

水稻功能基因研究與相關分子標誌技術之發展

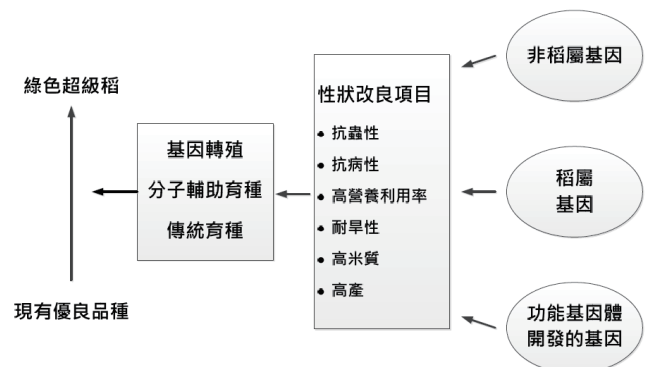
撰文/林大鈞·林岡諭·周思儀·王昭月·王強生

前言

到了西元 2050 年時，全球人口預計將高達 90 億人，而現今極端氣候變遷所造成的水資源匱乏、可耕面積縮減，以及新病害微生物或昆蟲的出現等問題，使「糧食安全 (food security)」議題成為育種家和農業專家所必須面臨的嚴峻挑戰^(1, 2)。水稻是重要的糧食作物之一，不僅提供全球 3 億人口日常熱量來源的 50-80%，同時也是基因體學中的重要模式植物。由於水稻對全球糧食的重要性，秈稻 (*indica*) 及粳稻 (*japonica*) 的全基因體序列，分別在 2002 年時發表^(3, 4)，而高品質且具有註解的粳稻全基因組序列更在 2005 年時公布，並成為水稻基因體學研究的里程碑⁽⁵⁾。

以目前全球農業的觀點來看，水稻的未來育種趨勢，或可以從 Zhang 等學者所提出：「綠色超級水稻發展的策略」，來作為思考的依據。他們認為未來的綠色超級水稻，必須具備對現行主要蟲害與病害的抗性、高營養吸收與利用的效率、高耐旱性與對其他非生物逆境耐受性、高品質及高產潛力等優良性狀⁽⁶⁾。而這些優良性狀中的許多項目，更是我國育種家現行育種計畫的目標。因此，水稻優良種原的保存與應用、突變庫的建立與篩選、目標性狀基因的定位與鑑定、差異表現的轉錄體分析以及目標性狀基因的功能驗證等，就成為現行水稻功能基因學研究的重要工作。探索所得的目標性狀基因，可

利用基因轉殖、分子標誌輔助育種 (marker-assisted selection, MAS) 及傳統育種等方式，逐步導入現有的優良品種，甚至透過堆疊 (pyramiding) 的育種方法，將其育成理想的「綠色超級稻」(圖一)。所以，功能基因的探索與選殖，是這些育種計畫的首要目標。而水稻現行重要功能基因之研究焦點，主要因應氣候變遷及糧食安全議題，因此包括：抗蟲基因、抗病基因、營養利用率基因、耐旱基因、品質基因和產量基因…等。本文茲就前述功能基因研究的進展，以及分子標誌對於水稻育種的應用現況進行簡介，並提出未來育種策略之建議。



資料來源：Zhang, 2007.

圖一 綠色水稻育種目標及策略

重要功能基因研究之進展

(一) 抗蟲基因

褐飛蝨 (brown planthopper, BPH) 是一種危害相當嚴重的水稻害蟲，具有刺吸式口器，是典型的吸食維管束液的昆蟲。水稻植株輕微感病時的病徵，呈現植株黃化、稔實率降低並減少產量，而當田間發生大量感病情形時，會導致植株快速枯萎倒伏，甚至會造成大面積枯萎的現象，稱之為「蝨燒」⁽⁷⁾。褐飛蝨也是台灣水稻栽培近四十年來，主要防治的害蟲之一。

利用寄主抗性培育抗性品種，被認為是防治褐飛蝨危害的有效途徑，因此自 1970 年代以來，學者們就致力於進行水稻褐飛蝨抗性基因的探索工作。*Bph1* 及 *Bph2* 基因是最早被發表的褐飛蝨抗性基因座，同時也被國際水稻研究所 (IRRI) 育成一系列抗性品種，得以控制褐飛蝨的危害^(8,9)。而 Sharma 等學者更進一步利用分子標誌輔助育種基因堆疊的方式，將 *Bph1* 及 *Bph2* 基因同時導入梗稻品種—Tsukushibare，結果發現帶有單一 *Bph1* 基因的漸滲品系 (introgression line) 的褐飛蝨抗性較單一帶有 *Bph2* 基因的漸滲品系高⁽¹⁰⁾。但隨著帶有 *Bph1* 及 *Bph2* 基因抗性品種的大面積推廣，卻發現有許多地區，已經陸續出現了可克服此兩基因的褐飛蝨生物小種；因此，育種者必須開始找尋新的抗性來源。目前已發表的褐飛蝨抗性基因座共有 29 個，已被定位者有 20 個，然而僅有 *Bph14* 基因被成功選殖出來 (表一)。在這些基因座中，*Bph14* 及 *Bph15* 基因座因具有極佳的褐飛蝨抗性，所以是目前中國大陸褐飛蝨抗性育種計畫的主要導入基因座^(11,12)。而在臺灣相關研究的部分，農業試驗所的李長沛博士，也收集了許多的抗褐飛蝨的野生稻種原，並已開發相關抗性基因座的連鎖分子標誌⁽¹³⁾。另一方面，農業試驗所嘉義分所吳永培博士亦已收集了含 *Bph3* 及 *Bph4* 基因的種原，並且開發出相關的分子標誌 (數據尚未公開)。目前這兩研究團隊，均致力於將這些相關抗性基因導入現行商業品種的 MAS 計畫。

(二) 抗病基因

目前水稻基因組中被發現的抗病基因，主要是針對真菌性的稻熱病與細菌性的白葉枯病。在台灣的水稻栽培中，稻熱病常好發於第一期作，而白葉枯病則多發生於第二期作⁽¹⁴⁾。這兩種病害經常造成台灣水稻產量的嚴重減產，是目前主要的水稻病害防治標的。

稻熱病主要是由 *Magnaporthe oryzae* 所引起的，常常造成水稻嚴重減產。抗稻熱病基因的分析工作是由日本學者率先進行，隨後國際水稻研究所及其他國家亦陸續加入研究的行列。目前已發表 75 個主效基因，其中有 64 個基因座已被定位，並有 18 個基因已被選殖出來。這些結果正可作為未來在稻熱病抗性分子育種的基礎。

