

# 水稻於良種繁殖制度下之遺傳變異<sup>1</sup>

吳東鴻<sup>2</sup> 胡凱康<sup>3,4</sup>

## 摘 要

吳東鴻、胡凱康。2010。水稻於良種繁殖制度下之遺傳變異。台灣農業研究 59:275–288。

本研究的目的是探討水稻良種繁殖三級制度中各級種子之遺傳一致性；以對於 2004 至 2005 年台灣地區良質米水稻品種具有完全鑑別力之 23 個 SSR 標誌為分析工具，而各品種遺傳組成之標準資料，係以 2004 年第二期作良種繁殖更新計畫中所生產之原原種種子為基礎。標準資料顯示大多品種原始種子與原原種之遺傳組成一致，且為單一基因型，僅台梗 11、16 號與台農秈 22 號以及高雄 139、145 號品種內並存多種基因型。以 2005 年第一期作所衍生的 77 處原種田，探討良種繁殖制度下各原種種子的變異性，各品種與其基礎資料相互比較後，結果顯示大體上品種之原種均與上一期作之原原種遺傳組成一致，但台梗 9 號原種與其原原種部份不一致，及台梗 16 號品種內多基因型並存現象發生變異，與部分台農 71 號原種出現特異基因型。最後建議藉由延後一季單株選拔，在 F<sub>5</sub> 世代仍進行單株選拔，待 F<sub>6</sub> (F<sub>5.6</sub>) 世代才混合收穫，其種子整齊度將由 87.5% 提升至 93.75%，避免日後逐年進行去偽去雜的工作。

**關鍵詞：**水稻、良種繁殖制度、簡單重複序列標誌、梗稻、秈稻。

## 前 言

良種繁殖制度的立意在於以計畫性的層層倍增種子數，並經由田間檢查與室內檢查控管品種純度與發芽率等種苗品質，以確保國內水稻種子能維持優良品種之遺傳特性，避免農民自行留種繁殖以至發生品種退化、混雜，使品質下降。除原始種子 (breeder's seed)，由各育種場所自行負責維持各育成品種之原始種子之外，良種繁殖三級制度包含由育成機關設置原

原種田，以原始種子生產原原種種子 (foundation seed)；再由縣 (市) 政府輔導優良農民設置原種田，以原原種生產原種種子 (registered seed)；最後由鄉鎮公所或農會委託農民設置採種田，以原種生產採種種子 (certified seed)；並對原原種、原種、採種三者進行種苗檢查作業。

綜觀國內水稻栽培面積中，梗稻佔整體面積約 86%。就 Blair *et al.* (2002) 研究結果顯示在梗稻上每基因座平均所帶有之對偶基因數目

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2441 號。接受日期：99 年 12 月 8 日。
2. 本所作物組助理研究員。台灣 台中市。
3. 國立台灣大學農藝系副教授。台灣 台北市。
4. 通訊作者，E-mail：khwu@ntu.edu.tw，Fax：(02)23620879。

(5.7 alleles) 少於秈稻品種 (8.7 alleles)，換言之，粳稻內對偶基因的變化程度本來已明顯小於秈稻；Wu & Lin (2008) 也曾提及國內粳稻品種的遺傳組成由少數日本粳稻馴化後做為親本而來，因此台灣粳稻的歧異度比一般粳稻更低，外觀形態辨識日漸困難。Garland *et al.* (1999) 認為 SSR 標誌是鑑別澳洲親緣相近的水稻品種之優良工具；而在韓國眾多親緣相近的粳稻上，Song *et al.* (2002) 及 Suh *et al.* (2005) 亦建議以 SSR 標誌作為鑑別工具，且 SSR 分子標誌也具有輔助偵測水稻可區別性、穩定性與均一性的潛力 (Singh *et al.* 2004)。

過去諸多水稻育種研究著重於建構選拔程序之完備性，鮮少研究檢視品種釋出後，良種繁殖更新能否維持該優良品種之純度與種苗品質，避免品種發生變異而喪失原有特性。然在三級良種繁殖更新中，因育種者常於同一品種維持數個姊妹系，對此可能造成品種均一性低落；故本試驗擬藉由分析各級繁殖圃間遺傳組成之一致性，以了解品種內姊妹系存在是否影響良種繁殖更新成效。擬藉由各育成機關於 2004 年良種繁殖更新計畫中所生產之原原種種子，作為本試驗研究建立各品種遺傳組成之標準資料，用以探究各品種內原原種與原種間種子之遺傳組成是否具一致性，並比較品種內各原種田間是否存有差異，以檢視良種繁殖更新之成效。

## 材料與方法

### 原始種子與原原種

本研究試驗之參試品種為 2004 年良種繁殖更新計畫中，第二期作所生產之原始種子及原原種種子，係由各育成機關提供其負責繁殖維持的良質米品種，為新育成、或具特殊風味品種；原原種種子為 2004 年第二期作所生產之水稻種子，而原始種子種子則是用以繁殖該原原種之親本種子，共取得 22 個品種，包含台中

191 號 (TC191)、台中秈 10 號 (TCS10)、台中秈糯 1 號 (TCSnG11)、台東 30 號 (TT30)、台南 11 號 (TN11)、台南糯 10 號 (TNGlu10)、台農秈 22 號 (TNGS22)、台梗 2 號 (TK2)、台梗 4 號 (TK4)、台梗 5 號 (TK5)、台梗 8 號 (TK8)、台梗 9 號 (TK9)、台梗 11 號 (TK11)、台梗 16 號 (TK16)、台梗 17 號 (TK17)、台梗糯 3 號 (TKGlu3)、台梗糯 5 號 (TKGlu5)、花蓮 19 號 (HL19)、花蓮 20 號 (HL20)、高雄 139 號 (KH139)、高雄 143 號 (KH143)、高雄 145 號 (KH145)，各品種分樣取得原始種子種子 20 g 及原原種種子 50 g，以供建立各推廣品種之基因型基礎資料 (表 1)。另自農委會農糧署種子檢查室分樣取得花蓮 20 號、高雄 145 號、台農秈 22 號等新品種，2005 年第一期作原原種圃之抽驗種子，將可供分析品種內原原種間變異分析。

### 原種

良質米原種種子是由前項原原種繁殖生產，並經種子檢查室於 2005 年第一期作原種田抽驗種子中代表性取樣所得，以 120 至 150 g 重量不等的分樣種子代表各塊原種田，樣品資料登錄如種子檢查室種子檢查紀錄，本參試原種樣品編號並承該室 2005 第一期作抽樣紀錄序號，包含台梗 8 號等 19 個品種 (表 1) 共 77 個原種樣品，其中包含未有基礎資料之台梗 14 號、桃園 1 號與台農 71 號等 21 個原種樣品。初步分析後，另自特定台農 71 號原種戶取得 1 份自行維持之 2006 年台農 71 號原種種子，以供確認 2005 年台農 71 號原種間遺傳變異原由。

