

三、種子(苗)檢查、檢測及驗證

一 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

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汙染。

本計畫配合農糧署執行基因轉殖作物安全監控，109 年度共抽檢木瓜種苗生產業者 15 家、累積採樣數 27 件；玉米種子業者 6 家、累積採樣數 16 件(表 3-1)；木瓜田間栽培區不定期抽檢嘉義 1 區、採 3 樣品，皆無檢出目標基改片段，確保我國田間無基因轉殖作物種植及被汙染風險。基因轉殖作物邊境安全管理業務共完成 50 筆出口木瓜抽檢，包含鮮果 1 件、木瓜種子 49 件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、大豆種子、玉米進行盲樣能力試驗，定性檢定結果皆 100% 符合。

表 3-1、109 年度國內種苗業者及栽培田監測一覽表

	木瓜栽培園	木瓜種苗業者	採樣數	玉米業者	採樣數
臺北市				2	5
苗栗縣		1	1		
臺中市		2	4	2	6
彰化縣		2	3		
嘉義市		1	1		
嘉義縣	1	3	11		
臺南市		2	4	2	5
高雄市		2	3		
屏東縣		2	3		
合 計	1	15	30	6	16

二 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

木瓜是我國最重要的出口種子品項之一，由基改作物檢監測團隊根據出口港埠及樣品型態，分工執行樣品檢測及保存，本年度抽檢木瓜種子 49 批次，5,053.69 公斤（截至 109 年 11 月 18 日）；果實 1 批次，12 公斤，估計出口產值達新台幣 5 億。雖然上半年種子出口數量為過往最低水準，不過到了期末之全年銷售統計數量持平。經洽詢業者上半年受到進口國停工影響港埠及交通運輸運作，因此收貨不順暢，但隨著經濟活動解封，又再恢復出口運輸，不過在果實銷售方面則可以明顯察覺到本次全球 COVID-19 疫情的影響，致使今年全年僅有一筆 12 公斤出口紀錄（表 3-2），因此明（110）年度的種子銷售及果品出口之產業動向值得持續關注。

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。現行飼料用玉米及大豆貨品輸入申報貨號已根據食用與飼料用區別，並自 106 年起項下全面細分基改或非基改類別，本（109）年收到進口基改大豆 115 件、基改玉米 63 件、非基改大豆 30 件以及非基改玉米 10 件（表 3-3），以及基改棉籽粕 3 件。對於申報為基改產品者，分析七項常見基改元件進行篩檢，多數樣品檢出含有 1 項以上基改元件符合預期，其中 tE9 元件可以最有效篩檢出基改大豆；另非基改玉米及大豆則以專一性檢測方法進行，結果全數未檢出有效訊號。本年截至 109 年 11 月 5 日進口硬質玉米達 344.4 百萬公噸及大豆達 224.8 百萬公噸，數量略少於較前 3 年度平均，整體抽檢率硬質玉米為 3.14% 及大豆為 4.52%。本計畫執行 4 年（106~109 年）以來，共抽檢非基改硬質玉米 25 件（佔全體 35.21%）及非基改大豆 141 件（佔全

表 3-2、106-109 年上半年出口木瓜種子及果實數量小計

	種子 (批次)	重量 (公斤)	果實 (批次)	重量 (公斤)	種苗 (批次)	株數 (苗)
109	49	5053.69	1	12	0	-
108	59	5285.8	5	4620	1	60
107	51	3317.7	6	4486	0	-
106	49	4986.4	19	8154	3	49

體 2.41%)，全數都未有效檢出基改訊號，這樣的結果顯示，國內業者特別在非基改

飼料農產品進口方面的品質掌控，都可以滿足我國法規之規範。

表 3-3、106-109 進口基改飼料抽檢頻度 (批次)

年度 \ 玉米	批次	報驗重量 (公噸)	抽檢件數及比率
106(基改)	2,668	3,918,472	62 (2.32%)
106(非基改)	20	5,755	3 (15%)
107(基改)	3,333	3,642,210	62 (1.86%)
107(非基改)	22	4,721	6 (27.2%)
108(基改)	2,938	4,458,370	91 (3.09%)
108(非基改)	16	2,197	6 (37.5%)
109(基改)	2,310	3,443,675	63 (2.72%)
109(非基改)	13	1,012	10 (76.92%)
小計	11,320	15,476,412	303 (2.67%)
年度 \ 大豆	批次	報驗重量 (公噸)	抽檢件數及比率
106(基改)	1,970	2,368,464	80 (4.06%)
106(非基改)	1,400	76,590	50 (3.57%)
107(基改)	2,700	2,473,830	39 (1.44%)
107(非基改)	1,312	74,064	21 (1.60%)
108(基改)	1,904	2,486,040	89 (4.67%)
108(非基改)	1,575	76,044	40 (2.53%)
109(基改)	1,648	2,174,635	115 (6.97%)
109(非基改)	1,560	73,810	30 (1.92%)
小計	14,069	9,803,477	464 (3.29%)

三 新世代基因改造生物檢監測體系之建構

陳哲仁、周明燕、林如玲、張惠如

有別於傳統基因轉殖作物係利用外源基因隨機性插入目標作物基因組中，以表現外源基因或利用基因靜默機制抑制作物内生（或侵染病原）基因表現，來達成改變作物性狀之目的。基因編輯技術是新一代的基因改造技術，可以達成精準改變作物基因組成進而達成改變性狀目的，可以實現精準且無外源序列殘留，是目前最受注目的基因改造技術，除了用於基礎基因功能研究，也被認為具有龐大的農業應用潛力，因此，首先就檢測技術面蒐集近 5 年期刊發表報告及相關技術文件（網站），彙整「基因編輯作物於農業應用之管理」之研究報告一篇供主管機關參採。

目前對利用 CRISPR/Cas9 系統所開發之基因編輯作物，普遍認為缺乏有效的檢測手段可以進行市售產品篩檢，判定是

否採用基因編輯作物，根據歐盟 GMO 實驗室網絡在 2019 提示的技術文件，有專家指出可利用基因編輯作物在 DNA 輸送體系及組織培養再生過程中的各種環境壓力、體細胞變異會在基因體或表觀基因體 (epigenome) 上留下可做為檢測標的的印痕 (scar)。為了測試這項觀點的可行性，以本場採用 CRISPR/Cas9 系統所建立的 eIF4 基因改造之基因編輯品系為實驗材料，利用甲基化敏感性酵素 -RAPD 進行分析野生型與基因編輯品系間是否有可偵測的胞嘧啶 (Cytosine, C) 甲基化修飾改變，結果清楚顯示相同遺傳背景的不同編輯品系確實具有可偵測的差異性甲基化修飾位點 (圖 3-1、圖 3-2)，由於試驗材料大小相近且栽培環境相同，較不可能是因為生長階段或是環境所引起的，但是無法分辨差異性來源是基因編輯操作、組織培養或是環境因子等其他因素造成的後果，故現階段利用甲基化修飾印痕作為基因編輯作物偵測仍屬假設性，尚未能實證。

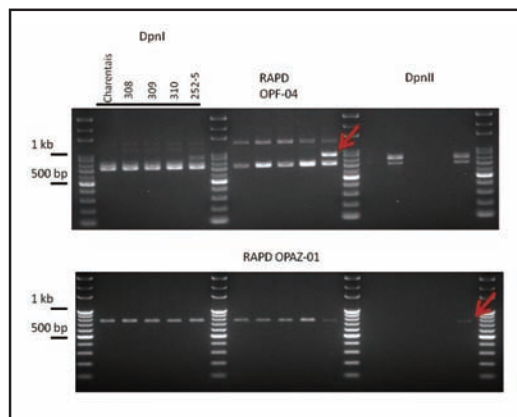


圖 3-1、甲基化敏感性 DpnI/DpnII 酵素 -RAPD 分析結果，以固定模板 DNA 用量進行 RAPD 引子 OPF-04 及 OPAZ-01 進行擴增，不同基因編輯品系間，會因為序列甲基化程度差異，導致擴增片段的有無及訊號強度之差異

