

出國報告（出國類別：研究）

# 赴荷蘭研習利用分子標誌進行花卉及蔬菜品種鑑(檢)定

服務機關：行政院農業委員會種苗改良繁殖場

姓名職稱：張惠如、張勝智 助理研究員

派赴國家：荷蘭

出國期間：101 年 8 月 19 日至 9 月 1 日

報告日期：101 年 10 月 5 日

## 目 次

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 摘要                      | 1  |
| 壹、目的                    | 2  |
| 貳、行程                    | 4  |
| 參、研習內容與心得               | 6  |
| 一、DUS 性狀檢定方面            | 6  |
| (一)荷蘭檢定專責機構 Naktuinbouw | 6  |
| (二)Naktuinbouw 品種檢定實務研習 | 6  |
| 二、蝴蝶蘭品種分子檢測及 DNA 資料庫方面  | 13 |
| (一)參觀 Naktuinbouw 機構    | 13 |
| (二)利用分子標誌進行品種鑑別         | 13 |
| (三)DNA資料庫的建立            | 17 |
| (四)討論雙方合作之可行方式          | 18 |
| 肆、檢討與建議                 | 20 |
| 伍、附件                    | 22 |

## 摘要

Naktuinbouw為荷蘭執行植物品種檢定的專責機構，亦負責歐盟成員國數種作物品種申請案件之檢定工作，具相當豐富的品種檢定業務經驗及人力。本次前往Naktuinbouw進行研習，研習內容主要分為：一、蝴蝶蘭、其他蘭花(萬代蘭、文心蘭)、飄香藤等重要經濟作物之品種檢定，透過實質檢定、雙方檢定技術交流、性狀調查表開發及結果討論；二、蝴蝶蘭SSR分子標誌分析方法比較與討論、研擬未來雙方可行之合作方式與DNA資料庫的建立方法等。透過與其技術人員的交流與經驗分享，可在往後操作上更加留意一些可以增加準確度的地方，進而調和雙方技術與檢定結果。除前述技術之實務操作與討論，建立雙方溝通及交流管道外。並蒐集有關Naktuinbouw之品質監管及作業程序等資料訊息，期有助於促進國內檢定技術的提升及經驗之累積。

## 壹、目的

品種為農業生產之重要根基，藉由新品種之不斷育成、更新，對提升產業競爭力及農民利益有極大的幫助，而品種保護之目的在於保障育種者之權益，並維持種苗消費秩序，進而加速新品種之育成，且近年來國際上愈來愈重視品種權之保護。為保護本國農產品之國內外市場，並符合 WTO 之規範，我國自 2005 年完成「植物品種及種苗法」之修正並公告實施後，開始促成國內對品種權的認知，並進一步推進與國際觀念接軌。但由於我國非國際植物新品種保護聯盟

(International Union for the Protection of New Varieties of Plants, 簡稱 UPOV) 成員，多年來農委會透過雙邊協商的方式，以解決我國品種於海外申請之困境。其中在歐盟方面，為能有效簡化台灣蝴蝶蘭品種申請歐盟品種權之檢定程序及審查期程，終在 2009 年於「台歐盟植物品種權合作圓桌會議」簽署多項協議。

目前品種檢定方法為外表性狀檢定方法，是以利用形態觀察或測量外表性狀，例如花色、花形、株高等的差異作為區分依據。但有時受不同外在環境的影響；或是在作物的某些生長期如苗期等，並不容易以外在性狀來區分個別差異。且 UPOV 成立有 UPOV-BMT ( UPOV working group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-profiling in particular ) 是為生化分子技術及 DNA 鑑定工作團隊，探討利用分子標誌於植物品種保護之應用相關問題，除於 2007 年發布有關植物品種 DNA 描繪 (DNA profiling) 方法的參考準則外，也對於使用分子標誌輔助性狀檢定提出三個看法：a. 應用於預測傳統性狀，提供分類依據；b. 建立分子標誌與性狀間的相關性，用來估計遺傳的相似性，以協助選擇參考品種；c. 建立新的品種權檢定系統。可見未來國際上利用分子標誌技術輔助品種性狀檢定作業，是有其需要性與趨勢性。

為了持續提升我國檢定人員的技術水準、調和性狀檢定判定的一致性與比較雙方所建立之分子鑑別系統，故前往荷蘭檢定機構 Naktuinbouw 研習，進行實質演練及技術交流。透過性狀檢定實務操作、性狀調查表的修訂、雙方蝴蝶蘭分子

鑑別方法與系統比較、收集蝴蝶蘭DNA資料庫建立方法與討論未來合作方式等交流，期許未來能透過互信及建立溝通機制，以克服我國因受限於國際政治情勢，無法加入國際植物新品種保護聯盟(UPOV)之困境。持續雙方技術交流與良好的互動，有利於未來延伸至其他作物檢定技術之調和；分子檢定技術的交流與蝴蝶蘭DNA資料庫之建立，可作為未來品種檢定合作與交流之重要方向。

## 貳、行程

| 日期   | 星期 | 地區及行程                  | 研習內容  |
|------|----|------------------------|---|
| 8/19 | 日  | 台北→阿姆斯特丹               | 搭機赴荷蘭阿姆斯特丹  |
| 8/20 | 一  | 荷蘭 阿姆斯特丹 → Naktuinbouw | 抵達荷蘭，參觀 Naktuinbouw 各單位及環境介紹  |
| 8/21 | 二  | 荷蘭 Naktuinbouw         | 1. Naktuinbouw 利用分子標誌於植物品種保護上的情況介紹。(共同)<br>2. 討論實驗進度與確認 DNA 品質與濃度。<br>3. DUS 檢定作業流程與環境介紹。 |
| 8/22 | 三  | 荷蘭 Naktuinbouw         | 1. AFLP 試驗操作(1 <sup>st</sup> PCR)，DNA 資料庫雙方合作方式討論。<br>2. 蝴蝶蘭 DUS 檢定實務操作。                  |
| 8/23 | 四  | 荷蘭 Naktuinbouw         | 1. AFLP 試驗操作(2 <sup>nd</sup> PCR)，蝴蝶蘭植株葉片採樣、冷凍乾燥。<br>2. 蝴蝶蘭 DUS 檢定實務操作與討論。                |
| 8/24 | 五  | 荷蘭 Naktuinbouw         | 1. 以 CTAB 方式萃取葉片 DNA，合作議案的細節討論。<br>2. 蝴蝶蘭 DUS 檢定實務操作與討論。                                  |
| 8/25 | 六  | 假日                     | 資料收集與整理。  |
| 8/26 | 日  | 假日                     | 資料收集與整理。  |
| 8/27 | 一  | 荷蘭 Naktuinbouw         | 1. SSR-PCR 試驗操作，以 LI-COR 系統進行四組分子標誌電泳分析。<br>2. 蝴蝶蘭 DUS 檢定實務操作與檢定結果討論。                     |
| 8/28 | 二  | 荷蘭 Naktuinbouw         | 1. SSR-PCR 試驗操作，以 LI-COR 系統進行四組分子標誌電泳分析。<br>2. 蝴蝶蘭 DUS 檢定實務操作與檢定結果討論。                     |
| 8/29 | 三  | 荷蘭 Naktuinbouw         | 1. SSR-PCR 試驗操作，以 LI-COR 系統進行兩組分子標誌電泳分析。學習 BioNumerics 分析軟體的操作。<br>2. 其他作物性狀檢定與檢定結果討論。    |
| 8/30 | 四  | 荷蘭 Naktuinbouw         | 1. 以 BioNumerics 分析軟體 SSR-PCR 結果。<br>2. 討論相同分子標誌在雙方電泳分析系統的結果差異。                           |

