

運用分子標幟輔助選拔提升香米品系 「嘉農育 911303」之耐旱性

郭介煒¹ 林昆鴻² 吳永培³ 林彥蓉⁴ 徐仁浩² 許育嘉^{5,*}

摘要

郭介煒、林昆鴻、吳永培、林彥蓉、徐仁浩、許育嘉。2015。運用分子標幟輔助選拔提升香米品系「嘉農育 911303」之耐旱性。台灣農業研究 64(4):299–316。

本研究以私型稻耐旱品種「早育 15 號」(‘Hang-yu 15’; ‘HY15’) 為貢獻親，梗型稻香米品系「嘉農育 911303」(‘CNY911303’) 為輪迴親，透過回交方式將 ‘HY15’ 之耐旱性轉移至 ‘CNY911303’，於幼苗期利用 28% 聚乙二醇 6000 (Polyethylene Glycol 6000; PEG-6000) 溶液模擬缺水逆境處理，挑選耐旱的植株。並於各回交世代之 BC_xF₁ 與 BC₄F₂ 進行分子標幟輔助背景選拔，結果發現 BC₂F₁、BC₃F₁、BC₄F₁ 及 BC₄F₂ 世代回復輪迴親遺傳背景之比率分別為 74.1、87.7、95.9 及 96.6%。以 ‘HY15’、‘CNY911303’ 及 4 個 BC₄F₄ 品系於三葉齡、五葉齡及七葉齡等 3 個幼苗時期，分別以 28% PEG-6000 模擬缺水之水分逆境處理，評估材料之耐旱性表現。試驗發現，4 個品系之耐旱性表現優於輪迴親 ‘CNY911303’，顯示已將 ‘HY15’ 之耐旱特性導入 ‘CNY911303’ 中，培育出高耐旱之香米新品系。進一步評估 4 個耐旱品系 (BC₄F₄) 在水分管理下的產量表現，結果發現 ‘DT73’、‘DT85’ 及 ‘DT86’ 的產量顯著高於 ‘CNY911303’，且 ‘DT73’ 的產量更高於 5,000 kg ha⁻¹。據此顯示，獲選之耐旱香米品系在缺水環境下具有栽培價值，未來有機會進一步發展成為台灣耐旱香米新品種。

關鍵詞：分子標幟輔助選拔、耐旱、水稻。

前言

水稻為全世界超過 50% 人口之主要糧食作物，隨著世界人口快速的增加，至 2050 年全球人口預計將達 92 億，面臨人口增加及耕作面積減少的壓力，提高水稻單位面積產量則為重要的研究發展趨勢，至 2025 年預計糧食須增產 50% 才能滿足日益增長的需要 (Bruin-sma 2009)。近年來，農業試驗因為全球溫室效應產生劇烈之氣候變遷影響，造成降雨分布不均的程度加劇，全世界有 34% 依靠雨水灌

溉之水稻田 (約 5,400 萬 ha) 亦遭受到不同程度的乾旱影響 (Maclean *et al.* 2002)，全球因缺水所造成的水稻減產約 1,800 萬 Mg (Bernier *et al.* 2008)，故耐旱新品種的育成乃成為現今水稻育種的重要課題。

具耐旱特性之植物能在缺水環境下維持其生存能力 (Levitt 1980)，不同作物、生長發育階段和乾旱逆境程度下之耐旱機制可能不同。植株處於營養生長階段，通常比生殖器官形成階段更能適應和忍受水分條件的變化，水稻在幼穗分化期至花粉母細胞減數分裂期對乾旱逆

投稿日期：2015 年 1 月 26 日；接受日期：2015 年 5 月 10 日。

* 通訊作者：oiupeppen@yahoo.com.tw

¹ 國立嘉義大學農藝學系助理教授。台灣 嘉義市。

² 國立嘉義大學農藝學系研究生。台灣 嘉義市。

³ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所副研究員。台灣 嘉義市。

⁴ 國立台灣大學農藝學系副教授。台灣 台北市。

⁵ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所研究助理。台灣 嘉義市。

境最為敏感，缺水會導致穎花大量退化，抽穗延遲，結實率嚴重下降，進而造成產量減少 (Datta & Datta 2006)。過去因缺乏有效的篩選技術挑選耐旱之雜交後代，造成耐旱育種改良的進展緩慢 (Khush 2001; Evenson & Gollin 2003)，部分學者建議以耐旱之相關性狀，諸如根系、穗長、捲葉程度、水分利用效率和氣孔阻力等形態與生理生化性狀作為耐旱性之指標，提高耐旱作物的篩選效率 (Fukai *et al.* 1999; Price & Courtois 1999; Jongdee *et al.* 2002; Pantuwan *et al.* 2002; Toorchi *et al.* 2003)。PEG-6000 聚合物為一種滲透調節物質，可被應用到模擬缺水逆境。Chutia & Borah (2012) 利用 12 個自印度阿薩姆地區所蒐集的水稻品種為材料，以 PEG-6000 (Polyethylene Glycol 6000) 配製不同滲透潛勢的溶液如：-0.15 bar、-0.25 bar 和 -0.56 bar 等，篩選具耐旱的品種，結果發現 Laodubi、Leserihali、Beriabhangha 和 Borah 等 4 個品種具有較佳的耐旱特性，認為這些耐旱品種不僅可作為耐旱研究的材料，也可運用到水稻育種改良上。

在邁入後基因體時代後，水稻育種家更嘗試將分子生物技術運用於傳統育種上，藉以縮短水稻育種的年限。國際水稻基因體計畫 (International Rice Genome Sequencing Project; IRGSP) 完成梗稻「日本晴」(‘Nipponbare’) 全基因體共約 389 Mb 的解序 (International Rice Genome Sequencing Project 2005)，促進了各種分子標幟的發展，隨後應用在水稻育種上，提高了育種效率和精確性 (Collard & Mackill 2008)，此即為分子標幟輔助選拔 (marker-assisted selection; MAS)。其可在不受環境干擾下準確挑選目標植株，並在全生育期進行選拔，應用於幼苗期篩選更可減少田間種植數量、人力和物力等耗費，尤其可將多基因導入或堆疊 (pyramiding) 於同一優良水稻品種中。目前水稻育種上利用分子標幟輔助育種技術的成果相當多，如：國際稻米研究所將耐淹浸 *Sub1* QTL，導入 ‘Swarna’、‘IR64’ 和 ‘Sumba Mahsuri’ 等水稻品種，除了保有品種原有的高產和優良農藝性狀外，更增加了耐淹

之特性 (Neeraja *et al.* 2007)；另外，也利用 ‘Pokkali’ 和 ‘IR29’ 雜交之重組自交系族群，篩選到一個高耐鹽品系 ‘FL478’，並利用分子標幟輔助回交育種的方式，將 ‘FL478’ 之耐鹽 *saltol* 基因導入一些優良品種中 (Thomson *et al.* 2010)；尚有抗稻熱病 (Jiang *et al.* 2012)、香味 (Salgotra *et al.* 2012)、抗褐飛蝨 (Hu *et al.* 2013)、穀粒產量 (Swamy & Kumar 2013) 等及其他作物應用 MAS 進行改良種上的實例 (Collard *et al.* 2008) 等，能有效提高水稻產量品質、抗病及抗逆境的特性。

在耐旱水稻品種育成上，利用耐旱性類型陸稻 ‘Azucena’ 與籼型陸稻 ‘Kalinga III’ 建立回交族群，利用分子標幟輔助技術將 4 個與根形態特性相關的目標片段轉移至 ‘Kalinga III’，在缺水和慣行灌溉之田間環境下，其回交後代植株根長上有顯著的提高效果 (Steele *et al.* 2006)。育成之 4 個近同源系進一步在乾旱條件下測試，結果發現穀粒產量相對於輪迴親 ‘Kalinga III’ 有明顯提高 (Steele *et al.* 2007)，最後育出 1 個高產且耐旱的水稻品種 ‘BirsavikasDhan 111’ (Steele *et al.* 2013)。Uga *et al.* (2013) 將可控制根系統結構的 *DRO1* (*DEEPER ROOTING 1*) 基因，利用回交導入 ‘IR64’，在乾旱下回交後代之近同源系，不僅增加根系的深度，增強避旱性外，更保留高產的表現。IRRI 目前也發現了多個在乾旱逆境下可維持或提高產量的 QTL (Swamy & Kumar 2013)，例如：位在水稻第 12 對染色體的 *qDTY_{12.1}* (Bernier *et al.* 2007)，在 21 個不同的環境下均證實具有耐旱效果，在嚴重缺水環境下，較對照品種增加 40% 產量，為具有再現性之主效 QTL (Bernier *et al.* 2009)，透過回交育種將 *qDTY_{12.1}* 導入對缺水高度敏感品種 ‘Sabitri’ 中也顯示，在乾旱逆性下，*qDTY_{12.1}* 在穀粒產量上能貢獻超過 45% 的累加效應 (additive effect) (Mishra *et al.* 2013)。

本試驗利用耐旱籼型稻 ‘HY15’ 為材料，透過分子標幟輔助回交育種的方式，將耐旱特性轉移至梗型香米品系 ‘CNY911303’ 中。本研究在每個世代透過 PEG-6000 溶液模擬乾旱逆境及分子標幟於水稻幼苗期進行選拔，篩選

