

# 應用分子輔助回交選育梗稻多粒數品系之探討

賴明信<sup>1</sup> 李長沛<sup>2</sup> 卓緯玄<sup>2</sup> 顏信沐<sup>2</sup> 胡凱康<sup>3</sup> 吳東鴻<sup>2,\*</sup>

## 摘要

賴明信、李長沛、卓緯玄、顏信沐、胡凱康、吳東鴻。2016。應用分子輔助回交選育梗稻多粒數品系之探討。台灣農業研究 65(1):31-44。

水稻粒數屬於數量性狀且無法於生育早期進行選拔，並需透過重複性田間試驗才能估計選拔效應；對此，為了加強籼、粳稻間的產量基因聚合效率並驗證目標基因座的效益，本試驗利用分子輔助回交法，將多粒數對偶基因 (*Ha-Gn1*) 由籼稻 'Habataki' 導入國內具有良好食味的粳型稻「台農 71 號」('Tainung 71' or 'TNG71') 中，藉以評估該基因在台灣品種背景下之產能效益。近同源系選育過程中，分別使用位在 *Gn1* 基因座旁 6 個連鎖標幟作為前景選拔使用，另背景選拔共分析 152 個 SSR 與 InDel 標幟使其標幟間距可達 10.8 cM。基因型分析結果顯示，除了第 1 號染色體短臂上帶有 *Gn1* 基因座約 30 cM 的長度外，該 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 後裔台農 71 號 *Gn1* 品系 (TNG71-*Gn1*) 已大多回復為「台農 71 號」的遺傳背景；而該植株的外觀農藝性狀，舉凡抽穗期、穗數與株高等均與輪迴親「台農 71 號」相似，僅每穗粒數較「台農 71 號」提升了 26%，由 105.2 (± 37.4) 增加為 133.1 (± 61.9) 粒。此外，另採用「台農 71 號」第 1 號染色體階層片段置換系，進一步觀察同在第 1 條染色體短臂區域上的粒數基因中 *Gn1a*、*Gn1b* 基因座與其 2 次枝梗數基因座 *qSBN1* 對於穗形結構與穎花數的關係。結果顯示，*Gn1a* 多粒數基因座並不影響 1 次枝梗粒數，主要係提升 2 次枝梗粒數且增加 2 次枝梗平均粒數，而非全面性提升每穗所有枝梗上的粒數。另上游區間 *Gn1b* 基因座，則係影響 2 次枝梗數，使得每穗粒數增加。藉此亦顯示，2 次枝梗數基因座 *qSBN1* 可細分為 2 個子基因座，對 2 次枝梗數的影響分別在兩親本間可達 38.4% 與 11.7%。上述成果，將有助稻作產能相關聚合育種以及穗形結構之選育基礎，應用分子輔助育種提升我國稻作產能。

**關鍵詞：**水稻、粒數、分子輔助回交、產量。

## 前言

稻作產量構成涵蓋每株穗數、每穗粒數、稔實率與千粒重等要素，若能提升任一性狀均對產能具有正面效應，其中以每株穗數及每穗粒數影響尤甚 (Lin 1990)。然分蘖數過多容易造成下位葉的遮蔽效應，穀粒過大則易導致心腹白比例過高，故以提升粒數作為增產潛力初步目標。每穗粒數屬於數量性狀且無法於生育早期進行選拔，並需透過重複性試驗設計才能估計選拔效應。另產量性狀在早期世代的遺傳

率不高、選拔效率不彰，甚至須花費龐大人力、物力等田間試驗資源在後裔檢定上。過去 20 年來，數量性狀基因座 (quantitative trait locus; QTL) 定位分析已經廣泛應用在各類水稻種原上，探索產量等重要農藝性狀，且已發現一系列與產量性狀基因座，並藉由據圖選殖策略挖掘出相關調控基因；例如，*Gn1a* 基因座係控制每穗粒數的基因座，亦發現該基因座編碼細胞分裂素氧化酶 (*OsCKX2*) (Ashikari *et al.* 2005)。除了 *Gn1a* 基因座外，也陸續發掘

投稿日期：2015 年 5 月 20 日；接受日期：2015 年 6 月 30 日。

\* 通訊作者：dhwu@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 國立台灣大學農藝學系副教授。台灣 台北市。

出 *DEP1* (Huang *et al.* 2009)、*WFP* (Miura *et al.* 2010)、*APO1* (Ikeda *et al.* 2007; Terao *et al.* 2010) 與 *OsSPS1* (Hashida *et al.* 2013) 等均有助提升每穗枝梗數，而有關穀粒長度、寬度及充實能力等相關基因亦被挖掘出來 (Song *et al.* 2007; Shomura *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008)。為了顯著提高產能，也有學者提出藉由堆疊多個有益基因的選育策略，亦已有了建立相關產量基因選育模式的具體成果 (Ashikari & Matsuoka 2006; Ando *et al.* 2008; Ohsumi *et al.* 2011)，並確認該基因的產能效益將日漸重要。

增加穎花數係提升產量的另一項最直接途徑，若能最佳化穗部內各構成要素間的平衡關係將有助提升穎花數，其中穎花數又與各級枝梗數與枝梗著粒密度息息相關。前人利用 'Habataki'/'Koshihikari' 中 96 個  $BC_1F_6$  後裔進行每穗粒數 QTL 定位分析，發現到第 1 號染色體短臂上 *Gn1* 基因座具有 44% 變異解釋量。再進一步利用 *Koshihikari-Gn1* 近同源系進行精細定位，發現 *Gn1* 區間中可細分為 *Gn1b* 基因座與 *Gn1a* 基因座，且兩者對於粒數貢獻效應彼此相當，也完成將 *Gn1a* 基因座精簡至 2 cM 以內與據圖選殖分析 (Ashikari *et al.* 2005)。在穗形結構上，於 2008 年每穗小枝梗數研究中曾利用 'Sasanishiki'/'Habataki' 組合上的 39 個染色體片段置換系品系，發掘出分別位於第 1 號染色體短臂上的 2 次枝梗數基因座 *qSBN1*，以及第 6 號染色體上的 1 次枝梗數基因座 *qPBN6* 等兩主效基因座，分別能提升 2 次枝梗數與 1 次枝梗數進而增加穎花數 (Ando *et al.* 2008)。然 2 次枝梗數基因座 *qSBN1* 與 *Gn1* 粒數基因座相互重疊，該區間有助提升穎花數與 2 次枝梗數，惟 *Gn1a*、*Gn1b* 與 *qSBN1* 基因座 3 者間對於各級枝梗數與枝梗著粒密度的相互關係，仍待進一步確認。

稈稻與秈稻兩亞種在產量構成要素以及外觀株型上具有不同形態特徵，稈稻具有較佳株型與劍葉形態，秈稻多為穗大、籽粒多、葉片寬大且長而下垂。近年來日本、韓國、中國大陸及國際稻米研究所利用不同生態型亞種間雜交，融合兩方優點認為比品種間的雜種較具有

生物學優勢 (Peng *et al.* 2008)，亦具擴大遺傳多樣性的優點。然而，秈稻雜交時常受到諸多因素的干擾不易選拔，諸如：雜交後裔穩定性較差、籽粒充實不良及生育期太長等瓶頸，而且秈、稈稻雜交後裔面臨高度分離，必須維持更高選拔族群數才得以獲得優良後裔。

本研究為了加速兩亞種間高產能基因滲入並維持優良米質背景，擬開發多粒數 *Gn1a* 多粒數功能性標幟作為前景選拔，並搭配全基因組 InDel 標幟進行背景選拔，將秈稻多粒數基因回交轉移至國內良質米品種中，評估多粒數基因座 *Gn1* 的產能貢獻程度。另將在第 1 條染色體短臂區域上，採用階層式逐步增減提供親片段的模式，加強目標區間內 QTL 的定位解析能力，便於重複評估 QTL 效應，並進一步確認同一區間上粒數基因中 *Gn1a*、*Gn1b* 基因座與其 2 次枝梗數基因座 *qSBN1* 對於穗形結構與穎花數的關係，作為日後稻作產能以及穗形結構之選育基礎。

