台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(2):154–172 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.06

研究報告

運用分子標幟輔助提升耐鹽粳稻之耐旱性

連怡鈞[1] 郭介煒[2] 郭素真[3] 林彥蓉[4] 吳永培[5,*]

摘要

連怡鈞、郭介煒、郭素真、林彥蓉、吳永培。2016。運用分子標幟輔助提升耐鹽粳稻之耐旱性。台灣農業研究 65(2):154–172。

本研究以 5 個粳型稻 (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) 誘變品系 SM61、CWY981126、CWY981127、CWY981128 及 CNY911303 等為材料，在 5 葉齡以 100、150、200、250 及 300 mM NaCl 等 5 種不同濃度溶液進行模擬鹽分處理，在各品系之耐鹽性評估中，發現除了 150 mM 鹽分逆境外，耐鹽表現均以 CWY981126 顯著優於其他品系。而以 4 個秈型稻 (*Oryza sativa* ssp. *indica*) 品種 (系) 'HY15'、'IR29'、'IR64' 及 SM1 為材料，在幼苗期 3 葉齡以 28% 聚乙二醇 (PEG 6000) 進行模擬缺水逆境處理，結果發現 'HY15' 的秧苗期耐旱性表現較佳。進一步以 CWY981126 為耐鹽性輪迴親，而 'HY15' 為耐旱性貢獻親，經 2 次回交將耐旱性導入 CWY981126 中。各回交世代選育過程均先經過缺水，挑選出耐鹽和耐旱的後代，再透過分子標幟之背景輔助選拔，發現 BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_2F_2 的回復率分別為 73.6、85.5 及 88%，與理論的遺傳回復率相近。而 BC_2F_3 品系經耐旱特性檢測，發現有 7 個品系之耐旱表現優良，進一步分析此 7 個品系之耐鹽表現，結果以 LD1、LD7、LD8 及 LD10 等 4 個品系之耐鹽表現良好，接近或優於輪迴親 CWY981126。由此推測，此 4 個品系已兼具有耐旱及耐鹽特性。綜合上述結果，顯示在分子標幟輔助下 BC_2F_2 回交後代平均已有 88% 比率回復至輪迴親的遺傳背景，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。這些品系值得進一步探討，希望未來能提供國內外缺水及鹽化土地的栽培利用。

關鍵詞：分子標幟輔助選拔、耐旱、耐鹽、水稻。

前言

水稻稻穀年均產量僅次於小麥，是世界第 2 重要的禾穀類糧食作物，全球超過一半人口以水稻作為主食，尤其是發展中國家人民所需熱量的主要來源。2008 年全球共有 15,570 萬公頃的土地栽種水稻，總共生產 66,100 萬噸的稻米 [International Rice Research Institute (IRRI) 2009]。隨著全球人口日益增長，糧食需求不斷的增加，帶給農業重大的挑戰，聯合國糧農組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 估計 2050 年時世界糧食產量需求要增加 60%，其中大部分糧食來源需由現有土地生產，尤其是經由水稻生產供應，顯示水稻生產將面臨越來越多的壓力和挑戰。然而，由於全球暖化效應加劇，加上如極端天氣事件發生、降雨量分布不均、肥料過度使用及鹽化土地面積增加等因素，皆將不利於水稻的生長與發育，因此未來非生物逆境將成為作物產量的最主要限制因子之一 (Brown & Halweil 1998; Pandey *et al*. 2000)。世界上約有 35% 水稻生產於看天田區，其稻米的生產

投稿日期：2015 年 8 月 7 日；接受日期：2015 年 9 月 21 日。
* 通訊作者：wuypei@dns.caes.gov.tw
[1] 國立嘉義大學農藝學系碩士生。台灣 嘉義市。
[2] 國立嘉義大學農藝學系助理教授。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系研究助理。台灣 嘉義市。
[4] 國立台灣大學農藝學系副教授。台灣 台北市。
[5] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系副研究員。台灣 嘉義市。

最主要受到乾旱影響；而沿海地區及內陸的水稻田區，乾旱通常會伴隨鹽害情形發生 (Wang *et al*. 2013b)。亞洲許多地區灌溉水是用來降低水田土壤中之鹽分，但因缺乏乾淨的灌溉水，往往導致土壤 2 次鹽化，從而增加逆境對水稻的影響。因此，鹽害是僅次於乾旱，影響水稻產量之第 2 大非生物逆境限制因素。

國際水稻基因體計畫 (International Rice Genome Sequencing Project; IRGSP) 於 1997 年開始針對粳稻「日本晴」('Nipponbare') 進行全基因體序列研究，在 2002 年公布粳稻品種「日本晴」(Goff *et al*. 2002) 和秈稻品種 '93-11' (Yu *et al*. 2002) 基因組的定序草圖後，2005 年時也完成「日本晴」的全基因體定序，其大小約 389 Mb (IRGSP 2005)。此結果促進多種分子標幟的發展，其中簡單序列重複 SSR (simple sequence repeat) 在水稻基因體內因分布廣泛數量豐富、多型性高、共顯性 (co-dominant)、易於探測及可使用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 技術操作等特性，故廣泛應用在圖譜建立、分子輔助選拔與定位選殖 (positional cloning)，有效提升了工作效率 (McCouch *et al*. 1997)。隨著後基因體學時代的來臨，應用分子生物技術輔助傳統育種工作，大幅提升了育種效率及縮短育種年限。而分子標幟可以偵測生物體內能遺傳至後代的特定 DNA 序列、蛋白質，目前以 DNA 標幟應用最廣泛 (Wu & Wang 2011)。

大多數水稻之非生物逆境耐受特性係受數量性狀基因座 (quantitative trait loci; QTLs) 所控制，遺傳特性複雜且容易受環境干擾，因此無法由植株外觀進行準確的判斷，導致選拔效率低下 (Wang *et al*. 2013a)。利用目標性狀 QTLs 圖譜定位，將有助於更進一步瞭解這些性狀的遺傳基礎，然而僅少數 QTLs 已被證實並作為育種指標。因為大多數的 QTLs 於不同遺傳背景或環境下，受遺傳與環境交感作用之影響，導致缺乏再現性 (Li *et al*. 2005; MacMillan *et al*. 2006; Yue *et al*. 2008)，也阻礙了耐逆境育種的研究發展。

分子標幟輔助選拔 (marker-assisted selection; MAS) 屬於間接選拔，且由於目標性狀的遺傳不會隨品種材料或環境不同而有差異，相當穩定且再現性佳。因此，藉由基因體學發現和標記新基因，再透過與目標基因緊密連鎖分子標幟的偵測，如此目標性狀便可間接依分子標幟表現而選出 (Wu & Wang 2011)。又應用 MAS 於水稻耐旱育種時，首要條件為目標基因在不同遺傳背景族群中均表現，如此耐旱 QTLs 在各遺傳背景中才具應用價值，並於確立與目標 QTLs 緊密連鎖的分子標幟後，可藉由分子標幟表現來選育耐旱水稻品種 (Wang *et al*. 2013a)，如此可大幅提升耐旱水稻的育種效率。

耐鹽與耐旱逆境基因的堆疊，是耐多重逆境水稻育種之重要目標。選育同時具耐鹽及耐旱雙重耐逆境特性之新品種，除了平日可於水田栽培外，栽培過程若發生逆境衝擊，因其具有耐多重逆境特性，故可降低減產效應，穩定糧食生產。在逆境易發生區，如於缺水、鹽化、或缺水及鹽化同時存在之多變環境下，更可利用耐多重逆境之耐逆境品種增加糧食的生產，因此耐多種逆境水稻的選育已逐漸成為當前育種者追求之重要目標。達成選育耐多重逆境新品種的方法，可藉由基因堆疊來完成，透過同時堆疊多個基因進入單一遺傳背景中，即可促使多個基因同時表現在 1 個品種中 (Mundt 1990)。基因堆疊過程相當複雜，僅藉由傳統育種很難有效完成，特別是控制目標性狀基因常與一些不良特性緊密連鎖，要打破顯性和上位性的效應困難度很高，常常需經過多次回交之操作方能達成 (Young & Tanksley 1989)。透過以外觀表現、穀粒質量性狀及分子標幟為基礎之背景選拔，篩選子代以快速回復至輪迴親的基因型，讓子代回復率可達到 85–96% (Dokku *et al*. 2013)，使外表性狀配合分子標幟之篩選可真正落實應用於基因堆疊中，此為耐多種逆境水稻的選育成功與否的關鍵決定因素。

過去研究結果顯示，耐旱與耐鹽有關基因座之數量龐大且組成複雜，控制基因廣泛分布於水稻基因組中，在不同族群或環境中只有極少數 QTLs 會持續的被檢驗出 (MacMillan *et al*. 2006; Yue *et al*. 2008; Zang *et al*. 2008)，目前只有發現少數與耐旱有關主效 QTLs，如 *qtl12.1*、*DRO1* 或與分子標幟 EM11-11 緊密

連鎖的 QTLs，耐鹽相關之 *SKC1* 與 *Saltol*，這些基因已被確認並應用於水稻 MAS 育種 (Ren *et al*. 2005; Bernier *et al*. 2007; Kumar *et al*. 2007; Uga *et al*. 2013)。因此，從種原中開發、檢測與耐旱、耐鹽相關緊密連鎖之分子標幟，對於發展耐旱與耐鹽水稻新品種將扮演非常重要的角色 (Yue *et al*. 2008)。

