

分子標誌在蔬菜種子之研發與應用

撰文/吳明哲

台灣位處亞熱帶地區，夏季(6-9月)高溫多濕，病蟲害嚴重，其他季節(10-5月)則氣候溫和，頗為適合作物生長。如此氣候環境造就台灣蔬菜生產的多元化，以種苗業發展而言，台灣可利用本身先天氣候環境，加上後天的種原蒐集，發展出具早生耐熱、抗病蟲害、優良品質等特性的品種，如十字花科的青花菜、花椰菜，茄科的番茄、番椒，葫蘆科的西瓜、甜瓜等，均擁有甚強之國際種子市場競爭力。台灣曾經創造「全世界每四顆西瓜種子大約一顆來自台灣」的佳績，此外花椰菜因具早生耐熱特性，每年種子出口量可達5公噸，業界這些成就令人讚佩。

植物種苗具備如下特性：(1)研發技術性高，經濟性高；(2)品種遺傳具獨特性與永續性；(3)體積小運銷成本低。因此，國內產官學界一致認為植物種苗產業頗為適合土地、人力資源均有限的台灣來發展。台灣植物種苗年產值113億元，出口金額36億元，其中蔬菜種子每年約有5億元之出口值(詳

如表一)，惟台灣大多數蔬菜種子業者為中小型企業，研發能力與投資均難以和國際種子公司匹敵，尤以近年來已有長足進步且能實際應用於提昇種子競爭力的分子標誌技術，台灣大多數蔬菜種子業者雖瞭解其重要性，但顯然力不從心，有賴政府研發單位針對業者迫切需求項目加強研發，並將研發成果技術轉移業者應用。

分子標誌技術簡介

分子標誌是生物體內可以被偵測到能夠遺傳至下一代的特定DNA序列或特定的蛋白質，目前分子標誌之應用全為DNA標誌，蛋白質標誌由於用途有限，現已幾乎不用。分子標誌之利用主要依據個體間分子層次之差異，包括點突變(point mutation)、插入/缺失(insertion or deletion)、重複序列(variable number repeats)等，具備如下之優點：(1)傳統利用外表型鑑定方法，受到植物生長發育階段及環境條件因素影響，造成判定上的困擾。分子標誌是個體遺傳組成的一部分，沒有前述的影響，且僅需要少

表一 台灣植物種苗年產值與出口金額

單位：新台幣元

	蘭花	其他花卉	果樹	蔬菜	農藝及特用作物	合計
產值	34億元	17億元	13億元	23億元	26億元	113億元
出口金額	28億元	2億元	1億元	5億元	—	36億元

資料來源：行政院農業委員會種苗改良繁殖場(2008)。

量的檢體，可利用種子或種苗直接進行鑑定。(2) 傳統病蟲害檢測以鏡檢和血清學方法為主，利用分子標誌檢測有精確及靈敏度高等優點，隨技術發展檢測項目有彈性且能簡化分析流程。(3) 利用與目標性狀連鎖或高度相關的分子標誌，作為育種上間接選拔利用，有助於外表型分析困難與多基因遺傳性狀之選拔，達到提升育種效率的目的。(4) 目前品種鑑定以植物型態分類為基礎，對於外觀類似與侵權訴訟糾紛，分子標誌鑑定有快速和精確的優點，有助於強化品種權保護。(5) 基因改造作物與原品種幾乎相同，如何檢測是否存有轉殖之外源基因，分子標誌是普遍最可行的方法，且針對加工製品亦可進行查驗。

國際間分子標誌技術之研發與應用概況

近年來，全世界分子遺傳技術之發展速度甚為驚人，其應用在農作物育種上主要有兩大類，一為基因改造作物之育成，國際種子公司由於基因改造作物研發成本高昂，所發展出之基因改造作物主要為種子市場龐大之大豆、玉米、棉花、油菜籽等四項作物，其他種子市場較小作物之研發主要由政府經費支持之計畫支持，較有名之例子為美國政府經費支持之抗輪點毒素病基因改造木瓜，印度政府經費支持之抗蟲基因改造茄子；另一為分子標誌輔助育種技術之研發，由於研發成本較低，不論大小作物，也不分公司大小或政府經費支持，只要有利可

