

利用分子標幟輔助導入 *Saltol* QTL 提升水稻 「台梗九號」之耐鹽性

溫甯翔¹ 郭介煒² 郭素真³ 林彥蓉⁴ 吳永培^{5,*}

摘要

溫甯翔、郭介煒、郭素真、林彥蓉、吳永培。2016。利用分子標幟輔助導入 *Saltol* QTL 提升水稻「台梗九號」之耐鹽性。台灣農業研究 65(3):328–347。

本研究利用台灣優質梗稻品種「台梗九號」(‘TK9’)為輪迴親，耐鹽稻品種‘Pökkali’為貢獻親，利用分子標幟輔助回交法將‘Pökkali’之 *Saltol* QTL 導入‘TK9’中。過程中各回交世代均先進行 *Saltol* QTL 之前景選拔，獲選後代再經分子標幟輔助之背景選拔。結果發現帶 *Saltol* QTL 對偶基因之回交子代，其 BC₁F₁、BC₂F₁ 及 BC₂F₂ 世代獲選植株遺傳背景回復至輪迴親比率平均分別為 71.5、85.4 及 82.7%。與傳統回交育種 BC₂F₁ 理論值 87.5% 相較，遺傳背景回復率有稍低的現象，顯示兩親本間可能遺傳背景較遠或發生遺傳拖曳之現象。又‘Pökkali’、CWY981126、‘IR64’及 10 個 BC₂F₃ 品系於五葉齡期分別以 100、150、200、250 及 300 mM NaCl 溶液進行鹽分逆境處理，結果‘Pökkali’在 100、150 及 200 mM NaCl 等鹽分濃度下均有高的耐鹽性表現，而 BC₂F₃ 回交後代則以 STK7 及 STK8 等 2 個品系耐鹽性表現較佳。而相同材料分別於五葉齡及最高分蘗期以 200 mM NaCl 逆境進行不同生長時期耐鹽性評估，其中秧苗五葉齡鹽分逆境處理下，以品系 STK8 的耐鹽等級表現最佳，而 STK4 及 STK7 亦有不錯的耐鹽性表現；至於成株期之最高分蘗期則以 STK7 及 STK8 的耐鹽性表現最佳，由回交品系 BC₂F₃ 耐鹽表現，顯示本試驗已順利將 *Saltol* QTL 導入‘TK9’中，且成功培育具優良耐鹽性之 BC₂F₃ 回交品系，未來可供國內鹽化土壤栽培利用。

關鍵詞：分子標幟輔助選拔、耐鹽、水稻。

前言

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是全世界重要的糧食作物之一，生長發育與產量受不同生物與非生物逆境影響甚鉅。鹽分逆境是屬於非生物逆境的一種，主要影響全世界灌溉與旱作農業，全世界作物生產嚴重受鹽害威脅之農業耕地約有 800 百萬公頃，佔全世界總面積約 6% (Munns 2005, FAO 2008)。至 2050 年估計有超過 50% 的農業耕地會面臨鹽分與乾旱逆境 (Wang *et al.* 2003)，伴隨著世界人口數量持續

增加，預計在 2050 年將達到 91 億 (Negrão *et al.* 2011)，人口的增加使得一些耕作土地轉變為工業及居住用地，迫使水稻之耕作轉移至生產力低的鹽分地。水稻生產必須增加超過 50% 才可滿足人類對糧食的需求，將使得糧食短缺之現象雪上加霜，故培育耐鹽水稻已成為全球育種的首要目標之一。

土壤中離子濃度過高 (主要為 Cl⁻ 和 Na⁺)，會使植物根部的滲透壓調節功能喪失，造成鹽分逆境。鹽分逆境不僅造成土壤結構的

投稿日期：2015 年 9 月 21 日；接受日期：2016 年 1 月 4 日。

* 通訊作者：wuypei@dns.caes.gov.tw

¹ 國立嘉義大學農藝學系碩士生。台灣 嘉義市。

² 國立嘉義大學農藝學系助理教授。台灣 嘉義市。

³ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系研究助理。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農藝系副研究員。台灣 嘉義市。

改變，使土壤的通氣量和水力傳導降低，又會降低土壤水分潛勢，阻礙水稻對水分及礦物質的吸收，進而抑制稻株的生長與發育。土壤大量的 Na^+ 與 Cl^- 等毒性離子直接被水稻吸收， Na^+ 及 Cl^- 的累積造成體內離子及滲透調節失衡，使氣孔關閉。當 CO_2 同化受限，致使電子傳送反應受阻，進而產生活化氧族 (reactive oxygen species; ROS)，導致細胞受損、光合作用及蛋白質合成受抑制，造成生長勢降低、不正常發育或產量降低，重者則導致植株死亡 (Darwish *et al.* 2009; Tavakkoli *et al.* 2010)。Munns & James (2003) 指出 Na^+ 累積在地上部與鹽分逆境下水稻植株的存活率有相關性。因此，對於克服鹽分逆境有效的方法，即為維持植株中低 Na^+ 濃度。也有研究指出， K^+ 對於植株耐鹽性也有所影響。維持地上部較低的 Na^+/K^+ 比率，對耐鹽性的強度至關重要 (Ren *et al.* 2005; Yamaguchi & Blumwald 2005)。據此研究結果，作物的耐鹽表現可以透過 Na^+ 的排除與隔離、 K^+ 吸收及維持 Na^+/K^+ 比率來提高。

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 (IRGSP 2005)，促進了各種分子標幟的發展。隨後應用在水稻育種上，不僅可在早世代進行候選植株的選拔，更可縮短水稻育種的年限，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)。MAS 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 MAS 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)；此外，也有將抗稻熱病 (Jiang *et al.* 2012)、抗白葉枯病 (Pradhan *et al.* 2015)、抗褐飛蟲 (Hu *et al.* 2013)、香

味 (Salgotra *et al.* 2012)、穀粒產量 (Swamy & Kumar 2013) 等應用 MAS 進行改良品種的實例，能有效提高水稻產量品質、抗病及抗逆境的特性。Ruengphayak *et al.* (2015) 更以多次回交的方式，將耐淹之 *sub1*、抗稻熱病之 *qBL1* 及 *qBL11*、抗白葉枯病之 *xa5* 及 *Xa21*、抗褐飛蟲基因 *sesquiterpene synthase (TP)* 及 *qBph3* 和決定支鏈澱粉合成之 *starch synthase IIa (SSIIa)* 等基因和基因座，導入到高產的泰國香米品種 ‘PinK3’ 中，透過 4 年 7 次的傳統回交法配合 MAS，不僅改良了品種耐逆境及稻米品質之特性，更能縮短新品種育成時間。

在耐鹽水稻品種育種上，印度已成功培育出 ‘Damodar’、‘Pokkali’、‘Nona Bokra’ 和 ‘Bhura Ratha’ 等耐鹽的水稻品種，但是大部分品種的產量表現均不佳 (Singh & Mishra 2004)。為了提高耐鹽品種在鹽分逆境下的產量表現，Islam & Gregorio (2013) 利用分子標幟輔助回交育種 (marker assisted back-cross; MABC)，將 *Saltol* 導入到印度秈稻品種 ‘BR11’、‘BRRI dhan28’ 和 ‘BRRI dhan29’ 中，不僅提高品種之耐鹽特性，更在鹽分逆境下維持了產量。Gregorio *et al.* (1997) 利用 ‘Pokkali’ 與 ‘IR29’ 進行雜交後自交產生之重組自交系，進一步在水稻第 1 條染色體上 10.7–12.2 Mb 發現 1 個與控制 Na^+/K^+ 比率有關之 QTL，命名為 *Saltol*。Thomson *et al.* (2010) 針對 *Saltol* QTL 進行檢測，顯示 *Saltol* QTL 對耐鹽等級變異的解釋率約為 27%，且對水稻耐鹽性有較大的影響。另外，根據圖譜定位找到了 3 個與幼苗存活天數相關之 QTLs，其幼苗存活天數會因耐鹽 QTLs 堆疊數目的增加而提高植株之耐鹽性 (Cheng *et al.* 2012)。國際稻米研究所利用 ‘Pokkali’ 和 ‘IR29’ 雜交之 F_8 重組自交系族群進行之耐鹽研究中，結果發現 1 個高耐鹽品系 FL478 (IR 66946-3R-178-1-1)，目前已利用 MABC 方式，將 FL478 之 *Saltol* 轉入優良品種中，期成功培育出高耐鹽且高產的新品系 (Thomson *et al.* 2010)；許多水稻耐鹽特性之研究學者於此區間設計多個緊密連鎖之分子標幟，本試驗選用 1 個緊密連鎖之分子標幟 CH0113 及 2 個鄰近兩側之分子標

幟，分別為 RM10695 及 RM10793，用以篩選出帶有 'Pokkali' 之 *Saltol* QTL 基因片段的回交後代。

本試驗利用耐鹽籼稻 'Pokkali' 為貢獻親，透過分子標識輔助回交育種方式，將 'Pokkali' 提供之耐鹽 *Saltol* QTL 轉移至台灣梗稻品種「台梗九號」('TK9')，過程中每 1 個世代均透過 200 mM 之高鹽分逆境篩選，而存活植株再利用分子標識進行前景選拔 (foreground selection)，篩選具耐鹽性且再以背景選拔選出與 'TK9' 遺傳背景相似度高之水稻新品系，並藉此建立台灣分子標識輔助耐鹽水稻的育種模式，因應未來氣候變遷下耐鹽逆境之水稻育種、栽培及糧食生產時需求。

