生物技術

組織培養

抗黑腐病甘藍品系之雙單倍體生產 本年度甘藍小孢子培養參試品系共 14 個，其中 6 品系對小孢子培養有反應，4 品系尚未產出小孢子胚，另 4 品系因植株污染問題而無法進行培養（圖 3-1）。6 個反應品系中，其中 5 品系以及對照之「初秋」甘藍已於 108 年秋季共提供 31 個 DH 品系總共 63 株予育種者進行後續之選拔（表 3-1）。此外以「1894」比較 31℃ 及 32℃ 溫度對小孢子出胚之影響，結果顯示以 31℃ 處理 1 天出胚率最佳（表 3-2）。以出胚率較高之「2181」、「1894」檢測其 DH 比率在 66.7~77.8%之間（表 3-3）。甘藍 DH 瓶苗之馴化成功率在 94.1~100%之間（表 3-4）。

表 3-1 108 年不同甘藍品系進行小孢子培養其產出之 DH 植株數量

Donor line	DH line	Total DH plants
16-2029-1	1	3
16-2042-1	1	1
16-2181-1	21	36
16-2401-1	2	5
17-1894-3	3	7
CQ	3	11
Total	31	63

表 3-2「1894」甘藍小孢子以不同溫度處理對胚分化之影響

Treatment	No. petridish with embryos/ total petridish	Total embryos	Cotyledonary Embryos / petridish
31℃	6 / 10	15	1.5 ± 0.5 a
32℃	4 / 10	6	0.6 ± 0.3 a

表 3-3 兩甘藍品系之小孢子培養其瓶苗倍體數之表現情形

Donor line	Tested lines	Ploidy level No. of plant (%)			
		C	2C	4C	Chimera
16-2181-1	30	6 (16.7%)	28 (77.8%)	2 (5.6%)	0 (0.0%)
17-1894-3	6	1 (16.7%)	4 (66.7%)	0 (0.0%)	1 (16.7%)

表 3-4 甘藍 DH 出瓶苗以有孔塑膠籃子進行馴化之成活率

Donor line	Off bottle No. (total plant)	Survival line No. (total plant)	Survival rate %
16-2029-1	1(3)	1(3)	100
16-2042-1	1(1)	1(1)	100
16-2401-1	2(5)	2(5)	100
16-2181-1	10(17)	10(16)	94.1



圖 3-1 108 年甘藍小孢子培養產出之 DH 植株出瓶後之生長情形。

薑組織培養種苗量化繁殖技術開發 將不同直徑廣東薑與竹薑根莖培養 8 wks 後結果顯示，4 mm 與 6 mm 根莖之每培植體可得 4.0~4.7 芽，顯著多於 2 mm 根莖 （表 3-5、圖 3-2）。廣東薑與竹薑根莖於 0.5~2.0 mg L^{-1} BA 之 MS 液態基分別培養 2、4 或 6 wks 後，將所得芽球團塊繼代於含有 0.5 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 固態培養基再經 8 wks 培養後，廣東薑 BA 處理 2 wks 之總芽數顯著低於 4-wk 與 6-wk 處理；當培養達 6 wks 時，對照組總芽數顯著低於 BA 處理，BA 處理組中又以 2 mg L^{-1} BA 處理顯著最高。竹薑 BA 處理組在 6 wks 培養後，總芽數顯著高於 2-wk 處理，但與 4-wk 處理間差異並不顯著；當培養達 6 wks 時，對照組總芽數顯著低於 BA 處理，但是 BA 處理組間則無顯著差異（表 3-6、表 3-7、圖 3-3）。

表 3-5 培植體大小對「廣東薑」與「竹薑」組培苗增殖與生長之影響

Cultivar	Diameter of microrhizome (mm) [z]	Shoot-buds/explant	Leaves number/explant	Plantlet height(cm)
Guang Dong	2	1.9 ± 0.2 b [y]	4.1 ± 0.3 b	1.5 ± 0.1 ab
	4	4.0 ± 0.3 a	5.2 ± 0.3 a	1.5 ± 0.0 ab
	6	4.7 ± 0.4 a	4.8 ± 0.2 ab	1.7 ± 0.1 a
Chu	2	2.4 ± 0.3 b	4.8 ± 0.2 a	1.9 ± 0.2 a
	4	4.5 ± 0.6 a	4.8 ± 0.6 a	1.8 ± 0.3 a
	6	4.5 ± 0.7 a	5.0 ± 0.6 a	2.2 ± 0.2 a

[z] *In vitro* microrhizome explants (about2, 4, or 6 mm in diameter) were cultured on MS medium containing 1 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} NAA for 8 wks of culture. Each treatment had 5 replications, and 3 explants were used in each replication. Plantlets higher than 5 mm were recorded.

[y] Means in each same column under various cultivar followed by different letters are significantly different at the 5% level by LSD test.

表 3-6 液態培養時間與 BA 濃度對「廣東薑」組織培養苗增殖與生長之影響

Liquid culture period (wk)	BA (mg L^{-1})	Liquid culture [z]				Liquid-solid culture [y]		
		Total plantlets (number)	Plantlets with unfolded leaves	Plantlets with green shoots	Plantlets with yellowish buds	Total plantlets (number)	Plantlets with unfolded leaves	Plantlets with green shoots
			- (%) -				- (%) -	
2	0	3.8 ± 0.2 h [x]	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 c	100.0 ± 0.0a	8.9 ± 1.8 e	78.2 ± 6.9 d	21.8 ± 6.9 a
	0.5	4.2 ± 0.3 gh	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 c	100.0 ± 0.0a	9.8 ± 1.3 de	80.1 ± 4.6 cd	19.9 ± 4.6 ab
	1.0	4.2 ± 0.4 gh	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 c	100.0 ± 0.0a	9.8 ± 2.0 de	86.5 ± 2.6 bcd	13.5 ± 2.6 abc
	2.0	4.6 ± 0.3 fg	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 c	100.0 ± 0.0a	9.7 ± 0.6 de	85.4 ± 5.1 bcd	14.6 ± 5.1 abc
4	0	5.1 ± 0.2 def	0.0 ± 0.0 d	52.8 ± 16.0 a	47.2 ± 16.0 b	13.0 ± 1.5 c	90.9 ± 4.7 b	9.1 ± 4.7 c
	0.5	5.3 ± 0.1 bcde	0.0 ± 0.0 d	34.5 ± 18.6 ab	65.5 ± 18.6 b	20.5 ± 1.3 b	89.9 ± 5.1 bc	10.1 ± 5.1 bc
	1.0	5.2 ± 0.1 bcdef	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 c	100.0 ± 0.0a	20.1 ± 1.6 b	88.3 ± 2.1 bcd	11.7 ± 2.1 abc
	2.0	5.0 ± 0.2 ef	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 c	100.0 ± 0.0a	21.0 ± 2.8 b	90.0 ± 2.4 bcd	10.0 ± 2.4 abc
6	0	5.7 ± 0.1 abcd	50.3 ± 7.7 a	37.9 ± 4.7 ab	11.8 ± 11.8 c	12.4 ± 1.8 cd	100.0 ± 0.0a	0.0 ± 0.0 d
	0.5	6.1 ± 0.4 a	22.4 ± 0.4 b	27.4 ± 10.5 b	50.1 ± 10.7 b	19.6 ± 2.4 b	100.0 ± 0.0a	0.0 ± 0.0 d
	1.0	5.8 ± 0.1 abc	20.8 ±11.3 bc	28.9 ± 10.2 ab	50.3 ± 9.2 b	22.3 ± 1.3 b	87.2 ± 1.6 bcd	12.8 ± 1.6 abc
	2.0	5.8 ± 0.2 abc	7.4 ± 4.9 c	38.0 ± 14.4 ab	54.6 ± 19.0 b	29.2 ± 2.7 a	86.9 ± 4.6 bcd	13.1 ± 4.6 abc

[z] *In vitro* rhizome explants (about 5×5×3 mm^3) were cultured on B5 liquid medium containing 0-2.0 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} NAA for 2, 4 and 6 wks of culture. Each treatment had 3 replications, and 3 explants were used in each replication.

[y] Uncut shoot-bud derived from various liquid culture periods were cultured on the B5 solid medium supplemented with 0.5 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} NAA for another 8 wks of culture.

[x] Means in each same column followed by different letters are significantly different at the 5% level by LSD test. Percentage data were arcsine-square -root transformed prior to analysis.

