

篩選適合臺灣水稻耐淹性育種之分子標誌

繆韋瀚¹ 林妤嫻² 葉凱平² 郭介煒¹ 張素貞^{*2}

¹國立嘉義大學農藝系 ²行政院農業委員會苗栗區農業改良場

摘 要

水稻為世界主要的糧食作物，在今日氣候變遷之下，相關該作物之研究著實重要，同時以分子標誌輔助育種程序之趨勢已日益普遍。本研究係利用7個分子標誌引子，比較臺灣主要栽培水稻品種與具有Sub1基因片段之耐淹品系等26個品種(系)間的差異性，發現惟RM23887分子標誌引子可區分出臺灣目前主要栽培品種與具耐淹基因之Sub1品系之差異。因此，該分子標誌將可應用於作為臺灣水稻或其雜交後裔耐淹性基因型之辨別工具，提高育種程序以及人力之效率。

關鍵詞：臺灣水稻品種、耐淹性、分子標誌。

前 言

水稻為世界主要的糧食作物，在今日氣候變遷之下，相關該作物之研究著實重要。近年來全球氣候異常頻率漸增，颱風以及聖嬰現象常伴隨洪患發生。在許多地區，印度以及東南亞各國，常因為突如其來的豪雨加上排水設施不良造成農產損失難以估計(Xu *et al.*, 2006, Fukao and Bailey-Serres, 2008)。位於菲律賓的國際稻米研究所

(International Rice Research Institute, IRRI)在易洪澇地區開發適合栽種的稻米品種，以解決未來糧食的危機(Voesenek and Bailey-Serres, 2009)。洪澇(Flooding)對於水稻產量所造成的影響，是因為突如其來的大量洪水造成了缺氧逆境，因而使得產量急遽下降。學者認為其與植物體內荷爾蒙如GA及乙烯有密切關聯(Setter *et al.*, 1997, Kende *et al.*, 1998)。在淹水逆境如何讓水稻產量損失最少策略，主要在尋找或育成耐淹品

*論文聯繫人

e-mail: sujein@mdais.gov.tw

種，次在建立淹水後復耕技術。

自從1996年由Xu學者研究指出與耐淹性狀有關之基因位於水稻第9條染色體上後，稻耐淹水基因之分子標誌的尋找也同時展開 (Xu and Mackill, 1996)。2006年，同樣的由 Xu 學者發表於 Nature 期刊上，水稻耐淹水基因 Sub1 基因定序的完成，所使用的分子標誌為與 Sub1 基因緊密連鎖的 RM219 與 RM464A 等簡單重複序列標誌 (simple sequence repeats, SSR) (Xu *et al.*, 2006)。Neeraja 等學者於 2007 年的試驗中，利用側翼標誌 (flanking markers) 進行重組篩選 (recombinant selection) 調整目標基因由貢獻親進入輪迴親時基因區間大小 (Neeraja *et al.*, 2007)。2008 年，Septiningsih 等學者利用單一核苷酸多型性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 標誌配合其餘已知 Sub1 基因分子標誌，成功的培育出 6 個耐淹稻品種 (Swarna-Sub1, Mahsuri-Sub1, IR64-Sub1, TDK1-Sub1, CR1009-Sub1, BR11-Sub1)。至此，稻耐淹水基因分子標誌之發展漸趨於完備，有便於吾人作為參考，以用於篩選臺灣具有成為耐淹稻的潛力品種。

材料與方法

本研究所調查的水稻品種，包括臺中區農業改良場與臺南區農業改良場水稻育種種原 (吐魯番種、SAHEL 201、山形 45、臺東陸稻、PEGONIL、北陸 100 豐錦、韓國捺)，與苗栗區農業改良場水稻育種種原 (臺稈 2 號、臺稈 8 號、臺

