

水稻抗白葉枯病突變體 SA0423 抗性表現 數量性狀基因座 (eQTL) 之研究

林大鈞¹ 林玉鈴² 黃巧宜³ 曾馨儀⁴ 曾文彬³ 陳純葳⁵ 王強生^{6,*}

摘要

林大鈞、林玉鈴、黃巧宜、曾馨儀、曾文彬、陳純葳、王強生。2016。水稻抗白葉枯病突變體 SA0423 抗性表現數量性狀基因座 (eQTL) 之研究。台灣農業研究 65(1):54–69。

為開發新的白葉枯病抗性基因，本研究針對轉錄體分析所得 17 個抗性候選基因，利用 GRAMENE 網站，檢索基因兩側 5 cM 內的 SSR 標誌，篩選於 2 親本 'TN1' (感性) 及 SA0423 突變體 (抗性) 間具多型性的標誌，針對 177 個 'TN1' × SA0423 F₂ 個體進行基因型分析，並配合白葉枯病菌 XF89b 接種後病斑之外表型調查。所得資料利用 R/qtl 以單一標誌回歸分析法，分析基因型與抗性外表型的連鎖關係。結果發現，僅有鄰近 *Ankyrin* 基因之 RM6838 的 LOD 值 (6.86) 超過閾值 (LOD = 3.0)，顯示 *Ankyrin* 基因極有可能參與 SA0423 的抗性表現。生物資訊學分析發現，*Ankyrin* 之蛋白質序列與阿拉伯芥 RING 型 E3 接合酶 (XBAT32) 具有 76% 的相似性，顯示其可能透過調控 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS) 之生合成，改變植物體內的乙烯量，而延緩植物的免疫系統。即時定量逆轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real time RT-PCR) 分析發現，接種 *Xoo* XF89b 後，*Ankyrin* 基因在 SA0423 突變體中的表現低於 'TNG67'。同時，*OsACS1* 及 *OsACS3* 在 SA0423 突變體的表現量顯著高於 'TNG67'。這些結果顯示，SA0423 突變體在接種後可能改變乙烯生合成路徑，因而具有較強的抗病性。經選殖 *Ankyrin* 基因上下游共 11.8 kb 的 DNA 片段進行定序結果顯示，在編碼區有 15 個突變位點，導致胺基酸置換 (Ser280Pro 與 Thr381Ala)。綜合試驗結果說明，*Ankyrin* 不僅在表現量與 SA0423 白葉枯病抗性間具有高度相關，其蛋白質特性亦與 'TNG67' 顯著不同。因此，*Ankyrin* 基因應是參與 SA0423 突變體白葉枯病抗性機制的表現數量基因座 (eQTL) 之一。

關鍵詞：水稻、白葉枯病抗性、突變體、轉錄體、表現數量性狀基因座。

前言

白葉枯病 (bacterial blight disease) 係由 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 所引起，是目前台灣地區嚴重的水稻病害之一，可造成高達 50% 的減產 (Gnanamanickam *et al.* 1999)。此病好發於台灣的第 2 期稻作，尤其是在颱風頻繁的季節 (Hsieh 2007)，而抗性品種的種植被

公認為最有效且經濟的防治手段 (Yang *et al.* 2003)。因此，開發抗性基因以協助抗性品種的選育更顯示其重要性。截至目前為止，在水稻品種中，已有 36 個以上的抗性基因座被發現，分別命名為 *Xa1* 至 *Xa36* (Lin *et al.* 1996; Niño-Liu *et al.* 2006; Zhang 2007; Shanti *et al.* 2010)。其中，*Xa1*、*xa5*、*xa13*、*Xa21*、*Xa3*

投稿日期：2015 年 5 月 12 日；接受日期：2015 年 7 月 3 日。

* 通訊作者：wangchansen@nchu.edu.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

³ 國立中興大學農藝學系研究助理。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

⁵ 農委會農業試驗所植物病理組聘用助理研究員。台灣 台中市。

⁶ 國立中興大學農藝系教授。台灣 台中市。

Xa26 及 *Xa27* 等基因已被利用於選殖 (Song *et al.* 1995; Yoshimura *et al.* 1998; Iyer & McCouch 2004; Sun *et al.* 2004; Gu *et al.* 2005; Chu *et al.* 2006; Jiang *et al.* 2006; Xiang *et al.* 2006)。

國際稻米研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 利用極感病的 IR24 品系作為輪迴親 (recurrent parent)，建立帶有不同 *Xa* 基因的 IRBB 系列近同源系 (near-isogenic lines)，作為良好的 *Xa* 基因提供親 (donor parent) 利用於抗性育種 (Huang *et al.* 1997)。Kottapalli *et al.* (2006) 及 Sama *et al.* (2014) 利用基因圖譜比較的策略，開發許多分子標誌，可應用於改良優良品種的白葉枯病抗性 (Kottapalli *et al.* 2006; Sama *et al.* 2014)。然而，長期栽培單一抗性品種，可能會改變栽種區域的生理小種 (races) 或菌相，而導致抗性崩解，如 *Xa4* 的抗病品種在釋出後很快喪失抗性 (Khush *et al.* 1989; Mew *et al.* 1992)。因此，育種家認為堆疊多個不同抗性基因，可以減緩抗性的崩解，是目前抗病育種的主流策略。所以，篩選新的抗性種原與開發新的抗性基因，以因應菌相的演化，是抗病育種的重要工作 (Wang *et al.* 2013)。

本研究利用「台農 67 號」(‘TNG67’) 及其廣幅抗性之 SA0423 突變體為材料，接種台灣水稻白葉枯病抗性檢定圃專用菌株 XF89b，利用微陣列分析兩品種 (系) 於接種後的轉錄體表現之差異，探討病原菌誘導與抗性相關之早期基因 (Huang *et al.* 2015)。另一方面，結合微陣列分析全基因組的表現群組 (genome-wide expression profiles) 與遺傳連鎖分析 (genetic linkage analysis) 等技術，針對重要的數量性狀進行表現數量性狀基因座 (expression quantitative trait loci; eQTLs) 探索，進而剖析參與特定性狀表現的機制，甚至藉此開發功能性分子標誌 (functional marker)，直接應用於育種選拔，此策略亦被稱為轉錄體定位 (transcriptome mapping) (Jansen & Nap 2001; Jansen 2003; Holloway & Li 2010)。

本研究針對先前轉錄體分析所得的候選基因 (Huang *et al.* 2015)，利用 GRAMENE 網站

搜尋目標基因兩側 5 cM 的 SSR 分子標誌，分析 177 個 ‘TN1’ × SA0423 F₂ 個體，探討候選基因與抗性的連鎖關係。所得結果，除可作為候選基因的確認與研究抗性機制的推論外，亦可研發分子標誌應用於水稻白葉枯病抗性的分子育種。

材料與方法

試驗材料

本研究選用對白葉枯病極敏感的水稻品種「台中在來 1 號」(‘TN1’) (susceptible, S) 與具廣幅抗性之突變體 SA0423 (resistant, R) 及其雜交組合 ‘TN1’ × SA0423 之 F₂ 族群為材料。所有試驗材料均依慣行農法，種植於行政院農業委員會農業試驗所試驗田。白葉枯病菌則以農業試驗所植病組稻作病害實驗室所保存的白葉枯病 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b (Xoo XF89b；採集地：台中) 作為供試菌株。