表 3-7 液態培養時間與 BA 濃度對「竹薑」組織培養苗增殖與生長之影響

Liquid culture period (wk)	BA (mg L^{-1})	Liquid culture [z]				Liquid-solid culture [y]		
		Total plantlets (number)	Plantlets with unfolded leaves	Plantlets with green shoots	Plantlets with yellowish buds	Total plantlets (number)	Plantlets with unfolded leaves	Plantlets with green shoots
			- (%) -				- (%) -	
2	0	4.0 ± 0.2 e[x]	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 e	100.0 ± 0.0 a	4.6 ± 0.1 e	100.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 c
	0.5	4.3 ± 0.0 de	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 e	100.0 ± 0.0 a	5.4 ± 0.2 de	85.6 ± 2.3 bc	14.4 ± 2.3 ab
	1.0	4.3 ± 0.3 de	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 e	100.0 ± 0.0 a	6.2 ± 0.6 cde	92.3 ± 2.4 abc	7.7 ± 2.4 abc
	2.0	4.2 ± 0.7 e	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 e	100.0 ± 0.0 a	7.1 ± 1.1 bcd	87.1 ± 1.4 c	12.9 ± 1.4 a
4	0	5.3 ± 0.2 cd	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 e	100.0 ± 0.0 a	5.4 ± 0.5 de	96.8 ± 3.2 a	3.2 ± 3.2 c
	0.5	5.8 ± 0.6 bc	0.1 ± 0.1 de	7.4 ± 7.4 de	92.6 ± 7.4 ab	8.0 ± 0.3 bc	95.3 ± 2.5 ab	4.7 ± 2.5 bc
	1.0	5.9 ± 0.1 bc	0.2 ± 0.1 de	11.5 ± 8.4 de	88.5 ± 8.4 ab	9.2 ± 0.4 ab	96.8 ± 3.2 ab	3.2 ± 3.2 bc
	2.0	5.9 ± 0.1 bc	0.3 ± 0.0 cd	12.7 ± 2.3 cd	87.3 ± 2.3 b	11.1 ± 2.0 a	94.6 ± 4.1 ab	5.4 ± 4.1 bc
6	0	5.4 ± 0.1 bc	23.7 ± 5.8 ab	5.9 ± 0.4 d	70.4 ± 5.8 a	7.2 ± 0.3 bcd	100.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 c
	0.5	5.9 ± 0.1 bc	26.9 ± 3.3 a	32.2 ± 4.9 c	40.9 ± 4.2 b	10.4 ± 0.6 a	97.8 ± 1.1 ab	2.2 ± 1.1 bc
	1.0	6.4 ± 0.2 ab	25.8 ± 6.4 a	30.4 ± 8.6 c	43.8 ± 5.6 b	10.3 ± 1.0 a	100.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 abc
	2.0	7.0 ± 0.6 a	28.7 ± 2.9 a	32.0 ± 7.3 c	39.4 ± 6.8 b	10.7 ± 0.2 a	99.1 ± 0.9 a	0.9 ± 0.9 c

[z, y, x] Same as Table 2.

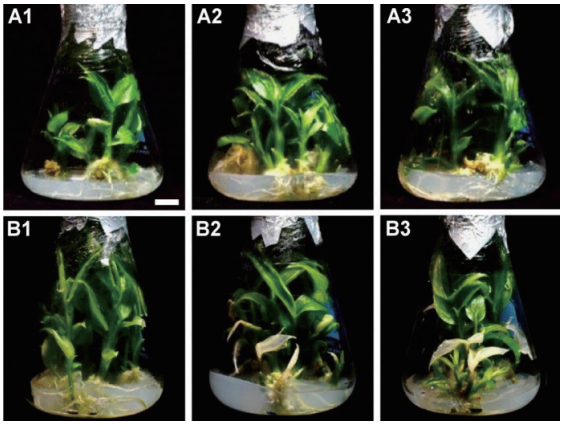


圖 3-2 利用不同大小組培根莖進行培養，組培薑苗之增殖與生長情形。將「廣東薑」(A) 與「竹薑」(B) 組培根莖直徑約 2 mm (1)、4 mm (2) 及 6 mm (3) 之培植體，培養於含有 1 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 固態培養基，經培養 8 wks 後，組培苗增殖與生長之情形。Bar = 1 cm。

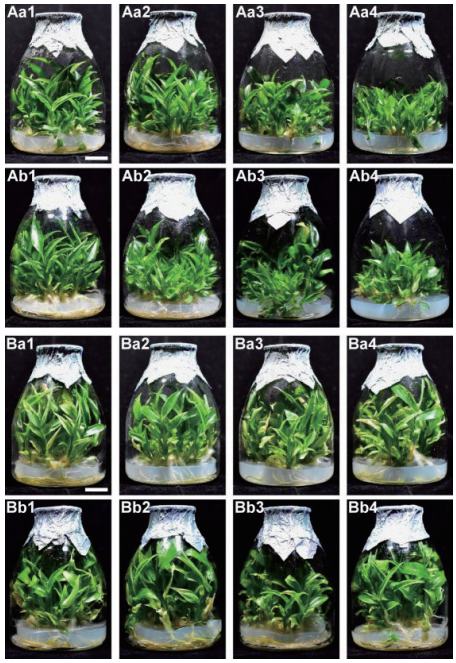


圖 3-3 組培根莖於不同 BA 濃度與液固態培養方式條件下，「廣東薑」與「竹薑」組培苗增殖與生長情形。「廣東薑」(A) 與「竹薑」(B) 之組培根莖 (約 5 mm 直徑) 於含有 0、0.5、1 及 2 mg L^{-1} BA (依序為 A 與 B 圖中之 1、2、3、4) 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 液態培養基培養 4 wks (a) 與 6 wks (b) 後，將芽苗團塊未經切割分別繼代培養於含有 0.5 mg L^{-1} BA 和 0.1 mg L^{-1} NAA 之 B5 固態培養基 8 wks 後之瓶苗生長情形。Bars = 2 cm。

藍紫色蝴蝶蘭育種之研究 經流式細胞儀檢測確定 4 倍體之 *P. bellina fma. coerulea* 植株與 2 倍體植株（圖 3-4），比較二者之花朵及園藝性狀結果顯示，4 倍體具有較大的花徑，花朵質地較堅挺硬實，葉片、小花柄、唇瓣中央裂片、蕊柱較寬，小花柄、蕊柱較長（表 3-8、圖 3-5），因此藉由多倍體化誘導可改善植株花朵及其園藝性狀，觀察少數已開花之 4 倍體花朵壽命顯示未比 2 倍體長，二者花朵壽命相同，但亦有花朵壽命較 2 倍體短之 4 倍體單株。在 4 倍體植株雜交親和性方面仍需更進一步雜交授粉測試。於 CYT142 雜交編號可分別選拔出具有圓整花型之 CYT142-6 以及花序排列佳之 CYT142-8 藍紫色優良單株，花徑約 4.5 cm（圖 3-6），花期在秋季。

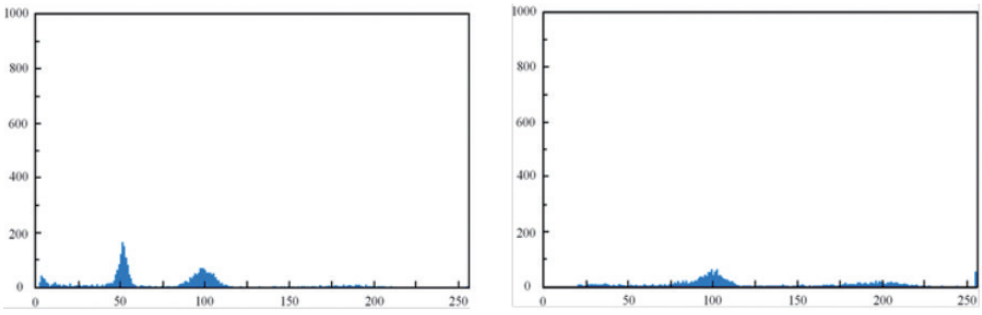


圖 3-4 利用流式細胞儀分析藍紫色蝴蝶蘭 *P. bellina fma. coerulea* (A) 2x 倍數體 (B) 4x 倍數體之圖譜。



圖 3-5 藍紫色蝴蝶蘭 *P. bellina fma. coerulea* 2 倍體與 4 倍體 (A) 花徑、(B) 小花柄、(C) 唇瓣側裂片、(D) 唇瓣中裂片、(E) 蕊柱以及 (F) 葉片性狀之比較。Bars = 1cm。



圖 3-6 選拔出具有 (A) 圓整花型之 CYT142-6 以及 (B) 花序排列佳之 CYT142-8 藍紫色優良單株，花徑約 4.5 cm。Bars = 1cm。

表 3-8 比較 2 倍體藍紫色蝴蝶蘭 *P. bellina* fma. *coerulea* 與其誘導所得之 4 倍體植株之園藝性狀

倍體數	梗長 (cm)	梗徑 (mm)	花徑 (cm)	蕊柱長 (cm)	蕊柱寬 (mm)	小花柄長 (cm)	小花柄寬 (mm)	唇瓣中央裂片長 (cm)	唇瓣中央裂片寬 (mm)	葉長 (cm)	葉寬 (cm)
2X	4.9 b	3.7 a	3.9 b	1.1 b	4.1 b	3.3 b	2.5 b	1.3 a	8.0 b	9.0 a	5.1 b
4X	4.3 a	4.8 a	4.8 a	1.3 a	4.6 a	4.0 a	3.4 a	1.5 a	9.8 a	8.8 a	6.3 a

