# 架構「臺灣水稻遺傳標幟之研究資源」網站

林彥蓉[1,2*]、吳永培[3]、魏甫錦[4]、盧柏昌[4]、黃元辰[2]、張健興[2]、侯藹玲[2]、郭素真[1]、謝兆樞[1]、邢禹依[4]

[1]臺灣大學農藝學系

[2]輔仁大學生命科學系

[3]行政院農委會農業試驗所嘉義分所農藝學系

[4]中央研究院植物暨微生物學研究所

## 摘要

水稻是世界上最重要的糧食作物之一，提供人類 23%的熱量來源，在臺灣是耕作面積最廣的農作物，佔全國農地的 51.29%；由於水稻與小麥、大麥、玉米等重要糧食作物之基因種類、數目和排列有密切關係，且水稻基因組中重覆性序列少，因此水稻成為目前研究基因組學上的模式植物。繼阿拉伯芥之後，水稻之 389 百萬鹼基對已完全被定序、解序及進行基因註解。這些豐富水稻基因組資料為水稻功能性基因組研究鋪路，更能以形態和分子標幟連鎖分析為基礎之「順向遺傳」作為探討水稻基因功能之重要手法。基此，本研究中共使用了 118 個分子標幟（113 SSR、4 STS 和 1 indel），分子標幟以平均 12.9 cM 的間距分佈在 12 條染色體上，以 81 個水稻品種（36 粳稻品種和 45 籼稻品種）為材料，分別調查各品種在分子標幟上之多型性，再計算出品種間之相似度係數。由於這些資料不但有助於釐清國內外常用水稻品種之親源關係，提供育種者作為選用雜交親本血緣疏遠的依據，其在連鎖圖譜之粗定位分析研究時，更可根據分析結果、標幟多型性及相似度等，設計適當的研究組合及可應用的分子標幟，大幅提供基因定位的效率，也減少不必要的資源浪費。故而彙整相關資料並架設「遺傳標幟」網站，供相關研究學者參考使用；除此之外，蒐集水稻研究之相關資源，如染色體替換品系、第五條染色體定序、插入突變族群及臺農 67 號 BAC 基因庫，架設了「臺灣水稻基因組研究資源」網站（http://rice.sinica.edu.tw）。本文主要目的即詳細介紹此網站的資源及使用方法，希冀藉此網頁資訊的流通能，一方面促進臺灣的水稻基因組相關研究，也提供未來分子輔助選拔時之水稻育種的參考依據。

**關鍵詞：**染色體片段替換品系、基因組、插入突變、分子標幟、水稻。

* 通信作者, bohsing@gate.sinica.edu.tw

投稿日期：2007 年 10 月 1 日

接受日期：2007 年 12 月 20 日

作物、環境與生物資訊 5:1-21 (2008)

Crop, Environment & Bioinformatics 5:1-21 (2008)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan ROC

## Construction of the Website 'The Resource of Rice Genetic Markers in Taiwan'

Yann-Rong Lin[1,2*], Yong-Pei Wu[3], Fu-Jin Wei[4], Po-Chang Lu[4], Yuan-Chen Huang[2], Chien-Hsin Chang[2], Ai-Ling Hour[2], Su-Chen Kou[1], Jaw-Shu Hsieh[1] and Yu-Ie Hsing[4]

[1] Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC

[2] Department of Life Science, Fu-Jen Catholic University, Taipei Hsien 24205, Taiwan ROC

[3] Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi 60014, Taiwan ROC

[4] Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan ROC

## ABSTRACT

Rice is a leading crop as well as a model plant in research. Rice provides 23% calories consumed by human; in addition, rice plantation is 51.29% of the total arable lands in Taiwan. Rice genome of 389 Mb, beside Arabidopsis genome, has been completed sequenced, decoded, and annotated, which provides enriched resource paving a way for rice functional genomic research. In order to employ forward genetics which is primarily based on linkage analysis of morphology and markers for functional study, a total of 113 SSR, 4 STS, and 1 indel markers, with an average interval of 12.9 cM distributed on 12 chromosomes, were surveyed polymorphism against 81 rice varieties, including 36 *japonica* and 45 *indica* varieties. The similarity coefficients calculated by the ratio of polymorphic markers between varieties provide a reference to phylogenetic study and cross designs, and the information of polymorphic markers served as anchor markers for coarse mapping. We constructed a website 'The Resource of Rice Genetic Markers in Taiwan' containing the 118 marker information for 81 varieties and the similarity coefficients for public access. In addition, we also recruited the information of chromosome segment substitution lines, genome sequencing of chromosome 5, insertion mutant libraries, and BAC libraries of Tainung 67 to construct a website 'Resources for Taiwan Rice Genomics Research' with the URL address http://rice.sinica.edu.tw. This enriched database of website can provide useful resource for facilitating rice genome research and marker assisted selection in breeding program work in Taiwan.


**Key words:** Chromosome Sequence Substitution Line (CSSL), Genome, Insertion mutant library, Molecular markers, Rice.

## 前言

水稻大約於九千年以前開始馴化，遍植於北緯 55 度至南緯 36 度之間，和小麥同為世界最重要的農作物，超過三十億的人口以稻米為主食，米食提供了人類 23%熱量來源，其中 90%水稻的生產來自亞洲，而在 2030 年對水稻的需求將增加 40％之多(Khush 1997, 2005)。水稻也是臺灣最重要的農作物，耕作面積佔全國農地的 51.29%，其中以粳稻栽培面積最大、秈稻次之、其餘為糯稻，分別佔 87％、9％和 4％(Council of Agriculture 2003)。此外，水稻亦是生物技術上重要的實驗研究材料，由於基因組相對較小，只有 389 百萬鹼基對，且與禾本科間就基因的種類、數目，以及排列方式來看，水稻的基因組是位於同心圓的中心，向外再擴展出其它重要糧食作物的基因組。換句話說，它的基因組與其它禾本科間有高度的相關性及相似度，而水稻是中心的基本單位(Devos and Gale 2000)。由此可知，水稻研究的成果未來是可以應用在小麥、玉米、高粱等禾本科植物，提高研究水稻基因組的重要性及經濟效益，也因此成為繼雙子葉模式植物阿拉伯芥 *Arabipdopsis* 基因組序列被解碼後，第二個被解碼的植物，更成為單子葉的模式植物；是以，「國際水稻序列分析計畫」於 2005 年完成粳稻日本晴的基因組解序，解序後預測出水稻的基因數、基因座的位置、和基因的功能(IRGSP 2005)。

由於水稻基因組解序後之豐富的資訊，加速「順向遺傳─由差異形態找尋相關的基因」的研究，但其關鍵步驟即是形態與分子標幟之連鎖分析的基因圖譜之建立。多型性的分子標幟在遺傳連鎖的分析扮演一個重要的角色，於 1988 年 McCouch *et al.*首先將 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism，限制酶切片段多型性)的技術引入水稻遺傳連鎖圖譜的研究中，目前約有 3000 個水稻 RFLP 標幟可供應用(Causse *et al.* 1994, Harushima *et al.* 1998)。除此之外，以 PCR 技術為基礎的分子標幟的操作方便性，如微衛星(microsatellite，又稱簡單重覆序列 SSR：Simple Sequence Repeats)和 STSs (Sequence Tagged Sites) 亦發展快速，尤其 SSR 應用更是廣泛， McCouch *et al.* (2002)發表了 2240 個水稻 SSR 標幟，「國際

水稻序列分析計畫」也利用生物資訊學的方法探勘出將近 30,000 個 SSR 標幟(IRGSP 2005)。物種間則以 indel (Insertion/Deletion，插入/缺失) 和 SNP (Single Nucleotide Polymorphism，單一核苷多型性)為數目最多、密度最大的分子標幟。尤其在秈稻 93 11 的基因組以散彈槍策略部分解序後(Yu *et al.* 2002)，經分析秈、粳稻之間的基因組序列，發現每 953 鹼基對即有一個 InDel，而每 268 鹼基對便有一個 SNP 之差異，如此 indel 和 SNP 將提供未來設計充裕的多型性 DNA 分子標幟 (Feltus *et al.* 2004, Shen *et al.* 2004) 的重要來源。利用生物資訊學的方法可輕易得知這些 SSR、indel、及 SNP 物理圖譜 (physical map)的相對位置，並可預測其在連鎖輿圖的相關位置。故而其除了數量多有助於水稻 DNA 指紋之資料庫建立外，這些資訊隨即可以應用於連鎖分析，如在進行質的性狀基因座和數量性狀基因座等基因圖譜建立時利用。

重要的農藝性狀，如產量、產量構成因素、株高、抽穗期等，均為數量性狀，除了受到環境的影響外，亦受到數個基因的調控。這些基因可經由分子標幟、連鎖分析、和區間定位法(interval mapping)將這些數量基因座定位在染色體上，最後解析成單一個孟德爾遺傳的基因，分析每個基因的影響和效應(Paterson *et al.* 1988)。緊鄰基因座的分子標幟，更可以應用於分子標幟輔助育種選拔(Marker Assisted Selection)，或是更進一步用定位選殖法 (positional cloning) 來選殖基因以探討基因的在生理、生化的功能。有關水稻數量性狀基因座的研究不勝枚舉，且廣泛地應用於水稻的分子輔助育種，尤其與性狀基因緊密連鎖標的分子標幟可直接提供標的基因的選拔，在水稻秧苗期即可進行基因型的鑑定。因此，只需種植經鑑定後具有之相關基因型個體即可，不但減少種植株數且後續的形態選拔、分析、收穫等研究工作亦大幅降低；而經由基因型的判別，可明顯區分是顯性同型合子或是異型合子，增加試驗的準確性。由於不須再進行異型合子之後裔檢測，減少一個世代的試驗時間；再者，利用其他均勻分布於染色體上的分子標幟，亦可選拔擁有較多輪迴親(recurrent parent)的染色體片段的個體進入下個輪迴選拔世代，快速剔除殘留於選拔世代子帶之貢獻親 (donor parent) 的染色體片段，此在回交育種或導入遠緣親性狀時，可大幅提高優良輪迴親選育效率，有效縮短育種年限。分子標幟輔助選拔廣泛成功地應用於許多單一個基因和聚合數個優良的基因的育種，如：抗白葉枯病(Singh *et al.* 2001)、抗稻熱病(Yi *et al.* 2004)、抗褐飛蝨 (Jena *et al.* 2006)、產量與半矮株的基因(Ashikari *et al.* 2005)、抽穗期(Takeuchi *et al.* 2006)、耐淹浸(Neeraja *et al.* 2007)等。

水稻是臺灣最重要的研究物種之一，然而目前網路上的公共資源大都以國外品種的研究資訊為主。雖過去國內水稻的研究成果相當豐富，在網路上可以查詢主要品種的特性與種源等相關資料，然對於國內主要栽培種、國外重要栽培種，秈稻及粳稻間相關的分子資訊相當缺乏，影響了國內水稻分子研究上的進展及與國外的競爭力。故乃整合近幾年來之試驗結果和相關資料，諸如臺灣重要品種的分子遺傳與基因組等研究資訊，將資料利用網站形式編排，提供國內的學者查閱搜尋，期望透過這些資料的流通，為臺灣的水稻學術研究及分子育種的進展貢獻棉薄之力。此一網站目前內容包含五個大項：遺傳標幟、替換品系、第五條染色體定序、插入突變及臺農 67 號 BAC 基因庫。

