

# 稻米品質功能性標誌分析<sup>1</sup>

陳哲仁<sup>2</sup> 李長沛<sup>2</sup> 曾東海<sup>2</sup> 吳明哲<sup>2,3</sup>

## 摘 要

陳哲仁、曾東海、李長沛、吳明哲。2008。稻米品質功能性標誌分析。台灣農業研究 57:317–322。

水稻是台灣重要農作物之一，而良質米品種深受生產者及消費者所喜好，因此，稻米品質提昇是現行水稻育種的主要目標，特別是稻米的食味及外觀品質的改良。本實驗利用 7 個不同品質相關分子標誌，針對澱粉合成、香味以及穀粒長基因座進行調查，藉此瞭解國內栽培品種品質性狀的遺傳組成，結果顯示日本型及印度型水稻品種呈現兩種不同基因型組成，此外，在粒長 *GS3* 基因座發現新的對偶基因型，調查結果有助於利用水稻分子標誌輔助育種改良應用。

**關鍵詞：**水稻、品質、功能性標誌。

水稻是世界重要的糧食作物，產量、外觀及食味品質是栽培水稻重要特性，亦為水稻之重要育種目標。稻米主要由澱粉組成，其中直鏈性澱粉含量是品質的重要關鍵因子，水稻 *Wx* 基因座編譯 granule bound starch synthase (GBSS)，研究指出 *Wx* 基因插入子 1 (intron 1) 的 5 端 splice site (G/T) 單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 影響基因表現，導致直鏈性澱粉含量變化，其中 T allele 屬於低直鏈性澱粉 (15.8%)，G allele 則有較高的直鏈性澱粉含量 (28.2%)；另外，*Wx* 基因序列中 CT motif 重覆套數多寡也有影響，但是有多達 10 種對偶基因型，與直鏈性澱粉含量關連性不如 5 端 splice site G/T SNP 精確，兩者能解釋高達 9 成以上的直鏈性澱粉含量變化 (Ayres *et al.* 1997; Bao *et al.* 2006b)。此外，可溶性澱粉合成酶 (soluble starch synthase, SSS) 和澱粉支鏈酶 (starch branching enzyme, SBE) 等酵素也共同參與稻米澱粉生合成作用，分別調控直鏈性和支鏈性澱粉合成與組成比例，影響米飯食味品質，但是不同基因型對米飯品質確切的影響仍不明朗 (Bao *et al.* 2002, 2006a; Han *et al.* 2004; Liu *et al.* 2004)。米飯香味也是重要的品質特性，目前在 8 號染色體已鑑定出一個香味基因 *BADH2*，透過專一性引子 PCR 鑑定，可作為茉莉香米品種及育種雜交後裔篩選之用 (Bradbury *et al.* 2005)。稻米粒型也是品質重要環節直接影響消費者購買意願，粒長 *GS3*

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2338 號。接受日期：97 年 11 月 18 日。

2. 本所生技組聘用人員、助理研究員、副研究員及研究員兼組長。台灣 台中縣 霧峰鄉。

3. 通訊作者，電子郵件：wu@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

基因位在 3 號染色體近中心 (pericentromeric) 位置, Fan 等人 (2006) 指出表現子 2 (exon 2) 序列中一個關鍵的 (C/A) SNP 是參試印度型水稻短粒型品種 (Chuan7, Zhenshan97) 與長粒型品種 (Minghui63, H94) 的區別, 同時短粒對長粒是顯性。