迷你蝴蝶蘭瓶內開花之研究 迷你蝴蝶蘭 *Phal. parishii* 與 *Phal. appendiculata* 種子不適合播種於含有活性碳之培養基，種子發芽後原球體容易褐化，母瓶同樣繼代於不含活性碳之播種培養基時，原球體生長與發育情形良好，*Phal. lobbii* 可播種於含有活性碳之培養基，母瓶同樣繼代於含活性碳之培養基，原球體生長與發育情形良好，開始分化成完整植株，生長速度較 *Phal. parishii* 與 *Phal. appendiculata* 快（圖 3-7）。以迷你蝴蝶蘭原生種 *Phal. appendiculata* 為模式植物，評估蝴蝶蘭屬植物可於瓶內開花之培養條件及開花特性表現。將著生 3 片葉、雙葉幅約 2 公分之 *Phal. appendiculata* 小苗分別接種於含有花寶一號（HYPONeX No. 1. N:P:K = 7:6:19）基本鹽類之 HP 培養基中，分別培養 4、6、8 個月後以 20/15℃（日 / 夜溫）、23/20℃（8/16 小時）、26℃（24 小時）等 3 種不同溫度處理誘導瓶內抽梗，結果顯示培養 6 與 8 個月瓶內小苗以 26℃環境下 22~24 天可誘導出花梗，誘導率皆為 28%，自抽梗至第一朵開花天數為 51~52 天（表 3-9、圖 3-8），但部份下位葉片有黃化，黃化率分別為 8% 與 100%，黃化葉數平均分別為 0.6 與 3.8 片葉，每花梗著花數為 4.6~4.8 朵（表 3-10、圖 3-9）。不同著花位置之花朵壽命不同，以第一朵花壽命最長，為 10~12 天，依序遞減，花梗末端最後著花位置之花朵壽命最短為 2~3 天（表 3-11）。

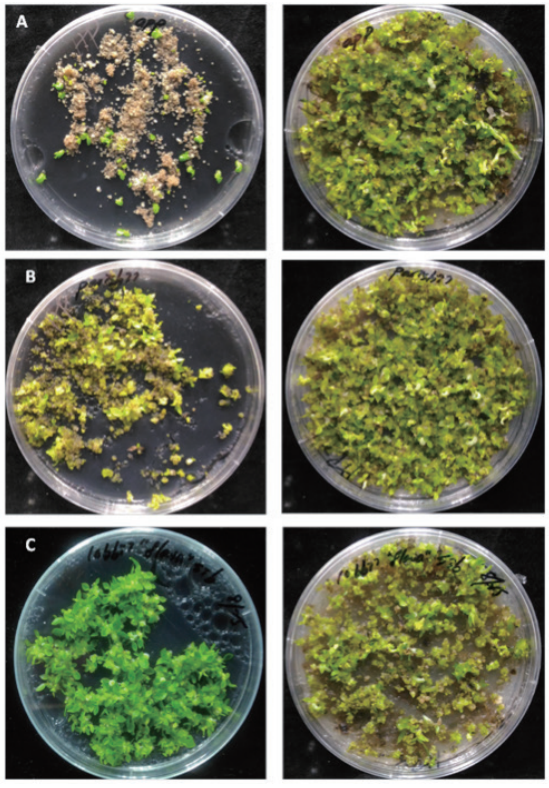


圖 3-7 迷你蝴蝶蘭原生種 (A) *Phal. appendiculata*、(B) *Phal. parishii* 與 (C) *Phal. lobbii* 分別播種於含活性碳 (左側) 與不含活性碳 (右側) 之花寶 1 號基本鹽類培養基種子發芽與生長之情形。

表 3-9 迷你蝴蝶蘭原生種 *Phal. appendiculata* 小苗於 HP 培養基分別培養 4、6、8 個月於 20/15 (日 / 夜溫 ℃)、23/20 (日 / 夜溫 ℃) 和 26℃ 三種溫度處理之花梗發生

培養時間 (月)	花梗發生率 (%)			花梗發生天數	第一朵花天數
	20/15(日 / 夜溫℃)	23/20(日 / 夜溫℃)	26℃		
4	0	0	0 b	-	-
6	0	0	28 a	22.0 ± 0.9	51.0 ± 1.5
0	0	0	28 a	24.4 ± 2.3	52.0 ± 2.0

表 3-10 迷你蝴蝶蘭原生種 *Phal. appendiculata* 小苗於 HP 培養基分別培養 4、6、8 個月於 26℃ 溫度處理之生長與開花情形

培養時間 (月)	葉數	葉長	葉寬	花朵數	梗數	黃葉率 (%)	黃葉數
4	5.8 ± 0.2 b	3.8 ± 0.2 c	1.8 ± 0.1 c	0.0 ± 0.0 b	0 ± 0 b	0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
6	6.4 ± 0.2 b	4.5 ± 0.2 b	2.5 ± 0.1 b	4.8 ± 0.2 a	1 ± 0 a	8 ± 4.9 b	0.6 ± 0.4 b
0	7.8 ± 0.2 a	5.8 ± 0.2 a	2.9 ± 0.1 a	4.6 ± 0.2 a	1 ± 0 a	100 ± 0.0 a	3.8 ± 0.2 a

表 3-11 迷你蝴蝶蘭原生種 *Phal. appendiculata* 小苗於瓶內與瓶外開花花朵壽命之比較

培養環境	不同著花位置花朵壽命 (天)				
	第一朵	第二朵	第三朵	第四朵	第五朵
瓶內	10.6 ± 0.4 a	7.4 ± 0.2 b	5.8 ± 0.4 b	4.2 ± 0.4 b	2.2 ± 0.2 b
瓶外	11.8 ± 0.7 a	11.4 ± 0.6 a	11.0 ± 0.6 a	11.4 ± 0.5 a	10.8 ± 0.6 a

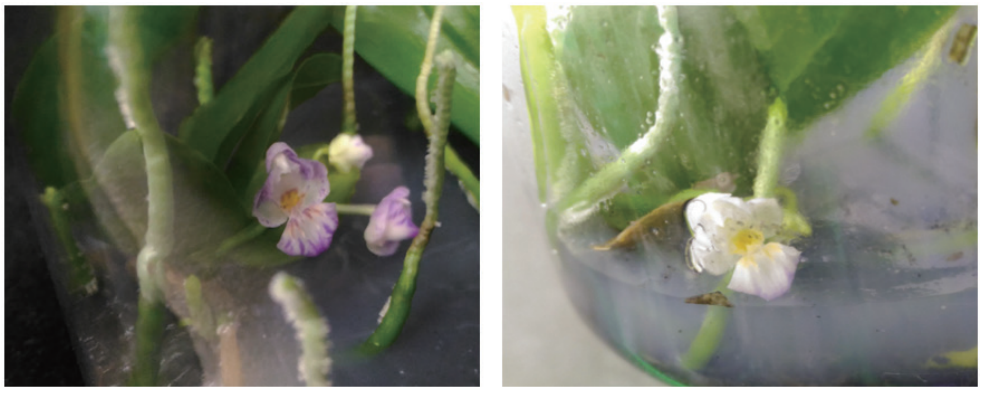


圖 3-8 迷你蝴蝶蘭原生種 *Phal. appendiculata* 培養於含活性碳之花寶 1 號基本鹽類 HP 培養基 6 個月瓶內開花之情形。



圖 3-8 迷你蝴蝶蘭原生種 *Phal. appendiculata* 於含活性碳之花寶 1 號基本鹽類 HP 培養基分別持續培養 4、6、8 個月生長之情形。Bar ＝ 1 cm。

分子遺傳

水稻突變體 AZ1310 白葉枯病抗性基因之研究

白葉枯病是水稻重要病害之一。抗性品種已是防治之最上策，而抗性來源則為主要限制因素。本團隊已完成 SA0423 及 SA0424 水稻突變體抗性基因定位及功能性基因體研究。故擬進行白葉枯病抗性水稻突變體 AZ1310 抗性之遺傳分析、連鎖分子標誌之開發及抗性基因（R）之探討，進而利用分子標誌輔助回交育種法，改良「臺中秈 10 號」的白葉枯病抗性。爰此，先以白葉枯病極感性「臺南 11 號」（TN11）與此突變體雜交後裔族群及強效病原菌分離株（XF89b），進行遺傳分析與數量性狀基因座（QTLs）定位。結果顯示，AZ1310 的抗性是受到顯性 QTL 所調控。QTL 定位結果，發現抗性基因（qBBR11.1）位於 11 號染色體，可以解釋 27.9% 的抗性外表型（圖 3-10）。同時，利用 RNA Seq 分析 IR64、AZ1310 於接種 *Xoo* XF89b 後 0、0.5、1、2、4、6 小時的轉錄體，結果發現有 80 個差異性表現基因，可能參與在 AZ1310 的白葉枯病抗性（圖 3-11）。目前我們正在探討位於 qBBR11.1 區間的差異表現基因。此外，亦利用本研究所開發的分子標誌，將 AZ1310、qBBR11.1 導入「臺中秈 10 號」，經選拔的 BC_2F_1 個體病斑明顯較「臺中秈 10 號」短，顯示 qBBR11.1 確實參與在 AZ1310 的白葉枯病抗性（圖 3-12）。這些研究成果可提供轉譯農學應用之重要材料，闡明 AZ1310 突變體之白葉枯病抗性遺傳基礎，除可直接育成抗性品種外，亦可提供分子標誌或抗性基因，作為今後水稻品種改良之依據。

