

出國報告（出國類別：研習）

因應氣候變遷對水稻病蟲害預警制度及安 全管理技術之建立研習報告

服務機關：行政院農業委員會花蓮區農業改良場

姓名職稱：陳任芳 副研究員

派赴國家：菲律賓

出國期間：中華民國 101 年 9 月 23 日至 10 月 6 日

報告日期：中華民國 101 年 12 月 10 日

壹、內容摘要

本次研習主要目的為因應農產品安全及氣候變遷議題的彰顯，藉由國際合作研究加入國際研發團隊，學習水稻抗病育種病害檢測調查分析方法、水稻生長模式之糧食生產風險評估研究、病害預測技術、及病蟲害綜合管理策略等相關水稻的栽培管理技術。分子標誌目前在世界稻作育種重要技術可提高育種效率與縮短期程，為解決我國抗病蟲育種問題，應加強研究病蟲害抗藥性、生理小種等特性以協助選拔。學習從稻熱病菌培養分離用培養基的製備，病原菌單胞分離及保存培養，品種檢定接種前之接種源大量製作步驟，以血球計數器計算孢子量，在溫室的單循環測試定性定量病害調查及多循環測試定量病害調查穗稻熱病病圃病害檢定調查等，在田間及溫室人工接種技術、與稻熱病抗病性評估技術流程及其判別標準，每一步驟均有仔細的指導說明。IRRI 已利用 ORYZA 2000 模型對不同地區、不同生產條件及不同品種類型的水稻的模擬表現和模型驗證，在氣候變化，生產管理等對水稻生長與產量及資源利用的影響，為水稻生產提供理論依據和技術，促進水稻可持續生產和資源利用水準的提高具有積極的意義。稻熱病預測可依據寄主植物標準、病害特性、孢子量、氣象、氣象及孢子量、或氣象、孢子量、病害參數及寄主植物標準等，就病勢發展、罹病度、發病率及病害暴發時間來預測。及早建立監測、預警制度，達到預警效果，可減少農藥使用量於作物病蟲害防治之技術，利用抗病蟲品種、加強生物防治、減少藥劑施用，和緩抗藥性族群發生，如捕食性及寄生性天敵之應用，保護天敵及種植蜜源植物等之生態工程法，以達到生態平衡、環境保護及農業永續經營利用之目的。遠距顯微鏡診斷(RMD)可透過網路伺服器連線直接和各地的專家互動討論，經由遠程顯微鏡頭觀察準確、快速鑑別害蟲和病害，可增強診斷的能力，縮短檢查時間，降低運輸寄送鑑定樣本的成本及避免檢疫問題。手機為現代人生活必要工具之一，IRRI 在菲律賓為農民設計利用手機可獲水稻施肥的資訊，教導農民使用智慧型手機即時監控稻米的生長狀況，降低肥料的使用量，提升稻米的產量與品質。

貳、目次

壹、	摘要-----	1
貳、	目次-----	2
參、	目的-----	3
肆、	行程-----	4
伍、	研習過程與心得	
	一、研習過程-----	5
	二、研習心得-----	18
陸、	建議事項-----	22
柒、	誌謝-----	24
捌、	附錄-----	25

參、目的

氣候變遷將造成農業生產及作物有害生物的種類與發生生態的變化，台灣高溫多濕，病蟲草害經常發生，近年來氣象資料顯示台灣為暖化的高危險區，因此預測未來病蟲害之發生將更形嚴重，使病蟲害防治管理工作面臨嚴峻挑戰，若無法發展具體有效的防治方法，將使農產品遭受重大損失，農藥或其它防治資材之不當使用問題更不容忽視。為有效因應全球氣候變遷對我國水稻安全及相關產業所造成之衝擊，擬強化與國際水稻研究所(IRRI)之農業科技合作，積極加入國際研發團隊，提昇我國農糧產業發展之國際競爭力，確保我國糧食安全與產業發展之穩定。

肆、行程

日期	行程	備註
09/23(日)	台北-馬尼拉-Los Banos (IRRI) 一、搭乘中華航空 13：50 CI703 班機 16:00 抵達馬尼拉。 二、搭乘 IRRI 專車至 IRRI。	去程
09/24(一)～ 10/05(五)	IRRI	一、參訪 PBGB 各實驗室及試驗田 二、學術研討稻熱病及白葉枯病抗病育種篩選及病害調查相關議題 三、實驗室及溫室病害接種試驗實習及檢定圃病害調查操作。 四、機關外試驗田調查及觀摩。 五、與 PBGB、CESD 及 UPLB 各研究專家教授上課進行討論。 六、參觀稻米世界博物館。
10/06(六)	馬尼拉-台北 搭乘中華航空 10：35 CI 702 班機 返回桃園-台北	回程

伍、研習過程與心得

一、研習過程：

(一)研習國家介紹：

菲律賓共和國（Republic of the Philippines，簡稱菲律賓或菲國）是一個群島國家，位於東南亞的中心，西鄰南中國海，北有台灣、中國和香港，西側的新加坡、馬來西亞和泰國，以及南方的印尼和汶萊。菲律賓群島（南琉球群島）由 7101 個島嶼組成，分為呂宋島、維薩亞斯群島和民答那峨島三大島群，面積約 30 萬平方公里，海岸線總長 36,289 公里，居世界第五位。首都為馬尼拉（Manila），主要語言有菲律賓語（Tagalog）及英語，境內大部分信仰天主教，少部分為基督教、回教及佛教，菲律賓本土約有 9,300 萬人口，加上約 1,100 萬居住於海外的菲律賓人，總計約超過一億人，居世界第 12 名，屬於多個種族國家(以馬來人為主，及先後移入的中國人、美國人、西班牙人和阿拉伯人)。菲律賓北部屬海洋性熱帶季風氣候，南部屬熱帶雨林氣候，全國各地普遍炎熱、潮濕，全年可分為 3-5 月炎熱乾燥的熱季，6-11 月的雨季及 12-2 月的涼季三個季節，年平均溫度約為 27℃，最高及最低氣溫的分布在無明顯差別，夏秋季多雨、多颱風。

(二)研習單位介紹：

國際稻米研究所（International Rice Research Institute，簡稱 IRRI）總部位於菲律賓首都馬尼拉的菲律賓大學洛斯巴諾斯主校區內，於菲律賓北部內湖省洛斯巴洛斯，這裡也叫溫泉鎮，它坐落在綠樹掩映的睡美人山上，景色十分優美。乃於 1960 年時全球許多國家遭遇二次大戰後的缺糧與飢荒，面對日益增加的人口，糧食增產與安全供應成為迫切需解決的課題，聯合國所屬世界銀行國際農業研究諮詢組織（the Consultative Group on International Agricultural Research, CGIAR）在其下設置包括國際稻米研究所(IRRI)、國際玉米小麥改良中心(CIMMYT)等 15 個國際農業研究中心，負責研發人類所需的各種糧食。國際稻米研究所為因應預防未來穀物不足問題開發新種稻米，由美國的福特、洛克斐勒兩基金會所共同設立的非營利性國際研究機構，為一非營利之農業研究單位，因此目前的經費大多由國際農業發展基金、世界銀行、會員國國家及私人基金會所提供，是聯合國下之國際農糧組織最老且最大的國際稻米研究單位。其成立最主要的目標乃在於藉由稻作試驗及品種改良以減少貧窮、飢餓、改善農民及消費者之健康，並透過國際合作推展農業研究、確保稻米生產之穩定、提供相關訊息及稻米知識的入口平台協助稻米研究人員，並提供及保存相關之遺傳材料等，尋求可持續方法改善消費者的福利，保護農業生態環境。為了到達目標，IRRI 僱用約 1000 餘

位之研究及支援人員，並提供訓練培養包括博士後研究及短期研究之人員，而且大部份的學生和學員都是來自開發中國家。

(三)研習過程及項目：

9 月 23 日當天下午搭乘中華航空公司班機由台灣桃園國際機場 13:30 出發，經 2 小時航程於 15:30 抵達菲律賓馬尼拉，出境後隨即由國際稻米研究所機場駐點接送至本部，並辦理相關手續，入住 Swaminathan guest Residences。9 月 24 日早上拜訪 Dr. Hei Leung 後開始參訪 PBGB 各實驗室及 IRRI 試驗田，進行學術研討稻熱病與白葉枯病抗病育種篩選及病害調查相關議題、實驗室與溫室病害接種試驗實習及檢定圍病害調查操作、機關外試驗田調查及觀摩，與 PBGB、CESD 及 UPLB 各研究專家教授上課進行討論，並參觀稻米世界博物館。

