

純度鑑定之應用 單核苷酸變異於蔬菜雜交種子

1 王聖善

一、前言

國內每年種子的出口金額約為8億新臺幣，其中多數以雜交一代蔬菜作物為主。雜交種子的生產技術性高且過程繁瑣，因此雜交種子於販售前須進行種子純度鑑定工作以確保產品品質。過往業者僅能透過觀察植物從播種至成熟時外觀差異（田間檢定法，Grow Out Test, GOT）來判定種子純度（圖1），此方法相對耗時且易受環境影響而降低判定的準確性。行政院農業委員會臺南區農業改良場（簡稱南改場）以單核苷酸變異（Single Nucleotide Polymorphisms, SNP）分子標誌平臺所研發之「蔬菜雜交種子純度檢測技術」可縮短檢測時程，提高檢驗準確性，提升臺灣蔬菜種子出口品質。



| 註1：行政院農業委員會臺南區農業改良場。



圖1. 種苗業者以往僅能透過間檢定法判斷出貨前的種子純度。

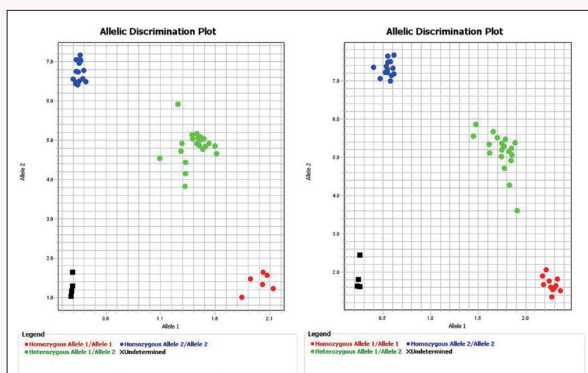


圖2.「蔬菜雜交種子純度檢測技術」在快萃DNA品質下基因型判定良好(左圖為使用1% SDS快萃方法所獲得的DNA樣品的檢測結果；右圖為使用NaOH快萃方法所獲得的DNA樣品檢測結果)。

二、SNP運用在雜交種子純度檢測之原理與應用

SNP指的是作物品種間的單一核苷酸(Deoxyribonucleic Acid DNA)的差異，可透過次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS)方法進行大規模探勘，且在不同品種間容易發現大量具有多型性(Polymorphism)的位點，因此近年來廣泛被運用在農業分子育種相關應用上。相較於早期藉由RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)、ISSR(Inter-Simple Sequence Repeat)、SCAR(Sequence Characterized Amplified Region)以及SSR(Simple Sequence Repeat)分子標誌技術所開發的DNA檢測技術，SNP檢測技術所要求的DNA品質較低，因此可在多數的核酸快萃的DNA品質下，成功進行基因型鑑別(圖2)。此外本技術不需藉由膠體電泳分析進行

最後的基因型判讀，有助於降低操作技術門檻與提升檢測效率，因此適合運用在雜交種子純度檢測分析上。

SNP運用在蔬菜雜交種子純度檢測之原理與我們常聽到的人類親子鑑定原理一樣，多數作物與人類皆為二倍體的生物，而二倍體生物一半的基因型來自父本，另一半則來自於母本，因此在執行純度檢測時，可藉由多組具多型性的SNP分子標誌，同時檢測蔬菜之父母本以及受試的採種種子，以此推斷每一顆受試種子與採種親本之間的親緣關係。以表1為例，採種母本在6組分子標誌基因型皆為BB同質結合；父本皆為AA同質結

表1. SNP運用在雜交種子純度檢測之原理介紹

	採種親本		採種種子			
	母本	父本	F1	雜交失敗	花粉污染	異品種混入
SNP_1	BB	AA	BA	BB	BB	AA
SNP_2	BB	AA	BA	BB	BB	AA
SNP_3	BB	AA	BA	BB	BA	BB
SNP_4	BB	AA	BA	BB	BA	BA
SNP_5	BB	AA	BA	BB	BA	BA
SNP_6	BB	AA	BA	BB	BB	BA



合，因此可推估雜交子代在6組分子標誌的基因型皆為BA的異質結合。試驗可藉由比對受試樣品與採種親本的基因型，用來判定受試樣本是否為雜交後代、雜交失敗個體、花粉污染個體或是採收調製時混入的異品種，用以推估雜交種子純度。

三、SNP常見之分析方法介紹

目前較為常見的SNP檢測方法有HRM (High-Resolution Melting)、TaqMan SNP Genotyping Technology、KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) 以及CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) 等方法。作物品種間的SNP來源通常是透過大量作物品種間的次世代定序所獲得，藉由次世代定