出與 ‘CNY911303’ 背景相同且具耐旱性之水稻，並於 BC₄F₅ 世代藉由田間耐旱試驗，篩選在成株期具耐旱性之品系，培育出全生育時期均有耐旱特性之新品系。此乃因幼苗期耐旱性之控制基因，可能與成株期有別所訂定之篩選策略，此種篩選方式不僅有效率，更可保留全生育期或特定時期具耐旱潛力之植株。由本研究所建立之分子標幟輔助耐旱水稻育種之模式，未來可應用在更多優良水稻品種的耐旱改良，選育耐旱梗稻新品種，因應環境氣候變遷下缺水逆境之水稻育種、栽培及糧食生產時所需之種原。

材料與方法

回交選拔耐旱族群之建立

本試驗以「嘉農育 911303」(‘CNY911303’) 為母本，而「早育 15 號」(‘Hang-yu 15’, ‘HY15’)

為父本進行雜交，並以 ‘CNY911303’ 為輪迴親，建立 ‘CNY911303’ 與 ‘HY15’ 各個回交世代，供分子標幟輔助選拔利用。本研究室進行 ‘CNY911303’ 的香味遺傳分析顯示，香味是顯性單一基因控制，「早育 15 號」的耐旱性狀則屬於數量性狀。其中「早育 15 號」為耐旱特性之貢獻親，係籼型耐旱水稻品種，由具高產潛力親本 ‘Qixiuzhuan’ 與具耐旱特性親本 ‘Zhonghan 3’ 進行雜交選育 (Luo 2010)。回交過程以 ‘CNY911303’ 為輪迴親本與雜交 F₁、BC_xF₁ (父本) 進行回交，建立分子標幟輔助選種所需 BC₁F₁、BC₂F₁、BC₃F₁、BC₄F₁ 及 BC₄F₂ 各世代之材料 (圖 1)，各回交世代材料數目在 BC₁F₁ 有 240 株、BC₂F₁ 有 270 株、BC₃F₁ 為 980 株、而 BC₄F₁ 世代則有 184 株；各回交世代以水耕液培養至秧苗 3–4 葉齡後，經含 28% PEG-6000 之水耕液進行乾旱逆境處理，其存活植株供分子標幟輔助背景選拔利

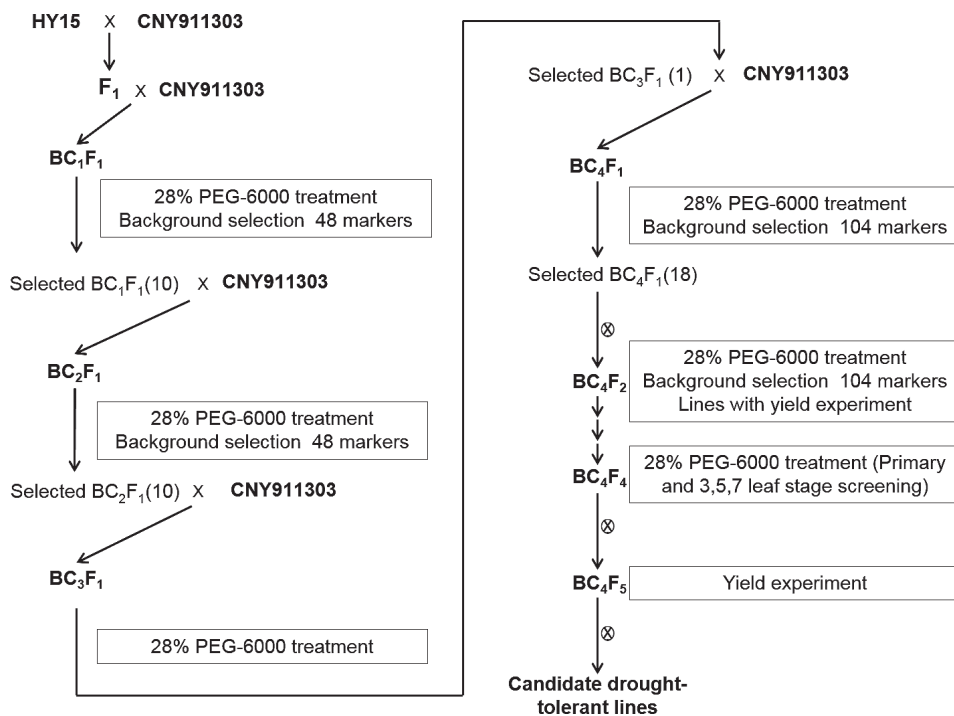


圖 1. 分子標幟輔助將「早育 15 號」之耐旱特性轉移至 ‘CNY911303’ 之回交育種流程，包含 28% PEG-6000 水分處理及用於背景選拔之分子標幟說明。括弧內數值為每個回交世代所挑選的植株數。

Fig. 1. The backcross breeding scheme for transfer the drought-tolerant trait of ‘HY15’ to ‘CNY911303’ by molecular marker selection, with details of the treatment of 28% PEG-6000 and markers used for background selection. The numbers of plants selected in each generation are indicated in parentheses.

用。在 BC_1F_1 共選獲有 46 株、 BC_2F_1 有 22 株及 BC_3F_1 有 1 株，各世代選出之植株皆進行回交； BC_4F_1 世代則獲選 18 株之耐旱植株，經移植田間栽種，於自交後得到 BC_4F_2 種子。 BC_4F_2 世代進行產量試驗後，再依譜系法繼續純化繁殖成 BC_4F_3 、 BC_4F_4 及 BC_4F_5 品系，而 BC_4F_5 各品系則進一步供田間缺水逆境下之產量評估試驗及不同水稻發育時期耐旱性的表現調查利用。

耐旱品系產量試驗

BC_4F_2 品系產量比較試驗：‘CNY911303’與‘HY15’雜交組合回交之 BC_4F_1 經模擬缺水逆境處理後，存活植株即視為具耐旱性之 BC_4F_1 子代，40 個 BC_4F_1 子代自交並單株收穫得到 BC_4F_2 種子， BC_4F_2 進一步種植成 40 個品系於田間，同時並加入對照親本‘HY15’及‘CNY911303’，編成代號‘DT69’-‘DT108’，於 2013 年一期作進行，每品系種植 32 株，每 1 品系 4 行植，每行 8 株，行株距為 30 cm × 15 cm，不設重複，於成熟時各品系分別收穫調查稻穀產量表現。

BC_4F_5 品系旱田實用性之評估：2014 年二期作以 BC_4F_5 進行品系旱田實用性評估。 BC_4F_5 幼苗期耐旱性之調查，以水耕液模式添加 28% PEG-6000 模擬缺水逆境處理進行，依 BC_4F_5 幼苗期耐旱性之調查結果，選出耐旱等級最佳之品系，進行小區稻穀產量之調查，試驗採用 RCBD 設計，每 1 品系 4 行植，每行 25 株，行株距為 30 cm × 15 cm，4 重複，乾旱處理方式係各品系達分蘖盛期時進行乾旱斷水，實際缺水狀態依據儀器 (Fieldsout soil sensor reader item 6465) 測量的水分潛勢讀值作為判斷依據，第一期作水分潛勢在 -30 kPa 至 -50 kPa，第二期作則是在 -50 kPa 以下，認定為旱田圃為缺水狀態，待試驗品系內一半以上植株抽穗後，且水分潛勢小於 -50 kPa 再進行 1 次灌水，直至收穫不再灌水。本試驗所有材料之培育及種植，均於農業試驗所嘉義分所水稻試驗田區進行，其田間管理按一般慣行法進行。

耐旱性之評估

水稻秧苗期模擬缺水之耐旱試驗處理與

耐旱等級評估：水稻種子先以稀釋 1,000 倍的免賴得 (benomyl) 溶液於培養皿中浸種消毒 24 h，爾後每日換水並置於烘箱內以 30°C 催芽，待種子皆萌芽後，移至溫室中點播於 50 cm × 60 cm 之 80 孔水耕盤進行水耕栽培，使用改良木村式 B 式水耕液配方 (Yoshida *et al.* 1976)。種子點播入水耕盤時，使用 0.5 倍水耕液，幼苗生長至一葉齡後，更換為 1 倍水耕液，三葉齡時則更換為 1.5 倍水耕液。待點播約 14 d 後幼苗平均 3-4 葉齡時，將水耕液更換成含 28% PEG-6000 之 1.5 倍水耕液，進行水稻幼苗期模擬缺水試驗。模擬缺水試驗處理後，每天進行單株調查，水稻幼苗期乾旱等級表現，調查標準引用國際水稻研究所訂定之水稻乾旱分級標準 (Standard Evaluation System for Rice) (International Rice Research Institute 1996)，依照水稻幼苗葉片捲曲及乾枯程度進行 0 (未處理)、1 (最耐旱)、3、5、7 及 9 (最不耐旱) 不同等級之判定 (圖 2)。耐旱試驗處理，是以缺水敏感型對照品種‘IR64’的耐旱等級表現，作為‘HY15’、‘CNY911303’及回交後代的復水標準，當‘IR64’幼苗的乾旱等級平均達 7 級，即判定當下為‘IR64’到達臨界凋萎點，即復水後‘IR64’植株也不會復原存活，而復水前調查並開始記錄乾旱等級，復水則每天 1 次紀錄幼苗模擬缺水處理後之復原能力調查，藉此區別參試材料幼苗期之耐旱能力。‘HY15’與‘CNY911303’透過 PEG-6000 篩選顯示，‘HY15’與‘CNY911303’在葉片會呈現捲曲反應，為避旱性的特性表現，但在葉片乾枯的情形‘HY15’較‘CNY911303’為和緩，若在耐旱等級為 7 以上復水，‘IR64’與‘CNY911303’的植株會持續乾枯死亡，‘HY15’則會回復生長。