材料與方法

試驗材料

回交族群之建立：本試驗以籼稻品種 (*Oryza sativa* L. indica) 'Pokkali' 作為貢獻親，而梗稻品種 (*Oryza sativa* L. japonica) 'TK9' 則作為輪迴親，'Pokkali' 為印度沿海栽培常用的極耐鹽之籼稻品種，所帶有之 *Saltol* QTL 是控制目標性狀耐鹽性的 QTL，因此以其做為貢獻親 (Thomson *et al.* 2010)；而 'TK9' 是台灣優質米推薦之水稻品種，食味品質優良，故在本研究中作為導入 *Saltol* QTL 所需之輪迴親。以 'Pokkali' 及 'TK9' 雜交後，得到 F₁ 種子，再與輪迴親 'TK9' 重複 2 次回交及自交，分別建立分子標識輔助選拔所需 BC₁F₁、BC₂F₁、BC₂F₂ 及 BC₂F₃ 之各世代材料 (圖 1)。在各回交世代中，BC₁F₁ 植株有 268 株、BC₂F₁ 為 320 株、而 BC₂F₂ 世代則為 608 株，在各世代稻株秧苗五葉齡時先以 200 mM NaCl 溶液進行鹽分逆境處理，其存活植株再進一步進行分子標識前景選拔，確認帶 *Saltol* QTL 之植株隨後則進行分子標識背景選拔。其中 BC₁F₁ 經分子標識背景選拔獲選之植株為 10 株，即挑選出與輪迴親 'TK9' 遺傳背景相似度最高之 10 株移至田間種植，供作為母本進行回交。至於 BC₂F₁ 及 BC₂F₂ 獲選之耐鹽植株同樣進行分子標識前景及背景選拔，分別選擇

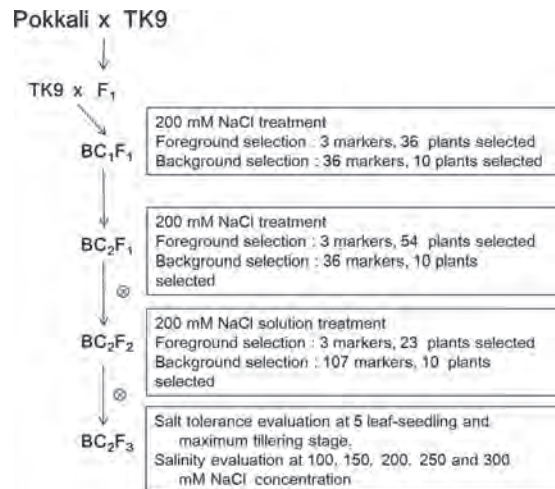


圖 1. 分子標識輔助 *Saltol* QTL 導入 'TK9' 之回交育種流程，包含各世代 200 mM NaCl 鹽分處理、前景及背景選拔之分子標識數量及獲選株數。

Fig. 1. Marker-assisted backcross breeding scheme for introgression *Saltol* QTL into 'TK9' with details of 200 mM NaCl solution treatment, markers used for foreground and background selection, and the numbers of plants selected in each generation.

帶有 *Saltol* QTL 且遺傳背景與 'TK9' 相似度最高之 10 單株，獲選單株分別收穫自交 BC₂F₃ 種子。

耐鹽表現調查

耐鹽等級調查：水稻種子以培養皿進行消毒及浸種發芽後，點播於 60 cm × 50 cm 之 80 孔的水耕栽培盤進行水耕栽培，每孔 1 株，培養液使用改良式木村氏 B 培養液配方 (Yoshida *et al.* 1976)。待全盤植株平均生長達 5–6 葉齡時，改以含有 200 mM NaCl 之水耕液進行鹽分逆境處理，並進行植株耐鹽等級之調查。調查耐鹽等級依據修改 IRRI 於 2002 年所制定鹽害等級分級標準之水稻標準評估系統 (Standard Evaluation System for Rice; SES) 手冊，其分為 6 個等級，分別為 0 級：植株正常生長；1 級：植株葉片捲曲或下位葉黃化；3 級：植株葉片前端乾枯白化；5 級：植株葉片約 1/2 乾枯白化；7 級：植株葉片約 2/3 乾枯白化；9 級：植株完全死亡 (圖 2)。

耐鹽品系不同發育時期之調查：BC₂F₂ 世代利用分子標識輔助選拔之 10 個單株分別

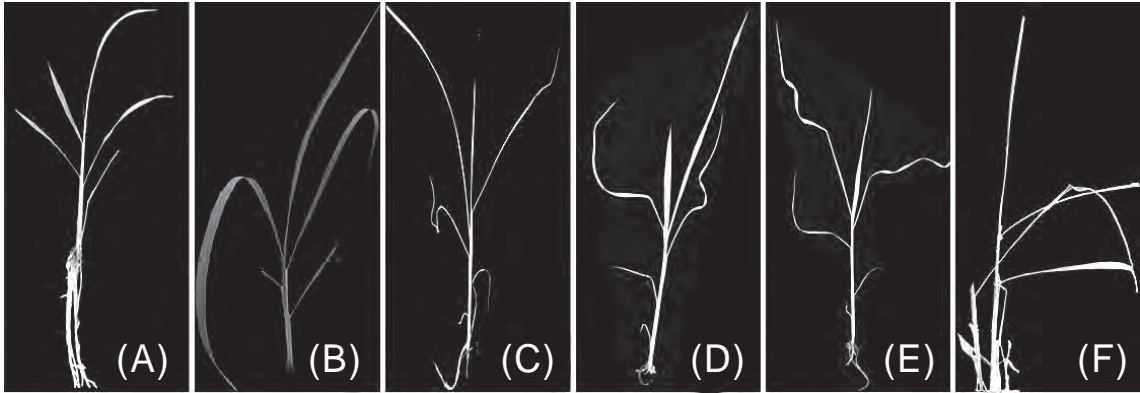


圖 2. 水稻秧苗期耐鹽等級調查標準。(A) 植株生長正常，耐鹽等級為 0；(B) 植株葉片捲曲或下位葉枯黃，耐鹽等級為 1；(C) 植株葉片先端乾枯黃化，耐鹽等級為 3；(D) 植株葉片約 1/2 乾枯黃化，耐鹽等級為 5；(E) 植株葉片約 2/3 乾枯黃化，耐鹽等級為 7；(F) 植株完全乾枯黃化，耐鹽等級為 9。

Fig. 2. Standards used for evaluating salt-tolerance in rice seedling. (A) When plant growth is normal, the scale of salt-tolerance is denoted 0; (B) some leaves are rolled or discolored, the scale of salt-tolerance is denoted 1; (C) some leaf tips are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 3; (D) about 1/2 leaves are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 5; (E) about 2/3 leaves are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 7; (F) and whole plant nearly dead and wilted, the scale of salt-tolerance is denoted 9.

收穫自交種子，並於 BC₂F₃ 世代成立品系，即 STK1、STK2、STK3、STK4、STK6、STK7、STK8、STK9、STK10、STK11 等 10 個品系。10 品系分別於五葉齡及最高分蘗期兩個不同生長階段進行鹽分逆境處理，並以輪迴親本 'TK9' 作為對照品種。五葉齡之試驗利用 34 cm × 27 cm 之 96 孔水耕栽培盤培育幼苗，並於苗齡達五葉齡時添加 200 mM NaCl 水耕液進行鹽分逆境處理。試驗以 RCBD (randomized complete block design; RCBD) 設計排列，2 重複，每重複 8 株。而最高分蘗期試驗則利用口徑 34 cm 之塑膠圓桶並加入 8.5 kg 田土，以自來水灌溉，維持水面為土面上 3–5 cm，於生長至最高分蘗以 200 mM NaCl 鹽水進行鹽分逆境處理。試驗以 RCBD 設計排列，3 重複，每重複 3 株。兩試驗皆於植株間耐鹽性表現出差異時為調查起始日，每日調查至植株死亡為止。

耐鹽品系不同鹽分濃度之調查：利用上述 10 個 BC₂F₃ 品系於五葉齡時期進行鹽分逆境處理，並以輪迴親 'TK9' 作為對照品種。使用 37 cm × 27 cm 之 96 孔盤水耕栽培盤進行材料培育，五葉齡階段分別添加 100、150、200、250 及 300 mM 等不同濃度之氯化鈉溶液處

理。試驗以 RCBD 設計排列，兩重複，每重複 8 株，於植株表現出差異時開始調查直至植株死亡為止。

分子標幟分析

水稻基因體 DNA 萃取：水稻基因體 DNA 萃取使用 Kazuhiro *et al.* (1998) 發表之 benzyl chloride 法萃取水稻 DNA。分子標幟則利用 Thomson *et al.* (2010) 進行前景選拔所使用的分子標幟及 Hsu (2012) 發表之多型性分子標幟資料，挑選在 'Pokkali' 及 'TK9' 間具有多型性的分子標幟進行分析。

