

# 分子標誌輔助水稻台稉9號之抗白葉枯病回交育種<sup>1</sup>

張瑞炘<sup>2</sup>、鄭佳綺<sup>2</sup>、楊嘉凌<sup>2</sup>、郭建志<sup>2</sup>

## 摘 要

水稻台稉9號為國內重要良質米品種，米粒品質優良但缺少抗白葉枯病基因，栽培期間可能因白葉枯病而影響產量，如何防治此病害成為重要課題，最經濟之作法為育成抗病品種，本場採用國際水稻研究所育成之IRBB66品系為貢獻親並以台稉9號為輪迴親進行回交育種，每一世代皆檢測*Xa4*、*xa5*、*Xa7*、*xa13*與*Xa21*等5個基因之分子標誌以輔助選拔，已完成繁殖BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>分離族群計1,000株。本試驗運用分子標誌檢測1,000株BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>個體，共選拔獲得9株帶有5個抗病基因之個體，其中1株帶有5個同質結合基因。獲選9株個體於分蘖盛期採用白葉枯病菌株接種，接種之結果皆未出現超過10公分之病斑。在遺傳背景分析方面採用限制酶切位標定片段定序法，完成SNP之探勘與比對，遺傳背景分析結果顯示9株個體回復率與台稉9號之相似度都超過80%，其中6株超過85%，在全基因組同質結合率方面9株個體皆超過92%，其中第2、4、7、9、10、11、12號染色體，每株個體同質結合率皆超過99%，本次試驗所選拔之9株個體，各帶有3-5個抗病基因，未來可建立9個家系，進而累積自交世代育成抗病品種。

**關鍵字：**水稻白葉枯病、水稻白葉枯病菌、分子標誌輔助育種、回復率、前景選拔

## 前 言

水稻台稉9號為本場育成之良質米品種，市場反應良好，此品種對水稻白葉枯病之抗性不強，在栽培過程中若遭遇強風豪雨造成葉片損傷，病菌容易經由傷口感染，進而導致產量減少，為控制此病害，育成抗病品種為最經濟之作法。國際上已有超過40個抗白葉枯病基因(R genes)被發現<sup>(12)</sup>，並有研究證實堆疊多個抗病基因不僅可增強抗性，亦可增加作物對不同生理小種水平抗幅之廣度<sup>(7)</sup>，因此各國水稻抗白葉枯病育種之策略皆以堆疊多個抗病基因為目標。

IRBB66是國際稻米研究室(IRRI)提供的抗病種原，歷經長時間的培育，堆疊育成具有抗白葉枯病能力的品系，根據IRRI的報導指出IRBB66堆疊出多個R genes，其中包含有*Xa4*、*xa5*、*Xa7*、*xa13*、*Xa21*，且對白葉枯病病原菌*Xanthomans oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo)具有抗性，其分離株包含PXO61<sup>b</sup>、PXO86、PXO79、PXO340、PXO71、PXO112、PXO99、PXO145、PXO280、PXO339、PXO341等<sup>(23)</sup>，因此IRBB66適合作為稻米抗病育種的貢獻親。

<sup>1</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0899 號。

<sup>2</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員、助理研究員、副研究員、助理研究員。

白葉枯病(bacterial blight, BB)屬於水稻的病蟲害之一，其病徵分為三種型式:典型葉枯型(leaf blight)、急性萎凋型(kresiek)以及淡黃化型(pale-yellow)<sup>(15)</sup>，根據報導指出BB最常以典型葉枯及葉片淡黃化型兩種病徵出現，通常透過病原菌感染所致，因而造成葉片黃化甚至枯萎<sup>(25)</sup>。水稻BB係由Xoo所引起的一種細菌性維管束病害，Xoo是革蘭氏陰性菌，屬於假單孢菌科(*Pseudomonadaceae*)，其透過傷口及泌水器(hydathodes)進入植物體內，繁殖於水孔與葉脈末端部間的薄壁組織(epitheme)，最後透過維管束在植物體中傳染開來<sup>(23)</sup>，透過不斷的繁殖及活化，產生許多具有毒力的因子，包含胞外多醣(exopolysaccharides)、胞外蛋白(extracellular enzyme)、鐵離子螯合蛋白(iron-chelating siderophores)等毒力物質，最後造成稻米葉子黃化及萎縮等BB的典型病徵<sup>(6,13,18,19,20)</sup>。對抗BB的方式可分為三種，生物性防護、化學性防護以及遺傳抗性等<sup>(23)</sup>，生物性防護及化學性防護的抗性易受到病原菌的變化而影響，且因應用於田間時需耗費大量人力及物力，因此利用遺傳抗性來預防BB的發生是個不錯的策略。

分子標誌輔助育種技術(marker-assisted selection, MAS)是近年來運用於作物育種的重要技術，其原理為利用作物基因組中可被穩定偵測的核酸片段作為偵測目標基因的工具，可避免環境之影響，精準選拔優良單株。水稻抗白葉枯病基因之發現，可追溯至1970至80年代，國際稻米研究所將不同抗病品種與不同菌株交叉接種測試後，發展出鑑別菌株生理小種的水稻品系，並導入多種野生稻抗病基因至栽培稻<sup>(16,17)</sup>。1990年代以PCR技術為基礎的分子標誌一一被開發，使其得以被應用於輔助育種<sup>(7)</sup>。2000年代水稻全基因組微衛星序列(simple sequence repeat, SSR)分子標誌發表<sup>(26)</sup>，此技術對於各種抗病基因的遺傳定位幫助很大，各國學者藉此完成了許多基因的精準定位與選殖<sup>(5,9)</sup>。除了SSR技術以外，近年來背景選拔的工具逐漸演變成以SNP(single nucleoside polymorphism)為主流，例如利用限制酶切位標定片段定序法(restriction site-associated DNA sequencing, RADseq)，可進行SNP標誌的開發與分析，此技術之原理為利用限制酶將全基因組核酸切割，不同個體的核酸連接各自的生物條碼核酸片段，接著混合在同一試管進行次世代定序(next generation sequencing, NGS)，藉此可大量降低定序成本<sup>(2)</sup>。完成NGS之後以生物資訊軟體分析，依據生物條碼將不同個體的序列分開，以分析各自的遺傳背景，目前已有免費軟體如Stacks可供分析RADseq序列<sup>(11)</sup>。

