

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

水稻胚乳相關突變體的篩選及其定性(3/3) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2313-B-002-008-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：國立臺灣大學農藝學系暨研究所

計畫主持人：謝兆樞

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：王映皓、陳儀芳

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96年12月12日

行政院國家科學委員會專題研究計畫報告

水稻胚乳相關突變體的篩選極其定性(3/3)

Screening and characterization of rice endosperm related mutants (3/3)

計畫編號：NSC 95-2313-B-002-008

執行期限：自民國 95 年 8 月 1 日起至民國 96 年 7 月 31 日

主持人：謝兆樞 執行機構及單位：國立台灣大學農藝學系

一、中英文摘要

本研究主要應用 TILLING 可以快速偵測點突變特性，篩選經 T-DNA 誘變的 TRIM (Taiwan Rice Insertion Mutants) 品系，在臘質基因上的體細胞變異率與變異的形式，並做相關的探討；並以 TILLING 了解台農 67 號和 Nipponbare 在臘質基因上的 SNP。

另外，台灣在北部、中部和南部陸續挖掘到炭化稻米的考古遺址，本實驗室使用在臺南科學工業園區和臺中挖掘到的炭化稻米為材料，炭化稻米年代距今約 400 至 5000 年。本實驗室將使用臺灣幾個不同文化層出土的炭化稻米和現生稻品種，分別測量約 100 粒稻米的長、寬、厚特性，來探討(1)臺灣稻作農業的歷史，(2)稻種類的馴化與分化、先民的選種喜好，(3)稻作農業的起源與演進。除此之外，我們也在這些碳化的材料上進行跟胚乳相關的糯性及半糯性基因的研究。

關鍵詞：水稻、糯性突變體、炭化稻米。

Abstract

We use TILLING in Waxy gene from TRIM 9(Taiwan Induced Insertion Mutants) population, in order to characterize the frequency and type of somaclonal variation. We also use TILLING to detect SNPs (single nucleotide polymorphism) in Waxy gene between Tainung and Nipponbare cultivars.

There are ancient rice seeds found out at several archeological sites in South, Central and North part of Taiwan. We used the rice seeds from the archeological sites in the Tainan Science-based Industrial Park in Southern Taiwan and in Taichung in Central Taiwan. The estimated age of these seeds is around from 400 to 5000 years. We are planning to research on the following subjects by measuring the width, thickness, and length of hundreds of rice seeds, including the ancient seeds and seeds of several modern varieties : (1)the history of the rice agriculture in Taiwan (2)the domestication and differentiation of the rice, the favorite rice of the ancient people (3)the origin and the evolution of the rice agriculture. Besides, the research will produce the

data which might be useful for the archaeologists to find out how the ancient people developed from hunting culture to agriculture.

Keywords: Rice (*Oryza sativa*), Yellow endosperm, waxy and semi-waxy mutants, carbonized rice.

二、緣由與目的

近年來，由於雜糧作物的育種改良工作，隨著農業政策的改變而逐漸式微，水稻成為台灣農業最不能棄守的作物產業；水稻的研究幾已成為農學研究水平的指標。再者，這些年來植物基因組 (genome) 的研究在台灣已經逐漸展開，尤其是水稻方面的研究更是投下巨大的人力、物力，累積了大量的植物基因的資訊與數據，帶領了熱絡的功能性的研究。此其中，最具直接育種價值的當數大量突變體的誘導。這些水稻突變體族群除了日本的反轉錄跳躍子 *Tos 17* 插入突變所誘導者之外，台灣自己的研究單位也有可以利用的族群。例如，農業試驗所及其分所的以 sodium azide 誘導突變的族群、中央研究院與農業試驗所合作的以 T-DNA knock-out 誘導的族群以及台灣大學農藝系的以 *Ac/Ds* 跳躍子系統插入突變所誘導的族群。這三個台灣自己誘導的族群所涵蓋的突變範圍極廣，所呈現的多樣性並不亞於日本的族群，這些珍貴的材料除了各單位用在功能基因體學的研究

之外，也樂意提供給外界篩選可資利用的變異。本人的實驗室過去數年來在國科會的支持下已進行高粱、水稻種子胚乳的 GBSS, SSS, branching enzyme, debranching enzyme, ADPG pyrophosphorylase 等的 cDNA clones 選殖定序以及有關澱粉顆粒生成的 proteomics 分析，同時也有過高粱 EMS 誘導突變體分離的經驗；再者，本人承國科會第三十七屆補助科學與技術人員國外短期研究，於 1999 年 8 月至 2000 年 7 月赴英國蘇格蘭作物研究所 (Scottish Crop Research Institute, Dundee) 進修，所作的就是分離大麥胚乳突變體及其澱粉顆粒結合蛋白 (starch granule associated proteins) 的蛋白質體研究。返國後又繼續與中研院生化所陳水田博士實驗室合作用高粱及水稻澱粉結合蛋白進行相關的研究。

