

野生稻 DNA 分子標幟之開發與應用

林彥蓉¹ 簡祥庭² 金漢煊² 林鉉穎² 顏信沐³ 卓緯玄³ 吳東鴻³ 賴明信⁴ 李長沛^{3*}

摘要

林彥蓉、簡祥庭、金漢煊、林鉉穎、顏信沐、卓緯玄、吳東鴻、賴明信、李長沛。2015。
野生稻 DNA 分子標幟之開發與應用。台灣農業研究 64(4):253–278。

野生稻具有高度遺傳歧異度，對於極端環境有著較高之耐受性，若將野生稻的基因體以分子輔助育種的策略應用於現代栽培種的水稻育種，可因應詭譎多變的氣候變遷與世界糧食需求激增等挑戰。本研究最終目的為將野生稻 *Oryza officinalis* (IRGC. 100986; CC 基因體) 和 *Oryza australiensis* (IRGC. 100882; EE 基因體) 之重要基因導入於亞洲栽培稻 *Oryza sativa* (AA 基因體) 之秈稻「台中秈 10 號」(‘TCS10’) 和粳稻「台農 67 號」(‘TNG67’)，現階段之目標為開發多型性分子標幟。篩選 249 個亞洲栽培稻 (*O. sativa*) 簡單重複序列 (simple sequence repeat; SSR) 分子標幟，結果在 *O. officinalis* 可擴增的分子標幟總計 100 個，轉移率為 40%，而在 *O. australiensis* 可擴增的分子標幟總計 67 個，轉移率為 27%。在這些可擴增之 SSR 分子標幟中，*O. officinalis* vs. ‘TCS10’ 和 *O. officinalis* vs. ‘TNG67’ 間有 72 個 (72%) 和 71 個 (71%) 多型性分子標幟；在 *O. australiensis* vs. ‘TCS10’ 和 *O. australiensis* vs. ‘TNG67’ 間則有 51 (76%) 和 53 (79%) 個。此外，以生物資訊方法進行栽培種與野生種的基因體序列比較，依據插入/缺失 (indel) DNA 片段，一共設計了 123 個分子標幟，分析結果發現在 *O. officinalis* 和 *O. australiensis* 可擴增的分子標幟分別為 109 (89%) 和 103 (84%) 個，大幅提升可擴增之分子標幟。並發現在 *O. officinalis* vs. ‘TCS10’ 和 *O. officinalis* vs. ‘TNG67’ 間有 79 (72%) 與 82 (75%) 個多型性分子標幟；而在 *O. australiensis* vs. ‘TCS10’ 和 *O. australiensis* vs. ‘TNG67’ 間則有 64 (62%) 和 65 (63%) 個多型性分子標幟。進一步以得到的多型性分子標幟分析 *O. officinalis* × ‘TNG67’ 衍生之 BC₁F₁ 和 BC₂F₁ 世代，結果發現異型合子比例由 86.7% (BC₁F₁) 下降為 18.1% (BC₂F₁)，而 ‘TNG67’ 同型合子比例則大幅提升，顯示野生稻之染色體片段迅速地自子代染色體中剔除，因此不易建立完整的染色體片段置換系。

關鍵詞：分子標幟、轉移率、水稻、野生稻。

前言

全球暖化影響全世界，隨極端天氣的頻率與強度增加，農作物之生產受到更大的挑戰，其中稻米之生產面臨更多難以預測的逆境，如極端溫度、乾旱與水澇等非生物性逆境及病蟲草害等生物性逆境。然而，目前稻作栽培趨於品種單一化，高產品種為目前育種之主要目標，造成育成品種的遺傳背景窄化和遺傳

脆弱性，因此難以因應氣候快速變遷所造成的危害 (Chang 1994; Huang *et al.* 2013)。野生稻因分布的環境各不相同，為適應不同的生長環境，演化出多樣化的基因型，可以賦予水稻在面對逆境時較強耐抗性或提高產量的潛力 (Vaughan *et al.* 2003; Wing *et al.* 2005)，因此野生稻的基因是近年來栽培種育成的最佳基因庫來源。例如，*Oryza officinalis* 有著清晨開花之特性，可以有效避開高溫所產生的

投稿日期：2015 年 1 月 15 日；接受日期：2015 年 3 月 29 日。

* 通訊作者：charngpei@tari.gov.tw

¹ 國立台灣大學農藝學系副教授。台灣 台北市。

² 國立台灣大學農藝學系研究生。台灣 台北市。

³ 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。

不稔現象，有助於在高溫之環境下提高其稔實率 (Ishimaru *et al.* 2010)；*Oryza punctata* 則對於鹽害逆境有較佳的耐性 (Farooq *et al.* 1992)。在生物性逆境中，對於病害與蟲害也有較高抗性 (Renganayaki *et al.* 2002; Yoshida & Miyashita 2009)。有學者提出以野生種來擴增現有的栽培種之基因歧異度，並應用於新的栽培品種的育成 (Lin & Hung 1996; McCouch *et al.* 2007)，如在 2002 年期間在越南推廣之高產栽培品種 'AS996' ('IR64' × *Oryza rufipogon*) 即導入野生稻 *O. rufipogon* 之基因，以及利用 CC 基因體導入現今之栽培品種 (*Oryza sativa* × *O. officinalis*) 'MTL98'、'MTL103'、'MTL105'、'MTL110' 與 'MTL114' 等，具有抗褐飛蟲的能力 (Brar 2005)。在菲律賓以 AA 基因體導入至栽培品種 ('IR64' × *O. rufipogon*) 得到 'Matatag 9'，其具有抗東格魯病毒 (tungro virus) 之能力 (Brar & Khush 2003)。

現今稻屬 (*Oryza*) 包含有 24 個種，依染色體組的不同共可分成 AA、BB、CC、BBCC、CCDD、EE、FF、GG、HHJJ、HHKK 等 10 種類型。Harlan & de Wet (1971) 和 Khush (1997) 的論點結合基因庫的概念將稻屬分成 3 個群集：第 1 級基因庫為現今的 2 個栽培稻種，分別是亞洲稻 *O. sativa* 和非洲稻 *Oryza glaberrima*，以及其他 6 個野生稻，皆屬於 AA 基因體；第 2 級基因庫為 *O. officinalis* complex，由 BB、CC、BBCC、CCDD、EE 和 FF 等 6 種基因體，總計有 10 個不同種的野生稻；第 3 級基因庫為包含 *Oryza meyeriana* (GG 基因體)、*Oryza ridleyi* (HHJJ 基因體) 和 *Oryza schlechteri* (HHKK 基因體) 等 3 個複合群。其中第 2 級基因庫之野生稻種含有豐富的抗生物與非生物逆境之優良特性，例如 *O. officinalis* 屬於 CC 基因體，具有抗蟲性基因之潛在利用價值 (Huang *et al.* 2001; Renganayaki *et al.* 2002)；另一為 *Oryza australiensis* 屬於 EE 基因體，可作為抗蟲性基因與耐旱性基因的來源 (Abbasi *et al.* 2010)。然而，第二級基因庫之野生稻種雖可與栽培種進行雜交，但雜交成功率與雜種稔實率皆不高，須透過胚拯救培養才可獲得雜種。因此，在利用野生種原作為育種

材料時，經常發生雜交不親和、無法產生有效的 F₁ 雜交和後續的分離族群、染色體不易發生互換以及連鎖負累 (linkage drag) 等問題。

自傳統育種方式進入分子輔助育種時，首先面對的問題即為如何獲得足量的多型性分子標幟，以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 為基礎的 SSR (simple sequence repeat) 分子標幟與 STS (sequence tagged site) 分子標幟、indel (insertion/deletion) 分子標幟等，現今已廣泛應用於作物之遺傳歧異度分析、親緣關係建立、遺傳連鎖圖譜建立、質的性狀與數量性狀基因座圖譜分析。然而，目前水稻之分子標幟皆以 AA 基因體之 *O. sativa* 序列開發，隨野生稻物種親緣差異漸遠、序列差異性增加，造成分子標幟之轉移性下降，不易獲得足量的多型性分子標幟應用於野生稻與栽培稻的雜交族群 (Gao *et al.* 2005)。本試驗的目的期望藉由生物資訊學的輔助，尋找野生稻與現有栽培稻種在 DNA 序列上的差異性，進而開發更多新的分子標幟。建立以野生稻 *O. officinalis* (CC 基因體) 或 *O. australiensis* (EE 基因體) 為貢獻親，以「台農 67 號」或「台中秈 10 號」為輪迴親，產生帶有部分野生稻染色體片段的回交族群。再進一步以該族群作為將野生種原導入栽培種的橋樑，降低直接以野生稻進行雜交時容易發生雜交不親和的問題，所開發之多型性分子標幟將可用於建立 *O. officinalis* × *O. sativa* 和 *O. australiensis* × *O. sativa* 之連鎖圖譜及後續抗逆境數量及質量基因座之圖譜分析。

材料與方法

試驗族群材料

本試驗所使用的回交族群是以台灣育成之梗稻品種「台農 67 號」(*O. sativa* ssp. *japonica* cv. 'Tainung 67'; 'TNG67') 與秈稻品種「台中秈 10 號」(*O. sativa* ssp. *indica* cv. 'Taichungsen 10'; 'TCS10') 為輪迴親；作為貢獻親的 2 個野生稻種皆引種自菲律賓國際稻米研究所 (International Rice Research Institute; IRRI)，一為 *O. officinalis* (IRGC. 100896)：

二倍體 ($2n = 24$)，屬於 CC 基因體；另一為 *O. australiensis* (IRGC. 100882)：二倍體 ($2n = 24$)，屬於 EE 基因體。

亞洲栽培稻 (*O. sativa*) 為 AA 基因體，當與 CC、EE 基因體間有著嚴重的雜交不親和存在，「台農 67 號」分別與 *O. officinalis* 和 *O. australiensis* 進行雜交後，所得 F_1 種子胚乳均容易退化，經胚拯救培養後，兩個組合皆順利獲得少許 F_1 世代植株；同樣的，「台中秈 10 號」分別與 *O. officinalis* 和 *O. australiensis* 進行雜交，即使經胚拯救培養後，只有「台中秈 10 號」與 *O. officinalis* 之組合有少許 F_1 世代植株存活，而「台中秈 10 號」與 *O. australiensis* 之雜交組合，於本次雜交無任何植株存活。以上述 3 個雜交組合之 F_1 分別與輪迴親進行回交產生 BC_1F_1 和 BC_2F_1 世代。

多型性分子標幟之基因型分析

本試驗之樣本 DNA 萃取依 Li *et al.* (1995) 之發表程序修改後而得，剪取約 3 cm 來自 3–6 葉齡植株之葉片，以組織均質機 (Qiagen, 德國) 將樣本均質化後，加入 DNA 萃取液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl; 1.25% SDS)，並以 65°C 水浴 30 min，加入 270 μ L 醋酸鉀，至於冰上 20 min，隨後以 4°C 轉速 15,000 $\times g$ ，離心 10 min，取出上清液，混和至裝有 700 μ L 之異丙醇離心管內，再以 4°C 轉速 15,000 $\times g$ ，離心 15 min，去除上清液，加入 70% 酒精清洗，待酒精揮發後，加入 100 μ L 的 TE 緩衝液 (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0)，保存於 4°C。

挑選 249 個 *O. sativa* 分子標幟進行多型性之篩選，包含 213 個 RM 系列與 36 個 CH 系列，其中 RM 系列之分子標幟為 Gramene (<http://www.gramene.org/>) 公布，採用自「日本晴」定序資料中，所提供之簡單重複性序列 (SSR) 設計分子標幟；CH 系列分子標幟以生物資訊軟體自 IRGSP (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/>) 公布「日本晴」之基因體序列資料，並以 SSR 為核心設計之分子標幟。此外利用「日本晴」和秈稻栽培品種 '93-11' 序列差異設計之 13 個 indel (insertion/deletion) 分子標幟，以及依照特定基因片段所設計的 17 個

STS (sequence tagged site) 分子標幟。然而多型性分子標幟數量仍不足涵蓋整個水稻之基因體，因此利用 OMAP 計畫 (The *Oryza* Map Alignment Project) 所建立之野生稻 *O. officinalis* (CC 基因體) 和 *O. australiensis* (EE 基因體) 之 BES (BAC end sequence) 資料庫 (<http://www.omap.org/cgi-bin/status/status.cgi>)，透過生物資訊軟體開發出 123 個具有多型性之 indel 分子標幟。本研究使用所有的 402 個分子標幟之在染色體、連鎖圖譜位點和 PCR 引子序列等資料整理於附錄，供研究人員使用。

本研究取自公開與自行探勘的 SSR、STS 和 indel 皆為 PCR 為基礎的 DNA 分子標幟，PCR 反應溶液體積為 10 μ L，包含 20 ng 樣本 DNA、0.2 μ M 引子、5 μ M Taq DNA polymerase master mix (Ampliqon, Danmark)，利用核酸增殖機 (Biometra, 德國) 進行核酸之擴增，其反應程序為 94°C 1 min, 94°C 1 min、40°C 為 30 s、72°C 為 30 s，共 15 個循環；再以 94°C 為 1 min、55°C 為 30 s、72°C 為 30 s，共 25 個循環。多型性分子標幟之分析以膠體電泳進行，2.5% SFR (Super Fine Resolution, Amresco®, Solon, Ohio, USA) 膠體含有 2 μ L 核酸染劑 Seeing Safe Nucleic Acid (昕穎生物科技, 台灣)，後以 FEBE (Faster Easier Better Electrophoresis, Biokeystone Co., USA) 高速電泳槽進行電泳分析。

結果

野生稻多型性分子標幟之開發

以 AA 基因體 *O. sativa* 開發的 249 個 SSR 分子標幟來分析「台中秈 10 號」與「台農 67 號」，結果能成功得到 PCR 產物分別為 227 (91%) 個與 233 (94%) (表 1)。然而從 AA 基因體 *O. sativa* 設計出的 SSR 分子標幟應用於野生稻 *O. officinalis* 和 *O. australiensis* 分別有 100 個和 67 個，轉移率 (可成功擴增之分子標幟占總分子標幟的百分比) 於 *O. officinalis* 和 *O. australiensis* 分別為 40% (100/249) 和 27% (67/249) (表 1、圖 1)。而其中其中 64 個皆可在兩野生稻使用，總計為 103 (=

表 1. 分子標幟篩選結果之摘錄。

Table 1. The summary of the surveyed markers.

Item	No. of amplified markers	No. of polymorphic markers		
		TCS10	TNG67	<i>Oryza sativa</i> ^z
SSR markers from <i>Oryza sativa</i> ^y				
<i>Oryza officinalis</i>	100 (40%)	72 (72%)	71 (71%)	54 (54%)
<i>Oryza australiensis</i>	67 (27%)	51 (76%)	53 (79%)	32 (48%)
TCS10	227 (91%)	-	-	-
TNG67	233 (94%)	-	-	-
Indel markers from <i>O. sativa</i> ^x				
<i>O. officinalis</i>	9 (30%)	8 (89%)	6 (67%)	3 (33%)
<i>O. australiensis</i>	5 (17%)	4 (80%)	4 (80%)	3 (60%)
TCS10	20 (67%)	-	-	-
TNG67	23 (77%)	-	-	-
Indel markers from wild rice ^w				
<i>O. officinalis</i>	109 (89%)	79 (72%)	82 (75%)	74 (68%)
<i>O. australiensis</i>	103 (84%)	64 (62%)	65 (63%)	61 (59%)
TCS10	121 (98%)	-	-	-
TNG67	118 (96%)	-	-	-

^z The number and percentage of markers displayed polymorphism between wild species and both of 'TCS10' and 'TNG67'.

