

出國報告（出國類別：考察）

# 赴菲律賓國際稻米研究所 參訪水稻逆境之研究

服務機關：臺東區農業改良場

姓名職稱：連苡廷助理研究員

郭丞恩助理研究員

派赴國家/地區：菲律賓

出國期間：113年10月13日至10月19日

報告日期：113年12月

## 摘要

近年來氣候變遷影響加劇，極端氣候影響水稻產量及品質的表現，對於水稻非生物性逆境耐受性與環境的相互作用機制研究成為重要課題。為因應水稻產業需求及氣候變遷的衝擊，研習耐逆境品種選育程序，並深化臺灣與國際稻米研究所（International Rice Research Institute, IRRI）之國際交流合作為本次考察計畫的主要目的。本計畫以乾旱及高溫兩種逆境為探討目標，主要參訪對象為 Amelia Henry 博士及其研究團隊，Amelia 博士研究領域為逆境生理學，包含乾旱、鹽分、高溫等逆境及水稻直播，藉由篩選耐逆境品種並調查性狀差異，建立合適的篩選指標。研習重點包含：了解性狀與耐逆境表現之關聯性及各品種（系）對逆境表現，並參訪高溫、乾旱試驗田及耐鹽品種育種田；除逆境相關試驗外，同時也參訪加速世代推進設施及進行分子標誌設計實習，提升選拔效率並縮短育種年限。藉由討論上述議題與實務操作，交流彼此觀點及知識，拓展研究視野，期望降低氣候變遷對稻作生產的危害與衝擊。

## 目次

壹、	目的.....	4
貳、	出國人員.....	4
參、	出國行程.....	5
肆、	研習過程.....	6
一、	耐旱研究建置及性狀調查.....	6
二、	高溫研究建置及性狀調查.....	7
三、	耐鹽品種篩選及育種程序.....	9
四、	數量性狀基因座定位.....	11
五、	分子標誌設計.....	11
六、	數位記錄工具- Field book.....	12
七、	國際稻米基因庫.....	13
八、	加速世代推進技術及設施.....	15
伍、	心得與建議.....	17
陸、	誌謝.....	18

## 壹、目的

水稻逆境耐受性遺傳特性受環境影響大，建立篩選環境指標可提升育種選拔效率，瞭解各基因及環境交感作用之關聯性。然而，欲設置有效的篩選田圃須配合精確的環境條件監控、合適的生育時期及目標性狀的選定，這也是逆境品種育成的困難之處。

本次參訪目標為乾旱及高溫兩種逆境，乾旱逆境為影響稻米生產的主要因素之一，目前國內水稻乾旱耐受性育種進展有限，除耐旱品種欠缺外，因其抗性調控機制複雜，造成育種選拔困難。高溫逆境在水稻各階段生育期造成不同程度的影響，包含秧苗的生長勢、抽穗期花粉活性，以及穀粒充實期米粒充實過程，皆會影響品質及產量。參訪內容包含逆境篩選田圃建置及環境控制、取得耐逆性種原資訊、耐逆境性狀調查、探討逆境數量性狀基因座定位相關內容及研究成果交流。

## 貳、出國人員

連苡廷助理研究員/臺東區農業改良場

郭丞恩助理研究員/臺東區農業改良場

### 參、出國行程

日期	行程
10月13日 (日)	臺灣(桃園國際機場)→菲律賓(馬尼拉機場)→ 轉乘 IRRI 專車至 IRRI
10月14日 (一)	Welcome and security orientation Presentation on drought stress screening and measurements Presentation on digital data collection with Field Book app Gene bank visit
10月15日 (二)	Stress physiology experiment visit Hands-on drought activities Grain quality lab visit
10月16日 (三)	Presentation on heat screening Heat-related field and lab activities Rice breeding innovation seminar by Dr. Katherine Steele, University of Bangor
10月17日 (四)	Drought tolerance QTL mapping Speed breed facility (SBF) tour Rapid generation advance (RGA) facility visit Development and design of molecular auxiliary markers Rice breeding innovation seminar by Dr. Camilla Pinelli, UADA
10月18日 (五)	Visit farmer's field in Infanta
10月19日 (六)	搭乘 IRRI 專車至馬尼拉機場 菲律賓(馬尼拉機場)→臺灣(桃園國際機場)

