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

使用 RAD 定序方法進行臺稉 14 號與桃園 1 號雜交組合之耐穗上發芽數量性狀基因座的遺傳定位

QTL Mapping for Pre-harvest Sprouting in the Cross between TK14 and TY1 Varieties Using RAD Sequencing

謝明修

Ming-Hsiu Hsieh

指導教授：陳凱儀 博士

Advisor: Kai-Yi Chen, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July 2013

誌謝

首先感謝陳凱儀老師兩年的指導與栽培，給我各種學習的機會，以及修改我的論文；也感謝吳東鴻學長兩年來的指導，不僅是在田間操作，在求學與生活上也給予我很大的鼓勵與幫助；同時也感謝農藝系所有老師六年來的栽培，讓我能夠找到自己的興趣，以及未來的人生方向。

感謝竹茵學姐、雲洋學長與糗哥在實驗上的指導，也是暑假與寒假的最佳吃飯友；感謝亞平學姐與群山學長在實驗、課業以及生活上給予我鼓勵與幫助，也度過許多快樂又充實的咖啡時光；感謝欣叡與宏宇的鼓勵，給我的建議總是很理性，我真的獲益良多，品田池有行也讓我永生難忘，因為實在太美也太累了；感謝癢癢，嘉義是好地方，感謝妳在嘉義的招待；感謝小朱在試驗上的經驗分享與討論；感謝愛陵，一起當了一學期的遺傳學助教，合作的很開心；感謝朱怡萱，祝妳學業順利；感謝阿咪與葉人豪，也祝你們研究順利。

感謝我的好朋友高樹民，從大一認識到現在，有苦有樂，在研究所階段也教我如何使用軟體，沒有你的幫助我不可能學習這麼快；感謝內衣幫的成員，總是能夠適時的淨化我的心靈，讓我有動力再繼續走下去；感謝系男籃的所有成員，完成了我的籃球夢。

感謝我大學時期的指導老師，林順福老師，以及實驗室的學長姐：泰佑、高高、婷玫與淨惠。與你們相處的一年半相當的充實開心，希望你們未來都順利。

感謝劉致華的支持與體諒，讓我在兼顧課業與家庭時，也能有妳的相伴，希望未來還能夠一起成長，品嘗人生各種滋味。

最後，感謝我的父母，感謝你們一路栽培我至今，未來你們要好好享福，不要為我們擔心。

中文摘要

水稻穗上發芽 (pre-harvest sprouting) 是指生理成熟的穎果在收穫前發芽，而造成產量損耗與稻米品質下降。我們選用高穗上發芽率品種臺粳 14 號以及低穗上發芽率品種桃園 1 號，建立 F_2 遺傳定位族群並進行穗上發芽與種子休眠之數量性狀基因座分析。我們在 F_2 族群中挑選出穗上發芽率最高與最低的個體各 30 株，並萃取這些植株的 DNA 來進行 RAD (Restriction-site Associated DNA) 定序，以便同時開發高密度的 SNP 分子標記並完成選拔個體之所有分子標記的基因型鑑定。我們亦由此 60 個 F_2 個體繁殖成 $F_{2:3}$ 家系，進一步觀察穗上發芽與種子休眠維持日數之關聯性。試驗結果顯示穗上發芽與種子休眠性之數量性狀基因座被定位在第 3 對染色上相同的染色體區間。此外，高休眠性之遺傳重組家系皆具有低穗上發芽的特性，但在低休眠性之遺傳重組家系中則呈現高度差異的穗上發芽率。

Abstract

Preharvest sprouting in rice is germination of physiologically ripe kernel before harvest, which leads yield loss and bad grain quality. We made an F_2 genetic mapping population by the cross of TK14, a variety with high preharvest sprouting rate, and TY1, a variety with low preharvest sprouting rate, and then conducted QTL analysis for preharvest sprouting and seed dormancy. We selected 30 individuals with each of highest and lowest preharvest sprouting rate in the F_2 population, and extracted their DNA to do RAD (Restriction-site Associated DNA) sequencing, in order to develop high-density SNP markers and to complete all marker genotypes of these selected individuals simultaneously. We also generated $F_{2:3}$ families from these selected F_2 individuals and investigated the relationship between preharvest sprouting and seed dormancy. The results showed that QTLs for both preharvest sprouting and seed dormancy were detected on the same region of chromosome 3. Also, all families with strong seed dormancy showed low preharvest sprouting rate. However, families with weak seed dormancy show highly variable preharvest sprouting rate.

目錄

口試委員審定書 i

誌謝 ii

中文摘要 iii

Abstract iv

圖目錄 vii

表目錄 viii

縮寫字對照 ix

第一章　前言 1

第一節　種子休眠性與穗上發芽的關係 1

第二節　種子休眠性與穗上發芽的遺傳研究 3

第三節　DNA 分子標記的發展與 RAD 定序法 13

第二章　研究目的 21

第三章　材料與方法 22

第一節　雜交親本及定位族群 22

第二節　穗上發芽離體檢定與休眠性檢定 23

第三節　RAD 定序圖書庫的建構 25

第四節　RAD 資料處裡 31

第五節　數量性狀基因座定位 34

第四章　結果與討論 35

第一節　穗上發芽離體檢定與休眠性檢定 35

第二節　RAD 圖書庫定序結果 44

第三節　數量性狀基因座定位 49

第五章　結論 54

引用文獻 55

圖目錄

圖一、前人研究所偵測到的休眠性與穗上發芽數量性狀基因座 8

圖二、RAD 定序圖書庫建立 16

圖三、Stacks 軟體分析 RAD 定序資料的序列組裝、比對、及基因型鑑定流程20

圖四、穗上發芽離體檢定方法 24

圖五、種子休眠性檢定方法 26

圖六、一期作 F_2 族群抽穗日期 36

圖七、一期作穗上發芽離體檢定結果 37

圖八、$F_{2:3}$ 家系抽穗日期 38

圖九、$F_{2:3}$ 家系發芽率分布 39

圖十、兩期作穗上發芽率散布圖 40

圖十一、二期作種子休眠性檢定日數分布 41

圖十二、二期作穗上發芽率與休眠性維持日數散布圖 43

圖十三、篩選後之分子標記物理圖譜 46

圖十四、每個品系的 reads 數、Loci 數以及平均 read depth 散佈圖 48

圖十五、10,000 次重排檢定 LOD 值分布 50

圖十六、分子標記與外表型散佈圖 52

表目錄

表一、目前已知之種子休眠及穗上發芽數量性狀基因座 5

表二、P1 adapter 上 62 種 barcode 序列 28

表三、基因資料篩選標準 33

表四、兩期作穗上發芽離體檢定與二期作休眠性檢定單一標記分析 51

縮寫字對照

ABA	Abscisic acid
AFLP	Amplified fragment length polymorphim
ARMS	Amplification refractory mutation system
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence
D	Dormancy
DNA	DeoxyriboNucleic acid
ECT	Effective cumulative temperature
GBS	Genotyping by sequencing
HRM	High resolution melting
KASPar	Kbiosciences allele specific PCR
LOD	Log of odds
PCR	Polymerase chain reaction
PHS	Pre-harvest sprouting
QTL	Quantitative trait locus
RAD	Restriction-site associated DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSR	Simple sequence repeat

第一章　前言

第一節　種子休眠性與穗上發芽的關係

種子休眠性的定義為種子在適合發芽的環境下暫時喪失發芽能力的情形 (Bewley, 1997; Hilhorst, 1995; Li and Foley, 1997)。若依照休眠性發生的時間來區分，可分為初始性休眠 (primary seed dormancy) 以及二次休眠 (secondary seed dormancy) (Bewley, 1997; Hilhorst, 1995; Li and Foley, 1997)：初始性休眠是指種子與植株分離後隨即具有的休眠性，形成的原因可能為植株本身的ABA或是種子發育時胚所合成的ABA影響了種子的發芽 (Hilhorst, 1995; Kucera *et al.*, 2005) 或是種子本身對於ABA的敏感性不同而造成；而二次休眠是指原來不具有休眠性或已經喪失休眠性的種子因為離開適合發芽的環境而誘導所產生的休眠性，影響的因素有溫度；氧氣等因素 (Baskin and Baskin, 1980; Gubler *et al.*, 2005)。若依照形成休眠的部位來區分休眠性種類，可分成種皮休眠 (hull-imposed dormancy) 以及胚休眠 (embryo dormancy) (Benech-Arnold *et al.*, 1999; Bewley, 1997)，種皮休眠是由包覆胚的組織，如胚乳 (endosperm)、果皮 (pericarp)、護穎 (glumella) 以及外穎 (lemma) 藉著阻止水分的吸收、物理性的阻礙氣體交換以及組織中存在著抑制發芽物質等方式來產生休眠性。Benech-Arnold *et al.* (1999) 發現若將具有強休眠性的大麥品種 Quilmes palomar 與具有較弱休眠性的品種 B1215 的胚獨立取出培養，發現 Quilmer palomar 的發芽勢能夠與 B1215 相同，顯示包覆胚的組織可能存在著抑制發芽的物質，而許多研究都認為是由會抑制種子發芽的離層素 (abscisic acid, ABA) 與吉貝素 (gibberellin) 所控制 (Benech-Arnold *et al.*, 1999; Steinbach *et al.*, 1997)。

穗上發芽的定義為生理成熟的種子在收穫前便發芽的情形 (Derera, 1989)。穗

上發芽被認為與種子休眠性相關，因為缺乏種子休眠性的品種通常會造成高穗上發芽的情形 (Harlan *et al.*, 1973)。已知影響種子穗上發芽耐受性的原因包括種子胚對於離層素 (abscisic acid) 的敏感程度 (Walkersimmons, 1987)、持續的降雨和較高的溫度與濕度 (Li and Foley, 1997)、以及種子中含有抑制穗上發芽的物質 (Himi *et al.*, 2002)。

水稻種子休眠性與穗上發芽關係的釐清，對於臺灣稻米的生產具有實用性的價值。臺灣水稻的栽培制度為特有的兩個期作，而一期作收穫至第二期作育苗時間較短，約 10 至 20 天，因此若要育成具有高度穗上發芽耐受性的品種，必須同時考慮品種的休眠性，避免因為休眠性太強，而影響到二期作的育苗作業。為了瞭解水稻穗上發芽耐受性與種子休眠性的關係，以及這兩種性狀在水稻品種間的變異情形，陳隆澤等人 (1980) 對 182 個水稻品種進行穗上發芽以及休眠性的檢定。穗上發芽檢定方法為在品種抽穗後 25 天至 45 天間，每隔 5 天逢機選取 3 穗，不經過乾燥立即置於舖有濾紙的發芽盤中浸水，並置於 30℃ 黑暗的環境中 7 天，再取出計算發芽率，並將抽穗後 25 天發芽率即達 50 % 的品系定義為 1 級，以後每隔 5 天增加 1 級。休眠性檢定方法為在水稻黃熟期 (約抽穗後 30 至 50 天) 進行取樣，先於室溫下風乾 3 天，然後分別經 0、3、7、14 (之後間隔 7 天) 天，將 50 粒種子 3 重複置於舖有濾紙的培養品中，於 30℃ 黑暗的環境中 7 天，再取出計算發芽率，發芽率未達 50% 者視為仍具有休眠性。結果顯示，水稻穗上發芽耐受性在品種間變異甚大，且具有較佳穗上發芽耐受性的多為秈稻品種；而水稻品種休眠性一般不長，但品種間仍具有變異，具有高度休眠性的品種同樣多為秈稻品種。不論粳稻或秈稻，品種之穗上發芽耐受性與休眠性間有極顯著的相關性，有高度穗上發芽耐受性的品種通常具有較強的休眠性，反之，穗上發芽耐受性較弱的品種休眠性亦較弱。

第二節　種子休眠性與穗上發芽的遺傳研究

水稻種子休眠性與穗上發芽特性皆是由許多基因調控的數量性狀，相關的遺傳研究結果整理於表一與圖一，以下針對個別研究中外表性狀量測的生理特性、遺傳材料的雜交組合、以及數量性狀基因座遺傳定位的結果，分別作摘要敘述。

在水稻種子休眠性方面，Lin *et al.* (1998) 使用休眠性較弱的粳稻品種 Nipponbare 與具有強休眠性的秈稻品種 Kasalath 雜交所建立的 BC_1F_5 族群進行休眠性的數量性狀基因座定位，取樣方法為在抽穗後第 40 天取樣，每個品系取兩穗，並將穗置於 30℃ 相對溼度 100% 的環境下 7 天，之後計算發芽率，結果在第 3 對、第 7 對、第 8 對染色體上偵測到 5 個 QTLs，發現這 5 個 QTLs 當中具有較強休眠性的秈稻品種 Kasalath 的對偶基因能增強種子的休眠性。

Cai and Morishima (2000) 使用具有強休眠性的野生稻 W1944 與休眠性較弱的秈稻 Pei-kuh 雜交所建立的 125 個重組自交系 (recombinant inbred line) 進行種子休眠性的數量性狀基因座定位，且為了區分種皮休眠以及胚休眠，將種子分成完整種子 (intact seed) 以及去除種皮種子 (de-hulled seed)，進行六種不同的發芽試驗。1995 年於抽穗後 100 天取樣，每個品系取 10 粒完整種子於培養皿中，置於 30℃ 的環境下 7 天，之後計算發芽率，1996 年則是於抽穗後 30 天進行取樣並進行發芽試驗，而 1997 年進行了四種發芽試驗，分別為抽穗後 30 天的完整種子；抽穗後 30 天的去除種皮種子；抽穗後 60 天的完整種子；抽穗後 60 天的去除種皮種子，種子取下後先於 30℃ 的溫室中風乾 7 天，之後進行發芽試驗。數量性狀基因座定位的結果顯示，1995 年的檢定資料偵測到 2 個種子休眠數量性狀基因座，1996 年偵測到 1 個，而 1997 年的四種試驗分別偵測到 12、2、8 與 5 個種子休眠數量性狀基因座，之後將遺傳位置相近的基因座視為同一個後，整理得到 17 個休眠性數量性狀基因座，位於第 2、3、5、6、8、9 與 11

表一、目前已知之種子休眠及穗上發芽數量性狀基因座

休眠性與穗上發芽數量性狀基因座生理特性的界定，是依據下列所陳述的標準決定。初始性休眠：將完熟期稻穀自穗取下後，未經任何前處裡，馬上進行發芽率試驗，所偵測到的數量性狀基因座與初始性休眠相關。二次休眠：稻穀先經過乾燥或儲藏等前處裡後進行發芽率檢定，且需要與初始性休眠的發芽率檢定結果進行比對，僅在乾燥或儲存的處理後才能偵測到的數量性狀基因座，才認定與二次休眠相關。若沒有與初始性休眠數量性狀基因座的定位結果作比對，則所偵測到的數量性狀基因座並無法清楚界定是屬於何種休眠性。胚休眠與種皮休眠：若將內外穎去除後進行發芽試驗，偵測到的數量性狀基因座便與胚休眠相關；而同時進行去穎以及完整穀粒發芽試驗，卻只有在完整穀粒試驗中偵測到的數量性狀基因座，則認為與種皮休眠相關。若只進行後者試驗，則無法界定是屬於何種休眠性。穗上發芽：同樣為取樣後未經任何前處裡，馬上進行發芽率試驗，其與初始性休眠不同之處在於取樣的稻穀仍留在稻穗上，而且取樣的時間介於水稻生殖生長期的黃熟期至完熟期之間。

數量性狀基因座名稱	約略物理位置		緊密連鎖分子標記	生理特性	雜交組合	引用文獻
(未命名)	Chr3	10 Mb	C1488			
(未命名)	Chr5	1 Mb	R830			
(未命名)	Chr7	17 Mb	R1440	初始性休眠	Nippobare/Kasalath//Nipponbare BC_1F_5	Lin *et al.* (1998)
(未命名)	Chr7	24 Mb	R1245			
(未命名)	Chr8	1.6 Mb	C390			

表一、目前已知之種子休眠及穗上發芽數量性狀基因座 (續)

