

## 109 年公務人員高等考試三級考試試題

類 科：農業技術

科 目：作物育種學

考試時間：2 小時

一、面臨氣候變遷之際，種原蒐集與保存，以及探勘種原之有益性狀/基因對於育種而言，是重要的工作項目。請描述建立核心種原目的與步驟，以及保存蒐集種原方法，並評估優缺點。若在蒐集水稻 300 個種原中，發現抗同一個稻熱病菌株有 56 個，將以何種方式來探勘此抗性基因？若在蒐集水稻 300 個種原中，發現只有 1 個種原具有抗新的稻熱病菌株，又將以何種方式來探勘此抗性基因？(30 分)

1. 《考題難易》：★★★★★(最難 5 顆★)

2. 《解題關鍵》：需掌握核心種原之定義與 GWAS 運用之原理方能得分

【擬答】：

(一)將國家種原庫中現有種原，導入新型次世代定序及 SNP 基因型分析技術，整合大數據/生物資訊學分析，建立原種原收集的 1/10，卻仍保有 80%遺傳歧異度之核心種原，以降低種原篩選及種原庫維護的難度，活化種原的利用效率。從過去種原基因庫保存、繁殖等例行性作業，提升至解碼其有益基因與深入利用，儼然成為建立核心種原最重要的目的。

(二)建立核心種原步驟如下：1. 利用次世代定序建構核心種原基因體資料庫 2. 並結合核心種原的外表型調查與累積資料 3. 以全基因組關聯性分析精準定位重要性狀的參與基因 4. 進而發展基因組選拔基礎育種或分子輔助育種平台。

(三)種原保存法依保存類型及保存制度性質，可分為三大系統：1. 原地保存(現場保存；in situ conservation)：一般優先考慮的有危險種、稀有種、固有種或母樹種，將這些材料保護留存於原生育地。現場保存工作包括種原植群的調查、追蹤、保護及復育等。2. 移地保育(離場保存；ex situ conservation)：經由探索蒐集的種源帶離原生育地而保存，可分為種子基因庫(Seed bank)、花粉基因庫(Pollen genebank)及營養系種質庫(Clonal germplasm)。3. 體外保存(in vitro conservation)：植物種源傳統繁殖方式是以種子、植物體或植物體的一部分來進行，但是隨著組織培養及分子生物學的發展，遺傳資源已能夠由組織、細胞甚至是 DNA 序列來繁殖。因此體外保存即是運用組織培養技術，切取小植株、器官、組織、細胞或 DNA 等保存體，無菌保存於試管內，以慢速生長或超低溫貯藏方式。原地保存之種原或族群可以持續進行演化，而移地保育及體外保存僅降低種源流失及確保遺傳資源獲得最大的保存為目的，種原或族群無法進行演化。

(四)利用 GWAS 與對照組進行關聯分析，在目標族群內(56 個種原苗)尋找特定性狀與某些較高基因頻度的相互關係，探索具有相同性狀的植株，是否帶有相同基因，以此尋找目標群體內是否有較高特定基因頻度，進而探勘此抗性基因。

(五)利用注射接種法接種新的稻熱病菌株之葉片，並量測病斑長度作為表現型評估指標，應用混合線性模型分析，將表現型、基因型、親緣關係與族群結構等因子合併考量，進行關聯性分析結果，初步篩選出與新的稻熱病菌株抗感性高度相關的候選 QTLs 進行比對，後續仍再進行重複試驗，確認其再現性，並經由單套體分析，來探勘此抗性基因。

二、為了配合政府大糧倉計畫，推廣雜糧栽種面積。若要育成之玉米、薏苡之高產新品種，如何進行育種(包括育種方法的用途、目的與主要選種種類所帶來在育種選拔的效益)? (20 分)

1. 《考題難易》：★★★★(最難 5 顆★)

