

水稻直鏈性澱粉突變體快速篩選法¹

鄭統隆² 林素月³ 曾東海² 王強生^{2,4}

摘 要

鄭統隆、林素月、曾東海、王強生。2005。水稻直鏈性澱粉突變體快速篩選法。台灣農業研究 54:103-112。

本試驗使用台農 67 號(TNG67)經疊氮化鈉誘變所得的低(7%)、高(30%)直鏈性澱粉含量的突變體，及直鏈性澱粉含量非純系之突變體 SA0404 為材料，並以中直鏈性澱粉含量(20%)之誘變親台農 67 號為對照品種，建立單粒米及半粒米之直鏈性澱粉測定方法，此方法節省人力。利用此方法不但可加速將突變體 SA0404 純化為直鏈性澱粉純系，且可應用於一穗內各穀粒間直鏈性澱粉含量變化之探討。本研究也確立同一米粒之頂端與基部之直鏈性澱粉含量並無明顯差異，不含胚之頂端可以代替開發為半粒米測定之代表，並建立半粒米之播種程序，更有助於追蹤並加速突變體之純化與篩選，及作為直鏈性澱粉特性之世代追蹤及加速品系選拔純化之相關研究用。

關鍵詞：水稻、直鏈性澱粉、突變體。

前 言

人類栽培水稻以收穫稻米為主要目的，所以米質之特性常為決定品種優劣之主要因素之一。影響米質之因素很多，如直鏈性澱粉(amylose)含量之高低。直鏈性澱粉含量之高低對澱粉特性有很大之影響，已知直鏈性澱粉含量會影響稻米之烹煮、食味及加工等性質(Juliano *et al.* 1965; Sano 1984; Kunihiro *et al.* 1993)。高直鏈性澱粉造成飯粒之柔軟度、黏著度、色澤、光澤等食味性質之下降；在化學特性上，它會提高糊化溫度及加速米粒澱粉之老化(Juliano *et al.* 1965)，所以直鏈性澱粉含量常被用來作為米質之指標。米質之定義眾說紛云，蓋每個人對米質之要求不一致，不同之米質可滿足不同國人之需求，不同直鏈性澱粉所決定不同之米粒特性，可提供各式各樣之食品加工及工業利用。

Satoh & Omura (1981)以 MNU (N-methyl N-nitrosourea)誘變劑處理水稻 Kinmaze 品種，及以 EMS (ethylmethane sulphonate) 誘變劑處理 Sasanishiki 品種，獲得幾個直鏈性澱粉之突變種，包括高直鏈性澱粉、糯性(waxy)、直鏈性澱粉擴增(amylose extender)及糊狀(dull)等突變體。利用這些突變體研究發現：控制直鏈性澱粉含量之基因，除了主要受結合性澱粉合成酵素(granule-bound starch synthase; GBSSI)控制外(Ball *et al.* 1998)，仍受澱粉分支酵素(starch branching enzyme; SBE)及 *du* 基因之調控

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2229 號。接受日期：94 年 7 月 28 日。

2. 本所農藝組助理研究員、助理研究員、研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。

3. 弘光科技大學食品營養系助理。臺灣 臺中縣 沙鹿鎮。

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

(Mizuno *et al.* 1993; Yano *et al.* 1988; Sano 1985)。此外，穀粒充實期間之氣溫(Umemoto *et al.* 1995)及穀粒穗內著生位置之差異(Matsue & Ogata 1999; Umemoto *et al.* 1994)，也會影響直鏈性澱粉含量。

農業試驗所農藝系分子遺傳研究室，利用疊氮化鈉誘變劑(NaN_3)誘變水稻台農 67 號所得突變庫中，篩選獲得不同直鏈性澱粉含量、米粒外觀及不同澱粉合成速率之突變品系(Wang *et al.* 2002)，是探討影響直鏈性澱粉含量與米質關係、及直鏈性澱粉合成之生理、遺傳與功能性基因等研究之最佳材料。所以針對突變庫之篩選、遺傳分析、特殊分離篩選、雜交後代篩選等工作，為必需著力進行的，然而直鏈性澱粉分析樣品數量相當龐大，極需開發簡便節省人力及有效之分析方法來進行篩選突變庫大量樣品。以往直鏈性澱粉之分析多參照 Juliano(1981)之方法測定，其方法以混合米為主，無法精確得知單一米粒之含量，對分析結果判讀容易產生偏差，對於分離族群個體之篩選及遺傳分析較為不利(Kumar & Khush 1987)，且其所需使用的樣品量約 5 粒以上米粒之混合，較單粒米多。近年來國人亦有使用單粒米測定直鏈性澱粉之報告(廖 1998; 許 1994)，但其測定並未與混合米測定作比較，為達到單粒米之測定值相同於混合米測定，測定程序適用於大量之樣品數，且該測定之單粒米能繁衍下一代，以達追蹤及加速世代純化之目的。本試驗將比較不同單粒米及半粒米之直鏈性澱粉測定方法，以符合混合米之標準及追蹤並加速突變體之純化與篩選，及建立半粒米繁殖程序，作為直鏈性澱粉特性之世代追蹤及加速品系選拔純化之相關研究用。