## 材料與方法

### 試驗材料

本試驗回交後裔以稈稻「台農 71 號」為輪迴親，以日本秈稻品種 'Habataki' 作為提供親；其中「台農 71 號」自 2000 年命名以來，皆被列為全台前十大優良推薦品種，具有芋頭香味、米質優良、株型良好等優點。但其生育期、產量略低於豐產品種，抽穗後期老化速度快且易倒伏。秈稻 'Habataki' 係於 1989 年命名，係日本北陸農業試驗場因執行「超多收作物之開發與栽培技術確立」相關農業政策 (1981–1988 年) 育成具超高產特性之秈稻品種。該品種為極穗重型品種，屬於多粒數基因型以 *Ha-Gn1* 符號代表，稈長約 78 cm、耐倒伏且具中等穗上發芽耐受性，且生育後期老化慢、光合作用效率強 (Kobayashi *et al.* 1990)。

台農 71 號 *Gn1* 品系選育係以輪迴親「台農 71 號」為父本，提供親 'Habataki' 為母本，在 2008 年第 2 期作建立雜交組合，連續經過 3 次回交與 1 次自交，產生  $BC_1F_1$ 、 $BC_2F_1$ 、 $BC_3F_1$  與  $BC_3F_2$  後裔。其後每一世代均在溫室

中先經過 *Gn1a* 功能性標幟與 5 個連鎖標幟進行前景選拔挑選目標基因型，與 152 個全基因組標幟作為背景選拔，每一世代均針對上一世代尚未回復成輪迴親的染色體區間進行篩檢，並挑選遺傳背景具有「台農 71 號」比例最高前 3 者進行回交避免雜交失敗 (圖 1)。

「台農 71 號」第 1 號染色體置換系與其階層片段置換系選育，則由上述 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 後裔中挑選具有第 1 號染色體完整程度最高者為目標，反覆進行回交提高背景回復率，直至 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 世代挑選出第 1 號染色體置換系 TARI71\_1。續針對第 1 號染色體短臂前約 30 cM 長的區域，在 BC<sub>3</sub>F<sub>2,3</sub> 世代中挑選 4 個品系依序置換不等提供親染色體片段的品系，分別遞增「台農 71 號」短臂片段終至粒數基因座 *Gn1a*，命名為 TARI71\_1\_1 至 TARI71\_1\_4 等 4 個品系，用以評估該區間上目標基因座對於穗形結構與穎花數的關係 (圖 2)。

### 專一性標幟設計與核酸分析

本試驗用以前景選拔粒數之功能性標幟，係針對文獻所示 *Gn1a* 基因座 5'UTR 區域上

16 bp 的 InDel 多型性 (Ashikari *et al.* 2005)，由水稻基因註解資料庫 (The Rice Annotation Project Database; RAP-DB) 下載梗稻 *Gn1a* 基因座上所編碼 *OsCKX2* 序列 (Os01g0197700)，另至美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information) 下載該基因坐落第 1 條染色體之 BAC 序列 (AP003200)，匯入 BioEdit 編輯軟體 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) 進行序列排列後，藉由 Primer Premier 5 軟體 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) 引子設計軟體設計專一性引子。而監控背景回復率所需 InDel 標幟，則參考 Wu *et al.* (2013) 全基因組 InDel 套組，並在部分長距離區間中增補 SSR 標幟加強選拔。專一性引子與輔助背景選拔標幟，均經兩親本「台農 71 號」與「Habataki」多型性篩選，而為使多型性標幟在全基因組能均勻分布，將所得多型性標幟利用 BLAST 套件將其引子序列對應至所屬 PACs/BACs 確認 IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) 網站 Build 5 版的物理圖譜位置，再依 IRGSP 網站 Build 5 所公布各染色體上 PACs/BACs 對應於「Nipponbare」/「Kasalath」遺傳圖譜資訊 (Harushima *et al.* 1998; IRGSP 2005)，將所有多型性標幟的物理位點轉換成遺傳圖譜位置，便於推估分子標幟間可能的遺傳距離、有效監控遺傳重組區間。遺傳背景回復率估算則以植株整體攜有輪迴親遺傳距離總長之百分比為基礎，其中由各分子標幟所坐落相鄰區間之平均長度累計輪迴親遺傳總長，並視輪迴親同質結合體基因型或異質結合體基因型分別給予加權係數 1 或 0.5 進行統計。

葉片基因組 DNA 萃取如 Wu *et al.* (2013) 所描述；PCR 的反應條件為 94°C 2 min；94°C 30 s、55°C (依黏合溫度最佳化測試結果可改為 50°C 或 60°C) 20 s、72°C 30 s，循環 2 次；94°C 20 s、55°C (50°C 或 60°C) 15 s、72°C 20 s，循環 30 次 (因不同分子標幟的擴增效率不同，將正負加減 2 次循環)；72°C 3 min；反應結束後以 4°C 保存擴增產物。PCR 產物進行電泳分析時，為提高膠體上之電泳功率，僅讓電泳液與膠體兩端接觸即可，避免 1× 電泳緩衝液淹

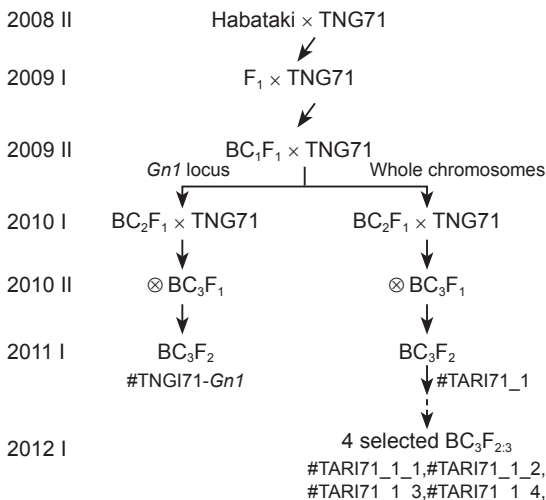


圖 1. 運用分子輔助回交選育將「Habataki」的 *Gn1* 片段與第 1 號染色體上各不同染色體片段長度導入「台農 71 號」中之選育流程圖。

Fig. 1. The breeding scheme of introgression of *Gn1* and different segment lengths of chromosome 1 from 'Habataki' to 'Tainung 71' by marker-assisted backcross selection.

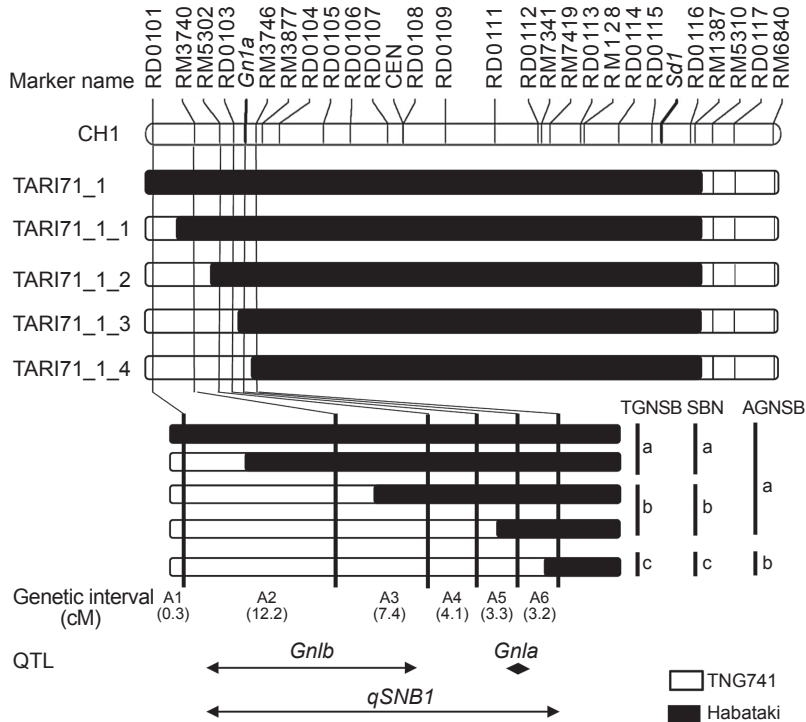


圖 2. 圖解「台農 71 號」第 1 號染色體置換系與其階層片段置換系之遺傳組成，並在 2 次枝梗總粒數、2 次枝梗數與 2 次枝梗平均粒數上以相同字母代表品系間不具顯著差異。

Fig. 2. Graphical genotypes of the 'TNG71' stepped aligned inbred recombinant lines on chromosome 1. Means within TGNSB, SBN and AGNSB followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

