

出國報告（出國類別：研習）

# 因應氣候變遷之 國際農業科技交流合作 -監測流行生理小種（病原型）與抗病育種 應用之技術

服務機關、姓名職稱：

國立台灣大學植物病理與微生物學系沈偉強教授

國立台灣大學植物病理與微生物學系鍾嘉綾助理教授

國立台灣大學植物病理與微生物學系余宗學博士班學生

行政院農業委員會苗栗區農業改良場吳岱融（作物改良課）助理研究員

行政院農業委員會台中區農業改良場鄭佳綺（作物改良課）助理研究員

行政院農業委員會台中區農業改良場張瑞炘（作物改良課）助理研究員

行政院農業委員會高雄區農業改良場張芳瑜（作物改良課）助理研究員

行政院農業委員會台東區農業改良場林家玉（作物改良課）助理研究員

行政院農業委員會農業試驗所陳純葳（植病組）聘用助理研究員

行政院農業委員會農業試驗所吳東鴻（作物組）助理研究員

行政院農業委員會農業試驗所卓緯玄（作物組）助理研究員

派赴國家：菲律賓（國際稻米研究所）

出國期間：中華民國102 年09月08 – 09月14日

報告日期：中華民國102 年10月07日

## 一、摘要

經農委會支持與台灣大學及農業試驗所之努力，於去（101）年展開「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」合作計畫，本計畫主要目的是為有效因應全球氣候變遷對我國糧食安全及相關產業所造成之衝擊，透過與國際稻米研究所（IRRI）及其相關機構密切合作，接軌新興之因應科技，選育適合於台灣推廣之水稻品種，同時建置穩定抗、耐逆境水稻的外表型評估技術及擴大繁殖稻熱病/白葉枯病菌生理小種（病原型）之判別品種及接種評估技術，並擴大雙方水稻抗病育種及調查資料之交流，希望得以提升我國在氣候變遷下之水稻農糧產業之適應力及競爭力。本篇論述針對病害逆境學術交流與研習提出第二階段報告，其中研習病害包括稻熱病及白葉枯病。在 102 年 9 月 9 日至 14 日間，由國立台灣大學、國立中興大學及農試所、苗栗、台中、高雄與台東區農業改良場等 14 位水稻病害及育種專家前往 IRRI 實務訓練心得及建議，以供日後台灣水稻抗病育種之參用。

本次研習內容包括稻熱病及白葉枯病之流行生理小種（病原型）監測分析、取樣、判別品種評估標準、病原菌 *avirulence/effector genes* 研究最新趨勢與作物抗病育種策略調整等多類項目，研習領域涵蓋病害、作物育種、防治技術等，主要目標不僅與 IRRI 研究人員一同分享目前台灣稻熱病與白葉枯病抗病育種最新進展與其評估技術建置現況，並研習 IRRI 在流行菌群監控技術與其抗病育種調整策略。

關鍵字：白葉枯病、稻熱病、監測技術。

## 目次

一、摘要.....	2
二、目的.....	4
三、參訪行程.....	5
四、參訪內容	
1. 水稻抗病育種與流行病學能力建構交流.....	8
2. 作物寄主抗性基因-非致病性基因研究綜論.....	9
3. 病原菌田間採樣調查時的取樣方法實作.....	11
4. SNP 基因型分析平台 (Fluidigm system) 與分子標誌應用實驗室觀摩.....	11
5. 應用影像分析軟體進行水稻植體上病況分析與實作.....	12
6. 引子設計要領導論與操作.....	12
7. 基因型定序分析、基因組關聯性分析、目標 QTL 與其分子標誌應用實作.....	13
8. 稻熱病菌株分離、抗性檢定判別技術差異.....	15
五、參訪心得.....	16
六、參訪建議.....	18
七、參考文獻.....	20
八、參訪記錄照片.....	21
九、抗病研習小組英文回饋報告.....	24

## 二、目的

本計畫依據農委會農業試驗所與國際稻米研究所 (International Rice Research Institute, IRRI) 共同協議合作架構下，制定目標並推動各項合作研究計畫，以有效導入抗、耐逆境基因，並改良台灣水稻推廣品種。

隨著台灣水稻栽培品種與氣候在時間性與地區性上的變遷，病原菌流行之生理小種 (病原型) 亦隨之消長，我們需要持續加強抗病育種與流行病學的研究；很明顯現今栽培狀況不僅是栽培品種的分布改變，台灣的氣候環境也改變了，每日最高溫和每日最低溫上升，增溫以夜晚比白天明顯，冬季較其他季節明顯，高溫日數增加，百年來總降雨量變化不大，但總降雨日數 (尤夏季) 呈減少趨勢，強降雨機率明顯增加，乾濕季差異更加顯著，且 2000 年之後侵台颱風由每年 3.3 個增加為 5.7 個，以上變化大幅影響水稻病害發生的機率及嚴重程度，菌群勢必也隨著逐漸改變。病害最主要的防治方法之一為種植抗病品種，然回顧目前台灣育成品系的抗病性普遍不足，顯示可能在選育過程中，沒有抗性種原、選拔效率不彰或是檢定系統不穩定，希望能藉由本次研習與 IRRI 學術交流提升我方的能力建構。

其中分子標誌分析不受環境干擾，對於抗性基因的檢定效率大幅提升，有助於抗病品種的選育，所以希望在本次研習中將分子抗病育種的策略引入我們育種程序中，這策略我們可以區分成 3 塊，平台建置、抗性基因開發與策略應用；在這兩年的研習與交流中逐步建構我們研發能力，第一年是平台建置、第二年是策略應用，未來能具有抗性品種育成的能力。回顧 2012 年研究目的：引入白葉枯病接種、抗性評估與鑑定生理小種 (病原型) 之技術平台，而研習目標著重於：(1) 菌株採集、接種與純化製備等病理技術之引進；(2) 穩定統一病圃評估標準並引入 IRBB 等含抗性基因的近等基因品系 (NILs)；(3) 導入抗性基因分子標誌操作技術。2013 年研究目的：建置流行菌株的監測技術與寄主抗性基因的應用策略；本次研習目標：(1) 交流雙方流行菌群的收集與分群概況；(2) 病原菌非致病性基因與效應蛋白的研究現況；(3) 分子輔助回交育種程序的執行與交流。

### 三、研習行程

時間與內容	地點
09月08日星期日	
07:30 桃園國際機場集合完畢	桃園機場
09:30 登機	長榮 BR271
12:10 抵達菲律賓 (誤點)	馬尼拉機場
13:30 抵達 IRRI	Swaminathan hall
09月09日星期一 (雙方計畫進度報告及問題討論)	
09:00 <b>Update from IRRI collaborators</b>	CESD conference room
1. Crosses made, genotyping of donors and recurrent parents	
2. Phenotyping of recurrent/donor parents	
BLB inoculation	Green house
12:00-13:30 Lunch	
13:30-17:00 <b>Updates from Taiwan Collaborators</b>	CESD conference room
1. BB team	
2. Blast team	
Pathotype Testing - Inoculation	Green house
09月10日星期二 Mini-workshop - Strategies and approaches to monitor pathogen populations and to deploy host resistance	
07:30-09:00 基因型分析操作技術實作與討論	Blast team/Alice Hei 實驗室
09:00-10:30 Workshop objectives and activities	Hei PBGB conference room
Background-Why is population genetics essential for managing disease resistance?	PBGB conference room
10:30-11:30 Overview of avirulence/effector genes - Magnaporthe oryzae (Mo)	Bo Zhou PBGB conference room
11:30-12:00 Discussions	PBGB conference room
12:00-13:00 Lunch	PBGB conference room
13:00-14:00 Overview of avirulence/effector genes- Xanthomonas oryzae pv oryzae (Xoo)	Ricardo Oliva PBGB conference room
14:00-15:00 Current status of rice pathogens over geographic regions	Adam Sparks PBGB conference room
15:00-16:00 From Taiwan collaborators - on pathogens	Wei-Chiang Shen, NTU PBGB conference room
16:00-17:00 Discussion in relation to the collaborative efforts	PBGB conference room

