

出國報告（出國類別：研究）

以次世代技術加速葡萄抗病育種效率

服務機關：行政院農業委員會農業試驗所

姓名職稱：陸明德助理研究員

派赴國家/地區：美國/紐約州

出國期間：107 年 9 月 21 日至 10 月 9 日

報告日期：108 年 1 月 8 日

摘要

美國進行全國跨機構的葡萄育種整合型計畫，目前進入第二階段 VitisGen2 (2017-2021 年)，名稱為「以次世代技術加速葡萄品種育成」 (Application of next generation technologies to accelerate grapevine cultivar development)。本項大型、多學科的合作計畫，將先進的基因體學技術和社會經濟研究納入傳統的葡萄育種和評估流程，擴大高通量 DNA 定序和表現型評估技術的使用，致力於減少開發新世代葡萄所需的時間、精力和成本，增加葡萄經濟生產與達到環境永續。康乃爾大學與美國農業部農業研究服務署東北區域日內瓦辦公室在以定序進行基因型分析 (Genotyping by sequencing, GBS) 技術上，開發出適合異質結合作物的次世代分子標誌基因型分析平台，以擴增子定序 (amplicon sequencing, AmpSeq) 為基礎，提出一個新穎有效的策略來開發次世代分子標誌，運用於葡萄的分子標誌輔助選種 (Marker-Assisted Selection, MAS)，可於一次操作同時分析多個樣品與分子標誌，具備高多工操作特性，可以精準預測性狀，在具備複雜物種遺傳背景的雜交族群可以實際運用。美國農業部農業研究服務署 (USDA ARS) 管理國家植物種原體系 (National Plant Germplasm System, NPGS)，位在紐約州的日內瓦國家種原庫 (National Germplasm Repository - Geneva)，保存葡萄屬 27 個物種和種間雜交共 1,414 份材料，其中種間雜交 802 份。除了收集材料的表現性狀調查外，亦進行香氣物質分析、多元酚物質的鑑定、花青素代謝酵素、葡萄遺傳和基因功能等研究。種原資源資訊網絡 (Germplasm Resource Information Network, GRIN-Global) 可資料查詢，線上申請材料，提供本土與國際寄送服務，近 10 年日內瓦國家種原庫葡萄屬申請件數美國本地 1,129 件、國際申請 14 國家以上，計 311 件。以收集的種原進行人工雜交，導入原生種特性，選育出的釀酒與鮮食葡萄品種具有優良的果實與酒品質、高產量、良好的環境適應性與抗病性。

目次

目的	4
過程	5
1. 研習以整合傳統與新技術的高品質葡萄抗病育種	5
2. 研習美洲種原生葡萄物種與品種保存與利用情形	8
3. 研習次世代分子標誌輔助育種整體操作平台	10
心得及建議事項	14
照片	15

目的

分子輔助選育為近年來新興且快速發展的技術，可大幅提高選拔效率、縮短選拔年限，已經在許多作物上實際應用。從 1990 年代開始，微衛星 (microsatellite) 是葡萄最常使用的分子標誌之一，公開資料庫所提供的微衛星序列不斷的增加。葡萄全基因組於 2007 年完成解序，對於開發分子標誌多型性提供完整資訊，近年來由於 DNA 定序的價格快速下降，次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 技術被應用在全基因組定序以及重新定序的計畫。美國康乃爾大學基因體多樣性研究所於 2011 年以 Illumina 次世代定序平台為基礎，發展出以定序進行基因型分析 (Genotyping by sequencing, GBS) 技術，利用此技術可以大量的開發單核苷酸多型性 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) 分子標誌。2016 年康乃爾團隊又開發出適合異質結合作物的次世代分子標誌基因型分析平台，以擴增子定序方法 (Amplicon Sequencing, AmpSeq) 運用於葡萄的分子標誌輔助選種 (Marker-Assisted Selection, MAS)。國內目前對多年生果樹作物的分子輔助選育程序相關研究較少，本研究計畫擬引入次世代分子標誌輔助選育技術，期待未來能有效增進國內葡萄品種改良之抗病育種效率。

過程

於 107 年 9 月 21 日至 10 月 4 日赴美國研習，拜訪康乃爾大學農業科技改良場 (Cornell AgriTech，原名紐約州農業試驗改良場 New York State Agricultural Experiment Station)、康乃爾大學生物技術研究所生物技術資源中心 (Biotechnology Resource Center, Institute of Biotechnology)、美國農部農業研究服務署 (Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture) 東北區域日內瓦辦公室 (Geneva, New York, Northeast Area) 葡萄遺傳研究系 (Grape Genetics Research) 與植物遺傳資源系(Plant Genetic Resources Research)等單位。研習參訪內容包括葡萄育種、自動化病害程度分析系統、分子標誌輔助育種、葡萄栽培、實習釀酒工廠、實習果園、次世代定序技術、葡萄種原保存、抗病品系田間表現、葡萄產業、葡萄園高效智能管理系統等。與康乃爾大學農業科技改良場與美國農部農業研究服務署東北區域日內瓦辦公室相關人員進行交流，學習技術與交換研究成果。茲將重要參訪內容與收集資料歸納整理如下：

