

分子標誌在農業生技 產業上之應用

撰文/陳哲仁·吳明哲

前言

分析DNA差異是現今作物遺傳研究的重點，在此領域中分子標誌（molecular marker）是非常有用的工具，用以分析作物的遺傳變異和遺傳組成，目前已經有多種分子標誌系統成功建立，包括RFLP（restriction fragment length polymorphism）、RAPD（random amplified polymorphic DNA）、AFLP（amplification fragment length polymorphism）以及SSR（simple sequence repeat）等。這些分子標誌往往與基因組中的特定位置或基因有關聯，分子標誌使用上大致可分為物種演化和遺傳圖譜建立兩大方面，利用分子標誌的差異估算物種遺傳歧異度和建構遺傳圖譜以分析質量或數量性狀，衍生在農業產業的應用可分為1.品種鑑定2.種子品質檢查3.基因轉殖作物檢測4.分子標誌輔助育種選拔（marker-assisted selection, MAS）四大項目。因為分子標誌的內容是個體遺傳組成的一部分，因此，幾乎所有的農業分子生物技術都離不開基因與分子標誌的範疇；根據ISAAA組織的報告指出，2006年全球基因轉殖作物市值約為61.5億美元，佔全球約300億美元商業種子市場其中的2成，基因轉殖作物市值分別為大豆（26.8億美元）、玉米（23.9億美元）、棉花（8.7億美元）以及油菜（2.1億美元），估計2007年產值將超過68億美元；此外，自1980年代DNA分子標誌技術的發展，育種人

員開始嘗試分子標誌協助育種的新技術，利用分子標誌間接篩選，精準地導入特定的優良性狀，以期獲得超過現有栽培種的新品種，在過去十年間分子遺傳的進展，育種人員逐漸能掌握基因座（gene locus）與性狀的關係，及同一基因座不同對偶基因表現的差異，加上分析設備上的改進，對分子標誌分析的效率及精確度都大幅提升，花費成本也明顯降低，各國農業生技公司也投入大量資源研發，分子標誌技術應用至商業品種改良深具市場成長潛力。雖然目前全球農業生技市場僅由6家公司主導，包括積極投入農業生技領域的瑞士Syngenta和美國Monsanto公司，仍需開發符合我國農業生技產業需求的核心技術，保障國內農業發展。

一、品種鑑定

近年來，台灣許多優良的品種，因為欠缺適當的保護機制，而流向大陸、東南亞等地，由於當地生產成本低廉，除了搶佔台灣原有之國外市場外，甚至回銷台灣打擊國內農業。因此，94年修正施行「植物品種及種苗法」作為保護植物品種之權利，而強化農作物「智慧財產權保護」，促進品種改良，並實施種苗管理，而近年發展的分標誌鑑定技術，僅需少量樣品，結果不僅快速且可靠，廣泛應用在多種作物鑑定。

