

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

糯稻種原之蜡質基因 DNA 序列與胚乳澱粉組成之相關性研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-367-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學農藝學系暨研究所

計畫主持人：林順福

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 11 月 1 日

題目：糯稻種原之蜡質基因 DNA 序列與胚乳澱粉組成之相關性研究

Studies on the correlations between variation in waxy gene sequences and starch components in endosperm for glutinous-rice germplasm

一、中文摘要

本試驗使用 144 個稻種原(包括 118 個糯性種原與 26 個非糯性種原)做為材料,目的為研究蜡質基因在糯稻背景下,偵測 Wx^a allele 是否在梗稻或糯稻中出現,或者蜡質基因序列上的差異是否會影響該基因的作用。因為米粒外觀與直鏈澱粉在判別是否為糯稻種原的標準上,存在些許差異,造成 10 個由外觀觀察歸類為糯性的種原,卻具有高直鏈澱粉含量。在轉譯起始點下游 144 bp 處,核苷酸 "G" 表示 Wx^a 對偶基因,而 "T" 則表示 Wx^b 對偶基因,在所有參試種原中,此處的差異可解釋 42.6 % 的直鏈澱粉變異。此外,在 8 個(CT)重複序列基因座中,6 個對直鏈澱粉具有顯著的作用,其中(CT)₁₁、(CT)₁₇ 與(CT)₁₀ 各別對直鏈澱粉變異的貢獻為 34.5 %, 19.5 % 及 18.7 %。在本實驗中,也另外發現(AATT)₆ 與另外三個鹼基置換點(第 229、363、390 bp 處)對於直鏈澱粉有顯著貢獻。另外,我們也發現有 3 個糯性種原(C102, C105, and C124)與 4 個梗稻種原(C010, C050, C093, and C100)具有 Wx^a 對偶基因,此結果推翻先前所認知的結果:糯稻及梗稻僅具有 Wx^b 對偶基因。同時,本試驗由蜡質基因的序列訊息,建立了該基因的樹狀圖;該 144 個種原的分布,主要依據(CT)重複序列、直鏈性澱粉含量、及引種國家進行分群,結果與先前 ISSR 分子標誌針對秈糯及梗糯分群結果相似。設計引子偵測 Wx 基因長度結果發現種原間並無明顯差異。由 GLM 分析結果,測得 144-G/T 變異及(CT)重複序列與蜡質基因表現有關,另外,亦新測得(AATT)_{5/6}、390-C/T、363-T/G 及 229-G/A 影響蜡質基因表現。其中(AATT)_{5/6}、390-C/T、363-T/G 可解釋 40.2 % 的直鏈澱粉變異,而 229-G/A 則可貢獻 54.9 %。

關鍵詞: 糯稻、種原、蜡質基因、直鏈性澱粉含量、DNA 序列、遺傳歧異性

Abstract

To study waxy gene expression under glutinous background, to detect Wx^a allele in glutinous or japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties, to identify sequences related waxy gene expression, and to evaluate genetic similarity among glutinous rices, the 5' upstream sequences of waxy alleles among 144 rice germplasm, (including 118 waxy and 26 non-waxy), were analyzed. Because ten germplasm classified as waxy-type by their appearance had higher amylose amount (>12%), there was a little difference in judging waxy-type varieties between by checking grain appearance and amylose content. The diverse nucleotides "G" and "T" respectively representing Wx^a and Wx^b were found in glutinous germplasm. The single nucleotide substitution could explain 42.6 % of amylose content. Besides, we have found eight alleles of (CT) repeat in our study, and six of the eight alleles have significant effects on amylose contents. The alleles (CT)₁₁, (CT)₁₇ and (CT)₁₀ contributed

34.5 %, 19.5 % and 18.7 % of total amylose variation, respectively. The finding of three glutinous (C102, C105, and C124) and four (C010, C050, C093, and C100) japonica germplasm carrying a Wx^a allele has refreshed the previous understanding that glutinous or japonica rice carry Wx^b allele only. According to the sequence of waxy alleles, the gene tree of 144 germplasm was established. The investigated varieties were separated predominantly by repeat numbers of (CT), amylose content, and origins of germplasm. Similar results have been found in clustering based on ISSR markers previously. From the GLM analysis results, 144th(G/T) and (CT) repeated alleles were detected and other newly discovered factors including (AATT)_{5/6}, 390-C/T, 363-T/G, and 229-G/A. have a significant attributions for amylose accumulation. (AATT)_{5/6}, 390-C/T, and 363-T/G could explain 40.2 % of amylose variation, and 229-G/A could contribute 54.9 %.

