

生物技術 研究室



摘要

仙履蘭(*Paphiopedilum*)為芭菲爾鞋蘭屬植物的俗稱，仙履蘭花型奇特，色彩艷麗，花期長，是台灣繼蝴蝶蘭之後另一極具潛力蘭花作物之一，如何以客觀且有效率的品種鑑定系統勢必為將來的重要課題。本研究初期以43組分子標誌，針對仙履蘭之 *Paph. armeniacum*、*Paph. rothschildianum*、*Paph. delenatii*、*Paph. wardii* 以及 *Paph. S Gratrix* 進行多型性分析，初步實驗獲得五組具多型性分子標誌；另以 *Maudiea-type* 之原生物種親本之一的 *Paphiopedilum wardii* 進行 Roche/454 GS FLX sequencing 分析，目前初步獲得19,223筆定序片段，共可設計79組SSR分子標誌，目前正以自業界蒐集而來的13組 *Maudiea-type* 雜交品系與8組芭菲爾鞋蘭原生種進行多型性分析。建立仙履蘭開花調控路徑之基礎研究，作為建立仙履蘭開花栽培管理技術之依據，結果指出特定光週與日/夜溫處理16週後對2個商業栽培品種有40%以上的催花效果，另以分子層次進行開花調控路徑之探討，利用基因保守區域設計仙履蘭開花時間基因之退化性引子(degenerated primers)，進行序列終端快速放大(rapid amplification of

cDNA ends, RACE)技術及RT-PCR方式，得到與蝴蝶蘭、石斛蘭等已知蘭科物種序列高度相似的三個開花基因。以共顯性SSR分子標誌對台灣蝴蝶蘭與毛豆進行品種指紋圖譜建立，用於保護台灣育種家權利。經測試，獲得24組穩定且具多型性之SSR分子標誌，足以檢測目前從業界所蒐集獲得之19個蝴蝶蘭商業品種；13組穩定且具多型性之SSR分子標誌，足以檢測目前11個台灣毛豆品種與2個日本毛豆品種。藉由參訪加拿大Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC)位於Saskatoon與Ottawa的研究中心、Ottawa的農業部與我國駐加拿大台北經濟文化代表處等，進行基因轉殖作物檢測與生物安全等相關內容研習，提出基因轉殖作物、傳統農業非基因轉殖作物甚至有機栽培作物的共存制度，以促使基因轉殖農業能與傳統農業永續共存。

仙履蘭品種鑑定與分子標誌之開發

仙履蘭(*Paphiopedilum*)為芭菲爾鞋蘭屬植物的俗稱，1997年英國學者Dr. Phillip Cribb將芭菲爾鞋蘭屬植物分為三亞屬：硬葉尖瓣亞(*Parvisepalum*)、短



↑多型性分析所使用之仙履蘭品系

梗亞屬(*Brachypetalum*)與芭菲爾亞屬(*Paphiopedilum*)，其中芭菲爾亞屬再細分為五個亞型：多花型、紅瓣多花型、單花型、序花型與標準型。仙履蘭花型奇特，色彩艷麗，花期長，是台灣繼蝴蝶蘭之後另一極具潛力蘭花作物之一。台灣培育仙履蘭近30年的歷史，其主要著重於商業栽培品系Maudiea-type hybrids (為單花型親本雜交)與Standard complex type hybrids (為標準型親本雜交)後代為主。至今，世上雜交所育成的仙履蘭品系更達兩萬餘種，如何以客觀且有效率的品種鑑定系統勢必為將來的重要課題。本研究初期以NCBI database 所公佈之芭菲爾鞋蘭屬EST序列進行SSR序列搜尋，並設計19組SSR分子標誌，此外並蒐集前人研究 (Rodrigues and Kumar, 2009) 所公佈之24組芭菲爾鞋蘭屬之 SSR分子標誌，合計43組分子標誌，針對仙履蘭之*Paph. armeniacum*、*Paph. rothschildianum*、*Paph. delenatii*、*Paph. wardii* 以及 *Paph. S Gratrix* 進行多型性分析，初步實驗獲得五組具多型性分子標誌；然而此43組分子標誌所設計之基因背景為多花型品系，故此五組分子標誌於主要商業栽培品系Maudiea-type hybrids與Standard complex-type hybrids雜交後代中表現並不穩定，因此，本研究於2010年8月以Maudiea-type之原生物種親本之

一的*Paphiopedilum wardii*進行Roche/454 GS FLX sequencing 分析，目前初步獲得19,223筆定序片段，共可設計79組SSR分子標誌，目前正以自業界蒐集而來的13組Maudiea-type雜交品系與8組芭菲爾鞋蘭原生種進行多型性分析。