沒膠體，於 26 cm × 26 cm 之 3% Agarose I 膠體上以 350 伏特 (15 V cm<sup>-1</sup>) 進行電泳。

### 產量與農藝性狀評估

稻穀產量評估試驗在行政院農業委員會農業試驗所水稻試驗田進行，其中台農 71 號 *Gnl* 多粒數品系產能評估，以「台農 71 號」與 'Habataki' 兩雜交親本為對照品種，在 2011 年第 2 期作進行 2 重複 4 行區，每小區種植 100 株，行株距 30 cm × 15 cm (小區面積為 4.5 m<sup>2</sup>)。栽培期間使用硫酸銨及台肥複合肥料 39 號，試區氮素施用量達 120 kg ha<sup>-1</sup>，施用量分為 1 次基肥、2 次追肥及穗肥共 4 次平均施用。磷鉀施用量係 72 kg ha<sup>-1</sup>，在基肥 1 次施用；氧化鉀施用量達 48 kg ha<sup>-1</sup>，以基肥及穗肥施用。病蟲害防治及其他田間管理，則依一般慣行法實施。小區稻穀產量係機械脫粒並經 1 次風選後，記錄乾穀重量及含水量，再

以穀粒水分含量 13% 為基準估算單位面積產量。產量構成要素，係每小區取樣 4 株進行考種調查。另每株取最高 3 穗主穗，供後續主要強勢穗上的粒數調查。各性狀多重比較檢定，係採 Fisher 的最小顯著差異性測驗 (Fisher's protected least significant difference test; LSD test)，進行所有處理平均值間的兩兩比較。

「台農 71 號」染色體置換系與其階層片段置換系，在 2012 年第 2 期作進行品系培育，分別移植「台農 71 號」第 1 號染色體置換系 TARI71\_1 與另外 4 個不等片段置換系，品系移植作業與田間栽培管理均同上述調查。每品系均種植 3 行區、每行 10 株，性狀調查以中間行 8 株為主，待成熟期後每株取 3 穗主穗供後續目標性狀調查。調查性狀包括每穗粒數、1 次枝梗總數、2 次枝梗總數、1 次枝梗總粒數、2 次枝梗總粒數、1 次枝梗平均粒數與 2

次枝梗平均粒數，性狀統計分析亦以 Fisher 的最小顯著差異性測驗進行多重比較。

## 結果

### 全基因組多型性標幟篩檢

由已開發的 506 個 InDel 標幟 (Wu *et al.* 2013)，在「台農 71 號」與「Habataki」間全基因組篩選獲得 118 個 InDel 多型性標幟，另再使用 39 個 SSR 標幟填補部分較大間距的區間。為推估各分子標幟的遺傳間距，以期有效監控各區間發生遺傳重組的狀況，依所有標幟的物理位點標註其所坐落的 BAC，再採該標幟之 BAC 對應於已知「Nipponbare」/「Kasalath」連鎖圖譜之相對遺傳位點。結果顯示，整體基因組平均每標幟間距 10.8 cM 遺傳距離，而物理距離約為 2.6 Mb，最大區間於第 6 條染色體約為 26 cM。在多粒數基因座 *Gn1a* 前景選拔，本試驗自行開發 *Gn1a* 功能性專一性標幟 (F: 5'-CCTGCTCTTGCTTCATTATC-3', R: 5'-CACCTTGTCCTTCTACAAT-3')，另搭配 RD0101、RM3740、RM5302、RD0103 與 RM3746 等 5 個分子標幟分別均勻散布第 1 條染色體短臂上。用以偵測輪迴親回復程度之背景選拔標幟，則使用上述 152 個 InDel 與 SSR 標幟廣泛分布於全基因組上，其平均遺傳距離小於 12.5 cM (圖 3)。

### 導入系輔助選育歷程

多粒數品系台農 71 號 *Gn1* 選育過程分述如下：於 2008 年第 2 期作建立雜交組合，隔年第 1 期作繁殖種植 30 株  $F_1$  後裔用以生產回交族群，均經 *Gn1a* 功能性標幟與兩側連鎖標幟確認  $F_1$  單株。2009 年第 2 期作培育 98 株  $BC_1F_1$  回交後裔，先經過前景選拔篩選出 50 株攜有目標基因之植株後，並將 152 個分子標幟分成 3 階段作為背景逐步篩選。第 1 階段先以平均區間 30 cM 粗略區間為篩選基礎，先以 61 個分子標幟確認 50 株目標植株的遺傳背景，第 2 階段再取出前 10 株攜有較多輪迴親背景者，提高篩選密度再補充 61 個分子標幟之遺傳組成，達成篩選區間長度仍維持 12.5 cM。首先挑選出背景回復率前 3 高者生

產  $BC_2F_1$  回交種子，針對這 3 株已生產回交後裔的植株再分析 30 組 SSR 標幟加強確認遺傳背景，該世代分析反應數約 4,338 組，而最終考量較多回交種子數與背景回復率者，選出單株背景回復率達 67.4% 者，供世代推進及背景回復率的計算。2010 年第 1 期作培育 60 株  $BC_2F_1$  回交後裔，亦先經過前景選拔後，獲得其中 32 株再經上一代未回復為輪迴親的 97 個分子標幟進行背景回復率分析，挑選出目標植株生產  $BC_3F_1$  回交種子，該世代分析反應數約 3,464 個。淘汰雜交種子數不足者，再選出單株背景回復率達 81.9% 者供下一世代備用。2010 年第 2 期作培育 60 株  $BC_3F_1$  回交後裔，重複上述篩選步驟後，再經尚未回復輪迴親背景 47 個分子標幟進行背景回復率分析，挑選出目標植株生產  $BC_3F_2$  自交種子，該世代分析反應數約 1,676 個，又從整體平均背景回復率為 87.4% 中挑選出最佳單株者 (背景回復率達 92.6%)。而 2011 年第 1 期作培育 150 株  $BC_3F_2$  分離後裔，亦經前景選拔與背景選拔等階段分析固定「台農 71 號」近同源系之遺傳背景，基因型分析規模達 1,500 個。最後，同時考量攜有目標基因與株高、劍葉等優良株型下選出台農 71 號 *Gn1* 多粒數品系，2011 年第 2 期作進行產量觀察試驗 (表 1)。

「台農 71 號」第 1 號染色體置換系與其階層片段置換系選育，則由上述 2009 年第 2 期作  $BC_1F_1$  後裔中挑選具有第 1 號完整染色體者，反覆進行回交提高背景回復率，直至 2011 年  $BC_3F_2$  世代挑選出第 1 號染色體置換系 TARI71\_1，僅長臂端點處長約 24.6 cM 已在世代推進中遺失。再針對第 1 號染色體短臂前約 30 cM 長的區域，分別以 2 個 InDel 標幟 RD0101 與 RD0103、3 個 SSR 標幟 RM3740、RM5302 及 RM3746 與 *Gn1a* 粒數功能性標幟，可將該區域再細分為 A1–A6 等 6 個區間。分別選育在 A1 至 A6 區間中發生置換片段長度不等的染色體片段置換系，在  $BC_3F_2$  世代中挑選 4 個品系依序置換不等提供親染色體片段且維持異質結合體狀態，但長臂等區域均固定提供親組成呈現同質結合體狀態者，2012 年第一期作各置換族群在  $BC_3F_{2,3}$