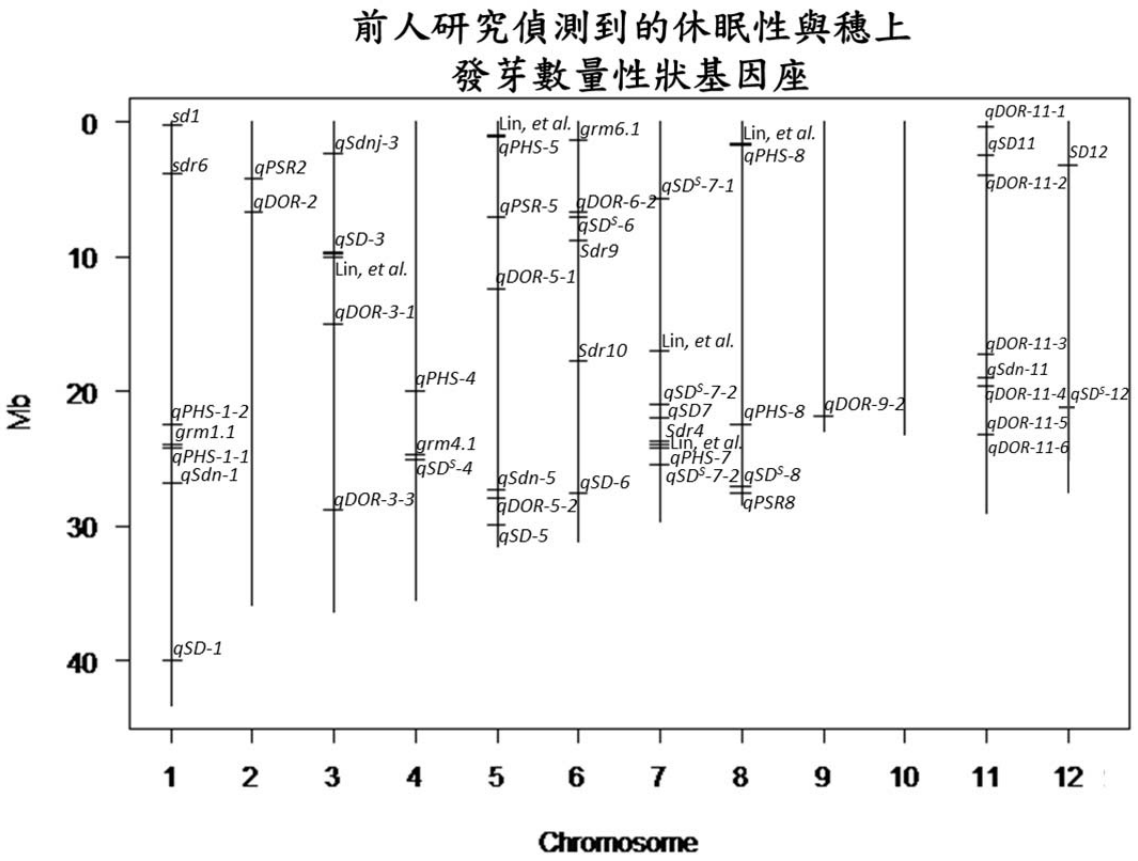
數量性狀 基因座名稱	約略物理位置		緊密連鎖 分子標記	生理特性	雜交組合	引用文獻
qDOR-2	Chr2	6.7 Mb	*Ampl*-RZ476	二次休眠		
qDOR-3-1	Chr3	15 Mb-19.6 Mb	G144-BCD454	初始性種皮休眠		
qDOR-3-2	Chr3	(沒有資訊)	C12-*Pgil*	初始性種皮休眠		
qDOR-3-3	Chr3	28.8 Mb-33.8 Mb	R1927-CDO122	初始性種皮休眠		
qDOR-5-1	Chr5	12.4 Mb-13.6 Mb	RZ296-BCD107	初始性種皮休眠		
qDOR-5-2	Chr5	27.9 Mb	*Bh2*-R521	初始性種皮休眠		
qDOR-6-1	Chr6	(沒有資訊)	*Pgi-Amp3*	二次種皮休眠		
qDOR-6-2	Chr6	6.7 Mb-8 Mb	R2171-RZ144	初始性休眠		
qDOR-8	Chr8	27.5 Mb	RG181-*Amp2*	初始姓種皮休眠	Pei-kuh/W1944 RILs	Cai and Morishima (2000)
qDOR-9-1	Chr9	(沒有資訊)	Awn-*Est12*	初始性休眠		
qDOR-9-2	Chr9	21.8 Mb-22.5 Mb	RZ792-C506	二次胚休眠		
qDOR-11-1	Chr11	0.3 Mb-4 Mb	G24-RZ141	二次種皮休眠		
qDOR-11-2	Chr11	4 Mb	RZ141-APAGE2	初始性休眠		
qDOR-11-3	Chr11	17.3 Mb-19.6 Mb	G257-CDO365	初始性種皮休眠		
qDOR-11-4	Chr11	19.6 Mb	CDO365-C6a	二次胚休眠		
qDOR-11-5	Chr11	23.2 Mb	R1465-RG1109	初始性種皮休眠		
qDOR-11-6	Chr11	23.2 Mb-28.4 Mb	RG1109-RZ536	初始性種皮休眠		

表一、目前已知之種子休眠及穗上發芽數量性狀基因座 (續)

數量性狀 基因座名稱	約略物理位置		緊密連鎖 分子標記	生理特性	雜交組合	引用文獻
grm1.1	Chr1	24 Mb	RM5	無法區分 (經乾燥 4 天)	IRGC 105491/Jefferson//Jsferson	Thomson *et al.* (2003)
grm4.1	Chr4	24.7 Mb	RZ740			
grm6.1	Chr6	1.3 Mb	RM170			
qSD^S-4	Chr4	25.Mb	RM252	無法區分 (經後熟處理)	SS18-2/EM93-1//EM93-1	Gu *et al.* (2004)
qSD^S-6	Chr6	7 Mb	RM549			
qSD^S-7-1	Chr7	5.7 Mb	RM180			
qSD^S-7-2	Chr7	21 Mb	RM346			
qSD^S-8	Chr8	22.5 Mb	RM531			
qSD^S-12	Chr12	25 Mb	RM270			
qSD-3	Chr3	9.7 Mb	CT339	初始性休眠	Zhaiyeqing 8/Jingxi 17 DH lines	Guo *et al.* (2004)
qSD-5	Chr5	31.5 Mb	RG776B			
qSD-6	Chr6	27.6 Mb	G329			
qSD-11	Chr11	2.5 Mb	RZ638			
qSD-1	Chr1	40 Mb	RM104	初始性休眠	IR50/Tatsumimochi//Miyukimochi	Wan *et al.* (2005)
qSD-3	Chr3	9.8 Mb	RM7			
qSD-7	Chr7	22 Mb	RM10			
sd1	Chr1	0.2 Mb	RM495	胚休眠 (儲藏後去穎)	Sharma et Shastry/CL16 F_2	Li *et al.* (2006)
sd6	Chr6	(沒有資訊)	RC6-69			
sd12	Chr12	3.18 Mb	RM247			

表一、目前已知之種子休眠及穗上發芽數量性狀基因座 (續)

數量性狀 基因座名稱	約略物理位置		緊密連鎖 分子標記	生理特性	雜交組合	引用文獻
qSdn-1	Chr1	26.8 Mb	RM237	初始性休眠	N22/Nanjin35//Nanjing35 N22/USSR5//USSR5 N22/USSR5 F_2	Wan *et al.* (2006)
qSdnj-3	Chr3	2.4 Mb	RM231			
qSdn-5	Chr5	27.3 Mb	RM480			
qSdn-7	Chr7	25.4 Mb	RM234			
qSdn-11	Chr11	19 Mb	RM21			
Sdr4	Chr7	23.7 Mb	RM1365	初始性休眠	Nippobare/Kasalath//Nipponbare **BC_1F_5**	Sugimoto *et al.* (2010)
Sdr6	Chr1	3.8 Mb	RM6902	初始性休眠	Nona bokra/Koshihikari//Koshihikari CSSL	Marzougui *et al.* (2012)
Sdr9	Chr6	8.8 Mb	RM5963			
Sdr10	Chr6	17.7 Mb	RM3207			
qPHS-1-1	Chr1	24.2 Mb	R2635	穗上發芽	IR24/Asominor RILs	Dong *et al.* (2003)
qPHS-1-2	Chr1	22.5 Mb	Y2820R			
qPHS-4	Chr4	20 Mb	C891			
qPHS-5	Chr5	1.1 Mb	R830			
qPHS-7	Chr7	24.2 Mb	R1245			
qPHS-8	Chr8	1.7 Mb	C277			
qPSR2	Chr2	4.2 Mb	RM5512	穗上發芽	K81/G46B F_2	Gao *et al.* (2008)
qPSR5	Chr5	7 Mb	RM6034			
qPSR8	Chr8	27 Mb	RM3754			



圖一、前人研究所偵測到的休眠性與穗上發芽數量性狀基因座。文獻中若分子標記無法找到確切物理位置之分子標記便沒有標記在圖中。

對染色體上，也發現完整種子與去除種皮種子試驗所偵測到的數量性狀基因座位置不完全相同，顯示數量性狀基因座的效應可能是由種皮休眠或是胚休眠所造成。

Thomson *et al.* (2003) 使用由野生稻收集系 (accession) IRGC 105491 (*Oryza rufipogon*) 與粳稻品種 Jefferson 雜交再與 Jefferson 回交所建立的高世代回交族群 (advance backcross population) 進行產量 (yield)、產量構成要素 (yield component) 以及型態性狀 (morphological trait) 的數量性狀基因座定位，在休眠性檢定方面，作者將 353 個 BC_2F_1 種植於溫室，於各品系開花後 30 天取樣，每個品系取 30 粒種子，先於 45℃ 環境中乾燥4天，再浸泡於水中兩天，最後置於鋪有濾紙的培養皿中 4 天，之後計算發芽率。數量性狀基因座定位的結果顯示，偵測到 3 個種子休眠性數量性狀基因座，分別是位於第1對染色體的 *grm1.1*、第 4 對染色體的 *grm4.1* 以及第 6 對染色體的 *grm6.1*，其中 *grm4.1* 為最主效的數量性狀基因座，能夠解釋 10.2% 的外表型變異，而能提高休眠性的對偶基因皆來自 IRGC 105491。

Gu *et al.* (2004) 使用種子休眠性較強的秈稻品種 SS18-2 與種子休眠性較弱的育種系 (breeding line) EM93-1 雜交，之後與 EM93-1 回交所建立的 156 個 BC_1 進行種子休眠性的數量性狀基因座定位，作者在開花後 40 天進行取樣，並先將收穫的種子進行乾燥，將種子水份含量降至 12.1%±0.6%，並將尚未進行發芽試驗的種子保存於 -20℃ 冰箱中保存，避免後熟作用而解除休眠性，之後先進行三種後熟處裡，分別是以溫度 25.7±0.6℃、相對濕度 31.9±2.9% 環境下處裡 1 天、11 天、21 天三種，再移至鋪有濾紙的培養品於 30℃、相對溼度 100% 的環境進行發芽試驗。在三種處理下共偵測到 6 個種子休眠數量性狀基因座，分別位於第 4、第 6、第 7、第 8、第 12 對染色體，分別命名為 qSD^S-4、qSD^S-6、qSD^S-7-1、qSD^S-7-2、qSD^S-8 以及 qSD^S-12，而上標 S 代表品種 SS18-2 的對偶基因可增加

種子的休眠性，其中 *qSD*^{S}*-12* 在三種處理下皆具有最大的外表型解釋能力，分別是 12.9%、24.3% 以及 19.7%，並發現基因座間存在著交感作用，顯示休眠性為多基因控制的複雜性狀。

Guo *et al.* (2004) 使用秈稻品種窄葉青 8 號與粳稻品種京系 17 號雜交所建立的 127 個雙單倍體品系 (double haploid line) 進行休眠性數量性狀基因座定位，且認為在分離族群中依據有效積溫 (effective cumulative temperature, ECT) 來決定取樣時間比抽穗後日數適當，作者在各品系抽穗後有效積溫達到 600℃ 時進行取樣，每個品系取 3 穗，置於 30℃ 相對溼度 100% 的環境下 7 天，之後取出計算發芽率，定位結果共偵測到4個種子休眠性數量性狀基因座，分別是位於第3對染色體上的 *qSD-3*、第 5 對染色體上的 *qSD-5*、第 6 對染色體上的 *qSD-6* 以及第 11對染色體上的 *qSD-11*，其中 *qSD-3* 能解釋最多的外表型變異，為 14.5%，而窄葉青 8 號與京系 17 號皆具有增強種子休眠性的對偶基因。

Wan *et al.* (2005) 使用具有強休眠性的秈稻栽培品種 IR50 與粳稻栽培品種 Tatsumimochi 雜交，再與粳稻栽培品種 Miyukimochi 雜交建立三向雜交 (three-way cross) 的 F_1 以及 F_2 族群進行種子休眠性數量性狀基因座定位，取樣方法為在抽穗後第 35 天進行取樣，並將尚未進行試驗的種子保存於 4℃ 冰箱中維持休眠性，之後再將種子置於舖有濾紙的培養皿中於 36℃、相對溼度 100% 環境下 7 天，再取出計算發芽率，在 F_1 世代偵測到三個種子休眠性數量性狀基因座，位於第 1、第 3 與第 7 對染色體上，命名為 *qSD-1*、*qSD-3* 與 *qSD-7*，其中 *qSD-3* 在 F_2 族群中也有被偵測到，分別能解釋 21% 以及 15% 的外表型變量。

Li *et al.* (2006) 使用休眠性較強的野生稻品種 Sharma et Shastry (*Oryza nivara*) 與休眠性較弱的秈稻品種 CL16 雜交所建立的F_2族群，針對落粒性、分蘖數、株高以及種子休眠性等性狀進行數量性狀基因座定位，而休眠性的檢定方法為將 F_1 植株所結的 F_2 種子收穫儲藏三個月後，將內外穎去除置於舖有濾紙的培養皿中，

於 27℃ 黑暗中進行發芽試驗，並記錄每顆種子於第幾天發芽。數量性狀基因座定位的結果顯示，偵測到 3 個數量性狀基因座，分別是位於第 1 對染色體的 *sd1*、第 6 對染色體的 *sd6* 以及第 12 對染色體的 *sd12*，而能增強休眠性的對偶基因皆是來自野生稻 Sharma et Shastry，其中 *sd1* 與 *sd6* 是較主效的數量性狀基因座，分別能解釋 22% 及 17.6% 的外表型變異。

Wan *et al.* (2006) 使用具有強休眠性的秈稻品種 N22 與休眠性較弱的粳稻品種 Nanjing35 以及 USSR5 建立三個族群進行種子休眠性數量性狀基因座定位，第一個族群是由 N22 與 Nanjin35 雜交，再與 Najing35 回交建立的 BC_1 族群，第二個族群由 N22 與 USSR5 雜交，再與 USSR5 回交建立的 BC_1 族群，第三個族群由 N22 與 USSR5 雜交所建立的 F_2 族群，取樣方法為在抽穗後第35天進行取樣，並將尚未進行試驗的種子保存於 4℃ 冰箱中維持休眠性，之後再將種子置於鋪有濾紙的培養皿中於 36℃、相對溼度 100% 環境下 7 天，再取出計算發芽率，結果共偵測到 5 個種子休眠性數量性狀基因座，位於第 1、第 3、第 5、第 7 以及第 11 對染色體上，並命名為 *qSdn-1*、*qSdn-3*、*qSdn-5*、*qSdn-7* 以及 *qSdn-11*，其中 *qSdn-1* 在三個族群中都有被偵測到，分別能解釋 9.1%、18.71% 與 12.06% 外表型變異，且增強種子休眠性的對偶基因皆來自 N22，*qSdn-5* 在第一個與第三個族群有被偵測到，分別能解釋 16% 以及 5.63% 的變異。

Sugimoto *et al.* (2010) 使用秈稻品種 Kasalath 與粳稻栽培品種 Nipponbare 雜交所建立的回交重組自交系進行基因的選殖，成功的選殖位於水稻第7對染色體上調控休眠性的基因座 *Seed dormancy 4* (*Sdr4*)。作者也檢測了 14 個粳稻栽培品種以及 45 個秈稻栽培品種中 *Sdr4* 基因的對偶基因型。結果顯示所檢測的 14 個粳稻品種在 *Sdr4* 基因上皆為 Nipponbare 的對偶基因型 *Sdr4-n*，而在 45 個秈稻品種的 *Sdr4* 基因上，除了 Kasalath 的對偶基因型 *Sdr4-k* 或與其相似的 *Sdr4-k'* 的對偶基因型外，也有 *Sdr4-n* 對偶基因型。然而，有些秈稻品種雖然帶有 *Sdr4-k*

或是*Sdr4-k'* 對偶基因型，其發芽率卻偏高; 反之，有些品種雖然帶有 *Sdr4-n* 對偶基因型，但其發芽率卻偏低，因此作者也認為仍然有其他基因在調控種子的休眠性。

Marzougui *et al.* (2012) 利用具強休眠性的品種 Nona Bokra 與較弱休眠性的品種 Koshihikari 雜交，產生以 Koshihikari 為輪迴親的染色體置換系 (chromosome segment substitution lines)，並進行休眠性相關之數量性狀基因座的遺傳定位，休眠性檢定的方式為在抽穗後第 6 週以及第 8 週進行取樣，稻穗以濕潤的濾紙包裹後置於 30℃ 不照光的生長箱中維持稻穗濕潤7天，取出後計算發芽率。在比對各染色體置換系的發芽情形後，挑選出 3 個可能帶有強休眠性對偶基因的染色體置換系與 Koshihikari 回交，產生三組 F_2 世代以進行更精確的數量性狀基因座定位。結果定位到 *Sdr6*、*Sdr9* 與 *Sdr10* 三個數量性狀基因座。作者也對挑選出的染色體置換系與 Koshihikari 進行種子內生 ABA 含量的測定，以及對解除休眠性的種子處理不同濃度的 ABA，並測量發芽率的變化。結果顯示帶有 *Sdr6* 的染色體置換系 SL502 具有較多內生 ABA，而帶有 *Sdr9* 和 *Sdr10* 的 SL519 對於 ABA 較為敏感。因此，作者推測 *Sdr6*、*Sdr9* 與 *Sdr10* 可能和 ABA 的生合成與對 ABA 的敏感程度有關，但確切的功能仍需進一步的證實。

在水稻穗上發芽方面，Dong *et al.* (2003) 使用不易穗上發芽的秈稻品種 IR24，以及較易穗上發芽的粳稻品種 Asominori 雜交所建立的 71 個 F_6 世代的重組自交系進行數量性狀基因座定位。為了瞭解收穫時的氣候是否會對於穗上發芽造成影響，作者將穗在開花後進行三種處理，分別是套上白色紙袋、套上黃色紙袋，以及不進行任何套袋。之後將穗浸入水中，以 25℃ 處理十天後，進行發芽率檢定。在三種處理下共偵測到 6 個穗上發芽的數量性狀基因座，分別位於第 1、第 4、第 5、第 7 與第 8 對染上體上，並命名為 *qPHS-1-1*、*qPHS-1-2*、*qPHS-4*、*qPHS-5*、*qPHS-7* 以及 *qPHS-8*，其中 *qPHS-4* 與 *qPHS-5* 在三種套袋處理下都有

被偵測到，且 *qPHS-4* 在三種處理下皆能解釋最多的外表型變異，而 *qPHS-7* 只在不套袋的處理下被偵測到，但具有 22% 的外表型變異解釋能力，顯示不同的環境確實會影響穗上發芽的表現，而不易穗上發芽的秈稻品種 IR24 的對偶基因可以增加品系對穗上發芽的耐性。