透過化學誘變方式進行水稻育種，其不僅可增加種原變異，更可創造種原新穎性，是作物育種的有效手段之一。Jwo (2007) 在疊氮化鈉 (sodium azide) 誘變水稻「台農 67 號」('TNG67') 突變品系為材料，在秧苗期耐鹽篩選逆境下，結果選出分別具有耐鹽及感鹽突變品系。Yen & Lin (2011) 則在 1,005 個粳稻嘉農育 911303 號 (CNY911303) 的甲基磺酸乙酯 (EMS) 誘變品系中，篩選出耐鹽品系 SM61，該品系耐鹽表現優於 'Pokkali' 及 'Nona Bokra' 等已知的耐鹽水稻品種，遺傳分析結果發現其耐鹽性由單一顯性基因所控制。Wu (2013) 以 'IR64' 經 2 次疊氮化鈉誘變品系為材料，在 M_3 族群進行 20% PEG 6000 溶液模擬水分缺乏逆境處理，結果選得 126 株 M_3 耐旱株，這些品系在 M_4 世代 3 葉齡時再以 28% PEG 6000 溶液進行耐旱性確認。結果發現有 9 個突變品系表現了高度耐旱性，上述結果顯示化學誘變不僅可增加栽培種的多樣性，更有助於耐逆境水稻之開發。

由於台灣地區非生物逆境發生時機不易精確預測，因此需積極投入非生物逆境水稻的研發，如此方能因應全球暖化的衝擊 (Wu 2013)。基此，本研究乃利用粳稻耐鹽品系 CWY981126 及秈稻耐旱品種 'HY15' 為親本，透過 2 次回交將 'HY15' 之耐旱性導入 CWY981126 中。而在回交過程中，各世代均則先進行缺水逆境篩選後，再後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之粳稻新品系。

材料方法

試驗材料

供試品系不同鹽分濃度之耐受性： CNY911303 係來自 1 mM 疊氮化鈉誘變「台農 67 號」種子所培育之香味突變品系，本品系 M_8 世代再以 100 mM 之 EMS 溶液再次進行誘變，其後以譜系法持續純化繁殖後，於 M_6 世代各品系於 3 葉齡時利用 150 mM NaCl 溶液進行耐鹽篩選，結果選出 SM61、CWY981126、CWY981127 和 CWY981128 等 4 個秧苗期呈現耐鹽之品系。此 4 個品系及誘變親本 CNY911303，即為不同 NaCl 鹽分濃度耐受性測定用材料。將此 5 個品系以水耕液培育至幼苗期 5 葉齡，分別以含有 100、150、200、250 及 300 mM NaCl 之水耕液進行模擬鹽分逆境處理，並以 RCBD (randomized complete block design) 設計排列。各品系於不同濃度處理時均採用 4 重複，每重複 8 株。在處理滿 1 d 後，開始進行耐鹽等級調查，耐鹽等級標準參考 Jwo *et al*. (2008) 修改自 IRRI (2002) 所定水稻標準評估系統之鹽害分級標準 (standard evaluation system for rice; SES)。經此挑選耐鹽表現佳者，以供作分子標幟輔助育種之輪迴親使用。

供試品系耐旱測試： 以 'HY15'、'IR29'、'IR64' 及 SM1 等 4 個秈稻 (*O. sativa* ssp. *indica*) 為材料，其中 'HY15' 為中國大陸引進之耐旱佳之秈稻品種，而 'IR29' 和 'IR64' 則為國際稻米研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 引進之缺水敏感型秈稻品種，至於 SM1 係 'IR64' 以疊氮化鈉誘變所得秧苗期表現耐旱之品系。4 個品種 (系) 均於水耕液中培育，至幼苗期 3 葉齡時，再以 28% PEG 6000 水耕液進行模擬缺水逆境處理，並以 RCBD 設計排列。各品種 (系) 處理時均採用 4 重複，每重複 8 株。在處理滿 1 d 後，開始進行耐旱等級調查，耐旱處理等級標準採用 IRRI (1996) 所定水稻標準評估系統進行。經此挑選耐旱佳者，供分子標幟輔助育種之貢獻親使用。

耐逆境表現調查

耐鹽等級調查： 種子進行模擬鹽分逆境處理前，以免賴得粉劑 (Benomyl) 稀釋 1,000× 溶液消毒種子 1 d，再將發芽種子點播於 80 孔的栽培盤中進行水耕栽培，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 NaCl 之 1.5× 水耕液進行耐鹽等級評估，同時以敏感型 'IR64' 做為對照品種，而耐鹽等級調查則同上述供試品系於不同鹽分濃度下耐受性之標準進行。惟分子標幟輔助育種之 BC_2F_3 回交後代，則於耐鹽處理後進行復水處理，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 (圖 1)。存活回交後代移至田間培育，並收穫自交種子利用。

耐旱試驗與等級調查：材料種子同樣係以免賴得粉劑稀釋 1,000× 溶液消毒種子 1 d，再將發芽種子點播於 80 孔的栽培盤中進行水耕栽培。營養液同樣採用改良式木村氏 B 培養液配方，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。當植株生長平均達 3 葉齡時，進行耐旱篩選及評估，即以 28% PEG 6000 之 1.5× 水耕液處理，同時培育敏感型 'IR64' 作為對照品種。耐旱處理等級調查標準，採用 IRRI (1996) 所定水稻標準評估系統進行。分子標幟輔助育種 BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_2F_2 回交後代經耐旱處理後，乃進行復水，而敏感型對照品種 'IR64' 耐旱等級平均達 7 級時，即進行復水處理 (圖 2)。存活回交後代移至田間培育，並收穫自交種子利用。

此外，為避免耐逆境操作時微環境之影響，在水耕盤中的 4 個角落、邊上、中間 4 個位置及中央位置均放入 'IR64' 作為對照，作為逆境等級進展、微環境穩定為否等控制及操作。當 'IR64' 的表現不正常時，該次試驗即予捨棄，尤其需進行復水操作時，'IR64' 的耐逆境等級表現是判定復水時機的依據。

分子標幟輔助水稻耐旱與耐鹽特性之堆疊

以 'HY15' 作為貢獻親，CWY981126 為輪迴親，進行雜交組合建立，並於 F_2 世代進行耐旱處理。由調查結果中，選出耐旱等級 3 之耐旱株與 CWY981126 進行回交族群建立。各回交世代 (BC_1F_1、BC_2F_1、BC_2F_2) 再以 28 % PEG 6000 缺水逆境進行篩選試驗，同樣耐旱等級 3 且復水後存活植株進一步移植田間栽培。存活植株再利用散布於 12 對染色體上，距離 30 centiMorgan 之分子標幟且進行分析及背景選拔，與輪迴親本 CWY981126 遺傳回復率高之植株則進行回交及自交，產生之回交



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

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



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

Fig. 2. The different scales of rice morphology in response to drought treatment. (A)–(F) Rice was treated with 28% PEG 6000 at 3-leaf-old stage and scaled as (A) none treatment, the scale of drought-tolerance is denoted 0. (B) Some leaves are rolled or discolored, the scale of drought-tolerance is denoted 1. (C) Some leaves tips are drying, the scale of drought-tolerance is denoted 3. (D) About 1/2 leaves of the plant are drying, the scale of drought-tolerance is denoted 5. (E) About 2/3 leaves of the plant are drying, the scale of drought-tolerance is denoted 7. (F) The whole plants are almost dead and drying, the scale of drought-tolerance is denoted 1, respectively.

種子及自交 BC_2F_2 種子。至於 BC_2F_2 族群，係獲選 BC_2F_1 之自交種子分別取相同比例混合而成，之後乃經缺水逆境及存活株背景選拔，而獲選之 BC_2F_2 分別收穫自交種子並成立 BC_2F_3 品系。BC_2F_3 品系則以進行 28% PEG 6000 缺水逆境及 200 mM 鹽分逆境，再確認耐多重逆境特性。檢定採用 RCBD 試驗設計，每系 3 重複，每重複 4 株。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 3 所示。

分子標幟分析

水稻 DNA 萃取：水稻基因體 DNA 的萃取是逆境處理前，先取水稻幼苗葉尖 4 cm 之新鮮葉片，經冷凍乾燥約 1 d 後，採用修改自 Kazuhiro *et al*. (1998) 發表之 benzyl chloride 法進行 DNA 萃取。

PCR 反應、電泳分析及基因型判讀：PCR 反應及電泳分析採用 Liao (2012) 發表的方式進行，比對子代與親代 PCR 擴增後產物的 DNA 片段大小，電泳圖譜若僅出現 1 個 DNA 條帶，且與 'HY15' 條帶相同者，則此子代為同型合子，基因型紀錄為 A；只出現 1 個 DNA 條帶而與 'IR64' 條帶相同者，則子代亦為同型合子，基因型紀錄為 B；子代同時出現兩個條帶並與兩個親本相同者，即為異型合子，基因型紀錄為 H。由於 BC_1F_1、BC_2F_1 均為回交子代，為避免自交種子的混雜影響，其雜交種子在基因型的分析中只會出現輪迴親同型合子 B 與異型合子 H，當子代基因型出現與貢獻親同型合子 A 者，則為自交植株，分析發現後乃淘汰自交單株。

建立多型性分子標幟：本研究主要利用 SSR 及 STS 分子標幟進行分析，而分子標幟之挑選先依據 Hsu (2012) 發表之多型性分子標幟資料進行，即挑選 CWY981126 和 'HY15' 間具多型性分子標幟進行分析。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 (Sup-