1. 研習以整合傳統與新技術的高品質葡萄抗病育種

美國目前正進行全國跨機構的葡萄育種整合性計畫，前期計畫 VitisGen (2011-2016 年) 名稱為「以表現型分析中心和次世代分子標誌加速葡萄品種育成」 (Accelerating grape cultivar improvement via phenotyping centers and next generation markers)，目前進入第二階段 VitisGen2 (2017-2021 年)，名稱為「以次世代技術加速葡萄品種育成」 (Application of next generation technologies to accelerate grapevine cultivar development)。這是一個大型，多學科的合作計畫，致力於減少開發新世代葡萄所需的時間、精力和成本，增加葡萄生產的經濟與環境永續。本計畫將先進的基因體學技術和社會經濟研究納入傳統的葡萄育種和評估流程，擴大高通量 DNA 定序和表現型評估技術的使用，加速識別如抗病性、耐低溫性和提高果實品質等性狀背後的重要基因的能力，鑑定這些基因將有助於提高各種不同用途 (釀酒、鮮食、葡萄乾、砧木) 葡萄品種的品質，使世界各地的葡萄育種計劃能夠更快速地開發出可以同時滿足種植者和生產者的需求，並吸引廣大消費者的新品種。

前期 VitisGen 計畫成就包括：(1) 以 DNA 定序技術建構葡萄基因組圖譜，由美國農部 USDA-ARS Grape Genetics Research 的 Dr. Lance Cadle-Davidson 和康乃爾大學生物資訊學設施 Cornell Bioinformatics Facility 的 Dr. Qi Sun 領導的團隊完成；(2) 開發與一系列重要性狀相關的 75 個分

子標誌；(3) 精確定位控制葡萄酸度的基因，由康乃爾大學農學與生命科學院食品科學系副教授 Gavin Sacks 領導的葡萄酒釀造果實品質團隊完成。由於美國原生種葡萄常做為雜交親本以導入抗病性狀，未來將可調節原生種葡萄族群中常發生的酸度過高情形；(4) 開發擴增子定序方法 (Amplicon Sequencing 或 AmpSeq)，使研究人員能夠同時以 2-500 個 DNA 序列標誌快速分析許多基因組區域的遺傳變異。該計畫已與美國各地的育種計劃共享抗病種原，加快更具風味與環境永續的葡萄品種的開發。

VitisGen2 計畫的經費來源是由美國農業部國家糧食和農業研究所 (USDA National Institute of Food and Agriculture) 特殊作物研究計劃競爭型預算 (Specialty Crop Research Initiative Competitive Grant) 所資助，為期 4 年整，總經費 650 萬美金，結合來自 11 個單位的 25 名科學家，大部分都是前期 VitisGen 計畫的成員，計畫總主持人為 Cornell AgriTech 的 Bruce Reisch 教授和 USDA-ARS GGRU 的植病研究員 Dr. Lance Cadle-Davidson，兼任葡萄育種和地區表現型分析團隊主持人，葡萄遺傳學團隊的主持人是 USDA-ARS GGRU 的遺傳研究員 Dr. Jason Londo，白粉病研究團隊主持人為康乃爾大學研究員 Dr. David Gadoury，性狀經濟學團隊主持人為加州大學戴維斯分校 Julian Alston 教授，果實品質團隊主持人為康乃爾大學 Gavin Sacks 副教授，推廣聯絡團隊主持人為康乃爾大學 Dr. Timothy Martinson。參與單位包括康乃爾大學 (Cornell University)、康乃爾合作推廣部門 (Cornell Cooperative Extension)、美國農部農業研究服務署 (USDA-ARS)、明尼蘇達大學 (University of Minnesota)、南達科他州立大學 (South Dakota State University)、密蘇里州立大學 (Missouri State University)、加州大學戴維斯分校 (University of California, Davis)、華盛頓州立大學 (Washington State University)、北達科他州立大學 (North Dakota State University)。提供支持的單位有國家葡萄研究聯盟 (National Grape Research Alliance)、加洛酒莊 (E&J Gallo Winery)、加州鮮食葡萄委員會 (The California Table Grape Commission)、勞爾葡萄園 (J. Lohr Vineyards)。合作的單位包括康乃爾大學的生物技術研究所生物技術資源中心 (Biotechnology Resource Center, Institute of Biotechnology)、葡萄酒分析實驗室 (The Cornell University Wine Analysis Lab)、核心實驗室中心 (Cornell Core Laboratories Center)。

VitisGen2 的目標為：(1) 評估產業導入新葡萄品種對成本、產量、收入、利潤、農藥使用和環境的經濟影響；(2) 開發高通量表現型分析方法，以界定理想的抗病性和果實品質性狀；(3) 基於表現型分析結果建立高解析度遺傳圖譜，以促進於育種族群中以廉價的分子標誌輔助選種；(4) 加強關於增進的知識如葡萄基因體學、新品種、新技術與葡萄產業和消費者不斷進化需求

