

分子標誌技術輔助育成良質水稻新品種之實例

陳榮坤^{1*}、林彥蓉²、王聖善¹

¹行政院農業委員會臺南區農業改良場

²亞洲蔬菜研究發展中心

摘要

本研究利用分子標誌輔助育種技術，開發與選拔具有優良稻米食味品質相關之數量性狀基因座之水稻品種。以臺灣引進的日本水稻品種‘越光’為例，由於其對於光週期具有敏感性，抽穗極度提早，產量及米質降低的情形，因此利用分子標誌輔助回交育種技術，以‘台農 67 號’日長鈍感基因為 DNA 分子標誌進行前景選拔，並進行‘越光’背景選拔，把臺灣本土水稻品種的日長鈍感基因導入‘越光’，培育出一個抽穗開花期與臺灣本土水稻品種相近，但是遺傳背景大部分為‘越光’的水稻新品種，達到讓‘越光’本土化的目的。此外，也利用 8 個‘越光’抽穗期近同源系間之米飯光澤度差異，進一步比對簡單重複序列 (Simple sequence repeat) 多型性標記，發現在遺傳圖譜中第 6 條染色體短臂上的 *qGCR6* 座位明顯不同。再利用越光抽穗期近同源系間之 F_{2:3} 及 F_{3:4} 回交自交系作為定位族群，進行米飯光澤度及基因型分析，最終定位米飯光澤度 *qGCR6* 基因座在染色體 6 短臂的遠端分子標誌 SNP2171 與 SNP2215 之間，此區間為一段 43.9 kb 的染色體區間，可進一步應用於稻米食用品質的改善。

關鍵字：良質米、分子標誌輔助選種技術、米飯光澤度定位。

Example of Molecular-Assisted Technology for Developing High-Quality Rice Varieties

Rong-Kuen Chen, Yann-Rong Lin, Sheng-Shan Wang

Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Chiayi County, 611002 Taiwan R. O. C.

This study uses molecular marker-assisted breeding techniques to develop and select rice varieties with quantitative trait loci related to excellent rice taste quality. Taking the Japanese rice variety ‘Koshihikari’ introduced to Taiwan as an example, it is sensitive to light cycles, resulting in extremely early heading, decreased yield, and rice quality. Therefore, molecular marker-assisted backcross breeding techniques were used to select for the ‘Tainung 67’ gene for photoperiod insensitivity as a DNA molecular marker

ABSTRACT

* 通訊作者，Corresponding email: rkchen@mail.tndais.gov.tw

for foreground selection, and ‘Koshihikari’ background selection was carried out to introduce the photoperiod insensitivity gene from Taiwanese rice varieties into ‘Koshihikari’. This resulted in a new rice variety with a heading and flowering period similar to that of Taiwanese rice varieties, but with a genetic background mostly derived from ‘Koshihikari’, achieving the goal of localizing ‘Koshihikari’. In addition, the difference in rice glossiness between 8 ‘Koshihikari’ near-isogenic lines was further compared by SSR polymorphic markers, and a significant difference was found at the *qGCR6* locus on the short arm of chromosome 6 in the genetic map. Using F_{2:3} and F_{3:4} backcross selfing lines of ‘Koshihikari’ near-isogenic lines as a mapping population, rice glossiness and genotype analysis were carried out, and the *qGCR6* locus for rice glossiness was finally located between the molecular markers SNP2171 and SNP2215 on the distal end of chromosome 6, a 43.9 kb chromosome interval that can be further applied to improve the quality of rice for consumption.

Keywords: High-quality rice varieties, Molecular-assisted technology, Genetic mapping of cooked rice glossiness.

前言

近年來生物技術快速發展，自 2005 年水稻基因體解序以後，已快速且持續的建立分子標誌與性狀基因座分析等豐富資訊，讓稻作育種人員能

夠更精確、有效率的進行選育，以因應氣候變遷環境下之各種逆境，提升品質與產量。由於分子標誌輔助選拔 (Marker-assisted selection, MAS) 技術可以有效進行數量性狀基因型選拔，而於育種計畫的角色日益重要。MAS 是以分子標誌基因型作為選拔的依據，於植株幼苗時期即可抽取 DNA 進行檢測及選拔，並且能夠在早期世代進行篩選作業，不但避免環境的干擾，也因為可以在幼苗時期選拔，只需要種植選獲的個體，減低土地與人力的耗費，大幅提高育種效率及準確性 (陳等，2014; Collard *et al.* 2008)。

