

國際稻米研究所之稻熱病 抗性檢定評估技術研習心得分享



農試所植病組 陳繹年 林宗俊 陳純葳

農試所作物組 賴明信 卓緯玄

農試所 嘉義分所 廖大經

高雄場 張芳瑜

一、前言

水稻 (*Oryza sativa*) 為世界三大主要糧食作物之一，也是台灣種植面積最廣、種植農戶數最多的農作物。稻熱病 (rice blast disease) 為水稻生育過程中，影響稻作生長及產量收成極大的真菌性病害之一，全球超過 85 個栽培水稻的國家都有其危害紀錄，每年造成全球稻作 10-30% 的產量損失。稻熱病的管理工作除利用栽培管理技術及化學藥劑防治外，育成產量穩定、品質優異且抗病性持久的水稻品種亦成為各國研究人員主要努力方向。

二、國內水稻抗稻熱病育種之發展與現況

國內自1950年起進行水稻抗稻熱病育種的檢定工作，最初由各試驗改良場所自行辦理，至1956年才在中國農村

復興聯合委員會(農復會)的整合下，陸續於宜蘭壯圍、台中東勢 (1956-1974) 或南投竹山 (1975-1979) 或國姓 (1980-1981)、嘉義、屏東萬巒及台東關山等五處設置水田式統一檢定圃，並將檢定結果列為新品種命名及推廣的重要參考資料。然 1982 年以後，因經費因素僅保留嘉義及關山兩處水田式病圃，而旱田式病圃則僅設置於嘉義。1978 年以前檢定圃之葉稻熱病調查基準，係依據農林廳編印之葉稻熱病罹病程度調查基準圖，以肉眼檢定每叢病斑面積比率計算罹病程度，穗稻熱病則調查其被害穗數計算罹病率。然因該套檢驗標準未能如實反應水稻品種對葉稻熱病及穗稻熱病間的抗性關係，故自 1979 年起改參照國際稻米研究所 (International Rice Research Institute, IRRI) 之國際稻熱病病圃 (IRRI Blast Nursery, IRBN) 的調查方法與標準 (IRRI 1980) 進行調查紀錄。(陳隆澤等2009)。

三、國際稻熱病菌生理小種研究現況

稻熱病菌 (*Magnaporthe oryzae* B. Couch) 存在生理分化的問題為稻熱病至

作者：陳繹年助理研究員
連絡電話：04-23317523

今仍無法有效防除之主要原因。1960 年代期間，日、美、台、菲、印及韓國等國家各自建立一套稻熱病菌生理小種水稻判別品種 (differential varieties)，但因各套系統的水稻品種不盡相同，使得研究結果無法比較。故此，日本與美國共同合作從美、日、台等 3 套系統中，挑選出 8 個具鑑別代表性的品種作為國際判別品種以供研究使用，然而上述各套判別品種當時均缺乏抗病基因組成分析，直至 1976 年日本才選育出一套由 9 個單一抗病基因組成的梗稻判別品種，並採用八進制計數法 (octal notation) 簡化生理小種命名上可能遇到的數量龐大問題。目前 IRRI 與日本已合作開發出四套含單一抗病基因的稻熱病判別品種，包括一套以大陸普感梗稻品種麗江新團黑穀 (Lijianxintuanheigu, LTH) 為背景的單基因系 (monogenic lines)；及三套分別以 LTH、CO39 (秈稻) 及 US2 (秈梗雜交稻) 品種為背景的近同源系 (near isogenic lines, NILs)。

四、台灣稻熱病菌生理小種之研究現況

台灣稻熱病菌生理小種水稻判別品種，為台灣省農業試驗所簡錦忠博士等篩選國內外 1,000 餘種水稻品種所選定，其組成包括 11 種梗稻 (japonica type) 品種及 5 種秈稻 (indica type) 品種，共 16 個品種。並應用此套判別品種於 16 年間（至 1960-1987 年）測定本省 1,871 株菌株，將菌株生理型歸類成七個群 (P、I、J、T、K、N 及 A)，78 個生理小種。後續幾年監測資料 (農業試驗所年報) 顯示每年均約有 20% 受測菌株異於已報告的 78 個生理小種，1995 年以後則無相關報告。

筆者利用台灣 16 種判別品種檢測 2011 年檢測台灣各地收集之 114 株菌株，將近九成異於已報告的 78 個生理小種，且有 25 株 (21.9%) 無法歸入已知的七個群中。田間稻熱病菌的主要生理群也由原來的 I、P 及 T 群，轉變為 K、I 與新族群，並且未檢出 P 群的菌株，由此推論台灣水稻田間稻熱病菌株之致病性已發生改變。