材料與方法

本試驗使用台農 67 號經疊氮化鈉誘變所建立之突變庫中，篩選得到已純化的低、高直鏈性澱粉含量之突變體 SA0419(7%)、SA0418(30%)(Wang *et al.* 2002)，及直鏈性澱粉含量非純系之突變體 SA0404 為材料，並以中直鏈性澱粉含量(20%)之誘變親台農 67 號為對照品種。

本試驗之材料均種植在台中縣霧峰鄉農業試驗所試驗農場。水稻種子播種於秧田，3 葉齡移植插秧於本田，行株距為 30×15 cm，單本植，一期作肥料用量 N : P_2O_5 : K_2O 為 130 : 54 : 60 kg/ha，分基肥與三次追肥施用；二期作氮肥減少 10kg，追肥分二次施用。其他管理按水稻慣行栽培法為之。

收穫成熟期之穀粒烘乾至含水率為 14% 左右，以脫殼機(Satake THU358，日本)脫殼，並以 Kett 小型精米機精米，精米時間設定為 40 秒。試驗樣品分為混合米、單粒米及半粒米等不同處理，半粒米則以解剖刀將全粒糙米均分為頂端(distal)及含胚之基部(proximal)等兩部份。混合米則以粉碎機(佑崎牌，台灣)將 5 g 白米磨成粉末，篩選小於 60 mesh 之粉末，依 Juliano(1981)之方法測定米粒直鏈性澱粉含量。稱取 0.1 g 樣品，加入 2.5 ml 水及 2.5 ml 2N NaOH，在 40°C 下作用 2 小時，並間歇振盪以充分混合。定量至 50 ml，取 0.5 ml 樣品，加入 4.5 ml 水、1N 0.1 ml 醋酸、0.2 ml 碘液，室溫下作用 30 分鐘後，以 Hitachi U-2000 型光電比色計測 620 nm 及 520 nm 之吸光值。用從白米純化的直鏈性澱粉作標準曲線，以計算直鏈性澱粉含量及 $\text{O.D.}_{620}/\text{O.D.}_{520}$ 比值。由以上方法可將直鏈性澱粉之測定分為澱粉膠化及碘液反應兩個步驟，單粒米之測定只在澱粉膠化方法之改變，其方法分為 3 種，方法 1：單粒米直接浸泡在 1 ml 1 N NaOH 溶液中，隔夜後震盪至完全膠化；方法 2：單粒米浸泡在 0.5 ml 水後，於 100°C 水浴中煮 60 分鐘，再加入 0.5 ml 1 N NaOH，震盪至完全膠化；方法 3：單粒米先以研鉢磨細，在 1 ml 1 N NaOH 溶液中作用 2 天。以上 3 種方法均定量至 10 ml，其後進行與混合米相同之碘液反應定量。半粒米之測定同單粒米分析之方法 3 進行。

含胚半粒糙米之播種分為種子消毒、播種及移植等 3 個步驟。種子之消毒以無菌水、75% 酒精、3% NaOCl 等液體依序消毒後，在無菌操作台將種子播入無菌洋菜膠培養基中，光照下發芽，當幼苗

發育至 10cm 左右，移植至含珍珠石及蛭石各一半的無菌盒內馴化，馴化溫度為 22.5°C。馴化完成後移植至含土壤之培養盆，其後則按水稻一般栽培方法管理。

試驗採用完全逢機設計(CRD)，3 重複。所得資料經變方分析後，若處理間差異顯著，則以 LSD(Fisher's Least Significant Difference test)測驗法比較處理間平均值之差異。

結 果

單粒米的不同膠化處理，所測到之直鏈性澱粉含量及 $O.D_{.620} / O.D_{.520}$ 比值會有差異(圖 1A 和 1B)。方法 1 及 2 的直鏈性澱粉含量及 $O.D_{.620} / O.D_{.520}$ 比值均比混合米測值低，尤其台農 67 號及 SA0418 的方法 2 測值最低；無論低、中或高直鏈性澱粉之米粒，方法 3 的直鏈性澱粉含量及 $O.D_{.620} / O.D_{.520}$ 比值的測值與混合米測值無明顯差異(圖 1A 和 1B)。