PCR 反應、電泳分析及基因型判讀：PCR 反應流程如下：94°C 設定 2 min，循環 1 次；94°C 設定 30 s，55°C 設定 30 s，72°C 設定 30 s，共循環 35 次；72°C 設定 2 min，循環 1 次；最後設定在 20°C 結束。PCR 增殖產物使用 2.5% SFR 洋菜膠，利用電泳系統在 200 V 下持續 25 min 進行電泳分析。比對親本與子代在 PCR 增殖後的 DNA 片段大小，出現 1 個條帶與 'Pokkali' 品種之條帶相同，則此子代為帶有 'Pokkali' 相同 DNA 之同型結合子，基因型紀錄為 A；出現一個條帶與 'TK9' 之條帶相同，則此子代為帶有 'TK9' 相同 DNA 之同型結合

子，基因型紀錄為 B；若子代同時出現兩個與兩親本相同之 DNA 條帶，則為異型結合子，基因型紀錄為 H。不論在 BC₁F₁ 或 BC₂F₁ 之回交後代植株，其基因型只會出現同型結合子 B 或異型結合子 H，若出現同型結合子 A 則為自交種子，此株即淘汰。

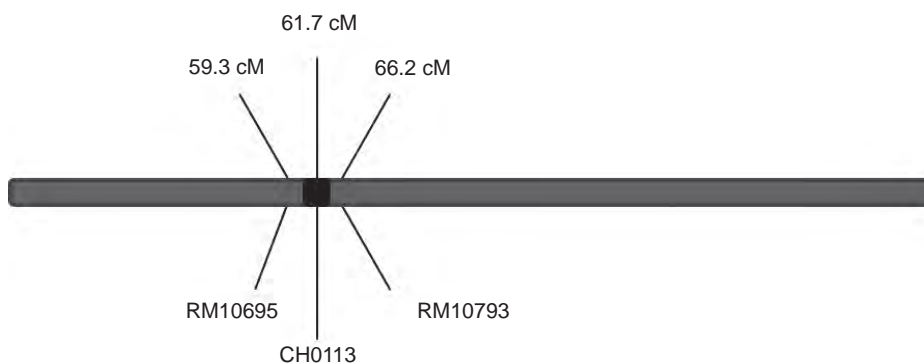
多型性分子標幟篩選：分子標幟的挑選依據 Hsu (2012) 發表之多型性分子標幟資料，挑選輪迴親本 ‘Pokkali’ 與 ‘TK9’ 間具多型性的分子標幟進行分析，並額外自行設計之 SSR 及 Indel 分子標幟填補不足位置。SSR 來源根據水稻分子標幟資料庫網站，Gramene (<http://www.gramene.org/markers/microsat/>) 已公布的 SSR 分子標幟序列 (Supplementary Table 18, IRGSP, 2005)，Indel 的設計則是根據 Shen *et al.* (2004) 所發表 Indel 存在位置進行相關引設計。至於應用於 *Saltol* QTL 篩選之分子標幟則挑選第一條染色體 59.3–66.2 cM 位置之 3 個分子標幟進行，其中包括與 *Saltol* 緊密連鎖的 1 個 indel 分子標誌 CH0113 及兩個位於 *Saltol* QTL 兩側之 SSR 分子標幟 RM10793 及 RM10695 進行前景選拔 (圖 3)。

遺傳相似度分析：將基因型判讀結果以 GGT graphical genotype (GGT 2.0)/2007 EDITION 軟體 (<http://www.plantbreeding.wur.nl/>) 進行統計分析，進一步計算出子代之遺傳背景相似度。圖 4 之連鎖圖譜乃根據上述所篩選出親本間具有多型性的分子標幟在 RAP-DB 網站所公布的 BAC/PAC 位置，換算成 IRGSP (The International Rice Genome Sequencing Project) 網站 Build 5 版公布的 ‘Nipponbare’/‘Kasalath’ 雜交族群的連鎖圖譜位置，並將結果利用 GGT 2.0 繪出之圖譜。

結果

分子標幟輔助水稻耐鹽性選育

分子標幟前景選拔：各世代之秧苗生長至五葉齡時期進行鹽分逆境篩選，存活之植株利用位於第一條染色體 59.3–66.2 cM 與 *Saltol* 緊密連鎖的 1 個 indel 分子標幟 CH0113 及 2 個位於 *Saltol* QTL 兩側之 SSR 分子標幟 RM10793 及 RM10695 (圖 3) 進行前景選拔，經基因型判讀於 BC₁F₁ 及 BC₂F₁ 世代選取帶有 ‘Pokkali’/‘TK9’ 異型結合子基因型之植株。而 BC₂F₂ 則選取帶有 ‘Pokkali’ 同型結合子基因型之植株，選出之植株均進行背景選拔。結果在 BC₁F₁、BC₂F₁ 及 BC₂F₂ 世代分別共選出 36、54 及 23 株，選出帶有 *Saltol* QTL 區間片段之植株供後續耐鹽特性試驗測試驗利用。



Name	Mb	cM	Notes	Forward primer	Reverse primer
RM10695	10.98	58.1-60.6	flanking marker	ACTCCATGAAACAACGAAC	TTGAATTCTACTAGTTTGGGAAGG
CH0113	11.46	60.9-62.5	foreground <i>Saltol</i>	CCCAACGGCACATTAATC	GATCCTGAGACCTGACACG
RM10793	12.5	66.2	flanking marker	GACTTGCCAACTCCTCAATTG	TGTCGAGTAGCTTCCTCTTACC

圖 3. 應用於回交品系之前景選拔所使用之功能性分子標幟及鄰近兩側分子標幟位置與序列。

Fig. 3. The position and sequence of functional markers and flanking markers used in foreground selection of back-cross lines.

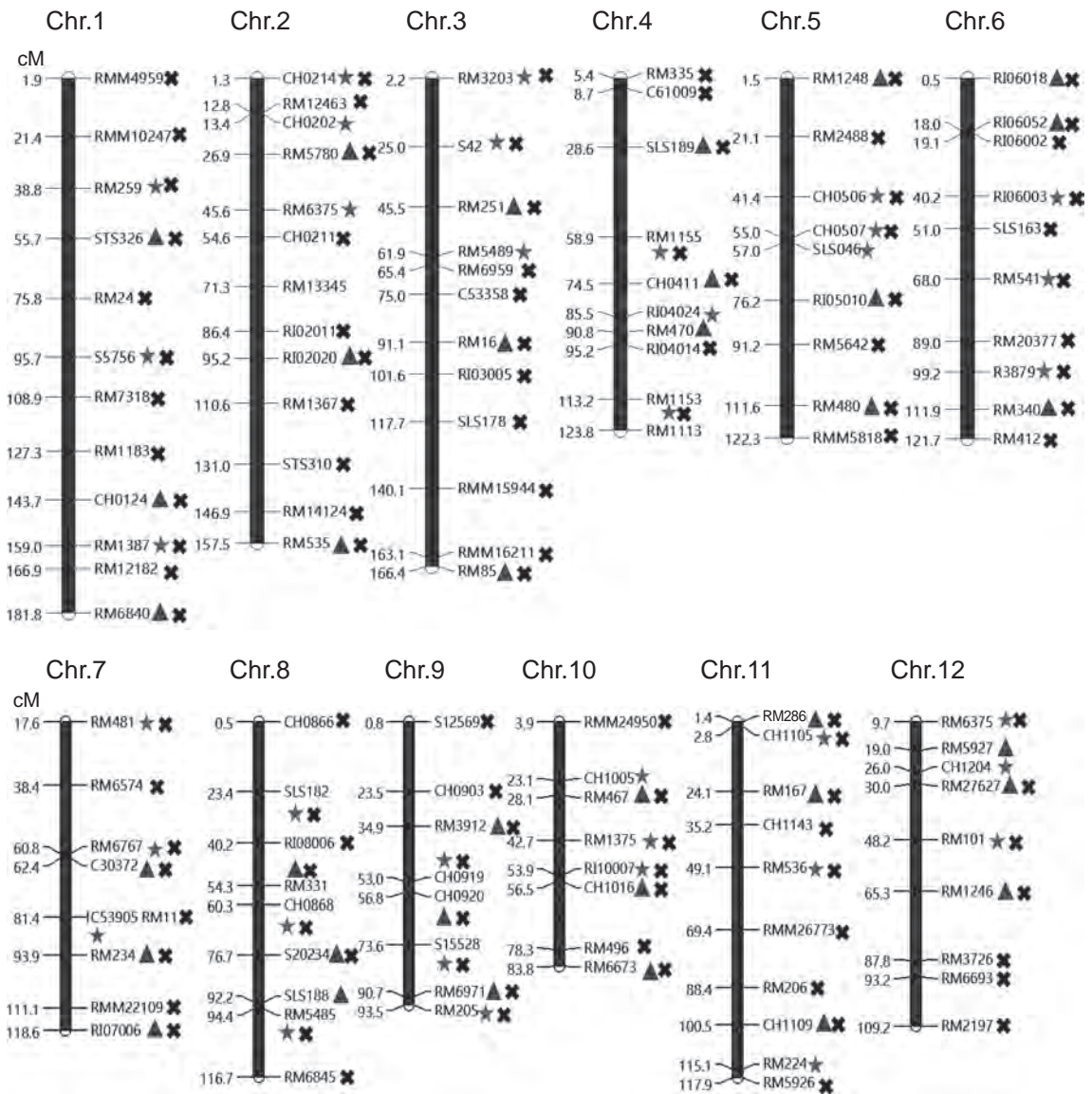


圖 4. 應用於背景選拔之多型性分子標幟。其中 36 個分子標幟於 BC₁F₁ 背景選拔 (星形)、36 個分子標幟於 BC₂F₁ 背景選拔 (三角形) 及 107 個分子標幟於 BC₂F₂ 背景選拔 (X 形)。分子標幟代號 RM 開頭為 SSR 分子標幟，C、R、S 或 E 為 STS 分子標幟，CH、STS、SLS 或 RI 為 indel 分子標幟。

Fig. 4. The polymorphic markers used for background selection. 36 markers indicated by stars at BC₁F₁ generation, 36 markers indicated by triangle at BC₂F₁ generation, and 107 markers indicated by X at BC₂F₂ generation. The prefixes RM indicates SSR markers, C, R, S or E indicates STS markers, and CH, STS, SLS or RI indicates indel markers.