## 材料和方法

### 一、試驗材料

以臺灣及世界各地的粳及秈稻為材料，進行分子標幟的調查分析，在此試驗中使用了 36 個粳稻品種，包括 24 個臺灣品種、11

個日本品種及 1 個中國品種等；而在秈稻方面，則使用了 45 個品種，包括 10 個臺灣品種、國際水稻研究所(IRRI)、菲律賓、印度、美國等其他國家品種(Table 1)。這些品種含括良質米品種，如臺粳 8 號、臺粳 9 號、高雄 139 號、越光等等；香米品種則如來源不同的 Basmati、桃園一號、臺農 71 號、Khao-kueng 等香米；以及用於水稻基因組解序的粳稻品種日本晴和秈稻品種 93 11。

## 二、基因型鑑定

1.水稻基因組 DNA 之萃取

DNA 之萃取依照 Li *et al.* (1995)所發表的方法加以修飾，約六週大的秧苗經過冷凍乾燥處理，以咖啡研磨機打成粉末，稱取 0.5 克粉末加入 9 ml 的 DNA 萃取液 (100 mM Tris ，pH 8.0；50 mM EDTA，pH 8.0；500 mM NaCl；1.25% SDS，新鮮配製加入 0.38% $NaHSO_3$) 後充分混合，放置在 65℃水浴一

Table 1. The 81 varieties used for evaluating marker polymorphism.

| 品　　種 | 亞種 | 來源地 | 品種 | 亞種 | 來源地 | 品種 | 亞種 | 來源地 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 臺東 29 號 | 粳 | 臺灣 | 千代錦 | 粳 | 日本 | 93 11 | 秈 | 中國 |
| 臺東 30 號 | 粳 | 臺灣 | 月之光 | 粳 | 日本 | Milagroso | 秈 | 菲律賓 |
| 臺中 65 號 | 粳 | 臺灣 | 福光 | 粳 | 日本 | Milfor | 秈 | 菲律賓 |
| 臺南 5 號 | 粳 | 臺灣 | 星豐 | 粳 | 日本 | PsBRc10 | 秈 | 菲律賓 |
| 臺粳 17 號 | 粳 | 臺灣 | 轟早生 | 粳 | 日本 | PsBRc18 | 秈 | 菲律賓 |
| 臺粳 2 號 | 粳 | 臺灣 | Akitakomachi | 粳 | 日本 | PsBRc20 | 秈 | 菲律賓 |
| 臺粳 14 號 | 粳 | 臺灣 | Toyonishiki | 粳 | 日本 | PsBRc4 | 秈 | 菲律賓 |
| 臺粳 16 號 | 粳 | 臺灣 | Khosakau | 粳 | 日本 | ASD16 | 秈 | 印度 |
| 臺粳 8 號 | 粳 | 臺灣 | 華粳 74 號 | 粳 | 中國 | Basmati 370 | 秈 | 印度 |
| 臺粳 9 號 | 粳 | 臺灣 | 臺中秈 10 號 | 秈 | 臺灣 | Basmati T3 | 秈 | 印度 |
| 臺粳糯 1 號 | 粳 | 臺灣 | 臺中秈 17 號 | 秈 | 臺灣 | Pokhareli | 秈 | 尼伯爾 |
| 臺農 67 號 | 粳 | 臺灣 | 臺中秈 3 號 | 秈 | 臺灣 | Pakistan Basmati | 秈 | 巴基斯坦 |
| 臺農 69 號 | 粳 | 臺灣 | 臺秈 2 號 | 秈 | 臺灣 | Khao-kueng | 秈 | 泰國 |
| 臺農 70 號 | 粳 | 臺灣 | 臺秈糯 2 號 | 秈 | 臺灣 | FKR19 | 秈 | 布吉那法索 |
| 臺農 71 號 | 粳 | 臺灣 | 臺農秈 14 號 | 秈 | 臺灣 | Giza 4120-205 | 秈 | 埃及 |
| 臺農 72 號 | 粳 | 臺灣 | 臺農秈 19 號 | 秈 | 臺灣 | Gz 5379 | 秈 | 埃及 |
| 光復 1 號 | 粳 | 臺灣 | 臺農秈 20 號 | 秈 | 臺灣 | MGG | 秈 | 海地 |
| 東陸 1 號 | 粳 | 臺灣 | 高雄秈 7 號 | 秈 | 臺灣 | Start Bomet | 秈 | 海地 |
| 花蓮 19 號 | 粳 | 臺灣 | 嘉農秈 11 號 | 秈 | 臺灣 | Basmati 370 | 秈 | 美國 |
| 桃園 1 號 | 粳 | 臺灣 | IR1545-339 | 秈 | IRRI | Della | 秈 | 美國 |
| 桃園糯 2 號 | 粳 | 臺灣 | IR1552 | 秈 | IRRI | L202 | 秈 | 美國 |
| 高雄 139 號 | 粳 | 臺灣 | IR2105 | 秈 | IRRI | M103 | 秈 | 美國 |
| 高雄 143 號 | 粳 | 臺灣 | IR29 | 秈 | IRRI | M202 | 秈 | 美國 |
| 新竹 64 號 | 粳 | 臺灣 | IR30 | 秈 | IRRI | M401 | 秈 | 美國 |
| 日本晴 | 粳 | 日本 | IR36 | 秈 | IRRI | Nortai | 秈 | 美國 |
| 越光 | 粳 | 日本 | IR64 | 秈 | IRRI | S301 | 秈 | 美國 |
| 絹光 | 粳 | 日本 | IR72 | 秈 | IRRI | Ku79-2 | 秈 | |

個小時，每 15 分鐘搖晃萃取液；加入 2.7 ml 的 5 M 醋酸鉀(potassium acetate)，輕微混合後放置冰上 20 分鐘，然後在 4℃下以 3500 rpm 離心 20 分鐘；將上清液經過不織布(miracloth)過濾至 10 ml 之-20℃異丙醇(isopropanol)，於-20℃下進行 DNA 沉澱 30 分鐘到一個小時；將 DNA 沈澱物鉤起並浸泡在 3 ml 的純化液(70%乙醇， 0.3 M 醋酸鈉)隔夜後，以-20℃之 70%乙醇清洗，風乾 DNA 後加入 500 µl 的 TE (10 mM Tris， pH 8.0；1 mM EDTA， pH 8.0)溶解 DNA。在粗萃取 500 µl 的 DNA 溶液中加入 3 µl 的 10 mg $ml^{-1}$ 之 RNase A (Amresco®, USA)在 37℃作用一個小時去除 RNA；加入 500 µl 的 PCI (phenol: chloroform: isoamylalchohol = 25 : 24 : 1) 充分混合後，以 8000 rpm 離心 10 分鐘，將分液上層移到 500 µl 的 PCI 中進行同樣的步驟。將分液上層移到 500 µl 的 CIA (chloroform: isoamylalchoho1 ＝ 24：1) 充分混合後，以 8000 rpm 離心 5 分鐘，將分液上層移到 1 ml 之 95%的乙醇和 140 µl 之 7.5 M 的醋酸胺(ammonium acetate)中沉澱 DNA 30 分鐘，以 8000 rpm 離心 10 分鐘；倒掉上清液，加入-20℃之 70%乙醇並以 8000 rpm 離心 5 分鐘，風乾 DNA 後加加入 200 µl 的 TE 溶解 DNA。

2.DNA 分子標幟之引子來源

本試驗使用以 PCR 為基礎的分子標幟來源有 (1)美國康乃爾大學 McCouch 所公佈的 2240 個 SSR 分子標幟(RM)(McCouch *et al.* 2002)，(2)日本水稻基因組計劃(RGP)所公佈的 STS 標幟 (Yamamoto and Sasaki 1997) ，(3)利用粳稻(日本晴，Nipponbare)第五條染色體序列與北京基因組中心公佈的秈稻 93 11 序列(Yu *et al.* 2002)比較後設計的 InDel 分子標幟(SLS)。從這些分子標幟中共挑選出分布於 12 條染色體的 113 個 RM 標幟、4 個 STS 標幟、103 個 SLS 標幟，即上述選用之分子標幟分析 Table 1 所列之 81 個粳稻及秈稻的基因型。此工作的目的除了比較水稻各品種及亞種之差異外，更以較大尺度探討 12 條染色體之分子標幟之多型性，而小尺度來詳細的探討第五條染色體上標幟分布情形。

目前已完成基因組序列的水稻品種有粳稻日本晴和秈稻 93 11，利用此二者基因組序列在第五條染色體上的 indels 設計引子。搜尋序列 InDels 的方法主要利用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 軟體 (Altschul *et al.* 1997)，以日本晴為 query，散彈槍法完成的 93 11 contigs 為搜尋之資料庫，設定 E-value<1E-20 進行 BLASTN 程式搜尋相似序列，BLAST 結果的比對序列中篩選長度大於 200 bps 且一致性 (identity) 大於 95%者。從序列比對中找到可以設計引子的位置，使得 PCR 產物長度在 200 到 2000 bps 之間，且品種間的長度差異在 30 到 200 之間。引子設計之後以 EMBOSS 軟體的 primersearch 程式搜尋在基因組中出現次數，篩除會有多組產物的 primers。

3.PCR 反應條件及基因型判讀

反應條件參照 Chen *et al.* (1997)並稍微修改後，PCR 反應總體積是 25 µl ，反應溶液包含約 50 ng 的 DNA、200 µM 的 dNTP(ABgene®，UK)、0.2 µM 的引子、0.5 unit *Taq* 及 *Taq* buffer (10 mM Tris-HCl，50 mM KCl，1.5 mM $MgCl_2$，0.1% Triton X-100，Protech 波士特，臺灣)，使用 Biometra 公司的核酸增殖儀進行反應，PCR 程式設定為 94℃ 5 分鐘，1 個循環；94℃ 1 分鐘，55℃ 1 分鐘，72℃ 2 分鐘，共 35 個循環；72℃ 5 分鐘，一個循環，最後結束在 4℃，擴增之片段長度範圍在 60~320 bp 左右。擴增 DNA 的長度在 Rapid Agarose Gel Electrophoresis (RAGE，Cascade Biologics®, USA)高速電泳系統下進行分析，首先配製溶於 1× TAE (Tris-acetate EDTA) 緩衝液之 2.5% SFR (Super Fine Agarose，Amresco®, USA)膠體，並加入 2 µl 的 EtBr (10 mg $ml^{-1}$)，

先在 RAGE 電泳槽加入 530 ml 的 1× TAE，然後將膠體放在緩衝液上，並在上面加入 500 ml 的 $ddH_2O$，加入擴增的 DNA 樣本後以 250V 進行電泳，依據分子間差距的大小決定電泳時間為 9~23 分鐘，最佳解析是差異 10 bp 以上的 DNA 條帶。每個品種在這些分子標幟之基因型以分子量大小為依據，相同的分子標幟擴增出相同的分子量的 DNA 條帶，則視為相同的等位基因(allele)，大部分的品種在這些分子標幟皆只有一個條帶，也就是只有一個等位基因，為同型合子(homozygous)；仍有少部分情形則有兩個條帶，意指此品種在此分子標幟有兩個等位基因，為異型合子(heterozygous)。

4.品種間分子標幟之相似度

整理分佈於12條染色體上的118個分子標幟之在 81 個品種間基因型的多型性與否，估算每兩個品種之間在這些分子標幟上之相似度。計算出相同基因型、非多型性(non-polymorphic)之標幟個數(*V1*)及相異基因型、多型性(polymorhpic)的標幟數(*V2*)，其相似度計算則為 [*V1*/(*V1*+*V2*)] (Jaccard 1908)。