|      |   |             |  |
|------|---|-------------|--|
|      |   |             | 3. DUS 檢定方法相關議題總討論。                                    |
| 8/31 | 五 | 荷蘭 阿姆斯特丹→台北 | 1. 由BioNumerics 系統輸出實驗結果，分子檢定方法相關議題總討論。<br>2. 由荷蘭飛回台灣。 |
| 9/1  | 六 | 荷蘭 阿姆斯特丹→台北 | 抵達台灣   |

## 參、研習內容與心得

### 一、DUS 性狀檢定方面：

#### (一)荷蘭檢定專責機構 Naktuinbouw

因荷蘭許多地方均低於海平面，因此又被稱為低地國，Naktuinbouw 位於荷蘭的 Roelofarendsveen 地區，此地亦低於海平面。Naktuinbouw 為荷蘭農業、自然及糧食品質部所贊助成立的獨立行政法機構(ZBO)。雖然 Naktuinbouw 參與繁殖材料的檢驗及許可，但 2006 年後則由荷蘭政府訂定市場繁殖材料之一般性規則。主要業務除以品種檢定外，亦有實驗室及檢驗部門，除為荷蘭當地民眾或業者提供服務外亦對其國外民眾提供相關服務，其收費有其一定的標準，因 Naktuinbouw 不從事商業活動且為一個非營利組織，因此經費來源亦由申請檢定之費用來支應組織的運作。

#### (二)Naktuinbouw 品種檢定實務研習

本次研習主要以參與實質檢定及性狀調查，實質檢定業務部分由其檢定人員就當時現有栽培之作物及檢定工作進行實地解說或參與檢定之進行，研習課程由觀賞植物及樹木品種檢定研究室主持人 Kees Grashoff 先生安排由 Henk De Greef 先生進行課程規劃，參與多種作物的檢定工作。規劃我們從事研習課程的檢定人員 Henk De Greef 先生從事品種檢定相關業務長達 30 餘年，除為蝴蝶蘭之檢定工作外，並曾經負責多種作物的檢定工作，並參與性狀調查表的制定，現在亦負責對外聯繫之業務，為一位資深的品種檢定專家。本次從事蝴蝶蘭(*Phalaenopsis*)、文心蘭(*Odontocidium*)、萬代蘭(*Vanda*)及飄香藤(*Mandervilla*)之檢定工作，並參與各調查性狀之探討。

#### 1. 蝴蝶蘭(*Phalaenopsis*)

蝴蝶蘭為台灣重要的外銷作物，在品種保護上更顯重要，為能有效提升我國品種於外國銷售並受到歐洲品種權的保障，因此對於雙方之交流更顯重要。在荷蘭當地，蝴蝶蘭因花期長且種類豐富美觀，成為荷蘭重要的蘭花種類，且具極高的市場價值。在 Naktuinbouw 主要由 Henk De Greef 先生負責蝴蝶蘭檢定工作及對外交流之事務。在多



種蘭科作物中，蝴蝶蘭檢定申請案件最多，在台灣亦有相同的情形，因此更顯示其具有交流及檢定技術調和之重要意義。

在蝴蝶蘭實質檢定之實務方面，主要由 Ruud Miedema 先生負責並參與性狀調查研習與討論，本次研習就蝴蝶蘭各性狀的調查方法、檢定須知、性狀量測工具之應用、RHS 色卡使用方法與人為判斷準則、拍照軟體介紹、電腦資料庫搜尋與對照品種分析配合應用之要點等項目，進行詳盡的討論與實務操作。在品種影像紀錄及資料庫查詢方面，經由 plantscope 網站([www.plantscope.nl](http://www.plantscope.nl))查詢即可取得相關品種基本性狀及數據資訊。在蝴蝶蘭性狀拍照方面，可參考應用 camera control Pro2 及 Capture NX2 等軟體，應用資訊來源可參考 [www.phaseone.com](http://www.phaseone.com) 之網站，均有詳盡的介紹。

蝴蝶蘭的檢定實務方面(包含調查方法、檢定須知、量測工具及 RHS 色卡之應用)，針對檢定過程及調查結果進行探討。台灣及荷蘭在性狀檢定上的差異如下：

- (1)葉：形狀(Leaf:shape)
- (2)葉：斑點或斑紋(Leaf:spot)
- (3)花序：梗數(Inflorescence:number)
- (4)上萼瓣：花色類型(Dorsal sepal:color pattern)
- (5)下萼瓣：花色類型(Lateral sepal:color pattern)
- (6)翼瓣：花色類型(Petal:color pattern)
- (7)唇瓣：中央裂片頂端形狀(Lip:tip shape of apical lobe)
- (8)唇瓣：鬚的顏色(Lip:color of whiskers)
- (9)唇瓣：中央裂片形狀(Lip:shape of apical lobe)
- (10)唇瓣：中央裂片斑紋型態(Lip:color pattern of apical lobe)
- (11)唇瓣：側裂片斑紋型態(Lip:color pattern of lateral lobe)
- (12)唇瓣：肉瘤形狀(Lip:shape of callus)
- (13)唇瓣：肉瘤斑紋類型(Lip:variegation on callus)

台灣具有而荷蘭無調查之性狀為葉之斑點或斑紋(Leaf:spot)、花序之梗數(Inflorescence:number)、唇瓣之中央裂片頂端形狀(Lip:tip shape of apical lobe)、唇瓣之鬚的顏色(Lip:color of whiskers)、唇瓣之肉瘤形狀(Lip:shape of callus)、唇瓣之肉瘤斑紋類型(Lip:variegation on callus)。在其他性狀方面，台灣均較荷蘭多出數個級距及調查類別。由上述資料可得知，目前公開版本，我國項目總數較多，歐盟(UPOV TG/213/1 版)

