

序

植物種苗為農業發展之根基，種苗科技的研發與創新是農業產業進步的原動力，唯有品質優良的種苗才能奠定作物豐收的基礎，促使種苗產業蓬勃發展。種苗產業除了技術精進外，品種保護的法規也因應產業發展而趨完善。

採種與育種在早期產業發展過程是不可分割，現今採種也專業分工，育種公司開發品種後委託專業採種公司進行種子生產，本研討會邀請國際種子公司講述蔬菜採種產業發產現況與面臨的挑戰，並由本場專家分享臺南區農業改良場近年來研發的特色雜糧新品種。植物品種民事侵權案近年屢有發生，本次邀請智慧財產法院庭長，分享智慧財產訴訟與植物品種侵權案例，讓品種權人知道對可能被侵害品種應如何維護權利。

優良種子生產之後無論進行種子貿易或種苗貿易，都面臨國際間檢疫法規的規範，健康種苗是農糧產業發展的基礎，農委會種苗改良繁殖場多年來進行重要病蟲害分子檢測技術的研究，在建立重要種子(苗)植物病原檢定技術標準作業流程上，已有具體成果；動植物防疫檢疫局將針對種子(苗)輸出入植物檢疫規定，進行詳細的說明，以保護國內農業免受外來疫病蟲害入侵。本場則針對番茄育苗場建立了健康種苗生產驗證規範，並實地輔導運作。

育種是種苗產業的基礎，基因改造品種受限於法規及消費者的接受度，分子標誌輔助育種已成為現代育種公司採用的育種技術，可大幅縮短育種年限，成為目前育種技術的主流，而分子標誌系統的演進更可說是一日千里，雖然品種表現的外表型會受環境影響，但基因型的鑑定變得更快速、準確及便宜，成為品種鑑定及抗病育種的新利器，提昇育種效率。本次邀請臺灣大學及中央研究院學者，發表雜交種子純度檢定、使用分子標記技術建立玉米雙單倍體族群的方法、次世代定序在玉米基因定位與育種上的應用，提供業界參考應用。

承蒙各位學者專家在百忙中抽空參與本研討會，發表最新研究成果，提供種苗產業發展趨勢與新知，為提升臺灣蔬菜種苗產業國際競爭力貢獻心力。也感謝共同辦理的中華種苗學會及台灣種苗改進協會，併致謝忱。

臺南區農業改良場 場長  謹誌

中華民國 106 年 11 月

蔬菜採種產業發展現況

王麗棻

傑尼爾種子集團公司 生產總監

摘 要

介紹現階段蔬菜種子生產現況、發展歷程與挑戰，以及產區發展特色。

一、蔬菜種子生產現況

1. 亞洲仍是主要蔬菜種子生產基地
2. 新品種比例逐年增加
3. 品質檢驗方式更精準快速
4. 種傳病害種類增加
5. 氣候因素影響產量與質量

二、亞洲蔬菜種子生產面臨的挑戰

1. 主要產區漸失優勢
2. 種子生產成本快速上漲
3. 採種農戶老齡化
4. 授粉工人老齡化與不足
5. 產量與質量改善
6. 新產區開發緩慢
7. 種原保護問題
8. 種子進出口
9. 亞洲各區域採種栽培特色

關鍵詞：蔬菜採種

臺南區農業改良場雜糧新品種介紹

游添榮、陳國憲、黃涵靈、吳昭慧、詹雅勛

行政院農業委員會臺南區農業改良場

摘 要

臺灣地窄人稠，自有糧食偏低，每年須進口 4 百多萬公噸的飼料玉米和 2 百多萬公噸的大豆及 1 百多萬公噸的小麥等糧食供國內使用。2007 年後，石油價格價格變動大，加以全球氣候異常變化，使世界糧食生產異常，國際糧價變動大，常使國內原物料成本上揚，國內物價上漲，對國人生活的壓力日增。硬質玉米、大豆、小麥、胡麻、落花生及薏苡等雜糧作物，其生產到收穫都可用機械完成，且生產過程中所需的水資源也僅為水稻的 1/5~1/3，是省工節水的糧食作物，政府推行大糧倉計畫將雜糧列入推廣種植的重點作物。本場服務的雲嘉南地區是臺灣重要的糧食生產地區，也是推動大糧倉的重點地區。在此介紹本場近年來研發的雜糧新品種落花生臺南 18 號和大豆臺南 10 號和黑豆南 11 號及硬質玉米臺南 29 號等新品種的特性。

關鍵詞：雜糧、落花生、大豆、硬質玉米

前 言

落花生是國內產值最高的雜糧作物，105 年國內栽培面積為 21,430 公頃，雲林縣的栽培面積為 15,851 公頃是主要產區。國產落花生以內為主，自給率達 80% 以上。為因應未來開放自由貿易準備，本場近年來花生品種選育標準逐漸調整為朝向本土風味，特殊多元化及延長儲窗壽命品種方向發展，以適度提升與國際市場區隔，減緩日後低價進口衝擊，保障農民收益。

大豆在國內分成黃豆和黑豆 2 種，黃豆主要作為豆漿，豆腐、豆花等加工產品的原料，黑豆主要供作釀造醬油的原料。大豆為國內重要大宗作物，臺灣每年需要約 200 多萬公噸，因供作加工食用的原料量多，價格高，是目前農委會重點推廣的雜糧作物。本場積極配合活化農地及提升糧食自給率之大糧倉政策，極力復耕國產大豆，栽培面積從 100 年 55 公頃至 105 年增加為 2,177 公頃，以雲嘉南和屏東為主要產區。

自 101 年，農委會為提高國產馬齒種和硬粒種玉米其用途的多元化，並增加農民收益，將國內農民種植的馬齒種或硬粒種的黃色玉米改稱為硬質玉米。國產硬質玉米除了當飼料用外，也可加工供作玉米粉、玉米糖漿及食品原料等用途。並輔導中華民國農會和各地區農會與農民契作收購硬質玉米，使國內硬質玉米的栽培面積從 101 年的 6,612 公頃，到 105 年提高到 16,157 公頃。目前硬質玉米在臺灣的主要產區為嘉義及臺南地區，約占 83%，為最主要的生產地區。

落花生臺南 18 號之特性

落花生臺南 18 號研發目的為朝本土風味方向發展所選育品種，具有現在主要栽培品種臺南 14 號大粒、豐產優點，同時兼具深受消費者喜愛的臺南選 9 號濃郁風味及高剝實率特性，加工後口感也較臺南 14 號更細緻鮮甜，風味更香醇。臺南 18 號係以雜交育種方法育成，於 101 年通過命名審查，104 年取得品種權。

臺南 18 號屬西班牙型，株型直立，成熟收穫期，春作為播種後 120~130 天，秋作為 100~110 天。平均公頃乾莢果產量春作為 4,123 公斤，秋作為 2,527 公斤。株高 32.9~37.3 公分，剝實率春作為 72.6%，秋作為 69.6%，百莢重 142~177 公克，千粒重 551~652 公克，籽粒油份含量 49.9~50.5%，蛋白質含量 27.8%~28.2%。在田間自然發病情形下，罹患銹病及葉斑病的程度，較臺南 14 號輕微。104、106 年分別技轉予雲林縣虎尾鎮及臺南市山上區專業農民生產使用，目前由承接農友釋出種原預估種植面積約達 200 餘公頃(106 年秋作)，仍持續成長中，主要用作供應主婦聯盟之生豆市場原料生產。

大豆臺南 10 號之特性

大豆臺南 10 號係臺南區農業改良場於 103 年 5 月育成，雜交育種法育成。大豆臺南 10 號具有高產、耐白粉病，臍色黃色、非基因轉殖、蛋白質含量高等優良特性。其生育日數在春作 101~103 天，秋作 96~98 天。植株屬於有限生長型。春作株高 59.3~62.2 公分，秋作株高 40.4~43.7 公分。花白色，葉為羽狀三小葉，小葉披針形。種子圓形，種皮、子葉及種臍均為黃色，百粒重 24.8~27.1 公克。籽實產量每公頃春作 2,700~3,800 公斤，秋作 2,100~2,400 公斤。乾基蛋白質(41%)含量高，營養成分豐富。

新品種大豆臺南 10 號為食用級大豆，蛋白質含量 40% 以上，適合做為豆腐、

豆漿、豆麥醬油、味噌等使用，尤其種臍為黃色，更為味噌業者的最愛，目前為新北市農會及義美公司契作製作豆漿之品種。新品種產量增加 10~20%，可提高農民種植意願，增加國內糧食自給率。

黑豆臺南 11 號之特性

黑豆臺南 11 號於 106 年育成，以雜交育種法育成。黑豆臺南 11 號具有高產、抗白粉病，非基因轉殖、蛋白質含量高等優良特性。其生育日數在春作 106 天，秋作 96 天。植株屬於有限生長型。春作株高約 53 公分，秋作株高約 58 公分。花紫色，葉為羽狀三小葉，小葉銳卵形。種子扁圓形，種皮黑色、子葉綠色及種臍為黑色，百粒重 22~28 公克。籽實產量每公頃春作約 3,000 公斤，秋作約 3,100 公斤。乾基蛋白質(39.2%)含量高，營養成分豐富。

黑豆臺南 10 號為優質中粒青仁黑豆品種，抗氧化能力、異黃酮及花青素含量高，且抗白粉病，適合作豆漿、豆腐、黑豆茶等產品，未來可往保健飲品開發。對推廣單位而言，可提供農民種植新選擇，國內種植大豆不僅可提高糧食自給率，同時大豆與根瘤菌共生，可以固定空氣中氮素，減少氮肥施用，對土壤地力維持及後期作物生產有很大幫助，且能在地生產在地消費，不僅降低運輸里程，愛護地球，而且有助於農業永續經營。對消費者而言，可提供非基改、高蛋白質、高品質國產大豆。

硬質玉米臺南 29 號之特性

硬質玉米臺南 29 號為 3 系雜交品種，於 106 年育成。硬質玉米臺南 29 號具有耐旱、耐低溫，籽實高產、抗倒伏倒折可適合機械收穫、不易感染銹病和葉斑病，播種後可不必施藥防治病蟲害、可省工節水栽培。臺南 29 號為非基因轉殖、其蛋白質含量高等特性。其生育日數在秋作 120~150 天。秋作株高 210~250 公分。莖桿及葉鞘為綠色，百粒重 26~38 公克。秋作籽實產量每公頃 6,500~7,500 公斤。蛋白質含量為 8.8%，營養成分豐富。

硬質玉米臺南 29 號的籽粒產量每公頃 6,500~7500 公斤，較現有栽培品種臺農 1 號高約 10%。籽實的蛋白質含量為 8.8%，比一般進口硬質玉米高約 10%，營養價值高且不易感染銹病、葉斑病，省工、耐低溫、可不用灌溉，播種後不必施藥防治病蟲害，可節省水資源及生產成本。植株強健，抗倒伏倒折，適合機械栽培收穫，可提高農民種植意願及收益。106 年在雲嘉南地區推廣 650 公頃。

結 語

近年來，政府進行「調整耕作制度、活化農地」計畫及「對地綠色環境給付」計畫都是針對目前臺灣農業中，農村人力老化・農村人力不足，平均每戶農地面積太少，稻米生產過剩，農地利用及節省水資源以生產糧食等問題所推行的重要工作。計畫中鼓勵農民種植的硬質玉米、大豆、小麥、薏苡等雜糧作物，其生產到收穫都可用機械完成，且生產過程中所需的水資源也僅為水稻的 1/5~1/3，故是省工和節水的糧食作物。

目前臺灣生產落花生、大豆和硬質玉米等雜糧作物，每公頃可較水稻節省 6,000~10,000 噸的水資源。10,000 公頃即可較水稻節省約 6,000 萬~1 億噸的水資源，是友善環境及省工節水的作物，也是推動稻田轉作的重要作物之一。但臺灣雜糧的生產成本多高於目前進口雜糧，如無政府的支持是無法推動的。故政府的政策支持是決定雜糧在臺灣能否生產的關鍵。國內雜糧的產業要配合政府政策外，也須努力提升產品價值，提升農民收益。

參考文獻

1. 行政院農業委員會。2016。農業統計年報。36-43
2. 吳昭慧、黃涵靈。2014。大豆新品種臺南 10 號之育成。臺南區農業改良場研究彙報 64：1-19。
3. 吳昭慧。2017。黑豆新品種臺南 11 號之育成。臺南區農業專訊 101: 1-3。
4. 陳國憲、楊藹華。2014。落花生新品種臺南 18 號之育成。臺南區農業改良場研究彙報：1-19。
5. 游添榮、詹雅勛。硬質玉米臺南 29 號之育成。臺南區農業專訊 101: 4-6。

重要種子(苗)植物病原檢定技術標準作業流程建立

邱燕欣、張惠如、鍾文全、沈翰祖、蘇士閔

行政院農業委員會種苗改良繁殖場

楊佐琦

行政院農業委員會農業試驗所

種子種苗產業

種苗(子)為作物生產根源，是農業永續發展的基石，具備資本密集、技術密集及高度專業化、企業化特性。臺灣植物種苗之需求量不斷成長，基本供應國內所需之外，了解外銷國際市場動態需求及供應，更是各種苗(子)業者經營的重要目標。

行政院農業委員會為展現我國農業軟實力，透過推動新南向政策「區域農業發展」旗艦計畫，與新南向國家在農業產業方面加強鏈結與合作，盤點我國11項農業項目具有國際競爭力，亦具備與新南向國家合作潛力，其中種子種苗產業即為其一要項，不僅是因為臺灣在國家政策、學術相關研究以及相關產業發展，在產官學通力合作之下，種子種苗產業在國際上具有一席之地。

目前臺灣種苗(子)年產值已達150億元以上，其中園藝種苗產值約占68%，商用種子的總市場規模約3億美元，全球排名第22名，占全球市場0.7%，因此種苗(子)生產不論在量的增加或質的提升，都是保有臺灣農業競爭力的關鍵。

種子種苗病害檢定

種苗(子)的國際貿易頻繁，對於健康種苗(子)或種子檢疫的相關議題也日益升溫，依據國際植物保護公約(International Plant Protection Convention, IPPC)的要求，必須檢疫外來有害生物，以便控制他們在新區域散布的情形。因為種子是主要攜帶媒介，所以有關種子的進出口需要檢疫規範來約束。而建立動植物檢疫適用測量標準協定(WTO Agreement on Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS)，是為確保各國可自行提出適當保護的獨立權，但一方面又不會錯誤使用造成貿易障礙。

在 2017 年 4 月 6 日於南韓召開的國際植物保護公約〈IPPC〉會議決議將納入以種子為檢疫標的國際植物防疫檢疫措施標準〈ISPM〉第 38 號，並要求 IPPC183 個會員國盡快執行，並且提供植物種傳有害生物風險評估指引與各國家植物保護機關（National Plant Protection Organization, NPPO）。

檢定技術建立實驗室

種苗改良繁殖場(種苗場)核心業務為種苗(子)檢測、健康種苗(子)發展、種苗(子)產業發展與國際接軌，在農委會動植物防疫檢疫局(防檢局)及農委會國際處等單位協助推動下，開發多樣種苗(子)傳播病原之檢定技術，並以標準流程化為目標，建立植物病原檢定技術標準作業流程。

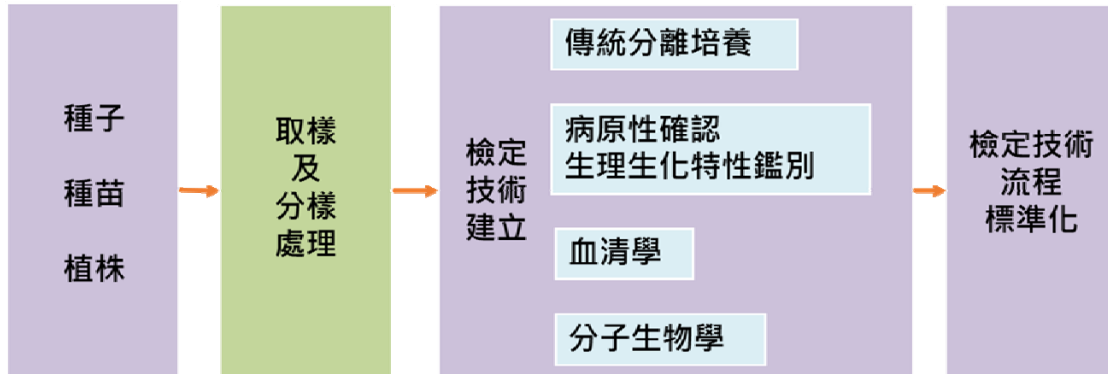
目前本場執行相關業務為種苗場 TAF 實驗室及 ISTA 種子檢查室，TAF 實驗室為本場生物技術課於 2008 年 7 月正式取得全國認證基金會(TAF)依據 ISO/IEC 17025：2005 之檢測實驗室認證，主要檢測項目為基因轉殖作物(GMO)與植物病原。而 ISTA 種子檢查室則為本場種苗經營課於 2012 年 6 月正式承接種子檢查室(原屬農糧署)業務，種子檢查室係國際種子檢查協會(ISTA)認證實驗室，主要業務為種子批取樣及種子水分、發芽與潔淨度檢驗、執行國內農作物良種繁殖體系的田間檢查與室內檢查工作以及核發國際種子(批)檢驗證。

上述實驗室皆具備符合國際標準(如 ISO/IEC 17025、ISTA Rules...)對申請實驗室之能力及品質系統進行評鑑；經認可之實驗室即可在出具的認證範圍內的報告上使用認證機構之認證標誌(正式證明)以證明其能力。實驗室認證體系相互承認關係的建立，可促使外銷產品直接在本地由認可實驗室執行檢測，而其檢測結果為輸入國所接受，突破國際間非關稅貿易障礙，且可避免產品重複檢測，降低產品成本，暢通國際貿易。

檢定技術分類

以病原特性及檢定需求建立不同階段之檢測技術。如作物生產的內部管控檢定，以組織培養苗、植物葉片及果實為檢定標的；或為種子生產，檢測種傳性病害。檢測技術則包含傳統分離培養、生理生化特性鑑別、血清學及分子生物學等檢查技術為主。而技術的選擇必須兼具敏感性(sensitivity)、專一性(Specificity)、重現性(repeatability)與經濟性(Economic)，而且必須在試驗的決定性步驟設置管

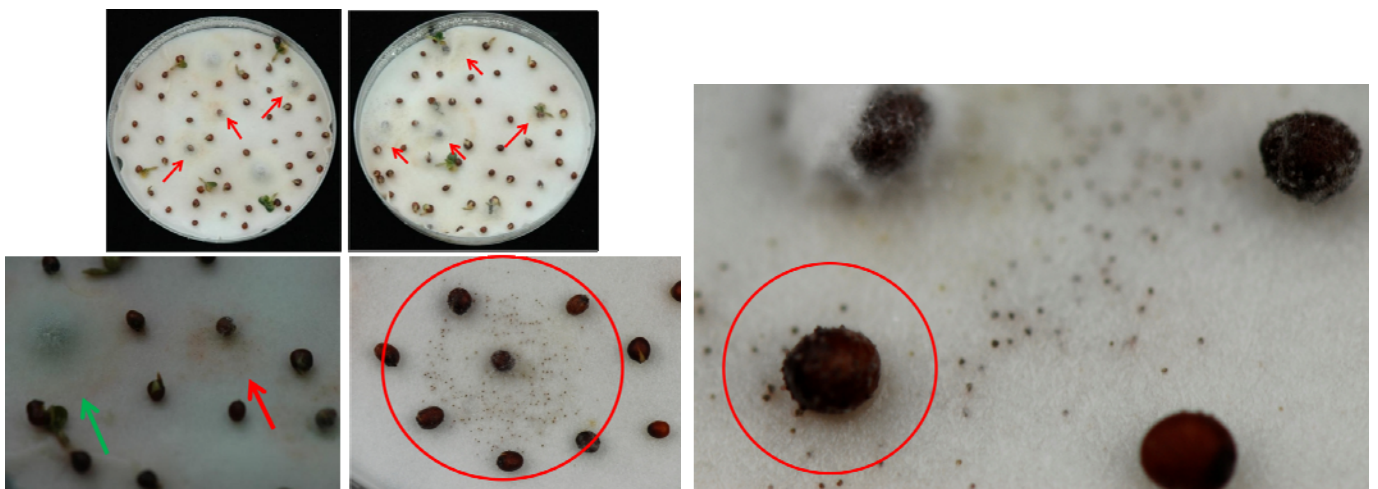
控點，藉由陽性(陰)對照物及對照標的有無判斷試驗的可信度，而檢定流程執行前尚包括採樣單位取樣及分樣動作，其樣品數量及頻度與植物病原傳播特性有關，必須針對病原特性設計取樣數及檢定技術，採集具統計分析代表性之種子數量，進行均勻分樣後，進入檢定流程(圖一)。