本計畫就上述台灣現有的 sodium azide 誘導突變的族群進行與胚乳相關的突變體的分離與分析。我們研究的目標重點性狀包括澱粉特性 (以 amylose / amylopectin 為指標，包括糯性與半糯性*)、有色胚乳 (colored endosperm；以金黃色系列為主，其他色系為輔)。

除了現生的水稻族群之外，我們也在上一個年度收集了古生水稻的材料。由於植物含有豐富的有機物質，當植物死亡後，土壤中的細菌、放線菌和真菌等微生物分解植物殘體，使植物腐爛。但是，植物在一些不尋常的環境中，植物殘體能夠保

存。如土壤非常乾燥，沒有足夠的水分滿足微生物的生長，或者在含水較多的沼澤地帶，由於缺少氧氣，微生物也不能生長。尤其是植物炭化後，幾乎能完全阻止化學方面和生物方面的作用，因此，其架構特徵能清楚地保存下來。另外，由於稻殼中含有高矽酸鹽，具有防止昆蟲和微生物侵害的能力，也可以保護穀粒。

臺南科學工業園區(簡稱「南科」)原先為中央研究院歷史語言研究所接受國科會委託在該地進行考古調查，後續計畫自民國 2003 年 10 月由臧振華和李匡悌博士帶領的團隊挖掘。在南科所挖掘到遺址的年代涵蓋了大坌坑文化(5000B.P.)至西拉雅文化(500B.P.)，出土的文物和植物遺留眾多，成果相當豐碩。本實驗室借出其中三個文化層所挖掘到的炭化稻米作為研究材料，分別為大坌坑文化的南關里遺址(4800~4200B.P.)、牛稠子文化的右先方遺址(3800~3000B.P.)和蔦松文化的五間厝遺址(1400~1000B.P.)。

2002 年由國立臺中自然科學博物館團隊在臺中市七期重劃區挖掘出考古遺址，名為惠來里遺址。另外，2003 年又於臺中縣沙鹿鎮南勢里挖掘出南勢坑遺址。兩個考古遺址皆為番仔園文化層(2000~400B.P.)，出土許多文物與植物遺留，以惠來里遺址挖掘到的炭化稻米數量較多。臺中科學博物館提供本實驗室惠來里遺址(1000B.P.)和南勢坑遺址(400B.P.)的炭化稻米研究。另外，此挖掘團隊還提供本實驗室惠來里遺址含有炭化稻米的完整土塊，讓本實驗室自土塊中挑選炭化稻米，減少使用大量水沖清洗篩選炭化稻米時，遭受到的外力損毀。

稻為禾本科(Gramineae)、稻屬(Oryza)之植物。亞洲栽培稻學名 *Oryza sativa* L.，可分為私稻(indica)、粳稻(japonica; sinica)及爪哇稻(javanica)或稱熱帶粳稻三類群。本實驗室從國家種原中心申請取得數種現代國內外現生私粳稻品種，以及日據時代前期及清朝時臺灣的在地品系(均為私稻)，包括現在栽培之粳稻：臺農 67 號、臺粳 8 號、臺農 71 號，和臺中 191 號；私稻：臺中在來 1 號和臺中私 10 號，國外栽培之義大利的 OS4 和 IR64，以及低腳烏尖(低腳烏尖為 100 年前由烏尖突變而成，於明末清初時漢人帶來臺灣)、菜園種(400 年前臺灣當地已有種植的品種)，和陸稻雷槌、饒腰、林芒、白殼早仔、烏殼，分別測量 100~300 粒有殼與無殼稻米其長、寬、厚。本實驗室藉現生稻米和炭化稻米比較，用於探討當初由植物演變為作物馴化過程中，先民的選拔觀念、喜好和成效、與臺灣早期陸稻品種是否相似等。

三、結果與討論

應用 TILLING 檢視 TRIM-DNA 誘變水稻族群

本研究主要應用 TILLING (Targeting Induced Local Lesion In Genomes) 可以快速偵測點突變特性，篩選經 T-DNA 誘變的 TRIM (Taiwan Rice Insertion Mutants) 品系，在臘質基因上的體細胞變異率與變異的形式，並做相關的探討；並以 TILLING 了解台農 67 號和 Nipponbare 在臘質基因上的 SNP(Single nucleotide polymorphism)。