調查項目相對較少，在性狀調查上的調和，我國可進行縮減即可。

在經實質檢定後之結果，經與 Naktuinbouw 蝴蝶蘭檢定專家 Ruud Miedema 先生討論，雙方在於對照品種的選擇，具有一致的眼光。性狀調查表檢視的結果方面，大部分的性狀均呈現相似的結果，但在少部分性狀略有差異，如花朵縱切面及橫切面形狀、花朵質地及色卡判別，但當這些性狀易因檢定過程中，如植株性狀表現不明顯，仍需由目視、觸感及檢定人員經驗判斷來進行區分，但此類性狀易因主觀判斷而產生差異，然而這些結果對於品種間是否具有可區別性，並不明顯影響結果的判斷。在與 Ruud Miedema 探討調查結果，更清楚的明白當前 Naktuinbouw 所著重的檢定原則及重點，故將其蝴蝶蘭檢定要點進行歸納整理如下：

- (1) 首先針對全部植株進行觀察，初步判別是否具有一致性。
- (2) 在進行檢定前，需注意所在的檢定地點，不可有陽光直射，以利於應用 RHS 色卡進行比色時減少誤差。
- (3) 每個花朵性狀觀察，須先由整株植株進行判斷，其他同品種植株作為輔助，在花朵的選取則以完全展開之花朵進行調查。
- (4) 花色判別需至於潔白桌面或白色紙上，有助於判別花色，減少誤差。
- (5) 花瓣主要顏色之色卡選擇，可先以花瓣主要顏色是否具多種顏色混雜，選擇同時具兩種主色顏色混和之顏色。花瓣上的主色如無法判別，可於利用花瓣背面主色作為主色依據。
- (6) 數量性狀判別，如僅有 1 個級距上的差距，外觀判別其差異並不明顯，可直接視為無可區別性。
- (7) 調查期間，必須於生育初期即開始調查，至開花完成階段，由生育初期到完全開花後均需進行觀察。
- (8) 性狀調查表上之性狀，如無法僅以現有性狀表示，則可利用備註來進行敘述說明，以作為更精準詳細的解說。

經以上討論，有助於未來雙方對於實質檢定上的調和及認知，並了解實際進行檢定所面臨的情形。

目前蝴蝶蘭品種試驗檢定方法為 UPOV TG/213/1 版，此版本為 2003 年 4 月份所制定實施。因新品種育成時間的縮短及種類繁多，為能更有效區分品種間的性狀，因此 UPOV 目前也正積極與 Naktuinbouw 協調進行蝴蝶蘭之檢定指導方針的修正，歷經多

年持續修正，由 TG/213/2(proj. 1) draft 版本修正至現在的 TG/213/2(proj. 5) draft 版本，並於今年(2012)內送至 UPOV 審議，期許更能符合未來蝴蝶蘭之檢定需求。

TG/213/2(proj. 5) draf 版本針對植株特性、葉片及花朵性狀進行大幅度的增修，原性狀調查表(UPOV TG/213/1 版)只有 67 項性狀需進行檢定，新草擬的版本 TG/213/2(proj. 5) draft 檢定表則有 97 項性狀，增修的項目有：

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| 調查表性狀                           | TG/213/2(proj. 5) draft 版<br>增修及增列性狀     |
| Plant                           | Plant : length                           |
| Leaf                            | Leaf : radio length/width                |
|                                 | Leaf : position of broadest part         |
|                                 | Leaf : symmetry of apex                  |
|                                 | Leaf : variegation                       |
|                                 | Leaf : main color of upper side          |
| Flower                          | Flower : shape in profile                |
|                                 | Flower : fragrance                       |
| Dorsal sepal                    | Dorsal sepal : ratio length/width        |
|                                 | Dorsal sepal : position of broadest part |
|                                 | Dorsal sepal : undulation of margin      |
|                                 | Dorsal sepal : over color                |
|                                 | Dorsal sepal : number of spots           |
|                                 | Dorsal sepal : size of spots             |
|                                 | Dorsal sepal : color of spots            |
|                                 | Dorsal sepal : number of stripes         |
|                                 | Dorsal sepal : color of stripes          |
|                                 | Dorsal sepal : density of netting        |
| Dorsal sepal : color of netting |  |
| Later sepal                     | Later sepal : number of spots            |
|                                 | Later sepal : color of spots             |
|                                 | Later sepal : number of stripes          |
|                                 | Later sepal : color of stripes           |
|                                 | Later sepal : density of netting         |
|                                 | Later sepal : color of netting           |
| Petal                           | Petal : ratio length/width               |
|                                 | Petal : groud color of upper side        |

|              |                                    |
|--------------|------------------------------------|
|              | Petal : over color                 |
|              | Petal : area of over color         |
|              | Petal : number of spots            |
|              | Petal : size of spots              |
|              | Petal : color of spots             |
|              | Petal : number of strips           |
|              | Petal : color of stripes           |
|              | Petal : density of netting         |
|              | Petal : color of netting           |
|              | Petal : shape of apical lobe       |
| Lip          | Lip : bump and ridge on apical lob |
|              | Lip : curvature of lateral lobe    |
| Apical lobe  | Apical lobe : gourd color          |
|              | Apical lobe : over color           |
|              | Apical lobe : number of spots      |
|              | Apical lobe : size of spots        |
|              | Apical lobe : color of spots       |
|              | Apical lobe : number of spots      |
|              | Apical lobe : number of stripes    |
|              | Apical lobe : color of stripes     |
|              | Apical lobe : density of netting   |
|              | Apical lobe : color of netting     |
| Lateral lobe | Lateral lobe : ground color        |
|              | Lateral lobe : over color          |
|              | Lateral lobe : number of spots     |
|              | Lateral lobe : color of spots      |
|              | Lateral lobe : number of stripes   |
|              | Lateral lobe : color of stripes    |
|              | Lateral lobe : density of netting  |
|              | Lateral lobe : color of netting    |

由上述增列及增修性狀可知，TG/213/2(proj. 5) draft 版本針對蝴蝶蘭花朵性狀進行大幅度的修改，修改項目如下：

- (1) 將單一性狀尤其是花朵性狀，將單一個性狀區分出多個特性進行調查。如在花朵之上萼瓣、下萼瓣、翼瓣及唇瓣之性狀，依其斑紋類型分別進行調查，此法可

詳盡的敘述花朵上各種斑紋類型分布情形及顏色特性，在品種間是否具有可區別性之情形，相較於原版本更能有效區分品種差異，有利於面對未來申請品種多樣及種類繁多情況。

- (2) 在某些性狀的調查上，如「葉形」修正為「葉片長寬比」，引進量化的概念，增加判別依據。
- (3) 增列多個性狀，如「植株高度」、「葉片斑點」、「葉色雜色的有無」等性狀。

此外，購入 Naktuinbouw 所出版的性狀檢定標準手冊(Calibration book)，包括南瓜、蘿蔔、甜瓜、菜豆、鬱金香等作物，手冊內有詳細的敘述及圖片解說，調查方法的指導等，參考其檢定說明可減少在性狀檢定過程中，只依據 test guideline 過於簡單的說明，所造成判斷上的失誤。