分子標幟背景選拔：利用分布在 12 條水稻染色體上，共 107 個分子標幟進行背景基因型判讀，其中包括 65 個 SSR 分子標幟、9 個 STS 分子標幟及 33 個 indel 分子標幟 (圖 4、表 1)。經耐鹽選拔及分子標幟前景選拔，

BC₁F₁、BC₂F₁ 及 BC₂F₂ 世代分別共選出 36、54 及 23 株。BC₁F₁ 植株使用分布於 12 條水稻染色體上之分子標幟 (表 1)，結果顯示 36 株耐鹽 BC₁F₁ 植株與 'TK9' 的遺傳相似度範圍為 56–87%，總體平均值約在 71.5%；選出

表 1. 'Pokkali' 與 'TK9' 間具多型性分子標幟及應用於耐鹽 QTL 導入族群背景選拔之數量。

Table 1. The number of polymorphic markers between 'Pokkali' and 'TK9' used for background selection.

Backcross generation	Chr.	Genetic marker			Subtotal
		SSR	STS	Indel	
BC ₁ F ₁	1	2	1	0	3
	2	1	0	2	3
	3	2	1	0	3
	4	2	0	1	3
	5	0	0	3	3
	6	1	1	1	3
	7	2	1	0	3
	8	1	0	2	3
	9	1	1	1	3
	10	1	0	2	3
	11	2	0	1	3
	12	2	0	1	3
	Total		17	5	14
BC ₂ F ₁	1	1	0	2	3
	2	3	0	0	3
	3	3	0	0	3
	4	1	0	2	3
	5	2	0	1	3
	6	1	0	2	3
	7	1	1	1	3
	8	1	1	1	3
	9	2	0	1	3
	10	2	0	1	3
	11	2	0	1	3
	12	3	0	0	3
	Total		22	2	12
BC ₂ F ₂	1	9	1	2	12
	2	6	0	5	11
	3	7	2	2	11
	4	4	1	3	8
	5	5	0	3	8
	6	4	1	5	10
	7	6	1	1	8
	8	3	1	4	8
	9	3	2	3	8
	10	5	0	2	7
	11	6	0	3	9
	12	7	0	0	7
	Total		65	9	33

遺傳相似度最高前 10 株，與 ‘TK9’ 之遺傳相似度分別為 86.6、85.9、84.4、82.2、81.5、79.3、76.7、76.2、75 及 73.8%，遺傳相似度平均值為 80.1%。獲選之植株均移植至田間，並於回交時作為母本使用，與 ‘TK9’ 回交。BC₂F₁ 回交後代經耐鹽且帶有 *Saltol* QTL 篩選中，結果獲得 54 株植株供分子標幟背景選拔，分子標幟選擇與 BC₁F₁ 世代完全不重複的 36 個分子標幟 (圖 4)，以避免相同之基因體片段重複篩選，降低了分子標幟背景選拔效率；背景選拔結果顯示 BC₂F₁ 與 ‘TK9’ 間遺傳相似度介於 68–97%，平均值約為 85.4% (圖 5)。選出 10 株與 ‘TK9’ 遺傳相似度較高之植株，其遺傳相似度分別為 96.5、93.5、92.8、92.4、90.3、90.1、89.9、89.6、89.3 及 89%，平均值為 91.3%，此 10 株獲選 BC₂F₁ 進行自交。進一步進行 BC₂F₂ 後代耐鹽且帶有 *Saltol* QTL 之前景選拔，結果選出 23 株耐鹽且帶有 *Saltol* QTL 之前景選拔，結果選出 23 株耐鹽且帶有 *Saltol* QTL 之 BC₂F₂，為達到覆蓋整個水稻基因體的背景選拔效果，因此挑選了 107 個分布於 12 條水稻染色體上的多型性分子標幟 (表 1、圖 4)，以此 107 個分子標幟進行 BC₂F₂ 回交後代之基因型判讀。結果顯示此 23 株與 ‘TK9’ 遺傳相似度範圍為 75.65–87.55%，整體平均約為 82.7% (圖 5)，其中遺傳相似度最高者為 87.55% (表 2)。由此結果可知，BC₂F₂ 回交後代遺傳背景回復至輪迴親 ‘TK9’ 之比率，相較於 BC₂F₁ 有下降的現象。結果顯示，利用分子標幟輔助選拔進行前景選拔，可準確地將目標性狀轉移進入輪迴親。

BC₂F₃ 品系不同鹽分濃度下之耐鹽性評估

以獲選之 10 個 BC₂F₃ 世代品系於五葉齡期處理 100、150、200、250 及 300 mM 不同濃度之氯化鈉溶液，評估各品系之穩定性，試驗同時增加輪迴親 ‘TK9’ 做為對照比較，結果如表 3 所示。在 100 mM NaCl 溶液處理下，各品系耐鹽等級表現在第 2 日開始出現差異，因此開始調查直至處理後第 22 日 (圖 6)。以 16 株植株表現之耐鹽等級進行平均，結果顯示處理後第 7 日敏感型親本 ‘TK9’ 即表現出耐

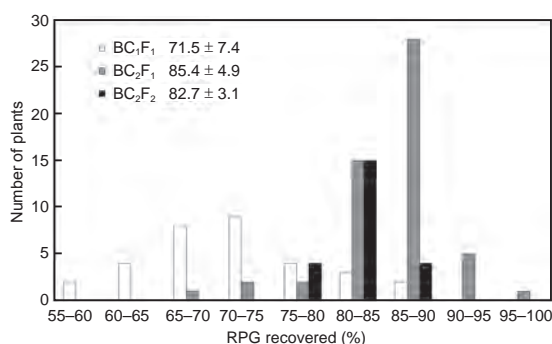


圖 5. ‘Pokkali’/‘TK9’ 分子標幟輔助回交育種後族群 BC₁F₁、BC₂F₁ 及 BC₂F₂ 回復輪迴親 ‘TK9’ 基因體比率之頻率分布圖。圖形符號右邊之數值為族群平均輪迴親基因體回復比率。

Fig. 5. The frequency distribution of recurrent parent genome (RPG) recovered rate using marker-assisted backcrossing in BC₁F₁, BC₂F₁, and BC₂F₂ populations derived from the backcross of ‘Pokkali’/‘TK9’. The numbers inside the right side of frame indicate the mean values of RPG recovered.

鹽等級為 5 級，其餘品系表現僅 3–4 級，直至第 9 日所有品系耐鹽等級均達 5 級以上，第 12 日所有品系耐鹽等級則均達 7 級；而變方分析結果顯示在第 4、7、15 及 21 日各品系間之耐鹽等級達顯著差異水準，其中以 STK6、STK7 及 STK11 有較佳耐鹽表現，而 STK1 則是偏向在鹽分逆境前期表現較優良 (表 3)。

在 150 mM NaCl 溶液處理下，各品系間耐鹽等級表現在第 2 日開始出現差異，因此開始調查直至處理後第 20 日。結果顯示處理第 8 日後，除 STK1、STK9 及 STK11 外，其餘品系之耐鹽等級皆達 5 級，而敏感型親本 ‘TK9’ 之耐鹽等級則已達到 7 級。至處理第 11 日，除了 STK11 之外，所有品系耐鹽等級均 7 級以上。經變方分析結果顯示，品系間耐鹽等級分別在處理第 6、7、8、9、10、11 及 12 日達到顯著差異水準，其中以 STK7、STK8、STK9 和 STK11 為耐鹽性較佳者，又以 STK11 的耐鹽特性表現最優良 (表 3)。

在 200 mM NaCl 溶液處理下，處理後第 2 日開始調查直至第 16 日。結果顯示處理第 6 日除 STK7 及 STK8 外，其餘品系耐鹽等級均達 5 級，其中耐鹽性表現最佳之品系為 STK7，耐鹽等級平均為 4.8 級，而表現最

表 2. 以 107 個分子標幟應用於 MAS 以分析 'Pokkali' 與 'TK9' 回交後代 BC₂F₂ 之基因體組成。

Table 2. The genome composition of BC₂F₂ derived from backcross between 'Pokkali' and 'TK9' by 107 polymorphic markers used for marker-assisted selection.

