

帶有抗白葉枯病基因水稻材料 之檢定評估

楊嘉凌

摘要

利用國際稻米研究所（IRRI）研發帶有抗白葉枯病基因之19個近同源系材料，以IRRI接種白葉枯病之評估技術流程，檢定抗性基因材料對白葉枯病之抗感性。分別進行一、二期作的檢定流程操作，兩個期作接種菌株之檢定結果，發現抗性基因聚合愈多的材料（如IRBB62、63、64、65及66等）較對照感病品種表現優異之抗性。本試驗另利用分子標誌輔助技術將抗性基因導入國內的臺梗9號、桃園3號及臺中秈10號等品種，分別以具有5個*Xa*基因的IRBB66及3個*Xa*基因的IRBB62為貢獻親。103年一期作培育BC₂F₁材料，利用CAPS、STS及RM20580等分子標誌進行抗性基因之前景選拔，篩選聚合3至5個抗性基因之個體，於開花期進行回交。二期作培育BC₃F₁材料，亦以前述分子標誌進行前景選拔，篩選聚合多個抗性基因之個體，將於104年自BC₃F₂族群利用分子標誌選拔同質結合*Xa*基因之個體。

前言

水稻白葉枯病係臺灣水稻主要流行病害之一，近年來兩期作普遍發生，以二期作發病較嚴重，發病面積年平均達1萬公頃，發病面積有逐年增加的趨勢，對臺灣稻作生產具有相當威脅性。水稻白葉枯病係由*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*引起，本病菌發現有許多生理小種之變異，使得田間外表型的選拔效果並不穩定。目前推廣品種一般對白葉枯病並無良好的抵抗性，主要係育種時缺乏可貢獻抗病性的親源材料，此外並無可判別流行菌株的品種材料，以致本場長年進行抗病檢定圍結果，較少發現具有較佳抗性的品種系材料，亦不易判斷地區流行之生理小種。因此，本研究擬引入IRRI研發針對白葉枯病具有不同抗性基因材料，以本土白葉枯病菌株對抗性基因材料進行檢定，比對瞭解本土之流行菌株並選擇具有優良抗性之品種材料作為貢獻親，利用雜交回交方式導入推廣品種，建立具抗



病基因的雜交後代族群材料，於白葉枯病檢定圃篩選檢定表現較佳抗性之品系。

內 容

一、帶有不同抗性基因材料之抵抗性檢定

(一) 材料與方法

1. 參試材料：利用IRRI導入IR24帶有不同抗性基因之IRBB 4~66等19個近同源系及對照感病品種臺中在來1號為材料（表一）。
2. 試驗方法：
 - (1) 露天試驗：參試材料順序排列於大田，每材料種植4行，每行10株，單本植，2重複。
 - (2) 溫室試驗：參試材料種植於試驗盆，每盆單本種植3株，每材料種植6盆(3重複x2菌株)，以完全逢機設計（CRD）方式排列於溫室。
 - (3) 接種菌株：以農試所提供培養本土白葉枯病之菌系XG91、XN12與XF89b等3個菌株，利用IRRI之水稻白葉枯病抗性檢定標準流程，於分蘗盛期（秧苗移植後55-60天），將剪刀沾菌液以剪葉法接種於每株稻葉上，每行或每盆接種不同菌株。
 - (4) 抗性調查：接菌3週後或對照感病品種臺中在來1號達中感等級時進行調查，以每株接菌3-5葉片之罹病面積進行調查，罹病判定標準以罹病最嚴重葉片之判定等級為準，其罹病程度判定標準如表二。

表一、參試材料名稱及其帶有之抗性基因

代號	材料名稱	抗性基因	代號	材料名稱	抗性基因
1	IRBB-4	<i>Xa4</i>	11	IRBB54	<i>xa5/Xa21</i>
2	IRBB-5	<i>xa5</i>	12	IRBB57	<i>Xa4/xa5/Xa21</i>
3	IRBB-7	<i>Xa7</i>	13	IRBB60	<i>Xa4/xa5/xa13/Xa21</i>
4	IRBB-8	<i>xa8</i>	14	IRBB61	<i>Xa4/xa5/Xa7</i>
5	IRBB11	<i>Xa11</i>	15	IRBB62	<i>Xa4/Xa7/Xa21</i>
6	IRBB13	<i>xa13</i>	16	IRBB63	<i>xa5/Xa7/xa13</i>
7	IRBB14	<i>Xa14</i>	17	IRBB64	<i>Xa4/xa5/Xa7/Xa21</i>
8	IRBB21	<i>Xa21</i>	18	IRBB65	<i>Xa4/Xa7/xa13/Xa21</i>
9	IRBB50	<i>Xa4/xa5</i>	19	IRBB66	<i>Xa4/xa5/Xa7/xa13/Xa21</i>
10	IRBB51	<i>Xa4/xa13</i>	20	TN1	臺中在來1號