## 肆、研習過程

### 一、耐旱研究建置及性狀調查

乾旱篩選田中，重要的環境參數如降雨量、土壤含水量、土壤水勢須特別留意，各項參數留意的重點分別為：(一) 降雨量除氣象站資料外，可同時設置簡易雨量計監控；(二) 土壤含水量依土壤質地及深度造成數值差異；(三) 土壤水勢以土壤張力計進行記錄，較不容易受土壤質地影響，但同樣會受到土壤深度造成數值差異，並留意栽培環境的一致性，可透過繪製土壤圖選定均質田區進行試驗。

環境參數建立後，接著選擇生育時期及設定篩選壓力，IRRI 團隊研究方向著重於生殖生長期的乾旱逆境，同時進行田間及盆栽兩種試驗，研究團隊考量田間遇到乾旱逆境時，多為造成產量損失，而非造成植株死亡，規劃試驗時期望盡量符合一般栽培容易發生的情況，因此篩選壓力設定為當土壤 30 公分深達 -65 kPa 時，進行土表灌溉或灑水裝置灌溉，避免植株全株死亡，並使用產量構成要素及減產表現作為篩選指標；而盆栽試驗則不設置張力計，以整個盆栽秤重的方式對土量及灌水量進行定量。

試驗調查耐旱性狀包含：植冠溫度 (圖 1A)、單株莖乾種、分蘖數、冠根數 (圖 1B)、根系型態及長度 (圖 1C)、氣孔密度及葉片水勢 (圖 1D)，其中根系型態及長度測定須特別留意，樣品依土壤深度進行分類，以直徑 4 公分、長度 60 公分的取樣鐵管插入同品種四株植株之間土壤取樣，60 公分的土壤樣品每 15 公分樣品分為四袋進行後續分析。另外不同參數間可能有明顯交感作用，例如：當蒸氣壓差 (Vapor pressure deficit, VPD) 大於 1.5 kPa 時，氣孔密度和產量有顯著負相關；而小於 1.5 kPa 時兩者便沒有顯著相關性，在後續分析上需將交感作用納入考量。



圖 1、耐旱性狀調查(A)使用紅外線溫度儀測量植冠溫度；(B)計算冠根數；(C)取樣土面下 60 公分土壤，進行根系型態及長度測量；(D)使用氮氣加壓的方式測量葉片水勢

## 二、高溫研究建置及性狀調查

高溫逆境會使水稻迅速累積生育積溫度數，縮短營養生長，提早進入生殖生長期，且夜溫的提高對水稻影響較大。為營造高溫條件，IRRI 曾使用生長箱、高夜溫帳篷（6x3m）及遮雨設施建置高溫試驗，然不同試驗方式皆有其操作上的限制。例如生長箱無法進行大量試驗，也不符合田間情況；高夜溫帳篷容易遇到每個帳篷內部溫度不均，帳篷內二氧化碳量上升，且需要每日人工搭設及拆除（6pm-6am）；遮雨設施和乾旱使用相同的設備（圖 2），將四面的塑膠棚於 4pm-6am 關閉，可進行高夜溫試驗，而將塑膠棚於 6am-2pm 關閉，則可進行高日溫試驗，不需額外設置加熱器，但是設施造價昂貴，鳥害嚴重且高日溫試驗容易發生病蟲害。以上顯示高溫環境的建置不易，且尚未找到實際影響作物的確切溫度變化，加上學者指出耐高溫特性與耐旱相同，由複數性狀控制

耐逆性，導致耐熱基因定位也非常困難。



圖 2、高溫及乾旱試驗共用的遮雨設施

高溫試驗中控制的環境因子除了溫度之外，相對溼度（Relative humidity, RH）也需要特別留意，若 RH 太低，植物可透過蒸散作用調節溫度，若在生長箱進行可擺放水盆控制濕度。此外，學者的研究指出溫度處理之間的區別不能單看環境溫度，需注意蒸氣壓差（Vapor pressure deficit, VPD）的變化。VPD 是計算當下溫度的空氣水蒸氣含量相較於飽和水蒸氣壓的差異，當 VPD 較高時，空氣比較乾燥，會加速植物水分的蒸散；VPD 較低時，表示空氣接近飽和狀態，空氣中的水蒸氣含量較高，植物會減少水分的蒸散。

