

國際稻米研究所 水稻白葉枯病抗性檢定評估 技術研習心得報告

農試所植病組 陳純葳

農試所作物組 吳東鴻

一、前言

台中場 楊嘉凌

苗栗場 張素貞

水稻為世界重要的糧食作物之一，稻熱病和白葉枯病為水稻的主要流行病害，常隨著發生之嚴重程度不同而造成產量損失，其中白葉枯病為細菌性病害，主要發生於第二期作，除少數推薦防治藥劑外，有效防治極為困難，最為有效之防治手段為種植抗性品種，是故開發抗病種原、育成抗性推廣品種一直是許多國家的努力方向，為此必須有一套穩定的水稻白葉枯病抗性檢定評估技術，才能有效快速的篩選出抗性水稻品系。

二、台灣水稻白葉枯病抗性檢定工作

在台灣，水稻白葉枯病之抗性檢定工作首先由1971年秈稻區域試驗開始，1975年正式於台中區農業改良場設立田間檢定圃，翌年更加入粳稻育種材料，根據期作一年檢定兩次，調查方法與標準

則依據國際稻米研究所 (International Rice Research Institute, IRRI) 建立的標準進行，而供試用白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Swings et al. 1990) 菌株從最早使用的中央研究院604菌株，陸續更改為2003年沿用至今的 XF89b 及 XM42 (農業試驗所提供)。1976至2008年間已選出 14 個抗性品種，然而檢定期間仍有結果不穩定之情形發生。

2012年為因應全球氣候變遷對我國食安全及相關產業所造成之衝擊，由台灣大學及農委會轄下各試驗改良場所與 IRRI 簽定「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」計畫，擴大雙方水稻種原及調查資料之交流，開發具有高逆境調適能力之水稻新品種，或強化改善現有品種之耐/抗逆境能力並加強栽培技術及病蟲害管理，培育抗病之水稻品種。而在交流初期，要先將雙方檢定評估技術達到某程度的一致性才能進行分析比較。因此筆者有幸於101年9月23-29日前往 IRRI 研習水稻白葉枯病抗性檢定評估相關技術，本文為筆者將其技術與台灣現有之技

作者：陳純葳助理研究員
連絡電話：04-23317502

術進行比較，期望將台灣技術進行修改後，提供將來水稻品系抗性檢定與白葉枯病菌生理小種鑑定使用。

三、IRRI與台灣現行技術上之差異比較

(一) 白葉枯病菌之保存與接種源製備

IRRI 保存白葉枯病菌的方式有3套。(1) 將白葉枯病菌懸浮於消毒滅菌過之 10% 脫脂牛奶 (Skim milk) 水溶液中，再裝入 2ml 的保存管內，放置於 -20°C 環境；(2) 與前者相似，但改成 30% 甘油 (Glycerol) 水溶液，並放置於 -80°C 環境；(3) 先將白葉枯病菌懸浮於消毒滅菌過之 10% 脫脂牛奶水溶液後，再進行冷凍乾燥動作，將病菌保存於密封的安瓿瓶中，隨後放置於 4°C 環境下。前兩者可供短期保存 (1-2年) 及移植接種源之用，後者則可進行長達 10年之久之長期保存，(圖一)。於台灣則僅使用一種保存方式，似第二種 (溶液改成 20% 甘油水或NB)，一旦放置之定溫箱發生事故則易