稈 9 號、臺稈 14 號、臺農 68 號、臺農 69 號、臺農 71 號、臺農 72 號、臺農 75 號、臺農 10 號、臺中 10 號、臺中 17 號、臺中在來 1 號、臺中 65 號、高雄 145 號、臺東 30 號、桃園 1 號)，以及兩耐淹性對照 Sub1 水稻品系 IR64-Sub1 與 Swa-Sub1 共計 26 水稻品種 (系)。受試品種 (系) 之稻種經浸種催芽後，以長 60 cm、寬 30 cm 之 98 孔洞穴苗盤育苗，單粒播種於育苗土，移至溫室進行綠化，取足量葉片萃取 DNA 後利用 7 個與耐淹相關基因緊密連鎖之分子標誌引子 (表 1) 進行聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 檢測，探討所蒐集的種原中是否具有培育成耐淹水稻品種的潛力，試驗日期為 2010 年 4 月中旬。本研究共進行 7 引子 * 26 品種 (系) 組合。

一、萃取 DNA

1. 將新鮮樣本秤取 0.1g (> 100 mg) 置於研鉢內以添加液態氮研磨致粉末狀。取樣後未能立即處理完畢之樣本儲存於 -70°C 冰櫃中保存。
2. 用刮匙將粉末置於 1.5 ml tube (ExcelPure™ plant genomic DNA purification kit)，加入 360 μ L extraction solution A, 40 μ L extraction solution B 以及 4 μ L RNase A solution，以震盪儀使試管內容物混合均勻。
3. 將試管至於 65°C 水浴 20 分鐘，每 3~4 分鐘將試管搖勻。
4. 加入 130 μ L precipitation solution，搖晃試管混合均勻置於碎冰上 5 分鐘。

- 5.將試管以12000-14000 rpm，4°C離心5分鐘。
- 6.取試管內上清液於spin filter 並與collection tube 組合進行離心2分鐘。
- 7.將collection tube 上清液置於乾淨的1.5 ml 微離心管。
- 8.在微離心管內加入上清液1.5倍體積的binding solution (with ethanol) 混合均勻。
- 9.取微離心管內650 μ L 溶液於 spin column內條件如(5)時間為離心1分鐘，倒掉濾液。
- 10.重複第9步驟。
- 11.將廢液倒除，在spin column內加入700 μ L wash solution 離心1分鐘，此步驟重複兩次。
- 12.倒掉廢液。為移除殘留的酒精，將spin column空管離心3-5分鐘，將其內微量酒精移除。
- 13.加入 100-200 μ L 之 65°C elution solution 離心，條件如(5)2分鐘洗出DNA，保存於-20°C 環境中。(重複兩次此步驟可以增加DNA產量10%，但是DNA濃度會比較淡。)

二、DNA定量及品質之檢測

測試每個樣本模板DNA (template)之品質，genomic DNA進行電泳分析以確認品質，確認所獲得之DNA無嚴重斷裂現象，將DNA解凍後取3 μ L DNA與dye 1 μ L 混合均勻後加入於1% 電泳膠片以110V電壓進行電泳分析約40分鐘後置入溴化乙錠 (ethidium

bromide) 染色10分鐘，取出後再置於逆滲透RO水中退染20min，於UV光箱中以影像分析系統(KODAK1D 3.6 Scientific imaging system)照相並儲存影像。

三、聚合酶連鎖反應檢測

聚合酶連鎖反應分析，每個樣本反應總體積為15 μ L，包含100ng/ μ L之模板DNA 1 μ L、5 μ M之primer 0.75 μ L、5 μ L之dNTP(1mM)、0.375 μ L之Tag、1.5 μ L buffer以及9.875 μ L ddH₂O。以applied Biosystems溫度梯度基因擴增儀 (Verti thermal cycler)進行最佳反應條件測試。聚合酶連鎖反應擴增反應設定程式如下：先將DNA預先變性 (pre-denature) (94°C，5分鐘)，再進行DNA變性 (94°C，30秒)，引子黏合 (annealing) (55°C，1分鐘)及引子延展 (extension) (72°C，30秒)，共計35個循環，再於72°C進行後延展 (Post-extension) 7分鐘，反應後將樣品以2%電泳膠片進行電泳分析。