Gao *et al.* (2008) 使用不易穗上發芽的品系 K81 與易穗上秈稻品種 G46B 雜交所建立的 164 個 F_2 進行穗上發芽數量性狀基因座定位，而親本 K81 是一個有8個染色體區域是來自不易穗上發芽的粳稻品種 Lemont，其他染色體區域皆與 G46B 相同的品系。發芽率的檢定方法為在每個品系開花後 35 天進行取樣，每個品系取 3 穗，並在收穫後將穗放入裝有去離子水的 150 ml 錐形瓶當中 4 小時，再將多餘的水倒出，留下約 1 公分高的水量，再用塑膠膜將瓶口封住防止水分散失，在 20℃ 的環境中處理 7 天，之後取出計算發芽率。定位結果共偵測到 3 個穗上發芽數量性狀基因座，分別是位於第 2 對染色體的 *qPSR2*、第 5 對染色體的 *qPSR5* 以及第 8 對染色體的 *qPSR8*，而能夠提高穗上發芽耐受性的對偶基因皆來自不易穗上發芽的粳稻品種 Lemont，其中 *qPSR8* 能夠解釋的外表型變異最多，為 43.04%。

第三節　DNA分子標記的發展與 RAD 定序法

DNA 分子標記能使用於遺傳圖譜的建構與基因座的遺傳定位，加速基因的選殖 (Lande and Thompson, 1990)。DNA 分子標記亦能應用於分子標記輔助育種 (marker-assisted selection)，使較難選拔的數量性狀能夠藉由與目標性狀緊密連鎖的分子標記在早世代便進行有效的篩選，提高育種選拔的效率 (Collard *et al.*, 2005)。

DNA 分子標記為兩個相近物種基因體組中的同源核酸序列的變異，主要有鹼基替代 (base substitution) 與核苷酸插入/缺失 (insertion/deletion, indel) 兩大類，前者可通稱為單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP)，後者則以簡

單重複序列 (simple sequence repeat, SSR) 為常見的分子標記 (Akkaya *et al.*, 1992)。DNA 分子標記於發展初期，習慣以常用之偵測核酸序列變異的技術對 DNA 分子標記進行分類，包括限制酶片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Botstein *et al.*, 1980)、DNA 逢機增幅多型性 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) (Williams *et al.*, 1990)、擴增片段長度多型性 (amplified fragment length polymorphim, AFLP) (Vos *et al.*, 1995)、以及酶切增幅多型性序列 (cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS) (Konieczny and Ausubel, 1993)，上述的這幾類的分子標記，大多數為偵測 SNP 的技術。現今可檢測 SNP 基因型的技術十分多樣，大概可分為下列八大類: 直接進行核酸定序 (sequencing)、對偶基因專一性聚合酶鏈鎖反應 (allele-specific PCR) （例如增幅阻礙突變系統 ARMS – amplification refractory mutation system、KASPar – kbiosciences allele specific PCR)、限制酶片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism)、高解析熔點法 (high resolution melting, HRM)、對偶基因專一性雜和 (allele-specific hybridization) (例如 TaqMan assay)、侵入式寡核苷酸酶切 (invasive oligonucleotide cleavage)、寡核苷酸連結法 (oligonucleotide ligation assay)、及引子延伸法 (primer extension assays) (Liew *et al.*, 2004; Macdonald, 2007)。

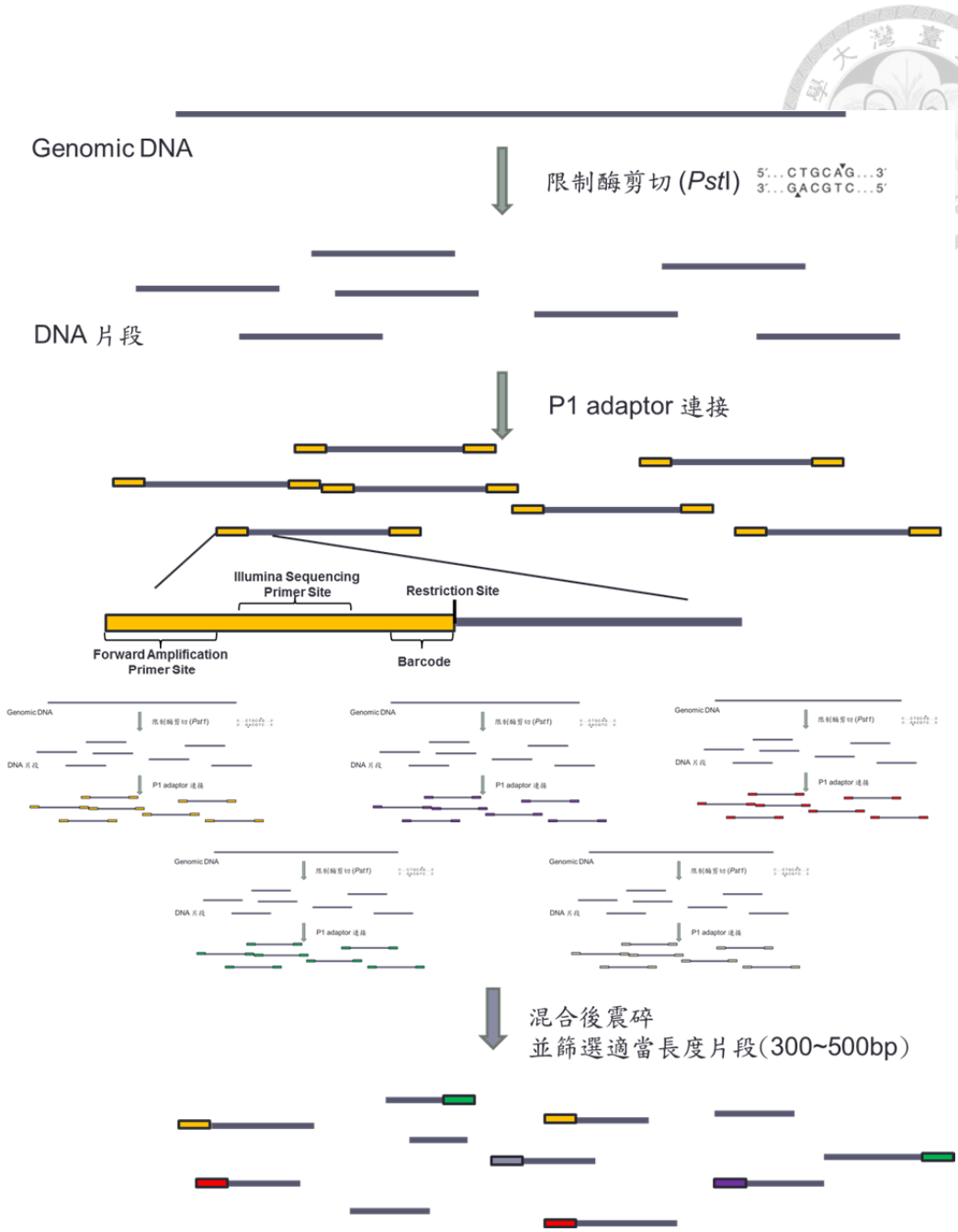
前述的 DNA 分子標記於實際應用時，都需要先確認該分子標記是否在欲進行基因型鑑定的遺傳雜交族群中具備多型性，而且絕大多數的 SNP 類型分子標記的「轉移性」(transferability) 不佳，亦即特定的 SNP 分子標記在某個族群的個體間具有多型性時，並無法保證對於另外族群的個體間也能具有多型性。此外，新 DNA 分子標記的開發往往需要龐大的經費才能滿足進行一個遺傳定位實驗的需求，此一困境大幅限制了分子標記技術應用至未被探索之遺傳種原的可能性。

然而，次世代核酸定序技術 (next generation sequencing) 的發明，以及其伴隨之核酸定序所需經費的大幅降低，使得 DNA 分子標記的開發與其基因型鑑定的

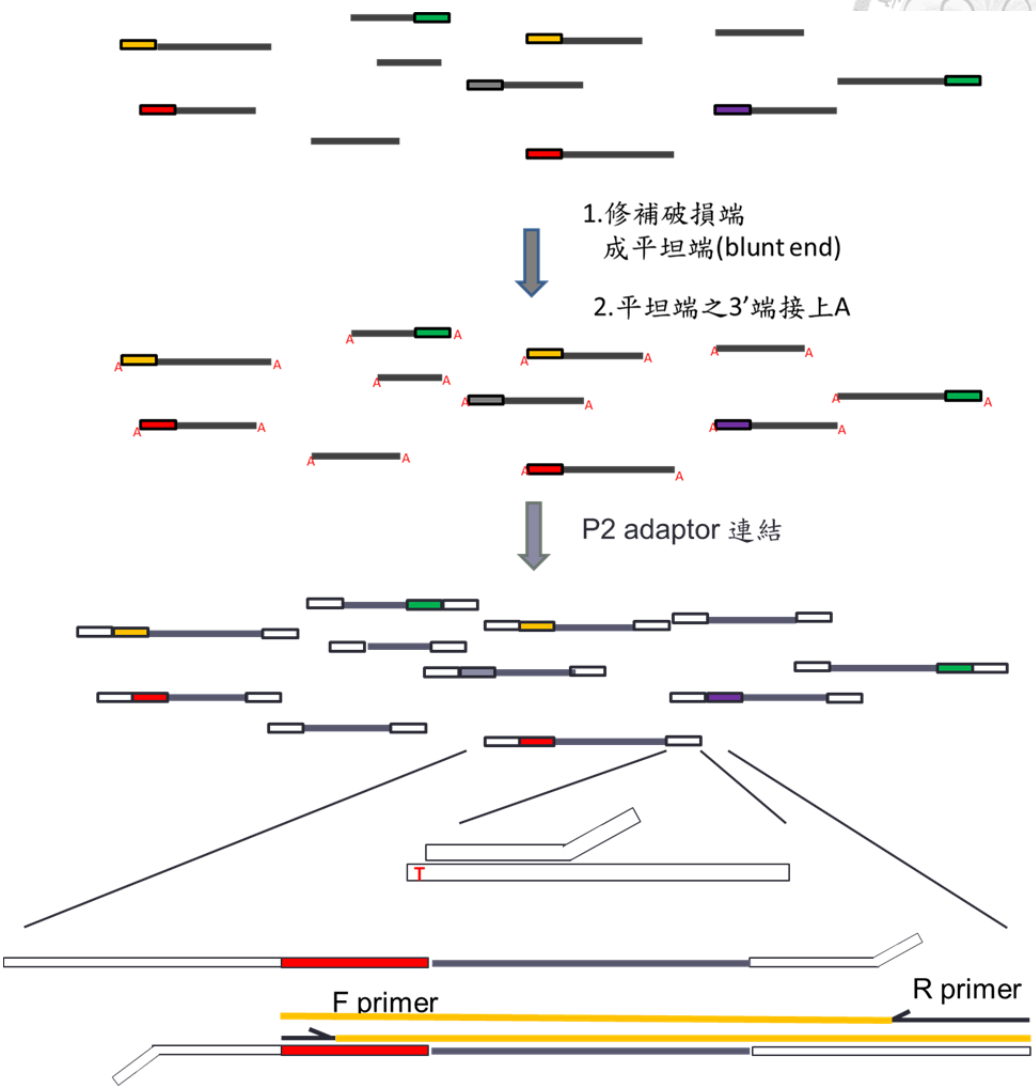
方式產生了全新的變革。Baird *et al.* (2008) 首先提出 RAD 定序 (Restriction site Associated DNA sequencing) 的想法，此法為利用 Illumina 次世代核酸定序平台，僅對族群中每個個體基因體組之特定限制酶切位旁的核酸進行解序，然後進行核酸序列比對，找出族群內個體間共有的 SNP 位點，藉此不必針對每個樣品進行全基因體的定序，就可在族群中開發高密度的分子標記。而為了更加節省成本，在建構核酸定序的定序圖書庫 (sequencing library) 時，在緊鄰限制酶切位的一側接上客製化的寡核苷酸條碼 (barcode)，能使數十個從不同個體所建構的定序圖書庫混合在一起，同時進行核酸定序。

RAD 定序法的標準實驗流程如下所述 (圖二)。首先，將個別樣品的基因體 DNA 以限制酶剪切，接上帶有條碼序列的 P1 adapter。然後等比例混合不同樣品的反應溶液，並將混合溶液中的核酸酶切片段進行超音波碎裂，再篩選長度在 500bp 以下的 DNA 片段，然後在序列兩端接上 Y 型 P2 adapter，並利用聚合酶鏈鎖反應擴增僅同時接上 P1 及 P2 adapter 的 DNA 片段，作成富集化的 RAD 定序圖書庫。將此 RAD 定序圖書庫送至次世代定序平台進行大規模平行式的短片段核酸定序。取回的定序資料可藉由核酸序列組裝與比對結果，同時找出此族群中具有 SNP 分子標記的位點，並決定各個樣品在該 SNP 分子標記位點的基因型。因此 RAD 定序法可藉由使用不同的限制酶酶切得到不同密度的分子標記，並能依據所分析物種的基因體大小與分析族群的種類，調整最適當的限制酶與混合樣品數量的組合，使進行核酸序列比對時，每個樣品的每一個 SNP 分子標記位點都能有適當數量的解序序列 (read coverage)，以同時達到節省經費、開發高密度 SNP 分子標記、與在族群的個別樣品中完成正確的基因型鑑別等多重目標。

利用次世代核酸定序平台對遺傳族群同時進行 SNP 分子標記開發與基因型鑑定的技術，除了 RAD 定序法之外，後續還有不同的方法被提出，但是基本上皆維持與 RAD 定序法相同的實驗邏輯。Elshire *et al.* (2011) 提出了一個定序圖書



圖二、 RAD 定序圖書庫建立。首先對個別樣品的基因體 DNA 進行酵素剪切，再接上 P1 adapter，P1 adapter 具有 PCR 擴增 forward primer site、次世代定序所需要的 primer site 以及用來區分樣品的條碼序列 (barcode)。然後利用超音波進行片段逢機震碎，並篩選適當長度的 DNA 片段。

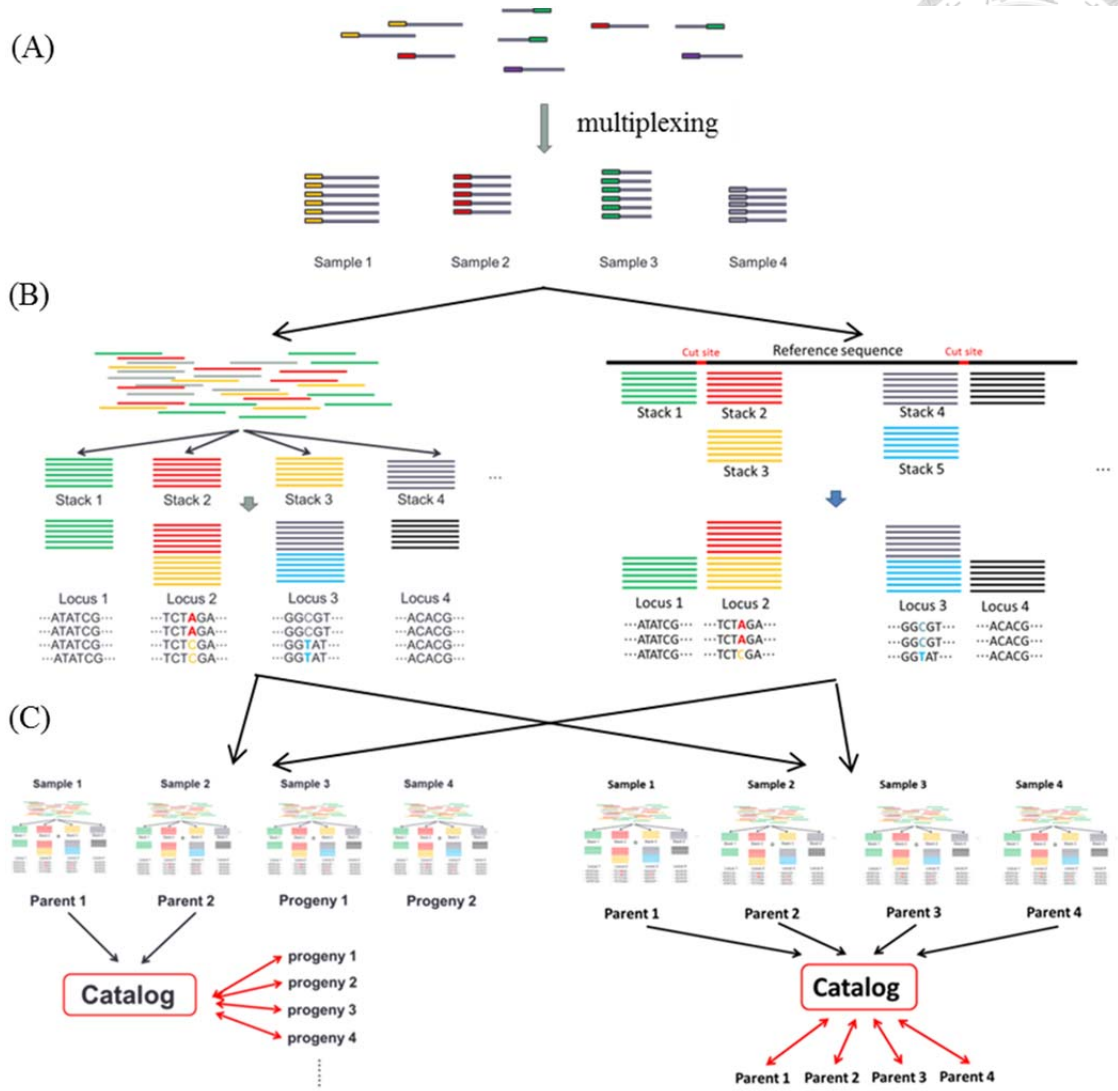


圖二、 RAD 定序圖書庫建立 (續)。 超音波隨機震碎的的 DNA 片段末端經酵素修補後，並在 3’端加上鹼基為 A 的核苷酸，使 P2 adapter 能順利連結，P2 adapter 為一個 Y 型的 adapter，較為突出的那股序列與 PCR 反向引子序列相同，必須要正向引子擴增產生互補的序列，反向引子才能黏合進行擴增，因此能確保擴增的片段同時帶有 P1 與 P2 adapter。