### 三、網頁之架構

為考量未來增加資料及改變呈現版面的方便，本網站的建立採用後端(伺服器端)應用程式及資料庫分立的架構。使用者前端以 HTML 格式呈現，網頁伺服器為 Apache 2.0 版，後端應用程式全以 PHP 開發，資料庫採用 PostgreSQL，架構簡單，便於管理。「臺灣水稻分子標幟之研究資源」網站之入口網址為：http://rice.sinica.edu.tw/，分為五大項：遺傳標幟、替換品系、第五條染色體定序、插入突變及臺農 67 號 BAC 基因庫。

## 結果

### 一、分子標幟多型性之分析

在一個分離族群子代之分子標幟和形態的差異之遺傳連鎖分析，一般以分子標幟間小於 20 cM 區間且均勻分佈於染色體上的分子標幟為基礎，並分析單一基因的質量性狀座或是由多基因的數量基因座其基因型影響差異，最後再建立分子標幟與目標性狀間之連鎖關係，以達到粗定位(coarse mapping)之目的。本試驗的最初設定目標也是如此，首先以等位基因數目較多(多型性較佳)的水稻微衛星標幟為主(SSR)，其次再以日本已公布的 STS 為輔助。若標幟區間仍大於 30 cM 時，再按照粳稻日本晴和秈稻 93 11 之序列 indels 設計多型性分子標幟。在本研究中，共使用了 118 分子標幟，包括 113 個 SSR (代號為 RM，Rice Microsatellite)、4 個 STS (代號分別是 C、E、和 S)和 1 個 indel (代號為 SLS) (Table 2)。這些分子標幟分佈於 12 條染色體上，其中 12 個位於第一條染色體，13 個位於第二條染色體，14 個位於第三條染色體，8 個位於第四條染色體，10 個位於第五條染色體，16 個位於第六條染色體，9 個位於第七條染色體，9 個位於第八條染色體，7 個位於第九條染色體，8 個位於第十條染色體，7 個位於第十一條染色體，以及 6 個位於第十二條染色體。根據分析粳稻日本晴和秈稻 Kasalath 於 186 $F_2$ 個體建立的的連鎖輿圖，水稻 12 條染色體共長 1521.6 cM (Harushima *et al.* 1998)，因此本研究共使用 118 個分子標幟，其密度已少於 20 cM。所有的 PCR 分子標幟依據其引子的序列，經由 BLAST 分析找出其在物理圖譜(physical map)的位置，再依照 IRGSP 整合物理圖譜和連鎖輿圖的方法(http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/)，進一步找出研究所使用之分子標幟在遺傳圖譜的位置。除了在 6 個染色體區域分別座落於第一條、第三條、第四條、第九條、第十一條和第十二條染色體上之分子標幟區間大於 30 cM 外，其餘皆小於 30 cM (Fig. 1)，這些資訊對於粗定位的分析提供了良好的多型性分子標幟的來源。

此外，針對我國參與國際水稻基因組定序計畫中負責第五條染體中，設計超過 150

Table 2. The allele numbers detected in each marker.

| Allele no. | Molecular Marker | |
|---|---|---|
| | Name[x] | No |
| 2 | C51124, E1113, RM016, RM022, RM025, RM030, RM101, RM104, RM161, RM167, RM205, RM212, RM222, RM240, RM250, RM256, RM267, RM270, RM278, RM282, RM289, RM331, RM420, RM517, RM1024, RM1376, RM3744, RM5626, RM6089, RM6407, SLS208 | 31 |
| 3 | E3528, RM010, RM011, RM017, RM019, RM085, RM168, RM186, RM190, RM201, RM214, RM223, RM225, RM246, RM253, RM258, RM263, RM286, RM287, RM302, RM447, RM470, RM475, RM480, RM508, RM515, RM518, RM527, RM536, RM541, RM567, RM584, RM3138, RM3330, RM3411, RM3826, RM3838, RM3912, RM5356, RM5687, RM5780, RM6038, RM6767, S12569 | 44 |
| 4 | RM001, RM003, RM021, RM072, RM135, RM143, RM145, RM152, RM154, RM162, RM211, RM234, RM247, RM324, RM341, RM430, RM496, RM545, RM551, RM1367, RM6673, RM6734 | 22 |
| 5 | RM125, RM218, RM224, RM235, RM243, RM251, RM252, RM257, RM340, RM1359, RM1387 | 11 |
| 6 | RM009, RM206 RM207, RM333, RM528, RM580, RM3252 | 7 |
| 7 | RM276, RM481, RM1375 | 3 |

[x] The markers of SSR, indel, and STS are indicated with prefixes RM, SLS, and C, E, and S, respectively.

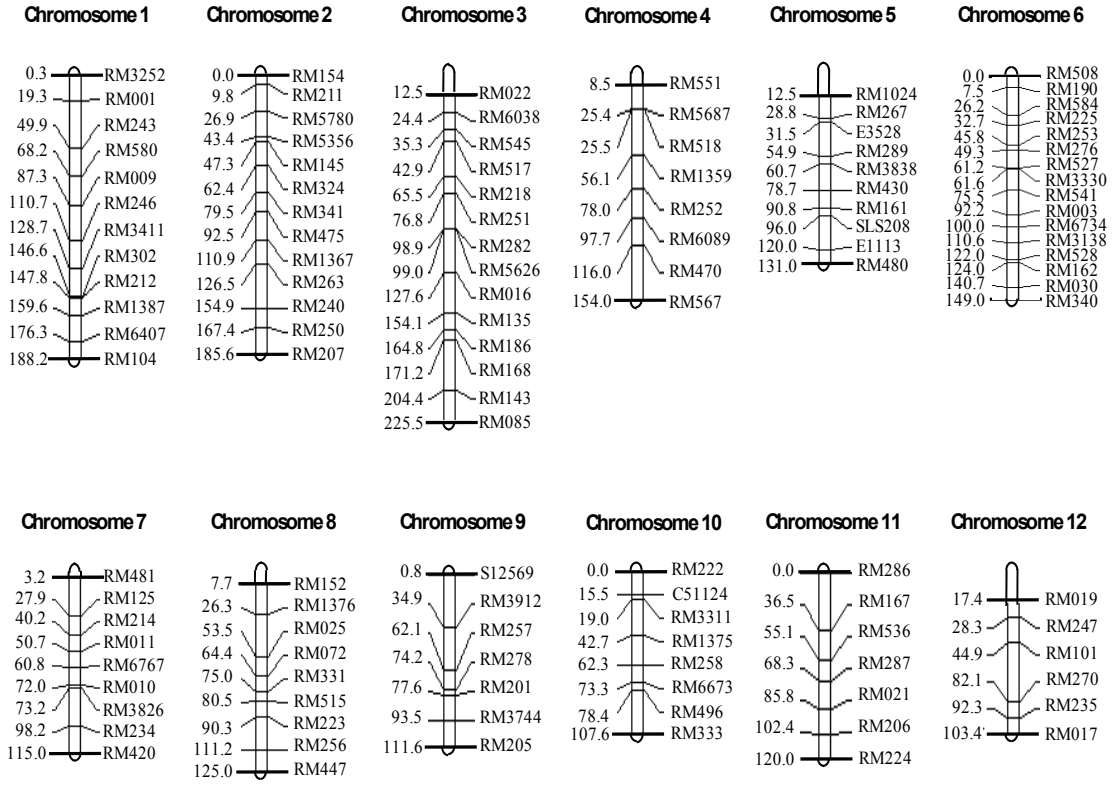



**Fig. 1. The linkage map of 118 markers distributed on 12 chromosomes.**

個 indel 標幟，其中有 103 個亦成功地應用於 18 個粳稻品種和 7 個秈稻品種的歧異度分析。合計 indel 和 SSR 標幟共有 112 個標幟可提供第五條染色體上基因座之初步定位分子標幟之多樣化以及細微定位(fine mapping)試驗時利用。

本研究以 SSR 標幟為主，SSR 之多型性起源於個體於兩專一引子之間微衛星的重複次數不同，通常 PCR 產物以聚丙烯醯胺膠体電泳(Polyacrylamide Gel Electrophoresis)來區分此一微小的差異，唯此試驗技術稍嫌繁瑣、不容易在進行大量基因型鑑定時利用。因此本試驗採用孔隙緻密且可分析小分子量 DNA 片段的洋菜膠 SFR(Super Fine Resolution)，在 2.5%濃度下能區分差異 5 bp 且大小在 250 bp 以下的 DNA 條帶，此一方法其 20 bp 梯度的對照分子量標幟圖譜亦相當清晰可見(Fig. 2)。雖此洋菜膠電泳系統的解析度不如聚丙烯醯胺膠体電泳，然為了日後能進行快速地且高產能的基因型分析，以此洋菜膠電泳系統進行 81 個品種之 118 分子標幟的分析，及 25 品種位於第五條染色體上 103 個 indel 標幟的基因型鑑定，是一相當經濟可行的方式。

以微衛星 RM304 為例，24 個品種在 PCR 擴增後以 2.5% SFR 和 RAGE 電泳系統分析，除了引子自行黏合的條帶外，呈現出清楚四個分子量的條帶。其中，秈稻品種皆擴增出 130 bp，東陸 1 號擴增出 150 bp，粳稻除了臺農 69 號擴增出 180 bp 外，其餘的粳稻皆擴增出 170 bp(Fig. 2)。所以，此分析系統可在 20 分鐘內偵測出 RM304 在 24 個品種間含有四個等位基因，故乃利用此系統進行所有的分子標幟，並統計 118 個分子標幟在此 81 個品種之多型性分析。這些分子標幟已偵測出臺粳 8 號和秈稻 IR1545-339 間或是日本晴和 IR1545-339 間具有多型性 (林和邢，未發表)，因此每個分子標幟至少有兩個等位基因，其中具有兩個等位基因者，共有 31 個分子標幟，佔 26%比率；大部分分子標幟具有 3 個等位基因，共有 44 個，佔 37%比率；分子標幟在此一快速偵測、高產能的基因型分

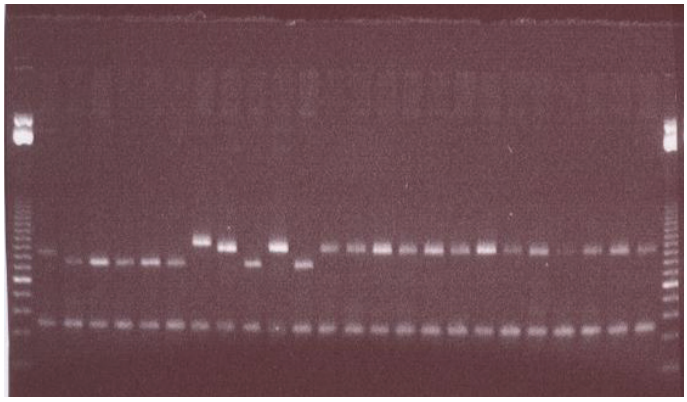


**Fig. 2. The polymorphism survey of one SSR marker, RM304. The leftmost and rightmost lanes indicate DNA molecular markers of 20-bp ladder, and the rest lanes indicate rice varieties (left to right), Dung Lu 1, Taichung Sen 3, Taichung Sen 10, Taichung Sen 17, Tainung Sen 14, Tainung Sen 20, Tainung 69, Tainung 72, Chianung Sen 11, Taikeng 8, Tainung Sen 19, Tainung 67, Taikeng 16, Taitung 30, Kwangfu 1, Tainan 5, Taoyuan 1, Taoyuan Gluntinous 2, Kaohsiung 143, Taikeng 17, Hualien 19, Tainung 71, Taikeng 2, and Taikeng 14, respectively. Three microliters of 25 ul PCR product were separated at 250V for 20 min on 2.5% SFR agarose using RAGE electrophoresis system. Four different DNA fragments, except the lowest one which was the primer self-annealing molecule, were detected by RM304 among 24 varieties and represented four different alleles.**