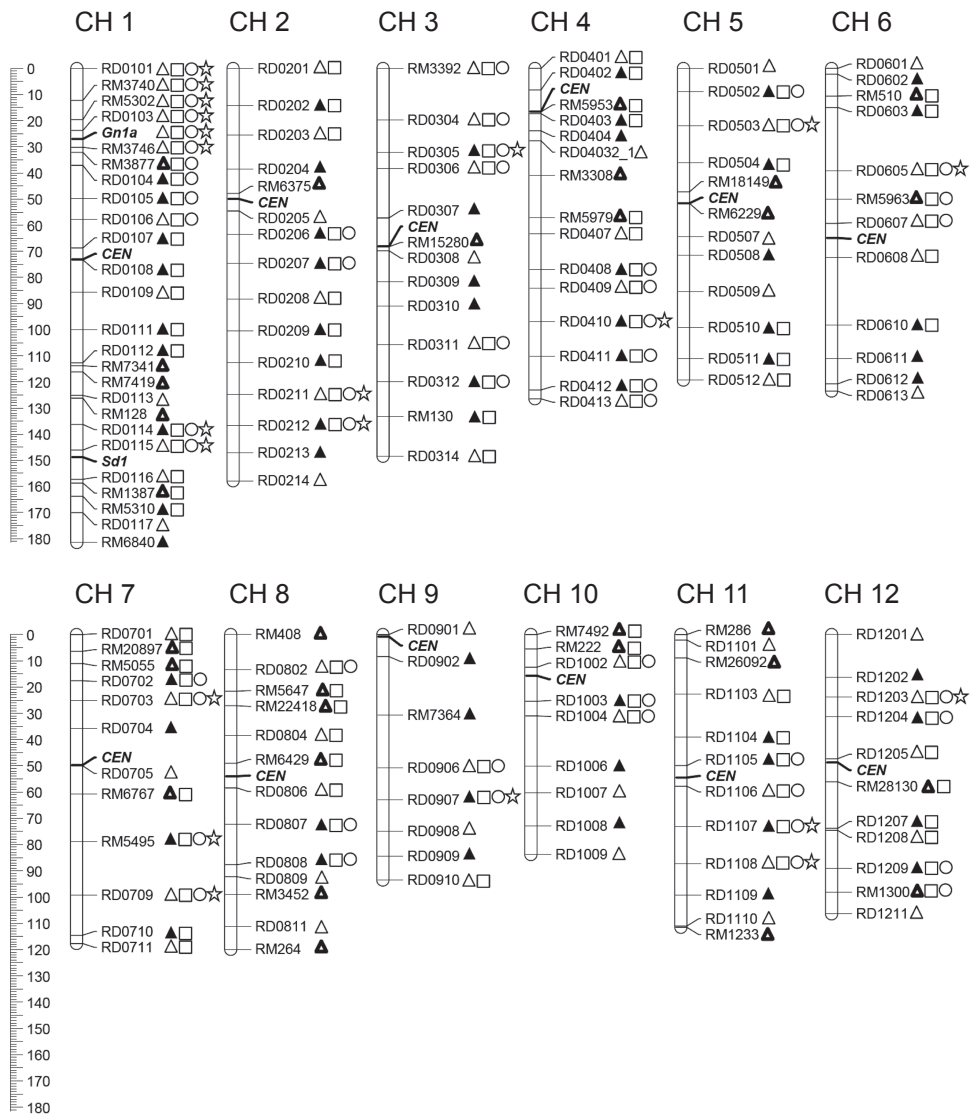


圖 3. 本試驗在「台農 71 號」與「Habataki」間親本多型性使用 118 個 InDel 與 39 個 SSR 標幟，而各標幟遺傳位點則利用所有分子標幟的引子序列所坐落的 PACs/BACs，將其物理位點歸納至 IRGSP 網站上所示各 PACs/BACs 在「Nipponbare」/「Kasalath」遺傳圖譜上。各標幟字頭分別以 RD 與 RM 代表 InDel 以及 SSR 標幟。其中台農 71 號 *Gn1* 品系各世代選育所使用標幟分別以三角形、方形、圓形以及星形代表  $BC_1F_1$ 、 $BC_2F_1$ 、 $BC_3F_1$  與  $BC_3F_2$  世代，而  $BC_1F_1$  世代中第 1、2 及 3 階段篩選標幟又以白色、黑色與黑粗邊區分。

**Fig. 3.** Parental polymorphism survey identified 118 InDel and 39 SSR polymorphic markers between 'TNG71' and 'Habataki'. All markers were assigned to the linkage map of 'Nipponbare'/'Kasalath' based on the primer sequences of markers by blasting against PACs/BACs, which were integrated to the linkage map by IRGSP. The prefixes RD and RM indicated InDel and SSR markers, respectively. Different marker symbols indicated by triangles, squares, circles and stars were applied to  $BC_1F_1$ ,  $BC_2F_1$ ,  $BC_3F_1$ , and  $BC_3F_2$  generation of TNG71-*Gn1*, respectively. The three triangle colors indicated by white, black and black edge were applied for the first, second and third step of  $BC_1F_1$  background selection.

世代均種植 24 株。最後從中挑選已置換回復成「台農 71 號」組成的品系，依序遞增「台農

71 號」短臂片段終至粒數基因座 *Gn1a*，命名為 TARI71\_1\_1 至 TARI71\_1\_4 等 4 個品系(圖 2)。

表 1. 多粒數品系台農 71 號 *Gnl* 選育歷程與各世代篩選規模。**Table 1.** The experimental scale to develop the 'TNG71' near-isogenic lines carrying high grain number *Gnl* allele in each generation.

Season	Generation	Background recover rate	Population size	Genotyping assay <sup>z</sup>		
				Foreground	Background	Total
2008 2nd	Crossing	-	Each 30	-	-	-
2009 1st	F <sub>1</sub>	-	30	90	-	90
2009 2nd	BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	67.4%	98	588	3,750	4,338
2010 1st	BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	81.9%	60	360	3,104	3,464
2010 2nd	BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	92.6%	60	360	1,316	1,676
2011 1st	BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub>	98.0%	150	900	600	1,500
2011 2nd	Yield trial	-	-	-	-	-

<sup>z</sup> Foreground: foreground selection reaction; background: background selection reaction; total: total reaction.

### 多粒數品系農藝特性與產能評估

多粒數品系台農 71 號 *Gnl*，於 2011 年第 2 期作稻穀產能評估試驗中，全生育日數為 104 d 與輪迴親「台農 71 號」相同，較提供親「Habataki」延後 4 d。在每穗粒數上達 133.1 粒，而主要強勢穗上平均粒數為 220.3 至 267.0 粒，然「台農 71 號」僅每穗平均具 105.5 粒，其主要強勢穗上平均粒數為 180.0 至 175.7 粒，顯示在目標性狀上獲得顯著遺傳增進。台農 71 號 *Gnl* 品系在每公頃產量上僅獲得 5,536 kg，相較於「台農 71 號」(5,312.2 kg ha<sup>-1</sup>) 只提升產能 4.2%。回顧產量構成要素，可見台農 71 號 *Gnl* 品系的平均穗數 15.8 穗，千粒重 (23.77 g)、粒長 (2.13 cm) 與粒寬 (0.35 cm) 等均與「台農 71 號」相近，歸咎主因係充實率不佳只達 63–65.6% (表 2)。在株高與穀粒外觀上，台農 71 號 *Gnl* 株高由 109.1 cm 下降至 104 cm，稻穀平面積為 0.2 cm<sup>2</sup> 與「台農 71 號」(0.22 cm<sup>2</sup>) 相似 (表 2、圖 4)。

### 「台農 71 號」階層片段置換系粒數性狀評估

「台農 71 號」第 1 號染色體置換系 (TARI71\_1) 攜有「Habataki」粒數 *Gnl* 與半矮性 *Sdl* 基因，主穗平均粒數可達 202.1 粒。另在穗形結構上可見 1 次、2 次枝梗數各為 9.6 與 45.4 枝，而各枝梗類型上平均粒數分別為 5.37 與 3.36 粒 (表 3)。而品系 TARI71\_1\_1 至 TARI71\_1\_4，則是隨著置換「台農 71 號」片段長度增加，可見主穗平均粒數、2 次枝梗數與 2 次枝梗平均粒數均呈現下降趨勢，主穗平均粒數由 207.8 粒下降至 138.1 粒，其中 1 次枝梗數 (9.6–9.2 枝) 與 1 次枝梗粒數 (5.75–5.37 粒) 均穩定維持相近狀態。然觀察品系間主穗平均粒數下降幅度較大，分別出現在品系 TARI71\_1\_3 以及 TARI71\_1\_4 上，在品系 TARI71\_1\_2 已因每穗 2 次枝梗數由 45.4 減少為 41.9 枝，使得主穗平均粒數減少為 194.2 粒，品系 TARI71\_1\_3 與品系 TARI71\_1\_1 相

表 2. 台農 71 號 *Gnl* 多粒數品系 2011 年第 2 期作產量構成要素與生育特性。**Table 2.** Comparisons of heading date, yield, and yield components between TNG71-*Gnl* and its parents. Data was collected in the second cropping season in 2011.

