

出國報告（出國類別：研習）

# 因應氣候變遷之國際農業科技交流合作 — 耐逆境水稻品種之開發

研習成員：

周思儀	行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所	助理研究員
吳永培	行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所	副研究員
李長沛	行政院農業委員會農業試驗所	助理研究員
呂奇峰	行政院農業委員會臺南區農業改良場	助理研究員
林佩瑩	行政院農業委員會桃園區農業改良場	助理研究員

派赴國家：菲律賓（國際稻米研究所，簡稱 IRRI）

出國期間：民國 102 年 04 月 14 日～04 月 19 日

報告日期：中華民國 102 年 06 月 26 日

## 摘要

為因應全球氣候變遷之衝擊，農委會農業試驗所於 2012 年開始，與菲律賓國際稻米研究所 (IRRI) 進行「因應氣候變遷之國際農業科技交流合作-抗、耐逆境水稻品種之開發」的國際合作計畫，盼能接軌國際新興科技，進而培育適合於台灣推廣之耐逆境水稻品種。本次水稻耐逆境實務研習以 MAGIC 族群材料與水稻耐旱、耐鹽育種篩選以及單一核苷多型性 (SNP) 分析平台之操作為主，主要行程包括 IRRI 耐旱根系篩選分析、耐旱與耐鹽育種田區選拔設置以及 SNP 分析平台的操作流程。此次研習的主要目的在進行 MAGIC 的觀察與引進工作、研習 IRRI 的水稻耐旱、耐鹽篩選模式以及研習 SNP 分析平台的操作流程。期能透過與國際農業研究機構的交流合作，建立適合台灣耐逆境水稻栽培的篩選模式與育種流程，以因應氣候變遷對我國農業產業的衝擊，提升國際競爭力。

## 目次

一、目的	4
二、行程	5
三、研習內容	6
四、研習心得	15
五、建議事項	17
六、誌謝	18
七、附錄	20

## 一、目的

根據世界氣象組織統計報告指出，全球地表溫度年平均值在過去百年間上升約 0.5~0.6°C，顯示近年來全球暖化現象有逐漸加劇的情形，而此趨勢對各地氣候將造成明顯的影響，諸如降雨型態改變，農作物生產、動物遷移習性、傳染病發生率與人類健康等均受到影響。台灣地處於農業容易受全球暖化影響的地帶，根據農業科學家總結的經驗法顯示作物在生長過程的重要階段，如授粉期及穀粒充實期，氣溫在攝氏 35 度以上時，溫度每升高 1 度，作物收成減少大約 10%。而台灣主要栽培糧食作物為水稻，其對日夜溫均相當敏感，在攝氏 40 度條件下會導致光合作用關閉，生長發育受阻，故應積極投入對環境等非生物性逆境水稻之研發，以利台灣農業因應暖化時代的來臨。

有關此水稻逆境方面目前國際以位於菲律賓的國際稻米研究所 (International Rice Research Institute, IRRI)，日本及大陸已有多年研發成果與經驗，可做為台灣水稻產官學界之參考與合作。農委會所屬試驗改良場所於 101 年開始由水稻專家編組成之合作團隊，希望透過人才培訓、材料合作交流及技術觀摩等議題，展開「因應氣候變遷之國際農業科技交流合作-抗、耐逆境水稻品種之開發」合作計畫，其目的是為了有效因應全球氣候變遷對台灣糧食安全及相關產業所造成之衝擊，藉由與國際稻米研究所 (IRRI) 的密切合作，接軌國際新興科技，進而培育適合於台灣推廣之耐逆境水稻品種，並同時引入針對稻熱病、白葉枯病、耐鹽、耐旱及多親多世代互交品系 (MAGIC) 族群，從而利用分子標幟輔助選拔技術平台，打開雙方水稻種原、分子育種及環境交感等各研究領域之交流，達到雙方互利成長的新契機，藉此有效提升台灣在氣候變遷下之水稻產業之競爭力，縮短因應及培育耐逆境新品種的時間，降低未來暖化所造成之衝擊。

本年度 (102 年) 為計畫實施的第二年，本次出國參訪主要針對耐逆境合作內容進行實務研習，參訪內容包括耐鹽、耐旱、MAGIC 族群及 Fluidigm 單一核苷酸多型性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 分析系統。於 102 年 4 月 14 日至 4 月 19 日間，由農業試驗所作物組、農業試驗所嘉義農業試驗分所、台南區農業改良場、桃園區農業改良場等 5 位水稻育種及分子生物專家前往 IRRI 接受實務訓練心得及建議，以供日後台灣水稻耐逆境之參考應用。

## 二、行程

日期	時間	研習行程
4 月 14 日 (星期日)	13:30	於桃園國際機場搭乘中華航空 CI703 班機
	15:30	抵達馬尼拉，再轉搭 IRRI 專車至 IRRI
4 月 15 日 (星期一)	08:30	研習成員自我介紹與討論研習的行程內容
	09:00	IRRI 與農業試驗所合作試驗之進度說明與 MAGIC 族群建立與選育品系引種之進度說明
	10:30	分子方法之說明與討論
	13:30	討論此次研習主題之內容與要求
	15:30	田間 MAGIC 族群與溫室內 IRRI 與農業試驗所合作試驗親本之生長情形
4 月 16 日 (星期二)	08:00	IRRI 水稻耐旱試驗簡短說明
	08:30	水稻田間耐旱根系篩選方法之研習
	09:15	水稻溫室耐旱根系 PVC 管篩選方法之研習
	10:30	水稻根系籃框法 (Basket method) 之研習
	11:00	水稻根系清洗與影像分析之操作過程
	11:30	水稻根系調查之資料表格建置與記錄方法
	13:30	IRRI 水稻耐旱育種流程之說明
16:00	IRRI 水稻耐旱育種田間設置之參訪	
4 月 17 日 (星期三)	08:30	SNP 基因型分析平台之操作過程
	13:30	Fluidigm 資料讀測與軟體分析之操作簡介
	14:00	“Genetics of Acclimation and Adaptation to Climate”之演講
	15:00	SNP 基因型分析平台之解說與討論
4 月 18 日 (星期四)	08:30	IRRI 水稻耐鹽育種試驗之講解與討論
	10:00	水稻耐鹽田區參訪
	11:00	參訪氣候調節室水稻秧苗期之耐鹽篩選試驗
	14:00	IRRI 水稻耐鹽性 donors 與功能性 markers 之解說與討論
	15:00	IRRI 水稻耐鹽性基因定位與 markers 建立之解說與討論
16:00	整個研習行程的會後討論	
4 月 19 日 (星期五)	06:30	搭乘 IRRI 專車至馬尼拉機場
	10:35	搭乘中華航空 CI702 班機
	12:35	返抵桃園國際機場

