

序

植物種苗產業在 1990 年代開始併購或重整，產生許多跨國種子公司，世界前十大蔬菜育種公司的市佔率已高達 85%，且在各主要市場也設立分公司，加上植物品種權及生技技術的專利，形成大者恆大的現象，在此高度競爭的市場如何保持國際競爭力便成為主要課題。

種子的品質是商業不可或缺的要件，本研討會邀請日本專家講述國際種子檢查規範，也請國內專家針對有機種苗及種子披衣技術進行論述。隨著穴盤育苗及種子精選的發展，專業育苗場扮演重要角色，為確保嫁接苗木及健康苗木的生產品質，種子種苗生產規範在國際間日受重視，例如歐盟自 2007 年起針對番茄細菌性潰瘍病制定相關的衛生草案，並自 2011 年起推動 GSPP 種苗認證，除可避免育苗過程受病害侵染，確保田間生產的品質，並可提升種苗競爭力。而育苗場除了田間衛生之確保外，嫁接苗的生產自動化也是不可或缺，針對上述主題邀請學界及業界專家介紹最近的發展。

種苗智財權除品種權外，生物技術專利也快速加入戰局，分子標誌輔助育種及品種鑑定已成為現代育種公司採用的育種技術，不僅大幅縮短育種年限，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。傳統的育種使用新工具也能促進育種效率，避免花期不一致或親本流失問題，花粉貯存技術也是產業競爭重點，本研討會也介紹辣椒花粉保存技術，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，為提升台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 104 年 11 月

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。近年來國內外對種苗之整體需求穩定成長，根據國際種子聯盟(International Seed Federation, ISF) 最新統計，2012 年全球種子貿易已達約 450 億美元，較 2008 年的 365 億元，四年間成長了 23%，而臺灣種子國際貿易約為 3 億美元，佔全球市場 0.7%，在國際貿易自由化後，種苗市場的流通管道更為暢通，臺灣種苗業者憑藉著品種優勢之掌握與優質種苗的生產技術，逐漸在國際上嶄露頭角的同時，面對全球化市場的競爭和國際貿易環境瞬息萬變的衝擊，未來該如何持續強化優勢，補強弱勢，提升種苗產業之競爭力，落實「亞太植物種苗中心」之願景，成為整體產業所關心的問題。

本會非常榮幸於今年度與行政院農業委員會臺南改良場、台灣種苗改進協會共同舉辦「種苗產業發展新趨勢研討會」，此次特別邀請日本獨立行政法人種苗管理中心佐藤仁敏博士和國內重量級專家、學者，前來分享當前種苗產業發展趨勢及未來展望，研討會第一節為分子技術輔助種苗產業之應用，第二節則著重種苗增值，第三節為優良種子產業操作，藉由介紹國際健康種子檢查規則、分子標誌應用、分子輔助育種、提升種苗附加價值、產業操作等單元，提供研究人員、學者及業界參考與利用，提升種苗競爭力，建立種苗產業新氣象。

中華種苗學會 理事長

楊作琦 謹誌

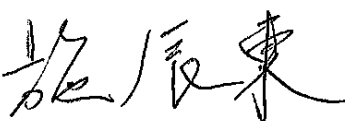
中華民國 104 年 11 月

序

隨著時代的演進，種苗產業由早期使用自交種子，進入到現在雜交種子的大量使用，其追求的核心目標是高產、更寬廣的環境耐受性如抗病、抗蟲，使各地農民有更好的收益。環繞這目標，以種苗產業價值鏈而言，在研發端追求的將是更快、更精準的開發出農民所需求品種。

傳統育種方式結合現在分子生物技術如分子標誌輔助育種等，將是有效縮短新品種研發時程的發展新趨勢。在種子繁殖面向，雜交種子以高品質、高附加價值為新發展趨勢。品種提供了高產及更寬廣的環境耐受性，而種子生產技術，如花粉保存、雄不育與種子披衣等技術結合新農機則提供了高純度、高發芽率、降低苗期管理成本與提高田間生長一致性，將可有效的提高農民收益。在生產消費端，可藉著這些新科技的應用，其需求可更快速地得到滿足。

在今天的研討會中，將勾勒出種苗產業未來的前景—快速有效的提供高產、高環境耐受性的高品質種子，以滿足消費市場。祝福研討會圓滿成功。

台灣種苗改進協會 理事長  謹誌

中華民國 104 年 11 月

International Seed Testing Association (ISTA) and Seed Health Testing Methods of ISTA

Masatoshi SATO

National Center for Seeds and Seedlings, Japan

Abstract

Seed is a basic material for agricultural products and is required to be of high quality in international active seed trading. The International Seed Testing Association called ISTA founded in 1924 produces internationally agreed rules for seed sampling and testing, accredits seed testing laboratories, and provides international seed analysis certificates to facilitate seed trading nationally and internationally and to also contribution to seed security.

ISTA

The vision of ISTA is ‘Uniformity in seed quality evaluation worldwide’. Currently its membership consists of 81 countries/distinct economies and 221 member laboratories around the world (August, 2015). 136 of the ISTA Member Laboratories are accredited by ISTA and entitled to issue ISTA International Seed Analysis Certificate. ISTA is managed and directed by an Executive Committee (ECOM), comprising of a President, Vice-President and 9 Members-at-large selected in the Annual Ordinary Meeting. The finances and administration of the association is managed by the ISTA Secretariat, Secretary General with 11 staff members, based in Switzerland. There are 17 Technical Committees (TCOMs) which are responsible for the development of new methodology for seed testing in ISTA called ‘ISTA International Rules for Seed Testing (ISTA Rules)’. TCOMs include Bulking and Sampling, Germination, Purity, Tetrazolium and Seed Health etc. and are made up of approximately 400 energetic members who work in seed testing laboratory, University, research institute or seed company. TCOMs organize Workshop to provide techniques to people involved in seed testing area, and also carry out Proficiency Test to evaluate laboratory’s performance.

ISTA Accreditation Programme

ISTA has a unique accreditation system specific to seed testing based on ISO/UEC 17025 Standard, called 'ISTA Accreditation Standard'. Laboratories which try to get ISTA accreditation should make a quality assurance system fulfilling the requirements of the ISTA Accreditation Standard and show evidence showing their technical performances. The laboratories accredited by ISTA are authorized to issue ISTA Certificate describing a result of testing which is carried out in accordance with ISTA Rules. In this programme, the accredited laboratory should have an on-site audit every 3 years. The ISTA Accreditation is recognized internationally, and the Certificate is used internationally as one of the indispensable documents for seed trading.

Seed Health Testing Methods in ISTA Rules

Seed Health Committee, one of the ISTA TCOMs, is responsible to establish seed health testing method, and there are 30 testing methods in ISTA Rules. In general, seed testing methods are required following characteristics such as 1) high specificity and sensitivity for pathogen, 2) simplicity and quick, 3) cost performance and 4) repeatability and reproducibility. General testing methods for fungi, bacteria and viruses are described as follows.

Blotter method is usually used as a practical test. Seeds are placed on moistened filter papers which are set in Petri dish, and kept in a certain temperature with alternating 12 hr periods of darkness and near ultraviolet light for optimal days. Fungal pathogen is identified morphologically with stereo-microscope. There are some modifications called freeze-blotter and 2,4-D blotter test.

In testing for bacteria pathogens, a combination of seed washing and semi-selective media is used. Seed sample is added into sterile solution and shaken, and the solution is plated on media and then examined on the sample plates for the presence of target bacterial colonies. For identification, pathogenicity test using young host plant is carried out. Identification by PCR method can be an option instead of pathogenicity test for some bacterial pathogens.

In testing for virus, ELISA method and Bioassay are used. ELISA method is the most sensitive within serological assay and can be applied to viruses in cucurbits and pea. Bioassay is performed by sap inoculation to indicator plant and is used for Tobamoviruses on tomato.

Information of ISTA

ISTA is seeking people who is interested in joining ISTA activities. We would like to invite all of you to visit following websites of ISTA.

- ISTA URL: <http://www.seedtest.org/en/home.html>
- ISTA Video: <http://adobe.ly/1RjH6gN>
- ISTA Seed Health Testing Methods:
http://seedtest.org/en/seed-health-methods-_content---1--1452.html
- Social network: Lined in

Keyword : ISTA, seed trade, accreditation, seed health test

分子標誌應用於蔬菜雜交種子純度之檢測

王昭月

行政院農業委員會農業試驗所

摘 要

一代雜交種子純度檢定，是商業種子生產中品質管控的重要工作。利用生育特性 (grow-out trials, GOTs； grow out test, GOT) 的檢查模式，為商業種苗業界進行純度分析，較常使用之方法。唯 GOT 方式容易受制於氣候環境，呈現較大變化與誤差。利用外觀生育特性的檢查方式，需要較大的時間、空間與栽培人力。近年來生物技術進步迅速，分子標誌成為遺傳分析重要工具，亦可輔助育種效率之提升。本文即闡明數個分子標誌應用於數種蔬菜作物的 F_1 雜交種子純度之鑑定。

關鍵詞：遺傳純度、分子標誌、 F_1 雜交種子

前 言

品種純度鑑定是種子生產流程中，品質管控的重要工作之一。國際間對於商業生產作經濟栽培用的種子品質規範，常參照『國際種子檢查協會』(International Seed Testing Association, ISTA) 所訂定的種子發芽活力檢定與純度鑑定等相關標準。而針對高單價的一代雜交種子 (F_1 種子)，除已具備的高生長勢、成熟期一致、優質、豐產以及抗病蟲等諸多優良特性外，對於其品種純潔度要求更嚴峻，檢測技術更需要快速、準確。一般業者多採用傳統 grow-out test (GOT) 方式，進行品種純度檢定，依據其外觀性狀之差異，鑑別其中混雜之異型株 (off-type)，取得 F_1 種子的遺傳純度。GOT檢測方式需要較大的栽培空間和人力，檢定時程較長，成本花費也相對較高；另季節或氣候環境限制，容易造成判讀困難或準確性不穩定。近三十年間，分子生物分析技術進步神速，已建立多種分子標誌包含蛋白質分子標誌與核酸層次的DNA分子標誌等。在農業上已應用分子標誌 (molecular markers) 作為品種鑑定、性狀遺傳分析之工具，或提供分子標誌輔助選種 (marker-assisted selection, MAS)之利用。本文另涵蓋台灣重要外銷採種作物-西瓜、花椰菜、番椒等作物，闡述DNA分子標誌鑑定技術應用於採種親本以及

F1雜交種子純度鑑定之進展，期提供業界進行自主性品種純度檢測之參考，以提升台灣蔬菜種苗產品之品質及國際市場之競爭力。

同功異構酶 (isozyme) 與種子純度鑑定

同功異構酶是蛋白質層次的特定分子，具有種間、不同生育期及組織部位的差異性，可作為與特定性狀相關聯的遺傳分析工具；或利用同功異構酶的多型性表現，作為標誌基因 (marker gene)，進行遺傳純度分析。Tanksley及 Jones (1981) 曾分析番茄種子的酒精脫氫酶 (Alcohol dehydrogenase, ADH)，利用ADH多型性酶譜 (polymorphic zymogram) 篩檢出番茄F₁之異型株，作為F₁種子純度檢定之用。Arus 等人 (1982) 自甘藍、青花菜、花椰菜等十字花科作物的種子(浸潤12小時)，進行磷葡萄糖酸酵素 (Phospho-glucomutase, PGM) 及磷酸葡萄糖異構酵素 (Phospho glucoisomerase, PGI) 分析，依據其酵素多型性圖譜，測得種子純度。王 (1995) 亦利用PGI同功異構酶的分子圖譜，作為番椒雜交種之鑑定。唯同功異構酶使用於親緣相近或性狀相似的作物栽培種之鑑定時，因遺傳歧異度 (genetic diversity) 較低，導致同功異構酶分析酶譜多型性不足，無法達到完全鑑別 (圖1、圖2) 的功效。另由於同功異構酶譜具有取樣組織(isozyme zymogram) 的差異性 (圖3)，影響異型株的判讀性，因此以同功異構酶譜多型性進行遺傳純度分析時，仍需配合其他外觀性狀，或以穩定性較高的DNA層次之分子標誌輔助判別，提升品種間的鑑別能力。

DNA 層次之分子標誌

Kary Mullis 於 1983 年提出的聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術，以微量樣品之 DNA 進行大量擴增，藉由 PCR 技術使一段基因得以複製成為原來的一百億至一千億倍，提供進行各樣基因分析之利用，因此獲得 1993 年諾貝爾化學獎之殊榮。DNA 層次的分子生物技術，因應人類基因組解序後時代，新反應儀器的快速開發、更新，性能升級與解析能力等效能不斷提升，配合生物資訊的處理能力與日俱增，已廣泛作為各種生物的指紋分析，或後裔族群的特定遺傳研究之工具。農業上，較常作為遺傳分析或品種鑑定的 DNA 分子標誌技術包含：隨機擴增多型性核酸 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析技術、微衛星標誌 (microsatellite markers) 分析、單核苷酸多型性標誌 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 等。



圖1. 番椒(*Capsicum* spp.)雜交親本系(A), 及其F₁ (B)的果實外觀性狀。

【圖示：1:*C. annuum* (P859), 2:*C. annuum* (P1717), 3:*C. annuum* (P852), 4:*C. annuum* (P1657), 5: *C. annuum* (P1740), 6:*C. annuum* (P1514), 7:*C. chinense* (P1697), 8:*C. annuum* (P709).】

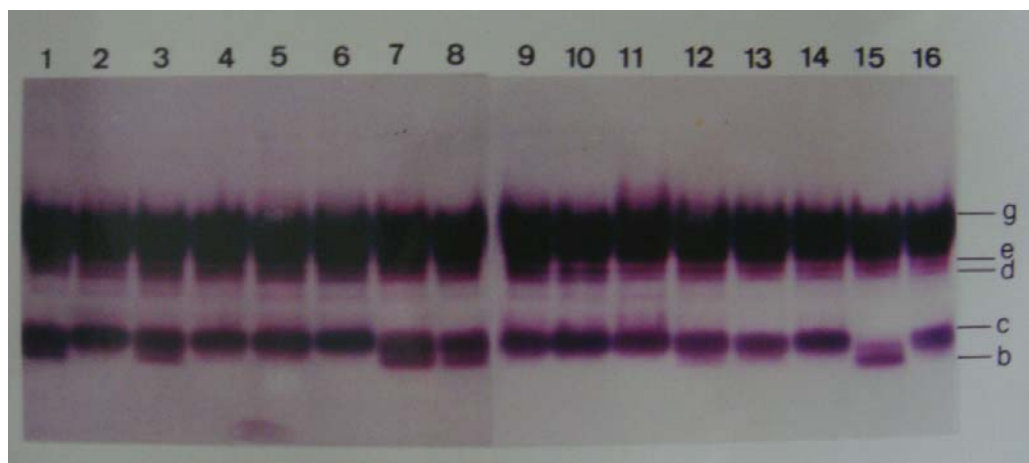


圖2. 甜椒品系(*C. annuum*) 及 F₁的PGI同功異構酵素圖譜。

【圖示：1~16分別為；1: P859(圖一 1); 2: P1717(圖一 2); 3: P852(圖一 3); 4: P1675(圖一 4); 5: P1717 x P852(圖一 2x3); 6: P1717 x P1657(圖一 2x4); 7: P1717 x P1740(圖一 2x5); 8: P1657 x P852(圖一 4x3); 9: P1740(圖一 5); 10: P859(圖一 1); 11: P852(圖一 3); 12: P1675(圖一 4); 13: P1740 x P859(圖一 5x1); 14: P1740 x P852(圖一 5x3); 15: P1740 x P1657(圖一 5x4); 16: P852 x 859(圖一 3x1)。

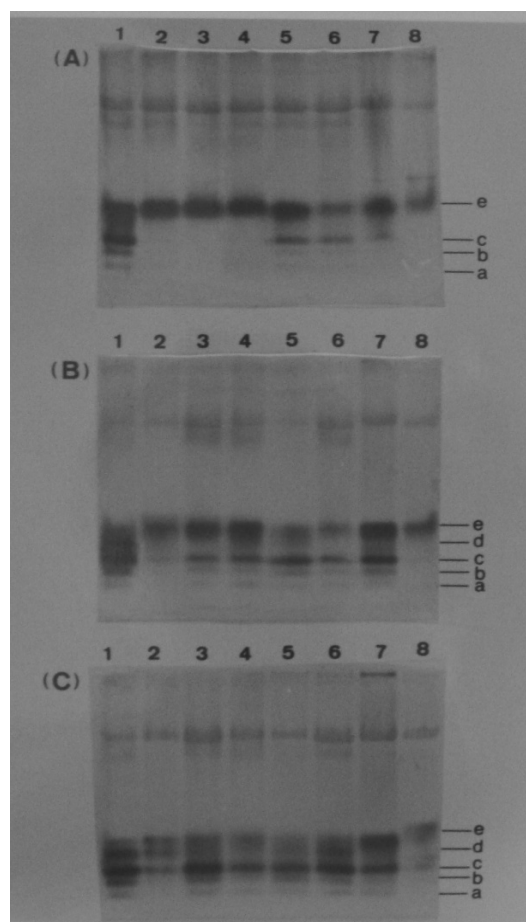


圖3. 甜椒品系(*C. annuum*)之上、中、及下位葉的PRX同功異構酵素圖譜。

【圖示：A, B, C, 分別為上、中、下位葉的分析樣品；1:*C. annuum* (P859), 2:*C. annuum* (P1717), 3:*C. annuum* (P852), 4:*C. annuum* (P1657), 5: *C. annuum* (P1740), 6:*C. annuum* (P1514), 7:*C. chinense* (P1697), 8:*C. annuum* (P709).】

一、隨機擴增多型性核酸 (RAPD) 分子標誌應用於種苗純度之檢測

1990年William開發操作簡單的『隨意引子聚合酵素連鎖反應 (arbitrary primer polymerase chain reaction, AP - PCR)』，使用的引子稱隨機引子(random primer)，為10個核苷酸序列，後通稱此分析技術為隨機擴增多型性核酸 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)，適用於基因組尚未完成解序的各種生物，方便於基因組分析，可節省人、物力成本。RAPD技術門檻低，是作物初建立分子標誌的基礎模式，Crockett等人 (2000) 曾應用RAPD分析進行甘藍F₁種子純度檢定，直接用於未發芽處理的單粒種子之純度分析，兼具簡便性與準確性。Ilbi (2003) 也以RAPD標誌作為番椒雜交種子純度之鑑定。Liu等人 (2007) 則應用RAPD標誌作為番茄雜交種子純度檢測之用。

二、微衛星標誌應用於品種純度之檢測

核酸層次的微衛星標誌 (microsatellite markers) 是與RAPD同期發展的PCR技術之一。微衛星DNA研究可追溯至Tautz等人 (1984) 發現真核生物的基因組上存在1~6個核苷酸的短序列重覆 (short tandem repeat)；近代學者Condit與Hubbell (1991) 在植物的基因

組，也發現這種豐富的簡單序列重複 (simple sequence repeat, SSR)· Lagercrantz 等人 (1993) 通稱這些短序列重複為微衛星DNA (microsatellite DNA)。迄今，microsatellite markers 廣泛應用於 (1) 建構重要作物基因組圖譜，如 McCouch 等人 (2002) 以此建立的水稻基因組連鎖圖譜 (genetic linkage map)；Yi 等人 (2006) 以 SSR 標誌建構番椒基因組連鎖圖譜等。(2) 應用於輔助作物選種，配合特定性狀或複雜的數量性狀之育種選拔需求，如 Neeraja 等人 (2007) 利用 SSR 標誌輔助育成耐淹水的水稻新品種。(3) 作物遺傳歧異度分析或親緣分析；如 Zhang 等人 (2002) 利用 SSR 標誌等進行獼猴桃的多倍體雜交種鑑定。(4) 提供栽培種或雜交品種鑑定，如 Louarn 等人 (2007) 以 microsatellite markers 進行甘藍栽培種鑑定。另 Ida 等人 (2008) 應用 microsatellite markers 進行花椰菜 F₁ 種子純度檢定，篩檢採種上因為自交不親合 (self-incompability, SI) 恢復，而產生的姊妹交 (sib) 或自交種子 (selfed seed) 污染。

由於利用 SSR-PCR 技術在引子設計上，具有較嚴格的作物專屬性，需要事先取得同物種的核酸序列以搜尋其 SSR motif，對於非國際性的經濟作物或少數新興作物，無法快速獲得鑑定用 SSR 標誌。Zietkiewicz 等人 (1994) 提出 SSR-anchored PCR 技術，此方式是利用真核生物基因組中出現頻度較高且具有保守性 SSR 重複序列 (一般為 2 至 5 個重複性核苷酸序列)，於 5' 或 3' 端加上一至三個隨機性寡核苷酸序列，這種分析引子長度約 20 個核苷酸，經 PCR 反應可擴增出基因組上 SSR 區域鄰近的 DNA 片段，其產物也具有高度多型性，可提供種間或不同物種之識別。1995 年 Kantety 等人特稱此為簡單序列重複間 (inter-simple-sequence-repeat, ISSR) 分析，進一步利用 ISSR-PCR 擴增的多型性標誌，作為玉米遺傳歧異度之分析。因為 ISSR-PCR 不需事先取得或建立專屬作物的核酸資料庫，即可進行作物遺傳分析或品種純度鑑定；加上 ISSR 引子長度大於 RAPD 引子，反應溫度與反應嚴格性也相對高於 RAPD 分析，不失為一種快速有效鑑定的理想工具。Leroy 等人 (2001) 亦應用 ISSR-PCR 分析作為花椰菜組織培養變異株之鑑定。

三、單核苷酸多型性標誌應用於品種純度之檢測

單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 是指基因組 DNA 序列中由於單個核苷酸 (A, T, C, G) 的替換而引起的多型性，依據 SNP 在基因組分布的位置可區分 (一) 基因編碼區 (coding region) 的單鹼基變異，簡稱 cSNP；(二) 非編碼區的單鹼基變異，又分為基因周邊的 pSNP (peripheral SNP) 和基因間的 iSNP (intronic SNP)。一般 cSNPs 的數量較少，但以此進行遺傳分析或品種鑑定，具有較大意義。同義 cSNPs (synonymous cSNPs) 發生之單鹼基變異不致影響轉譯的氨基酸序列，但非同義 cSNPs (non-synonymous cSNPs) 的單鹼基變異則影響轉譯之氨基酸序列，進而產生蛋白質序列改變，影響蛋白質功能，更適合用以

篩檢性狀相關之分子標誌。SNP 在生物基因組分布廣泛，依種類差異平均發生頻度約為每 50~300 鹼基對 (bp) 出現一個 SNP，可提供的標誌數量巨大，因此被譽為新一代分子標誌 (Lander 1996) 或稱為第三代分子標誌。隨著基因組定序技術、微陣晶片(microarray) 等技術快速發展和開發，結合高通量定序儀器與生物資訊處理能力，促使 SNP 的應用已達到基因組選種 (genomic selection) 目標。唯應用次世代定序 (next generation sequencing)的 SNP 分析，常需要搭配昂貴精密儀器與生物資訊處理技術，始發揮最大效用。

對一般種苗業界或育種者而言，仍期望以較簡便且準確的方式，進行遺傳純度的 SNP 分析。學者 Jarvis 等人 (1994) 曾提出共顯性 (co-dominant) 分子標誌-切割擴增多型性序列 (cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS) 分析技術，用以建構性狀相關的遺傳連鎖圖譜，亦稱為 PCR-RFLP。CAPS 是特定引子的 PCR 產物結合限制性內切酶的分析技術，可偵測特定 SNP 的多型性。CAPS 標誌操作設備較為簡單，分析結果再現性穩定，容易判讀，適合特定性狀的遺傳分析或品種鑑定等目標。Inoue 與 Nishio (2004) 曾利用 EST-CAPS 標誌，作為青花菜 F₁ 種子純度檢定之用。伴隨著解序作物種類與日俱增，利用基因組內特定基因的 SNP 多型性表現，設計檢測用 CAPS 標誌，可便於不同作物品種鑑定之利用。

DNA 分子標誌在台灣蔬菜雜交種純度檢測之應用

台灣外銷一代雜交蔬菜種子生產種類以 (1) 葫蘆科作物-西瓜、甜瓜 (2) 茄科作物-番茄、番椒 (3) 十字花科蔬菜-花椰菜等為最大宗，其中又以西瓜和花椰菜的出口種子數量暨產值較高，目前國內多數業者仍沿用傳統的 grow-out test 進行 F₁ 種子純度檢測。唯國內學術單位與公家試驗場所，已依照不同物種的需求差異，開發出多種 DNA 分子標誌，提供快速篩檢種苗所具有的特性狀 (如抗病毒病、花性等) 或作為遺傳純度檢定之利用。配合高品質、高價 F₁ 採種外銷市場，部份的 DNA 標誌技術業已技術轉移給國內相關種苗公司或業界，實際應用於品種純度檢定之品質管控工作。

一、RAPD 標誌應用於番椒及西瓜雜交種子純度檢測

針對番椒 (甜椒和辣椒) 種原歧異度分析，自 580 個 RAPD 隨機引子篩選出 17 個 RAPD 分子標誌，具種間多型性表現且易於判讀者，建立品種鑑定用核心標誌；後進一步應用於番椒商業雜交種子純度之檢測 (圖 4)。另針對農業試驗所

育成的西瓜品種：台農六號（2003年）、台農七號（2004年），涵蓋育種親本與對照經濟品種利用 RAPD 分子標誌分析，獲得 24 個多型性 RAPD 標誌，可用於栽培種之鑑別（圖 5）。唯 RAPD 標誌利用於品種檢測，要特別注意穩定性與再現性問題，需透過大量引子（至少 200 個以上）篩選，取得其中解析度與再現性較高的多型性標誌，始適用於雜交種或 F₁ 純度之檢測。另依據不同品種，宜篩選 3~5 個或以上易於判讀之標誌，進行交互比對，可增加其分析之準確性。

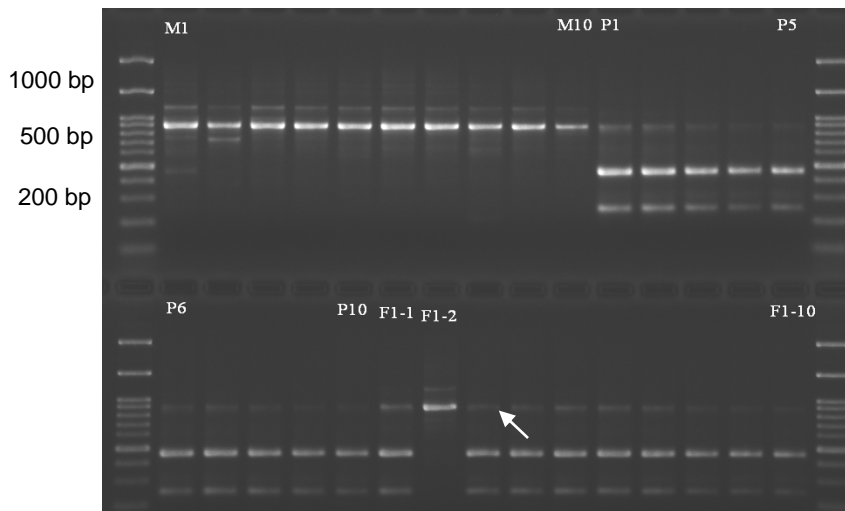


圖4. RAPD標誌 (OPAG14-250) 應用於彩色甜椒 (360)的 F₁種子純度鑑定之電泳圖譜。【圖示：樣品編號M1~10為雜交組合360的母本；P1~10為雜交組合的父本；F₁-1~10為待測樣品；箭頭顯示為混雜的異型株。】

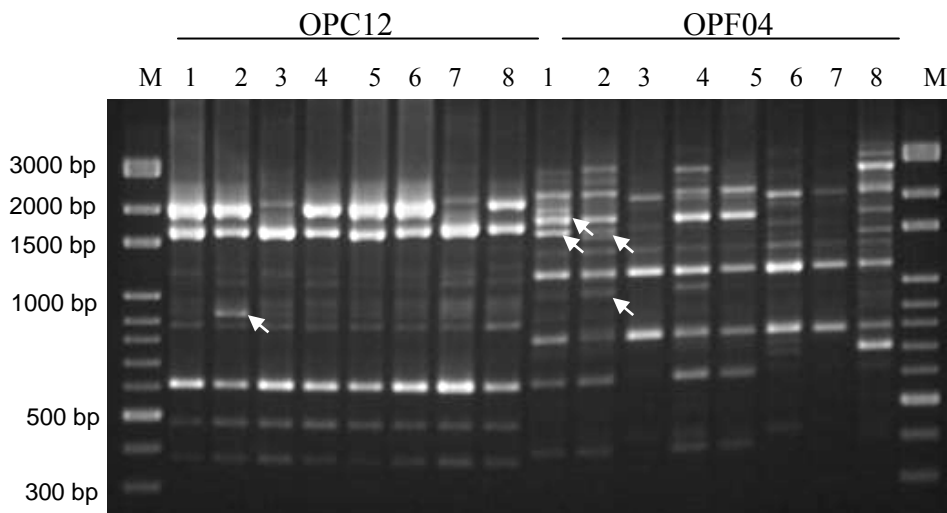


圖5. RAPD標誌 (OPC12與OPE04) 應用於西瓜臺農6號、台農7號雜交種鑑定之電泳圖譜。【圖示：樣品編號1、2分別為雜交種臺農6號、臺農7號；3、5分別為雜交種臺農6號、臺農7號的母本；4為父本；6、7、8分別為雜交種臺農6號、臺農7號的對照品種；箭頭顯示為鑑定用DNA標誌片段。】

二、SSR 標誌應用於番椒 F₁ 種子純度檢測

番椒 (*Capsicum*) 為一或多年生果菜作物，是茄科四大蔬菜作物之一，栽培面積僅次於馬鈴薯和番茄。依據 2010 年 FAO 生產年報統計，全世界番椒栽培面積為 185 萬公頃，亞洲地區約占總生產面積 60% 以上。番椒依據辣味有無區分為甜椒和辣椒兩類；甜椒 (*Capsicum annuum*) 中的彩色甜椒富含花青素與胡蘿蔔素等，是高營養、高產值的蔬菜新寵。目前彩椒商業品種幾乎全為一代雜交種，並以亞洲地區為重要採種據點。番椒為高單價採種作物，F₁ 種子售價偏高 (約台幣 10 元/籽)，商業生產雜交種子多利用雄不稔親本或以人工去雄後進行雜交授粉，唯其雜交種子純度須達 98% 以上。鑑於雄不稔基因的不穩定性或人工去雄未盡完全，時而導致採種純度之下降；故進行其雜交種之遺傳純度檢定，避免母本自交種子的污染，也成為 F₁ 種子生產上必要之品管工作。筆者自 1993 年迄今，以番椒核心種原 100 個以上，包含不同來源國家，不同果形、果色、高適應、耐熱等多種性狀，建立 150 個以上的 DNA 多型性分子標誌 (SSR、ISSR、RAPD markers)，其中以 SSR 及 ISSR 兩種微衛星標誌之數量較多。配合國內採種業界需求，取得栽培種間具有多型性的 SSR 引子組，進一步利用於商業雜交種子純度之檢測 (圖 6、圖 7)。

三、SSR 標誌應用於西瓜一代雜交種之檢測

西瓜適合溫暖氣候生長，1956 年農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所，即育成大西瓜 '富光'、無子西瓜 '鳳山一號' 等優良品種。而 1968 年農友種苗公司成立，迄今四十五年間已育成六十餘種馳名中外的西瓜品種，包含國內常見的紅肉小西瓜 (如：'黑美人'、'秀鈴' 等)，黃肉中小型西瓜 (如：'金蘭'、'特小鳳' 等)，其中 '金蘭' 與 '寶冠' 兩品種都曾獲得美國園藝品種比賽優勝獎。農業試驗所也於 2003 年與 2004 年，相繼推出兩個西瓜品種：'台農六號-紅蜜'、'台農七號-小甜甜'。目前台灣的西瓜育種技術和優良品種，仍稱冠於國際，列為台灣外銷 F₁ 種子的第一大經濟作物。

鑑於西瓜 F₁ 採種外銷的種子純度檢測需求，農試所開發 EST-SSR 分子標誌，輔助品種純度之檢定，建立核心 SSR 標誌 20 組以上，作為種子純度檢測之利用。另為簡化種苗純度分析流程，免去 DNA 萃取手續，建立以發芽幼苗 (7 天) 的微量子葉 (20mg) 進行 SSR-PCR 分析技術，加速量化之鑑定效率 (圖 8)。

「西瓜 F₁ 種子微衛星標誌純度鑑定技術」業於 2010 年技術轉移國內 1 家採種業者，提供 F₁ 種子純度檢測之應用。又利用此共顯性分子標誌的特質，進一步測試其他種苗業者之材料，結果顯示核心 SSR 標誌也適用於其他採種親本的遺傳同質性 (純度) 監測，以及其 F₁ 雜交種之檢定。(圖 9)

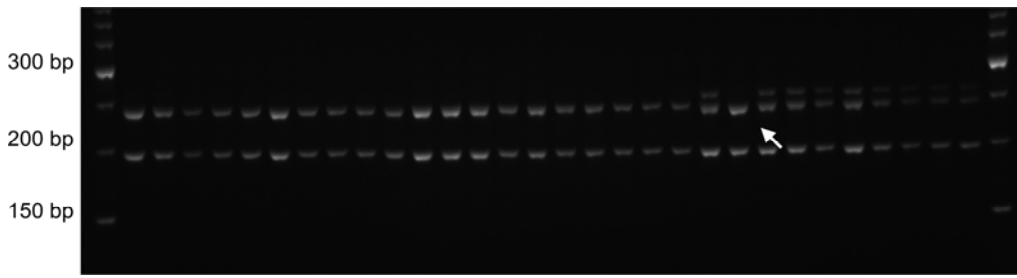


圖6. SSR標誌應用於彩色甜椒 (360) 的F₁種子純度鑑定之電泳圖譜。
 【圖示：樣品序號1~10為雜交組合360之母本；11~20為雜交組合之父本；21~30為待測的F₁樣品。黃色箭頭顯示為混雜的異型株，即第22個樣品。】

