

出國報告(出國類別：研究)

農業科技研究發展
— 國際農業合作
— 「加強與國際稻米研究所合作」

服務機關：行政院農業委員會臺南區農業改良場嘉義分場¹、
行政院農業委員會臺東區農業改良場²

姓名職稱：許龍欣 助理研究員¹、侯雅玲 助理研究員²

派赴國家：菲律賓

出國期間：民國 107 年 9 月 2 日至 9 月 8 日

報告日期：民國 107 年 11 月 19 日

摘要

在水稻抗稻熱病品種選育工作，及深化台灣與國際稻米研究所 (International Rice Research Institute, IRRI) 之國際交流合作，本計畫內兩項主要進行中之工作為 (一) 自台灣各地採集稻熱病菌株後，由 IRRI 進行病原菌族群無毒基因之判別分析 (二) 選擇台灣 50 個優良栽培品種，由 IRRI 進行稻熱病抗病基因之探勘。此次出國計畫主要參訪周波博士 (Dr. Bo Zhou) 之研究室，研習重點包含：瞭解稻熱病抗病基因與病原菌無毒基因之不同的交互作用種類、台灣稻熱病病原菌無毒基因組成分析現況，周波博士以 *Pi2/Pi9*、*Pib*、*Pik* 基因座等抗病基因為例，講解這些基因序列特徵及分子標誌設計原理；實作部分以水稻第 12 條染色體上之廣抗譜基因 *Pita2* 為標的，針對台灣水稻品種進行分子標記分析，最後雙方針對台灣及水稻抗稻熱病育種基因布局策略進行討論。

目次

一、研習目的	3
二、研習行程	4
三、研習內容	5
四、研習心得及建議.....	10
五、研習照片	12

一、研習目的

稻熱病為影響水稻產量最重要的病害之一，而稻熱病的防治措施主要包含藥劑防治及栽培抗病品種，種植優良的抗病品種可減少田間藥劑防治次數，對環境更為友善且可降低施藥者的暴露風險。培育稻熱病抗病品系之策略，須先通盤了解臺灣現有水稻品種可利用之抗病基因種類與臺灣各地病原菌生態型族群分布，再依據病原菌族群無毒基因組成，選擇有效之抗病基因並以分子標誌輔助回交選種導入現有水稻優良栽培品種中。本次研習主要目的為商討與 **IRRI** 國際合作之試驗進度，並學習水稻抗稻熱病育種之相關分子分析技術及基因布局策略，期望增進臺灣水稻研究人員在抗稻熱病育種方面之能量。

二、研習行程

日期	行程	工作記要
9/2 (日)	改良場→桃園機場→菲律賓賓馬尼拉機場→IRRI	搭乘 13:30 中華航空 CI703 班機，15:45 抵達馬尼拉。
9/3 (一)	IRRI-周波博士研究室	周波博士研究室導覽，水稻抗病基因單倍型分析及分子標誌設計方法解析。
9/4 (二)	IRRI-周波博士研究室	參觀稻熱病接種作業室、發病觀察溫室、育種材料溫室、人工氣候室，水稻抗病基因型分析技術實作及討論。
9/5 (三)	IRRI-周波博士研究室	台灣採集之稻熱病菌 Avr 基因多型性分析結果討論。
9/6 (四)	IRRI-周波博士研究室	病原菌無毒基因與水稻抗病基因交互作用機制與水稻抗病育種之基因布局概念。
9/7 (五)	IRRI-周波博士研究室	參觀種原庫，研商計畫進度及未來方向。
9/8 (六)	IRRI→菲律賓馬尼拉機場→桃園機場	搭乘 10:35 中華航空 CI702 班機，12:50 返抵桃園。

三、研習內容

稻熱病抗性基因診斷方式

今年是與 IRRI 合作的第二期第 3 年，從先前合作交流與經驗交流與檢討中，了解國內稻熱病抗病育種中，尚未釐清國內現有水稻品種中是否帶有可運用的抗性基因。育種流程中，若輪迴親水稻材料與貢獻親帶有相同抗病基因，或互為相同基因座上的複等位基因 (allele)，將降低育種的效率與準確性。因此，在雙方後續合作中，由周波老師這邊協助分析及診斷臺灣 50 個水稻的抗稻熱病基因。