不同的消費族群對稻米品質有不同的偏好, 像是美國、中國以及多數的亞洲國家消費市場喜好印度型 (*indica*) 外型細長, 烹煮後口感鬆散品種, 台灣及日本則偏好日本型 (*japonica*) 中短粒型, 米飯具光澤 Q 軟有嚼勁品種 (Fan *et al.* 2006; Ayres *et al.* 1997)。本研究針對澱粉合成酵素 (*Wx*、*SSI*、*SSIIa*、*SBE1*、*SBE3*)、香味 (*BADH2*) 以及穀粒長度 (*GS3*) 等 7 個不同基因座, 根據已知序列及參考資料合成專一性引子 (表 1) (Ayres *et al.* 1997; Bao *et al.* 2002, 2006a; Bradbury *et al.* 2005; Fan *et al.* 2006; Han *et al.* 2004), 利用 PCR 方法配合 2% agarose 電泳分析 44 個國內外水稻品種品質相關基因型 (表 2)。部分無法直接從 PCR 擴增產物鑑別的基因型, 將不同基因型序列上傳至 NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>), 分析可供鑑別之限制酵素, 以此瞭解稻米品質相關基因在國內水稻育種方面的應用潛力。分析參試水稻品種發現日本型水稻澱粉合成酵素整體的基因型組成大致為 *Wx* (SNP) T allele、*SS1* (SSR)-199 bp、*SBE1* (STS)-882 bp 及 *SBE3* (SNP) G allele; 印度型水稻 *Wx* (SNP) G allele、*SS1* (SSR)-202 bp、*SBE1* (STS)-548 bp 及 *SBE3* (SNP) C allele (表 2), 符合前人研究顯示印度型通常有較高的直鏈性澱粉含量和糊化溫度, 以及水稻不同亞種 *SBE1* 和 *SBE3* 基因型歧異 (Bao *et al.* 2002; Liu *et al.* 2004)。此外, 澱粉合成基因 *SSIIa* 在小麥基因功能性研究指出與支鏈性澱粉的細微結構有關 (Konik-Rose *et al.* 2007), Bao 等人 (2006a) 則指出 *SSIIa* 基因 GC/TT 多型性, 能作為中高與低糊化溫度的區別, 因此與米飯質地有關。*Wx* 基因 G/T SNP 一般是用 *AccI* 限制酵素 (辨識序列 GT A/C G/T AC) 加以區分 (Ayres *et al.* 1997; Bao *et al.* 2006b), 本試驗發現限制酵素 *BstZ17I* (辨識序列 GTATAC) (NEB, 美國) 能有相同的效果, 並且具有序列辨識專一性及單位酵素價格約 *AccI* 限制酵素二分之一的優點。Bradbury 等人 (2005) 發現茉莉香米品種 *Basmati* 和 *Jasmine* 的 *BADH2* 基因中 8-bp 缺失造成功能喪失, 導致香味成分 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) 的累積。利用可鑑別的 PCR 引子, 並以 *Basmati* 370 和 *Jasmine* 品種 PCR 增幅後的電泳圖譜為對照, 在國內品種中發現台中秈糯 1 號 (TCSW1) 和台中秈糯 2 號 (TSW2) 也有此一缺失, 台中秈糯 2 號是具有淡香的香米品種, 根據親緣譜系得知香味特性可能是從台中秈糯 1 號獲得, 而與 *BADH2* 基因有關; 國內新育成台農 71 號 (TNG71) 和桃園 3 號 (TY3) 具有芋頭香味, 兩者 *BADH2* 基因都不具 8-bp 缺陷, 顯示芋頭香味受其他基因控制。近期的研究顯示許多南亞及東南亞的香米品種也累積大量的 2AP, 但是 *BADH2* 基因並沒有 8-bp 缺失, 推測應有其他香味基因存在 (Fitzgerald *et al.* 2008)。本試驗針對穀粒長 *GS3* 基因設計專一性引子涵蓋表現子 2 (C/A) SNP, 並利用限制酵素 *PstI* 轉換成易於分析的 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) 標誌, 發現如下 3 個 CAPS 基因型: (A) 日本晴 (*Nipponbare*) 及台農 67 號 (TNG67) 為代表, 屬日本型; (B) 93-11 及 IR64 為代表, 屬印度型; (C) 台中在來 1 號 (TN1) 及台中秈 10 號 (TCS10) 為代表, 屬印度型。*GS3*<sup>°</sup> 基因型外表型性狀屬長粒型, 解序發現表現子 2 是 C allele, 且插入子 2 有 50-bp 插入片段 (未公開資料), 因此推測表現子 2 (C/A) SNP 並非粒長唯一關鍵性差異, 而國內參試秈稻品種都是 *GS3*<sup>°</sup> 基因型, 可能的原因還需要進一步地試驗及討論。利用 IR64 × TNG67 F<sub>2</sub> 分離族群已初步證實, *Wx*(SNP)*BstZ17I* 和 *GS3*(SNP)*PstI* 標誌可輔助選拔高低直鏈性澱粉及篩選穀粒長短 (表 3), 顯示分子標誌有助於選拔效率提升。提升稻米品質一直是育種工作的重要目標, 但傳

