

# 以功能性分子標誌輔助回交策略選育具低鎘累積能力之 秈稻新品系

吳佩真<sup>1,†</sup> 林毓雯<sup>2,‡</sup> 李長沛<sup>3</sup> 許健輝<sup>4</sup> 卓緯玄<sup>5</sup> 顏信沐<sup>5</sup> 郭鴻裕<sup>6</sup> 賴明信<sup>7</sup> 吳東鴻<sup>5,\*</sup>

## 摘要

吳佩真、林毓雯、李長沛、許健輝、卓緯玄、顏信沐、郭鴻裕、賴明信、吳東鴻。2017。  
以功能性分子標誌輔助回交策略選育具低鎘累積能力之秈稻新品系。台灣農業研究  
66(3):248–260。

本研究將運用分子輔助回交技術，將粳稻具有降低鎘累積量的遺傳組成置換至秈稻品種中，藉此改良秈稻品種的遺傳組成。而研究策略則先運用功能性標誌篩檢國內栽培品種對於鎘吸收的遺傳特性，再利用分子輔助選種技術選育 1 個具有低累積性的秈稻新品系，最後直接在高風險區進行現地評估與品系驗證試驗。首先，建立根吸收 (*OsNRAMP1*) 主效基因座的功能性標誌，確認國內推薦秈稻品種均帶有鎘易吸收基因型，與過去已知秈稻較粳稻品種更易吸收轉運土壤中鎘物質之現象相符。隨之，利用分子輔助回交育種法，從前期研究 (2006–2011) 所選育「台中私 10 號」全染色體置換系中，挑出適當品系由 2014 年第 1 期作開始，選育出帶有低鎘累積特性的秈稻新品系。2015 年第 1 期作在後里試驗區進行現地評估，可知秈稻新品系台中私 10 號 *qCd17* 帶有低累積基因型，與「台中私 10 號」有高度相似株型，但大幅下降鎘累積程度達 42.2%，能有效降低秈稻品種易發生鎘米風險的困擾。總結，本試驗運用分子輔助回交策略改良國內秈稻栽培品種後，並於現地栽培環境下進行初步可行性評估，冀望新品系選育能兼具在稻作生產與食品安全上提供一項緩解措施。

**關鍵詞：**鎘累積量、田間試驗、功能性標誌、秈稻、分子輔助回交。

## 前言

隨著工業發展，各種人為污染物經由環境輾轉進入食物鏈，使得國人健康備受威脅，其中又以重金屬污染最受關注。行政院環保署自 1982 年起著手進行土壤污染調查工作，截至 2016 年 3 月 31 日止，尚有 2,639 筆 (約 375 ha) 農地被公告為農地污染控制場址 (<https://sgw.epa.gov.tw/public/>)。依據土壤及地下水污

染整治法，上述場址在整治完成前禁止栽種作物，防止污染物隨作物生產流入市場。主要重金屬中又以鎘最易轉運累積，且不會對稻株造成顯著毒害，而作物對重金屬的累積受土壤及氣候因子、植物特性及農業管理等諸多因素影響，其風險需賴多方共同把關。

為加強農產品安全，衛生福利部針對食米訂有重金屬限量標準，其鎘含量標準值為 0.4 mg kg<sup>-1</sup>，而環保署也針對食用作物農地訂有較

投稿日期：2016 年 11 月 4 日；接受日期：2016 年 12 月 12 日。

\* 通訊作者：dhwu@tari.gov.tw

† 表作者對本研究具同等貢獻。

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所作物組研究助理。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所農業化學組副研究員。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>5</sup> 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>6</sup> 農委會農業試驗所農業化學組研究員兼組長。台灣 台中市。

<sup>7</sup> 農委會農業試驗所作物組研究員。台灣 台中市。

其他用地更為嚴格的重金屬限量標準，食用作物農地之監測標準值為  $2.5 \text{ mg kg}^{-1}$ 、管制標準值為  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ；但除了主要農業區之農田之外，仍有諸多零星農田從事農業生產且緊鄰都會區與工廠，在生活、工廠廢水並未與灌溉水源分流的現況下，使得生產環境惡劣、土地污染氾濫，重金屬污染導致農田休耕與食米安全等民生新聞不斷，對其農田及作物存有潛在風險 (Lin *et al.* 2012)。

水稻係國內主要農作物之一，每年栽培面積可達 25 萬公頃，依據農糧署 2015 年統計資料顯示國內整體比例以秈稻為主要栽培品種，但其中秈稻品種「台中秈 10 號」在 2015 年第 1 期作的栽培面積仍位居前 4 名，且自 1980 年品種命名後長達 30 yr 均為秈稻主要領先品種，穩定栽培於台中、彰化與雲林等地區 (<http://kiscrop.tari.gov.tw/kiscrop/index.aspx>)。從過去諸多研究顯示秈稻品種對重金屬的累積能力較粳稻高 (Uraguchi & Fujiwara 2012; Jha & Bohra 2016)，另據 Guo *et al.* (2007) 及 Romkens *et al.* (2009) 的研究報告指出，其進行大規模土壤與各品種鎘累積能力預測與模式建立，亦發現國內秈稻比「台農 67 號」等粳稻品種的鎘累積能力高出 1 倍。故在鎘濃度符合管制標準之農田，秈稻品種相較於粳稻品種可能產生鎘米的風險高出許多。

土壤中鎘元素在稻穀中的累積過程，主要是經過 (1) 根系對土壤鎘的稀釋活化與吸收，(2) 木質部的容載與轉運，(3) 再經節間韌皮部聚集在稻穀內。因此，由水稻對鎘吸收、轉運和累積的生理模式，也決定了水稻各植體部位中鎘含量分布，大致循序著根系、莖葉、穀粒遞減 (Uraguchi *et al.* 2009; Uraguchi & Fujiwara 2012, 2013)。隨著水稻基因體定序與分子標誌開發日漸豐富且公開於生物資料庫上，相較於其他產量與生物性逆境研究領域，水稻鎘累積能力相關基因定位研究雖有限，但回顧多篇定位研究時，仍可發現 *qCd7* (Norton *et al.* 2010)、*qGCd7* (Ishikawa *et al.* 2010)、*qCdT7* (Tezuka *et al.* 2010; Miyadate *et al.* 2011)、*qCdp7* (Abe *et al.* 2011) 等基因座相繼均被定位在水稻第 7 條染色體短臂上，

在同一區域中也利用據圖選殖或基因誘變等技術，挖掘出 *OsZIP8* (Os07g0232800, Ramesh *et al.* 2003)、*OsHMA3* (Os07g0232900, Ueno *et al.* 2009, 2010; Miyadate *et al.* 2011)、*OsNRAMP5* (Os07g0257200, Ishikawa *et al.* 2012; Ishimaru *et al.* 2012) 與 *OsNRAMP1* (Os07g0258400, Takahashi *et al.* 2011) 等基因與鎘含量有關，顯示第 7 號染色體短臂靠近中節處為其重要熱區。