### 三、研習內容

此次研習課程由 Dr. Chitra 負責接洽與安排，主要在瞭解水稻 MAGIC 研究材料的觀察與引進、耐旱及耐鹽分子輔助育種之雜交組合進度、耐旱及耐鹽的篩選模式以及相關標誌與新興技術之操作，其中，MAGIC研究由農業試驗所負責，耐旱研究由臺南區農業改良場及桃園區農業改良場負責，耐鹽研究由農業試驗所嘉義分所負責。

#### (一) IRRI與台灣合作試驗雜交工作在IRRI執行之進度

在本項合作計畫中，除由 IRRI 提供相關耐逆境種原給台灣稻作研究單位外，台灣亦提供相關親本，作為 IRRI 與台灣合作試驗的材料。目前 IRRI 材料分 5 批種植，台灣材料分 3 批種植，IRRI 已完成 18 個雜交組合。其中，台南 11 號與耐旱品系雜交獲得 5 個雜交組合，與台中秈 10 號雜交的獲得 8 個雜交組合，除台中秈 17 號外，各獲得 1 個雜交組合，雜交工作還持續在進行中。各親本均繁殖於簡易網室中，台灣的輪迴親本在 IRRI 田間的表現均不錯，比韓國或日本的梗稻還具產量及株型優勢，顯見台灣育成的梗稻品種在 IRRI 的適應性良好（表一、表二）。

表一、台灣農業試驗單位提供之親本品種

IRRI編號	品種名稱
TRL-001	台農 67 號 (Tainung 67)
TRL-002	台稈 9 號 (Taikeng 9)
TRL-003	台南 11 號 (Tainan 11)
TRL-004	台中秈 17 號 (Taichung Sen 17)
TRL-005	台農 71 號 (Tainung 71)
TRL-006	高雄 145 號 (Kaohsiung 145)
TRL-007	桃園 3 號 (Taoyuan 3)
TRL-008	台中秈 10 號 (Taichung Sen 10)

表二、IRRI提供之耐旱與耐鹽種原材料

種原名稱	特殊基因 / QTLs
IR91648-B-89-B-81	High yielding BC2F3 derived Moroberekan/3*Swarna lines
IR91648-B-343	High yielding BC2F3 derived Moroberekan/3*Swarna lines
IR74371-46-1-1	Donor for $qDTY_{12.1}$ for lowland condition
IR87707-445-B-B-B	IR64 NIL with $qDTY_{2.2}$ and $qDTY_{4.1}$
IR96321-315-240	Swarna <i>Sub1</i> line with $qDTY_{3.1}$ , $qDTY_{2.1}$ and $qDTY_{1.1}$
IR96322-34-223	Swarna <i>Sub1</i> line with $qDTY_{3.1}$ , $qDTY_{2.1}$ and $qDTY_{1.1}$
IR4630-22-2-5-1-3	Good plant type, salt tolerant at seedling and reproductive stages
TCCP266-1-3B-13-1-3	Somatoclonal variant of Pokkali
CSR30	Japonica, sodicity/salt tolerant
Pokkali	<i>Saltol 1</i> , traditional salt tolerant variety
IR 66946-3R-178-1-1	Source of <i>Saltol 1</i> , most tolerant at seedling stage
IR 45427-2B-2-2B-1-1	Salt tolerant with Fe tox tolerance
IR 63307-4B-4-3	<i>Saltol 1</i> , highly salt tolerant variety
IR 73571-3B-11-3-K2	Japonica salt tolerant elite line

## (二) 多親本多世代互交品系建立與選育品系引種

IRRI 根據 Mott et al. (2000) 利用遠親交配種 (outbred) 進行數量性狀的精細定位方法的概念，發展水稻多親本互交高世代品系 (Multi-parent advanced generation intercross, MAGIC) 的族群，做為同時導入多個親本特性，並作為數量性狀精細定位或探討基因間交感作用之材料，目前已發展出籼型、粳型及籼粳合併的 MAGIC 族群 (IRRI, 2011)，也提供給各國進行選拔並進行多地區的試驗評估。

本次在 MAGIC 族群選拔研習課程方面，進一步了解 MAGIC 族群的操作上族群逢機交配的方法及各世代建立之流程及實際做法。為獲得逢機交配讓基本親本之間獲得完全的重組機會，八個親本的半互交 F<sub>1</sub>，再次雜交時以可以獲得完整重組的 F<sub>1</sub> 為優先

考量，依此進行到八方向的交配後，共獲的 35 個八親聚合的  $F_1$ ，每個  $F_1$  至少種植 60 株 ( $S_0$ )，每一單株收穫後成立約 2100 個系統 ( $S_1$ )，每  $S_1$  系統種植 25 株，每系統選 1 株，其餘 24 株混合，繁殖收穫的單株，成立 2100 個  $F_{2,3}$ ，至  $F_{2,4}$  仍維持 2100 系統，每系統仍種 25 株，從每一系統中選出 10 株株型接近的混合成  $F_{2,5}$ ，進行觀察試驗，每系統種 5 行，每行 25 株，進行比較試驗後，選出 400 個系統，每系統混合收穫，進行進一步產量比較試驗 MET1，從中選出 130 個系統 MET2，每系統仍混合收穫並提供給各國進行適應型及參與選種 (Participatory varietal selection, PVS) 產量之評估，最後選出 40 個系統，進入 IRRI 的最後包含其他試驗計劃材料在內的綜合產量評估。

在 MAGIC 品系引種上，IRRI 同意提供去年選拔的秈稻 MAGIC 品系及整組的粳稻 MAGIC 品系，且材料已準備就緒，但仍有些行政手續待完成。研習返國後已積極接洽並簽屬 IRRI 所需之各項文件，於 5 月 10 日已收到所申請的稻種包含 240 選拔的 MAGIC 品系、401 份的粳稻 MAGIC 及 6 個親本，預計於 102 年第二期作進行繁殖，但目前這批材料僅能作為外表型性狀評估及調查，要進行基因型分析或作為雜交仍需要取得 IRRI 得同意書，在獲得 IRRI 同意後，將可與學校合作，進行包括 MAGIC 粳稻或其它材料之基因型分析及外表型分析工作。

