

應用 DNA 分子標誌檢定番茄 雜交一代種子純度

莊淑貞¹、孫永偉²、張惠如³、鍾文全⁴

一、前言

因應全球化的挑戰，種子（苗）產業需高精密之技術及高額資本投入，才更有競爭力。高品質的種子除了健康、高發芽活力外，為了提高商業競爭能力，種子的純度亦為高品質的指標。以外表形態進行遺傳純度分析鑑定時，除須要廣大的田間種植且須達一定的生長期，加上外表形態易受栽培環境影響等，使鑑定工作困難費時。快速的分子標誌檢定方法，可在種子期或苗期取用少量的植體材料即可進行純度鑑定，有助種子苗即時供銷。聚合酶連鎖反應 (DNA-PCR) 為 DNA 分子標誌技術的核心，DNA 經擴增反應電泳分析後會呈現 DNA 片段的多型性，即為分析鑑定的背景資料。近年來 DNA 分子標誌技術已廣泛應用於作物遺傳穩定性檢定，且可於早期即進行檢定，使種子（苗）純度品質鑑定更具公信力，進而提升產業永續的發展。

番茄 *Solanum lycopersicum* 屬茄科番茄屬，為世界重要蔬菜，全球每年生產逾

15 億噸，由於富含維他命 A、B1、B2、C、E 及茄紅素，經醫學及營養學研究報導，番茄有益人類健康。全球消費者對番茄的攝取量，已達所有蔬菜的首位，在臺灣也不例外。因此，促使生產面積迅速成長，全世界栽培面積達 400 餘萬公頃，臺灣栽培面積則在 5,000 公頃左右。

番茄商業品種多為雜交種，具雜種優勢遺傳質均一的優點，雜交種子生產母本去雄後再以父本花粉授粉的過程，易有去雄不完全造成自花授粉，或誤採父本及受外來花粉污染而造成混雜等純度上的問題。番茄一代雜交 (F1) 種子的純度，可利用幼苗或成株之外表性狀分析，或透過電泳法分析同功酶或蛋白質的酶型進行鑑定，後者可縮短檢查的時間，但卻只能侷限應用於兩親本為相異的兩個同質結合之鑑定，因此無法以此盡事功。DNA-PCR 方法操作簡易且多型性豐富，幾乎已經取代同功酶、蛋白質電泳法在種子純度檢定上的應用。因此除了外表性狀外，利用 DNA-PCR 分析建立識別標誌，作為雜交種子純度品質檢定，為時間急迫性與成本考量間平衡的另外選擇。

1 種苗改良繁殖場生物技術課 研究員

2 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員

3 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

4 種苗改良繁殖場生物技術課 研究員兼課長

二、小果番茄 F1 種子純度檢定 ISSR-SCAR 資料庫及客制 化檢定應用

F1 種子純度快速檢測的 DNA-PCR 方法包括 RAPD、ISSR、SSR、CAP 及 SCAR 等，因檢測成本考量，RAPD 及 ISSR 為運用頻率較高的方法，但常須進行 2 次 PCR 反應，加上每個反應所獲得的 PCR 產物之共同條帶數較多，易干擾識別條帶的判讀 (圖 1)。本場在調整標誌的大小及引子相容性後將所

開發的 ISSR-SCAR 標誌組成多重-PCR(Multiplex-PCR)僅須執行 1 次 PCR 反應，PCR 產物呈現引子專一性的識別條帶，清晰易判讀且大幅降低檢測成本 (圖 1)。

本場 100 年利用 28 個商業品種及 13 個番茄雜交組合 (父本親、母本親及雜交一代) 建立小果番茄 ISSR-SCAR 資料庫，應用於小果番茄 F1 種子純度檢定。並於 101 年繼續建立、收集、擴增資料庫。

