

以不同分子標誌評估稻屬物種遺傳歧異度之能力^{1,2}

鄭智允³、古新梅⁴

摘 要

作物種原的遺傳歧異度分析，有許多分子標誌可作為依據，但面臨不知如何從如此多類分子標誌中選擇適當或最有效率者進行分析。本次試驗中，藉由 13 種親緣關係較為清楚之稻屬 (*Oryza*) 物種，評估 4 種分子標誌 RAPD、ISSR、SRAP 及水稻 SSR 應用於稻屬分群之效益。20 個 RAPD、18 個 ISSR、24 個 SRAP 及 120 個單子葉 SSR 分子標誌共可分別增幅 379、334、878 及 3,750 個片段，並根據 Jaccard 相似係數所計算之相似矩陣，以 UPGMA 建立樹狀圖。綜合考量多型性片段、RP 值及最後分類分群的結果，推論在稻屬內進行遺傳歧異度的分析效率以 SRAP 最好，SSR 次之，ISSR 與 RAPD 較差，此外合併四種分子標誌進行分析，可以得到最佳的分群結果，合併使用優於單獨使用。

關鍵詞：集群分析、RAPD、ISSR、SRAP、SSR

前 言

進行作物遺傳歧異度分析時，分子標誌 (molecular marker) 是很好的依據，不受植株所處的環境、生育階段及組織部位而有所改變，而可呈現兩個物種之間的相似程度 (Agarwal *et al.*, 2008)。在 PCR 技術發展出來後，增加許多以 PCR 技術而建立的分子標誌，如 RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990)、ISSR (inter simple sequence repeat) (Zietkiewicz *et al.*, 1994)、SRAP (sequence related amplified polymorphism) (Li and Quiros, 2001) 皆被陸續發展及應用。隨著科技的進

¹ 行政院農業委員會桃園區農業改良場研究彙報第 524 號。

² 本文為作者碩士論文之一部分。

³ 桃園區農業改良場助理研究員(通訊作者，kurama630@tydais.gov.tw)。

⁴ 國立中興大學農藝學系教授。

展，目前可利用的序列或是生物資訊越來越多，但應用於某些領域，如系統分類學或是物種鑑定學，因缺乏完整的基因體組序列，設計專一性的引子相對上較為困難。因此，任意增幅的分子標誌依然有其存在或研究的必要性 (Poczai *et al.* 2013)。此外，將 SSR 跨物種應用更可以減少設計的費用與勞力，例如將葡萄 (*Vitis vinifera*) 的 SSR 標誌應用於葡萄屬 (Rossetto *et al.* 2002)。本研究將探討不同分子標誌評估遺傳歧異度之效率，利用親緣關係較為清楚的稻屬物種為材料，評估 RAPD、ISSR、SRAP 以及 SSR 分子標誌分析遺傳歧異度的能力。

材料與方法

一、試驗材料

本次試驗所使用的材料共有稻屬 13 個物種 (species)，包含 *O. sativa* cv. TNG67 (AA)、*O. rufipogon* (AA)、*O. longistaminata* (AA)、*O. punctata* (BB)、*O. officinalis* (CC)、*O. minuta* (BBCC)、*O. alta* (CCDD)、*O. grandiglumis* (CCDD)、*O. australiensis* (EE)、*O. brachyantha* (FF)、*O. granulata* (GG)、*O. ridleyi* (HHJJ)、*O. coarctata* (KKLL)。此外以禾本科之綠竹 (*Bambusa oldhamii*)、茄科之番茄 (*Solanum lycopersicum* cv. M82)、茄科之菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 及十字花科之阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 四個物種作為外群 (out-group) 對照。

二、DNA 萃取

本次試驗之 DNA 萃取法參考 CTAB 萃取法 (Doyle and Doyle, 1987) 並略微修飾，各 DNA 樣品以 1% 瓊脂膠體添加 1/50,000 EtBr 進行電泳，並使用分光光度計測量波長 260/280 比值，選擇 DNA 品質佳且沒有殘餘過多蛋白質與 RNA 的樣品進行後續分析，並以波長 260 nm 之吸光值換算 DNA 的濃度 (OD260 為 1 時表示 DNA 的濃度為 50 ng μL^{-1})。

三、各分子標誌之反應條件

RAPD 所使用的引子為 Operon A kits (Operon Tech. Inc., Alameda, CA, USA)，其中共 20 組 (表 1)，單管反應體積為 25 μL ，其中包含有 40 ng DNA、1 unit Taq polymerase、0.6 μM primer、0.1 mM dNTPs、1.65 mM MgCl_2 、10 mM Tris-HCl (pH

9.0)、50 mM KCl、0.01% gelatin、0.1% Triton X-100。反應條件為 94°C 5 分鐘，再接續進行 94°C 1 分鐘、36°C 2 分鐘、72°C 2 分鐘，共 45 個循環，最後再以 72°C 延長 7 分鐘。

表 1. RAPD 引子資訊及分析結果

Table 1. RAPD primer information and results of polymorphic analysis.

Primer	Sequence(5'-3')	NTL ^a	P% ^b	PIC ^c	RP ^d
OPA-01	CAGGCCCTTC	17	100	0.292	6.92
OPA-02	TGCCGAGCTG	14	100	0.279	4.92
OPA-03	AGTCAGCCAC	10	100	0.346	4.77
OPA-04	AATCGGGCTG	16	100	0.274	5.54
OPA-05	AGGGGTCTTG	15	100	0.293	6.15
OPA-06	GGTCCCTGAC	13	100	0.224	3.54
OPA-07	GAAACGGGTG	21	100	0.270	7.23
OPA-08	GTGACGTAGG	21	100	0.241	6.31
OPA-09	GGGTAACGCC	13	100	0.284	4.77
OPA-10	GTGATCGCAG	31	100	0.234	9.08
OPA-11	CAATCGCCGT	26	100	0.225	7.08
OPA-12	TCGGCGATAG	26	100	0.259	8.46
OPA-13	CAGCACCCAC	12	100	0.282	4.77
OPA-14	TCTGTGCTGG	22	100	0.255	7.38
OPA-15	TTCCGAACCC	18	100	0.284	6.92
OPA-16	AGCCAGCGAA	23	100	0.244	7.08
OPA-17	GACCGCTTGT	18	100	0.217	4.92
OPA-18	AGGTGACCGT	18	100	0.301	7.38
OPA-19	CAAACGTCGG	26	100	0.246	7.69
OPA-20	GTTGCGATCC	17	100	0.271	6.15
Average/sum		18.9/377	100	0.2661	6.353

a: number of total loci (NTL) b: polymorphic ratio (%) c: polymorphic information content (PIC)
d: resolving power (RP).

ISSR 所使用的引子為 UBC Primer Set #9 中的 18 組（表 2），單管的反應體積為 20 μ L，其中包含有 40 ng DNA、1 unit Taq polymerase、1 μ M primer、0.2 mM dNTPs、2 mM $MgCl_2$ 、10 mM Tris-HCl（pH9.0）、50 mM KCl、0.01% gelatin、0.1% Triton X-100。反應條件為 94°C 5 分鐘，再接續進行 94°C 1 分鐘、55°C 1 分鐘、72°C 1 分 30 秒共 46 個循環，最後再以 72°C 延長 5 分鐘。

表 2. ISSR 引子資訊及分析結果

Table 2. ISSR primer information and results of polymorphic analysis.