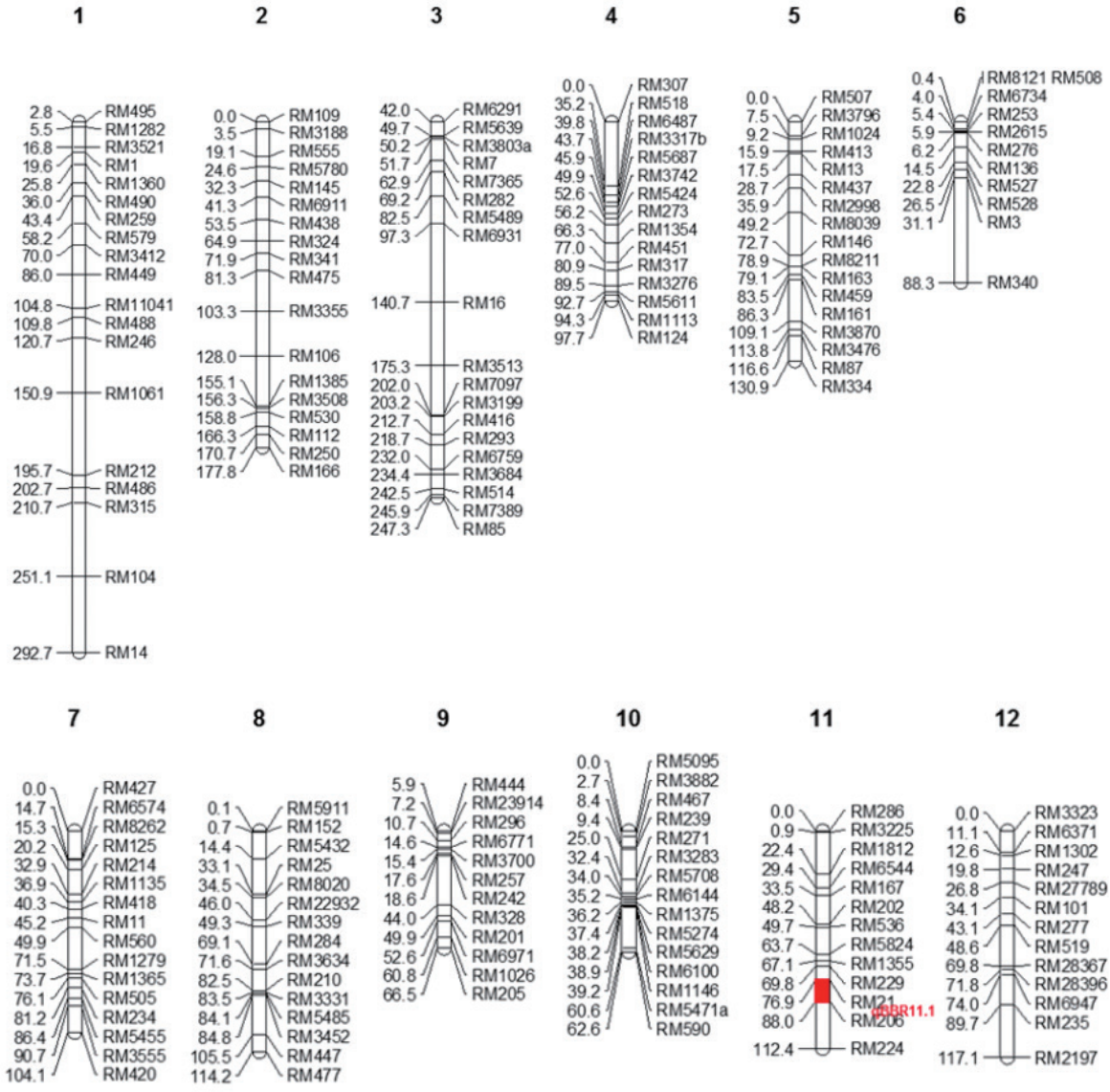


圖 3-10 **AZ1310 突變體白葉枯病抗性基因遺傳圖譜。**

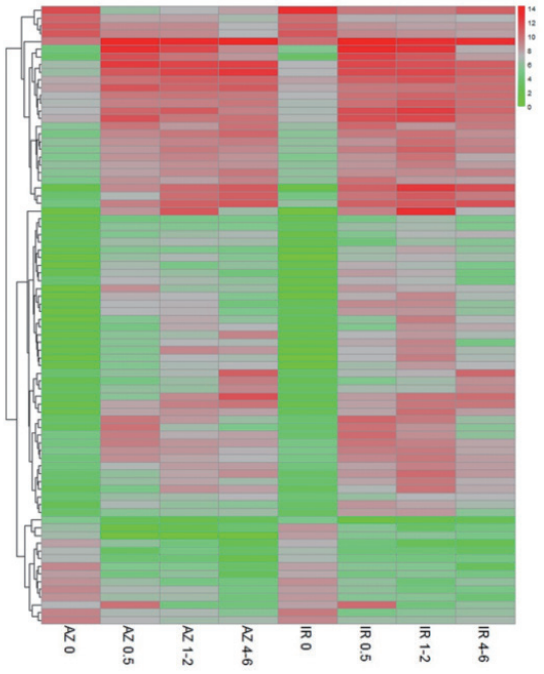


圖 3-11　AZ1310 突變體白葉枯病抗性相關之差異表現基因熱圖。



圖 3-12　AZ1310、BC_2F_1 及「臺中秈 10 號」(TSC10) 於接種白葉枯病菌 (XF89b) 28 天後之病斑長度。

建構異源基因表現之水稻分子農場　本研究旨在驗證水稻基因功能，並積極發展相關之研究。本年度持續將 *pCAMBIA-Ubi-5xGVYPHK*、*pCAMBIA-Ubi-5xPTHIKW*、*pCAMBIA-Ubi-5xVYPHK* 等 T_1 及 T_2 抗高血壓胜肽轉殖系進行同質結合體之篩選與蛋白質表現分析。於 PCR 檢測結果顯示，所篩選之 T_1 及 T_2 轉殖系皆帶有目標基因。進一步利用即時定量逆轉錄 PCR （real time RT PCR）偵測目標基因的表現量（圖 3-13 A），結果顯示轉殖系的目標基因表現量確實高於 TNG67 轉殖系中，隨後挑選其中 6 株目標基因表現量最高的轉殖系，利用西方墨點法偵測蛋白質表現，其中，編號 pCAMBIA-Ubi-5xGVYPHK3.2-3-1 可以看到 72 kDa 明顯訊號（圖 3-13 B），顯示水稻確實可以成功表現抗高血壓胜肽異源蛋白。於秈稻轉殖平台之建立，將醣類來源由 sucrose 改為 maltose，改善癒傷組織褐化的情形，並取得 15 株轉殖系，轉殖效率為 1.6%，經過 PCR 分子檢測，大部分轉殖株可以偵測到 *ZsGFP* 目標基因，顯示醣類來源的更換有助於提高秈稻轉殖成功率。另一方面，以 *CRISPR/Cas9* 基因編輯系統建構抗性澱粉關鍵基因 *sbe3* 載體（圖 3-14 A, B），透過農桿菌媒介轉殖取得 T_0 擬轉殖系，於 *Sbe3 CRISPR/Cas9* 表現系統，取得 6 株轉殖株，轉殖效率為 0.6%（圖 3-14 C），於 *pRGEB32* 載體，取得 14 株轉殖株，轉殖效率為 2.5%，大部分轉殖系皆可偵測到訊號，顯示外來的表現載體已轉殖至水稻細胞之中，未來可探討 *SBE3* 基因於澱粉生合成的路徑所扮演的功能。