表二、接種白葉枯病菌株之葉片罹病程度判定標準

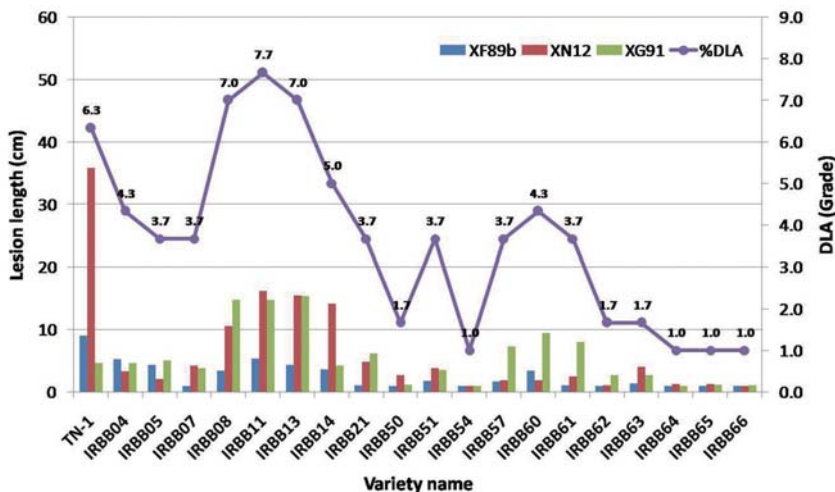
標準（罹病面積，DLA%）	等級	反應
無	0	極抗 (HR)
罹病面積率 1 ~ 5 %	1	抗 (R)
罹病面積率 6 ~ 12%	3	中抗 (MR)
罹病面積率 13 ~ 25%	5	中感 (MS)
罹病面積率 26 ~ 50%	7	感 (S)
罹病面積率 51 ~ 100%	9	極感 (HS)

*抗感性反應調查每株接菌葉片之罹病面積（病斑長度/全葉長度）。
 **罹病判定標準以罹病最嚴重葉片之判定等級為準。

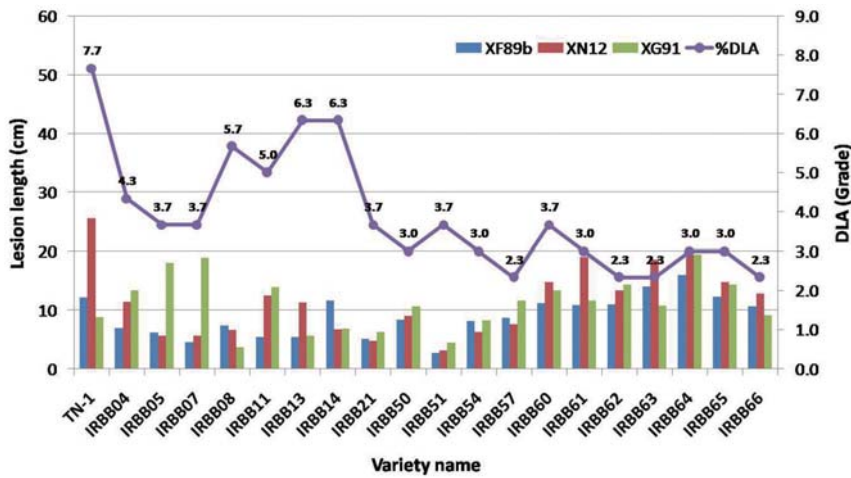
(二)抵抗力檢定結果

1. 露天試驗：

第1期作檢定結果顯示，對XG91反應呈抗級者有IRBB50、IRBB54、IRBB64、IRBB65及IRBB66，對XN12反應呈抗級者有IRBB54、IRBB62、IRBB64、IRBB65及IRBB66，對XF89b則多呈現抗級。綜合檢定結果，發現IRBB50、IRBB54、IRBB62、IRBB63、IRBB64、IRBB65及IRBB66等材料具有良好之抵抗力（圖一）。第2期作檢定結果顯示，所有材料對XG91及XN12皆無抗級反應，對XF89b則有IRBB57、IRBB62、IRBB63及IRBB66等材料呈現抗級。綜合檢定結果，以IRBB50、IRBB54、IRBB57、IRBB61、IRBB62、IRBB63、IRBB64、IRBB65及IRBB66等材料，呈現平均2.3~3等級中抗反應之較佳抗性（圖二）。



