



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201741663 A

(43) 公開日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 01 日

---

(21) 申請案號：106113134 (22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 11 月 26 日  
 (51) Int. Cl. : G01N33/03 (2006.01) G01N33/52 (2006.01)  
 (30) 優先權：2011/12/29 美國 61/581,552  
 (71) 申請人：陶氏農業科學公司 (美國) DOW AGROSCIENCES LLC (US)  
 美國  
 (72) 發明人：派特森 湯瑪斯 G PATTERSON, THOMAS G. (US) ; 弗里曼 泰德 FREEMAN,  
 TED (US) ; 弗魯克 約書亞 A FLOOK, JOSHUA A. (US)  
 (74) 代理人：惲軼群；陳文郎  
 申請實體審查：有 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：6 共 48 頁

---

## (54) 名稱

利用鹼皂化作用來對植物組織樣本總油含量進行比色測定之技術

COLORIMETRIC DETERMINATION OF THE TOTAL OIL CONTENT OF A PLANT TISSUE  
 SAMPLE USING ALKALINE SAPONIFICATION

## (57) 摘要

本發明係相關於一種植物、植物材料及其油特性。本發明提供了測定植物材料總油含量之實施例、組成物和方法。本發明之方法和組成物於一些實施例中，有助於確認與篩選傳統技術上難以或無法區分之油性狀與次性狀。

This disclosure concerns plants, plant materials, and the oil characteristics thereof. In embodiments, compositions and methods for determining the total oil content of plant materials are provided. Such methods and compositions may in some embodiments allow for the characterization and screening of oil traits and sub-traits that are difficult or impossible to distinguish by conventional techniques.

201741663

# 發明摘要

※ 申請案號： 106113134 (由101144139分割)

※ 申請日： 101/11/26

※IPC 分類： **G01N 33/03** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

## 【發明名稱】(中文/英文)

利用鹼皂化作用來對植物組織樣本總油含量進行比色測定之技術  
COLORIMETRIC DETERMINATION OF THE TOTAL OIL CONTENT  
OF A PLANT TISSUE SAMPLE USING ALKALINE  
SAPONIFICATION

## 【中文】

本發明係相關於一種植物、植物材料及其油特性。本發明提供了測定植物材料總油含量之實施例、組成物和方法。本發明之方法和組成物於一些實施例中，有助於確認與篩選傳統技術上難以或無法區分之油性狀與次性狀。

## 【英文】

This disclosure concerns plants, plant materials, and the oil characteristics thereof. In embodiments, compositions and methods for determining the total oil content of plant materials are provided. Such methods and compositions may in some embodiments allow for the characterization and screening of oil traits and sub-traits that are difficult or impossible to distinguish by conventional techniques.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（     ）圖。（無）

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

（無）

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

（無）

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

利用鹼皂化作用來對植物組織樣本總油含量進行比色測定之技術

COLORIMETRIC DETERMINATION OF THE TOTAL OIL CONTENT OF A PLANT TISSUE SAMPLE USING ALKALINE SAPONIFICATION

## 【技術領域】

優先權申明

[0001]本申請案係申明補充美國暫時專利申請案號61/581,552，於2011年12月29日提申之內容。

發明領域

[0002]本發明係關於一種組成物，以及以分析樣本中植物油之方法。

## 【先前技術】

發明背景

[0003]除了人類的直接消費，植物油亦具有作為牲畜飼料之附加價值，原因在於其較高的能量密度，並且也越來越多地被用作生產生物柴油的主要來源，尤其是在歐洲。含有高油酸(一種單不飽和脂肪酸)，與/或低量飽和脂肪酸的植物油，相較於飽和與多不飽和脂肪酸，可提供相當大的健康和烹飪優勢。Kinney等人(2002) *Biochem. Soc. Trans.* 30:1099-103；White and Weber (2003) "Lipids of the kernel," in *Corn: Chemistry and Technology* 2nd Ed., Vol. 10, Eds. White & Johnson, American Association of Cereal Chemists,

Inc., St. Paul, MN, pp. 355-95。

[0004]儘管不是典型的油類作物，高油(HO)玉米卻引起相當大的關注，因為玉米油提供了高營養價值供人食用，且玉米粉佔了全世界動物飼料相當大的比例。請見Weber (2003) “Lipids of the kernel,” In *Corn: Chemistry and Technology* 2nd Ed., Vol. 10, Eds. White & Johnson, American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, pp. 11-349; Shen等人(2010) *Plant Physiol.* 153:980-7。伊利諾高油(IHO)族群(Moose等人(2004) *Trends Plant Sci.* 9:358-64)，以及Alexho Single-Kernel (ASK)合成族群(Lambert等人(2004) “Single kernel selection for increased grain oil in maize synthetics and high-oil hybrid development,” in *Plant Breeding Reviews Part 1*, Vol. 1, Ed. Janick, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, pp. 153-75)，均為飼育者以重複擇取方式開發高油玉米的例子。這些族群的種子含油量高達22%，且兩個族群的油酸含量也較高。請見Poneleit and Alexander (1965) *Science* 147:1585-6；Zheng等人(2008) *Nat. Genet.* 40:367-72。也有報導提出非常高油酸與/或低飽和脂肪酸的玉米品種。請見美國專利號6,770,801和6,914,176。然而，大規模的商業用HO玉米雜交種尚未被釋出，原因在於其產量明顯減少，以及其他與HO胚質(germplasm)有關的不良農藝性狀。這些高油品種仍然提供了QTL定位和基因發現的寶貴材料，因為長期的篩選會產生異常的油和脂肪酸組成對偶基因。最近的研究已經

在這些胚質上找出幾個主要的油和脂肪酸組成QTLs。請見 Mangolin等人(2004) *Euphytica* 137:251-9; Dudley等人(2004) *Crop Sci.* 44:1419-28 ; Willmot 等人 (2006) *Maydica* 51:187-99 ; Clark等人(2006) *Crop Sci.* 46:807-19 ; Beló等人 (2008) *Mol. Genet. Genomics* 279:1-10 ; Zheng等人(2008), *supra* ; Wassom等人(2008) *Crop Sci.* 48:243-52 ; Wassom等人(2008) *Crop Sci.* 48:69-78 ; Yang等人(2010) *Theor. Appl. Genet.* 120:665-78。儘管現今對於植物油和脂肪酸生物合成途徑已有相當瞭解，且已有許多QTLs被發現，但是這些QTLs的潛在基因，特別是油QTLs，很少被選殖至玉米中。請見Zheng等人(2008)，同上；Beló等人(2008)，同上。這些多數可歸因於一個事實，即每一QTL，即使是主要QTLs，僅能解釋少部分的(10%或更少)表型變異，且受環境影響。

[0005]然而，高油玉米的油和脂肪酸QTLs基因，極少被發現的另一重要原因為，傳統的油測定方法不適用於測定玉米之油表型。舉例而言，以合理效能所進行的油測定方法，通常是以整個種子和濃度為基準，而大部分的玉米種子油(85-90%)位於胚芽，故應以胚芽和胚芽所佔種子部分之油濃度進行測定。請見White and Weber (2003)，同上。這種差異有時會造成油測數據的誤導，因為種子含油濃度也會明顯受種子與胚乳大小的影響。此外，植物組織總油含量的測定，通常是使用有機溶劑進行組織之油重量萃取。這種技術需要相當大量的組織，以準確測定質量。亦可使用脈衝NMR進行直接測定，但這種技術也需要大量組

織才能有足夠的液體油進行偵測。

[0006]因此，至少從高油玉米發展以來就已經存在的植物(包括玉米)油表型測定法，目前已需要改進，且因此需以相對少量樣本進行更準確的含油測定之技術，迄今尚未實現。

## **【發明內容】**

### **發明概要**

[0007]本文描述一種新方法，以確認植物材料之油含量。本發明之方法可用於量化任何植物(例如玉米、大豆、油菜、向日葵和棉花)之任何類型植物材料之總油含量。在特定實施例中，一種植物材料總油含量之測定方法，可用於測定植物材料小量樣本之油含量。此小量樣本之範例包括傳統技術無法準確與有效測定其油含量之樣本(例如單一胚芽樣本)。

[0008]在特定實施例中，油係以溶劑萃取自一樣本，包含經乾燥、研磨之植物材料。所萃取之油隨即以鹼(如氫氧化鉀)皂化。接著以酵素三酸甘油酯試劑測定甘油。反應最終產物以比色法測定(如分光光度法)，並以比色法數據計算樣本之甘油濃度。樣本甘油濃度可用來計算樣本之總油含量。

[0009]前述和其它特徵將經由下列數個實施例之詳述，並參照附圖，而更臻清楚。

### **【圖式簡單說明】**

[0010]圖1包括每一濃度油標準品之相對平均吸光值之

線性擬合圖。數據已減去“空白”吸光值。

圖2包括IHO和ASK某些高油近親配種品系玉米品種之品系關係圖。

圖3包括幾個示範性高油近親配種品系玉米品種所測得之整體種子油差異。散列符號數字(#)代表十一種高油品種中，種子油含量(%)和油/種子(mg)的相對排名。誤差條代表標準差。

圖4包括幾個示範性高油近親配種品系玉米品種所測得胚芽油(%)和EER數據。

圖5包括幾個示範性高油近親配種品系玉米品種所測得胚乳油(%)數據。

圖6包括示範性近親配種品系玉米品種、5UQ001和8UQH03所測得之油特性。

## 【實施方式】

用以實施發明之形態

### I. 幾個實施例概述

[0011]本發明實施例提供的方法，可確認小量植物材料之含油量(例如，總油含量測定)，其為傳統含油測定技術所無法達成的。這些方法在特定實施例中使用，以解決植物育種方面長期以來沒有解決而急需解決的問題。

[0012]在一些範例中，本發明之方法可包括一高敏感性和特異性之酵素比色分析法，以偵測植物材料中，油結合鹼皂化反應產生之甘油。在特定實施例中，此分析可準確定量任何植物材料的總油含量，舉例而言，包括傳統技術