在 Ueno *et al.* (2009, 2010) 研究中，利用秈稻 'Anjana Dhan (An)' 與粳稻 'Nipponbare' 的雜交 F2 族群，定位到效應高達 85.6% 變異解釋量的主效 QTL，隨後精細定位出 *OsHMA3* 基因。另一方面，在 Miyadate *et al.* (2011) 與 Tezuka *et al.* (2010) 則利用高鎘累積秈稻 'Cho-Ko-Koku (CKK)' 與粳稻 'Akita 63' 建立另一分離族群，在上述區域中定位到一個 *qCdT7* 主效基因座，進一步發現該基因座內 *OsHMA3* 基因存有核苷酸變異。該 CKK 秈稻親本在該基因座上，因第 7 內顯子上缺失核苷酸 153 bp，亦產生缺失 51 個胺基酸變異，導致該對偶基因喪失隔離功能。其基因功能調控位於根部細胞液泡膜上，將使鎘離子不會被儲存在根部細胞液泡內，進而直接轉運到木質部中，使得秈稻親本的莖部鎘濃度較高，最終導致稻穀鎘累積量提升；該研究亦發現，粳稻 'Nipponbare' 與秈稻 'IR24' 所帶有的 *OsHMA3* 對偶基因與低鎘親本 'Akita 63' 一致，均在第 7 內顯子上保有完整 153 bp 核苷酸。

隨後，在 Takahashi *et al.* (2011) 研究中，確認同樣位於 *qCdT7* 主效基因座內，且與前述 *OsHMA3* 基因僅相距 1.5 Mb 的 *OsNRAMP1* 基因係另一個調控基因。該基因調控根部細胞膜上鎘離子吸收通道的重要功能，基因啟動子區域存有 406 bp 的大片段刪除變異。具高鎘累積特性的秈稻品種 'Habataki'，因缺乏該片段使得基因表現過量而吸收較多的鎘，低鎘累積品種 'Nipponbare' 因該片段的負調控抑止根部吸收過量的鎘。而高鎘累積特性的秈稻品種 'Habataki'，則因基因啟動子區域存有 406 bp 的大片段刪除變異，使得基因表現過量而吸收較多的鎘；進一步也發現秈稻品種 'Habataki'

與粳稻品種 'Sasanishiki' 在 *OsHMA3* 基因座上則係 'Nipponbare' 類型的低鎘累積對偶基因，秈稻 'An' 與 'CKK' 係鎘高累積對偶基因，顯示部分秈稻品種內仍帶有正常功能的 *OsHMA3* 基因；而 *OsNRAMP1* 基因座上，則粳稻 'Nipponbare'、'Sasanishiki' 及 'Tsukinohikari' 均屬於低鎘吸收對偶基因。而秈稻品種 'Habataki'、'Jarjan'、'Anjana Dhan' 及 'Cho-Ko-Koku' 係高鎘吸收對偶基因，顯示該基因座在粳亞種間具有穩定遺傳變異。由此可知，存在於第 7 號染色體上 *qCdT7* 基因座的 *OsHMA3* 基因與 *OsNRAMP1* 基因具重要調控鎘累積及吸收功能，且在高低累積特性親本中存有自然遺傳變異可供品種選育。

全球稻作生產區以秈稻栽培為主要體系，而粳稻栽培也持續穩定存於我國水稻生產體系中。本文研究希望自行開發鎘累積相關功能性標誌，確認國內品種的遺傳特性，再藉由分子輔助回交策略，將粳稻第 7 條染色體上 *qCdT7* 基因座的遺傳組成置換至「台中秈 10 號」中。並利用過去已建立的染色體置換系族群加速選育期程，最後直接進行現地評估試驗，確認新品系上各植體部分的鎘累積能力與改良效果，冀望降低秈稻植株中鎘的含量，減緩秈稻栽培所面臨的環境衝擊並提升食米安全。

## 材料與方法

### 試驗材料

在 2014 年第 1 期作於台中市霧峰區之行政院農委會農業試驗所試驗田培育 18 個參試品種，其中包含國內主要栽培品種 14 個粳稻、2 個秈稻以及 2 個日本對照品種，分別為「台南 11 號」、「台中 192 號」、「台梗 14 號」、「台中秈 10 號」、「台中秈糯 2 號」、「高雄 139 號」、「台梗 2 號」、「台梗 9 號」、「台東 30 號」、「台梗 16 號」、「台梗 8 號」、「台東 33 號」、「台梗 4 號」、「台梗糯 3 號」、「台農 71 號」、「台農 67 號」、「Nipponbare」及 'Habataki'，採慣行肥培管理。在分蘖盛期進行葉片組織取樣，並隨即冷凍乾燥保存備用，供後續鎘累積相關功能性標誌設計與目標基因型確認使用。

### 選育「台中秈 10 號」導入系

利用前期研究 (2006–2011 年) 已選育的「台中秈 10 號」染色體置換系族群，該族群以粳稻「台梗 2 號」為提供親，秈稻「台中秈 10 號」為輪迴親。利用連續回交將粳稻不同條染色體分別置換到「台中秈 10 號」的遺傳背景下，在各置換系的背景回復成輪迴親後，保存每個染色體回交後裔的自交種子 ( $BC_3F_2$  或  $BC_4F_2$  世代)，作為各染色體中逐步置換片段族群使用 (Wu *et al.* 2013a)。本研究在 2014 年第 1 期作自冷藏庫取出帶有粳稻第 7 條染色體片段置換系 (#TCS10.7\_3) 的分離種子，該品系在該染色體短臂上已置換為「台梗 2 號」、長臂則仍維持異質結合體狀態；取出 96 顆種子先於溫室育苗後，進行長臂上遺傳組成的基因型篩檢，挑出第 7 條染色體長臂上均回復為「台中秈 10 號」遺傳組成者，再移植至農試所試驗田健化植株、待成熟後收穫種子，供下一期作種子繁殖使用 (圖 1)。

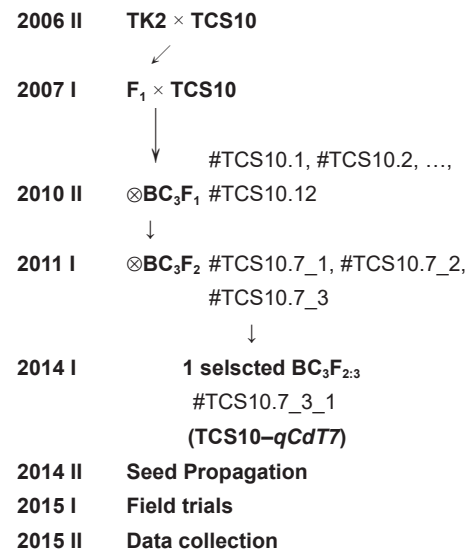


圖 1. 運用分子輔助回交選育將「台梗 2 號」第 7 號染色體上的 *qCdT7* 片段導入「台中秈 10 號」中之選育流程圖。

**Fig. 1.** The breeding scheme of introgression of *qCdT7* locus and different segment lengths of chromosome 7 from 'Taikeng 2' to 'Taichung Sen 10' by marker-assisted backcross selection.

