遺傳標誌與作物品種專利

劉邦基
行政院農委會農業試驗所園藝系

前　言

在未來世界裡，貿易自由化已成爲全球的必然趨勢，因此將使農產品貿易競爭日趨激烈；加以智慧財產權觀念日益興盛，各國對於植物種原和優良作物品種勢必加強保護，因此作物品種專利應是廿一世紀農業的重要課題。一種制度的落實，需有一套可靠的技術支援體系，以利於執行，作物品種專利亦不例外，近年來逐漸發展成熟的遺傳標誌(genetic marker)分析技術，適爲此制度所需。如何使遺傳標誌技術與作物品種專利制度適切地結合，將是作物品種專利制度的成功關鍵。

農作物品種專利的演變

雖然植物品種專利與保護的觀念起源甚早，少數國家(例如美國)在本世紀初葉即針對部分農作物建立品種保護制度，但直至 1950 年代末期，大部份國家對於植物品種仍然採取不立法保護的政策，主要原因約有三點，其一爲受到法律認知的影響，其二爲糧食政策的考量，其三則爲缺乏成熟的執行技術，茲分述如下。

一、法律認知的影響：

從法律觀點言之，由於傳統的專利制度肇始於工商產品，難免具有濃厚的工商本位色彩，因此當涉及植物品種專利問題時，在認知上往往會有落差。由於傳統的專利制度十分重視新穎性、創作性、重複性、以及工業可利用性等四大保護要件，身爲生物活體的作物新品種在面對此四大要件的考核時，除了新穎性外，其餘三者皆極易發生爭議，其原因詳如下述。(一) 對於創作性的爭議：工商業界所流行的專利觀念，旨在鼓勵創新，因此對新技術、新觀念和新產品採取保護；反之，作物新品種通常係由育種者利用遺傳學和育種學原理，經由一系列改良與選拔而來，所憑藉之方法通常爲一般舊有者，鮮有新技術之應用，可謂是以舊方法產生新產品，而且其新產品之產生還帶有機率性，致使其創作性較爲模糊。(二) 工業上可利用性的問題：傳統專利法很重視新產品在工業上的可利用性，藉以衡量其價值，而植物新品種並不一定具備這方面的明顯屬性。(三) 操作

過程的重複性問題：專利法所保護之技術或觀念在應用上須有穩定效果及高度重複性，以利於推廣應用；然而植物育種方法就操作結果而言並無理想的重複性可言，亦即下一次使用同樣材料與方法進行雜交和選拔，並不保證獲得相同結果。

此外，傳統專利權的保護僅至第一次銷售爲止，但由於植物有增殖能力，其特性可傳遞給後代，購買者遂可經由增殖過程不停地享受其特性，因此傳統專利權若施用在作物新品種上，顯然對育種家的權利無法達到完全保護之效果。

二、糧食政策的考量：

在糧食政策上，長久以來許多國家基於民以食爲天，並鑑於農業是許多基本物資的來源，爲了避免提高農民生產成本，以便維持較低糧價和基本物價水平，促進社會安定，因而對作物品種多不主張專利保護，或只採取有限度的保護。

三、缺乏成熟技術可爲支援：

從技術層面而言，一種政策或制度的建立須有可靠的技術體系作後盾，以利於執行。作物品種之有效鑑定方法，無疑是專利保護制度所不可或缺的一環。以今日科技發展結果觀之，此技術體系之發展和建立實有賴於分子生物學的發展，其臻於實用與成熟則是最近之事。在遺傳標誌分析技術尚未充分發展的年代，欲有效鑑別作物品種，常有其困難，因此不易解決專利保護過程中所引發的法律爭議問題。

