

利用分子標幟輔助水稻新品系堆疊耐旱與耐鹽性

廖大經¹ 郭介煒² 郭素真³ 連怡鈞⁴ 林彥蓉⁵ 吳永培^{6,*}

摘要

廖大經、郭介煒、郭素真、連怡鈞、林彥蓉、吳永培。2018。利用分子標幟輔助水稻新品系堆疊耐旱與耐鹽性。台灣農業研究 67(1):28–43。

本研究以耐鹽品系 CWY981126 分別與 ‘TNG82’、‘TCS17’ 雜交，2 雜交組合之 F₂ 後代於秧苗期 5–6 葉齡分別以 200 mM NaCl 溶液進行鹽分逆境處理，結果發現 2 組合之 F₂ 不耐鹽與耐鹽等級的分離情形符合 9：7 比率，顯示 CWY981126 之耐鹽特性可能為 2 對互補基因控制之遺傳模式。進一步以 CWY981126 為貢獻親，而耐旱品種 ‘HY15’ 為輪迴親，經 3 次回交將耐鹽性導入耐旱品種 ‘HY15’ 中，而各回交代選育過程 5 葉齡秧苗均先經 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理。挑選出耐鹽等級 3–5 的存活植株，以分子標幟進行背景輔助選拔，結果發現 BC₁F₁、BC₃F₁ 的回復率分別為 78.34% 及 94.37%，高於傳統回交理論的遺傳回復率。而 BC₃F₂ 世代再經耐鹽及耐旱特性檢測，結果發現有 183 個品系同時表現耐旱及耐鹽性。進一步以田間缺水逆境探討 183 個品系產量潛能，結果發現稻穀產量介於 2,280–7,294 kg ha⁻¹，據此再選出高產量之 27 個 BC₃F₅ 品系進行產量試驗。結果亦發現，有 6 個品系稻穀產量與高於輪迴親 ‘HY15’。由上述結果，顯示透過分子標幟輔助已成功將耐鹽性導入耐旱輪迴親中，同時選育出具耐鹽及耐旱特性之水稻新品系。這些品系未來值得進一步探討，並提供國內外缺水及鹽化土地栽培利用。

關鍵詞：分子標幟輔助選拔、耐旱、耐鹽、水稻。

前言

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是全世界重要的糧食作物之一，可供應人類成長發育的能量與營養來源，特別是發展中的國家很多是以水稻為主食。在 1970 年代的綠色革命，促使水稻產量有了突破性增加，之後的數十年，水稻產量的提升便停滯不前。然而，世界人口數量仍持續增加中，預計在 2030 年時將達到 80 億，水稻生產必須增加 50% 方可滿足人類對糧食的需求 (Khush & Brar 2002; Khush 2005)。然而，由於人口的增加，使得一些耕作土地轉變為工業及居住用地，迫使部分水稻耕作轉移到生產

力低的鹽分地 (Hossain 1994)，進一步使得糧食短缺現象雪上加霜，促使研究學者積極投入水稻耐鹽性的相關研究。

國際稻米研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 研究發現，水稻耐鹽遺傳特徵以累加性 (additive) 和顯性 (dominance) 作用較為重要 (Gregorio & Senadhira 1993; Lee 1995)。Gregorio & Senadhira (1993) 在 9 個親本全互交 (diallel analysis) 分析中發現，地上部的 Na⁺/K⁺ 比率有累加性和顯性 2 種作用，表現上會出現明顯的累加性作用，但顯性作用亦存在，故此 2 種基因作用均會參與耐鹽性表現的控制，

投稿日期：2017 年 5 月 1 日；接受日期：2017 年 6 月 19 日。

* 通訊作者：wuypei@dns.caes.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。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助理。台灣 嘉義市。

⁴ 國立嘉義大學農藝學系碩士生。台灣 嘉義市。

⁵ 國立台灣大學農藝學系教授。台灣 台北市。

⁶ 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。

而低 Na^+/K^+ 比率有超顯性 (over-dominance) 作用。另有學者研究指出，對鹽分之敏感度，遺傳上的影響高於環境影響 (Moeljopawiro & Ikehashi 1981; Mishra *et al.* 1990; Akbar *et al.* 2008)。此外，由水稻耐鹽相關研究得知，影響水稻耐鹽性之基因座數目相當多，其中耐鹽性與水稻第 1 條染色體上的 *Saltol* QTL 區段有密切關係，且另 1 個與耐鹽相關已完成選殖的 *SKC1* 亦位於此區段內。由此顯示，此區域有 1 個或數個與耐鹽性狀相關的 QTLs 存在，且普遍存在於耐鹽性水稻品種中 (Gregorio 1997; Bonilla *et al.* 2002; Ren *et al.* 2005)。

乾旱環境是水稻生產的主要限制因子之一，研究指出亞洲有 3,400 萬公頃水稻與 800 萬公頃的陸稻，近 1/3 的稻作栽培面積會受缺水環境影響 (Huke & Huke 1997)。尤其全球溫室效應產生劇烈之氣候變遷影響，會造成降雨分布不均程度加劇，全球每年因缺水所造成約 18 百萬噸的水稻減產 (Bernier *et al.* 2008)。Levitt (1980) 將植物適應乾旱環境之機制分為避旱性 (drought avoidance)、耐旱性 (drought tolerance) 及抗旱性 (drought resistance) 3 種，具高耐旱性植物在不同生育期與不等缺水環境下，相對較能維持各組織器官的基本生長發育。水稻對於水分缺乏十分敏感，在不同生育期有不等影響程度，因應水分缺乏所規劃之耐旱策略亦應有所差異。在水稻的營養生長期間若遭遇缺水逆境時，較重要的耐旱機制為避旱，最典型的例子即為提早抽穗之特性，在缺水環境來臨前即完成水稻生殖生長所需生長與發育；而在水稻生殖生長期間，則以較早抽穗可促使營養成分有較好的分配，最後以較高的穀粒重及稔實率等表達出避旱性 (Guan *et al.* 2010)。然耐旱作物育成的速度目前仍相當緩慢，限制主因是耐旱性為多基因控制，基因間會有累加性且具交感作用 (Ashraf 2010)。因此，耐旱作物育種需要大量的材料於田間評估耐旱性的表現，尤其是透過產量表現來評估耐旱性的良劣，惟因產量之遺傳力大於耐旱性的關係，田間試驗結果通常較易評估到產量特性而非耐旱特性 (Salekdeh *et al.* 2009)。由於耐旱性易受環境因素影響，故選擇適當的評估指

標是相當重要的，在不同缺水處理環境和生育期間必須找到適合的外表型表現評估方法，如此方能有效評估耐旱性的高低，而這些指標則必須能適切且穩定的評估耐旱性的表現。

近年來由於已有大量的各種水稻分子標幟可供利用，在育種上可經此提高育種效率和準確性 (Collard & Mackill 2008)，即透過分子標幟輔助育種 (marker-assisted selection; MAS) 可縮短育種年限，減少選拔時之環境干擾，亦可使幼苗期選拔、田間操作、種植、人力和物力等耗費的大幅降低，係未來值得應用的育種模式。尤其如能將控制多個優良性狀之基因 (QTLs) 堆砌在同一優良水稻品系中，更能充分展現效益。目前利用 MAS 的成果已相當多，諸如將梗稻 'Azucena' 上所發現的 4 個與耐旱相關的 QTLs，利用 MAS 方法轉移至優良栽培種 'IR64'，有效提高 'IR64' 的耐旱性 (Courtois & Lafitte 2003)。MAS 除了可準確地選出帶有目標性狀的植株，亦可將多個基因 (QTLs) 堆疊於同一個品種內，培育出帶有多種抗性基因或多個相同抗性基因的優良品種。在非生物性逆境方面，IRRI 利用緊密連鎖耐淹 QTL *sub1* 之分子標幟，將 *sub1* QTL 回交到印度栽培品種 'Swarna'，同時利用非連鎖的分子標幟進行背景選拔，培育出帶有耐淹基因的主要優良栽培品種 ('mega' varieties) (Neeraja *et al.* 2007)。Huyen *et al.* (2012) 及 Vu *et al.* (2012) 將帶有 *Saltol* QTL 的極耐鹽品種 'FL478' 與越南優良品種 'AS996' 與 'Bachthom 7' 進行雜交，利用分子標幟回交育種將 *Saltol* QTL 導入到 'AS996' 及 'Bachthom 7' 中，在 BC_4F_1 時遺傳背景回復率可高達 100%。Luo & Yin (2013) 同樣利用此方法，將水稻半矮性基因 *sd1*、耐淹基因 *Sub1A*、抗稻熱病基因 *Pi9* 及水稻抗白葉枯病基因 *Xa21*、*Xa27* 導入到泰國香米品種中。IRRI 的育種家將水稻抗白葉枯病基因 *Xa4*、*Xa5* 及 *Xa21* 同時導入到 'IR64'，成功堆疊抗白葉枯病基因並提高 'IR64' 白葉枯病抗性 (Toenniessen *et al.* 2003)。其他，亦有抗褐飛蝨 (Suh *et al.* 2013)、耐旱 (Cattivelli *et al.* 2008)、半矮性 (Luo *et al.* 2014) 及穀粒香味