表 1. 稻米品質 SSR、SNP 以及 STS 分子標誌引子序列

Table 1. The primer sequences used to amplified SSR, SNP and STS markers in grain quality genes

Marker		Primer (5' → 3')	Allele	Ch	Reference
Starch synthesis					
Wx(SSR)	F	CTTTGTCTAICTCAAGACAC	106–214 bp <sup>z</sup>	6	Ayres <i>et al.</i> 1997
	R	TTGCAGATGTTCTTCCTGATG			
Wx(SNP) <i>Bst</i> Z17I	F	CTTTGTCTAICTCAAGACAC	G/T <sup>y</sup>		
	W2R	TTTCCAGCCCAACACCTTAC			
SSI	F	GATCCGTTTTTGCTGTGCC	195, 199, 202, 218 bp <sup>z</sup>	6	Bao <i>et al.</i> 2002
	R	CCTCCTCTCCGCCGATCCTG			
SSIa	F7	CTGGATCACTTCAAGCTGTACGAC	GC/TT <sup>x</sup>	6	Bao <i>et al.</i> 2006a
	F22	CAAGGAGAGCTGGAGGGGGC			
	R1	GCCGGCCGTGCAGATCTTAAC			
	R21	ACATGCCGCGCACCTGGAAA			
SBE1(STS)	F	GAGTTGAGTTGCGTCAGATC	I/J <sup>w</sup>	6	Han <i>et al.</i> 2004
	R	AATGAGGTTGCTTGCTGCTG			
SBE3(SNP) <i>Spe</i> I	F	GTCTTGACTCAGATGCTGGACTC	G/C <sup>v</sup>	2	Han <i>et al.</i> 2004
	R	ATGTATAACTGGCAGTTCGAACGG			
Appearance					
GS3(SNP) <i>Pst</i> I	F500	TCCGTTTTAATTAGCACCAT	A/B/C <sup>u</sup>	3	Fan <i>et al.</i> 2006
	R500	TACTTTCATTTGCCAAGGTT			
Fragrance					
BADH2	ESP	TTGTTTGAGCTTGCTGATG	F/NF <sup>t</sup>	8	Bradbury <i>et al.</i> 2005
	IFAP	CATAGGAGCAGCTGAAATATATACC			
	INSP	CTGGTAAAAAGATTATGGCTTCA			
	EAP	AGTGCTTTACAAAGTCCCGC			

<sup>z</sup> Amplified fragments estimated by eGene capillary electrophoresis system model HDA-GT12™.

<sup>y</sup> G: AGGTATAC; T: AGTTATAC.

<sup>x</sup> GC: GGGCTC; TT: GGTTTC.

<sup>w</sup> J: *japonica*, 882 bp; I: *indica*, 548 bp.

<sup>v</sup> G: ACTAGT; C: ACTACT.

<sup>u</sup> A: CTGCAG; B: CTGAG; C: CTGCAG, containing 50-bp insertion.

<sup>t</sup> F: 257 bp; NF: 355 bp.