分子標誌輔助選種技術與稻米品質育種

稻米食味口感為數量性狀基因控制，基因效應小且容易受到環境交感影響，無法藉由水稻株型及米粒外觀形態進行選拔；在傳統育種選拔過程中，只能於基因型同質接合程度較高之晚期世代，藉由單一品系稻穀量化，並收穫、碾製後，才能進行稻米食味口感之檢測、篩選，選拔效率相當低落。近年來，分子標誌輔助選種技術相當發達與成熟，應用水稻食味品質相關分子標誌之育種選拔技術，在傳統育種過程中扮演相當重要角色。目前國內、外研究已開發數個與稻米品質相關之數量性狀基因座分子標誌，對於全面提升稻米品質與食味口感，將更具有選拔效益。

在米飯質地相關研究中，直鏈澱粉含量主要為第 6 條染色體上之糯性基因(*Wx*)所影響，因 *Wx* 基因座上存在不同單一核苷酸突變對偶基因會改變

直鏈澱粉的含量，進而影響食味品質 (Mikami *et al.* 2008; Isshiki *et al.* 2008; Tran *et al.* 2011)，但也有其他研究指出，糯性基因小部分也會影響凝膠展延性與糊化溫度 (Takeuchi *et al.* 2006; Lou *et al.* 2009)。鹼變性基因座 (Alk) 控制可溶性澱粉合成酶 II (Soluble starch synthase II)，進而影響糊化溫度 (Zhenyu *et al.* 2003)。此外，日本越光品種之優良食味 QTL 則定位於第 3 條染色體之短臂上及第 6 條染色體上 (Takeuchi *et al.* 2008)，而與米飯味度、光澤有關的基因座亦定位於第 6 條染色體 (Wang *et al.* 2017)。2012 年臺南區農業改良場與國立臺灣大學農藝學系合作利用分子標誌輔助選種技術改良越光品種抽穗期，以育成新品種‘台南 16 號’，為國內分子標誌輔助回交育種第一個成功實例 (陳等，2012)；2019 年相同部門以分子標誌定位及輔助選種技術，利用越光抽穗期近同源系‘台南 16 號’改善‘台南 13 號’品種之米粒外觀白垩質，育成低白垩質新品種‘台南 19 號’ (陳等，2019)。

分子標誌應用於育種選拔可分為前景選拔 (Foreground selection) 和背景選拔 (Background selection; Jena and Mackill 2008)。前景選拔是根據基因的功能性分子標誌或緊密連鎖的分子標誌作為篩選依據，可以導入一個或是堆砌數個標的基因，尤其對於外表形態不容易鑑定的性狀之利用性最大，或同時堆砌數個不同數量性狀的基因以開發新品種；還能於早期世代進行單株篩選，對於米質特性的選拔特別有利。背景選拔則利用兩親本所帶的多型性分子標誌作為篩選依據，這些多型性分子標誌均勻分布於全基因

體，在分析雜交後代的個體表現以後，可以快速剔除貢獻親的基因體，以回復特定親本之基因體，特別適用於輔助回交育種，將特定性狀基因導入優良栽培品種中，大幅縮短育種時程 (陳等，2014)。因此，如能結合分子標誌輔助傳統育種以選育高品質稻米，特別是提升大面積水稻栽培品種的食味口感，將助益於國內稻米品質與消費市場的競爭力。

分子標誌輔助育種實例 ~ 水稻 「台南 16 號」之育成

但是傳統回交育種方法是以子代的外表形態表現 (如植株高低、成熟期早晚等) 作為選拔的依據，這些外表形態容易受到環境的影響，而造成無法精準選拔帶有日長鈍感特性的後代，選拔效率低落。為了提高回交子代的選拔效率，將‘台農 67 號’日長鈍感基因 (*hd6*, *hdl*, *ehd1*) 當作 DNA 分子標誌 (Yano *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2001; Kojima *et al.* 2002; Doi *et al.* 2004)，在每一次篩選回交子代時，選擇帶有‘台農 67 號’日長鈍感基因 (前景選拔)，而且其它背景與‘越光’相近的子代 (背景選拔)，來進行下一次的回交 (圖 1)。如此不但可以取代田間冗長費工的形態選拔，還可以在不受到栽培氣候環境影響的情況下，精準的把‘台農 67 號’日長鈍感基因導入‘越光’，大幅提升選拔的效率 (陳等，2010)。最終從 BC₄F₂ 世代挑選出 8 株抽穗期延遲，而且 3 個功能性分子標誌為隱性同質結合之個體進行族群種植，進一步調查農藝性狀及進行產量比較試驗，分析米質外觀與食味，最終