圖一、種子(苗)病原檢定流程。

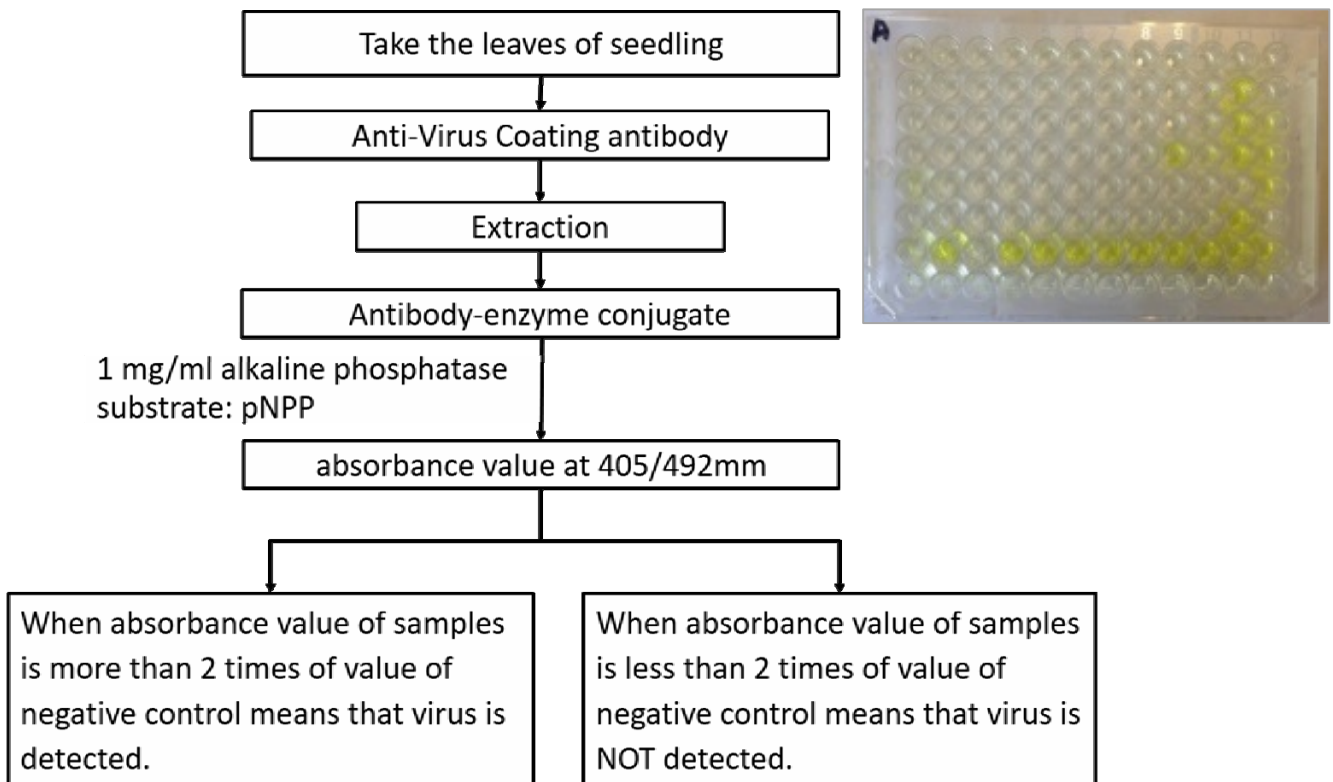
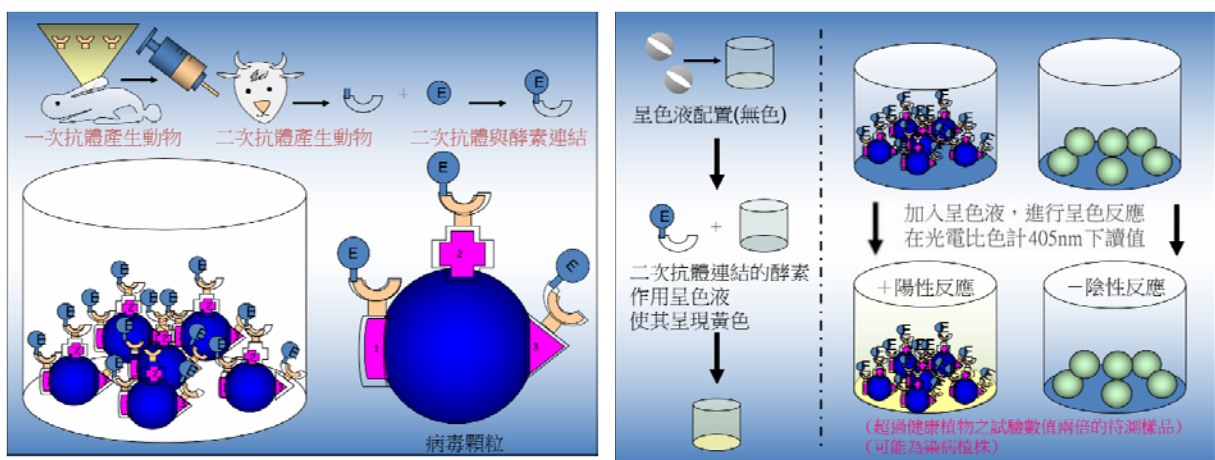
以下就常使用之檢定技術特性進行介紹：

微生物培養觀察法：運用病原微生物生長特性及盤據種子上型態，將種子或種子洗出液培養於選擇(鑑別)性培養基，觀察病原微生物菌落(如圖二)、菌絲，或是代謝培養基成分呈現顏色變化藉以判斷，由於培養過程較為耗時，且必須借重檢定人員實務經驗及判斷能力，必要時輔助接種試驗，確認其病原性，故該項檢定技術逐漸被其他技術取代，但因其所需設備較簡易，在部分國家仍為通用。



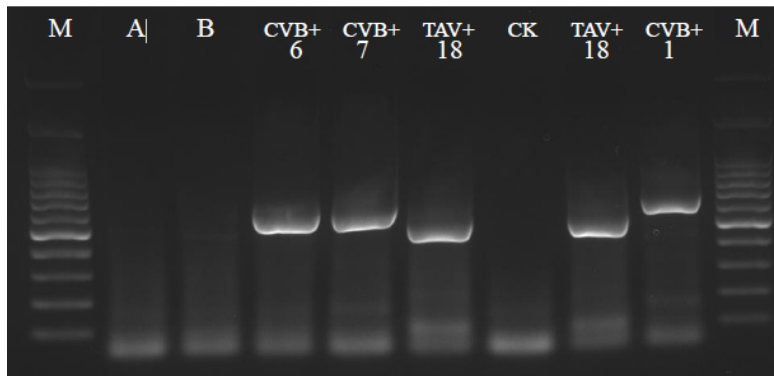
圖二、十字花科黑腳病菌 *Leptosphaeria maculans* (anamorph: *Phoma lingam*)於溼濾紙法觀察種子上真菌菌落型態。

酵素連結抗體法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, 簡稱 ELISA) - 血清學診斷：此技術係利用「抗體與抗原」的專一性結合，經由標定於抗體上酵素催化呈色基質反應，將檢測結果以顏色變化呈現，輔以分光光度計讀取其吸光度數據，判斷陽性(陰性)反應如圖三。因其抗體抗原結合順序差異或酵素連接抗體與抗原的直接與間接性，又可分為直接法與間接法，ELISA 技術因操作方便，適用於大量樣品之病毒檢測，利用 ELISA 診斷有許多檢查的方法，在偵測已未經純化之材料為被檢體時，常用的基本檢查法是雙抗體包夾法(Double antibody sandwich ELISA)。



圖三、ELISA示意圖。

核酸聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, 簡稱 PCR) 核酸檢測法係建立於物種間獨特的核酸序列, 然後依此序列設計出該物種人工合成的短片段專一性核酸引子對, 再配合核酸聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, 簡稱 PCR) 技術, 此技術乃利用一種分離自細菌的耐高溫核酸複製酵素, 在適宜的變溫循環程式下, 針對目標的特定區域核酸進行快速複製, 約經 2 小時 30 個循環左右, 即可複製出約 10 億倍的核酸, 再經由電泳分析以肉眼判別所增幅的核酸條帶如圖四。



圖四、利用反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse transcription-PCR, RT-PCR)進行菊花種苗病毒檢定之電泳圖。

而植物病毒核酸大多屬於 RNA, 故在變溫循環前, 須先以病毒反轉錄酵素 (reverse transcriptase) 進行反應, 將 RNA 反轉錄成 DNA 分子, 簡稱 RT-PCR, 由於 PCR 係針對病毒蛋白前驅物-核酸分子進行檢測, 因此較 ELISA 技術更敏感, 可更早偵測到病毒的存在。

近年來, 更發展出結合分子生物學、酵素動力學、電子學、光學與訊號處理等技術結合成生物晶片 (Biochip) 如圖五, 應用於植物病原檢定, 但尚未普及運用於標準技術建立。



圖五、利用反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse transcription-PCR, RT-PCR)結合晶片呈色, 進行茄科類病毒等病原檢定之晶片(測試中)。

種苗場自防檢局支持下，持續建立輸出種子植物病原之檢測標準作業檢測技術如表一，至「行政院農業委員會種苗改良繁殖場受託辦理基因轉殖及植物病原檢測收費標準」公告施行(公告施行日為 102/03/14)以來針對植物病原檢測受委託收費檢測的樣品數及收費金額逐年增加如表二。

表一、輸出種子植物病原之檢測標準作業檢測技術

年度	病原種類	病原名稱	技術類別
102	真菌	十字花科黑腳病菌(<i>Leptosphaeria maculans</i>)	種子病原培養型態特性
		瓜類蔓枯病(<i>Didymella bryoniae</i>)	種子病原培養型態特性
	病毒	菸草嵌紋病毒(Tobacco mosaic virus)	出芽檢測/ELISA
		豌豆種媒嵌紋病毒(Pea Seed-borne Mosaic Virus)	出芽檢測/ELISA
		南瓜嵌紋病毒(Squash mosaic virus)	出芽檢測/ELISA
	細菌	茄科細菌性斑點病菌(<i>Xanthomonas</i> spp.)	種子研磨/PCR
番茄細菌性葉斑病菌(<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>)		種子研磨/PCR	
103	真菌	菜豆炭疽病(<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)	種子病原培養型態特性
		豌豆葉斑病或果莢黑斑病(<i>Ascochyta pinodis</i>)	種子病原培養型態特性
	病毒	香瓜茄嵌紋病毒(Pepino mosaic virus)	出芽檢測/ELISA
		香瓜壞疽斑點病毒(Melon necrotic spot virus)	出芽檢測/ELISA
		菸草微綠斑駁病毒(Tobacco mild green mosaic virus)	出芽檢測/ELISA
		豌豆早褐病毒(Pea early browning virus)	出芽檢測/ELISA
	類病毒	馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒(PSTVd)	種子研磨/RT-PCR
		番茄類病毒(TPMVd)	種子研磨/RT-PCR
		番茄黃色矮化類病毒(TCDVd)	種子研磨/RT-PCR
		辣椒小果類病毒(PCFVd)	種子研磨/RT-PCR
		番茄頂矮化類病毒(TASVd)	種子研磨/RT-PCR
	金魚藤潛伏類病毒(CLVd)	種子研磨/RT-PCR	

表二、種苗場植物病原檢測受委託收費檢測的樣品數及收費金額
(106 年度為統計到 106/09/26)

年度	案件(件)	收入(千元)
102	31	26.1
103	148	45.25
104	156	77.75
105	233	175.25
106	303	152.3
合計	871	476.65

未來展望

為永續發展臺灣期能取得國際認證的實驗室，是以管理的手段達到減少檢測發生錯誤的機會，不僅可提升實驗室的檢測能力，為種苗品質把關；所開出的結果報告受到國際承認，可大幅提升其公信力與業者之國際競爭力。期待本場種子檢查室往亞太種子檢測中心的願景來邁進。

一、精進種子檢查技術強化國際合作

加強種子檢查國際視野：積極參與 ISTA 會員國合作與交流，參加 ISTA Workshop 訓練，提昇種子檢查技術與國際接軌，爭取辦理 ISTA Workshop，於臺灣舉辦 ISTA 年會活絡我國外交。種子檢查技術深植產業：除執行種子檢查業務外，輔導、訓練種子業者，以相同的國際標準進行種子品質管制，提昇我國種子業者競爭力。

二、增加種子健康檢查及病害鑑定業務

完成健康種子檢查加項認證作業：我國種子檢查目前僅執行純度、水分、發芽率檢查，應針對業者需求增加健康檢查之加項認證。開發更有效率健康種子檢測技術：以縮短健康種子檢查及認證之時程，提送 ISTA 進行檢測方法認證，研發有效之種子清潔調製技術：協助種子出口業者生產無病原菌、高品質種子，提升出口產值。

三、提升種子檢查效率

分作短-中-長期目標進行，短期：調整檢查流程：例如種子經風選後逕進行發芽試驗，進行相關試驗：例如種子打破休眠試驗。改變行政規範：例如種子發

芽率達門檻值即認定為合格種子，提升助理檢測技術等。中期：加入品種影像辨識系統，增加自動化系統設備。長期：串聯各部門自動化系統如分樣、發芽統計及病害檢定報告，達到自動化及智能化串聯實驗室工作群，使得後端連結數據分析及回饋機制，能夠更具效率執行內部管控及稽核工作。

參考文獻

1. 張世忠、胡仲祺。2007。動植物疫病診斷技術之另一“環”。農政與農情。178(04): 88-91。
2. 徐堯輝、胡仲祺、陳信宏、張世忠。2004。竹嵌紋病毒快速檢測試劑套組之開發與應用。農政與農情。146(08): 75-78。
3. 黃秀珍、胡仲祺、張瑞璋、邱安隆、曾國欽。2013。建立符合國際規範之瓜類種子傳播果斑病菌檢測技術平台。農業生技產業季刊。33: 26-31。
4. 邱安隆、胡仲祺、黃秀珍、曾國欽、鄧文玲。2010。現行國際規範之作物種傳病害檢定技術平臺之簡介。動植物防疫檢疫季刊。26: 35-40。
5. 張清安。2005。種傳病毒之特性、檢測與管理。植病會刊。14: 77 - 88。
6. 呂昫陞、曾國欽、鄧文玲、徐世典。2006。利用 DNA 減扣法開發十字花科黑腐病菌之 PCR 檢測技術。植物病理學會刊。15: 303。
7. 呂昫陞、曾國欽、徐世典。2004。應用聚合酵素連鎖反應快速鑑定及檢測茄科植物細菌性斑點病菌 *Xanthomonas vesicatoria*。植病會刊。13: 358。
8. 曾國欽、徐世典。2002。重要植物細菌病害診斷鑑定技術。植物重要防疫檢疫害蟲診斷鑑定研習會之二。95-115 <http://www.baphiq.gov.tw/view.php?catid=4307>
9. 邱燕欣、王慧如、楊佐琦。2015。馬鈴薯與葡萄重要病毒血清製備技術開發。2015 種苗科技研發成果發表會專刊。
10. 楊佐琦、王慧如、邱燕欣。2007。幾種作物病毒之快速診斷方法。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研討會專刊(六): 67-84。
11. 邱燕欣、王慧如、何書豪、楊佐琦。2008。馬鈴薯病毒病害及其檢測技術。農業世界 294: 26-39。
12. 楊佐琦、蘇士閔、邱燕欣、黃亮白、陳易徵、張仁銓、許鑄云、周永吉、黃卯昌、洪建民、黃玉梅、黃維東。2012。國際種子檢查協會(ISTA)發展近況與未來趨勢。頁 3-45。掌握植物種苗產業動態與關鍵技術開創新契機研討會專輯。行政院農業委員會種苗改良繁殖場編印。113 頁。台中。

13. 楊憶華、陳保良。2006。推動台灣植物種苗病毒驗證體系現況與展望。農政與農情。166: 25-28。
14. 蘇士閔、魏芊珊、簡良芬、徐麗芬。2015。十字花科黑腐病 ISTA 種子健康檢查技術之建立。2015 種苗科技研發成果發表會。(海報)
15. 蘇士閔、邱燕欣、鍾文全、王慧如、劉俊延、簡良芬、魏芊珊。2016。重要出口種子種傳病原檢測技術之建立。2015 種苗科技研發成果專輯。89-99。
16. 徐麗芬。2016。邁向新里程-2016 年國際種子檢查協會(ISTA)實地稽核。苗科技專訊。96: 22-25
17. 張惠如。2017。農業 ISO 檢測實驗室為種子苗品質做把關。行政院農業委員會新聞資料。第 047 號中華民國 106 年 3 月 20 日。
18. 陳葦玲、蕭政弘。2013。印度蔬菜及種苗產業現況。農業生技產業季刊。33: 1-7。
19. Federico Martinelli, Riccardo Scalenghe, Salvatore Davino, Stefano Panno, Giuseppe Scuderi, *et al.*. Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, 2015, 35 (1), pp.1-25.

種子種苗輸出入檢疫作業說明

王惠雯

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

摘 要

植物檢疫為防範有害生物隨植物產品國際貿易而跨國移動之重要措施，在世界貿易組織(WTO)架構下，各會員國採行植物檢疫措施應符合食品安全檢驗與動植物防疫檢疫措施協定(Sanitary and Phytosanitary Measures Agreement, SPS Agreement)。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局(以下簡稱防檢局)依據「植物防疫檢疫法」執行種子及種苗輸出入檢疫，其中輸出檢疫作業係配合輸入國檢疫規定辦理，經實施輸出檢疫後核發輸出植物檢疫證明書。另依相關法規及國際規範，執行進口種子及種苗之輸入檢疫，並針對具繁殖力之檢疫物未有自該輸出國家、地區輸入之紀錄者，辦理輸入風險評估，採行適當風險管理措施，以兼顧貿易需求及檢疫把關之平衡。

前 言

檢疫為世界各國為防範國際間重大病蟲草害等有害生物隨貿易傳入立足及保護其國內農業生產安全之重要措施，由於種子於國際間貿易運輸極為頻繁，為評估及管理國際運輸的種子可能伴隨的有害生物風險，並促進種子國際運輸，國際植物檢疫措施標準制訂委員會於 2017 年 4 月通過 ISPM 38「種子的國際運輸移動」，主要內容包含植物種子之有害生物風險分析、植物檢疫措施及其同等性、植物檢疫證明書核發及相關紀錄保存等。另國際種子貿易聯盟(International Seed Federation, ISF)為使各國之種子相關機構及業者瞭解 ISPM38 之精神，提醒種子於進行國際運輸移動前，應注意各輸入國之檢疫要求，鼓勵業者在生產國生產種子時，即規劃未來可能輸銷國家要求加註檢疫病原之田間檢查或實驗室檢測作業，以順暢貿易，詳如附圖一。

種子種苗輸出檢疫作業

一、協助種子種苗外銷，蒐集輸入國檢疫規定

防檢局自 94 年起即委託專家建置「對外貿易植物檢疫資料庫查詢系統」(http://192.192.148.121/coa/hotnews_idx.php?)，蒐集各國植物檢疫規定資訊以供輸出業者查詢，輸出業者如有須針對特定國家或特定產品進行檢疫資訊蒐集之需求可逕洽防檢局或轄區分局提出。

二、輸出植物檢疫作業及輸出植物檢疫證明書之核發

依據植物防疫檢疫法第二十條，輸出植物或植物產品，輸入國要求提出檢疫證明者，輸出人得申請植物檢疫機關檢疫，防檢局於實施檢疫後，核發輸出植物檢疫證明書。輸出檢疫申請及作業程序，詳如附圖二。由於輸出植物檢疫係配合輸入國植物檢疫規定辦理，輸入國要求加註之檢疫條件，應經防檢局人員臨場合格後，方可加註於輸出植物檢疫證明書中。如輸入國係要求就該批貨物進行檢查或檢測後加註於輸出植物檢疫證明書上，則防檢局可配合辦理。

三、再輸出植物檢疫證明書之核發

再輸出植物檢疫證明書之核發，依原輸出國之植物檢疫證明書加註內容是否符合輸入國規定分為兩種辦理方式：

- (一) 原輸出國檢疫證明書加註內容符合輸入國規定時：依據 ISPM 12 規範，再輸出國可發給再輸出植物檢疫證明書，並併附原輸出國植物檢疫證明書之認證副本(certified copy)。為配合業者外銷需求，除可由業者提供原輸出國之認證副本外，亦可由防檢局檢疫人員於原輸出國之植物檢疫證明書影本上加蓋 "I certified that this is a true copy of the original." 且由檢疫人員簽名副署並標明日期，並加蓋機關章戳。
- (二) 原輸出國植物檢疫證明書加註內容未符合輸入國規定時：依據 ISPM 12 規範，原輸出國植物檢疫證明書加註內容未符合輸入國規定時，再輸出國應就再輸出貨物進行必要之額外檢查（如取樣檢測指定病原）後加註證明。
- (三) 簡化再輸出植物檢疫證明書之核發作業：為利確認自國外輸入重新包裝再輸出種子無罹染有害生物之疑慮，並簡化相關業者自我管理作業，防檢局訂定「種子重新包裝申請再輸出檢疫作業要點」草案，規範輸入人於進行種子分裝前，依種子種類逐項填具「再輸出種子分裝及存放處所申請書」，並檢附該批種子輸入植物檢疫證明文件及分裝計畫，向防檢局轄區分局申請審查，審查通過者可於一定期間內進行分裝作業。防檢局轄區分局得視需要前往抽

檢相關作業、紀錄或取樣檢測，無須逐批監督分裝。

具種子分裝再輸出資格之輸入人，於貨物再輸出前仍應向各分局申報檢疫，並由各分局依其分裝紀錄，以書審為原則依實核銷，並依輸入國檢疫規定核發再輸出植物檢疫證明書。

(四) 如業者遇有輸入國不接受防檢局核發之再輸出檢疫證個案，將依據業者提供之不合格資訊，洽輸入國檢疫單位諮商。

四、配合輸入國檢疫規定要求，辦理輸出種子病原檢測並持續規劃新增病害檢測服務

防檢局係配合輸入國檢疫規定辦理輸出檢疫並為協助國內種子業者拓展外銷市場，依據 102 年 9 月 18 日公布之「輸出植物種子特定病原檢測作業要點」，委託農委會種苗改良繁殖場協助進行輸出種子病原檢測。現行檢測項目為十字花科黑腐病菌、瓜類細菌性果斑病菌、胡瓜綠斑嵌紋病毒、胡瓜嵌紋病毒及番茄嵌紋病毒、十字花科黑腳病菌 (*Phoma lingam*)、瓜類蔓枯病菌 (*Didymella bryoniae*)、菜豆炭疽病菌 (*Colletotricum lindemuthianum*)、豌豆葉斑病菌 (*Ascochyta pisi*)、菸草嵌紋病毒 (Tobacco mosaic virus)、豌豆種媒嵌紋病毒 (Pea seed-borne mosaic virus)、南瓜嵌紋病毒 (Squash mosaic virus)、馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒 (Potato spindle tuber viroid)、番茄黃色矮化類病毒 (Tomato chlorotic dwarf viroid)、辣椒小果類病毒 (Pepper chat fruit viroid)、番茄頂矮化類病毒 (Tomato apical stunt viroid)、番茄類病毒 (Tomato planta macho viroid)、金魚藤潛伏類病毒 (Columnea latent viroid) 等。未來亦規劃由防檢局認可之指定實驗室協助進行外銷種子病害檢測，提高檢測效率。

種子種苗輸入檢疫作業

一、輸入檢疫申請程序

自國外輸入種子種苗時，應依我國輸入植物檢疫規定辦理，並於輸入時向防檢局轄區分局或檢疫站申報檢疫。輸入檢疫申請及作業程序，詳如附圖三。

二、首次輸入風險評估之緣由

自我國加入 WTO 後，國外農產品輸入種類遽增，為順暢國際貿易及保護我國農業生態安全，各國為防杜外來入侵物種或有害生物之傳入，均依據原產國之有害生物疫情狀態訂定植物產品輸入檢疫條件。為確保於我國採種或於我國重新

