

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系研究所



碩士論文

Department of Agronomy

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

探討控制水稻抽穗日數基因與播種期之交感

Interaction between Genes Controlling Days to Heading  
and sowing dates in Rice

石瀨予

Ching-Yu Shih

指導教授：胡凱康 博士

Advisor: Kae-Kang Hwu, Ph.D.

中華民國 107 年 1 月

Jan 2018

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書



探討控制水稻抽穗日數基因與播種期之交互

Interaction between Genes Controlling Days to  
Heading and Sowing Dates in Rice

本論文係石澗予君(R04621120)在國立臺灣大學農藝所  
完成之碩士學位論文，於民國 107 年 1 月 30 日承下列考試  
委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

陳凱儀 國立台灣大學農藝學系副教授  
陳凱儀 博士

劉力瑜 國立台灣大學農藝學系教授  
劉力瑜 博士

胡凱康 國立台灣大學農藝學系副教授  
胡凱康 博士 (指導教授)



## 中文摘要

水稻的抽穗日數為影響產量的重要農藝性狀之一，不同品種因地理環境與栽培期作培育出最合適的抽穗日數以達到最佳產量。抽穗日數由多個效應不同的基因控制，有些基因與環境因子如日長及溫度具有交感效應。本試驗利用台稉 2 號與台中秈 10 號的雜交後 RILs，評估兩個播種期與四個功能性分子標誌 *Ehd1*、*Ehd4*、*Ghd7* 與 *Dth8* 基因與環境之間的交感作用，亦建構連鎖圖譜偵測在此族群中是否存在其他控制抽穗日數的 QTL。

分別對兩個播種期做多重迴歸分析，其中 *Ehd1*、*Ehd4* 與 *Dth8* 顯著影響兩個播種期抽穗日數的變異，*Ghd7* 只在較早播種期下顯著表現。在較早播種期下 *Ehd1*:*Ghd7*:*Dth8* 與較晚播種期下 *Ehd1*:*Dth8* 基因間交感統計上顯著。將兩個播種期與合併的多重迴歸分析中，播種期為影響抽穗日數變異最大的因子，其外表型解釋變異為 54.46%，除了在兩個播種期分別做多重迴歸分析結果得到的基因與基因交感效應，*Ehd4* 和 *Ghd7* 與播種期之間具有交感效應。QTL 分析與多重迴歸分析結果差異不大，除了 51.52 cM 上的 *Ghd7* 外，在 78 cM 上多偵測到 *qHD7*，推測此區間可能含有一個以上的基因，需要進一步利用染色體片段置換系驗證此觀察結果。在不同環境下評估基因表現有利於後續分子標誌輔助選種之應用，穩定表現的基因適用於廣泛區域的育種，與環境間具有交感的基因則可應用在特定地區品種之培育。

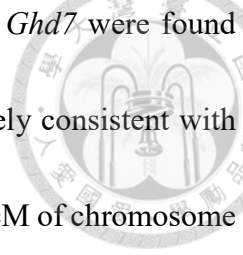
關鍵字：水稻、抽穗日數、多重迴歸分析、QTL 定位

## Abstract



Heading days is one of the important agronomic traits for seed production in rice. Rice cultivars have been bred to adapt to various environments and cropping systems in terms of optimum flowering time to maximize the grain yield. Heading days in rice is controlled by multiple quantitative genes, and some of these genes may have effects that interact with environmental factors such as photoperiod and temperature. In this study, we evaluated the heading days of a RILs population derived from a cross between Taiken 2 and Taichung Sen 10 under two sowing dates, and genotypes of four previously found heading days controlling genes *Ehd1*, *Ehd4*, *Ghd7*, and *Dth8* via functional markers to evaluate the interaction between genes and environments. We also constructed a genetic linkage map for this population to determine if there are other QTLs controlling heading days.

When analyzed separately, the results of multiple regression analysis showed that *Ehd1*, *Ehd4* and *Dth8* significantly affected heading days in both environments, while the effect of *Ghd7* was only statistically significant in the early sowing date. Genetic interactions of *Ehd1:Ghd7:Dth8* and *Ehd1:Dth8* were statistically significant in the early and late sowing date, respectively. When the heading days under both sowing dates were combined, the results of multiple regression analysis indicated the sowing date is the largest contributor to the phenotypic variance (54.46%). Besides the genetic



effects and interactions found in the separated analysis, *Ehd4* and *Ghd7* were found interacting with sowing dates. The result of QTL analysis was largely consistent with the multiple regression analysis except that *gHD7* position at 78.00 cM of chromosome 7 was mapped instead of the *Ghd7* located at 51.52 cM, suggesting that there may be more than one genes at chromosome 7 controlling heading days. Further study using chromosome segment substitution lines may be needed to verify this supposition. Evaluating genetic effects in different environments can contribute to marker assisted selection. Steadily detected genes can be used in general environments; however, genes having interactions with environments could be used for varieties developed for a certain sowing date.

Key word: *Oryza sativa* L, Heading days, multiple regression, QTL mapping



## 目錄

中文摘要.....	i
Abstract.....	ii
目錄.....	iv
圖目錄.....	vi
表目錄.....	vii
對照表.....	1
第一章 前言.....	3
第二章 前人研究.....	5
第一節 抽穗期相關研究.....	5
第二節 次世代定序.....	13
第三章 材料與方法.....	16
第一節 遺傳材料及栽培環境.....	16
1. 遺傳材料及外表型調查.....	16
2. 栽培環境因子.....	16
第二節 功能性分子標誌之建立與多重迴歸分析.....	18
1. 以 Taqman 系統對 <i>Ghd7</i> 做基因型判別.....	18
2. <i>Dth8</i> 基因定序及功能性分子標誌設計.....	19
3. 利用功能性分子標誌建立多重迴歸模型.....	20
第三節 文庫之製備流程及資料分析.....	21
1. 估計預期用於建構連鎖圖譜之分子標誌數量.....	21
2. Genomic DNA 萃取.....	21
3. 雙切酶切割.....	22
4. P1 adapter 及 Y adapter 連接酶反應.....	22
5. PCR 反應.....	23
6. 片段大小篩選 (Size selection).....	23
第四節 序列比對及 Variant calling.....	24
第五節 篩選建構連鎖圖譜的 SNP.....	24
第六節 連鎖圖譜建立及數量性狀基因座定位.....	25
1. 連鎖圖譜之建構.....	25
2. 數量基因座之定位.....	26
第四章 結果與討論.....	27
第一節 RILs 的抽穗日數變異.....	27
第二節 多重迴歸分析結果.....	28
1. 兩個播種期個別的多重迴歸分析結果.....	28
2. 四個抽穗期基因對抽穗日數之影響.....	31
3. 合併兩個播種期的分析結果.....	35

第三節	連鎖圖譜建構.....	38
1.	連鎖圖譜建構與分析.....	38
2.	不平衡分離現象.....	44
第四節	QTL mapping 分析結果.....	47
1.	早播種期與晚播種期之遺傳定位.....	47
2.	早播種期定位到 <i>Ghd7</i> 鄰近的 <i>qHD7</i> .....	50
3.	不同族群在不同環境下之遺傳定位比較.....	52
第五章	結論.....	55
參考文獻	.....	56
附錄	.....	67

## 圖目錄

圖一、每日日長變化.....	17
圖二、每日溫度變化.....	18
圖三、台稈 2 號/台中私 10 號 RILs 在早播種期 (左) 與晚播種期 (右) 的抽穗日數分布.....	27
圖四、台稈 2 號/台中私 10 號 RILs 族群在兩個播種期的抽穗日數散佈圖 .....	28
圖五、在早播種期的四個基因與晚播種期的三個基因中，按照基因型分類後得到 16 種跟 9 種對偶基因組合，每個組合下的抽穗日數變異.....	33
圖六、四個基因與播種期之間的交感效應圖.....	38
圖七、樣品間基因型相同比例之分布圖.....	39
圖八、樣品間基因型相同比例之常態分佈圖，虛線代表樣品間基因型相同比例為 0.93.....	39
圖九、刪除 TK2 對偶基因的比例為極端值的分子標誌在 12 條染色體的物理圖譜上波動情況.....	40
圖十、水稻 RILs 的 12 個連鎖群遺傳圖譜.....	43
圖十一、早播種期的抽穗日數 MIM 結果 .....	49
圖十二、晚播種期的抽穗日數 MIM 結果 .....	49
圖十三、在模式 Y~EHD1+EHD4+DTH8 條件下以 MIM 定位 QTL 在第七條染色體上的 LOD 值變化圖 .....	50
圖十四、在模式 Y~EHD1+EHD4+DTH8+QHD7 (MODEL 1) 條件下，第七條染色體上的 LOD 值變化 .....	51
圖十五、在模式 Y~EHD1+EHD4+DTH8+QHD7 (MODEL 2) 條件下，第七條染色體上的 LOD 值變化 .....	51





## 表目錄

表一、兩個播種期的氣候資料.....	17
表二、早播種期抽穗日數之完整模式變方分析結果.....	30
表三、晚播種期抽穗日數之完整模式變方分析結果.....	30
表四、早播種期的抽穗日數多重迴歸分析結果.....	31
表五、晚播種期的抽穗日數多重迴歸分析結果.....	31
表六、在早播種期下 16 種基因型效應的抽穗日數估計值與觀察值.....	34
表七、在晚播種期下 16 種基因型效應的抽穗日數估計值與觀察值.....	34
表八、合併兩個播種期抽穗日數之完整模式變方分析結果.....	36
表九、合併兩個播種期的多重迴歸分析結果.....	37
表十、分子標誌於 12 個連鎖群上的結果.....	42
表十一、試驗族群中發生不平衡分離的分子標誌.....	46
表十二 早播種期 MIM 結果 .....	48
表十三 晚播種期 MIM 結果 .....	48
表十四、模型 $Y \sim \text{EHD1} + \text{EHD4} + \text{DTH8} + \text{QHD7}$ (MODEL 1) 及 $Y \sim \text{EHD1} + \text{EHD4} + \text{DTH8} + \text{QHD7}$ (MODEL 2) 的遺傳定位結果 .....	52
表十五、台稈 2 號/台中私 10 號雜交 $F_2$ 、 $F_{2.4}$ 及 RILs 族群在不同環境下遺傳定 位結果.....	54

## 對照表



臨界日長 (critical day length)

雙限制酶切位相關 DNA 定序 (Double digest restriction site-associated DNA sequencing, ddRAD)

轉殖株 (transgenic plants)

據圖選殖 (map-based cloning)

頂端分生組織 (shoot apical meristem, SAM)

同源基因 (ortholog)

鋅指 (zinc finger)

單核苷酸多型性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

次世代定序 (Next Generation Sequence, NGS)

生物親緣關係學 (phylogenetics)

親緣地理學 (phylogeography)

關聯性分析 (association studies)

分子標誌輔助選拔 (marker-assisted selection, MAS)

基因組選拔 (Genomic selection)

數量遺傳基因座 (Quantitative trait locus, QTL)

簡化代表性基因組定序 (Reduced-representation Sequencing, RRS)

全基因體再定序 (whole-genome resequencing, WGR)

連鎖不平衡 (linkage disequilibrium)

限制酶切位相關 DNA 定序 (Restriction site-associated DNA sequencing, RADseq)

雙限制酶 GBS (Two-enzyme GBS)

重組自交系 (Recombinant Inbred Lines, RILs)

生育度數法 (growing degree days, GDD)

外表型解釋變異 (phenotypic variance explained, PVE)

多重區間定位法 (multiple interval mapping, MIM)

區間定位法 (Interval mapping, IM)

超親分離 (transgressive segregation)

分離基因座 (segregation distortion loci, SDL)

全染色體置換系 (whole chromosome substitution lines, WCSL)

染色體片段置換系 (chromosome segment substitution lines, CSSL)



## 第一章 前言



水稻 (*Oryza sativa* L.) 為短日植物，當其感受日照長度小於臨界日長 (critical day length) 時才會抽穗 (Izawa, 2007a)。水稻抽穗日數能做為評估品種對地域適應性的重要性狀，不同地理環境差異與栽培制度使得水稻抽穗日數變異相當大，但目標皆為在恰當的時機抽穗，維持穩定的產量 (Jung and Müller, 2009)。抽穗日數由多個基因與不同環境因子調控，為一複雜的數量性狀 (Lee and An, 2015; Cho et al., 2017)。地區及期作間的溫度與日長差異，使得水稻的抽穗日數表現不一致，部分控制抽穗期的數量遺傳基因座 (Quantitative trait locus, QTL) 在不同環境下有不同的效應，QTL 與環境之間具有交感作用 (王, 2010; 蘇, 2010; 顏, 2015; Han et al., 2017)。

抽穗日數的研究可以用以探討將台灣二期作更改為中間期作之構想，中間期作插秧時間介於一和二期作之間，除了能避開一期作秧苗期遭逢低溫寒害，在中南部地區則能夠避免春耕缺水的限制；亦能減緩在二期作因遭受較多的天然災害，使得生產成本較高、品質較差的現象。若將中間期作水稻的營養生長期拉長至秋颱過後才抽穗，此一生長階段的植株對颱風的耐受性較高，避免災害造成產量減損。此外，中間期作可以與其他雜糧作物輪種，產量收成應能舒緩兩期作總產量過剩的現象。

本次研究參考前人在相同親本不同世代雜交族群的抽穗日數遺傳定位與候選基因比對結果得到 *Ehd1*、*Ehd4*、*Ghd7* 與 *Dth8* 基因，採用前人已經設計的 *Ehd1* 與 *Ehd4* 功能性分子標誌，並從已知 *Ghd7* 序列中找尋其他 SNP 位點重新設計功能性分子標誌。此外，本次實驗亦將 TK2 與 TCS10 的 *Dth8* 基因定序並針對多型性位點設計功能性分子標誌，使用 *Ehd1*、*Ehd4*、*Ghd7* 與 *Dth8* 共四個功能性分子標誌對 RILs 族群做基因型判別，在相同的迴歸模型下探討基因與環境之間的交感作用。此外，亦利用雙限制酶切位相關 DNA 定序 (Double digest restriction

site-associated DNA sequencing, ddRAD) 建構連鎖圖譜，進行 QTL 定位，找尋其他可能控制抽穗日數變異的基因。



## 第二章 前人研究



### 第一節 抽穗期相關研究

水稻為短日植物，短日條件（日長 <10 小時）能促進水稻開花，長日條件（日長 >14 小時）則抑制開花 (Izawa, 2007a; Tsuji et al., 2008)。抽穗期為適應不同地理生態環境以及栽培期作的重要性狀，能決定後續的產量及品質 (Jung and Müller, 2009)。植株在生長期間，整合外在環境訊號以及內部遺傳調控機制，在最佳條件下抽穗後進入生殖生長期階段，最終以達到穩定的產量，其中受到的環境因子包含有溫度、濕度、光強度、風、溫度及日長 (Hayama et al., 2003; Bentley et al., 2013)。

至今已超過 70 個開花基因經由突變株 (mutants)、轉植株 (transgenic plants) 及自然變異 (natural variation) 的方法找到 (Hori et al., 2016)。其中經由據圖選殖 (map-based cloning) 方法找到的基因有：*Se/Se1/K/Lm/Hd1*、*E1/M/m-Ef1/Ghd7*、*E2/Hd17/Ef7/OsELF3-1/OsELF3/Hd-q*、*E3/Hd6*、*E/Ef1/Ehd1*、*Hd3a*、*RFT1*、*DTH8/Ghd8/LHD1/Hd5/LH8*、*DTH3/OsMADS51*、*DTH2*、*Hd16/EL1*、*OsPRR37/Hd2*、*Ehd4*、*Hd18*。

在短日條件下，開花素基因 *Hd3a* 由 *Hd1* 及 *Ehd1* 兩個獨立表現的基因控制 (Yano et al., 2000; Kojima et al., 2002; Doi et al., 2004; Tamaki et al., 2007)。*OsGI* 表現量由晝夜時鐘調控，能促進 *Hd1* 表現量，促使水稻開花 (Hayama et al., 2003)。*Ehd1* 上游基因 *Ehd2*、*Ehd3*、*Ehd4* 及 *OsMADS51* 互為獨立作用且為正調控因子 (Matsubara et al., 2008, 2011; Gao et al., 2013)；。*Ehd2* 與玉米 indeterminate 1 基因同源，能促使玉米開花 (Matsubara et al., 2008)；*Ehd3* 編碼轉錄調控因子 (Matsubara et al., 2011)；*Ehd4* 編碼鋅指 CCCH domain 蛋白，調控水稻對光週期的開花反應 (Gao et al., 2013)；*OsGI* 可直接或經由 *OsMADS51* 間接活化 *Ehd1* 表現量 (Itoh et al., 2010)。



在長日條件下，*Hd1* 功能由促進轉換為抑制 *Hd3a* 表現量，進而抑制水稻開花 (Izawa, 2007b)。 *Hd6* 能加強 *Hd1* 對 *Hd3a* 的抑制效應 (Takahashi et al., 2001; Ogiso et al., 2010)，亦受到 *Hd1* 與 *Ghd7* 構成的複合體調控 (Nemoto et al., 2016)。 *RFT1* 為 *Hd3a* 的同源基因，兩基因僅相距 11.5 kb，其在長日條件下表現量增加，使水稻仍保持開花 (Komiya et al., 2008, 2009)。 *Ehd1* 與 *DTH2* 為 *RFT1* 的正調控因子，能活化 *RFT1* 表現量 (Doi et al., 2004; Wu et al., 2013b)； *Se14* 則為負調控因子，抑制 *RFT1* 表現量 (Yokoo et al., 2014)。 *DTH3*、*OsMADS51*、*OsMADS56*、*Ehd2* 及 *Ehd4* 為 *Ehd* 上游基因，能誘導 *Ehd1* 表現量；*DTH8*、*OsCOL4*、*OsCOL10* 及 *OsLFL1* 則為 *Ehd1* 的負調控因子，會抑制 *Ehd1* 表現量。 *DTH8* 可能透過與 *Hd1* 形成複合體的形式而抑制開花 (Wei et al., 2010; Yan et al., 2011)； *DTH3* 與 *OsMADS51* 形成複合體進而調控 *Ehd1* (Ryu et al., 2009)； *OsMADS51* 藉由調控 *Hd18* 進而誘導 *Ehd1* 表現量 (Kim et al., 2007; Shibaya et al., 2016)； *OsVIL2* 能誘導 *OsLFL1* 表現量，進而抑制 *Ehd1* (Peng et al., 2008; Yang et al., 2013)； *Se13* 抑制 *Ehd2* 表現量進而活化 *Ehd1* 表現量 (Matsubara et al., 2008; Yoshitake et al., 2015)； *OsCOL4* 能持續抑制 *Ehd1* 表現量，與 *OsCOL10* 皆為類 CONSTANS 家族的成員 (Lee et al., 2010)，*OsCOL10* 能藉由活化 *Ghd7* 進而抑制 *Ehd1* 表現量 (Tan et al., 2016)。 *Ehd3* 與 *Hd17* 為 *Ghd7* 正調控因子，能誘導 *Ghd7* 表現量，*OsTrx1* 則為負調控因子，抑制 *Ghd7* 表現量 (Choi et al., 2014)； *Hd16* 藉由磷酸化作用活化 *Ghd7* 表現量，抑制 *Ehd1*、*Hd3a* 及 *RFT1* 表現量，造成晚花現象 (Hori et al., 2013)。 *OsCOL16* 藉由誘導 *Ghd7* 表現量，抑制 *Ehd1*、*Hd3a* 及 *RFT1* 的表現量，造成晚花 (Wu et al., 2017)。 *OsPRR37* 為 *Hd3a* 上游基因，作用機制獨立於 *Hd1* 及 *Ehd1*，*OsPRR37* 藉由抑制 *Hd3a* 表現量，進而抑制開花 (Koo et al., 2013)。 *Hd3a/RFT1* 調控下游基因的機制無論在長日或短日條件下皆一致，*Hd3a* 在莖頂端與 14-3-3 蛋白 *OsFD* 結合進而誘導開花 (Purwestri et al., 2009)，*OsFD* 與 *GF14c*

誘導 *OsMADS14* 與 *OsMADS15* 表現量，使莖頂端分生組織 (shoot apical meristem, SAM) 由營養生長期轉變成生殖生長期階段 (Lim et al., 2000)。

抽穗期為一數量性狀，由多對效應大小不等的 QTL 共同調控，有些 QTL 表現容易受到環境影響，在不同地區或期作之間有不同的效應，形成 QTL 與環境間的交感作用 (QTL  $\times$  environment interaction effect)。藉由在多個環境評估控制抽穗期的 QTL 表現差異，能夠衡量 QTL 效應之穩定性，有利於育種家進行分子標記輔助選拔。關於抽穗期在多個環境下的 QTL 定位，Han et al (2017) 建立私稻 Zhenshan 97 與粳稻 Xizang 2 雜交的分離族群 RILs，分別栽種在連續三年長日條件 (武漢，30.5°N) 及一年短日條件 (海南，18.5°N)，在長日條件下定位到 8 個 QTLs，短日條件下定位到 2 個 QTLs，其中僅有 *qHD10.1* 同時在長日及短日下被偵測到，其餘 QTL 在短日下沒有效應，或是效應很小以致無法顯著被定位，顯示控制抽穗期之 QTL 多為對光敏感，QTL 幾乎都在長日條件下被定位到，使得在長日條件下族群的抽穗期變異較短日條件下抽穗期變異來得大。其中 *qHD7.1* 及 *qHD8* 連續三年的長日條件下都有被定位到，可分別對應至 *Ghd7* 及 *Dth8* 基因的物理圖譜位置，為兩個控制抽穗期的主效基因，加性效應分別為 12.9-15.9 天及 8.6-11.1 天，外表型解釋變異分別為 49.1-59.8%及 21.6-29.9%。

王 (2010) 利用台粳 2 號 (TK2) 與台中秈 10 號 (TCS10) 雜交 F<sub>2</sub> 族群在台北一期作定位到 3 個與抽穗日數相關的 QTL，蘇 (2010) 利用相同親本不同世代雜交族群 F<sub>2.4</sub>，於台北、台中及高雄各兩期作共定位到 11 個與抽穗日數相關的 QTL。顏 (2015) 合併 7 個環境的遺傳定位結果，挑選重複定位到兩次以上的 QTL 並做候選基因比對，得到 *qHD10* (RD1005-RD1006) 範圍可對應至 *Ehd1*、*qHD3* (RD0301-RD0302) 範圍可對應至 *Ehd4*、*qHD7* (RD0704-RD0705) 範圍可對應至 *Ghd7*、*qHD8a* (RD0803-RD0804) 範圍可對應至 *Dth8* 基因。在重複定位到三次的 *qHD5a* (RD0501-RD0502) 區間內沒有比對到前人研究與控制抽穗日數相關的基因。顏 (2015) 將 TK2 與 TCS10 的 *Ehd1*、*Ehd4* 與 *Ghd7* 基因定序結果與前人研