圖一、密封的安瓿瓶中為冷凍乾燥過後含有白葉枯病菌脫脂牛奶粉末。(陳純葳提供)。

遺失菌株，且需常進行更新動作，可能會造成菌株的變異，應增加多項保存方式降低菌株種原遺失之風險。

在接種源製備方面，IRRI 先將病菌

從保存管中移植至 modified Wakimoto' s medium (WF-P) 斜面培養基上，於 30°C 下培養 2-3 天，並隨著移植再更新一次後，利用無菌水配製成細菌懸浮液，此即為接種源。台灣目前則有兩種接種源製備方式：(1) 同 IRRI，但多用在檢定圍與少量接種試驗；(2) 則是將移出並更新的病菌移植入液態培養基中進行培養，並直接使用該含菌之培養液做為田間接種源。所使用之培養基為 Wakimoto' s medium (WM)，但因配製時需用馬鈴薯煎汁，其可能會造成每次製作時的成分差異，進而影響病菌之生長，故近年改採用 523 medium。然液態培養時培養基中帶有的物質過於營養，可能會影響接種結果，另如在培養期間遭受污染，比起固態培養較不易察覺，此亦會影響結果，是故未來改成利用無菌水來製備接種源較佳。

(二) 田間檢定圍

IRRI 方面，於試驗田 (圖二A) 內種植供試水稻品系，待其生長至分蘗期 (約插秧後45-60天)，即利用特製的剪刀 (接種源可以一直流向刀面) 進行人工剪葉接種，每個分蘗僅接種最上位之完全展開葉 (葉尖1-2公分處)，共使用 2 個當地主要之生理小種代表菌株，每個菌株接種每個品系 10 株，並於接種後 14 天進行調查，使用病斑佔葉面積百分比 (Disease Lesion Area, %DLA) (SES, 1996)，即以病斑佔葉面積的1/2、1/4、1/8、1/16 的級距來判別等級，較為方便、快速適合於田間大量品種篩選時用，且適合於水稻品

系間性狀 (尤其株高) 差異大時使用。台灣檢定圃的接種流程相似，接種時期亦在分蘖至孕穗初期，但仍有幾點差異：(1)由於未有特製之剪刀，接種時需將剪刀浸於懸浮液後再進行接種；(2)接種時採用齊頭剪葉，除造成 %DLA 誤差變大外，接種所有葉片可能影響植株本身的生長與發病程度，且調查時可能因為較下位葉生理老化之問題造成判讀困難，此點乃極需改進之處；(3)調查時間需 28 天以上，此項差異與發病環境有關，調查時先確定感病品種 (如IR24、TN1) 至少達到中感程度即可；(4)田間管理方式不同，IRRI 接種後田間環境保持深水灌溉，以維持田間一定濕度，台灣則因配合一般灌排水管理方式進行，接種至調查期間會遇到排水降低田間濕度，未來試驗可考慮接種後即以深水灌溉至調查前日；(5)亦接種 2 個菌株，但因現行台

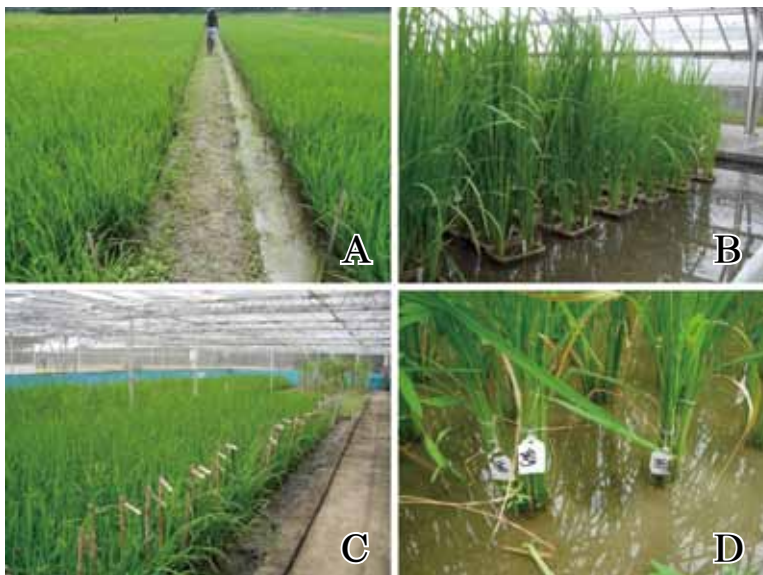
灣尚未有完整的生理小種分群，所以為以往固定使用之菌株，非主要生理小種代表菌株。此外，隨著帶有單一或堆疊多個抗病基因的近同源系 (near-isogenetic lines, NILs) IRBB lines 之使用，部分試驗場所調查方式改採用病斑長度進行調查，進行更精細之分析。

