『21 世紀農業發展與新興科技應用研討會』
2005 年 6 月 25 日

作物品種之 DNA 鑑定技術

林順福　　國立台灣大學農藝系助理教授

中文摘要

作物品種鑑定為保護育種家智慧財產權及確保良質農產品之有效途徑。品種鑑定之基本原理乃是依據個體間或品種間遺傳特性之差異，近年發展之 DNA 分子鑑定技術，不但可快速檢定，且僅需極少量之樣品即可獲得客觀且正確之鑑定效果。本報告將依照常見品種鑑定之五種類型進行討論，再舉實例說明 DNA 分子鑑定之利用，包括查驗走私作物品種、假冒品種之驗證、民間品種糾紛之釐清、假冒作物副產品之進口、高價作物生產條件之監控、品種純化、協助新品種之育成、鑑識混合品種及鑑別相同品種等利用。然而，任何鑑定工具或方法均有其應用限制，為達到正確且有效之品種鑑定目的，需先瞭解鑑定對象（樣品）之遺傳特性，再依照鑑定目的選擇有效之鑑定方法。

一、作物品種鑑定之重要性

就農業科技研發及農業生產目標而言，作物品種鑑定具有保護育種者智慧財產權，及監控農產品產銷和品質等兩大重要功能，分別討論如下：

(一)保護智慧財產權、鼓勵研發、全民共享品種改良成果

為了供應人類糧食生產之需要，提高食物品質，減少作物受到病蟲害、土壤及氣候環境造成生產損失，必需持續不斷研發新品種，以提供作物栽培之需要。然而，作物新品種之研發係作物育種人員或種苗公司經長期之人力及經費之投資成果。在台灣一般作物新品種之開發約需 8-10 年之時間，美國則需約 6-8 年之時間，約需評估十萬個體才可選出一個新品種(Lee, 2003)，而有些作物則需要更長之研發時間，例如，茶葉新品種之育成則需要高達 30-40 年之時間，尤其是新近發展之基因改造作物品種，在新品種推廣之前必需進行生物安全性及環境安全性評估，直接影響新品種商業化生產所需要時間。在台灣作物新品種之研發所需之經費平均約為台幣兩千萬元(約美 63 萬美元)，美國則需 50-700 萬美元(Lee, 2003)；而眾所皆知由 Calgene 生技公司所研發之全世界第一個上市之基因改造作物(FLAVR SAVR 蕃茄)其研發成本高達兩千五百萬美元，而由瑞士研究團隊所研發之黃金米其研發經費更高達一億美元。然而植物種苗容易外流，若所研發之品種未受到保護或智慧財產權未獲得保障，則將難以鼓勵業者投資或研究人員繼續從事新品種研發，而將阻斷農民所需之優良品種來源，消費者也無法購得高品質之多樣性農產品。尤其台灣已經加入世界貿易組織(WTO)，農產品市場更加開放，為維繫我國重要農產品之競爭優勢及拓展外銷市場，更需鼓勵新品種之研發

及保護研發者之權利，以促進農業之永續發展。

(二)確保純正優良種苗、作物產品來源，及健全生產履歷系統

生產履歷制度爲確保品質優良及食品安全之農產品產銷新趨勢，爲健全生產履歷制度，必需由『農場』到『餐桌』整個過程均能夠達到透明化(公開化)、嚴格品質監控、及可追蹤(溯)等要求。而優良及純正種苗來源爲生產履歷制度之首要步驟，例如日本毛豆業者(商社)特別要求各國進口之毛豆產品之種苗需由台灣提供，且必需逐年更新種苗，有助於台灣毛豆業者之國際市場競爭能力。此外，消費市場農產品之檢驗等亦需要藉由作物品種鑑定技術予以落實。以薰衣草之引種及栽培生產爲例說明：薰衣草原產於地中海沿岸地區，可利用於田園景觀、花藝、料理、花草茶、沐浴、美容、精油等功能。然而，薰衣草依其來源和遺傳特性而有不同生長習性及用途，例如，狹葉薰衣草及寬葉薰衣草均爲提煉精油之品種，但前者適合於較寒冷地區栽培，且所提煉精油品質優良，市場售價可達十倍，而後者則較耐熱；羽葉及齒葉薰衣草則較耐熱、低香味、含黃樟素會造成孕婦流產，較適合觀賞用；甜薰衣草則是由狹葉或寬葉薰衣草與齒葉薰衣草雜交而來。近年來種苗業者及農民自行引種及農友間交換種苗，造成品種名稱及用途混淆，非但增加育種與栽培之困難，亦無法確保消費者購買所需之薰衣草產品(簡，2004)。此外，近年來東南亞各國因爲無法提出非基因改造證明，玉米及大豆等農產品無法輸出歐盟等國，造成農產品滯銷及國內市場混亂。而未來進口基因改造產品及有機農產品之驗證，均可以品種鑑定爲基礎。