本次研習主要目的為因應農產品安全及氣候變遷議題的彰顯，藉由國際合作研究加入國際研發團隊，共同研究開發先進性之關鍵技術，掌握國際訊息、同享科技研發成果，確保我國水稻產業之競爭力及糧食安全之永續性，提升我國農業領域因應氣候變遷之能力，學習水稻抗病育種病害檢測調查分析方法、水稻生長模式之糧食生產風險評估研究、病害預測技術、及病蟲害綜合管理策略等相關水稻的栽培管理技術，其於國際稻米研究所內分屬不同之實驗室，本次研習課程由植物遺傳育種及生物技術研究室（Plant Breeding, Genetics and Biotechnology，簡稱 PBGB）主管 Dr. Hei Leung 負責統籌規劃，Dr. Chitra Raghavan 協助安排與多位不同研究領域的專家針對最新的水稻研究方向及研究現況進行訪談外，另安排所有與研究人員會談，參觀實驗室及田間操作實務等課程，包括 Dr. Casiana M. Vera Cruz、Alicia A. Bordeos、Marietta R. Baraoidan、Isabelita P. Oña、Dr. Rocardo Oliva、Dr. Bo Zhou、Rogelio C. Cabunagan、Dr. Tao Li、Dr. Crisanta S. Bueno、Dr. Benoit Clerget、Dr. Ireneo B. Pangga、Dr. Nancy P. Castilla、Josie Lynn A. Catindig 及 Rowena L. Castillo 等人。其中 Dr. Hei Leung、Dr. Casiana M. Vera Cruz、Alicia A. Bordeos、Marietta R. Baraoidan 及 Isabelita P. Oña 等人研究領域為抗病育種，分別負責水稻抗稻熱病及白葉枯病育種，Dr. Rocardo Oliva 與 Rogelio C. Cabunagan 分別負責紋枯病與病毒病抗病育種，而 Dr. Bo Zhou 則研究以稻熱病病原 AVR 基因為基礎篩選抗稻熱病品種，而 Dr. Tao Li 負責研究 ORYZA 2000 水稻生長模式開發，Dr. Crisanta S. Bueno 及 Dr. Benoit Clerget 以作物生理生態的角度參與改善水稻生產模式開發，Dr. Ireneo B. Pangga 研究領域為病害預測技術，Dr. Nancy P. Castilla 主要負責水稻病蟲害管理及損失評估，Josie Lynn A. Catindig 建立以遠距顯微鏡協助病蟲害診斷及生態工程法之害蟲管理策略，Rowena L. Castillo 發展透過手機和網路提供技術協助田間作物營養管理的決策工具。

至 IRRI 視聽中心觀賞 “Rice Science for a Better World” 影片，了解 IRRI 的研究目標和成果及未來的研究方向。接著安排參觀研究所內設立的稻米世界博物館，從而知悉稻作產業之發展歷程。IRRI 主要工作是對水稻的研究、推廣和人才的培養，致力於改進生產者和消費者的生活，用先進的科學技術來提升水稻生產，而所開發的水稻品種、材料和技術，都用來無償提供世界上的貧窮國家。稻米是全球近 25 億人口賴以生存的主要糧食。目前，全世界有 122 個國家和地區種植水稻，其中，發展中國家所產的稻谷佔全世界稻谷總產量的 95%。從地域分布看，90%的種植面積和總產量集中在亞洲。隨著世界人口不斷增長，耕地不斷減少，全球糧食安全問題日益突出，人們對高質量、高營養水稻的要求越來越多。

1.水稻抗病育種稻熱病/白葉枯病調查分析方法：

IRRI 的專家們發現，水稻增產的速度比不上人口增加的速率，並推估在西元 2025 年將發生全球缺糧的現象，而目前在各個國家的水稻育種者越來越少，未來將出現斷層，進而影響水稻育種及增產的計畫。IRRI 認為水稻育種者需要增加新技術與種原，為了解決當前並預防未來可能之問題，設定了未來世界稻作育種目標為產量提昇，縮短生育時數、廣泛的逆境抗性、稻米品質提昇及增加栽培水稻的基因歧異度。然而長期氣候變遷和短期的氣候變化已對全球許多國家的稻米生產造成不同的影響，其中病蟲害也是一個主要的產量限制因子，為了達到以上之目標，IRRI 藉由國際種原的交換與合作透過建立 QTL-mapping 及利用分子標誌改良育種工作，選拔具有抗稻熱病、白葉枯病、耐旱(Sub1)等基因品種。病蟲害抗性對於稻作育種而言是相當重要的，抗性較差的品種較不易受到農民朋友的喜愛，除非本身的技術相當良好，否則通常在品質及產量上會受到病蟲害的影響而降低，因此選拔一個具有良好抗性的品種是相當重要的，此外若能透過早期的篩選，藉以淘汰抗性較差的品系，避免人力、物力及財力的浪費，將可以提昇選拔的效率。

白葉枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 和稻熱病 (*Magnaporthe oryzae*) 是嚴重危害水稻的病害，在考慮育成持久性抗病品種時有許多因素要考慮，首先要了解抗性的遺傳基礎並找出抗性基因、選擇可用的抗性基因及佈署多個基因抗性等方面。近年來國際稻米研究中心大力開發『分子標記選拔 marker-assistance selection (MAS)』技術，透過 markers 在苗期即進行可以選拔的方便性，快速而且大量的篩選具有特定抗病基因的植株，經過數年的研究已有相當大的進展。目前水稻白葉枯病抗病研究已發現 34 個 (*Xa1~xa34(t)*) 抗性基因。其中，22 個為顯性基因 *Xa*，其餘為隱性基因 *xa* (*xa5*、*xa8*、*xa13*、*xa15*、*xa19*、*xa20*、*xa24(t)*、*xa26(t)*、*xa28(t)*、*xa32(t)*、*xa33(t)*、*xa34(t)*)，而已定位的抗性基因有 22 個，

其中 *Xa1*、*xa5*、*xa13*、*Xa21*、*Xa26* 及 *Xa27* 等 6 個基因已被成功選殖出來。IRRI 已將大部分白葉枯病 *Xa* 抗病基因導入或堆疊至秈稻 IR24、梗稻豐錦 (Toyonishiki) 與秈梗雜交背景的密陽 23 (Milyang 23)，育成一套 IRBB 抗白葉枯病近同源系，可作為各地區統一鑑別品種用以監控白葉枯病菌病原群(pathogenic group, pathotype, race) 之變化，亦可做為抗病親本，並利用分子標誌輔助選種快速將抗病基因導入栽培品種。稻熱病菌病原基因組容易發生變異，新品種抗性平均在 3 年內就崩壞，所以培育抗性品種需使用不同的抗性種原，系統化評估規劃及合適接種評估環境，堆砌多個抗性的數量性狀基因座配合單一抗性基因會是較好的選擇。如在稻熱病抗性部份，已選拔 *Pi40*(*Pib*、*Piz-t*)，*Pia*、*Pib*、*Pik-5*、*Pita*、*Pi11* 及 *Pi9* 等抗病基因，稻熱病單一基因含 *Pi* 基因的品系，已有 30 個連續期作(稻熱病檢定圃)，*Pii*、*Pik-p*、*Piz*、*Pi5(t)*及 *Pi9* 在病圃一直都是低感病性，11 個 *R* 基因品系 *Piz*、*Piz-5*(2 品系)、*Piz-t*、*Pi9(t)*、*Pik*、*Pik-m*、*Pik-h*、*Pik-p*、*Pil* 及 *Pi7* 幾乎耐所有南亞及東南亞的菌株。

本次研習於 IRRI 田間及溫室學習稻熱病人工接種技術、與抗病性評估技術流程及其判別標準，作為溫室與田間抗性表現之差異關聯性，藉此協助強化管控致病品系、生態分佈及流行病學之發生，以建立起病害保護體系。稻熱病菌分離培養及病害調查標準程序(附錄)，包括稻熱病菌培養分離用培養基的製備，病原菌單胞分離及保存培養，品種檢定接種前之接種源大量製作步驟，以血球計數器計算孢子量。在溫室的單循環測試定性病害調查，主要做為在一病害循環後評估供試植株對一稻病原菌株或一組菌株的抗感性，通常是做為評估主基因的存或缺乏；溫室的單循環測試定量病害調查，主要做為篩選局部抗性鑑定新的 QTL 稻熱病定量抗性族群圖譜用；溫室多循環測試定量病害調查為了測量當病原菌繁殖 2 至 3 個循環後，在一個供試植物族群上病害的累積發展。這對定量基因特徵的影響是有用的，可用來預測抗病耐久力；以及穗稻熱病、病圃病害檢定調查等。

2.水稻生長模型 ORYZA 2000：

水稻生長模型 ORYZA 2000 是一個不同的科學家和研究人員超過十年的改進和測試的產品。從一個簡單的模型追溯其潛在的生長和生產開始，而成為一個適用於不同的情景分析全方位的水稻模擬工具，是 ORYZA 系列模型的最新版本，為國際上具有代表性的水稻模型之一，可供做為收穫保險及糧食市場的長期產量估算之參考，其預測具可變動性，目前尚無法做短期立即性的預估。

ORYZA 系列水稻模型是由 IRRI 與荷蘭瓦赫寧根大學(WUCR)聯合研製模擬熱帶地區水稻的作物生長模擬模型。從 20 世紀 90 年代早期至今，ORYZA 系列模型已有多個版本。