^y A total of 249 SSR markers included markers affixed with RM and CH.

^x A total of 30 markers included STS and SLS markers.

^w A total of 123 indel markers that were designed between sequence of wild species and cultivars.

100 + 67 - 64) 個 AA 基因體分子標幟可轉移至 CC 或 EE 基因體使用，總轉移率為 41% (103/249)。

能於 *O. officinalis* (CC 基因體) 成功擴增出條帶的 100 個分子標幟 (91 個 RM 和 9 個 CH 系列)，分別有 72 與 71 個在 *O. officinalis* 與「台中秈 10 號」和「台農 67 號」之間呈多型性，占可擴增之分子標幟數的 72% (72/100) 和 71% (71/100)，其中 54 個 SSR 同時在 *O. officinalis* 和兩栽培品種間具有多型性 (表 1)。另外，在 EE 基因體的 *O. australiensis* 中能成功 PCR 擴增反應之分子標幟總共為 67 個 (63 個 RM 與 4 個 CH 系列)，於 *O. australiensis* 與「台中秈 10 號」以及 *O. australiensis* 與「台農 67 號」間有 51 和 53 個多型性之分子標幟，占可擴增之分子標幟數的 76% (51/67) 和 79% (53/67)，其中共 32 個分子標幟可同時在 *O. australiensis* 與兩栽培品種間呈現多型性 (表 1)。

在 30 個栽培種水稻之 indel 和 STS 分子

標幟中，*O. officinalis* 可成功擴增之分子標幟有 9 個，占總數之 30% (9/30)，可與「台中秈 10 號」或「台農 67 號」間呈多型性分子標幟數量與可擴增之分子標幟比例分別 89% (8/9) 與 67% (6/9)，其中 3 個分子標幟在 3 個稻種之間呈現多型性之分子標幟，占可擴增之分子標幟之 33% (3/9)。5 個分子標幟在 *O. australiensis* 可進行 PCR 擴增反應，占此類型之分子標幟的 17% (5/30)，與「台中秈 10 號」和「台農 67 號」間呈多型性之分子標幟均各有 4 個，占可擴增之分子標幟的 80% (4/5)，其中有 3 個分子標幟在此 3 稻種間具有多型性。然而，此兩種方式所獲得的多型性分子標幟，均無法同時在所使用的 4 個不同的稻種間找出具有多型性之分子標幟。

利用 OMAP 的野生稻之 BES 資料庫，以「日本晴」基因體為參考序列，其中「日本晴」分別 *O. officinalis* 與 *O. australiensis* 之間 indel 的設計出 75 和 48 個分子標幟，總計 123 組分子標幟 (表 1)。本次設計之 123 個分

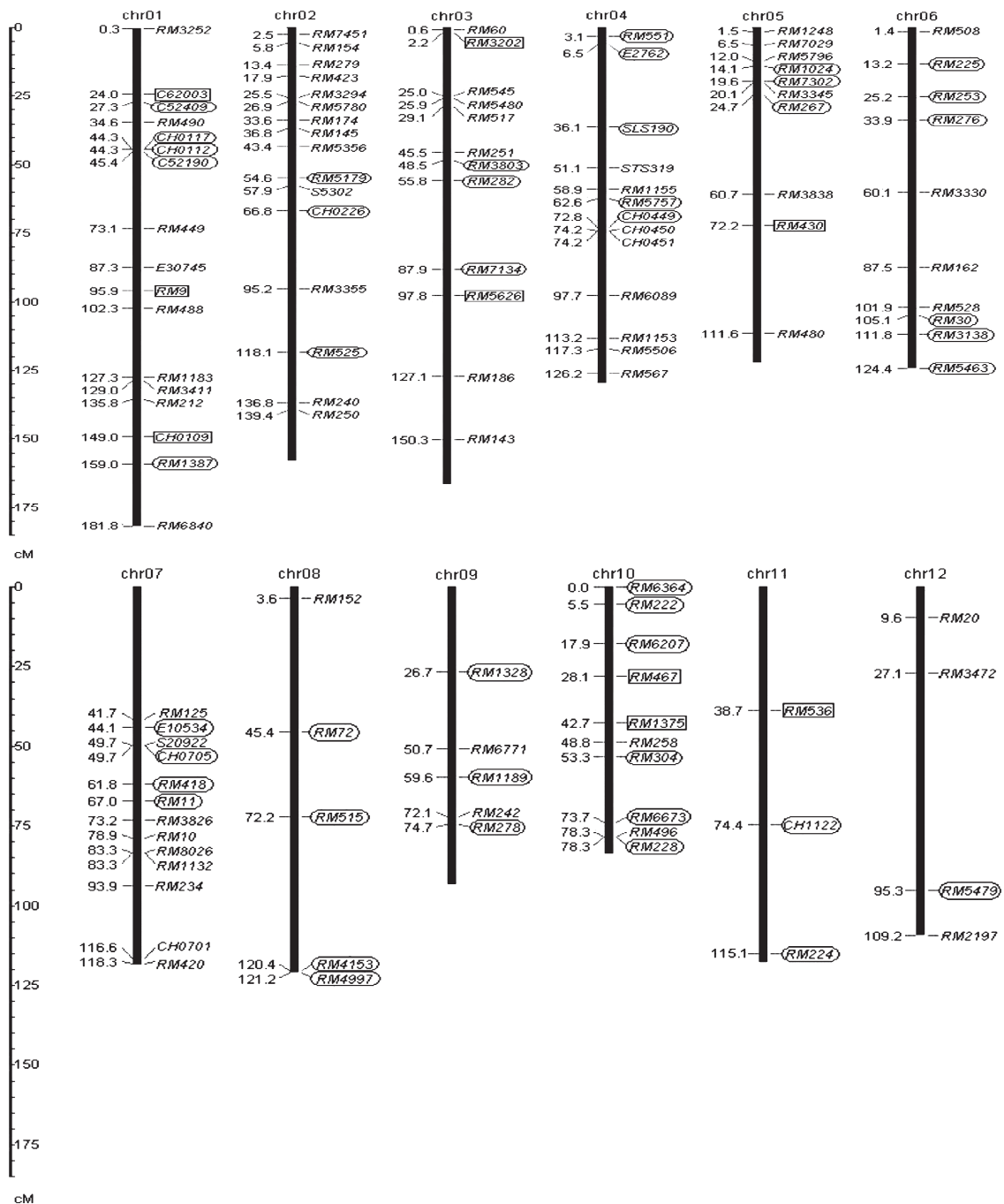


圖 1. 118 個可轉移至 *Oryza officinalis* 或 *Oryza australiensis* 之 *Oryza sativa* 分子標幟與其在 *O. sativa* 染色體之分布。○ 表示該分子標幟只能於 *O. officinalis* 進行擴增反應；□ 表示該分子標幟只能於 *O. australiensis* 進行擴增反應；未標識者表示該分子標幟能同時於 2 個野生稻中進行擴增反應。

Fig. 1. The distribution of 118 DNA markers obtained from *Oryza sativa* which can be transferred onto *Oryza officinalis* and *Oryza australiensis* on rice chromosomes. Symbols ○ and □ indicate markers can only be amplified from *O. officinalis* and *O. australiensis*, respectively, and unlabeled markers can be amplified from both *O. officinalis* and *O. australiensis*.

子標幟總共 109 個分子標幟在 *O. officinalis* 可成功進行 PCR 擴增反應，占所設計之總數的 89% (109/123)，在 *O. officinalis* 與「台中秈 10 號」或「台農 67 號」間呈現多型性的分子標幟數量分別有 79 (79/109 = 72%) 與 82 個 (82/109 = 75%)，在 3 者之間均可產生多型性之分子標幟總共有 74 個分子標幟。在 *O. australiensis* 得以進行 PCR 擴增反應之分子標幟總共為 103 個，占本方法設計之分子標幟的 84% (103/123)，其中 64 和 65 個分子標幟分別在 *O. australiensis* 和「台中秈 10 號」與 *O. australiensis* 和「台農 67 號」具有多型性，分別占 62% (64/103) 和 63% (65/103)；在此 3 稻種間保有多型性之分子標幟，總共為 61 個 (表 1)。

75 個以 *O. officinalis* 序列設計之分子標幟中，70 個可在 *O. officinalis* 中進行擴增反應，成功率為 93% (70/75)，而有 58 個可在 *O. australiensis* 成功擴增，轉移率為 77% (表 2)，高於選自 *O. sativa* 的 SSR 與 indel 分子標幟之可轉移至 *O. australiensis* 的 27% 與 17% (表 1)。同樣的結果也出現在以 *O. australiensis* 序列設計之 48 個分子標幟中，其中 45 個如預期可在 *O. australiensis* 成功進行 PCR 擴增反應，轉移率為 83% (40/48) (表 2)，轉移率同樣高於選自 *O. sativa* 的 SSR 與 indel 分子標幟可轉移至 *O. officinalis* 的 40% 與 30% (表 1)。

野生稻與栽培稻種間多型性分子標幟於水稻染色體之分布

利用 *O. sativa* 序列設計之 SSR 與 indel 分子標幟除受限於種間的轉移率，總計只有 118 個分子標幟呈現多型性，而這些多型性分

子標幟並沒有平均分布於染色體中，而是集中於特定區域，因此無法以每隔 20 cM 含有一個分子標幟之密度涵蓋整個染色體 (圖 1)。經由上述設計之分子標幟，有 203 個分子標幟可應用於 *O. officinalis* 和「台中秈 10 號」與「台農 67 號」之間，涵蓋 1,526.6 cM，除少數區間外，大部分均已達到每 20 cM 含有一個分子標幟之密度 (圖 2)。由於 *O. australiensis* 與一般栽培品種間具有多型性分子標幟之數量為 162 個，涵蓋 1,450.2 cM，其結果仍有多數區間未達到每 20 cM 之覆蓋度 (圖 3)。

衍生自 *O. officinalis* 與「台農 67 號」兩回交世代之染色體結構

203 個於 *O. officinalis* 與「台農 67 號」之間具有多型性之分子標幟，平均分布於 12 條染色體之中，進一步挑選分布於 6 條染色體中的 55 個分子標幟，針對 19 株此兩親本之 BC₁F₁ 世代進行基因型分析，其涵蓋 853.4 cM。在 BC₁F₁ 世代中，其染色體片段為異型結合子占 86.7%；來自輪迴親「台農 67 號」之同型結合子之染色體片段占 13.3%，並未發現貢獻親 *O. officinalis* 同型結合子之染色體片段。在編號 18 號的單株，其染色體片段為異型結合子之比例較此族群中最高，占 88.8%，「台農 67 號」同型結合子之染色體片段比例為 11.2%；編號 1 號所含的異型結合子比例最低為 85%，與「台農 67 號」同型結合之染色體片段占 15% (圖 4)。以 27 個分子標幟用於 31 株 BC₂F₁ 世代進行基因型分析，所選用之分子標幟共涵蓋 648.1 cM。其中編號 15-1 號單株其異型結合子比率最高占 38.9%，「台農 67 號」同行結合子之染色體片段為占 61.1%；編號 6-2 號單株衍生於 BC₁F₁ 世代中編號 22 號之個體，

表 2. 依 CC 或 EE 基因體野生稻種序列設計的 indel 分子標幟篩選結果之摘錄。

Table 2. The survey summary of the indel markers designed according to the BES sequences of CC or EE genomes of wild rices.

Species	No. of designed markers	No. of amplified markers			
		<i>O. australiensis</i>	<i>O. officinalis</i>	TCS10	TNG67
<i>Oryza officinalis</i> (CC)	75	58 (58%)	70 (93%)	73 (97%)	72 (96%)
<i>Oryza australiensis</i> (EE)	48	45 (94%)	40 (83%)	48 (100%)	48 (100%)

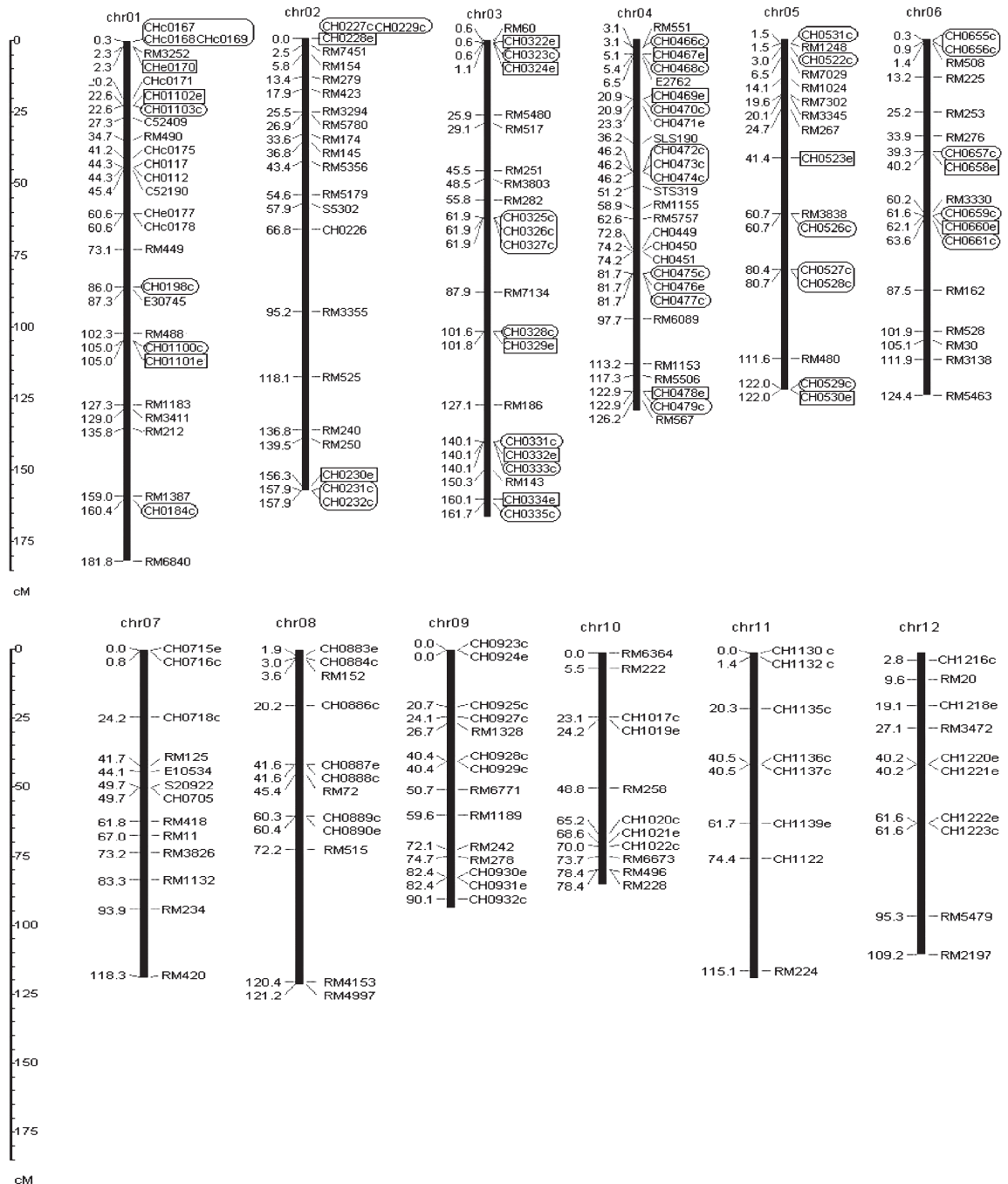


圖 2. 203 個可於 *Oryza officinalis* 與 *Oryza sativa* 間呈現多型性之分子標幟於染色體上之分布。約以每 20 cM 1 個分子標幟的密度分布於 12 條染色體上。○ 表示以 *O. officinalis* 序列設計之分子標幟；◻ 表示以 *Oryza australiensis* 序列所設計之分子標幟。

Fig. 2. The distribution of the 203 polymorphic markers between *Oryza officinalis* and *Oryza sativa*, at the density of approximately 20 cM. Symbols ○ and ◻ indicate the markers designed based on BES of *O. officinalis* and *Oryza australiensis*, respectively.