無法分析之非常小量組織樣本(例如，單一胚芽)。因此，在一些實施例中所提供的方法，可分析和篩選先前已知，以及新穎之植物品種之性狀和特性，這些以前可能都無法檢測出。

[0013] 在一些實施例中，植物材料中油的鹼皂化在第一步驟中進行，後續步驟係以比色法偵測皂化反應所產生的甘油。其他實施例則特別適用於高效能之應用，植物材料中油的鹼皂化與皂化反應後甘油的比色法偵測可同時進行。

## II. 縮寫

[0014]4-AAP	4-胺基安替比林
ASK	Alexho單核仁玉米
ATP	腺苷-5-三磷酸鹽
DAP	二羥丙酮磷酸鹽
EER	胚乳/胚芽(重量)比
G3P	甘油-3-磷酸鹽
GK	甘油激酶
GPO	甘油磷酸氧化酶
HO	高油
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	過氧化氫
IHO	伊利諾高油玉米
QTL	量化性狀位點
RBD	精煉、漂白和脫色
TBHB	3-羥基-2,4,6-三溴苯甲酸

### III. 術語

[0015] 油：如本文所指，“油”一詞可指包括甘油骨架(例如，三酸甘油酯、雙甘油酯和單甘油酯)的脂質分子。因此，“油”一詞不包括無甘油骨架的脂質分子，例如，但不侷限於，蠟、游離脂肪酸和不皂化脂質。

[0016] 脂肪酸為鏈長度不同(例如，由約C12到C22，雖然較長和較短鏈的酸為已知)的長鏈脂肪族酸(烷酸)。脂肪酸結構以符號表示， $x;y\Delta z$ ，其中“x”為特定脂肪酸之碳(C)原子總數，而“y”為“z”位置上的碳鏈雙鍵數，並由酸的羧基末端算起。

[0017] 分離或萃取自植物組織樣本之油，一般稱作“植物油”。植物油在室溫下通常呈液態，主要以三酸甘油酯組成。某些實施例提及“總油”，舉例而言，可分離或萃取自植物材料(例如，植物組織樣本)。植物材料“總油”係指植物材料中所有含甘油骨架脂質分子之總量。總油含量可以直接(亦即，藉由測定樣本之總油量)，或間接(亦即，藉由測定小部分之油，並放大測量以評估樣本之總油量)算出。

[0018] 種子的油含量通常以整個乾燥種子的百分比表示。傳統測定油含量的方法包括NMR、NIR和索氏(S Soxhlet)萃取。種子內總脂肪酸組成百分比之常見測定方式為，由種子萃取出油樣本、使油樣本之脂肪酸產生甲基酯，並以氣相層析法分析樣本中各種脂肪酸的比例。

[0019] 植物材料：如本文所指，“植物材料”一詞係指全部或部分源自植物之任何加工或未加工之材料。例如但

不限於此，植物材料可為一植物部分、種子、果實、葉、根、植物組織、植物組織培養、植物外植體、植物細胞，或整個植物。植物材料樣本可指一小部分或部分植物材料，舉例而言，所得之一小部分或部分樣本經本發明之方法分析，以推測整體植物材料之結果。若以整個植物材料進行分析，則植物材料樣本亦可指植物材料本身。

[0020]皂化：如本文所指，“皂化”一詞係指產生脂肪酸鹽的過程。皂化包含以鹼(通常為KOH或NaOH)水解三酸甘油酯，以形成含羧酸鹽之甘油。“皂化值”係指皂化一脂肪樣本所需的鹼量。

[0021]篩選：如本文所指，“篩選”一詞係指用於評估植物材料(或可取得或衍生出植物材料之植物)所欲的特性(如油含量)或所欲的性狀(如高油)之流程。篩選流程不需要完全無偽陽性或偽陰性，只要該篩選程序可測出何種植物材料具有增加所需之特性或性狀即可。

[0022]性狀(表型)：“性狀”和“表型”等詞在本文中可互換使用。如本文所指，“次性狀”一詞係指一表型產生一或多個多重變異性狀。就本發明之目的而言，尤佳之性狀為植物油性狀(例如，高油含量和高胚芽油含量)，而尤佳之次性狀為可產生多重變異植物油性狀之植物油次性狀。

[0023]除非另有說明，本文中“一”和“一個”等詞係指至少一個。

#### IV. 以鹼皂化作用轉換植物油為甘油

[0024]本發明提供了植物材料之油鑑定方法。在實施例

中，植物材料中的油可被鹼皂化水解，並以化學計量方式將油轉換成甘油。鹼皂化作用不具特異性，因為-OH反應物可水解及/或修飾樣本中油以外的材料。因此，相對於脂肪酶酵素，以鹼皂化含三酸甘油酯之樣本，強烈不適用於診斷應用。此外，以鹼皂化反應製作皂時，相較於其他材料，三酸甘油酯反應物通常需為高度純化。

[0025] 脂肪(包括植物油，以及動物脂肪)可被鹼水解其中所含之酯類，而皂化產生皂(脂肪酸鹽)與甘油。植物油中經皂化反應水解的脂肪酸酯包括稱作三酸甘油酯的三酯混合物，其源自不同的脂肪酸。三酸甘油酯可以一或兩步驟過程皂化。在傳統一步驟皂化過程中，三酸甘油酯以強鹼(如鹼液)處理，以加速酯鍵斷裂並釋出脂肪酸鹽與甘油。所得的皂藉由加入飽和氯化鈉而由反應產物中沉澱出來。

[0026] 鹼皂化過程之油類水解作用，係經由將甘油骨架上之羥基與脂肪酸之羧基所鍵結的酯鍵切斷而產生。該斷鍵係經由鹼陰離子的親核性醯基取代反應而進行。任何能執行此三酸甘油酯水解反應之鹼，均可用於本發明之某些實施例中。在特定實施例中，鹼陰離子為氫氧化物陰離子，舉例而言，以鹽分子形式供應。因此，在某些範例中包含使用鹼金屬鹽類(例如，KOH和NaOH)於皂化反應中，使植物油的組成脂肪酸產生甘油。其中，在特定實施例中，進行皂化反應前，植物材料和其中所含的油，可能會先經處理(例如，溶劑萃取，如庚烷萃取)或未經處理。

[0027] 雖然本發明實施例係關於植物材料之油特性，其

所提出之特定脂肪酸、所描述之方法和範例，係部分用於偵測及/或測定皂化反應中所釋出之游離甘油。利用脂解酶分解血清中三酸甘油酯的技術，已依其應用上的嚴格要求，使用於臨床上的診斷應用。這類技術中所使用的化學試劑，在一些實施例中，已被有效用於測定經皂化植物材料中之甘油。

#### V. 甘油偵測分析

[0028] 酵素比色甘油檢測法已被用於測定血清三酸甘油酯濃度，而血清三酸甘油酯濃度已是人類受試者是否有高脂血症、動脈粥狀硬化和胰臟炎之臨床診斷指標。請見，例如，美國專利號4,241,178。這些臨床甘油偵測法的進展，已經大大超越了植物中含油確認的進展。在採用這類臨床檢測的方法中，樣本中的三酸甘油酯被水解為甘油和脂肪酸。為了達到與三酸甘油酯進行如完全和篩選性反應，以及準確的臨床測定，這些方法使用脂解酶進行水解步驟。請見，例如，EnzyChrom™三酸甘油酯檢測套組(BioAssay Systems Cat# ETGA-200)；和購自Pointe Scientific (例如，Cat# T7531-150)之三酸甘油酯試劑組。

[0029] 在水解和釋出甘油後，可使用甘油偵測試劑來偵測和測量甘油，例如，舉例而言但不限於此，商業上可購得之甘油偵測試劑，其組成係以脂解酶-基底的三酸甘油酯診斷套組。此套組之一代表性範例中(Pointe Scientific Cat# T7531-150)，樣本中的甘油經ATP磷酸化，該反應經甘油激酶(GK)催化而產生甘油-3-磷酸(G3P)和腺苷-5-二磷酸鹽。

甘油-3-磷酸隨後經甘油磷酸氧化酶(GPO)轉換為二羥丙酮磷酸鹽(DAP)和過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。過氧化氫與4-胺基安替比林(4-AAP)和3-羥基-2,4,6-三溴苯甲酸(TBHB)反應，以過氧化酶催化，產生紅色的醌亞胺染料(quinoneimine dye)。在該分析中，以540 nm測定時，所產生的顏色強度直接正比於原始樣本的三酸甘油酯濃度。

[0030]其他經由脂解酶活性與甘油偵測而進行三酸甘油酯測定的方法已揭示於如Sugiura等人(1977) *Clin. Chim. Acta* 81(2):125-30 和 McGowan 等人(1983) *Clin. Chem.* 29:538。執行這些和其他方法的套組可購自數家製造商，例如但不限於此，BioAssay Systems (Hayward, CA, USA)、Medibena (Vienna, Austria)、Diagnostic Chemicals Ltd. (Charlottetown, PE, Canada)和Pointe Scientific。

[0031]任何上述臨床方法和套組中，基於甘油之三酸甘油酯偵測試劑，均可用於本發明之某些實施例中。舉例而言，可使用游離甘油試劑(購自Sigma Aldrich, Cat# F6428)或三酸甘油酯試劑組(購自Pointe Scientific, Inc., Cat# T7532-120)。雖然脂解酶在這些臨床方法和套組的預測應用上相當關鍵且不可或缺，但應被理解為，當本發明所述方法之試劑取自這些臨床方法和套組時，脂解酶與這些臨床方法和套組之其他試劑有所區分。

[0032]在特定實施例中，甘油偵測試劑為一種試劑(或試劑之組合)，可用於偵測樣本中以化學計量形式存在，並以油為起始材料之分子。因此，甘油偵測試劑無須直接偵

測甘油，但可間接偵測甘油，亦即直接偵測化學計量反應(或鏈反應)後甘油所轉換之產物。舉例而言，在上述示範性實施例中，利用購自Pointe Scientific的三酸甘油酯試劑組、TBAB和過氧化酶作為甘油偵測試劑，而這些試劑可直接偵測過氧化氫，其由甘油之一連串反應中化學計量地產生。在此範例中，過氧化氫用於產生被視為反應終產物的呈色產物(醌亞胺染料)，其產生量與樣本之甘油含量存在化學計量關係。在一些範例中，甘油偵測試劑可偵測該分子，如此一來，樣本中該分子產量便可被準確定量。其他酵素和試劑可用於特定範例，以產生與樣本甘油量(因此，如起始材料中的油)有關之可偵測信號，如本技術領域中所理解的。舉例而言，許多試劑可反應於甘油所產生的過氧化氫，以產生可偵測(例如，呈色)產物。

