

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

以分子輔助選種導入 *hd1*、*Hd6* 和 *ehd1*

抽穗期基因至水稻越光品種

Introgression of Three Heading Date Genes, *hd1*, *Hd6*,  
and *ehd1*, to *Oryza sativa* L. *japonica* cv. Koshihikari by  
Marker-Assisted Selection

陳正昇

Cheng-Sheng Chen

指導教授：林彥蓉 博士

Advisor: Yann-Rong Lin, Ph.D.

中華民國 98 年 6 月

June, 2009

## 謝辭

碩士生涯也走到該告別的時候了，三年的時間過得飛快，感覺昨天才剛考完研究所考試，但細細回想，卻又有很多事情浮現在腦中，回頭望去這一路上所經歷的一切，點滴在心頭。

衷心的感謝亦師亦母的林彥蓉老師，在課業與生活上給予許多啟發，不僅使學生在專業知識上獲益良多，也讓我的人生視野更加開闊，在您家庭繁忙之餘還要操心著學生，並在論文撰寫期間不厭其煩的修改與指正，使學生能夠順利的完成論文，很感激老師對學生的付出。感謝口試委員林順福老師、胡凱康老師以及羅正宗主任對本論文的不吝斧正，彌補學生在試驗中看不到的盲點，使本論文的完整度更加完善。另外，特別感謝農試所嘉義試驗分所陳榮坤助理研究員在田間的試驗，本論文得以順利產生。

感謝研究室學長姐素真、偉嘉、佩瑩與學弟妹鎰穎、勝偉、祥庭、素凰、順惠、韓國人金拉炮與挪威人蒲蒲，有你們在實驗室的協助與互相加油打氣，使繁忙的實驗期間增添許多樂趣與動力。也感謝95級同學，在課業之餘，相互腦力激盪，使我產生更多想法，對試驗方面增加許多助益，特別感謝群山與東融，在心情低落時的給予支持，深夜總圖前的宵夜，總是能振奮人心！以及學妹糗糗的默默支持，讓我有足夠的動力撐過論文的考驗。

最後，我要感謝在我背後支持的家人，親愛的阿嬤、父親、母親、大姊與二姐，深夜回家時會向我撒嬌的寶貝與黑寶貝，你們的支持是我完成碩士學位的最佳後盾。

在此獻給所有關心我的人們

正昇 2009

## 中文摘要

水稻栽培在不同地理位置與季節中，會有不同的抽穗期而影響水稻營養生長期，過短的營養生長期會造成稻米產量與品質的下降。在日本，越光具有良好的品質與產量，但種植在台灣時，會因為對光週期敏感而提早抽穗，降低產量與品質。台農 67 號為台灣本地品種，對於光週期不敏感。分析已選殖的六個抽穗期基因，發現越光與台農 67 號於三個抽穗期基因 *Hd1*、*Hd6* 與 *Ehd1* 存在序列與功能上的差異。本試驗目的即利用分子標幟輔助選種的方式，將此台農 67 號三個基因導入越光中，期望調整越光抽穗期，最終目的為建立越光近似同源系，以適合台灣地區種植與栽培。

依三個抽穗期基因於台農 67 號和越光的序列差異，設計三個功能性分子標幟做為前景篩選，分別為 indel 形式的 *Hd1* 功能性分子標幟、CAPs 形式的 *Hd6* 功能性分子標幟與 dCAPs 形式的 *Ehd1* 功能性分子標幟。背景篩選的分子標幟則有 87 個，為越光與台農 67 號之間具多型性的 SSR 和 indel 分子標幟，其平均間距為 17.3 cM。在育種流程中，以越光為輪迴親，台農 67 號為貢獻親的稈稈雜交族群，每世代皆使用三個功能性分子標幟篩選異質結合體 (*Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1*)，數量不等的多型性分子標幟篩選背景，應用於 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 與 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 各世代之篩選。由 283 株 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 中挑選出兩株當做父本進行回交越光，以 64 株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 中挑選出四株當做父本進行回交越光，246 株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 中挑選出 # 286-14-A23 與 # 286-85-A27，皆為 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1*，分別帶有 92.6% 與 90.8% 越光基因體背景，進行自交與回交。目前進行至 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>，挑選出之 # 286-14-A23 與 # 286-85-A27 進行自交成 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 世代和回交成 BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>。希冀在後續的分子輔助選種的協助下，可得到帶有不同抽穗期基因的近似同源系，從中評估挑選擁有越光優良米質且適合台灣地區種植的越光近似同源系。

中文關鍵字：越光、台農 67 號、抽穗期、光週期、分子輔助選種

## Abstract

The heading date of rice is the responds to diverse adaptation to different geographical distributions and seasons. The heading date also influences the rice vegetative stage, in which short vegetative stages reduce grain yield and quality. The elite rice cultivar, Koshihikari, possesses good yield and quality while planted in Japan; however, Koshihikari heads too early while planted by in Taiwan because of its photoperiod-sensitivity. A Taiwan elite cultivar, TNG67 is a photoperiod- insensitive variety and has been widely used as a priority germplasm in rice breeding programs in Taiwan. Sequence alignment analyses of six cloned heading date genes between Koshihikari and TNG67 reveal that three heading date genes, *Hd1*, *Hd6*, and *Ehd1*, differ in sequence and function, accounting the variation of days to head in Koshihikari and TNG67. Therefore, the main goal of this study is to introgress the three heading date genes of TNG67 to Koshihikari by MAS, and finally to establish several NILs of Koshihikari with different heading dates, suitably cultivated in Taiwan.

According to the sequence variation of the three heading date genes, we designed three functional markers for foreground selection, which *Hd1*, *Hd6*, and *Ehd1* were designed as indel, CAPs, and dCAPs markers, respectively. A total of 87 polymorphic markers of SSRs and indels, with an average distance of 17.3 cM, were employed as background selection. In the backcross recurrent selection, Koshihikar was served as the recurrent parent, and TNG67 was served as the donor parent. In each backcross generation, the three functional markers of heading date genes were used first to select individuals with *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1* for foreground selection, and then the selected individuals were subjected with various polymorphic markers for background selection. Three individuals selected from 283 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> by MAS were served as the male parents to backcross to Koshihikari; four individuals selected from 64 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> by

MAS were served as the male parents to backcross to Koshihikari; two individuals selected from 246 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> by MAS, which #286-14-A23 and #286-85-A27 possess *Hd1hd1 / Hd6hd6 / Ehd1ehd1*, and contain 92.6% and 90.8% of Koshihikari genome, respectively. Upto now, two BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> individuals, #286-14-A23 and #286-85-A27, were selfed to establish BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> and were served as the male parents to backcross to Koshihikari to establish BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>. In the future, several NILs of Koshihikari by further MAS will be established and be evaluated for grain quality, yield and other agronomic traits. Finally, the optimized NILs will be promoted to cultivate in Taiwan.

Keywords : Koshihikar, Tainung 67, heading date, photoperiod, marker-assisted selection



## 內容目錄

口試委員審定書 .....	i
謝辭 .....	ii
中文摘要 .....	iii
Abstract .....	iv
內容目錄 .....	vi
圖目錄 .....	viii
表目錄 .....	ix
壹、前言 .....	1
貳、前人研究 .....	3
一、水稻抽穗期之研究 .....	3
二、影響水稻抽穗期基因之研究 .....	4
三、分子標幟輔助選種 .....	12
四、水稻分子標幟輔助選種 .....	15
參、材料與方法 .....	17
一、試驗族群 .....	17
二、抽穗期之調查 .....	18
三、水稻葉片 DNA 萃取 .....	20
四、抽穗期基因定序 .....	20
五、功能性分子標幟設計 .....	21
六、多型性分子標幟篩選與設計 .....	26
肆、結果 .....	28
一、越光與台農 67 號於六個抽穗期基因之分析 .....	28
二、設計功能性分子標幟 .....	42
三、設計背景篩選的多型性分子標幟 .....	48
四、BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> 之基因型分析與篩選 .....	54
五、BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> 分析與篩選 .....	57
六、BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub> 分析與篩選 .....	62
伍、討論 .....	69



陸、參考文獻 .....	76
柒、附錄 .....	85



## 圖目錄

圖 一、本試驗回交育種流程圖 .....	19
圖 二、三品種 <i>Hd1</i> 之對偶基因型分析 .....	29
圖 三、四品種在 <i>Hd3a</i> 之序列分析 .....	31
圖 四、四品種在 <i>Hd6</i> 之序列分析 .....	33
圖 五、五品種在 <i>Ehd1</i> 之序列分析 .....	35
圖 六、三品種在 <i>Ghd7</i> 之序列分析 .....	37
圖 七、四品種在 <i>SE5</i> 之序列分析 .....	39
圖 八、 <i>Hd1</i> 基因型分析 .....	43
圖 九、 <i>Hd6</i> 基因型分析 .....	45
圖 十、 <i>Ehd1</i> 基因型分析 .....	47
圖 十一、本試驗使用之越光×台農 67 號多型性分子標幟於遺傳連鎖與圖與物理圖譜之位置 .....	51
圖 十二、背景篩選 .....	53
圖 十三、#286-14-A23 與 #286-85-A27 基因體結構分析 .....	60





## 表目錄

表 一、四個品種種植在台灣時抽穗期的相對表現.....	41
表 二、三個功能性分子標幟與 87 個多型性分子標幟之來源.....	49
表 三、#286 與 #330 的前景篩選與 17 個分子標幟的背景篩選.....	55
表 四、兩親本與篩選過後的 BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> 之抽穗天數.....	56
表 五、五株 BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> 的前景篩選與背景篩選之基因型.....	59
表 六、兩親本與篩選過後的四株 BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> 之抽穗天數.....	61
表 七、兩株篩選過後的 BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub> 之十二條染色體分析.....	65
表 八、兩親本與篩選過後的兩株 BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub> 之抽穗天數.....	68



## 壹、前言

水稻為禾本科 (Gramineae) 稻屬 (*Oryza*) 之一年生或多年生作物，目前有 21 個野生種與兩個栽培種，兩個栽培種分別為非洲稻 (*Oryza. glaberrima* Steud.) 與亞洲稻 (*Oryza. sativa* L.)，非洲稻僅種植於西非，栽培面積遠低於亞洲稻，而亞洲稻主要分為秈稻 (*indica*)、粳稻 (*japonica*) 與爪哇稻 (*javanica* 或 *tropical japonica*)，為世界上主要的栽培水稻 (Oka, 1974; Khush, 1997)。水稻在多樣的自然環境下選拔，經過約一萬年之漫長的馴化歷史，加上人類無遠弗屆之散播，使得水稻之各類生態歧異極其豐富，適應性極廣，從南緯 40° 到北緯 53°；從海平面到海拔 3000 公尺；從深水到旱地皆有其蹤跡 (Chang, 1976; Diamond, 2002)。

現今台灣地區主要栽種之稻種為亞洲稻，秈稻與粳稻兩種亞種皆有，並有少量台灣先住民保留下來的爪哇稻，而稻種的來源有三：一為先住民自東南亞地區攜入者，此類為山地陸稻，可能屬於爪哇稻，目前稱為台灣山地陸稻及陸糯稻，可見於「閩海贈言」書中「東番記」一文記載：「東番夷人不知所自始...。無水田，治畚種禾，山花開則耕；禾熟，拔其穗，粒長比中華稍長，且甘香...」（西元 1602 年，明萬曆三十年）；二為自十七世紀中葉後，荷人獎勵引誘漢人自大陸來台定居、明鄭以降大量漢人移居台灣，自福建及廣東地區引入多種秈型稻種，此即目前本地在來品種之來源；三為自 1899 年後日人有計劃引進日本溫帶粳稻品種並改良，以後逐漸演變為目前之蓬萊種 (沈，1963；吳，1993)。

在世界水稻栽培國家中，雖然秈稻在種植面積與市場皆較粳稻為大，但台灣、日本、韓國與中國北方特別偏好粳稻的黏度與彈性 (Lestari *et al.*, 2009)。台灣消費者對於粳稻食味性的偏好，與台灣稻作發展歷史息息相關，從日人佔台前無栽培粳稻之記錄，1935 年栽培面積超越秈稻，1966 年達 70% 以上，1974 年達 80% 以上，1981 年更占總面積 90% 以上 (曾，1999)。

民國七十年代由於稻米出口困難產量過剩，因此台灣稻米之生產由「量而轉為品質」。民國 71 年 (1982) 農業試驗所謝順景系主任邀請日本稻米品質專家堀末登博士來台一個月，指導稻米品質之育種及米質分級方法，開啟稻米品質研究的熱潮，且為配合稻米品質之育種，在農試所與台中區農業改良場分別設立稻米品質研究室，並添加了稻米品質分析之設備 (郭，1999)，因此水稻育種目標以育成良質米品種為主要工作，以滿足加工業、碾米業及消費者的需求 (林，2006)。

直至今日，工商業發展熱絡，國人經濟水準提高，對於生活品質亦相當注重，願意以較高的價格購買品質優良的食品，而對於米質的要求也與日俱增，不再侷限於吃的飽，而是要吃的安全且精緻。

日本粳米「越光」(*Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Koshihikari)，米質特性優良且食味感佳，自 1979 年登上日本栽培稻面積的首位之後，歷年皆為第一，至 2005 年時已達到 38%，除了至南的沖繩、至北的北海道與青森無栽種之外，日本本土緯度分布從北緯 31° 的鹿兒島縣，到北緯 39° 的秋田縣皆有栽培(獨立行政法人 農業・食品產業技術綜合研究機構 作物研究所)，但品質最好的栽種地區為北緯 37° 的新瀉縣。不同緯度所造成的溫度與日長的差異，對於越光的品質有很大的影響，而日本國內的試驗單位，也努力不懈地建立帶有不同染色體片段的越光近似同源系(near isogenic lines, NILs)，如不同抽穗期基因的越光近似同源系(Kanto IL1、Wakei 367、Wakei 370、Wakei 371)(Takeuchi *et al.*, 2006)或抗特定病蟲害基因的越光近似同源系(新瀉 BL1 號~12 號、富山 BL1 號~7 號)(獨立行政法人 農業・食品產業技術綜合研究機構 作物研究所)，皆是日本農業試驗單位為保留越光優良米質特性，又可以在緯度狹長的日本，因應不同環境而育成適應各地區或增加對病蟲害抗性的高品質的越光近似同源系。

在台灣，越光亦廣受大眾喜愛，其價格居高不下，能為台灣農民帶來較好的收益，但種植在台灣兩期作栽培制度時，因其具有光敏感的特性而提早抽穗，使產量與品質下降。本試驗目的即是希望能利用本地水稻品種調整越光抽穗期，以適應台灣本地的日長，期望改良出品質與產量能媲美日本栽種的越光。在台灣，許多栽培品種都是光不敏感性的，台農 67 號(*Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Tainung 67, TNG67)即為一個做為導入光不敏感的優良種原，是以，本研究以越光為輪迴親，台農 67 號為提供不同抽穗期基因的貢獻親，利用回交育種搭配分子輔助選種(marker-assisted selection, MAS)，選育具有越光優良米質但不同抽穗期的近似同源系，能於台灣廣泛推廣，並提供未來水稻分子輔助選種相關研究之參考。

## 貳、前人研究

### 一、水稻抽穗期之研究

稻米品質主要受到品種、環境、栽培管理及收穫後處理等因素影響，其中品種為決定稻米品質的根本要素，而水稻的生長分為三個時期，（1）營養生長期：從水稻發芽至幼穗的形成、（2）生殖生長期：幼穗形成至開花、（3）成熟期：開花至穀粒充實完全、成熟。一般而言，生殖生長期大約 35 天，成熟期大約 30 至 35 天，雖然在溫度較低時會延長、溫度高時會縮短，但這兩個時期大致上沒有多大的差異，可是在營養生長期中，由超過 400 個水稻品種的測試結果中發現，不同品種之間在此時期具有很大的變異（Vergara and Chang, 1985）。

在自然環境中，植物藉由控制開花的時間於適當的季節中產生種子，扮演著適應地區性與季節性的關鍵角色，其中，營養生長期的長短會影響提供開花時所需的養分，為糧食作物決定產量多寡與品質優劣的因子之一，而調控開花之基因和分子機制陸陸續續在阿拉伯芥（*Arabidopsis thaliana*）、水稻等研究中被發現。白天或黑夜的相對長度影響植物開花的現象稱為光週期，超過或少於一特定日長才會開花，此又稱為臨界日長，而植物對於光週期長短的反應，可以大致分為三種；（1）：超過臨界日長才會開花，為長日植物、（2）：少於一臨界日長才會開花，為短日植物、（3）：日長對於開花沒有影響，為日中性植物（Hopkins 和 Hüner, 2002）。阿拉伯芥是雙子葉植物研究的模式植物，為長日植物；水稻是單子葉植物研究的模式植物，為短日植物；另外，日中性植物不會受到日長變化而影響開花期的植物，例如番茄。雖然阿拉伯芥為長日植物，水稻為短日植物，兩者對於光週期的反應不同，但兩者在調控開花之基因的數目和種類卻十分相似，許多為同源性基因，其 DNA 序列具有保守性，並有相同的功能，如阿拉伯芥之 *CO*（*CONSTANS*）與水稻 *Hd1*（*Heading date 1*），分別可調控下游開花基因 *FT*（*FLOWERING LOCUS T*）與 *Hd3a*（*Heading date 3a*）（Yano *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 2002）。

影響水稻抽穗期的因素很多，水稻本身的基因、生物時鐘與溫度和日長等環境的交感，皆會影響抽穗期的長短，其中，以水稻對不同長度光週期的反應，大致上可以分為光週期敏感品種與光週期不敏感品種。一般而言，大部分野生水稻與較原始的栽培種水稻為光週期敏感品種，對於日長的增加而延遲抽穗期，但超過臨界日長則不會抽穗開花，而光週期不敏感品種在增加光週期的反應下，具有

較低的反應僅僅增加少許抽穗期日數 (Vergara and Chang, 1985)。以日本栽培的緯度分布來看，水稻品種中的光週期敏感基因與溫度和日長之交感影響抽穗期甚巨，例如在高緯度地區北緯 43.1° 的札幌，由於水稻生長適溫 18°C 以上只有從六月至九月，此時的日長卻高達 13 個小時到 15 個小時，經過此種自然環境與人為的選拔育種，水稻對於光週期幾乎不敏感且為早熟品種，特別光週期敏感基因 *Hdl*，在長日下會延遲開花，是以，在此地區水稻品種之 *Hdl* 基因皆喪失功能；但反觀日本中緯度地區北緯 35.7° 的東京與低緯度低區北緯 26.2° 的那霸，從缺失 *Hdl* 的 Nipponbare (*Oryza sativa* spp. *japonica*) 突變株種植在東京時，比正常植株早抽穗，但種植在那霸時，比正常植株晚抽穗。由此可知，一個光週期敏感性基因，受到日長變化而有不同的表現，長日會延遲抽穗，並影響水稻抽穗，推測不同地區的水稻品種，帶有不同光週期性基因和其他抽穗期基因以控制抽穗的時間，於適當的環境下產生種子，更扮演著適應地區性與季節性的關鍵角色 (Izawa, 2008)。

台灣地區位於亞熱帶，周年之光週期差異不大，大約 11~13 小時，由日本直接引種至本島栽培之粳稻品種 (如越光、Nipponbare) 大多提早開花成為早熟性品種，顯示台灣光週期低於一般日本栽培之粳稻的光週期要求，因而提前抽穗開花，是為光週期敏感品種；反觀台灣現行栽培之粳稻品種多屬於光週期不敏感品種，一般仍維持 120 天左右之生育期 (盧等, 2006)。

## 二、影響水稻抽穗期基因之研究

水稻抽穗期有很大的變異，可以分為對光週期敏感的品種與對光不敏感的品種，Vergara 和 Chang (1985) 整理 456 個品種在 10、12、14 與 16 小時日長處理的抽穗期表現，菲律賓秈稻品種 BPI-76 的抽穗日數表現分別為 52 天、72 天、超過 200 天未抽穗、超過 200 天未抽穗，對於日長的變化極為敏感；而台灣粳稻品種台南三號為 89 天、89 天、97 天、114 天，對於光週期不敏感。而 Yano 等人 (1997) 利用抽穗日數平均為 122 天的 Nipponbare 與平均 117 天的 Kasalath (*Oryza sativa* spp. *indica*) 雜交產生的 186 個 F<sub>2</sub> 族群中，平均抽穗日數為 125.7 天，抽穗日數的分布由 104 至 164 天，呈現變異大且連續分布的現象，推測抽穗期是由許多基因所調控。在近十幾年間，數量性狀基因座 (quantitative trait loci, QTLs) 廣泛地應用在抽穗期的研究中 (Li *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1996; Yano *et al.* 2001; Linh *et al.*, 2006; Matsubara *et al.*, 2008a)，使得抽穗期基因陸續被發現，更進一步的使用定位選殖

(positional cloning) 的策略選殖出基因；到了近幾年，利用功能性基因體概念建立突變庫的方式，也找到了數個影響抽穗期的基因 (Kim *et al.*, 2007)。

Li 等人 (1995) 使用爪哇稻 Lemont (萊蒙特) 與私稻 Teqing (特青) 雜交產生 2418 個 F<sub>4</sub> 分離族群與 113 個 RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制酶切多型性) 分子標幟，找到三個控制抽穗期的基因座，分別為 *QHd3a*，位在第三條染色體，此片段帶有 Lemont 會提早 8 天抽穗；*QHd8a* 位在第八條染色體，此片段帶有 Teqing 時，會提早 7 天抽穗；*QHd9a* 位在第九條染色體，此片段帶有 Lemont 會提早 3.5 天抽穗，這三個基因座共可以解釋 76.5% 的變異。

在粳稻 Nipponbare 和私稻 Kasalath 的雜交族群中找到 15 個調控抽穗期的數量性狀基因座，分別為 *Hd1~Hd3a*、*Hd3b~Hd14*。首先是 Yano 等人 (1997) 利用超過 850 個分子標幟與 186 株 F<sub>2</sub> 定位出 *Hd1~Hd5*，其中，兩個主效應的 QTLs，*Hd1* 和 *Hd2*，可解釋 67% 與 14% 的抽穗期變異，分別位在第六條染色體中間與第七條染色體尾端，這兩個 QTLs 帶有 Kasalath 對偶基因會提早 14.5 與 7 天抽穗；而把 *Hd1* 與 *Hd2* 的效應移除時，找到 *Hd3*、*Hd4* 與 *Hd5*，分別為在第六、第七與第八條染色體，帶有 Kasalath 對偶基因，分別延遲 2.1、2.9 與 3.4 天；利用 98 株 BC<sub>1</sub>F<sub>5</sub> (Nipponbare/Kasalath//Nipponbare) 與 245 個 RFLP 分子標幟，找到 *Hd7*、*Hd8* 與 *Hd11* 三個較微弱的 QTLs，分別為在第二條染色體尾端、第三條染色體短臂與第四條染色體短臂上，可解釋 5.7%、6.4% 與 6.6% 的抽穗期變異，*Hd7* 與 *Hd8* 基因座之 Kasalath 對偶基因，會延遲 2.4 與 2.5 天抽穗，而 *Hd11* 之 Kasalath 對偶基因時會提早 2.6 天抽穗 (Lin *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 2003)；進階回交後代 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 中找到位於第三條染色體長臂的 *Hd6*，帶有 Kasalath 片段的植株，在自然日長與日長 14.5 小時的情況下會延遲抽穗 (Yamamoto *et al.*, 2000)；而在第三條染色體短臂的 *Hd9*、第四條染色體的 *Hd10*、第八條染色體的 *Hd12*、第十二條染色體的 *Hd13*、與第十條染色體的 *Hd14*，對於影響抽穗期的效應較小，在初級分離族群時易不容易被偵測到，使用進階族群時，才會被偵測到 (Yamamoto *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002; Monna *et al.*, 2002)；其中，利用高解析定位 (High-resolution mapping) 分析近似同源系，發現 *Hd3* 的區域中，其實有兩個緊密結的基因 *Hd3a* 與 *Hd3b* (Monna *et al.*, 2002)。

粳稻越光與粳稻 Nipponbare 雜交族群中，利用兩個回交自交系 (backcross inbred lines, BILs)、BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 與 BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>，找到兩個調控抽穗期的數量性狀基因座，

位在第三條染色體尾端的 *Hd16* 與第六條短臂的 *Hd17*，Nipponbare 的對偶基因時分別會延遲約 5.4 至 5.8 天與提早 2.6 至 2.7 天 (Matsubara *et al.*, 2008a)。

