

臺灣環境下秈稻抽穗特性之數量 性狀基因座定位¹

王聖善、陳榮坤²

摘 要

王聖善、陳榮坤。2023。臺灣環境下秈稻抽穗特性之數量性狀基因座定位。臺南區農業改良場研究彙報 82：1-14。

全球暖化下，水稻遭受極端氣候的機會也愈趨頻繁，臺灣的秈稻栽培品種皆為中晚熟，較長的生育日數使得秈稻有著較高的生產管理風險。本研究利用 2 個具早抽穗特性的秈稻近同源系 (NIL_TNS14^{Koshihikari} 與 NIL_TCS17^{Aikawa1}) 與其中晚熟輪迴親 (臺農秈 14 號與臺中秈 17 號) 回交所衍生的分離族群，進行抽穗期的數量性狀基因座定位。分析結果發現，NIL_TNS14^{Koshihikari} 的早抽穗特性源自一段位於第五條染色體上臂的貢獻親 (Koshihikari) 置換區間，此 QTL (*HD5*) 可解釋分離族群中 40.9% 的外表型變異；而 NIL_TCS17^{Aikawa1} 早抽穗特性 QTL 則被定位在第三條染色體上臂一段來自貢獻親 (Aikawa1) 的置換區間，此 QTL (*HD3*) 可解釋分離族群中 61.0% 的外表型變異。抽穗期性狀調查結果顯示，NIL_TNS14^{Koshihikari} 相較於臺農秈 14 號可提早 8 天抽穗；而 NIL_TCS17^{Aikawa1} 相較於臺中秈 17 號可提早 10.5 天抽穗。結果顯示本研究所選獲的兩個 QTL，適合用於縮短臺灣秈稻品種所需生育日數，並供國內秈稻育種使用。

現有技術：回交育種法育成優良品種的近同源系，改善其缺陷性狀。

創新內容：開發早熟秈稻數量性狀基因座，提升育種選拔效率。

對產業影響：有助於縮短國內秈稻品種生育日數，降低生產風險。

關鍵字：次世代定序、分子標誌、分子標誌輔助選種、水稻

接受日期：2023 年 8 月 15 日

1. 農業部臺南區農業改良場研究報告第 560 號。

2. 農業部臺南區農業改良場助理研究員與研究員兼分場長。712009 臺南市新化區牧場 70 號。

前 言

秈稻是國內水稻 (*Oryza sativa* L.) 主要的栽培種之一，目前國內每年栽培面積約 19,000 公頃，主要栽種於第一期作。國內一期作插秧期間為氣溫寒冷的 1 ~ 2 月，收穫期間則在高溫多雨的 6 ~ 7 月。相較於其他稈稻栽培品種，秈稻品種需要較長的生育期。因近年來氣候變遷，國內一期作秈稻容易於插秧初期遭遇低溫而引發幼苗死亡，或者於生育後期遭受 7 月颱風與豪雨侵襲，導致收益受損。若能透過品種改良策略，選育具早熟特性的秈稻品種，就能延後秈稻插秧並提早收穫、降低秈稻遭遇非生物逆境的機會，穩定農民的收益。

不同水稻品種間，生育所需日數的差異主要來自於不同的抽穗期 (抽穗所需日數) 所導致。由不同栽培品種與栽培環境下的數量性狀基因座定位 (quantitative trait locus mapping) 結果，目前國際上已有 13 個關於水稻抽穗期相關數量性狀基因 (*DTH2*、*DTH7*、*DTH8*、*Ghd7*、*Hd1*、*Hd3a*、*Hd6*、*Hd16*、*Hd17*、*RFT1*、*DTH3*、*Ehd1* 與 *Ehd4*) 被選殖^(3-11,13-19)。水稻為光敏感作物，抽穗所需日數易受基因與環境交感影響。目前雖然國際上已有許多抽穗期基因被廣泛研究，但國外進行數量性狀基因座定位時，所遭遇的光週期與國內一期作環境不同，因此國內水稻育種人員不易透過國外研究所獲得的數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTL) 資訊，直接運用在國內秈稻品種的生育所需日數改良。

在先前研究中，本團隊已透過調查 105 個國內外栽培品種裡的 6 個抽穗期基因型 (*HD1*、*HD6*、*EHD1*、*GHD7*、*RFT1* 與 *DTH8*)，來瞭解在臺灣一期作與二期作環境下，各抽穗期等位基因的差異對參試品種抽穗期的影響⁽¹⁾。研究後雖然發現 3 個抽穗期基因 *HD1*、*DTH8* 與 *RFT1* 的等位基因型差異，可影響秈稻在臺灣二期作的抽穗期變異。然而於國內秈稻主要栽種的一期作栽培環境中，僅發現 *RFT1* 可顯著影響參試秈稻的抽穗期。此外研究中雖發現，早熟的 *RFT1* 等位基因，可使秈稻在國內一期作環境下提早約 5.4 天抽穗，但分析結果顯示，國內多數秈稻品種已帶有 *RFT1* 的早熟等位基因⁽¹⁾，因此在國內早熟秈稻的育種計畫中，多數秈稻品種無法透過 *RFT1* 早熟等位基因的導入，來達到同時避開 1 月寒害與 7 月豪雨的育種目標。

為了獲得可運用在國內早熟秈稻育種之數量性狀基因座，本研究先以兩個早熟的日本稈稻品種 'Koshihikari'，與 'Aikawal' 作為貢獻親，透過回交育種策略，各別選育出一個早熟的臺農秈 14 號，以及一個早熟的臺中秈 17 號近同源系。此外，本研究也透過數量性狀基因座定位策略，進行兩個分離族群的抽穗期數量性狀基因座定位。最後，本試驗評估了臺農秈 14 號與臺中秈 17 號的早熟近同源系與輪迴親，其在重要農藝性狀上的差異。本篇文章所獲得之結果，期望能作為秈稻早熟分子標誌輔助選種之分子標誌開發基礎，提供國內水稻育種專家做為參考。

材料方法

一、具早抽穗特性的臺農秈 14 號及臺中秈 17 號近同源系選育

分別選取中晚熟的臺農秈 14 號做為輪迴親，早熟的日本稈稻 Koshihikari 為貢獻親；以及中晚熟的臺中秈 17 號做為輪迴親，早熟的日本稈稻 Aikawal 為貢獻親，透過傳統回交育種方法，進行臺農秈 14 號與臺中秈 17 號的抽穗期特性改良。兩個組合各別於回