兩者間的溝通。**VitisGen2** 的多管齊下策略將解決整個葡萄生產的連續性問題，經濟學團隊研究了改良葡萄品種的好處，而遺傳學家則確定了葡萄重要性狀的分子標誌，從白粉病等疾病抗病性到提高低溫耐受性和果實品質；育種家開發出結合了這些特性的新葡萄品種，推廣團隊專家幫助業界人員和消費者了解新推出的葡萄品種的優勢。最終結果是新一代優質葡萄可以較低的成本種植，並且可以輕鬆適應各種地理區域和氣候，且對環境影響較小。計畫也在研究如何利用遺傳學的知識幫助種植者管理當前的葡萄園。例如，**AmpSeq** 技術可以追蹤白粉病病菌族群，使研究人員能夠確定哪些農藥在生長季節的某個特定時間最有效，從而減少農藥噴灑並提高藥效。

紐約州的葡萄育種計畫於康乃爾大學農業科技改良場 (**Cornell AgriTech**，原名紐約州農業試驗改良場 **New York State Agricultural Experiment Station**) 進行，改良場於 1880 年建立，在 1923 年成為康乃爾大學的一部份。自 1906 年第一個品種‘**Goff**’育成以來，目前已經有 59 個品種。

康乃爾大學的葡萄育種計畫目前每年種植 3,000-6,000 株苗，從雜交到育成新品種需要 15-40 年的時間。葡萄生產區域特性為環境潮濕、相對較涼的夏天、很少灌溉，盛行的病害為白粉病、露菌病、灰黴病、枝枯病、腫瘤病、黑痘病。冬季的低溫通常低於 -18°C ，有時後低於 -25°C ，業界對適合當地氣候的新品種興趣漸增。1945 年雜交，1972 年育成的 ‘**Cayuga White**’，親本為 ‘**Seyval blanc**’和 ‘**Schuyler**’ (歐洲種 ‘**Zinfandel**’與美洲種 ‘**Ontario**’ 雜交)，白酒品種，1970 年開始商業使用，1977 年單品種的酒上市，是 **Finger lakes** 區域的第一個由康乃爾育成的釀酒葡萄品種，本品種普及度高，抗病性好，高產，可以製成多樣類型的酒類，在 2011 年統計種植面積為 385 英畝，生產 2,808 噸果實，葡萄酒價值 2100 萬美元，是紐約州葡萄酒排名第 9 的葡萄品種。‘**Traminette**’ 於 1996 年公開發表，親本是 JS 23-416 x ‘**Gewürztraminer**’，白酒品種，目前接受度廣泛增加，本品種抗病性中等，萌芽期晚，果實的糖、酸、與 pH 完美平衡，酒質與 ‘**Gewürztraminer**’很相似，在 2006 年於紐約州種植面積是 65 英畝，外州也有種植，2011 年面積為 139 英畝，採收 361 噸，每公噸價格為 600-1,000 美元，於葡萄酒競賽獲得許多獎項，2015 年獲得美國園藝學會評選為當年度傑出果樹品種。‘**Valvin Muscat**’ 於 2006 年命名，親本是 **Couderc 299-35** x ‘**Muscat Ottonel**’，白酒品種，帶有 75%的歐洲種血統，酒具有極佳的麝香風味，植株較小，需嫁接來增加樹勢。‘**Corot noir**’ 在 2006 年命名，親本是 **SV 18-307** x ‘**Steuben**’，紅酒品種，樹勢強且豐產，需要疏果穗，在 10 月中旬採收，酒有好的水果與漿果風味，酒體中等，2011 年栽培面積 42 英畝，採收 234 噸。‘**Noiret**’在 2006 年命名，親本是 **NY65.0467.08** {**NY33277** x **Chancellor**} x ‘**Steuben**’，紅酒品種，在 9 月下旬至 10 月上旬採收，酒

帶有單寧、黑胡椒風味，2006 年種植面積 40 英畝，2011 年 57 英畝，採收 243 噸。‘Aromella’ 於 2013 年公開發表，親本是 ‘Traminette’ x ‘Ravat34’，芳香的白酒品種，植株大且高產，約 7.5 噸/英畝，非常耐寒，50%主芽死亡溫度為 -26.7°C (-16°F)，在寒冬後沒有樹體受傷情形，中等抗病性，果穗有少許脫粒，對 2-4D 敏感。‘Arandell’ 在 2013 年公開，親本是 NY84.0101.03 x NY88.0514.01，兩個親本都是種間雜交的選系，是高抗病性的紅酒品種，對白粉、露菌、灰黴抗病，50%主芽死亡溫度為 -25°C (-13°F)，植株直立性。鮮食品種部分，康乃爾育出 ‘Einset seedless’ (1985 年)、‘Canadice’ (1977 年)、‘Himrod’ (1952 年)、‘Marquis’ (1996 年)，2018 年推出 ‘Everest Seedless’ (NY98.0228.02)，是康乃爾的第一個四倍體鮮食葡萄品種，親本包含日本品種 ‘巨峰’、‘Pione’、美國品種 ‘Concord’、‘Niagara’，可耐受冬季溫度低至 $-10 \sim -15^{\circ}\text{F}$ ，適合紐約州大部分葡萄種植區和美國中西部地區，對露菌病和白粉病具有中度抗性。漿果重達 7 g，是 ‘Concord’ 的 2 倍重，滋味豐富，汁多，設定的栽種區域為小面積果園，果品可以在地方市集、農夫市集與觀光採果葡萄園販售。種苗目前授權業者販售，每株 11 美金，購買 50 株以上每株 5.25 美金。