究比對，得到 TK2 帶有失去部分功能 *ehd1-T65* 對偶基因，TCS10 帶有功能正常 *Ehd1* 對偶基因；TK2 帶有功能正常的 *Ehd4* 對偶基因，TCS10 帶有失去部分功能的 *ehd4* 對偶基因；TK2 帶有功能性較差的 *Ghd7-2* 對偶基因型，TCS10 帶具有完全功能的 *Ghd7-3* 對偶基因型。顏 (2015) 根據序列間多型性位點設計功能性分子標誌，*Ehd1* 與 *Ehd4* 功能性分子標誌可以清楚判別兩種對偶基因與異質結合型，但 *Ghd7* 基因型判別因為使用單一反應的 allele specific primer set，無法判別異質結合型。

*Ehd1* 基因僅存在於水稻，並未在阿拉伯芥中找到同源基因 (ortholog)，*Ehd1-Hd3a/RFT1* 途徑為水稻獨有，具有促使開花的作用 (Doi et al., 2004)。*Ehd1* 基因在長日及短日條件下皆會促使 *Hd3a* 與 *RFT1* 表現量，進而誘導開花。Saito et al (2009) 研究指出在短日條件下，帶有不具功能 *ehd1* 對偶基因之 T65 的 BVG 為 71.8 天，而帶具有功能 *Ehd1-gla* 對偶基因之 *NIL-T65e*，其 BVG 為 47.7 天，在短日條件下不具功能 *ehd1* 對偶基因能延長 BVG 使抽穗期較長。具功能 *Ehd1* 對偶基因之品種有較短的 BVG，這類品種多分布在緯度 25-39°N 之溫帶地區；不具功能 *ehd1* 對偶基因之品種，其 BVG 則相當長，分布區域位在緯度較低 21-26°N 地區。Zhao et al (2015) 建立 3 個 T65/Guangluai4 雜交 F<sub>4</sub> 族群，在中國廣州與海南兩個栽培季種植，分別為三月中到八月的長日條件 (c. 13.5 h)，及七月到十一月的短日條件 (c. 12 h)。當帶有不具功能 *ehd1-T65* 對偶基因的片段會使得抽穗期在長日及短日條件下分別增加 15 天及 18 天。此外，在同時具有不具功能 *ehd1-T65* 對偶基因與不具功能 *Hd3a/rft1-GLA* 對偶基因組合的族群中發現，無論長日或短日條件下植株都不抽穗；然而族群中帶有其中一個具有功能的 *Ehd1-GLA* 或 *Hd3a/RFT1-T65* 對偶基因時，植株則維持正常開花現象，推測 *ehd1-T65* 與 *Hd3a/rft1-GLA* 對偶基因具有上位性，當同時帶有兩個不具功能的對偶基因組合會使水稻無法開花。檢測 *Ehd1*、*Hd3a* 及 *RFT1* 對偶基因在 3 個族群的表現量，結果得到在短日條件下具功能 *Ehd1-GLA* 對偶基因能促進 *Hd3a* 及 *RFT1*

的表現量，但在長日條件下 *Ehd1-GLA* 對偶基因表現量減少，使得 *Hd3a/RFT1* 表現量隨之降低；而在不具功能的 *ehd1-T65* 對偶基因的情況下 *Hd3a* 表現量完全被抑制，但具功能的 *RFT1-T65* 對偶基因仍有些微表現量得以維持開花，不具功能的 *rft1-GLA* 對偶基因的植株則有不花現象，由此結果可得知具功能 *Ehd1* 對偶基因才能使 *Hd3a* 表現。

水稻開花由兩個遺傳機制控制，分別為 *Hd1* 及 *Ehd1* 兩個獨立途徑 (Doi et al., 2004; Izawa, 2007b; Komiya et al., 2009)。*Ehd1* 基因在短日下能促使水稻抽穗，長日條件下仍可促進早花，但效應則較不明顯。*Hd1* 基因在短日下會誘導開花素基因 *Hd3a* 表現量增加以促進開花，長日下 *Hd3a* 表現量則受到抑制，造成晚花現象 (Yano et al., 2000; Izawa et al., 2002)。然而 Nemoto et al (2016) 研究指出在長日條件下，*Hd1* 為 *Ehd1* 的上游基因，*Ehd1*、*Hd3a* 及 *RFT1* 基因的表現量皆會受 *Hd1* 抑制。在長日條件下，*Ehd1* 基因只有在不具功能 *hd1* 對偶基因存在的條件下才能促使 *Hd3a* 及 *RFT1* 開花素基因表現。

Lin et al (2002) 建立以日本晴為輪迴親，Kasalath 為貢獻親的 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 族群，長日條件下於第三條染色體前端定位到控制抽穗期的 *Hd9*，當染色體片段帶有 Kasalath 對偶基因時，會使抽穗期增加 2.7 天。建立以日本晴為遺傳背景，帶有 Kasalath 之 *Hd9* 片段的 Nip (hd9)，在長日條件下其開花時間較日本晴晚 7 天，在短日條件下兩者抽穗期則沒有差異。Bian et al (2011) 在帶有非洲稻 3S 對偶基因片段的 NIL 與粳稻 Dianjingyou 1 (DJY1) 雜交族群 F<sub>2</sub> 定位到 *DTH3*，當帶有 DJY1 的 *DTH3* 對偶基因片段時，於長日及短日條件下抽穗期皆減少 7-10 天。在長日及短日條件下，NIL 的 *dth3* 表現量皆低於 DJY1 的 *DTH3* 表現，*DTH3* 會促進 *Ehd1* 及 *RFT1* 表現量，但僅在長日條件下 *DTH3* 才會促進 *Hd3a* 表現量。*Ehd4* 編碼 CCCH-type 鋅指 (zinc finger) 蛋白，在水稻栽培種中具高度保守性，且未在阿拉伯芥、玉米、高粱等其他植物中找到同源基因。*Ehd4* 藉由促進 *Ehd1* 基因表現量，進而活化下游開花素基因 *Hd3a* 及 *RFT1* 之表現量，在長日及短日條件

下皆會促使水稻早花。然而 *Ehd4* 在長日條件下之促進早花的效應較短日下來得大，*ehd4-Kit* 突變株之抽穗期在長日及短日條件下，較 *Kit* 植株分別晚 106 天及 49 天開花，*ehd4-NIP* 突變株之抽穗期，與 *Nip* 相較在短日條件下晚 23 天開花，在長日條件下則不開花。利用 *Ehd4* 對偶基因之功能性可以區分私稈稻，私稻主要歸類於 Hap\_2，栽培環境為中低緯度地區，稈稻多被分類在具功能 Hap\_3 對偶基因，在長日條件下可以促進水稻開花，有助於水稻適應高緯度地區的長日條件 (Gao et al., 2013)。

Yano et al (1997) 於 Nipponbare/Kasalath F<sub>2</sub> 族群中的第七條染色體上定位到包含 *Ghd7* 基因的數量性狀基因座 Hd-4，在長日條件下帶有 Kasalath 之 *Hd-4* 對偶基因會使得抽穗期增加 2.9 天。*Ghd7* 基因編碼 CCT domain 蛋白，為一多效性基因，影響水稻每穗粒數、株高及抽穗期。帶有具功能 *Ghd7* 對偶基因之 NIL(mh7)，其抽穗期較帶失去功能 *ghd7* 對偶基因之 NIL(zs7) 多 21 天、株高增加 33.3 cm，及總產量提高 50.9%。*Ghd7* 基因在長日下會抑制 *Ehd1* 與 *Hd3a* 基因的表現量，短日下則促進 *Ehd1* 在黑暗期的表現量，但不影響 *Hd3a* 的表現量，三者間關係為 *Ghd7-Ehd1-Hd3a*，在阿拉伯芥中未發現相對應的同源基因，是水稻獨有控制開花的途徑。藉由分析栽培稻之 *Ghd7* 對偶基因序列，發現不同 *Ghd7* 對偶基因對水稻的產量及地理環境適應性影響相當大，帶有具功能 *Ghd7* 對偶基因之品種，其抽穗期在長日環境下會受到抑制；帶有不具功能 *ghd7* 對偶基因的品種分布在溫帶地區。在長日條件下不具功能 *ghd7* 對偶基因能減少對下游基因 *Ehd1* 與 *Hd3a* 的抑制作用，延遲開花的效應相當微弱或不具效應，因此使得品種能夠適應高緯度地區生長期較短的環境 (Xue et al., 2008)。Zheng et al (2016) 分析 69 個種原的 *Ghd7* 對偶基因及抽穗期之關聯性，發現不具功能 *ghd7* 對偶基因在長日條件下抽穗期顯著少於具功能 *Ghd7* 對偶基因，其中帶有不具功能 *Ghd7-7* 對偶基因之種原都分布在溫帶地區如中國北方、日本及韓國。Zhang et al (2015b) 建立 Zhenshan 97/93-11 F<sub>2</sub> 族群在長日條件下定位到 *Ghd7*，具功能 *Ghd7* 對偶基因會使抽穗期

延後 18.1 天。作者同時分析 320 個品種之 *Ghd7* 序列，發現粳稻之間有明顯的分界，粳稻主要歸類在功能性強 Hap1，秈稻則多屬於功能性較弱 Hap4。具功能性 *Ghd7*、*Ghd8* 及 *Hd1* 對偶基因皆對光照敏感 (Lin et al., 2000; Xue et al., 2008; Yan et al., 2011)，三個對偶基因皆具功能組合 (SSF) 在長日下有顯著的晚花現象。在長日條件下，*Ehd1*、*Hd3a* 及 *RFT1* 基因表現量在 SSF 組合顯著低於 SSN 組合，使得 SSF 組合有較長的抽穗期。三個不同對偶基因組合有其適應之地理環境，皆不具功能組合之品種於高緯地區栽培對日長反應為鈍感，能在生長期短且日照長的地區有恰當的抽穗期以避免寒冬受凍；皆具功能組合之品種則種植於地緯地區 (Zhang et al., 2015b)。帶有不具功能 *ghd7* 對偶基因之 NILs(*ghd7*) 的 *Ehd1*、*Hd3a* 及 *RFT1* 無論日照長短，皆具有高表現量；帶有不具功能 *Ghd7* 對偶基因之 NILs(*Ghd7*) 在長日條件下之 *Ehd1*、*Hd3a* 及 *RFT1* 表現量皆受到抑制，延後開花。*Ghd7* 基因可單獨造成水稻晚花現象，但 *Hd1* 必須在具功能 *Ghd7* 對偶基因存在下才有抑制開花的功效。在長日條件下 (13.5-14.5h)，*Hd1* 與 *Ghd7* 具有交感作用，帶有 *Hd1* 與 *Ghd7* 對偶基因組合的品系相較於 *hd1* 與 *Ghd7* 組合品系，其 *Ehd1* 及 *RFT1* 表現量顯著受到抑制。*Ghd7*-*Hd1* 複合體會藉由結合 *Ehd1* 5'UTR cis-regulatory region，兩者共同抑制 *Ehd1* 的表現量；但在短日條件下 *Ehd1* 表現量則不受 *Ghd7* 影響 (Nemoto et al., 2016)。

Yano et al (1997) 於 Nipponbare/Kasalath F<sub>2</sub> 族群中第八條染色體上定位到包含 *Ghd8* 基因的數量性狀基因座 *Hd-5*，在長日條件下帶有 Kasalath 之 *Hd-5* 對偶基因會使得抽穗期增加 3.4 天。*DTH8* 編碼 CCAAT-box-binding 轉錄因子的 HAP3 亞基，為一多效性基因，能控制產量、株高及抽穗期，在長日條件下抑制 *Ehd1* 及 *Hd3a* 表現量，造成晚花現象，但在短日條件下 *Ehd1* 及 *Hd3a* 基因表現量和抽穗期則不受影響。帶有不具功能 *dth8* 對偶基因之 CSSL61，在長日條件下其抽穗期、株高及每穗粒數均減少，在短日條件下則不影響性狀表現。分析 40 個水稻品種 *DTH8* 基因序列，品種因核甘酸序列有缺失造成失去功能的對偶基因，其表

現為光鈍感型，在長日條件下抽穗期不因日長而有大幅度變化，適合作為高緯地區育種選拔之對偶基因，帶有具功能 *DTH8* 對偶基因則為光敏感型，短日可促進開花，適合做為低緯度地區選拔之對偶基因 (Wei et al., 2010)。Yan et al (2011) 提出在短日及長日條件下，*Ghd8* 分別有促進與抑制開花的作用，帶有具功能 *Ghd8* 對偶基因之 ZS97-Nip 轉殖株在短日條件下較 ZS97 早花 1.5 天，在長日條件下則延後 1.5 天開花。檢測基因表現量的結果指出 *Ghd8* 為 *Ehd1* 與 *Hd3a* 上游基因，在短日條件下，分別帶有具功能及不具功能 *Ghd8* 對偶基因之 NIL-ZS 與 NIL-HR5，其 *Ghd8*、*Ehd1* 及 *Hd3a* 表現量沒有差異，抽穗期沒有顯著差異，但長日條件下三個基因在 NIL-HR5 之表現量則較低，NIL-HR5 延後開花 7.8 日。Dai et al (2012) 建立以 Teqing 為輪迴親，但帶有野生稻的 LHD1 對偶基因片段之 YIL79，在長日條件下其抽穗期較 Teqing 多出 34.6 天，在短日條件下兩者的抽穗期幾乎一致。在長日條件下，*Ehd1*、*Hd3a* 及 *RFT1* 表現量在 YIL79 低於在 Teqing 之表現量，抑制抽穗期，在短日下三個基因之表現量則沒有顯著差異。*LHD1/Ghd8/Dth8* 在長日條件下會抑制 *Ehd1*、*Hd3a* 及 *RFT1* 表現量，延遲開花時間，但不影響株高及每穗粒重；在短日條件下三個基因之表現量則無變化。Zhang et al (2015b) 建立 Zhenshan 97/93-11 F<sub>2</sub> 族群在長日條件下定位到 *Ghd8*，具功能 *Ghd8* 對偶基因會使抽穗期延後 17 天。*Ghd8* 之 haplotype 在私稈間有明顯分界，作者藉由分析 320 個品種之 *Ghd8* 序列，將私稻歸類於 hap11 及 hap5 兩群，皆為不帶功能的 haplotype (Wei et al., 2010; Yan et al., 2011)，稈稻多屬於具較弱的功能性 hap2。Zheng et al (2016) 指出 *Ghd8* 對偶基因分布有特定區域之特性，分析 74 個種原的 *Ghd8* 對偶基因功能性與抽穗期之關聯性，具功能與不具功能之 *Ghd8* 對偶基因的抽穗期平均值分別為 76 及 99 天，兩種對偶基因間之抽穗期具有顯著的差異，其中帶有不具功能 *ghd8* 對偶基因的種原分布於中國東部。Du et al (2017) 指出 *Dth8* 與 *Hdl* 具交互作用，共同調控 *Hd3a* 表現量，進而控制水稻開花。*DTH8-Hdl* 複合體在長日條件下會抑制 *Hd3a* 基因表現量，而不具功


能 *dth8* 對偶基因則不與 *Hd1* 形成複合體，使 *Hd3a* 表現量維持不變，水稻正常開花。然而 *DTH8-Hd1* 複合體在短日條件下會促進 *Hd3a* 基因表現量，使得水稻提早開花。



## 第二節 次世代定序

真核生物當中，單核苷酸多型性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 相較於其他分子標誌在基因組上多型性的數量比例最高，其中在水稻中發現每 232 bp 即出現一個 SNP (Feltus et al., 2004)。次世代定序 (Next Generation Sequence, NGS) 利用光學影像技術可以對大量個體平行定序，使得一次定序總量達到數億至數十億的鹼基數量，與 Sanger 定序方法相較下，降低了時間與資金成本而獲得高通量資料。Illumina Miseq 及 Hiseq (Illumina, San Diego, CA, USA) 為最廣泛被應用的定序平台，其得到的短讀序長度介於 50-300 bp，定序通量依照平台不同，介於 1.5-600 Gbp。利用 NGS 技術開發大量的 SNP 目前被廣泛應用在研究生物親緣關係學 (phylogenetics)、親緣地理學 (phylogeography)、關聯性分析 (association studies)、分子標誌輔助選拔 (marker-assisted selection)、基因組選拔 (Genomic selection)、建構遺傳圖譜 (genetic mapping) 及數量遺傳基因座 (Quantitative trait locus, QTL) 定位 (Huang et al., 2010; Poland et al., 2012b; McCormack et al., 2013; Spindel et al., 2013; Yang et al., 2015)。


GBS (Genotyping by sequencing) 方法結合 NGS 的技術，使得 SNP 的開發在定序時同步進行基因型探勘。傳統的分離標誌如 SSR 為最常被使用來建構水稻連鎖圖譜及 QTL 定位，SSR 分子標誌引子之設計受到參考序列的限制，開發 SSR 分子標誌需投入相對較多的時間與人力，且基因組上 SSR 分子標誌的密度較 SNP 稀少，以之建構的連鎖圖譜密度較低，遺傳定位到的 QTL 數量少且無法精細呈現 QTL 在連鎖圖譜上的位置 (Yu et al., 2011)。



GBS 方法可分為兩大類：以限制酶降低基因組複雜度的簡化代表性基因組定序 (Reduced-representation Sequencing, RRS) 以及全基因體再定序 (whole-genome resequencing, WGR)。根據族群結構組成以及研究目的預期獲得分子標誌數量，來決定使用何種 GBS 方法。當目標獲得的分子標誌總數少或是基因組複雜度高的情況下，使用 RRS 方法相較於 WGR 方法較有效率。RRS 使用限制酶辨識基因組上特定位點，僅選取特定基因組區域作定序，降低基因組複雜度，因此在固定定序資源條件下，可以提高定序深度，或是投入更多樣品。WGR 則缺少減低基因組複雜度之步驟，每個個體得到的定序深度相對較低，基因型缺值率較高，在有可靠的參考序列條件下，可進行基因型補差 (genotype imputation) 來彌補此方法的缺點。連鎖圖譜的密度取決於染色體的重組次數，當互換率低時，分子標誌間距太緊密時會造成資訊的累贅；當分子標誌之間連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) 相當大時，僅需挑選其中一個分子標誌就足夠。用於建構兩親本雜交後代族群的連鎖圖譜時，僅需數千個分子標誌就足以得到理想結果，此時 RRS 相較 WGR 較有效率提供足量的分子標誌以建立高密度連鎖圖譜 (Beissinger et al., 2013)。

RRS 方法共同特點皆以限制酶切辨識基因組特定位點以達到降低基因組複雜度，然而根據限制酶使用的種類與數量，較廣泛被應用的有：限制酶切位相關 DNA 定序 (Restriction site-associated DNA sequencing, RADseq) (Baird et al., 2008)、Elshire GBS (Elshire et al., 2011)、雙限制酶 GBS (Two-enzyme GBS) (Poland et al., 2012a)、雙限制酶切位相關 DNA 定序 (Double digest restriction site-associated DNA sequencing, ddRAD) (Peterson et al., 2012)。

RADseq (Baird et al., 2008) 方法使用辨識六個鹼基的 *EcoRI* 或辨識八個鹼基的 *SbfI* 限制酶後，連接包含條碼 (barcode) 的 P1 adapter，將樣品混合後隨機斷裂成長度約 500 bp 的大小後接上 P2 adapter，最終僅有包含 P1 與 P2 adapters 的片段才能進行 PCR 擴增。Elshire GBS (Elshire et al., 2011) 最初利用 *ApeKI* 避開



玉米基因組上重複序列，方法簡化為將限制酶切與 adapter 連結的步驟同時進行，並省去隨機斷裂與片段大小篩選兩步驟，其缺點為在分析大量個體時，每個個體僅能提供部分分子標誌資訊，在有參考序列的條件下可以進行 imputation 補足缺值。Two-enzyme GBS (Poland et al., 2012a) 以及 ddRAD (Peterson et al., 2012) 方法皆使用兩個限制酶組合，功能分別為決定片段數目、降低基因組複雜度與控制片段長度大小，Two-enzyme GBS (Poland et al., 2012a) 使用 *PstI* 及 *MspI* 限制酶組合後，接上 barcode adapter 及 Y adapter，避免在 GBS 方法的文庫製備中有一半的片段無法被增幅的資源浪費。ddRAD (Peterson et al., 2012) 使用 *EcoRI* 及 *MspI* 限制酶組合後，接上 barcode adapter 及 Y adapter 之後混合樣品，進行片段大小篩選。最後在 PCR 擴增階段加入能辨識不同樣品的 index，相較於 Two-enzyme GBS 方法可以投入更多樣品。

RRS 方法在建構連鎖圖譜與 QTL 定位中被廣泛應用，其中使用 RADseq 方法 (Baird et al., 2008) 的作物有大麥 (Chutimanitsakun et al., 2011)、草莓 (Davik et al., 2015) 及茄子 (Barchi et al., 2011, 2012)；使用 GBS 方法 (Elshire et al., 2011) 方法的作物有水稻 (Spindel et al., 2013)、玉米 (Chen et al., 2014)、向日葵 (Celik et al., 2016)、芝麻 (Uncu et al., 2016) 等。利用 ddRAD 方法 (Peterson et al., 2012) 的作物有花生 (Zhou et al., 2014)、奇異果 (Scaglione et al., 2012, 2015) 及康乃馨 (Yagi et al., 2017)。目前在水稻中已有許多研究利用 GBS 方法探勘 SNP 分子標誌，其具有增加連鎖圖譜上 SNP 密度，及提高 QTL 定位的效率及精確度 (Yu et al., 2011; Kim and Tai, 2013; Duan et al., 2013; Spindel et al., 2013; Liu et al., 2015; Arbelaez et al., 2015; Xu et al., 2015; Zhang et al., 2015a; Leon et al., 2016; Furuta et al., 2017)。



### 第三章 材料與方法



#### 第一節 遺傳材料及栽培環境

##### 1. 遺傳材料及外表型調查

本試驗的材料親本為台稉 2 號 (TK2) 及台中私 10 號 (TCS10)，及 F<sub>8,9</sub> 世代 258 個重組自交系 (Recombinant Inbred Lines, RILs)，分別於 2015/04/22 及 2015/07/03 播種，約兩週後移植至本田並調查抽穗日數，地點為台大實驗田 (121.5°E, 25.0°N)。家系按照序號由小到大在田間以 S 型排列種植，行株距 25 公分×25 公分種植，每個家系種植 6 株單本植，呈現 2×3 方格，以及 1 叢多本植栽種於方格中央，當超過半數植株抽出一個指尖的穗長時，則視為此一家系的抽穗日數。