Primer	Sequence(5'-3')	NTL ^a	P% ^b	PIC ^c	RP ^d
UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	19	100	0.288	6.25
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	13	100	0.249	3.63
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	21	100	0.326	8.00
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	21	100	0.249	5.63
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	26	100	0.266	7.13
UBC813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	15	100	0.224	3.25
UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	11	100	0.284	3.25
UBC822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	20	100	0.271	6.00
UBC823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	18	100	0.293	5.63
UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	20	100	0.263	5.50
UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	17	100	0.309	5.75
UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	20	100	0.304	6.88
UBC836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	17	100	0.290	5.88
UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	20	100	0.225	4.63
UBC841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	17	100	0.255	4.88
UBC842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	21	100	0.283	6.63
UBC899	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A	14	100	0.294	4.38
UBC900	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	15	100	0.330	6.38
Average/sum		18.1	100	0.2779	5.538

a: number of total loci (NTL) b: polymorphic ratio(%) c: polymorphic information content(PIC)
d: resolving power(RP). Y = C or T

SRAP 所使用的引子為 forward primer 4 種與 reverse primer 6 種，配對之後共 24 種引子組合（表 3），單管反應體積為 25 μ l，其中包含有 40 ng DNA、1 unit Taq polymerase、0.3 μ M forward primer、0.3 μ M reverse primer、0.2 mM dNTPs、1.5 mM $MgCl_2$ 、10 mM Tris-HCl (pH 9.0)、50 mM KCl、0.01% gelatin、0.1% Triton X-100。反應條件為 94°C 5 分鐘後，接續進行第一組循環，包含 94°C 1 分鐘、36°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘，共 5 個循環，而後進行第二組循環，包含 94°C 1 分鐘、50°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘，共 35 個循環，最後再以 72°C 延長 10 分鐘。

表 3. SRAP 引子資訊及分析結果

Table 3. SRAP primer information and results of polymorphic analysis.

Forward primer	Reverse primer	NTL ^a	P% ^b	PIC ^c	RP ^d
me1	em1	54	100	0.210	13.85
me1	em2	47	100	0.218	12.62
me1	em3	46	100	0.254	14.92
me1	em4	46	100	0.244	14.15
me1	em5	48	100	0.187	10.31
me1	em6	35	100	0.249	11.08
me2	em1	48	100	0.222	12.92
me2	em2	34	97.06	0.207	8.46
me2	em3	35	94.29	0.178	7.23
me2	em4	38	100	0.196	8.62
me2	em5	39	100	0.221	10.46
me2	em6	45	100	0.259	15.38
me3	em1	46	100	0.222	12.31
me3	em2	37	100	0.209	9.23
me3	em3	27	100	0.218	7.08
me3	em4	34	100	0.235	10.15
me3	em5	33	100	0.209	8.15
me3	em6	27	100	0.241	7.85

表 3. SRAP 引子資訊及分析結果 (續)

Table 3. SRAP primer information and results of polymorphic analysis. (continue)

Forward primer	Reverse primer	NTL ^a	P% ^b	PIC ^c	RP ^d
me4	em1	13	100	0.204	3.08
me4	em2	25	100	0.250	7.85
me4	em3	34	100	0.213	8.62
me4	em4	33	100	0.217	8.62
me4	em5	21	100	0.190	4.77
me4	em6	32	100	0.224	9.23
Average/sum		36.5/877	99.66	0.2198	9.872

a: number of total loci (NTL) b: polymorphic ratio (%) c: polymorphic information content (PIC)
d: resolving power (RP).

me1: TGAGTCCAAACCGGATA; me2: TGAGTCCAAACCGGAGC;

me3: TGAGTCCAAACCGGAAT; me4: TGAGTCCAAACCGGACC;

em1: GACTGCGTACGAATTAAT; em2: GACTGCGTACGAATTTGC;

em3: GACTGCGTACGAATTGAC; em4: GACTGCGTACGAATTTGA;

em5: GACTGCGTACGAATTAAC; em6: GACTGCGTACGAATTGCA.

SSR 所使用引子是依據 Gramene 網站上的資訊進行設計，共包含 120 個引子組合 (表 4)，單管的反應體積為 10 μ L，其中包含有 40 ng DNA、0.5 unit Taq polymerase、0.8 μ M primer、0.1 mM dNTPs、1.9 mM MgCl₂、10 mM Tris-HCl (pH 9.0)、50 mM KCl、0.01% gelatin、0.1% Triton X-100。反應條件為 94°C 5 分鐘，再接續進行 94°C 30 秒、黏合溫度 45 秒、72°C 45 秒共 35 個循環，最後再以 72°C 延長 5 分鐘。不同的引子具有不同的黏合溫度但皆在 55°C 以上。

表 4. SSR 引子資訊及分析結果

Table 4. SSR primer information and results of polymorphic analysis for rice.

	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')	NTL ^a	P% ^b	PIC ^c	RP ^d	T(%) ^e
RM14	ccgaggagaggagttcgac	gtgccaatctctcgaaaaa	31	100.00	0.208	7.69	91.67
RM165	ccgaacgcctagaagcgcgcc	cggcgaggttgctaattggcgg	26	100.00	0.299	10.15	100.00
RM151	agcatgcattgcaagtagcg	gatctgctgatcagttacaag	10	100.00	0.222	2.77	66.67
RM315	gaggtactctccgtttcac	agtcagctcactgtgcagtg	6	100.00	0.181	1.23	41.67
RM24	gaagtgtgatcactgtaacc	tacagtggacggcggaagtcg	29	100.00	0.233	8.46	91.67
RM84	taagggtccatccacaagatg	ttgcaaatgcagctagagtac	10	100.00	0.199	2.46	75.00
RM212	ccactttcagctactaccag	cacccattgtctctcattatg	7	100.00	0.142	1.08	33.33
RM237	caaateccgactgctgtcc	tgggaagagagcactacagc	26	100.00	0.226	7.23	100.00
RM462	acggcccatataaaagcctc	aagatggcggagtagctcag	29	100.00	0.235	8.77	91.67
RM583	agatccatccctgtggagag	gcgaactcgctgtgaatc	19	100.00	0.172	3.69	75.00
RM530	gcactgaccacgactgtttg	accgtaaccgggatctatcc	26	100.00	0.196	5.85	91.67
RM262	cattccgtctcggetcaact	cagagcaaggtgcttgc	48	100.00	0.240	14.62	91.67
RM485	cacactttccagctctctc	catcttctctctctggcac	37	100.00	0.210	9.54	100.00
RM475	cctcacgattttctccaac	acggtgggattagactgtgc	46	100.00	0.259	15.85	100.00
RM106	cgtcttcatcatcgctgccccg	ggcccatcccgtcgtggatctc	18	100.00	0.241	5.38	100.00
RM138	gacagagctttggatgtctg	aaagaagctgcctttgacgc	23	100.00	0.209	5.69	91.67
RM166	ggctctgggtcaataattgggttacc	ttgctgcatgatcctaaccgg	8	100.00	0.186	1.69	50.00
RM327	ctactctctgtccctctctc	ccagctagacacaatcgagc	43	100.00	0.217	11.08	100.00
RM423	agcacccatgccttatgttg	cctttttcagtagccctccc	26	100.00	0.222	7.08	100.00
RM7286	cagaacaattcgaccgttc	ggcttgagagcgtttgtagg	19	100.00	0.220	4.92	91.67
RM282	ctgtgtcgaaaggctgcac	cagtctgtgttcagcaag	30	100.00	0.231	8.46	100.00
RM251	gaatggcaatggcgctag	atgcggttaagattcgatc	18	100.00	0.213	4.77	100.00
RM514	agattgatctccattcccc	cacgagcatattactagtgg	22	100.00	0.162	4.00	41.67
RM468	cccttcctgtgtggctac	tgatttctgagagccaacc	30	100.00	0.271	10.46	83.33
RM36	caactatgcacattgtgc	gtactccacaagaccgtacc	32	100.00	0.237	9.38	100.00
RM55	ccgtcgcgtagtagagaag	tcccggttattttaaggcg	15	100.00	0.189	3.23	75.00
RM60	agtcccatgtccacttccg	atggctactgcctgtactac	24	100.00	0.182	5.08	91.67
RM156	gccgcaccctcactccctctc	tcttgcggagcgttgaggtg	17	100.00	0.223	4.77	75.00
RM489	acttgagacgatcgacacc	tcacctatgatgtgtcag	41	100.00	0.224	11.54	91.67
RM503	cacctttcacacacacac	gccccactaacaacccaag	43	100.00	0.219	11.23	100.00
RM177	ccctcttagacagaggccagagg	gtagccgaagatgaggccgcg	28	100.00	0.240	8.46	83.33

