台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.67 No.1 2018

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.67 No.1 2018

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

Review Article

1 Cadmium Stress in Rice: Influence of Silicon
Ching Huei Kao

Research Articles

9 The Genetic Interaction on the Quantitative Traits of Prescutellar Bristles in Melon Fly, *Bactrccera* (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (Coquillett)
Edward Yun Cheng, Zu-Hsien Wang, Yu-Bing Huang, Ming-Yaw Chiang, Hsiu-Ying Lu, Dong-Hong Wu, Chung-Ming Yang, and Chun-Chi Nien

16 Occurrence of Pith Necrosis of Tomato Caused by *Pseudomonas mediterranea* in Taiwan
Chia-Hsin Tsai, Pao-Jen Ann, Yun-Sheng Lu, Shu-Ling Hwang, and Ting-Hsuan Hung

28 The Pyramiding of Drought and Salt Tolerance of New Rice Lines Using Marker-Assisted Selection
Dah-Jing Liao, Chieh-Wei Kuo, Su-Chen Kuo, I-Chun Lien, Yann-Rong Lin, and Yong-Pei Wu

44 Effects of Two-Stage Culture and Paclobutrazol on *In Vitro* Bulblet Growth and Rooting of *Hippeastrum hybridum*
Uei-Chern Chen, Tzu-Ying Wu, Jhin-Yi Tsao, and Chi-Ni Hsia

54 Study on Development of Indica Breeding Lines Introgressed Blast Gene for *Pia* and *Piz* Loci through Marker-Assisted Backcross Approach
Dah-Jing Liao, Pei-Chen Wu, and Dong-Hong Wu

73 Effects of Treatments of Sprouting Inhibitor CIPC and Co60 on Sprouting and Decaying Rates of the Storage Roots of Sweet Potato
Che-Lun Huang, Min-QI Xu, Shu-Fang Lo, and Yung-Chang Lai

82 Field Evaluation of Blast for Rice Varieties (Lines) Developed from 2009 to 2014 in Taiwan
Szu-Yi Chou and Dah-Jing Liao

94 Screening on Tanshinone Production and Time Course Culture of Tetraploidy Hairy Roots of *Salvia miltiorrhiza*
Chi-Ni Hsia, Chin-Yi Tsao, Tzu-Ying Wu, and Uei-Chern Chen

ISSN 0022-4847
9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.67 No.1 2018

專題論述

1 水稻鎘逆境：矽元素的影響
高景輝

研究報告

9 瓜實蠅 [*Bactrocera* (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (Coquillett)] 中胸背板剛毛數量性狀之遺傳交互作用
鄭允、王志賢、黃毓斌、江明耀、呂秀英、吳東鴻、楊崇民、粘君琪

16 *Pseudomonas mediterranea*引起之番茄髓壞疽病
蔡佳欣、安寶貞、呂昀陞、黃淑苓、洪挺軒

28 利用分子標幟輔助水稻新品系堆疊耐旱與耐鹽性
廖大經、郭介煒、郭素真、連怡鈞、林彥蓉、吳永培

44 兩階段培養及巴克素對孤挺花組培苗生長與發根之影響
陳威臣、吳姿穎、曹進義、夏奇鈱

54 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、吳佩真、吳東鴻

73 抑芽劑CIPC、鈷60輻射照射對甘藷貯藏後發芽等性狀之影響
黃哲倫、徐敏記、羅淑芳、賴永昌

82 2009至2014年台灣水稻新育成品種（系）對於稻熱病罹病反應之研究
周思儀、廖大經

94 四倍體丹參毛狀根系之時序培養及其丹參酮生產篩選
夏奇鈱、曹進義、吳姿穎、陳威臣

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編（按筆劃序）

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業試驗所植物病理組
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

編輯助理

吳惠卿／農業試驗所技術服務組
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯助理顧問

吳宜晏／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第六十七卷　第一期　　中華民國一〇七年三月三十一日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　陳駿季
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://aspers.airiti.com/JTAR

編印　Airiti Press
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店／ 10485 台北市松江路 209 號 1 樓／電話 : (02) 2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場／ 40042 台中市中山路 6 號／電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(1):1–8 (2018)
DOI: 10.6156/JTAR.201803_67(1).0001

Review Article

Cadmium Stress in Rice: Influence of Silicon

Ching Huei Kao[1,*]

Abstract

Kao, C. H. 2018. Cadmium stress in rice: Influence of silicon. J. Taiwan Agric. Res. 67(1):1–8.

Rice plants grown in Cd-contaminated soils are facing concerns of human health and food safety. To reduce the uptake of Cd by rice plants from the soil, several strategies have been adopted for management of Cd-contaminated soil. Silicon (Si) is an element that is agronomically essential for rice growth. To minimize the negative effect of Cd, application of Si fertilizers has been used as one of strategies to reduce Cd accumulation in and toxicity of rice plants. In this review, we briefly discuss the mechanisms of Si-reduced Cd levels in rice plants.

Key words: Cadmium stress, Silicon, Rice.

INTRODUCTION

Cadmium (Cd) is a heavy metal that is toxic to humans and plants. This metal enters the environment mainly from industrial process, application of phosphate fertilizers and sewage sludges. In Taiwan, inappropriate disposal of industrial waste has given rise to the widespread Cd contamination in rice paddy by irrigated water. Due to the unregulated dismantling of electronic and electric waste (E-waste), some agricultural soils in southeast China have become severely contaminated with high levels of Cd (Fu *et al*. 2008). Thus, the disposal of E-waste is also becoming a serious environmental problem. Cd can be readily taken up by rice roots and translocated to shoot and then to grains (Song *et al*. 2015). Cd enters into the food chain through rice consumption and causes toxicities to humans (Aziz *et al*. 2015). It has been estimated that rice consumers ingest about half or more of their daily Cd intake from rice (Iwao 1977). Thus, rice plants grown in Cd-contaminated soils are facing problems of human health and food safety.

To reduce the uptake of Cd by rice plants from the soil, several strategies have been adopted for management of Cd-contaminated soil (Rizwan *et al*. 2016). One of which is the application of silicone (Si) fertilizers. Si is an element that is capable of enhancing multiple (biotic and abiotic) stresses (Ma 2004; Liang *et al*. 2007; Wu *et al*. 2013; Meharg & Meharg 2015; Lin *et al*. 2017). Various studies have shown that Si is able to enhance the heavy metal (including Cd) stress tolerance (Ma 2004; Liang *et al*. 2007; Wu *et al*. 2013; Lin *et al*. 2017). In this review, we discuss the possible mechanisms of Si-mediated alleviation of Cd damage in rice plants.

SILICON IS BENEFICIAL FOR PLANT GROWTH

Silicon is the second most abundant element in soil and readily absorbed by plants. For this reason, plants contain an appreciable amount of Si, ranging from 0.1% to 15% dry

Received: July 27, 2017; Accepted: September 14, 2017.
* Corresponding author, e-mail: kaoch@ntu.edu.tw
[1] Professor Emeritus, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

weight (Epstein 1994; Ma & Yamaji 2006; Farooq & Dietz 2015). Monocot plants such as rice, maize, wheat and barley are considered as Si-accumulating plants because of their very high contents of Si (10–15%). In contrast, most dicot plants accumulate less than 0.5% Si in dry weight (Farooq & Dietz 2015). The amount of Si that is able to be accumulated in rice plants is several-fold more than macronutrients such as nitrogen, phosphorus, and potassium (Yamaji *et al*. 2015). Si is known to be required for normal cell growth and imparts structural benefits to diatoms (Farooq & Dietz 2015). Up to now, Si is still not considered as an essential element. However, several pieces of evidence support the conclusion that Si is beneficial for plant growth and development, and regarded Si as an element that is "quasi-essential" (Epstein 1999). In a subsequent review article, Epstein (2009) considered Si as an inorganic secondary nutrient, which is analogous to organic secondary metabolite. For rice growth, Si has been considered as an essential element agronomically in 1976 (Lian 1976). Si is routinely applied to rice in Asian countries such as Japan and Korea to enhance high and sustainable crop yield.

SILICON UPTAKE AND TRANSPORT IN RICE PLANTS

Weathering of silicate-containing minerals is the major source of Si for plants. The mineral breakdown releases soluble silicic acid (H_4SiO_4) into the soil solution (Malhotra *et al*. 2016). H_4SiO_4 in the soil solution is then taken up by plant roots as an uncharged monomeric molecule below pH 9 (Takahashi & Hino 1978). He *et al*. (2013, 2015) used suspended rice single cells to investigate the localization of Si and demonstrated that Si is present in cell wall as a hemicellulose-bound form of Si.

Basically, passive and active are two mechanisms of Si uptake by higher plants (Ma *et al*. 2004; Mitani & Ma 2005). Passive uptake of Si takes place along transpiration stream. Most dicots absorb Si passively. Active Si uptake usually occurs in rice plants. However, Liang *et al*. (2006) reported that both active and passive mechanisms are operating in rice plants. Ma *et al*. (2002) isolated the first known rice mutant that is defective in active Si uptake. Using this mutant, they cloned the *low silicon rice 1* (*Lsi1*) gene (Ma *et al*. 2006), which encodes a membrane protein similar to water channel proteins (aquaporins). Suppression of *Lsi1* expression resulted in reduced silicon uptake. *Lsi1* functions as an influx transporter in rice plants. In a subsequent paper, Ma *et al*. (2007) reported the identification of *low silicon rice 2* (*Lsi2*). The protein encoded by this gene is localized, like *Lsi1*, on the plasma membrane. In contrast to *Lsi1*, *Lsi2* functions as a silicon efflux transporter. Based on the results of mathematical modeling study, Ma & Yamaji (2015) concluded that the cooperation of *Lsi1* and *Lsi2* in rice permits effective transcellular transport of the Si in rice.

Rice plants show genotypic difference in Si accumulation. *Japonica* rice varieties usually have a higher Si concentration than *indica* rice varieties (Deren *et al*. 1992). Ma *et al*. (2007) compared the difference between the *japonica* variety and the *indica* variety in Si uptake. They found that the difference in the Si accumulation results from the difference in abundance of in *Lsi1* and *Lsi2* transporter in rice roots. After transmembrane transport via *Lsi1* and *Lsi2* into the stele, Si is translocated to the shoot by transpiration flow through the xylem (Mitani *et al*. 2005). *Lsi6* is now known as a transporter responsible for the transport of Si out of the xylem (xylem unloading) and subsequently affects the distribution of Si in rice shoots (Yamaji *et al*. 2008).

SILICON REDUCES CADMIUM TOXICITY OF RICE PLANTS

Okuda &Takahashi (1962) demonstrated that Mn toxicity in rice plants was alleviated by exogenous addition of Si. The discovery

that Si-alleviated Mn toxicity in turn led to the finding that this role of Si can also be applied to other metal ions, such as Cd. Wang *et al*. (2000) were the first to report that application of Si significantly prevents the uptake of Cd into rice cells. In a pot experiment, Ping *et al*. (2008) found that addition of calcium silicate, a Si fertilizer, enhances the yield and decreases the Cd content in straw and grain of rice plants grown in a soil that was contaminated with Cd. Fly ash and steel slag, Si-rich amendments, are low cost industrial by-products. The results from a pot experiment by Gu *et al*. (2011) clearly showed that the application of fly ash and steel stag decreases the phytoavailability of Cd and further suppressed Cd uptake by rice. Recently, Ji *et al*. (2017) investigated the effect of different types of Si-rich soil amendments (slag, ground slag, and diatomaceous earth) and fertilizers on the distribution of soluble and insoluble forms of Cd in the rice plants grown on long-term cultivated paddy soil contaminated with Cd in China. They demonstrated that the Si-rich materials increase rice biomass and reduce the total leaf Cd. Si fertilizers used in the application were mainly applied into soil directly. Liu *et al*. (2009) conducted an experiment to investigate the effect of foliar application of two types of impurity-free SiO_2 solution on Cd toxicity in rice. They found that the total accumulation of Cd in rice grains decreased with the foliar application of Si solution. Similarly, Wang *et al*. (2015) also reported foliar application with nano-Si alleviated Cd toxicity in rice seedlings.

Nwugo & Huerta (2008) investigated the effect of Si nutrition on low-level Cd toxicity symptoms in rice seedlings. Their results showed that low-level Cd treatment generally inhibited growth. Application of Si significantly reduced root- and leaf-Cd content and alleviated low-level Cd-induced inhibition of growth. Most nutrient studies on the interaction between Si and Cd are short term. Zhang *et al*. (2008) conducted a long-term experiment, in which rice was grown for 105 d and harvested at four different growth stages to measure biomass accumulation and Cd uptake and distribution in shoots and roots. The results from their experiments concluded that Si enhances plant growth and decreases Cd accumulation in shoots. Despite evidence of the role of Si in the mitigation of Cd toxicity in rice plants at the whole-plant level (Shi *et al*. 2005; Tripathi *et al*. 2012; Srivastava *et al*. 2015), involvement of Si in inhibiting Cd uptake at the single-cell level of rice has been reported (Liu *et al*. 2013; Ma *et al*. 2015).

MECHANISMS OF SILICON-INHIBITED CADMIUM UPTAKE IN RICE PLANTS

It is now clear that the effect of Si application on reducing Cd toxicity of rice plants is related to the reduction on Cd uptake. Si could decrease Cd uptake in rice through mechanisms occurring at both soil and plant levels.

The interaction between Si and Cd occurs in the soil is an indirect effect (Ji *et al*. 2017). It has been shown that soil pH is a predominant factor which limits Cd uptake (Takjima & Katsumi 1973; Ping *et al*. 2008). Application of Si-rich substances was reported to increase the soil pH (Takijima & Katsumi 1973; Ping *et al*. 2008; Gu *et al*. 2011; Ji *et al*. 2017). These results suggest that increase in pH may lead the reduction of Cd bioavailability in the soil.

Liu *et al*. (2009) reported that foliar application of Si reduced Cd concentration in rice grains, suggesting that Si alleviates Cd accumulation in rice grains may be related to the Cd sequestration in shoot cell walls. Using rice single cells, Ma *et al*. (2015) demonstrated that the interaction of Si with Cd occurs in the cell walls via a [Si-hemicelluloses] Cd co-complexation. Gu *et al*. (2011) also found that Cd translocation from stem to leaf of rice was dramatically inhibited by adding Si-rich amendments. They found that the increase of Si concentration may form complex with Cd in stem.

Shi *et al*. (2005) investigated the effect of Si on the distribution of Cd in rice seedlings and proposed that Si partially physically blocks the apoplast bypass flow across the rice roots, and restrains the apoplastic transport of Cd. More recently, Ma *et al*. (2016) reported that Si-modified cell walls inhibited Cd uptake under short-term Cd stress, whereas the compartmentation of Cd into vacuoles under long-term Cd stress is the possible mechanism reducing Cd uptake.

In Cd-treated rice plants, about 50 proteins were significantly regulated by the presence of Si (Nwugo & Huerta 2008), suggesting that Si-enhanced Cd tolerance of rice might be associated with the synthesis of relevant proteins. The natural resistance-associated macrophage proteins (Nramps) are metal-ion transporters (Nevo & Nelson 2006). OsNramp5 is known to mediate Cd transport in rice plants (Sasaki *et al*. 2012). *Low cadmium* (*LCD*) is a gene related to Cd accumulation (Shimo *et al*. 2011). The heavy metal ATPases (HMAs), also known as the P_{1B}-ATPases, are localized mainly in vacuole of rice toots. Based on the available data, it appears that, when treated with Si, the expression of *OsLsi1* and *OsLsi2*, genes responsible for Si transport (Ma *et al*. 2006, 2007), is highly up-regulated in rice, resulting in down-regulated *OsLCD*, *OsNRamp5*, *OsHMA2*, and *OsHMA3* under Cd stress (Kim *et al*. 2014; Lin *et al*. 2017).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Rice plants grown in Cd-contaminated soils are facing problems of human health and food safety. In this review, we clearly show that application of Si-rich substances is able to mitigate the Cd stress of rice plants. Si nutrition and management in rice have received great attention in Japan. Compared with *japonica* rice, research information concerning Si nutrition in *indica* rice is less adequate. The reports on Si nutrition of rice suggest that high Si rice is better adapted to Cd stress. It is now well established that the difference in the Si accumulation results from the difference in abundance of *Lsi1* and *Lsi2* transporters in rice roots. Screening and genetic analysis of rice germplasm for high Si content will be the aid in the acceleration of breeding of rice that is higher in Si status.

Rice is a known Si accumulator. Due to continuous culture of high-yielding rice cultivars with intensive cultivation practices, especially if farmers are not replacing the Si removed by rice plants, the soil used in growing rice plants may contain an inadequate supply of Si. The challenge of how to effectively sustain Si levels in the soil appears to be of prime importance in future research.

In Taiwan, stress physiology of Cd has been extensively studied using ‘Taichung Native 1’, an *indica* cultivar in our laboratory. Unfortunately, the importance of Si-rich substances in mitigating Cd stress has been overlooked and poorly understood. Based on the present discussion, we strongly suggest that future work here in Taiwan to be focused on large-scale and long-term well-designed-field trials. Such results are certainly helpful for obtaining information regarding the feasibility of Si application for mitigation of Cd stress in rice plants.

ACKNOWLEDGMENTS

I thank Dr. Chwen-Ming Yang, Director of Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, for inviting me to write review articles concerning stress physiology of rice after my retirement from the National Taiwan University, where I have served for 40 years. Since 2013, about 11 review articles (Kao 2013, 2014a, 2014b, 2014c, 2015a, 2015b, 2015c, 2015d, 2017a, 2017b, 2017c) have been accepted or published in either *Crop Environment and Bioinformatics* or *Journal of Taiwan Agricultural Research*. Interestingly, C. M. Yang is coincidently responsible for editing work of both journals. I owe much to my students, colleagues and collaborators over the years and especially to

Chwen-Yang Hong, former student and long-term coworker. As always, financial support from the Ministry of Science and Technology (formerly National Science Council) of the Republic of China is greatly appreciated.

REFERENCES

Aziz, R., M. T. Rafiq, T. Li, D. Liu, Z. He, P. J. Stofelta, K. Sun, and Y. Xiaoe. 2015. Uptake of cadmium by rice grown on contaminated soils and its bioavailability/toxicity in human cell lines (Caco-2/HL-7702). J. Agric. Food Chem. 63:3599–3608.

Deren, C. W., L. E. Datnoff, and G. N. Snyder. 1992. Variable silicon content of rice cultivars grown on everglades histosols. J. Plant Nutr. 15:2363–2368.

Epstein, E. 1994. The anomaly of silicon in plant biology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:11–17.

Epstein, E. 1999. Silicon. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50:641–664.

Epstein, E. 2009. Silicon: Its manifold roles in plants. Ann. Appl. Biol. 155:155–160.

Farooq, M. A. and K. J. Dietz. 2015. Silicon as versatile player in plant and human biology: Overlooked and poorly understood. Front. Plant Sci. 6:994.

Fu, J., Q. Zhou, J. Liu, W. Liu, T. Wang, Q. Zhang, and G. Jiang. 2008. High levels of heavy metals in rice (*Oryza sativa* L.) from a typical E-waste recycling area in southeast China and its potential risk to human health. Chemosphere 71:1269–1275.

Gu, H. H., H. Qiu, T. Tian, S. S. Zhan, T. H. B. Deng, R. L. Chaney, S. Z. Wang, Y. T. Tang, J. L. Morel, and R. L. Qiu. 2011. Mitigation effects of silicon rich amendments on heavy metal accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) planted on multi-metal contaminated acidic soil. Chemosphere 83:1234–1240.

He, C., J. Ma, and L. Wang. 2015. A hemicellulose-bound form of silicon with potential to improve the mechanical properties and regeneration of the cell wall of rice. New Phytol. 206:1051–1062.

He, C., L. Wang, J. Liu, X. Liu, X. Li, J. Ma, Y. Lin, and F. Xu. 2013. Evidence for 'silicon' within the cell walls of suspension-cultured rice cells. New Phytol. 200:700–709.

Iwao, S. 1977. Cadmium, lead, copper and zinc in food, feces and organs of humans: Interrelationships in food and feces and interactions in the liver and the renal cortex. Keio J. Med. 26:63–78.

Ji, X., S. Liu, H. Juan, E. A. Bocharnikova, and V. V. Matichenkov. 2017. Effect of silicon fertilizers on cadmium in rice (*Oryza sativa*) tissue at tillering stage. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 24:10740–10748.

Kao, C. H. 2013. Role of nitric oxide in rice plants. Crop Environ. Bioinform. 10:229–237.

Kao, C. H. 2014a. Role of hydrogen peroxide in rice plants. Crop Environ. Bioinform. 11:1–10.

Kao, C. H. 2014b. Role of abscisic acid in abiotic stress tolerance in rice. Crop Environ. Bioinform. 11:57–64.

Kao, C. H. 2014c. Cadmium stress in rice plants: Influence of essential elements. Crop Environ. Bioinform. 11:113–118.

Kao, C. H. 2015a. Role of L-ascorbic acid in rice plants. Crop Environ. Bioinform. 12:1–7.

Kao, C. H. 2015b. Mechanisms of salt tolerance in rice plants: Compatible solutes and aquaporins. Crop Environ. Bioinform. 12:73–82.

Kao, C. H. 2015c. Mechanisms of salt tolerance in rice plants: Na^+ transporters. Crop Environ. Bioinform. 12:113–119.

Kao, C. H. 2015d. Role of glutathione in abiotic stress tolerance of rice plants. J. Taiwan Agric. Res. 64:167–176.

Kao, C. H. 2017a. Mechanisms of salt tolerance in rice plants: Reactive oxygen species scavenging-systems. J. Taiwan Agric. Res. 66:1–8.

Kao, C. H. 2017b. Cadmium stress in rice: Transporters involved in cadmium accumulation. Crop Environ. Bioinform. 14:1–4.

Kao, C. H. 2017c. Mechanisms of salt tolerance in rice plants: Cell wall-related genes and expansins. J. Taiwan Agric. Res. 66:87–93.

Kim, Y. H., A. L. Khan, D. H. Kim, S. Y. Lee, K. M. Kim, M. Waqas, H. Y. Jung, J. H. Shin, J. G. Kim, and I. J. Lee. 2014. Silicon mitigates heavy metal stress by regulating P-type heavy metal ATPases, *Oryza sativa* low silicon genes, and endogenous phytohormones. BMC Plant Biol. 14:13.

Lian, S. 1976. Silica fertilization of rice. p.197–220. *in*: The Fertility of Paddy Soils and Fertilizer Applications for Rice. Asian and Pacific Council. Food & Fertilizer Technology Center. Taipei, Taiwan. 249 pp.

Liang, Y. C., H. X. Hua, Y. G. Zhu, J. Zhang, C. M. Cheng, and V. Römheld. 2006. Importance of plant species and external silicon concentration to active silicon uptake and transport. New Phytol. 172:63–72.

Liang, Y. C., W. Sun, Y. G. Zhu, and P. Christie. 2007. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. Environ. Pollut. 147:422–428.

Lin, H., C. Fang, Y. Li, W. Lin, J. He, R. Lin, and W. Lin. 2017. Cadmium-stress mitigation through gene expression of rice and silicon addition. Plant Growth Regul. 81:91–101.

Liu, C., F. Li, C. Luo, X. Liu, S. Wang, T. Liu, and X. Li. 2009. Foliar application of two silica sols reduced cadmium accumulation in rice grains. J. Hazard. Mater. 161:1466–1472.

Liu, J., J. Ma, C. He, X. Li, W. Zhang, F. Xu, Y. Lin, and L. Wang. 2013. Inhibition of cadmium ion uptake in rice (*Oryza sativa*) cells by a wall-bound form of silicon. New Phytol. 200:691–699.

Ma, J., H. Cai, C. He, W. Zhang, and L. Wang. 2015. A hemicellulose-found form of silicon inhibits cadmium ion uptake in rice (*Oryza sativa*) cells. New Phytol. 206:1063–1074.

Ma, J., H. Sheng, X. Li, and L. Wang. 2016. iTRAQ-based proteomic analysis revels the mechanisms of silicon-mediated cadmium tolerance in rice (*Oryza sativa*) cells. Plant Physiol. Biochem. 104:71–80.

Ma, J. F. 2004. Role of silicon enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. Soil Sci. Plant Nutr. 50:11–18.

Ma, J. F., K. Tamai, M. Ichii, and G. F. Wu. 2002. A rice mutant defective in Si uptake. Plant Physiol. 130:2111–2117.

Ma, J. F., K. Tamai, N. Yamaji, N. Mitani, S. Konishi, M. Katsuhara, M. Ishiguro, Y. Murata, and M. Yano. 2006. A silicon transporter in rice. Nature 440:688–691.

Ma, J. F., N. Mitani, S. Nagao, S. Konishi, K. Tamai, T. Iwasjhita, and M. Yano. 2004. Characterization of the silicon uptake system and molecular mapping of the silicon transporter gene in rice. Plant Physiol. 136:3284–3289.

Ma, J. F. and N. Yamaji. 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. Trends Plant Sci. 11:392–397.

Ma, J. F. and N. Yamaji. 2015. A cooperative system of silicon transport in plants. Trends Plant Sci. 20:435–442.

Ma, J. F., N. Yamaji, K. Tamai, and N. Mitani. 2007. Genotypic difference in silicon uptake and expression of silicon transporter genes in rice. Plant Physiol. 145:919–924.

Ma, J. F., N. Yamaji, N. Mitani, K. Tamai, S. Konishi, T. Fujiware, M. Katsuhara, and M. Yano. 2007. An efflux transporter of silicon in rice. Nature 448:209–212.

Malhotra, C., R. T. Kapoor, and D. Ganjewala. 2016. Alleviation of abiotic and biotic stresses in plants by silicon supplementation. Sci. Agric. 13:59–73.

Meharg, C. and A. A. Meharg. 2015. Silicon, the silver bullet for mitigating biotic and abiotic stress, and improving grain quality, in rice. Environ. Exp. Bot. 120:8–17.

Mitani, N. and J. F. Ma. 2005. Uptake system of silicon in different plant species. J. Exp. Bot. 56:1255–1261.

Mitani, N., J. F. Ma, and T. Iwashita. 2005. Identification of the silicon form in xylem sap of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Physiol. 46:279–283.

Nevo, Y. and N. Nelson. 2006. The NRAMP family of metal-ion transporters. Biochim. Biophys. Acta 1763:609–620.

Nwugo, C. C. and A. J. Huerta. 2008. Effects of silicon nutrition on cadmium uptake, growth and photosynthesis of rice plants exposed to low-level cadmium. Plant Soil 311:73–86.

Okuda, A. and E. Takahashi. 1962. Effect of silicon supply on the injuries due to excessive amounts of Fe, Mn, Cu, As, Al, Co of barley and rice plant. Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr. 33:1–8.

Ping, L., X. Wang, T. Zhang, D. Zhou, and Y. He. 2008. Effects of several amendments on rice growth and uptake of copper and cadmium from a contaminated soil. J. Environ. Sci. 20:449–455.

Rizwan, M., S. Ali, M. Adrees, H. Rizvi, M. Zia-ur-Rehmanm, F. Hannan, M. F. Qayyum, F. Hafeez, and Y. S. Ok. 2016. Cadmium stress in rice: Toxic effects, tolerance mechanisms, and management: A critical review. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 23:17859–17879.

Sasaki, A., N. Yamaji, K. Yokosho, and J. F. Ma. 2012. Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. Plant Cell 24:2155–2167.

Shi, X. H., C. C. Zhang, H. Wang, and F. S. Zhang. 2005. Effect of Si on the distribution of Cd in rice seedlings. Plant Soil 272:53–60.

Shimo, H., Y. Ishimaru, G. An, T. Yamakawa, H. Nakamishi, and N. K. Nishizawa. 2011. *Low cadmium* (*LCD*), a novel gene related to cadmium tolerance and accumulation in rice. J. Exp. Bot. 62:5727–5734.

Song, W. E., S. B. Chen, J. F. Liu, L. Chen, N. N. Song, N. Li, and B. Liu. 2015. Variation of Cd concentration in various rice cultivars and derivation of cadmium toxicity thresholds for paddy soil by species-sensitivity distribution. J. Integr. Agric. 14:1845–1854.

Srivastava, R. K., P. Pandey, R. Rajpoot, A. Rani, A. Gautam, and R. S. Dubey. 2015. Exogenous application of calcium and silica alleviates cadmium toxicity by suppressing oxidative damage in rice seedlings. Protoplasma 252:959–975.

Takahashi, E. and K. Hino. 1978. Silica uptake by plant with special reference to the forms of dissolved silica. J. Soil Sci. Manure Jpn. 49:357–360.

Takijima, Y. and F. Katsumi. 1973. Cadmium contamination of soils and rice plants caused by zinc mining IV. Use of soil amendment materials for the control of Cd uptake by plants. Soil Sci. Plant Nutr. 19:235–244.

Tripathi, D. K., V. P. Singh, D. Kumar, and D. K. Chauhan. 2012. Rice seedlings under cadmium stress: Effect of silicon on growth, cadmium uptake, oxidative stress, antioxidant capacity and root and leaf structures. Chem. Ecol. 28:281–291.

Wang, L., Y. Wang, Q. Chen, W. Cao, M. Li, and F. Zhang. 2000. Silicon induced cadmium tolerance of rice seedlings. J. Plant Nutr. 23:1397–1406.

Wang, S., F. Wang, and S. Gao. 2015. Foliar application with nano-silicon alleviates Cd toxicity in rice seedlings. Environ. Sci. Pollu. Res. Int. 22:2837–2845.

Wu, J. W., Y. Shi, Y. X. Zhu, Y. C. Wang, and H. J. Gong. 2013. Mechanisms of enhanced heavy metal tolerance in plants by silicon: A review. Pedosphere 23:815–825.

Yamaji, N., G. Sakurai, N. Mitani-Ueno, and J. F. Ma. 2015. Orchestration of three transporters and distinct vascular structures in node for intervascular transfer of silicon in rice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 12:11401–11406.

Yamaji, N., N. Mitatni, and J. F. Ma. 2008. A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. Plant Cell 20:1381–1389.

Zhang, C., L. Wang, Q. Nie, W. Zhang, and F. Zhang. 2008. Long-term effects of exogenous silicon on cadmium translocation and toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). Environ. Exp. Bot. 62:300–307.

水稻鎘逆境：矽元素的影響

高景輝 [1,*]

摘要

高景輝。2018。水稻鎘逆境：矽元素的影響。台灣農業研究 67(1):1–8。

水稻生長於鎘污染土壤，會面臨人體健康及食品安全問題，很多策略可用來管理鎘污染土壤。在農藝上，矽是水稻生長所需重要元素。為降低鎘負面影響，矽肥可用來降低鎘之累積與水稻毒害。本文旨在探討矽肥降低鎘吸收可能機制。

關鍵詞：鎘逆境、矽元素、水稻。

投稿日期：2017 年 7 月 27 日；接受日期：2017 年 9 月 14 日。
* 通訊作者：kaoch@ntu.edu.tw
[1] 國立台灣大學農藝學系名譽教授。台灣 台北市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(1):9–15 (2018)
DOI: 10.6156/JTAR.201803_67(1).0002

Research Article

The Genetic Interaction on the Quantitative Traits of Prescutellar Bristles in Melon Fly, *Bactrccera* (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (Coquillett)

Edward Yun Cheng[1], Zu-Hsien Wang[2], Yu-Bing Huang[3,*], Ming-Yaw Chiang[3], Hsiu-Ying Lu[4], Dong-Hong Wu[5], Chung-Ming Yang[2], and Chun-Chi Nien[2]

Abstract

Cheng, E. Y., Z. H. Wang, Y. B. Huang, M. Y. Chiang, H. Y. Lu, D. H. Wu, C. M. Yang, and C. C. Nien. 2018. The genetic interaction on the quantitative traits of prescutellar bristles in melon fly, *Bactrccera* (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (*Coquillett*). J. Taiwan Agric. Res. 67(1):9–15.

The genetics of prescutellar bristles (prsc) in the melon fly, *Bactrocera* (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (Coquillett) is polygenic with a quantitative trait of 1 to 20 prsc or more. The field population is polymorphic in regard of prsc and harbors 95% 2prsc phenotype (the major wild type) and 5% 4prsc phenotype (the minor wild type). Several laboratory strains with different numbers of prsc were established for genetic study. When the 2prsc (2P) strain crosses with other phenotypes, instead of blending into the continuous prsc traits, the 2prsc phenotype (2PHT) frequency surged in the F_2 progeny. The reappearing of the parental phenotype in F_2 progeny is unusual in a quantitative genetic event, and is examined by comparing the 2P strain and the multiple prsc (MB) strain in two serial step-up phenotype crosses. All six 2P serial crosses resulted in the 2PHT surge, demonstrating that the 2P strain is the genetic source of the surge. The surge only happened in the F_2 progeny at 22.5% ± 4.0% but not in the F_1 progeny. For the MB strain, the serial crosses with other phenotypes showed no trace of phenotypic surge, and the results of all five MB serial crosses followed the quantitative genetic principle in continuous traits accordingly. The comparative study suggests that the quantitative genetics of prsc can be modified by other genetic factors, although the 2PHT surge mechanism still remains to be investigated. In population genetics, the 2PHT surge is considered to be a contributing factor in the dominance of 2PHT as the major wild type in the field population.

Key words: Quantitative genetics, Prescutellar bristles, *Bactrocera* (*Zeugodacus*) *cucurbitae*, Mono-phenotype surge.

INTRODUCTION

The insect specimen identification is essential in both the agricultural pest control program and the international trade quarantine. For the taxonomy of economic important fruit fly of Tephritidae family, the notal bristles are important morphological characters (White & Elson-Harris 1992; Drew & Hancock 1994), with special attention that certain species are polymorphic in either the number or the loca-

Received: September 21, 2016; Accepted: May 31, 2017.
* Corresponding author, e-mail: ybhuang@tari.gov.tw
[1] Former Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Technicians, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Director, Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Miaoli, Taiwan, ROC.
[5] Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

tion of bristles (White 2001). The melon fly, *Bactrocera* (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (*Coquillett*) is polymorphic in regard of prescutellar bristle (prsc) with 95% 2prsc-phenotype (2PHT) and 5% 4prsc-phenotype (4PHT) in field (Cheng *et al*. 2014). This prsc polymorphism has not been investigated in both genetics and developmental biology. In other dipterans species, for examples, the variation of bristles in *Drosophila melanogaster* and several *cyclorrapha dipterans*, including *Ceratitis capitata* (Mediterranean fruit fly) have been well studied for the interest of both quantitative genetics (Mackay 1995) and developmental biology (Ghysen & Dambly-Chaudière 1988; Simpson *et al*. 1999; Simpson & Marcellini 2006). In particular, the *achaete-scute* regulation on the notum of *Drosophila* has been related to the evolution of thorax development in dipterans (Alonso & Cabrera 1988; Garcia-Garcia *et al*. 1999; Wulbeck & Simpson 2000; Pistillo *et al*. 2002; Skaer *et al*. 2002). There are limited knowledge on prsc morphology of melon fly, and as a part of fruit fly control program, Taiwan Agricultural Research Institute (TARI) started investigating the possible cause of prsc polymorphism. The genetic analysis has confirmed the prsc polymorphism is a polygenic nature or a quantitative genetic controlled (Cheng *et al*. 2014). However, it is noticed that there is an unusual frequency surge of 2PHT in the F_2 progeny of the 2P strain (the wild type) cross with other phenotypes. The unusual increase of a single phenotype frequency not only disrupts the continuous prsc trait but also signaling the possibility of genetic interaction in quantitative genetics. The extra 2PHT progeny produced in this surge may also contribute to the field dominance of 2PHT in population genetics. The current study is tried to confirm the event, estimate the frequency, and locate its genetic source.

MATERIALS AND METHODS

Insect rearing

The melon fly rearing, phenotype separation and the definition of notum bristles following White & Elson-Harris (1992) were the same as described in the previous report (Cheng *et al*. 2014). The prsc phenotype characters of strains are described as follows: (1) the 2prsc phenotype (2P) strain: the mean = 2.0 ± 0.2 prsc and ranged 1–5 (Fig. 1A); (2) the 4prsc phenotype (4P) strain: the mean = 4.0 ± 0.4 prsc and ranged 1–8 (Fig. 1B); and (3) the multiple prsc (MB) strain: the mean = 12.3 ± 2.0 prsc and ranged 8–19 (Fig. 1C).

The comparative study of the continuous prsc traits in 2P and MB strains

The occurrence of 2PHT surge is compared in two series of step-up phenotype crosses. (1) The 2PHT is chosen as the representing phenotype of the 2P strain to cross with the 4, 6 and 8PHT of 4P strain, and the 10, 12 and 14PHT of MB strain. (2) The 12PHT is chosen as the representing phenotype of the MB strain to cross with the 4, 6 and 8PHT of 4P strain, and the 10 and 12PHT of MB strain. Each cross



Fig. 1. The comparison of prsc. (A) the 2PHT of the 2P strain; (B) the 4PHT of the 4P strain; (C) the 12PHT of the MB strain. PHT: prsc-phenotype.

contains 4–6 replicates with males and females from both parental phenotypes alternatively to average out the possible variables, even it has been determined that prsc genetics is not sex related (Cheng *et al*. 2014). The F_1 offspring was self-crossed for the F_2 generation. Due to the spread out quantitative trait, on average of 1,000 F_1 and 2,000 F_2 offspring were inspected for their prsc PFDs (phenotype frequency distribution).