耐旱品系不同發育時期耐旱性之調查：分子標幟輔助篩選並依譜系法繁殖所得之 40 個 BC_4F_4 品系，於當世代進行耐旱性篩選，每品系試驗 3 重複，依結果選出耐旱等級表現最佳的品系；並以耐旱品系‘HY15’與敏感型‘IR64’及‘CNY911303’作為對照。在三葉齡、五葉齡及七葉齡等 3 個水稻不同生長階段，利用 28% PEG-6000 水耕液模擬缺水逆境進行處

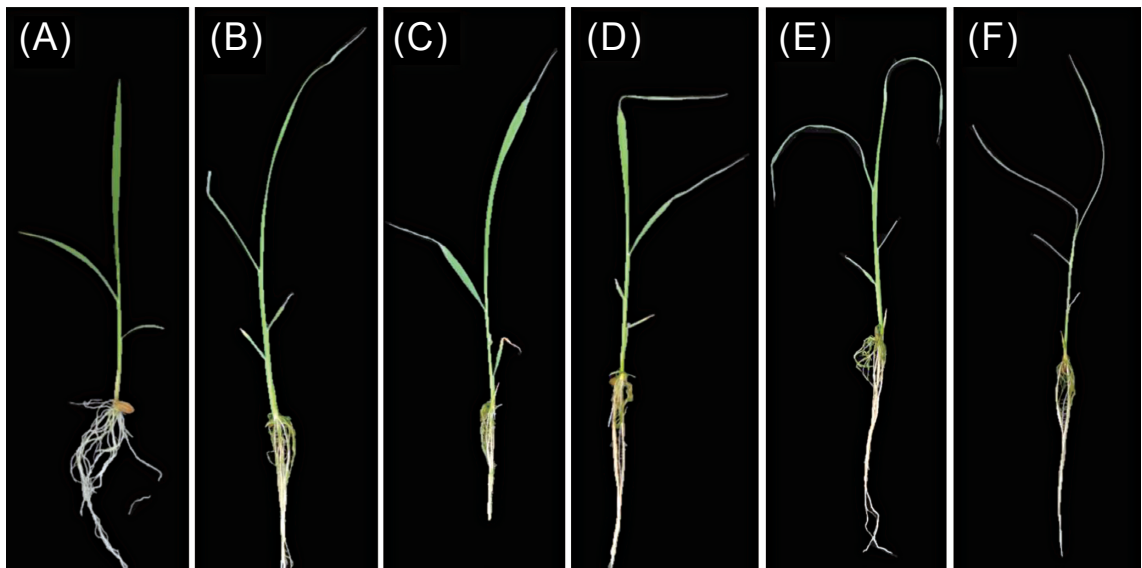


圖 2. 水稻幼苗期耐旱等級之型態。水稻三葉齡幼苗進行水分逆境處理後，不同耐旱等表現之等級，分別為 0：未乾旱處理 (A)；1：植株葉片捲曲或下位葉黃化 (B)；3：植株葉片先端乾枯白化 (C)；5：植株葉片約 1/2 乾枯白化 (D)；7：植株葉片約 2/3 乾枯白化 (E)；9：植株完全乾枯白化 (F)。

Fig. 2. The different scales of rice morphology in response to drought treatment. Rice was treated with drought during 3-leaf seeding and scaled as 0: none treatment (A); 1: Some leaves are rolled or discolored (B); 3: Some leaves tips are drying (C); 5: About 1/2 leaves of the plant are drying (D); 7: About 2/3 leaves of the plant are drying (E); 9: The whole plants are almost dead and dried, respectively (F).

理，並且不復水操作，各發育時期之處理，每 1 品系以 6 株水稻幼苗為 1 重複單位，試驗 3 重複，以 RCBD 設計排列，並於植株間表現出差異之起始點開始至植株接近死亡階段，每日進行耐旱等級調查。

統計分析

試驗中統計分析使用 Microsoft Office Excel 2010 套裝軟體，對試驗中產量構成要素和各葉齡處理天數先進行變方分析，並於有顯著差異之項目再以最小差異顯著性測驗 LSD ($\alpha = 0.05$) 進行品系間比較。

分子標幟輔助耐旱水稻選拔

水稻基因組 DNA 之萃取及多型性分子標幟篩選：水稻葉片基因體 DNA (genomic DNA) 萃取方式修改自 benzyl chloride 法 (Kazuhiro *et al.* 1998)，先取約 5 cm 鮮嫩葉片放入 2.0 mL 圓底離心管，並置入 1 顆鋼珠，以組織研磨機 Tissue-Lyser II (Qiagen, German)

設定頻率至 30 Hz 震盪 2 min 研碎葉片。再加入 300 μ L 之 Solution I (100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 40 mM EDTA, pH 8.0; 1.67% SDS) 和 150 μ L 之 benzyl chloride (Acros, USA) 後，置於 50°C 水浴中 15 min。其後加入 150 μ L 之 3 M 醋酸鈉緩衝液 (pH 5.0)，均勻混合，在 4°C 下以 21,380 \times g 離心 15 min。取上清液至新的離心管，加入 700 μ L 之 100% 乙醇混勻，以 21,380 \times g 離心 10 min 沉降 DNA，留下 DNA pellet，並加入 500 μ L 之 70% 乙醇，靜置 5 min，清洗鹽類。去除乙醇後，風乾 DNA。最後加入 100 μ L 之 TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) 溶解 DNA。而分子標幟的挑選是先依據 Hsu *et al.* (2012) 發表之多型性分子標幟資料，挑選輪迴親本 'CNY911303' 與 'HY15' 間具多型性的分子標幟進行分析，並額外自行設計之 SSR 及 Indel 分子標幟填補不足位置。SSR 來源根據水稻分子標幟資料庫網站，Gramene (<http://www.gramene.org/markers/microsat/>)

已公布的 SSR 分子標幟序列 (Supplementary Table 18, IRGSP, 2005), Indel 的設計則是根據 Shen *et al.* (2004) 所發表 Indel 存在位置進行相關引設計。

PCR、電泳與基因型判讀：PCR 反應總體積為 10 μL ，包含約 20 ng 的 DNA、0.2 μM 的引子、1 \times *Taq* DNA Polymerase Master Mix Red (75 mM Tris-HCl, pH 8.5; 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1.5 mM MgCl_2 ; 0.1% Tween 20[®]; 0.2 mM dNTPs; 0.05 units mL^{-1} Ampliqon *Taq* DNA Polymerase; red dye; stabilizer) (Ampliqon, Denmark) 和 ddH₂O，使用核酸增殖儀 Labcycler (Sensoquest, German) 進行反應。PCR 流程設定先 94 $^{\circ}\text{C}$ 為 2 min，1 個循環；94 $^{\circ}\text{C}$ 為 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 為 20 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 為 30 s，共 35 個循環；72 $^{\circ}\text{C}$ 為 2 min，1 個循環；最後結束在 20 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR 擴增之 DNA 產物以 6% 的 1.5 mm non-SDS PAGE (non-SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 進行 PCR 產物的分離。膠體製作使用 4 片注膠器 GCC-204-33 (C.B.S. Scientific[®], CA)，配方為 110 mL 的 1 \times TBE (Amresco[®], USA)、77 mL 的逆滲透水、33 mL 的 40% 19 : 1 ACRYL/BIS[™] (Amresco[®], USA)、0.1% APS (Amresco[®], USA)，最後添加 176 μL 的 TEMED (Amresco[®], USA)，靜置約 1 h 即可充分凝膠。電泳槽使用超寬型雙面直立式迷你電泳裝置 MGV-202-33 (C.B.S. Scientific[®], CA)，1 個電泳槽 1 次可進行 2 片 (每片 102 個 well) 膠體電泳，電泳緩衝液使用 0.5 \times TBE。膠片中樣品槽均加入 1 μL 的各樣品 PCR 產物，並使用 100 V 進行 1 h 電泳，即可適當地分離 PCR 產物。電泳結束後將膠片卸下，置於含 10 μL SYBR[®] Safe DNA gel stain (Life technologies[®], USA) 的 200 mL 逆滲透水中，輕搖 5 min 進行膠片外染，再放到暗箱中以 UV 光使 DNA 條帶顯影並照相記錄。經電泳分析 PCR 產物，比較親本和子代擴增 DNA 片段大小，當只出現 1 個 DNA 條帶並與 'HY15' 相同，此子代為同型合子，將其基因型紀錄為 A；當只出現 1 個 DNA 條帶並與 'CNY911303' 相同，此子代也為同型合子，將其基因型紀錄為 B；同時出現 2 個 DNA 條帶