二、DNA 鑑定技術之發展背景

生物個體間所具有不同之遺傳特性稱爲『遺傳標誌(genetic marker)』，作物品種間之遺傳特性差異爲作物品種鑑定之依據(林，2001；林及陳，2002)。作物之遺傳標誌可分爲(一)外觀或形態標誌：例如，花色及果實形狀等；(二)細胞遺傳標誌：需藉由顯微鏡觀察染色體數目或結構之差異；(三)分子標誌：包括蛋白質、RNA 及 DNA 等分子層次之差異。外觀或形態標誌具有易於判斷且穩定性高之優點，但是同一種作物可利用這類型之遺傳標誌數目相當有限。細胞遺傳標誌在遺傳或育種利用上亦有良好的效果，但是因爲材料建立與維持不易，且需較專業人員進行遺傳分析，故此種遺傳標誌通常利用於較具有經濟價值之作物之研究與利用。蛋白質標誌中最常用者爲同功酵素之遺傳標誌，在 1980 年代間廣泛被使用於作物遺傳研究，但通常仍然無法滿足品種鑑定或遺傳研究所需之數目。RNA 標誌由於抽取及保存不易，而不同生育階段或組織部位之測定結果常不一致，且易受外界環境之影響，很少使用於作物品種鑑定。DNA 分子標誌因爲具有可在任何發育時期選取任何器官之組織分析，少量樣品即可供多次分析(1 cm^2之新鮮大豆葉片可供 200 次分析，一片大豆新鮮葉片可供一萬次分析)，取樣時可避免干擾正常植株生育，DNA 樣品方便長期保存，試驗結果之穩定性及重複性高，及標準化之簡易操作步驟等優點，故建立作物品種指紋資料及品種鑑定之良好工具。

DNA 分子標誌種類很多，而且不斷在發展中，常見之 DNA 分子標誌包括：RAPD(random amplified polymorphic DNA)、RFLP(restriction fragment length polymorphism)、AFLP(amplified fragment length polymorphism)及 SSR(simple sequence repeat)等，各種分子標誌在品種鑑定應用上各具有其優點及缺點（林，2001），但是根據其分析原理可分以限制酵素識別及剪切區域、聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)之引子(primer)黏合區域、及 DNA 序列爲基礎等三個類別；追訴其根本原理乃爲個體間之 DNA 序列差異(林，2005)。目前作物分子檢測應用之關鍵在於根據不同作物產業需要開發高精確性且高效率之檢測系統或流程；簡言之，「正確」、「快速」、「穩定」及「經濟」等四項目標爲未來分子檢測商品化之基本要求。

三、作物品種鑑定之類型

作物品種鑑定因爲待檢材料不同或目的不同，一般可分爲五種類型，即包括(一)鑑定兩樣品是否爲不同品種；(二)鑑定兩樣品是否爲相同品種；(三)鑑定未知樣品爲何品種；(四)鑑定待檢樣品是否爲混合兩個以上之品種；(五)鑑定樣品是否爲基因改造品種。但無論屬於何種鑑定類型，穩定、正確及有效率的『分子鑑定流程』或『核心標誌(core markers)』必需預先確認，而且具有代表性或目前正在栽培之作物品種之 DNA 指紋資料必需先妥善建立(林，2004)。以下針對不同類型品種鑑定應注意之事項提出討論：

(一)鑑定兩樣品是否爲不同品種：若是其中之一爲已知品種，則僅需針對此已知品種特有之 DNA 指紋(或分子標誌)進行比對，發現一指紋(分子標誌)有差異，則經一次重複試驗確定後，即可認定兩鑑定樣品爲不同品種。但是，最好能夠有兩個以上分子標誌之差異，則更具有說服力。