RESULTS AND DISCUSSION

The purpose of this study is to clarify the unexpected finding of the 2prsc phenotype surge in our previous quantitative genetic report of the prescutellar bristle in melon fly (Cheng *et al*. 2014). The 2P strain, the major wild type, was compared to an artificially selected MB strain in two serial crosses with step-up phenotypes. The PFDs of both F_1 and F_2 progeny were presented in Figs. 2 and 3 for 2P and MB serial crosses, respectively. The quantitative genetic nature of prsc traits has been demonstrated in progeny of both serial crosses, as all PFDs are continuously distributed (Emerson & East 1913; Russell 2005; Griffiths *et al*. 2008), except the 2PHT surge which appeared in the F_2 progeny of all six 2P serial crosses. The test results confirmed that the previous observation of the parental 2P-phenotype reappeared in F_2 at a significant frequency is not accidental (Cheng *et al*. 2014). When comparing the 2P serial result to the continuous PFD prsc trait of MB series, the on and off of the 2PHT surge indicates that the

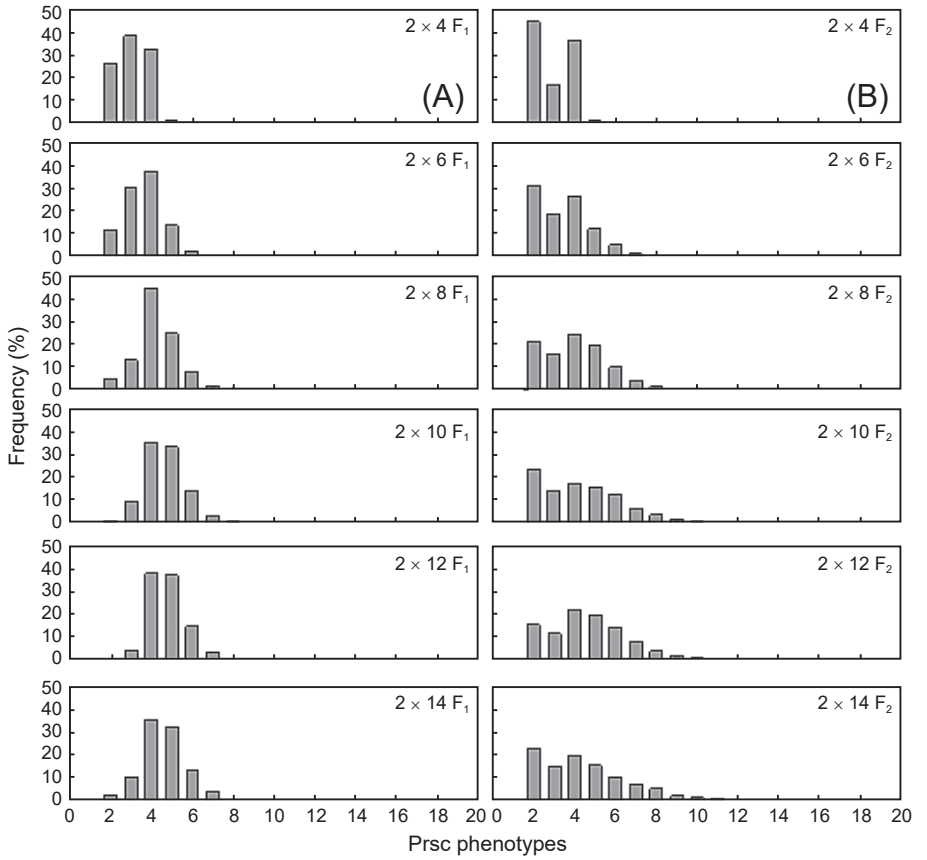


Fig. 2. The phenotype frequency distributions (PFDs) of F_1 (A) and F_2 (B) generations of the 2P serial crosses, and the 2PHT frequency surged in F_2 progeny.

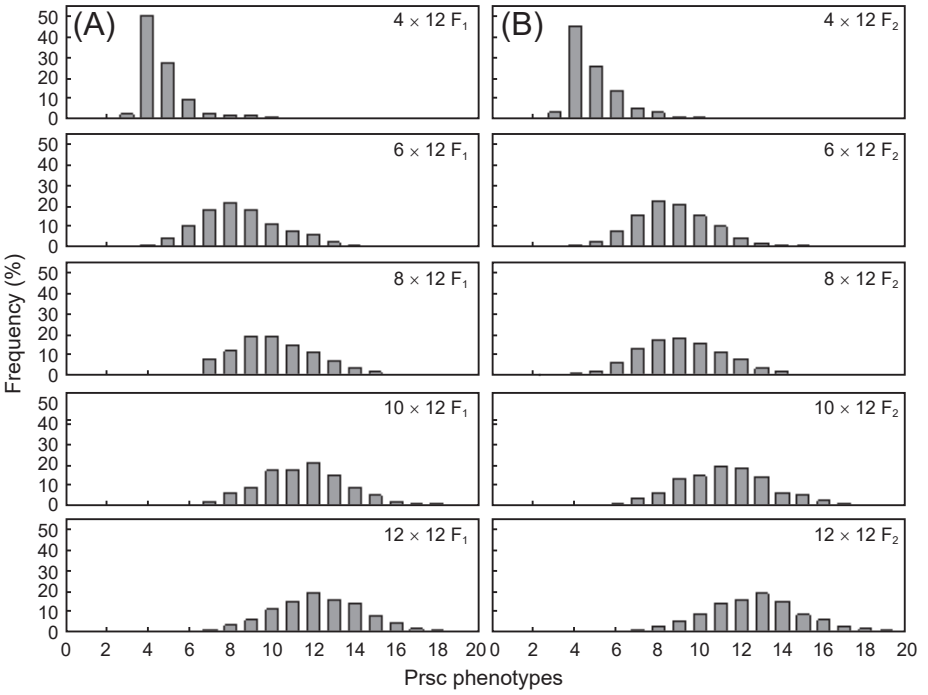


Fig. 3. The phenotype frequency distributions (PFDs) of F_1 (A) and F_2 (B) generations of the MB serial crosses.

2P strain is the genetic source of the surge. In quantitative genetics, the cross of two different strains resulted in an intermediate trait in following generations, and the MB serial crosses follow this principle accordingly while the 2P serial crosses were not. The reappearing frequency of 2PHT in progeny of both 2P and MB serial crosses were compared in Tables 1 and 2, and the results indicated that the MB strain did not produce 2PHT in its progeny and can serve as the blank control in the cross test, hence by grouping the three 2P × MB crosses, i.e., 2 × 10, 2 × 12 and 2 × 14 (total 13 replicates). It is possible to obtain the reappearing frequency of 2PHT in F_2 progeny at 22.5% ± 4.0% with almost no 2PHT appeared at the frequency of 1.7% ± 1.6% in the F_1 generation.

The 2PHT trait of 2P strain has blended with the prsc trait of MB strain in the F_1 progeny but then surged in the F_2 progeny, suggesting that the prsc quantitative genetics has been modified by other genetic mechanism or that

Table 1. The 2-prescutellar bristle phenotype frequencies (%) of F_1 and F_2 progeny in 2P-serial crosses, with the parental strains indicated.

	2PHT frequency (%)	
Phenotype (parental strains)	F_1	F_2
2PHT (2P) × 4PHT (4P)	26.8	45.1
2PHT (2P) × 6PHT (4P)	12.5	31.9
2PHT (2P) × 8PHT (4P)	4.9	21.8
2PHT (2P) × 10PHT (MB)	0.9	24.2
2PHT (2P) × 12PHT (MB)	0.5	15.6
2PHT (2P) × 14PHT (MB)	1.3	22.8

Table 2. The 2-prescutellar bristle phenotype frequencies (%) of F_1 and F_2 progenies in MB-serial crosses, with the parental strains indicated.

	2PHT frequency (%)	
Phenotype (parental strains)	F_1	F_2
12PHT (MB) × 4PHT (4P)	0.2	0.1
12PHT (MB) × 6PHT (4P)	0.0	0.0
12PHT (MB) × 8PHT (4P)	0.0	0.0
12PHT (MB) × 10PHT (MB)	0.0	0.0
12PHT (MB) × 12PHT (MB)	0.0	0.0

the genetic interaction was involved, and the responsible factors are only being carried in the 2P strain but not in the MB strain. The 2P strain only harbors a portion of the polygenic prsc traits and why this portion can be activated and overrides the expression of other phenotypes remains unknown. The expression of 2PHT surge only in the F_2, not in the F_1 progeny, coincides with the Mendelian segregation expression of a recessive gene, and can serve as a study lead in future. The 2PHT/F_2 frequency of 2P × MB cross is measured at 22.5% ± 4.0% in contrast to the theoretical 25% recessive homozygotes expression, and is worth to be noticed. The 2PHT is only a portion of prsc polygenic traits, and the mono-phenotype surge in a continuous trait suggests that other factor is involved.

In related subjects, the extra amount of 2PHT produced by the surge mechanism can actually be a contributing factor in population genetics for the dominance of 2PHT in field population. Besides, there is an interesting example in a closely related species, i.e., the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), which has fixed 2prsc morphology. It then raises the question as to why the 2PHT surge is just an intermediate step in the prsc evolution in Tephritidae.

CONCLUSIONS

The study has concluded: (1) The prescutellar bristles of melon fly is quantitative genetic controlled, but the phenotype expression in field population is deviated from the continuous trait, particular the dominance of 2PHT at 95%. It implies that other mechanism involvement is possible; (2) The genetic source of 2-phenotype surge is 2P strain; (3) The 2PHT surge expressed only in F_2 progeny with 22.5% ± 4.0% frequency; (4) The F_1 progeny of 2P strain cross is not affected by the 2PHT surge; and (5) The 2PHT surge may be a contributing factor for 2PHT to be the major wild type in the polymorphic population of melon fly.

REFERENCES

Alonso, M. C. and C. V. Cabrera. 1988. The achaete-scute gene complex of *Drosophila melanogaster* comprises four homologous genes. EMBO J. 7:2585–2591.

Cheng, Y., C. H. Wang, Y. B. Huang, and M. Y. Chiang. 2014. The quantitative genetics of prescutellar bristles in melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). J. Taiwan Agric. Res. 63:179–187.

Drew, R. A. I. and D. L. Hancock. 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. Bull. Entomol. Res. 2:1–68.

Emerson, R. A. and E. M. East. 1913. The inheritance of quantitative characters in maize. Nebr. Agric. Exp. Stn. Res. Bull. 2:1–120.

Garcia-Garcia, M. J., P. Ramain, P. Simpson, and J. Modolell. 1999. Different contributions of pannier and wingless to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. Development 126:3523–3532.

Ghysen, A. and C. Dambly-Chaudière. 1988. From DNA to form: The *achaete-scute* complex. Genes Dev. 2:495–501.

Griffiths, A. J. F., S. R. Wessler, R. C. Lewontinn, and S. B. Carroll. 2008. Introduction to Genetic Analysis. 9th ed. W. H. Freeman and Company. New York. 838 pp.

Mackay, T. F. C. 1995. The genetic basis of quantitative variation: Numbers of sensory bristles of *Drosophila melanogaster* as a model system. Trends Genet. 11:464–470.

Pistillo, D., N. Skaer, and P. Simpson. 2002. *scute* expression in *Calliphora vicina* reveals an ancestral pattern of longitudinal stripes on the thorax of higher Diptera. Development 129:563–572.

Russell, P. J. 2005. iGenetics: A Mendelian Approach. Benjamin Cummings. San Francisco, CA. 842 pp.

Simpson, P., R. Woehl, and K. Usui. 1999. The development and evolution of bristle patterns in Diptera. Development 126:1349–1364.

Simpson, P. and S. Marcellini. 2006. The origin and evolution of stereotyped patterns of macrochaetes on the nota of cyclorraphous Diptera. Heredity 97:148–156.

Skaer, N., D. Pistillo, and P. Simpson. 2002. Transcriptional heterochrony of *scute* and changes in bristle pattern between two closely related species of blowfly. Dev. Biol. 252:31–45.

White, I. M. 2001. Morphological features of the tribe Dacini (Dacinae): Their significance to behavior and classification. p.505–533. *in*: Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior. (Aluja M. and A. L. Norrbom, eds.) CRC Press. Boca Raton, FL. 984 pp.

White, I. M. and M. M. Elson-Harris. 1992. Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics. CAB International. Wallinford, UK. 601 pp.

Wulbeck, C. and P. Simpson. 2000. Expression of *achaete-scute* homologues in discrete proneural clusters on the developing notum of the medfly *Ceratitis capitata*, suggests a common origin for the stereotyped bristle patterns of higher Diptera. Development 127:1411–1420.

瓜實蠅 [*Bactrocera* (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (Coquillett)] 中胸背板剛毛數量性狀之遺傳交互作用

鄭允[1] 王志賢[2] 黃毓斌[3,*] 江明耀[3] 呂秀英[4] 吳東鴻[5] 楊崇民[2] 粘君琪[2]

摘要

鄭允、王志賢、黃毓斌、江明耀、呂秀英、吳東鴻、楊崇民、粘君琪。2018。瓜實蠅 [*Bactrocera* (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (Coquillett)] 中胸背板剛毛數量性狀之遺傳交互作用。台灣農業研究 67(1):9–15。

前期研究中已針對瓜實蠅 *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) 中胸背板之 prescutellar bristles (prsc) 數目屬數量遺傳 (quantitative genetics) 機制控制，惟在研究中發現野生型 (wild type) 之 2PHT (2prsc phenotype; 2P-strain) 與多剛毛品系 (multiple prsc phenotypes; MB-strain) 雜交時，F_1 子代遵循數量遺傳法則，但 F_2 之頻度分布 (phenotype frequency distribution) 中，2PHT 卻有異常增加之現象，可能有「非屬數量遺傳」之其他機制介入，因此本研究一方面確認前述觀察之確實性，另一方面則藉此探討其原因。本研究係以 2P 品系及 MB 品系分別與 MB 品系之各表現型 (phenotypes) 進行兩系列之雜交試驗，並比對 F_1 與 F_2 之表現型頻度分布，以分析其異同。結果發現凡以 2P 品系進行之雜交試驗，F_1 均依照數量遺傳法則表現，但 F_2 均出現 2PHT 表現型增多之情形，平均幅度為 22.5% ± 4%，因此 2PHT 之增加極有可能來自於專限於 2PHT 之其他因子表現。以 MB 品系之 12PHT 與其他表現型之雜交，無論 F_1 或 F_2 則依數量遺傳法則表現，並無任何一種 prsc 表現型突然增加頻度之現象。研究結果顯示瓜實蠅之中胸背板剛毛數確實依「數量遺傳」之機制控制。但田間族群之表現卻以 2PHT 占 95% 之野生型，並未依數量遺傳之連續型 (continuous traits) 表現，因此，其他遺傳因素之介入，至為明顯。而本研究發現之「2PHT 突增」(2PHT surge) 現象可能為介入遺傳因素之一，而此現象也的確有提升 2PHT 野生型表現頻率之效益。

關鍵詞：數量遺傳、小盾板前剛毛、瓜實蠅、隱性基因。

投稿日期：2016 年 9 月 21 日；接受日期：2017 年 5 月 31 日。
* 通訊作者：ybhuang@tari.gov.tw
[1] 農業委員會農業試驗所應用動物組前研究員。台灣 台中市。
[2] 農業委員會農業試驗所應用動物組技工及技術員。台灣 台中市。
[3] 農業委員會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農業委員會苗栗區改良場場長。台灣 苗栗縣。
[5] 農業委員會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(1):16–27 (2018)
DOI: 10.6156/JTAR.201803_67(1).0003

研究報告

Pseudomonas mediterranea 引起之番茄髓壞疽病

蔡佳欣[1] 安寶貞[2] 呂昀陞[1] 黃淑苓[3] 洪挺軒[4,*]

摘要

蔡佳欣、安寶貞、呂昀陞、黃淑苓、洪挺軒。2018。*Pseudomonas mediterranea* 引起之番茄髓壞疽病。台灣農業研究 67(1):16–27。

2011 年於彰化縣地區一處番茄栽植田，發現部分番茄植株出現整株褪色及衰弱現象，具此徵狀植株莖部表面出現暗褐色的長條狀病斑，切開莖部發現維管束褐化及髓部組織壞疽。從罹病莖部組織可於營養培養基分離出 1 種淡黃色的細菌菌落，該細菌經科霍氏法則測試，證實為一病原細菌。將該病原細菌再以 Biolog 系統測試、生理生化特性分析、internal transcribed spacer (ITS) 序列比對、以及專一性引子對測試，鑑定為 *Pseudomonas mediterranea*，此為 *P. mediterranea* 在台灣引起番茄髓壞疽病的首次報導。在室內經以濾紙圓盤擴散法測試市售 10 種藥劑在不同濃度下對該病原細菌的抑制生長效果，結果顯示以鏈黴素稀釋 500× 及多保鏈黴素稀釋 500× 對病原細菌之抑制生長效果最佳。

關鍵詞：番茄、髓壞疽病、*Pseudomonas mediterranea*、藥劑篩選。

前言

番茄屬於茄科 (Solanaceae) 茄屬 (Solanum) 植物，品種眾多，果實可供鮮食、熟食及加工用，為世界性的重要蔬菜之一。依農業統計年報 (Council of Agriculture 2017)，2016 年番茄在台灣的栽種面積達 5,006 ha，每公頃收穫量約為 23,804 kg，產量 118,958 m.t.，主要產區分布於中南部，尤以嘉義縣種植面積 1,085 ha 最大，高雄市 968 ha 次之。2011 年於彰化縣一處番茄栽植田，發現該田區部分的番茄植株出現葉片褪色及衰弱現象，具此徵狀植株生長較正常株緩慢、莖表面出現長條暗褐色病斑，切開莖部可發現維管束組織褐化，並且其髓部組織出現壞疽 (圖 1)。這些推測為罹病之植株可維持數月不死亡，徵狀進程緩慢。經切取可能為罹病之番茄植株莖部壞疽組織以光學顯微鏡觀察，發現大量細菌從組織切口處湧出，因此推測可能為細菌性病害。由於在這些番茄莖部之髓部組織出現嚴重壞疽之典型病徵，所以進一步推測該病可能由髓壞疽病原細菌所造成。經查國外文獻資料可知，Pseudomonas 屬內有多種細菌可引起番茄髓壞疽病徵，如 *Pseudomonas viridiflava* (Aysan *et al*. 2004)、*Pseudomonas cichorii* (Testen *et al*. 2015)、*Pseudomonas mediterranea* (Moura *et al*. 2005)、*Pseudomonas marginalis* (Bella & Catara 2010)、*Pseudomonas corrugata* (Moura *et al*. 2005; Molan & Ibrahim 2007) 以及 *Pseudomonas fluorescens* (Saygili *et al*. 2004) 等。

為確認本次所發生的番茄罹病株之病原菌，從莖部壞疽組織分離病原細菌，在營養培養基 (nutrient agar) 分離出 1 種淡黃色的細菌，將該細菌以注射法打入菸草葉片時，可誘導菸草產生過敏性反應，顯示該菌可能為植物病原細菌 (Lelliott & Stead 1987)。由於該菌

投稿日期：2016 年 10 月 20 日；接受日期：2017 年 8 月 30 日。
* 通訊作者：thhung@ntu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組前研究員兼組長。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
[4] 國立台灣大學植物病理與微生物學系教授。台灣 台北市。

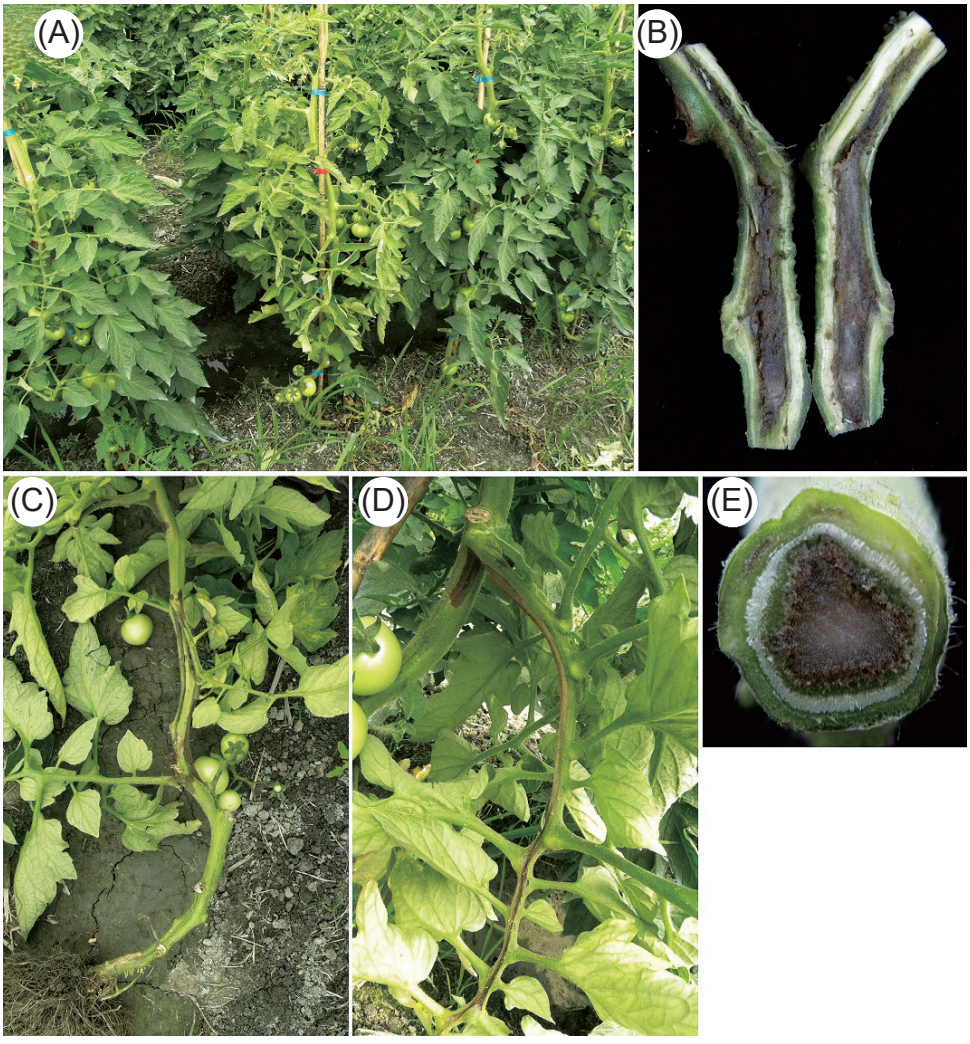


圖 1. 田間番茄髓壞疽病之病徵。罹病植株出現褪色及衰弱病徵 (A)；莖部維管束褐化及髓部組織出現褐色壞疽 (B)、(E)；莖部及側枝條表面出現長條暗褐色病斑蔓延 (C)、(D)。

Fig. 1. Symptoms of pith necrosis of tomato in the field. Diseased plant chlorosis and decline (A); section of stem displayed vascular browning and pith necrosis symptoms (B), (E); and longitudinal dark brown lesions on stem and side-shoot (C), (D).

在 King's B 培養基不具有螢光，且菌落型態與台灣已發表可感染番茄莖部維管束的髓壞疽病菌 *P. viridiflava* (Tsai *et al*. 2016)、莖腐病菌 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Hseu *et al*. 2003) 及青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* (Hsu *et al*. 2002) 不同，顯示本次病害可能為其他種類的病原細菌引起。因此，本研究擬對此病之病因、病原菌特性及室內藥劑篩選進行探討，以供栽培及防治參考。

材料與方法

菌株來源

從彰化縣番茄發病田區採集生長不良及莖髓部具褐化壞疽病徵之病株 (圖 1)，切取罹病莖部組織以 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 漂洗 30 s 進行表面消毒，再經 3 次無菌水漂洗後，將病健部組織切碎，放入裝有無菌水之離心管中震盪以釋出細菌。再用移植環沾取細菌懸浮液，以

劃線方式塗在營養培養基 (nutrient agar) (Difco Laboratories; Becton, Dickinson and Company, France) 平板上，之後將該培養基放在 28℃定溫箱培養 2–3 d。待細菌長出後，挑取細菌單一菌落以劃線方式塗至新的營養培養基平板，重複 3 次以純化細菌，以供後續試驗使用。

病原性試驗

接種試驗以分離自彰化縣之細菌菌株 ToPN01、ToPN02 及 ToPN03 共 3 分離株作為供試菌株，供試番茄植物為「紅番」番茄栽培品種。供試植株種植於盆缽，至植株高約 60 cm，進行接種試驗。細菌接種原製備方法為，先將 3 供試菌株劃線培養在營養培養基，置於 28℃定溫箱培養 1 d 後，將長出的細菌以無菌水懸浮，製備成細菌懸浮液，並以分光光譜儀 (spectrophotometer, Bausch & Lomb, USA) 測量細菌懸浮液濃度，並將其調整至吸收值 (A600) 為 0.3 (約 10^8 cfu mL^{-1}) 作為接種源。接種方法為滴 1 滴調配好濃度的細菌懸浮液在番茄莖部，再用滅菌的牙籤在該處刺 1 個小傷口供細菌感染，每株接種 2 處，每一供試菌株接種 3 棵番茄植株，以接種無菌水之處理作為對照組。接種後，將植株套上透明塑膠袋保濕 48 h，之後去除塑膠袋，放在 28℃之植物生長箱觀察植株病徵發展情形。待植株發病之後，切取罹病的莖部組織分離細菌，確認是否與原來的細菌相同。

Biolog identification system 鑑定細菌

供試菌株 ToPN01、ToPN02 及 ToPN03 以 Biolog 鑑定系統分析。首先將 3 供試菌株劃線培養在 5.7% BUG™ agar (Biolog Universal Growth Agar, Biolog Inc., CA, USA) 平板，之後放置在 30℃定溫箱培養 16–24 h，再以棉棒沾取細菌菌落，將細菌接種至 IF-A 接種液 (Biolog Inc., CA, USA)，並震盪混合均勻。以波長 590 nm 之濁度計 (Turbidity, Biolog Inc., USA) 調整接種液之細菌濃度至 90–98% T (turbidity)，濃度調整完成後，吸取細菌接種液加入 96 孔之 Biolog GEN Ⅲ反應盤 (Biolog Inc., CA, USA) 中，每個孔接種 100 μL。將接種菌液後的反應盤培養 25–35 h，以光譜儀測讀，所得讀值以 Biolog MicroLog™ 3 ver. 5.2.2 系統及 Biolog GEN Ⅲ資料庫 (2.6.1 版) 比對分析，以鑑定供試細菌種類。

生理生化特性測定

參考 Schaad *et al*. (2001) 及 Catara *et al*. (2002) 所述方法，將上述 3 供試菌株進行下列生理生化特性分析，試驗重複 2 次。試驗項目包括革蘭氏反應 (Gram reaction)、對葡萄糖利用方式 (氧化/發酵試驗 O/F test)、在 King's B 培養基上產生螢光色素的測定、果聚醣 (levan) 的生成、氧化酵素 (oxidase test) 測定、馬鈴薯軟腐測試 (potato soft rot)、精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase) 測定、菸草過敏性反應 (tobacoo hypersensitivity reaction) 測試、明膠 (gelatin) 液化能力測定、37℃下之生長能力、對 mannitol、benzoate、cellobiose、sorbitol、trehalose、sucrose、D-arabinose、L-rhamnose、histamine、meso-tartrat、2-ketogluconate 的利用能力，以鑑定供試菌株分類地位。

ITS 分子鑑定

選取彰化縣分離之 ToPN01、ToPN02，並從德國菌種中心引進對照菌株 *P. mediterranea* (DSM 16733) 及 *P. corrugata* (DSM7228) 純培養後，參考 Wang *et al*. (1993) 之簡易核酸萃取方法並略為修改後，進行核酸萃取。先將供試菌株劃線培養在營養培養基，待細菌長出後，以滅菌牙籤沾取單一的細菌菌落，並將細菌懸浮在 20 μL 之無菌水中，再加入 0.4 N NaOH 20 μL 將其震盪混合均勻。靜置 10 min 後，再加入 1 M Tris-HCl 40 μL 混合均勻，混合液再以無菌水稀釋 10× 作為聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 模板。PCR 以細菌 16S–23S 核糖體核酸基因間之內轉錄區 (internal transcribed spacer; ITS) 之引子對 D21/D22 進行增幅 (Manceau & Horvais 1997)，PCR 反應在 20 μL 的混合物進行，各反應物的濃度為 1× PCR buffer、1.5 mM 的 $MgCl_2$、0.25 mM 的 dNTP，引子各 2.5 pmol，Taq DNA polymersase 0.8 units，並加入 2 μL 模板。在熱循環反應器 (GeneAmp PCR System 2400) 內進行，PCR 溫度循環條件：先以

94℃進行 2 min 後；再以 94℃進行 1 min，60℃進行 1 min，72℃進行 1 min 共 36 cycles；最後 72℃進行 2 min。增幅後之 DNA 產物以 1.4% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析，確定是否產生預期之 DNA 片段。所得之 PCR 產物以 TOPfast PCR cloning kit (GeneMark, Taichung, Taiwan) 進行 DNA 片段選殖，選殖後將帶有 DNA 選殖片段的細菌菌株進行增殖及抽取質體，所抽取之質體再以 PCR 及電泳分析確認其帶有預期 DNA 片段後，委由明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 進行 DNA 定序，所得 DNA 序列資料再以 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 基因資料庫比對。

專一性引子對鑑定

為確認本次所分離之病原細菌種類，將本次所分離之供試菌株 ToPN01、ToPN02、ToPN03 以及對照菌株 *P. mediterranea* (DSM 16733)、*P. corrugata* (DSM7228)、*P. viridiflava* (TPN02，已知為台灣另一種番茄髓壞疽病菌) (Tsai *et al*. 2016)，經純培養後，以上述簡易方法萃取核酸。參考 Catara *et al*. (2000, 2002) 所述，分別以 *P. mediterranea* 專一性引子 (PC1/1 與 PC1/2) 以及 *P. corrugata* 專一性引子 (PC5/1 與 PC5/2) 對上述之供試菌株及對照菌株進行 PCR。PCR 條件略微修改如下：各反應物的混合液共 20 μL，濃度如下：1× PCR buffer、1.5 mM 的 $MgCl_2$、0.25 mM 的 dNTP，引子各 1.25 pmol，Taq DNA polymersase 0.4 units 以及 2 μL 模板。溫度循環條件如下：先以 94℃進行 5 min 後；再以 94℃進行 1 min，62℃進行 1 min，72℃進行 30 s 共 30 cycles；最後 72℃進行 5 min。增幅後之 DNA 產物以 1.4% agarose 進行電泳分析，確定是否產生預期之 DNA 片段。

藥劑感受性測定

選取 ToPN01 及 ToPN02 分離株，進行藥劑感受性試驗。測試方法以濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method) (Adaskaveg & Hine 1985) 測試供試菌株對各種市售藥劑在不同濃度之感受性。試驗藥劑種類選取植物保護手冊上對細菌有防治效果的藥劑共 10 種進行測試，藥劑測試濃度範圍以商品包裝所列之使用濃度為基準，並進一步上下增減 2 倍濃度進行測試比較。測試的藥劑種類，包括有抗生素類之鏈四環黴素 (streptomycin + tetracycline，10.0% SP，商品名為枯萎寧，全台公司)、鏈黴素 (streptomycin，12.5% SL，商品名為實多黴素，大勝化工)、嘉賜黴素 (kaugamycin，2.0% WP，商品名為菌友，世大化工)；含銅類藥劑之氫氧化銅 (copper hydroxide，53.8% WG，商品名為克菌多，台灣杜邦公司)；鹼性氯氧化銅 (copper oxychloride，85.0% WP，商品名為銅寶發，青山公司)、三元硫酸銅 (tribasic copper sulfate，27.12% SC，商品名為銅高尚，日產化工公司)；含鋅錳類藥劑之鋅錳乃浦 (mancozeb，80.0% WP，商品名為台生粉，世大化工)；混合類藥劑之多保鏈黴素 (thiophanate methyl + streptomycin，68.8% WP，商品名為安達菌，瑞總公司)；嘉賜銅 (kasugamycin + copper oxychloride，81.3% WP，商品名為高速攻露，世大化工) 及其他類藥劑之歐索林酸 (oxolinic acid，20.0% WP，商品名為金星，台灣住友公司)。

藥劑測試方法如下：先將細菌製備成懸浮液，濃度調整至 10^8 cfu mL^{-1}，吸取 0.1 mL 細菌懸浮液加入 6 mL 之 0.8% 水瓊脂 (water agar) 中混合均勻，再將水瓊脂覆蓋在營養培養基平板上；將上述各藥劑稀釋成不同濃度後，分別吸取 0.12 mL 滴入直徑 13 mm 的濾紙圓盤 (Whatman International Ltd., UK) 中，再將含有藥劑的濾紙圓盤放置在已覆上含細菌水瓊脂之營養培養基平板上，並以滴入無菌水之濾紙圓盤作為對照組，每處理 3 重複。之後將培養基平板，放置在 28℃下定溫箱培養 48 h 後，測量各藥劑在不同濃度下產生的抑制圈大小，以測定藥效。

結果與討論

病原性試驗

將 3 株供試菌株 ToPN01、ToPN02 及 ToPN03，以穿刺法接種細菌懸浮液於供試紅番番茄植株

莖部 14 d 後，接種植株雖未見萎凋病徵，但可見接種處附近之側枝條表面出現褐色長條斑。將該植株側枝條及主莖縱切觀察，發現細菌從接種處沿維管束蔓延，植株側枝條之維管束褐化 (圖 2A)，並且在莖部之髓部組織出現褐色壞疽病徵 (圖 2B、2C)，與田間所見病徵相同。持續觀察所接種番茄植株生長緩慢，2–3 mo 後陸續開始出現黃化及衰弱現象，病程進展緩慢，接種無菌水之對照植株則無病徵出現。從接種植株發病蔓延之壞疽病組織處可再分離出細菌，該細菌經核酸分析與原接種細菌相同，完成科霍氏法則，證實所分離之細菌為該病害之病原菌。

Biolog identification system 鑑定

以 Biolog 鑑定系統鑑定上述 3 株供試菌株，供試菌株培養在 Biolog GEN Ⅲ 反應盤以測定其對碳素源利用情形及生理特性，培養後的反應盤以光譜儀測讀後之讀值經 Biolog MicroLog™ 3 ver. 5.2.2 系統分析及資料庫比對，比對結果顯示供試菌株 ToPN01、ToPN02 及 ToPN03 屬於 *Pseudomonas corrugata*，相似值分別為 0.674、0.697 及 0.674，大於系統設定臨界值 0.5。

Pseudomonas corrugata 最早由 Scarlett *et al*. (1978) 所描述，為番茄髓壞疽病之病原菌，該菌已在全球各地被發現，並可依據生理生化

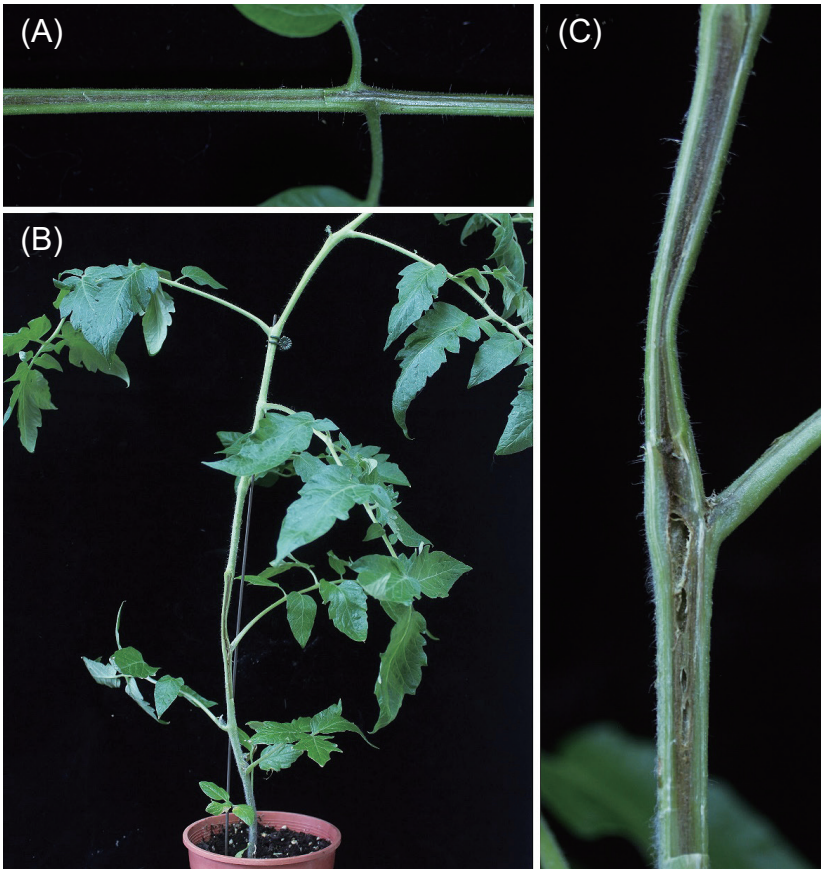


圖 2. 紅番番茄人工接種分離到的細菌後呈現的病徵。番茄接種 14 d 後，側枝條表面出現褐色長條斑及維管束組織出現褐化的病徵 (A)；莖部縱切後出現髓壞疽病徵 (B)；髓壞疽病徵放大圖 (C)。

Fig. 2. Symptoms of the tomato plants (cv. 'Hong Fan') after inoculation with the isolated bacteria. Tomato side shoot showing longitudinal brown external lesion and vascular browning in 14 days after inoculation (A); pith necrosis symptom observed in the stem after inoculation (B); and close-up of the pith necrosis symptom (C).

的差異性將 *P. corrugata* 分為 2 群 (Sutra *et al*. 1997)，其中 1 群在 2002 年被獨立為新種，命名為 *P. mediterranea* (Catara *et al*. 2002)。然而經查 Biolog GEN Ⅲ資料庫 (2.6.1 版) 內尚未建立 *P. mediterranea* 的資料，因此供試菌株被鑑定為 *P. corrugata*。顯示供試菌株與 *P. corrugata* 相似，但仍需再進行其他的生理生化試驗及核酸分析，進一步確定供試菌株的分類地位。

生理生化測定

將供試菌株 ToPN01、ToPN02、及 ToPN03，進行生理生化特性試驗，試驗重複 2 次，結果相同，3 供試菌株均為革蘭氏陰性 (Gram negative)；以氧化方式利用葡萄糖，在營養培養基培養時菌落為淡黃色；在 King's B 培養基培養時不產生螢光色素；培養在結晶紫果膠 (crystal violet pectate; CVP) 平板上時不形成凹陷；可產生果聚醣 (levan)；具氧化酶 (oxidase)；具精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase)；接種在馬鈴薯組織塊不產生軟腐；注射接種菸草葉片可誘導產生過敏性反應 (tobacoo hypersensitivity)；可液化明膠 (gelatin)；可在 37℃下生長。可利用 mannitol、trehalose、sucrose、meso-tartrate、D-arabinose、histamine 及 2-ketogluconate，不能利用 benzoate、cellobiose、sorbitol 及 L-rhamnose，如表 1 所示。

P. mediterranea 本屬於 *P. corrugata* 之一群，之後獨立為新種 (Catara *et al*. 2002)，兩者在生理生化特性十分接近，主要的差異為：*P. mediterranea* 可以利用 meso-tartrate、histamine 及

表 1. 番茄髓壞疽病菌之生理生化分析。

Table 1. Physiological and biochemical analysis on tomato pith necrosis pathogen.

Character	ToPN01-03 strain	*Pseudomonas mediterranea*[z]
Gram reaction	G (–)[y]	G (–)
O/F test	O	O
Fluorescent pigment on KB	–	–
Levan	+	–
Oxidase	+	+
Pectolytic activity	–	–
Arginine dihydrolase	+	+
Tobacco hypersensitivity reaction	+	V
Gelatin hydrolysis	+	+
Growth at 37℃	+	+
Utilization of:		
2-ketogluconate	+	+
Mannitol	+	+
Benzoate	–	–
Cellobiose	–	–
Sorbitol	–	–
Trehalose	+	+
Sucrose	+	+
Meso-tartrate	+	+
D-arabinose	+	+
L-rhamnose	–	–
Histamine	+	+

[z] Data are from: Schaad *et al*. (2001); Catara *et al*. (2002).
[y] G (–): gram negative; O: oxidative; F: fermentation; +: postive; –: negative; V: between 21–79% of strains positive.