Keywords: Glutinous Rice, Germplasm, Waxy Gene, Amylose, DNA Sequence, Genetic Diversity

二、緣由與目的

稻米是世界主要糧食之一，約有半數人口以稻米為主食，其中在亞洲地區之年產量及栽培面積均佔世界 90%以上。雖然世界人口不斷增加，但是各地區之單位面積稻米產量亦逐年增加 (FAO, 1990)，主要歸因於栽培技術及遺傳改良之貢獻，而稻之遺傳資源不但是育種的骨幹，亦是世界糧食安全基礎。目前世界收集之稻種原數接近十萬種之多，在 IRRI 之國際稻種原中心 (IRGC) 約收集 76,000 種，我國則約收集有 6,500 種。在早期保存稻作種原曾經過評估與有效利用，例如，來自台灣之低腳烏尖提供半矮性基因而育成許多早熟豐產品種、來自印度及斯里蘭卡品種與野生種提供抗褐飛蝨基因、來自中國大陸野生稻提供細胞質雄不稔特性有利於雜種水稻之育成等 (張德慈, 1997)。稻之栽培分佈甚廣，目前超過 110 個國家種植稻作，自北緯 53 度延至南緯 40 度，包括各種不同氣候環境，因此為一良好演化及遺傳變異研究材料 (Second, 1991)。早在 1976 年 Chang 曾經綜合生物分類學、演化生物學、生物地理學、考古學、歷史學、人類學、古地質學及古氣象學等證據，說明栽培稻之起源、演化及傳播情形。目前栽培稻包括 *Oryza sativa* 及 *Oryza glaberrima* 兩個物種，亞洲地區栽培種屬於 *Oryza sativa*，而 *Oryza sativa* 又可分為 indica、及 japonica (sinica) 兩個主要亞種 (subspecies)，但是若以穀粒內澱粉組成又可分為非糯稻及糯稻兩類型，其中非糯稻包括秈稻與梗稻，而糯稻則包括梗糯、秈糯及陸糯等三種。

有關非糯稻之遺傳變異之研究甚多，包括利用親緣係數估算兩個稻品種間之遺傳相似性 (林, 2000; Dilday, 1990; Lin, 1991)，利用數量性狀及質量性狀分析 indica 亞種與 japonica 亞種之遺傳變異 (Holcomb et al., 1977; Mackill & Lei, 1997)，及利用同功酵素區分 indica 及 japonica 型 (Sano & Morishima, 1992)。近年來由於 DNA 分子標誌廣泛地利用於作物遺傳研究及育種，也利用在水稻之演化與遺傳資源評估 (Blair et al., 1999; Mackill, 1995; Second, 1991; Virk et al., 1995; Yang et al., 1994; Zhang et al., 1992; Zhu et al., 1998)。除了種常用分子標誌應用於稻之遺傳歧異分析外，亦有學者嘗試使用 ribosomal DNA (rDNA) 及葉綠體之 SSR DNA 差異進行野生稻與栽培種之遺傳歧異性分析 (Liu et al., 1996; Provan et al., 1997)。然而，雖然世界主要稻米生產國亦重視糯稻種原之收集，但是有關糯稻之遺