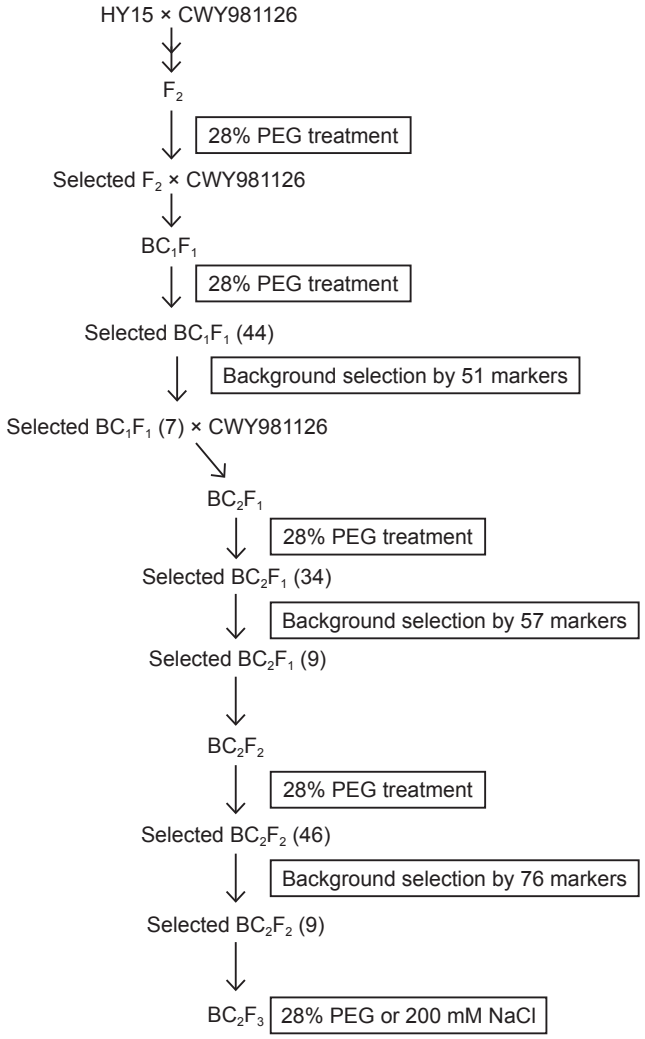


圖 3. 分子標幟輔助耐旱特性轉移至 CWY981126 之回交育種流程，包含 28% PEG 6000 水分處理及用於背景選拔之分子標幟說明。括弧內數值為每 1 個回交世代挑選植株數。

Fig. 3. The backcross breeding scheme for transfering the drought-tolerant trait to CWY981126 by MAS (marker-assisted selection), with details of the treatment of 28% PEG 6000 and markers used for background selection. The numbers of plants selected in each generation are indicated in parentheses.

plementary Table 18, IRGSP 2005)，indel 的設計則是根據 Shen *et al*. (2004) 所發表 indel 存在位置進行相關引子設計。

繪製連鎖圖譜：利用專一性引子將目標片段擴增，並以電泳系統將擴增片段加以分離，挑選出在 2 個輪迴親與貢獻親間具備多型性的分子標幟，使用 RAP-DB 網站提供 IRGSO/RAP build 5 版 BAC/PAC 位置，轉換成在 IRGSP 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。

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

結果

品系耐逆境測定

各品系對不同鹽分濃度耐受性：利用 CNY911303、SM61、CWY981126、CWY981127 及 CWY981128 等 5 個香米品系進行 100、150、200、250 及 300 mM 不同模擬鹽分濃度耐受性比較，結果在 100 mM 鹽分逆境下，稻株在處理 2 d 時即開始出現耐鹽等級差異。由試驗結果，發現除 SM61 外，其餘 4 個品系經 100 mM 鹽分逆境處理 5 d 時已達 3 級，而在 7 d 除品系 CWY981127 外，其餘品系均表現均達 3 級以上，9 d 時以品系 SM61 之耐鹽等級表現最佳，最終於 14 d 時所有品系則皆達到 7 級以上。而經由變方分析及多重比較發現，各品系於 5、7、9 及 14 d 時，其品系間之耐鹽表現達到顯著差異水準，而 14 d 之耐鹽等級以 CWY981126 耐鹽表現最佳 (表 1)。

在 150 mM 鹽分逆境處理下，於 2 d 時各品系葉片開始出現鹽分處理反應差異，3 d 時除 CWY981127 外，其餘 4 個品系皆已達 3 級。而在 5 d 時，則是除了 SM61 之外，其餘品系均表現 3 級以上，CWY981128 甚至達到 5 級。在 10 d 時，各品系皆達到 7 級以上，但整體而言仍以 CWY981126 仍維持最佳的耐鹽表現。至 14 d 時，CNY911303 與 CWY981128 耐鹽等級已達 9 級，但其餘 3 品系均未達 9 級 (表 1)。

在 200、250 及 300 mM 模擬鹽分逆境處理時，各品系處理後 2 d 耐鹽等級已皆達 3 級以上，其中以 SM61 對鹽分逆境表現最為敏感。在鹽分逆境處理後 2–4 d，即呈現 5–8 級的表現，並最快達到耐鹽等級 9 級；而 5 個品系經 3 種高鹽分逆境處理後，結果發現 CWY981126 的耐鹽表現仍維持優良表現 (表 1)。

綜合上述研究發現，CWY981126 不論是在 100、250 及 300 mM 模擬鹽分處理下，均是表現最優良的耐鹽品系，表現皆顯著高於其餘 4 個品系。而在 200、250 及 300 mM 模擬鹽分處理時雖表現並非最佳者，但仍有相當不錯的耐鹽反應，顯示本品系對不同濃度鹽分的耐受性佳。在 100 與 150 mM 模擬鹽分處理表現較佳的 SM61 和 CWY981127，其在 200、250 及 300 mM 模擬鹽分處理下，對鹽分耐受性並沒有一致性的穩定反應 (表 1)。

品系耐旱性測定：‘HY15’、‘IR29’、‘IR64’ 及 SM1 等於稻株幼苗 3 葉齡時，以 28% PEG 6000 進行模擬缺水逆境處理，結果稻株經缺水逆境處理 1 d 時即出現耐旱等級之差異。在 2 d 時，所有品種 (系) 皆達到 5 級，而在 3 d 時除了 ‘IR29’ 達到 7 級，其餘品系均未達到耐旱等級 7 級。雖然自 4 d 開始 ‘HY15’ 的耐旱表現低於 ‘IR29’，但是最終在 8 d 時只有 ‘IR29’ 達到 9 級。經由變方分析結果，顯示品系間耐旱等級表現皆未達顯著水準，雖然 ‘HY15’ 的耐旱反應表現不及耐旱品系 SM1，但 1 d 時仍以 ‘HY15’ 的表現最佳，並於最終 8 d 之耐旱表現高於缺水敏感型品種 ‘IR29’ (表 2)。

上述 4 個品系在 3 葉齡 28% PEG 6000 模擬缺水逆境處裡之耐旱表現調查結果，其中 ‘HY15’ 幼苗期之耐旱表現並未顯著高於敏感型品種 ‘IR64’ 及 ‘IR29’，其原因可能是 ‘HY15’ 耐旱特性主要表現時期並非在幼苗期，而係於生殖生長期或其他生長時期時才表現出耐旱特性。此由 Lin *et al.* (2014) 結果指出，‘HY15’ 雖具有秧苗期耐旱特性，然其經過 4 次回交轉移至 ‘TK9’ 後，結果 ‘HY15’ 及 BC_4F_4 品系之產量及產量要素表現相當優越，顯示在生殖生長期或其他生長時期時的高度耐旱性。然而，另有可能係在模擬缺水逆境處理下容易受到微氣候因素影響，致使調查上較易發生誤差，造成無法充分表現出本品種秧苗期之耐旱特性 (表 2)。

水稻耐旱與耐鹽特性堆疊族群之選拔

回交世代 (BC_1F_1 及 BC_2F_1) 之分子標幟背景選拔：在 ‘HY15’ 與 CWY981126 之 BC_1F_1 回交世代，經幼苗期 3 葉齡模擬缺水逆境處理分析，結果挑選耐旱表現較佳的 44 株，進行分子標幟背景選拔。共利用 51 個分子標幟，其中包括 28 個 SSR、5 個 STS 及 18 個 indel 分子標幟 (表 3、圖 4)，而在背景選拔過程中，有 7 株的基因型呈現同型合子 A。由於 BC_1F_1 世代基因型應與 CWY981126 相同或是

表 1. 5 個梗稻誘變品系的 5 葉齡幼苗在 5 種不同氯化鈉鹽分濃度處理 14 d 於 1–9 個耐鹽等級之耐鹽表現。

Table 1. The score of salinity-tolerance on 1–9 scales of five *japonica* mutants treated with 5 concentrations of NaCl for 14 days at five-leaf-old seedling stage.