[0033]甘油偵測試劑亦可為一種試劑(即，酵素或受質)，其反應後產生之產物與樣本之甘油含量存在化學計量關係，該反應產物隨即用於生成被視為反應終產物之呈色產物，其產生量與樣本之甘油含量存在化學計量關係。此反應可包含一或多種不同的化學反應。舉例而言，在上述示範性實施例中，利用購自Pointe Scientific的三酸甘油酯試劑組、ATP和GK作為甘油偵測試劑，其用於第一個獨特的化學反應以生成G3P，並與樣本之甘油含量存在化學計量關係。GPO為另一種甘油檢測試劑，其用於第二個獨特的化學反應以產生過氧化氫，並與樣本之甘油含量存在化學計量關係。

[0034] 一些實施例可包括已知油含量之油標準品(例如RBD油標準品)，其可用於校正檢測試驗，並有助於結果之解釋。在一些範例中，油標準品可來自與本發明方法所鑑定之植物材料或樣本相同的植物來源(亦即，大豆之大豆油、油菜籽之油菜籽油、玉米之玉米油等)。用於某些實施例之示範性油標準品之製備流程為：(1)油樣本秤重(例如1克)；(2)以溶劑(例如庚烷)稀釋該油至最終濃度為，例如，100 mg/mL；以及(3)移至一容器(例如，一螺旋蓋試管)中儲存。視需要製備品管樣本，係個別秤重該油標準品或單獨的甘油標準品(例如，配合商業上可購得之甘油偵測試劑，如Sigma Aldrich所供應結合游離甘油試劑之甘油標準品)。

[0035] 依據特定實施例之方法，所包含之其他材料和試劑包括緩衝液、界面活性劑、穩定劑、填料、防腐劑(例如疊氮化鈉)和溶劑(例如甲醇、庚烷)。適當的訊號偵測設備(分光光度計、盤式讀儀等)，依使用試劑與樣本之體積而定，使用者可酌情選用。

[0036] 在實施例中，源自植物材料之植物材料樣本或油樣本，經皂化後與甘油偵測試劑反應，以偵測及/或測定該樣本油含量，並確認所得植物樣本是否存在所欲的油性狀或次性狀。由此所得之訊息可用於評估和進行植物育種或植物生產策略，以誘導與/或維持植物之所欲的性狀或次性狀。本發明實施例方法之高靈敏度和小樣本量，可用於偵測先前未知的(或難以確認的)油性狀和次性狀，及/或先前無法詳盡確認的油性狀和次性狀。

## VI. 含油性狀植物之篩選、選育及/或生產

[0037]本發明所揭示之方法係採用高敏感性與特異性之酵素和比色分析，測定以植物為基礎之樣本之油特性，以辨識出具有特定油性狀或次性狀之植物。在本領域之多個過程中，需要辨識出(與任擇地後續篩選)具備特定油性狀之植物。舉例而言，當有數種植物被懷疑其中包含具備特定油性狀之一植物時，便欲篩選這些植物，以辨識出具備該性狀之植物。有數種植物被懷疑其中包含具備特定油性狀之植物之情況，可能出現在植物育種過程，不論是油性狀或另一性狀，其中育種植物油性狀之出現經追蹤或測定。這些植物的產生，亦可於生產轉基因或基因改造植物期間發生，例如使用重組DNA技術。在這些與其他應用中，較佳篩選出具特定油性狀(例如，所欲的油性狀)之植物。植物材料可取自這些植物，而所得植物材料樣本則可依據本發明之某些實施例進行分析，以辨識出一或多個具特定油性狀之來源植物。

[0038]以植物為基礎之樣本可製備自任何植物材料。用於一些實施例之植物為基礎樣本來源，可依所欲分析之特定油性狀而選取。舉例而言，若欲分析種子油之特定油特性，則較佳為該植物為基礎之樣本製備自受測植物種子。在一些實施例中，由植物材料製備之植物為基礎樣本太小，而無法以傳統方法個別分析其油特性。這些實施例之方法已使個別樣本的分析變成可能，其所偵測之次性狀或特徵(例如，個別樣本變異)，在過去因為傳統方法必須混合

成大量樣本而被掩蓋。

[0039]因此，某些實施例之方法可作為植物育種程序的一部分。舉例而言，經母代雜交後篩選其子代植物之油性狀及/或特徵，並擇取經篩選確認之子代植物，以進一步繁殖，例如生產含所欲的油性狀及/或特徵之近親配種植物，及/或基因滲入(introgress)所欲的之油性狀及/或特徵至特定胚質中。

[0040]某些實施例之方法可作為轉基因植物生產程序之一部分。舉例而言，經族群繪製之植物可依據某些實施例之方法，篩選出所欲的油性狀或次性狀，且篩選結果可用於辨識出一或多個有助於油性狀或次性狀之基因。一旦基因被辨識出，則對應於性狀或次性狀之等位基因可被導入植物中，例如，以基因轉形方式生產基因改造植物。額外地或任擇地，某些實施例之方法可用於篩選出已導入所欲的油性狀或次性狀基因之植物(例如，假定之轉形體)，並選取具有該性狀或次性狀之植物。因此，某些實施例之方法可用於結合重組基因技術之程序中，以產生含所欲的油性狀或次性狀之近親配種植物，及/或基因滲入油性狀及/或特徵至特定胚質中。

[0041]在實施例中，一旦本發明所提供之方法用於篩選植物，並辨識出含有所欲油性狀或次性狀者，則該油性狀或次性狀可被轉移至同種植物之其他品種，或轉移至另一植物，採用此技術領域者習知之方法，例如但不限於，涉及交叉授粉並選取子代之傳統植物育種技術，其中經篩選

與確定之植物胚質被導入其他品種或其他植物；以及基因轉形。

[0042]因此，可被一些實施例方法辨識出之所欲的油性状或次性状，可以結合其他所欲的植物性状，藉由將所欲的油性状或次性状，轉移至含有其他所欲的植物性状之品種或植物中。將所欲的油性状或次性状導入含有一或多個其他所欲的性状之過程，常被稱為這些性状的“堆疊”。在一些實施例中，將所欲的油性状或次性状堆疊為複數個所欲的性状，可使植物之油含量或特徵產生進一步變化或增進。在一些實施例中，將所欲的油性状或次性状堆疊為複數個所欲的性状，可產生具有該一或多個(例如，全部)複數個所欲的性状以外，尚有其他所欲的油性状或次性状之植物。

[0043]較佳與一油性状或次性状結合之性状範例包括，例如但不限於：植物抗病基因(請見，例如Jones等人(1994) *Science* 266:789 (抗枝孢屬病菌(*Cladosporium fulvum*)之番茄 *Cf-9* 基因)；Martin等人(1993) *Science* 262:1432 (抗丁香假單胞菌(*Pseudomonas syringae*)之番茄 *Pto*基因)；以及Mindrinos等人(1994) *Cell* 78:1089 (抗丁香假單胞菌(*Pseudomonas syringae*)之 *RSP2* 基因))；抗害蟲基因；蘇雲金芽孢桿菌(*Bacillus thuringiensis*)蛋白、其衍生物，或其模擬之合成多胜肽(請見，例如Geiser等人(1986) *Gene* 48:109 (Bt  $\delta$ -內毒素基因；編碼 $\delta$ -內毒素基因之DNA分子可購自American Type Culture Collection (Manassas,

VA)，例如參照ATCC登錄號40098；67136；31995；以及31998))；凝集素(請見，例如Van Damme等人(1994) *Plant Molec. Biol.* 24:25 (君子蘭(*Clivia miniata*)甘露糖結合凝集素基因))；維生素結合蛋白，例如卵白素(請見PCT國際公開號US93/06487 (以卵白素和卵白素同系物作為殺幼蟲劑抗害蟲))；酵素抑制劑；蛋白酶或蛋白水解酶抑制劑(請見，例如Abe等人(1987) *J. Biol. Chem.* 262:16793 (水稻半胱氨酸蛋白水解酶抑制劑)；Huub等人(1993) *Plant Molec. Biol.* 21:985 (煙草蛋白水解酶抑制劑I；以及美國專利號5,494,813)；澱粉酶抑制劑(請見Sumitani等人(1993) *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1243 (硝孢鏈黴菌 (*Streptomyces nitrosporeus*)  $\alpha$ -澱粉酶抑制劑))；昆蟲特異性激素或費洛蒙，例如蛻皮激素(ecdysteroid)或保幼激素(juvenile hormone)、其變體、其仿體，或其拮抗劑或協同劑(請見，例如Hammock等人(1990) *Nature* 344:458 (保幼激素去活劑))；昆蟲特異性胜肽或神經胜肽，可擾亂感染性害蟲生理功能(請見，例如Regan (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9 (昆蟲利尿劑激素受體)；Pratt等人(1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163:1243 (甲蟲蟑螂 (*Diploptera punctata*) 之allostatin)；美國專利號5,266,317 (昆蟲特異性、麻痺性神經毒素))；由蛇、黃蜂或其他生物自然產生之昆蟲特異性蛇毒(請見，例如Pang等人(1992) *Gene* 116:165 (蝎子昆蟲毒性胜肽))；單萜、倍半萜、類固醇、羥胺酸、苯丙素苷(phenylpropanoid)衍生物或其他具殺蟲活性非蛋白分子之