Individual	N ^z (%)	A ^y (%)	B ^x (%)	H ^w (%)	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant ^v	H-segments ^u
TK9	0	0	100	0	100	1,466.5	0	0
3-387	0	8.3	83.4	8.3	87.6	1,466.5	23	6
3-426	0	9.8	84.7	5.5	87.5	1,466.5	21	4
2-171	0	10.5	85.3	4.2	87.4	1,466.5	19	3
3-678	0	12.3	82.5	5.1	85.1	1,466.5	19	2
3-146	0	11.1	80.7	8.2	84.8	1,466.5	20	6
3-178	0	10.9	80.4	8.7	84.8	1,466.5	20	3
210	0	12.4	80.5	7.1	84.1	1,466.5	22	5
4-309	0	9.3	77.3	13.4	84.0	1,466.5	27	8
192	0	13.7	81.2	5.2	83.8	1,466.5	18	3
3-305	0	15.5	81.9	2.6	83.2	1,466.5	19	2
2-124	0	11.2	77.6	11.2	83.2	1,466.5	23	5
268	0	12.5	78.7	8.8	83.1	1,466.5	23	4
126	0	12.4	78.2	9.4	82.9	1,466.5	21	4
2-209	0	8.0	73.1	18.9	82.6	1,466.5	26	8
4-194	0	12.5	77.2	10.3	82.4	1,466.5	23	4
20	0	16.2	80.4	3.4	82.1	1,466.5	21	2
189	0	15.0	78.1	6.9	81.6	1,466.5	21	3
4-271	0	14.2	77.1	8.6	81.4	1,466.5	26	6
219	0	9.2	69.8	21.0	80.3	1,466.5	28	8
151	0	12.6	72.3	15.1	79.9	1,466.5	20	5
4-127	0	17.6	72.9	9.5	77.7	1,466.5	27	6
4-55	0	21.4	74.0	4.6	76.3	1,466.5	24	5
2-37	0	16.7	68.0	15.3	75.7	1,466.5	24	7
Pokkali	0	100	0	0	0	1,466.5	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.

差之品系為 STK2，耐鹽等級平均為 6.5，至於敏感型親本 'TK9' 則達 7 級以上。處理第 9 日除 STK4 及 STK8 外，其餘品系耐鹽等級均達 7 級以上，且 'TK9' 之植株均已死亡；經由變方分析顯示處理第 12 日以後各品系間未達顯著性差異水準外，其餘天數皆達顯著水準，其中以 STK8 之耐鹽表現最佳，而 STK4 及 STK7 也有不錯的耐鹽性表現 (表 3)。

在 250 mM NaCl 溶液處理下，各品系間

第 2 日葉片即表現出差異，於當日開始進行調查直至第 9 日植株全部死亡為止。試驗結果顯示，鹽分濃度提高到 250 mM NaCl 後，處理第 3 日除 STK7、STK8 和 STK9 外，其餘品系之耐鹽等級表現皆達 5 級，第 5 日所有品系耐鹽等級皆達 7 級，而親本 'TK9' 則大部分植株接近死亡；變方分析結果顯示各品系間在第 2、5、7 及 8 日均達顯著水準，其中發現 STK8 之耐鹽表現最佳，而 STK7 及 STK9 也

表 3. 'TK9' 和 10 個 BC₂F₃ 品系於 5 葉齡進行 5 種不同氯化鈉濃度鹽分逆境處理 22 d 之耐鹽等級表現 (續)。
 Table 3. The scales of salt-tolerance for 'TK9' and 10 BC₂F₃ lines under 5 concentrations of NaCl solution treatments for 22 days at 5-leaf stage (continued).

NaCl conc.	Line or variety	Scale of salt-tolerance ²																								
		Days after treatment																								
300 mM	STK1	3.0	5.5 b	6.8	7.0 b	7.5 ab	8.4 ab	9.0																		
	STK2	3.0	5.4 b	7.0	7.0 b	7.3 b	8.8 ab	9.0																		
	STK3	3.0	6.1 ab	7.0	7.0 b	8.1 ab	8.8 ab	9.0																		
	STK4	3.0	5.6 b	7.0	7.1 b	7.4 ab	8.5 ab	9.0																		
	STK6	3.0	5.8 b	6.9	7.0 b	7.8 ab	8.9 a	9.0																		
	STK7	3.0	5.3 b	6.9	7.0 b	7.6 ab	8.8 ab	9.0																		
	STK8	3.0	5.8 b	6.6	7.0 b	7.3 b	8.0 b	9.0																		
	STK9	3.0	5.6 b	7.0	7.0 b	8.0 ab	8.8 ab	9.0																		
	STK10	3.0	6.3 ab	7.0	7.0 b	7.9 ab	9.0 a	9.0																		
	STK11	3.0	6.3 ab	6.9	7.0 b	7.8 ab	8.9 a	9.0																		
	TK9	3.0	7.0 a	7.0	7.9 a	8.4 a	9.0 a	9.0																		

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

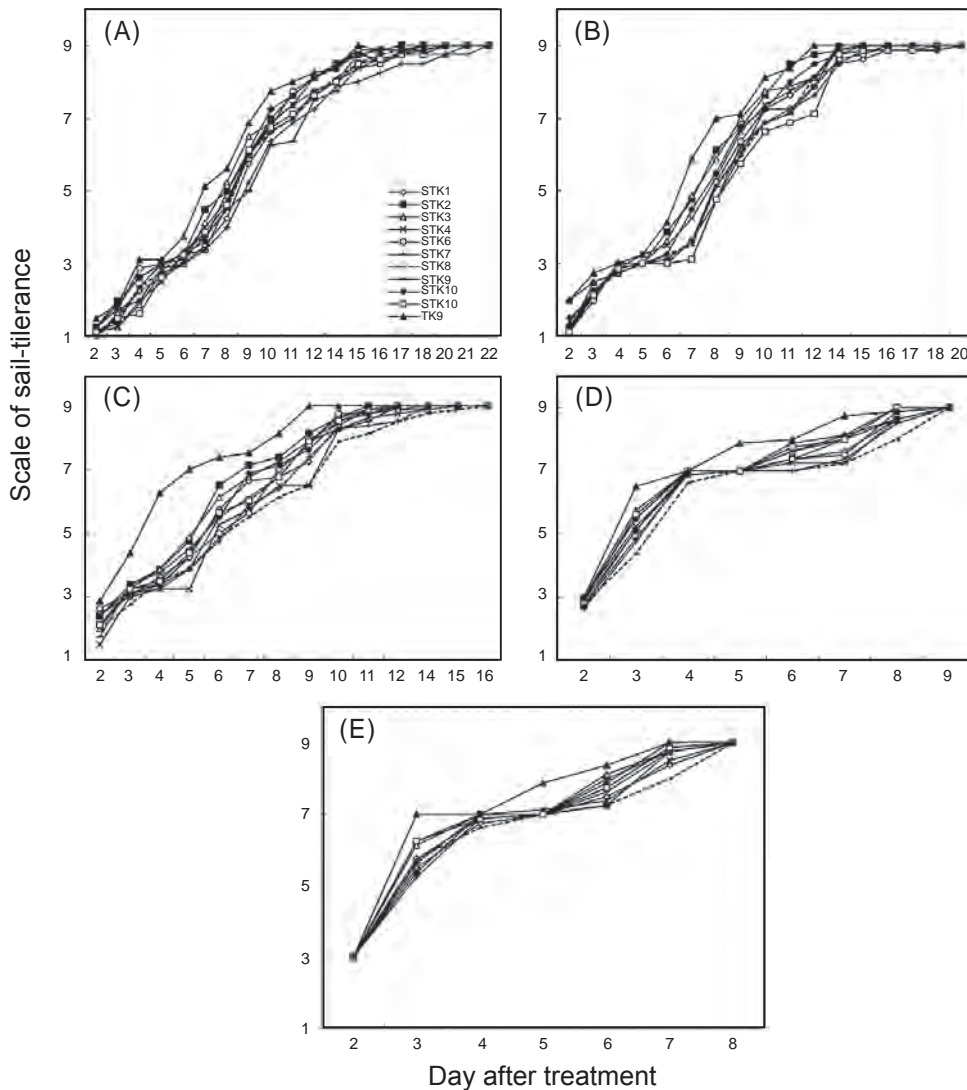


圖 6. 輪迴親 'TK9' 及 10 個 'TK9'/'Pokkali' 回交後代 BC_2F_3 品系於五葉齡時期進行不同濃度 (A) 100 mM; (B) 150 mM; (C) 200 mM; (D) 250 mM 及 (E) 300 mM 氯化鈉鹽分逆境處理下之耐鹽等級變化。

Fig. 6. The salt-tolerance scales for evaluating recurrent parent 'TK9' and 10 BC_2F_3 lines derived from the back-cross of 'Pokkali'/'TK9' at five-leaf seedling stage under five different NaCl concentrations. (A) 100 mM, (B) 150 mM, (C) 200 mM, (D) 250 mM, and (E) 300 mM NaCl.