傳變異研究則相當缺乏(張德慈,1997)。

高等植物儲藏器官內澱粉依其化學結構不同可分為直鏈性澱粉(amylose)及支鏈性澱粉(amylopectin)，其中 amylose 約佔 20-30%，而 amylopectin 約佔 70-80% (Preiss, 1990)。稻米之澱粉成份約佔 75%~80%，秈稻品種具有較大之直鏈性澱粉含量之遺傳變異，約為 7%~34%；梗稻品種一般具低直鏈性澱粉含量，約為 15%~20%；而糯稻品種則具有甚低直鏈性澱粉含量(低於 2%)或不具直鏈性澱粉。Kumar & Khush (1998)由低 amylose 與中 amylose 含量品種相互雜交所得 6 個雜交組合之 F1, F2, B1 及 B2 種子進行遺傳分析，發現不同雜交組合具有不同劑量效應(dosage effect)，其中有一主效基因(major gene)控制低 amylose 與中 amylose 雜交組合之 6-12% amylose 含量之差異。而在低 amylose 與低 amylose 相互雜交組合則發現微效基因(minor gene)及修飾基因(modifier)控制約 2.5% amylose 含量之差異。蜡質或糯質(Wx)基因產生蜡質(waxy protein, 或稱 granule-bound starch synthase, GBSS)蛋白質為合成胚乳內直鏈性澱粉所必需(Sano, 1984)。Wang et al. 分別由一個梗稻、秈稻及野生稻品系選殖 Wx 基因，並且加以定序比較(1990, 1994)，結果發現梗稻品種之 Wx 基因具有 13 個 exon 及 12 個 intron，而在 leader region 則發現一較大之 intron (1124 bp)。Wang et al. (1995)更以 15 個秈稻、8 個梗稻及 8 個糯稻品種進行 Wx 基因之轉錄(transcript)分析，發現高直鏈性澱粉含量之品種(秈稻)具有 2.3 kb 之 Wx mRNA，而中直鏈性澱粉含量之品種(梗稻)除了具有 2.3 kb 之 Wx mRNA 外，另外具有一 3.3 kb 之 Wx pre-mRNA(因尚含 1 kb 之 intron I)，而不具有直鏈性澱粉含量之糯稻品種則僅具 3.3 kb 之 Wx pre-mRNA。因此作者認為 intron I 之移除與否影響直鏈性澱粉含量。而 Nakamura et al. (1997)分析五個水稻 sugary-1 突變體，認為 starch-debranching enzyme 與支鏈性澱粉之結構有關。Ayres et al. (1997)分析 89 個在美國育成之非糯稻品種 Wx 基因的簡單重複序列數目(microsatellite alleles)，發現共有 7 種不同數目之重複序列，且這些重複序列數目差異可解釋 82.9%之直鏈性澱粉含量的遺傳變異，相似的結果亦在由低直鏈性澱粉含量與中直鏈性澱粉含量品種雜交所產生之 101 個後代發現。在同一研究報告中作者分析 42 個品種之 Wx 基因的 intron I，發現所有直鏈性澱粉含量低於 18%之品種均具有 AGTTATA 序列，而其他高直鏈性澱粉含量品種則具有 AGGTATA 序列。Mikami et al. (1999)分析四個具有不同 Wx 對偶基因(Wx^a, Wx^b, Wx^{op} 及 wx)之近似同源系(near-isogenic lines)，其直鏈性澱粉含量有明顯不同，且直鏈性澱粉含量與 intron I 之 DNA 序列有關。由以上報告可知，Wx 基因之 Intron I 的 DNA 序列差異及簡單重複序列數目對非糯稻品系(秈稻及梗稻)之澱粉組成及稻米品質有極重要的影響，但對於糯稻品系則未有較深入之研究。

雖然糯稻並非人類主食，但是在民俗食物、糕點及加工釀造上具有重要性，可惜仍未發現有關分子級之糯稻遺傳變異性之研究。又因為其糯稻種原包括梗糯、秈糯及陸糯等三種類型，此三種類型種原之 Wx 基因的 DNA 序列及其澱粉組成之關係值得探討。因此，此本計畫擬以具有代表性之糯稻種原及少數非糯稻種原(對照)為材料，分析不同種原其 Wx 基因之 Intron I 的 DNA 序列差異、Wx 基因長度、簡單重複序列數目(microsatellite alleles)等分子特性與直鏈性澱粉含量或支鏈性澱粉含量之關係。此外，由於本研究室已經以重要農藝性狀及 ISSR(inter simple sequence repeats)分子標誌完成相同材料之遺傳歧異性分析，因此可比較 Wx 基因 DNA 序列差異與遺傳歧異性分析結果，以供稻米 Wx 基因表現、種原管理及品質改良之參考。

三、結果與討論

(1) 直鏈性澱粉含量及支鏈性澱粉含量分析

本試驗以 118 個糯稻種原(包含 59 個秈糯、31 個梗糯及 28 個陸糯)及 26 個非糯稻種原

為材料，分析直鏈性(amylose)及支鏈性澱粉(amylopectin)含量(Fig 1)。結果顯示所調查之糯稻種原在 100mg 米粒粉末中之直鏈性澱粉含量介於 4.5mg 至 36.3mg 之間。雖然糯稻種原多為低直鏈性澱粉含量(低於 12%)，但是仍有 10 個種原具有高直鏈性澱粉含量，而相對地亦有 3 個非糯稻種原具有低直鏈性澱粉含量。在所調查之 144 個種原之 100mg 白米粉末中的穀粒澱粉含量介於 70.3mg 至 88.5mg 之間，顯示不同種原中之澱粉總量差異不大。但是，支鏈性澱粉含量則介於 40.6mg 至 80.7mg 之間，可知直鏈性澱粉含量與支鏈性澱粉含量之間對變異較小之澱粉總量相互具有補償作用。由相關分析顯示米粒澱粉含量與直鏈性澱粉含量(絕對量)間或澱粉含量與支鏈性澱粉含量(絕對量)間有顯著之正相關存在；但是澱粉含量與直鏈性澱粉含量(百分比)間則無顯著相關存在(Tab 1)。