(Shi *et al.* 2008) 等農藝性狀的分子標幟輔助育種實例。

國內將 MAS 應用於水稻的起步較晚，Hsu *et al.* (2012) 利用 3 個籼稻及 3 個粳稻為材料，首先使用 1,167 個分子標幟，涵蓋水稻基因組之遺傳距離 1525.8 cM，平均密度達 1.31 cM。結果發現有 736 個分子標幟在 6 個品種中表現多型性，其中籼粳亞種間有 730 個分子標幟具多型性，平均密度達 2.09 cM。由於多型性分子標幟之密度已相當高，可供籼粳雜交分離子代之遺傳圖譜定位利用，其建立之高密度多型性分子標幟平台，可供未來水稻品種鑑別、基因圖譜定位及親緣關係探討等利用。其後利用多型性分子標幟平台為基礎，Kuo *et al.* (2013) 以粳型稻耐鹽品系 SM61 為貢獻親，而世界栽培面積廣泛的優良籼稻品種 'IR64' 為輪迴親，透過回交方式將 SM61 之耐鹽性轉移至 'IR64'。在經分子標幟輔助選拔後，結果發現 ST12、ST18 及 ST59 等 3 個品系之耐鹽性表現優於貢獻親 SM61 及輪迴親 'IR64'，顯示 SM61 之耐鹽特性已導入 'IR64' 中，成功培育出高耐鹽之粳型稻新品系。Wen *et al.* (2016) 更順利將 *Saltol* QTL 導入 'TK9' 中，成功培育具優良耐鹽性之粳稻回交品系；Lin *et al.* (2014) 以粳型稻耐旱品系 'HY15' 為貢獻親，而台灣優良粳型稻 'TK9' 為輪迴親，透過回交方式將 'HY15' 之耐旱性轉移至 'TK9'，結果發現 DT22 擁有較重的穗重，DT38 和 DT56 則具較高稔實率，3 個品系稻穀產量皆達 5,000 kg ha⁻¹ 以上。由此顯示，獲選之 3 個耐旱品系可供具有缺水環境下之實際耐旱性栽培利用。又 Kuo *et al.* (2015) 亦透過分子標幟輔助方式，將 'HY15' 之耐旱性轉移至粳型稻香米品系 CNY911303，結果選育出 DT73、DT85 及 DT86 等 3 個高產且耐旱性優良之品系。除了將單一基因轉移至優良栽培稻外，近來亦開始利用分子標幟進行不同特性的聚合與導入，如 Lien *et al.* (2016) 將 'HY15' 的秧苗期耐旱性經 2 次回交將耐旱性導入 CWY981126 中，發現以 LD1、LD7、LD8 及 LD10 等 4 個品系之耐鹽表現良好，成功將耐旱性導入耐鹽粳稻中，而選育出同時具耐鹽

及耐旱特性潛力的新品系。Yap *et al.* (2016) 以抗白葉枯病籼稻品系 IRBB66 (*Xa4* + *xa5* + *Xa7* + *xa13* + *Xa21*) 作為抗病基因貢獻親，透過分子標幟輔助回交育種法將抗病基因導入 'TNG82'。並以多重 PCR 技術進行前景篩選，其後再以分子標幟進行背景選拔，顯示透過高效率的多重 PCR 技術的利用，可順利將 IRBB66 所帶抗白葉枯病基因導入台灣優良的粳稻栽培種 'TNG82'。如此，大幅提高了白葉枯病抗性，解決了台灣栽培稻不抗白葉枯病之頸瓶。

非生物逆境發生的時機常無法預測，然在台灣水稻栽培過程卻常同時遇到鹽分及乾旱逆境的發生。因此，為了因應全球氣候變遷衍生的逆境衝擊，培育抗多重逆境水稻新品種，已成為台灣水稻永續發展及糧食安全的重要課題。基此，本研究乃利用粳稻耐鹽品系 CWY981126 為貢獻親，以籼稻耐旱品系 'HY15' 為輪迴親，透過 3 次回交將 CWY981126 之耐鹽性導入 'HY15' 中。並於回交過程中，先進行鹽分逆境篩選後，再輔以分子標幟之背景選拔，期經此將耐鹽與耐旱特性進行堆疊，選育出同時具有耐鹽暨耐旱的粳稻新品系。

材料與方法

試驗材料

本試驗 CWY981126 是二次誘變的品系 (Kuo *et al.* 2015)，是以 'TNG67' 經疊氮化鈉 (NaN₃) 誘變之香米品系 CNY911303 種子為材料，再經 100 mM EMS 溶液進行誘變，並以譜系法持續繁殖純化，其後於 M₆ 世代各誘變品系秧苗期再利用 150 mM NaCl 溶液進行耐鹽性篩選，選出秧苗期呈現耐鹽之品系 CWY981126，故利用本品系做為耐鹽特性之貢獻親本。而 'HY15' 則為中國引進耐旱佳之籼稻品種，為本試驗之輪迴親本。

耐鹽等級調查

種子進行鹽逆境處理前，以免賴得粉劑 (benomyl) 稀釋 1,000× 溶液消毒種子 1 d，再將種子置於 30°C 生長箱黑暗環境下催芽 1 d，

其後發芽種子點播於 80 孔的栽培盤中於網室進行水耕栽培，水耕營養液採用改良式木村氏 B 培養液配方 (Kimura B solution) (Yoshida 1976) 進行，發芽種子先以 0.5× 水耕液培養，當生長達 1 葉齡時更換為 1× 水耕液，持續生長至 3 葉齡時再換成 1.5× 水耕液；當植株平均達 5 葉齡時，以 200 mM NaCl 之 1.5× 水耕液進行耐鹽逆境處理，同時以敏感型 'IR64' 做為對照品種，而耐鹽等級依據 Jwo (2007) 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進行；計分為 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。唯分子標幟輔助育種過程各回交後代耐鹽處理過程依 Kuo *et al.* (2013) 方式進行復水處理，即當敏感型對照品種 'IR64' 耐鹽等級平均達 7 級時即進行復水處理。又因耐鹽處理復水後，秧苗之耐鹽等級表現 3 級及 5 級者存活比率相當高，而耐鹽等級 7 級及 9 級幾乎全部死亡，故乃將 3 級及 5 級視為具有鹽分耐受性；而 7 級及 9 級則為對鹽分敏感性。存活回交後代移至田間培育，進一步供雜交親本或收穫自交種子備用。

耐鹽品系 F₂ 族群之遺傳分析

以耐鹽品系 CWY981126 建立 F₂ 族群以遺傳分析的進行，故分別使用以 CWY981126 做為親本的 2 個雜交組合，分別為 CWY981126 和 'TNG82' 之雜交組合 1022FA25 的 259 個 F₂ 後代，以及 CWY981126 和 'TCS17' 之雜交組合 1022FA27 的 257 個 F₂ 後代，進行耐鹽基因遺傳模式控制探討。兩個雜交組合的水稻幼苗，並同時種植 2 親本各 32 株做為對照，當植株幼苗生長至 5 葉齡時期以 200 mM NaCl 溶液之鹽分逆境處理，直至鹽分敏感型對照親本呈現耐鹽等級 7 級時，即進行復水處理解除鹽分逆境，並於復水後滿 1 d 調查各雜交組合耐鹽等級，以卡方適合度檢定 (χ^2 test, goodness-of-fit)，藉由雜交後代 F₂ 的耐鹽表現分布，以瞭解耐鹽基因的遺傳控制。