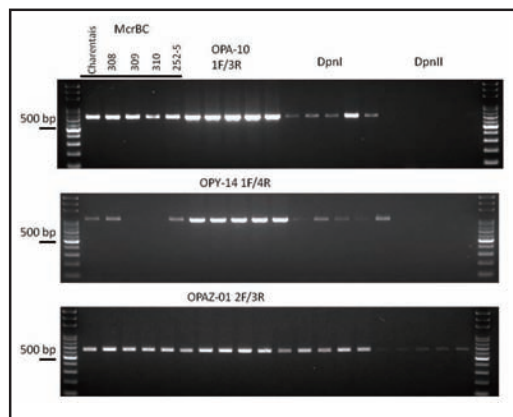


圖 3-2、序列專一性甲基化敏感性 DpnI/DpnII 酵素及 MspBc 分析結果，相同的基因片段，會因為選擇的甲基化敏感性酵素不同，而在不同基因編輯品系間顯示出差異

四 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

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)應依農委會(以下簡稱本會)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 (109) 年度共收玉米、大

豆、油菜以及馬鈴薯共 7 件基因改造參考樣品，累計已收到 331 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定性及定量檢測方法確認。本 (109) 年度完成包括玉米 2 件、油菜 2 件以及棉花 1 件檢測方法確認(表 3-4)，累計已建立 163 件基改作物檢測方法，另有 1 件基改馬鈴薯進行中。

表 3-4、108 年度進口基因改造植物性飼料查驗登記檢驗累計完成件數

報告編號	品系名稱	送樣單位	定量檢測	參考樣品檢驗
109DAI-GM050401	MON88702xMON15985xCOT102 xMON88701xMON88913	台灣拜耳股份有限公司	通過	符合
109DAI-GM073001	MS11 xRf3x MON88302	台灣巴斯夫股份有限公司	通過	符合
109DAI-GM073002	MS11 xRf3	台灣巴斯夫股份有限公司	通過	符合
109DAI-GM083101	MON87429	台灣拜耳股份有限公司	通過	符合
109DAI-GM083102	NK603 xT25xDAS-40278-9	台灣杜邦農業科學股份有限公司	通過	符合

五 番茄第六號染色體青枯病抗性基因分子標誌建立與應用

周明燕、陳哲仁、周佳霖

番茄除了加工、料理用外，也可以當作新鮮水果食用，全球番茄栽培面積約 500 萬公頃、產量高達 1 億 7 千萬公噸 (FAOSTAT, 2017)，是全球僅次於馬鈴薯的第二大宗蔬菜作物，台灣每年也有 4500~5000 公頃的栽培面積。番茄青枯病 (Bacterial wilt) 是由 *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi 所引起的一種細菌性土壤傳播病害，病原菌在高溫、多溼 (30℃、相對溼度 25% 以上) 季節最適宜發病，危害範圍涵括熱帶、亞熱帶地區 (圖 3-3)。當細菌侵入植物根系後，會在導管大量繁殖累積大量的聚醣 (exopolysaccharide I, EPS I) 及酵素 (如 polygalacturonase, PG、endo-1,4- β -D-glucanohydrolase, EC) 等，造成導管堵塞，阻礙植物水分傳導，因而引起植物枯萎。番茄青枯病最容易在結果期開始發病，植株一夜之間萎凋死亡，讓農友血本無歸，因此番茄青枯病又被稱為“見錢死”。有報告指出青枯病導致番茄產量減少 26%，嚴重時甚至損失可達 90.62% (Dharmatti 等, 2009)，足見該病害對番茄收益損害的嚴重程度。

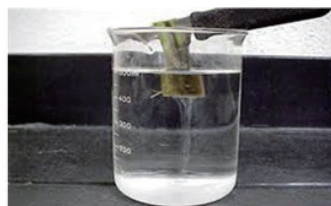
先前發表的研究文獻指出在番茄第 3、4、6、7、8、10、12 號染色體皆存在與青枯病抗性相關的數量性狀基因座 (QTL)，其中以第 6 號 (Bwr-6) 及第 12 號

(Bwr-12) 染色體的抗病效力最顯著 (Wang 等, 2000)，研究指出需堆疊較多抗病基因方能獲得較佳抗病效果。已知第 12 號染色體的抗性基因 Bwr-12 僅與第一演化型 (PhI) 青枯病菌株抗性有關，而第 6 號染色體的抗性基因 Bwr-6 則與第一及第二演化型 (PhI 及 PhII) 的青枯病菌株抗性有關。Truong (2015) 利用 RAPD 分析解序後在第六號染色體獲得兩段序列與抗病性有關，Kumar 等人 (2018) 測試了 14 組與青枯病抗病基因有關之分子標誌，其中 Suc176-534 與抗病性有顯著關係，結果與 Truong (2015) 相符。

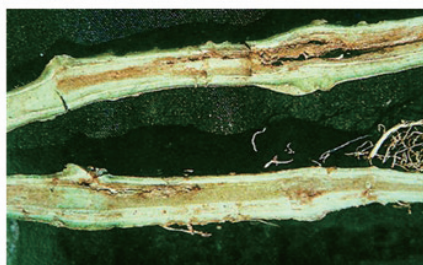
本研究依據 Truong (2015) 所偵測出與抗性有關之序列片段進一步探勘 SNP 資訊，尋獲 5 個 SNP 資訊，設計 17 組 SNP marker 組合。其中 3 組有多型性，且以 Bwr6-10 的水平電泳結果最佳，抗病材料增幅條帶 734bp，感病材料增幅條帶 534bp (圖 3-4)，PCR 黏合條件經梯溫試驗，以 61℃ 最佳。世界蔬菜中心王肇芬博士 (2013) 研究結果指出抗病基因 Bwr-12 及 Bwr-6 對抗病力解釋程度分別為 17.9~56.1% 抗病力及 11.5~22.2%，同時具備有 Bwr-12 及 Bwr-6 抗病基因時有最好的抗病性。本研究針對 Bwr-6 抗病基因所設計出之 Bwr6-10 可以與之前研發之 Bwr-12 抗病基因分子標誌合併使用，將更能精準偵測出番茄青枯病抗性材料，對於抗性品種之選育有正面助益。



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



<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRGqF0eHVuf0u2kidudCJefkNr9O7CiUT48ZQ9wg9JR4af4oht>



<http://4.bp.blogspot.com/-RvyurQUNYAg/VOzPBaorXGI/AAAAAAAAAW-U/vLjkoRdoQUM/s1600/Tomato%2Bstem%2BBacterial%2BWilt.jpg>

圖 3-3、番茄青枯病由細菌 *Ralstonia solanacearum* 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(左)，莖部橫切可觀察到維管束變褐色(右下)，以手壓之，有乳白色粘性的細菌菌泥溢出(右上)