上述原因使我們了解到作物新品種爲何不易列入智慧財產權保護範疇。早期各國對於作物品種的專利保護措施，若非完全缺乏即是做得非常不足，例如美國雖在 1930 年即針對無性繁殖之植物品種實施專利保護，使其權利人得以享有受保護品種之無性繁殖、銷售、使用等權利；美國對無性繁殖植物的這種作法在當時顯然是一種特例，至於其他作物則無量身定做的專利保護措施。許多國家的專利法規甚至明列不保護植物新品種，我國亦如此。然而有鑑於作物新品種的保護不緊是保障育種家的心血，亦將有利於全人類社會，在此時代潮流下，許多工業化國家終於在 1961 年於法國成立「植物新品種保護聯盟」(法文 Union Internationale Pour la Protection des Obtentions Vegetales，簡稱 UPOV)，希望針對植物特性研擬合適的法規，便於保護作物新品種，以達到鼓勵育種業務發展、對優良品種提供國際性的商業性保護、促進農業繁榮等目的。簡言之，UPOV 的主旨是針對植物特性，建立品種保護規範來保護育種家權益，藉以帶動農業和商業進步。其運作方式爲經由與會國所達成的共識，簽署共同協議書，作爲各國遵守依據。該組織成立時所簽署的第一個公約稱爲 1961 年公約，該公約曾在 1972 和 1978 年修正，最近修正並簽署通過者稱爲 1991 年公約。三十餘年來 OPUV 對各國作物新品種專利制度之蘊釀與建立，扮演著火車頭的角色，目前該組織

之會員國已超過三十國，影響可謂極爲顯著。除了 UPOV 所做的努力外，尚值得一提的是，隨著生物科技的迅速發展，許多國家於 1977 年所簽定的布達佩斯條約中，微生物品種首先跨越各國對於活體材料一向不給予工業專利保護的門檻，成爲專利保護對象，對植物而言無疑起到了示範作用；接著美國亦於 1985 年公告實施植物專利。近二十年來生物技術的發展更加快此演變趨勢，自 1994 年第一株轉基因番茄(transgenic tomato, Flavor Savor)推出以來，目前在已開發國家中已有上百種基因工程技術所產生的轉基因作物(transgenic crop)品種受到專利法保護。足見在時代的需求下，國際間逐漸進行法律觀念的調整和修正，加上科技進步的結果提供了必備的技術條件，終於使得新品種專利問題在許多國家浮上了檯面。此一趨勢的持續演變勢將使作物品種專利政策成爲廿一世紀全世界的重要議題，同時與此政策相關的科技項目將益發引人注意。

遺傳標誌的種類

當一個制度確定成爲時代所需時，剩下的問題除了人們的決心以外，最重要的則是有無相關的方法或技術可作支援了。對於作物新品種專利制度而言，遺傳標誌正扮演著關鍵技術的角色，此一技術體系亦是經由長期發展演變而來。

遺傳標誌是鑑別作物品種、品系的依據，依偵測方法可大略分爲形態標誌(morphological marker)、生化標誌(biochemical marker)和分子標誌(molecular marker)等三大類。不同的遺傳標誌各有其特色和優劣點，任何一種標誌只要具備客觀、準確、靈敏和容易分析等特色，即爲理想的鑑別工具，但上述三類標誌在客觀性、靈敏度和分析方法上則具有不同特色。形態標誌是直接觀察或測量植物的外表特徵所建立的鑑別依據，例如花色、葉形、株高、果長、果寬、或測量值的比值等等。此類標誌爲最早應用者，遠在遺傳學成立以前即普遍用於辨識植物。由於植物的形態可直接觀察或測量，因此較容易鑑別，但植物形態(例如葉片大小)易受環境和生育狀況影響，因此容易發生誤差。形態標誌最常用於植物分類上，整個植物分類體系的建立幾乎完全依賴形態標誌的應用，其準確程度在種(species)的層次以上是無庸置疑的，甚至在亞種(subspecies)和變種(botanical variety)的層次尚十分可靠。由於栽培上習稱的同種類農作物在植物分類學上多屬同一種(species)內之雜交後代或變異後代(例如甘藍菜、芒果)，即便是種間甚至屬間雜交結果(例如草莓、柑桔、玫瑰、蘭花等)，亦常因多次雜交和長期篩選，形態上已不易區分。因此在栽培作物間，對於品種(cultivar)、品系(line)或營養系(clone)的辨別，可用的形態標誌通常極爲有限，難以滿足需要。

