

# 針對稻熱病 *Pia* 及 *Piz* 基因座分子輔助選育 秈稻新品系之研究

廖大經<sup>1</sup> 吳佩真<sup>2</sup> 吳東鴻<sup>3\*</sup>

## 摘要

廖大經、吳佩真、吳東鴻。2018。針對稻熱病 *Pia* 及 *Piz* 基因座分子輔助選育秈稻新品系之研究。台灣農業研究 67(1):54–72。

稻熱病會嚴重影響稻穀品質與產量，一直係台灣稻作栽培的重要病害之一。為有效提高新品系抗性，本研究以秈稻高產品種「台中秈 17 號」為輪迴親，美國粳型稻抗病品種 'Zenith' 為提供親，利用分子標誌輔助回交法，將 'Zenith' 所帶抗稻熱病 *Pia* 及 *Piz* 的 allele (對偶基因) 導入「台中秈 17 號」之中，評估最佳抗性組合。在選育期間，每個回交世代均進行前景選拔，檢出帶 2 個 'Zenith' 抗病 alleles 之植株；並自 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代開始，以前景選拔之獲選植株為對象進行遺傳背景選拔，最後於 2015 年第 1 期作選出平均遺傳背景回復率達 92% 以上，帶 1 或 2 個抗病基因之同質結合植株 (BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>) 共 14 個株系，並給予品系名稱 CNY1042052–CNY1042065。這 14 個品系與「台中秈 17 號」於 2015–2016 年進行早田病圃葉稻熱病檢定及產量比較試驗，結果發現帶有 'Zenith' 的 *Pia* allele 並保有「台中秈 17 號」的 *Piz* allele 者的抗性最佳，例如 CNY1042052 (罹病平均等級 4)、CNY1042056 (罹病平均等級 2) 及 CNY1042057 (罹病平均等級 1.5) 表現抗-中抗級 (R-MR) 反應，優於兩親本之中抗-中感級 (MR-MS) 反應；亦定序兩親本 *Piz* 基因序列後，發現「台中秈 17 號」的 *Piz* 基因序列與其他已知品種的 *Piz* 基因序列相異。產量試驗上，14 個品系之平均產量均低於「台中秈 17 號」，新品系間以品系 CNY1042052 之產量表現最高 (5,390.0 kg ha<sup>-1</sup>)，表現其次為 CNY1042057 (5,280.0 kg ha<sup>-1</sup>)；綜合評估下，而以品系 CNY1042057 在抗病性及產量方面皆有不錯的表現。本研究已將抗病對偶基因順利導入「台中秈 17 號」，惟新品系之產量稍低，藉由各產量構成要素與產量的相關性分析，發現決定新品系產量高低之因素主要為穗數，其次為稔實率，與輪迴親之穗重型特徵有所不同，未來將調整新品系的灌溉施肥等栽培方式，抑制過度分蘗、增大穗型，有助改善抗性品系的產量表現。

**關鍵詞：**水稻、稻熱病、分子輔助回交育種、抗病基因。

## 前言

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是台灣栽培面積最大的主要糧食作物，然而隨著民眾生活習慣及飲食型態的改變，稻米每人年消費量由 1971 年之 134.28 kg 下降至 2014 年之 45.70 kg，40 餘年間減少了約 66% (Council of Agriculture, Executive Yuan 2015)。過去以鼓勵稻農休耕

以平衡稻米餘糧過剩的壓力，但目前面臨全球氣候變遷所導致重大天災發生頻率增加，造成地區性糧食供應不穩及生產風險大增；而稻田大量休耕，不但良田荒廢且地力大量流失，病蟲相也隨之改變，對於農業以及整體環境生態平衡產生不良影響。現行推廣品種係以糧食生產為主，若適時調整部分生產區用以生產加工原料，提升地產地銷的比例以及減緩仰賴大宗

投稿日期：2017 年 5 月 17 日；接受日期：2017 年 8 月 29 日。

\* 通訊作者：dhwu@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 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。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所作物組研究助理。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

進口，其品種用途分流將可避免商售價格波動或公糧收購積倉等疑慮。然栽培加工用品種需考量粗放管理且高產量等因素，便於在供給鏈上穩定維持原料成本，其中需大幅提升抗病性以降低防治成本、提升生產效率、降低風險、避免產量損耗尤為重要，使得選育抗性品種成為其不可或缺的目標。據此，可藉由分子輔助選育技術選育抗性品系，明確抗性品種的抗性遺傳組成，進而堆疊抗性基因延緩崩潰速率，並將有助於對應流行菌群的防治規劃。

高產秈稻「台中秈 17 號」(‘Taichung Sen 17’; ‘TCS17’) 是由行政院農業委員會台中區農業改良場分別以 ‘IR17488-2-2-1’ 及 ‘台中秈育 223 號’ 為父母本進行雜交選育，並於 1984 年通過命名審查之國產品種。該品種具有半矮性、抗倒伏、氮肥反應佳、中等粒型、穀粒較寬以及穀粒和白米之千粒重均高等高產農藝特徵 (Lin 1984)，屬穗重型品種。該品種直鏈性澱粉 (amylose content) 含量高，適合製作米食加工產品，有時亦作為賽鴿或其他禽類之食用飼料用，係適於開發作為水稻多用途加工的高產優良品種。稻作栽培從幼苗、分蘗盛期乃至生育末期均會面臨葉稻熱病、穗稻熱病侵襲，一旦高產型品種面臨危害將損益更深。「台中秈 17 號」歷年在行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所 (以下簡稱本分所) 稻熱病檢定病圃罹病性介於中抗至中感之間 (未發表資料)，故對於稻熱病抗性表現略顯不足。「台中秈 17 號」於 2000–2016 年全台年平均栽培面積約 692 ha，嘉義縣市為主要栽培地區 (<http://kiscrop.tari.gov.tw/kiscrop/index.aspx>)，若將來推廣栽培面積擴大，則有抗病性崩解的可能性 (Chien 1989)。因此，轉移抗病基因至「台中秈 17 號」或選育一系列具抗病性之近同源系，可望延長抗病年限，減少藥劑防治成本、友善環境及增加農民收益。

美國硬型稻品種 ‘Zenith’ 歷年在本分所早田式稻熱病病圃中，對於葉稻熱病均穩定表現中抗反應 (未發表資料)。Kiyosawa (1967) 以遺傳分析方法鑑定出 ‘Zenith’ 具有稻熱病 *Pia* 及 *Piz* 抗性基因，而 2 基因近年均已被選殖，其中 *Pia* 基因落於第 11 條染色體上 (*LOC\_*

*Os11g11790*) (Zeng *et al.* 2011)，另於第 6 條染色體上 *Piz* 基因座則近年陸續找到 *Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pi50* 與 *Pigm* 等不同抗性 allele (對偶基因) (Qu *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2006; Su *et al.* 2015; Deng *et al.* 2017)。回顧過去的研究，可知 *Pia* 基因座對於不同稻熱病菌之生理小種的抗幅較窄，但可見於多個抗性提供親中，而 *Piz* 基因座上的抗性基因則廣幅抗病較佳 (Tsunematsu *et al.* 2000; Telebanco-Yanoria *et al.* 2008)。例如，Tsunematsu *et al.* (2000) 在菲律賓以 12 個具代表性之稻熱病菌株對 LTH 單基因判別品系進行人工接種，其中品系 IRBLA-A (提供親 ‘Aichi Asahi’) 或 IRBLA-C (提供親 ‘CO39’) 的 *Pia* allele 的抗幅為 16.7%，而品系 IRBLZ-Fu (提供親 ‘Fukunishiki’) 上 *Piz* allele 則為 33.3%，品系 IRBLZt-T (提供親 ‘Toride 1’) 上 *Piz-t* allele 則為 41.6%，品系 IRBLZ5-CA (提供親 ‘C101A51’) 上 *Piz-5* (= *Pi2*) allele 則為 91.6%，品系 IRBL9-W (提供親 ‘WHD-IS-75-1-127’) 上 *Pi9* 基因則為 91.6%。Telebanco-Yanoria *et al.* (2008) 以 20 種病原型 (pathotype) 對 *Pia* 等 24 個抗病基因進行抗幅檢測評估，其中 *Pia* 基因之抗幅為 10%，而 *Piz* 基因座上的 *Piz-t*、*Piz*、*Piz-5* (*Pi2*)、*Pi9* 等 allele 抗幅分別為 30、95、95 及 95%。在韓國，Cho *et al.* (2005) 各以 15 個由硬型及籼型稻品種分離獲得之菌株進行接種，結果顯示 *Pia* 基因對於硬型稻菌株之抗幅為 20.0%，而對於籼型稻菌株則完全不具抗性，*Piz* 基因對於兩種來源菌株之抗幅則為 66.6% 及 80.0%。在中國大陸，Sun *et al.* (1999) 從硬型、籼型及雜交水稻採集 155 個稻熱病菌株對 13 個日本單基因判別品種檢測抗病表現，*Pia* 的抗幅為 13.3%，*Piz* 為 59.0%。Li *et al.* (2005) 以 282 個從雲南省蒐集之菌株對 LTH 單基因判別品系進行接種，其中基因 *Pia* 的抗幅為 34.4%，基因 *Piz* 則為 81.8%。上述均顯示 *Piz* 基因座上的抗性 allele 不僅廣幅抗病性較 *Pia* 基因座佳，且各抗性 allele 識別菌群幅度也不盡相同。雖然目前不乏針對 *Piz* 基因座上 *Piz*、*Pi2*、*Pi9* 及 *Piz-t* 等抗性基因設計專一性標誌用以鑑別上述 allele 的研究 (Rathour *et al.*

2008; Tian *et al.* 2016), 但該基因座的品種特異性極高 (Liu *et al.* 2011), 國內品種在 *Piz* 基因座上的序列變異與其抗性表現仍待研究。