超積累之負責酵素；參與生物活性分子修飾，包括轉譯後修飾之酵素，例如醣解酶；蛋白水解酶；脂解酶；核酸酶；環化酶；轉胺酶；酯酶；水解酶；去磷酸酶；激酶；磷酸化酶；聚合酶；彈性蛋白酶；幾丁質酶；或葡聚醣酶，無論天然或合成(請見PCT國際公開號WO 93/02197 (callase基因))；含幾丁質酶編碼序列之DNA分子(例如，取自ATCC登錄號39637和67152)；Kramer等人(1993) *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23:691 (煙草天蛾幾丁質酶)；和Kawalleck等人(1993) *Plant Molec. Biol.* 21:673 (歐芹ubi4-2多聚泛素基因)；訊息傳遞刺激分子(請見，例如Botella等人(1994) *Plant Molec. Biol.* 24:757 (調鈣素)；和Griess等人(1994) *Plant Physiol.* 104:1467 (玉米調鈣素)；疏水性矩(hydrophobic moment)胜肽(請見，例如PCT國際公開號WO 95/16776 (抑制真菌植物病原體之鬻(Tachyplesin)胜肽衍生物)；和PCT國際公開號WO 95/18855 (抗病性之合成抗微生物胜肽))；膜通透酶、通道成形分子，或通道阻斷劑(請見，例如Jaynes等人(1993) *Plant Sci.* 89:43 (使轉基因植物抵禦青枯菌(*Pseudomonas solanacearum*)之 cecropin- $\beta$ 裂解胜肽類似物)；病毒侵入性蛋白質或其衍生之複合毒素(請見，例如Beachy等人(1990) *Ann. Rev. Phytopathol.* 28:451 (殼蛋白媒介以抵禦苜蓿花葉病毒、黃瓜花葉病毒、煙草條紋病毒、馬鈴薯病毒X、馬鈴薯病毒Y、煙草蝕紋病毒、煙草脆裂病毒與煙草花葉病毒))；昆蟲特異性抗體或其衍生之免疫毒素(請見，例如Taylor等人，摘要#497，第七屆分子植物微生

物相互作用國際研討會(蘇格蘭愛丁堡)(1994) (經由產生單鏈抗體片段之酵素失活作用))；病毒特異性抗體(請見，例如Tavladoraki等人(1993) *Nature* 366:469 (重組抗體基因之保護免於病毒攻擊))；病原體或寄生蟲自然產生之發育捕捉型蛋白(請見，例如Lamb等人(1992) *Bio/Technology* 10:1436 (真菌之內- $\alpha$ -1,4-D-聚半乳糖醛酸酶經由溶解植物細胞壁之同源- $\alpha$ -1,4-半乳糖醛酸酶而促進真菌菌落拓殖和植物養分釋放；Toubart等人(1992) *Plant J.* 2:367 (內聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白))；以及植物自然產生之發育捕捉型蛋白(請見，例如Logemann等人(1992) *Bio/Technology* 10:305 (大麥核糖體失活基因提供更高的真菌病害抵抗力))。

[0044]較佳與一油性狀或次性狀結合之其他性狀範例包括，例如但不限於：抗除草劑基因(Lee等人(1988) *EMBO J.* 7:1241 (ALS酵素突變體))；Miki等人(1990) *Theor. Appl. Genet.* 80:449 (AHAS酵素突變體))；美國專利號4,940,835與6,248,876 (5-烯醇丙酮醯莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSPs)突變體基因以對抗草甘膦(glyphosate))；美國專利號4,769,061和ATCC登錄號39256 (aroA基因)；草甘膦乙醯轉移酶基因(抗草甘膦)；其他源自鏈黴菌屬(*Streptomyces*)之膦醯基化合物，包括吸水鏈黴菌(*Streptomyces hygrosopicus*)與*Streptomyces viridichromogenes*)，如歐洲專利申請號0 242 246和DeGreef等人(1989) *Bio/Technology* 7:61 (固殺草(glufosinate)磷絲菌素乙醯基轉移酶(PAT)基因以對抗草甘膦)所描述；吡啶氧基或苯氧基丙酸和環己酮(抗草甘膦)；

歐洲專利申請號0 333 033和美國專利號4,975,374 (麩醯胺合成酶基因,以對抗除草劑如L-草銨膦); Marshall等人(1992) *Theor. Appl. Genet.* 83:435 (Acc1-S1、Acc1-S2與Acc1-S3基因,以對抗苯氧基丙酸和環己酮,如烯禾定(sethoxydim)和合氯氟(haloxyfop)); WO 2005012515 (GAT基因以對抗草甘膦); WO 2005107437 (抗2,4-D、fop和吡啶氧基生長素等除草劑之基因); 以及抑制光合作用之除草劑,例如三嗪(psbA基因和gs+基因)或苧膦(膦水解酶基因)(請見,例如Przibila等人(1991) *Plant Cell* 3:169 (psbA基因突變體); 膦水解酶基因之核苷酸序列揭示於美國專利號4,810,648,而含有這些基因之DNA分子可取自ATCC登錄號53435、67441與67442; 和Hayes等人(1992) *Biochem. J.* 285:173 (穀胱甘肽S-轉移酶))。

[0045]較佳與一油性狀或次性狀結合之其他性狀範例包括,例如但不限於,具價值提升性狀之基因,舉例而言,脂肪酸代謝之修飾(請見,例如Knultzon等人(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:2624 (可增加植物硬脂酸含量之硬脂醯基-ACP去飽和酶之反義(antisense)基因)); 降低植酸含量(請見,例如Van Hartingsveldt等人(1993) *Gene* 127:87 (以黑麴黴(*Aspergillus niger*)之植酸酶基因增進植酸分解,添加更多游離磷酸鹽至轉化植物); 以及Raboy等人(1990) *Maydica* 35:383 (選殖與再導入與玉米突變體等位基因有關之DNA,使植酸量下降)); 以及改變相關之碳水化合物組成,舉例而言,將編碼可改變澱粉分支狀況之酵素之基因轉

形至植物(請見，例如Shiroza等人(1988) *J. Bacteriol.* 170:810 (鏈球菌果糖基轉移酶突變體基因)；Steinmetz等人(1985) *Mol. Gen. Genet.* 20:220 (果聚糖蔗糖酶(levansucrase)基因)；Pen等人(1992) *Bio/Technology* 10:292 ( $\alpha$ -澱粉酶)；Elliot等人(1993) *Plant Molec. Biol.* 21:515 (番茄轉化酶基因)；Sogaard等人(1993) *J. Biol. Chem.* 268:22480 (大麥 $\alpha$ -澱粉酶基因)；和Fisher等人(1993) *Plant Physiol.* 102:1045 (玉米胚乳澱粉分支酶II))。

[0046]以下範例之提出係說明某些特定之觀點及/或實施例。這些範例不應被理解為本發明受限於該特定之觀點或實施例之揭示內容。

#### 範例

**範例1：**利用氫氧化鉀水解和偶合酵素呈色反應以測定大量大豆之總油含量

[0047]測量經磨碎大豆之總油含量。經乾燥、磨碎之大豆以溶劑萃取出油，並利用氫氧化鉀皂化。所產生之甘油隨即以偶合酵素偵測試劑進行比色法測定。甘油存在時，酵素偵測試劑可於540 nm提供最大吸收，並以分光光度計監測。於540 nm之吸收度增加量，係直接正比於樣本之甘油濃度，並可用於計算該磨碎大豆樣本之三酸甘油酯(油)總含量。油中的游離甘油量可忽略不計。

#### 油萃取

[0048]稱取約20 g大豆至一小型金屬秤盤上。隨後將該樣本置入60°C烘箱內2小時以乾燥樣本。接著，將樣本移入

乾燥器直到樣本平衡至室溫。平衡後，樣本以 Retsch Grindomix™ (微型機械籠) 轉速10,000 rpm持續20秒磨碎。經磨碎樣本隨後移至1.5 oz彈簧蓋頭容器內，並置於乾燥器中直到使用。

[0049]稱取200 mg磨碎樣本至6.5 mL閃爍瓶中，並將BS-5鋼珠放入該含樣本小瓶內。接著，將4 mL庚烷加入小瓶內並蓋上蓋子。將含庚烷之樣本瓶置於試管架，並將該試管架置入GenoGrinder (SPEX SamplePrep)。設定值200達4分鐘以均質化該小瓶內容物。均質處理後，將試管架移至滑動渦流混合器上，並以運動速度7之設定值混合5分鐘。

[0050]以擺動離心方式進行2500 rpm離心達5分鐘。

定量

曲線、品管組(QCs)與空白組之製備：

[0051]於6.5 mL閃爍瓶內製備一系列油標準品，濃度由10 mg/mL至0.5 mg/mL (建立一參考曲線)，所使用之油標準品儲存濃度為100 mg/mL以進行測定：10 mg/mL (500  $\mu$ L取自100 mg/mL，並以庚烷稀釋至5.0 mL)；8 mg/mL (400  $\mu$ L取自100 mg/mL，並以庚烷稀釋至5.0 mL)；6 mg/mL (300  $\mu$ L取自100 mg/mL，並以庚烷稀釋至5.0 mL)；4 mg/mL (200  $\mu$ L取自100 mg/mL，並以庚烷稀釋至5.0 mL)；2 mg/mL (100  $\mu$ L取自100 mg/mL，並以庚烷稀釋至5.0 mL)；1 mg/mL (50  $\mu$ L取自100 mg/mL，並以庚烷稀釋至5.0 mL)；以及0.5 mg/mL (25  $\mu$ L取自100 mg/mL，並以庚烷稀釋至5.0 mL)。

[0052]在空白組部分，將5 mL庚烷(唯一)移至每孔內。

[0053]在QCs組部分，製備之樣本為標準曲線下方25%，以及標準曲線上方約75%處(分別為2.5與7.5 mg/mL)。

[0054]利用NX-Span 8液體處理機，將閃爍瓶置入24孔盤架上作為承托器，50  $\mu$ L各樣本便可移至96孔稀釋盤中。空白組、曲線標準品和QCs亦吸移至盤上。樣本以1:80之稀釋倍數轉移(依據結果需落於標準曲線內而調整稀釋體積)。每一樣本與標準品皆二重複，分析並測定每一樣本之標準差和變異係數(CV)。

[0055]利用氮氣於96孔乾燥裝置內吹除庚烷。

[0056]庚烷完全吹除後，利用NX-MC液體處理機將溶於甲醇之300  $\mu$ L 2M KOH加入每孔內。

[0057]樣本加蓋並以滑動渦流混合盤搖晃5.0分鐘。

[0058]利用NX-MC液體處理機將700  $\mu$ L之2M Tris緩衝液(pH 7.0)加入每孔內。樣本加蓋並以低至中速渦旋5.0分鐘。

[0059]將175  $\mu$ L分裝之工作試劑加入微量滴定盤。

[0060]針對每一樣本，利用NX-MC液體處理機，將25  $\mu$ L樣本加入含游離甘油工作試劑之盤中。

[0061]每孔之內容物以多次吸放方式混合。

[0062]各孔於37°C下培養10分鐘。

[0063]若使用4/1甘油工作試劑，樣本可於盤讀儀上測定540 nm之吸光值。若使用Pointe Scientific試劑，則樣本可於盤讀儀上測定500 nm之吸光值。

