

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系



碩士論文

Department of Agronomy
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

SIMYB94 轉殖基因對番茄花器長度的影響評估
Assessing Effect of the Transgenic *SIMYB94* Allele
on Floral Organ Length in Tomato

陳品堯

Pin-Yao Chen

指導教授：陳凱儀 博士

Advisor: Kai-Yi Chen, Ph.D.

中華民國 106 年 9 月

September, 2017

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書



SIMYB94 轉殖基因對番茄花器長度的影響評估

Assessing Effect of the Transgenic *SIMYB94* Allele on
Floral Organ Length in Tomato

本論文係陳品堯君(R04621121)在國立臺灣大學農藝所
完成之碩士學位論文，於民國 106 年 9 月 22 日承下列考試
委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

陳凱儀 老師

陳凱儀

董致韡 老師

董致韡

蔡育彰 老師

蔡育彰

蔡欣甫 老師

蔡欣甫

系主任、所長

林齊堯

(簽名)

誌謝



時光飛逝，兩年的碩士生涯一眨眼就過了。回想兩年前的我，剛踏入實驗室，笨手笨腳地抽取番茄葉片 DNA，然後失敗；跑電泳跑了一小時照膠後，才發現沒開電泳槽電源；在實驗的過程中不斷嘗試錯誤，一直到今天，能夠在這裡展現成果。感謝陳凱儀老師從大學專討開始一直到現在的指導，告訴我進行科學研究應該有的態度，雖然實驗的過程並不是一帆風順，但老師總會和我一起討論、思考解決問題的辦法，替我出謀劃策，然後我再帶著成功的實驗結果回來和老師分享喜悅。感謝董致韡老師，對我的實驗方法、架構疏漏之處提出改進方案；感謝蔡育彰老師，提醒我轉殖構築應該註明的事項；感謝蔡欣甫老師，對於統計方法、資料表現格式給予的建議。感謝林亞平學姊，在我對未來的研究計畫感到迷茫的時候，能夠給我方向，親自帶我做實驗，不厭其煩的回答我的問題，使我確立了研究計畫。感謝台南場的王聖善學長，在忙於自己的研究之餘，還撥空幫我檢討實驗的缺失，並親自帶我做實驗，並給我許多寶貴的實驗經驗、建議。感謝番茄育種領域研究的前輩們，有你們的努力不懈，我才能站在巨人的肩上觀覽科學世界。

感謝實驗室的大家，竹茵學姊和祐雅學姊雖然在我進實驗室不久之後，就離開實驗室，但對於當時實驗還不熟悉的我來說，兩位學姊就像救火隊一般，能在我出錯之前即時發現，並給我建議。感謝易整學長、兆平學長、瑋倫學姊還有依臻同學，在這兩年的時間內，易整學長總是在我最需要的時候伸出援手，許多體力活學長都義不容辭地一手接下；兆平學長在統計和程式語言上替我解答；瑋倫學姊分享許多選修課程和考試的經驗；依臻同學在我的實驗還有論文寫作上都給了許多的幫助。和你們一起度過的時間，一起創造的回憶，我永遠不會忘記！感謝昱富學弟、繼勤學弟，在我因為陪伴家人住院無法來照顧材料的時候，默默地扛起責任，幫我照顧實驗材料，當我焦急地從醫院趕到人候室的時候，發現盆栽的土還很濕潤！

感謝我所種下的番茄們，當你們挺過病魔、撐過銀葉粉蝨、經過農藥洗禮，重新開花結果，我的眼淚都快掉下來了。

感謝我的父母，沒有你們，我的人生無法爬到如此的高度、看到這樣的風景。

陳品堯 謹識於 國立台灣大學 農藝系

中華民國一零七年九月二十二日

中文摘要



番茄的 *se2.1* 數量性狀基因座為複合式數量性狀基因座，包含 *style2.1*、*stamen2.1*、*stamen2.2*、*stamen2.3*、以及 *dehiscence2.1*，其中的 *stamen2.2* 的候選基因定位在番茄第二對染色體上 cLED19A24 至 CT9 分子標記區間內。本研究選擇位於此染色體區間內的 *SIMYB94* 基因為 *stamen2.2* 的候選基因，並藉由基因轉殖的方式，觀察 *SIMYB94* 對偶基因數目的增加，是否造成番茄雄蕊與雌蕊長度的改變。轉殖植株的初步篩選是採用 CaMV 35S 分子標記和番茄背景分子標記對轉殖 T_0 世代植株進行篩選， T_1 自交世代個別植株的基因型則藉由焦磷酸定序 (pyrosequencing) 所偵測轉殖對偶基因型與背景對偶基因型之單核苷多型性的比例推算而得。試驗結果顯示 T_0 世代轉殖株「中研院 2-9」成功轉殖單一 *SIMYB94* 對偶基因，然而在其自交世代 16TS357 族群中，帶有不同數目轉殖對偶基因植株之間的雄蕊與雌蕊長度並沒有顯著的差異。由此結果推論 *SIMYB94* 並非 *stamen2.2* 基因。

關鍵字：番茄、*se2.1*、*stamen2.2*、MYB、焦磷酸定序、雄蕊長

ABSTRACT



The tomato *se2.1* is a composite quantitative trait locus, including *style2.1*, *stamen2.1*, *stamen2.2*, *stamen2.3*, and *dehiscence2.1*. The *stamen2.2* was delimited between molecular markers cLED19A24 and CT9 on the chromosome 2. In the current study, the *SIMYB94* gene is one of genes residing in the aforementioned chromosomal region and was chosen as the candidate gene of *stamen2.2*. The correlation between the *SIMYB94* copy number and the changes of stamen and style length were observed via the gene transformation approach. CaMV 35S marker and genetic background marker were used to identify successful transgenic plants in the T_0 generation. In the T_1 generation, pyrosequencing was used to detect the proportion of single nucleotide polymorphism between the transformed allele and the background allele, and hence to infer genotypes of T_1 plants. The results showed that the “sinica2-9” T_0 plant successfully received a single copy of the *SIMYB94* transgenic allele but its T_1 progenies, the 16TS357 population, did not show significant difference on style length and stamen length between individuals carrying different copy number of the *SIMYB94* transgenic alleles. This conclusion infers that the *SIMYB94* gene is not *stamen2.2*.

Key words: tomato, *se2.1*, *stamen2.2*, MYB, pyrosequencing, stamen length

目錄

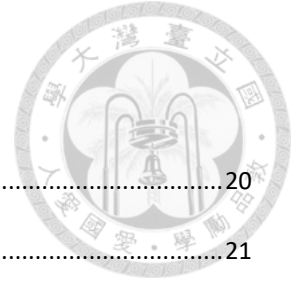


口試委員會審定書	#
誌謝	i
中文摘要	ii
ABSTRACT	iii
目錄	iv
圖目錄	vi
表目錄	vii
第一章 前言	1
第一節 <i>Style 2.1</i> 與 <i>Stamen 2.2</i> 的候選基因 <i>MYB94</i>	1
第二節 影響番茄花器長度的基因及轉錄因子 <i>MYB</i>	3
第二章 研究目的	4
第三章 材料與方法	5
第一節 試驗材料	5
第二節 抽取番茄基因體 DNA	8
第三節 DNA 純化	10
第四節 清洗種子及乾燥保存	11
第五節 初步確認轉殖是否成功及轉殖背景的分離標記	11
第六節 焦磷酸定序(pyrosequencing)	14
第七節 雌蕊及雄蕊長度調查	16
第八節 統計分析	16

第四章	結果.....	18
第一節	轉殖世代 T0 之轉殖與背景檢測及自交後代 T1	18
第二節	轉殖自交後代 T1 花器長度之測量.....	25
第三節	焦磷酸定序結果.....	27
第四節	基因型分析.....	32
第五章	討論.....	38
第一節	35S 分子標記與焦磷酸定序結果不完全相同.....	38
第二節	<i>SIMYB94</i> 基因可能並非期望的 <i>stamen2.2</i> 基因	39
引用文獻	40
附錄	42
附件 1.....	42
附件 2.....	45
附件 3.....	48
附件 4.....	49
附件 5.....	54
附件 6.....	61
附件 7.....	62
附件 8.....	64



圖目錄



圖一、35S 分子標記在T0世代 GENOMIC DNA 擴增結果.....	20
圖一(續)、35S 分子標記在T0世代 GENOMIC DNA 擴增結果	21
圖二、番茄背景分子標記在T0世代 GENOMIC DNA 擴增結果.....	23
圖二(續)、番茄背景分子標記在T0世代 GENOMIC DNA 擴增結果	24

表目錄



表一、分子標記 cLED19A24 至 CT9 間 20 個候選基因	2
表二、四種轉殖構築	7
表三、35S 分子標記及番茄背景 INDEL 分子標記	13
表四、焦磷酸定序使用的引子	15
表五、T0 世代之自交後代 T1 世代重新編號、命名	26
表六、焦磷酸定序 T0 世代與 M82、TA3178	28
表七、16TS357 的焦磷酸定序結果	30
表八、16TS357 基因型分群與外表型測量結果整理	33
表九、16TS357 卡方適合性檢定表(1 : 2 : 1)	36
表十、16TS357 基因型分群外表型變異結果	37

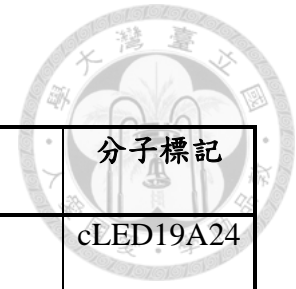
第一章 前言



第一節 *Style 2.1* 與 *Stamen 2.2* 的候選基因 *MYB94*

在本實驗室先前的研究中(Chen and Tanksley, 2004)，發現番茄的 *se2.1* 數量性狀基因座包含了 *style2.1* 控制雌蕊長度；*stamen2.1*、*stamen2.2*、及 *stamen2.3* 控制雄蕊長度；*dehiscence2.1* 控制雄蕊頂端的鬆弛與彎曲，這些控制相似性狀的基因座落在相鄰的位置。在本實驗室 100-103 年國科會補助計畫中，成功將 *se2.1* QTL 中控制雄蕊長短性狀的基因 *stamen2.2* 鎖定在番茄第二條染色體上 cLED19A24 至 CT9 分子標誌區間內，該區間含有 20 個候選基因(詳見表一)。其中 *Solyc02g087960.3.1* 這個基因被選為進行轉殖試驗的候選基因。與番茄的 *Solyc02g087960.3.1* 基因同源的 *MYB94* 基因在阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)上是一個正向調控表面蠟質的基因(Lee et al., 2015)，因為同源的關係，番茄的 *Solyc02g087960.3.1* 在前人的研究中又被稱為 *SIMYB94* (Zhao et al., 2014)。這個基因在茄科的氨基酸序列比較中，被分類在 S1、對於環境反應(environmental responses)相關的基因群當中(Gate et al., 2016)。由於 *MYB* 基因家族是轉錄因子，該基因 *SIMYB94* 有可能是藉由轉錄來調控雄蕊長度的基因 *stamen2.2*，因此最終選擇了 *SIMYB94* 來進行後續的轉殖互補性試驗。

表一、分子標記 cLED19A24 至 CT9 間 20 個候選基因



候選基因名稱	Annotation	分子標記
<i>Solyc02g087930.3.1</i>	60S ribosomal protein L34	cLED19A24
<i>Solyc02g087935.1.1</i>	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit	
<i>Solyc02g087940.3.1</i>	Coiled-coil domain-containing protein 115	
<i>Solyc02g087950.3.1</i>	60S ribosomal protein L34	TBS32
<i>Solyc02g087960.3.1</i>	R2R3 MYB transcription factor 94	
<i>Solyc02g087970.1.1</i>	Mini zinc finger protein	
<i>Solyc02g087980.3.1</i>	Structural maintenance of chromosomes protein 4	TAP109
<i>Solyc02g087990.3.1</i>	DUF1666	
<i>Solyc02g088000.3.1</i>	Starch synthase	
<i>Solyc02g088010.3.1</i>	Defective in cullin neddylation protein	
<i>Solyc02g088020.1.1</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	
<i>Solyc02g088030.1.1</i>	RING/U-box superfamily protein	
<i>Solyc02g088040.1.1</i>	Ribosomal protein L34e superfamily protein	
<i>Solyc02g088050.1.1</i>	Plasma membrane ATPase	
<i>Solyc02g088060.2.1</i>	Plasma membrane ATPase	
<i>Solyc02g088070.3.1</i>	Dof zinc finger protein	
<i>Solyc02g088075.1.1</i>	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	
<i>Solyc02g088080.2.1</i>	Thioredoxin superfamily Protein	
<i>Solyc02g088090.1</i>	Calcium-binding EF-hand	
<i>Solyc02g088100.2</i>	Expensin precursor 5	CT9

第二節 影響番茄花器長度的基因及轉錄因子 *MYB*



影響番茄花器長度的基因，最常見的就屬 MADS-box 的基因了，這類基因在花朵的發育 ABC-model 上，分別在不同時期啟動、調控包括萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊，4 層環狀構造的發育。在這之中，尤其是 B-class 的基因更是和雄蕊的發育息息相關，在一些例子中，過量表現 MADS-box 的基因 *TM8*，使得番茄雄蕊變得分散，並且影響花粉發育，造成後代稔實率降低(Daminato et al., 2014)；B-class 基因突變甚至會導致雄蕊消失(Quinet et al., 2014)；研究也指出，高溫造成的花柱外突、雄蕊變短、雄蕊分散，是源自於 B-class 的基因表現量改變(Müller et al., 2016)。然而研究結果顯示，除了 MADS-box 的基因外，其他基因也會直接或間接影響番茄的花器長度，例如調控茉莉酸的基因也會直接或間接的影響雄蕊長度(Dobritsch et al., 2015)；過量表現番茄 R2R3MYB 的 *SIANT1* 和 *SIANT2* 基因，會影響雄蕊以及果實的外表型(Kiferle et al., 2015; Meng et al., 2015)；其中一份轉殖葡萄的 R2R3MYB 至番茄當中的研究，甚至使整個番茄花朵都產生了變形(Mahjoub et al., 2009)。這些轉殖 R2R3MYB 至番茄的先例，為我們的研究提供了可能性，我們所找到的 *MYB94* 轉錄因子或許就是調控雄蕊長度的基因，並且轉殖基因可以作為研究的手段。現今關於番茄的 MYB 轉錄因子的研究仍十分稀少，因此確認轉殖 *SIMYB94* 在番茄中能否影響雄蕊長度，相信能夠給予未來的研究者們對於研究番茄 MYB 基因功能一些方向。

第二章 研究目的



本研究承接本實驗室 100-103 年的國科會計畫，利用基因轉殖將番茄 *se2.1* 數量性狀基因座中控制雄蕊長短 *stamen2.2* 的候選基因 *SIMYB94* 轉入番茄中，從而進行轉殖基因的互補性試驗，並欲藉由轉殖世代的自交後代 T_1 的分離比、基因型及外表型資料的結合來驗證，轉入的 *SIMYB94* 候選基因是否確實為調控雄蕊長短的 *stamen2.2* 基因。