且與兩親本相同，此子代為異型合子，將此基因型紀錄為 H。基因型判讀工作採用人工判讀方式，避免來自電腦程式的誤判導致基因型評估錯誤。另外，在 BC₁-BC₄ 世代之 F₁ 回交子代植株，基因型分析中只會出現同型合子 B 或異型合子 H，如出現同型合子 A 的基因型，則視為自交種子並淘汰該單株。

繪製連鎖圖譜：利用專一性引子將目標片段擴增，並以電泳系統將擴增片段加以分離，挑選出在兩個輪迴親與貢獻親間具備多型性的分子標幟，使用 RAP-DB 網站提供 IRGSO/RAP build 5 版 BAC/PAC 位置，轉換成在 IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) 網站 Build 5 版所公布的連鎖圖譜位置，並將結果利用 GGT 2.0: graphical genotypes/2007 edition 軟體 (<http://www.wageningenur.nl/>) 進行分析，並將用於輔助選拔之分子標幟的連鎖圖譜繪出。

結果

分子標幟輔助耐旱水稻之選育

回交世代之分子標幟背景選拔：BC₁F₁ 世代之秧苗經模擬缺水逆境處理後，挑選耐旱表現較佳之 46 株進行分子標幟背景選拔，利用分布在水稻 12 條染色體上，共 48 個分子標幟進行背景選拔，包括 30 個 SSR、4 個 STS 及 14 個 Indel 分子標幟，其密度約每 20 cM 選擇一個分子標誌進行分析 (表 1、圖 3)，結果 46 株 BC₁F₁ 植株與 'CNY911303' 的遺傳相似度介於 63.5-83.1% 之間，平均約為 74.1% (圖 4)，選出與 'CNY911303' 相似度最高的 10 株 BC₁F₁ 植株做為回交母本；在 BC₂F₁ 世代，經模擬缺水逆境處理後，共挑選 22 株耐旱表現較佳之植株，進行分子標幟背景選拔，為避免特定基因體片段的重覆篩選，降低背景選拔效率，遂以不同的 48 個分子標幟進行背景選拔。結果顯示，22 株 BC₂F₁ 植株與 'CNY911303' 的遺傳相似度介於 76.6-92.3%，平均為 87.8% (圖 4)，選出 10 株遺傳相似度高之 BC₂F₁ 進一步回交；在 BC₃F₁ 回交後代，由於過度的缺水逆境篩選，造成只存活 1 株，故在此世代

表 1. 應用於 ‘CNY911303’ 與 ‘HY15’ 間背景選拔具多型性的分子標幟型態、數量和分布。

Table 1. List of the types and numbers of polymorphic markers used for background selection and their distribution in chromosomes.

Backcross generation	Chr.	Genetic marker			Subtotal
		SSR	STS	Indel	
BC ₁	1	3	0	1	4
	2	2	0	2	4
	3	3	0	1	4
	4	2	0	2	4
	5	3	0	1	4
	6	3	0	1	4
	7	1	1	2	4
	8	3	0	1	4
	9	2	0	2	4
	10	3	0	1	4
	11	1	0	3	4
	12	4	0	0	4
	Total		30	1	17
BC ₂	1	3	0	1	4
	2	3	1	0	4
	3	3	0	1	4
	4	3	0	1	4
	5	2	1	1	4
	6	4	0	0	4
	7	2	1	1	4
	8	1	1	2	4
	9	2	0	2	4
	10	2	0	2	4
	11	2	0	2	4
	12	3	0	1	4
	Total		30	4	14
BC ₃	1	3	1	0	4
	2	2	0	2	4
	3	4	0	0	4
	4	1	0	3	4
	5	4	0	0	4
	6	2	0	2	4
	7	1	0	3	4
	8	2	0	2	4
	9	3	1	0	4
	10	3	0	1	4
	11	2	2	0	4
	12	3	0	1	4
	Total		30	4	14
BC ₄	1	8	1	2	11
	2	6	1	3	10
	3	7	1	2	10
	4	3	0	6	9
	5	6	0	3	9
	6	6	0	3	9
	7	3	0	5	8
	8	3	0	4	7
	9	3	2	2	7
	10	5	0	2	7
	11	5	0	4	9
	12	7	0	1	8
	Total		62	5	37

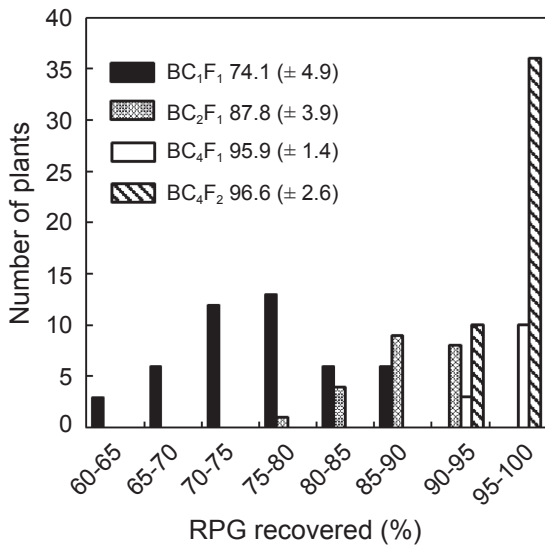


圖 4. 分子標幟輔助 ‘CNY911303’/‘HY15’ 回交育種後代族群於 BC₁F₁、BC₂F₁、BC₄F₁ 及 BC₄F₂ 回復輪迴親基因體比率之頻率分布。框中之數值為族群平均輪迴親基因體回復比率，括弧內數值為標準差。

Fig. 4. The frequency distribution of recurrent parent genome (RPG) recovered rate using marker-assisted backcrossing in BC₁F₁, BC₂F₁, BC₄F₁, and BC₄F₂ population derived from the backcross of ‘CNY911303’/‘HY15’. The numbers inside the right side of frame indicate the mean values of RPG recovered (± SD) in each generation.

不進行背景選拔，直接供進一步回交利用；在 BC₄F₁ 世代，利用分布在水稻 12 條染色體上，共 104 個分子標幟進行背景選拔，包括 60 個 SSR、5 個 STS 及 37 個 Indel 分子標幟，以此 104 個分子標幟進行 BC₄F₁ 回交後代之背景選拔 (表 1、圖 3)。篩選結果顯示，獲選之 13 株植株與 ‘CNY911303’ 之遺傳相似度介於 95.2–99.1%，平均達到 95.9% (圖 4)，全數植株自交收穫並建立 BC₄F₂ 世代，進行缺水逆境處理後，延續 BC₄F₁ 所使用之 104 個分子標幟再進行 1 次背景選拔。結果顯示，在所獲得之 BC₄F₂ 回交後代與 ‘CNY911303’ 的遺傳相似度介於 92.4–100.0%，平均達 96.6% (表 2、圖 4)。

耐旱品系在不同發育時期耐性之評估

由分子標幟輔助選種所得之 40 個 BC₄F₄ 品系，再經水分逆境篩選出耐旱等級佳之品系 DT73、DT85、DT86 及 DT90 等 4 個品系，分別於三葉齡、五葉齡及七葉齡等 3 個時期進行耐旱性評估，藉以確認耐旱品系在不同發育時期之耐旱性穩定性。結果如表 3 所示，在三葉齡時期在處理後第 1 天各品系在耐旱等級表現即可判別差異，故開始進行植株耐旱等級調查直至第 9 天 (圖 5A)，同樣以植株表現耐旱等

表 2. 以 104 個分子標幟於 MAS 分析 BC₄F₂ 之基因體組成。

Table 2. The genome composition of each individuals of BC₄F₂ calculated by the results of MAS-based 104 polymorphic markers.

Individual ^z	A (%) ^y	B (%) ^x	H (%) ^w	RPG recovered (%)	Recombinant ^v	H-segment ^u
CNY911303	0.0	100.0	0.0	100.0	0	0
3-10	0.0	100.0	0.0	100.0	0	0
3-11	0.0	100.0	0.0	100.0	0	0
3-12	0.0	100.0	0.0	100.0	0	0
4-12	0.0	100.0	0.0	100.0	0	0
15-10	0.0	100.0	0.0	100.0	0	0
15-11	0.0	100.0	0.0	100.0	0	0
15-12	0.0	100.0	0.0	100.0	0	0
3-4	0.0	98.4	1.6	99.2	2	1
11-12	0.0	97.7	2.3	98.9	2	1
20-11	0.0	97.2	2.8	98.6	4	2
27-12	0.0	97.2	2.8	98.6	5	3
8-11	0.0	97.0	3.0	98.5	2	1

表 2. 以 104 個分子標幟於 MAS 分析 BC₄F₂ 之基因體組成 (續)。

Table 2. The genome composition of each individuals of BC₄F₂ calculated by the results of MAS-based 104 polymorphic markers (continued).