## 2. 文心蘭(*Odontocidium*)

文心蘭在荷蘭尚屬新的檢定作物，檢定案件的申請量亦不多。因此目前尚無檢定執導方針(Test guideline)，故在品種性狀調查，仍需以品種敘述文件(Variety description)作為檢定參考依據。依照其植株特性進行描述，特性描述為植株、葉部、花梗及花等性狀，進行觀察及描述，主要以花朵性狀進行調查，選擇完全展開之花。本作物性狀調查不需挑選對照品種，目前尚於資料累積及資料庫的建置情形，未來則依品種申請案件，評估依據現有累積的資料進行檢定方針及調查表的訂定。

## 3. 萬代蘭(*Vanda*)

萬代蘭目前在荷蘭市場尚不大，屬於較新的檢定作物，申請的案件亦比較少。萬代蘭尚無檢定指導方針(Test guideline)，因此在品種性狀調查方面，以品種敘述文件(Variety description)作為檢定之參考依據。依據其植株、莖、葉及花朵特性，檢定人員依其特性進行觀察，在顏色判別方面，除可用目視判別外，亦可利用 RHS 色卡比對顏色，填列於品種敘述文件之性狀描述上。在量的性狀上，利用量測工具測量後填入即可。進行本作物的品種調查不需挑選對照品種。但可在第 15 項 description 進行品種的

名稱及特性描述，提供給檢定人員及育種人員參考之用。未來因新品種的申請增加，將會利用現今所累積的資料庫資料，研擬萬代蘭的檢定方針及調查表。台灣目前尚無公告萬代蘭的檢定方法及性狀調查表，未來如有新品種申請之需要，則需公告適用之檢定方法，作為品種檢定之依據。

#### 4. 飄香藤(*Mandervilla*)

飄香藤為夾竹桃科多年生常綠木質藤本植物。飄香藤為荷蘭重要的庭園造景植物。利用現有品種及歷年資料蒐集及建檔，今年度已完成指導方針(Test guideline)的訂定，但尚未送 UOPV 進行審核，預訂於近幾年完成審核後，將依據指導方針進行性狀檢定。現在對照品種及申請品種均種植於 Variety center 內進行管理。現在品種檢定案件仍依照品種敘述文件(Variety description)作為參考依據。新修訂版本為 UPOV TG/MANDE(Proj.3) draft，每個參試的品種調查株數至少需 10 株，調查性狀依照植株、幼莖、葉、花朵等特性區分，總計有 55 個調查性狀，檢定時除調查溫室栽培時之植株性狀外，尚需注意一致性及穩定性是否符合，在調查如花色亦須配合使用 RHS 色卡作為參考依據。此外數量性狀亦需亦需應用量測工具，測量後決定級距位置。

## 二、蝴蝶蘭品種分子檢測及 DNA 資料庫方面：

### (一) 參觀Naktuinbouw 機構

Naktuinbouw 機構位於荷蘭之Roelofarendsveen，目前除為荷蘭當地之主要品種檢定單位之外，並有實驗室及檢驗部門，為荷蘭及歐盟國家之民眾及業者提供多種關於種子健康、品質檢測及品種檢定之服務，並設有各項服務之收費標準。本次研習主要是與Naktuinbouw之Research & Development 實驗室主持人之一，亦為利用分子標誌技術進行品種鑑定與建立作物DNA資料庫之負責人Dr. Hedwich Teunissen聯繫研習時間與相關細節。於到訪當日，由Dr. Hedwich Teunissen的助理Mr. Daniel Deinum帶我們參觀解說包括行政部門、檢驗(Inspections)部門、品種試驗(Variety Testing)部門、實驗室(Laboratories)部門、檢定溫室與田間試驗的業務與工作，讓我們對於Naktuinbouw的組織架構及其執行的工作內容有初步的認識。除此，我們也拜訪了兩位負責蝴蝶蘭性狀檢定專家Mr. Henk De Greef與Mr. Ing. Ruud Miedema並短暫交談。Henk De Greef先生，已從事品種檢定工作長達30多年，並曾負責蝴蝶蘭等多項作物之檢定工作，為資深品種檢定專家，也曾於台灣國際蘭展期間受邀來訪並發表蝴蝶蘭品種檢定之專題演講。Ing. Ruud Miedema先生則為現今Naktuinbouw機構負責蝴蝶蘭及朵麗蝶蘭DUS 檢定之人員，也具有多年經驗為資深品種檢定專家。

Naktuinbouw檢驗部門負責品質檢驗，包括品種純度、品種與健康性等檢驗項目；種子分析實驗室進行有關病害相關的檢測，使用PCR及電泳分析、ELISA等技術，分析土壤、種子及植物材料等送檢樣品。其實驗室與檢驗項目亦通過國際ISO認證標準與ISTA認證之實驗室及檢測項目。

### (二) 利用分子標誌進行品種鑑別

SSR是一種由1-6個鹼基為重複單位所組成的簡單重複序列，又稱為簡單重複序列 (simple tandem repeat, STR)，且SSR廣泛存生物體的基因組中包括真核及原核生物。這些重複次數不同的SSR序列片段便可作為檢測基因組多型性的依據，又因SSR具有快速、操作相對簡易；具有高度的多型性與再現性；可發展自動化高通量分析系統等優

點，故被國際上建議做為開發品種鑑別的分離檢測工具。

Naktuinbouw目前可利用SSR分子標記進行品種鑑定的作物種類有：萵苣、馬鈴薯、玫瑰、蘋果、草莓、蝴蝶蘭及番茄(非所有品種)，而對於非開發有SSR分子標記的作物類別，一樣可接受品種分子鑑別的申请案，其使用的分子標記技術則為AFLP技術。因AFLP分子標記技術因不需先知道序列資料，或開發特定引子對，其使用的植物類別廣泛，且Naktuinbouw實驗室因長期使用AFLP技術進行品種鑑別分析，故累積了許多經驗，知道使用哪幾組商業引子對組合，就可容易獲得品種間的差異性，提供品種鑑別申請案件分析結果。在蝴蝶蘭方面，Naktuinbouw所使用之SSR引子對是由Wageningen University所開發建立共八組的SSR引子對，其使用之序列來自NCBI上所發表的序列資料，也多為台灣研究單位如成功大學所發表的蝴蝶蘭相關序列。本次研習主要是要交流荷蘭與台灣雙方所建立的蝴蝶蘭品種SSR分子標記檢測系統，比較兩方系統方法及分析結果的異同，並討論未來雙方可行的合作方式。

比較方式有二：1.利用我國所開發之十組SSR引子對於相同24個蝴蝶蘭材料(12個原生種與12個商業品種)，於荷蘭Naktuinbouw所使用的LI-COR 系統所得之品種鑑定結果，與我國使用ABI 系統所得之分析結果的異同進行比較，以了解系統不同可能造成的差異。2.利用我國所開發之十組SSR引子對與荷蘭Naktuinbouw所使用之八組SSR引子對，對於相同24個蝴蝶蘭材料(12個原生種與12個商業品種)，以LI-COR 系統所得之分析結果，其品種鑑定結果是否相同，以了解雙方所使用之分子標記使否會得到不同的品種鑑別結果。