台灣地處亞熱帶及熱帶氣候區, 水稻病蟲害發生種類本就多元且複雜, 而稻熱病更是每年威脅稻作生產之風土病, 嚴重發生或大流行時對於產量及品質的損失影響甚鉅。本研究以高產籼型稻品種「台中秈 17 號」為輪迴親, 以 *Pia* 及 *Piz* 基因座上具抗病 allele 之品種 'Zenith' 為提供親, 通過雜交後連續回交方式, 由回交後裔中逐代利用分子標誌輔助選拔, 選出帶有 1 或 2 個抗病 allele 且遺傳背景回復率高之同質結合植株, 以便確認最佳堆疊抗性遺傳組合。進而期能選拔農藝性狀良好具高產潛力之株系, 選育出明確稻熱病抗性組成之優良品系, 以減少病害防治成本, 確保農民栽培利基。

## 材料與方法

### 參試材料

本試驗雜交親本均取自本分所稻種繁殖圃 (嘉義市, 台灣), 以「台中秈 17 號」 ('Taichung Sen 17'; 'TCS17') 為母本, 與稻熱病抗性硬稻品種 'Zenith' 為父本進行雜交, 並以「台中秈 17 號」為輪迴親, 利用回交選拔方式建立「台中秈 17 號」與 'Zenith' 各回交世代後裔, 做為分子標誌輔助選拔材料使用。

### 回交選拔程序

以「台中秈 17 號」為輪迴親之回交選拔程序如圖 1 所示, 以「台中秈 17 號」為母本, 提供親 'Zenith' 為父本, 在 2012 年第 1 期作於本分所建立雜交組合, 連續經過 3 次回交與 1 次自交, 產生  $BC_1F_1$ 、 $BC_2F_1$ 、 $BC_3F_1$  與  $BC_3F_2$  後裔。每世代均先經 *Piz* 及 *Pia* 基因座連鎖標誌進行前景選拔挑選目標基因型, 並優先挑選抽穗期與輪迴親相近者生產下一代回交種子, 直至  $BC_2F_1$  世代起搭配 102 個全基因組標誌進行背景選拔。後續世代均針對上一世代尚未回復成輪迴親的染色體區間進行篩檢, 挑選恢復率最高者作為候選品系備用。在  $BC_3F_2$  世代挑選背景回覆率較高者、再配合植株外表型

觀察比較, 擇優選出外表型較接近輪迴親株之植株組成  $BC_3F_3$  品系, 接續進行品系產量比較及稻熱病罹病等級調查。

### 分子標誌基因型分析

#### 多型性標誌之選用

稻熱病 *Piz* 及 *Pia* 基因座上目標基因位置及多型性篩選, 分別參考 Cho *et al.* (2007) 及 Tacconi *et al.* (2010) 所提及的基因專一性標誌進行本試驗材料之測試, 然 *Piz* 基因座抗病連鎖標誌 z4794 在「台中秈 17 號」與 'Zenith' 間未具多型性。而 *Pia* 抗病基因專一性標誌 yca72 在兩親本間具多型性, 但需酶切處理、分析成本較高, 故後續後裔前景選拔均使用上述兩抗病基因座兩側緊密連鎖 InDel 及 SSR 標誌, 篩檢目標基因型, 如下所述:

本試驗多型性標誌係參照 Wu *et al.* (2013) 所發表的遍布水稻 12 條染色體的 InDel 標誌, 而各標誌遺傳位點則利用所有分子標誌的引子序列所坐落在 International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP) build 5 版的 PACs/BACs, 將其物理位點歸納至 IRGSP 網站上所示各 PACs/BACs 在 Nipponbare/Kasalath 遺傳圖譜上 (Harushima *et al.* 1998; IRGSP 2005)。全基因組遺傳圖譜總長為 1530.4 cM, 並於間距較大處補充 SSR 標誌, 共測試了 168 組分子標誌。剔除兩親本間無多型性或無專一性的標誌 58 組, 其中 *Piz* 基因座選定 RM19695、RD0605\_5、RM5963、RD06061\_5 及 RD0606\_3 等 5 組多型性標誌, 其區間涵蓋第 6 號染色體長度 21.9 cM。而 *Pia* 基因座, 則以 RM5128、RM5704 與 RD1105 等 3 組作為連鎖標誌, 其區間涵蓋第 11 號染色體長度 34.15 cM, 均作前景選拔使用。其餘 102 組標誌則為背景選拔之用 (如圖 2), 背景恢復率計算說明詳如 Lai *et al.* (2016)。

### DNA 萃取與 PCR 分析

取新鮮水稻葉片約 1–2 cm 長, 剪碎至 0.2 mL PCR 反應管中, 加入 30  $\mu$ L DNA 快速萃取液 (QuickExtract™ plant DNA extraction

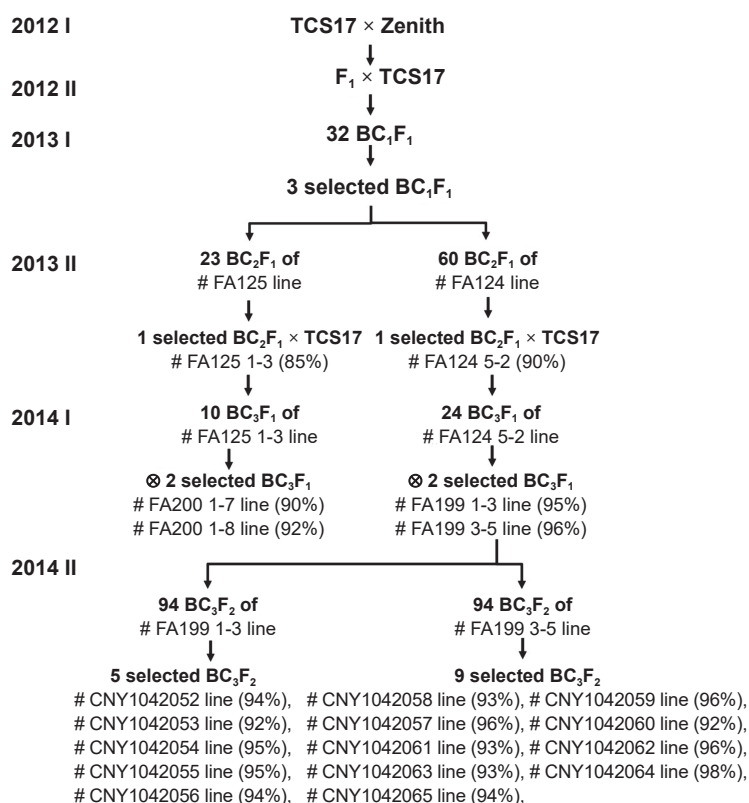


圖 1. 運用分子輔助回交選育將 'Zenith' 親本的 *Pia* 與 *Piz* 基因座上的抗性 allele 片段導入「台中秈 17 號」中之選育流程圖。品系後括號表示背景回復率。

Fig. 1. The breeding scheme of introgression by introgressing two blast-related loci (*Pia* and *Piz*) from 'Zenith' into 'Taichung Sen 17' through marker-assisted backcross selection. The number within the bracket was the background recovery rate.

solution, Epicenter Co., USA), 均勻混合後離心 5 min (3,355 g)。再以 PCR 反應儀 (Veriti, Applied Biosystems Co., USA) 在 65°C 下加熱 6 min, 隨後 98°C 下 2 min, 所獲 DNA 萃取原液以無菌蒸餾水稀釋 4× 後貯放於 -20°C 備用。PCR 反應條件及電泳分析方式, 均參照 Wu *et al.* (2013) 所述。

### 稻熱病 *Piz* 基因座定序分析

前人文獻 (Tacconi *et al.* 2010) 所列 *Piz* 基因座專一性標誌 z4794 於 'Zenith' 與「台中秈 17 號」未具多型性, 但與文獻所示均屬抗性條帶。兩親本的抗性檢定亦相仿, 需定序序列確認其抗性基因組成。而 *Piz* 各對偶基因間的第 1 內隱子 (1st intron) 的區間長度變異甚大, 又以第 2 外顯子 (2nd exon) 區間所包含的核苷酸結合位點結構域 (nucleotide binding site;

NBS) 和富亮氨酸結構域 (leucine-rich repeat; LRR) 區域變異最大並影響抗病性。後續以探討各品種間 *Piz* 基因第 2 外顯子區間的蛋白質序列差異為主, 參照 Imam *et al.* (2016) 所示 Pi9\_1 至 Pi9\_3 等 3 組定序引子, 並另行設計 2 組定序引子 (Pi9\_4、Pi9\_5), 對 'Zenith' 與「台中秈 17 號」兩親本分別針對 741 bp、836 bp、808 bp、836 bp、692 bp 等區間進行定序, 如表 1。序列拼接全長可達 3.4 kb, 將進一步確認兩親本 *Piz* 基因與已知抗性基因間的蛋白質序列差異, 在 Liu *et al.* (2011) 等研究中, 已提供 'Zenith' (*Piz*)、'Fukunishiki' (*Piz*)、'C101A51' (*Pi2*)、'75-1-127' (*Pi9*)、'Toride' (*Piz-t*) 等 14 個品種之第 2 外顯子核苷酸序列 2,280 bp, 使用 BioEdit v.7.2.6 (Hall 1999) 生