Individual ^z	A (%) ^y	B (%) ^x	H (%) ^w	RPG recovered (%)	Recombinant ^v	H-segment ^u
11-17	1.0	97.7	1.3	98.4	3	1
11-11	1.3	97.7	1.0	98.2	3	1
13-12	0.0	96.4	3.6	98.2	3	2
11-10	0.0	96.0	4.0	98.0	4	2
12-16	0.0	95.9	4.1	98.0	1	1
6-9	0.6	96.2	3.2	97.8	4	2
12-27	1.6	96.9	1.5	97.7	4	2
6-8	0.0	93.7	6.3	96.9	6	3
7-8	1.0	94.7	4.3	96.9	6	3
6-4	3.1	96.5	0.4	96.7	2	1
13-11	0.0	93.2	6.8	96.6	4	2
25-20	0.4	93.3	6.3	96.5	5	2
2-15	3.2	95.5	1.3	96.2	6	2
1-5	2.7	94.3	2.9	95.8	6	2
17-10	2.0	93.4	4.5	95.7	5	2
7-7	2.3	93.6	4.0	95.6	5	2
12-18	3.8	95.0	1.2	95.6	5	1
5-26	1.3	92.3	6.4	95.5	7	3
7-12	2.4	93.4	4.2	95.5	5	2
5-25	2.2	93.1	4.7	95.5	6	2
12-17	3.5	94.3	2.2	95.4	4	2
6-6	0.4	91.1	8.5	95.4	8	4
16-7	2.4	92.8	4.8	95.2	7	3
5-12	0.0	90.1	9.9	95.1	8	4
6-10	3.8	92.7	3.5	94.5	8	2
6-7	3.1	91.5	5.5	94.3	6	2
10-8	3.5	91.7	4.8	94.1	8	3
16-11	1.0	88.9	10.1	94.0	6	3
7-11	4.8	92.2	3.0	93.7	6	2
16-10	2.4	89.7	7.9	93.7	5	2
5-27	4.7	91.1	4.1	93.2	8	2
5-10	4.0	90.1	5.9	93.1	9	3
5-11	5.9	91.1	3.0	92.6	8	1
16-12	5.6	90.4	4.0	92.4	7	2
Hang-Yu 15	100.0	0.0	0.0	0.0	0	0

^z Variety name (Arrangement by RPG recovered of CNY911303).

^y The percent of Hang-Yu 15 genome.

^x The percent of recurrent parent genome.

^w The percent of heterozygote.

^v The frequency of cross-over happened in chromosome segment.

^u Amount of heterozygote in all markers.

表 3. ‘HY15’、‘CNY911303’、‘IR64’ 和 4 個 BC₄F₄ 耐旱品系於 3 個不同生長期行 28% PEG-6000 處理之耐旱等級表現。

Table 3. The scale of drought-tolerance in ‘HY15’, ‘CNY911303’, ‘IR64’, and four BC₄F₄ drought-tolerant rice lines under the treatment of 28% PEG-6000 at three growing stages.

Stage	Line or variety	Scale of drought-tolerance ^z										
		Days after treatment										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Three-leaf seedling	HY15	1.9	4.5 a	5.8 a	7.3	7.9	8.3 a	8.4	8.7 a	8.9 a	-	-
	CNY911303	1.9	4.3 ab	5.2 abc	6.9	7.2	7.7 abc	8.1	8.5 ab	8.7 ab	-	-
	IR64	2.6	4.7 a	5.4 ab	6.7	7.5	7.8 ab	8.3	8.9 a	8.9 a	-	-
	DT73	1.9	3.7 bc	4.8 bc	6.2	6.9	7.3 abc	7.7	7.9 bc	8.3 bc	-	-
	DT85	1.6	3.7 bc	4.5 c	5.5	6.3	6.7 c	7.0	7.3 c	8.1 c	-	-
	DT86	1.9	3.5 c	4.7 bc	5.6	6.4	6.9 bc	7.1	7.4 c	8.1 c	-	-
	DT90	1.4	3.7 bc	4.6 c	5.8	6.7	6.9 bc	7.3	7.9 bc	7.9 c	-	-
Five-leaf seedling	HY15	-	4.3 a	5.1	5.9 abc	6.4 ab	6.5 bc	7.5 b	8.0 ab	8.8 a	9.0 a	-
	CNY911303	-	3.7 abc	5.3	6.0 ab	6.5 ab	7.0 ab	7.8 ab	8.4 a	8.6 ab	9.0 a	-
	IR64	-	4.2 ab	5.8	6.3 a	6.9 a	7.3 a	8.4 a	8.6 a	8.9 a	9.0 a	-
	DT73	-	3.4 c	4.8	5.5 cd	5.5 cd	5.7 de	6.7 cd	7.4 bc	8.0 bc	8.6 b	-
	DT85	-	3.5 bc	4.7	5.4 d	5.5 cd	5.8 de	6.4 cd	7.6 bc	8.3 abc	8.7 b	-
	DT86	-	3.7 abc	5.1	5.7 bcd	6.0 bc	6.3 cd	7.1 bc	7.6 bc	7.8 c	8.6 b	-
	DT90	-	3.3 c	4.7	5.3 d	5.5 cd	5.6 e	6.3 d	7.1 c	8.1 bc	8.7 b	-
Seven-leaf seedling	HY15	-	3.3 b	4.3	5.5 abc	5.9 b	6.5 abc	6.7	7.6 b	8.5 abc	8.3	8.7
	CNY911303	-	3.8 a	4.5	6.3 a	6.6 a	6.8 ab	6.9	8.1 a	8.7 ab	9.0	9.0
	IR64	-	3.9 a	4.8	6.2 a	6.7 a	7.0 a	7.0	8.1 a	8.9 a	8.9	9.0
	DT73	-	3.1 b	4.1	5.1 bc	5.7 bc	6.1 cd	6.5	7.0 d	8.1 cd	8.4	8.7
	DT85	-	3.3 b	3.8	4.7 c	5.2 c	5.9 d	6.4	7.1 cd	7.7 d	8.3	8.7
	DT86	-	3.1 b	3.8	5.3 bc	6.0 b	6.5 bc	6.5	7.3 bcd	8.5 abc	8.4	8.8
	DT90	-	3.1 b	4.1	5.3 bc	5.9 b	6.4 bcd	6.6	7.5 bc	8.4 bc	8.7	8.9

^z Means with none or the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

級的平均值表示。結果發現，兩親本與對照品種在處理後第 3 天已達 5 級，各品系則在處理下第 4 天達到 5 級，在處理後第 7 天所有品系則皆達到 7 級以上；經由變方分析結果顯示，各品系間耐旱表現之差異於處理後第 2、3、6、8 和 9 天均達顯著水準，並繼續進行多重比較。結果發現 ‘DT85’ 品系的表現最好，於處理後第 3 天開始在多重比較下皆與 ‘IR64’ 達顯著差異，其餘 4 個品系在處理後第 8 和 9 天有顯著差異 (表 3)。耐旱測試結果顯示，三葉齡耐旱處理 3-4 天之間，可明顯區分出耐旱及不耐旱品系間之差異，且部分育成回交品系之耐旱性明顯較輪迴親表現良好。

在五葉齡時期，處理後第 2 天進行耐旱等級調查，調查植株耐旱等級直至第 10 天 (圖 5B)，在第 4 天，所有品系皆達 5 級以上，並在第 8 天，所有品系皆達到 7 級以上；經由變方分析結果顯示，品系間耐旱表現差異分別在第 2 與 4-10 天均有顯著差異。多重比較結果顯示，4 個品系耐旱等級表現較 ‘CNY911303’ 與 ‘IR64’ 具有顯著差異 (表 3)。耐旱測試結果顯示五葉齡耐旱處理 4 天時，即在耐旱及不耐旱品系間達顯著差異，且育成回交品系之耐旱性均明顯較輪迴親表現良好。

在七葉齡時期，植株在處理後第 2 天開始進行耐旱等級調查，調查每 1 天的植株耐

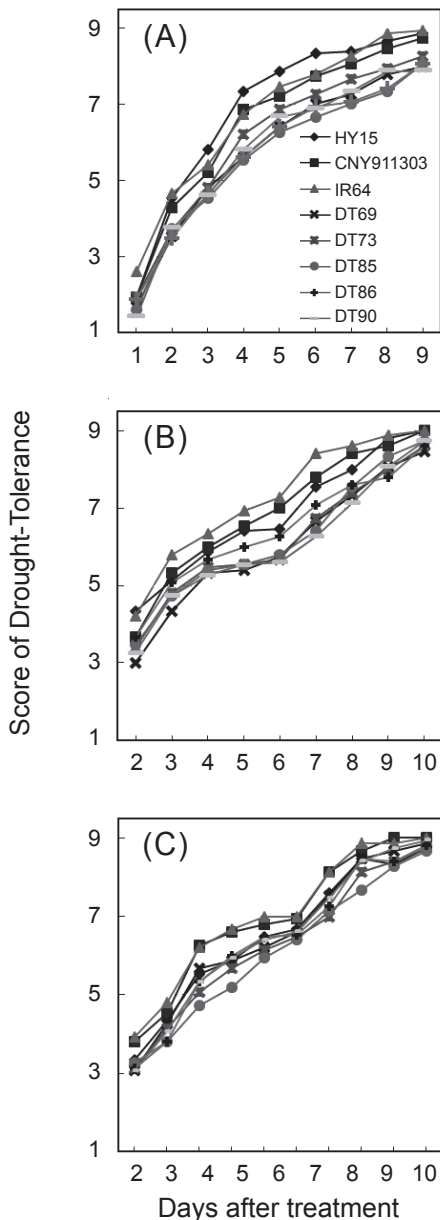


圖 5. 耐旱品種 'HY15'、乾旱敏感品種 'IR64'、輪迴親 'CNY911303' 及 5 個 'CNY911303'/'HY15' 回交後代 BC₄F₄ 耐旱品系於三葉齡 (A)、五葉齡 (B) 及七葉齡 (C) 進行 28% PEG-6000 模擬缺水逆境處理下之耐旱等級變化。

Fig. 5. The drought-tolerance scale evaluated in drought-tolerant line 'HY15', drought-susceptible variety 'IR64', recurrent parent 'CNY911303' and five BC₄F₄ drought-tolerant lines derived from the backcross of 'CNY911303'/'HY15' at three-leaf (A), five-leaf (B), and seven-leaf (C) stages under the treatment of 28% PEG-6000.