交後所衍生的 BC_1F_1 與 BC_2F_1 世代之中，選取 1 株最早抽穗的個體與輪迴親進行回交，並於 BC_3F_1 世代時挑選最早抽穗的 1 株個體進行自交，從而衍生出兩個 BC_3F_2 族群。實驗再於 BC_3F_2 族群中，挑選最早熟的 4 株個體進行自交純化，最後於 BC_3F_4 世代中，分別挑選一個具早熟特性且農藝性狀與臺農 14 號相似的近同源系 $NIL_TNS14^{Koshihikari}$ ，及一個具早熟特性且農藝性狀與臺中 17 號接近的近同源系 $NIL_TCS17^{Aikawa1}$ 進行後續實驗。 $NIL_TNS14^{Koshihikari}$ 與 $NIL_TCS17^{Aikawa1}$ 的選育過程詳如圖 1。

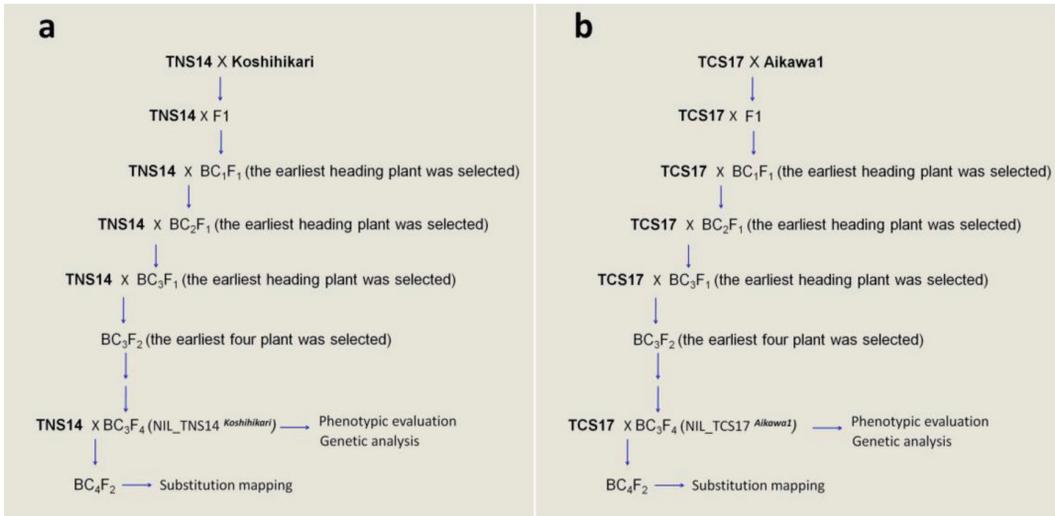


圖 1. 水稻臺農 14 號 (TNS14) 與臺中 17 號 (TCS17) 之各別早抽穗近同源系選育過程。
(a) $NIL_TNS14^{Koshihikari}$ 的選育流程。(b) $NIL_TCS17^{Aikawa1}$ 的選育流程

Fig. 1. Schematic representation for developing genetic materials in this study. (a) The breeding process of $NIL_TNS14^{Koshihikari}$. (b) The breeding process of $NIL_TCS17^{Aikawa1}$

二、早抽穗近同源系的遺傳背景探勘

為了分析兩個早抽穗近同源系 $NIL_TNS14^{Koshihikari}$ 與 $NIL_TCS17^{Aikawa1}$ 的遺傳背景，本研究將農 14 號、臺中 17 號、Koshihikari、Aikawa1、 $NIL_TNS14^{Koshihikari}$ 與 $NIL_TCS17^{Aikawa1}$ 進行 ddRAD (double digest restriction-site associated DNA) 圖書庫的建構與次世代定序 (next generation sequencing, NGS)。建構完成的定序圖書庫則委由基龍米克斯公司以 Illumina X-Ten 次世代定序平臺進行 150 bp paired end 核酸定序。ddRAD 圖書庫的建庫方法與後續的核酸定序原始資料分析則參考劉等人 (2020)⁽²⁾ 策略進行實驗。

三、數量性狀基因座定位

為了進行 $NIL_TNS14^{Koshihikari}$ 早抽穗數量性狀基因座的定位，本實驗選擇以 $NIL_TNS14^{Koshihikari}$ 與臺農 14 號回交所衍生的 70 株 BC_4F_2 族群作為遺傳定位材料 (圖 1a)。實驗材料於 2018 年 8 月 8 日，種植於臺南區農業改良場鹿草分場的玻璃溫室中，植株以行間距 20 cm × 20 cm 單本種植，並採慣行栽培進行植株的栽培管理。抽穗所需生育日數以植株定植到個體第一支穗完全抽出之所需日數作為依據。基因型分析方面，本研究先在 $NIL_TNS14^{Koshihikari}$ 位於第 2、5、6、11 與 12 條染色體中的 Koshihikari 染色體置換片段中，各設計一個在親本間具多型性 KASP (kompetitive allele specific

PCR) 分子標誌 (S2、S5、S6、S11 與 S12)，而在 NIL_TNS14^{Koshihikari} 位於第 1 條染色體長臂上的 2 個 Koshihikari 染色體置換片段上，則設計 1 個親本間具多型性 KASP 分子標誌 (S1)，用以進行分離族群的基因型分析。基因型與外表型分析所得結果再以單一標識迴歸法 (single-marker regression)，進行染色體片段與抽穗所需日數之間的基因座定位。為了進一步執行區間定位 (interval mapping)，本研究額外設計了 4 個位在第五條染色體的 0.7 ~ 5.9 Mb 區間的 KASP 分子標誌 (C5_78、C5_111、C5_144 與 C5_202)，並以迴歸區間定位法 (Haley-Knott regression scanone) 進行抽穗所需日數的數量性狀基因座的區間定位 (interval mapping)；NIL_TCS17^{Aikawal} 早抽穗數量性狀基因座定位策略與上述的 NIL_TNS14^{Koshihikari} 早抽穗數量性狀基因座定位相同，以 NIL_TCS17^{Aikawal} 與臺中秈 17 號回交所衍伸的 81 株 BC₄F₂ 作為遺傳材料 (圖 1b)。實驗材料於 2018 年 1 月 29 種植於臺南區農業改良場鹿草分場的玻璃溫室中，栽培管理與性狀調查方式同 NIL_TNS14^{Koshihikari} 早抽穗數量性狀基因座定位方法。基因型分析則是先將 NIL_TCS17^{Aikawal} 遺傳背景中，4 個來自貢獻親 Aikawal 的染色體片段中，各設計一個於親本間具多型性 KASP 分子標誌 (S2-1、S2-2、S3-1 與 S3-2)，用以進行分離族群的基因型分析。分析後所得結果先以單一標識迴歸法進行基因座初定位，接著再以額外設計的 4 個位在第五染色體 0.44 ~ 2.05 Mb 區間的 KASP 分子標誌 (C3_107、C3_123、C3_154 與 C3_205)，進行抽穗所需日數的區間定位分析。數量性狀基因座相關實驗以 R/qrtl 套件進行分析，QTL 定位的閾值則使用 1000 次的重排試驗，找出 $\alpha = 0.05$ 的 LOD (logarithm of odds) score 作為本次實驗的門檻。實驗所使用的 KASP 分子標誌資訊如表 1。