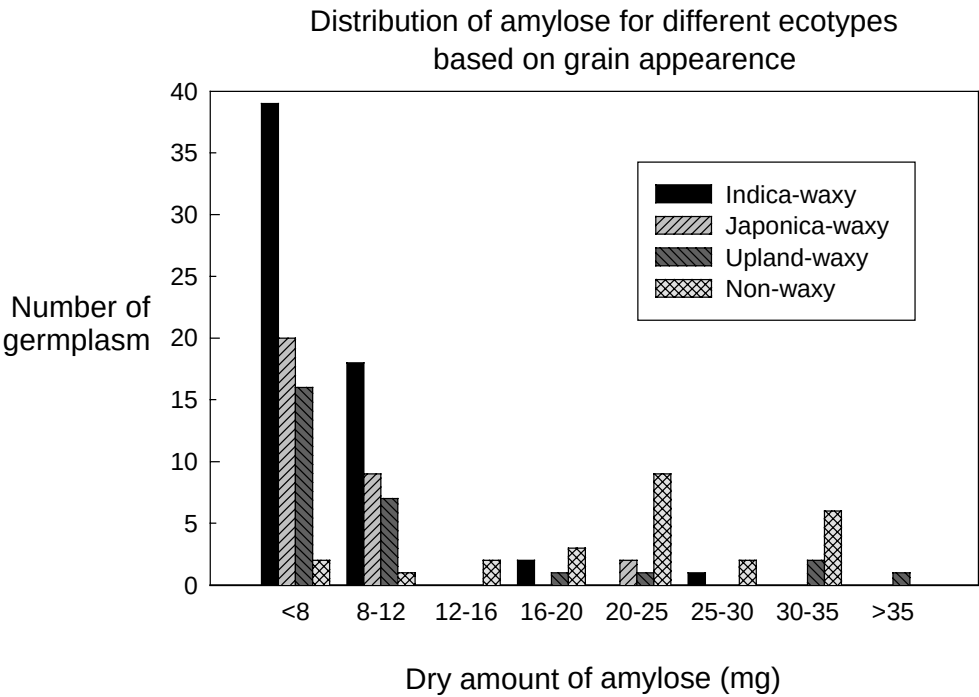


Fig. 1. The distribution of amylose amount for different ecotypes of 144 rice germplasm.

Table 1. Correlations among amylose amount, starch amount, amylopectin amount, and relative amylose ratio

	Amylose amount	Starch amount	Amylopectin amount	Relative amylose ratio (%)
Starch amount (mg/ 100 mg grain)	0.165**			
Amylopectin amount (mg/ 100 mg grain)	-0.837**	0.402**		

Relative amylose ratio (%)	0.996 ^{**}	0.087	-0.876 ^{**}	
Relative amylopectin ratio (%)	-0.996 ^{**}	-0.087	0.876 ^{**}	-1.00 ^{**}

(2) Wx 基因長度及其 intron 1 的 DNA 序列差異分析

在 Wang et al. (1995) 報告指出 Wx 基因之 5' 端上游位置具有調節秈稻及梗稻 post-transcription 程度之功能，主要在影響 intron 之切離。因此本研究針對相關區域進行 380 bp 長度之 DNA 定序(約包含 125bp 之 exon 及 255bp 之 intron)，由 144 種原之 DNA 序列發現除了兩個位置具有重複序列(repeat sequence)變異及兩個位置發生缺失(deletion)，有 22 位置核苷酸發生置換(substitution)情形，而多數 DNA 序列均具有高度保守性。

分析在 144 位置因為“G”或“T”的不同分別產生 Wx^a 及 Wx^b 兩種對偶基因(Tab 2)，在 144 種原中有 63 個秈糯、41 個梗糯及 25 個陸糯具有 Wx^b 對偶基因，而 15 個種原具有 Wx^a 對偶基因。這 15 個具有 Wx^a 對偶基因種原中有 12 個非糯稻種原(包括秈稻、梗稻及陸稻)及 3 個糯稻種原(全為秈糯稻)。由此可知，Wx^a 對偶基因存在於陸稻、秈稻及梗稻種原之中，且並不限於非糯稻種原。

為確認種原間 Wx 基因長度變異，本試驗設計兩組引子分析上述探討區域以外之 Wx 基因長度，將 PCR 放大產物進行電泳比較 DNA 長度結果，並未發現有明顯之長度差異，可知種原間並無明顯之 Wx 基因長度差異。進一步取第一組引子(Primers Y 及 Int B)放大片段進行 DNA 定序，發現有核苷酸缺失(deletion)、插入(addition)及置換(substitution)現象存在，平均 100bp 之核苷酸置換數為 1.7 個，且在於特定區域發生頻度較高，整個片段具有較高比例之 A/T 序列，但未發現重複系列數目之變異。