第三章 材料與方法

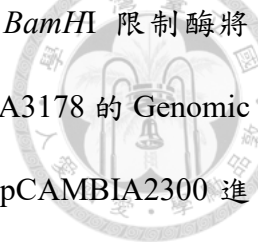


第一節 試驗材料

本研究所使用的兩親本分別為 *Solanum lycopersicum* cv. M82 以及 TA3178，其中 TA3178 是 *Solanum lycopersicum* cv. M82 的近似同源系(NIL)，只有在 T1301 至 T497 的這兩個分子標記之間的片段(se 2.1)是由 *Solanum pennellii* 所滲入。而 *Solanum lycopersicum* 的花器外表型為花柱不外突(雌蕊長小於雄蕊長)，*Solanum pennellii* 的花器外表型為花柱外突(雌蕊長大於雄蕊長)。在本實驗室先前的研究當中(Chen and Tanksley, 2004)，已經證實代表 *Solanum lycopersicum* 的 M82 雄蕊長度較 *Solanum pennellii* 的 TA3178 為長，因此設計轉殖互補試驗，期望能在轉殖品系雄蕊長度上觀察到變異。

1. 互補性試驗與基因轉殖

為了進行互補性試驗，我們設計了 4 組構築(constructs)，用以將 *SIMYB94* 利用基因轉殖轉入兩種親本當中。包含了將 M82 的 *SIMYB94* 全基因轉入 TA3178、將 M82 的 *SIMYB94* 基因的 cDNA 轉入 TA3178；以及將 TA3178 的 *SIMYB94* 全基因轉入 M82、將 TA3178 的 *SIMYB94* 基因的 cDNA 轉入 M82。這 4 種構築當中，將 TA3178 的 *SIMYB94* 基因 cDNA 轉入 M82 的構築沒有製作成功，因此只剩下 3 組構築，詳見表二、附件 1、附件 2。構築所使用的質體為 pCAMBIA2300，使用限制酶 *Pst*I 對 CaMV 35S 啟動子的 PCR 產物(引子兩端設計限制酶切位)及 pCAMBIA2300 進行處理，接著將兩端有 *Pst*I 切位的 35S 啟動子以連接酶接至



pCAMBIA2300 的多重切位點(multiple cloning site)，然後用 *Bam*HI 限制酶將 *SIMYB94* 基因的 PCR 產物(引子兩端有限制酶切位，由 M82 及 TA3178 的 Genomic DNA 和 cDNA 進行擴增)、以及前面已經有接入 35S 啟動子的 pCAMBIA2300 進行處理後，將 *SIMYB94* 基因接到 pCAMBIA2300 中 35S 啟動子的後面。基因轉殖使用的載體為農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)。

(構築的設計、製作，由本實驗室的林亞平學姊進行；基因轉殖由本實驗室的林亞平學姊、以及委託中央研究院植物轉殖中心[轉殖植物核心實驗室]進行轉殖，本人僅進行轉植株出瓶後的後續培養及試驗；編號 89C2、89M6、90M4 的轉植株為本實驗室的林亞平學姊進行轉殖，中研院 2、中研院 3、中研院 4 的轉植株為中研院進行轉殖；其中 89C2 和中研院 2 為完全相同的構築、89M6 和中研院 3 為完全相同的構築、90M4 和中研院 4 為完全相同的構築，僅進行轉殖操作的人員不同)

2. 轉植株出瓶與自交

轉植株於培養基成功再生(regeneration)出根與葉後，將植株取出，以蒸餾水清洗後，移植至 3 吋盆中，培養介質為根基旺，至植株成長至約 4 葉齡大後，移至 8 吋盆，培養介質為泥炭土:蛭石 = 2:1。植株培養於台灣大學人工氣候室(phytotron)中，日溫 20°C / 夜溫 15°C。待轉殖世代 T₀ 開花後進行自交，然後收取果實、清洗種子，之後再以穴盤發芽 T₁ 世代的種子，待植株約 4 葉齡，移至 8 吋盆，同樣培養於人工氣候室。

表二、四種轉殖構築

編號	轉殖設計	使用質體	插入基因使用的限制酶	使用的啟動子	插入啟動子使用的限制酶
沒有成功	TA3178 的 <i>MYB</i> cDNA 轉入 M82	pCAMBIA2300	<i>Bam</i> HI	CaMV 35S	<i>Pst</i> I
89C2 中研院 2	M82 的 <i>MYB</i> cDNA(864 bp) 轉入 TA3178	pCAMBIA2300	<i>Bam</i> HI	CaMV 35S	<i>Pst</i> I
89M6 中研院 3	M82 的 <i>MYB</i> (1293 bp) 轉入 TA3178	pCAMBIA2300	<i>Bam</i> HI	CaMV 35S	<i>Pst</i> I
90M4 中研院 4	TA3178 的 <i>MYB</i> (1347 bp) 轉入 M82	pCAMBIA2300	<i>Bam</i> HI	CaMV 35S	<i>Pst</i> I

第二節 抽取番茄基因體 DNA



抽取番茄 DNA 使用的是 CTAB 法，方法如下，

1. 備製萃取液

先將114mg的 sodium bisulfate 充分溶解於12.5mL的 DNA extraction buffer，然後依序加入12.5mL的 nuclei lysis buffer 及5mL的 5% Sarkosyl solution 後充分混合，溶液的配置在室溫下進行。

2. 採取番茄葉片樣品及葉片均質化

剪取 2~3 片番茄幼葉約 1 平方公分，置於已標示樣品編號的1.5mL微離心管中，加入200 μ L的萃取液，並加入一粒直徑3mm的鋼珠，藉由高通量組織研磨機的來回振動，將葉片打碎、均質化。從組織研磨機取出微離心管後，再加入500 μ L的萃取液，與均質液混合均勻後，置入 65 $^{\circ}$ C的水浴槽中等待 30 分鐘後取出。

3. 去除葉綠素與雜質

在抽氣通風櫃中，將每個樣品加入600 μ L的氯仿混合液(chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1)，蓋緊微離心管蓋子後，以手動方式將微離心管上下劇烈震盪 100 次，在置入離心機中，以10000rpm離心 5 分鐘。離心結束後的微離心管應小心取出避免震盪，而後取出500 μ L上層澄清液，置入新標示樣品編號的1.5mL微離心管中。所有步驟在常溫進行。

4. DNA 沉澱與溶解

每個樣品加入600 μ L的異丙醇(iso-propanol)，倒轉微離心管數次充分混合溶液，置入離心機中，以10000rpm離心 5 分鐘。離心後將溶液倒出拋棄，加

入200 μ L 70%酒精(ethonal)，再以10000rpm離心 5 分鐘。離心後將溶液倒出，靜置 30~60 分鐘待酒精乾燥後加入100 μ L的 TE buffer，置入 4°C冰箱靜置一天後即可使用。



DNA extraction buffer

31.885 克的 Sorbitol[Sigma S-6021]及 6.055 克的 Tris[hydroxymethyl]aminomethane, Trizma[®]及 0.931 克 EDTA[Ethylene]加水至接近500mL，而後以濃鹽酸調整 pH 值至 8.26，再加水至500mL。

Nuclei lysis buffer

加入100mL 1M Tris(121.1g/L)、100mL 0.25M EDTA(sodium salt, 84.05 g/L)、200mL 5M NaCl(292.2g/L)[Sigma S-3014]、10g CTAB(Hexadecyltrimethylammonium bromide, Sigma H-9151)、100mL ddH₂O，以磁石進行攪拌一天後，以濃鹽酸調整 pH 值至 7.5。

TE buffer

加入0.5mL 1M Tris(121.1g/L)、0.2mL 0.25M EDTA(sodium salt, 84.05 g/L)、49.3mL ddH₂O，配置為50mL溶液。

第三節 DNA 純化



使用AMPure® XP 的磁珠溶液進行DNA純化，為了去除溶液中小片段(<50 bp)的DNA以及雜質，加入的AMPure : DNA 溶液 = 1.8 : 1，

1. 將大片段DNA吸附至管壁

加入欲純化DNA溶液以及DNA溶液1.8倍體積的AMPure至200 μ L PCR tube中，充分混合後靜置5分鐘，然後將PCR tube至於磁石盤上靜置5分鐘。

2. 清洗DNA及拋棄雜質

將磁石盤上的PCR tube中的溶液小心吸出丟棄，然後加入200 μ L 70%酒精，靜置30秒後將酒精吸出丟棄。此步驟重複一次，並確認酒精完全吸出。然後將PCR tube由磁石盤上取下，自然陰乾5分鐘。

3. DNA回溶及磁珠分離

加入100 μ L的Buffer EB，將管壁上的磁珠沖下並充分混合，靜置5分鐘後，再移至磁石盤上靜置5分鐘，使磁珠與溶液分離，然後小心吸取澄清DNA溶液至新的離心管中，即完成純化。

第四節 清洗種子及乾燥保存



為了進行自交後代分離比，以及自交後代表型、基因型的整合調查，收取番茄果實、並清洗出番茄種子必須的。在轉殖番茄自交果實進入紅熟階段時，將果實採下，由果實中段橫切，觀察可見果實有 2-3 心室，以刮杓將種子及果膠取出置入燒杯中，加入 5%稀釋鹽酸至液面完全蓋過種子及果膠後，靜置 30 分鐘。以不鏽鋼小網目篩網(1mm)過濾種子，並以大量清水清洗後，將種子以刮杓移至擦手紙上，並於擦手紙上以標籤註記種子來源、編號，置於防潮箱內 3 天以上，待種子陰乾後，以封口袋收納，移置4°C冰箱保存。

第五節 初步確認轉殖是否成功及轉殖背景的分分子標記

在轉殖植株出瓶後，我們需要快速確認該轉殖植物是否有成功轉殖，並捨棄沒有成功轉殖的植物。除此之外，再次確認轉殖植物背景也是必須的。

1. 確認轉殖是否成功的分子標記

為了確認轉殖是否成功，我們使用了設計構築時 PCR 擴增 CaMV 35S 啟動子的引子，詳見表三。一旦 PCR 能夠在轉殖番茄的 genomic DNA 中擴增出，本來植物體不存在的 CaMV 35S 片段，我們就相信這是一株有轉殖成功的植物。

2. 確認轉殖植物背景的分分子標記

確認轉殖植物的背景(background)，能夠在植物還是幼苗時，就先行捨棄背景錯誤的轉植株。為此，我們在兩親本 M82 及 TA3178 間，利用 blast 搜尋兩親本不同的片段(T1301 至 T497)，然後選定了位於 *style2.1* 基因上的 Indel 片段，設計了

一組 Indel 分子標記，詳見表三。引子的設計使用 Primer3

(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)。利用 PCR 產物大小可以快速的分辨轉植株背

景是否有錯誤。



3. PCR 及電泳跑膠

PCR 使用的試劑如下，2 μ L 番茄 genomic DNA、2 μ L forward 引子、2 μ L reverse 引子、10 μ L Taq DNA Polymerase Master Mix RED、4 μ L ddH₂O。PCR 程序為：94°C 3 分鐘，然後 94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分鐘，此 2 分鐘步驟重複 35 次，最後 72°C 10 分鐘結束。電泳 agarose 為 1%，電泳溶液為 TBE 0.5X，以 100V 進行 1 小時，然後拍照確認並留存。

表三、35S 分子標記及番茄背景 Indel 分子標記



35S 分子標記				
引子名稱	引子序列	引子大小	產物大小	
35S-SF	CCTTTGAGCTCCCGCCTTCAGTTTAGCTTCA	31bp	580bp	
35S-SR	CCTTTGAGCTCAGAGTCCCCCGTGTCTCTC	31bp		
番茄背景 Indel 分子標記				
引子名稱	引子序列	引子大小	產物大小	
TMBG-F	GGGCCATGTAAGTGAAGACC	20bp	M82	TA3178
TMBG-R	GAAACATTTAAGGGCCACGTT	21bp	458bp	903bp

第六節 焦磷酸定序(pyrosequencing)




為了確認轉殖自交世代 T_1 ，以及轉殖世代 T_0 的基因型，進行了焦磷酸定序(pyrosequencing)，總共對 6 個有產生 T_1 後代的 T_0 進行檢查，並將 4 組有成功轉殖 *SIMYB94* 的 T_0 後代，共 82 株 T_1 世代，以及兩親本 M82、TA3178，總計 90 株進行交磷酸定序。焦磷酸定序使用的引子詳見表四。

焦磷酸定序時，有 biotin 標記的 PCR 產物，會被 Streptavidin-Sepharose HP (Amersham Pharmacia)捕捉，而後藉由 Pyrosequencing Vacuum Prep Tool 將 PCR 產物的另一股洗去，接著將焦磷酸定序的引子加入，該引子會 annealing 到單股的 PCR 產物上，定序使用的儀器為 PyroMark Q24 system (Qiagen)，並用 PyroMark Q24 軟體分析定序結果。

表四中 Pyro-F 和 Pyro-R 的引子是用來做 PCR 擴增欲定序片段的一組引子，且 Pyro-R 末端接有 biotin，Pyro-S1 則是進行焦磷酸測序時使用的引子。PCR 所使用的試劑如下：0.1 μ L Accu Prime Taq DNA polymerase(High fidelity)、2.5 μ L PCR buffer II、0.5 μ L Pyro-F 引子、0.5 μ L Pyro-R 引子、2 μ L genomic DNA、20.4 μ L ddH₂O。PCR 程序設定如下：94 $^{\circ}$ C 3 分鐘，然後94 $^{\circ}$ C 30 秒、57 $^{\circ}$ C 3 分鐘、72 $^{\circ}$ C 30 秒，此 4 分鐘步驟重複 40 次，最後 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘結束。PCR 產物以 AMPure XP 磁珠純化 DNA 方法純化後，委託明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech)(<http://www.missionbio.com.tw/>)進行焦磷酸定序。

表四、焦磷酸定序使用的引子



引子名稱	引子序列	引子大小	產物大小
Pyro-F	GGGCTGCCATAGCTTCATATCT	22bp	162bp
Pyro-R	BIO-ATTGCCCTCTGGAGGTTGAA	20bp	
Pyro-S1	TCATTTAAAAAGAAGCTG	19bp	

第七節 雌蕊及雄蕊長度調查



為了瞭解轉殖 *SIMYB94* 基因對蕃茄雄蕊長度是否有影響，總計對 94 株 T_1 世代共 1630 朵花進行了雄蕊長度、雌蕊長度的測量。

1. 收集花朵並掃描圖片留存


在 T_1 世代開始出現花苞後，在花苞下方繫上紅色細繩作為標記，之後每天繫紅繩，並且對有繫紅細繩的花朵，進行當天開放的花朵採集，採集下來的花朵插在濕海綿上、並標號，待當天開放的花朵全部採集完畢後，以鑷子照順序將花朵的萼片、花瓣摘除，然後小心的將雄蕊環從雌蕊外圍剝下，並將同一朵花雌蕊、雄蕊放在掃描機(HP Scanjet G4010)上，待掃描機上排列了適量的樣品後，蓋上 5mm 方格紙進行掃描。每株 T_1 世代盡量採集到 20 朵花，以利統計分析。

2. 測量雌蕊及雄蕊長度

對於已掃描進入電腦儲存的圖片，以 imageJ 軟體(<https://imagej.nih.gov/ij/>)，進行測量。先用直線工具對掃描照片中 5mm 長度進行 set scale，然後再以直線工具分別測量(measure)每一朵花的雄蕊及雌蕊最大直線距離，將結果輸出至 excel 進行儲存。

第八節 統計分析

單因子變異數分析 ANOVA 以及 Tukey's HSD 檢定使用 R 的 agricolae package。將焦磷酸定序 T_0 世代的結果，分為有成功轉入單一 copy 的轉植株，以及沒有成功轉入單一 copy 的轉植株；有成功轉入單一 copy 的 T_0 世代，其自交後代應該會符合