2. 《解題關鍵》：掌握異交作物與常異交作物育種之方法即可得分

【擬答】：

(一)玉米高產新品種育種方式如下：

1. 穗行選擇法是從被改良的基礎群體中，根據改良目標，按表型表現選擇 250 個優株(即 250 穗)，人選優株單穗脫粒後保存。次年將其種子一分為三，分別播種在 3 個生態條件不同的地點，這 3 個試點中，1 個試點應在隔離區內進行，另外兩個試點則不需要隔離條件。隔離區內按穗行法種植，即每穗播一行，每行就是一個家系。一般是種 4 個穗行母本，再種 1 行父本。父本種子由人選的 250 個優穗各取等量種子均勻混合而成。像通常玉米制種一樣，母本全部去雄，父本行則去掉劣株的雄穗。另外兩個不需要隔離條件的試驗地，主要目的在於對各人選家系進行異地鑑定。因此，僅按穗行種植，不再種植父本，但播種期應比隔離區早，以便為隔離區內優系的選擇提供依據。另外，3 個試驗地均最好能重複 1 次，並在一定穗行間設置對照(用原始群體作對照)，以便減少試驗誤差和有利於進行比較。乳熟期進行預選，成熟後，結合異地鑑定結果，定選 20% 的最優穗行，並從每個人選穗行中選擇 5 個最優株(5 穗)留種。人選穗行仍按單穗脫粒，次年仍按上述方法種植，進行下一輪迴的選擇。因此，這種選擇方法，一個生長季節就是一個選擇周期，加上進行了異地鑑定及設置重複和對照等田間試驗手段，並且，又是在隔離區內實行母本去雄，父本劣株去雄的條件下進行重組，因而，可在一定程度上控制基因型與環境互作，減少環境及不良基因型的影響。所以，選擇效果優於混合選擇。據國外對玉米品種海斯金黃進行改良穗行選擇 10 個輪迴的試驗結果，其產量每年的增益為 5.3%。
2. 半同胞輪迴選擇(half—Sib recurrent selection，簡記為 SRS 或 HS)這是一種最為常用的群體改良方法。具體作法是，根據預定的遺傳改良目標，在被改良的基礎群體中，選擇 100 株以上的優株自交，同時每個自交株又分別與測驗種進行測交，測驗種可為遺傳基礎比較複雜的品種，雙交種，綜合品種，複合品種，也可為遺傳基礎比較簡單的單交種和自交系或純合品系。測驗種的選擇，取決於育種方案及基因作用類型。第二年進行測交種比較試驗，經產量及其他性狀鑑定後，選出 10% 左右表現最優良的測交組合。第三年，將人選最優測交組合的相對應自交株的種子(室內保存)各取等量混合均勻後，播種於隔離區中，任其自由授粉和基因重組，形成第一輪迴的改良群體。以後各個輪迴改良按同樣方式進行，直至產量增加為止。
3. 全同胞輪迴選擇(full—sib recurrent selection，簡記為 FRS 或 FS)這是一種同時對群體的雙親進行改良的輪迴選擇方法。該方法具體作法是，根據一定的改良目標，在被改良群體中，選擇 200 株以上的優良植株，並將這些優良植株進行成對雜交(即  $S_0 \times S_0$ )，這樣就可獲得 100 個以上的成對雜交組合。第二年，利用半分法進行成對雜交組合的比較試驗，試驗中用原始群體作對照。經產量及其他性狀鑑定後，從中選出約 10% 的最優成對雜交組合。第三年，將人選優良成對雜交組合預留種子取等量均勻混合後於隔離區播種，任其自由授粉、重組，形成第一輪迴的改良群體。按同樣方式，可進行以後各個輪迴的選擇，直至產量增加為止。

(二)薏苡高產新品種育種方式如下：

目前國產薏苡單位面積產量已由每公頃 1,500 kg 提高至 3,000 kg，但仍無法與寮國進口的薏苡相競爭，因此仍須進行薏苡品種改良工作，以提高單位面積產量。

雜交及後代分離選拔



## 公職王歷屆試題 (109 高三級)

1. 人工雜交：於年春作選用具有適應性廣、強稈、抗病及產量高之臺中 1 號為母本，與具有分蘗力強、稔實率高及千粒重重之奧羽 3 號為父本進行雜交，成熟時收穫這些雜交種子。
2. 後代培育及選拔：F1 種子利用育苗箱育苗，3 葉齡時人工移植於本田，單本植，行株距 30×21cm，其後按照一般栽培管理，成熟時收穫 F1 植株及脫粒。F2 採用混合選種法，單本植，每組合種植 2,000 株。為篩選抗葉枯病及抗倒伏品種，從 F3 開始田間採重肥密植栽培，每公頃氮肥用量 270 kg，行株距為 30 × 15 cm，成熟時進行單株選拔，每組合選拔 100~200 個優良單株，經培育 5 代後選出優良系統(高產及抗病)參加新品系初級試驗。

三、利用以操作 DNA 分子生物的工具應用於作物育種，稱之為分子育種。將下列三種情境以最適當、最有效率的分子育種方法來育成新的品系/品種，以改良溫帶型梗稻(*Oryza sativa* ssp. *temperate japonica*)耐旱為例，每個方法只能應用一次，並敘述為何使用選定的方法及其優點與缺點。(每小題 10 分，共 30 分)