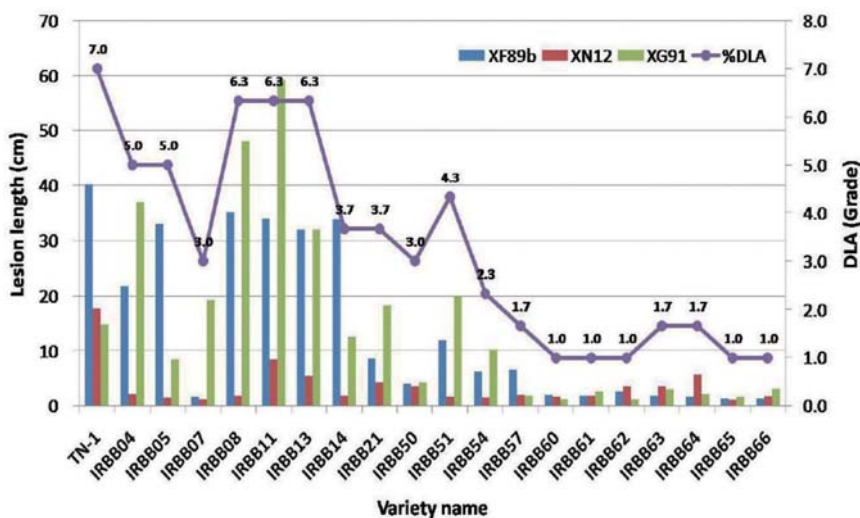
圖一、103年1期作露天檢定白葉枯病菌株之抵抗力結果。



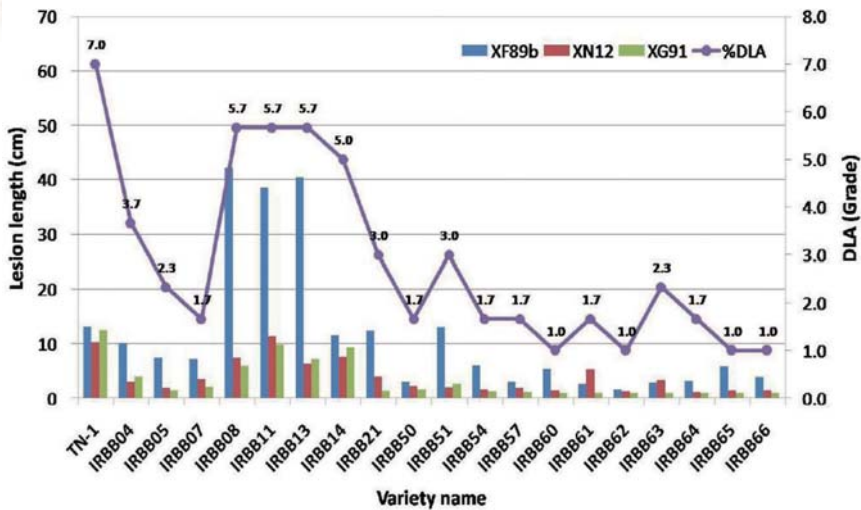
圖二、103年2期作露天檢定白葉枯病菌株之抵抗力結果。

2. 溫室試驗：

由第1及2期作檢定結果（圖三及圖四）發現，IRBB7、50、57、60、61、62、63、64、65及66等10個材料之抵抗力表現，於2個期作間均具有穩定良好之抗性表現。第1及2期作檢定IRBB7（單一基因 $Xa-7$ ）、IRBB50（含2個基因 $Xa-4$ 、 $xa-5$ ）之反應均分別為3.0（中抗級）及1.7（抗級），而含3個基因以上的IRBB57、60、61、62、63、64、65及66等材料之抵抗力表現甚佳，平均抵抗力多為1.7等級以下的抗級。