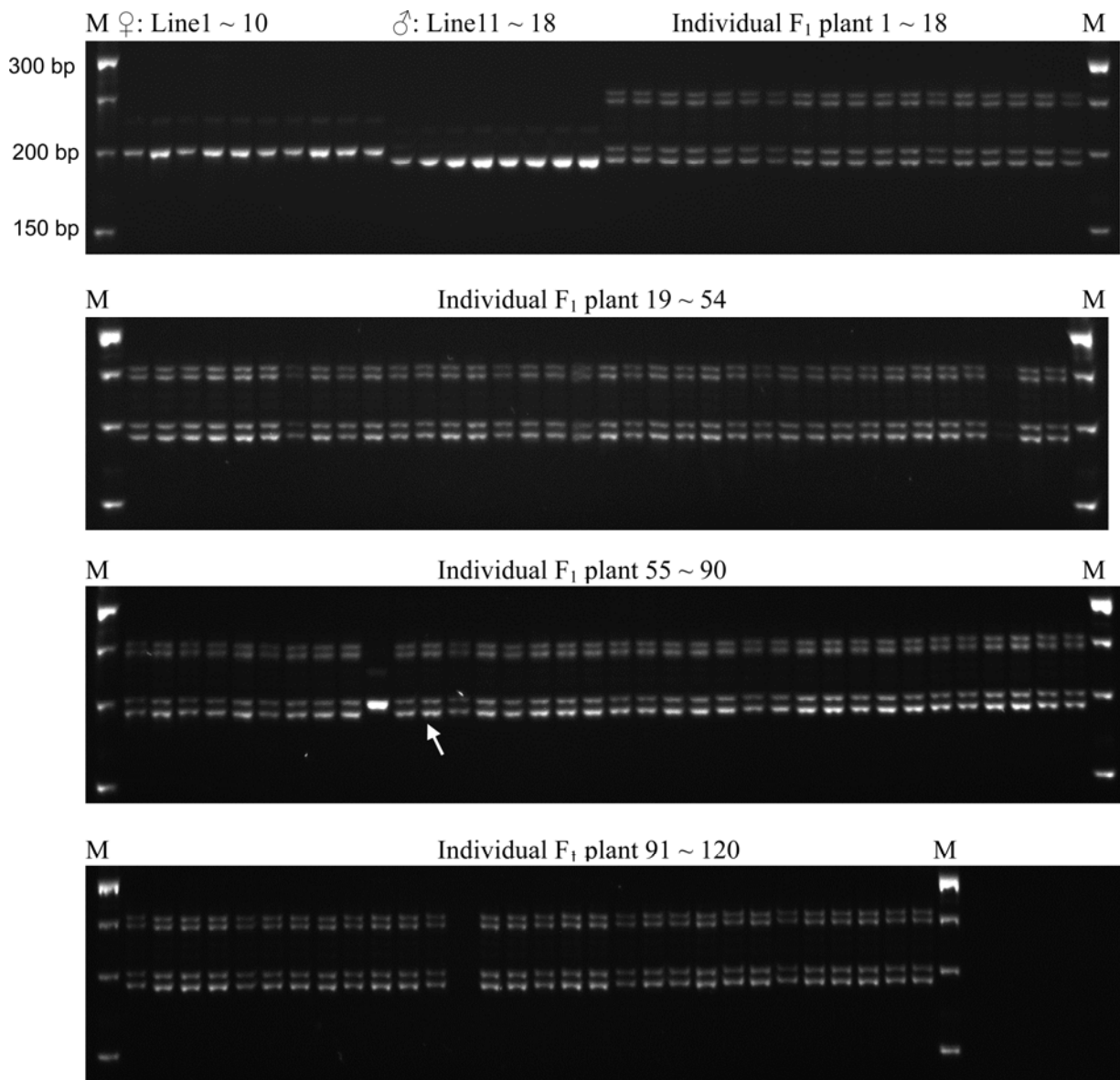


圖7. 利用 SSR 標誌 (AVRDC-PP83) 進行番椒‘No. 5’的雜交種子純度之檢測
 【圖示：樣品序號1~10為雜交種‘No. 5’之母本(♀)；11~18為雜交種之父本(♂)；待測計120個F₁樣品。黃色箭頭顯示為混雜的異型株，即第64個F₁樣品。】

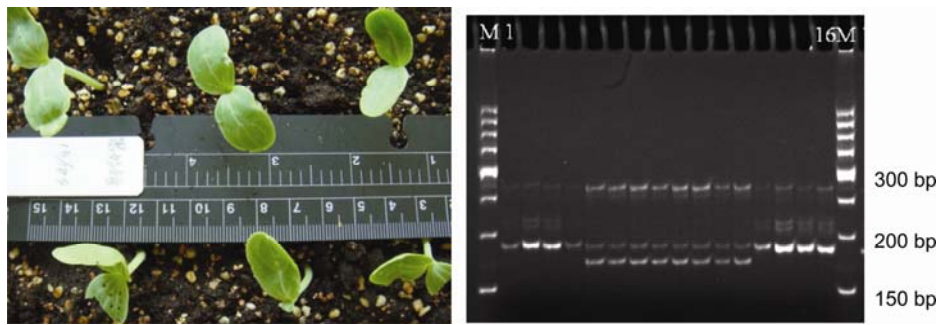


圖8. SSR標誌應用於西瓜雜交種之鑑定。【圖示：左圖為播種7天的西瓜發芽苗，切取1~20mg子葉免DNA萃取純化，可進行PCR分析；右圖為雜交品種經SSR-PCR分析結果的電泳圖譜；1~4金蘭, 5~8黑姑娘, 9~12農友抗病610, 13~16國光；引子: WMM330。】

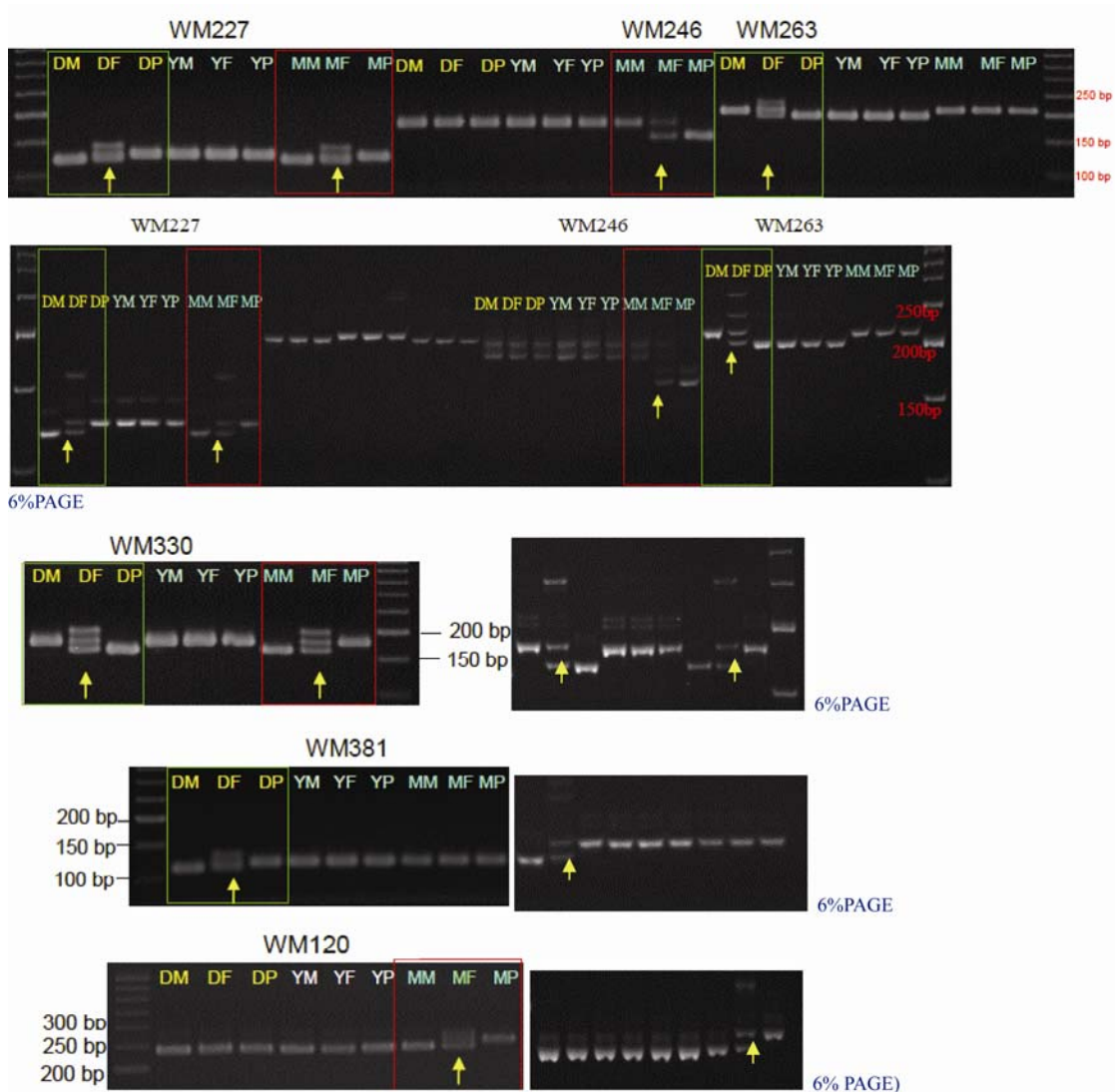


圖 9. 3 個西瓜雜交種和相關的親本分別以 6 個 SSR 標誌分析之圖譜。

【圖示：樣品DF; YF; MF為雜交種，DM, DP; YM, YP; MM, MP分別為雜交種採種用母本、父本品系。電泳膠體分別為3% Metaphor Agarose或6% (polyacrylamide gel electrophoresis, 簡稱PAGE)。6個高訊息SSR引子組分別為WM227, WM246, WM263, WM330, WM381, and WM120】

四、CAPS 標誌應用於花椰菜 F₁ 種子純度之檢測

花椰菜是世界性蔬菜，也是台灣具國際競爭力的採種作物之一，民間業者育種材料豐富，針對全球周年栽培之需求，區分有早、中、晚生不同品種，多數兼具有耐逆境特性（如：耐熱、耐寒、耐濕等），成為目前外銷一代雜交種的採種主力之一，估計年產值約新台幣 3 億元。出口的花椰菜一代雜交種子，因全球性極端氣候之影響，難免增加自交種子混雜的風險，因此出貨前的純度檢測甚為重要，並需於最短時效內，完成精確之純度檢定。據市場資訊，純度較高的種子售價也相對倍增；如雜交種子純度達 95%~98% 以上者，相較於一般 (90%) 約可提高 1.5~3 倍的售價。

鑑於高經濟價值的花椰菜採種需求，農業試驗所利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 十字花科核酸 ESTs (expressed sequence tags) 資料庫設計專一性引子，進行 EST-CAPS 分析，篩選雜交種與親本間之 co-dominant 分子標誌，作為 F₁ 品種純度檢定之依據。配合簡化純度分析流程，另建立花椰菜單粒種子 (3mg) 或播種 3~4 天的幼苗 (20mg) 微量 DNA 萃取技術 (圖 10)。優化的 CAPS-PCR 分析流程，可在 2 週內準確地完成種子純度檢測工作 (圖 11)。依據大量測試結果，此 3 組 CAPS 標誌，可適用於 15 個以上雜交品種之種子純度檢定。本技術業已轉移國內 2 家蔬菜採種業者，提供花椰菜 F₁ 種子純度檢測之利用，有助於縮短檢定時程，因應業界自主性的品管之需。

結 論

以 DNA 分子標誌進行遺傳鑑定具有多種優勢：(1) 不受季節、環境限制或發育時期之影響，判讀結果具穩定性；(2) 分子標誌數量豐富，可同時進行多標誌的交叉比對，以增加其精確性；(3) 針對共顯性分子標誌 (co-dominance marker)，可用於鑑別同質基因型或異質基因型，特別適合用在雜交種子或親本純度之鑑定，免除 GOT 檢定法的耗時、空間需求大，因環境影響而增加異品種判讀誤差等缺失。以 DNA 分子標誌 (RAPD、SSR、ISSR 以及 SNP 等) 檢定時間僅需 1~2 週，相較傳統 1 至 3 個月的 GOT 方式，可節省人、物力成本。另 DNA 分子標誌分析的檢測樣品，可用於種子或發芽苗在早期進行檢測，取樣大小亦僅需 5-20 mg，對植物損傷很小；採樣的苗株亦可以繼續進行 GOT 的對照檢查，兼具有快速、精確之雙重目的。

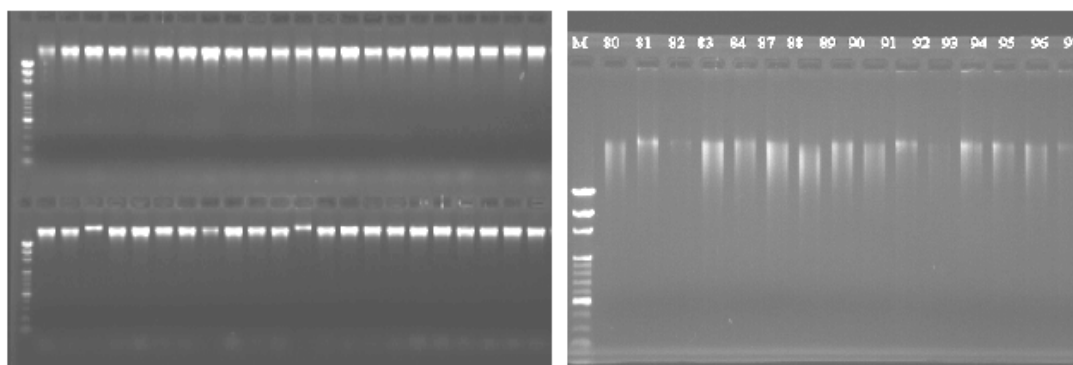


圖 10. 花椰菜商業 F₁ 種(WS)利用單粒種子 (約 3mg, 右圖) 或播種 3 天發芽苗的子葉 (約 20mg, 左圖), 萃取之 DNA 電泳圖。

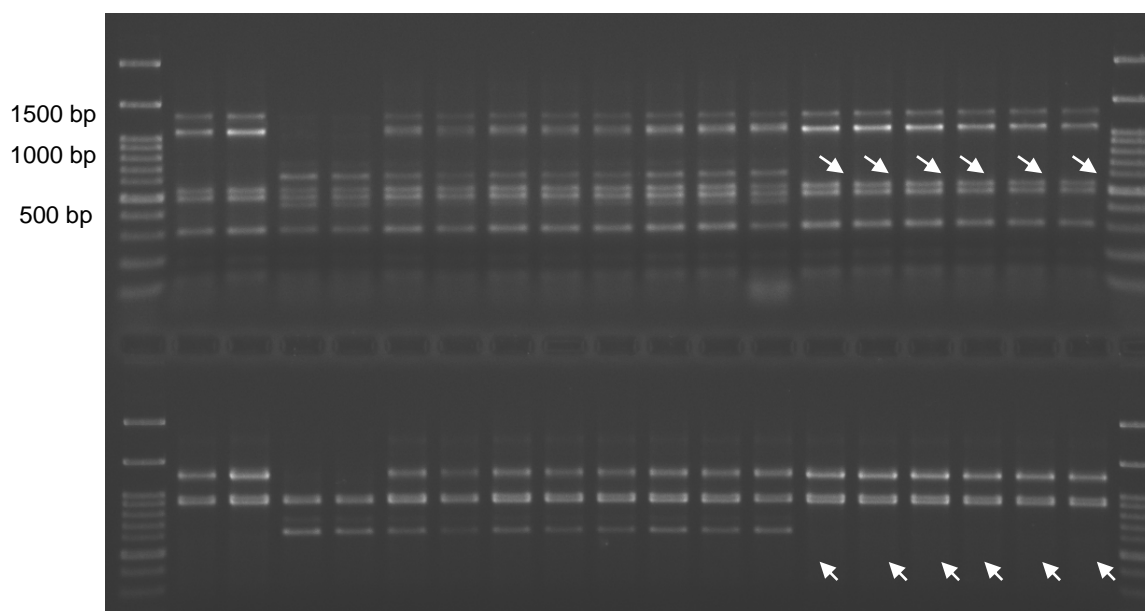


圖 11、CAPS 標誌應用於花椰菜商業 F₁ 種子及其親本純度鑑定之電泳圖譜 (上圖 CAPS 標誌為 C440- *DpnII*; 下圖為 C440- *BclI*)。

【圖示：樣品序號 1~2 為雜交種 WS 的母本；3~4 為雜交種 WS 的父本；5~12 為正確的 F₁ 樣品；13~18 為檢測出異型株。箭頭顯示為檢測出異型株的 CAPS 標誌片段之位置。】

參考文獻

1. 王昭月。1995。同功異構酵素與逢機增質多型性 DNA 標誌在番椒品種鑑別之研究。國立中興大學園藝系碩士論文。
2. Arus, P., S. D. Tanksley, T. J. Orton, and R. A. Jones. 1982. *Electrophoretic variation as a tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of Brassica oleracea*. *Euphytica* 31: 417-428.

3. Condit, R. and S. P. Hubbel. 1991. *Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes*. *Genome* 34: 66-71.
4. Crockett, P. A., P. L. Bhalla, C. K. Lee, and M. B. Singh. 2000. *RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar*. *Genome* 43: 317-321.
5. Ida, A. A., J. A. Plummer, R. A. Lancaster, and G. Yan. 2008. *Identification of 'Sib' plants in hybrid cauliflowers using microsatellite markers*. *Euphytica* 164: 309-316.
6. Ilbi, H. 2003. *RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum**. *Sci. Hort.* 97: 211-218.
7. Inoue, H., and T. Nishio. 2004. *Efficiency of PCR-RF-SSCP marker production in *Brassica oleracea* using *Brassica* EST sequences*. *Euphytica* 137: 233-242.
8. Jarvis P., C. Lister, V. Szaba, and C. Dean. 1994. *Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombination inbred lines of *Arabidopsis thaliana**. *Plant Mol. Biol.* 24:685-687.
9. Kantety R.V., X. J. Zeng, L. Bennetzen, and B. E. Zehr. 1995. *Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification*. *Mol. Breed.* 1: 365-373.
10. Lagercrantz, U., H. Ellegren, and L. Andersson. 1993. *The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plant and vertebrates*. *Nucleic Acids Res.* 21: 1111-1115.
11. Lander, E. S. 1996. *The new genomics: global views of biology*. *Science* 274: 536-539.
12. Leory, X. J., K. Leon, J. M. Hily, and P. Chaumeil. 2001. *Detection of in vitro culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis*. *Theor Appl. Genet.* 102: 885-891.
13. Liu, L. W., Y. Wang, Y. Q. Gong, T. M. Zhao, G. Liu, X. Y. Li, and F. M. Yu. 2007. *Assessment of genetic purity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) hybrid using molecular markers*. *Sci. Hort.* 115: 7-12.
14. Louarn, S., A. A. Torp, I. B. Holme, S. B. Andersen, and B. D. Jensen. 2007. *Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea**. *Genet Resour Crop Evol* 54: 1717-1725.
15. McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G.

- DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and L. Stein. 2002. *Development and Mapping of 2240 new SSR markers for rice (Oryza sativa L.)* DNA Research 9: 199-207.
16. Neeraja C. N., R. Maghirang-Rodriguez, A. Pamplona, S. Heuer, B. C. Collard, E. M. Septiningsih, G. Vergara, D. Sanchez, K. Xu, A. M. Ismail, D. J. Mackill. 2007. *A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars.* Theor Appl Genet 115: 767–776
17. Tautz, D. and M. Renz. 1984. *Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes.* Nucleic Acids Res. 12: 4127-4138.
18. Tanksley, S. D. and R. A. Jones. 198. *Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F₁ hybrid of tomato.* HortScience 16: 179-181.
19. Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.* Nucleic Acid Res. 18: 6531-6535.
20. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. *Genome fingerprinting simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification.* Genomics 20:176-183.
21. Yi, G., J. M. Lee, S. Lee, D. Choi, and Byung-Dong Kim. 2006. *Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map.* Theor. Appl. Genet. 114: 113-130.
22. Zhang, L., Z. Li, Y. Wang, Z. Jiang, S. Wang, and H. Huang. 2010. *Vitamin C, flower color and ploidy variation of hybrids from a ploidy-unbalanced Actinidia interspecific cross and SSR characterization.* Euphytica 175: 133–143.

分子輔助抗病育種

古新梅、王肇芬

國立中興大學農藝系、亞蔬-世界蔬菜中心

摘 要

長久以來病原菌危害一直是威脅作物產量與品質的重要因子之一，抗病育種提供更環保的方式防治病害。近二十年來分子標誌與基因圖譜的建立，使許多作物之抗病基因座得以定位在染色體上，進一步促進分子標誌輔助選拔(marker-assisted selection, MAS)的發展，使抗病育種更有效率。本篇主要介紹抗病 MAS 及其分子標誌的來源，並進一步以番茄為例子探討抗病 MAS 實際應用的情況與所面臨之挑戰。因為基因體解序日益普遍，未來在高通量分子標誌開發以及對作物基因體分析更方便快速之下，期能提高 MAS 在抗病育種的成效。

關鍵詞：抗病育種、分子標誌輔助選拔(MAS)、番茄病害、分子標誌、數量性狀基因座(QTL)

前 言

農業生產中真菌細菌病毒線蟲等害蟲造成的病害，不僅是作物產量主要限制因子，對作物品質的傷害更造成農民巨大損失，早期化學藥劑防治策略雖能控制病害發生但造成環境污染與農藥殘餘問題日益受到重視。以符合生態環保需求的抗性品種需求更為殷切，因此作物抗病育種在農業中扮演十分重要角色。

一般而言栽培品種容易受病害威脅，而野生種原被證明是提供作物抗性最佳來源(Tanksley and McCouch, 1997)，傳統育種以引種、雜交及回交育種等將不同野生種上帶有的抗性基因的染色體片段導入現有的栽培品種而育成許多抗病品種，這樣的傳統育種方式主要依賴表現型(phenotype)來進行育種選拔，而病害的檢測又較一般園藝性狀更為繁瑣及難以掌握。首先需要有經驗的植病專家確定造成當地病害的病原菌種類，確定病原菌後，抗病育種過程需進行族群中每個單株抗病性的檢測，這些過程需要在特定環境下進行，工作龐雜繁瑣，大量族群篩選過程需要單株接種手續十分麻煩且費時費力，往往需要數年到十幾年時間。此外，不同作物不同病原菌均有其特性，往往需要有經驗人員才能正確評估病害的

等級，因此傳統抗病育種是十分耗時費力的過程。近年來分子標誌及基因定位技術的發展，抗性相關的分子標誌的建立讓分子標誌補助選拔(marker-assisted selection, MAS)漸漸取代傳統方式來進行抗病育種。因為水稻是單子葉模式植物也是重要糧食作物之一，因此目前抗病 MAS 相關的報告多以禾本科作物最多，雙子葉作物則以茄科、豆科和十字花科等較多。本篇報告目的在於介紹抗病 MAS 及其使用之分子標誌，並以番茄為例介紹抗病 MAS 的應用情況。

MAS 的原理

作物分子育種的定義為利用分子技術尤其是分子標誌結合作物的連鎖圖譜(linkage map)和基因體學(genomics)等資訊以基因型的篩選來對作物進行改良(Jiang 2013)。其中分子標誌補助選拔(marker-assisted selection, MAS)又稱為分子標誌補助育種(marker-assisted breeding, MAB)即利用分子標誌(molecular marker)來檢測並篩選育種族群中帶有理想基因型(idea genotype)的單株進行選拔。MAS 的種類依據育種目的及過程可分為分子標誌補助回交育種(marker-assisted backcrossing, MABC)、分子標誌補助輪迴選種(marker-assisted recurrent selection, MARS)、分子標誌補助基因堆疊 (marker-assisted gene pyramiding, MAGP)以及基因組選拔(genomic selection, GS)等(詳細操作過程請參考 Jiang, 2013)等。不論上述哪一類 MAS，進行之先決條件都必須先得到與抗病基因緊密連鎖的分子標誌(請參考後面介紹)然後將分子標誌用於育種族群基因型之鑑定與選拔依據。

傳統育種以表現型(phenotype)為選拔依據，選拔易受複雜的遺傳與環境因子甚至二者交感作用往往造成選拔不精確。反之，在 MAS 中只要有與抗性基因座緊密連鎖分子標誌，用來分析單株基因型(DNA)，然後作為選拔依據，故較不受環境影響，選拔較傳統育種精確;此外，MAS 可以在幼苗期進行 DNA 篩選且無須病原接種試驗，因此節省大量空間及人力設備；在抗性基因為隱性情況下，MAS 使用共顯性分子標誌可以分辨異質體與同質體因此無須像傳統育種進行後裔試驗；尤其對遺傳率低的性狀 MAS 較傳統育種效率高；MAS 分析不像傳統育種有時需要在特別的季節或地區才能準確鑑定，故較不受時間限制;MAS 可將不同單一顯性抗性基因座進行堆疊生產抗數種病原菌的抗性品種且其效率較傳統育種高很多;MAS 可以組合數個性狀之基因如抗性基因及控制其他園藝性狀之基因堆疊(Ragimekula *et al.*, 2013)。近年來尤其在資金雄厚大型私人企業，MAS 已經成為育種的例行策略，MAS 主要用於雜種種子純度測試，快速篩選種原材料的抗病性以及果實品質等性狀用於回交育種中，如抗病和果實性狀的幼期即進行 DNA 分析的基因型篩選(Foolad and Panthee, 2012)。

MAS 使用的分子標誌

分子標誌為染色體上特定位置的一段 DNA 序列，用來檢測不同植物間遺傳上的多型性(polymorphism)。這些分子標誌在成為能被抗病 MAS 使用之前，需經過基因定位分析(或關聯性分析)試驗來測試族群中病害與分子標誌的連鎖(相關)程度。影響這些試驗的準確度將造成其分子標誌應用於抗病 MAS 的表現。在探討定位(關聯)分析的影響因子之前，首先要強調的是「分子標誌是一段 DNA，但不一定是基因本身」，依照分子標誌的來源可分為兩種，第一種稱為「功能性分子標誌(functional marker)」，當控制目標抗性基因已被選殖，則可以依照其 DNA 序列設計引子，作為 MAS 使用的分子標誌，但因為許多目標性狀或抗病基因尚未被選殖，故這類 functional marker 數目較少；第二類分子標誌為與控制目標性狀的基因連鎖(相關)的分子標誌，一般使用之分子標誌則多為此類，其來源為經由基因定位(關聯性)分析找到與目標抗病基因連鎖的分子標誌。早期基因定位及分子遺傳圖譜建立使用之分子標誌 RFLP，但其技術過於麻煩且耗時目前不用於 MAS，因此 MAS 常用分子標誌多為 PCR-based marker 如常見分子標誌如 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)、AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)、SSR(Single Sequence Repeats)、SCAR(sequence characterized amplified region)、CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence)和 SNP(single nucleotide polymorphism)等。其中 RAPD 及 AFLP 等因其重複性或方便性不佳和使用較不方便的 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)一樣大多轉換為 SCAR 或 CAPS 以便於 MAS 使用。

應用於 MAS 的分子標誌除了需要與目標抗性基因緊密連鎖外，還需要具備如重複性佳、便利使用、便宜且快速，最好對樣品 DNA 需求量低、具共顯性以及在不同族群具多型性等特質。一般而言若作物的經濟價值或重要性高如水稻與番茄等，因為其遺傳資源豐富且長期累積許多基因定位分析研究的成果，故分子標誌資訊十分豐富，尤其近年來許多重要作物之全基因體陸續解序完成，發展出高通量的基因定位分析或其他基因體相關新技術，使 MAS 可用的分子標誌成長更為快速。

分子標誌實際應用於 MAS 的影響因子

目前 MAS 命名上市的品種並不多，且大多由私人企業推出。反之學術界利用基因定位分析、關聯性分析和其他策略如 BSA(bulk segregant analysis)發表重

要性狀連鎖之分子標誌，到 2011 年為止約有三萬多篇，實際上應用於 MAS 的遠少於發表數目，顯示學術研究或政府機關研究所發表的和能實際應用的分子標誌數目有極大落差，歸納可能原因在於學界或政府補助資金不夠以至於分子標誌開發的過程並沒有包含實際評估的步驟。另一方面影響分子標誌開發的步驟均會影響其結果準確度，這些因子包括定位族群種類與結構(親本來源、族群世代或品種之育種歷程的了解與選擇)、基因或 QTL 定位分析(如基因型與表現型的鑑定的準確度、適當的統計分析和得到分子標誌與目標性狀之連鎖強度及其精確度)、定位之基因及 QTL 確認(多族群、多年份和多個區域之重複試驗對 QTL 更為重要)、定位後連鎖分子標誌之評估(是否自動化與高通量等)，以上這些影響因子均須長期累積的資料來評估分子標誌之應用效率(Kumpatla *et al.*, 2012)。

抗病 MAS 現況

目前私人企業使用 MAS 育種的數目遠超過政府部門，但私人企業命名上市的品種僅少數能追蹤到是由 MAS 育成，主因私人企業多不公開其育種的細節，故無從追蹤該品種是否使用 MAS。但從私人公司申請分子標誌相關的專利成長快速可以推測 MAS 在大型私人企業已經是例行的育種方式。以 2009 年申請的專利案件約有 2900 專利與 MAS 相關，其中 Pioneer 有 890 件、Monsanto 498 件，而 Syngenta 為 83 件(Greenpeace International, 2014)，這些資料顯示 MAS 成功案例並不少，只是沒有公開。另一方面，根據 2014 年資料顯示目前政府部門利用 MAS 育成後正式命名推廣的作物品種數約達 136 個。其中以禾本科作物的水稻最多，玉米次之，抗病 MAS 品種約佔 50%，禾本科之外的作物則以番茄和豆類較多，且均以抗病為目標育成之品種，其他作物亦以 MAS 抗病品種佔多數(Greenpeace International, 2014)。從上述資料得知 136 個 MAS 育成推廣品種中總共有 86 個是抗病品種，這個數目遠低於過去十幾年來已經被定位的作物抗病基因座。以番茄為例，2014 年為止政府部門命名推廣 MAS 抗病品種為 8 個，而針對 35 種以上病原菌造成之病害已被選殖或定位的抗病基因則有 17 個(Table 1, van Ooijen *et al.*, 2007)和超過 60 個 (Table 2, Foolad, 2007)。關於番茄抗病基因連鎖分子標誌的評估，Arens 等(2010)學者曾針對抗不同番茄病害的分子標誌進行評估，包括抗 *Verticillium* 基之 *Ve1* 及 *Ve2* 基因、抗 ToMV 的 *Tm2* 及 *Tm2²* 基因、抗線蟲之 *Mil-2* 基因和抗 *Fusarium* 之 *I* 及 *I2* 基因連鎖之分子標誌，以數個不同實驗室進行基因型鑑定與數個番茄品種族群抗病表現型分析評估這些分子標誌的效率，結果顯示 98% 測試之分子標誌與抗感表現型分析結果一致，且分子標誌

能清楚分辨同質體與異質體，顯示這些測試的分子標誌表現都穩定，其中又以抗 TMV 與抗線蟲的分子標誌表現最佳。

表一、政府部門利用 MAS 育成正式推廣的作物品種

作物	全部品種數	抗性品種數	百分比(%)	時間
大麥	6	5	83	2000-2010
豆類	9	9	100	2004-2013
樹薯	6	6	100	2010-2012
辣椒	1	1	100	2013
玉米	2	0	0	2008-2009
花生	2	2	100	2003-2013
珍珠粟	1	1	100	2005
稻米	61	31	50	2000-2013
高粱	4	4	100	2012
大豆	4	4	100	2005-2010
番茄	9	8	89	2002-2013
小麥	31	15	48	2006-2013

關於番茄抗病 MAS 的例子，前人研究中提到包括番茄萎凋病、晚疫病、黃萎病、細菌斑點病、番茄斑點萎凋病毒病、黃化捲葉病毒病以及根瘤線蟲病等數種病害，在私人種苗公司已例行使用分子標誌進行之抗病 MAS (Foolad and Panthee, 2012)，情況簡述如下：首先，由真菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) 造成之番茄萎凋病 (fusarium wilt) 經過多年利用數個野生番茄種源與栽培種雜交定位族群中找到四個抗性基因座 *I*, *I-1*, *I-2* 及 *I-3*，分別對 race 1、race 2 及 race 3 有抗性，*I* 及 *I-2* 位於第 11 號染色體，*I-1* 及 *I-3* 位於第 7 號染色體，*I* 及 *I-2* 較常用在抗 fusarium 萎凋病育種，但對於 race 3 嚴重區域則偏好使用 *I-3* 之連鎖分子標誌，上述三個是種苗公司分子育種例行使用的抗性基因，但無法確定使用的是文獻發表的分子標誌或公司自己開發的標誌。

其次，關於真菌 *Phytophthora infestans* 造成之晚疫病 (late blight) 已在野生番茄 *S. pimpinellifolium* 中找到的抗性基因座，包括 *Ph-1*, *Ph-2* 及 *Ph-3* 等，分別定位於第 7、10 和 9 號染色體上，其中最早找到抗 race T₀ 的完全顯性 *Ph-1* 基因座，抗性很快被 race T₁ 突破，後來找到另一個部分顯性基因 *Ph-2*，可以減緩但無法完全抵抗 race T₁ 之危害。此外在 *S. pimpinellifolium* L3708 中找到的 *Ph-3* 為部分顯性基因，但其抗性較 *Ph-2* 好，不僅可以對抗先前突破 *Ph-1* 和 *Ph-2* 的生理小種，且可以廣泛抵抗其他生理小種，*Ph-3* 已被選殖證明屬於典型 NBS-LRR 蛋白，