### SSR 分子標誌

本試驗沿用 Hsieh *et al.* (2007) 所篩選出於台灣粳稻品種間具多型性之 SSR 標誌，如 RM120、RM159、RM163、RM164、RM167、RM210、RM214、RM223、RM235、RM247、RM266、RM276、RM333、RM426、RM440、RM567、RM70 等 17 組，並由 McCouch *et al.*

表 1. 本研究所有參試品種之樣品清單

Table 1. The sample list of all rice materials in this study

| Cultivars | Breeding institute <sup>z</sup>                  | 2004 2 <sup>nd</sup> season<br>seed level | 2005 1 <sup>st</sup> season registered seeds <sup>y</sup>                    |
|-----------|--|---|--|
| HL19      | Hualien DARES                                    | Breeder, Foundation                       | —  |
| HL20      | Hualien DARES                                    | Breeder, Foundation                       | 109 (Foundation)   |
| KH139     | Kaohsiung DARES                                  | Foundation                                | 69, 93, 94   |
| KH143     | Kaohsiung DARES                                  | Foundation                                | —  |
| KH145     | Kaohsiung DARES                                  | Foundation                                | 13 (Foundation), 44  |
| TC191     | Taichung DARES                                   | Breeder, Foundation                       | 84   |
| TCS10     | Taichung DARES                                   | Breeder, Foundation                       | 89, 95, 96   |
| TCSnG11   | Taichung DARES                                   | Breeder, Foundation                       | 99   |
| TK02      | Tainan DARES                                     | Breeder, Foundation                       | 16, 47, 68, 72   |
| TK04      | Hualien DARES                                    | Breeder, Foundation                       | —  |
| TK05      | Kaohsiung DARES                                  | Foundation                                | 1, 14, 22, 105   |
| TK08      | Tainan DARES                                     | Breeder, Foundation                       | 17, 18, 21, 23, 24, 28, 29, 39, 40, 41, 42, 43, 64,<br>74, 90, 110, 113, 114 |
| TK09      | Taichung DARES                                   | Breeder, Foundation                       | 59, 65, 75, 76, 85, 88   |
| TK11      | Kaohsiung DARES                                  | Foundation                                | 15   |
| TK14      | Taoyuan DARES                                    | —   | 19, 20, 60, 97, 102, 104, 105  |
| TK16      | Hualien DARES                                    | Breeder, Foundation                       | 25, 26, 30, 31, 45, 50, 51, 62, 63, 108                                      |
| TK17      | Tainan DARES                                     | Breeder, Foundation                       | 27   |
| TKGlu3    | Tainan DARES                                     | Breeder, Foundation                       | 32   |
| TKGlu5    | Taichung DARES                                   | Breeder, Foundation                       | 100  |
| TN11      | Tainan DARES                                     | Breeder, Foundation                       | —  |
| TNG71     | Agricultural research institute                  | —   | 38, 49, 56, 57, 61, 66, 70, 71, 73, 77, 87, 91, 98                           |
| TNGlu10   | Tainan DARES                                     | Breeder, Foundation                       | 33   |
| TNGS22    | Chia-Yi Agricultural Experiment<br>Station, TARI | Breeder, Foundation                       | 53 (Foundation)  |
| TT30      | Taitung DARES                                    | Breeder, Foundation                       | 46   |
| TY01      | Taoyuan DARES                                    | —   | 103  |

<sup>z</sup> DARES, District Agricultural Research and Extension Station; TARI, Taiwan Agricultural Research Institute.

<sup>y</sup> The sample number continued with Seed Testing Laboratory, COA.

(2002) 所發表之 SSR 標誌，再篩選出 RM105、RM211、RM215、RM243、RM297 等 5 組引子，以求各多型性引子均勻散佈於整體基因組上 (表 2)。

### 分析方法

從原始種子中分樣取出 20 粒穀粒，經球磨機 (TissueLyser, Qiagen) 同時混合研磨，作為混合樣品供後續分析；原原種則取 50 粒穀粒作為混合樣品進行研磨。均從中取出粉末 0.15 g 供抽取 DNA，其餘粉末於 -20°C 冰箱中保存備

用。然混合樣品經 SSR 分析後發現混雜基因型時，則該基因座再進行數量不等之單粒分析 (10–48 粒)，以確認該混合樣品之遺傳組成；另對台稉 11、16 號與台農秈 22 號就特定基因座進行大量分析 (96 株)，探究品種內混合基因型之比例。而各原種樣品均取 60 粒穀粒為混合樣品，經上述流程進行分析。

穀粒 DNA 萃取方法是修改自 Zimmermann *et al.* (1998) 的 CTAB 方法而來：取 0.1 g 均質樣品放入 2.0 mL 離心管中，加入 900  $\mu$ L

表 2. 本研究於 25 個參試品種中具多型性之 23 個 SSR 基因座

Table 2. The basic data of 23 SSR loci which are polymorphic among 25 varieties

| Locus  | Ch. <sup>z</sup> | Anneal Temp. | Allele no. | PIC.   | Panel | Reference <sup>y</sup> |
|--------|------------------|--------------|------------|--------|-------|------------------------|
| RM105  | 9                | 60           | 3          | 0.2310 | 3     | (e)                    |
| RM120  | 11               | 60           | 2          | 0.1207 | 5     | (a)                    |
| RM159  | 5                | 60           | 3          | 0.5994 | 3     | (c)                    |
| RM163  | 5                | 60           | 4          | 0.5848 | 12    | (a)                    |
| RM164  | 5                | 60           | 4          | 0.6639 | 1     | (a)                    |
| RM167  | 11               | 60           | 3          | 0.4537 | 8     | (a)                    |
| RM210  | 8                | 60           | 4          | 0.4225 | 4     | (b)                    |
| RM211  | 2                | 60           | 2          | 0.2248 | 10    | (e)                    |
| RM214  | 7                | 60           | 4          | 0.2851 | 9     | (b)                    |
| RM215  | 9                | 60           | 3          | 0.5744 | 13    | (e)                    |
| RM223  | 8                | 60           | 3          | 0.5224 | 5     | (b)                    |
| RM235  | 12               | 60           | 4          | 0.5973 | 11    | (b)                    |
| RM243  | 1                | 60           | 3          | 0.2789 | 6     | (e)                    |
| RM247  | 12               | 60           | 3          | 0.5307 | 7     | (b)                    |
| RM266  | 2                | 55           | 8          | 0.6826 | 1     | (c)                    |
| RM266I | 2                | 55           | 2          | 0.2830 | 1     | —                      |
| RM276  | 6                | 55           | 3          | 0.5994 | 2     | (c)                    |
| RM297  | 1                | 60           | 5          | 0.5099 | 6     | (e)                    |
| RM333  | 10               | 55           | 12         | 0.8616 | 2     | (c)                    |
| RM426  | 3                | 60           | 4          | 0.5224 | 3     | (d)                    |
| RM440  | 5                | 60           | 4          | 0.3809 | 4     | (d)                    |
| RM567  | 4                | 60           | 4          | 0.6909 | 2     | (d)                    |
| RM70   | 7                | 55           | 5          | 0.5120 | 1     | (b)                    |

<sup>z</sup> Ch., Chromosome; Anneal Temp., Anneal Temperature; PIC., Polymorphism Information Content.