2-ketogluconate，*P. corrugata* 則無法利用。本次所分離之病原細菌經測定對 meso-tartrate、histamine 及 2-ketogluconate 均可以利用，因此供試菌株生理生化特性與 *P. mediterranea* 較為接近。此外供試菌株之其他生理生化特性大多數與 Catara *et al*. (2002) 所述之 *P. mediterranea* 資料相同，但在具有合成果聚醣 (levan) 能力則有所不同，顯示我國菌株與外國菌株在生理生化特性上有些許差異。此種合成果聚醣差異現象，在其他同屬於 Pseudomonas 屬之植物病原細菌亦可被觀察到，如 *P. viridiflava* 及 *P. savastanoi* (González *et al*. 2003; Marchi *et al*. 2005)。

ITS 序列分析

為確定所分離之菌株為 *P. mediterranea* 或是 *P. corrugata*，供試菌株 ToPN01、ToPN02 以及對照菌株 *P. mediterranea* (DSM16733)、*P. corrugata* (DSM7228) 之核酸，以細菌 internal transcribed spacer (ITS) 引子對 D21/D22 進行 PCR 增幅結果，均可增幅出一約 550 bp 之 DNA 片段。此 DNA 片段經選殖及定序後，供試菌株核酸序列 ToPN01 與 ToPN02 彼此序列相同度為 100% (以 ToPN01 為代表上傳 GenBank，NCBI accession number KX832047)，該序列經 NCBI 基因資料庫分析比對結果，供試菌株 ToPN01 與 *P. corrugata* strain (NCBI accession number D87087.1) 序列相同度達 97%，顯示所分離之菌株與 *P. corrugata* 高度相似。而供試菌株 ToPN01 序列與對照菌株比對結果，與 *P. corrugata* (DSM7228) 序列相同度亦為 97%，然而與 *P. mediterranea* (DSM16733) 序列相同度達 100%。因此，由 ITS 序列分析可知，所分離的菌株與 *P. mediterranea* 較為接近。

專一性引子鑑定

為進一步確認所分離之菌株為 *P. mediterranea* 或是 *P. corrugata*，以 *P. mediterranea* 之專一性引子對 PC1/1 與 PC1/2，以及 *P. corrugata* 專一性引子 PC5/1 與 PC5/2 進行 PCR 增幅。PCR 產物經電泳分析結果，*P. mediterranea* 專一性引子 PC5/1 與 PC5/2 可對 3 供試菌株 ToPN01、ToPN02 及 ToPN03 及對照菌株 *P. mediterranea* (DSM 16733) 增幅出約 600 bp DNA 片段，而對照菌株 *P. corrugata* (DSM 7228) 及 *P. viridiflava* (TPN02) 無增幅出預期之 PCR 產物 (圖 3A)。以 *P. corrugata* 專一性引子 PC5/1 與 PC5/2，則僅有對照菌株 *P. corrugata* (DSM 7228) 增幅出約 1,100 bp DNA 片段，3 供試菌株 ToPN01-03 及 *P. mediterranea* (DSM 16733) 及 *P. viridiflava* 並無增幅出 PCR 產物 (圖 3B)。顯示田間所分離之菌株為 *P. mediterranea*，而非 *P. corrugata*，亦非台灣已存在之 *P. viridiflava*。

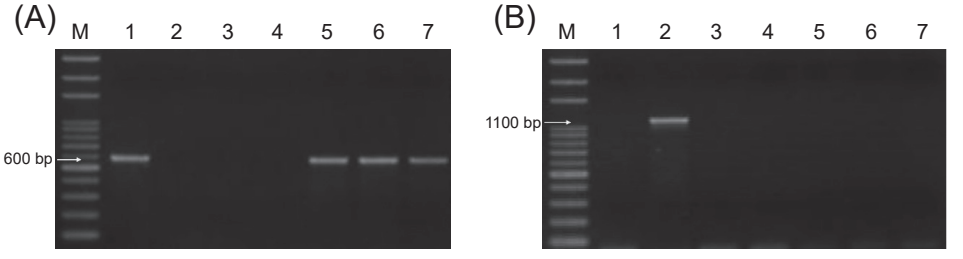


圖 3. 以 PCR 技術鑑定番茄髓壞疽病菌。*Pseudomonas mediterranea* 專一性引子對 PC1/1 與 PC1/2 之 PCR 增幅結果 (A)；*Pseudomonas corrugata* 專一性引子對 PC5/1 與 PC5/2 之 PCR 增幅結果 (B)。行 M：100 bp marker； 行 1：*Pseudomonas mediterranea* (DSM16733)； 行 2：*Pseudomonas corrugata* (DSM7228)； 行 3：*Pseudomonas viridiflava* (TPN02)；行 4：為未含有 DNA 模板之負對照；行 5–7：番茄髓壞疽病菌 (ToPN01–03)。

Fig. 3. Identification of tomato pith necrosis pathogen by polymerase chain reaction (PCR). PCR amplification with *Pseudomonas mediterranea* specific primer pair PC1/1and PC1/2 (A); PCR amplification with *Pseudomonas corrugata* specific primer pair PC5/1 與 PC5/2 (B). Lane M: 100 bp DNA marker; lane 1: DNA from *Pseudomonas mediterranea* (DSM16733); lane 2: DNA from *Pseudomonas corrugata* (DSM7228); lane 3: *Pseudomonas viridiflava* (TPN02); lane 4: no template control; and lanes 5–7: DNA from tomato pith necrosis pathogen (ToPN01–03).

藥劑感受性測定

以濾紙圓盤擴散法，在培養基上測定10種市售藥劑在3種不同濃度下對供試菌株ToPN01及ToPN02的抑制效果。2 d後量取各藥劑在培養基所產生的抑制圈直徑 (扣除濾紙圓盤直徑 13 mm)，試驗重複2次，結果類似，以其中1次結果為代表，將結果列於表2。試驗結果顯示，有4種藥劑可對2供試菌株出現抑制圈，分別為鏈黴素、鏈四環黴素、多

表 2. 供試藥劑在不同濃度對番茄髓壞疽菌株 ToPN01 及 ToPN02 之生長抑制效果。

Table 2. Growth inhibition of *Pseudomonas mediterranea* ToPN01 and ToPN02 by various agrochemicals in different concentrations.

Chemical	Dilution fold	Inhibition zone (mm in diam.)	
		ToPN01	ToPN02
Streptomycin (12.5% SL)	500	3.30 ± 0.06 a[z]	3.47 ± 0.03 a
	1,000	1.83 ± 0.03 d	1.97 ± 0.07 d
	2,000	0 f	0 g
Streptomycin + Tetracycline (10% SP)	500	2.67 ± 0.09 b	2.77 ± 0.03 b
	1,000	0.23 ± 0.12 e	0.43 ± 0.19 e
	2,000	0 f	0 g
Thiophanate methyl + Streptomycin (68.8% WP)	500	3.20 ± 0.12 a	3.40 ± 0.06 a
	1,000	2.00 ± 0.10 c	2.17 ± 0.19 c
	2,000	0.17 ± 0.03 e	0.23 ± 0.03 f
Kasugamycin (2.0% WP)	125	0 f	0 g
	250	0 f	0 g
	500	0 f	0 g
Kasugamycin + Copper oxychloride (81.3% WP)	500	2.10 ± 0.06 c	2.23 ± 0.03 c
	1,000	0 f	0 g
	2,000	0 f	0 g
Copper oxychloride (63.02% WP)	200	0 f	0 g
	400	0 f	0 g
	800	0 f	0 g
Copper hydroxide (61.4% WP)	750	0 f	0 g
	1,500	0 f	0 g
	3,000	0 f	0 g
Tribasic copper sulfate (27.12% SC)	250	0 f	0 g
	500	0 f	0 g
	1,000	0 f	0 g
Oxolinic (20% WP)	500	0 f	0 g
	1,000	0 f	0 g
	2,000	0 f	0 g
Mancozeb (80.0% WP)	250	0 f	0 g
	500	0 f	0 g
	1,000	0 f	0 g
LSD		0.12	0.15

[z] Mean ± standard error (n = 3). Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.

保鏈黴素，及嘉賜銅，其餘 6 種藥劑包括嘉賜黴素、鹼性氯氧化銅、氫氧化銅、三元硫酸銅、鋅錳乃浦及歐索林酸在本次測試的濃度下，對 2 供試菌株無抑制效果。抑制圈大小以鏈黴素 500× 及多保鏈黴素稀釋 500× 最大，抑制圈直徑為 3.20–3.47 mm，其次為鏈四環黴素稀釋 500×，抑制圈直徑為 2.67–2.77 mm，再其次為嘉賜銅 500× 及多保鏈黴素稀釋 1,000×，抑制圈直徑為 2.00–2.23 mm。在此 4 種可抑制菌株生長的藥劑中，其中 3 種藥劑亦可在基準濃度 (商品建議使用的稀釋倍率) 下對 2 供試菌株產生抑制圈，分別為鏈黴素稀釋 1,000×、多保鏈黴素稀釋 1,000× 及鏈四環黴素 1,000×，其中以鏈黴素稀釋 1,000× 及多保鏈黴素稀釋 1,000× 所產生的抑制圈直徑 1.83–2.17 mm 較佳，明顯大於鏈四環黴素 1,000 環所產生的抑制圈 0.23–0.43 mm。然而銅劑類在本次 3 種不同測試濃度下對供試菌株均無產生抑制圈，顯示銅劑在基準濃度上下 2 倍的濃度範圍內抑菌效果不佳。

自 *P. mediterranea* 從 *P. corrugata* 之一群獨立為新種後 (Catara *et al*. 2002)，目前尚無 *P. mediterranea* 藥劑試驗之文獻資料可供參考。但可從過去對 *P. corrugata* 的研究得知，*P. corrugata* 對銅劑具較高耐受度 (Alippi *et al*. 2003)。在本次藥劑試驗中，亦同樣發現在本次試驗的濃度中，銅劑類抑制 *P. mediterranea* 菌株生長的效果不佳，與早期的研究結果類似。由於本病為台灣新發生病害，國內亦未有相關的藥劑防治資料可供參考，因此本次進行 *P. mediterranea* 藥劑篩選，已初步篩選出 4 種藥劑可對該病菌產生抑制圈，抑制菌株生長，具有防治的應用潛力。該 4 種藥劑及濃度，在後續規劃田間防治試驗或種子消毒試驗時，可作為使用的藥劑種類及試驗濃度參考。

結論

2011 年在彰化縣番茄栽培田區發現部分番茄植株出現褪色及衰弱情形，病株莖部表面出現長條狀褐色病斑，切開莖部發現維管束褐化及髓部壞疽，其病徵與文獻所報告之番茄髓壞疽病 (Scarlett *et al*. 1978; Trantas *et al*. 2015) 相似。該病害經科霍氏法則確認為細菌所引起，並依據田間番茄病株以及經接種試驗後之植株均出現典型的髓部壞疽病徵，將此病稱為番茄髓壞疽病 (pith necrosis)。

番茄髓壞疽病已知可由多種 Pseudomonas 屬之病原細菌引起，在台灣已報導由 *P. viridiflava* 感染番茄造成髓壞疽病 (Tsai *et al*. 2016)，此菌在台灣亦被報導造成十字花科蔬菜細菌性葉枯病，地點遍及台灣北、中、南、東北各地，且在四季均有該病的發生，顯示 *P. viridiflava* 應已在台灣立足 (Hseu *et al*. 2015)。然而，本次在彰化縣所發生之番茄髓壞疽病，經鑑定所分離之病原細菌，與台灣已發生之 *P. viridiflava* 不同。該菌以 Biolog 鑑定系統測試屬於 *Pseudomonas corrugata*。然而 *P. corrugata* 早期可區分為 2 群 (Catara *et al*. 2000)，其中 1 群依照生理生化特性與核酸序列的差異而獨立成為新種 *P. mediterranea* (Catara *et al*. 2002)。經查 Biolog 鑑定系統資料庫 (2.6.1 版)，尚無 *P. mediterranea* 資料，因此進一步測試該病菌之生理生化特性、ITS 核酸序列分析及專一性引子對測試，發現該菌生理生化及核酸分析結果均與 *P. mediterranea* 較接近。因此，將本次番茄髓壞疽病原菌鑑定為 *P. mediterranea*，而不是 *P. corrugata*，亦非台灣已發生之 *P. viridiflava*。

P. mediterranea 最初主要分離自地中海國家，如義大利、法國、西班牙之具有髓壞疽病徵的番茄及甜椒 (Catara *et al*. 2002)，之後該菌陸續在土耳其 (Basim *et al*. 2005)、葡萄牙 (Moura *et al*. 2005)、巴西 (Rodrigues *et al*. 2010)、阿根廷 (Alippi & López 2010) 美國 (Xu *et al*. 2013; Searcy *et al*. 2016) 及希臘 (Trantas *et al*. 2015) 等國家被報導危害番茄造成髓壞疽病。然而該菌在台灣尚未有危害番茄的報導，此為 *P. mediterranea* 造成番茄髓壞疽病，在台灣的首次報導。

P. mediterranea 早期屬於 *P. corrugata*，從國外早期的研究中，由 *P. corrugata* 引起的番茄髓壞疽病，該病害通常感染率為 5–10%，但有案例感染率可超過 50% (Trantas *et al*. 2015)。近年亦有報導在美國喬治亞州 (Georgia) 兩處番茄生產區受 *P. mediterranea* 感染的番茄植株，兩處的感染率分別 10% 及 15% (Searcy *et*

al. 2016)。有國外研究，分別將 *P. corrugata* 及 *P. mediterranea* 接種番茄植株後，兩種病菌對果實造成的影響類似，所結之番茄果實品質下降，並分別造成 19% 及 20% 的產量損失 (Moura *et al*. 2005)。因此，若該病菌發生蔓延時，可能造成番茄顯著損失。台灣位於熱帶與亞熱帶區域，夏季氣候炎熱，冬季溫度不會過低。以 2016 年台灣中部台中為例，冬季最低溫之 2 月份平均溫度為 16.4℃，夏季最高溫之 7 月份平均溫度為 29.4℃ (Central Weather Bureau 2016)。早期研究指出，*P. corrugata* 可殘存在 15℃的土壤 (Ryder & Bird 1993)，但尚無 *P. mediterranea* 的殘存溫度試驗。由於 *P. mediterranea* 與 *P. corrugata* 類似，因此推測台灣的冬季溫度撲滅 *P. mediterranea* 的可能性低，並且本次經測試 *P. mediterranea* 由生理生化特性可知，在 37℃下依然可以生長，顯示該菌在台灣越夏的可能性高，因此推測 *P. mediterranea* 在台灣立足的可能性高。

在傳播特性上，依本次接種試驗顯示，此病菌可經由莖部小傷口感染番茄植株，因此病菌於田間，可能經植株修剪傷口入侵莖部感染。另外，有報告指出 *P. mediterranea* 可殘存於土壤 (Moura *et al*. 2012) 及 *P. corrugata* 殘存在種子 (Zutra 1989)，因此在本病的防治上應注意修剪工具的消毒、修剪後傷口的保護、及時清除病株、選擇非發病田種植、勿經病田引水灌溉及使用未帶病菌種子等措施。在藥劑防治上，本次初步在室內篩選出 4 種市面上販售之藥劑，在本次試驗濃度範圍內，在培養基上可抑制病原細菌生長，該藥劑與試驗濃度可做為進一步規劃田間防治試驗或種子消毒試驗之使用參考。

引用文獻

Adaskaveg, J. E. and R. B. Hine. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strain of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. Plant Dis. 69:993–996.

Alippi, A. M. and A. C. López. 2010. First report of *Pseudomonas mediterranea* causing tomato pith necrosis in Argentina. Plant Pathol. 59:1163.

Alippi, A. M., E. Dal Bo, L. B. Ronco, M. V. López, A. C. López, and O. M. Aguilar. 2003. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. Plant Pathol. 52:287–302.

Aysan, Y., N. Yildiz, and F. Yucel. 2004. Identification of *Pseudomonas viridiflava* on tomato by traditional methods and enzyme-linked immunosorbent assay. Phytoparasitica 32:146–153.

Basim, H., E. Basim, S. Yilmaz, and M. Ilkucan. 2005. First report of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas mediterranea* in Turkey. Plant Pathol. 54:240.

Bella, P. and V. Catara. 2010. Occurrence of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas marginalis* in Italy. Plant Pathol. 59:402.

Catara, V., D. Arnold, G. Cirvilleri, and A. Vivian. 2000. Specific oligonucleotide primers for the rapid identification and detection of the agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata*, by PCR amplification: Evidence for two distinct genomic groups. Eur. J. Plant Pathol. 106:753–762.

Catara, V., L. Sutra, A. Morineau, W. Achouak, R. Christen, and L. Gardan. 2002. Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:1749–1758.

Central Weather Bureau. 2016. Climate statistics. http://www.cwb.gov.tw/V7/climate/monthlyData/mD.htm (visit on 06/14/2017) (in Chinese)

Council of Agriculture. 2017. 2016 agricultural statistics yearbook. http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx (visit on 8/4/2017) (in Chinese)

González, A. J., M. R. Rodicio, and M. C. Mendoza. 2003. Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. Appl. Environ. Microbiol. 69:2936–2941.

Hseu, S. H., C. Y. Lin, and T. C. Sung. 2003. Bacterial stem rot of tomato caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Plant Prot. Bull. 45:257–262. (in Chinese with English abstract)

Hseu, S. H., S. Y. Hsu, S. F. Tsai, and Y. J. Tseng. 2015. Cruciferous bacterial blight: A new disease caused by *Pseudomonas viridiflava*. Plant Pathol. Bull. 24:119–130. (in Chinese with English abstract)

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsai. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)

Lelliot, R. A. and D. E. Stead. 1987. Method for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plants. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 216 pp.

Manceau, C. and A. Horvais. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. tomato. Appl. Environ. Microbiol. 63:498–505.

Marchi, G., C. Viti, L. Giovannetti, and G. Surico. 2005. Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. Eur. J. Plant Pathol. 112:101–112.

Molan, Y. and Y. Ibrahim. 2007. First report of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* and *P. corrugata* in the Kingdom of Saudi Arabia. Plant Dis. 91:110.

Moura, L., I. Queiroz, I. Mourão, L. M. Brito, and J. Duclos. 2012. Survival and genotypic variation of *Pseudomonas corrugata* and *P. mediterranea* in response to soil solarization and biofumigation. p.553–558. *in*: XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Organic Horticulture: Productivity and Sustainability. March 31, 2012. Lisbon, Portugal. International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium.

Moura, M. L., M. A. Jacques, L. M. Brito, I. M. Mourão, and J. Duclos. 2005. Tomato pith necrosis (TPN) caused by *P. corrugata* and *P. mediterranea*: Severity of damages and crop loss assessment. p.365–372. *in*: Proceedings of the First International Symposium on Tomato Diseases. November 25, 2005. Orlando, FL. International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium.

Rodrigues, L. M. R., S. A. L. Destéfano, L. O. S. Beriam, and J. Rodrigues-Neto. 2010. Occurrence of *Pseudomonas mediterranea* on tomato in Brazil. Plant Pathol. 59:797.

Ryder, M. H. and A. F. Bird. 1993. Effect of *Acrobeloides nanus* (Nematoda: Cephalobidae) upon the survival of *Pseudomonas corrugata* (Eubacteria) in pasteurized soil from, Kapunda, South Australia. T. Roy. Soc. South Aust. 117:179–182.

Saygili, H., Y. Aysan, F. Sahin, N. Ustun, and M. Mirik. 2004. Occurrence of pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* on tomato plants in Turkey. Plant Pathol. 53:803.

Scarlett, C. M., J. T. Fletcher, P. Roberts, and R. A. Lelliott. 1978. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. Ann. Appl. Biol. 88:105–114.

Schaad, N. W., J. B. Jone, and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 373 pp.

Searcy, J. V. K., S. Smith, R. D. Gitaitis, and B. Dutta. 2016. First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in Georgia, USA. Plant Dis. 100:518.

Sutra, L., F. Siverio, M. M. Lopez, G. Hunault, C. Bollet, and L. Gardan. 1997. Taxonomy of *Pseudomonas* strains isolated from tomato pith necrosis: Emended description of *Pseudomonas corrugata* and proposal of three unnamed fluorescent *Pseudomonas* genomospecies. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:1020–1033.

Testen, A. L., J. Nahson, D. P. Mamiro, and S. A. Miller. 2015. First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas cichorii* in Tanzania. Plant Dis. 99:1035.

Trantas, E. A., P. F. Sarris, M. G. Pentari, E. E. Mpalantinaki, F. N. Ververidis, and D. E. Goumas. 2015. Diversity among *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* isolated from tomato and pepper showing symptoms of pith necrosis in Greece. Plant Pathol. 64:307–318.

Tsai, C. H., P. J. Ann, Y. S. Lu, M. D. Chen, S. L. Hwang, and T. H. Hung. 2016. Occurrence of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas viridiflava* in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 65:269–277. (in Chinese with English abstract)

Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21:4153–4154.

Xu, X., F. Baysal-Gurel, and S. A. Miller. 2013. First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in the United States and *P. corrugata* in Ohio. Plant Dis. 97:988.

Zutra, D. 1989. Tomato pith necrosis in Israel. Hassadeh 69:612–613.

Occurrence of Pith Necrosis of Tomato Caused by *Pseudomonas mediterranea* in Taiwan

Chia-Hsin Tsai[1], Pao-Jen Ann[2], Yun-Sheng Lu[1], Shu-Ling Hwang[3], and Ting-Hsuan Hung[4,*]

Abstract

Tsai, C. H., P. J. Ann, Y. S. Lu, S. L. Hwang, and T. H. Hung. 2018. Occurrence of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas mediterranea* in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 67(1):16–27.

In 2011 some chlorosis and declined tomato plants were noticed in a field located in Changhua County. Diseased plants had longitudinal dark brown lesions on the stems. Section of the diseased stem showed vascular brown discoloration and pith necrosis symptoms. The yellowish bacteria were isolated from the necrotic stem tissues of tomato on nutrient agar. The isolated bacteria were confirmed as a disease pathogen by Koch's postulates test. The bacteria were identified as *Pseudomonas mediterranea* based on Biolog identification system, physiological and chemical tests, internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis, and specific primer pairs in polymerase chain reaction. This is the first report of *P. medietrranea* causing tomato pith necrosis disease in Taiwan. On screening 10 agrochemicals, streptomycin and thiophanate methyl + streptomycin diluted 500-fold showed the most effective inhibition on pathogen growth.

Key words: Tomato, Pith necrosis, *Pseudomonas medietrranea*, Agrochemical screening.

Received: October 20, 2016; Accepted: August 30, 2017.
* Corresponding author, e-mail: thhung@ntu.edu.tw
[1] Assistant Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Former Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Professor, Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(1):28–43 (2018)
DOI: 10.6156/JTAR.201803_67(1).0004

研究報告

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 F_2 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 F_2 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，而各回交世代選育過程 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 BC_1F_1、BC_3F_1 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 BC_3F_2 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 BC_3F_5 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秈稻新品系。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，諸如將粳稻 '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 'Bacthom 7' 進行雜交，利用分子標幟回交育種將 *Saltol* QTL 導入到 'AS996' 及 'Bacthom 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 個秈稻及 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，其中秈粳亞種間有 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，可供秈粳稻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秈稻品種 '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秈型稻新品系。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) 以秈型稻耐旱品種 '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) 以抗白葉枯病秈稻品系 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，以秈稻耐旱品種 '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秈稻新品系。

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 (NaN_3) 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 M_6 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秈稻品種，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℃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 F_2 族群之遺傳分析

以耐鹽品系 CWY981126 建立 F_2 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 F_2 後代，以及 CWY981126 和 'TCS17' 之雜交組合 1022FA27 的 257 個 F_2 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 F_2 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

利用具耐旱特性秈型品種 'HY15' 為輪迴親，與粳型誘變耐鹽品系 CWY981126 進行雜交，並在 F_2 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 (BC_1F_1、BC_2F_1、BC_3F_1) 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，BC_3F_1 植株自交產生 BC_3F_2 種子；取單株收穫之 BC_3F_1 自交種子依相同比例混合而成 BC_3F_2，之後 3,000 株 BC_3F_2 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 BC_3F_2，獲選之 BC_3F_2 分別收穫自交種子並成立 BC_3F_3 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 BC_3F_3 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，各材料達分蘖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：BC_3F_3 品系經品系產量比較試驗後選出產量表現最佳 27 個品系 (BC_3F_4)，由於台灣 2 期作水稻於最高分蘖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

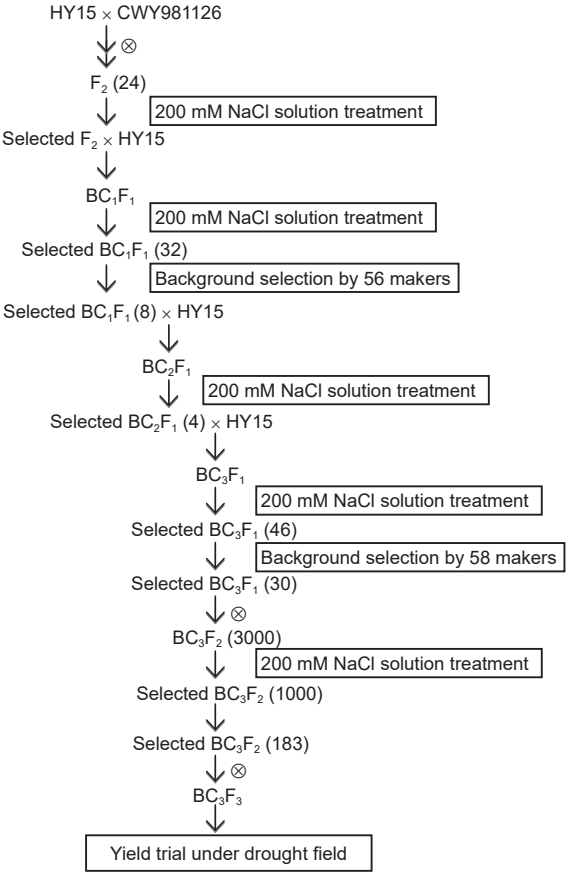


圖 1. 分子標幟輔助耐鹽特性轉移至 'HY15' 之回交育種流程，包含 200 mM NaCl 溶液處理及用於背景選拔之分子標幟說明。括弧內數值為每一個回交世代挑選植株數。

Fig. 1. The backcross breeding scheme for transfering 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 BC_3F_5 種子；2016 年 2 期作以 BC_3F_5 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 BC_3F_3 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 F_2 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 F_2 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 F_2 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。

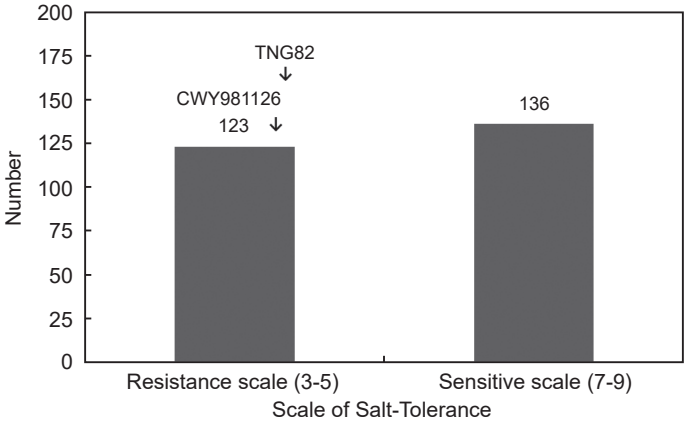


圖 2. CWY981126 與「台農 82 號」雜交後代之 259 株 F_2 植株在 200 mM NaCl 鹽分逆境處理後復水滿 1 d 之耐鹽等級調查。箭頭代表兩親本耐鹽等級平均值。

Fig. 2. The frequence distribution of salt-tolerance in 259 F_2 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 F_2 耐鹽等級的調查結果，在 257 株之 F_2 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

BC_1F_1 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 BC_1F_1 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 BC_1F_1 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

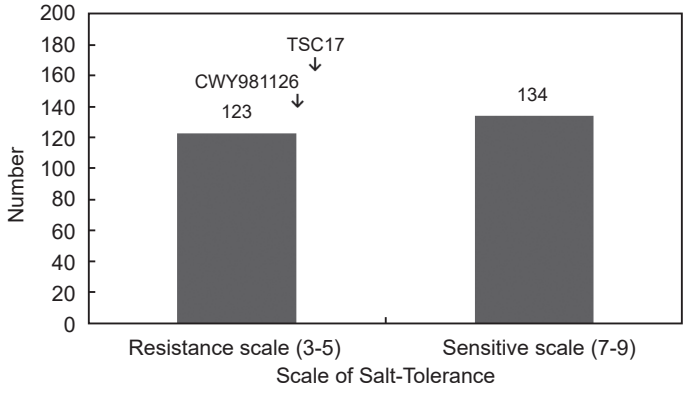


圖 3. CWY981126 與「台中秈 17 號」雜交後代之 257 株 F_2 植株在 200 mM NaCl 鹽分逆境處理後復水滿 1 d 之耐鹽等級調查。箭頭代表兩親本耐鹽等級平均值。

Fig. 3. The frequence distribution of salt-tolerance in 257 F_2 individuals derived from CWY981126/'TCS17' 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幟表現與 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 BC_1F_1 經基因型的判讀，再經軟體 GGT 2.0 graphical genotypes 分析，結果得知 24 株 BC_1F_1 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 BC_1F_1 與 HY15 回交，得到 BC_2F_1 種子。

BC_2F_1 世代：回交得到之 BC_2F_1 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 BC_2F_1 種子重複同樣的耐鹽處理流程，由於 BC_2F_1 種子數較少，故僅挑選 4 株存活之耐鹽株移植至田間。此 BC_2F_1 世代因株數過少，乃不進行分子標幟的背景選拔，而直接利用 4 株 BC_2F_1 與 'HY15' 進行回交並獲得 BC_3F_1 種子。

表 1. CWY981126 與 'HY15' 兩親本間具多型性分子標幟之數量。

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

		Genetic marker			
Backcross generation	Chromosome	SSR	STS	Indel	Subtotal
BC_1F_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	56
BC_3F_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	58

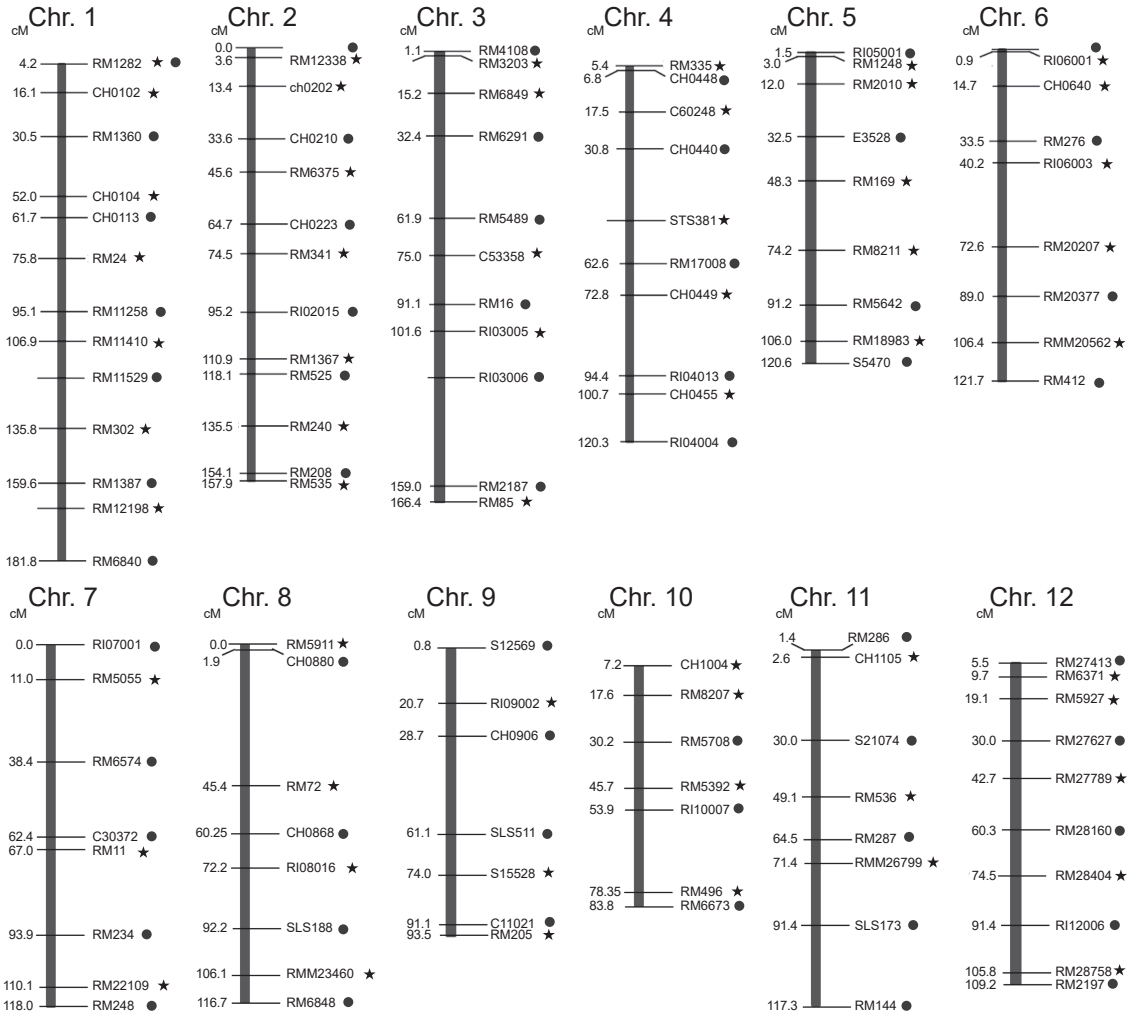


圖 4. 使用於秈型基因堆疊族群背景選拔之多型性分子標幟。分別使用其中的 56 個分子標幟於 BC_1F_1 背景選拔 (五角星) 及 58 個分子標幟於 BC_3F_1 背景選拔 (圓型)。分子標幟代號 RM 開頭為 SSR 分子標幟，C、R、S 或 E 為 STS 分子標幟，CH、STS、SLS 或 RI 為 indel 分子標幟。

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 個分子標幟於 marker-assisted selection (MAS) 分析 BC_1F_1 之基因體組成。

Table 2. The genome composition of BC_1F_1 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.

BC_3F_1 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 BC_3F_1 植株種植於田間並於自交後，各自交單株收穫 BC_3F_2 種子供日後純化及產量評估利用。

耐旱品系產量試驗

BC_3F_3 品系產量試驗：經耐旱處理後存活選育之 183 個 BC_3F_3 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 BC_3F_3 品系產量高於輪迴親本 'HY15'；

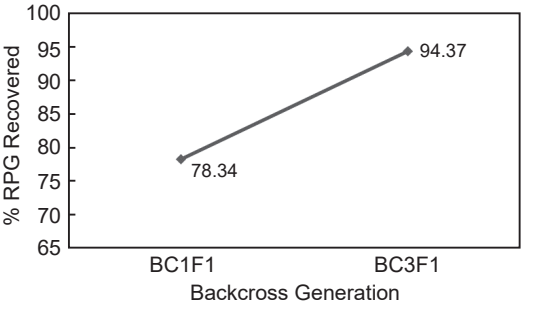


圖 5. 利用 GGT 2.0 分析分子標幟輔助回交育種在秈型堆疊族群之各世代與輪迴親基因體回復比率之曲線圖。

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

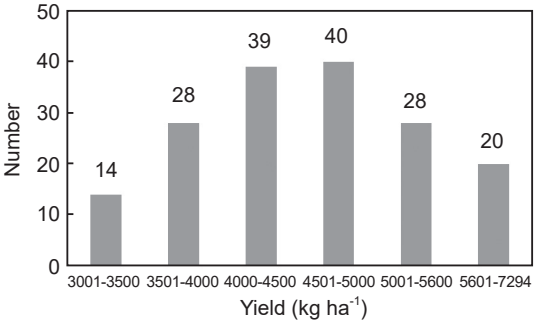


圖 6. 2015 年 2 期 183 個水稻品系乾旱逆境下之稻穀產量分布圖。

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_5 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 kg ha^{-1}，而 27 個 BC_3F_5 耐旱品系之稻穀產量介於 4,175–7,780 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 個分子標幟於 marker-assisted selection (MAS) 分析 BC_3F_1 之基因體組成。

Table 3. The genome composition of BC_3F_1 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 BC_1F_1 與 BC_3F_1 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 BC_2F_1 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 BC_1F_1 和 BC_3F_1 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 BC_3F_1 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 BC_3F_1 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 F_3 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 BC_2F_1、BC_3F_1、BC_4F_1 及 BC_4F_2 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 BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_3F_1 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 BC_2F_1 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 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 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，特別是需在水稻抽穗前完成，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. Manilla, Philippines. 83 pp.