旱等級直至第 11 天 (圖 5C)，'CNY911303' 和 'IR64' 於處理後第 4 天，品系在第 5 天達到 5 級以上，在第 8 天達到 7 級以上；經由變方分析結果顯示，品系間耐旱表現差異在處理後第 2、4、5、6、8 和 9 天達顯著水準。多重比較結果發現，以 'DT85' 和 'DT73' 品系耐旱性表現最佳，4 個耐旱品系在處理過程中的表現也都優於 'CNY911303' 與 'IR64' (表 3)。耐旱測試結果顯示，七葉齡耐旱處理 4 天時，即在耐旱及不耐旱品系間達顯著差異。觀察 4 個耐旱品系、兩親本與對照組，在 3 個不同葉齡情況下的水分逆境處理，各自調查耐旱等級表現，綜合表現以 'DT85' 在 3 個葉齡中皆有較好的表現，'DT73' 則在五和七葉齡處理反應良好；在 3 個葉齡的處理中，對照組 'IR64' 與輪迴親 'CNY911303' 在缺水處理過程之等級變化速度均較 4 個耐旱品系快，顯示 'CNY911303'/'HY15' 的雜交組合，成功地將 'HY15' 的耐旱特性轉移到 'CNY911303' 中。

耐旱品系產量比較與構成要素試驗

品系產量比較試驗：在 BC₄F₁ 世代經耐旱處理後存活的植株，移植於田間並經自交後進行單株收穫，共獲得 40 個 BC₄F₂ 品系，於 2013 年一期進行品系產量比較試驗，稻穀產量表現先換算成每株稻穀收穫重量，再依一般田間種植每公頃 220,000 株數量加乘，得到每公頃的產量，結果如表 4 所示。各品系產量介於 997–5,005 kg ha⁻¹，有 31 個品系的產量低於 3,000 kg ha⁻¹，以品系 'DT102' 稻穀產量最高為 5,005 kg ha⁻¹，其次為 'DT74' 及 'DT76'，各為 4,579 kg ha⁻¹ 及 4,311 kg ha⁻¹，其產量均高於輪迴親本 'CNY911303' (1,100 kg ha⁻¹)。

品系旱田實用性之評估：以模擬缺水逆境所篩選之 'DT73'、'DT85'、'DT86' 和 'DT90' 等 4 個 BC₄F₄ 耐旱品系為材料，於 2014 年二期利用旱田栽培模式於成株期進行稻穀產量調查。結果發現，在旱田栽培狀態下，以對照 'CNY911303' 之稻穀產量指數為 100%，換算 4 個耐旱品系之稻穀產量指數則介於 90.7–142.9% (表 5)，其中以 'DT73'、'DT85' 和 'DT86' 等 3 個耐旱品系之稻穀產量分別為 5,404、4,595 及 4,560 kg ha⁻¹ 高於對照品

表 4. 2013 年一期作 ‘HY15’、‘CNY911303’ 及 40 個 BC₄F₂ 耐旱品系稻穀試驗之稻穀產量表現。Table 4. The grain yield of ‘HY15’, ‘CNY911303’ and 40 BC₄F₂ drought-tolerant rice lines in yield trial in the first cropping season of 2013.

Line or variety	Grain yield (kg ha ⁻¹)	Line or variety	Grain yield (kg ha ⁻¹)
Y15	5,129	DT88	1,210
CNY911303	1,100	DT89	1,341
DT69	1,884	DT90	1,348
DT70	1,939	DT91	3,383
DT71	2,186	DT92	1,925
DT72	2,028	DT93	2,482
DT73	2,021	DT94	1,712
DT74	4,579	DT95	2,008
DT75	3,252	DT96	1,506
DT76	4,311	DT97	4,153
DT77	2,111	DT98	2,441
DT78	3,004	DT99	2,998
DT79	2,729	DT100	3,355
DT80	2,578	DT101	2,516
DT81	1,293	DT102	5,005
DT82	1,052	DT103	2,970
DT83	1,107	DT104	2,393
DT84	2,654	DT105	1,121
DT85	3,279	DT106	2,393
DT86	1,224	DT107	1,203
DT87	1,540	DT108	997

表 5. 2014 年二期作 ‘CNY911303’ 和 4 個 BC₄F₅ 耐旱品系產量試驗之稻穀產量表現。Table 5. The grain yield of ‘CNY911303’ and 4 BC₄F₅ drought-tolerant rice lines in yield trial in the second cropping season of 2014.

Line or variety	Grain yield (kg ha ⁻¹)	Yield index (%)
CNY911303	3,781 b ²	100.0
DT73	5,404 a	142.9
DT85	4,595 ab	121.5
DT86	4,560 ab	120.6
DT90	3,432 b	90.7

² Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

種，‘DT73’ 的產量更超過 5,000 kg ha⁻¹。顯示選出之 3 個耐旱品系於旱田栽培下，相較於輪迴親本有提升稻穀產量之效益，尤其耐旱品系 ‘DT73’ 品系，其稻穀產量高於對照品種 ‘CNY911303’ 約 42% 以上，顯示具有缺水耐受性及高產之潛能。

討論

分子標幟輔助選拔

利用傳統回交育種要完全回復到輪迴親背景的基因型，需經過 6–8 代的回交，然而在族群數量偏少或雜交親本遺傳背景較遠的因素影

響下，會造成各回交世代回復到輪迴親基因體的比率較理論值低 (Collard *et al.* 2005)。以分子標幟輔助選種結合回交育種的方法，可以在不受環境影響下，於早世代進行大量目標基因的選拔，只需回交 3–4 次，即可回復至輪迴親背景超過 95%，甚至將分子標幟選用的密度降於 10 cM 之內，回交 2 次即可達到此目標。因此，分子標幟輔助選拔的效率會受回交族群大小、導入基因的數目、分子標幟與目標基因座距離的遠近及背景選拔使用的標幟數量所影響 (Collard *et al.* 2008; Xu & Crouch 2008)。

本試驗雜交組合在回交 4 次之 BC₄ 所選拔的後代，其回復率介於 95.2–99.1% 間，顯示回交後代已回復接近輪迴親的基因體，然而由所挑選的 104 個分子標幟分析 BC₄F₁ 及 BC₄F₂ 世代各為 95.9% 及 96.6%，其回復率低於理論值，這可能是本試驗所選用雜交親本間的遺傳背景可能較遠，造成回復率偏低，但選拔的回交後代仍有單株達近 100% 回復率。顯示挑選的植株仍有回復至輪迴親基因體之後代。相似的選拔結果也在其他耐逆境的研究中發現，例如：Neeraja *et al.* (2007) 利用水稻基因圖譜上約 89 個分子標幟分析不同回交世代之耐淹植株背景，結果其回復率在 BC₁ 世代約 67.9%、BC₂ 世代約 90.7%、BC₃F₁ 世代約 96.2%、BC₃F₂ 世代則有植株回復比率達 100%；Kuo *et al.* (2013) 同樣利用水稻基因圖譜上共 113 個分子標幟，進行耐鹽不同回交世代之分析，回復率在 BC₁ 世代約 75%、BC₂ 世代約 89%、BC₃ 世代約 96.4%；Li *et al.* (2014) 利用水稻基因圖譜上共 104 個分子標幟，進行耐旱不同回交世代之分析，其回復率在 BC₂ 世代約 91.6%、BC₃ 世代約 91.6%、BC₄ 世代約 94.5%。本試驗將回交後代進一步繁殖成 BC₄F₃ 世代，再利用譜系法將單株純化固定成 BC₄F₅ 品系，於田間進行旱田產量評估試驗，其獲選耐旱品系在缺水環境上之栽培實用性便可獲得印證。