四、早抽穗近同源系的重要農藝性狀調查

臺農秈 14 號與 NIL_TNS14^{Koshihikari} 的農藝性狀調查試驗種植於 2016 年第一期作；臺中秈 17 號與 NIL_TCS17^{Aikawal} 的農藝性狀調查試驗種植於 2018 年第一期作。兩批試驗材料均種植於臺南區農業改良場鹿草分場。種植方法以育苗後插秧移植，試驗採單本植，栽培管理方法依慣行水田方式種植，期間氮肥施用量約 160 kg ha⁻¹。為了比較輪迴親與近同源系的農藝性狀，試驗設計採三重複完全隨機試驗設計 (completely randomized design)，每重複種植 52 株。試驗材料於調查時，每個品種 (系) 隨機採收 6 株進行抽穗所需日數、株高、每株穗數以及單株穀粒重調查。調查結果以 Student's t-test 方式進行品種 (系) 間的兩兩比較。

結 果

一、具早抽穗特性的臺農秈 14 號及臺中秈 17 號近同源系選育

為了選育具有早熟特性之秈稻品種，本研究分別選取中晚熟的臺農秈 14 號 (2013 年一期作抽穗所需生育日數為 102 天) 與臺中秈 17 號 (2013 年一期作抽穗所需生育日數為 102 天) 為輪迴親，早熟的日本梗稻 Koshihikari (2013 年一期作抽穗所需生育日數為 77 天) 與 Aikawal (2013 年一期作抽穗所需生育日數為 81 天) 為貢獻親，透過傳統回交育種方法，進行臺農秈 14 號與臺中秈 17 號的抽穗期特性改良，回交選育流程詳如圖 1。透過三次的回交選種，各別於 BC₃F₄ 世代中選獲一個具早抽穗特性的臺農秈 14 號近同源系 NIL_TNS14^{Koshihikari}，以及一個具早抽穗特性的臺中秈 17 號近同源系 NIL_TCS17^{Aikawal} (圖 2)。

表 1. 本篇文章中，基因型分析所使用的分子標誌資訊

Table 1. Competitive allele-specific PCR (KASP) markers used in this study

Assays ID	Primer Seq Allele X	Primer Seq Allele Y	Primer Seq common
S1	GCATTTGGTGGTACGTGTATCATGC	AGCATTTGGTGGTACGTGTATCATGA	ACACTACGTACGGGTAGGGTTC
S2	CTGTACGTAAAGCAGACCCTCAAGT	GTACGTAAAGCAGACCCTCAAGG	GTGTACTCCAGTAGTATCAAAGACACAAA
S5	GATCTTACACAAAACAAGCTTCTCA	TCCTACACAACAAAAAGCTTCTCG	TAACTTGC AATGTTTGCCGAT
C5_78	CAATCATCTGCAGTTGCTGAACAGTA	AATCATCTGCAGTTGCTGAACAGTG	ATGAGCAAATTTGCAGTTTCTTGCCAAGAA
C5_111	TCCAGCTGAAAAAGTCATATCCGC	GTTCCAGCTGAAAAAGTCATATCCGT	GCGTTGTTGCGTTTGTGTCTGGATT
C5_144	GCTACAATGGCCGAGCAACTA	GCTACAATGGCCGAGCAACTG	GCA GCAATCAATTTGTTGGCGAAAAGTTA
C5_202	CGGTGGCAGCACCCAG	GTCGGTGGCAGCACCCAA	CTGCAGAACCGGGTGCTGTTCAA
S6	TGGGCCCTCCAAAATCCAGCCA	GGGCCTCCAAAATCCAGCCG	TTCA TGGGCCGTTGTATTAGTGTGAAAA
S11	CATAAATCTGAGAAAGCAGCACACG	CCATAAATCTGAGAAAGCAGCACACA	CCTCTCCAGGTCCTGCTCTGTT
S12	CGAGTCTATGCCTCAAGCCCTA	GAGTCTATGCCTCAAGCCCTC	GAGTAACTCACTTATGAGGAGCTGTT
S2-1	GAGATGGAGTGCATGGAAGAGG	AGAGATGGAGTGCATGGAAGAGA	CATCTCCATGAATGATCTTAGCGGAGATA
S2-2	GCAAGAACAGACGACGTACGTG	CGCAAGAACAGACGACGTACGTA	CAGCACAAAGTGAACTGGATAATGTTCTAAA
S3-1	ATAACTGGCAGAAAAGAGGTGAGCA	ATAACTGGCAGAAAAGAGGTGAGCT	CCTGTTGTGAAAAAATTTGGACAGTGTGTTA
S3-2	CAACGAGATGGTCGCTGCC	CAACGAGATGGTCGCTGCCA	ACTTGAGGAGAAAATGCACGGCGAA
C3_107	GGCAGTCCTAGCACTTGCAGA	GGCAGTCCTAGCACTTGCAGT	TCTCACTGGGGATTGTTGG
C3_123	AGTATCCAAAAGCTCACAAAAGAGCC	AAGTATCCAAAAGCTCACAAAAGAGCT	ACACGACTGCGGTACAAATCGC
C3_154	CATGGCTGAATATTAAGTCTTTCGAAG	ACATGGCTGAATATTAAGTCTTTCGAAA	CTTGCAGCACAGCTCAAACCGAGAAT
C3_205	TTCACCCGTA TATCCCCTCC	GTTTACCCCGTACTATCCCCTCT	GATCCGTA TCCAGCAACGGAAAGAAA