生化標誌係經由生物化學反應方法所測得，例如同功酵素(isozyme)、ELISA(酵素連結免疫分析)、HPLC(高壓液態色層分析)等技術的測定結果鈞屬之，其中以同功酵素最常用於植物品種或品

系鑑別。生化標誌雖爲客觀可靠之標誌，在自然界中其種類及數量亦當十分豐富；可惜已開發之測定方法尙極爲有限，以同功酵素爲例，至今根據電泳染色法所建立的技術約僅能分析六十餘種酵素，常用者則不到二十種，因此在作物品種鑑別上時常不敷所需。基於此原因，此類標誌比較適於鑑別栽培種和其野生近緣種，或鑑定某些品種間的差異；在基因型比較接近的品系或營養系之鑑別上，生化標誌通常無法滿足需要。

分子標誌爲根據分子生物學所開發的鑑定依據，此類標誌分析技術爲近年來進步最爲快速者。簡言之，分子標誌分析是利用直接在生物的去氧核醣核酸(DNA)層次上所測得的現象與特徵去進行品種或品系鑑別。由於 DNA 是遺傳的基本物質，因此分子標誌是最直接的遺傳鑑定依據，而且無論其變異是否影響表型(phenotype)皆可成爲偵測對象。此類標誌依其偵測方法又可分爲許多種，常用者包括 RFLP(restriction fragment length polymorphism)、RAPD(random amplified polymorphic DNA)、VNTR(variable number of tandem repeats)、和 AFLP (amplified fragment length polymorphism)等。此外還有 CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence)和 STS (sequence tagged site)。其中 RAPD 標誌有時又稱爲 DAF(DNA amplification fingerprinting)或 AP-PCR(arbitrarily primed PCR)；VNTR 又可分爲 microsatellite 和 minisatellite。將來隨著分子生物學的發展，尙有其他分子標誌可能被開發出來。上述各種分子標誌中，除了 RFLP 外皆建立在 PCR(polymerase chain reaction)技術上，各種標誌的基本特色及其分析方法之簡要描述詳如表一。各種分子標誌在分析方法和基本特色方面各有不同，但在一般物種的基因組(genome)內皆含有極豐富的標誌數量可供偵測，尤以高等生物爲然，則是所有分子標誌的共同特色。形態標誌和生化標誌分析僅能從基因產物的表現推測其遺傳變異，但植物性狀的表現有時會受到環境因素與生育狀況影響，而使形態標誌和生化標誌分析產生誤差。此外，形態標誌和生化標誌的偵測範圍僅限於基因組之字碼區(coding area)，對於非字碼區(non-coding area)則無法著力。換言之，唯有會影響基因的轉錄和轉譯結果的 DNA 變異才能被偵測到，此爲形態標誌和生化標誌分析在先天上的限制。分子標誌所能偵測的範圍則可函蓋整個基因組，包括字碼區與非字碼區在內，後者之 DNA 因無須藉由轉錄與轉譯機制參與細胞的生化與生理活動，所承受之選種壓力(selection pressure)較小，使其 DNA 層面的變異比字碼區更容易累積，此區內因而含有更豐富的變異性，其變異只以分子標誌之形式存在。因此，吾人相信當分子標誌用於鑑別極相近的品種、品系或營養系時，只要勤於尋找即有機會發現其差異所在。當欲保護的優良品種與其他品種相似，僅在少數性狀上有差異時，所用的鑑定方法需有足夠的靈敏性，此時分子標誌常是最佳選擇。

如何選擇理想的遺傳標誌以鑑別作物品種與品系

基於品種鑑別上的需要，最理想的遺傳標誌至少應具備以下六種優點：1. 高靈敏度與穩定度、2. 具有共顯性現象 (co-dominance，註：可由分析結果直接分辨植株的基因型而非僅表現型，謂之共顯性)、3 分析效果不受植株部位和生育階段影響、4. 分析方法簡單而且安全、5. 所需設備不昂貴。一般的遺傳標誌很難兼具上述所有特色，即使是分子標誌亦只能具備較多項優點而已。因此分析者須就作物特性、分析目的、遺傳標誌之特性、設備條件、分析策略等作適當抉擇與擬定，其細節詳如下述：