[0064]依據標準品濃度繪製每一曲線點之平均吸光

圖，並以標準品與樣本點之讀值減去空白組之吸光值。請見圖1。

[0065]每一樣本之油濃度係以下列公式計算，其中Abs =吸光值。請見表1。

[0066](樣本吸光值)/(標準品吸光值) x (標準品濃度) =  
mg/dl (三酸甘油酯)

[0067]樣本計算：若樣本吸光值 = 0.300，標準品吸光值 = 0.200，以及標準品濃度 = 200 mg/dl： $0.300/0.200 \times 200 \text{ mg/dl} = 300 \text{ mg/dl}$ 三酸甘油酯。(欲取得S.I.單位之數值，則作乘法： $\text{mg/dl} \times 0.11 = \text{mmol/L}$ )。



**範例2：高油玉米胚質之油含量和脂肪酸狀況**

[0068]玉米油是一種人類可直接消費、增加生物柴油產量和牲畜飼料的重要資源。幾種重要的高油胚質可追溯至IHO或ASK的玉米品種。請見圖2。經由傳統育種方式，許多高油含量、普遍和特殊結合性佳，如5RQ675、UTS51NE及其衍生之品系，已被開發並廣泛用於物種雜交。

[0069]本研究之目的，係詳細測定高油胚質之含油量、脂肪酸狀況及油相關之次性狀，例如胚芽油濃度、胚芽大小(胚乳/胚芽比；EER)和胚乳油。依據本研究結果，我們更佳了解到，各次性狀對這些近親配種品系油含量提高的助益。我們也確定最佳的近親配種品系，進行每一重要次性狀之QTL定位，並發現一玉米品系(SRS72NE)具有相較於正常玉米近親配種品系極低量的飽和脂肪酸。在過去，高油玉米胚質之鑑定侷限於以NIR或NMR測定整體核仁(種子)，其至少部分解釋為何這些油特性先前未被發現(Channabasavaradhya等人，SAGE #2003385；Clayton等人，SAGE #100999)。

**植物材料**

[0070]將下列各種近親配種品系之十個核仁隔夜浸泡於水中、切開取出胚芽與胚乳(包括糊粉與果皮)，並冷凍乾燥至隔日。切開前整體核仁先秤重，並於冷凍乾燥後秤重各成分。

[0071]經分析之高油品系(品系關係示於圖2)為：UUQ21-2 (C99 SibsBxHO/6UQ025)；UUQ21-7 (C99

SibsBxHO/6UQ025) ; UUQ21-9 (C99 SibsbxHO/6UQ025) ;  
UTS51NE (4XZ756/UUQ21-9-1-1//MV8735) ; SRS57NE  
(7SH382/6UQ025//BE4207) ; 5RQ675 (2HOB0014.1B/  
FR1064//CS405) ; SBS02NE (5RQ675/SLB01) ; SRS72NE  
(5RQ675/7RN401) ; 5UQ001 ; 8UQHO3 ; 以及 5RQ311  
(HO4617/FR992-4 KPTYPE , 油性狀經確認)。

[0072]正常油品系為：7SH382；XHH13；6RC172；以  
及MV8735。

[0073]總油測定：在總油分析方面，將冷凍乾燥材料磨  
碎並以庚烷萃取，隨後以氫氧化鉀水解(皂化)，進行總油含  
量之吸光值測定。簡而言之，經庚烷萃取之三酸甘油酯  
(TAGs)以2M KOH水解為甘油和游離脂肪酸。甘油隨後以數  
個額外的偶合酵素反應測定。最終反應顯示於540 nm有最  
大吸收，可使用分光光度計監測。於540 nm之吸光值增加  
量直接正比於樣本中的甘油濃度或總油含量。

### 結果和討論

#### 表型數據

[0074][0001]係測量十一種高油和四種正常油之近親  
配種品系之總共27種重量與油相關之次性狀，並摘錄於表  
2。重要次性狀之更詳細分析如以下所述。

**表2.** 表型數據摘錄。本數據基於每一近親配種品系之10個核仁或胚芽之平均值。EER=胚芽/胚乳重量比。C12:0、C20:2與C22:1無法測得。FAME數據僅針對胚芽。

近親配種品系	種子重 (mg)	胚芽重 (mg)	胚芽油 (mg)	胚芽油 (%)	胚乳重 (mg)	胚乳油 (mg)	胚乳油 (%)	油/種子 (mg)	EER	種子油 % (乾重)	種子油 % (風乾)
UUQ21-2	249.4	53.8	26.0	48.3	181.9	2.5	1.4	28.5	3.4	12.1	11.4
UUQ21-7	209.2	46.1	22.4	48.7	151.4	2.6	1.7	25.0	3.3	12.7	12.0
UUQ21-9	183.1	41.7	22.3	53.6	133.0	2.4	1.8	24.7	3.2	14.2	13.5
UTS51NE	277.8	36.5	16.6	45.4	222.6	3.0	1.3	19.5	6.1	7.5	7.0
SRS57NE	263.8	46.4	18.6	40.7	202.8	1.2	0.5	19.8	4.4	8.0	7.6
5RQ675	201.4	33.6	10.5	31.3	156.9	1.0	0.6	11.5	4.7	6.0	5.7
SBS02NE	239.1	40.2	11.9	29.5	183.5	1.5	0.8	13.4	4.7	6.1	5.7
SRS72NE	237.6	37.5	11.7	31.7	184.2	1.1	0.6	12.8	5.0	5.8	5.4
5UQ001	274.1	57.6	28.4	49.4	203.7	1.8	0.9	30.2	3.5	11.6	11.0
8UQH03	261.2	49.6	25.0	50.4	198.7	2.0	1.0	27.0	4.0	10.8	10.3
5RQ311	140.0	36.3	17.0	47.0	96.8	1.5	1.5	18.5	2.7	13.8	13.1
7SH382	248.1	29.5	7.7	26.3	204.3	0.4	0.2	8.2	7.0	3.5	3.3
XHH13	325.9	39.9	9.9	25.0	261.0	1.4	0.5	11.3	6.6	3.8	3.5
6RC172	309.5	33.7	10.2	30.5	253.2	1.6	0.7	11.9	7.6	4.1	3.8
MV8735	315.8	27.3	6.7	25.1	263.7	1.5	0.6	8.2	9.8	2.8	2.6

### 整體種子油之明顯變化

[0075]種子油(%)、油/種子，和種子重量等數據列於圖3。需注意的是，十一種高油近親配種品系之種子油(以乾燥重量為基準，左圖)之變化由約5.8%至14.2%，而所有這些均明顯高於四種正常近親配種品系(其小於4.1%)。當以mg油/種子(中間圖)表示時，大部分高油品系之油含量多於正常油品系，除了5RQ675及其衍生物，SBS02NE和SRS72NE以外。然而，十一種高油近親配種品系的各項排名中，有些次性狀之變化較大。舉例而言，UUQ21-9於種

子油排名#1，卻於油/種子排名#5；5UQ001於種子油排名#5，卻於油/種子排名#1；以及5RQ311於種子油排名#2，但其每一種子之油含量僅排名#8。排名差異大部分歸因於每一近親配種品系之種子重量差異，其結果顯示於圖右。這些數據強化了我們的觀點，亦即單獨測定種子油(%)，可能會誤導對於特定玉米品種之種子油特性鑑定。

#### *胚芽油濃度和胚芽大小之明顯變化*

[0076] 胚芽油(%)和胚乳/胚芽比(EER, 種子內胚芽比例之良好指標)之變化列於圖4。十一種高油近親配種品系之胚芽油之變化由約29.5%至53.6%，而EER之變化由約2.7至6.1%。大部分高油近親配種品系之胚芽油濃度增加，且胚芽比例增加(EER下降)。然而，UTS51NE之多數油含量增加，主要來自胚芽油(%)升高，故其為胚芽油濃度QTL定位和基因探索之良好提供者。另一方面，5RQ675及其衍生物，SBS02NE與SRS72NE，其胚芽油(%)僅些許升高，而其多數之油含量增加，主要來自胚芽比例較大(EER較小)。這些品系都是胚芽大小、QTL定位和基因選殖的良好提供者。

#### *一些高油提供者之胚乳油增加*

[0077] 如所預期的，整體胚乳油% (0.5%至1.8%)遠低於胚芽油%，如圖5所示。同時也測出，一些高油品系(UUQ21-7、UUQ21-9與5RQ311)之胚乳油濃度高於正常近親配種品系三倍以上。5RQ675及其衍生品系具有正常胚乳油%。有趣的是，SRS57NE具有較高之胚芽油% (40.7%)和低EER (4.4)，卻有相對正常的胚乳油% (0.5%)，顯示至少某

些近親配種品系，可經由不同機制使胚乳油和胚芽油增加。

### 範例3：高油含量供體之分離玉米核仁之表型分析

[0078]由含油供體玉米品系6UQ025及三種精選之正常含油親代品系，所雜交分離之F<sub>2</sub>核仁，測定其核仁重量、每一核仁總油含量和核仁直鏈澱粉含量。

[0079]於標記輔助之高油玉米轉換程序中，以高油玉米品系6UQ025 (~18%油含量)作為第一代含油供體。首次基因定位指出一主要含油基因座或片段，於Ch-9上標記為Phi61/Phi65 (Ch9-45/55)，其解釋了50%以上觀察到的含油變異。若僅有一基因座(或片段)複本，經由等位基因替代運算，顯示可增加1.4%含油量。可惜的是，此基因座非常緊密連接至一蠟質核仁表型，使得這些性狀的分離相當困難。