孟德爾單一基因遺傳的分離比 1:2:1，因此用卡方適合性檢定(goodness of fit test)，檢定是否符合單一基因分離，若符合單一基因分離，則該T₀世代為成功轉殖單一 copy 的轉植株，然後依照基因型將T₀世代的自交後代T₁外表型分組，再次進行單因子變異數分析，分別檢定雄蕊長度、雌蕊長度、雌雄蕊長度差，在各基因型所代表的外表型組間是否有差異。

第四章 結果




第一節 轉殖世代 T_0 之轉殖與背景檢測及自交後代 T_1

1. 轉殖世代 T_0 與其自交後代 T_1 之種子數

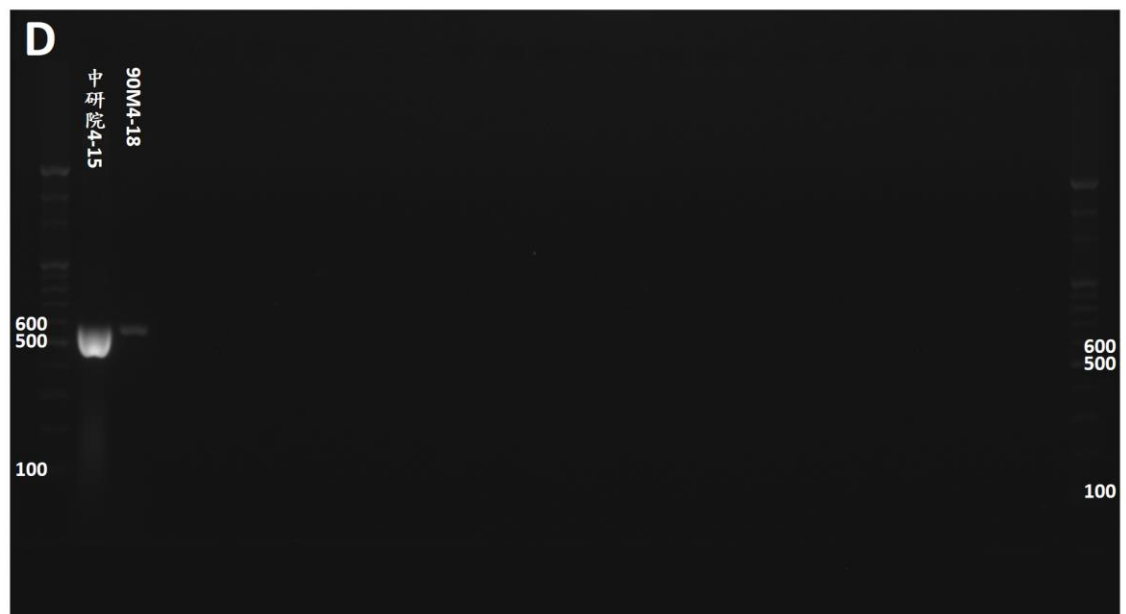
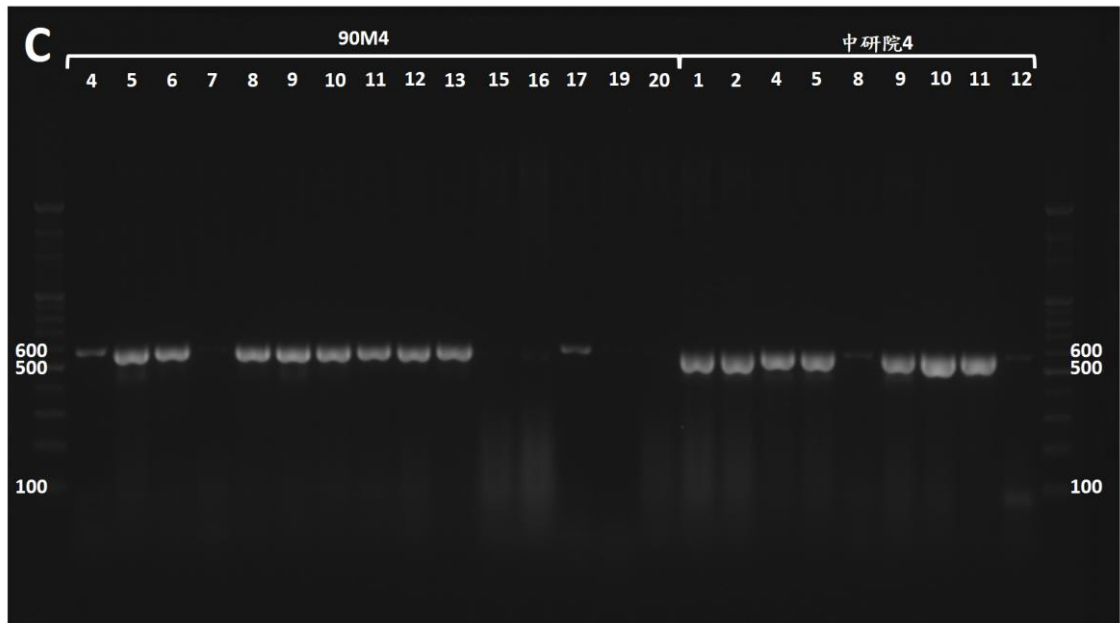
轉殖構築成功的有 3 組，分別為 M82 的 *SIMYB94* 基因 cDNA(共 864 bp)轉入 TA3178，轉殖世代 T_0 由本實驗室進行轉殖的名稱為 89C2、由中研院植物轉殖中心代為轉殖的名稱為中研院 2；M82 的 *SIMYB94* 全基因(共 1293 bp)轉入 TA3178， T_0 由本實驗室進行轉殖的名稱為 89M6、由中研院代為轉殖的名稱為中研院 3；以及將 TA3178 的 *SIMYB94* 全基因(1347 bp)轉入 M82， T_0 由本實驗室進行轉殖的名稱為 90M4、由中研院代為轉殖的名稱為中研院 4，詳見表二。 T_0 世代的植株數量，89C2 有 8 株，編號分別為 89C2-1 至 89C2-8，中研院 2 有 10 株，編號分別為中研院 2-2、中研院 2-4 至中研院 2-6、中研院 2-8 至中研院 2-11、中研院 2-14、中研院 2-15；89M6 有 6 株，編號分別為 89M6-1 至 89M6-6，中研院 3 有 23 株，編號分別為中研院 3-2、中研院 3-3、中研院 3-7 至中研院 3-12、中研院 3-14 至中研院 3-28；90M4 有 19 株，編號分別為 90M4-1 至 90M4-13、90M4-15 至 90M4-20，中研院 4 有 13 株，編號分別為中研院 4-1、中研院 4-2、中研院 4-4、中研院 4-5、中研院 4-8 至中研院 4-12、中研院 4-15 至中研院 4-18。附件 4 含全部 T_0 世代以及最後收取到的自交種子(T_1)的數量。

2. 35S 分子標記檢測 T_0 世代之結果

在轉殖世代 T_0 成長至四葉齡以後，抽取番茄基因體 DNA，使用 35S 分子標記



進行檢測，可以預先丟棄沒有轉殖成功的植株。35S 分子標記檢測結果可見 89C2 全部皆有在 genomic DNA 中擴增出 580 bp 的片段(圖一 A)；中研院 2 除了中研院 2-5、中研院 2-6、中研院 2-11 沒有擴增出片段，中研院 2-14 僅擴增出微量片段之外，其餘皆有擴增出 35S 片段(圖一 A)；89M6 全部沒有擴增出片段(圖一 A、圖一 B)；中研院 3 除了中研院 3-23 僅擴增出微量片段之外，其餘皆有成功擴增出 35S 片段(圖一 B)；90M4 除了 90M4-4、90M4-7 有擴增出微量片段，90M4-15 至 90M4-20 皆無擴增出片段以外，其餘皆有擴增出 35S 片段(圖一 B、圖一 C)；中研院 4 除了中研院 4-8、中研院 4-12 之外，其餘皆有成功擴增出 35S 的片段(圖一 C、圖一 D)。35S 分子標記檢測結果詳見附件 4。

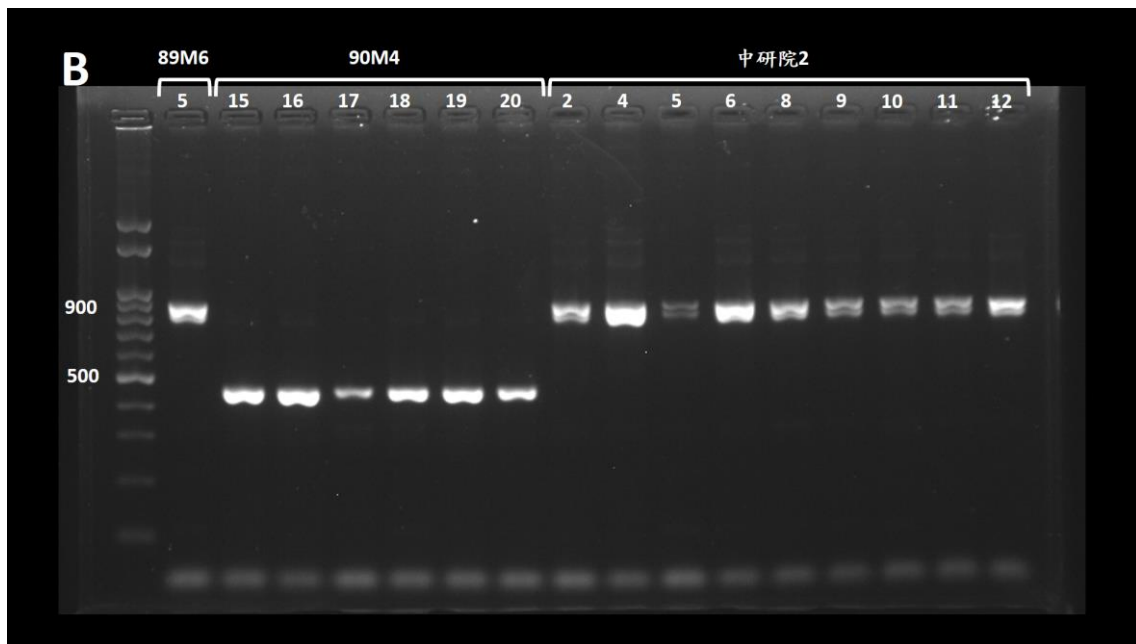
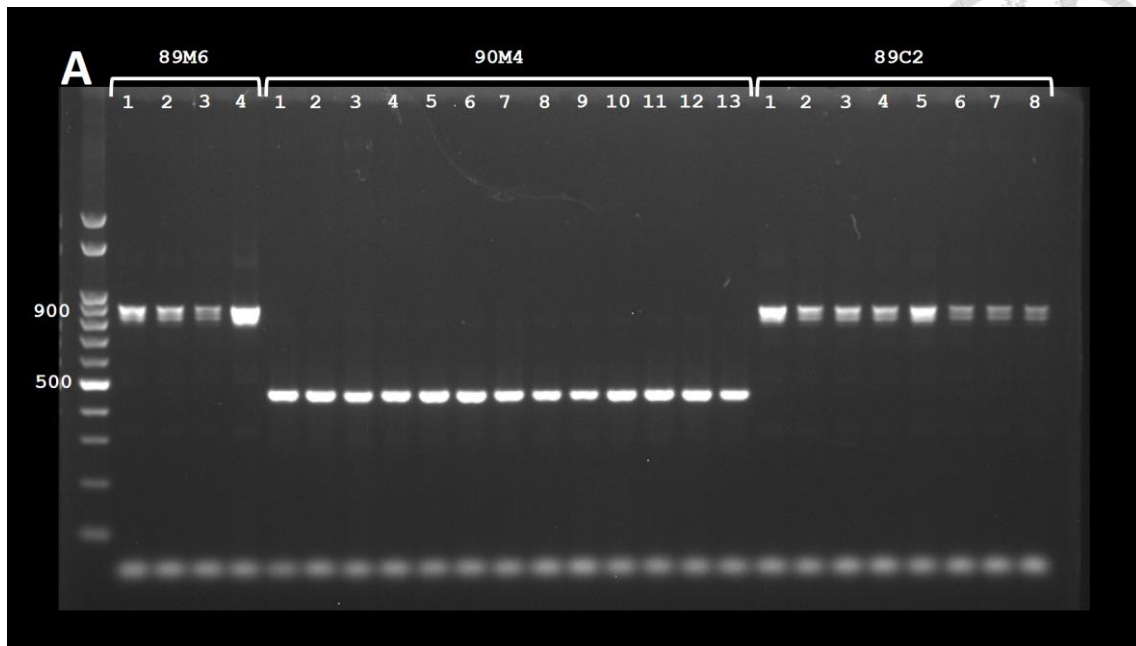


圖二(續)、35S 分子標記在T₀世代 Genomic DNA 擴增結果

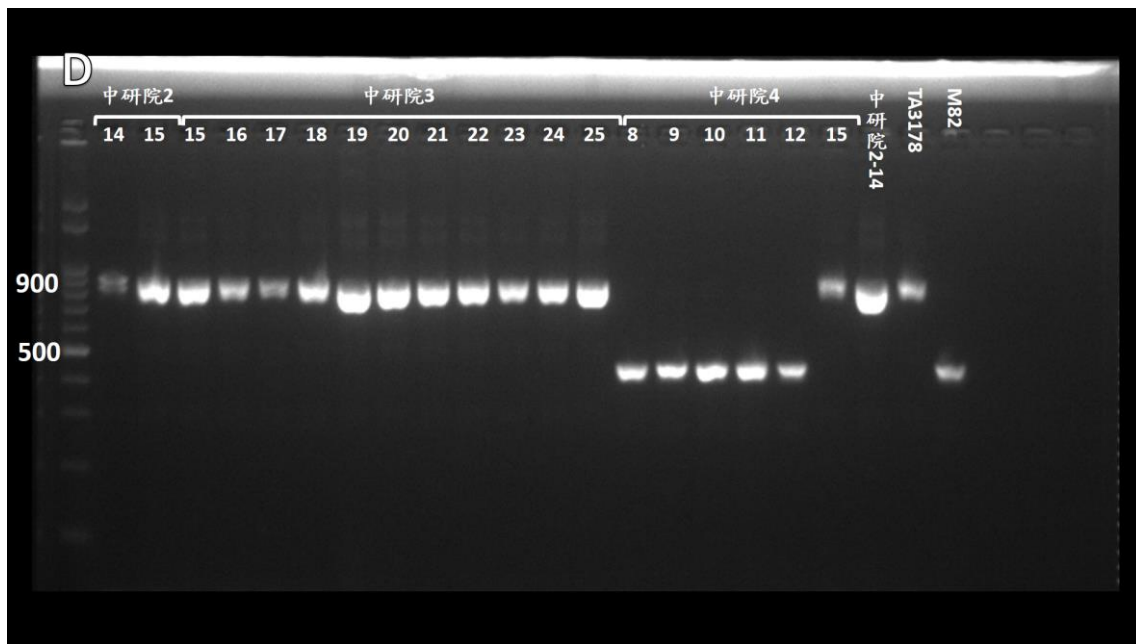
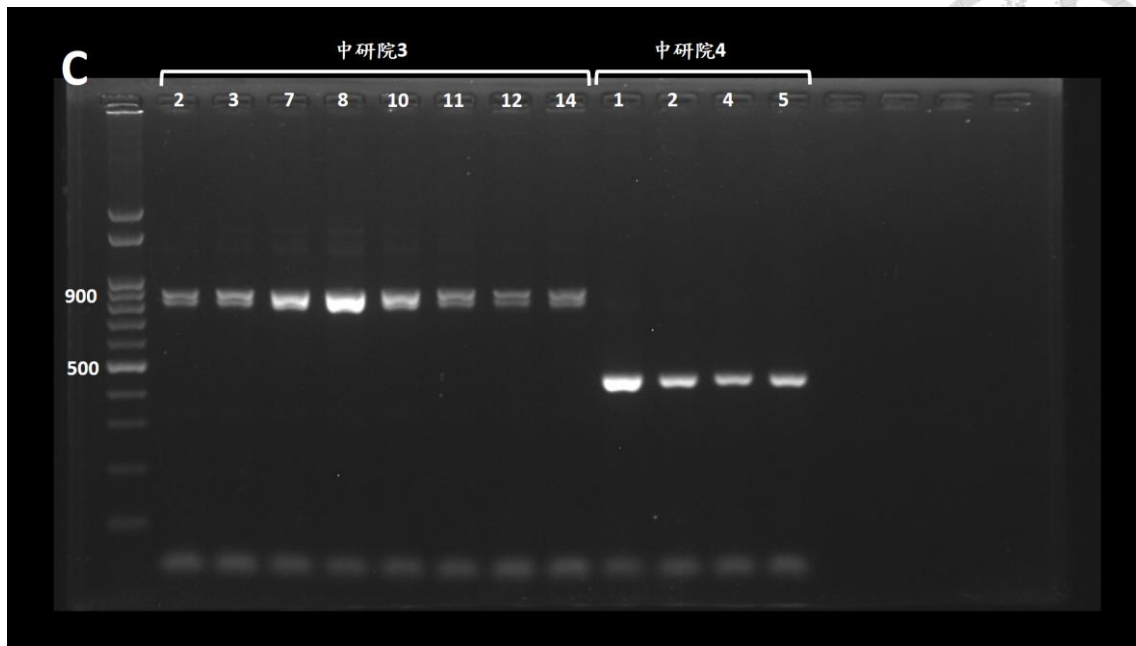