對於病原菌族群致病性幅度 (pathogenicity spectrum) 的分析，是稻熱病抗性育種中的重要工作。在 2001 年時，Chen 等學者以 792 個稻熱病分離菌系，對中國大陸華中及華南 13 省中，帶有稻熱病抗性的 6 個籼稻及 7 個 粳品系之近同源品系 (near isogenic lines, NIL) 進行接種，結果發現不到 10% 分離菌系會感染帶有 *Pil* 或 *Pi2* 基因的 NIL，但卻有高達 41.5% 的分離菌系會危害帶有 *Pi3* 基因的 NIL⁽¹⁵⁾。他們甚至發現，僅有 2% 分離菌系可感染帶有 *Pil* 及 *Pi2* 基因組合的水稻品系，而同時帶有 *Pil*、*Pi2* 及 *Pi4* 基因的品系則更具抗性；這些結果顯示透過堆疊抗病基因方法，能有效改善植株的抗病性，為目前中國大陸分子標誌輔助抗稻熱病育種主要策略。

臺灣稻熱病危害的情形時有所聞，只是臺灣相關研究已停頓多年，現今的主流菌種恐仍有待釐清，而現有栽培品種是否具有抗性或是帶有何種抗性基因型，仍需要進一步的評估。另一方面，學者已提出氣候變遷將影響病原菌之菌相，甚至造成其生活史及演化的改變⁽¹⁶⁻¹⁹⁾。因此，育成具有廣幅稻熱病抗性的新品種，方是今後稻熱病防治的根本之道。

白葉枯病是由 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* 所引起，由於受到白葉枯病感染的水稻植株，很容易

表一 褐飛蟲抗性基因座及其來源

種原	基因座	染色體	對生理小種的反應				連鎖標誌
			1	2	3	4	
Mudgo	<i>Bph1</i>	12	R	S	R	S	em5814(2.7cM); R2708(3.1cM)
ASD7	<i>bph2</i>	12	R	R	S	S	G2140(3.5cM)
Rathu Heenati	<i>Bph3</i>	6	R	R	R	R	RM589~RM588
Babawee	<i>bph4</i>	6	R	R	R	R	R2869, C76A,可能與 <i>Bph3</i> 等位
ARC10550	<i>bph5</i>		S	S	S	R	
Swarnalata	<i>Bph6</i>		S	S	S	R	
T12	<i>bph7</i>		S	S	S	R	
Chin Saba	<i>bph8</i>		R	R	R	-	
Balamawee	<i>Bph9</i>	12	R	R	R	-	RM463(6.8cM); RM5341(9.7cM)
<i>Oryza australiensis</i>	<i>Bph10</i>	12	R	R	R	-	RG457(3.7cM)
<i>O. officinalis</i>	<i>bph11</i>	9	-	-	-	-	G1318(12.4cM)
<i>O. officinalis</i>	<i>bph12</i>	3	-	-	-	-	G271(2.4cM); R93(4.0cM)
<i>O. latifolia</i>	<i>Bph12(t)</i>	4	R	R	R	-	C946(11.6cM); RM261(1.8cM)
<i>O. officinalis</i>	<i>Bph13(t)</i>	3	-	-	-	R	AJ09b(1.3cM)
<i>O. eichinger</i>	<i>Bph13(t)</i>	2	R	R	-	-	RM240(6.1cM); RM250(5.5cM)
B5	<i>Bph14</i>	3	R	R	R	-	G1318-R1925
B5	<i>Bph15</i>	4	R	R	R	-	C820-S11182
<i>O. officinalis</i>	<i>Bph16</i>	4	-	-	-	-	
B14	<i>Bph17</i>	4	R	R	-	-	RM8213(3.6cM); RM5953(3.2cM)
<i>O. officinalis</i>	<i>Bph17</i>	4	-	-	-	R	
<i>O. australiensis</i>	<i>Bph18</i>	12	R	R	-	-	RM463-S15552
<i>O. rufipogon</i>	<i>bph18(t)</i>	4	-	R	-	-	RM6506(11.0cM); RM273(6.0cM)
AS20-1	<i>bph19</i>	3	-	R	-	-	RM6308-RM3134
<i>O. rufipogon</i>	<i>bph19(t)</i>	12	-	R	-	-	RM17(16.7cM)
<i>O. minuta</i>	<i>Bph20(t)</i>	4	R	-	-	-	短臂193.4 kb的區間內
<i>O. minuta</i>	<i>Bph21(t)</i>	12	R	-	-	-	長臂194.0 kb的區間內
非洲栽培稻	<i>Bph22(t)</i>						
小粒野生稻	<i>Bph23(t)</i>						
普通野生稻	<i>Bph24(t)</i>						

資料來源：國家水稻數據中心(<http://www.ricedata.cn>)。

造成不飽滿穀粒的增加，而對水稻產量有很大的影響；在日本曾有造成稻米產量減少 10% 的紀錄，菲律賓有減產 30% 的報導，印度的感病品種甚至會因受病而減產達 50%。目前已發表 35 個白葉枯病抗性基因座 (*Xa* 基因座)，其中 24 個為顯性基因，其餘為隱性。這些基因中，有 24 個抗性基因已被定位，並有 7 個基因已被選殖出來。國際水稻研究所已利用 IR24 品系，建立帶有 *Xa* 基因的 NIL (IRBB 系列品系)，可作為良好的 *Xa* 基因提供親，供抗性育種工作之用。

中國大陸育種家已利用 MAS 及基因轉殖的方法，分別將 *Xa21* 導入明恢 63 及秈優 63，結果發現接種白葉枯病原菌後，導入 *Xa21* 品系之白葉枯病抗性優於未導入 *Xa21* 品系。另一方面，導入 *Xa21* 品系之每穗粒數、穀粒重及總產量方面的表現亦優於未導入 *Xa21* 品系^(20, 21)。而這些品系已開始應用於中國大陸雜交稻的育種工作，以防治白葉枯病的流行。目前中國大陸已開始利用 MAS 方法，分別將 *Xa4*、*Xa5*、*Xa13* 及 *Xa14* 堆疊於不同的商業品種，結果發現帶有不同組合的 *Xa* 基因水稻品系會呈現不同的抗病幅度與抗病性⁽²²⁾。另一方面，學者亦發現從明恢 63 選殖的 *Xa26*，使植株在苗期及成株期時具有中等抗性⁽²³⁾。但不管在秈稻或是粳稻的遺傳背景中大量表現此基因，均會提高轉殖水稻的白葉枯病抗性幅度及抗性層級⁽⁶⁾。因此，中國大陸的育種家在現行白葉枯病的抗性育種策略上，同時應用 MAS 及基因轉殖手段來進行白葉枯病廣幅抗性的育種。