<sup>y</sup> (a) Wu & Tanksley 1993; (b) Chen *et al.* 1997; (c) Temnykh *et al.* 2000; (d) Temnykh *et al.* 2001; (e) McCouch *et al.* 2002.

CTAB-buffer (20 g/L CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA) 與 2 μL Rnase (10 U/μL), 混合均勻, 以 65°C 水浴加熱處理 30 分鐘, 以 16000 g 離心 10 分鐘。將上清液倒入內含 800 μL 氯仿的離心管中, 震盪 30 秒後, 以 16000 g 離心 10 分鐘。取 400 μL 上清液至內含 800 μL CTAB precipitation solution (5 g/L CTAB, 0.04 M NaCl) 的離心管中, 混合均勻後置於室溫 60 分鐘, 以 16,000 g 離心 5 分鐘。倒去上清液, 加入 350 μL NaCl (1.2 M) 溶解沈澱物, 再加入 210 μL 異丙醇混合均勻,

以 16000 g 離心 10 分鐘。倒去上清液, 加入 500 μL 70% ethanol solution, 以 16000 g 離心 10 分鐘。倒去上清液, DNA 沈澱物乾燥後, 每管加入 100 μL QH<sub>2</sub>O, 以分光光度計 (NanoDrop-1000; Thermo Scientific, USA) 進行 DNA 濃度定量。

聚合酶連鎖反應 (PCR) 及毛細管電泳程序及設備同 Hsieh *et al.* (2007), 僅修改 PCR 循環次數, 由 30 次調降為 24 次。結果分析方式主要採用集群分析法 (cluster analysis), 呈現樣品間遺傳相似性的高低; 遺傳相似性係利用相

同基因座的數目於全部基因座數目中的比率。其集群分析係以 NTSYSpc 2.2 Cluster 類別中的 SHAN 模組以 UPGMA (Un-weight Pair-Group Method using Arithmetic averages) 法 (Nei *et al.* 1983) 進行分析,另多型性訊息提供量 (polymorphism information content, PIC) 之估算同 Hsieh *et al.* (2007)。

## 結 果

### 參試 22 組 SSR 引子對之複合毛細管電泳

由 22 組 SSR 引子對於參試良質米原原種上之電泳結果,整理出各基因座上其對偶基因大小分布,以各基因座之對偶基因分布範圍不相互重疊的前提下,混合各產物進行毛細管電泳,其引子對搭配組合如表 2,使得在可節省電泳時間下,且能維持 PCR 產物的穩定性。

另鑑於 RM266 引子於秈稻品種中產生非單一 PCR 產物,而於粳稻品種內則為單一產物,不同於其他 SSR 引子之專一性,為確認 RM266 引子於秈稻中確為複基因座 (multiple loci),而於粳稻參試品種上為單基因座,藉由 NCBI 資料庫中 Electronic PCR (e-PCR) 程式組搜尋粳稻品種 Nipponbare 與秈稻品種 93-11 基因體內 RM266 分布位置,序列比對結果顯示於粳稻品種 Nipponbare 上僅存有單一基因座,而秈稻品種 93-11 則呈現複基因座,依據參試品種上之對偶基因分布,將 108–110 bp 大小僅出現於台中秈 10 號、台中秈糯 1 號與台農秈 22 號等秈稻品種者定義為 RM266I 基因座,120–141 bp 則定義為 RM266 基因座。

### 原始種子、原原種

**品種基礎資料之建立:**將 2004 年第二期作所得 22 個參試品種之原始種子與原原種種子,經 23 個 SSR 分子標誌遺傳分析後,檢視各品種原始種子與原原種之基因型,顯示台中 191 號、台中秈 10 號、台中秈糯 1 號、台東 30 號、台南 11 號、台南糯 10 號、台梗 2 號、台

梗 4 號、台梗 5 號、台梗 8 號、台梗 9 號、台梗 17 號、台梗糯 3 號、台梗糯 5 號、花蓮 19 號、花蓮 20 號、高雄 143 號等 17 個參試品種,其品種內並無並存多種基因型,於 23 個 SSR 基因座上均為同質結合體基因型,且各品種原始種子與原原種之遺傳組成為一致基因型。

而台梗 11、16 號與台農秈 22 號以及高雄 139、145 號大多基因座均為單基因型,然少數基因座上並存多種基因型;經單粒分析後,確認台梗 11 號於 RM440 基因座、高雄 145 號於 RM210 基因座、台農秈 22 號於 RM235 基因座上,均並存 2 種基因型,其各品種基因型依序標記為 TK11\_1、TK11\_2、KH145\_1、KH145\_2、TNGS22\_1、TNGS22\_2,並於台梗 11 號上發現異質結合體基因型;然台梗 16 號亦並存 2 種基因型,但於 RM163 與 RM164 基因座上共分屬之,各別標記其基因型為 TK16\_1 與 TK16\_2;而高雄 139 號則於 RM333 基因座上兼具 3 種基因型,標記為 KH139\_1、KH139\_2、KH139\_3,也曾發現異質結合體基因型,其品種基因型組成如表 3 所列。另探究品種內其基因型混合比例,分別就台梗 11 號、台梗 16 號與台農秈 22 號各分析 96 顆,其結果顯示台梗 11 號混合比例為 27 (TK11\_1): 69 (TK11\_2)、台梗 16 號為 56 (TK16\_1): 40 (TK16\_2)、台農秈 22 號為 64 (TNGS22\_1): 32 (TNGS22\_2)。

**集群分析 (cluster analysis):**將此 22 個參試品種之遺傳資料進行集群分析,在樹狀圖上可以清楚區分開各品種 (如圖 1);若以 0.1 遺傳距離作為區分獨立品種之界線,0.1 至 0.2 遺傳距離間為灰色爭議地帶,超過 0.2 遺傳距離為獨立品種 (Heckberger *et al.* 2002);由圖中清楚可見,台梗 11 號、台梗 16 號、高雄 139 號、高雄 145 號以及台農秈 22 號等品種內多基因型混合的情形,仍在 0.1 遺傳距離內,但台梗 5 號與高雄 143 號兩品種間的遺傳距離則在