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

Dah-Jing Liao[1], Chieh-Wei Kuo[2], Su-Chen Kuo[3], I-Chun Lien[4], Yann-Rong Lin[5], 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 tolerence of rice accession, CWY981126, was inherited from two complementary genes, revealed by the two F_2 segregation populations of CWY981126 × 'TNG82' and CWY981126 × 'TCS17', for which the segregation ratio of 9 (salt sensitive) : 7 (salt tolerance) was detected in the F_2 progenies treated with 200 mM NaCl at 5–6th leaf seedling stage. In the following, salt tolerant characteristic was transfered 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 genernation, progenies exhibiting salt tolerence 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 BC_1F_1 and BC_3F_1 were 78.34% and 93.37%, respctivley, which were higher than theoretical recovery rates of traditional backcrosses. The BC_3F_3 generation was evaluated for drought tolerenace, indicating that 183 lines exhibited drought-tolerant characteristics. Consequently, these 183 linese 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 BC_3F_5 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.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(1):44–53 (2018)
DOI: 10.6156/JTAR.201803_67(1).0005

研究報告

兩階段培養及巴克素對孤挺花組培苗生長與發根之影響

陳威臣[1]　吳姿穎[2]　曹進義[1]　夏奇鉍[3,*]

摘要

陳威臣、吳姿穎、曹進義、夏奇鉍。2018。兩階段培養及巴克素對孤挺花組培苗生長與發根之影響。台灣農業研究 67(1):44–53。

本研究利用孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.)「台農 1 號-紅粉佳人」('Tainung No.1-Pink Lady')、「紅獅」('Red Lion') 及「千禧之星」('Blossom Peacock') 組培苗為材料，探討兩階段培養及巴克素對鱗莖生長與發根之影響。「台農 1 號」鱗莖 (直徑約 5 mm) 於含有 0.1 mg L^{-1} 苯甲基腺嘌呤 (benzylaminopurine; BA) 與 0.1 mg L^{-1} 奈乙酸 (α-naphthalene acetic acid; NAA) 之液態或固態 MS 培養基中培養 8 wk (第一階段)，再接種至相同組成之固態培養基 8 wk 後 (第二階段)。結果顯示，液-固態兩階段培養具有顯著增加組培苗鮮重、葉數、葉長及根數之效果。利用「紅獅」與「千禧之星」鱗莖 (直徑約 10 mm) 進行巴克素 (Paclobutrazol; PBZ) 液態培養試驗，結果顯示，對照組鱗莖培養至 8 wk 時，已有部分組培苗出現嚴重褐化的現象，建議繼代培養間隔時間不宜超過 8 wk。「紅獅」組培鱗莖在 50–75 mg L^{-1} PBZ 培養條件下，PBZ 處理之根數顯著較多於對照組，但 PBZ 處理間並無顯著差異。然而，「千禧之星」鱗莖在 25–75 mg L^{-1} PBZ 處理時根系生長受到抑制，且濃度越高時根數就越少，而 75 mg L^{-1} PBZ 處理則較對照組具有顯著較短與較寬的葉片；將 PBZ 濃度降低至 5 mg L^{-1}，則有增大鱗莖與促進發根之效果。

關鍵詞：朱頂紅、液-固態培養、生長抑制劑、多效唑。

前言

孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 為石蒜科 (Amaryllidaceae)、孤挺花屬 (*Hippeastrum*) 多年生球根花卉，又名朱頂紅、華胄蘭、柱頂紅及喇叭花，其花色鮮豔、花朵碩大，具多樣花色與花型變化而深受人們喜愛，並廣泛應用於盆花、切花及花壇 (De Bruyn 1997; Ilczuk *et al*. 2005; Liu 2005; Shen & Yu 2011; Amani *et al*. 2015)。台灣近年來在農業研究機構與業者努力下，已陸續推出許多優良品種，卻也面臨因種苗量產不易，導致新品種難以推廣的困擾。

孤挺花的繁殖可利用分球、種子、雙鱗片或組織培養等方式，其中以雙鱗片繁殖法最常被採用 (De Bruyn 1997; Liu 2005; Sarathe *et al*. 2013; Amani *et al*. 2015)。組織培養是許多花卉種苗量產的主要技術之一，尤其在新品種育成初期，面臨種苗數量稀少的狀況下，組織培養是種苗快速量產的有效方法 (De Bruyn 1997; Ilczuk *et al*. 2005; Shen & Yu 2011; Sarathe *et al*. 2013; Amani *et al*. 2015)。本研究前期以孤挺花「台農 1 號-紅粉佳人」('Tainung No.1-Pink Lady')、「紅獅」('Red Lion') 及「千禧之星」('Blossom Peacock') 為材料，已建立其組培瓶苗 (Chen *et al*. 2017)。然而，後續卻出現組培鱗莖生長緩慢的問題，需要進一步探討促進組培苗生長與鱗莖增大的方法。

前人研究指出，垂筒花 (*Cyrtanthus clavatus*

投稿日期：2017 年 7 月 3 日；接受日期：2017 年 8 月 9 日。
* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組約僱助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

與 *C. spiralis*) 組培苗於液態培養後再轉為固態培養，可增加其鱗莖鮮重 (Morán *et al*. 2003)。Shen & Yu (2011) 指出，液態培養雖有助於孤挺花組培苗生長。De Bruyn (1997) 卻指出液態培養下之孤挺花組培苗之生長較差。孤挺花雜交種 (*Hippeastrum* × *chmielii*) (Ilczuk *et al*. 2005) 與夏雪片蓮 (又名鈴蘭水仙) (*Leucojum aestivum*) (Ptak 2014) 的研究結果均顯示，液態培養基之短暫浸漬系統 (temporary immersion system; TIS) 處理可增加組培苗鮮重，且提升後續組培苗之出瓶存活率。

巴克素 (paclobutrazol; PBZ) 為抑制植物頂端分生組織生長的化學物質，作用機制為抑制激勃素 (gibberellic acid; GA) 合成，改變碳水化合物在供源與積儲組織器官間的關係，其傳導路徑係由根部吸收，經木質部往上運移後累積於葉片；具有調節種子發芽、營養生長、開花結果、產量品質及抵抗逆境等功能，且 PBZ 具有抑制細胞或節間伸長之功能，常被用於植株的矮化處理 (Rademacher 2000; Yadav *et al*. 2005)。植物組培系統可在培養基中添加抑制劑，如 PBZ、flurprimidol、chlorocholine chloride (CCC)、ancimidol (A-Rest) 用以抑制葉片生長、縮短節間及增加塊莖、球莖或鱗莖的重量的效果 (Chen *et al*. 2005; Ilczuk *et al*. 2005; Thakur *et al*. 2006; Sultana *et al*. 2010; Zheng *et al*. 2012; Ptak 2014)。因此，本研究以孤挺花組培苗為材料，利用液態培養後再轉為固態培養之兩階段培養程序 (液-固態培養)，以及於培養基中添加 PBZ 的方式，藉以促進組培苗生長與增大鱗莖，期能提供產業在種球生產與新品種推展時之用。

材料與方法

植物材料來源、培養基配製及培養條件

本研究利用 Chen *et al*. (2017) 建立之孤挺花重瓣品種「台農 1 號-紅粉佳人」、單瓣品種「紅獅」及重瓣品種「千禧之星」組培苗進行試驗。培植體培養於含有 6% 蔗糖、1 mg L^{-1} 苯甲基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine; BA) 配合 0.1 或 0.2 mg L^{-1} 奈乙酸 (α-naphthalene acetic acid; NAA) 之 MS (Murashige & Skoog 1962) 固態或液態培養基，固態培養基於加入 9 g L^{-1} 洋菜 (Difco Bacto-agar) 前，先以 0.1–1 N NaOH 或 HCl 將 pH 值調為 5.7 ± 0.1，液態培養基則無添加洋菜，且 pH 值調為 5.2 ± 0.1，再利用 121℃、1.05 kg cm^{-2} 滅菌 20 min 後冷卻備用。固態與液態培養均是將培植體接種於內含 20 mL 培養基之 125-mL 三角瓶 (Erlenmeyer flask) 進行試驗；固態培養置於 26℃ ± 2 ℃、光照 14 h、光強度 38 μmol m^{-2} s^{-1} (FL40D-EX/38, China Electric Co., Taiwan) 的環境培養；液態培養則置於相同溫度環境以 10 μmol m^{-2} s^{-1} 低光照於水平迴轉式振盪器 (Orbital Shaker, SK-302AB, Sun Kuan Co., Taiwan) 以 100 rpm 速度進行振盪培養。

兩階段培養對孤挺花組培苗生長與發根之影響

將孤挺花「台農 1 號」組培苗切除根系與葉片前端 (留下 5 mm 葉片) 之組培鱗莖 (直徑約 5 mm) 作為培植體，先以液態或固態培養基進行第一階段培養 8 wk 後，將所得組培鱗莖分別再利用相同組成之固態培養基進行第二階段培養 8 wk，再調查組培苗之鱗莖直徑、全株鮮重、葉數 (葉長 ≥ 1 cm)、最長葉長、根數 (根長 ≥ 1 cm) 及最長根長。本試驗採用 4 重複，每重複接種 5 個鱗莖，共接種 20 個鱗莖。

巴克素對孤挺花組培苗生長與發根之影響

利用已切除根系與葉片前端 (留下 5 mm 葉片) 之孤挺花「紅獅」與「千禧之星」鱗莖 (直徑約 10 mm) 作為培植體，以含有 6% 蔗糖、1 mg L^{-1} BA、0.2 mg L^{-1} NAA 及 MS 基本鹽類作為基礎培養基。PBZ 試驗係於基礎培養基中添加含 23% PBZ 水懸劑市售藥劑 (尚好擋，洽益化學股份有限公司，台灣) 進行試驗。試驗分為 3 個部分，試驗一為含有 0、50、100 及 200 mg L^{-1} PBZ 之液態基礎培養基；試驗二是含有 0、25、50 及 75 mg L^{-1} PBZ 之液態基礎培養基，培養 8 wk 與 12 wk 後調查組培苗之鱗莖直徑、葉數 (葉長 ≥ 1 cm)、最長葉長、最大

葉寬及根數 (根長 ≥ 1 cm)；試驗三含有 0、5、10 及 20 mg L^{-1} PBZ 之基礎培養基，並添加 2% 活性碳之固態基礎培養基，培養 8 wk 後調查組培苗之鱗莖直徑、葉數 (葉長 ≥ 1 cm)、最長葉長、根數及最長根長 (根長 ≥ 1 cm)。本試驗採用 3 重複，每重複接種 3 個鱗莖，共接種 9 個鱗莖。

試驗設計和統計分析

本研究採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD) 進行試驗。試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., USA) 套裝統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若處理間差異顯著 ($P < 0.05$)，則以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 比較各處理平均值間之差異。

結果

兩階段培養對孤挺花組培苗生長與發根之影響

本試驗利用「台農 1 號」組培鱗莖 (直徑約 5 mm) 培養於含有 0.1 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之液態或固態 MS 培養基中 8 wk 後，結果顯示液態培養所得組培鱗莖可達 11 mm，而固態培養所得組培鱗莖僅 7 mm (資料未列)。後續將此第一階段培養所得組培鱗莖，分別再進行第二階段之固態培養。組培苗經過 8 wk 培養後之結果顯示，液-固態培養處理之鮮重、葉數、葉長及根數，均顯著高於固-固態培養處理，但鱗莖直徑與根長在兩處理間並無顯著差異 (表 1)。

巴克素對孤挺花組培苗生長與發根之影響

本研究中 PBZ 涵蓋 3 組濃度範圍，試驗一採用 0–200 mg L^{-1} PBZ 處理之結果顯示，鱗莖培養於大於或等於 100 mg L^{-1} PBZ 條件下，組培苗於培養 4 wk 開始出現褐化情形，達 8 wk 時已嚴重褐化而死亡 (資料未列)。調降 PBZ 濃度為 0–75 mg L^{-1} 進行試驗二之結果顯示，「紅獅」鱗莖於不含 PBZ 之對照組條件下培養達 4 wk 時，培養基開始出現褐化現象，當培養至 8 wk 時已有部分組培苗或培養基均已出現出現更嚴重之褐化現象 (圖 1)；「千禧之星」也顯示類似的情形 (資料未列)。比較對照組於 8 wk 與 12 wk 之結果顯示，「紅獅」與「千禧之星」組培苗於 12 wk 時之葉長與根數雖增加，但其鱗莖直徑、葉數及葉寬的表現已出現生長停滯或衰退的情形 (表 2)。

「紅獅」與「千禧之星」鱗莖於 0–75 mg L^{-1} PBZ 條件培養達 12 wk 時，其組培苗葉數並無顯著差異 (表 2)。就組培苗之葉長與葉寬而言，「紅獅」鱗莖在此條件培養達 12 wk 時，組培苗葉長與葉寬在各處理組與對照組之間並無顯著差異。然而，「千禧之星」鱗莖於 0–50 mg L^{-1} PBZ 條件培養達 12 wk 時，葉長在各處理組與對照組之間雖無顯著差異，而 75 mg L^{-1} PBZ 處理之葉片顯著較短；此外，75 mg L^{-1} PBZ 處理之葉寬顯著大於對照組與 25 mg L^{-1} PBZ 處理，但與 50 mg L^{-1} 處理之間並無顯著差異 (表 2)。「紅獅」鱗莖在 50 與 75 mg L^{-1} PBZ 處理之根數顯著多於對照組，而 25 mg L^{-1}

表 1. 兩階段培養對孤挺花「台農 1 號」組培苗生長與發根之影響。

Table 1. Effect of two-stage culture on *in vitro* bulblet growth and rooting of *H. hybridum* 'Tainung No.1-Pink Lady'[z].

Culture procedure	Bulb diameter (mm)	Bulblet FW (g)	Leaf number (No.)	Leaf length (cm)	Root number (No.)	Root length (cm)
Solid-solid	8.6 ± 0.5 a[y]	1.3 ± 0.2 b	1.8 ± 0.2 b	9.8 ± 0.4 b	7.4 ± 0.6 b	12.4 ± 0.9 a
Liquid-solid	9.0 ± 0.2 a	2.2 ± 0.1 a	2.5 ± 0.1 a	17.7 ± 1.0 a	9.9 ± 0.4 a	11.4 ± 0.3 a

[z] Explants were cultured in liquid or solid MS medium containing 1 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} NAA in combination with 6% sucrose for 8 wk of culture, and followed by a solid MS medium with same components for another 8 wk of culture. Each treatment had 4 replications, and 5 explants were used in each replication.

[y] Means in the same column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test.

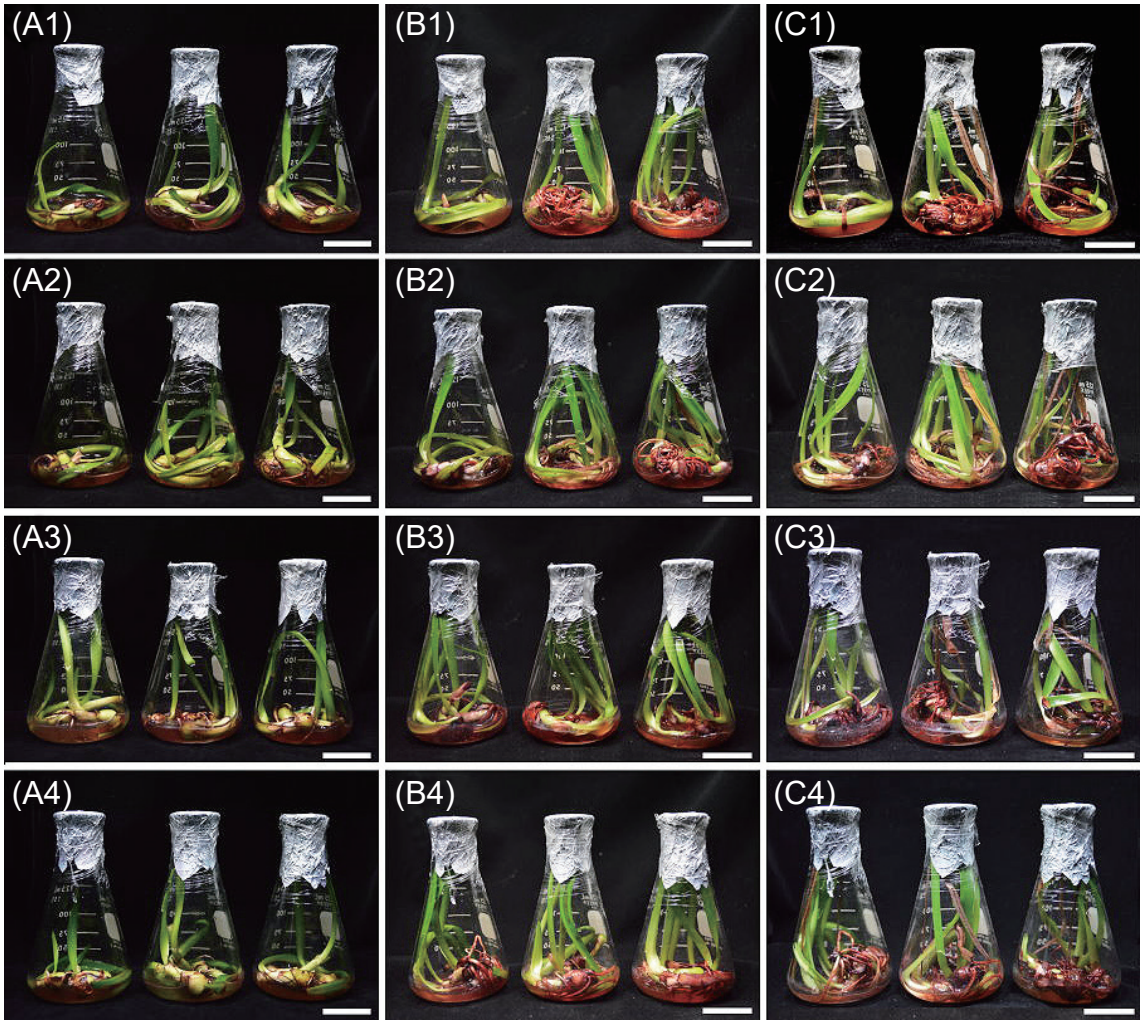


圖 1. 巴克素對孤挺花「紅獅」組培苗生長與發根之影響。(A)、(B) 及 (C) 分別為培養 4 wk、8 wk 及 12 wk 後組培苗生長與發根之情形。(1)、(2)、(3) 及 (4) 為培養於含有 1 mg L^{-1} BA、0.2 mg L^{-1} NAA 及 6% 蔗糖，並分別添加 0、25、50 及 75 mg L^{-1} 巴克素之 MS 液態培養基。Bars = 5 cm。

Fig. 1. *In vitro* bulblets growth and rooting of *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion'. Explants were cultured in MS liquid medium containing 1 mg L^{-1} BA, 0.2 mg L^{-1} NAA and 6% sucrose with additional 0 (1), 25 (2), 50 (3), and 75 (4) mg L^{-1} paclobutrazol, respectively, for 4 (A), 8 (B) and 12 (C) wk of culture. Bars = 5 cm.

PBZ 處理則與對照組間並無顯著差異；然而，「千禧之星」組培苗卻顯示根系生長受 PBZ 抑制的結果，對照組根數顯著多於其餘 PBZ 處理，而且PBZ濃度越高時之根數就越少 (表2)。

由於液態培養達 8 wk 之組培苗均出現玻璃質化與褐化現象，因此試驗三採用添加 2% 活性碳之固態培養方式，且調降 PBZ 濃度為 0–20 mg L^{-1} (約 0–15.7 μM) 進行試驗，並將試驗期縮短為 8 wk。結果顯示「紅獅」組培苗之鱗莖直徑在各處理組與對照組之間雖無顯著差異，然而「千禧之星」組培苗顯示鱗莖增大的結果。5 mg L^{-1} (約 3.9 μM) PBZ 處理鱗莖直徑顯著大於對照組與 20 mg L^{-1} (約 15.7 μM) PBZ 處理，但與 10 mg L^{-1} (約 7.8 μM) PBZ 處理並無顯著差異 (表 3)。「紅獅」與「千禧之星」鱗莖於 0–20 mg L^{-1} PBZ 條件培養達 8 wk 時，

表 2. 巴克素添加於液態培養基對孤挺花「紅獅」與「千禧之星」組培苗生長與發根之影響。

Table 2. Effect of paclobutrazol in liquid medium on *in vitro* bulblet growth and rooting of *H. hybridum* 'Red Lion' and 'Blossom Peacock'[z].

PBZ	Bulb diameter (mm)		Leaf number (No.)		Leaf length (cm)		Leaf width (mm)		Root number (No.)	
(mg L^{-1})	8 wk	12 wk	8 wk	12 wk	8 wk	12 wk	8 wk	12 wk	8 wk	12 wk
'Red Lion'										
0	1.2 ± 0.1 a[y]	1.0 ± 0 a	2.0 ± 0.0 a	2.2 ± 0.8 a	15.8 ± 0.2 ab	17.4 ± 2.3 a	6.6 ± 1.1 a	6.4 ± 1.0 a	4.6 ± 1.9 b	5.0 ± 2.2 b
25	1.2 ± 0.1 a	1.0 ± 0 a	2.2 ± 0.2 a	2.6 ± 0.4 a	15.4 ± 0.1 b	16.1 ± 0.2 a	7.7 ± 0.3 a	6.8 ± 0.4 a	7.1 ± 2.0 ab	9.2 ± 1.3 ab
50	1.2 ± 0.0 a	1.0 ± 0 a	1.9 ± 0.1 a	2.4 ± 0.3 a	16.0 ± 0.6 ab	17.7 ± 1.0 a	7.7 ± 0.6 a	7.0 ± 0.7 a	7.6 ± 0.7 ab	11.3 ± 0.4 a
75	1.3 ± 0.1 a	1.0 ± 0 a	2.1 ± 0.1 a	2.6 ± 0.2 a	16.2 ± 0.5 a	17.4 ± 0.6 a	7.1 ± 0.2 a	7.1 ± 0.2 a	10.6 ± 0.6 a	11.8 ± 0.3 a
'Blossom Peacock'										
0	1.4 ± 0.0 a	1.4 ± 0.0 a	2.8 ± 0.1 a	2.2 ± 0.1 a	8.1 ± 0.5 a	15.9 ± 1.0 a	8.0 ± 0.0 c	8.0 ± 0.0 c	4.1 ± 1.0 a	6.9 ± 0.6 a
25	1.5 ± 0.1 a	1.5 ± 0.1 a	2.6 ± 0.3 a	2.3 ± 0.5 a	8.0 ± 1.2 a	15.0 ± 0.4 a	9.8 ± 0.4 b	9.6 ± 0.8 b	3.2 ± 1.8 ab	4.0 ± 1.6 b
50	1.5 ± 0.1 a	1.5 ± 0.1 a	2.4 ± 0.3 a	2.4 ± 0.3 a	8.1 ± 1.9 a	14.7 ± 1.3 a	10.3 ± 0.6 ab	10.0 ± 0.0 ab	1.9 ± 1.6 ab	3.6 ± 0.2 b
75	1.5 ± 0.0 a	1.6 ± 0.0 a	2.1 ± 0.3 a	2.1 ± 0.3 a	4.8 ± 2.2 b	7.3 ± 6.0 b	10.7 ± 0.7 a	10.7 ± 0.7 a	1.0 ± 0.7 b	1.0 ± 0.7 c

[z] Explants were cultured in MS liquid medium containing 1 mg L^{-1} BA, 0.2 mg L^{-1} NAA and 6% sucrose with various concentrations of PBZ for 8 and 12 wk of culture under 100 rpm rotatory shaking condition. Each treatment had 3 replications, and 3 explants were used in each replication.

[y] Means in the same column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test.

組培苗葉數與葉長均無顯著差異 (表 3)。「紅獅」與「千禧之星」鱗莖於 0–20 mg L^{-1} PBZ 條件下，其發根率均可達到 100%，而且組培苗與培養基均未有嚴重褐化現象 (圖 2)。「紅獅」組培苗根數與根長在各處理之間並無顯著差異，然而「千禧之星」鱗莖在 5–10 mg L^{-1} PBZ 處理下，組培苗之根數顯著多於對照組與 20 mg L^{-1} PBZ 處理；此外，5 mg L^{-1} PBZ 處理之「千禧之星」組培苗的平均根長顯著大於對照組與 20 mg L^{-1} PBZ 處理，而與 10 mg L^{-1} PBZ 處理之間並無顯著差異 (表 3)。

討論

液態培養可有助於孤挺花組培苗的生長

表 3. 巴克素添加於固態培養基對孤挺花「紅獅」與「千禧之星」組培苗生長與發根之影響。

Table 3. Effect of paclobutrazol in solid medium on *in vitro* bulblet growth and rooting of *H. hybridum* 'Red Lion' and 'Blossom Peacock'[z].

PBZ (mg L^{-1})	Bulb diameter (mm)	Leaf number (No.)	Leaf length (cm)	Root number (No.)	Root length (cm)
'Red Lion'					
0	9.8 ± 0.4 a[y]	1.3 ± 0.3 a	11.8 ± 1.5 a	14.9 ± 1.8 a	8.5 ± 0.6 a
5	9.7 ± 0.3 a	2.1 ± 0.2 a	12.8 ± 1.7 a	12.0 ± 0.3 a	8.9 ± 0.6 a
10	9.9 ± 0.7 a	2.1 ± 0.8 a	11.9 ± 2.2 a	13.0 ± 1.7 a	8.5 ± 0.8 a
20	10.1 ± 0.9 a	1.9 ± 0.4 a	13.6 ± 2.0 a	12.8 ± 3.0 a	9.0 ± 0.2 a
'Blossom Peacock'					
0	10.3 ± 0.2 b	2.0 ± 0.0 a	12.9 ± 1.0 a	11.3 ± 0.5 b	9.4 ± 0.5 b
5	11.4 ± 0.2 a	2.0 ± 0.0 a	11.0 ± 1.6 a	13.4 ± 0.6 a	12.0 ± 0.4 a
10	10.9 ± 0.1 ab	2.0 ± 0.2 a	13.5 ± 1.0 a	14.6 ± 0.7 a	11.0 ± 0.5 ab
20	10.5 ± 0.3 b	1.8 ± 0.1 a	12.4 ± 0.9 a	11.4 ± 0.7 b	9.8 ± 0.3 b

[z] Explants were cultured in MS solid medium containing 1 mg L^{-1} BA, 0.2 mg L^{-1} NAA and 6% sucrose with various concentrations of PBZ for 8 wk of culture. Each treatment had 3 replications, and 3 explants were used in each replication.

[y] Means in the same column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test.

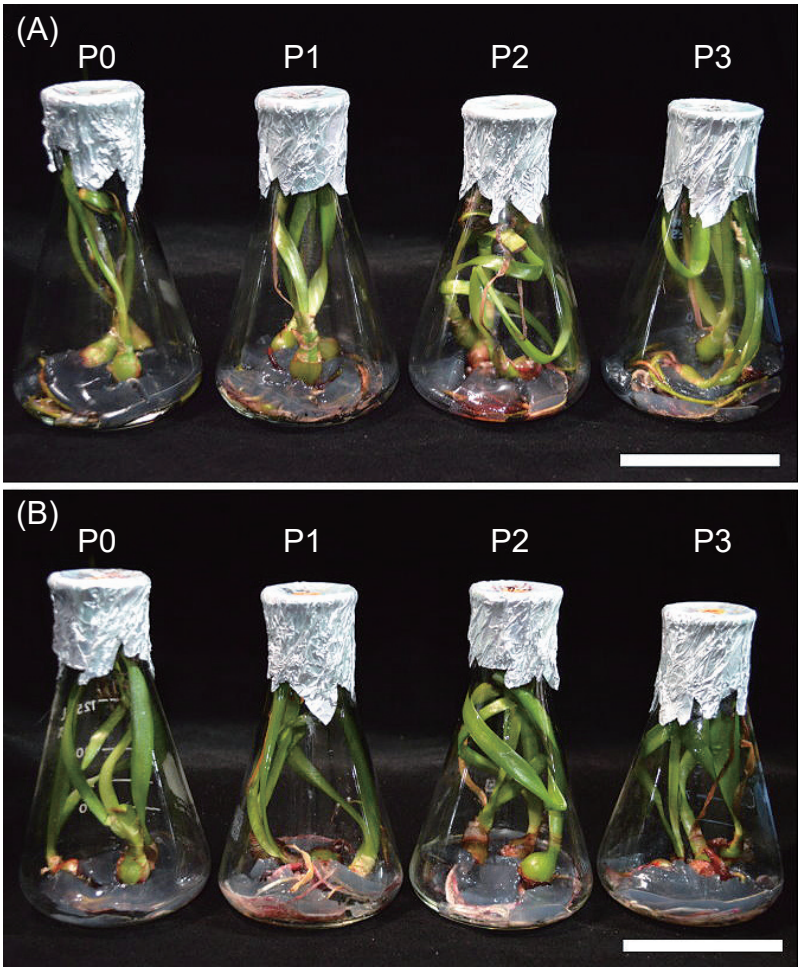


圖 2. 巴克素對孤挺花「紅獅」與「千禧之星」組培苗生長與發根之影響。(A) 與 (B) 分別為孤挺花「紅獅」與「千禧之星」。(P0)、(P1)、(P2) 及 (P3) 為培養於含有 1 mg L^{-1} BA、0.2 mg L^{-1} NAA、6% 蔗糖及 2% 活性碳，並分別添加 0、5、10 及 20 mg L^{-1} 巴克素之 MS 固態培養基。Bars = 5 cm。

Fig. 2. *In vitro* bulblets growth and rooting of *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion' (A) and 'Blossom Peacock' (B). Explants were cultured in MS solid medium containing 1 mg L^{-1} BA, 0.2 mg L^{-1} NAA, 6% sucrose and 2% active charcoal with additional 0 (P0), 5 (P1), 10 (P2), and 20 (P3) mg L^{-1} paclobutrazol for 8 wk of culture. Bars = 5 cm.

與增加鮮重 (Ilczuk *et al*. 2005; Shen & Yu 2011)，也有報告指出液態培養之孤挺花組培苗生長狀況較差 (De Bruyn 1997)。垂筒花組培苗於液態培養一段時間後再轉為固態培養，可促進其鮮重增加 (Morán *et al*. 2003)。Ptak (2014) 指出 TIS 培養系統可促進夏雪片蓮組培苗之根與葉的生長，不僅增加鮮重且提高其出瓶存活率。本研究結果顯示，第一階段採用液態培養即可達到 100% 發根率，然而組培苗葉片前端易出現褐化枯黃現象 (資料未列)；但由於每次繼代培養均會切除葉片前端，因此枯黃葉片並不影響後續試驗進行；此外，液-固態培養方式可有助於組培苗生長，其鮮重、葉數、葉長及根數均顯著高於固-固態培養處理 (表 1)；因此，與上述部分之前人研究的結果相類似。然而，「紅獅」組培苗即使在不含 PBZ 之條件下培養達 8 wk 時，部分組培苗或培養基均已出現嚴重褐化現象 (圖 1)；此外，對照組「紅獅」與「千禧之星」組培苗於第 8–12 wk 期間已出現生長停滯或衰退情形 (表 2)。

因此，本研究建議孤挺花組培苗於液態培養條件下之繼代間隔時間不宜超過 8 wk。

唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 研究結果顯示，PBZ 處理會抑制組培苗葉片的生長 (Nagaraju *et al*. 2002)。Zheng *et al*. (2012) 於東方型百合 (*Lilium* Oriental hybrids 'Sorbonne') 栽培試驗結果也顯示，生長抑制劑 (CCC 與 PBZ) 具有減少葉數與葉面積等生長抑制效果。Yadav *et al*. (2005) 之評論報告指出，PBZ 具有減少葉面積與增加葉寬、葉厚及乾重的效果。然而，萱草 (*Hemerocallis* spp.) 的研究結果卻顯示，PBZ 具有促進葉數與葉長的效果 (Chen *et al*. 2005)。Ptak (2014) 的研究結果也指出，PBZ 可提高夏雪片蓮組培苗的葉片形成率。Ilczuk *et al*. (2005) 於孤挺花雜交種的研究結果卻指出，flurprimidol 可增加組培苗之葉數，但同時會抑制其葉長。百合 (*Lilium longiflorum*) 的 PBZ 研究結果顯示，當濃度為 1.7 μM 時可促進葉片的生長，但在 3.4–8.5 μM 處理下則差異並不顯著，然而當濃度高達 17 μM 時則會出現生長抑制的結果 (Thakur *et al*. 2006)。綜合上述前人研究結果顯示，生長抑制劑對葉片生長具有物種差異性，甚至因為濃度有別而有不同的處理效應。本研究結果顯示，「紅獅」鱗莖在 0–75 mg L^{-1} PBZ 條件培養達 12 wk 時，組培苗之葉長與葉寬在各處理組與對照組之間並無顯著差異；「千禧之星」鱗莖在 0–50 mg L^{-1} PBZ 條件下培養達 12 wk 時，組培苗之葉長在各處理組與對照組間也無顯著差異，然而在 75 mg L^{-1} PBZ 條件卻顯示較短的葉片，顯示葉片生長受到 PBZ 抑制 (表 2)；然而，在降低 PBZ 濃度 (5–20 mg L^{-1}) 後進行試驗，對於組培苗之葉數與葉長的抑制效果則不再顯著 (表 3)。因此，本研究與上述報導顯示相類似的結果，亦即較高 PBZ 濃度會抑制葉片生長，但較低 PBZ 濃度則不影響葉片生長，然而本研究並未顯示 PBZ 具有促進葉片生長的效果。

百合 (*L. longiflorum*) 組培苗的研究結果顯示，PBZ 可促進其根系生長與乾重增加 (Thakur *et al*. 2006)。PBZ 可提高夏雪片蓮組培苗的發根率與出瓶存活率 (Ptak 2014)。Chen *et al*. (2005) 於萱草的研究結果指出，PBZ 處理並不會影響組培苗之根數與根長。Yadav *et al*. (2005) 的評論報告指出，PBZ 具有抑制根長、促進根徑與根重，以及提高側根數與發根率的效果。然而，Nagaraju *et al*. (2002) 研究結果卻指出，PBZ 會抑制唐菖蒲組培苗根系的生長而導致根徑縮小的結果。火焰百合 (Gloriosa rothschildiana) 的研究結果顯示，PBZ 與 flurprimidol 處理雖不會影響組培苗的根數，但具有促進發根率與增加根重的效果，同時會抑制根長，但若是 flurprimidol 濃度高達 5 mg L^{-1} 時則會抑制組培苗根系生長 (Kozak 2002)。Ilczuk *et al*. (2005) 於孤挺花雜交種的研究結果指出，flurprimidol 於固態或液態培養下對於組培苗根系發育影響並不一致，固態培養下顯示促進根數與抑制根長的結果，但在液態培養時則根數與根長均受到促進。依據上述前人研究結果顯示，生長抑制劑對根系生長的影響，也會因植物種類、品種、藥劑類型或處理濃度的不同，而出現相反的結果。本研究結果顯示，「紅獅」與「千禧之星」組培苗於 25–75 mg L^{-1} PBZ 處理之發根率雖然都可達到 100% (資料未列)，但是「紅獅」組培苗根數受到 PBZ 促進，然而「千禧之星」卻出現根數受到抑制的結果 (表 2)，顯示「紅獅」相較於「千禧之星」而言，對於 PBZ 具有較佳耐受性，此可能是因為基因型的差異所造成的結果。

Shen & Yu (2011) 於孤挺花組織培養評論報告指出，培養基添加具有吸附抑制物質能力之活性碳，可降低小鱗莖苗的褐化率。由於本研究無論在是否添加 PBZ 之液態培養條件下，組培苗均出現嚴重褐化的現象 (圖 1)，因此，後續試驗採用添加 2% 活性碳之固態培養方式進行試驗，結果亦顯示此種培養方式確實可以降低組培苗之褐化現象 (圖 2)。

就 PBZ 處理對於組培苗儲存器官 (塊莖、球莖、鱗莖) 之生長而言，唐菖蒲 (Nagaraju *et al*. 2002)、火焰百合 (Kozak 2002)、百合 (Thakur *et al*. 2006) 及夏雪片蓮 (Ptak 2014) 研究結果均顯示，PBZ 具有增加儲存器官鮮重的效果。Chen *et al*. (2005) 於萱草研究也有類似結果，組培苗乾重增加主要來自於澱粉的累積。孤挺花雜交種研究結果顯示，含有 flurprimidol 之液態培養基可促進組培鱗莖鮮重

的增加 (Ilczuk *et al*. 2005)；CCC (500 ppm) 也具有促進孤挺花組培鱗莖鮮重增加的效果 (Sultana *et al*. 2010)。Zheng *et al*. (2012) 於東方型百合的栽培試驗結果顯示，CCC 對於增加鱗莖鮮重的效果顯著，但 PBZ 處理則效果不佳。本研究結果顯示，「紅獅」與「千禧之星」鱗莖培養於 25–75 mg L^{-1} PBZ 條件達 8 或 12 wk 時，鱗莖直徑在各處理組與對照組之間並無顯著差異，亦即此條件下之 PBZ 處理並無促進鱗莖增大的效果，甚至「紅獅」可能因部分組培苗死亡而鱗莖萎縮，導致鱗莖直徑縮小的結果 (表 2)。此外，「紅獅」在 50–75 mg L^{-1} PBZ 條件下雖有助於組培苗根數的增加 (表 2)，但 5–75 mg L^{-1} PBZ 對鱗莖卻無增大的效果 (表 2、表 3)，而在 5 mg L^{-1} PBZ 條件之「千禧之星」組培苗，顯示鱗莖增大、根數增加及根長較長的結果 (表 3)，因此 PBZ 對於「紅獅」與「千禧之星」組培苗之處理效果並不一致，此結果可能是兩品種對於 PBZ 的耐受性不同所造成的差異。

本研究利用孤挺花「台農 1 號」、「紅獅」及「千禧之星」之無菌組培苗進行試驗，尋求促進組培苗生長與發根的方法。試驗結果顯示，利用液態培養轉固態培養之兩階段培養方式，具有促進「台農 1 號」組培苗生長的效果；此外，較高濃度 (50–75 mg L^{-1}) (約 39.2–58.7 μM) PBZ 處理可促進「紅獅」組培苗的發根；而較低濃度 (5 mg L^{-1}) (約 3.9 μM) PBZ 處理則顯示「千禧之星」組培苗之鱗莖增大、根數增加及根長變長的結果。本研究後續擬將上述試驗所得組培苗進行馴化試驗，並探討於馴化期間促進鱗莖增大的方法。

誌謝

本文稿承農業試驗所花卉研究中心蔡嫻婷博士協助審閱，特此申謝。

引用文獻

Amani, S. H., H. Zarei, A. Mottallebi Azar, and K. Mashayekhi. 2015. Micropropagation of *Hippeastrum hybridum*. Cumhuriyet Sci. J. 36:594–605.

Chen, J., D. E. Hall, and V. De Luca. 2005. Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Hemerocallis* spp.). *In Vitro* Cell. Dev. Biol.–Plant 41:58–62.

Chen, U. C., I. Din, T. Y. Wu, J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2017. Effect of disinfection method, explant type, and plant growth regulator on establishment of *in vitro* bulblet proliferation of Amaryllis. J. Taiwan Agric. Res. 66:286–297. (in Chinese with English abstract)

De Bruyn, M. H. 1997. Micropropagation of Amaryllis (*Hippeastrum hybridum*). p.3–13. *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 40. High-Tech and Micropropagation VI. (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer-Verlag, Berlin, Germany. 397 pp.

Ilczuk, A., T. Winkelmann, S. Richartz, M. Witomska, and M. Serek. 2005. *In vitro* propagation of *Hippeastrum* × *chmielii* Chm. – Influence of flurprimidol and the culture in solid or liquid medium and in temporary immersion systems. Plant Cell Tissue Organ Cult. 83:339–346.

Kozak, D. 2002. The effect of growth retardants on induction and development of *Gloriosa rothschildiana* O'Brien tubers *in vitro*. Acta Hort. 570:345–349.

