

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系



碩士論文

Department of Agronomy

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

利用分子標誌輔助回交選育

早熟之秈糯稻品系

Breeding Early Maturing and Glutinous Lines of Indica
Type Rice with Marker-Assisted Backcross Selection

劉長軒

Chang-Hsuan Liu

指導教授：林順福 博士

Advisor : Shun-Fu Lin, Ph. D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

誌謝

很幸運的能加入順福老師的研究室，這裡是一個大家庭，有宇宏學長的時事點評分析；世宗學長的「我很照顧你但就是不讓你知道」；思妤學姊的疑難雜症全解密；還有順福老師的未來人生展望異言堂，都讓我獲益良多，對自己以後的道路有了更鮮明的藍圖！

感謝口試委員農業試驗所作物組賴明信研究員、高雄農業改良場吳志文研究員及台南區農改場嘉義分場陳榮坤副研究員對本論文的指正和建議，使論文可以更加完善。另外特別感謝台南區農改場嘉義分場提供研究材料，以及羅正宗場長對研究計畫的支持，讓本研究可以順利進行。

謝謝龍欣學姊每次的高鐵站接送，並給田間經驗不足的我很多祕訣和幫助；謝謝榮坤學長告訴我很多調查上的技巧，也讓我看見原來研究生活是這麼樣熱血沸騰！還有性狀調查時，被我友情感召的朋友品堯、婷云、冠秀、鎮宇、炫宇、晏丞、佑澤、苡廷、茹鴻、緯宸、師瑋、家卉、湛鈞，雖然嘴上說要搞破壞不讓我畢業，卻還是非常用心地幫忙，謝謝你們！

最後要謝謝我的家人，提供一個無後顧之憂的環境給我，讓我可以求學的過程沒有經濟壓力，也相信並支持我在人生各階段的選擇，謝謝你們。

中文摘要



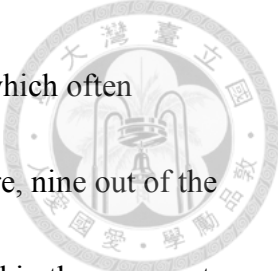
為配合臺灣中南部輪作制度的需求，農民希望栽培具早熟特性的水稻品種，然而現有的地方品種大陸秈雖具有早熟特性，所收穫稻穀卻需儲藏半年以上才可供加工利用，且國內目前無早熟秈糯品種。因此本研究之目的是將台稈糯 1 號品種所具有的低糊化溫度(*alk*)、多穎花數(*SPIKE*)及糯性(*wx*)基因利用分子標誌輔助回交育種的方法轉移至大陸秈品種，希望能選育早熟及適合加工用的秈糯稻優良品系。本研究成功篩選出與 *alk*、*SPIKE* 及 *wx* 等三個目標基因緊密連鎖的 SSR 分子標誌，其連鎖距離分別為 0.12 cM、0.26 cM 及 3.66 cM；並由 252 組標誌中篩選出 49 組具多型性且易判別的 SSR 分子標誌，即每對染色體至少有 4 個分子標誌可供遺傳背景分析使用。本研究先利用 2 個目標基因之分子標誌確認雜交成功的 F_1 植株，接著進行 87 株 BC_1F_1 植株的前景選拔及抽穗期和株高的外表性狀選拔，並且在 278 個 BC_2F_1 個體進行前景選拔及抽穗期、株高、穗數及主穗粒數等外表性狀選拔，共選獲 10 株優良 BC_2F_1 植株並自交以產生 BC_2F_2 種子，這些植株除了具有三個目標基因外，尚具有與輪迴親相近的稔實率，並無因秈稻與稈稻雜交所造成稔實率下降的問題。此外獲選植株中有 9 株與輪迴親遺傳背景相似度低於 85%，後續選獲品種可望以非實質衍生品種的條件申請品種權。本研究採用新提出的回交後代重組自交系的育種方法，即僅回交兩代並配合重要性狀外表性狀選拔超越輪迴親的品系，本研究結果初步證實此一育種方法的有效性。

關鍵字：糯稻、成熟期、穎花數、分子輔助回交

Abstract



To fit for the rotation system in central and southern Taiwan, rice farmers prefer growing early maturing variety. Although there is an early maturing local variety available, Da-lu-xian, its grains need to be stored more than six months before procession. Thus, the purpose of this study was to transfer low gelatinization temperature (*alk*), high spikelet number (*SPIKE*), and glutinous (*wx*) genes from Taikeng Waxy No.1 variety to Da-lu-xian with marker-assisted backcross selection method and to select early maturing, suitable for processing, and glutinous lines of indica type rice. In this study, we successfully developed three SSR markers closely linked with target genes, *alk*, *SPIKE* and *wx*, respectively. Correspondingly genetic distances between markers and genes are 0.12 cM, 0.26 cM and 3.66 cM. We screened 49 polymorphic markers from 252 SSR markers and at least four markers for genetic background analysis were distributed on each chromosome. At first, we confirmed F₁ hybrids with markers of two target genes and then performed foreground selection and phenotypic selection based on days to heading and plant height, for 87 BC₁F₁ plants. Then, we carried out foreground selection and phenotypic selection according to days to heading, plant height, spike number and grain number of principal spike, for 278 BC₂F₁ plants. Eventually, we selected ten superior BC₂F₁ plants to produce BC₂F₂ seeds. Besides possessing three target genes, these superior plants have normal fertility rates



close to the recurrent parent. No decrease in fertility rate was found which often occurred in a cross between indica and japonica type rice. Furthermore, nine out of the ten selected plants had similarity less than 85% of genetic background in the recurrent parent providing qualification for plant variety right without the limit of essentially derived variety. In this study, we adopted a new breeding method of backcross recombinant lines. That is backcrossing twice and selecting lines superior to recurrent parent in terms of important traits. The effectiveness of the method has preliminarily proved according to the result of this study.

Key word: Glutinous rice, Maturity, Spikelet number, Marker-assisted backcross



目錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
Abstract.....	iv
目錄.....	vi
表目錄.....	viii
圖目錄.....	ix
附圖表.....	x
一、前言.....	1
二、前人研究.....	2
三、材料與方法	
(一) 試驗材料.....	4
(二) 分子標誌分析	
1. DNA 抽取.....	5
2. 引子(Primer)合成.....	5
3. PCR 及瓊脂膠電泳分析.....	6
(三) 遺傳距離估算.....	7
(四) 外表型測量.....	7
(五) 遺傳組成估算.....	8
(六) 糯性檢測.....	8
四、結果	
(一) 分子標誌篩選	
1. 與 <i>ALK</i> 、 <i>SPIKE</i> 及 <i>Wx</i> 等三對目標基因連鎖分子標誌之篩選.....	9
2. 供遺傳背景分析分子標誌之篩選.....	12



(二) 雜交與回交後代之選拔	
1. 雜交產生 F ₁ 種子及其鑑定.....	14
2. BC ₁ F ₁ 世代植株之選拔.....	15
3. BC ₂ F ₁ 世代植株之選拔.....	16
4. BC ₂ F ₂ 世代種子之糯性檢測.....	21
5. 綜合選拔結果.....	23
(三) 雜交親本大陸秈品種遺傳純度之分析.....	23
(四) RM17486 與枝梗數關聯性之檢定.....	24
五、討論	
(一) 分子標誌篩選.....	26
(二) 雜交與回交後代選拔.....	27
(三) 大陸秈非純系的可能影響.....	28
(四) 秈稈稻雜交後代稔實率問題.....	28
(五) <i>SPIKE</i> 基因對枝梗數的影響.....	29
(六) 糯性偏離孟德爾分離率.....	29
(七) BRL 與品種權.....	30
六、結論.....	31
七、參考文獻.....	32



表目錄

表一、101 組 SSR 分子標誌之多型性分析及其在水稻各染色體之分布.....	12
表二、以與目標性狀緊密連鎖之三組分子標誌分析 BC ₁ F ₁ 世代之基因型.....	15
表三、以與目標性狀緊密連鎖之三組分子標誌分析 BC ₂ F ₁ 世代之基因型.....	17
表四、獲選 10 株 BC ₂ F ₁ 植株之抽穗期、穗高及穗數.....	17
表五、獲選之 10 株 BC ₂ F ₁ 植株遺傳背景與穀粒性狀.....	18
表六、BC ₂ F ₁ 植株之不同 RM17486 分子標誌(與 <i>SPIKE</i> 基因連鎖)基因型之 枝梗數比較.....	24



圖目錄

圖一、本研究使用之回交重組自交系育種方法流程圖.....	5
圖二、本研究所篩選與三對目標基因緊密連鎖之分子標誌.....	10
圖三、 <i>ALK</i> 、 <i>SPIKE</i> 及 <i>Wx</i> 等三個目標基因與前景選拔分子標誌間之 物理及遺傳距離示意圖.....	11
圖四、本研究進行前景選拔及背景選拔所使用之分子標誌及其物理圖譜.....	13
圖五、利用分子標誌檢測兩親本雜交所得之 F_1 單株.....	14
圖六、編號#46-04 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成.....	19
圖七、編號#93-68 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成.....	20
圖八、以透光度(A)與碘化鉀染色(B)法檢測糯性或非糯性之 BC_2F_2 種子.....	22
圖九、以分子標誌 RGNMS2176 分析 BC_1F_1 世代植株之部分電泳圖譜.....	25
圖十、以分子標誌 RGNMS2176 分析 24 株大陸私之電泳圖譜.....	25



附圖表

附圖一、編號#37-37 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成.....	40
附圖二、編號#46-01 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成.....	41
附圖三、編號#82-36 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成.....	42
附圖四、編號#82-41 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成.....	43
附圖五、編號#82-60 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成.....	44
附圖六、編號#86-16 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成.....	45
附圖七、編號#93-34 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成.....	46
附圖八、編號#93-53 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成.....	47
附表一、 BC_1F_1 世代之 3 組前景選拔分子標誌基因型.....	48
附表二、 BC_2F_1 世代之 3 組前景選拔分子標誌基因型.....	49
附表三、部分 BC_2F_1 世代植株之一次與二次枝梗數資料.....	52

一、前言



水稻為禾本科稻屬植物，是世界重要作物之一，同時也是臺灣民眾的主食，佔最大的作物栽培面積，目前臺灣主要栽培的是亞洲稻(*Oryza sativa* L.)的亞種—秈稻(*Indica*)與粳稻(*Japonica*)。

在綠色革命後，臺灣的水稻產量不斷提高，但隨之而來的是生產過剩造成的價格下跌問題，因此政府鼓勵開發多功能性的水稻品種，以另闢市場並兼顧糧食安全問題，目前糯米價格較非糯米高，顯示糯稻育種及栽培管理仍有發展潛力。

儘管經過綠色革命，提高單位面積產量一直是水稻育種的重要目標之一，其中 *SPIKE* 基因與二次枝梗數和穎花數有關，而普遍存在於熱帶型粳稻中的等位基因可以提升二次枝梗數及穎花數，進而增加產量，因此 *SPIKE* 基因在改良秈稻產量的應用上具有潛力(Fujita *et al.*, 2013)，而王等(2014)發現常見粳稻優良品系多具有 *SPIKE* 基因。


目前彰化、雲林及臺南等地區在大蒜或甘藷等作物收成後，常種植早熟的地方品種大陸秈作為間作，但大陸秈為硬秈，須儲放後才可以進行加工，於是衍生出需要儲放空間及保存時間等問題，因此若可以將大陸秈改良成為秈糯水稻品種，將可解決此問題，而降低糊化溫度將有利於秈糯水稻品種的加工。台稈糯 1 號是早熟的糯稻品種，具有良好的抗病性與加工品質，因此本研究以大陸秈與台稈糯 1 號為親本進行分子標誌輔助回交育種，希望將與糯性、低糊化溫度及多穎花數的相關等位基因導入大陸秈，以選育早熟、不同糊化溫度之高產秈糯水稻品種。



二、前人研究

常用於描述水稻烹調與食味品質的性狀包含：表觀直鏈澱粉含量(apparent amylose content, AAC) (Juliano, 1985)、糊化溫度(gelatinization temperature, GT) (Little *et al.*, 1958)、膠體軟硬度(gel consistency, GC) (Cagampang *et al.*, 1973)與黏度測定資料(rapid visco analyser profile, RVA) (Bason and Blakeney, 2007)，其中直鏈澱粉含量(amylose content, AC)與 GC 呈現負相關(Sun *et al.*, 2005)，而黏度由支鏈長與支鏈澱粉含量決定(Jane *et al.*, 1999)，因此 AC 和支鏈澱粉結構是決定加工與食味品質的重要因子(Ong and Blanshard, 1995)。在高等植物中有兩類澱粉合成酶，分別是澱粉粒結合合成酶(granule-bound starch synthase, GBSS)，能延長直鏈澱粉的鏈長，另一類為可溶性澱粉合成酶(soluble starch synthase, SS)，參與支鏈澱粉合成(Preiss and Sivak, 1996)。


水稻根據 AAC 可分為糯性(<2%)、極低(2-9%)、低(10-20%)、中(20-25%)與高(>25%)直鏈澱粉含量(Mutters and Thompson, 2009)，其中 AC 含量高的品種於烹煮後較乾、冷卻後較硬；而 AC 含量低的品種於烹煮後則較軟且黏(Juliano, 1971)。然而在相同 AAC 下仍會有不同的黏度(Yan *et al.*, 2005)，因此育種時可以結合 AAC 與黏性等性狀，以共同評估食味品質(Caffagni *et al.*, 2013)，水稻 AAC 與黏性受到負責調控 GBSSI 的 *Wx* 基因控制(Bao *et al.*, 2002, 2004)，目前已發現有 5 種等位基因(Sano, 1984; Wang *et al.*, 1995; Mikami *et al.*, 2008)，私稻中大部份具有 *Wx^a*，粳稻則多具有 *Wx^b* (Sano *et al.*, 1986)，而當 *Wx* 基因無法發揮正常功能時，水稻呈糯性(Wanchana *et al.*, 2003)，除了糯性與黏性以外，*Wx* 基因亦會影響膠體軟硬度 (Fan *et al.*, 2005)。



SS 主要可以分為三大類，SSI、SSII 及 SSIII，其中 SSII 與支鏈澱粉延長有關，SSIIa 為第 6 條染色體的 *ALK* 基因產物(Umemoto *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2003)，是影響 GT 的關鍵基因(Umemoto *et al.*, 2004)，能降低支鏈澱粉短鏈的比例，當支鏈澱粉短鏈比例下降時，澱粉呈高 GT 並且較容易硬化(Umemoto *et al.*, 2008)。相較於中、低 GT 的蒐集系(accessions)，高 GT 的水稻蒐集系需要更多量水、更高溫度與更長時間烹煮(Pandey *et al.*, 2012)。SSIIa 蛋白使秈稻與粳稻在支鏈澱粉結構及澱粉品質上呈現明顯差別，大部分秈稻的 SSIIa 蛋白具備活性，而大多數粳稻的 SSIIa 蛋白呈現低或無活性，當 SSIIa 蛋白失去功能時，會影響支鏈澱粉短鏈延長而使短鏈比率增加，造成 GT 下降(Nakamura *et al.*, 2002, 2005)。

高產量是水稻育種的重要目標之一，水稻的產量構成要素包含單位面積植株數、每株穗數、每穗穎花數、稔實率和穀粒重等，許多與產量相關的基因已經被發現，其中位於第 4 條染色體的 *SPIKE* 基因與二次枝梗數、穎花數、葉片大小、根系和維管束數目有關，且通過回交將粳稻的 *SPIKE* 等位基因導入秈稻中可提高產量，顯示 *SPIKE* 基因具有提升秈稻產量的潛力(Fujita *et al.*, 2013)。

分子標誌輔助選種(marker assisted selection, MAS)應用於水稻已有許多成功的例子，包括抗生物逆境選種(如抗稻熱病、抗白葉枯病、抗病毒性病害及抗褐飛蝨等)、抗非生物性逆境選種(如耐旱、耐鹽、耐寒及耐淹水等)、稻米品質改良(如外觀、香氣及食味等)及其他重要農藝性狀(如株高、抽穗期、產量及其構成要素等)(Jena and Mackill, 2008)，而分子標誌輔助回交育種(marker-assisted backcross, MAB)是 MAS 的應用之一，目前已成功應用於水稻耐淹水基因(Iftekharruddaula *et al.*, 2011)、抗白葉枯病(Basavaraj *et al.*, 2010)及抗褐飛蝨等性狀的改良，陳等(2010)利用此方法改良越光品種的抽穗期以育成台南 16 號，亦為 MAB 的另一個



成功實例。而郭等(2014)及蔡(2015)分別利用 MAS 方法選拔雜交及回交後代的低白垩質品系，均獲得良好結果。基於轉移目標基因與保留輪迴親優良特性的回交育種觀念，作物分子育種家提出選育回交後代重組自交品系的育種方法(backcross recombinant lines, BRL)，有別於一般回交育種方法需要回交 3-4 代(輪迴親遺傳背景達 90%以上)，此種方法僅回交 1-2 代(輪迴親遺傳背景低於 90%)，不但可縮短育種年限，且在回交第一代(BC₁)或第二代(BC₂)時進行其他重要農藝性狀選拔，利用此方法已成功選育耐淹水之水稻新品種(Iftekharuddaula *et al.*, 2015)。