由於高溫研究通常著重對生育後期的影響，調查的性狀與耐旱實驗相似，包含花粉活性、氣孔密度、冠層溫度及產量等。本次高溫實驗室示範花粉活性的測試方法（圖 3），首先每品系於田間取 3 重複尚未開花的小穗，保存於 70% EtOH 攜回實驗室。每個小穗分別取樣 3 個穎花，將黃色的花藥取出，放置於滴有 ddH<sub>2</sub>O 的玻片上，再把花藥切碎使花粉釋出。接著，滴入 1% I<sub>2</sub>/KI 溶液染色花粉，蓋上蓋玻片後置於顯微鏡下觀察，有活性的花粉會呈現深紫色，沒活性則呈現淡咖啡色，再以 ImageJ 軟體計算花粉活性表現。





圖 3、花粉活性試驗(A)於田間取樣小穗；(B)將花藥取出切碎製作玻片樣本；(C) 顯微鏡下有活性花粉及沒活性花粉的呈色

### 三、耐鹽品種篩選及育種程序

鹽份積累為東南亞及非洲國家沿海農田常發生之逆境，本次參訪耐鹽品種育種田位於菲律賓東岸城市-Infanta，該地容易因颱風或潮汐發生嚴重的海水倒灌，造成植株死亡及產量損失。Waseem Hussain 博士將篩選田圃（圖 4）設置於此，並透過海水灌溉對地方品種（系）及種原庫中的材料進行篩選，田區內目前有 240 種品種（系）。

鹽份逆境在全生育期皆可能發生，因此各品種（系）自插秧後全生育期皆以鹽份環境進行篩選，僅在移植初期及種子收穫時使用正常水源灌溉。於播種後 50-55 天開始進行海水灌溉，每周測定田間灌溉水之電導度（EC），生育期間灌溉水的 EC 值約在 32-45 間，在插秧後約 100 天會恢復正常水源灌溉，以利耐性品系恢復生長勢並授粉產生種子。鹽份會隨著長期鹽水灌溉累積於土壤中，造成逆境高於試驗設定之篩選壓力，因此需要在每季整地後移植前，用正常水源進行灌溉排水，將土壤中多餘鹽份洗去，以保持試驗之穩定性。

Waseem 博士將雜交育種流程分為 2 個階段，並在田區中同時篩選兩個階段的育種品系。第一階段（stage 1）中進行兩種材料篩選，包含種原庫材料及耐

鹽親本後雜交後代，各個雜交後代先在設施中栽培加速世代推進，一年可以推  
進 3~4 個世代，雜交分離後代大約到 F<sub>5</sub>-F<sub>6</sub> 世代趨近穩定不再分離，再對這些品  
系進行耐鹽篩選，目的是為了使基因重組及聚合數個基因，進一步提升耐逆境  
表現；進入第二階段（stage 2）後，將 stage 1 篩選出之耐鹽品系作為供給親，  
和高產或具其他逆境耐受性品種雜交，育成具有耐逆高產或是兼具數種逆境耐  
性之品種，亦可將 stage 2 的材料用於 GWAS 分析或數量性狀基因座定位  
（QTLs mapping），進行基因功能性分析及分子標誌開發。



圖 4、位於菲律賓東岸城市 Infanta 的耐鹽品種篩選圃



圖 5、Amelia Henry 博士與在地農友對談了解當地水稻產業

#### 四、數量性狀基因座定位

本行程拜訪了 John Damien Platten 博士，John 博士專精於基因體學，和 Amelia 博士有密切合作，協助耐旱數量性狀基因定位（QTL mapping）研究。博士於會談過程中提到，目前的耐旱 QTL 多以逆境下產量或減產程度作為主要性狀，如 *qDTY* 系列，但產量受環境的影響很大，若使用 GWAS 進行分析容易因遺傳雜訊造成偽陽性，因此建議如果規劃以產量進行耐旱基因的定位需要增加分離族群數量，至少會需要 250 個分離族群，同時試驗中應增加重複減少環境變因；此外，性狀調查時需要對不同生育期分別進行調查，並在 QTL mapping 的過程，使用多種不同的輪迴親，同時導入抗性、中間型及敏感型品種中後再進行性狀分析，以減少誤判。