庫建立過程較 RAD 簡易的基因型鑑定方式，稱為 GBS (Genotyping by Sequencing)。此法在建立定序圖書庫的過程中使用 *ApeK*I 限制酶剪切，並省略限制酶切後 DNA 片段的逢機碎裂與篩選。此外， GBS 方法以 common adapter 取代 Y 型 adapter 的使用，實驗流程是同時將具有限制酶切點序列互補黏合端 (sticky end) 的 common adapter 及 barcode adapter (相當於 RAD 定序法的 P1 adaptor) 與剪切完之 DNA 接合之後，直接進行聚合酶鏈鎖反應擴增限制酶剪切的 DNA 片段，然後進行次世代定序。GBS 方法定序的 DNA 片段共有三種 adaptor 接合的組合：barcode-barcode、barcode-common 以及 common-common。不過在進行次世代定序時 barcode-barcode 會因為 reverse-terminator sequencing 而被去除，而 common-common 則是因為不具有 pair-end primer 1序列 (位於 barcode adapter上) 而不會進行擴增，因此只有 barcode-common 序列能夠順利進行定序。雖然 GBS library 建立的步驟以及使用的 adapter 較 RAD 簡單，但也因為序列沒有經過篩選，以及 DNA 片段中會有 50% (兩端為 barcode-barcode 與 common-common 的片段) 無法進行定序，因此實際進行定序的片段數會比預期中的低。Poland *et al.* (2012) 所提出的方法也省略了限制酶切後 DNA 片段的逢機碎裂與篩選，而使用切點較廣泛 (common-cutting) 的限制酶 *Msp*I，搭配切位較少 (rare-cutting) 的限制酶 *Pst*I，來建立定序圖書庫。實驗流程是在使用酵素對基因體進行剪切後，在 *Pst*I 切點接上帶有條碼序列的 adapter，而在 *Msp*I 切點接上與 RAD 定序法中相似的 Y 型 adapter，能藉由聚合酶鏈鎖反應篩選 DNA 片段兩端分別為 *Pst*I 與 *Msp*I 的 DNA 片段進行核酸定序，致使核酸定序的範圍能限制在緊鄰 *Pst*I 限制酶切位的兩側，達到與 RAD 定序法十分相近的核酸定序結果。

RAD 定序法所產生的核酸序列資料的輪廓與一般次世代核酸定序資料的輪廓十分不同。RAD 定序法的核酸序列資料輪廓呈現出所有被解序的核酸序列都緊

鄰在建構定序圖書庫所使用之限制酶切位的兩側。由於解序的核酸序列長度皆相同，使序列組裝後的輪廓如同堆疊的木樁，而且兩側堆疊核酸序列的數目並不相同。基於 RAD 定序法資料輪廓的特性，(Catchen *et al.*, 2011) 開發了專門用來分析 RAD 定序資料的免費軟體 Stacks，此軟體進行序列組裝、比對、以及樣品基因型鑑定的分析流程 (pipeline) 如下所述 (圖三)。分析可分為四個步驟，第一步為指令 process_radtags，先將資料依照條碼序列區分成許多樣品，若分析的物種具有參考序列，則可利用其它軟體排列置參考序列後，再進行條碼序列的區分。第二步，沒有參考序列的資料使用指令 ustacks，將單一樣品中序列完全相同的序列先堆疊成一個 stack，此時可定義最少需要幾個相同 reads 才能成為一個 stack，再將每個 stack 每 k 個核苷酸 (原始定義為 2) 進行掃描，第一次為第 1 個核苷酸到第 k 個，第二次為第 2 個核酸到第 k+1個，以此類推，將每個 stack 建立一個有重疊序列資訊的 k-mer 資料，藉由比對 k-mer 資料，將可能為相同染色體區域但之間具有 SNP 的 stacks 堆疊在一起，成為一個 locus；排列至參考序列的資料則使用指令 pstacks，同樣先將完全相同的序列堆疊成 stack，再將排列至相同染色體區域的 stacks 堆疊成一個 locus。之後再對每個樣品進行編號，若資料形式為雜交後代分離族群，則可將樣品分為親本以及後代，若要進行族群遺傳分析，也可將每個樣品皆指定為親本。第三步為指令 cstacks，在雜交後代中整合兩親本所有的 locus 資訊，或是在沒有特定親本的情況下，整合所有樣品的 locus 資訊，建立成 catalog。第四步為指令 sstacks，使用個別後代的解序序列，依序確認每個 catalog 的基因型，同時也將資料上傳至 database。



圖三、Stacks 軟體分析 RAD 定序資料的序列組裝、比對、及基因型鑑定流程。(A) 樣品分群。首先將核酸定序的資料先依照條碼序列分群，若分析的物種具有參考序列，則可排列至參考序列。 (B) Stacks 分群以及堆疊。Stacks 會先將完全相同的序列堆疊成為一個 stack，此時可定義最少需要幾個相同 reads 才能成為一個 stack。在不具有參考序列的資料中，會建立 k-mer 資料庫進行比對，藉此將之間有 SNP 的 stacks 堆疊起來，成為一個 locus。而具有參考序列的資料則是依照參考序列的位置而堆疊。(C) Catalog 建立。若分析的資料為具有親本的雜交後代，則比對兩親本的 locus 資訊，並將此資訊建立為 catalog；也可將所有樣本皆定義為親本以進行族群分析，將每個樣品都進行比對來建立 catalog，之後將後代或是各樣品的資訊與 catalog 進行比對，確認基因型。

第二章　研究目的

水稻穗上發芽 (pre-harvest sprouting) 會造成穀粒品質下降與產量損耗進而影響農民收益。臺灣中南部一期作的收穫時期恰好遇上梅雨季，易發生成熟稻穗處於高溫高濕的環境，而導致穗上發芽；北部一期作的收穫時期則可能遭遇颱風，造成植株倒伏，使稻穗浸泡於水中而導致穗上發芽。前人研究顯示水稻種子的初始休眠性與稻穀穗上發芽的耐受性有高度相關，休眠性較強的品種往往具有穗上發芽高耐受性，因此全世界對水稻穗上發芽耐受性的育種方法都是藉由篩選種子休眠性高的雜交後裔達成間接選拔穗上發芽耐受性高的育種目標。然而，臺灣水稻有特殊的兩期作栽培制度，且兩期作的相隔時間很短，高度休眠性的種子易造成育苗時發芽不整齊的現象，因此如何育成具有較佳的穗上發芽耐受性與適當的休眠性的品種為臺灣水稻育種上特有的問題。另外，由於穗上發芽易受到環境影響，且評估方式較費工，較難於早世代進行較準確的評估與篩選。在臺灣現行的水稻育種制度下，稻種的穗上發芽特性並未在育種程序的早世代進行選拔，而僅於育種晚期進入區域試驗後才進行穗上發芽耐受性的評估。

本研究嘗試進行控制水稻穗上發芽特性的數量性狀基因座的遺傳定位，期望能找到與穗上發芽特性緊密連鎖的分子標記，以應用於分子標記輔助選種。研究所使用的遺傳定位族群為易穗上發芽的粳稻品種台粳 14 號與不易穗上發芽的粳稻品種桃園 1 號雜交所產生的 $F_{2:3}$ 世代。由於雜交的兩親本皆為粳稻，預期兩雜交親本的遺傳歧異度不高，因此採行 RAD 定序法開發 SNP 分子標記，以解決過去粳稻間不易找到多型性分子標記的問題。在外表型的觀測方面，除了穗上發芽的觀測外，也同時進行種子初始休眠性的檢定，以了解穗上發芽與種子初始休眠性的關係。

第三章　材料與方法

第一節　雜交親本及定位族群

(1) 親本

臺稉 14 號

農業試驗所嘉義分所於民國 77 年第一期作以台稉育 2011 號為母本，與台中育 418 號雜交，於民國 80 年第二期作選出，並於民國 85 年由桃園區農業改良場申請命名並推廣，稻穀產量高，米質優良。民國 91 年至民國 97 年花蓮區農業改良場的檢定資料顯示，臺稉 14 號於一、二期作的穗上發芽率七年檢定平均值皆為三個分級中的最高等級 (發芽率在 61~100% 之間)。

桃園 1 號

農業試驗所嘉義分所於民國 79 年第一期作將台稉 1 號與台稉育 4156 號之雜交後代與台稉育 4156 號雜交，於民國 82 年由桃園區農業改良場選出，並於民國 90 年申請命名並推廣，稻穀產量高且穩定性佳。民國 91 年至民國 97 年花蓮區農業改良場的檢定資料顯示，桃園 1 號於一、二期作的穗上發芽率七年檢定平均值皆為三個分級中的最低等級 (發芽率在 30% 以下)。

(2) 遺傳定位族群

試驗的遺傳材料皆由農業試驗所作物組稻作研究室吳東鴻博士提供。遺傳定位族群是以臺稉 14 號為母本、桃園 1 號為父本，於民國 100 年一期作雜交產生 F_1 種子，並於民國 100 年二期作種植的 F_1 植株自交後，由單株收穫的種子形成 F_2 族群。600 株 F_2 單株於民國 101 年一期作種植於農業試驗所試驗田區 (臺中霧峰)，進行穗上發芽離體檢定。此外，在抽穗期相近的 295 株 F_2 植株中以目視法挑選出穗上發芽率極端值個體各 50 株，單株收取 F_3 種子，

並於同年二期作在農業試驗所試驗田區繁殖成 $F_{2:3}$ 家系，每個家系均種植 30 株單株，再進行一次穗上發芽離體檢定。

第二節　穗上發芽離體檢定與休眠性檢定

(1) 民國 101 年一期作

穗上發芽為容易受環境影響之性狀，且因每季的降雨情形不同，不易直接於田間觀察，活體檢定也較難進行，因此本研究以離體檢定的方式，採用捲紙法進行發芽率試驗，希望能夠建立較穩定的調查方法。取樣時為了降低品系間因為抽穗期的差異，造成取樣時穀粒成熟程度不同而影響發芽能力，以掛牌方式標記 F_2 單株的抽穗期，而抽穗是以主穗超出劍葉環為判定標準。各 F_2 單株於抽穗後 42 天 (收穫適期) 進行取樣，為了避免較晚熟分蘖的穗影響發芽率檢定，每個單株僅收取高度最高的三稻穗進行發芽率的離體檢定。檢定方法為將 F_2 單株取下的三穗以擦手紙捲成一綑，潤濕後放入相對濕度 100% 的塑膠盒中，再將塑膠盒置於 30℃ 的黑暗生長箱中 7 天，進行發芽試驗 (圖四)。試驗期間每天進行換水並維持濕度。完成發芽試驗但尚未計算發芽率之稻穗暫存於 4℃ 冰箱中保存。計算種子發芽率之前先排除未充實的穀粒，然後將充實的種子區分為發芽種子及未發芽種子。發芽種子的認定以可見胚根或胚軸突出種皮為判定標準。發芽率的計算為發芽種子在充實種子中的比例。

(2) 民國 101 年二期作

個別 $F_{2:3}$ 家系抽穗期的判定以家系中第一株抽穗的日期作為此家系的抽穗日。發芽率離體檢定的稻穗同樣在抽穗後第 42 天進行取樣，取樣方法為每個家系逢機選取 15 個單株，每一個單株取主穗 1 穗，每 5 穗一綑進行穗上發芽離體檢定，以 15 穗發芽率之平均值代表此家系之發芽率，檢定方法與一期作相同。

圖四、穗上發芽離體檢定方法。離體檢定方法為將取下穗以擦手紙捲成一綑，潤濕後放入相對濕度 100% 的塑膠盒中，再將塑膠盒置於 30℃ 的黑暗生長箱中 7 天，進行發芽試驗。試驗期間每天進行換水並維持濕度。完成發芽試驗但尚未計算發芽率之稻穗暫存於 4℃ 冰箱中保存。計算種子發芽率之前先排除未充實的穀粒，然後將充實的種子區分為發芽種子及未發芽種子。發芽種子的認定以可見胚根或胚軸突出種皮為判定標準。發芽率的計算為發芽種子在充實種子中的比例。

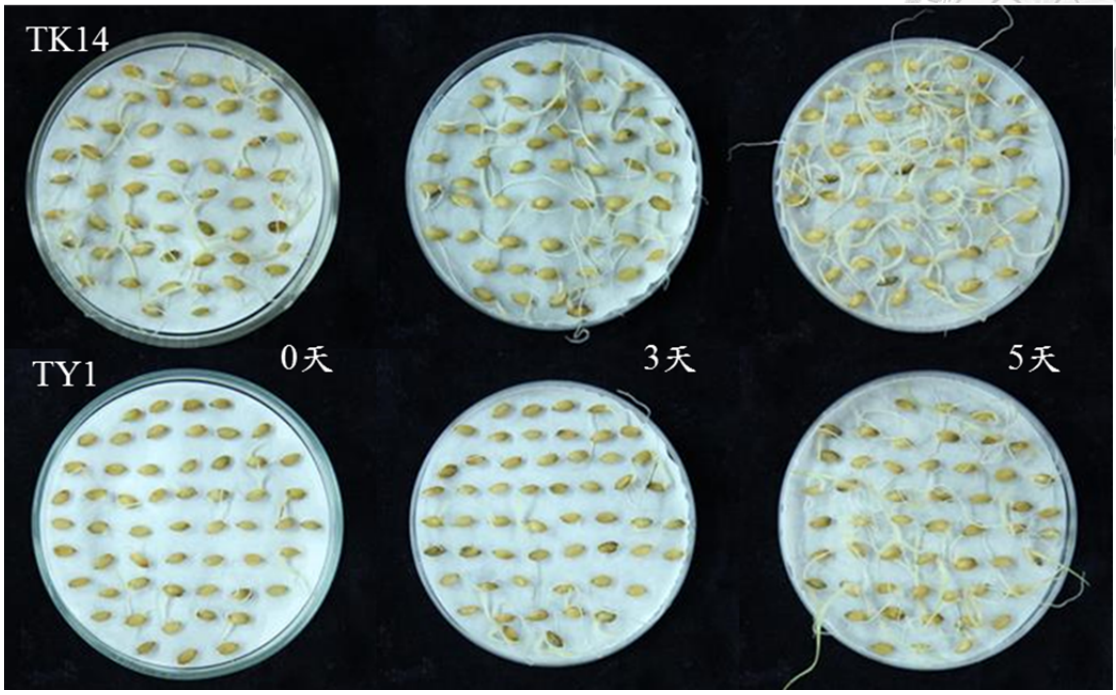
除了穗上發芽率的離體檢定外，二期作也同時檢定種子的休眠性，依循陳隆澤等人 (1980) 的方式進行，簡述如後 (圖五)。取樣方法為從穗上發芽離體檢定取樣的 15 個單株中，再取最高穗 1 穗。將取下的 15 穗脫粒並混合成一袋種子，接著將袋口打開進行自然風乾 3 天，然後依序分別於風乾後第 0、3、5、7、10、14、21、28、35 及 42 天進行發芽試驗。試驗方法為每次取約 150 粒種子，分置於鋪有濾紙之三個培養皿中，將水注入至淹沒約一半種子，放入 30℃ 黑暗生長箱 7 天，每天進行換水。發芽種子的判定標準及發芽率的計算皆與穗上發芽率的離體檢定法相同。當發芽率超過 80% 即認定種子已喪失休眠性，並停止進行該品系的發芽試驗，而該家系種子休眠性的維持天數即為該次發芽試驗所取種子的風乾後日數。

第三節　RAD 定序圖書庫的建構

水稻 Genomic DNA 萃取是利用改良式 CTAB 法進行 Genomic DNA 萃取 (Fulton *et al.*, 1995)，後續 RAD 定序圖書庫的建構是根據 Baird *et al.* (2008) 的方法進行。

(1) 水稻 Genomic DNA 萃取

每個樣品取葉片 3 到 4 公分，剪碎後加入 0.2 mL 的 DNA 萃取液 [新鮮配製，混合 2.85 mg Sodium bisulfate、312.5 μL DNA extraction buffer (0.35 M Sorbitol, 0.1 M Tris base, 5 mM EDTA, pH 8.26)、312.5 μL nuclei lysis buffer (0.2 M Tris base, 50 mM EDTA, 2 M NaCl, 20 g/L CTAB)、及 125 μL 5% N-lauroylsarcosine sodium salt]，以及一粒直徑 5 mm 的鋼珠，利用高通量組織研磨機 TissueLyser (Qiagen, Germany) 將葉片均質化，再加入 0.5 mL 的 DNA 萃取液，置於 65℃ 水浴槽 30 分鐘，水浴後加入 0.6 mL 氯仿混和液



圖五、種子休眠性檢定方法。圖為臺稉 14 號與桃園 1 號種子休眠性檢定的結果，由左至右分別是風乾後第 0 天、 3 天與第 5 天的結果。檢定方法為先將取樣的種子自然風乾 3 天，然後依序分別於風乾後第 0、3、5、7、10、14、21、28、35 及 42 天進行發芽試驗。試驗方法為每次取約 150 粒種子，分置於鋪有濾紙之三個培養皿中，將水注入至淹沒約一半種子，放入 30℃ 黑暗生長箱 7 天，每天進行換水。發芽種子的判定標準及發芽率的計算皆與穗上發芽率的離體檢定法相同。當發芽率超過 80% 即認定種子已喪失休眠性，並停止進行該品系的發芽試驗，而該家系種子休眠性的維持天數即為前一次發芽試驗所取種子的風乾後日數。