在行政院農業委員會支持下，2012 年各試驗改良場所與 IRRI 就「因應氣候變遷之國際農業科技交流合作－抗、耐逆境水稻品種之開發」議題展開合作，透過密切交流，吸收並接軌新興之農業科技，一方面選育改良適合於台灣之水稻品種，另一方面引入抗、耐逆境水稻的外表型評估技術及稻熱病/白葉枯病菌生理小種之判別品種及接種評估技術；進一步擴大雙方水稻種原及調查資料之交流。筆者在此次交流中，負責稻熱病菌生理小種接種評估技術引進的部份，以下就評估技術中相關細節之國內外異同進行說明與比較。

五、病害標本採集及病原菌之分離、培養與保存(圖一)

(一)國內：將採集之罹病植體密封於 6 號封口袋中，以減少水分散失。分離時將罹病組織置於溼室中，待病斑處長出病原孢子後刮取孢子塗佈於含 2% (w/v) 蔗糖之水瓊脂培養基 (2% w/v)，挑取發芽單孢移至 10% V-8 平板培養基，二週後切取新鮮菌絲塊，放入無菌水於室溫下保存。

(二)IRRI：採集之樣本折成 3-4 等分後置入紙袋，於低溫下保存。分離時將罹病組織置於溼室中，待病斑處產孢後挑取病原孢子塗佈於含鏈黴素

(streptomycin, 40 ppm)之水瓊脂培養基(4% w/v)，挑取發芽單孢至 prune agar 斜面培養基，培養四日後倒入滅菌濾紙片(5 × 5 mm²)。再培養 25 日確認菌絲纏繞濾紙片後，將濾紙片移入滅菌之 #00 號錢幣信封袋，經真空乾燥後，以密封袋包覆信封袋隔絕水氣，再置入有矽膠乾燥劑之容器中保存於 -20℃ 或 -70℃。

(三)差異：IRRI 為因應稻葉失水後捲曲，採集時會將葉片對折。而國內以封口袋採集，在袋中樣本數量足夠下，水汽即可保持葉片活性且不易捲曲，室溫下放置 3 天仍可維持樣本初始狀態。Prune agar 可促進真菌產孢，唯國內較少使用，目前筆者正著手測試其對稻熱病菌之生長及產孢效果。IRRI 以菌絲濾紙片保存稻熱病菌株至今已逾 30 餘年，其保存效果良好且不佔空間，此方法可解決需保存菌株數量龐大、保存空間不足之問題，值得參考學習。

六、接種源製備

(一)國內：將菌株從保存管移出活化後，切取菌絲尖端，移入新的 10% V-8 培養基培養 20 日，再以含 0.05% (v/v) Tween 80 之無菌水洗取病原菌分生孢子，製成孢子懸浮液(1 × 10⁵ spores ml⁻¹)。

(二)IRRI：將保存之菌株濾紙片移入 prune agar 培養基，活化後切取新鮮菌絲塊，置於新的 prune agar 斜面培養基培養 10 日，刮取表層所有菌絲移入 10 ml 無菌水試管中，研磨均質後平均倒入 4-5 皿 prune agar 平板培養基增量培養。7 日後刮除菌落表面菌絲，開蓋置於日光燈下刺激稻熱病菌產孢，3-4 日後加入無菌水刮洗分生孢子，定量(2.5-10 × 10⁴ spores ml⁻¹)後再加入 0.02% (v/v) Tween 20。

(三)差異：IRRI 以均質之菌絲片段增量培養，相較於使用單一菌絲塊可節省不少培養時間。此外，刮除菌落表面菌絲藉以刺激稻熱病菌產孢之處理，筆者亦曾嘗試，然並未得到穩定之促進產孢效果，而 IRRI 利用開蓋照光可得良好刺激效果值得吾人參考，但依筆者經驗，一般實驗室多有蟻類危害問題，開蓋培養恐是一大挑戰。為因應開蓋過程造成之培養基水分喪失，培養基會增量 2-3 倍以避免乾掉，此一技巧值得留意。