(二)鑑定兩樣品是否爲相同品種：若欲證明兩個樣品爲同一品種，在理論上需檢測所有之 DNA 序列或所有 DNA 指紋資料，但在實際作法上是難以達成，而且不符合經濟效益或時間要求。因此，只能依據鑑定結果一致分子標誌之數目，估算若認定爲同一品種時可能判斷錯誤之機率。換言之若是鑑定的分子標誌數目愈多，則判斷錯誤的機率越少。此種鑑定錯誤之機率一般要求需低於千分之一，若是鑑定結果有重大影響時(例如，商業利益或法律糾紛)，則需將鑑定錯誤之機率降低至小於萬分之一。

(三)鑑定一樣品爲何種品種：此種爲作物品種鑑定較爲困難之類型，通常會就樣品材料外觀做初步判斷，先刪除不可能之品種種類；再利用對此作物具有敏感(或最有效率)鑑定效果之核心分子標誌(core markers)進行鑑定。同樣此種鑑定結果需維持鑑定錯誤機率需小於千分之一。爲了降低錯誤鑑定機率，需核對若判斷爲第二個可能品種時，相對錯誤機率之比值。

(四)鑑定樣品是否爲混合品種：在鑑定一樣品是否爲混合品種時，需先瞭解待測品種(作物)或其產物本身應爲純質或異質。若正常狀況爲純質時，則可採用共顯性分子標誌(不同品種之 DNA 指紋差異可同時呈現者)或特殊基因之 DNA 定序方法。若正常狀況爲異質(不一致)時，則需由不同植株取樣混合成單一樣品，而對照樣品也採取同樣處理，若是待測樣品之 DNA 指紋超出對照範圍，則可認定爲不同品種之混合樣品；另外，也可以採取定序策略，若是相同對應區域之 DNA 序列超過兩個以上之類別(或指紋時)，亦可判定爲混合品種。

(五)鑑定樣品是否爲(或含)基因改造品種：基因改造作物種類及品種眾多，需平時多收集相關之資訊，以選擇較有效率之鑑定方法，通常可依據基因改造透明化共識，向研發單位或進口國要求寄存標準樣品及標準檢驗流程。另外，若能檢定待測樣品爲一已知非基因改造作物品種，亦是一種良好策略。

四、作物品種鑑定之研究及應用實例--

(一)協助追查走私落花生：落花生爲常見之走私農產品，尤其每年端午節前後常查獲走私產品，早期以帶莢方式走私進口，可由外觀判斷是否爲國產品種，但是近年來則以種仁形式走私，增加外觀判斷之困難，因此改以 DNA 鑑定技術鑑別走私落花生。又因爲落花生種仁含有大量油份會干擾 DNA 抽取及鑑別效果，(潘等，2003)推薦以胚部抽取高品質 DNA 技術及由雜交親本鑑定品種之方法(潘等，2004)，提供鑑定現有栽培或走私落花生品種之良好工具。

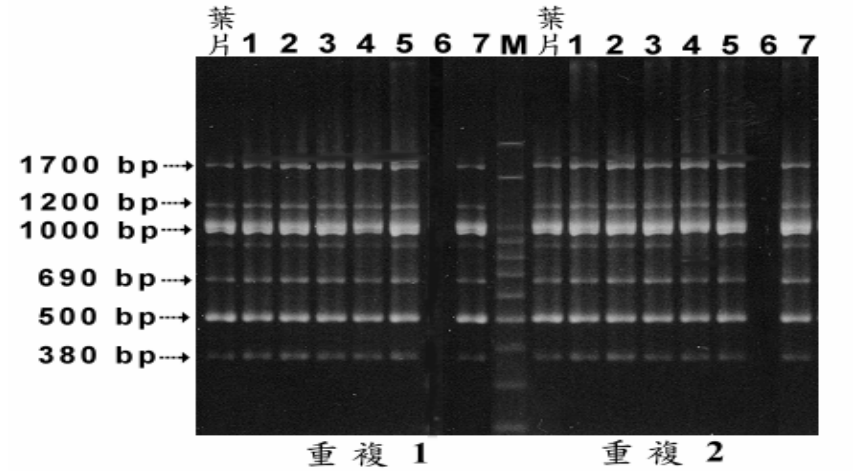


圖 1. 落花生由不同組織抽取之 DNA 所進行之分子標誌分析 (潘等，2003)