三、材料與方法

(一)試驗材料

本研究利用選育回交後代重組自交品系(BRL)的方法(Iftekharuddaula *et al.*, 2015)，以地方種大陸私與台稈糯 1 號為親本雜交產生 F₁ 後代，並回交 2 代再經自交產生 BC₂F₂ 後代，於世代推進同時，利用分子標誌輔助前景選拔及分析遺傳背景，並配合田間調查重要農藝性狀進行外表型選拔，如抽穗期、株高、粒數及穗數等，以期能選育遺傳組成不局限於輪迴親(大陸私)，且在其他重要農藝性狀亦有改進效果的早熟高產私糯水稻品系。

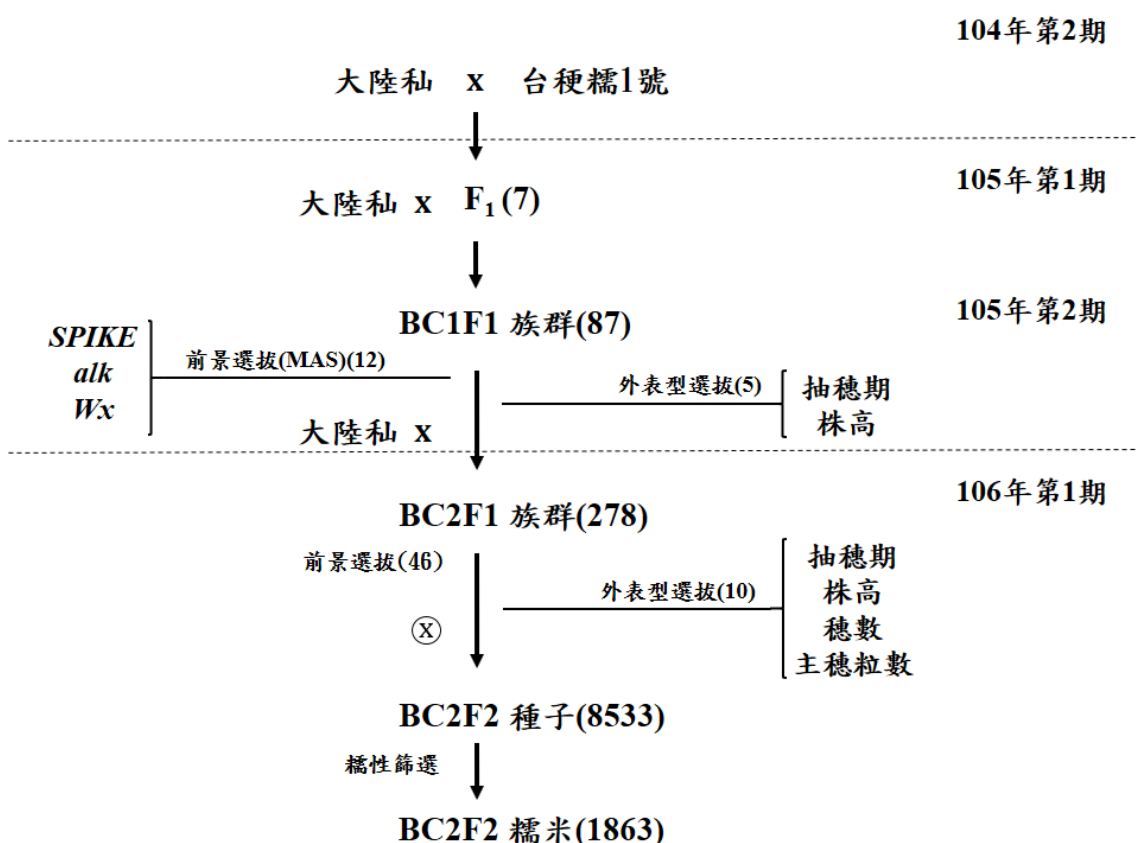
本研究的材料分別於 104 年第二期作、105 年第一期與第二期作及 106 年第一期作種植於臺南區農改場嘉義分場，其中 F₁ 世代取 7 株進行回交，以生產 BC₁F₁ 世代種子，並於田間種植的 87 株 BC₁F₁ 單株中選拔 5 株繼續回交，生產 BC₂F₁ 世代種子，再於溫室種植的 278 株 BC₂F₁ 之中前景選拔 46 株，再經外表型選拔選出其中 10 株早熟、高度適中且穗數與粒數多的單株，並由此 10 株 BC₂F₁ 植株自交產生 BC₂F₂ 世代種子共計 8533 粒以進行單株的糯性檢測(圖一)。



(二)分子標誌分析


1.DNA 萃取

本研究使用兩種 DNA 萃取方法，其中兩親本與 F₁ 世代植株的 DNA 萃取，是分別剪取約 0.5 g 的葉片放入 2.0 mL 的離心管中，再加入 1 顆直徑 3 mm 與 4 顆直徑 1 mm 的玻璃珠，並先置於冷凍乾燥機，在溫度為 -40°C；壓力為 -700 hPa 條件下持續冷凍乾燥 24 小時，以強化小型玻璃珠均質機(Mini-Bead Beater-8)打碎葉片的效果，葉片成粉末狀後，加入 CTAB 萃取液，依照 Doyle and Doyle (1990)



圖一、本研究使用之回交重組自交系育種方法流程圖

Fig. 1. A flow chart of BRL (backcross recombinant lines) breeding method used in this study



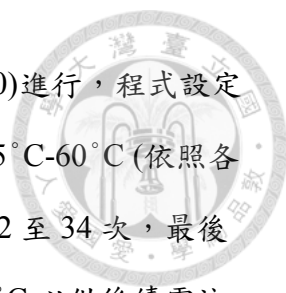
所改良的 CTAB 法萃取 DNA，並利用微量分光光度計(NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer)測量 DNA 品質及濃度，需同時符合 OD260/OD230 比值於 2.1 至 2.3 間，與 OD260/OD280 比值於 1.8 以上，才保存於攝氏-20°C，供後續研究分析使用。而 BC₁F₁ 與 BC₂F₁ 世代單株的 DNA 萃取是分別剪取約 0.5 cm 的葉片至 96 孔盤或 8 孔的 PCR 反應管中，再加入 100 μL 的植物葉片專用快速萃取液 (QuickExtraction™ Plant DNA Extraction Solution, EPICENTRE Biotechnologies)，同時確認葉片完全浸泡於萃取液中，並置於熱循環反應器(Gene Amp™ PCR System 9700)進行 65°C 持續 6 分鐘，98°C 持續 2 分鐘的程序加速反應，最後吸取溶液使其與葉片分離，並保存於 4°C 環境供後續研究分析使用。

2. 引子合成

本研究使用的引子主要參考本研究室先前篩選得到在台農 67 號與台南 13 號間具多型性的 SSR 分子標誌，根據物理圖譜位置選擇分子標誌以進行兩親本間的多型性篩選，並利用 Gramene 水稻資料庫的 SSR 分子標誌資源進行補充。

3. PCR 及瓊脂膠電泳分析

將萃取出的 DNA 原液稀釋成濃度為 20 ng/μL 的工作液，以進行聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)擴增特定的 DNA 片段，其中 PCR 的反應物包括：DNA 工作液 2 μL、2.0 μM forward primer 1.5 μL、2.0 μM reverse primer 1.5 μL、MixRed 5μL，共 10 μL，本研究所使用的 MixRed 為 Ampliqon 公司產品，其組成包括：3 mM MgCl₂ PCR buffer、0.4 mM dNTP、0.2 units/μL Ampliqon Taq DNA polymerase 及 Inert red dye and stabilizer。



PCR 反應採用熱循環反應器(Gene Amp™ PCR System 9700)進行，程式設定如下：以 94°C 維持 5 分鐘，再進入過程為 94°C 維持 30 秒；45°C-60°C (依照各引子黏合溫度設定)維持 30 秒；72°C 維持 20 秒的設定，循環 32 至 34 次，最後以 72°C 維持 10 分鐘，結束程式後將擴增的 PCR 產物保存於 4°C 以供後續電泳分析使用。

依照 PCR 產物間的長度差距選擇使用 2.0 %、2.5 %或 3.0 % SFR (Super Fine Resolution, Amresco)的瓊脂膠片進行電泳分析，先將 PCR 產物 3 μ L 注入浸置於 TBE 緩衝溶液的瓊脂膠片中，並以電壓 80-100 伏特通電持續 120-140 分鐘，隨後以 10 μ g/mL 溴化乙錠(ethidium bromide, EtBr)染色 5-15 分鐘，再以清水退染 10-15 分鐘，再照射紫外光並拍照記錄電泳結果供後續分析。

(三)遺傳距離估算

利用 Oryzabase 網站所提供的遺傳圖譜，估算前景選拔分子標誌與目標基因間的距離，首先自目標基因所在的連鎖群往分子標誌的方向選取最接近連鎖群，並將二連鎖群間的遺傳距離平均分配至每一單位的物理距離，最後以分子標誌與目標基因的物理距離估算兩者間的遺傳距離。

(四)外表型測量

本研究之抽穗期(days to heading)計算自種子發芽至第一穗抽出期間的日數；株高的量測為土表至全株最高穗的高度；粒數計算自單株；一次枝梗與二次枝梗數計算自最高穗。



(五)遺傳組成估算

利用分子標誌基因型估算植株輪迴親的遺傳組成比例，兩分子標誌基因型涵蓋範圍以之間的物理位置中點為界，將輪迴親同型結合基因型的區域加權為 1，異型結合的區域加權為 0.5，加總後再除以 12 條染色體全長。

(六)糯性檢測

利用支鏈澱粉與直鏈澱粉的透光程度不同，以區分糯性或非糯性米粒，不透光的米粒為糯性米粒，剩餘不易以透光度判別的糙米，則利用碘液與澱粉複合的呈色原理進行判別，染色後呈淡紫紅色的為糯性，呈藍黑色的為不具糯性。

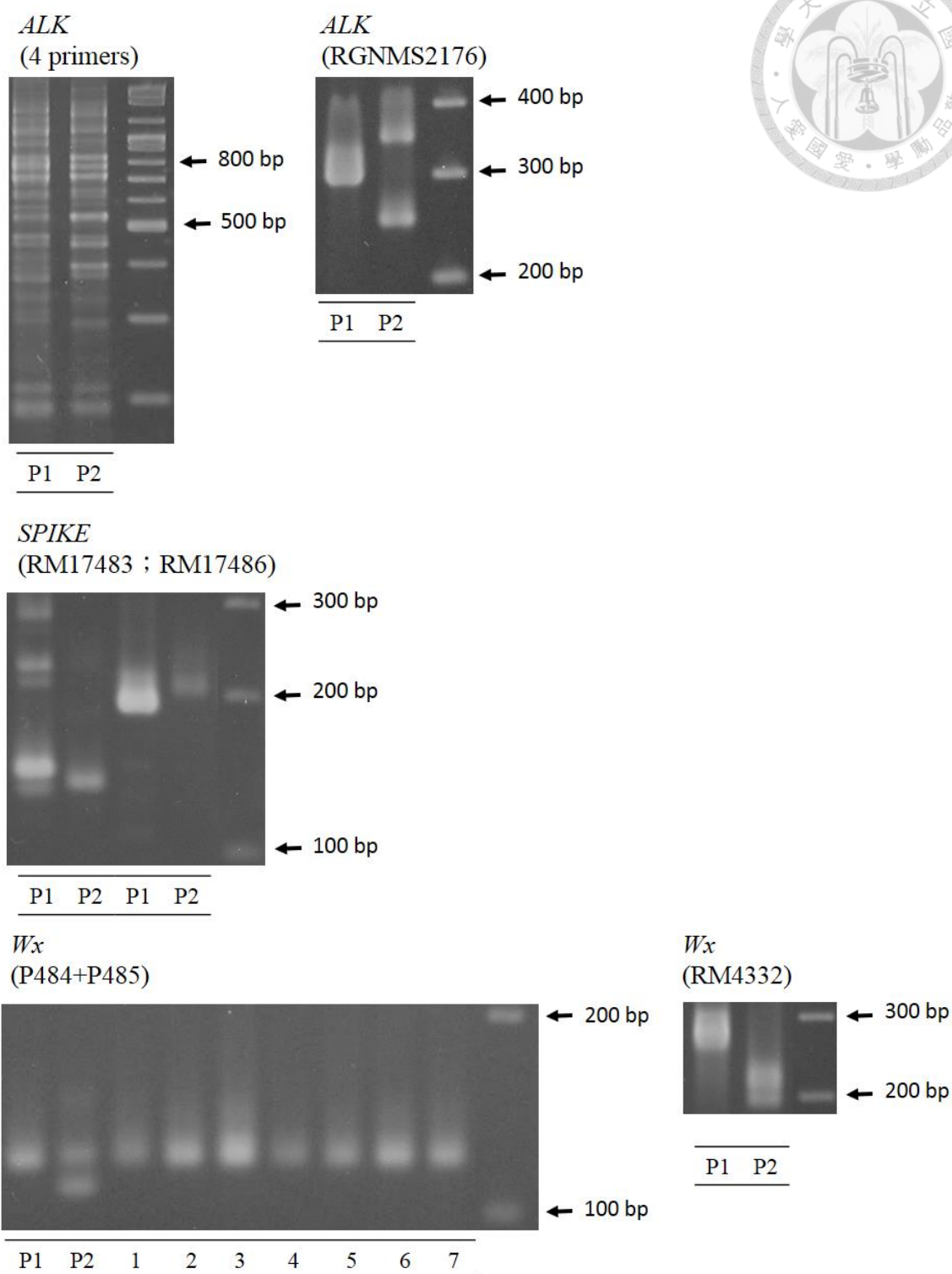


四、結果

(一)分子標誌篩選

1.與 *ALK*、*SPIKE* 及 *Wx* 等三對目標基因連鎖分子標誌之篩選

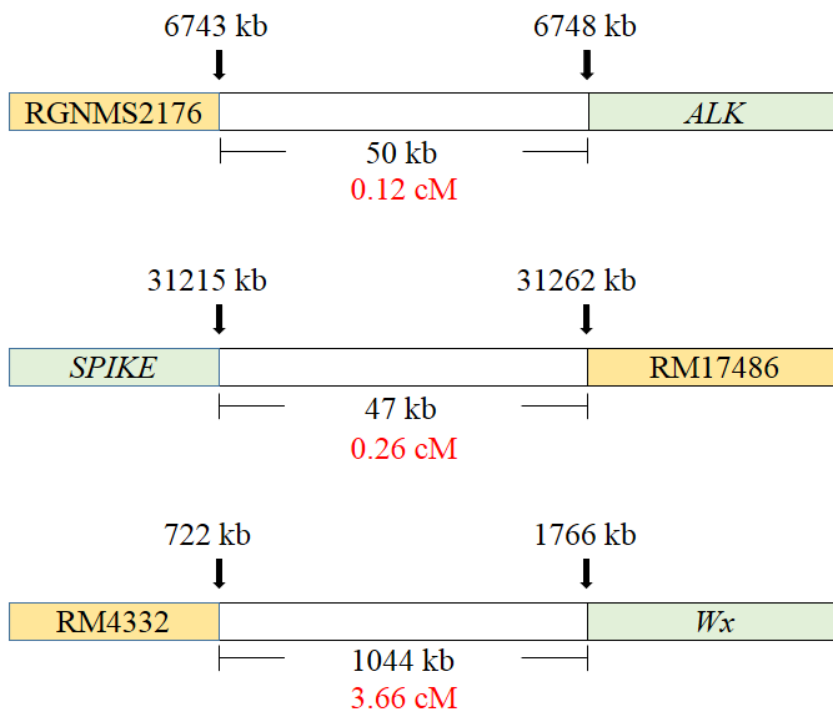
本研究針對三對欲導入的目標基因，進行緊密連鎖的分子標誌篩選，即以兩雜交親本(大陸私及台稈糯 1 號)為材料進行多型性分析，以利使用於雜交與回交後代的前景選拔。首先在 *ALK* 基因座上測試設計較為特殊的分子標誌，此設計同時利用 4 條引子進行多型性分析，並可以產生 832 bp (*alk* 專一條帶，米飯冷卻後較不易硬化)及 543 bp (*ALK* 專一條帶，米飯冷卻後較易硬化)的電泳條帶(Bao *et al.*, 2006)，但由於結果中有較雜的電泳條帶出現而干擾判別(圖二)，因此測試另一與 *ALK* 基因緊密連鎖的 SSR 分子標誌 RGNMS2176，其結果為易判別的共顯性電泳條帶(圖二)；於 *SPIKE* 基因的測試中，使用與之緊密連鎖的 RM17483 及 RM17486 等 2 組 SSR 分子標誌進行多型性分析，結果均呈共顯性，而其中分子標誌 RM17486 的多型性較易判別(圖二)；利用可區別 *Wx* 基因內不同 (CT)_n 重複序列的 P484 及 P485 等 2 條引子(Ayres *et al.*, 1997)，雖可於兩親本間產生多型性，但因為兩共顯性條帶過於接近不易判別(圖二)，故測試另一與 *Wx* 基因連鎖的 SSR 分子標誌 RM4332，其電泳結果為易判別的共顯性條帶(圖二)。根據以上結果，篩選出 RGNMS2176、RM17486 及 RM4332 等 3 組共顯性分子標誌，依序可應用於 *ALK*、*SPIKE* 及 *Wx* 等三對目標基因在雜交及回交後代的前景選拔，分子標誌與基因間估算遺傳距離分別為 0.12 cM、0.26 cM 及 3.66 cM (圖三)，均與目標基因緊密連鎖。