臺灣現在水稻抗白葉枯病統一病圃檢定於 1976 年由臺中區農業改良場負責執行。目前已檢定 10,389 個國內外品種(系)數，綜合歷年分析結果可篩選出 14 個抗病品種：台中秈 5 號、台東 29 號、台東秈 12 號、高雄 141 號、台南秈 15、台農 68 號、台農秈 14 號、台南 7 號、台農 69 號、台農秈 18、台中秈糯 1 號、台南 9 號、台農 72 號及台梗 6 號⁽²⁴⁾。其中，僅有台梗 6 號較具廣幅抗性外，其餘均僅能對單一菌種具有抗性。此分析結果可知，本土病原菌廣幅抗性品種的育種，是目前亟需進行的工作。因此，在臺灣的育種

家，如苗栗區農業改良場、臺中區農業改良場、臺南區農業改良場、中興大學農藝系以及農業試驗所等研究單位，已開始利用 IRBB 品系或是台農 67 號誘變庫中的抗性突變體，作為抗性提供親，進行臺灣重要商業品種的白葉枯病抗性改良。

(三) 營養利用率相關基因

增加水稻植株的營養利用率，一方面可降低栽培管理時的肥料需求，減少生產成本。另一方面，更可增加水稻在貧脊土地栽種時的產量。此性狀包含增加植株營養物質的吸收效率與轉換效率等機制。然而，目前的相關研究仍然以相關基因或數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTL) 的探索為主要目的。

目前已知氮在高等植物的吸收與固定化過程，需要多種參與轉運功能的蛋白質基因，方能將氮自土壤吸收至植物體。而被吸收的氮則再經由一系列的酵素，將其固定轉化為胺基酸或是其他物質，方能被植物進行代謝運用。然而目前仍不知道這些代謝途徑參與基因的調控機制，尤其是在低氮的環境。2005 年 Lian 等學者利用 239 個珍秈 97 與明恢 63 雜交所產生的重組自交系 (recombinant inbred lines, RILs)，建立高密度連鎖圖譜 (linkage map)。他們將水稻秧苗培養在低氮溶液及正常氮溶液，並分別測量兩種處理的根重、苗種及植株重，同時計算兩處理的相對根重、苗種及植株重，並將這 9 個量測值視為低氮耐受性的指標性狀，結果發現每個低氮耐受性性狀，均可偵測 4- 8 個主效的 QTLs⁽²⁵⁾。進一步利用水稻全基因組微晶片，分析明恢 63 在兩種氮濃度處理下，不同生長期的轉錄體，結果發現在低氮處理下的根部組織，有 431 個差異表現的基因，其中有 115 個正調控表現的基因，其餘均為負調控表現的基因⁽²⁶⁾。日後這些基因需再進一步進行功能分析，以評估是否可應用在未來改進水稻的氮利用效率上。

另一方面，目前絕大多數水稻種植區都缺乏磷，而大部分可開墾種植區域的土地，又多為酸性(熱帶或亞熱帶區域)或鈣化(溫帶區域)的土壤。其中，

酸性土壤中的游離離子與氧化鋁會結合土壤中的磷，轉化為植物無法利用的磷化合物。另一方面，鈣化的土壤中的鈣及鎂化合物亦會結合土壤中的無機磷，而使得植物無法利用。這兩種土壤的可吸收磷非常低，因而降低水稻對磷的吸收效率。所以，改善水稻對磷的利用效率，亦是現行重要育種方向。

2005年，Yi等學者自可高效利用磷的籼型陸稻 Kasalath 中，選殖到可因應磷缺乏而反應的轉錄因子 *OsPTF1* 基因。進一步將 *OsPTF1* 基因轉殖到對磷不敏感的日本晴中大量表現，結果發現其可增進轉殖水稻對磷的利用效率，並造成轉殖水稻的分蘗能力、生質產量及磷的含量均遠高於未轉殖的水稻⁽²⁷⁾。另一方面，Wissuwa 及 Ae 分析 30 個水稻品系在正常含磷或缺磷的土壤中吸收磷的情形，藉此篩選出低磷耐受性之品系⁽²⁸⁾。進一步建立 NILs 族群並進行其基因型的分析，結果顯示有兩個 QTLs 與低磷耐受性相關⁽²⁹⁾。其中，一主效的 QTL 位於 12 號染色體，另一次效的 QTL 則位於 6 號染色體。進一步分析第 12 對染色體上帶有低磷耐受性 QTL 置換片段的 NIL，結果發現其磷的吸收能力是日本晴的 4 倍。但若是帶有位於第 6 對染色體上低磷耐受性 QTL 置換片段的 NIL，其磷的吸收能力則僅是日本晴的 60-90%。雖然，目前仍須進一步的試驗，來探討真正參與磷吸收與利用代謝路徑的基因及功能，但這些結果仍可視為未來進行水稻磷利用率改進的基礎。

(四) 耐旱相關基因

植物對於乾旱的生理反應可包含下列機制：(1) 逃旱性 (drought escape)：在嚴重乾旱傷害前完成其生活史，或是發展乾旱的適應性；(2) 避旱性 (drought avoidance)：增加水分的吸收，或是降低水分的散失；(3) 耐旱性 (drought tolerance)：包含滲透壓的調節、抗氧化能力及耐脫水性機制。因此，為了能夠利用合理策略，進行水稻耐旱性的改良育種，就必須針對上述每個機制的遺傳背景深入的探討，尤其是針對避旱性及耐旱性的機制。因此，Yue 等學者利用珍秈 97 (灌溉

稻) 與 IRAT109 (耐旱高山稻) 雜交並建立 RILs，進行水稻避旱性及耐旱性的分析⁽³⁰⁾，結果發現有 27 個 QTLs 與適應性及產量有關，36 個 QTLs 與正常狀態下的根系性狀有關，另有 38 個 QTLs 與乾旱狀態下的根系性狀有關。目前已有學者利用 MAS，將可增加根長與根生質產量的 QTLs 導入現行的商業品種，結果確實可改善乾旱逆境下植株的根部性狀，但新品系在田間的耐旱性，仍須進一步的驗證^(31, 32)。