耐旱品系不同時期耐旱性之評估

分子標幟能在育種上作為輔助選拔的工具，但無法完全取代表型的選拔 (Ragimekula *et al.* 2013)，無論分子標幟與基因或基因

座是緊密連鎖，育成品系在外表特性的檢測是必需的 (Yu *et al.* 2000)。Dixit *et al.* (2012) 利用耐旱品種 ‘Vandana’ 與缺水敏感品種 ‘Way Raremy’ 雜交，透過分子標幟輔助回交育種將 *qDTY_{2.3}* 與 *qDTY_{3.2}* 導入帶有 *qDTY_{12.1}* 的 ‘Way Raremy’ 中，在插秧後 35 d 進行乾旱處理，當土壤濕度小於 -50 kPa 時才予以灌水。由 BC₂F₃ 篩選結果發現，在缺水逆境篩選過程發現，帶有 *qDTY_{2.3}* 與 *qDTY_{12.1}* 的品系 ‘IR84996-50-4-B-4’ 較輪迴親 ‘Way Raremy’ 耐旱性且高產。Li *et al.* (2014) 利用 ‘TK9’ 與 ‘HY15’ 之回交後代，在三、五、七葉齡水分逆境處理結果，顯示回交後代 ‘DT3’ 和 ‘DT39’ 等 2 個品系在苗期耐旱性表現較佳，與對照品種 ‘IR64’ 及輪迴親 ‘TK9’ 的表現在五及七葉齡有達顯著差異，顯示 ‘HY15’ 的耐旱基因成功導入水稻品種 ‘TK9’ 中。在本研究中品系，由 BC₄F₄ 世代所獲得品系的耐旱表現發現，‘DT73’、‘DT85’、‘DT86’ 及 ‘DT90’ 等 4 個品系，其在苗期均有不錯的表現且具穩定的耐旱表現，與對照品種 ‘IR64’ 及輪迴親 ‘CNY911303’ 的表現在五及七葉齡有達顯著差異，且生長勢與輪迴親間的並無發現差異。因此，4 個品系在苗期耐旱表現已顯著優於輪迴親來看，透過本試驗利用分子標幟輔助及缺水逆境篩選的回交育種策略，能成功將 ‘HY15’ 的耐旱性導入 ‘CNY911303’ 中，提高回交後代之耐旱特性。

耐旱品系產量評估試驗

水稻幼苗期與生長盛期對乾旱逆境之反應有所不同 (Jongdee *et al.* 2002; Gowda *et al.* 2011; Shih *et al.* 2012)，水稻幼苗期較成株期對缺水逆境相對敏感，透過幼苗期的耐旱性篩選，不僅可以篩選出早期表現耐旱相關的植株，亦可在成株期篩選同步表現耐旱之植株。Wu (2013) 利用 PEG-6000 在水泥槽進行缺水逆境處理，其結果篩選出 9 個於幼苗期具缺水耐受性之突變品系，其中 6 個品系在成株期較具缺水耐受性，另外 3 個品系則反應敏感。近年利用乾旱逆境下穀粒產量作為耐旱篩選指標，已逐漸獲得學者重視，例如：利用回交導入 *qDTY_{12.1}* 不僅可使導入品系耐乾旱逆境，更可增加產量約 0.5 Mg ha⁻¹，導入其他 *qDTY*

也可提高 10–30% 的產量，約增加 150–500 kg ha⁻¹，明顯提高栽培的經濟效益 (Babu *et al.* 2003; Lanceras *et al.* 2004; Kumar *et al.* 2008; Venuprasad *et al.* 2008; Swamy *et al.* 2013)。

Li *et al.* (2014) 利用 ‘TK9’ 與 ‘HY15’ 之回交後代，以缺水逆境及分子標幟輔助選拔進行篩選，由選出的 12 個 BC₄F₄ 回交品系，再經成株期的田間耐旱評估，結果發現有 4 個品系的平均產量超過 5,000 kg ha⁻¹，明顯提高 ‘TK9’ 的耐旱性及產量。本研究利用旱田水分管理模式，探討經幼苗期 PEG-6000 篩選 (前景選拔) 及分子標幟輔助背景選拔所得之 4 個回交品系在成株期之田間耐旱性差異，從選育出的品系材料中，‘DT73’、‘DT85’ 和 ‘DT86’ 等 3 品系在旱田缺水處理栽培下，其產量顯著高於輪迴親 ‘CNY911303’，其中又以 ‘DT73’ 稻穀產量約在 5,000 kg ha⁻¹ 以上，提高約 42.9%，顯示 ‘DT73’ 在旱田環境下具實用栽培價值。

本研究以 PEG-6000 進行前景選拔，不僅可獲得幼苗期耐旱的植株，更可篩選出水稻在成株期耐旱較佳之品系，顯示利用前景篩選可選出全生育或不同生育時期耐旱之植株。這也暗示幼苗期與成株期對缺水的反應是不相同的，且可能在不同發育時期會有不同的耐旱調控機制。Zhou *et al.* (2006) 利用野生稻 *Oryza rufipogon* 與籼稻品種 Guichao 2 進行回交，由所育成的 BC₄F₅ 和 BC₄F₆ 導入系進行缺水逆境處理，並針對耐旱相關的基因座進行定位，其結果分別在第 2、6 和 12 對染色體共定位到 4 個 QTL，其中在第 12 對染色體所發現的 *qSDT12-2*，可在幼苗期缺水的逆境下穩定表現，而其他的基因座則被認為可能會在不同的生育期表現。本研究藉由回交育種配合分子標幟輔助選拔及 PEG-6000 模擬缺水逆境的篩選模式，可有效進行耐旱性之轉移及選育工作，未來可提供國內進行耐旱水稻之育種之參考，可於 4–5 年內改良國內水稻優良品種的耐旱特性，因應極端氣候下在糧食生產的需求。

引用文獻

Babu, R. C., B. D. Nguyen, V. Chamarek, P. Shanmugasundaram, P. Chezhian, P. Jayaprakash, S. K. Ganesh,

A. Palchamy, S. Sadasivam, S. Sarkarung, L. J. Wade, and H. T. Nguyen. 2003. Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: Association between secondary traits and field performance. *Crop Sci.* 43:1457–1469.

Bernier, J., A. Kumar, R. Serraj, D. Spaner, and G. N. Atlin. 2008. Breeding upland rice for drought resistance. *J. Sci. Food Agric.* 88:927–939.

Bernier, J., A. Kumar, R. Venuprasad, D. Spaner, S. Verulkar, N. P. Mandal, P. K. Sinha, P. Peeraju, P. R. Dongre, R. N. Mahto, and G. Atlin. 2009. Characterization of the effect of a QTL for drought resistance in rice, *qll2.1*, over a range of environments in the Philippines and eastern India. *Euphytica* 166:207–217.

Bernier, J., A. Kumar, V. Ramaiah, D. Spaner, and G. Atlin. 2007. A large-effect QTL for grain yield under reproductive-stage drought stress in upland rice. *Crop Sci.* 47:507–516.

Bruinsma, J. 2009. The Resource Outlook to 2050: By How Much do Land, Water and Crop Yields Need to Increase by 2050? Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 33 pp.

Chutia, J. and S. Borah. 2012. Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* Linn.) genotypes of Assam, India II. Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress. *Amer. J. Plant Sci.* 3:971–980.

Collard, B. C. Y., C. Vera Cruz, K. L. McNally, P. Virk, and D. Mackill. 2008. Rice molecular breeding laboratories in the genomics era: Current status and future considerations. *Intl. J. Plant Genomics* 2008:1–25.

Collard, B. C. Y. and D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363:557–572.

Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196.

Datta, K. and S. K. Datta. 2006. Indica rice (*Oryza sativa*, BR29 and IR64). *Methods Mol. Biol.* 343:201–212.

Dixit, S., B. P. Mallikarjuna Swamy, P. Vikram, J. Bernier, M. T. Sta Cruz, M. Amante, D. Atri, and A. Kumar. 2012. Increased drought tolerance and wider adaptability of *qDTY_{12.1}* conferred by its interaction with *qDTY_{2.3}* and *qDTY_{3.2}*. *Mol. Breeding* 30:1767–1779.

Evenson, R. E. and D. Gollin. 2003. Assessing the impact of the green revolution, 1960 to 2000. *Science* 300:758–762.