在加速葡萄品種改良方面的成果，康乃爾大學已經陸續找出有效的 SSR 和 AmpSeq 分子標誌。以分子標誌輔助育種已超過 15,000 棵植株，2013 年小苗以分子標誌篩選後留下 50.1%植株，之後種在苗圃篩選後，留下最初的 22%；2017 年 marker 篩選後剩 13.3%，苗圃篩選後剩 7.1%。更多和更好的標誌對育種者來說是個利器，可以做到精準育種，以不同基因座堆疊可以增加抗病性，大量的植株在苗期第一年就可以種植和有效剔除不良株；AmpSeq 技術的開發可以快速和平價的偵測 GBS 或基因專一的標誌，在遺傳學研究上有眾多未來利用性。屬於 VitisGen 計畫的部分已經開始“結果”，優選品系 NY12.0107 和 NY12.0118 都具抗白粉病與露菌病特性。另外 NY06.0514.06 帶有 Run1/Ren2/Rpv1 基因座，對白粉、露菌、果腐有絕佳抗病性，中等枝枯病抗病。中度耐寒、萌芽期中、也許需要嫁接砧木，釀酒特性為有黑莓、李、櫻桃等果實香氣，有些許綠胡椒味，酒體好，中等單寧，有巧克力香，是頗為看好的抗病釀酒品種。

2. 研習美洲種原生葡萄物種與品種保存與利用情形

美國國家植物種原體系 (National Plant Germplasm System, NPGS) 合作保護農業重要植物的遺傳多樣性。NPGS 由美國農業部農業研究服務署管理。NPGS 的經費主要來自美國國會同意的撥款。然而，NPGS 是公私部門之間的伙伴關係。許多種原庫位在各州贈地的大學，這些處所提供營運所需的實驗室、辦公室、溫室和土地空間，以及技術和支持服務的工作人員。私部門是

NGPS所收集種原的主要使用者，是新的或改良植物商業化的主要手段。NPGS的使命藉由取得、保存、評估、表述、紀錄、分配作物種原來支持農業生產。NPGS 有 29 個地點，包含種子繁殖和無性繁殖作物，截至 2018 年 11 月，NPGS 保存了 243 科、2,550 屬、15,923 種、595,466 份材料。位在紐約州的日內瓦國家種原庫 (National Germplasm Repository - Geneva) 保存了 7,615 份材料，包含蘋果屬 (*Malus*) 蘋果 6,701 份、葡萄屬 (*Vitis*) 葡萄 1,414 份、桃李屬 (*Prunus*) 酸櫻桃 130 份、蔥屬 (*Allium*) 洋蔥 1,014 份、芹屬 (*Apium*) 芹菜 162 份、蕓苔屬 (*Brassica*) 1,047 份、南瓜屬 (*Cucurbita*) 南瓜 837 份、蕎麥屬 (*Fagopyrum*) 蕎麥 255 份、茄屬 (*Solanum*) 番茄 5,965 份、蘿蔔屬 (*Raphanus*) 蘿蔔 707 份。

NPGS 的葡萄屬植物保存有 2 個地方，一個是加州的戴維斯種原庫 (National Germplasm Repository - Davis)，另一個是 National Germplasm Repository - Geneva，Davis 保存 50 個種 (*species*) 和雜交種，3,616 份材料，其中歐洲種 (*V. vinifera*) 1,631 份，雜交種 1,093 份；Geneva 保存 27 個種 (*species*) 和雜交種，1,414 份材料，其中雜交種 802 份。大部分的材料以植株方式保存，目前 Geneva 正在增加種子保存的數量。