3. 番茄背景 Indel 分子標記檢測T₀世代之結果

對轉殖世代進行的背景檢測，是為了在植株仍為幼苗時，快速篩檢出背景錯誤的轉殖株並拋棄，除了可以減少試驗錯誤的風險，也可以降低維持植物生長的成本。在T₀世代轉殖株 89C2、89M6、中研院 2、中研院 3 當中，全部的植株都擴增出了 903 bp 的 PCR 產物，並與 TA3178 親本的 PCR 擴增結果相同(圖三)，這表示它們的轉殖背景無誤。在 90M4 以及大部分中研院 4 當中，則擴增出了 458 bp 的 PCR 產物，並且與 M82 親本的 PCR 擴增結果相同，然而在中研院 4-15 卻出現了與 TA3178 親本相同的擴增結果，這表示中研院 4-15 是轉殖背景出錯的植株。



圖三、番茄背景分子標記在T₀世代 Genomic DNA 擴增結果



圖四(續)、番茄背景分子標記在T₀世代 Genomic DNA 擴增結果

第二節 轉殖自交後代T₁花器長度之測量



在收取了T₁世代種子後，由附件 4 將背景錯誤的T₁世代種子排除，然後再將沒有轉殖 35S 啟動子的也排除。為了進行自交後代分離比的試驗，以及外表型的測量，我們假設由農桿菌轉入的 *SIMYB94* 基因在大部分T₀世代會是 1 copy，那麼外表型若符合孟德爾單一基因分離比的話，很有可能會是3：1。於是，假設不同株外表型有差異為獨立事件，若希望有 95%的機率能在T₁世代中看到至少 1 株外表型有差異的個體， $(1 - 0.25)^n \leq (1 - 0.95)$ ， $n = 10.4$ ，意即最少需要種植 11 株T₁世代，並且考慮到種子發芽率，我們挑選了種子數為 40 以上的T₁世代種子，每種構築(constructs)各挑選 3 個。最後挑選了 89C2-2、89C2-8、中研院 2-9、中研院 3-11、中研院 3-14、中研院 3-21、90M4-2、90M4-3、90M4-6 的T₁世代種子進行發芽，每組皆播種 40 粒種子。為了方便管理T₁世代，將T₁世代重新以本實驗室譜系編號命名為 16TS355 至 16TS363，詳見表五。

然而在發芽率不高，以及育苗過程中，有多數幼苗感染疾病死亡，最後剩餘的T₁世代數量 16TS355(以下簡稱 355)為 12 株，編號為 355-1 至 355-12；16TS356(以下簡稱 356)為 20 株，編號為 356-1 至 356-20；16TS357(以下簡稱 357)為 35 株，編號為 357-1 至 357-35；16TS358、16TS359、16TS360 因染病全數丟棄；16TS361(以下簡稱 361)為 15 株，編號 361-1 至 361-15；16TS362(以下簡稱 362)為 7 株，編號 362-1 至 362-7；16TS363(以下簡稱 363)為 5 株，編號 363-1 至 363-5。因此我們對剩餘總計 94 株T₁世代進行了雄蕊及雌蕊長度調查，每株盡量以 20 朵花為目標測量，花器的掃描圖標號後範例如附件 3，結果如附件 5 (單位：mm)。

表五、T₀世代之自交後代T₁世代重新編號、命名

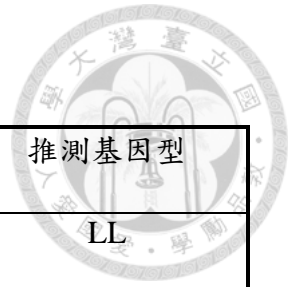
T ₀ 世代親本	T ₁ 世代	T ₀ 世代親本	T ₁ 世代	T ₀ 世代親本	T ₁ 世代
89C2-2	16TS355	中研院 3-11	16TS358	90M4-2	16TS361
89C2-8	16TS356	中研院 3-14	16TS359	90M4-3	16TS362
中研院 2-9	16TS357	中研院 3-21	16TS360	90M4-6	16TS363

第三節 焦磷酸定序結果

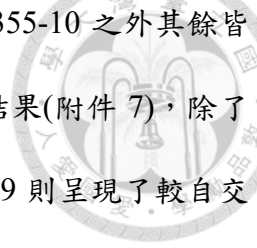


為了有效率的進行基因型鑑定，我們由作為 355、356、357、361、362、363 的親本 T_0 世代 89C2-2、89C2-8、中研院 2、90M4-2、90M4-3、90M4-6，以及未進行轉殖的 M82、TA3178，共 8 個樣品先進行焦磷酸定序，定序結果若確實有轉殖單一 copy，再繼續進行其自交後代 T_1 世代的焦磷酸定序。定序時由 Pyro-S1 引子由 5 端向 3 端合成並偵測 SNP 位點，目標位點為 ARGAAAGCTTGAAACA (R:A/G)，該位點為在 *SIMYB94* 基因的 exons 上，對於 M82 (*Solanum lycopersicum*)和 TA3178 (*Solanum pennellii*)皆有高度專一性的片段，在 M82 中 R 位置為 G，在 TA3178 中 R 位置為 A，即偵測 R 位置上 A 和 G 的比例，可以知道樣品中所含的來自 M82 和 TA3178 的片段的比例多寡。M82 的 genomic DNA 在目標 SNP 位點為 G，因此可以將其同源染色體所含的 *SIMYB94* 基因定義為 LL (*lycopersicum*)，而 TA3178 為 A，定義為 PP (*pennellii*)，那麼轉入一個 copy 的 T_0 世代，應該為 LLP、LPP，所含的 G 和 A 比例應該為 1/3，即 33%，但由表六的定序結果可以發現， T_1 世代只有中研院 2-9 較為接近 33%，89C2-2、89C2-8 雖然不接近 33%，但仍不為 0%，90M4-2 雖然為 6.89%，為求保險，我們決定將 89C2-2、89C2-8、中研院 2-9 以及 90M4-2 的自交後代 T_1 都進行焦磷酸定序。而 90M4-3 及 90M4-6 的焦磷酸定序結果顯示，它們並沒有成功轉入來自 M82 的 *SIMYB94* 基因，35S 分子標記檢測結果有轉入 35S 啟動子，但可能並不包含後續的 *SIMYB94* 基因。

表六、焦磷酸定序T₀世代與 M82、TA3178



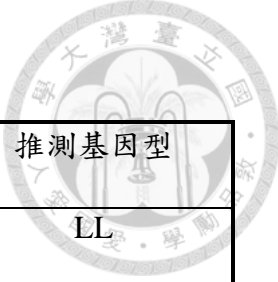
樣品名稱	A Frequency (%)	G Frequency (%)	推測基因型
M82	0	100	LL
TA3178	99.89	0.11	PP
89C2-2	88.97	11.03	LPP
89C2-8	87.77	12.23	LPP
中研院 2-9	71.76	28.24	LPP
90M4-2	6.89	93.11	LL
90M4-3	0	100	LL
90M4-6	1.63	98.37	LL



由 16TS355 的焦磷酸定序結果(附件 6)，可以觀察到除了 355-10 之外其餘皆沒有成功轉入 M82 的 *SIMYB94* 基因。16TS356 的焦磷酸定序結果(附件 7)，除了 356-9 之外其餘皆沒有成功轉入 M82 的 *SIMYB94* 基因，而 356-9 則呈現了較自交親本 89C2-8 更高的 M82 的 *SIMYB94* 基因比例。由 16TS361 的焦磷酸定序結果(附件 8)，16TS361 皆沒有成功轉入 TA3178 的 *SIMYB94* 基因。

由 16TS357 的焦磷酸定序結果(表七)，可以發現 357-4、357-18、357-20、357-23、357-27、357-34 沒有轉入 M82 的 *SIMYB94* 基因，而 357-11、357-13、357-15、357-21、357-24、357-25、357-26、357-32、357-33 則呈現了較自交親本中研院 2-9 更高的 M82 的 *SIMYB94* 基因比例，我們可以推測若中研院 2-9 是轉入單一 copy 的轉植株 LPP，那麼這些含有更高轉殖基因比例的自交後代，基因型應該為 LLPP。

表七、16TS357 的焦磷酸定序結果



樣品名稱	A Frequency (%)	G Frequency (%)	推測基因型
M82	1.55	98.45	LL
TA3178	99.33	0.67	PP
中研院 2-9	71.89	28.11	LPP
357-1	77.52	22.48	LPP
357-2	72.33	27.67	LPP
357-3	71.55	28.45	LPP
357-4	99.45	0.55	PP
357-5	73.27	26.73	LPP
357-6	72.39	27.61	LPP
357-7	76.47	23.53	LPP
357-8	75.17	24.83	LPP
357-9	76.85	23.15	LPP
357-10	72.29	27.71	LPP
357-11	60.35	39.65	LLPP
357-12	74.73	25.27	LPP
357-13	60.34	39.66	LLPP
357-14	75.02	24.98	LPP
357-15	60.61	39.39	LLPP
357-16	71.26	28.74	LPP
357-17	72.9	27.1	LPP
357-18	100	0	PP



357-19	73.13	26.87	LPP
357-20	100	0	PP
357-21	59.13	40.87	LLPP
357-22	71.09	28.91	LPP
357-23	100	0	PP
357-24	59.66	40.34	LLPP
357-25	62.95	37.05	LLPP
357-26	61.07	38.93	LLPP
357-27	100	0	PP
357-28	75.71	24.29	LPP
357-29	76.12	23.88	LPP
357-30	76.13	23.87	LPP
357-31	75.39	24.61	LPP
357-32	59.45	40.55	LLPP
357-33	61.39	38.61	LLPP
357-34	100	0	PP
357-35	80.16	19.84	LPP

第四節 基因型分析

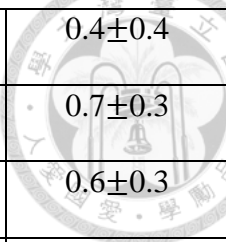


基因型分析主要有兩個目的，一是確定 T_1 世代的分離比，由基因型方面觀察是否符合孟德爾單一基因分離比，以確認 T_0 世代是轉入單一 copy 的轉植株；二是根據基因型將外表型資料分群，並比較各群之間是否有差異，驗證轉入的 *SIMYB94* 基因是否確實能夠調控雄蕊長度。由第三節、焦磷酸定序結果來對基因型分群，其中 16TS355、16TS356 因為都各只有一個 T_1 個體有成功遺傳自 T_0 世代的轉殖 *SIMYB94* 基因，而 16TS361 的 T_1 個體皆沒有成功轉殖 *SIMYB94* 基因，因此以下我們針對有成功轉殖的 16TS357 進行分群(表八)，其中共 35 個個體，依據推測的單一基因後代分離比 1:2:1，以卡方適合性檢定(goodness of fit test)，檢查推測基因型是否符合轉入單一 copy 的推測。

表八、16TS357 基因型分群與外表型測量結果整理



Sample ID	推測基因型	雄蕊長(mm)	雌蕊長(mm)	雌雄蕊長度差
357-21	LLPP	9.8±0.9	10.3±0.8	0.6±0.3
357-32	LLPP	10.6±0.6	11.2±0.7	0.6±0.3
357-24	LLPP	9.3±1.0	9.8±0.9	0.4±0.4
357-13	LLPP	10.2±0.9	10.2±2.2	0.0±1.7
357-11	LLPP	11.0±0.5	11.7±0.5	0.7±0.5
357-15	LLPP	10.6±0.3	11.2±0.4	0.6±0.4
357-26	LLPP	9.2±1.0	8.5±2.4	-0.7±1.8
357-33	LLPP	11.1±0.3	11.3±0.1	0.2±0.3
357-25	LLPP	10.4±0.7	11.0±0.8	0.6±0.4
357-22	LPP	未收取到花	未收取到花	未收取到花
357-16	LPP	7.4±0.1	8.3±0.7	0.9±0.6
357-3	LPP	10.5±0.6	11.0±0.7	0.6±0.3
357-10	LPP	10.7±0.8	11.4±0.8	0.8±0.5
357-2	LPP	10.7±0.6	11.1±0.7	0.5±0.3
357-6	LPP	11.3±0.5	11.9±0.6	0.6±0.3
357-17	LPP	10.1±0.7	10.6±0.8	0.5±0.3
357-19	LPP	9.2±0.4	9.8±0.5	0.6±0.2
357-5	LPP	9.8±1.1	10.1±1.1	0.3±0.3
357-12	LPP	10.8±0.4	11.3±0.5	0.5±0.3
357-14	LPP	10.8±0.4	11.5±0.4	0.7±0.3
357-8	LPP	10.2±0.8	10.7±0.9	0.5±0.4



357-31	LPP	10.0±1.0	10.4±1.0	0.4±0.4
357-28	LPP	10.3±0.7	11.0±0.7	0.7±0.3
357-29	LPP	10.2±0.7	10.7±0.8	0.6±0.3
357-30	LPP	10.5±0.5	11.0±0.5	0.5±0.3
357-7	LPP	9.8±1.1	10.2±1.1	0.4±0.3
357-9	LPP	10.5±0.5	10.9±0.5	0.4±0.4
357-1	LPP	10.8±0.4	11.3±0.6	0.6±0.4
357-35	LPP	10.0±0.9	10.3±1.4	0.3±0.5
357-4	PP	10.7±0.5	11.3±0.9	0.6±0.5
357-18	PP	11.0±0.6	11.6±0.7	0.6±0.3
357-20	PP	10.9±0.9	11.5±1.0	0.6±0.3
357-23	PP	10.3±0.5	10.9±0.6	0.6±0.5
357-27	PP	9.8±0.9	10.0±1.9	0.3±1.1
357-34	PP	8.2±0.6	8.5±0.6	0.3±0.3