圖的研發項目，均很容易發現有人在進行研發。

目前全世界最大的六家國際種子公司—Monsanto、Dupont、Syngenta、Bayer、BASF、Dow 等，除積極發展基因改造作物新品種外，亦不斷強化分子標誌輔助育種能力，以提昇蔬菜育種效率，期望能在競爭激烈之國際種子市場擊敗對手，以提高市場佔有率(詳如表二)，BASF 公司甚至成立子公司—DNA LandMarks 公司，專門研發 SSR、SNP、微轉座子序列多型性 (Inter MITE Polymorphism, IMP) 等分子標誌，並可接受客戶委託，研發可資應用之分子標誌技術。

有關政府經費支持分子標誌輔助育種部份，大多常見於糧食作物，如美國農業部自 2002 年起成立全國小麥、大麥、燕麥分子標誌輔助育種計畫，並建立四個核心實驗室—北卡州立大學、華盛頓州立大學、北達科他州立大學、堪薩斯州立大學，以因應周遭公立育種單位之需求，進行小麥、大麥、燕麥等作物農藝性狀(產量、株高、開花時間、及抗病性等)之基因型鑑定，找出與重要性狀密切關連之分子標誌，提供給各育種單位，以提高育種效率。此外，日本農林水產省支持的日本越光米品種，利用分子標誌技術育成抽穗期不同，可於北抵北海道南至沖繩縣栽培之品種，以及國際稻米研究中心利用分子標誌技術育成耐淹水及抗白葉枯病之水稻品種等，均為利用分子標誌技術育成優良品種甚為成功之案例。近日日本宣布該國 2009 年十大農

表二 全球六大農業生技企業之營收比較

公司	營收項目	營業額 (百萬美元)	營業比重	年成長率	備註
Monsanto	生技種子	4,694	58%	18%	含基改種子及雜交育種種子
Dupont	生技種子	3,353	11%	21%	含基改種子及雜交育種種子
Syngenta	生技種子	2,018	22%	16%	含基改種子及雜交育種種子
Bayer	生技種子	523	1.2%	22%	含基改種子及雜交育種種子
BASF	植物生技	4,294	5.4%	11%	含生技種子及植物保護
Dow	農業生技	3,779	7.0%	11%	含植物生技及動物生技

資料來源：台灣經濟研究院 (2008)。

業生技研究成果中，「抗稻熱病基因附近影響口感基因的發現，可在育種時篩選僅含抗病基因而不含影響口感基因」之研發成果高居第一名，可見分子標誌技術研究在日本所受到的重視程度。

分子標誌的種類

目前使用最為廣泛之分子標誌種類為：

(一) SSR標誌

簡單重複序列 (simple sequence repeat, SSR) 即微衛星標誌 (microsatellite)，是指在真核生物基因組中，由 1-5 個核苷酸以重複排列 (tandem repeat) 的方式存在於基因組中，而這些重複序列的重複次數差異，可視為不同的對偶基因 (allele)，因其在個體間存在著高度的變化，故可作為遺傳相似性分析及遺傳連鎖圖譜建構等用途。SSR 主要的特點為廣泛且穩定存在於真核生物中，其具有高度的多型性，並且屬於共顯性 DNA 標誌，有利於異質結合基因型分辨。早期 SSR 的利用受限於缺乏引子相關序列資訊，因為必須先將 DNA 定序或在基因資料庫 (GenBank) 中搜尋相關的 DNA 序列，知道簡單重複序列兩側相鄰保守序列 (conserved) 之 DNA 序列，才能合成引子，所需的時間與經費較多。但在目前國際上 DNA 序列資料庫之不斷累積的研究成果中，針對較常見的作物，如番茄、油菜、胡瓜等，已有大量的可利用 SSR 分子標誌可由 DNA 資料庫取得，故引子的取得已不再是一個限制因子。由於簡單重複序列的數量眾多，且分散在整個基因組，是目前遺傳研究上最廣泛使用的分子標誌之一。

(二) SNP標誌

單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP)，是指同一位點不同對偶基因之間單一核苷酸的差異，這種變異可由鹼基的同類轉換 transition (A → G, T → C) 或異類顛換 transversion (A → C, T → G) 所引起，並包括單一鹼基的插入或缺失。SNP 是可遺傳的變異中最常見