Geneva 保存了許多葡萄屬的物種，包括美國原生的 *V. acerifolia*、*V. aestivalis*、*V. cinerea*、*V. labrusca*、*V. monticola*、*V. mustangensis*、*V. palmata*、*V. riparia*、*V. rotundifolia*、*V. rupestris*、*V. tiliifolia*、*V. vulpine*；原生亞洲的 *V. amurensis*、*V. coignetiae*、*V. piasezkii*、*V. romanetii*；栽培種 *V. vinifera*；種間雜交的 *Vitis x andersonii* (*V. coignetiae* × *V. riparia*)、*Vitis x champinii* (自然雜交種，可能是 *V. mustangensis* × *V. rupestris*)、*Vitis x doaniana* (自然雜交種，*V. mustangensis* × *V. acerifolia*)、*Vitis x novae-angliae* (自然雜交種，*V. labrusca* × *V. riparia*)。在種原植株的維持上，低溫傷害是最大的挑戰，晚春或早冬的霜會對經歷冷馴化和去馴化過程的葡萄藤造成傷害，降低葡萄的生長表現，因此每份材料 (編號) 都種 2 棵，每年度重新繁殖 50-100 株來恢復園裡的弱株或死株，野生種葡萄另增加種子保存方面的努力，另外新技術如液滴玻璃質化法可將葡萄進行冷凍保存。

種原特性調查方面，研究人員對每個葡萄品系材料植株進行 33 個表現性狀調查，包含化學成份、分子、形態、物候、生產、病害等 6 大類別，化學成份類包含糖度、果實白藜蘆醇含量、葉片白藜蘆醇含量、可溶性固形物；分子類為單倍體和二倍體基因組大小；形態類包含漿果長度、寬度、形狀、大小、重量、果穗長度、寬度、緊密度、結果枝果穗數、果肉顏色、花性、果肉硬度、風味、果梗長、有無種子、果皮顏色等；物候類為萌芽日、盛花日；生產類每穗漿

果數、果穗重、特殊風味 (無、麝香、狐香、獨特風味)；病害類包括腫瘤大小與位置百分比。葡萄種原的研究包括香氣物質的分析、原生種多元酚物質的鑑定、花青素 5-O-glucosyltransferase 分子多樣性、遺傳和基因功能的研究。以分子特性描述進行親緣分析，優先挑選材料進行研究或育種工作，並減少重複收集種原增加遺傳多樣性。以收集的種原進行人工雜交，導入原生種特性，選育出的釀酒葡萄品種具有優良的果實與葡萄酒品質、高產量、良好的環境適應性與抗病性。

種原資源資訊網絡 (Germplasm Resource Information Network, GRIN-Global) 是種原的資料庫，以及索取材料的介面，申請材料不需任何費用。自 2013-2018 年間，National Germplasm Repository-Geneva 無性繁殖作物種原申請案桃李屬 10-30 件、葡萄屬 67-97 件、蘋果屬 235-439 件，總計 322-526 件；每年的數量包含枝條、種子、花粉、其他營養或繁殖組織為 5,751-8,015 份材料。近 10 年葡萄屬的申請件數以美國本地最多為 1,129 件、國際申請包含澳洲、加拿大、中國、法國、德國、匈牙利、印度、印尼、義大利、南韓、摩爾多瓦、蒙古國、台灣、土耳其等地計 311 件。

每年約有 25 個以上的團體，大約 100-250 位訪客參觀種原圃，每年會有一次年度開放日 (Open House)，在 9 月的第三個星期六早上 9-11 時，在蘋果、酸櫻桃和葡萄園內步行導覽，不需預約，風雨無阻，內容為簡介 10 分鐘、酸櫻桃 10 分鐘、葡萄 30 分鐘、蘋果 70 分鐘，訪客可以品嚐許多蘋果和葡萄品種，通常會有 50 人以上參與。

3. 研習次世代分子標誌輔助育種整體操作平台

分子標誌輔助育種 (marker-assisted selection, MAS) 目前在多年生作物被普遍的使用來加速品種改良。MAS 的優點是可以在幼年期進行選拔、堆疊抗病基因。符合或接近孟德爾遺傳學分離定律的簡單遺傳性狀是 MAS 的主要目標，例如葡萄的花性、無子、抗病性等。另外一些有主要數量性狀基因座效應 (major QTL effect) 的數量遺傳性狀，如桃子果實酸度、果實大小、稻米穀粒產量等性狀，也適合應用分子標誌輔助育種。

分子標誌的開發需要偵測目標性狀和基因型之間的關聯性。以固定親本的雜交族群進行數量性狀基因座分析或全基因組關聯分析 (genome-wide association study, GWAS) 是 2 種常用的方法。GWAS 的原理是利用連鎖不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 在多樣性的種原中尋找作用基因

(casual gene) 和分子標誌之間的聯鎖。然而，對於高度異質 (heterozygous) 和多樣性的作物如葡萄，GWAS有其限制，LD在葡萄屬 (Vitis) 物種中的迴歸係數在 2.7 cM 的距離快速下降至 0.1，造成 GWAS 不適用於現今的基因型分析平台，如單核苷酸多型性微晶片 (SNP microarray)。在雜交族群進行 QTL 分析是多樣性遺傳背景物種進行遺傳圖譜比較有效的方法。