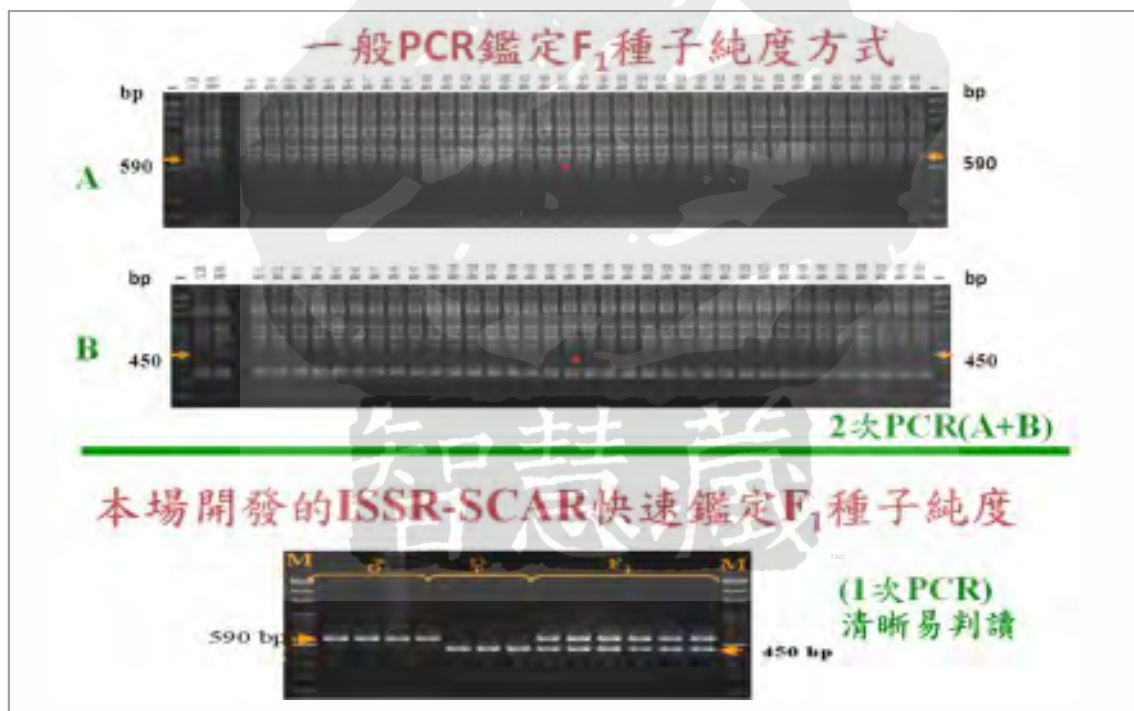


圖1、一般DNA-PCR方法及種苗場開發ISSR-SCAR方法，運用於F1種子純度鑑定之電泳圖比較。

本場開發的小果番茄 ISSR-SCAR 標誌資料庫，可針對種苗公司的須求客制化提供技術的建立。例如種苗公司自有的 4 個小果番茄雜交品種，本場共開發 1 組 Multiplex-PCR 具條帶專一性的引子組 (圖 2)，4 個小果雜交番茄

品種之 F1 種子純度均可使用，即可根據電泳分析比對由採種種子中檢出母本自交之種子，除可以確保該公司 F1 種子的純度品質，並可單一化對 4 個雜交品種之 F1 種子純度的檢測作業，以減低實驗室操作的複雜性。