利用混合米測定方法，水稻疊氮化鈉突變體 SA0404 判定為高直鏈性澱粉(約 26.5%)的突變體。但利用單粒米測定時發現突變體 SA0404 仍未完全純化，單粒米之直鏈性澱粉含量明顯分為 20% 及 28% 兩個族群(圖 1C)。

由單粒米之測試結果，將 SA0404 的直鏈性澱粉含量為 20% 和 28% 兩族群分別各種植 1 個品系，定名為 SA0404.1 和 SA0404.2，以進行純化。在 SA0404.1 品系後代族群中，隨機測定 2 個品系(定名為 SA0404.1.1 及 SA0404.1.2)之一穗各單粒米的直鏈性澱粉含量，結果發現 SA0404.1.1 品系之直鏈性澱粉含量介於 15.4%~24.5% 之間(圖 2A)，SA0404.1.2 品系則介於 14.0%~22.6%(圖 2B)之間。一穗各單粒米直鏈性澱粉含量之平均值常等於混合測試之結果(Webb *et al.* 1979)，雖然這兩個品系之平均值均約為 20%，以混合米測定法判定似為已純化之品系。單粒米測值則發現其中尚有 24.5% 高直鏈性澱粉含量之後代(圖 2A)，另雖只有一粒高直鏈性澱粉之後代，但其直鏈性澱粉含量分佈之範圍也有 8%(14%~22.4%)之多，且一次枝梗穀粒之直鏈性澱粉含量高於二次枝梗(圖 2)。

進一步分析 28% 高直鏈性澱粉 SA0404.2 品系之後代：SA0404.2.1 及 SA0404.2.2，其一穗各單粒米之平均值均屬於高直鏈性澱粉(27.4% 及 25.1%)(圖 3)。但單粒米測值仍發現有 20% 之後代，且兩品系之分離情形有差異，更意外的是，SA0404.2.1 品系中有一粒 9.9% 近糯化之後代(圖 3A)。高直鏈性澱粉之分離，再經一代之篩選已得到純化之品系。

單粒米測定方法也可利用於半粒米之測定，且無論低、中或高直鏈性澱粉含量之米粒，在同一米粒之頂端與基部之直鏈性澱粉含量並無明顯差異(圖 4)。在半粒米播種方面，發現半粒米因為切割而呈受傷狀態，容易感染病原菌，種子及培養介質之消毒就顯得特別重要，若消毒不完全，將種子播種於土壤介質中，雖發芽初期植株可以生長良好(圖 5A)，但後期容易因病原菌侵入而死亡。若將種子發芽於無菌之洋菜膠介質上，幼苗可順利生長，待長至約 10 公分時(圖 5B)，可移植馴化 2 星期後種植於一般土壤中正常生長至成熟(圖 5C)。種子播種於透明洋菜膠上，同時也可觀察根部發育之變異(圖 5A)，並發現具有紫色根之突變體(圖 5B)。

討 論

支鏈性澱粉及直鏈性澱粉加碘液後，分別在 520 nm 及 620 nm 有最大吸光值，所以劉(1988)建議 $O.D_{.620} / O.D_{.520}$ 值也可作為澱粉膠化程度及直鏈性澱粉含量測定之參考。當澱粉膠體溶出較多直鏈性澱粉時， $O.D_{.620} / O.D_{.520}$ 值會較高，洪(2003)也認為直鏈性澱粉較高者， $O.D_{.620} / O.D_{.520}$ 值則較高。本試驗方法 2 之直鏈性澱粉測值及 $O.D_{.620} / O.D_{.520}$ 值均最低(圖 1A 和圖 1B)，顯然膠化不完全會影響