對高度異質結合的作物，多種的基因型分析平台和分子標誌類型被應用在分子標誌輔助育種，包括簡單序列重複 (Single Sequence Repeat, SSR) 和單核苷酸多型性 (SNP) 分析，SSR 特別適合 MAS，因為其多對偶基因的自然特性和在特有物種或屬之間的高轉換性，可以分析以包含多物種間雜交的祖先複雜雜交組合族群。然而，SSR 的缺點是低通量、耗費人力與時間，低密度的分子標誌會失去標誌和作用基因間的連鎖、或族群內沒有分離。SNP 微晶片的出現成為另一種高通量基因型分析平台的選擇，商業化的高密度寡核苷酸陣列晶片可以同時分析上千個單株個體或分子標誌。但是 SNP 微晶片是封閉系統，彈性不足，跨種原轉換性差。再者，微晶片的事前設計經費高昂，仍然是園藝作物育種計畫採行此一技術的主要障礙。

為了填補育種技術與經濟的考量，以及分子標誌輔助育種的實際履行，次世代定序 (Next-generation sequencing, NGS) 技術提供潛在的機會，透過高通量與每樣品低分攤支出，進行公正的基因型分析。定序基因型分析 (Genotyping by sequencing, GBS) 利用同時進行標誌探勘與基因型分析的方法，提供許多優點，包括旁側 DNA 序列資訊、高樣品通量和多工性、高解析度。GBS 成功應用在許多自交與異交物種的標誌探勘。然而，在異質結合作物的育種計畫，尚未有成功的例子報導。技術上來說，資料遺失、基因型分析錯誤以及異質結合子被低量讀取常常發生在 GBS 的結果，起因於不均勻的工作點定序深度以及樣本多工操作。連鎖不平衡的快速消退、大規模的基因體結構差異、加上單倍型的資訊不足，對於具有多種遺傳背景來源的異質結合多年生物種的基因型分析無法使用。從實際的觀點來看，從樣品採集到資料分析的長時間對大部分的育種時間範圍來說顯得困難，再者，資料分析的電腦運算挑戰更阻撓育種者操作 GBS 的意願。

康乃爾大學以擴增子定序 (amplicon sequencing, AmpSeq) 為基礎，提出一個新穎有效的策略來開發分子標誌和實際履行分子標誌輔助育種。這種半自動的途徑以機器學習模型來設計引子，並使用 Illumina Nextera 雙重條碼與定序平台 (dual-barcoding and sequencing platform) 來做基因型分析。在從 GBS 偵測到 SNP 後，開始利用 GBS 序列標籤 (sequence tag) 來設計引子，轉換後的擴增子標誌接著可以用 NGS 進行基因型分析，這個設計牽涉到樣品與標誌的多工操作。

AmpSeq 策略的技術考量上，使用 AmpSeq 引子設計途徑的 2 個關鍵的決策點是選擇錨點標誌 (anchor marker) 與每個數量基因座的單倍區間邊界 (haploblock boundary) 的界定。錨點標誌是從在去除有分離偏斜、低基因型分析效率、推測定序錯誤、多餘、或是排列在重複基因體區域的 SNP 所得到的最終 GBS 連鎖圖譜上進行選擇。再者，錨點標誌具有高的標誌與性狀間的關連性，且必須在目標 QTL 的 1.8 LOD 距離區間內以確保高遺傳連鎖。錨點標誌接著以連鎖不平衡來找出單倍區間內的 SNP，在 QTL 範圍內增加標誌數量，以及提供更多 AmpSeq 標誌設計的選擇。SNP 的引子設計依據真正的 GBS 定序資料，而非參考基因體序列，在 SNP 的左右兩側設計 22 bp 的引子，總長 45 bp。有效的擴增子標誌的推薦標準為：(1) 與錨點標誌的連鎖不平衡顯著水準 (p-value) 值為 $1e-25$ ；(2) 引子的融合溫度介於 52 到 70°C 之間以得到高定序深度和避免遺失資料；(3) 精確的 2 個對偶子在同一點上；(4) 濾除高深度讀值；(5) 排除相互重疊。篩選出來的擴增子在不同雜交組合後代植株進行測試，嫩葉放入 96 孔的反應盤，每孔是單一的植株，抽取 DNA，同一個性狀的擴增子群所對應的引子對混合加入 PCR 反應液內，進行 2 次 PCR 反應，第 1 次以多種的標誌進行擴增，並加上連結序列 (linker sequence)，第 2 次 PCR 在連結序列加上獨特的條碼以區分不同樣品，完成 PCR 後所有的產物混合後送入 Illumina MiSeq 個人化次世代定序系統進行定序，獲得的序列資料進行歸類分析，檢查單一分子標誌的增幅專一性和有效性。