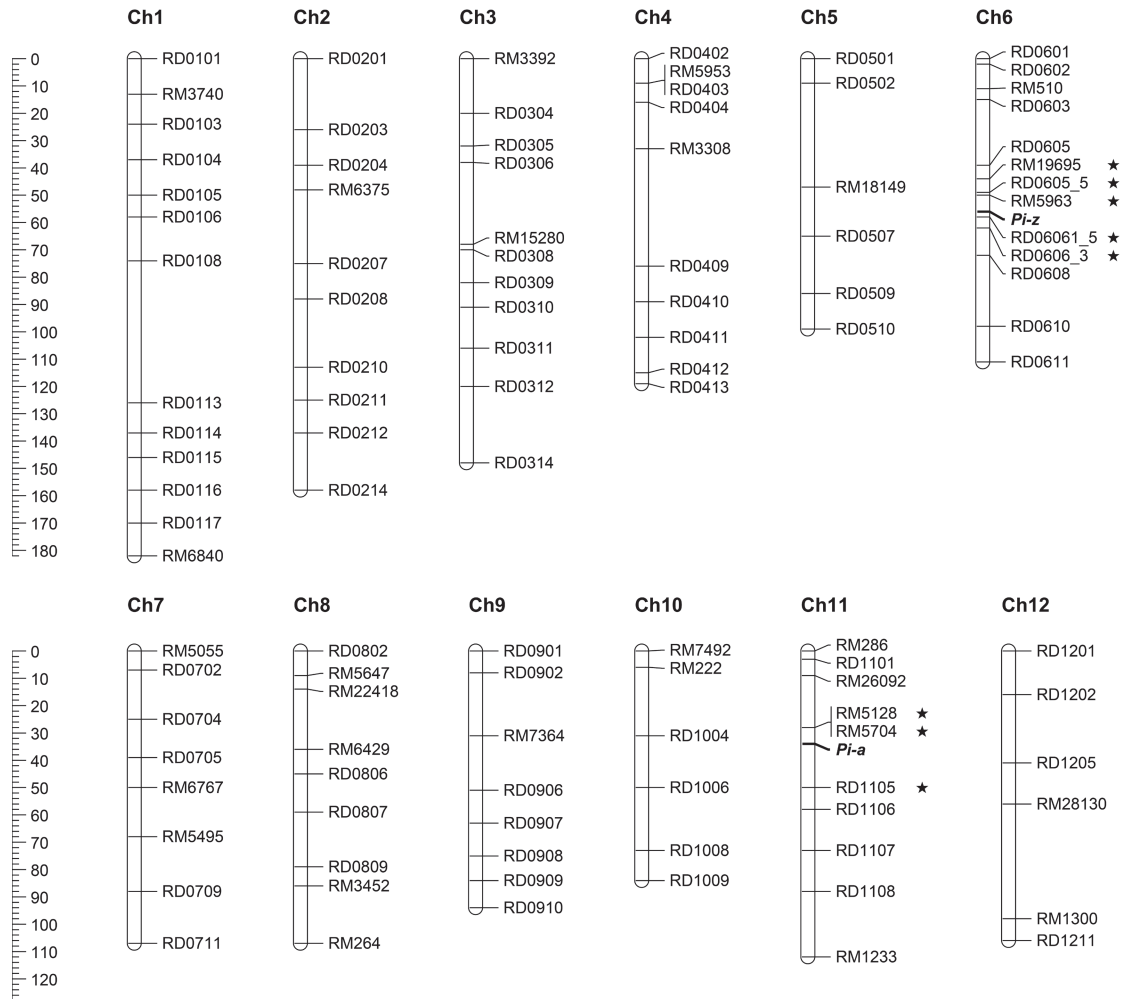


圖 2. 本試驗在「台中秈 17 號」與「Zenith」間親本多型性使用 81 個 InDel 與 29 個 SSR 標誌，而各標誌遺傳位點則利用所有分子標誌的引子序列所坐落的 PACs/BACs，將其物理位點歸納至 IRGSP 網站上所示各 PACs/BACs 在 Nipponbare/Kasalath 遺傳圖譜上 (Harushima *et al.* 1998)。各標誌字頭分別以 RD 與 RM 代表 InDel 以及 SSR 標誌，本試驗以星形標示為前景選拔標誌。

**Fig. 2.** The linkage map of 81 InDel and 29 SSR polymorphic markers between 'TCS17' and 'Zenith'. All markers were assigned to the linkage map of 'Nipponbare'/'Kasalath' (Harushima *et al.* 1998) based on the primer sequences of markers by blasting against PACs/BACs, which were integrated to the linkage map of IRGSP website. The prefixes RD and RM indicate InDel and SSR markers, respectively. The marker symbols indicated by stars were applied to foreground selection.

資軟體匯入序列對照品種 'Nipponbare' (*LOC\_Os06g17900*)、上述 Liu *et al.* (2011) 所示 14 個品種序列、Su *et al.* (2015) 所選殖出的 *Pi50* 基因 (*Pi50\_NBS4\_1*, GenBank: KP985761) 以及 Deng *et al.* (2017) 所選殖出的 *Pigm* 基因 (*PigmR*, GenBank: KU904633) 的蛋白質序列 (760 a.a.)，進行序列比對。其中，為區隔

'Zenith' 不同來源序列，以 'Zenith' (Chiayi) 加註本試驗親本資訊；並利用程式語言 "R" (3.3.3 版) 中 "phangorn" 套件，以 JTT 置換模式 (Jones *et al.* 1992) 計算兩兩蛋白質序列間的親緣係數，再以近鄰相接法 (neighbor-joining method) 繪製該基因座之無根親緣樹狀圖 (un-rooted phylogenetic tree)。

表 1. 本試驗用以擴增 *Piz* 基因座上 NBS-LRR 區域長達 3.4 kb 的定序引子。

**Table 1.** List of primers used for the amplification of 3.4 kb nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) region of *Piz* locus.

Primer	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon	Interval positionz	Reference
Pi9_1	ATCAGTCACAAAATAGACTGTTCATG	AGAGCTGTCTTGCCTAAACCAC	741	-334-405	Imam <i>et al.</i> (2016)
Pi9_2	GATGGGTGGTTTAGGCAAGACAG	CGACATCCTTAGTCGTCATC	836	380-1,215	Imam <i>et al.</i> (2016)
Pi9_3	TCGTCTAGTAGGTAGATGGATAGCAG	TACCTTCACACCGAATGATTCAG	808	1,145-1,952	Imam <i>et al.</i> (2016)
Pi9_4'	AAACTTTGAACATGCCGAG	CTTTTCCAACAGGGGTGA	836	1,690-2,528	
Pi9_5'	ATGGTCCTTTATCTTTATCGG	AGCCCTGCCCTATCTGTT	692	2,391-3,082	

<sup>z</sup> The first nucleotide of the 2nd exon of the reference genome is defined as +1 ('Nipponbare', *LOC\_Os06g17900*).

## 稻熱病旱田式病圃設置方及罹病反應檢定方法

「台中秈 17 號」與 'Zenith' 之 BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> 至 BC<sub>3</sub>F<sub>6</sub> 回交後裔，在 2015–2016 年第 1 期作種植於本分所旱田式病圃（經度 120°28'03"E，緯度 23°29'05"N），試驗田採順序排列，重複 2 次。各參試品種（系）條播種植 1 行，每行播種 5 g 種子，行長 50 cm，行距 10 cm，每隔 10 行種植 2 行感病品種 'Lomello'。同時，中間夾播 1 行抗病品種「台農 70 號」做為對照品種，周圍邊行則全數播種 'Lomello' 做為感染源。肥料施用量每公頃施用硫酸銨 240 kg，過磷酸鈣 36 kg，氯化鉀 48 kg。稻種發芽後，每天早晨與黃昏於葉面上各噴灑水霧數次，以維持葉面適當濕度促進發病。葉稻熱病罹病程度檢定，則依據 International Rice Research Institute (IRRI) 所訂定之方法及標準 (IRRI 2002)，於播種後 30 d 及 40 d 各調查 1 次，每行給予一個罹病等級。最後，以 2 次調查、各兩重複之評估結果中最嚴重之等級，做為該品種（系）當年度罹病程度之代表。罹病等級分 0–9 級記載，罹病等級對應於罹病反應，可分為 0 級：極抗 (HR)；1–3 級：抗 (R)；4 級：中抗 (MR)；5–6 級：中感 (MS)；7–8 級：感 (S)；9 級：極感 (HS)。

## 稻穀產量比較試驗

稻穀產量比較試驗於 2016 年第 1 期作在

嘉義分所水稻試驗田進行，田間採順序排列，每一品系採單本植，4 行區，每行 8 株，行株距 30 cm × 15 cm。田區肥料管理，氮素施用量 120 kg ha<sup>-1</sup>，以基肥、2 次追肥及穗肥分 4 次施用；過磷酸鈣施用量 72 kg ha<sup>-1</sup>，以基肥 1 次施用；氯化鉀施用量 48 kg ha<sup>-1</sup>，以基肥及穗肥分 2 次施用。各品系於穀粒黃熟期分別收穫，並隨機取樣 3 株調查平均穗數、一穗粒數、稔實率及千粒重等產量構成要素，並據此換算為單位面積產量。換算方式為先由產量構成要素估算單株產量，再以一般田區種植每公頃約 220,000 株數量加乘換算得到。

## 統計分析

本研究以變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 探討不同品種（系）間之平均單位面積產量是否有顯著差異；另以產量構成要素為自變數，產量為應變數進行相關分析 (correlation analysis)，以瞭解各自變數與產量之間的相關程度。以上資料分析程式，係以程式語言 "R" (3.3.3 版) 內建之 "stats" 套件撰寫執行。

## 結果

### 抗性回交品系之選育

由抗性品種 'Zenith' 將 *Pia* 及 *Piz* 基因座上的抗性基因，同時置換至秈稻「台中秈 17 號」下之選育過程分述如下 (圖 1)：於 2012 第

1 期作建立雜交組合，同年第 2 期作種植  $F_1$  世代並與輪迴親進行回交。2013 年第 1 期作種植  $BC_1F_1$  回交世代 32 株，利用 *Pia* 基因座 3 個連鎖 SSR/InDel 標誌 (RM5128, RM5704, RD1105) 及 *Piz* 基因座 5 個連鎖 SSR/InDel 標誌 (RM19695, RD0605\_5, RM5963, RD06061\_5, RD0606\_3) 進行篩選，挑出 3 株同時保有兩抗病基因均帶有 'Zenith' allele 之植株，再與輪迴親進行第 2 次回交，獲得  $BC_2F_1$  回交世代 83 株。其中，分屬後裔 #FA125 下 23 株，後裔 #FA124 下 60 株。同年第 2 期作，則以上述 8 個連鎖 SSR/InDel 標誌針對目標基因座 *Pia* 與 *Piz* 進行前景選拔，再對攜有 'Zenith' 抗性 allele 者，以 77 個 InDel 與 25 個 SSR 多型性標誌確認背景恢復率。分別從上述後裔族群中，各選獲出同時帶有目標抗病基因型且背景恢復率較高之植株，均再與輪迴親進行第 3 次回交。其中，後裔 #FA125 1-3 恢復率 85%、產生 10 個回交單株，而後裔 #FA124 5-2 恢復率 90%、產生 24 個單株，共獲得  $BC_3F_1$  世代 34 株。