09月11日星期三 Mini-workshop - Strategies and approaches to monitor pathogen populations and to deploy host resistance			
07:30-09:00	稻熱病圃觀摩及評估技術實作與討論	Bo	Blast nursery
09:00-10:30	Host resistance- Overview of disease resistance genes (blight, blast)	Bo and Nollie	PBGB conference room
10:30-11:30	Mapping QTLs for resistance to rice blast in Taiwan cultivars	Chia-Lin Chung, NTU	PBGB conference room
12:00-13:00	Lunch		PBGB conference room
13:00-14:00	Brief introduction of current studies with bacterial blight in Taiwan experimental institutions.	Taiwan BB team	PBGB conference room
14:00-15:00	Breeding of blast resistance in Taiwan	Taiwan Blast team	PBGB conference room
15:00-16:00	Gene-based markers for disease resistance, Fluidigm system	Chin and Jade	PBGB conference room
16:00-17:00	Discussion in relation to the collaborative efforts	Hei/Alice/Chitra	PBGB conference room
09月12日星期四			
Morning	Activity 1 - Sampling strategy for surveying pathogens	Abe/ Nancy	
Morning	Activity 2- Computer exercise: designing primer pairs for effector genes	Bo/Jonas	
Morning	Activity 3- Testing PCR markers against local isolates	Eula/Ricardo	
12:00-13:00	Lunch		
13:00-14:30	Hei Seminar	Hei	
Afternoon	Activity 1- Fluidigm system and MMAL	Jade/Chin	
Afternoon	Activity 1- GBS - GWAS - QTLs - markers	Eula/Chitra	
09月13日星期五			
08:30	台大團隊先行搭機返國		
8:30-9:00	Briefing on image analysis approach - disease	Steve Klassen	
Morning	Activity 1- Phenotyping - conventional and image analysis, hands-on	Mayette/Vanica/Chitra	
Morning	Activity 2 - Crosses and F1's, candidate genes and markers in the program	Alice	
12:00-1:00	Lunch		
1:00-1:20	Brief meet - to cross check on Activities missed by participants		
Afternoon	Activity 1 - Main Path lab - isolating pathogens and culturing	Ellen/Fani/Mayette	
Afternoon	Activity 2 - Additional Diseases - Brief introduction to Sheath blight and False smut	Ricardo and Bo	
Afternoon	Covering for activities that participants missed		
3.00pm	Summarizing week's achievements	Mayette/Alice/Chitra/Hei	PBGB conference room
	Taiwan Collaborators - comments and views on weeks activities	Taiwan Collaborators	PBGB conference room
	Completing the objectives	Hei/Alice/Chitra	PBGB conference room

Furture directions in this collaboration - focus -  
Plant pathogy  
Social activities

itra room  
Hei/Taiwan PBGB conference  
Collaboraton room

09月14日星期六

08:20- 搭車到機場

13:10- 登機 (誤點)

16:10- 抵達台灣

長榮 BR272

桃園機場

## 四、參訪內容

### (一) 水稻抗病育種與流行病學能力建構交流

在去 (101) 年引入白葉枯病和稻熱病接種、抗性評估與鑑定生理小種之技術平台，而研習目標著重於：(1) 菌株採集、接種與純化製備等病理技術之引進；(2) 穩定統一病圃評估標準並引入 IRBB 等 NILs 和帶有抗性基因的貢獻親本；(3) 導入抗性基因分子標誌操作技術。

白葉枯病方面：

去年研習 IRRI 的田間檢定技術，進行兩者間的差異比較，在田間使用之接種源製備、人工接種生育時期、人工接種模式、發病後調查時間、調查與評估方式、供試菌株數量、菌株保存等不同點上進行比較與修正，開始增加檢定的菌株數，也盡量提升檢定技術的精細度，並使用明確遺傳組成的 IRBB 判別族群，初步可以讓我們知道 *xa5*, *Xa7*, *Xa21* 對國內多個供試菌株具有穩定抗性，且堆疊多個抗性基因的抗性效果更為穩定。另外在抗性基因的分子檢定工具上，我們可以參考已發表的文獻或是自行進行定位研究，建立抗病基因的功能性標誌與連鎖標誌，其中在研習前，我們參考文獻已經建立 *xa5*, *xa13*, *Xa21* 與 *Xa27* 等抗病基因的功能性標誌；IRRI 也提供我們其他相關抗病基因的連鎖標誌資訊，供我們建立基因型分析平台使用，方便進行雜交後裔的前景選拔。

在白葉枯病流行病學資訊上，主要有兩方面：(1) 生理小種 (病原型) 研究。在菲律賓，利用表現型 (Phenotyping) 和基因型 (Genotyping) 的分析結果，確認當地白葉枯病菌有 14 個生理小種；在台灣，目前亦改用 IRBB NILs 進行台灣白葉枯病菌生理小種 (病原型) 研究，已建立溫室表現型判別系統平台，初步可將 16 個菌株分成 11 群，並提供對台灣菌株有效之抗性基因等資訊供育種人員參考。(2) 生理小種 (病原型) 監測技術研究。經與 IRRI 研究人員討論後，為了解台灣各地白葉枯病菌菌群變化，以方便選擇適種品種與調整育種方向，應於多地 (除長發病的熱點外，亦要增加其他點) 種植 IRBB 判別品種，以即時表現該地發病模式與菌群，了解當地適用之抗性基因及該地菌群變遷 (多年結果)；又或許可以參考 IRRI 正在研究之白葉枯病菌 avirulence/effector genes (T3S Xop effectors) 多型性進行分子快速確認，以提升病原菌生理小種 (病原型) 監測效率，然需先收集更多相關基因 markers 等相關資訊。

稻熱病方面：

本次研習的重點之一將與 IRRI 進行計畫執行進度探討與解決計畫執行遭遇之困難。目前國內稻熱病抗病育種將以 Sanhuangzhan 2 (SHZ-2) 為主要貢獻親，將其抗病基因與 QTLs 導入國內優良品種，並搭配基因型檢定與外表型檢定篩選具抗性的雜交後代。國內由農業試



驗所植病組已初步利用人工接種試驗測試貢獻親的反應，所有來自 IRRI 的貢獻親皆呈現抗性。另也在國內稻熱病病圃中觀察貢獻親對葉稻熱病與穗稻熱病之反應，以 SHZ-2 的整體表現最佳。目前雜交後代已進入 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 世代，在基因型檢測上有部分基因篩選上有困難。本次前往 IRRI 與其進行計畫交流，已獲得改進之方式，如利用 TILLING 進行檢測。然而國內的材料在 IRRI 的外表型檢定結果，許多呈現抗性反應，很有可能為菲律賓生理小種與國內的不同所導致。未來在世代的篩選上將同步於 IRRI 及國內進行，但仍需先規劃好未來進行背景篩選與外表型檢定的時程。

當植物體內的抗性基因 (R gene) 對應到非致病性基因 (Avr gene) 時，才能產生抗性。而來自不同貢獻親的 R gene 在同樣背景情況下，仍然會有不同的抗病反應。因此針對國際判別品種 LTH monogenic line 與 CO39 NILs 裡帶有同樣抗病基因的品系進行試驗時，應盡可能將所有材料納入，並做整體性的判斷。而在病原菌的採集應進行同一地點不同時間的採樣，以監測病原菌的頻度與族群變化。另在稻熱病病圃的環境要保持病原菌的多元性，並且讓感病品種適度發病，以利進行外表型的檢測。

未來在氣候變遷下要控制病害，除了掌控病菌的族群、結合抗病基因與 QTLs、選擇具有廣幅抗性或持久抗性的基因、發展 multiple lines、改變耕作模式外，透過蒐集氣象資料進行病害而導致產量受損模擬亦是不可避免的趨勢。本次研習過程中，EPIRICE Model 是一套模擬程式，需要雨量、溫度、相對溼度等資訊，可模擬難以控制的病害流行區域。RICEPEST Model 則需要日輻射量、溫度、作物生產區、病害程度等資訊，即可模擬出產量受損程度。

## (二) 作物寄主抗性基因-病原菌非致病性基因研究綜論

抗病性可分為垂直抗性與水平抗性兩類 (又稱質的抗性與量的抗性)。大多數垂直抗性乃依據 gene-for-gene 學說，主要由抗病基因 (R gene) 與非致病性基因 (avirulence gene, Avr gene) 交互作用所導致，而量的抗性主要由 QTLs 所調控，通常較具廣幅抗性特質。