(三) 溫網室檢定圃

除了田間檢定圃外，IRRI 亦在網室區設置水田式檢定圃 (圖二C) 進行水稻品系廣幅抗性檢定，即於網室內設立具灌排水設施的試驗水田，將水稻供試品系種植於其中，同樣待插秧後達45-60 天後進行人工剪葉接種，並於14天後進行調查。不同於田間，網室區內一個水稻品系會接種 IRRI 所有的白葉枯病菌生理小種代表菌株，並利用病斑長度 (SES,1996) (圖三) 進行調查。有時視情形而定，同一植株上可以接種兩個菌株 (圖二D)，以大幅減少材料使用量。台灣尚未有網室檢定圃，如能建立網室檢定圃的接種平台，配合適當的硬體設施 (如溫溼度等，因台灣四季溫度差異較 IRRI 大)，則可以穩定長期地檢定水稻品系對白葉枯病的廣幅抗性。

(四) 白葉枯病菌生理小種鑑定流程

於溫室內採高架水盤式平台 (圖二B)，



圖二、IRRI白葉枯病檢定圃。A.田間；B.溫室；C.網室；D.網室有時在同一植株上接種2個白葉枯病菌菌株。(A.由楊嘉凌提供，B.和C.由陳純葳提供，D.由吳東鴻提供)

分別於栽培盆鉢種植判別品種 (IR24、IRBB4、IRBB5、IRBB7、IRBB10、IRBB14、IRBB21)，再將盆鉢放置於高架水盤上，於分蘖期 (插秧後 45-60 天) 進行剪葉接種，每個品系 4 株，每株 3-5 片葉，菌株為各地採集罹病葉片後純化分離出來的白葉枯病菌，調查時間與方式同網室檢定圃，最後再根據抗感病反應結果來鑑定該菌株屬於哪一個生理小種。目前筆者於溫室採用之方式類似，然 (1)非固定設施 (在地面利用塑膠布圍出的水盤，或利用可以保水的盆子種植)，(2)較為早期 (插秧後21-28天) 即接種，(3)所使用植株需求量較多，(4)接種源製備非無菌水製備。如能設立固定的接種平台，則會減少多項因素所造成的結果誤差，在材料使用量與結果調查上也較為便捷，可加速台灣白葉枯病菌生理小種鑑定試驗之進行。

四、建議台灣修正措施

(一) 增加白葉枯病菌株之保存方式

IRRI 保存白葉枯病菌的方式有 3 套，於台灣則僅使用一種保存方式，易遺失菌株且需常進行更新動作，易造成菌株的變異，建議增加冷凍乾燥保存方式。

(二) 修正接種源製備方式

在接種源製備方面參考 IRRI 以 WF-P 斜面培養基，及利用無菌水配製成細菌懸浮液，降低台灣目前以 523 液態培養基培養過於營養，污染不易察覺及接種結果不穩定之缺失。

(三) 調整田間檢定接種及調查方式及增加溫網室檢定圃

IRRI 進行人工剪葉接種，每個分蘖僅接種最上位之完全展開葉 (葉尖1-2公分處)，台灣則以齊頭式接種，後者不適合株高或葉片差異大時使用，故建議日後接種葉片修正為與 IRRI 方式相同。另接種時期調整至分蘖中期，接種後田間水份保持7~10公分，調查時間為接種後14天最佳，或調查時先確定感病品種 (如 IR24、TN1) 至少達到中感程度即可開始調查。台灣目前尚未有網室檢定圃，如能建立網室檢定圃的接種平台，配合適當的硬體設施 (如溫溼度等)，則可以穩定長期地檢定水稻品系對白葉枯病的廣幅抗性。