若想將 QTL 導入逆境敏感品種中以提升耐逆境表現，可能會因該品種遺傳背景影響 QTL 效果，導致不同的敏感品種導入效果不同。John 博士對這樣的現象提出一個假說，會造成這樣的原因並不是因為 QTL 沒有效果，而是因為該品種遺傳背景中已具有影響該性狀的等位基因，決定耐旱表現的是逆境下 QTL 或其等位基因的表現程度而非基因的有無，因此，若將 QTL 導入某些敏感品種並不會增加耐旱性，因為它原本就具有功能相近的等位基因。

為了減少這樣這種情況，導入 QTL 前先確定親本遺傳背景中沒有帶有該 QTL 或類似功能的等位基因，或是選擇各品種等位基因頻度低的 QTL 導入。

#### 五、分子標誌設計

所有分子標誌的設計皆基於不同品種間等位基因的序列差異，依不同序列差異類型，可分為 InDel、STS、SNP 三種，基於序列差異，可設計為多種不同類型判別標誌，如 RAPD、RFLP、AFLP、InDel、SSR、CAPS、dCAPS 及 tetra-arms 等不同判讀方法。RAPD、RFLP、AFLP 為早期判別法，目前已經很少人使用；InDel 及 SSR 在不同品種間擴增之產物大小不同，可利用電泳判別；CAPS 及 dCAPS 在擴增產物上具有酵素切點，PCR 後須經過限制酶作用後再以電泳判別。

判別分子標記的方法可分為膠體電泳及螢光標定兩種類型，膠體電泳需在 PCR 擴增後使用 agarose gel 或 polyacrylamide gel 進行電泳判別產物大小， agarose gel 解析度大約 8 bps，而 polyacrylamide gel 則為 1 bps，膠體電泳成本低廉，已被廣泛應用於分子輔助育種上；螢光標定為利用與不同序列差異互補之螢光探針，在 PCR 過程中依 allele 釋放不同種類的螢光，藉螢光的比例判斷對應之基因型，螢光標定法無須進行電泳，耗時更短，可有效提升判別效率。

欲進行分子標記的設計，首先須取得目標基因在不同物種間之序列，序列資料可在 NCBI 或 FTP sequence 上查詢，或設計通用引子擴增目標片段並定序，得到序列資料後可使用 RAP-DB 資料庫的 BLAST 功能比對該片段是否與過去研究中的染色體位點吻合。接著進行不同品種間序列比對，序列比對可使用 bioedit 或 clustalX 進行，較長序列（大於 30 kb）則使用 mVISTA 網站進行序列比對，根據序列比對結果，具 InDel 或 SSR 的序列差異依擴增產物大小進行引子設計，若為 SNP 差異則可設計為 SCAR 或 CAPS 等形式之標記。設計引子時，建議將差異位點置在 3' 尾端以提高專一性，設計完成後計算 GC 比例並推估 Tm 溫度，Tm 溫度可作為 annealing 溫度參考值，一般建議將引子的 GC 比例調整於 40-60% 之間，Tm 在 54-60 度之間。

## 六、數位記錄工具- Field book

隨著近年來數位育種成為國際間重要的農業研究政策，能夠減少勞力及時間的數位工具逐漸開發流通，成為農業試驗重要助力。本次 IRRI 學者分享一款專為農業研究人員設計的數位記錄工具—Field Book，適用於各種田間試驗和觀察紀錄。

Field Book 的介面操作簡單（圖 6），使用者可以依照試驗設計，自行設定觀測項目（如株高、分蘖數、病害程度等）與分類，也可以掃描 QR code 以便於田間直接記錄，有助於大規模數據蒐集。完成數據記錄後，可立即匯出 Excel 或 CSV 檔案，方便資料分享及分析，幫助遠端管理者整合多筆實驗數據。此外，傳統育種的田間調查往往依賴紙本記錄，耗費人力輸入且容易發生數據遺失及錯誤。數位記錄為更環保的解決方案，還大幅降低人為錯誤風險，提升數