在 2014 年第 1 期作，針對上述  $BC_3F_1$  世代後裔進行分子標誌前景與背景選拔，在前景選拔上，針對 *Pia* 與 *Piz* 基因座分別篩檢 3 個 (RM5128, RM5704, RD1105) 及 5 個 (RM19695, RD0605\_5, RM5963, RD06061\_5, RD0606\_3) 連鎖 SSR/InDel 標誌，背景選拔針對上一世代尚未恢復區間累計使用 38 個 InDel 與 8 個 SSR 標誌，在 #FA125 1-3 族群下選出恢復率 90% 的後裔 #FA200 1-7 與恢復率 92% 的後裔 #FA200 1-8 恢復率 92%。另在 #FA124 5-2 族群下，選出恢復率 95% 的後裔 #FA199 1-3 與恢復率 96% 的後裔 #FA199 3-5，自交後收穫其  $BC_3F_2$  種子。同年第 2 期作，針對上述 4 株後裔族群依照其背景回復率擇優選取，分別培育 #FA199 1-3 與 #FA199 3-5 族群各 94 株  $BC_3F_2$  後裔，以 *Pia* 與 *Piz* 基因座上 3 個 (RM5128, RM5704, RD1105) 及 5 個 (RM19695, RD0605\_5, RM5963, RD06061\_5, RD0606\_3) 連鎖 SSR/InDel 標誌進行前景選拔。經前景選拔後，獲得 40 株各帶有 1 個或同時帶有 2 個抗病基因之同質結合植株，再針對上述  $BC_3F_2$  族群中尚未恢復成輪迴親組成的

區間進行背景選拔。累計使用 7 個 InDel 以及 1 個 SSR 標誌，並由背景選拔篩選出 20 株背景恢復率大於 92% 以上之植株，再配合回交世代與輪迴親植株外表型觀察比較，選出 14 株外表型較接近輪迴親株型之植株組成 14 個  $BC_3F_3$  品系。2015–2016 年進行品系產量比較及稻熱病罹病反應調查，並給予品系代號 CNY1042052–CNY1042065，其遺傳組成如圖 3。

### 兩親本間 *Piz* 基因座序列解析

因品種間 *Piz* 抗性 allele 變異程度較高，經定序比對本試驗兩親本 ['Zenith' (Chiayi), 「台中秈 17 號」] 之 *Piz* 基因第 2 外顯子 2,280 bp 區域的序列差異，可發現 25 個核苷酸差異 (即相似程度 0.989)、13 處胺基酸變異 (即相似程度 0.983)，在蛋白質序列上分別位於第 74、141、209、218、284、384、427、483–484、556–557、583、760 號胺基酸 (a.a.) 上。其中，在 483–484 胺基酸處發現同時置換 2 個鹼基與刪除 3 個鹼基的變異，造成連續 2 個胺基酸變異，而其他位置累計出現 10 處單一核苷酸多形性 (single nucleotide polymorphism; SNP)、2 處 2–3 鹼基的置換變異。其中，「台中秈 17 號」與 'Zenith' (Chiayi) 兩親本間的胺基酸支鏈特性，僅第 209、218、556 與 760 號胺基酸位點置換後特性不變，其他位點則是親水性/鹼性 (No. 74, 284, 384, 427 a.a.)、親水性/疏水性 (No. 141 a.a.)、鹼性/親水性 (No. 557 a.a.)、酸性/親水性 (No. 483 a.a.)、疏水性/鹼性 (No. 583 a.a.) 或刪除變異 (No. 484 a.a.)，如圖 4。而文獻所提供的 'Zenith' 序列，與本試驗材料僅在第 203 與 321 號胺基酸上存有變異。

進一步將兩親本「台中秈 17 號」與 'Zenith' (Chiayi) 的 *Piz* 基因序列，連同文獻所提供來自 17 個品種的基因序列進行序列比對與親緣分析，其差異排列如附錄，累計檢出 64 處變異。又觀察本試驗序列，比對 19 條分屬不同抗、感品種，針對此基因座可檢出 64 處胺基酸差異，任兩品種在定序區間的序列同質性平均為 0.980–0.988；再以不同抗、感性品種分類，僅在第 519 與 757 號胺基酸位置上，同屬感病品種 'Nipponbare'、'Nova'、'Mowanggu'、

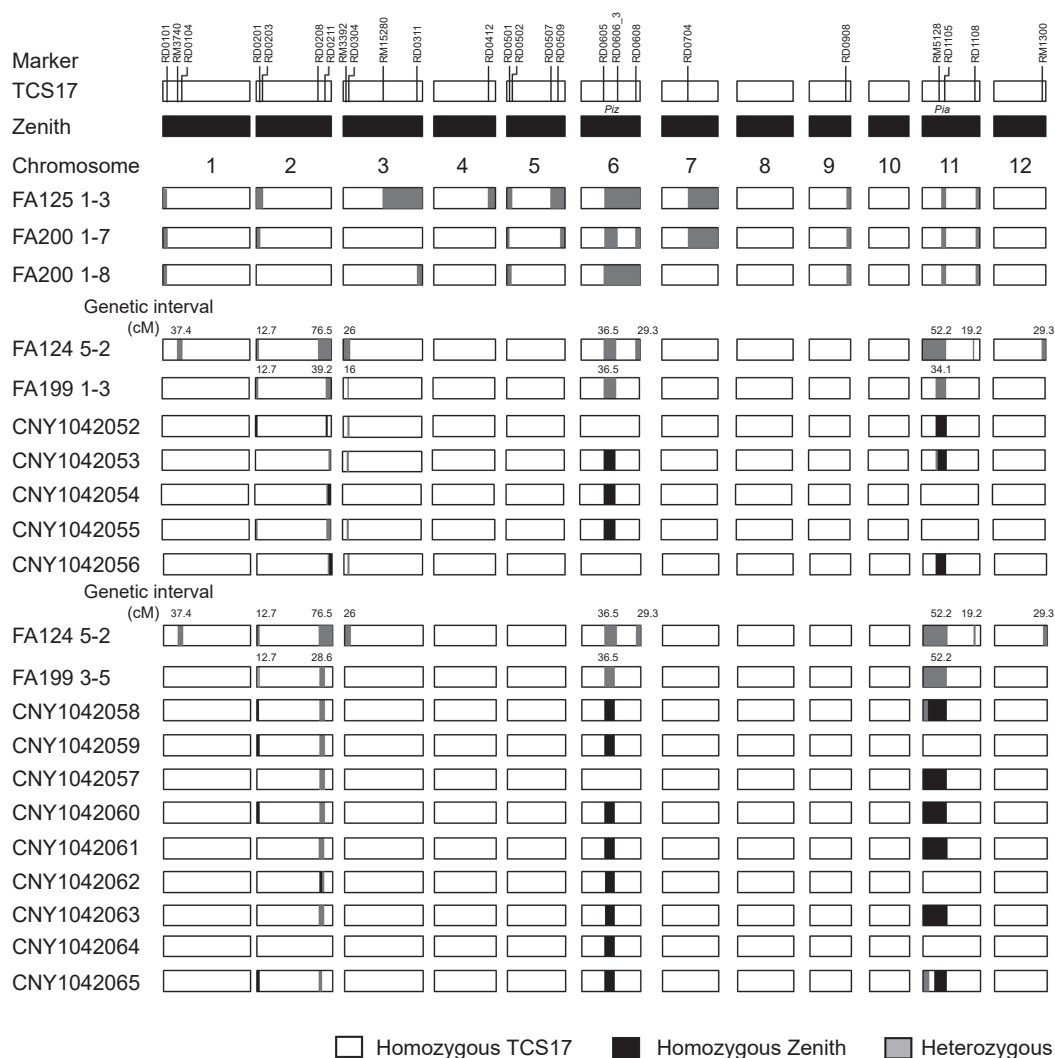


圖 3. 參圖解「台中秈 17 號」各回交世代中稻熱病抗性品系之遺傳組成。白色、黑色與灰色 2 的色塊分別代表同質結合的「台中秈 17 號」、「Zenith」以及異質結合體基因型，數字則是遺傳區間的距離。

Fig. 3. Graphical representation of genotypes for 'TCS17' backcross lines at each generation. White, black and gray blocks indicate the homozygous 'TCS17', homozygous 'Zenith' and heterozygous genotype, respectively. The number was the distance of genetic interval.

‘Panda’所帶的感性 alleles 與其他 15 個品種的抗性 alleles 存有抗感間多型性 (附錄)。另檢視位於 LRR 區域中，在第 556–583 號以及第 703–716 號胺基酸等 2 處連續區間中係較具 allele 間多型性，分別由 6 個與 9 個胺基酸多型性位點構成 3 種與 5 種單倍型。

由無根親緣樹狀圖上可知，在主軸線上裂出節點數最低為 6 個。將上述序列區分成 6 群

(圖 5)，其中已知 ‘Zenith’ 與 ‘Fukunishiki’ 均攜有 *Piz* 抗病基因 (Rathour *et al.* 2008)，除了 ‘Zenith’ (Chiayi)、‘Mars’ 以及 ‘Mercury’ 存有些微差異外，‘Bengal’ 和 ‘Lafitte’ 均與 ‘Zenith’ 的 *Piz* 基因序列完全一致，‘Azucena’ 則與 ‘75-1-127’ (*Pi9*) 具有高度親緣，‘NIL-e1’ (*Pi50*) 與 ‘Gumei4’ (*Pigm*) 則係序列完全一致。而 ‘Toride’ (*Piz-t*) 與 ‘5173’ (*Pi2*) 相較於其他抗病基因，彼此親