白葉枯病菌之接種源製備、接種與病勢調查

在接種源製備方面，將 Xoo XF89b 於室溫下於 523 固態培養基 (1% sucrose、0.8% casein hydrolysate、0.4% yeast extract、0.2% K₂HPO₄、0.03% MgSO₄ · 7H₂O 及 1.5% agar) 活化培養 72 h 後，再挑取單一菌落接種於新鮮培養基，於室溫下進行馴化培養 72 h，接著轉移至 523 液態培養基 (1% sucrose、0.8% casein hydrolysate、0.4% yeast extract、0.2% K₂HPO₄ 及 0.03% MgSO₄ · 7H₂O)。於室溫下、150 rpm 震盪培養 72 h。調整菌液濃度為 10⁹ CFU mL⁻¹，作為白葉枯病菌之接種源。

供試水稻植株於最高分蘗期 (maximum tillering stage，約 60 d)，依據剪葉接種法 (Kauffman *et al.* 1973)，進行病原菌接種。接種前，先將消毒的剪刀刀刃沾滿接種菌液，進行人工剪葉接種，每個分蘗僅接種最上位之完全展開葉，距葉尖 1–2 cm 處，剪葉接種。所有接種均在 1 h 內完成。並在感性對照品種 ‘TN1’ 之病斑長度達全葉 3/4 時，調查試驗植株之病斑，作為抗性外表型資料。

基因體 DNA 樣品之製備

總量 DNA 之萃取，以 GeneReach Biotechnology Corporation 公司製造之植物 DNA/RNA 萃取套組 (瑞基海洋生技公司，台灣)，並搭配 Taco™ 核酸自動化萃取系統 (瑞基海洋生技公司，台灣) 萃取 DNA。剪取 0.05–0.1 g 水稻葉片，置於 2 mL 之防爆離心管內，加入 3 顆直徑 3 mm 鋼珠，再以 Taco™ Prep 均質機 (瑞基海洋生技公司，台灣) 震盪破碎約 1 min。接著，加入 600 μ L 的裂解液 (lysis buffer)，震盪 30 s，混合後，於室溫、12,000 \times g 條件下，離心 5 min。另一方面，依序於 96 孔萃取盤分別加入 400 μ L 異丙醇 (isopropanol)、750 μ L 清洗液 A (washing buffer A)、50 μ L 磁珠液 (magnetic bead)、750 μ L 清洗液 A、750 μ L

清洗液 B、750 μ L 清洗液 B 及 150 μ L 溶出液 (eluting buffer)。接著，將上述離心之上清液，依序填入 96 孔萃取盤中的異丙醇管，即利用 taco™ 核酸自動化萃取系統，進行 DNA 的製備。所得 DNA 樣品再以分光光度計 (ND-1000, NanoDrop Technologies, USA) 及 DNA 電泳，進行 DNA 的濃度與品質之分析。

鄰近目標抗性基因之 SSR 分子標誌搜尋

利用 Gramene 網站 (<http://archive.gramene.org/>; Gramene Release 39, 10/2013) 進行搜尋。首先，利用候選基因的序號 (例：LOC_Os06g13050) 搜尋候選基因在染色體的位置，設定分子標誌類型為 SSR，涵蓋區間設定為 5 cM，即能搜尋目標候選基因兩側 5 cM 的 SSR 分子標誌 (表 1)。

表 1. 鄰近候選基因兩側 5 cM 內之 SSR 分子標誌。

Table 1. The SSR markers located in 5 cM region flanking to the candidate genes.

Gene	Position	SSR marker
<i>Ankyrin</i>	Up	RM3214, RM3215, RM3481, RM6027, RM6429, RM6838, RM8243, RM22669, RM22675, RM22684, RM22690, RM22696, RM22707, RM22715
	Down	RM344, RM3395, RM5514, RM5663, RM7267, RM22725, RM22742, RM22754, RM22761, RM22771, RM22779
<i>ATG1</i>	Up	RM147, RM484, RM4477, RM5009, RM5352, RM5628, RM6128, RM6691, RM25737, RM25743, RM25751, RM25761, RM25769, RM25776, RM25789, RM25794, RM25803
	Down	RM228, RM333, RM496, RM1162, RM1374, RM3123, RM3451, RM3563, RM3749, RM3750, RM3834, RM5009, RM5471, RM5494, RM5666, RM5768, RM6160, RM6960, RM25810, RM25818, RM25823, RM25829, RM25834, RM25844, RM25853, RM25859, RM25868, RM25885, RM25905
<i>CaM_Ch1.1-1</i>	Up	RM243, RM575, RM576, RM577, RM578, RM579, RM581, RM582, RM583, RM1151, RM3359, RM3780, RM5346, RM6466, RM6516, RM6630, RM8083, RM8091, RM8092, RM8093, RM8103, RM8140, RM8141, RM8148, RM8222, RM8268, RM10498, RM10518, RM10525, RM10533, RM10544, RM10551, RM10567, RM10573
	Down	RM292, RM294, RM572, RM580, RM600, RM1032, RM3627, RM5644, RM6039, RM6190, RM6613, RM6642, RM8046, RM8052, RM8053, RM8063, RM8065, RM8066, RM8071, RM8123, RM8131, RM8132, RM8133, RM10587, RM10601, RM10616, RM10628, RM10635, RM10644, RM10654, RM10660
<i>CaM_Ch1.1-2</i>	Up	RM292, RM572, RM580, RM581, RM582, RM600, RM1032, RM5346, RM5644, RM6039, RM6190, RM6466, RM6613, RM6642, RM8052, RM8053, RM8063, RM8065, RM8066, RM8071, RM8083, RM8091, RM8092, RM8093, RM8123, RM8131, RM8132, RM8133, RM8222, RM8268, RM10544, RM10551, RM10567, RM10573, RM10587, RM10601, RM10616
	Down	RM294, RM1287, RM3627, RM8046, RM10628, RM10635, RM10644, RM10654, RM10660, RM10665, RM10683, RM10695, RM10702, RM10712
<i>CaM_Ch1.2</i>	Up	RM555, RM1347, RM2008, RM3294, RM3497, RM3732, RM3865, RM4355, RM4949, RM5301, RM5350, RM5512, RM5553, RM5622, RM5664, RM5780, RM5869, RM6112, RM6129, RM6230, RM6378, RM6641, RM6654, RM6895, RM7082, RM7215, RM7638, RM8080, RM12569, RM12576, RM12583, RM12589, RM12594, RM12606, RM12616, RM12625, RM12632, RM12642, RM12649, RM12656
	Down	RM2483, RM4702, RM5862, RM5897, RM6069, RM6233, RM6247, RM7006, RM7575, RM12666, RM12672, RM12680, RM12687, RM12699, RM12708, RM12720, RM12730

表 1. 鄰近候選基因兩側 5 cM 內之 SSR 分子標誌 (續)。

Table 1. The SSR markers located in 5 cM region flanking to the candidate genes (continued).