以表八的推測基因型數量對 1:2:1 進行卡方適合性檢定(表九), H_0 : 符合 1:2:1 比例; H_a : 不符合 1:2:1 比例, 檢定結果 $\chi^2 = 1.228571$, $\chi^2_{(1-0.95,2)} = 5.991$, $\chi^2 < \chi^2_{(0.05,2)}$ 無法拒絕 H_0 , 即無法拒絕為 1:2:1 比例, 符合單一基因分離比, T_0 世代轉殖的 *SIMYB94* 基因為單一 copy。

接著用單因子變異數分析, 分別對雄蕊、雌蕊、雌雄蕊長度差, 依照基因型的分群, 對外表型有資料的 34 個 16TS357 個體進行分析, 檢查組間變異(轉殖 *SIMYB94* 基因的數量), 是否相對大於組內變異(轉殖同樣 copy 數 *SIMYB94* 基因個體間差異), 檢查結果顯示不論是雄蕊、雌蕊、或是雌雄蕊長度差, 依照基因型分群的情況下, 其外表型皆無顯著差異(表十)。



表九、16TS357 卡方適合性檢定表(1 : 2 : 1)

以卡方適合性檢定中研院 2-9 的自交後代 16TS357 是否符合孟德爾遺傳單一基因分離比，結果卡方值為 1.228571， $\chi^2 < \chi^2_{(0.05,2)} = 5.991$ ，無法拒絕為 1 : 2 : 1 比例，意即中研院 2-9 應為轉入單一 copy 的轉殖植株

推測基因型	LLPP	LPP	PP	合計
實際值(期望值)	9 (8.75)	20 (17.5)	6 (8.75)	35
卡方值	0.007143	0.357143	0.864286	1.228571

表十、16TS357 基因型分群外表型變異結果

三種推測基因型(LLPP、LPP、PP)分別對外表型(雄蕊、雌蕊、雌雄蕊長度差)進行 ANOVA，結果顯示 P-value 皆大於 0.05，以基因型分群的外表型間無差異



雄蕊長度 ANOVA					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F-value	Pr (>F)
genotype	2	0.0346	0.01729	0.039218	0.961589
Residuals	31	21.6156	0.69726		
雌蕊長度 ANOVA					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F-value	Pr (>F)
genotype	2	0.1135	0.05676	0.0671	0.9353
Residuals	31	26.2268	0.84603		
雌雄蕊長度差 ANOVA					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F-value	Pr (>F)
genotype	2	0.28204	0.14102	1.9986	0.1526
Residuals	31	2.18737	0.07056		

第五章 討論



第一節 35S 分子標記與焦磷酸定序結果不完全相同

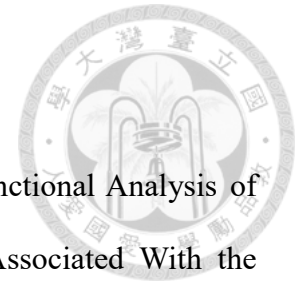
針對 6 個 T_0 世代 89C2、89M6、中研院 2-9、90M4-2、90M4-3、90M4-6，在焦磷酸定序結果中，90M4 的 3 個轉殖株皆確認沒有成功將 TA3178 pp 的 *SIMYB94* 基因轉入 M82 中，然而在更早之前進行的 35S 分子標記測試，卻都顯示上述 6 個 T_0 世代能夠在其體染色體中，藉由 PCR 擴增出 CaMV 35S 啟動子。這可能是由於轉殖構築製作時，沒有成功將 *SIMYB94* 基因接入，只有接入了 35S 啟動子。在焦磷酸定序設計中，*SIMYB94* 基因是屬於 MYB 家族的 R2R3MYB，*SIMYB94* 基因包含了 3 個外顯子(exons)，當中前 2 個分別屬於 R2、R3，為 MYB 的特徵片段，在整個番茄的基因體中能夠對到 1 至 2 處其他位置，專一性不夠高，因此焦磷酸定序設計的 SNP 位點是位在 *SIMYB94* 基因第 3 個 exon 上，並不是針對 35S 啟動子進行偵測，所以有可能發生 35S 分子標記和焦磷酸定序結果不同的狀況。

第二節 *SIMYB94* 基因可能並非期望的 *stamen2.2* 基因



在基因型分析 16TS357 轉殖品系的結果中，藉由卡方檢定，我們確認了 16TS357 轉殖品系的親本，中研院 2-9 確實是轉入單一 copy 的轉植株，然而將外表型數據以基因型進行分群的結果，在 16TS357 這個轉殖品系當中，轉入不論單一 copy，或是自交產生的 double copies 的 M82 之 *SIMYB94* 基因 cDNA，皆無法在 TA3178 這個轉殖背景上，產生顯著的外表型差異。考慮到初始的試驗設計為轉殖互補性試驗，然而在這次試驗中，沒能夠成功產生出 TA3178 的 *SIMYB94* 基因轉殖到 M82 背景的植株，因此，互補性試驗只能算是驗證了其中的一半，即 M82 之 *SIMYB94* 基因 cDNA 轉殖到 TA3178 中，並使其大量表現，並無法使其雄蕊長度發生顯著改變。雖然如此，但在這次試驗當中，在 CaMV 35S 啟動子大量表現 M82 的 *SIMYB94* 基因的條件之下，TA3178 的雄蕊長度並不因此產生變化，這可能是因為轉入的 *SIMYB94* 基因並非我們所期望的 *stamen2.2* 基因。這次的試驗雖然我們沒有找到 *stamen2.2* 基因，卻也反向證實了 *SIMYB94* 基因並非 *stamen2.2* 基因。對於未來的研究者們，我們在這次的研究中，以基因轉殖配合遺傳育種方式，測量外表型並比對轉入基因的 copy 數，以驗證目標基因的方式；相較常見的以 RT-PCR 分析表現量的研究模式，提供另一條研究方向。

引用文獻



Chen KY, Tanksley SD. (2004) High-Resolution Mapping and Functional Analysis of *se2.1*: A Major Stigma Exsertion Quantitative Trait Locus Associated With the Evolution From Allogamy to Autogamy in the Genus *Lycopersicon*. *Genetics* 168: 1563–1573.

Daminato M, Masiero S, Resentini F, Lovisetto A, Casadoro G. (2014) Characterization of *TM8*, a MADS-box gene expressed in tomato flowers. *BMC Plant Biology* 14:319

Dobritzsch S, Weyhe M, Schubert R, Dindas J, Hause G, Kopka J, Hause B (2015) Dissection of jasmonate functions in tomato stamen development by transcriptome and metabolome analyses. *BMC Biology* 13:28

Gates DJ, Strickler SR, Mueller LA, Olson BJSC, Smith SD. (2016) Diversification of R2R3-MYB Transcription Factors in the Tomato Family *Solanaceae*. *Journal of Molecular Evolution* 83:26–37

Kiferle C, Fantini E, Bassolino L, Povero G, Spelt C, Buti S, Giuliano G, Quattrocchio F, Koes R, Perata P, Gonzali S. (2015) Tomato R2R3-MYB Proteins *SIANT1* and *SIAN2*: Same Protein Activity, Different Roles. *PLoS ONE* 10(8): e0136365.

Lee SB, Suh MC. (2015) Cuticular wax biosynthesis is up-regulated by the MYB94 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 56(1): 48–60

Mahjoub A, Hernould M, Joubert JR, Decendit A, Mars M, Barrieu F, Hamdi S, Delrot S. (2009) Overexpression of a grapevine R2R3-MYB factor in tomato affects vegetative development, flower morphology and flavonoid and terpenoid metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 551–561

Meng X, Yang D, Li X, Zhao S, Sui N, Meng Q. (2015) Physiological changes in fruit ripening caused by overexpression of tomato *SIAN2*, an R2R3-MYB factor. *Plant*

Physiology and Biochemistry 89 24-30

Müller F, Xu J, Kristensen L, Wolters-Arts M , de Groot PFM, Jansma SY, Mariani1 C,

Park S, Rieu I. (2016) High-Temperature-Induced Defects in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Anther and Pollen Development Are Associated with Reduced Expression of B-Class Floral Patterning Genes. PLoS ONE 11(12): e0167614.

Quinet M, Bataille G, Dobrev PI, Capel C , Gómez P, Capel J, Lutts S, Motyka V, Angosto T, Lozano R. (2014) Transcriptional and hormonal regulation of petal and stamen development by STAMENLESS, the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) orthologue to the B-class *APETALA3* gene. Journal of Experimental Botany Vol. 65, No. 9, pp. 2243–2256

Zhao P, Li Q, Li J, Wang L, Ren Z. (2014) Genome-wide identification and characterization of R2R3MYB family in *Solanum lycopersicum*. Molecular Genetics and Genomics 289:1183–1207

附錄



附件 1

附件 1、*SIMYB94* 基因及其多肽鏈

序列當中淺灰色網底部分為 exons，深灰色網底部分為 M82 和 TA3178 對偶基因間的 Indel 及 SNP

SIMYB94 in *S. lycopersicum*(M82)

```
ATGGGTAGACCACCTTGTGTGATAAAACGGGGTGAAGAAAGGACCATGGACTCCT
GAAGAAGATATTATGCTAGTCTCTTTTGTTCAGAACATGGTCCAGGGAATTGGAGG
ACTGTTCCCACTCATAACAGGTTTCATTTCTTTTCTTTCCTTC-TTGATTTATCGTATAGTCA
CTCAA-TTAATAGTTA-TTATGTCATATACTTCAAAGTGTAATGTGTTTGTTTTAATGT
GCAGGGCTACGGAGATGTAGCAAAAGCTGCAGACTAAGGTGGACTAACTACCTCAGA
CCAGGAATCAAGAGGGGTAGCTTCAGTGATCAAGAGGAGAAGATGATTATCCAGCTT
CAGGCTCTCTTAGGCAACAAGTATGTATT-TTCTCATTAAATT-CCTTCATTACCTATC
T-TGATCCT-TTCGTTTCATTTTCATATGACTGTATTTGACAAAAAAAAAAAA-----
GAATTTATTTTTTAAAATAGATATACCAATTTTTGGCATTATACTAAAGTAC-C-TTTAT
TC-TATTA-TGAT-CGATCTTAAACATGTCATGACATTAGGGAGATTGAATTACTATTAC
ATGGATCTGGATAGTCACTTTGATGTATTTATT-C-TTCATTATGAAATTCTTTAAAG-
GTAA-C-TGTTTACAGTACAGCAA-G-TCCCTTGTTACTGATTTTCTGCTTCTTTGTAA-CA
GATGGGCTGCCATAGCTTCATATCTCCCTGAGAGAACCGATAACGCATTAAAAATT
ACTGGAATACTCATTTAAAAAAGAAGCTGAG-GGAAGCTTGAAACAAGTGATTTATACT
CAAATGATGGACATTGTTTATCAA-AATTTAATTCAACCTCCAGAGGGCAATGGGAAA
GGACACTTCAAGCTGATATTAACACAGC-CAAACAAGCTTTACAAAATGCTCTGTCAC
TCGATGAATCAAGCCCAATT-----CCTGATATTGGATGTTACCCAT
TCATAAAACAAGAAGCGAAAATGTCTACTACTACTTATGCATCAAGTGC-TGAAAACA
TAGCCAAATTACTCAAACAATGGACCAGAAGCGAATCCACAAAT-AATTCAGAGCAAT
CAAAGGCTTCGTCAAGTACTCAATTTTCTTGTAATACTA-C-TAACCAATAATGCCATGA
CTGAATATTCATCTTCATTTGAACCGTCGAATTCAGATCAATTTTACAAAGC-CACGA
CACCTGAAGCTGCTGGTAAATTTTCATGGTGAAAGCAAAAGAGAAATGGATGATGAAA
TTCAGTTGTCAGTAATGCTGGAGAGTTGGCTGTTTGTGATGAAAATGACGATTTATTAA
TTTAG
```



***SLMYB94* in *S. pennellii* (TA3178)**

ATGGGTAGACCACCTTGTGTGATAAAACGGGGTGAAGAAAGGACCATGGACTCCT
GAAGAAGATATTATGCTAGTCTCTTTTGTTCAGAACATGGTCCAGGAATTGGAGG
ACTGTTCCCACTCATAACAGGTTTCAATTTCTTTTCTTCTTTGATTATCGTATAGTCA
CTCAACTAATAGTTACTATGTCATATACTTCAAAGTGTAATGTGTTTGTTTAATGT
GCAGGGCTACGGAGATGTAGCAAAGCTGCAGACTAAGGTGGACTAACTACCTCAGA
CCAGGAATCAAGAGGGGTAGCTTCAGTCAATCAAGAGGAGAAGATGATTATCCAGCTT
CAGGCTCTCTTAGGCAACAAGTATGTATTCTCTCATTAAATTCCTTCATTACCTATC
TCGATCCTTTCGTTTCATTTTCAATGACTGTATTTGACAAAAAAAAAAGATAAA
GAGTTTATTTTTAAAATAGAAATACCAATTTTTGGCATTATACTAAAGTACTTTTAT
TCCATTA----CGATCTTAAACATGTCATGACATTAGGGAGATTGAATTACTATTA
ATGGATCTGGATAGTCACTTTGATGTATTTATTTTTCATTATGAAATCTTTAAAA
GTAATTGTTTACAGTACAGCAAATCCCTTGTTACTGATTTTCTGCTTCTTTGTA-CA
GATGGGCTGCCATAGCTTCATATCTCCCTGAGAGAACCGATAACGACATTA AAAATT
ACTGGAATACTCATTTAAAAAAGAAGCTGAAAGAAGCTTGAAACAAGTGATTTATACT
CAAATGATGGACATTGTTTATCAACATTTAATTC AACCTCCAGAGGGCAATGGGAAA
GGACACTTCAAGCTGATATTAACACAGCTTAAACAAGCTTTACAAAATGCTCTGTCAC
TCGATAAATCAAGCCCAATTCTGACTATAACAATTCCTGATATTGGATGTTACCCAT
TCATAAAACAAGAAGCGAAAATGTCTACTACTACTTATGCATCAAGTGC GGAAAACA
TAGCCAAATTA CTCAAACAATGGACCAGAAGCGAATCCACAAATGATTCAGAGCAAT
CAAAGGCTTCGTCAAGTACTCAATTTTCTTGTAATACTAAT---AATAATGCCATGA
CTGAATATTCATCTTCATTTGAACCGTCGAATTCAGATCAATTTTACAAGCTTACGA
CACCTGAAGCTGCTGGTAAATTTT CATGGTGAAGCAAAGAGAAATGGATGATGAAA
TTCAGTTGTCAGTAATGCTGGAGAGTTGGCTGTTT GATGAAAATGACGATTTATTAA
TTTAG