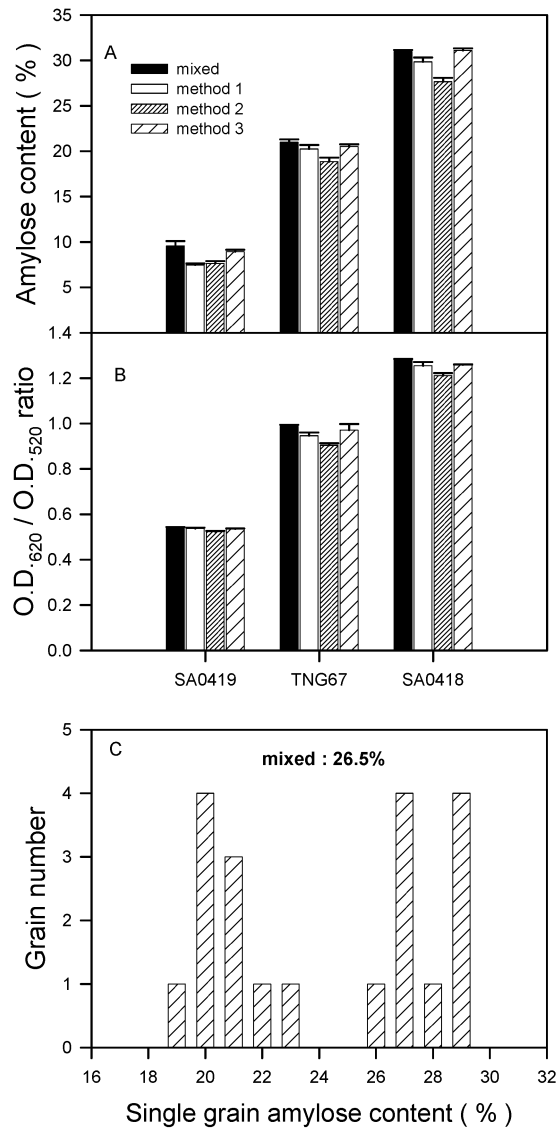


圖 1. 水稻混合米(mixed)及單粒米(single grain)直鏈性澱粉含量(A 和 C)和 O.D.₆₂₀ / O.D.₅₂₀ 比值(B)之測定方法比較。SA0419 突變體(7%)、台農 67 號(20%)和 SA0418 突變體(30%)，及 SA0404 突變體(C)分別代表低、中、高直鏈性澱粉米粒及直鏈性澱粉含量待純化之品系。SA0404 突變體以單粒米直鏈性澱粉含量之分布表示，其混合米之直鏈性澱粉含量(mixed)為 26.5%。混合米及單粒米之 3 種分析方法詳述於材料方法。

Fig. 1. Differences of amylose content (A and C) and O.D.₆₂₀ / O.D.₅₂₀ ratio (B) between mixed rice grains and single grain in rice mutant SA0419 (7%), TNG67 (20%), SA0418 (30%) and mutant SA0404 (C) with low, middle, high and non-purified amylose content, respectively. The representation of mutant SA0404 is amylose distribution of single grain, and the amylose content of mutant SA0404 detected by mixed is 26.5%. The methods for amylose analysis in mixed and single-grain are described in "Material and Method".

直鏈性澱粉之測值。而方法 3 的測定方法最為簡便，將單粒白米粉末在 1N NaOH 下作用，期間並無任何處理，減少人力之耗費，廖(1998)和許(1994)之單粒米測定則將白米粉末在 100°C 水浴中煮 10 分鐘，然後置於室溫冷卻 30 分鐘，其膠化過程需人力之參與。方法 1 及方法 2 必須利用震盪器震盪至完全膠化，每一樣品震盪時間不定，若震盪不完全，則直鏈性澱粉測值會偏低，對於大量樣品需投入相當多人力。比較圖 1 及圖 4 單粒米直鏈性澱粉含量之測值，其差異相當小，所以方法 3 之再現性很高，應足以取代混合米之分析法。

單粒米測值可以得知每一粒米之直鏈性澱粉含量，對於雜交後代和突變庫之篩選及遺傳分析等試驗，有關直鏈性澱粉分離品系之變異分析及純化監測會有幫助。單粒米之直鏈性澱粉測試分法不但可檢測穗內之變異(圖 2 及圖 3)，檢查突變庫或雜交後代之純化情形，及其分離情形、分布現象，更可以做為直鏈性澱粉遺傳分析之工具。以往有關直鏈性澱粉之分析均使用混合米之方式檢測，探討直鏈性澱粉遺傳時，必須以次一代測值作為上一代之推估值，往往會產生偏差(Kumar & Khush 1987)，利用本研究之單粒米測試方法將可減少其偏差，並獲得當代之結果，加速突變體 SA0404 朝預定方向