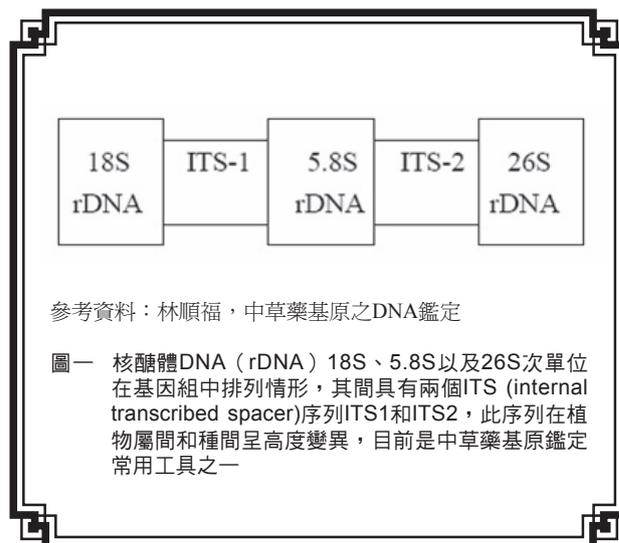
（一）新品種保護

育種過程往往耗費十數年，花費大量的人力

與物力，保障育種的研發成果（新品種），一直是必須謹慎面對的課題。國內自1998年起推動農業生物技術國家型計畫，現在已經進入第三期提出利基產業研發計畫/建立成果產業化平台，每年投注超過7億元預算，其中分子生物產業應用及技術平台建立是三大重點計畫之一，另外，農委會科技計畫也將「建立及應用作物品種（系）指紋分析系統」納入研發重點內容，每年投入1億2千萬元經費致力植物種苗生技產業研發，包括無菌播種、組織培養、基因工程等生物技術所培育、繁殖生產之植物種苗、組織及其代謝物等。植物種苗生技產業不僅是技術密集、資本密集、與勞力密集，同時屬於知識型產業，DNA分子標誌技術的發展，提供一個穩定、快速而可靠的品種分類及親源鑑定方法。應用分子生物原理建立重要品種（系）專一性DNA分子標誌，將可作為釐清商業品種與智財權保護的客觀依據，保障育種者權利，加速新品種育成，提升種苗產值。我國生技種苗產業年產值約25億元，外銷產品以蝴蝶蘭、文心蘭與拖鞋蘭為主，果樹部分，以香蕉組培苗之生產最多，外銷市場以日本、韓國及歐美為主。其中台灣是蝴蝶蘭全球最大出口國之一，蝴蝶蘭育種已有數十年的歷史，除了自然氣候適合蝴蝶蘭生長，同時種原豐富、不斷育成各式優質品種，而平地育成耐熱品種更是日本和荷蘭等溫帶國家難以競爭的強項。此外，產業的分工體系已趨於成熟，積極行銷國外市場，日前歐盟也同意開放台灣農友以自然人名義註冊蝴蝶蘭新品種，有利於種苗業者國際品牌之建立。另外，透過每年舉辦國際蘭展提升能見度爭取大量訂單，2006年蘭花出口金額約6,000萬美元。以蝴蝶蘭為例，如何利用DNA分子標誌保護發展之熱帶、亞熱帶作物新品種和種苗，並做為市場區隔，擴展國際市場佔有率，將是產、官、學相互合作的重要議題。

(二) 中草藥基原鑑定

隨著現代醫學技術進步與治療觀念的轉變，替代療法、傳統療法的功效也逐漸被證實，全球中草藥產業的發展受到注視。國內中草藥約有9成自大陸進口，總產值超過新台幣200億元，除了貨源與價格受制於對方，且品質參差不一，嚴重影響國內中草藥科學化及國際化的發展方向。此外，東西方對中草藥使用方式不同，歐美多採單方乾燥全草或成分萃取物為主，東方多經過炮製手續除去有毒成分或提高活性物質，造成外觀上難以根據植物學特徵辨識，由於中草藥種類及來源眾多，常發生混用或誤用之情形，而影響藥效或甚而危害人體健康，有必要採用DNA分子標誌鑑定技術加以釐清。中草藥之DNA鑑定原理主要係基於不同個體DNA序列差異，其中以核糖體rDNA的非轉錄區域（Internal Transcribed Spacer，ITS）序列是目前最廣泛使用的標的（圖一），因為核糖體rDNA序列在同一物種間同源性非常高，演化過程中變異性很小，但是rDNA次單位之間的非轉錄區域序列差異大，應用PCR及自動化序列分析技術，可由序列間的相似度鑑定中草藥基原，工研院已經成功建立300種常用中草藥ITS DNA鑑定序列資料庫，其中大陸中藥材186種及台灣特有種115種，可作為藥材基原鑑定的基準，也是保持品質與產品一致性的重要基礎，以期後續能夠通



過衛生署或美國FDA等機構核准使用。

二、種子品質

種苗產業包括種子與種苗兩大項，據估計全球種子市場市值約300億美元，其中國際種子交易市場約佔一半，其餘為國內銷售總和。國際種子市場單一作物銷售以玉米約4億美元最重要，小粒蔬菜種子全部約7.5億美元，而前十大國際種苗公司營業額即掌握其中八成。國內種子市場以栽培所需水稻為最大宗，而水稻及多數雜糧作物主要由國內農業試驗單位進行培育，蔬菜和花草種子則是以民間種苗業者為主，且國內需求已達飽和，業者積極培育新品種尋求打開國際市場。商業品種之種子純度鑑定是種子產銷流程中，對於種子品質及商譽維護的必要工作。重要十字花科蔬菜，如甘藍和花椰菜等作物的栽培、品種的鑑定、F1種子純度分析，對種苗業者而言都是很重要的課題。由於種子外觀或植株早期性狀不易區分，無法有效進行F1種子純度鑑定。為