***SlMYB94* cDNA in *S. lycopersicum*(M82)**

ATGGGTAGACCACCTTGTGTGATAAAACGGGGGTGAAGAAAGGACCATGGACTCCT
GAAGAAGATATTATGCTAGTCTCTTTTGTTCAGAACATGGTCCAGGGAATTGGAGG
ACTGTTCCCACTCATAACAGGGCTACGGAGATGTAGCAAAAGCTGCAGACTAAGGTGG
ACTAACTACCTCAGACCAGGAATCAAGAGGGGTAGCTTCAGTGATCAAGAGGAGAAG
ATGATTATCCAGCTTCAGGCTCTCTTAGGCAACAAATGGGCTGCCATAGCTTCATAT
CTCCCTGAGAGAACCGATAACGACATTAATAATTACTGGAATACTCATTTAAAAAAG
AAGCTGAGGAAGCTTGAAACAAGTGATTTATACTCAAATGATGGACATTGTTTATCA
AAATTTAATTCAACCTCCAGAGGGCAATGGGAAAGGACACTTCAAGCTGATATTAAC
ACAGCCAAACAAGCTTTACAAAATGCTCTGTCACTCGATGAATCAAGCCCAATTCT
GATATTGGATGTTACCCATTCATAAAACAAGAAGCGAAAATGTCTACTACTACTTAT
GCATCAAGTGCTGAAAACATAGCCAAATTACTCAAACAATGGACCAGAAGCGAATCC
ACAAATAATTCAAGAGCAATCAAAGGCTTCGTCAAGTACTCAATTTTCTTGTAATACT
ACTAACATAATGCCATGACTGAATATTCATCTTCATTTGAACCGTCGAATTCAGAT
CAATTTTCACAAGCCACGACACCTGAAGCTGCTGGTAAATTTTCATGGTGAAAGCAA
AGAGAAATGGATGATGAAATTCAGTTGTCAGTAATGCTGGAGAGTTGGCTGTTTGAT
GAAAATGACGATTTATTAATTTAG

***SlMYB94* protein in *Solanum lycopersicum* (M82)**

MGRPPCCDKTGVKKG PWTPEEDIMLVSFVQEHGPGNWRTVPHTHTGLRRC
KSCRLRWTNYLRPGIKRGSFSHQEEKMIIQLQALLGNKWAASYPERT
DNDIKNYWNTHLKKKLRKLETS DLYSNDGHCLSKFNSTSRGQWERTLQAD
INTAKQALQNALS LDESSP-----IPDIGCYPFIKQEAKMSTTTYASSAE
NIAKLLKQWTRSESTNNSEQSKASSSTQFSCNTTNNNAMTEYSSSFEP
SN SDQFSQATTPEAAGKFHGESKREMDDEIQLSVMLESWLF DENDLLI*

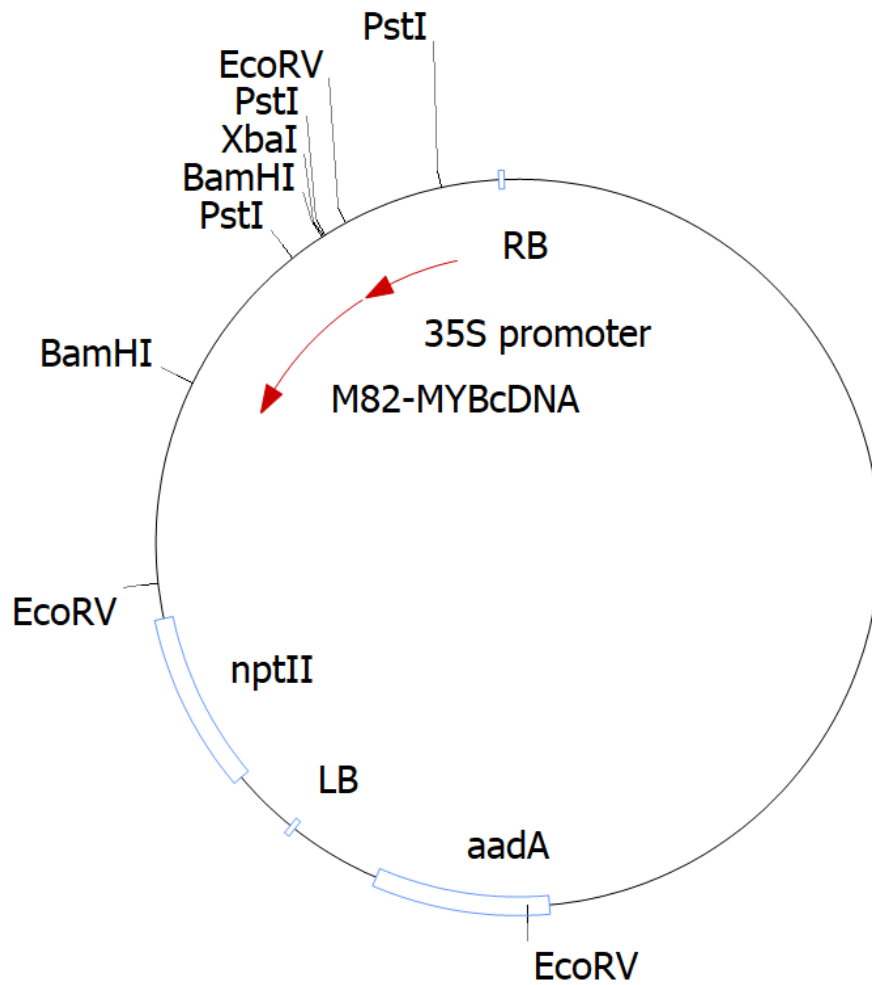
***SlMYB94* protein in *Solanum pennellii* (TA3178)**

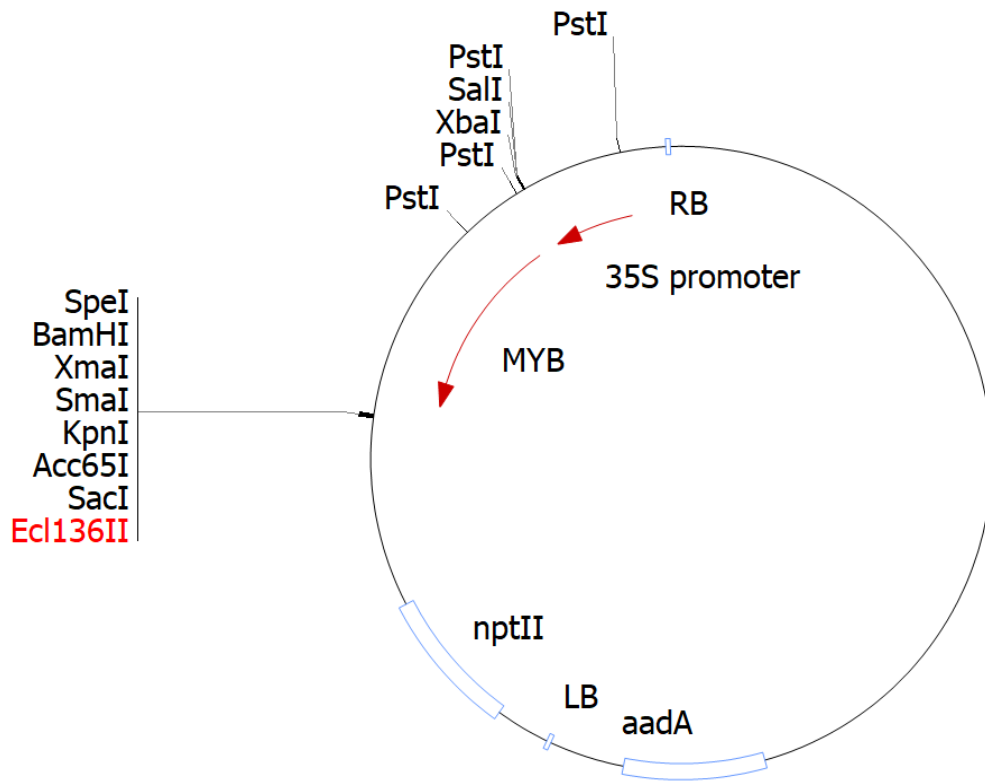
MGRPPCCDKTGVKKG PWTPEEDIMLVSFVQEHGPGNWRTVPHTHTGLRRC
KSCRLRWTNYLRPGIKRGSFSHQEEKMIIQLQALLGNKWAASYPERT
DNDIKNYWNTHLKKKLRKLETS DLYSNDGHCLSTFNSTSRGQWERTLQAD
INTAKQALQNALS LDKSSPISDYTI PDIGCYPFIKQEAKMSTTTYASSAE
NIAKLLKQWTRSESTNDSEQSKASSSTQFSCN-TNNNAMTEYSSSFEP
SN SDQFSQATTPEAAGKFHGESKREMDDEIQLSVMLESWLF DENDLLI*

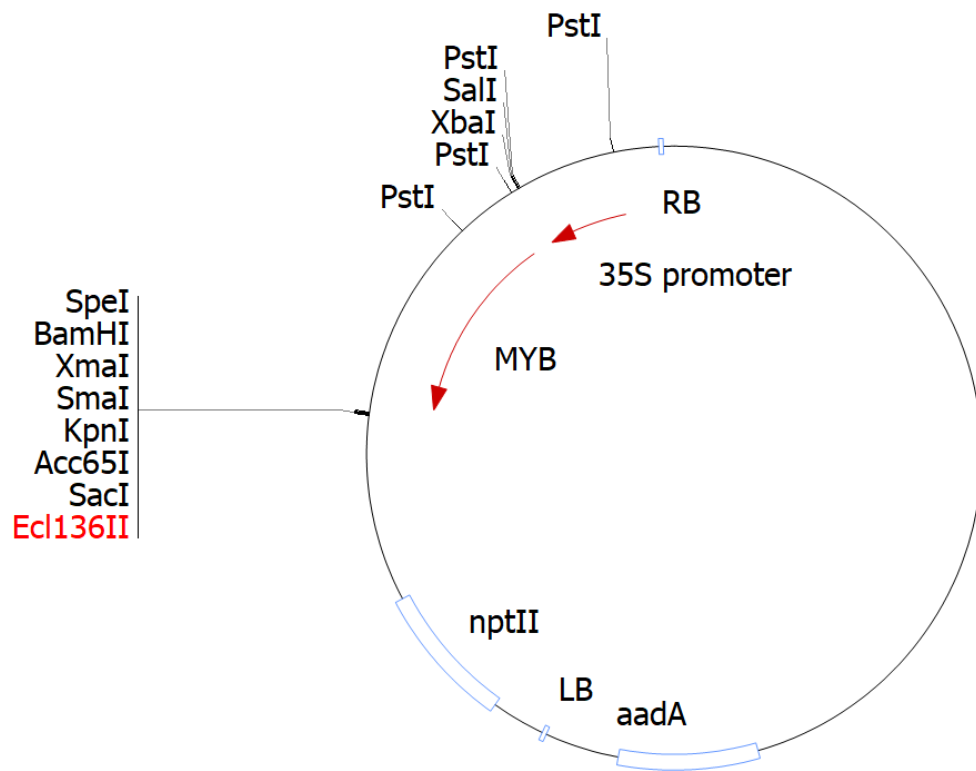
附件2

附件 2、轉殖構築示意圖

由上而下依序為 89C2、89M6、90M4，其中 89M6 和 90M4 構築僅 MYB 片段大小及來源(M82、TA3178)不同

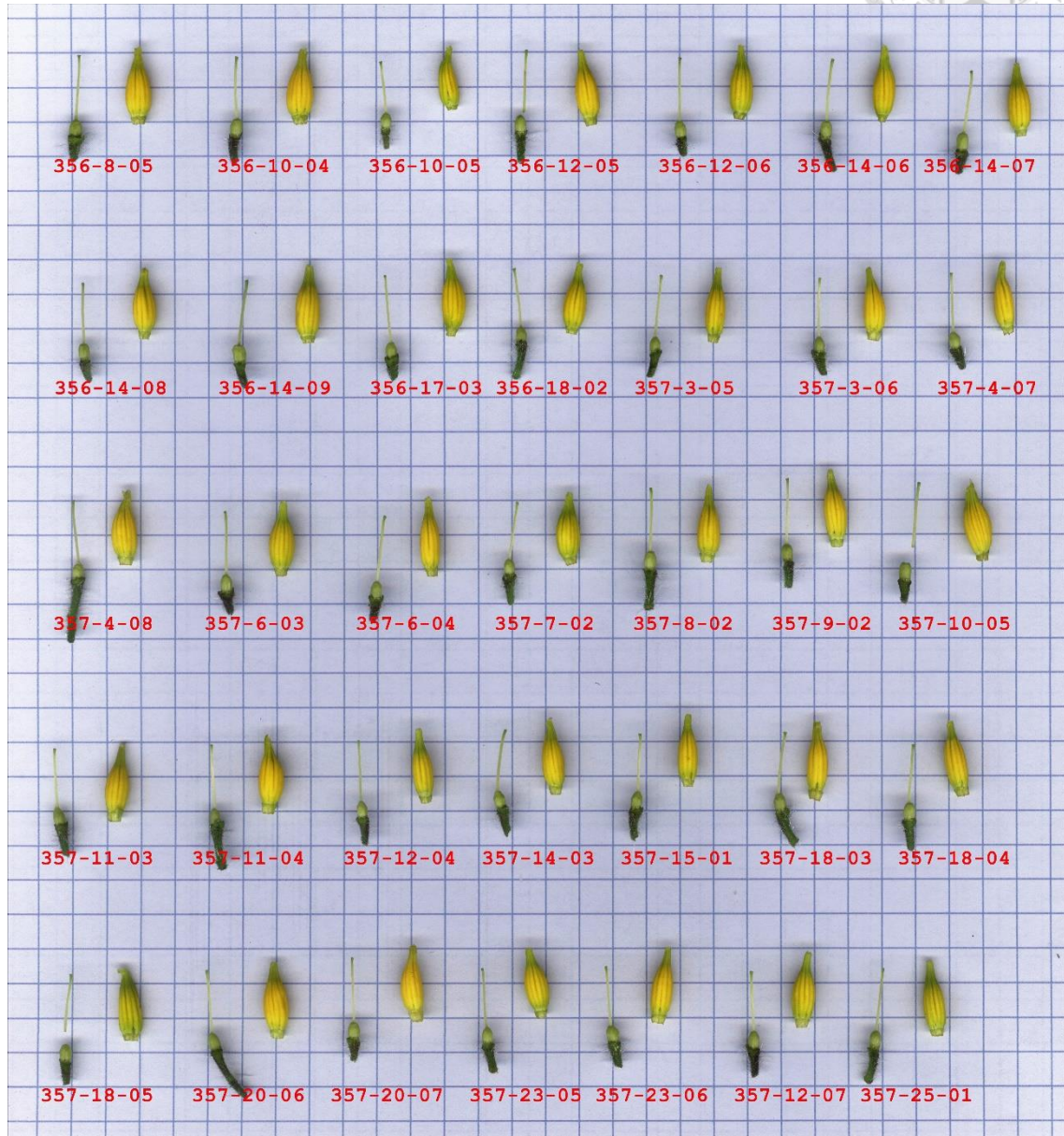
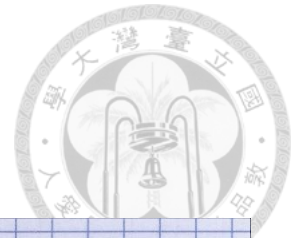