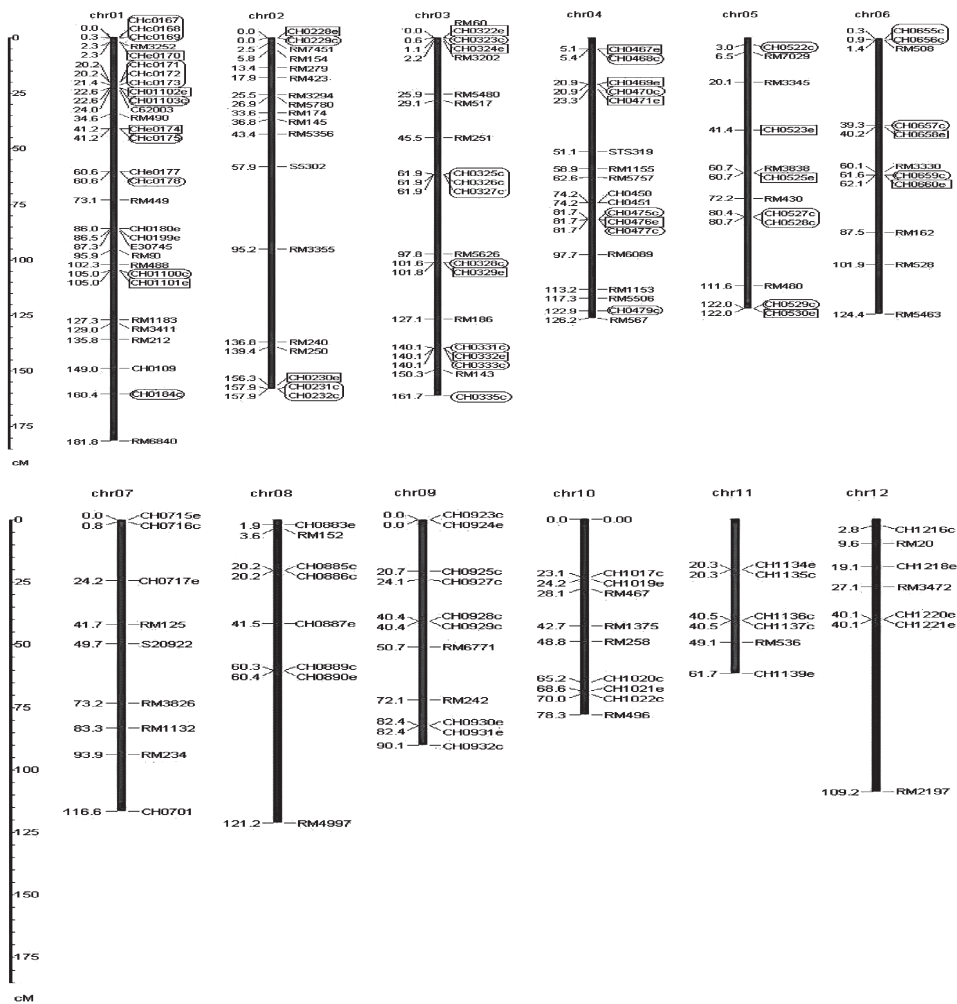


圖 3. 162 個可於 *Oryza australiensis* 與 *Oryza sativa* 間呈現多型性之分子標識於 *O. sativa* 染色體之分布。雖每條染色體皆有數個分子標識，但並非平均分布於各條染色體中。○ 表示以 *Oryza officinalis* 序列設計之分子標識；□ 表示以 *O. australiensis* 序列所設計之分子標識。

Fig. 3. The distribution of the polymorphic markers between *Oryza australiensis* and *Oryza sativa*. Though there are several polymorphic markers on each chromosome, they are not evenly distributed on the chromosomes. Symbols ○ and □ indicate the markers designed based on BES of *Oryza officinalis* and *O. australiensis*, respectively.

在 24 個分子標識所涵蓋之範圍，並未發現異型結合子之染色體片段，所有染色體片段皆為「台農 67 號」之同型結合子。

比較兩回交代其異型結合子之比例，發現異型結合子比率為 86.1% 下降為 18.1%，但是來自輪迴親「台農 67 號」同型結合子之比率由 13.9% 提高為 82.9% (圖 5)。分析結果顯示，野生稻染色體片段在經過 2 次回交栽培稻後，在 BC₂F₁ 世代野生稻染色體快速的被剔除，其

中已編號 6-2 號單株為例，雖然經過 1 次回交，但在分子標識所涵蓋之範圍中，已無發現 *O. officinalis* 之染色體片段的異型結合子存在。

討論

分子標識於種間之轉移性

SSR 分子標識是利用存在於特定物種中的重複性序列所設計，因此對於有著充足背景資

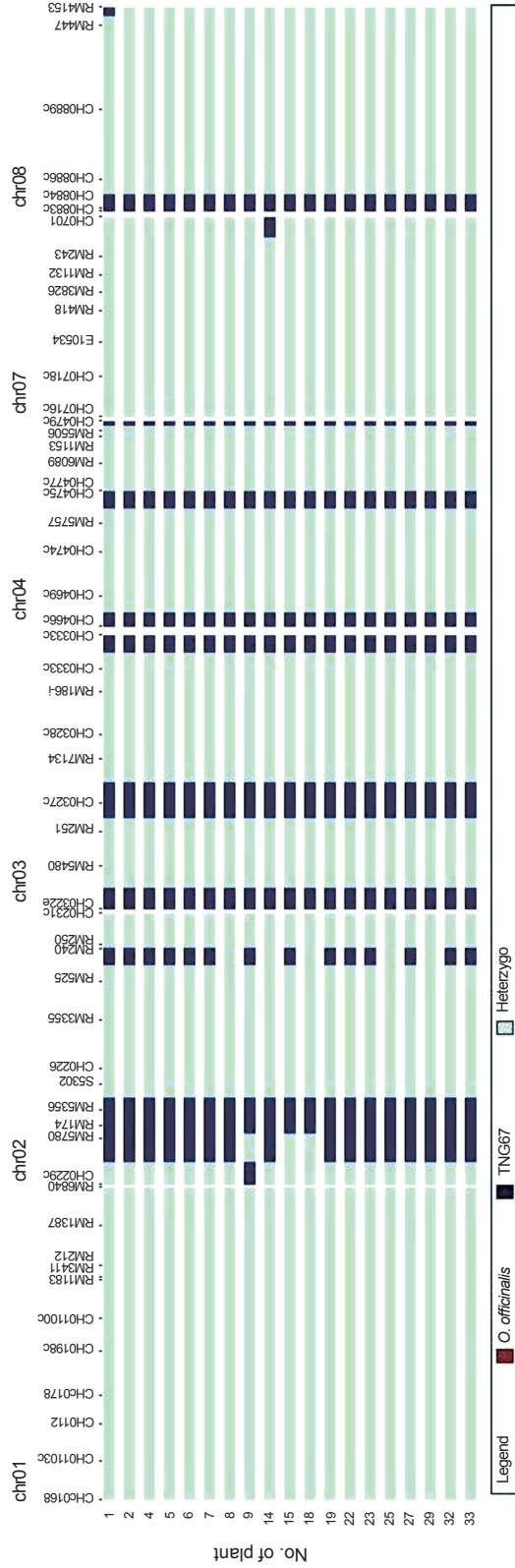


圖 4. *Oryza officinalis* × 「台農 67 號」 之 19 株 BC₁F₁ 之 55 個分子標幟基因型分析。紅色代表貢獻親 *O. officinalis*、深藍色代表輪迴親「台農 67 號」、淡藍色代表異型合子。

Fig. 4. The genotypes of 19 BC₁F₁ individuals derived from *Oryza officinalis* × 'TNG67' based on 55 polymorphic markers. Red, dark blue and light green regions indicate homozygote to *O. officinalis*, homozygotes to 'TNG67', and heterozygotes, respectively.

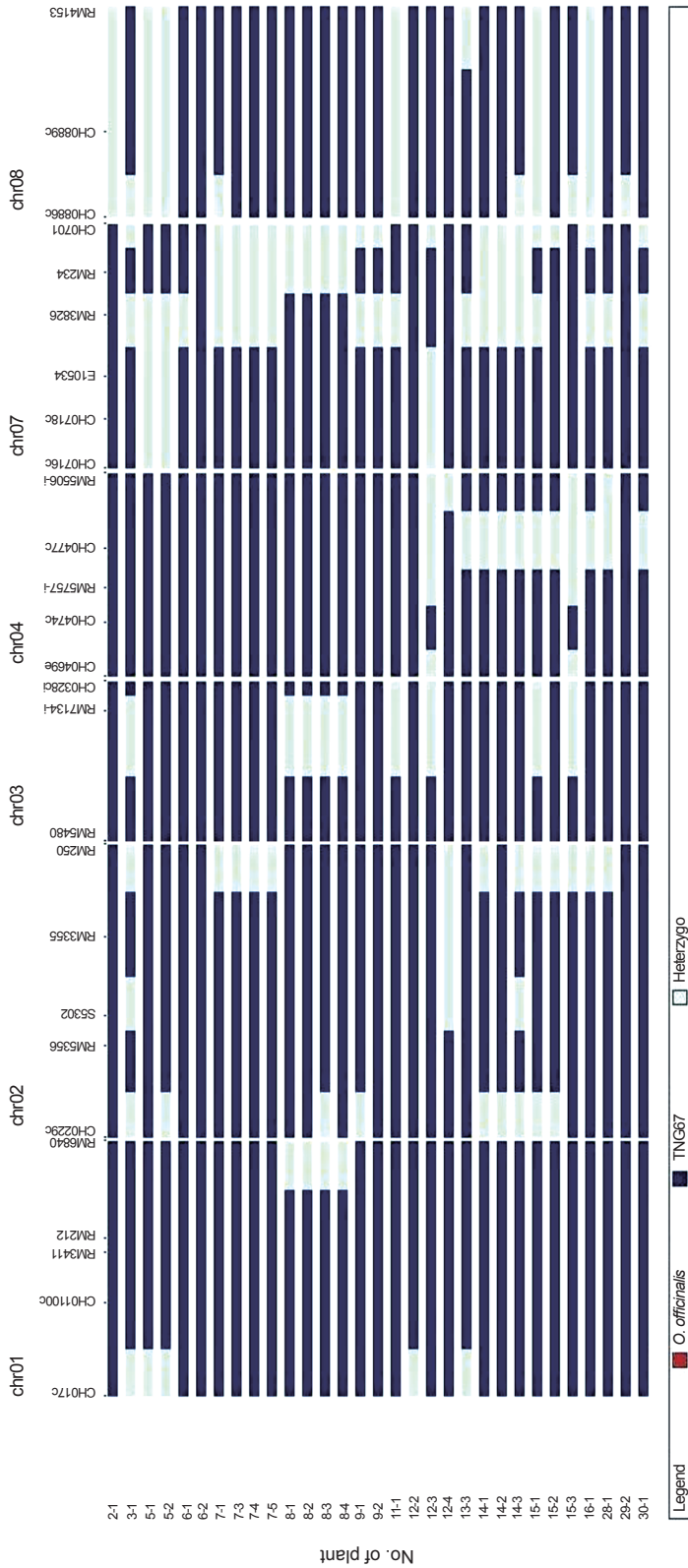


圖 5. 31 株分別衍生自不同 BC₁F₁ 單株之 BC₂F₁ (*Oryza officinalis* × 「台農 67 號」/「台農 67 號」) 植株之 27 個分子標識基因型分析。 *O. officinalis* 的染色體片段迅速自子帶染色體中剔除 (淡藍色所示)，輪迴親「台農 67 號」的同型合子比例則由大幅提升 (深藍色所示)，未發現貢獻親 *O. officinalis* 之同型合子存在 (紅色所示)。

Fig. 5. Genotypes of 31 BC₂F₁ individuals derived from different BC₁F₁ individuals of *Oryza officinalis* × 'TNG67' // 'TNG67' based 27 markers. The chromosome segments of *O. officinalis* were eliminated rapidly in the offspring genomes as seen the heterozygous segment labeled with light blue. The chromosome segments homozygous to recurrent parent, 'TNG67', were increased, labeled in dark blue. None chromosome segment homozygous to the donor parent, *O. officinalis*, was uncovered.

料的物種，如人類、水稻和阿拉伯芥，容易開發新的 SSR 分子標幟。然而鮮少人研究之孤兒作物 (orphan crop)，欲進行開發 SSR 分子標幟則相當困難。前人研究發現不同物種之間的 SSR 分子標幟可應用於其他作物，例如十字花科蕓薹屬的蔬菜作物之 SSR 分子標幟具有相當程度種間轉移性 (Shuang *et al.* 2012)；水稻、阿拉伯芥和栽培種大豆等作物之 SSR 分子標幟可成功運用於竹子 (Chen *et al.* 2010)、阿拉伯芥的近源者 (Clauss *et al.* 2002) 以及栽培種大豆應用於其他豆科植物 (Peakall *et al.* 1998)。稻屬的 24 個種中，除了亞洲栽培水稻 *O. sativa* 及非洲栽培稻 *O. glaberrima* 有基因體序列資料，本研究之野生稻 CC 基因體 *O. officinalis* 和 EE 基因體的 *O. australiensis* 並無公開可供使用之 SSR 分子標幟。因此，著手由已公開「日本晴」的 SSR 和 STS 分子標幟資料庫和自行設計的 AA 基因體之 indel 分子標幟探討在不同基因體之轉移率，並依 *O. officinalis* 和 *O. australiensis* 之 BES 資料庫與「日本晴」之基因體序列，設計出具有轉移或基因體專一之分子標幟。

本研究中挑選 249 個由秈稈稻為模版設計的 RM 和 CH 系列之分子標幟，應用於 *O. officinalis* 和 *O. australiensis*，可成功經由 PCR 擴增之分子標幟分別為 100 個 (40%) 與 67 個 (27%)，然而在「台中秈 10 號」與「台農 67 號」之間，可成功利用 PCR 擴增之分子標幟比例高達 91% 及 94%；而在 30 個亞洲栽培稻之 indel 與 STS 分子標幟，*O. officinalis* 與 *O. australiensis* 分別只有 9 個 (30%) 與 5 個 (17%)，可經由 PCR 擴增其片段。因此利用秈稻與稈稻所設計出的 SSR、indel 和 STS 分子標幟，並不容易應用於野生稻之間，顯示 SSR 分子標幟在不同基因組之間轉移率偏低，而 indel 和 STS 分子標幟之轉移率又更低 (表 1)。選取 8 個野生稻涵蓋 5 種不同基因體之 BES 序列資料，與 The International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP) 所公布之 *O. sativa* 第 1 條染色體序列進行比對的結果顯示，每百萬個鹼基對中所含有之 SSR 在 *O. officinalis* 和 *O. australiensis* 分別為 16 與

