

# 草莓種苗品種CAPS標誌 分子鑑定之研究

陳哲仁<sup>1</sup>、周佳霖<sup>1</sup>、簡怡文<sup>2</sup>、鍾文全<sup>3</sup>

## 一、前言

栽培種草莓 (*Fragaria x ananassa* Duch.) ( $2n=8x=56$ ) 為智利草莓 (*F. chiloensis*) 與北美洲野生種深紅莓 (*F. virginiana*) 之雜交種，屬於薔薇科 (Rosaceae) 多年生草本溫帶水果。草莓果實略呈心形，鮮紅多汁，質地柔軟，酸甜適中，氣味芳香，而且營養價值高，含豐富維他命 C，有幫助消化的功效及其他優點，所以草莓也被人們譽為「水果皇后」，廣受喜愛。在臺灣草莓主要以走莖跳苗或組織培養方法繁殖種苗，幼苗定植後經 3 個月栽培可以收成，採收時間為約在 12 月中旬開始收穫，收穫期可長達半年。根據農業統計年報 2012 年臺灣草莓種植面積 577 公頃，產量 7 千 9 百餘噸，主要產區在苗栗縣 (513 公頃) 佔約 9 成栽培面積，其次為南投縣 (18 公頃) 和新竹縣 (17 公頃)，其他各地僅零星種植。

臺灣最主要栽培品種為“桃園 1 號”係自日本引進之“豐香” (Toyonoka) 品種選育而來，此外，另有“桃園 2 號”、“桃園 3 號”、“桃園 4 號”以及其他農民自行引進“春香”等品種，其中“桃園 4 號”具有品種權。由於草莓常以走莖營養繁殖，鑑定未獲授權的種苗繁殖與果實販售是育種者

權益 (Plant Breeder's Rights, PBR) 保障上重要課題。現行新品種申請必須通過可區別性 (Distinctness)、一致性 (Uniformity) 與穩定性 (Stability) 檢定，植物新品種保護國際聯盟 (the International Union for the Protection of New Varieties of Plants，簡稱 UPOV) 在 2012 年修訂草莓新品種性狀檢定規範，要求無性繁殖品種至少選用 20 個單株幼苗進行檢定，種子繁殖品種則需要種植至少 40 個單株幼苗進行檢定，以植株、走莖、葉片、花器以及果實等 48 項外部型態作為草莓品種識別之參考，通過審議後始得正式登錄為新品種，但是這些外表性狀必須在能充分表現品種特性的環境進行，原則上要求在同一地點，且至少要調查 2 個完整生長週期，不但耗費大量勞力及育種者的金錢和時間成本，對於有時效迫切性之品種侵權鑑定，更凸顯出此方法之合適性問題。

## 二、分子標誌之研究

隨著 DNA 分子標誌技術的發展提供新的作物育種工具，根據不同的核酸擴增技術，以聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 為基礎的方法，如 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 以及 SSR (Simple Sequence Repeat)，已經應用在草莓種間遺傳歧異度評估與品種鑑定，日本研究學者國久美由紀提出之 CAPS (Cleavage Amplified Polymorphic Sequence) 標誌也已成功開

1 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

2 種苗改良繁殖場繁殖技術課 助理研究員

3 種苗改良繁殖場生物技術課 研究員兼課長

發，並發布於UPOV草莓品種DNA標誌鑑定技術文件BMT/8/20，CAPS標誌序列是針對特定基因序列增幅並配合適當的限制酵素截切，用以鑑別不同樣品間序列組成差異的一類分子標誌，已證實可有效鑑別不同草莓品種，操作上僅需少量檢體，具有快速及分析結果可靠優點，但由於栽培種草莓是八倍體物種，在基因序列增幅階段充分擴增來自八個基因組的基因序列，是草莓CPAS標誌鑑定方法關鍵的技術限制。

### 三、CAPS標誌於草莓品種鑑定之應用

日本野菜茶葉研究所 Kunihisa 等人(2003)有鑑於懷疑進口“紅珍珠”(RedPearl)品種可能參混“幸香”(Sachinoka)和“櫻乙女”(Tochiotome)品種，且“幸香”和“櫻乙女”品種是由野菜茶葉研究所選育，未曾授權境外生產，於是分析日本DNA資料庫中源自草莓樣品的15個基因座，選出ascorbate peroxidase(APX)、chalcone isomerase(CHI)、flavanone-3-hydroxylase(F3H)以及chitinase 2-1(CTI<sub>2-1</sub>)等4個基因座，先以4個品種進行序列分析並選擇適合的限制酵素種類設計CAPS標誌，結果篩選出APX-MluI、CHI-PvuII、F3H-NcoI、F3H-HpaII、F3H-AccI以及CTI2-1-HinfI六組CAPS標誌，可以充分鑑別“紅珍珠”、“幸香”以及“櫻乙女”等16個品種，並測試從葉片、萼片以及果實取樣分析都可獲得一致結果，稍後相關成果也發布於UPOV技術文件BMT/8/20，惟技術內容略作調整改以F3H-RsaI取代CTI2-1-HinfI CAPS標誌。

在2007年日本野菜茶葉研究所公布栽培種草莓品種CAPS DNA識別方法，以原有的CAPS標誌分析技術為基礎，擴大使用APX等18個基因座配合限制酵素截切，共

設計25個CAPS標誌，分析125個日本草莓品種，結果除少數變異衍生品種無法與原品種區分，其餘品種都可以透過本法加以鑑別。此外，在實際應用方面，研究人員利用本法進行日本市售韓國進口草莓鮮果檢驗，結果顯示5個包裝共71粒參試果實由62%“紅珍珠”和38%“幸香”品種組成，異品種混入比率在5-87%，除了推論可能是集貨分包作業混雜所致，也證實日本草莓種苗外流至韓國生產並回銷日本，此外，亦有部份商品標示為“女峰”品種但實際上卻全由其他品種混充，違反當地種苗法與商品標示相關規範，據此育種者向疑似侵權販售業者提出書面警告及提出訴訟，結果日本進口韓國草莓鮮果數量自2001年1,500公噸，隔年銳減半數，且自2003年起進口數量約略維持在200公噸，有效嚇阻不法回售日本市場情事，影響甚鉅值得我們借鏡。

### 四、結語

由於分子標誌在品種鑑定方面極具價值的應用潛力，在草莓品種分子鑑定以日本的進展較快，基於CAPS鑑定方法的效力，日本許多新選育品種也透過本技術建立高識別鑑定方法，以保護育種者權益。由於CAPS方法需要進行基因序列擴增及限制酵素截切兩步驟，而源自基因組定序資料的SSR標誌因具有高的多型性比例、共顯性特性、結果可靠，並且適合自動化分析系統，也開始擴大測試在草莓品種鑑定方面應用。臺灣目前僅有4個選育品種，且目前栽培最廣“桃園1號”係源自日本品種“豐香”，利用日本已建立之品種CAPS標誌遺傳型資料，應用於國內選育品種及農民栽培品種鑑定是合理可行的思考方向。