序進行SNP的基因型檢測雖然可獲得大量作物個體間的DNA差異，但此方法操作技術複雜、分析成本高並且所需分析時間長，因此不適合用來作為蔬菜雜交種子的純度檢測方法。相較於其他檢測方法，TaqMan SNP Genotyping Technology與KASP檢測方法對於DNA品質要求較低且操作簡單，因此適合快速的執行大量作物基因型檢測，也是目前國內外用來執行雜交種子純度檢測時最主要的檢測方法。

四、南改場研發之蔬菜雜交種子純度檢測技術介紹

為了協助國內種苗業者快速與精準的評估蔬菜雜交種子的純度，南改場藉由次世代定序技術大量探勘國內

重要蔬菜作物品種間的SNP位點，並將部分高多型性的位點設計成KASP分子標誌，藉此開發了多種蔬菜作物的純度檢測技術，方便業者快速且精確的執行蔬菜種子的品質管控，目前（111年）已成功開發了洋香瓜、胡瓜、南瓜、絲瓜、番茄、番椒、茄子、花椰菜、青花菜、芥藍菜與結球白菜的「KASP分子標誌的雜交種子純度檢測技術」，適合國內種苗業者應用（圖3）。

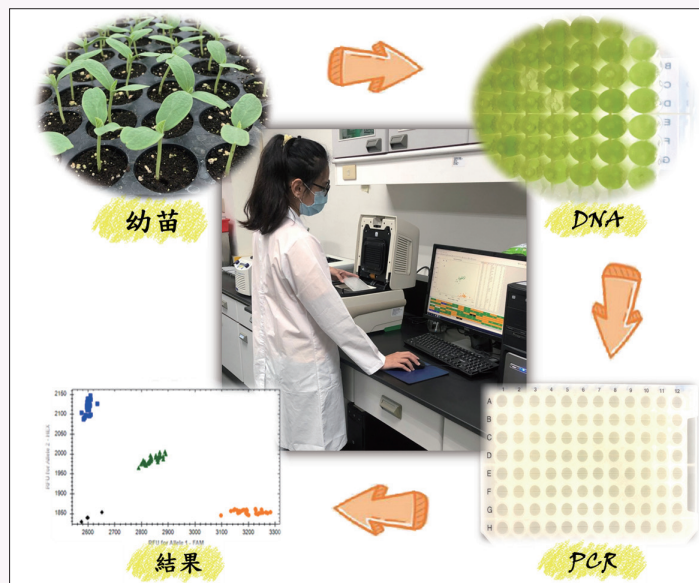


圖3.「蔬菜雜交種子純度檢測技術」分析操作流程。

五、分子標誌運用在雜交種子純度檢測須注意事項

蔬菜種子的採種過程中，異品種主要有「雜交失敗」、「花粉污染」以及「採收調製時混入異品種」等三個重要的來源，其中又以「雜交失敗」影響種子純度最鉅。為了增加種子檢測的效率，降低分析成本，多數種子公司在基因型檢測時，經常僅選用一組在親本間具有多型性的SNP，用來確認「雜交成功率」，並以此評估採種種子的純度，以達到省時省錢的效果。然而蔬菜的採種親本雖以自交系為主，但通常並非純系，因此採種親本經常帶有少量的異質結合的染色體片段，如果業者拿來執行雜交成功率的分子標誌剛好位在這些異質結合染色體片段時，會導致檢測結果低估了實際的雜交成功率。因此建議業者在每個雜交品種第一次以分子標誌執行雜交種子純度檢測時，須先確認用來進行檢測的SNP在採種親本的自交系上是否皆為同質結合，亦或是在第一次檢測時需同時使用2~3個分子標誌檢測同一批樣品，以確保檢測結果的準確性。

此外，業者若只使用1~3組分子標誌執行蔬菜雜交種子純度檢測時，僅能準確的篩選出雜交失敗的個體，使用少量的分子標誌並無法百分之百的篩選出因「花粉污染」或「採收調製時混入」的異品種。因此，業



者除了可以增加純度檢測時所使用的分子標誌數量來確保檢測的準確度外，也可從加強採種田間與採收調製時的控管，降低因「花粉污染」或「採收調製時混入」的異品種比例，確保檢測的準確性。

六、結語

種子純度檢測是雜交種子品質管理流程中的重要一環，南改場研發之「蔬菜雜交種子純度檢測技術」具備操作技術門檻低、正確率高以及檢測通量大等優點，此技術除了用來檢測雜交種子純度之外，也能用於執行作物品種鑑定、親緣分析、自交系統化等用途。目前南改場所開發的甜瓜、番茄、青花菜、花椰菜、芥藍與結球白菜的雜交種子純度檢測技術均已公告可供技轉，業者可透過技術轉移建立自身的雜交種子DNA純度檢測技術，提升蔬菜雜交種子的出貨速度並確保產品品質。