目前R genes分子標誌方面的研究，*Xa4*是一顯性抗病基因，位於第11號染色體，Wang等2000年應用RFLP分子標誌定位，並確認RS13標誌(0.00 cM)，可有效運用於輔助育種<sup>(28)</sup>。*xa5*基因位於第5號染色體，為隱性抗病基因，Li等人的研究指出*xa5*有部分顯性效應，並有增強*Xa4*及*Xa21*基因的抗病性的交感效應<sup>(14)</sup>。2004年Iyer-Pascuzzi等完成*xa5*的選殖定序，並於2007年開發了*xa5*的功能性標誌<sup>(10)</sup>。*Xa7*為顯性抗病基因，位於第6號染色體，Sidhu等人在抗病水稻品系DV85中發現此基因<sup>(21)</sup>，Ogawa等曾利用回交法將*Xa7*基因轉移到IR24品系，育成抗病品系IRBB7<sup>(16)</sup>，Chen等透過高解析度遺傳定位，找到*Xa7*的微衛星序列標誌(0.07 cM)<sup>(5)</sup>。*xa13*為隱性抗病基因，位於第8號染色體，Chu等在2006年成功選殖*xa13*基因，並證實*xa13*與銅離子的運輸有關<sup>(4)</sup>。*Xa21*是從野生稻*Oryza longistaminata*發現的顯性抗病基因，與*Xa4*同樣位於第11號染色體，其編碼的蛋白質屬於多亮胺酸區域(leucine rich region, LRR)蛋白質<sup>(22)</sup>，*Xa21*

的連鎖分子標誌pTA248是從隨機增幅多型性引子RAPD248的PCR產物設計而來，Williams等曾利用pTA248分子標誌育成帶有*Xa21*的IR24近同源系IRBB21<sup>(30,31)</sup>。

在水稻抗病機制研究方面，目前研究發現水稻抗病基因主要為受器激酶(receptor kinase, RLK)及核酸接合點多亮胺酸區域(nucleotide-binding site leucine-rich repeat, NBS-LRR)兩大類型，而*Xa21*屬於RLK類型、*Xa1*屬於NBS-LRR類型<sup>(32)</sup>，且研究證實*Xa21*、*Xa1*為廣效型對抗細菌性、病毒性及真菌的R genes<sup>(8)</sup>。另外兩個具有抗病功能的R genes分別為*xa5*及*xa13*，*xa5*屬於轉錄因子(IFIIA<sub>γ</sub>)家族，*xa13*屬於細胞膜蛋白(Plasma membrane protein)家族<sup>(27,29)</sup>，且研究結果證實*Xa4*、*xa5*、*xa13*、*Xa21*這些R genes對Xoo皆有抗性<sup>(24)</sup>，因此這些R genes為回交育種的目標基因。

為改良台稉9號之抗病性，本研究以IRRI之IRBB66品系作為貢獻親，以台稉9號為輪迴親進行回交育種，檢測每一世代的*Xa4*、*xa5*、*Xa7*、*xa13*與*Xa21*等5個基因，並在BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>族群選拔同時帶有5個基因的個體，並且採用RADseq法分析獲選個體的遺傳背景，以了解其染色體組成之輪迴親回復率，以及全基因組之同質結合率，進而選拔具有潛力之單株。

## 材料與方法

### 一、水稻回交分離族群

試驗材料中的雜交組合為台稉9號×IRBB66，貢獻親IRBB66係IR24之近同源系(near isogenic line)，堆疊5種抗病基因(*Xa4*、*xa5*、*Xa7*、*xa13*及*Xa21*)。本試驗以台稉9號為輪迴親已完成F<sub>1</sub>、BC<sub>1</sub>、BC<sub>2</sub>、BC<sub>3</sub>等世代之雜交，在每一回交世代皆以分子標誌檢測確保5個基因之存在，於2015年一期作期間利用帶有5個基因的BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>自交單株，於2015年二期作期間栽培BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>分離族群之種苗。為方便標定位置，採用96孔塑膠盤盛水播種，共播種1,000粒種子，於三葉齡採樣，樣品為每個單株剪下3 cm的葉片組織以萃取Genomic DNA。

### 二、萃取核酸與聚合酶連鎖反應

植株DNA抽取過程採用自動化核酸萃取儀(Smart Lab Assist-32，臺灣圓點奈米技術股份有限公司，臺灣)，以及試劑組(TANBead Plant DNA Auto Plate，臺灣圓點奈米技術開發有限公司，臺灣)。取三葉齡水稻葉片3 cm，置於2 mL厚壁試管中，以液態氮快速冷凍，加入鋼珠震盪1 min，將葉片磨成粉末後，加入700 μL Lysis buffer，混合均勻後靜置於室溫5 min。以8,000 g離心1 min，將上清液注入已預先分注試劑之96孔盤，放入自動化核酸萃取儀，依操作手冊選擇(BIO-W4-AUTO)程式，按下啟動後，等待40 min即可完成DNA萃取。以分光光度計測定DNA濃度，儲存於-20°C中備用。聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)使用的試劑為Fast-Run *Taq* Master Kit (Protech Technology, Taiwan)，總反應體積為25 μL，內含10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、0.01% Gelatin、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% Triton X-100、3.75 U *Taq* DNA polymerase、40 ng DNA及0.4 μM 引子。反應儀器為GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)，反應溫度及反應時間依各分子標誌之不同而調整。