海藻糖 (trehalose) 是一種非還原性葡萄糖雙聚糖，具有穩定細胞在非生物逆境下的生物結構之功能。因此，Garg 等學者將來自大腸桿菌的海藻糖生合成基因 *otsA* 及 *otsB*，轉殖到水稻中表現，結果發現轉殖水稻的海藻糖含量是未轉殖水稻的 3-10 倍。同時，在高鹽、乾旱及低溫的逆境環境下，數個轉殖水稻系能夠持續生長，並具有較低光氧化傷害及較佳的礦物質平衡特性⁽³³⁾。此外，Hu 等學者利用轉錄體分析，發現一受乾旱逆境誘導表現的轉錄因子基因 *SNAC1*，並轉殖至水稻中大量表現，結果發現 *SNAC1* 的表現可提升轉殖水稻的耐旱性，且不會改變水稻的其它性狀。進一步分析轉殖水稻的生理，又發現了 *SNAC1* 的表現會促使植株對離層酸的反應更為敏感，水分的蒸散較緩慢，但不影響光合作用的速率⁽³⁴⁾。由這些結果可以發現，這些基因確實能夠提升水稻的耐旱性，但目前仍尚未導入商業品種，亦無田間耐旱性的評估。此外，目前所發表的耐旱相關功能基因，對於未來耐旱的育種改良工作，仍嫌不足。因此，在耐旱種原篩選及利用功能基因體學探索新耐旱基因的相關工作，仍是現行分子遺傳學家必要的研究課題。

(五) 品質相關基因

稻米品質可細分為下列幾項：烹煮品質、食用品質、外觀品質、碾米品質、香味及營養成分等。目前稻米市場上較注重烹煮、食用及外觀等品質，而烹煮與食用品質，主要受穀粒中的直鏈澱粉含量、澱粉糊化溫度、澱粉凝膠強度等因子所影響。另一方面，外觀品質則主要受穀粒形狀，如粒長、粒寬、長寬比、

透明度及白堊質等所影響。現今稻米品質性狀的遺傳研究，主要是針對上述相關品質性狀進行 QTL 的定位與基因選殖，結果發現與品質相關的基因座如表二所列。其中，第 6 對染色體上的 *Wx* 基因座，在直鏈澱粉的生合成及澱粉凝膠強度的理化特性上，扮演重要的角色，但它亦可能與澱粉糊化的溫度有關^(35, 36)。另一方面，緊密連鎖在 *Wx* 基因座旁的 *Alk* 基因座，則主要與澱粉的糊化溫度有關^(36, 37)。在穀粒外觀上，*GS3* 基因座與粒長有關，而 *GS5* 基因座則與粒寬有關⁽³⁸⁾。此外，另一外觀相關的 *Chk5* 基因座，則與穀粒的白堊質有關⁽³⁸⁾。

水稻香味的遺傳研究，顯示香米品種的香味性狀，有的品種呈現單一顯性遺傳，部分則呈現單一隱性遺傳，亦有品種呈現兩對基因互補遺傳、兩重複基因遺傳或是三基因互補遺傳⁽³⁹⁻⁴³⁾。這些結果顯示，水稻香味的形成，可能源自於不同的機制所生成，而參與香味性狀的基因，也應該不只一種。正因為香味性狀的複雜性，故造成目前香味基因選殖與香味育種工作的困難。1992 年 Ahn 等學者利用限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分子標誌，進行水稻香味基因的遺傳定位，結

果發現香味基因座可能位在第八對染色體上，並證實所用品種的香味性狀是單一隱性的遺傳⁽⁴⁴⁾。隨後，水稻香味基因的研究紛紛興起，學者們利用不同的香米品種，進行香味基因的定位試驗，所得結果大多與 Ahn 等學者的定位結果類似，香味基因都定位於第八對染色體長臂端的 RFLP 標誌 RG28 到 RG1 附近，且香味性狀亦多為單一隱性遺傳⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾。直至 2005 年，Bradbury 等學者，定位選殖出香味基因，經序列分析發現，此區域編碼一甜菜鹼去氫酶 (betaine aldehyde dehydrogenase 2, *BADH2*) 基因，這是最早被發現參與香味性狀的基因⁽⁴⁵⁾。學者們發現另有一香味的 QTL，位在第四對染色體上，經定位選殖及序列分析，發現其為 *BADH1*，因而確立其與香味性狀的關係^(48, 49)。中興大學農藝系王強生教授，利用芋頭香味突變體 SA0420 與台農 67 雜交所建立的 RILs，探索其他香味基因，結果發現 2 個香味相關的 QTLs，分別位在第 6 對及第 8 對染色體上(數據尚未發表)。這些研究結果，將香味基因與水稻香味的生合成連結，因而協助育種者日後利用分子標誌輔助育種進行香米的育種。

此外，學者目前大多是利用代謝工程的方式，進

表二 穀粒烹煮、食味及外觀等米粒品質之相關基因

品質	基因	染色體位置	米質性狀	基因來源
烹煮與食味	<i>Wx^b</i>	6	直鏈澱粉含量	普通梗稻
	<i>Wx-mq</i>	6	直鏈澱粉含量	Milky Queen
	<i>Wx^{pp}</i>	6	直鏈澱粉含量	ARC6622
	<i>du-1</i>	7	直鏈澱粉含量	EM12
	<i>GIF1</i>	4	直鏈澱粉含量及穀粒充填	普通野生稻
	<i>Alk</i>	6	澱粉糊化溫度	
外觀	<i>GS3</i>	3	粒長	
	<i>GS5</i>	5	粒寬	
	<i>Chk5</i>	5	白堊質	

資料來源：國家水稻數據中心(<http://www.ricedata.cn>)。

行稻米營養成分的改良。最有名的例子即是可生產 β -胡蘿蔔素的黃金米^(50, 51)。近來，日本學者亦多致力於增加稻米成份中的必需胺基酸含量及功能性胜肽。而台灣亦有學者利用水稻作為生物反應器，進行疫苗、乳鐵蛋白質及抗高血壓胜肽的生產。

(六) 產量相關基因

長久以來，產量一直被認為一個複雜的性狀。因為，其不僅受到基因型的調控外，亦受到環境因子的影響。水稻產量主要是由下列三要素所影響：單位面積的穗數、每穗粒數及粒重。學者利用高密度的分子標誌發現約有 2,877 個與水稻產量或產量三要素有關的 QTLs (資料來自 www.gramene.org)。近期由於相關 QTL-based NILs 族群的建立，發現許多相關 QTLs 具有主效效應，進而可以透過據圖選殖的研究方法，將重要的基因選殖出來⁽⁵²⁾，包括與穗數、每穗粒數及粒重等相關的基因⁽⁵³⁻⁵⁶⁾。另一方面，除了這些產量相關基因的探索外，亦有學者嘗試分析 C4 植物光合作用的重要酵素基因，並轉殖至水稻，以提升光合作用效率⁽⁵⁷⁾。這些結果將可作為未來進行分子育種改良水稻產量的基礎。