秈稻台中 65 號 (*O. sativa* ssp. *japonica* Taichung 65, TC65) 與非洲稻 (*Oryza glaberrima* Steud. acc. IRGC 104038) 的 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 回交族群 (TC65/ *O. glaberrima* (IRGC 104038)/TC65)，找到三控制抽穗期的 QTLs，分別在第一、第六與第十條染色體，如前兩者帶有非洲稻的對偶基因時會提早抽穗，第十條染色體上的 QTL 帶有台中 65 號片段時會延遲抽穗 (Doi *et al.*, 1998)。後來在秈稻台中 65 號與秈稻 Nipponbare 的雜交後代，在第十條染色體找到一個重要的抽穗期基因，*early heading date 1* (Doi *et al.*, 2004)，與 Doi 等人 (1998) 找到在第十條染色體控制抽穗期的基因座相同。

秈稻珍汕 97 (Zhenshan 97) 與秈稻明拔 63 (Minghui 63) 的雜交後代中，利用 F<sub>2.3</sub> 與重組自交系 (recombinate inbred lines, RILs) 找到一個控制產量、株高與抽穗期的基因，位在第七條染色體的 *Ghd7*，在長日的情況下位延遲抽穗 (Xue *et al.*, 2008)。

此外，利用突變體或是生物資訊學比對的方式，也找到了幾個影響抽穗期的基因。利用序列比對的方式及遺傳實驗的證明，找到另一個在 *Ehd1* 上游扮演傳導角色的 *OsId1*，而這個結果與利用  $\gamma$ -ray 突變體找到的 *Ehd2* 相同 (Park *et al.*, 2008; Matsubara *et al.*, 2008b)；使用  $\chi$ -ray 物理誘變的方式，找到一個與光敏色素相關的 *SE5* (Izawa *et al.*, 2000)；利用 T-DNA 插入產生突變系的方法找尋到，如 *OsGI* 與 *Ehd1* 之間扮演傳導角色的 *OsMADS51* (Kim *et al.*, 2007)。

截至目前為止，以上調控抽穗期的基因中，已被選殖、定序與探討其功能的抽穗期相關基因有 *Hd1*、*Hd3a*、*Hd6*、*Ehd1*、*Ghd7*、*OsMADS51*、*OsId1* 與 *SE5*，而以下分別敘述各基因的功能與變異性對抽穗期的影響。

### *Heading date 1 (Hd1)*

*Hd1* 是第一個利用 Nipponbare 與 Kasalath 產生的 F<sub>2</sub> 分離族群所定位出來的抽穗期基因，位在第六條染色體，基因長度 4814 bp，*Hd1* 之 Kasalath 對偶基因會延遲 14.5 天抽穗 (Yano *et al.*, 1997)，利用超過 9000 個 BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> (N/K//N//N) 中，約 2000 個植株是早抽穗的，經過分析，發現這些植株皆為 Kasalath 的同質結合體 (*hd1/hd1*)，而異質結合體 (*Hd1/hd1*) 或是 Nipponbare 同質結合體 (*Hd1/Hd1*)

之植株則會延遲抽穗，因此，進而使用 1505 個極早抽穗的個體進行 *Hdl* 的定位選殖，並利用序列比對的方式，發現 *Hdl* 與阿拉伯芥 *CO* 有很高的相似性，推測和 *CO* 基因有相同的功能 (Yano *et al.*, 2000)，*CO* 為阿拉伯芥中調控開花基因 *FT* 的轉錄因子，在長日下可以促進 *FT* 表現，進而開花 (Putterill *et al.*, 1995)。而在 Nipponbare 之 *Hdl* 的第一個外顯子中，有一個 zinc finger domain，而 Kasalath 在這一個 domain 中，有 36 個鹼基的插入與 33 個鹼基的缺失，造成 *Hdl* 功能的缺失；而台中 65 號 (TC65) 在 *Hdl* 的 zinc finger domain 與 Kasalath 相同有 36 個鹼基的插入，另外在第二個外顯子中的 CCT domain 有 1901 個鹼基的插入，使得序列產生異常，無法正常的轉譯出 *Hdl* (Doi *et al.*, 2004)。是以 TC65 與 Kasalath 皆是無法轉譯出正常的 *hdl* 基因，使得此基因的功能喪失，所以對於光週期不敏感 (Yano *et al.*, 2000)。

利用控制光週期的方法分析抽穗日數，推測 *Hdl* 具有兩個功能，在短日照處理的情況下，會促進抽穗，使抽穗期提早；在長日照的處理情況下，會延遲抽穗，使抽穗期延後 (Yano *et al.*, 2000)。而把 Kasalath 的 *hdl* 導入 Nipponbare 之後，子代的表現會比 Nipponbare 晚開花，*Hdl* 在日本天然日長或是長日處理下，會延遲抽穗，但在短日的處理下，會提早抽穗 (Lin *et al.*, 2000)。

在水稻抽穗途徑中，*Hdl* 位在開花基因 *Hd3a* 的上游，利用表現量的分析，發現 *Hdl* 在短日下會增加 *Hd3a* 的表現而提早抽穗，此外在阿拉伯芥中，*Hdl* 的同源基因 *CO*，也是位在開花基因 *FT* 的上游 (Kojima *et al.*, 2002)。

### Heading date 3a (*Hd3a*)

*Hd3a* 粗定位在第六條染色體 (Monna *et al.*, 2002)，以 2207 株在此片段有重組的植株並加入在此區間的 CAPs (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 分子標幟分析，找到基因長度為 4110 bp 的 *Hd3a*，分析 Nipponbare 與 Kasalath 在此基因序列上的異同，發現在 *Hd3a* 基因的 C-terminal 端，有三個鹼基發生了置換，由於 C-terminal 端的差異，導致 *Hd3a* 有不同程度的表現 (Kojima *et al.*, 2002)。又將 Kasalath 之 *Hd3a* 對偶基因，轉殖進入 Nipponbare 中，在短日的環境中，明顯造成提早抽穗的現象，而 Nipponbare 與 Kasalath 在此基因座上皆為有功能的對偶基因，Nipponbare 之 *Hd3a* 的功能效應比 Kasalath 之 *Hd3a* 來的弱。由兩品種在近似同源系的試驗中 (Monna *et al.* 2002)，或是由轉殖兩品種 *Hd3a* 基因過度表現後代的試



驗中，短日處理下，皆是 Kasalath 比 Nipponbare 早開花，且在 *Hd3a* 的表現量上，也是 Kasalath 較多 (Kojima *et al.*, 2002)。

經過序列的分析比對，水稻 *Hd3a* 與阿拉伯芥的 *FT* 為同源基因，推測也具有相同的功能，而 *Hd3a* 蛋白即為水稻的開花素 (florigen)，*Hd3a* 蛋白在葉片經由維管束組織中的篩管移動到莖頂分生組織 (shoot apical meristem, SAM)，並引發開花的信息 (Tamaki *et al.*, 2007)，*Hd3a* 基因的表現量增加，會使開花期提早，但 *Hd3a* 的表現量也會受到上游光週期基因 *Hd1* 與 *Ehd1* 的影響 (Kojima *et al.* 2002)。

#### *Heading date 6 (Hd6)*

*Hd6* 定位在第三條染色體長臂 (Yamamoto *et al.*, 2000)，利用一株在 *Hd6* 基因座帶有異質結合體的 BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> 自交得到 2207 植株，以定位選殖的方式選殖，基因長度為 6929 bp，將 Kasalath 之 *Hd6* 對偶基因，轉殖進入 Nipponbare 中，在自然日長與長日情況下，會延遲抽穗現象。經過序列的分析比對，水稻 *Hd6* 與阿拉伯芥 *CK2α* 為同源基因，主要有一個 α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> heterotetrameric 的結構之 CK2α domain，包含兩個 catalytic(α)與兩個 regulatory(β)次單位，此基因參與水稻的光傳導途徑 (phototransduction pathway)，若 CK2α domain 不完整轉譯，則會造成水稻產生光週期敏感的外表形態，使水稻提早抽穗開花 (Takahashi *et al.*, 2001)。在抽穗期途徑中，*Hd6* 目前尚無法確定其位置，推測在長日的情況時，可能會與 *Hd1* 共同抑制 *Hd3a* 的表現而延遲抽穗 (Yano, 2007)。

在 Nipponbare (*hd6 hd6*) 的 CK2α domain 發生一個鹼基的置換，產生過早的終止密碼 (premature stop codon)，無法產生完整的 *Hd6*；在一個進階回交族群中的 BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>-9-28 品系，*Hd6* 異質結合體 (*Hd6 hd6*) 個體為材料，分析後代在抽穗日的表現，明顯的比帶有 Kasalath (*Hd6 Hd6*) 的植株早抽穗，且比帶有 Nipponbare 同質對偶基因 (*hd6 hd6*) 的植株晚抽穗，可以推論此基因為一個不完全顯性基因，且明顯控制抽穗期的日數 (Takahashi *et al.*, 2001)。

#### *Early heading date 1 (Ehd1)*

*Ehd1* 定位在第十條染色體 (Doi *et al.*, 1998)，利用超過 2500 株的 BC<sub>3</sub>F<sub>5</sub> (TC65/*O. glaberrima*//TC65///TC65////TC65)，以定位選殖的方式選殖出 *Ehd1*，基因長度

為 7540 bp，且發現 Nipponbare、Kasalath 與 *O. glaberrima* 在 *Ehd1* 為相同的對偶基因 (Doi *et al.*, 2004)。在台中 65 號 *Ehd1*，發生了一個鹼基的置換，使得 GARP domain 轉譯出不正確的胺基酸，由 Glycine (G, GGA) 轉變為 Arginine (R, AGA)，基因功能因此喪失，而 Nipponbare、Kasalath 與非洲稻 (*O. glaberrima*) 在 *Ehd1* 基因座上為相同的對偶基因，且會轉譯出正常的 GARP domain，使 *Ehd1* 基因正常表現，植株提早開花 (Doi *et al.* 2004)。

經由序列分析與相關比較，*Ehd1* 基因為水稻內特有的基因，並沒有在阿拉伯芥中發現，為一個 B-type response regulator，序列內包含一個 GARP domain，與 DNA binding 的能力有關，調控抽穗過程下游的 *Hd3a* 基因，在短日環境中，正常的 *Ehd1* 基因會使此類基因的表現會上升，進而提早開花，此外，在阿拉伯芥中，*Hd1* 的同源基因 *CO*，也是位在開花基因 *FT* 的上游 (Kojima *et al.*, 2002)。

### *Ghd7*

以兩個籼稻品種明恢 63 × 珍汕 97 的重組自交系 RI50，再與珍汕 97 回交兩次所建立的 8400 株 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 族群，利用定位選殖的方式選殖出一個同時影響產量、株高與抽穗期的 *Ghd7* 基因，在長日的情況下會表現，使抽穗期延遲、株高增加與產量上升，而短日環境下則不會表現。在基因結構方面，*Ghd7* 基因包含一個 CCT domain，並與阿拉伯芥 *CO* 基因、水稻 *Hd1* 基因中的 CCT domain 有高度的相似性，推測其基因的表達和功能受光週期長短的調控 (Xue *et al.*, 2008)。

以 RT-PCR 的方法分析 *Ghd7* 在抽穗期途徑中所扮演的角色，發現不會受到 *Hd1* 與 *OsGI* 基因的影響，但表現量會影響 *Ehd1* 與 *Hd3a*，推測 *Ghd7* 可調控 *Ehd1* 並進而影響下游 *Hd3a* 表現，但卻不會受到 *Ehd1* 上游基因 *OsGI* 所影響 (Xue *et al.*, 2008)。

在自然的環境中，分析各地的水稻品種，發現在 *Ghd7* 基因序列的變異很大，明恢 63 帶有功能正常之 *Ghd7-1*；而珍汕 97 為 *Ghd7-0*，則完全沒有功能；在牡丹江 8 號與合江 19 號有部分 *Ghd7* 序列，但不具功能的 *Ghd7-0a*；Nipponbare 中找到有功能但是微弱的 *Ghd7-2*；特青 (Teqing) 找到與 *Ghd7-1* 相同正常功能的 *Ghd7-3* (Xue *et al.*, 2008)。

## SE5

Izawa 等人(2000)以農林八號 X-ray 突變體中的 *photoperiodic sensitivity 5 (se5)* 突變株 (Yokoo and Okuno, 1993), 找到一個與阿拉伯芥 *HY1 (HEME OXYGENASE 1)* 基因同源的 *SE5* 基因, 此基因包含一個 Heme oxygenase, 參與光合色素的合成, 在 *se5* 突變體中, 對於光週期的反應完全喪失, 無論是在長日或是短日甚至是全日照的環境, 皆很早就開花, 可以證實在開花途徑中是由光合色素扮演一個重要的關鍵角色。

## OsGI

在 *se5* 突變體中, 使用 Fluorescent Differential Display (FDD) 的方法, 找到一個與阿拉伯芥 *GIGANTEA (GI)* 的同源基因 *OsGI*, 分析 *OsGI* 之 mRNA 表現, 發現 *OsGI* 的表現在 *se5* 基因中減少的影響, 會隨著生物時鐘而規律變動, 但表現不會受到光週期增長或縮短而影響 (Hayama *et al.*, 2002)。利用 *OsGI* RNAi 的植株, 在短日的情況會造成延遲抽穗與 *Hdl* mRNA 表現量減低的現象, 推測 *OsGI* 在水稻抽穗期途徑中, 位在 *Hdl* 與 *Ehd1* 的上游, 並扮演訊息傳導的角色 (Hayama *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007)

## OsId1

於 1946 年即已知玉米之 *Indeterminate 1 (Id1)* 與植物的開花有關, Park 等人 (2008) 於水稻中找到一個與 *Id1* 同源的 *OsId1*, 以 RNAi 突變的方式證實其功能與其在開花中扮演的角色, 發現缺少 *OsId1* 的植株, 不管在長日或是短日的環境中, 皆會延遲開花, 而在調控途徑的研究中, *OsId1* 傳導至 *Ehd1*, 但不會受到調控 *Ehd1* 的上游基因 *OsGI* 與 *OsMADS51* 所影響, 推測 *OsId1* 經由獨立的途徑傳導訊息至 *Ehd1*。另外, Matsubara 等人 (2008b) 利用一個稈稻品種 Tohoku IL9, 經過  $\gamma$ -ray 誘變產生的 M<sub>2</sub> 突變品系為材料, 找到一個 *Ehd1* 的上游基因, 命名為 *Ehd2*, 其試驗結果與 *OsId1* 相同, 證實 *Ehd2* 與 *OsId1* 為同一基因。

## OsMADS51

Kim 等人 (2007) 利用 T-DNA 突變株, 找到一個跟抽穗期基因相關的第一型 MADS-box 基因 *OsMADS51*, 在 *OsMADS51* 基因剔除 (knock-out) 的突變株中, 發現短日下會延遲兩週抽穗, *Ehd1* 與 *Hd3a* 表現量會下降, *OsGI* 與 *Hdl* 表現量則

沒有影響。過量表現 *OsMADS51* 的突變株會提早七天抽穗，*Ehd1* 與 *Hd3a* 表現量會增加，*OsGI* 與 *Hdl* 表現量則沒有影響。推測 *OsMADS51* 喪失功能，會造成延遲開花的現象，而 *OsMADS51* 過量表現，則會使水稻提早開花。另外，利用 *OsGI* 反義 (antisense) 植株偵測 *OsMADS51* 表現量，發現 *OsMADS51* 會受到 *OsGI* 的調控；在 *Ehd1* RNAi 的植株中，*OsMADS51* 並不會受到影響，證實在抽穗期途徑中，*OsMADS51* 扮演著 *OsGI* 與 *Ehd1* 之間訊息傳導的角色。

### 水稻抽穗期途徑

綜合上述水稻抽穗期基因的研究，推論水稻的抽穗期途徑，主要是由兩個途徑組成，一為較保守的 *Hdl*，另一為水稻特有的 *Ehd1*，最後皆誘導開花素基因 *Hd3a* 的產生，這三個主要的抽穗期基因，影響效應較大。而 *OsMADS51*、*OsId1* 與 *SE5*，為訊息傳導有關係的基因，而在這三者之上，為 *OsGI* 受到生理週期而影響抽穗期，扮演植物生理週期與光週期之間的關鍵角色；這四個基因分別利用突變株的方式找到，或是生物技術的方式證明功能，一般栽培品種中，可能無突變類型的對偶基因，推測此四個基因較為保守，即便是自發性的突變產生外表型變異，也很容易在選育過程中就被淘汰。另外，在長日的情況下，*Ghd7* 會抑制下游 *Ehd1* 的表現，使開花素基因 *Hd3a* 減少表現而延遲抽穗。

利用龐大的基因體資訊與功能性基因體的研究，水稻抽穗期分子途徑陸續地釐清當中 (參考附錄一)，從以上抽穗期相關基因的研究可以得知，自然界存在的變異中，由 *Hdl* 與 *Ehd1* 兩個主要控制抽穗期的基因所調控，對於不同地區的適應性有較大的影響 (Izawa, 2007; 2008)；*Hd3a* 與 *Hd6* 雖然也具有變異，但效應較小；*Ghd7* 具有 5 種對偶基因，但在功能上，大致上可分為三種，具有完全功能、部分功能且微弱、完全無功能。

在台灣，水稻育種是以一、二期作連續選拔的育種方式育成，水稻品種之選育跨越一、二期作，因此對光期較為敏感之基因型皆被淘汰，僅留下對光期較不敏感之基因型。針對以上幾個在自然界具有變異的 *Hdl*、*Hd3a*、*Hd6*、*Ehd1* 與 *Ghd7*，以及誘變之 *SE5*，對不同品種間在此六個抽穗期基因異同之確認，於抽穗期有差異的品種，可當做育種上良好的種原。

### 三、分子標幟輔助選種 (Marker-Assisted Selection, MAS)

在傳統外表型選拔育種程序中，利用的是族群中外表型的差異，來挑選具有成為優良品種潛力的個體，但遭遇到需要大量分離後代、性狀遺傳率太低、性狀難以評定良莠、與顯性性狀個體需要再多做一個世代之後裔檢定因素等，會限制選拔性狀與影響育種的成效。相反地，分子標幟輔助選種是以分子標幟基因型作為選拔的依據，具有以下的特點：(1) 可利用分子標幟來選擇親本，增加選拔群體的遺傳歧異度；(2) 可在幼苗時期準確選拔具目標性狀的基因，減少材料的損失、種植較少的個體；(3) 可分辨基因型，不需要做後裔測驗；(4) 可在單一植株上對單一或數個性狀做選拔的動作，發展近似同源系或堆砌多個目標基因的個體等。上述優點可以解決傳統育種所可能遭遇到的問題，並且能在早世代進行，減少土地、人力的耗費，可以大幅度地提高育種程序的效率與準確性 (Collard *et al.*, 2008)。

使用分子輔助選種有四個預備步驟，分別為 (1) 分離族群的建立：首要為親本的選擇與雜交，發展成  $F_2$ 、 $F_3$ 、 $BC_1F_1$ 、進階回交族群、重組自交系或是雙單倍體 (double haploid, DH) 等分離族群；(2) 偵測質或數量性狀基因座：以遺傳連鎖圖中的分子標幟基因型資料結合外表型資料，利用連鎖分析和數量性狀基因座分析，偵測出各個性狀的基因座或 QTLs；(3) 基因座的確認：確認基因座的位置與影響效應，或是在不同遺傳背景之下做測試，更可以直接選殖基因確定其變異；(4) 分子標幟的確認：利用與性狀或基因座緊密結合的分子標幟，測試重要的育種材料，確認數量性狀基因座是否具有多型性，而分子標幟的類型可以是 SSR (simple sequence repeat)、indel (insertion/deletion)、或是功能性分子標幟 (Collard and Mackill, 2008)。

在過去，水稻分子標幟的類型有很大的變化，尤其是水稻基因體定序完成之後，能夠開發數量龐大且足夠做精細定位的分子標幟，以下敘述水稻 DNA 分子標幟的發展於分子標幟輔助之選拔。

#### 1. 水稻 DNA 分子標幟發展

DNA 分子標幟的研究與發展，於遺傳學與基因體學等是一強大的工具，廣泛的應用於構築分子遺傳連鎖圖、數量性狀基因座分析、基因定位與選殖，乃至於基因體的研究。在近 20 年之間有很大的進展，在 1988 年 McCouch 等人首先以

135 個 RFLP 分子標幟，以及 50 株秈稻 IR36 的初期三染體和粳稻 Ma Hae 的雜交 F<sub>2</sub> 族群，構築全長 1389 cM (centi Morgan) 的連鎖輿圖；隨後在 1994 年，美國康乃爾大學 Causse 等人，以 726 個 RFLP 分子標幟與 113 個 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (*O. sativa* / *O. longistaminata* // *O. sativa*)，構築全長 1491cM 的水稻遺傳連鎖輿圖；同時，日本水稻基因體研究計畫 (Rice Genome Program, RGP) 的 Kurata 等人利用粳稻 Nipponbare 與秈稻 Kasalath，進行水稻亞種間雜交產生 186 株 F<sub>2</sub> 分離族群，以 883 個表現序列標幟 (expressed sequence tags, ESTs)、265 個 STSs (sequence tagged sites)、147 個隨機擴增多型性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 與 88 個其他種類的 DNA 分子標幟共 1383 個，建立全長 1575 cM 的水稻遺傳連鎖輿圖；爾後在 1998 年，Harushima 等人增加 934 個主要為 ESTs 的分子標幟，以 2275 個分子標幟構築全長 1521.6 cM 的高密度水稻遺傳連鎖輿圖，平均每 190 kb 即有一個 RFLP 分子標幟。

隨著對水稻基因體序列的研究，累積大量的資訊，開發了以 PCR 技術為基礎的分子標幟，如微衛星 (Microsatellites 又稱為 SSRs) 和 STSs。特別是 SSRs，廣泛地使用在水稻遺傳育種研究中，SSRs 的數量已達到 2240 個 (McCouch *et al.* 2002)，甚至在 2005 年 IRGSP (The International Rice Genome Sequencing Project) 以生物資訊方式探勘出 18828 個 SSRs 分子標幟。此外，利用秈稻 93-11 與粳稻 Nipponbare 以序列比對的方式，找到亞種之間平均 268 個鹼基有一個單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP)，953 個鹼基有一個 indel (Feltus *et al.* 2004; Shen *et al.* 2004)。

RFLPs 為水稻分子標幟發展初期大量使用的一種，採用具專一性之限制酵素進行反應，擁有共顯性、再現性與穩定性高等優點，但缺點為需要建立該物種相關之核酸分子庫、需要大量且品質高的 DNA，操作時需用到放射線或螢光等物質標定探針，實驗步驟繁瑣耗費時間長，且材料花費高，故目前已較少應用在水稻研究。

SSRs 已取代 RFLPs 在水稻遺傳育種研究中的地位，主要原因不外乎對於水稻基因體的解序 (IRGSP, 2005)，且 SSRs 以 PCR 技術為基礎，引子依據基因組中簡單重複序列變動之區域設計，專一性高，產物穩定，為共顯性的分子標幟。簡單重複序列容易發生變異，偵測亞種間或不同栽培品種間的變異，比其他種類的分子標幟容易找到多型性，加上在基因體中大量的分布，使得 SSRs 廣泛地使用在

遺傳連鎖圖的建立、基因型分析與分子標幟輔助選種等應用。

在 indel 與 SNP 的研究中，經過分析粳稻 Nipponbare 與秈稻 93-11 之間的基因組序列，找到平均 268 個鹼基有一個 SNP，953 個鹼基有一個 indel，數量比 SSR 分子標幟還來的多很多，為水稻基因體內最多的分子標幟，可以滿足基因選殖 (Gene cloning) 的需求。這兩類分子標幟也是以 PCR 技術為基礎，indel 形式的分子標幟為專一性高、穩定性高、再現性高等特色的共顯性分子標幟；而 SNP 形式的分子標幟雖然數量很多，但所需要的技術高，且要轉變成其他種類的分子標幟才可利用，例如 CAPs、dCAPs (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)、或 TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) 等等 (Konieczny and Ausubel, 1993; Neff *et al.*, 2002; McCallum *et al.*, 2000; Feltus *et al.* 2004; Shen *et al.* 2004)。

## 2. 功能性分子標幟

雖然 SSR 系統的分標幟廣泛的應用在分子輔助選種，但對於分子輔助育種者，外表功能型態上的變異還是有比較大的興趣。發展一特定已被註解證實基因的功能性分子標幟，須先了解基因中不同對偶基因在外表功能型態上的差異，且對偶基因之間序列的差異，利用設計引子的方式，發展功能性分子標幟，有可能是 SSR、STS、indel、SNP 形式的分子標幟。而功能性分子標幟允許在未利用分離族群建立遺傳圖譜的條件下直接使用，對族群直接篩選；在分離族群中使用時，不會有損失互換重組個體的風險；在自然族群或是育種族群中，較好解釋遺傳變異 (Xu *et al.*, 2005)。