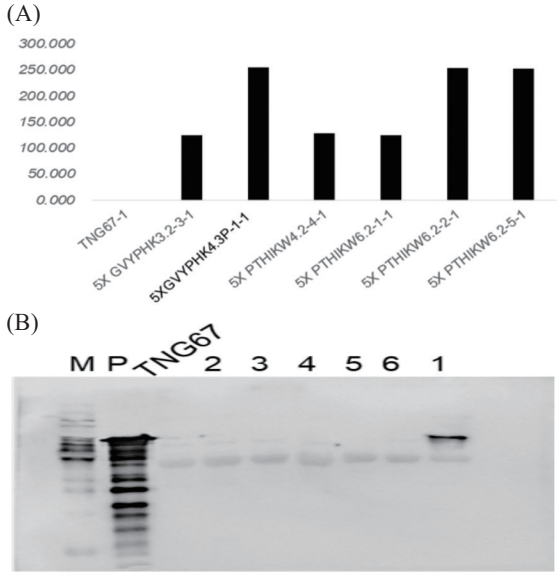


圖 3-13　抗高血壓胜肽 T2 轉殖系轉錄轉譯分析。
(A) pCAMBIA-Ubi-5xGVYPHK、pCAMBIA-Ubi-5xPTHIKW T_2 轉殖系 real-time RT-PCR 檢測
(B) 利用西方墨點法進行 pCAMBIA-Ubi-5xGVYPHK、pCAMBIA-Ubi-5xPTHIKW T_2 轉殖系蛋白質檢測。
P: positive control from CGT::5xACEI/pQG；
1:pCAMBIA-Ubi-5xGVYPHK3.2-3-1；
2: pCAMBIA-Ubi-5xGVYPHK4.3p-1-1；
3: pCAMBIA-Ubi-5xPTHIKW4.2-4-1
4: pCAMBIA-Ubi-5xPTHIKW6.2-1-1；
5: pCAMBIA-Ubi-5xPTHIKW6.2-2-2；
6: pCAMBIA-Ubi-5xPTHIKW6.2-5-1

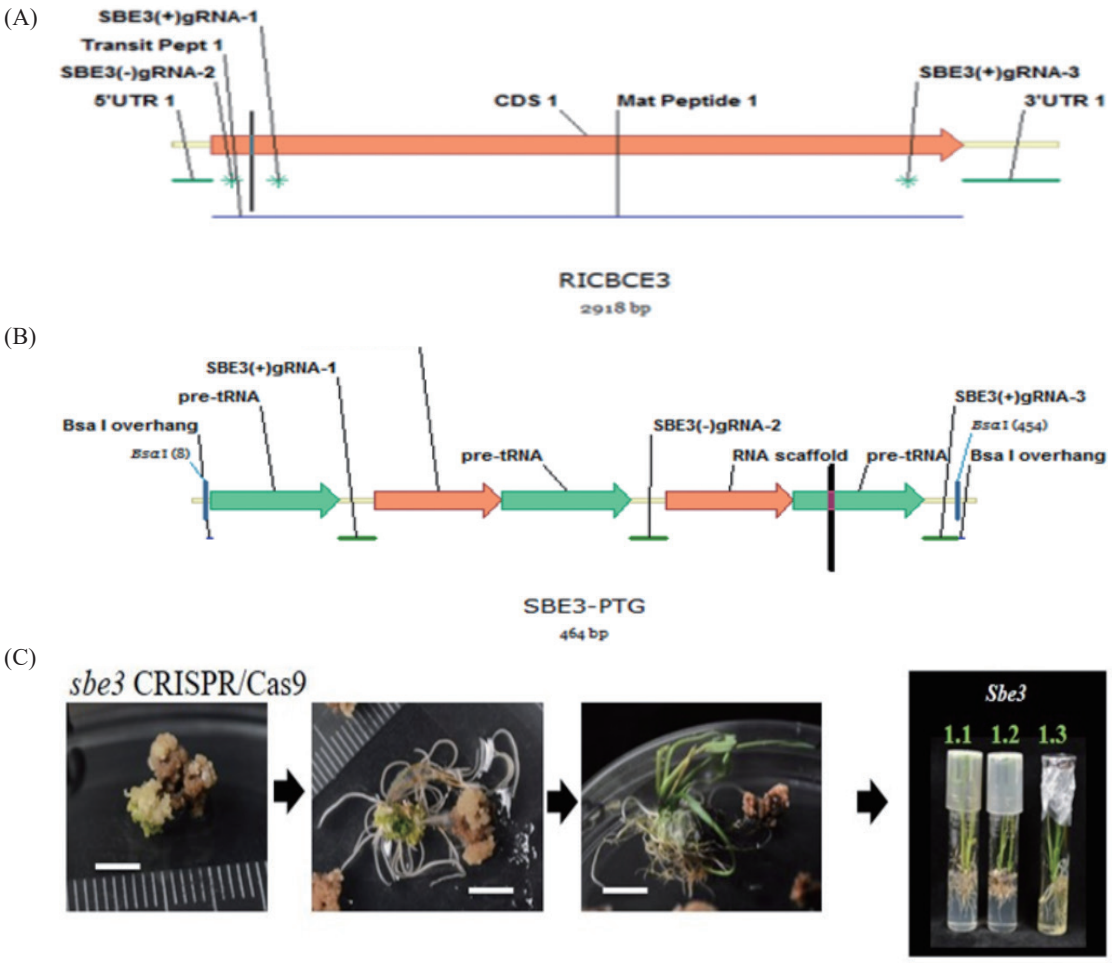


圖 3-14 建構 *sbe3* 之 *CRISPR/Cas9* 刪減表現系統。
(A) *sbe3* cDNA 及 gRNA 設計位置。
(B) *sbe3* 表現載體示意圖。
(C) *sbe3* 載體經轉殖後，於抗生素篩選後之癒傷組織，分化成植株。

甜瓜種原重要抗病性及外表型資訊之開發及應用 甜瓜為世界重要高經濟價值作物，近年來面對品種快速更迭及氣候變遷導致的一連串栽培逆境，有必要建立一系列從種原至育種之完整流程，提升種原利用性並加速育種效率以迅速回應甜瓜市場之所需。因此本計畫包含種原的盤點、外表型調查（多季評估）、抗病性評估、抗病基因驗證、分子標誌輔助回交育種，前兩年度已完成種原盤點、兩季重要園藝特性調查及抗病性評估（白粉病生理小種 1 及矮南瓜黃化嵌紋病毒）。本年度（108）接續先前計畫，持續完善甜瓜核心種原資訊，尤其補足抗病性資訊不足問題，因此針對我國甜瓜重要病害 - 白粉病生理小種 5 及木瓜輪點病毒 - 西瓜型進行抗感性評估，結果顯示 102 個甜瓜核心種原中有 17 個品系對白粉病生理小種 5 具抗性，33 個品系對木瓜輪點病毒 - 西瓜型具抗性，篩選得到之抗性種原將可用於抗性基因之探勘及抗病育種。另外為驗證先前全基因體關聯性分析得到之白粉病生理小種 1 抗性候選基因，本計畫亦建立 F_2 分離族群並進行數量性狀基因座定位（與臺灣大學農藝系合作），結果得到 3 個白粉病抗性基因座（分別位於第 2、5 及 12 條染色體上），明年度將應用此些抗性基因座於分子標誌回交育種，快速將單一或多個抗性基因導入優良甜瓜品系中（圖 3-15）。



圖 3-15 甜瓜白粉病生理小種 1 抗性基因驗證族群 19-C4-F_2 果實外觀及果肉。(A) 母本 (B) 父本 (C) 一代雜交種 (F_1) (D、E) 二代雜交種 (F_2)。

應用二氧化鈰促進電穿孔效率以進行基因轉殖

電穿孔為對細胞施以高電壓脈衝，使細胞膜上短暫出現微小孔洞供外界 DNA 或蛋白質通過。本次選用番椒花粉做為電穿孔試驗材料，並添加交通大學開發之二氧化鈰奈米粒子進行電穿孔試驗。在花粉活性及花粉管萌芽檢測中，添加二氧化鈰並沒有顯著性之影響，顯示二氧化鈰奈米粒子對生物不具有毒性。在電穿孔效率方面，添加二氧化鈰於 500V 電壓處理，可提升電穿孔效率達 70.8%（圖 3-16），且花粉管萌芽率相較對照組並無差異。在添加外源 EGFP DNA 並電穿孔處理後之花粉，經人工授粉至番椒雌蕊，共獲得 278 種子。螢光檢測 278 顆植株根部，共計 4 株具有螢光訊號（圖 3-17），以此計算轉殖率為 1.3%；PCR 檢測外源 EGFP 片段，共 183 株具有外源 DNA 片段，以此估算轉殖率為 65.8%。以此結果顯示，二氧化鈰奈米粒子確實可提高花粉電穿孔效率，並藉此獲得帶有 EGFP 螢光訊號之轉殖系。

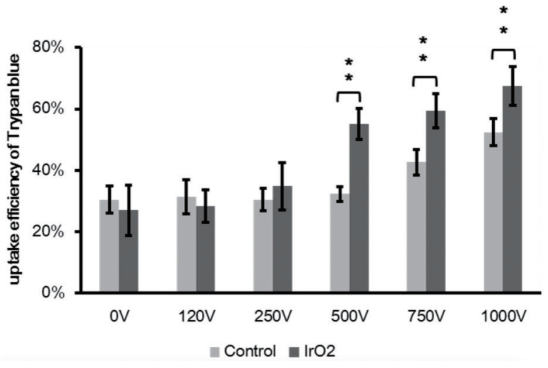


圖 3-16 於不同電壓處理下，Trypan blue 滲入花粉之程度。花粉溶液加入或不加入二氧化銥 (0.1 mg/ml) 後，於不同電壓處理下，計算 Trypan blue 滲透到細胞之比率 (n=6)。