- Fukai, S., G. Pantuwan, B. Jongdee, and M. Cooper. 1999. Screening for drought resistance in rainfed lowland rice. *Field Crops Res.* 64:61–74.
- Gowda, V. R. P., A. Henry, A. Yamauchi, H. E. Shashidhar, and R. Serraj. 2011. Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *Field Crops Res.* 122:1–13.
- Hsu, J. H., Y. R. Lin, C. W. Kuo, and Y. P. Wu. 2012. Establishing the platform of polymorphic markers for rice. *Crop Environ. Bioinform.* 9:137–159. (in Chinese with English abstract)
- Hu, J., M. Cheng, G. Gao, Q. Zhang, J. Xiao, and Y. He. 2013. Pyramiding and evaluation of three dominant brown planthopper resistance genes in the elite indica rice 9311 and its hybrids. *Pest Manage. Sci.* 69:802–808.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793–800.
- International Rice Research Institute. 1996. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. Los Banos. 56 pp.
- Jiang, H., Y. Feng, L. Bao, X. Li, G. Gao, Q. Zhang, J. Xiao, C. Xu, and Y. He. 2012. Improving blast resistance of Jin 23B and its hybrid rice by marker-assisted gene pyramiding. *Mol. Breeding* 30:1679–688.
- Jongdee, B., S. Fukai, and M. Cooper. 2002. Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. *Field Crops Res.* 76:153–163.
- Kazuhiro, K., Y. Niwa, T. Yamaguchi, H. Sunohara, H. Hirano, and M. Umeda. 1998. A rapid and easy-handling procedure for isolation of DNA from rice, *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Biotechnol.* 15:45–48.
- Khush, G. S. 2001. Green revolution: The way forward. *Nat. Rev. Genet.* 2:815–822.
- Kumar, A., J. Bernier, S. Verulkar, H. R. Lafitte, and G. N. Atlin. 2008. Direct selection for yield, response to selection and use of drought-tolerant donors in upland and lowland-adapted populations. *Field Crops Res.* 107:221–231.
- Kuo, S. C., C. W. Kuo, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2013. Marker-assisted selection of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Taiwan Agric. Res.* 62:137–156. (in Chinese with English abstract)
- Lanceras, J. C., G. Pantuwan, B. Jongdee, and T. Toojinda. 2004. Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiol.* 135:384–399.
- Levitt, J. 1980. Response of Plants to Environmental Stresses, Water, Radiation, Salt and Other Stresses. Academic Press. New York. 607 pp.
- Li, K. H., C. W. Kuo, Y. C. Hsu, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2014. Increasing drought tolerance of rice cultivar 'TK9' using marker-assisted selection. *Crop Environ. Bioinform.* 11:143–164. (in Chinese with English abstract)
- Luo, L. J. 2010. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. *J. Exp. Bot.* 61:3509–3517.
- Maclean, J. L., D. C. Dawe, B. Hardy, and G. P. Hettel. 2002. Source Book for the Most Important Economic Activity on Earth. CABI Press. Oxon. 153 pp.
- Mishra, K. K., P. Vikram, R. B. Yadaw, B. P. Swamy, S. Dixit, M. T. Cruz, P. Maturan, S. Marker, and A. Kumar. 2013. *qDTY_{12j}*: A locus with a consistent effect on grain yield under drought in rice. *BMC Genet.* 14:12.
- Neeraja, C. N., R. Maghirang-Rodriguez, A. Pamplona, S. Heuer, B. C. Collard, E. M. Septiningsih, G. Vergara, D. Sanchez, K. Xu, A. M. Ismail, and D. J. Mackill. 2007. A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 115:767–776.
- Pantuwan, G., S. Fukai, M. Cooper, S. Rajatasereekul, and J. C. O'Toole. 2002. Yield response of rice (*Oryza sativa* L.) to drought under rainfed lowlands: 3. plant factors contributing to drought resistance. *Field Crops Res.* 73:181–200.
- Price, A. and B. Courtois. 1999. Mapping QTLs associated with drought resistance in rice: Progress, problems and prospects. *Plant Growth Regul.* 29:123–133.
- Ragimekula, N., N. Varadarajula, S. Mallapuram, G. Gangimani, R. Reddy, and H. Kondreddy. 2013. Marker assisted selection in disease resistance breeding. *J. Plant Breed. Gene.* 1:90–109.
- Salgotra, R. K., B. B. Gupta, R. Millwood, M. Balasubramaniam, and C. N. Stewart, Jr. 2012. Introgression of bacterial leaf blight resistance and aroma genes using functional marker-assisted selection in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 187:313–323.
- Shen, Y. J., H. Jiang, J. P. Jin, Z. B. Zhang, B. Xi, Y. Y. He, G. Wang, C. Wang, L. Qian, X. Li, Q. B. Yu, H. J. Liu, D. H. Chen, J. H. Gao, H. Huang, T. L. Shi, and Z. N. Yang. 2004. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiol.* 135:1198–1205.
- Shih, C. L., R. K. Chen, C. N. Tsai, P. H. Liu, J. C. Lo, and W. L. Huang. 2012. Correlation analysis for drought tolerance between seedling stage and active tillering stage in rice. *J. Agric. For.* 9:55–69. (in Chinese with English abstract)
- Steele, K. A., A. H. Price, H. E. Shashidhar, and J. R. Witcombe. 2006. Marker-assisted selection to introgress

- rice QTLs controlling root traits into an Indian upland rice variety. *Theor. Appl. Genet.* 112:208–221.
- Steele, K. A., A. H. Price, J. R. Witcombe, R. Shrestha, B. N. Singh, J. M. Gibbons, and D. S. Virk. 2013. QTLs associated with root traits increase yield in upland rice when transferred through marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 126:101–108.
- Steele, K. A., D. S. Virka, R. Kumar, S. C. Prasad, and J. R. Witcombe. 2007. Field evaluation of upland rice lines selected for QTLs controlling root traits. *Field Crops Res.* 101:180–186.
- Swamy, B. P. and A. Kumar. 2013. Genomics-based precision breeding approaches to improve drought tolerance in rice. *Biotechnol. Adv.* 31:1308–1318.
- Thomson, M. J., M. D. Ocampo, J. Egdane, M. A. Rahman, A. Sajise, D. L. Adorada, E. Tumimbang-Raiz, E. Blumwald, Z. I. Seraj, R. K. Singh, G. B. Gregorio, and A. M. Ismail. 2010. Characterizing the *Saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. *Rice* 3:148–160.
- Toorchi, M., H. E. Shashidhar, T. M. Gireesha, and S. Hittalmani. 2003. Performance of backcross involving transgressive doubled haploid lines in rice under contrasting moisture regimes. *Crop Sci.* 43:1448–1456.
- Uga, Y., K. Sugimoto, S. Ogawa, J. Rane, M. Ishitani, N. Hara, Y. Kitomi, Y. Inukai, K. Ono, N. Kanno, H. Inoue, H. Takehisa, R. Motoyama, Y. Nagamura, J. Wu, T. Matsumoto, T. Takai, K. Okuno, and M. Yano. 2013. Control of root system architecture by deeprooting 1 increases rice yield under drought conditions. *Nat. Genet.* 45:1097–1102.
- Venuprasad, R., M. T. Sta Cruz, M. Amante, R. Magbanua, A. Kumar, and G. N. Atlin. 2008. Response to two cycles of divergent selection for grain yield under drought stress in four rice breeding populations. *Field Crops Res.* 107:232–244.
- Wu, Y. P. 2013. Drought tolerant rice lines by screening an ‘IR64’ mutant stock. *J. Taiwan Agric. Res.* 62:195–208. (in Chinese with English abstract)
- Xu, Y. and J. H. Crouch. 2008. Marker-assisted selection in plant breeding: From publications to practice. *Crop Sci.* 48:391–407.
- Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cook, and K. A. Gomez. 1976. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. International Rice Research Institute. Los Banos. 82 pp.
- Yu, K., S. J. Park, and V. Poysa. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: Efficacy and economics. *Plant Breed.* 119:411–415.
- Zhou, S. X., F. Tian, Z. F. Zhu, Y. C. Fu, X. K. Wang, and C. Q. Sun. 2006. Identification of quantitative trait loci controlling drought tolerance at seedling stage in Chinese Dongxiang common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *Acta Genet. Sin.* 33:551–558.

Increasing Drought Tolerance of Aroma Rice ‘CNY911303’ Using Marker-Assisted Selection

Chieh-Wei Kuo¹, Keung-Hung Lin², Yong-Pei Wu³, Yann-Rong Lin⁴, Jen-Hao Hsu², and Yu-Chia Hsu^{5,*}

Abstract

Kuo, C. W., K. H. Lin, Y. P. Wu, Y. R. Lin, J. H. Hsu, and Y. C. Hsu. 2015. Increasing drought tolerance of aroma rice ‘CNY911303’ using marker-assisted selection. *J. Taiwan Agric. Res.* 64(4):299–316.

To introgress the gene(s) conferring drought-tolerance to the Taiwanese aromatic *japonica* line ‘Tainung-Chianung-yu 931103’ (‘CNY911303’), the drought-tolerant variety ‘Hang-yu 15’ (‘HY15’) was used as a donor parent crossed to ‘CNY911303’. Four backcrossings were conducted and the progenies of each backcross generation BC_xF_1 were screened for drought tolerance by the treatment of 28% PEG-6000 solution and consequently selected by molecular markers to recover the recurrent parent’s genome. The percentages of recurrent parent recovery within selected individuals were 74.1, 87.7, 95.9, and 96.6% in BC_2F_1 , BC_3F_1 , BC_4F_1 , and BC_4F_2 respectively. The ‘HY15’, ‘CNY911303’ and four BC_4F_4 drought-tolerant lines were further evaluated for drought tolerance under the treatment of 28% PEG-6000 at three-leaf, five-leaf, and seven-leaf stages. The four BC_4F_4 lines exhibited higher tolerance to drought stress than the recurrent parent, implying that the drought-tolerant characteristic of ‘HY15’ was successfully transferred to ‘CNY911303’ using marker assisted selection (MAS). In addition, 4 drought-tolerant BC_4F_4 lines were evaluated for grain yields. Among them, ‘DT73’, ‘DT85’, and ‘DT86’ have significant better yield than ‘CNY911303’, and ‘DT73’ produced more than 5,000 kg per hectare, indicating that these three drought-tolerant lines can be grown in fields underwater saving cultivation system. These drought-tolerant lines will be registered as new aromatic rice varieties for water-saving rice production in Taiwan in the future.

Key words: Marker-Assisted Selection (MAS), Drought tolerance, Rice.

Received: January 26, 2015; Accepted: May 10, 2015.

* Corresponding author, e-mail: oiueppen@yahoo.com.tw

¹ Assistant Professor, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

² Graduate students, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

³ Associate Research Fellow, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

⁴ Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

⁵ Research Assistant, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.