[0080]爲了支援玉米營養強化計劃，確實瞭解6UQ025之含油QTLs，包括基因對基因和基因對環境之相互作用，是相當重要的。此外，探索其他核仁成分如何影響含油組成亦相當重要。以大量種子樣本測定含油表型之先前研究中，無法從油性狀分離出蠟質核仁表型。此研究說明了進行單F<sub>2</sub>核仁表型確認之努力與結果，其取自正常之精選玉米近親配種品系與蠟質高油供體品系6UQ025之雜交，以克服傳統技術之限制。該傳統技術無法順利達成單核仁之表型確認。

#### 總核仁油含量分析

[0081]以F<sub>2</sub>種子進行單種子分析，包含油表型、種子重量和直鏈澱粉。

[0082] 油萃取。秤取最接近十分之一毫克之單一種子，並放入6.5 mL閃爍小瓶(Simport #4411)。樣本隨即以心軸壓機(arbor press)粉碎，接著每一小瓶加入一顆5/16英寸(0.794 cm)鋼球(目錄號BS-5， Small Parts Inc.)。小瓶隨後加蓋，並以GenoGrinder (SPEX SamplePrep)乾燥研磨3分鐘，其設定為每分鐘750擊錘。樣本隨後渦旋混合，並以每分鐘750擊錘繼續研磨3分鐘。以己烷(4 mL)小心加入小瓶中，再加蓋並放回GenoGrinder另外3分鐘，接著以Troemner VX-2400設定8000 rpm滑動渦旋混合3分鐘。小瓶隨後於6°C下，以Beckman Coulter J6-MI離心機之3000 rpm離心 10分鐘。

[0083] 試劑製備。Pointe Scientific之三酸甘油酯試劑(Pointe Scientific， Cat # T7532-120mL)無須準備。在甘油工作試劑(Sigma)部分，需製備2M Tris緩衝液(pH 7.0)，係以121.1 g Sigma 7-9 Tris (Sigma Cat # 1378)溶於425 mL Milli-Q水中，並加入攪拌子。緩衝溶液以濃HCl調至pH 7.0。以Milli-Q水將最終體積補至500 mL。製備溶於甲醇之2M KOH溶液，係以56.1 g KOH (Sigma Cat # P1767 )顆粒溶於450 mL甲醇中，並加入攪拌子，接著以甲醇將最終體積補至500 mL而製備。

[0084] 標準曲線製備。100 mg/mL工作油之標準品製備，係精準秤取1000 mg全新精鍊之蔬菜種子油至10 ml容量瓶中，並以庚烷稀釋該油至10 mL。標準曲線依據下表3製備，並標記於6.5 mL閃爍小瓶。

[0085] QC標準品之製備係重複上述步驟，並使用第二

種油源。

表3. 標準曲線之產生

曲線點	100 mg/mL工作油	庚烷
10 mg/mL	500 $\mu$ L	4500 $\mu$ L
8 mg/mL	400 $\mu$ L	4600 $\mu$ L
6 mg/mL	300 $\mu$ L	4700 $\mu$ L
4 mg/mL	200 $\mu$ L	4800 $\mu$ L
2 mg/mL	100 $\mu$ L	4900 $\mu$ L
1 mg/mL	50 $\mu$ L	4950 $\mu$ L
0.5 mg/mL	25 $\mu$ L	4975 $\mu$ L
空白組	0	5000 $\mu$ L
QC 2 mg/mL	100 $\mu$ L*	4900 $\mu$ L
QC 8 mg/mL	400 $\mu$ L*	4600 $\mu$ L

\*第二種油源

定量

[0086] 將100  $\mu$ L之各標準曲線點、空白組、QCs和經萃取之含油樣本移至96孔萃取盤。以機械(例如, NX-span-8 Beckman Coulter)操作該移轉動作。該標準曲線被設計為涵蓋單一種子含油總百分比之3-7%範圍。

[0087] 一旦樣本分裝至96孔萃取盤, 便於60°C下以恆定氮氣流吹乾庚烷, 接著加入300  $\mu$ L溶於甲醇之2M KOH。該讀盤隨後加蓋, 並以4000 rpm滑動渦旋混合5.0分鐘。接著移去上蓋, 並將700  $\mu$ L 2M TRIS緩衝液(pH 7.0)加入各孔

內。再次加蓋後，以2000 rpm滑動渦旋緩和混合5.0分鐘。25  $\mu$ L之各樣本隨後移至96孔分光光度計讀盤中，內含175  $\mu$ L購自Pointe Scientific之三酸甘油酯試劑。樣本以滴管尖上下吸放數次混合。一旦樣本充分混合，便將分光光度計讀盤拆蓋，並置於37°C烘箱內10分鐘，接著以分光光度計設定值500 nm讀取該盤。上述流程可全部以多通道機器進行，以達到自動化。

[0088]利用盤讀儀之SoftMax™軟體繪製曲線點，所有標準品組與未知組均減去空白組數值。定量未知組之前，標準曲線具有大於0.99之 $R^2$ 值。檢查QC算出之濃度與已知量是否一致。針對未知組之每一重複樣本，計算其變異數(CVs)。任何CV大於15%者，捨棄並重作。將所得濃度數據輸出至Excel，而每一核仁含油百分比之計算則使用重量數據，其於分析開始時被記錄。

#### 核仁直鏈澱粉含量分析

[0089]利用比色法測定單核仁之脫脂玉米粉之直鏈澱粉含量。秤取30 mg脫脂玉米粉之樣本，放入16x100 mm旋蓋試管，並以3 mL內含60 mM碘之二甲基亞砷：水(9:1)溶液混合。試管緊蓋並於沸水浴中加熱一小時，期間每隔15分鐘渦旋混合。將試管冷卻至室溫，並以去離子水1:200稀釋和分裝。於室溫下培養30分鐘後，測定600 nm之吸光值。直鏈澱粉含量之測定係對照一標準曲線，其由不同比例(0至70%之間)之直鏈澱粉(取自玉米之70%高直鏈澱粉)與支鏈澱粉(取自蠟質玉米)標準品混合而成。針對直鏈澱粉(%)

之檢測範圍，可取得一線性吸光值反應曲線( $r^2 = 0.999$ )。

### 結果分析

[0090]單一種子之分析數據係以JMP™軟體程式進行分析。蠟質核仁表型之定義為任何具有直鏈澱粉含量 $\leq 5\%$ 之核仁。親代品系與分離子代之數據，以單因子變異數分析進行比較，以顯示核仁之平均值與分佈數據，其依據直鏈澱粉含量分類成蠟質或正常。欲驗證所得結果，係於不同地點進行相同分析，以確認不同環境之間是否可獲得類似結果。

### 結果

[0091]本研究主要目的之一為提供一分離群體之表型鑑定，以支援基因定位研究。於所研究之群體中，必須辨識出高核仁油含量性狀之遺傳標記，並明確區分其與緊密相關之蠟質核仁表型之供體品系。經由使用單核仁表型確認技術，核仁之低直鏈澱粉、高油和核仁重量等特徵之辨別和區分是可能的。個別分析之結果如以下所討論。

### 直鏈澱粉含量

[0092]親代表型或分離核仁之核仁直鏈澱粉含量(每一核仁直鏈澱粉%) 之平均值與範圍係被測定。若直鏈澱粉含量 $\leq 5\%$ 核仁質量，則該核仁視為”蠟質”。值得一提的是，雖然6UQ025供體之直鏈澱粉通常 $< 4\%$ ，且精選之親代直鏈澱粉 $> 12\%$ ，其 $F_2$ 後代之直鏈澱粉含量分離範圍卻很廣，最高含量遠多於精選之親代。這很有趣，因為玉米之蠟質性狀已知僅為遺傳性狀。此廣泛範圍之核仁直鏈澱粉含量，

顯示一更複雜之遺傳模式，且可能有多個基因參與該性狀。辨別核仁為蠟質(直鏈澱粉 $\leq 5\%$ )和非蠟質(直鏈澱粉 $> 5\%$ )及其分類有點武斷，有些核仁被認定為“正常”，係因其直鏈澱粉含量僅略高於 $5\%$ 之臨界值。6UQ025供體品系所含最大直鏈澱粉含量為 $3.3\%$ ，故 $5\%$ 值可視為合理之臨界點。三種雜交之每一者的 $90\%$ 之蠟質核仁之直鏈澱粉含量 $<4\%$ 。

### 核仁質量

[0093] 6UQ025供體與三種精選親代品系之間雜交之另一變因為核仁質量差距。各精選親代之核仁質量中位數 $>250$  mg，而6UQ025之核仁質量中位數卻 $<200$  mg。由於核仁質量為計算核仁油對核仁質量的比或油含量百分比之因子，瞭解核仁質量變化是重要的。

[0094] 親代品系與 $F_2$ 子代之核仁質量平均值與範圍係自三種雜交之每一者被測定。於所有情況中， $F_2$ 子代之平均核仁質量高於6UQ025含油供體親代。 $F_2$ 正常核仁之核仁質量略高於 $F_2$ 蠟質核仁。於所有 $F_2$ 子代中，所測得之核仁質量範圍大於親代品系。

### 總核仁油含量

[0095] 為了避免核仁油含量與核仁質量之混淆，係測定每一核仁之總油含量。基於蠟質或正常直鏈澱粉含量而作群組之親代品系與分離之 $F_2$ 子代的油含量平均值與範圍予以測定。該精選之親代品系之總核仁油含量分佈相對狹窄，其中位數油含量為 $8-11$  mg/核仁。6UQ025 油供體品系之中位數油含量為 $24.1$  mg/核仁，其值為正常親代品系之兩

倍以上。三種雜交之  $F_2$ 子代顯示廣範圍之含油量，範圍由正常親代品系之數值至高於油供體親代。於所有情況中，蠟質 $F_2$ 子代之油含量略高於非蠟質子代。 $F_2$ 平均核仁含油量皆明顯高於精選之親代品系。非蠟質 $F_2$ 核仁之高油含量顯示，在這些子代，高油性狀已成功地由蠟質核仁表型中分離。有趣的是，由V72與6UQ025之三種雜交衍生之子代，每一核仁具有最高油含量，顯示某些其他因子影響V72親代品系之油含量。

#### 油含量百分比

[0096]親代品系與 $F_2$ 子代之油含量百分比之範圍係自雜交測定。6UQ025具有最高油含量百分比，係因其較高之每一核仁油含量和較低之核仁質量。蠟質核仁 $F_2$ 子代相對於非蠟質子代具有較高含油百分比之趨勢，明顯基於類似原因。相較於其他兩種雜交，V72群體再次顯示較高之整體油含量百分比。