### 三、抗病基因之前景選拔

抗白葉枯病基因之檢測皆採PCR方式，引子序列及判斷抗病基因的片段大小如表一所示。檢測*Xa4*採用的引子為MP1、MP2，PCR條件為94°C 5 min，接著循環35次 94°C 60 s、55°C 60 s、72°C 120 s。最後是72°C 10 min<sup>(3)</sup>。檢測*xa5*之PCR條件為94°C 3 min，接著循環33次 94°C 30 s、50°C 30 s、72°C 60 s。最後是72°C 5 min。PCR產物以限制切割酵素*BsrI* (New England Biolabs, UK)完成切割。完成切割反應後以2%瓊脂膠(Agarose I, Amresco, USA)進行電泳。*Xa7*之檢測採用微衛星序列RM20580，PCR反應條件為94°C 5 min，接著循環35次94°C 30 s、60°C 45 s、72°C 60 s，最後是72°C 5 min。PCR產物以3%高解析度瓊脂膠(SFR Agarose, Amresco, USA)進行電泳分析。檢測*xa13*採用的引子參考Chu等發表之序列，反應條件為94°C 5 min，接著循環35次94°C 60 s、55°C 60 s、72°C 60 s，最後是72°C 7 min。針對*Xa21*基因，採用的分子標誌為pTA248，PCR反應條件為94°C 5 min，接著循環30次94°C 30 s、55°C 30 s、72°C 60 s。最後是72°C 5 min。PCR增幅產物直接以1.5%瓊脂膠(Agarose I, Amresco, USA)進行電泳分析。

表一、用於偵測抗病基因的的引子組序列

Table 1. Primer set used for detecting resistance genes in rice

Gene	Primer set	Sequence	Annealing (°C)	Reference
<i>Xa4</i>	MP1	5'-ATCGATCGATCTTCACGAGG-3'	58	Arif <i>et al.</i> , 2008
	MP2	5'-TGCTATAAAAGGCATTCGGG-3'		
<i>xa5</i>	xa5-F	5'-GATAGCAGCATTTCCTCAAGAG-3'	53	Iyer and McCouch, 2004
	xa5-R	5'-GATTCCTTTAGCAAGGTGTG-3'		
<i>Xa7</i>	RM20580F	5'-AACTTCCTTTCCAGGCTTTCAGC-3'	63	Chen <i>et al.</i> , 2008
	RM20580R	5'-TTCCTGAGCCTGAACACATTGC-3'		
<i>xa13</i>	xa13F	5'-CCTGATATGTGAGGTAGT-3'	46	Chu <i>et al.</i> , 2006
	xa13R	5'-GAGAAAGGCTTAAGTGC-3'		
<i>Xa21</i>	pTA248F	5'-AGACGCGGAAGGGTGGTTCCCGGA-3'	59	Williams <i>et al.</i> , 1996
	pTA248R	5'-AGACCGGTAATCGAAAGATGAAA -3'		

### 四、接種誘導發病

栽培帶有5個抗白葉枯病基因之獲選單株於12吋盆，並栽培未帶抗病基因之台梗9號個體5株作為對照，共14個單株。於分蘖盛期，培養*X. oryzae* pv. *oryzae*菌株，該菌株代號為Xoo-F2，由本場生物資材應用研究室自行分離保存之本土菌株。以移植環挖取水稻白葉枯病Xoo-F2之單一菌落至50 ml Wakimoto broth中，置於28°C定溫箱中，以120 rpm轉速條件下震盪培養。待培養48小時後，以分光光度計(Jasco V-630)測定菌液並調整其吸收光值OD600值為0.32，此時菌液濃度約有10<sup>8</sup> cfu/ml以上，作為本次試驗之接種源。接種時以剪刀沾菌液後，於葉片末端3 cm處剪下，每單株接種6至8片葉，完成後分別於11天及21天後拍照，並調查病斑長度。罹

病等級的記錄方式與國際稻米研究所採用同一標準，每一個體葉片病斑長度之平均數小於5 cm紀錄為R，介於5到10 cm紀錄為MR，10到15 cm紀錄為MS，15 cm以上記錄為S。

## 五、遺傳背景之分析

分析遺傳背景採用限制酶切割位點標定片段定序法(restriction site-associated DNA sequencing, RADseq)，本方法需要高品質的DNA，因此萃取方式與上述自動化萃取法不同。剪取水稻葉片3到4 cm，加入0.7 mL DNA萃取液(混合2.85 mg Sodium bisulfate、312.5  $\mu$ L DNA extraction buffer、312.5  $\mu$ L nuclei lysis buffer) 以及125  $\mu$ L 5% N-lauroylsarcosine sodium salt，其中DNA extraction buffer配方為0.35 M Sorbitol、0.1 M Tris base以及5 mM EDTA, pH 8.26，而nuclei lysis buffer配方為0.2 M Tris Base、50 mM EDTA、2 M NaCl以及20  $\text{g L}^{-1}$  CTAB。利用鋼珠將水稻葉磨碎，置於65°C水浴槽30 min，加入0.6 mL氯仿混合液(chloroform : isoamyl alcohol = 24:1)震盪後以10,000 rpm離心5 min，將上清液取出與0.6 mL異丙醇混合，以10,000 rpm離心5 min，將溶液倒出，加入0.2 mL 70%酒精，沖洗DNA沉澱物，以10,000 rpm離心5 min，將酒精倒出，自然風乾後以水溶解DNA。