析中，最多可以偵測出 7 個等位基因，共有 3 個(Table 2)。比較 SSR、indel 和 STS 標幟的多型性，結果如吾人所預期，仍以 SSR 在品種間的多型性最高，有 47% SSR 之等位基因數等於或多於 4 個；STS 和 indel 因為使用的標幟不多，但以目前的資料，最多只偵測出三個等位基因 (Table 2)。

## 二、建構「臺灣水稻基因組研究資源」網頁

網站的設立有助於資訊的交流，因此整合近幾年來的實驗結果和相關資料，包括臺灣重要品種的分子遺傳與基因組研究資訊，進一步架設「臺灣水稻基因組研究資源」網站，其網址為 http://rice.sinica.edu.tw/。本網站可供國內的學者查閱搜尋，這個網站內容包含五大項：遺傳標幟、替換品系、第五條染色體定序、插入突變及臺農 67 號(TNG67)之 BAC 基因庫(Fig. 3)，本篇文章主要目的是詳細介紹「遺傳標幟」和「替換品系」及第五條染色體定序(IRGSP 2005)、插入突變(Chern *et al.* 2007, Hsing *et al.* 2007)和 TNG67 之 BAC 基因庫(Lin *et al.* 2006)之發表成果作一介紹，期能透過本文介紹讓國內學者了解網站的網址、內容及查閱方式，藉以提高本網站的利用效益。

### 1.遺傳標幟(Genetic Markers)

將 SSR、indel 和 STS 分子標幟之實驗所得的資料整理後，以網頁呈現供搜尋，在此網頁有三項可點選：(1)水稻第五條染色體 SLS 分子標幟查詢─品種差異 (2)水稻品種分子標幟差異比較(自選)(3)水稻品種分子標幟差異比較總表(Fig. 4)。

(1)水稻第五條染色體 SLS 分子標幟查詢─品種差異

由於臺灣參與國際水稻定序組織，負責的是第五條染色體的定序分析，因此乃特別針對此條染色體，尋找更密集的分子標幟，此結果整理於「水稻第五條染色體分子標幟查詢─品種差異」以供研究者查詢。總計以日本晴與 93 11 序列設計了 103 個標幟，其代號為 SLS，由於使用不同品種基因組序列間的差異、定序及序列組合時難免的會有錯誤等，所設計的分子標幟並不一定符合預期。目前已使用了 25 個品種(18 個粳稻和 7 個秈稻品種)為材料，並調查 103 個 SLS 標記之多型性，其中共有 73 個 SLS 呈現多型性(約佔 71%)。

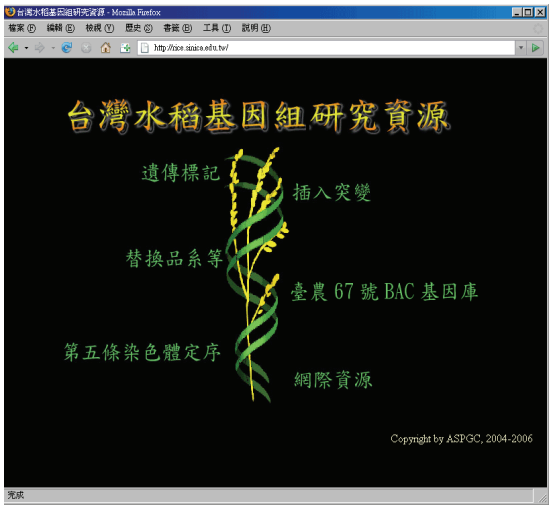



**Fig. 3. The homepage of 'Rice Genomic Research Resource in Taiwan'.**

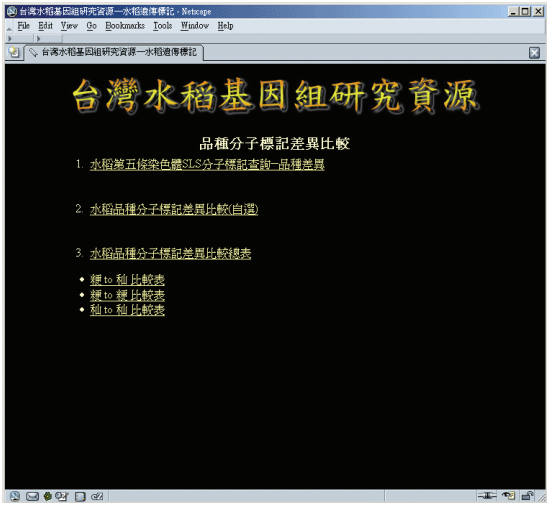



**Fig. 4. The webpage of 'The Polymorphic Markers among Varities'.**

分子標幟分析資料的結果對位於第五條染色體基因的細微定位分析(fine mapping)有極大的幫助。當使用此部份的資料時，在網頁上只須直接點選兩個水稻品種，便能得知能分辨此二品種的分子標幟名稱，繼續點選特定的 SLS 分子標幟後，即可得知此 SLS 分子標幟之兩段引子序列和 PCR 引子黏合的溫度，亦提供各品種的 PCR 產物大小等資訊。例如可分辨臺農 67 號與臺中秈 10 號的有 60 組；其中如 SLS001，兩方向引子的序列為 TCCTGGCCTGAATAGAATAGCATA 與 CAGATGATTCTTCTTCTTCGGACT，PCR 產物為 150bp 的品種有 7 個，包括臺中秈 3 號等，而 1200 bp 的品種有 19 個，包括臺粳 8 號等。又資料中亦可顯示其中的臺農 69 號為雜合體，即兩種 PCR 產物皆有(Fig. 5)。

(2) 水稻品種分子標幟差異比較(可自行選定品種組合)

為了讓使用者可快速搜尋特定的組合，可任意挑選兩個水稻品種並了解兩者間的相似度數值，亦可查知 118 個分子標幟在 12 條染色體上的多型性，此可在所架構「水稻品種分子標幟差異比較(自選)」中得到相關訊息。在此網頁中，首先使用者可得知指定組合下可區分(多型性)和不可區分(非多型性)之分子標幟數目，同時可了解每一分子標幟在不同染色體上所呈現的多型性，而將結果迅速應用在基因型分析等相關研究上。例如 Fig. 6 顯示粳稻臺農 67 號與秈稻 93 11 的相似度，網頁中水稻 12 條染色體係由上到下，自短臂向長臂依 cM 長短作順序排列，綠色表示使用的分子標示可以區分兩品種，而紅色則表示無法區分，12 條染色體的長度與中節位置則標示於圖之下方。在此一粳稻與秈稻的組合下，118 個分子標幟其位於第 5、10、11 條染色體上者均分辨兩品種，而在其他染色體上之分子標幟有些是無法分辨此二個品種，其中以第 6 條染色體的 16 個標幟僅 7 個標幟可以分辨兩品種的比率最低。

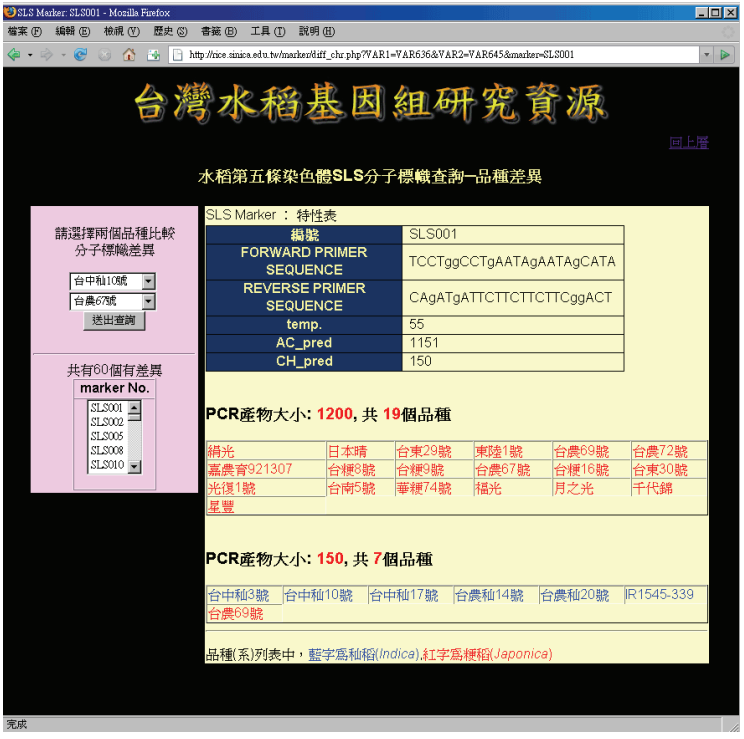



**Fig. 5. The query of SLS polymorphic markers among varieties on chromosome 5.**




**Fig. 6. The polymorphic survey of 118 markers between *japonica* Tainung 67 and *indica* 93 11. The colors green and red indicate polymorphic and non-polymorphic markers, respectively.**

(3) 水稻品種分子標幟差異比較總表

在「水稻品種分子標幟差異比較表」網頁中，包括了粳稻對粳稻、秈稻對秈稻及粳稻對秈稻的互相比較，相似性越高，數值越趨近於 1，其結果條列於總表上。例如：秈稻臺中秈 10 號與粳稻臺農 67 號的比較數字為 0.3136，而粳稻桃園 1 號與粳稻臺農 67 號的比較數字為 0.8718，秈稻臺中秈 10 號與秈稻嘉農秈 11 號的比較數字為 0.6838。粳稻與秈稻相比較時，由於親源較遠，相似度較小，但是粳稻與粳稻，或秈稻與秈稻相比，由於親源較近，相似度較大。當同是粳稻與粳稻相比時，相似度數值範圍 0.17-0.94，而秈稻與秈稻相比時，相似度 0.10-0.95，粳稻與秈稻相比時，相似度 0.12-0.69。這些數值的高低表示各品種間以分子標幟為基礎的親緣關係評估，提供水稻育種者具體的參考數據，亦可以作為進行基因定位分析和數量性狀分析時選擇親本之輔助參考。在此網頁中所有 81 個品種，每兩個品種間均計算相似度數值，並且可以連結到 12 條染色體示意圖(Fig. 7)，數量化與圖形化的整理與呈現，對水稻育種基因定位分析、功能基因組研究等工作提供更有效率的資訊。

2. 染色體片段替換品系 (Chromosome Segment Substitution Line, CSSL)

