

# 水稻良種繁殖圃中異型株之遺傳分析<sup>1</sup>

吳東鴻<sup>2</sup> 胡凱康<sup>3,4</sup>

## 摘要

吳東鴻、胡凱康。2011。水稻良種繁殖圃中異型株之遺傳分析。台灣農業研究 60:197–210。

本研究的目的是探討水稻良種繁殖異型株之可能形成因子；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 2 期作良種繁殖更新計畫中所生產之原原種種子為基礎。本試驗從 29 處繁殖圃共取得 40 件田間異型株，其結果顯示共有 8 件與對照樣品相同基因型、8 件品種內分離基因型、6 件品種混雜、13 件天然雜交後裔與 5 件未知品種。顯見大部分田間異型株主要係因天然雜交、品種混雜或品種內均一性不足所致；為了提高良種繁殖制度之效益，建議各級繁殖圃應加強執行設置保護行避免外來花粉汙染，並進行單株選拔提高品種均一性，收穫前確實田間去偽去雜清除異品種混雜等作業。

**關鍵詞：**水稻、三級繁殖圃、異型株、簡單重複序列標誌。

## 前言

水稻為我國最大宗糧食作物，其優良品種之純度與種苗品質控管流程格外重要，若純度低落將導致產生品種混雜及退化等現象，造成植株高矮不均及成熟期不一致，嚴重時導致米質變差和稻米規格不符的情形，進而影響民間糧商收購意願及價格與政府收購之公糧品質，對於農民及政府造成極大的損失。目前良質米推薦品種經良種繁殖制度依序設置原原種圃、原種圃、採種圃，以計畫性的逐層倍增種子數供應農民栽培使用，並對原原種、原種、採種三者進行種苗檢查作業；而現行品種純度的檢查，主要依據田間檢查時對植株形態與生育特

性的觀察，與室內檢查時對於稻穀外觀特性上的判別。由於近年來的水稻育種目標與育種程序的一致性，使得水稻品種間的差異有逐漸減小的趨勢，並且因為形態與生育特性的差異容易受到環境的影響，因而降低了現行檢查制度對於異品種的偵測能力。

已有許多文獻指出分子標誌是品種鑑別 (variety identification) 與品種檢查 (variety testing) 的適當工具 (Garland *et al.* 1999; Singh *et al.* 2004; Heckenberger *et al.* 2005; Chakravarthi & Naravaneni 2006; Pervaiz *et al.* 2010)；雖植物新品種保護國際聯盟 (the International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV) 公約上，對於品種認定是基於外觀性狀上的可

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2554 號。接受日期：100 年 8 月 31 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。

區別性 (distinctness)、均一性 (uniformity)、穩定性 (stability) 等檢測 (UPOV 1996)，但形態區別僅能提供真實親緣關係的粗略估計，雖具有相同親緣趨勢，但往往在經過一系列形態評估後，仍無法明確區分兩相近的品種 (Heckenberger *et al.* 2005; Nagy *et al.* 2009)。

然眾多分子標誌系統中，以 SSR 標誌具有共顯性能分辨異質結合體，數量眾多能均勻散佈於全基因組中，且因序列滑動複製造就遺傳訊息豐富多變，PCR 反應操作技術簡易，條帶再現性高及條帶性質適合使用自動偵測等性質，使得 SSR 標誌成為水稻遺傳分析的優先選擇 (Bautista *et al.* 2006; Shishido *et al.* 2006)。為了偵測水稻栽培品種內的遺傳歧異度 (allelic diversity)，能快速、有效、精確判讀基因型，相繼有學者利用 SSR 螢光標誌，以 Multiplex 方式搭配半自動螢光偵測系統 (Blair *et al.* 2002; Coburn *et al.* 2002; Jain *et al.* 2004)，其試驗結果也與過去的同功酶 (isozyme)、RFLP 等分析結果相符合，使得 SSR 標誌成為一項穩定又兼具高效性的鑑別工具。

而監控品種內的變異性程度，在現今強調智慧財產權的趨勢中尤其重要，因品種內分離幅度過大將危及品種內均一性，該品種可能因此喪失品種權的保護。亦鑒於種子檢查室田間檢查員對各級繁殖圃進行田間檢查時，常可檢出田間異型株的存在，但限於外觀形態易受環境影響而發生變異，無法僅藉由目視檢測釐清真實遺傳效應與外在環境干擾。因此本試驗希望藉由分子標誌輔助檢查，能進一步釐清造成田間異型株之成因，係純粹僅受環境因子造成性狀變異，或因品種混雜、外來花粉污染所致，以作為未來提升良種品質之參考依據。

## 材料與方法

### 試驗材料

田間異型株檢出標準，係在黃熟期以各繁

殖圃中特定品種普通植株外觀形態與生育特性，作為其採樣點對照樣品，若生育特性或外觀型態與其對照樣品相異者視為異型株，如：單一稻叢中多數分蘗與對照樣品相較下顯現株高異常超過 10 cm、整穗稻穗均具長芒、生育時期超過 7 天、或稈稻繁殖圃中存有長粒形之稻株等顯著異型態。本試驗每一件異型株均以該株單穗為分析單位，若種子袋中存有對照樣品與異型株相互混雜，則目測篩選異型態穀粒，逐一進行單粒分析，以釐清對照樣品與異型株之遺傳差異，而單穗混合樣品分析結果若檢出異質結合體基因型，則再以單粒穀粒進行個別分析。