Liu, M. C. 2005. *Amaryllis*. p.761–764. *in*: Taiwan Agriculture Encyclopedia, Crop Edition 2. 3rd ed. (Hung, J. H., T. D. Fan, and L. N. Lin, eds.) Council of Agriculture. Taipei, Taiwan. 926 pp. (in Chinese)

Morán, G. P., R. Colque, F. Viladomat, J. Bastida, and C. Codina. 2003. Mass propagation of *Cyrtanthus clavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. Sci. Hort. 98:49–60.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473–497.

Nagaraju, V., G. Bhowmik, and V. A. Parthasarathy. 2002. Effect of paclobutrazol and sucrose on *in vitro* cormel formation in gladiolus. Acta Bot. Croat. 61:27–33.

Ptak, A. 2014. *Leucojum aestivum* L. *in vitro* bulbs induction and acclimatization. Cent. Eur. J. Biol. 9:1011–1021.

Rademacher, W. 2000. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51:501–531.

Sarathe, S., M. K. Tripathi, M. Vidhya Sankar, and O. P. Singh. 2013. Studies on *in vitro* morphogenesis from bulb scale and leaf disc explant of *Amaryllis belladonna* L. Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol. 14:22–32.

Shen, M. M. and X. N. Yu. 2011. Research advances on tissue culture of *Amaryllis vittata*. Heilongjiang Agric. Sci. 10:135–138. (in Chinese with English abstract)

Sultana, J., N. Sultana, M. N. A. Siddique, A. K. M. A. Islam, M. M. Hossain, and T. Hossain. 2010. *In vitro* bulb production in hippeastrum (*Hippeastrum hybridum*). J. Cent. Eur. Agric. 11:469–474.

Thakur, R., A. Sood, P. K. Nagar, S. Pandey, R. C. Sobti, and P. S. Ahuja. 2006. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: Growth parameters. Plant Cell Rep. 25:382–391.

Yadav, R. K., N. Rai, D. S. Yadav, and B. S. Asati. 2005. Use of paclobutrazol in horticultural crops — A review. Agric. Rev. 26:124–132.

Zheng, R. R., Y. Wu, and Y. P. Xia. 2012. Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium* oriental hybrids ‘Sorbonne’. J. Zhejiang Univ. Sci. B 13:136–144.

Effects of Two-Stage Culture and Paclobutrazol on *In Vitro* Bulblet Growth and Rooting of *Hippeastrum hybridum*

Uei-Chern Chen[1], Tzu-Ying Wu[2], Jhin-Yi Tsao[1], and Chi-Ni Hsia[3,*]

Abstract

Chen, U. C., T. Y. Wu, J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2018. Effects of two-stage culture and paclobutrazol on *in vitro* bulblet growth and rooting of *Hippeastrum hybridum*. J. Taiwan Agric. Res. 67(1):44–53.

An improved method for *in vitro* bulblet growth and rooting of *Hippeastrum hybridum* was established in this study. *In vitro* bulblets of *Hippeastrum hybridum* 'Tainung No. 1', 'Red Lion', and 'Blossom Peacock' were used as materials to conduct the liquid-solid or solid-solid two-stage culture, and additional paclobutrazol was added into culture medium to enhance growth and rooting of *in vitro* Amaryllis bulblets. *In vitro* bulbs (5 mm diameter) of 'Tainung No. 1' were cultured in liquid or solid MS medium containing 1 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} NAA for 8 wk of culture before transferring to a solid MS medium with the same components for another 8 wk of culture. The results showed that liquid-solid culture was superior to solid-solid culture on fresh weight of bulblets, leaf number, leaf length, and root number. *In vitro* bulblets of 'Red Lion' and 'Blossom Peacock' showed severe browning or death after 8 wk of culture on the control medium. Therefore, it is suggested that the subculture interval should not exceed 8 wks. The root number of 'Red Lion' bulblets by 50–75 mg L^{-1} PBZ treatment was found significantly higher than that of control. No significant difference among PBZ treatments was found. However, root numbers of 'Blossom Peacock' were reduced treated with 25–75 mg L^{-1} PBZ concentrations. Leaf with shorter and wider shape was observed in 75 mg L^{-1} PBZ treatment. However, a lower concentration of 5 mg L^{-1} PBZ was found beneficially to bulb diameter, root number and root length.

Key words: Amaryllis, Liquid-solid culture, Plant growth retardant, PP333.

Received: July 3, 2017; Accepted: August 9, 2017.
* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Contract Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(1):54–72 (2018)
DOI: 10.6156/JTAR.201803_67(1).0006

研究報告

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 [1]　吳佩真 [2]　吳東鴻 [3,*]

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_2F_1 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_3F_2) 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 年進行旱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^{-1})，表現其次為 CNY1042057 (5,280.0 kg ha^{-1})；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
[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] 農委會農業試驗所作物組研究助理。台灣 台中市。
[3] 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。

美國粳型稻品種 'Zenith' 歷年在本分所旱田式稻熱病病圃中，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 個由粳型及秈型稻品種分離獲得之菌株進行接種，結果顯示 *Pia* 基因對於粳型稻菌株之抗幅為 20.0%，而對於秈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) 從粳型、秈型及雜交水稻採集 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。本研究以高產秈型稻品種「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，與稻熱病抗性粳稻品種 '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世代回交種子，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型之植株組成 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 μL DNA 快速萃取液 (QuickExtract™ plant DNA extraction

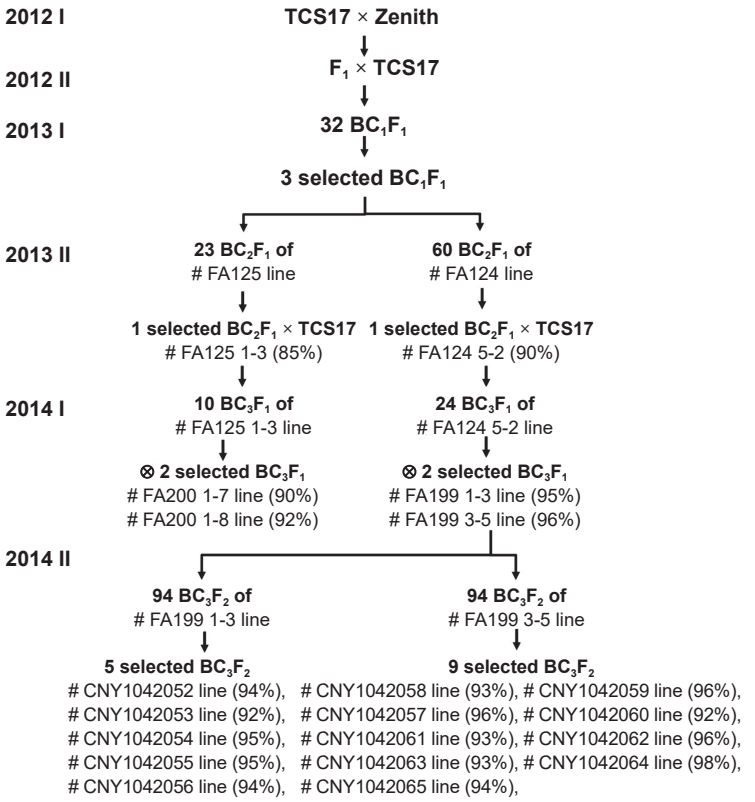


圖 1. 運用分子輔助回交選育將 'Zenith' 親本的 Pia 與 Piz 基因座上的抗性 allele 片段導入「台中秈 17 號」中之選育流程圖。品系後括號表示背景回復率。

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℃下加熱 6 min，隨後 98℃下 2 min，所獲 DNA 萃取原液以無菌蒸餾水稀釋 4× 後貯放於 -20℃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

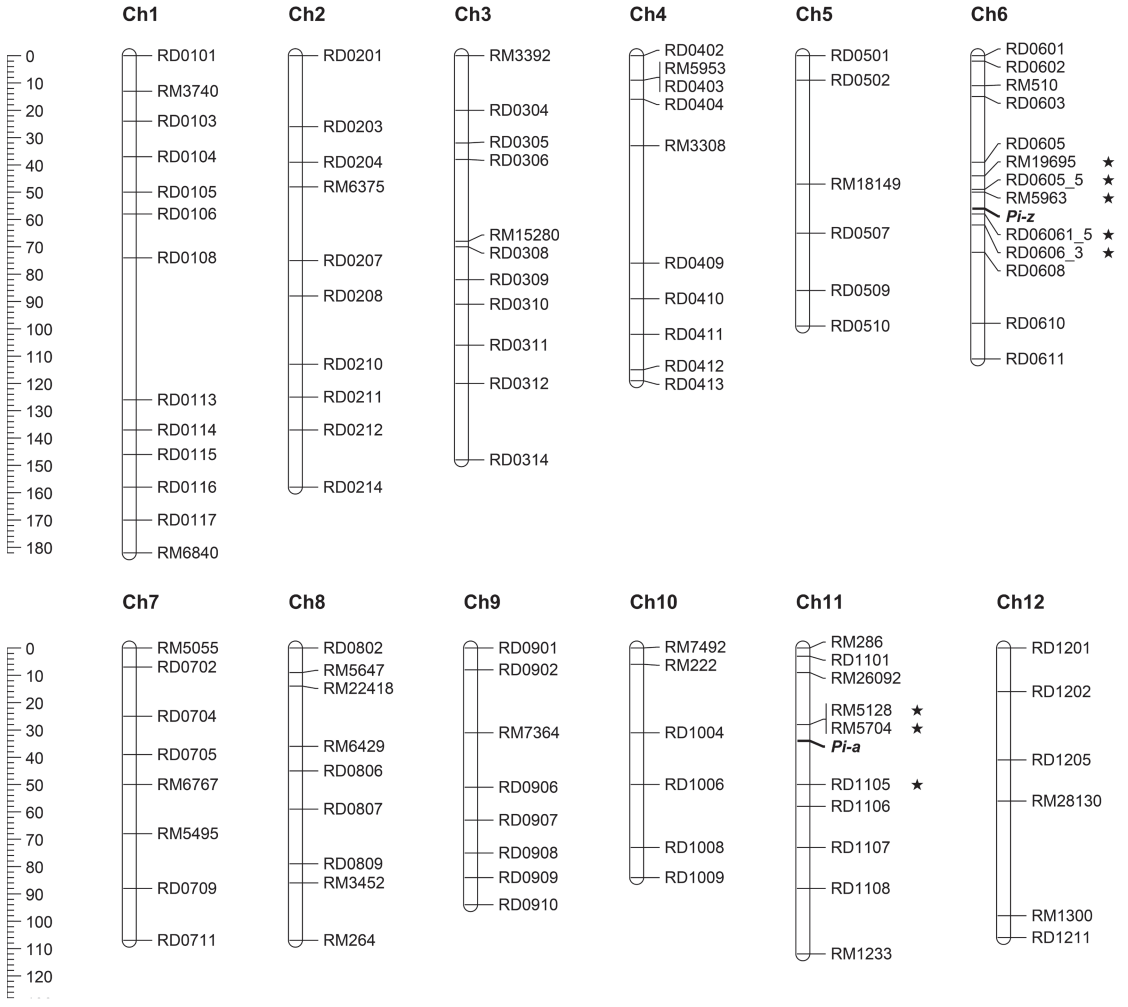


圖 2. 本試驗在「台中秈 17 號」與 'Zenith' 間親本多型性使用 81 個 InDel 與 29 個 SSR 標誌，而各標誌遺傳位點則利用所有分子標誌的引子序列所坐落的 PACs/BACs，將其物理位點歸納至 IRGSP 網站上所示各 PACs/BACs 在 Nipponbare/Kasalath 遺傳圖譜上 (Harushima *et al*. 1998)。各標誌字頭分別以 RD 與 RM 代表 InDel 以及 SSR 標誌，本試驗以星形標示為前景選拔標誌。

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 (*Pigm*R, 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 (unrooted 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	ATCAGTCACAAAATAGACTGTCATG	AGAGCTGTCTTGCCTAAACCAC	741	-334–405	Imam *et al*. (2016)
Pi9_2	GATGGGTGGTTTAGGCAAGACAG	CGACATCCTTAGTCGTCATC	836	380–1,215	Imam *et al*. (2016)
Pi9_3	TCGTCTAGTAGGTAGATGGATAGCAG	TACCTTCACACCGAATGATTCAG	808	1,145–1,952	Imam *et al*. (2016)
Pi9_4'	AAACTTTGAACATGCCGAG	CTTTTCCAACAGGGGTGA	836	1,690–2,528	
Pi9_5'	ATGGTCCTTTATCTTTATCGG	AGCCCTGCCCTATCTGTT	692	2,391–3,082	

[z] 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_3F_3 至 BC_3F_6 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^{-1}，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^{-1}，以基肥 1 次施用；氯化鉀施用量 48 kg ha^{-1}，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'、

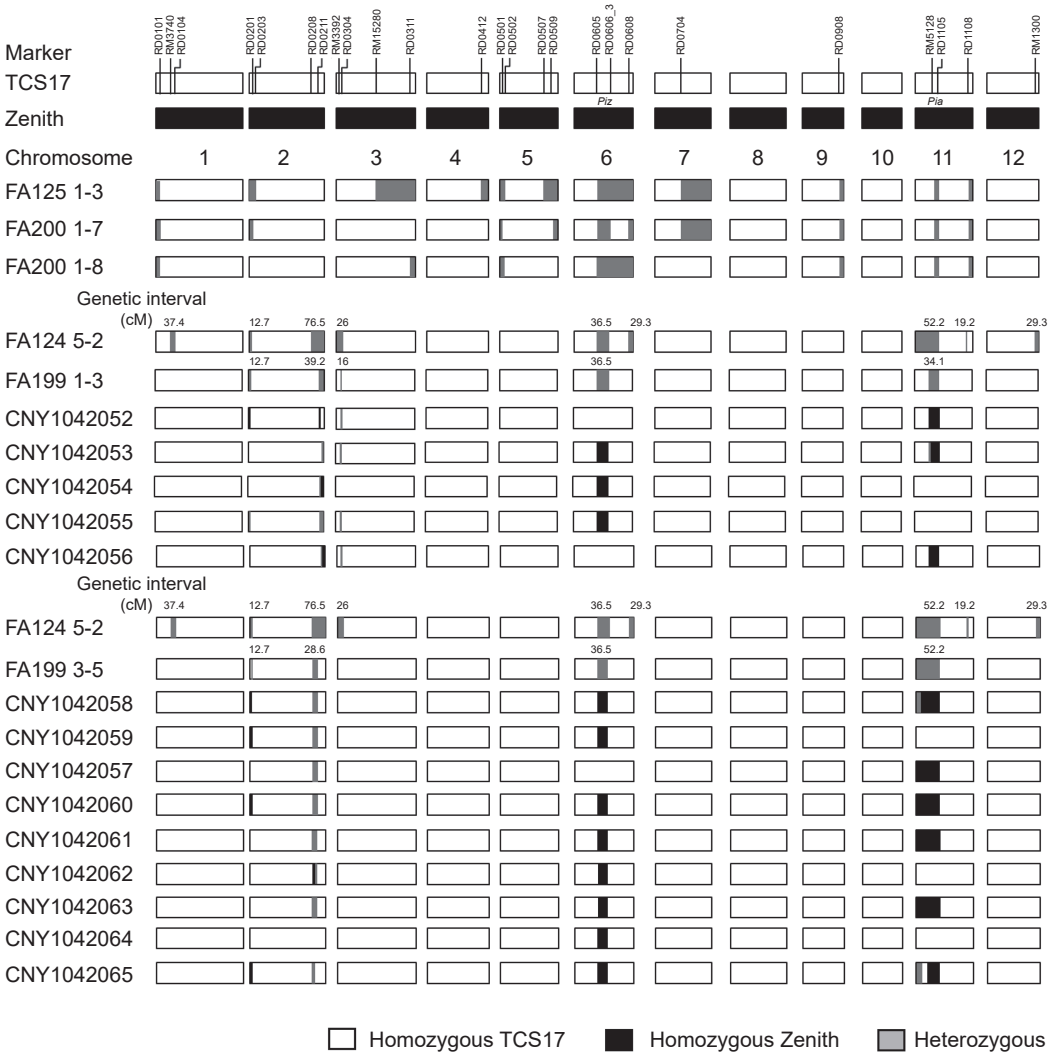
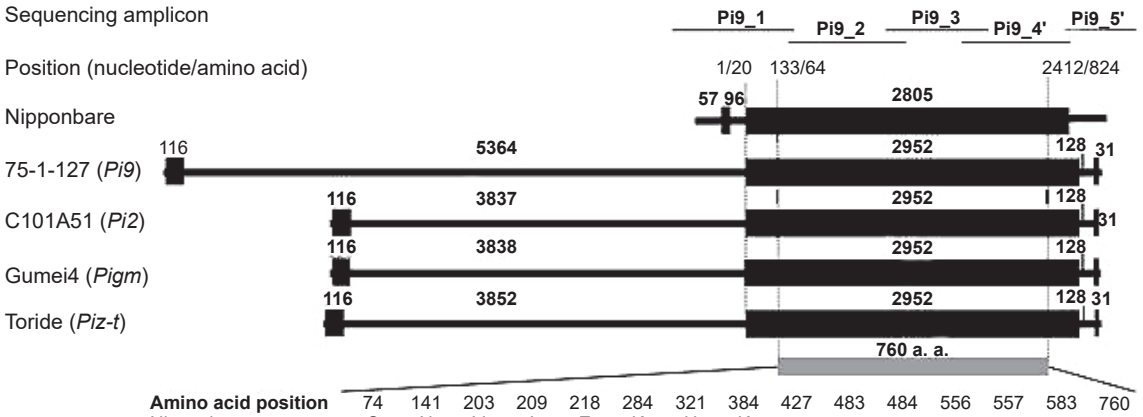


圖 3. 參圖解「台中秈 17 號」各回交世代中稻熱病抗性品系之遺傳組成。白色、黑色與灰色 2 的色塊分別代表同質結合的「台中秈 17 號」、'Zenith' 以及異質結合體基因型，數字則是遺傳區間的距離。

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



Amino acid position	74	141	203	209	218	284	321	384	427	483	484	556	557	583	760
Nipponbare	Q	N	V	I	E	K	H	K	R	D	R	P	S	H	R
Nova	Q	N	V	I	E	K	H	K	R	D	R	P	S	H	R
Mowanggu	Q	N	V	I	E	K	H	K	R	D	R	P	S	H	R
Panda	H	I	I	I	E	K	H	K	R	D	R	P	S	H	R
75-1-127 (*Pi9*)	Q	I	I	I	E	K	Q	K	R	D	R	L	R	V	R
Azucena	Q	I	I	I	E	K	Q	Q	R	D	R	L	R	V	R
Gumei2	Q	N	V	I	E	K	Q	K	R	D	R	P	S	H	R
Gumei4 (*Pigm*)	Q	N	V	I	E	K	Q	K	R	D	R	P	S	H	R
NIL-e1 (*Pi50*)	Q	N	V	I	E	K	Q	K	R	D	R	P	S	H	R
Fukumishiki	H	I	I	I	E	K	Q	K	R	D	R	L	R	P	G
Mercury	H	I	I	I	E	K	Q	K	R	D	R	L	R	P	G
Mars	H	I	I	I	E	K	Q	K	R	D	R	L	R	P	G
Bengal	H	I	I	I	E	K	Q	K	R	D	R	L	R	P	G
Lafitte	H	I	I	I	E	K	Q	K	R	D	R	L	R	P	G
C101A51 (*Pi2*)	Q	N	V	I	E	K	H	K	R	D	R	P	S	H	R
Toride (*Piz-t*)	Q	N	V	I	E	K	H	K	R	D	R	P	S	H	S
Zenith	H	I	I	I	E	K	Q	K	R	D	R	L	R	P	G
Zenith (Chiayi)	H	I	V	I	E	K	H	K	R	D	R	L	R	P	G
TCS17	Q	N	V	F	D	N	H	T	C	G	-	P	S	H	S

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_3F_3 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_3F_3 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_3F_3 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)，

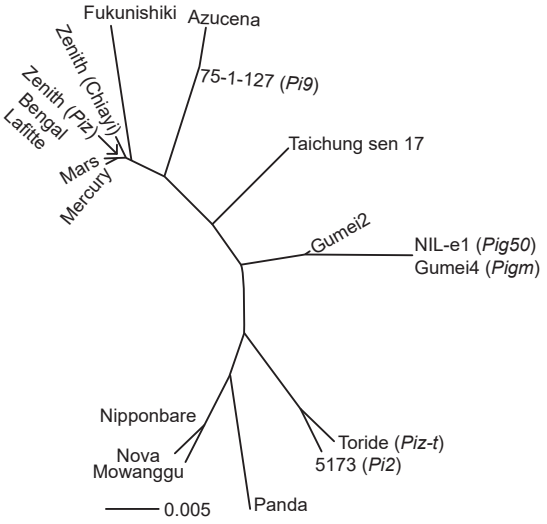


圖 5. 兩親本「台中秈 17 號」與 'Zenith' (Chiayi) 在 *Piz* 基因第 2 外顯子區間上的蛋白質序列歧異並與 17 個前人定序品種繪製無根親緣樹狀圖。

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 BC3F3 lines derived from 'TCS17' in blast screening trials conducted in 2015 and 2016.

	Resistance gene			Disease severity[z]		
BC_3F_3 line	*Pia* locus	*Piz* locus	Background recovery rate	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

[z] The severity score was evaluated based on a 0–9 scale developed by International Rice Research Institute (IRRI).

BC_3F_3 品系產量構成要素及單位面積產量之比較

本試驗 14 個 BC_3F_3 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^{-1}，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^{-1} 及 94.2%，其次為品系 CNY1042057 之 5,280 kg ha^{-1} 及 92.3%，最低為品系 CNY1042064 之 2,530 kg ha^{-1} 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_1 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_1 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_3F_3 line	Panicle number	Spikelets/Panicle	Spikelet fertility (%)	1000-grain weight (g)	Grain yield (kg ha^{-1})	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_3F_3 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_1F_1 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_3F_2 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_2 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 歸納於舊有基因型中，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蘗，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，抑制過度分蘗以使穗型增大，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 (*Pi9*)	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 (*Pigm*)	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 (*Pi50*)	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
Fukunishiki	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
C101A51 (*Pi2*)	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 (*Piz-t*)	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**[z]	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
Mowanggu	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 (*Pi9*)	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 (*Pigm*)	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 (*Pi50*)	R	I	P	S	I	G	Q	H	F	P	K	Q	I	K	Y	Y	N	A	L	L	-	D	E	S	R
Fukunishiki	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 (*Pi2*)	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 (*Piz-t*)	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

[z] 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 (*Pi9*)	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 (*Pigm*)	N	S	T	F	Y	R	R	G	F	S	H	S	L
NIL-e1 (*Pi50*)	N	S	T	F	Y	R	R	G	F	S	H	S	L
Fukunishiki	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 (*Pi2*)	D	I	T	I	Y	L	R	G	V	H	R	A	L
Toride (*Piz-t*)	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. Kajiya, 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_2 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 Phytophy. 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 Phytophy. 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[1], Pei-Chen Wu[2], and Dong-Hong Wu[3,*]

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_1F_1 to BC_3F_2. The background selection, containing 77 InDel and 25 SSR markers, was executed from BC_2F_1 to BC_3F_2 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^{-1}) and the second highest was CNY1042057 (5,280 kg ha^{-1}). 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

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

[2] Research Assistant, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(1):73–81 (2018)
DOI: 10.6156/JTAR.201803_67(1).0007

研究報告

抑芽劑 CIPC、鈷 60 輻射照射對甘藷貯藏後發芽等性狀之影響

黃哲倫[1]　徐敏記[2]　羅淑芳[3]　賴永昌[4,*]

摘要

黃哲倫、徐敏記、羅淑芳、賴永昌。2018。抑芽劑 CIPC、鈷 60 輻射照射對甘藷貯藏後發芽等性狀之影響。台灣農業研究 67(1):73–81。

本研究於甘藷採收前 14 d，將抑芽劑 N-(3-氯苯基) 甲醯胺異丙酯 [Isopropyl-N (3-chorophenyl) carbamate; CIPC] 分別噴施在採收前 14 d 之甘藷地上部莖葉與採收後之塊根，另將採收後之塊根以不同劑量鈷 60 γ 輻射處理。隨後，將上述 3 種處理之甘藷塊根分別貯藏在常溫及 15℃、90% 相對濕度兩種環境下 42 d，以瞭解各處理貯藏後之塊根發芽及腐爛情形。結果顯示，分別於甘藷地上部莖葉及塊根噴施不同濃度甘藷發芽抑制劑 CIPC，並無法有效降低貯藏後之甘藷塊根發芽率，但以 15℃及 90% 相對濕度冷藏，可有效抑制甘藷塊根發芽。甘藷健康管理田採收之甘藷塊根較不會感染病蟲害，而塊根貯藏時塊根發病率亦較低。另外，甘藷二品種經強度 500 GY 之鈷 60 照射後，「台農 57 號」在常溫貯藏 30 d 及「台農 66 號」在常溫貯藏 60 d 之發芽率皆為 0，而貯藏到 90 d，其發芽率皆低於 10%。顯示以 500 GY 鈷 60 照射甘藷塊根，可有效抑制其發芽，使貯藏時間延長到 90 d 以上。

關鍵詞：甘藷、抑芽劑 CIPC、鈷 60 照射、貯藏。

前言

2012–2014 年台灣甘藷平均種植面積為 9,782 ha，塊根總生產量為 223,497 Mg。2012–2014 年之平均出口甘藷塊根總量為 272 Mg，出口總值為 13,114 千元，而其中 96.3 Mg 為冷凍烤藷，新鮮甘藷塊根出口量僅 175.7 Mg (http://www.afa.gov.tw)。從上述資料得知，新鮮甘藷塊根出口量僅占總甘藷生產量之 0.08%，台灣所生產甘藷大部分都供應國內市場，僅極少量銷售至國外市場。國內生產甘藷塊根無法外銷主要原因，係採收後貯藏期短。甘藷塊根採收後在常溫或較高溫度下貯藏，因呼吸作用 (respiration) 增加，造成發芽或糠心 (Zhu *et al*. 2009)。甘藷塊根在較高溫下貯藏，重量減少，主因蒸散作用 (transpiration) 之關係 (Li 2013)。而塊根發芽或糠心、減重等皆造成品質劣化，不利於外銷出口市場。

甘藷塊根於 12–15℃及相對濕度 85–90% 下貯藏，可有效延長其貯藏時間 (Picha 1986, 1987; Li 2013, 2015)；若在高溫下貯藏，呼吸作用增加，較容易發芽；而在室溫 (12–14℃) 下，呼吸作用穩定則較耐貯藏 (Zhu *et al*. 2009)。儘管甘藷塊根於低溫及高濕貯藏可有效延長貯藏時間，但低溫高濕之貯藏設施成本極高。若將採收後甘藷進行人工處理，使其能在常溫條件下長期貯藏亦為研究重點。利用藥劑浸泡採收後甘藷塊根，期抑制發芽則為另一

投稿日期：2017 年 7 月 11 日。接收日期：2017 年 9 月 1 日。
* 通訊作者：davidlai@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] 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系前副研究員。台灣 嘉義市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

研究方向。

Lewthwaite & Triggs (1995) 以不同濃度之次氯酸鈉 (sodium hypochlorite) 分別浸泡 20、60 及 180 min，結果顯示以 9% 次氯酸鈉浸泡 180 min 甘藷塊根，隨後在 20℃下貯藏 102 d 之發芽率為 1%，有效延長甘藷塊根在常溫下之貯藏時間。另外，一種常用在馬鈴薯之抑芽藥劑 N-(3-氯苯基) 甲醯胺異丙酯 [Isopropyl-N (3-chorophenyl) carbamate; CIPC] 亦被使用在甘藷貯藏試驗，甲醯胺異丙酯可有效抑制馬鈴薯發芽，且貯藏 3 wk 後藥劑殘存量降到可接受標準 30 mg kg^{-1} (Mahajan *et al*. 2008)，廣為國外馬鈴薯業者使用。Tseng *et al*. (2003) 將抑芽劑 CIPC 塗抹在甘藷「台農 66 號」整條塊根，並貯藏在 20℃ ± 5℃及 70% ± 5% 相對濕度 (relative humidity; RH) 下 30 d，結果發現抑芽劑 CIPC 可延遲「台農 66 號」甘藷之發芽時間，但對於其主要組成分含量並不會造成顯著變化。

利用放射線輻射處理甘藷塊根，以抑制貯藏時發芽為另一種研究方向，Miu & Tson (1961) 將甘藷品種以 x-ray 照射後貯藏，強度 5,000–10,000 r 劑量處理之甘藷塊根，於貯藏 3 個月後沒有發芽及腐爛情形。Liu *et al*. (2011) 將甘藷塊根以鈷 60 γ 輻射處理，輻射劑量分別為 0.05、0.20、及 0.50 kGy，並貯藏於 18–27℃下 60 d，常溫貯藏未輻射處理之二甘藷品種之發芽率分別為 88.26% 及 96.90%；而以 0.50 kGy 輻射處理之甘藷塊根發芽率分別為 7.87% 及 5.24%，且輻射處理對塊根澱粉含量、呼吸率及 α-澱粉酵素活性沒有顯著影響。然而，El Saadany Raouf *et al*. (1974) 以不同輻射處理，發現可增加甘藷塊根之澱粉酸化及還原糖含量。Lu *et al*. (1986) 以 1.5 及 2.0 kGy 輻射處理之甘藷塊根，澱粉含量降低。總此，可知輻射處理能夠抑制甘藷發芽率，但對澱粉含量等性狀之影響並不明確。

本研究將抑芽劑 CIPC 分別噴施在採收前 14 d 之甘藷地上部莖葉、採收後之甘藷塊根，另將採收後之甘藷塊根以不同劑量之鈷 60 γ 輻射處理，隨後將上述三種處理之甘藷塊根分別貯藏在常溫或 15℃、85–90% 相對濕度兩種環境下 42 d，以瞭解 3 種處理對甘藷塊根貯藏後之發芽及腐爛情形。

材料與方法

CIPC 抑芽劑噴施甘藷地上部莖葉對貯藏後發芽等性狀之影響

2015 年秋作於彰化縣福興鄉設置甘藷「台農57號」健康管理田一處，種植方法包括將前作甘藷莖葉殘株、塊根等清除乾淨、種植前浸水 2 wk、種植種苗採用健康種苗及種植期間設置性費洛蒙以誘殺蟻象等健康管理措施。種植約 5 mo 後，於採收前 14 d 分別於地上部莖葉噴施濃度 200 mg L^{-1} 及 50 mg L^{-1} 之甘藷發芽抑制劑 CIPC。採收後，分別於噴施不同濃度 CIPC 抑芽劑及不噴施 CIPC 之甘藷田區分別取樣 120 個塊根。將取樣之甘藷塊根分別置放於室溫及 15℃、90% 相對濕度冷藏室貯藏 42 d，調查不同濃度 CIPC 處理之甘藷塊根在不同貯藏環境下之鮮重、發芽率及腐爛率等變化情形。

CIPC 抑芽劑噴施甘藷塊根後對貯藏後甘藷發芽等性狀之影響

試驗材料：選用收穫自彰化縣福興鄉秋作的非健康管理田甘藷品種「台農 57 號」與「台農 66 號」塊根，選用外表無傷口、重量介於 250–500 g 間的塊根進行試驗。

試驗方法：甘藷塊根於採收後第 2 天對甘藷塊根進行 CIPC 處理，將 CIPC 粉末溶於 95% 乙醇中調製 3 種 CIPC 濃度，分別為 50、100 及 200 mg L^{-1}，對照組為水溶液。將甘藷塊根浸於處理溶液後取出晾乾，每處理 3 重複，每處理共 15 個塊根。隨後於室溫、15℃及 90% 相對濕度下等兩種環境下貯藏，每週調查 1 次發芽率及腐爛率。超過 1 個以上之芽體長度超過表皮 2 mm，即列為發芽個數。塊根腐爛部分面積達總面積 10% 以上，即列為腐爛個數。發芽率為塊根貯藏期間發芽個數占全部貯藏個數的比率，腐爛率為腐爛個數占全部貯藏個數之比率。

鈷 60 輻射處理甘藷塊根對貯藏後發芽等性狀之影響

試驗材料：選用收穫自彰化縣福興鄉秋作非健康管理田的甘藷「台農 57 號」與「台農 66 號」塊根，外表無傷口、重量介於 250–500 g 間，進行試驗。

試驗方法：甘藷塊根於收穫第 2 天以鈷 60 輻射照射，鈷 60 照射工作委由國立清華大學原科中心進行。4 種照射強度分別為 10、50、100、500 GY，對照組為不照射，每處理 3 重複，每處理共 10 條甘藷塊根。處理後於室溫或 15℃及 RH 90% 下等 2 種環境下貯藏，其後每週調查 1 次發芽率及腐爛情形。

統計分析

試驗各項調查項目數據資料分析，分別利用套裝軟體 SAS EG (SAS Institute, Cary, NC, USA) 進行統計分析，試驗數據以平均值 ± 標準差 (mean ± SD) 表示。

結果

CIPC 抑芽劑噴施甘藷地上部莖葉對塊根貯藏後甘藷發芽等性狀之影響

表 1 為甘藷地上部莖葉噴施不同濃度 CIPC 抑芽劑後塊根在常溫下貯藏 42 d 之根重等性狀變化情形，結果顯示各處理之塊根重皆隨著貯藏時間增加而降低；在前 14 d 皆為 0，從貯藏第 14 天後發芽率開始逐漸增加，到第 28–42 天發芽率皆維持在 80–100% 之間。發病率在 42 d 貯藏期間內皆為 0，顯示於健康管理田採收之甘藷塊根較不會感染病蟲害，貯藏時之塊根發病率亦較低。對甘藷地上部莖葉噴施 200 mg L^{-1}、50 mg L^{-1} 及 0 mg L^{-1} 之塊根重、發芽率及發病率，皆沒有顯著差異。故於採收前 14 d 於地上部莖葉噴施 50 或 200 mg L^{-1} 發芽抑制劑 CIPC，並無法有效降低貯藏後之甘藷塊根發芽率。

表 2 為甘藷噴施不同濃度 CIPC 抑芽劑後之甘藷塊根在 15℃及 RH 90% 貯藏 42 d 之塊根重等性狀變化情形，結果顯示各處理之甘藷塊根重皆隨著貯藏時間增加而降低，而發芽率在 42 d 儲藏期間皆為 0；發病率在 42 d 儲藏時間內亦皆為 0。由此顯示，以 15℃、RH 90% 冷藏塊根，可有效抑制其發芽率。另外，於健康管理田採收之甘藷塊根較不會感染病蟲害，而貯藏時之塊根發病率亦較低。

CIPC 抑芽劑浸泡甘藷塊根對其貯藏後發芽等性狀之影響

圖 1 為甘藷二品種分別以不同濃度 CIPC

表 1. 甘藷地上部莖葉噴施不同濃度 N-(3-氯苯基) 甲醯胺異丙酯 [Isopropyl-N (3-chorophenyl) Carbamate; CIPC] 對其塊根在室溫下貯藏之發芽率及腐爛率。

Table 1. The rates of sprouting and decaying of sweet potato roots stored at room temperature with leaves sprayed with sprouting inhibitor, Isopropyl-N (3-chorophenyl) (CIPC), at two weeks before harvest.

CIPC conc. (mg L^{-1})	Storage performance	Storage time (d)						
		0	7	14	21	28	35	42
0	A (g)[z]	700.7 ± 71.8[y]	674.7 ± 170.6	659.9 ± 168.8	651.0 ± 147.3	639.6 ± 165.9	631.1 ± 164.1	616.3 ± 163.5
	S (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	26.7 ± 1.3	53.3 ± 1.2	80.0 ± 1.2	80.0 ± 1.2	100.0 ± 0.0
	R (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
50	A (g)	675.9 ± 95.7	657.8 ± 115.5	638.9 ± 87.9	630.7 ± 87.3	623.3 ± 86.3	616.6 ± 85.8	605.8 ± 85.6
	S (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	26.7 ± 0.2	73.3 ± 1.1	86.7 ± 1.2	86.7 ±1.2	100.0 ± 0.0
	R (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
200	A (g)	771.4 ± 26.7	742.4 ± 123.0	728.0 ± 121.4	719.1 ± 120.6	708.4 ± 119.1	696.8 ± 118.0	663.2 ± 118.3
	S (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	26.7 ± 0.2	73.3 ± 1.1	86.7 ± 1.2	86.7 ± 1.2	100.0 ± 0.0
	R (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

[z] A: weight of stored root; S: sprouting rate; D: decaying rate.
[y] Mean ± SD.

表 2. 甘藷地上部噴施不同濃度 N-(3-氯苯基) 甲醯胺異丙酯 [Isopropyl-N (3-chorophenyl) Carbamate; CIPC] 對其塊根在 15℃及 90% 相對濕度下之發芽率及腐爛率。

Table 2. The rates of sprouting and decaying of sweet potato roots stored in 15℃ and 90% RH with leaves sprinkled with sprouting- inhibitor, Isopropyl-N (3-chorophenyl) (CIPC), at two weeks before harvest.

CIPC conc. (mg L^{-1})	Storage performance	Storage time (days)						
		0	7	14	21	28	35	42
0	A (g)[z]	355.9 ± 47.0[y]	346.5 ± 45.6	341.0 ± 45.6	336.5 ± 45.5	332.1 ± 45.8	327.9 ± 45.72	323.2 ± 45.5
	S (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	R (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
50	A (g)	433.5 ± 74.8	418.3 ± 70.5	412.9 ± 69.9	406.8 ± 69.0	400.0 ± 68.6	394.3 ± 67.9	388.1 ± 67.4
	S (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	R (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
200	A (g)	356.5 ± 81.7	342.8 ± 79.0	336.6 ± 77.3	331.1 ± 76.3	325.3 ± 75.2	320.1 ± 74.0	314.0 ± 73.0
	S (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	R (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

[z] A: weight of stored root; S: sprouting rate; D: decaying rate.
[y] Mean ± SD.