偏向表現較佳的耐鹽性 (表 3)。

當施以 300 mM NaCl 溶液之鹽分濃度處理，同樣於第 2 日開始進行調查至第 8 日植株全部死亡。結果與 250 mM NaCl 溶液處理下之情況相似，在第 3 日及第 5 日品系之耐鹽等級分別達 5 級及 7 級，而敏感型親本 'TK9' 則是在第 3 日即達耐鹽等級 7 級。經變方分析結果顯示在處理第 3、5 和 6 日品系間耐鹽等

級均達顯著水準，結果顯示 STK8 及 STK2 之耐鹽等級表現較佳。綜觀此 11 個耐鹽品系在 5 種不同鹽分濃度下之耐鹽表現，以 STK7 及 STK8 為最優良耐鹽品系，於 4 種鹽分濃度下均表現出較佳的耐鹽性；而 STK2、STK4、STK6、STK9 及 STK11 則為單一濃度下有較佳耐鹽表現者，因此 STK7 及 STK8 為不同鹽分濃度下耐鹽性表現較為穩定的品系 (表 3)。

BC₂F₃ 品系不同生長時期下之耐鹽性評估

以 10 個 BC₂F₃ 回交世代之品系及輪迴親 'TK9' 於五葉齡及最高分蘗期進行 200 mM NaCl 鹽分逆境處理，藉以了解獲選品系在秧苗期及成株期生長階段鹽分逆境耐受性，結果顯示在五葉齡時期進行 200 mM NaCl 鹽分逆境處理後，其於第 2 日各品種 (系) 間耐鹽等級即出現差異，於此日開始進行調查，直至第 16 日植株全部乾枯死亡時為止，試驗結果如表 4 所示。顯示處理後第 5 日輪迴親 'TK9' 之耐鹽等級即達 7 級，而各品系則於處理第 7 日後，其耐鹽等級方達 5 級以上。至於處理第 9 日除 STK4 及 STK8 外，其餘品種 (系) 耐鹽等級均達 7 級以上，而輪迴親 'TK9' 則全數乾枯死亡。變方分析結果顯示，除處理 12 日以後各品種 (系) 間未達顯著差異水準外，其餘天數皆達顯著差異水準，處理結果顯示品系 STK8 之耐鹽等級表現最佳，而 STK4 及 STK7 之耐鹽性亦有不錯表現 (表 4、圖 7)。

最高分蘗期之各品種 (系) 間於耐鹽處理後第 9 日鹽害情形出現，因此開始進行耐鹽等級調查直至第 30 日，結果如表 4 所示。顯示處理 18 日之前，各品種 (系) 間之耐鹽等級表現皆無顯著差異，處理後第 20 日時，除了 STK7 之外，其餘品種 (系) 耐鹽等級均達 5 級以上。其中輪迴親 'TK9' 之耐鹽等級已達 7 級，與耐鹽表現最優良之品系 STK7 差距為 2.7 級。處理第 28 日後除 STK1 及 STK7 之外，所有品種 (系) 之耐鹽等級均達 7 級以上；變方分析結果顯示品種 (系) 間在處理第 18 日後之耐鹽等級差異始達顯著水準，而多重比較結果顯示品系 STK7 及 STK8 之耐鹽表現最佳 (表 4、圖 7)。

討論

分子標幟輔助水稻耐鹽性之選育

分子標幟輔助回交育種，傳統回交育種在試驗族群規模足夠的狀況下，於 BC₁、BC₂、BC₃ 及 BC₄ 世代之遺傳背景回復到輪迴親基因型的理論值分別為 75、87.5、93.8 及 96.9%。但在現實育種流程中，大多會因為雜交親本遺

傳背景差異大或族群數量不足，使各回交世代遺傳背景回復到輪迴親基因組之比率低於理論值 (Collard *et al.* 2005)。在傳統回交育種操作過程中，一般需回交 6–8 次，回交後代之基因組才能接近於輪迴親基因組，而透過分子標幟輔助回交育種，僅需回交 3–4 次即可達到傳統回交育種的功效。若將分子標幟使用之密度提高到 10 cM 以內，甚至可回交 2 次即可達到目標回復率 (Collard *et al.* 2005; Collard & Mackill 2008; Xu & Crouch 2008)。

本試驗雜交組合在回交 2 次之 BC₂ 世代，選出的回交後代遺傳背景與輪迴親基因組的相似度介於 89–96%。然 BC₂F₂ 經 107 個分子標幟分析基因組後，顯示遺傳背景相似度僅平均介於 76–88%，遺傳相似度平均值接近 BC₂F₁ 的理論值，並較 BC₂F₁ 的實際值偏低。其原因可能是因本試驗所選用之雜交親本間的遺傳背景差異較大，或因遺傳拖曳 (genetic drag)、重組、回交族群數量不足等因素，抑或是在 BC₁F₁ 及 BC₂F₁ 世代選用的分子標幟判讀基因型皆與輪迴親相同。而 BC₂F₂ 新加入之分子標幟判讀基因型可能為異型結合或與貢獻親為相同基因型，透過比較 BC₂F₁ 及 BC₂F₂ 背景選拔之基因型判讀，顯示 BC₂F₂ 新增的分子標幟基因型多與貢獻親相同，進而降低回交後代與輪迴親遺傳背景相似度，因此可看出為連鎖拖曳。以上原因，造成 BC₂F₂ 遺傳回復率有偏低的現象。由 BC₁F₁ 獲選回交後代之基因圖譜 (資料未列) 可發現，這些獲選的回交後代在第 1、3、4、6、11 及 12 條染色體上，其遺傳背景大多未回復到輪迴親之遺傳背景。惟就 BC₁F₁ 及 BC₂F₁ 遺傳回復率來看，其它水稻耐鹽性方面之研究也有相似的選拔結果。例如 Kuo *et al.* (2013) 利用水稻全基因體上共 100 個分子標幟進行水稻耐鹽性回交育種，於不同回交世代進行遺傳相似度分析，其回復率在 BC₁ 回交世代約 75%，BC₂ 世代為 89%；Vu *et al.* (2012) 同樣利用分子標幟回交育種法，將 FL478 所帶有的 *Saltol* QTL 堆疊到越南耐鹽品種 BT7，共選用 89 個分子標幟進行背景選拔，於 BC₁F₁ 回交世代遺傳相似度範圍為 71–76%，BC₂F₁ 回交世代為 88.5–95.5%，

表 4. 'TK9' 和 10 個 BC₂F₃ 品系於 5 葉齡及最高分蘗期進行 200 mM NaCl 鹽分逆境處理 30 d 之耐鹽等級表現結果。
 Table 4. The scale of salt-tolerance for 'TK9' and 10 BC₂F₃ lines at 5-leaf stage seedling and maximum tillering stage under the treatment of 200 mM NaCl solution for 30 days.

Stage	Line or variety	Scale of salt-tolerance ²																				
		Days after treatment																				
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	18	20	22	24	26	28	30
Five-leaf stage	STK1	2.5 abc	3.0 b	3.6 b	4.3 b	5.8 ab	6.6 abc	6.8 bc	7.3 bc	8.4 ab	8.9 ab	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	STK2	2.4 abc	3.4 b	3.9 b	4.8 b	6.5 ab	7.1 ab	7.4 ab	8.1 ab	8.6 ab	9.0 a	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	STK3	2.0 abc	3.3 b	3.9 b	4.9 b	6.1 ab	6.8 abc	7.3 abc	7.9 ab	8.6 ab	8.9 ab	8.9	8.9	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	STK4	1.5 c	3.0 b	3.3 b	3.3 b	5.3 b	5.8 bc	6.5 bc	6.5 bc	8.3 ab	8.6 ab	8.8	8.9	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	STK6	2.6 ab	3.1 b	3.4 b	4.3 b	5.0 b	5.6 bc	7.0 abc	7.8 abc	8.8 ab	8.8 ab	8.9	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	STK7	2.1 abc	3.1 b	3.3 b	3.9 b	4.8 b	5.9 bc	6.4 bc	7.4 bc	8.3 ab	8.4 ab	8.5	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	STK8	2.0 abc	2.8 b	3.5 b	3.9 b	4.9 b	5.5 c	6.1 c	6.5 c	7.9 b	8.1 ab	8.5	8.8	8.9	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	STK9	1.8 bc	3.4 b	3.8 b	4.5 b	5.5 b	6.1 abc	6.8 bc	7.9 ab	8.3 ab	8.5 ab	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	STK10	2.4 abc	3.3 b	3.4 b	3.9 b	5.5 b	6.9 abc	7.1 abc	7.6 bc	8.5 ab	8.8 ab	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	STK11	2.1 abc	3.3 b	3.5 b	4.4 b	5.6 b	6.0 abc	6.8 bc	7.9 ab	8.5 ab	8.9 ab	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
Maximum tillering stage	TK9	2.9 a	4.4 a	6.3 a	7.0 a	7.4 a	7.5 a	8.1 a	9.0 a	9.0 a	9.0 a	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	
	STK1							3.0	3.0	3.0	3.2	3.2	3.2	3.2	3.9	4.8 ab	5.2 ab	5.7 ab	5.9 bc	6.6 ab	6.8	7.4
	STK2							3.0	3.0	3.2	3.4	3.4	3.4	3.4	3.9	5.0 ab	5.9 ab	6.3 ab	6.8 abc	7.4 a	7.9	8.1
	STK3							3.0	3.0	3.0	3.4	3.4	3.4	3.4	4.1	5.7 ab	6.6 a	7.0 a	7.4 ab	7.7 a	8.1	8.1
	STK4							3.2	3.4	3.4	3.4	3.7	3.7	3.7	4.1	4.8 ab	5.9 ab	6.6 a	6.8 abc	7.2 ab	7.4	7.7
	STK6							3.0	3.0	3.2	3.2	3.4	3.4	3.4	3.7	4.8 ab	5.9 ab	6.3 ab	6.8 abc	7.4 a	7.4	7.4
	STK7							3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.2	3.9 b	4.3 b	4.6 b	5.2 c	5.9 b	6.8	7.7
	STK8							3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.9	4.1 b	5.2 ab	5.9 ab	5.9 bc	5.9 b	7.0	8.1
	STK9							3.0	3.0	3.0	3.0	3.4	3.7	3.7	4.3	5.2 ab	6.1 ab	6.6 a	7.0 ab	7.2 ab	7.4	8.1
	STK10							3.2	3.2	3.2	3.4	3.7	3.7	3.7	4.6	5.9 ab	6.8 a	7.0 a	7.2 ab	7.4 a	7.7	7.9
	STK11							3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.4	4.3 ab	5.7 ab	6.1 ab	6.3 abc	6.8 ab	7.0	7.4
TK9							3.0	3.0	3.0	3.0	3.7	4.1	4.1	4.6	6.3 a	7.0 a	7.4 a	7.7 a	7.7 a	7.9	8.1	