結果與討論

本研究利用國際稻米研究所分子遺傳專家Dr. Michael Thomson提供苗栗區農業改良場(以下簡稱苗栗場)與水稻耐淹性相關的分子標誌引子(表一)，進行苗栗場主要水稻雜交親本如臺梗9號、臺梗14號及臺中秈10號等之表現，發現惟RM23887分子標誌可區分出6個親本之差異(圖一)，並可區分IR64-Sub1與臺灣

主要品種之差異性。由文獻可知此RM23887分子標識位於第9條染色體且與Sub1基因緊密的連鎖距離為0.2Mb (Neeraja *et al.*, 2007)，在育種程序上能作為有效的前景篩選，以辨別雜交水稻後裔是否成功導入Sub1基因，提升育種程序與人力效率。

篩選出適合臺灣水稻耐淹育種之引子後，進而以RM23887及RM3769引子瞭解臺灣主要種原24個品種對此兩引子的表現，其中RM3769引子為Angaji等學者於2009年發表之研究關於水稻萌芽期耐淹基因相關之分子標誌，功能在於提升水稻萌芽期遭受湛水逆境危害之存活率。在RM23887引子檢測中，24個品種中臺中秈17號與吐魯番種發現具有與Sub1品系同樣的分子片段（圖二）。就臺中秈17號耐淹性測試，曾由繆等（2012）研究指出該品種在分蘖初期淹水處理後之株高，由淹水7天後調查結果，臺中秈10號淹水處理之平均株高高於對照組，而臺中秈17號則無顯著差異，依據耐淹性之生理特性為淹水時植株有停滯生長的現象 (Xu *et al.*, 2006)，因而推測臺中秈17號可能具有耐淹性之潛能。在RM3769檢測結果如圖三，該分子標誌無法區別Sub1品系與臺灣水稻品種之間不同的分子片段，除SAHEL 201及臺中在來1號，以此分子標誌檢測與其餘檢測的臺灣水稻品種有不同的分子片段表現。此兩品種中SAHEL 201經萌芽淹水性測試，具有耐淹性 (繆，2010)，未來可為水稻萌芽期耐淹基因相關之種子種原，提供水稻萌芽期湛水管理之品種改良的雜交親本，進而

發展適合臺灣的直播稻之品種。

結 論

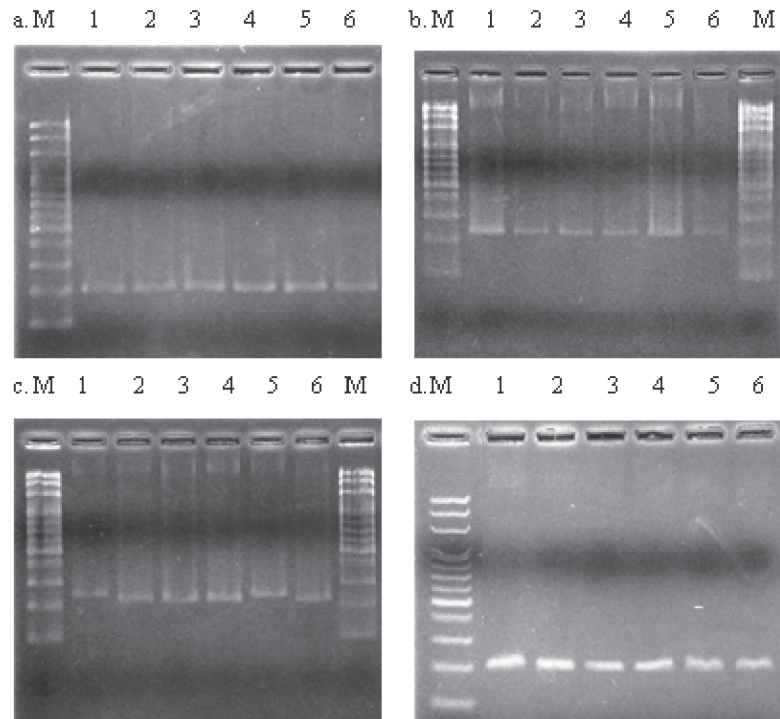
分子標誌RM23887引子能夠辨別臺灣水稻品種與Sub1品系之間的差異，此試驗結果有助於作為臺灣水稻或其雜交後裔耐淹性之辨別工具，提高育種程序以及人力之效率。