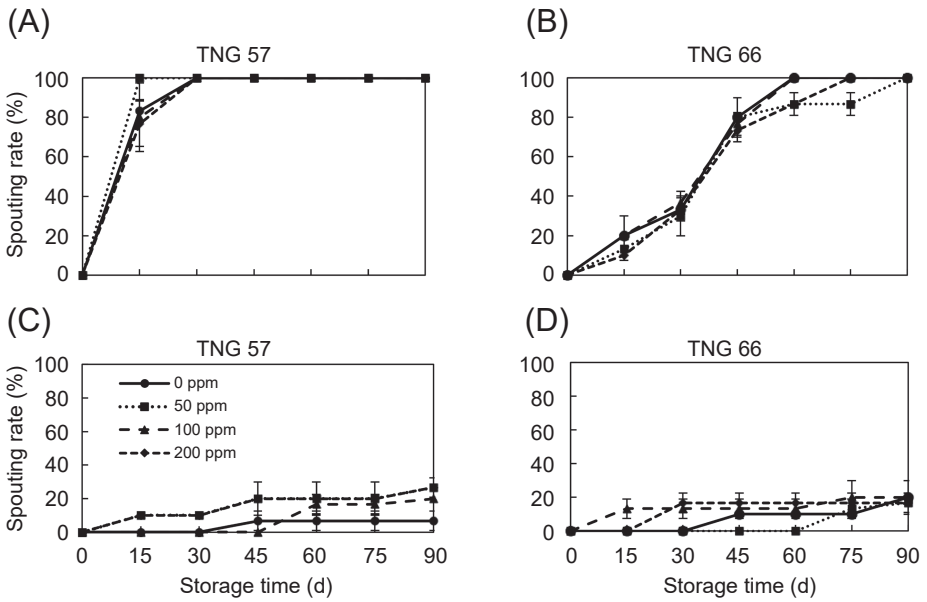


圖 1. 甘藷塊根以抑芽劑 N-(3-氯苯基) 甲醯胺異丙酯 [Isopropyl-N (3-chorophenyl) carbamate (CIPC)] 處理後在常溫 (A)、(B) 及 15℃ (C)、(D) 下貯藏之發芽率。

Fig. 1. Sprouting rates for the storage roots of sweet potato immersed in sprouting inhibitor, Isopropyl-N (3-chorophenyl) (CIPC), and then stored in room temperature (A), (B) and 15℃ , 90% RH (C), (D), respectively.

浸泡後，貯藏於室溫或 15℃及 RH 90% 下之發芽情形。結果顯示，「台農 57 號」與「台農 66 號」兩品種塊根之發芽率皆隨著貯藏時間延長而增加，其等塊根在常溫下貯藏，分別於貯藏後第 15 天及第 60 天發芽率達 100%。兩品種於 15℃及 RH 90% 下貯藏至 90 d，發芽率約 20%。顯示 15℃及 RH 90% 之甘藷塊根貯藏條件，可有效抑制其發芽率。以抑芽劑 CIPC 處

理甘藷塊根，不同濃度 CIPC 處理塊根之發芽率並無顯著差異，顯示抑芽劑 CIPC 處理甘藷塊根並無法有效抑制其發芽。

甘藷兩品種塊根分別以不同濃度 CIPC 浸泡後貯藏於室溫或 15℃及 RH 90% 下 90 d 之腐爛情形，如圖 2，兩品種塊根發芽率皆隨著貯藏時間延長而增加。兩品種塊根在常溫下貯藏，分別於貯藏後第 60 天及 45 天腐爛率達 70%，貯藏後第 90 天達 100%，塊根於 15℃及 RH 90% 下貯藏 45 d 之前，腐爛率約 40% 以下，但腐爛率隨貯藏時間延長而較緩慢增加。顯示浸泡 CIPC 之甘藷塊根於 15℃及 RH 90% 貯藏條件下，短期內可抑制甘藷塊根腐爛率，但長時間貯藏仍有塊根腐爛問題出現。至於不同濃度 CIPC 處理塊根之腐爛率間並無顯著差異，顯示抑芽劑 CIPC 浸泡甘藷塊根並無法有效抑制其腐爛率。

鈷 60 輻射處理甘藷塊根對貯藏後發芽等性狀之影響

甘藷「台農 57 號」及「台農 66 號」分別以不同劑量鈷 60 照射塊根後，貯藏於室溫或 15℃及 RH 90% 下 90 d 之發芽情形，如圖 3。兩品種塊根以 500 GY 之鈷 60 照射後，「台農 57 號」在常溫貯藏 30 d 及「台農 66 號」在 60 d 之發芽率皆為 0，經 90 d 貯藏，其發芽率皆低於 10%。以 10 GY、50 GY、100 GY 鈷 60 照射塊根之發芽率，皆隨貯藏時間延長而增加。不同鈷 60 照射強度處理之甘藷塊根貯藏於 15℃及 RH 90% 下，其發芽率皆偏低，至 20% 以下。顯示 500 GY 鈷 60 照射甘藷塊根在常溫貯藏下可有效抑制發芽率，在 15℃及 RH 90% 之貯藏條件下配合鈷 60 照射強度可抑制甘藷塊根之發芽。

圖 4 為甘藷兩品種分別以不同劑量鈷 60 照射甘藷塊根後，貯藏於室溫及 15℃或 RH 90% 下 90 d 之腐爛情形。塊根在 2 種貯藏條件下，其腐爛率皆隨貯藏時間延長而增加，且貯藏超過 70 d 時，其腐爛率皆高於 60% 以上。由知，鈷 60 照射強度並無法抑制甘藷塊根腐爛。

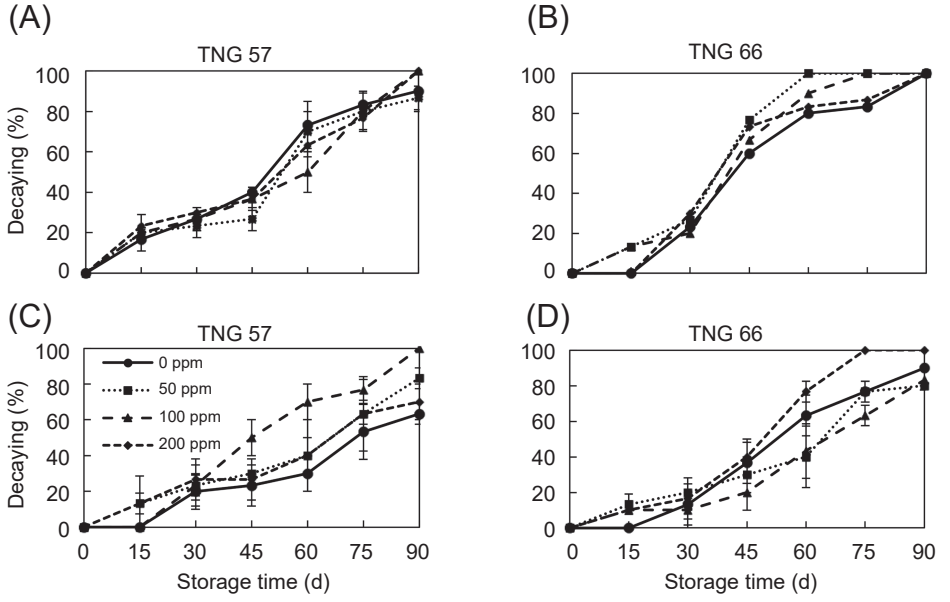


圖 2. 甘藷塊根以抑芽劑 N-(3-氯苯基) 甲醯胺異丙酯 [Isopropyl-N (3-chorophenyl) carbamate (CIPC)] 處理後在常溫 (A)、(B) 及 15℃、90% 相對濕度 (C)、(D) 貯藏下之腐爛率。

Fig. 2. Decaying rates for the storage roots of sweet potato immersed in sprouting inhibitor, Isopropyl-N (3-chorophenyl) (CIPC), and then stored at room temperature (A), (B) and 15℃, 90% RH (C), (D), respectively.

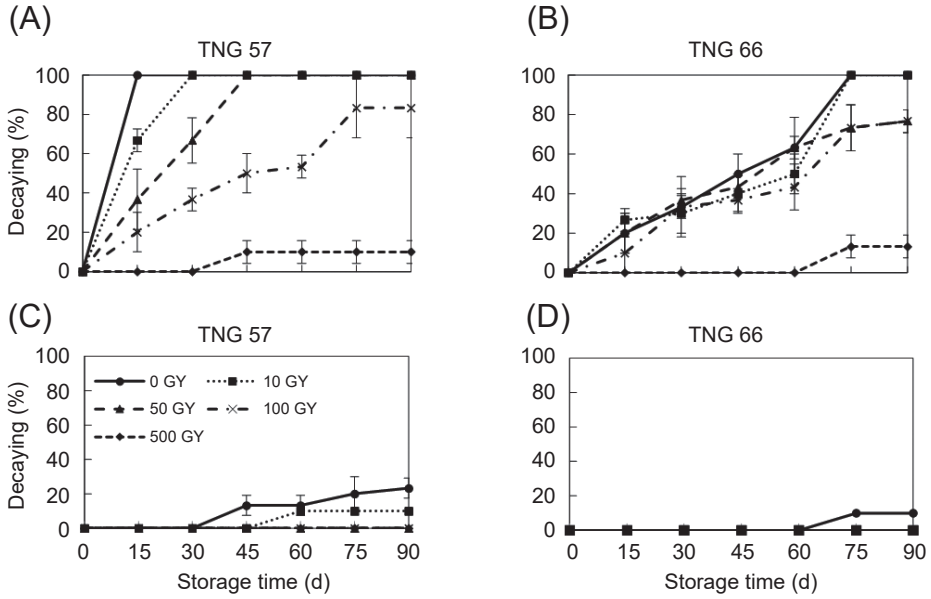


圖 3. 甘藷塊根以鈷 60 照射處理後在常溫 (A)、(B) 及 15℃、90% 相對濕度 (C)、(D) 下儲藏之發芽率。

Fig. 3. Sprouting rates for the storage roots of sweet potato exposed to Co60, and then stored at room temperature (A), (B) and 15℃, 90% RH (C), (D).

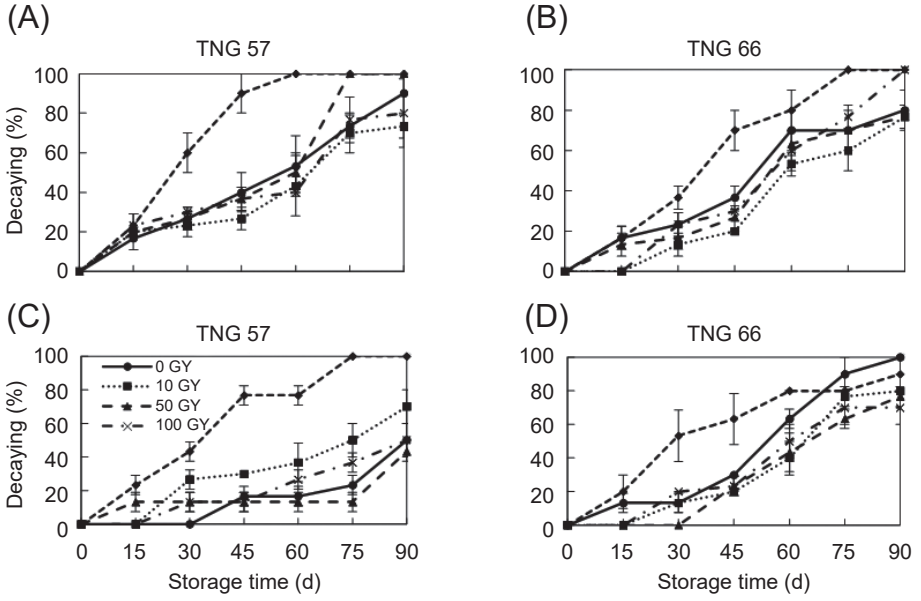


圖 4. 甘藷塊根以鈷 60 照射處理後在常溫 (A)、(B) 及 15℃、90% 相對濕度 (C)、(D) 下儲藏之腐爛率。

Fig. 4. Decaying rates for the storage roots of sweet potato exposed to Co60, and then stored at room temperature (A), (B) and 15℃, 90% RH (C), (D).

討論

甘藷塊根收穫後不耐貯藏，在室溫下貯藏約 2 wk 就開始發芽，造成塊根澱粉含量減少，品質及口感也急速降低，如何延長甘藷

塊根之貯藏期限過去一直是研究重點。Picha (1986) 將甘藷塊根貯藏在 15.6℃及 RH 90% 下 50 wk，並沒有發芽現象，且失重率介於 6.7–16.1%。主要因該貯藏條件可降低塊根呼吸作用及蒸散作用，使失重率大幅度下降。本試驗結果顯示，甘藷「台農 57 號」塊根貯藏在 15℃及 RH 90% 下 42 d (表 2) 及兩品種塊根貯藏在 15℃及 RH 90% 下 90 d (圖 1、圖 3) ，其發芽率約 20% 以下。因此，在 15℃及 RH 90% 下貯藏，可有效抑制甘藷塊根發芽，此與其他研究結果相似 (Picha 1986; Li 2013; Sheibani *et al*. 2014; Li 2015)。

至於腐爛率方面，採收自健康管理田之甘藷塊根，較不容易攜帶病害。在室溫及 15℃或 RH 90% 下貯藏 42 d，塊根沒有腐爛情形 (表 1、表 2)；來自非健康管理田區之甘藷塊根，無論在室溫或 15℃、RH 90% 下貯藏，腐爛率皆於 50–100% 間 (圖 2、圖 4)。此結果與 Afek & Orenstein (2003) 將甘藷塊根於 13℃及 RH 90% 下貯藏 5 個月，其塊根腐爛率達 86% 之結論相似。故採收自非健康管理田區之甘藷塊根於貯藏前需施用藥劑 iprodione 或蒸氣處理，以有效抑制腐爛率 (Afek & Orenstein 2003)。

本試驗證實低溫貯藏可抑制甘藷塊根發芽率，但尋找有效之常溫下貯藏方法，仍然是很多研究人員努力的目標。在馬鈴薯使用之抑芽藥劑 CIPC 被使用在甘藷貯藏之試驗上，Tseng *et al*. (2003) 將甘藷塊根塗抹 CIPC 後於室溫下貯藏 30 d，可延其發芽時間。然而，本試驗於採收前 14 d 於「台農 57 號」塊根地上部莖葉噴施不同濃度抑制劑 CIPC，或以不同濃度 CIPC 浸泡剛採收後之兩品種塊根，2 種抑芽劑處理之塊根在常溫下貯藏，發芽率皆偏高 (表 1、圖 1)。此結果顯示，抑芽劑 CIPC 於採收前噴施於地上部莖葉，並無法抑制所採收塊根在常溫貯藏時之發芽現象；而將採收後之塊根浸泡於抑芽劑 CIPC，亦無法抑制採收後甘藷塊根在常溫貯藏時之發芽現象。此結果與 Tseng *et al*. (2003) 結論並不相同，可能是使用抑芽劑 CIPC 之方式不同所造成。Tseng *et al*. (2003) 將抑芽劑 CIPC 塗抹在甘藷塊根表皮，但本試驗採以浸泡甘藷塊根方式，而造成抑芽程度不同，故需進一步釐清抑芽劑 CIPC 之有效應用方式及濃度。

利用放射線抑制甘藷塊根發芽，以往研究發現有良好效果 (Miu & Tson 1961; Liu *et al*. 2011)，本研究發現兩品種經 500 GY 之鈷 60 照射後，在常溫貯藏 30 d 及 60 d 之發芽率皆為 0，而貯藏到 90 d，其發芽率皆低於 10% (圖 3)，此結果與上述的研究結論吻合。另外，不同鈷 60 照射強度處理之甘藷塊根貯藏於 15℃及 RH 90% 下，其發芽率皆偏低於 20% 以下 (圖 3)。顯示放射線照射甘藷塊根後，配合 15℃及 RH 90% 之條件貯藏，可有效抑制甘藷塊根之發芽率。然而不同劑量鈷 60 照射甘藷塊根後，貯藏於室溫及 15℃或 RH 90% 下超過 70 d，其腐爛率皆高於 60% 以上。顯示鈷 60 照射並無法抑制甘藷塊根腐爛率，可能原因為鈷 60 照射有效抑制甘藷芽點生長，因而抑制甘藷塊根發芽率。可能 500 G 劑量之鈷 60 照射無法完全殺死甘藷塊根之病菌，剩餘病菌很快在甘藷塊根增殖，故無法有效抑制塊根腐爛率，惟真正原因仍需要進一步試驗加以證實。

引用文獻

Afek, U. and J. Orenstein. 2003. Decreased sweetpotato decay during storage by steam treatments. Crop Prot. 22:321–324.

El Saadany Raouf, M. A., A. El Safti Abd El Fatah, and M. El Saadany Farag. 1974. Effect of gamma irradiation on Egyptian sweet potato starch. Starke 26:190–192.

Lewthwaite, S. L. and C. M. Triggs. 1995. Sprout suppression in sweetpotato roots following immersion in sodium by hypochlorite solutions. New Zeal. J. Crop Hort. 23:283–287.

Li, H. C. 2013. Storage temperature affects quality of fresh tuberous roots of sweet potato during storage period. J. Taiwan Agric. Res. 62:174–183. (in Chinese with English abstract)

Li, H. C. 2015. Effect of curing and hot water treatment on the storage of sweet potato. Crop Environ. Bioinform. 12:95–104. (in Chinese with English abstract)

Liu, H. J., W. Wang, P. X. Li, J. J. Li, and K. H. Huang. 2011. Preservation effect of irradiation on two varieties of sweet potato. Jiangsu J. Agric. Sci. 27:160–163. (in Chinese with English abstract)

Lu, J. Y., S. White, P. Yakubu, and P. A. Loretan. 1986. Effect of gamma radiation on nutritive and sensory qualities of sweet potato storage roots. J. Food Qual. 9:425–435.

Mahajan, B. V. C., A. S. Dhatt, K. S. Sandhu, and A. Garg. 2008. Effect of CIPC (isopropyl-N (3-chlorophenyl) carbamate) on storage and processing quality of potato. J. Food Agric. Environ. 6:34–38.

Miu, T. S. and K. T. Tson. 1961. A study on the effect of x-ray exposure on the storage quality of sweet potato and on the nutrient condition contained of the tuber. Agric. Res. 10(2):7–15. (in Chinese with English abstract)

Picha, D. H. 1986. Weight loss in sweet potatoes during curing and storage: Contribution of transpiration and respiration. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 111:889–892.

Picha, D. H. 1987. Carbohydrate changes in sweet potatoes during curing and storage. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 112:89–92.

Sheibani, E., T. Kim, D. S. Wang, J. L. Silva, R. Arancibia, F. B. Matta, and D. Picha. 2014. Optimization of hot water treatment for sprout and spoilage inhibition of cured sweet potato. J. Food Process. Preserv. 38:493–498.

Tseng, Y. C., F. I. Lin, T. E. Lo, and C. Y. Chang. 2003. Effect of coating and sprout-inhibiting treatments on the chemical composition change of TN 66 sweet potato during storage. J. Da-Yeh Univ. 12:95–101. (in Chinese with English abstract)

Zhu, H., H. M. Li, A. J. Chang, F. Xu, and J. Sun. 2009. Effect of storage temperature on respiration intensity of sweet potato. Jiangsu Agric. Sci. 4:299–300. (in Chinese)

Effects of Treatments of Sprouting Inhibitor CIPC and Co60 on Sprouting and Decaying Rates of the Storage Roots of Sweet Potato

Che-Lun Huang[1], Min-QI Xu[2], Shu-Fang Lo[3], and Yung-Chang Lai[4,*]

Abstract

Huang, C. L., M. Q. Xi, S. F. Lo, and Y. C. Lai. 2018. Effects of treatments of sprouting inhibitor CIPC and Co60 on sprouting and decaying rates of the storage roots of sweet potato. J. Taiwan Agric. Res. 67(1):73–81.

Three experimental treatments on sprouting and decaying rates of the storages of sweet potato were studied in this research, including spraying sprouting inhibitor Isopropyl-N (3-chorophenyl) (CIPC) to the leaves at two weeks before harvest, dipping storage roots in CIPC solutions after harvest, and exposure of storage roots to different intensities of Co60 after harvest. The treated roots were stored at room temperature or 15℃, 90% RH for 6 wk before investigating their sprouting and decaying rates. Results showed that the sprouting inhibitor CIPC spraying on the leaves of storage roots would not inhibit the sprouting of sweet potato. However, the sprouting of the storage roots stored at 15℃ and 90% RH were inhibited substantially. The storage roots produced from a healthy field management practice showed little disease and insect infections, and the rates of disease-infected roots were lower during storage. For storage roots exposed to 500 GY of Co60, the sprouting rate was zero for 'TNG 57' stored at room temperature for 30 d as well as for 'TNG 66' stored at room temperature for 60 d, and the sprouting rate was 10% for both cultivars stored for 90 d. Overall, treatment of 500 GY of Co60 effectively inhibited the sprouting of storage roots of sweet potato, and storage time may be extended up to 90 d.

Key words: Sweet potato, Sprout inhibitor, CIPC, Co60 exposure, Storage.

Received: July 11, 2017; Accepted: September 1, 2017.

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

[1] Assistant Research Fellow, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[2] Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Retired Associate Research Fellow, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[4] Research Fellow and Head, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(1):82–93 (2018)
DOI: 10.6156/JTAR.201803_67(1).0008

研究報告

2009 至 2014 年台灣水稻新育成品種 (系) 對於稻熱病罹病反應之研究

周思儀 [1]　廖大經 [1,*]

摘要

周思儀、廖大經。2018。2009 至 2014 年台灣水稻新育成品種 (系) 對於稻熱病罹病反應之研究。台灣農業研究 67(1):82–93。

本研究為瞭解歷年台灣水稻新育成品種 (系) 對於稻熱病抗感性之數量變化趨勢，以作為育種研究人員未來擬定育種策略的參考，乃將 2009–2014 年期間 9 個台灣之農業試驗改良機關所育成之 1195 個水稻品種 (系)，於行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所稻熱病檢定病圃進行稻熱病特性檢定。感病對照品種 'Lomello' 及抗病對照品種「台農 70 號」於歷年檢定期間，其罹病反應均穩定表現出感病及抗病反應，顯示病圃發病條件一致，檢定結果可靠。粳型稻有 1,021 個品種 (系) 參加檢定試驗，在水田式病圃抗葉稻熱病與穗稻熱病之品種 (系) 比率各為 65.23% 及 43.39%；在旱田式病圃第一期作與第二期作抗葉稻熱病之品種 (系) 比率各為 48.58% 及 49.27%。秈型稻參試品種 (系) 有 174 個，在水田式病圃抗葉稻熱病及穗稻熱病之品種 (系) 比率各為 96.55% 及 90.23%；在旱田式病圃第一期作與第二期作抗葉稻熱病之品種 (系) 比率各為 95.98% 及 96.55%。進一步分析發現，部分粳型稻品種 (系) 對於葉稻熱病及穗稻熱病之抗性反應不一致，約有 22% 的品種 (系) 在水田式病圃表現抗葉稻熱病而對穗稻熱病呈現感病反應，因此新品系進入高級產量比較試驗後須檢定穗稻熱病罹病反應以免誤判。相同品種 (系) 在旱田式病圃之罹病反應較水田式病圃嚴重，可於育種初級世代利用旱田病圃進行大量淘汰感病材料，以提高育種效率。另分析結果顯示，粳型稻品種 (系) 在旱田式病圃之期作效應表現不一致，秈型稻之期作效應均未達顯著水準。

關鍵詞：水稻、稻熱病、稻熱病病圃。

前言

水稻係台灣目前栽培面積最大的單一糧食作物，稻米則仍是國人主要糧食及農民生計來源之一。近年來由於社會經濟進步及飲食習慣的改變，稻米每人年均消費量逐年減少，同時加上國際稻米開放進口的壓力，因此水稻的育種目標不再以追求高產為主，轉而開發米質優良或具有其他機能作用之新品種。然而，台灣多數糧食或飼料均須仰賴進口，目前因氣候變遷導致極端天氣發生頻率增加，對於世界糧食生產造成極度影響。因此，如何適度維持台灣稻米穩定生產，實屬攸關國家安全及社會民生安定的戰略議題。

稻熱病是由 *Magnaporthe grisea* 所引起的水稻主要病害，在台灣已經成為風土病，每年都會發生。水稻在任何生長時期與部位都有可能罹患稻熱病，而氣象因子對於稻熱病罹病與擴散程度影響很大。稻熱病主要區分為最高分蘖期罹患之葉稻熱病，以及抽穗期罹患之穗稻熱病。某些品種植株雖然感染葉稻熱病，但有部分恢復生長能力。若感染穗稻熱病導致稻穗白化不稔，對稻米產量及品質均造成難以彌補的損失。稻熱病防治有藥劑防治與種植抗病品種等兩種方式，其中又以種植抗病品種所花費

投稿日期：2017 年 6 月 10 日；接受日期：2017 年 9 月 1 日。
* 通訊作者：djliao@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。

防治成本最少，對環境也最為友善。設置稻熱病病圃針對新育成品種 (系) 進行罹病反應檢定，是開發抗病品種之育種計畫中最為關鍵且不可或缺的步驟。病圃所處環境位置是否適於發病、田區規劃是否合理及發病狀況是否穩定一致，對於檢定結果的可靠度都有相當影響。

天然病圃之稻熱病感染屬於多次循環感染，病圃內菌株生理小種之組成複雜而多變，同一品種 (系) 在不同年度或期作亦可能因田區微氣象因子改變造成前後檢定結果不一致。稻熱病病圃特性檢定結果，除提供育種人員作為選汰品系的參考依據外，長期資料的彙整分析，更可發現許多深具價值的流行病學資訊。例如，台灣稻熱病流行與期作間的相關性，早期研究認為粳型稻在第 1 期作較第 2 期作容易罹病，秈型稻在期作間的罹病反應模式則與粳型稻相反 (Chen 1990)。後來，又發現秈型稻罹病反應的期作效應表現不一致 (Chen *et al*. 2004)，近來則發現粳型稻罹病反應的期作效應表現也變得不一致 (Liao & Chen 2011)。另在抗病育種實務上，品種 (系) 之葉稻熱病罹病反應是否可作為評估穗稻熱病抗性的先期指標，以節省部分育種人力與時間，一般認為是可行的 (Chen *et al*. 2006)，或者至少可在育種品系初級世代作為選拔抗病品系的參考 (Chen 1990; Chen *et al*. 2004)。

本試驗係將 2009–2014 年共 6 年 12 個期作，由台灣 9 個稻作試驗改良機關所提供之參試水稻品種 (系)，在嘉義農業試驗分所 (以下簡稱本分所) 病圃之稻熱病檢定結果做一彙整分析，以期進一步瞭解歷年台灣水稻新育成品種 (系) 對於稻熱病抗感性之數量變化趨勢，期以作為提供稻作抗病育種人員未來擬定育種策略之參考。

材料與方法

參試水稻品種 (系)

本研究收集於 2009–2014 年期間由農業試驗所與本分所，以及桃園、苗栗、台中、台南、高雄、花蓮及台東區等 9 個農業改良場選育之品種 (系)，包括區域試驗品系、高級產量比較試驗品系及主要推廣良質品種之參試水稻品種 (系)，共計 1,195 個進行試驗 (表 1)。

稻熱病病圃設置

參試品種 (系) 於 2009–2014 年種植於本

表 1. 2009–2014 年參加稻熱病檢定之水稻品種 (系) 數量。

Table 1. The number of rice varieties/lines tested for rice blast test in Chiayi, Taiwan in 2009–2014.

	2009		2010		2011		2012		2013		2014	
Breeding agency[z]	Jap[y]	Ind	Jap	Ind	Jap	Ind	Jap	Ind	Jap	Ind	Jap	Ind
TARI	24	0	24	0	25	0	33	0	34	0	37	0
CAES	24	2	23	2	19	2	23	6	22	10	14	20
TYDARES	23	0	21	0	22	0	22	0	19	0	21	0
MLDARES	6	0	8	0	6	0	8	0	8	0	8	0
TCDARES	17	19	17	19	17	19	19	20	16	19	21	23
TNDARES	25	0	23	0	23	0	27	0	22	0	25	3
KHDARES	17	3	15	3	19	3	24	0	21	0	22	1
HLDARES	16	0	17	0	15	0	15	0	17	0	19	0
TTDARES	12	0	13	0	13	0	13	0	11	0	16	0
Total	164	24	161	24	159	24	184	26	170	29	183	47

[z] TARI: Taiwan Agricultural Research Institute; CAES: Chiayi Agricultural Experiment Station; TYDARES: Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station; MLDARES: Miaoli District Agricultural Research and Extension Station; TCDARES: Taichung District Agricultural Research and Extension Station; TNDARES: Tainan District Agricultural Research and Extension Station; KHDARES: Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station; HLDARES: Hualien District Agricultural Research and Extension Station; TTDARES: Taitung District Agricultural Research and Extension Station.

[y] Jap: japonica rice; Ind: indica rice.

分所稻熱病病圃 (經度 120°28’03”E，緯度 23°29’05”N)，稻熱病病圃分為水田式及旱田式兩類，茲分別說明設置方法如下。

水田式病圃：每個年度之第 1 期作設置水田式病圃，參試水稻品種 (系) 育苗至 3–5 葉齡時，移植於水田式病圃。種植採順序排列，重複 2 次，每品種 (系) 種植 2 行，行株距 25 cm × 20 cm，每行 7 叢，多本植，每叢 3–5 支苗。每行前後及每間隔 2 個品種 (系) 均種植感病品種 ‘Lomello’ 作為感病源以促進發病，另每間隔 10 個品種 (系) 種植 1 行抗病品種「台農 70 號」作為對照品種。肥料施用量每公頃氮素 (N) 320 kg、磷酐 (P_2O_5) 54 kg 及氧化鉀 (K_2O) 60 kg。其中，氮肥 1/5 量及磷、鉀肥全量用做基肥，其餘氮肥分別在插秧後 15、25、35 d 及抽穗前 25 d 施用。水稻植株進入最高分蘗期後將田水排乾，並於每日早晨及黃昏噴灑水霧各 1 次，盡量使其葉面保持水滴以促進發病及擴大病勢蔓延，至葉稻熱病調查結束後 1 wk 停止噴灑。其他栽培管理則依照一般慣行方式實施，並加強稻熱病以外之病蟲害防治，以免影響檢定結果。

旱田式病圃：每個年度之第一及第二期作均設置旱田式病圃，參試水稻品種 (系) 以種子條播方式種植。種植採順序排列，重複 2 次，每品種 (系) 種植 1 行，每行播種約 5 g 種子，行長 50 cm，行距 10 cm，每行前後及每間隔 10 行均種植感病品種 ‘Lomello’ 做為感病源以促進發病，同時中間夾播 1 行抗病品種「台農 70 號」做為對照品種。肥料施用量每公頃氮素 (N) 240 kg、磷酐 (P_2O_5) 36 kg 及氧化鉀 (K_2O) 48 kg。整地時氮肥 1/4 量及磷、鉀肥全量用做基肥與土壤混合均勻，剩餘氮肥分別在播種後 15、25、35 d 作為追肥施用。稻種發芽後，每日在葉面上噴灑水霧數次，以維持葉面適當濕度促進發病。

稻熱病調查方法及標準

葉稻熱病：依據國際水稻研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 訂定之葉稻熱病罹病度評估方法及標準 (IRRI 2002)，以目測方式於發病初期、中期及末期各調查 1 次。每品種 (系) 調查 10 叢，統計平均罹病等級，最後以 3 次調查、各 2 重複之評估結果中最嚴重之等級，作為該品種 (系) 當年度罹病程度之代表。罹病等級分為 0–9 級記載，罹病等級對應至罹病反應，可分為 0 級：極抗 (HR)；1–3 級：抗 (R)；4–5 級：中抗 (MR)；6 級：中感 (MS)；7–8 級：感 (S)；9 級：極感 (HS)。

穗稻熱病：依據 IRRI (2002) 訂定之穗稻熱病罹病度評估方法及標準，於水稻抽穗後 30 d 調查 1 次，調查罹病穗數。若 1 穗中有 3 枝梗以上罹病者則視之為罹病穗，每叢罹病率計算公式如下：

$$\text{罹病率 (\%)} = (\text{罹病穗數/全穗數}) \times 100\%$$

每品種 (系) 調查 10 叢，統計平均罹病等級，以 2 重複之評估結果中最嚴重之等級，作為該品種 (系) 當年度罹病程度之代表。罹病等級分為 0–9 級記載，罹病等級對應至罹病反應，可分為 0 級：極抗 (HR)；1 級：抗 (R)；3 級：中抗 (MR)；5 級：中感 (MS)；7 級：感 (S)；9 級：極感 (HS)。

統計分析

本研究比較歷年參試品種 (系) 對於不同類型稻熱病 (葉稻熱病 vs. 穗稻熱病)、不同病圃 (水田式病圃 vs. 旱田式病圃) 及不同期作間 (第 1 期作 vs. 第 2 期作) 之罹病反應比率是否有顯著差異，由於每參試品種 (系) 同時接受兩種處理因子，因此屬於類別資料成對比較 (paired comparison)。我們將罹病反應為抗級 (R) 與中抗級 (MR) 合併歸類為抗級，中感級 (MS)、感級 (S) 及極感級 (HS) 合併歸類為感級以便於比較分析，罹病反應比率的計算方式如下：假設某年度參試品種 (系) 總數 n，在處理 A (例如水田式病圃) 與處理 B (例如旱田式病圃) 中均為抗級的有 a 個參試品種 (系)；在處理 A 為感級而處理 B 為抗級者有 b 個；在處理 A 為抗級而處理 B 為感級者有 c 個；在處理 A 與處理 B 中均為感級有 d 個，則處理 A 之抗級反應比率為 (a + c) / n，處理 B 之抗級反應比率為 (a + b) / n。採用 McNemar test 進行不同

處理罹病反應比率之成對比較，並使用程式語言 “R version 3.3.3” 內建套件 “stats” 之 mcnemar.test 函數完成計算分析工作。

結果

對照品種對於稻熱病之罹病反應

對照品種 ‘Lomello’ 及「台農 70 號」在本分所稻熱病病圃之罹病反應如表 2 所示，在水田式病圃中抗病品種「台農 70 號」對於葉稻熱病罹病反應歷年表現均一致為抗級反應，穗稻熱病則表現中抗至抗級反應；感病品種 ‘Lomello’ 對於葉稻熱病罹病反應歷年表現為中感至極感級，穗稻熱病表現為感級至極感級。在旱田式病圃中抗病品種「台農 70 號」對於葉稻熱病罹病反應歷年期作表現為中抗至抗級；感病品種 ‘Lomello’ 對於葉稻熱病罹病反應除 2014 年第 1 期作為中感級外，其他年度期作則表現感級至極感級。以上結果顯示抗病及感病對照品種在稻熱病圃自然發病情況下，其罹病反應表現穩定，因此本病圃檢定結果有相當的可靠度。

參試品種 (系) 對稻熱病罹病反應檢定結果

水田式病圃：2009–2014 年參試品種 (系) 對於稻熱病罹病反應的檢定結果如表 3，其中粳型稻參試品種 (系) 共計 1,021 個，葉稻熱病罹病反應表現為抗級與中抗級者合計有 666 個，占全部參試品種 (系) 之 65.23%，罹病反應表現為中感、感與極感級者合計有 355 個，占全部參試品種 (系) 之 34.77%；穗稻熱病罹病反應表現為抗級與中抗級者合計有 443 個，占全部參試品種 (系) 之 43.39%，罹病反應表現為中感、感與極感級者合計有 576 個，占全部參試品種 (系) 之 56.42%。

秈型稻參試品種 (系) 共計 174 個，葉稻熱病罹病反應表現為抗級與中抗級者合計有 168 個，占全部參試品種 (系) 之 96.55%，罹病反應表現為中感、感與極感級者合計有 6 個，占全部參試品種 (系) 之 3.45%；穗稻熱病罹病反應表現為抗級與中抗級者合計有 157 個，占全部參試品種 (系) 之 90.23%，罹病反應表現為中感、感與極感級者合計有 17 個，占全部參試品種 (系) 之 9.77%。

旱田式病圃：2009–2014 年參試品種 (系) 在旱田式病圃對於葉稻熱病罹病反應的檢定結果如表 4，其中粳型稻參試品種 (系) 共計 1,021 個，第 1 期作罹病反應表現為抗級與中抗級者合計有 496 個，占全部參試品種 (系) 之 48.58%，罹病反應表現為中感、感與極感級者合計有 524 個，占全部參試品種 (系) 之 51.32%；第 2 期作罹病反應表現為抗級與中抗級者合計有 503 個，占全部參試品種 (系) 之 49.27%，罹病反應表現為中感、感與極感級者合計有 518 個，占全部參試品種 (系) 之 50.73%。

表 2. 2009–2014 年對照品種「台農 70 號」及 ‘Lomello’ 在本分所稻熱病病圃之稻熱病檢定結果。

Table 2. Evaluation of rice varieties ‘Tainung 70’ and ‘Lomello’ for resistance to leaf and panicle blast in the paddy and the upland nurseries in 2009–2014.

	Tainung 70				Lomello			
	Paddy nursery		Upland nursery		Paddy nursery		Upland nursery	
Year	LB[z]	PB	1st crop season	2nd crop season	LB	PB	1st crop season	2nd crop season
2009	MR[y]	MR	R	R	S	HS	HS	HS
2010	R	R	R	R	HS	HS	HS	HS
2011	R	R	MR	R	S	HS	HS	HS
2012	R	R	R	R	MS	HS	HS	HS
2013	R	-	MR	MR	S	S	HS	S
2014	R	MR	MR	R	MS	S	MS	HS

[z] LB: leaf blast; PB: panicle blast.
[y] R: resistant; MR: moderate resistant; MS: moderate susceptible; S: susceptible; HS: highly susceptible.

表 3. 2009–2014 年參試品種 (系) 在水田式病圃之稻熱病檢定結果。

Table 3. Evaluation of rice varieties/lines for resistance to leaf and panicle blast in the paddy nursery in 2009–2014.

Year	No. of entries tested	Resistant				Moderate resistant				Moderate susceptible				Susceptible				Highly susceptible			
		No. of entries		% of entries		No. of entries		% of entries		No. of entries		% of ntries		No. of entries		% of entries		No. of entries		% of ntries	
		LB[z]	PB	LB	PB	LB	PB	LB	PB	LB	PB	LB	PB	LB	PB	LB	PB	LB	PB	LB	PB
Japonica rice																					
2009	164	29	12	17.68	7.32	80	63	48.78	38.41	23	14	14.02	8.54	27	14	16.46	8.54	5	59	3.05	35.98
2010	161	50	30	31.06	18.63	36	40	22.36	24.84	9	6	5.59	3.73	40	7	24.84	4.35	26	78	16.15	48.45
2011	159	59	26	37.11	16.35	42	49	26.42	30.82	12	11	7.55	6.92	31	11	19.50	6.92	15	62	9.43	38.99
2012	184	54	91	29.35	49.46	72	4	39.13	2.17	14	32	7.61	17.39	30	39	16.30	21.20	14	18	7.61	9.78
2013	170	33	62	19.41	36.47	60	9	35.29	5.29	14	10	8.24	5.88	34	62	20.00	36.47	29	27	17.06	15.88
2014	183	61	10	33.33	5.46	90	47	49.18	25.68	27	43	14.75	23.50	5	27	2.73	14.75	0	56	0.00	30.60
Total	1,021	286	231	28.01	22.62	380	212	37.22	20.76	99	116	9.70	11.36	167	160	16.36	15.67	89	300	8.72	29.38
Indica rice																					
2009	24	21	8	87.50	33.33	2	14	8.33	58.33	0	1	0.00	4.17	1	0	4.17	0.00	0	1	0.00	4.17
2010	24	20	16	83.33	66.67	3	4	12.50	16.67	0	2	0.00	8.33	0	0	0.00	0.00	1	2	4.17	8.33
2011	24	20	17	83.33	70.83	3	4	12.50	16.67	0	1	0.00	4.17	1	1	4.17	4.17	0	1	0.00	4.17
2012	26	18	25	69.23	96.15	7	0	26.92	0.00	1	0	3.85	0.00	0	0	0.00	0.00	0	1	0.00	3.85
2013	29	20	26	68.97	89.66	8	1	27.59	3.45	0	1	0.00	3.45	1	1	3.45	3.45	0	0	0.00	0.00
2014	47	42	25	89.36	53.19	4	17	8.51	36.17	1	4	2.13	8.51	0	1	0.00	2.13	0	0	0.00	0.00
Total	174	141	117	81.03	67.24	27	40	15.52	22.99	2	9	1.15	5.17	3	3	1.72	1.72	1	5	0.57	2.87

[z] LB: leaf blast; PB: panicle blast.