2001 年，IRRI Bouman 等人在綜合潛在產量模型 ORYZA1、水分限制模型 ORYZA W 和氮素限制模型 ORYZA N 的基礎上更新擴充成一個綜合模型版本，稱為 ORYZA 2000。ORYZA 2000 模擬了各種不同條件下(潛在生產力、水分限制、氮素限制)水稻的生長、發育和水分平衡過程，並假定在所有這些生產條件下，作物完全不受病害、蟲害以及雜草的影響並且沒有產量減少的情況發生。ORYZA 2000 在 FORTRAN 模擬環境系統(FSE)下通過 Compaq Visual Fortran 進行編寫程式。FSE 系統是專門為動態模擬農業生態生長過程的模型程式設計的，如作物的生長過程，以及每天需要輸入天氣資料的情形。FSE 系統由如下成分構成：主程式 FSE，其功用是用於組成作物生長和水分平衡模型的模組，處理適時的資訊交換和每天結束時速率的積分；WEATHER 庫用於管理天氣資料；實用庫 TTUTIL 則用於資料的讀取與寫入等專門的軟體工作。FSE 使用模擬模型中的“速率-狀態”的概念，確保了所有模組和副程式的運行能夠平行進行，以及按正確的時間步長交換資料。ORYZA 2000 既能夠模擬移植水稻也能模擬直播水稻的生長發育。最近，研究者通過在 ORYZA 2000 模型中引入模擬旱作土壤水分平衡模型 SAHEL 和 SAWAH，以及水分脅迫模組等，拓展 ORYZA 2000 以適應於旱作水稻生長發育的模擬。對估算天氣對水稻生長及產量的影響具有較強的能力-潛在的生長發育和產量；在水或氮有限條件下對水稻實際生長和產量的估計具有良好的能力；可以用來研究水(灌溉)、氮肥、播種/插秧期等水稻栽培管理，可用於以應用為導向的研究，如作物理想株型(ideotypes)的設計，產量差距的分析，作物管理的最佳化，事前分析氣候變化對作物生長的影響，和農業生態區域劃分；已在亞洲 15 個地區的 18 個水稻品種已經得到了廣泛的驗證。

在現代農業研究中，作物模型和系統分析已經成為一個必不可少的工具，IRRI 已進一步開發和開展對 ORYZA 2000 模型對不同地區、不同生產條件及不同品種類型的水稻的類比表現研究和模型驗證，及利用 ORYZA 2000 模型開展不同的應用背景分析研究，如氣候變化，生產管理等對水稻生長與產量及資源利用的影響研究等，對於提高作物模型的研究和應用水平，並為水稻生產實踐提供理論依據和技術，促進水稻可持續生產和資源利用水平的提高具有積極的意義。

3. 稻熱病模擬預測：

20 世紀 80 年代以來，國際上已有不少水稻生長模式問世，雖然有一些通用的作物模式發表，但都不是專門為水稻設計的，作物參數經調整後大致也能適用於水稻。由於上述模式均未考慮水稻病蟲害發生的情況，或僅假設病蟲害已得到良好控制，在一定程度上限制了它們在水稻生產上的應用。在植保研究領域，已有如美國北卡羅來納州立大學研製的大豆蟲害

模型，假定蟲群密度隨溫度而變化，其蟲齡結構則保持固定比例，溫度對蟲群生長和繁殖的影響是通過計算生理日來實現的；假定在高溫條件下昆蟲的越冬存活力明顯提高、雌蟲產卵數激增、繁衍代數增加、地理活動範圍北移等。該模型除考慮昆蟲的自然死亡率外，還考慮了天敵(捕獲者、寄生蟲)、農藥和食物供應(葉面積)等因素對昆蟲死亡率的影響。這類模型儘管涵蓋因素較多，但畢竟是一種概念性模型，由於假設太多，還只是停留在教學和科研階段。而目前生產上大量應用的病蟲害預測模型，仍是以數理統計為主的經驗性模型。植物病理學家在定量模擬流行病的研究歷史相對較短，始於 Van der Plank 在 1963 年的發表，他深刻的影響每一代的流行病學者，以單方程模型來描述病害的流行發生，並提許多研究分析的被使用。在荷蘭瓦赫寧根和美國康涅狄格州大學的操作者很快就了解預測流行病在特定位置的限制，瓦赫寧根首創了電腦模式，康涅狄格州在植物病理學使用系統分析方法，形式化的概念和程式比使用模擬模型作為管理病害策略工具慢得多。和其他科學家一樣，植物病理學家發現模擬模型的規範性，雖然還沒有結論可以得出其有效性，但已經開始使用風險評估算法，提供提高稻熱病管理的工具。

水稻病害模型主要採用多元回歸方程建立預測模型。稻熱病預測可以病勢發展、罹病度、發病率及病害暴發時間來預測，一般以數學統計及簡單的方程式來模擬模式的趨勢。系統形式大致可依據寄主植物標準、病害特性、孢子量、氣象、氣象及孢子量、或氣象、孢子量、病害參數及寄主植物標準等；產量損失預估，則以經驗損害估算因稻熱病損失為最普遍的方法，在 IRRI 則試著將以病蟲害的影響(RICEPEST、EPIRICE)結合稻作生產模式預估產量損失(CERES/RICE model)。一般而言，稻熱病模擬和作物病害建模方法的優勢，是潛在有關病害在年度、地點、栽培措施等可傳輸的知識，事實上生物的真實性是比其他任何方法優於模型的模擬，穗頸稻熱病預測、病產量損失的量化關係亦均未被考量。整個稻熱病病害實際是由葉稻熱病和穗頸稻熱病兩個子系統組成，葉稻熱病病害和穗頸熱病害系統，每個子系統內操作垂直和水平的抗病系統。因此，從非水稻寄主和其他水稻寄主來的初感染源問題在造成流行病上對稻熱病的管理是非常重要的，許多葉稻熱病和穗頸稻熱病的模擬模型已有報導，雖然他們在不同環境中的驗證仍然是不明確的，許多因稻熱病的經驗損失函數是已知的，但他們的驗證和使用在病害管理上仍有待研究。結合稻熱病的影響到水稻模擬模型的工作是在幾個實驗室正在進行，將有助於改善稻熱病管理，無論是單方程預測和模擬模式都需要被實際使用的經驗功能。藉由稻熱病模擬模型到水稻動態生長模型的連結，這個限制可能被克服的，從而每天模擬對水稻稻熱病的生理效應，結合稻熱病模型或稻熱病效果的作物生長模型即使是更近於稻熱病模擬器的發展，但仍沒有結果被發表。由於宿主與病原體間相互

作用的生物真實性的模仿，結合病害和作物模型潛在地提供了一個比使用經驗損失函數更好的方法來解釋稻熱病對水稻的影響。

在日本第一個發展的葉稻熱病模式為 BLAST，之後依據不同的田區經驗發展了許多模式，分別為 PYRICULARIA、PYRIVIEW、BLASTAM、EPIBLA 及 PBLAST 等。第一個葉稻熱病模擬模式為 1982 年 Hashimoto 等人出版之 BLASTL，以病原菌生活史(產孢、孢子釋放及著陸、感染、病斑形成)，相關的氣候狀況、植物生長、葉片位置及因氣候、肥料施用、植物齡及葉位置影響寄主之抗感性做為模擬，每 3 小時記錄一次氣象資料做 7 天短期預報，預測稻熱病之暴發。另一個為 Ohta 等人發表的 BLASTCAST，類似 BLASTL 應用電腦模擬寄主抗性及其施用殺菌劑在病害發展及罹病度的影響。PYRICULARIA 則由 Gunther 開發以病原菌生活史資料為主，簡單的氣象因子加上寄主生長情形，但忽略寄主感性部份。而 Tastra 等人則增加氮肥及品系的作用修改 PYRICULARIA，又稱為 PYRNEW，適用於熱帶生態系統。Choi 等人的 LEAFBLAST 模式則以會受氣因子影響的孢子發芽、感染、潛伏期、病斑擴展、與孢子的產生、釋放及著陸，葉面積及稻熱病的病斑數及罹病率等資料進行電腦模擬計算。Torres 發展增加複雜的對數生長功能，構成要件包括病原菌產孢、孢子釋放與著陸及感染，造成流行的影響因子如株齡、溫度、露期、行株距及氮肥的施用。第一個穗稻熱病模擬模式為 Takasaki(1982)發表，認孢子掉落位置及侵是隨機的，因此將穗分為許多個感染位置單位，劃分為多個形式。Ishiguro 和 Hashimoto 發展的 PBLAST 為最詳盡，考量濕度期長短及溫度，每天計算每一個孢子掉落感染位置、heading、施肥、穀粒成長、每一感染點的感受性、病斑出現及擴展、穗稻熱罹病度、產量損失；每 3 小時計算孢子形成、釋放、附著、侵入及纏繞等參數；加上輸入 AMeDAS 氣象數據、濕度期長短數據、品種、栽培操作、葉斑形成孢子數等。

稻熱病病害管理只可靠的知識和適當的技術是不夠的，稻熱病和水稻存在一個由人的行為和態度扮演關鍵角色決定使用管理措施的環境中，病害系統分析必須考慮如何模擬和預測以改善稻熱病病害管理。更具體地說，產生這些決策工具技術的能力可被規劃者、推廣、作物保護人員或農民策略方式所決定。決策工具包括損失函數、經驗水平、滑動水平、預測系統、監測和預警系統、農場決策輔助、以電腦基礎決策支持系統等，如專家系統，和管理知識如休耕和雜草防除在稻熱病病害管理的角色。除了在韓國和日本的溫帶水稻生態系統中有使用模型和預報系統外有關這些決策工具在文獻中一般很少，實際重要性被知道的不多，而且也沒有其任何的利益經濟分析應用。農民較喜種植具高產潛力的抗病品種，雖然對風險程度的容忍取決年度和耕作區域，若加上相關利益或損失收入的預測，稻熱病預測會更容易被