周波老師先前為水稻全基因組定序中第四號染色體解序團隊的一員，後續也持續投入水稻抗稻熱病基因相關之研究，包含第 6 號染色體上 *Pi2/9* 基因座上的 *Pi9*、*Pi2*、*Piz-t* 的基因定位及選殖 (clone) 等工作。對於生物資訊運用及操作相當純熟，也對抗稻熱病基因、病原菌的無毒基因以及兩者間的交互關係的了解相當全面及深入。

臺灣所提供的 50 個水稻品種除了目前常見的商業品種台梗 2 號、台梗 8 號、台梗 9 號、台中秈 10 號外，也包含較老的水稻品種如台南 5 號、新竹 64 號等，這 50 個材料分別針對 *Pi2/9*、*Pik*、*Pii*、*Pia*、*Pish*、*Pib* 這 6 個抗性基因座進行分析。在已選殖到的 24 個抗稻熱病基因中，對這幾個基因座上 R 基因序列的研究是相對透徹的，有足夠的資訊知識為前提下，才能夠設計診斷用分子標誌，以應用於抗性基因的探勘。

- ***Pi2/9* 基因座分子標誌**

抗性單倍型診斷 (Resistant haplotype diagnosis) 用的分子標誌不同於 SSR、InDel 或 CAPS 分子標誌，不僅可以找到已知 R 基因，也可以發現新的未知 R 基因。周波老師先以 *Pi2/9* 基因座上抗性基因診斷為例子作說明，*Pi2/9* 基因座位在水稻第 6 號染色體，接近著絲點的短臂上，目前此基因座上至少已發現有 *Pi2* (*Piz-5*)、*Pi9*、*Piz*、*Piz-t*、*Pi50* (*Pigm*)、*Pi40* 等數個複等位基因存在。目前已選殖到的抗稻熱病基因多為 NBS-LRR (nucleotide-binding leucine-rich repeat) 基

因，且具有多個序列相似度高的 NBS-LRR 基因串接在一起的基因簇 (gene cluster) 的排列特徵。其中 *Pigm* 有 13 個 NBS-LRR 基因所串接，而 *Pi9* 及 *Pi2* 是由 9 個 NBS-LRR 基因串接。也因為同源基因 (Homolog) 序列上的高度相似性與重複性的特性，使得抗性單倍型診斷分子標誌開發上有一定的困難度，若分子標誌設計不良，使所有相似性高的 NBS-LRR 基因都可擴增出條帶，這樣的分子標誌則不具有鑑別或診斷是否帶有抗性基因的功用。研究發現 *Pi2* 這個基因只存在抗病材料中，在感病材料中不存在，進而利用 *Pi2* 來開發診斷用分子標誌。但由於診斷用分子標誌的產物太長，超過 3.8 kb，因此分階段進行分析，先分析啟動子區域，針對啟動子區域可以成功擴增出條帶的品種，才進行診斷用分子標誌的擴增及定序，最後依定序結果來判別該品種帶有的抗性基因為已知 R 基因或是新的未知 R 基因。而目前分析結果，臺灣 50 個品種中，有 8 個品種在此基因座為 *Piz-t* 基因型。

- ***Pik* 基因座分子標誌**

Pik 基因座位於第 11 條染色體長臂末端，已發現至少有 *Pik*、*Pikm*、*Pikh*、*Pikp*、*Pil*、*Piks* 與 *Pi7* 這 7 種抗病等位基因。部分抗病基因如 *Pi2*、*Pi9*、*Pib* 等，由一組 NBS-LRR 即可賦予 R 基因抗病功能，而有些抗病基因之功能性則需兩組 NBS-LRR 構成，例如 *PiCO39*、*Pia*、*Pii* 與 *Pik* 基因座。典型的 *Pik* 基因座上之抗病等位基因由兩組反向串接的 NBS-LRR 構成，其中一組 (*Pik-2*、*Pikm-2*...) 結構與 *Pia* 之 RGA4 相似，具有 2 個顯子，不同等位基因之此區序列較為保守；另一組 (*Pik-1*、*Pikm-1*...) 結構與 *Pia* 之 RGA5 相似，具有 3 個顯子，不同等位基因在顯子 1 與顯子 2 序列差異較大，此區序列差異與病原專一性辨識相關，因此將分子標誌設計於此，依據擴增片段之定序結果，經由 BLAST 序列比對後，臺灣 50 個品種中，有 41 個品種可擴增出 *Pik* 基因座序列，其中 8 個品種序列為 *Pik*、4 個品種序列為 *Pikh-8insert/IR64*、28 個品種為 *Piks* 基因型。