為了進行 AmpSeq 技術案例分析，Cornell 大學博士後研究人員 Dr. Shanshan Yang 等人以 5 個葡萄雜交族群 (1) *V. vinifera* 'Chardonnay' (歐洲種) x *V. cinerea* (美洲種) B9、(2) 'Horizon' (歐美種間雜交品種，親本包含 *V. vinifera*、*V. labrusca*、*V. rupestris*、*V. aestivalis*) x *V. cinerea* B9、(3) 'Horizon' x 'Illinois 547-1' (*V. rupestris* B38 x *V. cinerea* B9)、(4) *V. rupestris* B38 x 'Horizon'、(5) MN1246 x MN1264 (兩親本都是複雜的雜交後代品種系，遺傳背景包括 *V. vinifera*、*V. riparia*、*V. rupestris*、*V. labrusca*、*V. cinerea*、*V. aestivalis*)。選擇 3 個目標性狀，分別是有 3 個等位基因的單一基因座控制 (表型分析變異解釋率 93%) 的花性 (Flower sex，質量性狀)，由 1 個迴歸係數中到高的數量基因座控制 (解釋率 54%) 的酰化花青素 (acylated anthocyanin)，以及次要數量基因座 (Ren2) 控制 (解釋率 13%) 的白粉病抗病性，來源為美國原生種 *V. cinerea*。這些性狀如果在常規育種計畫進行表現型分析需要 2-4 年，要等到植株開花結果後才能開始調查評估。在 5 個雜交族群，一共 760 個樣品，測試 54 個 amplicon，其中花性相關 19 個、白粉抗病性 12 個、花青素相關 23 個。結果顯示花性 16 個 (解釋率 100%)、白粉抗病性 11 個、花青素相關 15 個 (解釋率 33%) 與性狀顯著相關。AmpSeq 分子標誌可以精準預測性狀，在分子標誌輔助育種的

跨物種雜交族群可以實際運用。AmpSeq 相較 SSR 在 marker 應用上，多工性增加 100 倍。一次分析 384 個樣品，使用 25 個 amplicon，每個樣品需要 4.47 美金，平均每個 amplicon 分子標誌 0.18 美金 (康乃爾大學校內價格，外部價格可能會多 20-80%)。

整體來說，AmpSeq 的優點是探勘、轉換、基因型分析在同一個平台進行，有許多用途，低價格，高多工操作，遺失資料少，可以把沒有關連性計畫的樣品合併分析節省經費，DNA 品質不佳也可以進行、不需要引子最佳化、半自動資料分析、周轉時間中等，約 2-4 星期。缺點是不平均的讀取深度，目標外區域的增幅，大約有 20% 的非有效引子會失敗，樣品數低於 96 個較不經濟實惠，多工 PCR 調配最好有自動化液體分注系統，需要有生物資訊相關人員參與等。

心得及建議事項

台灣的葡萄栽培與美國淵源極深，一些品種都有美洲葡萄的血統。鮮食葡萄主要栽培品種‘巨峰’ (*V. vinifera* x *V. labrusca*) 是歐美雜交四倍體品種，‘蜜紅’ 約 1980 年代初期由中興大學自日本引進，也是歐美雜交系四倍體品種。‘喜樂’ 原名 ‘Himrod’，是葡萄屬雜交品種，1952 年在美國紐約州農業試驗改良場 (NYSAES) 育成，後來引進台灣栽培。釀酒葡萄白酒主要品種 ‘金香’ 原名 ‘Golden Muscat’，也是在 NYSAES 育成 (1927 年)。這些源自美國或帶有美洲種遺傳背景的品種，對於夏季潮濕的環境適應性較世界主流的歐洲種來的好，且相較於歐洲種只有麝香或淡味的果實，美洲種帶有獨特的果實香氣 (狐味)，對於喜好香味水果的亞洲族群來說，深具吸引力，‘巨峰’就是一個很好的例子。

康乃爾大學在 1991 年開始，就建立不噴殺菌劑與殺蟲劑的葡萄園來篩選具抗病性的雜交後代，初選果園對新建立的雜交族群進行篩選，選出的品系進入複選果園進行後續評估。一些具有抗病性的美國原生種如 *V. cinerea*、*V. rupestris*、*V. aestivalis*、*V. riparia*、*V. rotundifolia* 等被用來與品質優良但容易感病的歐洲種進行雜交，許多的遺傳研究陸續找到新的抗病基因座，且對應的分子標誌也陸續被發現。次世代定序技術問世後，康乃爾大學也開發出以定序進行基因型分析 (Genotyping by sequencing, GBS) 技術大量開發單核苷酸多型性 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) 分子標誌，近年又開發以擴增子定序方法 (Amplicon Sequencing, AmpSeq) 運用於葡萄的分子標誌輔助選種 (Marker-Assisted Selection, MAS) 獲得成功結果。在 Vitisgen 2 的計畫裡，除了葡萄育種研究人員外，許多不同領域如植物病理、種原保存、遺傳、植物生理、基因體、定序技術、生物資訊、食品科學、經濟學、農業推廣等各方面的專家都參與其中，在表現型分析的部分也有機械、影像、資工的專家參與，等於說是一群一起作對的事，為新世代的葡萄育種齊心努力。在台灣，除了幾個比較大宗的作物如水稻、茶葉、番茄等有充足人力進行相關研究，果樹作物則沒有相對的資源，這次去美國看到如此團隊化合作的典範，著實令人羨慕，未來期望能與美國專家持續保持密切聯繫，以合作模式直接引入已開發完成的成熟技術。台灣所關注的抗露菌病 AmpSeq 分子標誌，對美東地區也是一樣重要，目前康乃爾正在研發階段。未來利用新開發的次世代分子標誌，可以快速的於苗期先進行抗病性篩檢，隨著其他更多性狀相關分子標誌的發表，以分子標誌輔助育種進行葡萄育種將會更精確。