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

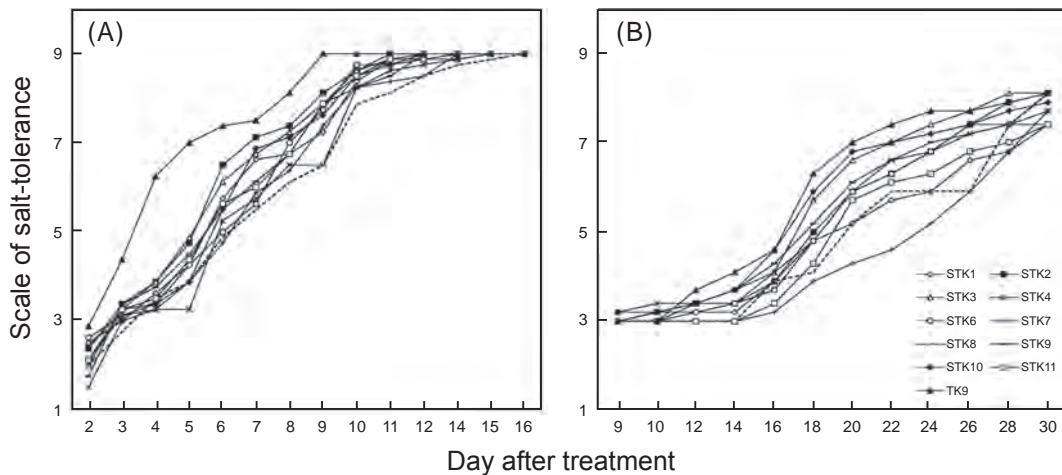


圖 7. 輪迴親 'TK9' 及 10 個 'Pokkali'/'TK9' 之 BC_2F_3 品系於不同生長時期進行 200 mM 氯化鈉鹽分逆境處理下之耐鹽等級變化。(A) 五葉齡時期；(B) 最高分蘗期。

Fig. 7. The salt-tolerance scales for evaluating recurrent parent 'TK9' and 10 BC_2F_3 lines derived from the back-cross of 'Pokkali'/'TK9' at two growth stages under the treatment of 200 mM NaCl solution. (A) 5-leaf seedling stage; (B) Maximum tillage stage.

而 BC_3F_1 回交世代之遺傳相似度最高可達 100%。這些研究結果與本試驗相近，然本試驗回交後代經自交繁殖，結果發現 BC_2F_2 與輪迴親之遺傳背景相似度有下降的現象，未來應直接評估獲選優良耐鹽品系在農藝特性和品質特性之表現，若已符合實際栽培需求，獲選品系將可進一步供鹽分地實際栽培利用測試後，並於命名為新品種後提供台灣水稻鹽化土地栽培利用；若獲選品系在實際栽培表現上未達理想，則仍需再進一步行回交藉以提高遺傳相似度。

BC_2F_3 品系於不同鹽分濃度及不同生長期之耐鹽性評估

不同鹽分濃度對水稻會有不同的傷害，而不同生長時期對鹽分逆境會有不同的反應，許多研究也針對與鹽分逆境相關的各種性狀及不同生長期進行檢測。如 Wang *et al.* (2012) 探討在不同氯化鈉濃度下，水稻地下部及地上部的 Na^+ 與 K^+ 含量以及耐鹽比率；Majeed *et al.* (2013) 探討不同鹽分濃度對發芽率、發芽時間、地上部及地下部乾重和耐鹽指數。這些結果顯示隨著鹽分濃度提高，逆境強度也會增強，而種子發芽率、發芽速度、地上部根長、

乾重、地下部根長及乾重等性狀都會隨著鹽分濃度提升而下降，而植株內部 Na^+ 含量更因溶液中 Na^+ 濃度的提升，致使植株吸收更多 Na^+ 離子，進而造成離子毒害。Thomson *et al.* (2010) 針對水稻秧苗期的株高、地上部 Na^+ 、 K^+ 含量、 Na^+/K^+ 比率、地下部 Na^+ 、 K^+ 及 Na^+/K^+ 比率等性狀進行 QTL 檢測，顯示第 1 條染色體上 *Saltol* QTL 區間對控制 Na^+/K^+ 比率有所貢獻，而 *Saltol* QTL 證實於水稻秧苗期之耐鹽性有增進的效果。Kumar *et al.* (2015) 利用 GWAS 檢測與成株期相關的 QTL，結果發現第 1 條染色體 *Saltol* QTL 區間的位置上有高度顯著的貢獻，亦即證實 *Saltol* QTL 不僅僅在水稻秧苗期的耐鹽性上有所貢獻，也在水稻成株期的耐鹽性有貢獻。

本試驗雖僅針對耐鹽評估等級進行篩選，但仍獲得相似實驗結果，隨著 NaCl 濃度的提高，其耐鹽等級的表現值上升幅度亦相當劇烈，植株存活天數亦隨著濃度提高而大幅遞減；在不同 NaCl 濃度下品系平均耐鹽等級達 5 級及 7 級的日數亦隨著濃度的上升而減少。究其原因，本次試驗利用不同鹽分濃度對鹽分逆境進行模擬，由於不同鹽分濃度對植株造成的傷害有所差異，在低濃度下鹽害對植株造成

的損傷較為輕微，植株在逆境下尚可維持部分生長發育功能或是修復損傷。而在高鹽分濃度下，參試材料之生長及發育嚴重受阻，亦無法進行損傷修復，因此在處理第 7 至 8 日後所有品系皆死亡。秧苗期及成株期之耐鹽性評估，結果顯示耐鹽等級在 5 葉齡時期時並無劇烈上升的現象，而在成株期，由於植株已生長至成熟株，在鹽分逆境處理前期並無明顯鹽害，品系間也無顯著差異。直至處理第 18 日品系間開始出現顯著差異，且處理達 28 日時大部分品系皆已死亡或 7 級趨近於死亡。

依據 11 個品種(系)的耐鹽表現來看，不同鹽分濃度處理下，結果顯示 STK7 及 STK8 兩個品系在耐鹽性上有較為優越的表現，較之對照品種 'TK9' 表現均有顯著性差異存在。在 5 葉齡及最高分蘗期後的鹽分逆境處理結果，在 5 葉齡時期 STK5、STK7 及 STK8 等 3 個品系在耐鹽性上的表現優於輪迴親 'TK9'。顯示導入 *Saltol* QTL 對回交後代的耐鹽性有提高的現象，而在最高分蘗期後的鹽分逆境處理，於處理前期品系間皆無明顯差異，然處理第 18 天後各品系間差異即達顯著差異，其中 STK1、STK7 及 STK8 等 3 個獲選耐鹽品系有較佳的耐鹽表現，並較其他品系及輪迴親 'TK9' 間之耐鹽性有顯著差異表現。其中 STK7 及 STK8 回交後代，分別在成株及秧苗期表現良好的耐鹽性。顯示回交品系導入貢獻親 'Pokkali' 所帶有的 *Saltol* QTL 後，由於回交品系帶有維持 Na^+/K^+ 比率之 QTL，使回交品系在鹽分逆境下較不會受鹽分逆境的影響，並提升了特定生育期之耐鹽性，因此使回交品系之耐鹽性有所提升。由於結果顯示導入 *Saltol* QTL 造成品系間在秧苗期及成株期之耐鹽性表現不同，推測雖然 *Saltol* QTL 可同時提升秧苗期及成株期之耐鹽性外，可能尚有其它與耐鹽性相關 QTL 的影響，其隨著回交操作而導入回交後代中 (Thomson *et al.* 2010; Sun *et al.* 2014)，從而某些只在特定生育期之耐鹽性表現佳。如 STK4 僅在秧苗期表現出耐鹽性，而部份品系則全生育期均有良好之耐鹽性 (Ghomi *et al.* 2013; Hossain *et al.* 2015)，如 STK8 及 STK7 在秧苗期及成株期均表現出