表 3. 高雄 139、145 號與台梗 11、16 號以及台農秈 22 號等品種之基因型組成

**Table 3.** Allelic composition of 6 SSR loci in 5 varieties, including Kaohsiung (KH) 139, 145, Taikeng (TK) 11, 16, and TainungSen (TNGS) 22

| Variety | RM164  | RM163  | RM210  | RM235  | RM333  | RM440  | Genotype   | Count        |        |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|--------------|--------|
| TK11    | 266 bp | 129 bp | 151 bp | 95 bp  | 179 bp | 168 bp | TK11_1     | 4            |        |
|         |        |        |        |        |        |        | 171 bp     | TK11_2       | 7      |
|         |        |        |        |        |        |        | 168,171 bp | Heterozygote | 1      |
| TK16    | 266 bp | 129 bp | 151 bp | 97 bp  | 179 bp | 168 bp | TK16_1     | 15           |        |
|         |        |        |        |        |        |        | 296 bp     | 127 bp       | TK16_2 |
| KH139   | 266 bp | 129 bp | 151 bp | 95 bp  | 222 bp | 168 bp | KH139_1    | 25           |        |
|         |        |        |        |        |        |        | 224 bp     | KH139_2      | 6      |
|         |        |        |        |        |        |        | 227 bp     | KH139_3      | 10     |
|         |        |        |        |        |        |        | 222,224 bp | Heterozygote | 1      |
| KH145   | 296 bp | 127 bp | 149 bp | 97 bp  | 219 bp | 168 bp | KH145_1    | 16           |        |
|         |        |        | 151 bp |        |        |        | KH145_2    | 8            |        |
| TNGS22  | 252 bp | 164 bp | 153 bp | 107 bp | 187 bp | 209 bp | TNGS22_1   | 9            |        |
|         |        |        | 133 bp |        |        |        | TNGS22_2   | 3            |        |

0.091，會低於 0.1 遺傳距離門檻值的主因，推測可能因台梗 5 號為高雄 143 號的直接親本，台梗 5 號給予高雄 143 號實際親本貢獻量遠超過 0.5 所致。而於 0.2 遺傳距離以內者，如：台梗 2 號與台梗 8 號或台中秈 10 號與台農秈 22 號等兩個組合，其親緣係數均為 0.5 (Chen *et al.* 2008)，顯示有較近的親緣關係，台梗 8 號與台農秈 22 號的直接親本分屬台梗 2 號、台中秈 10 號，綜觀顯示以 SSR 分子標誌所量測的遺傳距離與該等品種間實際親緣關係具有一致性。

**多型性訊息提供量：**就參試的良質米原原種，23 個 SSR 基因座所能提供的平均多型性為 0.4925 (表 2)，而以 RM120 SSR 基因座所提供的遺傳訊息最少，僅只有 0.1207，具有 2 種對偶基因，RM333 SSR 基因座具有最多種對偶基因 (12 種)，且該基因座所能提供的遺傳訊息也是最多。

**不同繁殖期中原原種之變異：**分析花蓮 20 號、高雄 145 號、台農秈 22 號等 2005 年第一期作原原種圃之抽驗種子，與 2004 年第二期作原原種所建立基礎資料相互比對，其結果顯示各品種內遺傳組成具高度一致性，如高雄 145 號品種內並存 2 種基因型仍於不同繁殖期作間穩定維持，但台農秈 22 號 2005 年第一期作原原種，則顯示由品種內並存基因型轉變為單一基因型 (圖 1)。

#### 良種繁殖制度下原種種子的變異性

由種子檢查室分樣所得之 2005 年第一期作原種種子，並承種子檢查室樣品編號為本試驗原種樣品編號，全部 77 處原種田樣品經 23 組 SSR 分子標誌分析後，再與 2004 年第二期作原原種分子資料合併比較，結果顯示品種內各原種田間均一性極高，且各品種之原種均與上一期作之原原種遺傳組成極為一致，如圖 1 所示，但少數品種仍存有些許變異：