Variety (line)	Maturity days	Plant height (cm)	Panicle number	Spikelet/panicle	Spikelet fertility (%)	1000-grain weight (g)	Estimated yield (kg ha <sup>-1</sup> )
Habataki	100 b <sup>z</sup>	97.7 b	14.2 ab	140.8 a	72.8 b	21.6 b	5,816.3 a
TNG71- <i>Gnl</i>	104 a	104.0 ab	15.8 a	133.1 b	64.7 c	23.8 a	5,536.0 b
TNG71	104 a	109.1 a	12.7 b	105.5 c	78.8 a	23.9 a	5,312.2 b

<sup>z</sup> Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

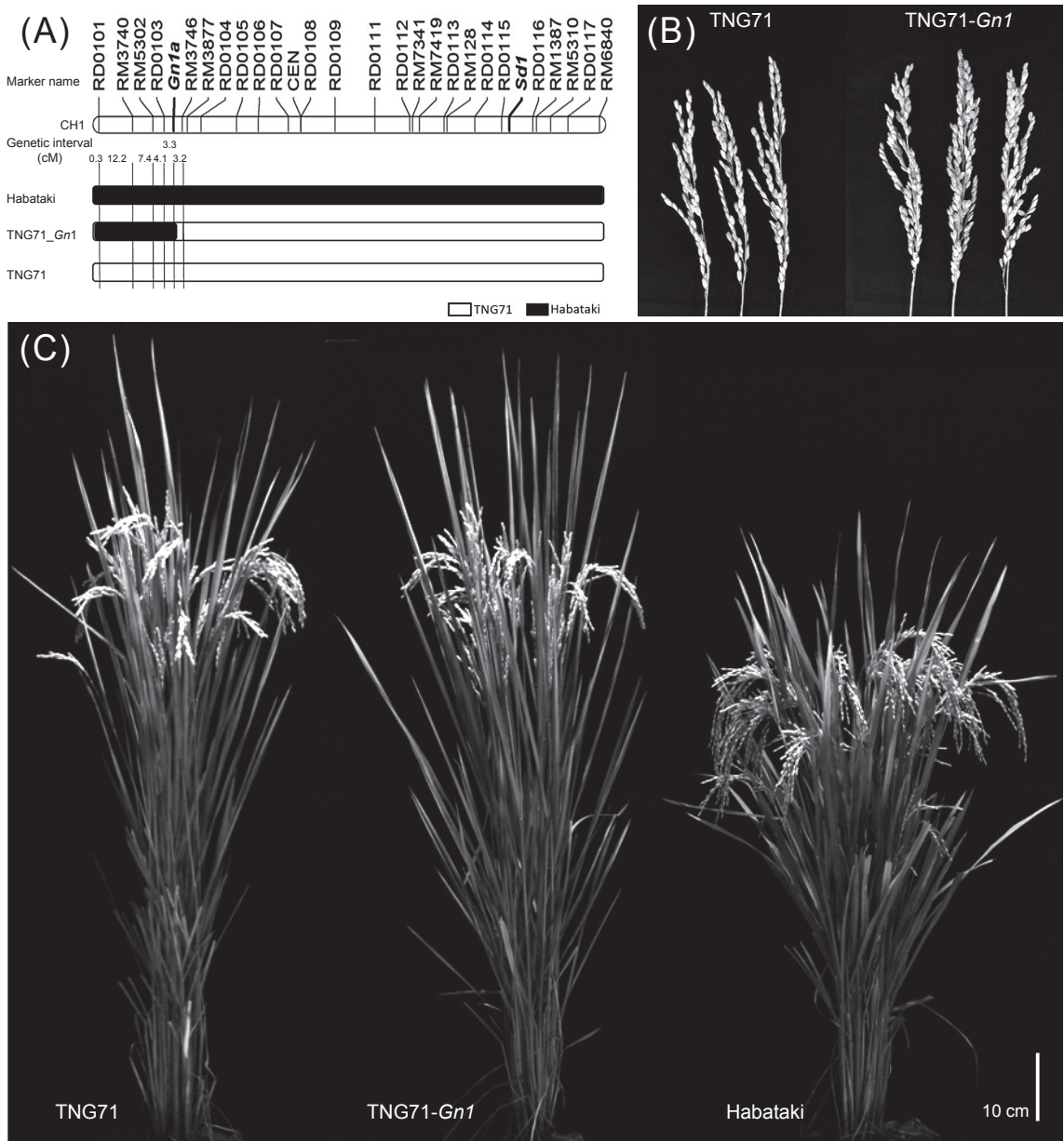


圖 4. 台農 71 號 *Gn1* 多粒數品系與其兩親本之基因型圖解以及成熟期株型紀錄。(A) 各品系基因型組成；(B) 多粒數品系台農 71 號 *Gn1* 與輪迴親「台農 71 號」稻穗表現；(C) 多粒數品系台農 71 號 *Gn1* 與兩親本之株型。

**Fig. 4.** Graphical genotypes and morphological characteristics of TNG71-*Gn1* and its parents. (A) Graphical genotypes of each material for *Gn1* locus. (B) Comparison of panicle performance between novel line (TNG71-*Gn1*) and recurrent parent ('TNG71'). (C) Comparison of plant types between novel line (TNG71-*Gn1*) and recurrent parent ('TNG71').

較之下，2 次枝梗平均粒數維持在 3.28 粒，然主穗平均粒數減少粒數達 20.8 粒，係因每穗 2 次枝梗數由 45.3 下降為 41.7 枝；而品系 TARI71\_1\_3 與品系 TARI71\_1\_4 比較下，主

穗平均粒數由 186.9 粒減少為 138.1 粒，分別在 2 次枝梗數上由 136.7 枝減少為 85.3 枝，以及 2 次枝梗平均粒數由 3.28 粒下降至 2.84 粒 (表 3)。

表 3. 「台農 71 號」第 1 號染色體置換系與其階層片段置換系在 2012 年第 2 期作之穗形結構變化。

Table 3. Comparisons of traits related to panicle architecture among 'TNG71' stepped aligned inbred recombinant lines. Data were collected in the second cropping season of 2012.

Breeding line	AGNMP <sup>z</sup>	TGNPB	TGNSB	PBN	SBN	AGNPB	AGNSB
TARI71_1	202.1 a <sup>y</sup>	51.3 a	150.9 a	9.6 a	45.4 a	5.37 a	3.36 a
TARI71_1_1	207.8 a	54.5 a	153.3 a	9.7 a	45.3 a	5.60 a	3.45 a
TARI71_1_2	194.2 ab	53.3 a	141.0 b	9.6 a	41.9 b	5.52 a	3.36 a
TARI71_1_3	186.9 b	50.1 a	136.7 b	9.3 a	41.7 b	5.40 a	3.28 a
TARI71_1_4	138.1 c	52.7 a	85.3 c	9.2 a	30.2 c	5.75 a	2.84 b

<sup>z</sup> AGNMP: average grain number of main panicle; TGNPB: total grain number of primary branch; TGNSB: total grain number of secondary branch; PBN: primary branch number; SBN: secondary branch number; AGNPB: average grain number of primary branch; and AGNSB: average grain number of secondary branch.

<sup>y</sup> Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

藉由各品系間置換「台農 71 號」的不等染色體片段，在第 1 號染色體短臂前 30 cM 分別採用 5 個分子標幟與 1 個 *Gn1a* 功能性標幟，將此區段區劃分成 6 個區間，並由各品系間的性狀顯著性分析可知，在每穗粒數、2 次枝梗總粒數 (total grain number of secondary branch; TGNSB)、2 次枝梗平均粒數 (average grain number of secondary branch; AGNSB) 與 2 次枝梗數 (secondary branch number; SBN) 在品系間存有顯著性差異，且隨著品系間的「Habataki」導入片段逐漸減少，發現 2 次枝梗總粒數與 2 次枝梗數在品系間的平均值出現過 2 次轉折差異，而 2 次枝梗平均粒數在品系間則僅出現 1 次變異。已知 *Gn1a* 基因座位於 A5–A6 區間下，且 *Gn1b* 基因座在其上游，由此可推知 *Gn1b* 基因坐落在 A2–A3 區間中。*Gn1a* 基因座會同時影響 2 次枝梗平均粒數與 2 次枝梗數，進而提升 2 次枝梗總粒數與每穗粒數，但 *Gn1b* 基因座對於 2 次枝梗總粒數的貢獻則僅來自於 2 次枝梗數的變異。另僅考量 2 次枝梗數，亦發現在各品系間的差異有類似 2 次轉折變異的趨勢，顯示 *qSBN1* 基因座符合文獻坐落於 A2–A6 區間中且可細分為 2 個子基因座 (圖 2)。