		Scale of salt-tolerance[z]													
		Days after treatment													
Treatment	Line	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
100 mM NaCl	CWY981126		1.00	1.75	2.63	3.38 ab	3.69	4.50 ab	5.00	6.69 a	7.00	7.06	7.25	7.38	8.19 b
	CWY981127		1.19	1.56	2.88	3.19 b	3.63	3.88 c	4.63	6.00 bc	6.81	6.88	7.31	7.44	8.50 ab
	CWY981128		1.19	2.19	2.88	3.25 b	3.69	4.56 a	5.06	6.44 ab	7.19	7.13	7.50	7.75	8.88 a
	SM61		1.38	1.69	2.56	2.63 c	3.56	4.06 bc	4.50	5.94 c	7.06	7.25	7.44	7.69	8.50 ab
	CNY911303		1.25	2.06	2.94	3.88 a	4.25	4.44 ab	5.00	6.56 a	7.00	7.13	7.31	7.81	8.63 a
150 mM NaCl	CWY981126		1.69 b	3.00 b	3.81 b	4.63 b	5.13 b	5.19 b	6.50 ab	7.13 b	7.38 c	7.38 c	7.44 c	8.06 b	8.69 ab
	CWY981127		1.75 b	2.94 b	4.19 ab	4.31 b	5.19 ab	5.19 b	6.31 b	7.13 b	8.00 a	7.94 ab	7.94 ab	8.50 ab	8.31 c
	CWY981128		2.56 a	3.69 a	4.69 a	5.19 a	5.69 a	6.00 a	6.88 a	7.56 a	8.06 a	8.00 a	8.13 a	8.69 a	9.00 a
	SM61		1.69 b	3.38 ab	3.75 b	3.63 c	4.44 c	5.13 b	5.25 c	6.31 c	7.50 bc	7.50 bc	7.50 bc	7.56 c	8.50 bc
	CNY911303		2.19 ab	3.44 ab	4.25 ab	4.13 bc	5.31 ab	5.31 b	6.44 ab	7.06 b	7.94 ab	7.94 ab	7.94 ab	8.19 b	9.00 a
200 mM NaCl	CWY981126	2.06	4.13 c	6.00 b	6.19 b	6.88 b	7.19 b	8.81	8.94						
	CWY981127	2.50	4.75 b	6.00 b	6.31 b	7.06 b	7.31 b	8.81	9.00						
	CWY981128	2.25	4.25 bc	5.94 b	6.06 b	6.69 b	7.19 b	8.56	8.94						
	SM61	2.44	5.94 a	7.06 a	8.00 a	8.38 a	8.69 a	9.00	9.00						
	CNY911303	2.50	4.63 bc	5.94 b	6.00 b	6.88 b	7.19 b	8.81	9.00						
250 mM NaCl	CWY981126	3.19 bc	5.44 bc	6.44 b	6.81 b	7.31 c	7.81 c								
	CWY981127	3.81 a	5.50 bc	6.50 b	6.81 b	7.56 bc	8.38 b								
	CWY981128	3.50 ab	5.25 c	6.69 ab	7.06 b	7.50 bc	8.50 b								
	SM61	3.00 c	6.25 a	7.00 a	8.31 a	8.94 a	9.00 a								
	CNY911303	3.88 a	5.81 ab	6.94 a	6.94 b	7.81 b	8.13 bc								
300 mM NaCl	CWY981126	3.56 ab	5.88	6.31	7.25 b	8.19 b									
	CWY981127	3.06 b	5.56	6.50	7.63 b	8.63 a									
	CWY981128	3.69 a	5.88	6.50	7.56 b	8.69 a									
	SM61	3.94 a	5.75	6.69	8.19 a	8.94 a									
	CNY911303	3.94 a	6.06	6.44	7.44 b	8.88 a									

[z] Means with none or the same letter of a row are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 2. 4 個秈稻品種在 3 葉齡幼苗以 28% PEG 6000 處理之耐旱等級表現。

Table 2. The scale of drought-tolerance on 1–9 scales of four indica rice treated with 28% PEG 6000 at three-leaf-old seedling stage.

	Scale of drought-tolerance							
	Days after treatment							
Line or variety	1	2	3	4	5	6	7	8
HY15	2.56	5.50	6.69	7.63	7.56	7.75	8.25	8.88
IR64	2.88	5.75	6.50	7.31	7.50	7.56	8.13	8.81
SM1	2.75	5.44	6.44	7.19	7.19	7.44	7.94	8.63
IR29	3.31	5.88	7.06	7.50	7.50	7.56	8.25	9.00

異型合子，故此 7 株為自交株而淘汰，而所餘 37 株 BC_1F_1 與 CWY981126 的遺傳相似度介於 68.1–81.2%，平均為 73.6% (圖 5)。選用與 CWY981126 相似度最高之 7 株 BC_1F_1 與輪迴親本進行回交，其遺傳相似度分別為 81.2、79.4、78.7、77.9、77.1、76.9 及 76.4%。同樣 BC_2F_1 世代幼苗期 3 葉齡經模擬缺水逆境處理挑選出 34 株耐旱 BC_2F_1，使用 57 個分子標幟進行背景選拔 (表 3、圖 4)，包括 36 個 SSR、5 個 STS 及 16 個 indel 分子標幟。又為避免特定基因型的重複篩選，除 RM1282 外，各回交世代使用之分子標幟均不相同；而 34 株 BC_2F_1 植株經過基因型判讀並去除自交株後，最終獲得 28 株 BC_2F_1 植株進行分析。其等與 CWY981126 的遺傳相似度介於 75.3–95.3%，平均約 85.5% (圖 5)。選用遺傳相似度較高之 9 株，其遺傳相似度分別為 95.3、90.1、89.5、89.3、88.8、88.6、88.6、88.4 及 87.8%，此 9 株 BC_2F_1 植株於自交後乃分別收獲 BC_2F_2 種子。

BC_2F_2 世代分子標幟背景選拔：各 BC_2F_1 單株收穫之自交種子，分別取 25 粒種子均勻混合成 BC_2F_2 族群。本族群經模擬缺水耐旱試驗篩選後，挑選耐旱較佳 46 植株，並以 76 個分子標幟進行背景選拔 (表 3、圖 4)，包括 41 個 SSR、4 個 STS 及 31 個 indel 分子標幟。除 indel 分子標幟 CH0448 外，此世代使用之分子標幟亦與前兩世代不同。分析結果顯示，46 株 BC2F2 植株與 CWY981126 的遺傳相似度介於 78.2–96.5% (表 4)，平均 88% (圖 5)。遺傳相似度 95.4、90、90.4、89.9、92.9、95、93.95、92.5、96.3 及 91.8% 的 10 株 BC_2F_2 稻株自交，分別收穫 BC_2F_3 種子供後裔耐旱及耐鹽檢定使用。

BC_2F_3 世代之後裔檢定：以獲選之 BC_2F_2 自交種子成立 BC_2F_3 品系，並利用此 10 個品系進行後裔檢定，藉以確認 'HY15' 之耐旱基因已成功導入 CWY981126 中。10 個品系耐旱處理結果，如表 5 所示。由各品系的耐旱等級表現，得知缺水處理 5 d 內，耐旱親本 'HY15' 的耐旱表現皆優於所有品系，且顯著高於耐鹽親本。在處理 1 至 5 d 內，除了品系 LD2、LD4 及 LD6 等 3 個品系之耐旱表現與 CWY981126 的耐旱等級相同或較差外，其餘品系耐旱等級表現雖不及 'HY15'，但耐旱表現大都顯著高於敏感親本 CWY981126。另外，為確立 BC_2F_3 世代耐鹽性是否仍保留於回交後代，由存活且耐旱性表現較佳的 7 個 BC_2F_3 品系進行耐鹽性檢測，結果如表 6 所示。由各品系的鹽分處理 5 d 開始表現耐鹽等級間之差異，而耐鹽親本 CWY981126 的耐鹽與品系 LD1、LD7、LD8 及 LD10 表現十分接近，並以 LD10 的耐鹽性表現最佳。復水後的恢復表現，則以 LD1、LD5、LD7、LD8 及 LD10 表現較佳。

討論

品系間耐逆境測定

Yen & Lin (2011) 從 CNY911303 之 EMS 誘變品系選得 11 個耐鹽品系，其 6 葉齡時以 300 mM NaCl 鹽分逆境處理 3 d，結果以 SM61 的存活率 83.33% 最佳，顯著高於其他耐鹽品系。本研究以 5 個品系在幼苗期 5 葉齡

表 **3.** CWY981126 與 ‘HY15’ 間應用於背景選拔具多型性分子標幟之數量。

Table 3. The number of polymorphic markers between CWY981126 and ‘HY15’ used for background selection.