在水稻定位分析研究中，無論是單一基因座或數量基因座的定位，染色體片段替換品系是相當有效率的研究材料。這些替換品系由日本水稻基因組資源中心(Rice Genome Resource Center；RGRC)學者以粳稻日本晴和秈稻 Kasalath 雜交，然後再回交日本晴數代後，最後再自交數代得到同型結合的固定品系，各品系以 RFLP 分子標幟選拔並確定替換品系之染色體替換片段。所以這些替換品系大部分的基因組來自日本晴，只有少數的染色體片段來自 Kasalath。如 Fig. 8 所示 SL50 (SL 為 Substitution Line 的縮寫)基因組的組成，其中大部分為日本晴同型基因型(淺藍色)，只有在第二條染色體的長臂、第五條染色體的五分之四、第十一條染色體的三分之二為 Kasalath 同型基因型(淺綠色)。




| | 高雄籼7號 | 93-11 | Basmati-370-Amer | kho-sakau | 台中籼10號 | 台中籼17號 | 台籼2號 | 台中籼3號 | 台農籼14號 | 台農籼19號 | 台農籼20號 | 台籼糯2號 | 嘉農籼11號 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 光復1號 | 0.2155 | 0.2414 | 0.4397 | 0.2328 | 0.2991 | 0.2564 | 0.2672 | 0.2906 | 0.265 | 0.2672 | 0.2821 | 0.2414 | 0.2414 | 光復1號 |
| 桃園1號 | 0.1197 | 0.1795 | 0.5128 | 0.1709 | 0.1709 | 0.1624 | 0.188 | 0.1538 | 0.1624 | 0.1709 | 0.1538 | 0.1624 | 0.1453 | 桃園1號 |
| 高雄139號 | 0.265 | 0.2564 | 0.4103 | 0.2479 | 0.2735 | 0.2735 | 0.2991 | 0.265 | 0.2479 | 0.2906 | 0.2821 | 0.2991 | 0.2564 | 高雄139號 |
| 高雄143號 | 0.1453 | 0.1709 | 0.5214 | 0.188 | 0.1624 | 0.188 | 0.2051 | 0.1538 | 0.1624 | 0.1709 | 0.1624 | 0.1795 | 0.1538 | 高雄143號 |
| 花蓮19號 | 0.1197 | 0.1795 | 0.4872 | 0.1709 | 0.1795 | 0.1966 | 0.188 | 0.1795 | 0.1709 | 0.1624 | 0.188 | 0.1709 | 0.1453 | 花蓮19號 |
| 東陸1號 | 0.265 | 0.2479 | 0.3761 | 0.2735 | 0.3305 | 0.2966 | 0.2821 | 0.3051 | 0.2966 | 0.2991 | 0.3136 | 0.2906 | 0.2735 | 東陸1號 |
| 新竹64號 | 0.2735 | 0.2564 | 0.4274 | 0.265 | 0.2735 | 0.265 | 0.3162 | 0.2564 | 0.2479 | 0.2991 | 0.2564 | 0.2991 | 0.265 | 新竹64號 |
| 台中65號 | 0.2308 | 0.3077 | 0.4444 | 0.3248 | 0.265 | 0.2222 | 0.2735 | 0.265 | 0.2393 | 0.2735 | 0.2479 | 0.2479 | 0.2564 | 台中65號 |
| 台農67號 | 0.2564 | 0.2393 | 0.4274 | 0.2393 | 0.3136 | 0.2712 | 0.2821 | 0.2881 | 0.2881 | 0.2991 | 0.2966 | 0.2991 | 0.2735 | 台農67號 |
| 台農69號 | 0.2393 | 0.2393 | 0.4274 | 0.2564 | 0.3305 | 0.3136 | 0.2564 | 0.3136 | 0.2797 | 0.265 | 0.3051 | 0.2821 | 0.2479 | 台農69號 |
| 台農70號 | 0.2991 | 0.2735 | 0.4274 | 0.2735 | 0.2991 | 0.2821 | 0.3333 | 0.2821 | 0.2735 | 0.3248 | 0.2735 | 0.3248 | 0.2906 | 台農70號 |
| 台農71號 | 0.1368 | 0.1966 | 0.5043 | 0.1966 | 0.1709 | 0.1709 | 0.188 | 0.1538 | 0.1538 | 0.1709 | 0.1624 | 0.1795 | 0.1453 | 台農71號 |
| 台農72號 | 0.2222 | 0.2308 | 0.4359 | 0.2564 | 0.2797 | 0.2458 | 0.265 | 0.2627 | 0.2542 | 0.265 | 0.2712 | 0.2479 | 0.2479 | 台農72號 |
| 台粳14號 | 0.2564 | 0.2735 | 0.4359 | 0.265 | 0.265 | 0.265 | 0.2821 | 0.265 | 0.2479 | 0.2821 | 0.265 | 0.2906 | 0.2479 | 台粳14號 |
| 台粳16號 | 0.2393 | 0.2222 | 0.4188 | 0.2308 | 0.3051 | 0.2797 | 0.2735 | 0.2966 | 0.2797 | 0.2821 | 0.2712 | 0.2735 | 0.2564 | 台粳16號 |
| 台粳17號 | 0.1282 | 0.1966 | 0.5385 | 0.2051 | 0.188 | 0.1795 | 0.2051 | 0.1709 | 0.1795 | 0.188 | 0.188 | 0.1624 | 0.1538 | 台粳17號 |
| 台粳2號 | 0.2821 | 0.2564 | 0.4188 | 0.2821 | 0.265 | 0.265 | 0.3162 | 0.2564 | 0.2479 | 0.3077 | 0.2564 | 0.3077 | 0.2735 | 台粳2號 |
| 台粳8號 | 0.2479 | 0.2137 | 0.4188 | 0.2393 | 0.2881 | 0.2542 | 0.265 | 0.2627 | 0.2542 | 0.2735 | 0.2627 | 0.2564 | 0.2479 | 台粳8號 |
| 台粳糯1號 | 0.2735 | 0.2564 | 0.4188 | 0.2479 | 0.2564 | 0.2564 | 0.3077 | 0.2479 | 0.2393 | 0.2991 | 0.2222 | 0.3077 | 0.265 | 台粳糯1號 |
| 台東29號 | 0.2564 | 0.2479 | 0.4274 | 0.265 | 0.3305 | 0.2881 | 0.2735 | 0.2966 | 0.2881 | 0.2821 | 0.2966 | 0.2821 | 0.2479 | 台東29號 |
| 台東30號 | 0.2137 | 0.2308 | 0.4359 | 0.2479 | 0.2627 | 0.2627 | 0.2479 | 0.2712 | 0.2458 | 0.2479 | 0.2627 | 0.2479 | 0.2222 | 台東30號 |
| 台南5號 | 0.2479 | 0.2479 | 0.4188 | 0.2479 | 0.3136 | 0.2881 | 0.265 | 0.2797 | 0.2881 | 0.2735 | 0.2627 | 0.2735 | 0.2564 | 台南5號 |
| 桃園糯2號 | 0.1293 | 0.1638 | 0.5172 | 0.1724 | 0.1638 | 0.1638 | 0.1983 | 0.1552 | 0.1638 | 0.1724 | 0.1552 | 0.1724 | 0.1466 | 桃園糯2號 |
| 嘉農242號 | 0.2564 | 0.2821 | 0.4444 | 0.2821 | 0.2564 | 0.2564 | 0.3077 | 0.2479 | 0.265 | 0.2991 | 0.2479 | 0.2906 | 0.2735 | 嘉農242號 |
| 華粳74號 | 0.7436 | 0.5385 | 0.4444 | 0.5556 | 0.6864 | 0.7627 | 0.6581 | 0.7881 | 0.7542 | 0.6752 | 0.7288 | 0.6325 | 0.6923 | 華粳74號 |
| | 高雄籼7號 | 93-11 | Basmati-370-Amer | kho-sakau | 台中籼10號 | 台中籼17號 | 台籼2號 | 台中籼3號 | 台農籼14號 | 台農籼19號 | 台農籼20號 | 台籼糯2號 | 嘉農籼11號 | |

**Fig. 7. The table of similarity coefficients among *indica* and *japonica* varities based on evaluating polymorphism of 118 molecular markers.**

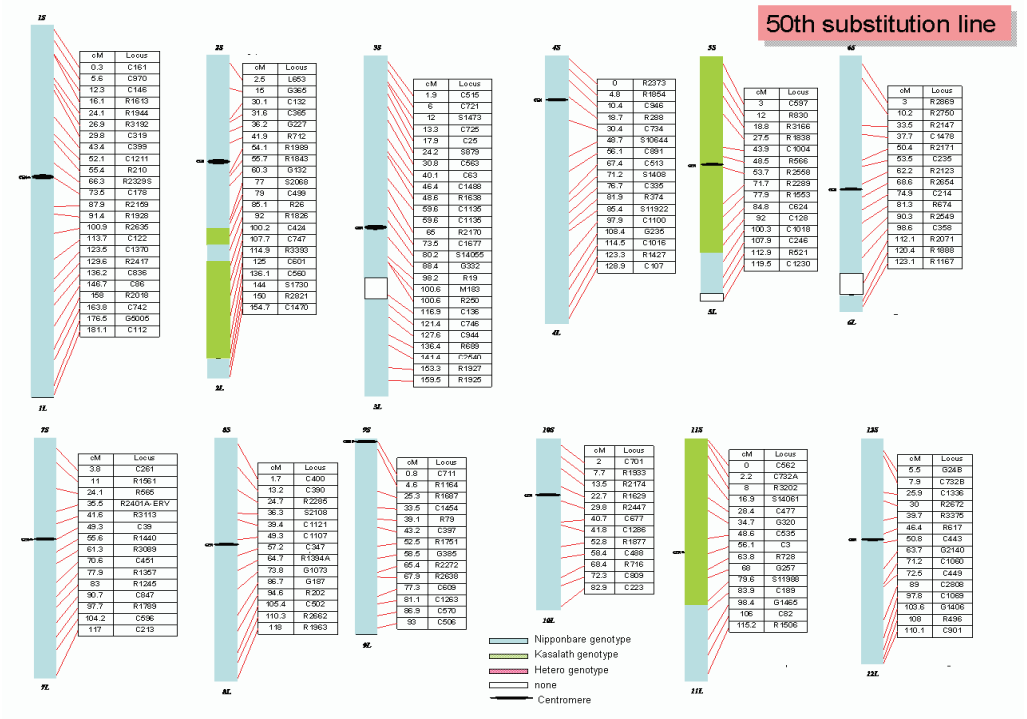



**Fig. 8. Schema of marker genotypes of Chromosome Segment Substitution Line (CSSL).**

替換品系可用於特定的染色體片段細微的定位分析，且對於數量性狀之特定基因的定位分析非常重要。例如株高和抽穗期等數量性狀除了受到環境的影響外，更受到數個基因調控，因此外表型在分離子代的族群中呈現連續性的分布，故要探討其中的某個特定的基因影響效應並不容易。當使用替換品系作細微的定位特定基因時，因其與日本晴回交後已剔除其他基因的影響，在大部分的遺傳背景為日本晴情形下，其 $F_2$ 子代會呈現兩個眾數的分佈(bimodal distribution)，其中隱性的個體約佔 1/4，可以避免定位分析時無意間所犯的錯誤。例如水稻 *d1* 矮性基因的定位工作中，由傳統的型態標幟和後來的 RFLP 分子標幟粗略定位方式得知 *d1* 基因位於第五條染色體的中節附近(Ideta *et al.*1994)，Ashikari *et al.* (1999)即以帶 *d1* 性狀的日本晴與 SL50 進行雜交，並在 $F_2$ 分離族群中找出隱性性狀植株(即 *d1* 表現型)。這個 SL50 替換品系如 Fig. 8 所示，12 條染色體中大部分基因組為日本晴，但第五條染色體的全部短臂與一半的長臂則為 Kasalath，此 $F_2$ 世代之株高可分為兩大族群，矮株的比例為 1/4。作者利用此 $F_2$ 分離族群成功的定位選殖出 *d1*，瞭解 *d1* 突變是因為吉貝素的接受蛋白在突變後不具功能，故可以影響株高而有矮株的型態。另一個使用替換品系的例子是抽穗期之 QTL 定位分析工作，水稻的抽穗期(heading date, HD)為多基因控制的性狀，至目前為止，已經找到 15 個 HD 基因(Yano *et al.* 2001) 。

