢測，我們選用 Envirologix 出品的 Quickstrix 7 合一玉米檢測試片，可檢測 2 種抗殺草劑（RoundupReady 及 pat）與五種 Bt 殺蟲毒蛋白，操作僅需粉碎樣品加水混勻靜置，取上層水溶液進行檢測，5 分鐘內即有呈色反應（圖 5-10），但經過本場自行蒐集已知樣品實測，整體的檢出正確率在 68.6%，並不足以替代 DNA 檢測方法，僅可作為輔助檢測之用。

我國飼料所需之玉米及黃豆 95% 以上仰賴進口，且畜禽配合飼料約含

60% 玉米及 20% 黃豆粕，實務面尚無法以國產雜糧完全取代進口飼料使用。現行貨品輸入申報貨號已進行調整，根據食用與飼料用區別，並且項下細分基改或非基改細項。106 年度收到進口基改大豆 56 件及玉米 38 件與非基改大豆 35 件及玉米 2 件，共計 131 件。其中非基改飼料大豆以品項專一性（event-specific）方法逐一檢測是否含有特定品項，在 35 件輸入申報非基改飼料大豆中，有 10 件檢出含有基改成分，包括 7 件 MON89788、一件 GTS40-3-2、一件 CV-127 以及一件同時檢出 GTS40-3-2 及 CV-127 訊號，根據估算結果顯示各別的品項濃度為 0.01~0.39%，同時檢出 GTS40-3-2（0.39%）及 CV-127（0.09%）訊號者，合併計算濃度為 0.48%，全數低於我國 0.9% 強制標示門檻（表 5-1）。



圖 5-10、Envirologix 公司出品之 Quickstrix 7 合一玉米檢測試片用於進口飼料玉米抽檢樣品檢測

表 5-1、進口非基改飼料用大豆成份抽檢結果

樣品代號	Lectin gene	GTS 40-3-2	MON 89788	CV-127
I02	P	—	0.02%	—
I04	P	—	0.02%	—
I05	P	—	0.20%	—
I06	P	—	0.10%	—
I08	P	—	0.05%	—
I09	P	—	0.39%	—
II12	P	—	—	0.02%
607P6-8949	P	0.10%	—	—
607P6-9550	P	—	0.01%	—
607P6-9988	P	0.39%	—	0.09%

八 基因改造植物性飼料或飼料添加物查驗登記之檢驗

陳哲仁、張惠如、鍾文全

依飼料管理法相關條文申請飼料用途許可證明文件，屬基因改造植物性飼料或飼料添加物者（如玉米、大豆、棉花、油菜及苜蓿等）應依本會通知之申請期限內，繳交參考品及檢驗方法。本場自 105 年起受本會畜牧處委任執行參考樣品及檢驗方法等資料之收件及保存事宜。本（106）年度共收到孟山都等 5 家公司玉米、大豆、棉花、油菜以及苜蓿共 21 件基因改造參考樣品（表 5-2），累計已收到 291 件參考樣品（含非

基因改造對照樣品），全部樣品妥善保存於常溫濕度控制環境中。並且參照歐盟公告之基因改造作物檢測方法之基本要求，進行各項申請案業者自行提供之方法確認。本（106）年度完成玉米 19 件、大豆 3 件、棉花 25 件、油菜 4 件、苜蓿 1 件以及甜菜 1 件，合計 50 件基改飼料檢測方法確認（表 5-3），累計已建立 147 件基改作物檢測方法。

表 5-2、106 年度進口種子公司查驗檢驗送件數

作物別	單一件數	複合件數
玉米	2	8
大豆		3
棉花		3
油菜	1	3
苜蓿	1	
小計	4	17
總數		21

表 5-3、106 年度進口種子公司查驗登記已完成件數

作物別	單一完成	複合完成
玉米	3	16
大豆	0	3
棉花	10	12
油菜	1	3
苜蓿	1	0
甜菜	1	0
小計	16	34
總數		50