### 專一性標誌設計與基因型分析

本試驗用以前景選拔鎘吸收之功能性標誌，係針對文獻所示 *OsNRAMP1* 基因座 5'UTR 區域上 406 bp 的 InDel 多型性 (Takahashi *et al.* 2011)，由水稻基因註解資料庫 (The Rice Annotation Project Database, RAP-DB) 下載梗稻 *OsNRAMP1* 基因座上所編碼 *OsNRAMP1* 序列 (Os07g0258400)。另至美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI)，下載該基因坐落第 7 條染色體之 BAC 序列 (AP014963)，匯入 BioEdit 編輯軟體 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) 進行序列排列比對後，藉由引子設計軟體 Primer Premier 5 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) 設計專一性引子 NRAMP1 (表 1)。

另針對 *OsHMA3* 基因座，Ueno *et al.* (2010) 及 Miyadate *et al.* (2011) 進行精密定位，使用了相關的連鎖標誌，將之先對雜交親本進行適用性測試，最後選出 RM21263 和 CdT-E 兩個穩定專一且親本間具多型性之連鎖標誌做為後續篩選之用；而 Kumagai *et al.* (2014) 與 Yan *et al.* (2016) 等研究指出，*OsHMA3* 基因座內所編碼的胺基酸 C 末端長達 51 個胺基酸刪除變異具重要功能性，即第 7 內顯子上缺失核苷酸 153 bp 處，藉由 Yan *et al.* (2016) 研究中所使用基因選殖引子 R7mf1 與 R7 進行定序目標刪除位點。

而瞭解背景回復率所需 InDel 標誌，則參考 Wu *et al.* (2013b) 全基因組 InDel 套組，並在部分長距離區間中增補 SSR 標誌加強選拔；

**表 1.** 台灣栽培品種在鎘累積相關基因座上以 *OsHMA3* 連鎖標誌與 *OsNRAMP1* 功能標誌之基因型分析，材料清單以 2015 年栽培面積比例排序。

**Table 1.** The genotype of Taiwan current cultivars, which listed by the percentage of cultivation area, for the linkage makers of *OsHMA3* and the functional marker of *OsNRAMP1* locus related cadmium accumulation.

Variety	Abbrev.	Subspecies	<i>OsHMA3</i> locus			<i>OsNRAMP1</i> locus
			RM21263 <sup>z</sup>	153 bp <sup>y</sup>	CdT-E <sup>x</sup>	NARMP1
Tainan 11	TN11	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taichung 192	TC192	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taikeng 14	TK14	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taichung Sen 10	TCS10	<i>indica</i>	B	+	B	B
Taichung Sen waxy 2	TCSW2	<i>indica</i>	B	+	B	B
Kaohsiung 139	KH139	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taikeng 2	TK2	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taikeng 9	TK9	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taitung 30	TT30	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taikeng 16	TK16	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taikeng 8	TK8	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taitung 33	TT33	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taikeng 4	TK4	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Taikeng waxy 3	TKW3	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Tainung 71	TNG71	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Tainung 67	TNG67	<i>japonica</i>	A	+	A	A
Nipponbare (low check)		<i>japonica</i>	A	+	A	A
Habataki (high check)		<i>indica</i>	B	+	B	B

<sup>z</sup> The genotypes A and B indicated the amplicom size of RM21263 marker for 'Nipponbare' and 'Habataki', respectively.

<sup>y</sup> The positive sign indicated the complete sequence of 153 bp at the exon 7 of *OsHMA3* gene.

<sup>x</sup> The genotypes A and B indicated the amplicom size of CdT-E marker for 'Nipponbare' and 'Habataki', respectively.

專一性引子與輔助背景選拔標誌，均先經兩親本「台中秈 10 號」與「台梗 2 號」多型性篩選，並為使多型性標誌在全基因組能均勻分布，將所得多型性標誌利用 BLAST 套件將其引子序列對應至所屬 PACs/BACs 確認 IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) build 5 版的物理圖譜位置，再依 IRGSP 網站 Build 5 所公布各染色體上 PACs/BACs 對應於 Nipponbare/Kasalath 遺傳圖譜資訊 (Harushima *et al.* 1998; IRGSP 2005)。將所有多型性標誌的物理位點轉換成遺傳圖譜位置，便於推估分子標誌間可能的遺傳距離、有效監控遺傳重組區間。遺傳背景回復率估算，則以植株整體攜有輪迴親遺傳距離總長之百分比為基礎，其中由各分子標誌所坐落相鄰區間之平均長度累計輪迴親遺傳總長，並視輪迴親同質結合體基因型或異質結合體基因型分別給予加權係數 1 或 0.5 進行統計。

葉片基因組 DNA 萃取如 Wu *et al.* (2013b) 所描述；PCR 的反應條件為 94°C 2 min；94°C 30 s、50°C、55°C 或 60°C (依黏合溫度最佳化測試結果) 20 s、72°C 30 s，預擴產物循環 2 次；94°C 20 s、55°C (50°C 或 60°C) 15 s、72°C 20 s，循環 30 次 (因不同分子標誌的擴增效率不同，將正負加減 2 次循環)；72°C 3 min；反應結束後以 4°C 保存擴增產物。PCR 產物進行電泳分析時，為提高膠體上之電泳功率，僅讓電泳液與膠體兩端接觸即可，避免 0.5× TBE 電泳緩衝液淹沒膠體，於 26 cm × 26 cm 之 3% Agarose I (Amresco, USA) 膠體上以 350 V (15 V/cm) 進行電泳分析。

### 田間試驗評估

確認以功能性分子標誌輔助回交策略，選育具低鎘累積秈稻新品系之可行性，在台中市后里地區高風險試驗田進行現地評估，已先針對試區進行土壤含鎘濃度梯度分析。先期試驗結果顯示，分布範圍為 1–4 mg kg<sup>-1</sup>，並由東往西存有逐漸增加趨勢，據此劃定試驗田西側作為本試驗試區。參試品系分別為已知高鎘累積秈稻品種 'Habataki'、低鎘累積梗稻品種「台農 71 號」、輪迴親「台中秈 10 號」、提供親「台梗 2 號」與新品系台中秈 10 號 *qCdT7* 等 5 個

品種 (系)，並在試區內以每間隔 2 行、2 株 (0.56 m × 0.36 m) 的土壤採樣密度進行網格式土壤取樣，建構當期作土壤鎘濃度空間分布，且各土壤取樣點均在行間與株間的交叉點上，可供後續鄰近上下對角 4 株樣品的背景濃度校正使用。

田間栽培採行一致性管理作業，將各參試品種 3–4 葉齡秧苗，以南北向單本植插秧於試驗田區，每品系種植 20 株、採單行順序排列，行株距 0.28 m × 0.18 m。在肥料施用採慣行栽培，於栽植期間施予四次化學肥料；基肥施用於插秧前 1–2 d，以台肥 39 號複合肥料 (粒劑，12% N，台灣肥料股份有限公司，高雄市) 施用 200 kg ha<sup>-1</sup>；第 2 次肥料施用於插秧後 1 wk (即水稻成活期)，以台肥硫銨 (粒劑，21% N) 施用 200 kg ha<sup>-1</sup>；第 3 次肥料施用於插秧後 3–4 wk (即水稻分蘖期)，以台肥硫銨用量 200 kg ha<sup>-1</sup>；第 4 次為穗肥，施用於插秧後約 8 wk、曬田結束，以台肥 39 號複合肥料用量 200 kg ha<sup>-1</sup>，合計 132 kg ha<sup>-1</sup> 的氮素。