Table 2 List of 144th bp of single nucleotide changes and (CT) repeated numbers in 129 glutinous and 15 non-glutinous germplasm

Code	144th	(CT)n	Code	144th	(CT)n	Code	144th	(CT)n	Code	144th	(CT)n
C001	T	17	C037	T	17	C073	T	17	C109	T	16
C002	T	17	C038	T	17	C074	G	10	C110	T	16
C003	T	17	C039	T	17	C075	T	17	C111	T	17
C004	T	18	C040	T	17	C076	T	17	C112	T	17
C005	T	18	C041	G	11	C077	T	17	C113	T	17

C006	T	17	C042	T	17	C078	T	17	C114	T	17
C007	T	18	C043	T	17	C079	T	17	C115	T	17
C008	T	16	C044	T	17	C080	T	16	C116	T	18
C009	T	17	C045	T	18	C081	T	18	C117	G	17
C010	G	10	C046	T	18	C082	T	17	C118	T	16
C011	T	17	C047	T	18	C083	T	17	C119	T	17
C012	T	17	C048	T	17	C084	T	18	C120	T	17
C013	T	17	C049	T	18	C085	T	17	C121	T	17
C014	T	17	C050	G	11	C086	T	15	C122	T	17
C015	T	17	C051	T	17	C087	T	18	C123	T	17
C016	T	17	C052	T	17	C088	T	18	C124	G	19
C017	T	17	C053	T	17	C089	T	17	C125	T	16
C018	T	17	C054	T	18	C090	T	18	C126	T	17
C019	T	17	C055	T	17	C091	T	17	C127	T	17
C020	T	17	C056	T	17	C092	T	17	C128	T	17
C021	T	19	C057	T	17	C093	G	19	C129	T	17
C022	T	17	C058	T	17	C094	T	17	C130	T	17
C023	T	19	C059	T	17	C095	T	17	C131	T	17
C024	G	11	C060	G	11	C096	T	18	C132	T	17
C025	T	17	C061	T	17	C097	T	17	C133	T	16
C026	T	19	C062	T	17	C098	T	17	C134	T	16
C027	T	17	C063	T	17	C099	T	17	C135	T	15
C028	T	17	C064	T	17	C100	G	20	C136	T	18
C029	T	17	C065	T	17	C101	G	11	C137	T	18
C030	T	18	C066	T	17	C102	G	19	C138	T	18
C031	T	18	C067	T	17	C103	T	17	C139	T	18
C032	T	17	C068	T	17	C104	T	17	C140	T	17
C033	T	18	C069	T	17	C105	G	19	C141	T	18
C034	T	17	C070	T	17	C106	T	17	C142	T	18
C035	T	17	C071	T	17	C107	T	17	C143	G	11
C036	T	17	C072	T	16	C108	T	19	C144	G	11

除了前人研究(Ayres et al., 1997; Wang et al., 1995)指出在約 49 位置有(CT)重複序列數目變異會影響 W_x 基因表達外，本研究亦發現在 271 位置亦有一重複序列變異存在。所調查之 144 種原之(CT)重複數目分佈分別為：91 個(CT)₁₇、1 個(CT)₂₀、8 個(CT)₁₉、24 個(CT)₁₈、9 個(CT)₁₆、2 個(CT)₁₅、6 個(CT)₁₁、及 3 個(CT)₁₀ 等 8 種不同重複數目。而(AATT)重複序列則僅有(AATT)₅ 及(AATT)₆ 兩種。值得注意的是(AATT)₆ 序列僅在非糯稻種原發現，而並未在糯稻種原中發現。

(3) W_x 基因序列差異與澱粉組成之相關性分析

Table 3. The R square, F values, and P values resulted from general linear model tests in amylose content for the 144th (G/T) and various numbers of (CT) repeated alleles among 144 surveyed rice germplasm

	G--T	(CT) _n								
		(CT) ₂₀	(CT) ₁₉	(CT) ₁₈	(CT) ₁₇	(CT) ₁₆	(CT) ₁₅	(CT) ₁₁	(CT) ₁₀	
R-square	0.4263	0.6452	0.0298	0.0034	0.0345	0.1954	0.0168	0.0046	0.3450	0.1870
F-value	105.52	35.32	4.36	0.49	5.07	34.48	2.43	0.67	74.80	32.67
P-value	<0.0001	<0.0001	0.039	0.486	0.026	<0.0001	0.012	0.415	<0.0001	<0.0001