誌 謝

本研究在行政院農業委員會科技計畫「面對全球暖化之水稻新育種、栽培技術與蟲害研究(98農科-4.1.1-苗-M1)」經費支持下完成。感謝國際稻米研究所分子遺傳專家Dr. Michael Thomson所提供之分子標誌引子，使本研究得以順利完成，行政院農業委員會臺南區農業改良場及臺中區農業改良場提供稻種，苗栗區農業改良場吳岱融助理研究員審視初稿，謹此申謝。

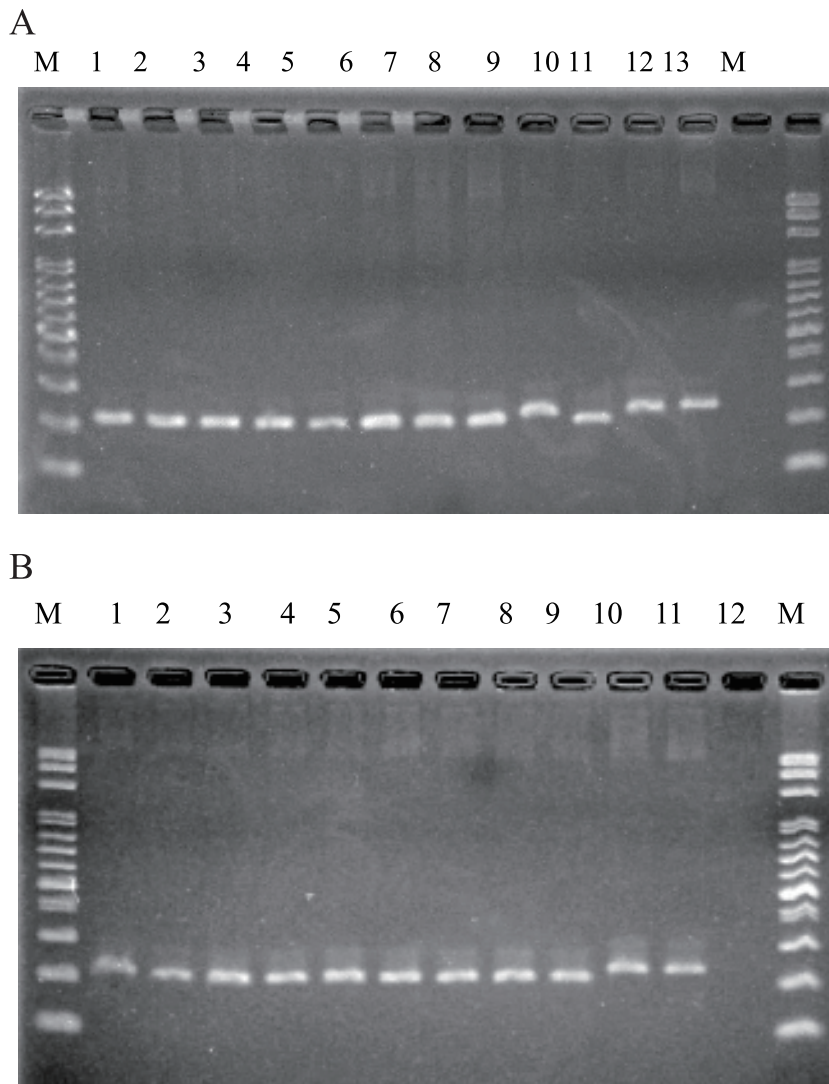
表一 本研究所使用耐淹相關之分子標誌引子(國際稻米研究所Dr. Michael Thomson提供)
 Table 1. The molecular markers from International Rice Research Institute by Dr. Michael Thomson in this study