(chloroform : iso-amyl alcohol = 24:1)，劇烈震盪後，以 10,000 rpm 離心 5 分鐘，再取出 0.6 mL 上清液，置入新的微量離心管中，然後加入 0.6 mL 異丙醇，倒轉數次混和溶液，沉澱 genomic DNA。以 10,000 rpm 離心 5 分鐘後，將溶液倒出，再加入 0.2 mL 70% 酒精，沖洗 DNA 沉澱物。再離心 10,000 rpm 5 分鐘後，將溶液倒出，使位於離心管底部的 DNA 沉澱於室溫下自然乾燥 5~10 分鐘。加入 0.2 mL TE buffer (10 mM Tris.base, 1 mM EDTA, pH 8.0) 溶解 DNA 沉澱。然後使用 DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen) 對粗萃取的 DNA 溶液進行純化。獲得之高純度的 DNA 溶液以 Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) 及 Qubit™ fluorometer (Life Technologies, USA) 測量濃度。

(2) 限制酶切割

每個樣品取 1 μg 的 genomic DNA，並加入 5 μL 10x NEBuffer 4，1 μL 20unit/μL *Pst*I-HF (NEB) 與二次蒸餾水至總體積為 50 μL，置於 37℃ 烘箱內過夜 (約 15 小時)，之後使用 PCR 機器, T-Gradient Thermo-cycler (Biometra, Germany) 將溶液加熱至 65℃ 20 分鐘，進行限制酶去活性反應。

(3) P1 adapter 連結酶反應

P1 adapter 為一個帶有 PCR 正向引子、次世代定序引子黏合區，並在末端帶有條碼 (barcode) 的 adapter，正向核酸序列為 5’ AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TXX XXX TGCA 3’，反向核酸序列為 5’ p-XXX XXA GAT CGG AAG AGC GTC GTG TAG GGA AAG AGT GTA GAT CTC GGT GGT CGC CGT ATC ATT 3’。其中 XXXXX 代表不同的條碼，藉由條碼序列的不同，可區分為 62 個不同的 adapter (表二)，而為了避免定序時的錯誤而造成條碼的誤判，每個條碼間皆至少有 3 個核苷酸的差異。每種 adapter 分別與一個樣品進行連結反應。此時預期每個樣品中帶有 1 μg 之

表二、P1 adapter 上 62 種 barcode 序列。每個 barcode 間至少有 3 個核苷酸的相異，避免定序的誤差造成 barcode 的誤判。Barcode 序列是完全參照 Baird *et al.* (2008) 文獻所設計。

AAAAA	AGAGT	CAACT	CGATA	GAAGC	GGAAG	TAATG	TGACC
AACCC	AGCTG	CACAG	CGCGC	GACTA	GGCCT	TACGT	TGCAA
AAGGG	AGGAC	CAGTC	CGGCG	GAGAT	GGGGA	TAGCA	TGGTT
AATTT	AGTCA	CATGA	CGTAT	GATCG	GGTTC	TATAC	TGTGG
ACACG	ATATC	CCAAC	CTAGG	GCATT	GTACA	TCAGA	TTAAT
ACCAT	ATCGA	CCCCA	CTCTT	GCCGG	GTCAC	TCCTC	TTCCG
ACGTA	ATGCT	CCGGT	CTGAA	GCGCC	GTGTG	TCGAG	
ACTGC	ATTAG	CCTTG	CTTCC	GCTAA	GTTGT	TCTCT	

Genomic DNA，並加入 2.2 μL 100 nM P1 adapter 與 2.8 μL 二次蒸餾水，使 DNA 端點數：P1 adapter 數 = 10:1，再加入 5 μL 混合溶液 [2.9 μL 二次蒸餾水, 1 μL 10x NEBuffer4 (NEB), 0.6 μL 100 mM riboATP (Promega), 0.5 μL 2,000 unit/μL T4 DNA ligase (NEB)]，將裝有混和溶液的微試管置於 PCR 機器內，保持溫度於 20℃ 1 小時，然後加熱至 65℃ 20 分鐘，隨後將混和溶液自 PCR 機器取出，靜置於室溫 30 分鐘，使其自然降溫。

(4) 混合樣品 DNA 分子的隨機斷裂 (DNA random shearing)

為了讓 DNA 片段符合進行次世代定序的長度 (500bp 以內) ，此步驟利用超音波震盪器進行 DNA 的隨機斷裂。將每個樣品取 3 μL，30 個樣品混合成一管，以進行 DNA 分子的隨機斷裂，並利用電泳分析來確認斷裂效果，若片段大小多數仍維持在 1 kb 以上，可再進行一次 DNA 的隨機斷裂，並再次利用電泳分析確認效果。將樣品每 150 μL 裝入一個 1.5 mL 微離心管中，使用 MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) 進行 DNA 溶液的濃縮。再使用 Agencourt® AMPure® XP system (Beckman Coulter, USA)，加入等同於目標溶液 0.65 倍體積之 AMPure® XP 溶液，去除長度小於 250 bp 之 DNA 片段。

(5) P2 adapter 連結反應

P2 adapter 為一個 Y 型的 adapter，正向核酸序列為 5’ p-GAT CGG AAG AGC GGT TCA GCA GGA ATG CCG AGA CCG ATC AGA ACA A 3’，反向核酸序列為 5’ CAA GCA GAAGAC GGC ATA CGA GAT CGG TCT CGG CAT TCC TGC TGA ACC GCT CTT CCG ATC T 3’。較為突出的那股序列與製備 RAD 定序圖書庫的 PCR 反向引子序列相同，必須要正向引子擴增產生互補的序列，反向引子才能黏合進行擴增，因此能確保擴增的 DNA 片段同時帶有 P1 與 P2 adapter。首先要在修補之前超音波隨機震碎的的 DNA 片段，並在 3’端加上鹼基為 A 的核甘酸，使 P2 adapter 能順利連結。修補反應使用 Quick Blunting Kit (NEB)，將前一

步回收的 DNA 取足 1000 ng，並加入二次蒸餾水使體積達到 19 μL，之後依序加入 2.5 μL 10x Blunting Buffer、2.5 μL 1mM dNTP mix 及 1.0 μL Blunting Enzyme Mix，然後置於 PCR 機器進行反應，25℃ 30 分鐘。將上個步驟反應完之溶液加入 1.8 倍體積之 AMPure® XP 溶液進行純化步驟，但先不將 DNA 洗出，依序加入 5 μL 10x NEBuffer2、41 μL 二次蒸餾水、1 μL 10 mM dATP 和 3 μL Klenow (exo-)，之後置於 PCR 機器反應，37˚C 30 分鐘，再置於室溫下 15 分鐘使其自然冷卻，之後加入 90 μL 20% PEG (2.5 M NaCl buffer) 混合，再進行純化步驟至 DNA 洗出前，之後進行 P2 adapter 連結反應，依序加入 43 μL 二次蒸餾水、5 μL 10x NEBuffer2、1 μL 10μM P2 adapter、0.5 μL 100mM riboATP、及 0.5 μL 2,000 unit/μL T4 DNA ligase，然後置於 PCR 機器進行反應，20℃ 3 小時。再次進行純化，最後使用 20 μL elution buffer (10 mM Tris, pH8.3) 沖洗 DNA，取出溶液轉移入新的微離心管中，並使用 Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) 與 Qubit™ fluorometer (Life Technologies, USA) 進行 DNA 的定量，最後將 DNA 溶液保存於 -20˚C 的凍箱中。我們將此 DNA 溶液稱為「RAD 圖書庫模板」。

(6) RAD 定序圖書庫的製備

製備 RAD 定序圖書庫的 Solexa primer mix 為等莫耳數混合的正向引子 5’ AAT GAT ACG GCG ACC ACC GA 3’(與部分 P1 adapter 正向核酸序列相同) 及反向引子 5’ CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA 3’ (與部分 P2 adapter 反向核酸序列相同)。RAD 定序圖書庫製備方式為取 50 ng「RAD 圖書庫模板」，加入二次蒸餾水將體積調整為 10 μL，再加入 4 μL 10 μM Solexa primer mix 與 50 μL Phusion High-Fidelity Master Mix 進行 PCR 反應，反應程序為 98℃ 30 秒、18 個循環的 98℃ 10 秒、66℃ 30 秒、72℃ 30 秒，之後進行 72℃ 5 分鐘，最後維持在 4℃。然後使用 Agencourt® AMPure® XP system (Beckman

Coulter) 清除分子量小於 150 bp 的 primer dimers。然後使用 Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit 與 Qubit™ fluorometer (Life Technologies, USA) 進行 DNA 定量。接著依據定量的濃度，將 DNA 濃度稀釋至 10 ng/μL，即為製備完成的 RAD 定序圖書庫。接著使用 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA) 的 High Sensitivity DNA chip 進行毛細管電泳，檢視 RAD 定序圖書庫是否已完全清除分子量小於 150 bp 的 primer dimers。確認完成後，將此 RAD 定序圖書庫送至陽明大學基因體研究中心所提供的 Illumina HiSeq 2000 次世代核酸定序服務平臺，進行 Illumina single-read sequencing 100 bp 的核酸定序。此 RAD 定序圖書庫使用 HiSeq 2000 平台一個 lane 的核酸定序量。

第四節 RAD 資料處裡

水稻為已經具有參考序列資訊的物種，因此將次世代核酸定序獲得的資料，先使用 CLC Genomic Workbench v.6.01 (CLC bio, Denmark)，將核酸序列依照條碼的不同而分群 (multiplexing)，然後使用 Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0 水稻基因體組序列 (簡稱 IRGSP 1.0) 為參照序列，將分群後的個別核酸序列分別依據此參照序列組裝，組裝時捨棄能比對至超過一個參考序列染色體位置的核酸序列。. 62 個分群樣品序列的組裝結果儲存為 62 個不同的檔案 (檔案格式為 .sam)。接著將所有檔案傳輸至臺大農藝系的公用伺服器 (為 Linux 作業系統) 中，使用專門分析 RAD 資料的 Stacks 程式 (Catchen *et al.*, 2011)，以指令 ref_map.pl 進行分析，安裝於公用伺服器的 Stacks 程式版本為 0.99993 版。

而本實驗將進行兩種分析，分別是包含親本以及 60 個 F_2 品系資料，以及只針對 F_2 品系資料兩種。在包含親本的資料中，為了避免異型結合的位點因為 read 數太少而只出現一種基因型，被誤判為同型結合，本次試驗所設定的門檻為必須

至少要有 5 個 reads 才可被認定為一個 stack，且為了畢免 read 數不足而將異型結合 catalog 誤判為同型結合基因型。最後使用指令 genotype 進行校正，校正的標準為：$\frac{\text{較少的基因型之 reads 數}}{\text{較多的基因型之 reads 數}} > 0.001$，即判定為異型結合基因型，輸出時設定每個 catalog 具有 2 個 allele ，catalog 必須在兩親本皆為同型結合基因型且至少在 30 個後代品系 (共 60 個後代品系) 中有被定位，才可定義為一個分子標記。

之後為了確認由親本所建立的 catalog 是否與後代間具有多型性的位置相符，之後將各 F_2 品系視為單一個體並非雜交後代以進行分析，但因為無法使用指令 genotype 進行異型結合基因型的校正，因此改將門檻值設定為只要有 1 個 read 就可成為 stack 進行分析，避免序列因為資訊較少而被剔除。而 catalog 便是依照 60 個品系中具有多型性的 SNP 位點而建立，且因為將親本資料剔除後，catalog 數目明顯增加，而 read 數的門檻降低使缺值的數量減少，之後便可進行較嚴格的篩選，輸出時篩選每個 catalog 具有 2 個 allele、須符合至少在 55 個品系中有被定位，以及每個 catalog 只能有 1 個 SNP 位點，才可定義為一個 marker。而為了避免因為 PCR 擴增時造成的鹼基錯誤被判定成為 SNP，將其中一種同型結合基因型出現在品系中的個數為 0，而異結合基因型只出現在 1 個品系的 catalog 剔除，剩餘的分子標記進行後續的分析 (表三)。

本試驗選用外表型為極端值的個體進行基因型鑑定，因此會造成與目標基因連鎖之分子標記產生不平衡分離的情形 (Xu, 2008)，勃離一般 F_2 世代的分離比例 1:2:1。Microsoft Excel 2010 版被用來檢測每個分子標記之分離比是否符合 1:2:1。卡方式適合性檢定的虛無假說以及對立假說分別為:

$$\begin{cases} H_0 : \mathrm{A} : \mathrm{H} : \mathrm{B} = 1 : 2 : 1 \\ H_a : \mathrm{A} : \mathrm{H} : \mathrm{B} \neq 1 : 2 : 1 \end{cases}$$

表三、基因資料篩選標準

資料型式 篩選標準	包含親本	不含親本
Catalog 建立	以兩親本資料建立	以 60 個家系建立
Reads 限制	至少 5	至少 1
指令 genotype 校正	$\frac{\text{較少的基因型之 read 數}}{\text{較多的基因型之 read 數}} > 0.001$	無法進行
Allele 限制	2	2
缺值限制	≦30	≦5
Catalog 中 SNP 限制	無限制	1
其他篩選	剔除後代中不具有多型性之分子標記	剔除異型結合只出現在 1 個家系之分子標記

第五節　數量性狀基因座定位

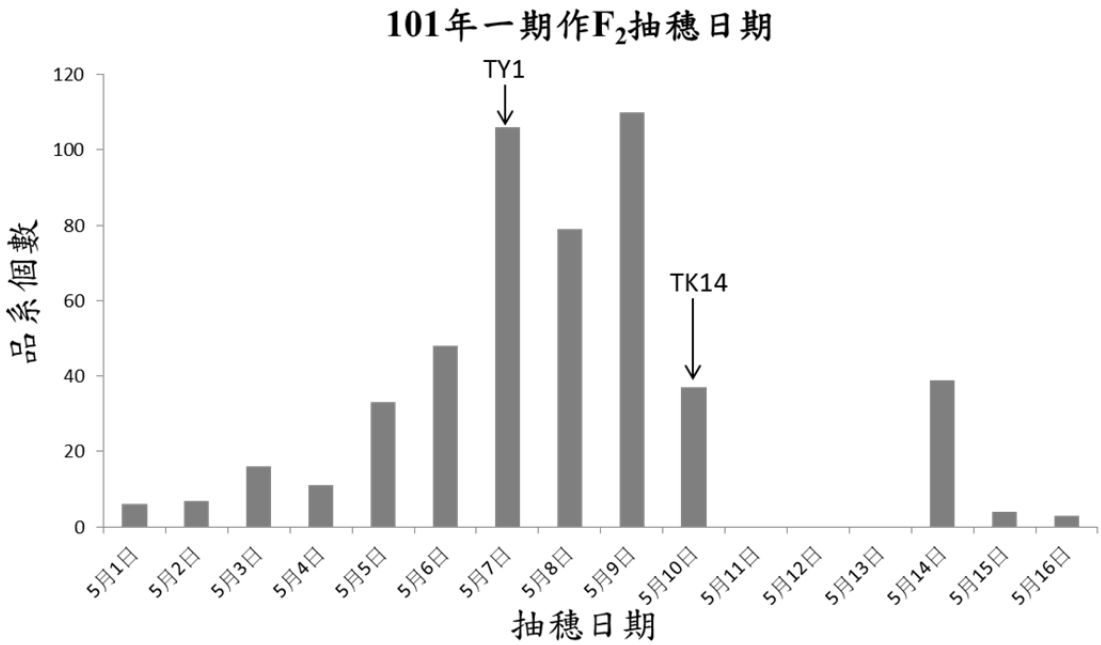
數量性狀基因座的遺傳定位分析是分別對每個分子標記進行單一標記分析 (single marker analysis)，使用的軟體為 R-2.15.3 版 (R Core Team, 2013)，以及 R/qtl 套件 (Broman *et al*., 2003)，利用套件中的 marker regression 分析方式得到 LOD 值，門檻值的設立由 10,000 次排列檢定 (permutation test) 決定 (Churchill and Doerge, 1994)，物理圖譜的繪製同樣使用 R/qtl 套件。