- ***Pib* 基因座分子標誌**

Pib 為來自秈稻的廣抗譜基因，位於第 2 條染色體長臂末端，所設計之單倍

型診斷分子標誌屬於是顯性分子標誌，若無法擴增，則表示不帶有 *Pib* 基因座。然而目前僅來自秈稻品種之部分 *Pib* 基因型具有抗病性，在稉稻品種如 Nipponbare，雖具有一組 *Pib* 之 NBS-LRR 序列，但為感病型之 *Pib*；有些秈稻品種中雖可擴增出 *Pib* 之 NBS-LRR 序列，例如 Shuhui498，其擴增出的 *Pib* 為 3 組串接的無效基因，不貢獻抗病能力。因此在進行臺灣品種的分析時，先以是否擴增出條帶篩選，有擴增出條帶之品種再進行 BLAST 序列比對。臺灣 50 個品種中，有 6 個秈稻品種具有抗病之 *Pib* 基因型。

- ***Pita2* 基因座分子標誌**

Pita/Pita2 為第 12 條染色體上之抗病基因，最初研究顯示兩者為等位或緊密連鎖之關係，且 *Pita2* 較 *Pita* 有更廣之抗譜，後續研究顯示，*Pita2* 之抗性表現可能為 *Pita* 加上 *Ptr* 所構成。本次研習進行部分臺灣品種之 *Pita2* 基因座分析，根據 Zhao 等人於 2018 年發表之 *Ptr* 選殖序列，設計 2 組引子對進行分析，以 IR64 作為 *Pita2* 之正對照，Co39 作為負對照，此次試驗所操作之部分臺灣品種不具有 *Pita2* 基因座，其餘品種尚待分析。

病原菌無毒基因分析原理與結果

除了植物的抗病基因外，相對應的病原菌研究也是相當重要的。當稻熱病原菌的無毒基因 (Avirulence gene, Avr gene) 被相對應的植物 R 基因所辨識後，可啟動水稻有效的免疫反應。IRRI 先前利用已選殖出的 Avr 基因對菲律賓的稻熱病菌做族群分析與分群，藉由了解病菌族群內各 Avr 基因型分布的頻度，可以據以選擇相對應的 R 基因作為育種目標，能夠發揮較高的抗病效果。從菲律賓稻熱病菌監測結果中，短時間內生理小種基因發生變異不大，主要是各地區中不同生理小種頻率的改變，造成年度間病害發生程度的差異。

先前交流合作中，IRRI 建議台灣應逐步蒐集各地方之病原並加以分析，以充實抗病育種之背景資訊，強化未來育種成果之準確性。在去 (106) 年，周波至臺灣參訪時，進行全台各地稻熱病原菌收集工作，並利用其技術引子與基因定

序協助臺灣建立病原菌生理小種 (病原型) 資料庫。

目前 IRRI 針對臺灣採集病原菌株進行 *AvrPi9*、*AvrPiz-t*、*AvrPik*、*AvrPii*、*AvrPia*、*AvrPib* 等無毒基因之分析，而 *AvrPish*、*AvrPi2* 尚未選殖，無可用序列資訊進行分析。臺灣稻熱病菌株之無毒基因分布頻率以 *AvrPi9* 及 *AvrPik* 較高，*AvrPiz-t* 次之，*AvrPia* 最低，而 *AvrPib* 仍在試驗分析中。

不像稻熱病 R 基因序列長度長達 10 kb 以上，Avr 基因的序列較短，啟動子大約 500 bp，而基因本身長度約為 1 kb 左右。造成 Avr 基因變成 virulence 基因可能的情形，以 *AvrPiz-t* 為例，當啟動子區域發生片段插入、基因上發生片段插入、在基因上發生錯意突變 (missense mutation) 以及 stop codon 序列發生點突變，基因轉錄無法正常終止等 4 種單倍型。

前人研究中，已知病原菌之 *AvrPik* 具有 5 種等位基因型 (*AvrPik-A~E*)，其編碼之蛋白質彼此僅存在 1 至 3 個胺基酸差異，而自臺灣採集之病原菌株皆具有 *AvrPik*，分別為 A、D 及新發現之 G、H 等位基因型。