一、作物特性之考量：

欲鑑別作物品種或品系時，對該作物應先有充分了解，這又可分爲下列三大方面：(一) 不同的植株部位和不同生育階段是否會影響分析效果？此問題以採用形態標誌或分子標誌時最須注意，一般的分子標誌則無這種顧慮，理由已如上節所述。(二) 該作物基因組內所蘊含的變異是否豐富？此一先天特性對於鑑別工作之難易具有決定性影響，也影響標誌種類的選擇；一般言之，基因組內變異豐富之作物所能選用的標誌種類較爲寬廣，反之則較爲狹隘。例如已有資料顯示，同爲瓜類作物的甜瓜和西瓜，前者在標誌分析上較後者富於變異性；此種現象應與：1.基因組的複雜程度、2. 作物起原中心是單純或複雜、以及 3.長久以來人們對該作物的選育種過程等三項因素有關。(三) 該品種或品系的構成方式究竟如何？亦即所鑑定的對象是屬於營養系、純系、一代雜交、一般品種 (又稱地方品種或 OP 種) 中的哪一類型？其中以營養系和自交作物的純系之遺傳組成最爲均一，理論上任何單一植株即可代表整個品種或品系，因此取樣技術最單純；異交作物的純系材料則只是一群遺傳組成近於均一的族群 (一般常採用的 6 代自交系族群理論上仍含有 3% 以上的差異性，即便是 8 代自交後代，其均一度亦僅約 99.2%)，爲了提高可信度，分析者對於取樣方法和樣品之代表性問題須慎重考量；一代雜交之品種或品系視其親本爲何種純系，在取樣上亦有類似於上述之問題；至於一般品種因其產生或選育之方式較爲粗放，族群內的遺傳組成較不均一，其取樣技術和分析結果的可信度常是分析者的一大挑戰。一般而言，遺傳組成越不均一之品種或品系，越不容易作客觀的鑑定。

二、鑑定與分析目的之考量：

鑑定與分析目的可分爲兩種：1. 只需區分其異同者，有許多例子屬於此一情況，尤其是營養系和純系之鑑別，在此情況下只要所用標誌得以達到「指紋」效果以供辨識即可，此時所選用之標誌只要具有區分效果即已足夠；2. 除了區分異同，尚須證明血緣觀係者，此種情形比較容易發生在一代雜交品種或

品系的鑑定上，此時須將父母本一併分析，所建立的資料必須合於孟德爾遺傳原理或母性遺傳原理，其中以可顯示孟德爾遺傳資料者因包含父方之遺傳路徑，較具準確性；此時所用之標誌以具有共顯性者爲佳，因共顯性標誌可提供較詳盡的資料，最有助於血緣關係之探討。

三、遺傳標誌特性之考量：

由表一可知各種標誌皆有其獨特的優缺點，當目標作物與鑑別之目的確定後，便可就需要選擇適用的標誌進行分析；通常適合達成目標之標誌種類可能不僅一種，此時有關執行上和操作上相關之因素便可列入考量，例如經濟與成本效益、設備齊全與否、工作人員對特定方法的熟悉程度、實驗室工作安全因素等等，以便選用眼前最方便順手的標誌種類，順利達成品種或品系鑑別目標。