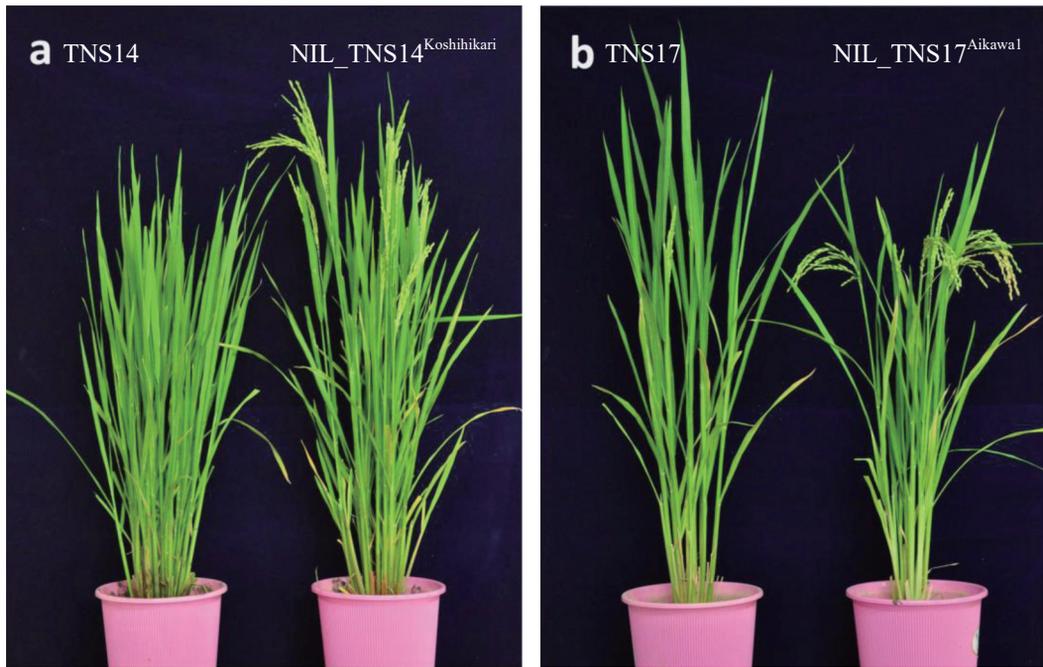


圖 2. 參試材料的抽穗期比較。(a) 臺農稻 14 號 (TNS14) 與 NIL_TNS14^{Koshihikari} 在抽穗時期的植株型態。b 臺中秈 17 號 (TCS17) 與 NIL_TCS17^{Aikawa1} 在抽穗時期的植株型態

Fig. 2. Phenotypic characters of TNS14, TCS17 and two near isogenic lines at heading stage. (a) Plant architecture of TNS14 and NIL_TNS14^{Koshihikari}. (b) Plant architecture of TCS17 and NIL_TCS17^{Aikawa1}

二、早抽穗近似同源系的基因型探勘

為了瞭解導致 NIL_TNS14^{Koshihikari} 與 NIL_TCS17^{Aikawa1} 早熟的遺傳機制，本研究透過 ddRAD-seq 技術分析臺農稻 14 號、臺中秈 17 號、Koshihikari、Aikawa1、NIL_TNS14^{Koshihikari} 與 NIL_TCS17^{Aikawa1} 的遺傳背景，並分別獲得 3,642,247 條 (臺農稻 14 號)、317,946 條 (臺中秈 17 號)、2,384,942 條 (Koshihikari)、4,225,212 條 (Aikawa1)、2,899,816 條 (NIL_TNS14^{Koshihikari}) 與 2,913,348 (NIL_TCS17^{Aikawa1}) 定序長度為 150 bp 的 DNA 序列。經比對臺農稻 14 號與 Koshihikari 定序序列，總共獲得了 4,903 個於兩親本間具有多型性的單一核苷酸多型性位點 (single nucleotide polymorphism, SNP)，藉由上述的 4,903 個 SNPs 位點分析 NIL_TNS14^{Koshihikari} 遺傳背景後發現，NIL_TNS14^{Koshihikari} 的遺傳回復率約為 94.6%，NIL_TNS14^{Koshihikari} 的遺傳背景中帶有 7 個來自於貢獻親 Koshihikari 的染色體片段 (圖 3a)；臺中秈 17 號與 Aikawa1 的定序序列經比對後，總共獲得了 896 個 SNPs，藉由比對 NIL_TCS17^{Aikawa1} 在上述 896 個 SNPs 的基因型結果發現，NIL_TCS17^{Aikawa1} 的遺傳回復率約為 98.8%，NIL_TCS17^{Aikawa1} 的遺傳背景中帶有 4 個來自於貢獻親 Aikawa1 的染色體片段 (圖 3b)。經比對 NIL_TNS14^{Koshihikari} 與 NIL_TCS17^{Aikawa1} 的染色體置換區間 (introgressed segments)，發現兩個早熟近同源系的染色體置換區間並無交集，因此推測 NIL_TNS14^{Koshihikari} 與 NIL_TCS17^{Aikawa1} 的早熟特性應來自於不同的基因座。