第四章　結果與討論

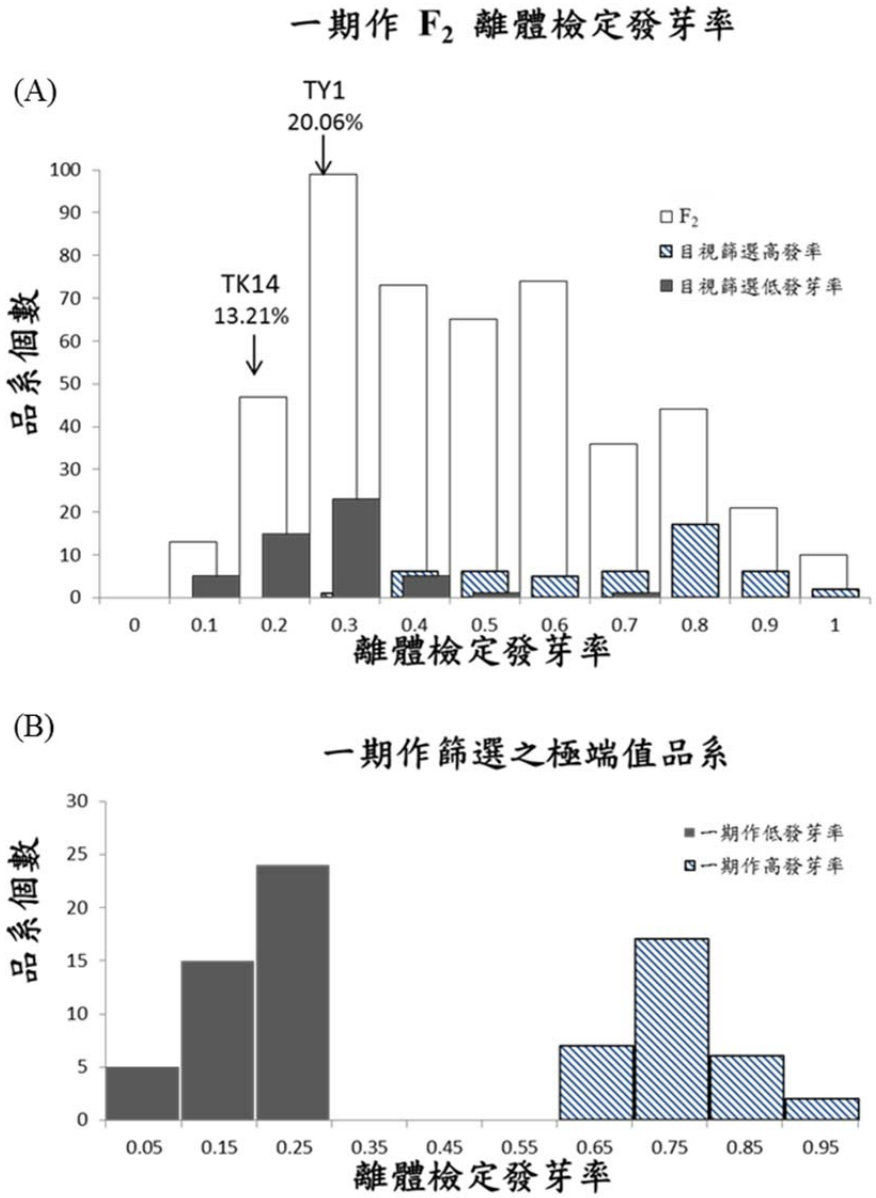
第一節　穗上發芽離體檢定與休眠性檢定

一期作臺稉 14 號發芽率為 13.21 %，桃園 1 號發芽率為 20.06 %，其中臺稉 14 號發芽率與花蓮區農業改良場自民國 91 年至民國 97 年兩個期作的穗上發芽檢定結果有明顯的差異。F_2 族群發芽率介於 2% 至 93%，平均發芽率為 46%。在 F_2 族群中抽穗期也有分離的情形 (圖六)，臺稉 14 號抽穗日期為 5 月 10 日，天數為 86 天，桃園 1 號抽穗日期為 5 月 6 日，天數為 82 天，兩親本相差 4 天，F_1 植株抽穗日期為 5 月 1 日 (77 天)，而 F_2 族群則為 5 月 1 日 (77 天) 到 5 月 16 日 (92 天)，其中有 295 株 F_2 於 5 月 7 日 (83 天) 至 5 月 9 日 (85 天) 抽穗。試驗過程中，先從抽穗期相近的 295 株 F_2 中，利用目視法篩選穗上發芽率為極端值的各 50 株植株，繁殖成 $F_{2:3}$ 家系。經過精確的發芽判定與發芽率計算後，再由原先目視篩選的各 50 個穗上發芽率極端值的家系中，挑選出穗上發芽率 60% 以上以及 30% 以下之家系各 30 個 (圖七)，進行基因型鑑定以及 $F_{2:3}$ 家系的外表型鑑定。

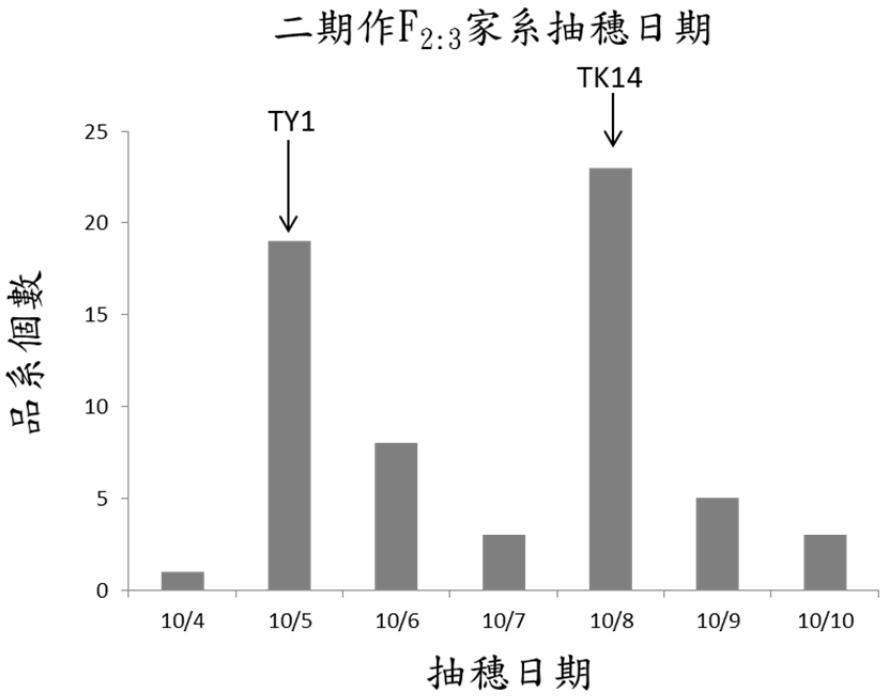
$F_{2:3}$ 家系的抽穗日期集中於一星期內 (圖八)。臺稉 14 號發芽率為 12.19 %，桃園 1 號發芽率為 16.52%。$F_{2:3}$ 家系發芽率介於 5.49% 至 69.96%，平均發芽率為 31.69%，分布情形沒有如預期地分成兩群，顯示發芽率在兩期作間有差異。但若將一期作高穗上發芽與低穗上發芽的品系分開來看，仍然能看出兩次族群的發芽率不同 (圖九)。將兩期作的發芽率繪製成散布圖，亦顯現適度相關性 (圖十)。60 個 $F_{2:3}$ 家系的休眠性檢定結果顯示休眠性維持日數介於 0 天至 14 天 (圖十一)，其中 51 個家系在五天內便喪失休眠性。臺稉 14 號的休眠性維持日數為 0 天 (即風乾三天後立即進行發芽試驗，發芽率可超過 80%)，桃園 1 號的休眠性維持日數為 5 天 (即風乾三天、室溫儲藏五天後進行發芽試驗，發芽率可超過



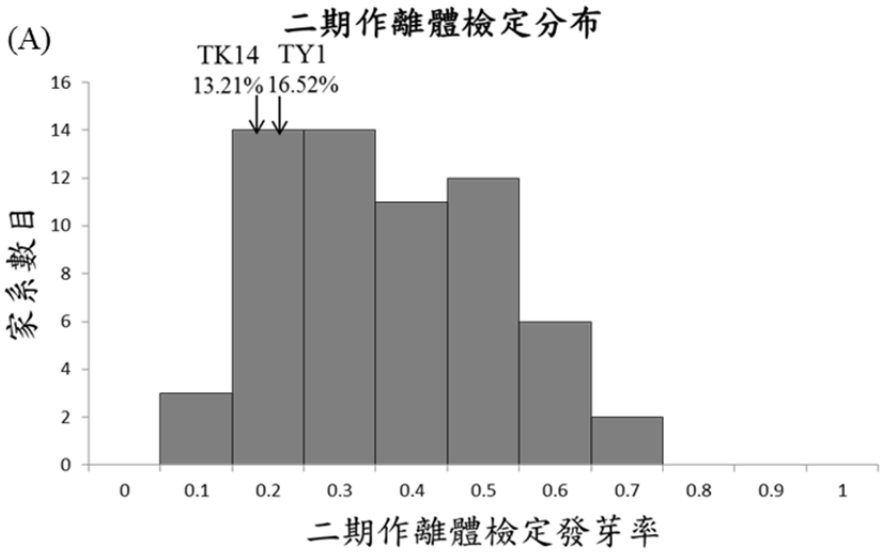
圖六、一期作 F_2 族群抽穗日期。親本抽穗期的定義是以一次掛牌 20 穗當日定義為抽穗期，而 F_2 抽穗的定義是以主穗超出劍葉環時為抽穗。臺稉 14 號抽穗日期為 5 月 10 日，日數為 86 天，桃園 1 號抽穗日期為 5 月 6 日，日數為 82 天，兩親本相差 4 天，F_1 植株抽穗日期為 5 月 1 日（77 天），而 F_2 族群則為 5 月 1 日（77 天）到 5 月 16 日（92 天），其中有 295 株於 5 月 7 日（83 天）至 5 月 9 日（85 天）抽穗，之後便從抽穗期相近的 295 株中先依目視篩選極端值家系。

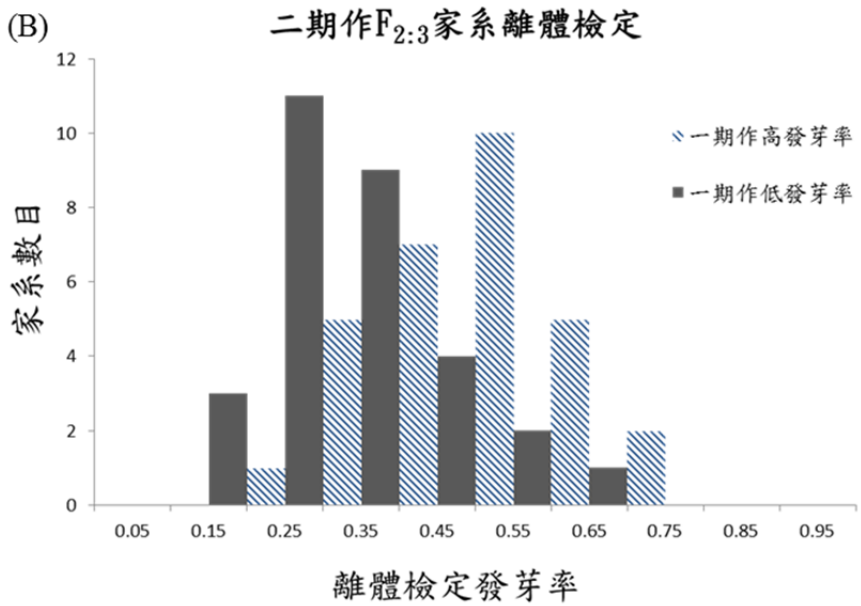


圖七、一期作穗上發芽離體檢定結果。(A) 一期作臺稉 14 號發芽率為 13.21 %，桃園 1 號發芽率為 20.06 %，其中臺稉 14 號發芽率與前人研究的結果有顯著的差異。F_2 族群發芽率介於 2% 至 93%，平均發芽率為 46%。(B) 從目視篩選的品系當中，依照實際的發芽率挑選極端值家系，最後所挑出的品系為發芽率在 30% 以下以及 60% 以上的品系共 60 個，繁殖成 $F_{2:3}$ 家系。

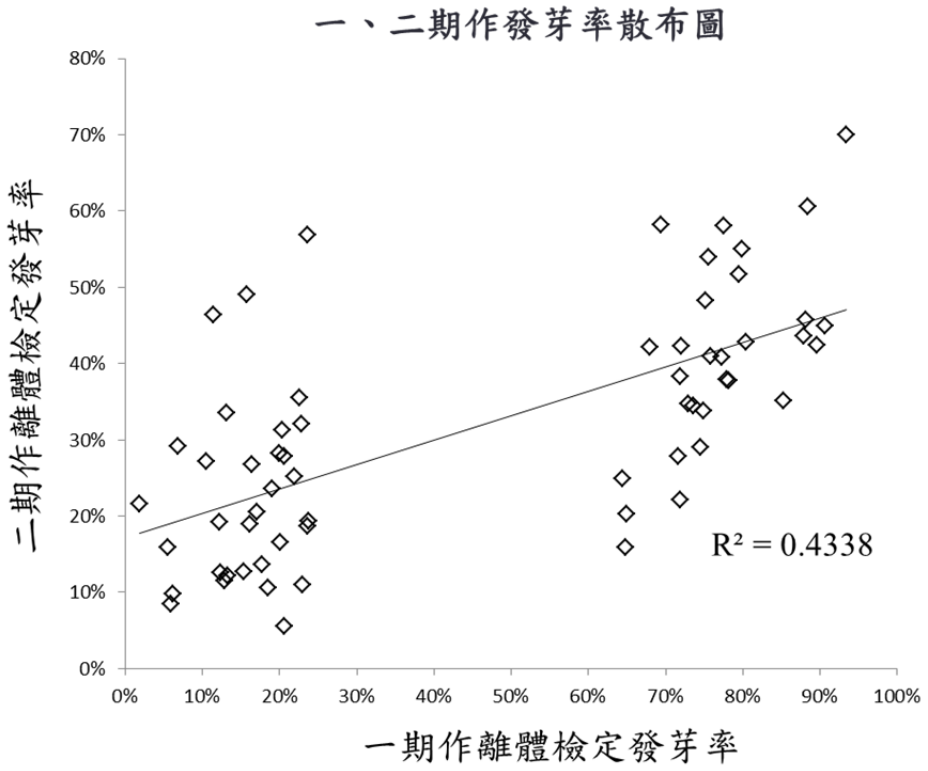


圖八、$F_{2:3}$ 家系抽穗日期。$F_{2:3}$ 家系的抽穗日期集中於一星期內，顯示一期作針對抽穗期的挑選確實能縮短品系間抽穗日數的差異，桃園 1 號的抽穗日期為 10 月 5 日，臺稉 14 號為 10 月 8 日。

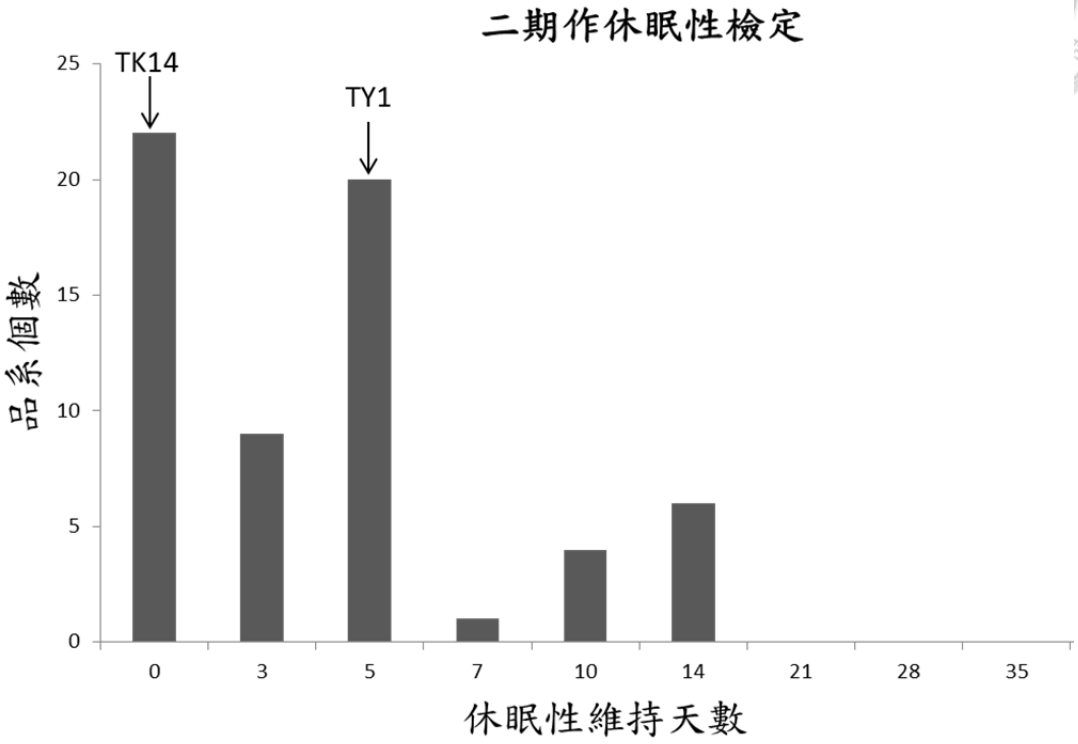




圖九、$F_{2:3}$ 家系發芽率分布。(A) $F_{2:3}$ 家系發芽率介於 5.49%至 69.96%，平均發芽率為 31.69%，臺稉 14 號發芽率為 13.21 %，桃園 1 號發芽率為 16.52%，分布情形沒有如預期地分成兩群，且整體發芽率較一期作低。(B) 一期作極端值品系二期作之表現，實心的部分為一期作發芽率在 30% 以下的品系分布，斜條紋為一期作發芽率在 60% 以上的品系分布，顯示在發芽率分布上仍然能分成兩群。



圖十、兩期作穗上發芽率散布圖。將兩個期作發芽率繪製成散布圖，顯示兩期作有適度相關。一期作高發芽率次族群與低發芽率次族群二期作的發芽率存在著差異。

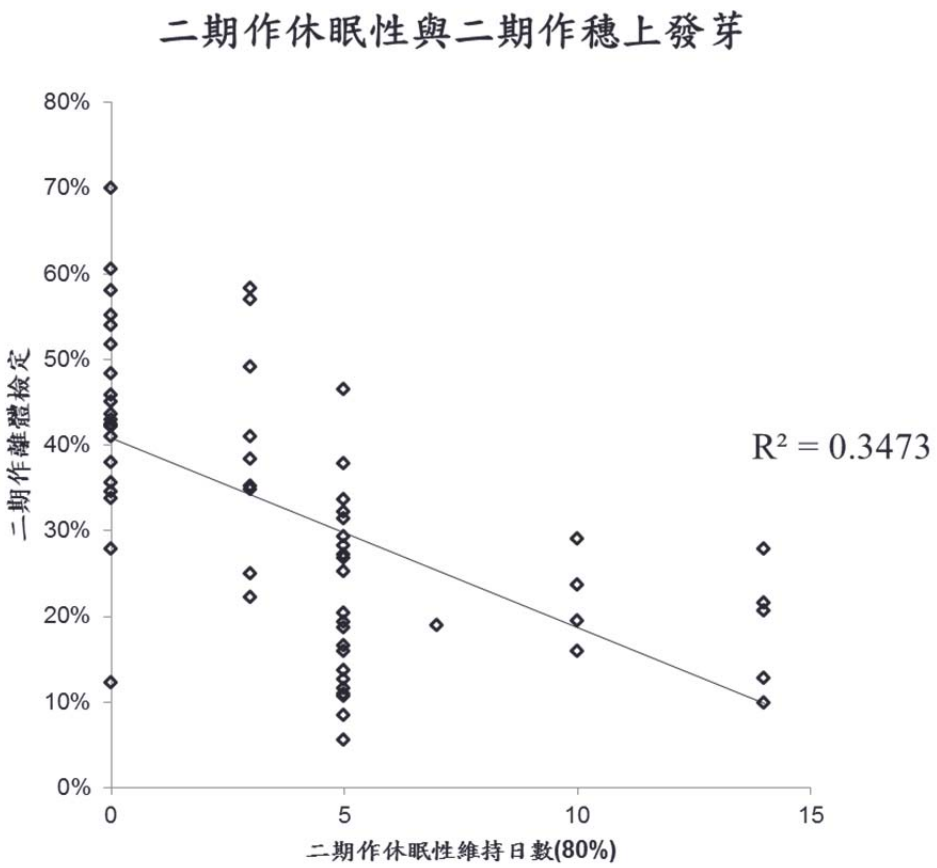


圖十一、二期作種子休眠性檢定日數分布。$F_{2:3}$ 家系的休眠性維持日數介於 0 天至 14 天，其中 51 個品系在 5 天內便喪失休眠性，臺稉 14 號的休眠性維持日數為 0 天，桃園 1 號的休眠性維持日數為 5 天。