##### 2. 栽培環境因子

水稻在營養生長期、幼穗分化期至抽穗期各生育階段中，受到氣象因素中影響有關的有日長、氣溫、濕度、降雨量、日射量及風速等 (Yoshida, 1981)。水稻營養生長期由對光照不敏感的基礎營養生長期與光敏感期構成，在合適的環境條件下幼穗分化進入生殖生長期，營養生長期為主要影響抽穗日數變化的階段，受到日長與溫度影響，生殖生長期與成熟期維持一定的天數，分別為 35 天及 30-35 天左右 (Vergara and Chang, 1985)。

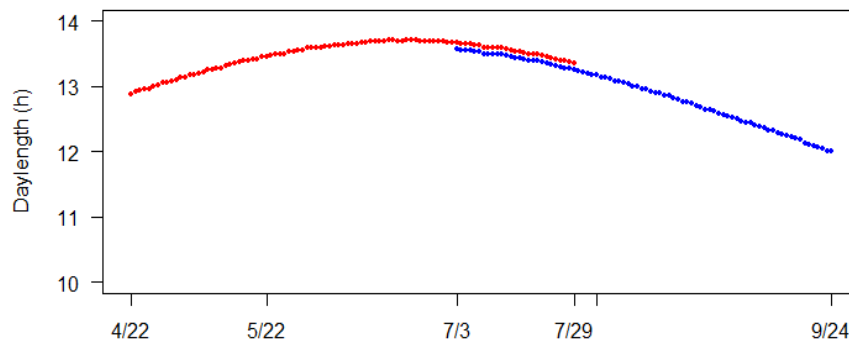
本試驗在同一地區分成兩個時期栽培 RILs 分離族群，兩個時期栽培環境的氣候如表一。兩個時期種植的氣候資料參考中央氣象局的氣候資料紀錄，包含每日日長變化 (圖一) 及每日溫度變化 (圖二)。日長計算方式為由日出到日落的時間，單位為小時 (hr)。溫度對水稻抽穗日數影響的量化方式以生育度數法 (growing degree days, GDD) 評估之，計算方法為：最早抽穗的家系在播種期至

幼穗分化期間，每日最高溫與最低溫之平均溫度減去其基礎溫度 10°C 後的總合，單位為攝氏。在早播種期最早抽穗家系的營養生長期由 2015/04/22 至 2015/05/22，在晚播種期最早抽穗家系的營養生長期由 2015/07/03 至 2015/08/03，兩次播種期中最早抽穗家系的營養生長期差異不大，天數約一個月，都在小於臨界日長進入幼穗分化；兩次播種期的生育度數亦超過生長積溫門檻值，因此光週期與溫度並非本次試驗的限制因子。

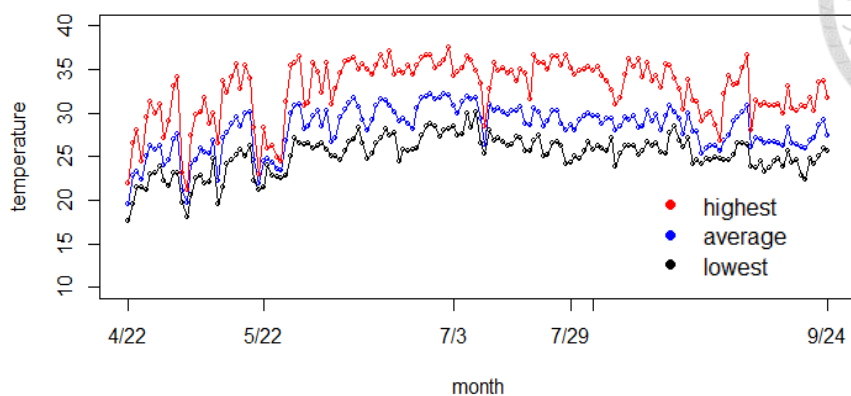
表一、兩個播種期的氣候資料

	感受日長變化 (hr)	GDD (°C)
早播種期 (E1)	12.8~13.5	469.6
晚播種期 (E2)	13.7~13.3	634.8

資料來源：中央氣象局 台北觀測站



圖一、每日日長變化 (資料來源：中央氣象局 台北觀測站)



圖二、每日溫度變化（資料來源：中央氣象局 台北觀測站）

## 第二節 功能性分子標誌之建立與多重迴歸分析

採用顏 (2015) 根據王 (2010) 在  $F_2$  及蘇 (2010) 在  $F_{2.4}$  族群，多個環境下 QTL 定位結果，選擇重複定位次數大於兩次的 QTL 共四個，基因比對結果為 *Ehd1*、*Ehd4*、*Ghd7* 及 *Dth8*。然而 *Ehd1* 與 *Ehd4* 的功能性分子標誌已在顏 (2015) 的研究結果中成功設計出，直接利用 *Ehd4* 與 *Ehd1* 功能性分子標誌對 RILs 族群做基因型判別。本次研究再根據顏 (2015) 定序 *Ghd7* 基因序列重新設計功能性分子標誌，以及定序兩親本 *Dth8* 序列以及設計功能性分子標誌。

### 1. 以 Taqman 系統對 *Ghd7* 做基因型判別

顏 (2015) 將 TK2 與 TCS10 的 *Ghd7* 基因序列分別對應至功能性較低的 *Ghd7-2* 對偶基因，以及具完全功能的 *Ghd7-3* 對偶基因型，但是根據先前 SNP 位點設計的 allele specific primer set 為顯性分子標誌，無法判別異質結合個體。因此採用 Taqman 系統重新挑選 SNP 位點設計新的一組功能性分子標誌，於 Thermo

Fisher 網頁設計 Taqman Assay，選取 SNP 位置前後 50 bp 的序列進行設計。PCR 反應總體積為 10  $\mu$ L，包含 10 ng genomic DNA，5  $\mu$ L ABI Universal Master Mix (Applied Biosystems)，20X Custom Taqman Genotyping Assay 0.5  $\mu$ L。以 ABI 7500 熱循環反應器進行產物擴增，模式設定為 Genotyping，反應條件為 60°C 1 min、95°C 10 min，40 cycles 的 95°C 15 s、60°C 1 min，最終 60°C 1 min 後降溫至 25°C。反應結束後根據 Allelic Discrimination Plot 的分群結果與親本做對照後，對 RILs 的 *Ghd7* 做基因型判別 (附圖六)。

## 2. *Dth8* 基因定序及功能性分子標誌設計

欲確立 TK2 與 TCS10 的 *Dth8* 基因核苷酸序列多型性，並取日本晴 DNA 做為對照組，利用 BatchPrimer3.0 (<https://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>) (You et al., 2008) 設計三組引子，引子之設計類別選擇 Generic primers，產物大小參數設定 min:300、opt:400 及 max:500 bp，其他參數設定為預設值。PCR 反應總體積 10  $\mu$ L，包含 20 ng genomic DNA，0.5  $\mu$ M 引子組合，5X Phusion HF Buffer 2  $\mu$ L，Phusion DNA Polymerase 0.1  $\mu$ L (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA)，10 mM 0.2  $\mu$ L dNTPs。PCR 反應條件為 98°C 30 s，35 cycles 的 98°C 30s，60°C 30s，72°C 1min，最終降溫至 4°C。將 PCR 產物於 1% Agarose I 進行電泳，確認產物符合目標大小及專一性後進行 Sanger 定序。以 CLC Sequence Viewer 7 作序列比對，參數設定為預設值，比對結果在可將日本晴、TK2 及 TCS10 分別歸類於功能性弱的 hap2、功能性強的 hap8 及不具功能的 hap5 (Zhang et al., 2015b)。

取 TK2 及 TCS10 的 *Dth8* 基因的複合型微衛星序列上找到兩親本之間有 (CGC)<sub>3</sub> 差異，針對這 9 bp 序列大小設計功能性分子標誌。在多型性位點前後 100 bp 序列大小以 BatchPrimer3.0 設計引子，引子之設計類別選擇 Generic primers，參數設定為預設值，其對 TK2 及 TCS10 的擴增產物大小為分別為 129 及 120 bp。PCR 反應總體積為 10  $\mu$ L，20 ng genomic DNA，0.4  $\mu$ M 引子組合，0.5 U

IMMOLASE™ DNA polymerase (Bioline), 2.5 mM 0.8 μL dNTPs, 50 mM 0.4 μL MgCl<sub>2</sub>, Bioline 10X buffer 3.75 μL。反應條件為 95°C 15 min, 35 cycles 的 95°C 30 s、65°C 30 s、72°C 30 s, 最終降溫至 4°C。因 PCR 產物大小僅差 9 bp, 故選擇解析度較大的膠體, 以 5% MetaPhor® Agarose (Lonza Rockland) 100 V 進行 2 小時電泳, 確認可以清楚判別 TK2、TCS10 及 artificial F<sub>1</sub> 的基因型後, 再對 258 個 RILs 做基因型判別 (附圖八)。

### 3. 利用功能性分子標誌建立多重迴歸模型

為了解控制抽穗日數基因與播種期之間的關係, 必須將遺傳因子與播種期在同一個線性模式下進行分析, 本次研究以四個功能性分子標誌對 RILs 族群進行基因型定型, 能夠正確地判別所有個體的基因型, 避免顏 (2015) 的迴歸分析受到基因型轉換的限制, 只能利用遺傳定位資料的兩側的分子標誌預測目標基因座的基因型, 在兩側分子標誌基因型相同的情況下才能保留該筆資料, 因此捨去部分不確定基因型的個體, 線性模型只有選擇效應較大的 *qHD10* 及 *qHD3* 兩個基因座放入模型, 以免加入過多基因座造成拋棄大量資料而無法得到正確的分析結果。

F<sub>8,9</sub> 世代族群的基因型異質結合率約 0.4%, 因此在做基因效應分割時只將目標基因型分為 A (A1A1) 與 B (A2A2) 兩個變級, 估算加性效應 (addictive effect, a)。資料分析分別在兩個播種期以變方分析法檢視統計顯著的基因或基因間交感項, 並且合併兩個播種期資料, 評估基因與播種期之間的交感項效應, 變方成分估計以 R::VCA 套件 remlMM 方法計算 (Schuetzenmeister, 2016), 外表型解釋變異 (phenotypic variance explained, PVE) 以變方成分之百分比估計。

### 第三節 文庫之製備流程及資料分析



#### 1. 估計預期用於建構連鎖圖譜之分子標誌數量

建構 RILs 的連鎖圖譜所需要分子標誌數量估計，根據先前 96 個水稻品種的 *PstI* 及 *MspI* 限制酶組合建構文庫，以 Hiseq2500 定序得到的資料結果中，資料分析篩選 48 K 目標片段，其中 TK2 與 TCS10 之間多型性的 SNP 有 10238 個，具有多型性的目標片段約 8000 個，這當中有些目標片段涵蓋不只 1 個 SNP，由此結果粗估 TK2 與 TCS10 多型性片段的比例約 1/6 (實驗室未發表資料)。預期得到的 RILs 連鎖圖譜密度為 1 SNP/cM，以水稻連鎖圖譜總長 1500 cM 估計，需要 1500 個 SNP，相當於 9000 個目標片段。對應至片段篩選大小為 60 bp，但避免篩選時遺失邊緣片段，故將篩選大小增加至 100 bp，最終估計可得到 15000 個目標片段，2500 個 SNP。

#### 2. Genomic DNA 萃取

為得到高品質 DNA，本實驗以 SDS 法搭配 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Venlo, Netherland) 抽取 260 個樣品，在 2 ml 離心管放入直徑為 2.5 mm 玻璃珠約 25 顆，剪碎經過冷凍乾燥葉片 0.02 g，放入均質機震碎 1 分鐘至粉末狀，加入 700  $\mu$ L SDS extraction buffer (0.1 M Tris buffer, 0.05M EDTA, 0.5M NaCl, 10% SDS,  $\beta$ -ME)，65°C 水浴 1 小時，加入 175  $\mu$ L 5M KOAc 混勻，放置 4°C 冰箱 15 分鐘，以 16000 xg 離心 10 分鐘取 600  $\mu$ L 上清液加入含有 2  $\mu$ L RNase A 的 1.5 mL 離心管，放置 37°C 恆溫 30 分鐘。接著在管內直接加入 600  $\mu$ L PB buffer，倒轉數次混勻後取一半體積加入 Spin Column，以 17000 xg 離心 1 分鐘，倒出管底液後再加入剩下的溶液，以 17000 xg 離心 1 分鐘。之後加入 500 mL PE buffer 清洗 Spin Column 上的 binding DNA，以 17000 xg 離心 1 分鐘，再將空管以 17000 xg 離心 1 分鐘。最終將 Spin Column 取下放在新的離心管，加入 100

μL EB buffer 靜置 10 分鐘，以 17000 xg 離心 1 分鐘後取出管底的 DNA。將此 DNA 以 nanodrop 測量 260/230 及 260/280 的值分別為~1.80 及~2.2，確定為沒有雜質的高品質 DNA，並用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) 定量 DNA 濃度。

### 3. 雙切酶切割

每個樣品取 300 ng genomic DNA，加入 5 μL 10X CutSmart Buffer，1 μL 20 U/μL *Pst I*-HF，1 μL 20 U/μL *Msp I* (New England BioLabs [NEB], Ipswich MA, USA) 與二次蒸餾水加至總體積 50 μL，放入 Veriti PCR 機器進行酶切，設定溫度 37°C，反應時間 1 小時。

### 4. P1 adapter 及 Y adapter 連接酶反應

P1 adapter 與 *Pst I*-HF 切口黏合，其正向核酸序列為 5' ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCA 3'，反向核酸序列為 5' p-AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT 3'，帶有部分 PCR 正向引子序列；P2 adapter 與 *Msp I* 切口黏合，其正向核酸序列為 5' p-CGAGATCGGAAGAGCGAGAACAA 3'，反向核酸序列為 5' GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT 3'，與部分 PCR 反向引子序列互補。Adapter 與 insert DNA 酶切端點數的莫耳數比設定為 5 :1，雙切酶處理後的樣品直接投入 5 μL 10X CutSmart Buffer，1 μL 1.31 μM P1 adapter，1 μL 12.8 μM P2 adapter，0.5 μL 400 unit/μL T4 DNA ligase，6 μL 10mM riboATP (NEB, Ipswich MA, USA) 及二次蒸餾水加至總體積 60 μL，於 PCR 機器處理 25°C 反應隔夜後，加溫至 65°C 10 分鐘，再以 1% ramp rate 降溫至 23°C，去除酵素活性。最後使用 Agencourt® AMPure® XP system (Beckman Coulter, Brea CA, USA)，以目標溶液體積 0.8 倍加入進行純化，去除 200 bp 以下的 primer dimer，避免在

PCR 時競爭資源，再以 15  $\mu\text{L}$  二次蒸餾水回溶後，於 PCR 機器以 50°C 10 分鐘去除殘留的酒精，再取 2  $\mu\text{L}$  進行定量。



## 5. PCR 反應

先取 5  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{M}$  forward primer (i5) 及 5  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{M}$  reverse primer (i7)，加入 10 mM 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (NEB, Ipswich, MA, USA)，5X Phusion HF Buffer 10  $\mu\text{L}$ ，Phusion DNA Polymerase 0.5  $\mu\text{L}$  (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA)，再加入 2  $\mu\text{L}$  adapter 接合 DNA 作為 template，最終以二次蒸餾水加至總體積為 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反應條件設定為 98°C 30 s，25 cycles 的 98°C 10 s、72°C 30 s，再進行 72°C 10 min，最終降溫至 4°C。之後使用 Agencourt® AMPure® XP system 以 0.8 倍 PCR 反應體積進行純化，去除 200 bp 以下的 primer dimer，再以 20  $\mu\text{L}$  二次蒸餾水回溶後，於 PCR 機器以 50°C 10 分鐘去除殘留的酒精。再以 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) 進行 DNA 定量，且根據定量濃度結果，每個樣品取 80 ng 進行標準化，避免定序資源不一致。

## 6. 片段大小篩選 (Size selection)

先取混合 DNA 文庫以 Agencourt® AMPure® XP system 的相同體積濃縮成 4 倍後，片段大小的篩選以 Blue Pippin (Sage Science, Beverly, USA) 進行切膠，範圍設定為 300-450 bp，之後使用 Agencourt® AMPure® XP system 純化。接著以 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 的 High Sensitivity DNA chip 進行毛細管電泳，確認切膠後文庫的片段大小分布符合原本的設定，以及定量使得最終濃度大於 10 nM 且體積大於 10  $\mu\text{L}$  的標準。最後將此 ddRAD 定序文庫送至陽明大學基因體研究中心提供的 Illumina HiSeq 2500 次世代核酸定序服務平臺 (Illumina, San Diego, CA, USA)，使用 Illumina PE100 一個 lane 進行核酸定序。



## 第四節 序列比對及 Variant calling

以 Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) 讀取原始 FASTQ 檔資料將其對應回水稻參考序列 (MSU Rice Genome Annotation Project Release 7)，設定可容許的最大 insert size 為 600 bp，將得到 SAM 檔並轉成 BAM 檔。以 Rsamtools (Morgan et al., 2009) 保留 paired-end 兩個讀序單一比對到 12 條染色體結果，刪除比對到多組位置之讀序，以及對應至胞器 (ChrC 及 ChrM) 與無法確定位置 (ChrSy 及 ChrUn) 的讀序。再以 PICARD tools (<http://broadinstitute.github.io/picard>) 將讀序按照物理圖譜位置排序，並以 MarkDuplicate 去除定序過程中被機器誤判為兩個以上 clusters 造成重複的讀序 (Optical Duplicates)。以 NCBI 水稻 dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) 資料庫為依據，利用 GATK (McKenna et al., 2010) BaseRecalibrator 檢視扣除水稻 variants 位置之後其餘位置之錯誤率，重新估算讀序各個位置及特定序列字串的錯誤率並校正 Quality score，最後以 GATK HaplotypeCaller 參照校正後 Quality score 對各個樣品的 genomic VCF (gVCF) 檔進行 joint calling，綜和所有樣品判斷 variants 是否存在。

## 第五節 篩選建構連鎖圖譜的 SNP

使用套裝軟體 R 之 Bioconductor VariantAnnotation (“Bioconductor - VariantAnnotation,”) 套件進 Variant Call Format (vcf) 檔案分析，以 readVcf() 讀取 vcf 檔案後，再以 isSNV() 設定參數 singleAltOnly=TRUE 篩選 reference allele 及 alternate allele 都只含一個 SNP 的 variants 後，得到 58499 個 variants。接著利用 geno()\$GT 取出所有個體的基因型資料，以利後續計算 variants 的缺值率及異質結合率。將缺值率與異質結合率總和門檻值設定為 10%，得到 8035 個 variants。

## 第六節 連鎖圖譜建立及數量性狀基因座定位



### 1. 連鎖圖譜之建構

將轉換成 A、B、H 基因型資料、分子標誌所屬連鎖群、物理圖譜位置，及兩次外表型調查資料整理成能夠使用 R/qtl 套件讀取的 csv 格式，以 `read.cross()` 讀取資料後，利用 `convert2rself()` 把原本預設的 F<sub>2</sub> 族群轉換成 RILs 族群型態。

以 `est.rf()` 檢查分子標誌在 RILs 中的 A、B 基因型是否有相反，再利用 `plot.rf()` 繪製分子標誌之間的重組率及 LOD 值圖。

刪除分子標誌基因型的缺值大於 60 個的樣品，以及刪除樣品間基因型相同比例高於 93% 的個體。

RILs 族群的基因型分離比在符合孟德爾分離比情況下為 1:1，利用 `geno.table()` 彙整所有分子標誌的統計值資料，並以卡方適合度檢定計算 p 值，以 Bonferroni 校正多重檢定之 p 值門檻，若分子標誌的 p 值小於 0.05 除以分子標誌總數，則視之為不平衡分離的分子標誌，確認發生不平衡分離的分子標誌區域是否與在早世代分離族群中發現的位置相符。

加入以建立的四個功能性分子標誌 *Ehd1*、*Ehd4*、*Ghd7* 及 *Dth8* 的基因型資料，其在染色體上的物理圖譜位置分別為 chr 10:17,077,589 bp、chr 4:1,270,709 bp、chr 7:9,152,804 bp 及 chr 8:4,333,919 bp。以 `est.map()` 計算每條染色體上 SNP 間的互換率，選用 Kosambi 函數 (Kosambi, 1943) 把互換率轉換成遺傳距離後，以 `replacemap()` 將估算後的遺傳距離放入原本讀取的物件中。以 `summary.map()` 檢視各連鎖群資訊及連鎖距離總長，並以 `plot.map()` 繪製連鎖圖譜。

## 2. 數量基因座之定位

在進行 QTL 定位前，先利用 Shapiro-Wilk 檢查外表型分布是否符合常態性，在第一個環境下外表型有些微偏離常態分布的現象 (p-value = 0.0003278)，第二個環境下外表型則符合常態分布 (p-value = 0.1299) (附圖)。

QTL 定位採用 multiple interval mapping (MIM) (Kao et al., 1999) 統計方法，步驟為：在一開始模式並未存在任何 QTL 時，先以 scanone() 進行區間定位 (Interval mapping, IM) 法，做單一 QTL 模式搜尋，選擇 Haley-Knott 的迴歸模式做運算 (Haley and Knott, 1992)，以重排試驗 (Churchill and Doerge, 1994) 方法重複計算 1000 次估算 LOD 的門檻值， $\alpha$  值設為 0.05。以 makeqtl() 建立模型並放入 scanone() 得到的 QTL 位置，利用 fitqtl() 分析整個模型的顯著性，當模型中涵括兩個以上 QTL 時，以 addint() 檢測兩兩 QTL 之間是否具有交感作用，若交感效應顯著則加入模型中，再以 refineqtl() 對模型中 QTL 的位置進行微調，使得全模式的 LOD 值為最高。以 addqtl() 在全模式下找尋額外的 QTL，若有新的 QTL 大於門檻 LOD 值則以 addtoqtl() 將此 QTL 加入模型，利用 fitqtl() 分析整個模型的顯著性，之後以 addint() 檢測模型中 QTL 間是否具有交感作用，以及 refineqtl() 調整最佳位置使得總 LOD 值最高。重複 addqtl() 及 addint() 步驟，直到掃描到 QTL 的 LOD 值都小於重排的門檻值則停止 QTL 定位。最終以 fitqtl() 設定參數 get.est=TURE，估計全模式中 QTL 的效應值以及外表型解釋變異。

為了避免遺漏主效應不強，但具有相當大交感效應組合的 QTL，以 addpair() 基於現有模式掃描是否存在其他的 QTL 交感效應，或以 scantwo() 建立基礎模式對整個基因組偵測 QTL 交感效應。