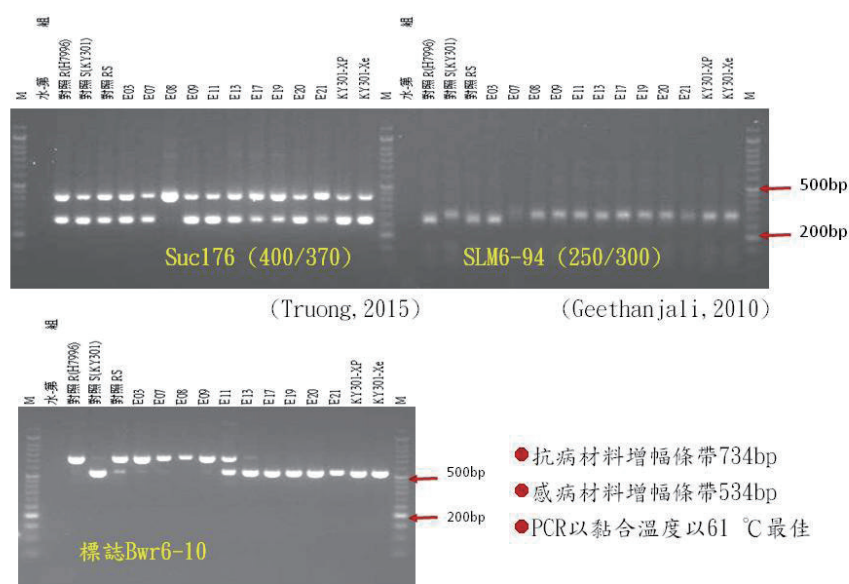


圖 3-4、針對番茄青枯病第六號染色體抗性基因所開發標誌 Bwr6-10(下) 對抗感病材料具被多型性，分別增幅出 734bp 及 534bp 條帶，較文獻標誌 Suc176(上左)、SLM6-94(上右) 清晰且容易判讀

六 建立番茄抗病及西瓜商業品種純度 SNP 分子標誌檢測技術平台

張惠如、龔美玲、周佳霖、林延諭

依據本計畫前三年執行成果，以分析結果是否偏離 X、Y 軸線、抗病基因型識別性 (與病原接種結果比對)... 等標準，篩選具識別性及穩定性之 SNP 引子組，並優化試驗條件與方法，完成篩選 SNP 引子組共 12 組，包括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)、番茄抗捲葉病毒基因 (Ty-1、Ty-2、ty-5)、抗萎凋病基因 (I-3)、抗冠狀根腐病基因 (Frl)、抗黃萎病基因 (Ve1)、抗根瘤線蟲基因 (Mi) 進行 OpenArray 系統設計，經洽國內代理商依據國內產業應用考量，採單次可執行 96 個樣品的 Array plate 儀器進行客製化 plate 訂製。經估算儀器與客製化所需費用，發現雖然同廠牌的 real-time PCR 和 Array plate 儀器價差不大，但客製化的 plate 費用較 real-time PCR 高 (以一次訂購 10 個 plate 計算)。且經和國內幾間進行番茄育種的種苗業者訪談後，發現雖然 Array plate 系統的操作流程方便，且具有一次可檢測多

個抗病基因的優點，但也有檢測成本較高、需新購置儀器與重新學習分析軟體操作的缺點；另一方面業者所具有的育種父母本組合並無同時涵蓋本計畫 12 個抗病基因。因此調整檢測系統策略，朝能減量使用 TaqMan™ assay 試劑量進行分析方法測試，以其所建立之檢測方法更能為產業接受使用。經過試劑半量使用測試後，此 12 組目標抗病基因的 SNP 分子標誌皆能將抗感病材料分群 (圖 3-5)。

另外，本研究亦成功以 7 組西瓜 SNP 螢光引子 (TaqMan™ assay) 區分 22 個西瓜親本品系 (圖 3-6) 其基因型分析如表一，雖然其中 1 組 (ANWC7RG) 之 FAM 對偶基因分群比較偏離 y 軸，但大量樣品之測試結果仍可成功分群 (圖 3-7)，同時其 F₁ 種子係以簡易核酸萃取方式所萃取之 DNA 進行測試，代表該 assay 可使用粗萃之 DNA，另外 assay 試劑濃度僅採用試劑廠商建議用量的一半，故可再降低檢測成本。即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 螢光基因型檢測系統，可自動分群判讀樣品檢測結果，不需於 PCR 增幅後再進行電泳分析，有效節省檢測時間，提高檢測精準度與效率 (表 3-5)。

表 3-5、西瓜 SNP 純度檢測套組對 22 個西瓜親本基因型

Variety\Assay	3-ANRWPHF	1-ANNK2DK	2-ANPRVXH	4-ANT2H3D	5-ANN7DNA	7-ANWC7RG	6-AN47662
	@chr4	@chr1	@chr2	@chr4	@chr3	@chr3	@chr7
UK48	C	C	A	A	G	G	A
WT1	C	C	A	A	G	G	T
RA108	C	C	G	G	G	G	T
Harris cs	C	C	G	G	G	T	A
AP2111	C	T	A	A	G	G	T

表 3-5、西瓜 SNP 純度檢測套組對 22 個西瓜親本基因型 (續)

Variety\Assay	3-ANRWPHF	1-ANNK2DK	2-ANPRVXH	4-ANT2H3D	5-ANN7DNA	7-ANWC7RG	6-AN4766Z
	@chr4	@chr1	@chr2	@chr4	@chr3	@chr3	@chr7
1015	C	T	A	G	A	G	T
Fry 1w	C	T	A	G	A	T	T
LS20	C	T	A	G	G	G	T
UC8	C	T	G	A	A	T	T
Cby F	C	T	G	A	G	G	A
UC4	C	T	G	A	G	G	T
英風 F8	C	T	G	A	G	T	A
ITL004 CS	C	T	G	G	G	H	A
WT41 bb	T	C	A	A	A	T	T
556-2F	T	C	A	G	A	G	T
D27	T	C	A	G	G	T	A
UC12	T	C	G	A	G	G	T
UC3	T	C	G	G	A	T	A
RB308	T	C	G	G	G	T	A
UK76	T	T	G	A	G	T	A
YVR as	T	T	G	G	A	T	A
UK75	T	T	G	G	G	T	A