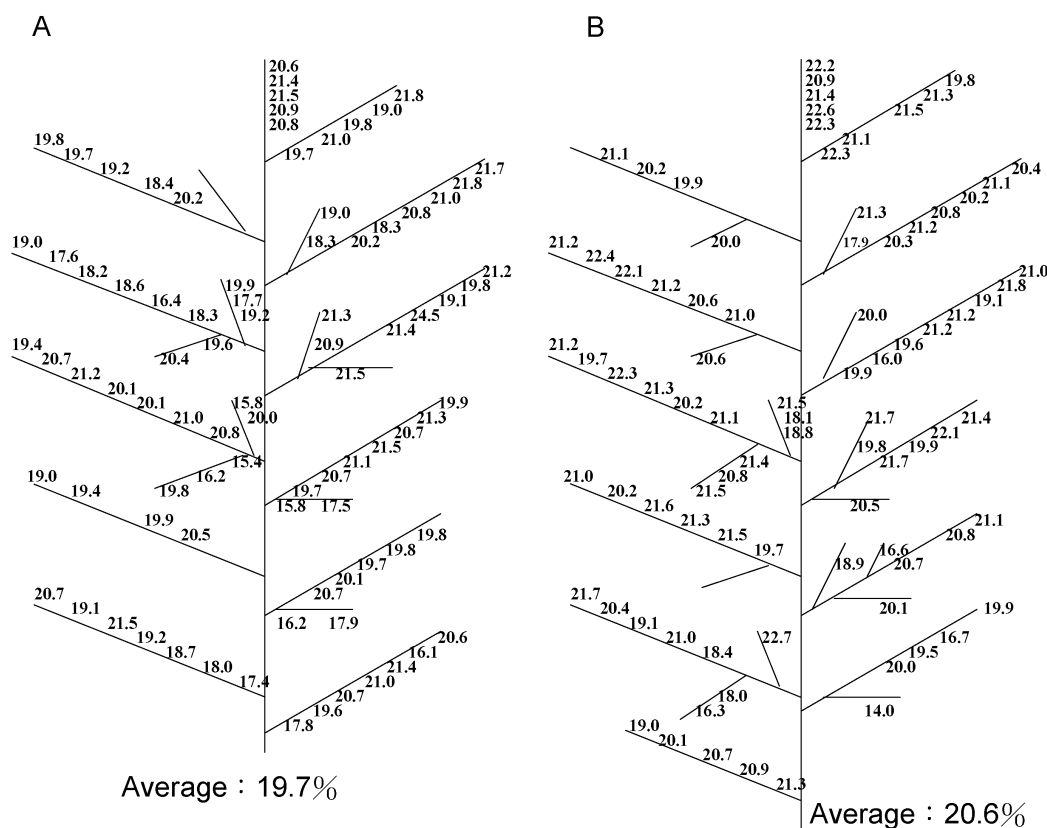


圖 2. 水稻突變體 SA0404.1 (20%直鏈性澱粉) 後代之 2 品系：SA0404.1.1 (A) 和 SA0401.1.2 (B)，其一穗內各結實米粒利用單粒米分析方法所測得之直鏈性澱粉含量分布圖。

Fig. 2. Distribution of grain amylose content measured by single-grain method for each grain on a panicle of mutants line SA0401.1.1 (A) and SA0401.1.2 (B) descended from SA0404.1 (20% amylose).