擇優選定帶有隱性 *hd1*、*ehd1* 光週期不敏感的基因與顯性 *Hd6* 光週期不敏感基因的南粳育 1001044 號 (遺傳圖譜如圖 2 所示; 簡等, 2011), 並命名為‘台南 16 號’ (陳等, 2012)。

水稻‘台南 16 號’為‘越光’抽穗期近似同源系, 是我國第一個利用分子標誌輔助選種技術選拔出來的品種。本品種除了 2 個日長鈍感基因來自‘台農 67 號’之外, 遺傳背景與‘越光’有 94% 的相似度, 抽穗期較‘越光’延遲, 一期作延遲約 13.3 天, 二期作延遲約 20.4 天 (圖 3)。且米粒外觀晶瑩剔透, 透明度高, 白垩質粒甚少, 品質與‘越光’相近 (表 1); 米飯口感軟而黏, 富有彈性及光澤, 比‘越光’更加優異 (圖 4), 已經明顯改善‘越光’之極早熟、產量低等缺點 (陳等, 2012), 堪稱為臺灣版的越光米品種。

水稻越光品種米飯光澤度基因座 *qGCR6* 細定位

近年來已有多篇探討越光米食味品質數量性狀基因座定位相關文章被發表, 並被運用於部分水稻育種試驗中, 然而並無任何一個光澤度相關基因被選殖, 因此增加了分子標誌運用於水稻食味品質育種的困難度。在上述利用分子標誌輔助選育越光近同源系‘台南 16 號’的過程中, 曾衍生 8 個抽穗期近同源系, 其米飯光澤度可顯著區分為 2 群 (表 2), 編號 87-111、87-143 及 87-233 之米飯光澤度明顯低於其它 5 個品系; 藉由 87 個多型性 SSR 標記的表現比對, 兩群間在遺傳圖譜中第 6 條染色體短臂上的 *qGCR6* 座位明顯不同 (圖 5)。因此利用兩個具

有不同米飯品質的越光近同源系 87-155 與 87-233 雜交所衍生之 F_{2:3} 及 F_{3:4} 回交自交系作為定位族群, 於種子成熟採收後進行米飯光澤度分析。米飯光澤度分析是以日本食味度計 (Toyotaste meter, MA-30A; Toyo Rice Corporation, Wakayama, Japan) 進行分析, 分析所得到之米飯光澤度分數再比對各回交自交系基因型。最終, 將影響米飯光澤度的 *qGCR6* 基因座定位在染色體 6 短臂的遠端分子標誌 SNP2171 與 SNP2215 之間, 此區間為一段 43.9 kb 的染色體區間 (圖 6), 在該區域中注釋了 10 個候選基因 (Wang *et al.* 2017), 將可進一步應用於稻米食用品質的改善。

結語

透過利用分子標誌輔助選種技術, 可以在早期世代即可進行米質品種選育, 更加準確地選育出具有優良品質的稻米品種, 並且可以縮短育種週期和降低育種成本, 在稻米品質上的應用具有潛在的優勢和應用價值。此外對我國未來在因應氣候變遷環境之稻作研究亦有相當助益, 進一步強化稻米產業競爭力。

參考文獻

- 陳榮坤、林彥蓉、羅正宗。2012。水稻新品種臺南16號之育成。臺南區農業改良場研究彙報 60: 1-12。
- 陳榮坤、林彥蓉、羅正宗。2014。水稻新品種分子選育技術應用。p.35-44。農業基因體科技發展現況與趨勢專題報告。休祁暉, 主編。行