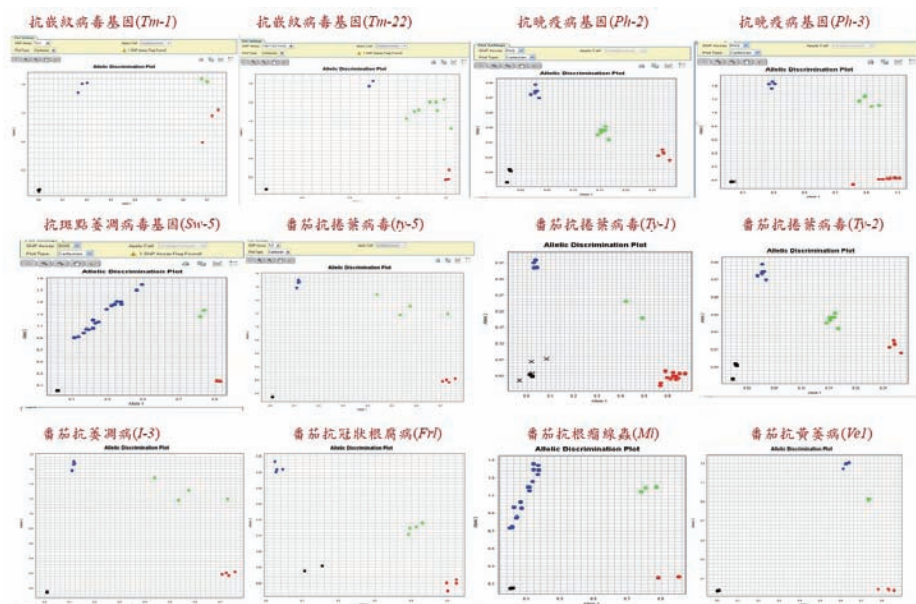


圖 3-5、利用 Real-time PCR 分析番茄抗病基因 SNP 分子標誌識別性

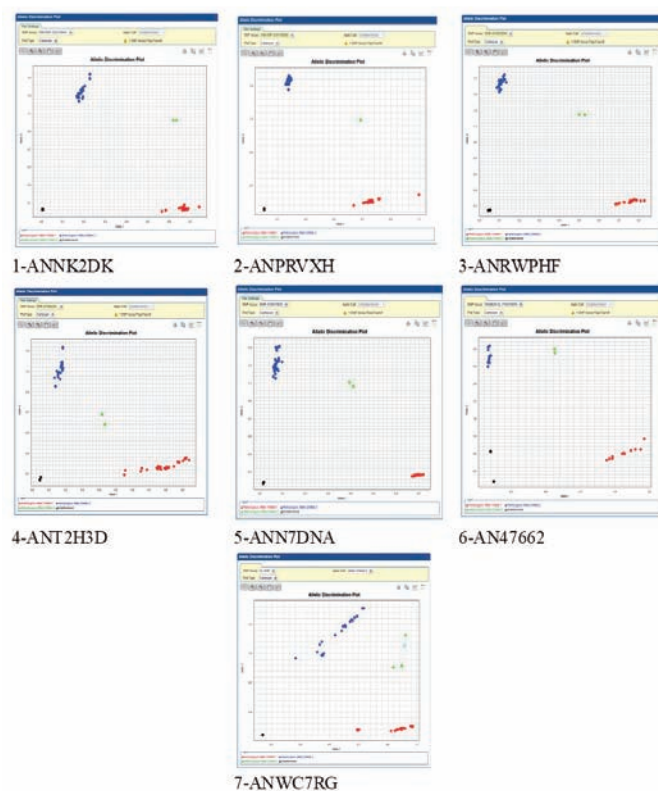


圖 3-6、7 組西瓜純度 TaqMan assay 測試結果。藍色及紅色分別代表 SNP 1 及 SNP 2 同質結合型，以兩個 SNP alleles 同質結合樣品之 DNA 混合模擬異質結合型（綠色點）兩重複作為對照

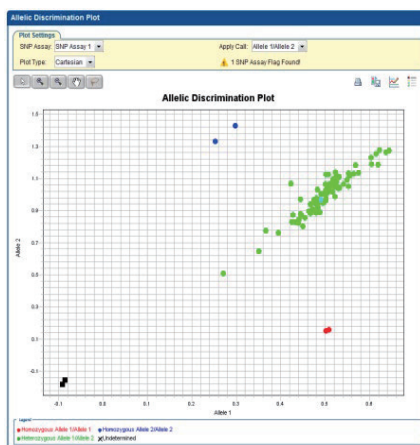


圖 3-7、7-ANWC7RG 大樣品 96 孔盤分析結果，仍可成功分群

七 番椒稔性恢復基因分子標誌之建立

龔美玲

番椒一代雜交 (F_1) 種子的生產普遍運用細胞質核互作雄不稔 (Cytoplasmic-genetic male sterility, CGMS) 系統，可省去人工去雄作業，該系統中的父本 (恢復親) 需要具有稔性恢復基因 (fertility restorer gene, *Rf*)，方能使 F_1 產生花粉進行自花授粉及結實。番椒稔性恢復候選基因 *CaPPR6* (Jo et al., 2016) 大小約 2Kbp，以 PCR 產物直接定序之結果不佳，顯示有多重序列存在，推測因為該基因屬於 Pentatricopeptide repeat (五肽重複序列)，以 35 個氨基酸為重複 motif，是植物界中常見的蛋白質家族，因此在基因體中存在多個相似基因。同理，雖嘗試以 PCR 產物做 cloning 後送定序，但同一個品系

樣品中挑 7 支 cloning 之定序結果即有不同，造成難以判定序列差異是為同一基因座上之不同 allele 或為不同之基因座上之 allele。另外定序發現雄不稔親 (A line) 在 *CaPPR6* 之 5' 端多了 6 個鹼基 (TATAAA) 的插入，但擴大比較亞蔬 - 世界蔬菜中心 (以下簡稱亞蔬) 之材料，除了 *C. chacoense* 恢復親 (R line) 增幅不出產物，結果有 1 個 *C. annuum* 辣椒及 3 個甜椒之恢復親同樣有該 6 bp 的插入，與預期並不一致。以文獻發表之 *Rf* 連鎖共顯性分子標誌 ColMod1-CASP (Jo et al., 2016) 檢測所蒐集之種子業者番椒 CGMS 材料皆吻合，但在亞蔬之 14 個恢復親中有 7 個基因型與外表型不一致。

因在 *CaPPR6* 上無法設計引子，進一步針對 *CaPPR6* 附近序列探勘 SNP，以及利用文獻標誌 ColMod1-CASP 之 SNP 位點，設計成 KASP SNP genotyping

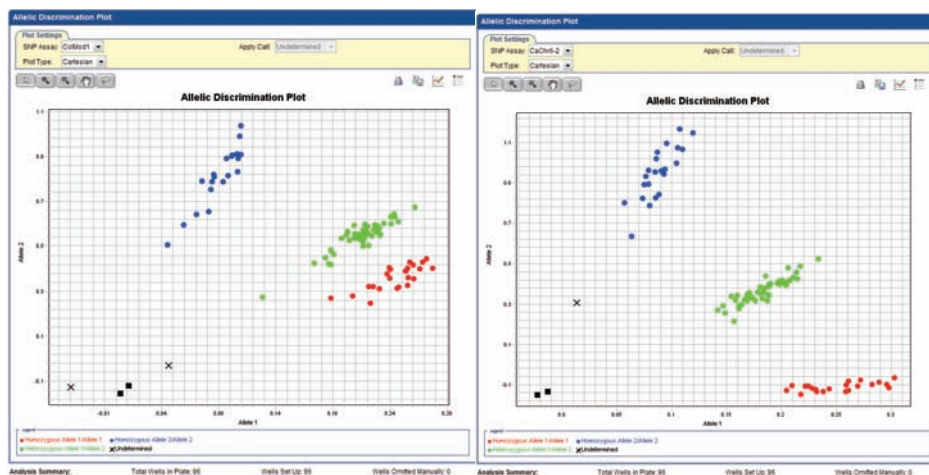


圖 3-8、 F_2 樣品 KASP (左 ColMod1；右 CaChr6-2) assay 基因型分析結果。本研究開發之 CaChr6-2 比文獻 SNP 位點之 ColMod1 (Jo et al., 2016) 有更佳之分群結果

assay，新設計之 SNP 標誌 (CaChr6-2) 相較 ColMod1 有較佳之分群結果 (圖 3-8)，且在所蒐集之番椒 CGMS 品系中有較高檢測準確率 (表 3-7)。雖然 ColMod1 距離 *CaPPR6* 較近，但 CaChr6-2 較不易誤判，

此 2 個 SNP 分別為於 *CaPPR6* 兩側。分析 1,425 株 F_2 族群之雄可稔：雄不稔比例 = 1016:409，適合度檢定結果符合單一顯性基因分離比 3:1；兩組 SNP 標誌分析結果完全一致。

表 3-7、Rf 連鎖分子標誌對番椒 CGMS 品系之檢測結果。

標誌名稱	檢測基因型	R lines (20) ^a <i>RfRf</i>	A、B lines (7) ^a <i>rfrf</i>	Successful genotyping (%)
ColMod1-CAPS (Jo et al., 2016)	<i>RfRf</i>	12	0	70
	<i>Rfrf</i>	1	0	
	<i>rfrf</i>	7	7	
CaChr6-2 (KASP assay)	<i>RfRf</i>	16	0	85
	<i>Rfrf</i>	0	0	
	<i>rfrf</i>	4	7	

^a R line：恢復親；A line：雄不稔親；B line：維持親，括弧內為所蒐集之品系數。

八 甜瓜抗 potyvirus 病毒群 CRISPR/Cas9 技術開發

林如玲、陳哲仁、龔美玲、張惠如

甜瓜栽培容易受到馬鈴薯 Y 病毒屬 (Potyvirus) 之侵害，使植株生長受阻，造成產量及品質下降。抗病育種為防治病毒病最有效的方法，但因栽培種甜瓜缺乏適當抗病毒種原，無法藉由傳統雜交育種取得抗病品系。近期 CRISPR/Cas9 技術，提供了對植物本身基因組特定序列進行編輯的途徑，能達到對作物獲得新性狀的目的。相關研究指出植物真核轉譯起始因子 eIF4E 參與調介植物病毒入侵宿主的複製過程，利用 RNA 干擾