綜上所述，利用替換品系做親本來進行基因定位工作，可以更有效率的獲得精確的材料，以進行分析。若已有特定基因，也粗略地知道在那條染色體上，則可挑選適當的替換品系作為雜交的親本之一，可更快速及正確的選殖到相關的基因。這個網站中收集的替換品系有兩套，均由日本的 RGRC (http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/) 提供，其中一套以日本晴和 Kasalath 為親本，共有 54 個品系，另一套則以越光與 Kasalath 為親本，共有 39 個品系(Ebitani *et al.* 2005)。設若擬於 54 個品系中尋找含第五條染色體片段之品系，其結果就如 Fig. 9 所示，針對基因位於第五條染色體短臂上端，應可挑選 SL9、SL12、SL13 品系，若基因位於 20 cM 附近，則 SL13 較為適合(Fig. 9)。

3.插入突變族群

在後基因組時代中，突變族群提供了利器，得以快速大量的研究各個基因的功能。因此，若能藉由研究突變株的性狀、生理功能，以及所找出被突變的基因，進而解新基因功能，對於功能性基因的應用將能有效掌控。故當以特定且帶有已知片段的載體(如 T-DNA、*Tos17* 或 *Ac/Ds/spm*)插入方式，再藉由載體逢機的跳躍插入到基因組中，如此便可造成各個插入點發生變異，形成被插入點位置的基因功能上發生變化，藉由變化差異的分析，達到釐定基因的目的。因此，插入突變族群能提供釐定基因的目的，是快速分析基因功能的重要工具之一，尤其是針對某一特定的突變株性狀及載體插入點的序列(flanking sequence)。由於可以很快得知此插入點的基因位置、序列及其與此性狀間的相關，因此能有效推定出基因的功能，而達到定位及選殖的目標。這種推測基因功能的方法稱為逆向遺傳法(reverse genetics)，將基因到型態作了重要且有效的連結。中研院分生所余淑美研究室、中研院植物暨微生物所邢禹依研究室、農試所作物組陳治官研究室、農試所種源中心黃勝忠研究室等四個研究室利用 T-DNA 基因剔除及活化法進行臺農 67 號插入突變族群材料創育，截至 2005 年 3 月為止，經由四個研究室工作群組的努力合作，目前已生產近 5 萬株的插入型/活化型突變株，收穫了近 4 萬株的 T0 種子，其中 1 萬 8 千株為一般的剔除型突變，其餘則同時具備插入及剔除型的型態，一般性狀的調查上亦登錄約兩萬株 T2 植株資料，並已繁殖收獲保

存種子，而另亦定序與解讀約 13,000 個插入點序列(Flanking Sequence Tags, FST)，建立了可以搜尋的資料庫。這些 T1 及 T2 突變品系種子目前均以適當的方式貯放至種源庫中保存，未來可提供國內學者在水稻基因功能時作為分析材料利用。

目前網頁中可聯結進入 T-DNA 突變族群插入點資料庫的首頁(Taiwan Rice Insertional Mutant Database, TRIM)，如 Fig. 10 所示。這個 TRIM 網站(http://trim.sinica.edu.tw)已開放國內的研究人員使用，使用人在下載申請表格後，經申請帳號後便可進行




| marker | c.m. | 品系 | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 9 | 12 | 13 | 21 | 23 | 24 | 25 | 32 | 36 | 37 | 38 | 40 | 42 | 46 | 50 |
| C1004 | 43.9 | A | A | A | B | B | B | A | B | A | A | B | B | A | A | B |
| C1018 | 100.3 | A | A | A | A | A | B | B | A | A | A | A | A | A | A | A |
| C1230 | 119.5 | A | A | A | A | A | B | B | A | A | A | A | A | A | A | - |
| C128 | 92.0 | A | A | A | A | A | B | A | A | A | A | A | B | B | A | B |
| C246 | 107.9 | A | A | A | A | A | B | B | A | A | A | A | A | A | A | A |
| C597 | 3.0 | B | B | A | A | B | A | A | B | B | B | A | A | A | B | B |
| C624 | 84.8 | A | A | - | A | A | B | A | A | A | A | A | B | B | A | B |
| R1553 | 77.9 | A | A | A | A | A | B | A | A | A | A | A | B | B | A | B |
| R1838 | 27.5 | A | A | A | A | B | A | A | B | A | A | H | A | A | A | B |
| R2289 | 71.7 | A | A | A | A | A | B | A | A | A | A | A | A | A | A | B |
| R2558 | 53.7 | A | A | A | A | B | B | A | B | A | A | H | A | A | A | B |
| R3166 | 18.8 | A | B | B | A | B | A | A | B | A | B | H | A | A | A | B |
| R521 | 112.9 | A | A | A | A | A | B | B | A | A | A | A | A | A | A | A |
| R566 | 48.5 | A | A | - | B | B | B | A | B | A | A | H | B | A | A | B |
| R830 | 12.0 | B | B | A | A | B | A | A | B | B | B | A | A | A | A | B |

**Fig. 9. The genotypes of 15 CSSLs distributed on chromosome 5.**

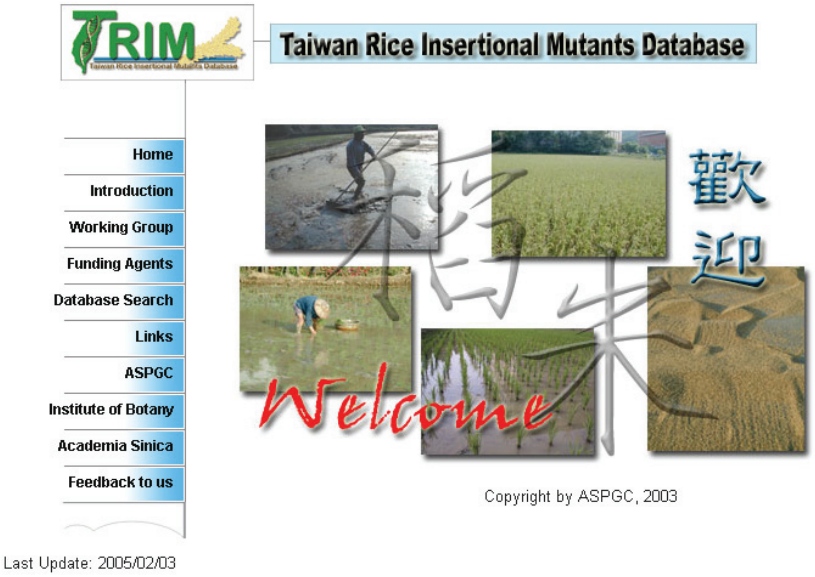



**Fig. 10. The homepage of TRIM, Taiwan Rice Insertional Mutants Database.**

線上搜尋。使用本搜尋工具時，可以利用序列、關鍵字、突變株號碼、性狀特徵等進行比對查詢。使用方式若為(一)利用 DNA 序列查詢：使用此功能時可以用 cDNA 序列或是基因組序列進行 BLAST 查詢，包括了具備此插入點的突變株編號及相關資料、序列比對的逢機期望值(E-value)，點選進入可看到 FST 序列及與水稻基因序列的比對，插入點在基因組上的位置；(二)利用關鍵字查詢：目前以 TAIL-PCR 方式(Liu *et al*. 1995, Hirochika *et al*. 2004)已將各個突變系的 T-DNA 插入點旁邊的水稻基因組序列加以定序，且又根據 NCBI (Wheeler *et al*. 2006)及 RiceGAAS (Sakata *et al*. 2002)之水稻基因資料進行解讀。由於具備了這些 FST 解讀結果的資料庫，研究者可快速利用逆向遺傳法，研究突變基因與其性狀的相關；(三)以突變系編號進行查詢：TRIM 網站亦可利用鍵入突變系編號的方式進行查詢，由於每株之 T-DNA 插入點數目平均為 1.9，有一些突變系可有一個以上的 FST 資料；(四)以外表型性狀查詢：此 T-DNA 突變族群，在 T2 分離世代的各種外表型的變異性狀均已詳細觀察並紀錄，性狀分為 11 大類，即生育、葉色、葉形態、株型、病斑、分蘗、抽穗期、穎花、穗、稔性、穀粒等等。在 TRIM 網站上，點選以外表型查詢後，可以進入查詢畫面，而性狀分類部分，只要點選即可顯示其下的數個細目，點選之後，再按下搜尋鍵，即會列出符合條件之突變系的詳細資料。

4.第五條染色體定序

國際合作之 IRGSP 於 1998 年開始進行水稻基因組定序，採用的定序方式為 clone-by-clone 策略。我國於 2002 年年底已完成第五條染色體的高品質草圖(Sasaki and Sederoff 2003)，之後再以兩年的時間將草圖進行拼裝至完稿，而在 2004 年年底全部完成(IRGSP 2005)。總計於過去 6 年間，我們定序註冊了 318 個 BAC/PAC 殖系，這些殖系平均大小為 120 Kb，扣除重疊的部分後，全長約有 29.7 Mb，涵蓋 181 cM 遺傳圖譜長度，其中包括約 2 Mb 長的中節及約 0.4 Mb 的端粒(telomere)。由此基因組研究資源網站亦可連結入此工作的入口網站(http://genome.sinica.edu.tw)，此網站包含了大量的資源，除了第五條染色體全部的序列解讀、分子標幟、DNA 複雜度等資料外，亦可連結至其它國際水稻定序工作網站、生物資訊各式工具網站等等。

5.臺農 67 號 BAC 基因庫

BAC 全名是 Bacterial Artificial Chromosome (細菌人工染色體)，由於可以裝入極長(平均 120～150 kb)的基因組 DNA，所以 BAC 基因庫是基因組研究的重要資源之一，全世界栽培水稻的 BAC 基因庫共有約數十個，包括粳稻的 Nipponbare，Azucena，Lemont 等，以及秈稻的 IR36，IR64，Milyan，Teqin 等。由於沒有臺灣品種所建構的 BAC 基因庫，因此乃以粳稻 TNG67 為材料製備了兩套 BAC 的基因庫，以利未來功能基因組與結構基因組方面研究利用。基因庫的建立係以兩個星期的秧苗為材料，製備高分子量的基因組 DNA，利用 *Hin*dIII 或 *Eco*RI 切割後，裝入 pAGIBAC1。其中 *Hin*dIII BAC 基因庫有 45,312 個殖系，分裝到 118 個 384 孔盤，其編號為 OSb01；*Eco*RI BAC 基因庫有 9,984 個殖系，分裝到 48 個 384 孔盤，其編號為 OSb02。兩個基因庫再共點成一組 3 張高密度膜，以便進行進一步的雜交分析使用。OSb01 基因庫的插入片段大小平均為 138.4 kb，基因組倍數(genome coverage)為 15.1×；OSb02 基因庫的插入片段大小平均為 137.8 kb，其基因組倍數為 3.2×，兩基因庫之基因組倍數合計為 18.3，可提供超過 99%的機會以選殖任一特定基因(Lin *et al*. 2006)。此二個 BAC 基因庫已製備兩份拷貝，一份存放於中央研究院植物暨微生物所，一份存放於食品研究所生物