13 個，低於秈稻的 47.2 個和稈稻的 55.8 個。研究中也指出，*O. australiensis* 的染色體中存在著大量的重複性序列，其基因體大小為 1.96 pg (pictogram) 是所有二倍體稻種中之冠，CC 基因體 *O. officinalis* 其染色體為 1.1 pg，亞洲栽培稻秈稈則分別是 0.93 與 0.91 pg。顯示不同稻種之間其染色體中重複性序列數量上的差異，導致染色體大小上有顯著的不同，同時也造成基因體歧異度產生明顯的差異 (Kim *et al.* 2008)。野生稻特有的逆轉位子基因、轉位子基因和染色體中重複性序列的出現，造成由 *O. sativa* 設計之分子標幟對於野生稻呈現低轉移率。

染色體序列中鹼基對的突變，使得依原先物種序列所設計之引子對無法順利在其他相近物種間成功進行 PCR 擴增反應 (Gao *et al.* 2005; Kim *et al.* 2008; Li *et al.* 2008)，因此可能造成依據 *O. sativa* 所設計之分子標幟應用於野生稻染色體其轉移率偏低的原因。當 *O. sativa* 和野生稻雜交的後代是異型結合子時，常因為野生稻序列與引子序列的差異，較不容易擴增，造成誤判為同型結合子 (Li *et al.* 2008)。基於此原因，我們先以較低的煉合溫度 (40°C) 進行 15 個循環擴增 DNA，爾後提高專一性，以煉合溫度 55°C 進行另 25 個循環擴增 DNA，以確保野生稻的對偶基因可以順利擴增。另外，分子標幟的轉移率會隨物種不同和親緣之遠近而有不同之結果 (Kuleung *et al.* 2004)，經由核型分析與分子生物學分析所繪製的親緣關係圖，顯示 AA 基因體 *O. sativa* 與 CC 基因體 *O. officinalis* 較為相近，與 *O. australiensis* 較遠 (Ge *et al.* 1999)。從本研究中可得知，經由亞洲栽培水稻序列所設計之 SSR 和 indel 分子標幟應用於 *O. officinalis* 之轉移率，皆高於 *O. australiensis* 之轉移率。顯示 *O. officinalis* 之染色體結構較 *O. australiensis* 更接近 *O. sativa*，因此可成功運用於 *O. officinalis* 的分子標幟比 *O. australiensis* 多出 37 個 (表 1)。

利用亞洲栽培稻秈稈之間設計之分子標幟其應用於野生稻之轉移率偏低，因此以 OMAP 資料庫所公布 *O. officinalis* 和 *O. australiensis*

之 BES 序列資料與 Gramene 資料庫亞洲栽培稻「日本晴」進行序列比對，尋找插入或刪除之變異區域設計分子標幟。本試驗中總共設計 123 個分子標幟，其中經由比對 *O. sativa* 與 *O. officinalis* 之 BES 所設計之分子標幟，高達 77% 可轉移到 *O. australiensis* 可成功地擴增 PCR 反應；*O. sativa* 與 *O. australiensis* 所設計之分子標幟中，83% 的分子標幟可轉移到 *O. officinalis* 擴增反應 (表 2)，顯示二野生稻於序列尚有相似區存在，並且與以分析野生稻、栽培稻種染色體結構後所獲得的結果一致 (Ammiraju *et al.* 2008; Lu *et al.* 2009)。本次研究利用野生稻與栽培稻序列設計之分子標幟，其種間之轉移率介於 77–100% 之間，明顯優於以亞洲栽培水稻序列設計之分子標幟 (表 1、表 2)，顯示以亞洲栽培水稻序列所開發之分子標幟，在應用於野生稻中，容易受到各項因素所干擾，降低此一類型的分子標幟於跨種間、跨基因體間的應用。

分子標幟於種間之多型性

100 個 *O. sativa* 可於 *O. officinalis* 擴增出之 SSR 分子標幟中，分別有 72 個 (72%) 和 71 個 (71%) 分子標幟與「台中秈 10 號」和「台農 67 號」呈現多型性，其中有 54 個 (54%) 之分子標幟可同時區分此 3 個不同的稻種；67 個可轉移至 *O. australiensis* 之 SSR 分子標幟中，與「台中秈 10 號」和「台農 67 號」具有多型性之分子標幟，分別有 51 個 (76%) 與 53 個 (79%)，能同時在 3 個稻種之間呈多型性之分子標幟總只有 32 個 (48%) (表 1)；56 個可同時在二野生種進行擴增的分子標幟中，有 33 個 (59%) SSR 分子標幟可同時在 *O. officinalis* 和 *O. australiensis* 間呈現多型性 (圖 1)。198 個可同時成功在「台中秈 10 號」與「台農 67 號」擴增反應的 SSR 分子標幟中，130 個 (66%) 分子標幟可在二不同亞種之栽培稻種間呈現多型性 (資料未呈現)，顯示 SSR 分子標幟能在 *O. sativa* vs. *O. officinalis* 或 *O. sativa* vs. *O. australiensis* 間呈現多型性之比例並不低於可在 *O. sativa* 二亞種間呈現多型性者。於 STS 與 SLS 分子標幟中，雖種間呈現多型性的比例介於 67% (*O. officinalis* vs. 「台農 67

號」)—89% (*O. officinalis* vs. 「台中秈 10 號」)，但與 SSR 分子標幟同樣受限於種間染色體結構差異，僅 9 個與 5 個分子標幟能轉移至 *O. officinalis* 或 *O. australiensis* 中進行 PCR 擴增反應 (表 1)。由於所使用的分子標幟數不多，本次篩得的多型性並未能代表 STS 和 SLS 在種間轉移性與多型性之高低，須再進行更多的篩選方能進行 STS 和 SLS 在 *O. officinalis* 和 *O. australiensis* 二野生種間轉移與多型性之評估。

在 *O. officinalis* vs. 「台中秈 10 號」和 *O. officinalis* vs. 「台農 67 號」呈現多型性的數量和比例分別為 79 個 (72%) 和 82 個 (75%)；在 *O. australiensis* vs. 「台中秈 10 號」或 *O. australiensis* vs. 「台農 67 號」間呈現多型性分子標幟數量分別為 64 個 (62%) 與 65 個 (63%)；是以自行設計之 indel 分子標幟與 SSR 分子標幟之多型性分子標幟比例相當。本次試驗所開發之 indel 分子標幟之轉移率大幅提升 (表 1、表 2)，此差異可歸咎於設計 PCR 引子對之策略上的不同，前述的 SSR、STS 和 SLS 分子標幟在設計上皆以 *O. sativa* 的序列為基礎，當這些分子標幟應用到野生稻時，種間的序列差異性，尤以在引子序列上的歧異，影響了分子標幟的轉移性，原先可進行擴增的分子標幟無法用在野生稻中。本次試驗所開發的 indel 分子標幟，則是以目標區間兩翼之野生種與栽培種的保守區序列中具有專一性的區域，設計引子對，可更有效率地探勘野生種與栽培種間之多型性分子標幟，以利連鎖圖譜的建立、數量基因座之定位與後續分子標幟輔助選種之進行，加速野生稻遺傳資源於水稻育種時的利用效率。

本研究總計探勘 203 個和 162 個多型性分子標幟於 *O. officinalis* vs. *O. sativa* 和 *O. australiensis* vs. *O. sativa*，大部染色體區間已達到每 20 cM 含有 1 個分子標幟之密度，這些分子標幟可馬上應用於此二野生稻與亞洲栽培稻建立之雜交族群，以利於後續連鎖圖譜建立、基因座圖譜分析。除此之外，「台中秈 10 號」與「台農 67 號」之間多型性分子標幟亦利於和稈雜交之遺傳圖譜分析，是以，總計 402 個多型性分子標幟之於染色體連鎖圖譜的位置和引

子序列整理在附錄，供研究人員使用，加速野生稻遺傳資源之利用。本研究提供之多型性分子標幟可做為起始的連鎖圖譜分析，因連鎖圖譜距離會隨著不同的雜交組合、分析子代數目等因素而有所不同，尤以不同種間、不同基因體物種的雜交，更因為染色體結構差異性大，影響同源染色體互換甚鉅，針對不同的雜交組合勢必依其需要增加多型性分子標幟，方能達到其試驗目的。

野生稻染色體於回交世代之置換情形

以 *O. officinalis* 為貢獻親和「台農 67 號」為輪迴親，經由胚拯救獲得 19 株 BC₁F₁ 植株，以 55 個分子標幟進行基因型分析，在涵蓋 583.4 cM 的染色體範圍中，異型合子占整體的 86.7%，而輪迴親「台農 67 號」占了 13.3%。利用 27 個分子標幟涵蓋 648.1 cM，分析 31 株 BC₂F₁ 世代。輪迴親「台農 67 號」基因型比例由原先的 13.3% 大幅增加為 82.9%，而異型合子自 BC₁F₁ 世代的 86.7% 迅速下降至 17.1% (圖 4、圖 5)。顯示外源野生稻染色體片段快速的自回交子代細胞核中剔除，這現象也出現在融合來自二不同物種體細胞之細胞培養中 (Nowak-Imialek *et al.* 2010)。外源染色體遭剔除的現象，可能起因於 2 個物種染色體不易發生重組所致 (Jena & Khush 1990)，染色體進行重組的機率隨著序列歧異度的提高而下降 (Chambers *et al.* 1996)，*O. officinalis* 和 *O. australiensis* 與 *O. sativa* 相較下有更多的重複性序列插入其中 (Uozu *et al.* 2000)。DNA 的轉置或轉位、序列的插入或缺失 (Amiraju *et al.* 2008; Kim *et al.* 2008)，皆可能使得不同稻種間同源區的序列出現變異、位置改變等因素導致染色體的不穩定，這個現象可由本研究的 *O. officinalis* × 「台農 67 號」之 BC₁F₁ 和 BC₂F₁ 植株經由分子標幟偵測染色體的組成可見，許多分子標幟在 BC₁F₁ 已呈現「台農 67 號」的同型結合子，但在 BC₂F₁ 竟然呈現異型結合子；例如，於第 2 條染色體的 CH0229 發現在編號 9 (BC₁F₁) 和 9-1 (BC₂F₁) 植株；於第 3 條染色體的 CH0372c 發現在編號 15 (BC₁F₁) 和 15-1 和 15-3 (BC₂F₁)；於第 7 條染色體的 CH0701 發現在編號 14 (BC₁F₁)

和 14-1、14-2、14-3 (BC₂F₁) 植株；於第 8 條染色體的 CH0886c 發現在編號 15 (BC₁F₁) 和 15-3 (BC₂F₁) 植株 (圖 4、圖 5)。本研究結果與以 SSR 分析以 *O. officinalis* × *O. sativa* 建立之雜交後代和 MAALs (monosomic alien addition line) 的基因型分析結果雷同，其中 *O. sativa* 的 124 SSR 基因座應用於 *O. officinalis* 的 C 基因體的圖譜分析時，發現高達 16.1% 有轉位或複製產生兩個基因座的情形，應用在 12 MAALs 的基因型分析時，每個 MAAL 除了可偵測其額外染色體 (additional chromosome) 的分子標幟外，亦可偵測位於其他條染色體上的 SSR 分子標幟，尤以 M1 和 M10 的兩個 MAALs 偵測到其他 5 條染色體上的分子標幟 (Li *et al.* 2008)，也因染色體的重組 (rearrangement) 造成染色體變異，導致減數分裂時野生稻與栽培稻之染色體無法順利進行重組互換，使得來自野生稻之染色體片段自回交後代之染色體中剔除 (Jin *et al.* 2006; Li *et al.* 2008)，尤以 BC₂F₁ 甚鉅 (圖 4、圖 5)。因此，欲建立完整以 *O. sativa* 為背景帶有來自非 AA 基因體野生稻的染色體片段置換系 (chromosome segment substitution lines; CSSLs)，如無大量資源的投入實為不可能 (Ali *et al.* 2010)。本研究也發現，由於栽培稻與不同基因體的野生稻種間雜交繁殖障礙非常高，在 F₁ 回交栽培稻時僅能獲得少數的回交種子，且經由胚拯救培養過程也可能導致生育障礙，根據以往的種間雜種 F₁ 回交成功獲得 BC₁F₁ 植株，植株亦有生長弱勢的問題，材料維持並不容易。因此，以不同的家系進行這部分的研究，雖然不是來自相同的家系，但是，整個野生稻染色體被快速剔除的趨勢是一樣的，提供重要訊息 (圖 4、圖 5)。建立經多次回交建立僅帶有部分外源染色體片段的進階回交族群 (advanced backcross population; AB) 是相對可行的策略，AB 族群的建立可應用於野生種遺傳資源的探勘，如獲得有利於現今作物改良所需的基因或優良性狀時，在研究上可進一步育成近同源系 (near isogenic lines; NILs) 應用於基因的效應評估與該基因是如何參與與植物生長與發育。在育種上的應用，因 AB 族群除

小部分外源染色體片段外，其餘組成皆為現今之栽培種，可降低直接將野生種原利用於作物育種時所帶來的衝擊，透過雜交將不同 NILs 帶有的有利基因堆砌於優良品種中，賦予所育成的品種有最佳的農藝性狀。