技術使甜瓜 eIF4E 基因靜默，可對多種植物病毒產生廣泛抗性。本計畫擬建立甜瓜 CRISPR/Cas9 技術，希望造成甜瓜 eIF4E 基因序列的缺失或插入，進而產生病毒抗性。前年度建立了甜瓜培植體再生系統和農桿菌的轉殖條件，今年持續導入 sgRNA 及 Cas9 表現載體，成功誘導再生株，經轉基因確認及標的基因定序，得到 3 株突變株在標的位點上產生了核苷酸取代 (圖 3-9)。將突變株增殖及進行 ZYMV 病毒接種測試 (圖 3-10)，經 RT-PCR 偵測 ZYMV 病毒的累積 (圖 3-11) 及目視病徵觀察，在突變株與控制組間無發現明顯差異。本年度雖因核苷酸取代的位點，無法讓 eIF4E 蛋白產生

改變而獲得抗性，但未來可透過所建立的技術流程，設計不同的 sgRNA 使甜瓜

eIF4E 產生缺失或改變而獲得病毒抗性，加速甜瓜抗病品系的育成。

		sgRNA 標的靶位	PAM	
M251	AGGAAGATGAGGAAC	TTGAGGAAGGTGAGAT	CGG	CGATGACGACCTTGACTCCTCCA 167
M252	AGGAAGATGAGGAAC	TTGAGGAAGGTGAGAT	CGG	CGATGACGACCTTGACTCCTCCA 169
M248	AGGAAGATGAGGAAC	TTGAGGAAGGTGAGAT	CGG	CGATGACGACCTTGACTCCTCCA 168
M421	AGGAAGATGAGGAAC	TTGAGGAAGGTGAGAT	CGG	CGATGACGACCTTGACTCCTCCA 169
M415	AGGAAGATGAGGAAC	TTGAGGAAGGTGAGAT	CGG	CGATGACGACCTTGACTCCTCCA 167
M418	AGGAAGATGAGGAAC	TTGAGGAAGGTGAGAT	CGG	CGATGACGACCTTGACTCCTCCA 167
M426	AGGAAGATGAGGAAC	TTGAGGAAGGTGAGAT	CGG	CGATGACGACCTTGACTCCTCCA 170
control	AGGAAGATGAGGAAC	TTGAGGAAGGTGAGAT	CGG	CGATGACGACCTTGACTCCTCCA 180

圖 3-9、轉殖株 eIF4E 基因多序列並列分析。在 eIF4E 基因 exon 1 第 120 個位點核苷酸序列發生改變，由 C 變成 T

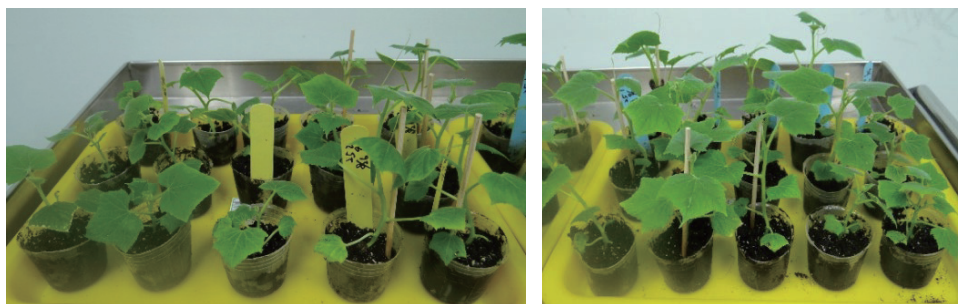


圖 3-10、突變株 M251、M252 增殖作為病毒接種材料

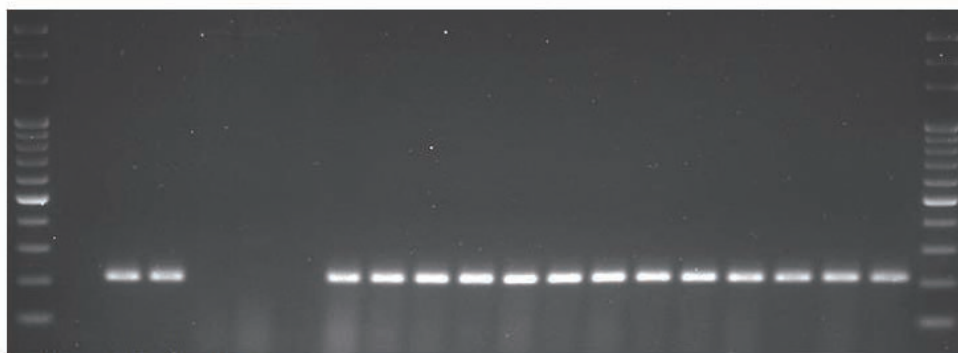


圖 3-11、對突變株進行 ZYMV 病毒接種，於 7 日後進行 ZYMV RT-PCR 偵測

九 植物種傳病原檢測作業流程優化研究

蘇士閔、白欣茹、陳姿瑜、邱燕欣

本(109)年度計畫目標為改善假單孢桿菌屬(*Pseudomonas* spp.) 檢測作業流程以提升效率並降低金錢與人力成本支出。半選擇性培養基測試結果，番茄細菌性葉斑病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Pst)、十字花科蔬菜細菌性葉枯病菌(*P. viridiflava*, Pv)和九層塔細菌性葉斑病菌(*P. cichorii*, Pc)皆可於mSTPsjA與KBZ培養基上生長，且形態差異不大；但在MT培養基上，Pst可產生透化圈，Pv與Pc則無透化圈生成(圖3-12至圖3-14)。因此MT培養基可與KBZ搭配，提升形態辨識效率。PCR檢測條件調整為三組專一性引子對MM5F/

MM5R(可偵測Pst)、20F/20R(可偵測Pv)、SfL1/SfR2(可偵測Pc)於同一增幅條件下產生條帶(圖3-15)，可加速檢測流程。

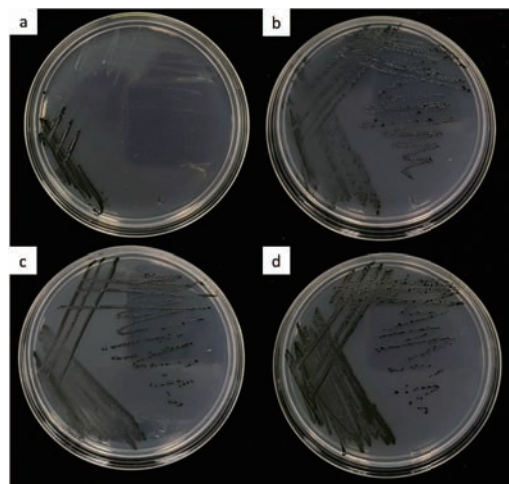


圖 3-13、(a) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* · (b) *P. viridiflava* · (c) *P. cichorii* · Pc12621 與 (d) *P. cichorii* · Pc12682 等菌株在 mSTPsjA 培養基上的生長情形。菌落形態為黑色，較小、平坦

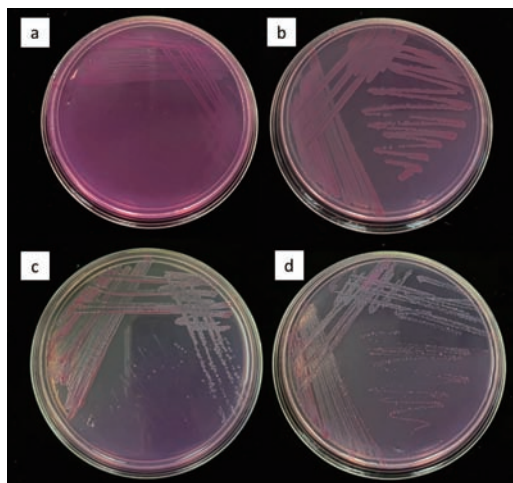


圖 3-12、(a) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* · (b) *P. viridiflava* · (c) *P. cichorii* · Pc12621 與 (d) *P. cichorii* · Pc12682 等菌株在 KBZ 培養基上的生長情形。菌落形態為紅色，平坦，邊緣略為透明