據的精確性。

然而，此軟體使用上也有部分限制，需多加注意，包括此軟體限使用於 Android 系統的智慧型手機或平板，在野外長時間使用時，需攜帶備用電源。對於不熟悉數位工具的資料蒐集者，需要提前學習和適應操作。並且定期將數據備份至雲端或其他儲存裝置，以避免數據遺失。

Field Book 作為田間數據收集的數位工具，非常符合數位育種時代的需求，能加速育種決策過程和增強數據管理。它不僅可提升田間數據記錄的效率，還能幫助研究者進行分子標記與田間性狀的關聯分析，為農業研究工作中實用的輔助工具。

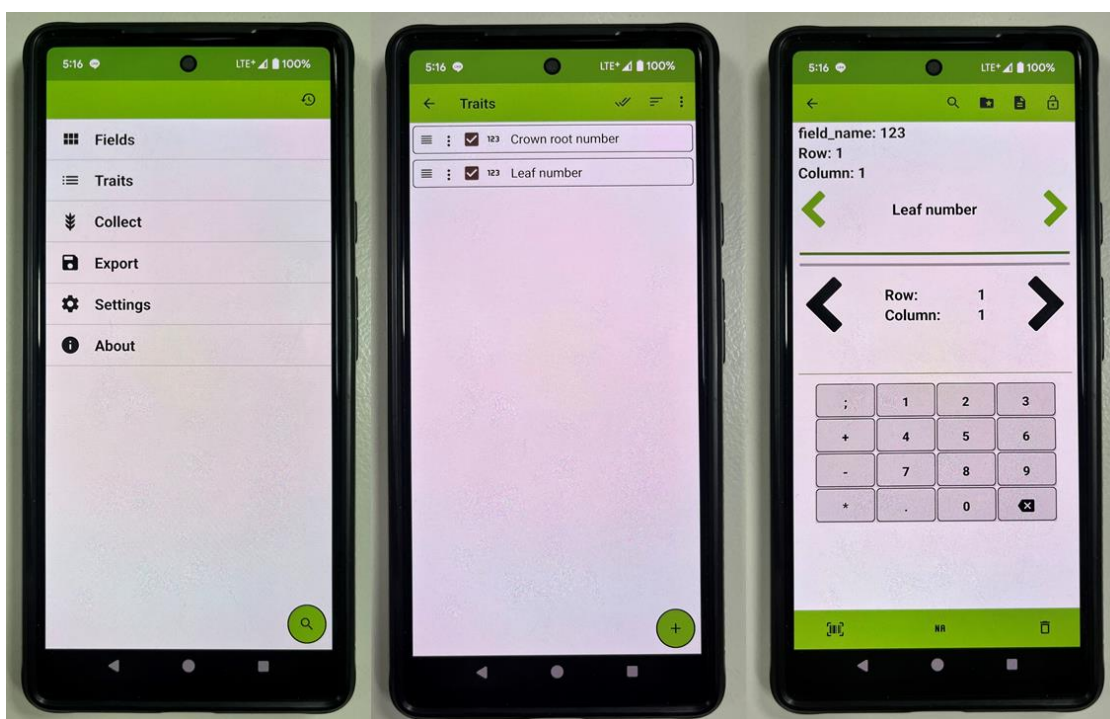


圖 6. Field Book 的操作介面（軟體下載網址：<https://reurl.cc/ky4Nlb>）

## 七、國際稻米基因庫

IRRI 的基因庫是目前全球最大的水稻遺傳多樣性儲藏中心，擁有超過 132,000 個水稻種質資源。這個基因庫始建於 IRRI 創立初期，且特別以臺灣稻米專家張德慈博士命名（圖 7A），致力於收集、保存與共享全球不同品種的水稻遺傳資源。

基因庫的保存分為「Base collection (BC)」與「Active collection (AC)」兩

類。BC 的種子存放於-20°C 以下的環境（圖 7C），適用於長期保存。AC 則將種子儲存在 2-4°C 環境中，用於即時分發的需求。BC 及 AC 的種子分別以每 5 年及每 10 年進行發芽測試（圖 7B），發芽測試採用捲紙法，將種子置於生長箱中 5 天後觀察發芽率，確保其發芽率在 85%以上，若種子活性不佳會重新繁殖新鮮種子。