了避免繁殖過程中處理不當，所造成的品種混雜和品種退化產生走型（off-type），利用RAPD等分子標誌作為品種純度早期檢定方法，在時間上可以提升種子產銷的效率，對銷售成本降低也有助益，同時保障購買農戶的權益。國內農友種苗和慶農種苗公司透過產學合作計畫，分別與國內農業研究單位開發F1種子純度分子檢測系統，以作為雜交F1種子品質管制；此外，檢測技術也可申請專利開發新商機，如國外推出玉米種子純度檢測試劑組，或是日本VisionBio生技公司提供水稻等各類種子分子標誌檢測服務，收費標準從12,000~60,000日圓不等（表一），遠高於購買種子單價，顯示值得繼續投入高經濟價值種子分子檢測系統研發。

三、基因轉殖作物檢測

GMO就是基因改造生物體（Genetically Modified Organism），根據聯合國農糧組織、世界衛生組織以及歐盟法規之定義，係指遺傳物質

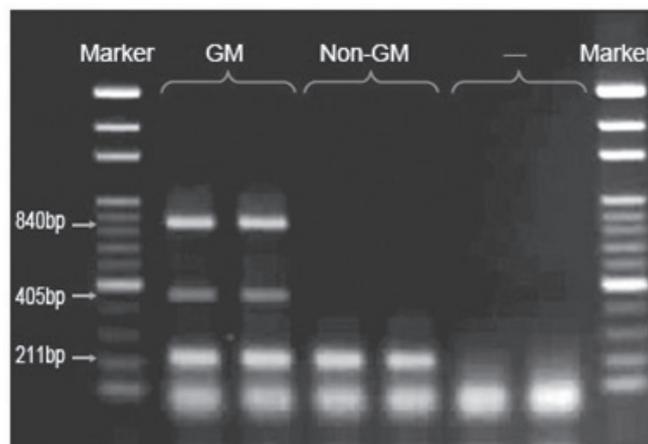
表一 日本水稻種子純度檢測服務及收費標準（日圓），
利用DNA標誌特徵作為種子與加工品品種檢測

檢查項目	定性檢查					
	標準			高精度	縣產米	
服務內容	有無其他品種混雜判定的一般分析				全部品種鑑定高準度分析	產地專一性鑑定
可能品種	60個主要市售品種	其他品種	釀酒用48個品種	糯米67個品種	266個市售品種	266個市售品種、釀酒用48個品種、糯米67個品種
可能型態	白米、糙米、種子、米飯、葉片、加工品					
必要量	約200 g					
檢查費	12000	15000		25000	12000	
檢查日數	3個工作天					

資料來源：<http://www.visionbio.com/charge/dna/>

被改變的生物，其改變方式是透過基因操作技術，而非自然增殖或自然重組方式產生。其中農作物部分稱為基因改造作物（簡稱基改作物）、轉基因作物、基因轉殖作物等不同名稱，從基因轉殖作物核准上市行銷的第一個十年（1996年至2005年），每年的種植面積都以兩位數的百分比持續成長，到了2006年仍有13%的成長率，全球的種植面積更達到1.02億公頃，市值超過61.5億美元。截至2006年底，全球共有22個國家投入基改作物種植的領域，前五大國分別為美國、阿根廷、巴西、加拿大以及印度，即便法規限制最為嚴格的歐盟國家如西班牙、德國、葡萄牙、法國與捷克，也核准基改種子使用，主要栽培基改作物分別為大豆、玉米、棉花以及油菜。美國、歐盟國家以及世界各國，對於轉基因作物的栽培使用及進出口行為，都採取因應的管制措施。我國轉基因作物相關法規，目前包括植物品種法及種苗法、基因轉殖植物田間試驗管理辦法以及基因轉殖植物之標示及包裝準則等；有關基因轉殖作物之進出口管制是採取境內管理措施，針對較可能進口的基改作物，稻米、馬鈴薯、油菜、玉