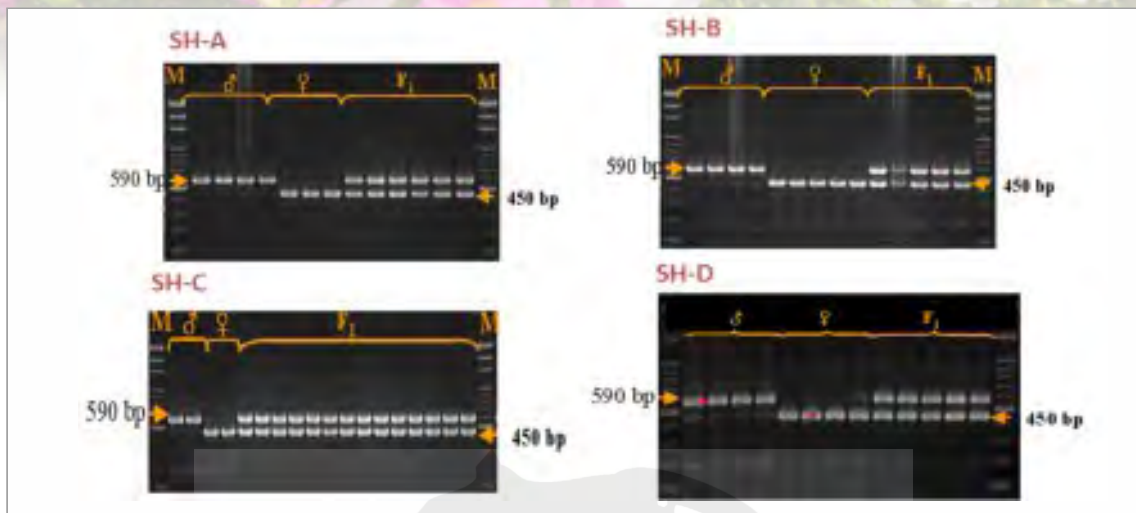


圖2、客制化小果番茄雜交品種(SH-A~D)之F1種子純度識別標誌電泳圖。

三、小果番茄 F1 種子純度之 ISSR-SCAR 標誌分子檢定分析

以本場建立之小果番茄 ISSR-SCAR 標誌共 5 組 (表一)，進行小果番茄 ZC301 採種種子純度檢定分析，其中 3 組 TIU1606、TIU2814 及 TIU6805 為鑑定母本及雜交一代，即父本無此標誌呈現屬第 1 型鑑定。另 2 組 TIU4712 及 TIU5706 為鑑定父本及雜交一代，即母本無此標誌呈現屬第 2 型鑑定 (表一)。

收集之 ZC301 採種種子 84 粒，以單粒種子逐粒作檢定。經第 1 型標誌檢定後，種子均呈現標誌，顯示 84 粒採種種子可能為母本親或 F1 種子。再經第 2 型標誌檢定後，採種種子中 82 粒均呈現標誌，顯示此 82 粒採種種子為 F1 種子，其餘 2 粒種子對 TIU4712 有標誌呈現，TIU5706 無標誌呈現 (表一) 顯示授粉之花粉非來自 ZC-301 的父本。純度檢定分析結果，本批 ZC301 採種種子之 F1 種子純度為 97.6%，無自花授粉的母

本自交種子，2.4% 之混雜來自外來花粉。

四、大果番茄 F1 種子純度之分子檢定分析

大果番茄桃園亞蔬 20 號採種種子 1 批，採種種子雜交授粉時疑似受白柿番茄花粉污染，因此進行 F1 種子純度檢定。由於本場尚未建立大果番茄 F1 種子純度檢定的 SCAR 資料庫，因此，本批採種種子以 ISSR 及 RAPD 先進行引子篩選，結果獲得三組識別標誌 BTIU30-400、BTIU30-1400 及 BTIU40-900。其中 BTIU30-1400 為鑑定白柿父本、20 號父本及 20 號之 F1，即 20 號之母本不呈現此標誌。BTIU30-400 為鑑定 20 號母本及 20 號之 F1，即白柿父本及 20 號之父本親不呈現此標誌。經識別標誌 BTIU30-1400 及 BTIU30-400 之鑑定後，可知採種之種子是否為母本自交種子 (圖 3)。經此三組 ISSR 識別標誌中的兩組 (BTIU30-1400 及 BTIU30-400) 為第一階段之鑑定步驟，但無法知道此雜交種

表一、小果番茄雜交品種ZC301之F1種子純度分子檢定結果。

marker	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F32	F33	F34	F35	F36	F37	F38	F39	F40	F41	F42		
BTU1698	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU2814	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU8909	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU4712	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU5796	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
marker	F43	F44	F45	F46	F47	F48	F49	F50	F51	F52	F53	F54	F55	F56	F57	F58	F59	F60	F61	F62	F63	F64	F65	F66	F67	F68	F69	F70	F71	F72	F73	F74	F75	F76	F77	F78	F79	F80	F81	F82	F83	F84		
BTU1698	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU2814	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU8909	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU4712	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU5796	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
marker	F85	F86	F87	F88	F89	F90	F91	F92	F93	F94	F95	F96	F97	F98	F99	F100	F101	F102	F103	F104	F105	F106	F107	F108	F109	F110	F111	F112	F113	F114	F115	F116	F117	F118	F119	F120	F121	F122	F123	F124	F125	F126		
BTU1698	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU2814	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU8909	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU4712	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
BTU5796	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

註：V-呈現標誌；X-無呈現標誌；父n：父本；母n：母本；Fn：採種種子

子授粉之花粉為來自 20 號之父本或為白柿之花粉。第三組 ISSR 識別標誌組 (BTIU40-900) 則在鑑定雜交種子授粉之花粉為來自 20 號之父本或白柿之花粉，此為第二階段之鑑定步驟，若呈現標誌則為來自 20 號之父本 (圖 4)。經此識別標誌建立後，大果番茄桃園亞蔬 20 號採種種子於苗期取樣 100 個單株進行 F1 種子