- (一)此耐旱性基因經由研究，發現澳洲野生稻(*O. australiensis*)的基因和溫帶型梗稻的基因序列相比後，發現此耐旱性是因為由幾個鹼基對缺失(few-bp deletion)所造成而產生。
- (二)此耐旱基因經由研究，發現只有存在澳洲野生稻(*O. australiensis*)，是由 5,000 鹼基對(5kb)轉譯成新的蛋白質而產生的抗性。
- (三)此耐旱性基因經由研究，發現在熱帶型梗稻(*O. sativa* ssp. *tropical japonica*)，由 10,000 鹼基對(10kb)轉譯成新的蛋白質。

- |  |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. 《考題難易》：★★★(最難 5 顆★)</li><li>2. 《解題關鍵》：掌握分子育種之意義與運用之方法即可得分</li></ol> |
|--|

【擬答】：

- (一)利用 CRISPR/Cas9 技術使溫帶型梗稻耐旱性基因產生數個鹼基缺失，而且此技術可以使溫帶型梗稻的基因組上可以做到不帶有來自其他物種的轉基因或核酸片段，目前利用 CRISPR/Cas9 技術研發基因編輯植物時有幾種作法。推薦的一種方法是先利用大腸菌生產 Cas9，並將其純化。同時利用體外轉錄系統(in vitro transcription)生產設計過的、具有特定序列的 gRNA。將兩者在試管中混合，製備出[Cas9-gRNA]複合體，再將其裹在奈米金粒子表面，利用基因槍的推動力把[Cas9-gRNA-奈米金粒子]送入植物之癒傷組織。或者，利用植物原生質體轉染(Protoplast transfection)技術，藉由聚乙二醇(Polyethylene glycol，簡稱 PEG)的媒介將[Cas9-gRNA]複合體送入原生質體內。在植物細胞核內[Cas9-gRNA]複合體能夠專一性的辨識出靶位 DNA，並在靶位 DNA 上創造出斷裂口，再藉由 NHEJ 修補機制在靶位 DNA 上創造出刪減或插入式的突變。接下來誘導癒傷組織進行分化，或誘導原生質體細胞壁重生以及組織分化。待長成再生植株後，以 PCR 確認靶位 DNA 是否已經產生突變。另一種作法乃是沿用開發基改植物時慣常使用的技術，也就是利用農桿菌進行植物細胞轉形的技術。首先將 Cas9 的表現卡匣和設計好的 gRNA 表現基因裝載在 Ti 質體上；接著利用農桿菌感染植物再生組織，將攜帶 Cas9 和 gRNA 基因的重組 T-DNA 嵌入受贈細胞的染色體中。在受贈細胞中表現出來的 Cas9 以及 gRNA 會組裝成[Cas9-gRNA]複合體，攻擊靶位基因，造成雙股 DNA 斷裂切口。透過細胞自我的修補機制(主要是 NHEJ)，在靶位 DNA 上產生刪減或插入式的突變。到此步驟所得到的突變植株在基因組中仍含有重組 T-DNA，所以仍然屬於基改植物的範疇。接下來讓已經變異的子代植株進行自交，在基因分離篩選過程(Segregation screen)中得到攜帶突變基因但不再擁有重組 T-DNA 片段的後代植株，這樣的植株在本質上才算是基因編輯植物。
- (二)先將澳洲野生稻耐旱性基因選殖並組裝於 Ti 質體中，藉由農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)對植物組織的感染能力、或基因槍的高壓氣體推動力，將此耐旱性目標基因插入溫帶型梗稻的

基因組中。再透過組培苗的培養與子代性狀的選拔，得到穩定攜帶轉基因的後代植株，因此這些植株歸類為基因改造生物(Genetically modified organism) (簡稱基改作物、或 GMO)。由於操作技術的因素，基改作物必然帶有轉基因和來自其他物種的核酸片段(例如胡瓜嵌紋病毒的 35S 轉錄啟動子、農桿菌 T-DNA 遺留痕跡、篩選標記基因等)；另外一項特徵就是轉基因在溫帶型水稻染色體上的插入位點是逢機的，因此基改行為可能導致一些非預期的遺傳效應。