Locus	Expected size (bp) in Nipponbare	Forward primer	Reverse primer
RM8300	209	GCTAGTGCAGGG_TGACACA	CTCTGGCCGTT_CATGGTAT
RM23887	220	CAGTGTTGC_GCAAAAAGGA	AACATTGGTCG_GCTCAACA
RM23770	274	GACCTTGTCAGAG_GATTTTG	ATTTGAGAATAAC_TTCCTACTTCG
GnS2	242	CTTCTTGC_CAACGACAACG	TCGATGGGGTC_TGATCTCT
SC3	n/a	GCTAGTGCAGGGT_GACACA	CTCTGGCCGTT_CATGGTAT
RM3769	103	TGCATGCTTCGT_CAGCTAG	GTCTCCGAGCTCC_CAGGTC
RM24161	279	GTATGGCGAGACCC_ACAGACC	GACCCACTTAATGTG_CACAAGG



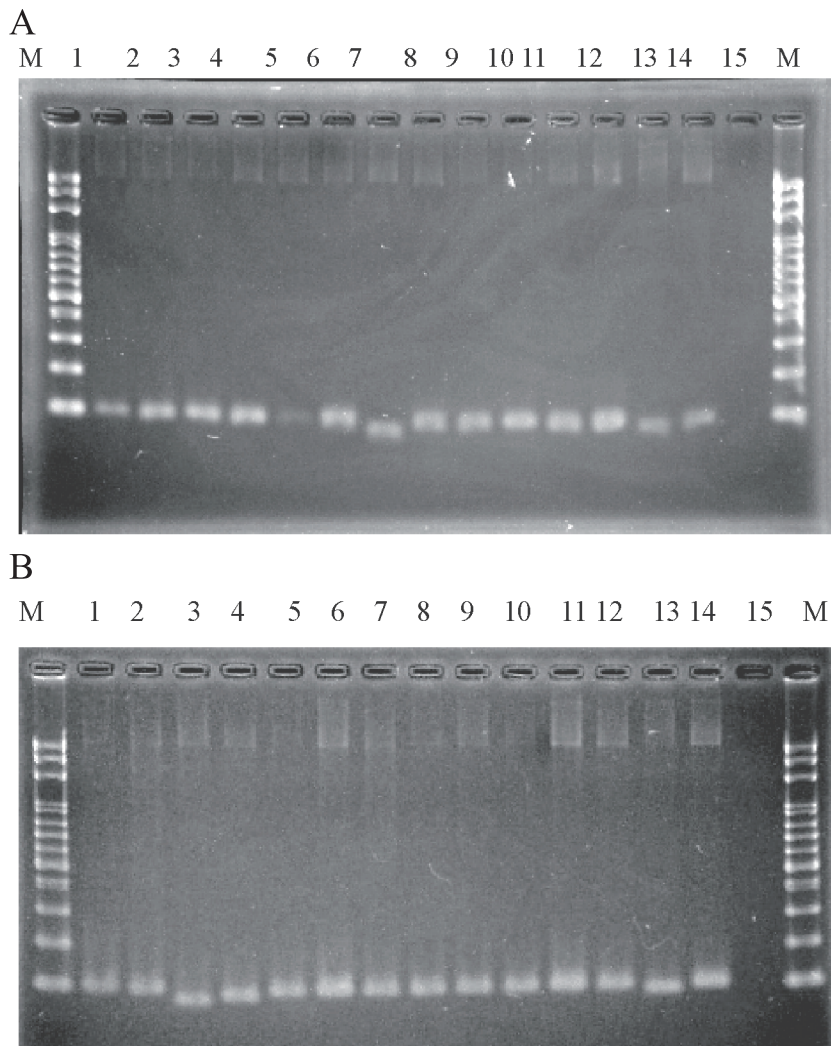
圖一 利用水稻研習國際稻米研究分子生物暨遺傳育種專家Dr. Micheal Thomson所提供分子標幟引子區分苗栗場主要雜交親本之差異性。檢測的品種(系) 1 : Swarna-Sub1、2 : TCS10、3 : TK14、4 : IRBB7、5 : IR64-Sub1、6 : TK9。a: RM8300、b: GnS2、c: Rm23887、d: SC3。