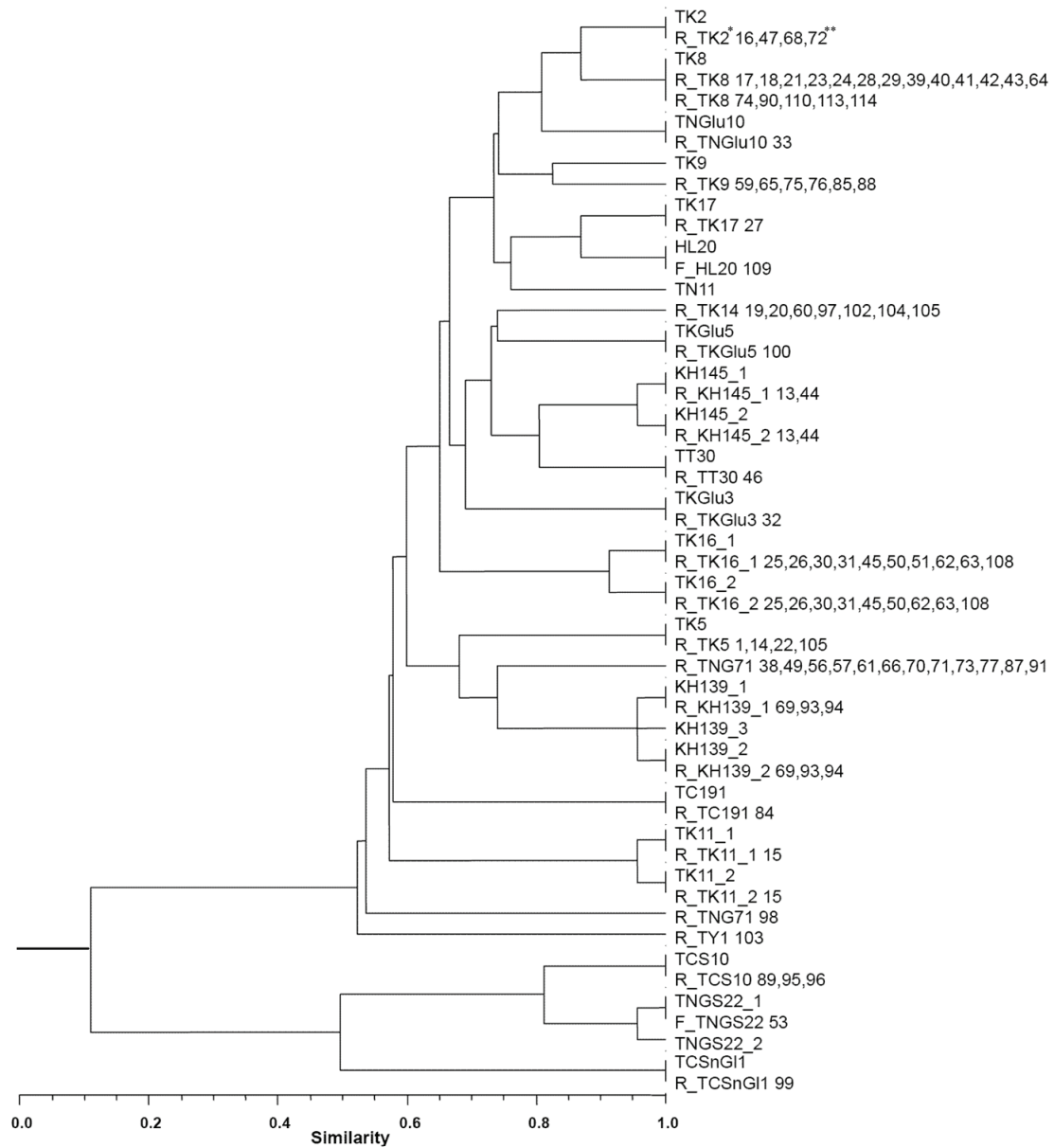


圖 1. 本試驗參試 2005 年第一期作 77 處原種田與其 2004 年第二期作原原種之集群分析。

**Fig. 1.** The cluster analysis of 77 rice registered seeds in 2005 first season that compared with 2004 second season foundationn seed. [\* Sample code: (1) first code: F, foundation seed level; R, registered seed level; (2) second code: variety name; (3) third code: the genotype within this variety. \*\* The sample number continued with Seed Testing Laboratory, COA.].

**原種與原原種其遺傳組成不一致者：**分析結果顯示台梗 9 號 2005 年第一期作全部 6 處原種田間遺傳組成完全一致，但所有 2005 年第一期作原種與 2004 年第二期作原原種間差異超過 0.1 的遺傳距離，23 個 SSR 分子標誌中共有 4 個基因座 (RM235、RM70、RM163 及 RM164) 分具不同基因型，其螢光條帶如圖 2 所示。

**品種內並存基因型發生偏移：**分析台梗 11、16 號與高雄 139、145 號具有並存多基因型之原種遺傳組成後，再與其基礎資料比較，發現各品種內原種田間具極高遺傳均一性外，亦發現品種內並存基因型於繁殖推進中仍可穩定維持，僅樣品編號為 51 號之台梗 16 號原種田，發生品種內並存基因型偏移現象，該塊原種田已偏向 TK16\_1 基因型，品種內多基因型並存情形已消失。

**無標準資料對照者：**因台梗 14 號、台農 71 號與桃園 1 號等 3 個品種，未取得該品種原原種以供建立分子基礎資料，但 7 處台梗 14 號原種田之混合樣品分子資料彼此間完全一致，顯示各原種田之間遺傳均一性極高，此後分析試驗能以此分子資料作為台梗 14 號基礎資料。

而台農 71 號於 2005 年第一期作設置 13 處原種田，其中有 12 個原種田間遺傳組成完全一致，僅樣品編號 98 號之台農 71 號原種種子 (R\_TNG71-98) 與另 12 個台農 71 號原種的遺傳組成不盡相同，分別於 RM105、RM243、RM266、RM276、RM333、RM567 等 6 個基因座上具多型性，但其遺傳組成又非其他良質米品種。為確認上述變異之來源，自農戶取得該台農 71 號原種 (R\_TNG71-98) 所自行繁衍之後

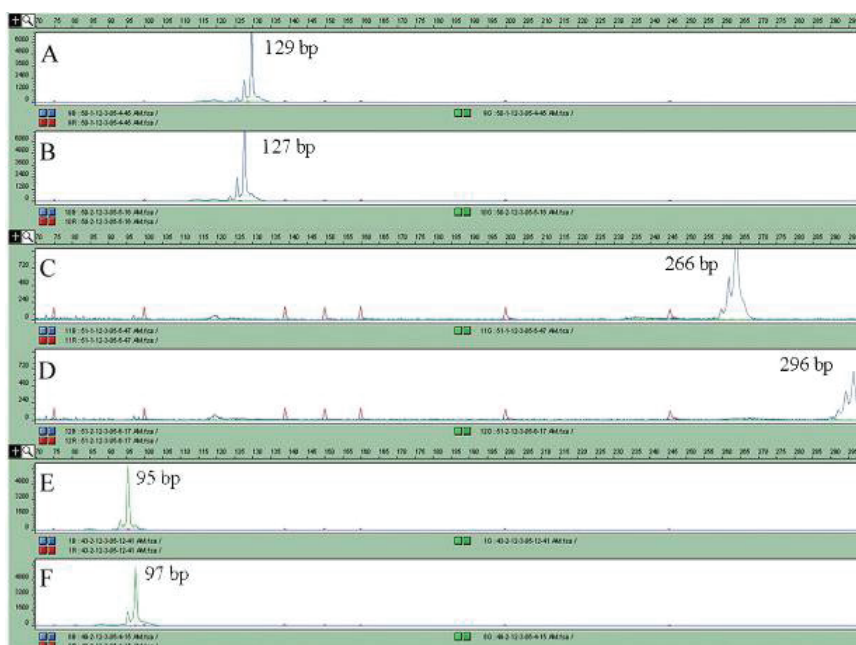


圖 2. 台梗 9 號 2004 年第二期作原原種與其 2005 年第一期作原種之螢光條帶 [原原種於 RM163 (A)、RM164 (C) 與 RM235 (E)、原種於 RM163 (B)、RM164 (D) 及 RM235 (F) 上]。

**Fig. 2.** The fluorescent bands of TK9 for the Foundation seeds in 2004 second season and the Registered seeds in 2005 first season [Foundation seeds in RM163 (A), RM164 (C) and RM235 (E); Registered seeds in RM163 (B), RM164 (D) and RM235 (F)].