這類蛋白普遍在植物上執行抗病功能(Zhang *et al.*, 2014)。此外，研究也顯示對晚疫病菌完全抗性的 *S. pimpinellifolium* L3708 中，除了部分顯性的 *Ph-3* 應該還有其他尚未找到的抗性基因座。後來新發現的生理小種也突破 *Ph-3* 抗性，但組合 *Ph-2* 和 *Ph-3* 則足以抵抗目前大部分的生理小種。之後，新的生理小種陸續出現，同時藉由篩選更多野生番茄種原，學者在第 1 及第 10 號染色體找到新的抗性基因座。另經由 QTL 定位分析，在野生種原 *S. habrochaites* LA2999 也找到數個非生理小種專一性的抗性基因座，經由育種計畫育成相對應的近同源系(near isogenic lines, NILs)，但因不良園藝性狀之連鎖關係，需要進一步更精細定位以排除連鎖累贅(linkage drag)才能進一步推廣。此外，栽培種番茄與野生番茄 *S. habrochaites* LA1777 之定位族群中找到五個主效抗性 QTLs，另源自 *S. habrochaites* BGH6902 的族群則定位到超過 29 個 QTLs，這些 QTL 定位分析顯示番茄抗晚疫病的抗性基因遺傳十分複雜，如何將這些定位的 QTL 實際應用在 MAS，也是目前面臨挑戰之一。

番茄黃萎病(verticillium wilt)大多由 *Verticillium dahliae* 和 *V. albo-atyum* 造成的嚴重病害。經由基因定位在 *S. lycopersicum* 找到第 9 號染色體上兩個連鎖的抗病基因座 *Ve1* 及 *Ve2*，其中 *Ve1* 可以抗 *V. dahlia* race 1 和 *V. albo-atyum*，且近年來 *Ve1* 基因已被選殖，發現其編碼位於細胞表面的受體蛋白，是典型帶有 leucine-rich repeat 植物抗性基因蛋白(Fradin *et al.*, 2009)。另一方面，race 2 則包含能夠危害所有帶有 *Ve* 番茄品種的生理小種，其抗性機制較為複雜，應屬於數量性狀，目前在 *S. lycopersicum* 種原中找到對抗 race 2 的連鎖分子標誌，但目前 MAS 應用上則以 *Ve* 主效基因座之分子標誌較為普遍。

關於番茄細菌性斑點病(bacterial spot)，主要由 *Xanthomonas euvesicatoria* (race T₁), *X. vesicatoria* (race T₂), *X. perforans* (races T₃, T₄ and T₅) 和 *X. gardneri* (race T₂)等造成病害。針對 race T₁，三個源自 Hawaii 7998 之抗性基因座 *Rx-1*, *Rx-2* 及 *Rx-3* 被定位於第 1 及第 5 號染色體上，但當初定位之 RFLP 分子標誌在一般族群沒有多型性，故無法用於 MAS。後來利用栽培種與抗性種原 Hawaii 7998 定位族群將 *Rx-3* 定位，且開發了 CAPS 分子標誌可用於 MAS 對抗 race T₁。此外，在抗病種原 Hawaii 7998 或 *S. pimpinellifolium* PI 128216 找到了對抗 race T₃ 之抗性基因座 *Rx-4*，定位於第 11 號染色體，其連鎖之 SSR 與 SNP 應可用於 MAS 上；但對抗 race T₄ 的 *S. pennellii* 抗性基因 *Xv-4* 的位置則不明確。再者，由於病原菌族群複雜，在抗性種原如 *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* PI 114490 中發現可以對抗多生理小種，進行 QTL 定位找到位於第 11 號染色體可對抗 races T₁, T₂, T₃, and T₄ 之主效 QTL。另一定位族群針對 race T₄，找到第 11 號和第 3 號染色體之 QTLs(PVE 為 29.4% 及 4.8%)，但這些 QTLs 連鎖分子標誌是否能應用於 MAS，

需進一步評估。

番茄抗斑點萎凋病毒(Tomato Spotted Wilt Virus,TSWV)的抗性基因座約有八個之顯性基因，抗性種原大多源於 *S. peruvianum*，其中 *Sw5* 基因座被定位於第 9 號染色體，且已經被選殖，是目前對抗 TSWV 表現最好的抗性基因。雖然田間顯示新產生之 TSWV 病毒株會克服 *Sw-5* 提供之抗性，但 *Sw-5* 分子標誌已十分廣泛使用於 MAS。另一個危害番茄十分嚴重病毒病為番茄黃化捲葉病毒(Tomato Yellow Leaf Curl Virus,TYLCV)，其抗性基因 *Ty1*, *Ty2*, *Ty3*, *Ty-4*, *Ty-5*, *Ty-6* 被定位於第 6、11、6、3、4 及第 10 號染色體上，分子標誌亦測試於 MAS。此外，QTL 定位亦找到數個抗性相關 QTL(Huton *et al.*, 2012, 2013; Foolad and Panthee, 2012)。

此外，抗根瘤線蟲 root-knot nematode(RKN)病害之 *Mi-1* 基因座可以對抗多小種之根瘤線蟲，目前例行用於 MAS 的抗性分子標誌，在某些熱帶區域之根瘤線蟲可以突破 *Mi-1* 之抗性，故另外有八個已定位之抗性基因座(*Mi-2* 至 *Mi-9*)被發表，這些抗性基因座對抗之根瘤線蟲之專一性較高，且有些需要在高於 32 度的高溫區才能提供抗性，故應用較不普遍。此外，關於抗性 functional marker 方面，Jung 等(2015)學者將已選殖的 *Ty1*、*Ph3* 及 *Ve* 等三個抗病基因設計成 functional markers，其中 *Ty1* 及 *Ve* 更成功設計成 HRM(high resolution melt)分子標誌適合應用於高通量 SNP 的分析，使應用於 MAS 更為快速便捷。

關於 MAS 堆疊抗性基因座的例子，Prasanna 等(2015)曾針對抗番茄捲葉病毒的抗性基因座 *Ty-2* 及 *Ty-3* 進行堆疊，且評估其選拔效率。結果發現以 *Ty-2* 及 *Ty-3* 分子標誌輔助選拔到 F₅ 及 F₆ 世代，帶有 *Ty-2* 異質體或同質體植株均無法對抗番茄捲葉病毒(ToLCBV, ToLCNDV)；帶有 *Ty-3* 同質體則表現出非常好的抗性；而 *Ty-3* 異質體則表現部分抗性。但是當植株為 *Ty-3* 異質體同時帶有 *Ty-2* 異質或同質體時，會加強其對 TYLCV 之抗性，顯示堆疊 *Ty-2* 和 *Ty-3* 可以增加抗性。Robbins (201) 利用 *Ph-3* 和 *Sw-5* 的分子標誌學者成功選拔出理想基因型組合之抗 TSWV 和晚疫病的子代。此外，應用於 MAS 並育成上市品種如 *Sw-5* 與 *Ph-3* 分子標誌 MAS 並命名為 Plum Regal 上市；*Ph-2* 與 *Ph-3* 分子標誌 MAS 並命名為 Mountain Merit 和 Mountain Magic (Greenpeace International, 2014)。

表二、番茄抗病 MAS 之抗性基因

病害	病原菌	R基因座	抗生理小種	染色體	分子標誌	抗性種原	文獻
番茄萎凋病	<i>Fusarium</i>	<i>I</i>	race 1	11	SCAR	<i>S. pimpinellifolium</i> P1126915	Foolad, 2012
	<i>oxysporum</i> f. sp.	<i>I-1</i>	race 1	7	RFLP	<i>S. pennellii</i>	Sarfatti 1991
	<i>Lycopersici</i> (Fol)	<i>I-2</i>	race 2	11	SACR; InDel	<i>S. pimpinellifolium</i> P1126915	Foolad, 2012
		<i>I-3</i>	race 3	7	CAPS; SCAR	<i>S. pennellii</i> LA716	Foolad, 2012
番茄晚疫病	<i>Phytophthora</i>	<i>Ph-1</i>	race T0	7	-	<i>S. pimpinellifolium</i>	Foolad, 2012
	<i>infestans</i>	<i>Ph-2</i>	race T1	10	CAPS	<i>S. pimpinellifolium</i>	Foolad, 2012
		<i>Ph-3</i>	數個	9	CAPS	<i>S. pimpinellifolium</i>	Foolad, 2012
番茄黃萎病	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Ve1</i>	race 1	9	SCAR; SNP	<i>S. lycopersicum</i>	Foolad, 2012
	race 1, <i>V. albo-atyum</i>	<i>Ve2</i>	race 2	9	SCAR; SNP	<i>S. lycopersicum</i>	Foolad, 2012
細菌性斑點病	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	<i>Rx-3</i>	race T1	5	CAPS	<i>S. lycopersicum</i> Hawaii 7998	Foolad, 2012
	(race T1); <i>X. vesicatoria</i>	<i>Rx-4</i>	race T3	11	SSR; SNP	<i>S. pimpinellifolium</i>	Foolad, 2012
	(race T2); <i>X. perforans</i>	<i>Xv-4</i>	race T4,	-	-	<i>S. pennellii</i>	Foolad, 2012
	(races T3, T4 and T5);	<i>QTLs</i>	multiple	11	-	<i>S. lycopersicum</i> var.	Foolad, 2012
	<i>X. gardneri</i> (race T2)					<i>cerasiforme</i> P1114490	
番茄斑點萎凋病	TSWV	<i>sw-5</i>		9	SCAR; CAPS; InDel	<i>S. peruvianum</i> P1128645	Foolad, 2012
番茄黃化捲葉病	TYLCV	<i>Ty-1/-3</i>		6	CAPS	<i>S. chilense</i> LA1969	Foolad, 2012
		<i>Ty-2</i>		11	SCAR	<i>S. harbrochaites</i> f.	Yang, 2014
						<i>glabratum</i> B6013	
		<i>Ty-4</i>		3		<i>S. chilense</i> LA1932	Foolad, 2012
		<i>ty-5</i>		4		<i>S. peruvianum</i>	Hutton, 2012
		<i>Ty-6</i>		10		<i>S. chilense</i> LA2779	Hutton, 2013
根瘤線蟲病	root-knot nematode	<i>Mi-1</i>		6	SCAR	<i>S. peruvianum</i> P1128645	Foolad, 2012
		<i>Mi-3</i>		12	SCAR	-	Foolad, 2012

抗病 MAS 面臨的挑戰

病害防治困難之原因很多，以 *Clavibacter michiganensis subp.michiganensis* (Cmm)引起的番茄潰瘍細菌病為例，其難以防治的原因在於病原菌侵略性強度因族群改變而異，且番茄抗性機制複雜，雖然有野生種原可以提供抗性，但育種過程中想要將抗性與優良園藝性狀組合起來並不容易。以上這些問題不論在傳統育種或 MAS 都會遇到，但有些情況如抗性遺傳為單一顯性基因控制且病原族群也較單純時，相較於傳統育種，MAS 對族群個體基因型之追蹤和預測，使育種過程較傳統方法較清楚且容易掌握(Foolad and Panthee, 2012)。

造成已開發的分子標誌在 MAS 上表現不佳，大多是因為寄主抗病基因或病原菌致病基因的遺傳複雜性所致。首先，在寄主抗性基因遺傳方面，有些抗性種原提供之抗性基因座呈現生理小種專一性(race specific)，因此只能抗單一生理小種，在田間病原族群複雜狀況會造成這類專一抗性基因的 MAS 表現較差。另一方面，有些抗性屬於數量性反應(由 QTL 控制)可同時對抗數種或數個生理小種。例如番茄細菌性斑點病或 *Ralstonia solanacearum* 引起的番茄萎凋病多因抗性基因遺傳不明或多基因控制而難以掌握，或如 TYLCV 的抗病品種表現則會因區域不同而表現不一致(Foolad 2012)。因此需先釐清定位族群之抗性遺傳機制屬於單一基因或 QTL 控制，再評估此連鎖分子標誌在當地進行 MAS 的可用性。MAS 效率不高尤其發生在抗性遺傳屬於數量性(多基因)控制的情況，QTL 定位分析找到之分子標誌大多非主效基因，即使是主效 QTL 也可能發生困難，第一個原因是主效 QTL 定位連鎖之分子標誌連鎖不夠緊密造成預期效果不佳，第二個原因是 QTL 定位之連鎖分子標誌有族群專一性，應用於育種族群時並沒有此 QTL，故造成 MAS 選拔無效。第三點是 QTL 連鎖分子標誌在育種族群中無多型性，以至於無法使用。第四點是 QTL 連鎖分子標誌在 MAS 過程中有連鎖累贅，使不良性狀也一起轉移。以上第二到第四點原因也常出現在單一基因控制的抗性基因 MAS 上。另一方面，並非單一抗性基因連鎖之分子標誌均可立即應用於 MAS，最好先測試其在育種族群的表現以及對當地病原菌族群之反應，以了解其適用性。但文獻上這類資訊十分缺乏，因大多數 MAS 上市公司為保護其自身權益而資訊不公開，抗病 MAS 經驗分享與累積受到極大限制，造成學術界和政府部門 MAS 計畫均須對每一個育種疾病原族群測試，花費許多勞力成本，是阻礙抗病 MAS 發展最大的主因(Foolad and Panthee, 2012)。另一方面，在病原菌致病基因遺傳方面，以番茄細菌性斑點病(bacterial spot)為例，其病原菌族群變化很大，可能為單一或多個種生或生理小種，故須先針對當地流行之病原菌進行鑑定，再針對病原菌選擇適當種原及抗性基因之分子標誌進行 MAS。

綜言之，關於抗性 MAS 所面臨挑戰主要是寄主與病原菌雙方複雜因子造成的，如分子標誌本身連鎖強度不夠、或在育種族群具有專一性與應用在不同族群時缺乏多型性、抗性基因座與病原菌致病基因在溫室與田間反應不同和病原菌在不同地區對抗性基因反應不同等因素造成的結果。

結 語

目前抗病 MAS 最成功例子以抗線蟲之分子標誌，在大麥與大豆育種應用上，二者共同特點在於當地線蟲病害嚴重，故育成抗線蟲品種之經濟價值極高，且二者抗線蟲基因座均為單一基因遺傳故容易掌控，相較於傳統育種需進行昂貴與不可靠的線蟲接種測試，彰顯 MAS 進行抗線蟲育種之優點((Ragimekula *et al.*, 2013)。至於面對寄主或病原菌遺傳性複雜的狀況下，欲進行 MAS，除需要了解發病區域病原菌族群種類、致病性強度與其遺傳性質外，針對作物本身需要先確認目標性狀的經濟效益是否符合 MAS 成本，然後確認分子標誌與目標抗病基因座之連鎖強度以及控制抗性遺傳的可能基因數目等，再經不同族群與地區的重複試驗測試抗性分子標誌之表現，根據所得資料進一步選擇適合的材料進行抗病 MAS。此外，近年來因許多作物進行全基因體解序，故能應用於基因定位和關聯性定位分析的分子標誌成長十分快速，以 SNP 為主或是次世代解序(NGS)的基因體選拔(Genomic selection, GS)的發展，讓 MAS 進入高通量分子標誌輔助選拔的時代。雖不在本文討論，但由目前相關文獻與高通量分子輔助 MAS 計畫增加的速度，可以期待未來 MAS 將有劃時代的進展。

參考文獻

1. Andolfo G *et al.* 2014. Defining the full tomato NB-LRR resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq. BMC Plant Biology 14: 120.
2. Arens *et al.* 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. Theor Appl Genet 120: 655-664.
3. Foolad. 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. Int. J. Plant Genomics. 2007; 2007:64358. doi: 10.1155/2007/64358.
4. Foolad and Panthee. 2012. Marker-assisted breeding in tomato. Critical Reviews

- in *Plant Sciences* 31: 93-123.
5. Fradin *et al.* 2009. Genetic dissection of verticillium wilt resistance mediated by tomato Ve1. *Plant Physiol.* 150: 320–332.
 6. Greenpeace International. 2014. Smart Breeding: The next generation; Marker assisted selection: a biotechnology for plant breeding without genetic engineering.
 7. Hutton *et al.* 2012. Recessive resistance to tomato yellow leaf curl virus from the tomato cultivar tyking is located in the same region as Ty-5 on chromosome 4. *HortScience* 47: 324–327.
 8. Hutton and Scott. 2013. Fine-mapping and cloning of Ty-1 and Ty-3; and mapping of a new TYLCV resistance locus, “Ty-6”. In: Tomato breeders round table proceedings.2013, Chiang Mai, Thailand.
 9. Jiang GL. 2013. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In: Anderson, S.B. (ed.), *Plant breeding – From laboratories to fields*. InTech, Croatia. pp. 45-83.
 10. Kumpatla, S. P., R. Buyyarapu, I. Y. Abdurakhmonov, and J. A. Mammadov. 2012. Genomics-assisted plant breeding in the 21st century: technological advances and progress. In: I.Y. Abdurakhmonov (ed.), *Plant Breeding*, InTech, pp 131-184.
 11. Prasanna *et al.* 2015. Marker assisted selection of Ty-2 and Ty-3 carrying tomato lines and their implications in breeding tomato leaf curl disease resistance hybrids. *Euphytica* 204: 407-418.
 12. Ragimekula *et al.* 2013. Marker assisted selection in disease resistance breeding. *J. Plant. Breed.Genet* 01: 90-109.
 13. Robbins. 2010. Marker Assisted Selection for Coupling Phase Resistance to Tomato Spotted Wilt Virus and Late Blight in Tomato. *HortScience* 45: 1424-1428.
 14. Sarfatti, M., M. Abu-Abied, J. Katan, and D. Zamir. 1991. RFLP mapping of I1, a new locus in tomato conferring resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1. *Theor. Appl. Genet.* 80: 22-26.
 15. Tanksley SD and McCouch SR. 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science.* 277: 1063-1066.
 16. van Ooijen *et al.* 2007. Structure and function of resistance proteins in Solanaceous plant. *Ann. Rev. Pytopathol.* 45: 43-72.

17. Yang. 2014. Fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene Ty-2 on chromosome 11 of tomato. *Mol Breeding* 34: 74-760.
18. Zhang *et al.* 2014. The Ph-3 gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. *Theor Appl Genet* 127: 1353-1364.

利用簡化基因組定序技術開發非模式物種的 SNP 分子標記

陳凱儀

國立臺灣大學農藝學系

摘 要

簡化基因組定序技術源自次世代核酸定序與電腦巨量資料分析兩種技術的結合，能開發出大量的 SNP 分子標記，並同時完成這些分子標記基因型的定型，是成本效益十分良好的新技術。適合使用於標的物種沒有基因體參照序列、沒有適當的分子標記系統、或是育種者需要自行開發與目標性狀具有緊密連鎖的 SNP 分子標記。本文的內容主要在介紹簡化基因組定序技術原理，並詳細說明此技術應用於不同物種時之試驗設計考量。

關鍵詞：分子標記、次世代核酸定序、簡化基因組圖書庫

前 言

分子標記輔助育種 (marker-assisted selection) 是利用 DNA 分子標記技術，使難以從外表型直接選拔的目標性狀能夠藉由與控制目標性狀基因緊密連鎖的分子標記在早世代便進行有效的篩選，提高育種選拔的效率 (Collard and Mackill 2008)。此一針對特定基因型的育種選拔技術因為十分精準有效率，已經被廣泛使用於外表型評估費時複雜但遺傳率高之數量性狀基因座的早世代前景選拔。例如，具有特定抗病對偶基因型植株的選拔。

執行分子標記輔助育種選拔需要取得相關的遺傳種源與資訊，包括：(1) 具有目標性狀的種原，作為雜交育種的貢獻親；(2) 決定雜交育種的另一個親本，這通常是育種者十分熟悉的優良品種或品系；(3) 分子標記的資訊，這個資訊必須包含兩個部分，一是貢獻親與另一個親本之間具有核苷酸多型性 (DNA polymorphism) 的位置，另一則是這個核苷酸多型性的位置必須在控制目標性狀的基因座內，或是十分接近而使核苷酸多型性的位置與目標性狀的基因座之間發生遺傳重組的機率十分地低。然而，當這些文獻中所記載的分子標記資訊無法

使用時，往往是因為該分子標記在育種者所選定的兩個雜交親本間並不具有核苷酸多型性。如果目標作物的全基因體序列已經解序，並具有粗略的物理圖譜，則能透過以下的試驗策略，解決上述的難題。方法是藉由分子標記的核苷酸序列與基因體參照序列的比對，找出原有分子標記在基因體參照序列上的物理位置。然後，透過兩個雜交親本的全基因體組重新定序和核苷酸多型性的搜尋，於原分子標記在基因體參照序列上物理位置的附近，開發出新的核酸分子標記。

如果進行育種的物種並未有基因體參照序列、沒有適當的分子標記系統、或是育種者有興趣的目標性狀還沒有相關的數量性狀基因座的遺傳定位研究，則能利用「簡化基因組定序技術」開發出大量的單一核苷酸多形性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 分子標記，並從中找出適合進行分子標記輔助選種的 SNP 分子標記。

簡化基因組定序技術源自次世代核酸定序與電腦巨量資料分析兩種技術的結合。此技術的操作步驟可概略分為三部分：構築簡化基因組定序圖書庫 (reduced representation library)、使用 Illumina 次世代核酸定序平台解序、以及資料分析。操作步驟的細節可參閱拙著 (謝等人 2014)。此技術的原理是對產生雜交族群的兩個親本以及族群中每個個體的基因體組內特定限制酶切位左右兩側固定長度的核酸進行解序，被重新定序的基因體組部分通常僅為該物種全基因體組的 5% 或更少，故以「簡化基因組定序技術」稱之。被解序的核酸序列資料可藉由軟體 Stacks (<http://catchenlab.life.illinois.edu/stacks/>)，進行核酸序列相似程度的比對，並找出在兩個親本的簡化基因組之間具有的 SNP 位點，定義為分子標記位點。由於簡化基因組的解序是以特定限制酶為基準點，親本與雜交後裔個體所解序的簡化基因組部分幾乎是相同的，所以簡化基因體定序技術不僅能從獲取的定序資料決定 SNP 分子標記的位點，也能同時決定這些分子標記位點在不同雜交後裔個體的基因型。簡化基因組定序技術發展至今，在簡化基因組定序圖書庫構築的實驗設計策略上有些微的差異，因而有了不同的名稱：從原型設計稱為 RADseq (Restriction-site Associated DNA sequencing) (Baird *et al.* 2008)，隨後陸續有 GBS (Genotyping By Sequencing) (Elshire *et al.* 2011)、MSG (Multiplexed Shotgun Genotyping) (Andolfatto *et al.* 2011)、與 SLAF-seq (Specific Locus Amplified Fragment sequencing) (Sun *et al.* 2013) 等變化。為了避免混淆，本篇後續的介紹皆以 RADseq 為主軸，對其他衍生方法有興趣的讀者可自行作深入的閱讀與比較。本文接下來就針對簡化基因組定序圖書庫構築的策略作進一步的討論。

一、「簡化基因組」比例與限制酶的選用

簡化基因組核酸定序的起始位置都在特定的限制酶切位兩側，以 *PstI* 限制酶為例，該酵素能專一性辨認 CTGCAG 核酸序列，而該序列在染色體中出現的平均頻度為 $1/(4^6)$ ，即每 4096 bp 出現一次，若限制酶切位左右各解序 90 個鹼基，則實際上每個樣品僅解序了 $(90 \times 2)/4096 = 4.4\%$ 的全基因體組核酸序列。若是使用不同的限制酶，如 *SbfI* 能專一性辨認 CCTGCAGG 核酸序列，其全基因體組解序的期望比例更低，僅有 0.275%。

限制酶的選擇除了「簡化基因組」比例的考量外，還會考慮使用對於甲基化敏感的限制酶。植物的染色體可以簡單的分為常染色質 (euchromatin) 與異染色質 (heterochromatin)。常染色質為基因表現活躍的區域，通常不會甲基化，在減數分裂時，也較常發生同源染色體互換 (遺傳重組)。反之，異染色質為基因表現靜默的區域，通常會甲基化，其遺傳重組的頻度相對常染色質來說也較低。因此選擇對於甲基化敏感的限制酶，能夠使被核酸定序的「簡化基因組」部分集中在常染色質區域，使得後續序列分析找到的分子標記，也會傾向集中在遺傳重組較為頻繁的染色體區間。*PstI* 與 *EcoRI* 都是常常被使用的對甲基化敏感的限制酶，而先前提到的 *SbfI* 則對甲基化不敏感。

二、個別樣品讀取數目的決定

進行次世代定序資料分析時，首先會面臨的問題是：個別樣品核酸定序的數量需要多少才足夠？回答此問題要先了解次世代核酸定序的資料特性。以 Illumina HiSeq 2000 的核酸定序平台為例，一個 Illumina 核酸定序晶片每次可同時解序一億至 1.5 億條固定長度的短核酸序列，單一條被解序的短序列，稱為一個「序列讀取」(sequencing read)。前述的問題因此變成：需要產生多少數量的序列讀取，才能夠使每一個簡化基因組的鹼基序列都被至少一個序列讀取所覆蓋 (至少被解序一次)？這樣問題若用 Poisson 機率分佈來推想，將序列讀取重複覆蓋某一鹼基的次數視為事件出現的次數，可進一步將問題轉換為：若簡化基因組內的每個鹼基能被序列讀取覆蓋一次的機率為 99% (或 95%)，則需要每個鹼基被序列讀取覆蓋的平均次數為何？如果再進一步考慮到 Illumina 核酸定序平台的定序錯誤率 (約為千分之三)，則上述的問題可變成：若簡化基因組內的每個鹼基能被序列讀取覆蓋三次的機率為 99%，則需要每個鹼基被序列讀取覆蓋的平均次數為何？由 Poisson 機率分佈的公式 $f(x) = e^{-\lambda} \times \lambda^x / x!$ ， λ 表示每個鹼基被序列讀取覆蓋的平均次數， x 表示每個鹼基被序列讀取覆蓋的次數。則當 $f(x \geq 3) > 0.99$ 時， λ 至少為 9。以進行研究物種單倍體的全基因體大小為 450Mb、該物種染色體缺乏異染色質、且使用 *PstI* 限制酶製作構築簡化基因組定序圖書庫為

例，*PstI* 限制酶切位點在二倍體 900 Mb 的全基因體組出現的數目為 $9 \times 10^8 / 4096 = 2.2 \times 10^5$ ，而每個限制酶切位的兩側都能夠產生一個序列讀取。據此，此物種單一樣品的核酸定序量必須至少有 $(2.2 \times 10^5) \times 2 \times 9 = 3.96 \times 10^6$ 個序列讀取。在此順便一提，目前我們進行簡化基因組定序實驗時，都是使用 Illumina 100bp single read 的定序選項，也就是說每個定序讀取的長度在沒有扣除核苷酸條碼之前，長度為100個鹼基序列。

當單一樣品解序的序列讀取不足時，最常見的結果，就是大量分子標記的基因型顯現缺值 (missing value)。此外，異型合子基因型被判讀為同型合子基因型的比率也會顯著地提高。不過，刻意使解序的序列讀取數目不足，配合電腦程式的基因型缺值設算 (genotype imputation)，有時會被用來做為節省經費的策略，只是使用此策略的前提是遺傳材料本身必須是自交系 (inbred line) 或是雙單倍體 (double haploid)。

三、次世代核酸定序總量、目標物種之全基因體組大小、與樣品混合數目

簡化基因組定序技術有個節省成本的設計，即在建構簡化基因組定序圖書庫時，在緊鄰限制酶切位的一側接上客製化的寡核苷酸條碼 (barcode)，能使數十個從不同個體所建構的定序圖書庫混合在一起，於同一片 Illumina 的定序晶片上進行高通量核酸定序。定序完成的資料，可以藉由核酸條碼來辨識次世代核酸定序的個別序列讀取 (sequencing read) 是屬於哪一個樣品。以上一節的範例而言，對一個全基因體組為 450Mb、使用 *PstI* 限制酶構築簡化基因組物種，需要取得至少 3.96×10^6 個序列讀取，才足以有 99% 的機率獲得正確的分子標記基因型。然而，一個 Illumina HiSeq 2000 核酸定序晶片每次可同時產生至少 100×10^6 個序列讀取，因此建構簡化基因組定序圖書庫時，每個圖書庫可以放入至少 25 個不同的樣品。

由於每個 Illumina 定序晶片能夠產生的最大數量的序列讀取數目是固定的，所以「目標物種之全基因體組大小」與「簡化基因組佔全基因體組大小的比例」會決定建構簡化基因組定序圖書庫時能夠混合的最多樣品數目。「目標物種之全基因體組大小」可以使用流式細胞儀估算，或是查詢 NCBI 資料庫；而「簡化基因組佔全基因體組大小的比例」則取決於建構簡化基因組定序圖書庫時所選用的限制酶。

上述幾個試驗設計的原則若能充分理解，並依此原則構築簡化基因組定序圖書庫，則大部分的樣品都能取得足夠的核酸定序資料。少數序列讀取不足的樣品，通常是因為製作定序圖書庫時，個別樣品混合的加入量彼此有所差異，或是在定序圖書庫擴增時不同的核苷酸條碼之間具有不同的擴增效率。然而，這些差

異在製作定序圖書庫時並無法完全避免。若序列讀取不足的樣品累積到一定數目，則可以考慮重複製作定序圖書庫及核酸定序，使這些序列讀取不足的樣品能再增添序列讀取數，以達到原試驗設計所期望的數目。

結 語

筆者在 Thomson Reuters 公司所建置的論文資料庫 Web of Science 中搜尋簡化基因組定序技術應用於開發分子標記相關的研究報告，總共搜尋到 30 篇。其中標的作物為具有基因體組參考序列者，計有 17 篇，包括的物種如下：稻 (Arbelaez *et al.* 2015; Begum *et al.* 2015; Liu *et al.* 2015; Xu *et al.* 2015)、大豆 (Li *et al.* 2014; Iquiria *et al.* 2015; Sonah *et al.* 2015)、番茄 (Chen *et al.* 2014; Viquez-Zamora *et al.* 2014)、黃瓜 (Wei *et al.* 2014)、蘋果 (Gardner *et al.* 2014)、玉米 (Li *et al.* 2015a)、棉花 (Wang *et al.* 2015)、鷹嘴豆 (Kujur *et al.* 2015)、釀酒葡萄 (Chen *et al.* 2015)、梅 (Zhang *et al.* 2015)、與油棕 (Pootakham *et al.* 2015)。而標的作物沒有基因體組參考序列作物則有：小麥 (Talukder *et al.* 2014; Li *et al.* 2015b; Li *et al.* 2015c; Lin *et al.* 2015)、大麥 (Honsdorf *et al.* 2014; Liu *et al.* 2014)、多年生黑麥草 (Hegarty *et al.* 2013; Pfender & Slabaugh 2013)、黑醋栗 (Russell *et al.* 2014)、西瓜 (Lambel *et al.* 2014)、芝麻 (Wu *et al.* 2014)、黃麻 (Kundu *et al.* 2015)、與胡桃 (Zhu *et al.* 2015)。以上的研究報告多數集中在近兩年發表，且有逐年增加的趨勢。或許，此一趨勢也顯示簡化基因組定序技術的成本效益良好，能成為植物育種者用來開發分子標記的常規技術。

參考文獻

1. 謝明修、吳東鴻、陳凱儀。2014。使用限制酶位點標定之核酸定序法進行種稻雜交組合之穗上發芽數量性狀基因座的遺傳定位。作物、環境與生物資訊 11: 11-25。
2. Andolfatto, P., D. Davison, D. Erezyilmaz, T. T. Hu, J. Mast, T. Sunayama-Morita, and D. L. Stern. 2011. Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping. *Genome Research* 21: 610-617.
3. Arbelaez, J. D., L. T. Moreno, N. Singh, C. W. Tung, L. G. Maron, Y. Ospina, C. P. Martinez, C. Grenier, M. Lorieux, and S. R. McCouch. 2015. Development

- and GBS-genotyping of introgression lines (ILs) using two wild species of rice, *O. meridionalis* and *O. rufipogon*, in a common recurrent parent, *O. sativa* cv. Curinga. *Molecular Breeding* 35: 81.
4. 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: e3376.
 5. Begum, H., J. E. Spindel, A. Lalusin, T. Borromeo, G. Gregorio, J. Hernandez, P. Virk, B. Collard, and S. R. McCouch. 2015. Genome-wide association mapping for yield and other agronomic traits in an elite breeding population of tropical rice (*Oryza sativa*). *PLoS ONE* 10: e0119873.
 6. Chen, A. L., C. Y. Liu, C. H. Chen, J. F. Wang, Y. C. Liao, C. H. Chang, M. H. Tsai, K. K. Hwu, and K. Y. Chen. 2014. Reassessment of QTLs for late blight resistance in the tomato accession L3708 using a restriction site associated DNA (RAD) linkage map and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. *PLoS ONE* 9: e96417.
 7. Chen, J., N. Wang, L. C. Fang, Z. C. Liang, S. H. Li, and B. H. Wu. 2015. Construction of a high-density genetic map and QTLs mapping for sugars and acids in grape berries. *BMC Plant Biology* 15: 28.
 8. Collard, B. C. Y. and D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil Trans R Soc B* 363:557-572.
 9. 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: e19379.
 10. Gardner, K. M., P. Brown, T. F. Cooke, S. Cann, F. Costa, C. Bustamante, R. Velasco, M. Troggo, and S. Myles. 2014. Fast and Cost-Effective Genetic Mapping in Apple Using Next-Generation Sequencing. *G3-Genes Genomes Genetics* 4: 1681-1687.
 11. Hegarty, M., R. Yadav, M. Lee, I. Armstead, R. Sanderson, N. Scollan, W. Powell, and L. Skot. 2013. Genotyping by RAD sequencing enables mapping of fatty acid composition traits in perennial ryegrass (*Lolium perenne* (L.)). *Plant Biotechnology Journal* 11: 572-581.