### 土壤與植體重金屬含量分析

試區內 51 個土壤樣品均係由表土向下挖取半徑 5 cm、深 15 cm 土柱，土壤樣品經風乾，以木製磨土棍粉碎，過 0.5 mm 篩網，儲存於乾淨塑膠罐中，供後續土壤鎘濃度分析使用。土壤鎘分析係採微波輔助王水消化法進行樣品消化，所得濾液以感應耦合電漿光譜儀 (Ultima 2C, Horiba Jobin Yvon, Irvine, CA, USA) 測定鎘濃度，流程如同 Romkens *et al.* (2009) 敘述。而各品種系的植體樣品於成熟期進行取樣，包含根部、地上部莖葉、糙米與稻殼；在樣品前處理上，先以清水仔細清洗各部位植體樣品以去除黏附的土壤與灰塵等，再以去離子水清洗，置入烘箱以 70°C 烘乾至恆重備用。各植體樣品經粉碎、酸處理後以感應耦合電漿質譜儀 (Agilent 7500C, Santa Clara, CA, USA) 測定鎘濃度，其分析流程亦如同 (Romkens *et al.* 2009) 敘述。

### 植體與糙米鎘累積能力

高風險田區的污染物大多伴隨灌溉水而來，因此土壤累積濃度通常以入水口處較高，

再向周圍遞減；避免田間土壤濃度不均質現象干擾品系鎘累積差異，故在高風險污染田區進行現地評估試驗時，將考量該測試樣品中「植體樣品鎘濃度 ( $Cd_{sample}$ )」與其「採樣點下土壤鎘濃度 ( $Cd_{soil}$ )」的比值，即生物性濃縮係數 (bio concentration factor, BCF)：

$$BCF = Cd_{sample} / Cd_{soil}$$

來呈現作物的吸收能力 (Zhang *et al.* 2014; Lin *et al.* 2015)，以此進行後續各品系間統計檢定。

### 農藝性狀調查

另為瞭解參試品系在高風險田區的性狀表現，先在成熟期調查品系株高，隨後各刈取 6 株調查產量性狀與生質參數；稻穀以 40°C 乾燥至 13% 含水量後調查單株總粒重與產量構成要素，產量構成要素包含每穗穎花數 (number of spikelets per panicle)、有效穗數 (panicle number)、稔實率 (fertility percentage) 及千粒重 (1000-grain weight) 等；而用以調查生質參數的地上部莖葉及地下部根部則經 70°C 烘乾至恆重後，秤量其乾物重，而單株收穫指數 (harvest index) 則分別取各單株總粒重與其全株乾重 (即總粒重與莖葉乾重之總和) 之比值。

### 試驗統計分析

試驗資料分析先以 R 統計軟體中的「agricolae」套件進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 檢定，各變因項達顯著水準後，再使用最小顯著性差異測驗 (least significance difference; LSD) 判定處理間的差異是否達到顯著性。而田間鎘濃度空間分布繪圖，則使用 R 統計軟體中的「geoR」、「lattice」及「latticeExtra」套件，用採樣點資料重新建構分布曲面梯度圖的函數，將原本梯度函數生產曲面預測值，最後利用「levelplot」套件畫製梯度分布圖。

## 結果與討論

本研究先搜尋生物資料庫中已發表的鎘吸

收基因 *OsNRAMP1* 基因序列，自行開發專一性功能標記，並以 ‘Nipponbare’ 與 ‘Habataki’ 分別作為低、高鎘累積對照品種，分析國內各栽培品種 *OsNRAMP1* 鎘累積基因型。該組功能性引子擴增 *OsNRAMP1* 基因 5’UTR 的片段，夾取 ATG 前-1473 至-1068 處之 406 bp 大片段刪除差異處，低鎘累積品種產物大小 652 bp，高鎘累積品種則為 246 bp (圖 2)。而國內 13 個主要梗稻栽培品種、「台農 67 號」均與 ‘Nipponbare’ 帶有相同低鎘累積 *OsNRAMP1* 對偶基因型，而秈稻「台中秈 10 號」與「台中秈糯 2 號」則與高鎘累積品種 ‘Habataki’ 的基因型一致。顯示國內梗稻品種鎘累積能力均屬於低累積遺傳類型，而本研究中 2 個秈稻品種 (TCS10, TCSW2) 的遺傳特性是屬於高累積類型 (表 1)。

在 Guo *et al.* (2007) 與 Romkens *et al.* (2009)

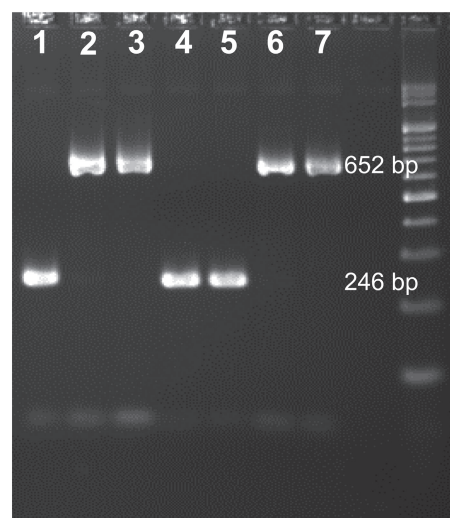


圖 2. 水稻 *OsNRAMP1* 基因型分析，功能性標記 NRAMP1 夾取該基因 5’UTR 區域具 406 bp 變異處，能區分低累積或高累積特性對偶基因，其樣品排序由左至右分別為 ‘Habataki’、‘Nipponbare’、‘台農 71 號’、‘台中秈糯 2 號’、‘台中秈 10 號’、‘台梗 2 號」與品系台中秈 10 號 *qCdT7*。

Fig. 2. The electrophoresis result of functional marker NRAMP1 illustrating PCR products with tolerant and sensitive alleles at *OsNRAMP1* locus (m-gel marker: 100 bp ladder). Lanes denote 1. ‘Habataki’, 2. ‘Nipponbare’, 3. ‘Taihung 71’, 4. ‘Taichung Sen waxy 2’, 5. ‘Taichung Sen 10’, 6. ‘Taikeng 2’, and 7. TCS10-*qCdT7*, respectively.

的研究中也顯示國內秈稻品種的鎘累積性比粳稻品種高出許多，其中包含了「台中秈 10 號」等；而第 7 條染色體上的主效基因座 *qCdT7* 還包含了 4 個相關基因 (圖 3)，由此可知國內秈稻品種高累積特性可由 *OsNRAMP1* 基因解釋部分的遺傳變異。因此，本試驗優先考量將「台中秈 10 號」第 7 號染色體上 *qCdT7* 基因座上的組成，置換為低鎘累積的粳稻品種片段，隨後以 *NRAMP1* 標誌作為該基因的功能性標誌。

進一步考量 *qCdT7* 基因座內可能存著 *OsHMA3* 自然變異的對偶基因，與鎘離子隔離於根部細胞液泡之機制有關。依據前人研究顯示，粳稻品種 *OsHMA3* 對偶基因係屬於有助隔離鎘離子並降低其在木質部中轉運，而部分秈稻品種則喪失隔離功能進而使稻穀鎘含量增

加。為了讓「台中秈 10 號」從根部吸收 (*OsNRAMP1*) 至木質部轉運能力 (*OsHMA3*) 均達到降低稻穀鎘累積的能力，將粳稻上述兩個基因同時保留至秈稻品種中，先以 *OsHMA3* 基因座旁緊密連鎖標誌 (RM2163、CdT-E) 判斷雜交親本間的差異 (表 1)，並可協助確認「台稈 2 號」置換至「台中秈 10 號」，亦在國內秈、粳栽培品種中具有多型性。但在 *OsHMA3* 第 7 內顯子上 153 bp 缺失處的定序結果，顯示「台稈 2 號」等粳稻品種均與 'Nipponbare' 帶有相同對偶基因，同時也確認「台稈 2 號」與「台中秈 10 號」上 *OsHMA3* 基因具有相同遺傳組成。此結果如同秈稻 'IR24'，與粳稻品種帶有相同 *OsHMA3* 低累積對偶基因一致 (Miyadate *et al.* 2011)。