80%)，而作為對照用的秈稻品種 Kasalath 休眠性維持日數則超過 42 天，兩親本相較於具有強休眠性的對照品種 Kasalath 皆不具有較強的休眠性。由第二期作離體檢定發芽率與休眠性維持日數資料所繪製散布圖顯示，休眠性較強的品系穗上發芽率較低，但休眠性較弱的品系卻不一定具有高穗上發芽率 (圖十二)。

臺稉 14 號之穗上發芽離體檢定結果，一期作發芽率為 13.21%，而二期作為 12.19%，與花蓮區農業改良場於民國 91 年至 97 年的穗上發芽檢定結果差異甚大，推測可能的原因如下：臺稉 14 號品種內雖然外表型相近，但基因型可能具有些微差異 (吳與胡, 2011)。本次試驗所使用的材料可能與歷年花蓮區農業改良場進行穗上發芽檢定的稻種不相同，造成發芽率相異的情形。另一可能原因則是取樣時間點不同而造成的差異，花蓮區農業改良場進行穗上發芽檢定的取樣時間以穗的基部有 3 到 5 粒青粒作為判定成熟度的標準，而本研究則以抽穗後的日數為取樣原則，因此在取樣時間點上可能不相同。此外，休眠性檢定的結果顯示，臺稉 14 號在風乾後 0 天所進行的試驗發芽率便超過 80%，喪失休眠性，而桃園 1 號則在風乾後第 5 天才喪失休眠性，顯示若將本試驗親本取樣時間點往後延遲，讓種子進行進一步的成熟，兩親本的發芽率或許有可能產生差異。

F_2 世代的穗上發芽率有分離的情形，顯示發芽率確實有受到基因調控。由一期作篩選的極端值 F_2 個體繁殖成的 $F_{2:3}$ 家系間，發芽率並無明顯的分成兩群，顯示發芽率可能受到期作間環境差異影響，或是因為在生育過程中遭遇不同環境，使取樣時種子成熟度不相同，進而影響發芽率。除了期作間的影響外，極端值家系篩選的方式也可能造成影響，在篩選 F_2 極端值家系時我們並不是從整個族群中去挑選，而是從抽穗期相近的 295 株中先依照目視進行篩選挑選出極端值個體各 100 株，再依照確切發芽率篩選極端值家系各 30 株，這樣選拔方式造成兩個影響：第一點，為了篩選抽穗期相近的個體而犧牲了部分家系，造成原始族群數下降，無法選擇到更為極端的家系，第二點，初步目視篩選的誤差也造成部分外表



圖十二、二期作穗上發芽率與休眠性維持日數散布圖。結果顯示高休眠性的重組個體穗上發芽率皆較低,而低休眠性的重組個體之穗上發芽率卻呈現分離的情形，顯示兩性狀不完全相關。

型較為極端的家系沒被選入，又降低了挑選家系外表型極端的程度，導致二期作家系的表現較為集中。

而二期作穗上發芽率與休眠性維持日數之散布圖顯示，高休眠性的重組個體穗上發芽率皆較低，而低休眠性的重組個體之穗上發芽率卻呈現分離的情形，顯示兩性狀不完全相關，因此推測可能存有不同的基因在調控穗上發芽以及休眠性這兩個性狀。

第二節　RAD 圖書庫定序結果

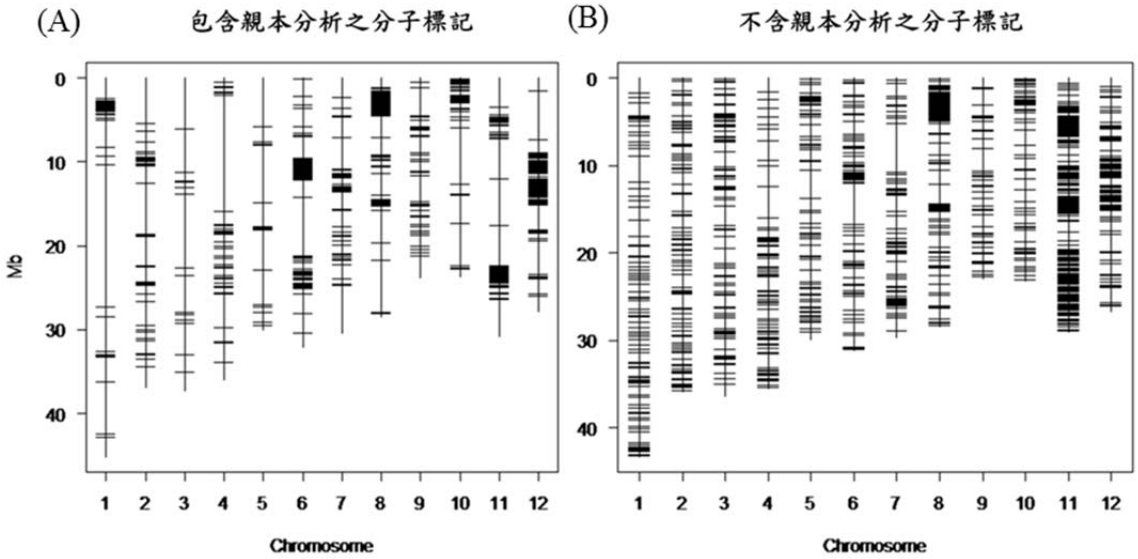
以 RAD 定序法進行基因型鑑定的試驗設計需要考慮下列幾個因素: 次世代定序平台能夠進行核酸定序的數量 (capacity)、進行基因型鑑定物種的基因體大小與使用限制酶的組合、核酸序列期望能被重複定序的次數、以及一個 RAD 定序圖書庫欲包含不同樣品的數目。本試驗最初始的設計是期望能使任一個核酸位點有 99% 的機率被重複定序 3 次，據此以 Poisson distribution 公式計算出每個核酸序列平均的重複定序次數應為 9 次。由水稻基因體組的參考序列 IRGSP 1.0 得知有 108,360 個 *Pst*I 限制酶切位，此限制酶切位在基因體組中的平均密度為 3.5kb，應可在粳稻雜交組合中偵測到足夠數量的 SNP 分子標記並同時完成樣品的基因型鑑定。由上述兩個參數計算，每個樣品需要定序的短片段核酸數量 (read number) 為 1,950,480 個。已知 Illumina Hiseq 2000 定序平台一個 lane 的定序數量大約為 180 百萬個短片段核酸序列 (reads)，由此推算在理想狀況下，每個 RAD 定序圖書庫可以包含 92 個不同樣品。但由於經費不足，我們最後製作 RAD 定序圖書庫時僅包含 62 個不同樣品 – 兩個親本以及各 30 個穗上發芽率極端值的 F_2 個體。

定序結果總共獲得 202,372,925 個 100 bp 的 reads，將 read 上的條碼剔除後進行核酸的序列比對與組裝，有 150,205,896 個 reads (74.2%) 能對應至水稻

IRGSP 1.0 參考序列上的單一位置。隨後使用序列上的條碼將 read 依據不同的樣品分群後，每個樣品所具有 read 數目的範圍從 1,002,614 到 4,594,264，大約為原始實驗設計所需 read 數目的 51%～235 %。 兩親本定序獲得的 read 數目分別為 2,652,860 (臺稉 14 號) 與 2,234,480 (桃園 1 號)，皆有超過原始實驗設計所需的 read 數目。

接下來以 Stacks 軟體進行分析，我們先採用了使用親本 reads 來建立 catalog 的分析流程，此流程是設計用於雙親雜交的遺傳定位族群。分析的結果共得到 119,689 個 catalog，當中有 119,608 個是位於基因體 DNA 上，而符合表三篩選標準的有 1,105 個具有多型性的分子標記。然而這 1,105 個 SNP 分子標記在後代分離族群中，有 548 個分子標記皆為桃園 1 號的同型結合基因型，另有 7 個分子標記皆為台稉 14 號同型結合基因型，顯示接近 1/2 於兩親本之間具有多型性的 SNP 分子標記卻在後代分離家系之間不存在多型性。此結果暗示雜交所使用的親本與進行定序的親本可能不同。為了避免誤判，我們採用了 Stacks 軟體所提供的另一種不使用親本建立 catalog 的分析流程，直接使用每一個分離族群中的個體建立 catalog。此分析流程由於沒有親本的核酸序列，因此無法確實得知染色體上相鄰分子標記對偶基因型的連鎖組態 (linkage configuration of adjacent alleles)，然而此分析流程卻能夠完整的呈現在分離族群中具有多型性的 catalog，而能將這些在分離族群中具有多型性的 catalog 視為此族群具有多型性的 SNP 分子標記。

在不使用親本建立 catalog 的分析資料中，共得到 423,894 個 catalog，而符合表三篩選標準的有 1,429 個分子標記。與先前使用親本建立 catalog 分析流程所獲得的物理圖譜進行比對 (圖十三)，發現兩種分析流程所產生的分子標記不盡相同，由此提供了雜交親本與進行定序的親本可能不同的另一個證據。在此一分析流程中，所有 60 個家系所偵測到的 catalog 數目 (423,894) 遠超出基因體中

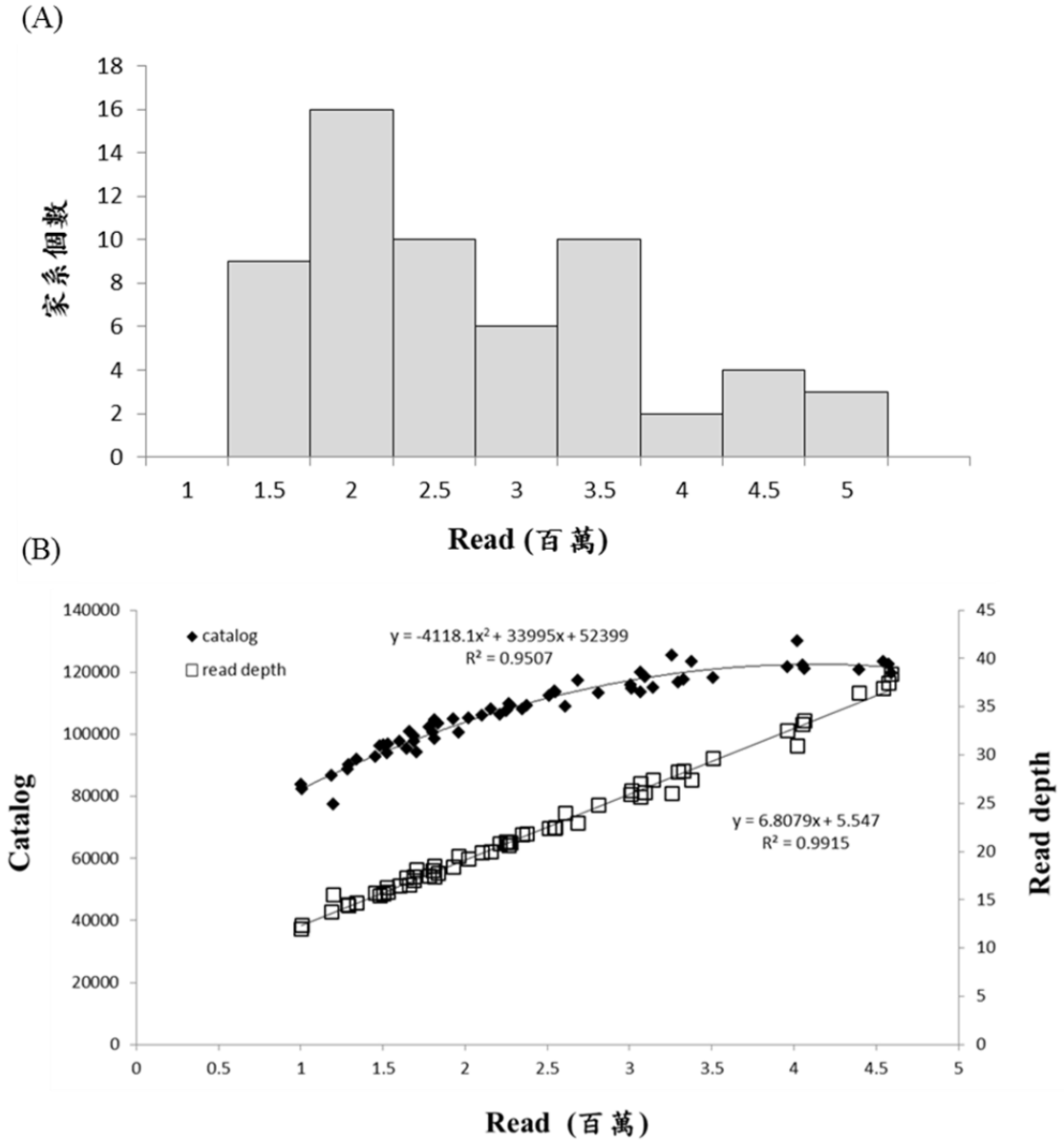


圖十三、篩選後之分子標記物理圖譜。(A) 包含親本的分析資料經過篩選後，剩下 1,105 個分子標記。(B) 不含親本的分析資料經過篩選後，剩下 1,429 個分子標記。發現兩種分析方法所產生的分子標記分布有明顯差異，在分離族群中具有多型性的分子標記不一定存在親本資料中，顯示雜交所使用的親本與定序所使用的親本可能不相同。

*Pst*I 切位的兩倍數量 (216,720)。其中約有二分之一的 catalog (248,930 個) 在 59 個以上的家系皆為缺值，若將這些 catalog 剔除，則剩下 203,400 個 catalog，接近理論的 catalog 數。會產生“假的”catalog 的原因，可能是在 PCR 或是定序時產生的錯誤，使得 read 在排列至參考序列時排列至其他的位置，而 catalog 的建立是依照所有 60 個家系的 catalog 資料建立，因此，只要有一個品系在該染色體位置有 read 存在，就會成為一個 catalog，也因為在不同樣品間因發生相同錯誤而排列至相同參考序列位置上的機率很低，因此這些 catalog 中大部分的缺值為 59。

若將每個品系的 reads 數、catalog 數以及平均 read depth 繪製成散佈圖 (圖十四)。當樣品 reads 數只有 100 萬時，catalog 數約為 8 萬，read depth 約為 10，而當樣品 reads 達到 450 萬時，catalog 數約為 12 萬，read depth 則增加為約 35，由此可知，當每個樣品所分配到的 reads 數降低時，偵測到的 catalog 的數目改變的比例較小，read depth 則會呈線性降低，反之當分配到的 reads 數再增多時，catalog 數的增加量有限，但可有效的提高 read depth，提高基因型鑑定的準確性。

卡方適合性檢定結果顯示，在 1,429 個 SNP 分子標記中，有 1,305 個有不平衡分離的情形，約佔所有分子標記當中的 91%，與預期中只有目標基因附近的區域會因為選拔極端值而造成不平衡分離有落差。Stacks 分析過程中會因為兩種對偶基因型 read 數差距太大而判定為同型結合，低估了異結合基因型的個數，對卡方檢定也會造成了影響 (Davey *et al.*, 2013)。若要避免因為 read depth 太少，造成對偶基因遺失而誤判為同型結合基因型，未來可將 read depth 總數較低的基因型值剔除，重新進行缺值篩選，將篩選後的 catalog 再次進行卡方檢定，目前 Stacks 資料庫雖然可列出每個 catalog 中各個樣品 stacks 堆疊情形，但無法針對總 read depth 進行篩選，只能設定堆疊成 stack 的 read 數門檻，在不含親本的分析的資料中，因為無法使用指令 genotype 進行校正，若提高此門檻，則會增加對偶基因遺