包裝之種子能順利輸銷各國，更應維持我國為重要有害生物之非疫狀態，以利我國優良農產品外銷。

我國參據國際規範，於 94 年 10 月 21 日公告修正「中華民國輸入植物或植物產品檢疫規定」，並續於 103 年 6 月 18 日修訂「植物防疫檢疫法」第十四條第三項規定，具繁殖力之檢疫物未有自該輸出國家、地區輸入之紀錄者，應先向防檢局提出申請，並依 104 年 5 月 25 日公告之植物防疫檢疫法施行細則第十一條，提送風險評估所需相關資料，供防檢局進行風險評估。

三、首次輸入風險評估程序

自國外輸入種子前，請先至防檢局網頁公布之「核准輸入植物清單」(首頁 > 植物檢疫組 > 核准輸入植物清單及說明)查詢，或洽詢防檢局或各分局確認擬輸入植物是否已有輸入紀錄，並確認輸入檢疫條件。如屬未有輸入紀錄者，則須依前述規定填寫防檢局「首次輸入植物種子(苗)申請問卷」，申請風險評估。

防檢局辦理首次輸入風險評估即依據國際疫情、科學文獻證據與申請人提供之資料，針對入侵種植物潛能及其有害生物風險綜合評估，並據以調整輸入檢疫條件。評估過程中亦請專家及相關試驗研究單位審閱並提供意見，彙整綜合各單位意見後審核是否核准同意輸入。

依目前受理申請風險評估案件之經驗，因申請人普遍未能提供完整植物生產管理及輸出國與申請輸入貨品有關之有害生物清單，常須再行補件或向輸出國植物檢疫機關索取補充資料，且防檢局執行評估作業人力有限，為避免影響貨物輸入安排，請輸入人儘早提出申請，並向輸出國要求提供評估所需完整資訊及文獻資料，以利防檢局加速評估作業。另統計一般首次輸入申請案件，每一種植物之審核時間平均兩個月左右，為兼顧其他申請人權益，如申請人一次同時提出數種植物之申請，建議請於申請時提供優先順序，以利防檢局安排評估作業。

四、依國際疫情，適時修增訂檢疫條件

有害生物疫情發生狀態係隨時間及環境變動，為即時採行有效檢疫把關措施，輸入檢疫條件須依國際疫情發生情形調整。另為檢討輸入種子苗產品之風險，爰對於五年內未有輸入我國紀錄之植物或植物產品，防檢局得視其檢疫風險情形重啟風險評估。

五、產業應強化種子品質之自主管理能力

種苗業者應提升種子品質與健康之自主管理能力，並落實於種子輸出入國際貿易。以某國際種子研究機構出口茄科種子至澳大利亞為例，該批種子運抵澳國

時，經檢測發現澳國關切之有害生物，除該批貨物被銷燬外，該研究機構對外之種原提供或交換亦須立即暫停，顯示業者自主管理機制健全與否實為關鍵所在。

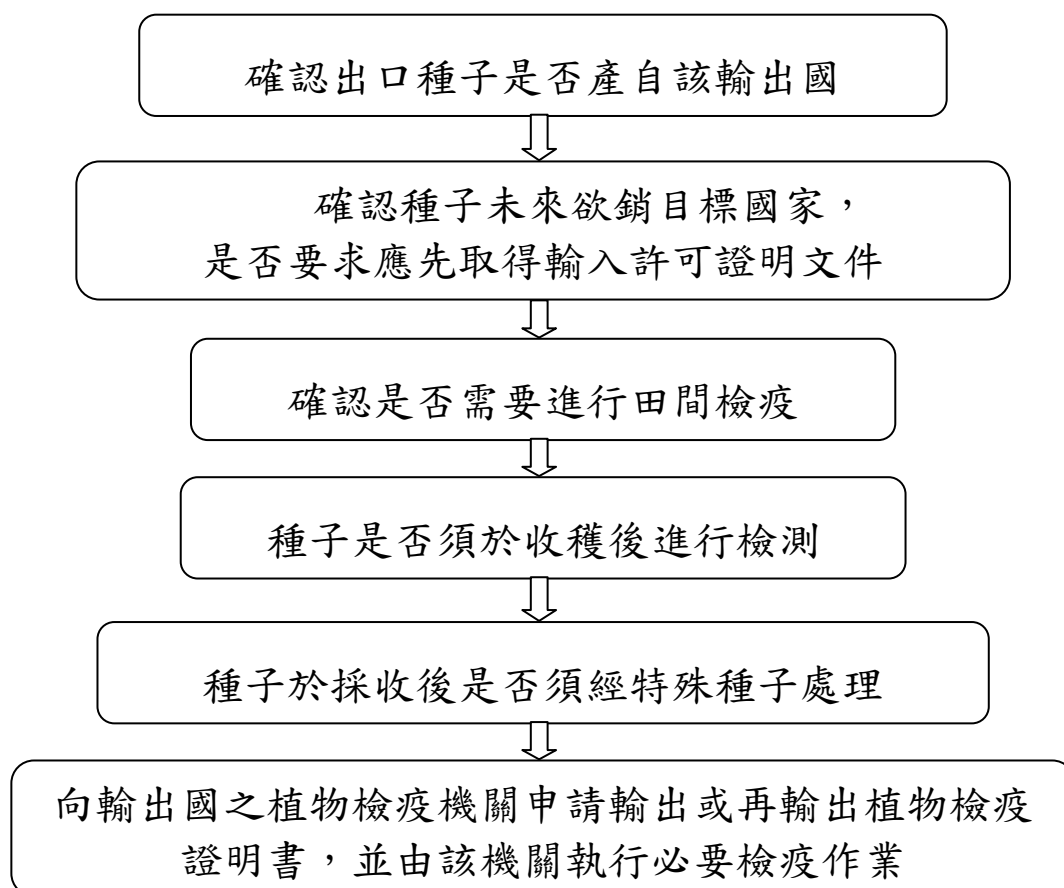
六、簡化首次輸入風險評估之規劃

依據 104 年 10 月 7 日「研商建構蔬果種苗產業價值鏈報告籌備會議」決議，防檢局委請專家成立計畫，106 年起已進行茄屬、番椒屬、西瓜屬及部分蕁苔屬之整體性風險評估作業，將陸續廣納業者進口需求之種類及輸出國，取代個案風險評估，必要時訂定個別種類種子輸入檢疫條件，以強化輸入檢疫把關並兼顧產業需求。

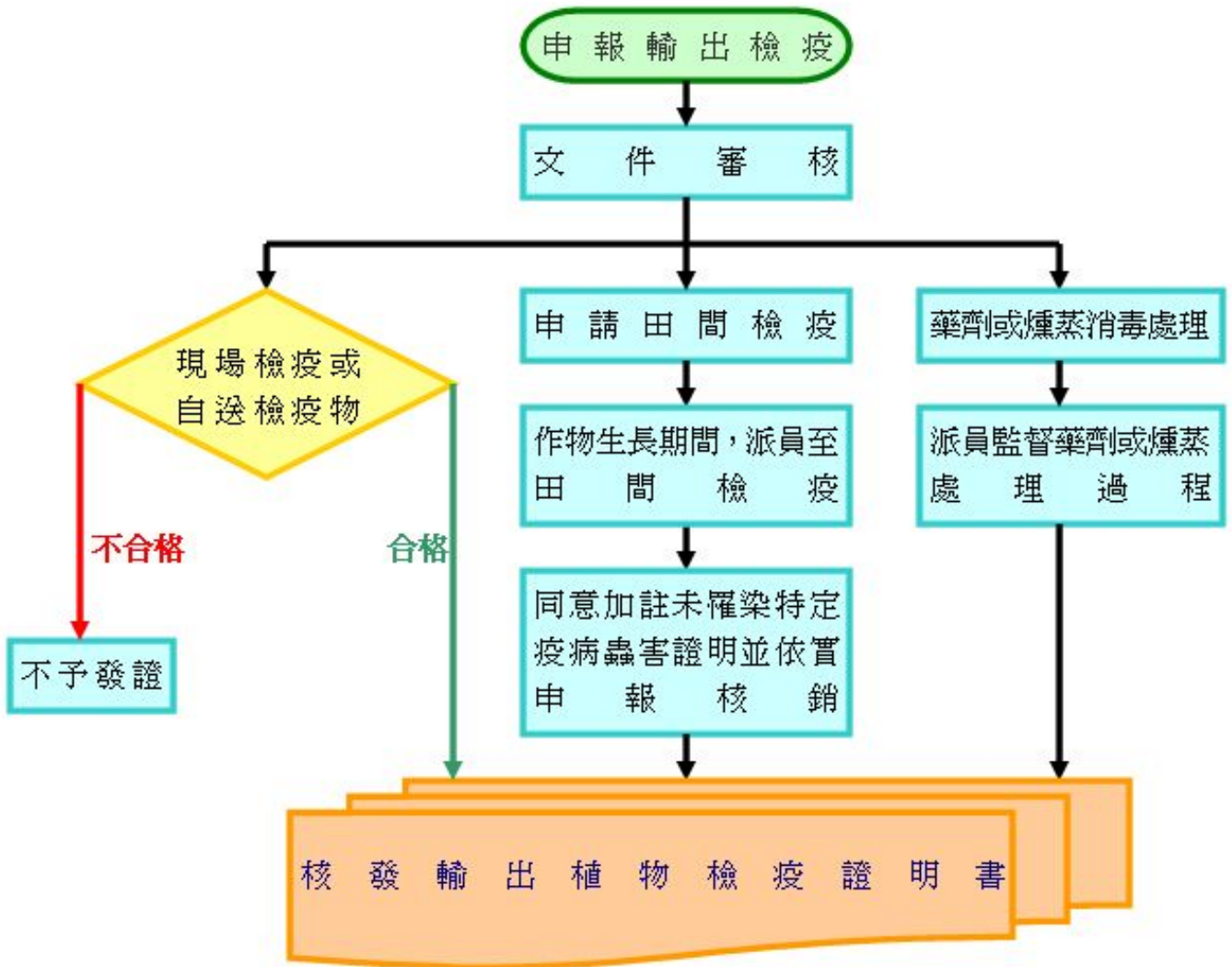
結 語

為協助我國農產品符合輸入國之檢疫要求順利外銷，防檢局已建置「對外貿易植物檢疫資料庫查詢系統」網站供民眾及業者查詢，另因種子國際貿易造成之檢疫病蟲害問題已受各國檢疫機關與國際組織之重視，臺灣許多種子係產自東南亞，輸入後重新包裝再輸出，防檢局除為配合輸入國檢疫要求於輸出植物檢疫證明加註病害檢測結果，也將持續提升並建立種子病害檢測技術，提升檢測量能及效率。對於再出口之種子，為配合核發再輸出植物檢疫證明書，防檢局已規劃訂定「種子重新包裝再輸出檢疫作業要點」以簡化再輸出檢疫作業。此外，防檢局將持續配合產業外銷需求，積極與輸入國進行市場開放及檢疫條件規定之諮商談判，協助開拓種子外銷市場。

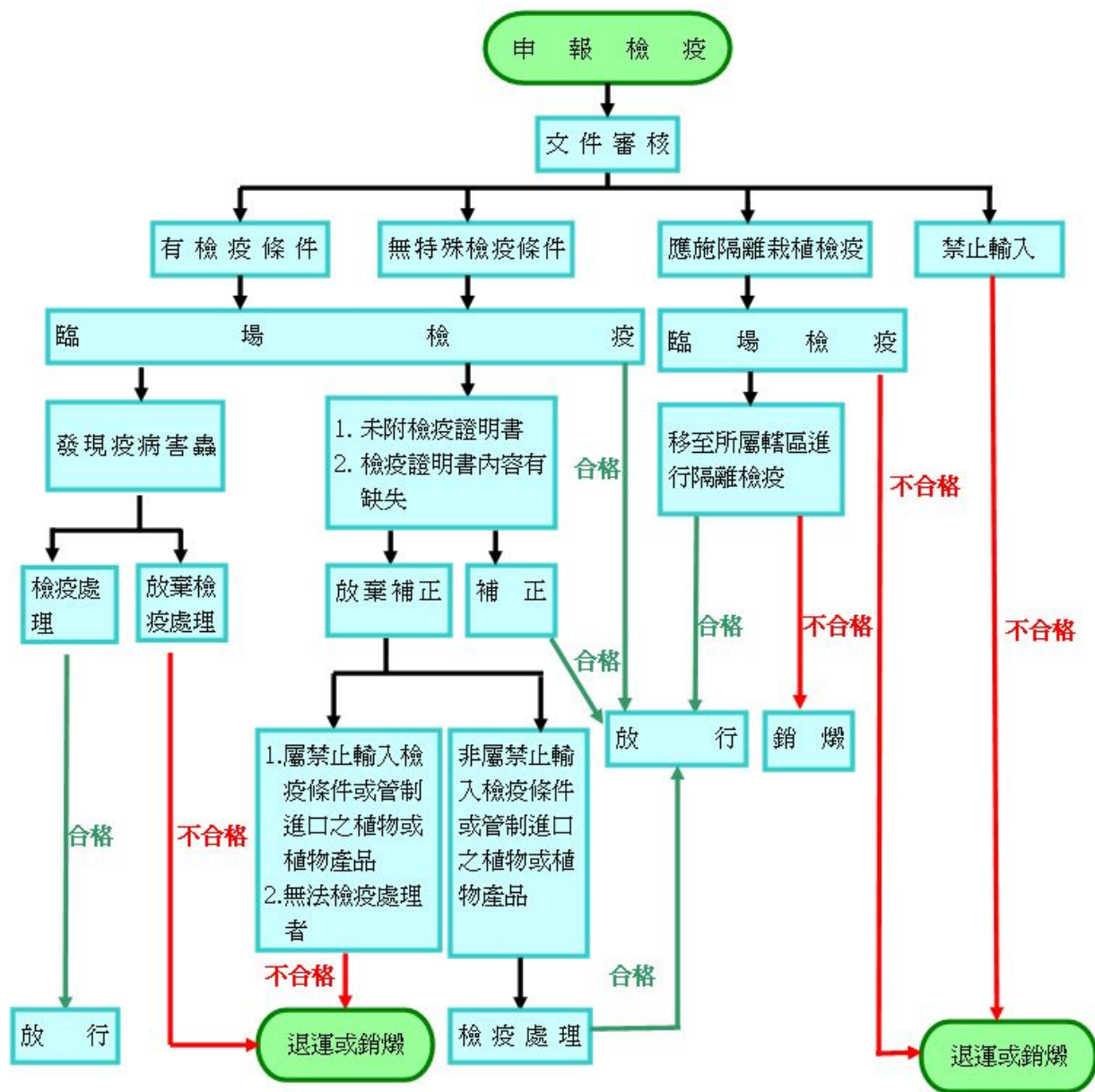
為防範國際間重大病蟲草害隨貿易傳入而影響國內農業生態安全，防檢局在符合國際檢疫措施標準並兼顧貿易順暢情況下，106 年起已委請專家進行茄屬、番椒屬、西瓜屬及部分蕁苔屬等植物之整體性風險評估作業，未來也將陸續廣納業者進口需求之種類及輸出國，進行全屬風險評估作業，確保輸入農產品安全並維持我國非疫狀態。



附圖一、國際種子貿易聯盟 (ISF) 提醒種子生產者或輸出業者，種子國際貿易須先確認符合輸入國檢疫規定。



附圖二、輸出檢疫申請及作業程序。



附圖三、輸入檢疫申請及作業程序。

健康番茄種苗生產驗證規範設立及運作

吳雅芳、陳昇寬、鍾瑞永、鄭安秀

行政院農業委員會臺南區農業改良場

摘 要

參考歐盟 GSPP 的規範及臺灣番茄育苗場的實際操作情形，以生產健康番茄種苗為目標，針對番茄育苗場之主要病蟲害設立檢查及檢定規範，透過擬定優良番茄育苗場育苗繁殖作業標準，提供番茄設施育苗場應具備之基本條件，從繁殖材料、環境設施、生產資材、水及人員對病蟲害的認識及正確觀念的灌輸等各方面嚴格控管，除訂定防治計畫定期施行防治外，並應建立育苗場內種苗移動的流程管理紀錄，隨時監測病蟲害的發生，並在病蟲害發生時，採取機動性的加強防治，並藉由種苗流程管理紀錄追溯病蟲原的可能來源，以遏阻感染源再次入侵。番茄健康種苗的驗證必需是種苗在完善的環境管理、生產流程管理、病蟲害管理等條件下生產，以育苗場生產環境、流程的檢查控管為基礎配合必要時的病蟲原檢定鑑定，方能確保種苗的健康。

關鍵詞：番茄、健康種苗、驗證規範、病蟲害管理

前 言

番茄為臺灣重要之蔬果作物，種植面積約 5,006 公頃，主要栽培地區分布於臺灣中南部，年產量約 118,958 公噸 (2016 年農業統計年報)，年產值約 36 億新臺幣，如果以每公頃平均約 20,000 苗計算，每年對番茄種苗的需求數量約 100,000,000 苗，其中嫁接苗已逐漸接近一半。而種苗的品質往往攸關田間生產的成敗，品質優良未罹染病蟲害的種苗進入田間，可提升種植的成活率，減少初期的防治成本。

在中南部高溫及設施栽培的氣候環境下，種植番茄面臨不少病蟲害的威脅，其中包括青枯病 (Bacterial wilt)、萎凋病 (Fusarium wilt)、根瘤線蟲病 (Root-knot) 等土壤傳播性病害，因不易防治而成為番茄栽培的重要限制因子。臺南區農業改良場 (簡稱臺南場) 及 AVRDC-世界蔬菜中心 (簡稱亞蔬中心) 合作，於 1998 年起於田間試種嫁接抗病根砧之番茄，篩選出來的茄子及番茄根砧除具有耐淹水

的特性外，尚具有抗土壤傳播性病害之優點，因此開啟了育苗場培育番茄嫁接苗的育苗方向，經過多年的田間種植，番茄嫁接苗已漸漸成為番茄栽培的主力。

育苗場生產番茄嫁接苗需投入較高的成本，從番茄接穗及茄砧的種子培育、人工嫁接、嫁接苗癒合、培育到出苗等，嫁接操作的過程使嫁接苗較實生苗有更多被病原菌侵染的機會，如種子傳播性病害、操作時人員、工具的污染等，因此需投入更多的設備、資材與人力，也需要更精準的技術與相關的管理智能，所以嫁接苗比實生苗昂貴，農民也必然的希望購買到的種苗是優良而健康的，相對的，育苗場也期望提供的種苗可以令種植者滿意而不生糾紛。

為避免番茄潰瘍病 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) 隨種子種苗傳播而有 GSPP (Good Seed and Plant Practices) 的組織，經由各個生產環節的管控，降低潰瘍病傳播的風險。臺灣目前並未有番茄潰瘍病發生的正式報告，但仍有其它的病蟲害具有隨種苗傳播的風險，而針對這些病蟲害設立相關的檢查方法，才能進入番茄健康種苗驗證的階段，提高種苗的品質，生產優質種苗，防止病蟲害藉由種苗傳播蔓延，進而減少本田期用藥，生產高品質番茄。

GSPP (Good Seed and Plant Practices)的概念

GSPP 為 Good Seed and Plant Practices 之簡稱，係由種子種苗商與育苗業者為防範番茄細菌性潰瘍病的傳播所推動成立的基金會，針對歐洲地區重要作物-番茄的種子種苗，建立相關的認證規章與規範，從種子、植株、根砧、嫁接生產過程的人員操作、繁殖材料、資材分區管控，及水源的有效消毒，針對番茄細菌性潰瘍病原細菌 Cmm 進行監控，透過清楚的組織架構、工作流程及品管系統，嚴格要求種子種苗生產區的各项隔離管制條件，加上風險評估及危機處理機制等，有效降低 Cmm 的傳播風險。臺灣並未有番茄潰瘍病發生的正式報告，但仍有其它病蟲害具有隨種苗傳播的風險，確實也有建立番茄種苗驗證管理規範的需求，因此臺南區農業改良場被交付任務性的計畫，建立番茄優良育苗場認證制度及番茄健康種苗的驗證規範，但以臺灣目前番茄育苗場的規模和農民的需求評估，若要參照GSPP的認證規範進行種苗的驗證，恐怕滯礙難行，因此，參考GSPP的生產流程管控模式及風險管理的理念，配合臺灣育苗場業者及農民的現況與需求，擬定一套適合臺灣的驗證作業標準及驗證規範，方能有效提升種苗品質，避免病蟲害藉種苗傳播的風險。

臺灣植物健康種苗驗證體系

健康種苗驗證制度源自二十世紀初荷蘭針對感染鬱金香之病毒病害所設計出來的一種檢查與品質認證的系統。1929年荷蘭輸往美國的鬱金香種球被美方以帶有檢疫危險病蟲害之理由而拒絕入境，因而蒙受巨大損失，此後荷蘭即開始重視鬱金香種球病蟲害之防範，在30年代開始成立負責鬱金香種球的病毒檢查專責實驗室，協助農民判別並篩選健康無病毒種球作為繁殖用種源，進而規劃出健康種球之標準生產模式供農民應用，更進一步推動種球驗證制度，藉由客觀的驗證標準對鬱金香種球品質與帶病毒比率加以評估，訂定不同等級之標準，一方面供消費者購買時之參考，另一方面也提供生產者訂定種球價位之客觀衡量標準，而驗證體系的基礎則建立在繁殖用種原之有害生物檢定、繁殖環境及過程檢查、驗證標準等程序上面。

過去臺灣省政府農林廳種子檢查室依據「臺灣地區農作物種苗檢查須知」，配合我國農作物優良種子種苗繁殖制度建立檢查機制，訂定包括水稻、落花生、大豆、小麥、高粱、玉米、大麥、棉花、油菜、黃麻、亞麻、鐘麻、雜交高粱及蔬菜等作物之種子，及甘藷、馬鈴薯、草莓等種苗之檢查標準，檢查之繁殖圃包括原原種、原種及採種等三級。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局成立後，為防止法定疫病蟲害藉由種苗傳播蔓延，業於1990年5月依據「植物防疫檢疫法」第八條及第九條規定，公告火鶴花為實施特定疫病蟲害檢查之植物種類，實施強制性種苗檢查制度。對於非檢疫之疫病蟲害者（即國內農業生態中一般疫病蟲害），防檢局亦於1992年3月公告「種苗疫病蟲害驗證輔導要點」。根據市場動態需求陸續訂定蝴蝶蘭、文心蘭、綠竹、豇豆、柑桔、馬鈴薯、甘藷、百香果及香蕉等9種作物之種苗病害驗證作業須知，同樣是以繁殖用種原之特定有害生物檢定、繁殖環境及過程檢查等作為驗證標準的訂定原則，並積極向育苗業者、農會及農友推廣健康種苗觀念，目的在提升該作物品質，減少田間疫病蟲害發生機率，進而增進業者在市場之競爭力。