Gene	Position	SSR marker
<i>CaM_Chr.5</i>	Up	RM421, RM534, RM1187, RM3476, RM3673, RM3870, RM5311, RM5575, RM5947, RM5970, RM5973, RM6054, RM6188, RM18842, RM18859, RM18866, RM18875, RM18884, RM18895, RM18905
	Down	RM178, RM1869, RM3348, RM3612, RM3620, RM4641, RM5770, RM6334, RM6545, RM6972, RM7081, RM7446, RM18912, RM18919, RM18925, RM18933, RM18951, RM18959, RM18965
<i>CMPG1</i>	Up	RM6, RM318, RM530, RM3275, RM3316, RM3421, RM5303, RM5378, RM5472, RM5993, RM6290, RM6295, RM6424, RM6933, RM7598, RM13871, RM13878, RM13883, RM13907, RM13912, RM13923, RM13928, RM13938
	Down	RM112, RM240, RM425, RM2578, RM2848, RM3857, RM4883, RM6535, RM8255, RM13945, RM13950, RM13963, RM13971, RM13978, RM13986, RM13995
<i>DUF_1c</i>	Up	RM1048, RM1973, RM2420, RM3404, RM3826, RM5009, RM5009, RM6011, RM21739, RM21753, RM21764, RM21771
	Down	RM336, RM455, RM1017, RM1279, RM2752, RM2848, RM3608, RM3799, RM5495, RM6152, RM6278, RM6403, RM21780, RM21786, RM21801, RM21823, RM21835
<i>FMO</i>	Up	RM111, RM115, RM1163, RM2434, RM2848, RM3034, RM3408, RM4608, RM5986, RM6119, RM6176, RM6734, RM6773, RM6917, RM7420, RM7561, RM8258, RM19458, RM19467, RM19478, RM19484, RM19491, RM19514, RM19521, RM19535, RM19548
	Down	RM253, RM276, RM2126, RM3794, RM4173, RM5754, RM5981, RM6194, RM19556, RM19565, RM19573, RM19581, RM19588, RM19596, RM19602, RM19609, RM19618, RM19626
<i>JOM</i>	Up	RM348, RM1153, RM3306, RM3335, RM3648, RM5478, RM5506, RM5950, RM6057, RM6238, RM6441, RM8217, RM8218, RM17549, RM17554, RM17568, RM17578, RM17586, RM17594, RM17599, RM17604
	Down	RM131, RM1112, RM1113, RM2275, RM2420, RM2799, RM3466, RM5307, RM7172, RM7314, RM7410, RM7474, RM8220, RM17616, RM17624, RM17634, RM17644
<i>PxMP</i>	Up	RM1246, RM2486, RM2848, RM2972, RM5195, RM5196, RM5341, RM28231, RM28247, RM28259, RM28270, RM28276
	Down	RM519, RM2848, RM3448, RM6022, RM28283, RM28292, RM28305, RM28319, RM28328
<i>SAM</i>	Up	RM276, RM402, RM549, RM3125, RM3370, RM4128, RM5531, RM5981, RM6194, RM6359, RM6701, RM6779, RM6857, RM7023, RM7088, RM7488, RM8270, RM8274, RM19618, RM19626, RM19637, RM19646, RM19653, RM19671, RM19676, RM19684
	Down	RM1169, RM3438, RM5585, RM5855, RM7572, RM19696, RM19705, RM19710, RM19715, RM19724, RM19730, RM19736, RM19748
<i>SNARE</i>	Up	RM134, RM429, RM1209, RM1364, RM3552, RM5455, RM6216, RM6650, RM22017, RM22024, RM22032, RM22041, RM22051, RM22062, RM22071
	Down	RM1306, RM1335, RM1357, RM1362, RM2420, RM2715, RM3555, RM5720, RM6063, RM6389, RM6655, RM22080, RM22086, RM22092, RM22098, RM22132, RM22143
<i>Ubi</i>	Up	RM147, RM484, RM3773, RM5009, RM6128, RM6691, RM7300, RM25719, RM25731, RM25737, RM25743, RM25751, RM25761, RM25769, RM25776, RM25789, RM25794
	Down	RM228, RM333, RM1162, RM1374, RM3123, RM3451, RM3563, RM3749, RM3750, RM3834, RM4477, RM5009, RM5352, RM5471, RM5628, RM5666, RM25803, RM25810, RM25818, RM25823, RM25829, RM25834, RM25844, RM25853, RM25859, RM25868
<i>Xa2</i>	Up	RM255, RM3276, RM3423, RM3534, RM5030, RM5511, RM6748, RM6992, RM17465, RM17471, RM17479, RM17487
	Down	RM1100, RM3687, RM3836, RM3843, RM5473, RM5771, RM6629, RM17492, RM17504, RM17512
<i>xa5</i>	Up	RM122, RM153, RM2494, RM5816, RM7373, RM17724, RM17732, RM17741, RM17746
	Down	RM159, RM1200, RM1258, RM3334, RM4777, RM5361, RM5693, RM6209, RM6300, RM6320, RM7029, RM17756, RM17770, RM17777, RM17784
<i>Xa25</i>	Up	RM179, RM465, RM2848, RM28057, RM28069, RM28075, RM28083, RM28089, RM28098, RM28107, RM28128
	Down	RM511, RM1261, RM3495, RM6564, RM28157, RM28172, RM28189, RM28204, RM28214, RM28221, RM28231

SSR 分子標誌之分析

進行 SSR 分子標誌分析時，每一個 PCR 反應的總體積為 10 μL ，其中包含 20 ng DNA、0.6 U *Taq* DNA polymerase (ProTagTM, Protech Technology Enterprise Co., Ltd.)、*Taq* buffer (10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、0.01% gelatin、1.5 mM MgCl₂ 及 0.1% Triton X-100)、200 μM dNTP、0.4 μM 正向引子和 0.4 μM 反向引子。PCR 反應在熱循環反應器 (DNAEngine[®] Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Inc.) 中進行，反應條件為 94°C、5 min；94°C、1 min；55°C、30 s；72°C、1 min，共 30 個循環；72°C、4 min，1 個循環；反應結束後以 15°C 保存 PCR 產物。

將 3 組 SSR 增幅的 PCR 產物，各取 5 μL 混合均勻後，依序放入 96 孔盤，續以高效能毛細管電泳儀 (eGene HAD-GT12, QIAGEN Co., Ltd.) 及卡匣 (型號：QIAxcel DNA High Resolution Kit 1200, QIAGEN Co., Ltd.)，依廠商說明書的操作流程，進行基因型的分析。所用之操作軟體為 QIAxcel ScreenGel (QIAGEN Co., Ltd.)；Size marker 為 50–800 bp (20 ng μL^{-1} ; QIAGEN Co., Ltd.)；Alignment marker 為 QX 15 bp–1 kb (QIAGEN Co., Ltd.)。

候選基因與抗病性之連鎖分析

抗性外表型係調查分析 177 個 'TN1' \times SA0423 F₂ 個體，於接種 *Xoo* XF89b 後第 28 d 的病斑長度，作為抗性外表型資料。利用上述位於目標基因 5 cM 內，且於兩親本間具多型性的 SSR 分子標誌，進行 F₂ 個體之基因型分析。最後，利用 R/qtl (ver. 3.1.0; <http://www.r-project.org/>) (Broman *et al.* 2003; Broman & Sen 2009) 之單一標誌回歸分析法 (single marker regression, SMR) (Haley & Knott 1992)，分析外表型與基因型間的連鎖關係。

即時逆轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time RT-PCR)

使用 SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen) 試劑組將總量 RNA 反轉錄

成 cDNA：加 1 μL 10 mM oligo d (T) 18 引子 (附錄 1) 於 2 μg 總量 RNA 樣品，經 80°C、10 min 變性後，隨即置於 4°C 下，再逐一加入 1 μL 0.1 M DTT、4 μL 2.5 mM dNTP (TaKaRa)、4 μL 5 \times first-strand buffer、1 μL RNase-OUT、1 μL SuperScript II (200 U μL^{-1})，並調整總體積為 20 μL 。於 25°C、10 min 及 42°C、90 min 作用後，再以 95°C、5 min 終止反應，所得即為 cDNA。接著再以 KAPATM SYBR[®] FAST qPCR 試劑組進行 PCR，取 4 μL 稀釋 20 倍的 cDNA，加入 10 μL 2 \times master mix、0.4 μL 10 μM 引子 (附錄 1)、0.4 μL 50 \times ROX low 及 4.8 μL 去離子水，置於多重螢光基因定量光譜分析儀 (ABI 7500, Life Technologies Co., Ltd.)，進行即時定量 PCR。PCR 條件設定如下：95°C、2 min 30 s，將模版變性；接著，進行增幅階段，95°C 變性 30 s，黏合反應於 60°C 下進行 30 s，72°C 聚合反應 32 s，此反應進行 40 次循環。最後，進行解離反應 (dissociation)：95°C、15 s，60°C、1 min。