對於白葉枯病的抗性，可分為幼苗期抗性、部分抗性與成株抗性 (例如 *xa8*) 三種。成株抗性的抗性顯現方式又分兩種，一種是逐漸消失，另一種是於某一階段突然消失。目前 IRBB 的抗性片段已命名到第 38，但其實序號 30 後之抗性片段還未完全區分其差異性。所使用的 IRBB *Xa element* 與菲律賓的 14 個生理小種有關，其中以 *xa5* 和 *Xa21* 較具抗性。在抗性育種上的策略通常是使用一個較強效的抗性基因，配上一個輔助的抗性基因，例如在菲律賓通常配上兩個 *Xa element* 就可以抵抗田間主要白葉枯病菌生理小種。另外經過 IRRI 調查發現，*Xa pyramid* 數目越多，通常田間所調查到的生理小種多樣性就越高，但這個現象並不影響其抗性。各抗性片段之效果可能因為溫度而改變，*Xa7* 基因處於日/夜溫

為 35/31°C 的環境下較 29/21°C 有效。*Xa 4* 基因則是在溫度較高時抗性表現不佳，故 IRBB 品系有將其合併，以增進其不同溫度下的抗性（如：IRBB67）。*Xa 4* 是在菲律賓相當有效果的基因片段，IRRI 釋出菲律賓的品種有 78.42% 帶有 *Xa 4* 基因。

稻熱病抗病基因與 QTLs 最多分布於水稻第 11 條染色體，其次為第 12 條與第 6 條染色體。抗病基因的類型依其分子結構，主要類型為 NBS-LRR 蛋白 (Nucleotide binding leucine rich repeats)。NBS 區域主要參與 ATP 結合或水解反應，LRR 區域主要參與抗病基因與非致病性基因的對應關係。目前已被 clone 出的 20 個抗病基因，有 11 個屬於 NBS-LRR 類型。IRRI 提供的貢獻親之一 SHZ-2 對中國 98% 菌株及菲律賓地區 96% 菌株有抗性，此品種含有 5 個 candidate defense genes：(1) 位於第 1 條染色體 Chitinase，透過水解病原菌的幾丁質 (chitin) 以提升植物體對抗病原菌的能力；(2) 亦是位於第 1 條染色體的 14-3-3 protein，負責訊息傳遞，與其受質蛋白，如細胞膜上的  $H^+$ -ATPase 及離子運輸通道，藉由離子與水分的運輸來調節膨壓，以維持細胞正常生理功能；(3) 位於第 7 條染色體的 Dehydrin，參與逆境之反應；(4) 位於第 10 條染色體的 Pathogenesis-related protein (PR-1 protein)，參與抗病反應；(5) 位於第 8 條染色體的 Oxalate oxidase，屬於 germin-like protein (GLP)。5 個 QTLs 中以 Oxalate oxidase 之貢獻最大。

禾本科的 GLPs 大多藉由產生過氧化物 (Reactive oxygen species, ROS) 參與植物的防禦機制。大多 GLPs 的功能仍未清楚，但有部分的族群類似大麥的 HvGER4，具有 superoxide dismutase 的功能，將超氧自由基轉為過氧化氫 ( $H_2O_2$ ) 參與抗病機制反應。位於水稻第 8 條染色體上 12 個 germin-like protein (*OsGLP*) 對抗稻熱病有功效。當越多位於第 8 條染色體的 *OsGLP* 表現被抑制，感病性隨之提升。其中以 *OsGER4* 次族群對抗病性貢獻較多。其基因序列、基因組成與大麥、小麥裡 GLP 皆類似，顯示第 8 條染色體上之 *OsGLP* 具廣幅抗性且為禾本科中基本的調控機制。

至 2011 年 SHZ-2 陸續被找到新的 QTLs，*qBR2.1*、*qBR6.1* 與 *qBR9.1*，其貢獻度分別為 16.2%、14.9% 與 22.3%。2013 年 *qBR9.1* 被命名為 *Pi56(t)* 且解序，屬於 NBS-LRR protein 且具廣幅抗性 (Liu *et al.* 2013)。

除了植物的抗病基因外，病原菌的研究亦是重要的環節。在本次於 IRRI 研習課程中，有關病原菌族群對病害控制的介紹，提及病原菌的族群大小、突變速率、基因流、有性與無性世代及寄主與環境皆會是影響病原菌族群的因素。一旦病原菌突破植株表面障礙，植物對病菌的免疫模式第一關將啟動 PAMP triggered Immunity (PTI)，此為植物最基本的防禦反應，藉由表面的辨識系統分辨自我或非我物質。PAMP 為病原菌高度保守的物質，會使植物啟動訊息傳導誘發防禦反應。PTI 的反應類型可有：(1) 產生過氧化物質、(2) 累積細胞內鈣

離子濃度、(3) 沉澱細胞壁的 callose、(4) 誘導 MAPKs、(5) 產生抗微生物物質及 (6) 一連串的轉譯反應。病原菌會產生 virulence effectors，effectors 具雙重的功能能決定致病性與否。當 effectors 與寄主反應，阻止 PTI 反應、奪取寄主養分並破壞寄主的生理功能而產生致病性，稱之 effector triggered susceptibility (ETS)。為了避免 ETS，植物的第二道防線稱為 effector triggered immunity (ETI)，由植物體內的 R gene 監測 effectors 啓動防禦，視為高敏感反應 (hypersensitive response, HR)，是快速且局限於程序性細胞死亡細胞的反應。

目前已知白葉枯病病原菌中的 *avrXa3* 基因對應水稻中的 *Xa3* 抗病基因、*avrxa5* 基因對應 *xa5* 抗病基因、*avrXa7* 基因對應 *Os11N3* 抗病基因、*avrXa10* 基因對應 *Xa10* 抗病基因、*avrXa27* 基因對應 *Xa27* 抗病基因、*PthX01* 基因對應 *xa13* 抗病基因等。已經發現已有部份菌株在 *avrXa7* 基因上有變異，不同地區的基因構成會不太相同，進而影響 *Xa7* 基因抗性效能。*XopV*、*XopW*、*XopY*、*XopAB* 是 Non-TAL effector genes，與 T3SS system 有關，可以用來區分水稻上白葉枯病菌和細菌性條斑病菌或部分生理小種。

### (三) 病原菌田間採樣調查時的取樣方法實作

取樣通常可在試區採 X 型、橫 W 型、縱 W 型進行取樣，依方便性而定，但要避免取試區邊緣的樣品。若是試區太大，無法全面進行取樣，則於試區中略取 30\*30 平方公尺之範圍，於對角線周圍取 12 株進行調查。各株的分蘗數即計算全株的分蘗數，各株的葉片數則以最高的分蘗與 4 個隨機的分蘗上所有葉片計算。一般來說，IRRI 在一個水稻品系取 5 個樣品進行調查。調查的項目 IRRI 另外設計出一個調查表以供紀錄。若是區域取樣，IRRI 目前以 3 至 4 個村落為一個區域，各村落內取 30 個試區進行調查。有關疫情發生預測部分，若無相關之資料庫，IRRI 建議可參考中國目前試驗進行的方式，以病原來源為中心，周圍種植不同品種，以品種發病程度預測當地流行發病之可能品種。

### (四) SNP 基因型分析平台 (Fluidigm system) 與分子標誌應用實驗室觀摩

MMAL 為分子標定應用實驗室 (Molecular Marker Applications Lab) 之縮寫，內包括 DNA 萃取區、電泳區、SNP 儀器區、基因解序區與研究人員置物區等。SNP 儀器區包括 BeadXpress 與 Fluidigm system 兩種機型，分別用於秈稻、秈梗稻之多型性偵測。BeadXpress 較小型，其偵測流程屬固定模式，可調整變動之參數與配方選擇較少，受測 DNA 經 BeadXpress 處理後，再以 genomestudio 與 ALCHEMY galaxy 分析結果，IRRI 以此儀器測試結果多為 NN，達 90-95%。Fluidigm system 之設定參數與配方可較自由調配，IRRI 所使用的 marker 有效性約 80%，其中秈稻使用 288 個 genomewide marker。受測 DNA 於

array chip 上後於儀器上進行 controller code/mix 與 PCR 程序後以搭配之 reader 讀取。讀取數據依試驗內容可能與 [www.ricediversity.org](http://www.ricediversity.org) 之資訊相對照。一般而言，IRRI 於回交檢定上使用 192\*24 之 array chip，其中 24 孔部分放置 function gene marker，背景基因檢定使用 96\*96 孔之 array chip，以提升親代比較效率。