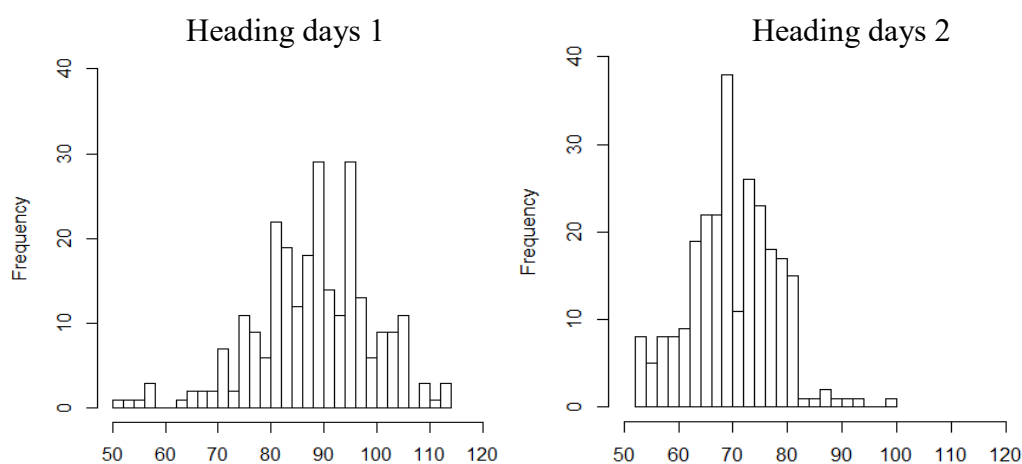
在兩個環境下估計涵蓋 QTL 的信賴區間方法為依據 Darvasi 等人的經驗公式 (Darvasi and Soller, 1997)：將定位到的 QTL 位置加減一半 CI 值，估計 QTL 坐落的信賴區間。 $CI = \frac{530}{N-v}$ ，N 為定位族群的數目，v 為外表型解釋變異量。

## 第四章 結果與討論

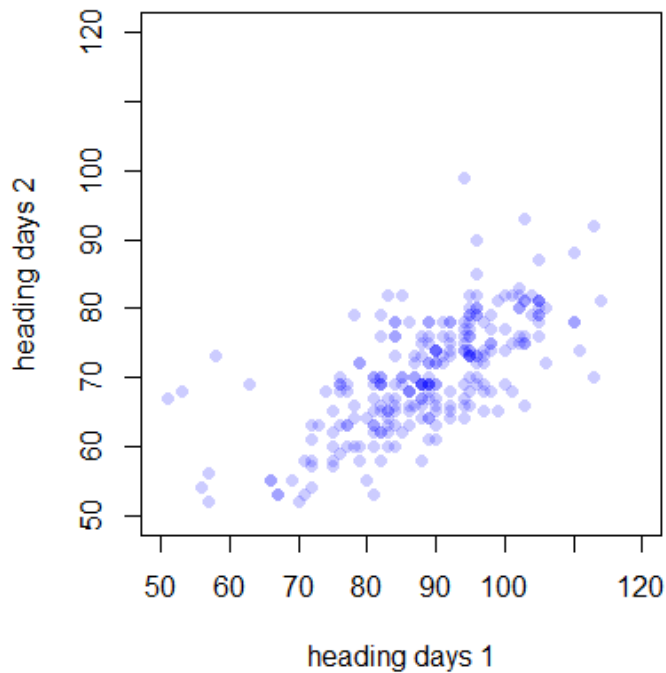


### 第一節 RILs 的抽穗日數變異

RILs 族群在早播種期的抽穗日數為  $88.7 \pm 11.3$  天，族群抽穗日數範圍 51-114 天，TK2 與 TCS10 抽穗日數分別為 100 及 83 天；晚播種期的抽穗期日數  $70.4 \pm 7.9$  天，族群抽穗日數範圍 52-99 天，TK2 抽穗期為 65 天，TCS10 在田間生命力表現較弱而死亡，因此無抽穗日數紀錄 (圖三)，觀察兩個播種期的抽穗日數散布圖，推測可能是環境機差或基因與播種期的交感作用造成抽穗日數有一定分散性 (圖四)。RILs 族群在早播種期的抽穗期分布遠超過兩親本的抽穗期，表現出超親分離 (transgressive segregation) 現象，推測具有多個效應方向分散 (disperse) 的抽穗期基因影響外表型變異。



圖三、台稈 2 號/台中私 10 號 RILs 在早播種期 (左) 與晚播種期 (右) 的抽穗日數分布




圖四、台梗 2 號/台中秈 10 號 RILs 族群在兩個播種期的抽穗日數散佈圖

## 第二節 多重迴歸分析結果

### 1. 兩個播種期個別的多重迴歸分析結果

早播種期抽穗日數之完整模式變方分析結果得到 *Ehd1*、*Ehd4*、*Ghd7*、*Dth8* 及一個三基因交感項 *Ehd1:Ghd7:Dth8* 顯著表現 (表二)，晚播種期抽穗日數之完整模式變方分析結果得到 *Ehd1*、*Ehd4*、*Dth8* 及一個兩基因交感項 *Ehd1:Dth8* 顯著表現 (表三)，將前述顯著表現的基因建構兩個播種期的多重迴歸模型，估計基因之效應、變方成分及外表型解釋變異，結果得到外表型總解釋變異分別為 58.91%與 74.97% (表四、五)。帶有 TK2 的 *Ehd1* 對偶基因效應在早與晚播種期分別為 5.5 及 5.9 天，*Ehd1* 表現在兩個播種期下差異不大；*Ehd4* 效應在早與晚播種期分別為 -4.3 及 -2.6 天，在早播種期的效應較晚播種期提早 1.7 天，推測 *Ehd4*



基因與環境之間有交感效應。本次 *Ehd1* 與 *Ehd4* 在兩個播種期的效應估計值和顏 (2015) 的迴歸分析結果差異不大，兩者皆為主要控制抽穗期變異的基因。*Ghd7* 表現只有在早播種期達到顯著水準，帶有 TK2 對偶基因的效應為-2.0 天，推測此基因可能只有在特定環境下才有表現。帶有 TK2 的 *Dth8* 對偶基因在早與晚播種期下效應分別為 1.5 及 0.8 天，*Dth8* 個別效應只在早播種期下顯著影響外表型。早播種期下 *Ehd1*:*Ghd7*:*Dth8* 交感項顯著表現，當三個基因都帶有 TK2 對偶基因時效應增加 1.4 天；在晚播種期下 *Ehd1*:*Dth8* 交感項達到顯著水準，當兩個基因都為 TK2 對偶基因時效應減少 1.2 天，因此推測 *Dth8* 可能在特定環境才有表現，且 *Dth8* 與其他基因形成交感項，影響抽穗日數變異。帶有 TK2 的 *Ehd1* 與 *Dth8* 對偶基因效應能延長抽穗日數，而 TK2 的 *Ehd4* 與 *Ghd7* 對偶基因效應則縮短抽穗日數，在私稻與粳稻之間帶有多個基因效應表現方向相反，使得後代分離族群抽穗期呈現分散。

表二、早播種期抽穗日數之完整模式變方分析結果

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Ehd1	1	5113.48	5113.48	66.99	1.92E-14 ***
Ehd4	1	3740.08	3740.08	49.00	2.83E-11 ***
Ghd7	1	907.52	907.52	11.89	0.000672 ***
Dth8	1	557.30	557.30	7.30	0.007409 **
Ehd1:Ehd4	1	17.52	17.52	0.23	0.632313
Ehd1:Ghd7	1	8.22	8.22	0.11	0.743122
Ehd4:Ghd7	1	27.11	27.11	0.36	0.551771
Ehd1:Dth8	1	58.98	58.98	0.77	0.38029
Ehd4:Dth8	1	4.65	4.65	0.06	0.805266
Ghd7:Dth8	1	36.39	36.39	0.48	0.490578
Ehd1:Ehd4:Ghd7	1	0.79	0.79	0.01	0.919013
Ehd1:Ehd4:Dth8	1	3.65	3.65	0.05	0.827151
Ehd1:Ghd7:Dth8	1	552.07	552.07	7.23	0.007687 **
Ehd4:Ghd7:Dth8	1	11.63	11.63	0.15	0.696586
Ehd1:Ehd4:Ghd7:Dth8	1	41.28	41.28	0.54	0.462836
Residuals	228	17402.87	76.33		

表三、晚播種期抽穗日數之完整模式變方分析結果

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Ehd1	1	6210.50	6210.50	228.30	3.32E-36 ***
Ehd4	1	1414.44	1414.44	51.99	8.12E-12 ***
Ghd7	1	38.76	38.76	1.42	0.233869
Dth8	1	159.23	159.23	5.85	0.016332 *
Ehd1:Ehd4	1	18.23	18.23	0.67	0.413897
Ehd1:Ghd7	1	0.27	0.27	0.01	0.921315
Ehd4:Ghd7	1	0.88	0.88	0.03	0.857594
Ehd1:Dth8	1	361.18	361.18	13.28	0.000333 ***
Ehd4:Dth8	1	4.39	4.39	0.16	0.68824
Ghd7:Dth8	1	3.59	3.59	0.13	0.716661
Ehd1:Ehd4:Ghd7	1	1.34	1.34	0.05	0.824443
Ehd1:Ehd4:Dth8	1	15.55	15.55	0.57	0.450381
Ehd1:Ghd7:Dth8	1	98.57	98.57	3.62	0.058233 .
Ehd4:Ghd7:Dth8	1	8.11	8.11	0.30	0.585624
Ehd1:Ehd4:Ghd7:Dth8	1	75.91	75.91	2.79	0.096199 .
Residuals	228	6202.44	27.20		

表四、早播種期的抽穗日數多重迴歸分析結果

$$HD1 = Ehd1 + Ehd4 + Ghd7 + Dth8 + Ehd1:Ghd7:Dth8 + \varepsilon$$

	Df	Effect <sup>a</sup>	Mean Sq	VC <sup>b</sup>	PVE(%) <sup>c</sup>	F value	Pr(>F)	
<b>Ehd1</b>	1	5.5	5113.5	59.51	32.73	68.82	8.054e-15	***
<b>Ehd4</b>	1	-4.3	3740.1	35.06	19.28	50.33	1.477e-11	***
<b>Ghd7</b>	1	-2.0	907.5	6.63	3.65	12.21	0.0005658	***
<b>Dth8</b>	1	1.5	557.3	3.31	1.82	7.50	0.0066368	**
<b>Ehd1:Ghd7:Dth8</b>	1	1.4	480.1	2.60	1.43	6.46	0.0116628	*
<b>Residuals</b>	238		74.3	74.72	41.09			

<sup>a</sup> 基因效應估計值以 TK2 對偶基因效應表示

<sup>b</sup>VC : variance component (R::VCA, remlMM)

<sup>c</sup>PVE : 外表型變異解釋量 phenotypic variance explained

迴歸模式顯著性採用 F 檢定，顯著水準表示為 \*0.05, \*\*0.01, \*\*\*0.001

表五、晚播種期的抽穗日數多重迴歸分析結果

$$HD2 = Ehd1 + Ehd4 + Dth8 + Ehd1:Dth8 + \varepsilon$$

	Df	Effect	Mean Sq	VC	PVE(%) <sup>b</sup>	F value	Pr(>F)	
<b>Ehd1</b>	1	5.9	6637.5	66.07	59.27	237.90	< 2.2e-16	***
<b>Ehd4</b>	1	-2.6	1579.9	13.62	12.21	56.62	1.024e-12	***
<b>Dth8</b>	1	0.8	151.5	0	0	5.43	0.0206227	*
<b>Ehd1:Dth8</b>	1	-1.2	381.5	3.89	3.49	13.67	0.0002689	***
<b>Residuals</b>	243		27.9	27.9	25.03			

<sup>a</sup> 基因效應估計值以 TK2 對偶基因效應表示

<sup>b</sup>VC : variance component (R::VCA, remlMM)

<sup>c</sup>PVE : 外表型變異解釋量 phenotypic variance explained

迴歸模式顯著性採用 F 檢定，顯著水準表示為 \*0.05, \*\*0.01, \*\*\*0.001

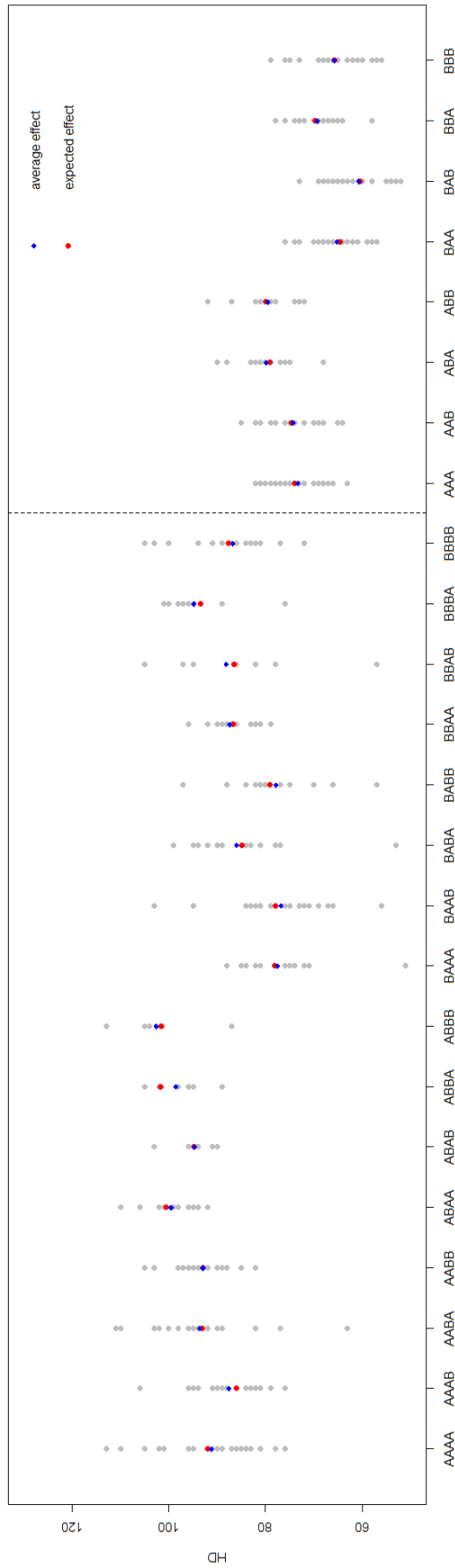
## 2. 四個抽穗期基因對抽穗日數之影響

早播種期的迴歸分析結果顯示，除了四個功能性分子標誌顯著影響抽穗日數，*Ehd1:Ghd7:Dth8* 交感作用亦顯著影響外表型，在 RILs 族群中每個功能性分子標誌各有兩種對偶基因，共有 16 種不同的組合的基因型。晚播種期的迴歸分析結果有三個控制抽穗日數的功能性分子標誌皆顯著影響抽穗日數，其中 *Ehd1* 與



*Dth8* 具有交感作用，共有 8 種不同的組合的基因型。第一個環境的迴歸分析結果以 AAAA 基因型為例，四個基因型依序為帶有具 TK2 的 *ehd1ehd1*、*Ehd4Ehd4*、*ghd7ghd7* 及 *Dth8Dth8* 對偶基因，TCS10 所帶的對偶基因則以 B 為代號。而在第二個環境的迴歸分析結果中，AAA 基因型依序為帶有具 TK2 的 *ehd1ehd1*、*Ehd4Ehd4* 及 *Dth8Dth8* 對偶基因。

在兩個播種期下以迴歸分析得到抽穗期效應估計值與實際觀察到的外表型平均值差異不大，但在晚播種期的抽穗期效應估計值相較早播種期下來得準確，基因組合內的標準差較小。在兩個播種期分別 16 個與 9 個對偶基因組合中，在每一個群內的相同基因組合下都有一定的變異性，推測抽穗日數之變異可能受到環境機差或其他基因控制（表六、七，圖五）。



表六、在早播種期下 16 種基因型效應的抽穗日數估計值與觀察值

基因組合	抽穗日數估計值	抽穗日數實際觀察值
AAAA	91.9	91.2 ± 9.2
AAAB	86.1	87.6 ± 7.1
AABA	93.1	93.7 ± 10.8
AABB	92.9	92.9 ± 5.8
ABAA	100.5	99.5 ± 5.4
ABAB	94.7	94.7 ± 4.2
ABBA	101.7	98.6 ± 5.9
ABBB	101.5	102.7 ± 8.5
BAAA	78.1	77.6 ± 8.9
BAAB	77.9	76.8 ± 10.7
BABA	84.9	86.0 ± 10.0
BABB	79.1	77.9 ± 10.9
BBAA	86.7	87.4 ± 3.8
BBAB	86.5	88.1 ± 16.1
BBBA	93.5	94.8 ± 6.9
BBBB	87.7	86.8 ± 9.3



表七、在晚播種期下 16 種基因型效應的抽穗日數估計值與觀察值

基因組合	抽穗日數估計值	抽穗日數實際觀察值
AAA	73.9	73.3 ± 4.3
AAB	74.7	74.3 ± 5.1
ABA	79.1	79.9 ± 4.8
ABB	79.9	79.5 ± 5.7
BAA	64.5	65.2 ± 4.6
BAB	60.5	60.7 ± 6.1
BBA	69.7	69.2 ± 3.9
BBB	65.7	65.8 ± 6.4

### 3. 合併兩個播種期的分析結果

為了解 TK2/TCS10 RILs 族群播種期與控制抽穗日數基因之間的關係，合併兩次播種期資料，以變方分析完整模型後，挑選統計顯著的變項進行多重迴歸分析 (表八、九)。得到結果顯示總解釋變異為 84.11%，其中播種期有最大的解釋變異佔 54.46%，效應在早播種期比晚播種期增加 18.8 天抽穗日數。*Ehd1* 與 *Ehd4* 為分別為第一及第二大的基因效應，當帶有 TK2 對偶基因的效應分別為 5.6 及 -3.5 天。*Ehd4* 和播種期有交感作用，在早播種期下帶有 TK2 的 *Ehd4* 對偶基因會使抽穗日數減少 0.8 天。帶有 TK2 的 *Ghd7* 對偶基因效應會使抽穗日數減少 1.2 天，*Ghd7* 與播種期之間交感作用表現顯著，在早播種期下帶有 TK2 的 *Ghd7* 對偶基因會使抽穗日數減少 0.8 天。當帶有 TK2 的 *Dth8* 對偶基因時，抽穗日數會增加 1.1 天，*Ehd1:Dth8* 與 *Ehd1:Ghd7:Dth8* 交感作用顯著影響抽穗日數，當形成交感的基因都帶有 TK2 對偶基因型時，效應分別-1.0 及 1.1 天，因此 *Dth8* 會和 *Ehd1* 及 *Ghd7* 基因形成交感項影響抽穗日數變異 (圖六)。整體而言，播種期效應、*Ehd1* 及 *Ehd4* 基因效應為主要影響抽穗日數變異的因子，*Ghd7* 與 *Dth8* 為效應相對較小的基因，基因與播種期之間的效應皆不大。

表八、合併兩個播種期抽穗日數之完整模式變方分析結果

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Env	1	40724.93	40724.93	786.71	2.50E-101 ***
Ehd1	1	11297.34	11297.34	218.24	1.23E-40 ***
Ehd4	1	4877.29	4877.29	94.22	2.25E-20 ***
Ghd7	1	660.68	660.68	12.76	0.0003912 ***
Dth8	1	656.15	656.15	12.68	0.0004094 ***
Env:Ehd1	1	26.63	26.63	0.51	0.4735851
Env:Ehd4	1	277.23	277.23	5.36	0.0211005 *
Ehd1:Ehd4	1	0.00	0.00	0.00	0.9934597
Env:Ghd7	1	285.59	285.59	5.52	0.0192584 *
Ehd1:Ghd7	1	5.72	5.72	0.11	0.7397229
Ehd4:Ghd7	1	18.87	18.87	0.36	0.5462627
Env:Dth8	1	60.37	60.37	1.17	0.2807386
Ehd1:Dth8	1	356.04	356.04	6.88	0.0090189 **
Ehd4:Dth8	1	0.00	0.00	0.00	0.995222
Ghd7:Dth8	1	31.43	31.43	0.61	0.4362927
Env:Ehd1:Ehd4	1	35.75	35.75	0.69	0.4064237
Env:Ehd1:Ghd7	1	2.76	2.76	0.05	0.8173838
Env:Ehd4:Ghd7	1	9.12	9.12	0.18	0.6749361
Ehd1:Ehd4:Ghd7	1	2.10	2.10	0.04	0.8405987
Env:Ehd1:Dth8	1	64.12	64.12	1.24	0.2662998
Env:Ehd4:Dth8	1	9.04	9.04	0.17	0.6762392
Ehd1:Ehd4:Dth8	1	2.07	2.07	0.04	0.8416778
Env:Ghd7:Dth8	1	8.56	8.56	0.17	0.6844752
Ehd1:Ghd7:Dth8	1	558.60	558.60	10.79	0.0010987 **
Ehd4:Ghd7:Dth8	1	19.59	19.59	0.38	0.5388009
Env:Ehd1:Ehd4:Ghd7	1	0.04	0.04	0.00	0.9789158
Env:Ehd1:Ehd4:Dth8	1	17.13	17.13	0.33	0.5653935
Env:Ehd1:Ghd7:Dth8	1	92.05	92.05	1.78	0.1830464
Env:Ehd4:Ghd7:Dth8	1	0.16	0.16	0.00	0.9558671
Ehd1:Ehd4:Ghd7:Dth8	1	114.58	114.58	2.21	0.1375121
Env:Ehd1:Ehd4:Ghd7:Dth8	1	2.62	2.62	0.05	0.8222205
Residuals	456	23605.31	51.77		

表九、合併兩個播種期的多重迴歸分析結果

HD= env<sub>i</sub>+Ehd1+Ehd4+Ghd7+Dth8+env:Ehd4+env:Ghd7+Ehd1:Dth8+Ehd1:Ghd7:Dth8+ε; i=1,-1

	Df	Effect <sup>a</sup>	Mean Sq	VC <sup>c</sup>	PVE(%) <sup>d</sup>	F value	Pr(>F)	
<b>Env<sup>b</sup></b>	1	9.4	40725	173.32	54.46	807.59	< 2.2e-16	***
<b>Ehd1</b>	1	5.6	11297	61.34	19.27	224.03	< 2.2e-16	***
<b>Ehd4</b>	1	-3.5	4877	22.50	7.07	96.72	< 2.2e-16	***
<b>Ghd7</b>	1	-1.2	661	1.20	0.38	13.10	0.0003265	***
<b>Dth8</b>	1	1.1	656	0.99	0.31	13.01	0.0003421	***
<b>Env:Ehd4</b>	1	-0.8	302	2.20	0.69	6.00	0.0146850	*
<b>Env:Ghd7</b>	1	-0.8	286	1.94	0.61	5.68	0.0175989	*
<b>Ehd1:Dth8</b>	1	-1.0	365	1.81	0.57	7.23	0.0074122	**
<b>Ehd1:Ghd7:Dth8</b>	1	1.1	548	2.37	0.74	10.86	0.0010564	**
<b>Residuals</b>	478		50	50.57	15.89			