水稻為我國重要糧食作物之一，除本文所簡介之功能基因外，尚有其它重要功能基因，像是抗逆境相關基因，如耐鹽基因、耐淹水基因及耐熱基因，另外與產期調節有關基因，如影響抽穗期基因等，因礙於篇幅之故，本文無法一一詳述。但這些功能基因均已被應用於因應氣候變遷的育種計畫。

後基因體世代的分子標誌分析平台

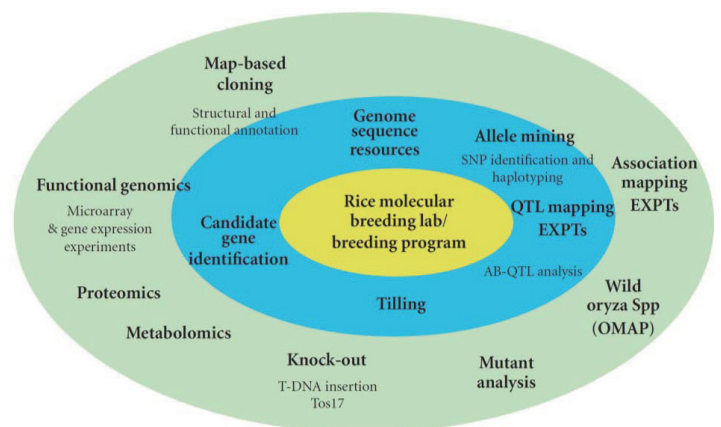
20 世紀之初是基因體學世紀的開始，因為稉稻及秈稻的基因體定序已陸續完成^(3, 4)，伴隨著高通量全基因體基因型分析、基因表現及次代基因體定序儀器的快速發展，同時先進的生物資訊學與資料庫的發展，深深地影響 21 世紀的水稻育種，開始進入所謂的「分子育種」或「後基因體作物育種」的世代。如何整合現行快速發展中的分生或基因體學技術，促使更快、更有效率的育種過程，便成為目前水稻分子育

種實驗室所需面對的挑戰。

有學者將水稻基因體序列發表前的分子育種實驗室，定義為「前基因體序列分子育種實驗室」⁽⁵⁹⁾，約莫是在 1990 年代早、中期。此時，RFLP 與逢機增幅多型性 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分子標誌，是最常被應用在水稻育種研究。在日本，RFLPs 仍是持續在使用的一個分子標誌系統⁽⁶⁰⁾。後來，為了簡化操作流程並提升相關技術的可信度，開始使用所謂的第二代的分子標誌—序列標記區 (sequence-tag site, STS)^(61, 62) 及簡單序列重複 (simple sequence repeat, SSR; 微衛星) 分子標誌⁽⁶³⁻⁶⁵⁾。

在水稻基因體序列發表後，分子育種實驗室現在常用的分子標誌分析技術，則依其標誌的性質有 SSR、SNP、INDEL 及「客製化」標誌。目前分子育種實驗室主要利用這些技術，得以進行後續探索 QTL 的連鎖目標基因、利用 Eco-TILLING 探索目標性狀基因、不同水稻種原的全基因組 SNP 探勘、連鎖圖譜之建立或 MAS (圖二)⁽⁵⁹⁾。分析技術的選擇，通常是依據實驗室可取得的經費、儀器及現有人力等資源。現將各平台的特色，分項敘述如下：

(一) SSR 標誌



資料來源：Collard, 2008.

圖二 後基因體世紀之水稻分子標誌平台應用的研究

SSR 標誌是一種高度可信、共顯性、具高度多型性，且容易在定位族群間轉移的分子標誌。它的缺點是必須利用聚丙烯膠體電泳分析基因型來檢測結果，較為繁瑣。同時，每次分析大多只能得到單一基因座的資訊。但由於 SSRs 的分析成本及實驗的簡易性，所以即使已經進入「後基因體序列分子育種實驗室」世代，其仍被持續利用在基因型的分析。2001 年時，約有 500 個 SSRs 自當時公布的水稻基因體序列 (57.8 Mb) 而被發展出來，但是隨著公佈序列的完整，釋出的 SSRs 數目也越高。在 2002 年時即發表 2,240 個 SSRs⁽⁶⁶⁾。到了 2005 年，隨著日本晴序列的發佈，共有 18,828 個第 I 型的 SSRs (雙、三及四個核苷酸的重複序列) 被發表⁽⁶⁷⁾。目前可用的 SSR 已能涵蓋水稻的基因組，平均每 Mb 就有 51 個 SSRs。所以，其已可被當作一種工具，用來進行連鎖圖譜的建立或 MAS 的應用。

在 SSR 分析方面，傳統上是利用聚丙烯酰胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis)，或是高解析度的瓊脂膠體電泳 (agarose) 進行分析。其優點是成本低廉，技術層次不高，所需儀器亦不複雜，因此大部分的實驗室均能執行。然而，這兩個分析方法均極耗費人力，而且還很難精準快速紀錄結果，不利下游分析的進行。近來為了提高分析的效率，有些分子遺傳實驗室開始利用多重引子 PCR (multiplex PCR)⁽⁶⁸⁾ 及毛細管電泳 (QIAGEN e-GENE 或 ABI 3730 sequencer) 來改善傳統 SSR 分析方法的效率。甚至有些實驗室會利用螢光標定的引子，結合上述兩種策略，來提升分析的效率並降低成本^(69, 70)。

(二) 單一核苷酸多型性 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs)

基因組解序後發現 SNPs 在許多生物基因組中的豐富性與普遍性，因而被許多育種家視為是新一代的分子標誌技術。在水稻，由於日本晴、93-11 及其他基因型水稻的基因組序列的發佈，現階段可藉由序列的比對，即可建立 SNPs⁽⁷²⁻⁷⁴⁾。尤其是隨著基因組定序

技術的演進，不同基因型或種原的基因組序列的取得容易，使得 SNP 被發現的數量也越來越多。然而，由於序列分析可能會有錯誤發生。所得之 SNP 分子標誌仍需經過實驗的驗證，方能應用⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾。