另外加速「台中秈 10 號」低鎘累積導入

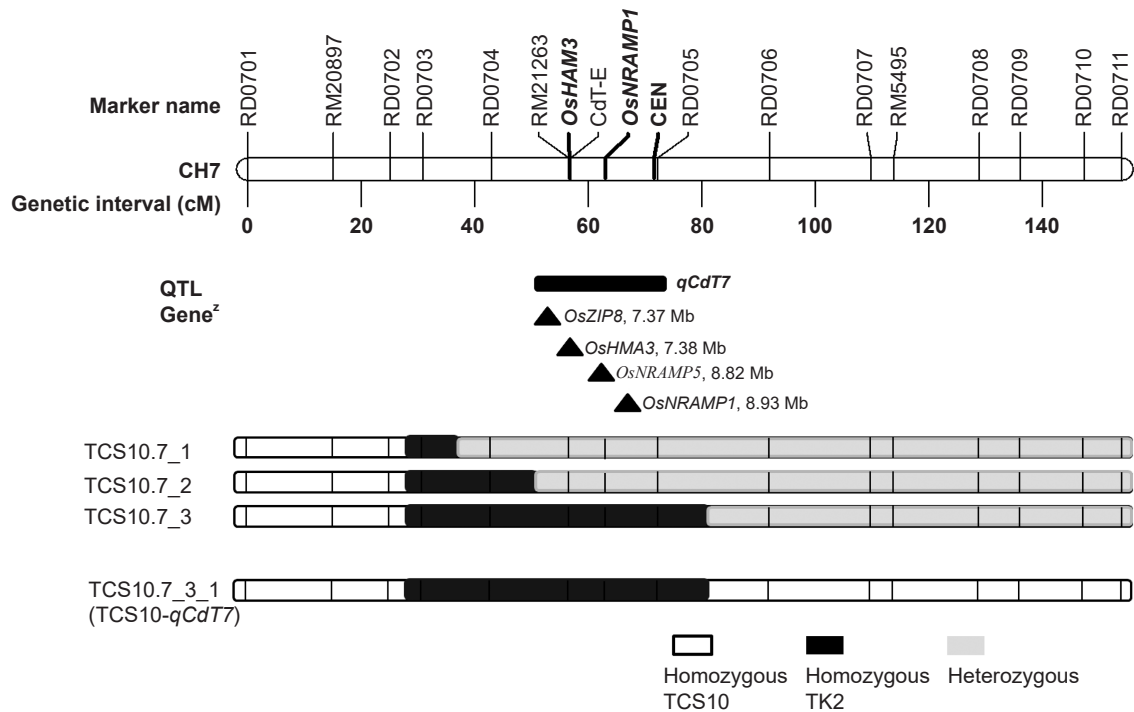


圖 3. 圖解「台中秈 10 號」第 7 號染色體階層片段置換系之遺傳組成 (Wu *et al.* 2013a)，並排列 QTL 基因座 *qCdT7* 內 4 個鎘累積相關基因的位置。

Fig. 3. Graphical genotypes of 'TCS10' stepped aligned inbred recombinant lines on chromosome 7 (Wu *et al.* 2013a), and illustrated the relationship among four known genes and major locus *qCdT7*.

<sup>2</sup> Locus ID and its reference: *OsZIP8*, Os07g0232800 (Ramesh *et al.* 2003); *OsHMA3*, Os07g0232900 (Ueno *et al.* 2009, 2010; Miyadate *et al.* 2011); *OsNRAMP5*, Os07g0257200 (Ishikawa *et al.* 2012; Ishimaru *et al.* 2012); *OsNRAMP1*, Os07g0258400 (Takahashi *et al.* 2011).

系的選育期程，從導入秈稻第 7 號染色體的逐步片段置換系開始篩檢，而片段置換系 #TCS10.7\_3 的遺傳背景利用 139 個距離平均 10–15 cM 的 InDel 標誌 (Wu *et al.* 2003) 進行全基因體分析，結果顯示回復為「台中秈 10 號」，背景回覆率為 94.11%。以第 7 號染色體上 13 個 InDel 與 SSR 標誌檢定幼苗期 #TCS10.7\_3 分離後裔於幼苗期檢定 94 株，第 7 號染色體上則分布 13 個 InDel 與 SSR 標誌，篩檢結果選獲 20 株目標植株，其染色體長臂均回復為「台中秈 10 號」遺傳組成者。另長臂區間中為「台稈 2 號」、異質結合體與重組體的頻度，分別為 21、31 與 22 株。而針對 #TCS10.7\_3 片段置換系的短臂末端本已回復為「台中秈 10 號」，再經分離選拔後所選獲的 20 株近同源系，僅保留第 7 條染色體短臂上近 40 cM 區間為「台稈 2 號」的組成，背景回覆率可達 96.46% (圖 2)。

本試驗在台中市后里地區高風險試驗田進行現地評估，有助直接驗證秈稻改良品系對於降低鎘累積能力，並考量試區土壤鎘濃度趨勢對參試品系的影響，在取樣間距為 0.56 m × 0.36 m 每行依序取土 3 次、共 51 個取樣點下，

可知該期作土壤鎘濃度由東向西濃度由 1.07–2.85 mg kg<sup>-1</sup> 依序遞增，各植株間略有土壤濃度差異。進一步可知，各品系行「台農 71 號」、「Habataki」、「台中秈 10 號」、「台稈 2 號」與台中秈 10 號 *qCdT7* 的土壤平均鎘濃度，分別為 2.03、1.71、2.48、2.48 以及 2.85 mg kg<sup>-1</sup>；後續將利用各單株最近採樣點的土壤濃度進行植體生物濃縮係數 (BCF) 之校正使用 (圖 4)。

各試驗品系均取樣 6 株，化驗根部、莖葉、糙米與稻殼的鎘累積量，並轉換成 BCF，隨後進行各品系最小顯著性差異統計檢定，結果顯示全株 4 個部位的 BCF 在各品種間達顯著差異 ( $p < 0.05$ )，如表 2。在根部上，其最小顯著門檻值 (LSD) 為 0.7116，BCF 值最高級別係同屬秈稻品種的輪迴親「台中秈 10 號」與「Habataki」，BCF 值達到 4.0234 與 4.0478，然後依序遞減為「台農 71 號」(2.9924)、提供親「台稈 2 號」(2.6685) 以及新改良品系「台中秈 10 號 *qCdT7*」(2.2242)。可知秈稻新品系與輪迴親「台中秈 10 號」的 BCF 值達到顯著差異，新品系改良後下降幅度可達 44.7%。莖葉的 BCF 值也是以秈稻「Habataki」達到 0.9215 為最高，而輪迴親「台中秈 10 號」次