- 政院農業委員會出版，臺北市。
陳正昇、陳榮坤、金漢煊、林彥蓉。
2010。以分子輔助選種導入 *hd1*、*Hd6* 和 *ehd1* 抽穗期基因至水稻越光品種。作物環境與生物資訊 7: 1-20。
- 陳榮坤、蔡世宗、林順福、羅正宗、吳炳奇、李杏芳、楊智哲。2019。水稻新品種臺南19號之育成。臺南區農業改良場研究彙報 74: 1-12。
- 簡祥庭、陳榮坤、侯藹玲、陳正昇、林彥蓉。2011。*Hd1*、*Hd6* 和 *Ehd1* 對水稻抽穗期之影響。作物、環境與生物資訊 8: 45-57。
- Collard BC, DJ Mackill (2008) Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 363: 557-572.
- Doi K., T. Izawa, T. Fuse, U. Yamanouchi, T. Kubo, Z. Shimatani, M. Yano, A. Yoshimura. 2004. *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT-like* gene expression independently of *Hd1*. **Genes Dev.** 18: 926-936
- Isshiki M, Y Matsuda, A Takasaki, HL Wong, H Satoh, K Shimamoto (2008) *Du3*, a mRNA cap-binding protein gene, regulates amylose content in Japonica rice seeds. **Plant Biotechnol.** 25: 483-487.
- Jena KK, DJ Mackill (2008) Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. **Crop Sci.** 48: 1266-1276.
- Kojima S, Y Takahashi, Y Kobayashi, L Monna, T Sasaki, T Araki, M Yano (2002) *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. **Plant Cell Physiol.** 43: 1096-1105.
- Lou J, L Chen, GH Yue, QJ Lou, HW Mei, L Xiong (2009) QTL mapping of grain quality traits in rice. **J. Cereal Sci.** 50: 145-151.
- Mikami L, V Dung, HY Hirano, Y Sano. (2008) Effects of the two most common *Wx* alleles on different genetic backgrounds in rice. **Plant Breed.** 119: 505-508.
- Takahashi Y, A Shomura, T Sasaki, M Yano (2001) *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2 α . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98: 7922-7927.
- Takeuchi Y, T Ebitani, T Yamamoto, H Sato, H Ohta, H Hirayashi, H Kato, K Ando, H Nemoto, T Imbe, M Yano (2008) Development of isogenic lines of rice cultivar Koshihikari with early and late heading by marker-assisted selection. **Breeding Sci.** 56: 405-413.
- Tran NA, VD Daygon, AP Resurreccion, RP Cuevas, HM Corpuz, MA Fitzgerald (2011) A single nucleotide polymorphism in the *Waxy* gene explains a significant component of gel consistency. **Theor. Appl. Genet.** 123: 519-525.

- Wang SS, KY Chen, YR Lin, RK Chen (2017) Genetic mapping of the *qGCR6* locus affecting glossiness of cooked rice. **Euphytica** 2017: 213-115.
- Yano M, Y Katayose, M Ashikari, U Yamanouchi, L Monna, T Fuse, T Baba, K Yamamoto, Y Umehara, Y Nagamura, T Sasaki (2000) *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. **Plant Cell** 12: 2473-2483.
- Zhenyu G, Z Dali, C Xia, Z Yihua, Y Meixian, H Danian, L Jiayang, Q Qian (2003) Map-based cloning of the *ALK* gene, which controls the gelatinization temperature of rice. **Sci. China Chem.** 46: 661-668.

表 1. 水稻臺農 67 號、越光及臺南 16 號之糙米外觀性狀分析

期作別	品種	乳白率	基白率	腹白率	粒長	粒寬
		(%)	(%)	(%)	(mm)	(mm)
二期作 2010	臺農 67 號	12.3 ^{a*}	8.2 ^a	14.5 ^a	4.79 ^b	2.89 ^a
	越光	5.2 ^b	2.1 ^b	2.1 ^b	4.88 ^a	2.60 ^c
	臺南 16 號	5.0 ^b	1.3 ^b	1.9 ^b	4.88 ^a	2.71 ^b
一期作 2011	臺農 67 號	11.4 ^a	18.9 ^a	2.1 ^a	4.61 ^c	2.85 ^a
	越光	3.8 ^b	0.9 ^b	1.2 ^b	4.98 ^a	2.80 ^a
	臺南 16 號	3.9 ^b	2.6 ^b	0.9 ^b	4.81 ^b	2.84 ^a

* Values of same column followed by the same letter are not significantly different at 5 % level of least square difference test.