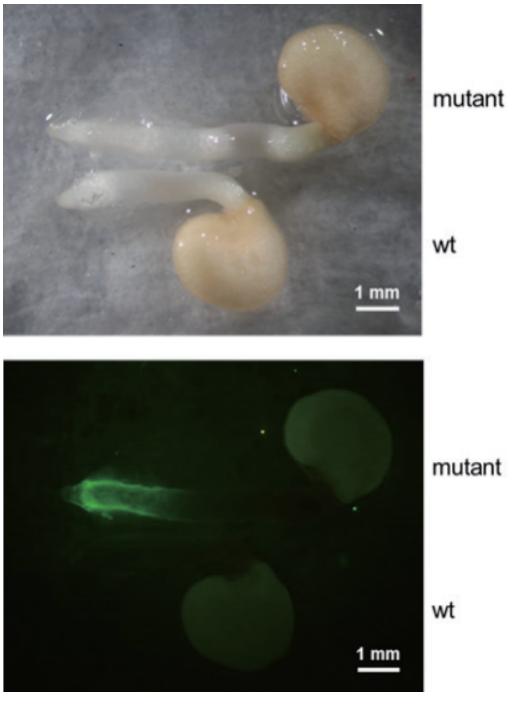


圖 3-17 T_1 轉殖株及正常番椒根部螢光表現圖。番椒種子平鋪於潮濕擦拭紙之培養皿上，於 26℃ 且避光中誘導發芽，約 3~7 日發芽後，利用螢光解剖螢光顯微鏡檢查根部螢光表現情形。

彩色辣椒核心種原之建立與利用 多樣性種原的蒐集與評估有助於提升作物育種效率。種原評估工作包含園藝性狀調查與遺傳背景分析。分子標誌是快速評估種原遺傳歧異性的工具之一，本研究利用分子標誌進行 49 份番椒（*Capsicum* spp.）種原之遺傳歧異性分析，以及辣味、果色與抗病性基因型分析。另進行 34 個園藝性狀調查，包含株高、果實成熟期、果實產量、果色、果形與可溶性固形物等。果實性狀結果，果重範圍 0.7~82 g，單株產量 47~623 g，單株果數 3~115 個，果實可溶性固形物含量（糖度） 4.0~14°Brix；顯示種原間性狀歧異度很大。另合併 20 個 SSR 引子進行 72 樣品（49 收集系）之遺傳歧異度分析結果，可區分為 3 群；其中 *C. annuum* 的遺傳相似度 44.1% 為最低，*C. chinense* 97% 為最高（圖 3-18）。本研究期綜合園藝性狀與分子標誌分析結果，篩選高適應性（耐熱性、抗病性等）並高遺傳歧異度之辣椒種原，以提供育種改良之利用。

生物安全

利用遺傳及遺傳工程方法改善水稻氮利用效率 試驗材料由中研院蔡宜芳研究員提供 5 個水稻轉殖系，轉殖基因為阿拉伯芥中和硝酸鹽轉運相關的蛋白 NRT1.7，其參與在將貯存於老葉的硝酸鹽再運移至新葉，提供給生長中葉片氮。利用不同氮肥施用量調查水稻農藝性狀和產量性狀表現，評估此基因是否能促進水稻植株生長或增進產量。5 個水稻「台農 67 號」NC4N 同質轉殖系（homozygote）和 1 個「台農 67 號」對照組在田間進行肥料試驗，氮肥濃度分別為 60 kg、120 kg 和 240 kg N/ha，各採 3 重複，以 8 行區，每行 8 株的方式種植。試驗結果顯示，Q-5 轉殖系在 120 kg/ha 氮肥的條件下的產量有顯著高於對照組，然而，在其他的氮肥條件下產量也有增加的趨勢，可見 Q-5 的確具有高產潛力。進一步分析 Q-5 和 V-2 中 NC4N 基因表現結果顯示，Q-5 中 NC4N 的表現量較 V-2 中的 NC4N 高，並且在老葉和年輕葉中的表現量差不多，而 NC4N 在 V-2 植株中則在新葉表現比老葉高。5 個 NC4N 轉殖水稻 -Q-5 和 V-2 轉殖系具有高產潛力。

轉殖水稻殘體對土壤微生物之研究 目前基改作物對生態環境安全的影響已有許多研究，基因轉殖技術培育而成的基因轉殖水稻也越來越多，但對土壤微生物群落的研究相對較少，水稻為 1 年生，禾本科植物，是人類的主要糧食作物之一，全球近一半人口以稻米為主要糧食。而基因轉殖水稻是可能影響土壤生態群體結構變化的最大問題之一。植酸主要以植酸鹽的形式存在於穀類、油籽或豆類等植

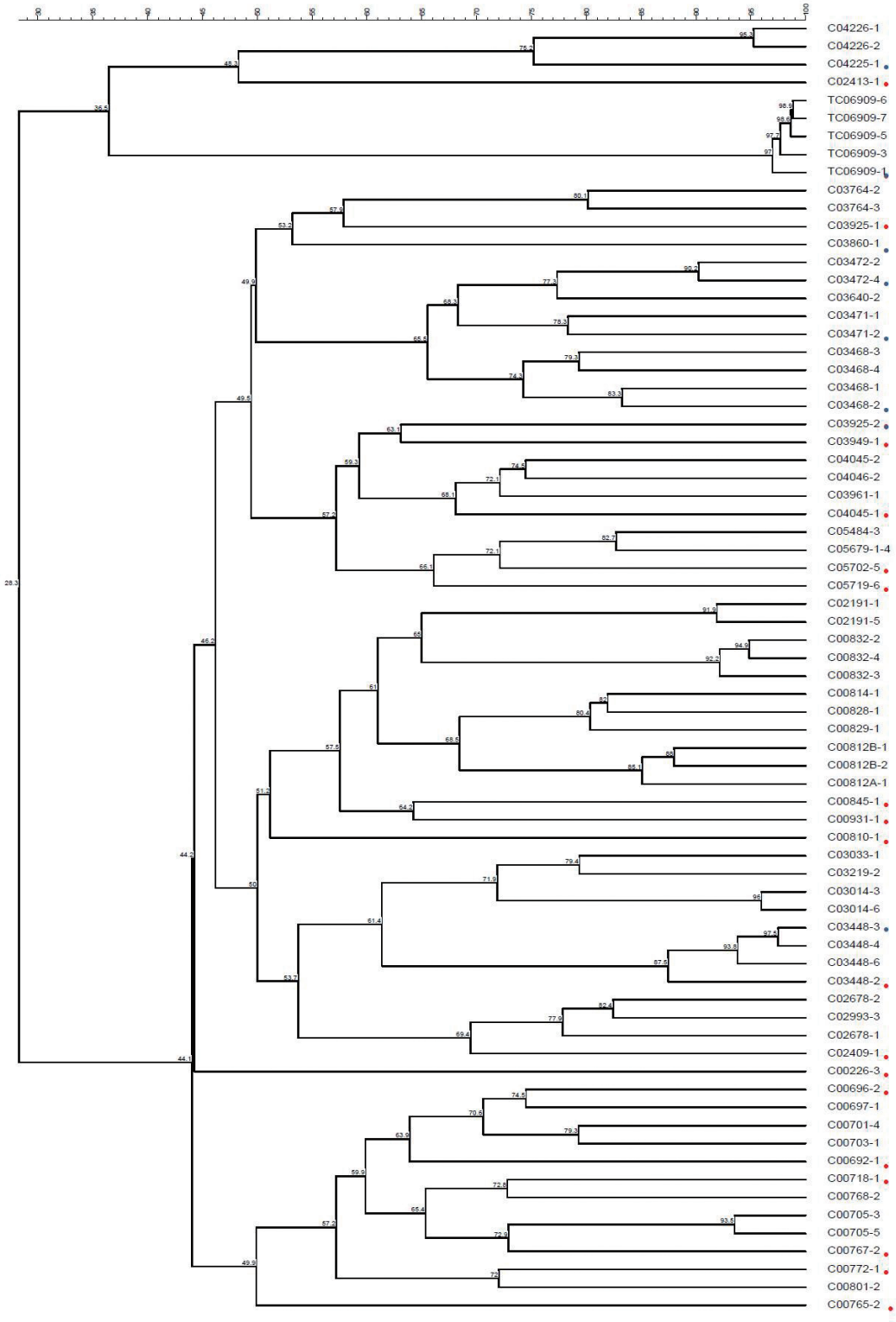


圖 3-18 番椒 72 個種原合併 20 個 SSR 引子以 Nei 和 Li 計算構築之群集樹狀圖。(藍、紅點為分別為抗病、高遺傳歧異度之種原)