表 4. SSR 引子資訊及分析結果 (續)

Table 4. SSR primer information and results of polymorphic analysis for rice. (continue)

	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')	N ^T L ^a	P [%] ^b	PIC ^c	RP ^d	T(%) ^e
RM518	ctcttcactcactcaccatgg	atccatctggagcaagcaac	34	100.00	0.233	9.85	100.00
RM564	catggccttgatgcatc	atgcagaggattggcttgag	32	100.00	0.248	10.00	91.67
RM142	ctcgctatcgccatcgccatcg	tcgagccatcgctggatggagg	8	100.00	0.198	2.00	100.00
RM241	gagccaaataagatcgctga	tgcaagcagcagatttagtg	26	100.00	0.192	5.85	83.33
RM261	ctactctcccccttgctcg	tgtaccatcgccaaatctcc	28	100.00	0.204	6.77	66.67
RM280	acacgatccactttgcgc	tgtgtcttgagcagccagg	53	100.00	0.231	15.54	100.00
RM348	ccgtactaataagcagagag	ggagctttgttcttgcgaac	16	100.00	0.207	4.15	83.33
RM401	tggaaacagatagggtgaagg	ccgttcacaaactatacaagc	10	100.00	0.187	2.15	58.33
RM417	cggatccaagaaacagcag	ttcggatcctccacacctc	36	100.00	0.208	8.77	100.00
RM249	ggcgtaaagggtttgcatgt	atgatgccatgaaggtcagc	42	100.00	0.222	11.38	100.00
RM233B	ccaatgaacctacatgttg	gcattgcagacagctattga	39	100.00	0.215	10.00	100.00
RM480	gctcaagcattctgcagttg	gcgcttctgctattggaag	29	100.00	0.212	7.38	91.67
RM178	tcgcgtgaaagataagcggcgc	gatcaccgttccctccgcctgc	30	100.00	0.218	7.69	100.00
RM13	tccaacatggcaagagagag	gggtggcattcgattccag	60	100.00	0.248	18.77	100.00
RM153	gcctcgagcatcatcatcag	atcaacctgcacttgcctgg	49	100.00	0.228	14.00	100.00
RM164	tcttggccgctactgcagatatacc	gcagccctaagtgtacaattcttc	21	100.00	0.174	4.15	75.00
RM188	tccgcctctctctcgttccc	gcaacgcacaaccgaaccgagc	40	100.00	0.212	10.00	91.67
RM437	acaccaaccagatcaggagag	tgctcgtcaatggtagttc	32	100.00	0.247	10.15	100.00
RM440	catgaacaacgtcaccttc	atggttggtaggcaccaaag	42	100.00	0.272	14.92	100.00
RM527	ggctcgatctagaaaatccg	ttgcacaggttgcgatagag	6	100.00	0.181	1.23	50.00
RM133	ttggattgtttgctggctcgc	ggaacacggggtcggaagcgac	49	100.00	0.229	13.85	100.00
RM589	atcatggctcgtggcttaac	caggttccaaccagacactg	26	100.00	0.207	6.46	100.00
RM103	cttccaattcaggccggctggc	cgccacagctgacctgcatgc	29	100.00	0.261	9.85	100.00
RM3	acactgtagcggccactg	cctccactgtccacatctt	51	100.00	0.271	18.31	100.00
RM314	ctagcaggaactcctttcagg	aacattccacacacacgc	23	100.00	0.253	7.23	91.67
RM340	ggtaaatggacaatcctatggc	gacaaatataaggcagtgctgc	21	100.00	0.194	4.77	41.67
RM343	ccacgaacctttgcatc	gtgatgatgcgtcggttg	47	100.00	0.263	15.69	100.00
RM454	ctcaagcttagctgctgctg	gtgatcagtgaccatagcg	39	100.00	0.277	13.85	91.67
RM549	acgaactgatcatatcgcc	ctgtggttgatccctgaacc	26	100.00	0.239	7.69	91.67
RM11	tctctcttccccgatc	atagcgggcgaggttag	36	100.00	0.225	9.69	83.33
RM214	ctgatgatagaacctctctc	aagaacagctgacttcacaa	11	100.00	0.153	1.85	41.67

表 4. SSR 引子資訊及分析結果 (續)

Table 4. SSR primer information and results of polymorphic analysis for rice. (continue)

	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')	NTL ^a	P% ^b	PIC ^c	RP ^d	T(%) ^e
RM420	ggacagaatgtgaagacagtcg	actaatccaccaacgcatcc	30	100.00	0.204	7.23	100.00
RM18	ttccctctcatgagctccat	gagtgccctggcgctgtac	27	100.00	0.218	7.23	100.00
RM10	ttgtcaaggaggagcatcg	cagaatgggaaatgggtcc	26	100.00	0.199	6.00	91.67
RM82	tgcttctgtcaattgcc	cgactcgtggaggtacgg	7	100.00	0.139	1.08	100.00
RM295	cgagacgagcatcgataag	gatctgggtggaggggagg	50	100.00	0.236	14.92	100.00
RM505	agagtatgagccgggtgtg	gatttggcgatcttagcagc	18	100.00	0.242	5.54	91.67
RM1335	gcatgcatgaatatgatgg	agatcgaacaagaagagtgg	30	100.00	0.215	7.85	100.00
RM7121	ggagatggcacacgtcaaac	aggatccccgtttgtagcag	28	100.00	0.234	8.15	83.33
RM284	atctctgatactccatccatcc	cctgtacgtgtgatccgaagc	36	100.00	0.178	7.23	91.67
RM210	tcacattcggtggcattg	cgaggatggtgttcacttg	32	100.00	0.232	9.23	83.33
RM531	gaaacatcccatgttccac	tcggttttcagactcggtc	28	100.00	0.163	5.08	91.67
RM72	ccggcgataaaacaatgag	gcatcggtcctaactaaggg	34	100.00	0.233	9.69	91.67
RM52	ctactcgcgcgtggagtt	tgtcttactggtgaagctgg	15	100.00	0.207	3.85	83.33
RM230	gccagaccgtggatgttc	caccgcagtcacttttcaag	37	100.00	0.249	12.00	91.67
RM281	accaagcatccagtaccag	gttcttcatacagtcacatg	31	100.00	0.270	10.46	83.33
RM337	gtaggaaagggaaggcagag	cgatagatagctagatgtggcc	33	100.00	0.229	9.08	91.67
RM3819	acctcacctgtgcatcttg	caatcccccttctctcttcc	17	100.00	0.182	3.54	58.33
RM8243	ctcgtgcaaccattatattc	accttagctgtctgaattg	22	100.00	0.175	4.46	66.67
RM296	cacatggcaccaacctcc	gccaaagtcatcactactctgg	18	100.00	0.200	4.15	75.00
RM219	cgtcggatgatgtaaagcct	catatcggcattcgcctg	37	100.00	0.178	7.54	91.67
RM444	gctccacctgcttaagcatc	tgaagaccatgttctgcagg	17	100.00	0.192	3.85	83.33
RM316	ctagttgggcatacatggc	acgcttatatgttacgtcaac	35	100.00	0.212	8.77	91.67
RM105	gtcgtcgacccatcgagccac	tggtcgaagggtgggatcgggtc	37	100.00	0.195	8.46	100.00
RM201	ctcgtttattacctacagtacc	ctacctcctttctagaccgata	30	100.00	0.181	6.31	91.67
RM205	ctggttctgtatgggagcag	ctggcccttcacgtttcagtg	19	100.00	0.199	4.46	83.33
RM215	caaatggagcagcaagagc	tgagcacctccttctctgtag	38	100.00	0.208	9.38	100.00
RM257	cagttccgagcaagagtactc	ggatcgagcgtggcatatg	29	100.00	0.198	6.62	75.00
RM5657	tatgtgcatttgaaggtga	gctttagattattgagcgag	54	100.00	0.206	13.23	91.67
RM269	gaaagcgatcgaaccagc	gcaaatgcgcctcgtgtc	28	96.42	0.284	10.77	100.00
RM222	cttaaatgggccacatgcg	caaagcttcggccaaaag	63	100.00	0.228	17.38	100.00
RM474	aagatgtacgggtggcattc	tatgagctggtgagcaatgg	62	100.00	0.251	19.38	100.00