目前，常用以 SNP 分析方法為基礎建立的分子標誌系統有：PCR-based SNP、切割增幅多型性序列 (cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS) 及衍伸式切割增幅多型性序列 (dCAPS) 等⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾。這些方法仍需配合聚丙烯酰胺膠體或是瓊脂膠體電泳的分析。近來由於技術的發展，演變出許多關於 SNP 基因型分析的高通量檢測方法，如應用毛細管電泳分析方法的單核苷酸引子延長 (single nucleotide primer extension, SNuPE)⁽⁸¹⁾、以微晶片為基礎的微珠陣列 (BeadArray, illumina)，或是配合 MALDI TOF MASS 的 SEQUENOM⁽⁸²⁾。因 SNP 在生物基因組高密度分佈的特性、上述這些高通量 SNP 基因型分析技術的快速發展演進及分析成本的降低，SNP 分子標誌將成為未來基因型分析的主流平台。

(三) 插入/缺失 (INDELs)

插入/缺失突變是一種常發生編碼區或非編碼區的突變。因此，可經由電腦直接比對籼、粳稻基因組序列後，快速找到 INDELs。在兩亞種間，通常存有豐富的 INDELs，所以可作為籼、粳雜交族群或漸滲雜交 (introgression) 間的必備多型性分子標誌來源之一⁽⁸³⁾。INDELs 如同 SNP 分子標誌，是由全基因組序列比對結果而來，因此仍須經過驗證，以排除因定序錯誤而產生的錯誤 INDELs。

隱子 (intron) 為基因間的非編碼區，比顯子 (exon) 較能忍受插入/缺失突變。因此，有許多的 INDELs 是在隱子中發現，而其長度多型性已被當成一種新型態的隱子長度多型性標誌 (intron length polymorphic marker, ILP)⁽⁸⁴⁾。經實驗驗證的結果顯示，IPL 是明確可信的共顯標誌。雖然，這些標誌是源自籼/粳稻的序列比對，但還是有相當比例的 INDELs 在亞種間仍具有多型性。

(四)「客製化」標誌

由於水稻基因組序列資訊的取得容易，使得分子育種家得以依照研究室的需求，利用比較圖譜，重新設計連鎖分子標誌，成為所謂的「客製化」標誌，使基因型的檢定能更簡化與經濟。通常，發展大量「客製化」標誌是水稻分子育種研究室獨特的特色，而這些標誌主要可從電腦分析水稻基因體序列而得。以日本晴 /93-11 為例，可以直接依據基因組序列，或是資料庫中可取得之對應目標性狀基因的 EST、BAC 或 PAC 序列，設計新型的標誌。或是直接利用比較圖譜來開發「客製化」標誌。甚至，可以直接利用基因探索所得的功能基因序列來設計新標誌 (圖三)^(78, 79, 85)。新設計標誌的形式可以是任何型態，也可以是新的 SSR、INDEL、PCR-based SNP，或是 CAPS。但最重要的設計原則：則是能夠利用實驗室現有的資源，以最簡單容易的方法，就能夠完成基因型檢測的目的。但是新設計的「客製化」標誌，仍需經過 wet-lab 實驗驗證方可應用^(79, 80)。目標性狀的參與基因亦能作為「客製化」標誌設計與開發的基礎。以此設計而得之標誌，通常是與標的性狀緊密連鎖在一起，而

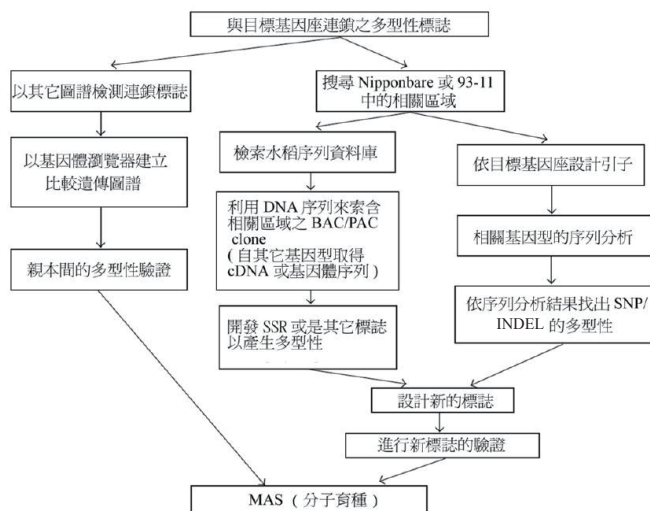
已經成功應用的 MAS，主要是在水稻白葉枯病抗性基因的導入^(86, 87)。

結論

全球農業目前所面臨的最大衝擊，是越來越嚴重的全球氣候變遷。Peng 等學者發現，在全球暖化所造成的夜間溫度提升，對水稻產量已經有了很負面的影響⁽²⁾；再加上極端氣候的變遷，造成了農業生產區頻繁發生的世紀旱、澇災現象，更讓水稻生產產量雪上加霜；另一方面，隨著全球人口的劇烈增長，糧食供不應求的情形也越趨嚴重。因此，如何能夠快速育出因應氣候變遷的水稻品種，以因應這些問題，已經是育種者刻不容緩的研究課題了。

為了因應這些問題，以快速育出因應氣候變遷的水稻品種，在水稻重要功能性基因研究之進展與相關分子標誌技術之平台上，現行或以兩個階段來進行因應氣候變遷新品種的育種。在第一階段，先發展帶有單一特定性狀的有用品種，如抗蟲、抗病、高品質、耐旱...等，並進行田間實際性狀表現的評估，以確定新品種符合育種目的；另一方面，在此育種過程中，同步開發連鎖目標性狀的分子標誌。在第二階段時，將所得幾個單一性狀的品種，利用 MAS 將幾個目標性狀堆疊至同一品系，再驗證新品種在田間的表現情形。未來，可利用經此發展出來的多目標性狀品種與分子標誌，快速應用在將這些目標性狀品種導入其它商業品種，或自其他種原導入新性狀的育種計畫。

AqBIO



- | | | |
|-----|---------------|-----------------|
| 林大鈞 | 行政院農業委員會農業試驗所 | 生物技術組
聘用副研究員 |
| 林岡諭 | 國立中興大學農藝系 | |
| 周思儀 | 行政院農業委員會農業試驗所 | 生物技術組
助理研究員 |
| 王昭月 | 行政院農業委員會農業試驗所 | 生物技術組
助理研究員 |
| 王強生 | 國立中興大學農藝系 | 副教授 |

資料來源：Collard, 2008.