分子標幟輔助水稻耐鹽與耐旱特性之堆疊

利用具耐旱特性粳型品種 'HY15' 為輪迴親，與粳型誘變耐鹽品系 CWY981126 進行雜交，並在 F₂ 植株生長至 5 葉齡時透過 200 mM 鹽分逆境處理，篩選及挑出保有耐鹽特性之植株回交至 'HY15'，過程經 3 次回交以回復 'HY15' 之遺傳背景，各回交世代 (BC₁F₁、BC₂F₁、BC₃F₁) 再以 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理，同樣耐鹽等級 3 且復水後存活植株進一步移植田間栽培，同時配合分子標幟輔助進行背景選拔，挑選與輪迴親本 'HY15' 遺傳回復率高之植株進行回交或自交，BC₃F₁ 植株自交產生 BC₃F₂ 種子；取單株收穫之 BC₃F₁ 自交種子依相同比例混合而成 BC₃F₂，之後 3,000 株 BC₃F₂ 於秧苗 5 葉齡先經 200 mM NaCl 溶液鹽分逆境處理，復水存活植株 (約 1,000 株) 移植田間 1 個月後，即進行不再灌水的缺水逆境處理，最後於成熟時選拔 183 株優良 BC₃F₂，獲選之 BC₃F₂ 分別收穫自交種子並成立 BC₃F₃ 品系，以供後續產量試驗利用，分子標幟輔助耐旱及耐鹽特性之堆疊及選育詳細流程，如圖 1 所示。

耐旱品系產量試驗

品系產量試驗：'HY15' 與 CWY981126 雜交組合回交 BC₃F₃ 後代獲選之 183 個品系，於 2015 年 2 期作種植於田間試驗區，每品系種植 100 株，不設重複；栽培過程中，各材料達分蘗盛期時進行乾旱斷水處理，待試驗品系內 1/2 以上植株抽穗後再進行 1 次灌水，直至收穫不再灌水，成熟時各品系分別收穫 100 株稻株稻穀產量，並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，得到每品系每公頃的產量；又由於進行試驗期間並無降雨發生，故已土壤缺水乾旱之環境適合做旱田耐旱品系之產量試驗利用。

品系旱田實用性之評估：BC₃F₃ 品系經品系產量比較試驗後選出產量表現最佳 27 個品系 (BC₃F₄)，由於台灣 2 期作水稻於最高分蘗期後較少出現降雨現象，容易於無遮雨設施的情況下，進行大面積及多品系的旱田實用性評

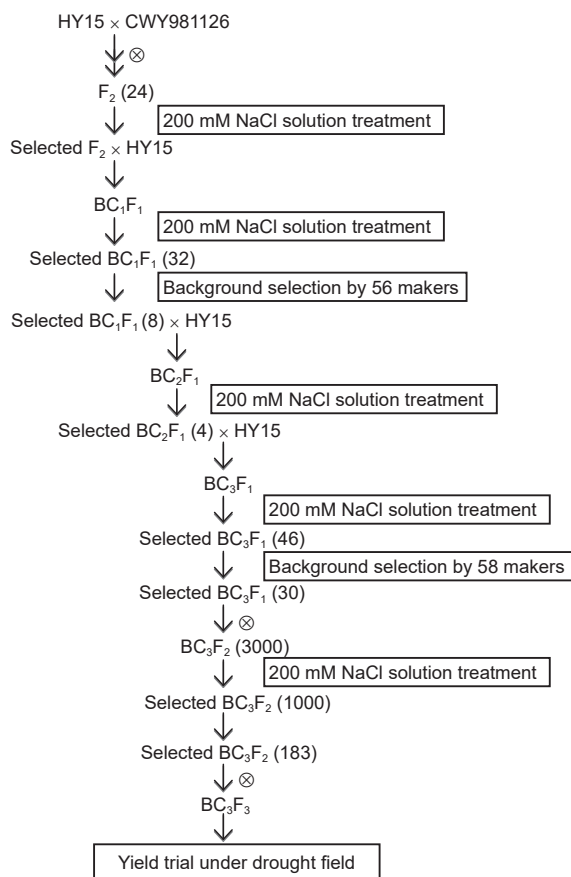


圖 1. 分子標幟輔助耐鹽特性轉移至 'HY15' 之回交育種流程，包含 200 mM NaCl 溶液處理及用於背景選拔之分子標幟說明。括弧內數值為每一個回交世代挑選植株數。

Fig. 1. The backcross breeding scheme for transferring the salt-tolerant trait to 'HY15' by marker-assisted selection (MAS), with details of the treatment of 200 mM NaCl solution and markers used for background selection. The numbers of plants selected in each generation are indicated in parentheses.

估，故 27 個品系於 2016 年 1 期作自交繁殖並收穫得到 BC₃F₃ 種子；2016 年 2 期作以 BC₃F₃ 品系進行旱田實用性評估試驗。試驗採用 RCBD 設計排列，每 1 品系 4 行植，每行 25 株，行株距為 30 cm × 15 cm，2 重複，栽培過程中進行乾旱處理，乾旱處理方式同 BC₃F₃ 品系產量試驗。

分子標幟分析

水稻 DNA 萃取方法修改自 Kikuchi *et al.*

(1998) 發表之 benzyl chloride 法，而 PCR 反應、電泳分析及基因型判讀採用 Kuo *et al.* (2013) 方式進行；至於多型性分子標幟由 Hsu *et al.* (2012) 建立之分子標幟平台資料庫中，挑選 SSR 及 STS 標幟進行分析；分子標幟不足位置則額外自行設計 SSR 及 indel 填補，自行設計之 SSR 來源根據水稻分子標幟資料庫網站 Gramene (<http://www.gramene.org/markers/microsat/>) 已公布之 SSR 分子標幟序列 (International Rice Genome Sequencing Project 2005, Supplementary Table 18)，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子設計；至於繪製連鎖圖譜則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 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/>) 進行統計分析，並用於輔助選拔之分子標幟的連鎖圖譜繪出。

結果

耐鹽品系 F₂ 族群之遺傳分析

為探討耐鹽性的遺傳控制模式，將調查所得之 2 個 F₂ 雜交組合 (1022 FA25 和 1022 FA27) 植株之耐鹽等級結果進行分群，即抗或耐鹽型族群為等級 1、3 與 5 級的植株，等級 7 與 9 則為敏感型不耐鹽族群，以抗 (耐) 鹽與敏感型族群分布情況，再經卡方適合度檢定，探討此耐鹽品系之耐鹽性基因符合哪種遺傳分離比，利用此方法以判別基因之遺傳控制模式。雜交組合 1022 FA25 在 259 株之 F₂ 後代中，表現出等級 3 及 5 之抗 (耐) 鹽者有 123 株，等級 7 及 9 之敏感型者有 136 株 (圖 2)，此組合無等級 1 的植株。藉由以上的耐鹽分布結果，再經由卡方適合度檢定後，結果發現耐鹽品系 CWY981126 之耐鹽特性符合 2 對互補基因的遺傳分離比，耐鹽與不耐鹽者之比率為 7 : 9 的 2 對基因遺傳控制模式。

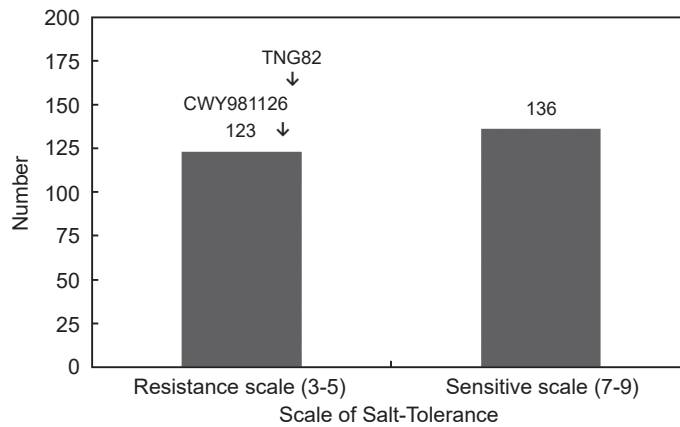


圖 2. CWY981126 與「台農 82 號」雜交後代之 259 株 F₂ 植株在 200 mM NaCl 鹽分逆境處理後復水滿 1 d 之耐鹽等級調查。箭頭代表兩親本耐鹽等級平均值。

Fig. 2. The frequency distribution of salt-tolerance in 259 F₂ individuals derived from CWY981126/'TNG82' after 200 mM NaCl treatment and one day water recovery. Arrows indicate the mean of salt-tolerance score for two parents.