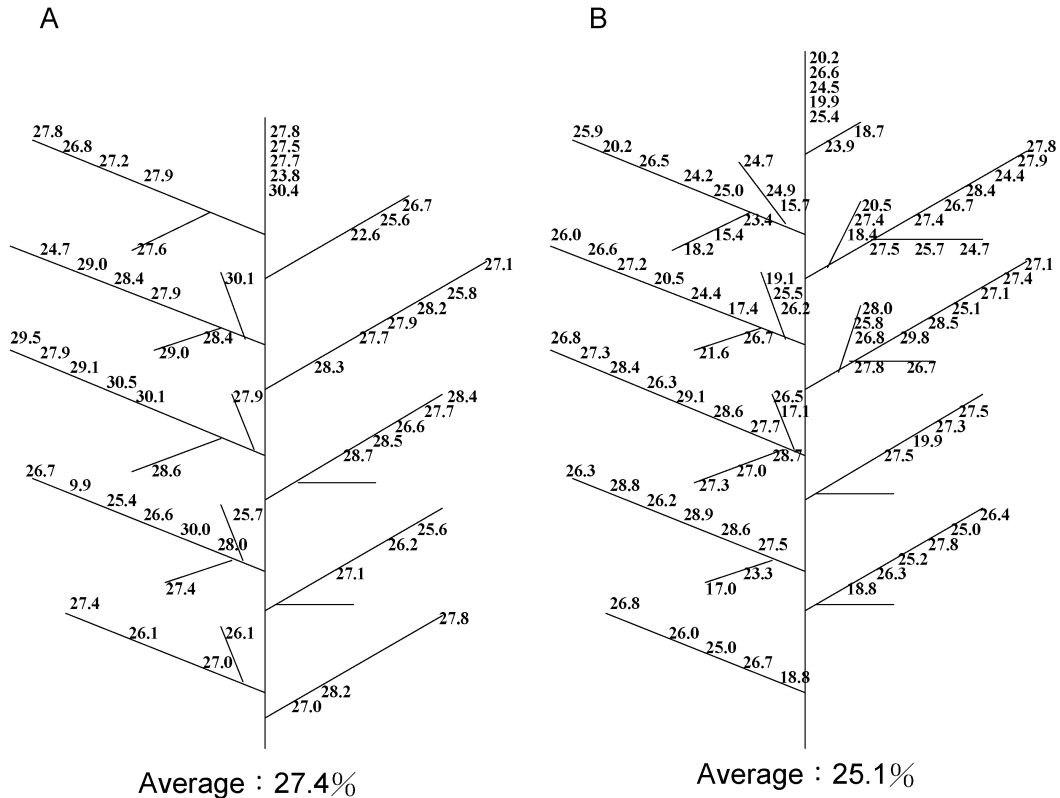


圖 3. 水稻突變體 SA0404.2 (28%直鏈性澱粉) 後代之 2 品系：SA0404.2.1 (A) 和 SA0404.2.2 (B)，其一穗內各結實米粒利用單粒米分析方法所測得之直鏈性澱粉含量分布圖。

Fig. 3. Distribution of grain amylose content measured by single-grain method for each grain on a panicle of mutant line SA0404.2.1 (A) and SA0404.2.2 (B) descended from SA0404.2 (28% amylose).

純化。而水稻一穗內各穀粒之直鏈性澱粉含量的變異，有可能來自穗內結構之差異(Matsue & Ogata 1999)，造成一次枝梗穀粒之直鏈性澱粉含量高於二次枝梗穀粒(Umemoto *et al.* 1994)；另也可能來自遺傳物質之差異，有趣的是，突變體 SA0404 有相當多為 14%~16%之後代(圖 2)，可能具有優良米質之潛力，值得進一步純化追蹤

單粒米測定法雖可測到單粒米之直鏈性澱粉含量，但該單粒米已無法以正常方式進行繁殖，所以用單粒米之頂端部位做為直鏈性澱粉之測定，基部仍可以進行繁衍。因此半粒米測定之方法必須建立，且單粒米頂端及基部二者之直鏈性澱粉含量是否有差異，也必須釐清。由試驗之結果顯示，不含胚之頂端可以代替開發為半粒米測定之代表；本試驗亦已建立半粒米之直鏈性澱粉測定方法及播種程序(圖 4 及圖 5)，將更有助於直鏈性澱粉突變體之純化速度。

總而言之，欲進行水稻米粒之直鏈性澱粉含量的穗內變異、突變庫及雜交後代之純化、異常分離及遺傳分析等試驗，單米粒測定為最佳之分析方法，而本研究提出節省人力且有效之方法，可應用於大量樣品之試驗。而半粒米之直鏈性澱粉測定方法及播種程序之建立，更有助於以上試驗之進行。

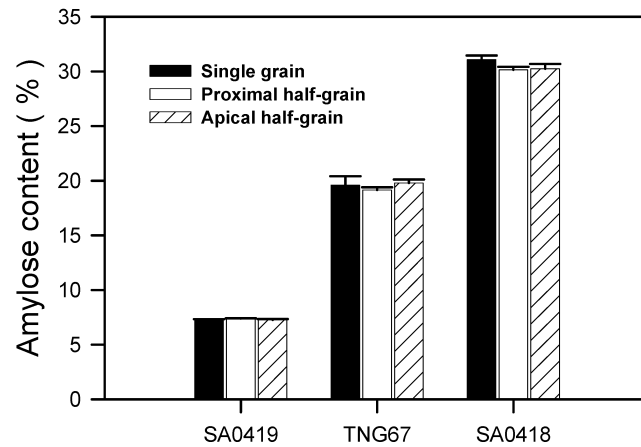


圖 4. 水稻單粒米(single grain)及基部(proximal)和頂端(distal)半粒米直鏈性澱粉含量測定之比較。突變體 SA0419(7%)、台農 67 號(20%)和突變體 SA0418(30%)分別代表低、中、高直鏈性澱粉米粒。

Fig. 4. Comparison of amylose content in single grain, proximal and distal half of rice grain in rice mutant SA0419 (7%), TNG67 (20%) and SA0418 (30%) with low, middle and high amylose content, respectively.