接受，而不僅是針對病害而已，因此在發展稻熱病的模型和預測系統中，在經濟方面附加考量產量的損失的步驟是必要的。稻熱病的經驗損失函數研究似乎也利用非常簡單的公式：我們的審查並沒有發現任何多點模式，或使用病害面積進展曲線，健康的面積時間曲線及作為預測產量和/或產量損失。這同樣適用於使用病害變量（如在特定時間疾病的罹病度）與作物變量（如作物年齡）預測的表面模型。這種模型通常源自回歸方法，已知比單點或單點、多預測模式可提供更多的彈性。

4.電話和線上營養管理決策工具：

2011 首次在菲律賓發表，種植水稻的農民可通過自己的手機，由行動營養管理 (NMRice Mobile) 的設計得知肥料的建議用量，以手機撥打 NMRice 專用電話碼，即可聽到用方言所說的語音說明，農民只要按照語音提示回答問題，將水稻種植條件相對應回答的數字輸入後，農民即可由他的手機簡訊服務收到客製化的化肥施用量的指引，手機應用 NMRice 幫助菲律賓農業部針對農民的特殊情況和需求提供農民精確的耕作方式，自 2011 年 1 月推出以來，NMRiceMobile 已收到超過 6500 個電話。

菲律賓農業部在農業培訓學院(Agricultural Training Institute, ATI) 的支持下與國際水稻研究所長期合作，IRRI 更進一步推出水稻營養管理的應用程式(NMRice App)，在菲律賓 Apalit, Pampanga; Batac, Ilocos Norte; Infanta, Quezon; Victoria, Laguna; Dingle and Oton, Iloilo; Banay-banay, Davao Oriental;及 Kabacan, Cotabato 等 8 個直轄市通過可以 Android 操作系統的智慧型手機，上網測試指導農民施肥應用，希望在智慧型手機上可以補充現有網上的及行動電話的 NMRice 的應用，NMRice App 為稻農民提供了另一種肥料的建議用量的方式，且比 NMRice Mobile 有更多的功能。2011 年起在 La Paz, Tarlac、Oton, Iloilo 及 Makilala, Cotabato 等地，可以在 Android 上通過搜索“NMRice Philippines”免費下載應用程式，在這些地方的推廣人員和農民都說，NMRiceApp 很容易使用，因為有圖片和影像幫助他們了解問題。使用智慧型手機和 NMRice App 使農民可以不用離開自己的農場，而直接上網藉由定址化營養管理找到施肥量的建議，推廣人員也可以智慧型手機直接使用 NMRice App，代替拜訪農民、採訪他們、和存儲信息在手機裡，因為智慧型手機連線後，推廣人員可以將推薦施肥的相關訊息通過簡訊發送給農友，同時，推廣人員可攜帶著智慧型手機到更遠的地區，使得它的功能更強化。此外，可以確保提供給農民的化肥施用建議是最新的研究資料，讓推廣工作更容易及便利。

5.生態工程法之害蟲管理策略及遠程顯微鏡診斷：

生態工程法 (ecological engineering)最早是由 Odum 於 1962 年所提出的，強調人類社會活動能與自然環境配合，使兩者均能從中獲益的觀念。生態工程包含理論生態系，如演化生物系、系統理論及族群生態學等；應用生態系，如資源管理，影響評估及監測等，為農業生態系設計之基礎，而加強生態系服務系統。水稻生態工程法的一般田間操作包含合理化使用藥劑、田埂植被操作應用等方式，更可結合鄰近植被及水域棲所的管理、調節水稻種植時間及空間模式、避開病蟲害主要發生時期等操作方法。水稻生態系在地景多樣性 (landscape diversity) 低的情況下，如何保留生物防治之服務功能性，避免在失去天敵控制來維持生態平衡的情況下害蟲猖獗為害。生態系服務具有社會價值，但不一定馬上感受到的，其考量為長期性的效果，包括(1)作用範圍大，機制盤根複雜，僅少部份被研究，且大部份不可以被現今科技所取代，如生物防治功能服務。(2)人為的修正生態系統，長期下將破壞生態服務的價值，短期則將縮短社會利益的獲得。(3)維護生態服務需相當大的生物多樣性種類及族群相互支持、配合。(4)在及時且適當的行動下，許多生態系的功能是可被恢復的。生態系服務包含(1)食物、水及纖維的供應服務。(2)初級生產、棲所、營養及水循環的支持服務。(3)心靈、宗教價值、教育、靈感、創造與美學價值的文化服務。(4)入侵抵抗、授粉、病蟲害調節、氣候、天然災害減緩及保護的調節服務。(5)被使用殺蟲劑所取代的天敵生物防治功能所提供的有害生物調節服務。(6)授粉昆蟲族群的授粉生物調節服務。以水稻飛蝨為例，飛蝨是單食性昆蟲，以水稻為主食，r 型害蟲之移動性高且侵略性強，若要能持續性控制及管理此類害蟲，必需要由大尺度層面規模思考，不能只依賴殺蟲策略，且大量的藥劑施用，亦會造成抗藥性的迅速產生；因應之防治策略必需考量包含生態、社會、經濟、結構及政治等面向，配合地形的生態農業，即利用棲所多樣性，如田埂草生栽培、種植開花植物、保護和利用天敵、冬季種植綠肥、減少化學肥料施用量等方式，改變政策結構，不能只仰賴農藥、肥料的使用及補助，以達到增產之目的。如水稻瘤野螟需要進行防治的時期為何，學者必須以科學研究及分析後，方可提供建議農民防治參考。在水稻生育初期，大部份取食葉片之昆蟲均會被農民視為必需防除之目標，但因水稻植株具補償作用，此時期葉片之損害並不會轉嫁至產量上，加上在水稻生長期間，許多捕食性及寄生性天敵仍會提供生物防治效力的作用，此害蟲所造成之損害更是微不足道。水稻瘤野螟之族群約 46%被天敵捕食，18%卵被寄生，幼蟲亦面臨許多捕食性及寄生性天敵。在分蘖期，即使有 67%葉片被害仍不會對產量造成影響，幼蟲密度在每叢大於 15 隻以上時，水稻產量才會開始減少，水稻葉片於分蘖期被剪除，其產量損失與對照組並無差別。

迅速、準確鑑定是很多病蟲害研究和應用成果的關鍵，在確定可疑的緊急植物病蟲害、其他侵入性害蟲和病原體是否具安全威脅時，診斷為一個關鍵起步。傳統上需要鑑定的

生物標本通常直接郵寄給在各地的分類專家去鑑別；雖然有效，但這是一個既貴、又勞力費時的方法，往往需幾天才可收一個確認的鑑定結果。遠距顯微鏡診斷(RMD)是一個以鏡頭直接觀察植物害蟲和病害標本，並同時透過網路伺服器連線，將即時影像直接傳給世界各地的專家，可立即的、互動的討論，來自不同國家的專家通過遠程顯微鏡準確的鑑定標本，在網路用戶共享高品質的顯微鏡圖像，使用此技術可以快速鑑別害蟲和病害，也可用於增強診斷的能力，及提供有效的防治措施，縮短檢查時間，降低運輸寄送鑑定樣本的成本及避免的檢疫問題。

二、研習心得：

(一)透過本次之考察研習，可以清楚了解目前國際稻作研究發展趨勢，水稻育種工作現況，以及各國面臨氣候變遷之因應措施。在與 IRRI 研究人員交流互動中，可彼此建立國際水稻專家的聯繫管道及發現未來類似問題及因應之道，不僅達到稻作資訊交流目的，亦將我國介紹給其他國家，是相當成功的國民外交。此外，各國已利用分子標誌輔助水稻品種選育改進現有品種對逆境之適應性，國內應繼續加強和 IRRI 合作，派員前往研習新技術，以因應未來全球暖化產生的缺糧危機，改善國內育成品種對生物性逆境與非生物性逆境的抗性而預作準備。

(二)為及時因應極端氣候和作物病蟲害加劇的重大變化，應加強國際合作引進國外技術與成果，分子標誌目前在世界稻作育種上佔有相當重要的一部份，如抗病、抗蟲、香味及耐旱等特性，都可透過分子標誌的技術方法提高稻作育種效率與縮短期程用，並提升準確性，在菲律賓、日本、韓國及中國大陸等國家都使用的相當廣，而且也都積極的開發其他的標誌。相較於其他國家，台灣發展的速度明顯較慢，尤其目前擁有的抗病抗蟲特性標誌很少，因此建議主管單位應重視極端氣候和病蟲害的基礎與應用研究，整合團隊並給予必要的支援。IRRI 已發現許多抗性基因可有效防禦特定生理小種，但育種者可能亦不清楚應該導入或組合哪些抗性基因，為了真正解決我國的抗病蟲育種困境，育種者應與植物流行病學者合作建立病原基礎資料結合育種計畫進行抗病育種。另外，我們應先加強研究其抗藥性、生理小種等特性，由於稻熱病的流行病學，並未受到應有重視或新認知，對於國內目前主要流行生理小種、生理小種分群與變遷資料不足，將直接影響育種選拔的正確性。

(三)於 IRRI 田間及溫室學習人工接種技術、與稻熱病抗病性評估技術流程及其判別標準，從稻熱病菌培養分離用培養基的製備，病原菌單胞分離及保存培養，品種檢定接種前之接種源大量製作步驟，以血球計數器計算孢子量，在溫室的單循環測試定性定量病害調查及多循環測試定量病害調查穗稻熱病病圃病害檢定調查等。每一步驟均有仔細的指導說明，對病害及品種抗性評估調查均有詳細的級及圖片說明，讓每一個初學者均可以從中學習，其檢定作業繁瑣，代其對品種的抗感性檢定的嚴謹，但亦說明著國內在這一方面人力的缺乏。