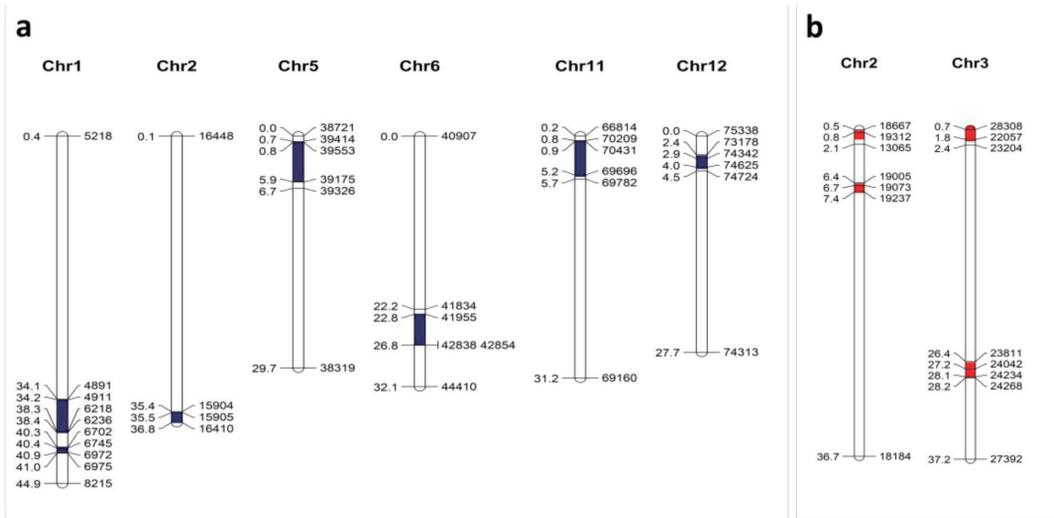


圖 3. NIL_TNS14^{Koshihikari} 與 NIL_TCS17^{Aikawal} 染色體置換片段的遺傳背景

(a) NIL_TNS14^{Koshihikari} 的染色體物理圖譜。白色染色體區間為臺農秈 14 號 (TNS14) 同質結合片段；藍色染色體區間為 Koshihikari 同質結合置換片段。(b) NIL_TCS17^{Aikawal} 的染色體物理圖譜。白色染色體區間為臺中秈 17 號 (TCS17) 同質結合片段；紅色染色體區間為 Aikawal 同質結合置換片段

Fig. 3. Genetic background of two near isogenic lines. (a) Physical map of NIL_TNS14^{Koshihikari}. White squares: homozygous chromosomal segments of TNS14; Blue squares: homozygous chromosomal segment of Koshihikari. (b) Physical map of NIL_TCS17^{Aikawal}. White squares: homozygous chromosomal segments of TCS17. Red squares: homozygous chromosomal segment of Aikawal

三、數量性狀基因座定位

(一) NIL_TNS14^{Koshihikari} 早抽穗特性的數量性狀基因座定位

為了獲得導致 NIL_TNS14^{Koshihikari} 早熟的數量性狀基因座，本實驗將 NIL_TNS14^{Koshihikari} 與臺農秈 14 號進行回交，衍生出 BC₄F₂ 族群，用以進行抽穗期的數量性狀基因座定位。BC₄F₂ 族群的抽穗所需日數如圖 4a。為了瞭解 NIL_TNS14^{Koshihikari} 遺傳背景中，來自 Koshihikari 的染色體片段對抽穗所需生育日數的影響，實驗設計了 6 個分別位在不同染色體置換區間中的 KASP 分子標誌 (位於第一條染色體 34.2 ~ 38.4 Mb 以及 40.4 ~ 40.9 Mb 的兩個置換區間，由於物理距離接近，因此僅設計 1 個 KASP 分子標誌)，並藉由單一標識迴歸法，進行抽穗所需日數與染色體置換片段之間的基因座定位。實驗結果發現，僅有一個位於第五條染色體上臂的分子標誌 (S5) 與抽穗所需日數之間達顯著相關 (圖 5a)。為了進一步瞭解此數量性狀基因座在第五條染色體的詳細區間，我們額外設計了 4 個位於第五條染色體的 0.7 ~ 5.9 Mb 區間的 KASP 分子標誌，並以迴歸區間定位法進行抽穗所需日數的數量性狀基因座定位。實驗結果發現導致 NIL_TNS14^{Koshihikari} 早熟的主效數量性狀基因座位於分子標誌 C5_111 與 C5_144 區間 (本文中，接下來稱此基因座為 HD5)，此基因座可解釋 40.9% 定位族群的外表型變異，加性效應約 -2.9 天 (表 2)。

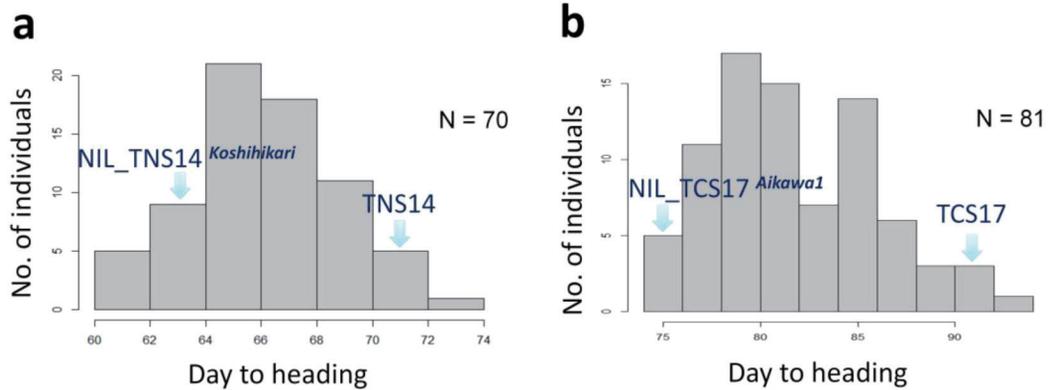


圖 4. 兩個基因座定位族群 (BC₄F₂) 之抽穗所需生育日數分布。(a) 臺農秈 14 號 (TNS14) 分離族群之抽穗所需生育日數分布；(b) 臺中秈 17 號 (TCS17) 分離族群之抽穗所需生育日數分布

Fig. 4. Frequency distribution of DTH (day to heading) in two QTL mapping populations. (a) Frequency distribution of DTH among BC₄F₂ population, which was created from the cross of TNS14 and NIL_TNS14^{Koshihikari}. (b) Frequency distribution of DTH among BC₄F₂ population, which was created from the cross of TCS17 and NIL_TCS17^{Aikawa1}.

表 2. 兩個定位族群的抽穗期主效數量性狀基因座、累加性效應 (additive effect) 及其對外表型變異解釋率 (variance explained by the QTL)

Table 2. Main effect QTLs (quantitative trait loci) of two mapping populations

QTL	Chr. ^a	Marker interval	LOD ^b	A ^c	V ^d %	Mapping parents
HD5	5	C5_111 ~ C5_144	9.4	-2.9	40.9	NIL_TNS14 ^{Koshihikari} TNS14
HD3	3	C3_107 ~ C3_123	14.7	-6.3	61.0	NIL_TCS17 ^{Aikawa1} TCS17

^a Chr, chromosome.

^b LOD, logarithm of odds.

^c A, additive effect.

^d V, variance explained by the QTL.