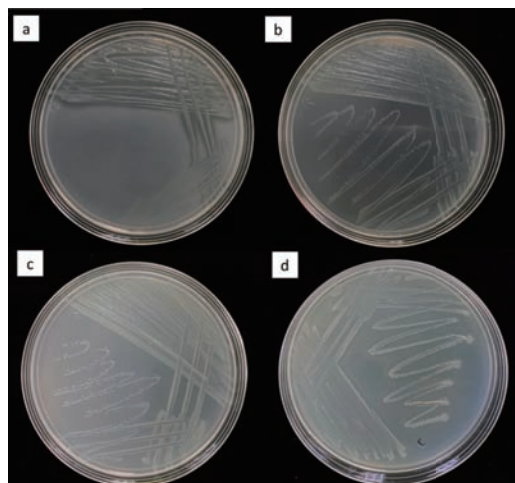


圖 3-14、(a) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* · (b) *P. viridiflava* · (c) *P. cichorii* · Pc12621 與 (d) *P. cichorii* · Pc12682 等菌株在 MT 培養基上的生長情形。菌落形態為乳白色，平坦狀，Pst 可產生透化圈

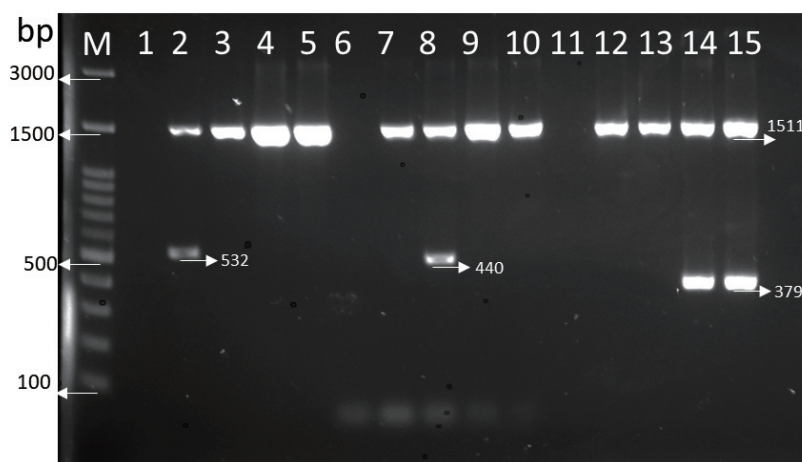


圖 3-15、MM5F/MM5R、20F/20R、Sfl1/SflR2 測試 Pst、Pv、Pc12621、Pc12682；1511 bp 為 UpBacF/UpBacR。M 為 100 bp marker，1-5 為 MM5F/MM5R：1: 無菌水，2:Pst，3:Pv，4:Pc12621，5:Pc12682；6-10 為 20F/20R：6: 無菌水，7: Pst，8:Pv，9:Pc12621，10:Pc12682；11-15 為 Sfl1/SflR2，11: 無菌水，12: Pst，13:Pv，14:Pc12621，15:Pc12682。Pst 於 532 產生專一性條帶；Pv 於 440 產生專一性條帶，Pc12621 和 Pc12682 於 379 bp 產生專一性條帶

+ 自動化幼苗評鑑系統建構與種子檢測平台整合

陳易徵

本計畫對四種不同尺寸（圖 3-16）之進行特徵萃取錯誤原因與數量之比較。其中，A4 尺寸水稻盤（雙排，25 顆水稻種子）與 A5 尺寸水稻盤（雙排，20 顆水稻種子）的生長空間為上、下各一排，由於上排種子離水源較遠，導致上排種子之發育情況不及下排種子，所以後續試驗將不以生長空間為上、下兩排的水稻盤為主要研究方向。比較 A4 尺寸水稻盤（單排，25 顆水稻種子）與 A5 尺寸水稻盤（單排，20 顆水稻種子）在空間利用上的效

率，A4 尺寸水稻盤平均一顆水稻種子需 118.8mm 寬的生長空間，而 A5 尺寸水稻盤只需 105mm。因此本計畫的主要研究方向為 A5 尺寸水稻盤（單排，20 顆水稻種子），次要為 A4 尺寸水稻盤（單排，25 顆水稻種子）。

本計畫目前已完成 6080 筆影像樣本（解析度 300dpi）之數據資料。針對特徵萃取部分以色彩特徵建立倒傳遞類神經網路分類器進行水稻發芽苗的構造之分類，並利用骨架化、Dijkstra 演算法等方法進行特徵萃取，針對 6080 個樣本進行特徵萃取測試，平均特徵萃取成功率為 88.9%（表 3-8）。

表 3-8、影像擷取正確率約 90%

水稻盤尺寸	數量 (個)	特徵萃取 正確數 (個)	萃取 正確率
A4 (1x25)	1100	1001	88.89%
A4 (2x25)	2650	2327	87.81%
A5 (1x20)	2080	1852	89.03%
A5 (2x20)	250	225	90.00%

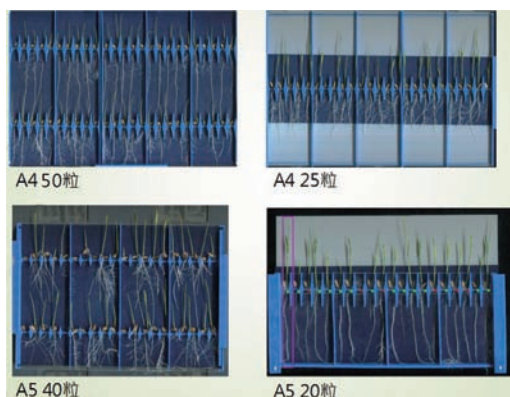


圖 3-16、設計適於擷取幼苗影像之發芽容器

強化種子檢查技術之研究與改進

許鑄云、陳易徵、楊怡玟

本計畫之主要目的，一為建立不同種子檢定項目的方法驗證流程，為了達到種子檢查方法具一致性的目標，ISTA 執行方法驗證方案以期檢查方法是可信及再現。方案中提供如何執行其資料分析的詳細內容。本研究建立了質性資料的方法驗證統計模式，並建構分析手冊及程式碼，利用文獻所提供的資料進行分析，以說明如何完成方法驗證之統計分析過程。二為建立可預測水稻種子田間表現的活力測定方法，參試水稻種子分別以加速老化法、胚根突出法、TTC 染色法以及電導度法檢測之水稻種子活力，分析所獲數據與田間出土率及 25℃ 發芽表現之相關性。最佳加速老化條件為 41℃ 下高濕 3 天再

評估 25℃ 之發芽表現，胚根突出法的溫度條件為 23℃。參試的秈稻種子，田間出土率 (GF_F) 與 25℃ 第一次紀錄發芽率 ($G1^{st}$)、加速老化法之第一次紀錄發芽率 ($G1^{st}_{AC}$)、胚根突出法之 102 小時突出率 (G_{RE102}) 及 TTC 染色法與之相關性分別為 R^2 值 0.903、0.861、0.929 與 0.937 (表 3-9)。參試的梗稻種子，田間出土率 (GF_F) 與 25℃ 發芽表現之 $G1^{st}$ 、 G_F 、 GT_{50} 之相關性分別為 R^2 值分別為 0.769、0.850 與 0.704；與加速老化法之 $G1^{st}_{AC}$ 、 GF_{AC} 的相關性分別為 R^2 值分別為 0.819 及 0.834；與胚根突出法之 G_{RE144} 的相關性 R^2 值為 0.865 (表 3-10)。相對電導度與田間出土率無相關性。TTC 染色法檢測耗時 2 天，胚根突出法 168h，加速老化法 17 天。