表 4. SSR 引子資訊及分析結果 (續)

Table 4. SSR primer information and results of polymorphic analysis for rice. (continue)

	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')	NTL ^a	P% ^b	PIC ^c	RP ^d	T(%) ^e
RM244	ccgactgttcgtccttatca	ctgctctcgggtgaacgt	68	100.00	0.211	17.23	91.67
RM171	aacgcgaggacacgtacttac	acgagatacgtacgcctttg	47	100.00	0.219	12.62	91.67
RM184	atcccattcgccaaaaccggcc	tgacacttgagagcgggtgtgg	52	100.00	0.219	13.69	100.00
RM228	ctggccattagtctctgg	gcttgccgctctgcttac	42	100.00	0.233	12.00	91.67
RM311	tggtagtataggtactaaacat	tcctatacacatacaaacatac	24	100.00	0.157	4.15	50.00
RM333	gtacgactacgaggtgcacaa	gtcttcgcgactcctgc	35	100.00	0.210	8.77	91.67
RM467	ggtctctctctctctctctctc	ctcctgacaattcaactgcg	49	100.00	0.223	13.54	100.00
RM286	ggcttcacatcttggcgac	ccggattcacgagataaa	40	100.00	0.220	10.62	83.33
RM202	cagattggagatgaagtctcc	ccagcaagcatgtcaatgta	15	100.00	0.183	3.23	100.00
RM332	gcgaaggcgaaggtgaag	catgagtgtactcactcacc	45	100.00	0.255	14.92	91.67
RM229	cactcacacgaacgactgac	cgcaggttctgtgaaatgt	11	100.00	0.142	1.69	41.67
RM144	tgccctggcgcaaatgtgatcc	gctagaggagatcagatggtagtgc g	30	100.00	0.234	8.46	100.00
RM167	gatccagcgtgaggaacacgt	agtccgaccacaaggctgcgtgtc	52	100.00	0.203	12.46	91.67
RM254	agccccgaataaatccacct	ctggaggagcatttggtagc	33	100.00	0.184	6.92	83.33
RM441	acaccagagagagagagagag	tctgcaacggctgatagatg	51	100.00	0.249	15.54	100.00
RM2859	atattgtgctaacacatgct	cgagcttgactgtgtatagt	25	100.00	0.169	4.77	50.00
RM6085	ggtgagagatggctaaagcg	catcgctctagcacctcc	48	100.00	0.281	18.31	91.67
RM4A	ttgacgaggtcagcactgac	agggtgtatccgactcatcg	46	100.00	0.221	12.31	100.00
RM247	tagtgccgatcatgtaacg	catatggttttgacaaagcg	17	100.00	0.156	2.92	58.33
RM179	ccccattagtcactccaccacc	ccaatcagcctcatgcctcccc	21	100.00	0.201	5.08	100.00
RM558A	gaactcctcgaactcgaatgc	aggcattcaacctgttcgac	60	100.00	0.245	18.92	100.00
RM17	tgccctgttattttctctctc	ggtgatcctttccatttca	16	100.00	0.185	3.38	75.00
RM19	caaaaacagagcagatgac	ctcaagatggacgccaaga	50	100.00	0.205	12.00	100.00
RM270	ggccgttggttctaaaatc	tgcgcagtatcatcggcgag	41	100.00	0.226	11.23	100.00
RM313	tgctacaagtgttcttcaggac	gtcaccttttgtgtccac	28	100.00	0.181	5.85	75.00
RM463	ttcccctccttttatgggtgc	tgttctcctcagtcactgcg	13	100.00	0.195	2.92	91.67
RM512	ctgcctttcttaccctcttc	aaccctcgcgtggattctag	45	100.00	0.195	10.31	100.00
Average/sum			31.3/3750	99.85	0.2146	8.478	87.43

a: number of total loci (NTL) b: polymorphic ratio (%) c: polymorphism information content (PIC)
d: resolving power (RP) e: transferability of *Oryza sativa* SSR markers acrossing other species (T%)

四、電泳膠圖計數與統計分析

RAPD 與 ISSR 以 2%瓊脂膠體電泳 (agarose gel electrophoresis) , SRAP、SSR 以 4%聚丙烯醯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis) , 根據其膠體的濃度及各自的解析能力而異, 瓊脂膠體全部記錄清楚可見之條帶, 聚丙烯醯胺膠體選擇約在 100-1,000 bp 內, 皆重複兩次, 選擇再現性高且可清楚區別之條帶進行紀錄。將有增幅出條帶的物種紀錄為『1』, 沒有增幅出條帶的物種紀錄為『0』, 利用 NTSYS-pc version 2.20 m, 以 Jaccard 相似係數估計遺傳距離, 並建構成相似矩陣 (similarity matrix) , 並且使用 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 進行集群分析 (cluster) , 並繪製成樹狀圖 (dendrogram) 以瞭解物種之間的關係, 同時使用 NTSYS-pc version, CONSENS 中選擇 MAJRUL, 進行 1,000 次 bootstrap, 以瞭解各分支 (clade) 的可信程度 (bootstrap percentages) , 並將超過 50%之 bootstrap 百分比標註於樹狀圖之節點上。

結果與討論

本次試驗中使用 20 組 RAPD 引子 (表 1)，針對野生水稻平均共增幅出 377 個片段，平均每個引子可以增幅 18.9 個片段，此外所有的片段皆具多型性，最多的是 OPA10 共增幅出 31 個片段，最少為 OPA03，只增幅 10 個片段。PIC 的範圍從 0.217 (OPA17) 到 0.346 (OPA03)，平均為 0.2661。RP 的範圍從 3.54 (OPA06) 到 9.08 (OPA10)，平均為 6.353。利用 RAPD 的結果並根據 Jaccard 相似係數計算的相似矩陣，以 UPGMA 建立的樹狀圖與相似矩陣之間有不錯的配適性 ($P \text{ value} < 0.01$, $r = 0.8874$)，參考 1,000 次 bootstrap 的結果，將樹狀圖於相似係數 0.1429 的節點上分為 8 群 (圖 1)。並非所有的外群都和稻屬分開，綠竹被混入稻屬群之中，且 *O. punctate* (BB) 也被分入 B、C genome 的另外一群。