測量DNA濃度後取1  $\mu$ g DNA，以*pst*I-HF酵素(New England Biolabs, MA, USA)切割，過程參照產品說明書，將切割後的產物調整至50  $\mu$ L，加入2.2  $\mu$ L 100 nM P1 adapter與2.8  $\mu$ L二次蒸餾水，再加入5  $\mu$ L DNA接合溶液(2.9  $\mu$ L二次蒸餾水、1  $\mu$ L 10x NEBuffer4、0.6  $\mu$ L 100 mM riboATP，以及0.5  $\mu$ L 2,000 unit/ $\mu$ L T4 DNA ligase)，保持溫度20°C於PCR儀器中1 hr，加熱65°C 20 min去除活性。其中P1 adapter序列為適用於Illumina公司的定序平台的核酸片段，包含PCR正向引子、次世代定序引子黏合區以及5個鹼基的生物條碼。連接完成後將樣品混合，每個樣品各取3  $\mu$ L，以超音波處理使DNA斷裂，利用磁珠(AMPure@XP, Beckman Coulter, MA, USA)蒐集DNA片段大小介於300 bp 到500 bp 的片段。

接著進行DNA的修補，使用Quick Blunting Kit (NEB, Ipswich MA, USA)。將前一步回收的DNA取足1  $\mu$ g，加入二次蒸餾水使體積達到19  $\mu$ L，再依序加入2.5  $\mu$ L 10x Blunting Buffer、2.5  $\mu$ L 1 mM dNTP mix及1.0  $\mu$ L Blunting Enzyme Mix，然後置於25°C PCR 機器中反應30 min，修補後以AMPure@XP磁珠純化。接著進行加A的動作，依序加入5  $\mu$ L 10xNEBuffer2、1  $\mu$ L 10 mM dATP和3  $\mu$ L Klenow (exo-) (NEB, Ipswich MA, USA)，置於37°C PCR 機器中反應30 min，再置於室溫下15 min使其自然冷卻。完成後以AMPure@XP磁珠純化，接著進行P2 adapter連結反應。依序加入5  $\mu$ L 10x NEBuffer2、1  $\mu$ L 10  $\mu$ M P2 adapter、0.5  $\mu$ L 100 mM riboATP、及0.5  $\mu$ L 2,000 unit  $\mu$ L<sup>-1</sup> T4 DNA ligase (NEB, Ipswich MA, USA)，然後置於20°C PCR 機器中反應3 hr。再次使用AMPure® XP磁珠進行DNA純化，最後使用20  $\mu$ L elution buffer (10 mM Tris, pH 8.3)沖洗DNA，完成DNA定量後保存於-20°C，完成RAD-library template製備。

取50 ng RAD-library template，加入二次水調整體積至10  $\mu$ L，再加入4  $\mu$ L 10  $\mu$ M Solexa primer mix與50  $\mu$ L Phusion High-Fidelity Master Mix (NEB, Ipswich, MA, USA)進行PCR反應。其中，Solexa primer mix為等莫耳數混合的正向引子5'AAT GAT ACG GCG ACC ACC GA 3'及反向引子5'CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA 3'。PCR 反應程序為98°C 30 s、18個循

環的98°C 10 s、66°C 30 s、72°C 30 s，之後進行72°C 5 min。使用AMPure®XP清除分子量小於300 bp 的primer dimers。然後進行DNA定量。接著依據定量的濃度，將DNA濃度稀釋至10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ，即為製備完成的RAD定序圖書庫。接著委託廠商進行毛細管電泳，確認RAD定序圖書庫品質。確認完成後，將此RAD定序圖書庫送至陽明大學基因體研究中心所提供的Illumina HiSeq 2,000 次世代核酸定序。序列資料分析採用國立臺灣大學農藝系之公用伺服器，採用Linux作業系統之Stacks程式，進行SNP的探勘與定型。

回復率與同質結合率之計算，若基因組中一基因座輪迴親基因型皆為AA，貢獻親皆為BB，異質結合為AB，則後裔之染色體上AA的數量為a個位點，BB的數量為b個位點，AB的數量為h個位點，則回復率= $(a+0.5*h) / (a+b+h)$ ，同質結合率為 $= (a+b) / (a+b+h)$ ，再各自乘以100%。

## 結 果

### 一、各抗病基因之前景選拔

採用pTA248檢測1,000個BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>分離株的*Xa21*基因，結果顯示有265個單株呈現抗病型同質結合。此265株接著以RM20580檢測*Xa7*基因，結果顯示有53個單株呈現抗病型同質結合。此53株接著採用MP1及MP2檢測*Xa4*，結果顯示有24個單株呈現抗病型同質結合。*Xa4*、*Xa7*、*Xa21*等3個基因皆為抗病型同質結合之單株比例為2.4%較理論值(1/64)偏高，是因為*Xa4*與*Xa21*同時位於第11號染色體，有互相連結的效應。將獲選的24株檢測*xa5*及*xa13*基因，顯示共有9個單株各自帶有5個抗病基因(如表二所示)，只有1株為5個基因皆為抗病型同質結合(編號2-59)，其他8株分別帶有不同的異質結合基因。

表二、前景選拔獲選之9個單株及其帶有之抗病基因

Table 2. The selected plants in foreground selection and resistant genes carried

Individuals	Homozygous R genes	Heterozygous R genes
2-59	<i>Xa4, xa5, Xa7, xa13, Xa21</i>	None
3-55	<i>Xa4, Xa7, Xa21</i>	<i>xa5, xa13</i>
3-64	<i>Xa4, xa5, Xa7, Xa21</i>	<i>xa13</i>
3-80	<i>Xa4, xa5, xa13, Xa21</i>	<i>xa5</i>
4-66	<i>Xa4, Xa7, Xa21</i>	<i>xa5, xa13</i>
6-17	<i>Xa4, xa5, Xa7, Xa21</i>	<i>xa13</i>
8-83	<i>Xa4, xa5, Xa7, Xa21</i>	<i>xa13</i>
9-15	<i>Xa4, xa5, xa13, Xa21</i>	<i>xa5</i>
10-10c	<i>Xa4, xa5, Xa7, xa13</i>	<i>Xa21</i>

### 二、接菌誘導發病之結果

參加接種試驗的14個單株發病情形皆不嚴重(表三)，包括5株台梗9號對照組，接種後21天病斑皆未達10 cm。以個體2-59為例，接種後第11天病斑平均長度即達到2.71 cm，第21天僅

發展至3.61 cm，從第11天至第21天的過程中病斑僅延長0.9 cm，並且可發現在第21天有褐色沉澱反應(圖一)。然而5株台稉9號個體在本次試驗中，發病並不明顯，病斑平均長度也未達10 cm，無法凸顯抗病基因之作用，需要改變接種策略，將於下一期作接種9個BC<sub>3</sub>F<sub>2:3</sub>家系時修正試驗之設計。

表三、菌株接種 11 天及 21 天後之病斑長度與罹病等級

Table 3. The average lesion lengths and disease rating scales at 11<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day after inoculation.