(四)IRRI 已利用 ORYZA 2000 模型對不同地區、不同生產條件及不同品種類型的水稻的類比表現和模型驗證，在氣候變化，生產管理等對水稻生長與產量及資源利用的影響，為水稻生產提供理論依據和技術，促進水稻可持續生產和資源利用水準的提高具有積極的意義。在台灣，由於生態研究不被重視，缺乏鉅細靡遺的水稻生長相關資料，ORYZA 2000 模型的應用

可能運作上會較困難，準確度亦不夠，加上研究人力不足，因此鮮少被引進使用。若有詳細的基礎資料可供分析模擬，相信應可以類似對糧食期貨做評估一樣，在對國內作物產銷的失衡上提供預測，以減少衝擊，目前僅農試所利用 DSSAT 作物模式評估氣候變遷對水稻生長及產量的衝擊，利用氣候敏感度分析探討氣候因素對水稻產量的影響程度。

(五)近年來由於稻熱病嚴重危害，其原因可能因水稻種植期混亂、過量施用肥料、使用藥劑防治不當、抗病品種崩潰、雜交稻大面積推廣及氣候變遷全球溫暖化趨勢等，造成水稻稻熱病害流行之嚴重災情。為確保其國內糧食生產安全等因素，無不積極加強防治研究，建立長期監測調查計畫，為最基礎且最重要的研究工作之一，亦為未來擬定經濟、有效防治策略的基礎資訊。稻熱病預測可以病勢發展、罹病度、發病率及病害暴發時間來預測，可依據寄主植物標準、病害特性、孢子量、氣象、氣象及孢子量、或氣象、孢子量、病害參數及寄主植物標準等，但這些參數的基本需求都需要大量人力及時間的支援，與長期的資料建立，才能將一個預測模式發揮到最準確。

(六)及早建立監測、預警制度，達到預警效果，可減少農藥使用量於作物病蟲害防治之技術，為未來台灣農業政策之方針，研發非農藥之防治方法、利用抗病蟲品種、加強生物防治、減少藥劑施用，和緩抗藥性族群發生，加強生物防治，如捕食性及寄生性天敵之應用，保護天敵及種植蜜源植物等之生態工程法，建議各試驗研究機構多加強此方面之研究與開發，以達到生態平衡、環境保護及農業永續經營利用之目的。生態工程生態系統服務可加強棲所生態多樣性，提供天敵的避護所、食物源及管道，在 IRRI 的農田使用生態工法後，降低農藥量 87.5%，使得週遭青蛙變多了，常一夕間馬路上蛙屍遍地。

(七)遠距顯微鏡診斷(RMD)可透過網路伺服器連線直接和各地的專家互動討論，經由遠程顯微鏡頭觀察準確、快速鑑別害蟲和病害，可增強診斷的能力，縮短檢查時間，降低運輸寄送鑑定樣本的成本及避免檢疫問題。和近年農試所所建立的視訊服務系統相類似，亦是利用網路為媒介，透過農會直接和改良場、農試所，為農民進行病蟲害診斷；但不同的是，RMD 是世界各地試驗人員間的溝通，屬於較專業級的鑑定。

(八)手機為現代人生活必要工具之一，IRRI 在菲律賓為農民設計利用手機可獲水稻施肥的資訊，導入管理手法，教導農民使用智慧型手機即時監控稻米的生長狀況，降低肥料的使用量，提升稻米的產量與品質，以兼顧環境的永續發展；利用已建立之定址化營養管理，將資訊程式放在語音或網頁上，針對地區、品種、栽培方式等提供施肥建議，對於合理化施肥有相當大的助益，可以增加氮素使用效率、減少肥料之浪費，達到精準施肥之效果，目前只針

對東南亞個國家及水稻品種。

(九)無論是水稻生長模式或熱病預測模式的建立、NMRice 的應用及生態工法的利用，其所依靠的是研究人員的執著與努力，長期收集資料，建立資料庫，需時冗長，如果研究人員無法持續的試驗或是中途放棄，這些資料將無法順利收集完成，並成為可以使用的資料。

(十)進到菲律賓這個國家，若有看到英(菲)文廣告看板，以及特有的交通工具(Jeepney、Tricycle)，整體環境感覺和台灣沒多大不同。雖然菲律賓曾經歷數次經濟快速成長，但因政局時常動盪，社會的不安定已成為阻礙菲律賓發展的一大因素。在本次前往菲律賓研習的過程中，感受到菲律賓國家的混亂與不安定，政治上的紛擾影響了國家的發展，國家除首都馬尼拉及部分地區外，彷彿是 50~60 年代的台灣，加上槍枝自由買賣，導致治安的敗壞，在如 7-11 超商、大賣場、百貨、銀行、政府及研究單位等，每棟建築均需要配槍保全的保護。

陸、建議事項

(一)透過本次研習可以充分瞭解目前國際稻作研究發展趨勢，同時透過相互的討論與意見交換，可以彼此學習，並發現未來可能面臨之問題以及相關的因應之道。在這次與 IRRI 相關研究人員交流互動中，不僅達到稻作資訊交流之目的，建立與聯合國下轄組織之聯繫，同時也將我國介紹給其他國家，是相當成功的國民外交。因此為提昇我國外交之能見度，並突破目前之外交困境，建議將來如有機會應儘量派員前往。藉由國際合作研究加入國際研發團隊，共同研究開發先進性之關鍵技術，同步掌握國際訊息、同享科技研發成果，確保我國水稻產業之競爭力及糧食安全之永續性。

(二)建議國內主管單位應建立並提供國際研究單位間之相互聯繫與合作管道，提供相關研究人員交流及彼此討論之平台，加強國際交流，並鼓勵國內研究人員多出國瞭解世界發展現況，藉由彼此合作與資訊交換等方式，培養相關國際研究之人才，提升我國農業領域因應氣候變遷之能力。

(三)在本次研習過程中，發現 IRRI 就設在菲律賓大學校區內，而大部分研究單位都與學校建立合作關係，作為試驗進行或是資源共享，提供給學生實習研究交流，因此建議國內各試驗研究單位應多與大學單位合作擴大研發能量，甚至可以設立於大學學區中，以互補不足。

(四)ORYZA 2000 模型的應用可對水稻生長與產量及資源利用對氣候變化，生產管理等的影響做模擬預測，為水稻生產提供理論依據和技術，若有詳細的基礎資料可供分析模擬，相信應可在對國內作物產銷的失衡提供預測，以減少衝擊，在促進水稻可持續生產和提高資源利用極具意義，建議將來如有機會應儘量派員前往研習至少 2 週至 1 個月。

(五)精細的試驗研究通常需要長時間的調查與分析，水稻生長基礎資料至少調查 5 年以上，生態工法執行 15 年之久，協助農民因應暖化後的農業生態，以達防治病蟲害的目標，降低作物重大疫情發生的機率，減低對化學農藥、肥料的依賴，進而改善生態環境，發展產量穩定與安全健康的農業，以維持氣候變遷下農作物生產的品質與安全，維護國人之健康。未來病蟲害之發生將更形嚴重，使病蟲害防治管理工作面臨嚴峻挑戰，若無法發展具體有效的防治方法，將使農產品遭受重大損失，農藥或其它防治資材之不當使用問題更不容忽視，因此建議主管單位應幾予試驗研究人員較多之空間與時間，績效都非一蹴可及的。

柒、誌謝

本次赴菲研習承蒙行政院農業委員會提供旅費及國際稻米研究中心協助研習相關事宜，台大盧虎生與張孟基老師、農試所呂秀英副所長與賴明信博士及苗栗場張素貞博士等人的協助聯繫，使得此行能更加順利完成，並獲得相當多的資訊與交流機會，特此誌謝。