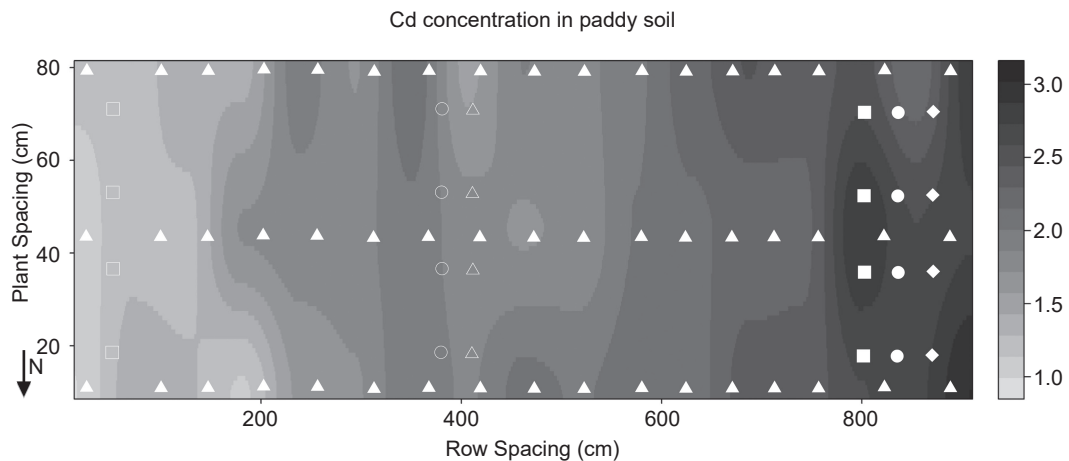


圖 4. 后里試區 2015 年第 1 期作鎘濃度分布圖，其中以實心三角代表 51 個土壤採樣點與空心圓為「台農 71 號」、空心三角為「Habataki」、實心方形為「台中秈 10 號」、實心圓形為「台稈 2 號」以及實心菱形為品系「台中秈 10 號」*qCdT7* 等參試品種的植株位置。

Fig. 4. Spatial distribution of cadmium concentration (mg kg<sup>-1</sup>) in the Haoli paddy field. Samples of surface soil were collected at 51 sites in the first cropping season of 2015, and different marker symbols indicated by solid triangles, hollow circles, hollow triangles, solid squares, solid circles and solid diamond were applied to soil samples, 'TNG71', 'Habataki', 'TCS10', 'TK2' and 'TCS10-*qCdT7*' individuals, respectively.

之 (0.6212)，秈稻新品系與另 2 個粳稻品種的 BCF 值則為 0.4667–0.3637，在最小顯著差異門檻 0.1548 之下，新品系的莖葉 BCF 值與輪迴親未達顯著差異水準，然與輪迴親相比之下降幅度業達 24.9%。在糙米的 BCF 值上，以最小顯著差異門檻 0.048 為分界，可見與前述性狀的排序相仿，仍以秈稻品種 ‘Habataki’ 的 BCF 值 0.3706 為最高，輪迴親「台中 10 號」的糙米 BCF 值 0.2667 排次之，秈稻新品系 (0.1540) 與粳稻「台農 71 號」 (0.1251) 以及「台梗 2 號」 (0.1124) 同屬於較低累積量者。新品系的糙米 BCF 值與秈稻品種達到顯著差異，並較輪迴親「台中 10 號」下降 42.2%。且在稻殼 BCF 值上，也可以發現新品系的 BCF 值是最低者 (0.0562)，與其他參試品種相較之下，並未分配過多鎘含量累積在稻殼上。

新品系台中 10 號 *qCdT7* 所種植區的土壤鎘濃度最高 ( $2.85 \pm 0.16 \text{ mg kg}^{-1}$ )，而兩親本「台中 10 號」與「台梗 2 號」採樣點的土壤濃度則略低，亦達  $2.52 \pm 0.32 \text{ mg kg}^{-1}$ ，但「台中 10 號」糙米累積量達  $0.67 \pm 0.16 \text{ mg kg}^{-1}$ 、「台梗 2 號」糙米累積量則為  $0.28 \pm 0.03 \text{ mg kg}^{-1}$ 。在尚未考量彼此土壤濃度不均下，新品系台中 10 號 *qCdT7* 的糙米累積量僅為  $0.44 \pm 0.09 \text{ mg kg}^{-1}$ ，已較「台中 10 號」糙米濃度下降 34.3%。但其新品系糙米 BCF 值 (0.1540) 則顯著低於「台中 10 號」的 BCF 值 (0.2667)。顯示新品系的吸收性可下降

42.2%，能有效表現出低鎘累積特性，比秈稻品種「台中 10 號」降低許多風險。

目前已知運用分子輔助育種策略，將粳稻第 7 條染色體上 *qCdT7* 基因座的組成置換至秈稻中，可成功大幅降低新品系糙米中的鎘累積現象。但依據前人研究發現在第 7 條染色體上 *qCdT7* 基因座區間中，陸續發現 4 個與鎘吸收、轉運等相關功能的基因。其中 *OsZIP8* (Ramesh *et al.* 2003) 與 *OsNRAMP5* (Ishikawa *et al.* 2012; Ishimaru *et al.* 2012) 係藉由過度表現或基因轉殖等技術確認其功能，而 *OsNRAMP5* 基因座上的遺傳變異則是由粳稻突變庫中所尋獲，甚至在後續研究中也發現缺失 *OsNRAMP5* 基因將導致水稻生長與稻穀產量顯著降低，且 Tezuka *et al.* (2010) 與 Miyadate *et al.* (2011) 研究中亦排除 *OsZIP8* 是 *qCdT7* 基因座內調控鎘累積表現的候選基因。推測上述 2 項基因存在於秈、粳稻間的自然變異之可能性偏低，但需進一步藉由定序分析或 RNA 表現量確認在此新品系上的功能性。

性狀調查上，各參試品系均取樣 6 株，進行株高、產量構成要素、莖葉乾重、根部取樣乾重與收穫指數等性狀檢定，各調查性狀在參試品系間均具顯著差異 ( $P < 0.05$ )，顯示各調查性狀均能穩定呈現品種間的遺傳差異。而新品系經過多次回交後，大部分遺傳組成已與輪迴親「台中 10 號」相仿，在 2015 年第一期作后里試驗田的農藝性狀調查上，兩者外觀上

表 2. 「台中 10 號」*qCdT7* 品系與親本與其他品種在各植體部位上鎘生物濃縮係數的統計分析，資料收集自 2015 年第 1 期作。

Table 2. Comparisons of bio concentration factor among ‘TCS10’-*qCdT7*, its parents and other two cultivars in four biomass components. Data were collected in the first cropping season in 2015.