表 2. 越光 8 個抽穗期近同源系之農藝性狀調查

Line	DTH [▷] days	PH [▷] cm	PN [▷] no.	SPP [▷] no.	GF [▷] %	GW [▷] g	PC [▷] %	GCR [▷] score
TNG67	89 ± 0.0 [▷]	106.9 ± 2.0 [▷]	11.4 ± 1.1 [▷]	123.1 ± 3.1 [▷]	95.7 ± 0.9 [▷]	26.5 ± 0.5 [▷]	6.9 ± 0.2 [▷]	54.5 ± 2.2 [▷]
<u>Koshihikari</u>	74 ± 1.0 [▷]	97.8 ± 2.2 [▷]	10.6 ± 1.1 [▷]	80.4 ± 2.1 [▷]	96.3 ± 0.6 [▷]	24.2 ± 0.3 [▷]	7 ± 0.3 [▷]	69.3 ± 3.2 [▷]
85-1 [▷]	87.3 ± 0.6 [▷]	114.2 ± 1.7 [▷]	12.2 ± 1.0 [▷]	108.1 ± 6.6 [▷]	97.4 ± 0.5 [▷]	25.7 ± 0.9 [▷]	6.3 ± 0.2 [▷]	74.3 ± 2.0 [▷]
86-196 [▷]	84.7 ± 0.6 [▷]	111.9 ± 0.5 [▷]	10.8 ± 1.1 [▷]	120.2 ± 1.1 [▷]	97.4 ± 0.3 [▷]	27.9 ± 0.5 [▷]	6.7 ± 0.4 [▷]	72.5 ± 3.0 [▷]
86-269 [▷]	84.3 ± 0.6 [▷]	109.5 ± 0.3 [▷]	10.5 ± 1.5 [▷]	112.3 ± 4.9 [▷]	97.3 ± 0.4 [▷]	27.9 ± 1.0 [▷]	6.5 ± 0.2 [▷]	74.2 ± 1.3 [▷]
86-331 [▷]	87.7 ± 0.6 [▷]	113.7 ± 1.1 [▷]	11.6 ± 0.5 [▷]	105 ± 2.4 [▷]	97.4 ± 0.3 [▷]	26.3 ± 0.6 [▷]	6.5 ± 0.2 [▷]	70.5 ± 2.2 [▷]
87-111 [▷]	87.7 ± 0.6 [▷]	112.9 ± 1.3 [▷]	12.4 ± 1.4 [▷]	106.2 ± 5.5 [▷]	97 ± 0.2 [▷]	26.7 ± 0.5 [▷]	6.5 ± 0.3 [▷]	62.7 ± 2.9 [▷]
87-143 [▷]	86.3 ± 0.6 [▷]	112.8 ± 0.7 [▷]	11.7 ± 0.1 [▷]	93.6 ± 14.2 [▷]	96.9 ± 0.7 [▷]	25.9 ± 1.1 [▷]	6.3 ± 0.4 [▷]	67.8 ± 2.8 [▷]
87-155 [▷]	84 ± 0.0 [▷]	106 ± 2.2 [▷]	12 ± 0.6 [▷]	99.8 ± 2.7 [▷]	96.9 ± 0.3 [▷]	26.8 ± 0.5 [▷]	6.5 ± 0.3 [▷]	71.5 ± 0.9 [▷]
87-233 [▷]	83.3 ± 0.6 [▷]	104.7 ± 0.3 [▷]	11.1 ± 0.7 [▷]	101.7 ± 0.6 [▷]	96.7 ± 0.3 [▷]	25.9 ± 0.4 [▷]	6.5 ± 0.5 [▷]	66.2 ± 1.8 [▷]

DTH day to heading, PH plant height, PN panicle number per plant, SPP spikelet number per panicle, GF grain fertility, GW 1000 grain weight, PC protein content, GCR glossiness of cooked rice determined by Toyo-taste meter.