### (三) 耐旱育種及篩選田區參訪

IRRI 進行水稻耐旱方面的研究已有四十幾年的歷史。在 1970 年代，耐旱研究主要以利用田間及溫室進行耐旱基因型的選拔為主。1990 年代則以選拔水稻的耐旱特性為主要策略，例如水稻根系分布、葉片或穗的水分潛勢表現以及水稻滲透調節性能等等。在分子層次方面，也以這些耐旱特性的數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTLs) 定位為研究主流。在 2000 年之後，則以直接比較乾旱及慣行供水環境下，水稻的產量表現為耐旱選拔的主要性狀。在分子層次方面，則以選殖乾旱逆境下與產量表現相關之 QTL 為主要策略。



## 1. 水稻耐旱性 QTL 分析

目前水稻的耐旱育種進展十分緩慢，主要歸咎於缺乏針對水稻耐旱性的有效篩選標準及逆境環境下穀粒產量的低遺傳力 (Ouk et al., 2006)。然而在最近的研究報告指出，於妥善管理的處理模式下，乾旱逆境下的穀粒產量的遺傳力相似於正常栽培條件下所得的結果，對於逆境下的穀粒產量直接篩選 (direct selection) 是有效的 (Kumar et al., 2008; Venuprasad et al., 2007, 2008)。此外另一個影響水稻耐旱育種進展的原因是尚未發現具顯著效應及一致性高可用於分子標誌輔助育種 (marker-assisted breeding, MAB) 的數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTLs)。

與水稻耐旱性有關之數量性狀基因座研究，首先廣泛被使用於 CT9993/IR62266 和 IR64/Azucena 族群中，其中 CT9993 為低滲透壓調節能力的粳型品系、IR62266 為高滲透壓調節能力的籼型品系、IR64 為乾旱敏感型之籼型品系及 Azucena 為乾旱容忍型之粳型品系，以這些品系進行雜交，建立根型態和滲透壓力調整等二次乾旱相關性狀 (secondary drought-related traits) 的數量性狀基因座圖譜。然對性狀具有顯著效應的數量性狀基因座，卻未能被成功利用於分子標誌輔助選拔 (Marker-assisted selection, MAS) 中達乾旱逆境下增進產量之目的，故相關研究人員開始著手於尋找與產量具有直接關聯性的數量性狀基因座 (Mackill, 2003)。

在與 IRRI 的耐旱合作方面，由我國引種 IRRI 提供具高產耐旱數量性狀基因座的耐旱種原 (表二) 回台灣栽種，盼能以與稻穀產量相關的性狀作為目標改善品種的耐旱性，並在耐旱環境下，以產量表現來評估品種(系)的耐旱性，將有助於進一步了解在乾旱逆境下，不同品種間遺傳與生理特性的差異，並可應用於分子標誌輔助選拔。

本次參訪行程中，來自 IRRI Shalabh Dixit 博士 4 月 16 日簡報所提供的資料顯示， $qDTY_{1.1}$  位在第 1 條染色體上，介於 RM11943 及 RM12091 之間； $qDTY_{2.1}$  位在第 2 條染色體上，與 RM324 緊密連鎖； $qDTY_{2.2}$  位在第 2 條染色體上，與 RM236 緊密連鎖； $qDTY_{3.1}$  位在第 3 條染色體上，與 RM416 緊密連鎖； $qDTY_{4.1}$  位在第 4 條染色體上，與 RM518 緊密連鎖； $qDTY_{12.1}$  位在第 12 條染色體上，介於 RM28099 及 RM28199 之間。

## 2. 水稻耐旱根系研究參觀

此次參訪耐旱部分主要由 Dr. Amelia 與 Dr. Shalabh 介紹目前 IRRI 水稻耐旱生理與耐旱育種方面的研究。Dr. Amelia 主要研究水稻耐旱特性與水稻根系之間的關係。其利用移動式大型遮雨棚進行耐旱環境控制與正常供水的環境下，比較耐旱及非耐旱水稻根系型態的變化情形，並利用此結果來印證水稻耐旱特性的解釋參考。

根據 Dr. Amelia 表示，先前研究報告指出，具有耐旱 QTL 12.1 的水稻品種系，在嚴重乾旱逆境下，具有較低的葉溫及高氣孔導度特性。而這些特性可能是它具有耐旱特性的原因之一。另外，也有文獻顯示，具有耐旱 QTL 的品種系，在嚴重乾旱逆境下，具有較低的植冠溫度，而其他不具耐旱 QTL 的品種系，在乾旱逆境下，則具有較高的植冠溫度。最後根據分析結果顯示，植冠溫度與根系的密度具有顯著的負相關。當根系密度高時，植冠溫度較低，當根系密度低時其植冠溫度較高。如此，也間接證實了具有耐旱 QTL 品種系的耐旱特性與根系密度的密切關係。

#### (1) 水稻耐旱根系試驗田區參訪

試驗方法主要將耐旱或非耐旱品種系分別種植於乾旱及非乾旱環境下，再利用土壤取樣器（直徑 4 公分，長 60 公分）在每品種系行間取樣 3 次，分析土壤下 30 公分及土壤下 30~60 公分的根系形態表現。其方法為利用鐵鎚將土壤取樣器打入土下 30 公分，之後再利用鐵鍊拉出，再相同位置打入土中 60 公分，再利用鐵鍊拉出。分別將各層土壤取出，裝進標識好的塑膠袋中，利用人工將每個樣品清洗乾淨，篩出土中的水稻根系。進入實驗室後再做更詳細的清洗。最後利用掃描器與軟體分析，分析每樣品中六個等級的水稻根系直徑（ $< 0.05\text{mm}$ ,  $0.05\sim 0.1\text{mm}$ ,  $0.1\sim 0.2\text{mm}$ ,  $0.2\sim 0.5\text{mm}$ ,  $0.5\text{mm}\sim 1.0\text{mm}$ , 及  $> 1\text{mm}$ ）。最後再將各等級根系染色後切片，比較耐旱及非耐旱品種系在乾旱環境及非乾旱逆境下根系的構造與長度的差異性。

#### (2) 籃框法 (Basket Method) 試驗操作過程參訪

IRRI 利用 Basket Method 來評估不同水稻品種系的根系生長角度。Basket Method 是一種將作物種植於填滿土壤的塑膠或鋼性半球形篩網中，使其根系穿過篩孔的方式。常有學者利用此方法評估根系生長角度與數量，由此判斷該品種系為深根或淺根系類型。就水稻而言，已有許多學者證實，深根類型的根系是抵抗耐旱環境的重要特性之一。