裔種子 (2006 年, R\_TNG71-98 Progeny seed), 並以其他 2005 年台農 71 號遺傳均一之原種種子為對照樣品, 兩方各取 24 粒種子進行單株分析, 其結果顯示仍於 RM105、RM243、RM333

基因座上具多型性, 而 RM266、RM276、RM567 基因座上則無多型性, 該特異台農 71 號後裔遺傳均一, 但其基因型與對照樣品內分屬不同兩大類基因型 (表 4、圖 3)。

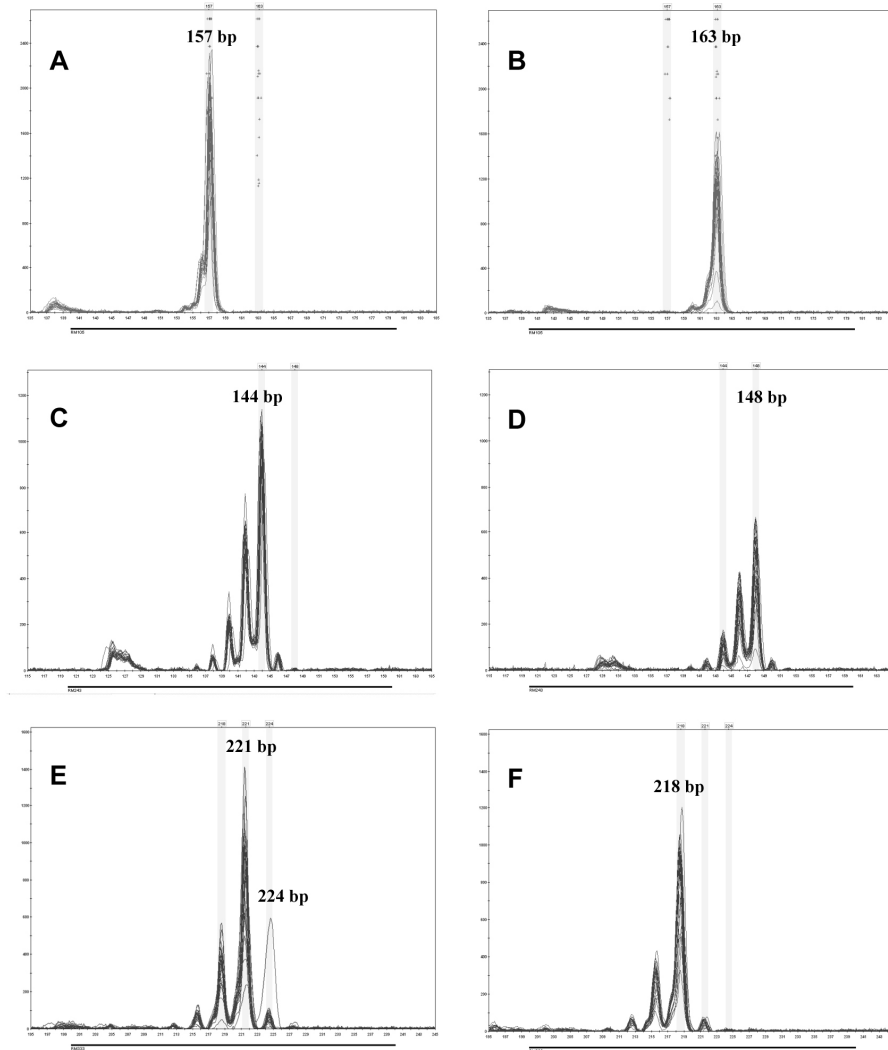


圖 3. 台農 71 號 24 粒原種種子 (2005) 與編號 98 號台農 71 號其 24 粒後裔種子 (2006) 在 RM105 (A, B)、RM243 (C, D) 與 RM333 (E, F) SSR 基因座上之毛細管電泳結果。

**Fig. 3.** The capillary electrophoresis result of 24 TNG71 Registered seeds (2005) and 24 R\_TNG71\_98 progeny seeds (2006) in RM105, RM243 and RM333 SSR locus. [2005 TNG71 Registered seed in A: RM105 (157 bp), C: RM243 (144 bp) and E: RM333 (221 bp, 224 bp); 2006 R\_TNG71\_98 progeny in B: RM105 (163 bp), D: RM243 (148 bp) and F: RM333 (218 bp)].

**表 4.** 台農 71 號 2005 原種與原種編號 98 號台農 71 號其 2006 後裔種子之遺傳組成**Table 4.** Allelic composition of 2005 TNG71 registered seed and 2006 R\_TNG71\_98 progeny seed in RM105, RM243 and RM333 SSR locus

| Sample                  | RM105  | RM243  | RM333  | Count |
|-------------------------|--------|--------|--------|-------|
| TNG71 registered seed   | 157 bp | 144 bp | 221 bp | 23    |
|                         |        |        | 224 bp | 1     |
| R_TNG71_98 progeny seed | 163 bp | 148 bp | 218 bp | 24    |

## 討 論

據我國「臺灣地區農作物種苗檢定須知」，種苗級別自原始種苗、原原種、原種至採種依序繁殖，在種苗檢定作業中由原原種級別開始受檢。而日本「主要農作物種子法」種苗級別亦由優良品系、原原種、原種至採種依序繁衍，優良品系由育種家自行控管用以繁殖原原種，由原原種級別接受檢驗，優良品系級別未進入檢定制度的。經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 種子規範中，basic seed 須能維持該品種特性以及種子內具有高度均一者，並需經過嚴格檢測合格後，才可供 certified seed 生產用；但只要為生產 basic seed 之用，皆稱為 pre-basic seed (OECD 2008)。美國種子級別則依 breeder's seed、foundation seed、registered seed 及 certified seed 逐層排列；breeder's seed 係大學實驗站或種子公司的育種人員負責生產、控管，以確保種子純度，以供應生產 foundation seed 用；然 foundation seed 需經過嚴格篩選、檢驗，因 foundation seed 必須保有品種特性以及非常高的種子純度，而檢定工作一般由州農業廳的種子檢查室、或州立大學的種子檢查室負責，合格後的種子可直接用以生產 certified seed 或生產 registered seed (Sleper & Poehlman 2006)。由上述各地區進入檢定制度的最上層繁殖級別可見，依其內涵各對應為原原種 (我國)、原原種 (日本)、foundation seed (美國) 及 basic seed (OECD)；因此，在對應各

地區種子繁殖級別名稱上，可藉由各級別實際操作作業顯見 breeder's seed 為原始種苗而非原原種級別。

本試驗有 9 個參試品種與 17 個 SSR 分子標誌，與 Hsieh *et al.* (2007) 之試驗研究具有共通性，但本試驗品種標準資料與過去所建立主要硬稻品種之遺傳組成有部份相異，主要原因在於材料來源相異，過去試驗種子來源，主要來自國家作物種原中心及農糧署種子檢查室，均為過去作為品種保存用途之種子，然而本試驗用以建立品種標準資料之種子來源，來自各品種育成機關，且於 2004 年良種繁殖更新計畫中所生產之種子。