Variety/Line	Subspecies	Bio concentration factor			
		Root	Shoot	Brown rice	Husk
Habataki	<i>indica</i>	4.0478 a <sup>z</sup>	0.9215 a	0.3706 a	0.0969 a
TNG71	<i>japonica</i>	2.9924 b	0.3637 d	0.1251 c	0.0738 ab
TK2	<i>japonica</i>	2.6685 bc	0.3931 d	0.1124 c	0.0721 ab
TCS10	<i>indica</i>	4.0234 a	0.6212 bc	0.2667 b	0.0913 a
TCS10- <i>qCdT7</i>	<i>indica</i>	2.2242 c	0.4667 cd	0.1540 c	0.0562 b
LSD <sub>0.05</sub>		0.7116	0.1548	0.0488	0.0282

<sup>z</sup> Values are expressed as the mean of six plants and means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

亦有高度相似性。新品系株高 107.7 cm 與輪迴親「台中秈 10 號」109.7cm 相近；在分蘗數、每穗穎花數、稔實率以及千粒重等產量構成要素上均未達顯著差異且呈現高度相似，僅其中新品系的每穗穎花數略比輪迴親增加 12.1%，在分蘗數、稔實率與千粒重均維持與輪迴親相似程度下，似乎有增產趨勢，且在新品系的莖葉乾重偏低 (36.6 g) 下，其新品系的收穫指數 (穀粒總乾重/全株乾重) 可達 0.51，與輪迴親「台中秈 10 號」收穫指數 0.48 相比略增 4.2%

但未達顯著差異，如表 3 與圖 5。

本試驗首重於現地栽培環境下進行秈稻後裔的鎘元素累積能力之探討，對於目標栽培環境具有直接應用效益，並利用分子輔助育種技術大幅改良栽培品種的生產風險，農民不需要重新適應新品種的栽培管理，新品系選育能兼具在稻作生產與食品安全上提供一項緩解措施，對於農民生產與市場銷售等產業經濟發展提供保護作用，亦穩定國內稻作發展並提升環境安全永續利用。

表 3. 「台中秈 10 號」*qCdT7* 品系與親本與其他品種針對生質量、產量構成要素與收穫指數的統計分析，資料收集自 2015 年第 1 期作。

Table 3. Comparisons of plant height, biomass dry weight and yield components among 'TCS10'-*qCdT7*, its parents and other two cultivars. Data was collected in the first cropping season in 2015.

Variety/Line	Plant height (cm)	Panicle number	Spikelets/panicle	Fertility (%)	1000-grain weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Harvest index
Habataki	96.0 b <sup>z</sup>	13.8 ab	153.3 a	88.4 ab	23.30 c	34.8 bc	9.6 ab	0.56 a
TNG71	98.3 b	15.7 a	78.6 b	81.0 c	25.48 ab	31.3 c	6.6 c	0.45 c
TK2	112.2 a	15.8 a	92.0 b	92.0 a	24.63 b	46.5 a	10.6 a	0.42 c
TCS10	109.7 a	11.8 ab	139.6 a	88.9 ab	26.18 a	43.8 ab	7.7 bc	0.48 bc
TCS10- <i>qCdT7</i>	107.7 a	11.0 b	156.6 a	86.3 b	26.16 a	36.6 abc	6.6 c	0.52 ab
LSD <sub>0.05</sub>	5.19	4.1	26.7	5.1	0.87	11.0	2.5	0.06

<sup>z</sup> Values are expressed as the mean of six plants and means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

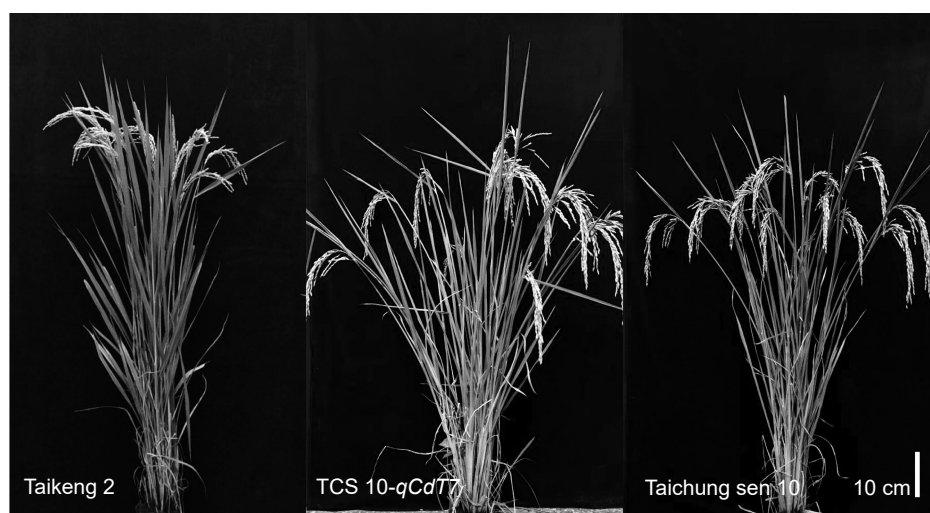


圖 5. 新品系台中秈 10 號 *qCdT7* 與兩親本在成熟期時的株形影像紀錄。

Fig. 5. Comparison of morphological characteristics between novel line (TCS10-*qCdT7*) and recurrent parent ('TCS10'). Bar is 10 cm.

## 引用文獻

- Abe, T., F. Taguchi-Shiobara, Y. Kojima, T. Ebitani, M. Kuramata, T. Yamamoto, M. Yano, and S. Ishikawa. 2011. Detection of a QTL for accumulating Cd in rice that enables efficient Cd phytoextraction from soil. *Breed Sci.* 61:43–51.
- Guo, H. Y., T. S. Liu, C. L. Chu, C. F. Chiang, and P. F. Römken. 2007. Prediction of heavy metal uptake by different rice species in paddy soils near contaminated sites of Taiwan. p.95–116. *in: Proceedings of the International Workshop of ESAFS 8: New Solutions to Soil Pollution and Distribution, Bioavailability and Management of Heavy Metals.* October 22–23, 2007. Tsukuba, Japan Food Fert. Tech. Ctr. Publ., Taipei, Taiwan.
- Harushima, Y., M. Yano, A. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S. Y. Lin, B. A. Antonio, A. Parco, H. Kajiya, N. Huang, K. Yamamoto, Y. Nagamura, N. Kurata, G. S. Khush, and T. Sasaki. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F<sub>2</sub> population. *Genetics* 148:479–494.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793–800.
- Ishikawa, S., T. Abe, M. Kuramata, M. Yamaguchi, T. Ando, T. Yamamoto, and M. Yano. 2010. A major quantitative trait locus for increasing cadmium-specific concentration in rice grain is located on the short arm of chromosome 7. *J. Exp. Bot.* 61:923–934.
- Ishikawa, S., Y. Ishimaru, M. Igura, M. Kuramata, T. Abe, T. Senoura, Y. Hase, T. Arai, N. K. Nishizawa, and H. Nakanishi. 2012. Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *PROC. Natl. Acad. Sci. USA* 109:19166–19171.
- Ishimaru, Y., R. Takahashi, K. Bashir, H. Shimo, T. Senoura, K. Sugimoto, K. Ono, M. Yano, S. Ishikawa, T. Arai, H. Nakanishi, and N. K. Nishizawa. 2012. Characterizing the role of rice *NRAMP5* in manganese, iron and cadmium transport. *Sci. Rep.* 2:286.
- Jha, U. C. and A. Bohra. 2016. Genomics enabled breeding approaches for improving cadmium stress tolerance in plants. *Euphytica* 208:1–31.
- Kumagai, S., T. Suzuki, K. Tezuka, N. Satoh-Nagasawa, H. Takahashi, K. Sakurai, A. Watanabe, T. Fujimura, and H. Akagi. 2014. Functional analysis of the C-terminal region of the vacuolar cadmium-transporting rice *OsHMA3*. *FEBS Lett.* 588:789–794.
- Lin, Y. W., T. S. Liu, C. T. Chen, H. J. Tang, H. T. Chen, J. R. Job, J. H. Tsai, Y. H. Lin, C. C. Chang, S. J. Tsai, and W. T. Huang. 2012. Contents of cadmium and lead in vegetable crops produced in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 61:38–51. (in Chinese with English abstract)
- Lin, Y. W., T. S. Liu, H. Y. Guo, C. M. Chiang, H. J. Tang, H. T. Chen, and J. H. Chen. 2015. Relationships between Cd concentrations in different vegetables and those in arable soils, and food safety evaluation of vegetables in Taiwan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 61:983–998. (in Chinese with English abstract)
- Miyadate, H., S. Adachi, A. Hiraizumi, K. Tezuka, N. Nakazawa, T. Kawamoto, K. Katou, I. Kodama, K. Sakurai, H. Takahashi, N. Satoh-Nagasawa, A. Watanabe, T. Fujimura, and H. Akagi. 2011. *OsHMA3*, a P<sub>1B</sub>-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytol.* 189:190–199.
- Norton, G. J., C. M. Deacon, L. Xiong, S. Huang, A. A. Meharg, and A. H. Price. 2010. Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. *Plant Soil* 329:139–153.
- Ramesh, S. A., R. Shin, D. J. Eide, and D. P. Schachtman. 2003. Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. *Plant Physiol.* 133:126–134.
- Römken, P. F. A. M., H. Y. Guo, C. L. Chu, T. S. Liu, C. F. Chiang, and G. F. Koopmans. 2009. Prediction of Cadmium uptake by brown rice and derivation of soil-plant transfer models to improve soil protection guidelines. *Environ. Pollut.* 157:2435–2444.
- Takahashi, R., Y. Ishimaru, T. Senoura, H. Shimo, S. Ishikawa, T. Arai, H. Nakanishi, and N. K. Nishizawa. 2011. The *OsNRAMP1* iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *J. Exp. Bot.* 62:4843–4850.
- Tezuka, K., H. Miyadate, K. Katou, I. Kodama, S. Matsumoto, T. Kawamoto, S. Masaki, H. Satoh, M. Yamaguchi, K. Sakurai, H. Takahashi, N. Satoh-Nagasawa, A. Watanabe, T. Fujimura, and H. Akagi. 2010. A single recessive gene controls cadmium translocation in the cadmium hyperaccumulating rice cultivar Cho-Ko-Koku. *Theor. Appl. Genet.* 120:1175–1182.
- Ueno, D., I. Kono, K. Yokosho, T. Ando, M. Yano, and J. F. Ma. 2009. A major quantitative trait locus controlling cadmium translocation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.* 182:644–653.
- Ueno, D., N. Yamaji, I. Kono, C. F. Huang, T. Ando, M. Yano, and J. F. Ma. 2010. Gene limiting cadmium accumulation in rice. *PROC. Natl. Acad. Sci. USA* 107:16500–16505.