( Yoshida and Hasegawa, 1982; Lilley and Fukai, 1994; Araki and Iijima, 2005; Uga, 2010) 。  
Basket Method 亦可使用不同的土壤或水耕栽培方式進行。此方式最先被利用於小麥  
Oyanagi *et. al.* (1993) ，並於 2012 年被 Uga 學者應用於水稻上。利用 Basket Method 的  
水稻深根系判斷，主要是根據根系穿過半球形篩網的位置而定。半球形篩網中間部分有  
一圈鐵環，可以區分半球形篩網為兩部份，一部份較高，約為  $0^{\circ}$  至  $45^{\circ}$  ，第二部分較  
低，約為  $46^{\circ}$  至  $90^{\circ}$  。最後計算出水稻穿過  $46^{\circ}$  至  $90^{\circ}$  的根系數量所佔所有穿過整個  
篩網的根系數量比率。

### 3. IRRI 水稻耐旱育種田間設置與性狀調查

在耐旱育種方面，由 Dr. Shalabh 解說 IRRI 的耐旱育種流程細節。IRRI 的耐旱育  
種田間操作季節主要是在乾季 (12 月~隔年 5 月) 進行，其選拔的環境設置與操作可分  
為旱田 (upland) 及濕田 (lowland) 二種。然而台灣水稻栽培方式大多為湛水栽培，與其  
濕田 (lowland) 環境較為接近，所以本次研習目標多集中在 IRRI 的濕田 (lowland) 耐旱  
育種田間設置與性狀調查方式，期望能供台灣農業研究人員作為發展水稻耐旱育種上的  
參考。但由於此次參訪時間較為延後，所以 IRRI 濕田 (lowland) 耐旱育種皆已選拔、  
收穫完畢，所以此次參訪未能實地參與，實為可惜。

在旱田 (upland) 耐旱育種方面，首先進行育種田區整地、耕犁土壤後開溝，溝深  
約 10 公分，溝間距約 25 公分，再以條播方式將種子平均分散在犁溝中，最後覆土及  
噴水使種子發芽。發芽後利用撒水器約 2~3 天灌溉一次，每次灌水量需使土壤水分含  
量接近田間容水量。直到種植後 35 天再開始進行耐旱處理，處理方式為當埋於地下 30  
公分之土壤水分張力計數值達到 -50 kPa 或對照品種 50% 以上葉片嚴重捲曲時，即行  
復水。復水方式為利用撒水器噴灌 1 小時後，即進入下一次乾旱處理。

在濕田 (lowland) 耐旱育種方面，首先在乾燥或濕潤的苗床上育苗，待 21 天後進  
行移植工作。耐旱育種田區灌水後即行水田整地，整地需力行平整，並確保稻田移植後  
保有濕潤的土壤及田區土壤水分均勻分布。另外，耐旱育種田區周圍需設置田埂以蓄留  
水分。待水稻秧苗移植後約一週再進行灌水，水深約 5 公分，之後維持每個育種田區  
土壤濕潤狀態，但是不能湛水。

直到移植 50 天後，開始進行乾旱處理，處理方式為當埋於地下的土壤水分深度監測管內水位降至 100 公分以下或對照品種 50% 以上葉片嚴重捲曲時，即行復水處理。其復水方式為上午灌溉，下午進行排水工作。之後再進入下一次的乾旱處理。在旱田 (upland) 及濕田 (lowland) 耐旱育種上，皆以比較乾旱逆境及非乾旱逆境下的水稻穀粒產量、株高、抽穗期、生物量及收穫指數等資料，以作為耐旱選拔主要依據。

#### (四) 耐鹽育種及篩選田區參訪

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是全世界重要的糧食作物之一，為供應人類成長發育最主要的能量來源，特別是發展中的國家很多是以水稻為主食，在 1970 年代綠色革命促使水稻產量有了突破性增加後，之後的數十年，水稻產量的提升便停滯不前，但世界人口數量卻是持續增加，預計在 2030 年時將達到 80 億，水稻生產必須增加 50% 方可滿足人類對糧食的需求 (Khush and Brar, 2002; Khush, 2005)，而人口的增加使得一些耕作土地轉變為工業及居住用地，迫使水稻耕作轉移到生產力低的鹽分地 (Hossain, 1994)，使得糧食短缺現象更是雪上加霜，促使研究學者積極投入水稻耐鹽性的相關研究。

水稻為對鹽分敏感的作物，整個生長發育過程均會受到鹽害的影響，特別是營養生長期之早期和生殖生長期之晚期 (Thomson et al., 2010)，因此耕作土壤的鹽化將導致水稻的生長受到不同程度之影響，世界上約有 30% 水稻栽培區因遭此種非生物逆境因素，致使水稻產量無法有效提升 (Tanji, 1990; Wu and Garg, 2003)。氯化鈉 (NaCl) 是土壤發生鹽害的主要鹽分，所以在水稻耐鹽逆境的研究過程中，幾乎均利用添加 NaCl 來模擬鹽份逆境之環境 (Flowers, 2004)。

##### 1. 水稻耐鹽性 QTL 分析

水稻運用分子標幟進行基因圖譜定位選殖已行之有年，成果亦相當豐碩，而隨著全球暖化的加劇，在多年前水稻亦開始進行耐鹽基因之定位研究，唯由於水稻耐鹽性大都為多基因控制之數量性狀，受環境影響非常大，使得植株在耐鹽表現試驗之重複性或再現性不佳，造成了耐鹽基因定位選殖的困難度大幅提高 (Pandit et al., 2010)。目前水稻耐鹽研究主要針對水稻在營養生長期對鹽分逆境的反應，國際稻米研究所利用耐鹽品種

Pokkali 和 IR29 之 F<sub>8</sub> 重組自交系 (recombinant inbred lines, RILs) 為試驗材料, 以幼苗期表現耐鹽的 38 株和敏感的 42 株植株進行 206 個增殖片段長度多型性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) 分子標識的耐鹽基因圖譜定位, 將調控 Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup> 比率的耐鹽 QTL (*saltol*) 定位在第一條染色體 10.7-12.2 Mb 的位置上, 隨後在此區段增加 RFLP 和 SSR 分子標識及 54 個 RIL 植株, 測定出此 QTL 對耐鹽性狀有 34% 的貢獻度 (IRRI, 1997; Bonilla et al., 2002), 然截至目前為止, 在此染色體區段的相關研究仍持續進行中, 唯貢獻度已然下修至 27%, 但此一 QTL (*saltol*) 仍為水稻耐鹽性之主效 QTL (Thomson et al., 2007; Thomson et al., 2010)。