基因組 DNA 片段之選殖與序列分析

首先從 Gramene 網站 (Gramene Release 39, 10/2013)，下載候選基因及其上下游各 5 Kb 的序列，以 SoftBerry 網站 (http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=case_study_plants) 預測啟動子 (promoter) 及轉錄因子結合位置 (transcription factor binding site)，從啟動子位置開始，每 4 Kb 設計一個正向及一個反向引子 (附錄 2)，共有 3 段。PCR 擴增時，反應體積為 25 μL ，其中包含 200 ng DNA、0.6 U *Taq* DNA polymerase (TaKaRa Ex TaqTM) 和 *Taq* buffer、200 μM dNTP、0.4 μM 正向引子、0.4 μM 反向引子。PCR 反應在前述熱循環反應器中進行，反應條件為 95°C、2 min 30 s；95°C、30 s、60°C、30 s、72°C、3 min，共 25 個循環；72°C 7 min，一個循環；反應結束後於 15°C 保存擴增產物。

所得 PCR 產物以 0.8% 0.5 \times TAE 洋菜膠進行電泳分析，確認大小正確後，即將 DNA 條帶所在的膠體切下來，以 QIAquick Gel Extraction 試驗套組 (QIAGEN Co. Ltd.)，以廠商建議之操作流程，進行目標 DNA 的回收。回

收所得 DNA 產物，取 1 μ L 進行電泳分析，估算品質及濃度。接著，將上述目標片段次選殖至 pGEM-T easy vector 系統 (Promega Co.)，所得黏合產物，再依 Chung *et al.* (1989) 所發表方法，轉形至大腸桿菌 JM109，經藍白篩選後，挑選白色菌落，進行重組質體 DNA 抽取及 *Eco* RI 限制酵素剪切，確認正確的重組質體，再利用 T7 及 SP6 引子，進行插入 DNA 定序。所得插入 DNA 序列先以 Vector NTI (ver 8.0; Invitrogen) 進行序列拼接 (contig)，再利用 SDSC web site (<https://www.sdsc.edu/>) 的生物資訊學工具進行序列比對分析。

結果與討論

目標抗性基因兩側之 SSR 標誌搜尋與多型性分析

利用轉錄體學及生物資訊學等分析方法，我們發現有 17 個基因可能與 SA0423 的抗性有關 (表 1) (Huang *et al.* 2015)。本研究利用 GRAMENE 網站資料庫，針對這些候選基

因，搜尋基因兩側的 SSR 分子標誌 (表 1) 進行多型性分析。由於水稻的遺傳圖譜已近飽和，因此每個基因的上、下游均可搜尋到至少 9 個 SSR 分子標誌，可供基因型分析。

連鎖分析的材料為利用極感品種「台中在來一號」(‘TN1’) 與 SA0423 雜交所得的 F₂ 族群 (Tseng *et al.* 2015)。首先將上述搜尋所得之 SSR 標誌，進行 ‘TN1’ 及 SA0423 兩親本的多型性分析 (圖 1)，發現 RM6838、RM5352、RM8123、RM572、RM6378、RM421、RM13938、RM3862、RM19556、RM17604、RM3448、RM7488a、RM22086、RM147、RM3843、RM28157 及 RM17741 等 SSR 在 ‘TN1’ 及 SA0423 呈現多型性 (表 2)。

表現數量基因座 (eQTLs) 與抗性之連鎖分析

為探討這些目標基因與 SA0423 抗性間的連鎖關係，挑選 177 個 ‘TN1’ \times SA0423 F₂ 個體 (圖 2)，並利用兩親本多型性的 SSR (表 2) 進行基因型分析 (圖 3)，再配合抗性外表型調

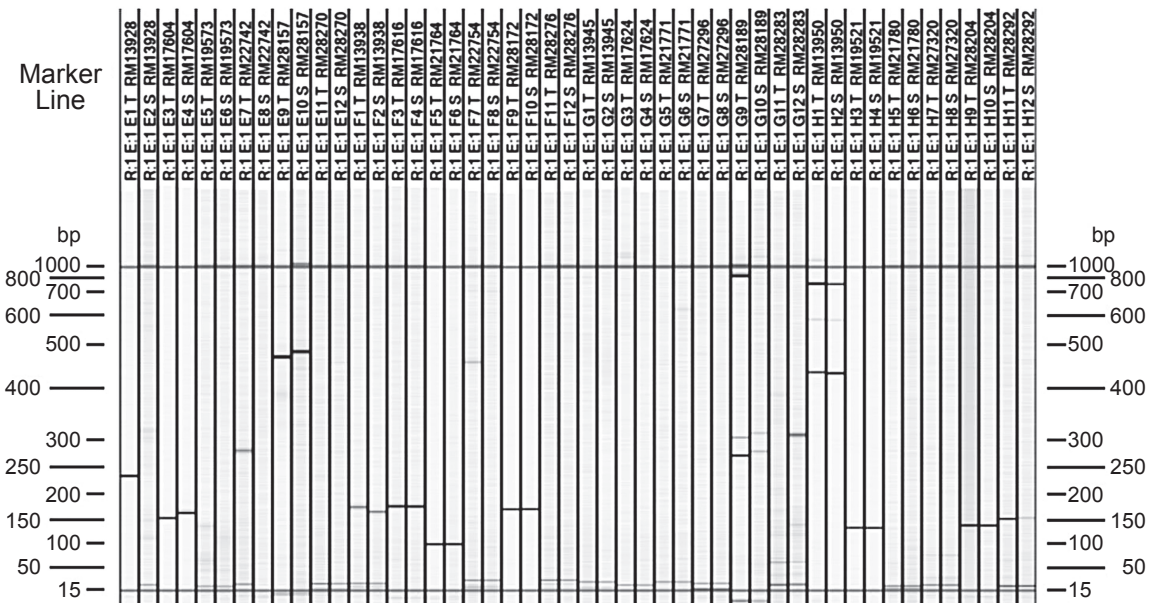


圖 1. ‘TN1’ 及 SA0423 兩親本間具多型性之 SSR 分子標誌。

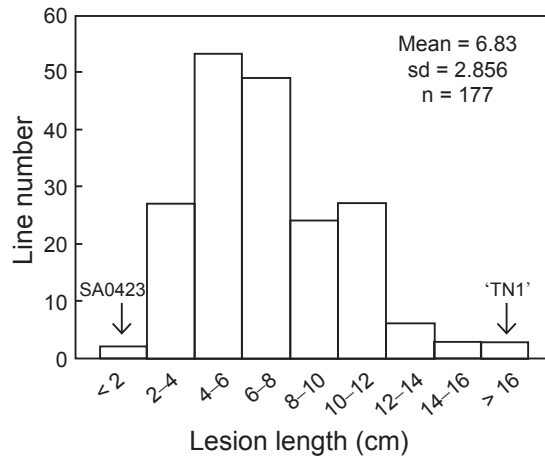
Fig. 1. The polymorphic SSR markers between ‘TN1’ and SA0423 analyzed with E-Gene system. T represents ‘TN1’ and S represents SA0423.