## 3. 選拔策略

分子標幟輔助選種 (Marker-Assisted Selection, MAS) 選拔策略主要是利用分子標幟之基因型當做篩選的依據，分為篩選基因的前景篩選 (foreground selection) 與回復特定背景基因體的背景篩選 (background selection)。前景篩選主要是導入一個或是堆疊數個標的基因，主要以標的基因之功能性分子標幟直接篩選子代，或是緊密連鎖標的基因上下各一個分子標幟，當做篩選的依據，以確保篩選時，降低互換發生在分子標幟與基因座間的機率 (Collard 和 Mackill, 2008)；背景篩選則使用建立遺傳連鎖圖與數量性狀基因座分析時的多型性分子標幟，當做判

斷該區段基因體組為哪一個親本的同質結合體，抑或是帶著異質結合體；以分子輔助選種搭配回交育種（marker-assisted recurrent selection, MARS）的方式為例，挑選較多輪迴親背景的子代，可快速達到輪迴育種的目標，縮短育種年限。

另外，在目標基因座的鄰近兩端，可以建立重組篩選（recombinant selection），以減少連鎖拖曳（linkage drag），防患周圍鄰近的劣勢基因一起導入，造成其他不良的性狀。

#### 四、水稻分子標幟輔助選種

目前分子標幟輔助選種已應用在水稻育種研究中，廣泛地使用在抗病、抗蟲、耐淹水、耐旱、耐鹽、抗重金屬、香氣、半矮性、株高、穀粒重、抽穗期…等等（Takeuchi *et al.*, 2006; Jena and Mackill, 2008; Collard *et al.*, 2008）。以下分別介紹耐淹浸和抽穗期之分子輔助選種，推廣於田間栽種。

##### 1. 水稻耐淹浸

Neeraja 等人（2007）利用分子標誌輔助選拔技術導入印度現行廣泛栽培的水稻品種 Swarna，以具耐淹基因 *Sub1* 的水稻品種 IR49830-7-1-2-2 與 Swarna 進行雜交，以 Swarna 為輪迴親，使用兩個 SSRs 於前景篩選、兩個 SSRs 於重組篩選和 93 個 SSRs 於背景篩選，成功地在 420 株 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 與 432 株 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 各找到帶有 *Sub1* 耐淹基因，而背景篩選部分，已達到輪迴親的 87.2% 與 94.2%，且品質與產量皆與輪迴親相似，成功的導入 *Sub1* 耐淹基因。

##### 2. 水稻抽穗期

Takeuchi 等人（2006）於越光與 Kasalath 的雜交組合中，根據前人研究已知 Kasalath 的 *Hd1* 基因喪失功能（Yano *et al.* 2000），*Hd4*、*Hd5* 與 *Hd6* 基因在長日下具有延遲抽穗的功能（Lin *et al.* 2003），利用分子輔助選種的方式，以越光為輪迴親當作背景篩選的依據，發展出四個近似同源系，分別為 Kanto IL1 帶有 Kasalath 的 *Hd1* 染色體片段、Wakei 367 帶有 Kasalath 的 *Hd6* 染色體片段、Wakei 370 帶有 Kasalath 的 *Hd4* 染色體片段與 Wakei 371 帶有 Kasalath 的 *Hd5* 染色體片段。

在日本本土的自然生長季中，日長的變化大致在較長日的情況，而在喪失 *Hd1* 功能的 Kanto IL1 中，相較於越光早抽穗，是因為越光帶有會在長日情況延遲抽穗



的 *Hd1* 基因；而 Wakei 367 與 Wakei 371 分別帶有在長日會延遲抽穗的 *Hd6* 與 *Hd5*，比越光晚 10 天與 11 天抽穗；另外，帶有 *Hd4* 基因片段的 Wakei 370，相對於越光在抽穗期方面並沒有顯著的差異，但由平均值來看，還是多增加了 2.5 天，而分析其他數個農藝性狀與生理特性，發現四個近似同源系幾乎和越光沒有差別，而這些近似同源系即為很好的育種材料，應用在適應不同地區的種植環境，例如調整抽穗日期、避免勞力集中在收穫時期、躲避充實期遇到高溫的機會 (Takeuchi *et al.*, 2006)。

利用分子輔助選種的方式，可以準確的保留特定基因或是染色體片段，例如發展帶有特定基因的近似同源系，不僅可以確認特定基因的功能與農藝性狀的表現，並且利用其堆疊不同基因，以上實例，即可調整水稻品種在抽穗日數上面的表現，一方面調整成適合某地的栽培環境與制度，更可以利用此方法避免一些環境上的逆境，例如閃避雨季或是乾旱。



## 參、材料與方法

### 一、試驗族群

本試驗使用的親本是兩個粳稻品種越光 (*Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Koshihikari) 與台農 67 號 (*Oryza sativa* spp. *japonica* cv. Tainung 67, TNG 67)。越光為日本優良水稻品種之一，由農林 22 號與農林 1 號雜交選育而來，於 1957 年在日本登記命名，並於 1977 年引進臺灣，品種生育特性為早熟品種、矮生、分蘗數少、對氮肥效應敏感、品質極佳、種子具休眠性、可減少穗上發芽損失和脫粒性稍難 (台灣省政府糧食處，1997)，在 2007 年成為台灣良質米試作品種 (台灣稻作資訊系統，TRIS)。台農 67 號為臺中 187 號與台農 61 號的雜交後代，再回交台農 61 號選育而來，由臺灣省農業試驗所於 1978 年登記推廣，生育特性為中晚熟品種、具有強稈、不易倒伏、適合機械收穫、具有穩定高產潛力、適應性廣與對病蟲害之忍耐性強等特性 (黃，1979)。

本試驗之材料種植於農業試驗所嘉義分所溪口農場，由陳榮坤助理研究員進行試驗的雜交、溫室栽培與管理、以及抽穗期調查，兩親本越光與台農 67 號雜交產生的  $F_1$ ，經過與越光三次的回交，分別產生  $BC_1F_1$ 、 $BC_2F_1$ 、 $BC_3F_1$ ，每一個回交世代先經過三個功能性分子標幟為前景篩選與數目不等的多型性分子標幟為背景篩選，篩選 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1* 個體，挑選帶有較多越光基因體背景個體進行下一世代的回交，育種流程如圖一所示。

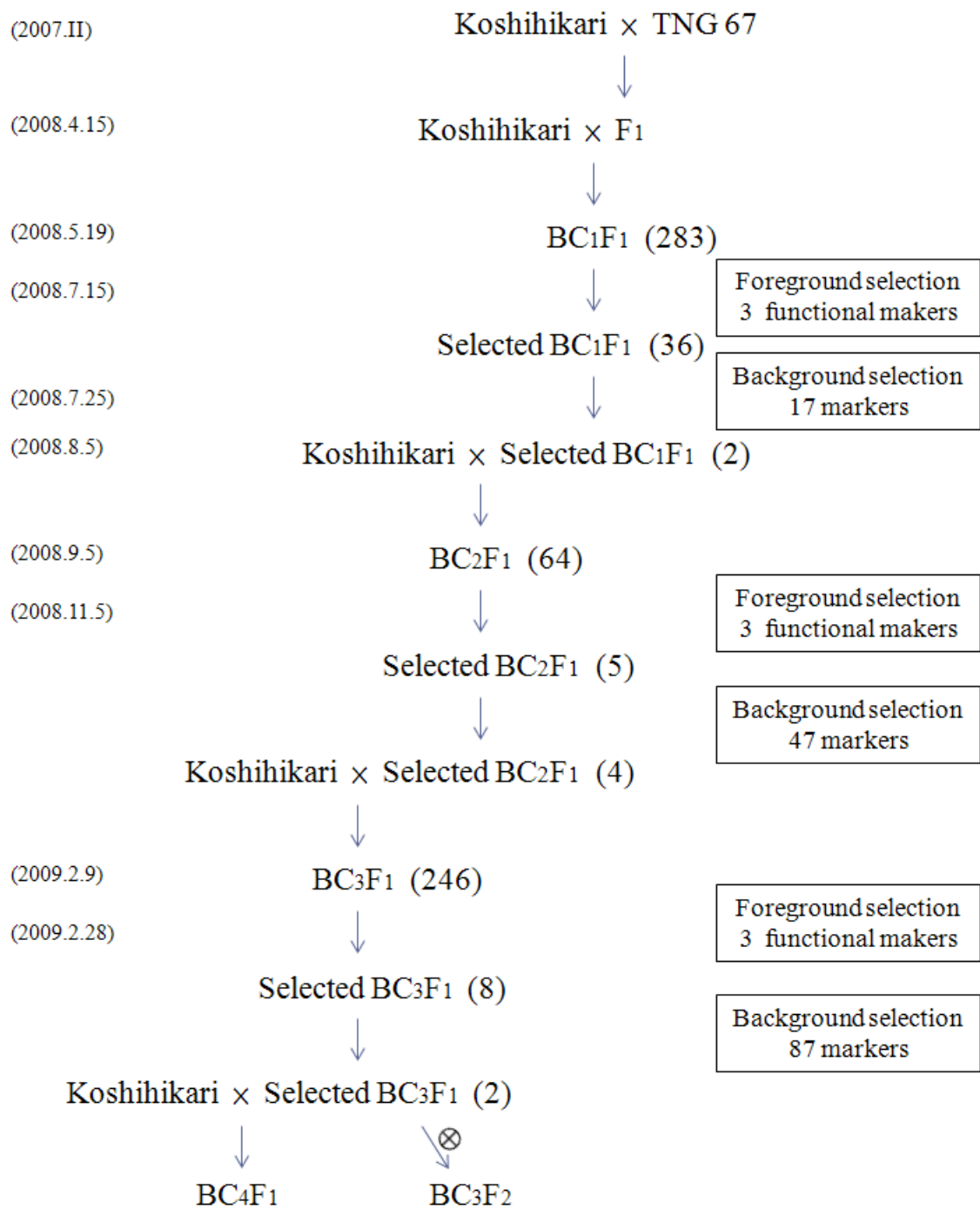
以越光為母本，台農 67 號為父本於 2007 年二期作進行種植與雜交， $F_1$  子代在 2008 年 4 月 15 日與越光進行第一次的回交，產生  $BC_1F_1$  種子；283 株  $BC_1F_1$  在 2008 年 5 月 19 日移植，並在 7 月 15 日進行 *Hd1*、*Hd6*、*Ehd1* 三個功能性分子標幟的篩選，挑選出  $BC_1F_1$ ，共有 37 株，並在 7 月 25 日進行 17 個多型性分子標幟的背景篩選，挑選 #286、#322 與 #330 共三株，而結合植株生長勢等因素，刪去不稔的 #322，#286 與 #330 於 2008 年 8 月 5 日進行第二次與越光的回交，得到  $BC_2F_1$  種子；64 株  $BC_2F_1$  在 2008 年 9 月 5 日種植於溫室，並在 11 月 5 日進行三個功能性分子標幟的篩選，剩下編號 #286-14、#286-23、#286-85、#330-36 與 #330-52 共五株  $BC_2F_1$ ，再進一步的使用另外 47 個多型性分子標幟進行分析，留下 #286-14、#286-23、#286-85 與 #330-36 共四株  $BC_2F_1$ ，於 2008 年 11 月下旬進行第三次與越光的回交，得到  $BC_3F_1$  種子；246 株  $BC_3F_1$  在 2009 年 2 月 9 日

種植於溫室，並在 2 月 28 日進行三個功能性分子標幟的篩選，留下八株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>，再進一步使用涵蓋全基因組的 87 個多型性分子標幟進行分析，最後挑選 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1* 的個體和帶有較多越光背景的 2 個子代，編號為 #286-14-A23 與 #286-85-A27，分別於 2009 年 4 月 29 日與 4 月 26 日開始抽穗並產生自交與回交後代。

## 二、抽穗期之調查

目前在台灣，抽穗期的調查常以超過 50%有效分蘗抽穗之日當作抽穗期，然而在過去抽穗期研究中，以第一個穗抽出之日數，定義為 DTH(days to heading)，用於定義營養生長期與生殖生長期的分野，以及用於不同光週期處理，再把營養生長期區分為基本營養生長期與感光期，其中皆以 DTH 當作抽穗期計算之依據 (Chang *et al.*, 1969)。是以，而本試驗中抽穗期的紀錄亦以 DTH 為計算標準。





圖一、本試驗回交育種流程圖。各世代旁的括號內為植株數，左邊括號內為各世代種植、雜交與分子標幟輔助選種之日期。

### 三、水稻葉片 DNA 萃取

DNA 萃取方法採用 Li 等人在 1995 年所發表的方法加以修改。待水稻生長至 3~6 葉齡時，剪取約 3 公分葉片放入裝有 900  $\mu$ l 的 DNA 萃取液（100 mM Tris-HCl, pH8.0；50 mM EDTA, pH8.0；500 mM NaCl；1.25% SDS）的 1.5 ml 離心管中，放入一顆鋼珠，蓋上蓋子後以 TissueLyser<sup>TM</sup>（Qiagen, German），設定每秒 30 次震盪 40 秒，快速打碎葉片後，於 65°C 水浴 30 分鐘，並每 15 分鐘搖晃萃取液；加入 270  $\mu$ l 的乙酸鉀（potassium acetate, KOAc），輕微混合後放置冰上 20 分鐘，後於 4°C 以轉速 15000 rpm 離心 15 分鐘；取出上清液至乾淨的 1.5 ml 離心管中；加入 700  $\mu$ l 的異丙醇，上下倒轉以充分混勻，以 15000 rpm 離心 15 分鐘沉降 DNA；移去異丙醇，並以 500  $\mu$ l 的 70% 冰酒精洗鹽；以 15000 rpm 離心 10 分鐘，移去 70% 酒精；風乾至完全去除酒精後，以 100  $\mu$ l 的 TE 緩衝溶液（10 mM Tris；1 mM EDTA, pH8.0）回溶，並放置 4°C 冰箱中備用。



### 四、抽穗期基因定序

#### 1. 設計引子對

利用定序的方式檢視越光與台農 67 號已選殖與功能探討的 *Hd3a*、*Hd6*、*Ehd1*、*Ghd7* 與 *SE5* 等抽穗期基因中，有無 DNA 序列變異存在，並確認此變異是否造成基因功能的變異。利用 NCBI 網站（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）上所登錄的基因庫（Gene Bank）搜尋基因序列，其登錄編號如下，*Hd3a*：AB052942（Nipponbare）；*Hd6*：AB036785（Nipponbare）；*Ehd1*：AB092506（Nipponbare）；*Ghd7*：EU286801（明恢 63 號）與 *SE5*：AB092506（Nipponbare）。並由發表的文獻結果中，尋找對偶基因變異的位置，在 Primer 3 網站（<http://frodo.wi.mit.edu/>）設計能擴增包含變異位置的引子對，引子長度為 18~22 個單一鹼基，PCR 擴增片段長度大約 400-800 bp。

#### 1. PCR 反應

使用具有校正（proof-reading）功能的 KOD-Plus（Toyobo Co., LTD. Osaka, Japan）擴增用於 DNA 定序之 PCR 反應，反應溶液總體積為 50  $\mu$ l，包含約 50 ng

的 DNA、200  $\mu$ M 的 dNTP、0.3  $\mu$ M 的引子、2 mM 的  $MgSO_4$ 、1 unit KOD-Plus 及一倍 KOD-Plus 緩衝溶液，使用核酸增殖儀 (Biometra, German) 進行反應，PCR 程式設定 94°C 為 5 分鐘，一個循環；94°C 為 15 秒，55°C 為 30 秒（依引子煉合溫度的不同而做調整），68°C 為 1 分鐘，一共 35 循環；68°C 為 5 分鐘，一個循環，最後結束在 20°C 備用。

## 2. PCR 產物定序

擴增之 DNA 產物以 Faster Easier Better Electrophoresis (FEBE, Biokeystone Co., USA) 高速電泳系統下進行分析，配製溶於 1 $\times$  TAE (40 mM Tris-acetate; 20 mM acetic acid; 2 mM EDTA) 緩衝溶液之 1% 的 SFR (Super Fine Resolution, Amresco<sup>®</sup>, USA) 膠片，並加入 2  $\mu$ l 的 Seeing Safe Nucleic Acid 染劑 (昕穎生物科技, 台灣)，待膠體凝固備用。

取出 1  $\mu$ l 的 PCR 產物於石蠟膜上，加入 1  $\mu$ l 的 6 $\times$  loading dye (0.25% bromopenol blue; 0.25% xylene cyanol FF; 30% glycerol) 與 4  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O，以 220 伏特進行電泳分析，確認是否為單一條帶，如不為單一條帶但目標大小有條帶產生，則利用切膠方式取下，並委託昕穎生物科技公司 (台灣) 進行定序實驗。

## 3. 定序資料分析

待定序完成後，以軟體 BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) 進行序列分析，將所得之定序資料前後各約 20 個鹼基左右較不精確知序列去除，個別儲存越光與台農 67 號之序列，利用序列比對 (alignment) 兩品種在 *Hd3a*、*Hd6*、*Ehd1*、*Ghd7*、*SE5* 基因序列之異同，並與已發表之對偶基因做比對，確認越光與台農 67 號在這五個基因中的序列差異。

## 五、功能性分子標幟設計

根據上述六個抽穗期基因定序與序列比對的結果，*Hd3a*、*Ghd7* 與 *SE5* 三個基因序列在越光與台農 67 號之間是沒有差異的，而 *Hd1*、*Hd6* 與 *Ehd1* 是具有序列差異的。依文獻記載，發現越光帶有正常功能的 *Hd1* 與 *Ehd1*，對光週期敏感，而喪失功能的 *Hd6*，造成提早抽穗；台農 67 號帶有喪失功能的 *Hd1* 與 *Ehd1*，正常

功能的 *Hd6*，所以對光週期不敏感，可延遲抽穗。因此，依 *Hd1*、*Ehd1* 和 *Hd6* 於越光與台農 67 號之序列變異，設計三個功能性分子標幟，用於前景篩選，將台農 67 號三個對偶基因 (*hd1*、*Hd6*、*ehd1*) 導入越光，以調整越光之抽穗期，適合台灣一、二期作栽培。

## 1. *Heading date 1 (Hd1)*

### 1.1 找尋變異並設計引子

利用 Yano 等人 (2000) 與 Doi 等人 (2004) 在 *Hd1* 基因的研究，發現台中 65 號在第二個外顯子中有一個 1901 bp 的插入，且會造成 *Hd1* 基因的轉錄異常，並喪失功能。推測越光與 Nipponbare 應為相同的對偶基因，而台農 67 號與台中 65 號應為相同的對偶基因 (參考附圖二)。依此 1901 bp 之差異設計 indel 形式的引子對，確認越光與台農 67 號之 *Hd1* 基因的序列長度，利用 NCBI 搜尋 *Hd1* 基因序列 (Acc. AB041837)，比對基因內會發生變異的位置，使用 Primer 3 網站設計引子，在 1901 bp 變異區之兩翼側設計引子，其序列為 Hd1ex2\_F : 5'-ATTCgCATATTTCAGtgACC-3', Hd1ex2\_R : 5'-CTCATgAgTCCCATCAGAAC-3'，預估 PCR 擴增長度於越光為 413 bp，於台農 67 號為 2314 bp。

### 1.2 PCR 反應

以 *Taq* DNA Polymerase Master Mix<sup>RED</sup> (Ampliqon, Denmark) 進行 *Hd1* 功能性分子標幟之 PCR 反應溶液，反應總體積是 10  $\mu$ l，反應溶液包含約 20 ng 的 DNA、0.2  $\mu$ M 的引子、5  $\mu$ l 的 Master Mix<sup>RED</sup> (75 mM Tris-HCl pH, 8.5；20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；1.5 mM MgCl<sub>2</sub>；0.2% Tween 20<sup>®</sup>；200  $\mu$ M dNTPs；0.025 unit Ampliqon *Taq* DNA Polymerase)，使用能分析 384 個盤式樣品的核酸增殖儀 9700 (Auto-Lid Dual 384-Well GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700, Applied Biosystems, USA) 進行反應；PCR 程式設定 94°C 為 5 分鐘，一個循環；94°C 為 1 分鐘，55°C 為 1 分鐘，72°C 為 3 分鐘，一共 35 循環；72°C 為 5 分鐘，一個循環，最後結束在 20°C 備用。

### 1.3 *Hd1* 基因型分析

擴增之 PCR 產物以 FEBE 高速電泳系統下進行分析，配製溶於 1× TAE 緩衝溶液之 1% 的 SFR 膠體，並加入 2 μl 的 Seeing Safe Nucleic Acid 染劑，待膠體凝固備用。取出適量的 PCR 產物，以 220 伏特進行電泳，電泳時間為 15 分鐘。於子代之 *Hdl* 基因型分析，若只有 413 bp 之 DNA 條帶，則為越光的 *Hdl* 對偶基因 (*Hdl/Hdl*)；若只有 2314 bp 之 DNA 條帶，則為台農 67 號的 *Hdl* 對偶基因 (*hdl/hdl*)；若同時有 413 bp 與 2314 bp 之 DNA 條帶，則代表該子代為異質結合體 (*Hdl/hdl*)，利用 EXCEL 與圖片方式記錄每個子代之 *Hdl* 基因型。

## 2. *Heading date 6 (Hd6)*

### 2.1 找尋變異並設計引子

利用 Takahashi 等人(2001)在 *Hd6* 基因的研究，發現 Nipponbare 在 CK2α domain 中有一個鹼基的突變，由 T 變成 A，造成 *Hd6* 基因提早出現 TAG 終止碼(Stop codon)，使基因轉錄提早結束，基因功能喪失；而另一個品種 Kasalath 的 *Hd6* 基因則是正常，假設越光與 Nipponbare 為相同的對偶基因 (T)；台農 67 號與 Kathalath 為相同的對偶基因 (A) (參考附錄三)，至 NCBI 搜尋 *Hd6* 基因序列 (Acc. AB036785)，比對 Takahashi 等人 (2001) 發現的 SNP (A→T)，把基因序列輸入網站 RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org/>) 中，查出此單一核苷酸多型性涵蓋 *HindIII* 限制酶的辨認切點 (A<sup>^</sup>AGCTT)，因此，利用此 SNP 的差異，轉換成 CAPs 形式的功能性分子標幟。以 Primer 3 網站設計引子，在此 SNP (A→T) 兩翼側設計引子，其序列為 Hd6\_F：5'-AACTTgCAAgCAGTgAgAAT-3'，Hd6\_R：5'-TggTgCATCTTTAACAgTgA-3'，越光與台農 67 號經過 PCR 擴增長度預估為 617 bp，經過 *HindIII* 限制酶處理過後，越光沒有 *HindIII* 切點應該還是 617 bp，而具有切點的台農 67 號應該會變成 335 bp 與 282 bp。

### 2.2 PCR 反應

製做 *Hd6* 功能性分子標幟之 PCR 反應溶液為 *Taq* DNA Polymerase Master Mix<sup>RED</sup>，反應總體積是 10 μl，反應如 *Hdl* 功能性分子標幟，詳述於 1.2。其 PCR 成是設定 94°C 為 5 分鐘，一個循環；94°C 為 1 分鐘，55°C 為 1 分鐘，72°C



為 1 分鐘，一共 35 循環；72°C 為 5 分鐘，一個循環，最後結束在 20°C 備用。

### 2.3 限制酵素反應

反應總體積為 15  $\mu$ l，包含 10  $\mu$ l 的 PCR 產物、10 unit 的 *Hind*III (New England BioLab Inc., USA)、一倍 NEB Buffer 2，37°C 水浴 2 小時，移至 4°C 冰箱備用。

### 2.4 *Hd6* 基因型分析

擴增之 PCR 產物以 FEBE 高速電泳系統下進行分析，配製溶於 1 $\times$  TAE 緩衝溶液之 1% 的 SFR 膠體，並加入 2  $\mu$ l 的 Seeing Safe Nucleic Acid 染劑，待膠體凝固備用。取出適量的 PCR 產物，以 220 伏特進行電泳，電泳時間為 15 分鐘。於子代之 *Hd6* 基因型分析，若只有 617 bp 之 DNA 條帶，則為越光的 *Hd6* 對偶基因 (*hd6/hd6*)；若只有 335 bp 與 282 bp 之 DNA 條帶，則為台農 67 號的 *Hd6* 對偶基因 (*Hd6/Hd6*)；若同時有 617 bp、335 bp 與 282 bp 之 DNA 條帶，則代表該子代為異質結合體 (*Hd6/hd6*)，利用 EXCEL 與圖片方式記錄每個子代之 *Hd6* 基因型。

## 3. *Early heading date 1 (Ehd1)*

### 3.1 找尋變異並設計引子

利用 Doi 等人(2004)於 *Ehd1* 基因的研究，發現台中 65 號在 GARP domain 中有一個鹼基的突變，由 G 變成 A，造成 *Ehd1* 基因提早出現 TAG 終止碼(Stop codon)，使基因轉錄提早結束，喪失基因功能；而另一個品種 Nipponbare 的 *Ehd1* 基因則是正常。假設越光與 Nipponbare 為相同的對偶基因 (G)，且台農 67 號與台中 65 號為相同的對偶基因 (A) (參考附錄四)，利用此 SNP 的差異設計功能性分子標幟，至 NCBI 搜尋 *Ehd1* 基因序列 (Acc. AB092506)，將此 SNP (G $\rightarrow$ A) 附近序列輸入網站 RestrictionMapper 中，沒有任何限制酶辨識切點涵蓋此 SNP，是以，轉換成 dCAPs 形式的功能性分子標幟。