引用文獻

- Abbasi, F. M., H. Ahmad, F. Perveen, M. Inamullah, M. Sajid, and D. S. Brar. 2010. Assessment of genomic relationship between *Oryza sativa* and *Oryza australis*. *Afr. J. Biotechnol.* 9:1312–1316.
- Ali, M. L., P. L. Sanchez, S. Yu, M. Lorieux, and G. C. Eizenga. 2010. Chromosome segment substitution line: A powerful tool for the introgression of valuable genes from *Oryza* wild species into cultivated rice (*O. sativa*). *Rice* 3:218–234.
- Ammiraju, J. S., F. Lu, A. Sanyal, Y. Yu, X. Song, N. Jiang, A. C. Pontaroli, T. Rambo, J. Currie, K. Collura, J. Talag, C. Fan, J. L. Goicoechea, A. Zuccolo, J. Chen, J. L. Bennetzen, M. Chen, S. Jackson, and R. A. Wing. 2008. Dynamic evolution of *Oryza* genomes is revealed by comparative genomic analysis of a genus-wide vertical data set. *Plant Cell* 20:3191–3209.
- Brar, D. 2005. Broadening the gene pool of rice through introgression from wild species. p.157–160. *in: Rice is Life: Scientific Perspectives for the 21st Century.* (Toriyama, K., K. L. Heong, and B. Hardy, eds.) Intl. Rice Res. Inst. Los Baños. 590 pp.
- Brar, D. and G. S. Khush. 2003. Utilization of wild species of genus *Oryza* in rice improvement. p.283–309. *in: Monograph on Genus Oryza.* (Nanda, J. S. and S. D. Sharma, eds.) Science Pub. Inc. Enfield. 400 pp.
- Chambers, S. R., N. Hunter, E. J. Louis, and R. H. Borts. 1996. The mismatch repair system reduces meiotic homeologous recombination and stimulates recombination-dependent chromosome loss. *Mol. Cell Biol.* 16:6110–6120.
- Chang, T. T. 1994. The biodiversity crisis in Asian crop production and remedial measures. p.25–41. *in: Biodiversity and Terrestrial Ecosystems.* (Peng, C. I. and C. H. Chuo, eds.) Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 14. Taipei. 527 pp.
- Chen, S. Y., Y. T. Lin, C. W. Lin, W. Y. Chen, C. H. Yang, and H. M. Ku. 2010. Transferability of rice SSR markers to bamboo. *Euphytica* 175:1–11.
- Clauss, M., H. Cobban, and T. Mitchell-Olds. 2002. Cross-species microsatellite markers for elucidating population genetic structure in *Arabidopsis* and *Arabidopsis* (*Brassicaceae*). *Mol. Ecol.* 11:591–601.
- Farooq, S., M. Asghar, N. Iqbal, and T. M. Shah. 1992. Variability in salt tolerance of accessions of wild rice species *Oryza punctata* and *O. officinalis*. *Intl. Rice Res. Newsl.* 17:16.
- Gao, L. Z., C. H. Zhang, and J. Z. Jia. 2005. Cross-species transferability of rice microsatellites in its wild relatives and the potential for conservation genetic studies. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 52:931–940.
- Ge, S., T. Sang, B. R. Lu, and D. Y. Hong. 1999. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14400–14405.
- Harlan, J. R. and J. M. J. de Wet. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20:509–517.
- Huang, D., G. Qin, C. Liu, Z. Ma, Y. Zhang, and Y. Yan. 2013. Feasibility of utilization of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) genetic diversity in rice breeding for high yield. *Adv. J. Food Sci. Technol.* 5:640–645.
- Huang, Z., G. He, L. Shu, X. Li, and Q. Zhang. 2001. Identification and mapping of two brown plant hopper resistance genes in rice. *Theor. Appl. Genet.* 102:929–934.
- Ishimaru, T., H. Hirabayash, M. Ida, T. Takai, Y. A. San-Oh, S. Yoshinaga, I. Ando, T. Ogawa, and M. Kondo. 2010. A genetic resource for early-morning flowering trait of wild rice *Oryza officinalis* to mitigate high temperature-induced spikelet sterility at anthesis. *Ann. Bot.* 106:515–520.
- Jena, K. and G. Khush. 1990. Introgression of genes from *Oryza officinalis* Well ex Watt to cultivated rice, *O. sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 80:737–745.
- Jin, H., G. Tan, D. S. Brar, M. Tang, G. Li, L. Zhu, and G. He. 2006. Molecular and cytogenetic characterization of an *Oryza officinalis*-*O. sativa* chromosome 4 addition lines and its progenies. *Plant Mol. Biol.* 62:769–777.
- Khush, G. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol. Biol.* 35:25–34.
- Kim, H., B. Hurwitz, Y. Yu, K. Collura, N. Gill, P. San-Miguel, J. C. Mullikin, C. Maher, W. Nelson, M. Wissotski, M. Braidotti, D. Kudrna, J. L. Goicoechea, L. Stein, D. Ware, S. A. Jackson, C. Soderlund, and R. A. Wing. 2008. Construction, alignment and analysis of twelve framework physical maps that represent the ten genome types of the genus *Oryza*. *Genome Biol.* 9:R45.
- Kuleung, C., P. S. Baenziger, and I. Dweikat. 2004. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theor. Appl. Genet.* 108:1147–1150.
- Li, G., W. Hu, R. Qin, H. Jin, G. Tan, L. Zhu, and G. He. 2008. Simple sequence repeat analyses of interspe-

- cific hybrids and MAALs of *Oryza officinalis* and *Oryza sativa*. *Genetica* 134:169–180.
- Li, Z., S. R. M. Pinson, J. W. Stansel, and W. D. Park. 1995. Identification of quantitative trait loci (QTLs) for heading date and plant height in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 91:374–381.
- Lin, M. S. and P. C. Hung. 1996. Ancestry of rice varieties of Taiwan. *J. Agric. Assoc. China. New Ser.* 175:88–100. (in Chinese with English abstract)
- Lu, F., J. S. Ammiraju, A. Sanyal, S. Zhang, R. Song, J. Chen, G. Li, Y. Sui, X. Song, Z. Cheng, A. C. de Oliveira, J. L. Bennetzen, S. A. Jackson, R. A. Wing, and M. Chen. 2009. Comparative sequence analysis of *MONOCULMI*-orthologous regions in 14 *Oryza* genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:2071–2076.
- McCouch, S. R., M. Sweeney, J. Li, H. Jiang, M. Thomson, E. Septiningsih, J. Edwards, P. Moncada, J. Xiao, A. Garris, T. Tai, C. Martinez, J. Tohme, M. Sugiono, A. McClung, L. P. Yuan, and A. N. Ahn. 2007. Through the genetic bottleneck: *O. rufipogon* as a source of trait-enhancing alleles for *O. sativa*. *Euphytica* 154:317–339.
- Nowak-Imialek, M., W. Kues, C. Rudolph, B. Schlegelberger, U. Taylor, J. Carnwath, and H. Niemann. 2010. Preferential loss of porcine chromosomes in reprogrammed interspecies cell hybrids. *Cell Re-program.* 12:55–65.
- Peakall, R., S. Gilmore, W. Keys, M. Morgante, and A. Rafalski. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15:1275–1287.
- Renganayaki, K., A. K. Fritz, S. Sadasivam, S. Pammi, S. E. Harrington, S. R. McCouch, S. M. Kumar, and A. S. Reddy. 2002. Mapping and progress toward map-based cloning of brown planthopper biotype-4 resistance gene introgressed from *Oryza officinalis* into cultivated rice, *O. sativa*. *Crop Sci.* 42:2112–2117.
- Shuang, L. S., J. Y. Lee, C. Y. Lee, Y. F. Chan, K. K. Hwu, and Y. R. Lin. 2012. Application of molecular markers of Brassicaceae in the polymorphic and phylogenetic analyses of broccoli and cauliflower. *J. Taiwan Soc. Hort. Sci.* 58:45–60. (in Chinese with English abstract)
- Uozu, S., M. Tanaka-Ueguchi, H. Kitano, K. Hattori, and M. Matsuoka. 2000. Characterization of *XET*-related genes of rice. *Plant Physiol.* 122:853–859.
- Vaughan, D. A., H. Morishima, and K. Kadowaki. 2003. Diversity in the *Oryza* genus. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:139–146.
- Wing, R. A., J. S. Ammiraju, M. Luo, H. Kim, Y. Yu, D. Kudrna, J. L. Goicoechea, W. Wang, W. Nelson, K. Rao, D. Brar, D. J. Mackill, B. Han, C. Soderlund, L. Stein, P. SanMiguel, and S. Jackson. 2005. The *Oryza* map alignment project: The golden path to unlocking the genetic potential of wild rice species. *Plant Mol. Biol.* 59:53–62.
- Yoshida, K. and N. Miyashita. 2009. DNA polymorphism in the blast disease resistance gene *Pita* of the wild rice *Oryza rufipogon* and its related species. *Genes. Genet. Syst.* 84:121–136.

附錄 本研究中 402 組可成功擴增之分子標誌染色體位置與序列。

Appendix Chromosomal location and sequence of 402 successfully amplified primers used in this study.

Chr.	cM	Marker name	Forward	Reverse
chr01	0	CHc0167	ATCAgAAATCTCgTgTggAA	ATggTTATggCgTTggAT
chr01	0	CHc0168	gTTgCACTTTCAAAAaggAAT	ACCTCCTTCAAaggTAACAT
chr01	0.3	CHe0169	AATAAAgAgCgCAGAgACAg	CACAAAATgTAGTgCACCTg
chr01	0.3-4.2	CHe0170	TAgCTACAgCAgATCCAACA	AgACAaggTCTCTgCTCTgg
chr01	0.3-4.2	RM3252	ggTAACCTTgTTCCCATgCC	ggTCAATCATgCATgCAAgC
chr01	16.1	CH0102	TTCACgAAgCCTCgTTATCTC	gggTTTCgACTTTCgAACAA
chr01	20.2	CHc0171	CATTTTCTgCATAACgATgA	AACACAgCTACACACAgAC
chr01	20.2	CHc0172	AgATTCTCgAgCAATTTCAg	CTgAAgAATgAAATgTCCAAC
chr01	22.6	CH01102e	gCATCAATAgTggCTTCAGa	AgTTggAATTTgATTATgTCg
chr01	22.6	CH01103c	gCATCAATAgTggCTTCAGa	ACCAAAGTTggAATTTgATTA
chr01	20.2-22.6	CHc0173	ggTgTTCTTTTCCATgTACC	CACTTgAgCACTCATTTgAA
chr01	24	C62003	CgggAggAAgATgACgATAg	TAgCTgAAAATgCCACAATC
chr01	27.3	C52409	TgTAACAgCAATATAggAgC	gTgCATTTgTTCAGgATAC
chr01	27.6	CH0130	CCTCTATCTCTATCCCCAAT	AggTggTATgATCgCCTCT
chr01	28.4	CH0116	CATCCggAATTTcAgAgAA	AgCACTAgCgCgTTCgTAAA
chr01	24.0-25.4	RM1	gCgAAAACACAATgCAAAAA	gCgTTggTTggACCTgAC
chr01	32.4-36.9	RM490	ATCTgCACACTgCAAACACC	AgCAAgCAgTgCTTTCAGAg
chr01	41.2	CHe0174	ATAgCaggAAgTgAACCAAA	ACTgCTATTcTgTgCATTA
chr01	41.2	CHc0175	AAggTTTgTgTgTgAAATCC	ATgTCCATCCTgTgAAgAAC
chr01	42.4-43.2	RM243	gATCTgCAgACTgCAgTTgC	AgCTgCAACgATgTTgTCC
chr01	43.2-45.4	CH0117	AgCAgCgACAaggTAAAaggAA	AAAATgCACgggAACTTACg
chr01	43.2-45.4	CH0112	TTCggAACCAACATTTAAAACA	CTTTggTCAAACCATTTTgC
chr01	45.4	C52190	TCTTCACCgTTTCTTgCACC	AAACCgATgAAAACgCCAACC
chr01	45.4	CHe0176	gAgCATTggAAgAgAAgAAA	TACggCAgATTgTACTgTCA
chr01	46.3-49.0	S10788	AgCCgAggAgCAGAgTgTTC	ATCgTCTAgCCATACACCTC
chr01	49.6-50.8	RM580	gATgAACTCgAATTTgCATCC	CACTCCCATgTTTggCTCC
chr01	60.6	CHe0177	TACCTCCTTgAAAAATgTgCT	TTgTAAATCCCCTACgTTTg
chr01	60.6	CHc0178	ggTATgTTTTCCATCCTTA	ggCATTCTTAgCTACTTgg
chr01	60.9-62.5	CH0113	CCCAACggCACATTAATAATC	gATCCTgAggACCTgACACg
chr01	73.1	RM449	TTgggAggTgTTgATAaggC	ACCACCAGCgTCTCTCTCTC
chr01	78	CH0119	ATgTgCATCTTgCCTTACCA	CCTAAgCCggCCAAAAAT
chr01	86	CH0198c	CgTggTAAACATTgATgACA	ATATgTCTAggTgAACTgTgAAC
chr01	86.0-87.1	CH0199e	TTCTgTTTTCAATgTCCTCA	gCTCTCCAATATgAATCgT
chr01	83.7	CH0179e	TAgCCAATAgACAAgCCACT	TTTTgTTggTgCTgTgATTA
chr01	86	CH0180e	CACgTggAAggAATAAAACA	AgTTTCgAAAaggAAAACAAT
chr01	87.1-87.4	E30745	AAgAAgCAGgAgAgTCgTgg	ATAATggATggTTCggTgCC
chr01	95.7-96.1	RM9	ggTgCCATTgTCgTCCTC	ACggCCCTCATCACCTTC
chr01	102.3	RM488	CAGCTAgggTTTTgAggCTg	TAgCAACAACCAgCgTATgC
chr01	100.4	CH0181c	AgAAgCAAACAAACATCAAT	gTgAgTgAAAATggggTAAA
chr01	100.4	CH0182e	ACgAAATgCAAaggTTAAgAg	CATATTgCCTTTTTgCTTTC
chr01	103.7-106.2	CH01100c	gATgTTgCaggTCTAgCATT	gTTgACCTTATCCTgCAGAC

附錄 本研究中 402 組可成功擴增之分子標誌染色體位置與序列 (續)。

Appendix Chromosomal location and sequence of 402 successfully amplified primers used in this study (continued).

Chr.	cM	Marker name	Forward	Reverse
chr01	103.7–106.2	CH01101e	CCTTgCATCTTTAATCTgCT	ggAAAATCTCAgCTTTgCTA
chr01	114.1–116.5	RM246	gAgCTCCATCAgCCATTCaG	CTgAgTgCTgCTgCgACT
chr01	127.3	RM1183	gggCACgAATAAAACCAgAg	gggATggTCCAATgACAAAg
chr01	129	RM3411	CgTCCCTCCAgATggTCCAC	ATgggACTCCCgTACTCCTC
chr01	135.8	RM302	TCATgTCATCTACCATCACAC	ATggAgAAgATggAATACTTgC
chr01	135.8	RM212	CCACTTTCAgCTACTACCAg	CACCCATTTgTCTCTCATTATg
chr01	136.9	RM7180	gTgTTTATAggggTgCCACg	TgTTggTggTgCAggTAAAg
chr01	145.3	CH0120	gTCCACAAAACgTAggCCACT	TTTCTgTAgCAACgCACAgg
chr01	145.3	CH0114	CCATAgCgAACACAgCCATA	CCTTgTCAggCAAgCgATA
chr01	146.4	RM472	CCATggCCTgAgAgAgAgAg	AgCTAAATggCCATACggTg
chr01	149	CH0109	gCgAACAgAACATgCTCAAA	ggCACggAACAAggAAATTA
chr01	159	RM1387	gTggCTggCTgATCgATC	AATCAACCCAgCTACCATgC
chr01	159	RM104	ggAAgAggAgAgAAAgATgTgTgTCg	TCAACAgACACACgCCACCgC
chr01	160.4	CH0183c	gTTAgAgTTgATgCCAAAGC	CACACATCCTTCTgAgTTAgg
chr01	160.4	CH0184c	TgCACATgCTTAACCATAAAA	gCACTgCTTTCTACCTTCTg
chr01	170.4–176.3	RM6407	TgAAATggTggAgTCCAAGg	ACggAgCCACTgACAaggTC
chr01	181.8	RM6840	TACCAAgACTCCgCTATggC	gAAgAAgggATCATggATCg
chr01	181.8	CH0115	ACAACgAATCCAgACggCTA	TTTTATTggACgATgCACCA
chr02	0	CH0227c	AggTCTTTgACATCTCATCC	gCAgCACAggTTTATTCaGT
chr02	0	CH0228e	TCTCAgATgAAgTgACATgC	TCCTCgAgAACATTACCTTA
chr02	0	CH0229c	CATCTggCggTAAgAAgATA	AgCCTgCACATCAAATTAAG
chr02	2.5	RM7451	TAATACgAgCAGCgATCgTg	gCTAATTgCAgCTTgTgTCg
chr02	4.7–6.9	RM154	ACCCTCTCCgCCTCgCCTCCTC	CTCCTCTCCTgCgACCgCTCC
chr02	8.9–10.8	RM211	CCgATCTCATCAACCAACTg	CTTCACgAggATCTCAAAGg
chr02	13.4	RM279	gCgggAgAgggATCTCCT	ggCTAggAgTAAACCTCgCg
chr02	17.9	RM423	AgCACCCATgCCTTATgTTg	CCTTTTTCAgTAgCCCTCCC
chr02	25.5	RM3294	TTACACACTACggACgCg	CCTggTggTACCTCTCTTAATC
chr02	26.9	RM5780	gCTgCTgCATCTTCTACTgC	ACgCACATgCCTAAgCCTAg
chr02	29.8	RM53	ACgTCTCgACgCATCAATgg	CACAAgAACTTCCTCggTAC
chr02	33.6	RM174	AgCgACgCCAAgACAAGTCggg	TCCACgTCgATCgACACgACgg
chr02	36.8	RM145	CCggTAggCgCCCTgCAgTTTC	CAAggACCCATCCTCggCgTC
chr02	43.4	RM5356	AgAgCACTTggAgTgAAgAgg	AAgCgAgggAgACAATgC
chr02	51.1	RM324	CTgATTCCACACTTgTgC	gATTCCACgTCAggATCTTC
chr02	51.9	C2544	ATCTCgCTCCTCgCCgTCTC	CggAgATTgCTgTgCCTgAC
chr02	54.6	CH0211	gCAgCAAAgTgCggAgTA	CaggTgAATTgCCAATTT
chr02	54.6	RM5179	ATgAgCTAATgTTTCTAAgC	CAAATTgATTAgTTTgAACC
chr02	57.9	S5302	TggAgCATTCATTTgTTgTg	CAATAAgAgTgTCCTTCgCC
chr02	62.2–71.3	CH0226	TTCTTgTgggATACAggAAg	TAAgATCgAgTTggATggAg
chr02	57.9	CH0221	gTAgTgAAAAGATCCTCggTTT	ATggTTTTAAAgTAACTCTTTT
chr02	64.7	CH0222	TggCCTAATCAgTCAAATAAAA	gTCggATggCTAATACAAAgA
chr02	64.7	CH0223	gCTAAAAGgAAgCAATgTTCA	TCATTTACATCCATCgTTTg

附錄 本研究中 402 組可成功擴增之分子標誌染色體位置與序列 (續)。

Appendix Chromosomal location and sequence of 402 successfully amplified primers used in this study (continued).