水稻傳統和野生品種面臨遺傳侵蝕的風險，隨著新品種的引入與育成，許多品種逐漸被淘汰，甚至瀕臨滅絕。在全球各國的共同努力下，IRRI 基因庫將各國水稻樣本集中保管，成為水稻多樣性保存的重要平台。透過完善的管理體系，基因庫不僅支持世界各地的農業研究，還為提供水稻品種改良不可或缺的遺傳資源，確保水稻的基因多樣性能延續至後代。



圖 7、(A)張德慈博士協助創立基因庫的紀念狀；(B)發芽率試驗；(C) Base collection 保存庫內部；(D)基因庫蒐集來自世界各國的水稻種原

## 八、加速世代推進技術及設施

為了加速稻米育種進程，IRRI 開發一套加速世代推進技術及設施，讓水稻育種得以在更短時間內完成更多世代的選育，一年最多可以完成 3-4 個世代。加速世代推進（Rapid generation advance, RGA）設施適用於普遍的育種材料（圖 8），於溫室內採用高密度的穴盤種植方式，最大化利用設施空間進行育種，且溫室內密植及高溫的生長環境，營造輕度環境逆境，有助於縮短營養生長期，同時配合單粒後裔法（single seed descent, SSD）進行選育，該技術簡述如下：

1. 育種材料通常於 F<sub>2</sub> 至 F<sub>5</sub> 世代於 RGA 設施內進行。其中，早期世代（F<sub>2</sub> 至 F<sub>4</sub>）材料種植於 104 孔穴盤，每穴只播種 3 粒種子。於播種後 14-20 天，去除不健康的分蘖及植株，只留下單一具有健康主穗的植株，同時取樣葉片進行基因型篩選，最終擇定 1 粒種子進入下一世代，此作法即單粒後裔（SSD）法。
2. 穩定世代（F<sub>5</sub>）材料種植於孔徑較大的 35 孔穴盤，同樣播種 3 粒種子，但是 3 株植株都須保留，成熟後收穫全部種子送回育種者運用，即完成加速世代的階段。
3. 此項服務僅限 IRRI 內研究人員使用，使用者需要事先於網站進行登記，並產生 QR code 以便操作者管理各不同組合。



圖 8、加速世代推進的(A)操作流程，包含事前準備、播種、栽培管理、收穫及種子加工；(B)早期世代材料種植於 104 孔穴盤；(C)穩定世代材料種植於孔徑較大的 35 孔穴盤

除了以一般溫室進行 RGA 技術，IRRI 另外建置加速育種設施（Speed breed facility, SBF），提供需特定環境條件進行篩選的品種使用。SBF 建有加速生長室

(圖 9) 及走入式生長箱 (圖 10)，配備高效的環境控制系統，可以調整溫度、光照、濕度及二氧化碳含量等，模擬最佳生長條件，促進水稻加速完成生長周期，約 60-70 天即可抽穗開花。此設施還可收集數據，監測作物生長過程中的關鍵參數，供研究人員進行即時分析與管理。設施的應用搭配 SSD 的育種方法，能顯著提升水稻育種效率，加速耐逆性、高產或特定加工品種的育成，對氣候變遷糧食生產所面臨的挑戰大有助益。