(四) 建立台灣白葉枯病菌生理小種鑑定標準流程

IRRI 利用溫室高架水盤式平台種植判別品種 (IR24、IRBB4、IRBB5、IRBB7、IRBB10、IRBB14、IRBB21)，進行白葉枯病菌生理小種鑑定流程，具有易管理及穩定且可單株接種多菌株之優點，依據之修正台灣非固定設施、較早期接種、單株接種單菌株等缺失，並建立具台灣本土品種背景之帶有抗病基因之近同源系，讓台灣生理小種鑑定流程標準化且在地化(表一)。

五、結語

藉由修改台灣目前的檢定評估技術，除可使檢定結果更加穩定外，並可利用具秈稻背景 (IR24) 與粳稻背景 (豐

錦 Toyonishiki) 之攜有單一或堆疊多個抗病基因的近同源系，或建立台灣本土品種背景之近同源系，來建立多年度、多期作與多地點 (苗栗、台中、彰化) 的資料，強化彼此間檢定資料的關聯性，讓彼此間調查結果與標準一致性，建立台灣最適檢定模式。甚至在使用同一套檢定評估技術和水稻品系的情形下，更易與 IRRI 進行交流。

六、參考文獻

IRRI. 1996. Standard Evaluation System for Rice. 4th ed. 52pp.
 陳隆澤、黃守宏、鄭清煥。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，pp.83-103頁，倪蕙芳、楊宏仁編，農業試驗所印。



圖三、溫網室檢定圃內的供試水稻品系於接種後第14天測量病斑長度。

表一、IRRI 與台灣水稻白葉枯病檢定評估技術差異比較

項目		IRRI	台灣
水稻寄主	種植環境	田間：深水栽培 溫室：高架水盤式 網室：水田式	田間：灌排水調節 溫室：水盤式
	接種生育時期	分蘗期 (插秧後45-60 天)	田間：分蘗-孕穗期 溫室：插秧後 21-28 天
白葉枯病菌	保存方式	<ul style="list-style-type: none"> • 10% 脫脂奶粉水溶液保存管(-20°C) • 30% 甘油水溶液保存管(-80°C) • 冷凍乾燥法 	<ul style="list-style-type: none"> • 20% 甘油水溶液或NB液態培養基) 保存管 (-80°C)
	供試菌株數量	田間：當地常見之兩個生理小種代表菌株 網室：所有生理小種代表菌株各一。	固定菌株2支(因現行台灣尚未有完整的生理小種分群)
	接種源 製備	先使用固態培養，再利用無菌水配製懸浮液	<ul style="list-style-type: none"> • 直接使用液態培養液 • 無菌水配製懸浮液
接種方式		剪葉接種法 <ul style="list-style-type: none"> • 每個分蘗最上位之完全展開葉(每叢3-5片) • 田間有專屬的剪刀工具 	剪葉接種法 <ul style="list-style-type: none"> • 所有葉尖(齊頭) • 剪刀沾菌液再剪
接種後調查時間		14 天	田間：28 天以上 溫室：21 天
調查與評估方式		<ul style="list-style-type: none"> • 田間：病斑佔葉面積百分比 (%DLA) • 溫網室：病斑長度 	<ul style="list-style-type: none"> • 田間：%DLA、病斑長度 (近年部分試驗使用) • 溫室：病斑長度
因應措施		<ul style="list-style-type: none"> • 增加白葉枯病菌株冷凍乾燥保存方式 • 修正接種源為無菌水細菌懸浮液 • 調整田間檢定接種、調查方式及增加溫網室檢定圃 • 建立台灣本土品種背景之近同源系 • 台灣生理小種鑑定流程標準化 	