七、供試植物之準備

(一)國內：供試水稻種子先以 0.6% 次氯酸鈉溶液浸泡 40 分鐘，再於室溫下(25-30℃)以流水浸種催芽 2-3 日。冒芽後，以滅菌赤玉土種於 20 孔穴盤中，一個孔穴一個水稻品種，每品種 10 顆種子。生育期間添加兩次荷格蘭氏(Hoagland)養液補充養分，待植株長至 3-4 片葉後供接種使用。

(二)IRRI：以過篩田土為栽培介質，供試之水稻種子不經任何處理直播於方型塑膠盒(35 × 28 × 11 cm³)或保鮮盒(22.5 × 10.5 × 11 cm³)。生育期間提供足夠氮源(硫銨)以提高感病性，至植株長出 3-4 片葉後供接種使用。

(三)差異：IRRI 使用之過篩田土其土壤性狀良好，土質鬆軟且富含有機質，而國內一般水田土壤粉粒、黏粒含量高，粉碎過篩後吸水性差且失水後易形成硬實土塊，不便於溫室試驗操作，因此筆者選擇進口之細粒赤玉土作為栽培介質。

八、接種試驗(圖一)

(一)國內：將孢子懸浮液以噴霧接種法均勻噴灑於供試秧苗葉片上，每菌

株接種 30 ml/盤。接種後先於濕室保溼 3 日，移出後再經 4 日即紀錄菌株對各品種之致病反應。

(二)IRRI：葉稻熱病抗性檢測分為定性評估 (qualitative disease assessment) 與定量評估 (quantitative disease assessment) 兩種。定性評估部份，將孢子懸浮液 ($5-10 \times 10^4$ spores ml⁻¹) 以動力噴霧方式均勻接種於供試秧苗葉片上（每菌株接種 50 ml/方形塑膠盤或 20 ml/保鮮盒）；而定量評估因需計算產孢病斑密度，為避免病斑數過多難以計量，將孢子懸浮液調整為 $2.5-7.5 \times 10^4$ spores ml⁻¹，其餘不變。穗稻熱病抗性檢測部份，於始穗期以注射針筒將孢子懸浮液 ($5-10 \times 10^4$ spores ml⁻¹) 直接注入劍葉葉鞘中；或以棉花吸附孢子懸浮液直接包覆於剛抽出之稻穗，外層再以鋁箔紙包住保溼。接種完後移入室內覆蓋有麻布袋的棚架中（麻布袋先行噴水潤濕，葉稻熱病保溼 24 小時、穗稻熱病 48 小時。接著移至 26-28℃ 之環控溫室，每日噴水保溼 3 次。

(三)差異：IRRI認為，接種初期前 24 小時高濕度有助於稻熱病菌附著器形成與成功侵染，而後栽培於 26-28℃ 環控溫室利於病勢發展。國內受限於現有溫室條件，在水牆及風扇的運作下，夏天溫室中溼室的最高溫度仍達到 40℃，為達成功接種之目的，因此延長保溼時間至 3 日，而此法同樣可得到不錯的接種效果。是否國內稻熱病菌株較 IRRI 菌株耐熱，或溫度並非影響病勢發展的主要原因，仍有待觀察。

九、稻熱病溫室抗病檢定評估 (圖一)

(一)國內：目前配合田間稻熱病菌致病性調查，溫室試驗部份僅檢測葉稻

熱病抗性之定性評估。接種後第 7 天調查各判別品種呈現之最嚴重病斑型，依據罹病等級加以記錄 (Bonman *et al.* 1986)。

(二)IRRI：配合水稻抗稻熱病育種工作，葉稻熱病之定性評估部份於接種後第 7 日調查受測品種之最嚴重型病斑，以同樣之罹病等級為依據；而定量評估部份則計算產孢型病斑密度 (Roumen *et al.* 1992) 與罹病葉面積百分率 (Notteghem 1985)。穗稻熱病部份則於接種後 2-3 週調查接種部位嚴重感染型 (等級 7-等級 9) 之罹病率 (IRRI 1996)。

(三)差異：目前國內溫室試驗，僅針對葉稻熱病抗病性進行定性評估，而嘉義及台東關山之稻熱病檢定病圃除針對葉稻熱病進行抗性檢定外，亦於水田式病圃同步進行穗稻熱病抗性之檢定。

十、稻熱病檢定圃抗病檢定評估 (圖一)