Chr.	cM	Marker name	Forward	Reverse
chr02	71.3–77.8	RM341	CAAgAAACCTCAATCCgAgC	CTCCTCCCgATCCCAATC
chr02	71.3–77.8	CH0249e	ggCATggTCCCAgATgTAAg	TTCCCCAgCTgAgAgACATC
chr02	71.3–77.8	CH0250c	ACAgCgTgggAAATgAAgAA	CCTCAgCAACAAgCAATCAA
chr02	80.5	RM475	CCTCACgATTTTCCTCCAAC	ACggTgggATTAgACTgTgC
chr02	88.2	RM3688	gTTgAATCAAAGCTgTgCAgC	AgCTAggCAAAgCATgCATg
chr02	95.2	RM3355	CATATgCAATTgATgTTTCg	TTAATTCCTTggTCTCAAATg
chr02	103.9–105.8	RM263	CCCAggCTAgCTCATgAAACC	gCTACgTTTgAgCTACCACg
chr02	110.9	RM1367	gTgTgTACgTAggATCggAg	TgCTACTCCTAgCTgCTACC
chr02	110.9	RM1367-2	gCATCgTTCATgTACTTgg	CTgCTACgCTgCTACTCCTAg
chr02	110.6	CH0251e	gCTTTggTTCAGgACTCAgg	TCTTgCAATCTTTTCCTCCA
chr02	110.6	CH0252e	gAAAgATgCggAATACCAACA	TTTCCAgCAgTCAggTgAgA
chr02	118.1	RM525	ggCCCgTCCAAGAAATATTg	CggTgAgACAgAATCCTTACg
chr02	135.5–138.0	RM240	CCTTAATgggTAGTgTgCAC	TgTAACCATTCCTTCCATCC
chr02	138–140.9	RM250	ggTTCAAACCAAgCTgATCA	gATgAAggCCTTCCACgCAg
chr02	156.3	CH0230e	CTAgCAGggTTAggAggAAC	TCTgAAACTTCgCTCTgATT
chr02	157.9	CH0231c	TTAACTggTAGTTggCTgCT	ACAAAAACgTTTgAgAATTgA
chr02	157.9	CH0232c	TCgCTgATgCAgAATTAgTA	ATTgCACACTCCAAGTATCC
chr02	157.9	RM207	CCATTCgTgAgAAGATCTgA	CACCTCATCCTCgTAACgCC
chr03	0.0–1.1	RM60	AgTCCCATgTTCCACTTCCg	ATggCTACTgCCtTACTAC
chr03	0.0–1.1	CH0322e	TAAAAACATgAAAAggAAgC	TCAgAgTTAACggTCATgTg
chr03	0.0–1.1	CH0323c	TgCTTTgAACACAATgAgg	AAACTACTgAggATTAgCC
chr03	1.1	CH0324e	AgTTCATTCCAAGCTCATgT	AgTTTACACCgAACAgTTgAA
chr03	2.2	RM3203	AgAgCATCATgCAggTCCTC	ATACgAATggAgTgCAAgggg
chr03	2.2	RM3202	TTCACTCCTATTggCggC	TCATCATCAgTCCAgCATCg
chr03	6.3	RM22	ggTTTgggAgCCCATAATCT	CTgggCTTCTTCACTCgTC
chr03	11.5	RM231	CCAgATTATTTCTgAggTC	CACCTgCATAgTTCTgCATTg
chr03	24.4	RM6038	CTTCgCCCgCATAAgTCTAg	gTAGTCCgACTCgATCTCCg
chr03	25	RM545	CAATggCAGAgACCCAAAAg	CTggCATgTAACgACAgTgg
chr03	25.9	RM5480	AAgAAgAggATTTCTCgCC	gTCCAAGATTTcCAACgg
chr03	29.1	RM517	ggCTTACTggCTTCgATTTg	CgTCTCCTTTggTTAgTgCC
chr03	40.3	RM218	TggTCAAACCAAggTCCTTC	gACATACATTCTACCCCGg
chr03	44.4–46.6	RM251	gAATggCAATggCgCTAg	ATgCggTTCAAgATTCgATC
chr03	48.5	RM3803	gACCTTACAAgTCACCCgg	gCTAgCCggACTTgTAAAAg
chr03	55.8	RM282	CTgTgTCgAAAggCTgCAC	CAgTCCTgTgTTgCAgCAA
chr03	61.9	CH0325c	TCCCTCAgAgCAITCTgTAT	CACTggAATggTAAgTCCTg
chr03	61.9	CH0326c	AAATggCAGTAGTTCAGTTCA	AAggAAAATggCACTACAAA
chr03	61.9	CH0327c	CTTgCATACCACAgAAgCTC	ACTTCCCAAAGATCAAaggT
chr03	73.5–76.6	CH0347e	gCCCATCCATgAATCACTAA	TACTTAgCTggCggTggAgT
chr03	76.6–83.0	CH0348e	gCCgTTTggAATgATACTgC	TgCATggATTTgCTTgATCT
chr03	87.9	RM7134	TTCTACgCgTgCATATggTC	ATggCgCCATTAaggTTAgAg
chr03	91.1	RM16	CgCTAgggCAGCATCTAAA	AACACAgCAGgTACgCgC

附錄 本研究中 402 組可成功擴增之分子標誌染色體位置與序列 (續)。

Appendix Chromosomal location and sequence of 402 successfully amplified primers used in this study (continued).

Chr.	cM	Marker name	Forward	Reverse
chr03	96.6–99.0	RM5626	gCAgACgAgATgAgATCg	gTAgAggATgggCAgCAg
chr03	101.6	CH0328c	TCCATCTggAAAAATgTAACAagg	TggTTCgTATTTCTTTATTTTgTgA
chr03	101.6	CH0329e	CTCCAATCTCCCCATCACTC	CATCgTgCCCCAgTTCAC
chr03	101.6–101.9	CH0330e	ATTAATCCTCCCCTCCTCgAT	CTCTggTACATCTCCgACAgC
chr03	115.6	RM2334	CATgCATCTgATCTgATTAT	TgTgAAgAgTACAAGTAagg
chr03	115.6–119.7	RM7097	gggAggAggAgAggAgATTg	TTAggCCTgCACTTTTggAg
chr03	120.4	RM135	CTCTgTCTCCTCCCCgCgTCg	TCAgCTTCTggCCggCCTCCTC
chr03	122.8	RM168	TgCTgCTTgCCTgCTTCCTTT	gAAACgAATCAATCCACggC
chr03	127.1	RM186	TCCTCCATCTCCTCCgCTCCCg	gggCgTggTggCCTTCTTCgTC
chr03	149.1–151.5	RM143	gTCCCgAACCCCTAgCCCgAggg	AgAggCCCTCCACATggCgACC
chr03	151.5	RM1038	TggTTCgATTCggATTC	AAgCTATTCAAAgCAgCTC
chr03	140.1	CH0331c	TCACCAACAACAATCAgAgCA	CCAATgTCggTgATCTTgTg
chr03	140.1	CH0332e	CAAAgCgCACCATTCTATC	ggCTCACgCCATAgCTTAGT
chr03	140.1	CH0333c	AAgTggAgACCTCAACAACCT	TCTTCTTgCAATTATTggTTgg
chr03	160.1	CH0334e	TCAgAAgAgCCTACTggATT	AgATTATATATTgACAATCTTCACg
chr03	161.7	CH0335c	CTCTTggTTACAACCTAAAAgg	ggACTAgTACCTggCCCCAAg
chr03	166.4	RM85	CCAAAATgAAACCTggATTg	gCACAaggTgAgCagTCC
chr04	3.1	RM551	AgCCCAgACTAgCATgATTg	gAAggCgAgAAggATCACAg
chr04	3.1	CH0466c	ggTgCgACggTATAgTAATC	TggTTCAgAATgAgTTTAgTTg
chr04	5.1	CH0467e	TAAggCATCAAgAACAggAC	TgTATAgAggCCAaggTCATT
chr04	5.4	CH0468c	AAATggTTTTCCAACCTCA	AgTACggTACCCTTCTAgC
chr04	6.5	E2762	gCTCTCCCTgATTgATTAC	TCCAAAATAAgCCATAgTC
chr04	8.7	C61009	ggCCAACAAggTgTAgTAAg	ACAAAACCCCAgCACCCTAAG
chr04	7.9	RM518	CTCTTCACTCACTACCATgg	ATCCATCTggAgCAAgCAAC
chr04	20.9	CH0469e	CTAgTgCACTCAGTTgCAGAg	ATATgCAAgAAgAgCCTgAT
chr04	20.9	CH0470c	ATgCCATAAACTgACATgCTg	gCACAATggTAgCACCTgAA
chr04	23.3	CH0471e	ggTggAAAATTgCCTAgATT	TgCAAAAATAgTTATAAAAaggTAAAg
chr04	25.4	RM5687	gATCgCTggCgATTgATC	gACTTgTggggTggTTTTTg
chr04	30.8	SLS162	gTggTggTggCTCTCTATCT	CCACCTCTATTTCTCTCCTC
chr04	30.8–41.5	C12802	AgTTgCAGAgAgggCTATTg	ACAAGCgTAaggAAAATgAgg
chr04	30.8–41.5	SLS190	gTTggCTgTCTCTTATTgT	ATTCCAATTCgTAgAATTACTC
chr04	41.5	CH0493e	TTCTTggTgAAAATgCTAA	ggTgTAgAgAACACggAATCCT
chr04	41.5–44.0	CH0494e	TTATTgggTAggTAATgCTTCAA	CATCATCTTgggAgCATgTg
chr04	41.5–44.0	CH0495e	TgAACTgAAgggAATgAgTgg	AACTTTTgCATgAAATAAAACgA
chr04	44.0–48.3	CH0472c	ACggAgAgAgAAgTCCTgA	TTTTgAACgAgATTCAGACg
chr04	44.0–48.3	CH0473c	CATAgACACAATgAACTgCAA	CTgAATACaggTCTCggAAg
chr04	44.0–48.3	CH0474c	gCgCgAAAaggAAAaggATA	TTCAATTTAggggTATATAggg
chr04	49.7–52.6	STS318	CAATgCATACTCCACTTCTTC	ATAAgTTCTCTACCTgCCgTT
chr04	49.7–52.6	STS319	ACTggCACTgCTATTTACTTg	CAGATgAgACTTTCTCCACAg
chr04	49.7–52.6	STS385	TCATAgTgATTAgCCCTgAgA	gCTgggTTTCTTCTCATATT
chr04	49.7–52.6	STS379	AgTCATAATTAaggCCACTCC	CAgggATAggAAgAAgAAgAA

附錄 本研究中 402 組可成功擴增之分子標誌染色體位置與序列 (續)。

Appendix Chromosomal location and sequence of 402 successfully amplified primers used in this study (continued).

Chr.	cM	Marker name	Forward	Reverse
chr04	56.1	RM1359	AACgAATCTATTTgCgTC	TTCTTCTCATTCAATTCgC
chr04	58.9	RM1155	AgggAgTgTggCAACTATgC	gggAggAgTgAgAAgggATC
chr04	60.2	RM7313	TATgTgggCTCgTgggTC	TCTCATCCgTTTCTTCCACC
chr04	62.6	RM5757	CCTgAgACCATATgCTgCTg	gAgggAgCATCATTAgCTgg
chr04	72.8	CH0449	TAATCgCTgCTCCCTAACTA	CACACATACCgTAACACAg
chr04	74.2	CH0450	CCCCTCCACTCgAATCAATg	AATCAACTCAAgCgCCAAAT
chr04	74.2	CH0451	AgAggAgAACCTTTTCTTgg	ACTgCTTTTgCTACTTTTgg
chr04	77.9–78.2	RM252	TTCgCTgACgTgATAggTTg	ATgACTTgATCCCGAgAACg
chr04	81.7	CH0475c	CAACgTACAACAATCAATgC	ACAgACCgCTAATCTTCAAA
chr04	81.7	CH0476e	TACACggAAggCTATgTTCT	TCTCCgTTCATCAgTCTACC
chr04	81.7	CH0477c	CCACCTgTTCCTCgTTAgTA	CTggTAAgCTCTCCTTCTCC
chr04	83	RM241	gAgCCAAATAAgATCgCTgA	TgCAAgCgCgAgATTTAgTg
chr04	87.1–94.4	RM470	TCCTCATCggCTTCTTCTTC	AgAACCCgTTCTACgTCACg
chr04	94.4	RM273	gAAgCCgTCgTgAAgTTACC	gTTTCTACTCgATCgCgAC
chr04	94.4–96.0	RM317	CATACTTACCgTTCACCgCC	CTggAgAgTgTCAgCTAgTTgA
chr04	97.7	RM6089	CCACCgAATCgAATAACCAC	ATggCCAgCgTgATCTCC
chr04	113.2	RM1153	ACCAACgCCAAAAgCTACTg	TACTCgCCCTgCATgAgC
chr04	114.3–120.3	RM5506	AggCgATgTTTgATCTCgAC	CTggACgTACACACAgTACg
chr04	122.9	CH0478e	AATTgCATgATTAACATggTC	gATgCCTgAACgAgTAAgAA
chr04	122.9	CH0479c	TCTTACTCgTTCAggCgTCA	CCTCTgCgATATCCgTgT
chr04	123.8–128.5	RM567	ATCAgggAAATCCTgAAggg	ggAAggAgCAATCACCCTg
chr05	0.0–3.0	CH0531c	TgTTATgTAAgTgTATTgACTgAA	ggATggTCAAgtATCTCAgC
chr05	3	CH0522c	ATggTACTgCTgCCTATTgT	gTTTggTCgTCAAAgTCATC
chr05	0.0–3.0	RM1248	ACAACgCgCTAATggTTggg	gTgATTTTggCTCaggTCAg
chr05	3	RM1182	ggCCCAgATTCgATgTAATg	AAAgCTTCTTCCgCTTCCCTC
chr05	6.5	RM7029	gATTCCCTgCaggAACAAATg	CAAaggCagACAACAACATgg
chr05	12	RM2010	ATCTTCTAggAAATCgAggA	gTTggCAACTTgTAgTCTTg
chr05	12	RM5796	gCgATggAACATgAAgTgTg	TggATgTTCTgATgCgAgC
chr05	14.1	RM1024	gCATATACCATggggATTgg	gggATTgggATAATggTgTg
chr05	19.0–20.1	RM7302	AggAggAAgAAgAgATTgCg	CCCACACgAgATgAgATTgg
chr05	20.1	RM3345	AgTgTCCCCTTTTCTCTCCC	gCTTCTTgCTTCTATggg
chr05	24.7	RM267	TgCagACATAgAgAAggAAgTg	AgCAACAgCACAACCTgATg
chr05	29.1	RM574	ggCgAATCTTTgCACTTgg	ACggTTTggTAgggTgTCAC
chr05	32	RM3777	gCTCCCAAATCTTgTCTTg	TCTCACCTCTTCCCTACAAgC
chr05	32.5	E3528	gggAAgAAgAgTAgAggCTg	TACACCCCAATATACCTTCg
chr05	39.2	STS204	TgTAATCATCACAAATCACTgT	ATgTAATggATCgTATCATCg
chr05	41.4	CH0523e	TTACAAATgCATTgATTTCTTT	TATCCAgtgCTTgTgATTCTT
chr05	45.8	S6520	CTCTACgCCAAAgAAAAgAg	ggTCCCTTAgCCACAAAACC
chr05	49.4	RM289	TTCCATggCACACAAgCC	CTgTgCACgAACTTCCAAAg
chr05	60.7	RM3838	AgATgTTgCCAgTTTgCCTg	TAgTgTCTTTgTgCAAgCCg
chr05	60.7	CH0525e	ggAATTgAgCagggTgTAT	CAACTgTCTgAACgCTTCTA