圖二、本研究所篩選與三對目標基因緊密連鎖之分子標誌

Fig. 2. Selected markers linked to 3 target genes

註：P1 為台稈糯 1 號；P2 為大陸秈；1-7 為 7 株 F₁ 世代植株



圖三、*ALK* (A)、*SPIKE* (B)及 *Wx* (C) 等三個目標基因與前景選拔分子標誌間之物理及遺傳距離示意圖

Fig. 3. An illustration of distances between forward selection markers and targeted genes, *ALK* (A), *SPIKE* (B) and *Wx* (C)



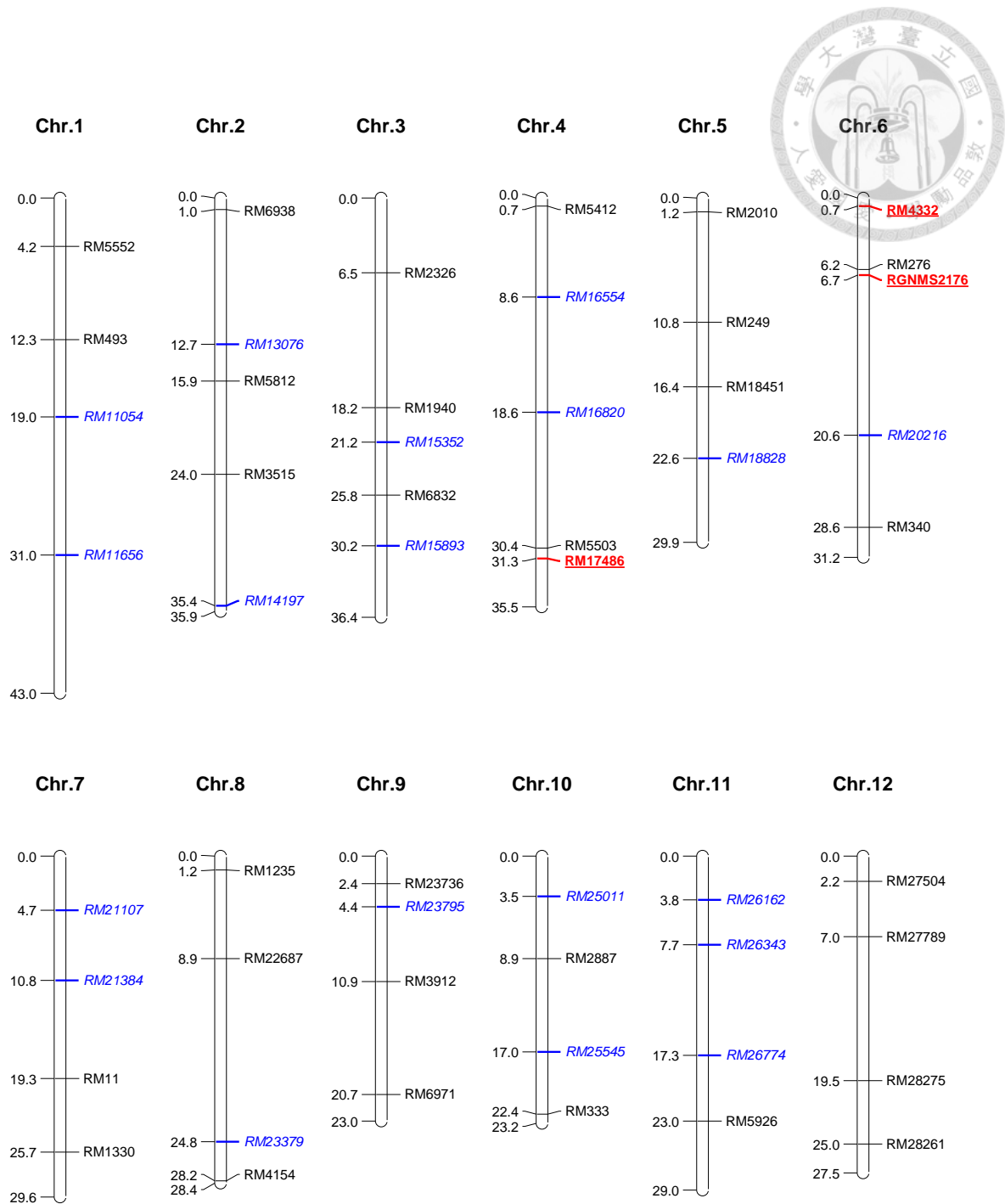
2. 供遺傳背景分析分子標誌之篩選

為了瞭解回交育種後代的輪迴親遺傳比例，本研究首先依研究室先前所建立的常用分子標誌資料設計 101 組 SSR 分子標誌對兩親本進行多型性分析，結果得到 56 組具有多型性，並於其中選出均勻分布於各染色體且易判別的 30 組共顯性分子標誌，而多型性分子標誌數目仍不足 4 個的染色體上，再利用 Gramene 水稻資料庫設計引子進行補充，基於物理圖譜上均勻分布的原則追加 151 組 SSR 分子標誌進行多型性檢測，合計共篩選 252 組 SSR 分子標誌，完成在 12 條染色體上至少各有 4 個分子標誌(圖四)可供遺傳背景的評估利用。常見私稈雜交親本間的分分子標誌多型性約為 20%，而於本研究 101 組分子標誌的測試中，12 條染色體的多型性平均高達 55%，且最低仍有 38.5% (表一)，顯示兩親本大陸私與台稈糯 1 號之間有較大的遺傳距離，因此在 BRL 僅回交 2 代的育種方法下更有機會選拔出超越親本表現的後代。

表一、101 組 SSR 分子標誌之多型性分析及其在水稻各染色體之分布

Table. 1. Polymorphism analysis of 101 SSR markers distributed on each chromosome of rice

	Chromosome												Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Tested markers	6	10	6	9	6	6	11	6	12	6	10	13	101
Polymorphic markers	5	4	4	4	4	6	5	4	5	4	6	5	56
Polymorphism (%)	83.3	40.0	66.7	44.4	66.7	100	45.5	66.7	41.7	66.7	60.0	38.5	55.5



圖四、本研究進行前景選拔及背景選拔所使用之分子標誌及其物理圖譜

Fig. 4. Physical map of forward and background selection markers used in this study

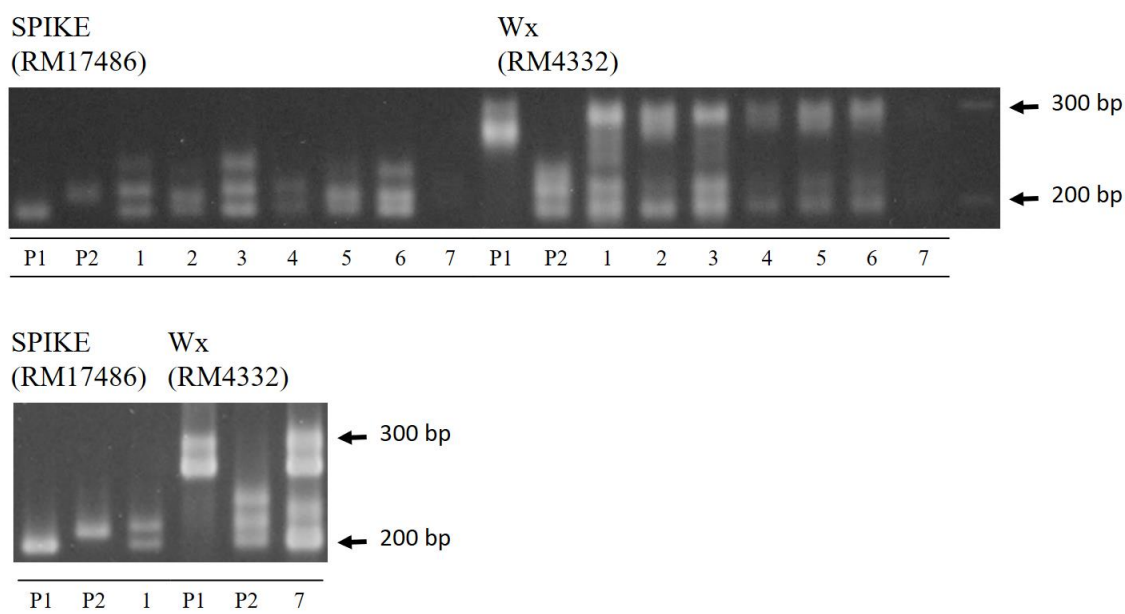
註：前景選拔之分子標誌以底線表示；篩選自研究室先前建立之多型性分子標誌以正體表示；篩選自 Gramene 水稻資料庫之多型性分子標誌以斜體表示



(二) 雜交與回交後代之選拔

1. 雜交產生 F₁ 種子及其鑑定

由於兩雜交親本(大陸秈與台稈糯 1 號)的抽穗期不同，因此分批種植以進行雜交，而後將所收穫種子種植於田間，並逢機選取 7 株幼苗的葉片進行 SSR 分子標誌分析，檢測其是否雜交成功，由 RM17486 及 RM4332 分析的結果顯示，7 株受測植株均具有異型結合基因型(圖五)，表示此 7 株均為雜交成功的 F₁ 植株，並且進一步繼續回交大陸秈，以獲得 BC₁F₁ 種子。



圖五、利用分子標誌檢測兩親本雜交所得之 F₁ 單株

Fig. 5. Validation of F₁ hybrids with molecular markers

註：P1 為台稈糯 1 號；P2 為大陸秈；1-7 為 7 株 F₁ 世代植株



2. BC₁F₁ 世代植株之選拔

在田間種植的 87 株 BC₁F₁ 中，以 RGNMS2176(與 *ALK* 基因連鎖)、RM17486(與 *SPIKE* 基因連鎖)及 RM4332(與 *Wx* 基因連鎖)等 3 組分子標誌進行前景選拔，結果顯示其中 12 株的三對目標基因之基因型均為異型結合(表二)，即具有台稉糯 1 號的等位基因，並於其中選取株高適中且抽穗期與田間大陸秈配合得以雜交的編號#37、#46、#82、#86 及#93 共 5 植株繼續回交大陸秈，以獲得 BC₂F₁ 種子。

表二、以與目標性狀緊密連鎖之 3 組分子標誌分析 BC₁F₁ 世代之基因型

Table. 2. The genotypic frequencies of 3 markers closely linked with targeted genes in the BC₁F₁ population

Marker	Genotype								Total	
	H	H	H	B	H	B	B	B	H	B
RGNMS2176 (<i>ALK</i>)	H	H	H	B	H	B	B	B	28	56
RM17486 (<i>SPIKE</i>)	H	H	B	H	B	H	B	B	33	51
RM4332 (<i>Wx</i>)	H	B	H	H	B	B	H	B	33	51
n	12	2	6	10	8	9	5	32	94	158
%	14.3	2.4	7.1	11.9	9.5	10.7	6.0	38.1	37.3	62.7

註：B 表示與大陸秈基因型相同；H 表示異型結合；n 表示個數



3. BC₂F₁ 世代植株之選拔

在溫室分別種植編號#37 後代 55 株、#46 後代 19 株、#82 後代 94 株、#86 後代 31 株與#93 後代 79 株，共計 278 BC₂F₁ 植株，並以 3 組分子標誌進行前景選拔，結果顯示其中 46 株的三對目標基因之基因型均為異型結合(表三)，即具有台稉糯 1 號的等位基因，並自其中選拔早熟、穗數多且株高適中的編號#37-37、#46-01、#46-04、#82-36、#82-41、#82-60、#86-16、#93-34、#93-53 及#93-68 共 10 株(表四)進行自交以產生 BC₂F₂ 種子。以分子標誌估算 10 株 BC₂F₁ 的遺傳背景結果中，除#46-04 的 87.4%接近理論值 87.5%外，其餘植株所具輪迴親遺傳背景均小於 85%，其中以#93-68 的 72.9%為最低，後代將有機會以非實質衍生品種的條件申請品種權(表五)(圖六、圖七)；此 10 株選拔後代的稔實率在 67-87%間，而田間隨機抽樣調查三株輪迴親(大陸秈)的稔實率分別為 62 %、82 %及 84 %，可知未有秈稻與稉稻雜交常出現的低稔實率問題，表示多數品系已經回復至與輪迴親相近的稔實率(表五)。而 10 株選拔後代的輪迴親遺傳背景與稔實率呈顯著的負相關(P 值=0.048)，顯示高輪迴親(大陸秈)遺傳背景之植株具有較低的稔實率，可於後代分離族群再行驗證。



表三、以與目標性狀緊密連鎖之 3 組分子標誌分析 BC₂F₁ 世代之基因型

Table. 3. The genotypic frequencies of 3 markers closely linked with targeted genes in the BC₂F₁ population

Marker	Genotype								Total	
	H	H	H	B	H	B	B	B	H	B
RGNMS2176 (<i>ALK</i>)	H	H	H	B	H	B	B	B	129	138
RM17486 (<i>SPIKE</i>)	H	H	B	H	B	H	B	B	142	125
RM4332 (<i>Wx</i>)	H	B	H	H	B	B	H	B	129	138
n	46	22	31	27	30	47	25	39	400	401
%	17.2	8.2	11.6	10.1	11.2	17.6	9.4	14.6	49.9	50.1

註：B 表示與大陸私基因型相同；H 表示異型結合；n 表示個數

表四、獲選 10 株 BC₂F₁ 植株之抽穗期、穗高及穗數

Table. 4. Days to heading, plant height and numbers of spikes in 10 selected plants in BC₂F₁ generation

ID	Days to heading (day)	Plant height (cm)	Number of spikes
#37-37	78	80	8
#46-01	78	90	10
#46-04	85	95	10
#82-36	78	85	8
#82-41	85	90	13
#82-60	78	90	8
#86-16	85	95	9
#93-34	78	110	7
#93-53	85	90	9
#93-68	85	85	8

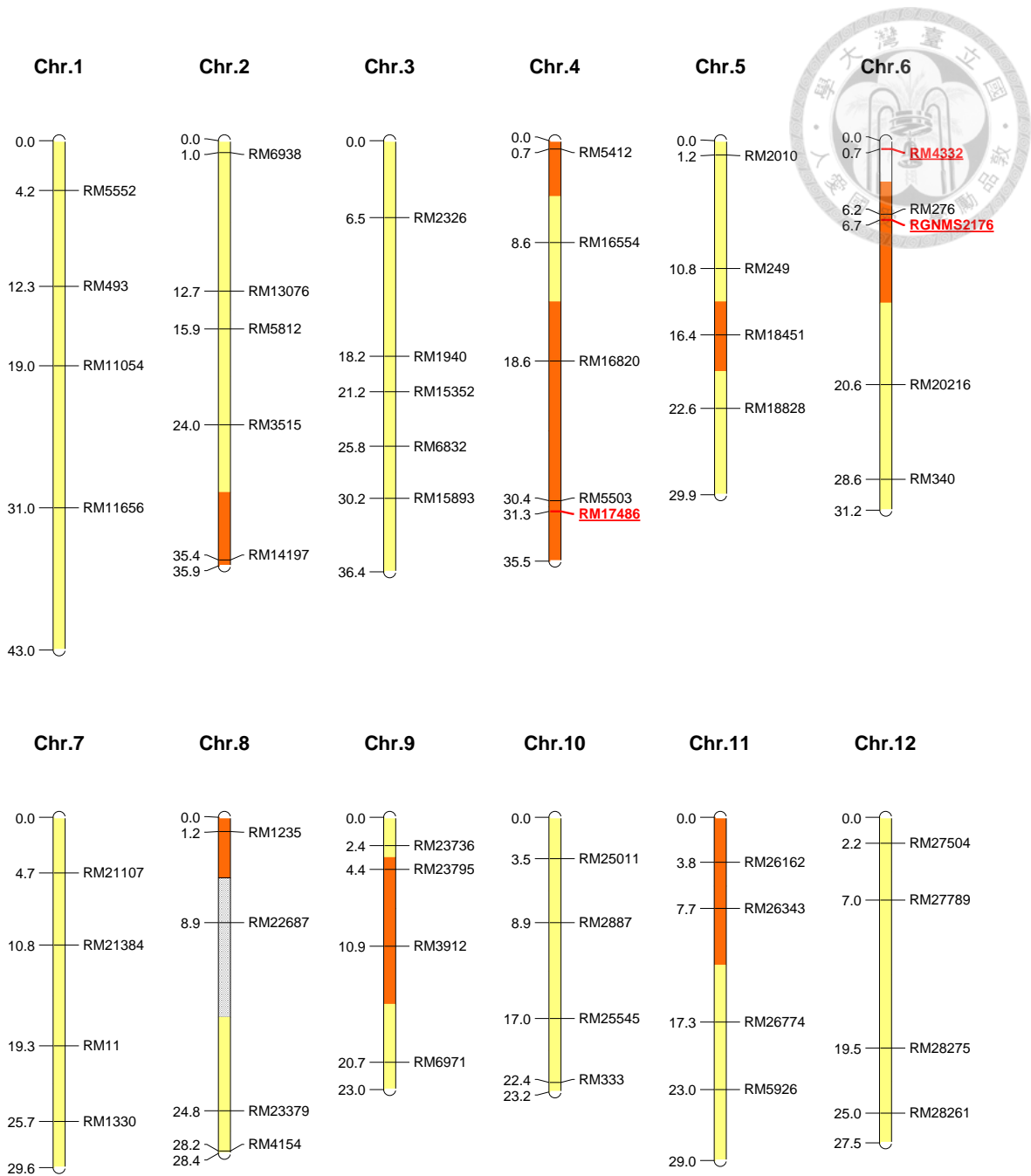
表五、獲選之 10 株 BC₂F₁ 植株遺傳背景與穀粒性狀

Table. 5. Genetic background composition and grain traits of 10 selected BC₂F₁ plants