以此交流比較之目標，觀摩學習Naktuinbouw蝴蝶蘭品種SSR分子檢測之流程，包括：蝴蝶蘭植株葉片採樣、蝴蝶蘭DNA萃取流程、SSR-PCR、LI-COR 4300電泳分析整合性分析軟體BioNumerics 的使用。

(1)蝴蝶蘭樣品葉片採樣：

1. 準備樣品收集袋(雙層)、冰、標示筆及紅黃兩色標示牌(如附圖三左)。
2. 在申請品種權的送樣10株植株中，挑選狀況較好及形態相似的兩株(性狀檢定後將保留此標示的兩株植株)，分別以紅色及黃色塑膠標示牌標示後(如



附圖三右)，取約兩隻手指寬度之葉片以手翻折兩次後撕下，將紅色(1st)標示之植株葉片裝於收集袋之前袋；黃色(2nd)標示之植株葉片裝於收集袋之後袋中，將收集袋置於冰上。

3. 每個葉片以圓孔鑽孔器(鑽孔器以75%酒精浸泡，每次取新樣品時皆居浸泡後使用)取兩個直徑0.5 cm的圓形葉片裝於Micronic Tube中(此動作需重複兩次，即每個樣品取兩份葉圓片，一份兩片。則一份可以萃取DNA另一份則冷凍保存)，並置於Micronic 96 well rack，於-80°C中冷凍30分鐘(以上)。
4. 取出冷凍圓葉片，置於已預冷至-60°C的冷凍乾燥機中(Christ ALPHA 1-4 LD Freeze dryer)，進行葉片組織的真空冷凍乾燥至隔夜(如附圖四左)。隔天確認葉片組織是否乾燥，再進行DNA萃取或材料保存。

#### (2) 蝴蝶蘭葉片DNA萃取

1. 每個裝有乾燥葉片組織的Micronic Tube中加入一顆 Stainless Steel Beads，再以 TissueLyser (Qiagen)於以震盪速度21 HZ (約1260次/分鐘)，震盪適當時間約45秒。
2. 確認葉片組織已呈粉末狀後，以CTAB方法進行DNA萃取。

#### (3) SSR-PCR分析

1. 欲以LI-COR 4300螢光影像系統進行分析，微衛星分子標誌正向引子對需以IRDye 700或IRDye 800螢光標定。標定IRDye 700引子：R:F\*-700:F = 2:1:1；標定IRDye 800引子：R:F\*-800:F = 4:1:3。(F\*為螢光標定正向引子)

#### 2. PCR配方：

|                                     | IRDye 700 (ul) | IRDye 800 (ul) |
|-------------------------------------|----------------|----------------|
| Template DNA (2 ng/ul)              | 5              | 5              |
| 10X PCR buffer (-Mg <sup>2+</sup> ) | 2              | 2              |
| MgCl <sub>2</sub>                   | 0.6            | 0.6            |
| dNTP (10 mM)                        | 0.2            | 0.2            |
| Primer (F+F*+R)                     | 0.4            | 0.8            |
| Taq polymerase                      | 0.06           | 0.06           |
| H <sub>2</sub> O                    | 11.74          | 11.34          |

|       |    |    |
|-------|----|----|
| Total | 20 | 20 |
|-------|----|----|

3. PCR條件：94°C \*3分鐘，(94°C \*30秒、50°C \*30秒、72°C \*45秒，共進行35個循環)，72°C \*10分鐘，15°C \*到取出樣品。

#### (4) LI-COR 4300電泳分析

##### 1. LONZA Gel的製備

- a. 將欲製備polyacrylamide gel的乾淨乾燥玻璃板。
- b. 一份LONG RANGER SINGELS LI-COR 6% (Catalog No. 50689)的材料，依據說明書說明依序混合內容物。
- c. 將上述混合完全的gel倒入燒杯中，以針筒吸取後，緩慢注入玻璃板之間並輕輕敲打玻璃板，以避免氣泡形成，確認無氣泡形成後插入齒梳(齒梳需先以蒸餾水清洗過並以拭鏡紙擦乾)。
- d. 靜置2小時以上確認膠體凝固後，可以溼紙巾與保鮮膜包覆，置於4°C冰箱中保存。

##### 2. 電泳分析

- a. 以蒸餾水清洗玻璃板上的殘膠，並以絕對酒精加速玻璃板的乾燥，並以拭鏡紙擦拭乾淨，避免有水痕殘留於玻璃板上。
- b. 將組裝之玻璃板膠片置於LI-COR 4300機器上，倒入1X TBE buffer，加上電極，進行預跑20分鐘。
- c. 預跑期間，稀釋並混合不同螢光標定之PCR產物並加入sizer與loading dye，混合後以94°C加熱3分鐘，再置於冰上。
- d. 預跑後，於齒梳間隙注入0.5-1  $\mu$ l上述混合液及10 bp DNA ladder(如附圖四右)。
- e. 接上電極，進行電泳反應2.5小時。

#### (5) 以BioNumerics分析軟體進行基因型分析

電泳分析後所得圖檔存入BioNumerics version 6.6軟體資料庫中，分別進行Land tracking, Normalization及Peak scoring，並進行分析結果相關註記、親緣演化樹分析、品種間相似度分析與DNA資料庫比對(如附圖五)。

分析結果顯示，比較我國所開發之十組SSR引子對於相同24個蝴蝶蘭材料(12個原生種與12個商業品種)，於荷蘭Naktuinbouw所使用的LI-COR 系統所得之品種鑑定結果，與我國使用ABI 系統所得之分析結果。發現同一組微衛星分子標誌於LI-COR 4300與ABI PRISM 3730兩系統中，所得之對偶基因大小差異多為3-5bp。例如在相同蝴蝶蘭樣品其代號為stu的材料中，由V31-2這組SSR引子對進行分析後，在LI-COR系統所得之scoring數值為121,167；在ABI系統所得之scoring數值為117,162。造成兩系統分析所得之對偶基因的數值不同，但如果轉換成對偶基因碼(allele code)則會得到相同的品種鑑別結果。這樣差異性的結果可能的造成原因有：PCR反應條件不同、不同系統之內差法所造成的計算誤差、不同研究員人員的scoring標準不同及stutters影響判讀結果等因素。

另外，利用我國所開發之十組SSR引子對與荷蘭Naktuinbouw所使用之八組SSR引子對，對於相同24個蝴蝶蘭材料(12個原生種與12個商業品種)，以相同分析系統(LI-COR)所得之分析結果，其品種鑑定結果是否相同。分析結果顯示，不同的SSR引子在相同的材料中，有不同的scoring數值，這樣的結果是可預期且必然的。然其基因分型(Genotyping)分析結果，雙方結果一致，即使我們使用完全不同的SSR引子對。這說明了，雙方各自所建立之SSR引子對組合，在相同的24個蝴蝶蘭材料中皆具有鑑別能力。但，由於本次材料是使用遺傳歧異度較高且外觀性狀差亦較明顯的材料，所以對於雙方的引子對鑑別能力的考驗不算嚴峻。故如果要進一步比較雙方的SSR引子對組的鑑別能力，需挑選遺傳歧異度低且外表性狀相似的品種進行試驗，方能有具建設性的分析比對結果。