純度檢定。第一階段檢定，結果受檢的 100 個單株中有 3% 為母本自交種子，再經第二階段檢定，97 株雜交單株中 18 單株之花粉為來自白柿之花粉。總合兩階段的鑑定結果，本批大果番茄桃園亞蔬 20 號採種種子之 F1 種子純度為 79%，混雜白柿之花粉授粉者為 18%，自交之母本種子為 3% (圖 5, 圖 6)。

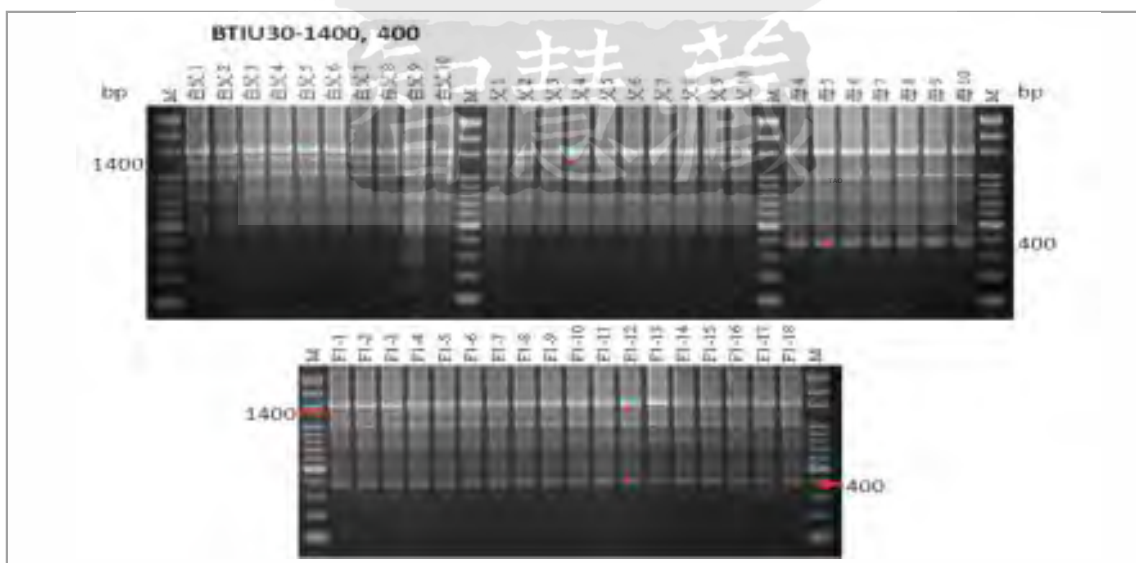


圖 3、DNA 分子標誌 BTIU30-1400 及 BTIU30-400，識別白柿番茄父本及桃園亞蔬 20 號父母本及 F1 之電泳圖。(白父 n：白柿番茄父本；父 n：桃園亞蔬 20 號父本；母 n：桃園亞蔬 20 號母本；Fn：桃園亞蔬 20 號之採種種子)