以此 SNP 為中心，前後各包括約 25 個序列，以不超過 60 個鹼基為原則，輸入網站 dCAPs Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)，缺失數目參數設定為 1，挑選基因序列與 *Bsu36I* 限制酶辨識切點 (CC<sup>^</sup>TNAGG) 而

修改的 5'端引子為 Ehd1\_F: 5'-TTTAATTTgATCACTCACTgTCTTCCC<sup>^</sup>-3', 帶有底線之核酸為使台農 67 號能讓 *Bsu36I* 限制酶所辨識的人工修改, 而"<sup>^</sup>"符號為 *Bsu36I* 限制酶辨識切點之位置。3'端引子以 Primer 3 網站設計, 引子序列為 Ehd1\_R: 5'-AgATgACATggTCAACTACAATgg-3')。越光與台農 67 號經過 PCR 擴增長度預估為 143 bp, 經過 *Bsu36I* 限制酶處理過後, 越光沒有 *Bsu36I* 切點, DNA 條帶為 143 bp, 而具有切點在台農 67 號預估 DNA 條帶為 114 bp 與 28 bp。

### 3.2 PCR 反應

製做 *Ehd1* 功能性分子標幟之 PCR 反應溶液為 *Taq* DNA Polymerase Master Mix<sup>RED</sup>, 反應總體積是 10  $\mu$ l, 反應如 *Hdl* 功能性分子標幟, 詳述於 1.2。PCR 程式設定 94°C 為 5 分鐘, 一個循環; 94°C 為 1 分鐘, 58°C 為 1 分鐘, 72°C 為 1 分鐘, 一共 35 循環; 72°C 為 5 分鐘, 一個循環, 最後結束在 20°C 備用。

### 3.3 限制酵素反應

反應總體積為 15  $\mu$ l, 包含 10  $\mu$ l 的 PCR 產物、10 unit 的 *Bsu36I* (New England BioLab Inc., USA)、一倍 BSA、一倍 NEB Buffer 3, 37°C 水浴 2 小時, 移至 4°C 冰箱備用。

### 3.4 *Ehd1* 基因型分析

擴增之 PCR 產物以 FEBE 高速電泳系統下進行分析, 配製溶於 1 $\times$  TAE 緩衝溶液之 2.5% 的 SFR 膠體, 並加入 2  $\mu$ l 的 Seeing Safe Nucleic Acid 染劑, 待膠體凝固備用。取出適量的 PCR 產物, 以 220 伏特進行電泳, 電泳時間為 15 分鐘。於子代之 *Ehd1* 基因型分析, 若只有 142 bp 之 DNA 條帶, 則為越光的 *Ehd1* 對偶基因 (*Ehd1/Ehd1*); 若只有 114 bp 之 DNA 條帶 (28 bp 無法看到), 則為台農 67 號的 *Ehd1* 對偶基因 (*ehd1/ehd1*); 若同時有 143 bp 與 114 bp 之 DNA 條帶, 則代表該子代為異質結合體 (*Ehd1/ehd1*), 利用 EXCEL 與圖片方式記錄每個子代之 *Ehd1* 基因型。

## 六、多型性分子標幟篩選與設計

為了加速篩選帶有較多輪迴親背景的子代，使回交的效率增加，本研究將利用涵蓋水稻全基因體共 90 個分子標幟，包括三個功能性分子標幟與 87 個多型性分子標幟，平均距離為 17.3 cM，當作篩選標的基因與背景的依据。

首先，由本實驗室現有的 382 個於私種間具有多型性的 SSR 分子標幟 (McCouch *et al.*, 2002) 中，挑選間隔約 20 cM 的分子標幟於越光與台農 67 號中篩選，挑選具有多型性的分子標幟；第二，利用 Matsubara 等人 (2008b) 於越光與 Nipponbare 所使用的多型性分子標幟，測試在越光與台農 67 號之間是否具有多型性；最後，兩多型性分子標幟之間距離超過 30 cM 時，則利用密西根州立大學之 Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 所提供之 Nipponbare 與 93-11 比對的 indel 資訊，在所需位置搜尋 indel 分子標幟，並挑出 indel 大小超過 20 bp 的區域，下載 indel 兩翼側之序列，並於 Primer 3 網站設計引子對，再委託百力生物科技股份有限公司 (台北，台灣) 合成，之後測試在兩親本間有無多型性，直到補足所需的多型性分子標幟。

### 基因型分析

#### 1. PCR 反應

SSR 與 indel 分子標幟之 PCR 反應使用 *Taq* DNA Polymerase Master Mix<sup>RED</sup>，反應總體積是 10  $\mu$ l，反應如 *Hdl* 之基因型分析，詳述於 1.2。PCR 程式設定為 94°C 為 5 分鐘，一個循環；94°C 為 1 分鐘，55°C 為 1 分鐘 (依引子煉合溫度的不同而做調整)，72°C 為 1 分鐘，一共 35 循環；72°C 為 5 分鐘，一個循環，最後結束在 20°C 備用。

#### 2. 電泳

擴增之 PCR 產物以 FEBE 高速電泳系統下進行分析，配製溶於 1 $\times$  TAE 緩衝溶液之 2.5% 的 SFR 膠體，並加入 2  $\mu$ l 的 Seeing Safe Nucleic Acid 染劑，待膠體凝固備用。取出適量的 PCR 產物，以 220 伏特進行電泳，依據分子差距的大小決定電泳時間為 9~23 分鐘。

#### 3. 基因型判讀

比較各子代與親本擴增 DNA 片段的大小，記錄條帶大小同質結合體與越光相同者為 A，同質結合體與台農 67 號相同者為 B，帶有兩者片段大小的異質結合體為 H。將前景篩選與背景篩選之分子標幟的基因型記錄後，以 EXCEL 記錄、依照每個分子標幟在 RGP (Rice Genome Program) 的公布遺傳連鎖圖與 IRGSP 公布的第四版物理圖譜 (Pseudomolecules 4.0) 的位置順序排列。



## 肆、結果

本試驗共分為四大部分，第一、檢視越光和台農 67 號於六個已發表抽穗期基因之異同；第二、依上述實驗結果，於有差異的基因序列，設計功能性分子標幟，用於前景選拔；第三、開發涵蓋全基因體的多型性分子標幟，用於背景選拔；第四、把以上開發的功能性分子標幟和多型性分子標幟當作前景篩選與背景篩選的指標，選拔  $BC_1F_1$ 、 $BC_2F_1$  和  $BC_3F_1$  之子代，以利輪迴選種，導入台農 67 號之 *hd1*，*Hd6*，*ehd1* 至越光，並有效回復越光之基因體。

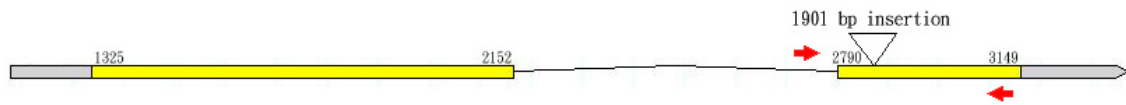
### 一、越光與台農 67 號於六個抽穗期基因之分析

#### *Hd1*

*Hd1* 位在第六條染色體，基因長度為 4814 bp，包含兩個外顯子（圖二 a），在調控抽穗期中有兩個功能，一為在短日照處理的情況下，會促進開花，使抽穗日期提早，二為在長日照的處理情況下，會延遲抽穗，使抽穗日數延後。因此，Nipponbare 具有正常 *Hd1*，抽穗期受到日長影響，為光週期敏感之品種 (Yano *et al.*, 2000)，而台中 65 號在 *Hd1* 的第二個外顯子有 1901 個鹼基的插入，使得 *Hd1* 轉錄發生錯誤，造成 *Hd1* 功能的喪失 (Doi *et al.*, 2004)。本試驗設計 PCR 的引子（位置為 2750 ~3162 bp）包含到第二個外顯子（位置為 2790~3149 bp），其 PCR 產物片段大小為 413 bp（圖二 a）。經過電泳分析，發現越光與 Nipponbare 相同，DNA 片段大小為 413 bp，為正常功能的 *Hd1*；而台農 67 號與台中 65 號相同，DNA 片段大小為 2314 bp（圖二 b），可以得知台農 67 號在 *Hd1* 中與台中 65 號相同，為無功能的 *hd1*。

由上述結果可推測，越光具有正常功能的 *Hd1*，為光敏感的品種，在台灣的栽培環境中會造成提早抽穗的現象；而台農 67 號為喪失功能的 *hd1*，若導入台農 67 號 *hd1* 基因於越光，可使越光為光不敏感，可在一、二期作栽種。

(a)



(b)



圖 二、三品種 *Hdl* 之對偶基因型分析。(a) *Hdl* 基因結構，箭頭為引子位置，倒三角型為 1901 bp 插入之位置 (b) PCR 擴增產物之電泳分析，於 1% 之 SFR 瓊脂膠片，以 220 伏特電泳 20 分鐘。M：100 bp DNA ladder，A：越光，B：台農 67 號，C：台中 65 號。

### *Hd3a*

*Hd3a* 位在第六條染色體短臂，基因長度為 4110 bp，共有四個外顯子(圖三 a)，此基因與阿拉伯芥開花基因 *FT* 為同源基因，在 *Hd1* 與 *Ehd1* 的下游，受到兩者調控。*Hd3a* 蛋白即為水稻的開花素，Nipponbare 與 Kasalath 在此基因座上皆為有功能的對偶基因，但根據 Kojima 等人 (2002) 的研究指出 Nipponbare 之 *Hd3a* 的功能效應比 Kaalath 之 *Hd3a* 來的弱，且在序列差異中，Kasalath 在第四個外顯子中發生三個 SNP，分別為第 3075 bp (A→C)、第 3100 bp (C→A) 與 3101 bp (C→A)，影響此基因轉譯的最後一個胺基酸，由 Proline (P, CCC) 變成 Asparagine (N, AAC) (圖三 b)。利用定序越光與台農 67 號在此 *Hd3a* 變異的序列 (2681~3268 bp)，其大小為 588 bp，並至 NCBI 下載 Nipponbare (Accession number: AB052942) 與 Kasalath (Accession number: AB052941) 的 *Hd3a* 序列做比對，經過序列比對，Kasalath 則為另一種對偶基因，根據文獻記載，短日環境下 Kasalath 比上述三個品種早抽穗 (Kojima *et al.*, 2002)；而越光、台農 67 號與 Nipponbare 在 *Hd3a* 為相同的對偶基因 (圖三 b)。是以，*Hd3a* 將不納入做為抽穗期之前景篩選。



(a)



(b)

<i>Hd3a</i> _Nipponbare	AGCGCGAGGCAGGCTCCGGCGGCAGGAGGGTCTACCCCTA	3104
<i>Hd3a</i> _Kasalath	.....C.....AA...	3118
<i>Hd3a</i> _Koshihikari	.....A.....CC...	
<i>Hd3a</i> _TNG67	.....A.....CC...	
Consensus	agcgcgaggc gctccggcggcaggagggtctac cta	

圖 三、四品種在 *Hd3a* 之序列分析。(a) *Hd3a* 基因結構，星號為突變位置，箭頭為引子位置。(b) 四品種之 *Hd3a* 在突變位置序列比對。





## *Hd6*

*Hd6* 位在第三條染色體長臂，基因長度為 6929 bp，共有三個外顯子，此基因為一個不完全顯性基因，在長日的情況下會延遲抽穗，Nipponbare 之 *Hd6* 第一個外顯子中，發生一個鹼基的置換(圖四 a)，由 T→A，造成 *Hd6* 基因提早出現 TAG 終止碼，使基因轉錄提早結束，喪失基因功能，因而促進抽穗；而 Kasalath 的 *Hd6* 則是正常的轉譯出完整的胺基酸序列 (Takahashi *et al.*, 2001)。利用定序越光與台農 67 號在 *Hd6* 之變異區的序列(2532~3148 bp)，其 PCR 產物片段大小為 617 bp，並至 NCBI 下載 Nipponbare (Accession number: AB036785) 與 Kasalath (Accession number: AB036786) 之 *Hd6* 序列做比對，四個品種經過序列比對，結果顯示越光與 Nipponbare 相同，第一個外顯子中，第 2813 bp 位置，發生一個鹼基的置換，由 T→A，產生提早出現的終止碼 TAG，為無功能的 *Hd6*；而台農 67 號與 Kasalath 則為相同，正常轉譯 *Hd6* (圖四 b)，在長日下可延遲抽穗期。

由以上結果可得知，越光帶有喪失功能的 *hd6*，而台農 67 號為正常功能的 *Hd6*，若導入台農 67 號之 *Hd6* 進入越光，在長日的情況下可使越光的抽穗期延長。



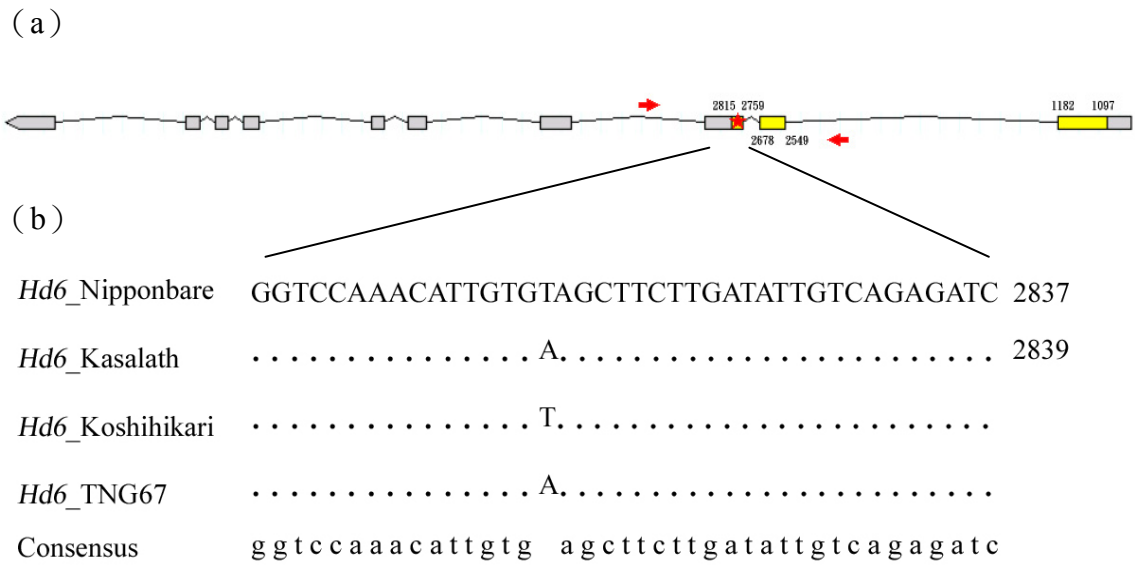


圖 四、四品種在 *Hd6* 之序列分析。(a) *Hd6* 基因結構，星號為突變位置，箭頭為引子位置。(b) 四品種之 *Hd6* 在突變位置序列比對。



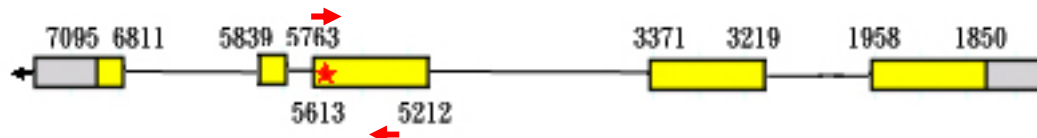
## *Ehd1*

*Ehd1* 調控開花過程中下游的 *Hd3a*，不管在長日或是短日處理下，皆會表現，但在短日處理時的表現量會多一點，而台中 65 號在 *Ehd1* 中發生了一個鹼基的置換（圖五 a），轉譯出胺基酸由 Glycine（G, GGA）轉變為 Arginine（R, AGA），基因功能因此喪失（Doi *et al.*, 2004）。利用定序越光與台農 67 號在 *Ehd1* 變異區的序列（5489~5631 bp），並於 NCBI 下載之 Nipponbare（Accession number：AB092506）、Kasalath（Accession number：AB092508）與台中 65 號（Accession number：AB092507）*Ehd1* 做比對，五個品種經過序列比對，結果顯示越光、Nipponbare 與 Kasalath 在 *Ehd1* 為相同的對偶基因，會轉譯出正常的 *Ehd1*；而台農 67 號與台中 65 號在 *Ehd1* 基因之第 5604 bp 的位置，同樣發生了一個鹼基的置換，使得 *Ehd1* 轉譯出不正確的胺基酸，由 Glycine（G, GGA）轉變為 Arginine（R, AGA），基因功能因此喪失（圖五 b）。

由以上結果可得知，越光具有正常功能的 *Ehd1*，在台灣的栽培環境中會造成提早抽穗的現象，而台農 67 號為喪失功能的 *Ehd1*，對光週期不敏感，假若導入台農 67 號 *ehd1* 進入越光，可延長越光的抽穗期。



(a)



(b)

<i>Ehd1</i> _Nipponbare	TCATTGCAGCAGTGAACCCACCTCGGAGAAGACAGTGAGTG	5620
<i>Ehd1</i> _Kasalath	.....G.....	5636
<i>Ehd1</i> _TC65	.....A.....	5799
<i>Ehd1</i> _Koshihikari	.....G.....	
<i>Ehd1</i> _TNG67	.....G.....	
Consensus	ggtccaaacattgtg agcttcttgatattgtcagagatc	

圖 五、五品種在 *Ehd1* 之序列分析。(a) *Ehd1* 基因結構，星號為突變位置，箭頭為引子位置。(b) 五品種在 *Ehd1* 突變位置序列比對。



## *Ghd7*

*Ghd7* 位在第七條染色體，基因長度為 7220 bp，共有兩個外顯子（圖六 a），為一個影響產量、株高與抽穗期等性狀的基因，在基因結構方面，*Ghd7* 基因包含一個 CCT domain，並與阿拉伯芥 *CO*、水稻 *Hdl* 中的 CCT domain 有高度的相似性，推測其基因的表達和功能受光週期長短的調控，在長日的情況下會表現，使抽穗期延遲、株高增加與產量上升，而短日環境下則不會表現（Xue *et al.*, 2008）。*Ghd7* 有五種對偶基因，利用定序越光與台農 67 號在 *Ghd7* 變異區的序列（227~925 bp），並於 NCBI 下載明恢 63 號之 *Ghd7* 序列（Accession number: EU286801），經過序列比對，在第 636 bp 與的 677 bp 兩個位置有變異存在，並對照 Xue 等人（2008）所研究的五種 *Ghd7* 對偶基因，結果顯示，越光與台農 67 號相同有功能但微弱的 *Ghd7-2*（圖六 b），故無法應用台農 67 號之 *Ghd7* 基因調整越光抽穗期，





(b)

<i>Ghd7</i> _Minghui63	CGCCGGCGGGCTCACGTTTCGACGTCTCCCTCGGCGGACGG	640
<i>Ghd7</i> _Koshihikari	..... A.....	
<i>Ghd7</i> _TNG67	..... A.....	
Consensus	c g c c g g c g g g c t c a c g t t c g a c g t c t c c c t c g g c g a c g g	
<i>Ghd7</i> _Minghui63	CCCGACCTGGACGCCGGGCTCGGCCTCGGCGGCGGCAGCG	680
<i>Ghd7</i> _Koshihikari	..... G....	
<i>Ghd7</i> _TNG67	..... G....	
Consensus	c c c g a c c t g g a c g c c g g g c t c g g c c t c g g c g g c g g c g c g	

圖六、三品種在 *Ghd7* 之序列分析。(a) *Ghd7* 基因結構，星號為突變位置，箭頭為引子位置。(b) 三品種在 *Ghd7* 突變位置序列比對。



## SE5

*SE5* 位在第六條染色體，基因長度為 4245 bp，共有四個外顯子（圖七 a），此基因直接參與光合色素的合成，在 *se5* 突變體中，對於光週期的反應完全喪失，無論是在長日或是短日甚至是全日照的環境，皆很早就開花，*SE5* 在開花途徑中光合色素扮演一個重要的關鍵角色。Izawa 等人（2000）的研究發現 *se5* 突變體在 *SE5* 基因第一個外顯子中的第 698 bp 的位置，有一個 A 鹼基的缺失（圖七 a），使得整個基因在缺失位置之後，轉譯完全錯誤。利用定序越光與台農 67 號在 *SE5* 變異區的序列（第 68~809 bp），並與 RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) 下載 Nipponbare (RAP loci accession number: AK104955) 的 *SE5* 序列、依據 Izawa 等人（2000）所繪製的農林八號 *se5* 突變株 *SE5* 基因序列，四個品種經過序列比對，結果顯示越光、台農 67 號與 Nipponbare 皆為正常的 *SE5* 基因（圖七 b）。

推測在人為選拔的時候，如果 *SE5* 基因異常，在任何日長之下皆會造成植株過早抽穗，而此種植株會因為營養生長期短而產量不高，故很難受到育種家的喜愛，且光合色素對於植株正常生長是必要的，推測此種異常的對偶基因在自然界中是不存在的。



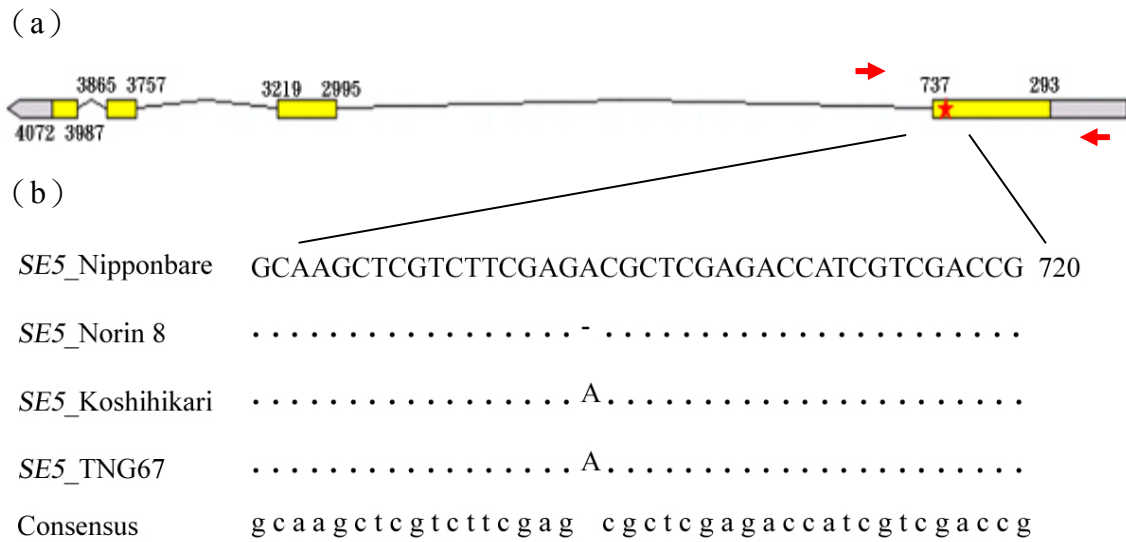


圖 七、四品種在 *SE5* 之序列分析。(a) *SE5* 基因結構，星號為突變位置，箭頭為引子位置。(b) 四品種在 *SE5* 突變位置序列比對。





越光與台農 67 號於此六個抽穗期基因之異同

由上述六個已發表定序之抽穗期基因的序列分析，在越光與台農 67 號之間，有三個基因是相同的，分別為 *Hd3a*、*Ghd7* 與 *SE5*；有三個基因是不同的，分別為 *Hd1*、*Hd6* 與 *Ehd1*。因此，利用此三個基因 *Hd1*、*Hd6* 與 *Ehd1* 的功能差異來延遲越光的抽穗期，台農 67 號 *hd1* 不會受到短日的影響而提早抽穗；台農 67 號 *Hd6* 會在長日的情況下延遲抽穗，且為不完全顯性，代表子代在此片段為異質結合體，還是具有延遲抽穗的部分效果；台農 67 號 *ehd1*，不會受到短日與長日的影響而提早抽穗。利用以上試驗結果與前人之研究，整理越光、台農 67 號、台中 65 號與 Nipponbare 四個品種在 *Hd1*、*Hd6* 與 *Ehd1* 三個基因與抽穗期的相對關係(表一)，推測把台農 67 號中 *hd1*、*Hd6* 與 *ehd1* 三個基因導入越光中，可以成功調整越光的抽穗期。