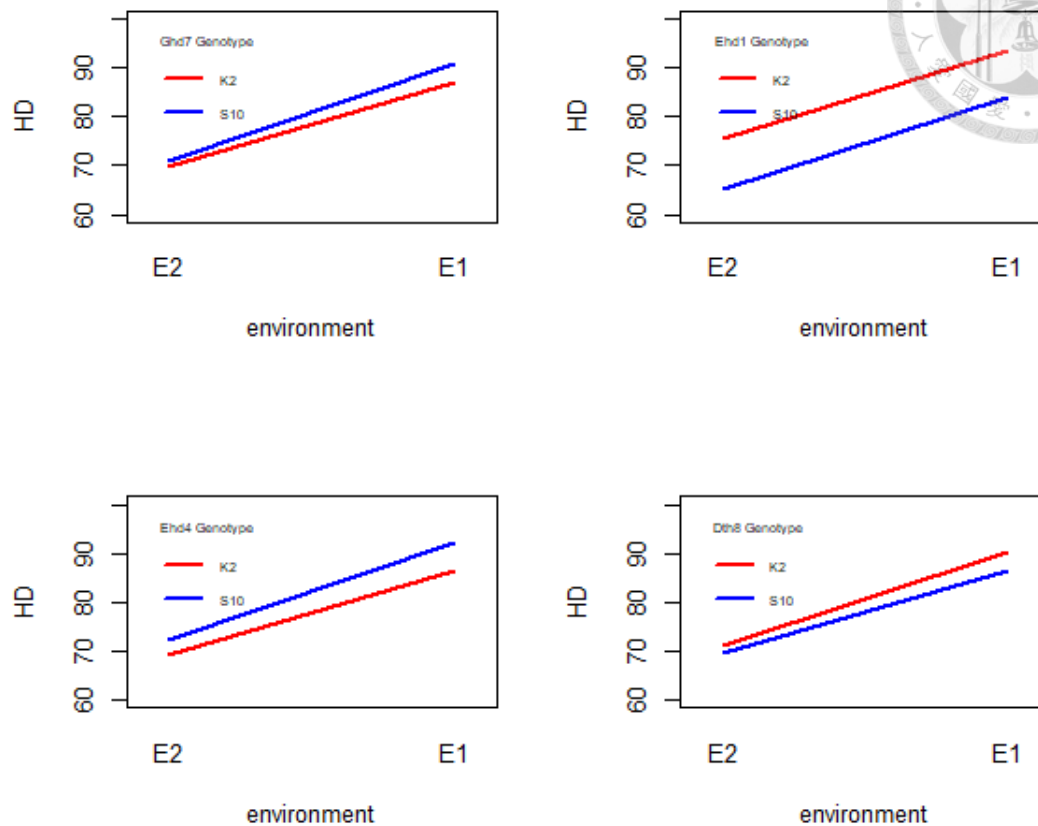
<sup>a</sup> 基因效應估計值以 TK2 對偶基因效應表示

<sup>b</sup> 播種期效應估計值以早播種期效應表示

<sup>c</sup> VC : variance component (R::VCA, remlMM)

<sup>d</sup> PVE : 外表型變異解釋量 phenotypic variance explained

迴歸模式顯著性採用 F 檢定，顯著水準表示為 \*0.05, \*\*0.01, \*\*\*0.001

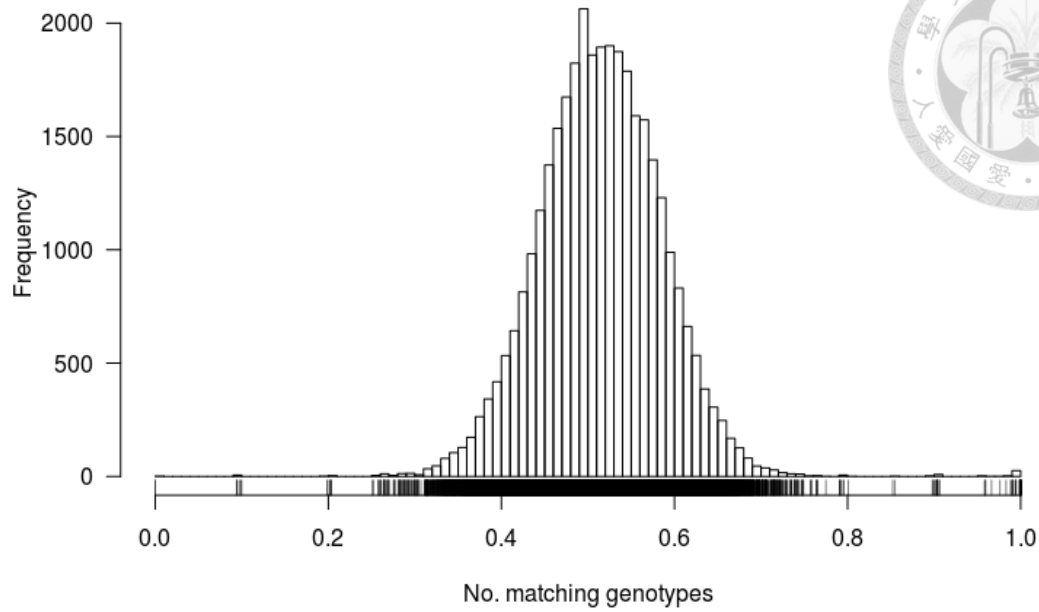


圖六、四個基因與播種期之間的交感效應圖

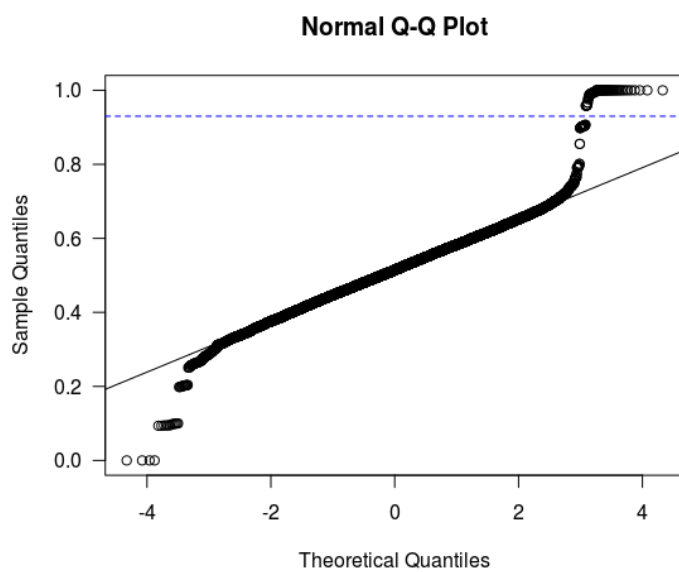
### 第三節 連鎖圖譜建構

#### 1. 連鎖圖譜建構與分析

刪除分子標記基因型的缺值大於 60 個的樣品，共 3 個，以及刪除樣品間基因型相同比例高於 93% 的個體，共 23 個 (圖七、八)。當不同家系來自同一個 F<sub>2</sub> 單株時，可能造成 RILs 世代的家系間的基因型出現高度相同的比例。最終包含親本及被保留下來的 RILs 總數為 234 個。



圖七、樣品間基因型相同比例之分布圖



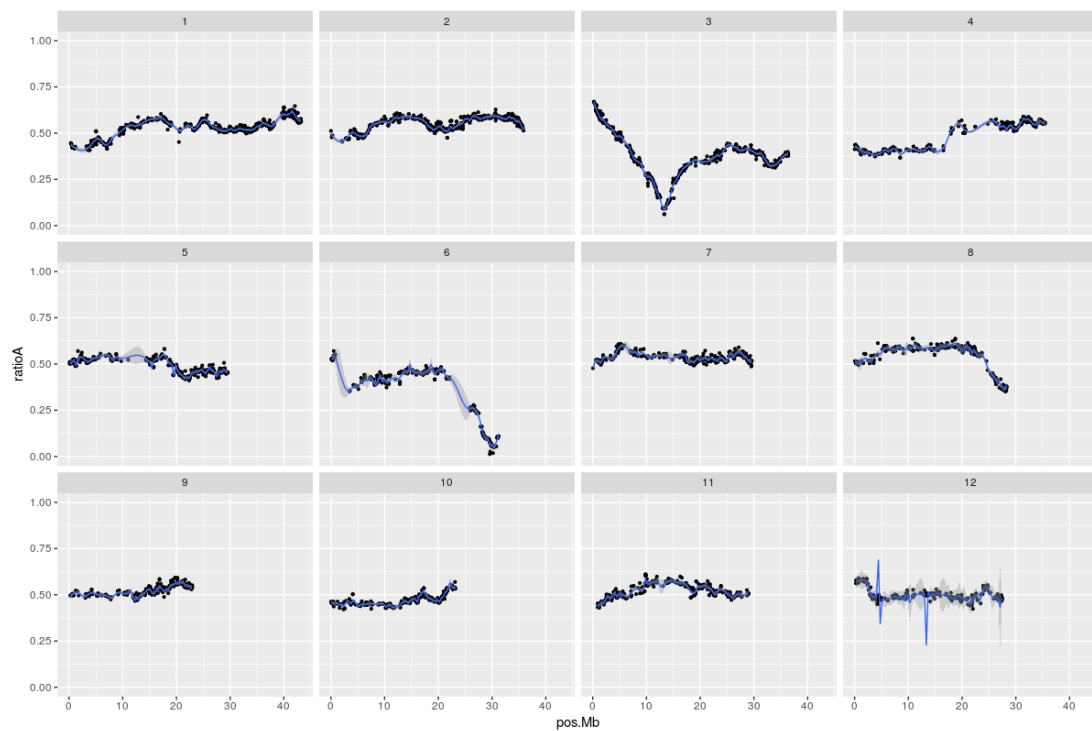
圖八、樣品間基因型相同比例之常態分佈圖，虛線代表樣品間基因型相同比例為 0.93

vcf 檔中 0/0、1/1、0/1 基因型分別代表 hom-ref、hom-alt、異型結合型，並非親本的基因型資料，因此將資料轉換為代表 TK2 和 TCS10 對偶基因的基因型



A/A 及 B/B，及異質結合型 A/B。扣除親本間不具多型性的 variants (16.6% = 1150/6937)、任一親本基因型為缺值而無法從 RILs 基因型推估的 SNP，以及親本基因型為異質結合型的 SNP，最後得到 5216 個 SNP。

RILs 族群在第九世代時，兩種對偶基因數量占總數的比例應趨近 0.5，且對偶基因頻度變化應隨著物理圖譜位置呈現連續性波動，除了在王 (2010) F<sub>2</sub> 世代發現第 3 及 6 條染色體上具有分離失衡的區域，以 minor allele frequency 小於 0.1 作為門檻值，刪除 SNP 後最終得到結果如圖九。



圖九、刪除 TK2 對偶基因的比例 (ratio A) 為極端值的分子標誌在 12 條染色體的物理圖譜 (Mbp) 上波動情況

將初步的連鎖圖譜結果當中，分子標誌間距大約 2 cM 內挑選一個缺值率最低的 SNP，此外在分子標誌間距大於 5 cM 的區域加入缺值率及異質結合率總合低於 40% 的 SNP。四個功能性分子標誌分別位在第 1 (7.8 及 54.3 cM)、4 (30.8 cM)、5 (48.9 cM)、6 (84.3 cM)、10 (61.7 cM) 條染色體上，總共 332 個分子標誌，

對 233 個樣品 (231 個 RILs 及 2 個親本) 建構的連鎖圖譜總長為 1274.6 cM，每條染色體有 20 至 39 個分子標誌，分子標誌間平均距離為 4 cM，連鎖群長度為 71.1 至 164.8 cM。除了在第一及第六條染色體上出現分子標誌最大間距大於 20 cM 的現象之外，其他條染色體的分子標誌最大間距皆小於 15 cM(表十，圖十)。

其他研究當中同樣以水稻 RILs 為材料，但使用一或兩種限制酶減少基因組複雜度的文庫製備方法，De Leon et al (2016) 以 GBS 方法建構文庫，經過篩選後得到 9303 個 SNP 建構連鎖圖譜總長為 1650 cM；Chen et al (2016) 改良 GBS 方法，選擇 *MseI* 及 *HaeIII* 酵素組合建構文庫，以 2711 個 SNP 建構連鎖圖譜，總長為 2343.68 cM。Spindel et al (2013) 以 *ApeKI* 建構文庫，利用所有具有多型性的 SNP 建構連鎖圖譜，總長為 1862.96 cM；Liu et al (2015) 以 *ApeKI* 建構兩個族群文庫，分別得到 6513 及 14382 個 SNP，連鎖圖譜總長分別為 1402 及 1536 cM。

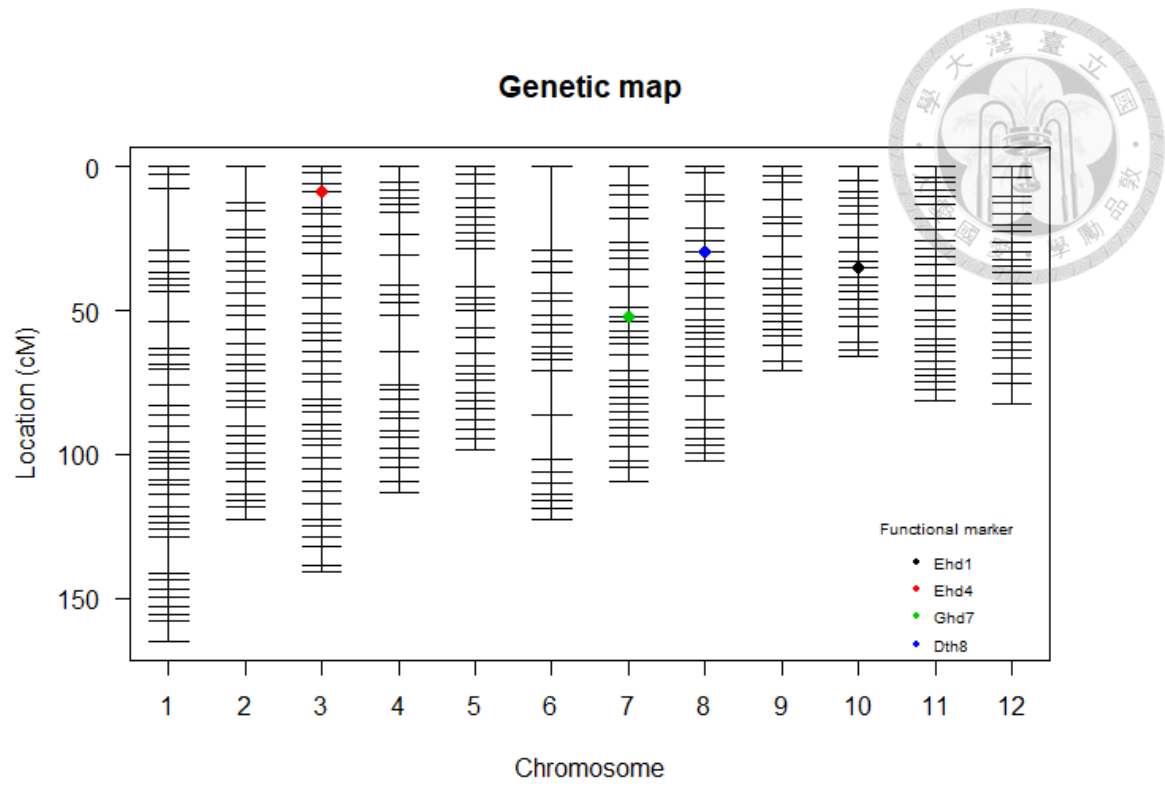
親本間的親緣關係遠近、採用的限制酶種類及組合、資料分析篩選過程的標準及使用的分析軟體等皆會影響分子標誌在連鎖圖譜的分布型態，透過觀察連鎖圖譜總長度是判斷分子標誌品質的參考依據，因為錯誤的分子標誌會使得連鎖圖譜長度膨脹。數量遺傳基因座是否能被精確定位，有賴連鎖圖譜上分子標誌的基因型資訊的正確性及密度大小 (Darvasi et al., 1993)。

在相同親本的 F<sub>2</sub> 族群中使用 133 個 InDel 及 14 個 SSR 分子標誌建構連鎖圖譜，總長 1432.4 cM，平均距離為 9.8 cM，在第 1、6、7 及 12 條染色體上的分子標誌間距大於 20 cM(王, 2010)。然而本次實驗 RILs 族群除了在第 1 條染色體上分子標誌 rs18076621-rs18287105 之間最大間距為 21.6 cM，以及在第 6 條染色體上的分子標誌 rs877802467- rs20468485 之間最大間距為 28.8 cM，與在 F<sub>2</sub> 圖譜上的最大間距相比差異不大外，於其他條染色體上的分子標誌之間最大間距皆明顯比建構 F<sub>2</sub> 族群的遺傳圖譜縮小許多，改善了使用傳統型分子標誌數量不足，無法完整呈現遺傳圖譜上互換位點的限制。

在這次連鎖圖譜當中，第六條染色體上 6:3465711\_T/C- rs348069060 分子標誌區間有最大間距 35.2 cM，其中可能的原因為 TK2 與 TCS10 皆帶有相同祖先來源 identical by decent 的 Waxy-L 對偶基因片段 (Chen et al., 2008; Wu et al., 2013a)，因此在這片段區間內無法找到額外兩親本之間具有多型性的分子標誌。

表十、分子標誌於 12 個連鎖群上的結果

連鎖群	分子標誌數目	連鎖長度 (cM)	平均距離 (cM)	最大距離 (cM)
1	39	165.0	4.3	21.7
2	32	122.6	4.0	12.9
3	39	141.2	3.7	7.6
4	25	113.5	4.7	12.1
5	27	98.2	3.8	13.3
6	21	122.4	6.1	28.8
7	30	109.2	3.8	8.1
8	27	102.3	3.9	9.5
9	20	70.9	3.7	7.1
10	21	66.4	3.3	5.3
11	27	81.6	3.1	5.0
12	24	82.5	3.6	7.4
總和	332	1274.6	4.0	28.8



圖十、水稻 RILs 的 12 個連鎖群遺傳圖譜

## 2. 不平衡分離現象

不平衡分離指的是在雜交後代族群中，對偶基因或對偶基因型頻度偏離孟德爾遺傳定律的現象。在 TK2/TCS10 RILs 族群中發現具有不平衡分離現象位在第三條染色體前端 rs18803599 及 rs18834207 (0.26-0.56 Mb) 兩個分子標誌方向都是偏向 TK2 基因型；同樣在第三條染色體上 rs19573815-rs19353340 (9.02-24.61 Mb) 區間與 rs350741874-rs19511507 (31.80-34.32 Mb) 區間的分子標誌不平衡分離出現群集現象偏向 TCS10 基因型，分別有 14 個及 3 個分子標誌；在第六條染色體末端 rs878022495- rs20374719 (25.88-31.20 Mb) 區間有 7 個群集現象的分子標誌發生不平衡分離的方向都偏向 TCS10 基因型；在第八條染色體末端上 rs352554350- rs20698229 (26.93-27.99 Mb) 區間有 3 個分子標誌不平衡分離偏向 TCS10 基因型 (表十一)。

王 (2010) 在  $F_2$  族群中發現第 3、4、5、6、7、8 及 12 條染色體上的分子標誌也有不平衡分離現象，本次 RILs 族群與  $F_2$  族群發生偏離的分子標誌的物理圖譜區間具有重疊，在第 3 條染色體上 RD0301 (0.4Mb) 分子標誌不平衡分離為偏向稈稻同質結合型，同樣在第 3 條染色體上 RD 0304-RD0310 (7.89-27.24 Mb) 以及 RD0312-RD0314 (31.28-37.15 Mb) 分子標誌區間不平衡分離為偏向私稻同質結合型；在第 6 條染色體 RD0609-RD0613 分子標誌區間不平衡分離偏向私稻同質結合型。

曾 (2010) 以 TCS10 為母本及 TK2 為父本的  $F_2$  及四個正反回交 ( $BC_1F_1$ ) 族群中，在第 3 及 6 條染色體找到不平衡分離基因座 (segregation distortion loci, SDL)，偏離方向皆為 TCS10 同質結合型，在第 3 條染色體上 RD0306-RD0307 (12.55-15.52 Mb) 區間的 SDL 具雄配子效應；在第 6 條染色體上 RD 0612 (29.89 Mb) 上的 SDL 具雄配子效應。經由模擬族群的結果顯示，當一條染色體上僅存在一個 SDL，或兩個 SDL 獨立存在於不同條染色體時，遺傳距離的估算並不會受到影響，亦不影響 QTL 的偵測。只有在同一條染色體上出現兩個 SDL 時才會

影響連鎖圖譜的長度，當兩個 SDL 偏離的方向相同時會縮短遺傳距離的長度，若兩個 SDL 偏離的方向相反，則造成遺傳距離長度增加。



表十一、試驗族群中發生不平衡分離的分子標誌

Markers	Chromosome	Genotype in RILs population		P.value	direction
		AA	BB		
rs18803599	3	142	67	2.13E-07	TK2
rs18834207	3	134	78	0.00012	TK2
rs19573815	3	66	144	7.35E-08	TCS10
rs19710648	3	55	157	2.46E-12	TCS10
rs876835731	3	49	162	7.30E-15	TCS10
rs19015867	3	36	174	1.68E-21	TCS10
rs54288749	3	23	173	8.72E-27	TCS10
rs352093581	3	14	194	9.51E-36	TCS10
rs19143414	3	19	192	1.05E-32	TCS10
3:14599069_C/T	3	32	178	7.13E-24	TCS10
3:14938671_G/A	3	38	171	3.59E-20	TCS10
rs878326992	3	53	157	7.14E-13	TCS10
rs19561508	3	64	147	1.10E-08	TCS10
rs19113702	3	70	140	1.36E-06	TCS10
rs19301217	3	71	124	0.000147	TCS10
rs19353340	3	78	134	0.00012	TCS10
rs350741874	3	75	136	2.68E-05	TCS10
rs878411478	3	64	144	2.91E-08	TCS10
rs19511507	3	66	144	7.35E-08	TCS10
rs878022495	6	49	163	4.90E-15	TCS10
rs20023693	6	40	170	2.94E-19	TCS10
rs20035585	6	32	175	2.81E-23	TCS10
rs20095644	6	28	171	3.79E-24	TCS10
rs877324770	6	18	192	3.26E-33	TCS10
rs20278539	6	8	198	5.30E-40	TCS10
rs20374719	6	12	199	6.34E-38	TCS10
rs352554350	8	76	137	2.92E-05	TCS10
rs20542870	8	77	136	5.29E-05	TCS10
rs20698229	8	75	139	1.21E-05	TCS10