#### (五) 應用影像分析軟體進行水稻植體上病況分析與實作

IRRI 目前開發使用之影像分析軟體，為網路上之免費軟體 (ImageJ) 加以改造而成，ImageJ 是由 National Institutes of Health 開發的圖像處理軟體，可進行圖片的顯示、編輯及分析圖片區域的面積及特定顏色所占面積比例統計，可於網址 [rsbweb.nih.gov/ij/](http://rsbweb.nih.gov/ij/) 下載，其網頁亦有軟體使用說明。主要設定流程為選取待分析之影像，設定 threshold color，將病斑部分以 filter 換色，然後計算畫素，使用原理即以畫素面積取代病斑面積加以計算 (系統自動運算)，選取 analysis 之 analysis particle 後，影像上病斑會有數字顯示分析結果。程序撰寫則是以其軟體之 record 紀錄寫成，撰寫完 script 後，後續分析項目以 macro 下之 macro run 功能即可自行運算。運算結果可再經由調整參數，以增進系統判斷之準確性。各病害、區域由於病徵狀況略有不同，所以需要以不同參數來校準分析結果，一旦使用適用參數進行分析，則各分析樣品則以同樣標準進行病況 (發病面積率、罹病等級等) 判定，如此可降低人為判斷之試驗誤差。

搭配 ImageJ 影像分析之其他設備，包括數位相機、相機架、透光寫字板與電腦等。於透光寫字板上將數位相機架設於相機架上，並與電腦傳送影像功能連線，寫字板上另覆一張透明片用以壓平樣品，然後以約 1 平方公分之對照物先拍攝一張相片，然後換不同的稻葉壓在透明片下，依序進行照片拍攝。照片拍攝後以撰寫好之 script 套用於 ImageJ 中進行分析。分析結果另與實物相片進行隨機對照，確認病斑判別之正確性，若有差距則調整 ImageJ 內之設定參數，後全部樣品再分析一次，再行確認，至分析結果與隨機實物相片相符後即完成分析程序。若是以傳統的肉眼判別法，則著重於經驗的傳承。因個人對病斑範圍解讀不同，所以將造成不同的結果。為降低這種結果 IRRI 通常採用兩種方式克服：1.以資深人員的標準為標準。2.以分區調查的方式抵銷個人病斑解讀之差異性。

#### (六) 引子設計要領導論與操作 (primer design techniques)

分子標誌的檢測方法中，PCR-based 檢定法因設備需求較為單純，容易廣為各實驗室應用，如何從序列多型性的資訊設計有用的 PCR 引子，是一項重要課題。本次研習中 Dr. Bo Chou 在課堂上分享了一些關於引子設計的原則以及技巧，對台灣研習成員有很大的幫助。

雖然已經有許多軟體可以應用，但是如果能夠對核酸片段之特性更加了解，則可以不用軟體直接判斷序列即可避免一些錯誤的發生。

進行引子設計首先必須考慮的是引子長度和 GC 含量，通常長度越長或 GC 含量越高則黏合溫度越高，一般而言最適宜的引子長度大約在 20 bp 上下，而 GC 含量大約是 40-60% 左右，太低或太高都會對 PCR 的效率造成不良影響。從資料庫上判斷引子專一性也是一大重點，若專一性過低則 PCR 產物條帶眾多，難以確定何者為目標片段。避免引子序列前後端如有互補的情形容易產生 stem-loop 的二級結構，若兩條引子之序列有互補則會形成 primer-dimer，這樣的序列也容易造成 PCR 產物增幅的效率大幅下降。

IRRI 及世界各國目前發展分子標誌的方向為高通量的 SNP，因此需要大量的引子設計工作以提供 SNP 檢測所需，未來台灣也勢必朝向此一方向發展，因此關於引子設計相關的技術對我國未來研發農業科技是至關重要的一環。

#### (七)、基因型定序分析、基因組關聯性分析、目標 QTL 與其分子標誌應用實作 (GBS - GWAS - QTLs – markers)

過去在流行病學上，因人類不似植物可創造特定雜交組合，在確定遺傳變異的情形下進行數量性狀基因座定位 (biparent mapping population)，而是在目標族群內尋找特定性狀與某些較高基因頻度的相互關係，藉由目標族群內是否存有較高特定基因頻度，進而懷疑是否因個體存有此基因，才導致個體表現目標性狀。

然則，近幾年關聯性定位 (association mapping) 開始應用於作物遺傳研究上，主要是因：1. 特定定位族群，如  $F_2$ 、 $BC_1$  等族群，產生減數分裂的次數有限，換而言之，發生遺傳重組的機會有限，當族群樣品數少時，轉而低估互換率。2. 以二倍體作物而言，一個基因座上僅帶有 2 個對偶基因，雜交族群上同基因座最多只能偵測到 4 種對偶基因，對偶基因的種類變異有限。因此，關聯性定位又可作為探索種原內目標基因的種類與各亞種內的分布概況，並進一步估算目標基因座對於特定性狀的貢獻效應，方便未來作為雜交親本的檢索依據，建置親本分子指紋圖譜資料庫。

關聯性定位也可稱連鎖失衡定位 (linkage disequilibrium mapping, LD mapping)，或為關聯性分析 (association analysis, AA)，關聯性定位是建立在基因型發生連鎖不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 的關係上，因此在討論連鎖失衡前，應先探討何謂連鎖平衡 (linkage equilibrium, LE)，平衡狀態是指符合哈溫平衡 (Hardy-Winberg equilibrium, HWE)，而欲達成哈溫平衡則需滿足幾項條件：1. 龐大族群個數，以減少隨機漂變 (random drift)，避免造成部份基因型因同質結合而固定不再分離。2. 需隨機交配 (random mating)，使基因型能獨立

分配產生。3. 並且無選拔、突變、遷移等情形，不能使基因頻度發生變化。在以上前提下，能使基因頻度 (gene frequency) 與基因型頻度 (genotype frequency) 維持一定，且世代代不變，因此期望基因型頻度會因獨立分配，而為基因頻度的乘積。

連鎖失衡即實際基因型頻度 ( $f_{ab}$ ) 與期望基因型頻度之差距，其實際基因型頻度無法達成期望基因型頻度，如

$$D = f_{ab} - f_a \cdot f_b, \quad \text{式 1,}$$

且在這須劃分配子失衡 (gametic phase disequilibrium) 與連鎖 (linkage) 的關係，連鎖是指同一條染色體上的物理性連接，而配子失衡是族群中不同基因座間對偶基因的關聯性 (association)，因此基因座並不需要一定要具有連鎖關係才可以呈現連鎖失衡，故連鎖失衡的程度會伴隨每世代 ( $t$ ) 發生逢機交配而逐漸降低，但若基因座間具有連鎖關係 ( $c$ )，則降低的幅度會隨連鎖距離而減少，如

$$D_t = D_0(1 - c)^t, \quad \text{式 2。}$$

另外連鎖失衡會受族群結構、植株授粉特性等影響，以族群結構而言，會因花期早晚、株高高低、親緣關係等關係，導致試驗材料間具有事先非獨立關係存在，使控制目標性狀的 allele 頻度在該族群中應該會比無目標性狀族群中的高，族群若有再分化、該次族群個數越多時，關聯性係數也會越高，而呈現偽關聯性，但可藉由非連鎖的分子標記檢測試驗族群結構，即以各次族群分群比較時，存有基因頻度差異，則是因特定族群結構所致，而以目標性狀分群比較時，存有基因頻度差異，才是控制該目標性狀的基因座，而有模擬研究指出試驗者應使用 15-20 SSR marker 或 30 biallele markers 進行事前評估，才具有 95% 的信心水準可推測該試驗材料不具特定族群結構 (Jonathan and Rosenberg, 1999)。授粉特性會導致差異，是因自交作物上的基因座為同質結合體若發生遺傳重組也無意義，因此異交作物的 LD 在 500 bp 內發生衰降，但自交作物的 LD 則能保持 10 kb 左右，故對此延伸出分子標記擺放的間距需多少才能維持適當效力，以異交作物玉米而言是 100 - 200 bp，自交作物阿拉伯芥則是 50 kb。

在育種程序中常見的試驗族群，有遺傳種原、優良栽培品種、合成品種族群等，這些試驗族群往往累積大量性狀調查數據，是個豐富試驗資料來源，而各試驗族群的遺傳特性大相逕庭，核心種源：能代表整體遺傳變異，且適當族群數下能方便管理，最適於遺傳研究，栽培品種是遺傳特性最穩定者，能用於多環境區域比較試驗。