本次參訪行程中, 由 IRRI 水稻耐鹽研究專家 Dr. Glenn Gregorio 及其博士後研究員 Dr. Mohammad Rafiqul 以簡報介紹耐鹽材料之種植與篩選, 並提供 IRRI 基因體研究專家 Dr. Michael Thomson 列出的耐鹽功能性分子標識清單如表三所示。

表三、供耐鹽分子標識輔助選育利用之功能性分子標識

Marker	Chr. 1 (Mb)	Size (bp)	Notes
RM490	6.7	101	Background selection
RM1287	10.9	154	Flanking marker
RM10694	11	194	Flanking marker
AP3206	11.2	375	Foreground <i>saltol</i>
AP3206f	11.2	167	Foreground <i>saltol</i>
RM8094	11.2	209	Foreground <i>saltol</i>
RM3412b	11.5	110	Foreground <i>saltol</i>
RM10748	11.7	96	Foreground <i>saltol</i>
RM493	12.2	211	Flanking marker
RM10793	12.5	124	Flanking marker
SalT1	13.8	159	Background selection
RM562	14.6	243	Background selection
RM7075	15.1	155	Background selection

## 2. IRRI 水稻耐鹽育種田間與氣候調節室水稻秧苗期之耐鹽篩選試驗參訪

此次參訪 IRRI 耐鹽試驗田區，其田間耐鹽性篩選，不設重複，二行植，每行 35 株，於插秧後一個月後由貯存鹽水的 5000 公升塑膠貯存桶開始灌入電導度 (electrical conductivity, EC)  $EC12 \text{ dS.m}^{-1}$  之鹽水溶液，每一小區之田間置有二個鹽度計，將試驗材料整株收穫後 (5 株/品系) 依 IRRI 水稻標準評估系統手冊判定耐鹽等級，此方法值得國內仿效設置。IRRI 在田區耐鹽育種選拔依據的作法為先將試驗材料種植於田間，待耐鹽篩選的數據資料出來後再於田間觀察，選拔株型良好且耐鹽的品系，淘汰不良株型且不耐鹽的品系以及良好株型但不耐鹽的品系。除田間耐鹽檢定田外，IRRI 亦在簡易網室設置耐鹽檢定圃，以每品系五行植，每行 7 株進行耐鹽試驗。另參訪室內氣候調節室耐鹽性秧苗期之篩選，IRRI 將參試秧苗於 96 孔水耕盤裝置上進行水耕方式栽培，置於溫室中培養水稻幼苗，待秧苗生長至 3 葉齡以上後，先以耐鹽水耕液  $EC10 \text{ dS.m}^{-1}$  處理 2 天後，再以  $EC18 \text{ dS.m}^{-1}$  處理至對照組達 7 級時復水。IRRI 耐鹽之篩選基本上方法與台灣水稻差異不大，但設施及規模遠大台灣育種單位，且各項分工作相當清楚及細膩，值得台灣參考。

### (五) SNP 基因型分析操作平台

本次參訪 IRRI 的 SNP 實驗室主要瞭解 IRRI 的單一核苷酸多型性基因型分析之操作平台，本操作平台中，需要高品質 DNA 的萃取方式，水稻葉片取樣後冷凍乾燥，以高速震盪研磨系統 (型號: TissueLyser II, 廠牌: QIAGEN) 進行組織研磨，一次做多可處理兩個 96 孔盤，共 182 個樣品數，再經自動化 DNA 萃取系統 (型號: KingFisher Flex, 廠牌: Thermo Scientific) 進行萃取水稻葉片 DNA，IRRI 所使用的為 E.Z.N.A.® Mag-Bind issue DNA Kit for KF (此套組為專為 KingFisher 自動化 DNA 萃取系統所需的 DNA 萃取套組，廠牌: OMEGA bio-tek)，待萃取出 DNA 後，以高通量超微量分光光度計 (NanoDrop 8000) 進行核酸定量，同時可進行八個樣品偵測，約 6 分鐘可分析完一盤 96 孔盤的 DNA 樣品，之後即可進行 SNP 基因型分析實驗。此次觀摩的 SNP 基因型分析平台，以 Fluidigm EP1 系統為主，Illumine BeadXpress 系統則僅海報說明。

## 1. Fluidigm EP1 系統

Fluidigm EP1 系統係由美國生物晶片製造商 Fluidigm 公司所開發，結合微量流體技術、生物技術及微電子等技術，發展出 EP1 高通量 (High Throughput) 基因分析系統，其中包含 IFC 晶片、IFC 控制器、熱循環控制系統及 EP1 讀測系統。利用數以千個精密微流體導管 IFC (Integrated Fluidic Circuit) 集成成的薄膜晶片，透過壓力控制反應試劑間的混合，如 48.48IFC 晶片中可進行 2304 個樣本的反應，192.24IFC 晶片中可進行最多 4608 個樣本的反應、96.96IFC 晶片中可進行最多 9216 個樣本的反應，因此減省樣品用量，並且操作簡單，所需反應時間短，僅 4 個小時可處理完畢，大幅度增加敏感度。其處理流程為將配置好的樣本溶液注入 IFC 兩側的圓形孔洞中，將 IFC 晶片放入 IFC 控制器，加壓後將自動進行分液、液體混合，分液混和好的 IFC 晶片放入熱循環系統進行 PCR 反應，反應完畢後，再經 IFC 晶片放入 EP1 讀測系統讀取並利用軟體進行分析。

## 2. Illumine BeadXpress 系統

Illumine BeadXpress 系統係由美國基因測序及分析 Illumine 公司所開發，為獨特的微珠陣列 (bead array) 設計，將核酸探針製作於微小顆粒上，再將其放置於特製載體上成為晶片，可以使用 GoldenGate 套組 (GoldenGate Kits) 使用標準的 GoldenGate 樣品處理方式，利用雙色雷射偵測系統進行雙色檢測，可以同時辨識圓柱型 Vera Code 微珠中的代碼 (barcode)，以及偵測每個微珠的訊號強度。IRRI 所採用的 Illumine BeadXpress Reader 384 系統，可以針對客製化的 384 個 SNP 位點進行分析，以 96 個樣本進行基因型分析，僅需兩天。可應用於遺傳歧異度分析 (genetic diversity analysis)、DNA 指紋鑑定 (DNA fingerprinting)、數量性狀基因座定位 (QTL mapping)、indica/indica 或 indica/japonica 種原進行的分子輔助育種回交 (marker-assisted backcrossing)。