		Genetic marker			
Backcross generation	Chromosome	SSR	STS	Indel	Subtotal
LD-BC_1F_1	1	6	0	1	7
	2	2	0	4	6
	3	5	0	0	5
	4	1	0	4	5
	5	1	1	1	3
	6	2	1	0	3
	7	3	1	1	5
	8	0	0	2	2
	9	0	1	2	3
	10	1	0	1	2
	11	3	1	1	5
	12	4	0	1	5
	Total	28	5	18	51
LD-BC_2F_1	1	5	0	2	7
	2	6	0	1	7
	3	3	1	2	6
	4	1	1	3	5
	5	4	0	0	4
	6	2	1	1	4
	7	3	0	1	4
	8	3	0	1	4
	9	1	1	3	5
	10	1	0	1	2
	11	2	1	1	4
	12	5	0	0	5
	Total	36	5	16	57
LD-BC_2F_2	1	14	0	6	9
	2	14	1	1	8
	3	10	1	3	6
	4	3	0	4	5
	5	11	0	1	7
	6	9	1	1	7
	7	10	0	2	6
	8	6	1	4	8
	9	3	0	3	5
	10	4	0	3	5
	11	7	0	3	5
	12	14	0	0	5
	Total	41	4	31	76

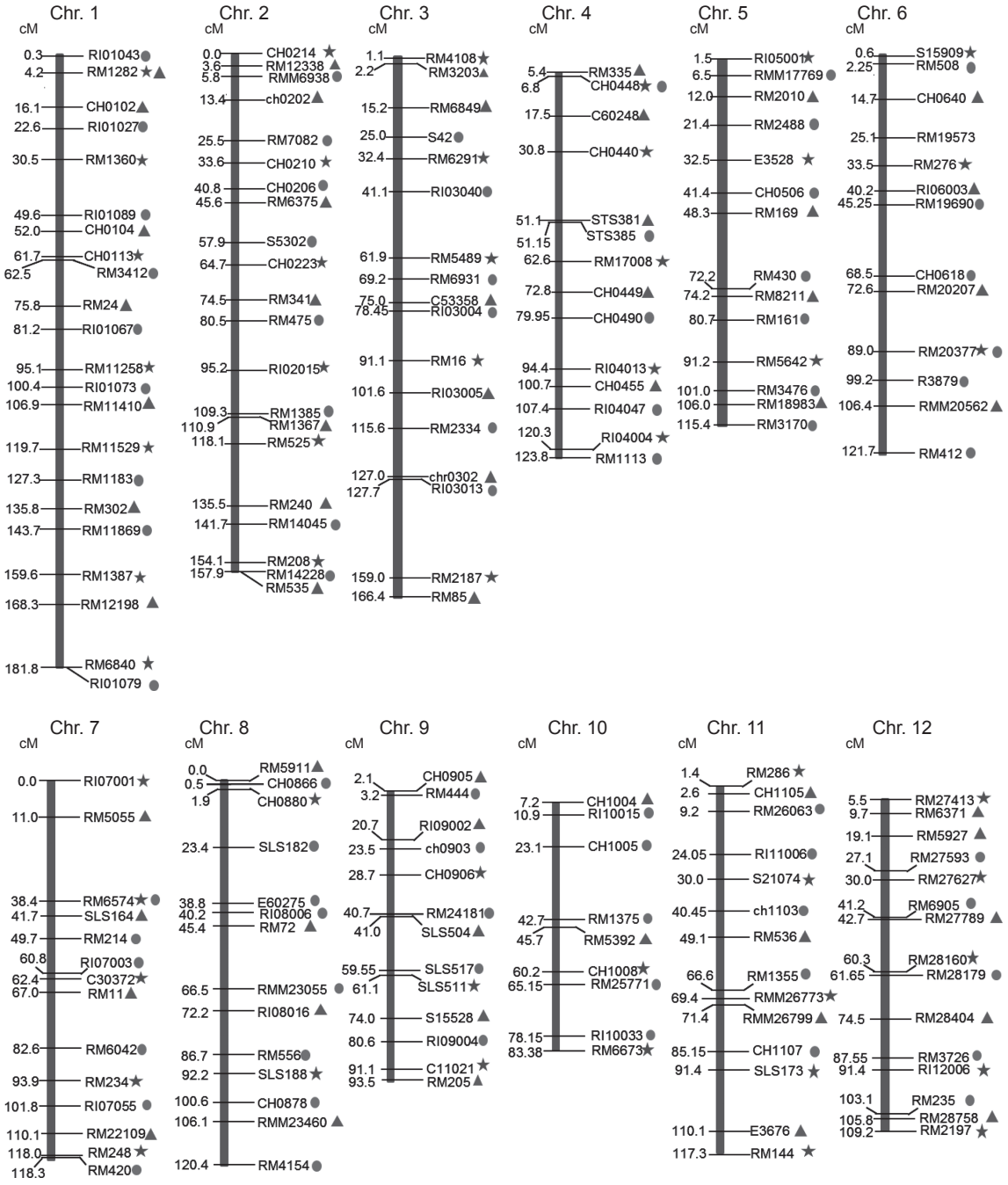


圖 4. 使用於回交族群背景選拔之多型性分子標幟。分別使用其中的 51 個分子標幟於 BC_1F_1 背景選拔 (星形)、57 個分子標幟於 BC_2F_1 背景選拔 (三角形) 及 76 個分子標幟於 BC_2F_2 背景選拔 (圓形)。分子標幟代號 RM 開頭為 SSR 分子標幟，C、E 或 S 為 STS 分子標幟，CH、STS、SLS 或 RI 為 indel 分子標幟。

Fig. 4. The polymorphic markers used for background selection in backcross population. 51 markers among all markers were applied to BC_1F_1 background selection (star), 57 markers among all markers were applied to BC_2F_1 background selection (triangle), and 76 markers among all markers were applied to BC_2F_2 background selection (circle). The prefixes RM indicates SSR markers, C, R, S or E indicates STS markers, and CH, STS, SLS or RI indicates indel markers.

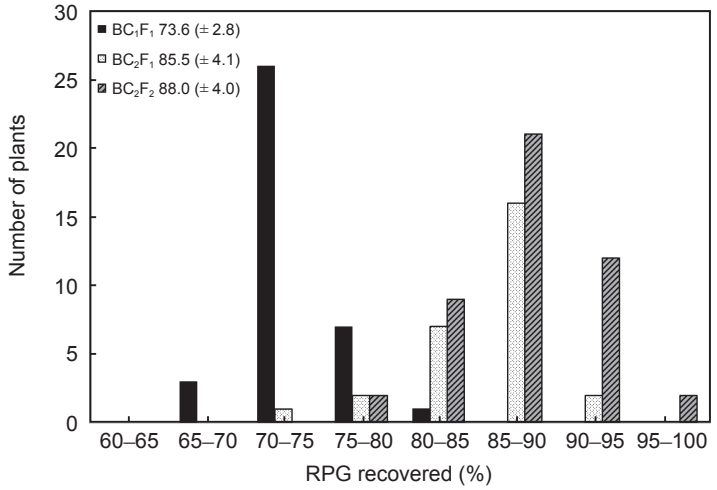


圖 5. CWY981126/'HY15' 分子標幟輔助回交族群 BC_1F_1、BC_2F_1 和 BC_2F_2 回復輪迴親 CWY981126 基因體比率之頻率分布。左上角為每世代平均值，括弧內數值為標準差。

Fig. 5. The frequency distribution of recurrent parent genome (RPG) recovered rate using marker-assisted backcrossing in BC_1F_1, BC_2F_1, and BC_2F_2 populations derived from the backcross of CWY981126/'HY15'. The numbers in the upper left indicate the mean values of RPG recovered (± SD) in each generation.

表 4. 以 76 個分子標幟應用於分子標幟輔助育種以分析 CWY981126 與 'HY15' 雜交後代 BC_2F_2 之基因體組成。

Table 4. Marker-assisted selection analysis of genome composition of BC_2F_2 derived from cross between CWY981126 and 'HY15' by 76 polymorphic markers.

Individual[z]	A[y] (%)	B[x] (%)	H[w] (%)	-[v] (%)	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant[u]	H-segment[t]
CWY981126	0.0	100.0	0.0	0.0	100.00	1,363.2	0	0
38	0.0	92.9	7.1	0.0	96.45	1,363.2	9	5
4	1.1	92.4	6.5	0.0	95.65	1,363.2	8	3
18	0.0	88.9	11.1	0.0	94.45	1,363.2	13	7
37	2.5	88.4	9.1	0.0	92.95	1,363.2	7	4
3	8.7	87.7	3.6	0.0	89.50	1,363.2	6	2
13	5.6	87.4	7.0	0.0	90.90	1,363.2	9	3
46	4.9	87.3	3.7	1.4	89.15	1,363.2	14	3
9	4.4	86.1	9.5	0.0	90.85	1,363.2	6	1
40	1.2	85.9	13.0	0.0	92.40	1,363.2	10	5
14	7.3	85.8	6.9	0.0	89.25	1,363.2	9	4
17	4.8	85.8	9.5	0.0	90.55	1,363.2	11	6
11	0.0	85.6	14.4	0.0	92.80	1,363.2	7	4
10	5.8	85.5	8.7	0.0	89.85	1,363.2	10	4
8	4.1	85.3	10.7	0.0	90.65	1,363.2	13	4
6	3.7	85.0	11.3	0.0	90.65	1,363.2	9	3
16	8.4	85.0	6.7	0.0	88.35	1,363.2	9	3
32	6.5	85.0	8.5	0.0	89.25	1,363.2	12	4
19	0.8	84.8	14.4	0.0	92.00	1,363.2	9	4
29	5.5	84.7	8.4	1.4	88.90	1,363.2	14	5

表 4. 以 76 個分子標幟應用於分子標幟輔助育種以分析 CWY981126 與 'HY15' 雜交後代 BC_2F_2 之基因體組成 (續)。

Table 4. Marker-assisted selection analysis of genome composition of BC_2F_2 derived from cross between CWY981126 and 'HY15' by 76 polymorphic markers (continued).