圖 3 為雜交組合 1022 FA27 之 F₂ 耐鹽等級的調查結果，在 257 株之 F₂ 後代中，表現出等級 3 及 5 者有 123 株，等級 7 及 9 者有 134 株，此組合亦無等級 1 的植株。耐鹽等級分布結果經由卡方適合度檢定後，結果發現耐鹽品系 CWY981126 耐鹽特性之遺傳模式與 1022 FA25 之結果相同，即耐鹽與不耐鹽者之比率同樣為 7 : 9，即符合 2 對互補基因的遺傳分離比。

分子標幟輔助耐旱又耐鹽之秈稻選育

BC₁F₁ 世代：經過鹽分逆境處理後，由存活植株中挑出耐鹽表現較佳之 32 株 BC₁F₁ 植株進行分子標幟背景選拔，背景選拔時分子標幟密度則是分布在全 12 條染色體上，以每 30 cM 選出 1 個分子標幟為原則，在 BC₁F₁ 世代總共使用 56 個分子標幟進行分析 (表 1、圖 4)。其中，包括 39 個 SSR 分子標幟，3 個 STS 分子標幟及 14 個 indel 分子標幟。但是在基因型判讀

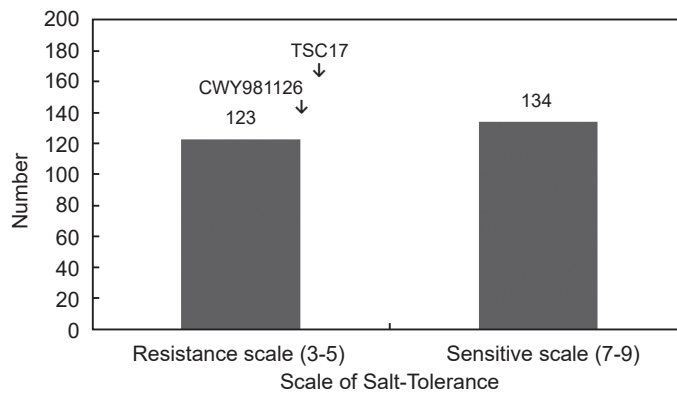


圖 3. CWY981126 與「台中秈 17 號」雜交後代之 257 株 F₂ 植株在 200 mM NaCl 鹽分逆境處理後復水滿 1 d 之耐鹽等級調查。箭頭代表兩親本耐鹽等級平均值。

Fig. 3. The frequency distribution of salt-tolerance in 257 F₂ individuals derived from CWY981126/'TSC17' after 200 mM NaCl treatment and one day water recovery. Arrows indicate the mean of salt-tolerance score for two parents.

的過程中，發現 8 株回交後代的基因型表現在部分分子標識表現與 CWY981126 條帶大小相同，由於此世代之後代基因型表現理論上應只會出現與 ‘HY15’ 相同之同型合子，或是異型合子，故將此 8 株視為自交種子，淘汰不列入篩選。而剩餘之 24 株 BC₁F₁ 經基因型的判讀，再經軟體 GGT 2.0 graphical genotypes 分析，結果得知 24 株 BC₁F₁ 植株與 ‘HY15’ 的遺傳相似度介於 65.1–98.2% 之間 (表 2)，平均約 78.34%。其中，8 株與 ‘HY15’ 的遺傳相似度較高，分別為 98.20、88.40、87.45、87.45、85.85、84.70、84.30 與 82.40%，平均為 87.34% (圖 5)。利用此 8 株

BC₁F₁ 與 HY15 回交，得到 BC₂F₁ 種子。

BC₂F₁ 世代：回交得到之 BC₂F₁ 種子重複相同的耐鹽處理流程，選擇耐鹽表現較佳的 44 株進行 ‘HY15’ 背景選拔，而本世代挑選出之耐鹽株於 2013 年 2 期作同時種植於田間，但因開花期受到褐飛蝨侵害致使植株死亡而無法進行回交。因此，2014 年 1 期作時利用剩餘之 BC₂F₁ 種子重複同樣的耐鹽處理流程，由於 BC₂F₁ 種子數較少，故僅挑選 4 株存活之耐鹽株移植至田間。此 BC₂F₁ 世代因株數過少，乃不進行分子標識的背景選拔，而直接利用 4 株 BC₂F₁ 與 ‘HY15’ 進行回交並獲得 BC₃F₁ 種子。

表 1. CWY981126 與 ‘HY15’ 兩親本間具多型性分子標識之數量。

Table 1. The number of polymorphic markers between CWY981126 and ‘HY15’ lines.

Backcross generation	Chromosome	Genetic marker			Subtotal
		SSR	STS	Indel	
BC ₁ F ₁	1	5	0	2	7
	2	6	0	1	7
	3	3	1	1	5
	4	1	1	3	5
	5	5	0	0	5
	6	2	0	3	5
	7	3	0	0	3
	8	3	0	1	4
	9	1	1	1	3
	10	3	0	1	4
	11	2	0	1	3
	12	5	0	0	5
	Total		39	3	14
BC ₃ F ₁	1	6	0	1	7
	2	2	0	4	6
	3	5	0	1	6
	4	1	0	4	5
	5	1	2	1	4
	6	3	1	0	4
	7	3	1	1	5
	8	0	1	3	4
	9	0	2	2	4
	10	2	0	1	3
	11	3	1	1	5
	12	4	0	1	5
	Total		30	8	20