以 GLM 分析探討在 144 位置之 G/T 差異對直鏈性澱粉含量之影響(Tab 3)，發現此位置之變異可影響 42.6%之直鏈性澱粉含量變異，而(CT)重複序列數目差異則可影響 64.5%之直鏈性澱粉含量性狀之變異。然而，(CT)重複序列對於直鏈性澱粉含量之貢獻並無依數目之大小而增減，其中 (CT)₁₁ 可影響約 34.5%之直鏈性澱粉含量變異，而(CT)₂₀、(CT)₁₈ 及(CT)₁₆ 則僅影響 1.7 至 3.5 %之直鏈性澱粉含量變異。其他位置 DNA 序列差異對直鏈性澱粉含量影響分析如 Tab 4。

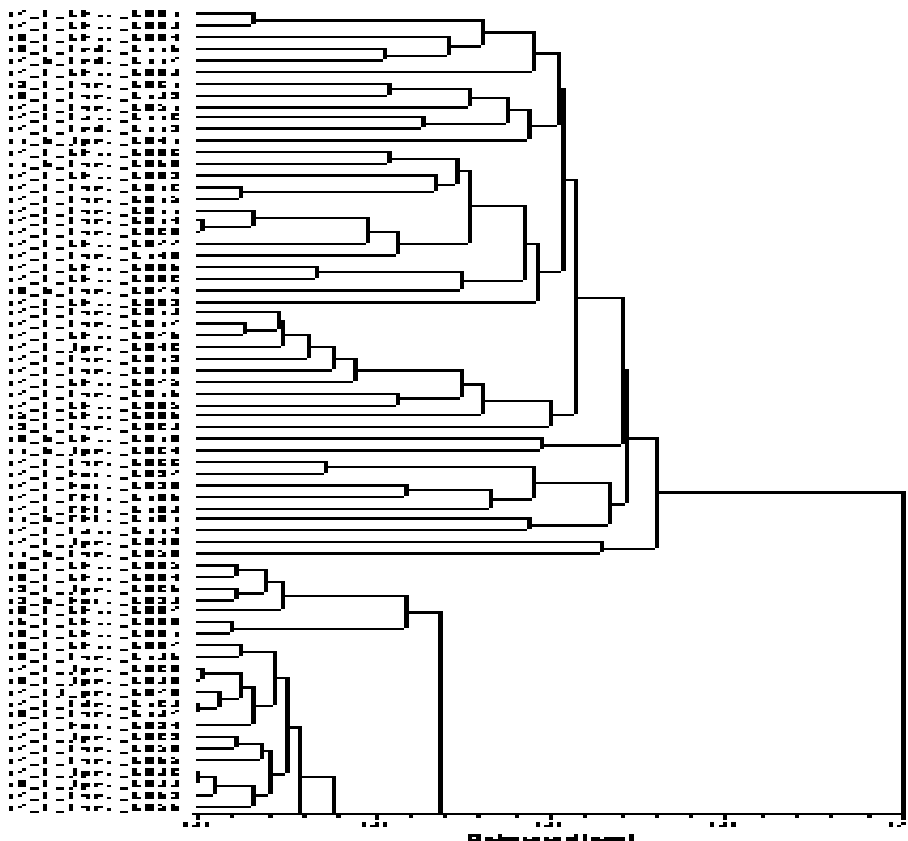
Table 4. GLM analysis of several SNPs and Indels which were found in first five principal components among 144 examined rice germplasm.

PC	Markers	df	R-square	F value	P value
1	(AATT) _{5/6}	1	0.4020	95.46	<0.0001
1	390-C/T	1	0.4020	95.46	<0.0001
1	363-T/G	1	0.4020	95.46	<0.0001
1	229-G/A/X	2	0.5485	85.66	<0.0001
2,3	43-T/G/C/A	3	0.0300	1.45	0.2322
2	42-C/A	1	0.0036	0.51	0.4751
2	41-A/C/G	2	0.0050	0.35	0.7045
2	33-C/T	1	0.0011	0.15	0.6958
2	31-G/T	1	0.0011	0.15	0.6958
2	29-A/T	1	0.0025	0.36	0.5527

3	370-T/G	1	0.0087	1.25	0.2651
3	37-A/T	1	0.0009	0.12	0.7261
4	22-C/T/G/A	3	0.0329	1.59	0.1957
4	21-T/C/G	2	0.0070	0.89	0.6152
4	20-G/T/C	2	0.1044	8.22	0.0004
4	19-T/G/C	2	0.0084	0.60	0.5512
5	230-T/X	1	0.1337	21.91	<0.0001

(4)、Wx 基因序列差異與農藝性狀及 ISSR 分群之相關分析

以144個種原之Wx基因DNA序列進行分群分析，發現無法將參試之種原完全區分，但以144-T/G進行主要分群，其中有56個種原因共同具有(CT)₁₇及144-T (Wx^b)序列而歸集於同一大群內；而5個種原共同具有(CT)₁₆及144-T (Wx^b)序列而歸集於同一小群內。而在9個具有高直鏈性澱粉含量之6個種原中，因共同具有(CT)₁₁ 及 Wx^a 序列而歸屬於同一小群。