Individual[z]	A[y] (%)	B[x] (%)	H[w] (%)	-[v] (%)	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant[u]	H-segment[t]
22	8.5	84.6	6.3	0.6	87.75	1,363.2	15	5
12	8.2	84.1	6.3	1.4	87.25	1,363.2	11	3
20	9.5	84.1	6.4	0.0	87.30	1,363.2	11	4
35	5.6	83.8	10.6	0.0	89.10	1,363.2	9	4
7	9.3	83.4	7.3	0.0	87.05	1,363.2	7	2
24	8.8	83.0	8.2	0.0	87.10	1,363.2	13	2
21	7.1	82.7	5.8	4.4	85.60	1,363.2	14	4
34	2.1	82.6	15.3	0.0	90.25	1,363.2	14	7
25	11.8	81.9	4.9	1.4	84.35	1,363.2	14	3
44	2.3	81.3	16.4	0.0	89.50	1,363.2	12	6
1	6.1	80.9	11.9	1.1	86.85	1,363.2	17	7
5	4.1	80.8	15.1	0.0	88.35	1,363.2	16	7
15	0.0	80.4	19.6	0.0	90.20	1,363.2	11	6
41	7.6	80.2	12.1	0.0	86.25	1,363.2	14	5
31	7.8	80.0	9.7	2.5	84.85	1,363.2	20	5
2	4.0	79.4	13.9	2.7	86.35	1,363.2	14	6
45	0.6	79.2	18.7	1.4	88.55	1,363.2	17	8
28	10.7	79.1	8.8	1.4	83.50	1,363.2	16	5
26	6.6	78.6	10.8	4.0	84.00	1,363.2	16	4
39	9.0	78.2	12.8	0.0	84.60	1,363.2	16	7
43	11.0	78.1	9.5	1.4	82.85	1,363.2	14	4
27	9.1	76.9	12.6	1.4	83.20	1,363.2	12	3
30	5.1	75.8	19.1	0.0	85.35	1,363.2	18	8
36	14.4	75.6	10	0.0	80.60	1,363.2	16	5
23	14.0	73.8	12.2	0.0	79.90	1,363.2	20	8
42	9.0	73.7	17.3	0.0	82.35	1,363.2	14	6
33	13.5	71.2	13.9	1.4	78.15	1,363.2	15	6
HY15	100.0	0.0	0.0	0.0	0.00	1,363.2	0	0

[z] Arrangement by the percentage of RPG (recurrent parent genome) recovered.
[y] The percentage of 'HY15' genome.
[x] The percentage of CWY981126 genome.
[w] The percentage of heterozygote.
[v] The percentage of missing data.
[u] The frequency of crossing-over happened in chromosome segments.
[t] Amount of heterozygote in all markers.

時進行耐鹽篩選處理，結果發現 SM61 於高鹽濃度下的表現不佳，而以 CWY981126 有最穩定之鹽分逆境耐受性，惟各品系之鹽害指數均隨處理日期增加而提高。此與 Kuo *et al*. (2013) 以 SM61 與 'IR64' 之 8 個回交耐鹽品系的試驗結果相似，在 8 個耐鹽品系不同水稻幼苗齡期的 200 mM 耐鹽處理下，各品系之鹽害指數均隨處理日期增加而提高，尤其是處理之苗齡愈

表 5. ‘HY15’、CWY981126 和 10 個耐旱品系 3 葉齡時以 28% PEG 6000 處理後之耐旱等級反應。

Table 5. The scale of drought-tolerance in ‘HY15’, drought sensitive parent CWY981126, and 10 drought-tolerant BC_2F_3 lines by the treatment of 28% PEG 6000 solution at 3-leaf-old seedling stage.

	Score of drought tolerance							
	Days after treatment							
Line or variety	1	2	3	4	5	6	7	8
HY15	5.00 c[z]	4.67 e	4.50 d	4.50 e	4.50 d	5.00 c	4.67 e	4.50 d
CWY981126	6.17 b	6.67 ab	6.67 ab	7.17 ab	7.00 ab	6.17 b	6.67 ab	6.67 ab
LD1	6.33 b	6.17 bcd	6.50 abc	6.50 bcd	6.50 abc	6.33 b	6.17 bcd	6.50 abc
LD2	7.67 a	7.50 a	7.67 a	7.83 a	7.83 a	7.67 a	7.50 a	7.67 a
LD3	5.67 bc	5.67 bcde	6.00 bc	6.17 bcd	6.50 abc	5.67 bc	5.67 bcde	6.00 bc
LD4	5.50 bc	5.67 bcde	6.67 ab	7.00 abc	7.00 ab	5.50 bc	5.67 bcde	6.67 ab
LD5	6.33 b	6.33 abc	6.50 abc	6.33 bcd	6.33 bc	6.33 b	6.33 abc	6.50 abc
LD6	5.83 bc	6.00 bcd	6.67 ab	6.83 abcd	7.00 ab	5.83 bc	6.00 bcd	6.67 ab
LD7	5.00 c	5.00 de	5.33 cd	5.67 de	5.17 cd	5.00 c	5.00 de	5.33 cd
LD8	5.33 bc	5.33 cde	6.00 bc	6.00 bcd	5.83 bcd	5.33 bc	5.33 cde	6.00 bc
LD9	5.17 bc	5.17 cde	5.67 bcd	5.83 cd	6.00 bc	5.17 bc	5.17 cde	5.67 bcd
LD10	6.00 bc	6.17 bcd	6.33 bc	6.33 bcd	6.50 abc	6.00 bc	6.17 bcd	6.33 bc

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 6. ‘HY15’、CWY981126 和 7 個耐旱品系 5 葉齡時以 200 mM NaCl 處理後之耐鹽等級反應。

Table 6. The scale of salt-tolerance in ‘HY15’, CWY981126, and 7 drought-tolerant BC_2F_3 lines by the treatment of 200 mM NaCl at 5-leaf-old seedling stage.

	Score of salt tolerance							
	Days after treatment					Days after rewater treatment		
Line or variety	4	5	6	7	8	2	4	6
HY15	3.2 a[z]	4.0 a	4.7 a	6.2 a	7.0 a	7.2 a	7.2 a	7.0 a
CWY981126	3.0 a	3.3 ab	3.8 ab	5.6 a	7.0 a	7.2 a	7.2 a	7.5 ab
LD1	3.0 a	3.0 b	3.7 ab	4.3 bc	6.0 ab	7.0 ab	6.7 a	6.5 ab
LD3	3.3 a	3.7 ab	4.0 ab	6.0 ab	7.2 a	7.3 a	7.2 a	7.2 ab
LD5	3.0 a	3.0 b	3.5 ab	5.2 ab	6.2 ab	6.7 ab	6.3 ab	6.3 ab
LD7	3.0 a	3.0 b	3.3 b	4.7 abc	5.0 ab	6.7 ab	6.7 ab	6.7 ab
LD8	3.0 a	3.3 ab	3.3 b	4.5 abc	6.0 ab	6.5 ab	5.8 ab	6.2 ab
LD9	3.3 a	3.3 ab	3.5 ab	5.5 ab	6.8 ab	7.3 a	7.2 ab	6.7 ab
LD10	3.0 a	3.2 ab	3.0 b	3.3 c	5.7 b	5.7 b	6.0 b	6.0 b

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by LSD test.

早，鹽害指數有相對提升的現象。然幼苗期不同鹽分逆境下之篩選，僅顯示不同品種 (系) 間幼苗期是否具有鹽分逆境耐受性，對於水稻成株期對鹽分逆境耐受性程度則仍有待需要進一步測試。

由 CWY981126 在 100、250 及 300 mM 鹽分逆境處理下具較佳耐鹽表現，且與誘變親本 CNY911303 之表現有顯著之差異，而 SM61 耐鹽性在 200、250 及 300 mM 鹽分逆境處理時，鹽害指數較其他品系表現差，此結果似與其他學者之結果似有所相違 (Yen & Lin 2011; Kuo *et al*. 2013)。究其原因，可能是由於 SM61 品系生長勢相對柔弱，處理後 SM61 之鹽分耐受性表現乃不及其他品系。不過由於水稻幼苗期之耐鹽篩選與測試可快速得知品系間之鹽分耐受程度訊息，據此可快速選出具耐鹽性材料，在操作上相當簡易可行，是耐鹽水稻評估及選育時值得利用的模式。而本試驗結

果，可知粳稻耐鹽品系 CWY981126 耐鹽表現良好，故本品系值得作為分子標幟輔助育種之輪迴親使用。

作物品種生育初期之耐旱特性是該品種抗旱性的重要指標之一 (Bayuelo-Jiménez *et al*. 2002)，因此幼苗期耐旱篩選是耐旱育種篩選的重要環節。而幼苗期進行耐旱鑑定可對多個品種 (系) 及雜交子代進行簡單快速篩選，可降低育種選擇的複雜性、減少田間工作量及避免氣候環境的影響，從而以提高選拔效率和加速育種程序 (Zhou *et al*. 2005)。本研究利用 4 個不同品種 (系) 於 3 葉齡時以 28% PEG 6000 進行模擬缺水逆境試驗，結果經乾旱處理後，不同品種 (系) 間之乾旱指數並無明顯差異，但自處理後 1 d 開始，'HY15' 的乾旱指數表現均優於耐旱敏感型對照品種 'IR29'，惟與耐旱敏感型對照品種的 'IR64' 相比，'IR64' 的耐旱表現優於 'HY15'。造成此現象的原因，可能係因 'IR64' 的生長勢相對較快速強健，致使耐旱處理後之耐旱等級表現反較 'HY15' 佳。然由 Lin *et al*. (2014) 結果指出，'HY15' 具有優良耐旱特性，故仍選擇 'HY15' 作為分子標幟輔助育種耐旱性的貢獻親。