## 討論

持續提高稻穀產能，一直係稻作改良目標中重要的一環，隨著生物技術與相關遺傳研究日漸普及，並將落實分子輔助篩選技術至育種

程序中，增加試驗資源的利用效率與運用彈性。然目標 QTL 在分子輔助育種運用上遭遇 3 種問題，其一在定位族群中所發現的有益對偶基因是否能運用在育種品系上且順利表現；其二是 QTL 的信賴區間可能過大無法適用於輔助選育上，而且個別 QTL 的效應相對上比較小的話，可能會造成改良效應不彰；其三則是堆砌不同性狀的 QTL 時，因上位效應關係導致改良效果不彰 (Ashikari & Matsuoka 2006; Collard & Mackill 2008)。過去對於稻穀產量或相關構成要素等性狀已累積相當豐厚的遺傳訊息 (Bai *et al.* 2012; Huang *et al.* 2013; Ikeda *et al.* 2013)，回顧過去藉由 MAS 技術協助改良稻穀產能的成功範例，多是仰賴改良由主效基因控制的病蟲害、生育日數或是耐逆境等 (Zhou *et al.* 2003; Chen *et al.* 2004; He *et al.* 2004; Joseph *et al.* 2004; Sharma *et al.* 2004; Tan *et al.* 2005; Neeraja *et al.* 2007; Chen *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2014; Lin *et al.* 2014)，相較之下對於直接改良產量構成要素的研究則較受限 (Ashikari *et al.* 2005; Ando *et al.* 2008; Wang *et al.* 2012; Zong *et al.* 2012)，此亦是本文所要努力之處。對於稻穀產量般的複雜數量性狀，可能受到不同遺傳背景、栽培環境或構成要素間的補償效應導致產能無法如預期提升，因此對於已知基因仍需進一步驗證其改良效應。以本篇成果作為初期基礎，冀望逐漸堆疊多個累加效應的 QTL，以達到顯著的改良效果 (Guo & Ye 2014; Wang *et al.* 2014)。

Yan *et al.* (2009) 研究中亦針對每穗粒數 *Gn1a*、粒長 *GS3* 與粒寬 *GW2* 基因座設計功能性標幟，其中分析 156 個籼、粳稻種原，發現 121 份粳稻中僅 21.5% 帶有 *Gn1a* 對偶基因，兩亞種間偏低的滲入比率顯示此類有助於提高產量構成要素的基因尚未被廣泛運用。Sun *et al.* (2012) 分析 1963–2008 年間東北地區 78 個主要粳稻品種，也顯示僅只有 2 個粳稻品種攜有 *Gn1a* 對偶基因。推測過去育種程序中儘管選用具有該優良基因的籼稻親本，但粒數屬於數量性狀僅仰賴形態選拔，導致該基因不易保留在雜交後裔中。有鑒於此，本研究已成功將籼稻產量基因藉由分子輔助選拔逐漸滲入國內粳稻栽培背景中，有助加速國內選育聚合亞種間的優良基因型組合。

在日本栽培環境中顯示，「越光」(‘Koshihikari’) 背景下的 *Gn1* 近同源系在每穗粒數可提升 45%，而每株總粒數則可以提升 34% (Ashikari *et al.* 2005)。然 Yan *et al.* (2009) 研究中，曾在 2007 年中國大陸江蘇省揚州大學試驗農場種植 ‘Sasanishiki’/‘Habataki’ 染色體置換系族群，其中 ‘Habataki’ 的每穗粒數約 200 粒，此與 Ashikari *et al.* (2005) 研究中報導 ‘Habataki’ 在日本種植時每穗粒數可達 306 粒，相較之下短少了 35%。但是，從染色體置換系族群 ‘Sasanishiki’/‘Habataki’ 中仍可發現 *Gn1* 在粳稻背景中具有明顯效應，可知 *Gn1* 的功能有助表現每穗粒數的性狀，儘管該性狀容易受到環境因子的影響，對於利用 Ha-*Gn1a* 對偶基因有助提升每穗粒數的表現。本試驗所選育台農 71 號 *Gn1* 品系亦有相同效應，每穗粒數較「台農 71 號」提升了 26%，由 105.2 ( $\pm 37.4$ ) 增加為 133.1 ( $\pm 61.9$ ) 粒。雖不及前人研究中近同源系 Koshihikari-*Gn1* 較 ‘Koshihikari’ 的每穗粒數由 164 粒提升至 237 粒，增加幅度達 44.5%，仍顯示在亞熱帶地區對於提高台灣粳稻粒數仍具選拔增進。惟整體產量因穗頸稻熱病與稔實率不佳而無法彰顯，未來將利用肥料試驗調整肥培管理，或堆疊充實率與高光合效能相關基因以平衡植株內供源關係進行改善。

粒數基因座 *Gn1* 在前人研究上原利用 96

個 BIL (backcross inbred line) 分離後裔進行定位分析，將粒數基因座 *Gn1* 定位到離最近分子標幟 BB-85 達 22.6 cM 的位置上，進一步再以 96 株近同源系 NIL-*Gn1* 的 F<sub>2</sub> 後裔進行精細定位，將 *Gn1* 基因座細分為 *Gn1a* 與 *Gn1b* 基因座。其中，*Gn1a* 位於分子標幟 R3192 與 C12072S 之間 2 cM 的區間內，但只顯示 *Gn1b* 基因座位於 *Gn1a* 的上游而未表示詳細區間資訊，‘Habataki’ 在 *Gn1a* 與 *Gn1b* 基因座的貢獻效應相同，加上 *Gn1a* 基因座已明確限縮於兩個分子標幟間，因此選擇 *Gn1a* 基因座進行據圖選殖分析。最終利用 13,000 株近同源系 NIL-*Gn1a* 的 F<sub>2</sub> 後裔，將 *Gn1a* 基因座的區間縮減至 6.3 Kb 內，且 NIL-*Gn1a* 多粒數近同源系能比 ‘Koshihikari’ 提升 21% 的每穗粒數，但 *Gn1b* 基因座則仍未完成精細定位分析 (Ashikari *et al.* 2005)。

階層式置換系具有可連續排列置換不同大小片段的特徵，能快速縮短定位區間並重複試驗 (Koumproglou *et al.* 2002)，希望能進一步釐清 *Gn1a*、*Gn1b* 與 *qSBN1* 基因座的位置與性狀功能；兩兩比較相鄰置換品系的性狀差異可知 (圖 2、表 3)，每穗粒數增加係因 2 次枝梗總粒數增加，但 1 次枝梗總粒數不具貢獻。進一步觀察 2 次枝梗相關性狀，顯示 Ha-*Gn1a* 同時影響 2 次枝梗數與 2 次枝梗平均粒數，而 A2–A3 區間中可以發現品系間的大多穗形結構要素均維持不變，僅 2 次枝梗數下降為 41.7 枝進而使得每穗粒數下降為 186.9 粒，該區間與前人研究中 *Gn1b* 基因座位置相近。文獻中曾提及，*Gn1a* 與 *Gn1b* 基因座的效應相近 (Ashikari *et al.* 2005)，但本試驗則在每穗粒數上發現 *Gn1a* 的效應是 *Gn1b* 基因座的 3 倍。若以品系 TARI71\_1 與 TARI71\_1\_1 的每穗粒數平均為 204.9 粒視為 Ha-*Gn1a* + Ha-*Gn1b* 的品系表現 (式 1)，品系 TARI71\_1\_2 與 TARI71\_1\_3 的每穗粒數平均為 190.5 粒則為帶有 Ha-*Gn1a* 的品系表現 (式 2)，品系 TARI71\_1\_4 則不帶有 Ha-*Gn1a* 或 Ha-*Gn1b* 多粒數對偶基因表現為 138.1 粒 (式 3)。推估 Ha-*Gn1a* 的估算效應為 52.4 粒 (式 2–式 3)，而 Ha-*Gn1b* 的估算效為 14.4 粒 (式 1–式 2)，

係 Ha-Gn1a 效應的 3 分之 1，主要影響 2 次枝梗粒數與其平均粒數，使整體穗型結構趨於更加密集。其次，2 次枝梗數基因座上，在整體 A2–A6 區間中可見 1 次枝梗數在品係間表現相近，然 2 次枝梗數則連續 2 次調降的趨勢，亦與 *qSBN1* 基因座效應相符合，對於 2 次枝梗數與 2 次枝梗數上的平均粒數均有貢獻。換言之，*qSBN1* 基因座可細分為 2 個子基因座，分別會增加 2 次枝梗數 38.4% (A5–A6 區間) 與 11.7% (A2–A3 區間)。