Individuals	Lesion length at the 11 <sup>th</sup> day after inoculation (cm)	Lesion length at the 21 <sup>st</sup> day after inoculation (cm)	The disease rating scale at 21 <sup>st</sup> day after inoculation
2-59	2.71 ± 1.23	3.61 ± 1.17	R
3-55	2.54 ± 1.10	2.74 ± 1.31	R
3-64	2.96 ± 1.39	3.59 ± 1.84	R
3-80	5.90 ± 2.94	5.47 ± 2.74	MR
4-66	7.06 ± 1.37	8.40 ± 1.46	MR
6-17	4.75 ± 2.22	8.57 ± 3.96	MR
8-83	2.70 ± 0.89	2.87 ± 0.97	R
9-15	2.78 ± 1.49	4.69 ± 2.73	R
10-10c	7.06 ± 2.04	8.10 ± 1.89	MR
TK9-1	2.84 ± 1.33	4.68 ± 2.06	R
TK9-2	0.94 ± 0.57	3.98 ± 2.15	R
TK9-3	1.80 ± 1.30	5.65 ± 2.44	MR
TK9-4	0.78 ± 0.29	5.28 ± 0.88	R
TK9-5	0.48 ± 0.16	2.26 ± 0.72	R



圖一、台稉 9 號/IRBB66 之 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 個體 2-59 接種後第 11 天(左)及第 21 天(右)之葉片病斑情形  
Fig. 1. The leaf lesion of the individual 2-59 on 11<sup>th</sup> day (left) and 21<sup>st</sup> day (right) after inoculation

### 三、背景分析之結果

利用RADseq法完成SNP定型共超過一萬個位點，遍及12個染色體，相較於微衛星序列之方法，在數量及效率上皆大為提升，獲選的9株BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>個體基因組之回復率如表4所示，回復率最高為87.33% (編號3-55)，最低為80.98% (個體4-66)，9株個體平均為85.61%，顯示所有個體的基因組大部分已回復與台梗9號相似。尤其第4、7、9、10及第12號染色體，其中9株個體的回復率達到98%以上。而回復率最低者為第8號染色體，9株個體的平均回復率為47.30%，此現象為所謂的連鎖累贅(linkage drag)，主因是位於第8號染色體的*xa13*被選拔時，前後連結的片段也被保留，尤其個體9-15其回復率只有14.3%。同樣的情況也發生在第5、6及第11號染色體，回復率平均為69.88%、81.91%及69.35%。通常回復率較低者為帶有目標基因之染色體，而第1號染色體則是未帶抗病基因回復率卻平均僅有80.80%，甚至低於帶有*Xa7*的第6號染色體(81.91%)，未帶抗病基因卻低於回交3次的理論值93.75%。

利用RADseq法檢測同質結合率之結果如表5所示，9株個體同質結合率平均為94.22%，顯示基因組已逐漸趨於固定，其中最高為97.77% (個體3-80)，最低為92.17% (個體3-55)，個體3-80的基因組除了第5號及第8號染色體，其餘10對染色體的同質結合率皆達到98.99%以上。從不同染色體來看，同質結合率最低為第5號染色體與第8號染色體，9株個體平均僅有82.72%與70.05%。表4中黑體字的部分代表有異質結合抗病基因存在，第5號染色體中同質結合率較低者有4株個體2-59 (78.5%)、3-64 (78.73%)、6-17 (78.71%)及10-10c (79.36%)，反而抗病基因*xa5*皆為同質結合。第5號染色體中，同質結合率最高的個體為4-66 (97.53%)，而表4中4-66的第5號染色體回復率僅有53.61%，代表此個體的第5號染色體雖然趨於固定但輪迴親的基因比例僅約佔一半。同樣的情況也發生在第8號染色體，個體9-15同質結合率達到97.39%，但是回復率僅14.13%，代表此染色體大部分基因為貢獻親所提供，並且已趨近固定。個體3-80之第8號染色體同質結合率為92.73%，為第二高(表五)，且第8號染色體回復率60.27%也是第二高(表四)，所以個體3-80為第8號染色體較理想的單株。整體而言同質結合率平均超過99%的有第2、4、7、9、10、11及第12號染色體。其中第11號染色體雖有*Xa4*與*Xa21*這兩個抗病基因，回復率皆介於67.75%及73.75%之間，同質結合率皆超過99%，可見每一個體的第11號染色體組成皆相當類似。

每一株BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>個體之外表型皆如預期地近似於輪迴親，如圖二所示，以個體2-59為例，株高近似台梗9號，與IRBB66相差甚遠，然而個體數量太少無法進行統計分析，將初步調查各項農藝性狀後，在9個家系後代中選拔潛力品系。

## 討 論

本研究以抗病基因前景選拔方式成功堆疊5個抗病基因於台梗9號回交後裔，從1,000株個體的族群中選拔9株帶有5個抗病基因之個體，選種強度達到0.9%。在檢測流程之策略方面，為節省成本，每檢測一個基因就捨棄一部分的個體，從*Xa4*、*Xa7*及*Xa21*這3個基因開始，選拔3個基因皆為同質結合之個體，最後才檢測*xa5*與*xa13*，這是因為*xa5*與*xa13*在雜交後裔中數