Shinada *et al*. (2014) 指出許多主要的農藝性狀包括產量、抗病性及耐逆境等特性，通常由多個數量性狀基因座所控制，且研究主要集中在 QTLs 定位及 QTLs 對表現型變異貢獻度的估計。水稻耐鹽特性是一個複雜的數量性狀，可能為涉及眾多基因的數量性狀基因座 (Gregorio *et al*. 2013)，尤其耐鹽特性在幼苗期和生殖生長期之控制機制可能有所不同 (Moradi *et al*. 2003)。目前最廣為人知的耐鹽基因 *Saltol* 和 *SKC1* 基因，則均於幼苗期表現 (Kuo *et al*. 2013)，至於水稻耐旱基因截至目前則大都未獲選殖。Hsu (2012) 針對 'HY15' 幼苗期之耐旱基因進行圖譜定位，結果發現 2 個耐旱 QTLs 分別與第 12 條染色體長臂與短臂上，與 2 分子標幟 RM277 (62.2–64.4 cM) 與 RM6693 (91.9–94.6 cM) 呈現緊密連鎖現象。Uga *et al*. (2011) 在陸稻 'Kinandang Patong' 與 'IR64' 間重組自交系中，則發現根系統結構 (root system architecture; RSA) 基因 *DRO1*，該基因經回交導入淺根系品種發現對提升耐旱及產量表現有所助益，該基因已獲選殖 (Uga *et al*. 2013)。雖然水稻耐旱基因目前選殖的結果相當少，惟目前仍有許多耐旱品種已選育命名，諸如「沪旱 3 號」、'Doddabyranellu'、'Dhan 4' 與 'Doddi' (Lin *et al*. 2011)，顯示應可結合耐逆境及分子標幟技術的應用，加速抗多重逆境水稻之選育。尤其水稻在栽培利用過程中，其遭遇逆境的種類、時機及期限均有很大的不確定性，如鹽化土地常會拌隨著乾旱的環境的出現，顯示抗多重逆境水稻品種的研發符合台灣栽培環境的需要。然由於耐鹽及耐旱特性的控制因子均相當複雜 (Shinada *et al*. 2014)，可利用之耐逆境分子標幟相當有限，故因應現階段之需求，需先找出適當的輪迴親與貢獻親本，以幼苗期進行耐旱篩選，再將耐旱及耐鹽特性透過回交方導入優良品種中，並在連續回交過程中利用分子標幟輔助背景篩選，短期內快速選獲同時具有耐旱及耐鹽水稻新品系，培育出符合台灣需求之耐多重逆境水稻。而透過幼苗期之耐鹽及耐旱篩選結果，本研究篩選出 CWY98126 適合作為輪迴親，而 'HY15' 可供做為貢獻親。

分子標幟輔助耐鹽及耐旱基因堆疊水稻族群之選育

Collard *et al*. (2005) 指出傳統回交育種至少需要經過 6–8 次的回交才能大致回復輪迴親之基因型，但藉由分子標幟輔助回交育種，只需回交 3–4 次，甚至 2 次即可達到此目標。顯示應用分子標幟輔助於堆疊耐逆境 QTLs 之育種，當回交族群數量足夠時，其可有效達到選拔數量性狀表現型的目的 (Ashikari & Matsuoka 2006; Nagai *et al*. 2012)。然而，QTLs 堆疊結果常無法如預期效益，會有如 QTLs 間上位性影響，且 QTLs 因遺傳背景的不同而會有所變化 (Miedaner *et al*. 2006; Bovill *et al*. 2010)。尤其傳統回交育種回交後代基因型理論上 BC1 世代回復至輪迴親基因體比率為 75%，BC2 世代為 87.5%，到 BC3 世代則回復率為 93.8%。但回交育種操作過程，會因族群數量較小或親本遺傳背景較遠，致使回復至輪迴親基因體比率常較理論值低 (Collard *et*

al. 2005)。Kuo *et al*. (2013) 利用秈粳回交育種結果，顯示分子標幟輔助回交育種回復至輪迴親基因體比率高於傳統回交育種，於 BC2、BC3 世代回復到輪迴親基因體的比率平均可達 89% 及 96.4%，達到了分子標幟輔助育種的預期結果。顯示回交後代族群數量，會影響後代回復輪迴親遺傳背景之速度與比率。

本研究利用秈粳稻回交族群為材料，透過不同回交世代幼苗期耐旱的篩選，將秈稻耐旱特性導入或堆疊至耐鹽粳稻親本中，經 2 次回交再使獲選子代自交 2 次，故理論上 BC_2F_3 的遺傳回復率應雖無法像 Kuo *et al*. (2013) 結果。但 BC_2F_1 的回復率，仍大致上已接近理論輪迴親 CWY981126 遺傳背景；然 BC_1F_1 及 BC_2F_1 世代時，其分子標幟背景選拔時所測定之遺傳回復率。由圖 5 得知，2 世代的回復率分別為 73.6% 和 85.6%，稍低於理論之回復率，推測原因可能是使用之分子標幟數量不足。故於 BC_2F_2 世代乃進一步提高分子標幟密度及使用數量，期藉此涵蓋整個水稻基因體的背景選拔。結果由 46 株的 BC_2F_2 回交後代基因型分布得知，其遺傳回復平均達到 88%，最高者可達到 96.5%，顯示 BC_2F_2 世代部分後代幾乎回復到 CWY981126 的基因型，達到本研究設定之預期目標。故前 BC_1 及 BC_2 等 2 個回交世代回復率雖低於理論回復率，但仍可透過 BC_2F_2 高密度之分子標幟輔助達到目標。由於可知利用子標幟輔助進行回交育種時，其使用之回交族群大小及分子標幟數量需足夠，如此方能快速回復回交後代至輪迴親之遺傳背景，尤其對於不同的回交世代應進行回復率檢視。當實際回復率低於理論回復率時，宜增加回交族群數量及分子標幟密度或回交次數，如此才能順利達到分子標幟輔助回交育種的目標。

由 BC_2F_2 回交後代中選出回復率較高之 10 株，經繁殖至 BC_2F_3 世代，10 個品系在進行後裔耐檢測中，結果有 7 個品系之耐旱特性優於耐旱敏感親本 CWY981126，且檢測 7 個品系耐鹽特性是否依然保留，結果發現 LD1、LD3、LD7 及 LD10 等 4 個品系之耐鹽性表現良好 (表 6)。其中，LD7、LD10 之耐鹽性甚至優於輪迴親 CWY981126，此與 Kuo *et al*. (2013) 結果相似，其將 SM61 耐鹽性以 3 次回交導入 'IR64' 後，結果回交後代之耐鹽性表現優於貢獻親本。顯示耐逆境特性在回交過程，可能因為數量基因基因重組，致使回交後代之耐逆境特性優於原來之親本；而 4 個獲選耐鹽品系之耐旱性表現，則以 LD7 的表現最好。

由上述結果顯示，分子標幟回交育種過程可快速選育耐多重逆境之水稻新品系，有效將不同逆境特性進行組合或堆疊，提供未來全球暖化下逆境環境之水稻栽培需求。惟水稻耐逆境特性幼苗期及成株期的控制機制並不相同 (Moradi *et al*. 2003)，故獲選之 LD7 及 LD10 等品系雖因此幼苗期耐旱及耐鹽特性表現較佳，未來可進一步深入評估。尤其是逆境下之大面積產量試驗及品質評估，如此方能確認實用性，進而推廣供台灣水稻栽培利用。

引用文獻

Ashikari, M. and M. Matsuoka. 2006. Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. Trends Plant Sci. 11:344–350.

Bayuelo-Jiménez, J. S., R. Craig, and J. P. Lynch. 2002. Salinity tolerance of species during germination and early seedling growth. Crop Sci. 42:1584–1594.

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

Bovill, W. D., M. Horne, D. Herde, M. Davis, G. B. Wildermuth, and M. W. Sutherland. 2010. Pyramiding QTL increases seedling resistance to crown rot (*Fusarium pseudograminearum*) of wheat (*Triticum aestivum*). Theor. Appl. Genet. 121:127–136.

Brown, L. R. and B. Halweil. 1998. China's water shortage could shake world food security. World Watch 11:10–21.

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.

Dokku, P., K. M. Das, and G. J. N. Rao. 2013. Pyramiding of four resistance genes of bacterial blight in Tapaswini, an elite rice cultivar, through marker-assisted selection. Euphytica 192:87–96.

Goff, S., S. A. Goff, D. Ricke, T. H. Lan, G. Presting, R. Wang, M. Dunn, J. Glazebrook, A. Sessions, P. Oeller, H. Varma, D. Hadley, D. Hutchison, C. Martin, F. Katagiri, B. M. Lange, T. Moughamer, Y. Xia, P. Budworth, J. Zhong, T. Miguel, U. Paszkowski, S. Zhang, M. Colbert, W. L. Sun, L. Chen, B. Cooper, S. Park, T. C. Wood, L. Mao, P. Quail, R. Wing, R. Dean, Y. Yu, A. Zharkikh, R. Shen, S. Sahasrabudhe, A. Thomas, R. Cannings, A. Gutin, D. Pruss, J. Reid, S. Tavtigian, J. Mitchell, G. Eldredge, T. Scholl, R. M. Miller, S. Bhatnagar, N. Adey, T. Rubano, N. Tusneem, R. Robinson, J. Feldhaus, T. Macalma, A. Oliphant, and S. Briggs. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296:92–100.