捌、附錄



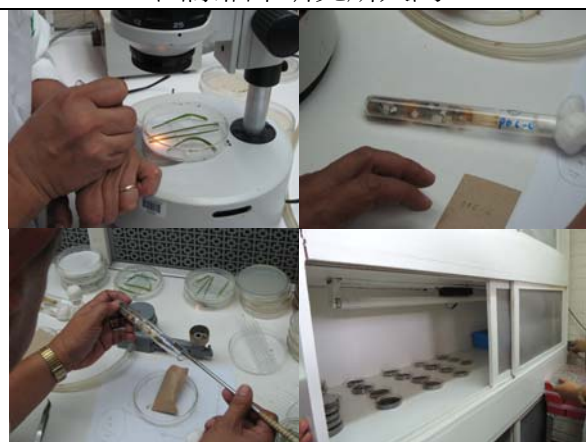
國際稻米研究所入口



國際稻米研究所大門



拜訪 Dr. Hei Leung 參觀實驗室、田間及水稻博物館



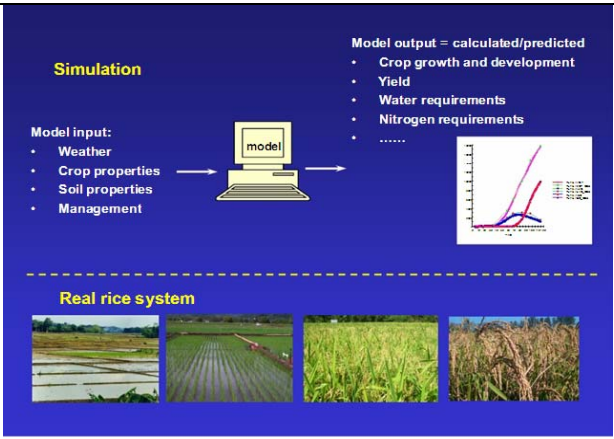
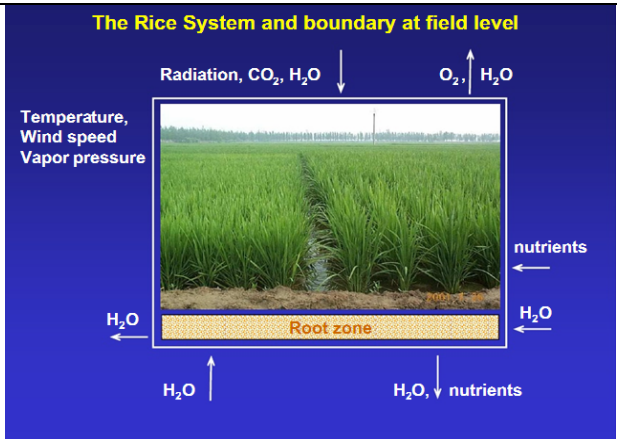
稻熱病菌單胞分離培養保存及接種源製備

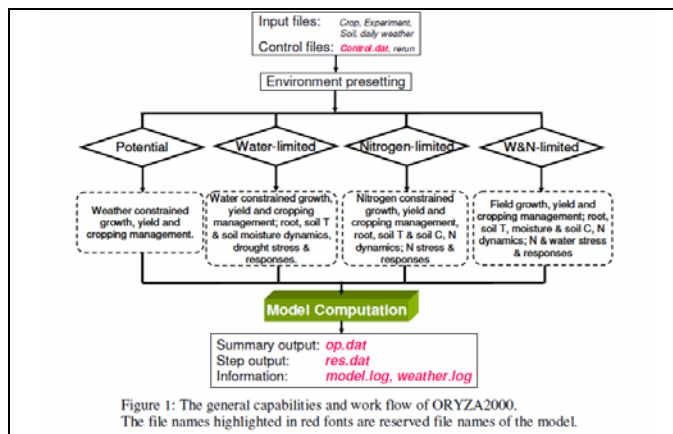


稻熱病菌接種

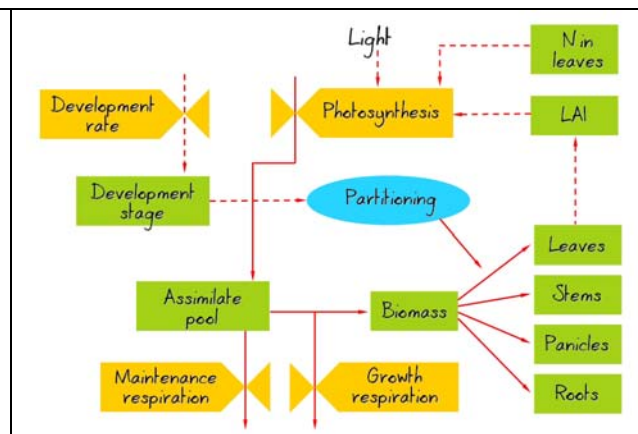


接種後放入保濕室

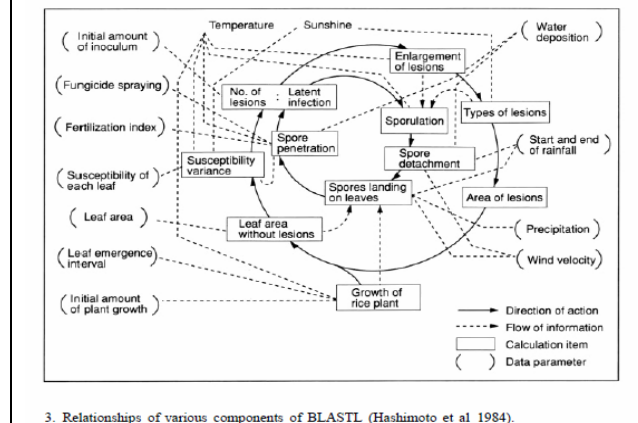
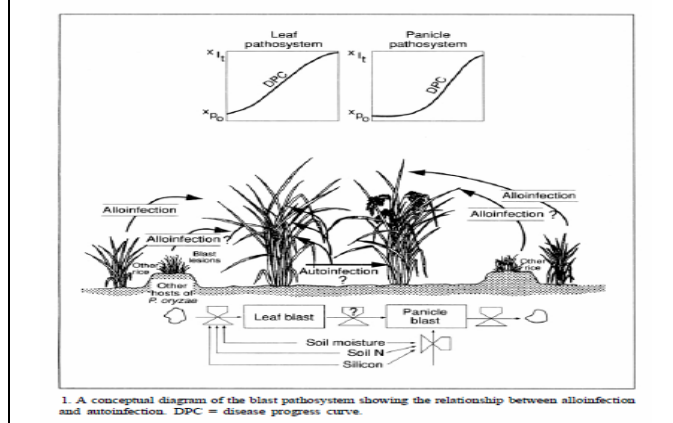
	
移至空調室	品系檢定調查
	
穗稻熱病接種	稻熱病檢定圃
	
水稻模擬運作比對實際栽培進行參數修正	模擬學習水稻栽培田週邊環境情形



ORYZA 2000 的一般功能和運作流程

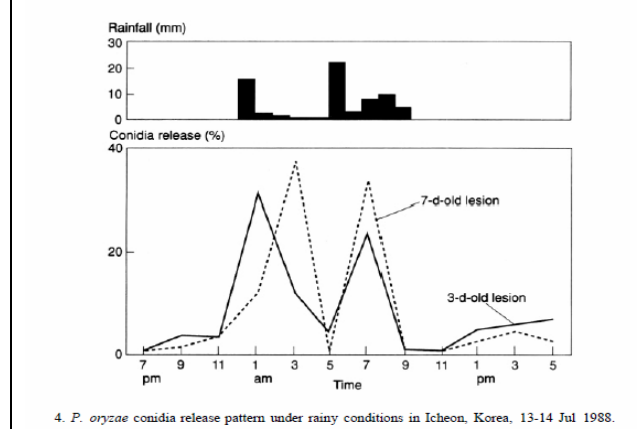
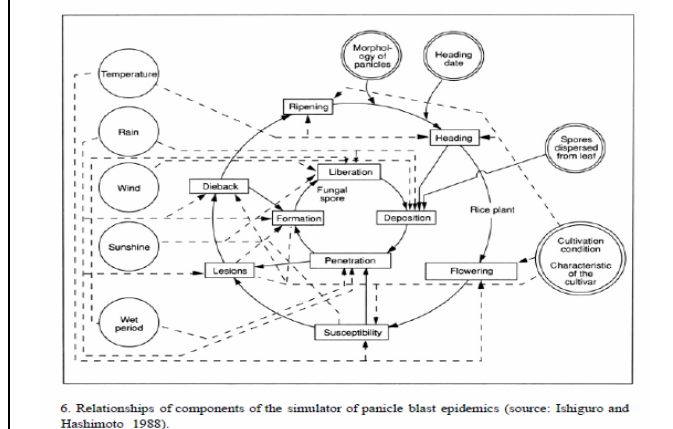


ORYZA 2000 生產條件的模擬圖



稻熱病由葉稻熱病和穗頸稻熱病兩個子系統所組成

BLASTL 的組成關係

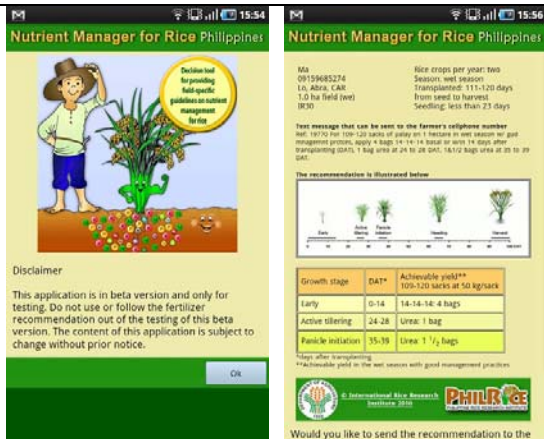


穗稻熱病模擬的組成關係

在雨天時的孢子釋放模式



NMRice 網頁



NMRice 的使用訓練



NMRice APP 畫面



遠距顯微鏡診斷



生態工法田梗草生栽培



生態工法草生栽培用-長柄菊



合照

IRRI 早上忙錄的開始-田間除草

稻熱病菌分離培養及病害調查標準程序

A.培養基準備

Prune-Agar(PA)配方

Prune agar	3pcs
乳糖(Lactose)	5g
酵母菌萃取物(Yeast extract)	1g
洋菜(Agar)	20g (gulaman bar)或 17g (Bacto)
蒸餾水(dH ₂ O)	