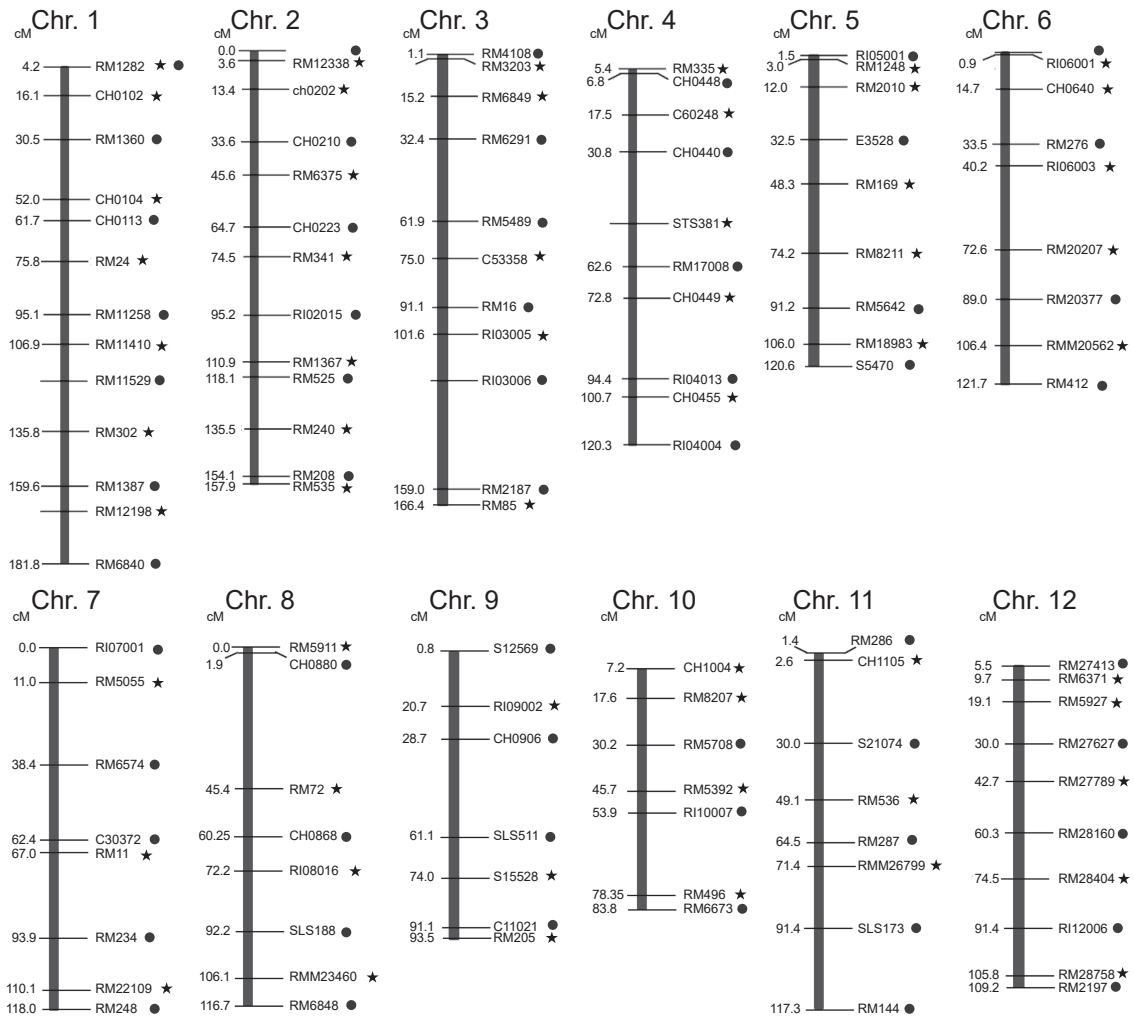


圖 4. 使用於籼型基因堆疊族群背景選拔之多型性分子標幟。分別使用其中的 56 個分子標幟於 BC_1F_1 背景選拔 (五角星) 及 58 個分子標幟於 BC_3F_1 背景選拔 (圓型)。分子標幟代號 RM 開頭為 SSR 分子標幟，C、R、S 或 E 為 STS 分子標幟，CH、STS、SLS 或 RI 為 indel 分子標幟。

Fig. 4. The polymorphic markers used for background selection of indica-type gene pyramiding population. 56 markers among all markers were applied to BC_1F_1 background selection (pentacle), and 58 markers among all markers were applied to BC_3F_1 background selection (round). The prefixes RM indicates SSR markers, C, R, S or E indicates STS markers, and CH, STS, SLS or RI indicates indel markers.

BC_3F_1 世代: 回交得到之 BC_3F_1 種子進行鹽分逆境處理, 結果選出 46 株耐鹽性佳之 BC_3F_1 進行分子標幟背景選拔, 分子標幟密度同樣以每 30 cM 選 1 個分子標幟, 分布在全 12 條染色體上, 總共 58 個分子標幟進行後代基因型的判讀 (表 1、圖 4)。其中, 包括 30 個 SSR 分子標幟, 8 個 STS 分子標幟及 20 個 indel 分子標

幟。為避免某些位置之特定基因型的重複篩選, 除了其中 1 個在第 1 條染色體上的 SSR 分子標幟 RM1282 以外, 本世代選用之分子標幟均與 BC_1F_1 不同, 即 BC_1F_1 使用之分子標幟, 本世代不再重複挑選使用, 藉以增加 MAS 過程背景選拔效率。46 株 BC_3F_1 植株經過基因型判讀過程並去除自交株後, 結果得到 30 株

表 2. 以 56 個分子標識於 marker-assisted selection (MAS) 分析 BC₁F₁ 之基因體組成。

Table 2. The genome composition of BC₁F₁ by 56 polymorphic markers used for marker-assisted selection (MAS).

Individual ^z	A (%) ^y	B (%) ^x	H (%) ^w	- (%) ^v	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant ^u	H-segment ^t
HY15	0	100.0	0.0	0	100.00	638.9	0	0
32	0	96.4	3.6	0	98.20	638.9	1	1
27	0	76.8	23.2	0	88.40	638.9	14	7
8	0	74.9	25.1	0	87.45	638.9	15	8
17	0	74.9	25.1	0	87.45	638.9	16	8
25	0	71.7	28.3	0	85.85	638.9	16	8
9	0	69.4	30.6	0	84.70	638.9	13	7
10	0	68.6	31.4	0	84.30	638.9	15	8
24	0	64.8	35.2	0	82.40	638.9	16	8
7	0	59.3	40.7	0	79.65	638.9	13	7
29	0	57.3	42.7	0	78.65	638.9	14	7
12	0	56.3	43.7	0	78.15	638.9	20	10
4	0	52.6	47.4	0	76.30	638.9	11	6
22	0	50.7	49.3	0	75.35	638.9	11	6
15	0	48.9	51.1	0	74.45	638.9	12	6
5	0	48.6	51.4	0	74.30	638.9	14	7
21	0	48.5	45.9	5.7	71.45	638.9	15	7
6	0	48.1	51.9	0	74.05	638.9	11	6
2	0	47.2	52.8	0	73.60	638.9	19	10
16	0	46.4	53.6	0	73.20	638.9	14	7
28	0	45.5	54.5	0	72.75	638.9	17	9
13	0	43.6	56.4	0	71.80	638.9	17	9
26	0	42.9	57.1	0	71.45	638.9	17	9
31	0	42.3	57.7	0	71.15	638.9	11	6
1	0	30.2	69.8	0	65.10	638.9	13	7
CWY981126	100	0	0	0	0	638.9	0	0

^z Arrangement by the percent of RPG (recurrent parent genome) recovered.

^y The percent of CWY981126 genome.

^x The percent of HY15 genome.

^w The percent of heterozygote.

^v The percent of missing data.

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

^t Amount of heterozygote in all markers.

BC₃F₁ 植株，其與‘HY15’的遺傳相似度介於 87.75–99% 之間 (表 3)，平均 94.37% (圖 5)。之後將此 30 株 BC₃F₁ 植株種植於田間並於自交後，各自交單株收穫 BC₃F₂ 種子供日後純化及產量評估利用。

耐旱品系產量試驗

BC₃F₃ 品系產量試驗：經耐旱處理後存活

選育之 183 個 BC₃F₃ 品系，於 2015 年 2 期進行品系產量試驗，結果如圖 6 所示，其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，得到每品系每公頃的產量。結果各品系產量表現介於 2,280–7,294 kg ha⁻¹，以‘HY15’稻穀產量 (5,400 kg ha⁻¹) 表現作為選拔基礎，結果發現有 27 個 BC₃F₃ 品系產量高於輪迴親本‘HY15’；

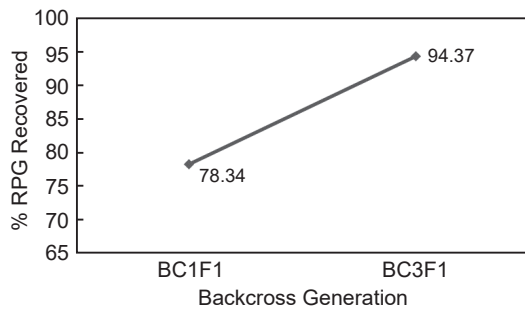


圖 5. 利用 GGT 2.0 分析分子標幟輔助回交育種在籼型堆疊族群之各世代與輪迴親基因體回復比率之曲線圖。

Fig. 5. Graph of GGT 2.0 analysis of RPG recovery of indica-type gene pyramiding population using marker-assisted backcrossing.

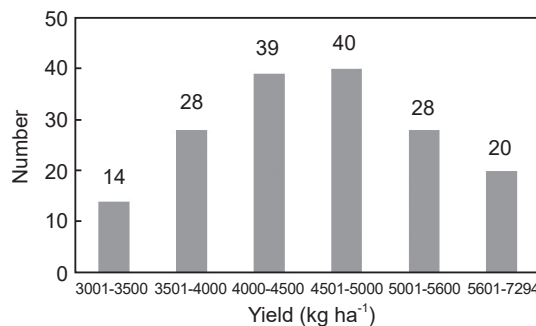


圖 6. 2015 年 2 期 183 個水稻品系乾旱逆境下之稻穀產量分布圖。

Fig. 6. The grain yield of 183 rice stress-tolerant lines under upland cultivation at 2nd crop season in 2015.