表 2. 抗性候選基因與 SA0423 抗病性之連鎖分析。

Table 2. Linkage analysis between the resistance gene candidates and the resistance trait of SA0423.

Gene	Chromosome	Position (cM)	Marker	LOD ^z
<i>CaM_Chr.1-1</i>	1	50.8	RM6039	0.8941
<i>CaM_Chr.1-2</i>	1	50.9	RM572	1.7618
<i>CaM_Chr.2</i>	2	25.3	RM6378	0.0886
<i>CMPG</i>	2	131	RM13938	0.5618
<i>Xa2</i>	4	107.4	RM17492	1.2685
<i>JOM</i>	4	120.3	RM17604	0.5006
<i>xa5</i>	5	3	RM17741	0.2725
<i>CaM_Chr.5</i>	5	104.7	RM6972	0.5717
<i>FMO</i>	6	19.1	RM19556	0.2034
<i>SAM</i>	6	33.5	RM276	0.1920
<i>DUF26</i>	7	73.2	RM3826	0.1547
<i>SNARE</i>	7	116.1	RM1362a	0.2325
<i>Ankyrin</i>	8	42.9	RM6838	6.8579
<i>ATG</i>	10	73.7	RM5471a	0.0479
<i>Ubi</i>	10	99.8	RM147	0.2880
<i>Xa25</i>	12	57.9	RM28157	0.4657
<i>PxMP</i>	12	69.6	RM519	0.2940

^z LOD: Log₁₀ of odds.

圖 2. 'TN1' 與 SA0423 突變體雜交 F₂ 族群接種白葉枯病菌後病斑長度之頻佈圖。Fig. 2. Distribution of lesion length (cm) after inoculation with Taiwanese *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b in the F₂ population of 'TN1' × SA0423 containing 177 individuals.

查結果，利用 R/qtl (ver. 3.1.0)，以單一標誌回歸模式，分析這些分子標誌的基因型與抗性外表型資料的連鎖關係，以確認候選基因參與

抗性機制的可能性。結果發現，僅有 *Ankyrin* 鄰近 RM6838 的 LOD 值為 6.86，超過門檻值 (LOD = 3) (表 2)，顯示此基因與 SA0423 抗

‘TN1’ × SA0423 F₂ individuals

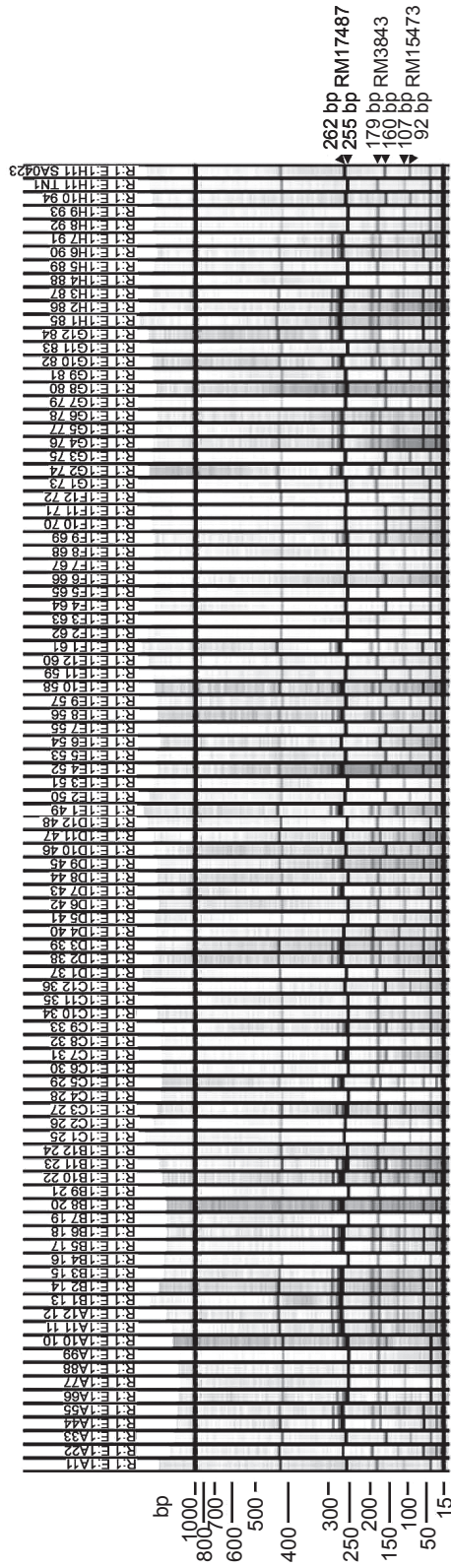


圖 3. 利用 eGENE 毛細管電泳系統進行 ‘TN1’ × SA0423 F₂ 個體之 SSR 標誌之基因型分析。
Fig. 3. The SSR genotyping of ‘TN1’ × SA0423 F₂ individuals using eGENE system.

性呈連鎖。由微陣列與連鎖分析結果顯示，*Ankyrin* 基因極可能參與 SA0423 的白葉枯病抗性機制。

目前已知植物細胞內有一群含 *Ankyrin* motif 的基因家族，如 *XB* 基因家族。本研究所發現的水稻 *Ankyrin* 基因 (LOC_Os08g15840)，其蛋白質序列與阿拉伯芥 *XB* 基因家族比對的結果顯示，其與阿拉伯芥 RING 型 E3 接合酶 (*XBAT32*) 蛋白質序列間具有 76% 相似性，可知它們在植物細胞中可能扮演著相似的生理功能。而阿拉伯芥 *XBAT32* 之功能為負調控乙烯合成的關鍵酵素 ACS7 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7) 在細胞內的含量，進而導致乙烯在植物體的累積量降低 (Lyzena *et al.* 2012)。乙烯是一種植物賀爾蒙，與生物逆境的反應有關，特別是在真菌類毒性或是細菌性病原的抗性中，扮演著訊號化合物的角色 (Ecker & Davis 1987; Feys & Parker 2000; Lorenzo *et al.* 2003)。Helliwell *et al.* (2013) 發現於水稻中大量表現 *OsACS2* 基因，可使乙烯累積量增加，導致水稻對 *Magnaporthe oryzae* (稻熱病菌) 與 *Rhizoctonia solani* (紋枯病菌) 呈現抗性。然而，Shen *et al.* (2011) 將水稻的 *OsDER* 基因進行刪減表現，發現乙烯的累積會有負調控白葉枯病抗性的現象，此結果與許多阿拉伯芥相關研究呈現相反的結論 (Rober-Seilantantz *et al.* 2011)。乙烯對於植物抗性的調控，可能需要配合其他植物賀爾蒙的協同作用 (Yang *et al.* 2013)。另一方面，學者發現在阿拉伯芥與番茄體內的乙烯含量對與白葉枯病菌同屬之 *Xanthomonas campestris* 病原菌之抗性呈正相關 (Bent *et al.* 1992; Ciardi *et al.* 2000)。由這些結果可推論，乙烯確實參與水稻白葉枯病的抗性機制，但仍需更多的研究證據，方能釐清其在白葉枯病抗性機制中所扮演的角色。在微陣列的轉錄體分析發現，接種後 SA0423 突變體的 *Ankyrin* 基因表現量下降，而 *OsACS* 同源基因 (LOC_Os01g09700, *OsACS1*; LOC_Os03g51740, *OsACS2*; LOC_Os04g48850; *OsACS3*) 表現量則上升。這些結果說明，抗病突變體 SA0423 可能在接種 *Xoo*