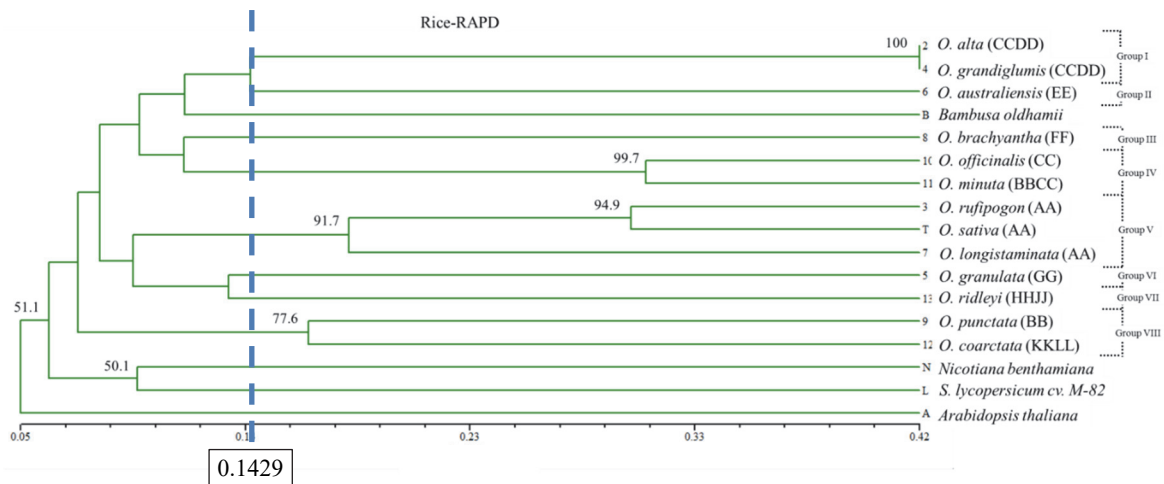


圖 1. 將 RAPD 分析的結果以 UPGMA 建立之樹狀圖

Fig. 1. The dendrogram of rice constructed based on markers amplified by 20 RAPD primers using UPGMA. The horizontal axis indicates the Jaccard's similarity coefficient. Number above branches are bootstrap percentages above 50%. The eight major clades are indicated by Jaccard's similarity 0.1429.

本次試驗中使用 18 組 ISSR 引子 (表 2)，針對野生水稻共增幅出 325 個片段，平均每個標誌可以增幅出 18.1 個片段，此外所有的片段皆為具有多型性，最多的是 UBC812 共增幅出 26 個片段，最少為 UBC808，只增幅 13 個片段。PIC 的範圍從 0.224 (UBC813) 到 0.330 (UBC900)，平均為 0.2779。RP 的範圍從 3.25 (UBC813、UBC818) 到 8.00 (UBC810)，平均為 5.538。利用 ISSR 的結果並根據 Jaccard 相似係數計算的相似矩陣，以 UPGMA 建立的樹狀圖與相似矩陣之間有良好的配適性 (P value < 0.01, $r = 0.9264$)，同時，參考 1,000 次 bootstrap 的結果，將樹狀圖於相似係數 0.1539 的節點上分為 8 群 (圖 2)。此外並非所有的外群都和野生水稻分開，菸草被混入稻屬的分群之中，而 *O. coarctata* (KKLL) 被分入外群。

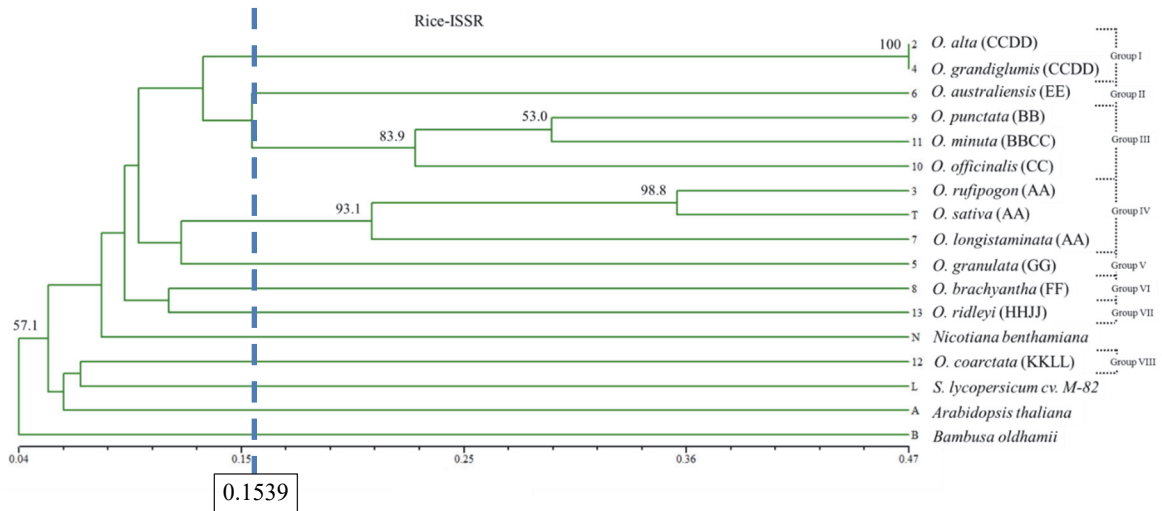


圖 2. 將 ISSR 分析的結果以 UPGMA 建立之樹狀圖群

Fig. 2. The dendrogram of rice constructed based on markers amplified by 18 ISSR primers using UPGMA. The horizontal axis indicates the Jaccard's similarity coefficient. Number above branches are bootstrap percentages above 50%. The eight major groups are indicated by Jaccard's similarity 0.1539.

本次試驗使用 10 條 SRAP 引子 (表 3) 所產生的 24 種引子組合, 針對稻屬共增幅出 877 個片段, 其中多型性片段占 99.66% (874/877), 最多的是 me1 x em1 共增幅出 54 個片段, 最少為 me4 x em1, 只增幅 13 個片段, 平均每個標誌可以增幅出 36.5 個片段。PIC 的範圍從 0.178 (me2 x em3) 到 0.259 (me2 x em6), 平均為 0.2198。RP 的範圍從 3.08 (me4 x em1) 到 15.38 (me2 x em6), 平均為 9.872。利用 SRAP 的結果並根據 Jaccard 相似係數計算的相似矩陣, 以 UPGMA 建立的樹狀圖與相似矩陣之間有良好的配適性 ($P \text{ value} < 0.01, r = 0.9140$)。參考 1,000 次 bootstrap 的結果, 將樹狀圖於相似係數 0.0948 的節點上分為 8 群 (圖 3), 稻屬群內的關係分類與前人研究相近, 唯 *O. australiensis* (EE) 與 *O. ridleyi* (HHJJ) 之親緣關係較其他稻屬種原相近, 與前人研究稍有不同外, 整體的稻屬分類關係與前人研究相同, 且所有的稻屬物種皆與外群分開, 並且水稻群有 62.3% 的 bootstrap 支持。