對偶基因分析的結果指出，越光帶有具功能性的 *Hd1* 與 *Ehd1*，喪失功能性的 *hd6*，而台農 67 號則是具有喪失功能性的 *hd1* 與 *ehd1*，具有功能性的 *Hd6*。其中，越光具有功能性的 *Hd1* 與 *Ehd1*，為光週期品感的品種，在台灣的栽培環境下會提早抽穗，特別是在二期作時，較短的日長會使越光提早抽穗；而台農 67 號屬具功能性的 *Hd6* 在長日的情況下會延遲抽穗。因此，利用台農 67 號導入喪失功能性的 *hd1* 與 *ehd1*，具有功能性的 *Hd6*，推測可以調整越光之抽穗期，增加營養生長期，期能提升越光在台灣種植之品質與產量。

表一、四個品種種植在台灣時抽穗期的相對表現。

	Nipponbare	Koshihikari	TNG67	TC65
<i>Hd1</i>	<i>Hd1</i>	<i>Hd1</i>	<i>hd1</i>	<i>hd1</i>
<i>Hd6</i>	<i>hd6</i>	<i>hd6</i>	<i>Hd6</i>	<i>Hd6</i>
<i>Ehd1</i>	<i>Ehd1</i>	<i>Ehd1</i>	<i>ehd1</i>	<i>ehd1</i>
Heading in Taiwan	early heading	early heading	late heading	late heading



## 二、設計功能性分子標幟

分析越光與台農 67 號在 *Hdl*、*Hd3a*、*Hd6*、*Ehd1*、*Ghd7* 與 *SE5* 基因在序列上的差異，發現在 *Hdl*、*Hd6* 與 *Ehd* 基因序列上有差異，因此，依差異設計功能性分子標幟，藉以利用在分子輔助選種的前景篩選。在 *Hdl* 中，由於台農 67 號在第二個外顯子中有一個 1901 bp 的插入，造成轉錄發生錯誤，喪失 *Hdl* 基因功能，而越光在此基因為正常轉錄，保有 *Hdl* 正常功能，所以，利用此差異設計成 indel 形式的功能性分子標幟；在 *Hd6* 中，由於越光在第一個外顯子中發生一個鹼基的置換，由 T→A，造成 *Hd6* 基因提早出現 TAG 終止碼，使基因轉錄提早結束，基因功能喪失，而在台農 67 號中，沒有此鹼基的置換發生，並且序列上為 *HindIII* 限制酶所辨識，而越光因為發生鹼基的置換，為 *HindIII* 限制酶無法辨識，因此利用兩個品種間的 SNP 轉換成 CAPs 形式的功能性分子標幟；在 *Ehd1* 中，由於台農 67 號在第三個外顯子中發生一個鹼基的置換，由 G 變成 A，造成 *Ehd1* 基因轉譯時發生胺基酸的變異，由 G→R，基因功能因此喪失，越光則沒有此鹼基的置換發生，利用兩個品種間的 SNP 轉換成 dCAPs 形式的功能性分子標幟。

### *Hdl* 之功能性分子標幟設計與基因型分析

利用台農 67 號在 *Hdl* 中，發生 1901 bp 插入位置兩側之序列設計引子，越光擴增的片段大小為 413 bp，而台農 67 號為 2314 bp，篩選親本與子代結果如圖八，A 代表越光，B 代表台農 67 號。此功能性分子標幟直接應用在 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 子代的篩選中，分析 14 個 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 子代中，帶有越光同質結合體的基因型者，會在 413 bp 產生單一條帶，此類型共有 8 株，分別為編號 1、2、6、7、8、9、13、14，基因型標示為 A；帶有異質結合體的基因型者，會產生兩條條帶，為 413 bp 和 2314 bp，此類型共有 6 株，分別為編號 3、4、5、10、11、12，基因型標示為 H（圖八）。

在 *Hdl* 功能性分子標幟基因型分析中，帶有異質結合體的 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 子代（3、4、5、10、11、12），基因型為 H，在 *Hdl* 中帶有台農 67 號 *hdl*，則可以進一步的分析另外兩個功能性分子標幟 *Hd6* 與 *Ehd1*。

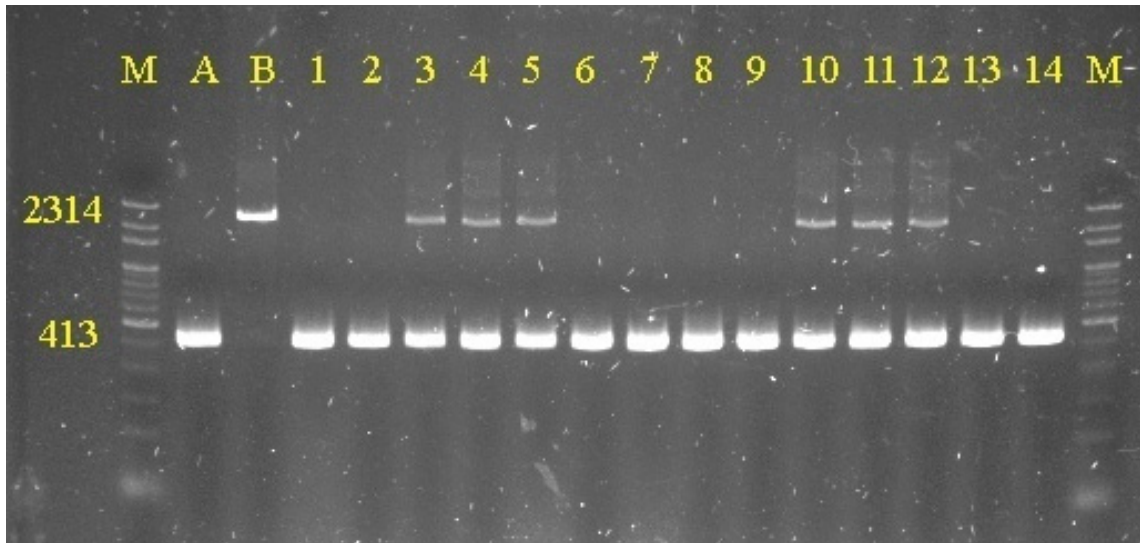


圖 八、*Hd1* 基因型分析。M 為 100 bp DNA ladder，A 為越光，B 為台農 67 號，1-14 為 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 子代，使用 1% 之 SFR 瓊脂膠片，電泳條件為 220 伏特，進行 15 分鐘。



### *Hd6* 之功能性分子標幟之設計與基因型分析

利用越光在 *Hd6* 基因中，發生一個鹼基置換的位置兩側之序列設計引子，越光與台農 67 號的 PCR 擴增片段大小皆為 617 bp，但經過 *Hind*III (A<sup>^</sup>AGCTT) 限制酶的處理之後，因為越光之序列，無法為限制酶所辨識，PCR 產物大小仍維持在 617 bp，而台農 67 號之 PCR 產物則被酶切為 335 bp 與 282 bp。而使用 1% SFR 瓊脂膠片分析時，帶有台農 67 號對偶基因時，酶切的 335 bp 與 282 bp 比較相近的緣故，會在膠片上產生較模糊的兩個條帶，但不影響分析。此功能性分子標幟直接應用在 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 子代的篩選中，分析 14 個 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 子代中，帶有越光同質結合體的基因型者，會在 617 bp 產生單一條帶，此類型共有 10 株，分別為編號 1、3、4、5、6、7、8、11、13、14，基因型標示為 A；帶有異質結合體的基因型者，會產生三條條帶，為 617 bp、335 bp 與 282 bp，此類型共有 4 株，分別為編號 2、9、10、12，基因型標示為 H (圖九)。

在 *Hd6* 功能性分子標幟基因型分析中，帶有異質結合體的 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 子代(2、9、10、12)，基因型為 H，在 *Hd6* 基因中帶有台農 67 號的 *hd6*，則可以進一步的分析最後一個功能性分子標幟 *Ehd1*。



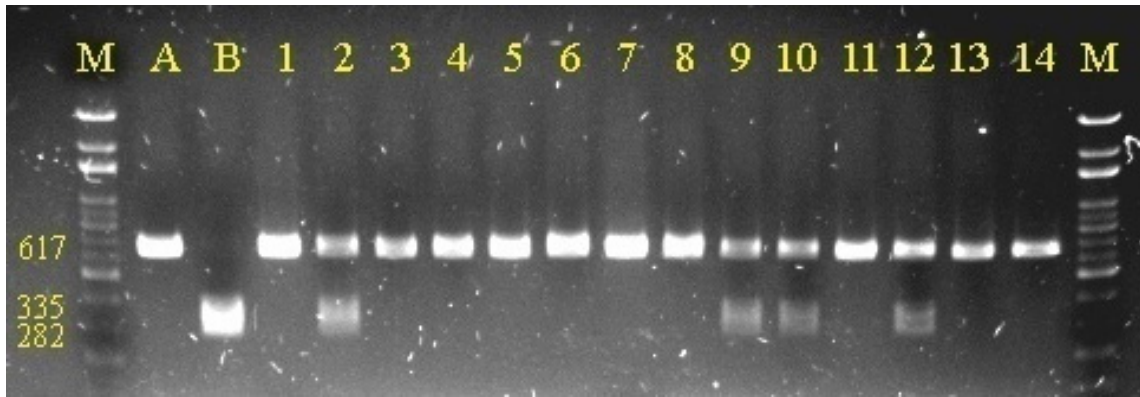


圖 九、*Hd6* 基因型分析。M 為 100 bp DNA ladder，A 為越光，B 為台農 67 號，1-14 為 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 子代，使用 1% 之 SFR 瓊脂膠片，電泳條件為 220 伏特，15 分鐘。



### *Ehd1* 之功能性分子標幟之設計與基因型分析

由 *Ehd1* 序列比較發現，在越光與台農 67 號之間有一個 SNP 存在，而在此 SNP 發生的位置，沒有限制酶可以辨識，故轉換成 dCAPs 形式的分子標幟，以 SNP 為中心，前後各包括約 25 bp，以不超過 60 個鹼基為原則，輸入網站 dCAPs Finder 2.0 產生 5'端引子，並找到一個 *Bsu36I* 的限制酶 (CC<sup>^</sup>TNAGG)，經過 5'端引子修飾過後，並在 3'端引子以正常設計引子方式設計。

越光與台農 67 號的 PCR 擴增片段大小為 143 bp，經過 5'端引子修飾過後的 PCR 產物，加上發生鹼基置換的位置，使得台農 67 號帶有 *Bsu36I* 可辨識的序列，而越光則無，以 *Bsu36I* 限制酶的處理之後，越光片段大小依然為 143 bp，而台農 67 號則被酶切為 114 bp 與 28 bp；但在電泳分析中，28 bp 的條帶會跑出可分析的區域，在瓊脂電泳膠片上只會看到 114 bp 的條帶（圖十 a）。此功能性分子標幟直接應用在 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 子代的篩選中，分析 13 個 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 子代中，帶有越光同質結合體的基因型者，會在 143 bp 產生單一條帶，此類型共有 9 株，分別為編號 1、2、3、4、6、8、9、10、11，基因型標示為 A；帶有異質結合體的基因型者，會產生三條條帶，為 143 bp、114 bp 與 28 bp，但在膠片上無法看到 28 bp 大小的片段，此類型共有 4 株，分別為編號 5、7、12、13，基因型標示為 H（圖十 b）。

本試驗開發 *Ehd1* 功能性分子標幟時，使用 dCAPs 分子標幟，在回交系統內，子代只會產生越光同質結合體與異質結合體的條帶，即 A 與 H。然而在使用限制酶時，辨識位置如在越光時，會有限制酵素酶切不完全之虞，造成 A 誤判成 H，挑錯子代而使試驗失敗，故在設計 dCAPs 形式的分子標幟時，把 5'端引子修飾成限制酶能辨認的位置，在台農 67 號上，不僅可以縮短限制酶作用的時間，只需要有酶切到，就可以在條帶上看到兩個條帶，不必擔心有誤判的情形發生。

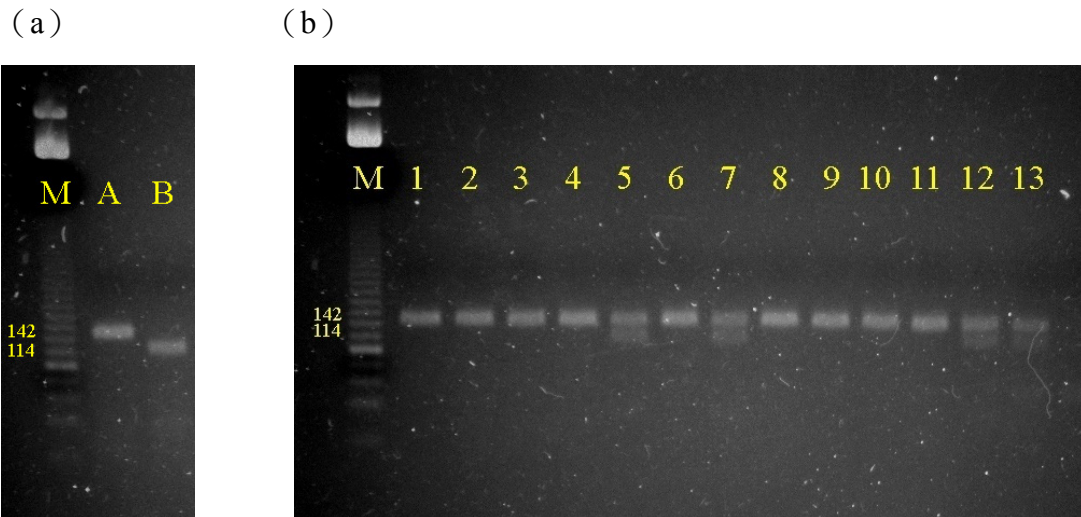


圖 十、*Ehd1* 基因型分析。(a) M 為 20 bp DNA ladder，A 為越光，B 為台農 67 號。(b) M 為 20 bp DNA ladder，BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 編號 1~13 共 13 株。使用 2.5% 之 SFR 瓊脂膠片，電泳條件為 220 伏特，進行 20 分鐘。





### 三、設計背景篩選的多型性分子標幟

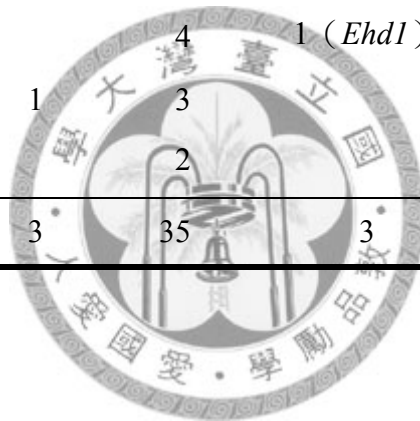
利用本實驗室現有 382 個私種間多型性之 SSR 分子標幟，進行越光與台農 67 號之間多型性的分析，但只有 21 個 SSR 分子標幟在兩親本中具有多型性，多型性比例只佔 5.5%；參考 Matsubara 等人 (2008b) 研究中使用 McCouch 等人在 2002 年的 SSR 分子標幟與自行開發的 indel 分子標幟，推測在同為稉稻的越光與 Nipponbare 之間具有多型性之分子標幟，在同為稉稻的越光與台農 67 號之間有多型性的機率較高，一共使用 55 個分子標幟進行多型性分析，在越光與台農 67 號之間共有 31 個分子標幟具有多型性，其中包括 28 SSRs 與 3 indels，多型性比例為 56.4%；在以上兩種分子標幟未能補齊以 20 cM 為間距的目標，自行設計 155 組分子標幟，在兩親本中有 35 個具有多型性，多型性比例為 22.6% (表二)。

以 RGP 公布遺傳連鎖圖之長度分析本試驗 87 個多型性分子標幟，第一條染色體遺傳距離為 181.8 cM，共有 9 個分子標幟，平均距離為 20.2 cM；第二條染色體遺傳距離為 157.9 cM，共有 9 個分子標幟，平均距離為 17.5 cM；第三條染色體遺傳距離為 166.4 cM，共有 11 個多型性分子標幟加一個前景篩選的 *Hd6* 功能性分子標幟，平均距離為 13.9 cM；第四條染色體遺傳距離為 129.6 cM，共有 7 個分子標幟，平均距離為 18.5 cM；第五條染色體遺傳距離為 122.3 cM，共有 7 個分子標幟，平均距離為 17.5 cM；第六條染色體遺傳距離為 126.3 cM，共有 6 個分子標幟加一個前景篩選的 *Hdl* 功能性分子標幟，平均距離為 18.0 cM；第七條染色體遺傳距離為 118.6 cM，共有 7 個分子標幟，平均距離為 16.9 cM；第八條染色體遺傳距離為 121.2 cM，共有 7 個分子標幟，平均距離為 17.3 cM；第九條染色體遺傳距離為 93.5 cM，共有 5 個分子標幟，平均距離為 18.7 cM；第十條染色體遺傳距離為 83.8 cM，共有 6 個分子標幟加一個前景篩選的 *Ehdl* 功能性分子標幟，平均距離為 12.0 cM；第十一條染色體遺傳距離為 119.5 cM，共有 6 個分子標幟，平均距離為 19.9 cM；第十二條染色體遺傳距離為 109.5 cM，共有 7 個分子標幟，平均距離為 15.6 cM (表二)。而所有分子標幟平均距離為 17.3 cM，最大的距離在第五條染色體 *RM164* 與 *RM2357* 之間的 34.5 cM，最小的距離在第三條染色體 *RM2334* 與 *RM6736* 之間的 4.7 cM。

共有 87 個分子標幟可當作背景篩選的依據，加上先前三個當作前景篩選的功能性分子標幟，利用各引子序列比對 RGP 公布遺傳連鎖圖的位置，並比對 IRGSP

表 二、三個功能性分子標幟與 87 個多型性分子標幟之來源。

Chromosome	McCouch <i>et al.</i> 2002	Matsubara <i>et al.</i> , 2008a	This Study	FMs of This Study	Subtotal	Average distance (cM)
1	5		4		9	20.2
2	7		2		9	17.5
3	10		1	1 ( <i>Hd6</i> )	12	13.9
4	3		4		7	18.5
5	4	1	2		7	17.5
6	2	1	3	1 ( <i>Hd1</i> )	7	18.0
7	4		3		7	16.9
8	3		4		7	17.3
9	2		3		5	18.7
10	2		4	1 ( <i>Ehd1</i> )	7	12.0
11	2	1	3		6	19.9
12	5		2		7	15.6
Total	49	3	35	3	90	17.3



公布的第四版物理圖譜 (Pseudomolecules 4.0) 的位置，使用 MapDraw (<http://www.nslj-genetics.org/soft/mapdraw.v2.2.xls>) 繪製遺傳連鎖圖，並排列出遺傳連鎖圖與物理圖譜的相對位置。*Hd1* 位在第六條染色體，距離 *RM276* 與 *CH0618* 分別為 20.2 cM 與 14.4 cM；*Hd6* 位在第三條染色體，距離 *RM2593* 與 *RM143* 分別為 3.6 cM 與 10.2 cM；*Ehd1* 位在第十條染色體，距離 *RM5304* 與 *CH1014* 分別為 2.7 cM 與 4.1 cM (圖十一)。其中，在 *Hd6* 與 *Ehd1* 的篩選過後，分別使用 *RM2593* 與 *RM143*、*RM5304* 與 *CH1014* 當作重組篩選的分子標幟，由於這幾個背景分子標幟距離前景篩選的基因較近，故在前景篩選過後，挑選這幾個分子標幟基因型為越光同質結合體的個體，可以降低連鎖拖曳的情形。

本試驗使用 3 個功能性分子標幟與 87 個多型性分子標幟，共有 15 個區間大於 20 cM，5 個區間大於 30 cM，其餘兩兩分子標幟之間的區段少於 20 cM。距離在 20 cM 時，誤判的最大 1%，而大於 30 cM 會使誤判的機率上升到 2.25%，尤以第五條染色體中 *RM164* 與 *RM2357* 之間的 34.5 cM，誤判的最大機率為 3.0%，在未來增加其區間內的分子標幟以彌補此問題。

87 個分子標幟應用在子代的背景篩選，以 SSR 分子標幟 *RM8010* 與 indel 分子標幟 *CH0701* 在五株經前景篩選保留的 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> (#286-14、#286-23、#286-85、#330-36 與 #330-52) 為例。在 *RM8010* 基因型的分析結果中 (圖十二 a)，A 為越光，B 為台農 67 號，經由 PCR 擴增之後越光與台農 67 號的 DNA 大小分別為 140 bp 與 155 bp，帶有越光同質結合體的基因型者，只在 140 bp 產生單一條帶，此類型共有 3 株，為 #286-14、#286-23、#286-85，基因型標示為 A；帶有異質結合體的基因型者，會產生 140 bp 與 155 bp 兩條條帶，此類型共有 2 株，為 #330-36 與 #330-52，基因型標示為 H。在 *CH0701* 基因型的分析結果中 (圖十二 b)，經由 PCR 擴增之後越光與台農 67 號的 DNA 大小分別為 105 bp 與 120 bp，帶有越光同質結合體的基因型者，會在 105 bp 產生單一條帶，此類型共有 4 株，分別為編號 C (#286-14)、D (#286-23)、F (#330-36) 與 G (#330-52)，基因型標示為 A；帶有異質結合體的基因型者，會產生 105 bp 與 120 bp 兩條條帶，此類型共有 1 株，為編號 #286-85，基因型標示為 H。

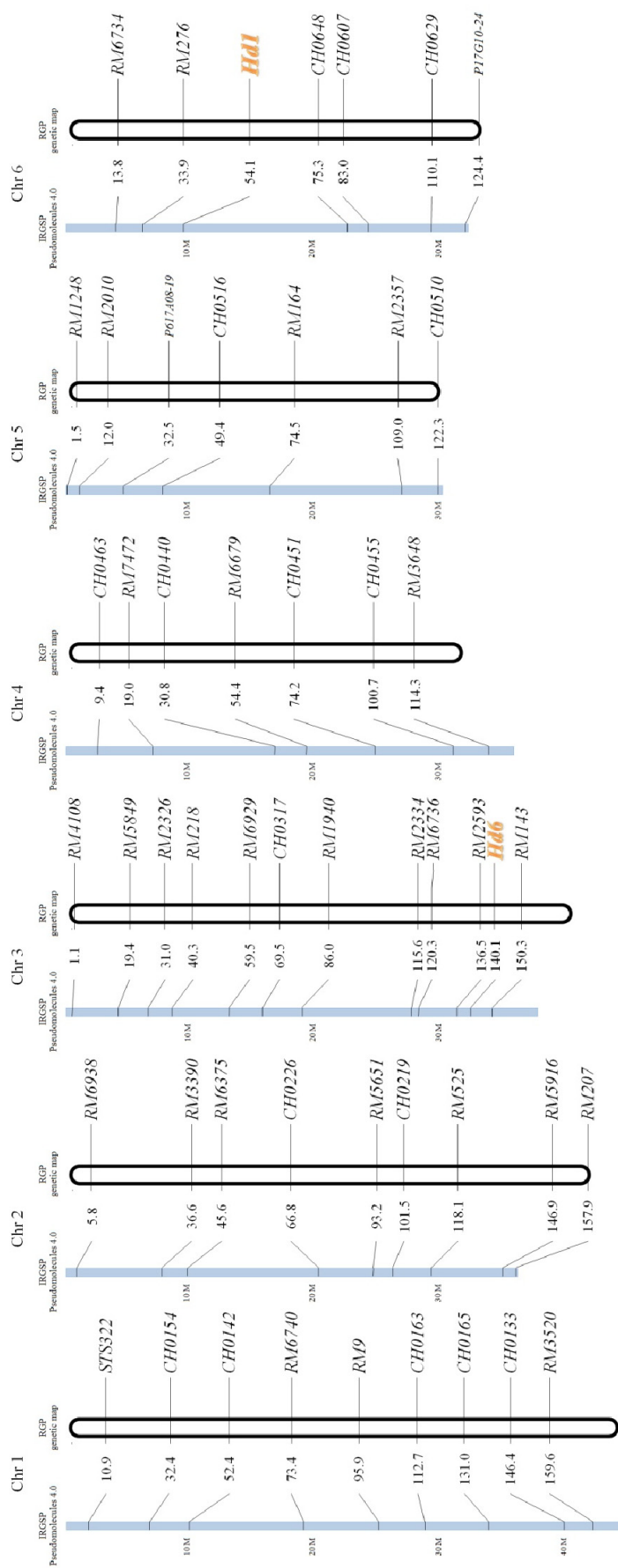


圖 十一、本試驗使用之越光 × 台農 67 號多型性分子標幟於遺傳連鎖圖與物理圖譜之位置。遺傳連鎖圖與圖參考 RGP，物理圖譜參考 IRGSP Pseudomolecules 4.0。(待續)