量經常低於理論值(各4分之1)，若先檢測 $xa5$ 與 $xa13$ 則一開始即淘汰過多單株，導致遺珠之憾的機率提高。最後保留了 $xa5$ 或 $xa13$ 為異質結合的個體，是期望下一代 $BC_3F_{2.3}$ 再選拔即可獲得 $xa5$ 與 $xa13$ 皆為同質結合者，並且 $BC_3F_{2.3}$ 族群的歧異性可提供選拔優良農藝性狀的潛力。

表四、遺傳背景分析之結果，9 個單株各 12 對染色體的回復率

Table 4. The results of genetic background analysis in which the SNP markers revealing the recovery rates of 12 pairs of chromosomes in 9 individuals

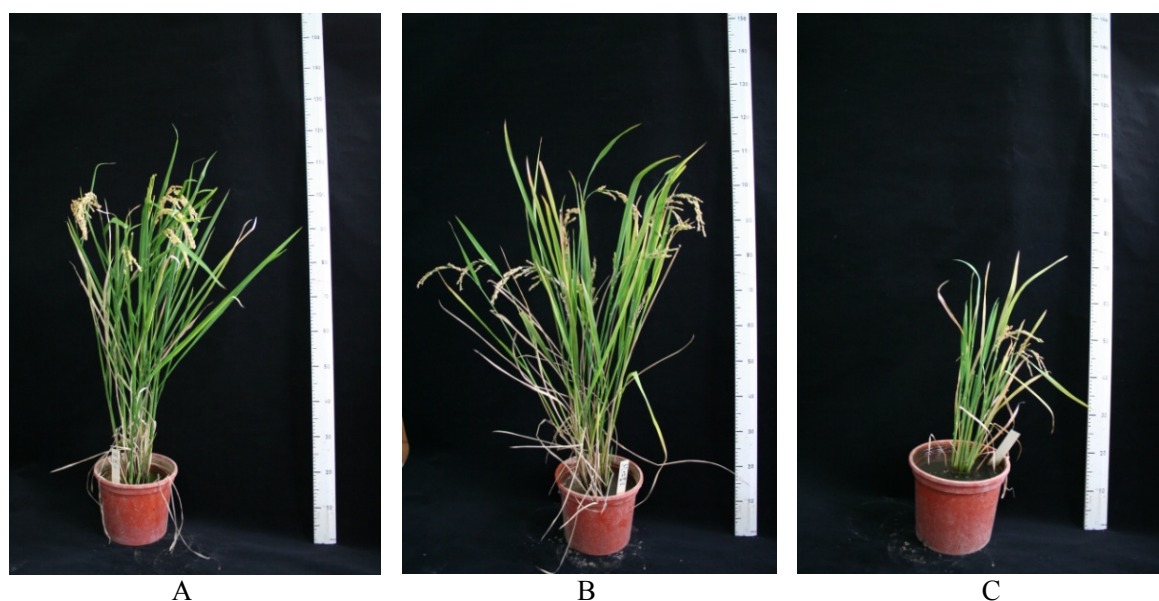
Individual	Chr 1	Chr2	Chr3	Chr4	Chr5	Chr6	Chr7	Chr8	Chr9	Chr10	Chr11	Chr12	Average
2-59	91.35	94.97	83.58	98.07	65.03	84.95	99.20	50.00	98.48	98.60	67.89	98.13	86.87
3-55	86.31	94.82	91.23	98.21	64.74	78.57	99.06	63.99	98.17	98.46	68.47	98.33	87.33
3-64	78.75	96.60	88.66	98.31	74.44	82.62	98.96	29.93	98.20	98.59	68.55	98.26	84.79
3-80	64.53	96.55	83.35	98.51	66.30	82.38	99.05	60.27	98.18	98.78	71.29	98.24	84.10
4-66	77.96	69.10	93.05	98.34	53.61	83.11	99.05	46.61	98.11	98.65	68.56	98.02	80.98
6-17	64.08	94.97	90.54	98.45	82.77	84.01	99.22	52.70	98.18	98.73	67.75	98.06	85.67
8-83	81.89	95.02	98.50	98.20	68.11	80.72	99.10	54.89	98.30	98.93	69.08	98.18	87.24
9-15	99.10	94.49	90.85	98.20	83.33	81.86	98.85	14.13	98.72	98.68	68.82	98.24	87.03
10-10c	81.39	94.51	90.86	97.85	70.58	78.98	98.98	53.22	97.99	98.85	73.75	98.16	86.45
Average	80.80	91.80	90.07	98.24	69.88	81.91	99.05	47.30	98.26	98.70	69.35	98.18	85.61

表五、遺傳背景分析之結果，9 個單株內各 12 對染色體的同質結合率

Table 5. The results of genetic background analysis in which the SNP markers revealing the homozygosity of 12 pairs of chromosomes in 9 individuals

Individual	Chr 1	Chr2	Chr3	Chr4	Chr5	Chr6	Chr7	Chr8	Chr9	Chr10	Chr11	Chr12	Average
2-59	90.67	99.59	99.56	99.72	78.51	88.83	99.77	89.71	99.64	99.63	99.92	99.74	95.43
3-55	82.04	99.73	88.58	99.62	<b>85.49</b>	99.58	99.75	<b>51.62</b>	99.04	99.39	99.91	99.91	92.17
3-64	80.25	99.61	91.83	99.77	78.73	99.66	99.58	<b>74.51</b>	99.12	99.27	99.45	99.82	92.96
3-80	99.62	99.72	99.51	99.46	<b>81.72</b>	99.50	99.75	92.73	99.31	99.39	98.99	99.44	97.77
4-66	84.45	99.49	91.89	99.30	<b>97.53</b>	93.24	99.59	<b>63.79</b>	99.01	98.96	99.73	99.62	93.78
6-17	99.47	99.71	87.93	99.76	78.71	97.85	99.65	<b>47.49</b>	99.38	99.36	99.86	99.60	92.71
8-83	81.28	99.75	99.60	99.64	81.51	97.48	99.52	<b>51.68</b>	99.32	99.05	98.94	99.57	92.28
9-15	99.78	99.61	92.16	99.72	<b>82.90</b>	99.20	99.62	97.39	99.77	99.28	99.57	99.68	97.57
10-10c	91.01	99.60	91.46	99.36	79.36	97.92	99.59	61.56	99.53	99.49	<b>98.47</b>	99.89	93.31
Average	89.84	99.65	93.61	99.59	82.72	97.03	99.65	70.05	98.35	99.31	99.43	99.70	94.22

Note: Bold numbers indicate that there is a heterozygous R gene on that chromosome.