XF89b 後，其植株內的乙烯生合成，可能受 *OsACS* 同源基因表現量的不同而較 'TNG67' 更具抗性。

Ankyrin 基因之選殖與特性分析

為確認 SA0423 突變體 *Ankyrin* 及 *ACS* 同源基因的表現，利用 real time RT-PCR 偵測 *Ankyrin* 及 *OsACS* 同源基因於 'TNG67' 及 SA0423 於接種 *Xoo* XF89b 後的表現量，結果發現 SA0423 *Ankyrin* 基因的表現低於 'TNG67'，然而 *OsACS1* 及 *OsACS3* 表現量較高，*OsACS2* 則無明顯差異 (圖 4)。這些基因的表現情形，說明 SA0423 *OsACS* 基因之表現量可能與 'TNG67' 植物體內不同，而改變水稻植體內乙烯的生合成量，進而導致 SA0423 突變體對白葉枯病菌的抗性改變。

經選殖、定序並比較 'TNG67'、'TN1' 及 SA0423 突變體的 *Ankyrin* 基因序列 (約 11.8 kb) 結果發現，在啟動子的序列沒有改變，但在其他位置則有 29 個鹼基發生 transition 及 transversion 的變異 (表 3)。其中，有 15 個變異位於編碼區，導致 2 個蛋白質殘基 Ser-280Pro 與 Thr381Ala 發生胺基酸的置換。目前，*Ankyrin* 蛋白質結構仍未被解析，因此無法利用結構模擬 (modeling) 的方式，來探討突變對蛋白質結構與功能的影響。但兩個突變位點取代殘基的側鏈基團 (side chain) 與原始殘基的側鏈基團，具有截然不同的性質。推測這些突變應該會促使蛋白質結構發生改變，進而影響功能。尤其，Proline 是個定向的殘基，可能會限制結構的彈性，進而影響蛋白質的功能 (Perálvarez-Marín *et al.* 2006)。由這些結果可得知，*Ankyrin* 不僅在基因表現、遺傳連鎖皆與 SA0423 白葉枯病抗性具有高度相關，其蛋白質特性亦與 'TNG67' 野生型明顯不同。因此，*Ankyrin* 應是參與抗病突變體 SA0423 之白葉枯病抗性機制的表現數量基因座 (eQTL)。

結論

一般參與植物性狀的功能基因，若為質的遺傳 (qualitative inheritance)，可利用基因轉

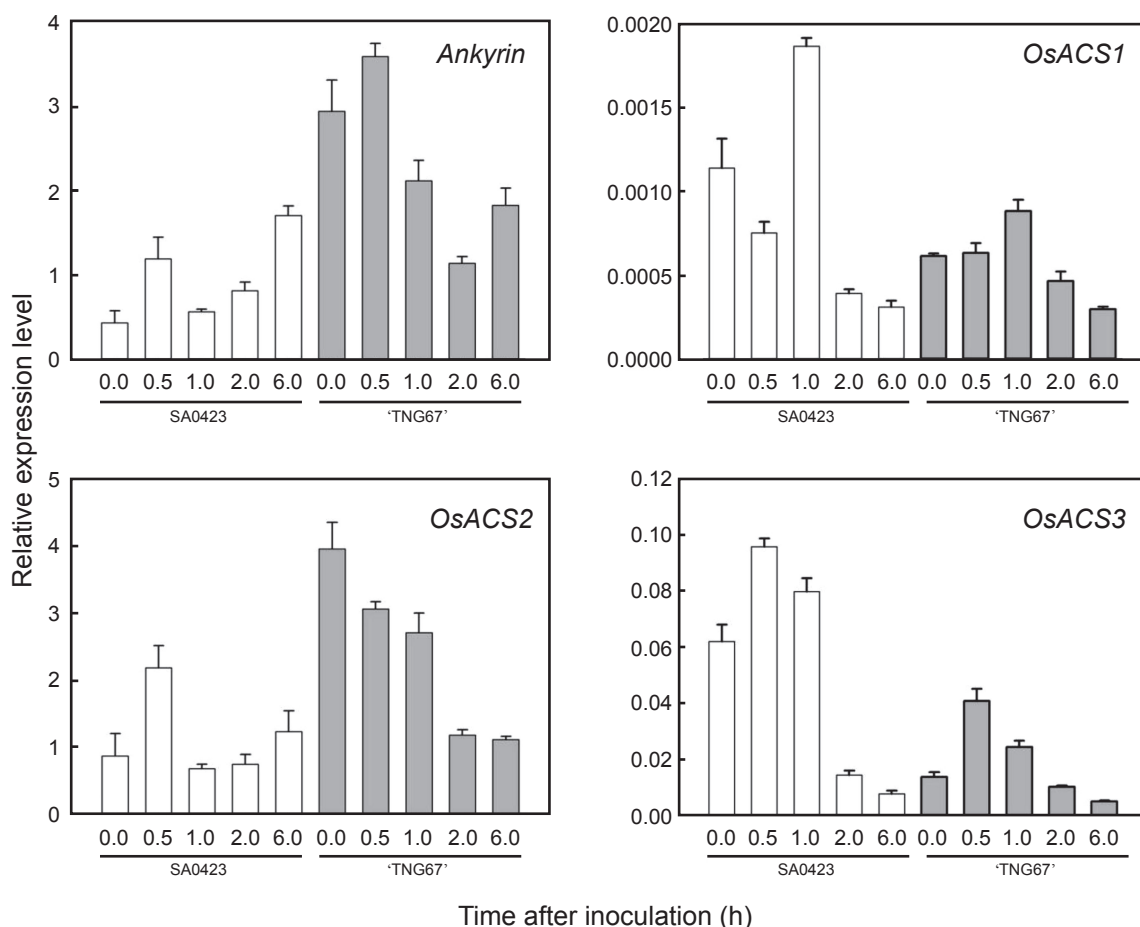


圖 4. 利用即時逆轉錄聚合酶連鎖反應分析 'TNG67' 及 SA0423 突變體於接種 XF89b 後 *Ankyrin* 及 *OsACS* 同源基因群 mRNA 之表現。

Fig. 4. Quantitative analysis of mRNA expression of *Ankyrin* and *OsACS* homologs in 'TNG67' and SA0423 after inoculated with XF89b by using real-time RT-PCR.

殖技術，以大量表現或 RNAi 靜默表現等基因轉殖策略進行功能探討；或利用與其突變體雜交進行互補性測驗，以驗證其功能 (Doebley *et al.* 1997; Waterhouse & Helliwell 2003; Salvi & Tuberosa 2005)。許多高經濟價值的性狀為數量性狀 (quantitative trait) 的遺傳模式。白葉枯病抗性即為典型的數量性狀 (Holland 2007; St. Clair 2010)，受小效應的多基因 (polygenes) 所調控，同時易受環境因子的影響 (Mather 1941)。對於性狀貢獻度較小的數量性狀基因座，較難以上述策略進行基因功能驗證。本研究針對前期轉錄體分析所得之 17

個可能的抗性候選基因 (Huang *et al.* 2015)，利用連鎖分析，探討這些基因參與 SA0423 抗性機制的可能性。結果發現僅有 *Ankyrin* 基因通過閾值，顯示此基因可能參與 SA0423 突變體的白葉枯病抗性表現。生物資訊學分析顯示，由於 *Ankyrin* 蛋白質與阿拉伯芥 XBA32 蛋白質間具 76% 的相似性，顯示其可能與阿拉伯芥 XBA32 蛋白質功能類似，具有調控乙烯合成的功能 (Ecker & Davis 1987; Feys & Parker 2000; Lorenzo *et al.* 2003; Lyzenga *et al.* 2012; Huang *et al.* 2015)。而微陣列與 real time RT-PCR 分析結果，亦發現接種

表 3. SA0423 突變體抗性候選基因 *Ankyrin* 序列的突變型式與比率。
Table 3. The type and rate of mutations occurred in the resistance gene, *Ankyrin*, of resistance mutant, SA0423.