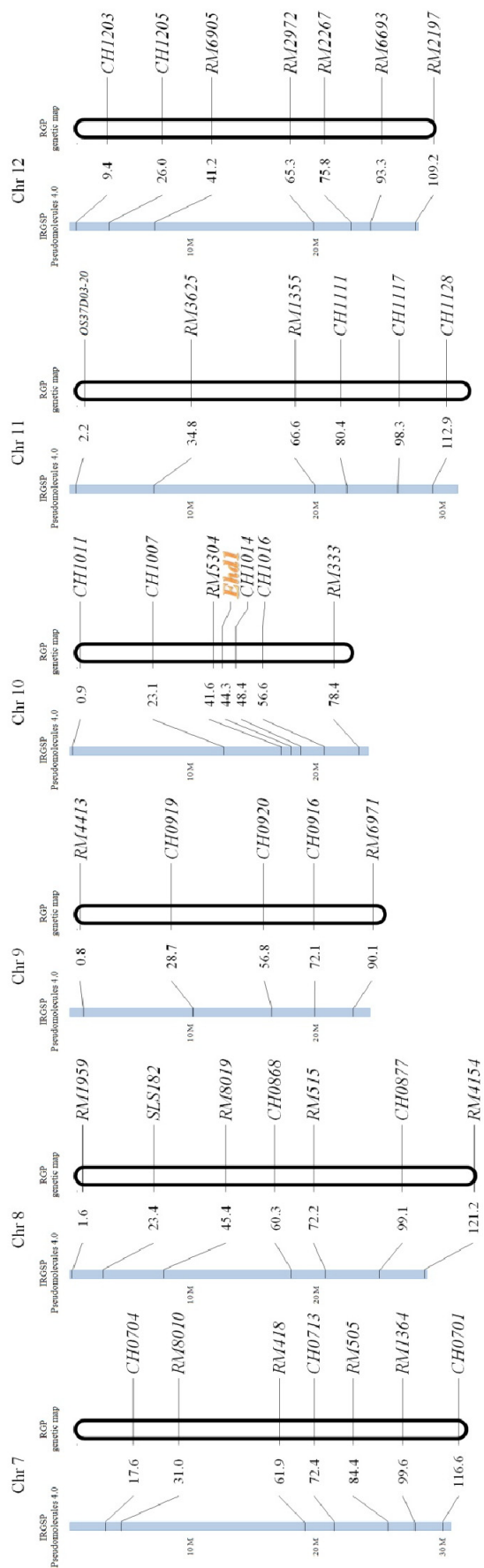
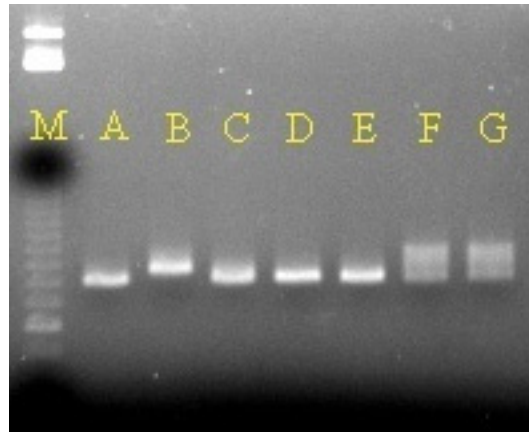


圖 十一、本試驗使用之越光 × 台農 67 號多型性分子標幟於遺傳連鎖與物理圖與物理圖參照 RGP，物理圖參照 IRGSP Pseudomolecules 4.0。(續)

(a)



(b)

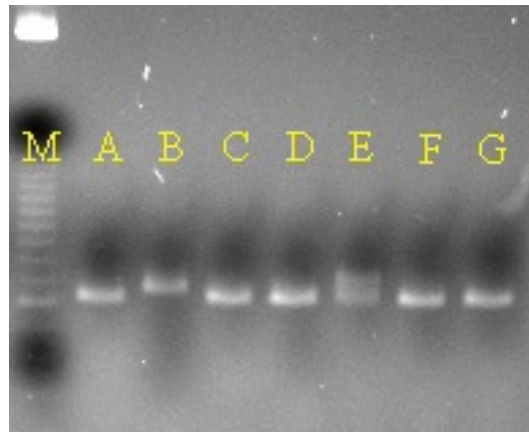


圖 十二、背景篩選。(a) *RM8010* 基因型分析結果；(b) *CH0701* 基因型分析結果。M 為 20 bp DNA ladder，A 為越光，B 為台農 67 號，C 為 #286-14，D 為 #286-23，E 為 #286-85，F 為 #330-36，G 為 #330-52。使用 2.5% 之 SFR 瓊脂膠片，電泳條件為 220 伏特，進行 20 分鐘。

#### 四、BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>之基因型分析與篩選

以越光為母本，F<sub>1</sub>世代為父本，在 2008 年 4 月 15 號進行第一次的回交，得到 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 種子，發芽之後共有 283 株 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 進行試驗，2008 年 7 月 15 日剪取葉片抽取 DNA，開始進行前景篩選與部分背景篩選的基因型分析。

##### 前景篩選

利用三個功能性分子標幟篩選出 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 皆為 *Hd1hd1 / Hd6hd6 / Ehd1ehd1* 的個體，依序進行 *Hd1*、*Hd6* 與 *Ehd1* 功能性分子標幟，283 株 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 經由 *Hd1* 功能性分子標幟篩選，留下 127 株 *Hd1hd1* 的個體進入 *Hd6* 基因篩選；經由 *Hd6* 功能性分子標幟篩選，留下 67 株 *Hd1hd1 / Hd6hd6* 的個體進入 *Ehd1* 基因篩選；經由 *Ehd1* 功能性分子標幟篩選，剩下 37 株 *Hd1hd1 / Hd6hd6 / Ehd1ehd1* 的 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>。篩選三基因皆為異質結合體的期望值應為  $283 \times 0.5 \times 0.5 \times 0.5 = 35.375$ ，利用卡方適合度檢驗，其卡方值為 0.08 小於 95% 信心水準理論值 3.84，故以三個功能性分子標幟篩選之 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 個數符合期望值。

##### 背景篩選

前景篩選之 37 株 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 進行 17 個背景分子標幟的篩選（表二）。儘量保留較多越光同質結合體的個體，初步評估挑選出 #286、#322 與 #330 三株，但其中 #322 植株為不稔，故無法與輪迴親回交。由 17 個背景分子標幟中分析的結果得知，#286 和 #330 分別帶有 76.5% 與 79.6% 的越光基因體（表二），根據水稻回交理論，在 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代輪迴親基因體背景期望值為 75%。

越光與台農 67 號之抽穗期分別為 49 天和 77 天（表四），#286、#322 與 #330 之基因型為 *Hd1hd1 / Hd6hd6 / Ehd1ehd1*，其抽穗期分別為 67、63 和 59 天（表四），雖介於兩親本之間，但依然無法以抽穗期日數直接做篩選。是以，此三個功能性分子標幟，可直接對基因型做篩選的依據，較為精確，不受外在環境或其他因素影響。

表 三、#286 與 #330 的前景篩選與 17 個分子標幟的背景篩選。

Chr.	Position of Linkage Map	Marker	# 286 <sup>a</sup>	# 330
Foreground selection				
3	140.1	<i>Hd6</i>	H <sup>b</sup>	H
6	54.1	<i>Hd1</i>	H	H
10	44.3	<i>Ehd1</i>	H	H
Background selection				
1	159.6	<i>RM3520</i>	A	A
2	101.5	<i>CH0219</i>	A	A
3	31	<i>RM2326</i>	H	A
3	40.3	<i>RM218</i>	H	H
3	149.1-151.5	<i>RM143</i>	A	H
4	114.3	<i>RM3648</i>	A	A
5	73.9-75.0	<i>RM164</i>	H	H
6	33.5-34.3	<i>RM276</i>	H	H
6	83	<i>CH0607</i>	H	A
7	24	<i>CH0704</i>	A	H
7	61.9	<i>RM418</i>	H	A
8	21.6-25.2	<i>SLS182</i>	A	A
8	72.2	<i>RM515</i>	A	A
8	121.2	<i>RM4154</i>	A	A
10	41.6	<i>RM5304</i>	H	H
10	73.7-83.0	<i>RM333</i>	H	H
12	65.3	<i>RM2972</i>	A	A
total Koshihikari genome			76.5%	79.6%

<sup>a</sup> BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 編號 #286 與 #330 在三個前景篩選基因為 H，分析 17 個背景篩選的分子標幟

<sup>b</sup> A 代表該分子標幟帶有越光同質結合體，B 代表該分子標幟為異質結合體



表 四、兩親本與篩選過後的 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 之抽穗天數。

	Koshihikari	TNG67	BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>		
			# 286	# 322	# 330
Days to heading	49	77	67	63	59

2008/05/20 seeding



## 五、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 分析與篩選

以越光為母本，BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代為父本，在 2008 年 8 月 5 日進行第二次的回交，得到 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 種子，#286 的 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 回交後共有 48 株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>、#330 的 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 回交後共有 16 株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>，共有 64 株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 進行試驗，種植於溫室中，於 2008 年 11 月 5 日剪取葉片抽取 DNA，進行前景篩選與部分背景篩選。

### 前景篩選

利用三個功能性分子標幟篩選出 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1* 的 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 個體，依序進行 *Hd1*、*Hd6* 與 *Ehd1* 功能性分子標幟之基因行鑑定，#286 家系之 48 株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 進行 *Hd1* 功能性分子標幟篩選，留下 18 株 *Hd1hd1* 的個體進入 *Hd6* 基因篩選；經由 *Hd6* 功能性分子標幟篩選，留下 8 株 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* 的個體進入 *Ehd1* 基因篩選；經由 *Ehd1* 功能性分子標幟篩選，剩下 3 株 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1* 的 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> (#286-14、#28623 與 #286-85)。而篩選三基因皆為異質結合體的期望值應為  $48 \times 0.5 \times 0.5 \times 0.5 = 6$ ，利用卡方適合度檢驗，其卡方值為 1.71，小於 95% 信心水準理論值 3.84，符合以基因型篩選後的個體數符合期望值。

#330 家系之 16 株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 進行 *Hd1* 功能性分子標幟篩選，留下 7 株 *Hd1hd1* 的個體進入 *Hd6* 基因篩選；經由 *Hd6* 功能性分子標幟篩選，留下 4 株 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* 的個體進入 *Ehd1* 基因篩選；經由 *Ehd1* 功能性分子標幟篩選，剩下 2 株 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1* 的 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> (#330-36 與 #330-52)，而篩選三基因皆為異質結合體的期望值應為  $16 \times 0.5 \times 0.5 \times 0.5 = 2$ ，符合期望值。

### 背景篩選

前景篩選為 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1* 的五株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> (#286-14、#286-23、#286-85、#330-36 與 #330-52) 進行 47 個背景分子標幟的篩選，儘量保留較多越光基因體的個體。由 47 個背景分子標幟中分析的結果得知(表五)，#286-14、#286-23、#286-85、#330-36 與 #330-52 分別帶有 87.2%、84.0%、80.9%、83.0% 與 79.8% 越光基因體，最後，刪去帶有較低越光基因體的 #330-52，留下編號為 #286-14、#286-23、#286-85 與 #330-36，此四株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 與越光回交，產生 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>。

BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代帶有越光基因體比例之期望值為 87.5%，篩選之子代帶有越光基因體的比率稍低於期望值，推測可能是此世代只有 64 株子代可供篩選，在以先挑選

*Hd1hd1 / Hd6hd6 / Ehd1ehd1* 為前提之下，目標基因 *Hd6*、*Hd1*、*Ehd1* 所在的第三、第六與第十條染色體，大部分的分子標幟分析為異質結合體的比率較其他染色體高，以 #286-14 的個體為例，在第三條染色體分析的 9 個分子標幟中，有 5 個為異質結合體；第六條染色體分析的 3 個分子標幟中，有 2 個為異質結合體；第十條染色體分析的 3 個分子標幟中，皆為異質結合體。在三個目標基因皆要挑選異質結合體的條件下，目標皆因周圍為越光同質結合體的比例就會下降，使得目標基因區間異質結合體的比例上升，以致於較難挑選到帶有較多越光基因體的個體，因此，較期望值為低。但反觀 #286-14 個體其他條染色體分析的分子標幟，例如第一條、第二條、第四條、第八條、第十一與第十二條染色體，皆置換成越光同質結合體，可縮短回交所需的世代。

此世代在 9~12 月份的時間種植，自然環境的日長為短日，調查兩親本與 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 的抽穗期天數（表七），越光為 46 天，台農 67 號為 88 天，#286-14 為 51 天，#286-23 為 37 天、#286-85 為 36 天、#330-36 為 71 天，有兩個顯性光週期性基因基因（*Hd1hd1 / Ehd1ehd1*）的五個個體，在短日下提早抽穗，更顯得以抽穗期無法直接作為篩選的依據；另外，#286-23 和 #286-85 比親本越光還早抽穗，推測台農 67 號可能帶有其他在短日情況中會影響抽穗的因子或上位性作用。

表 五、五株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 的前景篩選與背景篩選之基因型。(待續)。

Chr.	Position of Linkage Map	Marker	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>				
			# 286-14	# 286-23	# 286-85	# 330-36	# 330-52
Foreground selection							
6	54.1	<i>Hd1</i>	H	H	H	H	H
3	154	<i>Hd6</i>	H	H	H	H	H
10	44.3	<i>Ehd1</i>	H	H	H	H	H
Background selection							
1	10.9	<i>STS322</i>	A	H	A	H	H
1	73.4	<i>RM6740</i>	A	A	H	H	H
1	95.7-96.1	<i>RM009</i>	A	A	A	H	H
1	159.6	<i>RM3520</i>	A	A	A	A	A
2	36.3-36.8	<i>RM3390</i>	A	H	H	H	H
2	43.4-47.8	<i>RM6375</i>	A	H	H	A	H
2	62.2-71.3	<i>CH0226</i>	A	A	H	A	H
2	118.1	<i>RM525</i>	A	A	A	H	H
2	146.9	<i>RM5916</i>	A	A	A	H	A
2	157.9	<i>RM207</i>	A	A	A	H	H
3	1.1	<i>RM4108</i>	A	A	A	H	H
3	18.4-20.3	<i>RM5849</i>	A	A	A	A	A
3	31	<i>RM2326</i>	H	H	H	A	A
3	40.3	<i>RM218</i>	H	H	H	H	H
3	86	<i>RM1940</i>	A	A	A	H	H
3	115.6	<i>RM2334</i>	H	A	A	H	H
3	120.1-120.4	<i>RM6736</i>	H	A	A	H	H
3	136.5	<i>RM2593</i>	H	H	H	A	H
3	149.1-151.5	<i>RM143</i>	A	A	A	A	A
4	52.6-56.1	<i>RM6679</i>	A	A	A	A	A
4	114.3	<i>RM3648</i>	A	A	A	A	A
5	12	<i>RM2010</i>	A	H	H	A	A
5	32.5	<i>P617A08-19</i>	A	H	H	A	A
5	73.9-75.0	<i>RM164</i>	H	H	H	A	A
5	109	<i>RM2357</i>	A	A	A	A	A

表 五、五株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 的前景篩選與背景篩選之基因型。(續)。

Chr.	Position of Linkage Map	Marker	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>				
			# 286-14	# 286-23	# 286-85	# 330-36	# 330-52
Foreground selection							
6	54.1	<i>Hd1</i>	H	H	H	H	H
3	154	<i>Hd6</i>	H	H	H	H	H
10	44.3	<i>Ehd1</i>	H	H	H	H	H
Background selection							
6	13.8	<i>RM6734</i>	H	A	H	H	H
6	33.5-34.3	<i>RM276</i>	A	H	H	H	H
6	83	<i>CH0607</i>	H	H	H	A	A
7	24	<i>CH0704</i>	A	A	A	A	A
7	31	<i>RM8010</i>	A	A	A	H	H
7	61.9	<i>RM418</i>	H	A	H	A	A
7	84.1-84.6	<i>RM505</i>	A	A	A	A	A
7	99.6	<i>RM1364</i>	A	A	H	A	A
7	116.6	<i>CH0701</i>	A	A	H	A	A
8	21.6-25.2	<i>SLS182</i>	A	A	A	A	A
8	45.4	<i>RM8019</i>	A	A	A	A	A
8	60.1-60.4	<i>CH0868</i>	A	H	A	A	A
8	72.2	<i>RM515</i>	A	A	A	A	A
8	121.2	<i>RM4154</i>	A	A	A	A	A
9	0.8	<i>RM4413</i>	A	A	A	A	A
9	90.1	<i>RM6971</i>	A	A	A	A	A
10	23.1	<i>CH1007</i>	H	A	H	A	A
10	41.6	<i>RM5304</i>	H	H	H	A	H
10	73.7-83.0	<i>RM333</i>	H	H	A	H	H
11	34.8	<i>RM3625</i>	A	H	A	A	A
12	65.3	<i>RM2972</i>	A	A	A	A	A
12	109.2	<i>RM2197</i>	A	A	A	A	A
total Koshihikari genome			87.2%	84.0%	80.9%	83.0%	79.8%

表 六、兩親本與篩選過後的四株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 之抽穗天數。

	Koshihikari	TNG67	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>			
			# 286-14	# 286-23	# 286-85	# 330-36
Days to heading	46	88	51	37	36	71

2008/09/05 seeding



## 六、BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 分析與篩選

以越光為母本，BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代為父本，在 2008 年 11 月下旬陸續進行第三次的回交，得到 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 種子，BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 家系 #286-14 產生 97 株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>，#286-23 產生 14 株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>，#286-85 產生 36 株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>，#330-36 產生 99 株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>，於 2009 年 2 月 9 日播種，並種植於溫室中，2009 年 2 月 28 日剪取葉片抽取 DNA，進行前景篩選與部分背景篩選。

### 前景篩選

利用三個功能性分子標幟篩選 *Hdl*、*Hd6* 與 *Ehd1* 基因，期望在 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 中得到 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1* 的個體，#286-14 家系的子代中，發生了一些未知的因素，使得 *Hdl* 異質結合基因遺失，除了 #286-14-A23 此單株外，全部皆為越光同質結合體，故放棄 #286-14-A23 之外的 96 株後代。

編號 #286-23 家系之 14 株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 進行 *Hdl* 功能性分子標幟篩選，留下 5 株 *Hd1hd1* 的個體進入 *Hd6* 基因篩選；經由 *Hd6* 功能性分子標幟篩選，留下 3 株 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* 的個體進入 *Ehd1* 基因篩選；經由 *Ehd1* 功能性分子標幟篩選，剩下 2 株 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1* 的 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>，為 #286-23-A16 與 #286-23-A24。篩選三基因皆為異質結合體的期望值應為  $14 \times 0.5 \times 0.5 \times 0.5 = 2.75$ ，利用卡方適合度檢驗，其卡方值為 0.25，小於 95% 信心水準理論值 3.84，以三個功能性分子標幟篩選出之株數符合期望值。

#286-85 家系之 36 株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 進行 *Hdl* 功能性分子標幟篩選，留下 14 株 *Hd1hd1* 的個體進入 *Hd6* 基因篩選；經由 *Hd6* 功能性分子標幟篩選，留下 7 株 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* 的個體進入 *Ehd1* 基因篩選；經由 *Ehd1* 功能性分子標幟篩選，剩下 5 株 *Hd1hd1* / *Hd6hd6* / *Ehd1ehd1* 的 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>，為 #286-85-A4、#286-85-A6、#286-85-A12、#286-85-A27 與 #286-85-A41。篩選三基因皆為異質結合體的期望值應為  $48 \times 0.5 \times 0.5 \times 0.5 = 6$ ，利用卡方適合度檢驗，其卡方值為 0.20，小於 95% 信心水準理論值 3.84，以三個功能性分子標幟篩選出之株數符合期望值。

#330-36 家系的子代中，發生了一些未知的因素，使得 *Hdl* 異質結合基因遺失，全部皆為越光同質結合體，且抽穗期為 71 天，較其他三株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 為晚，故不使用此家系之子代。

### 全基因體之背景篩選

前景篩選過的 #286-14-A23、#286-23-A16、#286-23-A24、#286-85-A4、#286-85-A6、#286-85-A12、#286-85-A27 與 #286-85-A41 共八株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>，進行 87 個全背景分子標幟的篩選，最後挑選出 #286-14-A23 與 #286-85-A27 兩株進行於 98 年第一期作進行自交，以產生帶有三個基因同質結合體 (*hd1 hd1/Hd6 Hd6/ehd1 ehd1*) 的 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>，和回交至越光產生 BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>，以增加越光之基因體。其中，#286-14-A23 與 #286-85-A27 除了三個目標基因之外，分別帶有 92.6% 與 90.8% 的越光基因體(圖十二)。BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 應帶有越光基因體的期望值為 93.75%，如同 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代時，在以先挑選 *Hd1hd1 / Hd6hd6 / Ehd1ehd1* 為前提之下，造成鄰近之染色體片段亦為異質結合體，但扣除掉使篩選產生偏離的三個目標基因所在的染色體(第三、第六與第十條染色體)時，#286-14-A23 與 #286-85-A27 帶有越光基因體比例皆為 95.3%，高於理論期望值。

12 條染色體中共 87 個背景分子標幟的分析，由個別染色體來觀察，#286-14-A23 在第一條染色體 9 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 8 個，比例為 88.9%；第二條染色體 9 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 9 個，比例為 100%；第三條染色體 11 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 7 個，比例為 63.6%；第四條染色體 7 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 5 個，比例為 71.4%；第五條染色體 7 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 6 個，比例為 85.7%；第六條染色體 6 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 5 個，比例為 83.3%；第七條染色體 7 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 5 個，比例為 71.4%；第八條染色體 7 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 7 個，比例為 100%；第九條染色體 5 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 5 個，比例為 100%；第十條染色體 6 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 3 個，比例為 50.0%；第十一條染色體 6 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 6 個，比例為 100%；第十二條染色體 7 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 7 個，比例為 100% (表七)。

#286-85-A27 在第一條染色體 9 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 7 個，比例為 77.8%；第二條染色體 9 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 9 個，比例為 100%；第三條染色體 11 個分子標幟中，越光同質結合



體之分子標幟共有 9 個，比例為 81.8%；第四條染色體 7 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 6 個，比例為 85.7%；第五條染色體 7 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 4 個，比例為 57.1%；第六條染色體 6 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 1 個，比例為 16.7%；第七條染色體 7 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 7 個，比例為 100%；第八條染色體 7 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 7 個，比例為 100%；第九條染色體 5 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 5 個，比例為 100%；第十條染色體 6 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 3 個，比例為 50.0%；第十一條染色體 6 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 6 個，比例為 100%；第十二條染色體 7 個分子標幟中，越光同質結合體之分子標幟共有 7 個，比例為 100%（表七）。

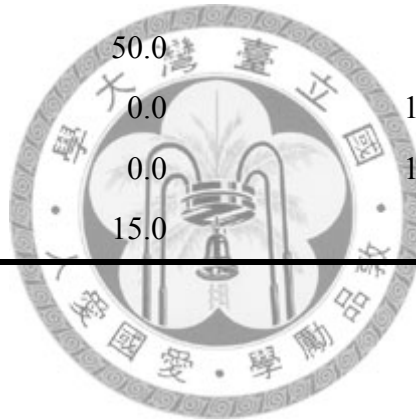
由表七與圖十二可以得知，#286-14-A23 在第二、第八、第九、第十一與第十二條染色體，已置換成越光的背景，在第三、第四、第六、第七與第十條染色體，異質結合體仍多，原因為上一代 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 篩選時，在這五條染色體中，帶有異質結合體的比例較其他染色體來的高(表五)，且在第十條染色體 *Ehd1* 周遭區域，帶有異質結合的範圍也較大，使得置換回越光背景的效率較低。而 #286-85-A27 在第二、第七、第八、第九、第十一與第十二條染色體，已置換成越光的背景，在第一、第三、第五、第六與第十條染色體，異質結合體仍多，原因為上一代 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 篩選時，在這五條染色體中，帶有異質結合體的比例較其他染色體來的高(表五)，且在第六條染色體 *Hd1* 與第十條染色體 *Ehd1* 周遭區域，帶有異質結合的範圍也較大，使得置換回越光背景的效率較低。

調查兩親本與 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 的抽穗期天數（表八），越光為 54 天，台農 67 號為 88 天，#286-14-A23 為 64 天、#286-85-A27 為 62 天，背景分別帶有 92.6%與 90.8%越光基因體（85.1%與 81.6%越光同質結合體）。在 *Hd1*、*Hd6*、*Ehd1* 三個抽穗期基因中，越光基因型為 *Hd1Hd1/hd6hd6/Ehd1Ehd1*，因此兩株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 之基因型為 *Hd1hd1/Hd6hd6/Ehd1ehd1*，此兩株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 個體較越光延遲約 8~10 天，是以台農 67 號之 *hd1*、*Hd6*，和 *ehd1* 可以延遲越光之抽穗，但因兩光週期性基因為 *Hd1hd1/Ehd1ehd1*，仍為光敏感，較台農 67 號早抽穗。