圖二、台梗 9 號(A)、BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 個體編號 2-59(B)以及 IRBB66(C)

Fig. 2. The phenotypes of Taiken 9 (A), BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> individual 2-59 (B), and IRBB66 (C)

堆疊多個抗病基因不僅增廣對抗生理小種的幅度，同時亦可增加個別生理小種抗病性的強度<sup>(6,11)</sup>。本試驗試圖以接種誘導發病的結果來證實這一點，然而台梗9號發病不嚴重，未能顯示抗病基因的效用，未來可改善的方向有三：第一、滿足病原菌發病之環境，選在二期作氣候濕熱環境進行接種；第二、接種多個不同的生理小種之病菌，本次試驗使用單一菌種可能對台梗9號侵略性較小，若採用多個生理小種，較有可能找到對台梗9號致病性較強的生理小種，第三、加入已知感病品種作為對照，台中在來1號為國際稻米研究所使用之感病品種，以大多數生理小種之病菌誘導皆會發病<sup>(6,11)</sup>，未來將加入台中在來1號與台梗9號同時作為對照品種，可更加確認是環境影響或是菌株差異造成發病不完全之現象。

除了前景選拔與接種試驗，染色體遺傳背景的分析同樣有助於育種者判斷染色體組成，國內已有採用RADseq技術完成穗上發芽數量性狀基因座定位之研究<sup>(2)</sup>。本次研究中RADseq技術同樣扮演了重要的角色，表4與表5的遺傳背景分析結果，有些染色體的遺傳行為與預期有所差異，使用RADseq法才得以發現。例如回交3次的回復率應該為平均93.75%，而本次試驗中證實某些染色體會偏向輪迴親，如第4、第7、第9、第10及第12號染色體，回復率皆達到98%以上。而第1號染色體則是比例分布較分散，從64.08%到99.10%皆有。而單株9-15的第8號染色體則是歷經回交三次僅保有14.13%的輪迴親回復率，推測此單株之後裔性狀將受到貢獻親較多的影響。由此可知遺傳背景分析對育種者而言，可推論各染色體之遺傳行為，可作為將來擬定檢測策略之重要參考依據。

近年來生物技術的進步帶動了育種研究方法的更新，自從2000年水稻全基因組SSR發表以來，SSR被廣泛利用作為背景分析之工具<sup>(1,5,16)</sup>，然而近年來次世代定序(NGS)技術的成本降

低，以NGS為基礎的SNP分子標誌逐漸成為主流。以本次試驗為例，若採用SSR分析背景，則1個基因組SSR數量大約為120至150個位點，RADseq法實際上產生了大約10,000個SNP位點的資料，密度大為提升。此外，RADseq法最大的優勢在於可節省人力，將勞力密集的電泳實驗轉變成*in silico*的電腦運算過程，展現高通量及自動化的優勢。NGS與生物資訊學，在可預見的未來，將逐漸成為育種者重要的輔助工具。

## 參考文獻

1. 朱雅玲 2002 利用SSR分子標誌建立水稻連鎖圖譜及分析F2族群之遺傳重組 國立臺灣大學農藝學研究所碩士論文。
2. 謝明修、吳東鴻、陳凱儀 2014 使用限制酶位點標定之核酸定序法進行稉稻雜交組合之穗上發芽數量性狀基因座的遺傳定位 作物、環境與生物資訊 11: 11-25。
3. Arif, M., M. Jaffar, M. Babar, M. A. Sheikh, S. Kousar, A. Arif and Y. Zafar. 2008. Identification of bacterial blight resistance genes *Xa4* in Pakistani rice germplasm using PCR. Afr. J. Biotechnol. 7: 541-545.
4. Chu, Z., M. Yuan, J. Yao, X. Ge, B. Yuan, C. Xu, X. Li, B. Fu, Z. Li, J. L. Bennetzen, Q. Zhang and S. Wang. 2006. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. Genes Dev. 20: 1250-1255.
5. Chen, S., Z. Huang, L. Zeng, J. Yang, Q. Liu and X. Zhu. 2008. High-resolution mapping and gene prediction of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* resistance gene *Xa7*. Mol. Breed. 22: 433-441.
6. Hu, J., W. Qian, and C He. 2007. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *eglXoB* endoglucanase gene is required for virulence to rice. FEMS Microbiol. Lett. 269: 273-279.
7. Huang, N., E. R. Angeles, J. Domingo, G. Magpantay, S. Singh, G. Zhang, N. Kumaravadivel, J. Bennett and G. S. Khush. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. Theor. Appl. Genet. 95: 313-320.
8. Hulbert, S. H., C. A. Webb, S. M. Smith and Q. Sun. 2011. Resistance genes complexes: evolution and utilization. Ann. Rev. Phytopathol. 39: 258-312.
9. Iyer-Pascuzzi, A. S. and S. R. McCouch. 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. Mol. Plant Microbe Interact. 17: 1348-1354.
10. Iyer-Pascuzzi, A. S. and S. R. McCouch. 2007. Functional markers for *xa5*-mediated resistance in rice (*Oryza sativa*, L.). Mol. Breed. 19: 291-296.
11. Katchen, J., P. A. Hohenlohe, S. Bassham, A. Amores and W. A. Cresko. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. Mol. Ecol. 22: 3124-3140.