Gregorio, G. B., M. R. Islam, G. V. Vergara, and S. Thirumeni. 2013. Recent advances in rice science to design salinity and other abiotic stress tolerant rice varieties. SABRAO J. Breed. Genet. 45:31–41.

Hsu, J. H. 2012. The Platform of Polymorphic Markers and Genetic Mapping of a Drought Tolerance Gene at Seedling Stage in Rice. Master Thesis, Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 98 pp. (in Chinese with English abstract)

International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature 436:793–800.

International Rice Research Institute. 1996. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 52 pp.

International Rice Research Institute. 2002. Rice Almanac. CABI. Wallingford, UK. 253 pp.

International Rice Research Institute. 2009. Harvested area of rough rice by country and geographical region (USDA). World rice statistics: Trend in the rice economy. http://beta.irri.org/solutions/index.php?option=com_content&task=view&id=250 (visit on 9/10/2015)

Jwo, W. S. 2007. Physiological Characterizations of Salt Tolerance at Germaination 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)

Jwo, W. S., C. G. Chern, M. H. Lai, H. M. Yen, T. H. Tseng, and H. E. Yen. 2008. Screening technique for salt tolerance in the rice seedling stage. J. Taiwan Agric. Res. 57:193–204. (in Chinese with English abstract)

Kazuhiro, K., Y. Niwa, T. Yamaguchi, H. Sunohara, H. Hirano, and M. Umeda. 1998. A rapid and easy-handling procedure for isolation of DNA from rice, Arabidopsis and tobacco. Plant Biotechnol. 15:45–48.

Kumar, R., R. Venuprasad, and G. Atlin. 2007. Genetic analysis of rainfed lowland rice drought tolerance under naturally-occurring stress in eastern India: Heritability and QTL effects. Field Crops Res. 103:42–52.

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)

Li, Z., P. Mu, C. Li, H. Zhang, Z. Li, Y. Gao, and X. Wang. 2005. QTL mapping of root traits in a doubled haploid population from a cross between upland and lowland japonica rice in three environments. Theor. Appl. Genet. 110:1244–1252.

Liao, Y. N. 2012. The Genetic Analysis and Coarse Mapping of the Rice Floury Gene, *FLOURY ENDOSPERM6* (*FLO6*). Master Thesis, Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 73 pp. (in Chinese with English abstract)

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. 11:143–164. (in Chinese with English abstract)

Lin, Y. R., S. C. Kuo, and Y. P. Wu. 2011. The breeding strategies and developments of stress resistant rice for global warming in Taiwan. p.65–78. *in*: Proceeding of the Workshop on Crop Breeding and Management of Agricultural Environment for Coping with Climate Change. August 31, 2011. Taichung, Taiwan. Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung. (in Chinese with English abstract)

MacMillan, K., K. Emrich, H. P. Piepho, C. E. Mullins, and A. H. Price. 2006. Assessing the importance of genotype × environment interaction for root traits in rice using a mapping population II: Conventional QTL analysis. Theor. Appl. Genet. 113:953–964.

McCouch, S. R., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y. G. Cho, N. Huang, T. Ishii, and M. Blair. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Mol. Biol. 35:89–99.

Miedaner, T., F. Wilde, B. Steiner, H. Buerstmayr, V. Korzun, and E. Ebmeyer. 2006. Stacking quantitative trait loci (QTLs) for Fusarium head blight resistance from non-adapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. Theor. Appl. Genet. 112:562–569.

Moradi, F., A. M. Ismail, G. B. Gregorio, and J. A. Egdane. 2003. Salinity tolerance of rice during reproductive development and association with tolerance at the seedling stage. Ind. J. Plant Physiol. 8:105–116.

Mundt, C. C. 1990. Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids. Phytopathology 80:221–223.

Nagai, K., T. Kuroha, M. Ayano, Y. Kurokawa, R. B. Angeles-Shim, J. H. Shim, H. Yasui, A. Yoshimura, and M. Ashikari. 2012. Two novel QTLs regulate internode elongation in deepwater rice during the early vegetative stage. Breed. Sci. 62:178–185.

Pandey, S., D. D. Behura, R. Villano, and D. Naik. 2000. Economic Cost of Drought and Farmers' Coping Mechanisms: A Study of Rainfed Rice Systems in Eastern India. International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. 47 pp.

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.

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 genomewide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. Plant Physiol. 135:1198–1205.

Shinada, H., N. Iwata, T. Sato, and K. Fujino. 2014. QTL pyramiding for improving of cold tolerance at fertilization stage in rice. Breed. Sci. 63:483–488.

Uga, Y., K. Okuno, and M. Yano. 2011. Dro1, a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. J. Exp. Bot. 62:2485–2494.

Uga, Y., K. Sugimoto, S. Ogawa, J. Rane, M. Ishitani, N. Hara, Y. Kitomi, Y. Inukai, K. Ono, N. Kanno, H. Inoue, H. Takehisa, R. Motoyama, Y. Nagamura, J. Wu, T. Matsumoto, T. Takai, K. Okuno, and M. Yano. 2013. Control of root system architecture by deeperrooting 1 increases rice yield under drought conditions. Nat. Genet. 45:1097–1102.

Wang, Y., J. Zang, Y. Sun, J. Ali, J. L. Xu, and Z. Li. 2013a. Background-independent quantitative trait loci for drought tolerance identified using advanced backcross introgression lines in rice. Crop Sci. 53:430–441.

Wang, Y., L. Zhang, A. Nafisah, L. Zhu, J. Xu, and Z. Li. 2013b. Selection efficiencies for improving drought/salt tolerances and yield using introgression breeding in rice (*Oryza sativa* L.). Crop J. 1:134–142.

Wu, L. and C. Wang. 2011. Application of molecular marker assisted selection in gene pyramiding and selection of new cultivars. J. Northeast Agric. Univ. 18:79–84.

Wu, Y. P. 2013. Drought tolerant rice lines by screening an 'IR64' mutant stock. J. Taiwan Agric. Res. 62:195–208. (in Chinese with English abstract)

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.

Young, N. D. and S. D. Tanksley. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. Theor. Appl. Genet. 77:353–359.

Yu, J., S. Hu, J. Wang, G. K. Wong, S. Li, B. Liu, Y. Deng, L. Dai, Y. Zhou, and X. Zhang. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. spp. *indica*). Science 296:79–92.

Yue, B., W. Xue, L. Luo, and Y. Xing. 2008. Identification of quantitative trait loci for four morphologic traits under water stress in rice (*Oryza sativa* L.). J. Genet. Genom. 35:569–575.

Zang, J. P., Y. Sun, Y. Wang, J. Yang, F. Li, Y. L. Zhou, L. H. Zhu, R. Jessica, F. Mohammadhosein, and J. L. Xu. 2008. Dissection of genetic overlap of salt tolerance QTLs at the seedling and tillering stages using backcross introgression lines in rice. Sci. China Life Sci. 51:583–591.

Zhou, G. S., K. H. Cui, D. M. Jin, C. G. Cao, C. G. Xu, and B. S. Luo. 2005. Studies on using rooting capacity to appraise the drought resistance of different varieties of *Oryza sativa* at seedling stage. Sci. Agric. Sin. 38:2571–2576. (in Chinese with English abstract)

Increasing Drought Tolerance in a Salt-Tolerant *Japonica* Rice Cultivar Using Marker-Assisted Selection

I-Chun Lien[1], Chieh-Wei Kuo[2], Su-Chen Kuo[3], Yann-Rong Lin[4], and Yong-Pei Wu[5,*]

Abstract

Lien, I. C., C. W. Kuo, S. C. Kuo, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2016. Increasing drought tolerance in a salt-tolerant *Japonica* rice cultivar using marker-assisted selection. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):154–172.

Five mutant lines of *Oryza sativa* ssp. *japonica*, SM61, CWY981126, CWY981127, CWY9811268, and CNY911303, were evaluated for salt tolerance by treated with 100, 150, 200, 250, and 300 mM NaCl solutions, respectively. The CWY981126 showed the most tolerant cultivar under all concentrations except 150 mM of NaCl. On the other hand, drought tolerant cultivars were evaluated among four *indica* rice cultivars including 'HY15', 'IR29', 'IR64', and SM1 by treated with 28% PEG 6000. The 'HY15' showed the best tolerance to drought stress. To improve drought tolerance in the salt-tolerant *japonica* cultivar, the 'HY15' was used as a donor parent to pyramid the drought tolerant trait into the CWY981126. After two backcross generations, the drought tolerant trait was successfully introgressed into the salinity tolerant line, CWY981126. For each generation, all progenies were visually screened by drought or salinity stress tolerant phenotypes combined with a background selection using molecular markers. The recovery rates of recurrent parental genome in BC_1F_1, BC_2F_1, and BC_2F_2 were 73.6%, 85.5%, and 88%, respectively. Seven accessions of BC_2F_3 exhibited better drought tolerance than the recurrent parent, and four of them such as LD1, LD7, LD8, and LD10 also showed good salinity tolerance, indicating that these lines have dual tolerance to drought and salinity. Thus, new accessions harboring both drought and salinity tolerance were bred and could be applied to cultivate in fields with water deficiency and high salinity in Taiwan.

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

Received: August 7, 2015; Accepted: September 21, 2015.
* Corresponding author, e-mail: wuypei@dns.caes.gov.tw
[1] Master student, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Professor, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
[3] Research Assistant, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[4] Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
[5] Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.