的一種，在基因組 DNA 序列中，任何鹼基均有可能發生變異，因此 SNP 既有可能在基因序列內，也有可能是在基因以外的非編碼序列上，而 SNP 發生機率在人類平均約為千分之一，而玉米則平均約為百分之一，依物種和親緣關係遠近而異。目前檢測 SNP 的方法有許多種，包括傳統的變性高效液相層析 (dHPLC)、單股構型多型性 (SSCP)、直接定序法等。現行多採用 PCR 技術為基礎，針對 SNP 位點設計引子之 multiplexPCR 或 dCAPS，但是不適合大規模及高通量使用。一般認為利用生物晶片技術是檢測 SNP 理想方法，在同一晶片上布置眾多專一性 SNP 分析探針進行偵測，分析效率是電泳方法的 10-50 倍。美國康乃爾大學 Susan McCough 教授和國際稻米研究所 Michael Thompson 博士積極研究開發水稻品種間之 SNP (據估計水稻約有 160 萬個 SNP)，Susan McCough 教授主要利用 Affymetrix 44K、Affymetrix 600K 等 microarray 系統，Michael Thompson 博士主要利用 Illumina 公司的 bead-array 系統。

國內研發概況

(一) 蔬菜種子純度分子鑑定

目前種苗業者利用田間種植試驗 (grow-out test) 及 RAPD 分子標誌鑑定種子純度，田間種植試驗費時且費工，RAPD 分子標誌技術並不穩定，均有其重大缺點。目前農業試驗所針對葫蘆科蔬菜 (西瓜、甜瓜) 和十字花科蔬菜 (花椰菜、結球白菜) 加強研發 SSR 分子標誌技術，種苗改良繁殖場以番茄、番椒等茄科作物為基礎，逐年建立商業品種種子純度分子檢測技術標準化及管理體系，期望能營造優質種子產業環境，提升種子產業國際化競爭力。

(二) 蔬菜種子種傳病害分子檢測

蔬菜種子種傳病害的鑑定方法包括幼苗長出試驗 (seedling grow out test)、選擇性培養基 (selective medium)、血清學技術、聚合酵素連鎖反



應 (polymerase chain reaction, PCR) 為基礎之技術等，其中以聚合酵素連鎖反應之技術為分子標誌檢測技術中靈敏度最高、最穩定之技術，惟大多種苗業者並未具備分子檢測能力。經農委會整合結果，由中興大學等會外學研機構、種苗改良繁殖場、台南區農業改良場等單位加強研發西瓜細菌性果斑病與花椰菜黑腐病分子檢測技術，由農業試驗所研發西瓜蔓枯病與炭疽病、甜瓜病毒（胡瓜嵌紋病毒、矮南瓜黃化嵌紋病毒、胡瓜綠斑嵌紋病毒）、花椰菜黑斑病與菌核病分子檢測技術，並由動植物防疫檢疫局負責審核分子標誌標準作業程序及建立出口種子無特定病原驗證及發證系統。

（三）分子標誌輔助育種選拔

一般而言，蔬菜種子產業之競爭力來自於育種選拔之能力，種子業者面對同業之激烈競爭，必須不斷推出優良新品種，以維持自身競爭力，甚至擴張市場佔有率。分子標誌輔助育種選拔需先建立高密度分子標誌連鎖群圖譜，以定位重要性狀之基因座，找出與基因緊密連鎖之分子標誌，做為提高育種選拔效率之利器。綜觀國內各大小蔬菜種子業者，普遍需要抗病蟲與適合有機栽培品種，希望藉由分子育種技術縮短育種期程，但大多能力不足，因此期待政府研發單位針對迫切需求之項目加強研發，將基因—標誌模組技術轉移業界應用於育種選拔，並協助業界培訓人才。

目前農委會植物種苗團隊業已整合各研究機關，針對業界迫切需建立之分子標誌輔助育種技術加強研發，這些研發項目包括：亞蔬中心研發番茄抗黃化捲葉病毒、抗晚疫病、青枯病等分子標誌輔助育種技術；種苗改良繁殖場研發番茄抗黃化捲葉病毒、斑點萎凋病、根瘤線蟲、番椒辣椒素、木瓜性別相關基因等分子標誌輔助育種技術；台南區農業改良場研發番茄抗黃化捲葉病毒、甘藍抗黑腐病等分子標誌輔助育種技術；花蓮區農業改良場研發

番茄抗黃化捲葉病分子標誌輔助育種技術；農業試驗所研發西瓜抗蔓割病、苦瓜抗萎凋病、甜瓜抗白粉病、胡瓜雄不稔性等分子標誌輔助育種技術。此外，農委會亦委辦大專院校針對番茄晚疫病、番椒雄不稔性、青花菜與花椰菜早生耐熱等四項分子標誌輔助育種技術執行學界科專計畫。