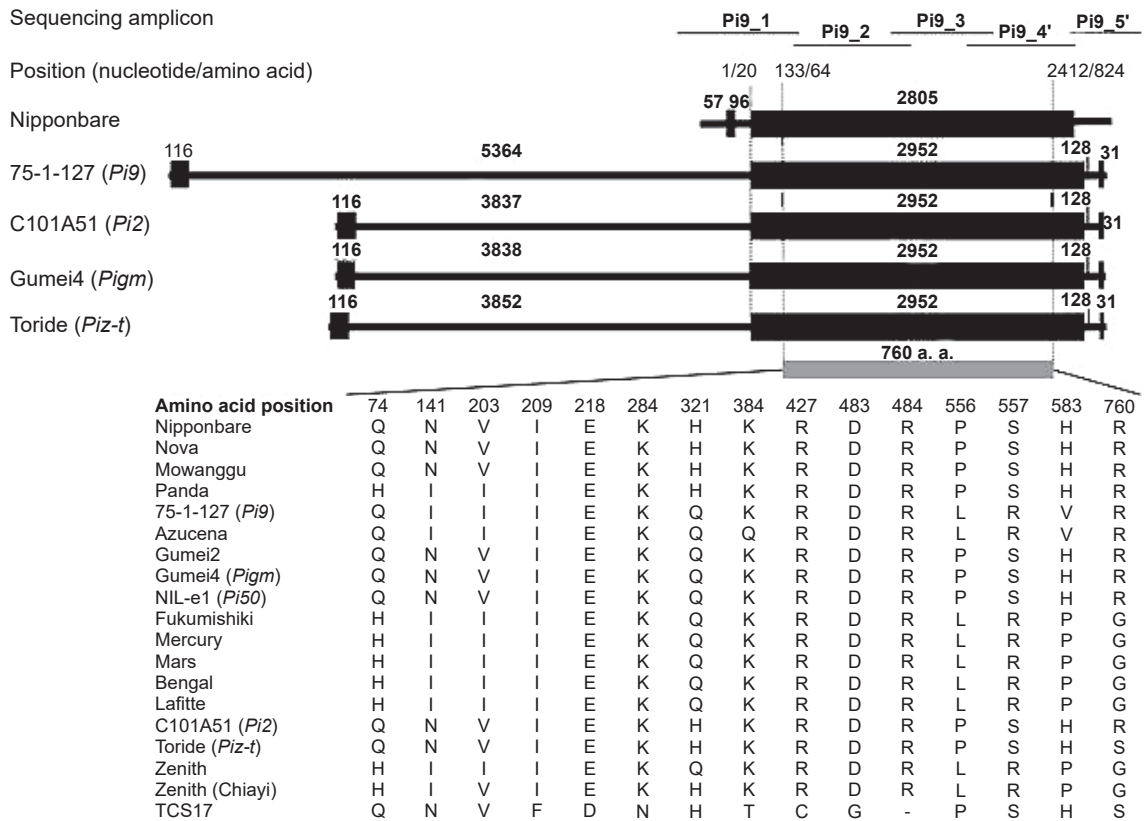


圖 4. 參試親本間 *Piz* 基因第 2 外顯子區間上的蛋白質序列差異，圖說顯示該 15 個差異位點以及參考品種 'Nipponbare' 與 16 個前人定序品種的胺基酸組成；參考品種 'Nipponbare' 的 *Piz* 基因序列為 *LOC\_Os06g17900*，而 *Pi2*、*Pi9* 與 *Piz-t* 基因序列均參考 Liu *et al.* (2011)、*Pi50* 序列來自 Su *et al.* (2015)、*Pigm* 序列來自 Deng *et al.* (2017)。

**Fig. 4.** The multiple protein sequence alignment of *Piz* from 'TCS17' and 'Zenith' (Chiayi), exhibited polymorphism at the 15 different amino acid positions with 'Nipponbare' and other 16 varieties from previous publications. Gene sequences and its references: *Piz* of 'Nipponbare', *LOC\_Os06g17900*; *Pi50* (Su *et al.* 2015); *Pigm* (Deng *et al.* 2017); *Pi2*, *Pi9* and *Piz-t* (Liu *et al.* 2011).

緣係數極為相近，如同文獻所示，兩者全長蛋白質序列僅差 8 個胺基酸差異 (Zhou *et al.* 2006)。有趣的是，「台中秈 17 號」並未被劃分在任一已知抗病基因的分群中。

### BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> 品系對於葉稻熱病之罹病等級

本試驗選育出 14 個分別帶有 'Zenith' 親本 *Pia* 或 *Piz* 或同時兼具 2 個抗病基因之同質結合 BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> 品系，在 2015 及 2016 年第 1 期作對於葉稻熱病之罹病等級，如表 2 所示。輪迴親「台中秈 17 號」在 2 年 2 期作的罹病等級均為 4 級，呈中抗級反應。BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> 品系於 2015 年之

罹病等級介於 1–4 級，最低為 CNY1042057 之 1 級 (抗級)，其次為 CNY1042056 之 2 級 (抗級)，其他 12 個品系之罹病反應均表現為 4 級 (中抗級)。2016 年之罹病等級介於 1–6 級，最低為 CNY1042061 之 1 級 (抗級)，其次為 CNY1042056 及 CNY1042057 之 2 級 (抗級)；最高為 CNY1042063 之 6 級 (中感級)，次高為 CNY1042060 及 CNY1042062 之 5 級 (中感級)。

經比較「台中秈 17 號」回交品系中不同稻熱病基因型組成的抗性反應，輪迴親「台中秈 17 號」在 2 年度間罹病均係中抗級 (4 級)，

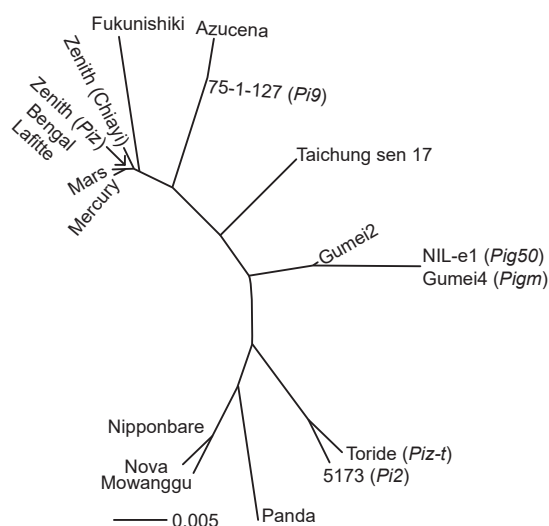


圖 5. 兩親本「台中秈 17 號」與「Zenith」(Chiayi) 在 *Piz* 基因第 2 外顯子區間上的蛋白質序列歧異並與 17 個前人定序品種繪製無根親緣樹狀圖。

Fig. 5. Phylogenetic tree of the 2nd exon of *Piz* protein sequences of 'TCS17', 'Zenith' (Chiayi), and other 17 varieties from previous publications.

其中僅導入「Zenith」的 *Piz* allele 之品系共有 5 株、回復率均達 95–98%。在 2015 年罹病等級均為 4 級 (中抗級)，2016 年罹病範圍 4–5 級、平均 4.2 級 (中抗級)、中位數 4 級 (中抗級)，2 年度綜合表現亦屬中抗級 (4.1 級)。而僅導入「Zenith」的 *Pia* allele 之品系共有 3 株、回復率均達 94–96%，2015 年罹病等級介於 1–4 級 (抗–中抗級)、平均 2.3 級 (抗級)、中位數 2 級 (抗級)，2016 年罹病範圍 2–4 級、平均 2.7 級 (抗級)、中位數 2 級 (抗級)，2 年度綜合表現屬於抗級 (2.5 級)。最後，同時具有「Zenith」的 *Pia* 與 *Piz* allele 之品系共有 6 株、回復率均達 92–94%，2015 年罹病等級均為 4 級 (中抗級)，2016 年罹病範圍 1–6 級 (抗–中感級)、平均 4 級 (中抗級)、中位數 4 級 (中抗級)，2 年度綜合表現屬於中抗級 (4.0 級)。由此顯示，具有「台中秈 17 號」的 *Piz* allele 與「Zenith」的 *Pia* allele 之堆疊組合 (CNY1042052、CNY1042056、CNY1042057)，能比中抗親本更具抗性潛力。

表 2. 新育成「台中秈 17 號」回交品系之 *Pia* 與 *Piz* 基因型組合、背景恢復率及對於葉稻熱病之罹病反應。

Table 2. Reaction of 14 BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> lines derived from 'TCS17' in blast screening trials conducted in 2015 and 2016.

BC <sub>3</sub> F <sub>3</sub> line	Resistance gene		Background recovery rate	Disease severity <sup>z</sup>		
	<i>Pia</i> locus	<i>Piz</i> locus		2015	2016	Mean
CNY1042054	AA	BB	95%	4	4	4.0
CNY1042055	AA	BB	95%	4	4	4.0
CNY1042059	AA	BB	96%	4	4	4.0
CNY1042062	AA	BB	96%	4	5	4.5
CNY1042064	AA	BB	98%	4	4	4.0
CNY1042052	BB	AA	94%	4	4	4.0
CNY1042056	BB	AA	94%	2	2	2.0
CNY1042057	BB	AA	96%	1	2	1.5
CNY1042053	BB	BB	92%	4	4	4.0
CNY1042058	BB	BB	93%	4	4	4.0
CNY1042060	BB	BB	92%	4	5	4.5
CNY1042061	BB	BB	93%	4	1	2.5
CNY1042063	BB	BB	93%	4	6	5.0
CNY1042065	BB	BB	94%	4	4	4.0
TCS17	AA	AA	-	4	4	4.0
Zenith	BB	BB	-	4	5	4.5

<sup>z</sup> The severity score was evaluated based on a 0–9 scale developed by International Rice Research Institute (IRRI).

### BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> 品系產量構成要素及單位面積產量之比較

本試驗 14 個 BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> 品系，在 2016 年第 1 期作之單位面積產量及產量構成要素如表 3 所示。由 ANOVA 分析結果顯示，雖品系間的平均值具差異趨勢，但部分品系內的變異幅度甚大，14 個品系及「台中秈 17 號」之平均單位面積產量間未達顯著差異水準 ( $P = 0.0959$ )。輪迴親「台中秈 17 號」之單位面積產量為 5,720 kg ha<sup>-1</sup>，產量指數為 100%，新育成品系單位面積產量及產量指數均低於輪迴親。其中，最高為品系 CNY1042052 之 5,390 kg ha<sup>-1</sup> 及 94.2%，其次為品系 CNY1042057 之 5,280 kg ha<sup>-1</sup> 及 92.3%，最低為品系 CNY1042064 之 2,530 kg ha<sup>-1</sup> 及 44.2%。在產量構成要素方面，輪迴親之穗數平均為 8.7 支，新育成品系之穗數平均介於 12.3–6.7 支，共有 CNY1042052 等 10 個品系高於輪迴親，CNY1042064 等 4 個品系低於輪迴親；輪迴親之一穗粒數平均為 117.0 粒，新育成品系之一穗粒數平均介於 116.2–70.1 粒，均低於輪迴親；輪迴親之平均稔實率為 81.2%，新育成品系之稔實率平均介

於 83.7–56.1%，僅有品系 CNY1042057 高於輪迴親；輪迴親之平均千粒重為 31.9 g，新育成品系之千粒重平均介於 32.5–25.4 g，僅有品系 CNY1042062 平均 32.5 g 高於輪迴親。針對穗數、一穗粒數、稔實率、千粒重及產量之相關分析結果，如表 4 所示。穗數和稔實率與產量之相關係數為 0.68 及 0.76，表現出顯著正相關；一穗粒數和千粒重與產量之相關係數則未呈見顯著。

### 討論

傳統水稻抗病育種方法，由親本選定雜交獲得 F<sub>1</sub> 世代起，至選育出抗病新品種為迄，期間選汰雜交後裔族群之數量甚為龐大且費時 (Witcombe & Virk 2001)，對育種者而言是相當沉重的負擔。以目前台灣對於稻熱病具有抗性之水稻品種「台農 84 號」為例，該品種自 2002 年雜交獲得 F<sub>1</sub> 世代後，以譜系法進行選育，於 2010 年通過審定正式命名，前後共耗時 9 年 (Chen *et al.* 2011)。利用分子標誌輔助回交育種，可精確估算雜交後裔族群規模，並於作物初期生長階段即可選獲帶有目標

表 3. 本試驗 14 個「台中秈 17 號」回交品系之產量及產量構成要素。

**Table 3.** The yield performance and yield related components of the 14 backcross lines derived from 'TCS17' were compared with the recurrent parent 'TCS17'.

BC <sub>3</sub> F <sub>3</sub> line	Panicle number	Spikelets/Panicle	Spikelet fertility (%)	1000-grain weight (g)	Grain yield (kg ha <sup>-1</sup> )	Yield ratio (%)
CNY1042054	7.3 ± 2.1	95.1 ± 17.6	63.8 ± 8.1	29.1 ± 2.1	2,786.7 ± 832.9	48.7
CNY1042055	9.7 ± 2.1	70.1 ± 7.7	69.4 ± 4.6	29.2 ± 1.0	3,006.7 ± 672.1	52.6
CNY1042059	7.7 ± 3.8	97.2 ± 20.5	79.5 ± 4.9	31.2 ± 0.6	4,363.3 ± 3,183.0	76.3
CNY1042062	7.7 ± 2.1	107.3 ± 12.7	73.1 ± 5.8	32.5 ± 2.3	4,290.0 ± 1,296.9	75.0
CNY1042064	6.7 ± 2.3	116.2 ± 7.6	56.1 ± 8.8	25.4 ± 1.3	2,530.0 ± 1,268.6	44.2
CNY1042052	12.3 ± 1.5	92.0 ± 6.3	71.8 ± 4.2	30.3 ± 0.3	5,390.0 ± 291.0	94.2
CNY1042056	9.3 ± 3.5	98.9 ± 13.3	76.1 ± 10.6	27.5 ± 2.3	4,070.0 ± 1,008.2	71.2
CNY1042057	10.7 ± 2.5	99.1 ± 12.0	83.7 ± 6.0	27.2 ± 1.2	5,280.0 ± 1,488.1	92.3
CNY1042053	11.7 ± 2.3	83.3 ± 6.5	69.4 ± 3.5	27.3 ± 0.7	4,033.3 ± 854.4	70.5
CNY1042058	9.7 ± 1.2	112.3 ± 16.4	68.7 ± 8.5	25.8 ± 0.8	4,253.3 ± 1,039.7	74.4
CNY1042060	10.7 ± 1.2	97.2 ± 7.4	74.5 ± 4.7	28.9 ± 2.7	4,876.7 ± 519.8	85.3
CNY1042061	9.0 ± 1.7	90.5 ± 14.8	73.2 ± 1.2	29.1 ± 2.2	3,813.3 ± 961.1	66.7
CNY1042063	9.0 ± 3.5	84.5 ± 9.0	70.0 ± 4.9	30.0 ± 1.0	3,446.7 ± 1,112.8	60.3
CNY1042065	10.3 ± 1.2	95.9 ± 10.1	73.2 ± 5.2	28.7 ± 1.3	4,546.7 ± 458.0	79.5
TCS17	8.7 ± 1.2	117.0 ± 14.9	81.2 ± 6.7	31.9 ± 1.2	5,720.0 ± 687.0	100.0

表 4. 本試驗 14 個「台中秈 17 號」回交品系穗數、一穗粒數、稔實率及千粒重與產量之相關分析。

Table 4. The correlation analysis between grain yield and yield components of the 14 backcross lines.

Item	Correlation coefficient	P-value
Panicle number	0.68	0.0069
Spikelet per panicle	0.09	0.7661
Spikelet fertility	0.76	0.0015
1,000-grains weight	0.21	0.4757

基因之植株，縮短育種期程。本研究以 3 年時間，利用分子標誌輔助選育 14 個帶有抗病基因 *Pia* 及 *Piz*，且背景回復率介於 92–98% 之 BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> 高度同質結合品系，顯示其育種效率較傳統方式確有顯著提升。然在試驗規模上，回顧本試驗 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 回交世代僅成功培育 32 株，前景選拔後只獲得 3 株目標後裔，最終 BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 新品系之平均背景回復率 94.4% 僅略高於理論值 93.8%。因此，未來應在回交初期世代適度擴大族群規模，不僅可避免抗性組合在世代推進中遺失的風險，亦有助大幅提升背景回復率進而縮短世代數 (Collard *et al.* 2005)。在篩檢策略上，配合增加分子標誌密度 (例如將兩標誌距離設定為 10 cM 以下)，則可降低連鎖拖曳造成的負面影響，有助提高遺傳背景回復率，甚至在 BC<sub>2</sub> 回交世代即可達到預期的目標 (Frisch *et al.* 1999; Collard & Mackill 2008)。另外，輔助育種策略可選育出明確遺傳組成的抗病品系，突破過去僅仰賴田間檢定不易挑選多重抗性品系的瓶頸，使得未來抗性品種在對應流行菌株時可以更加明確，有效進行抗性品種的輪替或地區布局。

稻熱病 *Piz* 基因座位於水稻第 6 染色體短臂端約 10 Mb 處，該處至今選殖出 6 個稻熱病抗性 alleles *Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Piz*、*Pi50* 及 *Pigm*，其中 *Pi2*、*Pi9*、*Pi50* 及 *Pigm* 均被認為對稻熱病具有廣幅抗性，彼此互為複等位基因的關係，在抗稻熱病育種上具重要的應用價值 (Jiang *et al.* 2012; Tian *et al.* 2016)。它們均屬於含有 NBS-LRR 的基因，在序列上相似度極高 (Deng *et al.* 2017)。本文觀察 19 條分屬不同抗、感品種的序列比對結果，在不同抗、感性基因分類上，僅在第 519 與 757 號胺基酸位置上，同屬 'Nipponbare' 等 4 個感病品

種能與其他來源的抗性基因存有一致多型性。此外，由 LRR 區域中，可知在第 556–583 號及第 703–716 號胺基酸等區間中，可構成 3 種與 5 種單倍型。由此可見，任單一區間並不易能一次鑑別開感病、*Pi2*、*Pi9*、*Piz*、*Piz-t*、*Pi50* (*Pigm*) 及「台中秈 17 號」抗性 allele，未來在鑑別上述抗性基因可針對該區間設計基因專一性標誌。

再者，在圖 5 所示 *Piz* 基因分群中包含 'Fukunishiki'、'Zenith' 至 'Mercury' 等 7 個來源，其中 'Fukunishiki' 是判別品系 IRBLz-Fu 上 *Piz* 基因的提供親，亦帶有 *Piz* 基因的 'Zenith' 則與 'Bengal'、'Lafitte' 序列完全一致，顯示該基因座在品種間具有較高歧異度。部分基因專一性標誌僅針對感病參考品種 'Nipponbare'、*Pi2*、*Pi9* 與 *Piz-t* 抗性 allele 序列設計可區別性，若僅仰賴單一多型性位點作為鑑別未知親本時，可能誤將新穎抗性 allele 歸納於舊基因型中，而導致誤判實際基因型。換言之，針對高歧異性的抗病基因，探索未知品種時僅使用少數 SNP 標誌無法穩定推論其 allele 基因型，建議僅應用於已知親本下進行雜交後裔的選育工具或針對未知親本定序確認。

本次試驗發現雖然「台中秈 17 號」與帶有 *Piz* 基因的 'Zenith' 同屬中抗等級，經過 *Piz* 基因座上全長約 76% 的蛋白質序列 (760 a.a.) 序列比對，發現「台中秈 17 號」上所帶有的 *Piz* 抗病 allele 與前人研究 (Liu *et al.* 2011; Su *et al.* 2015; Deng *et al.* 2017) 所示 16 個品種上的主效抗病 alleles (*Piz*、*Pi2*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pi50*、*Pigm*) 在圖 5 親源樹狀圖上明顯相異、自成一群。雖然「台中秈 17 號」上的 *Piz* allele 抗性未明，藉由表 2 中同屬「台中秈 17 號」回交背景下的堆疊品系中，在均具有 'Zenith' 親本

*Pia* allele 下 (CNY1042052, 56, 57, 53, 58, 60, 61, 63, 65), 其中 3 個品系帶有 *Piz* (TCS17) allele 與另外 6 個 *Piz* (Zenith) allele 者的抗性更佳。顯示 *Piz* (TCS17) allele 具有更佳抗性效果, 或 *Piz* (TCS17) allele 與 *Pia* (Zenith) 親緣不同 alleles 堆疊成為更抗堆疊組合, 暗示著「台中秈 17 號」上的 *Piz* allele 可做為新穎抗性候選來源之一。