ID	Genetic background of recurrent parent (%)	Spikelet number	Filled spikelet number	Fertility (%)
BC₂F₁				
#37-37	79.3	841	719	85.5
#46-01	78.7	1199	1041	86.8
#46-04	87.4	1173	912	77.7
#82-36	83.5	1016	714	70.3
#82-41	79.8	1171	868	74.1
#82-60	83.9	1005	673	67.0
#86-16	81.0	1128	862	76.4
#93-34	76.3	679	566	83.4
#93-53	76.5	1336	1029	77.0
#93-68	72.9	1320	1149	87.0
\bar{x}	79.93	1087	853	78.5
Range	72.9-87.4	679-1336	566-1149	67.0-87.0
Recurrent parent				
#1	100	1146	962	84.0
#2	100	765	480	62.7
#3	100	607	497	81.9
\bar{x}	100	839	646	76.2
Range		607-1146	480-962	62.7-84.0

註： \bar{x} 為平均值

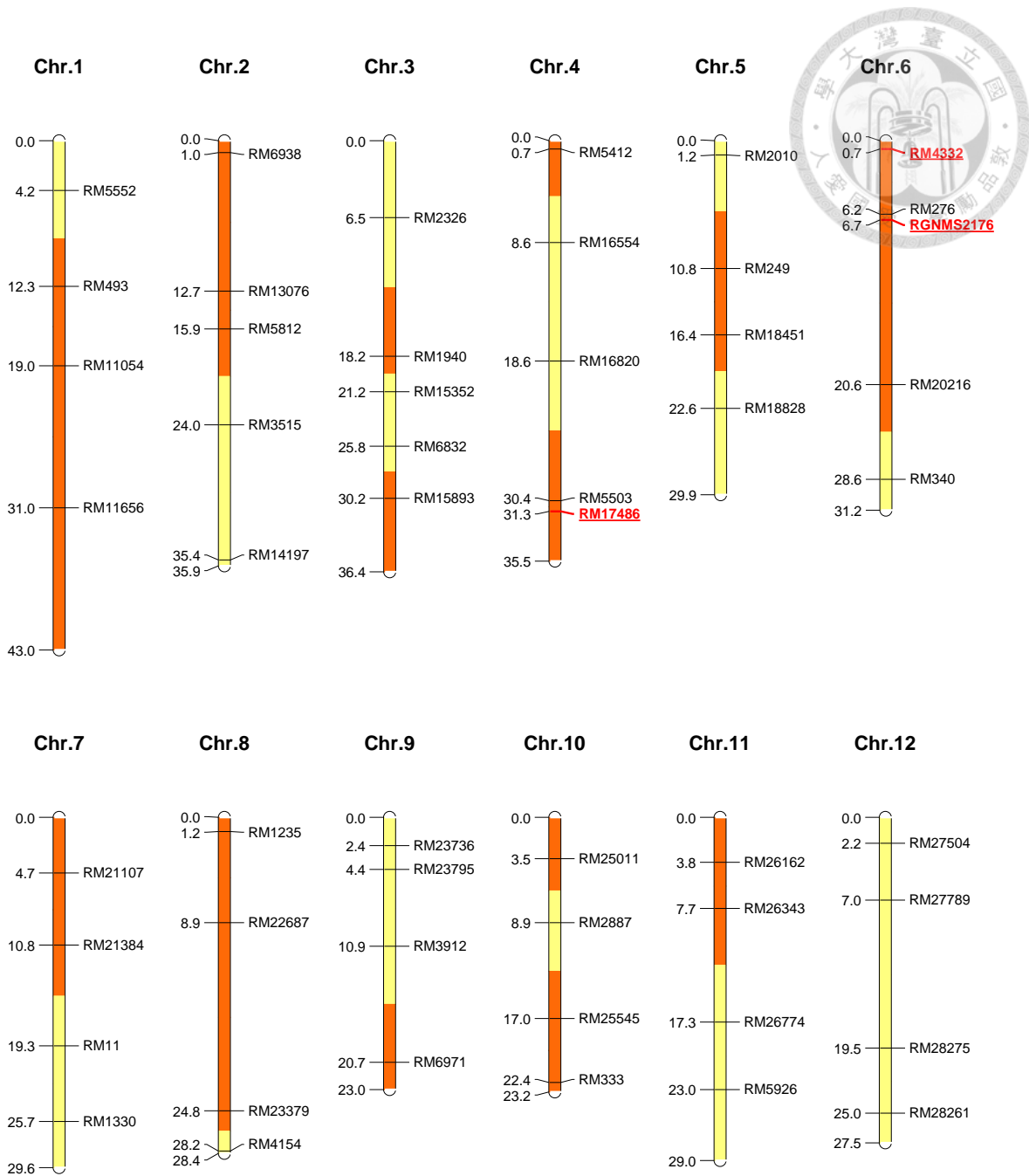


圖六、編號#46-04 之 BC₂F₁ 植株的分子標誌遺傳組成

Fig. 6. Markers basis genetic composition of the BC₂F₁ plant #46-04

註：■ 表示與大陸私基因型相同；■ 表示異型結合；

▨ 表示與台稉糯 1 號基因型相同



圖七、編號#93-68 之 BC₂F₁ 植株的分子標誌遺傳組成

Fig. 7. Markers basis genetic composition of the BC₂F₁ plant #93-68

註：□ 表示與大陸私基因型相同；■ 表示異型結合



4. BC₂F₂ 世代種子之糯性檢測

由於水稻種子的糯性性狀具有當代顯性的遺傳特性，因此可以透過 BC₂F₂ 種子的胚乳判別其基因型，在 BC₂F₁ 單株分開收穫其自交所得之 BC₂F₂ 種子中，先將種子脫粒成為糙米，並利用支鏈澱粉與直鏈澱粉透光程度的不同，快速區分糯性或非糯性米粒，由於糯性米粒的直鏈澱粉含量小於 2% 導致透光度較差，故不透光的米粒為糯性米粒，但是仍有少量不易以透光度判別的糙米，則利用碘液與澱粉複合的呈色原理進行判別，染色後呈淡紫紅色的為糯性米粒，呈藍黑色的為非糯性米粒，呈紫黑色的可能為鏈長較長的支鏈澱粉，具有糊化溫度高的特性 (Nakamura *et al.*, 2002, 2005)，亦可能為異型結合基因型之胚乳受 *Wx* 基因劑量的影響而導致呈色不同，故均予以淘汰(圖八)。受測 BC₂F₂ 世代種子共計 8371 粒，在檢測篩選後，具有糯性基因型的種子剩下 1863 粒，非糯性與糯性米粒之比值為 6508 : 1863 = 3.49 : 1，有偏離孟德爾分離率的現象。因為在育苗前即已完成篩選，而大幅節省人力及田間種植空間，受測後的種子在苗期則可進一步對 *ALK* 與 *SPIKE* 基因進行前景選拔，而可提高育種效率。



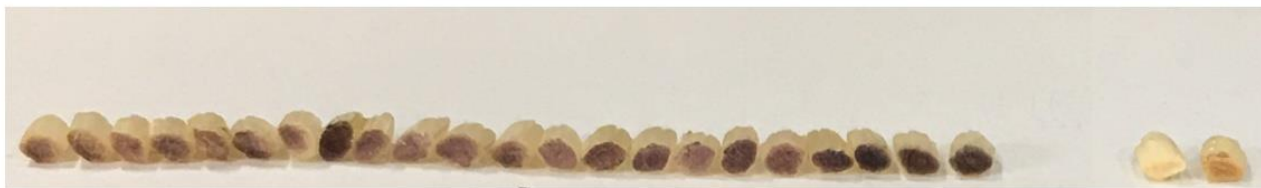
(A)不透光

透光



(B)紫黑色與藍黑色

淡紫紅色



圖八、以透光度(A)與碘化鉀染色(B)法檢測糯性或非糯性之 BC_2F_2 種子

Fig. 8. Tests of glutinous or non-glutinous BC_2F_2 seeds with light transmittance (A) and KI staining (B) methods



5.綜合選拔效果

本研究的最終目標是選育低糊化溫度、多粒數且早熟的秈糯稻品種，經過 F₁ 世代之確認雜交成功種子，BC₁F₁ 世代之前景選拔及外表型選拔，及 BC₂F₁ 世代之前景選拔、外表型選拔及遺傳背景的評估，並篩檢出具有糯性基因型之 BC₂F₂ 種子，將於苗期選拔具有 *alk* 與 *SPIKE* 同結合基因型的單株，再依 BC₂F₁ 世代的編號將種子分行植於田間，並選拔早熟、株高適中、多穗數及多粒數等重要農藝性狀表現優良且穩定的後裔行，持續自交至 BC₂F₃ 並植於田間，使行內遺傳背景趨於同質，以對產量與糊化溫度性狀進行篩選，期能達成育種目標。由於本研究採用回交後代重組自交系(backcross recombinant lines, BRL)選拔的方法，雖然以兩次回交達到轉移目標基因及維持輪迴親優良特性的目標，但因為與輪迴親遺傳背景的相似度低於 85%，故若育成新品種，可以受到品種權的保護。

(三) 雜交親本大陸秈品種遺傳純度之分析

由於進行 SSR 分子標誌 RGNMS2176(與 *ALK* 基因緊密連鎖)的分析時，出現 3 種不同長度的電泳條帶(圖九)，此現象在兩純系的雜交後代中應不會出現，故而利用此分子標誌進行輪迴親(大陸秈)的純度分析，於田間隨機取 24 株大陸秈單株分別編號，並自葉片抽取 DNA 以進行分子標誌分析，結果發現在大陸秈品種內有 2 種長度的電泳條帶(圖十)，表示與之連鎖的 *ALK* 基因在大陸秈品種內可能有分離現象，而來自單株的大陸秈後代在株高、抽穗期等性狀變異均大，顯示大陸秈極有可能並非純系，可能會增加雜交與回交後代的遺傳或外表型變異。



(四) RM17486 與枝梗數關聯性之檢定

於 BC₂F₁ 世代中，針對 RGNMS2176、RM17486 與 RM4332 三對基因型依序為 HHH 與 HBH 的植株進行主穗一次枝梗與二次枝梗數調查，並依 RM17486(與 *SPIKE* 基因連鎖)的基因型分成 B 組(與大陸私相同)與 H 組(異型結合)，結果顯示 HHH 與 HBH 之一次枝梗平均值分別為 10.05 及 9.61，而二次枝梗平均值分別為 26.62 及 24.77，平均二次枝梗分別為 2.62 及 2.60 (表六)。分別對一次、二次枝梗總數，及一次枝梗的平均二次枝梗數進行雙尾 T 檢定，檢定的 P 值依序為 0.22、0.26 及 0.92，在 95% 信心水準下均不顯著(表六)，顯示在本研究 BC₂F₁ 族群中，*SPIKE* 基因的基因型間差異，對一次、二次枝梗總數與平均二次枝梗數的影響不顯著，其原因可能為 BC₂F₁ 世代之 *SPIKE* 基因劑量僅有 0 與 1 的差距，而在樣本數不夠大的條件下不足以對枝梗數造成顯著影響，可於 BC₂F₂ 世代依照基因劑量 0、1 及 2 分組，並擴大樣本數再行檢定。

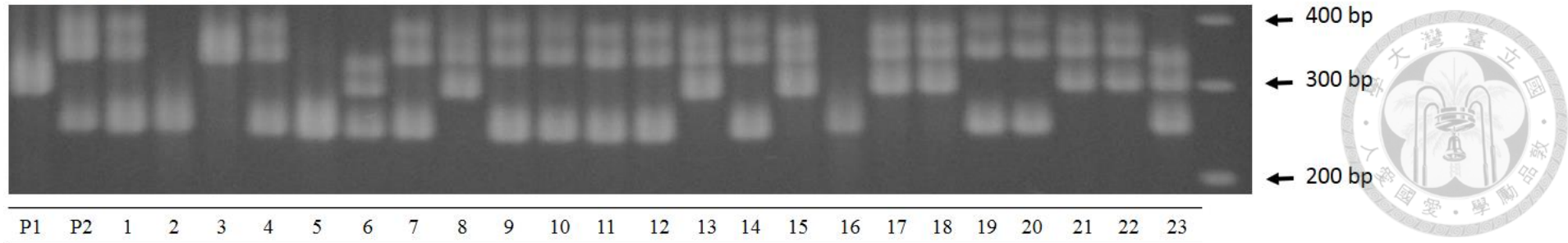
表六、BC₂F₁ 植株之不同 RM17486 分子標誌(與 *SPIKE* 基因連鎖)基因型之枝梗數比較

Fig. 6. Comparison of branch number between different genotypes of RM17486 marker linked with the *SPIKE* gene

Genotype (RM17486)	n	Number of branch		Secondary branch no. per primary
		Primary branch	Secondary branch	
H	37	10.05±1.79	26.62±5.47	2.62±0.4
B	31	9.61±1.26	24.77±6.67	2.60±0.8
P-value		0.26	0.22	0.92

註：n 表示個數；H 表示異型結合；B 表示與大陸私基因型相同

ALK
(RGNMS2176)

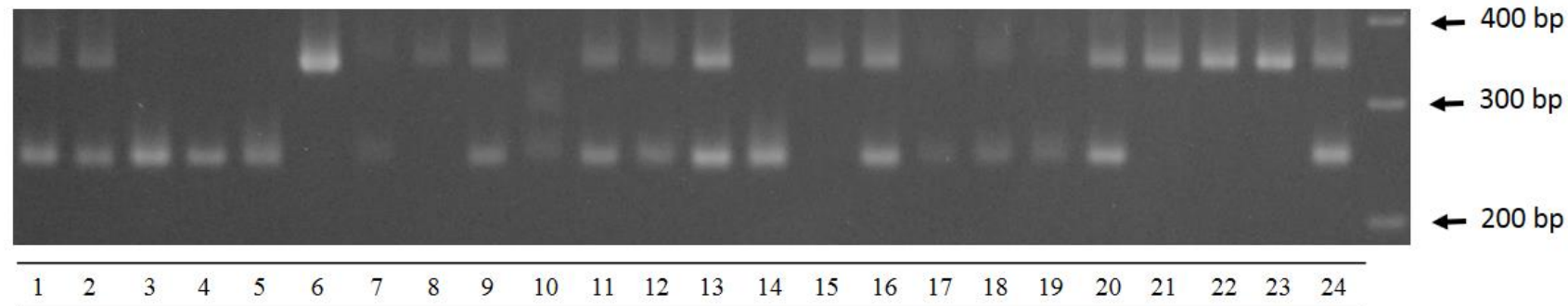


圖九、以分子標誌 RGNMS2176 分析 BC₁F₁ 世代植株之部分電泳圖譜

Fig. 9. Partial electrophoresis patterns of BC₁F₁ plants amplified with marker RGNMS2176

註：P1 為台稉糯 1 號；P2 為大陸秈；1-23 為 23 株 BC₂F₁ 世代株

ALK
(RGNMS2176)



圖十、以分子標誌 RGNMS2176 分析 24 株大陸秈之電泳圖譜

Fig. 10. Electrophoresis patterns of 24 recurrent plants amplified with marker RGNMS2176

註：1-24 為 24 株大陸秈植株



五、討論

(一)分子標誌篩選

分子標誌若沒有設計在基因內，將有機率與基因間發生重組，因此前景選拔的分子標誌若能設計於基因功能性突變序列上最為理想，如本研究之 *ALK* 基因第一個測試的 4 條引子設計，不僅設計在 *ALK* 基因序列內，且其中 2 條引子各別專一性互補的 SNP GC/TT 核酸序列變異是造成基因功能產生差異的關鍵(Bao *et al.*, 2006)，直接連結分子標誌與基因功能，又因為是共顯性分子標誌，可以明確區分兩親本與異型結合的基因型。然而在本研究中大陸私所產生的電泳圖譜具有多條帶的混雜，可能原因為 DNA 斷裂致使不同長度的條帶出現，或者為引子的黏合溫度設定過低使專一性降低。但由於混雜的條帶過多，且在其他分子標誌並未發現此一現象，因此排除 DNA 斷裂的可能；曾嘗試不同引子黏合溫度與瓊脂膠片濃度，然而最終仍無法克服多條帶混雜現象，故而改用緊密連鎖的 SSR 分子標誌。本研究使用於前景選拔的分子標誌均為共顯性，且與 *ALK* 及 *SPIKE* 基因連鎖之分子標誌的遺傳距離分別為 0.12 cM 及 0.26 cM，其重組率均小於 1%，故幾近於基因內。而與 *Wx* 基因連鎖之分子標誌的遺傳距離為 3.66 cM，雖稍大於前兩者，但已能充分滿足選拔之需求，況且可輔以外表型選拔糯性之穀粒。

本研究室先前使用的 101 組 SSR 分子標誌中，有 56 組在大陸私及台稉糯 1 號間具多型性，多型性比例高達 55.5%，極為少見，且 12 條染色體中多型性最低仍有 38.5% (表一)，相比於其他以私稻與稉稻作為親本的報告如林孟輝等人(2007)篩選具有多型性分子標誌佔的 26% 及 Lee 等人(2016)的 16% 要高出許多，而與林崇正等人(2007)在台農 67 號與源自印度旁遮普省(Punjab)的 Basmati 370 品種間所篩選的 56% 多型性接近，表示此高度多型性的現象除了因這些分子標誌在其他的