12. Honsdorf, N., T. J. March, A. Hecht, J. Eglinton, and K. Pillen. 2014. Evaluation of juvenile drought stress tolerance and genotyping by sequencing with wild barley introgression lines. *Molecular Breeding* 34: 1475-1495.
13. Iquira, E., H. Sonah, and F. Belzile. 2015. Association mapping of QTLs for sclerotinia stem rot resistance in a collection of soybean plant introductions using a genotyping by sequencing (GBS) approach. *BMC Plant Biology* 15. DOI 10.1186/s12870-014-0408-y.
14. Kujur, A., H. D. Upadhyaya, T. Shree, D. Bajaj, S. Das, M. S. Saxena, S. Badoni, V. Kumar, S. Tripathi, C. L. L. Gowda, S. Sharma, S. Singh, A. K. Tyagi, and S. K. Parida. 2015. Ultra-high density intra-specific genetic linkage maps accelerate identification of functionally relevant molecular tags governing important agronomic traits in chickpea. *Scientific Reports* 5: 9468.
15. Kundu, A., A. Chakraborty, N. A. Mandal, D. Das, P. G. Karmakar, N. K. Singh, and D. Sarkar. 2015. A restriction-site-associated DNA (RAD) linkage map, comparative genomics and identification of QTL for histological fibre content coincident with those for retted bast fibre yield and its major components in jute (*Corchorus olitorius* L., Malvaceae s. l.). *Molecular Breeding* 35: 19.
16. Lambel, S., B. Lanini, E. Vivoda, J. Fauve, W. P. Wechter, K. R. Harris-Shultz, L. Massey, and A. Levi. 2014. A major QTL associated with *Fusarium oxysporum* race 1 resistance identified in genetic populations derived from closely related watermelon lines using selective genotyping and genotyping-by-sequencing for SNP discovery. *Theoretical and Applied Genetics* 127: 2105-2115.
17. Li, B., L. Tian, J. Y. Zhang, L. Huang, F. X. Han, S. R. Yan, L. Z. Wang, H. K. Zhang, and J. M. Sun. 2014. Construction of a high-density genetic map based on large-scale markers developed by specific length amplified fragment sequencing (SLAF-seq) and its application to QTL analysis for isoflavone content in *Glycine max*. *BMC Genomics* 15: 1086.
18. Li, C. H., Y. X. Li, Y. S. Shi, Y. C. Song, D. F. Zhang, E. S. Buckler, Z. W. Zhang, T. Y. Wang, and Y. Li. 2015a. Genetic control of the leaf angle and leaf orientation value as revealed by ultra-high density maps in three connected maize populations. *PLoS ONE* 10: e0121624.
19. Li, G. Q., Y. Wang, M. S. Chen, E. Edae, J. Poland, E. Akhunov, S. M. Chao, G. H. Bai, B. F. Garver, and L. L. Yan. 2015b. Precisely mapping a major gene

- conferring resistance to Hessian fly in bread wheat using genotyping-by-sequencing. *BMC Genomics* 16: 108.
20. Li, H. H., P. Vikram, R. P. Singh, A. Kilian, J. Carling, J. Song, J. A. Burgueno-Ferreira, S. Bhavani, J. Huerta-Espino, T. Payne, D. Sehgal, P. Wenzl, and S. Singh. 2015c. A high density GBS map of bread wheat and its application for dissecting complex disease resistance traits. *BMC Genomics* 16: 216.
 21. Lin, M., S. B. Cai, S. Wang, S. B. Liu, G. R. Zhang, and G. H. Bai. 2015. Genotyping-by-sequencing (GBS) identified SNP tightly linked to QTL for pre-harvest sprouting resistance. *Theoretical & Applied Genetics* 128: 1385-1395.
 22. Liu, H., M. Bayer, A. Druka, J. R. Russell, C. A. Hackett, J. Poland, L. Ramsay, P. E. Hedley, and R. Waugh. 2014. An evaluation of genotyping by sequencing (GBS) to map the *Breviaristatum-e* (*ari-e*) locus in cultivated barley. *BMC Genomics* 15: 104.
 23. Liu, Y., X. S. Qi, N. D. Young, K. M. Olsen, A. L. Caicedo, and Y. L. Jia. 2015. Characterization of resistance genes to rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in a “Green Revolution” rice variety. *Molecular Breeding* 35: 52.
 24. Pfender, W. F. and M. E. Slabaugh. 2013. Pathotype-specific QTL for stem rust resistance in *Lolium perenne*. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 1213-1225.
 25. Pootakham, W., N. Jomchai, P. Ruang-Areerate, J. R. Shearman, C. Sonthirod, D. Sangsrakru, S. Tragoonrung, and S. Tangphatsornruang. 2015. Genome-wide SNP discovery and identification of QTL associated with agronomic traits in oil palm using genotyping-by-sequencing (GBS). *Genomics* 105: 288-295.
 26. Russell, J., C. Hackett, P. Hedley, H. Liu, L. Miline, M. Bayer, D. Marshall, L. Jorgensen, S. Gordon, and R. Brennan. 2014. The use of genotyping by sequencing in blackcurrant (*Ribes nigrum*): developing high-resolution linkage maps in species without reference genome sequences. *Molecular Breeding* 33: 835-849.
 27. Sonah, H., L. O’Donoghue, E. Cober, I. Rajcan, and F. Belzile. 2015. Identification of loci governing eight agronomic traits using a GBS-GWAS approach and validation by QTL mapping in soya bean. *Plant Biotechnology Journal* 13: 211-221.
 28. Sun, X., D. Liu, X. Zhang, W. Li, H. Liu, W. Hong, C. Jiang, N. Guan, C. Ma, H. Zeng, C. Xu, J. Song, L. Huang, C. Wang, J. Shi, X. Zheng, C. Lu, X. Wang, and

- H. Zheng. 2013. SLAF-seq: An efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. *PLoS ONE* 8: e58700.
29. Talukder, S. K., M. A. Babar, K. Vijayalakshmi, J. Poland, P. V. V. Prasad, R. Bowden, and A. Fritz. 2014. Mapping QTL for the traits associated with heat tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genetics* 15: 97.
30. Viquez-Zamora, M., M. Caro, R. Finkers, Y. Tikunov, A. Bovy, R. G. F. Visser, Y. L. Bai, and S. van Heusden. 2014. Mapping in the era of sequencing: high density genotyping and its application for mapping TYLCV resistance in *Solanum pimpinellifolium*. *BMC Genomics* 15: 1152.
31. Wang, Y. K., Z. Y. Ning, Y. Hu, J. D. Chen, R. Zhao, H. Chen, N. J. Ai, W. Z. Guo, and T. Z. Zhang. 2015. Molecular mapping of restriction-site associated DNA markers in allotetraploid upland cotton. *PLoS ONE* 10: e0124781.
32. Wei, Q. Z., Y. Z. Wang, X. D. Qin, Y. X. Zhang, Z. T. Zhang, J. Wang, J. Li, Q. F. Lou, and J. F. Chen. 2014. An SNP-based saturated genetic map and QTL analysis of fruit-related traits in cucumber using specific-length amplified fragment (SLAF) sequencing. *BMC Genomics* 15: 1158.
33. Wu, K., H. Y. Liu, M. M. Yang, Y. Tao, H. H. Ma, W. X. Wu, Y. Zuo, and Y. Z. Zhao. 2014. High-density genetic map construction and QTLs analysis of grain yield-related traits in sesame (*Sesamum indicum* L.) based on RAD-Seq technology. *BMC Plant Biology* 14: 274.
34. Xu, F. F., X. Sun, Y. L. Chen, Y. Huang, C. Tong, and J. S. Bao. 2015. Rapid identification of major QTLs associated with rice grain weight and their utilization. *PLoS ONE* 10: e0122206.
35. Zhang, J., Q. X. Zhang, T. R. Cheng, W. R. Yang, H. T. Pan, J. J. Zhong, L. Huang, and E. Z. Liu. 2015. High-density genetic map construction and identification of a locus controlling weeping trait in an ornamental woody plant (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *DNA Research* 22: 183-191.
36. Zhu, Y. F., Y. F. Yin, K. Q. Yang, J. H. Li, Y. L. Sang, L. Huang, and S. Fan. 2015. Construction of a high-density genetic map using specific length amplified fragment markers and identification of a quantitative trait locus for anthracnose resistance in walnut (*Juglans regia* L.). *BMC Genomics* 16: 614.

花粉保存與應用技術研究

郭宏遠

行政院農業委員會種苗改良繁殖場

摘 要

本研究先採不同溫度進行辣椒花粉保存以瞭解其效果，再進行液態氮保存與應用之相關研究，以探討該法應用於育種及採種之可能性。結果顯示室溫下花粉只能維持3天活力；在4 °C下花粉活力持續下降，9週後已無發芽能力，而授粉後之單果種子數及種子發芽率則在4週後開始顯著降低。在-20 °C下保存之花粉發芽率在第12週時開始明顯降低，而以液態氮保存12週後仍保有活力，此兩處理對授粉後之單果種子數及種子發芽率均無影響。液態氮回溫條件試驗以D、E處理為適當，保存1年後仍能保持其活力及遺傳穩定性，且不影響花粉結構，在花粉回溫後發芽時偵測到ATP含量升高，故液態氮至少可維持辣椒花粉一年之保存效果，有利於育種及採種之應用。

關鍵詞：花粉保存、花粉活力、超低溫保存

前 言

花粉保存能維持植物的單倍體基因，有助於種原保存交換、提升育種效率及基因學之相關研究(Hanna, 1994)。利用花粉保存，能在小空間內保存大量的植物基因並有利運輸、克服時間和空間的隔離而完成植物的授粉，同時也能長時間重複利用特定的基因型進行研究(Barnabas and Kovacs, 1997; Hanna and Towill, 1995; Hecker *et al.*, 1986; Tandon *et al.*, 2007)。溫度為影響花粉活力及保存時間之重要因子，以低溫保存方式最為有效(Imani, 2011; Rajasekharan *et al.*, 1994; Kozlowski and Pallardy, 2002)。花粉活力的評估，除直接計算其離體發芽率外，採用花粉授粉法，以花粉在柱頭上發芽後，將精細胞送至胚囊中完成受精著果的比例來判斷，最為接近花粉的真正活力(Boughedri and Bounaga, 1987; Rodriguez-Riano and Dafni, 2000; Shivanna *et al.*, 1991)。

超低溫保存(cryopreservation)為利用液態氮進行保存之方式，將植物的組織或器官，在液態氮(-196 °C)中保存，理論上，植物在此低溫狀態下，細胞分裂及

生理代謝停滯，不易發生體細胞變異現象(Kartha, 1985; Engelmann, 2004)，可維持生命力(Matsumoto *et al.*, 2001)，且無保存時間之限制(Engelmann, 2004)，已普遍利用於種原長期保存及育種利用 (Bajaj, 1979; Crisp and Grout, 1984; Hanna and Towill, 1995 ; Sparks and Yates, 2002; Tandon *et al.*, 2007)。種原保存後須保有其遺傳穩定性，方具有保存之意義及利用性，AFLP、RAPD 和 ISSR 等分子標誌技術可應用於種子及組培苗保存後之遺傳穩定性鑑定(胡等，2003; 莊，2008; Lakshmanan, 2007; Schafer-Menuhr *et al.*, 1996)。

由於育種家權利的高漲，植物品種權日益受到重視，育種家除利用植物品種權做為自身之保障之外，在實務操作上，如何於種子生產時落實雜交親本之保護及控管實為重要。對於蔬菜育種及採種公司來說，預防採種親本流失，提升品種純度及種子品質是重要課題，而採種親本遭竊及種子純度、品質之爭議仍時有所聞。育種家保存大量的花粉可以進行多次的雜交授粉工作，而不需重複種植花粉親。雖然利用種子或無性繁殖形式作為植物種原的保存已實用於世界各國，而花粉的保存及利用於蔬菜雜交種子生產的研究則相對較晚。根據前人研究顯示，種子及花粉之低溫保存較含水量高的活體組織保存容易，是植物種原保存的良好方法。由於國內對於花粉保存之研究尚少，期待藉由本文，提供花粉保存應用之相關資訊，連結學理與實務之應用，提升品種保護之技術及育種與採種業者之競爭力。

材料與方法

一、植物材料及栽培管理

本試驗材料為辣椒(*Capsicum annuum* L.)品系 hp27 及 C。供採收花粉之參試品系，於育苗 45 天後定植於直徑 60 公分之紅色塑膠盆，介質採泥炭土(Kakilla)、珍珠石(南海)與蛭石(南海 4 號，南海工業股份有限公司)以 2:1:1 (V/V/V) 比例混合，每盆混入 5 克 14 N-14 P₂O₅-14 K₂O 之 Osmocote 100 天型緩效性肥料。試驗期間每週以稀釋 1000 倍之 Peters 速效性肥料 (5 N-11 P₂O₅-26 K₂O) 澆灌 1 次；進行授粉試驗之苗株則定植於簡易鋁管網室中，試驗田區施用之基肥為每 10 公畝施用台肥 1 號有機肥 200 公斤及台肥 43 號化學肥 80 公斤，試驗期間每二週以稀釋 1000 倍之 Peters 速效性肥料 (5 N-11 P₂O₅-26 K₂O) 澆灌 1 次。病蟲害依各季節發生情形進行防治。植株第一分叉以下之側芽完全去除，以上節位之枝條則不再整枝，並去除第一分叉節位所生之花朵。

二、試驗方法

(一) 保存溫度對辣椒花粉活力及授粉後果實性狀之影響

1. 保存溫度對花粉活力之影響

參試材料為辣椒品系 hp27，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株之花粉，先測量新鮮花粉之發芽率，接著分裝於液態氮保存管中，分別置於室溫、4 °C、-20 °C 及液態氮中進行保存，每一處理有 5 管。其中室溫處理組每天取出 1 管測量其發芽率，直至發芽率降至零為止；其餘處理則於保存 1、3、5、7 及 9 星期後，分別取出 1 管測試其發芽率。花粉發芽率試驗之培養基採 Brewbaker 和 Kwack (1963) 為基本配方，蔗糖含量為 10%。將培養皿至於 25 °C 之黑暗培養箱中 1 小時後，以花粉管長度超過花粉直徑兩倍者視為發芽。每處理之發芽率觀察為 3 重複，每重複至少計算 200 粒花粉。

2. 保存溫度及時間對花粉授粉後果實性狀之影響

參試材料為辣椒品系 hp27 及 C，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株品系 hp27 之花粉，先測量新鮮花粉之發芽率，接著分裝於液態氮保存管中，分別置於 4 °C、-20 °C 及液態氮中進行保存，每一處理含 4 管，於保存 1 星期、2 星期、1 個月及 3 個月後，分別取出 1 管測試其發芽率，並將花粉平均授於 9 株之品系 C 柱頭上，每株授粉 2 朵花，於果實紅熟後，隨機採收量測果實長度、寬度、果肉厚度、種子數及種子發芽率。每授粉處理 3 重複，每重複 5 個果實。

(二) 回溫條件對液態氮保存花粉活力及授粉採種之影響

參試材料為辣椒品系 hp27 及 C，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株品系 hp27 之花粉，先測量其新鮮花粉之發芽率，接著分裝於液態氮保存管中，共 9 管，置於液態氮中保存 1 星期後，分次進行下列之回溫處理：1. A、B、C 處理；2. D、E、F、G 處理；3. H、I、J、K 處理。回溫後先行花粉活力測試，再將花粉平均授於 9 株之品系 C 柱頭上，授粉及調查方式同前一試驗。

(三) 液態氮保存花粉對遺傳穩定性之影響

參試材料為辣椒品系 hp27 及 C，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株品系 hp27 之花粉，分裝於液態氮保存管中，共 8 管(處理)，其中 1 管之新鮮花粉先測量其發芽率，並授粉於品系 C 柱頭上，於果實成熟轉色後，採收種子保存於 8 °C 之種子冷藏庫，其餘 7 管於液態氮中保存分別保存 1 星期、2 星期、1 個月、2 個月、3 個月、6 個月及 12 個月後，先測量其花粉發芽率，再將花粉授於品系 C 柱頭上，之後採收種子保存於 8 °C 之種子冷藏庫，待所有處理之種子採收完畢後，統一進行播種定植於直徑 60 公分之紅色塑膠盆中，每處理 3 盆，進行植株

遺傳穩定性分析。

A、分子標誌分析：當植株生長至第二分叉後，每處理混合採取嫩葉 6 片，以 AFLP 分子標誌技術分析不同處理間之遺傳穩定性。遺傳相似性分析以電泳結果記錄產生之分離條帶資料，根據條帶之有無分別以 1 和 0 表示，樣品間遺傳相似性的估算採用 Jaccard's coefficient (Jaccard, 1908)。

B、型態調查：於植株生長過程中，參考農糧署公告之「辣椒品種性狀調查表」調查主要性狀，以判斷不同處理是否對雜交後代植株外觀造成影響。

(四) 液態氮保存對花粉活力之影響

1. 花粉採收時期對液態氮保存後之活力影響

參試材料為辣椒品系 hp27，試驗於春季、夏季及秋季進行，分別選擇盛花期之一日，混合採收 10 株品系 hp27 之花粉，分裝於液態氮保存管中，共 2 管，其中 1 管之新鮮花粉直接測量花粉發芽率，另一管放入液態氮保存 1 星期後，再取出測量其花粉發芽率。每處理之發芽率觀察為 3 重複，每重複至少計算 200 粒花粉。

2. 花粉液態氮保存對發芽時 ATP 生合成之影響

參試材料為辣椒品系 hp27，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株品系 hp27 之花粉，分裝於液態氮保存管中，共 2 管，分別代表新鮮及液態氮保存 1 星期之處理，以量測花粉發芽時 ATP 含量。先將液態氮保存之花粉回溫，分別秤取 0.1 g 之新鮮與回溫後之花粉，放入含 1 mL 液體培養基之離心管中分別培養 15、30、45 及 60 分鐘後，再進行 ATP 含量分析。花粉培養基以 Brewbaker 和 Kwack(1963) 為基本配方，蔗糖含量為 10%。分析時，以 PerkinElmer 之 ATPlite 1step kit 進行。

3. 花粉液態氮保存對花粉粒外表與內部形態之影響

參試材料為辣椒品系 hp27，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株之花粉，分裝於液態氮保存管中，共 2 管，其中 1 管為新鮮花粉組、另一管為液態氮保存處理組，該組為放入液態氮保存 1 星期後進行回溫，兩組之花粉分別以掃描式電子顯微鏡、穿透式電子顯微鏡進行花粉粒外觀及超薄切片之觀察與攝影。

結 果

一、保存溫度對辣椒花粉活力及授粉後果實性狀之影響

(一) 保存溫度對花粉活力之影響

參試辣椒品系 hp27 花粉，置於室溫、4 °C、-20 °C 及液態氮中進行不同時間保存後之花粉發芽率如圖 1。結果顯示花粉於室溫下保存時，保存 1 日後，發芽率從 60.2 % 迅速降至 25.3 %，至第 4 日即無發芽率(圖 1A)。當花粉保存於 4 °C 時，保存 1 週後，發芽率從 65.2 % 降至 31.3 %，發芽率隨保存時間增加而下降，至第 9 週發芽率為 0.5 % (圖 1B)。當花粉保存於-20 °C 時，新鮮花粉之發芽率為 62.5 %，保存 1 週後，發芽率為 60.5 %，保存過程花粉發芽率變化不大，至第 9 週仍有 57.6 % (圖 1C)。當花粉保存於液態氮時，新鮮花粉之發芽率為 62.8 %，不同保存時間處理之發芽率在 63.2 % 至 67.1 % (圖 1D)。

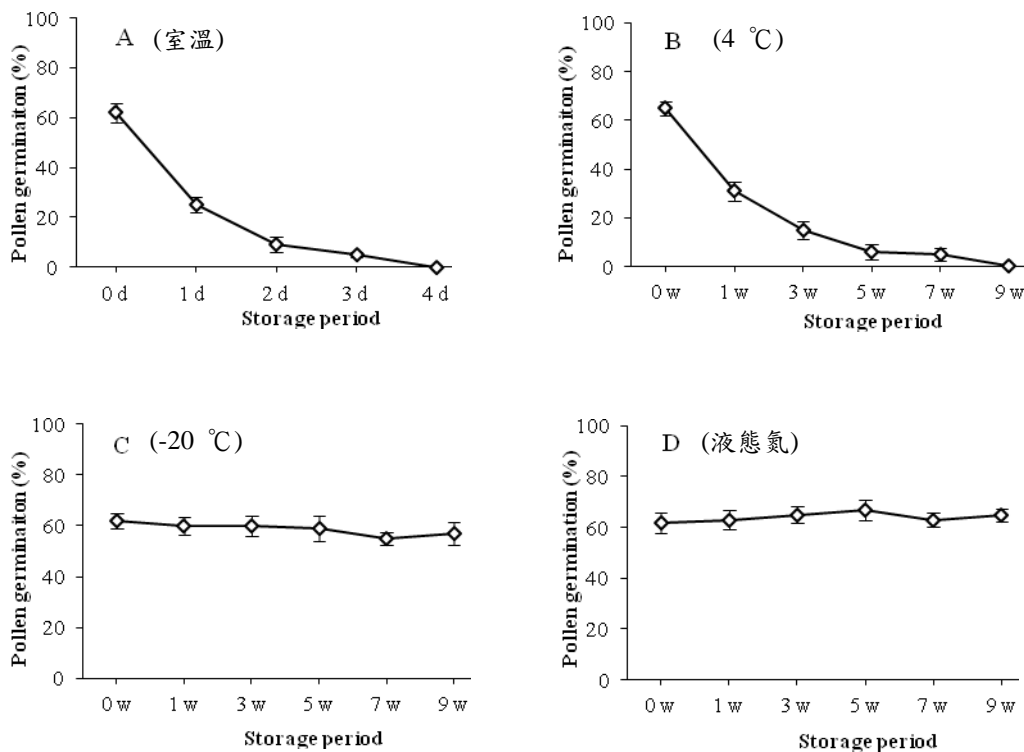


圖 1. 保存溫度及時間對辣椒品系 hp27 花粉活力之影響,室溫(A)、4 °C(B)、-20 °C (C)及液態氮(D)。

表一、保存溫度及時間對辣椒品系 hp27 之花粉活力及授粉後對品系 C 果實及種子性狀之影響

保存處理 ^y Storage treatment	花粉發芽率 Pollen germination (%)	果長 Fruit length (mm)	果寬 Fruit width (mm)	果肉厚 Flesh thickness (mm)	種子數/果 Seed/fruit	種子發芽率 Seed germination (%)
Fresh	65.3a	125.3a	12.3a	3.3a	70.3a	90.3a
4 °C						
1 W ^x	35.3b	124.5a	12.4a	3.3a	68.4a	90.5a
2 W	26.6c	123.4a	12.3a	3.2a	65.6a	91.5a
4 W	7.0d	110.5b	11.7a	3.0a	9.2b	70.8b
12 W	0	-	-	-	-	-
-20 °C						
Fresh	65.3a	125.3a	12.3a	3.3a	70.3a	90.3a
1 W	65.0a	125.3a	12.5a	3.1a	70.5a	92.5a
2 W	62.3a	125.1a	12.4a	3.1a	70.9a	91.2a
4 W	63.2a	125.0a	12.4a	3.2a	70.5a	89.8a
12 W	55.1b	124.8a	12.3a	3.1a	68.4a	90.3a
LN						
Fresh	65.3a	125.3a	12.3a	3.3a	70.3a	90.3a
1 W	68.3a	125.6a	12.6a	3.2a	73.6a	91.5a
2 W	67.4a	125.1a	12.7a	3.1a	72.9a	92.8a
4 W	66.9a	125.0a	12.5a	3.1a	75.5a	91.5a
12 W	68.9a	126.0a	12.6a	3.1a	74.5a	90.8a

^z Means within column followed by the same letter(s) are not significantly different by Fisher's protected LSD test ($P < 0.05$).

^y Pollen was collected after 2-day pre-dehydration of flower bud one day before anthesis during full blossom period in low temperature desiccators (15 °C / RH 8%).

^x W: week.

(二) 回溫條件對液態氮保存花粉活力及授粉採種之影響

參試辣椒品系 hp27 之花粉於 4 °C、-20 °C 及液態氮中保存不同時間，再授粉於品系 C 後所得之果實及種子生育情形如表一。在 4 °C 下，花粉發芽率由新鮮花粉之 65.3 %，隨著保存時間增加而下降，至第 12 週時已無法測得發芽率。以新鮮、保存 1 週及保存 2 週花粉授粉所得果實之單果種子數(65.6-70.3 粒)，顯著高於保存 4 週之處理組(9.2 粒)；種子發芽率同樣以新鮮、保存 1 週及保存 2 週處理組(90.3-91.5 %)顯著高於保存 4 週之處理組(70.8 %)。

在 -20 °C 下，以新鮮、保存 1 週、保存 2 週及保存 4 週之花粉發芽率最高(62.3-65.3 %)，顯著高於保存 12 週之處理組(55.1 %)；以不同處理所得果實之果長(124.8-125.3 mm)、果寬(12.3-12.5 mm)、果肉厚(3.1-3.2 mm)、單果種子數(68.4-70.9 粒)及種子發芽率(89.8-92.5%)，均與新鮮花粉處理組無顯著差異。

在液態氮條件下，保存 1 週、2 週、4 週及 12 週之花粉發芽率(68.3-68.9 %)與新鮮花粉(65.3 %)無顯著差異。以不同保存時間花粉授粉所得果實之果長(125.0-126.0 mm)、果寬(12.5-12.7 mm)、果肉厚(3.1-3.2 mm)、單果種子數(72.9-75.5 粒)及種子發芽率(91.5-92.8%)，均與新鮮花粉處理組無顯著差異。

利用螢光顯微鏡觀察辣椒品系 hp27 之新鮮及保存後之花粉授粉於品系 C 柱頭上 4 小時後之花粉管生長情形如圖 2。新鮮花粉授粉後之花粉管生長情形如圖 2A。當花粉於 4 °C 條件下保存 1 個月後，花粉發芽率明顯較低，同時花粉管生長速率較慢(圖 2B)。於 -20 °C 及液態氮中保存 1 個月後，花粉發芽率及花粉管生長速率相近(圖 2C、D)，而保存 3 個月後之結果亦相近(圖 2E、F)，但優於新鮮花粉之表現。

二、回溫條件對液態氮保存花粉活力及授粉後種子數之影響

將辣椒品系 hp27 之花粉於液態氮保存 1 星期後，以 A、B、C 處理之花粉活力及授粉於品系 C 後之種子數結果顯示，三種回溫處理後之花粉發芽率在 73.5-74.9 % 之間，單果種子數在 72.3-75.1 粒之間，種子發芽率在 90.5-93.1 % 之間，均與對照組(新鮮花粉)無顯著差異(表二 I)。

以 D、E、F、G 處理之花粉活力及授粉後種子數之結果顯示，三種回溫處理後之花粉發芽率在 68.7-69.9 % 之間，單果種子數在 72.8-76.7 粒之間，種子發芽率在 90.5-93.8 % 之間，均與對照組(新鮮花粉)無顯著差異(表二 II)。

以 H、I、J、K 處理之花粉活力及授粉後種子數之結果顯示，三種回溫處理後之花粉發芽率在 74.4-77.3 % 之間，單果種子數在 76.5-79.3 粒之間，種子發芽率在 85.9-92.4 % 之間，均與對照組(新鮮花粉)無顯著差異(表二 III)。

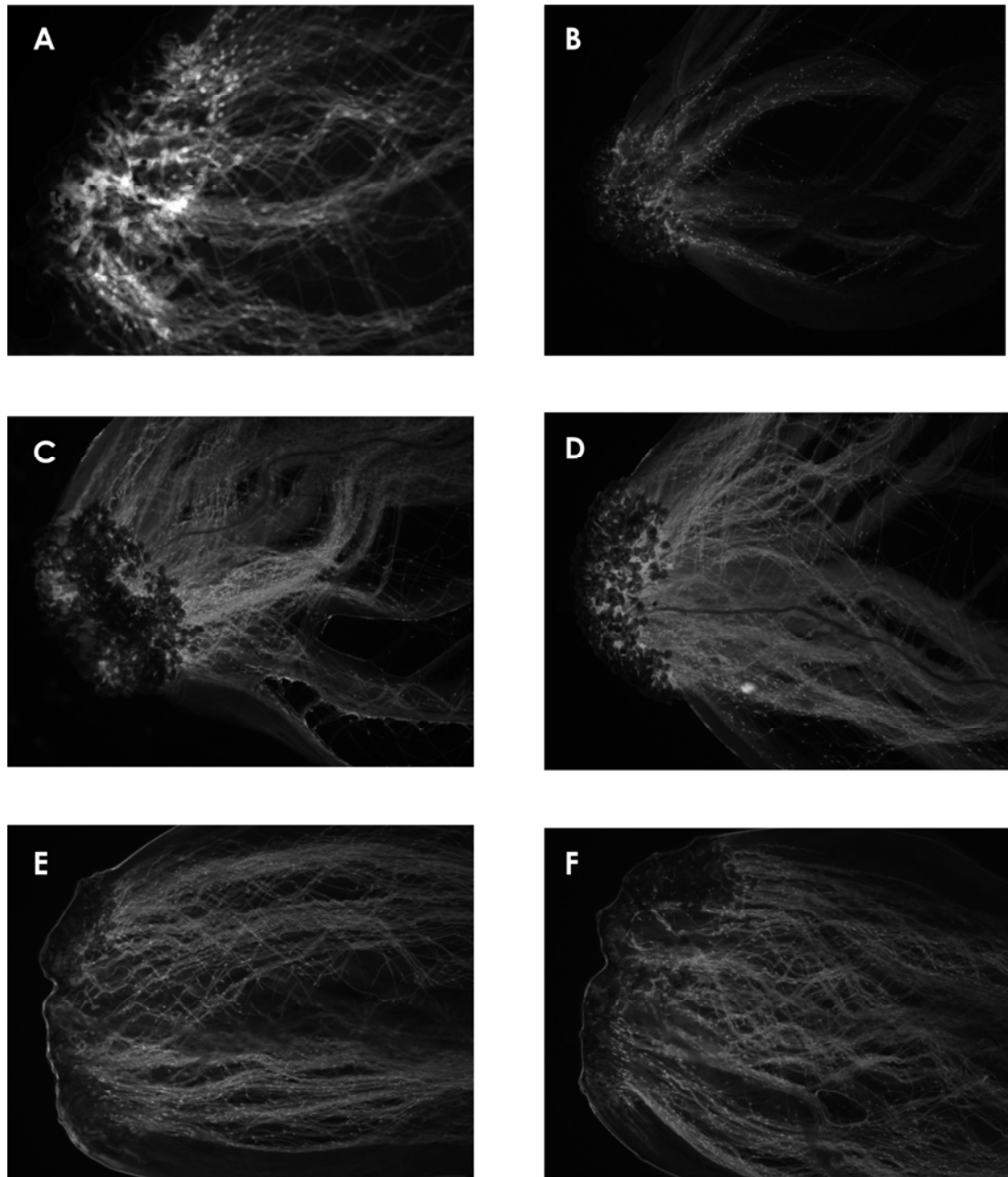


圖 2、辣椒品系 hp27 花粉於不同保存處理後授粉於品系 C 柱頭上 4 小時後之花粉管生長情形，新鮮花粉(A)、4 °C/1 個月(B)、-20 °C/1 個月(C)、液態氮/1 個月(D)、-20 °C/3 個月(E)、液態氮/3 個月(F)。

表二、回溫處理對液態氮保存後辣椒品系 hp27 之花粉活力及授粉後對品系 C 果實及種子性狀之影響

回溫處理 Warming treatment	花粉發芽率 Pollen germination (%)	果長 Fruit length (mm)	果寬 Fruit width (mm)	果肉厚 Flesh thickness (mm)	種子數/果 Seed number/fruit	種子發芽率 Seed germination (%)
第一次(I)						
Fresh	70.3a	124.8a	12.5a	3.1a	71.3a	90.2a
A	73.5a	125.3a	12.4a	3.2a	72.3a	93.1a
B	75.4a	125.5a	12.6a	3.2a	74.5a	92.9a
C	74.9a	125.6a	12.4a	3.2a	75.1a	90.5a
第二次(II)						
Fresh	65.3a	125.1a	12.4a	3.2a	70.6a	89.5a
D	69.1a	124.6a	12.5a	3.0a	72.8a	91.20a
E	68.7a	124.3a	12.6a	3.1a	74.6a	90.5a
F	69.9a	125.0a	12.4a	3.0a	76.7a	93.8a
G	69.5a	125.1a	12.5a	3.1a	75.5a	92.8a
第三次(III)						
Fresh	75.2a	125.2a	12.7a	3.2a	77.6a	90.5a
H	75.3a	125.4a	12.6a	3.2a	77.9a	85.9a
I	77.3a	125.3a	12.7a	3.2a	76.5a	92.4a
J	76.1a	124.9a	12.7a	3.1a	79.3a	90.9a
K	74.4a	125.0a	12.6a	3.2a	76.8a	86.9a

^z Means within column followed by the same letter(s) are not significantly different by Fisher's protected LSD test ($P < 0.05$).