物中。哺乳動物、家畜、家禽等單胃動物因腸道中缺乏分解植酸的植酸酶，導致無法將植酸分解。近年來人們將植酸酵素基因轉殖至作物上可改善飼料中動物對磷的消化率，但基改作物對於土壤微生物是否帶來負面影響，仍然是環境風險評估的重點。本研究主要目的為比較轉殖植酸酵素基因水稻與水稻「台農 67 號」品種對其根圈土壤微生物的影響，利用聚合酶連鎖反應暨變性梯度電泳分析對細菌進行調查，根據土壤微生物群落數量分析為指標，被用於轉基因水稻和非轉基因水稻的植物殘留物的堆肥試驗。評估可培養細菌群落的多樣性，並且揭示了土壤中的轉基因引起的顯著改變（表 3-12）。主成分分析中的模式顯示轉基因和非轉基因水稻植物，根據其相關細菌群落的指紋電泳圖譜聚類顯示無顯著性差異（圖 3-19），期望未來可提供生物安全評估之科學依據。

表 3-12 基因轉殖系與非轉殖對照組殘體周邊附著土壤微生物族群數目之比較

Sampling time	細菌數量 Bacteria ($x10^6$/g 土)			真菌數量 Fungi ($x10^2$/g 土)			放線菌 Actinomyces ($x10^4$/g 土)		
	AAN	TNG67	BK	AAN	TNG67	BK	AAN	TNG67	BK
0-Month	4.36±0.06 b	4.55±0.07 ab	4.66±0.06 a	4.94±0.03 ab	4.99±0.05 a	4.82±0.04 b	4.73±0.03 b	4.93±0.05 a	4.67±0.03 b
2-Month	4.10±0.10 b	4.43±0.13 ab	4.76±0.09 a	5.48±0.04 a	5.31±0.06 b	4.73±0.09 c	4.95±0.03 b	5.41±0.03 a	4.79±0.22 b
4-Month	4.56±0.14 ab	2.77±1.39 b	4.65±0.09 a	5.19±0.06 a	5.18±0.02 a	4.62±0.09 b	4.94±0.03 b	5.43±0.05 a	4.89±0.06 b
6-Month	5.34±0.06 b	5.66±0.03 a	5.01±0.05 c	5.36±0.05 a	5.24±0.05 a	4.97±0.04 b	5.28±0.01 b	5.47±0.02 a	5.11±0.05 c
8-Month	5.08±0.07 b	5.42±0.04 a	4.86±0.05 b	5.14±0.08 a	5.01±0.04 a	4.50±0.10 b	5.69±0.03 a	5.32±0.05 b	5.00±0.07 c
10-Month	5.19±0.06 a	5.27±0.06 a	4.89±0.06 b	5.08±0.04 a	4.99±0.05 a	4.40±0.10 b	5.63±0.03 a	5.49±0.02 b	4.95±0.06 c
1-Year	5.10±0.01 b	5.20±0.02 a	4.20±0.10 c	4.36±0.06 b	5.10±0.09 a	4.74±0.07 b	4.81±0.13 ab	4.98±0.10 a	4.40±0.10 b

表中數據為試驗三重覆取 log10 之平均值 ± 標準差。

同列數據之不同小寫字母表示在 $P < 0.05$ 上差異顯著。

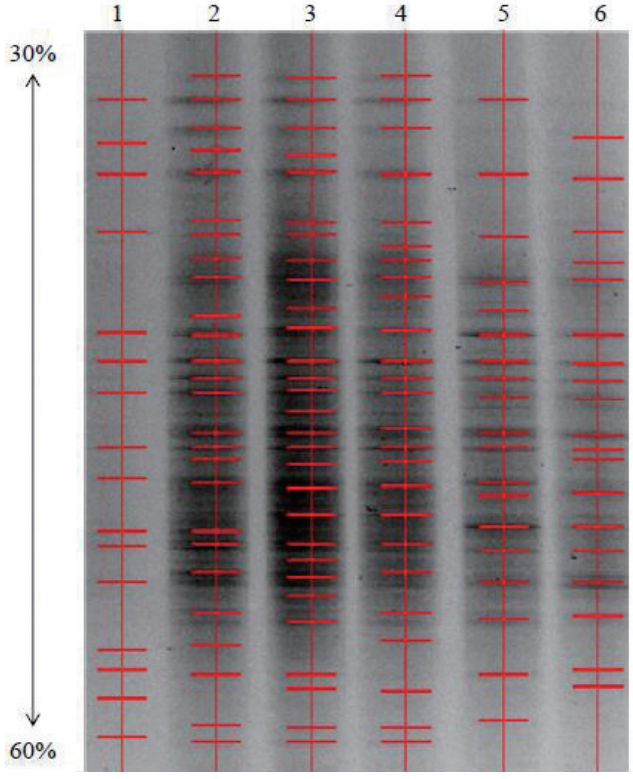


圖 3-19 AAN 轉殖系與「台農 67 號」水稻殘體周邊附著土壤微生物生物群以 DGGE 分析圖譜。

建立基改馬鈴薯及黃豆之多重 PCR 檢測技術 因應基改作物管理政策之發展，須建立高效率檢測技術以滿足基改安全管理技術需求。為簡化檢測技術流程及有效初步篩選基改轉殖品項，本試驗以多重 PCR 檢測技術，分別檢測不同基改馬鈴薯及黃豆轉殖品項。以 EH92-527-1、AM04-1020 及 2-1 等 3 種基改馬鈴薯品項個別之專一性序列（event-specific sequence）及物種專一性（taxon-specific）基因內生性尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（UDP-glucose pyrophosphorylase, *UGPase*）序列為檢測目標，結果顯示經多重 PCR 反應可正確增幅出目標片段，且 2 或 3 個不同轉殖品項之 DNA 樣本亦能檢出專一性目標片段（圖 3-20）。此方法檢測之最低檢測極限（limit of detection, LOD）可達 0.5%，另外可配合簡易快速萃取方法及毛細管電泳，大幅縮減檢測流程所耗時間、人力成本。基改黃豆檢測目標則根據公告之基改檢測方法，共挑選 9 個適合的基因元件（gene element）做引子設計，包括 2 種啟動子（P35S, P-FMV）、4 種插入基因（Pat, CP4-EPSPS, OTP-mEPSPS, cry1Ab）、3 種終止子（T-nos, T-E9, T-AHASL），以及 1 個轉殖品項 DP-305423-1 之專一性序列。將引子對分成 Set A 與 Set B 兩套引子組，經多重 PCR 反應後可成功辨識個別單一轉殖品系條帶位置。以未知來源黃豆樣品為試驗材料，目前檢測靈敏度可達 99.03%，專一性則為 100%（圖 3-21）。以上結果期望能應用於不同基改作物檢測技術開發，以利快速且正確地判斷可能的基改作物轉殖品項，供建立基改作物快速檢測流程與轉殖品項檢驗方法之參考。

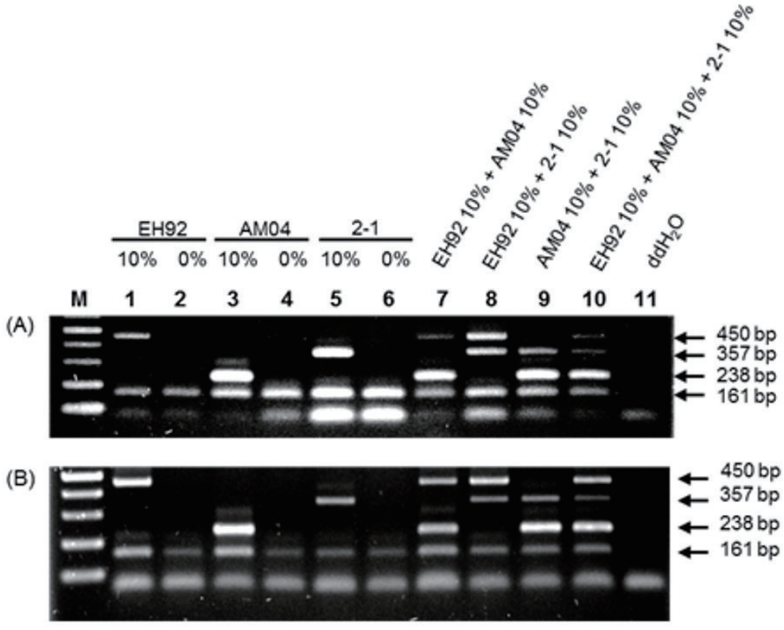


圖 3-20 **以商品化套組 (A) 及快速萃取 DNA 方法 (B) 配合多重 PCR 檢測電泳圖。**

		GM soy samples		
		True GM	Non GM	
Result	Positive	306	0	PPV = 100 %
	Negative	3	30	NPV = 90.9 %
		Sn = 99.03 %	Sp = 100 %	