雜交組合已顯現較高多型性的趨勢外，亦可能顯示大陸私與台稉糯 1 號兩雜交親本間的遺傳距離大，而此現象是否影響雜交後代的重組或分離，尚待進一步分析了解。

(二)雜交與回交後代選拔

目標基因中的 *ALK* 基因與 *Wx* 基因均位於第 6 條染色體上，遺傳距離約為 29.1 cM (Oryzabase)，因此可預期在前景選拔時能篩選到更高比率的期望植株，試驗結果顯示，在 85 株 BC_1F_1 植株中，12 株為欲選拔的基因型，其比率為 $\frac{12}{85}$ (0.141)；在 277 株 BC_2F_1 植株中，46 株為欲選拔的基因型，比率為 $\frac{46}{277}$ (0.166)，均高於三對基因獨立分離時的選拔期望值 $\left(\frac{1}{2}\right)^3 = 0.125$ ，然而在卡方適合度檢定的結果中 BC_1F_1 及 BC_2F_1 世代的 P 值依序為 0.97 和 0.34，在 95 % 的信心水準下，獲選與淘汰的植株在兩個世代均沒有偏離 1:7 的分布。雖然私稉稻雜交後代具有偏離孟德爾分離率的現象，可能因此降低台稉糯 1 號的等位基因頻度，進而減少三對基因均為異型結合的機率，但是由於第 6 條染色體的偏離現象主要受雌配子主導(Reflinur *et al.*, 2014)，而第 4 條染色體目前尚未發現與偏離現象相關的基因座，故於輪迴親大陸私為母本的雜交中，後代應會依循孟德爾分離率不會偏離。因此推測獲選與淘汰植株的比例沒有偏離 1:7 的可能原因是兩基因間遺傳距離為 29.1 cM 並非緊密連鎖，所以在樣本數不夠大的條件下，後代偏離無法達到顯著水準，此推論之合理性可由 BC_1F_1 及 BC_2F_1 的 P 值隨樣本數增加而降低的趨勢而獲得支持。

在 BC_1F_1 及 BC_2F_1 世代分別選獲 12 株及 46 株具有三個目標基因的個體，可進一步進行株高及抽穗期等重要農藝性狀的選拔，經選拔後分別獲得 5 株

BC₁F₁ 及 10 株 BC₂F₁ 植株供進一步繁殖及選拔，而不至於無可選擇之株數，使得育種選拔策略之使用更具有彈性。



(三) 大陸私非純系的可能影響

親本大陸私的粒數與抽穗期性狀之變異均大，可能是其並非純系，遺傳組成仍非同質結合所致。在選拔的 10 株 BC₂F₁ 後代遺傳背景中(圖六、圖七及附圖一至八)，分子標誌 RM22687、RM2887 及 RM26162 均出現供給親的基因型，然而在 BC₂F₁ 世代植株不應具有供給親基因型，推測造成此結果的原因是大陸私品種內具有與供給親相同或接近的電泳條帶，影響基因型判讀，因此以 24 株大陸私分析此 3 組分子標誌的多型性，結果顯示部分大陸私在 RM22687 與 RM26162 的分析中，確實具有與供給親相同或接近的電泳條帶。雖然大陸私非純系造成更大的遺傳變異，但是也增加判別或分析來自輪迴親(大陸私)遺傳背景的困擾。

(四) 私稈稻雜交後代稔實率問題

私稻與稈稻的雜交後代常有低稔實率的問題(Kato *et al.*, 1930)，而本研究透過回交方法，將三對稈稻基因導入私稻背景中，亦可能面臨此問題，因此針對選拔後代與兩親本的稔實率進行調查：供給親台稈糯 1 號的稔實率約為 90 % (莊商路和郭金條，1990)；輪迴親大陸私的株高與粒數變異大，可能造成稔實率不穩定，故於田間隨機選取 3 株大陸私進行調查，其稔實率分別為 62 %、82 % 及 84 %；在本研究選拔的 10 株 BC₂F₁ 植株中稔實率最高可達 87 %，最低為 67 % (表四)。從調查的結果推論，選拔的部分後代之稔實率已經與輪迴親大陸私相近，但由於 BC₂F₁ 植株的稔實率調查是取樣單株，其代表性仍不足，且後代仍會分離，應於

後代品系持續追蹤稔實率的變化，而目標基因 *SPIKE* 具有增寬劍葉的功能(Fujita *et al.*, 2013)，預期 *SPIKE* 基因座為大陸私等位基因同結合時，可增加植株之供給部(source)以提升粒數。



(五) *SPIKE* 基因對枝梗數的影響

多穎花數的 *SPIKE* 等位基因主要透過增加一次與二次枝梗數以提升總穎花數(Fujita *et al.*, 2012)，而在本研究之 BC₂F₁ 世代中具有多穎花數等位基因的植株在一次枝梗數、二次枝梗數及一次枝梗之平均二次枝梗數等三個性狀的平均值雖均有較多的數量(表六)，但檢定中 *SPIKE* 基因仍對枝梗數不具顯著影響，推測可能原因是 *SPIKE* 基因具有劑量效應(Fujita *et al.*, 2013)，而 BC₂F₁ 植株間只有 0 個或 1 個多穎花數等位基因，使得外表型差異不足以達顯著水準，此推論可於 BC₂F₂ 世代 *SPIKE* 等位基因數具有 0 個、1 個或 2 個的分離族群中再行驗證。

(六) 糯性偏離孟德爾分離率

本研究將控制糯性的 *wx* 等位基因透過回交方法導入大陸私品種，因糯性為隱性性狀且具有當代顯性的特性，故可直接調查 BC₂F₁ 植株自交所收穫的 BC₂F₂ 種子，在 BC₂F₂ 世代糯米比例的期望值為 $\frac{1}{4}$ ，但糯性檢測結果中 1863 粒為糯米，6508 粒為非糯米，進行適合度檢定的 P 值小於 0.001，在 95 % 的信心水準下偏離 1 : 3 的分布，獲選的糯米顯著低於期望值，推測可能原因是私稻與粳稻間的生殖障礙，造成部分染色體區域偏離孟德爾分離率，而 *Wx* 基因所在第 6 條染色體，其偏離現象主要受雌配子主導(Reflinur *et al.*, 2014)，可能因此造成 BC₂F₂ 世代的輪迴親(大陸私)非糯性等位基因頻度提升，進而降低糯米比例。雖然糯性種子數

低於理論值，但由於所繁殖種子數量充足，故所選獲的 1863 粒具糯性的種子已足以提供後續選拔之用。



(七) BRL 與品種權

在定義實質衍生品種(essentially derived variety, EDV)的要件中包含需與現有品種的遺傳相似度高，雖然我國尚未規範遺傳相似度的門檻，但目前的共識是與現有品種的遺傳相似度高於 90% 即為實質衍生品種(行政院農委會農糧署)，而本研究之採用 BRL 育種方法與一般回交育種不同，僅與輪迴親回交 2 代，輪迴親的遺傳背景理論值為 87.5%，已低於 90%，又因轉移來自供給親之三對目標基因所連帶的染色體片段，預期約有 50% 後代個體與輪迴親之相似度低於 85%。在本研究選拔的 BC₂F₁ 世代植株中，多數植株與輪迴親之相似度低於 85% (表四)，故於未來品種育成時，有機會以非實質衍生品種條件申請品種權，有別於一般回交育種方法，所獲得品系具有高於 90% 之輪迴親遺傳背景，而需以實質衍生品種的條件申請品種權。此外，因為選拔後代與輪迴親基因組的相似程度低，亦可增加後代族群的遺傳變異，更有機會選拔出優於親本農藝性狀的品系。

六、結論



為選育適合臺灣中南部地區輪作體系的加工用之早熟秈糯稻品種，本研究首先篩選與 *alk*、*SPIKE* 及 *wx* 等三個目標基因緊密連鎖的 SSR 分子標誌及 49 組供遺傳背景分析的 SSR 分子標誌，並以分子輔助回交育種的方法將台稈糯 1 號品種所具有的低糊化溫度、多穎花數及糯性基因轉移至大陸秈品種。透過 2 個目標基因之分子標誌確認雜交成功的 F_1 植株，接著進行 87 株 BC_1F_1 植株的前景選拔及抽穗期和株高的外表性狀選拔，並且在 278 個 BC_2F_1 個體進行前景選拔及抽穗期、株高、穗數及主穗粒數等外表性狀選拔，共選獲 10 株優良 BC_2F_1 植株自交以產生 BC_2F_2 種子，並於種子階段篩選糯性以節省人力及田間種植空間。獲選的 BC_2F_1 植株除了具有三個目標基因外，尚具有與輪迴親相近的稔實率，並沒有因秈稻與稈到雜交所造成稔實率下降的問題，而其中 9 株與輪迴親遺傳背景相似度低於 85%，可望以非實質衍生品種的條件申請品種權。本研究採用新提出的選育回交後代重組自交系的育種方法，即僅回交兩代並配合重要性狀外表型選拔超越輪迴親的品系，本研究結果初步證實此育種方法的有效性。未來可於 BC_2F_2 植株苗期篩選 *alk* 與 *SPIKE* 同結合基因型，並依選育回交後代重組自交系的育種方法執行目標性狀以外的性狀選拔，即對糊化溫度、產量及其他農藝性狀進行選拔，希望能育成符合農民需求且表現穩定的高產、早熟秈糯稻品種。

七、參考文獻



王聖善、陳榮坤、楊藹華、羅正宗 (2014) 臺灣常見稻種之產量相關等位基因型調查。行政院農業委員會台南區農業改良場研究會報 64:56-72

林孟輝、林家偉、陳若竹、林育宗、鄭舒允、劉宗華、詹富智、吳詩都、曾富生、古新梅 (2007) 利用微衛星分子標誌偵測水稻耐旱基因 QTL。作物、環境與生物資訊 4:65-76

林崇正、李長沛、鄭舒允、林育宗、許愛娜、曾富生、吳詩都、古新梅 (2007) 利用水稻 SSR 分子標誌偵測影響米質的數量性狀基因座。作物、環境與生物資訊 4:269-284

陳正昇、陳榮坤、金漢煊、林彥蓉 (2010) 以分子輔助選種導入 *hdl*、*Hd6* 和 *ehd1* 抽穗期基因至水稻越光品種。作物、環境與生物資訊 7:1-20

郭婷玫、林順福、簡禎佑、丁文彥、林家玉、陳榮坤、廖大經 (2014) 利用分子標誌輔助選拔水稻低白堊質品系。作物、環境與生物資訊 11:230-242

莊商路和郭金條 (1990) 粳型糯稻新品種—台粳糯 1 號。台南區農業改良場技術專刊農產-5

蔡世宗 (2015) 利用分子標誌輔助回交改良水稻之食味及米粒外觀品質。國立臺灣大學農藝學系 碩士論文。台北市，臺灣

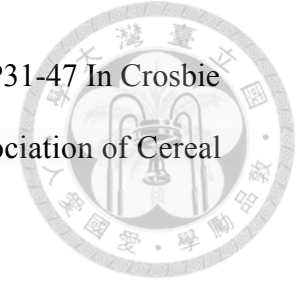
Ayres, N. M., A. M. McClung, P. D. Larkin, H. F. J. Bligh, C. A. Jones, W. D. Park
(1997) Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent
amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theor. Appl.
Genet.* 100:280-284

Bao, J. S., Y. R. Wu, B. Hu, P. Wu, H. R. Cui, Q. Y. Shu (2002) QTL for rice grain
quality based on a DH population derived from parents with similar apparent
amylose content. *Euphytica* 128:317-324


Bao, J. S., M. Sun, L. H. Zhu, H. Corke (2004) Analysis of quantitative trait locus for
some starch properties in rice (*Oryza sativa* L.), thermal properties, gel texture,
swelling volume. *J. Cereal Sci.* 39:379-385

Bao, J. S., H. Corke and M. Sun (2006) Nucleotide diversity in starch synthase IIa and
validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization
temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.).
Theor. Appl. Genet. 113:1171-1183

Basavaraj, S. H., V. K. Singh, A. Singh, A. Singh, A. Singh, S. Yadav, R. K. Ellur,
D. Singh, S. G. Krishnan, M. Nagarajan, T. Mohapatra, K. V. Prabhu, A. K. Singh
(2010) Marker-assisted improvement of bacterial blight resistance in parental lines
of Pusa RH10, a superfine grain aromatic rice hybrid. *Mol. Breed.* 26:293-305



- Bason, M. L. and A. B. Blakeney (2007) Grain and grain products. P31-47 In Crosbie G. B. and Ross A. S. (eds) The RVA Handbook. American Association of Cereal Chemists International, St. Paul, USA
- Caffagni, A., G. Albertazzi, G. Gavina, S. Ravaglia, A. Gianinetti, N. Pecchioni, J. Milc (2013) Characterization of an Italian rice germplasm collection with genetic markers useful for breeding to improve eating and cooking quality. *Euphytica* 194:383-399
- Cagampang, G. B., C. M. Perez and B. O. Juliano (1973) A gel consistency test for eating quality of rice. *J. Sci. Food Agr.* 24:1589-1594
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Fan, C. C., X. Q. Yu, Y. Z. Xing, C. G. Xu, L. J. Luo, Q. F. Zhang (2005) The main effects, epistatic effects and environmental interactions of QTLs on the cooking and eating quality of rice in a doubled haploid line population. *Theor. Appl. Genet.* 110:1445-1452
- Fujita, D., A. G. Tagle, L. A. Ebron, Y. Fukuta, N. Kobayashi (2012) Characterization of near-isogenic lines carrying QTL for high spikelet number with the genetic background of an *indica* rice variety IR64 (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* 62(1):18-26



Fujita, D., K. R. Trijatmiko, A. G. Tagle, M. V. Sapasap, Y. Koide, K. Sasaki, N. Tsakirpaloglou, R. B. Gannaban, T. Nishimura, S. Yanagihara, Y. Fukuta, T. Koshiha, I. H. Slamet-Loedin, T. Ishimaru, N. Kobayashi (2013) NAL1 allele from a rice landrace greatly increases yield in modern indica cultivars. Proc. Natl. Acad. Sci. 110(51):20431-20436

Gao, Z., D. Zeng, X. Cui, Y. Zhou, M. Yan, D. Huang, J. Li, Q. Qian (2003) Map-based cloning of the ALK gene, which controls the gelatinization temperature of rice. Sci. China Ser. C. 46:661-668

Iftekharruddaula, K. M., M. A. Newaz, M. A. Salam, H. U. Ahmed, M. A. A. Mahbub, E. M. Septiningsih, B. C. Y. Collard, D. L. Sanchez, A. M. Pamplona, D. J. Mackill (2011) Rapid and high-precision marker assisted backcrossing to introgress the SUB1 QTL into BR11, the rainfed lowland rice mega variety of Bangladesh. Euphytica 178:83-97

Iftekharruddaula, K. M., H. U. Ahmed, S. Ghosal, Z. R. Moni, A. Amin, M. S. Ali (2015) Development of new submergence tolerant rice variety for Bangladesh using marker-assisted backcrossing. Rice Sci. 22:16-26

Jane, J., Y. Y. Chen, L. F. Lee, A. E. McPherson, K. S. Wong, M. Radosavljevic, T. Kasemsuwan (1999) Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. Cereal Chem. 76(5):629-637



Jena, K. K. and D. J. Mackill (2008) Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. *Crop Sci.* 48(4):1266-1276

Juliano, B. O. (1971) A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Sci. Today* 16:334-338

Juliano, B. O. (1985) Criteria and tests for rice grain qualities. P443-524 In Juliano B. O. (ed) *Rice Chemistry and Technology*. The American Association of Cereal Chemists, St. Paul, USA

Kato, S., H. Kosaka, Y. Maruyama, Y. Takiguchi (1930) On the affinity of cultivated varieties of rice plants, *Oryza sativa* L. *J. Dept. Agric., Kyushu Imper. Univ. Fukuoka* 2:241-276.