而大多數 BC_3F_3 品系之稻穀產量均低於輪迴親現本，顯示低產潛能。

BC_3F_3 品系旱田實用性之評估：經品系產量試驗選出之 27 個耐旱品系，於 2016 年 1 期再自交純化後，2016 年 2 期利用 BC_3F_5 品系於旱田栽培模式下進行耐旱品系成株期稻穀產量評估，結果發現在旱田栽培狀態下，以輪迴親本 'HY15' 之稻穀產量為 $5,614 \text{ kg ha}^{-1}$ ，而 27 個 BC_3F_5 耐旱品系之稻穀產量介於 $4,175\text{--}7,780 \text{ kg ha}^{-1}$ 。進一步以對照 'HY15' 之稻穀產量指數為 100%，換算 27 個 BC_3F_5 耐旱品系之稻穀產量指數介於 74.4–138.6% (表 4)，其中有 6 個耐旱品系之稻穀產量高於輪迴親 'HY15'。顯示選出之 6 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 LS20 及 LS30 稻穀產量指數分別為 133.9% 及 138.6%，遠高輪迴親表現，顯示具有缺水耐受性及高產之潛能。另外，也發現有 8 個 BC_3F_5 耐旱品系之稻穀產量指數低於輪迴親 15% 以上，顯示這 8 個品系稻穀產量之表現受到缺水逆境較嚴重影響，此 8 個耐旱品系可能在回交轉移耐鹽特性的過程中，部分的耐旱性已發生丟失，致使缺水耐受性表現不如輪迴親。

討論

耐鹽性之遺傳分析

本研究使用之 CWY981126 係利用疊氮化鈉誘變後培育之香米品系 CNY911303 為材料，再透過 EMS 化學誘變劑第 2 次誘變後所培育之具耐鹽性品系，其農藝特性表現與 Singh *et al.* (1981) 指出化學誘變劑誘發之變異多屬於少數基因或單基因的變異，即疊氮化鈉誘變對於後代之大部分性狀並無顯著之影響等結論相似。有學者以疊氮化鈉誘變水稻 'TNG67'，並自誘變系中選育出數個耐鹽品系 (Jwo 2007)，而 Yen & Lin (2011) 自 EMS 誘變系中亦篩選出 11 個耐鹽品系，並發現 SM75 與 SM61 兩品系耐鹽性表現較 'Pokkali' 和 'Nona Bokra' 優良。Kuo (2012) 以 5 個 EMS 突變耐鹽品系為材料，探討不同突變系的耐鹽基因遺傳機制，在利用 200 mM 氯化鈉溶液逆境處理中得知，突變品系 SM75 及 SM61 的耐鹽性遺傳模式均為 1 對顯性基因控制，而突變品系 SM77 及 SM143 的耐鹽性則為 1 對或 2 對隱性基因控制之遺傳模式，至於 SM76 突變品系的遺傳模式是受 2 對互補基因控制。

由於 MAS 過程中若無基因標幟可供作為前景選拔利用時，對於轉移性狀應先瞭解遺傳控制情形，如此方能根據轉移之目標性狀控制基因的模式，擬定適當的 MAS 策略。故本研究乃針對獻親 CWY981126 先進行遺傳分析，驗證 CWY981126 對鹽分之耐受性是否為少數基因所控制。而本試驗在 2 個雜交組合 F_2 的耐鹽等級分布中發現，CWY981126 的

表 3. 以 58 個分子標識於 marker-assisted selection (MAS) 分析 BC₃F₁ 之基因體組成。

Table 3. The genome composition of BC₃F₁ by 58 polymorphic markers used for marker-assisted selection (MAS).

Individual ^z	A (%) ^y	B (%) ^x	H (%) ^w	- (%) ^v	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant ^u	H-segment ^t
HY15	0	100.0	0.0	0	100.0	1,439	0	0
27	0	98.0	2.0	0	99.0	1,439	2	1
13	0	96.3	3.7	0	98.2	1,439	2	1
40	0	96.1	3.9	0	98.1	1,439	2	1
31	0	95.8	4.2	0	97.9	1,439	4	2
12	0	95.2	4.8	0	97.6	1,439	3	2
45	0	95.2	4.8	0	97.6	1,439	5	3
11	0	92.8	7.2	0	96.4	1,439	8	4
35	0	92.8	7.2	0	96.4	1,439	5	3
43	0	91.7	8.3	0	95.9	1,439	4	2
32	0	91.3	8.7	0	95.7	1,439	5	3
21	0	91.2	7.9	0.9	95.2	1,439	6	3
22	0	91.0	9.0	0	95.5	1,439	3	2
24	0	90.1	9.9	0	95.1	1,439	7	4
4	0	89.4	10.6	0	94.7	1,439	5	3
28	0	88.1	11.9	0	94.1	1,439	7	4
25	0	88.0	10.0	2	93.0	1,439	11	5
29	0	88.0	12.0	0	94.0	1,439	4	2
16	0	87.8	12.2	0	93.9	1,439	10	5
44	0	87.5	12.5	0	93.8	1,439	7	4
5	0	87.2	12.8	0	93.6	1,439	6	3
20	0	86.9	13.1	0	93.5	1,439	5	3
3	0	86.7	13.3	0	93.4	1,439	7	4
17	0	84.6	15.4	0	92.3	1,439	9	5
6	0	84.4	15.6	0	92.2	1,439	7	4
7	0	84.3	15.7	0	92.2	1,439	6	3
15	0	83.6	16.4	0	91.8	1,439	10	5
26	0	83.0	17.0	0	91.5	1,439	8	4
23	0	82.2	17.8	0	91.1	1,439	6	3
9	0	80.2	19.8	0	90.1	1,439	13	7
41	0	75.5	24.5	0	87.8	1,439	13	7
CWY9811266	100	0	0	0	0	1,439	0	0

^z Arrangement by the percent of RPG (recurrent parent genome) recovered.

^y The percent of CWY981126 genome.

^x The percent of HY15 genome.

^w The percent of heterozygote.

^v The percent of missing data.

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

^t Amount of heterozygote in all markers.

耐鹽特性均不符合常態分布 (圖 2、圖 3)，即 CWY981126 之鹽分耐受性不符合多基因遺傳模式，而符合 2 對互補基因之遺傳模式，與傳

統耐鹽品種 'Pokkali'、'Nona Bokra' 及 'Kararata' 的耐鹽性遺傳模式似有所不同。一般而言，由於傳統耐鹽品種多經育種及長期鹽分地栽培演

表 4. 2015 年 2 期作 'HY15' 及 27 個耐旱品系田間乾旱處理下之穀粒產量。

Table 4. The grain yield of 'HY15' and 27 drought-tolerant rice lines in yield trial under water deficient condition at the second cropping season of 2015.

Line/variety	Grain yield (kg ha ⁻¹)	Grain yield index (%)	Line/variety	Grain yield (kg ha ⁻¹)	Grain yield index (%)
LS1	4,280	76.2	LS17	5,496	97.9
LS2	4,747	84.6	LS18	4,521	80.5
LS3	5,474	97.5	LS20	7,516	133.9
LS4	4,415	78.7	LS22	4,674	83.3
LS5	5,261	93.7	LS23	4,791	85.4
LS7	5,475	97.5	LS24	4,319	76.9
LS8	5,802	103.4	LS25	4,662	83.0
LS9	5,029	89.6	LS30	7,780	138.6
LS10	5,034	89.7	LS32	4,175	74.4
LS11	5,464	97.3	LS33	4,806	85.6
LS12	6,420	114.4	LS35	4,857	86.5
LS13	5,821	103.7	LS37	4,769	85.0
LS15	5,489	97.8	LS38	5,391	96.0
LS16	5,770	102.8	HY15	5,613	100.0

化而來，過程累積了與耐鹽機制相關基因，致使造成傳統耐鹽品種多屬於數量性的多基因遺傳控制模式 (Gong *et al.* 1999; Prasad *et al.* 2000; Koyama *et al.* 2001; Lin *et al.* 2004)。而參照 Lien *et al.* (2016) 結果來看，CWY981126 誘變親本 CNY911303 應為鹽分敏感性者來看，本研究使用之耐鹽品系係 EMS 誘變篩選培育之耐鹽品系，其對鹽分耐受性應來自化學誘變劑造成之少數基因突變。因此，CWY981126 之耐鹽特性為 2 對基因所控制之遺傳模式，應為可接受的預期結果。而又 CWY981126 之鹽分耐受性因僅為 2 對基因所控制，在 MAS 轉移過程較單純容易，因此適合作為 MAS 貢獻親利用。

分子標幟輔助耐旱又耐鹽之秈稻選育

CWY981126 之耐鹽特性以 3 次回交導入耐旱親本 'HY15'，過程中在 BC₁F₁ 與 BC₃F₁ 等 2 個世代均以分子標幟進行背景選拔及偵測遺傳回復率，惟回交過程之 BC₂F₁ 世代時受到環境因素影響，致使無法挑選出足量之候選植株。因此，本世代未進行分子標幟輔助背景選拔，此可能降低了分子標幟輔助選拔效率，然由 BC₁F₁ 和 BC₃F₁ 兩個世代遺傳回復