12. Kim, S. M., J. P. Suh, Y. Qin, T. H. Noh, R. F. Reinke and K. K. Jena. 2015. Identification and fine-mapping of a new resistance gene, *Xa40*, conferring resistance to bacterial blight races in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 128: 1933-43.
13. Köplin, R., W. Arnold, B. Hötte, R. Simon, G. Wang, and A. Pühler. 1992. Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* gene are involved in UPD-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *J. Bacteriol* 174: 191-199.
14. Li, Z. K., A. Sanchez, E. Angeles, S. Singh, J. Domingo, N. Huang and G. S. Khush. 2001. Are the dominant and recessive plant disease resistance genes similar? : A case study of rice R genes and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* races. *Genetics* 159: 757-765.
15. Mew, T. W. 1987. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 359-382.
16. Ogawa, T., Y. Yamamoto, G. S. Khush and T. W. Mew. 1991. Breeding of near-isogenic lines of rice with single genes for resistance to bacterial blight pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*). *Jpn. J. Breed.* 41: 523-529.
17. Ogawa, T. 1993. Methods and strategy for monitoring race distribution and identification of resistance genes to bacterial leaf blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) in Rice. *J. A. R. Q.* 27: 71-80.
18. Rajeshwari, R., G. Jha, and R. V. Sonti. 2005. Role of an in planta expressed xylanase of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 830-837.
19. Rajeshwari, R., G. Jha, and R. V. Sonti. 2007. Functional interplay between two *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 31-40.
20. Ray, S. K., R. Rajeshwari, and R. V. Sonti. 2000. Mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 394-401.
21. Sidhu, G. S., G. S. Khush and T. W. Mew. 1978. Genetics analysis of bacterial blight resistance in seventy-four cultivars of rice, *Oryza sativa* L.. *Theor. Appl. Genet.* 53: 105-111.
22. Song, Y. L., G. L. Wang, L. L. Chen, H. S. Kim, L. Y. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W. X. Zhai, L. H. Zhu, C. Fauquet and P. Ronald., 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 279: 1804-1806.
23. Kim S. I., J. T. Song, J. Y. Jeong, H. S. Seo. 2016. Niclosamide inhibits leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant molecular biology.* 6: 21209

24. Swamy, P. A. N. Panchbhai, P. Dodiya, V. Naik, S. D. Panchbhai, U. B. Zehr, and B. R. Char. 2006. Evaluation of bacterial blight resistance in rice lines carrying multiple resistance genes and *Xa21* transgenic lines. *Curr. Sci.* 90: 818-824.
25. Tabei, H. 1977. Anatomical studies of rice plant affected with bacterial leaf blight, *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama Dowson). *Bull. Kyushu Agri. Expt. Sta.* 19: 193-257.
26. Temnykh, S., W. D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y. G. Cho, T. Ishii and S. R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 697-712.
27. Verdier, V., C. V. Cruz, and J. E. Leach. 2012. Controlling rice bacterial blight in africa: needs and prospects. *J. Biotechnol.* 159: 320-328.
28. Wang, M., Y. Zhou, G. Jiang, B. Ma, X. Chen, Q. Zhang, L. Zhu and W. Zhai. 2000. Fine mapping of the rice bacterial blight resistance gene *Xa-4* and its co-segregation marker. *Chin. Sci. Bul.* 45: 1779-1782.
29. White, F. F. and B. Yang. 2009. Host and pathogen factors controlling the rice-*Xanthomonas oryzae* interaction. *Plant Physiol.* 150: 1677-1686.
30. Williams, C. E., B. Wang, T. E. Holsten, J. Scambray, F. de Assis, G. da Silva and P. C. Ronald. 1996. Markers for selection of the rice *Xa-21* disease resistance gene. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1119-1122.
31. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
32. Yoshimura, S. U Yamanouchi., Y. Katayose, S. Toki, Z. X. Wang, I. Kono. And T. Sasaki. 1998. Expression of *Xa1*, a bacterial blight resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1663-1668.

# Marker-Assisted Backcrossing for Introgressing Rice Bacterial Blight Resistance Genes to the Variety Taikeng 9<sup>1</sup>

Ray Jui-Hsin Chang, Chia-Chi Cheng, Jia-Ling Yang and Chien-Chih Kuo<sup>2</sup>

## ABSTRACT

Rice variety Taikeng 9 is one of the most important high-quality cultivars in Taiwan. It obtained excellent palatability but sensitive to rice bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). Yield loss could happen when bacterial blight outbreaks. To breed resistant varieties is the most economic way to prevent the disease. This study conducted a backcross breeding by utilizing IRBB66 from IRRI as the donor parent and Taikeng 9 as the recurrent parent. Every generation from F1 to BC3F2, the selection was based on detecting the five bacterial blight resistance genes, *Xa4*, *xa5*, *Xa7*, *xa13*, and *Xa21*. Screening on BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> population, 9 out of 1,000 individuals were verified and selected carrying 3-5 R genes. One of the 9 individuals contain 5 homozygous R genes. The 9 individuals was inoculated by *X. oryzae* pv. *oryzae* and none of their leaf lesions longer than 10 cm. The genetic backgrounds were analyzed by restriction site-associated DNA sequencing, and SNPs in their genomes were discovered and genotyped. The genetic backgrounds showed the 9 individuals all have recovery rates higher than 80%, and 6 of them were higher than 85%. The homozygosity of the 9 individuals are all higher than 92%. On chromosomes 2, 4, 7, 9, 10, and 12, the average homozygosity were higher than 99% among 9 individuals. The 9 selected individuals with 3-5 R genes could establish 9 families which is valuable breeding resources for bacterial blight resistant rice varieties.

**Key words:** rice bacterial blight, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, marker-assisted selection, recovery rate, foreground selection.

---

<sup>1</sup>Contribution No. 0899 from Taichung DARES, COA.

<sup>2</sup>Assistant researcher, assistant researcher, associate researcher and assistant researcher of Taichung DARES.