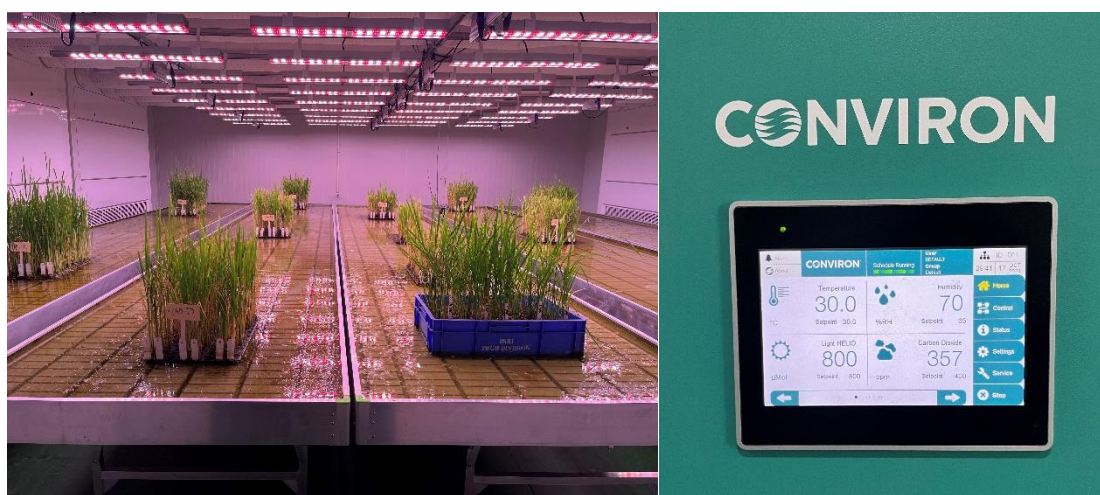


圖 9、SBF 的加速生長室可調控溫度、光照、濕度及二氧化碳含量等



圖 10、SBF 的走入式生長箱亦可調控溫度、光照、濕度及二氧化碳含量等



## 伍、心得與建議

IRRI 為歷史悠久且規模完善之國際水稻研究機構，匯集各國專業的研究學者進行各項水稻研究，尤其 IRRI 的研究人力豐沛、腹地廣泛，將多項試驗分派給田間調查員，研究學者專注於分析資料及多項研究合作，體現專業分工的國際水準。

近年來氣候變遷加劇，降雨分布不均及高溫等極端氣候，影響水稻產量及品質，非生物性逆境（如乾旱、高鹽、低溫、高溫及淹水等）對水稻的生長和產量有顯著影響。為因應氣候變遷的衝擊，IRRI 投入大量資源選育耐逆境的水稻研究，然水稻的非生物性逆境耐受性基因與環境之間的作用較為複雜，涉及基因的調控機制、環境因素及基因與環境之相互作用，如何建立適合的篩選指標一直是研究學者們的重要課題。

本次參訪著重於逆境篩選圃的建置以及逆境指標性狀，在經過參訪及討論後，對逆境篩選的條件有了進一步的認識。篩選圃除了降雨、氣溫、相對濕度的監控外，土壤均質性也是需要考量的重點，選擇土壤更為均質的田區可有效減少試驗誤差；另一個重點則是逆境發生時期的選擇，同樣的逆境發生於不同的生育時期可能導向不同的結果，需要事前規劃並確立篩選標的。

IRRI 除了逆境性狀的調查外，也致力於耐逆性基因的定位及探勘，一般而言，抗病或抗蟲性等生物性逆境多為少數主效基因控制，在基因功能解明及分子標誌開發較為單純。而非生物性逆境多受微效基因調控，除了基因與環境交感作用外，基因與基因之間相互作用也是造成標誌開發的困難之一，為了解決這種困境，目前 IRRI 的研究人員已經有了初步研究成果及假設，各品種的基因背景及各個等位基因的存在與否可能是關鍵原因，未來或許可參考相關研究報告，建立國內商業品種的基因背景資料庫，以利於耐逆性品種的選育。

本次參訪交流與諸多學者進行研究成果的討論與腦力激盪，收穫許多珍貴的研究經驗，也實習多項水稻逆境研究的性狀評估方法，有助於應用於國內的試驗研究。其中，分子標誌的運用在水稻育種中發揮關鍵作用，但技術門檻仍較高，若能開發出更友善的軟體或培訓，能幫助更多研究人員掌握技術。未來若能將數位紀錄工具與基因庫的數據共享或結合，讓數據得以即時整合與分

析，相信對國際間水稻研究合作很有幫助。

## 陸、誌謝

本次赴國際稻米研究所（IRRI）考察承蒙農業部經費支援，並感謝國際稻米研究所（IRRI）多位學者及研究團隊不吝分享新知，尤其 Dr. Amelia Henry, Dr. Waseem Hussain, Dr. John Damien Platten, Dr. Sung Ryul Kim 等學者的分享讓我們獲益良多，並感謝 IRRI education 的接待團隊 Froilan Fule 及 Justine Denise Urbina 等人協助各項聯絡事宜。最後，感謝農業試驗所李長沛博士、臺灣大學農藝系劉力瑜教授及林香君教授對於此趟交流的支持及牽線，本次考察順利完成，特此誌謝。