## 第四節 QTL mapping 分析結果



### 1. 早播種期與晚播種期之遺傳定位

在兩個播種期以 1000 次重排試驗所得的統計量的 99.9%、95% 及 90% 作為經驗顯著水準的門檻值，當資料檢定的統計量超過 95% 經驗顯著水準的門檻值時，則判定此區間存在 QTL。其中  $\alpha$  為 0.001、0.05 及 0.1 時，早播種期的外表型經驗門檻值分別為 3.69、3.13 及 2.78，晚播種期的外表型經驗門檻值分別為 3.64、2.95 及 2.67。QTL 名稱按照座落的染色體予以命名，效應值估計以 TK2 的對偶基因效應表示。

在早播種期的 MIM 分析結果顯示總共定位到四個 QTL (圖十一、表十二)，分別為在第 10、3、7 及 8 條染色體上的 *Ehd1*、*qHD3*、*qHD7* 及 *qHD8*，基因之間都沒有顯著的交感效應，外表型總解釋變異為 39.25%，遺傳定位結果與多重迴歸分析結果類似，除了在第 7 條染色體上 *qHD7* 與 *Ghd7* 距離差 26.48 cM，兩者之間明顯不同以外，在第 10 條染色體的定位結果恰為 *Ehd1*，*qHD3* 與 *Ehd4* 相差 4.86 cM，*qHD8* 與 *Dth8* 相差 2.18 cM。

在晚播種期的 MIM 分析結果總共定位到三個 QTL (圖十二、表十三)，分別為在第 10、3 及 8 條染色體上的 *Ehd1*、*qHD3* 及 *qHD8*，其中 *Ehd1* 與 *qHD8* 具有顯著的交感效應，外表型總解釋變異為 59.94%，遺傳定位結果與多重迴歸分析結果一致。

兩個播種期的遺傳定位結果得到 *Ehd1*、*qHD3* 與 *qHD8* 皆位在相同的遺傳距離上，當帶有 TK2 的 *Ehd1* 對偶基因效應都為 5.8 天；帶有 TK2 的 *qHD3* 對偶基因效應分別為 -4.8 與 -3.1 天，相差 1.7 天；帶有 TK2 的 *qHD8* 對偶基因效應分別 2.2 與 1.0 天，相差 1.2 天；*qHD7* 只在早播種期被定位到，帶有 TK2 的 *qHD7* 對偶基因效應為 -2.5 天。其中 *qHD3* 對偶基因效應在兩個播種期的差異較大，在多重迴歸分析中亦得到 *qHD3* 與播種期之間交感顯著表現，蘇 (2010) 在多個環境



遺傳定位中也指出 *qHD3* 效應在一期作的效應相較二期作大，*qHD3* 效應在不同環境下表現有差異。



表十二 早播種期 MIM 結果

QTL	chr	CI	Pos	LOD	Effect <sup>a</sup>	%var <sup>b</sup>	P-value
<b>Ehd1</b>	10	32.99-38.35	35.25	18.08	5.8	25.96	< 2e-16 ***
<b>qHD3</b>	3	0-20.80	4.00	11.49	-4.8	15.41	6.60e-13 ***
<b>qHD7</b>	7	31.96-84.73	78.00	3.76	-2.5	4.66	3.97e-05 ***
<b>qHD8</b>	8	12.00-99.56	32.00	3.00	2.2	3.69	0.000241 ***
<b>Total</b>	y ~ Ehd1+qHD3+qHD7+qHD8					39.25	

<sup>a</sup> 基因效應估計值以 TK2 對偶基因效應表示

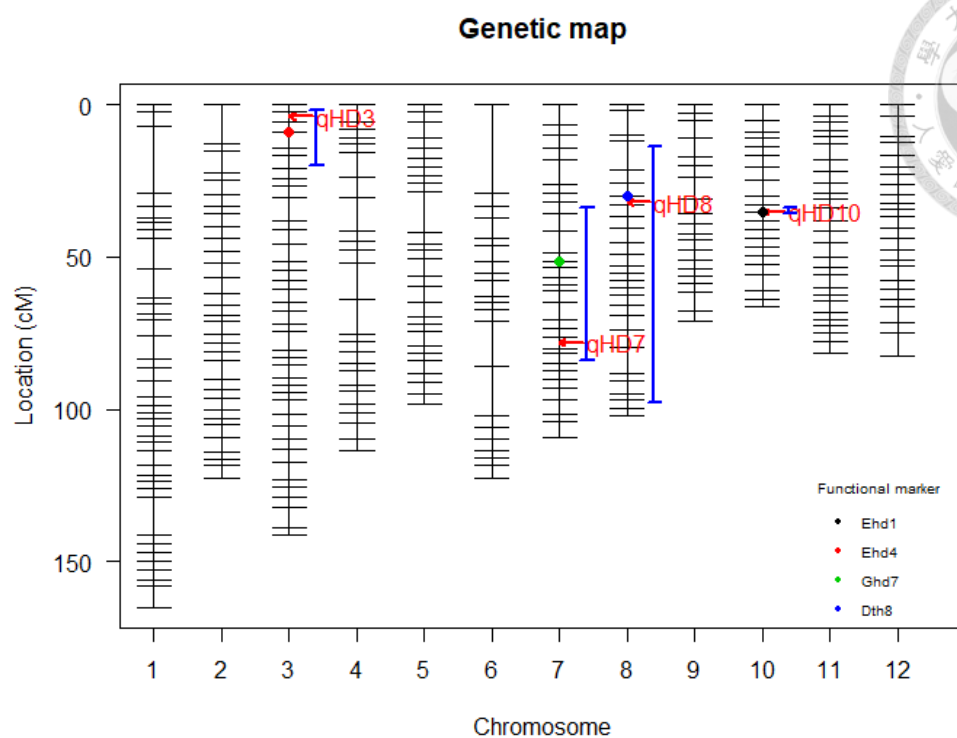
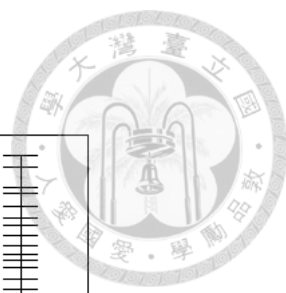
<sup>b</sup>var : 外表型變異解釋量 phenotypic variance explained

表十三 晚播種期 MIM 結果

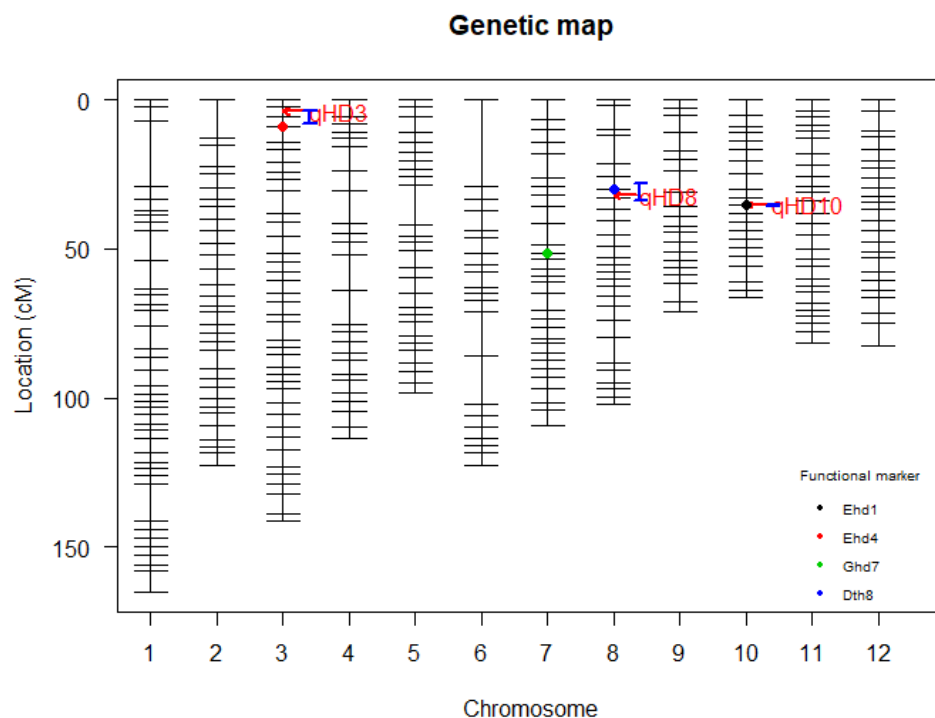
QTL	chr	CI	Pos	LOD	Effect <sup>a</sup>	%var <sup>b</sup>	P-value
<b>Ehd1</b>	10	35.24-38.35	35.24	42.85	5.8	53.37	< 2e-16 ***
<b>qHD3</b>	3	2.33-8.85	4.00	14.57	-3.1	13.37	5.55e-16 ***
<b>qHD8</b>	8	25.93-36.79	32.00	4.98	1.0	4.15	1.33e-05 ***
<b>Ehd1: qHD8</b>				3.11	-1.3	2.54	0.000184 ***
<b>Total</b>	y ~ Ehd1+qHD3 +qHD8+ Ehd1: qHD8					59.94	

<sup>a</sup> 基因效應估計值以 TK2 對偶基因效應表示

<sup>b</sup>var : 外表型變異解釋量 phenotypic variance explained



圖十一、早播種期的抽穗日數 MIM 結果

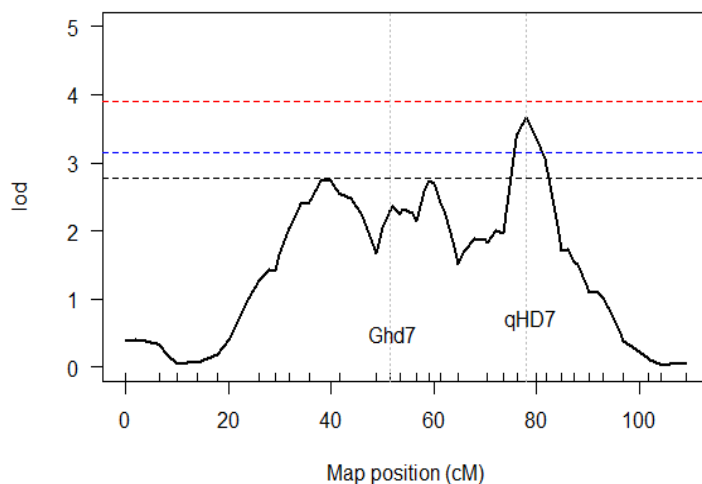


圖十二、晚播種期的抽穗日數 MIM 結果

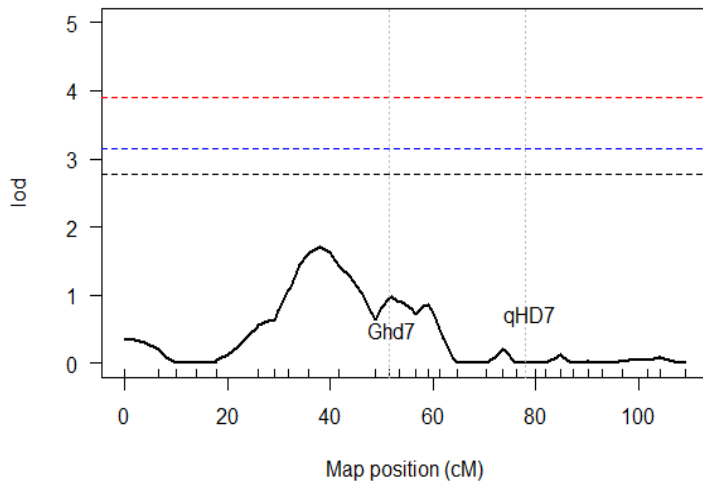
## 2. 早播種期定位到 *Ghd7* 鄰近的 *qHD7*

*qHD7* 僅在早播種期下被定位到，當帶有 TK2 對偶基因的效應為-2.5 天，外表型解釋變異量為 4.66%，蘇 (2010) 在  $F_{2.4}$  世代於台北一期作及高雄一期作也定位到 *qHD7*，外表型解釋變異界於 3.2~5.6%，帶有 TK2 對偶基因的效應為-1.7~-2.6 天，兩個族群的定位結果差異不大，推測 *qHD7* 只在特定環境下有表現。蘇 (2010) 在  $F_{2.4}$  世代定位 *qHD7* 的物理圖譜位置約為 20.61 Mbp，本次 RILs 的定位結果中 *qHD7* 的物理圖譜位置約為 23.39 Mbp，*qHD7* 與 *Ghd7* 之間遺傳距離相差 26.48 cM，推測 *qHD7* 的信賴區間內可能包含不只一個控制抽穗日數的基因。

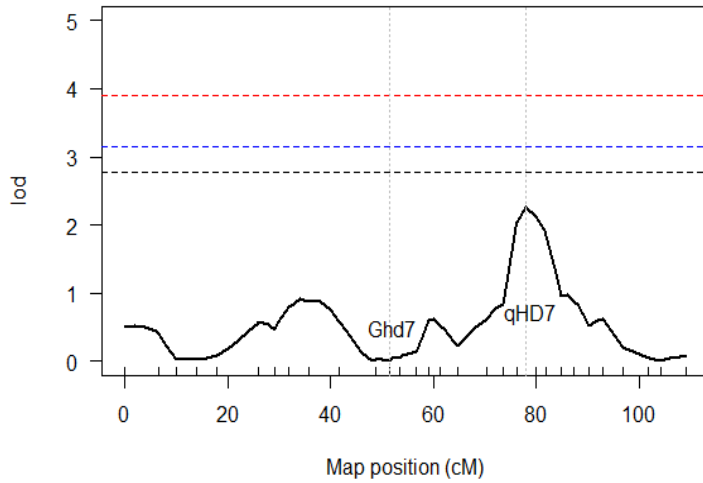
*qHD7* 與 *Ghd7* 因為連鎖且效應較小，因此在進行遺傳定位時將 *qHD7* 納入模型後解釋掉部分 *Ghd7* 的變異，使得 *Ghd7* 的 LOD 值不易超過重排試驗門檻值，*qHD7* 與 *Ghd7* 無法同時被定位到。若先將 *Ehd1*、*Ehd4* 與 *Dth8* 納入遺傳定位的模型中 (圖十三)，在相同的基準模式下分別放入 *Ghd7* 與 *qHD7* (圖十四、十五)，分析結果得到 *Ghd7* 亦顯著影響外表型解釋變異，*Ghd7* 與 *qHD7* 兩者的效應估計值差異不大 (表十四)。



圖十三、在模式  $y \sim Ehd1 + Ehd4 + Dth8$  條件下以 MIM 定位 QTL 在第七條染色體上的 LOD 值變化圖



圖十四、在模式  $y \sim Ehd1 + Ehd4 + Dth8 + qHD7$  (model 1) 條件下，第七條染色體上的 LOD 值變化



圖十五、在模式  $y \sim Ehd1 + Ehd4 + Dth8 + Ghd7$  (model 2) 條件下，第七條染色體上的 LOD 值變化

表十四、模型  $y \sim Ehd1 + Ehd4 + Dth8 + qHD7$  (model 1) 及  $y \sim Ehd1 + Ehd4 + Dth8 + Ghd7$  (model 2) 的遺傳定位結果

	Effect <sup>a</sup>		%var <sup>b</sup>	
	model 1	model 2	model 1	model 2
<b>Ehd1</b>	5.8 ***	5.6 ***	25.96	24.52
<b>Ehd4</b>	-4.8 ***	4.3 ***	15.41	13.01
<b>Dth8</b>	2.2 ***	-2.2 ***	3.69	3.78
<b>qHD7</b>	-2.5 ***	-	4.66	-
<b>Ghd7</b>	-	1.9 **	-	2.90

<sup>a</sup> 基因效應估計值以 TK2 對偶基因效應表示

<sup>b</sup>var : 外表型變異解釋量 phenotypic variance explained

欲進一步將第七條染色體上的連鎖基因分離，可利用以 TCS10 為遺傳背景但在第七條染色體上帶有 TK2 染色體片段的全染色體置換系 (whole chromosome substitution lines, WCSL) 產生染色體片段置換系 (chromosome segment substitution lines, CSSL)，進行更精細的 QTL 定位 (吳東鴻，個人通訊)。

### 3. 不同族群在不同環境下之遺傳定位比較

*Ehd1* 在 F<sub>2</sub>、F<sub>2.4</sub> 及 RILs 族群中，不同年份、期作以及播種期皆被偵測到，除了在 F<sub>2.4</sub> 的台北二期作因為低溫使得效應值為 12.42 天外，其他環境下的效應值介於 5.61~6.92 天，具有最大的外表型解釋變異，介於 25.96~58.69%，為穩定表現的主效基因 (表十五)。

*Ehd4* 除了在 F<sub>2.4</sub> 的台北二期作沒被偵測到，其在 F<sub>2</sub> 與 F<sub>2.4</sub> 的一期作效應 (-3.63~-6.71 天) 較二期作效應 (-1.85~-3.61 天) 來得大，在 RILs 的早播種期的效應為 -4.8 天，較晚播種期效應為 -3.1 天來的大，*Ehd4* 表現與環境間具有交感作用，在合併兩個播種期資料的多重迴歸分析結果亦得到 *Ehd4* 與播種期之間的交感顯著。*Ehd4* 的外表型解釋變異介於 5.23~26.47%，為次於 *Ehd1* 的主效基因。

*Dth8* 在 RILs 族群兩個播種期都有被定位到，在 F<sub>2</sub> 台北一期作以及 F<sub>2.4</sub> 北中南的一期作亦有被定位到，有可能在日照較長的環境下容易表現，與前人研究指出 *Dth8* 只在長日條件下被定位到的結果類似 (Han et al., 2017)。 *Dth8* 效應值介於 1~3.98 天，外表型解釋變異介於 1.35~9.12%，相對 *Ehd1* 及 *Ehd4* 而言為效應較小的基因。在晚播種期亦偵測到 *Ehd:Dth8* 交感效應，但在 F<sub>2</sub> 及 F<sub>2.4</sub> 族群皆未被偵測到。

在 RILs 族群中 *qHD7* 只在早播種期有顯著表現，在 F<sub>2.4</sub> 族群中 *qHD7* 只在台北一期作與高雄一期作被偵測到，推測 *qHD7* 僅在日照較長的條件下才有表現。*qHD7* 效應值介於 -1.72~-1.58 天，外表型解釋變異介於 3.09~4.90%，為效應相對較小的 QTL。

表十五、台稈 2 號/台中私 10 號雜交 F<sub>2</sub>、F<sub>2.4</sub> 及 RILs 族群在不同環境下遺傳定位結果

QTL	population	Environment	Position (cM)	Effect <sup>a</sup>	LOD	PVE <sup>b</sup>
qHD10	F <sub>2</sub>	971Taipei	36.00	6.29	28.66	26.97
		F <sub>2.4</sub>	981Taipei	39.00	6.16	39.85
		981Taichung	39.00	5.66	51.08	43.11
		991Kaohsiung	39.00	6.68	48.23	44.81
		982Taipei	39.00	12.42	44.41	47.48
		982Taichung	39.00	5.61	43.76	45.65
		982Kaohsiung	39.00	6.92	70.99	58.69
		RILs	Sowing date 1	35.25	5.80	18.08
		Sowing date 2	35.24	5.80	42.85	53.37
qHD3	F <sub>2</sub>	971Taipei	6.00	-6.71	28.25	26.47
		F <sub>2.4</sub>	981Taipei	6.00	-4.53	20.40
		981Taichung	6.00	-3.63	23.23	14.96
		991Kaohsiung	6.00	-3.88	20.58	14.60
		982Taipei			0.45	0.32
		982Taichung	6.00	-3.21	23.44	12.05
		982Kaohsiung	6.00	-1.85	7.16	5.23
		RILs	Sowing date 1	4.00	-4.80	11.49
		Sowing date 2	4.00	-3.10	14.57	13.37
qHD8	F <sub>2</sub>	971Taipei	36.00	3.98	11.31	9.12
		F <sub>2.4</sub>	981Taipei	30.00	3.98	12.19
		981Taichung	30.00	3.78	4.57	2.48
		991Kaohsiung	30.00	1.53	2.25	1.35
		982Taipei			1.05	0.75
		982Taichung			1.15	0.48
		982Kaohsiung			3.14	2.21
		RILs	Sowing date 1	32.00	2.20	3.00
		Sowing date 2	32.00	1.00	4.98	4.15
qHD7	F <sub>2.4</sub>	981Taipei	71.00	-2.58	7.90	4.90
		981Taichung			3.63	1.96
		991Kaohsiung	71.00	-1.72	5.03	3.09
		982Taipei			0.09	0.06
		982Taichung			0.87	0.36
		982Kaohsiung			1.97	1.37
	RILs	Sowing date 1	78.00	-2.50	11.49	4.66

<sup>a</sup> 基因效應估計值以 TK2 對偶基因效應表示，F<sub>2</sub> 遺傳定位結果摘錄王群山 (2010)，F<sub>2.4</sub> 遺傳定位結果摘錄蘇家玄 (2010)

<sup>b</sup>PVE：外表型變異解釋量 phenotypic variance explained

## 第五章 結論



本研究利用 *Ehd1*、*Ehd4*、*Ghd7* 與 *Dth8* 共四個功能性分子標誌，探討栽培於兩個環境的 TK2/TCS10 RILs 族群中播種期與基因間의 交感，兩個播種期的多重迴歸分析結果中，*Ehd1*、*Ehd4* 與 *Dth8* 顯著影響兩次環境的抽穗日數變異，在早播種期與晚播種期下，*Ehd1* 效應分別為 5.5 及 5.9 天，*Ehd4* 效應分別為 -4.3 及 -2.6 天，*Dth8* 效應分別為 1.5 及 0.8 天。*Ghd7* 只在早播種期下顯著表現，效應為 -2.0 天。在早播種期下 *Ehd1*:*Ghd7*:*Dth8* 與晚播種期下 *Ehd1*:*Dth8* 基因間交感顯著表現，效應分別為 1.4 及 -1.2 天。合併基因與播種期的多重迴歸分析結果指出播種期具有最大的外表型解釋變異為 54.46%，*Ehd4* 及 *Ghd7* 與播種期的交感效應皆為 -0.8 天，基因間交感 *Ehd1*:*Ghd7*:*Dth8* 與 *Ehd1*:*Dth8* 效應分別為 1.1 及 -1.0 天。*Ehd1* 與 *Ehd4* 為穩定表現的主效基因，*Ghd7* 與 *Dth8* 的效應相對較小。利用連鎖圖譜找尋是否仍有其他 QTL 控制抽穗日數變異，QTL 定位結果與多重迴歸分析結果差異不大，在兩個播種期都定位到 *Ehd1*、*Ehd4* 與 *Dth8*，*Ehd1* 效應分別為 5.7 及 5.8 天，*Ehd4* 效應分別為 -4.6 及 -3.1 天，*Dth8* 效應分別為 2.4 及 1.0 天，在晚播種期下偵測到 *Ehd1*:*Dth8* 交感效應為 -1.3 天。*qHD7* 只在早播種期下被偵測到，其信賴區間涵蓋 *Ghd7*，推測此區間可能含有兩個以上的 QTL，需要進一步利用全染色體置換系衍生成染色體片段置換系，才能將連鎖的基因做精細定位。