引用文獻

- 洪梅珠。2003。米飯食味品質與澱粉特性間相關之研究(二)。台中區農業改良場研究彙報 79: 41-50。
- 許愛娜。1994。稻米品質理化性質之研究。農藝學系博士論文。國立中興大學。台中市。193 pp。
- 劉慧瑛、林禮輝、宋勳、洪梅珠。1988。不同稻米品種之食用與化學性質之關係。p.76-90。稻米品質研討會專集。台中區農業改良場編印。彰化。
- 廖久薰。1998。水稻品種 Pokhareli 直鏈性澱粉含量之遺傳研究。農藝學系碩士論文。國立中興大學。台中市。52 pp。
- Ball, S. G., M. H. B. J. van der Wal, and R. G. F. Visser. 1998. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends Plant Sci.* 3(12): 462-467.
- Juliano, B. O., C. M. Perez, A. B. Blakeney, T. Castillo, N. Kongseree, B. Laignelet, E. T. Lapis, V. V. S. Murty, C. M. Paule, and B. D. Webb. 1981. International cooperative testing on the amylose content of milled rice. *Stärke* 33:157-162.
- Juliano, B. O., L. U. Onate, and A. M. del Mundo. 1965. Relation of starch composition, protein content, and gelatinization temperature to cooking and eating qualities of milled rice. *Food Technol.* 19:1006-1011.
- Kumar, I. and G. S. Khush. 1987. Genetic analysis of different amylose levels in rice. *Crop Sci.* 27:1167-1172.
- Kunihiro, Y., Y. Ebe, N. Shinbashi, H. Kikuchi, H. Tanno, and K. Sugawara. 1993. A new paddy rice variety with good eating due to low amylose content developed by anther culture breeding. *Jpn. J. Breed.* 43:155-163.