表 4. 2009–2014 年參試品種 (系) 在旱田式病圃之稻熱病檢定結果。

Table 4. Evaluation of rice varieties/lines for resistance to leaf blast in the upland nursery during 2009–2014.

Year	No. of entries tested	Resistant				Moderate resistant				Moderate susceptible				Susceptible				Highly susceptible			
		No. of entries		% of entries		No. of entries		% of entries		No. of entries		% of entries		No. of entries		% of entries		No. of entries		% of entries	
		I[z]	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Japonica rice																					
2009	164	45	48	27.44	29.27	36	44	21.95	26.83	6	6	3.66	3.66	6	32	3.66	19.51	71	34	43.29	20.73
2010	161	27	42	16.77	26.09	44	28	27.33	17.39	6	12	3.73	7.45	12	30	7.45	18.63	72	49	44.72	30.43
2011	159	10	8	6.29	5.03	73	56	45.91	35.22	9	10	5.66	6.29	21	21	13.21	13.21	46	64	28.93	40.25
2012	184	36	40	19.57	21.74	60	68	32.61	36.96	7	21	3.80	11.41	19	14	10.33	7.61	62	41	33.70	22.28
2013	170	8	1	4.71	0.59	58	68	34.12	40.00	16	24	9.41	14.12	35	33	20.59	19.41	52	44	30.59	25.88
2014	183	17	24	9.29	13.11	82	76	44.81	41.53	20	13	10.93	7.10	29	22	15.85	12.02	35	48	19.13	26.23
Total	1,021	143	163	14.01	15.96	353	340	34.57	33.30	64	86	6.27	8.42	122	152	11.95	14.89	338	280	33.10	27.42
Indica rice																					
2009	24	10	5	41.67	20.83	13	18	54.17	75.00	0	0	0.00	0.00	0	0	0.00	0.00	1	1	4.17	4.17
2010	24	11	10	45.83	41.67	12	13	50.00	54.17	0	0	0.00	0.00	0	0	0.00	0.00	1	1	4.17	4.17
2011	24	16	14	66.67	58.33	7	9	29.17	37.50	0	0	0.00	0.00	0	0	0.00	0.00	1	1	4.17	4.17
2012	26	12	6	46.15	23.08	13	19	50.00	73.08	0	0	0.00	0.00	0	0	0.00	0.00	1	1	3.85	3.85
2013	29	4	2	13.79	6.90	24	26	82.76	89.66	0	0	0.00	0.00	0	1	0.00	3.45	1	0	3.45	0.00
2014	47	25	25	53.19	53.19	20	21	42.55	44.68	1	0	2.13	0.00	0	0	0.00	0.00	1	1	2.13	2.13
Total	174	78	62	44.83	35.63	89	106	51.15	60.92	1	0	0.57	0.00	0	1	0.00	0.57	6	5	3.45	2.87

[z] I: 1st crop season; II: 2nd crop season.

秈型稻參試品種 (系) 共計 174 個，第 1 期作罹病反應表現為抗級與中抗級者合計有 167 個，占全部參試品種 (系) 之 95.98%，罹病反應表現為中感、感與極感級者合計有 7 個，占全部參試品種 (系) 之 4.02%；第 2 期作罹病反應表現為抗級與中抗級者合計有 168 個，占全部參試品種 (系) 之 96.55%，罹病反應表現為中感、感與極感級者合計有 6 個，占全部參試品種 (系) 之 3.45%。

參試品種 (系) 對於葉稻熱病及穗稻熱病罹病反應之比較

分析 2009–2014 年參試品種 (系) 在水田式病圃中對於葉稻熱病及穗稻熱病罹病反應比較如表 5 所示，歷年粳型稻品種 (系) 對於葉稻熱病罹病反應為抗級之比率均顯著高於穗稻熱病。總計 2009–2014 年粳型稻品種 (系) 對於葉及穗稻熱病之罹病反應同樣表現抗級有 439 個，占粳稻全部參試數量之 43.00%，對於兩類稻熱病同樣呈感病反應品種 (系) 數量有 349 個，占粳稻全部參試數量之 34.18%，合計對於兩類稻熱病罹病反應表現一致之品種 (系) 共計 788 個，占粳稻全部參試數量之 77.18%。至於對葉稻熱病表現抗性而穗稻熱病呈感病反應之品種 (系) 則共有 227 個，占粳稻全部參試數量之 22.23%。歷年秈型稻品種 (系) 對於葉稻熱病與穗稻熱病之罹病反應為抗級的比率均無顯著差異，總計 2009–2014 年秈型稻品種 (系) 對於葉及穗稻熱病之罹病反應同樣表現抗級有 157 個，占秈稻全部參試數量之 90.23%，對於兩類稻熱病同樣呈感病反應品種 (系) 數量有 6 個，占秈稻全部參試數量之 3.45%，對葉稻熱病表現抗性而穗稻熱病呈感病反應之品種 (系) 則共有 11 個，占粳稻全部參試數量之 6.32%。

參試品種 (系) 在水田式及旱田式病圃中對於葉稻熱病罹病反應之比較

分析 2009–2014 年參試品種 (系) 在水田式病圃及旱田式病圃中對於葉稻熱病罹病反應比較如表 6 所示，歷年粳型稻品種 (系) 在水田式病圃中葉稻熱病罹病反應為抗級之比率均顯著高於旱田式病圃。總計 2009–2014 年粳型稻品種 (系) 在水田式及旱田式病圃均表現抗葉稻熱病反應有 485 個，占粳稻全部參試數量之 47.50%，在兩病圃中同樣呈感病反應品

表 5. 水稻品種 (系) 對於葉稻熱病及穗稻熱病罹病反應之比較。

Table 5. Comparison of rice varieties/lines for resistance to leaf blast and panicle blast in the paddy nursery, 2009–2014[z].

		No. of entries in japonica rice			No. of entries in indica rice		
		Panicle blast			Panicle blast		
Year	Leaf blast	Resistant	Susceptible	*P* value	Resistant	Susceptible	*P* value
2009	Resistant	74	35	< 0.0001	22	1	1.0000
	Susceptible	1	52		0	1	
2010	Resistant	69	17	0.000407	20	3	0.2482
	Susceptible	1	74		0	1	
2011	Resistant	75	26	< 0.0001	21	2	0.4795
	Susceptible	0	58		0	1	
2012	Resistant	94	32	< 0.0001	25	0	-
	Susceptible	1	57		0	1	
2013	Resistant	71	22	< 0.0001	27	1	1.0000
	Susceptible	0	77		0	1	
2014	Resistant	56	95	< 0.0001	42	4	0.1336
	Susceptible	1	31		0	1	

[z] The proportion of resistance to leaf blast and panicle blast was analyzed by McNemar test.

表 6. 2009–2014 年育成水稻品種 (系) 對於水田式與旱田式病圃葉稻熱病罹病反應之比較。

Table 6. Comparison of rice varieties/lines for resistance to leaf blast between the paddy and upland nurseries in 2009–2014[z].

		No. of entries in japonica rice			No. of entries in indica rice		
		Upland nursery			Upland nursery		
Year	Paddy nursery	Resistant	Susceptible	*P* value	Resistant	Susceptible	*P* value
2009	Resistant	79	30	< 0.0001	23	0	-
	Susceptible	2	53		0	1	
2010	Resistant	70	16	0.0006850	23	0	-
	Susceptible	1	74		0	1	
2011	Resistant	79	22	0.0008561	23	0	-
	Susceptible	4	54		0	1	
2012	Resistant	95	31	< 0.0001	25	0	-
	Susceptible	1	57		0	1	
2013	Resistant	64	29	< 0.0001	28	0	-
	Susceptible	2	74		0	1	
2014	Resistant	98	53	< 0.0001	45	1	1.0000
	Susceptible	1	31		0	1	

[z] The proportion of resistance to leaf blast between the paddy and upland nurseries was analyzed by McNemar test.

種 (系) 數量有 343 個，占粳稻全部參試數量之 33.59%，合計在兩病圃罹病反應表現一致之品種 (系) 共計 828 個，占粳稻全部參試數量之 81.10%。至於在水田式病圃表現抗性而旱田式病圃呈感病反應之品種 (系) 則共有 181 個，占粳稻全部參試數量之 17.73%。歷年秈型稻品種 (系) 在水田式病圃與旱田式病圃中對於葉稻熱病罹病反應為抗級之比率均無顯著差異，總計 2009–2014 年秈型稻品種 (系) 在水田式及旱田式病圃之罹病反應同樣表現抗級有 167 個，占秈稻全部參試數量之 95.98%，對於兩病圃同樣呈感病反應品種 (系) 數量有 6 個，占秈稻全部參試數量之 3.45%，對在水田式病圃表現抗性而旱田式病圃呈感病反應之品種 (系) 則僅有 1 個，占粳稻全部參試數量之 0.57%。

參試品種 (系) 在不同期作間對於葉稻熱病罹病反應之比較

分析 2009–2014 年參試品種 (系) 在第 1 期作及第 2 期作中對於葉稻熱病罹病反應比較如表 7 所示，總計 2009–2014 年粳型稻品種 (系) 在第 1 期作及第 2 期作均表現抗葉稻熱病反應者有 455 個，占粳稻全部參試數量之 44.56%，在兩期作中對於葉稻熱病均表現為感病反應之品種 (系) 數量為 476 個，占粳稻全部參試數量之 46.62%，合計兩期作之罹病反應表現一致之品種 (系) 共計 931 個，占粳稻全部參試數量之 91.19%。至於在第 1 期作表現抗性而第 2 期作呈感病反應之品種 (系) 則共有 41 個，占粳稻全部參試數量之 4.02%，在第 1 期作表現感病反應而第 2 期作呈抗病反應之品種 (系) 有 48 個，占粳稻全部參試數量之 4.70%。但各年度在兩期作中對於葉稻熱病罹病反應為抗級之比率差異表現不一致，其中 2009、2011 及 2012 年有顯著之差異表現，除 2011 年第 1 期作抗病比率為 52.20% 高於第 2 期作之 40.25% 外，2009 及 2012 年均以第 2 期作之抗病比率較高；其他 3 個年度則無顯著差異。歷年秈型稻品種 (系) 在第 1 期作與第 2 期作對於葉稻熱病罹病反應為抗級之比率均無顯著差異，總計 2009–2014 年秈型稻品種 (系) 在第 1 期作及第 2 期作均表現抗葉稻熱病反應者有 167 個，占粳稻全部參試數量之 95.98%，在兩期作中對於葉稻熱病均表現為感病反應之品種 (系) 數量為 6 個，占粳稻全部參試數量之 3.45%，合計兩期作之罹病反應表

表 7. 2009–2014 年育成水稻品種 (系) 對於第一期作與第二期作葉稻熱病罹病反應之比較。

Table 7. Comparison of rice varieties/lines for resistance to leaf blast between the first and the second crop seasons in 2009–2014[z].

		No. of entries in japonica rice			No. of entries in indica rice		
		2nd crop season			2nd crop season		
Year	1st crop season	Resistant	Susceptible	*P* value	Resistant	Susceptible	*P* value
2009	Resistant	80	1	0.005546	23	0	-
	Susceptible	12	71		0	1	
2010	Resistant	62	9	1.000000	23	0	-
	Susceptible	8	82		0	1	
2011	Resistant	64	19	< 0.0001	23	0	-
	Susceptible	0	76		0	1	
2012	Resistant	94	2	0.005960	25	0	-
	Susceptible	14	74		0	1	
2013	Resistant	62	4	0.546500	28	0	-
	Susceptible	7	96		0	1	
2014	Resistant	93	6	1.000000	45	0	1.0000
	Susceptible	7	77		1	1	

[z] The proportion of resistance to leaf blast between first and second crop seasons was analyzed by McNemar test.

現一致之品種 (系) 共計 173 個，占粳稻全部參試數量之 99.43%。

討論

回顧過去二十餘年來水稻稻熱病檢定結果發現，粳型稻新育成品種 (系) 抗稻熱病比率似乎有減少的趨勢。在 1990–2002 年，粳型稻新育成品種 (系) 抗葉稻熱病及穗稻熱病比率平均為 83.4% 與 60.6% (Chen *et al*. 2004)，2003–2008 年減少為 58.8% 與 42.9% (Liao & Chen 2011)，2009–2014 年則回升為 65.2% 與 43.4% [表 3，將抗級與中抗級品種 (系) 數量加總後計算平均]。其中，葉稻熱病抗病比率於 1997 年達 99.0% 為最高峰，該年度之後抗病比率最高亦不超過 85%，2006 及 2007 年抗病比率僅 45.0% 與 42.5%。穗稻熱病抗病比率於 1990 年之 81.4% 為最高，往後亦大致呈下滑走勢，2014 年最低僅 31.1%。造成新品種 (系) 抗病比率減少的原因，可能在於台灣以往水稻雜交育種之抗病親本遺傳背景過於接近，以致對於病圃中不同病原菌生理小種的抗性幅度狹窄 (Chen *et al*. 2004)。為解決現今水稻抗病育種所面臨的問題，由台灣各農業試驗改良機關稻作研究人員所組成之水稻推動小組，於 2012 年自 IRRI 引進帶不同單一抗病基因之 'LTH' 與 'CO39' 遺傳背景的 IRBL 系列判別品系 (Tsunematsu *et al*. 2000; Kobayashi *et al*. 2007)。本分所目前已針對在台灣具有穩定抗性之不同抗病基因，如 *Piz-5*、*Pib*、*Pi12*(*t*)、*Pita2*、*Pik* 與 *Pikh* 等 (Liao *et al*. 2016)，經由雜交後連續回交的方式導入失去抗性的栽培品種中，並且利用分子標誌輔助選拔帶有抗病基因的回交後代，再堆疊不同抗病基因，進而選育出具有多重抗病來源的水稻新品種 (系)。

水稻新育成品種 (系) 對於葉稻熱病與穗稻熱病抗性反應的相關性是值得關注的問題，Chen *et al*. (2004) 指出粳型稻品種 (系) 若抗葉稻熱病，則通常對於穗稻熱病也有抗性。Ma *et al*. (2005) 利用天然病圃輔以人工接種檢定 12,151 個水稻品種 (系) 對於葉及穗稻熱病之罹病反應，結果葉及穗稻熱病之罹病反應一致者有 74.35%，屬於抗葉稻熱病而穗稻熱病感病者有 15.90%。Chen *et al*. (2006) 的研究結果顯示，雖然天然病圃中葉稻熱病與穗稻熱病之抗病比率呈顯著正相關，但兩者相關係數

為 0.6322，僅為中度相關性。本研究平均約有 22% 之粳型稻品種 (系) 在水田式病圃對葉稻熱病反應表現抗性，卻對於穗稻熱病呈現感病反應 (表 5)。綜合 Ma *et al*. (2005)、Chen *et al*. (2006) 及本研究中關於同品種 (系) 之葉及穗稻熱病抗性反應表現結果顯示，對葉稻熱病表現抗病但對於穗稻熱病感病之品種 (系) 所占比率不可謂低。若育種人員僅參考葉稻熱病檢定結果即逕予推廣種植，將來可能有相當的風險會發生穗稻熱病流行。鑑於穗稻熱病對於稻米產量及品質所造成的損失較葉稻熱病更為直接且嚴重 (Goto 1965; Fujii & Hayano-Saito 2007)，因此建議新育成品系進入高級產量比較試驗或者區域試驗時，仍須進行穗稻熱病檢定，以降低誤判風險。

水稻品種 (系) 在水田式病圃中之葉稻熱病抗性反應比率較旱田式病圃為高 (Chen 1990; Chen *et al*. 2004)，比較本試驗粳型稻品種 (系) 在水田及旱田式病圃中抗性反應比率的差異，同樣符合上述情形，平均約有 18% 的品種 (系) 在水田式病圃表現抗病反應，但在旱田式病圃中表現出感病反應。Yang (1967) 指出旱田式病圃較水田式病圃易於發病之原因，可能與土壤乾旱影響水稻生理狀態有關。由於旱田式病圃的篩選強度大於水田式病圃，因此稻作育種之初級品系可於幼苗期在旱田式病圃針對葉稻熱病抗性進行大量選汰，以提高育種效率。

水稻對於不同期作間之稻熱病罹病反應是否有期作效應，過去的研究指出，稻熱病在第 1 期作為害嚴重程度高於第二期作 (Chien 1979)，原因可能與第 2 期作之氣候條件不利於稻熱病傳播有關。台灣水稻第二期作 7–9 月間為颱風侵襲高峰時期，平日上午高溫炎熱，田間稻株露水易蒸發，午後則常有瞬間強雷陣雨。根據本分所氣象站資料統計顯示，2009–2014 年第一期作 4–6 月之平均月降雨日數與時降雨量，4 月為 9.3 d 及 1.96 mm hr^{-1}，5 月為 11 d 及 3.52 mm hr^{-1}，6 月為 13 d 及 4.14 mm hr^{-1}；第二期作 7–9 月平均月降雨日數與時降雨量，7 月為 14.3 d 及 5.36 mm hr^{-1}，8 月為 19.8 d 及 6.42 mm hr^{-1}，9 月為 11.2 d 及 5.87 mm hr^{-1}，因此第二期作之平均月降雨日數與時降雨量均高於第二期作。雖然降雨日數多有利於稻熱病發生，然而 Tsai (1977) 研究指出，時雨量 3.5 mm hr^{-1} 以上則減少孢子釋放，大雨可將田間稻熱病菌孢子洗去，進而降低傳染機會。本研究粳型稻品種 (系) 各年度之期作效應較無一致表現，6 個年度裏有 3 個年度無顯著期作效應，亦即兩期作罹病反應表現抗性之品種 (系) 比率無顯著差異。本分所旱田式病圃設有透光遮雨屋頂，較全露天式田區不易受大雨影響，故而期作間氣象因子對於品種 (系) 罹病反應的影響程度有限。

本研究秈型稻品種 (系) 無論在葉稻熱病與穗稻熱病、水田式病圃與旱田式病圃及第一、二期作間之抗性比率比較分析，均未達顯著差異水準。實際上參試秈型稻品種 (系)，除了作為感病源的對照品種 'Lomello' 外，其他品種 (系) 無論在任何處理條件下，幾乎全數表現抗病反應。現今台灣水稻栽培以粳型稻品種為主，秈型稻品種數量及栽培面積均不大，因此病圃中致病生理小種可能以感染粳型稻為主要目標，秈型稻發生感染的機會減少，從而表現出抗病反應。

誌謝

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局經費補助 [103 管理-3.1-植防-2(1)]，試驗調查工作及資料整理承本分所農藝系陳隆澤前研究員、羅俊欽、廖偉盛及賴佳鴻等同仁協助，特此誌謝。

引用文獻

Chen, F., H. Ruan, X. Yang, S. Lin, Q. Fang, and Y. Yan. 2006. The correlation in seedling blasts, leaf blasts and neck blasts of rice. Chinese Agric. Sci. Bull. 22:440–443. (in Chinese with English abstract)

Chen, L. C. 1990. Reaction of rice varieties and selections to blast in the uniform blast nurseries. J. Agric. Res. China 39:303–314. (in Chinese with English abstract)

Chen, L. C., Y. S. Chen, and Y. H. Cheng. 2004. Test of rice varieties and strains resistant to rice blast in blast nurseries during 1990–2002. J. Agric. Res. China. 53:269–283. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C. 1979. Occurrence and influence of rice diseases on yield in the first and second rice crops in Taiwan. p.177–189. *in*: The Causes of Low Yield of the Second Crop Rice in Taiwan and the Measures for Improvement. June 7–8, 1978. Taichung, Taiwan. National Science Council, Taipei, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Fujii, K. and Hayano-Saito, Y. 2007. Genetics of durable resistance to rice panicle blast derived from an indica rice variety Modan. Jpn. J. Plant Sci. 1:69–76.

Goto, K. 1965. Estimating losses from rice blast in Japan. p.195–202. *in*: The Rice Blast Disease: Proceedings of a Symposium at the International Rice Research Institute, July, 1963. (International Rice Research Institute, ed.) Johns Hopkins Press. Baltimore, MD. 507 pp.

International Rice Research Institute. 2002. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 56 pp.

Kobayashi, N., M. J. Telebanco-Yanoria, H. Tsunematsu, H. Kato, T. Imbe, and Y. Fukuta. 2007. Development of new sets of international standard differential varieties for blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Jpn. Agric. Res. Q. 41:31–37.

Liao, D. J. and L. C. Chen. 2011. Field evaluation of rice varieties and lines from Taiwan for resistance to leaf and panicle blasts caused by *Magnaporthe grisea* during 2003–2008. J. Taiwan Agric. Res. 60:279–292. (in Chinese with English abstract)

Liao, D. J., L. C. Chen, C. W. Wu, and C. L. Chung. 2016. Response of rice varieties 'LTH' monogenic lines and 'CO 39' near-isogenic lines to rice blast. J. Taiwan Agric. Res. 65:8–17. (in Chinese with English abstract)

Ma, B. T., L. Yang, L. X. Wang, T. Z. Yang, X. Y. Zhao, X. G. Gao, S. G. Li, X. D. Wang, and P. Li. 2005. Resistance evaluation and breeding of rice varieties (lines) to rice blast in nursery. Chinese Agric. Sci. Bull. 21:263–267. (in Chinese with English abstract)

Tsai, W. H. 1977. Occurrence of rice blast and meteorological conditions in an upland nursery. J. Agric. Res. China. 26:290–296. (in Chinese with English abstract)

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.

Yang, S. C. 1967. The use of non-irrigated nursery for breeding blast resistance of rice. J. Agric. Res. China. 16:1–7. (in Chinese with English abstract)

Field Evaluation of Blast for Rice Varieties (Lines) Developed from 2009 to 2014 in Taiwan

Szu-Yi Chou[1] and Dah-Jing Liao[1,*]

Abstract

Chou, S. Y. and D. J. Liao. 2018. Field evaluation of blast for rice varieties (lines) developed from 2009 to 2014 in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 67(1):82–93.

The present study was to analyze the changing trends of blast resistance and its relationship among rice cultivars/lines developed in 2009–2014. The information can be provided as a reference for breeders in planning breeding strategy in the future. The experimental materials included 1,195 rice cultivars/lines provided by the local 9 agricultural experimental agencies, and were examined for their responses to both leaf and panicle blast in the upland and the paddy nurseries located at Chiayi Agricultural Experimental Station of Taiwan Agricultural Research Institute. A susceptible cultivar 'Lomello' and a resistant cultivar 'TNG70' were used for reference checks, and were found stable to the responses of blast during the period of experiment, indicating that the conditions of nursery and results of examination were stale and reliable. There were 1,021 cultivars/lines of japonica type rice included in the experiment, and the ratio of expressing resistance to leaf and panicle blast in the paddy nursery were 65.23% and 43.39%, respectively. In the upland nursery, the ratio of expressing resistance to leaf blast in the first and the second cropping season were 48.58% and 49.27%, respectively. The other 174 cultivars/lines of indica type rice were also examined for their resistance performance to blast. It showed that ratio of expressing resistance to leaf and panicle blast in the paddy nursery were 96.55% and 90.23%, respectively. In the upland nursery, the ratio of expressing resistance to leaf blast in the first and the second cropping season were 95.98% and 96.55%, respectively. By further analyzing the experimental results, it showed that some cultivars/lines of japonica type rice varied in the responses to leaf and panicle blast. Among the cultivars/lines, about 22% were resistance to leaf blast while were infected by panicle blast. These cultivars/lines required further studied in the advanced field examination for their resistance to panicle blast. Since the susceptibility of a cultivar/line to blast will be more serious in upland nursey than in paddy condition, we suggest that upland nursery can be used for selection of blast resistance in the early stage of a breeding program so as to improve breeding efficiency. Results also showed that japonica type rice cultivars/lines perform differently in the upland nursery between the first and the second cropping seasons, while indica type rice cultivars/line have a consistent performance in both crop seasons.

Key words: Rice, Blast, Disease nursery.

Received: June 10, 2017; Accepted: September 1, 2017.

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

[1] Assistant Research Fellows, Agronomy Department, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 67(1):94–105 (2018)
DOI: 10.6156/JTAR.201803_67(1).0009

研究報告

四倍體丹參毛狀根系之時序培養及其丹參酮生產篩選

夏奇鈮[1]　曹進義[2]　吳姿穎[3]　陳威臣[4,*]

摘要

夏奇鈮、曹進義、吳姿穎、陳威臣。2018。四倍體丹參毛狀根系之時序培養及其丹參酮生產篩選。台灣農業研究 67(1):94–105。

丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 為唇形科多年生草本植物，是中醫治療心血管疾病的重要藥材。4 倍體 (4N) 毛狀根與其 2 倍體 (2N) 相較，具有二次代謝物含量較高之特性，是離體培養大量生產植物二次代謝物的良好工具。本研究利用秋水仙素誘導所得之 4N 丹參毛狀根群，探討從中篩選出高丹參酮產量毛狀根系 (以下簡稱根系) 的可行性。首先以固體培養基進行連續 3 次、每次 8 wk 的根系培養，並依據丹參酮產量從 103 個 4N 根系中篩選出前 32 名，繼續進行連續 3 次、每次 8 wk 的液體培養；同時從 32 個 4N 根系中挑選出 2 個根系與 2N 根系一起進行時序培養。固體培養的結果顯示，4N 根系群的平均生質量較 2N 根系低，僅達 2N 根系的 67.2%，但 4N 根系群的平均總丹參酮含量較 2N 根系為高，是 2N 根系的 4.66 倍，且 4N 根系群的平均丹參酮產量為 2N 根系的 3.29 倍。檢視 4N 根系群丹參酮含量比例的變化，以隱丹參酮含量之比例增加最多，丹參酮 I 含量之比例減少最多，丹參酮 IIA 含量之比例減少其次。在固體培養中丹參酮產量表現最佳之前 10 名 4N 根系，在液體培養篩選後僅餘 2 根系仍保持於前 10 名，顯示 4N 根系在固、液體培養中的表現並非完全一致，建議在固體培養篩選階段保留較多的根系，作為後續液體培養篩選之用。時序培養結果顯示，4N 根系的生長速度較 2N 根系慢，2 個 4N 根系的生長模式亦存有差異；2 個 4N 根系之丹參酮含量皆於第 8 週達到最高，較 2N 根系於第 12 週達到最高明顯提早。綜合來看，雖然 4N 根系之生質量平均較 2N 根系為低，但因 4N 根系具有丹參酮含量較高，且丹參酮產量累積較快之特性，因此在丹參酮的生產效率上，4N 根系仍較 2N 根系為高，且透過篩選機制可將高產之 4N 根系選拔出來，作為大規模培養之基礎。

關鍵詞：丹參、毛狀根、多倍數、丹參酮、離體培養。

前言

丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 為唇形科 (Labiatae) 鼠尾草屬 (Salvia) 多年生草本植物，其乾燥根具有活血化瘀之功效，列為神農本草經上品，是治療心血管疾病的之重要中藥。丹參中萃取出的化學成分包含脂溶性的二萜醌類和水溶性酚酸類，其中脂溶性成分有丹參酮 I (tanshinone I)、丹參酮 IIA (tanshinone IIA)、丹參酮 IIB (tanshinone IIB)、隱丹參酮 (cryptotanshinone) 等 (Takahashi *et al*. 2002)，這些脂溶性化合物具有高度的抗氧化活性及強大的自由基清除能力 (Wang *et al*. 2003)。其中，丹參酮 I 與隱丹參酮能夠抑制 interleukin-12 (IL-12) 和 interferon-gamma (IFN-γ) 的產生，具有抗發炎與減緩免疫反應產生 (Kang *et al*. 2000)；丹參酮 IIA 具抗腫瘤活性，對急性骨髓型血癌 (acute promyelocytic leukemia) 細胞能產生誘導分化作用，使癌細胞分化為正常細胞，亦能誘導人類鼻咽癌

投稿日期：2017 年 7 月 4 日；接受日期：2017 年 9 月 14 日。
* 通訊作者：UCChen@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

細胞與肺腺癌細胞走向細胞凋亡 (Yuan *et al*. 2003)。隱丹參酮則被認為對革蘭氏陽性菌具有抗菌能力 (Lee *et al*. 1999) 外，並可抑制基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases)，具有抗血管內膜增生和抗動脈粥狀硬化等效用 (Suh *et al*. 2006)。

利用農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 轉殖育成之毛狀根 (hairy root)，因轉入之外源生長基因，與不定根相較，具有無須添加生長調節劑即可快速生長之優勢。毛狀根與懸浮細胞相較，除了遺傳穩定性較高外，還有二次代謝物含量較高之優點，具有以產業化方式大量生產高價值之植物二次代謝物的可行性 (Flores *et al*. 1999; Guillon *et al*. 2006; Ono & Tian 2011; Zhou *et al*. 2011)。過去的研究證實丹參毛狀根具有生產丹參酮之潛力，可藉由調整培養基成分與添加誘引劑來提高丹參酮的產量 (Chen *et al*. 2008, 2010; Chan *et al*. 2012)。此外，利用多倍體化來提高二次代謝物的含量亦為有效策略之一 (Dhawan & Lavania 1996)。4 倍體 (4N) 毛狀根系 (以下簡稱根系) 與其 2 倍體 (2N) 相較，在二次代謝物含量方面有提高之情形，例如生產治療瘧疾之青蒿素的黃花蒿 (*Artemisia annua*) 其 4N 根系之青蒿素產量是 2N 根系的 6 倍 (De Jesus-Gonzalez & Weathers 2003)，但這篇研究報告僅以 4 個 4N 根系作為調查基礎，顯示多倍體毛狀根需要更多的研究以釐清相關論點。Berkov *et al*. (2003) 利用 2N 及 4N 曼陀羅 (*Datura stramonium*) 植株之葉片，以農桿根群菌進行誘導分別得到 2N 及 4N 之毛狀根並加以比較，結果顯示在各自最佳培養條件下，以 4N 根系之莨菪鹼 (hyocyamine) 產量最高。本研究藉由前期誘導所得之丹參 4N 根系群 (Hsia *et al*. 2013)，總共 103 個 4N 根系以連續多批次的固體培養及液體培養，篩選丹參酮含量及產量較高之 4N 根系，並經由時序培養瞭解 4N 根系之生長與其二次代謝物含量變化間的關係，探討利用 4N 根系作為提高丹參酮產量策略的可行性。

材料與方法

毛狀根材料

2N 毛狀根係以丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 葉片經由農桿根群菌 R1601 感染所得並經長期篩選之根系 (Lin 2006)，4N 根系群為上述 2N 根系經由秋水仙素處理並以流式細胞儀確認之 103 個 4N 根系 (Hsia *et al*. 2013)。

固體培養篩選 4N 根系

以 103 個 4N 根系及 2N 根系進行固體培養，培養基含有 B5 鹽類配方 (Gamborg *et al*. 1968)、3% 蔗糖與 0.9% Bacto agar。培養容器為直徑 55 mm、高 15 mm 培養皿，每皿裝填 12.5 mL 之培養基。培養方式為每皿接種長約 1 cm 之根尖共 6 根，每個根系接種 2 皿，於 25℃黑暗環境中培養 8 wk 後，將毛狀根取出調查其生質量並分析丹參酮含量後計算其產量。共進行連續 3 批次之培養。

液體培養篩選與時序培養 4N 根系

取於固體培養基中生長 4 wk 後之毛狀根作為接種材料，切取長約 1–1.5 cm 之根尖為培植體。液體培養基之成分與固體培養基相同但未加入凝膠物質，培養容器為 125 mL 三角瓶，內裝有 20 mL 培養液，每瓶接種 5 條根尖。液體培養共有 32 個參試之 4N 根系，每一根系共培養 3 瓶，培養瓶於 25℃黑暗環境中利用往復式震盪培養器以 70 rpm 震盪培養，培養 8 wk 後將毛狀根取出，調查之項目與固體培養試驗相同，共進行連續 3 批次之培養。

時序培養的培養方式與液體培養相同，接種材料為 4N-16 號與 30 號之根系以及作為對照組之 2N 根系，分別於培養 6、8、10 及 12 wk 後，各取樣 3 瓶進行與固體培養相同之調查。

丹參酮萃取與含量分析

將於 45℃烘箱乾燥 2 d 之毛狀根磨碎，以二氯甲烷：甲醇 = 1：4 溶劑進行超音波震盪萃取 30 min 後收集濾液，殘渣再萃取一次後將兩次濾液合併濃縮，以甲醇定容後以 0.45 μm 濾膜過濾。HPLC 分析之條件為流動相甲醇：

四氫呋喃：冰醋酸：水 = 18：35：1：46，流速 1 mL min^{-1}，吸收波長 254 nm，分別檢測隱丹參酮 (cryptotanshinone; Crypto)、丹參酮 I (tanshinone I; Tan I)、丹參酮 IIA (tanshinone IIA; Tan IIA) 之含量。總丹參酮含量 (mg g^{-1}) = 隱丹參酮含量 (mg g^{-1}) + 丹參酮 I 含量 (mg g^{-1}) + 丹參酮 IIA 含量 (mg g^{-1})。總丹參酮產量 (mg L^{-1}) = 丹參毛狀根生質量 (g L^{-1}) × 總丹參酮含量 (mg g^{-1})。

統計分析方法

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc. 2014) 套裝統計分析軟體進行 ANOVA 變方分析，若處理間差異顯著 ($P < 0.05$)，則利用 least significant difference test (LSD) 比較各處理平均值間之差異。

結果

利用固體培養篩選 4N 根系

以 103 個 4N 根系進行連續三批次的固體培養，分別調查各根系之生質量、丹參酮含量 (包括隱丹參酮、丹參酮 I、丹參酮 IIA)，並計算總丹參酮含量及總丹參酮產量，將 103 個 4N 根系 3 批次培養之平均值以頻度分布方式表示於圖 1。在生質量方面，4N 根系群之生質量分布在 3.2–4.0 g L^{-1} 之間最多 (圖 1A)，平均為 3.54 g L^{-1}，低於 2N 根系之平均值 5.27 g L^{-1}，僅為 2N 根系的 67.2%。隱丹參酮含量方面，4N 根系群含量分布以 2.4–3.6 mg g^{-1} 之間最多 (圖 1B)，平均為 3.50 mg g^{-1}，是 2N 根系平均值 0.52 mg g^{-1} 的 6.73 倍，103 個 4N 根系中只有 1 個根系 (0.97%) 之隱丹參酮含量低於 2N 根系。丹參酮 I 含量方面，4N 根系群含量分布以 1.0–1.8 mg g^{-1} 之間最多 (圖 1C)，平均為 1.51 mg g^{-1}，是 2N 根系平均值 0.48 mg g^{-1} 的 3.15 倍，103 個 4N 根系中只有 2 個根系 (1.94%) 之丹參酮 I 含量低於 2N 根系。丹參酮 IIA 含量方面，4N 根系群含量分布以 0.3–0.6 mg g^{-1} 之間最多 (圖 1D)，平均為 0.53 mg g^{-1}，是 2N 根系平均值 0.19 mg g^{-1} 的 2.79 倍，103 個 4N 根系中只有 5 個根系 (4.85%) 之丹參酮 IIA 含量低於 2N 根系。總丹參酮含量方面，4N 根系群分布在 3.75–5.25 mg g^{-1} 之間最多 (圖 1E)，平均值為 5.55 mg g^{-1}，是 2N 根系平均值 1.19 mg g^{-1} 的 4.66 倍，103 個 4N 根系中只有 1 個根系 (0.97%) 之總丹參酮含量低於 2N 根系。在總丹參酮產量方面，4N 根系群分布以 16–24 mg L^{-1} 之間最多 (圖 1F)，平均值為 20.07 mg L^{-1}，是 2N 根系平均值 6.10 mg L^{-1} 的 3.29 倍，103 個 4N 根系中只有 4 個根系 (3.88%) 之總丹參酮產量低於 2N 根系。檢視 3 個批次 4N 根系群之平均隱丹參酮、丹參酮 I 及丹參酮 IIA 含量所占比例，如圖 2 所示。2N 根系之 3 種丹參酮的比例依序為 43.7、40.3 及 16.0%；而 4N 根系群之 3 種丹參酮含量的比例依序為 63.2、27.1 及 9.7%，顯示 4N 根系群以隱丹參酮含量比例增加最多，達 19.5%，以丹參酮 I 含量比例減少 13.2% 最多，丹參酮 IIA 含量比例減少 6.3% 其次。

利用液體培養基篩選 4N 根系

依據固體培養 4N 根系之總丹參酮產量，在 103 個 4N 根系中挑選出前 32 名之根系，分別進行連續 3 批次的液體培養，將 32 個 4N 根系 3 批次培養之平均值以頻度分布方式表示於圖 3。在生質量方面，4N 根系群生質量分布以 3.75–5.25 g L^{-1} 之間最多，平均為 5.28 g L^{-1}，僅及 2N 根系平均值 8.54 g L^{-1} 的 61.8%，32 個 4N 根系中只有 1 個根系 (3.13%) 之生質量高於 2N 根系 (圖 3A)。隱丹參酮含量方面，32 個 4N 根系群含量分布以 1.8–4.2 mg g^{-1} 之間最多 (圖 3B)，平均為 2.87 mg g^{-1}，是 2N 根系平均值 0.24 mg g^{-1} 的 12.0 倍，32 個 4N 根系之隱丹參酮含量全部高於 2N 根系。丹參酮 I 含量方面，4N 根系群分布以 0.6–1.8 mg g^{-1} 之間最多 (圖 3C)，平均為 1.38 mg g^{-1} 是 2N 根系平均值 0.75 mg g^{-1} 的 1.84 倍，32 個 4N 根系中有 5 個根系 (15.63%) 之丹參酮 I 含量低於 2N 根系。丹參酮 IIA 含量方面，4N 根系群含量分布以 0.3–0.9 mg g^{-1} 之間最多 (圖 3D)，平均為 0.68 mg g^{-1}，是 2N 根系平均值

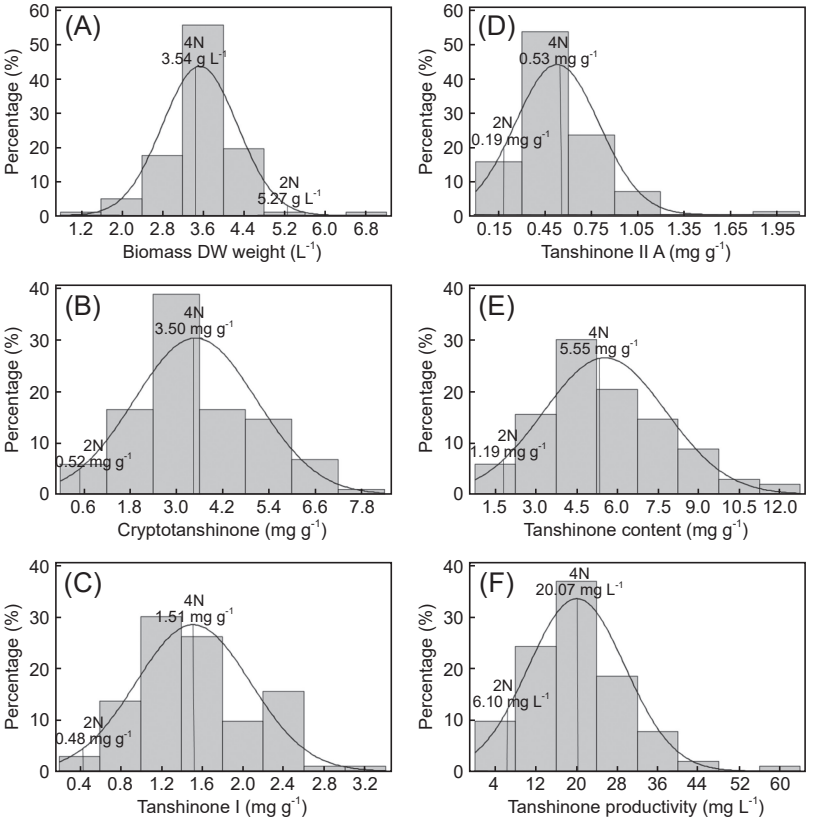


圖 1. 103 個 4N 丹參毛狀根系連續 3 批次固體培養之平均值頻度分布情形。生質量 (A)、隱丹參酮含量 (B)、丹參酮 I 含量 (C)、丹參酮 IIA 含量 (D)、總丹參酮含量 (E) 及丹參酮產量 (F)。

Fig. 1. Mean distributions from 103 lines of 4N hairy roots of *S. miltiorrhiza* on biomass (A), content of cryptotanshinone (B), tanshinone I (C), tanshinone IIA (D), total tanshinone (E), and production of tanshinones (F) after three consecutive cultures on the solid medium.