四、最佳分析策略之擬定與考量：

分析策略亦是影響標誌選擇的重要因素。大體言之，有兩種基本方式可用於基因型鑑別，其一爲「整體比對方式」，其二爲「特殊部份比對方式」。對同功酵素和分子標誌而言，「整體比對方式」即是以所有電泳條帶所構成的圖譜樣式(banding pattern)作爲比對單元，「特殊部份比對方式」則是以特定條帶作爲比對單元。採用「整體比對方式」時，以容易產生複雜條帶之標誌(例如 AFLP 和 RAPD)較容易發現差異，因此可提高工作效率，但所得結果容易受到分析誤差與雜訊(包括不穩定的條帶和背景，以及不易根據遺傳學原理解釋的不明條帶)的影響，而且此種分析方式只有「指紋」比對效果，甚難進一步提供血緣關係線索；採用「特殊部份比對方式」時，須專注於某些特定條帶的差異，此法可免除雜訊干擾，減少分析誤差，且一旦找到可資辨識的部位，尚可進一步探究其遺傳行爲模式以建立更詳細資料，甚至可用以推測後代植株之條帶圖譜，只是此法有時須耗費較多時間或嘗試多種標誌才能找到適用者。除了上述兩種基本方法，亦可將全圖譜樣式之比對與特定條帶之比對一起參照運用，此法可稱爲「綜合比對方式」。此外，在專利權的保護上，被鑑識之品種必須有別於所有其他品種，方能實施保護，若無法找到理想的單一標誌來做鑑別依據，可改用「分別比對」之策略，此法即是將新品種與所有舊品種間進行有系統的單獨比對，一一找出可作爲鑑別依據之標誌。除了「分別比對方式」，尚可依據特殊部份比對方式將一個以上不同標誌所呈現之結果，整合成各品種之基因型特性資料，再以此特性資料進行品種間之比較；隨著分析標誌的增加，不同品種或品系間呈現相同分析結果的機率將越來越小，因此此種「整合型比對方式」之靈敏度可藉由使用的標誌數目加以調整和掌握，直至達到鑑別目標爲止；此處所謂的不同標誌可以是不同種類

的標誌 (例如同時使用同功酵素、RFLP、AFLP 等標誌進行分析)，或是同類標誌的不同成員 (例如 RFLP 標誌中的不同探針與 RAPD 標誌中的不同引子所產生的不同條帶均屬之)。總之，爲了提升分析效率和可信度，分析時可選擇不同的策略，進而決定使用何種標誌。

遺傳標誌在品種專利保護上的應用與未來展望

一種制度之形成必有其因緣際會之各種必要因素，遺傳標誌的應用在作物品種專利制度中，雖只是諸多必要因素之一環，但如果就此制度之執行角度來看，遺傳標誌分析技術則是最主要的關鍵角色，足見其重要性。從另一方面言之，遺傳標誌分析技術自有其淵遠流長的發展過程與歷史，並非專爲品種專利制度而設。近年來因分子生物學的突飛猛進，使遺傳標誌技術進入嶄新境界，各種新的標誌不斷開發出來，研究者日眾， 現今所累積的資料已十分豐富。由於生物基因組爲遺傳變異的根源，各種基因組的研究成果將更進一步帶動遺傳標誌分析技術的進步，吾人可以想見在即將到來的「後基因體」(post genome) 時代裡，應用遺傳標誌以鑑定作物品種或品系的技術將更爲成熟，作物品種專利制度將更容易落實，屆時不僅育種家的權益得以受到周密保護，更可進一步促進農業發展。

表一、各種常用遺傳標誌的基本特色及其分析原理

標誌種類與名稱	使用PCR*技術與否	共顯性	標誌數量	基本原理與分析方法
形態標誌	✗	✗	有限	直接觀察或測量植物外觀形態所建立的辨識依據。
生化標誌： 同功酵素(isozymes)	✗	✓	豐富但未充分開發	利用同種酵素在電場中移動速度的差異(起因於基因變異而造成分子結構上的差異)，形成不同的電泳條帶，據以辨識植物基因型。
分子標誌 RFLP	✗	✓	極豐富	不同植株基因組的相同部位 DNA(包括基因或非基因部份)經過限制酵素(restriction enzyme)切割後所形成的片段，在長度上可能有差異，經由電泳及特殊程序可形成不同條帶，供作辨識基因型的依據。