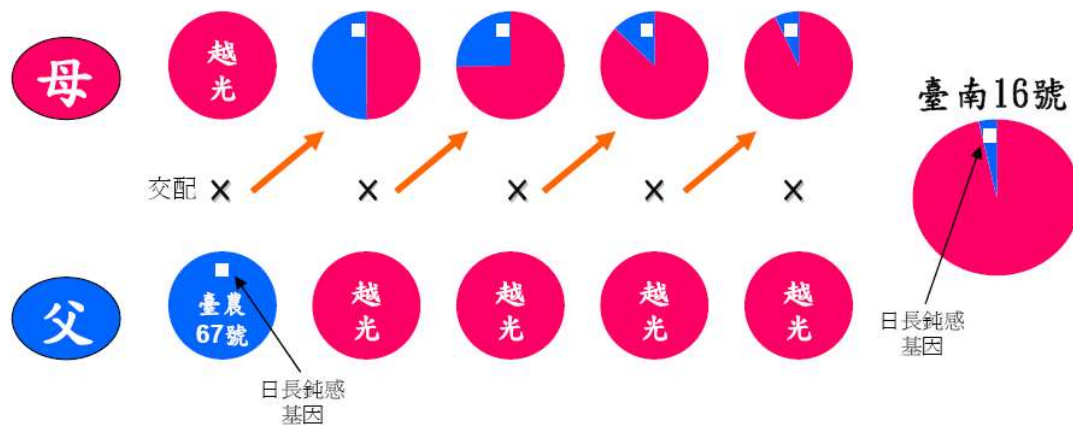


圖 1. 水稻臺南 16 號分子標誌輔助回交育種流程



圖 2. 水稻「臺南 16 號」之遺傳圖譜。藍色及黃色染色體片段分別為越光基因體組及臺農 67 號基因體組之染色體片段

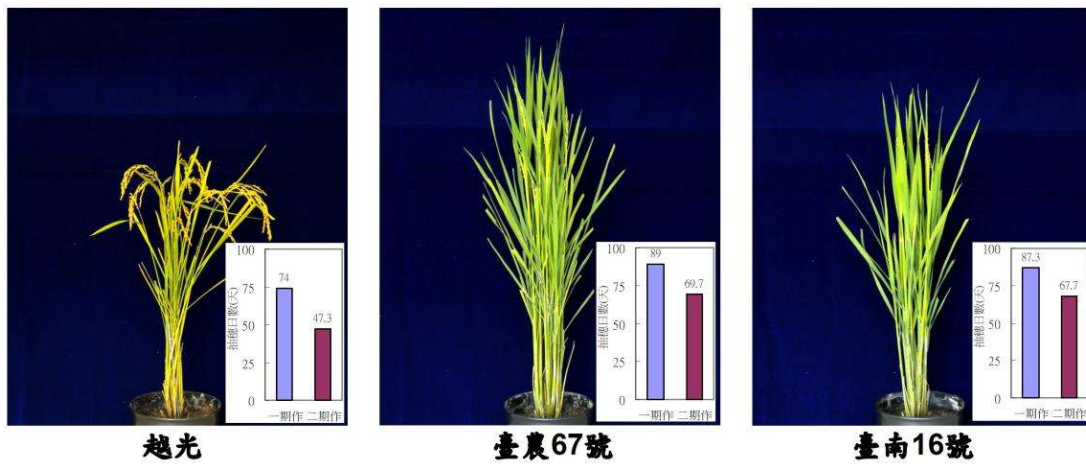


圖 3. 水稻「越光」、「臺農 67 號」、「臺南 16 號」的抽穗日數及表外型比較

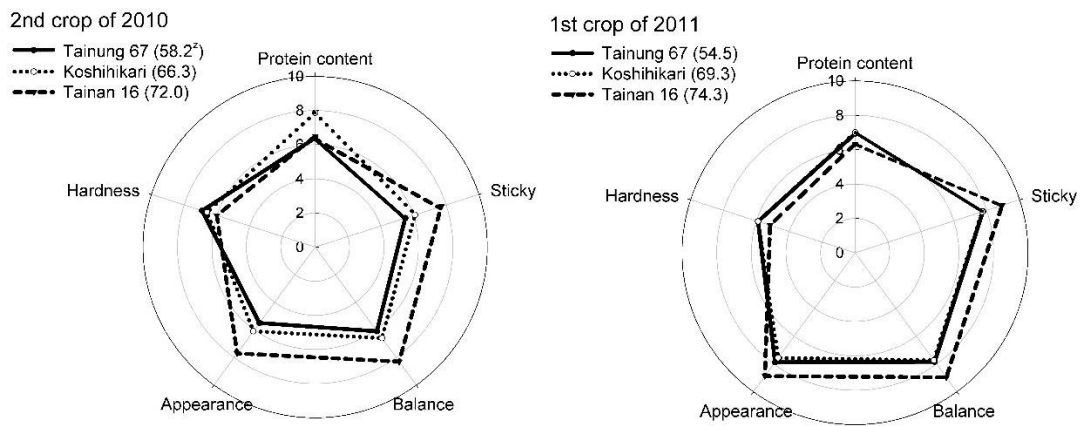