已選殖之抗病基因與無毒基因中，具有不同形式之交互作用模式。互為等位基因之 *Pi9* 與 *Piz-t*，兩者編碼之蛋白分別辨認不同基因座來源的 AVR-Pi9 與 AVR-Piz-t；而由兩組 NBS-LRR 構成之抗病基因如 *Pik* 之等位基因，一組 NBS-LRR 蛋白 (*Pik-1*) 直接與 *AvrPik* 編碼之蛋白進行專一性識別，另一組 NBS-LRR 蛋白 (*Pik-2*) 可能負責啟動過敏反應 (HR, hypersensitive response)，目前已知的不同 *Pik* 等位基因皆識別同一基因座之 AVR-Pik，但不同 *Pik* 等位基因只能識別特定的 AVR-Pik 等位基因，如 *Pik-h* 可與 AVR-Pik-A、AVR-Pik-B、AVR-Pik-C、AVR-Pik-D 與 AVR-Pik-E 進行專一性辨識，具有最廣之抗幅，而 *Pik* 只能識別 AVR-Pik-D。水稻 *Pik* 等位基因與病原菌 *Avr-Pik* 等位基因之序列分析顯示，*Pik* 抗病基因與無毒基因之間具有互相競爭與共同演化之關係。若要以 *Pik* 抗病基因進行堆疊，則採用抗幅較廣之 *Pik-h* 或 *Pik-m* 其一即可。

水稻抗稻熱病育種策略

雖然育成抗稻熱病水稻品種為防治稻熱病最經濟有效的方式，然而過去育種受限於可利用之抗性基因來源不夠廣，對抗性基因分子層次了解較少，因此育種

過程多以外表型而非基因型進行選拔，加上田間病原菌族群結構變化頻繁，因此抗病品種常在推廣後幾年內即失去抗性。

為使得水稻品種獲得更為有效、持久的抗病性，首先需進行長時間持續性的菌株收集與監測各地區病原菌的族群結構與頻率變化，以篩選可利用之抗病基因。若要育成具持久抗病性之水稻品種，同時堆疊垂直抗性及水平抗性基因為較長遠之策略，然而現有可利用之水平基因材料較少，因此持續發掘及引進新的抗病材料亦為重要工作。

而隨著抗病基因與無毒基因在分子層次之研究發展，現已累積許多抗病基因與無毒基因之分子資訊，若能發展抗病基因專一性分子標誌，針對現有水稻品種進行全面之抗病基因篩檢，了解各品種抗性基因分布頻率，並且配合菌株接種或病圃檢定，分析現有抗病基因分別對稻熱病抗性之貢獻程度，有助於評估各個抗病基因可利用性。

四、研習心得及建議

1. 長時間持續性的菌株收集與監測各地區病原菌的族群結構與頻率變化。如何可以快速的偵測鑑定的技術?

(1) 水稻抗病育種是必須同時關注水稻以及病原菌兩方的交互關係。IRRI 在稻熱病抗病育種研究上，在病原菌部分，有專人在負責菌株的採集、分離純化、培養及保存，接種條件與技術都已完備，運作相當成熟。在水稻植物部分，對於龐大的雜交、回交等族群材料，也有 QR code 等記錄系統，避免試驗材料的混雜。實驗室內具有生理小種菌株接種、抗感病程度判定的能力。這對於抗病育種中，品系的外表型選拔、抗病性的驗證、品系所帶有的抗病基因質量與數量的釐清、對於未知的抗性基因探索與研究，都是由這些不可或缺的技术所支持。因此在水稻育種以及植病研究上若能夠緊密合作，更能夠充分發揮研究能量及效能。

(2) 與 IRRI 的合作中，已將 IRBL 單基因系材料應用在台灣各地區(桃園場、臺中場、臺南場、高雄場、臺東場)稻熱病監測的判別品種，由於田間的試驗檢定圃是開放空間，感病情形不像單一菌株接種那樣直接與單純。田間的稻熱病發病情形，深受各地區不同稻熱病生理小種分布的組成與密度、及氣候條件等影響，若某判別品系帶有典型病稻熱病病斑，但病斑面積不大，不代表此品系稻熱病抗性提高或降低，僅表示這期作在此田區環境中，不帶有與此品系相對應非致病性基因的生理小種數量、比率不高，或者發病環境不合適的可能情況。因此需要長時間持續性的設置稻熱病監測病圃，並收集監測結果，了解田區生理小種變化的趨勢。