(一)國內：國內稻熱病檢定圃水田式病圃設置於嘉義市及台東關山，而旱田式病圃僅設置於嘉義市農業試驗所嘉義分所。水田式病圃一般設置於第一期作，調查葉稻熱病及穗稻熱病；旱田式病圃則兩期作均有設置，僅調查葉稻熱病。統一病圃藉施用重氮肥、遍植感病品種 Lomello 及噴水保溼等方式，促使受測水稻品種自然發病。檢定調查方法及標準自 1979 年起即參照國際稻熱病圃之規範行之。

(二)IRRI：此次研習僅安排參訪旱田式稻熱病檢定圃。檢定圃採活動式隧道設計，夜間覆蓋塑膠布提高濕度，白天則將塑膠布移除並配合噴水降溫避免高溫傷害。每塊病圃最外圈以 8 個感病性不同之水稻品種混植作為散佈行



IRRI 以紙袋保存採集樣本



國內以封口袋採集維持樣本活性



IRRI 以溼麻布袋之棚架進行接種材料之保溼



國內穗稻熱病接種方式



IRRI 稻熱病抗性檢測環控溫室



國內稻熱病溫室檢定設施



IRRI 旱田式稻熱病檢定圃



本所嘉義分所之稻熱病旱田檢定圃

圖一、稻熱病抗性檢定技術，國內與 IRRI 作法比較。

(spreader rows)，內部再分為兩大打行進行品種檢測。播種後11-14天取前一批試驗留下的罹病植株作為接種源，置於散佈行繁殖、增加田間病原菌密度，接種15-20天後依據調查標準 (IRRI 1996) 進行罹病等級調查。

(三)差異：IRRI 採用 8 種感病性不同之水稻品種，可有效提高田間稻熱病菌族群致病性的多樣性，減少因族群分佈不均造成的試驗偏差，進而提昇育成抗病品種的適用性及持久性。此外，IRRI 額外補充罹病材料作為接種源，可確保檢測結果的可信度，避免因環境中病原族群數量不足而造成的偽抗性表現。

十一、結論

稻熱病嚴重發生時常造成產量上的巨大損失。除利用化學藥劑防治及栽培管理等方式處理外，育成抗病品種為最根本的解決之道。抗病品種育成需有完善的抗病檢定措施與標準，國內目前建立的稻熱病溫室檢測平台及田間病圃檢定技術均有相當的成熟度及穩定度，藉由此次的研習交流，引入國際稻米研究所最新的研究材料與技術，及對國內的檢定系統進行微調，相信可以進一步提高國內水稻抗病育種的效率與育成品種抗性的持久度，進而增加我國在水稻農糧產業上之適應力及競爭力。

十二、未來展望

目前至少已有 100 個稻熱病抗病基因 (*R*-gene) 及 40 多個稻熱病菌的無毒力基因 (*AVR*-gene) 被鑑定出，研究結果顯示，稻熱病菌的 *AVR*-gene 與水稻 *R*-gene 間的交互作用，符合 gene for gene 學說 (Silue et al. 1992)。從病害研究的觀點來看，長遠之計仍需重

新建立一套以台灣水稻品種為背景的單基因判別品種 (系)，透過單基因系統的檢測，瞭解國內稻熱病菌菌株致病基因的分佈架構，配合國內水稻品種所含抗稻熱病基因背景資料庫的建置，檢視田間病原菌致病族群的變動與水稻栽培品種分佈及田間病害發生的關聯性，應更有助於本病害發生的預測與抗病育種工作的進行。

參考文獻

- 陳隆澤、黃守宏、鄭清渙。2009。水稻病蟲害抗性檢定工作回顧。台灣水稻保護成果及新展望研討會專刊，第 83-103 頁。行政院農業委員會農業試驗所特刊138號。
- Bonman, J. M., T. J. V. d. Dios, and M. M. Khin. 1986. Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines. *Plant Disease* 70:767-769.
- IRRI. 1996. Standard evaluation system for rice. 4 ed. IRRI, Manila, Phillipine.
- Notteghem, J. L. 1985. Définition d'une stratégie d'utilisation de la résistance par analyse génétique des relations hôte-parasite. *Cas due couple riz-Pyricularia oryza*. *Agronomie Tropicale* 40:129-147.
- Roumen, E. C., J. M. Bonman, and J. E. Parlevliet. 1992. Leaf age related partial resistance to *Pyricularia oryzae* in tropical lowland rice cultivars as measured by the number of sporulating lesions. *Phytopathology* 82:1414-1417.
- Silue, D., J. L. Notteghem, and D. Tharreau. 1992. Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa-Magnaporthe grisea* pathosystem. *Phytopathology* 82:577-580.