圖三 「客製化」標誌的開發流程

參考文獻

1. Khush, G. S. (1999) *Green revolution: preparing for the 21st century*. Genome 42(4):646-655.
2. Peng, S., et al. (2004) *Rice yields decline with higher night temperature from global warming*. Proc Natl Acad Sci U S A 101(27): 9971-9975.
3. Goff, S. A. et al. (2002) *A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica)*. Science 296(5565):92-100.
4. Yu, J., et al. (2002) *A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. indica)*. Science 296(5565):79-92.
5. Project., I. R. G. S. (2005) *The map-based sequence of the rice genome*. Nature 436(7052): p. 793-800.
6. Zhang, Q., (2007) *Strategies for developing Green Super Rice*. Proc Natl Acad Sci U S A 104(42): p. 16402-16409.
7. 鄭清煥 (2003) 褐飛蟲。植物保護圖鑑系列8—水稻保護，頁75-83。防檢局。
8. Hirabayashi, H. and Ogawa, T. (1995) *RFLP mapping of Bph-1 (brown planthopper resistance gene) in rice*. Breed Sci 45:369-371.
9. Murai, H., et al. (2001) *Construction of a high-resolution linkage map of a rice brown planthopper (Nilaparvata lugens Stal) resistance gene bph2*. Theor Appl Genet 103: 526-532.
10. Sharma, P. N., et al. (2004) *Marker-assisted pyramiding of brown planthopper (Nilaparvata lugens Stal) resistance genes Bph1 and Bph2 on rice chromosome 12*. Hereditas 140(1): 61-69.
11. Huang, Z., et al. (2001) *Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice*. Theor Appl Genet 102:929-934.
12. 李進波等人 (2006) 水稻抗褐飛蟲基因Bph14和Bph15的分子標記輔助選擇。中國農業科學 39(10):2132-2137。
13. 李長沛等人 (2011) 野生稻Oryza officinalis基因導入系統褐飛蟲抗性的研究。台灣農業研究 60(4):263-278。
14. 周泳成、林駿奇、黃德昌 (2010) 水稻主要病害之發生與防治。植物保護通報，24:4-15。
15. Chen, H. L., et al. (2001) *Pathotypes of Pyricularia grisea in Rice Fields of Central and Southern China*. Plant Disease 85:843-850.
16. Parry, M. L. et al., Editors (2007) *Climate Change 2007: Climate Change Impacts, Adaptation and Vulnerability*, IPCC, Cambridge, UK.
17. Smit, B. and Skinner, M. W. (2002) *Adaption options in agriculture to climate change: A typology*. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 7:85-114.
18. Lobell, D. B. and Field, C. B. (2007) *Global scale climate-crop yield relationships and the impacts of recent warming*. Environmental Research Letter 2:1- 7.
19. 蘇宗振 (2009) 氣候變遷下台灣糧食生產因應對策。農政與農情，200。
20. Chen, S., et al. (2000) *Improvement of bacterial blight resistance of 'Minghui 63', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection*. Crop Sci. 40:239-244.
21. 周永力等人 (2002) 轉基因雜交稻梗秣和秣559對白葉枯病的抗性。中國水稻科，16(1):93-95。
22. Huang, N., et al., (1997) *Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR*. Theor Appl Genet 95:313-320.
23. Sun, X., et al. (2004) *Xa26, a gene conferring resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein*. Plant J 37(4):517-527.
24. 陳隆澤、黃守宏、鄭清煥 (2009) 水稻病蟲害抗性檢定工作回顧。台灣水稻保護成果及新展望研討會刊，頁83-103。行政院農業委員會農業試驗所。
25. Lian, X., et al. (2005) *QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid*. Theor Appl Genet 112(1):85-96.
26. Lian, X., et al. (2006) *Expression profiles of 10,422 genes at early stage of low nitrogen stress in rice assayed using a cDNA microarray*. Plant Mol Biol 60(5):617-631.
27. Yi, K., et al. (2005) *OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice*. Plant Physiol

參考文獻

- 138(4):2087-2096.
28. Wissuwa, M. and Ae, N. (2001) *Genotypic variation for tolerance to phosphorus deficiency in rice and the potential for its exploitation in rice improvement*. Plant breed 120(1):43-48.
29. Wissuwa, M. and Ae, N. (2001) *Further characterization of two QTLs that increase phosphorus uptake of rice (Oryza sativa L.) under phosphorus deficiency*. Plant and soil 237:275-286.
30. Yue, B., *et al.* (2006) *Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance*. Genetics 172(2):1213-1228.
31. Shen, L., *et al.* (2001) *Evaluation of near-isogenic lines of rice introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection*. Theor Appl Genet 103:75-83.
32. Steele, K.A., *et al.* (2006) *Evaluation of near-isogenic lines of rice introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection*. Theor Appl Genet 112:208-221.
33. Garg, A.K., *et al.* (2002) *Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses*. Proc Natl Acad Sci U S A 99(25):15898-15903.
34. Hu, H., *et al.* (2006) *Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice*. Proc Natl Acad Sci U S A 103(35):12987-12992.
35. Tan, Y.F., *et al.* (1999) *The three important traits for cooking and eating quality of rice grains are controlled by a single locus in an elite rice hybrid, Shanyou 63*. Theor Appl Genet 99:642-648.
36. Wang, L.Q., *et al.* (2007) *Genetic basis of 17 traits and viscosity parameters characterizing the eating and cooking quality of rice grain*. Theor Appl Genet 115:463-476.
37. He, P., *et al.* (1999) *Genetic analysis of rice grain quality*. Theor Appl Genet 98:502-508.
38. Tan, Y.F., *et al.* (2000) *Genetic bases of appearance quality of rice grains in Shanyou 63, an elite rice hybrid*. Theor Appl Genet 101:823-829.
39. Tripathi, R.S. and Rao, M. (1979) *Inheritance and linkage relationship of scent in rice*. Euphytica 28:319-323.
40. Dhulappanavar, C.V. (1976) *Inheritance of scent in rice*. Euphytica 25:659-662.
41. Kadam, B. S. and Patankar, V. K. (1938) *Inheritance of aroma in rice*. Chron. Bot. 4: 32.
42. Joden, N. E. (1944) *The inheritance of flower fragrance and other characters in rice*. J. Amer. Soc. Agron. 36:844- 848.
43. Ghose, R. L. M. and Butany, W. T. (1952) *Studies on the inheritance of some characters in rice (Oryza Sativa L.)*. Indian J. Genet. Plant Breed 12:26- 30.
44. Ahn, S. N., Bollich, C. N. and Tanksley, S. D. (1992) *RFLP tagging of a gene for aroma in rice*. Theor. Appl. Genet. 84:825-828.
45. Bradbury, L. M., *et al.* (2005) *The gene for fragrance in rice*. Plant Biotechnol J 3(3):363-370.
46. Sun, S. A., *et al.* (2008) *Genetic analysis and gene fine mapping of aroma in rice (Oryza sativa L. Cyperales, Poaceae)*. Genet. Mol. Biol. 31:532- 538.
47. Wanchana, S., *et al.* (2005) *A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning*. Science Asia 31:299-306.
48. Amarawathi, Y., *et al.* (2008) *Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (Oryza sativa L.)*. Mol. Breed. 21:49- 65.
49. Lorieux, M., *et al.* (1996) *Aroma in rice: genetic analysis of quantitative trait*. Theor. Appl. Genet. 93:1145-1151.
50. Ye, X., *et al.* (2000) *Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm*. Science 287(5451):303-305.
51. Paine, J. A., *et al.* (2005) *Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content*. Nat Biotechnol 23(4):482-487.
52. Salvi, S. and Tuberosa, R. (2005) *To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges*. Trends Plant Sci 10(6):297-