註：1 : 種仁乾燥後抽取之 DNA　　2 : 種仁蒸煮後抽取之 DNA；

3 : 種仁細磨及加熱乾燥後抽取之 DNA　4 : 種仁細磨及加熱蒸煮後抽取之 DNA

5 : 種仁直接抽取 DNA　　6 : 由種皮抽取 DNA

7 : 由胚抽取 DNA

(二)進口稻米品種之檢定：由於部分進口稻米品種之品質優良且信譽佳，深受消費者之喜愛，然而發現有一稻米進口商未有採購進口產品之紀錄，卻反標榜進口國之品種，引起相關業者間之質疑。因此，實際進行市場取樣，並且以進口國之品種爲對照，發現取樣稻米之 DNA 指紋與對照相差甚大(圖 2)，也證明產品來源或名稱有誤。

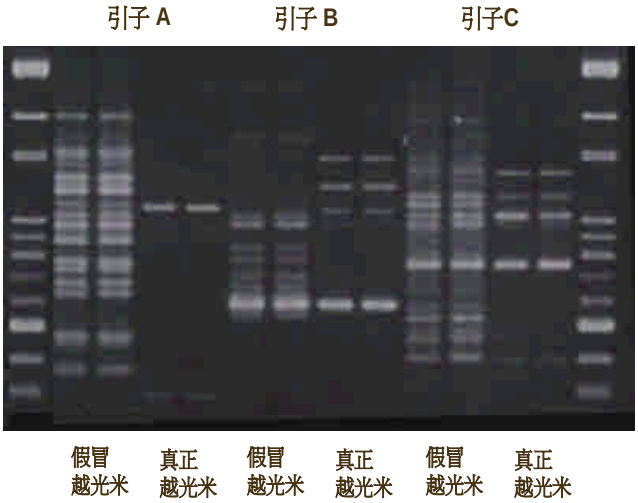
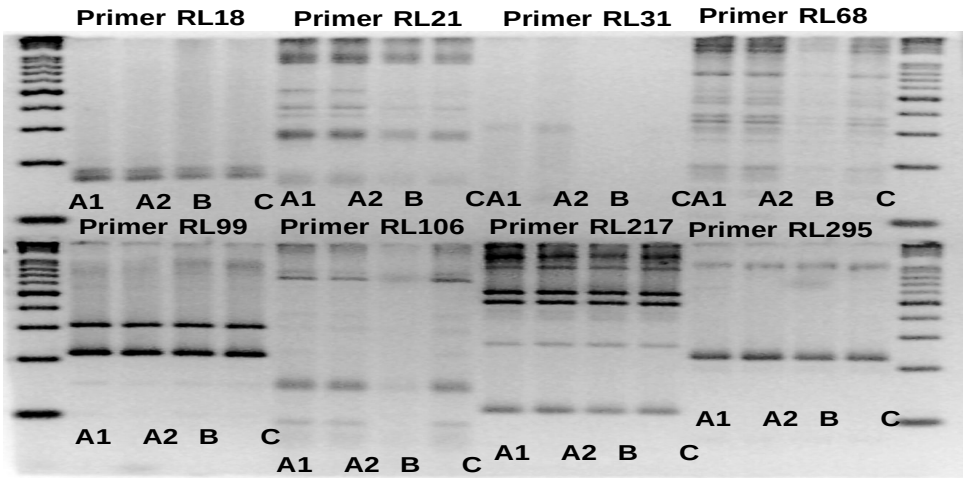


圖 2. 利用 DNA 分子標誌鑑定假冒進口之良質米品種

(三)解決農民與水稻育苗中心之品種認定爭議：水稻台梗 11 號品種爲高屏地區農民喜好栽培之品種之一，然而由於 2005 年一期作農民過早種植，於秧苗期受到寒流影響而導致生育後期之穀粒充實降低及植株外觀異常（圖 3），造成農民質疑農業改良場及水稻育苗中心提供錯誤品種。因此，本研究室以台梗 11 號品種特有之 DNA 指紋進行待檢樣品與對照品種之比對，結果證實農民所栽培之品種確實爲台梗 11 號品種。



註: A1及A2爲已知台梗11號品種(對照);
B,C分別爲疑似台梗11號之正常植及早植品種

圖 3. 利用 DNA 分子標誌鑑識疑爲錯誤品種之種苗

(四)鑑定進口之草稈：於 2004 年十月，海關檢驗人員查獲數個貨櫃來自越南疑似稻桿之草稈(圖 4)，委請改良場稻作專家協助鑑定，認定應爲稻桿但難提出客觀證據，故由本研究室協助進行 DNA 鑑定，本研究室採用 DNA 定序方法，分析結果發現受檢樣品之 DNA 序列與水稻相似度達 100%，且所有比對之序列未發現相近之物種。