(二) NIL_TCS17^{Aikawa1} 早抽穗特性的數量性狀基因座定位

為了進行 NIL_TCS17^{Aikawa1} 抽穗期的數量性狀基因座定位，實驗以 NIL_TCS17^{Aikawa1} 與臺中秈 17 號回交所衍生的 BC₄F₂ 族群作為定位材料，BC₄F₂ 族群抽穗所需日數如圖 4b。為了探討 NIL_TCS17^{Aikawa1} 遺傳背景中，4 個來自 Aikawa1 的染色體片段對抽穗所需生育日數的影響，實驗使用四個分別位於各個染色體置換區間片段中的 KASP 分子標誌，以單一標識迴歸法，進行抽穗所需日數的數量性狀基因座定位。實驗結果僅有一個位於第三條染色體上臂的分子標誌 (S3-1) 與抽穗所需日數達顯著相關 (圖 5b)。為了進一步分析此數量性狀基因座在第三條染色體所在詳細區間，我們額外設計了 4 個位在第三條染色體的 0.7 ~ 1.8 Mb 區間內的 KASP 分子標誌，並以迴歸區間定位法，進行抽穗所需日數的數量性狀基因座定位。實驗結果獲得了一個位於分子標誌 C3_107 與 C3_123 區間的主效數量性狀基因座 (本文中稱此基因座為 HD3)，此基因座可解釋 61.0% 定位族群的外表型變異，加性效

應約 -6.3 天 (表 2)。

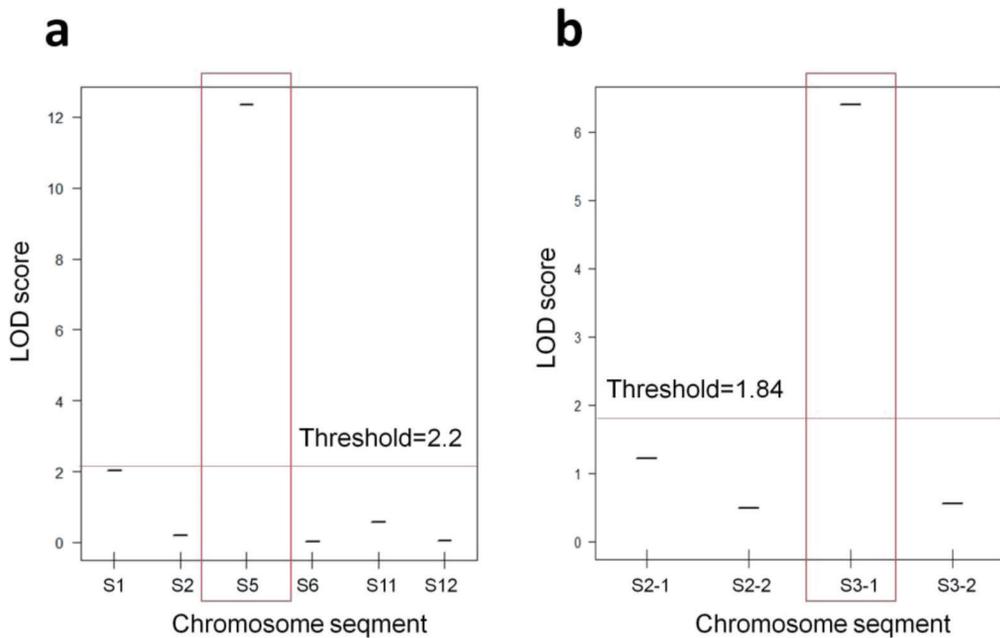


圖 5. 抽穗所需日數與染色體置換片段之間的遺傳定位。(a) 6 個來自於貢獻親 (Koshihikari) 的染色體片段，在臺農秈 14 號回交分離族群中的 LOD (logarithm of odds) score。(b) 4 個來自於貢獻親 (Aikawai) 的染色體片段在臺中秈 17 號回交分離族群中的 LOD score
 Fig. 5. Trait-marker association of two mapping population. (a) Logarithm of odds score (LOD) of 6 substituted segments in " TNS14₁₄ × NIL_TNS14^{Koshihikari} " F₂ population. (b) LOD of 4 substituted segments in " TCS17₁₇ × NIL_TCS17^{Aikawai} " F₂ population

四、臺農秈 14 號、臺中秈 17 號與早熟近似同源系的農藝狀調查

抽穗所需日數的改變，容易影響水稻植株的總生物量，進而影響產量。為了評估兩個早熟數量性狀基因座對臺農秈 14 號與臺中秈 17 號產量的影響，本研究分別於 2016 年第一期作進行臺農秈 14 號與 NIL_TNS14^{Koshihikari} 產量比較試驗；於 2018 年第一期作進行臺中秈 17 號與 NIL_TCS17^{Aikawai} 產量比較試驗。試驗結果顯示，相較於臺農秈 14 號，NIL_TNS14^{Koshihikari} 於 2016 年第一期作可顯著提早 8 天抽穗，此外，NIL_TNS14^{Koshihikari} 的單株穗數顯著較多，而 NIL_TNS14^{Koshihikari} 的產量與臺農秈 14 號相比並無顯著差異 (表 3)。臺中秈 17 號與 NIL_TCS17^{Aikawai} 相比，NIL_TCS17^{Aikawai} 無論在抽穗期、株高與最終產量都顯著比臺中秈 17 號低，NIL_TCS17^{Aikawai} 比臺中秈 17 號早 10.5 天抽穗，株高減少了約 6.5%，最終產量減少了約 16.4%。

討 論

近年來氣候變遷，使得全球農作物經常遭受極端氣候的衝擊。育種專家除了選育可耐非生物逆境特性的作物品種外，也能透過縮短作物栽培時間來避開天然災害，降低作物遭遇非

生物逆境的機率。國內多數秈稻在一期作的生育期較長，透過選育具有早熟特性的秈稻品種，有助於減少遭遇非生物性逆境的機會。本研究透過兩個具早熟特性秈稻近同源系，與其輪迴親雜交後所衍伸的分離族群進行數量性狀基因座定位，選獲了 2 個抽穗期主效基因座，*HD5* 與 *HD3*，兩個 QTLs 分別可解釋 40.9% 與 61.0% 定位族群的外表型變異，可以有效縮短輪迴親抽穗所需日數。

表 3. 兩個秈稻近同源系 (NIL_TNS14^{Koshihikari} 與 NIL_TCS17^{Aikawai}) 與其輪迴親 (臺農秈 14 號與臺中秈 17 號) 的重要農藝性狀比較

Table 3. Comparison of agronomic traits between TNS14 and NIL_TNS14^{Koshihikari}, and between TCS17 and NIL_TCS17^{Aikawai}

Traits	2016		2018	
	臺農秈 14 號	NIL_TNS14 ^{Koshihikari}	臺中秈 17 號	NIL_TCS17 ^{Aikawai}
Day to heading (days)	98.0	90.0*	106.0	95.5*
Plant height (cm)	104.2	102.4	89.6	83.8*
Panicles per plant	12.9	17.4*	17.0	17.5
Grain yield (kg/ha)	8,452	8,284	9,994	8,354*

* Indicates the significance of the difference between inbred lines and recurrent parent based on Student's t-test at $\alpha = 0.05$.