耐鹽性，使得帶有 *Saltol* QTL 回交品系在秧苗期及成株之耐鹽性出現了不同程度之差異。

本試驗主要針對水稻於不同鹽分濃度及不同生長期的耐鹽性進行評估，惟 *Saltol* QTL 對耐鹽性的提升有限，後續可將獲選優良回交耐鹽品系繼續純化或導入更多耐鹽相關基因於同一品種。而全生育期均表現耐鹽性之品系由於秧苗期及成株期均可忍受鹽化土壤的逆境，未來於鹽化土壤的利用上極具潛力，應可進一步開發利用以擴大水稻生產面積，藉此培育出耐鹽且同時具有穩產特性之水稻新品種以增進糧食供應及確保糧食安全生產。

引用文獻

- Cheng, L., Y. Wang, L. Meng, X. Hu, Y. Cui, Y. Sun, L. Zhu, J. Ali, J. Xu, and Z. Li. 2012. Identification of salt-tolerant QTLs with strong genetic background effect using two sets of reciprocal introgression lines in rice. *Genome* 55:45–55.
- Collard, B. C. 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.
- Darwish, E., C. Testerink, M. Khalil, O. El-Shihy, and T. Munnik. 2009. Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves. *Plant Cell Physiol.* 50:986–997.
- Ghomi, K., B. Rabiei, H. Sabouri, and A. Sabouri. 2013. Mapping QTLs for traits related to salinity tolerance at seedling stage of rice (*Oryza sativa* L.): An agrigenomics study of an Iranian rice population. *OMICS*. 17:242–251.
- Gregorio, G. B., D. Senadhira, and R. D. Mendoza. 1997. Screening Rice for Salinity Tolerance. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 30 pp.
- Hossain, H., M. A. Rahman, M. S. Alam, and R. K. Singh. 2015. Mapping of quantitative trait loci associated with reproductive-stage salt tolerance in rice. *J. Agron. Crop Sci.* 201:17–31.
- Hsu, J. H. 2012. The Platform of Polymorphic Markers and Genetic Mapping of a Drought Tolerance Gene at Seedling Stage in Rice. Master Thesis, Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University.

- Chiayi, Taiwan. 98 pp. (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.
- Islam, M. R. and G. B. Gregorio. 2013. Progress of salinity tolerant rice variety development in Bangladesh. *SABRAO J. Breed. Genet.* 45:21–30.
- 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. Breed.* 30:1679–1688.
- 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, *Ara-bidopsis* and tobacco. *Plant Biotechnol.* 15:45–48.
- Kumar, V., A. Singh, S. V. A. Mithra1, S. L. Krishnamurthy, S. K. Parida, S. Jain, K. K. Tiwari, P. Kumar, A. R. Rao, S. K. Sharma, J. P. Khurana, N. K. Singh, and T. Mohapatra. 2015. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). *DNA Res.* 22:133–145.
- 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)
- Majeed, K. A., A. S. Ali, H. H. Hasan, and R. H. Ghal. 2013. Salt tolerance study of six cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) during germination and early seedling growth. *J. Agric. Sci.* 5:1916–9752.
- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytol.* 167:645–663.
- Munns, R. and R. A. James. 2003. Screening methods for salinity tolerance: A case study with tetraploid wheat. *Plant Soil* 253:201–218.
- 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.
- Negrão, S., B. Courtois, N. Ahmadi, I. Abreu, N. Saibo, and M. M. Oliveira. 2011. Recent updates on salinity stress in rice: From physiological to molecular responses. *Crit. Rev. Plant Sci.* 30:329–377.
- Pradhan, S. K., D. K. Nayak, S. Mohanty, L. Behera, S. R. Barik, E. Pandit, S. Lenka, and A. Anandan. 2015. Pyramiding of three bacterial blight resistance genes for broad-spectrum resistance in deepwater rice variety, Jalmagna. *Rice* 8:19.
- Ren, Z. H., J. P. Gao, L. G. Li, X. L. Cai, W. Huang, D. Y. Chao, M. Z. Zhu, Z. Y. Wang, S. Luan, and H. X. Lin. 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat. Genet.* 37:1141–1146.
- Ruengphayak, S., E. Chaichumpoo, S. Phromphan, W. Kamolsukyonyong, W. Sukhaket, E. Phuvanartnarubal, S. Korinsak, S. Korinsak, and A. Vanavichit. 2015. Pseudo-backcrossing design for rapidly pyramiding multiple traits into a preferential rice variety. *Rice* 8:7.
- 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 Q. B. Yu. 2004. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiol.* 135:1198–1205.
- Singh, R. K. and B. Mishra. 2004. Role of central soil salinity research institute in genetic improvement of rice varieties in India. p.189–242. *in: Genetic Improvement of Rice Varieties in India.* (Sharma, S. D. and U. P. Rao, eds.) Today & Tomorrows Printers and Publishers. New Delhi, India. 1251 pp.
- Sun, J., D. T. Zou, F. S. Luan, H. W. Zhao, J. G. Wang, H. L. Liu, D. W. Xie, D. Q. Su, J. Ma, and Z. L. Liu. 2014. Dynamic QTL analysis of the Na⁺ content, K⁺ content, and Na⁺/K⁺ ratio in rice roots during the field growth under salt stress. *Biol. Plant.* 58:689–696.
- Swamy, B. P. M. and A. Kumar. 2013. Genomics-based precision breeding approaches to improve drought tolerance in rice. *Biotechnol. Adv.* 31:1308–1318.
- Tavakkoli, E., P. Rengasamy, and G. K. McDonald. 2010. High concentrations of Na⁺ and Cl⁻ ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. *J. Exp. Bot.* 61:4449–4459.
- Thomson, M. J., M. de Ocampo, J. Egdane, M. A. Rahman, A. G. 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.
- Vu, H. T. T., D. D. Le, A. M. Ismail, and H. H. Le. 2012. Marker-assisted backcrossing (MABC) for improved

- salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) to cope with climate change in Vietnam. *Aust. J. Crop Sci.* 6:1649–1654.
- Wang, W., B. Vinocur, and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1–14.
- Wang, Y., H. Guo, H. Li, H. Zhang, and X. Miao. 2012. Identification of transcription factors potential related to brown planthopper resistance in rice via microarray expression profiling. *BMC Genom.* 13:687.
- Xu, Y. and J. H. Crouch. 2008. Marker-assisted selection in plant breeding: From publications to practice. *Crop Sci.* 48:391–407.
- Yamaguchi, T. and E. Blumwald. 2005. Developing salt-tolerant crop plants: Challenges and opportunities. *Trends Plant Sci.* 10:615–620.
- Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cook, and K. A. Gomez. 1976. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. International Rice Research Institute. Philippines. 83 pp.

The Introgression of *Saltol* QTL into ‘TK9’ to Increase Salinity Tolerance by Using Marker-Assisted Selection

Ning-Hsiang Wen¹, Chieh-Wei Kuo², Su-Chen Kuo³, Yann-Rong Lin⁴, and Yong-Pei Wu^{5,*}

Abstract

Wen, N. H., C. W. Kuo, S. C. Kuo, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2016. The introgression of *Saltol* QTL into ‘TK9’ to increase salinity tolerance by using marker-assisted selection. *J. Taiwan Agric. Res.* 65(3):328–347.

In this study, *japonica* cv. ‘TK9’, a rice variety with high quality in Taiwan, was used as the recurrent parent and *indica* cv. ‘Pokkali’, a salt-tolerant variety with *Saltol*, was used as the donor parent. Marker-assisted backcross was applied to introgress *Saltol* QTL from ‘Pokkali’ to ‘TK9’. For each backcross generation, the foreground selection was conducted first, and the selected progenies were subsequently subjected to background selection by marker-assisted selection. Among the backcross progeny carrying *Saltol* QTL, the average recovered rates of genetic background of the recurrent parent in BC₁F₁, BC₂F₁, and BC₂F₂ generations were 71.5, 85.4, and 82.7%, respectively. In comparison with the theoretical value of traditional backcross breeding of BC₂F₁, 87.5%, the recurrent parent genome recovered rate of BC₂F₂ has decreased, indicating the genetic background between parents were quite different or the condition of genetic dragging occurred. In addition, ‘Pokkali’, CWY981126, ‘IR64’, and ten lines of BC₂F₃ were treated with five concentrations of saline solution, 100, 150, 200, 250, and 300 mM of NaCl, at the fifth-leaf seedling stage. The results showed that ‘Pokkali’ expressed high salt-tolerance under 100, 150, and 200 mM NaCl. Moreover, STK7 and STK8, the backcross progenies of BC₂F₃, performed better salt-tolerance. Under the condition of 200 mM NaCl, STK8 had the best salt tolerance, followed by STK4 and STK7, at the fifth-leaf stage. STK7 and STK8 had best salt tolerance at active tillering stage. The *Saltol* QTL was successfully introgressed into ‘TK9’ by the evidence of salinity tolerance in the selected backcross progenies. The backcross lines of BC₂F₃ with good salinity tolerance have great potential to be developed into cultivars for growing in salt affected areas in Taiwan in the future.

Key words: Marker-Assisted Selection, Salt tolerance, Rice.

Received: September 21, 2015; Accepted: January 4, 2016.

* Corresponding author, e-mail: wuypei@dns.caes.gov.tw

¹ Master student, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

² Assistant Professor, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

³ Research Assistant, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

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

⁵ Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.