應用 TILLING 尋找台農 67 號和 Nipponbare 在臘質基因上的 SNP，結果兩品種在此基因上，並沒有多型性。應用 TILLING 在 200 個 TRIM T-DNA 水稻品系中，篩選臘質基因 (6297bp) 上的體細胞變異，共有五個突變品係再臘質基因序列上有變億，都是屬於核苷酸置換 (substitution)，五個突變都位在啟動子和 5'-UTR，對於基因並不會造成嚴重影響。本研究在 200 品系 x 15 單株 x 臘質基因 6297 bp = 18,891,000 bp 找到 5 個突變，突變率為 2.6×10^{-7} 。

碳化古米樣品的初步觀察

由中研院史語所於南科出土牛稠子文化遺址挖掘到水稻炭化種子，取得第一批約三千多年前牛稠子文化遺址出土的二十顆炭化稻穀，其稻穀幾乎已無殘留。使用光學顯微鏡初步觀察穀粒外觀形狀大小，無法分辨稻穀間的差異。利用水稻 *Japonica* 及 *Indica* 質體連鎖基因上 *rpl16* 與 *rpl14* 之間序列約 100bp 中，有一片段具核苷酸 CA 重複作為 PS-ID (Plastid subtype identity)。*Japonica* 具有 6C7A、7C6A 序列片段，*Indica* 具有 7C7A、8C8A、9C7A 序列片段。而且 63% *Indica* 葉綠體 DNA (cpDNAs) 在 Pst-12 片段 ORF-100 位置有缺失 69bp 序列，但是所有 *Japonica* 葉綠體 DNA 在 Pst-12 片段 ORF-100 位置沒有缺失 69bp 序列。利用此兩種不同序列特徵可以作為區分依據。先抽取炭化穀粒及對照組的現生水稻品種 (含秈稻與粳稻) 之質體 DNA，設計引子，使用聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 方法，進行將 *rpl16*

和 *rpl14* 基因之間片段序列與放大，PCR 產物用 agarose gel 進行電泳，結果現生水稻品種序列可以清楚看到條帶，但是炭化穀稻沒有條帶產生，再跑第二次 PCR 結果也相同。再用 PCR 方法將 Pst-12 片段 ORF-100 區域放大，PCR 產物用 agarose gel 進行電泳，結果亦相同。猜測可能沒有抽到炭化穀稻之 DNA，但是之後再重新進行抽取 DNA，進行 PCR，電泳結果仍然只能看到現生水稻 DNA 的條帶。

第二批取得約五千年前牛稠子文化遺址出土的九百八十顆炭化稻穀，重複使用 PCR 的方法，仍然沒有得到結果，猜測可能是殘留下來 DNA 含量很少或是已無遺留。使用光學顯微鏡觀察估計約有三分之一數量的穀粒仍有殘留稻殼。使用掃描式電子顯微鏡觀察部分仍有殘留稻殼之炭化稻穀，發現稻殼表面可以觀察到雙峰乳突，欲使用「水稻雙峰乳突鑑定法」進行判別，利用水稻雙峰乳突具有峰 (peak)、峽 (col)、凹 (depression)、谷 (valley) 和副突 (attached papilla) 等特徵，其可測量的數量性狀有雙峰距 (BPD)、峽深 (CD)、距/深比 (BPD/CD)、峰角度 (PA)、峽角度 (CA) 以及乳突縱距 (VD)、和基部橫寬 (HW) 等，再利用判別函數公式 $G(X) = 44.4788 - 0.4308 (BPD) - 0.4263 (PA) + 0.075 (BPD/CD)$ 進行判別。 $G(X)$ 得正值為 A 型 (Acute type) 雙峰乳突，多數為秈稻品種屬之； $G(X)$ 得正值為 O 型 (Obtuse type) 雙峰乳突，多數為粳稻品種屬之。判別準確率可達 95.58%。同時以判別函數的後驗概率 (Posterior probability) 作雙峰乳突演化程度指標，可將兩種雙

峰乳突類型分為混沌態（I型）、分化態（II型）和穩定態（III型）等三種演化狀態。但是所挑選出的稻穀之稻殼上雙峰乳突大部份磨損嚴重，效果不盡理想，難以精確測量，仍需進一步觀察是否有完整的雙峰乳突可以利用。

測量具有較完整外形之 586 粒炭化稻穀，平均粒長 4.01mm、粒寬 2.12mm、粒厚 1.57mm。長寬比 1.90mm（變異係數 9.17%），其粒型為短圓形。形狀變異幅度較大，粒長在 2.2mm—4.47mm 之間，粒寬在 1.45mm—2.65mm 之間，粒厚在 1.09mm—2.43mm 之間，長寬比在 1.18mm—2.62mm 之間。由穀粒形狀初步判別大部份可能為粳稻。