率中來看，此二世代回復率分別為 78.34% 和 94.37%，顯示已超過理論的遺傳回復率。尤其透過 30 株 BC₃F₁ 回交後代分子標幟基因型分布結果得知 (表 3)，回交後代中有 13 株與 'HY15' 的遺傳相似度已達到 95% 以上，而最高者更可達到 99%，顯示 BC₃F₁ 世代已有部分後代幾乎回復到 'HY15' 的遺傳背景。

Shinada *et al.* (2013) 利用帶耐低溫 QTLs 品種 Eikei88224 和不耐低溫品種 Suisei 進行雜交，並針對堆疊不同 QTLs 數量之 152 株 F₃ 進行耐低溫測定，由結果得知 QTL 累加數目越多越有利於逆境的耐受性。Lin *et al.* (2014) 指出在 'HY15' 與 'TK9' 的分子標幟輔助育種過程中，其 BC₂F₁、BC₃F₁、BC₃F₁ 及 BC₄F₂ 世代的遺傳回復率分別為 86.2、91.6、94.5 及 93.0%，與本研究的結果相近。而 Kuo *et al.* (2013) 在分子標幟輔助耐鹽水稻之選育試驗中，其 BC₁F₁、BC₂F₁ 及 BC₃F₁ 世代回復輪迴親遺傳背景比率分別為 75.0、89.0、96.4%，高於回交之理論遺傳回復率。較之本研究結果佳，究其原因可能是本研究 BC₂F₁ 因未進行分子標幟背景選拔，使分子標幟輔助選拔效益無法充分發揮所致。

耐旱品系旱田產量評估結果顯示，藉由回

交方式可快速育成耐旱品系，然從選育出的材料中諸如 LS8、LS12、LS13、LS16、LS20 和 LS30 等 6 品系在旱田缺水處理栽培下，其稻穀產量在 $5,800 \text{ kg ha}^{-1}$ 以上，達到旱田環境下之實用栽培價值。尤其 LS20 及 LS30 兩品系稻穀產量達 $7,500 \text{ kg ha}^{-1}$ 以上，顯示在篩選流程中不但成功轉移耐鹽性，更保有輪迴親耐旱性或高產潛能於 BC_3F_5 後代中。因此，對於多種逆境抗性之水稻育種選拔，未來國內可以早世代秧苗期及晚世代田間評估的方式進行，可有效進行耐鹽性之轉移及多種耐逆境特性之聚合。因此，本研究結果可提供未來於水稻耐多重逆境水稻育種參考利用。

綜觀以上結果顯示，利用分子標幟輔助選拔可使回交後代之遺傳背景快速回復到輪迴親的基因型，且回交世代藉由鹽分逆境篩選，確保了回交後代欲導入之目標性狀。尤其 BC_3F_2 世代於秧苗期藉由 200 mM NaCl 鹽水分逆境處理，其後存活植株移植田間再以缺水逆境進行成株期耐旱性篩選，如此將確保獲選品系耐鹽性。除保留了輪迴親 'HY15' 之耐旱特性，讓獲選品系具有耐旱性的雙重逆境耐性，成功培育出耐多重非生物性逆境之水稻新品系。未來這些品系將可繼續以譜系法純化與繁殖，透過田間大面積逆境下實際產量試驗後，獲選品系於逆境栽培的應用性將更具潛力。預期未來命名成新品種後，將可提供全球暖化下逆境環境台灣水稻的栽培利用，大幅的降低台灣糧食生產的風險，有效且安全因應了糧食日益缺乏的需求，對於鹽化土地及乾旱地區之土地利用率的提升亦能有所助益。

影響 MAS 選育成功的因素相當多，尤其是透過 SSR 分子標幟進行時，需有足量具多型性的標幟方能掌控遺傳回復率，再據此選拔回交後代。然根據筆者近年來以秈及粳型水稻雜交進行 MAS 發現，若 MAS 完成根據背景恢復率進行選拔，選拔世代至少應進行至 BC_3 或 BC_4 世代，如此回交後代農藝特性之表現才易出現栽培生產上所需之理想株型。此由 Kuo *et al.* (2013) 及 Lin *et al.* (2014) MAS 結果可以得到印證，其 MAS 分別經 3 次及 4 次回交，結果可選拔出適合商業生產的優良品系。然

Lien *et al.* (2016)、Wen *et al.* (2016) 及 Yap *et al.* (2016) 等 MAS 僅回交 2 次，其獲選品系雖成功將目標性狀進行轉移，但獲選品系之產量及農藝特性表現均與輪迴親間有相當之差異存在 (未發表資料)，顯示應再進行第 3 次的回交操作方能有效發揮 MAS 之育種效果。

台灣水稻為 1 年 2 期作的栽培及育種模式，在 MAS 回交過程之 BC_1 、 BC_2 、 BC_3 及 BC_3F_2 等均需進行前景選拔及大量的分子標幟背景選拔工作，特別是在水稻抽穗前完成，如此才能順利完成回交。因此，在時間、人力及資源是一大挑戰及負擔，而本研究於 BC_1 及 BC_2 等世代因需進行回交，故設計上則以較少量且位置不同的分子標幟進行背景分析。至於 BC_3F_1 及 BC_3F_2 世代再以數量較多的分子標幟來進行較嚴格的背景選拔，如此 MAS 模式便能符合國內育種模式及栽培環境之需，而獲致成功的機會亦能相對提高。又透過多次觀察，若只依照分子標幟背景選拔之遺傳回復率進行選拔時，其常導致失敗結果，可能係分子標幟或後代族群數目不足所致。因此，需考慮放寬遺傳回復率選拔標準，並從較高遺傳回復率後代中，進行水稻農藝特性及產量選拔工作，農藝特性及產量選拔效果大約等同於一個世代的分子標幟背景選拔效率，如此可大幅提升選育品系之實用性。

引用文獻

- Akbar, M., G. S. Khush, and D. Hillerislambers. 2008. Genetics of salt tolerance in rice. p.399–409. *in*: Proceedings of the International Rice Genetics Symposium. May 27–31, 1985. Manila, Philippines. International Rice Research Institute, Laguna, Philippines.
- Ashraf, M. 2010. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnol. Adv.* 28:169–183.
- Bernier, J., G. N. Atlin, R. Serraj, A. Kumar, and D. Spaner. 2008. Breeding upland rice for drought resistance. *J. Sci. Food Agric.* 88:927–939.
- Bonilla, P. S., J. Dvorak, D. J. Mackill, K. Deal, and G. Gregorio. 2002. RFLP and SSLP mapping of salinity tolerance genes in chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.) using recombinant inbred lines. *Philipp. Agric. Sci.* 85:64–74.