本試驗材料分別由 2005 年第 1 期作各級繁殖圃 18 處與 2005 年第 2 期作新竹縣採種圃 11 處，共取得 40 件水稻田間異型株。其中第 1 期作各級繁殖圃異型株係由農糧署種子檢查室協助取樣，田間檢查員於 2005 年 5 月至 7 月中進行田間檢查時，分別在 1 處原原種田、14 處原種田與 3 處採種田共 18 個採樣點，檢出 23 件田間異型株，並合併該採樣點之對照樣品共取得 40 個參試樣品，涵蓋台梗 5·8·14 號 (TK5, 8, 14)、高雄 139、145 號 (KH139, 145)、台中 191 號 (TC191)、桃園 1 號 (TY1) 與台農 71 號 (TNG71) 等 8 個栽培品種。另配合 2005 年「全國稻米優良採種戶競賽」新竹縣初賽，於新竹縣 2005 年第 2 期作台梗 14 號 11 處採種田，檢出 17 件採種異型株，個別保存種子並紀錄異型株性狀，並進行遺傳分析以及後裔行田間性狀調查；另因未建立 2004 年台梗 14 號第 2 期作原原種基礎資料，2005 年第 2 期作台梗 14 號 23 處採種戶採樣點均未取樣對照樣品，改以 2005 年第 1 期作台梗 14 號原種為其後續分析基礎資料。本試驗樣品編號皆以第 1 碼為採樣點編號，第 2 碼編號為 1 者係該採樣點之對照樣品，第二碼編號 2 以上者，則為異型株。

## 分析方法

本研究使用 Wu & Hwu (2010) 所篩出於台灣梗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、RM105、RM211、RM215、RM243、RM297 等 22 組引子，並以 2004 年第 2 期作各良質米推薦品種之原原種基因型作為該品種之基礎資料，以便進行後續各異型株遺傳分析，而其基礎資料包含台中 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、4、5、8、9、11、16、17 號 (TK2, 4, 5, 8, 9, 11, 16, 17)、台梗糯 3、5 號 (TKGLu3, 5)、花蓮 19、20 號 (HL19, 20)、高雄 139、143、145 號 (KH139, 143, 145) 共 22 個品種 (Wu & Hwu 2010)。本試驗中穀粒樣品經球磨機 (TissueLyser, Qiagen Co.) 研磨後，以修改自 Zimmermann *et al.* (1998) 的 CTAB 法萃取穀粒 DNA，經分光光度計 (NanoDrop-1000; Thermo Scientific, USA) 進行 DNA 濃度定量，然 PCR 反應條件與毛細管電泳程序與設備皆同 Hsieh *et al.* (2007)。

本試驗統計分析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的比率。集群分析係以 NTSYSpc 2.2 (Exeter Software) 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。

## 結 果

本試驗共取得 40 件水稻田間異型株與其採樣點上對照樣品，皆經 22 組 SSR 引子分

析其基因型後，再與 2004 年第 2 期作原原種資料合併比較，其中 2005 年第 1 期作各級繁殖圃 18 處採樣點分析結果如表 1，而 2005 年第 2 期作台梗 14 號 11 處採種田分析結果如表 2。整體試驗結果可區分為數項：(1) 採樣點對照樣品與基礎資料不一致、(2) 異型株與其採樣點對照樣品基因型無異、(3) 品種內分離基因型、(4) 品種混雜、(5) 栽培品種天然雜交與 (6) 未知品種等類型。而待測樣品若屬高度同質結合體基因型樣品則採集群分析探究品種來源，其與 22 個良質米推薦品種基礎資料合併分析結果如圖 1 所示。然遺傳組成部分比例異質結合體基因型則判定為天然雜交後裔，需進一步進行後裔分離檢測基因型探究其雜交親本。

### 對照樣品遺傳組成與基礎資料不一致者

本試驗 2005 年第 1 期作各級繁殖圃 18 處採樣點中，大多採樣點上之對照樣品遺傳組成與其基礎資料相符合，僅台梗 14 號 2 處採樣點的對照樣品 (O12-1, O17-1) 呈現基因型內分離，雖然該品種事先並未建立基本種與原原種等基礎資料，但與其 2004 年 7 處原種田的分子資料比較遺傳相似性，顯示這 2 處所取得的對照樣品與原有原種田有 0.04 到 0.06 的遺傳距離，亦顯示該品種具較低遺傳均一性 (圖 1)。

### 異型株遺傳組成與對照樣品無異者

台梗 8 號原種田異型株 O1-2，株高較對照樣品高超過 10 cm，但其遺傳組成仍與基礎資料完全一致；相同情形也出現在高雄 145 號原種田異型株 O5-2、高雄 139 號原種田異型株 O13-2、以及台梗 14 號採種田異型株 O17-2、O17-3、O23-2 及 O24-2 等 6 件，顯示僅以株高異常做為田間目視判斷異型株的證據力較為薄弱。而在台中 191 號原種田中所取得的異型株 O6-2，雖田間紀錄異型態為秈型且有芒，但穀粒外觀並不似秈型瘦長穀粒，且遺傳分析結果仍顯示與基礎資料之遺傳組成完全一致；惟因

表 1. 2005 年第 1 期作三級繁殖圃田間異型株分析結果

Table 1. Analysis of off-type plants of rice grown in the three-step propagation nursery in the first crop season of 2005