資源保存及研發中心。

## 討論

### 一、「臺灣水稻分子標幟之研究資源」網站之應用性

2005 年 IRGSP 正式公布水稻基因組 389Mb 完全解序以來，已利用生物資訊學之方法將這些序列進行組合，組合之 12 條偽分子(pseudomolecules)則相對應於水稻的 12 條染色體，而依據此偽分子的物理圖譜位置目前已預測與註解出 37000 個基因座及非基因座部份序列(重複性序列、跳躍子等)其所佔的比例及位置(IRGSP 2005)。除了提供研究水稻基因組的組成與排列外，也提供利用比較基因組學(comparative genomics)方法探討在稻屬(*Oryza* genus)和禾本科其他重要糧食農作物如小麥、玉米等的演化現象重要的資訊，奠定了以水稻為模式植物，而延伸應用於其他的作物的研究途徑，更開起了一扇水稻基因功能性研究的功能性基因組時代。在此後基因組時代，以「順向遺傳─由型態差異找尋相關的基因」和「逆向遺傳─由剔除的基因找尋影響突變型態」為兩大主軸方向來選殖基因，再進行基因的功能分析。為了以「逆向遺傳」策略找尋基因，建立了粳稻臺農 67 號之 T-DNA 插入突變庫以及「TRIM」網頁快速搜尋(Chern *et al.* 2007, Hsing *et al.* 2007) ；為了以「順向遺傳」策略找尋基因，建立了臺農 67 號之 BAC 基因庫，以供選殖臺農 67 號之等位基因(Lin *et al.* 2006)和建立 81 個秈稻和粳稻品種的 118 個分子標幟之基因型的資料庫，以供親本雜交之選擇和初步的遺傳連鎖分析之多型性分子標幟等參考利用。我們架設網站包含上述的資訊、參與第五條染色體定序的工作成果及可向日本索取之一套替換品系遺傳材料，期望此網站能有助於臺灣水稻學術研究與分子育種的進展。

無論是自然界突變、化學誘變或組織培養過程均會造成基因的變異，最後導致形態上的差異，此均可以「順向遺傳」策略，利用雜交 F2 後代族群、回交族群、或重組自交系等為材料，經由形態和分子標幟的連鎖分析來找到目標基因，再進一步達到定位選殖基因之目的。另亦可應用分子標幟於分子育種的選拔，將作為形態特性導入以 DNA 分子為依據，一方面完成性狀的導入，一方面藉由分子標幟來降低不良遺傳背景的比率，以達到提昇育種選拔率，縮短育種年限及創育新的品種目標。再者，雜交親本的選擇對於分離族群的建立影響相當深遠，若親本間親緣太近將無法找到足夠的多型性分子標幟，太遠則有可能造成分離偏差(segregation distortion)，因此親本的選擇適當性將影響遺傳連鎖分析及基因定位的成功與否。有鑑於此，乃將 81 品種其 118 分子標幟多型性分析結果整理成表，其中相似度數值越高代表親源越近，其多型性分子標幟數則越少，不利於連鎖分析，反之，則否。此在「水稻品種分子標幟差異比較表」網頁中記載了品種之間的相似度，亦可由總表中快速搜尋適合的雜交親本組合，當有特定組合時，下一步可至「水稻品種分子標幟差異比較」網頁中，查詢多型性分子標幟之分佈於 12 條染色體上的情形。因此本次架構網所涵蓋之資訊不但提供了以分子標幟為基礎之品種多型性的關係，因此可作為雜交親本選擇之參考依據，尤其揭露品種多型性分子標幟詳細訊息，研究學者可隨即將之用於連鎖分析的試驗，進而達到基因粗定位目的。

### 二、分子標幟多型性之探討

遺傳標幟可為穩定遺傳的形態標幟，但數量不多且多型性低，應用有限；然而以 DNA 為主軸發展出的分子標幟，由於 PCR 因操作簡易，標幟的多型性高，故廣為應用於品種鑑定和連鎖分析。雖說逢機放大之 PCR 分子標幟如 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)， AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)，和 ISSR

(Inter-Simple Sequence Repeat)，可一次取得許多不同基因座和非基因區域之分析，但這些基因型之資料庫並不容易客觀地建立，且較不容易由他人或研究室重複得到相同的資訊。粳稻日本晴和籼稻 93 11 之基因組相繼的解序後，利用生物資訊學的方法即可探勘出 SSR、籼稻及粳稻間的 indels 和 SNPs，可以利用這些分子標幟進行品種之間歧異度、單倍型(haplotype)的分析，又因為這些分子標幟之物理圖譜位置已知，且已可預測出其遺傳圖譜的位置，因此適用於連鎖輿圖的建立、基因定位及後續的分子標幟輔助選種和定位選殖。

雖說個體之間存在最大的多型分子標幟為 SNP，目前在使用的 SNP 之基因型鑑定的方法有定序、Real-time PCR、tetra-primer、CAPs (Cleaved Amplified Polymophic Site，又稱 PCR-RFLP)、dCAPs (derived-CAPs)等，然而這些方法因操作費時、實驗條件需依不同 SNP 需做調整，產能不高，無法在分子標幟輔助育種或高解析度之連鎖分析時大量子代基因型鑑定時利用。分佈密度其次的為 indel 標幟，目前皆以比較粳稻日本晴和籼稻 93 11 後，經探勘得到 indels，最後再以試驗用的雜交組合進行多型性測試。但 indels 大多存在於籼稻及粳稻之間，同亞種內並不多見，在本試驗中設計出位於第五條染色體的 103 個 indel 標幟，其中在兩型稻間呈現多型性的標幟佔了 71%，然而 7 個籼稻品種間的多型性分子標幟僅佔約 29%，18 個粳稻間更只佔了 11.6%；除此之外，每個 indel 標幟所偵測出來的等位基因數目有限，因此，indel 標幟較適用於籼稻及粳稻雜交的實驗，而較不適用於歧異度的分析。雖 SSR 的分佈密度不及 SNP 和 indel，但在品種或個體間存在多型性等位基因的原因始於在減數分裂過程中，由於 DNA 複製時聚合酶發生失誤(DNA slippage)或同源染色體的不對稱互換(unequal crossing over)，故造成個體間之簡單重複性序列的次數有所不同，如本試驗中 SSR 標幟最高有 7 個等位基因存在(Table 2)，可見多型性比率相當高，因此 SSR 應用於歧異度分析相當有利(Garris *et al.* 2005)。再者，因其引子序列在染色體的位置專一，且可預知將有大量多型性存於籼稻及粳稻間或是稻屬種間的雜交，故其近年來已取代 RFLP 標幟而廣泛應用於水稻的連鎖輿圖建立、數量性狀基因定位、定位選殖和分子標幟輔助選種。

SSR 意指少於 10 bp 的簡單重複性序列，在生物間以 3 bp 或 2 bp 重複為最常見的多型性，有時個體間的差異僅一次重複而已，也就是最小的差異是 3 bp 或 2 bp，一般是以緊鄰重複性序列兩邊的序列來設計出引子、以 PCR 擴增及聚丙烯醯胺膠体電泳分析 PCR 產物、最後再以螢光標定區分此微小的差異(Jain *et al.* 2004)。唯此研究技術稍微繁瑣，且因設備昂貴而不容易進行大量基因型鑑定，爾後雖有改良聚丙烯醯胺膠体電泳分析 SSR 系統，但仍以洋菜膠水平電泳系統較易操作、花費較少、基因型的產能較高。本試驗建立之 2.5%洋菜膠系統，其最適分離 DNA 片段介於 60 bp 和 250 bp 之間，等位基因 DNA 之分子量若相差 10 bp 以上，可容易區分；若僅相差 5 bp 以上，尚可以進行分離族群之異型合子或是同型合子基因型鑑定；若相差少於 5 bp，則無法區分，需用提高洋菜膠的濃度。因此，此洋菜膠 SSR 分析統因解析度有限，故必需捨棄一些具有多型性且差異在 5 bp 以下的標幟，但為求快速、高產能的基因型鑑定及未來應用於分子標幟輔助育種或是定位選殖基因的可能，使用此折衷的方法不但相當簡便易行，更符合經濟效益而提高了實用價值。正因為洋菜膠 SSR 分析統之解析度的限制，本研究推算出相似度僅作為連鎖分析時雜交親本選擇的參考，而不意味著這些品種真正的親緣關係及其實際在整個基因組間的相似度。

## 三、持續增加此研究資源網站之資料庫

依據水稻 12 條染色體連鎖輿圖總長為 1521.6 cM (Harushima *et al.* 1998)，本研究共使用 118 個分子標幟，平均密度為 12.9 cM，少於一般用於基因連鎖分析或區間定位分析數量基因座之分子標幟間距為 20 cM 的標準。然而，經由整合物理圖譜和連鎖輿圖分析後，這 118 分子標幟在染色體上並未均勻的分佈，有些標幟集中在一起，造成有 6 個染色體區域之分子標幟區間大於 30 cM (Fig. 1)。除此之外，在第三、四、五、八、和十二條染色體靠近端粒的區域缺少分子標幟，日後將進一步尋找和設計更多的多型性 SSR 或 indel 標幟，使得標幟之間的距離能小於 20 cM，進一步建立完整地均勻分佈分子標幟連鎖分析輿圖，提供作為鑑定品種的參考利用。再者，本研究使用的 81 水稻品種源來自亞、非、美洲，涵蓋秈稻(*indica*)、粳稻(*temperate japonica*)、陸稻 (*tropical japonica*)、香米(*aromatic*)(Garris *et al.* 2005)，其中許多品種是良質米如臺粳 8 號、臺粳 9 號、臺農 71 號、高雄 139、越光及臺中秈 10 號等等。但是為了因應全球暖化、水資源短缺、耕地面積減少、和亞洲等米食為主的國家人口的增加，培育出抗生物和非生物逆境、減少肥料使用、理想株型、高產等性狀品種，進行所謂的「第二次綠色革命」的育種，需引進同種或不同種的野生水稻，增加臺灣現有的水稻基因池。未來將持續增加野生水稻品種分佈於 12 條染色體分子標幟的基因型鑑定，進一步豐富「臺灣稻分子標幟之研究資源」的資料庫，藉加速臺灣水稻分子育種的進展，提昇新品種的選育效率。

粳稻臺農 67 號是國內最常用於水稻育種和學術研究材料之一，目前在臺灣水稻功能性基因體研究，也以臺農 67 號作為突變的材料，目前約有三千個疊氮化鈉誘變體(Wang *et al.* 2002)和超過五萬株的 T-DNA 剔除突變體 (Chern *et al.* 2007, Hsing *et al.* 2007)。然並非每個基因皆可被 T-DNA 標定，故 T-DNA 剔除突變體快速選殖出基因仍有一定盲點存在。另可利用疊氮化鈉等誘變體為材料，再藉由定位選殖策略選殖出突變基因，之後再進一步的功能性分析來補救 T-DNA 插入法的盲點。惟定位選殖最重要的成功關鍵在於建立高解析度的連鎖分析，此須維持適當的遺傳多型性和減少分離偏差，如此方能有效建立高解析度的連鎖圖譜。基此，以分子標幟多型性之高低作為臺農 67 號(TNG 67)雜交親本的選擇，結果發現其與臺中秈 10 號(TCS 10)間有最多的多型性分子標幟，其次為臺中秈 17 號(TCS 17)，TNG 67 分別與 TCS 10 和 TSC 17 雜交，發現在 TNG 67/TCS 10 之 $F_2$ 族群分析離偏差很嚴重，不利於定位選殖；TNG 67/TCS 17 之 $F_2$ 族群分離偏差的現象明顯減少 (吳、林、邢等未發表)。由於 TNG 67 與 TCS 17 親緣較近，而使得多型性降低，造成多型性的分子標幟變少，故雖再以 Gramene 網上之微衛星分子標幟進行分析，結果仍有不足之處，因此進一步設計多型性 indel 分子標幟來補足平均每 20 cM 具一個多型性之分子標幟，最終目標是在 12 條染色體平均 20 cM 即有一個多型性分子標幟。這些多型性分子標幟的引子序列、PCR 引子黏合溫度和 PCR 擴增片段大小等資訊，將公佈在「臺灣水稻基因組研究資源」網頁，以供臺灣學者即可進行重要基因之粗定位分析利用。