統的育種方法，評估的準確性易受環境因素影響，以及必須在後期固定世代才能獲得同質材料，再進行相關性狀調查分析，因此透過前述的功能性核酸多型性 (functional nucleotide polymorphism, FNP) 分析結果可知，應用分子標誌可在世代早期即進行優良基因型選拔，特別有助於育種效率提昇。依據目前對國內外文獻搜尋結果，並未找到任何綜合分析所有已知米質相關基因型的研究工作，本試驗篩及改良現有之品質分子標誌，也設計 GS3 粒長基因座分子標誌，並發現新的對偶基因型，將利用此一基礎訊息作為稻米品質分子標誌輔助育種改良，以及深入探討 SSI、SBE1 與 SBE3 等澱粉生合成基因對米質的影響。

表 2. 水稻栽培品種 *Wx*、*SSI*、*SSIIa*、*SBE1*、*SBE3*、*BADH2* 以及 *GS3* 基因型分析Table 2. Genotyping of *Wx*, *SSI*, *SSIIa*, *SBE1*, *SBE3*, *BADH2* and *GS3* genes in rice cultivars

Cultivar	Starch synthesis						Fragrance	Grain length
	<i>Wx</i> (SSR)	<i>Wx</i> (SNP)- <i>Bst</i> Z171	<i>SSI</i>	<i>SSIIa</i>	<i>SBE1</i> (STS)	<i>SBE3</i> (SNP)- <i>SpeI</i>	<i>BADH2</i>	<i>GS3</i>
TK1	118 bp	T <sup>z</sup>	199 bp	GC <sup>z</sup>	J <sup>z</sup>	G <sup>z</sup>	NF <sup>z</sup>	A <sup>z</sup>
TK2	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK3	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK4	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK5	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK6	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK7	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK8	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK9	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK10	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK11	118 bp	T	199 bp	GC	J	G	NF	A
TK12	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK13	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK14	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK15	118 bp	T	199 bp	GC	J	G	NF	A
TK16	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TK17	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG67	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG68	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG69	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG70	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG71	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNG72	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TNGW73	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TCS10	120 bp	T	199 bp	TT	I	C	NF	C
TY1	118 bp	T	199 bp	GC	J	G	NF	A
TY3	120 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TT30	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
Koshihikari	118 bp	T	199 bp	GC	J	G	NF	A
Nipponbare	118 bp	T	199 bp	TT	J	G	NF	A
TCSW1	122 bp	T	202 bp	TT	I	G	F	C
TSW2	122 bp	T	202 bp	TT	I	G	F	C
TNGSW2	118 bp	T	202 bp	TT	I	C	NF	C
TN1	106 bp	G	202 bp	TT	I	G	NF	C
IR64	118 bp	G	199 bp	GC	I	C	NF	B
IR24	107 bp	G	202 bp	TT	I	C	NF	C
IR28	106 bp	G	202 bp	TT	I	C	NF	B
IR5105	118 bp	T	213 bp	TT	I	C	F	B
93-11	120 bp	T	202 bp	TT	I	C	NF	B
Jasmine	118 bp	T	202 bp	TT	I	C	F	B
Basmati 370	118 bp	G	195 bp	GC	I	G	F	B
Milfor	124 bp	G	199 bp	GC	I	G	F	B
KDML105	118 bp	T	218 bp	TT	I	C	F	B
Mudgo	104 bp	G	218 bp	GC	I	G	NF	C

<sup>z</sup> Allele characteristics as listed in Table 1.