Mutation	Transition				Transversion				Total	Silent	Missense	
	AT-GC	GC-AT	AT-TA	AT-TA	AT-CG	GC-TA	GC-CG	Insertion				Deletion
Mutations occurred in genomic DNA sequences (4,619 bps)												
No. (bp)	17	19	7	7	2	5	2	3	3	58		
Rate (%)	0.37	0.41	0.15	0.15	0.04	0.11	0.04	0.06	0.06	1.26		
Total rate (%)	0.78											
Mutations occurred in cDNA sequence (1,856 bps)												
No. (bp)	11	8	4	4	2	2	2	0	0	29		
Rate (%)	0.59	0.43	0.22	0.22	0.11	0.11	0.11	0	0	1.56		
Total rate (%)	1.02											
Mutations occurred in amino acid sequences (495 residues)												
No. (aa)	13											
Rate (%)	2.63											
											2	0.40

Xoo XF89b 後，SA0423 突變體的 *Ankyrin* 基因表現量較低，而其下游的 *OsACS* 同源基因之表現則高於 ‘TNG67’。由這些結果推論，SA0423 突變體內可能因 *Ankyrin* 基因表現的改變，改變下游的 *OsACS* 酵素含量，進而改變乙烯的生合成，導致植物體對白葉枯病菌抗性的增強。目前，對於 ‘TNG67’ 及 SA0423 突變體於接種白葉枯病菌後植物體乙烯含量的變化，仍須進一步試驗分析，以瞭解乙烯在水稻白葉枯病抗性機制中所扮演之角色。本研究結果可確認 *Ankyrin* 基因為白葉枯病抗性突變體 SA0423 的表現數量性狀基因座 (eQTLs) 之一，現已應用於白葉枯病抗性的分子育種。

引用文獻

- Bent, A. F., R. W. Innes, J. R. Ecker, and B. J. Staskawicz. 1992. Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5:372–378.
- Broman, K. W. and S. Sen. 2009. A Guide to QTL Mapping with R/qtl. Springer. New York. 396 pp.
- Broman, K. W., H. Wu, S. Sen, and G. A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889–890.
- Chu, Z., M. Yuan, J. Yao, X. J. Ge, B. Yuan, C. G. Xu, X. H. Li, B. Y. Fu, Z. K. Li, J. L. Bennetzen, Q. F. 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.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2172–2175.
- Ciardi, J. A., D. M. Tieman, S. T. Lund, J. B. Jones, R. E. Stall, and H. J. Klee. 2000. Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiol.* 123:81–92.
- Doebley, J., A. Stec, and L. Hubbrad. 1997. The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386:485–488.
- Ecker, J. R. and R. W. Davis. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5202–5206.
- Feys, B. J. and J. E. Parker. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16:449–455.
- Gnanamanickam, S. S., V. B. Priyadarisini, N. N. Narayanan, P. Vasudevan, and S. Kavitha. 1999. An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. *Curr. Sci.* 77:1435–1443.
- Gu, K., B. Yang, D. Tian, L. Wu, D. Wang, C. Sreekala, F. Yang, Z. Chu, G. L. Wang, F. F. White, and Z. Yin. 2005. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* 435:1122–1125.
- Haley, C. S. and S. A. Knott. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69:315–324.
- Helliwell, E. E., Q. Wang, and Y. Yang. 2013. Transgenic rice with inducible ethylene production exhibits broad-spectrum disease resistance to the fungal pathogens *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. *Plant Biotechnol. J.* 11:33–42.
- Holland, J. B. 2007. Genetic architecture of complex traits in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:156–161.
- Holloway, B. and B. Li. 2010. Expression QTLs: Applications for crop improvement. *Mol. Breeding* 26:381–391.
- Hsieh, S. P. Y. 2007. Bacterial leaf blight of rice. p.325–340. *in: Plant Protection Illustrations 8: Rice Protection*. Vol. 2. (Cheng, C. H., ed.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 550 pp. (in Chinese)
- Huang, C. Y., S. Y. Chou, Y. L. Lee, W. B. Tseng, C. W. Chen, C. S. Wang, and D. G. Lin. 2015. Transcriptomic analysis of a resistant mutant in response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection. *J. Taiwan Agric. Res.* 64:145–158. (in Chinese with English abstract)
- 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.
- Iyer, 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.
- Jansen, R. C. 2003. Studying complex biological systems using multifactorial perturbation. *Nat. Rev. Genet.* 4:145–151.
- Jansen, R. C. and J. P. Nap. 2001. Genetical genomics: The added value from segregation. *Trends Genet.* 17:338–391.

- Jiang, G. H., Z. H. Xia, Y. L. Zhou, J. Wan, D. Y. Li, R. S. Chen, W. X. Zhai, and L. H. Zhu. 2006. Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog *TFIIA γ 1*. *Mol. Genet. Genomics* 275:354–366.
- Kauffman, H. E., A. P. K. Reddy, S. P. Y. Hsieh, and S. D. Merca. 1973. An improved technique for evaluation resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Dis. Rep.* 57:537–541.
- Khush, G. S., D. J. Mackill, and G. S. Sidhu. 1989. Breeding rice for resistance to bacterial blight. p.207–217. *in: Bacterial Blight of Rice*. (International Rice Research Institute, ed.) International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 235 pp.
- Kottapalli, K. R., N. Sarla, and S. Kikuchi. 2006. *In silico* insight into two rice chromosomal regions associated with submergence tolerance and resistance to bacterial leaf blight and gall midge. *Biotechnol. Adv.* 24:561–589.
- Lin, X. H., D. P. Zhang, Y. F. Xie, H. P. Gao, and Q. Zhang. 1996. Identifying and mapping a new gene for bacterial blight resistance in rice based on RFLP markers. *Phytopathology* 86:1156–1159.
- Lorenzo, O., R. Piqueras, J. J. Sánchez-Serrano, and R. Solano. 2003. Ethylene response factor 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15:165–178.
- Lyzenga, W. J., J. K. Booth, and S. L. Stone. 2012. The *Arabidopsis* RING-type E3 ligase *XBAT32* mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7. *Plant J.* 71:23–34.
- Mather, K. 1941. Variation and selection of polygenic characters. *J. Genet.* 41:159–193.
- Mew, T. W., C. M. V. Cruz, and E. S. Medalla. 1992. Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars planted in the Philippines. *Plant Dis.* 76:1029–1032.
- Niño-Liu, D. O., P. C. Ronald, and A. J. Bogdanove. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. *Mol. Plant Pathol.* 7:303–324.
- Perálvarez-Marín, A., J. L. Bourdelande, E. Querol, and E. Padrós. 2006. The role of proline residues in the dynamics of transmembrane helices: The case of bacteriorhodopsin. *Mol. Membr. Biol.* 23:127–135.
- Robert-Seilaniantz, A., D. MacLean, Y. Jikumar, L. Hill, S. Yamaguchi, Y. Kamiya, and J. D. G. Jones. 2011. The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis: Away from camalexin and towards glucosinolates. *Plant J.* 67:218–231.
- Salvi, S. and R. Tuberosa. 2005. To clone or not to clone plant QTLs: Present and future challenges. *Trends Plant Sci.* 10:297–304.
- Sama, V. S. A. K., N. Rawat, R. M. Sundaram, K. Himabindu, B. S. Naik, B. C. Viraktamath, and J. S. Bentur. 2014. A putative candidate for the recessive gall midge resistance gene *gm3* in rice identified and validated. *Theor. Appl. Genet.* 127:113–124.
- Shanti, M. L., V. V. Shenoy, G. L. Devi, V. M. Kumar, P. Premalatha, G. N. Kumar, H. E. Shashidhar, U. B. Zehr, and W. H. Freeman. 2010. Marker-assisted breeding for resistance to bacterial leaf blight in popular cultivar and parental lines of hybrid rice. *J. Plant Pathol.* 92:495–501.
- Shen, X., H. Liu, B. Yuan, X. Li, C. Xu, and S. Wang. 2011. OsEDR1 negatively regulates rice bacterial resistance via activation of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Environ.* 34:179–191.
- Song, W. Y., 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* 270:1804–1806.
- St. Clair, D. A. 2010. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:247–268.
- Sun, X., Y. Cao, Z. Yang, C. Xu, X. Li, S. Wang, and Q. Zhang. 2004. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant J.* 37:517–527.
- Tseng, H. Y., D. G. Lin, H. Y. Hsieh, Y. J. Tseng, W. B. Tseng, C. W. Chen, and C. S. Wang. 2015. Genetic analysis and molecular mapping of QTLs associated with resistance to bacterial blight in a rice mutant, SA0423. *Euphytica* 205:231–241.
- Wang, C. S., A. Z. Wang, and D. G. Lin. 2013. The application of mutants in breeding disease resistance in rice. p.89–102. *in: Special Issue or the Symposium on Important Crop Pathogen Detection and Management* (Wang, C. L., F. J. Jan, and K. C. Zeng, eds.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taichung, Taiwan. 193 pp. (in Chinese with English abstract)
- Waterhouse, P. M. and C. A. Helliwell. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* 4:29–38.
- Xiang, Y., Y. Cao, C. Xu, X. Li, and S. Wang. 2006. *Xa3*, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as *Xa26*. *Theor. Appl. Genet.* 113:1347–1355.