Code <sup>z</sup>	Cultivars	Phenotype <sup>y</sup>	Genetic result <sup>x</sup>	Seed class	Collection site
O1-1	TK8	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Beidou township, Changhua county
O1-2		Tall	Identical genotype		
O2-1	TK8	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Beidou township, Changhua county
O2-2		Long awn	0.18 genetic distance		
O2-3		Long awn	0.18 genetic distance		
O3-1	TK5	Normal type	Identical genotype	Foundation seed	Pingtung city, Pingtung county
O3-2		Different panicle	0.04 genetic distance		
O4-1	KH145	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Wandan township, Pingtung county
O4-2		Mix indica and japonica type	Hybrid progeny (low heterozygosity)		
O5-1	KH145	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Tianzhong township, Changhua county
O5-2		Tall	Identical genotype		
O6-1	TC191	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Beidou township, Changhua county
O6-2		Indica plant type, awn	Identical genotype		
O7-1	TNG71	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Wufeng township, Taichung county
O7-2		Tall, long grain, awn	Variety mixture, TCS10		
O8-1	TNG71	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Wufeng township, Taichung county
O8-2		Tall, long grain, awn	Variety mixture, TCS 10		
O9-1	TNG71	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Wufeng township, Taichung county
O9-2		Tall, long grain	Variety mixture, TCS 10		
O10-1	TNG71	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Wufeng township, Taichung county
O10-2		Early maturity, dwarf	0.1 genetic distance		
O11-1	TNG71	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Wufeng township, Taichung county
O11-2		Early maturity, dwarf	0.1 genetic distance		
O12-1	TK14	Normal type	0.06 genetic distance	Registered seed	Gukeng township, Yunlin county
O12-2		Awn	0.13 genetic distance		
O13-1	KH139	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Fuli township, Hualien county
O13-2		Tall	Identical genotype		
O14-1	TY1	Normal type	Identical genotype	Certified seed	Fangliao township, Pingtung county
O14-2		Early maturity, awn	0.5 genetic distance		
O14-3		Early maturity, large grain	Hybrid progeny (high heterozygosity)		
O14-4		Large grain, awn	Hybrid progeny (high heterozygosity)		
O15-2	TY1	Awn	Hybrid Progeny (high heterozygosity)	Certified seed	Fangliao township, Pingtung county
O16-1	TK14	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Zhudong township, Hsinchu county
O16-2		Awn	0.17 genetic distance		
O16-3		Early maturity, dwarf,	Hybrid progeny (low heterozygosity)		
O17-1	TK14	Normal type	0.04 genetic distance	Certified seed	Fangliao township, Pingtung county
O17-2		Tall	Identical genotype		
O17-3		Tall	Identical genotype		
O18-1	TK14	Normal type	Identical genotype	Registered seed	Xiangshan dist., Hsinchu city
O18-2		Late maturity, tall	Hybrid progeny (low heterozygosity)		

<sup>z</sup> Sample code: (1) first code = collection site and (2) second code: 1= normal plant and 2, 3 or 4 = off-type plants.<sup>y</sup> The phenotype of off-type plants was based on comparison with normal plants at the same sampling location in the first crop season of 2005.<sup>x</sup> The genetic component of off-type plants in the first crop season of 2005 was based on comparison with the plants from foundation seeds planted in the second crop season of 2004.

表 2. 2005 年第 2 期作新竹地區台梗 14 號採種田間異型株分析結果

**Table 2.** Analysis of off-type plants in certified seeds of Japonica rice cultivar TK14 grown in the second crop season of 2005 at Hsinchu county

Code <sup>z</sup>	Phenotype <sup>y</sup>	Genetic result <sup>x</sup>	Collection site
O19-2	Tall, high shattering	TK14 hybrid progeny (high heterozygosity)	Zhudong township
O19-3	Tall	TK14 hybrid progeny (high heterozygosity)	Zhudong township
O20-2	Tall, high shattering	TK14 hybrid progeny (high heterozygosity)	Zhudong township
O21-2	Tall, late maturity	TK14 hybrid progeny (low heterozygosity)	Xinpu township
O21-3	Tall, long grain	TK14 × TCS10	Xinpu township
O21-4	Tall, late maturity, awn	TK14 hybrid progeny (high heterozygosity)	Xinpu township
O22-2	Tall, long grain	TK14 hybrid progeny (high heterozygosity)	Xinpu township
O23-2	Tall, grown between rows	Identical genotype, TK14	Qionglin township
O24-2	Tall	Identical genotype, TK14	Guanxi township
O24-3	Tall	TY1 hybrid progeny (low heterozygosity)	Guanxi township
O25-2	Tall	TK14, 0.11 genetic distance	Guanxi township
O26-2	Long grain	Variety mixture, TCS10	Xinfeng township
O26-3	Tall, grown between rows	TCS10, 0.1 genetic distance	Xinfeng township
O27-2	Long grain	Over 0.5 genetic distance, near Indica type	Zhubei city
O28-2	Dwarf, early maturity	Over 0.5 genetic distance, near Indica type	Xinpu township
O29-2	Tall	Over 0.5 genetic distance, near Indica type	Xinpu township
O29-3	Late maturity	Over 0.5 genetic distance, near Indica type	Xinpu township

<sup>z</sup> Sample code: (1) first code = collection site and (2) second code: 2, 3 or 4 = off-type plants.

<sup>y</sup> The phenotype of off-type plants was based on comparison with normal plants at the same sampling location in the second crop season of 2005.

<sup>x</sup> The genetic component of off-type plants in the second crop season of 2005 was based on comparison with the plants from 2005 registered seeds of TK14.

台中 191 號屬梗形早熟稻，穀粒呈現稈形恐影響該品種表現型之一致性，在田間檢查過程仍宜去除。

### 品種內分離基因型者

各採樣點上異型株與其基礎資料的遺傳距離小於 0.2 者視為品種內分離基因型 (Heckberger *et al.* 2002)；然本試驗中小於 0.1 遺傳距離者，僅台梗 5 號原種田上的異型株 O3-2，雖穗形有別於對照樣品，顯示此異型株仍屬於品種內分離基因型。而品種內對照樣品與異型株之遺傳距離介於 0.1 到 0.2 者，可見於台農 71 號 2 處原種異型株 O10-2 與 O11-2 之中，其生育特性均為早熟、植株矮，與其 2005 年第 1 期作原種種子具 0.1 個遺傳距離；台梗 8 號原種異型株 O2-2 與 O2-3，外觀形態為長稈尖，有 0.18 個遺傳距離；台梗 14 號原種異型