拜訪康乃爾大學農業與生命科學院 (College of Agriculture and Life Science of Cornell University) 整合植物科學學群 (School of Integrative Plant Science) 園藝學門 (Horticulture Section) Bruce Reisch 教授。Reisch 教授隸屬農業科技改良場 (Cornell AgriTech)，專長為葡萄育種與遺傳。



於紐約州手指湖 (Finger Lakes) 葡萄酒莊種植的釀酒葡萄，康乃爾大學葡萄育種計畫的優選品系於此酒莊進行試驗，工作人員正在採收葡萄。



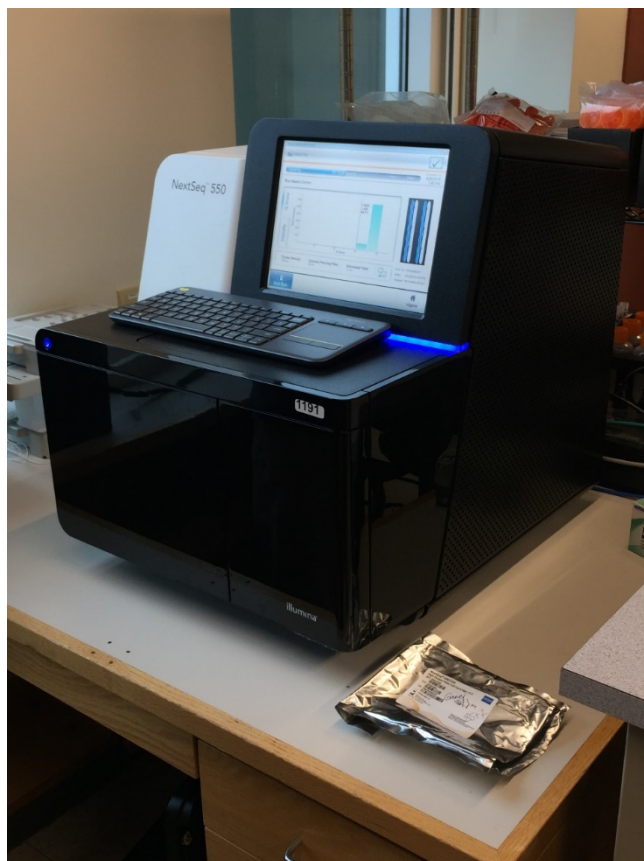
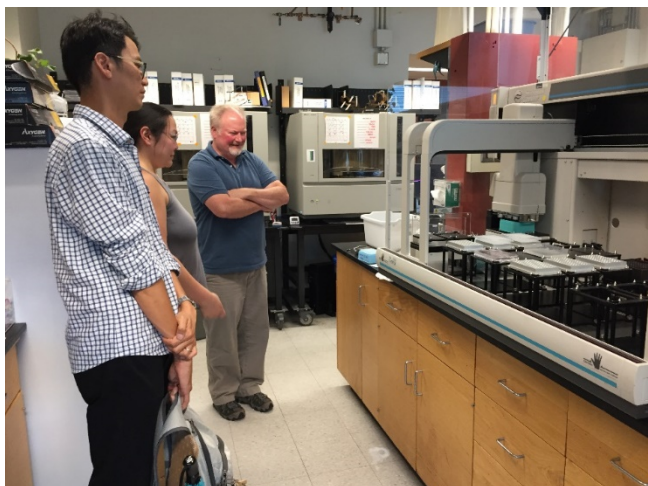
葡萄園為了防治鳥害，通常都會使用鳥網覆蓋著果部位 (Fruiting zone)，有的品種因為整枝方式不同，甚至將樹冠 (Canopy) 全部覆蓋。



康乃爾大學葡萄育種計畫抗病優選品系的田間表現，於生長季未噴施任何農藥，左上圖為商業栽培對照品種，遭受露菌病嚴重感染，其餘為優選品系，葉片健康，果穗外觀優良。



美國農業部 (USDA) 農業研究服務署 (ARS) 日內瓦國家種原保存園 (National Germplasm Repository – Geneva) 種原收集情形，負責葡萄種原的研究人員是植物遺傳資源研究組 (Plant Genetic Resource Research) 的 Dr. Benjamin Gutierrez。



康乃爾大學生物技術研究所生物技術資源中心 (Biotechnology Resource Center, Institute of Biotechnology)，基因體部門組長為 Dr. Peter Schweitzer (左上圖右 1)，左下為樣品自動分注系統。目前次世代定序 (NGS) 的主力機種為右圖的 Illumina NextSeq500，每次分析可以產生最多 8 億條讀值，120Gbp 序列。