圖 4. 2010 年二期作及 2011 年一期作，水稻臺農 67 號、越光及臺南 16 號之食味品質分析

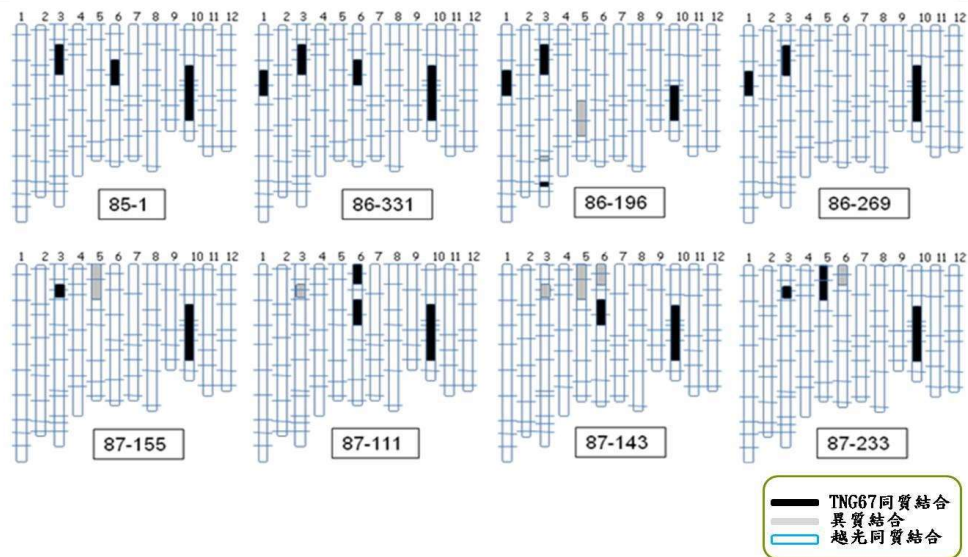


圖 5. 藉由 8 個越光抽穗期近同源系比對 87 個多型性 SSR 標記在遺傳圖譜的表現

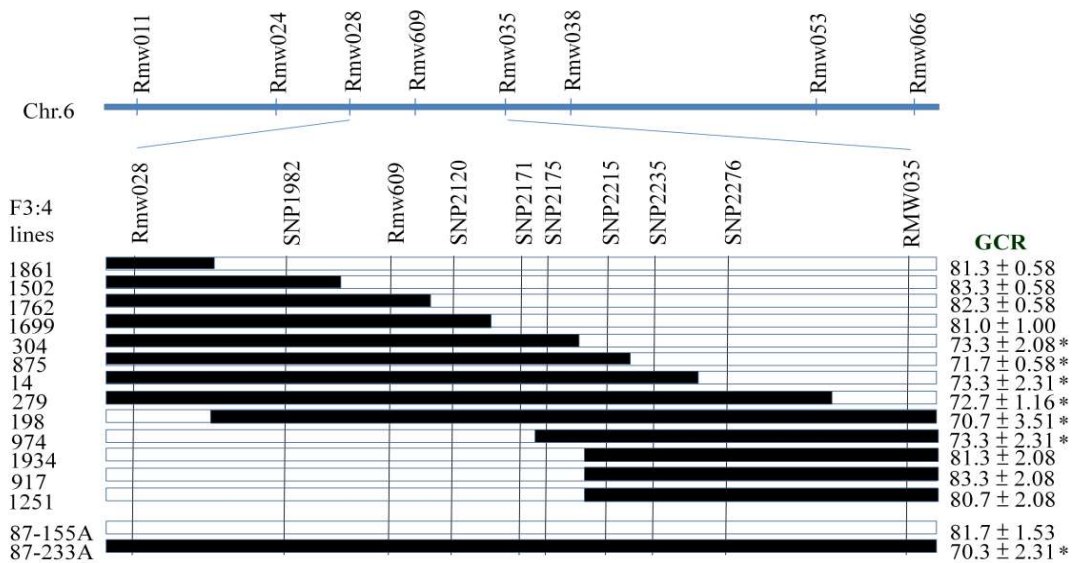


圖 6. 以 13 個不同光澤度回交自交系 F2:4 lines 進行 *qGCR6* 細定位