## 四、研習心得

### (一) 促進雙方交流合作

本次台灣研究人員與 IRRI 各研究人員交流，雖開始之參訪內容與原先預定之課程不甚相同，經與 IRRI 承辦人員溝通後，其熱心的協助台灣訪問團隊更改各項訓練內

容，雖造成相當大的困擾，IRRI 研究人員對台灣訪問人員友善之幫忙，令人感到既貼心又感動，尤其為讓台灣研究人員能與 IRRI 的人員熟悉互動，其於每日中午更安排餐敘，增加彼此接觸及認識的安排，使得本次之訪問收穫更形豐富，此舉有助於大幅提高兩方未來彼此深入合作之機會。

## (二) 技術學習及分工合作

1. 本次訪問過程，IRRI 之課程解說時已將耐鹽及耐旱之功能性分子標幟清單簡報秀出，唯經協調是否可取得簡報，IRRI 雖已同意，但截至離開前仍未拿到各課程之簡報檔案。
2. 在本項合作計畫中，IRRI 已提供水稻耐旱種原給台灣稻作研究人員，作為台灣水稻耐旱育種之雜交親本。而目前台南場正在進行 IRRI 提供之耐旱種原對台灣的耐旱環境適應性評估以及將此批耐旱種原與台灣水稻栽培品種台南11號雜交工作，而後將搭配外表型調查與環境監測儀器進行選拔，再與結合分子標誌輔助回交與背景選拔技術，快速將耐旱基因導入台南11號中，以增加水稻耐旱育種速率，加速耐旱水稻品種育成，降低未來全球暖化對臺灣所帶來的衝擊。
3. 在耐鹽部分，耐鹽之分子標幟輔助選拔目前確定請 IRRI 將 *Satol* 轉移至台灣秈稻及稈稻中，過程只需進行到 BC2F2 世代，每一回交世代以秧苗期耐鹽篩選進行前景選拔，再透過分子標幟進行背景選拔，故應可於四年內完成合作案之要求。由於參訪實際進行時間僅4天左右，因此本次行程雖對於相關耐鹽之秧苗期及成株期田間鹽田之選拔已進行見習，但由於訪問時間有限，真正實際之技術操作仍有待未來補強。
4. 在 SNP 分析平台的課程方面，由於僅一天的時間在 SNP 實驗室從旁觀看SNP的操作流程，故僅能初步了解其操作過程，對於資料的分析則了解有限，實為可惜。
5. 台灣需及早建立耐鹽田間分析技術，目前秧苗期之耐鹽篩選技術及方法，由於二邊差異不大，只是濃度及處理程序稍加調整後，即可完成秧苗期之耐鹽篩選技術之建立；唯田間鹽田之相關設施及調查方法仍有待加強，嘉義分所於 102 年一期作嘗試建立鹽田篩選圃，結果初步發現並未成功，此次發現 IRRI 利用簡易之鹽水灌溉系統，其便可穩定田間鹽度，得到較穩定之篩選環境，故展望未來將尋找約 15-20 萬元之經



費已建立此一篩選系統，如此未來才能有同樣的資料可供參考。

6. 水稻秧苗期之耐鹽篩選由於 IRRI 具有穩定環境之空調溫網室設施，因此其秧苗期進行耐鹽處理時，其處理效果較不易受環境差異干擾，觀之台灣進行此一篩選時，僅利用一般網室進行，故篩選不易達到像 IRRI 之效率。
7. 目前已大致清楚 IRRI 之 MAGIC 族群、耐鹽及耐旱等篩選程序及研究方向，並取得相關篩選方法之實驗步驟及材料安排。未來可等到 IRRI 將各項特性之操作手冊完成後，台灣部份可能還需根據同一方法進行相關分析調查與測試，如此方能落實技術轉移台灣的效益。
8. 明年台灣與 IRRI 之合作特性將增加、抗（耐）溫、褐飛蝨及未來栽培模式等議題，是否會模糊焦點目標性狀，或因增加主題而大幅更動訪問 IRRI 的台灣研究人員，造成無法聚焦的結果，亦徒增 IRRI 在訓練課程及接待上的負擔，尤其不同主題會增加分子標幟輔助選拔過程之材料準備、培育、外表型分析及基因型分析之工作量，值得兩個研究團隊深入討論。
9. 由於目前與 IRRI 之合作交流為計畫中第二年，因此有關的雙方的運作模式，合作詳細內容部份目前已逐漸成熟，雖初期存有一定程度的模糊空間，但展望本次訪問將為台灣訪問 IRRI 時，IRRI 如何接待、安排及互動提供之良好的模式，希望透過各項細節及內容的確立，讓睽違十幾年後的台灣研究人員，能重新與 IRRI 建立良好的合作關係，使台灣研究人員能積極加入水稻產業國際合作的大家庭，並藉由雙方的觀摩學習，刺激國內水稻研究人員吸收國際水稻專家之優點及長處，亦建構所須之檢測技術及設備，架構出適合台灣之水稻耐逆境檢測、栽培、育種及分子技術上，訂出合適的發展方向與策略，從而開創台灣水稻逆境育種新的旅程碑。

## 五、建議事項

### (一) 設備需求

1. IRRI 在 DNA 自動萃取及 SNP 分析系統等設備遠優於目前農業試驗所及改良場，這些系統的設備需有專人進行維護及操作，台灣大學農藝系目前已購置這些系統，未

來如何藉由 IRRI 所學習到之耐逆境分子標幟輔助知識與經驗，透過台灣大學農藝系之設備的幫助，大幅提升國內水稻在分子育種上之效率將有待學者專家之共同努力。

2. 目前合作案中之外表型性狀的調查及所需投入之設備當需相關經費之支援及挹注，否則合作案之效益不易顯現。

## (二) 加強國內農業研究人員新興育種技術之訓練

1. 以 PCR 技術為主的 SNP 分析技術 (Fluidigm EP1 system) 在引子挑選部份是以 Cornell 大學之資料庫進行，IRRI 認為過程較為複雜，很難在短短的訪問過程解釋清楚，未來可於台灣大學舉辦之 Fluidigm SNP system 訓練課程再詳細討論。
2. 由於此次研習 IRRI 的 SNP 操作分析平台時間有限，故僅研習 Fluidigm 的操作流程，對 SNP 的發現與資料分析並未安排研習課程，IRRI 的 SNP 實驗室主要操作人員 Ms. Jade 表示 IRRI 有針對 SNP 的搜尋發現與資料分析等開設課程，未來若有需要或許可列入考量。