1. 將 prune 在 500ml 蒸餾水中熬煮 1 小時
2. 將洋菜溶於 500ml 的熱水中
3. 搗碎的 prune 用棉布或尼龍布過濾
4. 將濾汁加入洋菜溶液中
5. 將整個體積用蒸餾水調整到 1L
6. 加入乳糖跟酵母萃取物並攪拌均勻
7. 調整 pH 至 6.5
8. 待冷卻後加入試管(10ml/管)或是燒瓶(250ml)中
9. 瓶口用棉花塞緊後，置入高壓滅菌釜中，15psi.消毒 15 分鐘
10. 待培養基冷卻到 50-60℃時，每 250ml 培養液中加入 10mg 的鏈黴素

*Gulaman bar 是較適合且便宜的材料，請多利用此種材料。

4% Water Agar(WA)

蒸餾水(dH ₂ O)	1L
Bacto agar	40g

1. 秤量 40g 的 Bacto agar
2. 將之加入 2L 的燒瓶中，並加入 1L 的蒸餾水
3. 瓶口用棉花塞緊後，置入高壓滅菌釜中，15psi.消毒 15 分鐘
4. 待培養基冷卻到 50-60℃時加入 40mg 的鏈黴素

米糠培養基 Rice Polish Agar(RPA)

(若在 PA 培養基上不產孢時，可改用此培養基)

米糠(Rice polish)	20g
糖(Sugar)	5g
洋菜條(Gulaman bar)	20g
蒸餾水(dH ₂ O)	1L

1. 秤量所有需使用的藥劑(當然除了水)
2. 將所有材料置於 2L 的燒瓶內，其中洋菜條要先敲碎再置入
3. 將水加滿至 1L，瓶口用棉花塞緊後，置入高壓滅菌釜中，15psi.消毒 25 分鐘
4. 待培養基冷卻到 50-60℃時加入 40mg 的鏈黴素

B.單孢分離(從感病組織分離純化)

1. 切取約 5cm 長的罹病組織(可為葉、莖或葉鞘)
2. 將切下的組織保濕，置於室溫 24 小時
3. 利用解剖顯微鏡鏡檢病徵處，用細玻璃針(tip 需經高壓滅菌後方可使用)挑取分生孢子並且塗佈於 4%的 WA 上，培養於室溫 24 小時

有耐心些!讓你的眼睛時常多看看室外的綠色植物休息一下。

不要任意丟棄可回收的 4%WA，若隔日要使用 4%WA，可在室溫先將之置於罩子內，或是置於冰箱內。

4. 挑取單一菌落並養在 PA 培養基上

這一步需在無菌操作台進行，請確保你挑取的是單一菌落，如果你在第三步塗佈培養基時做得很完美，則在這步挑取單一菌落應該是非常容易的。

5. 在室溫下培養 4 天，可當作保存用
6. 收集到的病葉，需將之置於塑膠袋中，保存在冰箱中待之後分離培養。

C.保存培養

注意：製作保存用培養基時，可在 PA 中加入 20g 的 Bacto agar 使培養基更硬，並且在培養基上鋪濾紙片可以降低菌絲量

1. 將濾紙剪成 5x5mm 的大小
2. 將 750-1000 片濾紙片置於 50ml 的錐形瓶中
3. 用棉花及鋁箔紙將錐形瓶瓶口塞住，置於 15psi 滅菌 15 分鐘，需要滅菌兩次
4. 將 15-25 片濾紙片置於養 *P. grisea* 4 天的 PA 培養基斜面
5. 培養在室溫(25-27°C) 25 天
6. 25 天後，小心取濾紙片去除多餘的 agar，置於二次消毒過後的信封內(#00 brown coin envelopes)，一斜面試管的濾紙片放於一個信封內
7. 將信封置於滅菌過的培養皿中，利用乾燥器使之乾燥一週(乾燥器上要有矽膠做為乾燥與否的指標)

若無乾燥器，請將信封置於冷、安全且乾燥的環境 14 天。

8. 將矽膠(指示標準，12-28mesh, gr408)與已乾燥過的信封置於塑膠袋中，將之置於-20°C 或-70°C 內保存，當矽膠指示劑由藍轉粉紅時就要更換

若希望以較易恢復使用的方式保存，可將濾紙片儲存於含矽膠的消毒玻璃小試管(2 drams 8ml cap)中，將試管置於一般的容器中儲藏，記得要將矽膠放置於容器內外做為標示濕度用，放一些矽膠包於容器外並用塑膠袋密封，在容器的上面註明以防倒置，儲藏於-20°C 或-70°C 冷藏櫃中，以防萬一最好在其他地方做相同的備份儲藏。

準備儲藏用小試管：將矽膠置於試管底部，上面在鋪上棉花，蓋子不要栓太緊，正立放在燒杯中，在 15psi 滅菌 15 分鐘，需滅菌兩次，在 50°C 烤箱烘乾三週，或是等矽膠轉為藍色。

注意：如果這個菌株非常重要而且會常使用，或是這個 stock 儲藏管變少了，要製作更多儲藏管時，可由儲藏管中取一個濾紙片置於 PA 斜面(2 slant per isolate)，於室溫中培養 4 天後，切取菌絲尖端並置於新的斜面，在室溫培養 2-3 天，並且將 15-25 片濾紙片置於斜面培養基中，重複步驟 5-8，三個信封的濾紙片可以放在一個玻璃小試管中。

D. 接種源製作 Inoculum Preparation for Greenhouse Blast Inoculation

培養稻熱病菌製作接種源大部份步驟應在一乾淨的無菌操作台下進行。

1. 放置一濾紙片於 PA 試管斜面上以 revive 保存菌株，每一菌株 3 片濾紙(3 個斜面)。在室溫下生長 7-10 天，若進一步增殖則不需要。若有人想縮短培養時間，可放在 30°C 下培養。

*選擇 2 個或 3 個長得最好的斜面去 macerate

*需看要多少 ml 的接種源而決定斜面的數量，一或兩個 10 天的斜面可以用 10ml 的 macerated 菌絲可以 spread 5-7 個平板供產胞。

*如果需要大量的接種源，可從 revive 後培養 3-4 天的 2 個最好的斜面去增殖培養(步驟 2)。

*當濾紙片 stock 變少時(少於 20-40)，多 revive 1-2 個濾紙片以準備做新的 stock (C.)。

2. 增殖，以移植針切下少量菌絲，移植至新的斜面，一個菌絲塊一個斜面，在室溫下一週(或 30°C 下縮短培養時間)。培養菌絲覆蓋長滿至整個斜面一半。

3. The maceration step，從斜面上儘可能切下大部份的菌絲而只有少量的 agar，將菌絲移至含有 10ml 無菌水的試管中，以移植針或抹刀壓碎浸軟菌絲。

若菌絲覆蓋整個斜面，每 10ml 無菌水一個斜面就夠了，若只長滿一半就用 2 支斜面。

4. 倒菌絲片段及孢子懸浮液到 PA 平板表面(每個平板約 2ml)，均勻分佈至培養基上。

5. 在室溫下培養 7 天。

6. 促使產胞，以消毒過的玻片刮生長的菌後，打開培養皿蓋在螢光燈下照 3-4 天。

爲了這個目的，我們設計一個有紗門可防蟲進入的櫃

7. 收集孢子，倒入 10-20ml 無菌水至培養皿中，以玻片輕刮菌絲表面。

8. 以 4 層棉布或尼龍網過濾孢子懸浮液

9. 以血球計數器計算孢子濃度(E.)

10. 調整所需的濃度。若孢子數低則再刮取一些平板，若太濃則以無菌水稀釋。

收孢子前，記錄培養的外觀(顏色或污染)供參考。記錄每個平板孢子量，當計算孢子時注意分生孢子外觀(顏色形狀是否正常?)，這些訊息有助於將來接種源的製備。

11. 爲幫助接種源粘附在植物葉片上，添加一小滴的 Tween 20 (最後的濃度接近 0.02% 或 20ul 每 100ml)，使用前搖一搖。或者 0.5-1% 的 gelatin 溶液亦可。

12. 若無法立即接種時(如有許多不同的接種源要準備)，將裝有孢子懸浮液的燒瓶放在冰上直到使用完畢。

E. 孢子量計算 Counting of spores Using Hemacytometer

使用 Hauser Scientific Company 的 Bright Line Counting Chamber，血球計數器(hemacytometer) 是一片石英玻片上有 H 型在中間 0.1 mm 高凹槽，形成 2 個計算區域，上下各一半連貫兩個計數區和注射液體的缺口，計數區由 9 個 1 mm 方格組成的九宮格，每一方格被劃成三行，中間是一個正方形的邊界。

1.清潔血球計數器，用濕的拭淨紙(Kimwipe)擦拭玻片，乾燥後，放蓋玻片於 Counting Chamber 上。

2.搖一搖孢子懸浮液使孢子分佈均勻，但不要搖太大力使產生氣泡。

3.用 pipette 吸取 30ul 孢子懸浮液，慢慢從缺口處注入液體，液體會由毛細作用吸進蓋玻片和規劃區玻片的間隙；重複另一邊。放置 1-2 分使細胞可以沈澱下來。