另礙於遺傳分析儀 (Prism® 310 Genetic Analyzer) 進行 1 次毛細管電泳，平均需耗費 31 分鐘，儘管藉由 multiplex 的方式減少毛細管電泳次數、提高分析效率，但經濟合作暨發展組織 OECD 對於原原種的品種純度要求 99.7%，原種品種純度為 99.0%，若需要達成此要求，原原種則需檢測 995 粒穀粒、原種需 300 粒全無異品種混雜，才具 95% 的信心水準可推估此結論 (Remund *et al.* 2001; Laffont *et al.* 2005)，但原種田設置數目眾多，若要對所有種子來源一一進行純度檢測，龐大的試驗規模難以在短短數個月內消耗，因此改以混合樣品為分析單位，追蹤水稻繁殖制度中之原始種子、原原種乃至原種之主要遺傳組成是否發生變化，因此內部遺傳組成其實仍存些許差異。

且本試驗係以 23 個均勻散佈於整體基因組上的 SSR 分子標誌，能於台灣良質米品種上

具有完全鑑別力；但在可負荷的試驗規模下，無法對各品種之原原種一一進行品種均一性測驗，而改採以 50 粒混合樣品分析各原原種之遺傳組成，但受限於簡單序列重複的特性使然，造成對偶基因間往往差距僅有 2-3 bp，且於 PCR 反應中會因滑動複製，產生跡痕條帶 (stutter bands)，干擾對偶基因的判別，因為每一對偶基因往往會產生一系列連續遞減的條帶，當該基因座的基因型並非同質結合體時，跡痕條帶易遮蓋分子量較小的對偶基因，而影響基因型判讀的正確性 (Garland *et al.* 1999)，基於此限制，造成所觀測到的混合比例往往趨近於各方相近；且隨著對偶基因分子量差距越大，混合樣品可檢出的極限會逐漸提高，因此當基因型差異大 (台稈 16 號與台農秈 22 號原原種)，便可輕易觀測到品種內並存多基因型，當差異小時，則不易觀測到品種內仍存有另一基因型，故本試驗雖發現台稈 11 號、台稈 16 號、台農秈 22 號、高雄 139 號與高雄 145 號等五個品種，出現品種內並存多基因型，但不表示其他品種僅具有單一基因型，品種內可能仍隱藏其他比例較低的基因型。

檢視整體基因組上 SSR 分子標誌分布，顯示 RM163 與 RM164 具有相異 PIC 值，但位於同一重組位點上，這兩個基因座為共分離關係，因此雜交、遺傳重組發生後，當 RM163 基因座上的基因型固定時，往往亦決定 RM164 基因座之基因型，使得台稈 16 號於品種內僅混合 2 種基因型。當一個品種長期在同一地區純化選拔而釋出時，儘管在形態外觀已經呈現高度均質或僅剩些微差異，已難以分辨個體差異，但於 SSR 分析層次上，將會強化這些個體間的差異 (Gethi *et al.* 2002; Cooke *et al.* 2003)，如同台稈 16 號內雖並存 2 種基因型，基因型間相異 2 個基因座，但農藝性狀並無差異。

而本研究針對連續 3 個繁殖世代，追蹤繁殖制度中的原始種子、原原種、原種等三種級

別種子之遺傳組成，顯示絕大部分品種在這 3 個級別中呈現連續一致，儘管品種內並存多基因型均都能穩定地在世代推進中表現，這與 Singh *et al.* (2004) 的結果相符合；但仍有部份品種原原種 (台農秈 22 號) 與原種 (台稈 9 號)，與該品種基礎資料的遺傳組成不盡相同，推測可能為育種家在進行種子繁殖更新時，再繼續單株選拔以提高品種純度，或維持數個不同世代衍生品系，以備抽換生產原原種種子的品系，但若過於頻繁抽換代表品系，容易降低該品種的均一性。

以台稈 9 號良種繁殖過程為例，每間隔 3 至 4 年進行原始種子的繁殖更新，並且再以單株選拔推進世代，因此於 2002 年便維持了 3 個不同世代衍生品系 (F<sub>14:15</sub>、F<sub>15:16</sub>、F<sub>16:17</sub>)，各衍生品系的種子個別混合收穫，分別釋出供原原種使用 (許志聖，個人通訊)，所以推測供台灣大學作物育種實驗建立純度標準資料之原原種，與實際種子檢查室所抽驗之原種並非同一批，是分屬於不世代衍生品系，因此才出現 2004 年第二期作所得之原原種與 2005 年第一期作原種之遺傳組成相異。而花蓮 20 號良種繁殖方式，為每次種子繁殖更新時都維持 25 個品系，並利用 25 個品系之整體外觀性狀作為選拔基準，將所有達整體水平的品系混合收穫，供原原種生產用，而下一世代原始種子種子的來源，則是從達標準的品系上挑選出 25 個單株，作為下一次 25 個品系生產用 (宣大平，個人通訊)，25 個品系間的親緣關係不明確且年年變動。

而本試驗雖沒有針對所有良質米品種進行全面性的均一性測驗，但針對多重來源的原種檢視其主要遺傳組成，並無對每一個來源樣品進行完整的純度檢測，從原種整體分析結果看來，各品種內的原種田之間是具有極高度均一性，除了編號 98 的台農 71 號原種，其遺傳組成與該品種的其他原種並不完全一致；然經由

該農戶提供其變異原種之後裔種子進行單株分析，其遺傳分析與訪談結果均顯示該原種戶曾對該品種於繁殖過程中持續進行單株選拔，造使該品種原種偏離主要基因型，亦暗示該品種於釋出初期仍具有某程度遺傳變異，以致於良種繁殖過程中發生形態均一度不足並加上農民自行單株選拔所致。

品種內高度異質性起因於非同質結合的親本，以及不同種子批相混合所致，如高雄 139 與高雄 145 號多基因型並存，高雄區農業改良場良種繁殖方式，是將所有種子混合收穫後，供原原種生產用，然而也從中取出部份種子供原始種子繁殖用，並無原始種子與原原種層級隔閡，而低度的異質性則往往是由於殘存的異質結合體(台稉 11 號、高雄 139 號)、花粉污染、與品種混雜 (Cooke *et al.* 2003)。

由上述結論可見水稻良種繁殖制度可穩定維持品種內遺傳組成，對於控管品種純度與發芽率等種苗品質具高度正面意義；然其中欲維持品種純度則須由繁衍過程之源頭嚴格控管，但現行所有成之大部分良質米品種，往往是評估完  $F_4$  之後裔行，即  $F_5$  世代，便將優良後裔行 ( $F_{4.5}$ ) 內的種子混合收穫，其往往會造成品種內的均質性不足，而需在高世代時再單株純化作業，以供該原原種生產之用，但若在  $F_5$  世代仍進行單株選拔，待  $F_6$  ( $F_{5.6}$ ) 世代才混合收穫，其後裔種子的整齊度(即單株上同質結合率)，可由原先 87.5% 提升至 93.75%，便可使品種內變異小到足以忽略，能減少新品種完成命名後再純化等諸多困擾，避免日後逐年進行去偽去雜的工作。