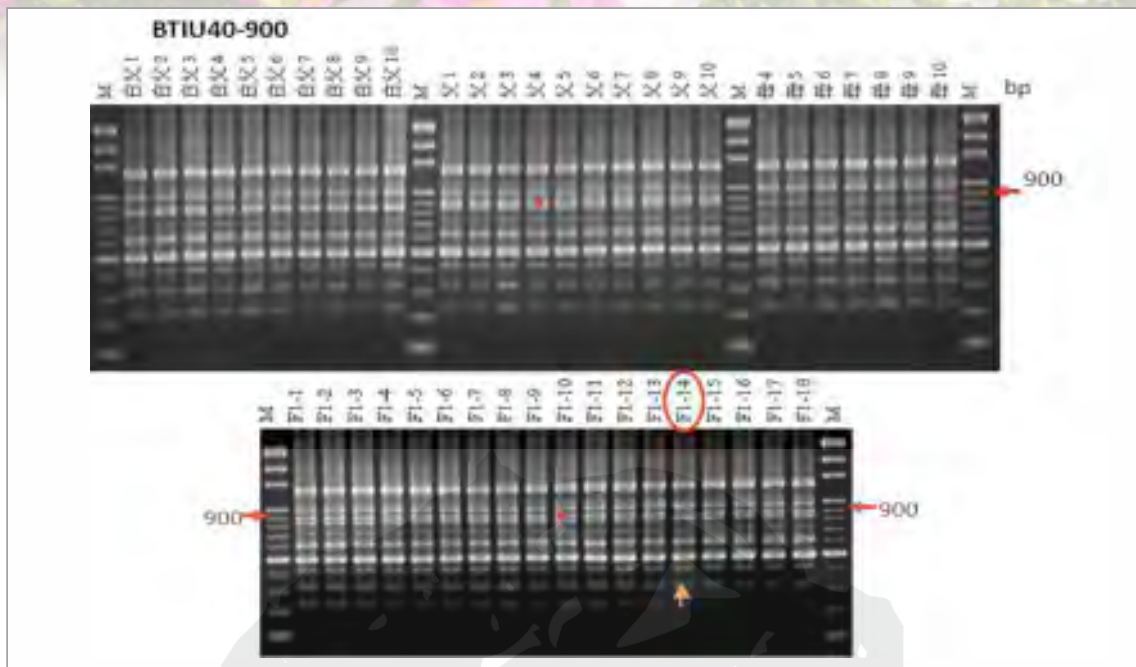


圖4、DNA分子標誌BTIU40-900，識別大果番茄桃園亞蔬20號之父本及白柿父之電泳圖。(白父n：白柿番茄父本；父n：桃園亞蔬20號父本；母n：桃園亞蔬20號母本；Fn：桃園亞蔬20號之採種種子)

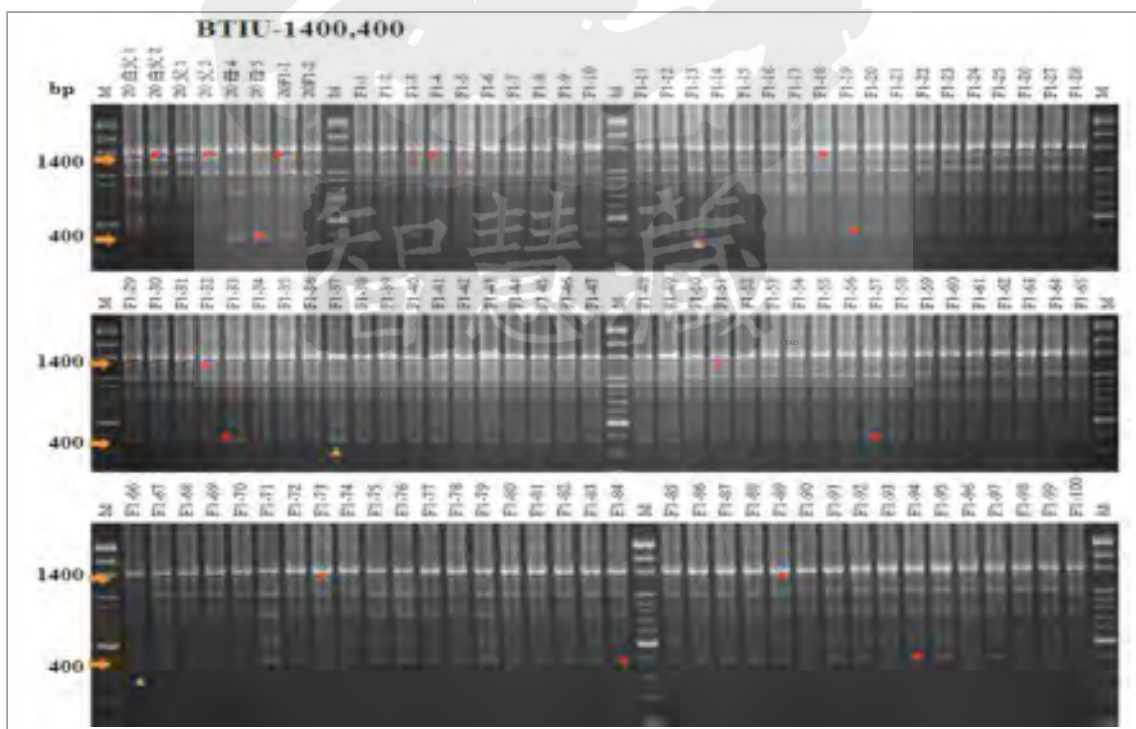


圖5、大果番茄桃園亞蔬20號採種種子，第一階段分子標誌BTIU30-1400及BTIU30-400檢定之電泳圖。(白父n：白柿番茄父本；父n：桃園亞蔬20號父本；母n：桃園亞蔬20號母本；Fn：桃園亞蔬20號之採種種子)