仙履蘭產期調節技術之開發

仙履蘭產業發展上面臨的一個問題是不同品種的幼年期差異很大，出瓶苗長至成株開花，需二至五、六年以上不等，使得植株單價高，造成推廣不易而影響其普遍性。因此建立仙履蘭開花調控路徑之基礎研究，作為建立仙履蘭開花栽培管理技術之依據，將有助於仙履蘭產期調節，擴展仙履蘭的商業價值。芭菲爾鞋蘭亞屬的葉片型態可區分為綠葉種與斑葉種兩類，綠葉種大多喜好較高光環境(600 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 3000 f.c.)，斑葉種大多喜好較低光環境(200-400 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 1000~2000 f.c.)，營養生長適溫為日溫25-30 $^{\circ}\text{C}$ ，夜溫18-22 $^{\circ}\text{C}$ 。然而某些在2-5月開花的斑葉品種則需要經由低溫刺激而開花。由前人產期調節研究得知，光週與溫度是蘭科作物的開花調控重要因子。本研究希望藉由光週及溫度等栽培環境因子，尋找仙履蘭最佳開花栽培模式。本年度的研究是以不同栽培條件(2光週期 \times 4種日夜溫組合)針對4種芭菲爾鞋蘭屬商業栽培品種進行初步試驗，結果指出特定光週與日/夜溫處理16週後對2個商業栽培品種有40%以上的催花效果。同時嘗試以分子層次進行開花調控路徑之探討，根據NCBI網站中植物之完整開花時間基因之登錄序列，利用基因保守區域設計仙履蘭開花時間基因之退化性引子(degenerated primers)，進行序列終端快速放大(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技術及RT-PCR方式，得到與蝴蝶

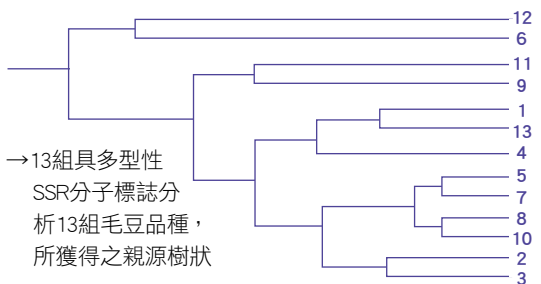
蘭、石斛蘭等已知蘭科物種序列高度相似的三個開花基因。由已獲得的仙履蘭開花基因進行不同組織部位之表現量分析，在花朵與葉片部位均有表現。後續研究將利用已獲得的仙履蘭開花基因測試相關處理栽培生理調控試驗，藉由這些調控基因之mRNA的表現量找出與仙履蘭開花之間的關連性，建立仙履蘭常見栽培品系之催花與抑花之初步栽培條件。

蝴蝶蘭與毛豆分子標誌品種鑑定

本試驗主要目的為以共顯性SSR分子標誌對台灣蝴蝶蘭與毛豆進行品種指紋圖譜建立，用於保護台灣育種家權利。本研究分別針對蝴蝶蘭與毛豆進行分析。

(一)蝴蝶蘭SSR分子標誌之開發與DNA指紋圖譜建立: 由NCBI database中搜尋獲得96組EST-SSR分子標誌，先經9個商業紅花蝴蝶蘭品種多型性分析後，共獲得24組穩定且具多型性之SSR分子標誌。經測試，此24組分子標誌足以檢測目前從業界所蒐集獲得之19個蝴蝶蘭商業品種。

(二)毛豆SSR分子標誌之開發與DNA指紋圖譜建立: 由NCBI database中搜尋獲得75組EST-SSR分子標誌，經13個毛豆品種多型性分析後，共獲得13組穩定且具多型性之SSR分子標誌。經測試，此13組分子標誌足以檢測目前11個台灣毛豆品種與2個日本毛豆品種。



研習植物品種保護與鑑定技術及GMO作物檢定技術

近幾年來受到氣候變遷之影響，國際糧價飆漲，逐漸暴露糧食之危機；基因轉殖作物針對特定基因改造，提高生產力及品質之優點，漸漸受到肯定，因此基於消費者與農民種植樣態的選擇權利，部分國家針對基因轉殖作物如何與傳統農業共同存在，提出基因轉殖作物、傳統農業非基因轉殖作物甚至有機栽培作物的共存制度，以促使基因轉殖農業能與傳統農業永續共存。

透過農委會國際處於99年3月25日安排加拿大農業部國際科技合作局周堅強副局長至種苗場參訪，並討論至加拿大進行基因轉殖作物檢測與生物安全等相關內容研習與參訪事宜。研習參訪單位為加拿大Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC)位於Saskatoon與Ottawa的研究中心、Ottawa的農業部與我國駐加拿大台北經濟文化代表處等，日期為9月11日至20日共10天，本次團員包括中興大學農藝系郭寶錚教授、臺南區農業改良場楊藹華研究員、農試所鳳山分所李文立主任、種苗改良繁殖場沈翰祖副研究員等，並由團員共推郭寶錚教授為團長。目的為與加拿大AAFC 研究人員進行基因轉殖作物檢測、作物種源鑑定與

生物安全科技交流。與加拿大農業部達成未來基因轉殖作物檢測與生物安全等科技人員互訪、我國派農業科系博士班或博士後研究生至加拿大進行相關科技研究等共識。我國駐加拿大台北經濟文化代表處科技組亦同意協助未來台加合作事宜。



↑將基因轉殖油菜葉片樣品置於保存DNA用的FTA Card中央圓圈範圍內