米以及木瓜等作物，由相關的農業試驗研究單位研發取樣及檢測技術。根據轉入基因的啟動子、終止子、基因本身，以及篩選基因與（或）報導基因作為標的，並且以作物特有基因做對照，設計專一性引子轉為簡便的分子標誌，以PCR聚合酵素連鎖反應法偵測樣品中是否存有不屬於原本的遺傳物質混雜，利用此類分子標誌技術偵檢轉基因片段是目前最可行的科學驗證方法。中興大學葉錫東副校長開發的轉基因木瓜，是國內第一個完成隔離田間試驗的基改作物，已進入最後評估階段，國內基因轉殖作物檢測監測聯合實驗室以此為模式作物，已建立本地轉基因作物檢測體系（圖二）。2006年8月美國農部（USDA）宣布境內生產和稻受到Bayer公司基改稻米（含LLRICE601）污染事件，結果市售遭到污染的產品一律下架，日本也立即宣布停止進口相關產品，歐盟要求美國進口稻米需檢附清淨證明，造成美國稻米市場價格遽降百分之十，直接嚴重衝擊農民收益，估計農民損失達1億5千萬美元以上。美國稻米年產值約18億美元，其中半數外銷，而和稻主要銷售至歐盟市場，雖未立即遭受



參考資料：沈等，基因轉殖作物檢測監測體系之建立

圖二 抗木瓜輪點病基轉(GM)與非基轉(non-GM)轉基因檢測電泳結果，檢測標的轉入木瓜輪點病毒外鞘蛋白基因(840, 405 bp)，木瓜內生papain gene(211 bp)，"—"為空白實驗

禁止進口，但日後銷往歐盟的稻米必需檢查有無基改稻米混雜，並由出口商負擔費用，也間接提高農民生產成本，造成後續全球廣泛且深遠的影響。此一單事件說明利用分子標誌作為基因轉殖作物檢測的重要性，國內雖然還沒有核准任何基因轉殖作物栽種，基因轉殖作物相關的嚴格規範除了規定生產者應盡的義務，也保障農民及消費者權益，在市場對基因轉殖作物安全疑慮未消除前，更是確保國內農業經濟穩定發展的重要防線。

四、MAS分子標誌輔助選拔

在國際市場和消費者信心對於基改作物產品還存有安全顧忌的情況下，分子標誌輔助選拔

(marker-assisted selection, MAS) 提供育種者新的助益。過去數十年間，分子生物技術的發展，從染色體、蛋白質、基因體累積越來越多的瞭解，利用與外表性狀緊密相關或連鎖的分子標誌，在育種材料中進行基因型篩選的方式間接選拔外表型，為傳統上選拔困難的作物和性狀提供新的解決方法。基因型篩選具有不受環境影響、僅需要少量樣品分析、在早期生育下個世代前即完成分析篩選的優點，不論是單一或多個基因控制的性狀，不同作物已有許多成功案例（表二）。由於所有的改進是從作物固有的變異中選拔，沒有外源基因，一旦完成品種審查即可上市販售，無關乎基因改造規範。科學家已經成功分離水稻耐淹基因*Sub1A*，並利用分子標誌輔助選拔技術導入

表二 利用分子標誌輔助育種選拔的重要案例

作物品種	MAS案例
大麥(Barley)	Release of US variety Tango in 2000 that contains two QTL for adult resistance to stripe rust. Advancement of a 'Sloop type' variety with CCN (cereal cyst nematode) resistance for commercial release. Introgression of Yd2 gene conferring resistance to barley yellow dwarf virus (BYDV) into a BYDV susceptible background through two cycles of marker-assisted backcrossing.
玉米(Maize)	Use of yield-related QTLs for MAS in private sector. Development of quality protein maize (QPM) through marker-aided transfer of opaque2 gene in backcross programmes.
珍珠粟(Pearl millet)	Release of a Indian pearl millet hybrid cultivar 'HHB 67 Improved' in 2005, which has resistance to downy mildew.
水稻(Rice)	Release of two Indonesian rice cultivars 'Angke' and 'Conde', in which MAS was used to introduce xa5 into a background containing xa4. Pyramiding of disease resistance genes in rice, particularly against blight, blast, and both simultaneously. Pyramiding of insect and blight resistance. The pyramiding of blight resistance with Basmati quality characters.
高粱(Sorghum)	Pyramiding of stay green QTLs in elite but drought-susceptible sorghum lines.
小麥(Wheat)	>50 000 assays for more than a dozen loci, including tolerance to high soil boron (Bo1), tolerance to late maturity a amylase (LMA) (7BL), barley yellow dwarf virus resistance (BYDV2) (7DL), cereal cyst nematode resistance Cre1 (2BL), Cre8 (6BL), waxy or granule bound starch synthase (Wx B1) (4A), high molecular weight glutenin subunits (GluD1) (1DL), leaf rust resistances (Lr46) (1BL), (Lr34) (7DS), height or dwarfing genes (Rht1) (4BS), (Rht2) (4DS), (Rht8) (2DS), root lesion nematode resistance (Rlnn1) and yellow flour colour (7AL), stem rust resistances (Sr2) (3BS), (Sr36) (2B) and VPM (Ventricosa x Persicum x Marne), a source for eyespot resistance gene Pch1, are being performed annually in an Australian wheat breeding programme, to implement molecular markers in wheat breeding.
甘藍(lettuce)	Pyramiding and breeding of aphid resistant lettuce variety.