三、液態氮保存花粉對遺傳穩定性之影響

本試驗所採收之辣椒品系 hp27 新鮮花粉發芽率為 68.4 %，經液態氮保存後之花粉發芽率約在 69.8-72.1 % 之間，保存 12 個月後之花粉發芽率(71.9 %)仍與新鮮花粉之表現近似(表三)。辣椒品系 hp27 與 C 之 8 個雜交組合後代共 48 個植株的 AFLP 電泳圖如圖 3 及 4，使用之選擇性聯合引子組分別為 M-CAT/E-ACG 及 M-CTA/E-AGC，AFLP 分析共使用 6 組選擇性聯合引子組。AFLP 電泳圖經 LI-COR Saga generation 2 軟體標定條帶及判讀後，6 組 Mse I/Eco RI 選擇性聯合引子組對 8 組雜交後代材料共分析出 281 個片段，大小介於 25-660 bp，止讀於 570-660 bp，其中，以 M-CAG/E-ACT 表現最多 DNA 片段數(73 個)，以 M-CAT/E-AGC 表現最少 DNA 片段數(32 個)，8 組材料所產生之共同片段均為 281 個，且無多型性條帶(表四)。分析 8 組材料彼此間的 Jaccard 相似性係數，新鮮及各處理組均為 1.00(表五)。

從授粉後所得之 F1 種子外觀及植株生育過程中，各處理間之種子均為淡黃色、子葉大小約 2.7-2.9×1.0 mm、胚軸無呈現紫色、莖色為紫綠混色-紫色不明、節色為紫色、葉色為綠色、植株生長習性為中間型、株高約 70-75 公分、株寬約 71-75 公分、花色為白色、花藥色為紫色、未成熟果綠色、成熟果紅色、果長約 10.2-10.5 公分、果寬約 1.5-1.6 公分、果實縱切面為長方形、橫切面為圓形，彼此間在外表型態上並無差異(表六)。

表三、以液態氮保存不同時間後對辣椒品系 hp27 花粉發芽率之影響

保存時間 Preservation period	花粉發芽率 Pollen germination (%)
fresh	68.4±1.0a
1 week	69.8±0.9a
2 weeks	69.5±0.9a
1 month	68.1±1.2a
2 months	71.3±1.1a
3 months	70.2±0.6a
6 months	69.9±0.9a
12 months	71.9±1.1a

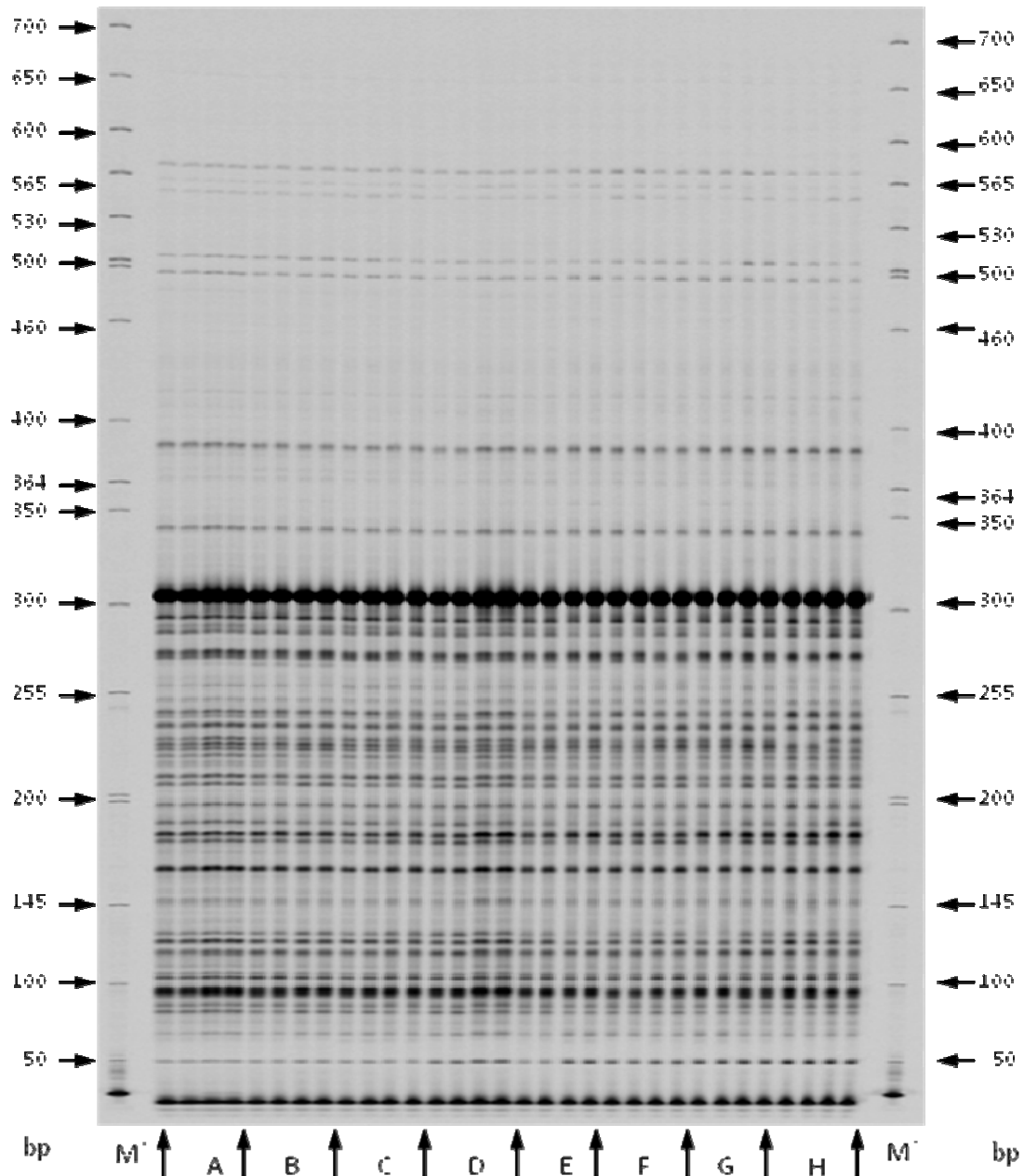


圖 3. 花粉液態氮保存不同時間後授粉之辣椒雜交一代植株以 M-CAT/E-ACG 選擇性聯合引子組進行 AFLP 分析之電泳圖。

*In A to H: Samples were collected from hybrids produced by pollen cryopreserved for 0 week (A), 1 week (B), 2 week (C), 1 month (D), 2 month (E), 3 month (F), 6 month (G) and 12 month (H), respectively, four PCR replicates.

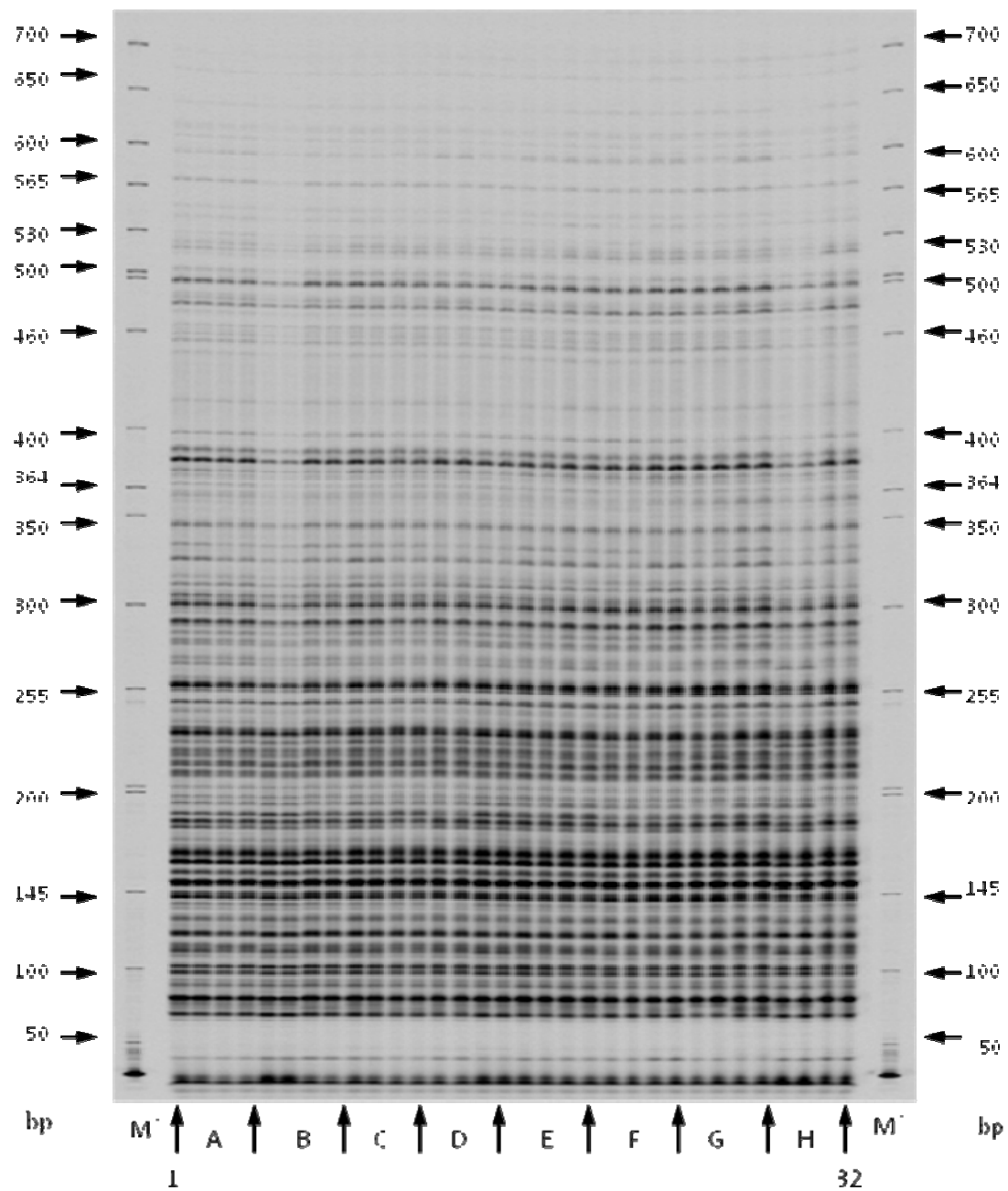


圖 4. 花粉液態氮保存不同時間後授粉之辣椒雜交一代植株以 M-CTA/E-AGC 選擇性聯合引子組進行 AFLP 分析之電泳圖。

*In A to H: Samples were collected from hybrids produced by pollen cryopreserved for 0 week(A), 1 week (B), 2 week (C), 1 month (D), 2 month (E), 3 month (F), 6 month (G) and 12 month (H), respectively, four PCR replicates.

表四、以 AFLP 分析花粉液態氮保存不同時間後授粉對辣椒雜交一代植株葉片之 DNA 片段表現情形

引子對 Mse 1/Eco R1 Primer pair	總條帶數/多型性條帶數 ^z No. of total / polymorphic fragments								總數 Total
	新鮮 fresh	1 星期 1 week	2 星期 2 week	1 個月 1 month	2 個月 2 month	3 個月 3 month	6 個月 6 month	12 個月 12 month	
CAA/AGG	48/0	48/0	48/0	48/0	48/0	48/0	48/0	48/0	384/0
CAC/ACG	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	296/0
CAG/ACT	73/0	73/0	73/0	73/0	73/0	73/0	73/0	73/0	584/0
CAT/ACG	32/0	32/0	32/0	32/0	32/0	32/0	32/0	32/0	256/0
CTA/AGC	54/0	54/0	54/0	54/0	54/0	54/0	54/0	54/0	432/0
CTC/ACG	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	296/0
總數 Total	281/0	281/0	281/0	281/0	281/0	281/0	281/0	281/0	2248/0

^z The fragments were obtained from hybrids produced by pollen cryopreserved for different period.

表五、以花粉液態氮保存不同時間後授粉對辣椒雜交一代植株間之 Jaccard 相似性係數

取樣植株 ^z Sampled plants	新鮮 fresh	1 星期 1 week	2 星期 2 week	1 個月 1 month	2 個月 2 month	3 個月 3 month	6 個月 6 month	12 個月 12 month
fresh	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
1 week	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 weeks	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
1 month	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 months	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
3 months	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6 months	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
12 months	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

^z The sampled hybrids were produced by pollen cryopreserved for different period.

表六、花粉液態氮保存不同時間後之花粉活力及授粉對辣椒雜交一代植株^z外觀性狀之影響

花粉活力 與植株性狀 Pollen viability and plant characteristics	液態氮保存時間 Cryopreserved period							
	新鮮 fresh	1 星期 1 week	2 星期 2 week	1 個月 1 month	2 個月 2 month	3 個月 3 month	6 個月 6 month	12 個月 12 month
花粉發芽率(%)	68.4	70.2	71.3	69.8	70.9	71.5	72.1	71.9
種子顏色	淡黃色	淡黃色	淡黃色	淡黃色	淡黃色	淡黃色	淡黃色	淡黃色
子葉大小(cm)	2.9 x 1.0	2.9 x 1.0	2.8 x 1.0	2.7 x 1.0	2.8 x 1.0	2.8 x 1.0	2.9 x 1.0	2.7x 1.0
胚軸顏色	無紫色	無紫色	無紫色	無紫色	無紫色	無紫色	無紫色	無紫色
莖色	紫綠混色- 紫色不明 顯	紫綠混色- 紫色不明 顯	紫綠混色- 紫色不明 顯	紫綠混色 -紫色不 明顯	紫綠混 色-紫色 不明顯	紫綠混 色-紫色 不明顯	紫綠混色 -紫色不 明顯	紫綠混色- 紫色不明 顯
節色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色
葉色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色
植株生長習性	中間型	中間型	中間型	中間型	中間型	中間型	中間型	中間型
株高(cm)	72	72	75	74	70	72	71	75
株寬(cm)	71	71	75	73	72	73	72	75
花色	白	白	白	白	白	白	白	白
花藥色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色
未成熟果色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色
成熟果色	紅色	紅色	紅色	紅色	紅色	紅色	紅色	紅色
果長(cm)	10.4	10.4	10.2	10.3	10.3	10.4	10.2	10.5
果寬(cm)	1.6	1.6	1.6	1.5	1.6	1.5	1.6	1.6
果形(縱切面)	長方形	長方形	長方形	長方形	長方形	長方形	長方形	長方形
果形(橫切面)	圓形	圓形	圓形	圓形	圓形	圓形	圓形	圓形

^z The hybrids were crossed by female line (line C) and male line (line hp27) after different periods of liquid nitrogen storage of male line's pollen

四、液態氮保存對花粉活力之影響

(一) 花粉採收時期對液態氮保存後之活力影響

參試材料為辣椒品系 hp27，在春季、夏季及秋季分別種植三批植株進行新鮮及液態氮保存花粉之花粉發芽表現結果如表七，試驗結果顯示，在相同株齡條件下，春季採收之花粉活力為 78.8%，明顯高於秋季收之花粉活力(60.3%)及夏季採收花粉之活力(29.5%)。而經液態氮保存 1 週後，同樣以春季採收之花粉活力為 82.1%，明顯高於秋季收之花粉活力(62.4%)及夏季採收花粉之活力(31.6%)。而經液態氮保存 1 週後，以春季花粉之花粉管長為 0.376 mm，明顯高於秋季花粉之 0.321 mm 及夏季花粉之 0.300 mm。

表七、採粉季節對辣椒品系 hp27 新鮮及液態氮保存花粉發芽之影響

採粉時間 ^z	新鮮花粉			液態氮保存花粉		
	Fresh pollen			Cryopreserved pollen ^y		
Season of pollen harvested	花粉發芽率 Pollen germination (%)	花粉管長 Pollen tube length (mm)	花粉管寬 Pollen tube width (mm)	花粉發芽率 Pollen germination (%)	花粉管長 Pollen tube length (mm)	花粉管寬 Pollen tube width (mm)
spring	78.8±3.5a ^x	0.370±0.010a	0.014±0.006a	82.1±3.3a	0.376±0.008a	0.014±0.006a
summer	29.5±5.1c	0.290±0.009c	0.013±0.007a	31.6±4.5c	0.300±0.009b	0.014±0.007a
fall	60.3±4.2b	0.302±0.008b	0.014±0.005a	62.4±4.1b	0.321±0.009b	0.014±0.007a

^z Pollen was harvested in spring(4/25),summer(7/22)and fall(10/30), respectively.

^y Pollen was cryopreserved in liquid nitrogen for 1 week.

^x Means within column followed by the same letter(s) are not significantly different by Fisher's protected LSD test ($P < 0.05$).

(二) 花粉液態氮保存對發芽時 ATP 生合成之影響

以辣椒品系 hp27 之新鮮及液態氮保存 1 週花粉，進行花粉發芽時 ATP 生合成量分析結果如表八。試驗結果顯示，新鮮花粉於 B&K 液體培養基培養 15 分鐘時所測得之 ATP 含量達 6.69×10^{-10} mM，明顯高於其他處理組，而 45 分鐘處理組顯著最低，僅有 1.92×10^{-10} mM。當花粉經液態氮保存 1 週後進行培養時，培養 45 及 60 分鐘時所測得之 ATP 含量達 5.30×10^{-10} mM 及 5.29×10^{-10} mM，明顯高於其他處理組。

表八、辣椒品系 hp27 新鮮及液態氮保存花粉於培養後之 ATP 生成量

培養時間 Cultured period	ATP 生成量 ^y ATP content ($\times 10^{-10}$ mM)	
	新鮮花粉 Fresh pollen	液態氮保存花粉 Pollen cryopreserved ^z
15 min	6.69 \pm 0.23a ^x	4.00 \pm 0.22b
30 min	2.71 \pm 0.29b	3.72 \pm 0.24c
45 min	1.92 \pm 0.25c	5.30 \pm 0.21a
60 min	2.47 \pm 0.26b	5.29 \pm 0.24a

^z Pollen cryopreserved in liquid nitrogen for 1 week

^y Pollen cultured in liquid medium for 15, 30, 45 and 60 min, respectively, and measured for its ATP synthesis content.

^x Means within column followed by the same letter(s) are not significantly different by Fisher's protected LSD test ($P < 0.05$).

(三) 花粉液態氮保存對花粉粒外表與內部形態之影響

辣椒品系 hp27 之新鮮及液態氮保存 1 星期花粉，以掃描式電子顯微鏡、穿透式電子顯微鏡進行花粉粒外觀及超薄切片之結果分別如圖 5 及圖 6。由花粉外觀觀察可知，辣椒花粉為紡錘形、具三孔溝(圖 5A)、外壁具點狀突起(圖 5B)。新鮮花粉(圖 5C)與液態氮保存 1 星期後花粉(圖 5D)之外觀無差異，以超薄切片觀察其花粉粒可知，兩者之花粉外壁之構造如圖 6A 及圖 6B，內部之胞器分布如圖 6C 及圖 6D，並無明顯差異。花粉壁橫切面構造如圖 6E。

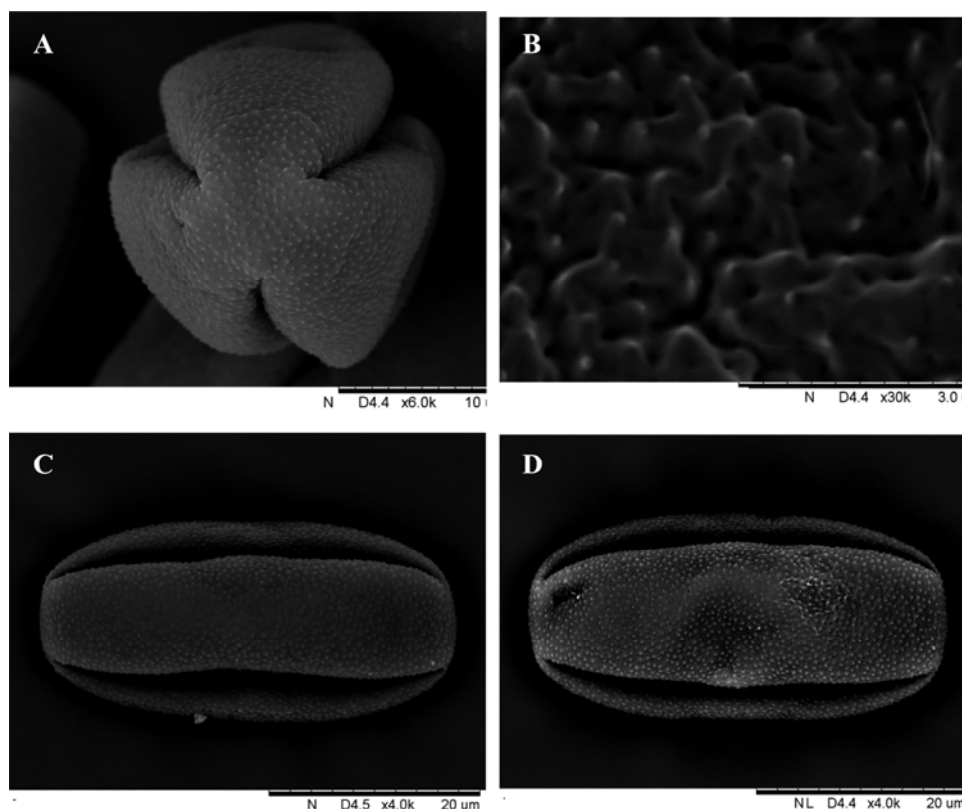


圖 5. 掃描式電子顯微鏡觀察辣椒花粉粒外觀。具三孔溝，6000 倍(A)、外壁細部構造，30000 倍(B)、新鮮花粉，4000 倍(C)、液態氮保存花粉，4000 倍(D)。

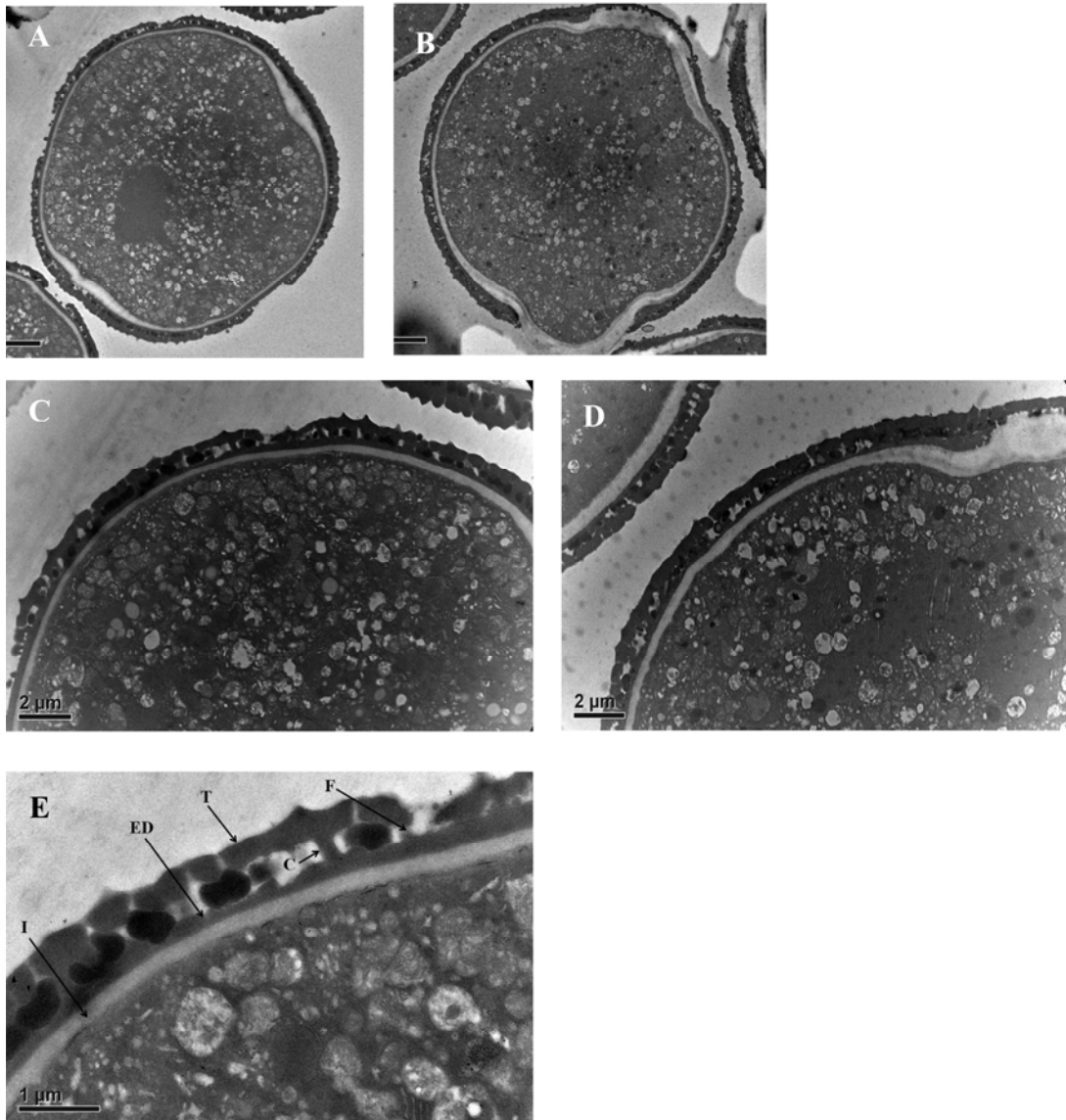


圖 6. 穿透式電子顯微鏡觀察辣椒花粉粒超薄切片構造。完整新鮮花粉，4000 倍(A)、完整液態氮保存花粉，4000 倍(B)、新鮮花粉細部，10000 倍(C)、液態氮保存花粉細部，10000 倍(D)、細胞壁橫切面構造(E)，頂蓋(T, tectum)、柱狀物(C, columella)、底層(F, foot layer)、外壁內層(ED, endexine)、內壁(I, intin), 30000 倍。

討 論

花粉保存如同種子保存一般，可依需求進行短、中、長期之保存。一般而言，雙核型的花粉多具耐乾燥性 (desiccation-tolerance)，壽命較長，辣椒即屬於此類之花粉，因此可以進行保存以延長可利用之時間。而花粉具有體積小、處理方便的優點，若能配合溫度控制，可於 -20°C 的低溫或 -196°C 的液態氮中進行超低溫

保存 (Stushnoff, 1991)。由試驗得知，辣椒花粉於室溫下保存時，花粉活力會迅速下降，至第四天後即完全失去發芽率(圖 1A)，因此新鮮採集之花粉若不置於冷藏或低溫保存設施內，便應立即使用，以免其活力喪失，而在雜交授粉的實務操作時，若能採粉後立即授粉，則無此問題發生。在 4 °C 的條件下能短暫維持花粉發芽率，從對採種之種子產量及發芽率來看，至少能維持 2 週之活力，所得之結果與新鮮花粉相近，可作短期之保存。在 -20 °C 及液態氮條件下，保存 12 週後授粉後所得果實之單果種子數及種子發芽率均與新鮮花粉無顯著差異(表一)，表示兩方式至少能維持 12 週之花粉活力。本研究亦利用螢光顯微鏡觀察授粉 4 小時後之花粉管發育情形，試驗結果顯示，花粉於 4 °C 條件下保存 4 週後，花粉發芽率較低且發芽管生長速率慢，其餘以 -20 °C 及液態氮保存 4 週及 12 週之花粉發芽表現均相近，並優於新鮮花粉(圖 2)，表示利用低溫及超低溫保存之花粉，其實際發芽率均至少能維持 12 週，此與表一所得數據之各時間處理間單果種子數無顯著差異之結果相符合。

花粉於液態氮保存後，需經過回溫解凍之過程方能利用，解凍過程中需快速經過冰晶形成區，以避免產生冰晶而破壞細胞膜，導致細胞死亡(Tisserat *et al.*, 1983)，通常以溫水水浴方式為常用之回溫解凍方式(Crisp and Grout, 1984; Rajasekharan *et al.*, 1994; Tandon *et al.*, 2007)。本試驗為嘗試找出合適之回溫條件，先以 A、B、C 處理，結果顯示花粉解凍後所測得之花粉發芽率在 73.5 %-75.4 % 之間，略高於新鮮花粉之 70.3 %，但彼此間無顯著差異，同時將其授粉後所得果實之果實大小、種子數及種子發芽率亦與新鮮花粉無顯著差異，其中單果種子數仍略高於新鮮花粉之對照組(表二 I)，因此該三種時間均可採用於回溫解凍之處理，進一步以 D、E、F、G 處理，結果同樣顯示不同回溫時間處理後之花粉發芽率及單果種子數均略高於新鮮花粉之對照組，但彼此間無顯著差異，而果實大小及種子發芽率亦與對照組相同(表二 II)，此表示該四種時間處理亦能用於回溫。而為了解其他溫度與時間之組合是否合適於回溫處理，本試驗設計以 H、I、J、K 處理，結果同樣顯示各處理間之各項調查項目均與對照組無顯著差異，因此亦能適用於回溫之處理。由此可知，花粉於液態氮保存後，利用上述之溫度及時間進行水浴回溫處理均能達到維持花粉發芽率與授粉後所得單果種子數及種子發芽率與新鮮花粉相近之目的，此外，經由掃描式電子顯微鏡及穿透式電子顯微鏡之觀察發現，液態氮保存花粉之外觀、細胞壁及胞器於 D 處理後均與新鮮花粉近似(圖 5 和圖 6)，此亦表示之快速降溫正確的回溫解凍方式可保持細胞的完整性而維持其活力。若從節省能源及操作之便利性來考量，以 D、E 處理為簡便可行之方法，同時在本試驗中亦發現花粉經由液態氮保存回溫後有發芽率提升之現象，此與王等學者(2003)在馬鈴薯花粉液態氮保存試驗中之結果相同。

為進一步探討液態氮保存花粉後所產生之花粉發芽率提升之現象，本研究先嘗試從不同採粉季節來分析新鮮及保存後花粉之發芽率及發芽管生長情形，結果顯示在相同株齡條件下，不同採粉季節之花粉發芽率不同，此結果應與該品系特性及不同季節之溫度有關，而將上述季節採收之花粉經液態氮保存後，均出現花粉發芽率略高於新鮮花粉之現象，表示確實存在某種因素導致其活力提升。近年來，開始有學者研究關於 extracellular ATP(eATP)控制植物生長之議題(Demidchik *et al.*, 2003; Jeter *et al.*, 2004)，其中亦證實 ATP 會影響花粉發芽(Steinebrunner *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2007)，本試驗中比較新鮮與液態氮保存花粉於液體培養基內發芽時之 ATP 生成量，新鮮花粉以培養 15 分鐘後之生成量最高(6.69×10^{-10} mM)，遠高於其他時間，推測可能與新鮮花粉之粒線體功能正常，因此一開始之 ATP 生成量便較高，之後又迅速下降；而液態氮則在 15 分鐘時低於新鮮花粉之含量，推測可能因液態氮低溫貯藏後，對粒線體造成非外觀之功能傷害，因此花粉吸水後進行胞器修復的工作，而使初期之 ATP 產生量低，經功能恢復後，再逐漸升高，於 45 及 60 分鐘時生成量最高(分別為 5.30×10^{-10} mM 及 5.29×10^{-10} mM)。若以花粉管於培養後 30 分鐘開始萌發來看，液態氮保存之花粉於 30、45 及 60 分鐘時之 ATP 生成量均高於新鮮花粉者(表七)。Roux 和 Steinebrunner (2007)曾指出在適當的濃度範圍內，eATP 以濃度方式調控植物生長，而過高或過低之濃度也會對生長不利，Bernard 等人(2011)的研究則顯示阿拉伯芥突變種(ENT1-RNAi)之花粉發芽率隨 eATP 含量下降而降低，綜合上述試驗及前人研究結果，可從 eATP 含量之觀點解釋液態氮保存後之能維持花粉活力，甚至略有升高之原因。

為了解花粉經液態氮保存後能否維持遺傳穩定性，利用不同保存時間解凍後之父本花粉授粉於母本柱頭上所得之雜交一代植株進行外表型及遺傳質穩定性之分析。經由植株外表形態之觀察得知，種子及植株外表重要性狀之表現無目視可區別之差異(表六)，因此可證實將父本花粉以液態氮保存一年後再行授粉，對雜交一代植株之外表型態無影響，此可符合以外觀來區別之雜交種子純度之標準。若進一步探討液態氮保存對遺傳質穩定性之影響，因 AFLP 兼具高度專一性及再現性之特性(Powell *et al.*, 1996; Vos *et al.*, 1995)，本試驗以此法進行分析，採混合 DNA 模板(bulk DNA template)之方式(Yu and Pauls, 1993)，將多個單株的基因組 DNA 等量混合後，以其作為 PCR 反應的模板 DNA，再以 6 組 Mse I/Eco RI 選擇性聯合引子組進行後續之遺傳穩定性分析，其電泳圖(圖 3、4)均顯示清晰而易辨識之條帶，經判讀均無多型性條帶發生(表四)，該法屬於逢機產生之條帶，條帶數多於 RAPD 法，本次亦使用 6 組選擇性聯合引子組，共產生 281 個條帶，故產生之條帶均位於母本植株之機率極低，應不失判斷保存後花粉遺傳質穩定性之可信度，且 8 個保存時間處理間之 Jaccard 相似性係數均為 1.00(表五)，此亦

證明經不同時間液態氮保存後之花粉雜交之後代，能維持其遺傳質之穩定性，以此回推，經液態氮保存後之花粉亦應維持其遺傳質之穩定性，此與胡等人(2003)在小麥種子、莊(2008)在紫錐菊組培苗及 Schaefer-Menuhr 等人(1996)在馬鈴薯組培苗所得之結果相符。

綜上所述，室溫下不利於辣椒花粉保存，在此環境下花粉活力迅速下降，3 天後即喪失活力，4 °C 下只適合短時間之保存，授粉後之單果種子數及種子發芽率則在 4 週後就明顯下降，故在無適當保存條件之環境下，所採集之花粉必須立刻儘快使用，以免影響其活力。而花粉發芽率在 -20 °C 下及液態氮保存 12 週後仍無降低，同時該兩處理對授粉後之單果種子數及種子發芽率均無影響，故兩者可作為較長時間之保存。若以蔬菜採種觀之，因應異地採收花粉及雜交授粉所需，花粉最多保存一年即可，當加入運輸便利性之考量時，則以液態氮桶保存攜帶之方式為首選；而若從種原保存及利用觀之，則儘量採簡單方便且能維持長時間活力之方式，即應採取液態氮保存之策略。理論上，花粉於液態氮內能作長期之保存，經試驗後亦得知辣椒花粉經液態氮保存後有略為提升其活力之效果，且至少於一年內不影響其活力及遺傳穩定度，因此在花粉活力最佳之時期採收花粉後進入液態氮保存，將有利於蔬菜育種及採種上之應用。

參考文獻

1. 王玉萍、張峰、王蒂。2003。馬鈴薯花粉的超低溫保存研究。園藝學報 30: 683-686。
2. Amarech, C. 2007. Bulk genomic DNA PCR analysis- A rapid method to estimate genetic relatedness among heterogeneous Lecerne (*Medicago sativa* L.) cultivars. Cytologia 72: 363-368.
3. Bajaj, Y. P. S. 1979. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. Euphytica 28: 267-285.
4. Barnabás, B. and G. Kovács. 1997. Storage of pollen, p. 293-314. In: K.R. Shivanna and V. K. Sawhney(eds.). Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge, UK.
5. Bernard, C., M. Traub, H. H. Kunz, S. Hach, O. trentmann, and T. Mohlmann. 2011. Equilibrative nucleoside transporter 1(ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*. J. Exp. Bot. 62: 4627-4637.
6. Boughediri, L. and N. Bounaga. 1987. *In vitro* germination of date pollen and its

- relation to fruit set. *Date Palm J.* 5: 120-127.
7. Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack. 1963. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth. *Amer. J. Bot.* 50: 859-865.
 8. Chinnusamy, V., J. Zhu, and J.-K. Zhu. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12: 444-451.
 9. Crisp, P. and B. W. W. Grout. 1984. Storage of Broccoli pollen in liquid nitrogen. *Euphytica* 33: 819-823.
 10. Demidchik, V., C. Nichols, M. Oliynyk, A. Dark, B. J. Glover, and J. M. Davies. 2003. Is ATP a signaling agent in plants? *Plant physiol.* 133: 456-461.
 11. Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
 12. Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: process and prospects. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40: 427-433.
 13. Gibbs, R. A. 1990. DNA amplification by polymerase chain reaction. *Anal. Chem.* 62: 1201-1214.
 14. Hanna, W. W. 1994. Pollen storage in frostless and conventional frostforming freezers. *Crop Sci.* 34: 1681-1682.
 15. Hanna, W. W. and L. E. Towill. 1995. Long-term pollen storage. *Plant Breed. Rev.* 13: 197-207.
 16. Haunold, A. and P. C. Standwood. 1985. Long-term preservation of hop pollen in liquid nitrogen. *Crop Science* 25:194-196.
 17. Hecker, R. J., P. C. Stanwood, and C. A. Soulis. 1986. Storage of sugarbeet pollen. *Euphytica* 35: 777-783.
 18. Imani, Ali, K. Barzegar, S. Piripireivatlou, and S. H. Masomi. 2011. Storage of apple pollen and in vitro germination. *Afri. J. Agri. Res.* 6: 624-629.
 19. Jeter, C. R, W. Tang, E. Henaff, T. Butterfield, and S. J. Roux. 2004. Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 2652-2664.
 20. Kartha, K. K., N. Leung, B. Baudet-Lapreirie, and F. Constabel. 1982. Cryopreservation of periwinkle, *Catharanthus roseus* cells culture *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 1: 135-138.
 21. Kidwell, K. K., D. F. Austin, and T. C. Osborn. 1994. RFLP evaluation of nine *Medicago* accessions representing the original germplasm sources for North American alfalfa cultivars. *Crop Sci.* 34: 230-236.