番茄健康種苗驗證規範同樣依據特定有害生物檢定、繁殖環境及過程檢查等原則，先是參考GSPP的精神草擬「優良番茄育苗場育苗繁殖作業標準」，以生產優良種苗為目的，制定番茄育苗場基本的軟硬體管理流程，繼而草擬「番茄健康種苗生產驗證規範」，透過輔導改善育苗場的各項軟硬體系統，以利相關運作。

建立番茄優良育苗場認證制度及健康種苗驗證規範

參考 GSPP 的精神草擬「優良番茄育苗場育苗繁殖作業標準」，以生產優良種苗為目的，其中涵蓋基本設備及環控需求、排程管理、可追蹤的生產及出貨流程管控、可能的感染源包括繁殖材料、生產資材、人員、水的管控、病蟲害監測及檢測、病蟲害管理、風險管理、品質管制等，而最重要的環節在於種苗培育過程的關鍵病蟲害防除，藉由對關鍵病蟲害的認知，擬定預防措施及發生後之風險管理，並詳實紀錄種苗生產鏈的流程，以此作業標準作為健康種苗驗證程序的繁殖環境及過程的檢查基礎，配合特定病蟲害的檢查、檢定設立番茄健康種苗驗證規範。驗證規範內明定育苗場之設置設備及操作管理條件、應施檢查的病蟲害種類、相關的檢查、監測、採樣及檢定鑑定方法，及驗證的標準等。

驗證規範內應施檢查的番茄病蟲害種類

一、病毒病：可因種子帶毒或昆蟲媒介而傳播

1. 番茄嵌紋病毒 (Tomato mosaic virus, ToMV)，為菸草鑲嵌病毒屬 (*Tobamovirus*) 之 RNA 病毒，可經種子傳播及機械傳播。
2. 胡瓜嵌紋病毒 (Cucumber mosaic virus; CMV)，為黃瓜鑲嵌病毒 (*Cucumovirus*) 屬病毒，可經由種子、機械傷口及蚜蟲媒介傳播。
3. 番茄黃化捲葉病毒 (Tomato yellow leaf curl virus; TYLCV)，為豆類金黃嵌紋病毒 (*Begomovirus*) 屬 DNA 病毒，可經由銀葉粉蝨傳播。
4. 馬鈴薯病毒 Y (Potato virus Y; PVY)，為馬鈴薯 Y 病毒 (*Potyvirus*) 屬病毒，可經蚜蟲以非永續性方式傳播及機械傳播。
5. 番茄斑點萎凋病毒 (Tomato spotted wilt virus; TSWV)，為番茄斑萎病毒 (*Tospovirus*) 屬病毒，可經由薊馬傳播。

二、細菌性病害：可能因種子種苗帶菌傳播，加上育苗期間的高濕環境而加劇病害的蔓延

1. 潰瘍病 (Bacterial canker)，由 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 引起，為革蘭氏陽性菌，菌體成桿狀。此病多在 16~28℃ 發生，可藉種子帶菌傳播，目前臺灣並無正式的研究報告證實 Cmm 存在，但是此病害分佈全球各主要番茄生產區，加上種子進出口貿易頻繁，因此 Cmm 仍是臺灣種子種苗業者及農民必須注意提防的病害。

2. 細菌性斑點病 (Bacterial spot)，由 *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe)、*X. vesicatoria* (Xv)、*X. perforans* (Xp) 及 *X. gardneri* (Xg) 引起，為革蘭氏陰性好氣菌，可藉種子帶菌傳播，目前臺灣尚無 *X. gardneri* 存在之正式報告，細菌性斑點病是臺灣番茄育苗場最為棘手的病害，頻繁的噴灌常使得此病害難以根除而隨種苗進入田間。
3. 青枯病 (Bacterial wilt)，由 *Ralstonia solanacearum* 引起，為革蘭氏陰性好氣菌，生長適溫約 30°C。於臺灣田間常造成嚴重危害，以目前育苗場的水準及品質而言，青枯病隨種苗傳播的機會幾近於零，但若有由田間回收的苗盤或育苗介質則仍可能有風險。灌溉水源的污染也可能有機會。

三、真菌性病害：育苗場內的高濕環境下可能感染真菌性病害而隨種苗傳播

1. 葉黴病：由 *Passalora fulva* 引起，好發於 18-26°C 之高濕環境下。
2. 黑葉黴病：由 *Pseudocercospora fuligena* 引起，好發於 28°C 以上之高濕環境下，常和葉黴病複合感染。
3. 晚疫病：由 *Phytophthora infestans* 引起，好發於低溫高濕環境下。

四、蟲害：會危害番茄並可能傳播病害的昆蟲

1. 粉蝨：*Bemisia tabaci* Biotype B，直接刺吸植株養液致使生長衰弱外，並可傳播番茄黃化捲葉病毒。
2. 薊馬：除直接取食危害，尚可傳播病毒。
3. 蚜蟲：除直接取食危害，尚可傳播病毒。
4. 番茄斑潛蠅：*Liriomyza bryoniae*，成蟲以產卵管刺破葉背組織後吸吮汁液，被害葉片呈現白色小斑點，產卵於葉肉組織內，孵化後之幼蟲在葉片中潛食葉肉，僅剩上、下表皮，外觀成灰白色曲折之隧道食痕，嚴重時被害葉片乾枯。

結 語

為提高番茄嫁接苗之品質，讓生產者的健康管理生產體系能落實由健康種苗做起，參考歐盟訂定之 GSPP 規範精神，建立番茄優良育苗場認證制度。我國過去數十年來所推動之健康種苗業務，均是輔導與鼓勵性質，除非面臨強大的病害威脅，否則很難刺激農民產生栽培健康種苗之動機，這種情況常會使健康種苗生產者在生產過程中所增加之成本反而成為一種反淘汰之壓力，在沒有客觀之認證

標準下，健康種苗不易與一般種苗區隔，導致其生產者未能在辛苦的工作後獲得相對的投資報酬，栽培者也無法感受到信心。驗證制度可協助種苗生產者建立統一之種苗健康管理標準，讓合於標準之種苗獲得客觀之驗證，提升品質形象與競爭力，進而對未能符合統一標準之業者施以淘汰之壓力，促使其提升種苗健康管理之意願。驗證制度亦可使栽培者有選擇種苗品質的依據，進而從栽培成果的改進，提升購買健康種苗之意願，而健康種苗也因而獲得較佳之認同，從而提升其在種苗市場上之競爭力，良性循環的結果將可創造健康種苗生產者與栽培者雙贏的局面。未來種苗產業將導入生產力 4.0 應用，建構 ICT 智能育苗平台，導入精準生產管理，將更有機會與健康種苗驗證的概念結合，建構優質種苗的產銷平台。

參考文獻

1. 行政院農業委員會。2016。農業統計年報。
2. 植物品種及種苗法，中華民國93年4月21日總統華總一義字第09300074811號。令修正公布名稱及全文65條；行政院核定本法自94年6月30日施行。
3. 種苗業者應具備條件及設備標準，中華民國94年6月29日行政院農業委員會94農授糧字第0941057956號令修正發布全文8條。
4. 徐孟豪、陳保良。2011。臺灣植物健康種苗驗證體系推動之歷程與展望。植物種苗生技25: 13-15。
5. 寧方俞。2012年。鑑定及檢測茄科植物細菌性斑點病菌*Xanthomonas perforans*之聚合酵素連鎖反應技術及台灣*X. perforans*菌株之多型性分析。中興大學植物病理學系所碩士學位論文。
6. 楊佐琦、沈再發。1998。淺談灌溉水之消毒技術。種苗通訊：36 (<http://www.ecaa.ntu.edu.tw/weifang/lab551/vegetable/WATER.html>)
7. 鄭安秀、王仕賢、黃山內。2001。番茄嫁接茄子根砧防治土傳病害，台南區農業專訊35: 1-3。
8. Adkins, S., W. M. Wintermantel, T. Momol, and J. E. Plost. 2012. Management of Important Viral Diseases. Pages 113-125. *in*: Tomato Health Management. Davis, R. M. Pernezny, D. K. and Broome, J. C. eds. APS, St. Paul, USA. 191pp.
9. Annex 14.1 Guidelines GSPP for sampling of seed lots for seedhealth testing 2.4 version. (<http://www.gspp.eu/documents>)
10. Annex-14.5 Technical requirements of GSPP-standard 2.3version. (<http://www.gspp.eu/documents>)

11. Black, L. L., D. L. Wu, J. F. Wang, T. Kalb, D. Abbass, and J. H. Chen. 2003. Grafting Tomatoes for Production in the Hot-Wet Season. *in*: International Cooperators' Guide. AVRDC pub #03-551, Shanhua, Taiwan, ROC. (http://203.64.245.61/web_crops/tomato/Grafting%20tomatoes%20for%20production%20in%20the%20hot-wet%20season_w.pdf)
12. Chang, C. A. 2005. Characteristics, detection and management strategies of seed-transmitted viruses, *Plant Pathol. Bull.* 14: 77-88.
13. Farrar, J. J. 2012. Management of Important Foliar and Fruit Diseases. Pages 87-93. *in*: Tomato Health Management. Davis, R. M. Pernezny, D. K. and Broome, J. C. eds. APS, St. Paul, USA. 191pp.
14. GSPP Standard for tomato seed and young plant production sites 3.0 version. (<http://www.gspp.eu/documents>)
15. Gitaitis, R. and R. R. Walcott. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 371-397.
16. Jones, J. B., R. E. Stall, and H. Bouzar. 1998. Diversity among *Xanthomonas* pathogenic on pepper and tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 41-58.
17. Jones, J. B. and S. A. Miller. 2014. Bacterial Spot. Pages 55-57. *in*: Compendium of Tomato Diseases and Pests. 2nd edition Jones, J. B., Zitter, T. A., Momol, T. M., and Miller, S. A. eds. APS, St. Paul, USA. 168pp.
18. Jones, J. B., G. H. Lacy, H. Bouzar, R. E. Stall, and N. W. Schaad. 2004. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 755-762.
19. Leite, R. P., J. B. Jones, G. C. Somodi, G. V. Minsavage, and R. E. Stall. 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* sp. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Dis.* 79: 917-922.
20. Lue, Y. S., W. L. Deng, Y. F. Wu, A. S. Cheng, S. T. Hsu, and K. C. Tzeng. 2010. Characterization of *Xanthomonas* Associated with Bacterial Spot of Tomato and Pepper in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 19: 181-190.
21. Manual of Seed Health Testing Methods-ISHI: Tomato –*Xanthomonas* spp. Nov. 2017. (<http://www.worldseed.org/our-work/phytosanitary-matters/seed-health/ishi-veg/#protocols>)
22. Hasan, B., C. Nancy, and J. Q. Li. 2012. Management of Important Seedborne Diseases. Pages 77-85. *in*: Tomato Health Management. Davis, R. M. Pernezny, D. K. and Broome, J. C. eds. APS, St. Paul, USA. 191pp.

23. Pernezny, K., R. M. Davis, and T. Momol. 2012. Management of Important Bacterial Diseases. Pages 103-112. *in*: Tomato Health Management. Davis, R. M. Pernezny, D. K. and Broome, J. C. eds. APS, St. Paul, USA. 191pp.
24. Tzeng, K. C. 2010. Characterization of *Xanthomonas* Associated with Bacterial Spot of Tomato and Pepper in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 19: 181-190.
25. Zitter, T. A. 1985. Bacterial Diseases of Tomato, Vegetable Crops, Cooperative Extension. New York State. Cornell University. (http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Tomato_Bacterial.htm)

雜交種子純度檢定

王群山、張心怡、胡凱康

臺灣大學農藝系

摘 要

以再現性高且可充分自動化的 SNP 分子標誌，對於種苗業者販售的一代雜種進行雜交成功率檢定與種子批的品種鑑定，將有助於提高我國種苗產業所生產種子的純度及種子產業的出口競爭力。目前已可利用簡化基因體定序文庫進行次世代定序，並配合生物資訊方法探勘，快速產生大量的分子標誌，但在實務上必須瞭解技術上的限制，並注意以下的問題：(1) 依據目標物種的基因體特性，選定適當的限制酶組合與片段大小篩選標準，以確保目標片段的定序深度達到預定目標。(2) 使用適當的工具進行探勘，建立 SNP 的品質參數與基因型的可靠度參數，以控制定序錯誤所造成的偽陽性，與篩選可用的基因型資料。從探勘獲得的 SNP 與各品種的基因型資料中，綜合 PIC 值與特性篩選，可選出近乎獨立，適用於品種鑑定與雜交成功率檢定的核心分子標誌組合。為避免親本中殘存的分離造成雜交成功率檢定時的偽陽性，需要時可先針對親本進行純化。

關鍵詞：簡化基因體、次世代定序、單一核苷酸多型性

前 言

一代雜交種子為種苗公司的重要收入來源，在雜交種子的生產過程中，影響種子純度最重要的因子為雜交成功率。為因應種苗產業的需求，自民國 95 年起便有相關開發計畫（95 農糧-2.8-作-01(5)：作物種子品種檢查體系）。受到當時開發技術與成本的限制，雜交成功率檢定採用不具專一性，如 RAPD 或 ISSR 等隨機引子進行 PCR 分析，作為親本辨識的分子標誌。然而由於非專一分子標誌技術的可重複性較低，因此對於實驗步驟如 DNA 萃取等操作的技術性需求較高，且因為分析與判讀的過程需要大量中階人力，無法自動化，導致種苗產業對於研發成果接受度不足的情況。

近年來作物基因體研究與生物資訊技術進展迅速，隨著高通量次世代平行定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 技術的快速進展，近年來已發展出透過限

制酶對於基因體取樣，降低每一個體的定序量來提高各個基因型定序深度，以提高結果可靠性的方法。目前應用最為廣泛的方法包括 Restriction-site associated DNA sequencing (RAD-seq, Baird *et al.* 2008), Genotyping-by-sequencing (GBS, Elshire *et al.* 2011), 與 Double Digest RADseq (ddRAD, Peterson *et al.* 2012; 或稱為 Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing, Poland *et al.* 2012)。本文將描述建立簡化基因體 ddRAD 定序文庫，探勘單一核苷酸多型性 (SNP) 分子標誌，以及篩選可用於控管一代雜交種子純度與內部品管所需的品種鑑定核心 SNP 組合的原則與方法。

建立作物簡化基因體 ddRAD 定序文庫

ddRAD 使用 2 種限制酶，第一種辨識 6 個鹼基，第二種限制酶辨識 4 個鹼基，前者在基因體中的切位較少，亦稱為 rare cutter，用來降低基因體的複雜度，後者的切位較多，亦稱為 common cutter，用來控制定序片段的長度。經過雙重酶切後的片段，可以透過片段長度篩選進一步降低所要定序片段的數目，使得在固定的定序資源下，可以分析更多的樣品，或提高定序的深度。對於分析雜交種的基因型，提高定序深度可以避免異質結合的基因型因取樣偏差而導致誤判為同質結合的機會。

由於各物種基因體的組成不同，在選定限制酶組合時以全基因體解序後的參考序列先行模擬限制酶切割的結果，將有助於預測特定片段大小區間所包含片段的數目。依據模擬結果初步選定限制酶組合後，以膠片電泳或更高解析度的平台 (如 Agilent Bioanalyzer) 檢查實際產生片段的分布，排除會產生明顯條帶的限制酶組合，因為這些條帶可能是高度重複的基因體序列或是胞器的序列，而這些序列對於探勘可用的分子標誌並無助益。

各樣品 DNA 以選定限制酶組合雙重切割後的片段，依據限制酶切口序列黏上包含次世代定序系統所需的定序引子序列的轉接子，再以 PCR 方法導入可供辨識品種的條碼序列後，最後依據 PCR 產物濃度等量混合建立 ddRAD 定序文庫。

探勘基因體中的 SNP 位點

從定序結果探勘品種間具有差異 SNP 分子標誌的障礙，來自於高通量定序系統不可避免的定序錯誤。以 Illumina HiSeq 2500 為例，定序服務的規格為「Q30

的比率大於 75%」；Q 值的計算方式為 $-\log_{10}(\text{錯誤率}) \times 10$ ，Q30 即為錯誤率等於 1/1000，前述規格即「定序結果中有大於 75% 的鹼基，其錯誤率低於 1/1000」。一次定序量可以高達 50 Gb (50,000,000,000 鹼基)，若錯誤率為 1/1000，錯誤的鹼基數為 50,000,000 個；以每條 100 鹼基的讀序而言，平均每 10 條讀序就有 1 條包含 1 個錯誤的鹼基。但是實務上的觀察，定序錯誤並不是完全隨機的，情況較差的讀序上往往有不止 1 個錯誤。

在探勘 SNP 分子標誌的過程中，若對於定序錯誤不加以控制，可能產生大量基因頻度低的錯誤 SNP (偽陽性)。可能的改善方法為採用以樣品為單位，同時比對多個樣品的方式來決定 SNP 是否存在。此外，採用可以綜合鹼基定序品質參數來建立 SNP 品質參數的分析方法，也可以做為篩選的依據。

另一種可能發生的錯誤是基因型判定錯誤，當樣品的定序深度不足的時候，異質結合的基因型因為取樣而只定序到其中的 1 個對偶基因，就可能被判定為同質結合；相同的定序深度不足情況下，定序錯誤可能使得同質結合的基因型被判定為異質結合。可能的改善方法除了減少簡化基因體覆蓋率，提高平均定序深度，以及製備定序文庫時將樣品間 DNA 濃度正規化，減少目標序列數在樣品間的波動之外，還可以採用可以判定基因型值可靠度的分析方法，情況許可時淘汰可靠性較低的資料點，以增加資料的整體可信度。

建立核心 SNP 組合

針對探勘得到且具有高可信度的 SNP 位點，排除缺值率高於 10% 的 SNP，並篩選在兩邊鄰近序列 (flanking sequence) 具有良好引子設計特性的 SNP，便可建立品種基因型矩陣，進行進一步的核心 SNP 篩選。

多型性訊息指數 (Polymorphic information content, PIC) 定義為「分子標誌可以區分任一兩兩品種組合的能力」， $PIC = 1 - \sum p_i^2$ ， p_i 為第 i 個基因型的頻度，因此 $\sum p_i^2$ 即為兩兩品種間因屬於同一基因型而無法區分的機率。族群中基因型的種類越多，分佈越均勻，PIC 值越高。族群中存在 3 種基因型時，PIC 的理論上限為 2/3。PIC 篩選的門檻需視可用 SNP 的數量與其 PIC 值的分布而決定。

SNP 之間通常會有相當程度的相關，造成 SNP 間相關的原因包括 (1) 鄰近的高密度 SNP 間有緊密的連鎖關係造成的連鎖失衡，與 (2) 雜交種間的親緣關係造成非連鎖 SNP 間的相關。對於變數間具有相關的高維度資料，最常用的降維方法為基於奇異值分解 (Singular value decomposition) 的主成分分析法，主成分為各維度的線性組合，主成分之間完全直交，為理論上的最佳值。但由於我們

所要選擇的是實際的 SNP，而不是分子標誌的線性組合，因此主成分分析法在此並不適用，而必須採用其他可針對變數選擇的數值方法，例如 Feature selection (Deshpande *et al.* 2006)。所選出的核心 SNP 雖然彼此之間並不完全直交，但在適當的演算法之下，可以相當接近最佳的理論值，其缺點是這一類的分析通常需要大量的運算資源。

若使用全部的 SNP 資料可以完全區分全部的品種，所選出與品種數相當的核心 SNP 也必然可以完全區分全部的品種；接下來逐步淘汰核心組合中不具有特殊辨識力的 SNP，即可建立可用於品種鑑別的核心 SNP 組合。

對於特定雜交種而言，如果品種鑑定核心 SNP 組合中包含異質結合的 SNP，這些分子標誌就可以用來判定該品種的雜交成功率；若品種鑑定核心組合中不包含異質結合的 SNP，就必須回到初步的核心組合中挑選可用於雜交成功率檢定的 SNP，因此用於雜交成功率的組合，可能比品種鑑定的核心組合略大一些。

雜交種子純度檢定實務

針對種子批取樣得到的檢測樣品，若以品種鑑定系統進行全面的分析，除了雜交不成功的母本型種子外，還可以檢出在調製時混入的其他品種種子，但是因為需要檢驗的分子標誌數目較高，在目前的 SNP 檢定系統之下，可能導致檢定成本上的負擔。由於通常雜交種子的生產與調製都在嚴密控制之下進行，因此在實務上建議將品種鑑定與純度檢定區分開來，並且將純度檢定簡化至雜交成功率檢定，這樣才有可能以目前的技術進行品質管理上所需的檢定工作。亦即當一批雜交種子要進行品質管制時，先以少量樣品用具有多個 SNP 的品種鑑定核心組合確認品種標示的正確性，例如每批種子抽檢 10 粒，檢定 5-10 個 SNP，以“基因型組態”判別品種。確認品種的正確性之後，再以大量樣品少數 SNP 的方式，例如每批種子檢定 100-400 粒，每粒雜交種子只檢定 1 個在親本間有差異的 SNP，來判斷該批雜交種子的雜交成功率。

在實務上還需考慮部分自交代數較低的親本，或是採用混合法繁殖的自交親本，可能還有殘存的分離，會造成雜交成功率的誤判。因此在使用分子標誌判定雜交成功率之前，需先檢定親本對於該分子標誌的純度。如果親本需要純化，可以在繁殖親本時，於幼苗期檢定各株該分子標誌的基因型，開花期之前拔除不合預期的單株，混合收穫即可得到純化後的親本種子。

參考文獻

1. Baird, N. A., P. D. Etter, T. S. Atwood, M. C. Currey, A. L. Shiver, Z. A. Lewis, E. U. Selker, W. A. Cresko, and E. A. Johnson. 2008. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS One* 3(10): e3376.
2. Deshpande, A., L. Rademacher, S. Vempala, and G. Wang. 2006. Matrix Approximation and Projective Clustering via Volume Sampling. *Theory of Computing* 2: 225-247.
3. Elshire, R. J., J. C. Glaubitz, Q. Sun, J. A. Poland, K. Kawamoto, E. S. Buckler, and S. E. Mitchell. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS One* 6(5): e19379.
4. Peterson, B. K., J. N. Weber, E. H. Kay, H. S. Fisher, and H. E. Hoekstra. 2012. Double Digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE* 7(5): e37135.
5. Poland, J., J. Endelman, J. Dawson, J. Rutkoski, S. Y. Wu, Y. Manes, S. Dreisigacker, J. Crossa, H. Sanchez-Villeda, M. Sorrells, and J. L. Jannink. 2012. Genomic Selection in Wheat Breeding using Genotyping-by-Sequencing. *Plant Genome* 5: 103-113.