- (三)由於此耐旱性基因是 10,000 鹼基對(10kb)所組成，因其基因片段太大，故無法利用農桿菌或基因槍方式進行轉殖，所以可以利用分子標記輔助育種方式進行改良。首先先將熱帶型水稻與溫帶型水稻雜交，雜交後的第一個世代稱為 F1，在 F1 中利用分子輔助育種選出具此耐旱性基因的品系，再與溫帶型水稻進行回交，產生的新後代 (BC1F1) 同樣再以分子輔助育種的方式挑選具上述基因的後代，重複同樣步驟四次使得雜交水稻的基因組成愈趨近於溫帶型水稻，同時也具有帶型水稻耐旱的特性，四次回交後產生的子代 (BC4F1) 再進行雜交產生 BC4F2，所以傳統的育種方法無法透過基因快篩的方式選拔優秀的子代，只能透過外表型的觀察進行，在廣大的子代基因組成中，要挑選出僅具有特定基因的優秀品系有如大海撈針，利用「分子標誌輔助育種」，則能協助育種家更快篩選具有特定基因組成的新品種。

四、面對氣候變遷，需要從近源野生種擴大現有栽培種的基因池，來達到抗生物逆境、耐非生物逆境特性，以朝向韌性農業。然而，進行種間或屬間雜交常遇到一些困難。請說明遺傳上造成困難之處，以及常用於克服種間或屬間困難的方法。(20 分)

1. 《考題難易》：★★★(最難 5 顆★)

2. 《解題關鍵》：掌握遠緣雜交之意義與克服之方法即可得分

【擬答】：

(一)遠緣雜交育種常見的障礙大致上可以分為三階段，包括受精前之親本間雜交不親和、雜種胚敗育死亡和雜交種植株稔實性低甚至不稔性等。雜交不親和通常指受精前花粉在柱頭無法萌芽，或花粉雖可萌芽但花粉管的伸長受阻無法到達子房內的胚珠位置，所以雜交不親和的表現方式一般為花粉黏合性降低或花粉管生長遲緩或分叉畸形，因而阻礙了受精作用的發生，雜交授粉後初期受花粉刺激子房雖然有可能顏色轉綠甚至稍微膨大，但是往往在短時間內即轉為黃化脫落。雜種胚的敗育則是指雜交的障礙發生在受精之後，有三種表現方式：1. 植物在雙重受精後，雜種胚和胚乳不能正常發育，胚乳發育畸型影響養份之供應與輸送，導致雜種胚的分化受到抑制；2. 雜種胚可以正常分化發育，但是雜交種子接近成熟時，雜種胚敗育死亡；3. 雜交種子雖然有胚，但不發芽，有的雖能發芽，但苗期容易死亡不能成株。為了解決雜交胚敗育的問題，未成熟胚培養是最佳途徑之一，可以避免雜交胚的萎縮退化。遠緣雜交種染色體的配對異常或細胞核與細胞質的不協調導致植株無法正常地行使減數分裂，是造成雜種發生生理性雄不稔或稔實性低的主因，無法得到自交後代。

(二)慎選適當育種親本及基因型外，可以在蕾期趁著花粉萌芽抑制物質尚未形成前進行授粉，有助於花粉的萌發與花粉管的伸長；或採用重複大量授粉增加植物受精機會。部分育種者利用植物生長調節劑刺激花粉萌發增加受精機率，或是改變生長環境條件如降低溫度或光照以延長授粉後雌蕊生育時間，及用經輻射處理之花粉，或是以氯化鈉溶液塗抹柱頭配合蕾期授粉都有助於降低遠緣雜交不親和性問題。遠緣雜交種胚衰敗死亡主要是由於胚和胚乳發育異常、胚乳提早退化萎縮，因此在胚發生敗育之前取出進行離體培養拯救，在某種程度上可以克服雜交胚敗育障礙。胚拯救技術是指在適當時機下將子房、胚珠或胚切離母體，在無菌的條件下放置在人工製備的培養基，提供適當的營養組成及適宜的溫度、光照等生長條件使其再生成為植株之技術。遠緣雜種基因組分別來自異種或異屬的兩親本，因此多以異源二倍體(allodiploid)或異源三倍

## 公職王歷屆試題 (109 高考三級)

體(allotriploid)雜種呈現，對於種子繁殖作物而言，雜種第一代無法立即應用於產業，一般多利用回交育種親來逐漸提高遠緣雜種的稔實性，回交配合胚培養技術，隨著代數增加，稔實性愈高。另一種提高遠緣雜種稔實性的方法為染色體倍加技術，將異源二倍體或異源三倍體的遠緣雜種第一代以秋水仙素處理植株芽體，誘導細胞染色體倍加成為異源四倍體（或稱複二倍體）或異源六倍體，遠緣雜種經過染色體倍加後，染色體配對平衡可以進行正常的減數分裂，藉以改變雜種稔實性。

公  
職  
王