表 3. 水稻 IR64 × TNG67 F<sub>2</sub> 子代不同 *Wx* 及 *GS3* 基因型直鏈性澱粉和粒長平均值

Table 3. Mean value of amylose content and grain length of different genotypes at *Wx* and *GS3* loci in rice F<sub>2</sub> progeny derived from IR64 × TNG67

Trait	Parent (mean ± SD)		Homozygous for TNG67 allele		Homozygous for IR64 allele		TNG67 / IR64 Heterozygous	
	TNG67	IR64	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
Amylose content (%)	19.20 ± 0.82	23.10 ± 0.72	15.37 ± 2.2	12.00–17.8	22.34 ± 2.3	19.80–24.3	22.18 ± 1.9	15.60–24.8
Grain length (mm)	7.22 ± 0.13	9.67 ± 0.63	8.38 ± 0.52	7.34–8.93	8.89 ± 0.49	7.68–10.21	8.23 ± 0.69	6.63–9.87

### 引用文獻 (Literature cited)

- Ayres, N. M., A. M. McClung, P. D. Larkin, H. F. Blich, C. A. Jones, and W. D. Park. 1997. Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylase classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. *Theor. Appl. Genet.* 94:773–781.
- Bao, J. S., H. Corke, and M. Sun. 2002. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105:898–905.
- Bao, J. S., H. Corke, and M. Sun. 2006a. Nucleotide diversity in *starch synthase IIa* and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 113:1171–1183.
- Bao, J. S., H. Corke, and M. Sun. 2006b. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 113:1185–1202.
- Bradbury, L. M., R. J. Henry, Q. Jin, R. F. Reinke, and D. L. Waters. 2005. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Mol. Breed.* 16:279–283.
- Fan, C., Y. Xing, H. Mao, T. Lu, B. Han, C. Xu, X. Li, and Q. Zhang. 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.
- Fitzgerald, M. A., N. R. Sackville Hamilton, M. N. Calingacion, H. A. Verhoeven, and V. M. Butardo. 2008. Is there a second fragrance gene in rice? *Plant Biotechnol. J.* 6:413–423.
- Han, Y., M. Xu, X. Liu, C. Yan, S. S. Korban, X. Chen, and M. Gu. 2004. Genes coding for starch branching enzymes are major contributors to starch viscosity characteristics in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 166:357–364.
- Konik-Rose, C., J. Thistleton, H. Chanvrier, T. Tan, P. Halley, M. Gidley, B. Kosar-Hashemi, H. Wang, O. Larroque, J. Ikea, S. McMaugh, A. Regina, S. Rahman, M. Morell, and Z. Li. 2007. Effects of starch synthase IIa gene dosage on grain, protein and starch in endosperm of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 115:1053–65.
- Liu, X., M. Gu, Y. Han, Q. Ji, J. Lu, S. Gu, R. Zhang, X. Li, J. Chen, S. S. Korban, and M. Xu. 2004. Development gene-tagged molecular markers for functional analysis of starch-synthesizing genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 135:345–353.

# Genetic Analysis of Rice Grain Quality Traits Using Functional Markers<sup>1</sup>

Jen-Ren Chen<sup>2</sup>, Chang-Pei Li<sup>2</sup>, Tung-Hai Tseng<sup>2</sup>, and Min-Tze Wu<sup>2,3</sup>

## Abstract

Chen, J. R., C. P. Li, T. H. Tseng, and M. T. Wu. 2008. Genetic analysis of rice grain quality traits using functional markers. *J. Taiwan Agric. Res.* 57:317–322.

Rice (*Oryza sativa*) is one of the most important crops in Taiwan and quality rice varieties are preferable by producers and consumers. Hence, improvement of rice quality is a major objective in current breeding program, especially in appearance, cooking and eating quality. In this study, seven functional markers related to loci of starch synthesis, fragrance and grain length were surveyed to reveal the genetic basis of grain quality traits in rice cultivars grown in Taiwan. Results showed diversities of starch synthesis gene between japonica and indica subspecies of rice. Moreover, a new allele at GS3 locus was found. These findings are useful in rice breeding for quality improvement via marker-assisted selection.

**Key words:** Rice, *Oryza sativa*, Grain quality, Functional markers.

- 
1. Contribution No.2338 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: November 18, 2008.
  2. Respectively, Contract Employee, Assistant Research, Associate Researcher, and Senior Researcher and Head, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
  3. Corresponding author, e-mail: wu@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.