各文化層中炭化稻米的粒型特徵值

由測量結果可知南科的南關里遺址和右先方遺址的炭化稻米粒形較相似，短圓型居多，粒形整齊度高，推測當時先民可能已經有選種觀念。五間厝遺址稻粒的粒形變異大，粒形也較大、較厚，與爪哇稻相似，但是與南關里遺址和右先方遺址比較，則粒形差別很大，依照年代順序觀察粒形變化，呈現不連續性，推測蔦松文化時期的先民可能有遷移或交流貿易行為。臺中挖掘的惠來里遺址和南勢坑遺址的炭化稻米粒形整齊度相當高，推測當時先民已有選種觀念。

比較炭化稻米與現生稻米的測量結果，所有年層的炭化稻米粒形都較現生稻米小，並且大部份炭化稻米粒形與現生粳稻較為相似，為短圓形居

多。

本實驗室使用解剖顯微鏡觀察炭化稻米，大部份的稻殼與胚已無殘留。蔦松文化尚有少許炭化稻米有稻殼遺留，但是使用掃描式電子顯微鏡觀察稻殼上的雙峰乳突特徵，磨損很嚴重。另外，本實驗室取得惠來里遺址中的土塊，從土塊中自行挑出的炭化稻米，由於少了人為洗選過程的外力破壞，炭化稻米表面特徵保存較為完整。挑出的炭化稻米使用掃描式電子顯微鏡觀察，稻殼表面上有少數完整的雙峰乳突特徵可供觀察。使用雙峰乳突鑒定法判別目前所觀察到的雙峰乳突，推測惠來里遺址可能是粳稻品種。

目前只有初步的結果，還需繼續增加觀察與測量炭化稻米的數量，以增加準確度。日後還可由土壤中所殘留的稻桿、花粉和矽酸體等進行較多的生物實驗與化學分析，歸納出比較可信的結論來進行探討，以了解先民於幾千年前是否已開始著手選拔工作。藉此可推測植物漸漸轉變為作物之馴化過程，並將考古與農業領域之學術研究作密切的結合。

古生材料的相關胚乳特性將繼續分析探討。

四、計畫成果自評

本計畫原定的進度都在正常進行，古生材料的部分，成果之一已發表於「94年臺灣考古工作會報」，應用 TILLING 檢視 TRIM-DNA 誘變水稻族群的結果也已完成，預計寫出一至二篇文章，投到國外的雜誌。

五、參考文獻

- Beyer, Peter , Salim Al-Babili, Xudong Ye, Paola Lucca, Patrick Schaub, Ralf Welsch and Ingo Potrykus . 2002. Golden rice: Introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency1. *J. Nutr.* 132: 506S–510S
- Cheng C, Motohashi R, Tsuchimoto S, Fukuta Y, Ohtsubo H, and Ohtsubo E. 2003. Polyphyletic origin of cultivated rice: based on the interspersed pattern of SINEs. *Mol Biol Evol* 20:67-75.
- Chen, W-B., Nakamura, I., Sato, Y-I., and Nakai, N. 1994. Indica-Japonica differentiation in Chinese rice landraces. *Euphytica* 74: 195-201.
- Guiderdoni, E., G. An, S. M. Yu, Y. I. Hsing and C. Wu 2007. T-DNA insertion mutants as a resource for rice functional genomics. *Rice Functional Genomics*:181-221.
- Ishikawa R, Nakamura I, Nishihara T, Kikuchi M, Senda M, Akada S, Harada T, and Niizeki M. 2002. Origin of cytoplasm substituted rice cultivars found in Japan. *Theor Appl Genet* 105:608-613.
- Ishikawa R, Sato I, Tang T, and Nakamura I 2002. Different maternal origins of Japanese lowland and upland rice populations. *Theor Appl Genet* 104:976-980.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klo^oti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. & Potrykus, I. (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303–305.
- 張德慈等.1988.水稻對人類文明和人口增長的影響.農業考古.1988/1
- 張居中等.2004.淮河中游地區稻作農業考古調查報告.農業考古.2004/3
- 泥山 胜.1991.試論長江下游新石器時代的稻作和旱作.農業考古.1991/1
- 游修齡等. 1995.河姆渡稻穀研究進展及展望.農業考古.1995/1
- 劉軍.1991.河姆渡稻穀的啟示.農業考古.1991/1
- 嚴文明.1982.中國稻作農業的起源.農業考古.1982/1
- 河南省文物考古研究所.1999. 舞陽賈湖科學出版社
- 胡兆華.2000.人類發展的過去現在及未來-農耕、文化、生態.國立中興大學文教基金會出版社
- 龍虬莊遺址考古隊編著.1999.龍虬莊:江淮東部新石器時代遺址發掘報告.科學出版社