#### 油含量與核仁質量之間的關係

[0097]親代品系和 $F_2$ 子代之核仁油含量與核仁質量之間的關係係被測定。三個群體中，6RC172群體之油含量與核仁質量之間的關係較弱。相較之下，以7SH382作為精選之親代時，總油含量與核仁質量之間的關係更強。

#### 油含量與直鏈澱粉含量之間的關係

[0098]非蠟質 $F_2$ 子代之核仁油含量與直鏈澱粉含量(%)之間的關係係被測定。所有三種雜交子代之核仁油含量與直鏈澱粉含量百分比之間存在微弱卻明顯之負相關。蠟質

子代不存在明顯關係，可能是由於直鏈澱粉含量範圍窄(0-5%)。同樣地，親代品系表現不明顯。

[0099]上述分析顯示，供體品系之高油含量，可分離自相同品系之蠟質核仁表型(低直鏈澱粉含量)。單核仁表型確認方法可區分出三種雜交之子代。先前致力於由高油特徵分離出蠟質核仁表型之有限成果，係因樣本量大而非單核仁。

[0100]平均而言，相較於非蠟質高油含量分離體，經分離核仁具蠟質核仁表型者，有較高的油含量百分比。當以每一核仁總油為基礎表示時，差異較不顯著。相較於蠟質表型核仁，非蠟質表型核仁有較高的核仁重量。F<sub>2</sub>分離子代之直鏈澱粉含量範圍大於各親代表型，顯示蠟質與非蠟質核仁性狀之間的區分較不明確。不被視為蠟質(直鏈澱粉百分比≤5%)之分離核仁，其總核仁含油含量與直鏈澱粉含量之間存在輕微負相關。這些結果顯示，單核仁之直鏈澱粉、核仁重量與總油等分析，可有效地由高油供體之高油性狀中辨識出蠟質性狀分離體。

[0101]使用單核仁分析，可準確地追蹤每一參與之性狀，以及子代之共分離狀況：直鏈澱粉含量(蠟質)、油含量和核仁質量。此表型數據可用於基因分型作業，以辨別與高油性狀相關之標記，而不受其他兩種相關特徵混淆。測定每一核仁總油，亦可區分核仁質量變異與核仁油含量變異，當測定油含量百分比時，這些變異會造成混淆。

表：脫脂粉

實驗室 編號	樣本	孔	吸光值	濃度	稀釋	總油重 (mg)	重量 (mg)	油%	油 平均%
脫脂粉-1	1A	C3	0.042	0.036	80	2.88	228.2	1.26	1.35
	1B	C4	0.046	0.041	80	3.28	228.2	1.44	
脫脂粉-2	2A	D3	0.034	0.028	80	2.24	210.9	1.06	1.01
	2B	D4	0.031	0.025	80	2.00	210.9	0.95	
脫脂粉-3	3A	E3	0.027	0.021	80	1.68	203.0	0.83	0.79
	3B	E4	0.025	0.019	80	1.52	203.0	0.75	
脫脂粉-4	4A	F3	0.045	0.040	80	3.20	190.2	1.68	1.66
	4B	F4	0.044	0.039	80	3.12	190.2	1.64	

## 【符號說明】

(無)

## 申請專利範圍

1. 一種辨別含有至少一油性狀或次性狀的植物之方法，該方法包含：
  - 提供得自一植物之一含油植物材料樣本；
  - 混合該樣本與一鹼，以皂化該樣本中之酯類，從而產生一數量(amount)的甘油；
  - 偵測該樣本中的甘油量；
  - 計算該植物材料中的甘油量；
  - 測定該植物材料的總油含量，其中一特徵性油含量(characteristic oil content)可預估該植物中存在有至少一油性狀或次性狀；以及
  - 比較該植物材料之總油含量與該特徵性油含量，以測定該植物是否含有該油性狀或次性狀。
2. 如請求項1之方法，其中該油性狀或次性狀為高油(high-oil)。
3. 如請求項1之方法，其中該油性狀或次性狀為取自相同植物之相同植物材料之樣本的油含量中之可變性(variability)，其中該可變性並未反映在總植物材料之油含量。
4. 如請求項3之方法，其中該植物材料為種子，且該樣本為一單獨的種子。
5. 如請求項3之方法，其中該植物材料為種子，且該樣本為一單獨的種子胚芽。

6. 一種用於傳遞在植物品種中之至少一油性狀或次性狀之方法，該方法包含：
- (a) 提供經如請求項18之方法辨別出含有至少一油性狀或次性狀之一第一植物，以及具有一受體基因型之一第二植物；
  - (b) 將該第一植物與該第二植物進行性雜交，以取得一後代群體；
  - (c) 利用如請求項18之方法，從該後代群體辨別出一含有該至少一油性狀或次性狀的個體；
  - (d) 將個體與受體基因型進行回交，以產生一下一代群體；
  - (e) 利用如請求項18之方法，從該下一代群體辨別出至少一含有該至少一油性狀或次性狀的個體；
  - (f) 測定該經辨別含有該至少一油性狀或次性狀之下一代群體之成員，是否進一步包含一所欲的該受體基因型之性狀；以及
  - (g) 若該經辨別出含有該至少一油性狀或次性狀之下一代群體之成員，無一者具有所欲的該受體基因型之性狀，則重複步驟(d)至(f)，直到該經辨別出含有該至少一油性狀或次性狀之下一代群體之一成員，含有所欲的該受體基因型之性狀為止。
7. 如請求項6之方法，其中該油性狀或次性狀為高油 (high-oil)。