Lee, G. H., I. K. Kang and K. M. Kim (2016) Mapping of novel QTL regulating grain shattering using doubled haploid population in Rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Genomics*:2128010

Little, R. R., G. B. Hilder and E. H. Dawson (1958) Differential effect of dilute alkali on 25 varieties of milled white rice. *Cereal Chem.* 35:111-126

Mikami, I., N. Uwatoko, Y. Ikeda, J. Yamaguchi, H. Y. Hirano, Y. Suzuki, Y. Sano (2008) Allelic diversification at the *wx* locus in landraces of Asian rice. *Theor. Appl. Genet.* 116:979-989



Mutters, R. G. and J. F. Thompson (2009) Rice quality in the global market. P1-22 In
Mutters, R. G. and Thompson J. F. (eds) Rice Quality Handbook ANR Publication
University of California

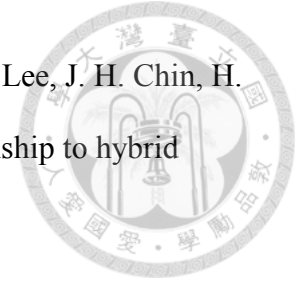
Nakamura, Y., A. Sakurai, Y. Inaba, K. Kimura, N. Iwasawa, T. Nagamine (2002) The
fine structure of amylopectin in endosperm from Asian cultivated rice can be
largely classified into two classes. *Starch Starke* 54:117-131

Nakamura, Y., P. B. Francisco, Y. Hosaka, A. Sato, T. Sawada, A. Kubo, N. Fujita
(2005) Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin
structure and starch quality between japonica and indica rice varieties.
Plant Mol. Biol. 58:213-227

Ong, M.H. and J. M. V. Blanshard (1995) Texture determinants of cooked, parboiled
rice. Physicochemical properties and leaching behaviour of rice. *J. Cereal Sci.*
21:261-269

Pandey, M.K., N. S. Rani, M. S. Madhav, R. M. Sundaram, G. S. Varaprasad, A. K.
Sivaranjani, A. Bohra, G. R. Kumar, A. Kumar (2012) Different isoforms of starch-
synthesizing enzymes controlling amylose and amylopectin content in rice (*Oryza*
sativa L.). *Biotechnol. Adv.* 30:1697-1706

Preiss, J. and M. N. Sivak (1996) Starch synthesis in sinks and sources. P63-96 In:
Zamski E. and Schaffter A. A. (eds) Photoassimilate Distribution in Plants and
Crops: Sink–Source Relationships. Marcel Dekker, New York



Reflinur Kim, B., S. M. Jang, S. H. Chu, Y. Bordiya, M. B. Akter, J. Lee, J. H. Chin, H.

J. Koh (2014) Analysis of segregation distortion and its relationship to hybrid barriers in rice. *Rice* 7:3

Sano, Y. (1984) Differential regulation of *waxy* gene expression in rice endosperm.

Theor. Appl. Genet. 68:467-473

Sano, Y., M. Katsumata and K. Okuno (1986) Genetic studies of speciation in cultivated rice. Inter- and intraspecific differentiation in the *waxy* gene expression in rice.

Euphytica 35:1-9

Sun, Y.Y., Y. LÜ, C. L. Dong, P. R. Wang, X. Q. Huang, X. J. Deng (2005) Genetic

relationship among *Wx* gene, AC, GC and GT of rice. *Acta Agr. Sin.* 31:535-539

Umemoto, T., M. Yano, H. Satoh, A. Shomura, Y. Nakamura (2002) Mapping of a gene

responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties. *Theor. Appl. Genet.* 104:1-8

Umemoto, T., N. Aoki, H. X. Lin, Y. Nakamura, N. Inouchi, Y. Sato, M. Yano, H.

Hirabayashi, S. Maruyama (2004) Natural variation in rice starch synthase IIa affects enzyme and starch properties. *Funct. Plant Biol.* 31:671-684

Umemoto, T., T. Horibata, N. Aoki, M. Hiratsuka, M. Yano, N. Inouchi, N. (2008)

Effects of variations in starch synthase on starch properties and eating quality of rice. *Plant Prod. Sci.* 11(4):472-480

Wanchana, S., T. Toojinda, S. Tragoonrung, A. Vanavichit (2003) Duplicated coding sequence in the waxy allele of tropical glutinous rice (*Oryza sativa* L.).
Plant Sci. 165:1193-1199



Wang, Z.Y., F. Q. Zheng, G. Z. Shen, J. P. Gao, D. P. Snustad, M. G. Li, J. L. Zhang, M. M. Hong (1995) The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the *waxy* gene. Plant J. 7:613-622

Yan, C., X. Li, R. Zhang, J. Sui, G. Liang, X. Shen, S. Gu, M. Gu (2005) Performance and inheritance of rice starch RVA profile characteristics. Rice Sci. 12(1):39-47

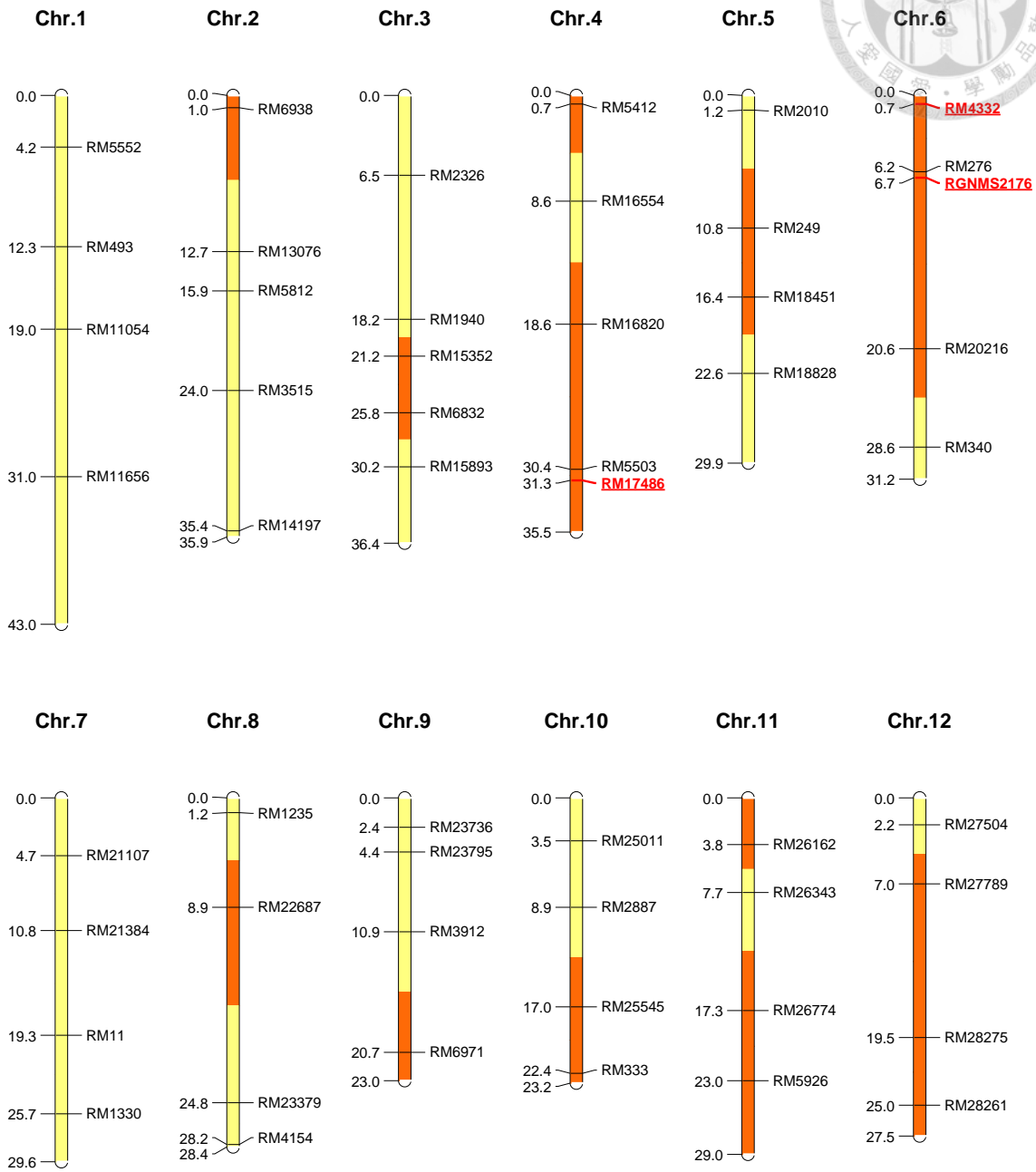
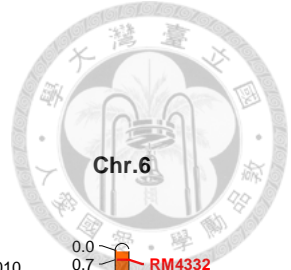
Gramene (n.d.) Information on all Class I SSRs.

retrieved from <http://archive.gramene.org/markers/microsat/supp-table18.xls>.

Oryzabase (n.d.) Chromosome and linkage maps:chromosome 6

retrieved from <https://shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/marker/mapNk/6>