### 誌 謝

本研究承行政院農業委員會農糧署經費 94 農科-1.3.1-糧-Z1 與 95 農科-1.3.1-糧-Z1 科技計畫補助，謹此致謝。

### 引用文獻 (Literature cited)

- Blair, M. W., V. Hedetale, and S. R. McCouch. 2002. Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105:449-457.
- Chen, H., M. S. Lin, and K. K. Hwu. 2008. A database of Taiwan rice pedigrees. *Crop Environ. Bioinform.* 5:22-28. (in Chinese with English abstract)
- Chen, X., S. Temnykh, Y. Xu, Y. G. Cho, and S. R. McCouch. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 95: 553-567.
- Cooke, R. J., G. M. N. Bredemeijer, M. W. Ganai, R. Peeters, P. Isaac, S. Rendell, J. Jackson, M. S. Röder, V. Korzun, K. Wendehake, T. Areshchenkova, M. Dijcks, D. Laborie, L. Bertrand, and B. Vosman. 2003. Assessment of the uniformity of wheat and tomato varieties at DNA microsatellite loci. *Euphytica* 132:331-341.
- Garland, S. H., L. Lewin, M. Abedinia, R. Henry, and A. Blakeney. 1999. The use of microsatellite polymorphisms for the identification of Australian breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 108: 53-63.
- Gethi, J. G., J. A. Labate, K. R. Lamkey, M. E. Smith, and S. Kresovich. 2002. SSR variation in important US maize inbred lines. *Crop Sci.* 42:951-957.
- Heckberger, M., M. Bohn, J. S. Ziegler, L. K. Joe, J. D. Hauser, M. Hutton, and A. E. Melchinger. 2002. Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties I Genetic and technical sources of variation in SSR data. *Mol. Breed.* 10:181-191.
- Hsieh, L. Y., D. R. Wu, and K. K. Hwu. 2007. Variety identification among major Japonica rice cultivars of Taiwan based on simple sequence repeat markers. *Seed Nursery* 9:25-38. (in Chinese with English abstract)
- Laffont, J. L., K. M. Remund, D. Wright, R. D. Simpson, and S. Gregoire. 2005. Testing for adventitious presence of transgenic material in conventional seed or grain lots using quantitative laboratory methods: statistical procedures and their implementation. *Seed Sci. Res.* 15:197-204.
- McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. B. Xu, K. B. Lobos, K.

- Clare, M. Walton, B. Y. Fu, R. Maghirang, Z. K. Li, Y. Z. Xing, Q. F. 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 Res.* 9: 199–207.
- Nei, M., F. Tajima, and Y. Tatenno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol.* 19:153–170.
- OECD. 2008. OECD Seed Schemes. Organisation for Economic Co-operation and Development Press. Paris. 278 pp.
- Remund, K. M., D. A. Dixon, D. L. Wright, and L. R. Holden. 2001. Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Sci. Res.* 11:101–119.
- Singh, R. K., R. K. Sharma, A. K. Singh, V. P. Singh, N. K. Singh, S. P. Tiwari, and T. Mohapatra. 2004. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica* 135:135–143.
- Sleper D. A. and J. M. Poehlman. 2006. *Breeding Field Crops*. 5<sup>th</sup> ed. Blackwell press. Iowa. 424 pp.
- Song, M. T., J. H. Lee, Y. S. Cho, Y. H. Jeon, S. B. Lee, J. H. Ku, S. H. Choi, and H. G. Hwang. 2002. Narrow genetic background of Korean rice germplasm as revealed by DNA fingerprinting with SSR markers and their pedigree information. *Korean J. Genet.* 24:397–403.
- Suh, J. P., J. H. Ku, H. S. Hur, and J. Y. Lee. 2005. Analysis of genetic diversity among Korean rice varieties by molecular markers and pedigree information. *Treat. Crop Sci.* 6:114–122.
- Temnykh, S., G. DeClerk, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour, and S. McCouch. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res.* 11:1441–1452.
- Temnykh, S., W. D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y. G. Cho, T. Ishii, and S. R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:697–712.
- Wu, K. S. and S. D. Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellite in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241:225–235.
- Wu, W. C. and M. S. Lin. 2008. Pedigree analysis of rice varieties of Taiwan: relationships among Japanese introductions. *Crop Environ. Bioinform.* 5:248–257. (in Chinese with English abstract)
- Zimmermann, A., J. Lüthy, and U. Pauli. 1998. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 207: 81–90..

# Rice Genetic Variation under the Three-Step Propagation System<sup>1</sup>

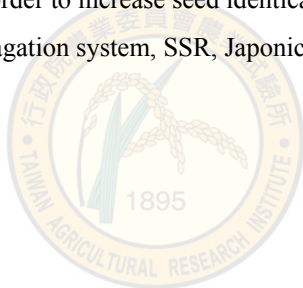
Dong-Hong Wu<sup>2</sup> and Kae-Kang Hwu<sup>3,4</sup>

## Abstract

Wu, D. H. and K. K. Hwu. 2010. Rice genetic variation under the three-step propagation system. *J. Taiwan Agric. Res.* 59:275–288.

Objective of this study is to determine the genetic consistency of seeds produced under three-step propagation system. Twenty-three simple sequence repeat (SSR) markers which have full discrimination power on 22 superior rice varieties produced in Taiwan during 2004 and 2005 were used in this study. Breeder's seeds and foundation seeds of these 22 varieties were used to establish standard genetic profiles for each variety. The result shows that allelic composition of foundation seeds possessed single genotype and was identical with breeder's seeds in most varieties. But allelic composition of TK11, TK16, KH139, KH145 and TNGS22 contained more than one genotype. Cluster analysis of 77 registered samples in 2005 first season and their predecessors, breeder's seed, reveals high genetic consistency except TK9, TNG71 and TK16. In final, it is suggested to extend one more generation for plant selection until F<sub>5</sub> generation, in order to increase seed identical ratio from 87.5% to 93.5%.

**Key words:** Rice, Three-step propagation system, SSR, Japonica rice, Indica rice, *Oryza sativa*.



- 
1. Contribution No. 2441 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: December 8, 2010.
  2. Assistant Researcher, Crop Science Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
  3. Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
  4. Corresponding author, khwu@ntu.edu.tw, Fax: (02)23620879.