然最佳抗性品系的堆疊組合不易預測, 本試驗將 'Zenith' 的 *Pia* 基因與「台中秈 17 號」的 *Piz* 基因重新組合在一起時, 其回交後裔能從輪迴親中抗表現提升至抗性級, 顯示導入窄抗幅性基因至中抗品種亦能提升良好抗性。未來持續延緩品系抗性崩跌的策略上, 而非僅能仰賴主效抗性基因, 創造豐富多元的抗性組合更有助抗性品種選育; 而善用堆疊選育策略, 將有機會選育出新穎抗性組合的品系, 突破過去雜交後裔僅仰賴天然病圃檢定而不易聚合多個抗性基因, 使得栽培品種因抗性基因數目稀少或抗性組合貧乏。而面臨抗性崩解的年限過短, 本例亦佐證藉由堆疊選育有效創造豐富多元抗性組合, 更利於導入過多的抗性基因, 亦是本文的重要結果之一。

在新品系產量表現上, 不同品系之平均單位面積產量雖具差異趨勢, 但在綜合變方分析中未能檢出顯著差異, 原因可能在於部分品系

以單株產量估計面積產量之取樣誤差較大所致。未來在進行品種命名之產量比較試驗時, 增加單株取樣規模應可提高產量估計的精確度。雖 14 個新品系的產量表現均低於輪迴親, 另由新品系的產量與其構成要素之相關分析的結果顯示, 穗數和稔實率與產量有顯著相關, 這說明了決定  $BC_3F_3$  品系產量的主要因子為穗數及稔實率。而與輪迴親「台中秈 17 號」穗重型特徵相異 (Lin 1984), 未來栽培管理上將朝向抑制過度分蘖, 維持良好稔實率與穗重, 有助發揮抗性品系的產量潛力。

綜合考量下, 本研究  $BC_3F_3$  品系以 CNY1042057 在罹病反應及產量表現均為最佳, 雖然產量未超越輪迴親, 但可調整農藝栽培方式, 例如通過水分及肥料調控, 抑制過度分蘖以使穗型增大, 亦不失為提高抗性品系產量之良策。

## 誌謝

本研究承行政院農業委員會計畫 (102 農科-14.1.4-農-C3、103 農科-14.1.2-農-C5 及 104 農科-14.2.2-農-C4) 經費挹注, 農業試驗所嘉義農業試驗本分所羅俊欽、廖偉盛及賴佳鴻等同仁之協助調查與資料整理, 研究報告承農業試驗所作物組戴宏宇助研員與文稿審查委員協助校稿得以完成全文, 謹此一併深表謝忱。

附錄 本試驗針對 *Piz* 基因座上第 2 外顯子內 760 a.a. 序列比對 17 個文獻參考品種與兩參試品種。

**Appendix** The multiple protein sequence alignment of both parents and 17 reference varieties for the interval (760 a.a.) of the 2nd exon at *Piz* locus.

Amino acid position	74	77	141	203	209	218	284	305	311	321	338	339	342	374	380	384	398	402	415	427	431	454	483	484	494	513
Nipponbare	Q	R	N	V	I	E	K	A	Q	H	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Nova	Q	R	N	V	I	E	K	A	Q	H	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	A	I	D	R	I	T
Mowanggu	Q	R	N	V	I	E	K	A	Q	H	N	G	R	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Panda	H	R	I	I	I	E	K	A	Q	H	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
75-1-127 ( <i>Pi9</i> )	Q	R	I	I	I	E	K	A	H	Q	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Azucena	Q	R	I	I	I	E	K	A	H	Q	M	V	G	R	F	Q	N	S	S	R	V	N	D	R	N	T
Gumei2	Q	R	N	V	I	E	K	A	Q	Q	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Gumei4 ( <i>Pigm</i> )	Q	H	N	V	I	E	K	A	Q	Q	M	V	G	I	L	K	Y	N	A	R	V	N	D	R	N	T
NIL-e1 ( <i>Pi50</i> )	Q	H	N	V	I	E	K	A	Q	Q	M	V	G	I	L	K	Y	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Fukumishiki	H	R	I	I	I	E	K	A	H	Q	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	A
Mercury	H	R	I	I	I	E	K	T	H	Q	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Mars	H	R	I	I	I	E	K	A	H	Q	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Bengal	H	R	I	I	I	E	K	A	H	Q	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Lafitte	H	R	I	I	I	E	K	A	H	Q	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Zenith	H	R	I	I	I	E	K	A	H	Q	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Zenith (Chiayi)	H	R	I	V	I	E	K	A	H	H	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
TCS17	Q	R	N	V	F	D	N	A	H	H	M	V	G	R	F	T	N	N	A	C	V	N	G	-	N	T
C101A.51 ( <i>Pi2</i> )	Q	R	N	V	I	E	K	A	Q	H	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T
Toride ( <i>Piz-f</i> )	Q	R	N	V	I	E	K	A	Q	H	M	V	G	R	F	K	N	N	A	R	V	N	D	R	N	T

附錄 本試驗針對 *Piz* 基因座上第 2 外顯子內 760 a.a. 序列比對 17 個文獻參考品種與兩參試品種 (續)。

**Appendix** The multiple protein sequence alignment of both parents and 17 reference varieties for the interval (760 a.a.) of the 2nd exon at *Piz* locus. (continued)

Amino acid position	519 <sup>z</sup>	531	556	557	579	580	581	583	634	639	657	669	679	681	703	705	707	709	710	711	713	714	716	732	734
Nipponbare	H	I	P	S	I	G	Q	H	F	P	R	Q	T	N	S	H	D	V	L	F	G	I	G	R	R
Nova	H	V	P	S	I	G	Q	H	F	P	R	Q	T	N	S	H	D	V	L	F	G	I	G	R	R
Mowangu	H	I	P	S	I	G	Q	H	F	P	R	Q	T	N	S	H	D	V	L	F	G	I	G	R	R
Panda	H	I	P	S	I	G	Q	H	F	P	R	Q	T	N	S	H	D	V	L	F	G	I	G	R	R
75-1-127 ( <i>Piz9</i> )	R	I	L	R	S	R	K	V	F	P	R	H	I	K	S	Y	N	A	L	L	-	D	E	R	G
Azucena	R	I	L	R	S	R	K	V	F	P	R	H	I	K	S	Y	N	A	L	L	-	D	E	R	G
Gumei2	R	I	P	S	I	G	Q	H	F	P	K	Q	I	K	Y	Y	N	A	L	L	-	D	E	S	R
Gumei4 ( <i>Pigm</i> )	R	I	P	S	I	G	Q	H	F	P	K	Q	I	K	Y	Y	N	A	L	L	-	D	E	S	R
NIL-e1 ( <i>Piz0</i> )	R	I	P	S	I	G	Q	H	F	P	K	Q	I	K	Y	Y	N	A	L	L	-	D	E	S	R
Fukumishiki	R	I	L	R	I	G	Q	P	F	P	R	Q	I	K	S	Y	N	A	L	L	-	D	E	R	G
Mercury	R	I	L	R	I	G	Q	P	F	P	R	Q	I	K	S	Y	N	A	L	L	-	D	E	R	G
Mars	R	I	L	R	I	G	Q	P	F	L	R	Q	I	K	S	Y	N	A	L	L	-	D	E	R	G
Bengal	R	I	L	R	I	G	Q	P	F	P	R	Q	I	K	S	Y	N	A	L	L	-	D	E	R	G
Lafitte	R	I	L	R	I	G	Q	P	F	P	R	Q	I	K	S	Y	N	A	L	L	-	D	E	R	G
Zenith	R	I	L	R	I	G	Q	P	F	P	R	Q	I	K	S	Y	N	A	L	L	-	D	E	R	G
Zenith (Chiayi)	R	I	L	R	I	G	Q	P	F	P	R	Q	I	K	S	Y	N	A	L	L	-	D	E	R	G
TCS17	R	I	P	S	I	G	Q	H	F	P	R	Q	I	K	S	Y	N	A	L	L	-	D	E	R	G
C101A51 ( <i>Piz2</i> )	R	I	P	S	I	G	Q	H	I	P	R	Q	T	N	S	H	D	A	G	I	-	D	G	R	V
Toride ( <i>Piz-t</i> )	R	I	P	S	I	G	Q	H	I	P	R	Q	T	N	S	H	D	V	L	F	G	I	G	R	V

<sup>z</sup>The same color indicates the same haplotype within the interval.

附錄 本試驗針對 *Piz* 基因座上第 2 外顯子內 760 a.a. 序列比對 17 個文獻參考品種與兩參試品種 (續)。

**Appendix** The multiple protein sequence alignment of both parents and 17 reference varieties for the interval (760 a.a.) of the 2nd exon at *Piz* locus. (continued)

Amino acid position	737	739	751	756	757	759	760	773	780	782	785	787	806
Nipponbare	N	S	T	F	D	R	R	G	V	Y	R	A	L
Nova	N	S	T	F	D	R	R	G	V	Y	R	A	L
Mowanggu	N	S	T	F	D	R	R	G	V	Y	R	A	L
Panda	N	S	T	F	D	R	R	W	V	Y	G	A	F
75-1-127 ( <i>Pi9</i> )	N	S	T	I	Y	L	R	G	V	Y	W	A	L
Azucena	N	S	T	I	Y	L	R	G	V	Y	W	A	L
Gumei 2	N	S	T	F	Y	R	R	G	V	Y	R	A	L
Gumei 4 ( <i>Pigm</i> )	N	S	T	F	Y	R	R	G	F	S	H	S	L
NIL-e1 ( <i>Pi50</i> )	N	S	T	F	Y	R	R	G	F	S	H	S	L
Fukumishiki	N	S	T	F	Y	F	G	G	V	Y	G	A	F
Mercury	N	S	T	F	Y	L	G	G	V	Y	G	A	L
Mars	N	S	T	F	Y	L	G	G	V	Y	G	A	L
Bengal	N	S	T	F	Y	L	G	G	V	Y	G	A	L
Lafitte	N	S	T	F	Y	L	G	G	V	Y	G	A	L
Zenith	N	S	T	F	Y	L	G	G	V	Y	G	A	L
Zenith (Chiayi)	N	S	T	F	Y	L	G	G	V	Y	G	A	L
TCS17	N	S	T	F	Y	L	S	G	V	Y	G	A	L
C101A51 ( <i>Pi2</i> )	D	I	T	I	Y	L	R	G	V	H	R	A	L
Toride ( <i>Piz-t</i> )	D	I	M	I	Y	L	S	G	V	H	R	A	L