在有限資源下，希望能強化將分子輔助技術落實育種程序中，並有效精簡試驗規模、分散各階段作業人力密集性。將品系基因型篩選依序進行前景選拔、重組體選拔與背景選拔，能有效挑選出目標植株並精簡分析規模，以本試驗篩檢 TNG71-*Gn1* 的 BC<sub>1</sub> 回交後裔為例，對整體試驗族群進行完整分析需耗費 15,484 個反應 (158 markers × 98 plants)，而本次採階梯式篩選分析 4,338 反應，約可精簡 40–70% 的試驗規模 (Frisch *et al.* 1999a, b)，能有效分散各階段的作業期程。實務上可利用播種到移植前的育苗時期在溫室進行前景選拔，作業時間約略僅有 2 wk，以單基因為例，僅需利用 1 個功能性分子標幟或 2 個連鎖標幟先行淘汰大量非目標品系，得以配合移植期程能在正常栽培季節下妥善獲得正常性狀表現，並有效精簡田間觀察品系數目，讓田間試驗資源與實驗室篩選規模能更具調整彈性。而植株成活後至抽穗前約有 1–1.5 mo，在田間定植後才針對目標品系進行重組體篩選、背景篩選或形態評估。在而背景篩選中，若全基因組標幟的密度區間為 12.5 cM 為例，BC<sub>1</sub> 世代針對背景全基因組篩選時，可考量先以寬鬆間距 20 至 30 cM 作為初步篩選，能快速挑選出具有高背景回復率之候選親本。在高世代回交後裔上，則分析尚未回復成輪迴親的組成，並逐步增加背景標幟密度。另在 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 與 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代，可能因為抽穗期過早等連鎖累贅效應，先篩選目標基因座兩側發生重組者外，亦可優先挑選抽穗期接近的品系，將有助後續世代雜交數目增加。至 BC<sub>3</sub> 世代，則可大量培育回交後裔用以提高背景回復率，乃至 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 世代固定

目標基因時仍可提高背景回復率。對於背景選拔的實務建議，則針對沒有攜帶目標基因的每條染色體僅擺放 4 個獨立分子標幟，平均擺放分子標幟將有助減少所需的族群數，在高世代進行背景篩選會更具選拔效率，每個世代透過多階段篩選能更有效減少分析規模 (Frisch *et al.* 1999a)。

本試驗成功將秈稻多粒數基因 Ha-*Gn1* 導入台灣梗稻栽培品種中，有助日後提高亞種間優良基因滲入效率，改良後能較「台農 71 號」有效提高每穗粒數 26 至 133.1 (± 61.9) 粒。同時也進一步確認粒數基因座 *Gn1a*、*Gn1b* 與 2 次枝梗數基因座 *qSBN1* 對穎花數與穗形結構的關係，結果顯示 *Gn1a* 基因座係提升 2 次枝梗總粒數且增加 2 次枝梗平均粒數。在上游區間 *Gn1b* 基因座，則影響 2 次枝梗數使得每穗粒數增加，但貢獻效應僅為 3 分之 1。又因 *Gn1* 基因座與 *qSBN1* 基因座相互重疊，可知 *qSBN1* 基因座應細分為 2 個子基因座，且其效應影響不一。考量產量性狀易受環境干擾，未來將持續累積多期作產量試驗資料以增加評估穩健性，以資進行綜合變方分析與兩兩比較品系確認目標基因座效應。

## 誌謝

感謝行政院農業委員會農業試驗所技術人員莊垣漳、研究助理莊雯凌、林孟誼、平嘉雲、吳佩真、張輔升君在試驗期間陸續提供協助核酸分析與性狀取樣調查。本研究承行政院農業委員會經費 99 年至 102 年補助 [99-101 農科-4.2.1-農-C1(5)、102 農科-9.2.1-農-C2]，謹此致謝。

## 引用文獻

- Ando, T., T. Yamamoto, T. Shimizu, X. F. Ma, A. Shomura, Y. Takeuchi, S. Y. Lin, and M. Yano. 2008. Genetic dissection and pyramiding of quantitative traits for panicle architecture by using chromosomal segment substitution lines in rice. *Theor. Appl. Genet.* 116:881–890.
- Ashikari, M. and M. Matsuoka. 2006. Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. *Trends Plant Sci.* 11:344–350.

- Ashikari, M., H. Sakakibara, S. Lin, T. Yamamoto, T. Takashi, A. Nishimura, E. R. Angeles, Q. Qian, H. Kitano, and M. Matsuoka. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309:741–745.
- Bai, X., B. Wu, and Y. Xing. 2012. Yield-related QTLs and their applications in rice genetic improvement. *J. Integr. Plant Biol.* 54:300–311.
- Chen, C. S., R. K. Chen, H. H. Chin, and Y. R. Lin. 2010. Introgression of three heading date genes, *hd1*, *Hd6*, and *ehd1*, to *Oryza sativa* L. japonica cv. Koshihikari by marker-assisted selection. *Crop Environ. Bioinform.* 7:1–20. (in Chinese with English abstract)
- Chen, X. W., S. G. Li, Y. Q. Ma, H. Y. Li, K. D. Zhou, and L. H. Zhu. 2004. Marker-assisted selection and pyramiding for three blast resistance genes, *Pi-d(t)1*, *Pi-b*, *Pi-ta2*, in rice. *Chin. J. Biotechnol.* 20:708–714. (in Chinese with English abstract)
- Collard, B. C. Y. and D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos. T. Roy. Soc. B* 363:557–572.
- Frisch, M., M. Bohn, and A. E. Melchinger. 1999a. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. *Crop Sci.* 39:1295–1301.
- Frisch, M., M. Bohn, and A. E. Melchinger. 1999b. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. *Crop Sci.* 39:967–975.
- Guo, L. B. and G. Y. Ye. 2014. Use of major quantitative trait loci to improve grain yield of rice. *Rice Sci.* 21:65–82.
- Harushima, Y., M. Yano, P. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S. Y. Lin, B. A. Antonio, A. Parco, H. Kajiyama, N. Huang, K. Yamamoto, Y. Nagamura, N. Kurata, G. S. Khush, and T. Sasaki. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F<sub>2</sub> population. *Genetics* 148:479–494.
- Hashida, Y., N. Aoki, H. Kawanishi, M. Okamura, T. Ebihara, T. Hirose, T. Yamagishi, and R. Ohsugi. 2013. A near isogenic line of rice carrying chromosome segments containing *OsSPS1* of Kasalath in the genetic background of Koshihikari produces an increased spikelet number per panicle. *Field Crop Res.* 149:56–62.
- He, G. M., C. Q. Sun, Y. C. Fu, Q. Fu, K. J. Zhao, C. L. Wang, Q. Zhang, Z. Z. Ling, and X. K. Wang. 2004. Pyramiding of senescence-inhibition *IPT* gene and *Xa23* for resistance to bacterial blight in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genet. Sin.* 31:836–841. (in Chinese with English abstract)
- Huang, R., L. Jiang, J. Zheng, T. Wang, H. Wang, Y. Huang, and Z. Hong. 2013. Genetic bases of rice grain shape: So many genes, so little known. *Trends Plant Sci.* 18:218–226.
- Huang, X., Q. Qian, Z. Liu, H. Sun, S. He, D. Luo, G. Xia, C. Chu, J. Li, and X. Fu. 2009. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. *Nat. Genet.* 41:494–497.
- Ikeda, K., M. Ito, N. Nagasawa, J. Kyojuka, and Y. Nagato. 2007. Rice *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1*, encoding an F-box protein, regulates meristem fate. *Plant J.* 51:1030–1040.
- Ikeda, M., K. Miura, K. Aya, H. Kitano, and M. Matsuoka. 2013. Genes offering the potential for designing yield-related traits in rice. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16:213–220.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793–800.
- Joseph, M., S. Gopalakrishnan, R. K. Sharma, V. P. Singh, A. K. Singh, N. K. Singh, and T. Mohapatra. 2004. Combining bacterial blight resistance and basmati quality characteristics by phenotypic and molecular marker-assisted selection in rice. *Mol. Breeding* 13:377–387.
- Kobayashi, A., Y. Koga, H. Uchiyama, H. Horiuchi, K. Miura, K. Okuno, K. Fujita, Y. Uehara, S. Ishizaka, M. Nakagahra, and T. Yamada. 1990. Breeding a new rice variety 'Habataki'. *Bull. Hokuriku Natl. Agric. Exp. Stn.* 32:65–84. (in Japanese)
- Koumproglou, R., T. M. Wilkes, P. Townson, X. Y. Wang, J. Beynon, H. S. Pooni, H. J. Newbury, and M. J. Kearsey. 2002. STAIRS: A new genetic resource for functional genomic studies of *Arabidopsis*. *Plant J.* 31:355–364.
- Kumar, A., S. Dixit, T. Ram, R. B. Yadav, K. K. Mishra, and N. P. Mandal. 2014. Breeding high-yielding drought-tolerant rice: Genetic variations and conventional and molecular approaches. *J. Exp. Bot.* 65:6265–6278.
- Lin, K. H., C. W. Kuo, Y. C. Hsu, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2014. Increasing drought tolerance of rice cultivar 'TK9' using marker-assisted selection. *Crop Environ. Bioinform.* 11:177–194. (in Chinese with English abstract)
- Lin, T. F. 1990. Effect of yield components on the yield of rice in central Taiwan. *Bull. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta.* 26:17–23. (in Chinese with English abstract)
- Miura, K., M. Ikeda, A. Matsubara, X. J. Song, M. Ito, K. Asano, M. Matsuoka, H. Kitano, and M. Ashikari. 2010. *OsSPL14* promotes panicle branching and