使用分子標記技術建立玉米雙單倍體族群的方法

楊依臻、陳凱儀

國立臺灣大學農藝學系

陳裕儒、謝光照

行政院農業委員會農業試驗所作物組

摘 要

現今全世界公部門或種苗公司的玉米育種計畫，呈現使用雙單倍體取代傳統自交系的趨勢，因為玉米特有的雙單倍體技術能快速育成自交系。雙單倍體技術為透過具有誘導單倍體能力之誘導系，誘導母本種原產生單倍體種子，進一步以有絲分裂抑制劑使單倍體之染色體倍加。傳統單倍體種子的鑑別方式為使用型態標記，包括在胚及胚乳花青素呈色之 *R1-nj* 標記，在根部花青素呈色的 *PII* 標記，或是植株的生長勢。本實驗根據單倍體誘導系與母本種原間之單一核苷酸多型性位點，開發 DNA 分子標記 ZMKASP_002、ZMKASP_008 及 ZMKASP_009，結合雜交不親和基因座 *gal* 之 ID1 與 ID4 分子標記，針對農試所提供的單倍體誘導系授粉於甜玉米 F1 雌穗所取得的種子，進行雙單倍體植株的篩選與雙單倍體遺傳分離族群的建立。試驗結果共篩選 2849 株幼苗，確定 305 株雙單倍體植株。此外，本試驗也確認由農業試驗所雜糧研究室培育的 6 個單倍體誘導系 THI-A~THI-F 的單倍體誘導率在 6.8%~16.2% 的範圍。

關鍵詞：玉米、雙單倍體、單倍體誘導系、分子標記

前 言

玉米 (*Zea mays* L.) 為異質結合作物，透過雙單倍體 (doubled haploid) 技術，可在二至三個世代內獲得同質結合同體，作為遺傳材料使用。雙單倍體技術是以人為方式使單倍體之染色體倍加，單倍體可從生物體外 (*in vitro*) 或者生物體內 (*in vivo*) 誘導產生，一般較常採用的生物體內培養，是透過具有誘導單倍體胚能力之誘導系 (haploid inducer) 作為花粉親，誘導母體產生單倍體種子。玉米單倍體在自然界中發生率約 0.1%，Coe 等人 (1959) 發表第一個具有穩定單

倍體誘導率 (haploid induction rate, HIR) 之誘導系 Stock 6，誘導率約 2~3%，之後的玉米誘導系多源自此品系。

單倍體個體以有絲分裂抑制劑 (mitosis inhibitor) 處理，能促使染色體倍加，在藥劑處理下，藥劑內化合物與微管蛋白 (tubulin) 結合，抑制紡錘體微管 (spindle microtubules) 形成，因此，在有絲分裂後期 (mitosis anaphase)，姊妹染色體 (sister chromatids) 無法分離至細胞核的兩端，直到末期 (telophase)，細胞核膜生成並包圍未分離之染色體，此時，細胞內具有二套染色體，達成染色體倍加。有絲分裂抑制劑中，較常被使用的為秋水仙素 (colchicine) 及殺草劑 (Wan *et al.*, 1991)。有絲分裂抑制劑使用方式，較為常見的有三種：切芽法、切根法、注射法 (Eder & Chalyk, 2002)，切芽法係將芽長兩公分之單倍體幼苗，自芽尖切除一公分，使切口位於生長點附近；切根法主要使用在某些由根部吸收的殺草劑，切除 2~3 公分的幼根，殺草劑被根部吸收，經由木質部輸送至頂端分生組織 (Shoot apical meristem, SAM) (Melchinger *et al.*, 2016; Häntzschel *et al.*, 2010)；注射法則是在植株三至四葉齡時，利用針頭將藥劑直接注射生長點。

母體內誘導單倍體機制中，誘導系引發部分種子無法正常雙重受精，同一果穗上同時會有二倍體及單倍體種子，因此會以容易辨識的外表型標記，鑑定單倍體植株或者種子。其中，單倍體種子鑑定方式以 *R1-nj* (Navajo) 標記最為常見，*R1-nj* 為花青素 (anthocyanin) 合成基因之一，當 *R1-nj* 與其他花青素合成途徑中基因同時存在，便會使種子的胚乳頂端以及胚的子葉盤 (scutellum) 堆積花青素，呈現紫紅色。帶有顯性 *R1-nj* 基因之誘導系與不帶有顯性 *R1-nj* 之母本種原雜交，理論上，單倍體種子胚乳會呈現紫色，胚則為白色 (無花青素堆積)，以 *R1-nj* 標記作為單倍體種子辨別方式，可以在種子時期完成鑑定。然而，該標記仍有其限制，當母本種原中帶有花青素抑制基因，則導致 *R1-nj* 基因不表現 (Chaikam *et al.*, 2015)。因此，尚有以根部、莖部顏色鑑定方式。*P11* (*Purple1*) 亦為花青素合成基因之一，能控制玉米幼苗、成株營養組織的花青素呈色 (Pilu *et al.*, 2003)，帶有 *P11* 顯性對偶基因之個體，照光後根、莖部呈現紫色 (Röber *et al.*, 2005; Rotarencu *et al.*, 2010)，當誘導系帶有顯性 *P11* 顯性對偶基因時，與不帶有任何 *P11* 對偶基因種原雜交所產生之單倍體，其幼苗根部應為白色 (無花青素堆積)。最早在誘導系 Stock6 中便帶有顯性 *P11* 基因，現今部分誘導系在育成過程中，也會導入 *P11* 基因，與 *R1-nj* 合用，作為發芽前、後，二階段式單倍體鑑定 (Chaikam *et al.*, 2016)，甚至在 *R1-nj* 被抑制時，有替代作用。

本研究的主要目的為開發 DNA 分子標記，適用於農業試驗所作物組雜糧研究室所育成的玉米單倍體誘導系 THI 系列的雙單倍體玉米品系的建立。此 THI 誘導系的主要遺傳背景來自 RWS 雙單倍體誘導系。本試驗 DNA 分子標記的開

發具有多重功能：(1) 提供 *P11* 型態標記使用於辨識真實單倍體種子效率的評估標準。(2) 作為 THI 系列雙單倍體誘導系的單倍體誘導率評估的選拔評估工具。(3) 在種子發芽階段快速選拔誘導成功的單倍體種子。

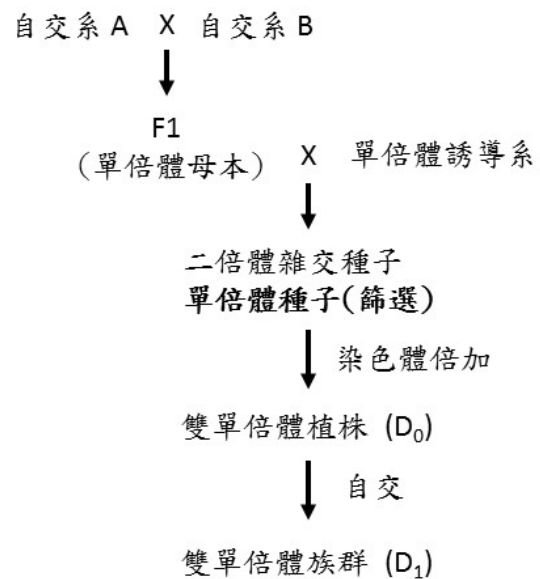
DNA 分子標記的開發

玉米雙單倍體族群的建立流程如圖一。用來篩選單倍體種子的 DNA 分子標記在自交系和單倍體誘導系間具有多型性，但是此分子標記在自交系 A 與自交系 B 之間沒有多型性存在。因此，期望此分子標記在二倍體雜交種子(或幼苗)的基因型為異型結合，但在單倍體種子(或幼苗)的基因型為同型結合。

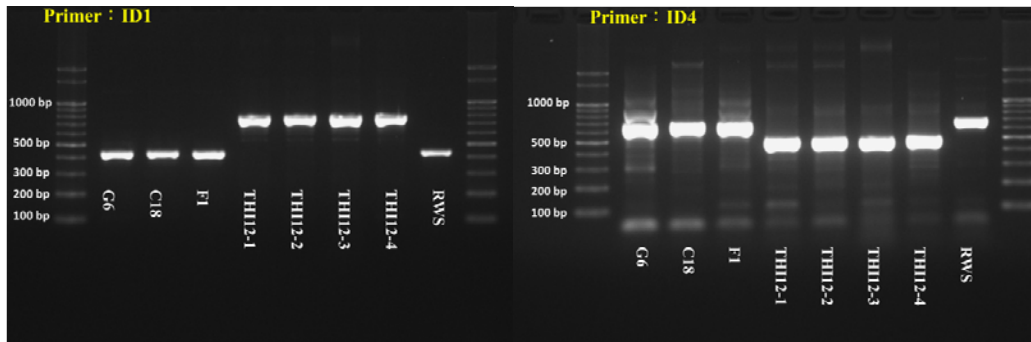
本試驗的兩個自交系來源為農試所作物組雜糧研究室選育的兩個甜質種玉米自交系「彩白 18」與「好 6」。單倍體誘導系 THI 系列 (A – F) 則為誘導系 THI12-2 自交一代所產生。此

誘導系為 RWK76 與 HP68-07 爆裂種玉米之雜交 F1 與 RWS 雜交一代之後，經自交五代產生。其中 RWK76 與 RWS 為姊妹系，RWS 為溫帶玉米誘導系，誘導率約 8.1%；HP68-07 為 1986 年釋出的黃玉米自交系 (Ashman, 1991)。

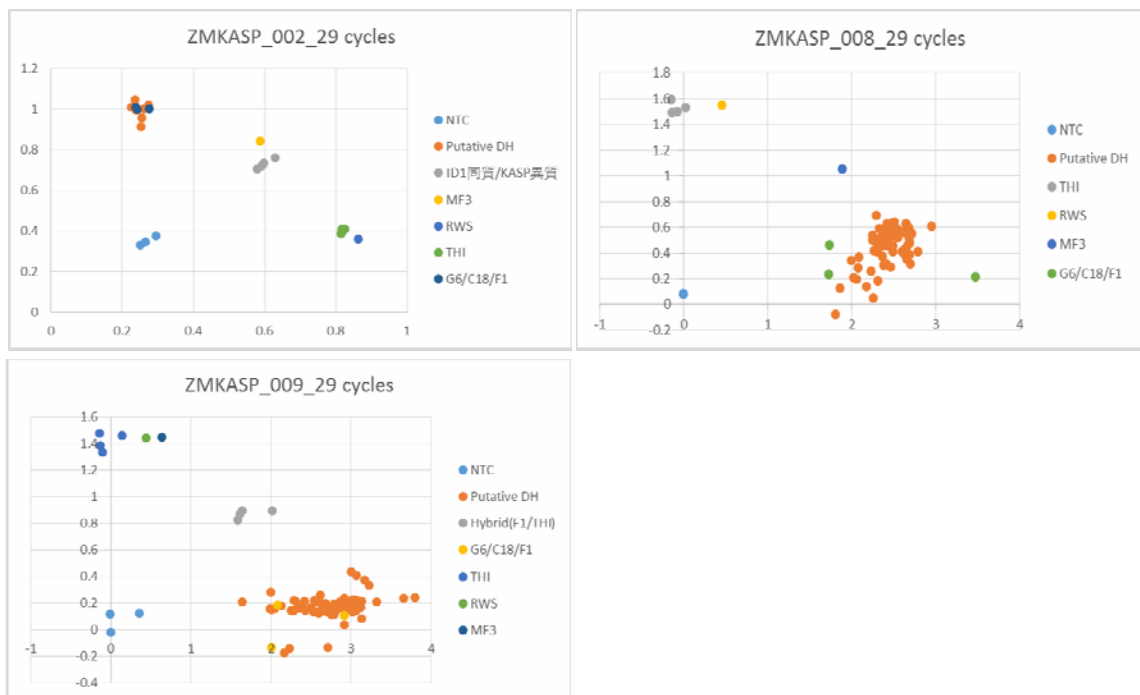
我們一共成功開發了五個分子標記，包含兩個 InDel 分子標記以及三個 KASP 分子標記。兩個 InDel 分子標記沿用已發表的 ID1 與 ID4 分子標記，位於玉米第四對染色體的雜交不親和基因座 *gal* (*gametophytic factor 1*) 附近 (Liu *et al.*, 2014) (圖二)。三個 KASP 分子標記 ZMKASP_002、ZMKASP_008、ZMKASP_009 則分別位於第 5 對、第 8 對、第 9 對染色體上 (圖三)。ZMKASP_002 分子標記多型性的發掘是源自 Illumina MaizeSNP50 Bead Chip 的基因型分型資料，ZMKASP_008 與 ZMKASP_009 分子標記多型性的發掘則是來自 RAD 定序的基因型分型資料。



圖一、雙單倍體族群建立流程



圖二、ID1，ID4 分子標記 PCR 產物電泳膠圖。



圖三、KASP 分子標記 ZMKASP_002、ZMKASP_008、以及 ZMKASP_009 使用於甜玉米雜交 F1 族群之單倍體植株的鑑別。

單倍體的篩選

本試驗使用 16 個單倍體果穗，一共 3039 粒種子，分批進行發芽，平均發芽率 94.3%。這些種子分批發芽，於切下芽鞘進行秋水仙素處理的同時，保留芽鞘作為抽取 DNA 的來源，同時以 ID1/ID4 分子標記、以及型態標記 *P11* 進行單倍體幼苗的篩選，總共篩檢了 2849 株幼苗，鑑定出 305 株單倍體。花青素調控基

因 *Pll* 存在於單倍體誘導系 THI 及其親本 RWS 中 (Röber *et al.*, 2005)，而具有 *Pll* 顯性基因之個體根與葉鞘會呈現紫紅色，因此可於幼苗期鑑定單倍體。種子發芽後約 4~5 天，幼芽長度約 2~3 公分時，可進行外表型鑑定，若根部無紫紅呈色，即為單倍體。

單倍體誘導率 (haploid induction rate, HIR) 計算方式為單倍體幼苗數佔所有基因型鑑定的幼苗數比例 (Prasanna *et al.*, 2012)，此試驗的平均誘導率為 9.7%。我們也對秋水仙素處理後存活植株進行第二次基因型確認，目的為降低取得 aneuploidy 的可能性。試驗分別以 ZMKASP_002、ZMKASP_008 及 ZMKASP_009 分子標記進行 PCR 擴增，三分子標記擴增結果均顯示無雙單倍體樣品落在異質結合群或父本同質結合群。

型態標記 *Pll* 誤判率

誤判率可分為偽發現率 (False discovery rate, FDR) 及偽陰性率 (False negative rate, FNR) (Melchinger *et al.* 2014)。FDR 代表以型態標記鑑定為單倍體的個體中，真實基因型為雜交二倍體所佔比例，FNR 則是真實單倍體植株中，經由型態標記誤判為二倍體所佔的比例。本次試驗使用型態標記 *Pll* 判定的單倍體植株，與基因型所判定的單倍體植株完全一致，亦即 $FDR = 0$ 且 $FNR = 0$ 。前人研究結果顯示，以根部呈色鑑定單倍體之平均 $FDR = 13.9\%$ ， $FNR = 6.1\%$ ，不同族群 FDR 範圍介於 0~55.6%，FNR 則在 0~16.7% 之間 (Chaikam *et al.*, 2016)。值得注意的是，我們因為有基因型鑑定的結果可以比對，因此了解到根部紫色呈色不明顯的個體，可由觀測根與種子交接處的花青素呈色排除可疑的非單倍體種子。

參考文獻

1. Ashman, R. B. 1991. Registration of three popcorn (maize) parental lines HP62-02, HP72-11, and HP68-07. *Crop science*, 31(5): 1402-1403.
2. Chaikam, V., L. Martinez, A. E. Melchinger, W. Schipprack, and P. M. Boddupalli. 2016. Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. *Crop Science*, 56(4): 1678-1688.
3. Chaikam, V., S. K. Nair, R. Babu, L. Martinez, J. Tejomurtula, and P. M. Boddupalli. 2015. Analysis of effectiveness of *R1-nj* anthocyanin marker for in

- vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of *R1-nj* expression. *Theoretical and applied genetics*, 128(1): 159-171.
4. Coe Jr, E. H. 1959. A line of maize with high haploid frequency. *The American Naturalist*, 93(873): 381-382.
 5. Eder, J. and S. Chalyk. 2002. *In vivo* haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(4): 703-708.
 6. Häntzschel, K. R. and G. Weber. 2010. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. *Protoplasma*, 241(1-4): 99-104.
 7. Liu, X., H. Sun, P. Wu, Y. Tian, and D. Cui. *et al.* 2014. Fine mapping of the maize cross-incompatibility locus *gametophytic factor 1 (ga1)* using a homogeneous population. *Crop Science*, 54(3): 873-881.
 8. Melchinger, A. E., W. S. Molenaar, V. Mirdita, and W. Schipprack. 2016. Colchicine alternatives for chromosome doubling in maize haploids for doubled-haploid production. *Crop Science*, 56(2): 559-569.
 9. Pilu, R., P. Piazza, K. Petroni, A. Ronchi, C. Martin, and C. Tonelli. 2003. *pl-bol3*, a complex allele of the anthocyanin regulatory *pl1* locus that arose in a naturally occurring maize population. *The Plant Journal*, 36(4): 510-521.
 10. Prasanna, B. M., V. Chaikam, and G. Mahuku. 2012. *Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice*. CIMMYT.
 11. Röber, F. K., G. A. Gordillo, and H. H. Geiger. 2005. *In vivo* haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica*, 50(3/4): 275.
 12. Rotarenco, V., G. Dicu, and S. Fuiua. 2010. New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, (84): 21-22.
 13. Wan, Y., D. R. Duncan, A. L. Rayburn, J. F. Petolino, and J. M. Widholm. 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(2): 205-211.

次世代定序在玉米基因定位與育種上的應用

鄭舒允

中央研究院植微所

摘 要

次世代定序 (Next Generation Sequencing) 能快速且大量的產生 DNA 序列，而 GBS (Genotyping By Sequencing) 即是以次世代定序為基礎的應用之一。GBS 可以快速的找到不同樣本間涵蓋全基因組的單一核苷酸多型性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 以及酵素截切差異位置藉此獲得大量的分子標誌。在基因定位的目的上，GBS 的應用可以快速的填補全基因組標誌數的不足，配合特殊族群的建立方式，能夠有效的限縮目標基因的可能位置，減少人力、財力以及時間的消耗。本文將介紹藉由 GBS 的方式進行全基因組 miRNA 表現數量性狀基因座關連分析 (miRNA eQTL Genome-wide Association Study) 以及異交不親和 *gal* 基因定位的應用。

關鍵詞：次世代定序、GBS、SNP、GWAS、異交不親和

前 言

利用次世代定序檢測基因型

次世代定序 (Next Generation Sequencing) 技術是以 Sanger sequencing 為基礎，目前以 Illumina 公司的解序技術為最大宗，主要步驟如下：1. 萃取 DNA; 2. 建立 Library; 3. 將建構好的 Library 解序; 4. 序列分析。游離核苷酸帶有不同的螢光，一旦合成股成功結合上新的核苷酸，就會釋放螢光由螢光感測器偵測，從而得知每一個位置的序列。由於螢光偵測以及電腦的應用，NGS 能夠快速且大量的產生短片段 (約 100-200 bp) 序列 (Fig. 1)⁷。

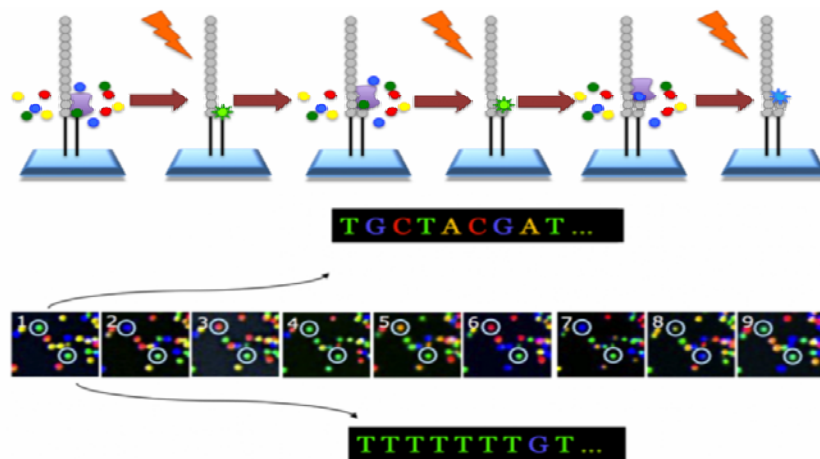


Fig. 1. 次世代定序原理。

由於技術的進步，次世代定序的價格從 2001 年逐年降低，如果將與人類基因組大小相近的物種 (3.2Gbp) 進行次世代定序，所需的價格只有 2001 年的十萬分之一 (Fig. 2)¹³。

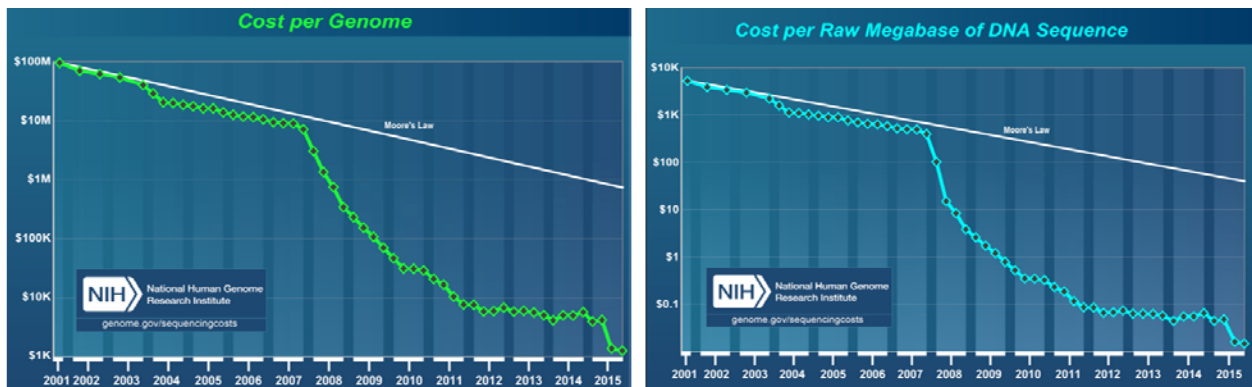


Fig. 2. 次世代定序以人類基因組為例的價格波動。

- (A) 進行完整解序所需價格
- (B) 原始數據中平均每百萬核苷酸所需價格

因為次世代定序的價格越來越合理，使得這個技術不僅能成為建立全基因組分子標誌的方式之一，另外包括快速的找出樣本間的多型性、樣本基因表現差異，甲基化修飾差異等都是應用範圍。目前在利用次世代定序進行基因型鑑定的方式有很多，包括 Multiplex shotgun genotyping (MSG)、Restriction association DNA sequencing (RAD-seq)、Genotyping-by-sequencing (GBS) 等，這些方法在建構 library 的過程中結合指引條碼(index barcode)，使得不同的樣本能夠混和在一起進行解序，進而降低每個樣品解序的成本 (Table 1)¹⁴。

Table 1. A technical comparison of current genotyping methods using next-generation sequencing of multiplex barcoded libraries

Method	Random shearing	Size selection	Fragment size	Enzymes [†]	Multiplexing level [‡]	Analysis tool(s)	Reference
Multiplex shotgun genotyping	No	Yes	Size selected	<i>MseI</i>	96 (up to 384)	Burrows-Wheeler alignment tool	Andolfatto et al., 2011
Restriction association DNA sequencing (RAD-seq)	Yes	Yes	Size selected	<i>SbfI</i> <i>EcoRI</i>	96	Custom Perl scripts	Baird et al., 2008
Double digest RAD-seq	No	Yes	Size selected	<i>EcoRI</i> and <i>MspI</i>	48 [§]	MUSCLE [¶]	Peterson et al., 2012
2b-restriction association DNA	No	No	33–36 bp	<i>BsaXI</i> [#]	NA ^{††}	Custom Perl scripts	Wang et al., 2012
Genotyping-by-sequencing	No	No	<350 bp	<i>ApeKI</i> ^{‡‡}	48 (up to 384)	TASSEL ^{§§}	Elshire et al., 2011
Genotyping-by-sequencing – two enzyme	No	No	<350 bp	<i>PstI</i> and <i>MspI</i>	48 (up to 384)	TASSEL	Poland et al., 2012a
Sequence-based genotyping	No	Yes	Size selected	<i>EcoRI</i> and <i>MseI</i> <i>PstI</i> and <i>TaqI</i>	32	Burrows-Wheeler alignment tool and unified genotyper	Truong et al., 2012
Restriction enzyme sequence comparative analysis	No	Yes	Size selected	<i>MseI</i> <i>NlaIII</i>	NA ^{¶¶}	Burrows-Wheeler alignment tool and Samtools	Monson-Miller et al., 2012

[†]All of these approaches can use different enzymes. Shown are the enzyme(s) used in the initial study.