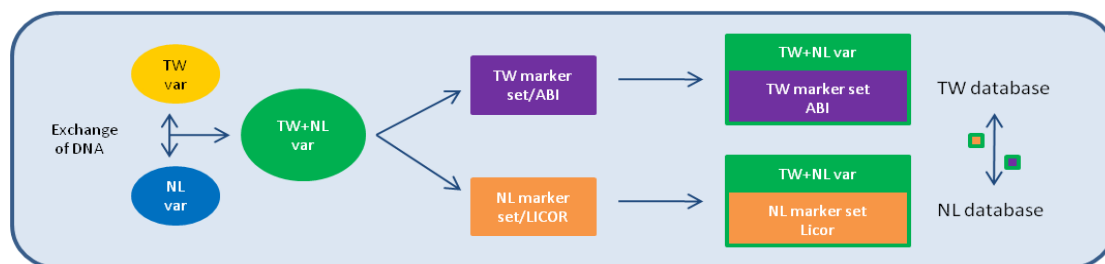
### (三)DNA資料庫的建立

Naktuinbouw利用BioNumerics軟體進行作物品種DNA資料庫的建立，目前建立有馬鈴薯、玫瑰及蝴蝶蘭的DNA資料庫。透過實際操作這套軟體，並在實務操作過程中，與Dr. Hedwich Teunissen和Mr. Daniel Deinum討論有關未來我方實驗室欲建立蝴蝶蘭DNA資料庫時，所需購置的部分包括：Application Modules等。因Naktuinbouw在每年一月及八月會接受蝴蝶蘭申請品種權的案件，此時Mr. Daniel Deinum會與性狀檢定人員連繫，進行植株葉片採樣，所以不論申請案件的DUS測試結果如何，實驗室這邊皆會進行DNA分析。因此，除申請案件的申請品種與對照品種外，加上Naktuinbouw所收集的蝴蝶蘭品種等，目前他們的蝴蝶蘭DNA資料庫中已累積有800個蝴蝶蘭及朵麗蝶蘭品種之基因型鑑定資料，而每個品種皆會有兩筆不同個體株樣品的分析資料，因此累積的分析資料有1600筆。

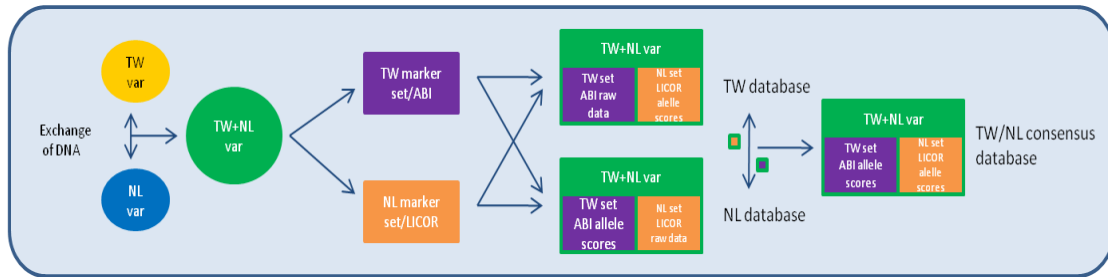
#### (四)討論雙方合作之可行方式

因應臺灣與荷蘭雙方農業合作會議中的議題，雙方除交流蝴蝶蘭品種分子鑑定技術與DNA資料庫建立方法外，對於未來在此技術上是否有機會繼續交流合作，就技術層面上應共同討論可行的方案。因此，根據在臺灣開發並整合的研究成果與相關問題，在實驗進行的空檔中提出與Dr. Hedwich Teunissen和Mr. Daniel Deinum進行討論。三人交換相關意見後，初步提出三點建議方案，再與負責Variety Testing部門的Dr. Ettehoven, C. Kees進行討論（如附圖六），透過多次的提出問題討論、分析與討論，最終我們提出四點的建議方案，供雙方決策單位研擬未來可行的合作方式所參考。四點建議方式分別是：

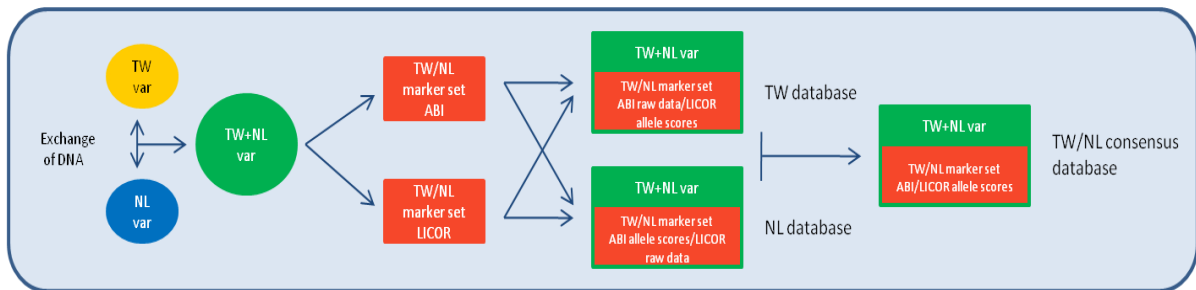
#### Option 1: Two different databases containing the same varieties



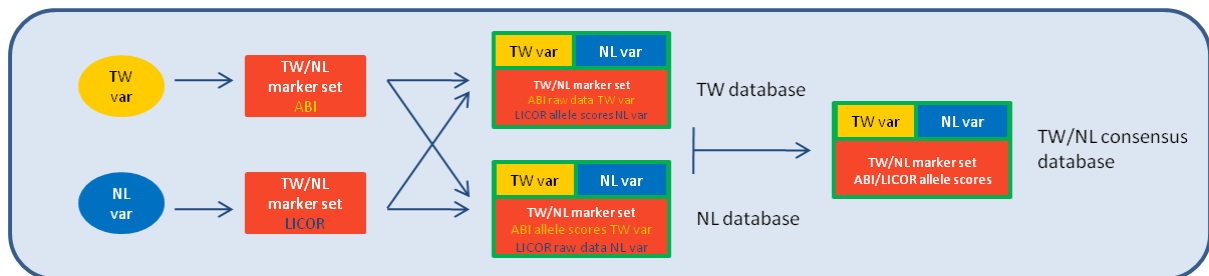
Option 2: Two databases containing each others results of the same varieties



Option 3: One joint database; both countries test all material



Option 4: One joint database; material is only tested in the country of application