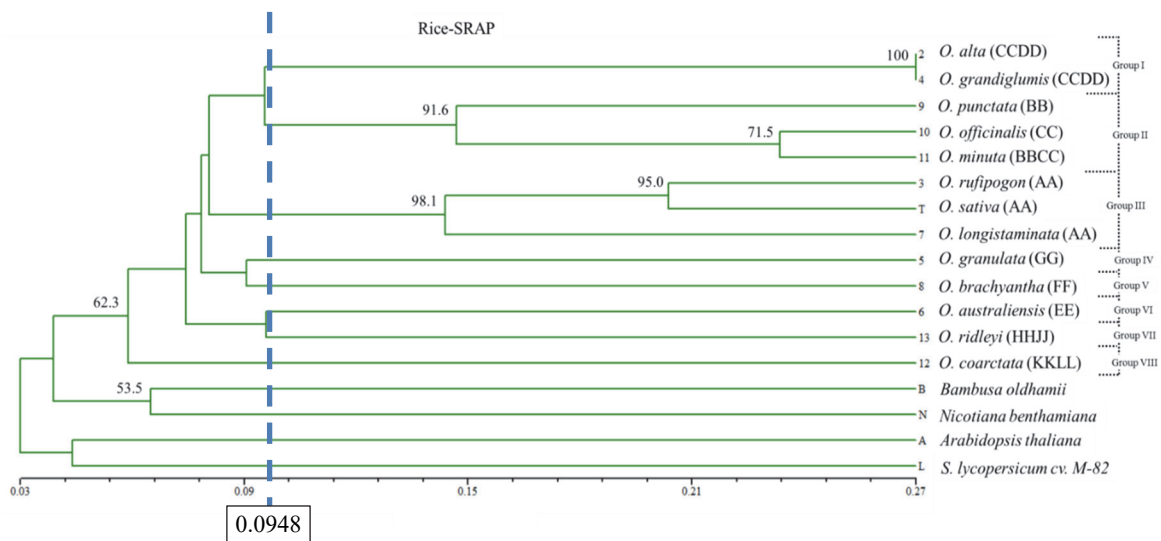


圖 3. 將 SRAP 分析的結果以 UPGMA 建立之樹狀圖

Fig. 3. The dendrogram of rice constructed based on markers amplified by 24 SRAP primer pairs using UPGMA. The horizontal axis indicates the Jaccard's similarity coefficient. Number above branches are bootstrap percentages above 50%. The eight major groups are indicated by Jaccard's similarity 0.0948.

本次試驗使用 *O. sativa* 的 120 組 SSR 標誌中，皆可以跨物種轉移到本試驗中的任一個野生水稻中，共增幅出 3,750 個片段，其中多型性片段占 99.95%。PIC 的範圍 0.139 (RM82) 到 0.299 (RM165)，平均 0.2146。RP 的範圍 1.08 (RM212 及 RM82) 到 19.38 (RM474)，平均 8.084 (表 4)。根據 SSR 的結果並且依照 Jaccard 相似係數所計算的相似矩陣。利用 UPGMA 建立的樹狀圖與相似矩陣之間有良好的配適性 (P value < 0.01, $r = 0.9651$)。參考 1,000 次 bootstrap 的結果，將樹狀圖於相似係數 0.0761 的節點上分為 6 群 (圖 4)，雖然稻屬群內的關係分類與前人研究相近，但 *O. coarctata* (KKLL) 沒有被分入稻屬群中，其親緣關係比外群更為遠源。

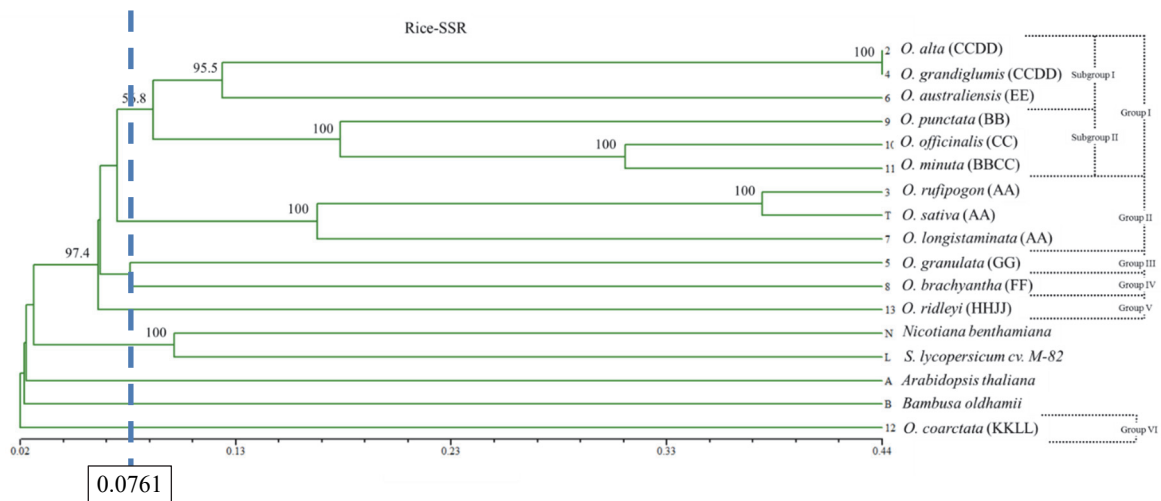


圖 4. 將 SSR 分析的結果以 UPGMA 建立之樹狀圖

Fig. 4. The dendrogram of rice constructed based on markers amplified by 120 *Oryza sativa* SSR primers using UPGMA. The horizontal axis indicates the Jaccard's similarity coefficient. Number above branches are bootstrap percentages above 50%. The six major groups are indicated by Jaccard's similarity 0.0761. Group I could be divided two subgroup by Jaccard's similarity 0.0871.

綜合本次試驗 4 種分子標誌之結果，並根據 Jaccard 相似係數所計算的相似矩陣，利用 UPGMA 建立的樹狀圖（圖 5）與相似矩陣之間有良好的配適性（ P value < 0.01, $r = 0.9694$ ），參考 1,000 次 bootstrap 的結果，將樹狀圖於相似係數 0.0835 的節點上分為 8 群，此外，所有的外群都和稻屬分開，並且稻屬群有 77.0% 的 bootstrap 支持。

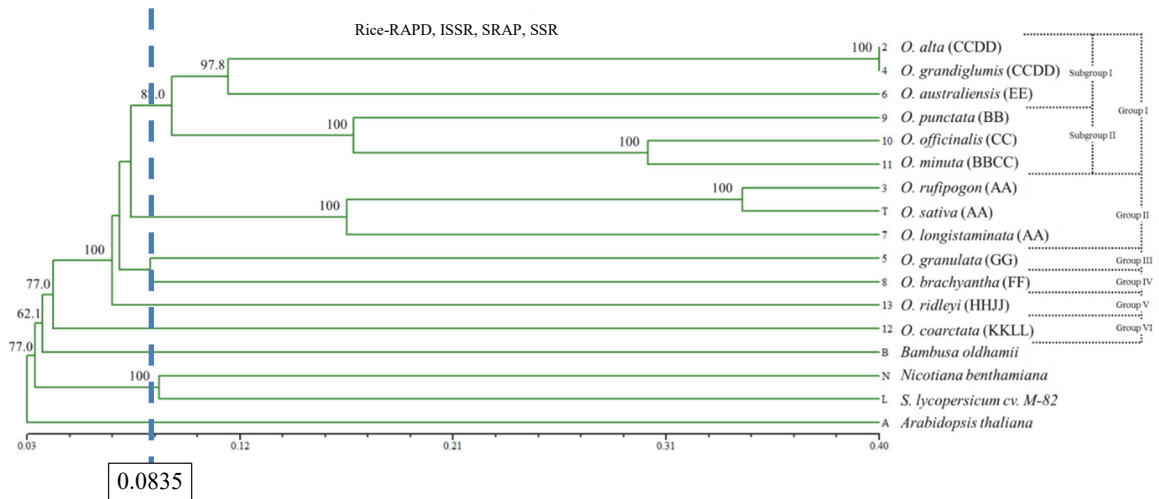


圖 5. 將 RAPD、ISSR、SRAP 及 SSR 分析的結果以 UPGMA 建立之樹狀圖

Fig. 5. The dendrogram of rice constructed based on combined RAPD, ISSR, SRAP, and *Oryza sativa* SSR markers using UPGMA. The horizontal axis indicates the Jaccard's similarity coefficient. Number above branches are bootstrap percentages above 50%. The six major groups are indicated by Jaccard's similarity 0.0835. Group I could be divided two subgroup by Jaccard's similarity 0.0874.