附件3

附件 3、番茄花器掃描圖編號後之範例



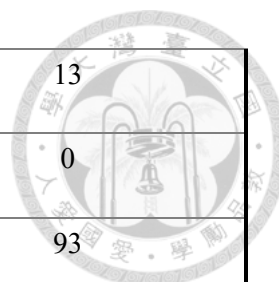
附件4

附件 4、轉殖世代T₀之 35S 及背景檢測與收取的自交種子(T₁)的數量

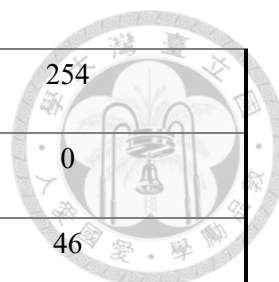


M82 的 <i>SIMYB94</i> 基因 cDNA 轉入 TA3178			
T ₀ 世代編號	是否轉入 35S	番茄背景	收取的自交種子(T ₁)數量
89C2-1	是	TA3178	157
89C2-2	是	TA3178	109
89C2-3	是	TA3178	0
89C2-4	是	TA3178	69
89C2-5	是	TA3178	37
89C2-6	是	TA3178	7
89C2-7	是	TA3178	83
89C2-8	是	TA3178	113
T ₀ 世代編號	是否轉入 35S	番茄背景	收取的自交種子(T ₁)數量
中研院 2-2	是	TA3178	0
中研院 2-4	是	TA3178	29
中研院 2-5	否	TA3178	4
中研院 2-6	否	TA3178	0
中研院 2-8	是	TA3178	47
中研院 2-9	是	TA3178	90
中研院 2-10	是	TA3178	61
中研院 2-11	否	TA3178	75

中研院 2-14	否	TA3178	112
中研院 2-15	是	TA3178	0
M82 的 <i>SIMYB94</i> 全基因轉入 TA3178			
T₀世代編號	是否轉入 35S	番茄背景	收取的自交種子(T₁)數量
89M6-1	否	TA3178	78
89M6-2	否	TA3178	51
89M6-3	否	TA3178	333
89M6-4	否	TA3178	70
89M6-5	否	TA3178	5
89M6-6	未檢測	未檢測	10
T₀世代編號	是否轉入 35S	番茄背景	收取的自交種子(T₁)數量
中研院 3-2	是	TA3178	20
中研院 3-3	是	TA3178	30
中研院 3-7	是	TA3178	48
中研院 3-8	是	TA3178	5
中研院 3-9	是	TA3178	0
中研院 3-10	是	TA3178	0
中研院 3-11	是	TA3178	193
中研院 3-12	是	TA3178	0
中研院 3-14	是	TA3178	140
中研院 3-15	是	TA3178	55

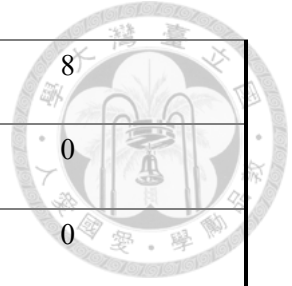


中研院 3-16	是	TA3178	13
中研院 3-17	是	TA3178	0
中研院 3-18	是	TA3178	93
中研院 3-19	是	TA3178	62
中研院 3-20	是	TA3178	0
中研院 3-21	是	TA3178	128
中研院 3-22	是	TA3178	0
中研院 3-23	否	TA3178	0
中研院 3-24	是	TA3178	0
中研院 3-25	是	TA3178	0
中研院 3-26	未檢測	未檢測	0
中研院 3-27	未檢測	未檢測	0
中研院 3-28	未檢測	未檢測	0
TA3178 pp 的 <i>SIMYB94</i> 全基因轉入 M82			
T₀世代編號	是否轉入 35S	番茄背景	收取的自交種子(T₁)數量
90M4-1	是	M82	0
90M4-2	是	M82	66
90M4-3	是	M82	53
90M4-4	否	M82	281
90M4-5	是	M82	0
90M4-6	是	M82	119



90M4-7	否	M82	254
90M4-8	是	M82	0
90M4-9	是	M82	46
90M4-10	是	M82	10
90M4-11	是	M82	86
90M4-12	是	M82	116
90M4-13	是	M82	26
90M4-15	否	TA3178	74
90M4-16	否	M82	0
90M4-17	否	M82	0
90M4-18	否	M82	9
90M4-19	否	M82	0
90M4-20	否	M82	0
T₀世代編號	是否轉入 35S	番茄背景	收取的自交種子(T₁)數量
中研院 4-1	是	M82	0
中研院 4-2	是	M82	18
中研院 4-4	是	M82	0
中研院 4-5	是	M82	0
中研院 4-8	否	M82	0
中研院 4-9	是	M82	10
中研院 4-10	是	M82	4

中研院 4-11	是	M82	8
中研院 4-12	否	M82	0
中研院 4-15	是	M82	0
中研院 4-16	未檢測	未檢測	0
中研院 4-17	未檢測	未檢測	0
中研院 4-18	未檢測	未檢測	42



樓系編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39			
16TS357-14 雄蕊長	11.22	11.04	10.98	11.5	10.94	10.59	10.44	10.63	10.38	11.16	9.869	10.32	11.34	10.98	10.59	10.9	10.97	10.48	11.04	10.59																						
16TS357-14 花柱長	9.183	8.645	8.913	9.228	9.415	9.257	8.67	9.259	9.15	9.746	8.9	9.794	9.468	9.301	8.915	9.334	9.037	8.993	9.262	9.334																						
16TS357-14 子房長	2.385	2.537	2.472	2.933	2.66	2.447	2.787	2.379	2.396	2.452	2.151	1.803	2.474	2.369	2.324	2.256	2.219	1.973	2.43	2.01																						
16TS357-14 子房+花柱長	11.568	11.182	11.385	12.161	12.075	11.704	11.457	11.638	11.546	12.198	11.051	10.777	11.942	11.670	11.239	11.590	11.256	10.966	11.692	11.344																						
16TS357-15 雄蕊長	10.38	10.66	10.46	10.48	10.62	10.14	10.71	10.67	9.986	10.7	10.36	10.62	10.95	11.14	10.82	10.71	10.95	10.79	10.51	10.46																						
16TS357-15 花柱長	8.368	9.15	8.727	9.33	9.256	8.936	8.959	8.929	8.407	9.046	8.612	8.804	9.055	8.971	9.056	9.558	8.934	9.286	8.656	8.944																						
16TS357-15 子房長	2.294	2.851	2.244	2.477	2.396	2.57	2.766	2.193	1.872	2.075	2.153	2.29	2.221	2.605	2.162	1.845	2.116	1.982	2.127	2.007																						
16TS357-15 子房+花柱長	10.662	12.001	10.977	11.807	11.652	11.306	11.725	11.122	10.279	11.121	10.765	11.094	11.276	11.198	11.403	11.050	11.268	10.783	10.951																							
16TS357-16 雄蕊長	7.296	7.426																																								
16TS357-16 花柱長	5.987	7.482																																								
16TS357-16 子房長	1.599	1.478																																								
16TS357-16 子房+花柱長	7.586	8.900																																								
16TS357-17 雄蕊長	8.947	10.96	10.81	11.14	11.28	9.576	9.664	10.54	10.57	10.59	10.32	9.901	10.89	10.08	9.699	9.662	9.711	9.456	9.215	9.304																						
16TS357-17 花柱長	7.139	9.656	8.249	9.575	9.134	8.336	8.298	9.153	9.316	9.082	8.644	8.163	9.398	8.601	7.86	8.143	8.594	8.192	8.18	7.962																						
16TS357-17 子房長	2.296	2.403	2.591	2.821	2.431	1.755	1.707	1.787	1.94	1.9	1.986	2.096	1.843	1.88	1.901	1.94	1.862	1.644	1.707	1.741																						
16TS357-17 子房+花柱長	9.435	12.059	10.840	12.396	11.565	10.091	10.005	10.940	11.256	10.982	10.630	10.259	11.241	10.481	9.761	10.083	10.456	9.856	9.887	9.703																						
16TS357-18 雄蕊長	9.690	10.39	11.18	10.96	10.36	11.9	11.59	11.54	11.76	11.65	11.3	11.03	10.29	10.92	11.26	10.05	10.94	11.36	10.62	10.95																						
16TS357-18 花柱長	7.912	8.658	8.909	8.385	8.204	9.755	10.09	10.07	9.789	9.415	9.302	9.415	9.053	9.274	9.259	8.858	9.32	10.12	9.078	9.585																						
16TS357-18 子房長	2.097	2.282	2.371	2.48	2.485	2.821	2.441	2.619	2.396	2.715	2.408	2.326	2.422	2.505	2.607	1.741	2.067	1.783	2.167	1.98																						
16TS357-18 子房+花柱長	10.009	10.740	11.280	10.865	10.689	12.576	12.535	12.686	12.185	12.130	11.910	11.741	11.475	11.779	12.136	10.999	11.387	11.900	11.245	11.565																						
16TS357-19 雄蕊長	9.421	9.69	8.92	9.682	10.06	9.875	9.261	9.015	9.277	9.016	9.077	9.033	9.241	9.19	9.218	8.967	9.548	8.419	8.85	8.371																						
16TS357-19 花柱長	8.173	8.478	7.572	8.354	8.622	8.524	7.96	7.84	8.33	7.407	7.392	7.934	8.13	7.981	8.147	7.918	8.234	7.429	7.493	6.911																						
16TS357-19 子房長	2.055	1.9	1.875	1.886	1.978	2.063	1.712	1.693	1.747	1.963	1.868	1.794	1.753	1.779	1.944	1.654	2.059	1.951	1.57	1.518																						
16TS357-19 子房+花柱長	10.228	10.378	9.447	10.240	10.600	10.387	9.672	9.533	10.077	9.370	9.360	9.728	9.883	9.760	10.091	9.572	10.293	9.380	9.063	8.439																						
16TS357-20 雄蕊長	10.204	10.41	10.57	11.97	11.04	11.02	10.99	11.5	11.25	10.87	11.97	11.99	12.17	11.01	11.98	10.07	9.49	10.07	9.679	9.122																						
16TS357-20 花柱長	7.123	8.395	9.141	9.747	9.142	8.936	9.287	9.469	10.17	9.533	10.18	10.16	10.27	9.894	10.07	8.693	7.998	8.952	8.534	8.519																						
16TS357-20 子房長	2.602	2.425	2.275	2.631	2.533	2.416	2.779	2.468	1.969	2.399	2.784	2.567	2.598	2.024	2.25	1.787	2.091	1.627	1.793	1.628																						
16TS357-20 子房+花柱長	9.725	11.020	11.416	12.378	11.495	11.352	11.476	11.957	12.142	11.930	12.964	12.727	12.865	11.918	12.320	10.480	10.089	10.579	10.327	10.147																						
16TS357-21 雄蕊長	11.1	10.67	9.781	10.83	10.48	10.47	9.579	10.58	9.962	9.434	9.769	10.52	9.669	9.927	9.418	9.209	9.888	9.226	8.129	7.885	8.259																					
16TS357-21 花柱長	9.224	9.24	8.272	9.008	9.36	8.96	8.85	8.381	9.019	8.574	8.651	8.84	8.333	8.81	7.93	8.17	8.803	8.291	7.004	6.971	7.42																					
16TS357-21 子房長	2.128	2.128	1.895	2.386	2.214	1.793	1.803	2.16	1.751	1.746	1.716	1.99	1.688	1.861	1.663	1.693	1.767	1.679	1.674	1.689	1.755																					
16TS357-21 子房+花柱長	11.352	11.368	10.167	11.394	11.574	10.753	10.253	10.541	10.770	10.320	10.367	10.830	10.021	10.671	9.953	9.863	10.570	9.970	8.660	9.175																						
16TS357-22 雄蕊長																																										
16TS357-22 花柱長																																										
16TS357-22 子房長																																										
16TS357-23 子房+花柱長																																										
16TS357-23 雄蕊長	8.85	10.85	10.66	10.45	10.37	11.11	10.8	9.707	10.46	9.549	10.6	10.29	11.08	9.985	10.77	10.22	10.41	9.738	10.53	10.08																						
16TS357-23 花柱長	7.325	8.405	8.333	8.236	8.508																																					

測系編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39			
161S357-29	雄蕊長	9.306	10.19	9.929	11.36	10.87	10.88	10.42	10.89	10.98	10.4	10.43	10.04	10.21	9.837	9.935	9.167	9.458	9.283	9.174																						
	花柱長	8.355	8.859	8.349	9.314	9.084	9.524	8.464	9.171	9.18	9.091	8.966	9.069	8.403	9.02	8.237	7.376	7.209	7.813	7.704	8.006																					
	子房長	2.27	2.448	1.719	2.481	2.298	2.203	2.24	2.323	2.161	2.62	2.204	2.046	2.066	1.63	1.978	2.067	2.067	1.923																							
	子房+花柱長	10.625	11.307	10.068	11.795	11.565	11.822	10.667	11.411	11.503	11.252	11.586	11.273	10.449	10.704	10.303	9.006	9.187	9.870	9.771	9.929																					
161S357-30	雄蕊長	10.19	11.43	10.86	10.19	10.48	11.06	10.9	10.61	9.97	10.88	10.36	10.2	11.11	11.13	9.989	11	10.15	9.352	9.997	10.39																					
	花柱長	8.595	8.909	8.576	8.684	8.636	8.973	8.881	8.805	8.781	8.956	8.64	8.932	9.21	8.365	8.4	8.266	8.74	8.262	8.283	8.71																					
	子房長	2.303	2.904	2.466	2.305	2.501	2.891	2.178	2.12	1.96	2.241	2.126	2.006	2.289	1.94	2.15	2.122	2.046	1.92	1.96																						
	子房+花柱長	10.898	11.713	12.042	10.989	10.937	11.864	11.059	10.741	11.197	10.766	10.938	11.496	10.654	10.340	11.416	10.862	10.308	10.203	10.670																						
161S357-31	雄蕊長	8.19	10.41	11.9	10.41	10.68	10.52	10.14	10.42	10.54	10.53	10.96	9.795	10.31	9.815	9.916	8.967	8.995	7.865	9.07	8.983																					
	花柱長	7.208	8.599	9.841	9.496	8.363	8.148	8.689	8.226	8.76	8.457	8.041	8.534	8.935	8.93	8.72	8.48	7.087	7.588	6.953	7.576	7.09																				
	子房長	1.797	2.756	2.756	2.936	2.2	2.571	2.122	2.15	2.044	1.923	2.363	2.066	1.898	1.753	2.017	1.913	1.774	1.911	1.913																						
	子房+花柱長	9.005	11.355	12.597	11.892	10.563	10.719	10.811	10.376	10.804	10.380	10.804	10.897	10.661	10.828	10.473	10.497	9.000	9.519	8.727	9.487	9.008																				
161S357-32	雄蕊長	9.956	10.01	10.76	10.833	11.27	11.14	11.63	11.48	11.29	9.926	10.84	10.35	10.7	10.73	9.901	10.33	10.51	10.52	10.18	9.395																					
	花柱長	8.485	8.38	9.307	8.951	9.835	9.367	10.23	9.864	9.642	8.946	8.955	8.921	8.836	8.503	8.398	8.841	8.402	8.797	8.45	8.28																					
	子房長	2.131	2.13	2.219	2.295	2.662	2.523	2.385	2.68	2.206	1.929	2.044	1.964	2.163	2.243	1.98	2.163	2.123	2.046	2.083	1.93																					
	子房+花柱長	10.616	10.510	11.526	11.246	12.497	11.890	12.618	12.544	11.848	10.875	11.049	10.885	10.999	10.746	10.378	11.004	10.525	10.843	10.533	10.210																					
161S357-33	雄蕊長	10.64	11.37	11.32																																						
	花柱長	8.9	9.029	8.764																																						
	子房長	2.341	2.385	2.481																																						
	子房+花柱長	11.241	11.414	11.245																																						
161S357-34	雄蕊長	7.882	8.02	9.314	8.091	7.703																																				
	花柱長	6.242	6.306	7.848	6.761	7.026																																				
	子房長	1.591	1.793	1.745	1.91	1.236																																				
	子房+花柱長	7.833	8.099	9.593	8.671	8.262																																				
161S357-35	雄蕊長	10.42	10.44	10.79	11.23	10.93	9.467	9.621	8.525	8.628																																
	花柱長	8.323	9.151	9.154	9.017	9.573	8.07	7.996	5.919	6.629																																
	子房長	2.084	2.082	2.492	2.389	2.385	2.037	1.807	1.976	1.629																																
	子房+花柱長	10.407	11.233	11.646	11.406	11.958	10.107	9.803	7.895	8.258																																
161S361-1	雄蕊長	8.595	9.169	10.74	10.11	11.11	11.07	10.71	10.53	10.9	10.36	10.18	10.72	10.03	10.25	10.79	9.431	9.844	9.011	7.39																						
	花柱長	6.594	6.228	6.027	6.33	6.731	7.221	6.329	7.692	8.48	7.847	7.44	8.28	6.031	7.751	8.221	7.229	7.449	7.145	5.498																						
	子房長	2.059	2.179	2.178	2.178	2.484	2.391	2.691	2.233	2.474	2.264	2.331	2.684	2.354	2.692	1.801	1.851	1.93	1.76																							
	子房+花柱長	8.543	8.407	8.205	8.508	9.215	9.612	9.020	9.925	10.954	10.111	9.771	10.598	8.715	10.291	10.913	9.030	9.300	9.075	7.258																						
161S361-2	雄蕊長	10.64	10.82	9.467	10.14	10.32	10.01	9.794	9.435	9.806	9.947	9.936	9.463	8.924																												
	花柱長	7.301	7.478	6.406	7.094	6.041	6.413	6.367	6.153	6.522	5.854	7.411	7.308																													
	子房長	2.311	2.084	2.437	2.43	2.379	1.747	1.663	1.794	2.07	2.175	2.145	1.822	1.754																												
	子房+花柱長	9.612	9.562	8.843	9.458	9.473	7.788	8.076	8.181	8.223	8.697	7.999	9.233	9.062																												
161S361-3	雄蕊長	10.01	10.64	10.88	10.79	10.24	10.9	10.04	10.35	10.68	10.98	10.31	10.19	10.83	9.32	9.402	9.198	7.18	6.515	6.941																						
	花柱長	7.217	7.215	6.92	8.003	7.448	7.48	7.659	8.32	8.159	8.211	8.365	8.135	7.521	7.065	6.944	6.54	6.132	6.624	5.059																						
	子房長	2.523	2.305	2.389	2.869	2.006	2.053	2.302	2.584	2.299	2.422	1.869	2.034	2.674	1.526	1.96	1.707	1.621	1.884																							