## 肆、 檢討與建議

在性狀檢定方面：

### (一)持續加強人才培育及技術交流

品種檢定需大量的實務經驗累積，人才培育之經驗極為重要，因此宜持續選派檢定人員前往研習，並參加期訓練課程累積實務，促進本國人員技術提升與國外先進國家之技術交流。此外，邀請國外專家來訪指導，更為重要的交流機會，除可提升我國檢定人員品種檢定技術之水準，亦可與國際接軌，有助於國內業者或育種者於歐盟或其他地區進行品種權之申請。如本次於 Naktuinbouw 交流研習，交流雙方於蝴蝶蘭檢定技術的經驗及方法，均能有效促進雙方之技術調和與檢定報告書之認可。

### (二)強化國際合作與參與國際活動

主動參與國際活動，接洽國際合作事宜，以期許提升我國在國際植物品種檢定之地位，此外，並藉此提升國內品種保護理念，促成我國尋求加入此國際組織之可能性，藉由與多國雙邊技術交流、建立溝通協調機制等，進而促成相互承認雙邊檢定報告，有助於促進國內業者或育種者在歐盟等國家或地區之品種權的申請效率，提升我國品種於國際市場之競爭力。

### 蝴蝶蘭品種分子檢測及 DNA 資料庫方面：

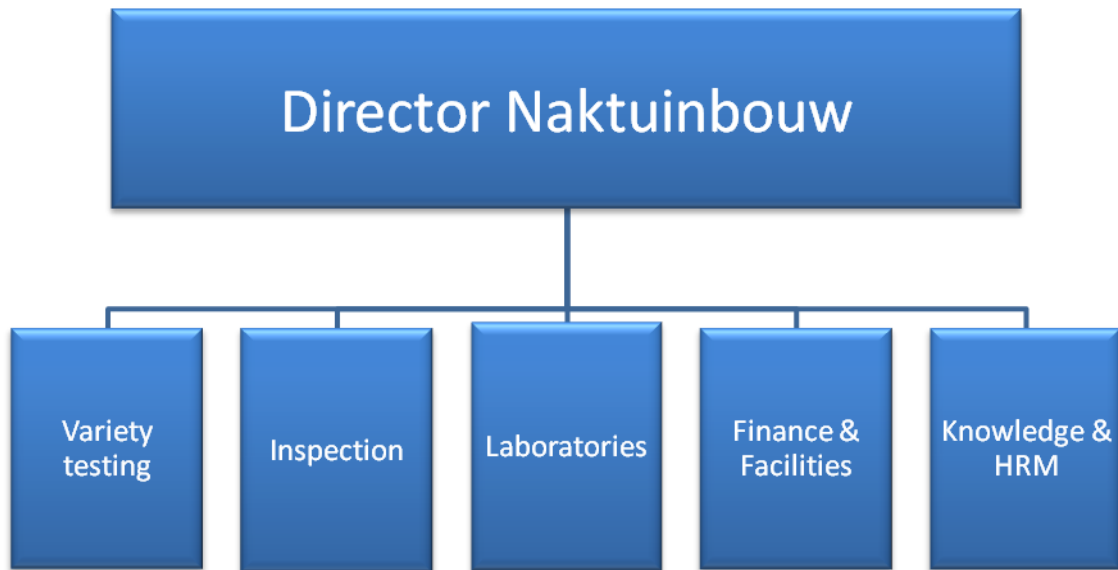
DNA 分子標誌可以輔助性狀檢定方法，提供分子層次上的鑑別依據。因此，開發具專一性及高鑑別力之 DNA 分子標誌系統，為目前的國際趨勢也為品種檢定專責單位所考量的。因此，開發蝴蝶蘭品種分子標誌鑑別系統與建立 DNA 資料庫是有其必要性的。在建立分析系統的過程中，除了分子標誌技術人員相互交流討論，以提升其技術能力外，也需收集多樣性品種材料，並透過性狀檢定人員的協助與之討論與溝通，才能有助於縮短開發時程建立高效能的系統。在本次的研習討論過程中，發現分子檢測系統仍有許多需逐步解決的問題：包括分子標誌鑑別能力的確認、分析結果的可信度、有效採樣數與採樣方法的建立、技術方法如何申請國際認證及未來應用的範圍與流程等相關問題。雖然以上問題，在本次的研習期間，皆有提出與荷方技術人員進行討論，

但討論的結果則為需進一步的實驗結果去分析與解決，就目前雙方的經驗裡無法有明確的答案。另外，提出幾點建議：

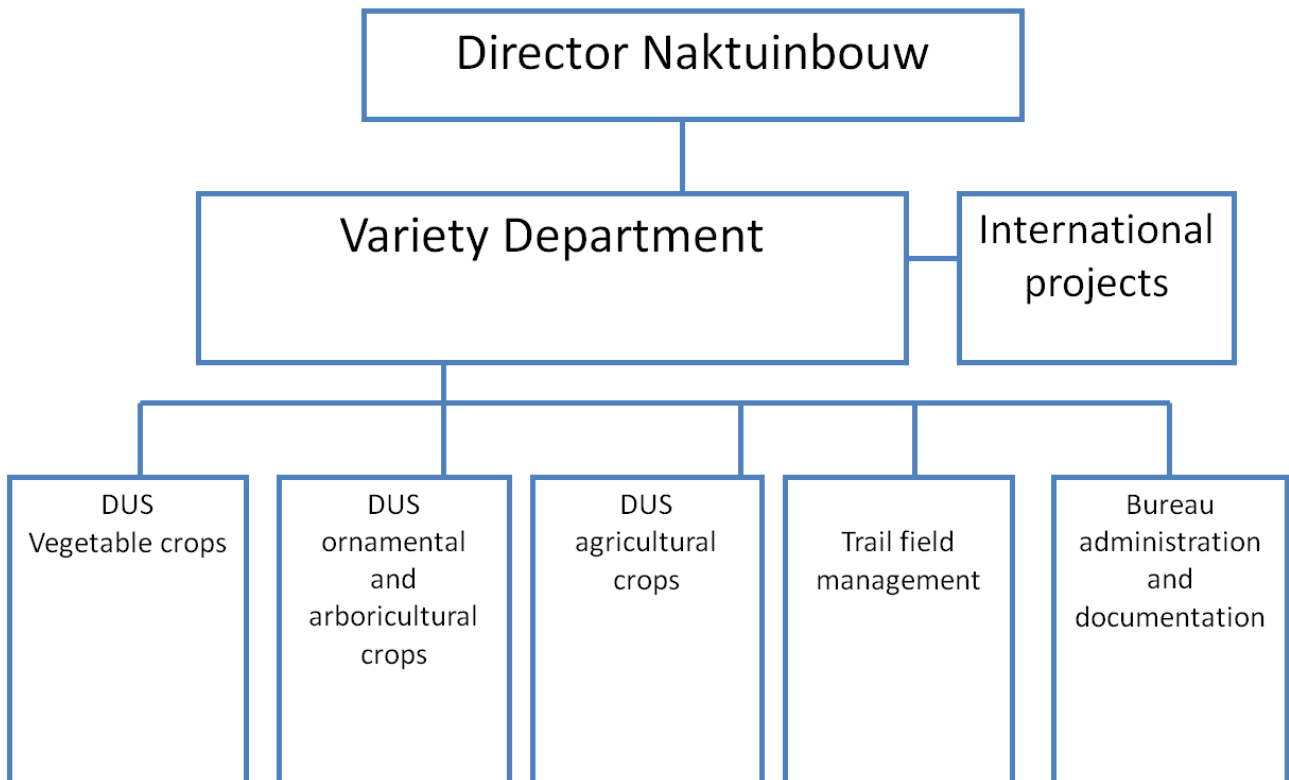
- (一)、雙方試驗流程與方法的整合：就上述提出的可行合作方式之四點建議，皆或多或少需要雙方進行整合的部分，如材料的交換、採樣與 DNA 萃取方法與分析結果交換等。因此，未來仍有許多需要雙方持續交流討論的地方。此外，因為 Naktuinbouw 執行蝴蝶蘭品種分子標誌分析的試驗工作，僅由 Mr. Daniel Deinum 進行，因此在試驗進行的過程中，較容易取得操作上的一致性。故建議國內需加快各試驗單位與學術單位所開發之 SSR 分子標誌的整合工作，以能透過多次試驗與不同實驗室間能力試驗，建立相同 PCR 反應與分子標誌 peak scoring 之標準，並挑選一套容易進行基因型分析的 SSR 分子標誌(stutter 較少，peak 清楚易於分析)，以減少人為與分析系統上的誤差。
- (二)、蝴蝶蘭 DNA 資料庫連結性狀資料庫：建議我國未來建立蝴蝶蘭 DNA 資料庫後，可以進一步將 DNA 資料庫與性狀資料庫進行連結，除可以輔助蝴蝶蘭品種檢定，提升品種鑑定的效率外，未來也可以透過不同分子標誌的分析結果，建立分子標誌與性狀之間的連結性，可提供性狀檢定時參考品種的選定，也可以提供蝴蝶蘭相關的研究資料，增加台灣的研究發展能量。