22. Kozłowski, T. T. and S. G. Pallardy. 2002. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *Bot. Rev.* 68(2): 270-334.
23. Lutz, C. 2010. Cell physiology of plants growing in cold environment. *Protoplasma* 244: 53-73.
24. Matsumoto T., K. Mochida, H. Itamura, and A. Sakai. 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plant Cell Rep.* 20: 398-402.
25. Ouellet, F. 2007. Cold acclimation and freezing tolerance in plants. *Encycl. life Sci.* John Wiley & Sons, Ltd. <<http://www.els.net/>>.
26. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafae, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. The comparison of RFLP, RAPD, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238.
27. Rajasekharan, P. E., T. M. Rao, T. Janakiram, and S. Ganeshan. 1994. Freeze preservation of gladiolus pollen. *Euphytica* 80: 105-109.
28. Reed, B. M., J. Denoma, J. Luo, Y. Chang, and L. Towill. 1998. Cryopreservation and long-term storage of pear germplasm. *In Vitro Cell. & Devel. Biol. Plant* 34: 256-260.
29. Rodriguez-Riano, T. and A. Dafni. 2000. A new procedure to assess pollen viability. *Sex. Plant Reprod.* 12: 241-244.
30. Roux, S. J. and I. Steinebrunner. 2007. Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. *Trends in Plant Science* 12: 522-527.
31. Shivanna, K. R., H. F. Linkens, and M. Cresti. 1991. Pollen viability and pollen vigor. *Theor. Appl. Gen.* 81: 38-42.
32. Sparks, D., and I. E. Yates. 2002. Pecan pollen stored over a decade retains viability. *HortScience* 37: 176-177.
33. Steinebrunner I., J.Wu, Y. Sun, A. Corbett, and S. J. Roux. 2003 Disruption of apyrases inhibits pollen tube-specific monosaccharide transporter in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 131: 1638-1647.
34. Stushnoff, C. 1991. Cryopreservation of fruit crop genetic resources - implications for maintenance and diversity during conservation. *HortScience* 26: 518-522.
35. Tandon, R., R. Chaudhury, and K. R. Shivanna. 2007. Cryopreservation of oil palm pollen. *Curr. Sci.* 92: 182-183.
36. Tisserat, B., J. M. Ulrich, and B. J. Finkle. 1983. Survival of Phoenix pollen

- grains under cryogenic conditions. *Crop Sci.* 23: 254-256.
37. Vos, P, R. Hogers, M. Bleeker, T. van de Lee, M. Hornes, A. Ferijters, J. Pot, J. Peleman, M Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a review technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
 38. Wolf, C., M. Hennig, D. Romanovicz, and I. Steinebrunner. 2007. Developmental defects and seedling lethality in apyrase AtAPY1 and AtAPY2 double knockout mutants. *Plant Mol. Biol.* 64: 657-672.
 39. Yu, K. and K. P. Pauls. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulk genomic DNA samples. *CIP Program Rep.* 1997-1998: 303-310.
 40. Zietkiewics, E., A. Ralfalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
 41. resistance in walnut (*Juglans regia* L.). *BMC Genomics* 16: 614.

國際有機種子發展趨勢

趙秀滂、顏永福

臺南區農業改良場、嘉義大學生物農業科技學系

摘 要

2013 年全球的有機食品和飲料市場值 720 億美元，國際市場成長率每年高達 25%，有機栽培面積將逐年增加，歐盟於 2007 年通過(EC) No 834/2007 法規規定有機栽培必須使用前一代用有機管理的母本所生產的種子；美國有機農業法標準(National Organic Program Standard)第 205.204 條也限制農民要種植有機種子，所以有機種子的需求將會隨著增加。傳統種子和有機種子的採種技術兩者相似，唯一區別是有機種子採種田須採用有機農法並取得認證，歐盟的 STOVE (Seed Treatment for Organic Vegetable production) 又要求有機種子感病率須低於 0.01%，所以有機採種也就更有難度。台灣種子公司有很好的採種技術和自有品種，曾經是國際種子公司委托採種地區，所以發展有機種子採種產業很有潛力。

關鍵詞：有機農業、種子、採種

前 言

有機農業是一種較不污染環境、維護生態，並能提供消費者健康與安全農產品的生產方式，所以有機農業有時亦被稱為生態農業、低投入農業、生物農業、動態農業、自然農法、再生農業、替代農業、或永續農業之一種。過去有機農民的種子來源多為一般慣行農法栽培親本所生產的種子或繁殖材料，然而近幾年各國依有機農業法規要求有機採種的親本生產過程亦必須採用有機栽培和取得驗證，才能取得有機種子標章和出售。

歐盟於 2001 年決議要求到 2004 年時，有機栽培須回歸法律規定使用有機種子。美國有機農業法標準(National Organic Program Standard)第 205.204 條規定農民要種植有機種子除非無法購得商業有機種子，才可以以未經藥物處理也非基改的傳統種子代替。2005 年國際有機農業推動聯盟的有機生產和加工基準法 4.1 條 (IFOAM NORMS for ORGANIC PRODUCTION and PROCESSING, 4.1 Choice of Crops and Varieties) 規定有機栽培要使用有機種子或資材，這項規定已成為國際

標竿，並成為許多國家有機標準和立法的參考。我國現行規範對於種苗的有機農業規範與其他國家相比，明顯有所不足，並未要求有機種植需要採用有機種苗，僅要求種苗不得經化學藥劑處理，加上有機種苗的售價基於成本的考量，必定遠高於慣行種苗，這樣會讓有機農民購買有機種苗的意願降低，更無法吸引種子公司生產有機種苗，形成惡性循環，亟待改進。

2004年由國際有機農業推動聯盟(IFOAM)、國際糧農組織(FAO)及國際種子聯盟組織共同舉行第一屆有機種子世界會議，可見有機種子日益受到了重視。本文擬由有機農業法和有機種子、有機種子產業及有機種子採種和育種等三方面，介紹國際有機種子發展趨勢，以因應未來有機農業之趨勢與有機種子的市場需求。

有機農業法規和有機種子

歐盟農業部於1991年批准有機農法Regulation (EEC) No.2092/91，規定農民要種植有機種子，但無法購得商業有機種子時可以用傳統種子，造成驗證機構有彈性空間，未能依法要求有機栽培須種植有機種子，因此歐盟於2001年要求到2004年時須回歸法律規定使用有機種子。歐盟又於2007年通過(EC) No 834/2007法同時廢止No.2092/91，No 834/2007法第12條，規定有機栽培必須使用前一代用有機管理的母本所生產的種子，營養繁殖的作物至少一代親本亦須用有機管理，多年生作物親本至少須有兩個生長季節用有機管理。第26條規定栽培用的有機種子和營養繁殖資材須取得驗證標示。配合歐盟國家到2004年時須回歸法律規定使用有機種子，歐盟於2003年建立會員國有機種子資料庫，供登錄商業有機種子，歐盟自2005年1月起已有15個國家可以經由有機種子資料庫(www.europa.eu.int/comm/agriculture/qual/organic/seeds/index_en.htm) 首頁連結，若資料庫顯示仍有有機種子可販售，則不得使用傳統種子，因此驗證機構操作空間變小，因為若資料庫顯示有種子，歐盟任何政府就必須關閉替代條款，強迫必須使用有機種子。因此荷蘭於2004年關閉使用小麥、燕麥、大麥、馬鈴薯和黑麥草等作物傳統種子，比利時於2005年關閉使用9個種類的蔬菜傳統種子。法國政府對8個種類糧食作物和10個蔬菜作物特別監視，並於2007年否決所有申請玉米使用傳統種子代替有機種子(ECO_PB, 2007)。現在有機栽培須種植有機種子的法令執行越來越嚴，未來歐盟的農民只能種植種子公司所能提供的有機種子。

美國有機農業法標準(National Organic Program Standard)第205.204條規定農民要種植有機種子除非無法購得商業有機種子，才可以以未經藥物處理也非基改

的傳統種子代替，由於美國法令這項規定已帶動有機種子研究、生產和市場。估計目前美國約有8%的有機栽培使用經驗證的有機種子(Dillon, 2007)，但Reiten（美國Oregon-based區種子公司研究和農場經理）懷疑美國種植有機種子的面積不超過1%，因為美國生產的有機種子大多被賣到歐盟，所以用有機種子產量推算種植有機種子面積可能有誤，因為未扣除賣到歐盟的種子量。

有關美國有機種子供應資料庫，最早是由美國種子貿易協會(ASTA)於2004年透過有機材料審查研究所(Organic Material Review Institute, OMRI)和資金支援，建立一個國家級的經過認證可用的有機種子品種資料庫。由於缺乏美國農業部國家有機計畫(National Organic Program, NOP)法規正式背書，進而阻礙資料庫正常運作和營運，最終在2011年關閉該資料庫。2005年卡羅來納州農場土地管理單位組成「有機認證和教育組織」，資助一個名為「保存我們種子專案」，創建另一個資料庫，其目標是免費公開使用，搜索被認證的有機種子，支持有機種子生產教育資料。不幸地這個資料庫到2008年年底被迫停止運作。2007年農村地區技術轉移服務(Appropriate Technology Transfer for Rural Areas, ATTRA)發起創立另一個資料庫。2008年有機種子聯盟 (Organic Seed Alliance, OSA)在其網站上創立一個23個有機種子供應商的清單。除外，仍有更多的資料庫被認證機構陸續開發中，包括加利福尼亞認證有機農民 (California Certified Organic Farmers, CCOF)，編寫一個29個有機種子供應商的資料庫，作為支援有機栽培之用。最近由OSA的有機種子工作小組(OSA's Organic Seed Working Group)協助，針對有機種子供應、生產和資訊共享進行改進，OSA的有機種子工作小組廣邀相關業者參與資料庫開發，並與協會的官方種子核證機構 (Association of Official Seed Certifying Agencies, AOSCA) 一同創立"有機種子搜索器(Organic Seed Finder)"網站(www.organicseedfinder.org)，這個國家有機種子資料庫是由參與使用者和贊助商共同資助，期待已久的美國有機種子資料庫終於在2012年10月正式啟動。該資料庫並作為服務農民、認證機構和其他相關者的免費資源，從中尋找獲得有機種子可用性的資訊。

2005年國際有機農業推動聯盟的有機生產和加工基準法4.1條 (IFOAM NORMS for ORGANIC PRODUCTION and PROCESSING, 4.1 Choice of Crops and Varieties)規定有機栽培要使用有機種子或資材，這項規定已成為國際標竿，並成為許多國家有機標準立法的參考。有機種子(苗)定義主要根據歐盟於2007年通過(EC) No 834/2007法規定，1.有機栽培必須使用前一代用有機管理的母本所生產的種子。2.營養繁殖的作物至少一代親本亦須用有機管理。3.多年生作物親本至少須有兩個生長季節用有機管理。4.第26條規定：栽培用的有機種子和營養繁殖資材須取得驗證標示。使用有機種子有三個理由:(一)有機農業法有規定，所

以驗證機構要求有機栽培用要有機種子，(二)減少上游傳統生產帶來的污染，(三)發展有機農法栽培品種，這三個理由對發展有機種子都很重要，其中發展有機農法栽培品種更是有機農業的基礎，因為適當有機栽培的品種，可以補有機農法的不足。Groot *et al* (2005)報告指出，即使有足夠的有機種子，確實執行種植有機種子仍有下列困難：(1)有機種子或繁殖資材仍不是所有作物可以取得，尤其適當的品種。(2)用有機農法生產的種子品質無法與傳統種子相比。(3)有些有機種子較貴，因此實際上農民會選擇傳統種子。(4)有機農法種子可能農民自行留種或社群會員交換，因此種子品質會是嚴重問題，所以依法執行種植時使用有機種子仍須克服許多的困難。

有機種子產業

2013 年全球的有機食品和飲料市場值 720 美元，2011 年全球的有機食品和飲料市場值 628 美元與 2008 年相較有 25% 的成長，而傳統食品和飲料市場增加率只有 2-6% (GRAIN, 2008)。全球有機栽培面積也是逐年增加，由 1999 年的 11,000,000 公頃到了 2013 年已達 43,100,000 公頃，14 年內增加將近 4 倍，加上國際有機推動聯盟 (IFOAM) 和國際種子組織 (ISF) 已於 2004 年 7 月在意大利羅馬召開第一屆「國際有機種子會議」，有高達 57 個國家與會，可見有機種子已受到各國的重視。

大型的種子公司已開始研究和供應有機種子，例如杜邦 (Dupont) 供應有機玉米種子，法國種子公司巨擘 Limagrain 公司供應全系列有機種子，德國 KWS 公司供應玉米和甜菜有機種子，德國 Bayer 公司因為看重有機種子未來的利益，因此併購德國 Hild 有機種子公司和美國 M&M Mars 有機種子公司，這個趨勢愈來愈強 (GRAIN, 2008)。歐盟種子大國荷蘭亦加入有機種子供應的行列，尤其荷蘭種子公司在國外有採種基地或子公司，因此可以全年供應種子，例如跨國種子公司 Enza 已在 14 個國家的子公司生產有機蔬菜種子。另外的兩家荷蘭大種子公司 Bejo and Rijk Zwaan 透過國外生產也開始供應有機種子 (GRAIN, 2008)。荷蘭的 Wageningen 大學和研究中心已開設有機種子農法和種子技術課程 (Groot *et al.*, 2005)。美國很多有機種子公司是小型公司或家族農場，這種小規模有機種子產業適合台灣發展。其中 Enza Zaden 集團內的 Vitalis 種子公司成立於 1994 年，是美國第一家專門為有機農業育種、生產、清理和銷售高品質有機種子的公司。

有機種子生產技術和產業仍面臨困難，Lammerts van Bueren (2002) 提出有機種子的生產面對三個主要困難：(1) 因為有機農業面積有限，所以有機種子市場

有限導致生產成本比傳統種子高。(2)技術上的困難，因為缺乏不使用農藥和肥料於生產有機種子的經驗。(3)有機種子品質達到標準的困難：有機種子採種的困難有病蟲害和雜草的控制，尤其種子傳染病害更應特別注意，所以須要對這些問題進行研究。例如 Boelt(2003)報告指出有機苜蓿採種，因受到象鼻蟲幼蟲 (weevil larvae) 危害，有機種子採種量減少 12-77%。

根據 FIBL and IFOAM (2015)年調查結果，2013 年全球前十大有機產品市場依序為美國、德國、法國、中國、加拿大、英國、義大利、瑞士、奧地利和瑞典等十國。2011 年有機耕地栽培作物種類最多的是穀物作物(40%)，其次是飼料作物(35%)、油料作物(8%)、蛋白質作物(5%)、蔬菜作物(4%)及其他(8%)。全世界有機穀物作物種植面積，根據 FAO(2010)統計約佔總生產之 0.4%(2,500,000 公頃/700,000,000 公頃)，其中美國是最大有機穀物生產國，約 0.6%(370,000 公頃)。因此以穀物中的小麥為例，比較有機及慣行栽培所需種子費用，在美國有機小麥 1 英畝約需要 120 磅種子，每磅種子約美金 3 元，折合台幣每公頃種子費用約 26,676 元；小麥慣行栽培，每 50 磅種子約美金 24 元，折合台幣每公頃種子費用約 4,268 元，有機栽培種子費用約為慣行栽培 6 倍。台灣小麥慣行栽培 1 公頃約需要 150Kg 種子，每公斤種子 40 元，所需種子費用僅 6,000 元，因為台灣有機栽培並未強行規定使用有機種子，所以很難預估小麥有機種子市場，若依照美國有機栽培種子費用約為慣行栽培之 6 倍，加上未來有機栽培要求使用有機種子，台灣從事有機小麥種子生產將會有很大的獲利。

另外全世界有機蔬菜種植面積，根據 FAO(2010)統計約佔總生產之 0.4%(240,000 公頃/6,000,000 公頃)，其中美國是最大有機蔬菜生產國，約有 20,000 公頃，主要包括豆類、根莖類及沙拉用葉菜類。因此以有機栽培中常見的胡蘿蔔為例，比較有機及慣行栽培所需種子費用，在美國有機胡蘿蔔 1 英畝需要 2 磅種子，每磅種子約美金 170 元，栽培方式為行株距 80×4cm，折合台幣每公頃種子費用約 25,194 元；胡蘿蔔慣行栽培，每磅種子約美金 30 元，折合台幣每公頃種子費用約 4,446 元，有機栽培種子費用約為慣行栽培 5 倍。台灣慣行栽培胡蘿蔔 1 公頃約需要 5Kg 種子，每磅種子因品種不同變化很大(500~2500 元)，栽培方式為行株距 100×10cm，所需種子費用 5,500~27,500 元。因為胡蘿蔔在台灣有機栽培是不可或缺的蔬菜種類，所以使用有機種子有其必要性。綜合上述，隨著有機農業的發展，有機栽培改用有機種子市場潛力極大，因此如何以政策鼓勵和誘導更多種子業者投入有機種子的開發生產，將有利於有機種子產業的發展。

根據 Dillon(2007)指出美國用有機種子產量推算種植有機種子面積，約只有 8%的有機栽培使用經驗證的有機種子，但隨著 2005 年國際有機農業推動聯盟的有機生產和加工基準法 4.1 條，規定有機栽培要使用有機種子或資材，這項規定

將使得未來有機種子的市場需求擴大。根據 2014 年加拿大有機&慣行之種子市場分析指出，種子包括蔬菜(\$28,000,000)、自行留種(\$30,000,000)及購買進口(\$20,000,000)共三部分，其市場總價值約 7 仟 8 百萬美金，其中有機蔬菜種子(\$9,100,000)、自行留種(\$11,600,000)及購買進口(\$7,700,000)約佔 36.4%，而且需求量有日益增加的趨勢，顯示有機種子受到重視。

有機種子採種和育種

有機種子聯盟(Organic Seed Alliance)是美國一個研究和教育的機構，目標是支援農作物種子的遺傳資源的倫理學發展和管理工作。最近，有機種子聯盟公佈美國「國家有機種子」(2008)的報告。報告中指出：「即使有機產業成長快速，有機種子產業仍尚未迎頭趕上滿足需求。合格生產的有機種子供應量仍有限，造成的原因有很多，包括公部門縮減植物育種計劃、私人的種子公司產業缺乏整合投資、以及對於執行 NOP(National Organic Program Standard) 規定要求種植有機種苗的分歧意見等」。所以在美國有機種子產業正處於起步階段。

傳統種子和有機種子的採種技術兩者相似，唯一區別是有機種子採種田須採用有機農法並取得認證，由於有機農法禁用化學肥料和農藥，因此有機採種田控制病蟲害較困難，以致有機種子感病的風險增加，但歐盟的STOVE(Seed Treatment for Organic Vegetable production)又更改規定，要求有機種子感病率須低於0.01%，所以有機採種的田間衛生和控制種傳病害就變成很重要(Gail, 2005)。但由於有機禁用農藥所以露地採種的有機種子感病的風險增加，尤其二年作物生長期更易感病，已有許多的地區採用溫室採種，因為可以控制環境和避免污染，避免種子受到病害感染，紐西蘭已用保護栽培在有機種子採種(Walker, 2003)。

使用有機種子有三個理由：(1)有機農業法有規定，所以驗證機構要求有機栽培需要用有機種子，(2)減少上游傳統生產帶來的污染，(3)發展有機農法栽培品種。這三個理由對發展有機種子都很重要，其中第三點發展有機農法栽培品種更是有機農業的基礎，因為適當有機栽培的品種，可以補有機農法的不足。因為有機農法內涵不是只有不能使用禁用資材清單，而是有機農業系統不同於傳統農業，發展有機農法栽培品種是有機農業的基礎，因為適當有機栽培的品種，可以補有機農法的不足，但是育種是長期性的工作，所以Lammerts van Bueren等人(2007)對於有機育種提出短、中及長期的目標，短期以找到適合有機生產的作物品種為首要目標，之後必需考量對環境低投入的作物品種，以符合節能減碳的目

的，終極的目標則是以有機方式及條件所育成的作物品種。此外Wiethaler 等人(2000)針對有機作物育種準則提出1.具有自然繁殖能力，2.適應有機條件的能力，及3.遺傳多樣化等特點。所以 FiBL DOSSLER (2001)指出適合有機栽培的品種須具1.適應當地氣候及土壤狀況，2.抗/耐病蟲害，要能與雜草競爭，能在土壤和環境氣候逆境下生長，3.產量穩定，4.耐貯運，及5.富含營養價值等特點，因此適合有機栽培的品種特性會不同於傳統品種。針對上述品種特性之需求，已有種子公司和育種家在發展適合有機栽培的品種(Colley, 2011)，這些品種具生長勢強，地上部形成遮蔽效果早以抑制雜草生長，耐低溫等氣候逆境，植株根系生長快生長勢強而且分佈密，所以吸肥力強，尤其有機栽培禁用農藥更須要能抗病蟲害品種。Grube (2007)報告有機蔬菜生產規模比傳統蔬菜小，而且操作也多樣化，尤其栽培環境、土壤和灌溉也多變，所以有機品種育種須要遺傳多樣化以配合多樣化的栽培環境和操作(Ceccarelli and Grando 2007；Dawson *et al.*, 2008)。

結 語

臺灣有機農業的發展始於1986年，有機栽培面積逐年增加，在2014年已達5992公頃，10年成長率為20.5%，以水稻和蔬菜面積最大，也較為成功。水稻為自交作物，可自行留種使用；蔬菜以短期葉菜類為主，其種類、品種繁多，所需的種子用量非常地高，但在有機種子生產及供應上，因無法取得，所以大多數有機栽培仍使用市售商業種子。

有機種子生產是完備有機農業必需的一環，台灣有很好的採種基礎，曾是國際大型種子公司委託採種之地區，而且台灣蔬菜育種技術進步，有自己育成的品種，不但蔬菜品質適合國人口味，而且已馴化成適合在台灣採種，同時許多蔬菜品種有OP及地方品種，非常適合做為有機採種使用。但有機採種田間管理會影響採種量和種子品質，這是臺灣較欠缺的技術。有機作物育種需要基礎有機育種理論，即要有遺傳多樣性和糧食安全概念，所以有機育種應採用OP品種和mass selection選拔的哲學思想，並可從較大宗短期葉菜開始有機育種。同時由96年7月6日公佈「有機農產品及有機農產加工品驗證管理辦法」和「有機農產品及有機農產加工品驗證基準」之「第三部分作物之三、作物、品種及種子、種苗」，並未給「有機種子」明確定義，因此將來須要配合修正有機種子規定才能完備有機農業並與國際有機農業接軌。

參考文獻

1. Boelt, B. 2003. Organic Forage Seed production. Loch, Donald (Eds). Proceedings of the 5th International Herbage Seed Conference, Gatton, Australia, 2003, "Herbage Seeds in the New Millenium-New Market, New Products, New Opportunities, pp. 43-47.
2. Ceccarelli, S. and S. Grando. 2007. Decentralized-participatory plant breeding: an example of demand driven research. *Euphytica* 155: 349-360.
3. Colley, M. 2011. Plant Breeding for Organic Systems. Organic Seed Alliance
4. Dawson, J. C., K. Murphy, and S. S. Jones. 2008. Decentralized selection and participatory approaches in plant breeding for low-input systems. *Euphytica*. 160:143.
5. Dillon, M. 2007. Organic Seed Alliance, personal communication, 2007. ECO_PB, 2007. Newsletter on organic seeds and plant breeding.
6. FiBL and IFOAM. 2013. The world of organic agriculture statistics and emerging trends 2013. 340p.
7. FiBL Dossier. 2001. An evaluation for organic plant breeding. Plant Breeding Techniques No.2. 1st edition.
8. Gail, Z. 2005. Organic seed propagation: current status and problems in Europe. http://eco-pb.org/09envirfood_organicseedpropagation.pdf.
9. Groot, S., R. Bulk van den, J. Burg van der, H. Jalink, C. Langerak, J. Wolf van der. 2005. Production of Organic Seeds: Status, Challenges and Prospects. Seed Info 28. www.icarda.org/News/Seed%Info/SeedInfo_28/ResearchNotes_28.htm
10. Grube, R. 2007. Breeding for organic and sustainable systems: One size does not fit all. *HortScience* 42: 813.
11. Lammerts van Bueren, E. 2002. Organic plant breeding and propagation: concept and strategies. Ph. D. Thesis Wagening University. Louis Bolk Institute, Driebergen, P. 210.
12. Lammerts van Bueren, E. T., K.-P. Wilbois, and H. Østergård. 2007. European perspectives of organic plant breeding and seed production in a genomics era. *JARTS*, 89: 101-120.
13. Marie-Eve Levert Canada Organic Trade Association. 2014. The Market for Organic & Ecological seed in Canada, Trends and opportunities. 66p.
14. Walker, C. 2003. Seeds of survival // *Organicnz*, Vol. 62, No. 6, pp. 11 www.organicnz.pl.net

種子披衣(Seed Coating)技術研發

黃玉梅

行政院農業委員會種苗改良繁殖場

摘 要

種子披衣(coating)技術始於 1930 年代發展於英國，運用在穀類種子上，至 1960 年代為因應精密的播種才迅速在歐洲發展，並大規模在商業使用。目前已成為商業種子生產過程，重要的種子處理技術，且在促進種子品質上，被認為是最具助益的處理技術。種子披衣技術的研發，除使種子處理擺脫只能解決休眠、拌藥等問題之傳統局限，可依需求在披衣過程添加殺菌殺蟲劑、營養元素、拮抗或有益微生物..等，讓種子滿足客製化要求，使終端使用農戶或育苗場能確保成苗率，提升制病防蟲效率，減少農藥、肥料使用量，降低生產成本，另因披衣種子之顏色區分，更可降低品種混雜的風險。農委會種苗改良繁殖場針對不同作物的種子特性進行研發，目前已成功研製十字花科、番茄、萵苣、胡蘿蔔種子披衣配方及處理程序，未來進一步研發微生物與其他生物性材料披衣種子，以增加作物抗性及促進養份攝取，更符合安全及有機概念。種子披衣加工技術可以工業化量產，且可增加產品附加價值及滿足客製化需求，深具市場潛力。

關鍵詞：種子、種子披衣、發芽

前 言

近年來因農業勞動力老化及外移的現象，使得農忙時常有請不到工的窘境，生產者必須以機械化取代人力，而改變原有作物的生產模式，穴盤育苗興起，直播蔬菜改採機械點播，農民對種子品質除了要求發芽率外，還要發芽快速、整齊，甚至於播種後必須具有可以忍受田間逆境及制病防蟲的能力。因此，種子處理技術不再只是解除休眠、拌藥等種子預措工作而已，如使種子發芽迅速而整齊的滲調(priming)處理，以及倍受各國矚目的種子披衣(seed coating)處理技術均已純熟，且可商業化應用量產。目前在國際上流通的高價蔬菜種子，如：茄科、十字花科、葫蘆科等種子披衣處理極為常見，且隨著全球暖化、能源作物需求大增、原物料上漲、採種地取得日益困難、採種成本居高不下..等因素，種子公司必須

讓每一粒種子發揮最大的功能，不能再以傳統的「增加播種量」來彌補缺株的問題。

產品價值決定售價，以荷蘭為例，2012年種子進口量為1.5萬噸稍高於出口量的1.1萬噸，但每公噸出口均價10.8萬美元卻是進口均價2.4萬美元的4倍以上，藉由國外委託採種進口後，經過種子多元精製處理及包裝，而創造高額利潤，除品牌及品種外，品質決定種子售價。因此，任何有助於品質提升之種子處理技術，不僅是種子研究人員的研究重點，更是種子企業重視的處理加工技術。本文介紹提升種子品質的種子披衣處理技術之研究與未來展望。

種子披衣技術的發展

種子披衣技術於1930年代始於英國，最初運用於穀類種子上，美國於1940年末即開始造粒（seed pelleting）技術的研發，至1960年代為因應精密的播種才迅速在歐洲發展，並逐漸在商業性使用（Glen, 1991；Grellier *et al.*, 1999），之後在荷蘭、英國、法國等不斷研究、改良種子披衣技術，並擴大到蔬菜和花卉上應用。在亞洲1963年日本出現了用紅土包覆牧草種子的技術，1981年日本開始研發應用於種子的專一種衣劑。八〇年代中後期，美、日、英以及西歐一些國家對種衣劑引起高度重視，並相繼投入大量的研發資源，使種衣劑的理化性能、產品質量和應用效果獲得提昇，許多專利產品大量在市場流通使用，1984年日本住友株式會社並針對蔬菜種子進行工業化的披衣處理。

中國大陸則於1976年開始進行甜菜種子披衣種子技術研究，1980年代由中國農業大學研製藥肥型的種衣劑，在1995年以前披衣種子推廣面積僅為1000多萬畝，但1995年被農業部以“種子工程”列為優先發展的高技術重點，在政策性的全面推動下，到2000年高達4.2億畝。

種子披衣(seed coating)處理技術發展至今已為商業種子生產過程中，重要的種子處理技術之一，且在提升種子品質上，被認為是最具助益的處理技術（Copeland and McDonald, 2001），披衣可增加種子的附加價值及滿足客製化需求，使產品更具市場競爭力。

種子披衣加工的類型

種子披衣（seed coating）是結合農學、化工、機械等加工技術，目前已被廣泛應用在種子處理加工上，而形成所謂的「種子工業(seed industry)」。依加工處

理方法不同可分為鑲衣 (seed encrustment)、膜衣 (seed film coating) 造粒 (seed pelleting) 及種子團(Seed granule)等四種類型(Tyron, 1994)。分述如下：

1. 種子鑲衣 (seed encrustment) 處理：利用披覆材料進行種子包埋，不刻意改變原來形狀和大小，如：十字花科、茄科種子(圖 1)。鑲衣處理亦可於材料加入殺蟲劑、殺菌劑、營養劑、生長調節劑等混合後進行包埋。
2. 膜衣 (seed film coating) 處理：膜衣處理技術起源於歐洲，乃在鑲衣、造粒或拌藥之後，以一層聚合物粘劑來處理種子，如：葫蘆科種子(圖 2)。其目的在於減少處理時添加殺菌、殺蟲劑之脫落現象，以避免浪費藥劑、污染環境及使用時危害人的健康。膜衣處理亦可增加披衣種子強度，減少產生機械傷害，此處理可同時添加染劑，以增加種子之區別性與顏色管理(圖 3)。
3. 造粒 (seed pelleting) 處理：此技術 1940 年末於美國發展，造粒處理乃將小、輕、形狀不規則或不定形的種子，如：萵苣、萵菜、芹菜、洋蔥、胡蘿蔔..等較不易單粒機械化播種之種子，以黏著劑、填充劑處理種子(圖 4)，使成為圓粒或一致的形狀，亦可在材料中加入拮抗微生物及殺菌、蟲劑等保護劑、營養劑以改善發芽或幼苗萌芽能力。



圖 1. 鑲衣 Encrustment(番茄)



圖 2. 膜衣 Filmcoat(西瓜)