廣泛種原的長處是可代表一個物種的全部遺傳歧異度，並在利用與目標性狀未具連鎖關係的分子標記下，挑選試驗材料，避免族群結構產生，使得在最少樣品數下能保有最大遺傳變異，但缺陷是試驗材料內的遺傳異質性過高，如天然族群通常由開放授粉品種組成，導致

基因型相互混雜，使試驗結果不易區分。因此分析重點是欲解決過去受限於栽培種僅能針對已馴化的性狀，種子休眠性、開花類型，此試驗材料適合針對抗病性或特定質量性狀（顏色、香味），不適於分析數量性狀，因非原產地環境造成性狀表現不佳。

以優良栽培品種為試驗材料，其所得結果能使分子標記輔助篩選效率發揮至最大，並因對普通栽培環境適應性高，適於評估低遺傳率性狀，產量、產量構成要素、無機逆境的耐性，且由多年度、多區域，重複試驗設計下累積大筆外觀性狀紀錄可供分析。而該種試驗數據會出現，由年度、地點、重複等試驗設計與多基因效應所造成的共變方，以及品系觀察試驗常常各品系評估年限不一，新舊淘汰導致品系間的資料結構可能不均衡，不過這在產量混合線性模式內，利用最大概度法便可獲得產量的無偏估值，共變方疑慮已獲得解決 (Breseghello and Sorrells, 2006b)。在此不需要透過未連鎖標記的資料來衡量族群結構，用於品種保護的品種指紋圖譜、或品種純度檢測的標準資料均可用來衡量族群結構，或知道譜系資料，便可估算品系間關聯性，控制其他的基因效應的干擾。一般栽培品系往往是近代中來自一個基礎族群，並經過高選拔強度，因此 LD 強度應很高，而與雙親雜交的定位族群相較之下，其關聯性定位的解析度雖未改進，但在目標族群中能得到大量有用對偶基因是一大優點。

目前 IRRI 已經開始運用多親本 MAGIC 族群（合成品種模式）為關聯性定位的試驗材料，其潛力雖未知，但卻最可視為逢機交配的族群，因在品種建立與維持時均要求減低品系自交率，其族群結構的干擾會最低，並因起始世代的重組少，LD 會最高，可偵測到染色體大片段與目標性狀是具有關聯性，解析度較低，而後期世代的遺傳重組現象增加，定位解析度會提高，加上人為選拔促使增加有利基因的組合，更易偵測到優良基因型，優點眾多。

## (八) 稻熱病菌株分離、抗性檢定及表現型判別技術差異

### 1. 稻熱病菌株分離技術差異

稻熱病菌株分離除可進行菌種分群研究，觀察栽培區內菌相改變情形，亦可測試抗性基因表現強弱，做為稻熱病抗性育種時的參考。國內稻熱病菌株分離技術沒有統一的作法，大多數均將罹病葉片放置於潮濕環境，於產孢後進行分離。農試所過去主要是利用含有 2% 蔗糖的 water agar (2%) 進行分離培養後取單一孢子，移至 10% V-8 培養基培養 2 週後切取新鮮菌絲塊，置於含無菌水之標本瓶中進行保存，於 2012 年至 IRRI 進行研習後亦著手調整其保存方式，增進保存效率。台東場目前是於罹病葉片產孢後，直接取單一孢子，培養於含有鏈黴素的 PDA 培養基上，並儲存於 22°C 環境中。IRRI 則是待罹病部位產孢後於解剖顯微鏡下挑取孢子塗佈於含 40 ppm 鏈黴素的 water agar (4%)，培養至孢子發芽後於解剖顯微鏡下以燒尖之毛細管挑取單一孢

子，移至 *prune agar* 斜面培養基培養，待稻熱病菌株生長活化時，倒入裁切成小片的濾紙，培養至菌絲生長於濾紙上後將濾紙取出，放入小型玻璃瓶做為未來接種源製備使用。

稻熱病菌株分離方面，IRRI 在分離及培養用的培養基中均加入鏈黴素，可減少雜菌污染，可供國內參考。在保存方面，IRRI 在濾紙取出後分為兩種保存方式，長久保存方面，將濾紙放入信封袋乾燥保存於  $-20^{\circ}\text{C}$ ，此法可保存 30 年以上；常備使用的部分則放置於小型玻璃瓶中，以乾燥劑維持乾燥，亦可保存 10 年左右。相較於國內過去的保存方法，IRRI 的保存方式可減少保存空間，有利於菌株的儲存。

## 2. 抗性檢定及表現型判別技術差異

國內稻熱病抗性檢定圃可分為水田式及早田式，水田式檢定圃於第 1 期作分別設置在嘉義市及台東縣關山鎮，調查葉稻熱病及穗稻熱病之抵抗力；旱田式檢定圃兩期作皆設置於嘉義市，調查葉稻熱病抵抗力。水田式檢定圃主要是藉由高氮肥 ( $320\text{ kg/ha}$ )，並於檢定圃周圍及品種 (系) 間種植感病品種 *Lomello* 之方式，促使水稻自然發病，於最大分蘖期後每隔 10 天調查葉稻熱病發病情形，總共三次；穗稻熱病則於進入成熟期後進行調查。調查方法依據國際稻熱病圃之規範行之，以肉眼依據調查標準進行記載，檢定圃為 2 重複，每重複由 2-3 人同時進行調查，如有判斷上之差異則進行討論後決定。IRRI 之稻熱病抵抗力檢定圃可分為溫網室檢定圃及早田式檢定圃，其中溫網室檢定圃調查葉稻熱病及穗稻熱病，旱田式檢定圃調查葉稻熱病抵抗力。在溫網室檢定圃部分，IRRI 採取分別接種 12 種於菲律賓分離出致病力較強的病原菌株，配合水稻抗稻熱病育種工作，接種後 7 日進行葉稻熱病抵抗力檢定，穗稻熱病於 2-3 週後調查植株罹病情形。調查方法分別以肉眼及 *ImageJ* (公共的圖像處理軟體，詳見第 12 頁的 (五)) 進行罹病葉片照片分析後比對判定程度，差異性較大的部分再行討論。

## 五、參訪心得

藉由加強台灣目前的監測與抗病基因的應用技術，除可使檢定結果更加穩定外，未來將加強：

1. 在目前全球氣候變遷的環境下，台灣的稻作也面臨極大的挑戰，水稻白葉枯病的為害造成農民栽培困難及經濟上的損失，在台灣尚未發現對水稻白葉枯病有顯著效果之抗病基因，藉由本計畫由 IRRI 引進抗病基因並透過回交育種及分子輔助選種，期望能儘速選育出具有良好抗性的水稻品種。
2. IRRI 於水稻白葉枯病抗病育種上已有成熟模式運行，由蒐集地方病原菌開始，進而純化



分析，以基因解碼定序之方式加以歸類，準確性高於以外表型（水稻-病原相互反應）進行判斷。其解碼定序之引子亦為已開發之技術關鍵，本次技術交流亦包括引子數種，以提供台灣病原菌生理小種（病原型）鑑定另一方式。待病原菌生理小種（病原型）之資料庫建立之後，再以各地主要小種類型進行水稻抗病基因之育種程序，縮短育種期程，也提高育種目標之準確率。