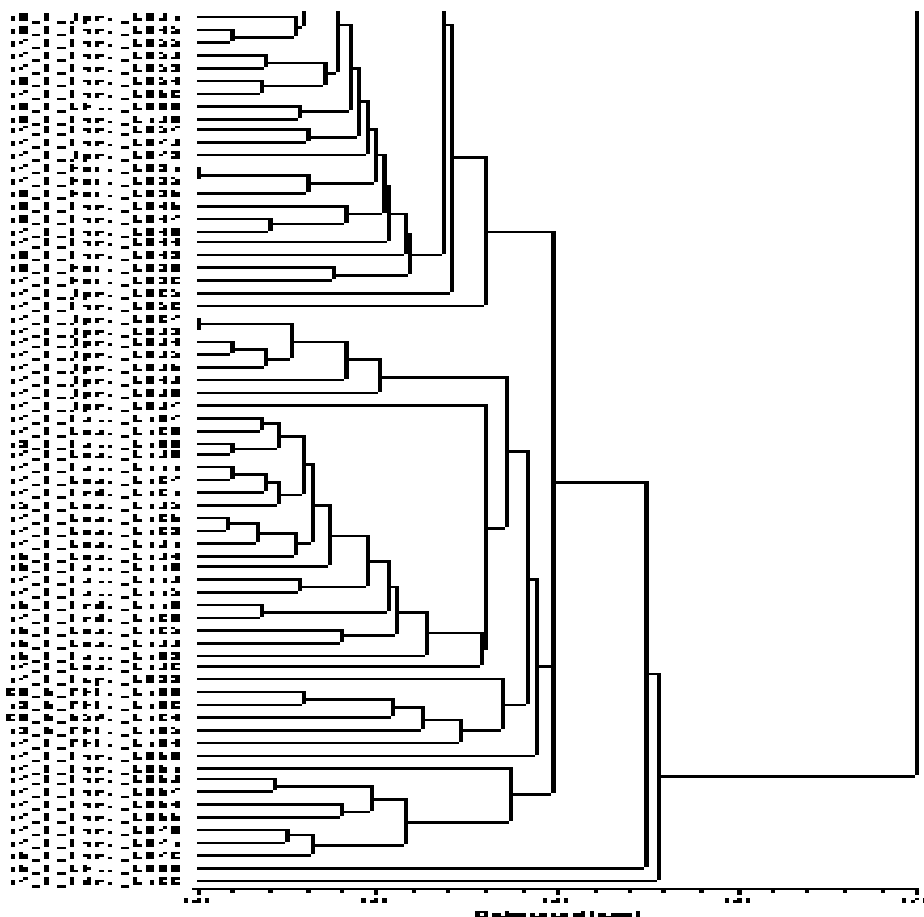


Fig 2. Dendrogram of cluster analysis using genetic diversity of waxy 5' upstream UTR among 144 rice germplasm

將W_x基因與本研究室先前使用ISSR分子標誌進行遺傳歧異性分析結果(圖未列出)比較，發現ISSR分子標誌可將不同種原區分並且加以分群，可將種原依據秈稻、梗稻、陸稻及來源國家之差異與予分群。由於ISSR分子標誌係隨機對整個基因體序列進行取樣分析，並未針對W_x基因或其內部特定序列進行分析，雖其分群結果與W_x基因DNA序列分群結果均可對秈稻及梗稻類型區分，但是W_x基因序列則無法細分同一類型下之不同種原。另外，分別在兩期作調查葉色、葉基色、葉環色、葉舌色、葉舌形狀、葉毛、劍葉形、莖稈角度、稈強度、稈尖色、節間色、柱頭色、穗軸、穗形、芒之有無、芒色、抽穗期、株高、穀粒長、穀粒寬、百粒重等農藝性狀進行種原分群(圖未列出)，發現以株高及葉長兩性狀可將秈糯及梗糯分群，而陸糯則分散於兩群之間。

四、計畫成果自評

本研究以糯稻種原(一般具有較低之直鏈性澱粉含量)為材料針對 W_x 基因內 DNA 序列差異對直鏈性澱粉含量變異之影響，除了確認在 144 位置之 G/T 及(CT)重複次數差異可影響糯稻之

直鏈性澱粉含量外，亦發現另一重複序列(AATT)_{5/6} 及其他五個位置亦影響直鏈性澱粉含量。由於直鏈性澱粉含量對稻米品質有重要影響，美國農業部已經依據 144 位置之 G/T 及(CT)重複次數差異，進行不同用途稻米選種。本研究獲得之新訊息除了有助於 W_x 基因表現之瞭解，更可提供較精確之選種依據。