表 3-9、秈稻品種處理間相關性分析

	25°C紙上法發芽試驗					41°C老化3天					田間發芽試驗				
	G1 st (%)	GF (%)	MGT (d)	GT ₅₀ (d)	G1 st _{AC} (%)	GF _{AC} (%)	MGT _{AC} (d)	GT _{50AC} (d)	G _{REL02}	TTC	G1 st _F (%)	GF _F (%)	MGT _F (d)	GT _{50F} (d)	
25°C	G1 st (%)	1	0.878*	0.361	0.219	0.962**	0.878*	0.077	0.013	0.949**	0.918*	0.259	0.903*	0.097	0.049
	GF (%)		1	0.398	0.332	0.781*	0.865*	0.02	0	0.716	0.719	0.074	0.643	0.02	0
	MGT (d)			1	0.935**	0.397	0.179	0.634	0.514	0.408	0.362	0.321	0.178	0.496	0.332
	GT ₅₀ (d)				1	0.218	0.093	0.479	0.396	0.228	0.219	0.178	0.065	0.379	0.219
41°C	G1 st _{AC} (%)					1	0.848*	0.15	0.057	0.953**	0.854*	0.286	0.861*	0.126	0.078
	GF _{AC} (%)						1	0.001	0.013	0.717	0.651	0.036	0.724	0	0.012
	MGT _{AC} (d)							1	0.970**	0.188	0.126	0.545	0.049	0.796*	0.75
	GT _{50AC} (d)								1	0.077	0.035	0.42	0.003	0.712	0.692
G _{REL02}									1	0.960**	0.466	0.929**	0.241	0.18	
TTC										1	0.491	0.937**	0.246	0.179	
田間	G1 st _F (%)										1	0.386	0.854*	0.865*	
	GF _F (%)											1	0.121	0.094	
	MGT _F (d)												1	0.966**	
	GT _{50F} (d)														1

**：相關性在 0.01 層級上顯著 (雙尾)

*：相關性在 0.05 層級上顯著 (雙尾)

表 3-10、梗稻品種處理間相關性分析

	25°C紙上法發芽試驗					41°C老化 3 天					田間發芽試驗				
	G1 st (%)	GF (%)	MGT (d)	GT ₅₀ (d)	G1 st _{AC} (%)	GF _{AC} (%)	MGT _{AC} (d)	GT _{50AC} (d)	G _{REL144}	TTC	G1 st _F (%)	GF _F (%)	MGT _F (d)	GT _{50F} (d)	
25°C	G1 st (%)	1	0.962 ^{**}	0.045	0.889 ^{**}	0.947 ^{**}	0.918 ^{**}	0.144	0.231	0.970 ^{**}	0.656 ^{**}	0.731 ^{**}	0.769 ^{**}	0.019	0.002
	GF (%)		1	0.006	0.808 ^{**}	0.955 ^{**}	0.951 ^{**}	0.064	0.125	0.980 ^{**}	0.656 ^{**}	0.721 ^{**}	0.850 ^{**}	0.061	0.004
	MGT (d)			1	0.142	0.042	0.021	0.656 ^{**}	0.630 ^{**}	0.013	0.09	0.057	0.006	0.740 ^{**}	0.757 ^{**}
	GT ₅₀ (d)				1	0.867 ^{**}	0.824 ^{**}	0.244	0.375 [*]	0.852 ^{**}	0.537 ^{**}	0.832 ^{**}	0.704 ^{**}	0.007	0.069
41°C	G1 st _{AC} (%)				1	0.990 ^{**}	0.11	0.197	0.947 ^{**}	0.575 ^{**}	0.692 ^{**}	0.819 ^{**}	0.016	0.003	
	GF _{AC} (%)					1	0.061	0.131	0.935 ^{**}	0.554 ^{**}	0.664 ^{**}	0.834 ^{**}	0.031	0	
	MGT _{AC} (d)						1	0.939 ^{**}	0.096	0.196	0.135	0.01	0.317	0.338 [*]	
	GT _{50AC} (d)							1	0.167	0.202	0.245	0.04	0.329	0.396 [*]	
	G _{REL144}								1	0.679 ^{**}	0.753 ^{**}	0.865 ^{**}	0.057	0.003	
	TTC									1	0.621 ^{**}	0.472 [*]	0.002	0.007	
田間	G1 st _F (%)										1	0.686 ^{**}	0.004	0.063	
	GF _F (%)											1	0.118	0.025	
	MGT _F (d)												1	0.953 ^{**}	
	GT _{50F} (d)													1	
															1

** : 相關性在 0.01 層級上顯著 (雙尾)

* : 相關性在 0.05 層級上顯著 (雙尾)

十一 運用智能化排程分析高通量小分子 RNA 比對重要番茄種子病原技術建立

邱燕欣、王慧如

本計畫針對進出口番茄種子及田間嚴重罹病番茄植株（圖 3-17），以小分子核酸作為檢定標定，。番茄種子直接萃取品質雖不葉片好，但單批次上機解序的樣品數多，可降低解序成本。部分輸入種子具有披覆材料須清洗，影響病毒汙染

的實際情形。輸入種子 2 批次，一批為無病毒檢出。一則經高通量序列比對得知有種子總萃取核酸具有番茄嵌紋病毒（Tomato mosaic virus；ToMV）與南方番茄病毒（Southern tomato virus, STV）。以葉片所獲得的 RNA 品質，以分光光度計 OD260/280 吸光值比值較佳，但解序前 RIN 值也偏低。以葉片進行 small RNA 解序資料可知，可用此解序材料比對出多種病毒，包含植物 DNA 病毒。



圖 3-17、田間嚴重罹病番茄植株（左）及進出口茄科種子（右）

十三 建置大宗蔬菜育苗生理參數與生產作業模式

薛佑光、張倚瓏、蔡瑜卿

109 年度進行結球白菜與甜椒周年育苗生育生理參數之建立，選定最常栽培的結球白菜(4 號包白品種)及甜椒(銘星品種)2 個品種進行穴盤育苗試驗調查(圖 3-18)。已於種苗場環控溫室與塑膠布網室完成大宗蔬菜葉菜類十字花科結球白菜 5 期作與茄科甜椒 3 期作之穴盤育苗栽培試驗調查，同時記錄育苗溫室環境條件資料數據，以追溯溫網室條件對蔬菜育苗生長之影響。完成甘藍及花椰菜 2 種大宗蔬菜



圖 3-18、周年育苗生育生理參數穴盤育苗試驗調查

各 2 期作(春、夏作)之穴盤育苗栽培與生理參數調查與資料紀錄，進行種苗生長預測模式驗證資料收集，預測適當之種苗播種與出貨日期，並作為下一年度示範育苗場產程管理測試實證之依據與修正。

本年度亦完成種苗場 3 號育苗溫室示範場域環境感測控制系統更新升級(圖 3-19)，達到溫室環境條件異地監控的功能，主要為國產環控主機與溫溼度感測裝置，每 15 分鐘擷取一次資料，進行溫室育苗生育氣候環境分析，作為蔬菜育苗生產設施遠端監測與控制管理系統建置與購置之依據，供育苗栽培技術智慧化改善運用。



圖 3-19、育苗溫室示範場域環境感測控制系統更新升級

十四 種子檢查業務成果

許鑄云、蘇士閔、陳易徵、李濡夙

徐麗芬、劉芳怡

109 年度本場種子檢查室受託，依據臺灣地區農作物種苗檢查須知辦理各項種子檢查業務，其中良種繁殖田間檢查作物種類有：水稻、落花生、大豆、玉米及高

粱等，共計 176 件，總面積為 139.45 公頃；室內檢查共計 1,143 件（表 3-11）；另辦理市售種子品質查驗計 235 件；一般業者申請種子品質檢測計 379 件；核發出口種子 ISTA 檢驗證及英文報告共計 151 件（表 3-12）；全年度種子檢查總件數為 1,908 件。