株 O12-2 以及 O16-2，外觀性狀亦為穀粒有芒，分別存有 0.13 與 0.17 個遺傳距離；上述異型株雖然與各品種之核心基因型均超過 0.1 遺傳距離，但仍小於 0.2 遺傳距離，仍認定這些異型株為各品種內的分離基因型品系。

然 2005 年第 2 期作台梗 14 號採種異型株 O25-2 的遺傳組成與 2005 年第 1 期作台梗 14 號原種基因型相近，相差 0.11 個遺傳距離，但因 RM266I 基因座對台中秈 10 號、台中秈糯 1 號與台農秈 22 號與桃園 1 號存有品種專一性對偶基因 (Wu & Hwu 2010)，而該樣品其 RM266I 基因座上具有桃園 1 號所專有的對偶基因 110 bp，而另 22 個 SSR 基因型均同質結合體，後裔農藝性狀整齊、無性狀分離，因此暫且將異型株 O25-2 歸類為台梗 14 號，但仍懷疑是否為台梗 14 號與桃園 1 號雜交後裔。



圖 1. 本試驗參試 2005 年三級良種繁殖異型株與其 2004 年第 2 期作原原種之集群分析。

**Fig. 1.** The cluster analysis of off-type plants of rice in the three-step propagation nursery in the 2005 crop season, compared to the plants from foundation seeds of the second crop season of 2004. (\*Off-type plant sample code: (1) first code: cultivar, (2) second code: collection site, and (3) third code: 1 = normal plant and other numbers = off-type plants.)

### 品種混雜

台農 71 號原種異型株 O7-2、O8-2、O9-2，經分群分析後發現此 3 個異型株的遺傳組成與台中秈 10 號一致，且穀粒外觀性狀均為瘦長型，其性狀與遺傳分析結果一致，顯示這 3 件皆為品種混雜的情形；經洽農糧署種子檢查室，推測可能為育苗土添加稻穀，因未完全粉碎所遺留稻穀發芽所致。而類似情況亦發生於 2005 年第 2 期作台梗 14 號採種異型株中，經遺傳分析發現台梗 14 號異型株 O24-3 是桃園 1 號，而異型株 O26-2、O26-3 係台中秈 10 號，調查異型株 O24-3 後裔亦具有桃園 1 號穗重型特性，且異型株 O26-2、O26-3 後裔也顯現秈稻株型與瘦長型穀粒，顯示遺傳分析結果能與田間後裔性狀表現相對應。

### 栽培品種天然雜交

良質米栽培品種均是經由多代自交、選拔固定後才釋出，其遺傳組成呈現高度同質結合狀態，再經 3 級良種繁殖制度穩定倍增繁殖，可維持品種內高度均一性。然據 Wu & Hwu (2010) 所示 22 個良質米推薦品種之基礎資料，在品種內並存多種同質結合體基因型者中亦至多僅相異 2 基因座，因此認定遺傳組成若超過 3 個基因座為異質結合狀態者，可推論該株是屬雜交後裔；再經由異型株遺傳組成的異質程度可推論親本親緣之遠近，若遺傳組成屬於高度異質性者，其雜交親本是兩親緣較遠的品種，若少數基因座為異質結合體，大多數基因座呈現基因型未分離者，是因親緣較近的品種雜交所致，形成異型株為低度異質結合狀態。而為推測雜交後裔之雜交組合，可藉由具品種專一之對偶基因推測出雜交候選親本，再比對異型株之整體遺傳組成，便可知曉其雜交親本。

**高度異質結合體者：**在桃園 1 號採種田中所取得的異型株 O14-3、O14-4 以及 O15-2，一開始以單穗混合樣品進行分析時，呈現所有基

因座均為異質結合狀態，進一步各別取 10 粒穀粒進行單粒分析，發現其遺傳組成仍為高度異質結合狀態，且發現部份對偶基因超出存於良質米品種上之已知範圍，顯示此 3 件異型株是由於親緣關係較遠的品種，在田間自然雜交所產生的雜交子代，其雜交親本非本試驗良質米品種。

台梗 14 號採種異型株 O19-2、O19-3、O20-2、O21-4、O22-2 者，其遺傳背景高度異質化，多數基因座呈現異質結合體基因型，然其由單粒基因型分離情形發現各基因座上均有台梗 14 號對偶基因，顯示這 5 個異型株均是台梗 14 號與其他品種雜交所致；而這 5 件異型株的後裔田間表現，大多顯現成熟期不一致、株高高低分離、單株間長短芒不一等性狀分離，大多異型株後裔所具有的芒為白色，以異型株 O20-2 後裔性狀分離歧異度最高，其後裔各單株間，有者為普通白色長芒 (> 2 cm)、紅色長芒者、紫黑色稃尖但無芒以及正常無芒穀粒。

藉由具品種高鑑別力的分子標誌可協助推論雜交親本，如 SSR 基因座 RM333 與 RM266 對台中秈 10 號具品種專一性對偶基因而存有高鑑別能力，在分析台梗 14 號採種異型株 O21-3 的後裔基因型分離情形中，比對結果顯示可能為台中秈 10 號與台梗 14 號雜交所致 (表 3)，且後裔田間性狀也出現瘦長粒型與秈稻株型，兩方結果相符，更加印證此推論。

**低度異質結合體者：**於台梗 14 號原種田上所取得的異型株 O16-3 與 O18-2，以及在高雄 145 號原種田所發現的異型株 O4-2，各以 5 - 10 粒穀粒進行單粒遺傳分析後，結果顯示有少數基因座為異質結合狀態，大多數基因座基因型未分離。進一步將 O16-3 與 O18-2 台梗 14 號異型株與現行良質米品種比對其遺傳組成，發現桃園 1 號與台梗 14 號為該 2 個異型株的雜交親本 (表 4)，且因在桃園 1 號與台梗 14 號上本有 15 個基因座帶相同對偶基因，因此這些基因