(3) 若是帶有相同抗性基因，但不同遺傳背景來源的單基因系出現不一致的抗感性反應時，其抗性表現可能來自於遺傳背景中未知的抗性基因，而非來自已知的抗性基因，可藉由雜交後代的抗病比率，進一步判別是否受其他基因調控。而水平抗性基因的抗性表現必須在沒有其他垂直抗性基因存在的遺傳背景下才可以顯現，若利用單一菌株接種方式進行測試，水平抗性的病斑可能呈現中感或中抗的等級。

2. 目前桃園改良場、臺南場及高雄場，藉由 **IRBL** 近同源系的抗性基因導入，已進行桃園 3 號、臺南 11 號及高雄 145 號的品種改良。各個改良場除了選用廣抗幅性的抗性基因為優先外，考量後續推廣面積逐漸增加，各場若可以選用或分配導入不同的抗性基因作利用，以維持田間抗性基因的多樣性，達到延長抗性基因的有效性，並延遲其抗性的崩潰。
3. 依基因序列進行稻熱病菌株非致病性基因型分析與分類時，所使用的分子標誌是重要的技術關鍵。可應用於快速偵測鑑定稻熱病菌源菌，並配合長期的菌株收集與監測，了解各地區病原菌的族群結構與頻率變化。後續合作中若 **IRRI** 可以提供引子的序列資訊，可以提升國內稻熱病菌株分析的能力以及監測的即時性。

五、研習照片

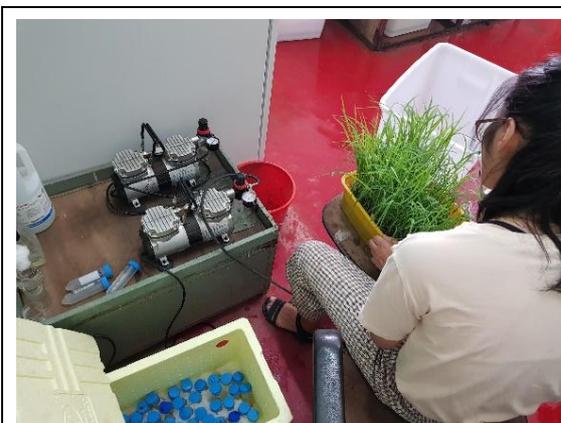


圖 1. 稻熱病接種情形



圖 2. 稻熱病接種後，移至發病環境



圖 3. 水稻稻熱病育種溫室及其材料



圖 4. IRRI 新建的人工氣候室設備



圖 5. 人工氣候室可調控溫度、濕度、光度及二氧化碳濃度的參數條件



圖 6. 利用人工氣候室精準控制系統，了解及確立最合適的接種條件。



圖 7. 植物病害分生實驗室相關設備



圖 8. 水稻基因型分析技術實作及討論。

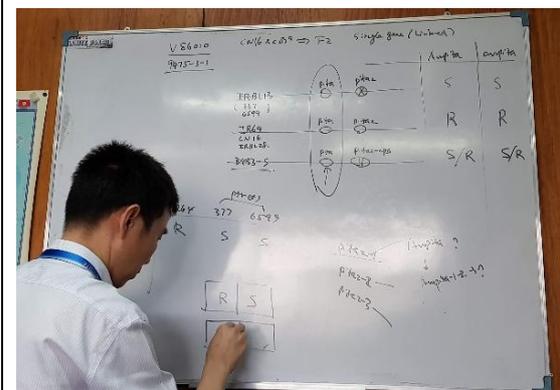


圖 9. R 基因與 AVR 基因交互關係講解



圖 10. 秧苗接種後發病情形判斷。



圖 11. 水稻基因型分析技術實作結果。

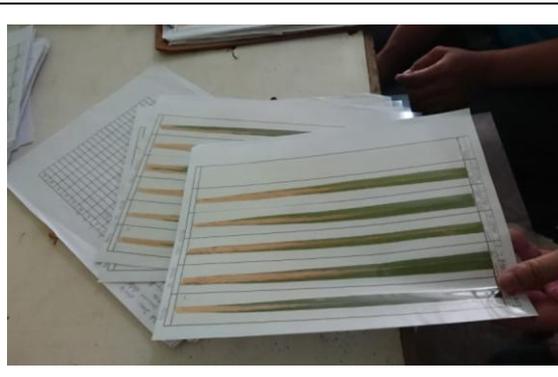


圖 12. 葉稻熱病發病等級檢定樣本。