表 3-11、良種繁殖田間檢查面積及室內檢查件數

檢查作物類別	田間檢查面積（公頃）	室內檢查（件）	備註
水稻	51.22	1,051	含儲藏性 27 件
落花生	20.79	57	-
大豆	1.80	9	-
玉米	45.11	8	-
高粱	20.53	18	-
合計	139.45	1,143	

表 3-12、各項種子檢查申請案室內檢查件數

檢查種類	室內檢查（件）
市售種子品質查驗	235
一般業者申請（參考性）	379
ISTA 檢驗證	95
英文報告	56
合計	765

十五 重要蔬菜種傳病原滅菌處理系統之開發

蘇士閔、邱凱瑩*、江筱暉

本計畫目標在測試高壓靜電場應用於瓜類種子的滅菌處理效果，期能協助國內種子業者降低因病原污染種子造成的經濟損失。在以高壓靜電場處理胡瓜種子與甜瓜種子的試驗結果（表 3-13）顯示，高壓靜電場強度在 5-20 kv/cm、處理 10 分鐘或強度 5 kv/cm、處理 10-20 分鐘等組合，即可在不降低種子發芽率的狀況下

完全除滅種子上的蔓枯病菌（*Didymella bryoniae*）。目前硬體設備尚無法進行大批次的種子處理，要在能處理大量種子的同時不影響種子發芽、仍具殺菌能力的前提下，降低電場輸出強度並達到均勻穩定，未來尚需在設備元件上進行調整與測試，但高壓靜電場在植物病害防治上的應用仍具開發潛力。另外，可供做試驗材料、均勻的帶病毒種子蒐集不易，後續將再規劃與種子公司合作，測試高壓靜電場在其他種傳病原應用的效果。

表 3-13、高壓靜電場處理人工污染甜瓜種子後的蔓枯病菌（*Didymella bryoniae*, Db）殘存情形調查結果。電場強度達 5 kv/cm、處理 5 分鐘以上種子上的 Db 分離率為 0%。低處理強度 1 kv/cm 條件下、處理 10 分鐘 Db 分離率即顯著降低至 18%，處理 20 分鐘以上分離率低於 10%

處理時間 (min)	Db 分離率 (%)				
	1	5	10	20	30
0	100	100	100	100	100
5	100	23	0	0	0
10	18	0	0	0	0
20	8	0	0	0	0
30	5	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0

* 明道大學精緻農業學系副教授

十六 水稻種子高效能供料及品種辨識系統之研究

許鑄云、鍾佩恩、張雅琪

為確保我國水稻優良種子品質供應，執行水稻三級良種繁殖制度之種子檢查工作，其中為維持水稻品種純度及縮短水稻品種檢查時間，本研究主要目的分成 2 部分，第 1 部分為以現有 5 個品種為基礎，擴增新的水稻品種，建立‘臺梗 2 號’、‘臺梗 4 號’、‘臺梗 8 號’及‘臺梗糯 3 號’等 4 個品種之影像比對處理技術。各水稻品種有效影像擷取率範圍為 91.3~92.6%，有效影像擷取率平均達 92.0%（表 3-14）；各水稻品種辨識成功率範圍為 83.4~99.9%，品種辨識成功率平

均達 92.9%（表 3-15）；各水稻品種平均處理速度範圍為 105~126 粒 / 分鐘，平均為 118 粒 / 分鐘（表 3-16）。第 2 部分為多樣品自動進出料設備建置，可一次性擺放 7 個不同樣品，並於其中一樣品檢測完畢後自動進行下一樣品辨識。設計使用圓盤供料方式，旋轉供料盤將樣品送入供料桶中，並透過震動供料將種子送到輸送帶進行影像擷取。系統整體外觀如圖 3-20，其中種子影像辨識區域的主要構造包括：雜草型紅米影像擷取區域與收集盒、種子外觀形態影像擷取區域、種子出料分類區包含正確品種收集盒和不正確品種收集盒、人機介面之操作介面，以及人機介面之設定介面。

表 3-14、水稻品種有效影像擷取率結果

項目	臺梗 2 號	臺梗 4 號	臺梗 8 號	臺梗糯 3 號
總數 (粒)	3,237	3,175	4,221	4,291
有效影像擷取率 (%)	91.3	92.0	92.2	92.6

註：有效影像擷取率 = (總數 - 無效影像) / 總數

表 3-15、水稻品種辨識成功率結果

項目	臺梗 2 號	臺梗 4 號	臺梗 8 號	臺梗糯 3 號
總數 (粒)	3,237	3,175	4,221	4,291
品種辨識成功率 (%)	90.8	97.6	83.4	99.9

註：辨識正確率 = 辨識正確數 / 總數

表 3-16、系統之平均處理速度結果

項目	臺梗 2 號	臺梗 4 號	臺梗 8 號	臺梗糯 3 號
總數 (粒)	3,237	3,175	4,221	4,291
時間 (秒)	1,857	1,618	2,061	2,039
速度 (粒 / 分鐘)	105	118	123	126



圖 3-20、水稻種子高效能供料及品種辨識系統外觀圖

十七 種子數位圖鑑平台之研究

許鑄云、張雅琪、鍾佩恩

本研究欲進行種子外觀特徵影像處理，以建置種子數位圖鑑平台，並運用於種子檢查及相關檢驗單位，希冀透過此平台快速檢查出雜草種子或不欲引入的植物種子，避免造成生物性公害的物種散佈，而此系統除了提供於相關檢查及研究人員使用外，並可提供於農民及一般民眾交流使用。本年度針對旋花科等 20 個科別共 195 種植物種子，採用多模態階層式分類器應用於植物種子辨識，擷取 5 種不

同屬性的特徵圖形資訊，包括影像中的紋理、色彩與形狀等，增加資料多樣性與互補性，透過低維度向量代表其影像重要資訊，並運用自組織映射神經網路分別對應其特徵映射座標，以階層方式層層將運用資料量減少，以最短時間為前提輸出辨識效能，以達即時性檢驗與應用（圖 3-21）。結果顯示在最終決策融合 PNN 時，以 85% 為其平均辨識結果，而以 TOP-5 做為辨識規則，則辨識率可高達 95%，所使用的運算時間與運用資源相對少，其平均一筆樣本處理時間為 55 毫秒。

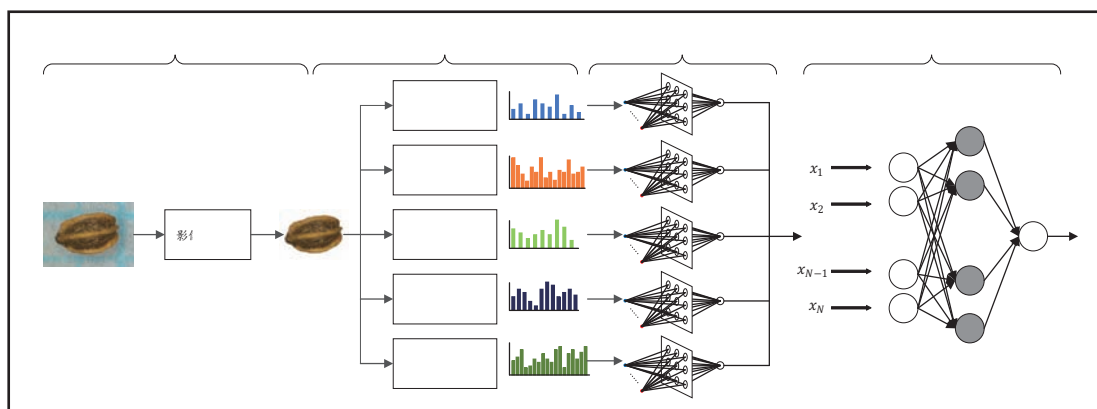


圖 3-21、多模態種子分類器系統架構圖