表 3. 台中秈 10 號、台梗 14 號與台梗 14 號採種異型株 O21-3 之遺傳組成  
 Table 3. Allelic composition of 23 SSR loci in the off-type plants O21-3 of cultivar TK14, compared to the cultivars TCS10 and TK14

Sample	RM105 (bp)	RM120 (bp)	RM159 (bp)	RM163 (bp)	RM164 (bp)	RM167 (bp)	RM210 (bp)	RM211 (bp)	RM214 (bp)	RM215 (bp)	RM223 (bp)	RM235 (bp)	RM243 (bp)	RM247 (bp)	RM266 (bp)	RM266 <sup>y</sup> (bp)	RM276 (bp)	RM297 (bp)	RM333 (bp)	RM426 (bp)	RM440 (bp)	RM567 (bp)	RM70 (bp)
TCS10	134	165	243	164	252	122	153	149	112	144	154	107	111	134	128	108	98	147	207	219	209	244	164
TK14	126	167	252	127	296	144	151	138	147	149	145	97	113	156	120	- <sup>y</sup>	121	195	179	147	168	254	164
O21-3_1 <sup>z</sup>	134,126	165,167	243	164,127	252	144	151	149	112,147	144	145	107,97	111	134	128,120	108	121	195	207,179	147	209	244	164
O21-3_2	134,126	165,167	243	164,127	252	144	151	149	112,147	144	145	97	111	156	128,120	108	121	195	207,179	147	209	244,254	164
O21-3_3	134	165,167	243	127	252	144	153,151	138	112,147	144	145	97	111	134,156	128,120	108	98,121	147,195	207,179	147	209	244	164
O21-3_4	134	167	243,252	164,127	252	144	151	149,138	147	144,149	145	97	111	156	128,120	108	98	147,195	207,179	147	209	254	164
O21-3_5	126	165,167	243	127	296	144	151	149,138	112,147	144	145	97	111	156	120	-	98,121	195	207,179	147	209	244	164
O21-3_6	134	165,167	243	164	252	144	153	149	112	144	145	97	111	134	128,120	108	98	195	207	147	209	244	164
O21-3_7	126	167	243	164,127	252	144	153,151	138	112,147	144,149	154,145	97	111	156	128	108	98,121	147	207,179	147	209	244	164
O21-3_8	126	165,167	243	127	252,296	144	151	138	112,147	144	145	107	111	156	128	108	98	147,195	179	147	209	244	164
O21-3_9	134,126	167	252	164	252	144	151	138	147	149	145	107	111	134	128	108	121	195	207	147	209	244,254	164
O21-3_10	126	165,167	243	164	252	122,144	153,151	138	112,147	144	145	107	111	156	128,120	108	98,121	195	179	147	209	244,254	164
O21-3_11	126	165	243	127	252	122	151	138	112	144	145	107	111	134	120	-	98,121	195	207	147	209	254	164
O21-3_12	126	165	243	164	252	122	151	149	147	144	145	107	111	156	120	-	121	147,195	207,179	147	209	254	164

<sup>z</sup> Off-type plant sample code: (1) first code = sampling location, (2) second code = number of off-type plant and (3) third code = progeny number of off-type plant.

<sup>y</sup> The null allele in RM266<sup>y</sup> SSR locus.

表 4. 桃園 1 號、台梗 14 號與台梗 14 號異型株 O16-3、O18-2 之遺傳組成

**Table 4.** Allelic composition of 8 SSR loci in the off-type plants O16-3 and O18-2 of cultivar TK14, compared to the cultivars TY1 and TK14

Sample	RM164 (bp)	RM215 (bp)	RM243 (bp)	RM266 (bp)	RM266I (bp)	RM333 (bp)	RM440 (bp)	RM567 (bp)
TK14	296	149	113	120	— <sup>y</sup>	179	168	254
TY1	264	146	111	136	110	210	171	256
O16-3_1 <sup>z</sup>	264, 296	146	111	136	110	179	168, 171	256
O16-3_2	296	146	111	136	110	179	168, 171	256
O16-3_3	264, 296	146	111	120, 136	110	179	168, 171	256
O18-2_1	264, 296	146	111	120, 136	110	179, 210	168, 171	254
O18-2_2	264	146	111	136	110	179, 210	168, 171	254

<sup>z</sup> Off-type plant sample code: (1) first code = sampling location, (2) second code = number of off-type plant, and (3) third code = number of progeny of off-type plant.

<sup>y</sup> The null allele in RM266I SSR locus.

座在雜交後裔中並不會出現基因型分離現象，僅剩下 8 個基因座會產生分離，而 O16-3 與 O18-2 有出現異質結合狀態的基因座就在這 8 個基因座中，且 RM266 引子對所偵測到的對偶基因即為桃園 1 號所特有，以及這些異型株在 RM215 與 RM243 上所具有的基因型均與桃園 1 號一致，綜觀顯示這 2 個異型株的雜交親本可能為桃園 1 號與台梗 14 號。

由高雄 145 號 O4-2 異型株中取出 10 粒穀粒，分析單粒基因型組成，剔除重複遺傳組成的品系，以其中 6 個主要不同基因型 (haplotype) 的品系與已知品種逐一比對，發現此件異型株最大可能的雜交親本為高雄改良場所育成的台梗 2 號 (TaiSeng 2, TS2)，有 12 個基因座與異型株的基因型完全一致，剩下 11 個基因座中有 7 個基因座能完全解釋異型株的基因型，僅有 RM215、RM235、RM426 與 RM70 等 4 個基因座不同 (表 5)。