## (三) 聯絡窗口

1. 根據本次與 IRRI 之合作計畫負責人 Dr. Hei Leung 的溝通的結果，其認為要讓 IRRI 與農業試驗所之合作過程順利進行，他同意未來台灣研究人員在耐鹽、耐旱及 MAGIC 族群之合作議題、內容及進行方式可直接與其所屬連繫，並建議耐鹽部份可直接與 Dr. Glenn Gregorio 和 Dr. Mohammad Rafiqul 洽談，而不需再透過 Dr. Hei Leung 來進行。
2. Dr. Hei Leung 對於台灣耐鹽材料，包括誘變品系與分子標幟輔助育成品系十分感興趣，認為若能正式透過此一合作管道將材料提送 IRRI 進行評估及利用，將是十分重要且有意義的互動合作，故建議明年可由農業試驗所種原庫將此材料送往 IRRI 進行秧苗期及成熟期之評估。

## 六、誌謝

本次赴菲律賓國際稻米研究所研習承蒙行政院農業委員會提供旅費及教育訓練費

用，亦感謝國立臺灣大學農藝系盧虎生與張孟基教授以及農業試驗所作物組賴明信博士等人協助聯繫與行程安排，使本次研習順利完成，特此誌謝。

## 七、附錄



圖 1. 水稻耐旱性根系試驗。A. 田間土壤根系取樣；B. 樣品裝袋；C.清洗根系；D. 籃框法 (Basket Method)；E. 根系掃瞄；F. 影像分析。