Fig. 1. The different response of Taiwanese varieties which used in breeding program of Miaoli DARES to the four molecular markers from International Rice Research Institute by Dr. Michael Thomson in this study. The detected varieties as 1: Swarna-Sub1, 2: TCS10, 3: TK14, 4: IRBB7, 5: IR64-Sub1, 6: TK9; the four markers as a: RM8300, b: GnS2, c: Rm23887, d: SC3.



圖二 以分子標誌引子RM23887與苗栗場蒐集水稻品種(系)進行聚合酶連鎖反應之差異比較。A：1.臺稉14號、2.臺農69號、3.臺農75號、4.臺農68號、5.臺農72號、6.臺農秈20號、7.臺中秈10號、8.臺中在來1號、9.臺中秈17號、10.臺中65號、11. IR64-Sub1、12. Swa-Sub1、13. NO DNA。B：1.吐魯番種、2. SAHEL 201、3.山形 45、4.東陸1號、5.東陸2號、6. PEGONIL、7. 北陸 100、8. 豐錦、9. 韓國捧、10. IR64-Sub1、11. Swa-Sub1、12. NO DNA、M為標準品。

Fig. 2. The different response of the varieties which collected in breeding program of Miaoli DARES to RM23887 molecular marke. A: 1. Tai-keng 14, 2. Tainung 69, 3. Tainung 75, 4. Tainung 68, 5. Tainung 72, 6. Tainung sen 20, 7. Taichung sen 10, 8. Taichung native 1, 9. Taichung sen 17, 10. Taichung 65. 11. IR64-Sub1, 12. Swa-Sub1, 13. NO DNA. B: 1. Turpan race, 2. SAHEL 201, 3. Yamagata 45, 4. Taitung upland rice 1, 5. Taitung upland rice 2, 6. PEGONIL, 7. Hokuriku 100, 8. Toyonishiki, 9. Korea Phang, 10. Taichung 65. 11. IR64-Sub1, 12. Swa-Sub1, 13. NO DNA. M: standard.



圖三 以分子標誌RM3769與水稻品種(系)進行聚合酶連鎖反應之差異比較。A：1. RASI、2.臺東育 73、3.南投陸稻、4.祝賀、5.PEGONIL、6.吐魯番種、7.SAHEL 201、8.山形 45、9.南投陸稻、10.南投陸稻、11.PEGONIL、12.北陸 100、13.IR64-Sub1、14.Swa-Sub1、15.No DNA。B：1.臺農秈20號、2.臺中秈10號、3.臺中在來1號、4.臺中秈17號、5.臺中65號、6.臺稈9號、7.臺稈8號、8.高雄145號、9.臺東30號、10.桃園1號、11.臺農71號、12.臺稈2號、13. IR64-Sub1、14. Swa-Sub1、15.No DNA、M為標準品。

Fig. 3. The different response of the varieties which collected in breeding program of Miaoli DARES to RM3769 molecular marke. A: 1. RASI, 2. Taitung yu 73, 3. Nantou upland rice, 4. Omedetogozaimasu, 5. PEGONIL, 6. Turpan race, 7. SAHEL 201, 8. Toyonishiki, 9. Korea Phang, 10. Taichung 65. 11. PEGONIL, 12. Hokuriku 100, 13. IR64-Sub1, 14. Swa-Sub1 15. NO DNA. B: 1. Tainung sen 20, 2. Taichung sen 20, 3. Taichung native 1., 4. Taichung sen 17, 5. Taichung 65, 6. Tai-keng 9, 7. Tai-keng 8, 8. Kaohsiung 145, 9. Taitung 30, 10. Taoyuan 1, 11. Tainung 71, 12. Tai-keng 2, 13. IR64-Sub1, 14. Swa-Sub1 15. NO DNA. M: standard.