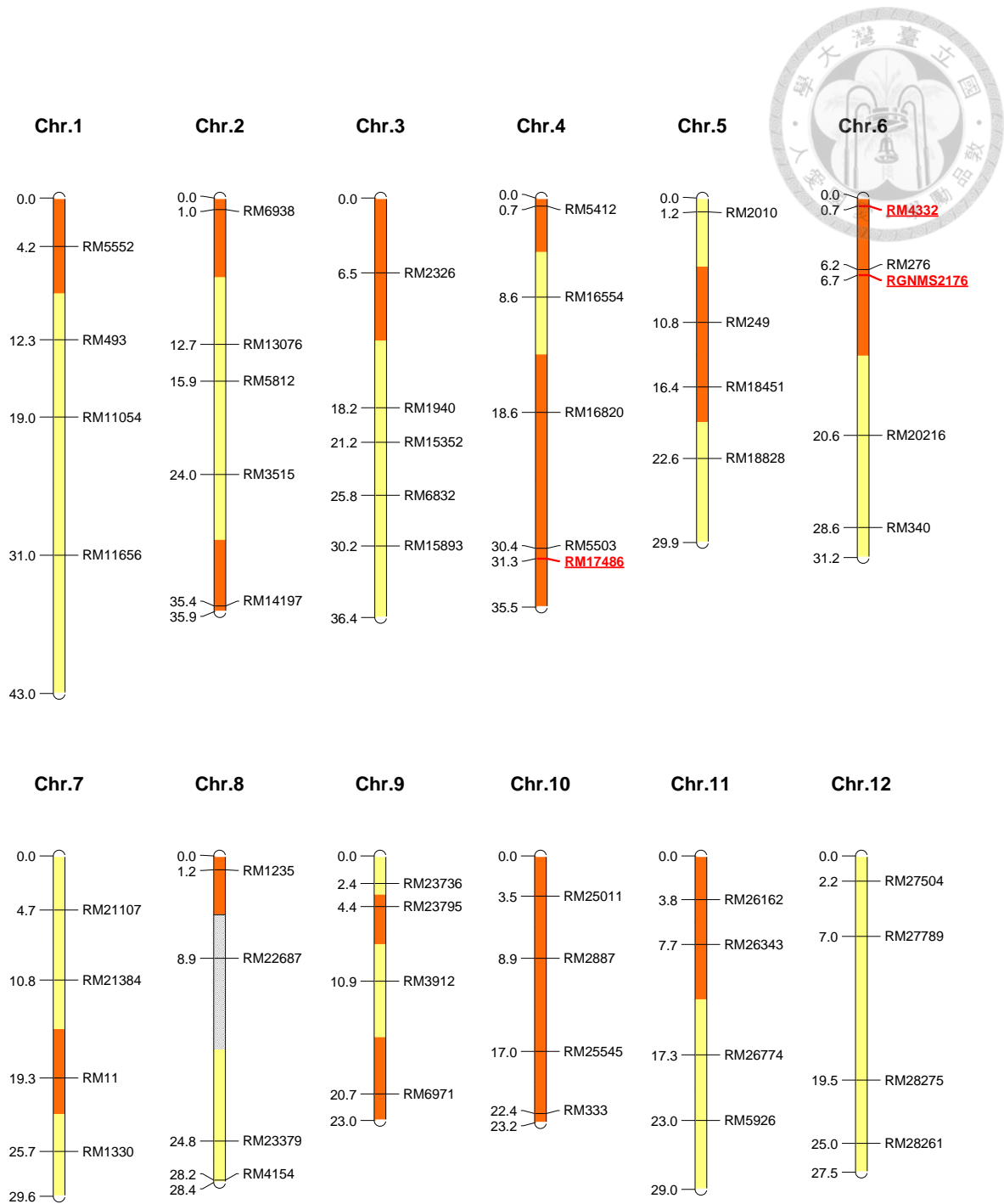
附圖表



附圖一、編號#37-37 之 BC₂F₁ 植株的分子標誌遺傳組成

Fig. S1. Markers basis genetic composition of the BC₂F₁ plant #37-37

註： 表示與大陸私基因型相同； 表示異型結合

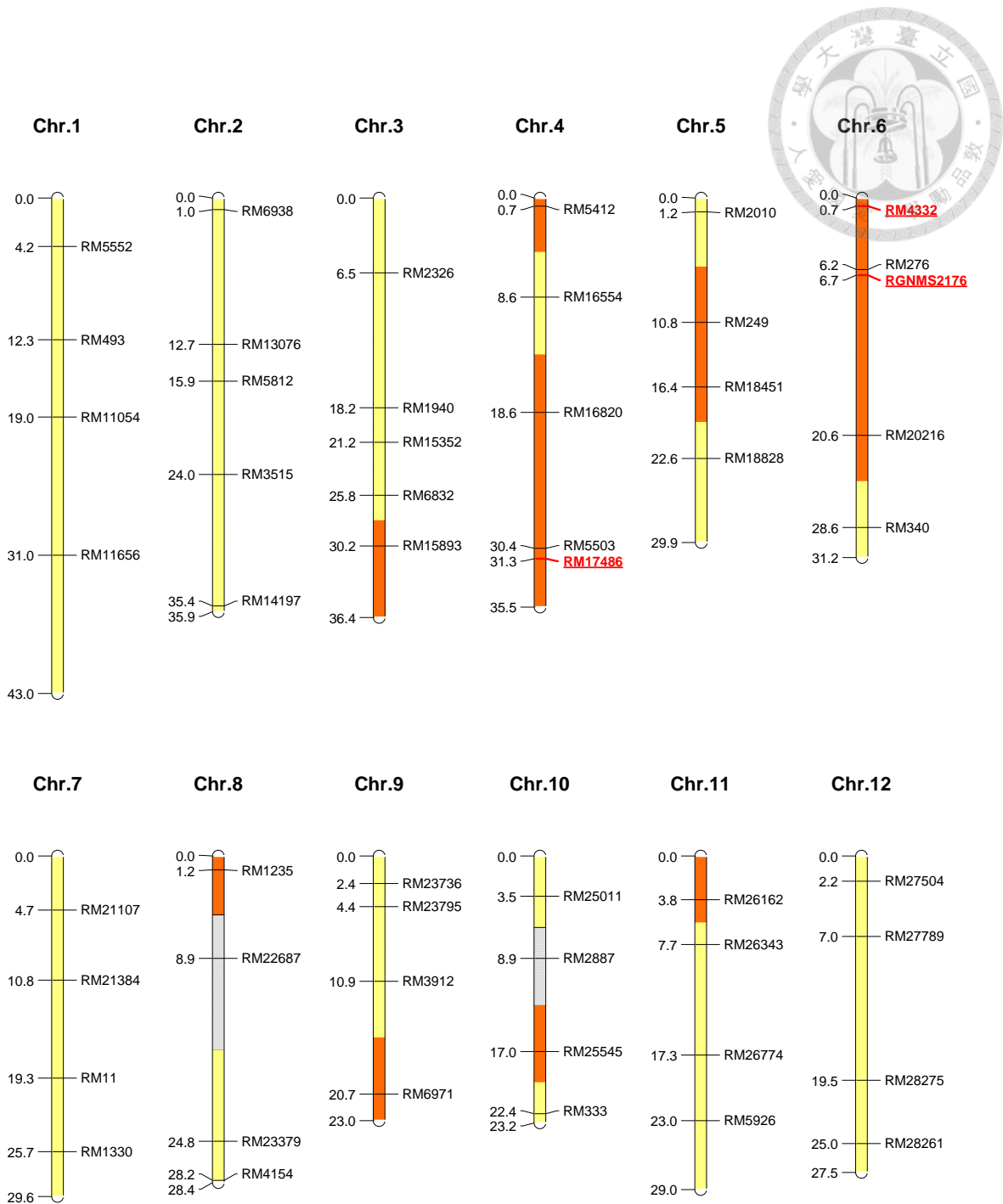


附圖二、編號#46-01 之 BC₂F₁ 植株的分子標誌遺傳組成

Fig. S2. Markers basis genetic composition of the BC₂F₁ plant #46-01

註：■ 表示與大陸私基因型相同；■ 表示異型結合；

▨ 表示與台稉糯 1 號基因型相同

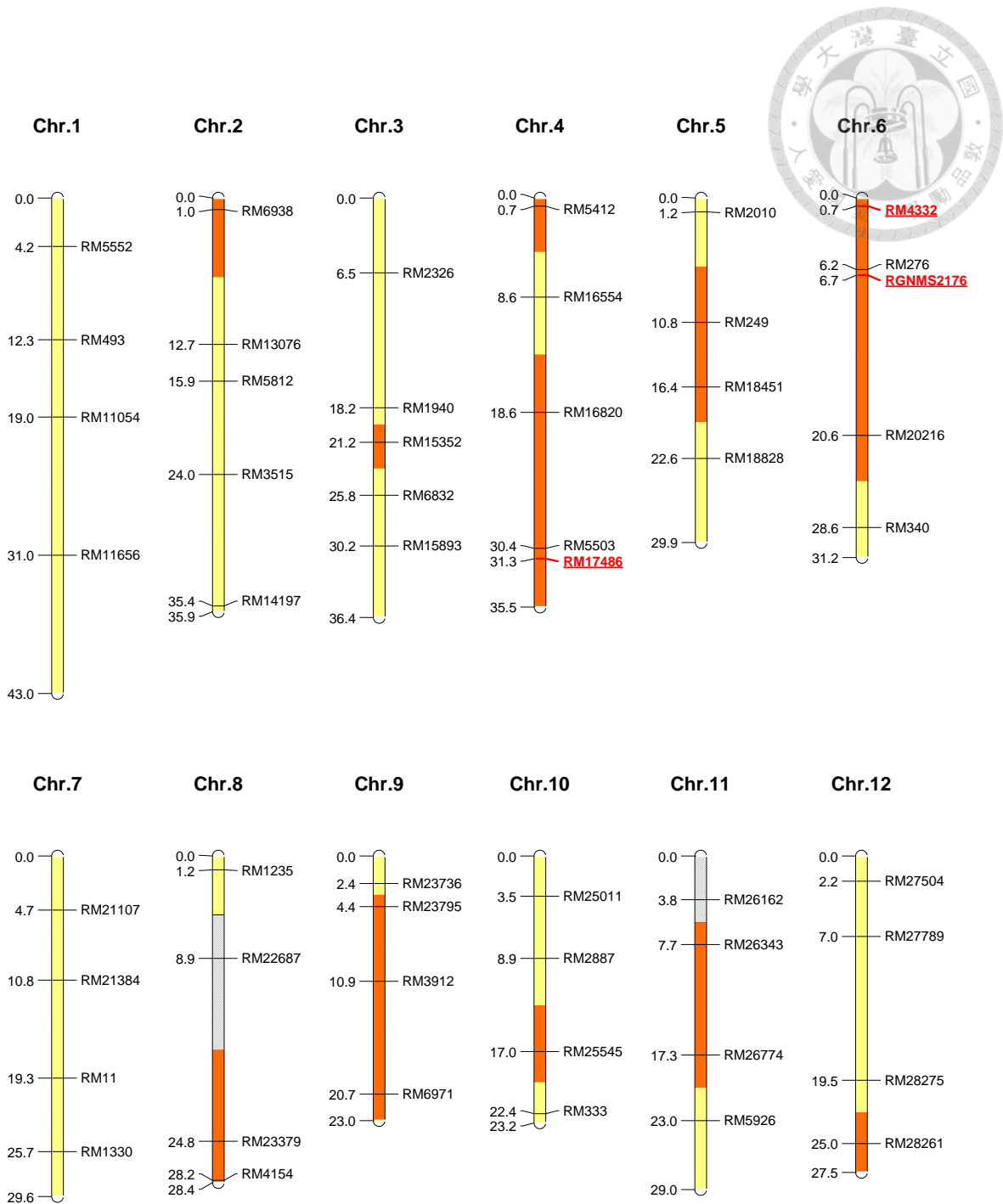


附圖三、編號#82-36 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成

Fig. S3. Markers basis genetic composition of the BC_2F_1 plant #82-36

註：■ 表示與大陸私基因型相同；■ 表示異型結合；

▨ 表示與台稉糯 1 號基因型相同

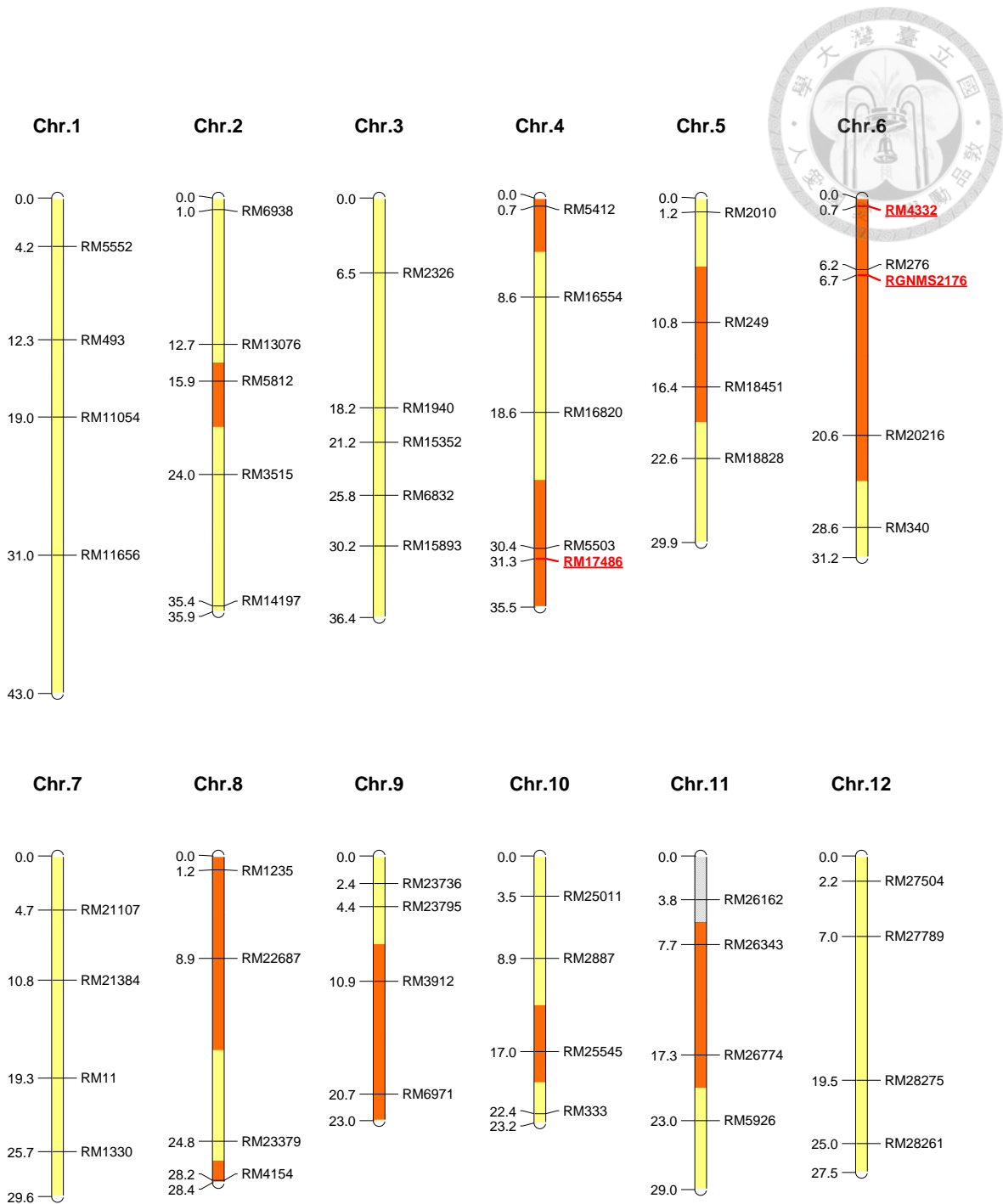


附圖四、編號#82-41 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成

Fig. S4. Markers basis genetic composition of the BC_2F_1 plant #82-41

註：■ 表示與大陸私基因型相同；■ 表示異型結合；

▨ 表示與台稉糯 1 號基因型相同

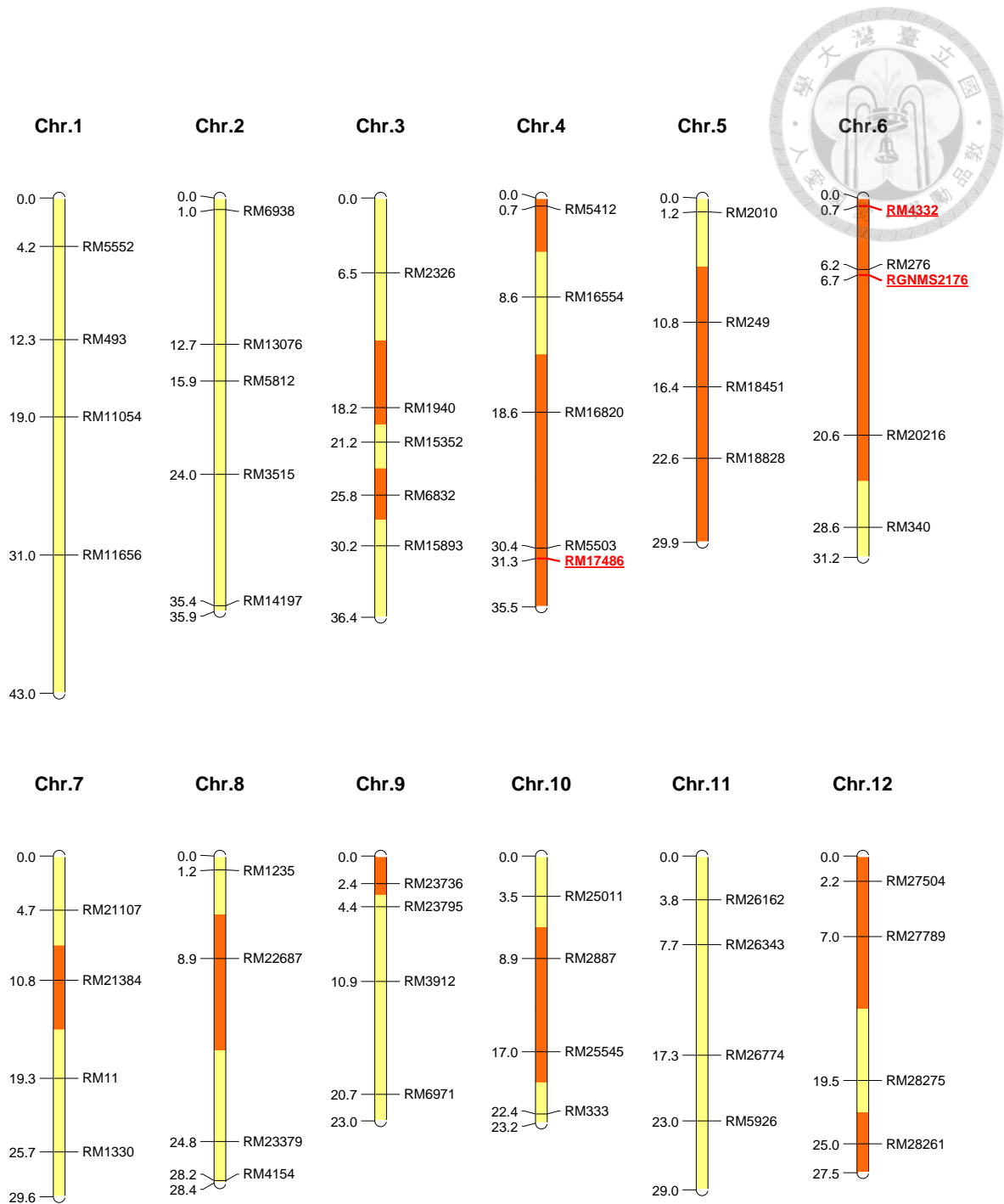


附圖五、編號#82-60 之 BC_2F_1 植株的分子標誌遺傳組成

Fig. S5. Markers basis genetic composition of the BC_2F_1 plant #82-60

註：■ 表示與大陸私基因型相同；■ 表示異型結合；

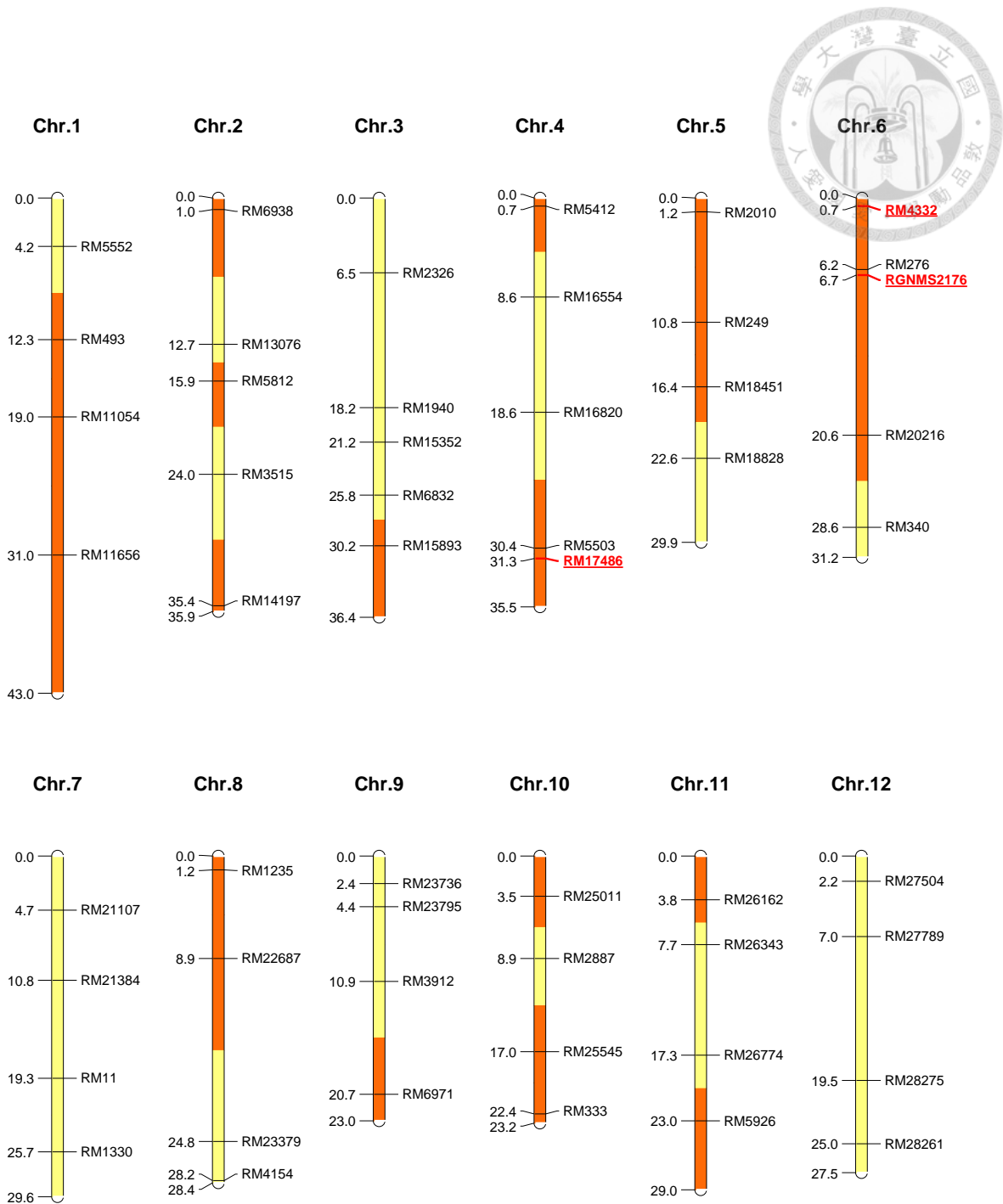
▨ 表示與台稉糯 1 號基因型相同



附圖六、編號#86-16 之 BC₂F₁ 植株的分子標誌遺傳組成

Fig. S6. Markers basis genetic composition of the BC₂F₁ plant #86-16

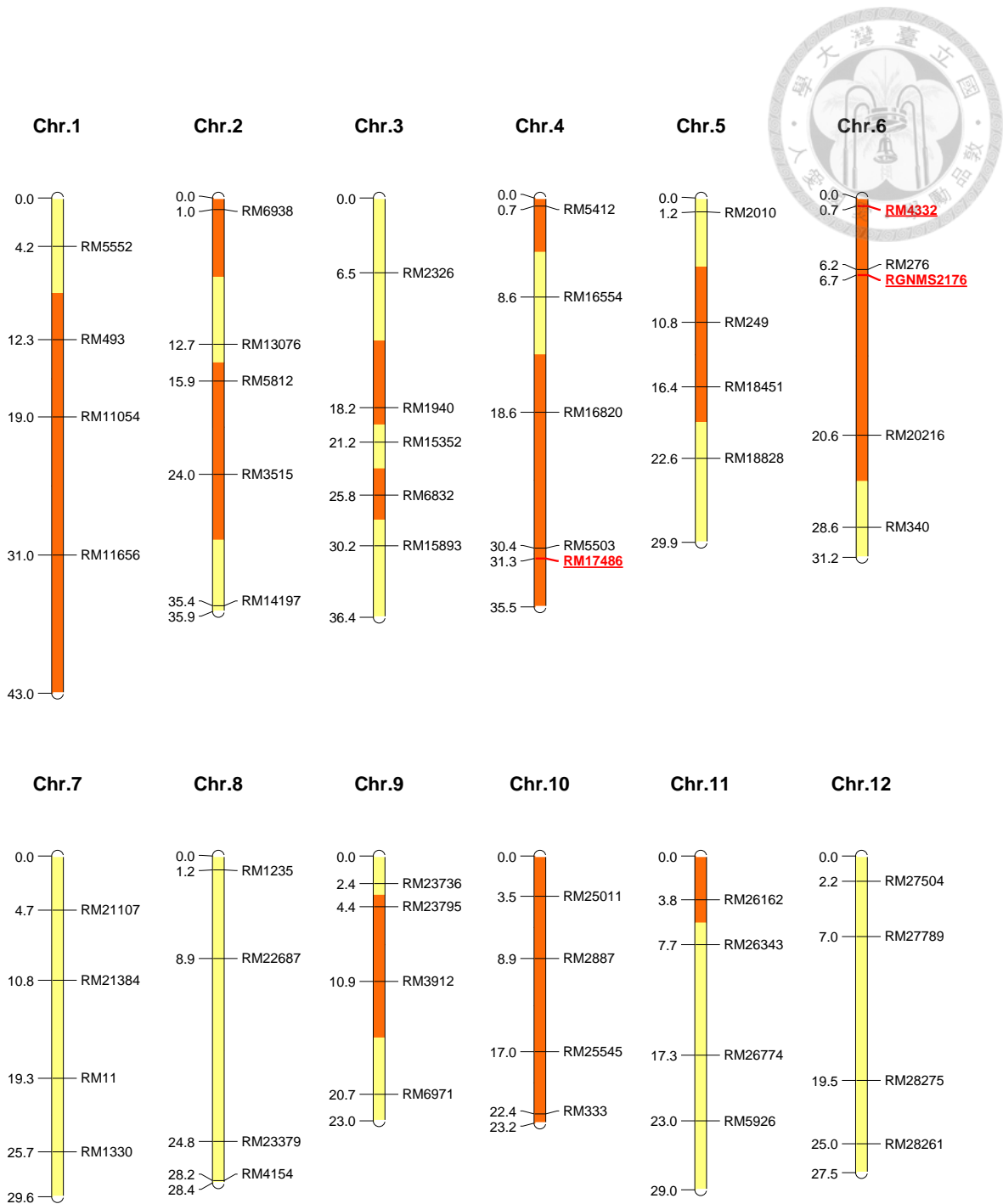
註：□ 表示與大陸私基因型相同；■ 表示異型結合



附圖七、編號#93-34 之 BC₂F₁ 植株的分子標誌遺傳組成

Fig. S7. Markers basis genetic composition of the BC₂F₁ plant #93-34

註：□ 表示與大陸私基因型相同；■ 表示異型結合



附圖八、編號#93-53 之 BC₂F₁ 植株的分子標誌遺傳組成

Fig. S8. Markers basis genetic composition of the BC₂F₁ plant #93-53

註：□ 表示與大陸私基因型相同；■ 表示異型結合

附表一、BC₁F₁ 世代之 3 組前景選拔分子標誌基因型

Table. S1. Genotypes of 3 markers for foreground selection in BC₁F₁ generation

1	2	3	6	13	14	15	17	18	24	25	26	27	28	29
H	H	H	B	B	H	B	B	H	B	B	B	H	H	B
B	H	B	B	B	H	H	H	B	B	H	H	B	H	B
B	H	B	H	H	H	B	B	B	H	B	H	B	B	B
30	31	33	34	35	36	37	39	40	41	42	43	44	45	46
H	B	B	H	H	B	H	H	B	B	B	B	B	B	H
H	H	H	B	H	B	H	B	B	H	H	B	H	H	H
B	B	H	B	H	B	H	H	B	B	B	B	H	H	H
49	52	53	54	55	56	57	58	59	60	62	63	65	66	67
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	H	B	B	B	B	B	B	B	NA	B	B	B	B	B
68	69	70	71	73	74	75	76	78	81	82	83	84	85	86
B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	B	B	H	H
B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	B	B	B	H
B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	H	B	B	H	H
87	88	89	90	91	92	93	94	95	97	99	100	101	102	103
B	B	B	B	H	B	H	H	H	B	B	B	H	B	H
H	H	H	H	B	H	H	B	H	B	B	H	B	B	B
H	H	B	B	B	H	H	B	H	B	B	H	B	H	H
104	105	106	107	109	110	111	113	114	115					
B	H	B	H	H	B	H	B	B	H					
B	B	B	H	B	H	H	H	H	B					
B	H	B	H	H	B	H	H	H	H					

註 1：由上至下依序為 RGNMS2176、RM17486 與 RM4332

註 2：B 表示與大陸私基因型相同；H 表示異型結合；NA 表示無基因型資料

附表二、BC₂F₁ 世代之 3 組前景選拔分子標誌基因型

Table. S2. Genotypes of 3 markers for foreground selection in BC₂F₁ generation

37-1	37-2	37-3	37-4	37-5	37-6	37-7	37-8	37-9	37-10	37-11	37-12
H	B	B	H	B	B	B	B	B	H	B	B
B	H	H	H	B	B	H	H	H	B	H	B
H	B	B	B	B	H	B	NA	B	H	B	B
37-13	37-14	37-15	37-16	37-17	37-18	37-19	37-20	37-21	37-22	37-23	37-24
B	B	H	H	B	B	H	B	B	B	B	B
H	B	H	B	H	H	B	B	B	B	H	B
H	B	H	H	B	H	B	B	H	H	H	B
37-25	37-26	37-27	37-28	37-29	37-30	37-31	37-32	37-33	37-34	37-35	37-36
B	H	H	B	B	H	H	B	B	B	B	B
H	B	B	H	B	B	H	H	B	H	B	B
H	H	B	H	H	H	H	H	H	B	H	H
37-37	37-38	37-39	37-40	37-41	37-42	37-43	37-44	37-45	37-46	37-47	37-48
H	B	H	B	B	H	B	H	B	H	H	B
H	B	B	B	H	H	H	H	H	B	B	B
H	H	B	NA	H	B	B	B	B	NA	B	NA
37-49	37-50	37-51	37-52	37-53	37-57	37-59	46-1	46-2	46-3	46-4	46-5
B	H	B	H	B	B	H	H	H	B	H	B
B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	B
B	B	B	B	B	B	B	H	H	B	H	B
46-6	46-7	46-8	46-9	46-10	46-11	46-12	46-13	46-14	46-15	46-16	46-17
B	H	NA	H	B	B	B	B	H	H	H	B
H	B	B	H	B	H	H	H	B	B	B	B
B	B	H	B	B	B	B	B	B	H	H	B
46-22	46-23	82-1	82-2	82-3	82-4	82-5	82-6	82-7	82-8	82-9	82-10
H	H	B	H	B	H	B	H	H	B	H	H
H	B	B	H	H	H	B	H	B	H	B	B
H	H	H	H	H	H	B	B	H	B	H	H
82-11	82-12	82-13	82-14	82-15	82-16	82-17	82-18	82-19	82-20	82-21	82-22
H	B	B	B	H	B	B	B	B	B	H	H
B	B	H	H	B	H	B	B	B	H	H	H
H	H	B	B	B	H	H	B	B	H	B	H

82-23	82-24	82-25	82-26	82-27	82-28	82-29	82-30	82-31	82-32	82-33	82-34
H	H	H	B	B	H	B	B	B	H	B	B
H	B	H	H	H	H	H	B	B	H	H	B
H	H	H	H	B	H	H	B	H	B	H	B
82-35	82-36	82-37	82-38	82-39	82-40	82-41	82-42	82-43	82-44	82-45	82-46
B	H	B	B	B	B	H	B	B	H	NA	B
H	H	H	B	B	H	H	H	H	B	B	B
H	H	B	B	B	B	H	B	B	H	H	H
82-47	82-48	82-49	82-50	82-51	82-52	82-53	82-54	82-55	82-56	82-57	82-58
H	B	B	B	B	B	B	B	B	H	B	H
H	B	B	H	B	B	B	B	B	B	H	H
H	H	B	H	B	B	H	B	B	H	B	B
82-59	82-60	82-61	82-62	82-63	82-64	82-65	82-66	82-67	82-68	82-69	82-70
H	H	B	H	B		H	H	B	H	H	B
H	H	H	H	B	NA	B	B	B	H	B	B
H	H	H	B	B		B	B	B	H	B	B
82-71	82-72	82-73	82-74	82-75	82-76	82-77	82-78	82-79	82-80	82-81	82-82
H	H	H	H	H	B	B	B	H	H	H	H
H	B	B	H	H	H	H	B	B	B	B	H
H	H	H	B	B	B	H	B	B	B	H	B
82-83	82-84	82-85	82-86	82-87	82-88	82-89	82-91	82-92	82-93	82-94	82-95
B	NA	B	H	B	B	H	H	H	H	B	B
H	B	H	H	H	B	B	B	H	H	B	B
B	B	B	B	B	B	B	B	B	H	B	H
86-1	86-2	86-3	86-4	86-5	86-6	86-7	86-8	86-9	86-10	86-11	86-12
B	B	H	H	B	H	B	B	H	H	B	H
H	H	H	H	H	B	H	H	B	B	H	H
B	H	H	H	B	H	B	B	B	H	B	B
86-13	86-14	86-15	86-16	86-17	86-18	86-19	86-20	86-21	86-22	86-23	86-24
H	H	H	H	B	B	H	H	H	H	H	H
H	B	H	H	B	B	B	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	H	H