編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39				
16TS361-9	雌蕊長	10.359	9.514	10.53	11.37	10.64	11.04	11.11	10.54	11.34	8.599	9.027	8.75	8.522	8.741	8.934	8.607	7.407	9.13	8.933	8.898	9.522	8.846																				
	花柱長	7.020	6.416	6.139	7.275	7.421	7.545	7.684	8.143	7.847	7.309	7.137	6.526	7.008	7.512	7.302	7.137	5.967	6.627	7.651	7.269	7.589	7.146																				
	子房長	2.438	2.225	2.437	2.147	2.168	2.106	2.494	1.966	2.546	1.77	1.669	1.885	1.625	1.758	1.974	1.995	1.884	1.812	1.518	1.686	1.742	2.022																				
	子房+花柱長	9.458	8.641	8.576	9.422	9.589	9.651	10.178	10.109	10.393	9.079	8.782	8.376	8.633	9.270	9.476	9.132	7.851	8.439	9.169	8.955	9.331	9.168																				
16TS361-10	雌蕊長	10.48	9.779	9.301	10.12																																						
	花柱長	5.755	5.754	5.708	6.084																																						
	子房長	2.838	2.4	2.267	2.648																																						
	子房+花柱長	8.593	8.154	7.975	8.682																																						
16TS361-11	雌蕊長	10.680	17.33	10.28	10.36	10.13	10.36	10.42	10.69	11.2	10.9	11.28	11.06	10.24	7.834	7.13	7.87																										
	花柱長	5.560	6.701	5.862	7.005	6.969	7.247	8.053	7.638	8.306	7.481	8.236	8.568	7.381	5.972	5.959	6.914																										
	子房長	2.546	2.483	2.56	2.369	2.216	2.389	2.216	2.389	2.216	2.234	1.577	1.884	1.574																													
	子房+花柱長	10.096	9.184	8.422	9.351	9.321	9.548	10.422	9.854	10.695	9.850	11.115	10.784	9.615	7.549	7.843	8.488																										
16TS361-12	雌蕊長	9.84	9.929	11.05	10.85	9.575	10.32	9.221	9.556	9.798	8.332	8.963	7.671																														
	花柱長	4.755	4.028	4.872	5.421	4.813	5.343	5.913	7.493	7.317	7.03	6.21	5.56																														
	子房長	2.43	2.708	2.697	2.369	1.807	1.953	1.705	1.953	1.44	1.611	2.004	2.115																														
	子房+花柱長	7.185	6.736	7.569	7.790	6.620	7.298	7.618	9.446	8.751	8.641	8.214	7.675																														
16TS361-13	雌蕊長	10.91	11.71	11.01	10.16	10.06	9.768	9.424	10.12	9.778	9.973	10.05	9.492	9.417	8.961	9.276	9.754	10.26	9.201	9.035	7.944	10.3	9.088	9.024	9.546	7.468																	
	花柱長	6.96	7.191	7.211	6.819	7.555	7.922	6.774	7.846	7.386	7.361	7.211	7.807	7.616	7.005	6.875	7.167	6.575	6.794	6.817	6.125	7.687	7.022	7.402	6.561	3.329																	
	子房長	2.43	2.745	2.709	2.137	1.96	2.037	2.028	1.852	2.039	1.99	1.798	2.013	1.657	1.576	2.304	2.004	2.026	1.923	1.969	2.531	1.918	1.56	1.684	1.957	1.43																	
	子房+花柱長	9.390	9.936	9.920	8.956	9.515	9.959	8.802	9.689	9.351	9.009	9.800	9.273	8.581	9.179	9.171	8.601	8.777	8.786	8.656	6.905	8.982	9.086	8.518	4.759																		
16TS361-14	雌蕊長	10.73	11.25	8.99	8.348	8.425	8.663	7.918	7.804	7.748	8.994	6.305	8.575	8.203	7.85	9.84	9.32	9.407	9.15	9.623	9.025	9.213	9.951	9.215	8.916	9.731	9.343	7.681	8.941	9.062													
	花柱長	6.439	6.663	6.013	5.517	5.577	5.513	5.88	5.964	6.005	6.813	4.944	6.959	6.402	4.917	7.558	7.14	7.026	7.039	7.136	7.004	7.157	7.385	6.663	6.916	7.407	7.137	6.256	7.273	7.031													
	子房長	2.476	2.526	1.807	1.743	1.765	1.544	1.63	1.597	1.5	2.09	1.991	2.007	1.556	1.473	2.358	2.139	2.026	2.106	2.136	1.521	1.774	1.812	1.533	1.923	1.923	1.862	1.694	2.022	2.171													
	子房+花柱長	8.915	9.189	7.830	7.260	7.342	7.057	7.510	7.561	7.505	8.903	6.335	8.966	7.958	6.390	10.015	9.279	9.052	9.145	9.272	8.525	8.931	9.197	8.196	8.839	9.400	8.999	7.950	9.295	9.202													
16TS361-15	雌蕊長	9.915	10.41	10.02	11	10.36	10.46	11.22	11.04	10.47	10.54	11.2	11.08	10.11	10.81	10.41	10.42	9.458	9.436	8.91	9.411	9.085	8.508	8.872																			
	花柱長	5.852	5.715	6.096	6.988	6.51	6.823	7.54	7.519	7.727	7.865	6.556	8.109	7.182	7.837	7.047	6.852	6.963	7.05	4.144	6.738	6.444	5.833	6.875																			
	子房長	2.295	2.367	2.325	2.502	2.501	2.604	2.374	2.273	2.07	2.295	3.066	2.424	2.189	2.182	2.047	2.594	2.064	1.921	1.917	1.914	1.772	1.581	1.888																			
	子房+花柱長	8.245	8.082	8.421	4.950	9.011	9.427	9.914	9.792	9.797	10.160	9.402	10.533	9.371	10.019	9.044	9.446	9.027	8.971	6.061	8.652	8.216	7.414	8.763																			
16TS362-1	雌蕊長	9.432	9.648	9.648	10.17	11.29	10.4	9.961	9.924	9.947	10.09	10.01	9.825	8.648	8.802	8.652	8.486	9.348	9.358																								
	花柱長	5.910	6.167	6.435	6.631	7.434	6.593	6.4	6.659	7.098	6.963	7.151	7.119	6.256	6.314	5.5	5.183	4.893	5.251																								
	子房長	2.262	1.768	2.05	1.959	2.478	2.08	2.5	2.364	1.923	2.375	2.365	2.175	1.956	2.117	1.792	1.758	1.7	2.267																								
	子房+花柱長	8.172	7.935	8.485	8.590	9.912	8.673	8.900	9.003	9.021	9.338	9.516	9.294	8.212	8.431	7.292	6.941	6.593	7.518																								
16TS362-2	雌蕊長	8.580	8.000	9.691	8.344	10.49	10.96	10.46	10.78	9.939	10.85	10.32	10.8	9.682	9.716	10.31	10.59	10.1	9.766	9.955	9.929	10.51	10.33	9.388	10.22	10.16																	
	花柱長	6.720	6.120	5.896	6.772	6.202	7.001	6.215	6.242	6.33	6.681	6.871	6.873	7.611	6.955	6.264	7.142	6.135	6.058	7.364	7.391	7.686	7.682	7.223	6.602	6.782																	
	子房長	2.438	2.404	2.122	2.417	2.18	2.176	2.257	2.14	2.124	2.368	1.899	2.189	2.455	2.182	2.465	2.095	2.533	2.61	2.019	2.194	1.74	1.974																				
	子房+花柱長	8.586	9.214	8.438																																							

組系編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39			
161S363-2	11	10.11	9.387	10.22																																						
雌蕊長	8.149	7.183	7.342	7.983																																						
花柱長	2.297	2.182	1.769	2.061																																						
子房長	10.446	9.365	9.111	10.044																																						
子房+花柱長	10.257	10.297	10.32	9.273	9.735	9.683	10.23	11.36	11.73	10.35	11.2	11.78	10.38	8.723	8.649	9.231	7.094	7.73	8.129	9.125	8.668	9.553	8.539	10.14	9.512	9.537																
雌蕊長	6.966	6.667	6.618	5.315	6.699	5.984	6.541	7.425	7.695	7.563	7.466	8.517	7.742	6.354	6.219	6.701	4.998	5.661	5.365	6.273	3.035	3.067	3.771	3.457	4.318	3.684																
花柱長	2.335	2.369	2.071	1.813	1.836	1.978	2.326	2.23	2.551	2.049	2.426	2.789	2.185	1.777	1.973	1.652	1.987	1.652	1.882	1.986	1.88	2.011	1.972	2.342	1.742	2.109																
子房長	9.301	9.036	8.689	7.128	8.535	7.962	8.867	9.655	10.246	9.612	9.872	11.306	9.927	8.131	8.192	8.353	6.985	7.313	7.247	8.259	4.915	5.078	5.743	5.799	6.060	5.743																
子房+花柱長	10.445	9.736	10.19	11.43	10.62	10.93	10.72	10.45	9.551																																	
雌蕊長	7.016	6.082	7.643	8.495	7.355	7.852	7.415	7.115	7.662																																	
花柱長	2.275	2.275	1.963	2.747	2.56	2.444	2.137	2.127	1.811																																	
子房長	9.291	8.857	9.606	11.242	9.915	10.296	9.552	9.242	9.473																																	
子房+花柱長	9.714	9.625	9.361	9.71	9.476	9.864	10.38	9.477	10.54	10.6	10.49	10.57	10.23	10.84	10.21	10.79	10.05	10.24	10.19	10.49	10.98																					
雌蕊長	6.272	6.819	7.015	6.719	6.887	5.978	7.067	6.548	7.336	7.375	6.817	7.223	7.167	7.041	7.315	6.991	6.651	6.736	6.921	6.774	7.242																					
花柱長	2.183	1.729	1.805	1.931	1.799	1.808	2.378	1.805	2.143	2.221	2.146	2.271	2.108	2.139	1.968	2.267	2.234	2.361	2.084	2.143	2.189																					
子房長	8.455	8.548	8.820	8.650	8.686	7.786	9.445	8.353	9.479	9.596	8.963	9.494	9.275	9.180	9.283	8.338	8.885	9.097	9.005	8.917	9.431																					
子房+花柱長																																										



附件6

附件 6、16TS355 的焦磷酸定序結果



樣品名稱	A Frequency (%)	G Frequency (%)	推測基因型
M82	1.55	98.45	LL
TA3178	99.33	0.67	PP
89C2-2	87.46	12.54	LPP
355-1	100	0	PP
355-2	100	0	PP
355-3	100	0	PP
355-4	100	0	PP
355-5	100	0	PP
355-6	100	0	PP
355-7	100	0	PP
355-8	100	0	PP
355-9	100	0	PP
355-10	88.92	11.08	LPP
355-11	98.99	1.01	PP
355-12	99.8	0.2	PP

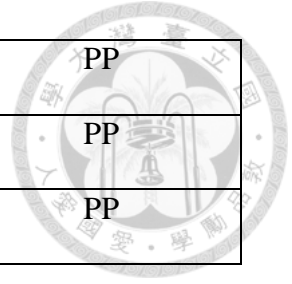
附件7

附件 7、16TS356 的焦磷酸定序結果



樣品名稱	A Frequency (%)	G Frequency (%)	推測基因型
M82	1.55	98.45	LL
TA3178	99.33	0.67	PP
89C2-8	85.78	14.22	LPP
356-1	99.69	0.31	PP
356-2	98.74	1.26	PP
356-3	100	0	PP
356-4	96.19	3.81	PP
356-5	100	0	PP
356-6	96.34	3.66	PP
356-7	100	0	PP
356-8	98.41	1.59	PP
356-9	57.8	42.2	LLPP
356-10	98.79	1.21	PP
356-11	100	0	PP
356-12	100	0	PP
356-13	100	0	PP
356-14	96.43	3.57	PP
356-15	100	0	PP
356-16	99.2	0.8	PP
356-17	100	0	PP

356-18	100	0	PP
356-19	100	0	PP
356-20	100	0	PP



附件8

附件 8、16TS361 的焦磷酸定序結果



樣品名稱	A Frequency (%)	G Frequency (%)	推測基因型
M82	1.55	98.45	LL
TA3178	99.33	0.67	PP
90M4-2	15.77	84.23	LLP
361-1	5.15	94.85	LL
361-2	0	100	LL
361-3	10.53	89.47	LL
361-4	5.13	94.87	LL
361-5	5.92	94.08	LL
361-6	3.97	96.03	LL
361-7	7.01	92.99	LL
361-8	6.6	93.4	LL
361-9	2.92	97.08	LL
361-10	1.76	98.24	LL
361-11	0.85	99.15	LL
361-12	3.27	96.73	LL
361-13	3.8	96.2	LL
361-14	0	100	LL
361-15	2.29	97.71	LL