參考文獻

- 304.
53. Li, X., *et al.* (2003) *Control of tillering in rice*. *Nature* 422(6932):618-621.
54. Ashikari, M., *et al.* (2005) *Cytokinin oxidase regulates rice grain production*. *Science* 309(5735):741-745.
55. Fan, C., *et al.* (2006) *GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein*. *Theor Appl Genet* 112:1164-1171.
56. Song, X.-J., *et al.* (2007) *A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase*. *Nat Genet* 39(5):623-630.
57. Ku, M.S.B., *et al.* (2000) *Photosynthetic performance of transgenic rice plants overexpressing maize C4 photosynthesis enzymes*. *Studies in Plant Sci.* 7:193-204.
58. Varshney, R.K., Graner, A. and Sorrells, M. E. (2005) *Genomics-assisted breeding for crop improvement*. *Trends Plant Sci* 10(12):621-630.
59. Collard, B.C.Y., *et al.* (2008) *Rice Molecular Breeding Laboratories in the Genomics Era: Current Status and Future Considerations*. *Int J Plant Genomics* 2008:524847.
60. Harushima, Y., *et al.* (1998) *A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population*. *Genetics* 148(1):479-494.
61. Blair, M. W. and McCouch, S. R. (1997) *Microsatellite and sequence-tagged site markers diagnostic for the rice bacterial leaf blight resistance gene xa-5*. *Theor Appl Genet* 95:174-184.
62. Inoue, T., *et al.* (1994) *Sequence-tagged sites (STSs) as standard landmarks in the rice genome*. *Theor Appl Genet* 89:728-734.
63. McCouch, S.R., 1/ *VU84X96*. (1997) *Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding*. *Plant Mol Biol* 35(1-2):89-99.
64. Gupta, P.K., *et al.* (1999) *Molecular markers and their applications in wheat breeding*. *Plant Breeding* 118:369-390.
65. Gupta, P. K. and Varshney, R. K. (2000) *The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat*. *Euphytica* 113:163-185.
66. McCouch, S.R., *et al.* (2002) *Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (Oryza sativa L.) (supplement)*. *DNA Res* 9(6):257-279.
67. Matsumoto, T., *et al.* (2005) *The map-based sequence of the rice genome*. *Nature* 36:793-800.
68. Ribaut, J. M., *et al.* (1997) *Use of STSs and SSRs as rapid and reliable preselection tools in a marker-assisted selection backcross scheme*. *Plant Molecular Biology Reporter* 15:156-163.
69. Blair, M. W., Hedetale, V. and McCouch, S. R. (2002) *Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (Oryza sativa L.)*. *Theor Appl Genet* 105(2-3):449-457.
70. Coburn, J. R., *et al.* (2002) *Design and application of microsatellite marker panels for semiautomated genotyping of rice (Oryza sativa L.)*. *Crop Sci.* 42:2092-2099.
71. Rafalski, A. (2002) *Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics*. *Current Opinion in Plant Biology* 5:94-100.
72. Feltus, F. A., *et al.* (2004) *An SNP Resource for Rice Genetics and Breeding Based on Subspecies Indica and Japonica Genome Alignments*. *Genome Res* 14:1812-1819.
73. Nasu, S., *et al.* (2002) *Search for and Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Rice (Oryza sativa, Oryza rufipogon) and Establishment of SNP Markers* *DNA Res* 9:163-171.
74. Shen, Y. J., *et al.* (2004) *Development of Genome-Wide DNA Polymorphism Database for Map-Based Cloning of Rice Genes*. *Plant Physiol* 135:1198-1205.
75. Monna, L., *et al.* (2006) *Genome-wide Searching of Single-nucleotide Polymorphisms among Eight Distantly and Closely Related Rice Cultivars (Oryza sativa L.) and a Wild Accession (Oryza rufipogon Griff.)* *DNA Res* 13:43-51.

参考文献

76. Hour, A., *et al.* (2007) *Detection of SNPs between Tainung 67 and Nipponbare rice cultivars*. Botanical Studies 48:243-253.
77. Shirasawa, K., *et al.* (2007) *The number of genes having different alleles between rice cultivars estimated by SNP analysis*. Theor Appl Genet 115:1067-1074.
78. Hayashi, K., Yoshida, H. and Ashikawa, I. (2006) *Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes*. Theor Appl Genet 113:251- 260.
79. Hayashi, K., *et al.* (2004) *Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus*. Theor Appl Genet 108:1212-1220.
80. Komori, T. and Nitta, N. (2005) *Utilization of the CAPS/dCAPS method to convert rice SNPs into PCR-based markers*. Breeding Science 55:93-98.
81. Yoshimura, A., *et al.* (1996) *Analysis and pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice by using DNA markers*. Rice Genetics III:577-581.
82. Tsuchihashi, Z. and Dracopoli, N. C. (2002) *Progress in high throughput SNP genotyping methods*. Pharmacogenomics J 2(2):103-110.
83. Katagiri, S., *et al.* (2004) *End Sequencing and Chromosomal in silico Mapping of BAC Clones Derived from an indica Rice Cultivar, Kasalath*. Breeding Sci 54:273-279.
84. Wang, X., *et al.* (2006) *Genome-wide Investigation of Intron Length Polymorphisms and Their Potential as Molecular Markers in Rice (Oryza sativa L.)* DNA Res 12:417-427.
85. Fjellstrom, R., McClung, A. M. and Shank, A. R. (2006) *SSR markers closely linked to the Pi-z locus are useful for selection of blast resistance in a broad array of rice germplasm*. Mol Breed 17:149-157.
86. Conaway-Bormans, C.A., *et al.* (2003) *Molecular markers linked to the blast resistance gene Pi-z in rice for use in marker-assisted selection*. Theor Appl Genet, 107:1014-1020.
87. Lin, F., *et al.* (2007) *A high-resolution map of the rice blast resistance gene Pi15 constructed by sequence-ready markers*. Plant Breeding 126:287-290.