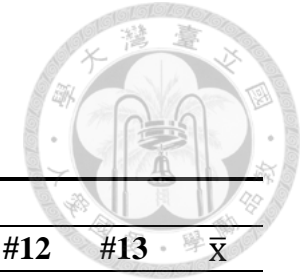
86-25	86-26	86-27	86-28	86-29	86-30	86-31	93-1	93-2	93-3	93-4	93-5
H	H	H	B	H	B	H	H	H	B	B	B
H	B	NA	H	B	B	H	H	H	H	H	H
B	B	B	B	H	H	H	H	B	B	B	B
93-6	93-7	93-8	93-9	93-10	93-11	93-12	93-13	93-14	93-15	93-16	93-17
B	H	H	H	B	H	H	B	B	H	H	H
H	B	H	B	B	H	H	B	H	B	H	H
H	B	H	B	B	H	H	B	B	B	H	H
93-18	93-19	93-20	93-21	93-22	93-23	93-24	93-25	93-26	93-27	93-28	93-29
H	H	B	H	H	B	H	B	H	H	B	H
H	B	B	H	B	B	B	H	B	H	H	B
B	B	H	H	B	H	B	H	H	H	B	H
93-30	93-31	93-32	93-33	93-34	93-35	93-36	93-37	93-38	93-39	93-40	93-41
B	H	H	B	H	H	H	B	B	B	B	B
H	B	H	B	H	B	B	B	H	H	B	H
H	H	H	B	H	H	H	B	B	B	B	H
93-42	93-43	93-44	93-45	93-46	93-47	93-48	93-49	93-50	93-51	93-52	93-53
H	H	B	H	B	B	B	B	H	H	B	H
B	B	H	H	B	B	B	H	B	B	H	H
B	H	H	H	H	B	H	B	B	B	B	H
93-54	93-55	93-56	93-57	93-58	93-59	93-60	93-61	93-62	93-63	93-64	93-65
H	H	B	B	B	H	H	B	B	B	B	B
H	B	H	NA	B	B	H	H	H	B	B	B
H	B	B	H	B	H	H	H	H	B	B	B
93-66	93-67	93-68	93-69	93-70	93-71	93-74	93-75	93-76	93-77	93-78	93-79
B	B	H	H	H	H	H	B	H	B	B	B
B	H	H	H	B	H	B	H	B	B	B	H
H	B	H	B	H	B	B	H	B	B	H	H
93-80	93-81										
B	H										
H	B										
B	B										

註 1：由上至下依序為 RGNMS2176、RM17486 與 RM4332

註 2：B 表示與大陸私基因型相同；H 表示異型結合；NA 表示無基因型資料

附表三、部分 BC₂F₁ 世代植株之一次與二次枝梗數資料

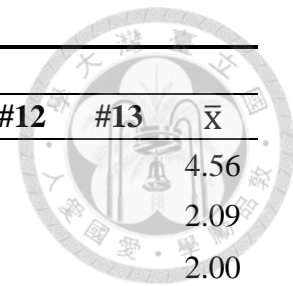
Table. S3. Primary and secondary branches of partial plants in BC₂F₁ generation



ID	RM17486	Primary branch	Secondary branch	Secondary branch no. per primary branch														
				#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	\bar{x}	
86-3	H	9	27	3	2	3	3	4	3	4	3	2						3.00
86-13	H	9	22	0	2	2	3	2	4	3	3	3						2.44
86-16	H	8	16	1	0	2	2	3	3	3	2							2.00
86-21	H	11	29	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	2				2.64
86-23	H	9	23	2	2	2	3	3	3	3	3	2						2.56
46-1	H	10	30	1	2	2	5	5	4	3	3	4	1					3.00
46--2	H	10	19	0	1	0	3	2	2	3	3	3	2					1.90
46-4	H	12	43	2	2	3	4	5	3	4	5	4	4	4	3			3.58
37-37	H	11	30	1	2	3	3	3	4	4	3	3	2	2				2.73
82--2	H	11	33	0	2	4	4	4	3	4	3	3	3	3				3.00
82--4	H	11	36	2	2	4	5	3	4	4	3	3	3	3				3.27
82-22	H	10	25	0	1	2	3	3	4	3	3	3	3					2.50
82-23	H	9	27	3	3	3	3	2	3	3	4	3						3.00
82-25	H	9	15	0	1	2	2	3	3	2	2	0						1.67
82-28	H	9	26	3	4	3	4	4	4	3	1	0						2.89
82-36	H	11	26	1	2	3	2	3	3	3	2	3	2	2				2.36
82-41	H	12	33	1	3	3	3	2	3	4	3	3	3	3	2			2.75

ID	RM17486	Primary branch	Secondary branch	Secondary branch no. per primary branch													
				#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	\bar{x}
82-47	H	8	18	0	1	3	2	3	4	2	3						2.25
82-59	H	13	26	0	1	1	3	2	2	3	2	3	3	2	2		2.00
82-60	H	11	25	1	2	2	2	2	3	3	3	3	1	3			2.27
82-68	H	11	22	1	1	3	3	2	2	2	2	2	2	2			2.00
82-71	H	9	27	0	0	2	5	4	4	4	4	4					3.00
82-93	H	9	24	3	2	3	2	4	3	2	3	2					2.67
93-1	H	11	29	0	1	3	3	4	4	4	3	3	2	2			2.64
93-8	H	12	29	0	2	2	3	4	2	3	3	3	3	2	2		2.42
93-11	H	2	17	0	3	1	3	3	3	4							2.43
93-12	H	10	29	2	3	0	3	4	4	4	3	3	3				2.90
93-16	H	11	32	2	3	2	3	3	4	4	4	3	3	1			2.91
93-17	H	10	24	0	1	3	3	3	3	3	3	3	2				2.40
93-21	H	9	26	1	3	3	3	3	3	4	3	3					2.89
93-27	H	11	29	1	2	2	2	3	4	3	3	3	3	3			2.64
93-32	H	10	29	0	2	2	3	4	4	4	4	3	3				2.90
93-34	H	11	30	4	0	2	4	5	4	4	2	3	2				3.00
93-45	H	12	29	1	1	2	3	3	4	3	3	3	2	2	2		2.42
93-53	H	11	26	0	3	2	0	4	3	4	3	3	2	2			2.36
93-60	H	10	24	0	0	3	1	4	4	2	4	3	3				2.40
93-68	H	10	30	1	2	3	4	3	3	3	4	4	3				3.00

ID	RM17486	Primary branch	Secondary branch	Secondary branch no. per primary branch														
				#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	\bar{x}	
86-6	B	7	41	3	3	5	7	5	6	5	4	3						4.56
86-10	B	11	23	3	2	1	1	2	2	3	3	2	2	2				2.09
86-14	B	10	20	0	0	1	2	2	3	3	3	3	3					2.00
86-19	B	9	21	0	2	3	4	4	3	2	2	1						2.33
86-29	B	11	29	1	1	2	4	4	4	4	3	2	2	2				2.64
46-15	B	11	24	1	2	0	1	1	4	2	3	3	4	3				2.18
46-16	B	10	25	0	1	3	2	4	4	2	3	3	3					2.50
46-23	B	10	19	1	0	1	3	2	2	3	3	2	2					1.90
37--1	B	7	32	4	4	5	5	6	4	4								4.57
37--10	B	8	24	1	4	3	4	4	3	3	2							3.00
37-16	B	11	29	1	4	2	2	3	4	4	3	3	2	1				2.64
37-26	B	8	24	3	2	3	3	3	4	4	2							3.00
37-30	B	9	26	2	4	2	3	3	4	3	3	2						2.89
82-7	B	10	31	0	1	4	3	4	4	4	4	4	3					3.10
82-9	B	11	21	1	1	1	3	2	3	3	2	2	2	1				1.91
82-10	B	11	23	0	1	1	3	3	3	3	3	2	2	2				2.09
82-11	B	10	21	0	2	1	3	3	3	3	2	2	2					2.10
82-24	B	7	26	1	4	4	5	4	4	4								3.71
82-44	B	11	26	1	1	3	3	4	4	3	2	2	2	1				2.36
82-56	B	10	19	0	1	3	3	3	2	2	2	2	1					1.90



ID	RM17486	Primary branch	Secondary branch	Secondary branch no. per primary branch													
				#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	\bar{x}
82-72	B	9	22	0	0	2	4	3	3	4	3	3					2.44
82-73	B	8	21	2	2	3	2	4	2	3	3						2.63
82-81	B	9	16	0	3	1	2	3	2	2	2	1					1.78
93-26	B	10	39	5	2	2	5	4	5	4	6	3	3				3.90
93-29	B	9	22	2	1	2	3	3	3	3	3	2					2.44
93-31	B	11	37	4	2	3	3	4	4	4	4	3	3	3			3.36
93-35	B	11	24	0	1	2	2	4	4	3	2	3	2	1			2.18
93-36	B	10	32	4	3	3	3	4	4	3	3	3	2				3.20
93-43	B	10	27	0	4	1	2	3	4	4	3	3	3				2.70
93-59	B	9	12	0	0	2	0	1	3	2	2	2					1.33
93-70	B	10	12	0	0	1	1	2	2	2	1	2	1				1.20

註：B 表示與大陸私背景相同；H 表示異型結合；#1-13 為由穗基部至頂端一次枝梗編號； \bar{x} 表示一次枝梗之平均二次枝梗數