圖 4. 疑似稻桿之進口草稈

(五)金線連品種變異之偵測：金線連爲珍貴之保健食品，通常利用組織培養技術大量繁殖種苗，然而在組織培養過程容易引起體細胞變異，而影響有效成份。因此，本研究室與台北醫學大學鄭可大教授合作，除了開發具有鑑別高有效成份之品種外，亦可有效鑑別體細胞變異之 DNA 分子標誌(楊，2001)，並且此工具可利用於調整較低體細胞變異之組織培養條件。

(六)協助紅豆品種純化：紅豆爲高屏地區重要作物之一，爲保護毛豆品種之智慧財產權，由本研究室協助建立台灣紅豆品種之 DNA 指紋資料，結果發現品種純度不佳。因此，建議原育種單位重新純化品種，並且以 DNA 分子標誌協助檢驗，目前紅豆品種純度甚高。

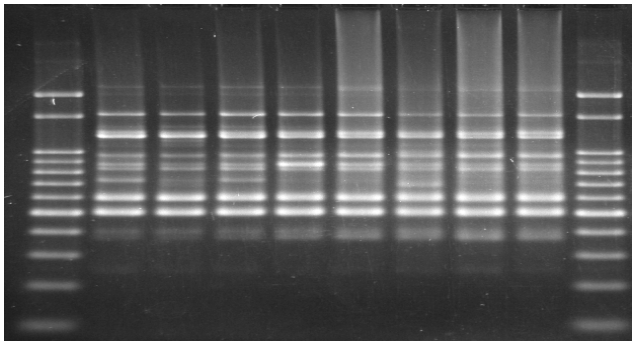


圖 5. 利用 DNA 分子標誌偵測毛豆品種純度

(七)協助毛豆新品種育成：台南區農業改良場由地方種中選拔優良毛豆新品系，且於 2003 年申請毛豆(茶豆)新品種命名審查，但唯恐此一新品系為農民自日本引進栽培品種，故委由本研究室協助進行 DNA 鑑別，結果確認新品系與現有台灣保存之茶豆品種毛豆約有 30～32%之歧異度(圖 6)，而使新品系順利通過命名為台南選一號品種。

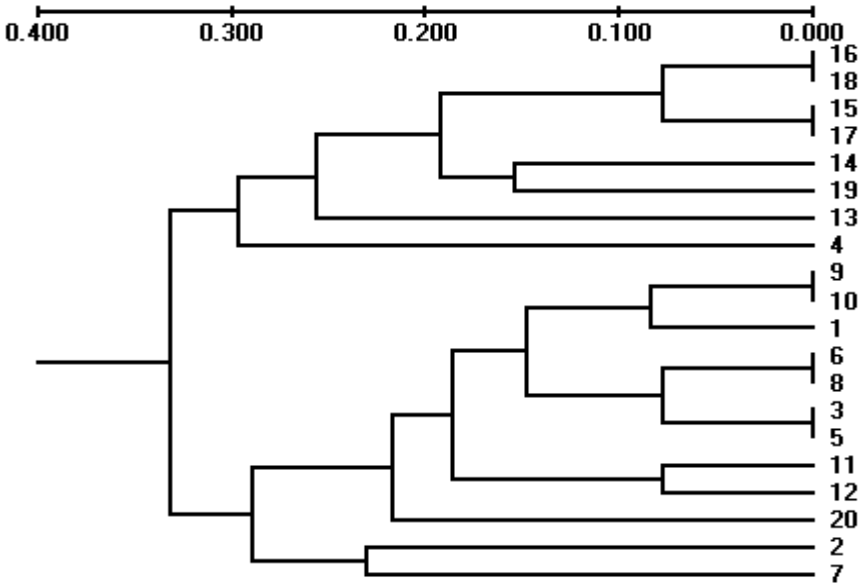


圖 6. 利用 DNA 分子標誌驗證由地方種選育之毛豆新品種

註：代號 19 為通過命名之新品種

(八)茶葉混合品種之檢驗：茶葉為高經濟價值之特用作物之一，茶葉之來源及品質影響價格差異甚大，每年各地均盛大舉行品茶比賽，藉以促銷茶葉及增加茶農收益。然而，近年來有不肖業者走私來源不明半成品茶，再加以混合國產茶葉品種，造成品質及市場價格混亂，也影響品茶比賽。因此，本研究室與茶業改良場合作開發共顯性(codominance)之品種鑑定技術(胡，2004)，可檢驗混合兩種以上品種之茶葉。