圖三、103年1期作溫室檢定白葉枯病菌株之抵抗力結果。

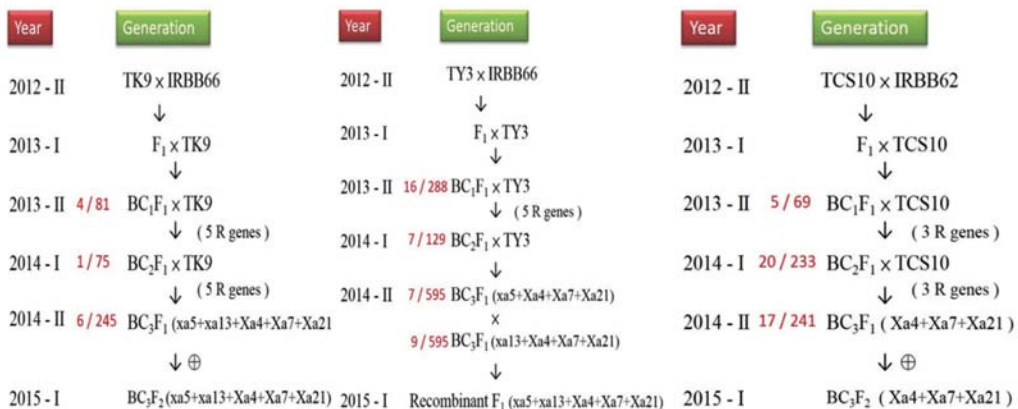


圖四、103年2期作溫室檢定白葉枯病菌株之抵抗力結果。

二、導入抗性基因改良國內推廣品種：

目前發現的水稻白葉枯病抗性基因超過30個以上，分別為Xa1至xa32，對國內流行菌株具穩定單一抗性基因座係xa5、Xa7及Xa21等，依IRRI的建議，當堆疊多個抗性基因時，對白葉枯病的抗性效果較佳且穩定。堆疊3個以上抗性基因的品系確實對國內流行菌株具有廣幅且穩定的抗性。因此，本試驗研究的目標係至少導入3個抗性基因於推廣品種。

本試驗利用分子標誌輔助選拔抗白葉枯病材料，選擇臺稉9號（TK9）、桃園3號（TY3）及臺中秈10號（TCS10）等國內推廣品種為母本，與IRRI已育成具白葉枯病抗性基因之導入系IRBB66或IRBB62進行至少3次之回交操作（圖五），利用IRRI的基因型資料庫及外表型調查系統，配合利用InDel標誌技術進行背景選拔評估輪迴親回復率，將目標基因導入改良國內品種。