圖 3. 萵苣種子造粒後以不同顏色膜衣區別品種

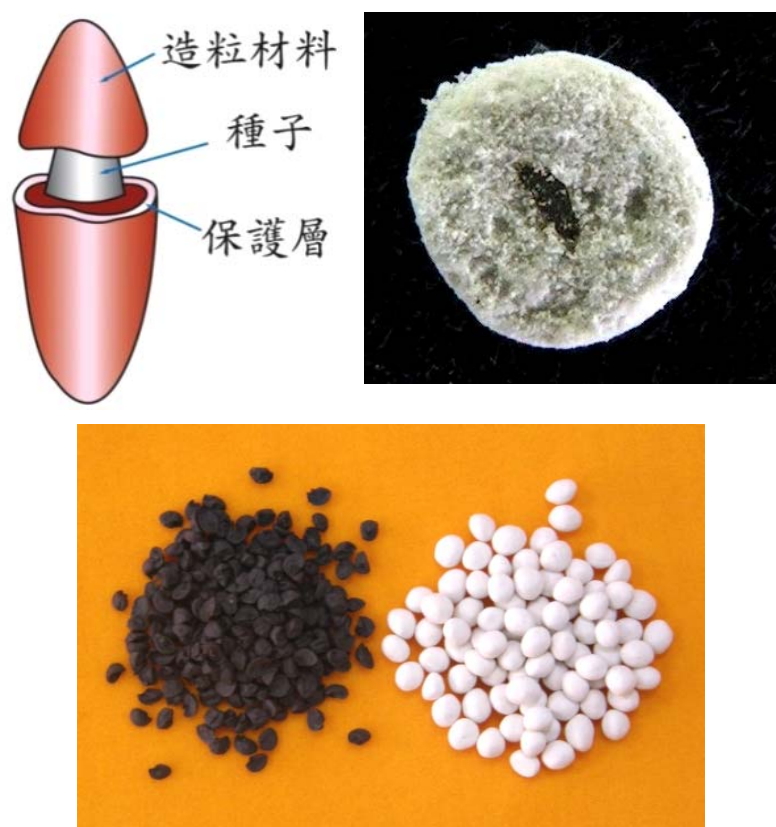


圖 4. 種子造粒處理(上圖：萵苣，下圖：洋蔥)

4. 種子團(Seed granule)：某些作物種子播種時需要同一穴多粒種子，則可以將多粒種子用黏著劑及其他材料裹成一團，稱為種子團。

然而在實際應用生產時，各種處理並不一定獨立分開處理加工，可因作物類型、種子特性、栽種模式、環境需求結合不同披衣處理，甚至其他種子處理技術，可建立多元的處理模式。

種子披衣技術的應用

種子披衣技術能受到許多先進國家重視，投入大量的研發人力與經費，主要原因除了利於機械播種外，其可在披衣過程中加入藥劑、肥料、植物生長調節劑或有益微生物等，可有效防治苗期病蟲害及促進生長 (Rhodes and Nangju, 1979； Silcock and Smith, 1982； Watkins *et al.*, 1996； Otto and Sommer, 2002； Bardin *et al.*, 2004)；另可搭配不同物理、化學特性的披衣物質，使作物在不良的土壤條件下能促進種子之發芽或調控其發芽的時間 (Berdahl and Barker, 1980； Thomson *et al.*, 1983； Yamauchi and Chuong, 1995； Copeland and McDonald, 2001)，用於

爭取農時，改善發芽，簡化浸種、拌種等多種作業程序，方法簡便易行，也是披衣技術備受青睞的原因。綜合其在作物生產上的效益有：

一、利於機械播種及節省種子降低生產成本

經披衣的種子有別於原樣種子且重量、形狀均可一致，尤其是小粒及不規則的種子可明顯獲得改善，使種子更利於機械播種，相較於傳統直播原種子使用披衣種子可以節省種子用量、省去間苗、補苗的人力支出降低生產成本。

二、有效防治作物苗期病蟲害

傳統的浸種、拌藥等種子預措處理，雖可降低種子帶菌比率，但藥劑直接接觸種子使活力下降，且藥劑容易脫落，對環境造成污染以及使用時危害人的健康。而利用披衣添加殺菌、殺蟲劑包覆於種子周圍，隨著種子發芽內吸傳導作用，可更有效防治苗期病蟲害，且可透過膜衣處理避免藥劑脫落，提高使用之安全性。直播蔬菜可省去播種到出苗，田間大面積噴灑農藥等防治病蟲害的工作，減少過度使用農藥，降低生產成本，並可減輕對環境的污染。

因應有機栽培的需求，亦可添加符合有機規範的微生物製劑或植物萃取物達到防治的效果。

三、提高種子品質，促進幼苗生長

種子在披衣之前必須先經過精選或打破休眠等處理，在披衣過程中再加入藥劑、肥料、微量元素、植物生長調節劑或微生物製劑等，經過披衣的種子，更有利於發芽，促進幼苗生長，使終端使用農戶或育苗場能確保出土及成苗率。

四、控制種子發芽，抵抗環境逆境

藉由不同披衣包覆材料的開發、組合，可用來調節種子吸水及提供氧氣，促進種子萌芽。其中添加親水性物質可改進種子與土壤之接觸，促水分移動使披衣種子具抗旱作用；疏水性物質則使種子吸水速度緩慢，減少吸水傷害，處理於茶菜種子可改進於潮濕土壤之萌芽情形；美國甚至有專利產品利用溫度影響種衣劑結構，控制水分進出種皮的特性，可於早春提早播種，待土壤升溫後，種子開始順利吸水發芽，達到促成栽培的目的，亦有專利產品利用聚合物延遲種子吸水特性，於雜交種子生產時，可將原需延遲播種的親本一起播種，調整父母本種子發芽時間促使同時開花、授粉。

種子披衣基質研發

無論披衣種子的目的為何，披衣物質之特性是決定能否實際運用的成功關鍵。種衣劑的研發與應用，不僅是種子處理研究人員的研究重點，更被種子相關企業視為商業機密，因應不同需求之種衣劑不斷被開發，同時受到專利保護，專利商品不斷在市場流通，加上種子披衣加工技術可以工業化量產更具市場潛力。

學者認為理想的披覆材料特性應包含：1.顆粒大小一致。2.含有益物質。3.沒有毒害作用。4.不阻礙種子發芽。5.能與其它化學添加物相容等五個特性。在經過披衣處理後也應具備下列特性：1.發芽率高：保持或提高種子原有之發芽率。2.外型、大小必須均一。3.硬度強：足以抵抗外在壓力，避免披衣層碎裂。4.孔度適宜：吸水浸潤前，披衣層需要低孔度以降低種子的呼吸；吸水活化後需高孔度以增加空氣的流通，利於種子活化發芽等(Caruso,2001;陳,1999)。

一般使用的披衣物質有黏土、沙、珍珠石、石英粉、石灰..等(Halmer, 1987；陳, 1999；Caruso, 2001)。另需加入黏著劑使披覆材料附著在一起。黏著劑濃度是重要關鍵，因為黏著劑太多會延遲發芽，太少在播種機上會引起碎屑和顆粒，而造成補缺株現象，可被當做黏著劑之化合物包括：各種澱粉、糖、黏土、纖維素、聚乙烯等(Halmer, 1987；陳, 1999)，甚至是水(Burgesse, 1949)都可當做黏著劑。大多數種子發芽需氧氣，黏土成分之披衣物質會抑制種子對氧氣吸收而有礙發芽，因此可於披衣材料中加入過氧化物以提供更多氧氣，依學者的研究指出，種子在披衣後改變了氣體或水分進出種子的量或速率，進而對種子發芽 (Sachs *et al.*, 1981； Sachs *et al.*, 1982； Schneider, 1998)或種子貯藏(Roos, 1979)產生影響。因此，合適的披衣基質，最基本的要求必須是：處理後不能影響發芽率，且能在適當的環境下貯藏一段時間；另須具有足夠的披衣強度，以抵抗運銷或播種過程中的壓力而不致碎裂。

另外，披衣劑中會添加一些為特殊目的，例如：防病蟲害、增加作物抵抗力，與促進養份攝取而添加使用的物質，如：有益微生物、殺蟲劑、殺菌劑、肥料、微量元素、植物生長調節劑等(賴和蔡, 2004；羅和謝, 2005；謝, 2005)，同樣必須考量對種子發芽及貯藏壽命是否有不良影響。農委會種苗改良繁殖場針對各種作物不同的特性需求研發種子披衣技術，已成功研製十字花科、番茄、萵苣、胡蘿蔔種子披衣配方及處理程序，未來進一步研發微生物與其他天然成份之生物性材料披衣種子，以增加作物抗性及促進養份攝取，以符合安全及有機概念，亦針對不同作物育苗環境需求研發增加制病防蟲能力的披衣配方。披衣材料之研發目前朝複合處方發展，即以滿足個別作物及田間環境所需之特殊配方，未來可因作物、因時、因地、因個別需求以不同種衣處方進行披衣處理。

結 語

種子披衣技術在國外已發展純熟，歐、美、日、澳等地皆有大型種子處理代工公司提供客製化的專業服務，相較之下，國內的種子處理技術尚處於發展階段，種子公司如有披衣需求時，常委託國外處理或購買國外專利種衣劑，主控權在他人且增加許多處理成本。種子披衣技術提供種子業者有極大機會促進種子品質，為現代農業重要的加工技術，亦是種子標準化的重要措施，未來處理流程必須朝工廠化生產以提昇效率。

種苗的生長與發育需許多因子配合，並非一種披衣技術可完成，未來種子處理將是各種技術之綜合應用，如配合促進發芽快速整齊的滲調處理以及各種種子預措，以滿足不同的多元需求。商品化的種子必須提昇更多的附加價值，使種子同時具備高活力、治病防蟲、促進生長、抗逆境等功能，讓種苗生長得到最大的保障，並提高種子公司之信譽及競爭力。

參考文獻

1. 陳榮坤。1999。種子披系統之設置與測試。國立台灣大學農藝系研究所碩士論文。
2. 賴文龍、蔡宜峰。2004。溶磷菌及磷肥施用對茄子生長效益之研究。臺中區農業改良場研究彙報 83: 19-27。
3. 謝奉家。2005。兼具殺蟲與抗菌作用的生物農藥明日之星—光桿菌。農業生技產業季刊 4: 40-44。
4. 羅朝村、謝建元。2005。菌海戰術-有益木黴菌的應用。科學發展 391: 34-39。
5. Bardin, S. D., H. C. Huang, and J. R. Moyer. 2004. Control of Pythium damping-off of sugar beet by seed treatment with crop straw powders and a biocontrol agent. *Biological Control*. 29: 453-460.
6. Berdahl, J. D. and R. E. Barker. 1980. Germination and emergence of Russian wildrye seeds coated with hydrophilic materials. *Agron. J.* 72: 1006-1008.
7. Burgesser, F. W. 1949. Important developments in coated seeds may save time and money. *The Fruit and Vegetable Review* 11: 18-19
8. Caruso, L. V., R. C. Pearce, B. Gilkinson, and L. P. Bush. 2001. Effect of seed pellet modification on spiral root formation of tobacco seedlings. Vol. 33, No. 2.

9. Copeland, L. O. and M. B. McDonald. 2001. Principles of seed science and technology, 4th Edition. Kluwer Academic Publishers. Norwell, Massachusetts USA.
10. Glen, K. 1991. Seed coating: a tool for stand establishment, a stimulus to seed quality. HortTechnology. 1: 98-102.
11. Grellier, P., L. M. Riviere, and P. Renault. 1999. Transfer and water-retention properties of seed-pelleting materials. Euro. J. Agron. 10: 57-65.
12. Halmer, P. 1987. Technical and commercial aspects of seed pelleting and film coating. British Protection Council, Thorton Heath, pp. 191-204.
13. Rhodes, E. R. and D. Nangju. 1979. Effects of pelleting cowpea and soybean seed with fertilizer dusts. Expl. Agric. 15: 27-32.
14. Roos, E. E. 1979. Storage behavior of pelleted, tableted, and tape lettuce seed. J. Amer. SOC. Hort. Sci. 104: 283-288.
15. Sachs, M., D. J. Cantliffe, and T. A. Nell. 1981. Germination studies of clay-coated sweet pepper seeds. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106: 385-389.
16. Sachs, M., D. J. Cantliffe, and T. A. Nell. 1982. Germination behavior of sand-coated sweet pepper seeds. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107: 412-416.
17. Silcock, R. G. and F. T. Smith. 1982. Seed coating and localize application of phosphate for improving seedling growth of grasses on acid, sandy red earths. Aust. J. Agric. Res. 33: 785- 802.
18. Silcock, R. G. and F. T. Smith. 1982. Seed coating and localize application of phosphate for improving seedling growth of grasses on acid, sandy red earths. Aust. J. Agric. Res. 33: 785-802.
19. Thomson, R. J., R. K. Belford, and R. Q. Cannell. 1983. Effect of a calcium peroxide seed coating on the establishment of winter wheat subjected to pre emergence waterlogging. J. Sci. Food. Agric. 34: 1159-1162.
20. Watkins, R. W., H. J. Mosson., J. E. Gurney., D. P. Cowan, and J. P. Edwards. 1996. Cinnamic acid derivatives: novel repellent seed dressing for the protection of wheat seed against damage by the field slug, *Deroceras reticulatum*. Crop Protection. 15: 77-83.
21. Yamauchi, M. and P. V. Chuong. 1995. Rice seedling establishment as affected by cultivar, seed coating with calcium peroxide, sowing depth, and water level. Field Crops Research. 41: 123-134.

國外 GSPP 發展現況

陳迪偉

瑞成種苗有限公司

摘 要

GSPP 設施採種已於歐洲施行多年，其目的在隔離生產環境，排除生產過程可能帶來污染的介質、動物、人與水，預防番茄細菌性潰瘍病。目前種子多使用於溫室或隧道棚設施中為多，預估至今年會有 75% 荷蘭及 50% 法國育苗業者達到 GSPP 標準和使用種苗，除歐洲外尚有如加拿大、美國、以色列、澳洲、墨西哥、日本、南非、土耳其及摩洛哥等國設施業者使用。近年，雖大環境不景氣，GSPP 種子需求量仍有在增加，且其售價比非 GSPP 種子高上 10-20%。展望為未來，GSPP 範圍可能擴增至其他番茄擬菌質如 PSTV、番椒 TMV、ToMV 與 PMMV 及胡瓜 CGMMV 上。

關鍵詞：GSPP、番茄、採種

前 言

歐盟國家自 2012 年起開示實行嚴格的番茄種子檢疫附加聲明，針對了四種病害—番茄細菌性潰瘍病、細菌性斑點病、PSTV 及 pepino mosaic virus 輸入時要求附記如下：

Due to council directive 2002/89/EC amending directive 2000/29 EU regulates the following information has to appear exactly on the phytosanitary certificate.

Tomato seeds (*Lycopersicon lycopersicum*)

Consignment complies with Annex IV part A, part 1 of EC Plant Health Directive 2000/29/EC:

Article 48.

Seeds of *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw. have been obtained by means of an appropriate acid extraction or an equivalent method approved in accordance with the procedure laid down in Article 18.

Article 48.b

No symptoms of diseases of the following harmful organisms;

Clavibacter michiganensis ssp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.,

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye,

Potato spindle tuber viroid

have been observed on the plants at the place of production during their complete cycle of vegetation.

Consignment complies EC Plant Health Directive 2004/200/EC Annex 1b.

Seeds of *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw. have been obtained by means of an appropriate acid extraction method and no symptoms of Pepino mosaic virus have been observed at the place of production during their complete cycle of vegetation.

在此同時，Good seed and plant practice (GSPP) 雜交番茄設施內採種，由歐盟內種苗工會組織發起亦開始實行。雖然 GSPP 是民間組織性質，但其生產種子於進口時相當於得到歐盟政府植檢證與附加聲明之認同。GSPP 發展這幾年之影響及未來展望，也值得台灣業者注意與學習。

GSPP 起源為歐盟內荷蘭與法國業者聯盟，預防番茄細菌性潰瘍病 (*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*) 的發生，於設施內所採取的生產履歷採種與育苗的方法。其目的在隔離的生產環境，排除生產過程可能帶來污染的介質、動物、人與水(Fig. 1)，以增加生產之穩定性，與種子之可追溯性。

GSPP 目前認證範圍 (Fig. 2-3)，育種者之原種番茄種子需經荷蘭 Naktuinbouw (NAKT)、法國 the Official Service for Seed Control and Certification (SOC, the technical department of GNIS) 二實驗室或其他已認證實驗室檢測無 cmm 後，方可進入種子生產程序。後續從生產至育苗業者經過共 18 過程，均有詳細清潔衛生及檢驗規範 (Tab.1, Fig. 4)。

GSPP 種子或種苗生產嚴格來說，就只能於安全地帶綠區做操作，並且管制一切可能汙染來源，並提供可追溯性之原則。若不幸感染番茄細菌性潰瘍病，並提供一套完整 SOP 之 TIP 將可能感染來源排除。

預估至今年會有 75% 荷蘭及 50% 法國育苗業者達到 GSPP 標準和使用種苗，除歐洲外尚有如加拿大、美國、以色列、澳洲、墨西哥、日本、南非、土耳其及摩洛哥等國設施業者使用。近年，雖大環境不景氣，GSPP 種子需求量仍有在增加，且其售價比非 GSPP 種子高上 10-20%。展望為未來，GSPP 範圍可能擴增至其他番茄擬菌質如 PSTV、番椒 TMV、ToMV 與 PMMV 及胡瓜 CGMMV 上。

結 語

設施採種成本高，包含昂貴溫室造價，精密操作管理技巧，高溫度與濕度環境，及雇工不易等因素，為生產上所需克服之問題。

台灣於七八十年代曾經為世界採種大本營，但因工資高漲及勞動力缺乏，造成採種產業鏈整體外移。近年，本土設施面積大量增加，若只生產本土需求之蔬果，相信菜土菜金的循環，很容易在台灣淺碟型經濟下上演。GSPP 能否為台灣設施，提供另一條出路，值得大家思考。

參考文獻

1. <http://www.gspp.eu/>
2. GSPP Newsletter No 6 2015 March
3. GSPP Newsletter No 7 2015 April
4. GSPP Newsletter No 8 2015 July

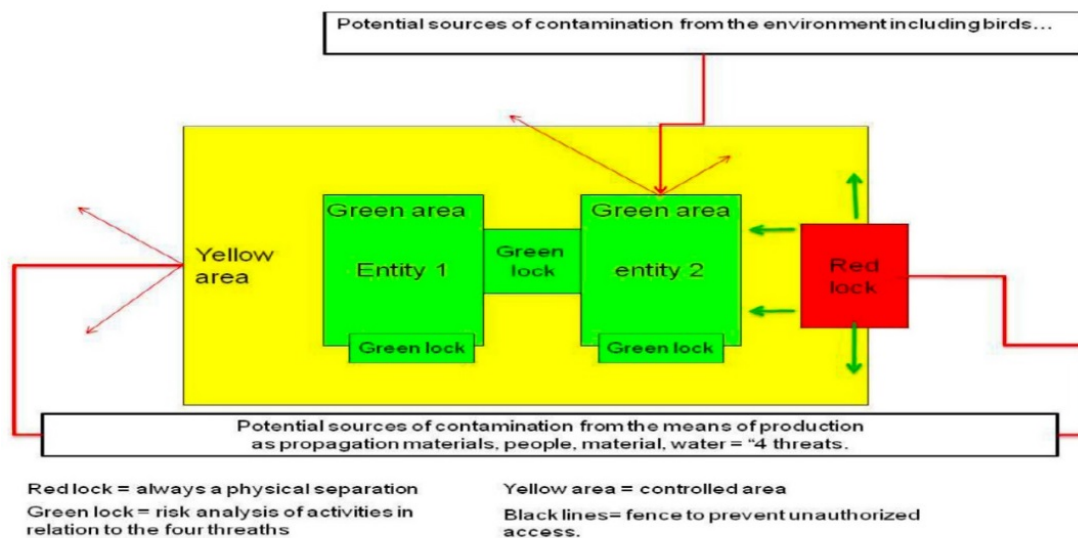


Figure 1: Model of the GSPP principle

來源: <http://www.gspp.eu/>

SCOPE #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
PROCESS	Sampling and/or testing of starting material	Interface (shipment of starting material)	Production of plants for seed production	Interface (shipment of plants)	Production of seeds	Interface (shipment of fruits)	Extraction	Interface (shipment of seeds)	Seed processing	Interface (shipment of seeds)	Seed treatment / enhancement	Interface (shipment of seeds)	Sampling and/or testing of seeds	Interface (shipment of seeds)	Trading of seeds, issue the logo	Interface (shipment of seeds with GSPP-logo)	Production of plants for fruit production	Interface (shipment of plants with GSPP-logo)	Growing of fruit
RESPON-SIBLE	Seed Company															Plant Raiser	Grower		

FIGURE 2 : REFERENCE T TABLE INDICATING WHICH PROCESSES ARE PART OF THE SCOPE OF A GSPP-PARTICIPANT

來源: <http://www.gspp.eu/>

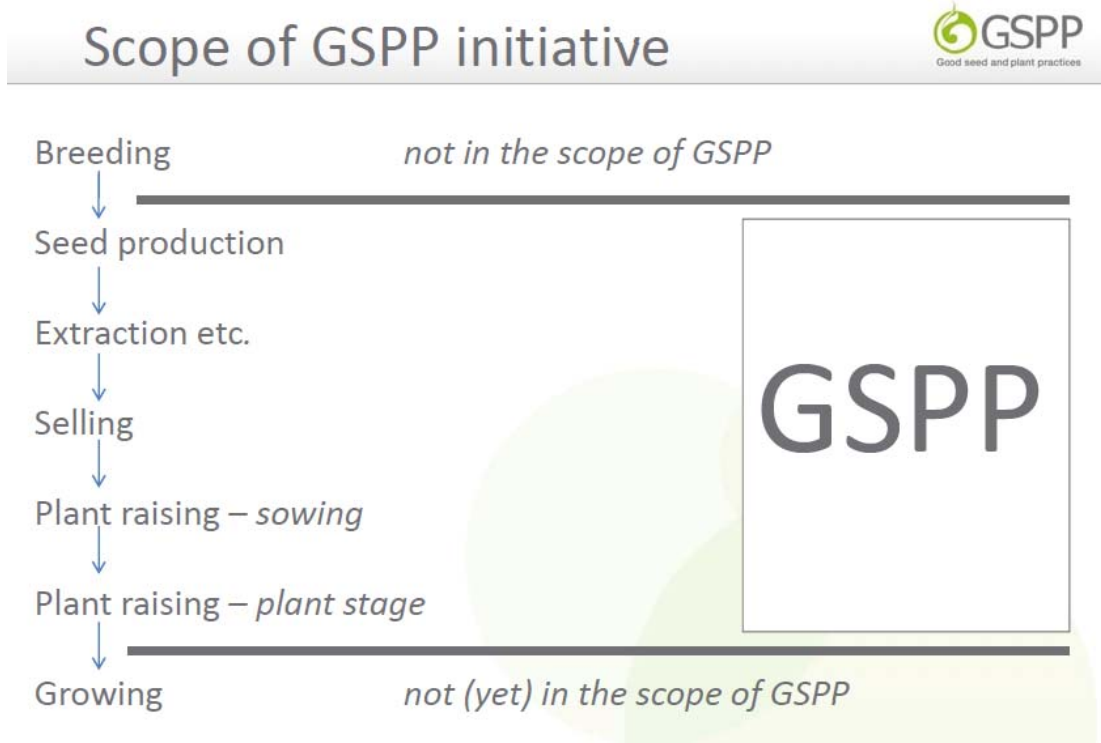


Fig. 3. GSPP 包含之範圍 (來源: <http://www.gspp.eu/>)

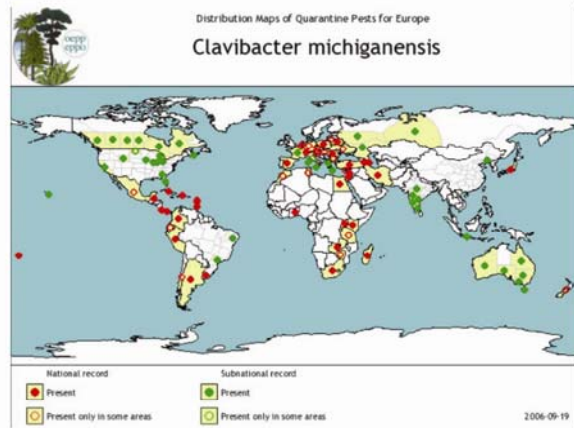
Table 1. 目前已獲 GSPP 認證公司 (來源: <http://www.gspp.eu/>)

公 司	國 家	地 點	範 圍	起 訖 日 期
Adams Enterprises LTD.	Thailand	5	3-10	29/01/10 25/02/13
Agris S.A.	Greece	1	17-18	26/06/14
Antufen Seeds Ltda	Chile	2	3-10	13/12/10 05/12/13
Axia Vegetable Seeds bv	Netherlands	1	1-16	24/11/14
Bakker Seed Productions BV	Netherlands	1	5	11/10/10 04/11/13
Beekenkamp Plants B.V.	Netherlands	1	17-18	31/01/12 31/01/15
	France	1	1-16	25/05/11 08/04/15
HM.Clause S.A.	Spain	1	3-10	18/03/10 29/05/13
				28/04/15
Enza Zaden Beheer BV	Netherlands	4	1-16	01/05/10 31/10/13
	Tanzania	1	1-8	15/06/11 15/06/14
Gautier Semences SAS	France	3	1-16	26/07/10 12/06/13
Germaines Seed Technology	Netherlands	2	11-12	11/02/13
Hazera Seeds Ltd.	Israel	2	1-16	12/12/12 03/12/14
HFT Seedservices S.A. (The Netherlands)	Guatemala	1	3-8	25/05/11 01/05/14
Hishtil LTD	Israël	1	3-4	24/01/12 25/01/15

公 司	國 家	地 點	範 圍	起 訖	日 期
Incotec Europe B.V.	Netherlands	1	11	21/02/12	21/02/15
Inova (Dalat) Agricultural Co., ltd.	Vietnam	1	3-10	01/09/10	24/02/14
International Nursery	Morocco	1	17-18	10/04/14	
Maraseed Ltda	Chile	1	3-10	21/12/10	03/12/13
Meshek Napso Ali LTD	Israel	1	5-7	11/12/11	04/05/15
Meshek Yafe Arie and Oded Ltd.	Israel	1	5-7	13/05/14	
Monsanto Vegetable Seeds Division (brands: De Ruiter and Seminis); Seminis Inc. California, USA	Netherlands	4	1-16	02/12/10	07/04/14
	France	1	3-8	23/07/10	11/03/14
	Peru	1	3-8	26/02/10	11/12/12
	Mexico	1	3-8	13/04/11	28/10/14
	Guatemala	1	3-8	22/05/11	22/05/14
Nunhems Netherlands BV	Netherlands	3	1-16	19/05/11	04/07/14
	Israël	1	2, 4-8	21/12/10	19/02/14
Piga SA	Peru	1	3-10	06/05/10	10/12/12
Natucultura SA	Peru	2	3-10	03/05/10	05/12/12
Natural Power Seed BV	Netherlands	1	11-12	19/03/15	
Plantenkwekerij Valstar BV	Netherlands	1	17-18	03/01/12	03/01/15
Plantenkwekerij Vreugdenhil BV	Netherlands	1	3-4, 17-18	01/12/11	13/11/14
	Netherlands	1	3-4, 17-18	01/12/11	13/11/14
Rijk Zwaan Zaadteelt & Zaadhandel B.V.	Netherlands	5	1-16	07/04/10	06/06/13
	France	1	1-10 + 13-16	25/05/11	25/05/14
	Mexico	1	3-8	01/08/10	12/03/14
	Spain	1	1-10 + 13-16	28/03/12	26/03/15
Sakata Vegetables Europe SAS	France	1	1-16	29/07/10	02/07/13
	South Africa	1	1-8, 13-14	21/11/12	
	Thailand	2	3-10, 13-14	18/02/11	27/02/14
	United States	1	9-16	11/03/15	

公 司	國 家	地 點	範 圍	起 訖	日 期
Syngenta Seeds BV	Netherlands	2	1-16	06/05/11	22/05/14
	France	1	3-10, 13-16	28/06/10	18/06/14
	Spain	1	3-10, 13-16	25/01/11	29/11/13
	United States	1	8-16	03/08/12	
	Kenya	1	3-8	30/10/10	09/12/13
	Morocco	1	3-10, 13-16	25/05/11	03/10/14
	Israel	1	1-2,8-16	07/01/13	
Tokita Seed Co Ltd	Japan	3	1-16	31/01/11	30/01/14
Tomatech R&D (Israel) Ltd.	Israel	2	1-16	16/05/14	
Top Seeds 2010 LTD.	Israel	1	1-16	12/05/14	
Vilmorin SA	France	1	1-2, 8-16	16/03/12	05/03/15

Symptoms of *Cmm*



Route through the company



Disinfection of hands and feet



Disinfection of hands

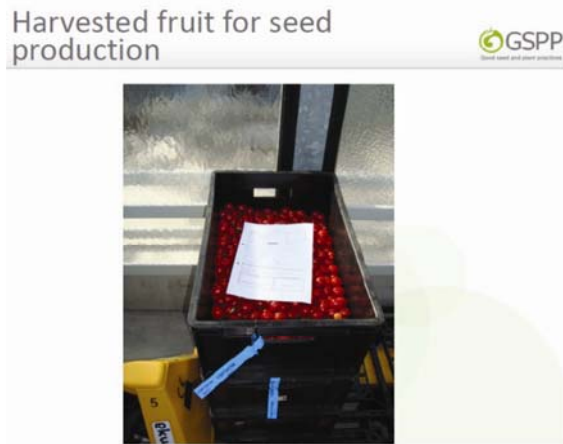
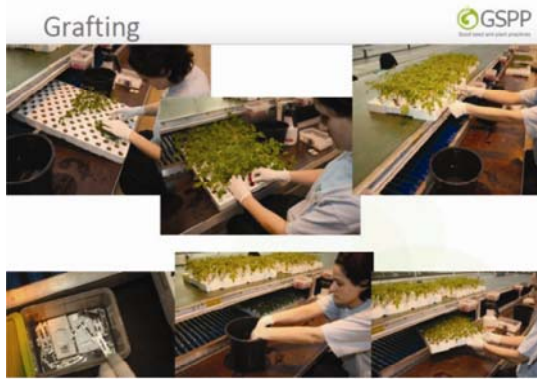



Registration and distribution of clean clothes



Seedlings





GSPP: cost of accreditation 

- Annual fee to Foundation for 2011
 - Dependent on size of company
 - Between € 750,- and € 10.000,- per year

Class	Nr. of employees	Tariff (€)
S	1-25	750
M	26-100	2.500
L	101-500	5.000
XL	>500	10.000

- Audit fees
 - Approx. € 950,- per auditor per audit day
 - Approx. € 475,- per auditor per travel day
 - Cost of travelling and accommodation of auditor

Fig. 4. 細菌性潰瘍病癥、發生區域與 GSPP 溫室生產流程

番茄嫁接育苗場之病蟲害管理策略

吳雅芳、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，針對番茄嫁接育苗場之主要病蟲害進行相關的規範擬定，以建立優良健康種苗繁殖標準作業流程為目標，於實施時應依據各育苗場的條件擬定病蟲害管理策略，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，隨時採取機動性的加強防治，另可藉由種苗流程管理紀錄追溯病蟲原的來源，以遏阻感染源再次入侵。

關鍵詞：番茄嫁接苗、病蟲害管理

前 言

番茄為臺灣重要之蔬果作物，種植面積約 5,247 公頃，主要栽培地區分布於臺灣中南部，年產量約 136,066 公噸(2014 年農業統計年報)，年產值約 36 億新臺幣，尤其是溫室小果番茄的種植面積更是年年增加，600 公克裝的小紅果實，已成為年節送禮的極佳選擇。

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，發現嫁接苗在抗病及耐淹水方面有良好的效果。

事實上，亞蔬中心當初發展番茄嫁接栽培的主要目的在於對抗夏季易淹水之問題，從而發現篩選出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，EG190、EG203 及 EG219 等三個茄子根砧品種，是亞蔬中心由眾多茄子品種中篩選出來，經由多次田間試種及抗病檢定，肯定三個茄子根

砧品種對青枯病、根瘤線蟲及萎凋病的優良抗病性，並積極推廣，也因此開啟了育苗場培育番茄嫁接苗的育苗方向。

目前番茄嫁接茄子根砧的技術已普遍被育苗場所採用，各育苗場以小果番茄嫁接茄子根砧為最主要的生產項目，番茄嫁接苗可克服因高溫、高濕環境下，番茄栽培所面臨的淹水及土傳性病害的威脅，相對的，嫁接苗比實生苗昂貴，因育苗場生產番茄嫁接苗需投入較高的成本，包含設備、資材與人力。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，也因嫁接操作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、工具等的污染等，當然，與實生苗相同的，還有育苗場高濕的環境及育苗時噴灌所造成的病原菌飛濺傳播的風險。因此嫁接育苗場必需了解苗期病蟲害的感染源及發生條件，擬定完善的病蟲害管理策略，以提高嫁接種苗的品質，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。

臺灣的重要番茄種子傳播性病害

一、細菌性斑點病

細菌性斑點病為番茄重要的細菌性病害之一，此病害可藉種子帶菌傳播，常在育苗期便造成病害嚴重發生。寄主包括番茄、甜椒、辣椒等，病原細菌可危害葉片、果實、葉柄、莖及花序。初期在葉片引起水浸狀小斑點，隨後逐漸擴大為不規則圓形病斑，顏色由黃綠轉為深褐色，最後變為壞疽，中央呈灰褐色。莖部呈灰到黑色，圓形到長窄形病斑。果實上亦出現水浸狀斑點，初期周圍往往具有白色暈環，病斑擴大後，暈環消失，病斑轉為黑褐色，呈瘡痂狀，中央凹陷且邊緣稍有隆起。連續風雨的天氣，藉雨水飛濺，能迅速傳播而造成嚴重危害。過去的病原菌為 *Xanthomonas campestris* sp. *vesicatoria*，後被重新分類為 *X. euvesicatoria* (Doidge) Jones *et al.*、*X. gardneri* (Sutic) Jones *et al.*、*X. vesicatoria* (Doidge) Vauterinet *et al.* 及 *X. perforans* Jones *et al.* 等四種，其中前三種可感染甜椒及番茄，最後一種則只感染番茄。經文獻報告目前臺灣的番茄細菌性斑點病菌除 *X. gardneri* 未發現外，其餘三種均存在，而近年的調查又以 *X. perforans* 為主。