在臺灣，主要以蓬萊米也就是粳稻為主要的米食，持續改良育出新的粳稻品種一直是水稻育種專家不變的目標。因秈稻及粳稻雜交後會造成分離偏差、雜交衰退(hybrid breakdown)等問題，且粳稻間的雜交能在較少世代的選拔達到育成目標。故若能在粳稻的雜交組合中加入分子標幟輔助系統，將更能縮短新品種的育成時間。因粳稻品種間之多型性不佳，例如已在兩型稻間有多型性的分子標幟中，僅有 8% indel 和 24% SSR 標幟在臺農 67 和日本晴間呈現多型性。因此，建立 SNP 探勘與 SNP 基因型鑑定平台，刻不容緩。國際水稻功能性基因組協會

(International Rice Functional Genomics Consortium， http://irfgc.irri.org/)以用於水稻基因組定序的粳稻日本晴為基礎，大規模探勘粳稻臺農 67 號以及其他秈稻、粳稻等的 SNP 位點，所有偵測出的 SNP 位點已由 OryzaSNP Consortium 建立資料庫、搜尋網頁 (http://irfgc.irri.org/cgi-bin/gbrowse/oryzasnp10/)，供大眾使用。我們將以此資料庫為起點，探勘臺灣粳稻品種間的 SNP。首先在 OryzaSNP Consortium 架構 Rice SNP Browser 的網頁上，以 2 Mb 的間距在水稻的 12 條染色體之偽分子搜尋粳稻日本晴和臺農 67 號的 SNPs，再利用 Ecotilling 的方式(Comai *et al*. 2004)，進行臺灣優良品系之 SNP 確認、定序再確認、建立臺灣粳稻的 SNP 資料庫。最後，將此 SNP 資料架構於「臺灣水稻基因組研究資源」之下，使此網站更為豐富、更有助於臺灣的水稻研究和水稻的分子育種。

## 誌謝

本研究的經費來源為「農業生物技術國家型科技計畫」(邢禹依)。

## 引用文獻

Altschul SF, TL Madden, AA Schaffer, J Zhang , Z Zhang, W Miller, DJ Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**. 25: 3389-3402.

Ashikari M, H Sakakibara, S Lin, T Yamamoto, T Takashi, A Nishimura, ER Angeles, Q Qian, H Kitano, M Matsuoka (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. **Science** 309: 741-5.

Ashikari M, J Wu, M Yano, T Sasaki, A Yoshimura (1999) Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf1* encodes the α-subunit of GTP-binding protein. **Proc. Natl. Sci. USA** 96: 10284-10289

Causse MA, TM Fulton, YG Cho, SN Ahn, J Chunwongse, K Wu, J Xiao, Z Yu, PC Ronald, SE Harrington, G Second, SR McCouch, SD Tanksley (1994) Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. **Genetics** 138:1251-1274.

Chen X, S Temnykh, Y Xu, YG Cho, and SR McCouch (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 95**:** 553-567

Chern CG, MJ Fan, SM Yu, AL Hour, PC Lu, YC Lin, FJ Wei, SC Huang, S Chen, MH Lai, CS Tseng, HM Yen, WS Jwo, CC Wu, TL Yang, LS Li, YC Kuo, SM Li, CP Li, CK Wey, A Trisiriroj, HF Lee, YI Hsing (2007) A rice phenomics study-phenotype scoring and seed propagation of a T-DNA insertion-induced rice mutant population. **Plant Mol. Biol.** 65: 427-438

Comai L, K Young, BJ Till, SH Reynolds, EA Greene, CA Codomo, LC Enns, JE Johnson, C Burtner, AR Odden, S Henikoff (2004) Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. **Plant J.** 37: 778-786.

Council of Agriculture (2003) AG. Statistics Year book 2003. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei. 437pp.

Devos KM, MD Gale (2000) Genome relationships: the grass model in current research. **Plant Cell** 12: 637-646.

Ebitani T, Y Takeuchi, Y Nonoue, T Yamamoto, K Takeuchi, M Yano (2005) Construction and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of *indica* rice cultivar 'Kasalath' in a genetic background of *japonica* elite cultivar 'Koshihikari'. **Breeding Sci.** 55: 65-73.

Feltus FA, J Wan, SR Schulze, JC Estill, N Jiang, AH Paterson (2004) An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies *indica* and *japonica* genome alignments. **Genome Res.** 14: 1812-9.

Garris AJ, TH Tai, J Coburn, S Kresovich, S McCouch (2005) Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics** 169: 1631-8.

Harushima Y, M Yano, A Shomura, M Sato, T Shimano, Y Kuboki, T Yamamoto, SY Lin, BA

Antonio, A Parco, H Kajiya, N Huang, K Yamamoto, Y Nagamura, N Kurata, GS Khush, T Sasaki (1998) A high–density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single $F_2$ population. **Genetics** 148: 479-494

Hirochika H, E Guiderdoni, G An, YI Hsing, MY Eun, CD Ha, N Upadhyaya, S Ramachandran, Q Zhang, A Pereira, V Sundaresan, H Leung (2004) Rice mutant resources for gene discovery. **Plant Mol. Biol.** 54: 325-34.

Hsing YI, CG Chern, MJ Fan, PC Lu, KT Chen, SF Lo, PK Sun, SL Ho, KW Lee, YC Wang, WL Huang, SS Ko, S Chen, JL Chen, CI Chung, YC Lin, AL Hour, YW Wang, YC Chang, MW Tsai, YS Lin, YC Chen, HM Yen, CP Li, CK Wey, CS Tseng, MH Lai, SC Huang, LJ Chen, SM Yu (2007) A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. **Plant Mol. Biol.** 63: 351-64.

Ideta O, A Yoshimura, N Iwata (1994) Integration of conventional and RFLP linkage mps in rice. III. Chromosomes 5, 7, 8, and 12. **Rice Genet. Newslett.** 11: 116-117

IRGSP, International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. **Nature** 436: 793-800

Jacard P (1908) Nouvelles rescherches sur la distribution florale. **Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat**. 44: 223-270

Jain S, RK Jain, SR McCouch (2004) Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.** 109: 965-977

Jena KK, JU Jeung, JH Lee, HC Choi, DS Brar (2006) High-resolution mapping of a new brown planthopper (BPH) resistance gene, *Bph18(t*), and marker-assisted selection for BPH resistance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 112: 288-297.

Khush GS (1997) Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Mol. Biol. 3**5: 25-34

Khush GS (2005) What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. **Plant Mol. Biol.** 59: 1-6

Li ZK, SRM Pinson, MA Marchetti, JW Stansel, WD Park (1995) Identification of QTL for heading date and plant in rice using RFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 91: 382-388

Lin YR, TY Chow, M Luo, D Kudrna, CC Lin, RA Wing, YI C Hsing. (2006) Two highly representative rice BAC libraries of *japonica* cv Tainung 67, suitable for rice structural and functional genomic fesearch. **Plant Sci.** 170: 889-896

Liu YG, N Mitsukawa, T Oosumi, RF Whittier (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. **Plant J.** 8: 457-63.

McCouch SR, G Kochert, ZH Yu, ZY Wang, GS Khush, WR Coffman, SD Tanksley (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. **Theor. Appl. Genet.** 76: 815-829

McCouch SR, L Teytelman, Y Xu, KB Lobos, K Clare, M Walton, B Fu, R Maghirang, Z Li, Y Xing, Q Zhang, I Kono, M Yano, R Fjellstrom, G DeClerck, D Schneider, S Cartinhour, D Ware, L Stein (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Res.** 9: 199-207.

Neeraja CN, R Maghirang-Rodriguez, A Pamplona, S Heuer, BC Collard, EM Septiningsih, G Vergara, D Sanchez, K Xu, AM Ismail, DJ Mackill (2007) A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. **Theor. Appl. Genet**. 115:767-776.

Paterson AH, ES Lander, JD Hewitt, S Peterson, SE Lincoln, SD Tanksley (1988) Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphism **Nature** 335: 721-726

Sakata K, Y Nagamura, N Numa, BA Antonio, H Nagasaki, A Idonuma, W Watanabe, Y Shimizu, I Horiuchi, T Matsumoto, T Sasaki, K Higo (2002) RiceGAAS: an automated annotation system and database for rice genome sequence. **Nucleic Acids Res.** 30: 98-102.

Sasaki T, RR Sederoff (2003) Genome studies and molecular genetics: The rice genome and comparative genomics of higher plants. **Curr.**

**Opin. Plant Biol.** 6: 97-100

Shen YJ, H Jiang, JP Jin, ZB Zhang, B Xi, YY He, G Wang, C Wang, L Qian, X Li, QB Yu, HJ Liu, DH Chen, JH Gao, H Huang, TL Shi, ZN Yang (2004) Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. **Plant Physiol.** 135:1198-205.

Singh S, JS Sidhu, N Huang, Y Vikal, Z Li, DS Brar, HS Dhaliwal, GS Khush (2001) Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR 106. **Theor. Appl. Genet.** 102: 1011-1015

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

Wang CS, TH Tseng, and CY Lin (2002) Rice biotech research at the Taiwan Agricultural Research Institute. **APBN** 6：950-956..

Wheeler DL, T Barrett, DA Benson, SH Bryant, K Canese, V Chetvernin, DM Church, M DiCuccio, R Edgar, S Federhen, LY Geer, W Helmberg, Y Kapustin, DL Kenton, O Khovayko, DJ Lipman, TL Madden, DR Maglott, J Ostell, KD Pruitt, GD Schuler, LM Schriml, E Sequeira, ST Sherry, K Sirotkin, A Souvorov, G Starchenko, TO Suzek, R Tatusov, TA Tatusova, L Wagner, E Yaschenko (2006) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Res.** 34: D173-80.

Yamamoto K, T Sasaki (1997) Large-scale EST sequencing in rice. **Plant Mol. Biol.** 35: 135-144.

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

Yi G, SK Lee, YK Hong, YC Cho, MH Nam, SC Kim, SS Han, GL Wang, TR Hahn, PC Ronald, JS Jeon (2004) Use of *Pi5(t)* markers in marker-assisted selection to screen for cultivars with resistance to *Magnaporthe grisea.* **Theor. Appl. Genet.** 109: 978-85.

Yu J, S Hu, J Wang, GK Wong, S Li, B Liu, Y Deng, L Dai, Y Zhou, X Zhang, M Cao, J Liu, J Sun, J Tang, Y Chen, X Huang, W Lin, C Ye, W Tong, L Cong, J Geng, Y Han, L Li, W Li, G Hu, X Huang, W Li, J Li, Z Liu, L Li, J Liu, Q Qi, J Liu, L Li, T Li, X Wang, H Lu, T Wu, M Zhu, P Ni, H Han, W Dong, X Ren, X Feng, P Cui, X Li, H Wang, X Xu, W Zhai, Z Xu, J Zhang, S He, J Zhang, J Xu, K Zhang, X Zheng, J Dong, W Zeng, L Tao, J Ye, J Tan, X Ren, X Chen, J He, D Liu, W Tian, C Tian, H Xia, Q Bao, G Li, H Gao, T Cao, J Wang, W Zhao, P Li, W Chen, X Wang, Y Zhang, J Hu, J Wang, S Liu, J Yang, G Zhang, Y Xiong, Z Li, L Mao, C Zhou, Z Zhu, R Chen, B Hao, W Zheng, S Chen, W Guo, G Li, S Liu, M Tao, J Wang, L Zhu, L Yuan, H Yang (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Science** 296: 79-92.

－編輯：謝兆樞