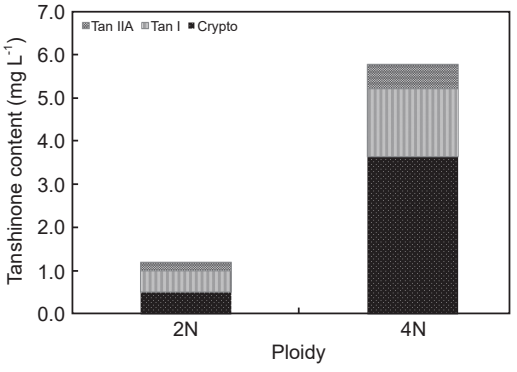


圖 2. 固體培養之 2N 及 103 個 4N 毛狀根系所含丹參酮之比較。

Fig. 2. Tanshinone compositions of 2N and 103 lines of 4N hairy roots of *S. miltiorrhiza* cultured on the solid medium. Tan I: tanshinone I, Tan IIA: tanshinone IIA and Crypto: cryptotanshinone.

0.41 mg g^{-1} 的 1.66 倍，32 個 4N 根系中有 6 個根系 (18.75%) 之丹參酮 IIA 含量低於 2N 根系。總丹參酮含量方面，4N 根系群分布在 4.0–6.0 mg g^{-1} 之間最多 (圖 3E)，平均值為 4.93 mg g^{-1}，是 2N 根系平均值 1.41 mg g^{-1} 的 3.50 倍，32 個 4N 根系中僅有 1 個根系 (3.13%) 之總丹參酮含量低於 2N 根系。在總丹參酮產量方面，4N 根系群以 15–35 mg L^{-1} 之間最多 (圖 3F)，平均值為 26.65 mg L^{-1}，是 2N 根系平均值 12.66 mg L^{-1} 的 2.11 倍，32 個 4N 根系中有 5 個根系 (15.63%) 總丹參酮產量低於 2N 根系。

4N 根系之時序培養

選取在固體培養篩選中總丹參酮產量最高

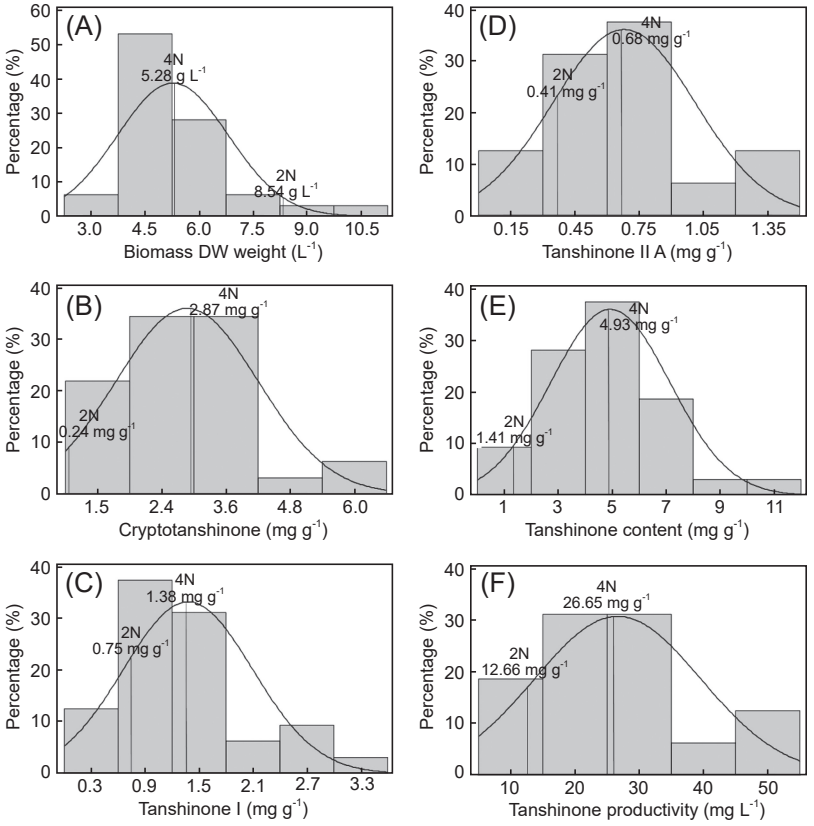


圖 3. 32 個 4N 丹參毛狀根系連續三批次之液態培養之平均值頻度分布情形。生質量 (A)、隱丹參酮含量 (B)、丹參酮 I 含量 (C)、丹參酮 IIA 含量 (D)、總丹參酮含量 (E) 及丹參酮產量 (F)。

Fig. 3. Mean distributions from 32 lines of 4N hairy roots of *S. miltiorrhiza* on biomass (A), content of cryptotanshinone (B), tanshinone I (C), tanshinone IIA (D), total tanshinones (E), and production of tanshinone (F) after three consecutive cultures on the liquid medium.

之 4N-16 號根系，以及生質量高但丹參酮含量偏低之 4N-30 號根系與 2N 根系同時進行時序培養，分別於培養 6、8、10 及 12 wk 後取樣進行調查，結果如圖 4 及圖 5 所示。對照組之 2N 根系於 8 wk 培養後生質量達到最高，並維持至 10 wk 後略微下降，其隱丹參酮、丹參酮 I 及丹參酮 IIA 皆持續增加至第 12 週；4N-16 號與 2N 對照組相較，生長明顯較慢，生質量於第 12 週時方達最高，但其隱丹參酮、丹參酮 I 分及丹參酮 IIA 則於第 8 週皆達到最高，之後明顯下降；4N-30 號根系於 8–10 wk 間生質量明顯增加，於第 10 週時達到最高，但其隱丹參酮、丹參酮 I 及丹參酮 IIA 亦於第 8 週即達最高，之後亦明顯下降；總丹參酮含量方面，2N 根系於第 12 週達最高，但 4N-16 號及 30 號根系皆在第 8 週達到高點後下降。丹參酮產量方面，2N 根系於第 12 週達最高，4N-16 號及 30 號根系皆在第 8 週達最高後下降，雖然 4N-16 號根系在第 10 週後有回升之趨勢，但並未超過第 8 週之高點 (圖 4)。從 2N 及 2 個 4N 根系的生長情形來看，可明顯看出 2N 較 4N 根系生長情形較佳，4N-30 號根系並合併有癒傷組織狀態之細胞增生 (圖 5)。

討論

利用轉殖毛狀根取代細胞在離體 (*in vitro*) 環境中培養，能夠避開自然環境中的各種不利因子，猶如化學工廠 (chemical factories) 以產業化方式大量生產高價之植物二次代謝物，是

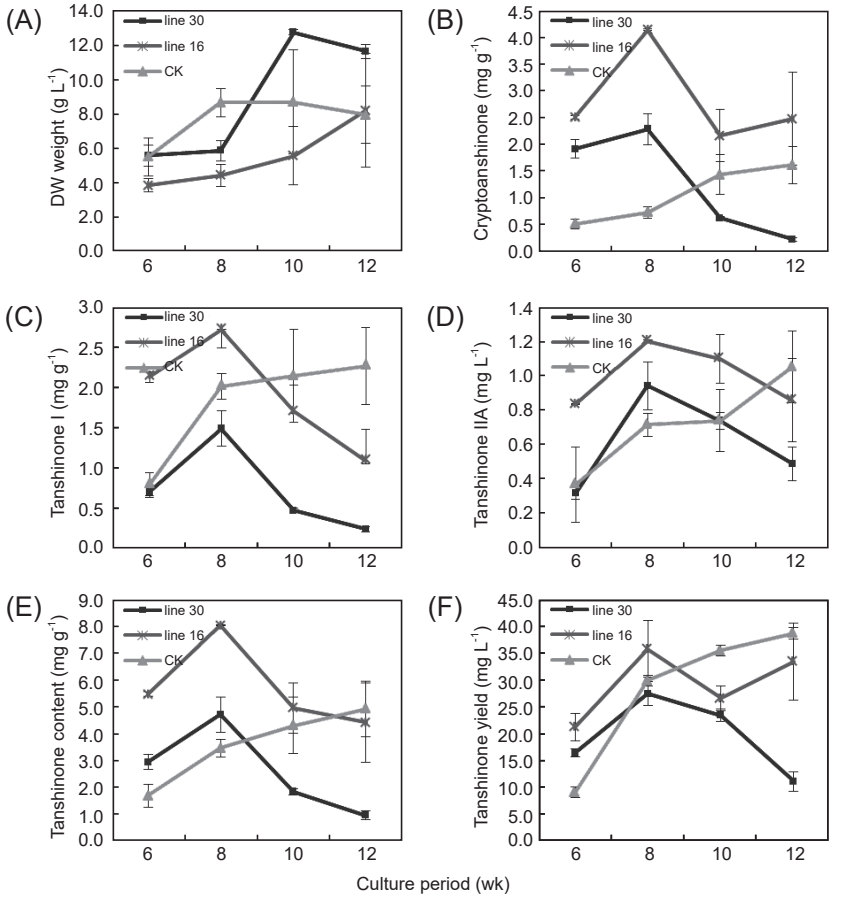


圖 4. 2N (CK) 及 4N (16、30 號) 丹參毛狀根系時序培養之表現。生質量 (A)、隱丹參酮 (B)、丹參酮 I (C)、丹參酮 IIA (D)、總丹參酮含量 (E) 及丹參酮產量 (F)。

Fig. 4. Time course for 2N (CK) and 4N hairy root lines (line16 and 30) of *S. miltiorrhiza* on biomass (A), content of cryptotanshinone (B), tanshinone I (C), tanshinone IIA (D), total tanshinone (E), and production of tanshinone (F).

近年來生技產業發展的新趨勢 (Guillon *et al*. 2006; Georgiev *et al*. 2007; Ono & Tian 2011; Zhou *et al*. 2011; Habibi *et al*. 2017)。針對提高毛狀根的生產效率可以從多方面來改進，包括選用高產根系、優化培養條件、添加誘引劑提高二次代謝物含量以及利用生物反應器放大培養規模等 (Georgiev *et al*. 2007; Srivastava & Srivastava 2007)。此外，利用多倍體化來提高二次代謝物含量亦為有效策略之一。在本研究中以秋水仙素處理丹參 2N 毛狀根得到之 103 個 4N 根系進行培養，在固體培養階段的結果顯示，99.03% 之 4N 根系其總丹參酮含量皆較 2N 根系為高，證實多倍體對二次代謝物含量具有提升之效果。此外，本研究中之 103 個 4N 根系群誘導自同一 2N 根系 (Hsia *et al*. 2013)，誘導所得之 4N 根系理論上其遺傳表現應具有一致性，但觀察這些 4N 根系的個別表現，卻發現個別根系從生長量到丹參酮的含量以及產量都有相當幅度的差異。例如，本研究在固體培養階段，4N 根系生質量最高與最低者相較，差異可達 5.9 倍 (10.40 DW g L^{-1}/1.76 DW g L^{-1})，總丹參酮含量最高與最低者相較，差異可達 66.1 倍 (12.56 mg g^{-1}/0.19 mg g^{-1})，總丹參酮產量最高與最低者相較，差異可達 48.4 倍 (40.20 mg L^{-1}/0.83 mg L^{-1}) (數據未顯示)，足見 4N 根系間在二次代謝物的生產上具

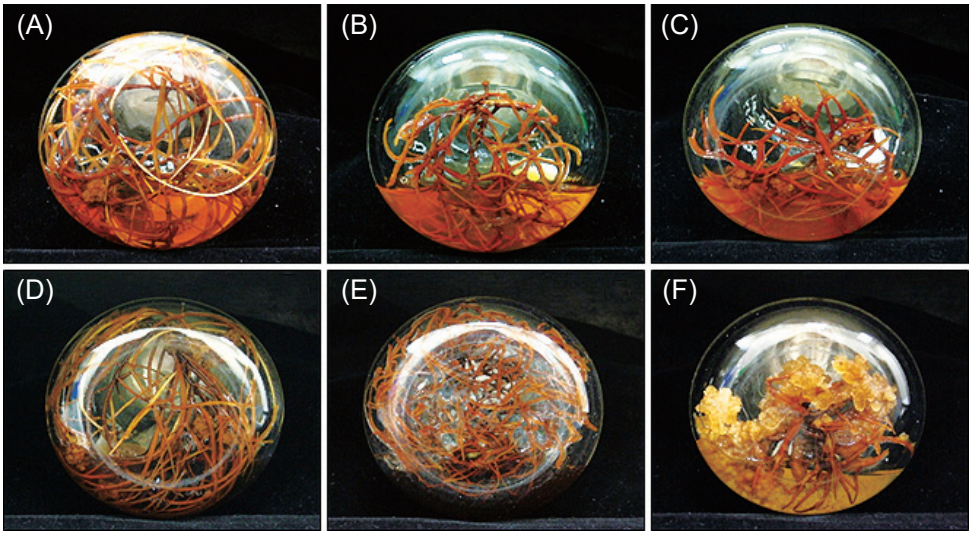


圖 5. 2N 及 4N 毛狀根系於液體培養 8 wk (上排) 及 12 wk (下排) 之生長情形。2N 根系 (A)、(D)；4N-16 號 (B)、(E) 及 4N-30 號根系 (C)、(F)。

Fig. 5. Root growth of 2N and 4N hairy root lines of *S. miltiorrhiza* at various culture times. Upper row: 8-wk-culture, lower row: 12-wk-culture. 2N (A), (D), 4N-16 (B), (E), and 4N-30 (C), (F).

有相當大之差異性。

Lavania (2013) 指出多倍體毛狀根與 2N 毛狀根雖然所含有之二次代謝的主要產物相同，但其含量多寡會產生變化，且伴隨一些次要產物的增減與改變。過去多倍體化的研究指出，藉由多倍體化提高二次代謝物產量的機制可能與數量調控基因劑量的改變、基因調控交互作用的複雜化，以及 DNA 甲基化造成表觀遺傳現象 (epigenetic phenomena) 等有關 (Lavania 2005, 2013)。一般認為染色體倍加主要是誘導基因及基因體數量的增加，在過程中可能會導致基因體的不穩定、染色體的不平衡，最終導致基因體結構、基因表現以及發育特性的改變。因此，雖然同源多倍體 (autopolyploidy) 在 DNA 的變化很小，但仍會因上述原因以及 DNA 甲基化伴隨表觀遺傳的改變，而產生許多複雜的變化。由此推測，本研究中 2N 根系之每一根尖在多倍體化誘導的過程中，雖然其基因組成相同，但因每一根尖其染色體細胞週期的不一致，可能導致不同程度之 DNA 甲基化，造成 4N 根系群在丹參酮的合成上有相當大的差異性。

此外，Berkov *et al*. (2003) 由 2N 及 4N 曼陀羅 (*Datura stramonium*) 植株誘導而來之 2N 及 4N 毛狀根，顯示兩者在生物鹼頻譜分布與累積量上有相當程度之不同。本研究中僅檢測 3 種丹參酮的含量，並未檢測其他二次代謝物種類及含量的變化，因此無法加以比較。但本研究的結果亦顯示，4N 根系與 2N 根系相較，在 3 種丹參酮含量比例的增減亦具有差異性，以隱丹參酮含量比例增加最多、丹參酮 I 含量比例減少最多，而丹參酮 IIA 含量比例減少其次。換言之，雖然 4N 根系之 3 種丹參酮含量雖然皆有增加，但 3 種丹參酮之含量並非以相同比例增加。此外，雖然 4N 根系群之總丹參酮含量皆明顯提高，卻伴隨著生質量普遍較 2N 根系為低之情形，平均生質量僅及 2N 根系之 67.2%。

Lavania (2013) 以多種藥用及香草植物進行多倍體化研究，結果顯示通過多倍體化雖能提高植物二次代謝物的含量，但未能保證植物體積 (body size) 的增大。原因在於多倍體化雖能造成細胞體積 (cell size) 的增加，但整體植物體積的增大主要取決於二次代謝物生產路徑的複雜程度，亦即二次代謝物複雜度越高，則植物體積減少的機率亦增加。亦由此推測，

丹參 4N 根系細胞在提高二次代謝物合成的同時，可能導致生長所需之一次代謝物合成量的相對減少，造成生長的緩慢，此結果並反應在 4N 根系群生質量的降低。

利用離體培養生產植物二次代謝物的研究，早期大都以細胞培養系統進行，細胞培養系統在長期培養後，常有二次代謝物含量過低或是生產不穩定等問題。推測其原因，可能與細胞在多次培養後，因培養條件產生了篩選作用，不同細胞族群間因此產生消長。其中，二次代謝物含量較高的細胞株，因為在生長及繁殖競爭上屈居劣勢，其族群在所有培養細胞中所占的比例會隨著細胞繁殖代數的增加而逐漸下降，因而造成生產系統中二次代謝物產量的下降 (Yesil-Celiktas *et al*. 2010)。惟植物細胞株的篩選有其難度，因植物細胞有集結 (aggregate) 之特性，單一細胞分離不易，且單細胞培養的條件亦較嚴苛。相對於單一細胞的逐一篩選有其困難度，毛狀根系的育成則可利用根尖為單位進行篩選，甚至對來自同一根系但不同分支間的生長差異，藉由毛狀根在固體培養基中之生長型態加以判斷選別，達到篩選高產根系的目的。

Mallol *et al*. (2001) 在人參毛狀根中觀察到 3 種不同形態之毛狀根，分別為標準、癒傷組織狀及缺乏分支等 3 種，但高生質量及高人參皂苷產量之特性則只存在於標準毛狀根。在本研究中亦有相似之觀察，例如在 4N-30 號根系觀察到癒傷組織狀的生長 (圖 5)，其丹參酮含量與標準毛狀根形態之 4N-16 號根系相較偏低。在本研究中由秋水仙素誘導所得之 103 個 4N 根系，以接種單一根系於固體培養中進行連續 3 批次篩選，在固體培養第二批次時發現有 6 個根系因生長勢差無法進行分析，第 3 批次培養時又增加 2 個生長勢變差之根系。足見不同根系間之生長穩定性並不相同，篩選初期使用固體培養有助於觀察毛狀根之生長模式 (分支性及生長形態)，達到早期篩選並淘汰生長不良根系之目的。

Georgiev *et al*. (2007) 指出利用離體培養大量生產具經濟價值之二次代謝物需配合擴大培養規模，以及後續產品純化與回收等流程，藉以達到經濟上的成本考量。液體培養即為擴大培養規模之第一步，因此本研究在固體培養後接續以液體搖瓶培養進行第二階段的 4N 根系篩選。在本研究中所以未用液體培養作為第一階段篩選的原因，在於毛狀根在液體培養中無法避免根系間的纏繞糾結，造成繼代時所取之根尖培植體無法清楚回溯其原始接種根尖之生長表現。因此，無法藉由生長模式來淘汰不良根系及其分支，故第一階段採取固體培養篩選。然而，因大量培養時需藉由液體培養來擴大培養規模，故以液體培養進行第二階段篩選，觀察 4N 根系在液體培養中之生產潛力。

圖 3 為 32 個 4N 根系在液體培養 3 批次之表現，其中在固體培養中排名前 10 名之根系，在液體培養後僅存 2 個根系 (16 號與 42 號) 仍保持在前 10 名。而在固體培養名列第 1、31 及 32 之根系，在液體培養時排名分別為第 11、第 7 及第 10 (資料未顯示)，亦即液體培養與固體培養篩選的結果有相當大的差異性。為避免表現優異之根系因篩選制度而被錯誤淘汰，建議在第一階段之固體培養篩選應儘量保留較多的根系進入第二階段之液體培養篩選，可以避免一些在液體培養中具有生長潛力之根系，因為篩選制度的不適當而提早被淘汰。

Pavlov *et al*. (2009b) 指出，高產根系的篩選是最基本且在研究初期即應進行之事項，但其重要性卻常被忽略。此一研究利用 2N 及 4N 曼陀羅花 (*Datura stramonium*) 植株之葉片，以農桿根群菌誘導所得之 2N 及 4N 毛狀根各 20 個根系，以固體培養每 3 wk 繼代 1 次，連續培養 24 wk 後，篩選出生長最快速之 10 個根系。再從 2N 及 4N 根系中，各選出 1 個莖荺鹼產量最高之根系，進行後續之營養條件測試。本研究在固體培養階段之篩選率為 31.1% (32/103) 低於 Pavlov *et al*. (2009b) 使用之 50% (10/20) 篩選率。由本研究之結果來看，建議可適度提高第一階段固體培養之篩選率；但本研究之優點為具有較大之備選族群 (103 根系)，較 Pavlov *et al*. (2009b) 僅以 20 根系作為備選族群為佳。此外，本研究比較 2N 及 4N 根系在固、液體培養中的表現，觀察到對照組之 2N 根系在液體培養時有較佳的表現。

以生質量、丹參酮含量及產量三方面來看，2N 根系由固體轉為液體培養後，分別增加 1.61 倍、1.18 倍及 2.08 倍，但 32 個 4N 根系由固體轉為液體培養後，僅分別增加為 1.47 倍、0.86 倍及 1.27 倍。推測原因，為本研究使用之 2N 根系是過去長時間培養所篩選出來之優良根系 (Lin 2006)，對液體培養已具有良好之適應力，因此在液體培養中的表現相對較佳。

時序培養是進行大量培養前必須建立的基本資訊，主要為瞭解毛狀根於液體培養中之生長、養分吸收與其二次代謝物累積在時間軸上的變化及關聯性，作為監測二次代謝產物收穫時間的依據。我們過去在丹參 2N 毛狀根的研究顯示，2N 根系的丹參酮是在毛狀根生長進入定常期 (stationary phase) 後才開始大量累積 (Chen *et al*. 2008)，本研究中 2N 根系的表現亦符合此觀察。此外，本研究之結果顯示 4N 根系的生長速度較 2N 根系慢，但其丹參酮的累積卻較 2N 根系提早，亦即 4N 根系的生理老化時間可能較 2N 根系提早。在實務上雖然延長 4N 根系培養時間有助生質量的提升，但必須考慮此舉伴隨著丹參酮含量降低的影響。綜合從生質量到各種丹參酮含量累積的表現來看，顯示 4N 根系的生長及丹參酮的累積模式與 2N 根系並不相同，在本研究中固、液體培養篩選皆以培養 8 wk 後作為調查時間，依照時序培養結果所示，在 8 wk 時 4N 根系的生質量尚未達最高點，但丹參酮含量已達最高，在此時間點收穫之 4N 根系其丹參酮產量仍優於 2N 根系。也就是說 4N 根系因具有丹參酮累積所需時間較短的特性，在培養時間的效率上優於 2N 根系，亦即培養所需時間越短，在相同培養時間內可增加培養的批數。以一年 52 wk 為計算基準，8 wk 收穫的 4N 根系可培養批次為 6.5 次，10 wk 收穫之 2N 根系培養批次為 5.2 次，若延至 12 wk 收穫則培養批次降為 4.3 次。

以離體培養方式生產植物二次代謝物，與以生產種苗為目標的培養方式相較，前者在優化培養條件的判定上較為複雜，因為培養系統的好壞不能以單一因子表現來評斷。例如，單純以培植體生質量或單純以二次代謝物的含量高低來判斷，尤其當提高生質量與提高二次代謝物含量所需之培養條件有拮抗或競爭時，或兩者所需培養條件不一致時，必須以二次代謝物的產量為終極目標來調整生產策略，亦即理想中的高產丹參毛狀根的定義應為丹參酮總產量的提高。在過去的研究中對 2N 丹參毛狀根培養條件的最佳化，已累積有相當多之資料 (Chen *et al*. 2008, 2010; Chan *et al*. 2012)，但對於 4N 毛狀根培養條件最佳化的研究則相對缺乏，因此以 2N 根系的培養條件套用於 4N 根系是否適當必須檢討。

Pavlov *et al*. (2009b) 以曼陀羅 (*Datura stramonium*) 葉誘導所得之 2N 及 4N 毛狀根，比較兩者培養所需營養條件之差異。結果顯示，2N 毛狀根以 3% 蔗糖培養時，有最高之生質量及莨菪鹼產量，蔗糖濃度繼續增加不利生質量及莨菪鹼的生成；而 4N 毛狀根之生質量及莨菪鹼產量，則隨著蔗糖濃度增加而提高，至 7% 達最高，其生質量及莨菪鹼分別為 2N 毛狀根的 2.75 倍及 2.5 倍。其他營養成分之差異如 PO_4^{-3} 濃度，2N 毛狀根培養之最佳濃度為 1.25 mM，4N 毛狀根則為 0.63 mM，其生質量及莨菪鹼產量分別是 2N 毛狀根的 2 倍及 1.35 倍。此外，Pavlov *et al*. (2009a) 以 MS 培養基為基礎，進行主要營養成分最佳化研究，結果顯示 2N 及 4N 根系獲得莨菪鹼最高產量之培養基 C/N 比值，分別從原本 MS 培養基的 10.7 增加至 17.2 (2N) 及 21.5 (4N)。在最佳化的培養條件下，4N 根系之莨菪鹼產量要比 2N 根系為高。本研究中 4N 根系使用之培養基及培養週期等條件，皆沿用過去 2N 根系培養之資料，未來將針對優良之 4N 根系優化其培養條件以確認其生產潛力。

過去發表的報告指出，4N 毛狀根有較高的二次代謝物含量 (De Jesus-Gonzalez & Weathers 2003; Dehghan *et al*. 2012)，本研究亦顯示相同之結果。但進一步分析 4N 之個別根系，發現個別根系在生質量及二次代謝物含量方面的表現具有相當大之差異性，必須經由篩選來確認優秀之高產根系。惟篩選策略會影響優良根系的選出，例如本研究中液體培養之 32 個根系是固體培養後依據其總丹參酮產量所選出，

3 種丹參酮產量中又以隱丹參酮所占比例最高。因此，液體培養中 4N 根系之隱丹參酮含量在 32 個根系中表現相當一致，皆明顯較 2N 根系為高。相較於 4N 根系隱丹參酮的絕對偏高，4N 根系的丹參酮 I 與丹參酮 IIA 含量雖然普遍亦較 2N 根系為高，但比例上不如隱丹參酮含量表現之一致。這個現象主要是受到篩選時以總丹參酮含量為依據，而總丹參酮含量中又以隱丹參酮為最高所致。這也提示我們未來可針對特定二次代謝物的種類及其含量對個別根系加以篩選，達到客製化之目的。離體毛狀根培養系統的建立，係為配合產業化方式大量生產高價之植物二次代謝物，許多基本之培養條件必須在放大培養前逐一加以確認，高產根系的篩選即為其基礎，但卻最易為人們所忽略。本篇研究的結果，亦證實此一觀點的正確性。未來將針對目前篩選所得之高產 4N 根系進行培養條件之最佳化，讓優良 4N 根系達到其最佳之生產狀態，充分發揮其高產之優勢。

引用文獻

Berkov, S., A. Pavlov, P. Kovatcheva, P. Stanimirova, and S. Philipov. 2003. Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium*. Z. Naturforsch. C. 58:42–46.

Chan, H. S., T. T. Lo, U. C. Chen, C. N. Hsia, and H. S. Tsay. 2012. Effect of nitrogen source on biomass and tanshinone production of *Salvia miltiorrhiza* in hairy root culture. J. Taiwan Agric. Res. 61:100–111. (in Chinese with English abstract)

Chen, U. C., H. S. Chan, C. Y. Lee, C. Y. Tsao, J. C. Liu, Y. C. Lee, and C. N. Hsia. 2008. Production of tanshinones of *Salvia miltiorrhiza* in hairy root culture. J. Taiwan Agric. Res. 57:305–326. (in Chinese with English abstract)

Chen, U. C., C. Y. Lee, H. S. Chan, C. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2010. Influence of metal ion and elicitor on hairy root growth and production of tanshinones of *Salvia miltiorrhiza*. J. Taiwan Agric. Res. 59:49–60. (in Chinese with English abstract)

Dehghan, E., S. T. Häkkinen, K. M. Oksman-Caldentey, and F. S. Ahmadi. 2012. Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 110:35–44.

De Jesus-Gonzalez, L., and P. J. Weathers. 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Rep. 21:809–813.

Dhawan, O. P. and U. C. Lavania. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: A review. Euphytica 87:81–89.

Flores, H. E., J. M. Vivanco, and V. M. Loyola-Vargas. 1999. 'Radicle' biochemistry: The biology of root-specific metabolism. Trends Plant Sci. 4:220–226.

Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151–158.

Georgiev, M. I., A. I. Pavlov, and T. Bley. 2007. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74:1175–1185.

Guillon, S., J. Trémouillaux-Guiller, P. K. Pati, M. Rideau, and P. Gantet. 2006. Harnessing the potential of hairy roots: Dawn of a new era. Trends Biotechnol. 24:403–409.

Habibi, P., M. F. G. De Sa, A. Makhzoum, S. Malik, A. L. L. da Silva, K. Hefferon, and C. R. Soccol. 2017. Bioengineering hairy roots: Phytoremediation, secondary metabolism, molecular pharming, plant-plant interactions and biofuels. p.213–251. *in*: Sustainable Agriculture Reviews. Vol. 22. (Lichtfouse, E., ed.) Springer. Cham, Switzerland. 328 pp.

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, and T. Y. Wu. 2013. Polyploidy hairy roots induction of *Salvia miltiorrhiza*. J. Taiwan Agric. Res. 62:280–288. (in Chinese with English abstract)

Kang, B. Y., S. W. Chung, S. H. Kim, S. Y. Ryu, and T. S. Kim. 2000. Inhibition of interleukin-12 and interferon-γ production in immune cells by tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. Immunopharmacology 49:355–361.

Lavania, U. C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genet. Resour. 3:170–177.

Lavania, U. C. 2013. Polyploidy, body size, and opportunities for genetic enhancement and fixation of heterozygosity in plants. Nucleus 56:1–6.

Lee, D. S., S. H. Lee, J. G. Noh, and S. D. Hong. 1999. Antibacterial activities of cryptotanshinone and dihydrotanshinone I from a medicinal herb, *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63:2236–2239.

Lin, J. F. 2006. Development of hairy root transformation system and its secondary metabolites production of *Salvia miltiorrhiza*. Master Thesis, Department of Agronomy, National Chung Hsing University.

Taichung, Taiwan. 76 pp. (in Chinese with English abstract)

Mallol, A., R. M. Cusidó, J. Palazón, M. Bonfill, C. Morales, and M. T. Piñol. 2001. Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. Phytochemistry 57:365–371.

Ono, N. N. and L. Tian. 2011. The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. Plant Sci. 180:439–446.

Pavlov, A. I., V. G. Georgiev, A. S. Marchev, and S. H. Berkov. 2009a. Nutrient medium optimization for hyoscyamine production in diploid and tetraploid *Datura stramonium* L. hairy root cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. 25:2239–2245.

Pavlov, A., S. Berkov, J. Weber, and T. Bley. 2009b. Hyoscyamine biosynthesis in *Datura stramonium* hairy root *in vitro* systems with different ploidy levels. Appl. Biochem. Biotechnol. 157:210–225.

Srivastava, S. and A. K. Srivastava. 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. Crit. Rev. Biotechnol. 27:29–43.

Suh, S. J., U. H. Jin, H. J. Choi, H. W. Chang, J. K. Son, S. H. Lee, S. J. Jeon, K. H. Son, Y. C. Chang, Y. C. Lee, and C. H. Kim. 2006. Cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza* Bunge has an inhibitory effect on TNF-α-induced matrix metalloproteinase-9 production and HASMC migration via downregulated NF-κB and AP-1. Biochem. Pharmacol. 72:1680–1689.

Takahashi, K., X. Ouyang, K. Komatsu, N. Nakamura, M. Hattori, A. Baba, and J. Azuma. 2002. Sodium tanshinone IIA sulfonate derived from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) attenuates hypertrophy induced by angiotensin II in cultured neonatal rat cardiac cells. Biochem. Pharmacol. 64:745–750.

Wang, A. M., S. H. Sha, W. Lesniak, and J. Schacht. 2003. Tanshinone (*Salviae miltiorrhiza* extract) preparations attenuate aminoglycoside-induced free radical formation *in vitro* and ototoxicity *in vivo*. Antimicrob. Agents Chemother. 47:1836–1841.

Yesil-Celiktas, O., A. Gurel, and F. Vardar-Sukan. 2010. Large Scale Cultivation of Plant Cell and Tissue Culture in Bioreactors. Transworld Research Network. Kerala, India. 54 pp.

Yuan, S. L., X. J. Wang, and Y. Q. Wei. 2003. Anticancer effect of tanshinone and its mechanisms. Chin. J. Cancer 22:1363–1366.

Zhou, M. L., X. M. Zhu, J. R. Shao, Y. X. Tang, and Y. M. Wu. 2011. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90:1229–1239.

Screening on Tanshinone Production and Time Course Culture of Tetraploidy Hairy Roots of *Salvia miltiorrhiza*

Chi-Ni Hsia[1], Chin-Yi Tsao[2], Tzu-Ying Wu[3], and Uei-Chern Chen[4,*]

Abstract

Hisa, C. N., C. Y. Tsao, T. Y. Wu, and U. C. Chen. 2018. Screening on tanshinone production and time course culture of tetraploidy hairy roots of *Salvia miltiorrhiza*. J. Taiwan Agric. Res. 67(1):94–105.

Salvia miltiorrhiza Bunge, a perennial herb of Labiatae Family, has been used to cure cardiology disease in traditional Chinese medicine for long history. Polyploidy hairy roots containing higher concentration of secondary metabolites than its diploidy are considered as better explants for *in vitro* production of valuable secondary metabolites. The objective of this study was to establish a selection strategy on tanshinone production of tetraploidy hairy root lines (4N lines) which were induced from the diploid hairy root line (2N line) by colchicine treatment. Three consecutive cultures in solid medium were first conducted on 103 lines of 4N. Among them, 32 lines with the highest tanshinone production were selected for another 3 consecutive liquid medium culture. Meanwhile, two 4N lines and the 2N line were used to conduct the time course culture in liquid medium for 12 wk span. Screening results from solid cultures showed that the average biomass of 103 lines of 4N was only counted 67.2% of the 2N line. However, average total tanshinone contents and productivity of 4N lines were counted 4.66 times and 3.29 times higher than that of the 2N line, respectively. Composition ratios of cryptotanshinone, tanshinone I, and tanshinone IIA contents on 4N lines and 2N line were compared. It was found ratio of cryptotanshinone increasing the most in contrast decreasing ratios of tanshinone I and tanshinone IIA. The ten best lines of 4N selected from solid medium on production of tanshinones were found having only 2 lines remaining in the best ten after liquid medium selection. In order not to miss elite lines, lower selection strength was recommended in the stage of solid culture on 4N lines. Results of time course culture showed that lagging growth of 4N lines than that of 2N line. Moreover, two 4N lines had slightly different growth rates. The highest tanshinone contents were found after 8 wk of culture on 4N lines which was much earlier than that of 12 wk of culture on 2N line. In conclusion, although 4N lines have lower biomass than that of the 2N line, 4N lines have higher tanshinone contents and shorter culture period on tanshinone accumulation which would provide better efficacy on tanshinone production than that of 2N lines. It is thought that selection of elite 4N lines will provide a good foundation for *in vitro* production secondary metabolites.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge, Hairy root, Polyploidy, Tanshinone, *In vitro* culture.

Received: July 4, 2017; Accepted: September 14, 2017.
* Corresponding author, e-mail: UCChen@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Ruey-Jang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University
Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Chen, Su-Ming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University
Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University
Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University
Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute
Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University
Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University
Ko, Chiun-Cheng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University
Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University
Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station
Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University
Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute
Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University
Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wu, Huei-Ching
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

Consultant to Editorial Assistants

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 67 No. 1 March 31, 2018

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://aspers.airiti.com/JTAR
Press	Airiti Press
Address	18F., No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330