台梗 14 號採種異型株 O21-2 亦顯示遺傳背景低度異質化，多數基因座之基因型呈現同質結合體，然其由後裔基因型分離情形發現各基因座上均存有台梗 14 號對偶基因，顯示該件異型株亦是台梗 14 號與未知品種雜交所致。

### 未知品種

在桃園 1 號採種田上發現 O14-2 異型株，與其基礎資料有 0.5 個遺傳距離，外觀性狀有成熟早、具芒、葉色深等特性，該異型株的遺傳組成不與目前資料庫中任何一個已知品種相符合，推測可能某一地方品種或為某一尚未納入資料庫中的品種。另台梗 14 號異型株 O27-2、O28-2、O29-2、O29-3 與秈稻良質米相差 0.5 個遺傳距離，外觀性狀有成熟早、粒型長、植株矮等特性，該異型株的遺傳組成亦不與任何 2005 年良質米推薦品種相符合，但 SSR 分析顯示遺傳背景均一，推測可能某一地方品種或為某一尚未納入資料庫中的品種，且遺傳分析結果顯示與秈稻遺傳組成相近。另由桃園 1 號採種異型株 O15 的分蘗數多 (36.4 支)、矮性株高平均 73.29 ( $\pm$  3.82) cm、早熟、中間型穀粒等外觀形態，並經 SSR 遺傳分析顯示遺傳背景均一，22 個 SSR 基因型均為同質結合體，應經過人為選拔純化，SSR 遺傳相似性亦與秈稻親緣相近，均與早期秈稻矮性株高、早熟外觀性狀相符合，顯示可能為過去於新竹地區曾普遍種植的地方品種「新竹矮腳尖」(黃振增，個人通訊)。

表 5. 台秈 2 號與高雄 145 號異型株 O4-2 之遺傳組成

**Table 5.** Allelic composition of 11 SSR loci in the off-type plants O4-2 of cultivar KH145, compared to the cultivars TS2 and KH145

Sample	RM163 (bp)	RM164 (bp)	RM215 (bp)	RM235 (bp)	RM243 (bp)	RM266 (bp)	RM266I (bp)	RM333 (bp)	RM426 (bp)	RM440 (bp)	RM70 (bp)
TS2	164	252	144	107	111	126	108	204	219	209	205
KH145	127	296	149	97	111	120	— <sup>y</sup>	219	147	168	164
O4-2_1 <sup>z</sup>	136, 164	252, 266	146	143	111, 117	118	110	176	221	204, 209	207
O4-2_2	136, 164	252, 266	146	143	111, 117	118	110	176, 204	221	204, 209	207
O4-2_3	136	266	146	143	111	126	108	176, 204	221	204	207
O4-2_4	136	266	146	143	111, 117	126	108	176, 204	221	204	207
O4-2_5	136	266	146	143	111, 117	126	108	176, 204	221	204	207
O4-2_6	164	252	146	143	117	118	110	176, 204	221	209	207

<sup>z</sup> Off-type plant sample code: (1) first code = sampling location, (2) second code = number of off-type plant, and (3) third code = number of progeny of off-type plant.

<sup>y</sup> The null allele in RM266I SSR locus.

## 討 論

品種檢查 (variety testing) 是種子檢查領域中一個重要工作項目。依據國際種子檢查協會 (International Seed Testing Association, ISTA) 所制訂的國際種子規範 (International Rule Book for Seed Testing), 品種檢查的目的為:「檢測受檢樣品種子與其宣稱品種的一致性程度」。很顯然的, 在品種檢查概念中除了品種正確性外, 還必需具有相當遺傳純度。然 (遺傳) 純度與純潔度 (Purity) 並不同, 在種子檢查的領域中, 基本檢查項目為「水分」、「發芽率」與「純潔度」, 但此處的純潔度所指的是送驗種子樣品中無生命雜質與其他 (物種的) 種子之比率。

另一種常見的誤解, 是將品種檢查與品種鑑定 (variety identification) 混為一談。在品種檢查中, 目標品種的正確性甚為重要, 且它的著眼點並不在於所檢定的品種與其它的品種間是否存有差異, 而是送驗樣品與生產者所宣稱的品種是否一致; 但品種檢查並不止於此, 它另一項重點目標是檢查送驗樣品是否在遺傳層

次上具有相當純度, 足以代表所宣稱的品種。就如同發芽率的檢查一般, 著眼點係在於保障消費者 (農民) 所購買到種子的品質。換言之, 品種鑑定所保護的對象是育種家 (種子公司), 是應用於品種保護議題上, 所以研究目標較著重於試驗樣品的獨特性, 所面臨問題的範圍 (scope) 較大或沒有限制, 須分析的試驗樣品數較少, 會需採用複雜、精細的技術; 而品種檢查所要保護的是農民, 係應用於良種繁殖制度中, 研究目標較著重於試驗樣品的均一性, 檢測範圍已有明確限制, 但需要分析的試驗樣品數較多, 所以技術發展時須考慮時間與分析成本等因素。

Wu & Hwu (2010) 前文研究曾針對良質米品種連續 3 個繁殖世代, 以 SSR 分子標誌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但均能穩定地在世代推進中表現, 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有高度正面意義, 但在稻作大面積經濟栽培