[‡]All of these methods have the possibility to increase the number of multiplexed samples using additional unique barcodes. The multiplex level as reported in the reference paper. Given in parenthesis are subsequent increases.

[§]Combinatorial barcoding is possible, placing a barcode on each end of the DNA fragment. Using a set of 48 adapter P1 barcodes and × 12 polymerase chain reaction (PCR) 2 indices it is possible to uniquely label 576 individuals (48 [adapter P1 barcodes] × 12 [PCR2 indices]). This method would require paired-end sequencing.

[¶]MUSCLE, multiple sequence comparison by log-expectation.

[#]Uses type IIB restriction endonucleases.

^{††}NA, not applicable.

^{‡‡}Has been successfully applied to using *PstI* and *HindIII* (E. Buckler and R. Elshire, personal communication, 2012).

^{§§}TASSEL, trait analysis by association, evolution, and linkage.

^{¶¶}96-plexing reported but unpublished.

經由次世代定序進行基因鑑定獲得的資訊，可以更進一步的使用在許多不同的範疇，包括遺傳上的相關性圖譜建立 (Association mapping)、連鎖圖譜建立 (Linkage mapping) 以及育種上的基因組選擇 (Genomic selection) 等，讓基因組的資訊更加完備 (Fig. 3)¹⁴。

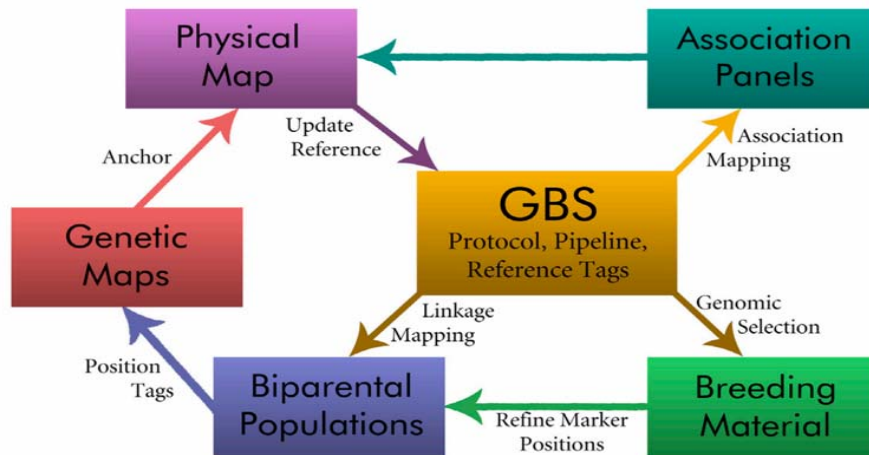


Fig. 3. 次世代定序進行基因型鑑定資訊應用。

次世代定序在基因定位的應用

數量性狀基因座 (Quantitative Trait Loci, QTL) 研究是遺傳研究的範疇，一般作物的重要農藝性狀皆屬於此⁹，其中數量基因調控性狀最顯著的例子為番茄果實大小的差異性⁶。目前已在不同的作物物種中找到許多調控不同性狀的 QTLs，包括了大麥中與種子休眠、條紋病 (stripe rust) 抗性相關的調控基因³；多年生黑麥草生長發育以及耐寒性相關的數量基因²³；豌豆基因組中定位得到影響種子產量、產量成分與生長特性的 QTLs²¹；玉米種子的耐淹水相關 QTLs¹⁶；水稻中則有找到控制淹水耐性的 QTLs²⁰、調控種子寬與重的 QTLs 基因-GW2¹⁸與 GW5 的選殖²²、小麥的產量調控 QTLs 選殖¹⁵等。

現今定位 QTLs 並選殖出 QTL 基因的方式以 positional cloning 與 association mapping 為主 (Fig. 4)¹⁹，Positional cloning 主要利用估計遺傳標誌或分子標誌與目標性狀間的相關性來決定，包含三個步驟：1.找到目標性狀有差異的親本；2.建構有多型性存在的遺傳圖譜；3.QTLs 相關性分析¹¹。GWAS 是從演化上的觀點尋找同物種不同品種、品系、地方種等個體的不同等位基因間連鎖不平衡 (Linkage disequilibrium, LD)與性狀間相關性的策略。LD 的解釋為「兩個以上基因座的等位基因出現非隨機連鎖」的可能，其高低程度可藉由預期的單套體 (haplotype) 頻度與觀測到的單套體頻度間差異求得⁵。GWAS 應用於植物 QTLs 找尋上擁有三項優勢：1.不需大量的試驗族群與時間；2.有更高的遺傳解析度；3.可以在同一基因座上找到演化成不同等位基因的功能性基因¹⁹。GWAS 的應用包括了高粱¹²、玉米¹⁰、乳牛¹⁷等，相當廣泛。

但上述的方式會受限於圖譜解析度不夠高，真正能夠從圖譜上定位到的位置可能距離實際影響基因仍有距離，降低在育種上的應用¹⁹。而次世代定序快速且大量找到涵蓋全基因組的標誌，就可以有效解決圖譜解析度不足的問題，讓找到的連鎖標誌相當靠近目標基因。

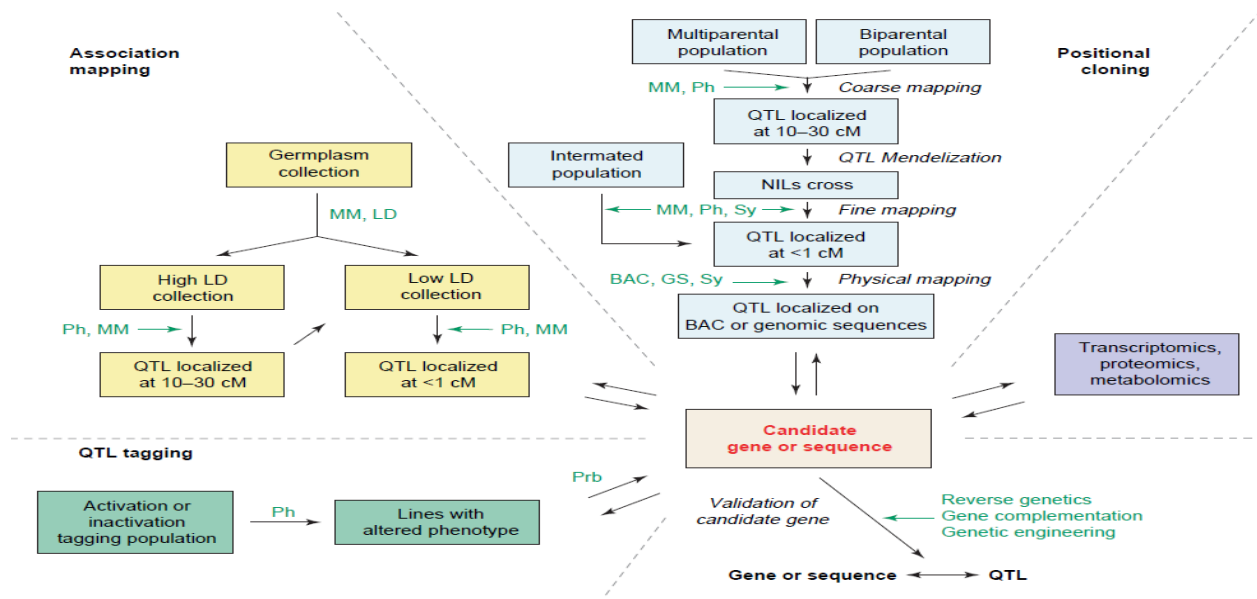


Fig. 4. 利用分子標誌方式進行數量性狀基因座定位的不同流程。

案例一：避免 GMO 污染的救世主-異交不親和 *gal* 基因

研究發現玉米異花授粉的情況在相隔 650 公尺仍能發生，其花粉更能夠飄到數公里之遠，因此如何防範不同種植區玉米品種間花粉互相污染是相當重要的。玉米的異交不親和基因 (cross-incompatibility gene) *gametophyte factor 1 (gal)* 即為解決方式之一，*gal* 基因的特性是母株的柱頭是帶有 *Ga1-S* 等位基因時，帶有 *gal* 等位基因的花粉無法有效的延長花粉管而授精⁸ (Table 2)

Table 2. 異交不親和等位基因間的關係

	<i>Ga1-S</i> (♂)	<i>Ga1-M</i> (♂)	<i>gal</i> (♂)
<i>Ga1-S</i> (♀)	✓	✓	X
<i>Ga1-M</i> (♀)	✓	✓	✓
<i>gal</i> (♀)	✓	✓	✓

[†]*Ga1-S*, gametophyte factor 1-strong allele; *Ga1-M*, gametophyte factor 1-male; *gal*, gametophyte factor-1; ✓, cross compatible; X, cross incompatible; ♂, male; ♀, female.

Bloom 等學者² 以帶有 *gal/gal* 等位基因的 B73 自交系為母本與帶有 *Gal/Gal* 基因座的 Hp301 自交系為父本，建構 192 株自交五代的重組自交系 (recombinant inbred lines, RILs)；利用 1106 個 SNP 標誌，將 *gal* 基因座定位於第四條染色體短臂上 (Fig. 5)，又進一步利用 GBS 標誌將候選基因的範圍縮小到僅有 13 個基因的 2.6Mb 左右 (Fig. 6)。這些候選基因中，GRMZM2G135056 的功能可能與花粉交互作用有關，而 GRMZM2G039983 則是另一個與花粉管生長有關的候選基因 (Table 3)。

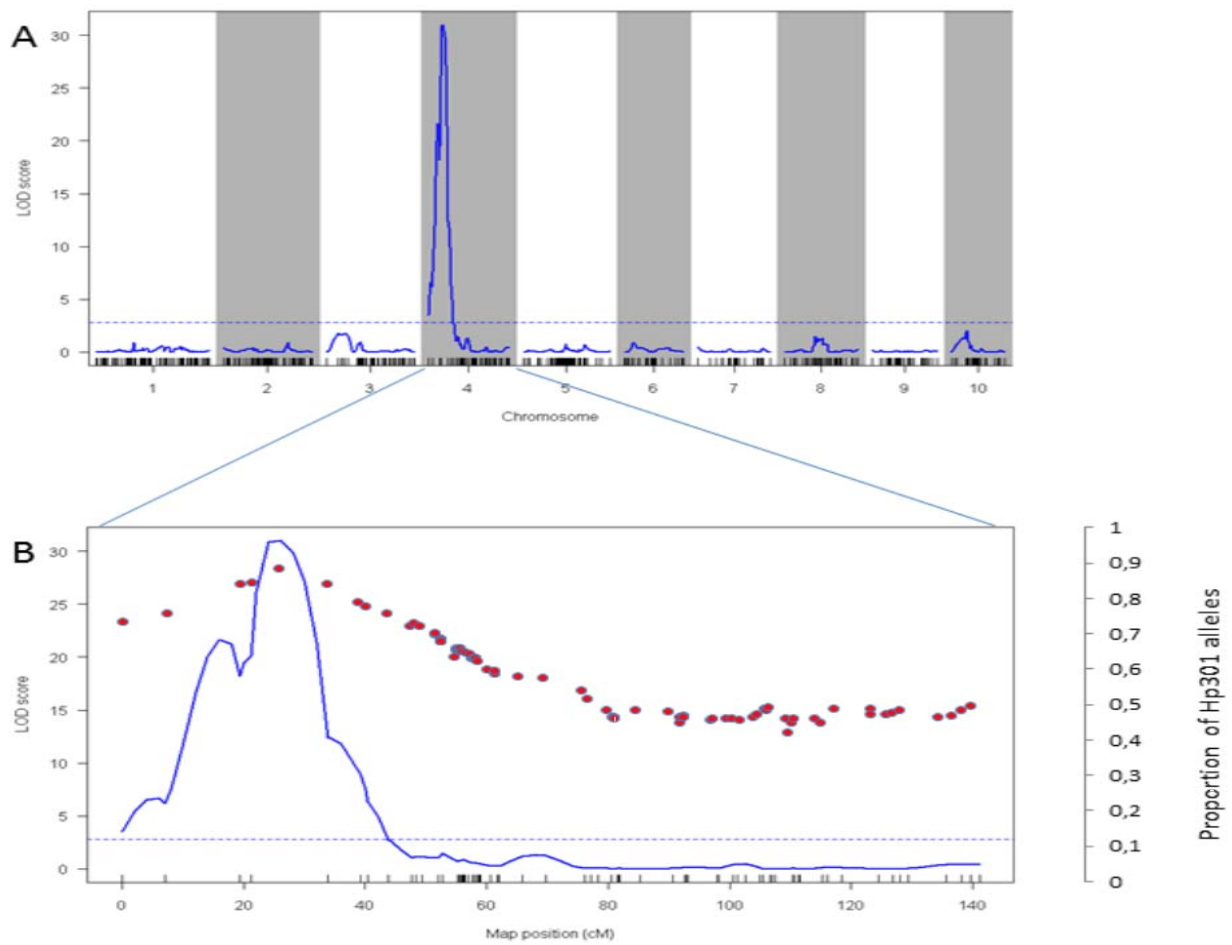


Fig. 5. B73xHp301 重組自交系的全基因組檢測。

(A) 全基因組檢測影響重組自交系接受 *gal/gal* 花粉的表現型結果

(B) 放大檢視定位到 *Gal* 基因的區間，紅色圓點代表 Hp301 等位基因的頻度

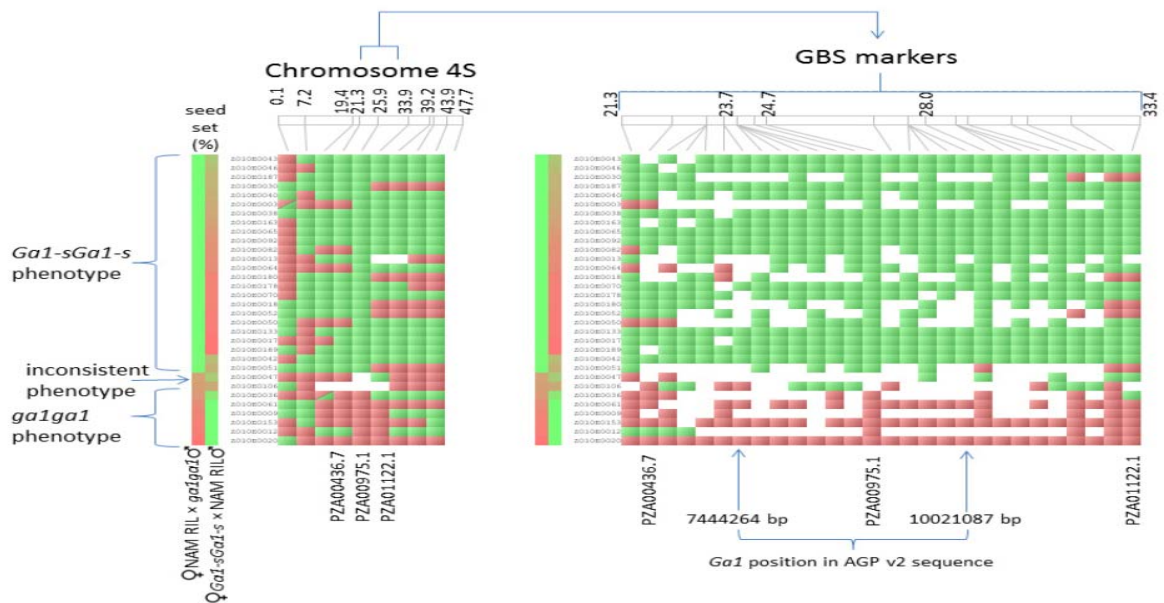


Fig. 6. 利用 GBS 的標誌去限縮並尋找更接近目標基因座的標誌。

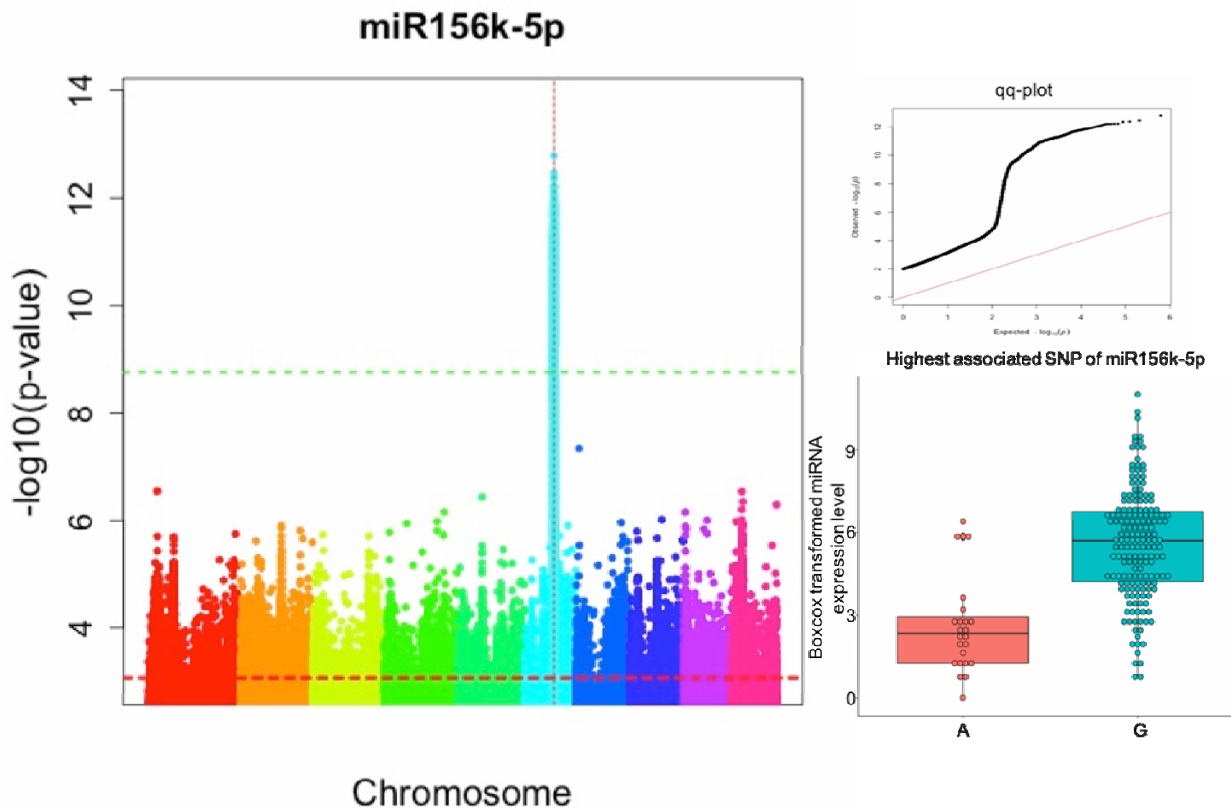
Table 3. *gal1* 基因座可能區間內的候選基因

Gene ID	AGP v2 sequence positions (bp)		Conserved domains
	Transcript start	Transcript end	
GRMZM2G012821	7616846	7618466	F-box domain cyclin-like kinesin motor domain nodulin-like
GRMZM2G424553	7653177	7691914	
GRMZM2G135056	7780877	7782970	
GRMZM2G181073	8078275	8079905	thioredoxin-like fold GTP-binding protein hflX Xklp2 targeting protein, WDL1
GRMZM2G029496	8305887	8308705	
GRMZM5G835418	8899536	8900563	
AC196002.2_FG002	8901387	8901950	
AC201986.3_FG002	9183034	9183546	
GRMZM2G702344	9259652	9260731	
GRMZM5G817995	9325329	9325631	
GRMZM2G419836	9351020	9354236	
GRMZM2G027021	9485207	9494351	
GRMZM2G039983	9589010	9592389	

來自藍河有機種子公司 (Blue River Organic Seed)¹ 的玉米商品「PuraMaize™」，即是利用這種異交不親和基因，讓商品本身的雌花僅能接受自己的商品的花粉，從而隔絕其他周遭玉米花粉的汙染，且特別強調可以在有機栽種上避免轉基因花粉的汙染。