(九)葉用甘藷品種來源之追溯：台農 71 號及桃園 2 號為台灣僅有之兩個葉用甘藷優良品種，分別由農業試驗所(嘉義分所)及桃園區農業改良場於 1998 年申請命名通過。然經本研究室(簡，2003)以 DNA 指紋技術分析結果，其 DNA 指紋完全一致，經追查桃園區農業改良場所命名品系係由農業試驗所提供眾多品系中選拔而來，而農業試驗所亦選得相同品系，因此認定此兩品種應為同一品種。

(十)其他：包括西瓜、馬鈴薯、薰衣草、毛豆等作物品種之 DNA 指紋建立及品種鑑定。

作物品種鑑定爲 DNA 分子標誌眾多應用之一，而各種鑑定技術不斷更新，因此需持續學習及運用。然而針對不同鑑定目的，各種分析工具均具有其優缺點或應用限制，故必須審慎考量檢定作物之特性及選擇有效且可靠之方法，。

五、檢討與建議

一、 由於不同鑑定單位採用之方法及鑑定品質差異甚大，有必要建立穩定且共同認定之標準化操作方法或流程。

二、 目前品種分子鑑定證據雖然僅能供參考，但卻是合乎科學原理且客觀之鑑識工具。有必要宣導其公正性，並且應加強科技與法律之結合。

三、 具有重大商業利益或法律爭執之品種鑑定案例無法預期發生時間，通常要求鑑定時間非常急迫，且要求高度準確性，除了需提昇快速鑑定技術外，有必要加強人員之訓練，及重要作物鑑定技術之建立。

四、 基因改造產品種類及數量日益增加，必需收集世界各地之產品資訊外，平時亦應加強查驗。

六、重要參考文獻

林順福。2001。分子標誌在作物育種上之應用。生物技術在農業上之應用。pp21-30。楊盛行編。國立台灣大學農業陳列館。

林順福。陳成 2002。作物育種觀念與技術之發展。科學農業 50:110-121。

林順福。2004。作物品種鑑定常見之問題。植物品種純度檢定技術座談會專刊。pp24-28。黃玉梅、楊佐琦、蕭吉雄主編。中華種苗學會編印。

林順福。2005。生物技術在水稻育種上之應用。東部稻米產銷研討會專刊。pp33-46。侯福份等編輯。行政院農業委員會花蓮區農業改良場編印。

胡智益。2004。台灣茶樹種原葉部性狀及 DNA 序列變異之探討。國立台灣大學農藝研究所碩士論文。

胡智益。蔡右任。林順福。2005。利用簡單重複序列(ISSR)DNA 分子標誌評估台灣茶樹種原之遺傳變異。中華農學會報 (已接受)

陳源俊。2002。利用 ISSR 分子標誌及農藝性狀分析糯稻種原之遺傳歧異性。國立台灣大學農藝研究所碩士論文。

楊旻璟。2002。台灣金線連品系遺傳標誌之研究。台北醫學大學研究所碩士論文。

廖慧雅。2000。 利用 AFLP、SSLP、和 ISSLP DNA 分子標誌於台灣水稻品種之白米樣品辨識與親緣關係分析。國立台灣大學農藝研究所碩士論文。

潘慶芝。陳 成。林順福。2003。台灣落花生品種分子鑑定之研究。 中華農學會報 4(4)：328-346。

潘慶芝。陳 成。林順福。2004。利用雜交親本之 ISSR DNA 鑑別落花生品種之研究 中華農學會報 5(3):234-248。

簡靖華。2004。甘藷品種 DNA 序列變異之探討。國立台灣大學農藝研究所碩士論文。

簡銘錦。2004。利用 ISSR 及細胞質 DNA 標誌探討薰衣草品種之遺傳歧異性。國立台灣大學農藝研究所碩士論文。

Lee M. 1998. Genome projects and gene pools: new germplasm for plant breeding? Proc Natl Acad Sci (USA) 95:2001-2004.