- Yang, D. L., Y. Yang, and Z. He. 2013. Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Mol. Plant* 6:675–685.
- Yang, Z., X. Sun, S. Wang, and Q. Zhang. 2003. Genetic and physical mapping of a new gene for bacterial blight resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 106:1467–1472.
- Yoshimura, S., U. Yamanouchi, Y. Katayose, S. Toki, Z. X. Wang, I. Kono, N. Kurata, M. Yano, N. Iwata, 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.
- Zhang, Q. 2007. Strategies for developing Green Super Rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:16402–16409.

附錄 1. 即時定量 RT-PCR 引子之序列。

Appendix 1. Sequences of primer for real-time RT-PCR analysis.

Primer	Sequence (5' → 3')
Ankyrin F	TACGCATTCTCCATCATCA
Ankyrin R	TTTCTCCACCCACATTCC
ACS1F	TTGGACACGCTGGATCTT
ACS1R	TATTGCTGTTCTTGCTGCT
ACS2F	AGAAGAACCCCCACGCGC
ACS2R	CACCTTGACCTCTCTG
ACS3F	ACTGTTGCTGGAGGTCAG
ACS3R	TCCTTGGTGAGCCTGAAG
Ubi-F1	ACACTTGTGATTCAGTTCCA
Ubi-R1	TGCAGTGTGATGAAACC
oligo d (T) 18	GTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

附錄 2. 選殖 *Ankyrin* 基因之引子序列。

Appendix 2. Primers used for cloning of *Ankyrin* gene.

Primer	Sequence (5' → 3')
Ankyrin-F1	GTCGATGCCATTGAACAAGACA
Ankyrin-R1	GTAGGTCTGTCTAGCTTGCTG
Ankyrin-R1-1	GTATTTCTTAGTCCCTAGTGGAA
Ankyrin-F2	GCTCCTAATTGAGTCTGGTGTTG
Ankyrin-R2	GACTGTCCAGATTCATAGCACT
Ankyrin-R2-1	G TTCAGGGTTTGAGAAATTTGCC
Ankyrin-F3	GATCTGCCTCCGGTTTACACT
Ankyrin-F3-1	GTGCGCGTGTCCCGTGTAAT
Ankyrin-F3-2	GAACGCCAGCTTGATCCCGA
Ankyrin-R3	GACTTAGCATTGTACC GGGA
Ankyrin-R3-1	GACTTTGCAGTTGTAGACACT
Ankyrin-R3-2	GACCGTTTCCACCCGTTGTC
Ankyrin-CF4	GATGGGGCTCTTAGGTATGGTG
Ankyrin-CF4-1	GCTCTCCATTCTCGTTGCCT
Ankyrin-CR4	GCTATGAAAATTGTGAATACTCTTAATT
Ankyrin-CR4-1	GACTACAGGTATGAAGAAGCCA

Study on the Resistance eQTLs in the Rice Bacterial Blight Resistant Mutant, SA0423

Da-Gin Lin¹, Yu-Ling Lin², Chiao-Yi Huang³, Hsin-Yi Tseng⁴, Wen-Bin Tseng³, Chun-Wei Chen⁵, and Chang-Sheng Wang^{6,*}

Abstract

Lin, D. G., Y. L. Lin, C. Y. Huang, H. Y. Tseng, W. B. Tseng, C. W. Chen, and C. S. Wang. 2016. Study on the resistance eQTLs in the rice bacterial blight resistant mutant, SA0423. J. Taiwan Agric. Res. 65(1):54–69.

To explore the novel bacterial blight resistance gene for rice disease resistance breeding, 17 candidate resistance genes found from previous transcriptomic analysis were characterized in this study. The SSR markers flanking 5 cM region of them were retrieved from GRAME web site, and analyzed for the polymorphic markers between ‘TN1’ (susceptible parent) and SA0423 (resistant parent). Genotyping analysis of 177 ‘TN1’ × SA0423 F₂ individuals was performed using polymorphic SSR markers. The lesion of these F₂ individuals were also investigated following the inoculation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b (*Xoo* XF89b) as the resistance phenotype. The linkage between genotyping and resistance was analyzed by R/qtl using the single marker regression model. The result displayed that only RM6838 adjacent to *Ankyrin* showed a significantly high LOD (6.86) comparing with the threshold LOD (3.0). It is suggested that *Ankyrin* have high potential to be involved in providing the resistance of SA0423. The bioinformatic analysis demonstrates that the *Ankyrin* protein shares a similarity of 76% with the *Arabidopsis* RING type ligase, XBAT32, an *Arabidopsis* XB family. Results suggested that *Ankyrin* may change the ethylene biosynthesis pathway by regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (*ACS*), and then compromised the immune system. The real-time RT-PCR displayed that the expression profile of *Ankyrin* in SA0423 was less than that of ‘TNG67’; however, higher expressions of *OsACS1* and *OsACS3* were found in SA0423. These findings indicated that the biosynthesis of ethylene might change in the SA0423 mutant leading to resistance against pathogens. Cloning and sequence comparison on *Ankyrin* gene found that 15 mutations were located in the coding region and resulted two amino acid mutations, Ser280Pro and Thr381Ala. Therefore, *Ankyrin* is considered to be one of the expression quantitative trait loci (eQTLs) involved in the bacterial blight resistance of SA0423.

Key words: Rice, Resistance of bacterial blight, Mutant, Transcriptome, Expression quantitative.

Received: May 12, 2015; Accepted: July 3, 2015.

* Corresponding author, e-mail: wangchansen@nchu.edu.tw

¹ Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Research Assistants, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁵ Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁶ Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.