稻屬內共有 27 個物種，其中包含二倍體（AA、BB、CC、EE、FF、GG）與四倍體（BBCC、CCDD、HHJJ、HHKK、KKLL）等 11 個不同的 genome type（Stein *et al.*, 2018）。最早是依據細胞遺傳學針對稻屬種原進行 genome type 的區分，往後將二倍體與四倍體的 *O. meyeriana* complex、*O. ridleyi* complex 與先前定義的基因組型態加以區別，並且依照 AFLP 的結果分別定義為 GG 與 HHJJ（Aggarwal *et al.*, 1999）。四種 AA genome 的野生水稻 *O. meridionalis*、*O. glumaepatula*、*O. nivara* 及 *O. rufipogon*，利用 RAPD 進行分群，加深對於 AA genome 之研究（Martin *et al.*, 1997）。在序列上的遺傳歧異度可以進一步推估 genome 之間的演化關係，如 Ge 等（1999）利用 *Adh1*、*Adh2*、

matK 進行分析，得知 AA、BB、CC 之間的關係最近，EE 為其姊妹枝，GG 最遠，而剩餘的四倍體物種卻形成並系群（paraphyletic）。此外，BBCC genome 之間可能為不同的起源且母本可能是 BB 或 CC 其中一個，而 CCDD 物種之間可能為 CC 和 DD 的祖先物種雜交後再進行物種分化，雖然形成不同物種但彼此間關係很近，最後 DD genome 由 CC genome 演化而來的機會很低，較有可能是由 EE genome 演化而來，這些物種間的關係也有其他的研究支持（Bao and Ge, 2004; Bao *et al.*, 2006; Nishikawa *et al.*, 2005）。此外較為遠源的 *O. coarctata* 依照基因序列分類為 HHKK（Ge *et al.*, 1999）。但根據水稻 *MOC1* 基因座附近的 DNA 序列分析，發現同樣命名為 HH genome 的四倍體 *O. coarctata* 與 *O. ridleyi*，其 HH 的 *MOC1* 區域中並沒有同源性，因此為了避免混淆也建議將 *O. coarctata* 的基因組型態改為 KKLL（Lu *et al.*, 2009）。最後，Ammiraju 等（2010）同樣使用各物種的 *Adh1*、*Adh2* 同源區域，配合相關的化石證據進行演化歷史的分析，推估整個水稻基因組型態之間的關係。綜合上述結果 A genome 與 B genome 最相近，其次是 C genome，而 D genome 與 E genome 關係很近，同時這五種 genome 可以分成一群，其他關係較遠的則依序為 F、G、H、J、K、L genome，並分在另外一群。

本次試驗的結果，RAPD 和 ISSR 分群的結果與前人結果不盡相同，除了不同科的外群植物分入稻屬群之中，各個稻屬 genome 的關係也較為混亂；SRAP 與 SSR 分群結果與關係與前人研究結果較為類似，但 SRAP 仍將 *O. australiensis*（EE）和 *O. ridleyi*（HHJJ）分為同一群，SSR 也沒有將 *O. coarctata*（KKLL）分入稻屬群之中而落入外群。不過若將各分子標誌合併分析後，所得出的結果最符合前人研究所得出稻屬間的關係，並將外群分開。綜合以上結果，本試驗所使用的分子標誌都可以進行遺傳歧異度的分析，其中以 SRAP 最好，SSR 次之，ISSR 與 RAPD 較差，且合併的結果優於單獨使用。將各分子標誌合併分析的結果更佳，這樣的結果也與其他研究相符合，例如利用野牛草〔*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Englem.〕比較 RAPD、ISSR、SRAP，以及跨物種應用玉米、小米、高粱及甘蔗的 SSR 標誌，在各分子標誌之間的區別能力研究者認為 SRAP 優於其它者（Budak *et al.*, 2004），其他研究者也不只使用一種分子標誌作為依據，而是將各類分子標誌全部組合後，皆可得到更為可靠的結果（Fu *et al.*, 2008, Shao *et al.*, 2010）。

另一方面，評估遺傳歧異度分析的優劣時，除了分群的結果是否正確外，另需考慮條帶的呈現是否在分群時可給予最多的資訊，或是可否將族群以最少的引子數目產

生最多的多型性條帶，進行最有效率的分群，常用的評斷方式有多型性條帶數目、polymorphism informative content (PIC)、resolving power (RP) 等。PIC 計算的方式為 $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$ ，參考 Roldán-Ruiz 等 (2000) 應用於 AFLP 分子標誌之區別能力 (discriminative) 的評估上，由於本次試驗中所使用的分子標誌，其片段並非針對相同的位置進行增幅，情況與顯性分子標誌 AFLP 雷同，因此，可使用此公式進行區別能力的評估，定義同一個標誌所增幅出來的相同大小的片段為相同的基因體組位置 (loci) 所增幅出來的產物，其中 PIC_i 表示第 i 個片段上的多型性資訊， f_i 表示針對水稻族群中增幅出條帶的頻率，反之， $(1-f_i)$ 表示沒有增幅出條帶的頻率。根據此公式可以知，PIC 值會落在 0.5 到 0 之間，若 PIC 值越高 (接近 0.5) 表示具有較高的區別能力，若 PIC 值越低 (接近 0)，則表示分辨的能力越差。RP 計算的方式是 $RP = \sum I_b$ ，根據 Prevost 和 Wilkinson (1999) 應用於 ISSR 分子標誌之區別能力的評估，其中 I_b (band informativeness) 表示為每個片段上出現的多型性資訊， $I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$ ， p 表示可以增幅出條帶的物種占有所有物種之比率。根據此公式可知 I_b 的值會落在 0 到 1 之間，若 I_b 的值越高 (接近 1) 表示此片段上的族群被平均分為兩群，其分群時具有較高的效率，若越低 (接近 0) 則表示此片段在族群內出現的情況越相同，分成兩群的效率較差。將某個分子標誌的所有片段之 I_b 累加後可得 RP 值，RP 值是一個大於 0 的數且沒有上限，因此，若某個分子標誌能增幅較多的片段或是可以增幅的物種數目越接近總物種數目的一半，則 RP 值會越高。

雖然現今已經有許多利用分子標誌進行遺傳歧異度研究的實例 (Fu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008; Yildiz *et al.*, 2011)，不過為何依據相同分子標誌所計算的歧異度並不完全相同，可能有幾種影響的原因。例如 Patzak (2001) 以 ISSR 評估忽布花 (*Humulus lupulus* L.) 遺傳歧異度分析的能力，同時得知兩種膠體 agarose 與 acrylamide 進行電泳後解析能力是有差異的。Landry 和 Lapointe (1996) 以 RAPD 的結果進行模擬，得知增加更多的引子數目進行分析，不但可以得到更多的條帶，也會增加分析的穩定性。就算相同物種與相同標誌，使用電泳的膠體、引子的數目，都有可能影響歧異度分析的結果。本次試驗平均每個分子標誌增幅的多型性片段數目，都以 SRAP (36.5) 最高、SSR (31.3) 次之，RAPD (18.9) 與 ISSR (18.1) 較少，但是以平均的 PIC 來講，RAPD (0.2661) 與 ISSR (0.2779) 卻高於 SRAP (0.2198) 與 SSR (0.2146)。不過以平均的 RP 來看，以 SRAP (9.872) 最高、SSR (8.478) 次之，RAPD (6.353) 與 ISSR (5.538) 較低，從這樣的結果表示以不同的方式來評估分子標誌的效率會得到不一樣