3. 在本次研習中我們與 IIRRI 研究人員加強交流有關目前台灣白葉枯病抗病育種的研發現況與評估平台建置的穩定性，其中部分已知抗性基因 *xa5*, *Xa7* 與 *Xa21* 能有效抵抗台灣供試菌株。IIRRI 建議可先將這些抗病基因導入我國栽培品種，優先回交選育部分優良栽培品種同時攜有 *Xa4*, *xa5*, *Xa7*, *xa13* 與 *Xa21* 等多重抗性基因，該抗病衍生品種可作為未來導入 2 個以上抗病基因的抗病親本使用，提高我國抗病品系的選育效率與導入效益。導入抗病基因之堆疊數目方面，則與地方病原生理小種（病原型）之對應性相關。如菲律賓，由於其主要生理小種之種類單純，IIRRI 以堆疊兩種抗病基因之品系為試驗主力。如印度，鑒於其生理小種之種類複雜，IIRRI 則以三種抗病基因堆疊之品系為發展主力。對於台灣生理小種（病原型）之複雜程度尚未明朗之情況(如台灣)，IIRRI 則建議以三種抗病基因堆疊之品系為首要發展對象。再者可從 MAGIC population 進行篩選，尋求對台灣有利之抗病基因。
4. 另在 IIRRI 的監測研究中發現，菲律賓大多水稻品種均攜有 *Xa4* 抗性基因，未來我們將進一步確認是否國內栽培品種已有 *Xa4* 抗性基因的滲入，此結果將做為未來抗病基因堆疊策略的重要參考。
5. 在這個國際抗稻熱病育種合作計畫的執行上，經討論後國內將以 SHZ-2 品種作為主要貢獻親，並將其抗病基因 *Pi56(t)* 與 QTLs (OXLP) 導入國內優良水稻品種。惟國內針對基因型檢測方面仍有部分抗病基因檢測技術需要克服，在本次前往 IIRRI 研習中，藉由雙方執行人員進行討論獲得豐碩的細節修正方式與觀念，此一溝通模式可做為爾後雙方合作重要參考。而針對國際判別品種的使用，經由討論了解，為了排除相同抗病基因但來自不同貢獻親造成的影響，須將 LTH monogenic lines 與 CO39 NILs 同時進行試驗，依整體表現進行判斷較為恰當。而在 IIRRI 的外表型檢測結果，本次計畫送往 IIRRI 的台灣親本材料，接種菲律賓當地的菌株多數具有抗性，可以推定兩地區的生理小種有差異，未來在雜交後代檢定上，亦會導致不同反應，所以透過雙方以同樣雜交組合在兩地分別進行試驗與交流，將有助於對稻熱病的研究推進。
6. 稻熱病抵抗力檢定及外表型判別技術部分，國內與 IIRRI 有明顯差異，國內檢定圍主要利用自然發病，氮肥施用較高、菌株混合（臺灣於田間採集分離菌株同一田區可分離出 15

種以上不同的菌株)，且以肉眼進行判定，依賴檢定人員的學經驗及相關訓練；另外在調查次數部分，國內葉稻熱病由最大分蘗期起，調查 3 次，有助於後期稻熱病發病情形觀察，判別發病情形為停滯或持續進行，有利於育種人員參考。IRRI 抵抗力檢定採接種方式，氮肥施用低，與田間實際情形有稍微差異，稻熱病抵抗力只調查 1 次；使用 ImageJ 影像軟體做病況辨識，需注意此為破壞性取樣，無法進行後續觀察，然而此法可減少人為誤差，並可將葉片圖像進行長久保存，有利於後續之研究進行，但是此法耗時較長（平均一個樣品約需 3-5 分鐘）且在遇到綜合性病害時軟體判別不易，需注意圖像處理，才能獲得較正確的結果。故 ImageJ 影像軟體法較適於病理學研究使用，將轉移給合作團隊中病理研究同仁參考。

7. 目前 IRRI 在水稻病徵診斷判別上，逐漸以數位影像取代人工辨識，由於影像的分析技術若配合適當參數設定後，對不同病原菌所形成的病斑辨視程度高且較為客觀，另外透過繪圖及運算軟體的輔助，將可同時提供水稻罹病葉片的病斑面積比率及影像資料，可提供研究人員罹病程度判別的輔助資料。且數位影像分析技術，可降低個人辨識經驗的誤差，由於病徵辨識人員的訓練不易，故採用影像析技術應可減少人員訓練及罹病辨識等工作，惟針對不同病徵的影像分析參數建立及配合影像分析所需的取樣及樣品保存相關技術可能需要再研議。

## 六、參訪建議

### (一)、白葉枯病檢定技術建議修正措施

1. IRRI 的病原菌接種是將每個分蘗最上位之完全展開葉，靠近葉尖 1-2 公分處進行剪葉，台灣則以齊頭式接種，故日後擬研議修正為與 IRRI 相同的接種方式，並調整至分蘗中期進行接種，以減低雙方因檢定技術上差異而造成檢定資料判讀的誤差。
2. IRRI 利用完整的人工接種病原生理小種試驗的結果，作為後續育種程序的重要參考依據，以提高育種目標效率，此點值得作為臺灣抗病育種模式的借鏡。此次參訪時 IRRI 建議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。
3. 未來將著重思考如何整合白葉枯病流行生理小種（病原型）資訊與抗病育種間的連結性。在運用監測流行生理小種（病原型）的監控技術上，不應僅在收集流行菌群的變遷資訊與好發預測模式的建置，要如何有效將流行菌群的變遷資訊回饋到抗病育種上，作為育種目標的調整依據與運用有效性的提升將是未來思考的目標之一。
4. 嘗試運用非致病性基因等相關分子標誌在菌群變化上的即時監控，以及田間種植 IRBB

判別品種監控天然發病的流行菌群變遷，這些即時資訊均有助於提升我國在抗病育種上的選育效益與跨領域間的整合機制。

5. Genotyping 的部分，IRRI 正在進行本菌全基因組定序的試驗，未來如能發展高通量的 SNP 分析法，台灣的菌株也可用同樣的方法進行族群結構的分析，以及 Avr 基因的探討，進而更加了解水稻品種與不同病菌生理小種 (病原型) 之間的交互作用，以利未來抗病育種的進行。
6. IRRI 並表達未來雙方合作之意願，欲以其技術引子與基因定序成果協助台灣建立病原菌生理小種 (病原型) 資料庫。於育種計畫資源規劃範圍之內，此可作為台灣未來抗病育種計畫考量列入之項目之一。
7. 台灣的育種研究目標與 IRRI 的差異在於我國相當注重米質，而 IRRI 注重抗病性與產量以促進發展中國家的糧食安全，「抗病基因的導入是否會造成品質下降？」這個問題是 IRRI 較少著墨而我們必須深入研究的部分，未來在分子標誌輔助育種過程中，進行背景選拔的同時也應注重品質的觀察，避免來自回復親的優良性狀受到影響或者難以回復。

## (二) 稻熱病抗病育種策略及基礎研究建議修正措施

1. 在本合作計畫中所使用的品種操作過程中，藉由雙方的技術討論模式得知，國內過去並無針對水稻品種進行抗病基因篩選，我們尚未清楚在合作試驗材料中輪迴親的背景是否含有任何抗病基因存在，未來希望能有充分經費進行此一方面研究，進一步獲得相關資訊。
2. 國內在分子輔助選拔實驗室尚需儘快突破 Pi56(t)基因的檢測技術，另須在 BC2 世代之前建立起背景篩選的系統。
3. 在貢獻親的外表型檢測，目前只有進行一個期作的天然病圃試驗，將建議以國內的菌株進行穗稻熱病的接種，綜合評估貢獻親的表現，也可嘗試將貢獻親在病圃監測不同年份的反應。
4. 另外在菌株的收集與族群變動的頻度監測，還有 Avr gene 的研究亦是不可缺少的環節。

## 七、參考文獻

盧孟明、卓盈旻、徐堂家、李清滕、林昀靜、李思瑩。台灣過去百年的氣候變化特性

Breseghello, F. and M. E. Sorrells. 2006. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172(2):1165-1177.

Jonathan, K. P. and N. A. Rosenberg. 1999. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *American Journal of Human Genetics* 65:220-228.

Yan Liu, Bin Liu, Xiaoyuan Zhu, Jianyuan Yang, Alicia Bordeos, Guoliang Wang, Jan E. Leach, Hei Leung. 2013. Fine-mapping and molecular marker development for *Pi56(t)*, a NBS-LRR gene conferring broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice. *Theor. Appl. Genet.* 126:985-998.