圖十四、每個品系的 reads 數、Loci 數以及平均 read depth 散佈圖

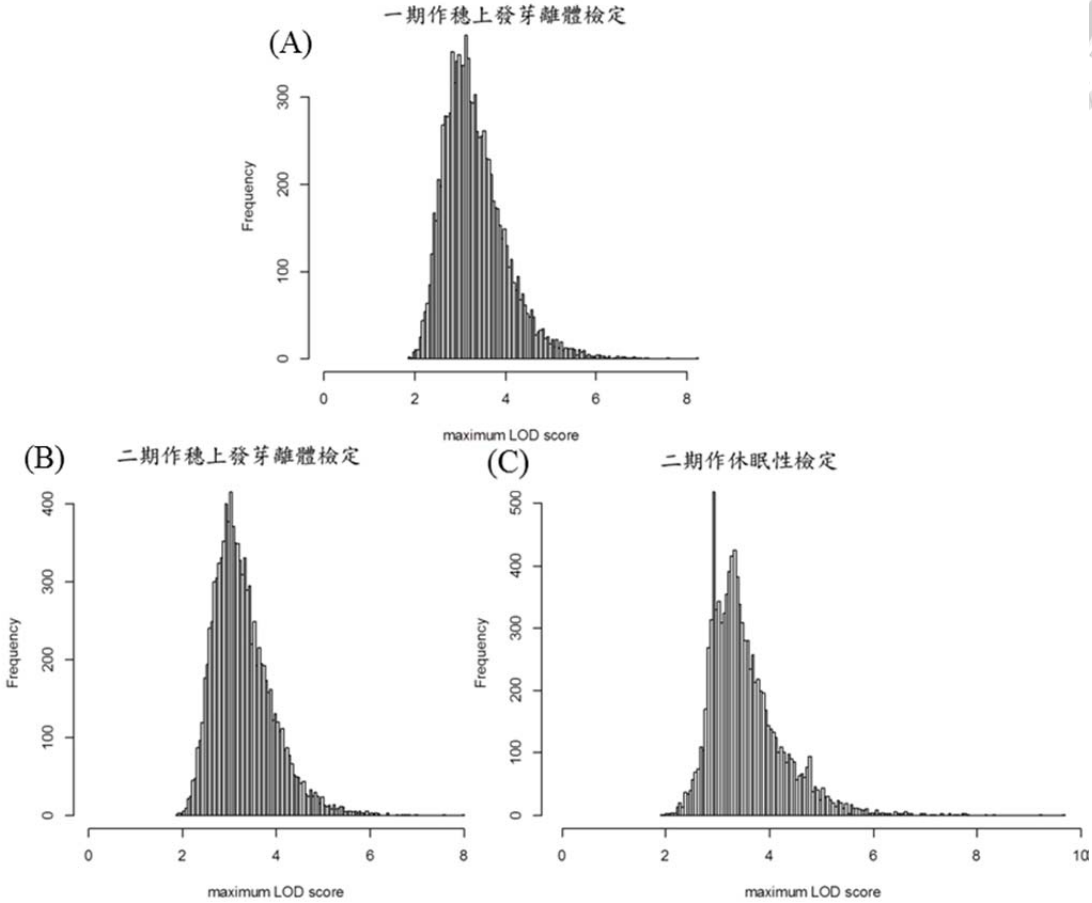
(A) 品系 reads 數平均為 2.43 M reads，分佈較集中於 1.5 M reads 至 2 M reads 間。(B) 當每個樣品所分配到的 reads 數降低時，偵測到的 catalog 的數目改變的比例較小，read depth 則會呈線性降低，反之當分配到的 reads 數再增多時，catalog 數的增加量有限，但可有效的提高 read depth。

失的情形，使偏差更加嚴重。由於 catalog 數量太多，逐一對各個基因型的 read depth 進行篩選過於費時，不是理想的篩選方式，待未來更熟悉資料析方式及各種軟體後，進行進一步的確認與篩選。

第三節　數量性狀基因座定位

本研究利用單一標記分析 (Single marker analysis) 進行數量性狀基因座的定位，在兩期作的穗上發芽離體檢定與二期作休眠性檢定資料中，在第 3 對、第 5 對、第 8 對以及第 11 對染色體上偵測到 LOD 值高於 3 的分子標記，而 10,000 次排列檢定結果顯示在 α=0.05 的顯著水準下，LOD 的門檻一期作穗上發芽檢定為 4.58，二期作穗上發芽檢定為 4.45，二期作休眠性檢定為 4.86。若將 LOD 門檻值設為 3 ，在三種外表型資料都將有超過 50% 的機率犯下 Type I error，LOD 門檻為 4 時三者也有超過 10%的機率犯下 Type I error (圖十五)，因此不適合以 3 作為篩選門檻。篩選後有位於第 3 對染色體的分子標記 43502 於一期作的穗上發芽離體檢定達 5% 顯著水準，以及同樣位於第 3 對染色體的分子標記 44933 於二期作的穗上發芽離體檢定與休眠性檢定皆達到 1% 的顯著水準 (表四)，若將兩個分子標記分別對外表型做散佈圖，可發現在各基因型間外表型的分布確實存在著差異 (圖十六)，且分子標記 44933 基因型為 G 時，品系的穗上發芽率較低，休眠性的維持日數也較長，顯示穗上發芽的耐受性較強，休眠性也較強。而兩個分子標記距離相近，約 100 kb，可能為相同的數量性狀基因座。

單一標記分析結果顯示，經過 10,000 次排列檢定建立門檻值後，第 3 對染色體上的分子標記 43502 與 44933 達顯著水準，且物理位置與 Wan *et al*. (2006) 所偵測到的數量性狀基因座 *qSdnj-3* 相近 (圖一)。前人研究中，提高穗上發芽耐受性或是增強種子休眠性的對偶基因多來自於休眠性較強的秈稻親本，而在 *qSdnj-3* 中增強休眠性的對偶基因是來自於粳稻品種 Nanjing 35，因此本研究所偵



圖十五、10,000 次重排檢定 LOD 值分布

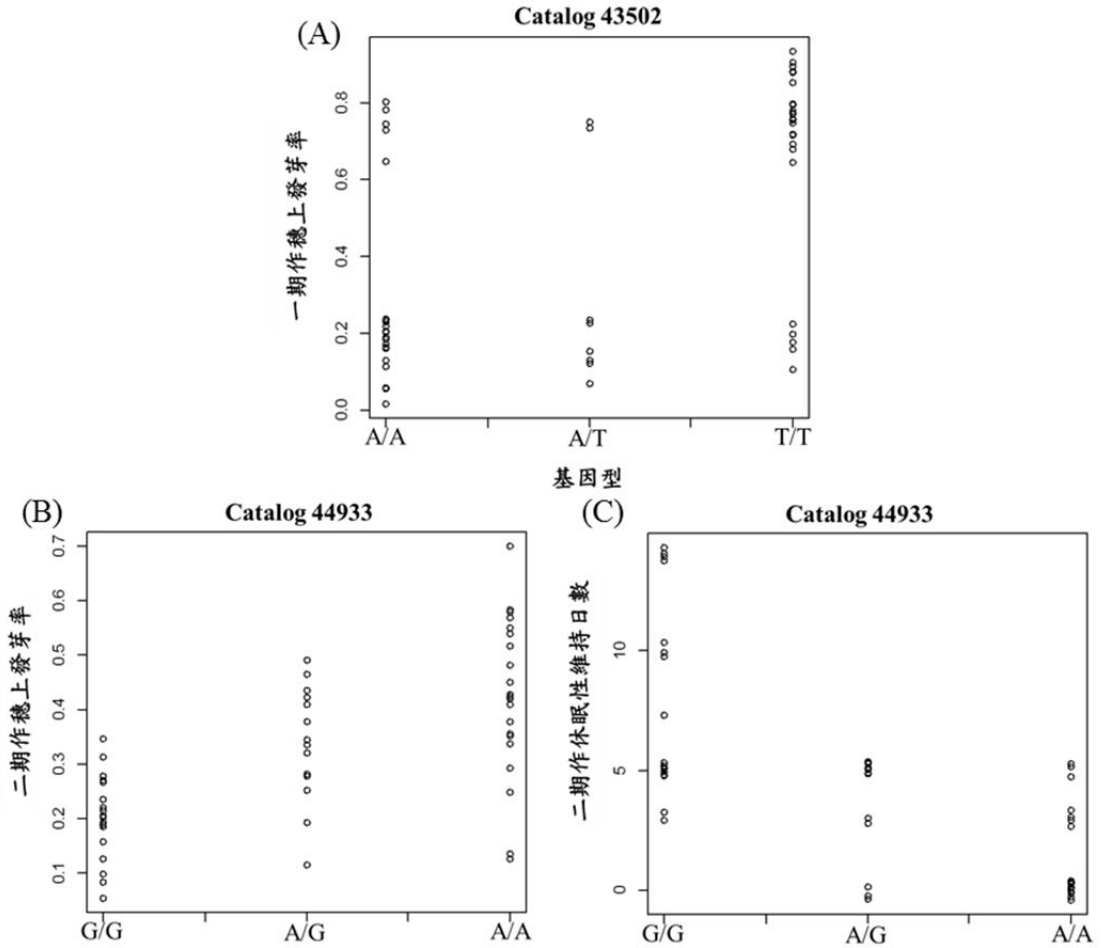
α=0.05 的顯著水準下，LOD 的門檻一期作穗上發芽檢定為 4.58，二期作穗上發芽檢定為 4.45，二期作休眠性檢定為 4.86。若將 LOD 門檻值設為 3，在三種外表型資料都將有超過 50% 的機率犯 下 Type I error。

表四、兩期作穗上發芽離體檢定與二期作休眠性檢定單一標記分析

由 10,000 次排列檢定所得到 α=0.05 的門檻值一期作穗上發芽檢定為 4.58，二期作穗上發芽檢定為 4.45，二期作休眠性檢定為 4.86。

PHS_1:一期作穗上發芽，PHS_2:二期作穗上發芽，D_2:二期作休眠性檢定

性狀	catalog ID	染色體	SNP 位點	LOD 值	R^2
PHS_1	43502	3	347,652	5.28*	0.285
PHS_2	44933	3	443,369	6.42**	0.415
D_2	44933	3	443,369	8.31**	0.486



圖十六、分子標記與外表型散佈圖

(A) Catalog 43502 在一期作的穗上發芽離體檢定資料中 LOD 達到 5% 顯著水準，圖中顯示在兩種同結合基因型間品系發芽率的分佈確實不同；(B) (C) catalog 44933 在二期作的穗上發芽離體檢定與休眠性檢定資料中 LOD 皆達到 1% 顯著水準，圖中也顯示發芽率在兩種同結合基因型間存在差異，且穗上發芽率較低的品系具有較強的休眠性。

測到的數量性狀基因座，可能具有稉稻品種中特有的增強穗上發芽耐受性與休眠性對偶基因，可應用於稉稻雜交育種中。

兩期作穗上發芽檢定資顯示，穗上發芽會受到期作或是栽培環境的影響，為遺傳率較低的性狀，因此，若進行挑選極端值的族群不夠大，而無法挑選更為極端的個品系時，將有較高的機會挑選到基因型值並非極端值的品系，使 selective genotyping 偵測數量性狀基因座的效力下降 (Sun et al., 2010)，也使得 F2:3 族群表現不如預期。而在二期作資料中我們發現，穗上發芽檢定結果與休眠性維持日數不完全相關，兩者並不是完全相同的性狀，而 selective genotyping 方法為針對單一性狀來挑選極端值個體並進行分析，因此本研究無法偵測到對穗上發芽沒有影響的種子休眠性數量性狀基因座。

第五章　結論

為了在稉稻品種間開發穗上發芽耐受性相關的分子標記，本研究使用臺稉 14 號與桃園 1 號雜交建立的 F_2 以及 $F_{2:3}$ 族群進行分析，並使用 RAD 定序技術開發高密度的分子標記，解決過去較難於稉稻品種間開發分子標記的問題，同時試著了解穗上發芽與種子休眠性的關係。經篩選後，在此族群中共得到 1,429 個具有多型性的分子標記，並在第 3 對染色體上偵測到 1 個穗上發芽與休眠性的數量性狀基因座。外表型檢定的結果顯示，穗上發芽率會受到期作不同而影響，而種子休眠性與穗上發芽兩性狀並不完全相關，可能由不同的基因所調控，因此育種上確實有機會育成具有較佳穗上發芽耐受性且具有適度休眠性的品種。雜交選育不易於早期世代進行穗上發芽耐受性檢定，又易受生育時期與栽培環境影響，期望上述成果能提供日後稉稻雜交間穗上發芽耐受性之分子輔助選拔參考，也期望 RAD 定序技術的發展有助於未來育種上的應用。

引用文獻

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。

陳隆澤，張萬來，邱鳳廷。(1980) 水稻品種穗上發芽之變異性及其與休眠性關係之研究。科學發展月刊 8: 151-161。

Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB. (1992) Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean. Genetics 132:1131-1139.

Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA. (2008) Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. Plos One 3:e3376.

Baskin JM, Baskin CC. (1980) Ecophysiology of Secondary Dormancy in Seeds of *Ambrosia-Artemisiifolia*. Ecology 61:475-480.

Benech-Arnold RL, Giallorenzi MC, Frank J, Rodriguez V. (1999) Termination of hull-imposed dormancy in developing barley grains is correlated with changes in embryonic ABA levels and sensitivity. Seed Science Research 9:39-47.

Bewley JD. (1997) Seed germination and dormancy. Plant Cell 9:1055-1066.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. (1980) Construction of a Genetic-Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. American Journal of Human Genetics 32:314-331.

Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA. (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. Bioinformatics 19:889-890.

Cai HW, Morishima H. (2000) Genomic regions affecting seed shattering and seed dormancy in rice. Theoretical and Applied Genetics 100:840-846.

Catchen JM, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W, Postlethwait JH. (2011) Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. G3-Genes Genomes Genetics 1:171-182.

Churchill GA, Doerge RW. (1994) Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping. Genetics 138:963-971.

Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142:169-196.

Davey JW, Cezard T, Fuentes-Utrilla P, Eland C, Gharbi K, Blaxter ML. (2013) Special features of RAD Sequencing data: implications for genotyping. Mol Ecol 22:3151-64.

Derera NF. (1989) The effects of preharvest rain. , in: Derera NF (Ed.), Preharvest Field Sprouting in Cereals, FL: CRC Press, Boca Raton. pp. 1-25.

Dong YJ, Tsuzuki E, Kamiunten H, Terao H, Lin DZ, Matsuo M, Zheng YF. (2003)

Identification of quantitative trait loci associated with pre-harvest sprouting resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Field Crops Research 81:133-139.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE. (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. Plos One 6:e19379.

Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD. (1995) Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and Other Herbaceous Plants. Plant Molecular Biology Reporter 13:207-209.

Gao FY, Ren GJ, Lu XJ, Sun SX, Li HJ, Gao YM, Luo H, Yan WG, Zhang YZ. (2008) QTL analysis for resistance to preharvest sprouting in rice (*Oryza sativa*). Plant Breeding 127:268-273.

Gu XY, Kianian SF, Foley ME. (2004) Multiple loci and epistases control genetic variation for seed dormancy in weedy rice (*Oryza sativa*). Genetics 166:1503-1516.

Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV. (2005) Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. Curr Opin Plant Biol 8:183-187.

Guo LB, Zhu LH, Xu YB, Zeng DL, Wu P, Qian Q. (2004) QTL analysis of seed dormancy in rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica 140:155-162.

Harlan JR, Wet JMJD, Price EG. (1973) Comparative Evolution of Cereals. Evolution 27:311-325.

Hilhorst HWM. (1995) A Critical Update on Seed Dormancy .1. Primary Dormancy. Seed Science Research 5:61-73.

Himi E, Mares DJ, Yanagisawa A, Noda K. (2002) Effect of grain colour gene (R) on grain dormancy and sensitivity of the embryo to abscisic acid (ABA) in wheat. Journal of Experimental Botany 53:1569-1574.

Konieczny A, Ausubel FM. (1993) A Procedure for Mapping Arabidopsis Mutations Using Codominant Ecotype-Specific Pcr-Based Markers. Plant Journal 4:403-410.

Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Science Research 15:281-307.

Lande R, Thompson R. (1990) Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits. Genetics 124:743-756.

Li BL, Foley ME. (1997) Genetic and molecular control of seed dormancy. Trends in Plant Science 2:384-389.

Li CB, Zhou AL, Sang T. (2006) Genetic analysis of rice domestication syndrome with the wild annual species, *Oryza nivara*. New Phytologist 170:185-193.

Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. (2004) Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of

small amplicons. Clin Chem 50:1156-64.
Lin SY, Sasaki T, Yano M. (1998) Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. Theoretical and Applied Genetics 96:997-1003.
Macdonald SJ. (2007) Intermediate-throughput laboratory-scale genotyping solutions, in: Weiner MP, Gabriel SB,Stephens JC (Eds.), Genetic Variation: a Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, NewYork, USA.
Marzougui S, Sugimoto K, Yamanouchi U, Shimono M, Hoshino T, Hori K, Kobayashi M, Ishiyama K, Yano M. (2012) Mapping and characterization of seed dormancy QTLs using chromosome segment substitution lines in rice. Theoretical and Applied Genetics 124:893-902.
Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink JL. (2012) Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach. Plos One 7:e32253.
R Core Team. (2013) R: A language and enviroment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
Steinbach HS, BenechArnold RL, Sanchez RA. (1997) Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds. Plant Physiol 113:149-154.
Sugimoto K, Takeuchi Y, Ebana K, Miyao A, Hirochika H, Hara N, Ishiyama K, Kobayashi M, Ban Y, Hattori T, Yano M. (2010) Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. Proc Natl Acad Sci U S A 107:5792-5797.
Sun Y, Wang J, Crouch JH, Xu Y. (2010) Efficiency of selective genotyping for genetic analysis of complex traits and potential applications in crop improvement. Molecular breeding 26:493-511.
Thomson MJ, Tai TH, McClung AM, Lai XH, Hinga ME, Lobos KB, Xu Y, Martinez CP, McCouch SR. (2003) Mapping quantitative trait loci for yield, yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. Theoretical and Applied Genetics 107:479-493.
Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Vandelee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. (1995) Aflp - a New Technique for DNA-Fingerprinting. Nucleic Acids Research 23:4407-4414.
Walkersimmons M. (1987) Aba Levels and Sensitivity in Developing Wheat Embryos of Sprouting Resistant and Susceptible Cultivars. Plant Physiol 84:61-66.
Wan JM, Cao YJ, Wang CM, Ikehashi H. (2005) Quantitative trait loci associated with seed dormancy in rice. Crop Science 45:712-716.
Wan JM, Jiang L, Tang JY, Wang CM, Hou MY, Jing W, Zhang LX. (2006) Genetic

dissection of the seed dormancy trait in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Plant Science 170:786-792.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990) DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic-Markers. Nucleic Acids Research 18:6531-6535.

Xu S. (2008) Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion. Genetics 180:2201-8.