## 參考文獻

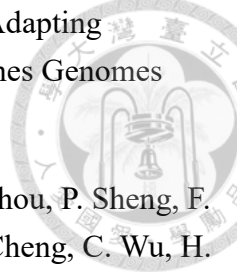


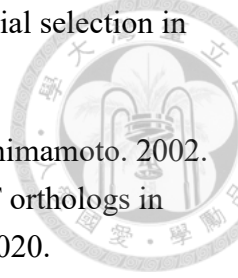
- 曾馨儀. 2010. 秈稈稻雜交 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 與 F<sub>2</sub> 族群之不平衡分離。碩士論文，國立台灣大學，台北市
- 王群山. 2010. 控制水稻穀粒長、穀粒寬、抽穗期、株高與穗長之數量性狀基因座的遺傳定位。碩士論文，國立台灣大學，台北市
- 蘇家玄. 2010. 多環境下水稻抽穗期與株高之數量性狀基因座定位。碩士論文，國立台灣大學，台北市
- 顏維萱. 2015. 水稻抽穗期基因在台灣自然日照環境下之效應。碩士論文，國立台灣大學，台北市
- Arbelaez, J.D., L.T. Moreno, N. Singh, C.-W. Tung, L.G. Maron, Y. Ospina, C.P. Martinez, C. Grenier, M. Lorieux, and S. McCouch. 2015. Development and GBS-genotyping of introgression lines (ILs) using two wild species of rice, *O. meridionalis* and *O. rufipogon*, in a common recurrent parent, *O. sativa* cv. Curinga. *Mol. Breed.* 35(2): 81.
- Baird, N.A., P.D. Etter, T.S. Atwood, M.C. Currey, A.L. Shiver, Z.A. Lewis, E.U. Selker, W.A. Cresko, and E.A. Johnson. 2008. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *Plos One* 3(10): e3376.
- Barchi, L., S. Lanteri, E. Portis, A. Acquadro, G. Valè, L. Toppino, and G.L. Rotino. 2011. Identification of SNP and SSR markers in eggplant using RAD tag sequencing. *BMC Genomics* 12(1): 304.
- Barchi, L., S. Lanteri, E. Portis, G. Valè, A. Volante, L. Pulcini, T. Ciriacci, N. Acciarri, V. Barbierato, L. Toppino, and G.L. Rotino. 2012. A RAD Tag Derived Marker Based Eggplant Linkage Map and the Location of QTLs Determining Anthocyanin Pigmentation. *PLOS ONE* 7(8): e43740.
- Beissinger, T.M., C.N. Hirsch, R.S. Sekhon, J.M. Foerster, J.M. Johnson, G. Muttoni, B. Vaillancourt, C.R. Buell, S.M. Kaeppler, and N. de Leon. 2013. Marker Density and Read Depth for Genotyping Populations Using Genotyping-by-Sequencing. *Genetics* 193(4): 1073–1081.
- Bentley, A.R., E.F. Jensen, I.J. Mackay, H. Hönicka, M. Fladung, K. Hori, M. Yano, J.E. Mullet, I.P. Armstead, C. Hayes, D. Thorogood, A. Lovatt, R. Morris, N.

- Pullen, E. Mutasa-Göttgens, and J. Cockram. 2013. Flowering Time. p. 1–66. *In* Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bian, X.F., X. Liu, Z.G. Zhao, L. Jiang, H. Gao, Y.H. Zhang, M. Zheng, L.M. Chen, S.J. Liu, H.Q. Zhai, and J.M. Wan. 2011. Heading date gene, *dth3* controlled late flowering in *O. Glaberrima* Steud. by down-regulating *Ehd1*. *Plant Cell Rep.* 30(12): 2243–2254.
- Bioconductor - VariantAnnotation. Available at <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/VariantAnnotation.html> (verified 5 October 2016).
- Celik, I., S. Bodur, A. Frary, and S. Doganlar. 2016. Genome-wide SNP discovery and genetic linkage map construction in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using a genotyping by sequencing (GBS) approach. *Mol. Breed.* 36(9): 133.
- Chen, M.-H., C.J. Bergman, S.R.M. Pinson, and R.G. Fjellstrom. 2008. Waxy gene haplotypes: Associations with pasting properties in an international rice germplasm collection. *J. Cereal Sci.* 48(3): 781–788.
- Chen, L., W. Gao, S. Chen, L. Wang, J. Zou, Y. Liu, H. Wang, Z. Chen, and T. Guo. 2016. High-resolution QTL mapping for grain appearance traits and co-localization of chalkiness-associated differentially expressed candidate genes in rice. *Rice* 9(1): 48.
- Chen, Z., B. Wang, X. Dong, H. Liu, L. Ren, J. Chen, A. Hauck, W. Song, and J. Lai. 2014. An ultra-high density bin-map for rapid QTL mapping for tassel and ear architecture in a large F2 maize population. *BMC Genomics* 15: 433.
- Cho, L.-H., J. Yoon, and G. An. 2017. The control of flowering time by environmental factors. *Plant J.* 90(4): 708–719.
- Choi, S.C., S. Lee, S.-R. Kim, Y.-S. Lee, C. Liu, X. Cao, and G. An. 2014. Trithorax Group Protein *Oryza sativa* Trithorax1 Controls Flowering Time in Rice via Interaction with Early heading date3. *PLANT Physiol.* 164(3): 1326–1337.
- Churchill, G.A., and R.W. Doerge. 1994. Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping.
- Chutimanitsakun, Y., R.W. Nipper, A. Cuesta-Marcos, L. Cistué, A. Corey, T. Filichkina, E.A. Johnson, and P.M. Hayes. 2011. Construction and application

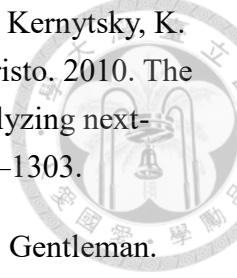
for QTL analysis of a Restriction Site Associated DNA (RAD) linkage map in barley. *BMC Genomics* 12: 4.

- Dai, X., Y. Ding, L. Tan, Y. Fu, F. Liu, Z. Zhu, X. Sun, X. Sun, P. Gu, H. Cai, and C. Sun. 2012. LHD1, an Allele of DTH8 / Ghd8, Controls Late Heading Date in Common Wild Rice (*Oryza rufipogon*). *J. Integr. Plant Biol.* 54(10): 790–799.
- Darvasi, A., and M. Soller. 1997. A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav. Genet.* 27(2): 125–132.
- Darvasi, A., A. Weinreb, V. Minke, J.I. Weller, and M. Soller. 1993. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 134(3): 943–951.
- Davik, J., D.J. Sargent, M.B. Brurberg, S. Lien, M. Kent, and M. Alsheikh. 2015. A ddRAD Based Linkage Map of the Cultivated Strawberry, *Fragaria xananassa*. *PLOS ONE* 10(9): e0137746.
- De Leon, T.B., S. Linscombe, and P.K. Subudhi. 2016. Molecular Dissection of Seedling Salinity Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) Using a High-Density GBS-Based SNP Linkage Map. *Rice* 9: 52.
- Doi, K., T. Izawa, T. Fuse, U. Yamanouchi, T. Kubo, Z. Shimatani, M. Yano, and A. Yoshimura. 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(8): 926–936.
- Du, A., W. Tian, M. Wei, W. Yan, H. He, D. Zhou, X. Huang, S. Li, and X. Ouyang. 2017. The DTH8-Hd1 Module Mediates Day-Length-Dependent Regulation of Rice Flowering. *Mol. Plant* 10(7): 948–961.
- Duan, M., Z. Sun, L. Shu, Y. Tan, D. Yu, X. Sun, R. Liu, Y. Li, S. Gong, and D. Yuan. 2013. Genetic analysis of an elite super-hybrid rice parent using high-density SNP markers. *Rice* 6(1): 21.
- Elshire, R.J., J.C. Glaubitz, Q. Sun, J.A. Poland, K. Kawamoto, E.S. Buckler, and S.E. Mitchell. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *Plos One* 6(5): e19379.
- Feltus, F.A., J. Wan, S.R. Schulze, J.C. Estill, N. Jiang, and A.H. Paterson. 2004. An SNP Resource for Rice Genetics and Breeding Based on Subspecies Indica and Japonica Genome Alignments. *Genome Res.* 14(9): 1812–1819.

- 
- Furuta, T., M. Ashikari, K.K. Jena, K. Doi, and S. Reuscher. 2017. Adapting Genotyping-by-Sequencing for Rice F2 Populations. *G3 Genes Genomes Genet.* 7(3): 881–893.
- Gao, H., X.-M. Zheng, G. Fei, J. Chen, M. Jin, Y. Ren, W. Wu, K. Zhou, P. Sheng, F. Zhou, L. Jiang, J. Wang, X. Zhang, X. Guo, J.-L. Wang, Z. Cheng, C. Wu, H. Wang, and J.-M. Wan. 2013. Ehd4 Encodes a Novel and *Oryza*-Genus-Specific Regulator of Photoperiodic Flowering in Rice. *Plos Genet.* 9(2): e1003281.
- Haley, C.S., and S.A. Knott. 1992. A Simple Regression Method for Mapping Quantitative Trait Loci in Line Crosses Using Flanking Markers. *Heredity* 69: 315–324.
- Han, Z., W. Hu, C. Tan, and Y. Xing. 2017. QTLs for heading date and plant height under multiple environments in rice. *Genetica* 145(1): 67–77.
- Hayama, R., S. Yokoi, S. Tamaki, M. Yano, and K. Shimamoto. 2003. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* 422(6933): 719–722.
- Hori, K., K. Matsubara, and M. Yano. 2016. Genetic control of flowering time in rice: integration of Mendelian genetics and genomics. *Theor. Appl. Genet.* 129(12): 2241–2252.
- Hori, K., E. Ogiso-Tanaka, K. Matsubara, U. Yamanouchi, K. Ebana, and M. Yano. 2013. Hd16, a gene for casein kinase I, is involved in the control of rice flowering time by modulating the day-length response. *Plant J.* 76(1): 36–46.
- Huang, X., X. Wei, T. Sang, Q. Zhao, Q. Feng, Y. Zhao, C. Li, C. Zhu, T. Lu, Z. Zhang, M. Li, D. Fan, Y. Guo, A. Wang, L. Wang, L. Deng, W. Li, Y. Lu, Q. Weng, K. Liu, T. Huang, T. Zhou, Y. Jing, W. Li, Z. Lin, E.S. Buckler, Q. Qian, Q.-F. Zhang, J. Li, and B. Han. 2010. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nat. Genet.* 42(11): 961–967.
- Itoh, H., Y. Nonoue, M. Yano, and T. Izawa. 2010. A pair of floral regulators sets critical day length for Hd3a florigen expression in rice. *Nat. Genet.* 42(7): 635–638.
- Izawa, T. 2007a. Daylength Measurements by Rice Plants in Photoperiodic Short-Day Flowering. p. 191–222. *In* Cytology, B.-I.R. of (ed.), Academic Press.

- 
- Izawa, T. 2007b. Adaptation of flowering-time by natural and artificial selection in Arabidopsis and rice. *J. Exp. Bot.* 58(12): 3091–3097.
- Izawa, T., T. Oikawa, N. Sugiyama, T. Tanisaka, M. Yano, and K. Shimamoto. 2002. Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev.* 16(15): 2006–2020.
- Jung, C., and A.E. Müller. 2009. Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends Plant Sci.* 14(10): 563–573.
- Kao, C.-H., Z.-B. Zeng, and R.D. Teasdale. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152(3): 1203–1216.
- Kim, S.L., S. Lee, H.J. Kim, H.G. Nam, and G. An. 2007. OsMADS51 Is a Short-Day Flowering Promoter That Functions Upstream of Ehd1, OsMADS14, and Hd3a. *Plant Physiol.* 145(4): 1484–1494.
- Kim, S.-I., and T.H. Tai. 2013. High resolution genotyping by restriction enzyme-phased sequencing of advanced backcross lines of rice exhibiting differential cold stress recovery. *Euphytica* 192(1): 107–115.
- Kojima, S., Y. Takahashi, Y. Kobayashi, L. Monna, T. Sasaki, T. Araki, and M. Yano. 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(10): 1096–1105.
- Komiya, R., A. Ikegami, S. Tamaki, S. Yokoi, and K. Shimamoto. 2008. Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice. *Development* 135(4): 767–774.
- Komiya, R., S. Yokoi, and K. Shimamoto. 2009. A gene network for long-day flowering activates RFT1 encoding a mobile flowering signal in rice. *Development* 136(20): 3443–3450.
- Koo, B.-H., S.-C. Yoo, J.-W. Park, C.-T. Kwon, B.-D. Lee, G. An, Z. Zhang, J. Li, Z. Li, and N.-C. Paek. 2013. Natural Variation in OsPRR37 Regulates Heading Date and Contributes to Rice Cultivation at a Wide Range of Latitudes. *Mol. Plant* 6(6): 1877–1888.
- Kosambi, D.D. 1943. The Estimation of Map Distances from Recombination Values. *Ann. Eugen.* 12(1): 172–175.

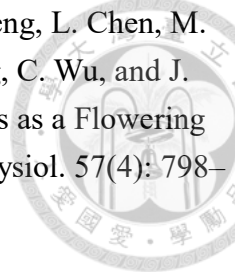
- Langmead, B., and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9(4): 357–359.
- Lee, Y.-S., and G. An. 2015. Regulation of flowering time in rice. *J. Plant Biol.* 58(6): 353–360.
- Lee, Y.-S., D.-H. Jeong, D.-Y. Lee, J. Yi, C.-H. Ryu, S.L. Kim, H.J. Jeong, S.C. Choi, P. Jin, J. Yang, L.-H. Cho, H. Choi, and G. An. 2010. OsCOL4 is a constitutive flowering repressor upstream of Ehd1 and downstream of OsphyB. *Plant J.* 63(1): 18–30.
- Leon, T.B.D., S. Linscombe, and P.K. Subudhi. 2016. Molecular Dissection of Seedling Salinity Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) Using a High-Density GBS-Based SNP Linkage Map. *Rice* 9(1): 52.
- Lim, J., Y.-H. Moon, G. An, and S.K. Jang. 2000. Two rice MADS domain proteins interact with OsMADS1. *Plant Mol. Biol.* 44(4): 513–527.
- Lin, H., M. Ashikari, U. Yamanouchi, T. Sasaki, and M. Yano. 2002. Identification and Characterization of a Quantitative Trait Locus, Hd9, Controlling Heading Date in Rice. *Breeding Science* 52, 35-41.
- Lin, H.X., T. Yamamoto, T. Sasaki, and M. Yano. 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(7): 1021–1028.
- Liu, Y., X. Qi, N.D. Young, K.M. Olsen, A.L. Caicedo, and Y. Jia. 2015. Characterization of resistance genes to rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in a “Green Revolution” rice variety. *Mol. Breed.* 35(1): 52.
- Matsubara, K., U. Yamanouchi, Y. Nonoue, K. Sugimoto, Z.-X. Wang, Y. Minobe, and M. Yano. 2011. Ehd3, encoding a plant homeodomain finger-containing protein, is a critical promoter of rice flowering. *Plant J.* 66(4): 603–612.
- Matsubara, K., U. Yamanouchi, Z.-X. Wang, Y. Minobe, T. Izawa, and M. Yano. 2008. Ehd2, a Rice Ortholog of the Maize INDETERMINATE1 Gene, Promotes Flowering by Up-Regulating Ehd1. *Plant Physiol.* 148(3): 1425–1435.
- McCormack, J.E., S.M. Hird, A.J. Zellmer, B.C. Carstens, and R.T. Brumfield. 2013. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66(2): 526–538.

- 
- McKenna, A., M. Hanna, E. Banks, A. Sivachenko, K. Cibulskis, A. Kernytksy, K. Garimella, D. Altshuler, S. Gabriel, M. Daly, and M.A. DePristo. 2010. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20(9): 1297–1303.
- Morgan, M., S. Anders, M. Lawrence, P. Aboyoun, H. Pagès, and R. Gentleman. 2009. ShortRead: a bioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data. *Bioinformatics* 25(19): 2607–2608.
- Nemoto, Y., Y. Nonoue, M. Yano, and T. Izawa. 2016. Hd1, a CONSTANS ortholog in rice, functions as an Ehd1 repressor through interaction with monocot-specific CCT-domain protein Ghd7. *Plant J.* 86(3): 221–233.
- Ogiso, E., Y. Takahashi, T. Sasaki, M. Yano, and T. Izawa. 2010. The Role of Casein Kinase II in Flowering Time Regulation Has Diversified during Evolution. *Plant Physiol.* 152(2): 808–820.
- Peng, L.-T., Z.-Y. Shi, L. Li, G.-Z. Shen, and J.-L. Zhang. 2008. Overexpression of transcription factor OsLFL1 delays flowering time in *Oryza sativa*. *J. Plant Physiol.* 165(8): 876–885.
- Peterson, B.K., J.N. Weber, E.H. Kay, H.S. Fisher, and H.E. Hoekstra. 2012. Double Digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE* 7(5): e37135.
- Poland, J.A., P.J. Brown, M.E. Sorrells, and J.-L. Jannink. 2012a. Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach. *Plos One* 7(2): e32253.
- Poland, J., J. Endelman, J. Dawson, J. Rutkoski, S.Y. Wu, Y. Manes, S. Dreisigacker, J. Crossa, H. Sanchez-Villeda, M. Sorrells, and J.L. Jannink. 2012b. Genomic Selection in Wheat Breeding using Genotyping-by-Sequencing. *Plant Genome* 5: 103–113.
- Purwestri, Y.A., Y. Ogaki, S. Tamaki, H. Tsuji, and K. Shimamoto. 2009. The 14-3-3 protein GF14c acts as a negative regulator of flowering in rice by interacting with the florigen Hd3a. *Plant Cell Physiol.*: pcp012.
- Ryu, C.-H., S. Lee, L.-H. Cho, S.L. Kim, Y.-S. Lee, S.C. Choi, H.J. Jeong, J. Yi, S.J. Park, C.-D. Han, and G. An. 2009. OsMADS50 and OsMADS56 function

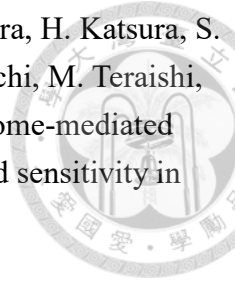
antagonistically in regulating long day (LD)-dependent flowering in rice. *Plant Cell Environ.* 32(10): 1412–1427.

- Saito, H., Q. Yuan, Y. Okumoto, K. Doi, A. Yoshimura, H. Inoue, M. Teraishi, T. Tsukiyama, and T. Tanisaka. 2009. Multiple alleles at Early flowering 1 locus making variation in the basic vegetative growth period in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 119(2): 315–323.
- Scaglione, D., A. Acquadro, E. Portis, M. Tirone, S.J. Knapp, and S. Lanteri. 2012. RAD tag sequencing as a source of SNP markers in *Cynara cardunculus* L. *BMC Genomics* 13: 3.
- Scaglione, D., A. Fornasiero, C. Pinto, F. Cattonaro, A. Spadotto, R. Infante, C. Meneses, R. Messina, O. Lain, G. Cipriani, and R. Testolin. 2015. A RAD-based linkage map of kiwifruit (*Actinidia chinensis* Pl.) as a tool to improve the genome assembly and to scan the genomic region of the gender determinant for the marker-assisted breeding. *Tree Genet. Genomes* 11(6): 115.
- Schuetzenmeister, A. 2016. VCA: Variance Component Analysis.
- Shibaya, T., K. Hori, E. Ogiso-Tanaka, U. Yamanouchi, K. Shu, N. Kitazawa, A. Shomura, T. Ando, K. Ebana, J. Wu, T. Yamazaki, and M. Yano. 2016. Hd18, Encoding Histone Acetylase Related to Arabidopsis FLOWERING LOCUS D, is Involved in the Control of Flowering Time in Rice. *Plant Cell Physiol.* 57(9): 1828–1838.
- Spindel, J., M. Wright, C. Chen, J. Cobb, J. Gage, S. Harrington, M. Lorieux, N. Ahmadi, and S. McCouch. 2013. Bridging the genotyping gap: using genotyping by sequencing (GBS) to add high-density SNP markers and new value to traditional bi-parental mapping and breeding populations. *Theor. Appl. Genet.* 126(11): 2699–2716.
- Takahashi, Y., A. Shomura, T. Sasaki, and M. Yano. 2001. Hd6, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the  $\alpha$  subunit of protein kinase CK2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(14): 7922–7927.
- Tamaki, S., S. Matsuo, H.L. Wong, S. Yokoi, and K. Shimamoto. 2007. Hd3a Protein Is a Mobile Flowering Signal in Rice. *Science* 316(5827): 1033–1036.