的結果。由於多型性片段在族群內呈現一半時分群的效率最好，因為兩者的計算公式皆是當族群中增幅出條帶的比率占一半時會有最高的值。然而，PIC 將各片段在族群內出現的比率進行平均，因此，產生的片段總數目就被稀釋掉，從分子標誌的 PIC 值，只可以瞭解到片段在族群間出現的情況，而無法得知增幅的片段數目。相對上 RP 有透過加總的方式來計算，因此，除了增幅的片段在族群間出現的比率會影響外，片段的數目也會影響 RP 值。不過分子標誌較有效率的情況除了增幅的片段在族群間各占一半的情況之外，使用較少組的引子就可以增幅較多的片段效率也會較高，推論以 RP 為基礎判斷分子標誌的效率較好，並且依次為 SRAP > SSR > RAPD 與 ISSR。

參考文獻

- Agarwal, M., N. Shrivastava, and H. Padh. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27:617-631.
- Aggarwal, R.K., D.S. Brar, S. Nandi, N. Huang, and G.S. Khush. 1999. Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 98:1320-1328.
- Ammiraju, J.S., C. Fan, Y. Yu, X. Song, K.A. Cranston, A.C. Pontaroli, F. Lu, A. Sanyal, N. Jiang, and T. Rambo. 2010. Spatio-temporal patterns of genome evolution in allotetraploid species of the genus *Oryza*. *Plant J.* 63:430-442.
- Bao, Y., and S. Ge. 2004. Origin and phylogeny of *Oryza* species with the CD genome based on multiple-gene sequence data. *Plant Syst. Evol.* 249:55-66.
- Bao, Y., H.F. Zhou, D.Y. Hong, and S. Ge. 2006. Genetic diversity and evolutionary relationships of *Oryza* species with the B- and C-genomes as revealed by SSR markers. *J. Plant Biol.* 49:339-347.
- Budak, H., R.C. Shearman, I. Parmaksiz, and I. Dweikat. 2004. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. *Theor. Appl. Genet.* 109:280-288.
- Doyle J.J., and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Fu, L.Z., H.Y. Zhang, X.Q. Wu, H.B. Li, H.L. Wei, Q.Q. Wu, and L.A. Wang. 2010.

- Evaluation of genetic diversity in *Lentinula edodes* strains using RAPD, ISSR and SRAP markers. *World J. Microb. Biot.* 26:709-716.
- Fu, X., G. Ning, L. Gao, and M. Bao. 2008. Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using two molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morphological traits. *Sci. Hortic.* 117:263-270.
- Ge, S., T. Sang, B.R. Lu, and D.Y. Hong. 1999. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14400-14405.
- Landry, P.A., and F.J. Lapointe. 1996. RAPD problems in phylogenetics. *Zool. Scr.* 25:283-290.
- Li, G., and C.F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 103:455-461.
- Liu, L.W., L.P. Zhao, Y.Q. Gong, M.X. Wang, L.M. Chen, J.L. Yang, Y. Wang, F.M. Yu, and L.Z. Wang. 2008. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. *Sci. Hortic.* 116:240-247.
- Lu, F., J.S.S. Ammiraju, A. Sanyal, S. Zhang, R. Song, J. Chen, G. Li, Y. Sui, X. Song, Z. Cheng, A.C. de Oliveira, J.L. Bennetzen, S.A. Jackson, R.A. Wing, and M. Chen. 2009. Comparative sequence analysis of MONOCULM1-orthologous regions in 14 *Oryza* genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:2071-2076.
- Martin, C., A. Juliano, H.J. Newbury, B.R. Lu, M.T. Jackson, and B.V. Ford-Lloyd. 1997. The use of RAPD markers to facilitate the identification of *Oryza* species within a germplasm collection. *Genet. Resour. Crop Ev.* 44:175-183.
- Nishikawa, T., D. Vaughan, and K.I. Kadowaki. 2005. Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes. *Theor. Appl. Genet.* 110:696-705.
- Patzak, J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* 121:9-18.
- Poczei, P., I. Varga, M. Laos, A. Cseh, N. Bell, J. Valkonen, and J. Hyvonen. 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods* 9:6.
- Prevost, A. and M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to

- ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker, and M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breeding* 6:125-134.
- Rossetto, M., J. McNally, and R.J. Henry. 2002. Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitaceae. *Theor. Appl. Genet.* 104:61-66.
- Shao, Q.S., Q.S. Guo, Y.M. Deng, and H.P. Guo. 2010. A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemi. Syst. and Ecol.* 38:1160-1169.
- Stein, J.C, Y. Yu, D. Copetti, D.J. Zwickl, L. Zhang, C. Zhang, K. Chougule, D. Gao, A. Iwata, J.L. Goicoechea, S. Wei, J. Wang, Y. Liao, M. Wang, J. Jacquemin, C. Becker, D. Kudrna, J. Zhang, C.E.M. Londono, X. Song, S. Lee, P. Sanchez, A. Zuccolo, J.S.S. Ammiraju, J. Talag, A. Danowitz, L.F. Rivera, A.R. Gschwend, C. Noutsos, C.C. Wu, S.M. Kao, J.W. Zeng, F.J. Wei, Q. Zhao, Q. Feng, M.E. Baidouri, M. Carpentier, E. Lasserre, R. Cooke, D. Farias, L.C. da Maia, R.S. dos Santos, K.G. Nyberg, K.L. McNally, R. Mauleon, N. Alexandrov, J. Schmutz, D. Flowers, C. Fan, D. Weigel, K.K. Jena, T. Wicker, Mi. Chen, B. Han, R. Henry, Y.C. Hsing, N. Kurata, A.C. de Oliveira, O. Panaud, S.A. Jackson, C.A. Machado, M.J. Sanderson, M. Long, D. Ware, and R.A. Wing. 2018. Genomes of 13 domesticated and wild rice relatives highlight genetic conservation, turnover and innovation across the genus *Oryza*. *Nat Genet* 50:285-296.
- Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Yildiz, M., E. Ekbic, D. Keles, S. Sensoy, and K. Abak. 2011. Use of ISSR, SRAP, and RAPD markers to assess genetic diversity in Turkish melons. *Sci. Hortic.* 130:349-353.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

Evaluation of different molecular marker systems on the genetic diversity analysis of rice species^{1,2}

Chih-Yun Cheng³ and Hsin-Mei Ku⁴

Abstract

Many different types of molecular markers can be used for genetic diversity analysis. The current problem is that we do not know how to choose the most appropriate or most efficient one from so many types of molecular markers for genetic diversity analysis. In this study, 13 *Oryza* species with relatively clear genetic relationships were used to evaluate different molecular markers such as RAPD, ISSR, SRAP and *Oryza sativa* SSR for the genetic diversity analysis. The PCR results of 20 RAPD, 18 ISSR, 24 SRAP, and 120 *O. sativa* SSR primers/primer pairs could amplified 379, 334, 878, 3750 fragments in rice species respectively. Base on results of dendrogram of 13 *Oryza* species and RP values. SRAP and *O. sativa* SSR showed more effective than RAPD and ISSR in genetic diversity analysis of *Oryza*. Combination of four different marker systems showed more effective in genetic diversity analysis base on polymorphic loci ratios, and RP value.

Key words: cluster, RAPD, ISSR, SRAP, SSR

¹. Contribution No. 524 from Taoyuan DARES, COA.

². This article is part of the author's master thesis.

³. Associate Researcher (corresponding author, kurama630@tydais.gov.tw), Taoyuan DARES, COA.

⁴. Professor, Department of agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.