- Cattivelli, L., F. Rizza, F. W. Badeck, E. Mazzucotelli, A. M. Mastrangelo, E. Francia, C. Marè, A. Tondelli, and A. M. Stanca. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crop. Res.* 105:1–14.
- Collard, B. C. Y. and D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363:557–572.
- Courtois, B. and R. Lafitte. 2003. Using marker-aided selection for a specific drought-tolerance trait. p.84–89. *in*: Breeding Rice for Drought-Prone Environments. (Fischer, K. S., R. Lafitte, S. Fukai, G. Altin, and B. Hardy, eds.) International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 98 pp.
- Gregorio, G. B. 1997. Tagging salinity tolerant genes in rice using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Ph.D. Dissertation, University of the Philippines, Laguna, Philippines. 118 pp.
- Gregorio, G. B. and D. Senadhira. 1993. Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 86:333–338.
- Gong, J., P. He, Q. Qian, L. Shen, L. Zhu, and S. Chen. 1999. Identification of salt-tolerance QTL in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin. Sci. Bull.* 44:68–71.
- Guan, Y. S., R. Serraj, S. H. Liu, J. L. Xu, J. Ali, W. S. Wang, E. Venus, L. H. Zhu, and Z. K. Li. 2010. Simultaneously improving yield under drought stress and non-stress conditions: A case study of rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 61:4145–4156.
- Hossain, M. 1994. Rice-wheat production system in Eastern India and Bangladesh: Recent developments and economic constraints. p.97–111. *in*: Sustainability of Rice-Wheat Production Systems in Asia. (Paroda, R. S., R. B. Singh, and T. Woodhead, eds.) Regional Office for Asia and the Pacific, Food and Agricultural Organization. Bangkok, Thailand. 209 pp.
- 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)
- Huke, R. E. and E. H. Huke. 1997. Rice Area by Type of Culture: South, Southeast, and East Asia. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 59 pp.
- Huyen, L. T. N., L. M. Cuc, A. M. Ismail, and L. H. Ham. 2012. Introgression the salinity tolerance QTLs *Saltol* into AS996, the elite rice variety of Vietnam. *Amer. J. Plant Sci.* 3:981–987.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793–800.
- Jwo, W. S. 2007. Physiological Characterizations of Salt Tolerance at Germination and Seedling Stages in Rice (*Oryza sativa* L.) Tainung 67 mutants. Master Thesis, Master Programs of Life Sciences, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 122 pp. (in Chinese with English abstract)
- Khush, G. S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol. Biol.* 59:1–6.
- Khush, G. S. and D. S. Brar. 2002. Biotechnology for rice breeding: Progress and impact. p.41–58. *in*: Proceedings of the 20th Session of the International Rice Commission: Sustainable Rice Production for Food Security. July 23–26, 2002. Bangkok, Thailand. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Kikuchi, 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.
- Koyama, M. L., A. Levesley, R. M. D. Koebner, T. J. Flowers, and A. R. Yeo. 2001. Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. *Plant Physiol.* 125:406–422.
- Kuo, C. W., N. H. Wen, S. C. Kuo, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2015. The introgression of *Saltol* QTLs into salt tolerant line CWY981126 to increase its salinity tolerance by using marker-assisted selection. *Crop Environ. Bioinform.* 12:198–217. (in Chinese with English abstract)
- Kuo, S. C., 2012. The Inheritance and Marker-Assisted Selection of Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.). Master Thesis, Department of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 72 pp. (in Chinese with English abstract)
- 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)
- Lee, K. S. 1995. Variability and genetics of salt tolerance in japonica rice (*Oryza sativa* L.). Ph.D. Dissertation, University of the Philippines. Laguna, Philippines. 112 pp.
- Levitt, J. 1980. Response of Plants to Environmental Stresses: Water, Radiation, Salt and Other Stresses. Academic Press. New York. 607 pp.
- Lien, I. C., C. W. Kuo, S. C. Kuo, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2016. Increasing drought tolerance in a salt-tolerance japonica rice cultivar using marker-assisted selection. *J. Taiwan Agric. Res.* 65:154–172. (in Chinese with English abstract)
- Lin, H. X., M. Z. Zhu, M. Yano, J. P. Gao, Z. W. Liang, W. A. Su, X. H. Hu, Z. H. Ren, and D.Y. Chao. 2004.

- QTLs for Na⁺ and K⁺ uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. *Theor. Appl. Genet.* 108:253–260.
- Lin, 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.* 11:177–194. (in Chinese with English abstract)
- Luo, Y., S. Zakaria, B. Basyah, T. Ma, Z. Li, J. Yang, and Z. Yin. 2014. Marker-assisted breeding of Indonesia local rice variety Siputeh for semi-dwarf phenotype, good grain quality and disease resistance to bacterial blight. *Rice* 7:33.
- Luo, Y. and Z. Yin. 2013. Marker-assisted breeding of Thai fragrance rice for semi-dwarf phenotype, submergence tolerance and disease resistance to rice blast and bacterial blight. *Mol. Breed.* 32:709–721.
- Mishra, B., M. Akbar, and D. V. Seshu. 1990. Genetic studies on salinity tolerance in rice towards better productivity in salt-affected soils. p. 1–25. *in: Proceedings of the Papers Presented at the Rice Research Seminar. July 12, 1990. Makati, Philippines. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.*
- Moeljopawiro, S. and H. Ikehashi. 1981. Inheritance of salt tolerance in rice. *Euphytica* 30:291–300.
- Neeraja, C. N., R. Maghirang-Rodriguez, A. Pamplona, S. Heuer, B. C. Y. 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.
- Prasad, S. R., P. G. Bagali, S. Hittalmani, and H. E. Shashidhar. 2000. Molecular mapping of quantitative trait loci associated with seedling tolerance to salt stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr. Sci.* 78:162–164.
- 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.
- Salekdeh, G. H., M. Reynolds, J. Bennett, and J. Boyer. 2009. Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends Plant Sci.* 14:488–496.
- 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.
- Shi, W., Y. Yang, S. Chen, and M. Xu. 2008. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. *Mol. Breed.* 22:185–192.
- Shinada, H., N. Iwata, T. Sato, and K. Fujino. 2013. QTL pyramiding for improving of cold tolerance at fertilization stage in rice. *Breed. Sci.* 63:483–488.
- Singh, R. B., R. S. N. Pillai, and H. Kumar. 1981. Induced translocations in safflower. *Crop Sci.* 21:811–815.
- Suh, J. P., J. U. Jeung, T. H. Noh, Y. C. Cho, S. H. Park, H. S. Park, M. S. Shin, C. K. Kim, and K. K. Jena. 2013. Development of breeding lines with three pyramided resistance genes that confer broad-spectrum bacterial blight resistance and their molecular analysis in rice. *Rice* 6:5.
- Toenniessen, G. H., J. C. O’Toole, and J. DeVries. 2003. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:191–198.
- 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. *Aus. J. Crop Sci.* 6:1649–1654.
- 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 increasing the salinity tolerance by using marker-assisted selection. *J. Taiwan Agric. Res.* 65:328–347. (in Chinese with English abstract)
- Yap, R., Y. C. Hsu, Y. P. Wu, Y. R. Lin, and C. W. Kuo. 2016. Multiplex PCR genotyping for five bacterial blight resistance genes applied to marker-assisted selection in rice (*Oryza sativa*). *Plant Breed.* 135:309–317.
- Yen, C. C. and J. H. Lin. 2011. Screening, inheritance and linkage marker analyses of salt tolerance in mutated scented japonica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.* 14:260–269.
- Yoshida, S. 1976. Routine procedures for growing rice plants in culture solution. p.61–66. *in: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice.* (Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cook, and K. A. Gomez, eds.) International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 83 pp.

The Pyramiding of Drought and Salt Tolerance of New Rice Lines Using Marker-Assisted Selection

Dah-Jing Liao¹, Chieh-Wei Kuo², Su-Chen Kuo³, I-Chun Lien⁴, Yann-Rong Lin⁵, and Yong-Pei Wu^{6,*}

Abstract

Liao, D. J., C. W. Kuo, S. C. Kuo, I. C. Lien, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2018. The pyramiding of drought and salt tolerance of new rice lines using marker-assisted selection. *J. Taiwan Agric. Res.* 67(1):28–43.

The salt tolerance of rice accession, CWY981126, was inherited from two complementary genes, revealed by the two F₂ segregation populations of CWY981126 × ‘TNG82’ and CWY981126 × ‘TCS17’, for which the segregation ratio of 9 (salt sensitive) : 7 (salt tolerance) was detected in the F₂ progenies treated with 200 mM NaCl at 5–6th leaf seedling stage. In the following, salt tolerant characteristic was transferred from CWY981126 to the drought tolerant variety, ‘HY15’, by marker-assisted backcrossing selection (MAB) for three generations. In the MAB breeding, CWY981126 and ‘HY15’ were used as the donor parent and recurrent parent, respectively. In each backcross generation, progenies exhibiting salt tolerance with scale 3–5 were selected first after 200 mM NaCl treatment, and then were selected by marker-assisted selection for background selection. The genome recovery rates of BC₁F₁ and BC₃F₁ were 78.34% and 93.37%, respectively, which were higher than theoretical recovery rates of traditional backcrosses. The BC₃F₃ generation was evaluated for drought tolerance, indicating that 183 lines exhibited drought-tolerant characteristics. Consequently, these 183 lines were evaluated for yield potential in the field under water deficient condition. The yields were ranged from 2,280 kg ha⁻¹ to 7,294 kg ha⁻¹. A total of 6 out of 27 BC₃F₃ lines exhibited higher yields than the recurrent parent ‘HY 15’ after yield test. As a result, these new indica accessions possessing both drought and salt tolerance bred by MAB may be applied to cultivate in water-deficient and saline fields in the future in Taiwan and other countries.

Key words: Marker-assisted selection, Drought tolerance, Salt tolerance, Rice.

Received: May 1, 2017; Accepted: June 19, 2017.

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

¹ Assistant Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

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

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

⁴ Master student, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

⁵ Professor and Head, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

⁶ Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.