若發現有溢到凹槽，重做一次，因為孢子可能會掉到凹槽裡。

4.在複合式顯微鏡下檢視，計算如圖標記 A-E 的 1 mm 方格中像稻熱病菌的大孢子。避免重複計算 2 次，孢子在線上的只算在上方及方線上的。

5.以下列公式計算原來懸浮中的孢子數

5 個 1 mm 方格中的孢子總數×稀釋係數 (若孢子懸浮液有稀釋，如 2 即稀釋 1:1 或 10 即稀釋 1:10)×2000

6.應計算兩個計數區。

7.使用後立即以拭淨紙(Kimwipe)清潔好血球計數器。

8.依下列公式稀釋孢子懸浮液

$$C1V1=C2V2$$

F. 溫室單循環測試定性病害調查 Greenhouse Monocyclic Test for Qualitative Disease Assessment

主要做為在一病害循環後評估供試植株對一稻病原菌株或一組菌株的抗感性，通常是做為評估主基因的存或缺乏。

1.估計/確定基因種源材料

2.知道抗性基因的抗性範圍

3.就稻熱病菌株的致病性/毒力將一組種源分類成群/小種

4.遺傳分析研究

5 在育種時追蹤 R 基因的 introgression

注：開始試驗前，準備時間表以便在接種日期時準備好菌株，甚至在開始試驗前也要確定保留保濕籠及霧室的空間。接種源繁殖培養依循時間表的活動在這章節結束。

1.準備培養稻熱病菌菌株接種源如手冊中描述的，至少在 21 天前開始準備培養。

2.在合適的播種盤內，每品系播種 5 到 10 粒種子。可使用食物托盤 (22.5×10.5×11 cm³) 約可容納 6-8 排，或更大一點的塑膠盒(35×28×11 cm³) 可容納達 10 排，每排兩品系(行)，則大塑膠盒可以容納 20 個品系(行)。排的準備首先要用一個 1 cm 厚的桿挖土，種子不可播種太深會使發芽延遲。在播種 14-21 天後接種。

建議每一盒要包含合適對照品種。CO39 常被當做感性對照品種，若接種成功可以它的反應做為測量基準。

3.每個托盤施用 4 公克肥料(硫酸銨或 21-0-0)，或每盒 12 公克肥。若接種日是在播種後 21

天，在播種後 14 天時每個托盤澆 30ml 的 21-0-0 肥料溶液(30 克/公升)；同樣的，塑膠盒澆 50ml 肥料溶液。植株缺氮肥是不易感染稻熱病的。

4.準備孢子懸浮液($5-10 \times 10^4$ /ml)如本手冊所描述的，同時也在 Room K4 準備好黃麻布袋蓋保濕籠，使整個麻布濕透。

5.使用小型霧化器(pocket atomizer)連接空氣泵浦，噴佈接種植株。每一次接種前或更換菌株時，以 95%酒精沖洗霧化器，接著再用水洗。

6.噴佈時可將植物盒可放在旋轉平台上，小心均勻噴佈接種源到植株上，分別接種 20ml/盤或 50ml/盒。在 Room K4 完成接種。

7.已接種的植株放進在 Room K4 保濕的黃麻布籠(1m^3)內，若黃麻布非常濕，則濕度可達最高，要濕透但不會滴水，可 24 小時預濕；或在 25°C，濕度 100%的 Percival dew chamber 內。

*若可能，接種過不同菌株的植株分別置放不同的籠，否則，放置盒時要使不同盒上的植株葉片不會互相接觸到。

*對病害在附著器形成及入侵時，高濕是很重要的

8.移植物至 BG-05-00 有空調的房間。溫度維持在 26-28°C，以霧化器或噴水器連接水管每天噴____次保持植株濕度。對病害在 Colonization 和病斑形成時，低溫是重要的，在 22°C 或低於時對植株會產生不利影響。

9. 5-6 天後，檢查葉片上稻熱病病斑，分 0-5 級評估調查病害反應。

0=沒有明顯的感染

1=褐色斑點直徑小於 0.5 mm，未產胞。

2=褐色斑點直徑約 0.5-1 mm，未產胞。

3=圓形至橢圓形病斑直徑約 1-2 mm，中心灰色有褐色邊緣，病斑可產胞。

3⁺=圓形至橢圓形病斑直徑約 2-3 mm，中心灰色有褐色邊緣，病斑可產胞。

4=典型紡錘形稻熱病病斑有產胞，3 mm或更長的中心灰色壞疽斑及水浸狀紅褐色邊緣，有一點或無癒合斑。

5=病斑同 4，但有一片或兩片葉有一半有癒合斑且枯死。

依據最感病病斑型出現時調查等級，植株的等級為 0 到 3 可列為抗性，4 到 5 則為感病。

接種源培養接種感染及調查等級時程表

保存－培養生長	3-4 天(菌可維持至 10 天)
培養生長－浸軟刮菌	7-10 天
培養基備製	前 1 天(
浸軟刮菌－開蓋產胞	6 天(彈性範圍 5-7 天)
開蓋產胞－接種	4 天(彈性範圍 3-5 天，4 天最好)
播種－接種	14-21 天
接種－調查	6-7 天

G.溫室單循環測試定量病害調查 Greenhouse Monocyclic Test for Quantitative Disease Assessment

1.篩選局部抗性

2.通常做為鑑定新的 QTL 稻熱病定量抗性族群圖譜用

參照 F 章節(Greenhouse Monocyclic Test for Qualitative Disease Assessment)植物材料及病原菌的準備基本步驟，就定量抗性的調查，以下步驟是不同的。

1.使用一個適合的菌株，評估調查定量抗病。

2.在一個大的塑膠盒(35×28×11 cm³)內每排播種 15-20 粒種子。

一盒只可分成 8-9 排，定量抗性評分可能需要更多植株處理如品系間有更大的空間更好。但當有大量的品系要進行評估時，則未必可行的

3.孢子濃度從 25,000-75,000/ml，每盒使用 50ml 接種源，在播種 14-18 天後接種，老一點的植株為優先 (18 天大)，14 天大的植株可能葉片仍小。

當測試定量抗性時使用較少量的接種源，高接種壓力可能使品系間的微小差異難以檢測，如果有太多病斑，計算病斑數則會更困難。

4.有些研究者喜歡在接種前用筆在最年輕的葉片上做標記，這樣可幫助確定接受到接種源的區域(在計算病斑數或罹病葉面積時是很重要的，特別是當植株具高定量抗病時)，要小心做記號避免傷到葉片。

5.病害評估調查：計算病斑數及.或罹病葉面積率(DLA)

每一個品系計算 10-15 株，選擇相同生長期的植株。去除太小、太嫩的植株。

1)病斑密度

*從最年輕或次年輕的葉片標記處計算產胞病斑數(中心灰色)至葉尖。不要計算沿著葉緣上長、窄的病斑。

*測量從葉尖至標記處或最低的部份的葉長(cm)。

*依據下列公式計算病斑密度

病斑密度 Lesion density = 病斑數/葉面積

葉面積 Leaf area = 長×寬×0.7

在接種第 5 或 6 天時，調查罹病葉面積率前先計算病斑數，特別是若有許多植株要調查時，病斑在感性植株在第 7 天時可能已經癒合而難計算。

2)罹病葉面積率(% DLA)

以 ff.guide 目測罹病葉面積比率(如圖)

H.溫室多循環測試定量病害調查 Greenhouse Polycyclic Test for Quantitative Disease Assessment

進行多循環測試是為了測量當病原菌繁殖 2 至 3 個循環後，在一個供試植物族群上病害的累積發展。這對定量基因特徵的影響是有用的，可用來預測抗病耐久力(5-7 個循環)。

1.在 35×28×11 cm³ 的盒內，每排播 100 粒種子或較少量的種子在盤內。在不同的盒內種植單一品系，植株培養在 F 章節有描述。

2.在接種當日，移植株至溫室(BG-05-00 annex)內的麻布袋保濕籠(1m³)。每一盆放在不同的保濕室，可以放置塑膠布區隔成更多的保濕室。品系需分開放得以在自體感染 2-3 個 cycle 後調查病害級數，其他品系存在會因異體感染影響結果。

- 3.每一保濕室內每盒接種 15-50ml 接種源(50,000 spore/ml)。植株也可於 K4 接種後直接移至溫室內的麻布袋保濕籠。
- 4.在白天，打開籠子前方及上端部份的麻布，使陽光進入。在白天時，每天定期澆水 4-5 次，以保持高濕。
- 5.在晚上(6:00pm)籠子蓋上麻布及塑膠布。
- 6.在接種 14 天後調查病害級數
 - 1)病斑密度(Lesion density)
在 4 個逢機選擇的植株中，每株選 3 片葉計算病斑密度，若可行，可以增加調查植株數以降低標準差。
 - 2)罹病面積率%(DLA)
 - A)從 10 個逢機選擇的植株中測量罹病面積率
 - B)另外，就小畦(miniplot)技術上，可整個畦調整方法調查罹病面積率
- 7.可採幾個時間點測量高查病害進展曲線。

穗稻熱病檢測調查 Greenhouse/Screenhouse Test for Panicle Blast Disease Assessment

- 1.注射接種源至包著稻穗的葉鞘內
- 2.用鋁箔紙包住注射的位置
- 3.接種 3 個植株，每株 5 個穗，選 3 個調查。
- 4.置於保濕籠 24-48 小時後移至有空調、玻璃屋頂的觀察室內 2-3 週

I. 稻熱病圃病害檢定調查 Disease Evaluation in Blast Nursery

對於設立在田間的稻熱病苗圃試驗程序，是使用一個參考自 HPDR 來的 protocol 改良的小畦(miniplot)技術，品系並依據 IRRI 的水稻評估調查系統調查。