參考資料：Trends in Biotech. 24:490-9



參考資料：Science 442:705-8

圖三 利用MAS篩選攜帶轉移水稻品種FR13A耐淹基因Sub1A的回交F₂和F₃子代，完全淹水14天再經14天恢復期之後拍照，（左）Swarna輪迴親（recurrent parent），（右）IR49830貢獻親（FR13A衍生耐淹品種）。

現行廣泛栽培的水稻品種，將能夠幫助東南亞農民面臨持續降雨的極端氣候仍能保有收成，該處小農每年因雨季大水的損失估計超過十億美元。目前改良的IR64和Swarna等品種已經進入各地的區域試驗階段並作繁殖工作，最快今年6月印度官方就能夠提供農民改良的Swarna Sub1種子，此計畫如果成功，將是基礎研究與實際應用結合的良好典範。此外，美國加州主要稻米種植區每年花費高達7,500萬美元於除草劑，為了控制日趨困難的雜草防治，耐淹水稻在完全淹沒的狀態能存活達2週（圖三），可作為雜草控制的手段，由於耐淹水稻品種同時有益於傳統農家和有機農法，可用於「安全」的防治工作。其他利用分子標誌輔助選拔的抗病、抗蟲水稻品種也已經正式推出市場，英國生技與生物學研究委員宣布，將會投入1,330萬英鎊經費支持花椰菜延遲老化與抗蟲的研究，並強調不採取轉基因作物方式，而是從花椰菜自然遺傳變異中找尋採收後維持保鮮和營養成

分的關鍵因子，提高產品價值。另外，隨著全球暖化的氣候變遷，原本就很嚴苛的作物蟲害問題預期將更加劇，農業研究單位需及早因應尋求解決之道，國內方面也利用各式發展的分子標誌系統，持續投入花椰菜延遲老化和水稻抗褐飛蝨等相關研究，以期能對重要作物育種工作做出實質貢獻。

五、結語

為了因應全球人口成長對糧食的需求，科學家曾大膽提出轉基因植物的利用將會是解決之道，但是從1994年第一個延遲後熟的轉基因蕃茄上市以來，並未如預期成功搶佔消費市場與農民信心，因為外源基因和篩選抗抗生素基因使用的道德與安全問題，使得在科學界對轉基因作物安全性未有定論、官方政策未鬆綁以及消費者疑慮未消除之前，轉基因植物的發展處處受到限制，國際農業生技公司也調整基改種子目標性狀的方

向，由原先抗蟲和抗殺草劑性狀，轉變為提高產品品質，如延長保鮮時間、提高營養成分等，但問題仍未獲得解決？隨著生物技術的進展，對各種作物分子層次的瞭解也逐漸累積，有越來越多的分子標誌被註記可能與特定的性狀直接或間接相關，利用這類分子標誌輔助育種選拔工作，是目前最理想的解決方法。德國農業生技大廠BASF公司旗下成立DNA LandMarkers子公司，專門進行作物分子標誌分析，及分子標誌輔助育種選拔工作服務，顯示其在此領域的重視程度。為了培育

理想的性狀，廣泛地蒐集型態變異的種原是先決條件之一，整體而言，利用分子標誌輔助育種選拔培育的新品種，沒有基因轉殖作物的安全問題與造成生態環境衝擊等種種不良影響，而育種過程中綜合多種生物技術的使用，產出成果配合品種鑑定和種子品質檢測，提供高品質、安全、新鮮的農產品，強化內外銷市場競爭力，值得作為我國提高農業產值的發展方向。

AgBIO

陳哲仁 農業試驗所 生物技術組 聘用人員
吳明哲 農業試驗所 生物技術組 研究員兼組長

參考文獻

1. 沈等(2006), 農業生技產業季刊5:35-40
2. 林順福(2006), 中草藥基原之DNA鑑定
3. ISAAAA: <http://www.isaaa.org>
4. Xu et. al.(2006) Science 442:705-8.
5. Varshney et al.(2006) Trends in Biotech. 24:490-9.