案例二：miRNA 表現數量性狀基因座關連分析 (miRNA eQTL Genome-wide Association Study)

microRNA (miRNA) 是基因表現相當重要的調控因子之一，在動植物的不同生長發育時期都需要 miRNA 的參與，但是調控 miRNA 表現的基因座在玉米基因組裡仍未發現，Chen 等⁴，將玉米 282 個 NAM 自交系的發芽後根尖以及開花期的劍葉下一葉為目標，利用次世代定序的方式將成熟 miRNA 的表現量化 (smallRNA-seq) 獲得性狀，結合已知的基因型數據 Maize hapmap 3.21 進行全基因組關連性分析，找到調控 miRNA 表現的數量基因座 (Fig. 7)。



結 語

次世代定序能夠快速且大量的提供序列，結合不同分子標誌的找尋方式，能有效的找出涵蓋全基因組的差異性標誌，再加上不同指引條碼的組合，使得多個樣本一起解序成為可能，大大降低解序所需的時間與成本。Genotyping-by-Sequencing 即是其中一種方式，不僅能如本文介紹的應用在基因座的測定，還可尋找品種專一性的標誌來建立品種特有指紋、使用於演化的研究以瞭解變異。此外，這些大範圍高密度的標誌，更能應用在基因組選拔 (genome selection) 與基因組預測 (genome prediction) 等的未來育種策略上。

參考文獻

1. Blue River Organic Seed
<http://www.blueriverorgseed.com/products/corn/puramaize/145>
2. Bloom, J. C. and J. B. Holland. 2012. Genomic localization of the maize cross-incompatibility gene, Gametophyte factor 1 (ga1). *Maydica* 56-1782.
3. Castro, A. J., X. Chen, P. M. Hayes, S. J. Knapp, R.F. Line, T. Toojinda, and H. Vivar. 2002. Coincident QTL which determine seedling and adult plant resistance to stripe rust in barley. *Crop Sci.* 42: 1701-1708.
4. Chen, S. Y., M. H. Su, K. A. Kremling, N. K. Leapk, M. C. Romay, K. L. Swarts, Q. Sun, P. J. Bradbury, and E. S. Buckler. Identification of miRNA eQTLs in Maize Seedling Root and Mature Leaf Tissue by GWAS (on processing).
5. Flint Garcia, S. A., J. M. Thornsberry, and E. S. Buckler. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 357-374.
6. Frary, A., T. C. Nesbitt, A. Frary, S. Grandillo, E. V. D. Knaap, B. Cong, J. Liu, J. Meller, R. Elber, K. B. Alpert, and S. D. Tanksley. 2000. Fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Sci.* 289: 85-88.
7. Illumina website
<https://www.illumina.com/>
8. Liu, X., H. Sun, P. Wu, Y. Tian, D. Cui, C. Xu, S. Li, P. Li, H. Zhang, T. Chen, D. Li, X. Zhao, Y. Zhang, Y. Xue, and H. Chen. 2014. Fine mapping of the maize cross-incompatibility locus gametophytic factor 1 (ga1) using a homogeneous population. *Crop Science* 54: 1-9.
9. Kearsley, M. J. and A. G. L. Farquhar. 1998. QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity* 80: 137-142.
10. Massman J. M., A., Gordillo, R. E. Lorenzana, and R. Bernardo. 2013. Genomewide predictions from maize single-cross data. *Theor. Appl. Genet.* 126: 13-22
11. Mauricio, R. 2001. Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nat. Rev. Genet.* 2: 370-381.
12. Morris G. P., P. Ramu, S. P. Deshpande, C. T. Hash, T. Shah, H. D. Upadhyaya, O. Riera-Lizarazu, P. J. Brown, C. B. Acharya, S. E. Mitchell, J. Harriman, J. C. Glaubitz, E. S. Buckler, and S. Kresovich. 2013. Population genomic and genome-wide association studies of agroclimatic traits in sorghum. *PNAS* 110: 453-458
13. National human genome research institute website
<https://www.genome.gov/>

14. Poland, J. A. and T. W. Rife. 2012. Genotyping-by-Sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome*. 5: 92-102.
15. Quarrie, S. A., S. Pekic Quarrie, R. Radosevic, D. Rancic, A. Kaminska, J. D. Barnes, M. Leverington, C. Ceoloni, and D. Dodig. 2006. Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments: from the QTL to candidate genes. *J. Exp. Bot.* 57: 2627-2637.
16. Qiu, F., Y. Zheng, Z. Zhang, and S. Xu., 2007. Mapping of QTL associated with waterlogging tolerance during the seedling stage in Maize. *Ann. Bot.* 99: 1067-1081.
17. Schaeffer L. R. 2006. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 123: 218-223
18. Song, X. J., W. Huang, M. Shi, M. Z. Zhu, and H. X. Li. 2007. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat. Genet.* 39: 623-630.
19. Salvi, S. and R. Tuberosa. 2005. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends Plant Sci.* 10: 297-304.
20. Toojinda, T., M. Siangliw, S. Tragoonrung, and A. Vanavichit. 2003. Molecular genetics of submergence tolerance in rice: QTL analysis of key traits. *Ann. Bot.* 91: 243-253.
21. Timmerman-Vaughan, G. M., A. Mills, C. Whitfield, T. Frew, R. Butler, S. Murray, M. Lakeman, J. McCallum, A. Russell, and D. Wilson. 2005. Linkage mapping of QTL for seed yield, yield components, and developmental traits in pea. *Crop Sci.* 45: 1336-1344.
22. Weng, J., S. Gu, X. Wan, H. Gao, T. Guo, N. Su, C. Lei, X. Zhang, Z. Cheng, X. Guo, J. Wang, L. Jiang, H. Zhai, and J. Wan., 2008. Isolation and initial characterization of GW5, a major QTL associated with rice grain width and weight. *Cell Res.*: 1-11.
23. Yamada, T., E. S. Jones, N. O. I. Cogan, A. C. Vecchies, T. Nomura, H. Hisano, Y. Shimamoto, K. F. Smith, M. D. Hayward, and J. W. Forster. 2004. QTL analysis of morphological, developmental, and winter hardiness-associated traits in perennial ryegrass. *Crop Sci.* 44: 925-935.

附錄：智慧財產訴訟與植物品種侵權案例分享

智慧財產訴訟與植物品種侵權案例分享

智慧財產法院 陳忠行庭長
106年11月24日

1

我國智慧財產權之法律保障體系



2

壹、智慧財產訴訟新制介紹

一、設立智慧財產專業法院

我們都知道21世紀為知識經濟時代，以知識產能為基礎的智慧財產權，不僅性質上與傳統的財產權有異，在權利保護上亦呈現不同面貌。尤其高科技產業發達與否，攸關國家競爭力，因鉅額投資研發取得的高科技成果，有賴建全的智慧財產法制保護，始能確保該產業在國際市場上的競爭力。

隨著科技的推陳出新，智慧財產權的態樣日漸多元化與複雜化，所牽涉的糾紛更是層出不窮，不僅造成本國業者間的訴訟，更形成國際間貿易的障礙。各國保護智慧財產權的實體法律雖可經由加入國際性組織及簽訂國際性條約，而漸趨一致，但法律的實踐仍有賴訴訟制度之完備與便捷，始能達到司法機關保障人民權利的憲法要求。

3

智慧財產權與其他法律專業領域(例如勞工、國際貿易、金融、海商等)最大的不同，在於智慧財產權(例如專利、商標)常涉及行政機關之審查及授予權利的程序，各國對於涉及科技專業事項之智慧財產權發生爭訟時，大多設計不同於一般訴訟的司法審查機制以資因應。環顧先進法治國家或力求經濟發展的國家莫不高度重视智慧財產權之保護，設立智慧財產專業法院已形成趨勢。

我國於2002年1月1日加入世界貿易組織(WTO)，成為該組織第144個會員國，並受世界貿易組織協定附件一「與貿易有關之智慧財產權協定」(TRIPS)的拘束。事實上早在正式加入WTO之前，我國已陸續著手修正智慧財產權之相關法律，使得我國智慧財產之實體相關法律規範基本上已符合世界主要條約或協定之標準。

4

但因我國舊有的訴訟制度係採取民事、刑事及行政訴訟分軌並行制，關於智慧財產權訴訟，依訟爭特性，分別由普通法院之民、刑事庭或行政法院審理，以致同一權利客體(例如專利權或商標權)發生爭訟時，往往需在不同訴訟中重複審理，耗費當事人的時間精力與司法資源，延宕司法救濟時效，甚至影響我國產業的國際競爭。國內外產官學界呼籲亦應變革，以符合智慧財產權保護之需求。因此成立智慧財產專業法院首要任務，即在於改善目前分軌制度下產生的訴訟延滯問題。

其次則是擇優選取一批跨法律及科技知識的專業法官，並配置適當之技術專家，以輔助法官正確判斷智慧財產訴訟所涉及的科技問題，這也是成立智慧財產專業法院的主要考量。

5

我國司法院為因應各界改革智慧財產訴訟制度的呼聲，乃自2004年2月起即研議籌設智慧財產專業法院，以及擬具智慧財產訴訟制度改革之法案，2006年4月提出「智慧財產法院組織法」及「智慧財產案件審理法」二項草案，經立法院三讀通過，諮請總統於2007年3月28日公布，2008年7月1日施行同日智慧財產法院亦正式開始運作。自此，我國智慧財產案件之審理，進入了新的里程碑。

6

二、各國智慧財產專業法院之比較

國家	設立年代	專業法院
德國	1961.07.01	設全國性聯邦專利法院於慕尼黑
英國	1977	於倫敦高院內設專利法院
	1990	於倫敦設地方專利法院
美國	1982.10	設聯邦巡迴上訴法院
泰國	1997.12	設中央智慧財產及國際貿易法院
韓國	1998.03	設全國性專利法院
日本	2005.04.01	設智慧財產高等裁判所
臺灣	2008.07.01	設智慧財產法院
大陸	2014.11-12	設北京、上海、廣州知識產權法院

7

三、智慧財產訴訟新制之特色

(1) 三合一之訴訟架構，管轄集中

智慧財產法院管轄之案件種類，包括智慧財產權之民事訴訟、刑事訴訟及行政訴訟，可謂三合一之訴訟架構，此為我國法院體制中之首創。智慧財產法院設定為高等法院的層級。

所謂智慧財產權，主要係指專利法、商標、著作權法、積體電路電路布局保護法、植物品種及種苗法、營業秘密法、公平交易法等所保護之權利。智慧財產法院組織法(下稱組織法)第3條及智慧財產案件審理法(下稱審理法)第7、23、31條，將有關上述智慧財產權之民事訴訟第一、二審、刑事訴訟第二審及行政訴訟第一審，均納入智慧財產法院管轄。

8

關於智慧財產權之民事訴訟事件，原則上由具專業知識與能力之智慧財產法院管轄，但**非專屬管轄**。若當事人捨智慧財產法院，合意由普通法院管轄，亦宜尊重當事人之意思，應許其等以合意方式定普通法院為管轄法院。但行政及刑事訴訟事件，因有關公益，故不許當事人以合意定管轄。

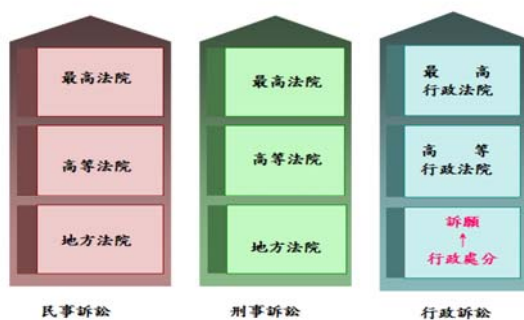
智慧財產民事及行政訴訟事件，並非專屬管轄，但不代表原告可任意選擇法院起訴。由於智慧財產民事及行政訴訟事件，其與一般民事及行政訴訟事件間，界限並非明確，若採專屬管轄，恐導致若干灰色地帶之案件，發生管轄錯誤，判決違背法令之情形。司法院有鑑於此，提出訴訟法所無之「**優先管轄**」概念，即在專屬管轄之下

9

、特別審判籍之上，增加一個優先管轄，亦即智慧財產民事及行政訴訟案件，除民事之合意管轄外，均應由智慧財產法院管轄，達到成立專業法院之目的。只是管轄錯誤，不生裁判違背法令之問題而已。

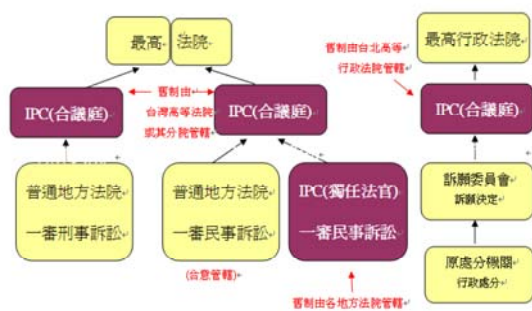
10

一般案件審判流程



11

智慧財產案件審判流程



12

指定管轄：

因智慧財產權內容與時俱進，仍在發展中之概念，法律規定無法全部含蓋，又因某些案件宜由智慧財產法院管轄，所以組織法第3條第4款規定，授權我國司法院得指定某些原非法律所定之智慧財產案件，由智慧財產法院管轄，以資彈性運用。

司法院於97.4.24以院台廳行一字第0970009021號令指定下列訴訟事件由智慧財產法院管轄：

民事事件部分

- 不當行使智慧財產權權利所生損害賠償爭議事件。
- 當事人以一訴主張單一或數項訴訟標的，其主要部分涉及智慧財產權，且係基於同一原因事實而不宜割裂者，均為智慧財產權訴訟。

13

行政事件部分

- 不當行使智慧財產權妨礙公平競爭所生行政訴訟事件。
- 海關依海關緝私條例第39條之1規定，對報運貨物進出口行為人侵害智慧財產權標的物所為行政處分，提起之行政訴訟事件。

14

(2) 專業人力之強化

智慧財產法院成立後，其專業化之提高更仰賴優質之人力，因此，組織法規定智慧財產法院之法官應經嚴謹之訓練合格始得任用，並應持續在職研習。另外，更參考日本及韓國之法制，引進技術審查官（相當於日本的調查官）及專家諮詢委員（相當於日本的專門委員）制度，以優秀專業之科技背景人，協助法官處理案件有關之專業技術上爭點，但不直接參與裁判。

目前智慧財產法院法官人數為16名（含院長1名、庭長2名），組成審查庭（第四庭）、審判第一庭、審判第二庭、審判第三庭（專辦民事第一審案件）。法官由各法院具有審判智慧財產案件經驗或有智慧財產專門著作中遴選，並經職前理論與實務訓練8個月。

15

智慧財產法院法官員額有限，故每位法官兼辦民事、刑事、行政訴訟案件，惟民事訴訟案件第一審由第一庭審理，第二審由第二、三庭審理。

依組織法第15條規定，智慧財產法院設技術審查官室，置技術審查官。技術審查官之來源得以任用、選聘或借調具有智慧財產知識或技術人員充任之。智慧財產法院成立初期，技術審查官

9名全部向經濟部智慧財產局借調資深專利審查官充任，2009年11月以選聘方式，新聘1名專利代理人擔任技術審查官，全院共有技術審查官13名(含主任技術審查官)。以專常領域分類，機械及土木6名，電子及電機3名資訊及光電1名，化學及化工1名，生物及醫藥1名，新式樣1名。

技術審查官之定位——法官之助手，非鑑定人

16

司法院及智慧財產法院另設置有提供法官專業問題之專家諮詢制度，受諮詢之專家共有100名。受諮詢之專家，並非訴訟法上鑑定人，只是單純提供法官專業上之意見，其所為意見陳述亦不得直接作為證據，與技術審查官之功能相似。但諮詢專家係法官審理具體案件時諮詢人員，選任之專家，非法院常任人員，由法院個案支付報酬。

技術審查官之指定，係以案件是否涉及技術層面為考量，故不以專利案件為限；其他智慧財產案件，如著作權案件有關電腦程式者，亦有指定技術審查官協助之必要；又專利案件如未涉及技術層面，而單純為法律上爭議者，則無須技術審查官之協助。

17

(3) 審理民、刑事訴訟法庭自為認定智慧財產有效性

傳統公私二元化之司法體制：

商標權、專利權等由經濟部智慧財產局審查而特許取得之智慧財產權，其授與及剝奪，傳統上均認為係屬行政之「專權事項」，其正確性之審查，應依行政爭訟程序處理，在未經撤銷確定前，仍應認為有效。

我國訴訟制度採民、刑事與行政訴訟二元分立之訴訟體制，普通民事法院於審理涉及此等權利侵害之訴訟中，如因當事人提出專利權、商標權有效性抗辯時，普通法院通常依規定裁定停止所審理的訴訟，等待行政爭訟確定結果。亦即同一原因事實所生之智慧財產侵權與智慧財產有效

18

性爭議，採取截然二分之訴訟程序，就侵權訴訟部分須到普通法院提起，就權利有效性之爭議須循行政爭訟程序處理，**普通法院就權利有效性之問題，不得為實質認定**。因此衍生拖延普通法院終結訴訟之時程，不能對智慧財產權作有效保護之問題。

審理法新的變革規定：

審理法參考法制相近國家之比較法例，於**第16條第1項**規定：「當事人主張或抗辯智慧財產權有應撤銷、廢止之原因者，法院應就其主張或抗辯有無理由**自為判斷**，不適用民事訴訟法、行政訴訟法、商標法、專利法、植物品種及種苗法或其他法律有關停止訴訟程序之規定」，明確宣示於民事侵權訴訟中，法院就智慧財產權有無應予撤銷或廢止原因之爭點，具有判斷之權限，**不得**以其民事訴訟之裁判，須待行政處分或行政爭訟程序之結果為據，而**裁定停止訴訟程序**。

19

(4)智慧財產專責機關之參加訴訟

依前所述，審理民事侵權訴訟之法院，應自行判斷智慧財產之有效性；惟其判斷結果，與智慧財產專責機關之職權有關，自宜使其得適時就智慧財產之有效性表示專業上意見；因此審理法**第17條第1項**規定，法院於必要時，得以裁定**命智慧財產專責機關參加訴訟**。

智慧財產專責機關依審理法**第17條**規定參加訴訟時，以關於智慧財產權有無應撤銷或廢止之原因為限，就當事人主張智慧財產權有效性之爭點，在與當事人之訴訟行為不牴觸之範圍內，審理細則**第31條**特別規定，應許其得獨立提出攻擊防禦方法，故適用民事訴訟法**第61條**有關從參加之規定。

20

惟法院就當事人間之民事訴訟，不宜對智慧財產專責機關發生訴訟參加之拘束力，且亦無使其承當訴訟之必要，故有關同法**第63條第1項**前段及**第64條**有關規定，不在適用之列。又前揭參加訴訟，並非輔助任何一造當事人，而係以中立立場陳述意見，故為特殊的輔助參加。

審理法第17條擬予修正為：

「法院為判斷當事人依前條第一項所為之主張或抗辯，得命智慧財產專責機關就該事件有關之法律適用及其他必要事項，**陳述意見**（第一項）。智慧財產專責機關，經法院許可，得就該事件有關之法律適用及其他必要事項，向法院陳述意見（第二項）。前二項之陳述意見，智慧財產專責機關得指定其職員為之（第三項）。」

21

(5) 行政訴訟中得提出獨立新證據

➢ 舊制情形：

現行專利法**第67條第3項**規定，**舉發人補提理由及證據應自舉發之日起1個月內為之，但在舉發審定前提出者，仍應審酌之**。依此規定，舉發人就關於專利權應撤銷之獨立證據（補強證據不在此限），如未於舉發審定前提出，讓專利專責機關為第一次判斷，縱於行政訴訟中補提，行法院亦不予審酌。

又專利法**第67條第4項**規定，於行政訴訟判決確定後，舉發人仍得以前行政訴訟中未能提出之新證據，就同一專利權**再為舉發**，並因之衍生另一行政爭訟程序；而關於撤銷或廢止商標註冊之行政爭訟程序，實務上亦同此處理；致使同一商標或專利權有效性爭議，發生多次行政爭議，難以終局確定，甚而影響其他相關民刑事訴訟之終結。

22

➢ 新制情形：

為避免當事人就同一商標或專利權有效性爭執，衍生新的行政爭訟；且智慧財產法院成立後，法官已強化其智慧財產權的專業知識，並有技術審查官之輔助，應有充分能力在訴訟中就獨立新證據為斟酌判斷。因此，智慧財產案件審理法**第33條第1項**規定，容許在撤銷、廢止商標註冊或撤銷專利權之行政訴訟中，當事人得於言詞辯論終結前，就**同一撤銷或廢止理由提出新證據**，智慧財產法院仍應審酌之。

23

(6) 刑事附帶民事訴訟，刑事法院應自為判決

➢ 舊制情形：

我國刑事訴訟法**第504條**規定：「(刑事)法院認附帶民事訴訟確係繁雜，非經長久時日不能終結其審判者，得以合議裁定移送該法院之民事庭。…前項移送案件免徵裁判費。」實務上，多數附帶民事訴訟案件均**移送民事庭**；造成民事庭法官必須重新調查證據及認定事實，因而延滯訴訟程序。

24

► 新制情形：

智慧財產刑事案件，前已說明，由各地方法院刑事庭管轄，如不服該判決，則可上訴智慧財產法院。為免刑事案件與附帶民事訴訟案件分別處理，造成訴訟程序延遲，智慧財產案件審理法第27條第2項特別規定，不得裁定移送民事庭審理。

為顧及附帶民事訴訟案件須踐行言詞辯論程序可能無法與刑事訴訟裁判同時宣示，智慧財產案件審理法第29條另規定，得於刑事訴訟裁判後60日內裁判。

25

- 審理第二十三條案件之附帶民事訴訟，認為原告之訴不合法，或刑事訴訟諭知無罪、免訴或不受理者，應以判決駁回之；其刑事訴訟經裁定駁回者，應以裁定駁回原告之訴（審理法第27條第1項）。
- 前項既已特別規定於上開情形應駁回原告之訴，刑事訴訟法第五百零三條第一項但書關於該項前段情形，經原告聲請時，應將附帶民事訴訟移送管轄法院民事庭之規定，即不在準用之列。

26

(7) 擴大起訴前證據保全範圍

民事訴訟法368條1項原規定：「證據有滅失或礙難使用之虞，或經他造同意者，得向法院聲請保全。」92年2月修正民事訴訟法時增訂後段：「就確定事、物之現狀有法律上利益並有必要時，亦得聲請為鑑定、勘驗或保全書證。」