中，仍時而檢出田間異型株，顯示繁衍過程中尚存有部分混雜因子，若不嚴格控管將降低品種純度與生產品質。

在本試驗分析來自 29 處良種繁殖圃 40 件異型株中，檢出異型株與其採樣點對照樣品基因型無異者有 8 件，該類型可能係因參試 22 組 SSR 分子標誌未能涵蓋整體基因組，造成遺傳分析與株高等形態性狀相關性不足，或因品種內各分離基因型於不同栽培環境下，發生環境與基因의 交感效應導致性狀變異。本試驗檢出品種內分離基因型 8 件外，另有超過半數的異型株 (24 件) 是與對照樣品遺傳組成高度相異者，依其結果可區分為 3 大類型：(1) 天然雜交：現行水稻栽培品種均是經連續固定育種程序所釋出之品種，其遺傳組成應呈現高度同質化，因此若反之，則視為雜交子代。不論是由親緣相近的兩品種雜交所致之低度異質性，或為遠緣雜交後裔之高度異質性，若檢出超過 3 個基因座為異質結合體者，均認定為外來花粉污染，形成品種天然雜交後裔；僅需再藉由地緣關係、具品種專一性對偶基因等限定背景訊息，可推測出其雜交組合。(2) 品種混雜：其遺傳組成為高度同質化的植株，便可知該植株曾歷經多世代自交純化的過程。因在良種繁殖制度運轉之下，種子年年由育成場所計畫性更新倍增，排除契約農戶自行留種，雜交後裔可隨繁殖制度推進世代數並不多，恰獲得完全偏向特定親本之雜交後裔的機率極低。該類異型株僅需藉由已知品種之基礎資料，進行遺傳組成之分群分析，並在不跨越所有已知品種間之遺傳距離為門檻值下 (Cooke *et al.* 2003)，尋求最高遺傳相似性之已知品種，便能區分該株是否為原生品種或混雜品種，若為混雜品種也可推論混雜來源。(3) 未知品種：即遺傳組成為高度同質化但與任何已知資訊均不符合，此類為非現行良質米推薦品種，大都屬於過去曾大量種植之地方品種 (如：新竹矮腳尖)，或少

數農民偏好品種 (如：台秈 2 號)。對於非屬良質米推薦品種者，而未納入良種繁殖制度內，僅只有零星散佈的栽培面積，仍不影響目標良質米品種的鑑別力。

然在栽培品種天然雜交上，可見於台梗 14 號原種田異型株 O16-3 與 18-2 是來自台梗 14 號 × 桃園 1 號，台梗 14 號與桃園 1 號均屬桃園區農業改良場負責維持其原原種生產，而高雄 145 號原種異型株 O4-2 的遺傳組成係屬台秈 2 號雜交後裔，然台秈 2 號是高雄區農業改良場改良台中秈 10 號為抗水稻白葉枯病所育成的品種，都可以發現天然雜交後裔均具有地緣性，顯示育成單位兼顧新品種育成與良質米推薦品種的原原種生產，試驗田內眾多品系 (品種) 並存，保護行隔離設置需更加嚴謹。而採種田上所存異型株之雜交後裔，更可發現花粉污染的來源已擴增為相鄰種植的品種，如台梗 14 號採種異型株 (O21-3) 已檢出台中秈 10 號與台梗 14 號雜交組合，更加佐證各級繁殖圃上保護行設置需嚴格執行，才能降低外來花粉污染。

另不論是否良質米品種為混雜品種，本試驗共檢出 11 件品種混雜；然機械混雜或育苗土內殘留穀粒所造成的品種混雜時有所聞，為了降低該類型混雜因子的影響，應確實進行田間去偽去雜作業，在抽穗期至收穫前是植株農藝性狀表現最為完整的生育時期，在此時期進行異型株的拔除，可讓篩選效果達到最佳；雖株高、稻穀芒長或成熟期等數量性狀，易因品種、生育階段及栽培管理等不同條件而影響判斷，然實務上，在一塊遺傳組成均質性高的田區中，理應抽穗期、穀粒外觀、株高等會高度均一，為降低異品種混雜與異型株發生率，因此若檢出性狀明顯差異的植株，便須在收穫前拔除。

在田間異型株中依遺傳分析結果對照外觀性狀，發現若特異性狀僅只有株高差異者

(>10 cm)，其遺傳組成往往與基礎資料無異，株高是屬於數量性狀，易受環境因子影響，若在田間檢查時僅以單穗株高異常作為異型株的依據，往往會造成誤判，應至少是整個稻叢或多穗均較一般植株高者，整叢者可顯示某一單株初期營養生長旺盛、分蘖多，大部份分蘖株高較高，競爭光合作用強，而若僅是單穗較高可能是由於環境因子造成。然株高異常者也暗示著該品種遺傳均一性較低，若僅針對高株進行淘汰選拔，因株高易受栽培管理等外在環境影響，連續在同一地區進行去偽去雜，在環境與基因交感效應抑制下，殘存的異質性仍無法剔除，選拔效果有限，往往呈現株高異常者其遺傳組成卻與對照樣品無異，該品種理應進行單株純化，提高族群的均質性，才是徹底增加品種均一性的方法。

然品種內的變異性，可能來自於花粉污染、種子混雜、突變、基因與環境的交感作用等而造成不同程度的異質性；高程度的異質性，通常歸因於親本品種（品系）的非同質性、或是不同品種種子曾發生混雜；而低程度的異質性，則可能源自於殘留的異質結合體、花粉異交 (Röder *et al.* 2002; Cooke *et al.* 2003; Kwon *et al.* 2005; Kumar *et al.* 2007)。而本試驗異型株遺傳分析，顯見大部分田間異型株主要係因天然雜交、品種混雜或品種內均一性不足所致。Heckenberger *et al.* (2002) 提出，若是具有品種內變異性，則在取樣來源不同，或是取樣數量不足的情況下，分子標誌檢測的結果可能就有所不同。因此，雖然屬於同一個品種，樣品間就存在著不同程度的遺傳距離。若是品種內變異性程度較高，那麼樣品間遺傳距離的變異程度即會隨之增加。如此該品種的實質衍生品系，就有可能因為品種本身變異性的問題，被檢定為與該品種完全不相關的品系。這時原品種的育種者，就會因為品種本身的均一性不足，喪失對於實質衍生品系的植物育種家