## 八、參訪照片

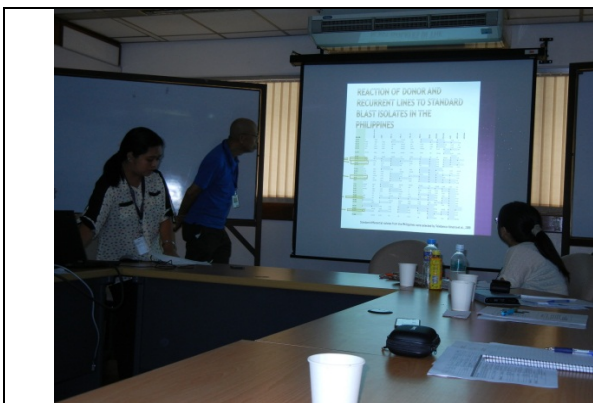


圖1. IRRI update 稻熱病合作計畫工作進度。



圖2. 台灣 update 稻熱病工作小組進度。



圖3. 雙方研究人員就稻熱病 genotyping 技術瓶頸進行討論。

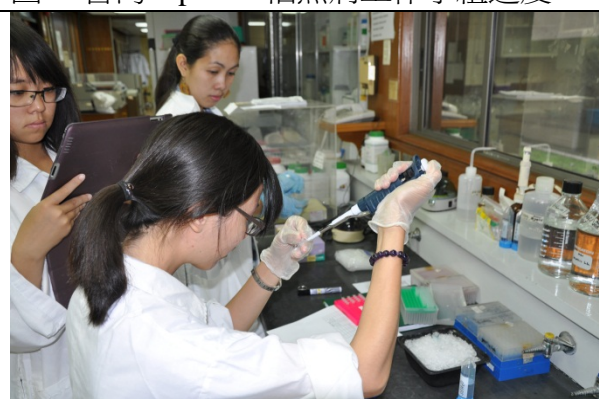


圖4. 稻熱病 genotyping 技術實際操作及討論。



圖5. ImageJ 圖像分析檢測平台硬體。

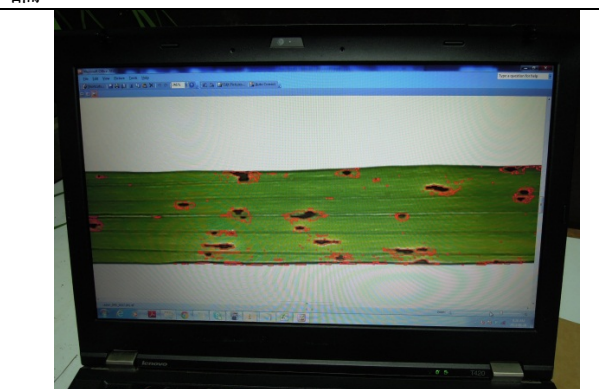


圖6. ImageJ 圖像分析檢測平台軟體分析。



圖7. Dr. Bo 指導病圃檢定技術。



圖8. Dr. Nancy 指導病害取樣策略及判別。



圖9. 2013年 IRRI 抗病學術交流小組合照。



圖10. 陳純葳報告台灣生理小種 (病原型) 初步分群結果與採集概況。



圖11. 吳岱融報告白葉枯病病圍篩選趨勢。



圖12. 吳東鴻報告在台有效抗性分析結果。



圖13. 張瑞忻報告基因型分析平台建構概況。



圖14. 抗病育種能力建構議題雙方交流熱烈。

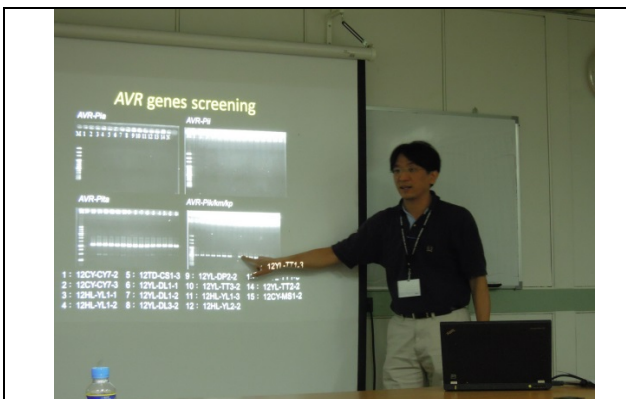


圖15. 沈偉強老師報告稻熱病台灣初步分群



圖16. Dr. Chin 導論抗病基因功能性標誌設

鑑定結果。



圖17. 水稻病害基礎資料實作。

計案例介紹。



圖18. 水稻病害基礎資料調查實作。



圖19. GWS 討論與實作紀錄。



圖20. GWS 討論與實作紀錄。



圖21. 分子標誌應用研究室觀摩與討論。



圖22. 白葉枯病採集與純化保存操作。

## 九、抗病研習小組英文回饋報告

Woei-Shyuan Jwo 卓緯玄

Assistant Researcher, Taiwan Agricultural Research Institute

In the training course, we learned a lot about rice blast:

1. Dr. Bo mentioned that some blast R genes originated from different donors are located at the same locus, which is a helpful info for designing resistance breeding strategies.
2. Our breeders have long been aware of the variability of the blast pathogen, however there have been no systemic studies conducted in Taiwan. IRRI's great efforts on understanding pathogen populations can serve as a nice basis for us to target this issue. In the future, we will use the CO39/LTH near-isogenic lines to identify the physiological races of local blast isolates, which will bring our pathogen characterization in line with international system.
3. Breeders in Taiwan work mostly on applied studies and very little on basic research. In this training course, IRRI arranged discussion session(s) for the progress of the bilateral cooperation project. I think it is very helpful for troubleshooting.
4. I'm afraid that this training course might have taken too much of IRRI researchers' time. This time we had eight people from COA - seven are young researchers lacking of operation experience. It would be better if the program could provide the opportunity for young researchers to actually work with IRRI staff. That way the researchers from Taiwan can help process samples and learn from IRRI staff at the same time.

Dong-Hong Wu 吳東鴻

Assistant Researcher, Taiwan Agricultural Research Institute

In this training course, we learned much about bacterial blight. Followings are some of the important issues:

1. Effective R-genes against different local isolates: We exchanged ideas with IRRI scientists on our current studies. Some known R-genes, such as *xa5*, *Xa7* and *Xa21*, could be effective against the isolates currently present in Taiwan. In the future, we will identify the allele(s) of selected R-genes (such as *Xa4*) in Taiwan cultivars. This will contribute to better understanding of the genetic backgrounds of rice lines in our germplasm.
2. Resistant breeding with bacterial blight: Most Taiwan cultivars don't carry *xa5*, *Xa7*, or *Xa21* genes. We would like to develop a supper cultivar containing five R-genes (*Xa4*, *xa5*, *Xa7*, *xa13* and *Xa21*) against current Xoo isolates in Taiwan. In the future, we can use the supper cultivar as a donor to introgress two more R-genes into our breeding lines.
3. To strengthen the connection between the studies of pathogens and resistance breeding: The objective of studying pathogen population will be not only to characterize current race types but also to efficiently provide feedback information for breeding programs. The use of related molecular markers to target AVR genes and differential lines to monitor local isolates will be helpful for resistant breeding.



Chun-Wei Chen 陳純葳

Assistant Researcher, Taiwan Agricultural Research Institute

After this visit and discussion, here are what I learned:

1. The modified platform in greenhouse is useful in Taiwan for the race classification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*).
2. Our scoring system can be modified.
3. We may collaborate with IRRI for *Xoo* genotyping, but I need to make sure no one is doing this study in Taiwan first.
4. The effectiveness of some R genes is associated with temperature (*Xa4*, *Xa7*) and plant age (*xa8*). We should be aware of it when conducting related studies.
5. We can use IRBB lines at different locations in Taiwan to: 1) monitor which R genes are effective against local *Xoo* isolates, and 2) collect the *Xoo* on these plants for race classification study.
6. There is no better way than talking directly with the author to learn about the history of *Xoo* studies.
7. The image analysis system can be used in our studies.
8. IRRI's greenhouse inoculation method for sheath blight can reduce the amount of materials and improve the evaluation efficiency.

Dai-Rong Wu 吳岱融

Assistant Researcher, Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

1. This visit helped build my knowledge on the link between resistance cultivars and pathogens. I learned how to classify pathogen race types and apply the information for the development of breeding strategies.
  2. The progress on race classification and Avr gene sequencing for pathogen is highly impressive. I appreciate IRRI's suggestion on the establishment of pathogen model in Taiwan. I'm hoping that the connection and collaboration between IRRI and Taiwan can continue and move forward.
  3. The resistant genes against bacterial blight have not been identified in Taiwan cultivars. Under the Taiwan-IRRI cooperation project, some resistance genes will be introduced into Taiwan cultivars by marker-assisted backcrossing, which will accelerate the breeding process and allow us to release resistant cultivars to farmers as soon as possible.
- Image analysis, which requires simple equipment and technology, is a feasible and efficient way for disease evaluation. Both diseased leaf area (%) and lesion type can be analyzed with adaptive parameters. The use of image analysis can reduce the experimental errors caused by different raters.
5. Thanks again for IRRI's great efforts and nice arrangement. We really learned a lot!