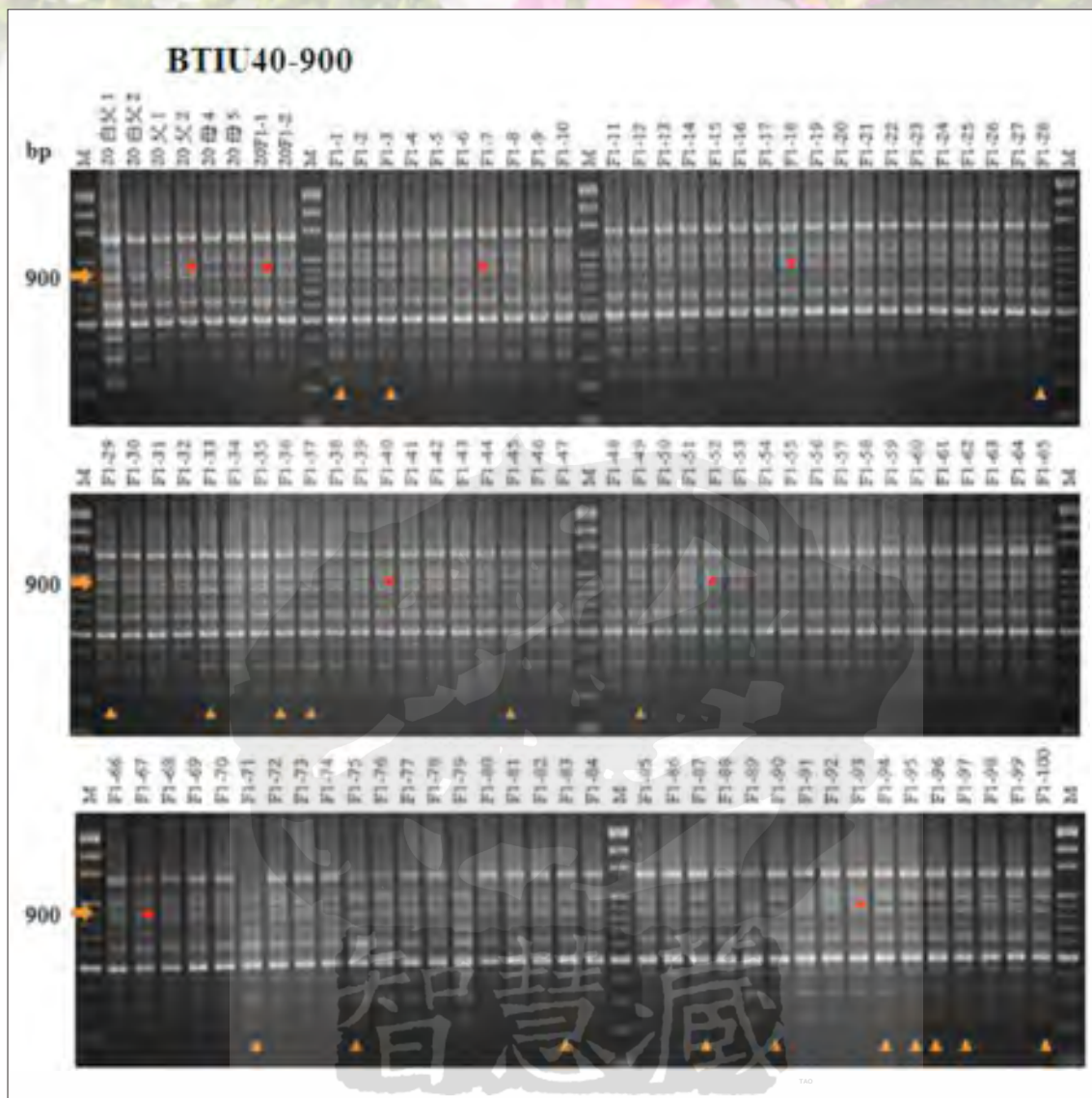


圖6、大果番茄桃園亞蔬20號採種種子，第二階段分子標誌 BTIU40-900 檢定之電泳圖。(白父n：白柿番茄父本；父n：桃園亞蔬20號父本；母n：桃園亞蔬20號母本；Fn：桃園亞蔬20號之採種種子)

五、檢討與建議

作物品質與產量取決於種苗之良莠，若種苗之遺傳質不純，可能造成品質及產量不佳，導致買方之農業損失。因此，建立一套標準化且具公信力之檢測技術與流程，是從事相關工作的實驗室所努力的重

要方向。本場已建立小果番茄 ISSR-SCAR 純度檢定技術資料庫，可提供業者 F1 種子純度自主檢測，此技術省時省成本且清晰易判讀，能提升小果番茄 F1 種子純度檢測的精確性和時效。