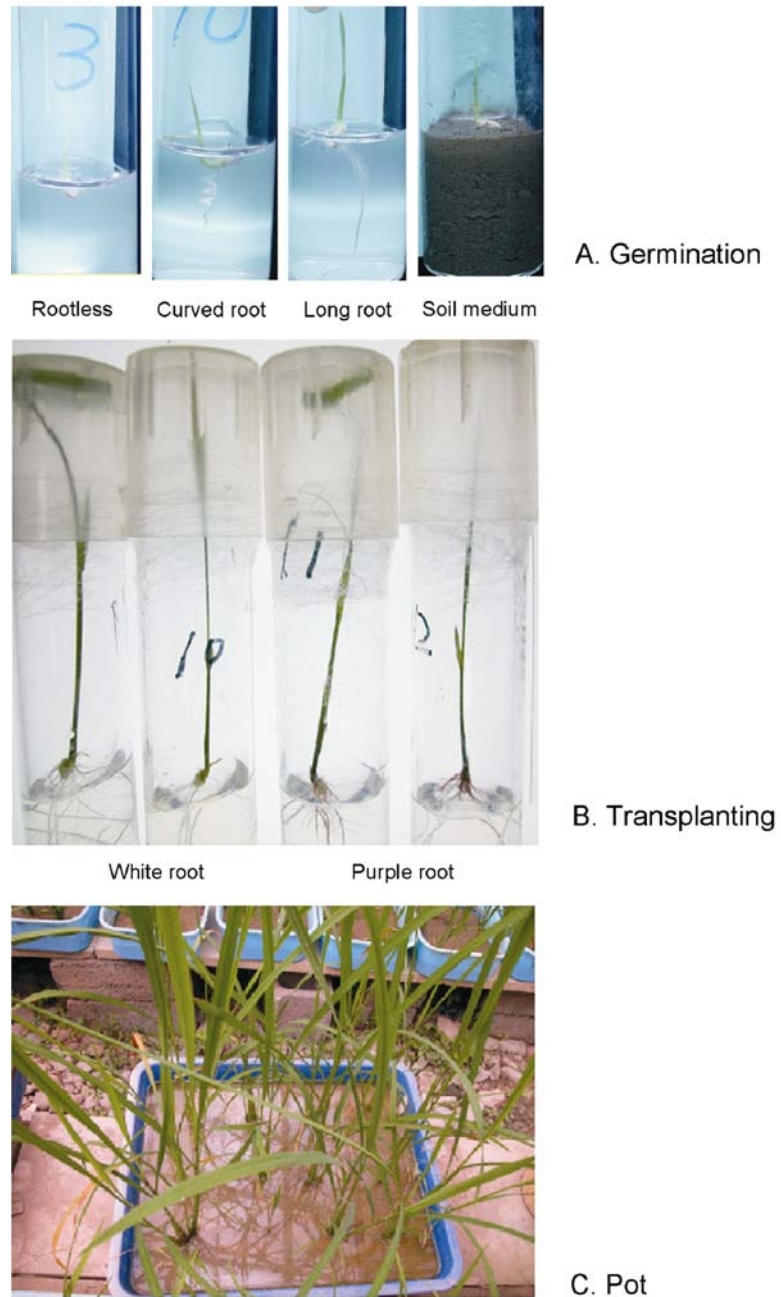


圖 5. 水稻含胚之半粒米的播種育苗流程。流程分為發芽初期(A)、移植期(B)及盆栽期(C)，發芽之介質可分為無菌洋菜膠或消毒之土壤，盆栽之介質則為一般水田壤土。

Fig. 5. The three steps for growing embryo-containing half rice grain: (A)germination in culture tube, (B)transplanting, and (C) pot cultivation. The medium used for germination step was sterilized agar or sterilized soil then the seedlings were transplanted to the pot tilled with paddy soil.

- Matuse, Y. and T. Ogata. 1999. Influences of environment conditions on the amylose content of grain at different positions in a rice panicle. *Jpn. J. Crop Sci.* 68:495-500.
- Mizuno, K., T. Kawasaki, H. Shimada, S. Satoh, E. Kobayashi, S. Okumura, Y. Arai, and T. Baba. 1993. Alteration of the structural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. *J. Biol. Chem.* 268:19084-19091.
- Sano, Y. 1985. Gene regulation at the *waxy* locus in rice. *Gamma Field Symposia.* 24:63-79.
- Sano, Y. 1984. Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 68:467-473.
- Satoh, H. and T. Omura. 1981. New endosperm mutations induced by chemical mutagens in rice, *Oryza Sativa* L.. *Jpn. J. Breed.* 31:316-326.
- Umemoto, T., Y. Nakamura, and N. Ishikura. 1995. Activity of starch synthase and amylose content in rice endosperm. *Phytochemistry* 40(6):1613-1616.
- Umemoto, T., Y. Nakamura, and N. Ishikura. 1994. Effect of grain location on the panicle on activities involved in starch synthesis in rice endosperm. *Phytochemistry* 36:843-847.
- Wang, C. S., T. H. Tseng, and C. Y. Lin. 2002. Rice biotech research at the Taiwan Agricultural Research Institute. *APBN.* 6:950-956.
- Webb, B. D., C. N. Bollich, T. H. Johnston, and W. O. McIlrath. 1979. Components of rice quality: their identification, methodology, and stage of application in United States breeding programs. p. 191-205. *in: Proc. Workshop on Chemical Aspects of Rice Grain Quality.* Int. Rice Res. Inst., Los Banos, Philippines.
- Yano, M., K. Okuno, H. Satoh, and T. Omura. 1988. Chromosomal location of genes conditioning low amylose content of endosperm starches in rice, *Oryza sativa* L.. *Theor. Appl. Genet.* 76:183-189.

A Fast Method for Screening Amylose Mutant Rice¹

Toong-Long Jeng², Su-Yue Lin³, Tong-Hai Tseng² and
Chang-Sheng Wang^{2,4}

Summary

Jeng, T. L., S. Y. Lin, T. H. Tseng, and C. S. Wang. 2005. A fast method for screening amylose mutant rice. *J. Taiwan Agric. Res.* 54:103-112.

Rice grains with various amylose contents from low(7%)、high(30%)and varied (non-purified) amylose mutants, as well as from their original variety, TNG67(20%), were applied in this study. A method with less labor cost for amylose analysis on a single grain and half grain is developed in this study. The distribution of amylose in grains of all spikelets on a panicle could be detected and planted to the next generation for further analysis, and a non-purified segregating mutant, SA0404, was quickly screened and purified by this method. Besides, our investigations found that there is no difference in amylose content between distal and proximal part of a single rice grain. In this report, a fast and reliable method for analyzing amylose content and plant growing system on a single rice grain was developed that will benefit to improve rice quality related amylose content.

Key words: Rice, Amylose, Mutant.

-
1. Contribution No.2229 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: July 28, 2005.
 2. Respectively, Assistant Agronomist, Assistant Agronomist and Senior Agronomist, Agronomy Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Research Assistant, Food Science and Nutrition Department, HungKuang University, Sha-Lu, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: cswang@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23302806.