Chia-Chi Cheng 鄭佳綺

Assistant Researcher, Taichung District Agricultural Research and Extension Station

This is my first time visiting IRRI. It is really a great honor to have this chance. In this training, I learned much about bacterial blight. Followings are some of my thoughts:

1. Resistance breeding for bacterial blight: Some known R-genes, such as *xa5*, *Xa7*, or *Xa21* genes, could be effective against the *Xoo* isolates in Taiwan. Most of Taiwan cultivars don't carry bacterial blight resistance genes (R-genes). We can use the donors provided by IRRI to introgress R-genes (*Xa4*, *xa5*, *Xa7*, *xa13* and *Xa21*) into our breeding lines. This way we would be able to develop supper cultivar(s) containing multiple R-genes.
2. We all know that with the main purpose of reducing poverty and eliminating hunger, IRRI is mainly engaged in Indica-type rice research. On the other hand, Japonica-type rice is cultivated in more than 90% of rice growing areas in Taiwan. In general, japonica-type rice is physiologically adapted to the temperate climate, so the primary focus of rice breeding in Taiwan has been on the improvement of grain quality. When I saw that the Taiwan varieties (Japonica-type rice) growing well in IRRI's field, I thought that Japonica-type rice may have good potential for further development. Hopefully we can breed some good-quality Japonica-type rice lines which are suited to tropical climate and release those varieties in tropical countries.

Jui-Hsin Chang 張瑞忻

Assistant Researcher, Taichung District Agricultural Research and Extension Station

This is my first time visiting IRRI and Philippines. I have read some scientific articles and papers by IRRI from some journals, and I always wanted to see what it looks like and how people here do their research so well. After the week full of trainings and lectures, I have some thoughts:

3. The effectors of pathogens could be key points to distinguish their genotypes and phenotypes. We have received the list of primers for *Xoo* effectors genes from IRRI. I think the information will be very important for Taiwanese pathologists to survey the bacterial populations and to exchange the data with IRRI in the future.
4. IRRI has been working on the research of Indica rice for a long time, because the main purpose is to stop poverty and hunger. Taiwan is Japonica rice cultivation area, and maybe the collaboration project can be a good opportunity to do some Japonica varieties cultivation test in IRRI. I saw the Taiwanese varieties growing well in IRRI's field. I was surprised and happy to see this, and hoped someday we can breed some high-quality Japonica rice, and extend these varieties to more and more tropical countries.
5. From the discussion between researchers and Dr. Leung, I found a cultural difference between Taiwan and IRRI. We always respect our supervisors too much and are unable to discuss with them at ease. In IRRI, the supervisors always give suggestions and opinions but not just orders. I like your communication way and I hope we can do the same way someday.

Fang-Yu Chang 張芳瑜

Assistant Researcher, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station

At the beginning of blast resistance breeding program in Taiwan, we really bumped into some trouble. In this workshop, through many discussions, we got valuable suggestions and information. For MAS, using TILLING method is another way for screening target gene and we also got some methods to solve the problems on screening *Pi56(t)*. Like IRRI's procedure, in BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> generation, we'll do foreground selection and do background selection until BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> generation. About the differential materials, even for the same R gene, the alleles from different donor parents or in different backgrounds could have different disease responses, so it is necessary to use both sets of the differential materials (LTH monogenic lines and CO39 NILs) and to include as many as lines for evaluation. Besides, sampling from the same plot in different seasons and years is extremely important for pathogen type analysis. For blast nursery, the first one is to maintain the diversity of races, and another one is the suitable incidence of susceptible varieties. In some situation, we must confirm the reaction is really caused by blast pathogen (not due to the problem of mixing up of seeds), so to inoculate the same isolate again is necessary.

Our top concerns regarding the resistance breeding in Taiwan: First, the information of blast resistance genes in Taiwan materials (recurrent parents) is still unknown; Second, SHZ-2 has many R genes and QTLs, but due to the limitation of manpower we might just chose *OXP* and *Pi56(t)* as our target genes in MAS. How these two genes can work in Taiwan, we're still not sure. Last but not least, when to combine phenotype screening in the breeding procedure. We hope to get more information or thoughts so that the program can work simultaneously in Taiwan and IRRI.

Chia-Yu Lin 林家玉

Assistant Researcher, Taitung District Agricultural Research and Extension Station

1. Maybe we can modify the training program a little bit, such as to have lectures and reports in the morning and activities in the afternoon, so that we would have more time to digest all the information.
2. Maybe we can take a nap for 15-30 minutes after lunch.
3. I am interested in phenotyping – conventional and image analysis. In Taiwan, most DARESS only conduct the screening in local environments and for a single disease. We got the chance to discuss about environmental and agrochemical effects in this class.
4. We learned that the races of blast fungi are different between Taiwan and IRRI, and this would affect the phenotyping of breeding lines in the field.
5. Blast resistance genes *Pi2*, *Pi9*, and *Pita* can be easily broken down. It is thus important to design the breeding strategy based on the knowledge on pathogen Avr genes. There are different levels of resistance even in the NILs carrying the same R gene, so it is necessary to include as many as differential lines in our disease nursery.
6. We are very glad to get IRRI's help on the markers of R genes. We will try and see if those are workable.

Wei-Chiang Shen 沈偉強  
Professor, National Taiwan University

Under the leadership of Drs. Hei Leung, Men-Chi Chang, and Hsu-Sheng Lur, this NTU-IRRI-TARI international collaboration project is in its second year of four-year grant. Taiwan collaborators who are specialized in plant pathology and disease resistance breeding visited IRRI during Sep 8 and 14, 2013. Dr. Hei Leung and his colleagues organized a five-day program for this pathology group. The program includes a series of lectures emphasized the importance of monitoring pathogen populations, avirulence/effector genes of rice blast fungus and bacterial blight pathogen, disease resistance genes, and mapping and cloning the resistance genes and also laboratory hands-on activities. IRRI has created a very nice environment for studying rice science and they have very good laboratory and greenhouse facility for pathological and breeding studies and also huge fields for different field works. They recently recruited outstanding junior researchers Drs. Bo Zhou and Ricardo Oliva to join their team. In the mini-workshop, Drs. Zhou and Oliva gave several lectures of their expertise, kindly share their experiences, participated in the discussion, and provided valuable comments to Taiwan researchers. Especially, I and Dr. Bo Zhou have discussed the future collaborative possibility on the long-term evolution of blast pathogen in Taiwan. This trip is very exciting and fruitful, my student, Michael Yu, and I learned and enjoyed very much. We also wish to visit IRRI again in the near future.

Chia-Lin Chung 鍾嘉綾  
Assistant Professor, National Taiwan University

- Many thanks to Dr. Hei Leung and Chitra's organization and all the participants from the IRRI plant pathology and genetics lab. It was probably the most fruitful training trip I have ever participated! Although the visiting date and schedule for this visit were settled pretty late (sorry about that!), I was surprised to see that almost every topic of Taiwan group's interest was nicely covered, whether it was included in the update meetings, the 2-day miniworkshop, or the (hands-on) activities. Most importantly, the IRRI researchers are extremely open-minded and always show great patience and generosity for sharing experience and materials! Being able to interact with the members from both sides and have the opportunities to witness diverse ongoing activities at IRRI really added extra value to this trip. I really enjoyed the whole learning and interacting process, and hopefully I can contribute more to the NTU-IRRI-TARI collaboration project in the future.
- The advantages/drawbacks of different types of molecular markers were discussed during the miniworkshop and the activities "Fluidigm" and "genotyping-by-sequencing". Although the information was not new to me, it was helpful to have a review and know which ones are regularly used at IRRI and at different agricultural research units in Taiwan. It was also nice to have some discussion on the breeding strategy, especially on when to apply markers for foreground and background selection in the backcrossing process.
- Sampling and monitoring: Nancy Castilla lectured for 1 hr on basic principles of disease investigation and the diagnosis of various rice diseases. We were separated into groups and worked to check 2 hills of rice and fill up an injury sheet. It was a nice way to show people how to differentiate different disease symptoms and how to do extensive disease scouting in the field. I may include similar exercise in my class at NTU.
- Great to have all the members of IRRI's pathology group to give lectures on R genes, Avr genes, and plant-pathogen coevolution. The information provided in the miniworkshop covers basic to applied aspects of several important issues in resistance breeding. I was inspired and have developed new ideas since then.
- It was helpful having a personal meeting with Dr. Adam Sparks after his excellent talk. We

discussed about the progress and difficulties of blast monitoring and modeling in Taiwan. We could possibly collaborate on trying the model, EPIRICE, for blast prediction in selected small area(s) in Taiwan