附錄 本研究中 402 組可成功擴增之分子標誌染色體位置與序列 (續)。

Appendix Chromosomal location and sequence of 402 successfully amplified primers used in this study (continued).

Chr.	cM	Marker name	Forward	Reverse
chr05	60.7	CH0526c	gggAACAAAATgATTCATCTAA	gTATggAACCCCAACTCAg
chr05	70.5–73.9	RM430	AAACAACgACgTCCCTgATC	gTgCCTCCgTggTTATgAAC
chr05	80.4	CH0527c	CCAgTATgACCTTTCgACTg	TACCgATgAATgTTATgCTT
chr05	80.7	CH0528c	CCCCTCAATAAAATgAgACA	CgTgCCATAAAAAATCAgACT
chr05	80.7	RM161	TgCAgATgAgAAgCggCgCCTC	TgTgTCATCAgACggCgCTCCg
chr05	95.3	STS208	CAAAGgTATgATgAggATAAagg	TAgATTCgTCTCgCAgTTTAC
chr05	101	RM3476	gATTCTCgTCgTAATCAAgA	ATCCACggTTAAgATAAATg
chr05	111.6	RM480	gCTCAAgCATCTCgCAgTTg	gCgCTTCTgCTTATTggAAg
chr05	122	RM1054	TgCATATgTACCgCAACCTC	TTTCTgCATgATCCCCTCTg
chr05	122	CH0529c	gTTTTCTCCTgAggTCAATg	CAgAATCCTTgggAgCTTAT
chr05	122	CH0530e	AgCTAgACgCATAgTgTggT	ACAgCTCTgCTAATTTgCTC
chr05	122.3	E1113	AggCCTCCTCCgTCTTCATC	CACACACgTCggTCggACAg
chr05	122.3	CH0502	ATATCggAggCCTTTCAC	TgAgACTCAggCTAgCTTTTC
chr05	122.3	CH0503	gggAAgACATCTgCCTCTAT	gAAATTggCTAaggCTTAATg
chr05	122.3	CH0505	gTATCCCTATggCgggATCg	CCAgACTCCAgAggTCTATC
chr06	0.0–0.6	CH0655c	ATTgACCAAACCAAgAAAga	AgATgATTggTTgCATgTTT
chr06	0.9	CH0656c	TTgATTACTCTCTCCTgTATAAAgTC	AgTATATAgCggACTgCATgg
chr06	1.4	RM508	ggATAgATCATgTgTggggg	ACCCgTgAACACAAAgaAAC
chr06	8.2	RM190	CTTTgTCTATCTCAAgACAC	TTgCAgATgTTCTTCCTgATg
chr06	12.9–13.5	RM584	AgAAAATggATCAggAAggC	gATCCTgCAggTAACCACAC
chr06	12.9–13.5	RM225	TgCCCATATggTCTggATg	gAAAATggATCAggAAggC
chr06	13.8	RM6734	TgAgCAgTCTgCAgATgACC	gCTTggACTTggAgTCTTgg
chr06	19.1–31.3	RM253	TCCTTCAAgAgTgCAAAACC	gCATTgTCATgTCgAAgCC
chr06	33.5–34.3	RM276	CTCAACgTTgACACCTCgTg	TCCTCCATCgAgCAgTATCA
chr06	38.3–40.2	CH0657c	ATTTgggTCATTCCTCCTAT	TTggCTATTTCTTCCATgT
chr06	40.2	CH0658e	AATCATTTCTACAAAaggAAAga	TCAgggACAAaggTTTgTTAg
chr06	56.3	RM527	ggCTCgATCTAgAAAATCCg	TTgCACAggTTgCgATAgAg
chr06	58.7–61.6	RM3330	ATTATTCCCCCTTCCgCTC	AAgAAACCCTCggATTCCTg
chr06	61.6	CH0659c	ggCTAgTCTCCCTgAggTAT	CTgCTTAgCTCCTTAACAgg
chr06	61.6–62.6	CH0660e	TAAgTgATgggTTACCATgTg	AgCTATggTCATTgATgAAA
chr06	63.2–64.0	CH0661c	TgCTCACTCgCTAAgTATTg	gCTCCAACCCTTCTTgATAC
chr06	67.7–68.5	RM541	TATAACCgACCTCAgTgCCC	CCTTACTCCCATgCCATgAg
chr06	67.7–68.5	RM3	ACACTgTAgCggCCACTg	CCTCCACTgCTCCACATCTT
chr06	87.5	RM162	gCCAgCAAAACCAgggATCCgg	CAAaggTCTTgTgCggCTTgCgg
chr06	100.8–103.0	RM528	ggCATCCAATTTTACCCTC	AAATggAgCATggAggTCAC
chr06	105.1	RM30	ggTTAggCATCgTCACgg	TCACCTCACCACAgACACg
chr06	110.6	RM400	gTgCAACCggCACTCTTATC	gAgAAggCggAgAgATCTgA
chr06	110.6–113.1	RM3138	TTgACAAgAgATCAAggCgg	gTgAATgTTgAgCTgCATgg
chr06	124.4	RM5463	ACCCTTgCAgACAACgTACC	ATATACCgCAgCTgCATgC
chr07	0	CH0715e	TCACATCAAATgTgTgTAggTT	ggTCTTgCTAAATgTCCTg
chr07	0.8	CH0716c	TgTTTTgATTCTTCAAATgC	ggCAAACACTAggACAAAAg

附錄 本研究中 402 組可成功擴增之分子標誌染色體位置與序列 (續)。

Appendix Chromosomal location and sequence of 402 successfully amplified primers used in this study (continued).

Chr.	cM	Marker name	Forward	Reverse
chr07	24.2	CH0717e	AAgCATgAACCGAAgTAAgA	CCATCATACTCCACCAgT
chr07	24.2	CH0718c	CACgTCAAAGTgATTTTCAG	CCATAATgACCACAAAACA
chr07	11.0–24.2	RM481	TAgCTAgCCgATTgAATggC	CTCCACCTCCTATgTTgTTg
chr07	41.7	RM125	ATCgCAgCCATggCAgCgACC	AggggATCATgTgCCgAAggCC
chr07	44.1	E10534	ACCTgCAgCACACTggTTC	gCAgCATCCAACATgATAg
chr07	49.7	S20922	ATATgCACAAAaggTAgCgTg	TgCTATTATCgACAAGAAgg
chr07	49.7	CH0705	gTTTTgTgCATTCCTTTAC	TTTATgACATTTTgACCg
chr07	49.7	RM214	CTgATgATAgAAACCTCTTCTC	AAgAACAgCTgACTTCACAA
chr07	60.8	RM6767	ACAAgCAACTTgCACTgTgg	CATCgCCTgggAgATCATAc
chr07	61.6–61.9	RM418	gATCgAgCATCAACACAACg	TTAAGTCTgAAgCCCCTgCT
chr07	67	RM11	TCTCCTCTTCCCCgATC	ATAgCgggCgAggCCTAg
chr07	73.2	RM3826	TTAgCTTTCCTCCAgTCTCC	ACgggTATCTgAAACACAAC
chr07	78.9	RM10	TTgTCAAgAggAggCATCg	CAGAAgTgggAAATgggTCC
chr07	83.3	RM8026	TAAgCFAAAACggTTTATTA	ACgTAGTTTCTTTTCAGCA
chr07	83.3	RM1132	ATCACCTgAgAAACATCCgg	CTCCTCCCACgTCAAggTC
chr07	93.9	RM234	ACAgTATCCAAGgCCCTgg	CACgTgAgACAAAACgAggAg
chr07	118.3	RM420	ggACAgAATgTgAAgACAgTCg	ACTAATCCACCAACgCATCC
chr07	88.7	RM6420	CATgggCCgTACTACgTAgg	gAgTTCTCCAgCCACTCCAg
chr07	81.9–83.3	RM6042	TCCAgCgAgAgAACAgCg	gAgggATggAggAAggAAA
chr07	81.9–83.3	RM1365	CAggCggTgATTTTCTTCTC	gACAACCTAgTTCCAATCCC
chr07	84.6	CH0709	CACCATTAgAAggCCAATAg	ATCTTTTgCATgTCCTTACg
chr07	84.6	CH0714	AACAAGAggTTggAAcAAAA	ACTTCTACCCACAgtTACgC
chr07	102.3	CH0706	gggTgCATATAAAAAggAgTT	AAgTTACCAACCTCTgTTCg
chr07	105.7	CH0707	CAAgACAgCAATgAAgATCA	gAggATCATggTTCAGACAT
chr07	105.7	CH0708	CTTgATTTgCgAAAAGgTTT	TgACgAggATATgAATgATg
chr07	116.6	CH0701	CTACTgCTCCgTATgCTgCT	gTgCCAATTACCTTCCCgTA
chr08	0	RM2344	TAAgTgAAATCATACTTAA	CCTTTTACTgTAATTAACATA
chr08	0	RM5911	CCCTCTTTTAAgTCTgggg	ggTgCCTCCTTCAAAGTTg
chr08	0.5	RM337	gTAggAAAaggAAgggCAgAg	CgATAgATAgCTAgATgTggCC
chr08	1.9	CH0883e	TgAATTCgATCAAAAATAgCA	TCAACACAgATACTCgTACCAC
chr08	3	CH0884c	CAAgCCCgTAAgATTCTC	TTgCATCAATATACTCAACACA
chr08	3.6	RM152	gAAACCACCACACCTCACCG	CCgTAgACCTTCTTgAAgTAG
chr08	20.2	CH0885e	TCCTTCTATTCAGCACCTTg	TggTAATgAgAAAAAggTgAA
chr08	20.2	CH0886c	ATATTgTggCCTCAACAgAg	TgAAgggCACTACTgAATCT
chr08	26.3	RM1376	CATgTgTgATgACTgACAagg	ggTgCTgTgATgATTCTTTC
chr08	34.6–35.7	RM25	ggAAAgAATgATCTTTTCATgg	CTACCATCAAAACCAATgTTC
chr08	40.2–42.9	CH0887e	TgTTTTgCAgTCATCAGAAA	ATTTCTTgCAGACCTTCgTA
chr08	40.2–42.9	CH0888c	TggTCTCgTTACATgACAAA	gCAAAAgtTCTCTgTTgCCT
chr08	45.4	RM8019	CAAgACAgATAAAgCATTAA	gTAGTTTTgAAgTgATggAA
chr08	45.4	RM72	CCggCgATAAAAACAATgAg	gCATCggTCCTAACTAAggg
chr08	54.3	RM331	gAACCAgAggACAAAAATgC	CATCATAcATTTgCAgCCA

附錄 本研究中 402 組可成功擴增之分子標誌染色體位置與序列 (續)。

Appendix Chromosomal location and sequence of 402 successfully amplified primers used in this study (continued).