圖 3-21 **評估多重 PCR 方法用於檢測基改黃豆轉殖品系。檢定結果以 Sn、Sp、PPV 與 NPV 做為評估參數。**

作物機能

印加果種子發芽試驗 星果藤（*Plukenetia volubilis*）為大戟科多年生木質藤本植物，原生於南美洲安地斯山脈低海拔熱帶雨林，果實為蒴果、星形，當地原住民食用歷史已有三千多年，由印加民族馴化種植，印加語稱為 Sacha Inchi，果實俗稱「印加果」，種子則為「印加花生」，含油量可達 50%，ω3 脂肪酸約佔 50%，極富營養價值。臺灣於民國 103 年起陸續有農民種植，目前從屏東地區向北延伸至臺中均可種植，當年種植即可結果，目前全臺栽培面積超過 300 公頃。印加果種子屬異儲型，不耐低溫與乾燥保存，相對於正儲型種子，其壽命也較短。初步進行種子發芽率試驗，採用溫湯（40℃）處理浸種（50 粒種子）24 小時是為對照組，加入刻傷處理作為試驗組（50 粒種子）。種子處理後插入栽培介質（珍珠石:蛭石:泥炭土以 3:3:2 比例調配）中，約沒入 2/3 種子體積，並於表面覆蓋蛭石（注意透氣性、避免發霉）；發芽表現是以播種後第一對子葉展開作為標準（圖 3-22）。種子刻傷處理方式，是在種子兩端種皮較厚處進行，以避免傷及種仁（由於種子油脂、蛋白質含量高，種仁若受傷容易引發感染）。試驗結果（圖 3-23）：刻傷處理組發芽率明顯較快，18 天後發芽率為 40%，對照組發芽較慢，於第 25 天時發芽率為 78%，此時對照組為 62%，最後試驗結束時兩者發芽率都接近 90% 以上。

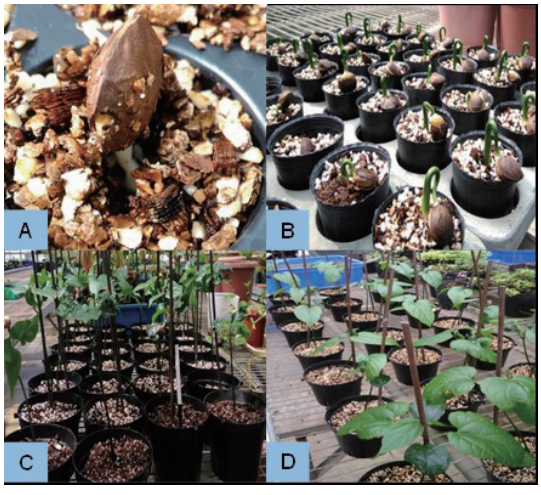


圖 3-22 A：撥種後第七天開始發根。B：撥種後第十三天。C：第一對子葉展開後換大盆，可手動剝除附著的種皮。D：進入迅速生長期，可架設竹竿或是利於藤蔓攀爬的裝置。

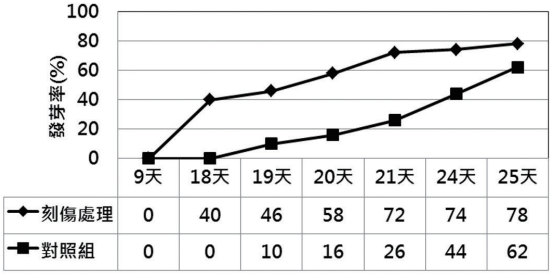


圖 3-23 印加果種子發芽試驗。對照組為溫湯 (40℃) 處理浸種 24 小時，試驗組增加刻傷處理。發芽表現是以播種後第一對子葉展開作為標準。

國產大豆營養評估及機能產品開發 本研究開發「全大豆醱酵製作天貝技術」，在製作天貝的過程中不需去除種皮，有別於傳統方法需先將大豆脫除種皮。利用色差儀分析技術，將天貝表面白色菌絲體量化，使用亮度（L 值）作為指標， L 值高表示天貝表面白色程度高，顯示菌絲分布較緻密、發酵較為成功； L 值低，表示菌絲生長較鬆散、發酵完成度較差。去皮對照組是傳統方式發酵之天貝，全豆對照組為以傳統方式發酵，僅將發酵基質替換成無脫除種皮之全豆大豆，試驗組則為本研究開發的全豆發酵技術。所有發酵反應皆於 36℃ 環境進行 24 小時。試驗結果顯示全豆發酵技術之天貝 L 值最高，達到 74.7，其次為去皮對照組 68.2，全豆對照組之 L 值最低，大約為 63.4（圖 3-24）。

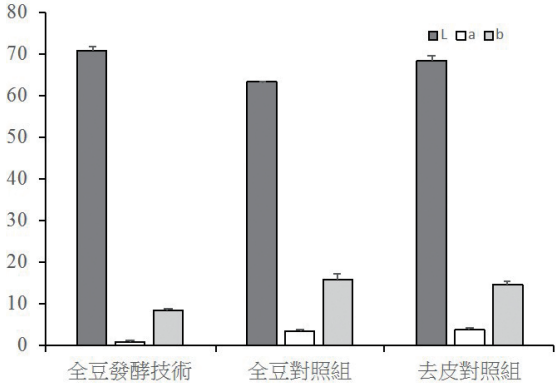


圖 3-24 以色差儀分析大豆天貝發酵程度，發酵方法分別為本研究開發之全豆發酵技術 (左)、去皮對照組為傳統方式發酵之天貝 (右)，全豆對照組為傳統方式發酵，僅將發酵基質替換成無脫除種皮之全豆大豆 (中)。

龍眼花紓壓功效之研究 長期的壓力及焦慮會誘發壓力荷爾蒙的分泌，對身心皆有不良的影響。與靜宜大學及臺中榮總合作，利用電腦分子結構模擬發現龍眼花含有具抗憂鬱潛力之天然小分子，並利用動物行為學模式驗證龍眼花萃取物可減輕小鼠之焦慮程度。曠野實驗是評估焦慮的程度，嚙齒類動物在焦慮時有遠離空曠區域的傾向，若小鼠在場地中央部分的次數增加，表示焦慮程度較低；此外，小鼠在箱中的總移動距離越長，代表活動力較高。結果顯示餵食龍眼花萃取物的小鼠，在中央區的次數及移動總時間皆有顯著的提高（圖 3-25），顯示小鼠有焦慮減輕的現象並且活動力增加。明暗箱試驗是利用嚙齒類動物對明亮燈光具有迴避本能之特性，觀察小鼠在一相連之明箱及暗箱間之活動及停留傾向。若小鼠傾向在明箱中活動，則表示焦慮程度較低。實驗結果顯示，餵食龍眼花萃取物的小鼠進入明箱的次數有顯著提升，在明箱中的停留時間亦有提升之趨勢（圖 3-26）。生化分析顯示，小鼠餵食龍眼花萃取物後，血液中之血清素及多巴胺含量皆有顯著提升，顯示龍眼花萃取物可能可促進血清素及多巴胺之分泌，且提升效果高於注射抗憂鬱藥物 Imipramine（圖 3-27）。此研究顯示龍眼花具有紓壓安神的效果，可開發為紓壓飲品為民眾提供日常生活紓緩壓力的新選擇。

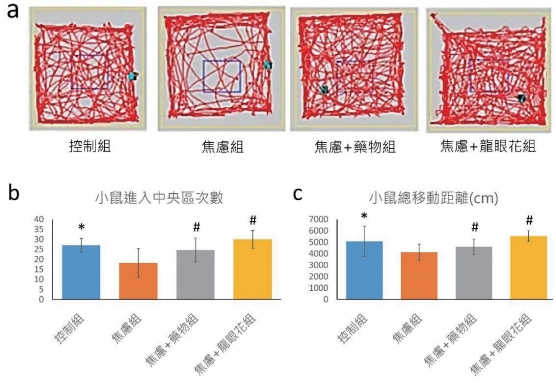


圖 3-25 **曠野實驗結果顯示小鼠餵食龍眼花萃取物後有焦慮減輕的現象並且活動力增加。(a) 小鼠在箱體中之移動軌跡；(b) 小鼠進入箱體中央區之次數；(c) 小鼠在箱體中之總移動距離。**

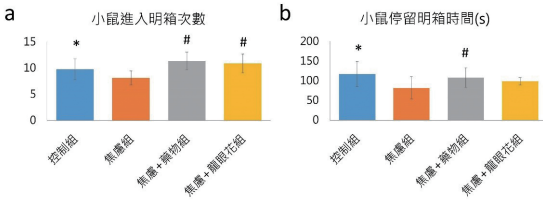


圖 3-26 **明暗箱實驗結果顯示小鼠餵食龍眼花萃取物後有焦慮減輕的現象。(a) 小鼠進入明箱之次數；(b) 小鼠停留於明箱之時間。**

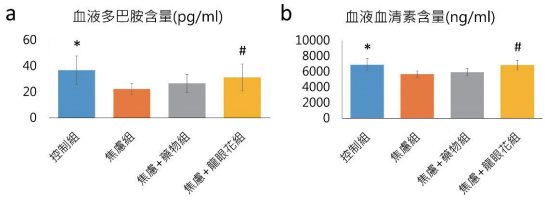


圖 3-27 **小鼠餵食龍眼花萃取物可增加血液中多巴胺及血清素之含量。(a) 不同組別小鼠血清之多巴胺含量；(b) 不同組別小鼠血清之血清素含量。**