引用文獻

- 繆韋瀚。2010。水稻種原耐淹品系與相關分子標幟之篩選。國立嘉義大學農藝研究所碩士論文，78pp。嘉義。
- 繆韋瀚、郭介煒、張素貞。2012。分蘖期稻株生長對淹水之反應。作物、環境與生物資訊 9:184-192。
- Angaji, S. A., E. Septiningsih, D. J. Mackill, and A. M. Ismail.** 2009. QTLs associated with tolerance of flooding during germination in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*: DOI 10.1007/s10681-009-0014-5.
- Collard, B. C. Y., E. M. Septiningsih, S. R. Das, J. J. Carandang, A. M. Pamplona, D. L. Sanchez, Y. Kato, G. Ye, J. N. Reddy, U. S. Singh, K. M. Iftekharrudaula, R. Venuprasad, C. N. Vera-Cruz, D. J. Mackill, and A. M. Ismail.** 2013. Developing new flood-tolerant varieties at the International Rice Research Institute (IRRI). *SABRAO J. Breed. Genet.* 45(1): 42-56.
- Fukao, T and J. Bailey-Serres.** 2008. Ethylene—A key regulator of submergence responses in rice. *Plant Science* 175: 43-51.
- Kende, H., E. van der Knaap, and H. T. Cho.**1998. Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. *Plant Physiology*118:1105-1110.
- Neeraja, C. N., R. Maghirang-Rodriguez, A. Pamplona, S. Heuer, and B. C. Y. Collard.** 2007. A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. *Theor Appl Genet* 115: 767-776.
- Septiningsih, E. M., A. M. Pamplona, D. L. Sanchez, C. N. Neeraja, G. V. Vergara, S. Heuer, A. M. Ismail, and D. J. Mackill.** 2008. Development of submergence tolerant rice cultivars: The Sub1 locus and beyond. *Ann. Bot.* 103: 151–160
- Setter, T. L., M. Ellis, E. V. Laureles, E. S. Ella, D. Senadhira, S. B. Mishra, S. Sarkarung, and S. Datta.** 1997. Physiology and genetics of submergence tolerance in rice. *Ann. Bot.* 79, 67–77.
- Voesenek, L. A. C. J. and J. Bailey-Serres.** 2009. Genetics of high-rise rice. *Nature* 460: 959-960.
- Xu, K. and D. J. Mackill.** 1996. A major locus for submergence tolerance mapped on rice chromosome 9. *Mol. Breed.* 2: 219-224.
- Xu, K., X. Xu, T. Fukao, P. Canlas, M. R. Reycel, S. Heuer, A. M. Ismail, J. B. Serres, P. C. Ronald, and D. J. Mackill.** 2006. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature*

Molecular marker selected for submergence-tolerance rice breeding in Taiwan.

**Wei-Han Miao¹, Yu-Shan Lin², Kai-Ping Yeh², Chei-Wei Kuo¹,
and Su-Jein Chang^{*2}**

¹ Department of Agronomy, National Chiayi University, Taiwan, R. O. C.

² Miaoli District Agricultural Improvement Station, Miaoli, Taiwan, R. O. C..

ABSTRACT

Rice is the main food of the world. Due to the worldwide climate change, it has become an important topic for food security. Meanwhile, the molecular marker assisted selection applied in breeding program also becomes more and more popular. In this study, we used 7 molecular markers to genotypes of the 24 rice Taiwanese cultivars and the introgression lines carrying flooding-tolerance (*Sub1* gene). The results demonstrated that only RM23887 displayed the polymorphisms between Taiwanese rice varieties and Sub1-introgression lines. Therefore, this marker can be used as a tool to distinguish with the genotypes of Taiwanese cultivars and their crossing progeny for improving the efficiency of breeding.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.), submergence, molecular marker

* Corresponding author, email: sujein@mdais.gov.tw