權利。由於分子標誌在未來，可能會應用於相關的品種檢測上，因此對於品種內的變異性程度，應該更加正視其重要性 (Pervaiz *et al.* 2010)。

品種內變異程度較高的品種，除了可能損失對實質衍生品系的植物育種家權利外，尚其他的疑慮存在。例如在品種的維持上，由於保存較少量的樣品，這時候也許就會因為取樣的問題，造成所保存的品種樣品，與原本的品種有差異性存在。更嚴重時，甚至會偏離了品種的本質，最後對於品種的原貌無從得知。往後的育種家，若是以此作為親本育種材料，就會出現難以想像的後果。在進行種子繁殖階段時，也可能在收穫種子的作業程序中，因為取樣效應，使得品種內變異性的發展程度難以預測。所以 Heckenberger *et al.* (2002) 與 Patra & Chawla (2010) 均提出，在申請植物育種家權利之前，應該盡量增加新品系內的均一性程度，以避免因為變異性過高而衍生的種種問題。

## 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，行政院農業委員會農糧署種子檢查室提供部分試驗材料，謹此致謝。

## 引用文獻 (Literature cited)

- Bautista, N. S., D. Vaughan, A. H. M. Jayasuriya, A. S. U. Liyanage, A. Kaga, and N. Tomooka. 2006. Genetic diversity in AA and CC genome *Oryza* species in southern South Asia. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53:631–640.
- 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.
- Chakravarthi, B. K. and R. Naravaneni. 2006. SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L.). *Afr. J. Biotech.* 5:684–688.
- Coburn, J. R., S. V. Temnykh, E. M. Paul, and S. R. McCouch. 2002. Design and application of microsatellite marker panels for semiautomated

- genotyping of rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Sci.* 42:2092–2099.
- Cooke, R. J., G. M. N. Bredemeijer, M. W. Ganal, 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.
- Heckenberger, 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.
- Heckenberger, M., M. Bohn, D. Klein, and A. E. Melchinger. 2005. Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines:II. Morphological distances and heterosis in comparison with simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data in maize. *Crop Sci.* 45:1132–1140.
- 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)
- Jain, S., R. K. Jain, and S. R. McCouch. 2004. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 109:965–977.
- Kumar, M. B. A., R. J. Sherry, A. Varier, and M. Dadlani. 2007. Suitability of seed esterases for establishing distinctness, uniformity and stability of pearl millet genotypes. *Curr. Sci.* 93:951–956.
- Kwon, Y. S., J. M. Lee, G. B. Yi, S. I. Yi, K. M. Kim, E. H. Soh, K. M. Bae, E. K. Park, I. H. Song, and B. D. Kim. 2005. Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Mol. Cells* 19:428–435.
- Nagy, E., T. Spitko, and L. C. Marton. 2009. Applicability of biochemical and genetic markers in the polymorphism analysis of maize lines. *Cereal Res. Commun.* 37:373–381.
- 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.
- Patra, N. and H. S. Chawla. 2010. Biochemical and RAPD molecular markers for establishing distinctiveness of basmati rice (*Oryza sativa* L.) varieties as additional descriptors for plant variety protection. *Indian J. Biotech.* 9:371–377.
- Pervaiz, Z. H., M. A. Rabbani, I. Khaliq, S. R. Pearce, and S. A. Malik. 2010. Genetic diversity associated with agronomic traits using microsatellite markers in Pakistani rice landraces. *Electron. J. Biotech.* 13:4–5.
- Röder, M. S., K. Wendehake, V. Korzun, G. M. N. Bredemeijer, D. Laborie, L. Bertrand, P. Isaac, S. Rendell, J. Jackson, R. J. Cooke, B. Vosman, and M. W. Ganal. 2002. Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106:67–73.
- Shishido, R., M. Kikuchi, K. Nomura, and H. Ikehashi. 2006. Evaluation of genetic diversity of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Myanmar using simple sequence repeats (SSRs). *Genet. Resour. Crop Evol.* 53:179–186.
- 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.
- UPOV. 1996. Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Homogeneity and Stability:Wheat, Document TG/3/11. The International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Geneva. 55 pp.
- Wu, D. H. and K. K. Hwu. 2010. Rice genetic variation under the three-step propagation system. *Taiwan J. Agric. Res.* 59:275–288. (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.

# Genetic Analysis of Off-Type Plants of Rice in the Three-Step Propagation Nursery<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. 2011. Genetic analysis of off-type plants of rice in the three-step propagation nursery. J. Taiwan Agric. Res. 60:197–210.

The objective of this study was to determine the genetic composition of 40 off-type plants of rice (*Oryza sativa*) from 29 sampling locations in the three-step propagation nursery. Twenty-three simple sequence repeat (SSR) markers capable of identifying the 22 superior rice varieties produced in Taiwan in 2004 and 2005 were used in this study. Foundation seeds from the second crop of 2004 were used to establish standard genetic profile of the 22 rice varieties. Results of allelic composition analyses showed that, among the 40 rice off-type plants tested, 8 cases were identical to the standard genotype profile, 8 cases were other genotypes within variety, 6 cases were variety mixture, 13 cases were hybrid progeny and 5 cases were unknown variety. These results suggest that the off-type plants of rice were mostly originated from natural hybridization, mixture of varieties and low genetic uniformity within variety. In order to improve efficiency of the three-step propagation nursery for production of superior rice varieties with genetic purity, it is necessary to establish guard rows in the field to prevent outcrossing by foreign pollen, conduct one more generation for single plant selection during breeding program and rogue out off-type plants and foreign variety from seed producing nurseries.

**Key words:** Rice, *Oryza sativa*, Three-step propagation nursery, Off-type plant, Simple sequence repeat.

- 
1. Contribution No. 2554 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: August 31, 2011.
  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.