Chr.	cM	Marker name	Forward	Reverse
chr08	60.1-60.4	CH0889c	gATTCgCACTTgCTATTTgT	CTTgTACATgAATCCCTCgT
chr08	60.4	CH0890e	gACAgAggAgAAgCAggAAT	gAgAAAgTCTgAAgTAgTCATgTg
chr08	70.1	CH08103c	CgAgCAGTTTATCCCTCCAT	ATTggCTCgAgAACCAAgAA
chr08	72.2	CH08104c	TTgTTggTgCATggTCTTTC	gTgACgTTgCCTTTCCATTC
chr08	72.2	RM515	TAggACgACCAAAGggTgAg	TggCCTgCTCTCTCTCTCTC
chr08	75.7	RM223	gAgTgAgCTTgggCTgAAAC	gAAggCAAgtCTTggCACTg
chr08	80.4	CH08101c	TTCgCAGATAAACTAgAgAgAgTACAA	gCTCgCTgACTCCgATTg
chr08	80.4	CH08102c	CTCTCTCAgCgggAAAT	gAgATCTggCTggTCgTC
chr08	96.6	RM256	gACAgggAgTgATTgAAggC	gTTgATTCgCAAAGggC
chr08	109.3	RM447	CCCTTgTgCTgTCTCCTCTC	ACgggCTTCTTCTCCTTCTC
chr08	120.4	RM4153	TgTggTAgACTTTCTTAACC	ggTCCCTAgTTggATATATg
chr08	121.2	RM4997	CCTTCACggAAAATTAATgA	gTACgACAAgATCAGTgTgC
chr08	121.2	RM4154	AgAAgATCgATCgAAgAAAC	ATCATgAAACACAATAAggC
chr08	121.2	RM5545	CAGCACTCTCCCTACCAg	ggCTAAgTCAgCgTgAgACC
chr09	0	CH0923c	ggATTCATCCAATACAAgC	gTCTAgTCAATgCCCACCT
chr09	0	CH0924e	gTTTgTgCCATCATCTATCC	gggTTggTgTgACAATAAAT
chr09	20.7	CH0925c	TgCATAAATTAgAAACTgTgg	ACATCATTCATATgCCAAA
chr09	21.4-26.7	CH0926c	AgTCTgTgAggAggTCACTg	gAACCAgACAgtTCCgAAT
chr09	21.4-26.7	CH0927c	CATCgCCACATAgATAACTg	gATggCagCAAACCTgTATT
chr09	26.7	RM1328	gAATgggATTAgACgATTg	CCATgAgTgACATCAAAAagg
chr09	34.9	RM3912	TgTgTgTgCCCgATCTAC	CCTCTCgATgAgCATTCC
chr09	40.7	RM105	gTCgTCgACCCATCggAgCCAC	TggTCgAggTggggATCgggTC
chr09	40.1-40.7	CH0928c	CCATgCTCATAAATTCAACA	TggTAgACTTgggAgTTgTT
chr09	40.1-40.7	CH0929c	TAgTTCAggTgCACggTAAg	TATCTCCCATAAACTggTg
chr09	41.9	RM524	TgAAgAgCAggAACCGTAgg	TCTgATATCggTTCCTTCgg
chr09	50.7	RM566	ACCCAACCTACgATCgCTCg	CTCCAaggAACACgCTCTTTC
chr09	50.7	RM6771	gCATCAAAGCgAACTTAACC	TAgtCgCCgATggATAAAC
chr09	58.3-60.8	RM1189	AACTgCCCATTgTgTCgTC	gACTCCggACTAgACCAATC
chr09	63.0-65.1	RM257	CAGTTCCgAgCAAgAgTACTC	ggATCggACgTggCATATg
chr09	72.1	RM242	ggCCAACgTgTgTATgTCTC	TATATgCCAAGACggATggg
chr09	74.7	RM278	gTAgTgAgCCTAACAATAATC	TCAACTCAgCATCTCTgTCC
chr09	75	RM3909	CCTCTTgACATAATgggC	gTCCTCCCACAgAACACAC
chr09	78	RM201	CTCgTTTATTACCTACAgTACC	CTACCTCCTTCTAgACCgATA
chr09	82.4	CH0931e	AATCCgCTgAAATgACCT	ACCTTCCATgATTTTAAACg
chr09	90.1	CH0932c	gTACAgACACCCAAgAACCA	AgCTgTTTgTACATAgCTACTCA
chr09	90.1	CH0933c	ATAggAAAAGCCAgCgAAgA	TTTgAATAggTgTgAAAgAgg
chr09	93.5	RM3744	CAGgTAAgTTTTATTTTCA	gAgCAGgAgTAACAgTTgTA
chr09	93.5	RM205	CTggTTCTgTATgggAgCAG	CTggCCCTTACgTTTCAgTg
chr10	0	RM6364	gTAggTgAggAggATCTTgT	AATTTCTCgATTCTTCTTTC
chr10	1.1-1.9	CH1026e	ATTTCCgCAACCACTACgAg	ggCCggCTAgTgggTAgTAg
chr10	1.1-1.9	CH1027e	TTgggCCgAAgAAgAAgTAG	TCTTCCTgTgTggggAAgAg

附錄 本研究中 402 組可成功擴增之分子標誌染色體位置與序列 (續)。

Appendix Chromosomal location and sequence of 402 successfully amplified primers used in this study (continued).

Chr.	cM	Marker name	Forward	Reverse
chr10	5.5	RM222	CTTAAATgggCCACATgCg	CAAAGCTTCCggCCEAAAAG
chr10	11.7–13.3	RM216	gCATggCCgATggTAAAg	TgTATAAAAACCACACggCCA
chr10	17.9	RM6207	TCTggCAGTgAACgTggC	AACgggTAGAgATgCACCAC
chr10	17.9	RM3311	TCTggCAGTgAACgTggC	AACgggTAGAgATgCACCAC
chr10	23.1	CH1017c	CgAAAaggTTTgACAgATgTT	TTgTCgTTATATggCTTCCT
chr10	23.1	CH1018c	AATTTATTgCgAAAaggTTTg	TTgTCgTTATATggCTTCCT
chr10	24.2	CH1019e	AAgCACAgAAAaggAACTgAA	CTgCAATCAATTCTgCAATA
chr10	26.1–30.2	RM467	ggTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC	CTCCTgACAATTCAACTgCg
chr10	30.2	RM5708	AATTAgAACCATCTgAATTg	gTATTTAAaggTCACgTATCg
chr10	42.7	RM1375	CTACACgCgCAAACCTCTgTC	ATgAAggTCTAaggCTgCACC
chr10	42.7	RM1375	CTACACgCgCAAACCTCTgTC	ATgAAaggTCTAaggCTgCACC
chr10	48.8	RM258	TgCTgTATgTAgCTCgCACC	TggCCTTTAAAgCTgTCgC
chr10	58.3	RM184	ATCCCATTCgCCEAAACCggCC	TgACACTTggAgAgCggTgTgg
chr10	53.3	RM304	TCAAACCggCACATATAAgAC	gATAgggAgCTgAAggAgATg
chr10	61.7–68.6	CH1020c	CgTTAgTgggTTCTCTTgg	AgCATACgCATCTTTCTAgC
chr10	68.6	CH1021e	TTTTgTATgCAACTTCAAagg	gCTTTTgCACAATATATCACA
chr10	68.6–71.4	CH1022c	AgAgggAgAgATTgCCATTA	CCATgAaggTggTTTTCTTTA
chr10	73.7	RM6673	CATCgCATCgTATCgTATCg	gCTTCAAACACgCCTTCTTC
chr10	73.7–83.0	RM5471	ACAggTAATgAACAgCTTgC	AgTAgCAGCAAAAagggAAAg
chr10	73.7–83.0	RM333	gTACgACTACgAgTgTCACCAA	gTCTTCgCgATCACTCgC
chr10	73.7–83.0	RM496	gACATgCgAACAAcAgACATC	gCTgCggCgCTgTTATAC
chr10	73.7–83.0	RM228	gCCATTAgTCCTTggTTTTCTC	ACAAggATCggAAgTAgACgAg
chr11	0	CH1130c	CCTCTCgAAACgATATTgA	ATTCCgTgTTgCTTgATTCT
chr11	0	CH1131c	gCCCTTACTTTTTAggTCAAC	ggTTgCATACTggTTCCTT
chr11	0	CH1145e	gCACAgCCTgCACAgTgTAA	ggAATTCgCTCTCAACgAAg
chr11	0	CH1146e	CTCAATgTACTTgCgCTTCg	TTCAAAgCTTCATTCACAgCA
chr11	1.4	CH1132c	AAgCAAAAaggTgAAgAAATC	gCAGaggTAAATTCACAg
chr11	1.4	RM286	ggCTTCATCTTTggCgAC	CCggATTACAgAgATAAACTC
chr11	19.8	RM6544	ACCACTATgCACCTTCgTC	gAATgCTCTgCTTCgTTTCC
chr11	19.8	RM1124	AAgCTATCCCCCTTTTTggC	AgggATCggTAGACCCAATC
chr11	20.3	CH1134e	CAAgAACACAggggAgTTTA	TgTTAAgCCTgCAACTAAAA
chr11	20.3	CH1135c	TgCAATggATCgATgATTTA	TTTgTTgAgTAATgAAAACAgC
chr11	20.3–27.8	RM167	gATCCAgCgTgAggAACACgT	AgTCCgACCACAaggTgCgTTgTC
chr11	32.1–33.4	RM3133	TCAATAgACACAgggCATg	CgATTTTgCTCACTgCACAg
chr11	35.6–45.3	CH1136c	TTgCAgTCTCTgCATgTTAg	ATTCATCCAAgAAAACACAg
chr11	35.6–45.3	CH1137c	CTATTCTTgggCTCAGTTg	CATCCTgTCCATCATTTTT
chr11	49.1	RM536	TCTCTCTCTTgTTTggCTC	ACACACCAACACgACCACAC
chr11	59.2–64.2	CH1138e	AgTggAgCAGAAAgAAAT	CTgATgTACATggTTggTgA
chr11	59.2–64.2	CH1139e	CCTATgTggAgTTCCTTgTg	CTCAACCAgTgATCTggAgT
chr11	64.8	RM287	TTCCCTgTAAgAgAgAAATC	gTgTATTTggTgAAAgCAAC
chr11	71.4–77.4	CH1122	ATCgTTTgCAAgAgTTgAAg	AgggggTTTAgTgAgATCAT

附錄 本研究中 402 組可成功擴增之分子標誌染色體位置與序列 (續)。

Appendix Chromosomal location and sequence of 402 successfully amplified primers used in this study (continued).

Chr.	cM	Marker name	Forward	Reverse
chr11	79.1	RM21	ACAgTATTCCgTAggCACgg	gCTCCATgAgggTggTAgAg
chr11	80.2–80.5	RM1341	AACCTggAggTgCTggTCTC	TTTCTCCCCCAACCAC
chr11	88.4	RM206	CCCATgCgTTAACTATTCT	CgTTCCATCgATCCgTATgg
chr11	115.1	RM224	ATCgATCgATCTTCACgAgg	TgCTATAAAAaggCATTcggg
chr12	0.0–5.5	CH1216c	TTCTTCTTCTTggTCATCgT	CACAggACATCTCCgACA
chr12	0.0–5.5	CH1217c	TTCTTCTTCTTggTCATCgT	ggTgACACACTATCCAAACA
chr12	9.4–9.7	RM20	ATCTTgTCCCTgCAggTCATA	gAAACAgAggCACATTTcATTg
chr12	9.7	RM415	CTTCgATCCATCATCCATgg	ATTgCTgTACgCAgTTTCgg
chr12	10.8	RM8215	gTTCTCCCTTCATgACACAg	TAgAgACTTTATATTTggTgTgC
chr12	12.2–26.0	RM19	CAAAAACAgAgCAGATgAC	CTCAAgATggACgCCAAGAg
chr12	12.2–26.0	CH1218e	CTCTCTggCgTggATATAAg	ACACCAgATTTCTgggTATg
chr12	12.2–26.0	CH1219c	TCATAACCAATAACCACTgATg	TCTTCAgTAACAaggAAgCAGAg
chr12	27.1	RM3472	ATCgCAAgAACTCCgTgAAg	CgCTTTTgAgCTCgCCTC
chr12	39.4	RM5746	TCgCTACgTCgACTgATTTg	ATATCATCAGTCggCAGCAG
chr12	39.7–40.6	CH1220e	CTgACgACATCTTgTgATg	CCATTgCTgATCACTTCTg
chr12	39.7–40.6	CH1221e	AAgCCAAGATggAACTgTAA	TTgTCAAAAgTgTTgTggAA
chr12	48.2	RM101	gTgAATggTCAAATgACTTAaggTggC	ACACAACATgTTCCCTCCCATgC
chr12	58.9–61.6	RM247	TAgTgCCgATCgATgTAACg	CATATggTTTTgACAAAAGCg
chr12	61.6	CH1222e	TTAAgTgTgTTgCAAAgTgC	TTTgAATgggAATAAAATgg
chr12	61.6	CH1223c	CCCAACCACATATATATAACC	ATTTTgTTgCTgCTTAAggT
chr12	65.3	RM5195	TCTCTgTTCTTgggTTTAAc	CCgACCAATTTTATTAAGAT
chr12	65.3	RM2972	gAgCCAATATgTTgTCTTgA	gTTCAGATCATgATgCCTAC
chr12	69.6	RM519	AgAgAgCCCCTAAATTTCCg	AggTACgCTCACCTgTggAC
chr12	78.9	CH1229c	gCTTCTATCgAATACCCTgA	TgTCATCATTCTgTAgCTTTAACCA
chr12	78.9–86.5	CH1230e	CTCACATCAGCAATGCgACT	TgTACCTTggAggCTggTTC
chr12	78.9–86.5	CH1231e	TTTgCACCTTTCCTgAggA	TgAggCAGgAgAgTTgATgA
chr12	91.3	RM270	ggCCgTTggTTCTAAATC	TgCgCAGTATCATCggCgAg
chr12	95.1–95.4	RM5479	TgATgCCTCCTAAgCTCACC	ACTTCTCCCCTCTCTgCTCC
chr12	97	RM3739	AgTTgCgCAGCTAATCgATC	AAgATCCAACgggTTCTgTg
chr12	97	RM6386	gTTCTCgAgCTCCACgTAgg	CTCCACCTCCATCTCCgTC
chr12	103.1	RM235	AgAAgCTAaggCTAACgAAC	TCACCTggTCAgCCTCTTTC
chr12	107.4	RM17	TgCCCTgTTATTTTCTTCTCTC	ggTgATCCTTTCCCATTTCA
chr12	109.2	RM2197	ACTgAgAACTTTAATCATCg	gAACAACCTTTgAAgAgAAAC

The Development and Application of Molecular Markers of Wild Rice

Yann-Rong Lin¹, Hsiang-Ting Chien², Han-Shiuan Chin², Hung-Ying Lin², Hsing-Mu Yen³,
Woei-Shyuan Jwo³, Dong-Hong Wu³, Ming-Hsing Lai⁴, and Charng-Pei Li^{3,*}

Abstract

Lin, Y. R., H. T. Chien, H. S. Chin, H. Y. Lin, H. M. Yen, W. S. Jwo, D. H. Wu, M. H. Lai, and C. P. Li. 2015. The development and application of molecular markers of wild rice. *J. Taiwan Agric. Res.* 64(4):253–278.

Wild rice has high genetic diversity and high tolerance to extreme environments. If genomes of wild rice can be applied into modern rice breeding programs by marker-assisted selection, newly bred cultivars can endure mercurial climate and meet sharply increased demands of food in the world. The goal for this research is to introgress genes/chromosome segments of *Oryza officinalis* with CC genome and *Oryza australiensis* with EE genome into *Oryza sativa* ssp. *indica* cv. 'TCS10' and ssp. *japonica* cv. 'TNG67' with AA genome, respectively. Currently, polymorphic markers were surveyed and developed. A total of 249 SSR (simple sequences repeat) had been applied but only 100 (40%) and 67 (27%) of markers could be amplified successfully in *O. officinalis* and *O. australiensis*, respectively. Among polymorphic SSR markers, 72 (72%) and 71 (71%) of markers were polymorphic between *O. officinalis* vs. 'TCS10' and 'TNG67', respectively; 57 (76%) and 53 (79%) of markers were polymorphic between *O. australiensis* vs. 'TCS10' and *O. australiensis* vs. 'TNG67', respectively. To effectively obtain polymorphic markers, the BES (BAC end sequence) of wild and the genome sequence of ssp. *japonica* cv. 'Nipponbare' were aligned to search for indel markers flanking with conserved sequences. A total of 123 markers had been developed, and 109 (89%) and 103 (84%) markers could be amplified successfully in *O. officinalis* and *O. australiensis*, respectively. Among which, 79 (72%) and 82 (75%) of markers were polymorphic between *O. officinalis* vs. 'TCS10' and 'TNG67', respectively; 64 (62%) and 65 (63%) of markers were polymorphic between *O. australiensis* vs. 'TCS10' and *O. australiensis* vs. 'TNG67', respectively. From genotypes of BC₁F₁ and BC₂F₁ populations derived from *O. officinalis* × 'TNG67', the ratio of heterozygotes was 86.7% (BC₁F₁) and abruptly decreased to 18.1% (BC₂F₁). It indicated that the chromosome segments of wild rice were excluded rapidly in backcrossed progenies, implying that it is very difficult to develop a complete chromosome segment substitute line (CSSL) population, which carried the chromosome segment from different genome of wild species into *O. sativa* background.

Key words: Molecular marker, Transferability, Rice, Wild rice.

Received: January 15, 2015; Accepted: March 29, 2015.

* Corresponding author, e-mail: charngpei@tari.gov.tw

¹ Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

² Graduate students, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

³ Assistant Research Fellows, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.