五、參考文獻

- (1)林茂森 (2000) 台灣水稻品種之歸群分析。中華農學會報 1(1):89-90
- (2)張德慈 (1997) 植物遺傳資源-未來植物生產的關鍵。台灣省農業試驗所編印
- (3)Ayres N. M., A. M. McClung, P. D. Larkin, H. F. J. Bligh, C. A. Jones, and W. D. Park (1997) Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. Theor Appl Genet 94:773-781
- (4)Blair M. W., O. Panaud, and S. R. McCouch (1999) Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 98:780-792
- (5)Chang T. Z. (1976) The origin, evolution, cultivation, dissemination, and diversification of Asian and African rices. Euphytica 25:425-441
- (6)Dilday R. H. (1990) Contribution of ancestral lines in the development of new cultivars of rice. Crop Sci 30:905-911
- (7)FAO- Food and Agriculture Organization (1990) AGROSTAT: information system on food and agriculture. FAO, Rome
- (8)Juliano, B. O. (1971) A simplified assay for milled rice amylose. Cereal Sci Today 16:334-348
- (9)Kumar I. and G. S. Khush (1988) Inheritance of amylose content in rice (*Oryza sativa* L.) Euphytica 38:261-269
- (10)Labate J. A. (2000) Software for population genetic analysis of molecular data. Crop Sci 40:1521-1528
- (11)Liu K. D., G. P. Yang, S. H. Zhu, Q. Zhang, X. M. Wang, and M. A. S. Maroof (1996) Extraordinarily polymorphic ribosomal DNA in wild and cultivated rice. Genome 39:1109-1116
- (12)Lin M. S. (1991) Field uniformity of the japonica rice region of Taiwan as estimated by relative genetic contribution. Theor Appl Genet 83:115-118

- (13) Mackill D. (1995) Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. *Crop Sci* 35:889-894
- (14) Mackill D. and X. Lei (1997) Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. *Crop Sci* 37:1340-1346
- (15) Mikami I., M. Aikawa, H. Hirano, and Y. Sano (1999) Altered tissue-specific expression at the Wx gene of the opaque mutants in rice. *Euphytica* 105:91-97
- (16) Nakamura Y., A. Kubo, T. Shimamune, T. Matsuda, K. Harada, and H. Satoh (1997) Correlation between activities of starch debranching enzyme and α -polyglucan structure in endosperms of *sugary-1* mutants of rice. *The Plant J* 12(1):143-153
- (17) Preiss, J. (1990) Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. *Oxford Surv Plant Mol Cell Biol* 7:59-114
- (18) Provan J., G. Corbett, J. W. McNicol, and W. Powell (1997) Chloroplast DNA variability in wild and cultivated rice (*Oryza* spp.) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Genome* 40:104-110
- (19) Sano R. and H. Morishima (1992) Indica-japonica differentiation of rice cultivars viewed from variations in key characters and isozymes, with special reference to landraces from Himalayan hilly areas. *Theor Appl Genet* 84:266-274
- (20) Sano, Y. (1984) Different regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor Appl Genet* 68:4567-4573
- (21) Second G. (1991) Molecular markers in rice systematics and the evaluation of genetic resources. In: *Bitechnology in Agriculture and Forestry- Rice*, ed. Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- (22) Virk P. S., B. V. Ford-Lloyd, M. T. Jackson, and H. J. Newbury (1995) Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity* 74:170-179
- (23) Virk P. S., B. V. Ford-Lloyd, M. T. Jackson, H. S. Pooni, T. P. Clemeno and H. J. Newbury (1996) *Heredity* 76:296-304
- (24) Wang, Z., F. Zheng, G. Shen, J. Gao, D. P. Snustad, M. Li, J. Zhang, and M. Hong (1995) The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the waxy gene. *The Plant J* 7(4):613-622
- (25) Wang, Z., Z. Wu, Y. Xing, F. Zheng, J. Gao, and M. Hong (1990) Nucleotide sequence of rice waxy gene. *Nucleic Acids Res* 18:5898

- (26) Yang G. P., M. A. Saghai, C. G. Xu, Q. Zhang and R. M. Biyashev (1994) Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol Gen Genet* 245:187-194
- (27) Zhang Q., M. A. S. Maroof, T. Y. Lu, and B. Z. Shen (1992) Genetic diversity and differentiation of indica and japonica rice detected by RFLP analysis. *Theor Appl Genet* 83:495-499
- (28) Zhu J., M. D. Gale, S. Quarrie, M. T. Jackson, and G. J. Bryan (1998) AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theor Appl Genet* 96:602-611