- higher grain productivity in rice. *Nat. Genet.* 42:545–549.
- Neeraja, C. N., R. Maghirang-Rodriguez, A. Pamplona, S. Heuer, B. C. Y. Collard, E. M. Septiningsih, G. Vergara, D. Sanchez, K. Xu, A. M. Ismail, and D. J. Mackill. 2007. A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 115:767–776.
- Ohsumi, A., T. Takai, M. Ida, T. Yamamoto, Y. Arai-Sanoh, M. Yano, T. Ando, and M. Kondo. 2011. Evaluation of yield performance in rice near-isogenic lines with increased spikelet number. *Field Crops Res.* 120:68–75.
- Peng, S., G. S. Khush, P. Virk, Q. Tang, and Y. Zou. 2008. Progress in ideotype breeding to increase rice yield potential. *Field Crop Res.* 108:32–38.
- Sharma, P. N., A. Torii, S. Takumi, N. Mori, and C. Nakamura. 2004. Marker-assisted pyramiding of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance genes *Bph1* and *Bph2* on rice chromosome 12. *Hereditas* 140:61–69.
- Shomura, A., T. Izawa, K. Ebana, T. Ebitani, H. Kanegae, S. Konishi, and M. Yano. 2008. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nat. Genet.* 40:1023–1028.
- Song, X. J., W. Huang, M. Shi, M. Z. Zhu, and H. X. Lin. 2007. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat. Genet.* 39:623–630.
- Sun, J., D. Liu, J. Y. Wang, D. R. Ma, L. Tang, H. Gao, Z. J. Xu, and W. F. Chen. 2012. The contribution of interspecific hybridization to the breeding of super-high-yielding japonica rice in northeast China. *Theor. Appl. Genet.* 125:1149–1157.
- Tan, C. X., X. M. Ji, Y. Yang, X. Y. Pan, S. M. Zuo, Y. F. Zhang, J. H. Zou, Z. X. Chen, L. H. Zhu, and X. B. Pan. 2005. Identification and marker-assisted selection of two major quantitative genes controlling rice sheath blight resistance in backcross generations. *Acta Genet. Sin.* 32:399–405. (in Chinese with English abstract)
- Terao, T., K. Nagata, K. Morino, and T. Hirose. 2010. A gene controlling the number of primary rachis branches also controls the vascular bundle formation and hence is responsible to increase the harvest index and grain yield in rice. *Theor. Appl. Genet.* 120:875–893.
- Wang, E., J. Wang, X. Zhu, W. Hao, L. Wang, Q. Li, L. Zhang, W. He, B. Lu, H. Lin, H. Ma, G. Zhang, and Z. He. 2008. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nat. Genet.* 40:1370–1374.
- Wang, P., Y. Xing, Z. Li, and S. Yu. 2012. Improving rice yield and quality by QTL pyramiding. *Mol. Breeding* 29:903–913.
- Wang, X., Y. Pang, J. Zhang, Q. Zhang, Y. Tao, B. Feng, T. Zheng, J. Xu, and Z. Li. 2014. Genetic background effects on QTL and QTL  $\times$  environment interaction for yield and its component traits as revealed by reciprocal introgression lines in rice. *The Crop J.* 2:345–357.
- Wu, D. H., H. P. Wu, C. S. Wang, H. Y. Tseng, and K. K. Hwu. 2013. Genome-wide InDel marker system for application in rice breeding and mapping studies. *Euphytica* 192:131–143.
- Yan, C. J., S. Yan, Y. C. Yang, X. H. Zeng, Y. W. Fang, S. Y. Zeng, C. Y. Tian, Y. W. Sun, S. Z. Tang, and M. H. Gu. 2009. Development of gene-tagged markers for quantitative trait loci underlying rice yield components. *Euphytica* 169:215–226.
- Zhou, P. H., Y. F. Tan, Y. Q. He, C. G. Xu, and Q. Zhang. 2003. Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 106:326–331.
- Zong, G., A. Wang, L. Wang, G. Liang, M. Gu, T. Sang, and B. Han. 2012. A pyramid breeding of eight grain-yield related quantitative trait loci based on marker-assistant and phenotype selection in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Genet. Genom.* 39:335–350.

# Study on Development of *Japonica* Breeding Lines Introgressed High Grain Number Gene through Marker-Assisted Backcross Approach

Ming-Hsing Lai<sup>1</sup>, Chang-Pei Li<sup>2</sup>, Woei-Shyuan Jwo<sup>2</sup>, Hsing-Mu Yen<sup>2</sup>, Kae-Kang Hwu<sup>3</sup>, and Dong-Hong Wu<sup>2,\*</sup>

## Abstract

Lai, M. H., C. P. Li, W. S. Jwo, H. M. Yen, K. K. Hwu, and D. H. Wu. 2016. Study on development of *japonica* breeding lines introgressed high grain number gene through marker-assisted backcross approach. *J. Taiwan Agric. Res.* 65(1):31–44.

Rice grain number, a quantitative trait, is difficult to be selected in early generations and needs to be evaluated its genetic gain number based on replicate filed trials during breeding procedure. In order to improve the introgressed efficiency of grain yield related genes and validate QTL effect between *japonica-indica* cross, this study introduced the high grain number gene, *Gn1*, from ‘Habataki’ (*indica* type) into ‘Tainung71’ (‘TNG71’), a *japonica* cultivar with high eating quality, to assess the yield potential of the near-isogenic lines through marker-assisted backcross approach. The development of near-isogenic lines used 6 flanking markers of *Gn1* locus for foreground selection and 152 SSR and InDel markers with an average of 10.8 cM for background selection. Genotyping assay showed that one BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> plant (TNG71-*Gn1*) has completely recovered the recurrent ‘TNG71’ genome except a 30 cM segment harboring *Gn1* on the short arm of chromosome 1. TNG71-*Gn1* had the same heading date, panicle number, and plant height as the recurrent parent, ‘TNG71’, while TNG71-*Gn1* had higher grain number per panicle than ‘TNG71’. In addition, four ‘TNG71’ stepped aligned inbred recombinant lines different from their introgressed chromosomal region harboring *Gn1* gene on chromosomal 1 were developed in order to investigate the relationship among *Gn1a*, *Gn1b*, and *qSBN1* loci for genetic effects on rachis branch and spikelet number. Genetic analysis showed that *Gn1a* locus increased secondary branch number and average grain number of secondary branch, but not average grain number of primary branch. *Gn1b* locus, which located in upstream region, would be beneficial on second branch number resulting in increased grain number. The *qSBN1* locus consisted of two sub-loci and explained 38.4% and 11.7% of the difference in the second secondary branch number between ‘Habataki’ and ‘TNG71’, respectively.

**Key words:** *Oryza sativa* L., Grain number, Marker assisted backcross, Grain yield.

---

Received: May 20, 2015; Accepted: June 30, 2015.

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

<sup>1</sup> Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Assistant Research Fellows, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.