（四）分子標誌品種鑑定

植物品種為智慧財產之一，我國具有外銷全球之毛豆、番茄等優良作物品種，遭受侵權損失之權利金難以估算。植物品種侵權糾紛之判定單位為司法單位，農政單位應整合現行品種權之性狀檢定及分子標誌為主之植物品種鑑定技術，建置服務平台，並加強國際合作，協助我國業者進行植物品種權之全球佈局。

目前農委會植物種苗團隊中，高雄區農業改良場與台南區農業改良場業已進行毛豆品種分子鑑定標準作業流程建立中，花蓮區農業改良場進行苦瓜、番茄、青葱分子標誌品種鑑定技術研發，台中區農業改良場進行豌豆分子標誌品種鑑定技術研發。

（五）基因改造作物檢測與監測系統

目前全世界基因改造作物已達1億4千萬公頃，以玉米與大豆為大宗，近年來台灣雖已甚少飼料用玉米與大豆之種植，但此兩項作物主要以甜玉米與毛豆等蔬菜用途方式生產，因此進口國外生產之基因改造玉米與大豆及其產製品必須嚴密監控，防患基因污染至甜玉米與毛豆產區。此外，甜玉米與毛豆進口國常要求我國外銷種子業者提出非基因改造作物證明，造成非關稅貿易障礙問題，因此外銷產品如能直接在本地由認證實驗室執行檢測，可避免產品重複檢測，降低產品查驗成本，暢通國際貿易。

為克服前述問題，農委會業已由農糧署整合各單位建置基因改造作物檢測平台，中興大學建立基因改造作物田間取樣模式，種苗改良繁殖場、桃園區農業改良場、台南區農業改良場、花蓮區農業改

良場與農業試驗所負責田間取樣、田間檢測與樣品分析，最終由種苗改良繁殖場負責樣品複檢確認，並建置基因改造作物檢測標準流程、基因改造作物聯合實驗室檢測模式與電腦資料庫管理系統。

未來努力方向

近年來全世界分子生物技術之發展速度甚為驚人，許多分生技術不僅靈敏、快速、準確，而且成本費用不斷降低，使得過去昂貴且可行性低之技術變得非常實用化。有關分子標誌在蔬菜種苗之研發與應用上，國際大型種子公司均已普遍採用，而且大力投資在分子標誌技術之研發，使得這項技術之實用價值愈來愈高。台灣蔬菜種子公司大多為中小型企業，在資本、人力、設備上均無法像國際大型種子公司那樣大量投資在分子標誌技術之研發上，有可能會導致台灣蔬菜種子之外銷市場占有率逐年下降。為力挺國內蔬菜種子公司之市場競爭能力，政府應在研發面、產業面、制度面、國際合作面上加強分子標誌在蔬菜種子之研發與應用：

(一) 研發面

1. 加速開發具有利基之耐熱蔬菜作物如番茄、花椰菜、結球白菜等的研發。
2. 開發缺乏基因組資料之作物如西瓜、花椰菜等之分子標誌系統測試。
3. 建立高感度、高通量分子標誌檢測系統。
4. 加強功能性基因之選殖與分析。

(二) 產業面

1. 辦理示範觀摩與技術研討會。
2. 加強辦理技術轉移。
3. 加強產業發展規劃分析。
4. 建置技術與諮詢服務平台。
5. 促進新事業「農業生技檢測服務」業務推展。

(三) 制度面

1. 蔬菜種子純度認證：預定在101年度建立葫蘆科和

十字花科蔬菜種子純度分子鑑定認證制度。

2. 蔬菜種子種傳病害分子檢測：預定在100年度建立西瓜果斑病、十字花科蔬菜黑腐病無病原認證與發證制度。
3. 品種鑑定：預定在99年度建立毛豆，101年度建立番茄品種鑑定標準作業流程。
4. 基因改造與非基因改造證明：預定在99年度建立大豆種子，100年度建立玉米種子非基因改造認證制度。

(四) 國際合作面

1. 品種分子鑑定規則必須與各先進國家如荷蘭、日本、美國等接軌，以確保我國蔬菜種子之品種權。
2. 病害分子檢定技術必須標準化，且應獲得進口國之認可。
3. 加強重要目標性狀之國際合作，以提升我國分子標誌輔助育種技術之水準。
4. 尋求與國際尖端機構之合作機會，例如與法國農業科學研究院(Institut national de recherche agronomique, INRA)在基因改造作物檢測與監測技術之合作。

AgBIO

吳明哲 行政院農業委員會農業試驗所 生物技術技組 組長