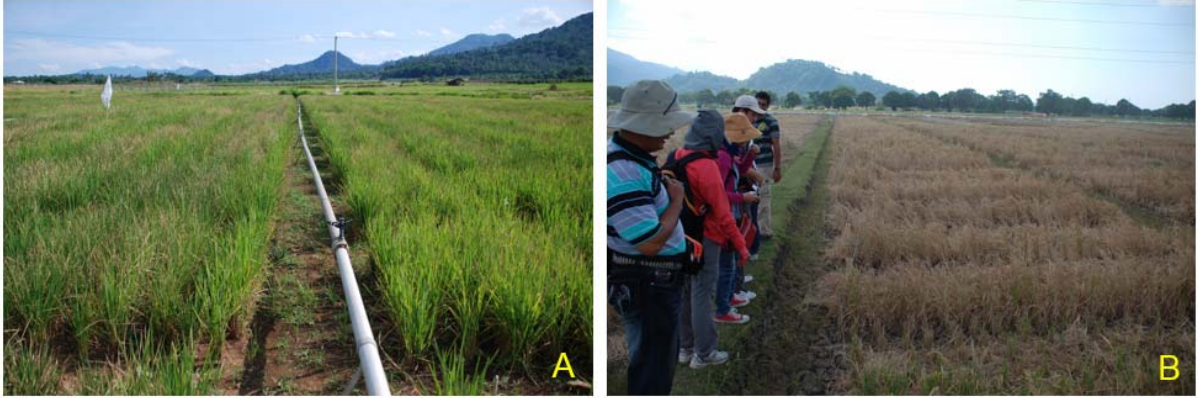


圖 2. 水稻耐旱育種田觀摩。A. 旱田；B. 濕田。



圖 3. 水稻耐鹽試驗田區觀摩。A. 耐鹽田間檢定圃；B. 耐鹽灌溉設施；C. 簡易網室耐鹽檢定圃；D. 鹽度計。

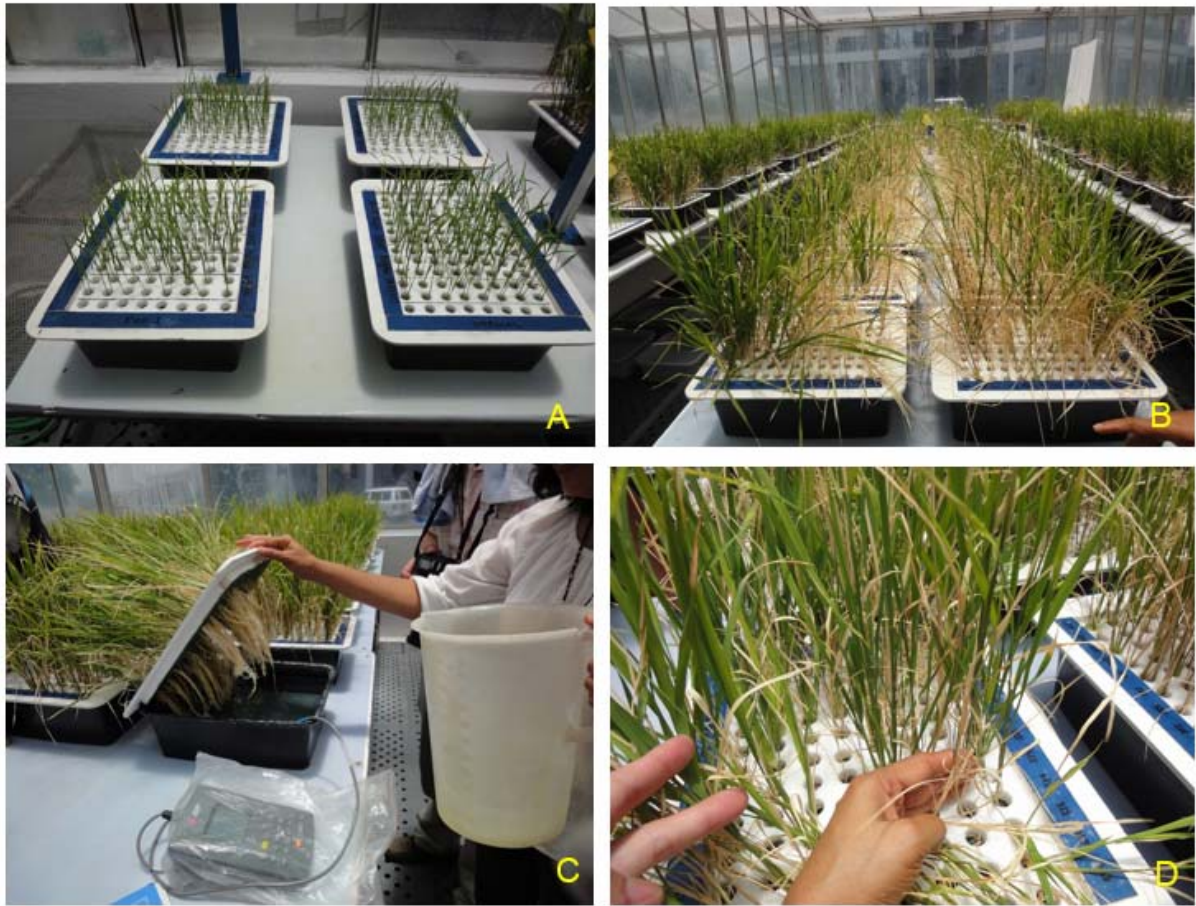


圖 4. 水稻耐鹽性秧苗期篩選試驗。A. 96 孔水耕盤裝置；B. 篩選試驗；C. 電導度 (EC 值) 測定；D. 耐鹽等級判定。



圖 5. DNA 萃取裝置。A. 高速震盪研磨系統 (TissueLyser II)；B. 自動化 DNA 萃取系統。

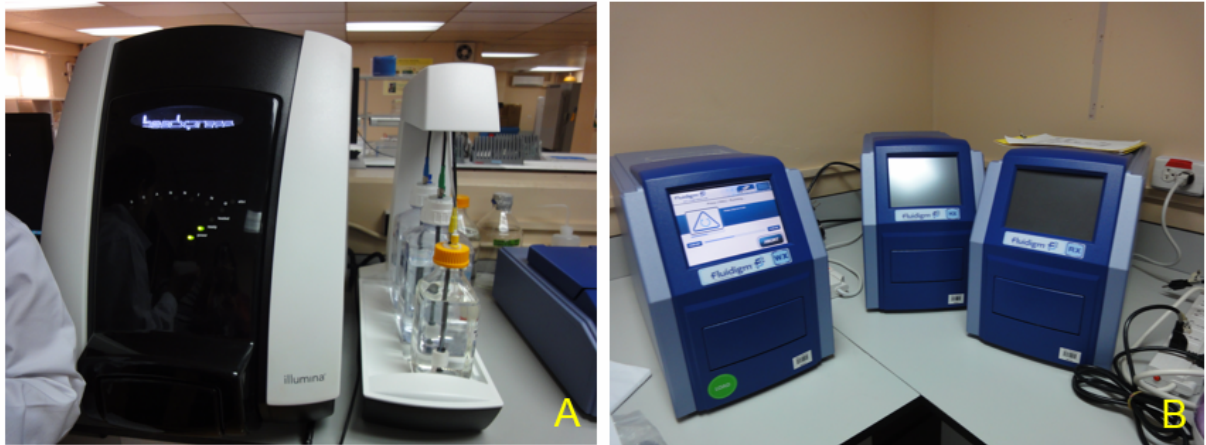


圖 6. SNP 基因分析操作平台。A. BeadXpress 系統；B. Fluidigm EP1 系統。

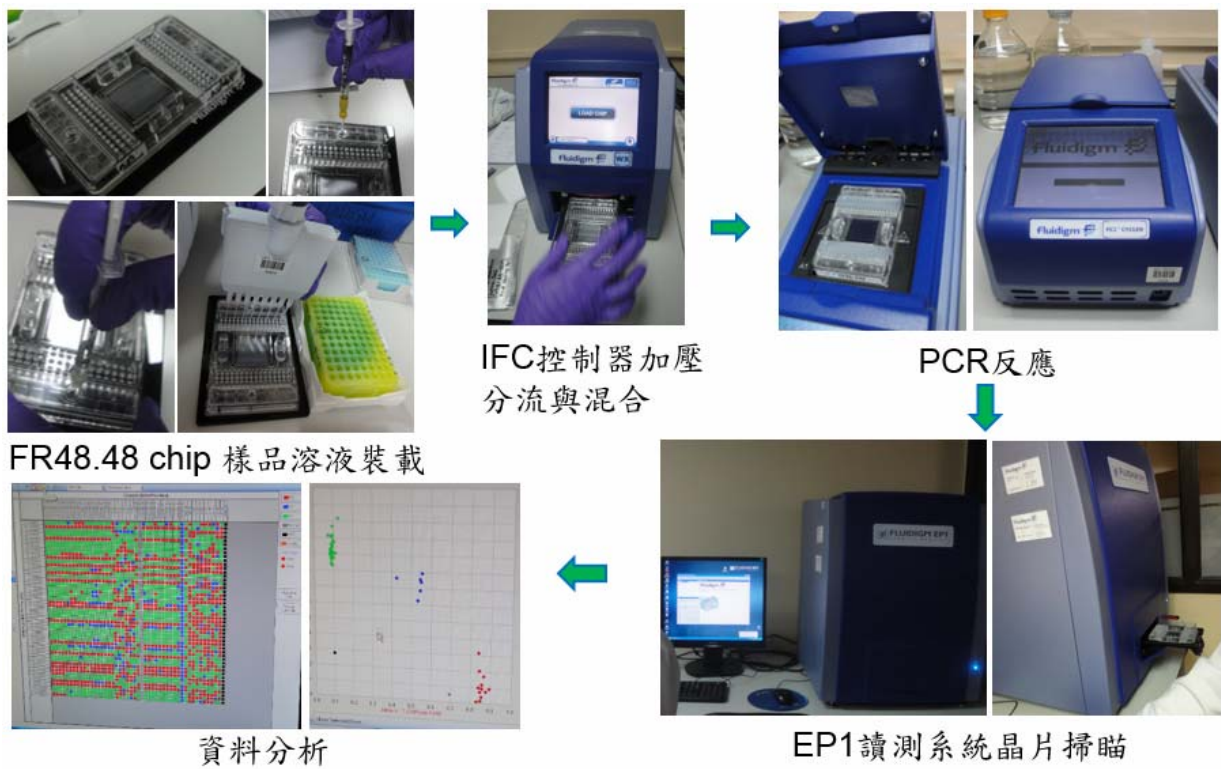


圖 7. Fluidigm EP1 系統操作流程。



圖 8. 研習人員合照。