- 
- Tan, J., M. Jin, J. Wang, F. Wu, P. Sheng, Z. Cheng, J. Wang, X. Zheng, L. Chen, M. Wang, S. Zhu, X. Guo, X. Zhang, X. Liu, C. Wang, H. Wang, C. Wu, and J. Wan. 2016. OsCOL10, a CONSTANS-Like Gene, Functions as a Flowering Time Repressor Downstream of Ghd7 in Rice. *Plant Cell Physiol.* 57(4): 798–812.
- Tsuji, H., S. Tamaki, R. Komiya, and K. Shimamoto. 2008. Florigen and the Photoperiodic Control of Flowering in Rice. *Rice* 1(1): 25–35.
- Uncu, A.O., A. Frary, P. Karlovsky, and S. Doganlar. 2016. High-throughput single nucleotide polymorphism (SNP) identification and mapping in the sesame (*Sesamum indicum* L.) genome with genotyping by sequencing (GBS) analysis. *Mol. Breed.* 36(12): 173.
- Vergara, B.S., and T.T. Chang. 1985. The flowering response of the rice plant to photoperiod: a review of the literature. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.
- Wei, X., J. Xu, H. Guo, L. Jiang, S. Chen, C. Yu, Z. Zhou, P. Hu, H. Zhai, and J. Wan. 2010. DTH8 Suppresses Flowering in Rice, Influencing Plant Height and Yield Potential Simultaneously. *PLANT Physiol.* 153(4): 1747–1758.
- Wu, D.-H., H.-P. Wu, C.-S. Wang, H.-Y. Tseng, and K.-K. Hwu. 2013a. Genome-wide InDel marker system for application in rice breeding and mapping studies. *Euphytica* 192(1): 131–143.
- Wu, W., X.-M. Zheng, D. Chen, Y. Zhang, W. Ma, H. Zhang, L. Sun, Z. Yang, C. Zhao, X. Zhan, X. Shen, P. Yu, Y. Fu, S. Zhu, L. Cao, and S. Cheng. 2017. OsCOL16, encoding a CONSTANS-like protein, represses flowering by up-regulating Ghd7 expression in rice. *Plant Sci.* 260: 60–69.
- Wu, W., X.-M. Zheng, G. Lu, Z. Zhong, H. Gao, L. Chen, C. Wu, H.-J. Wang, Q. Wang, K. Zhou, J.-L. Wang, F. Wu, X. Zhang, X. Guo, Z. Cheng, C. Lei, Q. Lin, L. Jiang, H. Wang, S. Ge, and J. Wan. 2013b. Association of functional nucleotide polymorphisms at DTH2 with the northward expansion of rice cultivation in Asia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(8): 2775–2780.
- Xu, F., X. Sun, Y. Chen, Y. Huang, C. Tong, and J. Bao. 2015. Rapid Identification of Major QTLs Associated with Rice Grain Weight and Their Utilization. *PLOS ONE* 10(3): e0122206.

- Xue, W., Y. Xing, X. Weng, Y. Zhao, W. Tang, L. Wang, H. Zhou, S. Yu, C. Xu, X. Li, and Q. Zhang. 2008. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat. Genet.* 40(6): 761–767.
- Yagi, M., K. Shirasawa, T. Waki, T. Kume, S. Isobe, K. Tanase, and H. Yamaguchi. 2017. Construction of an SSR and RAD Marker-Based Genetic Linkage Map for Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Mol. Biol. Report.* 35(1): 110–117.
- Yan, W.-H., P. Wang, H.-X. Chen, H.-J. Zhou, Q.-P. Li, C.-R. Wang, Z.-H. Ding, Y.-S. Zhang, S.-B. Yu, Y.-Z. Xing, and Q.-F. Zhang. 2011. A Major QTL, *Ghd8*, Plays Pleiotropic Roles in Regulating Grain Productivity, Plant Height, and Heading Date in Rice. *Mol. Plant* 4(2): 319–330.
- Yang, H., J. Jian, X. Li, D. Renshaw, J. Clements, M.W. Sweetingham, C. Tan, and C. Li. 2015. Application of whole genome re-sequencing data in the development of diagnostic DNA markers tightly linked to a disease-resistance locus for marker-assisted selection in lupin (*Lupinus angustifolius*). *BMC Genomics* 16: 660.
- Yang, Y., Q. Peng, G.-X. Chen, X.-H. Li, and C.-Y. Wu. 2013. *OsELF3* Is Involved in Circadian Clock Regulation for Promoting Flowering under Long-Day Conditions in Rice. *Mol. Plant* 6(1): 202–215.
- Yano, M., Y. Harushima, Y. Nagamura, N. Kurata, Y. Minobe, and T. Sasaki. 1997. Identification of quantitative trait loci controlling heading date in rice using a high-density linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 95(7): 1025–1032.
- Yano, M., Y. Katayose, M. Ashikari, U. Yamanouchi, L. Monna, T. Fuse, T. Baba, K. Yamamoto, Y. Umehara, and Y. Nagamura. 2000. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell Online* 12(12): 2473–2483.
- Yokoo, T., H. Saito, Y. Yoshitake, Q. Xu, T. Asami, T. Tsukiyama, M. Teraishi, Y. Okumoto, and T. Tanisaka. 2014. *Se14*, Encoding a JmjC Domain-Containing Protein, Plays Key Roles in Long-Day Suppression of Rice Flowering through the Demethylation of H3K4me3 of *RFT1* (H Sassa, Ed.). *PLoS ONE* 9(4): e96064.
- Yoshida, S. 1981. Fundamentals of rice crop science. *Int. Rice Res. Inst.*

- 
- Yoshitake, Y., T. Yokoo, H. Saito, T. Tsukiyama, X. Quan, K. Zikihara, H. Katsura, S. Tokutomi, T. Aboshi, N. Mori, H. Inoue, H. Nishida, T. Kohchi, M. Teraishi, Y. Okumoto, and T. Tanisaka. 2015. The effects of phytochrome-mediated light signals on the developmental acquisition of photoperiod sensitivity in rice. *Sci. Rep.* 5: srep07709.
- You, F.M., N. Huo, Y.Q. Gu, M. Luo, Y. Ma, D. Hane, G.R. Lazo, J. Dvorak, and O.D. Anderson. 2008. BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics* 9(1): 253.
- Yu, H., W. Xie, J. Wang, Y. Xing, C. Xu, X. Li, J. Xiao, and Q. Zhang. 2011. Gains in QTL Detection Using an Ultra-High Density SNP Map Based on Population Sequencing Relative to Traditional RFLP/SSR Markers. *PLOS ONE* 6(3): e17595.
- Zhang, B., W. Ye, D. Ren, P. Tian, Y. Peng, Y. Gao, B. Ruan, L. Wang, G. Zhang, L. Guo, Q. Qian, and Z. Gao. 2015a. Genetic analysis of flag leaf size and candidate genes determination of a major QTL for flag leaf width in rice. *Rice* 8(1): 2.
- Zhang, J., X. Zhou, W. Yan, Z. Zhang, L. Lu, Z. Han, H. Zhao, H. Liu, P. Song, Y. Hu, G. Shen, Q. He, S. Guo, G. Gao, G. Wang, and Y. Xing. 2015b. Combinations of the *Ghd7*, *Ghd8* and *Hd1* genes largely define the ecogeographical adaptation and yield potential of cultivated rice. *New Phytol.* 208(4): 1056–1066.
- Zhao, J., H. Chen, D. Ren, H. Tang, R. Qiu, J. Feng, Y. Long, B. Niu, D. Chen, T. Zhong, Y.-G. Liu, and J. Guo. 2015. Genetic interactions between diverged alleles of Early heading date 1 (*Ehd1*) and Heading date 3a (*Hd3a*)/ RICE FLOWERING LOCUS T1 (*RFT1*) control differential heading and contribute to regional adaptation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.* 208(3): 936–948.
- Zheng, X.-M., L. Feng, J. Wang, W. Qiao, L. Zhang, Y. Cheng, and Q. Yang. 2016. Nonfunctional alleles of long-day suppressor genes independently regulate flowering time. *J. Integr. Plant Biol.* 58(6): 540–548.
- Zhou, X., Y. Xia, X. Ren, Y. Chen, L. Huang, S. Huang, B. Liao, Y. Lei, L. Yan, and H. Jiang. 2014. Construction of a SNP-based genetic linkage map in cultivated peanut based on large scale marker development using next-generation double-digest restriction-site-associated DNA sequencing (ddRADseq). *BMC Genomics* 15: 351.

## 附錄

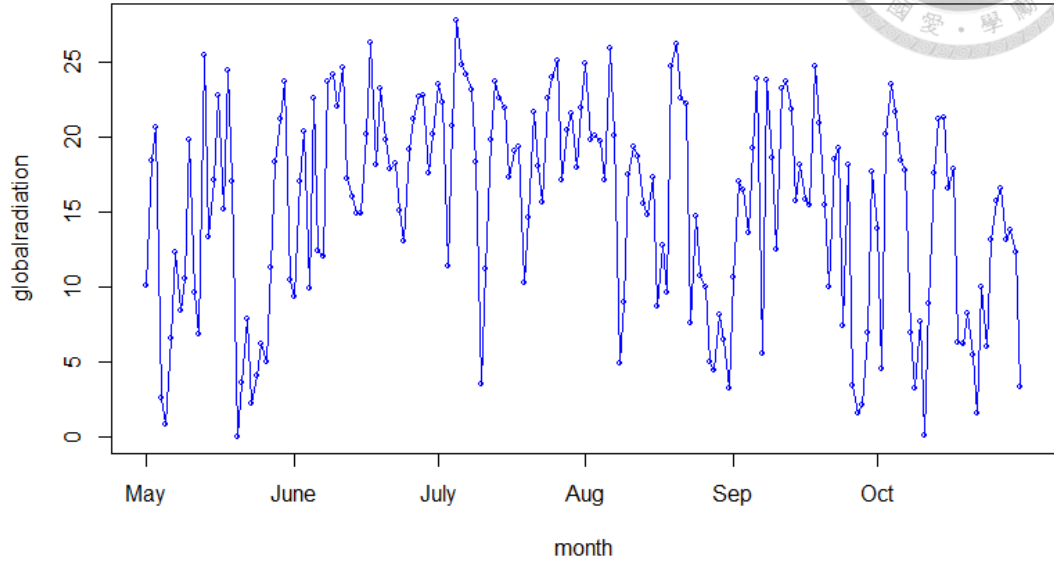


附表一、功能性分子標誌引子序列

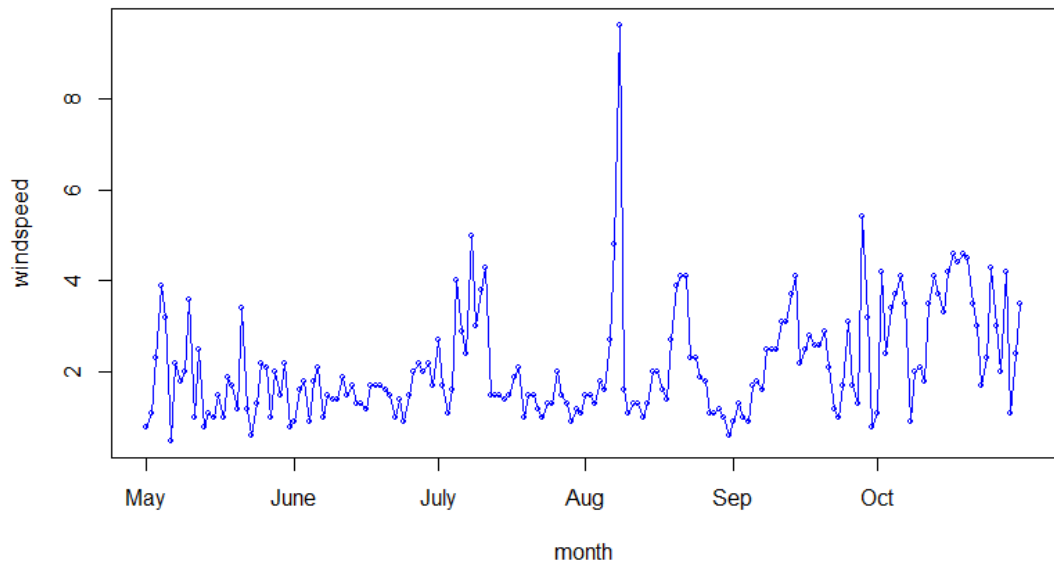
引子組合	引子名稱	引子序列 (5'-3')	文獻來源
Ehd1	Ehd1-RG	TGATCACTCACTGTCTTCGCC	(顏維萱, 2015)
	Ehd1-RA	TTGATCACTCACTGTCTTCGCT	
	Ehd1-F	CAGTTGCACCGTCAGTTCAT	
Ehd4	Ehd4-RT	GAATGGAAGTACTAGGACTCCCA	
	Ehd4-RC	AATGGAAGTACTAGGACTC CCG	
	Ehd4-F	AAAGAGGTGTCTCCGCAATC	
Ghd7	Ghd7-FT	CGTACATCTGGATTGTAACCTCGAT	
	Ghd7-FC	CGTACATCTGGATTGTAACCTCGAC	
	Ghd7-R	GTGAACGTGCTCCCACAATA	
Dth8	Dth8-Ind9- F	GCTAGCTAATTAGTACTCCTCTTT	
	Dth8-Ind9- R	GATGGAGTTCGAGGGCATC	

附表二、Dth8 定序引子

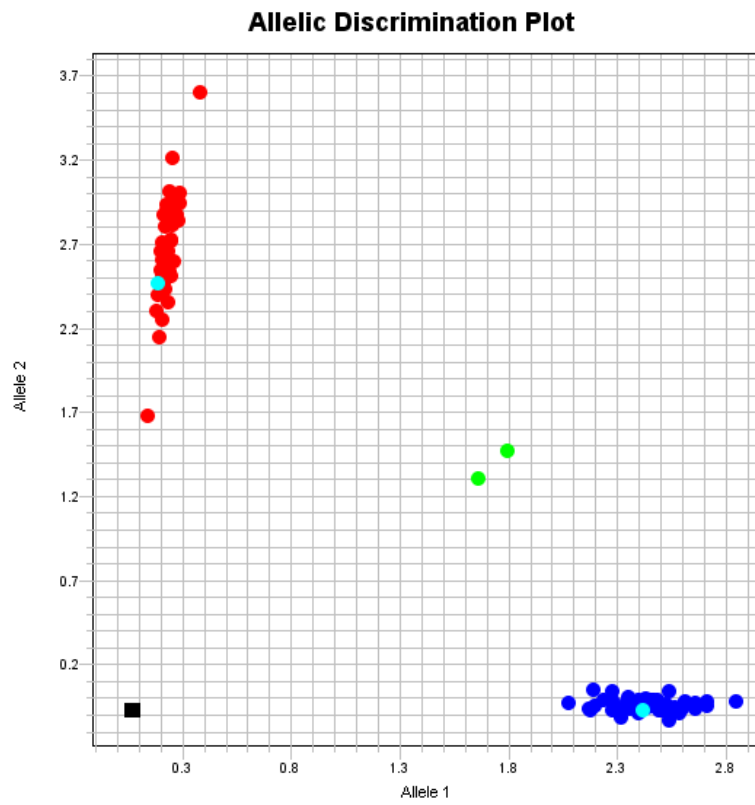
引子組合	引子名稱	引子序列 (5'-3')
Dth8_seq	Dth8_A_f	AAACTACGCGTGTGCCTAGC
	Dth8_A_r	GTCATCGACGGGCATTACC
	Dth8_B_f	CCGTCCTGCTGCTGATGA
	Dth8_B_r	AACGCCAAGATCTCCAAGG
	Dth8_C_f	TCGCCTGTAACGAAGCTGAT
	Dth8_C_r	CCATAACCTCCCCCTTCTCT



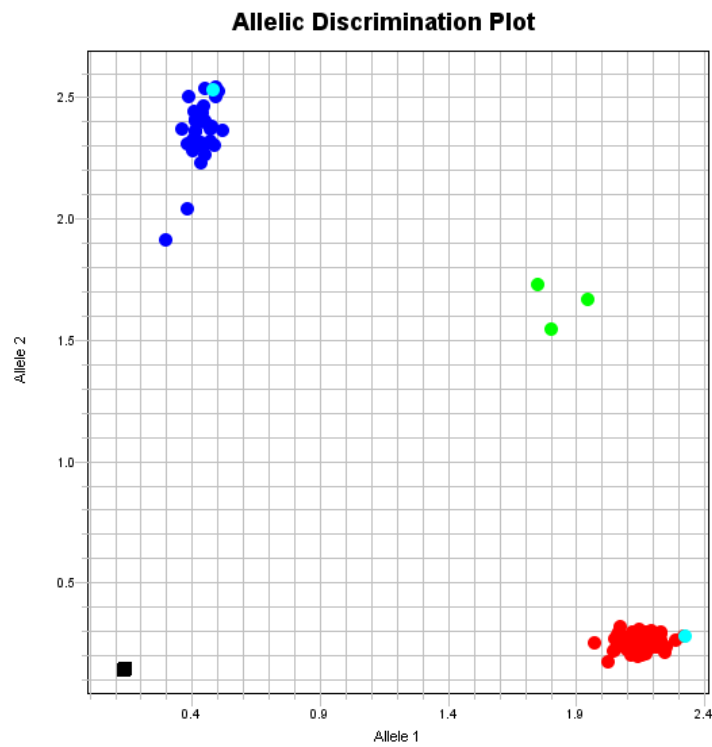
附圖一、每日日照強度



附圖二、每日風速變化

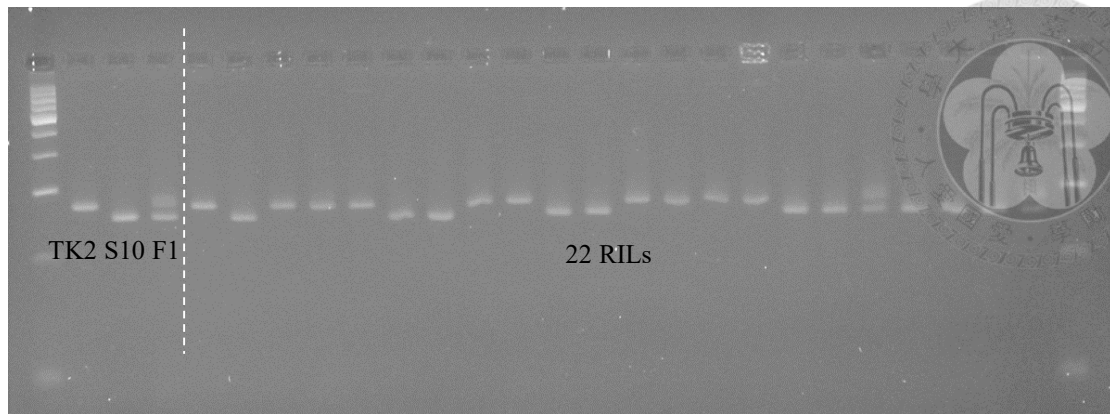


附圖三、TK2、TCS10、artificial F1 及部分個 RILs 的 *Ehd1* 基因型定型結果

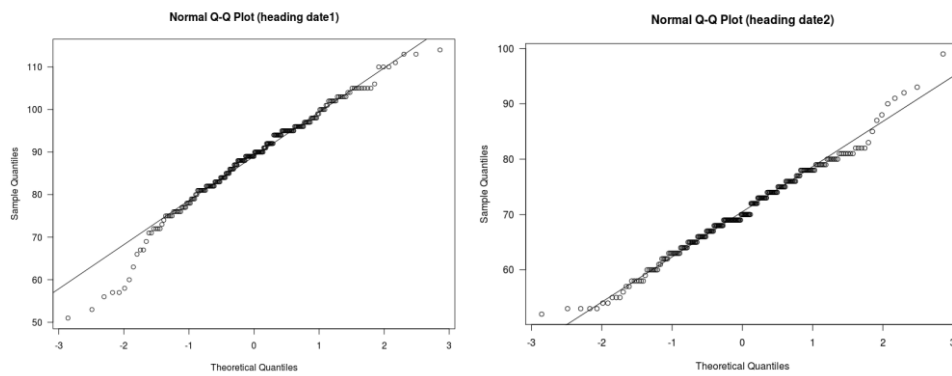


附圖四、TK2、TCS10、artificial F1 及部分個 RILs 的 *Ehd4* 基因型定型結果



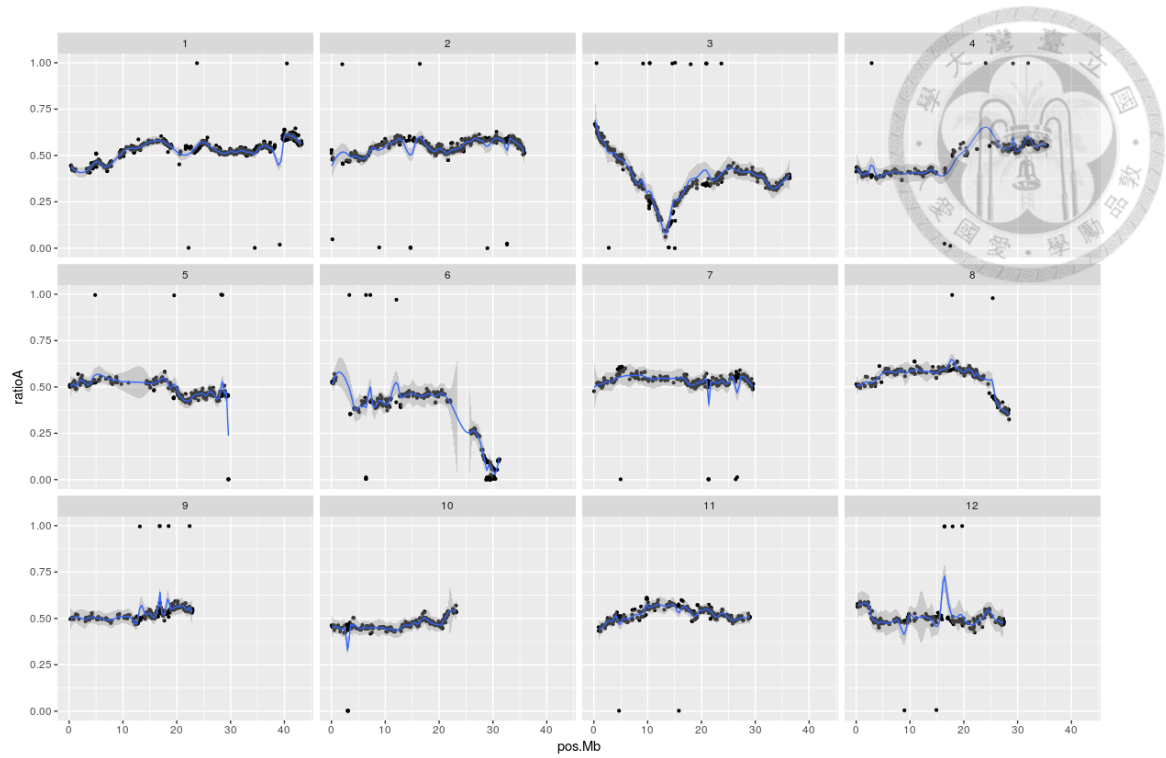


附圖七、TK2、TCS10、artificial F<sub>1</sub> 及 22 個 RILs 的 Dth8 基因型判別電泳圖。  
TK2 產物大小 129 bp，TCS10 產物大小 120 bp。



附圖八、Shapiro-Wilk 檢查外表型分布是否符合常態性





附圖九、TK2 對偶基因的比例 (ratio A) 在 12 條染色體的物理圖譜 (Mbp) 上波動情況