HD5 是導致 NIL_TNS14^{Koshihikari} 早熟的主效基因座，*HD5* 位於水稻第五染色體的 1.11 ~ 1.44 Mb 區間，經由比對 Michigan State University Rice Genome Annotation Project release 7 資料庫，此區間包含了 34 個 putative genes，對比前人研究結果發現，此區間與 Zhan 等人 (2015)，以及 Sun 等人 (2017) 發現的抽穗期 QTLs (*qHD5*) 位置重疊^(12,19)。Zhan 等人 (2015) 先利用秈稻與粳稻雜交產生的重組自交系，進行抽穗期的數量性狀基因座定位，實驗結果發現了一個位在第五條染色體上臂的主效基因 *qHD5*⁽¹⁹⁾。接著，Sun 等人 (2017) 透過 BC₄F₃ 族群進行高解析度遺傳定位，實驗結果將 *qHD5* 定位在一段總長為 52.59 kb 的區間，藉由定序分析比對此區間的 *AP2* (*APETALA2*) transcription factor，發現其在兩親本間有 6 個單一核苷酸多型性的差異，是此區間中最可能的候選基因⁽¹²⁾。前人文獻中，對比帶有來自秈稻親本 (BigGrain 1) 的 *qHD5* 等位基因近同源系，與帶有來自粳稻親本 (Xiaolijing) 的 *qHD5* 等位基因近同源系的結果發現，帶有秈稻等位基因的近同源系，無論在長日照與短日照環境時，比帶有粳稻等位基因的近同源系分別提早 20.6 與 14.6 天抽穗⁽¹²⁾。雖然本文所定位到的 *HD5* 區間與文獻中的 *qHD5* 重疊，但在本文中，帶有秈稻 *HD5* 等位基因的近同源系，反而比帶有粳稻 *HD5* 等位基因的近同源系晚抽穗，因此初步判定，Sun 等人 (2017) 發現的抽穗期 QTLs (*qHD5*) 與本文章的 *HD5* 可能是不同基因，亦或是相同基因但親本所帶有的等位基因不同所導致。

本研究在臺中秈 17 號與 Aikawai 所衍生的定位族群中，選獲了一個位在第三條染色體短臂 1.07 ~ 1.23 Mb 區間的抽穗期主效基因座 *HD3*，經由比對 Michigan State University Rice Genome Annotation Project release 7 資料庫，此區間包含了 20 個 Putative genes。相對於前人研究結果，此區間與 Bian 等人 (2011) 發現的抽穗期 QTL (*DTH3*)，以及 Gao 等人 (2013) 發現的抽穗期 QTL (*Ehd4*) 位置重疊^(3,5)。Bian 等人 (2011) 是以粳稻親本 (Dianjingyou 1) 與

非洲稻親本 (*Oryza glaberrima*) 所衍生的重組自交系，進行抽穗期基因的數量性狀基因座定位，試驗結果發現一個位於第三條染色體短臂的主效基因座 (*DTH3*)。其中，帶有來自非洲稻等位基因的近同源系，比帶有來自 *Dianjinyou 1* 等位基因的近同源系晚 7 ~ 10 天抽穗⁽³⁾。而 Gao 等人 (2013) 則是以一個經由 T-DNA 誘變所獲得的晚熟秈稻突變品系，作為遺傳定位材料，藉由高解析度的定位分析，*Ehd4* 被定位在第三條染色體上臂的一段長度約 103 Kb 的區間，經定序結果發現，位於此區間的 *LOC_Os03g02160* 基因，在第一段 exon 中發現了一個可導致 premature stop 的點突變，因此認定 *LOC_Os03g02160* 基因就是造成抽穗期改變的 *Ehd4*⁽⁵⁾。本研究獲得的 *HD3* 基因座，與文獻中的 *DTH3* 以及 *Ehd4* 基因座重疊，究竟 *HD3* 與 *DTH3* 以及 *Ehd4* 的關係為何，則需進一步的實驗來驗證。

水稻生育過程中，營養生長所需時間約佔整個生育期的 70%，較長的抽穗所需日數雖然會增加栽培管理的成本與風險，但較長的抽穗所需日數有助於提昇水稻的生物量 (biomass)，使得水稻的每穗粒數增加，因此容易獲得較高的穀粒產量。許多前人研究發現，具有較長抽穗所需日數的近同源系容易獲得較高的產量^(16,17)。因此，透過縮短生育期的育種策略雖可有效的避開栽培期的非生物逆境，但可能會犧牲掉最終的產量。有趣的是，本研究產生的兩個早熟秈稻近同源系中，僅有 *NIL_TCS17^{Aikawa1}* 的最終產量顯著比輪迴親 (臺中秈 17 號) 低。反觀 *NIL_TNS14^{Koshihikari}* 最終的穀粒產量與輪迴親 (臺農秈 14 號) 相比並無顯著差異，對比兩套材料的重要農藝性狀後發現，*NIL_TNS14^{Koshihikari}* 相較臺農秈 14 號具有顯著較高的單株穗數，因此有機會填補因每穗粒數減少所導致的產量損失。未來如欲選育較短生育期的水稻品種時，可透過導入其他產量構成因素的數量基因座，彌補因較短生育期所減少的每穗粒數，或許可有效降低因縮短生育期對水稻產量造成的影響。

結 論

本研究藉由各別選育自臺農秈 14 號與臺中秈 17 號之 2 個具早熟特性的秈稻近同源系，進行抽穗期性狀的數量性狀基因座定位。實驗結果獲得了 2 個可顯著縮短國內秈稻生育日數的 QTLs (*HD3* 與 *HD5*)，藉由農藝性狀調查結果顯示，來自 *Koshihikari* 的 *HD5* 等位基因可使臺農秈 14 號提早 8 天抽穗；而來自 *Aikawa1* 的 *HD3* 等位基因可使臺中秈 17 號提早 10.5 天抽穗。本研究試驗過程中所使用的分子標誌與試驗材料可作為國內水稻育種專家選育早熟秈稻時的參考，協助提升育種選拔時的育種效率。