表一（續）

標誌種類與名稱	使用PCR*技術與否	共顯性	標誌數量	基本原理與分析方法
RAPD	✓	✗	極豐富	以隨意合成的引子進行 PCR 反應所產生的電泳圖譜，可作爲鑑別植物基因型之標誌。
CAPS	✓	✓	極豐富	基因組特定部位之 DNA 片段經 PCR 複製後再以限制酵素切割，最後形成特殊的電泳圖譜，用以辨識不同的基因型。
STS	✓	✓	豐富	基因組特定部位之 DNA 片段經 PCR 複製後直接進行電泳分析，再依據電泳圖譜辨識不同的基因型。
AFLP	✓	✗	極豐富	將基因組核酸先經限制酵素切割，再根據限制酵素切位序列設計特殊引子(視情況需要在原引子之一端增加 1~3 個鹼基對)，進行 PCR 分析，最後依據電泳條帶辨識基因型。
VNTR：				
Microsatellite	✓	✓	豐富	基因組內存在許多連續的簡短 DNA 重複序列(數個鹼基對以內)，其重複次數極易產生變化(通常爲 4~40 個重複)，習稱 microsatellite，可作爲辨識基因型之標誌。其分析原理與方法與 STS 相同。
Minisatellite	✓	✓	豐富	與 microsatellite 相似，其重複序列通常含有 15~60 個鹼基對，而重複次數可達數百個。其分析原理與方法亦與 STS 相同。

PCR (polymerase chain reaction)，「DNA 聚合酵素連鎖反應」之意，是一種可將 DNA 分子上之特定片段大量複製的技術。複製時須藉由特定片段兩頭之短小序列 [含八到二三十個鹼基對，稱爲核酸引子(DNA primer)，須由人工合成] 與單股之 DNA 黏合，再由 DNA 聚合酵素催化其餘部位之合成，完成複製反應，其複製程序係以循環方式進行，複製之效率則以幾何級數計算，因此可以在極短時間內(<3 小時)大量合成所需之 DNA 片段。PCR 是生物技術研究所常用的方法，爲許多研究工作項目所不可缺的基本技術。

參考文獻

電腦網站--植物新品種保護聯盟資料：http://seed.agron.ntu.edu.tw/

台灣省政治府農林廳，1992。植物種苗管理法令彙編。204 pp。

周廷光、沈百奎、劉兆烘、李善忱，1992。赴日研修植物新品種審查檢定技術報告。行政院所屬各機關出國人員報告。經濟部商品檢驗局。47 pp。

徐源泰。1999。生物多樣性、生物技術與生物產業。In: 林曜松(ed.) 1999 生物多樣性研討會論文集。行政院農業委員會編印。pp 145-159。

郭華仁，1993。UPOV 各會員國新品種保護現況。種苗通訊 (15):8。台北。

陳怡臻，1997。植物育種家權利法規的比較。台灣大學農藝研究所碩士論文。台灣大學。96 pp。

陳世賢，1991。植物種苗法規施行之現況與檢討。嘉義農專推廣簡訊 (39):2-7。

劉邦基，1991。生物技術在果樹育種上之應用。台灣果樹之生產及研究發展研討會會專刊。台灣省農業試驗所編印。pp 183-202。

蕭吉雄、張有明、林昭雄、黃賢良，1991。研習植物新品種檢定審查技術。行政院所屬各機關出國人員報告。台灣省政治府農林廳。51 pp。

Hoelzel, A. R. 1992. Molecular genetic analysis of populations—a practical approach. IRI Press, Oxford UK. 315 pp.

Hubbard, M., J. Kelly, S. Rajapakse, A. Abbott, and R. Ballard. 1992. Restriction fragment length polymorphisms in rose and their use for cultivar identification. HortScience 27(2): 172-173.

Jarvis, P., C. Lister, V. Szabo, and C. Dean. 1994. Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biol. 24: 685-687.

Konieczny, A.and F. M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. The Plant Journal 4(2): 403-410.

Lewin, B. 1997. Genes VI. Oxford, UK. 1260 pp.

McMillin, D. E. 1983. Plant isozymes: a historical perspective. In: S. D. Tanksley and T. J. Otron (eds.), Isozyme in plant genetics and breeding, Part A. pp 3-13. Elsevier. New York..

Pieter, V., R. Hogers, M. Mleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23(21): 4470-4414.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitray primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18(22): 6531-6535.