# 圖式

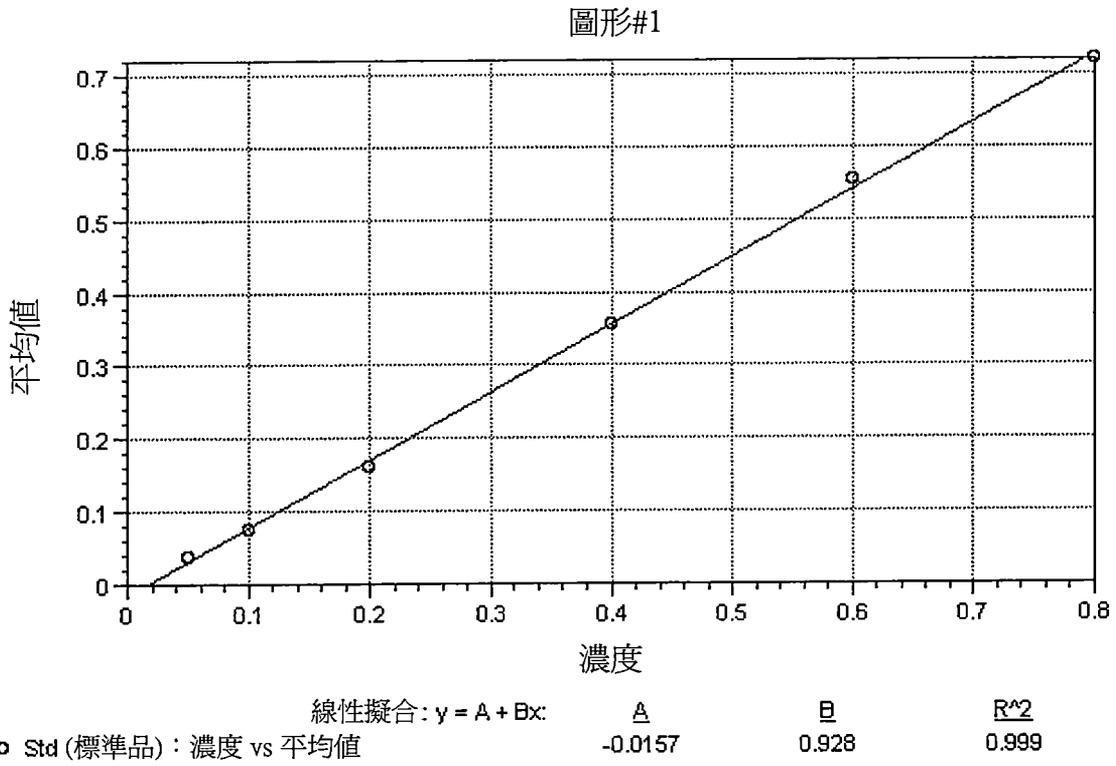


圖1

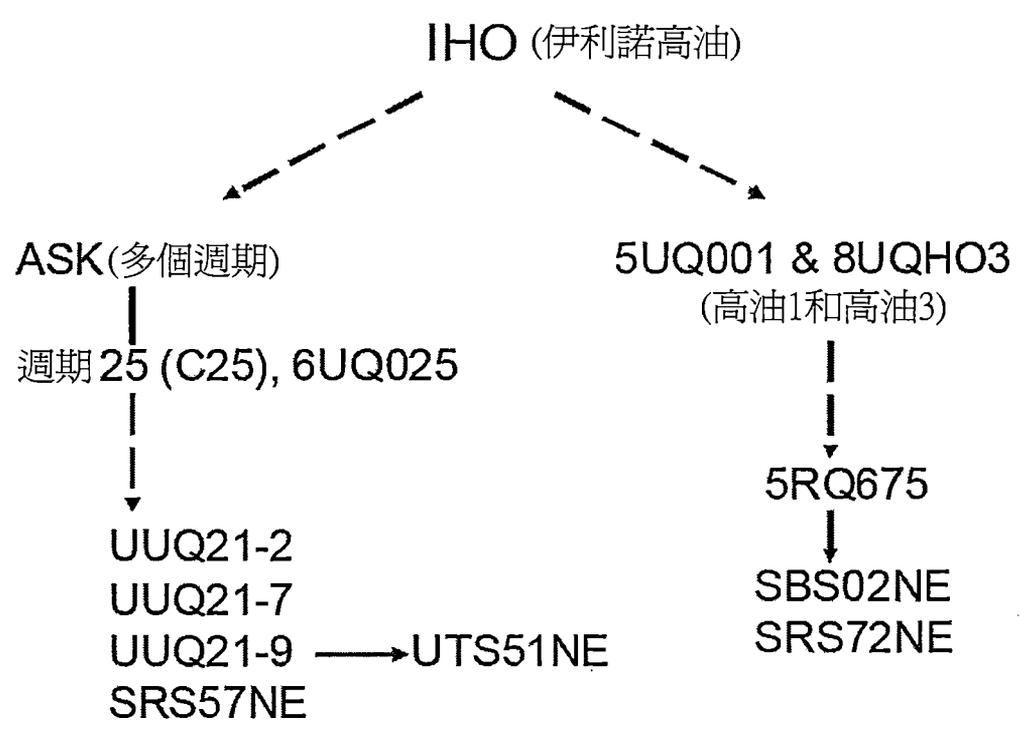


圖2

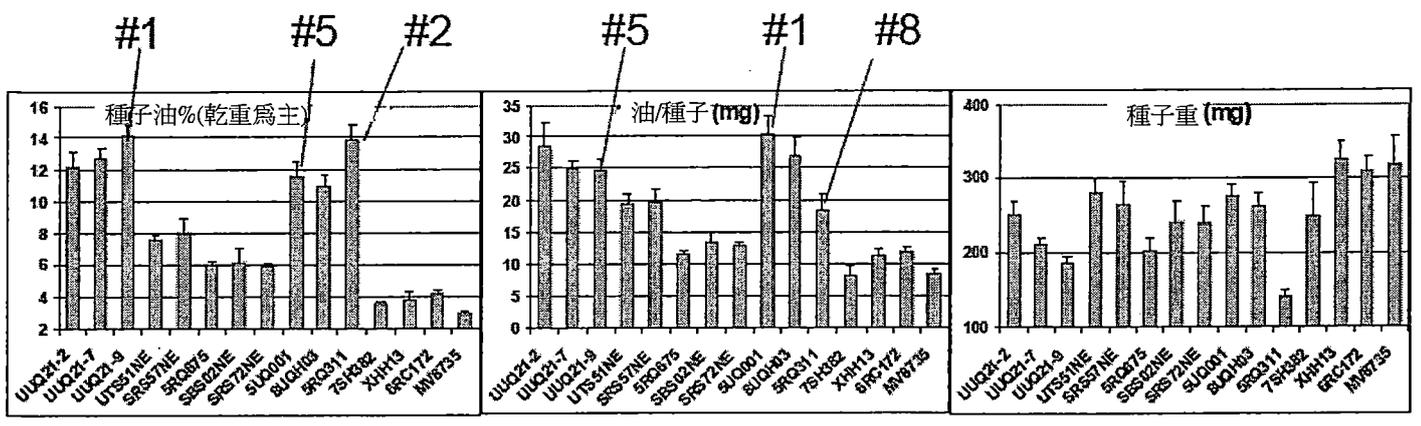


圖3

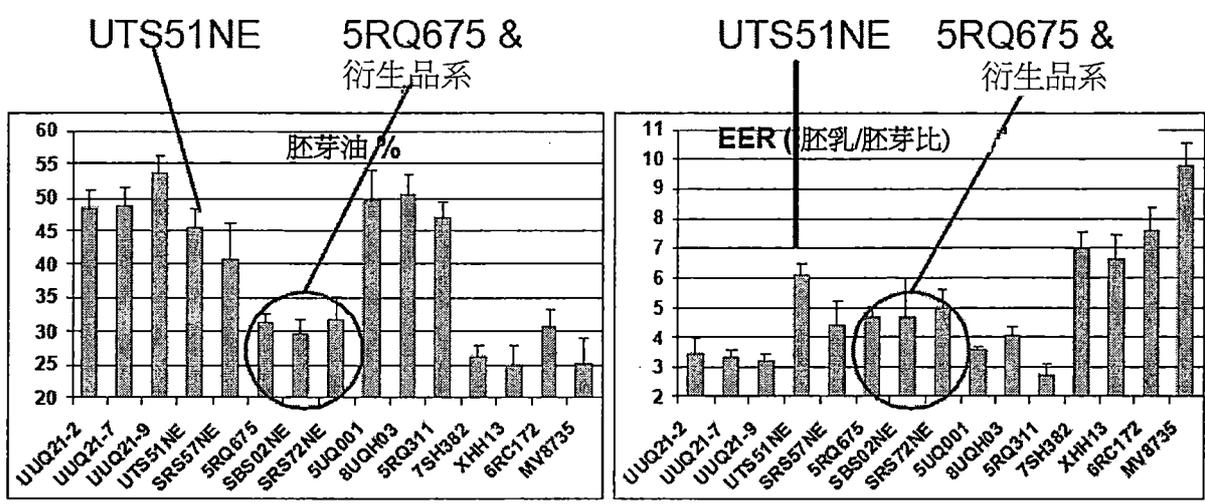


圖4

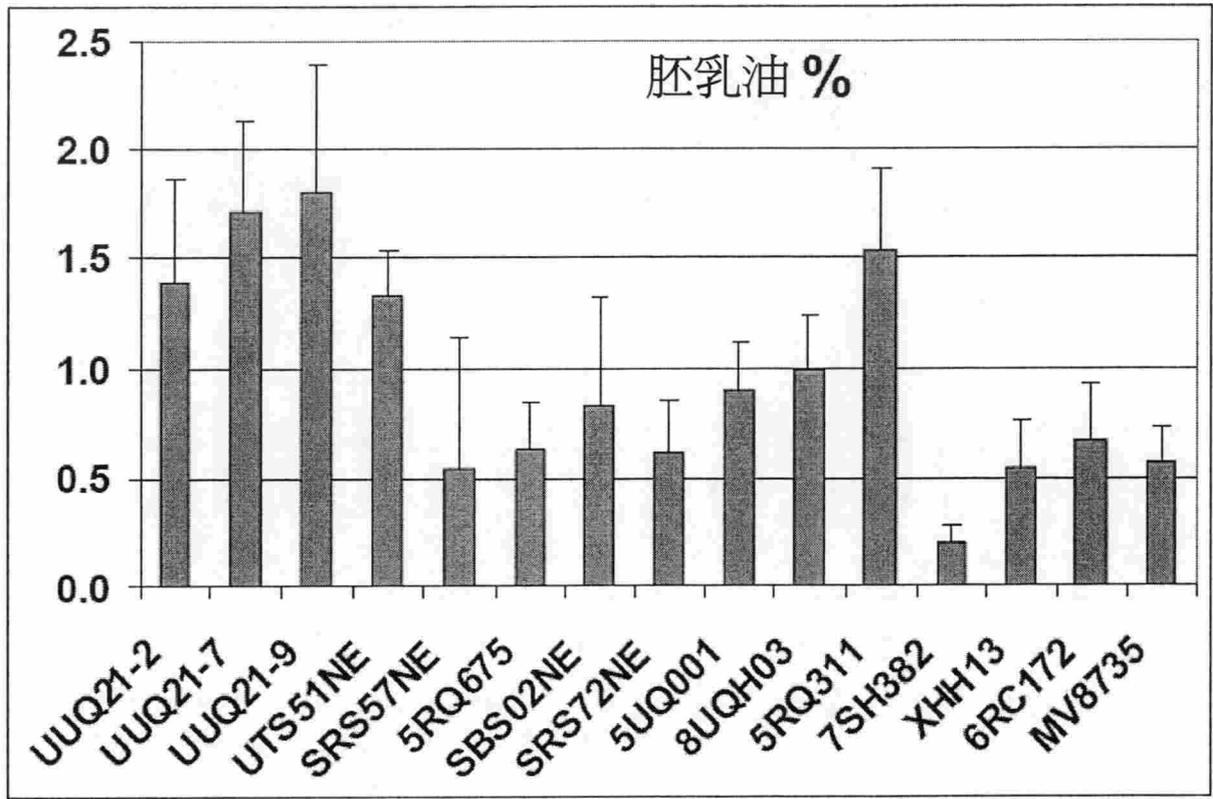


圖5

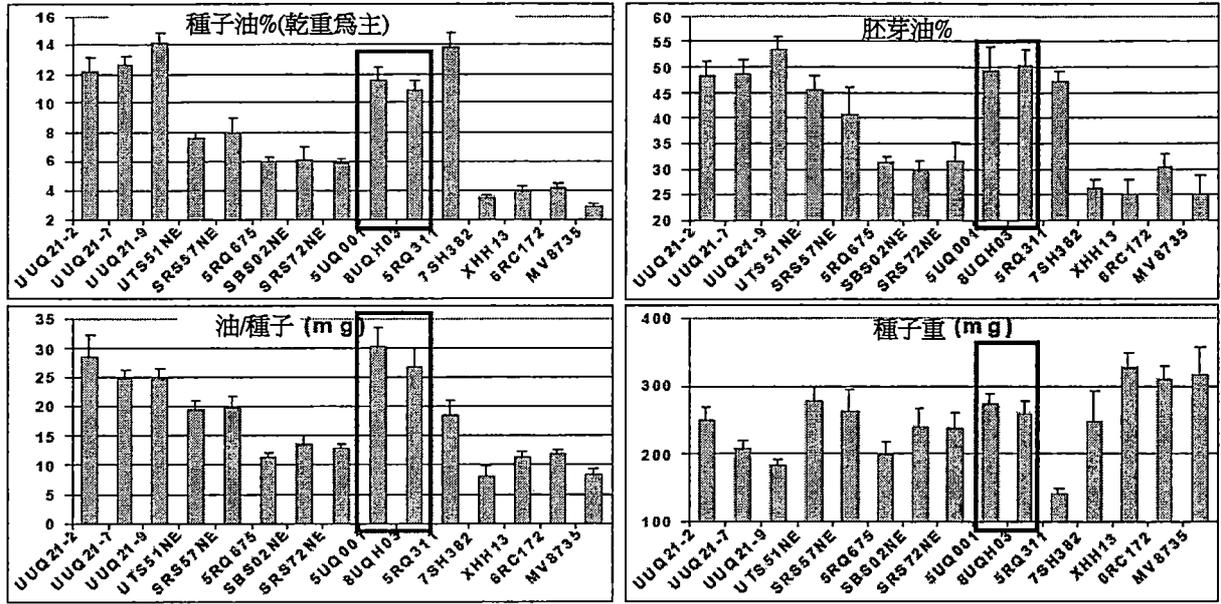


圖6