誌 謝

感謝名古屋大學 (Nagoya University) 與 Motoyuki Ashikari 博士提供實驗所需水稻品種 *Aikawa 1* 種子。感謝農業部臺南區農業改良場科技計畫經費支持【102 農科 -9.1.1- 南 -N1、107 農科 -7.6.3- 南 -N2】。

引用文獻

1. 王聖善、陳榮坤。2021。臺灣栽培環境下水稻抽穗期基因型與抽穗日數的關係。臺南區

農業改良場研究彙報 77 : 13-29。

2. 劉祐廷、王聖善、陳榮坤。2020。秈稻幼苗耐寒性之近似同源系育成與數量性狀基因座探勘。臺南區農業改良場研究彙報 76 : 25-36。
3. Bian X.F., X. Liu, Z.G. Zhao, L. Jiang, H. Gao, Y.H. Zhang, M. Zheng, L.M. Chen, S.J. Liu and H.Q. Zhai et al. 2011. Heading date gene, *dth3* controlled late flowering in *O. Glaberrima* Steud. by downregulating *Ehd1*. *Plant Cell Rep.* 30: 2243-2254.
4. 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: 926-936.
5. Gao H., X. M. Zheng, G. Fei, J. Chen, M. Jin, Y. Ren, W. Wu, K. Zhou, P. Sheng and F. Zhou et al. 2013. *Ehd4* encodes a novel and *Oryza*-genus-specific regulator of photoperiodic flowering in rice. *PLoS Genet.* 9: e1003281.
6. Gao H., M. Jin, X.M. Zheng, J. Chen, D. Yuan, Y. Xin, M. Wang, D. Huang, Z. Zhang and K. Zhou. 2014 *Days to heading 7*, a major quantitative locus determining photoperiod sensitivity and regional adaptation in rice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111: 16337-16342.
7. 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. *The Plant J.* 76: 36-46.
8. 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: 1096-1105.
9. Lin H., Z.W. Liang, T. Sasaki and M. Yano. 2003. Fine mapping and characterization of quantitative trait loci *Hd4* and *Hd5* controlling heading date in rice. *Breed Sci.* 53: 51-59.
10. 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: 603-612.
11. Ogiso-Tanaka E., K. Matsubara, S.I. Yamamoto, Y. Nonoue, Wu J, Fujisawa H, Ishikubo H, Tanaka T, Ando T and Matsumoto et al. 2013. Natural variation of the *RICE FLOWERING LOCUS T 1* contributes to flowering time divergence in rice. *PloS One.* 8: e75959.
12. Sun B., X.D. Zhan, Z.C. Lin, W.X. Wu, P. Yu, Y.X. Zhang, L.P. Sun, L.Y. Cao and S.H. Cheng. 2017. Fine mapping and candidate gene analysis of *qHD5*, a novel major QTL with pleiotropism for yield-related traits in rice (*Oryza Sativa* L). *Theor. Appl. Genet.* 130: 247-258.
13. 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 *CK2α*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 7922-7927.
14. 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: 1747-1758.
15. Wu W., X.M. Zheng, G. Lu, Z. Zhong, H. Gao, L. Chen, C. Wu, H.J. Wang, Q. Wang and K. Zhou et al. 2013. Association of functional nucleotide polymorphisms at *DTH2* with the

- northward expansion of rice cultivation in Asia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110: 2775-2780.
16. 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: 761-767.
 17. 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 and Y. Z. Xing. 2011. A major QTL, *Ghd8*, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice. Mol. Plant. 4: 319-330.
 18. Yano M., Y. Katayose, M. Ashikari, U. Yamanouchi, L. Monna, F. Takuichi, T. Baba, K. Yamamoto, Y. Umehara, Y. Nagamura and T. Sasaki. 2000. *HDI*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. Plant Cell. 12: 2473-484.
 19. Zhan X., B. Sun, Z. Lin, Z. Gao, P. Yu, Q. Liu, X. Shen, Y. Zhang, D. Chen, S. Cheng and L. Cao. 2015. Genetic mapping of a QTL controlling source-sink size and heading date in rice. Gene. 571: 263–270.

Genetic mapping of heading date in indica Rice in Taiwan¹

Wang, S. S. and R. K. Chen²

Abstract

Climate change and extreme weather increase the risk of rice production. In Taiwan, the majority of indica rice varieties exhibit a longer vegetative period compared to japonica rice varieties, which often leads to higher production risks. Among the indica rice varieties in Taiwan, TNS14 and TCS17 are the two popular cultivars known for their longer vegetative period. In this study, we created two near-isogenic lines (NIL_TNS14^{Koshihikari} and NIL_TCS17^{Aikawa1}) with a shorter vegetative period. The quantitative trait locus (QTL) mapping of two BC₄F₂ populations, derived from donor parents Koshihikari and Aikawa1, and the recurrent parents TNS14 and TCS17, respectively, revealed the detection of a single QTL in each population. For NIL_TNS14^{Koshihikari}, the QTL named *HD5* was identified on the short arm of chromosome 5, and the *HD5* allele from Koshihikari effectively reduced the vegetative period by 8 days. In the case of NIL_TCS17^{Aikawa1}, the QTL named *HD3* was located on the short arm of chromosome 3, resulting in a reduction of the vegetative period by 10.5 days. Our findings indicate that these two QTLs could be utilized to effectively reduce the vegetative period of indica rice varieties in Taiwan.

What is already known on this subject?

Backcross breeding is an effective method to breed the near-isogenic lines of elite variety and to improve its defects.

What are the new findings?

We newly developed potential molecular markers of early heading data, and improved the efficiency of breeding selection.

What is the expected impact on this field?

The results in this study contribute to shorten growth period of indica rice variety in Taiwan, and allow farmers to reduce risks of production.

Key words: Next generation sequencing、Molecular marker、Marker assisted selection、*Oryza sativa* L

Accepted for publication: August 15, 2023

-
1. Contribution No. 560 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station.
 2. Assistant Researcher, Researcher and Branch station Director, Tainan District Agricultural Research and Extension Station. 70 Muchang, Hsinhua, Tainan 712009, Taiwan, R.O.C.