二、病毒病害

臺灣境內已有記錄且可能藉種子傳播之番茄病毒種類，主要有番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*; ToMV) 及菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*; TMV)。ToMV 僅污染種子外表或其他部位但並未感染胚細胞，當種子發芽，幼根突破種

皮時因造成微細傷口，病毒藉機侵入根部細胞造成幼苗感染，或藉由其他人為操作(人手或工具)接觸到污染在種皮上的病毒，而將病毒藉由傷口傳染到幼苗。此種病毒性質穩定，能忍受乾燥或低溫等不良環境，於種子長期保存後仍能保持活性。三個已知抗ToMV的基因*Tm-1*、*Tm-2*及*Tm-2²* 被應用於抗病育種，大部份的商業品種擁有*Tm-2²* 抗病基因。

建立番茄優良育苗場認證制度

種子種苗生產規範在國際間日受重視，歐盟更自2007年起針對番茄細菌性潰瘍病制定相關的衛生草案，並自2011年起推動GSPP (Good Seed and Plant Practices) 種苗認證，除可避免育苗過程受病害侵染確保田間生產的品質，並可提升種苗競爭力，爰此，臺灣除應積極開發建置符合GSPP檢查及生產之單位，也需要針對國內育苗場的重要病蟲害建立優良的生產規範，以生產健康種苗。

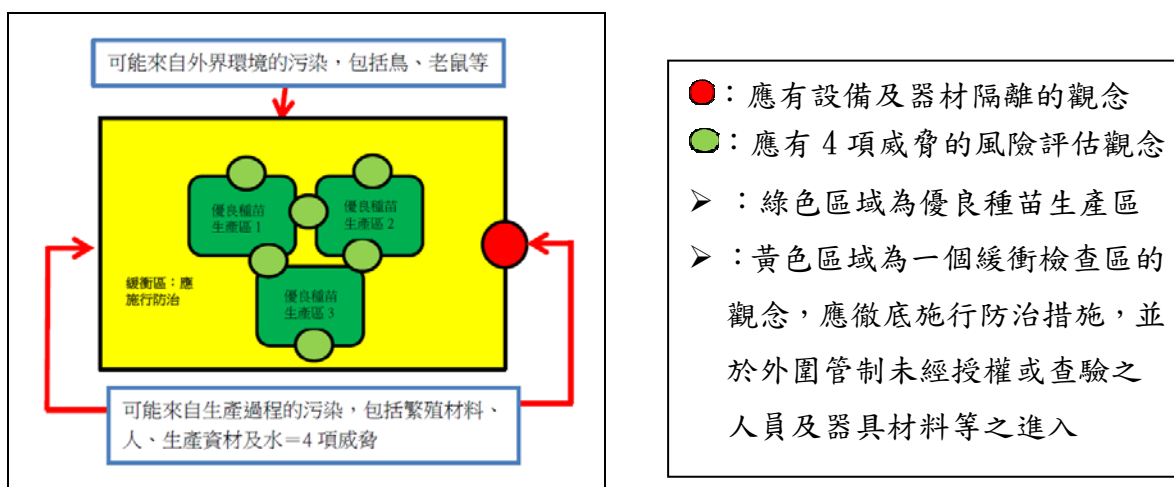
歐盟GSPP針對番茄細菌性潰瘍病的可能入侵途徑包括水、人、繁殖材料及資材等採行分區的管制及追蹤措施，進行環境、人員、生產流程的嚴格控管，種子亦進行取樣及檢測，因番茄細菌性潰瘍病目前在臺灣並未有發生的紀錄，而經業者反應臺灣的番茄育苗場最為重要也難以防治的病害為細菌性斑點病，經參考歐盟GSPP的規範及臺灣番茄育苗場的實際操作情形，針對番茄細菌性斑點病及育苗場常見的病蟲害，擬定病蟲害管理策略，以做為建立優良健康種苗繁殖標準作業流程的基礎，並朝向建立番茄優良育苗場認證制度之方針，以提升臺灣種苗在國際間的競爭力。

番茄嫁接育苗場之病蟲害管理策略

一、育苗場的設施及環境需求

依據歐盟 GSPP，育苗場地及育苗過程可能遭遇的威脅及風險評估，擬定優良番茄育苗場育苗繁殖作業標準。

優良的育苗場應具備與外界環境可能發生特定病蟲害及病原菌污染加以隔離的實體設備，並應設置緩衝檢查區（黃色區域），在此區域應嚴格控管可能的病蟲害感染源，包括繁殖材料、人員、生產資材及水等4項威脅，經過充分的消毒及風險分析將病原菌感染的機率降至最低後，才能進入種苗生產區（綠色區域），生產區應有溫網室設備，可區隔成不同的區域，分別加以控管。



育苗場所應是一個隔離的空間，需有效隔絕病毒媒介昆蟲侵入，種苗生產區應為設雙層門之隔離網室(screenhouse：32 網目以上，最佳狀況為 60 網目，可有效隔絕銀葉粉蝨進入)，覆蓋抗 UV 塑膠布用於防雨，50% 遮陰網用於降低光照強度及溫度。嫁接後立刻將苗移入癒合室(grafting chamber)，此時應覆蓋 70% 遮陰黑網避免陽光直曬造成太強的蒸散作用，維持 25-32°C 的溫度，高於 85%RH 的相對濕度，防雨並隔絕病毒媒介昆蟲侵入，3-5 天後接穗無枯萎現象即已癒合。癒合後將上層覆蓋取下，進入健化過程，經 2-3 天後移入育苗室。(資料來源：亞蔬中心—Grafting Tomatoes for Production in the Hot-Wet Season)

二、選用健康種子

番茄細菌性斑點病、ToMV、TMV 可隨種子攜帶而傳播，不僅造成苗期病害，也將隨種苗傳播至田間。應確保使用的種子未罹染上述病原菌，可要求種子業者於進口時在檢疫證明書上加註種子未攜帶上述病原菌，必要時可經由檢測確認。相關檢測方法可參考 Manual of Seed Health Testing Methods-ISHI。必要時可經由種子處理去除或降低病原菌密度。種子應有適當的儲放設備及溫濕度調控。並應詳實記錄種子進出。

番茄細菌性斑點病目前已知的診斷鑑定技術包含 Tween 及 CKTM 等選擇性培養基、蛋白質圖譜分析、澱粉及果膠水解酵素測試、碳源測試、脂肪酸圖譜分析、DNA 相似度分析、16S rRNA 及 ITS 序列分析、單株抗體、重複性 DNA 聚合酵素連鎖反應分群分析(rep-PCR)、多位序列分析(MLSA)、增幅片段長度多形性分析(AFLP)、及利用專一性引子對進行 PCR 快速鑑定。2012 年寧氏等發展一套 *X. perforans* 之 PCR 檢測技術，並配合 *X. euvesicatoria* 及 *X. vesicatoria* 之專一性引子對，建立一套完整的快速檢測流程，可同時檢測國內三種細菌性斑點病之病原細菌，應用於番茄種子(苗)檢測。一般檢測取樣數量為 10000-30000 粒種子。

三、種子處理

種子處理旨在將種子傳播性病原造成之風險降到最低，分為殺滅(eradication)及保護(protection)兩種方式，殺滅可利用熱水或含氯化合物來殺死種子內或附著於種子表面之病原，保護則是採用藥劑粉衣的方式，保護種子避免受土傳性病原侵染。

50°C、25 分鐘的溫水處理、浸漬於 5% 鹽酸(HCl)20-24°C，5-10 小時、或 5.2% 次氯酸鈉(Sodium hypochlorite)20-24°C，20-40 分鐘、或 0.6-0.8% 冰醋酸(acetic acid)21°C，24 小時、或調製種子時的發酵過程均可以殺滅污染於番茄種子表面的斑點病病原細菌，且以新鮮種子處理效果優於儲存一、二年後之種子。另有報導指出 10% 磷酸三鈉(Na_3PO_4)處理 20-30 分鐘、或 50°C、25 分鐘的溫水處理等可以用於去除 ToMV 及 TMV。

經本場研究結果，番茄種子以 12.5% 之磷酸三鈉(Na_3PO_4)處理 30 分鐘或 15% 之磷酸三鈉處理 20 分鐘，去病毒最為有效，處理後完全檢測不到帶病毒之種苗，且其發芽率達 95% 以上。另外在乾熱處理部分，以 50°C 預熱 6 小時後，再以 68°C 處理 24 小時去病毒效果較佳，完全檢測不到帶病毒之種苗，且發芽率可達 95% 以上。

四、生產資材及人員控管

番茄細菌性斑點病及病毒病害除因種子帶有病原為首次感染源外，嫁接操作時的人為及機械傳播更可加速病害的蔓延，所以管理者及現場工作人員均應經過訓練，具備足以辨認關鍵病蟲害的能力。嫁接苗之操作人員應具備無菌的觀念，以避免操作過程的污染，如工作前雙手消毒、定時更換拋棄式手套、工作檯面的清潔與消毒及使用刀片的消毒與更換等。育苗現場需分工明確，藉以區隔不同區域的工作人員進出，以避免交叉污染。管理者應提供正確的操作手冊供工作人員遵循，並確實監督工作人員之操作可達到規定的標準。

各區域之生產資材應嚴加區隔控管，在進入緩衝檢查區前應確保未罹染病蟲害或經過適當的檢查處理後，才能進入種苗生產區，如介質應經過 EC、pH 檢測及目測生物性檢查，穴盤等均應定期消毒並記錄。

五、田間衛生

育苗場的環境衛生是病蟲害管理的首要條件，隨時清除場內罹病蟲植株、植株殘體、廢棄介質及場區內外雜草，並帶離場區，杜絕病蟲源於場區內及周圍滋生及殘存。育苗場發生病蟲害應妥善處理，以避免蔓延傳播。罹染病蟲害的植株等材料，應迅速移出並銷毀，以避免再次感染。管理者及工作者隨時監控病蟲害

的發生情形，並訂定完整的防治計畫定期施行防治。如有特定批號之種子培育出之種苗發生細菌性斑點病或 ToMV 時，該批號種子應停止使用或經適當處理後再使用，尚未發生本病害之不同生產區應嚴格規範人員及資材的進出，避免病害傳播，各生產區均應施行治療性或預防性的藥劑處理。

六、灌溉及濕度控管

育苗場內高溫、高濕、高密度栽培、頂端噴灌(overhead irrigation)的操作模式及環境極利於番茄細菌性斑點病的病原細菌於育苗場內迅速蔓延，有時病原細菌可能附著於幼苗表面但並未呈現病徵，但可因噴灌而在植株間飛濺傳播。故灌溉水的來源應至少無病原菌污染之虞，育苗場內應有儲水設備。每年至少作一次水質檢測。灌溉水應經適當的消毒處理，如臭氧、紫外線、二氧化氯等。利用有效的通風設備降低濕度，儘量減少噴灌機會。

七、病蟲害管理

除 ToMV 外，在培育番茄幼苗時，*Cucumber mosaic virus*(CMV)、*Potato virus Y*(PVY)、*Tomato leaf curl virus*(TLCV)、*Tomato spotted wilt virus*(TSWV)等番茄病毒病害，可能藉由蚜蟲、粉蝨及薊馬等小型昆蟲媒介而侵染育苗場內之幼苗，針對這些可傳播病毒病的小型昆蟲，應訂定防治計畫定期防治，並設置黏紙監測蟲口密度，於密度上升時加強防治。隨時檢查網室是否有破洞。人員及器材進出注意勿引入小型昆蟲，如果發現疑似罹病毒株，需立刻清除銷毀，避免擴大傳播，更要注意該等病毒可能於嫁接操作時經刀片而機械傳播。

高濕度的栽培環境有利於番茄葉黴病、灰黴病及黑葉黴病的發生與蔓延，18-24°C 適合葉黴病及灰黴病的發生，而黑葉黴病及細菌性斑點病則好發於較高溫的環境，一旦發生病害立即防治，並於病害好發之環境下訂定防治計畫定期施藥防治。藥劑防治細菌性斑點病時需注意病原細菌對銅劑產生抗藥性的問題。

結 語

利用番茄嫁接抗病根砧，除可耐淹水、增加對青枯病、根瘤線蟲及萎凋病等土壤傳播性病害之抗病性外，於設施小果番茄栽培上又有提高甜度的作用，因此廣泛的被栽培者所青睞，嫁接苗儼然成為番茄育苗業者之主要業務之一。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，朝向建立番茄優良育苗場認證制度前進。育苗場因

作物栽培及嫁接作業的需求，高濕的環境使病害的控管相對的不易，期藉由提昇育苗場設備、環境衛生控管、生物資材及人員的檢疫觀念，有助於種苗的品質及競爭力的提升。

參考文獻

1. 行政院農業委員會。2015。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. 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。
5. 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>)
6. 彭瑞菊、陳紹崇。2008。番茄種子種苗帶毒率檢測及種子去病毒方法之研究。台南區農業專訊 66。
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. Ploston, 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 seed health testing 2.4 version. (<http://www.gspp.eu/documents>)
10. Annex-14.5 Technical requirements of GSPP-standard 2.3 version. (<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 2.1 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, R. E. and 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. and 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. 2013. (http://www.worldseed.org/isf/ishi_vegetable.html)
 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)

國內外嫁接機械發展現況

張金元、田雲生、林學詩
行政院農業委員會臺中區農業改良場

摘 要

蔬菜嫁接苗因具有抵禦土壤傳播病害、耐逆境等優勢，已普遍應用於高經濟蔬菜種苗之生產，其中以番茄嫁接苗需求量為大宗，因此各國均投入人力物力研發相關嫁接機械設備，以改善人力不足及提昇嫁接技術。研發嫁接機共計有 8 個國家、14 項機型以上，分別為臺灣、荷蘭、西班牙、義大利、以色列、日本、韓國、中國，其中可發現機台之操作人數約為 1 至 2 人，以及穗砧苗供苗方式可分為預先前置處理並整盤式供苗、單株供苗 2 類；嫁接苗夾持固定方式則有機械自動或人力手動嫁接接合 2 種型式；其中茄科作物嫁接固定方式，歐洲地區多以套管夾支撐固定，亞洲地區則採套管或塑膠夾固定穗砧苗，國內外嫁接機研發型式多樣，可供蔬果種苗產業嫁接機應用及後續研製參考。

關鍵詞：蔬菜種苗、嫁接苗、嫁接機

前 言

蔬菜嫁接苗因具有抵禦土壤傳播病害、耐逆境，已普遍應用於高經濟蔬菜種苗之生產，由於蔬菜嫁接種苗需求量日益增加，且技術日新月異，為提升生產效能，各國研發相關嫁接生產機械。本文將調查國內外目前重要蔬菜嫁接苗之嫁接機械發展現況與資料統整，作為適用於我國之蔬果種苗嫁接機使用及後續研製參考。

為提高農作物之耐鹽性、耐水性及抗逆境等優勢，嫁接可為一種方法，將具優勢之同屬植物作為砧木，嫁接具高經濟價值之接穗，藉以提高植物的存活率與產量⁽⁶⁾。而國內嫁接苗生產以茄科與葫蘆科作物為主，皆仰賴人工為之，並應用各類手工器具與穗砧固定夾、塑膠夾等輔助作業，人工嫁接作業效率平均為每小時約 180 至 200 株。而後為了提高效率與減輕負荷，歷年來均有相關嫁接機械引進測試及本土化研發，惟仍未被產業廣泛應用，因此本文將調查國內外蔬果種苗嫁接機研製發展現況及實際應用情況，作為適用於我國之蔬果種苗嫁接機研製參考。

嫁接機械大致可概分為兩種嫁接作業方式：第一型作業流程係在機體工作台面的兩側，將砧木、穗木苗裁切適合之長度及斜切角度後，移動至中央區集合對齊完畢，再使用塑膠夾等物進行嫁接接合，每次嫁接處理數量為 1 株，為單株供苗模式；第二型作業流程係先經過前置處理作業，例如苗盤上的砧木全數切割完畢，整盤苗供應進入至嫁接機械內部，接穗再逐株或一次數株方式進行嫁接作業，使嫁接可連續不中斷方式作業，因此第二型可較第一型嫁接速率快速。

嫁接機研發相當多樣，並且已有商品化的國家共計有 8 個國家、14 項機型以上，分別為臺灣、荷蘭、西班牙、義大利、以色列、日本、韓國、中國，其中已有相關成品及產品發表的機型有荷蘭：ISO Graft 1000、1100、1200、西班牙：EMP-3、INJESTAR、義大利：GR 300/3、以色列：plant-grafting robot、日本：GRF800-U、GRF803-U、韓國：GR600C-S、臺灣：百香果種苗嫁接機、套管式蔬果種苗嫁接機、中國：2JC-600B、2JC-1000B，共計 14 項機型。

荷蘭 ISO-Group 公司發展的嫁接機有 3 款，機型編號分別係 ISO Graft 1000、1100、1200 型⁽¹³⁾，係針對茄科作物採斜切或平接作業，適用茄科作物，3 型作業方式分別如下：

Graft 1200 型係使用 PU 材質塑膠夾，嫁接方式為砧木和接穗採平切或斜切嫁接苗，作業流程係先將整盤砧木苗經前置裁切處理後供入嫁接機台，而單株接穗苗則由人員依序供入機台，經由氣壓缸裁切後，將砧木及接穗苗相互靠近後再同時裁切，藉以確保裁切位置及角度準確，最後再以塑膠夾嫁接固定，作業人數為 1 名，即作單株接穗供苗作業；Graft 1100 型則係將原先整盤砧木苗須經前置裁切處理作業，改以作業人員單株供入機台方式取代，因此作業人數增加為 2 名；Graft 1000 型穗砧固定方式係使用三角耳套管為其特點，三角耳套管與國內手工嫁接常用之套管功能類似，惟其套管上具有 3 個鱗片，經拉伸後可打開套管開口，使苗株可直接插入接合後嫁接，作業人數為 1 至 2 名。上述 3 型機台作業效率皆可達每小時 1,000 株，主要在於機台單株供苗循環時間快速，約介於 3 秒至 4 秒區間，荷蘭 ISO Graft 1200、1100、1000 嫁接機機型如圖 1、圖 2、圖 3 所示。



圖 1. 荷蘭 ISO Graft 1200 型嫁接機



圖 2. 荷蘭 ISO Graft 1100 型嫁接機



圖 3. 荷蘭 ISO Graft 1000 型嫁接機

西班牙有 2 間公司研發嫁接機，分別係 Conic-System 公司研製的 EMP-300⁽¹⁰⁾ 型與 Agrupamex 研製的 Injestar⁽⁸⁾ 型，其中 EMP-300 型為半自動單人操作，穗砧苗由單人分別左右手持，供應苗株給予氣壓缸夾持後進行斜向裁切，再經由氣壓缸向中間集合，進行套管夾嫁接接合作業，嫁接機構自動以套管夾固定，最後由手臂夾持至輸送帶匯集，作業效率每小時可嫁接 300 至 500 株，適用於茄科及葫蘆科作物，而其特點為訴求孩童亦能操作之嫁接機，ISO EMP-300 實體如圖所示。

西班牙 Injestar 型則為更加精簡形式，適用於茄科作物，機械嫁接作業分別為裁切穗砧苗，以及套管夾夾持固定 2 大機械作業區塊，其餘取苗、置苗、調整等細節動作，皆由 1 名人力完成，因此其操作熟練度將影響作業效率與嫁接成功率，最大作業效率預估為每小時 450 株。Injestar 特點為屬於非自動化單人操作機械，為輔助機具類型，僅能協助完成苗株剪切及輔助嫁接接合作業，其餘工作皆須由人力完成，因此在長時間操作下，人員亦將有作業疲累產生，仍有可能造成嫁接品質與速度下降疑慮，而其優點為可協助進行剪切及嫁接作業，並且每顆苗株所剪切之切口角度一致，以及無須拿取套管夾嫁接，作業人員僅需要拿取苗株即可，可減少苗株作業道次，如作業人員取刀斜切以及取夾嫁接之 2 項作業項目，Injestar 實體如圖所示。

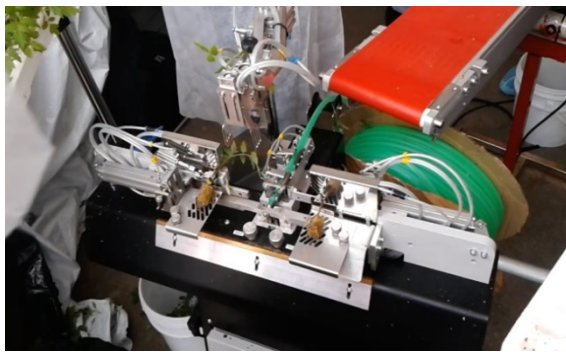


圖 3. 西班牙 ISO EMP-300 型嫁接機

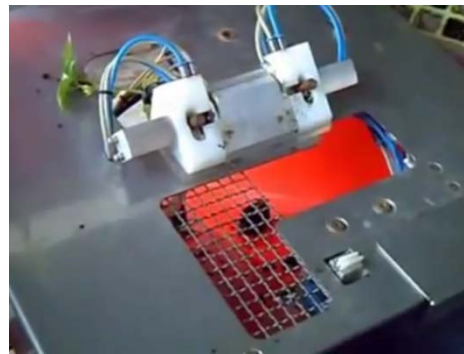


圖 4. 西班牙 Injestar 型嫁接機

義大利 Atlantic Man 公司研發之 GR 300/3⁽⁹⁾ 機型，為單人操作，適用於莖粗範圍介於 1.4mm~4mm 之茄科及瓜類作物，嫁接作業方式為瓜類裁切根砧留單子葉，接穗靠接嫁接，茄科則採穗砧苗斜切方式嫁接，其中茄科作物機械嫁接作業包含斜切接穗、砧木，輸送穗砧苗至中央接合處等 2 項主要作業動作，而供應苗株及塑膠夾嫁接作業則由單人操作完成，與西班牙 Injestar 嫁接機設計精神上有相似處，預估每小時約可嫁接 300 株。嫁接動作流程係先以人工放置砧木、接穗於機台上，固定在刀口，啟動後由氣壓缸裁切苗株後，再將砧木、接穗苗移動

輸送至中央嫁接區集合，以人工方式對齊切口，手持塑膠夾進行嫁接。此機型特點為苗株於中央嫁接區為懸空狀態，作業人員須以手指輔助扶持苗株，並且觀察切口間是否接合，再使用塑膠夾(葫蘆科)或套管夾(茄科)夾持苗株，以完成嫁接作業，GR 300/3 之實體如圖所示。

以色列 Virentes 公司於本(104)年度發表 1 台未販售的自動化嫁接機⁽¹⁴⁾，適用葫蘆科作物，可同時將接穗和砧木苗進行裁切，以及塑膠夾嫁接固定雙排 14 株穗砧苗，作業效率預估約 840 株。此機型特點為嫁接動作係同時裁切及嫁接 14 株作物，然而因每棵苗株物理性狀條件皆不盡相同，嫁接機在同時作業時，苗株相關嫁接距離與角度，與苗株整齊度有關，將影響裁切與嫁接成功與否，Virentes 發表之嫁接機如圖所示。



圖 5. 義大利 GR 300/3 型嫁接機



圖 6. 西班牙 Virentes 型嫁接機

日本 ISEKI 公司研發 2 款適用於葫蘆科的嫁接機，分別為單人作業的 GRF800-U 型，以及 3 人作業的 GRF803-U 型⁽¹²⁾，其中 GRF800-U 型作業方式為由 1 名人工放置穗砧苗，以及在輸送帶拾取嫁接苗 2 項作業外，其餘均由機台作業，機械可自動取苗為其關鍵，斜切根砧，並留存單片葉，接穗與根砧接合後，再以塑膠夾固定，並採斷根法嫁接，即嫁接苗無介質塊，作業效率估約 800 株。而 803 型則將機械自動取苗功能，改為 2 名人工分別供應穗砧苗，因供苗速度較機械為快，因此嫁接速率更提高至 900 株。嫁接流程係先扶正根砧苗進行第一級裁切後搬移，運輸過程中旋轉葉面方向，使之可定位及固定單邊葉面後，再由下而上斜面裁切，最後移動到中央嫁接區進行接合作業，夾持砧木，根部一同被裁切後進行嫁接，GRF800-U 如圖所示。

韓國 Helper Robotech 公司研發之 GR600C-S 型⁽¹¹⁾，由 2 人供給穗砧苗，以及 1 人自輸送帶取嫁接苗之嫁接機械，機械採圓弧切割，以及塑膠夾固定苗株，固定時有輔助支撐機制，作業效率為每小時 600 株。嫁接作業流程係先將砧木、穗木夾持後採圓弧裁切，最後旋轉至中央嫁接區進行接合，使用塑膠夾嫁接固

定，其中可發現因刀具是以軸心旋轉裁切，因此苗株裁切傷口不是一傾斜平面，而是一圓弧面，嫁接之接觸面積將會比一般斜面大，為其特點，GR600C-S 如圖所示。

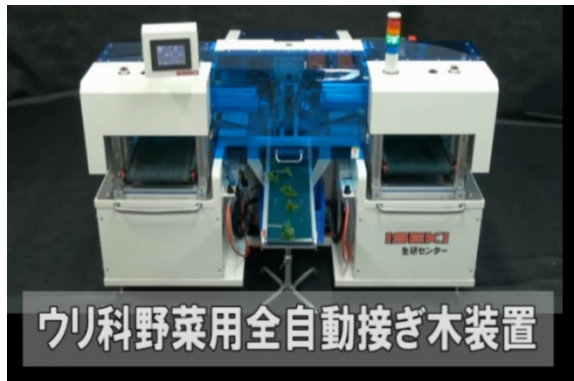


圖 7. 日本 GRF800-U 型嫁接機



圖 8. 韓國 GR600C-S 型嫁接機

中國針對葫蘆科瓜類頂插接嫁接作業研發有 2 款嫁接機，型號分別為 2JC-600B、2JC-1000B。其中 2JC-600B 機型係 2 人操作，作業流程係以人工將砧木放置在氣壓缸上夾持，並以手撥開葉面，再以氣壓缸帶動尖頭針，自根砧子葉脈向根砧斜插穿刺 1 小孔洞，將另 1 人工供給之接穗苗，經由氣壓缸將接穗苗插進孔洞內，嫁接苗再由機械夾持置於特定區域，作業效率 600 株，2JC-600B 如圖 9 所示。

機型 2JC-1000B 則將先經過前置處理之整盤砧木與接穗供入機台，機台會一次剪切一整排為 5 株之砧木苗，搬運至嫁接區移植入苗盤，氣壓缸再於砧木苗於頂部葉脈戳洞，緊接著則相同裁切一排 5 株接穗苗，並移送至嫁接區苗盤上方，將裁切後之接穗苗插入洞裡，已完成嫁接作業，2JC-1000B 機型因可同時裁切及嫁接一排 5 株苗之砧木刺孔、接穗插接等動作，作業效率為 1,150 株，2JC-1000B 如圖所示。



圖 9. 中國 2JC-600B 型嫁接機



圖 10. 中國 2JC-1000B 型嫁接機

國內嫁接機研發多樣，其中以試驗單位目前研發成果發表計有 2 款，分別係百香果種苗嫁接機^{(1)、(2)}與套管式蔬果種苗嫁接機^(3、4、5、7)。其中百香果種苗嫁接機為臺中區農業改良場與中興大學、嘉義大學共同合作開發，由單人供給穗砧苗，由機械切削、頂劈接合與塑膠夾固定，作業效率達 200 株。作業流程係先以人工將穗砧苗分別置於氣壓夾抓上，夾持砧木、接穗後各自進行裁切，再將砧木與接穗移動至中央處接合，而嫁接夾應用震動盤機構，可將嫁接夾自動送入夾持機構，為其特點，最後將嫁接夾與嫁接苗夾上，完成嫁接動作。

臺南區農業改良場與臺灣大學、宜蘭大學共同合作開發研發之套管式蔬果種苗嫁接機，由單人供給穗砧苗，作業流程同樣先以人工分別供應穗砧苗給予機台進行裁切後，再將套管撐開後，再將砧木與接穗移動至中央嫁接處，此時機台會將套管撐開，爾後穗砧苗分別由上下位置伸進撐開的套管內，最後放鬆套管完成嫁接作業，讓套管綁緊嫁接後的砧木與接穗，嫁接速度可達每小時 300 株以上。



圖 11.臺灣百香果種苗嫁接機



圖 12.臺灣套管式蔬果種苗嫁接機

結 語

國內嫁接苗生產皆仰賴人工為之，作物以茄科與葫蘆科為主，並應用各類手工器具與穗砧固定夾等輔助作業，因人工嫁接作業效率平均每小時僅達 200 餘株，並且長時工作疲勞更將降低作業速率。為提高嫁接效率與減輕作業人員辛勞，歷年來皆有嫁接機具之引進與本土化研發，包括種苗改良繁殖場引進之日本 GR-800 葫蘆科用嫁接機，臺中區農業改良場等研發之百香果種苗嫁接機，臺南區農業改良場等研發之套管式蔬果種苗嫁接機，為國內最具代表性。而綜合上述國內外嫁接機型之發展現況與資料統整，可歸納研發趨勢方向如下：

蔬果嫁接苗主要對象：以葫蘆科與茄科作物為主要對象，葫蘆科作物採用頂插接方式嫁接，應用苗株插入穿刺孔洞加以固定，無須塑膠夾固定。而茄科作物

則採斜切或平切方式嫁接，並使用塑膠夾、套管夾等塑膠零件輔助固定。

嫁接固定方式：在茄科作物方面，歐洲地區之荷蘭、以色列、西班牙、義大利多以套管夾支撐固定，而亞洲地區之臺灣、日本、韓國及中國，則採套管或塑膠夾固定穗砧苗。

自動化程度：依供苗進料、穗砧固定方式，可分為單株或整排批次處理 2 種類型。若採單株供苗，又可分為 1 人供應穗砧苗，或 2 人各別供應穗砧苗，2 種型式，如荷蘭、西班牙、義大利、日本、韓國、臺灣機型，因採單株供苗處理，作業效率介於每小時 200 株至 1000 株範圍，進一步研究發現差異在於單株供苗循環時間，如荷蘭機型，在供苗熟練情況下，以及自動化程度較高，單株循環時間約為 3 秒至 6 秒區間，因此嫁接速率可達每小時 1000 株；若以整排批次處理方式之機械自動化供苗作業，在不計算前置處理作業人員數，則機台操作人數可降低為 1 人，並且作業效率每小時均可達 600 株以上，如荷蘭、以色列、日本、中國機型，其中又以荷蘭嫁接速率最高，達 1000 株以上，而國內研發之百香果種苗嫁接機以及套管式蔬果種苗嫁接機，則因單株供苗循環時間平均為 15 秒以上，並且已無法在提高速度。此外，上述機型之嫁接速率，亦將取決於作業人員熟練度。

國內外嫁接機研發現況多樣，其中可發現機台合適之操作人數約為 1 至 2 人，以及穗砧苗供苗可分為預先前置處理並整盤式供苗、單株供苗方式 2 類；嫁接苗夾持固定方式則有機械自動或人力手動嫁接接合 2 種型式，若以此嫁接苗夾持固定方式區別嫁接機自動化程度，則可較為簡易概分為自動或手動，因此機械嫁接已可細分為上述數種樣式；而在機械嫁接成功與否，進一步發現關鍵在於穗砧苗裁切及嫁接接合動作的定位方式與準確度，其與機台自動化研發方式有關，各國機構研發皆有所差異，如荷蘭採用如紅外線感測等高度自動化設備，但相對的其機械售價亦與其嫁接速率同屬高單價，因此，現階段研發方向除應考量嫁接速度外，在顧及未來商品機售價及嫁接速率是否符合市場需求，研發一種在合適的嫁接速率下符合市場接受之嫁接機械。

參考文獻

1. 田雲生、龍國維。2002。百香果種苗自動嫁接機簡介。農政與農情 125: 96-98。
2. 邱奕志、陳世銘、張允瓊。2003。循環式瓜類種苗嫁接機之設計與試驗 p.47-48 九十二年農機與生機論文發表會。台北。

3. 黃圓滿。1999。蔬菜作物的嫁接技術。台南區農業專訊 30: 9-14。
4. 黃圓滿。2014。蔬果嫁接。科學發展 496: 14-19。
5. 鍾瑞永、鄭榮瑞、劉政宏、許建興、黃圓滿。2005。套管式番茄嫁接機之研製測試。台南區農業改良場研究彙報 45: 74-84。
6. 戴順發、張武男。1997。蔬菜嫁接之研究與發展。科學農業 45: 266-274。
7. 陳世銘、邱奕志、張允瓊。套管式蔬果種苗嫁接機之設計與嫁接存活率之分析研究 http://bmte.niu.edu.tw/files/writing/108_faf04d71.pdf
8. Agrupamex 官網，<http://www.agrupamex.com/>
9. Atlantic Man. 官網，<http://tech.atlanticgroup.it/prodotti/grafting-robot-universale-gr-3003-patented>
10. Conic-system 官網，<http://www.conic-system.com/wp/gallery/51-2?lang=en>
11. Helper Robotech 官網，http://helpersys.en.ec21.com/Grafting_Robot--2012260_2012262.html
12. ISEK 官網，<http://www.iseki.co.jp/products/nougyou/tugiki/>
13. ISO 官網，<http://www.isogroepmachinebouw.nl/nl/producten.html>
14. Trendlines 官網，<http://trendlines.com/portfolio/virentes/>