## 伍、 附件

附圖一、Naktuinbouw 組織架構



附圖二、Naktuinbouw 品種及試驗部門組織架構

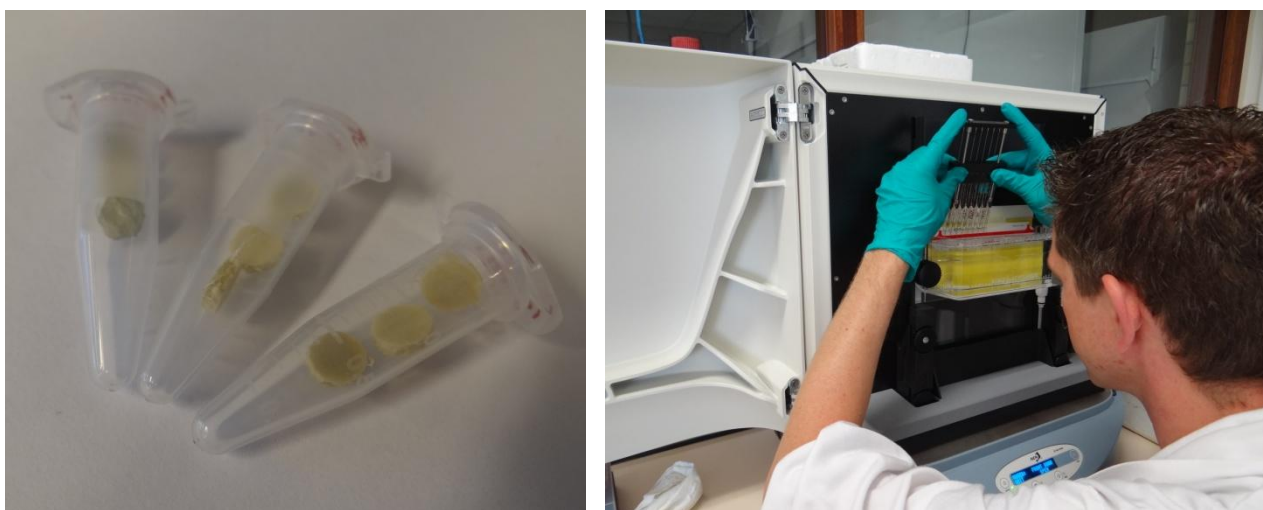




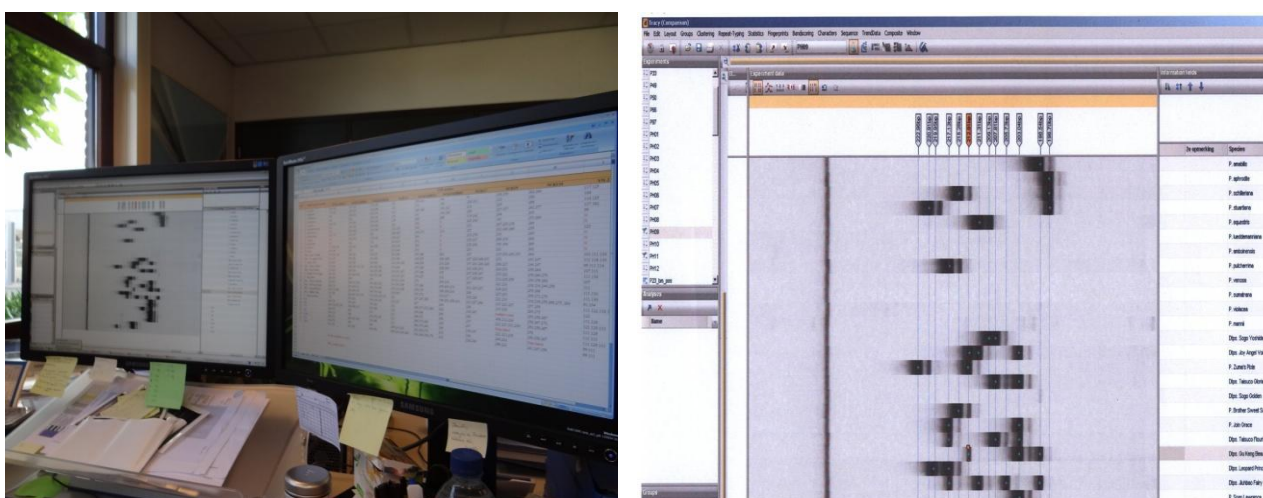
附圖三、蝴蝶蘭植株葉片樣品採樣



附圖四、冷凍乾燥葉圓片與 LI-COR 電泳分析



附圖五、利用 BioNumerics 軟體分析



附圖六、蝴蝶蘭分子檢測技術討論會