表 七、兩株篩選過後的 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 之十二條染色體分析。

Chr	# 286-14-A23		# 286-85-A27	
	homozygote of K <sup>a</sup> (%)	heterozygote(%)	homozygote of K (%)	heterozygote(%)
1	88.9	11.1	77.8	22.2
2	100.0	0.0	100.0	0.0
3	63.6	36.4	81.8	18.2
4	71.4	28.6	85.7	14.3
5	85.7	14.3	57.1	42.9
6	83.3	16.7	16.7	83.3
7	71.4	28.6	100.0	0.0
8	100.0	0.0	100.0	0.0
9	100.0	0.0	100.0	0.0
10	50.0	50.0	50.0	50.0
11	100.0	0.0	100.0	0.0
12	100.0	0.0	100.0	0.0
total	85.1	15.0	81.6	19.0

<sup>a</sup> Koshihikari genome



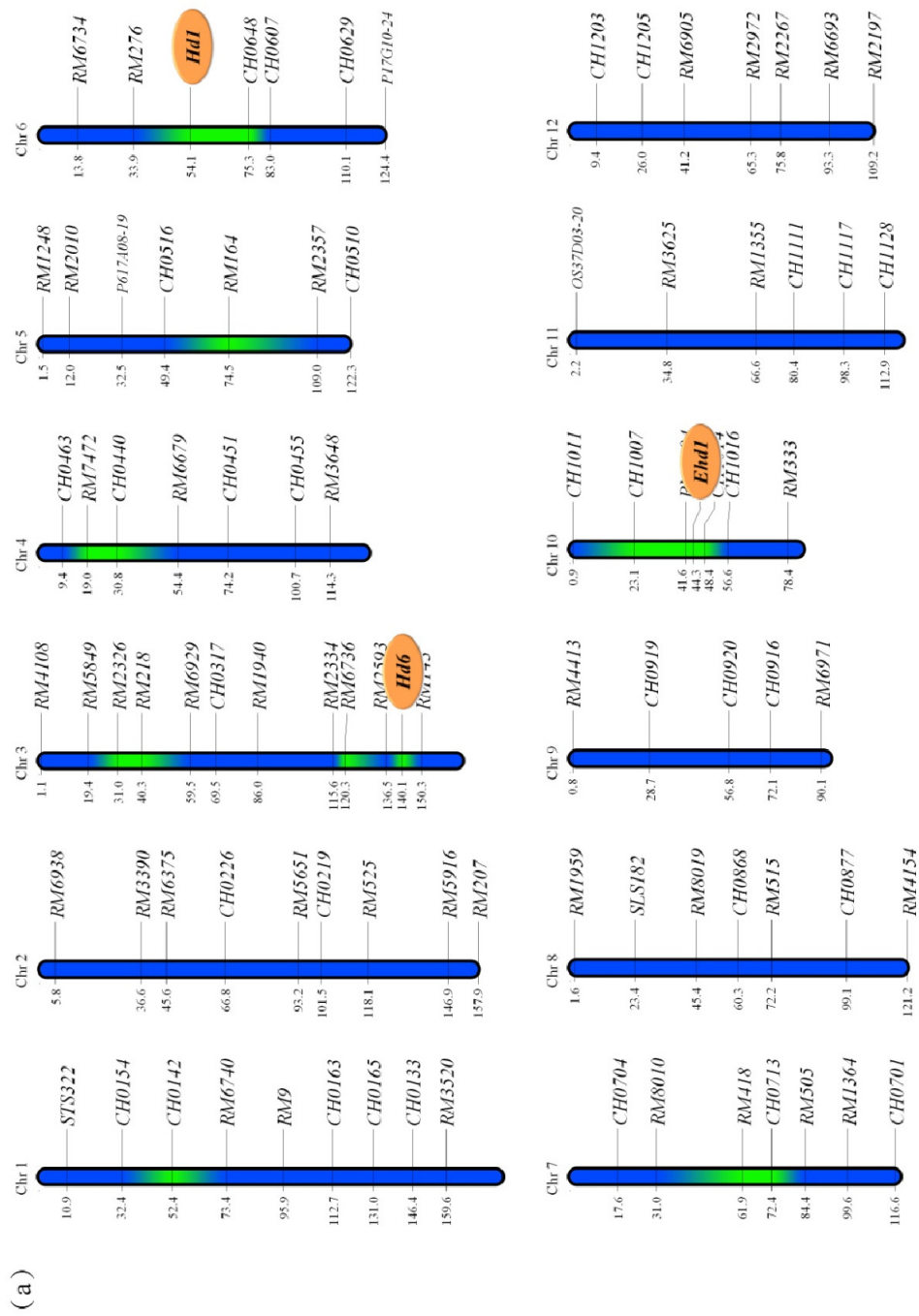


圖 十三、#286-14-A23 與 #286-85-A27 基因體結構分析 (a) #286-14-A23 (b) #286-85-A27。藍色背景代表越光同質結晶體，而綠色代表異質結晶體。(待續)

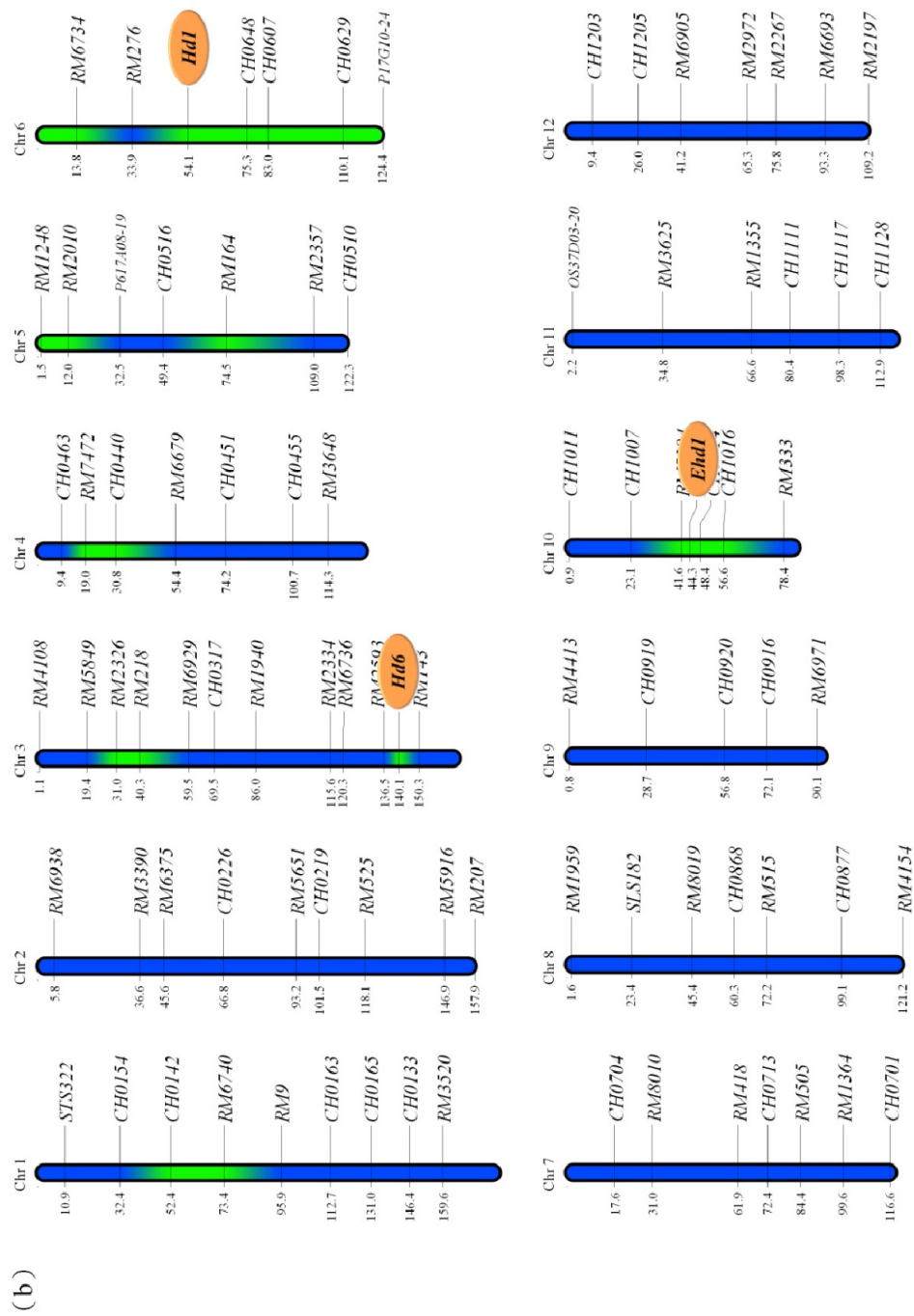


圖 十三、#286-14-A23 與 #286-85-A27 基因體結構分析 (a) #286-14-A23 (b) #286-85-A27。藍色背景代表越光同質結合體，而綠色代表異質結合體。(續)

表 八、兩親本與篩選過後的兩株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 之抽穗天數。

	Koshihikari	TNG67	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	
			# 286-14-A23	# 286-85-A27
Days to heading	54	88	64	62

2009/02/09 seeding



## 伍、討論

根據六個已選殖的抽穗期基因，利用定序的方式於越光與台農 67 號檢視其異同，發現有三個基因相同，分別為 *Hd3a*、*Ghd7* 與 *SE5*，而另外三個基因不同，為 *Hd1*、*Hd6* 與 *Ehd1* 且帶有功能上的序列差異，因此利用此三個台農 67 號之基因調整越光抽穗期。根據此三個基因的差異設計功能性分子標幟以利於前景篩選，其中以 *Hd1* 之 1901 bp 插入，設計 indel 形式的功能性分子標幟；以 *Hd6* 之 SNP 設計 CAPs 形式的功能性分子標幟；以 *Ehd1* 之 SNP 設計 dCAPs 形式的功能性分子標幟；且開發 87 個 SSR 與 indel 多型性分子標幟供背景篩選之用，其平均距離為 17.3 cM。應用以上三個功能性分子標幟與 87 個多型性分子標幟於 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 與 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 各世代的篩選，由 283 株 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 中挑選出三株當做父本進行回交越光，64 株 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 中挑選出四株當做父本進行回交越光，246 株 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 中挑選出 #286-14-A23 與 #286-85-A27，皆為 *Hd1hd1 / Hd6hd6 / Ehd1ehd1*，其越光基因體背景分別為 92.6% 與 90.8%，進行自交與回交，期望不同抽穗期的越光近似同源系，擁有越光優良米質且適合台灣地區種植。

### 水稻品種地理分布與其抽穗期

根據 Izawa (2007) 分析不同地區粳稻的對光週期的敏感程度，推測在高於北緯 31° 的水稻品種，具有很強的光週期敏感性，在低於北緯 31° 的粳稻品種，具有微弱的光週期敏感性，而在約北緯 25° 的地區，粳稻品種幾乎不具有光週期敏感性。把種植在北緯 31° 以上帶有很強光週期敏感性的品種，如越光與 Nipponbare，種植在台灣時，因自然日照長短的影響，很快就抽穗。然而台灣水稻育種是以一、二期作連續育種方式育成，水稻品種之選育跨越一、二期作，因此對光期較為敏感之基因型皆被淘汰，僅留下對光期較不敏感之基因型。

1899 年之前，台灣的水稻種原皆為大陸移民攜入的私型水稻，但日人引進原為溫帶種植的粳稻，因其帶有很強的光週期敏感性，使得水稻在尚未達到足夠的營養生長就提前抽穗，造成低產低品質的現象，在短時間之內無法增進台灣的稻作生產 (Iso, 1963; Saito *et al.*, 2009)，而這個問題直到 1936 年台中 65 號育成之後才被克服。台中 65 號由日本兩個粳稻品種龜治 (Kameji) 與神力 (Shinriki) 雜

交選育而來，具有對光週期不敏感的特性，使稈稻能夠適應台灣的生長環境，且在 1940 年至 1980 年代，成為大多台灣優良稈型水稻的親本。

在張等人 (2006) 的研究，在 2004 年一期作利用 10、11、12、13、14 與 15 個小時的日長處理，種植在試驗田中，分析九個水稻品種對於抽穗期的反應，以越光在 6 種不同日長處理下之抽穗日數平均最短，為 70.1 天，但變異係數則為最大，為 15.6%；而台農 67 號之抽穗日數平均 88.8 天，變異係數範圍則是在 2.9%。而本試驗中，BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代種植時期為 2009 年一期作，而越光的抽穗日數僅有 54 天，推測本試驗種植在溫室，而光線的遮蔽率較高，造成日照不足，促進越光提早抽穗。

Doi 等人 (2004) 發現台中 65 號在 *Hd1* 與 *Ehd1* 基因皆為喪失功能，為光週期不敏感性品種，Saito 等人 (2009) 分析 50 個台灣稈稻品種、1 個印尼稈稻品種與 6 個私稻品種、4 個孟加拉稈稻品種與 6 個私稻品種、21 個大陸稈稻品種與 2 個菲律賓水稻研究中心的私稻品種，發現台中 65 號形式的 *ehd1* 只存在台灣的品種內，50 個台灣品種有 46 個 *ehd1* 喪失功能，推測種植在台灣的稈型水稻，帶有喪失功能的 *ehd1*，可適應台灣兩期作不同的栽培環境。而本試驗中，台農 67 號也帶有喪失功能的 *ehd1*，推測可以順利的調整越光的抽穗期，延長營養生長期。在 Nishida 等人 (2001) 與 Ichitani 等人 (2002) 的研究中，發現 *Hd1* 與 *Ehd1* 雙重突變體，比 *Ehd1* 突變體延遲抽穗的效應更大，而在本試驗中，台農 67 號 *Hd1* 與 *Ehd1* 皆喪失功能，推測把台農 67 號兩個基因順利導入越光時，可以摒除越光光週期敏感的特性，可在一、二期耕種。

#### 越光與台農 67 號在抽穗期基因之異同

水稻調控抽穗期基因 *Hd1*、*Hd3a*、*Hd6*、*Ehd1*、*Ghd7* 與 *SE5* 已被選殖，並探討在抽穗期途徑中的功能，在本試驗中經由定序實驗證明，在越光與台農 67 號有三個相同的基因，分別為 *Hd3a*、*Ghd7* 與 *SE5*。從 *Hd3a* 定序的結果發現越光、台農 67 號與 Nipponbare，皆為相同的對偶基因，推測可能是種原太過相近，變異程度不大。另外，經過基因內部的序列比對，發現有 6 種形式的對偶基因，除了與 Kasalath 相同的對偶基因造成最後一個胺基酸的改變之外，但不會造成胺基酸序列的改變，*Hd3a* 為水稻中重要的開花素，推測變異程度過大時，則容易被人為選拔

所淘汰，間接證實 Hd3a 的功能在主要栽培品種中，具有高度的保守性 (Kojima *et al.*, 2002; Tamaki *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2009)。從 *Ghd7* 序列研究中發現，越光、台農 67 號與 Nipponbare 皆為部分功能的 *Ghd7-2* 對偶基因，推測在日本本土種植時，大部分品種帶有較強的光週期敏感性，此時抽穗期的兩個主要途徑 *Hd1* 與 *Ehd1* 基因皆有功能，外在光週期是屬於長日的狀態，而 *Hd1* 會抑制開花，此時需靠 *Ehd1* 的表現而誘導開花，如果 *Ghd7* 為具有全部功能的 *Ghd7-1* 或 *Ghd7-3* 時，則長日的表現會抑制 *Ehd1* 的表現，使抽穗受到抑制，而抽穗兩個主要路徑中，*Hd1* 抑制開花而 *Ehd1* 表現被 *Ghd7* 抑制，抽穗日期則會延後許久，甚至不會抽穗 (Izawa, 2007; Xue *et al.*, 2008)。從越光、台農 67 號與 Nipponbare 的定序結果中得知，三個品種皆為正常功能的 *SE5*，而 *se5* 為一個物理誘變產生的突變體所找到的基因，基因功能與光合色素的合成有關，在 *se5* 突變體中發現，植株無論是在長日還是短日的光週期，甚至是 24 小時全日照處理下，完全喪失對於光週期的感應，在約 40 多天即抽穗，*SE5* 推測在育種過程中，即便有突變體產生，也會因為營養生長期過短而被淘汰 (Izawa *et al.*, 2000; 2002)。

越光與台農 67 號在 *Hd1*、*Hd6* 與 *Ehd1* 三個基因中，各為不同功能的對偶基因，其中，*Hd1* 具有兩個功能，在短日照環境下，會促進抽穗，使抽穗期提早，長日照的環境下，會延遲抽穗，使抽穗期延後 (Yano *et al.*, 2000)；而 *Ehd1* 會誘導水稻開花素基因 *Hd3a* 的表現下，進而促進抽穗 (Doi *et al.*, 2004)；*Hd6* 在長日下會延遲抽穗 (Takahashi *et al.*, 2001)。而台農 67 號的 *hd1* 與 *ehd1* 喪失基因功能，具有功能的 *Hd6* 可在長日的情況下延遲抽穗，為一個良好調整越光抽穗期的種原。越光的食味品質優良，食用、經濟價值甚高，目前有許多案例利用分子輔助選種的方式導入特定基因進入越光，例如 Wang 等人 (2005) 利用私稻品種 IR24，導入半矮性 *sd1* 基因進入越光，發展半矮性的越光近似同源系，可避免水稻因強風而倒伏；Ashikri 等人 (2005) 利用私稻 Habataki，導入影響穀粒數目的 *Gn1* 基因進入越光，可增加越光收穫量。在本試驗中使用分子標幟輔助選種，可望成功導入三個台農 67 號的對偶基因進入越光中，藉以調整越光抽穗期，建立不同越光近似同源系為光不敏感，適於一、二期作栽培，有不同抽穗期適於不同地區栽培，以維持越光的品質與產量。



## 功能性分子標幟之前景選拔

回交育種中，無法利用外表型直接選拔隱性基因，如要導入隱性基因，需選拔異質結合基因，並在每次回交之餘，還須要另外再做一個世代的後裔測試，從後代的分離推斷前一個世代是否為該留下的異質結合體，但利用功能性分子標幟直接當做篩選的依據時，可直接判斷個體是否帶有異質結合體，大幅度的減少種植空間與後裔測試的時間。在本試驗中，每一個子代皆無法由抽穗日數直接判斷，甚至有些子代比親本越光還來的早抽穗，但利用本試驗設計的功能性分子標幟當做篩選依據，很容易的就能直接判別出該基因是何種的對偶基因（圖八、圖九、圖十）。

與傳統外表型育種相比，使用分子輔助選種時，可減少試驗的流程，並節省經費，而本試驗利用三個抽穗期基因當作標的，直接由功能性分子標幟篩選，直接即可判斷，而抽穗日數調查在本試驗中，無法當作篩選的依據。本試驗的在三個世代中，只需要利用育苗盤種植，待 3~6 葉齡時剪取葉片抽取 DNA，進行前景與背景的篩選，在篩選  $BC_1F_1$  時，共有 283 株，最後篩選剩下 3 株；篩選  $BC_2F_1$  時，共有 64 株，最後篩選剩下 4 株；篩選  $BC_3F_1$  時，共有 246 株，最後篩選剩下 2 株，留下帶有標的基因的個體，大幅度的減少田間的使用與花費。

將 SNP 轉成 CAPs 和 dCAPs 形式的功能性分子標幟時，因其經過限制酵素的作用，會有限制酵素酶切不完全之虞，需加考慮，在本試驗中，子代於前景篩選時，欲保留異質結合的個體，故可將 CAPs 和 dCAPs 酶切的片段設計在貢獻親上，只需要有酶切到，就可以在條帶上看到兩個條帶，不僅可以縮短限制酶作用的時間，更不必擔心有誤判的情形發生，增加 CAPs 與 dCAPs 基因型鑑定之效能。

## 越光與台農 67 號之多型性分子標幟的建立

本試驗背景篩選的多型性分子標幟來源有三個，本實驗室已篩選過於私種之間具有多型性的 SSRs 分子標幟共 382 個，然在越光與台農 67 號之間具有多型性的只有 21 個，多型性的比例為 5.5%；利用私稻 93-11 與粳稻 Nipponbare 比對的 indel 資訊設計多型性分子標幟，篩選條件設定為差異超過 20 bp、插入或缺失形態為簡單重複序列，一共設計 155 組，可利用在越光與台農 67 號之間的有 35 個，

多型性比例為 22.6%；參考 Matsubara 等人(2008b)研究中使用 McCouch 等人(2002) SSR 分子標幟與其自行開發的 indel 分子標幟，本試驗一共使用 55 個於稉稻越光和稉稻 Nipponbare 具有多型性之分子標幟，在越光與台農 67 號之間共有 31 個分子標幟具有多型性，其中包括 28 個 SSR 與 3 個 indel，多型性比例為 56.4%。有以上可以得知，利用私稉之間具有多型性的分子標幟使用在稉稉之間時，多型性比例降低，只有 5.5%；自行設計的多型性分子標幟的比例提高至 22.6%；但由其他組合的稉稻越光與稉稻 Nipponbare 之間之多型性分子標幟應用在本試驗中，多型性比例最高，達 56.4%。因此在稉稻與稉稻之間具有多型性的分子標幟，不同稉稻與稉稻之間，會有較高的多型性比例。是以，使用於本試驗 87 個於越光與台農 67 號間具有多型性的分子標幟，可應用於其他私稉雜交之連鎖分析與分子輔助育種，更甚者，大部分的分子標幟可應用於稉稉雜交試驗。

#### 多型性分子標幟之背景篩選

本試驗分子標幟密度之平均遺傳距離為 17.3 cM，最小的距離在第三條染色體 RM2334 與 RM6736 之間的 4.7 cM，最大的距離在第五條染色體 RM164 與 RM2357 之間的 34.5 cM。其中，最大距離區間發生兩次互換而產生的誤判機率最大為 3.0% ( $0.1725 \times 0.1725 \times 100\%$ )，造成兩分子標幟中間帶有一小區段異質結合體。避免誤選子代，可利用再回交一代以回復越光同質基因體背景，或是於此區間開發更多的多型性分子標幟，例如使用 SNPs，以 Hour 等人(2007)偵測台農 67 號與 Nipponbare 之間的 SNPs，應用在偵測台農 67 號與越光。

背景篩選效率在各世代 ( $BC_1F_1$  為 76.5%與 79.6%， $BC_2F_1$  為 87.2%、84.0%、80.9%與 83.0%， $BC_3F_1$  為 92.6%與 90.8%)，大致上與回交理論標準效率不相上下 ( $BC_1F_1$  為 75%、 $BC_2F_1$  為 87.5%、 $BC_3F_1$  為 93.25%)，利用分子輔助選種看似並沒有特別突出，推測與三個前景篩選基因有關，由於一次導入三個抽穗期基因，經過前景篩選之後，可以做背景選拔的植株就只剩下八分之一，且還要考量到生長勢強弱等問題，可分析的株數就變少。在三個目標基因的前景篩選的前提下，從兩株  $BC_3F_1$  來看，基因所在的第三條、第六條與第十條染色體，置換的速度就慢了許多，大部分仍為異質結合區(圖十二、十三)，這也是影響篩選效率的最大因素(表七)，然而在第二條、第八條、第九條、第十一條與第十二條染色體

中，已完全置換成越光的背景，而在第一條、第四條、第五條與第七條只帶有少部分的異質結合區域，因此，當扣除三個目標基因的染色體計算越光基因體背景，為了降低因篩選異質結合體造成遺傳拖曳的問題，在以後相關堆疊基因的試驗，可利用某一個早世代（ $BC_1F_1$  或  $BC_2F_1$ ）產生大量的族群，並以緊鄰目標基因的分子標幟進行重組選拔，可解決目標基因染色體周遭輪迴親導入緩慢的問題。#286-14-A23 與 #286-85-A27 皆帶有 95.3% 的越光基因體，實際比理論值 93.25% 佳。

使用功能性分子標幟可直接對目標基因做前景篩選，且使用在分子輔助選種過程中，可以避免誤判的情況發生，而篩選的結果也非常直接與明顯，適合利用在大量子代分析上；另外使用重組篩選的分子標幟，可減少連鎖拖曳的現象，例如本試驗中距離 *Hd6* 基因 3.6 cM 的 *RM2593* 與 10.2 cM 的 *RM143* 兩個分子標幟，可當做重組篩選的分子標幟；距離 *Ehd1* 基因 2.7 cM 的 *RM5304* 與 4.1 cM 的 *CH1014*，但在本試驗中，因為開發分子標幟的密度尚不足以涵蓋到 *Hd1* 基因重組篩選的部分，且植株數量過少，在基因與重組篩選分子標幟之間，較難產生互換，以減少連鎖拖曳的現象，可增加某一個早世代（ $BC_1F_1$  或  $BC_2F_1$ ）產生大量的族群來解決這個問題。

因此，在重組篩選與背景篩選的部分，需要一個大量族群的世代，以提供較好的置換背景，參考 Neeraja 等人在 2007 年的試驗， $BC_1F_1$  的數目有 697 株，並且只導入一個基因，以兩個世代分別進行重組篩選，而本試驗有三個目標基因，減少同時產生較好背景的機率，可以數個世代分別進行重組篩選，往後在進行類似試驗時，可擴大試驗的族群以解決此類問題。