## 引用文獻

- Chen, L. C., D. J. Liao, S. H. Huang, W. S. Jwo, H. M. Yen, J. C. Lo, and R. K. Chen. 2011. Breeding a new japonica rice variety Tainung 84. *J. Taiwan Agric. Res.* 60:221–238. (in Chinese with English abstract)
- Chien, C. C., L. C. Hsieh, and Y. C. Chang. 1989. Studies on the break-down of resistance in rice cultivar Tainung 70 to rice blast. *J. Agric. Res. China.* 38:72–79. (in Chinese with English abstract)
- Cho, Y. C., J. H. Roh, B. R. Kim, I. S. Choi, M. K. Kim, S. S. Han, Y. Fukuta, H. G. Hwang, and Y. G. Kim. 2005. Reaction of resistance genes of monogenic lines to rice blast (*Magnaporthe grisea*). *Korean J. Breed. Sci.* 37:155–161.
- Cho, Y. C., S. W. Kwon, I. S. Choi, S. K. Lee, J. S. Jeon, M. K. Oh, J. H. Roh, H. G. Hwang, S. J. Yang, and Y. G. Kim. 2007. Identification of major blast resistance genes in Korean rice varieties (*Oryza sativa* L.) using molecular markers. *J. Crop Sci. Biotech.* 10:265–276.
- 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.
- 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.
- Council of Agriculture, Executive Yuan. 2015. Agricultural Statistics Yearbook. Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 361 pp. (in Chinese)
- Deng, Y., K. Zhai, Z. Xie, D. Yang, X. Zhu, J. Liu, X. Wang, P. Qin, Y. Yang, G. Zhang, Q. Li, J. Zhang, S. Wu, J. Milazzo, B. Mao, E. Wang, H. Xie, D. Tharreau, and Z. He. 2017. Epigenetic regulation of antagonistic receptors confers rice blast resistance with yield balance. *Science* 355:962–965.
- Frisch, M., M. Bohn, and A. A. Melchinger. 1999. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. *Crop Sci.* 39:967–975.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
- Harushima, Y., M. Yano, A. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S. Y. Lin, B. A. Antonio, A. Parco, H. Kajiyama, N. Huang, K. Yamamoto, Y. Nagamura, N. Kurata, G. S. Khush, and T. Sasaki. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F<sub>2</sub> population. *Genetics* 148:479–494.
- Imam, J., N. P. Mandal, M. Variar, and P. Shukla. 2016. Allele mining and selective patterns of *Pi9* gene in a set of rice landraces from India. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.01846.
- International Rice Research Institute. 2002. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 56 pp.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793–800.
- Jiang, N., Z. Li, J. Wu, Y. Wang, L. Wu, S. Wang, D. Wang, T. Wen, Y. Liang, P. Sun, J. Liu, L. Dai, Z. Wang, C. Wang, M. Luo, X. Liu, and G. L. Wang. 2012. Molecular mapping of the *Pi2/9* allelic gene *Pi2-2* conferring broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in the rice cultivar Jefferson. *Rice* 5. doi:10.1186/1939-8433-5-29.
- Jones, D. T., W. R. Taylor, and J. M. Thornton. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics* 8:275–282.
- Kiyosawa, S. 1967. The inheritance of resistance of the Zenith type varieties of rice to the blast fungus. *Jpn. J. Breed.* 17:99–107.
- Lai, M. H., C. P. Li, W. S. Jwo, H. M. Yen, K. K. Hwu, and D. H. Wu. 2016. Study on development of japonica breeding lines introgressed high grain number gene through marker-assisted backcross approach. *J. Taiwan Agric. Res.* 65:31–44. (in Chinese with English abstract)
- Li, J. B., C. Y. Li, Y. Chen, C. L. Lei, and Z. Z. Ling. 2005. Evaluation of twenty-two blast resistance genes in Yunnan using monogenetic rice lines. *Acta Phytotphy. Sinica* 32:113–119. (in Chinese with English abstract)
- Lin, T. F. 1984. The rice breeding for high yield with special reference to Taichung Sen 17. *Bull. Taichung DARES* 8:29–40. (in Chinese with English abstract)
- Liu, J., Y. Hu, Y. Ning, N. Jiang, J. Wu, J. S. Jeon, Y. Xiao, X. Liu, L. Dai, and G. L. Wang. 2011. Genetic variation and evolution of the *Pi9* blast resistance locus in the AA genome *Oryza* species. *J. Plant Biol.* 54:294.
- Qu, S., G. Liu, B. Zhou, M. Bellizzi, L. Zeng, L. Dai, B. Han, and G. L. Wang. 2006. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics* 172:1901–1914.

- Rathour, R., M. Chopra, and T. Sharma. 2008. Development and validation of microsatellite markers linked to the rice blast resistance gene *Pi-z* of Fukunishiki and Zenith. *Euphytica* 163:275–282.
- Su, J., W. Wang, J. Han, S. Chen, C. Wang, L. Zeng, A. Feng, J. Yang, B. Zhou, and X. Zhu. 2015. Functional divergence of duplicated genes results in a novel blast resistance gene *Pi50* at the *Pi2/9* locus. *Theor. Appl. Genet.* 128:2213–2225.
- Sun, G., X. Du, R. Chai, X. Mao, and S. Sun. 1999. Analysis and utilization of major gene resistance to blast in China. *Acta Phytopy. Sinica* 26:103–106. (in Chinese with English abstract)
- Tacconi, G., V. Baldassarre, C. Lanzanova, O. Faivre-Rampant, S. Cavigiolo, S. Urso, E. Lupotto, and G. Valè. 2010. Polymorphism analysis of genomic regions associated with broad-spectrum effective blast resistance genes for marker development in rice. *Mol. Breed.* 26:595–617.
- Telebanco-Yanoria, M. J., T. Imbe, H. Kato, H. Tsunematsu, L. A. Ebron, C. M. Vera Cruz, N. Kobayashi, and Y. Fukuta. 2008. A set of standard differential blast isolates (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.) from the Philippines for rice (*Oryza sativa* L.) resistance. *Jpn. Agric. Res. Q.* 42:23–34.
- Tian, D., Z. Chen, Z. Chen, Y. Zhou, Z. Wang, F. Wang, and S. Chen. 2016. Allele-specific marker-based assessment revealed that the rice blast resistance genes *Pi2* and *Pi9* have not been widely deployed in Chinese *indica* rice cultivars. *Rice* 9. doi:10.1186/s12284-016-0091-8.
- Tsunematsu, H., M. J. T. Yanoria, L. A. Ebron, N. Hayashi, I. Ando, H. Kato, T. Imbe, and G. S. Khush. 2000. Development of monogenic lines of rice for blast resistance. *Breed. Sci.* 50:229–234.
- Witcombe, J. R. and D. S. Virk. 2001. Number of crosses and population size for participatory and classical plant breeding. *Euphytica* 122:451–462.
- Wu, D. H., H. P. Wu, C. S. Wang, H. Y. Tseng, and K. K. Hwu. 2013. Genome-wide InDel marker system for application in rice breeding and mapping studies. *Euphytica* 192:131–143.
- Zeng, X., X. Yang, Z. Zhao, F. Lin, L. Wang, and Q. Pan. 2011. Characterization and fine mapping of the rice blast resistance gene *Pia*. *Sci. China Life Sci.* 54:372–378.
- Zhou, B., S. Qu, G. Liu, M. Dolan, H. Sakai, G. Lu, M. Bellizzi, and G. L. Wang. 2006. The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:1216–1228.

# Study on Development of Indica Breeding Lines Introgressed Blast Gene for *Pia* and *Piz* Loci through Marker-Assisted Backcross Approach

Dah-Jing Liao<sup>1</sup>, Pei-Chen Wu<sup>2</sup>, and Dong-Hong Wu<sup>3\*</sup>

## Abstract

Liao, D. J., P. C. Wu, and D. H. Wu. 2018. Study on development of *indica* breeding lines introgressed blast gene for *Pia* and *Piz* loci through marker-assisted backcross approach. *J. Taiwan Agric. Res.* 67(1):54–72.

Rice blast is one of severe diseases in Taiwan resulting in the loss of grain yield and quality. In this study, novel breeding lines with a single or two blast resistant genes (R gene) were developed by incorporating blast resistance genes (*Pia* and *Piz*) from a *japonica* donor ‘Zenith’ into elite *indica* cultivar ‘Taichung Sen 17’ (‘TCS17’) based on marker-assisted backcrossing (MABC) strategy. The foreground selection was conducted for the blast resistant genes (*Pia* and *Piz*) during the period from BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> to BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>. The background selection, containing 77 InDel and 25 SSR markers, was executed from BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> to BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> generations. In the first cropping season of 2015, 14 breeding lines with a single or two R genes were selected with a high background recovery rate (> 92%). Based on the results of blast screening trials in 2015 and 2016, breeding lines CNY1042052, CNY1042056 and CNY1042057 with the *Pia* gene of ‘Zenith’ allele and the *Piz* gene of ‘TCS17’ allele showed lower severity scale (4, 2 and 1.5, respectively). The sequencing result of both parents in the *Piz* locus exhibited that ‘TCS17’ has a novel *Piz* allele. In the yield trial, the grain yield of all novel breeding lines were lower than the recurrent parent ‘TCS17.’ Among 14 lines, the best performance of grain yield was CNY1042052 (5,390 kg ha<sup>-1</sup>) and the second highest was CNY1042057 (5,280 kg ha<sup>-1</sup>). Based on the evaluation of disease resistance and yield performance, the novel breeding line CNY1042057 possessed the best yield potential and strongest resistance. The correlation analysis between grain yield and yield components of the 14 backcross lines suggested that the limiting factors were panicle number and spikelet fertility. In future, the cultivation strategy (irrigation or fertilizer application) will focus on the control of panicle numbers to increase the grain yield of the novel resistant lines.

**Key words:** *Oryza sativa* L., Blast disease, Marker assisted backcross, Disease resistant gene.

---

Received: May 17, 2017; Accepted: August 29, 2017.

\* Corresponding author, e-mail: dhwu@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellow, Agronomy Department, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Assistant, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.