審理法第18條之立法理由二特別提示「按智慧財產權之民事訴訟，關於侵害事實及損害範圍之證據，極易滅失或隱匿，常造成權利人於訴訟上無法舉證，而不能獲得有效之救濟，因此，智慧財產權之民事事件，其起訴前證據之保全，較之其他訴訟，更有必要。而民事訴訟法第368條

27

第1項亦已修正增列就確定事、物之現狀有法律上利益並有必要時，得聲請為鑑定、勘驗或保全書證，於智慧財產訴訟，尤應積極運用。」實現起訴前開示事證，俾便和解，並避免訴訟。

審理法第18條第4項另規定：「相對人無正當理由拒絕證據保全之實施時，法院得以強制力排除之，但不得逾必要之程度。必要時並得請警察機關協助」同條第3項規定：「法院實施證據保全時，得命技術審查官到場執行職務。」

28

(8) 強制提出證據

智慧財產訴訟，尤其是專利侵權訴訟，其有關侵害之事證，具有明顯偏向存在於一造之特性，負侵權行為舉證責任之智慧財產權人通常不易取得有關侵害事實及損害範圍之相關證據，導致權利行使困難。而民事訴訟法為促使當事人或第三人持有之文書及勘驗物，提出於法院，設有第342條第1項、第343條、第346條第1項、第348條聲請命他造或第三人提出文書、第344條第1項之文書提出義務之規定，而對不遵從命令提出者，亦有第345條及第349條第1項之效果，並準用於於勘驗之情形（民事訴訟法第367條參照）。從而，於智慧財產訴訟法院依他造當事人之聲請所發之證據提出命令，法院固得審酌情形

29

認他造關於該文書（勘驗物）之主張或依該文書（勘驗物）應證之事實為真實。惟如何情形始得認他造關於該文書應證之事實為真實，並不明確，特定之證據或基於待證事實之特性，即使當事人提出，亦未必對待證事實具有完全之證明力，自不得僅因其未提出，逕行認定待證事實為真實，是以民事訴訟法上開規定之適用，仍有相當之不確定性。

民事訴訟法對於違反提出命令者，區別當事人及第三人，異其效果，其為第三人無正當理由不從提出命令時，依第349條規定，法院得處罰鍰或命為強制處分；而於訴訟當事人不從法院之命提出文書或勘驗標的物時，則應依民事訴訟法第345條第1項規定，審酌情形認他造關於該證據

30

之主張或依該證據應證事實為真實，而不得為直接或間接之強制。惟如參照比較法制之演進，仍不無檢討之餘地。於確認證據係由他造持有中時，如亦得參照第三人違背提出命令之情形，強制促其於訴訟中顯現，使當事人得即時就其證據進行辯論，應無必予排斥之理由。

因此，審理法第10條明定：「**文書或勘驗物之持有人，無正當理由不從法院之命提出文書或勘驗物者，法院得以裁定處新臺幣三萬元以下罰鍰；於必要時並得以裁定命為強制處分。**其強制處分之執行，並準用強制執行法關於物之交付請求權執行之規定。」，以促使當事人協助法院為適當之裁判。又容許法院得強制當事人提出證據，與民事訴訟法上既有之心證上不利認定之制裁，仍屬選擇而非排斥之關係。

31

(9) 引進秘密保持命令制度

智慧財產民事訴訟中，當事人經常必須面對營業秘密相關事項之主張及舉證，但就內含營業秘密之文書等證據，其蒐集及提出均有相當困難，法院於審理相關訴訟時，就如何兼顧充分之辯論與當事人營業秘密之保護，亦不易求其平衡。而現行法對於營業秘密之保護，雖然有公平交易法第19條第5款「以脅迫、利誘或其他不正當方法，獲取他事業之產銷機密、交易相對人資料或其他有關技術秘密之行為。」及營業秘密法第10條以下相關之規定存在。當事人向法院提出之準備書狀或證據中，記載營業秘密時，亦得依營業秘密法第14條第2項聲請法院准許為不公開審判及限制閱覽；而限制閱覽之規定，依我國相

32

關之法律，並未限於當事人以外之訴訟第三人，則如法院認為必要時，非不得限制訴訟對造閱覽。惟限制訴訟當事人接近對訴訟結果有影響之訴訟資料，實際上亦將對於當事人實施訴訟造成顯著之不利影響，在正當程序及聽審請求權之保障上，亦有值得檢討之處。民事訴訟法就此問題雖委由法官權衡裁量，但營業秘密僅涉及財產權之保護，與國家機密或涉及人格利益之隱私，究竟有其位階上之差異。其保護價值相對於訴訟當事人憲法上之聽審權利，能否認為當然居於較優之地位，亦有疑問。

審理法為兼顧訴訟當事人之營業秘密保護，與對當事人訴訟權保障，乃參考日本法制，設置「**秘密保持命令**」之制度，其立法意旨，係在智

33

慧財產權相關訴訟中，就包含**營業秘密之準備書狀及證據，禁止其提供作為該訴訟進行以外之目的而使用，以及向訴訟關係人以外之人開示**，以此促使該營業秘密容易在訴訟程序中顯現，並使營業秘密保護與侵害行為舉證容易化，以與審理資料之充實取得平衡；而對於**違反此命令**，則於同法第35條規定，應**處以刑事罰**；法人違反者，同法第36條亦有處罰之規定，以確保秘密保持命令之實效性。

34

(10) 定暫時狀態處分之要件更嚴謹

智慧財產審理法與民事訴訟法規定相異之處：

1. 釋明不足不得以供擔保代之

一般聲請定暫時狀態處分之案件，依民事訴訟法第538條之4準用同法第533條、第526條規定，即聲請人雖就聲請定暫時狀態處分及請求原因釋明仍有不足，惟其陳明願供擔保，或法院認為適當者，得定相當之擔保金額准許之。但審理法第22條第2項已明定「其釋明有不足，法院應駁回聲請」，則嗣後有關智慧財產案件，不得以釋明不足而以供擔保代替為由，准許定暫時狀態處分之聲請。

35

2. 提高聲請人之釋明責任

智慧財產案件多具有高度技術性，准否當事人聲請定暫時狀態之處分，均會對當事人造成深切影響，應提高聲請人之釋明責任，以期衡平。審理法第22條第4項及審理細則第37條第1項亦分別規定，法院為定暫時狀態之處分前，應令兩造陳述意見。聲請人就有爭執之智慧財產法律關係聲請定暫時狀態之處分者，須釋明該法律關係存在及有定暫時狀態之必要，即就聲請定暫時狀態處分保全之必要性，提出高度釋明，有異於民事訴訟法規定之釋明責任。

36

3. 法院審酌標準

聲請人就智慧財產案件有爭執之法律關係，向法院聲請定暫時狀態之處分，既須就該法律關係存在及有定暫時狀態之必要性，提出高度釋明，則法院在審酌當事人之釋明標準，亦應更趨慎重。詳言之，法院在審理定暫時狀態處分之聲請時，就定暫時狀態之必要性，應審酌：**(1)聲請人將來勝訴可能性**，包括權利有效性及權利被侵害之事實；**(2)法院若否准定暫時狀態之處分，聲請人是否受到無可彌補之損害**；**(3)聲請之准駁對於雙方損害之程度**；**(4)對公眾利益**（例如醫藥安全或環境問題）造成如何之影響等事項，以期周全。

37

四、智慧財產案件審理成功之鑰 ---- 審理法第 8 條：

法院已知之**特殊專業知識**，應予當事人有辯論機會，始得採為裁判之基礎（第1項）。

審判長或受命法官就事件之法律關係，應向當事人**曉諭爭點**，並得**適時表明其法律上見解及適度開示心證**（第2項）。

38

四、智慧財產案件審理成功之鑰 ---- 審理法第 8 條

- 所稱「特殊專業知識」，究竟何所指？
按本條項立法意旨謂：「法院本身已具備與事件有關之專業知識，或經技術審查官為意見陳述後，就事件有關之特殊專業知識，如未於裁判前對當事人為適當揭露，使當事人有表示意見之機會，將對當事人造成**突襲**。」可知「特殊專業知識」，係屬法官「私知」，而當事人不知者，即未經當事人主張或舉證者（否則即無突襲裁判之可言）。
- 又所謂「特殊專業知識」，係指屬於特殊專業領域內業已**被證實**，且經確信有**真實性**者而言。故一般人均得瞭解之「通常知識」，並不包括在內；未經證明為確屬真實者則僅屬「觀點」或「意見」（例如法官或技術審查官對兩造爭點一系爭專利是否不具進步性之判斷），亦不包括在內。

39

四、智慧財產案件審理成功之鑰 ---- 審理法第 8 條

- 技術審查官所作成之技術報告，係與法官多次討論後之結果，已摻雜有法官之意見，並非全然為技術審查官個人之意見，故**技術審查官之技術報告本身，不能稱之專業知識，更遑論為特殊專業知識**。僅技術報告論證過程內引用之資料，若為當事人所不知之專業知識者，應公開予當事人辯論而已。
- 最高法院100年度台上字第480號民事判決：
智慧財產法院並依智慧財產法院組織法第十五條第四項及智慧財產案件審理法第四條之規定，配置有技術審查官，使其受法官之指揮監督，依法協助法官從事案件之技術判斷，蒐集、分析相關技術資料及對於技術問題提供意見（性質上屬於受諮詢意見人員）。是以，智慧財產法院審理是類訟爭事件就自己具備與事件有關之專業知識，或經技術審查官為意見陳述所得之專業知識，倘認與專責機關之判斷歧異，自應依智慧財產案件審理法第八條及第十七條第一項規定，**將所知與事件有關之特殊專業知識對當事人適當揭露，令當事人有辯論之機會，或適時、適度表明其法律上見解及開示心證，或裁定命智慧財產專責機關參加訴訟及表示意見**，經兩造充分攻防行言詞辯論後，依辯論所得心證本於職權而為判決。

40



41

智財法院成立以來撤銷行政處分之比例

- 專利行政訴訟撤銷行政處分比例
2004.07.01~ 2008.06.30北高行**10.44%**
- ➔ 2008.07.01- 2017.09.30智慧財產法院**26.38%**
- 商標行政訴訟撤銷行政處分比例
2004.07.01~ 2008.06.30北高行**10.32%**
- ➔ 2008.07.01- 2017.09.30智慧財產法院**17.16%**
- 自成立以來迄今無有關植物品種行政訴訟案件

42

智慧財產法院各類案件新收涉外比率

97年7月1日至106年9月30日 單位：件、%

種 類 別	合計	民事	行政	刑事
涉外比率	21.51	14.78	20.79	37.59
新收件數	8759	3871	3127	1761
涉外件數	1884	572	650	662

【備註：刑事部分是自98年5月開始蒐集涉外案件】
 【備註：行政部分案件新收之時尚未有參加人故涉外件數會偏低】

43

智慧財產法院保全證據事件終情形

年 月 別	全部准許	部分准許	撤回	駁回	准許率	全部案件
97年7-12月	2	2	5	22	15.38	31
98年	1	1	4	50	3.85	56
99年	6	2	9	38	17.39	55
100年	8	3	3	29	27.50	43
101年	3	2	5	32	13.51	42
102年	4	3	0	18	28.00	25
103年	6	4	1	14	41.67	25
104年	15	1	1	12	57.14	29
105年	14	4	3	8	69.23	29
106年1-8月	6	1	4	3	70.00	14
合計	65	23	35	226	28.03	349

44

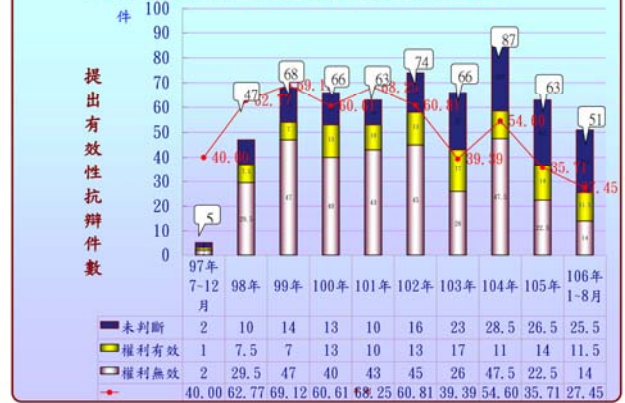
智慧財產法院民事第一審專利訴訟事件無效抗辯成立之比率

單位：件、%

年 月 別	判斷權利有效與否			判斷是否落入專利權範圍			權利無效比率	全部案件
	權利無效	權利有效	未判斷	落入	未落入	未判斷		
合計	316.5	105	168.5	96	181.5	312.5	53.64	384
97年7-12月	2	1	2	0	2	3	40.00	5
98年	29.5	7.5	10	4	13	30	62.77	47
99年	47	7	14	5	17	46	69.12	68
100年	40	13	13	12	14	40	60.61	66
101年	43	10	10	8.5	12.5	42	68.25	63
102年	45	13	16	13	16	45	60.81	74
103年	26	17	23	12.5	28.5	25	39.39	66
104年	47.5	11	28.5	15	27	45	54.60	87
105年	22.5	14	26.5	19	23	21	35.71	63
106年1-8月	14	11.5	25.5	7	28.5	15.5	27.45	51

45

智慧財產法院民事第一審專利訴訟事件無效抗辯成立之比率



46

智慧財產法院民事第二審專利訴訟事件無效抗辯成立之比率

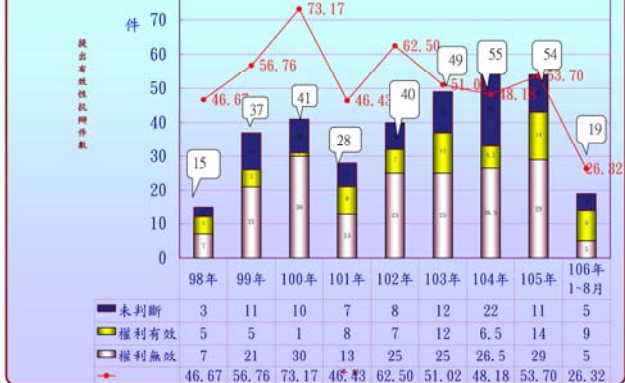
單位：件、%

年 月 別	合計	判斷權利有效與否			判斷是否落入專利權範圍			權利無效比率	全部案件
		權利無效	權利有效	未判斷	落入	未落入	未判斷		
合計	338	181.5	67.5	89	60.5	107.5	170	53.70	265
98年	15	7	5	3	3	5	7	46.67	15
99年	37	21	5	11	3	12	22	56.76	37
100年	41	30	1	10	0	11	30	73.17	41
101年	28	13	8	7	6	9	13	46.43	28
102年	40	25	7	8	5.5	9.5	25	62.50	40
103年	49	25	12	12	9	15	25	51.02	49
104年	55	26.5	6.5	22	12	18	25	48.18	55
105年	54	29	14	11	13	21	20	53.70	54
106年1-8月	19	5	9	5	9	7	3	26.32	19

47

智慧財產法院民事第二審專利訴訟事件無效抗辯成立之比率

(含民事一審已提出而二審仍繼續抗辯情形)



48

貳、植物品種民事侵權案例分享

- ◆智慧財產法院自成立以來共受理5件植物品種民事侵權訴訟案件
- 一件調解成立
- 二件當事人自行協商由原告撤回一審民事訴訟
- 二件目前審理中，一件在一審、一件在二審

49

貳、植物品種民事侵權案例分享

- 103年度民植訴字第1號茶葉品種民事侵權事件
- 103年度民植訴字第2號香蕉品種民事侵權事件
- 兩造當事人自行協商和解撤回訴訟結案。

50

貳、植物品種民事侵權案例分享

- 105年度民植訴字第2號蝴蝶蘭（朵麗蝶）品種侵權民事事件
- ➡經由法院調解委員調解成立，被告願意賠償新臺幣40萬元。
- 法院調解方式
 - ✓強制調解（民事訴訟法第403條規定）
 - ✓任意調解
 - ✓審判中移送調解
 - ✓審判兼調解

51

貳、植物品種民事侵權案例分享

- 目前審理中案件
- 105年度民植訴字第1號玫瑰花品種民事侵權事件
- 105年度民植上字第1號橘子品種民事侵權事件
- ➡要在相同時空背景、土壤、施肥及澆水方式等環境下，交由公正第三者培育約1年（有者須2年或更久），經開花結果，觀察四季變化，採取外觀比對法或基因定序比對法始能判斷是否侵害系爭品種權？！

52

貳、植物品種民事侵權案例分享

- 103年度民植訴字第2號香蕉品種民事侵權事件（兩造已自行和解撤回訴訟）
- 原告主張經農委會核准取得「◎◎」香蕉種苗植物品種權，提出「◎◎」之品種權證書為證，對被告甲公司及乙苗圃起訴
- ▶聲明：
 - ▶1. 被告應給付原告新台幣500萬元，及自起訴狀繕本送達翌日起按週年利率5%計算之利息，並被告甲不得再為「◎◎」之生產繁殖及被告乙苗圃不得為銷售、輸出入及持有品種之行為。
 - ▶2. 被告甲應將其持有及所繁殖之「◎◎」品種香蕉種苗銷毀。
 - ▶3. 訴訟費用由被告負擔。
 - ▶4. 願供擔保請准為假執行宣告。

53

貳、植物品種民事侵權案例分享

- 103年度民植訴字第2號香蕉品種民事侵權事件
- ▶調查結果：
 - 被告所種「◎◎」之組培蕉苗非原告苗圃所供應，而侵害原告之新品種權益，經調查發現係被告所屬之「○○苗圃」違法繁殖
- ▶原告將被告所繁殖之種苗送請○○大學、○○大學進行DNA分子親緣鑑定，認定被告已侵害原告之品種權
- ▶依植物品種及種苗法第40條請求損害賠償及排除侵害。

54

貳、植物品種民事侵權案例分享

➤103年度民聲字第23號聲請保全證據民事裁定(針對103年度民植訴字第2號香蕉品種民事侵權事件)

經法院裁定准就

- (一)相對人丙向相對人乙購買「◎◎」號組織培養苗種植於○○縣○○鄉○○農場(○○縣○○鄉○○號)內香蕉園區之香蕉品種植株採樣;
- (二)相對人乙之苗圃內現有之「◎◎」香蕉種苗採樣;
- (三)相對人甲公司位於○○縣○○鄉○○號實驗室內自相對人乙所取得「◎◎」之品種之組織培養苗採樣,並均送往○○大學以聲請人之「◎◎」與○○為對照組進行DNA分子親緣鑑定之方式予以保全。

55

貳、植物品種民事侵權案例分享

➤103年度民聲字第23號聲請保全證據民事裁定(針對103年度民植訴字第2號香蕉品種民事侵權事件)

經法院裁定准就

(四)

- 相對人乙持有自民國101年1月1日起迄今營運銷售之帳冊(包括書面及電子帳冊)、委託相對人甲公司以組織培養方法繁殖「◎◎」香蕉品種組織培養苗之委託資料及相關帳冊資料(包括書面及電子資料)
- 暨相對人乙所有帳號「...@...com.tw」之電子郵件信箱內,自民國101年1月1日起迄今與相對人甲公司間往來之電子郵件,
- 分別以儲存電磁紀錄於儲存媒體或抄錄、影印之方式予以保全。

56

貳、植物品種民事侵權案例分享

◆植物品種權侵害之保護(植物品種及種苗法第40條)

- 品種權人或專屬被授權人於品種權受侵害時,得請求排除其侵害,有侵害之虞者,得請求防止之。對因故意或過失侵害品種權者,並得請求損害賠償。
- 品種權人或專屬被授權人依前項規定為請求時,對於侵害品種權之物或從事侵害行為之原料或器具,得請求銷毀或為其他必要之處置。
- 育種者之姓名表示權受侵害時,得請求表示育種者之姓名或為其他回復名譽之必要處分。
- 本條所定之請求權,自請求權人知有行為及賠償義務人時起,二年內不行使而消滅;自行為時起,逾十年者亦同。

57

貳、植物品種民事侵權案例分享

◆民事訴訟審理中被告可抗辯原告之植物品種權有可撤銷或廢止之原因

➤植物品種及種苗法第37條

✓有下列情事之一者,中央主管機關應依申請或依職權撤銷品種權:

一、具品種權之品種,不符第十二條規定。二、品種權由無申請權之人取得。

✓有下列情事之一者,中央主管機關應依申請或依職權廢止品種權:

一、經取得權利後,該具品種權之品種,不再符合第十二條所定一致性或穩定性。二、品種權人未履行第三十三條規定之義務,而無正當理由。

三、品種權人未依第三十五條提出適當名稱,而無正當理由。

➤植物品種及種苗法第38條

✓任何人對品種權認有前條第一項或第二項規定之情事者,得附具理由及證據,向中央主管機關申請撤銷或廢止。但前條第一項第二款撤銷之申請人,以對該品種有申請權者為限。

✓依前條第一項撤銷品種權者,該品種權視為自始不存在。

58

貳、植物品種民事侵權案例分享

➤植物品種及種苗法第42條

關於品種權之民事訴訟,在品種權撤銷或廢止案確定前,得停止審判。

➤智慧財產案件審理法第16條

✓當事人主張或抗辯智慧財產權有應撤銷、廢止之原因者,法院應就其主張或抗辯有無理由為判斷,不適用民事訴訟法、行政訴訟法、商標法、專利法、植物品種及種苗法或其他法律有關停止訴訟程序之規定。

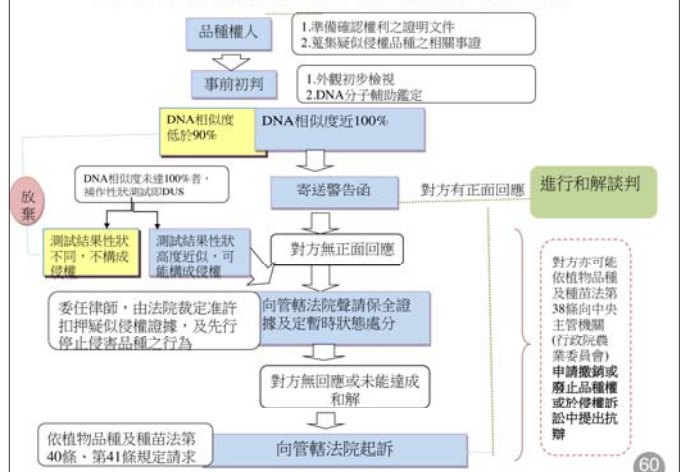
✓前項情形,法院認有撤銷、廢止之原因時,智慧財產權人於該民事訴訟中不得對於他造主張權利。

➤智慧財產案件審理法第16條

法院為判斷當事人依前條第一項所為之主張或抗辯,於必要時,得以裁定命智慧財產專責機關參加訴訟。

59

品種權人對於可能被侵害品種事件維護權利方式(建議稿)



60