#### 未來展望

由  $BC_3F_1$  的分析中可得知，#286-14-A23 與 #286-85-A27 為 *Hd1hd1 / Hd6hd6 / Ehd1ehd1*，且帶有較高之越光基因體，分別為 92.6% 與 90.8%。而本試驗的目的在於挑選帶有不同台農 67 號抽穗期基因同質結合體（*hd1 hd1*、*Hd6 Hd6* 或 *ehd1 ehd1*）的個體，且背景為越光同質結合體，發展出帶有不同抽穗期基因的越光近似同源系，藉以調整越光抽穗期，並保留越光的優良米質特性，並提高產量等性狀。

本試驗後續的試驗中於 98 年第一期作，利用 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 自交產生 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 種子，#286-14-A23 品系產生 419 顆 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 種子，#286-85-A27 品系產生 393 顆 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 種子，將於 98 年第二期作栽培 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 世代，之後利用三個基因前景篩選的功能性分子標幟，挑選帶有三個基因同質結合體的個體 (*hd1hd1 / Hd6Hd6 / ehd1ehd1*)，或是挑出分別帶有單一個基因(*hd1 hd1*、*Hd6 Hd6*、或 *ehd1 ehd1*)、兩個基因(*hd1hd1 / Hd6Hd6*、*hd1hd1 / ehd1ehd1*、或 *Hd6Hd6 / ehd1ehd1*) 等個體，發展出帶有越光背景但具有不同抽穗期的近似同源系。於 98 年第一期作 #286-14-A23 和 #286-85-A27 與越光回交，分別產生 241 顆 #286-14-A23 品系和 267 顆 #286-85-A27 BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub> 種子，繼續增加越光背景的回復，將於 98 年第二期作栽種，之後進行前景與背景篩選，得到三個基因為異質結合體的個體，流程如同前幾個世代所示，可望更加提升越光基因體的比例。

期望在 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 自交產生 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 族群中，或是 BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub> 中挑選帶有更高越光基因體比例的個體，自交產生 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 族群中，挑選到三個前景篩選基因為同質結合體 (*hd1hd1/Hd6 Hd6/ehd1 ehd1*) 的個體，且背景帶有高比例越光基因體，達到延長營養生長期，並成功調整越光抽穗期，得到具有越光優良米質特性但適合台灣兩期作栽培環境生長的近似同源系。而未來還必須針對這些近似同源系做各項農藝性狀的調查，例如株高、穗長、穗數、一穗粒數、千粒重、食味品質...等等，經過一連串的調查，選出食味品質、米粒外觀與產量可媲美或優於越光之品系，且可大面積推廣於一、二期作栽種。

本試驗初期開發分子標幟時，雖然在尋找和探勘於越光和台農 67 號之間具有多型性的分子標幟，遇到很多困難，但拜水稻序列完全解序之賜，提供許多資訊參考，建立了一套可以使用一般電泳即可分析的 SSR 和 indel 分子標幟，並不需要特殊的儀器即可進行分析，降低應用分子輔助選種所耗費的經費。此 87 個 SSR 和 indel 分子標幟應用在其他稉稻與稉稻品種之間，相信會有較高多型性的比例，可廣泛的應用在私稉或是稉稉之間的雜交，進行基因定位、QTL 分析和分子輔助選種。

## 陸、參考文獻

- 矢野昌裕 (Yano, M.)。2007。水稻有用基因發掘和基因體育種策略。台日農業生物技術應用研討會。台北市。
- 台灣省政府糧食處。1997。台灣主要稻作品種外觀辨識參考手冊。台灣省政府糧食處。台北市。
- 台灣稻作資訊系統, TRIS。台灣。http://210.69.150.233:8080/commend/index.jsp
- 吳田泉。1993。臺灣農業史。自立晚報社。台北市。
- 沈宗瀚。1963。台灣農業之發展。臺灣商務印書館。台北市。
- 林富雄。2006。水稻產量、品質及抗病蟲害育種的回顧及展望。作物、環境與生物資訊 **3**: 285-296。
- 郭益全主撰。1999。稻之遺傳及細胞遺傳之研究。載於張彩泉主編, 台灣稻作發展史。台灣省政府農林廳。
- 曾東海主撰。1999。稈稻。載於張彩泉主編, 台灣稻作發展史。台灣省政府農林廳。
- 張瑪利、羅正宗、劉景平。2006。日長對水稻栽培品種抽穗及農藝性狀之影響。作物、環境與生物資訊 **3**: 147-158。
- 黃真生。1979。水稻品種台農 67 之育成。中華農業研究 **28**: 57-66。
- 獨立行政法人 農業・食品產業技術綜合研究機構 作物研究所。日本。  
<http://ineweb.narcc.affrc.go.jp/index.html>
- 盧虎生、劉韻華、中央氣象局。2006。臺灣優質水稻栽培之環境挑戰與因應措施。作物、環境與生物資訊 **3**: 297 - 306。
- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S.Y., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E.R., Qian, Q., Kitano, H., and Matsuoka, M. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* **309**: 741-745.
- Causse, M.A., Fulton, T.M., Cho, Y.G., Ahn, S.N., Chunwongse, J., Wu, K., Xiao, J., Yu, Z., Ronald, P.C., Harrington, S.E., Second, G., McCouch, S.R., and Tanksley, S.D. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific

backcross population. *Genetics* **138**: 1251–1274.

Chang, T.T. 1976. The origin, evolution, cultivation, dissemination, and diversification of Asian and African rices. *Euphytica* **25**: 425-441.

Chang, T.T., Li, C.C., and Vergara, B.S. 1969. Component analysis of duration from seeding to heading in rice by the basic vegetative phase and the photoperiod-sensitive phase. *Euphytica* **18**: 79-91.

Collard, B.C. and Mackill, D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**: 557-572.

Collard, B.C., Vera Cruz, C.M., McNally, K.L., Virk, P.S., and Mackill, D.J. 2008. Rice molecular breeding laboratories in the genomics era: current status and future considerations. *Int J Plant Genomics* **2008**: 524847

Diamond, J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* **418**: 700–707.

Doi, K., Yoshimura, A., and Iwata, N. 1998. RFLP mapping and QTL analysis of heading date and pollen sterility using backcross populations between *Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steud. *Breed Sci* **48**: 395–399.

Doi, K., Izawa, T., Fuse, T., Yamanouchi, U., Kubo, T., Shimatani, Z., Yano, M., and Yoshimura, A. 2004. *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT-like* gene expression independently of *Hd1*. *Genes Dev* **18**: 926-936

Feltus, F.A., Wan, J., Schulze, S.R., Estill, J.C., Jiang, N., and Paterson, A.H. 2004. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies *indica* and *japonica* genome alignments. *Genome Res* **14**: 1812-1819.

Harushima, Y., Yano, M., Shomura, A., Sato, M., Shimano, T., Kuboki, Y., Yamamoto,

- T., Lin, S.Y., Antonio, B.A., Parco, A., Kajiya, H., Huang, N., Yamamoto, K., Nagamura, Y., Kurata, N., Khush, G.S., and Sasaki, T. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F<sub>2</sub> population. *Genetics* **148**: 479-494.
- Hayama, R., Izawa, T., and Shimamoto, K. 2002. Isolation of rice genes possibly involved in the photoperiodic control of flowering by a fluorescent differential display method. *Plant Cell Physiol* **43**: 494-504.
- Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M., and Shimamoto, K. 2003. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* **422**: 719-722.
- Hopkins, W.G. and Hüner, N.P.A. 2002. *Introduction to plant physiology*, 3<sup>rd</sup> edition. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Hour, A.L., Lin, Y.C., Chou, T.Y., Li, P.F., Lu, W.F., Wei, F.J., and Hsing, Y.I. 2007. Detection of SNPs between Tainung 67 and Nipponbare rice cultivars. *Botanical Studies* **48**: 243-253.
- Ichitani, K., Inoue, H., Nishida, H., Okumoto, Y., and Tanisaka, T. 2002. Interactive effects of two heading-time loci, *Se1* and *Efl*, on pre-flowering developmental phases in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* **126**: 227-234.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based of the rice genome. *Nature* **436**: 793-800.
- Iso, E. 1963. Horai rice. Special Bulletin of the Yamaguchi Agricultural Experiment Station 16. Yamaguchi, Japan.
- Izawa, T. 2007. Adaptation of flowering-time by natural and artificial selection in *Arabidopsis* and rice. *J Exp Bot* **58**: 3091-3097.
- Izawa, T. 2008. Photoperiodic flowering in rice. *In* *Biology in the Genomics Era*. Rice

Biotechnology in Agriculture and Forestry **62**: 163-176.

Izawa, T., Oikawa, T., Tokutomi, S., Okuno, K., and Shimamoto, K. 2000. Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). *Plant J* **22**: 391-399.

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

Kim, S.L., Lee, S., Kim, H.J., Nam, H.G., and An, G. 2007. *OsMADS51* is a short-day flowering promoter that functions upstream of *Ehd1*, *OsMADS14*, and *Hd3a*. *Plant Physiol* **145**: 1484-1494.

Khush, G.S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol Biol* **35**: 25-34.

Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T., and Yano, M. 2002. *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol* **43**: 1096–1105.

Konieczny, A., and Ausubel, F.M. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* **4**: 403-410.

Kurata, N., Nagamura, Y., Yamamoto, K., Harushima, Y., Sue, N., Wu, J., Antonio, B.A., Shomura, A., Shimizu, T., Lin, S.Y., Inoue, T., Fukuda, A., Shimano, T., Kuboki, Y., Toyama, T., Miyamoto, Y., Kirihara, T., Hayasaka, K., Miyao, A., Monna, L., Zhong, H.S., Tamura, Y., Wang, Z.X., Momma, T., Umehara, Y., Yano, M., Sasaki, T., and Minobe, Y. 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genet* **8**: 365-372.

Lestari, P., Ham, T.H., Lee, H.H., Woo, M.O., Jiang, W., Chu, S.H., Kwon, S.W., Ma, K., Lee, J.H., Cho, Y.C., and Koh, H.J. 2009. PCR marker-based evaluation of the



eating quality of *japonica* rice (*Oryza sativa* L.). J Agric Food Chem **57**: 2754-2762.

Li, Z., Pinson, S.R.M., Stansel, J.W., and Park, W.D. 1995. Identification of quantitative trait loci (QTLs) for heading date and plant height in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet **91**: 374–381.

Lin, H.X., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Sasaki, T., and Yano, M. 2002. Identification and characterization of quantitative trait locus, *Hd9* controlling heading date in rice. Breed Sci **52**: 35-41.

Lin, H.X., Liang, Z.W., Sasaki, T., and Yano, M. 2003. Fine mapping and characterization of quantitative trait loci *Hd4* and *Hd5* controlling HD in rice. Breed Sci **53**: 51-59.

Lin, H.X., Yamamoto, T., Sasaki, T., and Yano, M. 2000. Characterization and detection of epistatic interactions of 3 QTLs, *Hd1*, *Hd2*, and *Hd3*, controlling heading date in rice using nearly isogenic lines. Theor Appl Genet **101**: 1021-1028.

Lin, S.Y., Sasaki, T., and Yano, M. 1998. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. Theor Appl Genet **96**: 997-1003.

Linh, L.H., Jin, F.X., Kang, K.H., Lee, Y.T., Kwon, S.J., and Ahn, S.N. 2006. Mapping quantitative trait loci for heading date and awn length using an advanced backcross line from a cross between *Oryza sativa* and *O. minuta*. Breed Sci **56**: 341-349.

Matsubara, K., Kono, I., Hori, K., Nonoue, Y., Ono, N., Shomura, A., Mizubayashi, T., Yamamoto, S., Yamanouchi, U., Shirasawa, K., Nishio, T., and Yano, M. 2008a. Novel QTLs for photoperiodic flowering revealed by using reciprocal backcross inbred lines from crosses between *japonica* rice cultivars. Theor Appl Genet **117**: 935-945.

Matsubara, K., Yamanouchi, U., Wang, Z.X., Minobe, Y., Izawa, T., and Yano, M.

- 2008b. *Ehd2*, a rice ortholog of the maize *INDETERMINATE1* gene, promotes flowering by up-regulating *Ehd1*. *Plant Physiol* **148**: 1425-1435.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., and Henikoff, S. 2000. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**: 439-442.
- McCouch, S.R., Kochert, G., Tu, Z.H., Wang, Z.Y., Khush, G.S., Coffman, W.R., and Tanksley, S.D. 1988. Molecular mapping of rice chromosome. *Theor Appl Genet* **76**: 815-829.
- McCouch, S.R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K.B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z., Xing, Y., Zhang, Q., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom, R., DeClerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D., and Stein, L. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* **9**: 199-207.
- Monna, L., Lin, X., Kojima, S., Sasaki, T., and Yano, M. 2002. Genetic dissection of a genomic region for a quantitative trait locus, *Hd3*, into two loci, *Hd3a* and *Hd3b*, controlling heading date in rice. *Theor Appl Genet* **104**: 772-778.
- Neeraja, C.N., Maghirang-Rodriguez, R., Pamplona, A., Heuer, S., Collard, B.C., Septiningsih, E.M., Vergara, G., Sanchez, D., Xu, K., Ismail, A.M., and Mackill, D.J. 2007. A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. *Theor Appl Genet* **115**: 767-776.
- Neff, M.M., Turk, E., and Kalishman, M. 2002. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet* **18**:613-615.
- Nishida, H., Okumoto, Y., Nakagawa, H., Ichitani, K., Inoue, H., and Tanisaka, T. 2001. Analysis of tester lines for rice (*Oryza sativa* L.) heading-time genes using reciprocal photoperiodic transfer treatments. *Ann Bot* **88**: 527-536.
- Oka, H.I. 1974. Experimental studies on the origin of cultivated rice. *Genetics* **78**:

475-486.

Park, S.J., Kim, S.L., Lee, S., Je B.I., Piao, H.L., Park, S.H., Kim, C.M., Ryu, C.H., Park, S.H., Xuan, Y.H., Colasanti, J., An, G., and Han, C.D. 2008. Rice *Indeterminate 1 (OsId1)* is necessary for the expression of *Ehd1 (Early heading date 1)* regardless of photoperiod. *Plant J* **56**: 1018-1029.

Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., and Coupland, G. 1995. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**: 847-857.

Saito, H., Yuan, Q., Okumoto, Y., Doi, K., Yoshimura, A., Inoue, H., Teraishi, M., Tsukiyama, T., and Tanisaka, T. 2009. Multiple alleles at *Early flowering 1* locus making variation in the basic vegetative growth period in rice (*Oryza sativa L.*). *Theor Appl Genet* (in press)

Shen, Y.J., Jiang, H., Jin, J.P., Zhang, Z.B., Xi, B., He, Y.Y., Wang, G., Wang, C., Qian, L., Li, X., Yu, Q.B., Liu, H.J., Chen, D.H., Gao, J.H., Huang, H., Shi, T.L., and Yang, Z.N. 2004. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiol* **135**: 1198-1205.

Takeuchi, Y., Ebitani, T., Yamamoto, T., Sato, H., Ohta, H., Hirabayashi, H., Kato, H., Ando, I., Nemoto, H., Imbe, T., and Yano, M. 2006. Development of isogenic lines of rice cultivar Koshihikari with early and late heading by marker-assisted selection. *Breeding Sci* **56**: 405-413.

Takeuchi, Y., Lin, S.Y., Sasaki, T., and Yano, M. 2003. Fine linkage mapping enables dissection of closely linked quantitative trait loci for seed dormancy and heading in rice. *Theor Appl Genet* **107**: 1174-1180.

Takahashi, Y., Shomura, A., Sasaki, T., and Yano, M. 2001. *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7922-7927.

- Takahashi, Y., Teshima, K.M., Yokoi, S., Innan, H., and Shimamoto, K. 2009. Variations in Hd1 proteins, *Hd3a* promoters, and *Ehd1* expression levels contribute to diversity of flowering time in cultivated rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4555-4560.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S., and Shimamoto, K. 2007. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* **316**: 1033-1036.
- Tsuji, H., Tamaki, S., Komiya, R., and Shimamoto, K. 2008. Florigen and the photoperiodic control of flowering in rice. *Rice* **1**: 25-35.
- Vergara, B.S. and Chang, T.T. 1985. The flowering response of the rice plant to photoperiod, 4<sup>th</sup> edition. International Rice Research Institute Press. Manila, Philippines.
- Wang, Z.X., Sakaguchi, S., Oka, Y., Kitazawa, N., and Minobe, Y. 2005. Breeding of semi-dwarf Koshihikari by using genomic breeding method. *Breeding Res* **7**: 217 (in Japanese).
- Xiao, J., Li, J., Yuan, L., and Tanksley, S.D. 1996. Identification of QTLs affecting traits of agronomic importance in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. *Theor Appl Genet* **92**: 230-244.
- Xu, Y., McCouch, S.R., and Zhang, Q. 2005. How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? *Plant Mol Biol* **59**: 7-26.
- Xue, W., Xing, Y., Weng, X., Zhao, Y., Tang, W., Wang, L., Zhou, H., Yu, S., Xu, C., Li, X., and Zhang, Q. 2008. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat Genet* **40**: 761-767.
- Yamamoto, T., Lin, H., Sasaki, T., and Yano, M. 2000. Identification of heading date quantitative trait locus *Hd6* and characterization of its epistatic interactions with *Hd2* in rice using advanced backcross progeny. *Genetics* **154**: 885-891.

Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T., Baba, T., Yamamoto, K., Umehara, Y., Nagamura, Y., and Sasaki, T. 2000. *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* **12**: 2473-2483.

Yano, M., Harushima, Y., Nagamura, Y., Kurata, N., Minobe, Y., and Sasaki, T. 1997. Identification of quantitative trait loci controlling heading date in rice using a high-density linkage map. *Theor Appl Genet* **95**: 1025-1032.

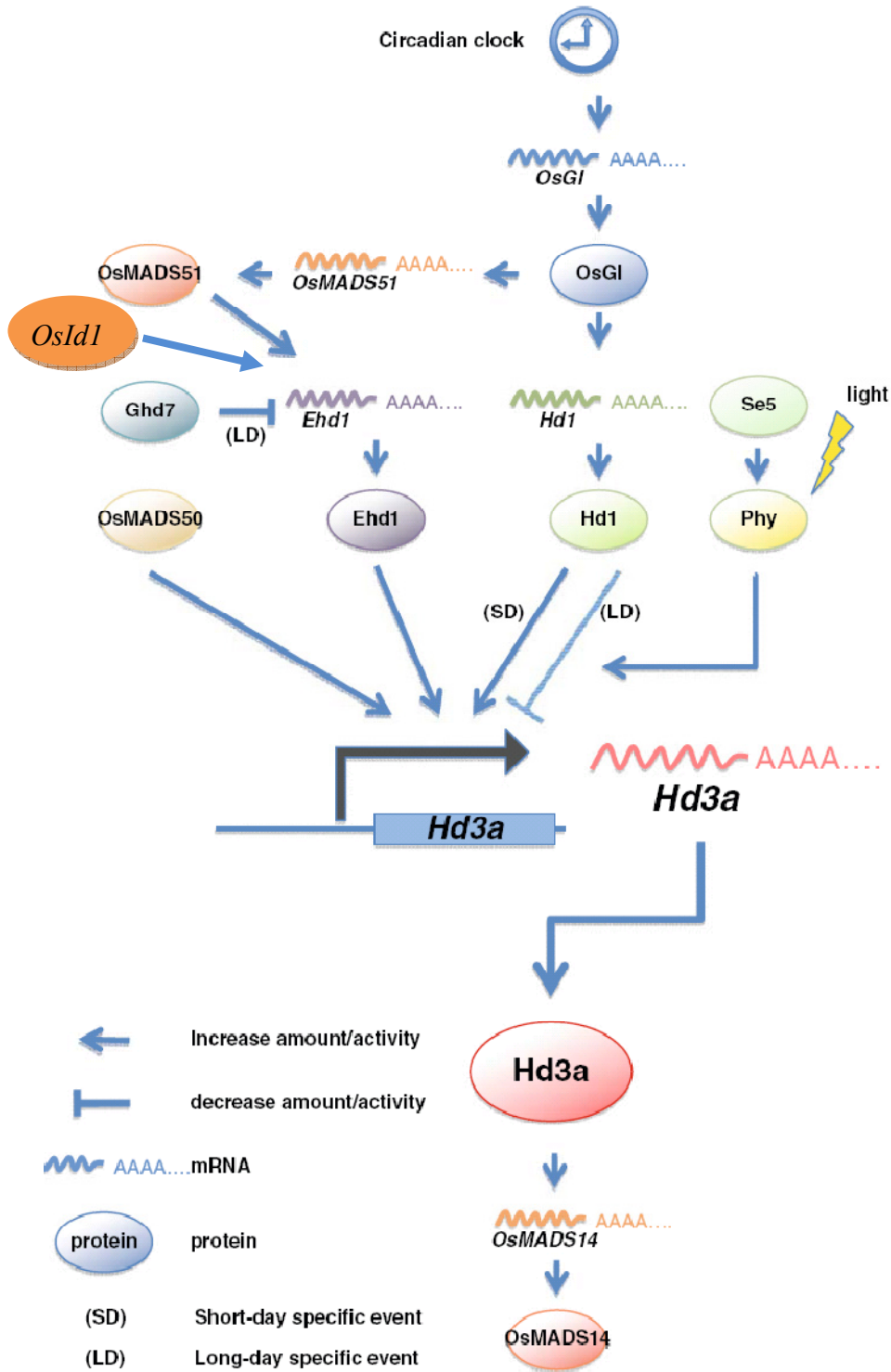
Yano, M., Kojima, S., Takahashi, Y., Lin, H., and Sasaki, T. 2001. Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant. *Plant Physiol* **127**: 1425-1429.

Yokoo, M. and Okuno, K. 1993. Genetic analysis of earliness mutations induced in the rice cultivar Norin 8. *Jpn J Breed* **43**: 1-11.



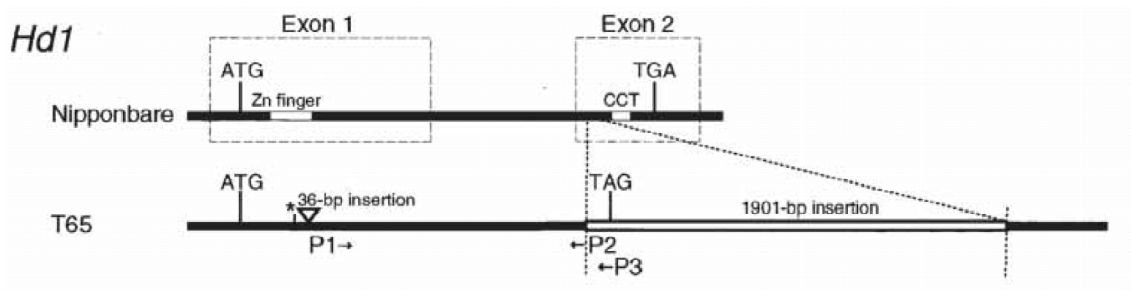
柒、附錄

附錄 一、水稻抽穗期分子途徑。



(修改自 Tsuji *et al.*, 2008)

附錄 二、兩種 *Hdl* 對偶基因的差異。



(Doi *et al.*, 2004)



附錄 三、兩種 *Hd6* 對偶基因的差異。

Nipponbare	ATT	GTG	TAG	CTT	CTT
89	I	V	*		
Kasalath	ATT	GTG	AAG	CTT	CTT
89	I	V	K	L	L 93

(Takahashi *et al.*, 2001)





附錄 四、*Ehd1* 對偶基因的差異。

G → R (*ehd1-T65*)

<i>Ehd1-Kas</i>	197	G	S	R	T	N	T	L	R	Q	F	A	V	N	H	D	G	E	D	K	A	V	P	K	K	I	L	G	I	K	V	K	H	D	T	E	V	A	S	H	L	Q	K	V	R	M	Q	L	K	K							
<i>Golden2</i>	183	R	V	K	V	D	N	T	P	E	L	E	R	R	F	V	Q	A	V	E	Q	L	G	I	D	K	A	V	P	S	H	I	L	E	I	M	G	T	D	C	L	T	H	N	I	A	S	H	L	Q	K	Y	S	H	R	K	H
<i>ARR1</i>	236	K	K	P	E	V	V	M	S	V	E	L	E	Q	F	V	A	V	N	Q	L	G	V	E	K	A	V	P	K	I	L	E	L	M	N	V	P	G	L	T	E	N	V	A	S	H	L	Q	K	Y	I	Y	L	R	R		
<i>Per1</i>	21	P	E	P	S	L	R	W	T	E	L	E	R	F	V	D	A	V	T	H	L	G	G	P	E	K	A	T	P	K	T	I	R	V	M	G	V	K	G	L	T	L	Y	H	L	K	S	H	L	Q	K	F	L	G	K	Q	P

(Doi *et al.*, 2004)



全文完