- Uraguchi, S. and T. Fujiwara. 2012. Cadmium transport and tolerance in rice: perspectives for reducing grain cadmium accumulation. *Rice* 5:5.
- Uraguchi, S., S. Mori, M. Kuramata, A. Kawasaki, T. Arao, and S. Ishikawa. 2009. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major pROCeSS determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. *J. Exp. Bot.* 60:2677–2688.
- Uraguchi, S. and T. Fujiwara. 2013. Rice breaks ground for cadmium-free cereals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16:328–334.
- Wu, D. H., K. K. Hwu, C. S. Wang, C. H. Su, W. L. Chuang, M. Y. Lin, C. P. Li, W. S. Jwo, H. M. Yen, and M. H. Lai. 2013a. Construction and evaluation of rice whole chromosome substitution lines of indica cultivar ‘Taichung sen 10’ carrying japonica cultivar ‘Taikeng 2’. p.113. *in*: Proceedings of the Agronomy Society of Taiwan 2013 Annual Meeting. April 25, 2013. Taichung, Taiwan. Agric. Soc. Taiwan. Publ., Taichung, Taiwan.
- Wu, D. H., H. P. Wu, C. S. Wang, H. Y. Tseng, and K. K. Hwu. 2013b. Genome-wide InDel marker system for application in rice breeding and mapping studies. *Euphytica* 192:131–143.
- Yan, J., P. Wang, P. Wang, M. Yang, X. Lian, Z. Tang, C. F. Huang, D. E. Salt, and F. J. Zhao. 2016. A loss-of-function allele of *OsHMA3* associated with high cadmium accumulation in shoots and grain of Japonica rice cultivars. *Plant Cell Environ.* 39:1941–1954.
- Zhang H, J. Chen, L. Zhu, G. Yang, and D. Li. 2014. Transfer of cadmium from soil to vegetable in the Pearl River Delta area, South China. *PLoS One* 9:e108572.

## A Novel *Indica* Rice Breeding Line Selection with Low Cadmium Accumulation Level by Functional Markers Assisted Backcross Strategy

Pi-Jen Wu<sup>1,#</sup>, Yu-Wen Lin<sup>2,#</sup>, Charng-Pei Li<sup>3</sup>, Chien-Hui Syu<sup>4</sup>, Woei-Shyuan Jwo<sup>5</sup>, Hsing-Mu Yen<sup>5</sup>,  
Horng-Yuh Guo<sup>6</sup>, Ming-Hsin Lai<sup>7</sup>, and Dong-Hong Wu<sup>5,\*</sup>

### Abstract

Wu, P. J., Y. W. Lin, C. P. Li, C. H. Syu, W. S. Jwo, H. M. Yen, H. Y. Guo, M. H. Lai, and D. H. Wu. 2017. A novel *Indica* rice breeding line selection with low cadmium accumulation level by functional markers assisted backcross strategy. *J. Taiwan Agric. Res.* 66(3):248–260.

The goal of this study was to improve the genetic uptake factor in *indica* rice cultivars through introgression of a *japonica* DNA segment that limits Cd accumulation. Our strategy was to screen the genetic potential of Cd uptake in Taiwan cultivars using a functional marker, to develop a novel *indica* line by marker-assisted selection, and then to evaluate the genetic improvement of the target breeding line under field conditions. Genotyping with the functional marker of *OsNRAMP1* showed that the current Taiwan *indica* cultivars possessed a high accumulation allele that was consistent with the phenotype of the Cd accumulation trend between Taiwan *indica* and *japonica* cultivars. Subsequently, we selected advanced backcross inbred lines (BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub>) from a chromosome 7 segment substitution line population that was derived from the cross between ‘Taichung Sen 10 (TCS10)’ and ‘Taikeng 2’ based on previous studies (2006–2011). An *indica* line, TCS10-*qCdT7*, that limits Cd accumulation was developed in the first cropping season of 2014 and possessed 96% genetic background similarity compared with the recurrent parent ‘TCS10’. In the first cropping season of 2015, this new breeding line exhibited the highly similar morphological characteristics compared with the *indica* variety ‘TCS10’, but had a Cd bio concentration factor in brown rice that was 44.4% less than that in the ‘TCS10’ parent. In summary, this study was conducted in a field environment and improved one of Taiwan’s popular *indica* cultivars using a marker-assisted backcross approach. The newly developed lines in this study would have the potential to contribute greatly to the future cultivation of rice production and increase the food safety within the Taiwan rice industry.

**Key words:** Cadmium accumulation, Field trial, Functional marker, *Indica* rice, Marker assisted backcross selection.

---

Received: November 4, 2016; Accepted: December 12, 2016.

\* Corresponding author, e-mail: dhwu@tari.gov.tw

# The author contributed equally to this work as first author.

<sup>1</sup> Research Assistant, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Associate Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>5</sup> Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>6</sup> Research Fellow and Director, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>7</sup> Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.