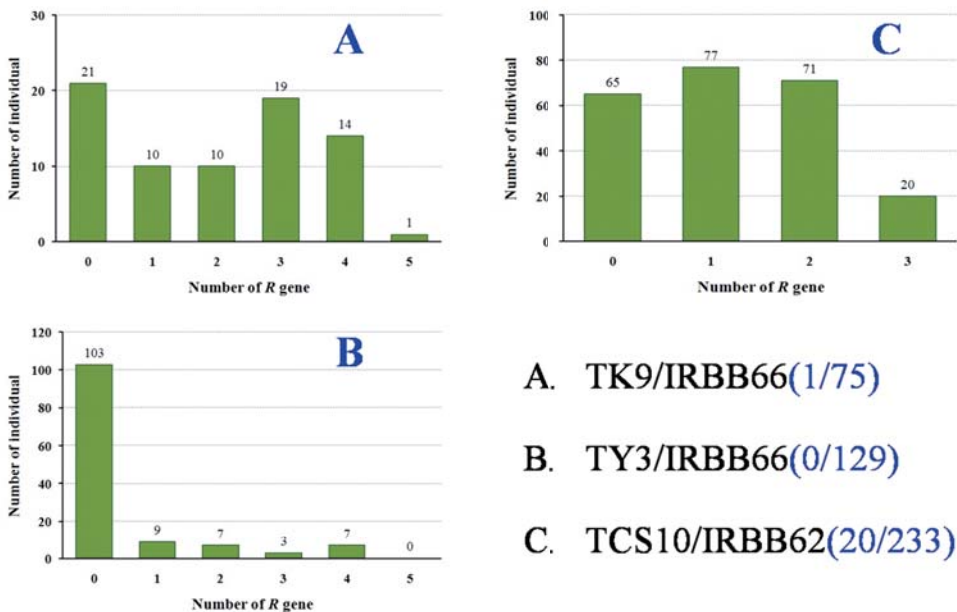
圖五、分子標誌輔助導入抗病基因予回交材料之譜系流程。



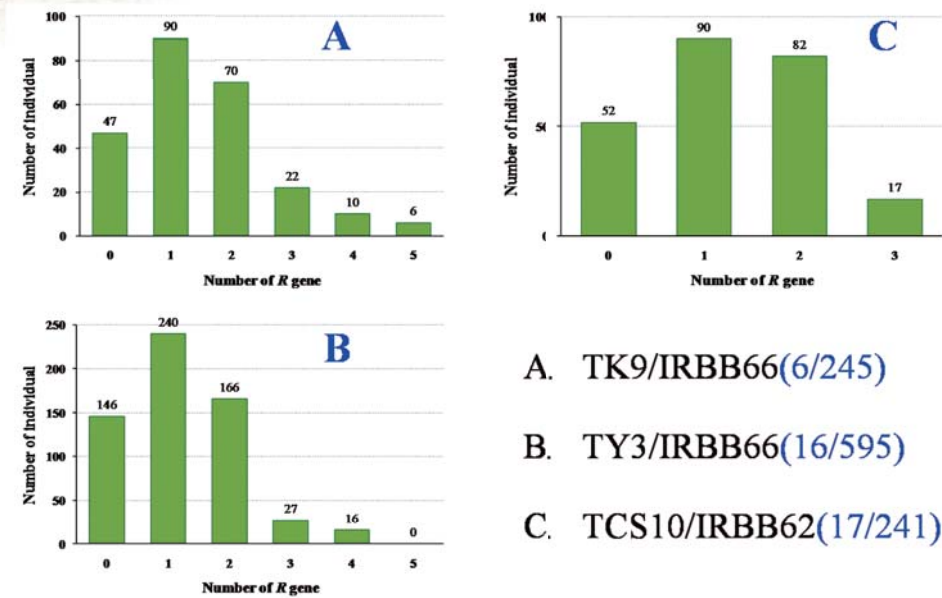
101年第二期作分別建立TK9/ IRBB66、TY3/ IRBB66及TCS10/ IRBB62等雜交組合。102年第一期作分別培育此三個雜交F₁族群共53株個體，於幼苗期利用CAPS，RM20580及STS等分子標誌檢測*Xa4*、*xa5*、*Xa7*、*xa13*及*Xa21*等抗性基因，檢測結果剔除感病同質結合個體後，於抽穗開花期進行第一次回交（BC₁）操作及收集雜交種子。102年第二期作各組合分別培育81、288及69個單株個體之BC₁F₁族群，幼苗期進行抗性基因的前景選拔，同樣利用前述分子標誌檢測*Xa*等抗性基因的存在。

103年第一期作培育各組合之BC₂F₁族群，分別種植75、129及233個單株個體，檢測結果顯示，TK9/IRBB66的族群含0至5個抗性基因分別呈現21、10、10、19、14及1個的分布（圖六，A）；TY3/IRBB66的族群則分別呈現103、9、7、3、7及0個體的分布（圖六，B）；IRBB62係堆疊*Xa4*、*Xa7*及*Xa21*等三個基因之近同源系，因此檢測TCS10/IRBB62的BC₂F₁族群的結果，含0至3個抗性基因的個體分別呈現65、77、71及20個體的分布（圖六，C）。

103年第二期作培育各組合之BC₃F₁族群，分別種植245、595及241個單株個體，皆於幼苗期進行抗性基因前景選拔。檢測結果顯示，TK9/IRBB66的族群分別呈現47、90、70、22、10及6個的分布（圖七，A）；TY3/IRBB66的族群分別呈現146、240、166、27、16及0個體的分布（圖七，B）；TCS10/IRBB62的族群含0至3個抗性基因的個體，分別呈現52、90、82及17個體的分布（圖七，C）。



圖六、三組合BC₂F₁族群以分子標誌檢測抗性基因數之頻度分布。



圖七、三組合BC₃F₁族群以分子標誌檢測抗性基因數之頻度分布。

結 語

103年於水稻分蘖盛期（秧苗移植後55-60天），進行剪葉接種菌株的結果顯示，參試材料接種後之抗性反應受期作間的環境影響，第二期作較第一期作多呈感病等級，與以往經常於2期稻作發生白葉枯病經驗相仿。惟二期作9月中、下旬之高溫乾燥應不利菌株發展，本場因此為避免影響菌株反應，田間稻株接種後，持續2-3周維持田間高水位(5cm以上)。由檢定引自IRRI材料之結果，不論室外田間或室內溫室之接種環境，堆疊多個抗病基因之材料（譬如IRBB62、64、65及66等），於2個期作間均具穩定且良好之抗病性，可作為抗病育種之材料。

本研究另利用IRRI具有堆疊多個抗性基因的同源系材料，以分子標誌輔助選育以導入國內推廣品種，育成具有良好抵抗白葉枯病能力之新品系材料。選定具有Xa4、xa5、Xa7、xa13及Xa21等抗性基因的IRBB66及具有Xa4、Xa7及Xa21等基因的IRBB62為貢獻親，以TK9、TY3及TCS10為輪迴親。103年第一期作培育BC₂F₁材料，利用分子標誌進行Xa基因之前景選拔，以篩選堆疊5個（來自IRBB66）或3個（來自IRBB62）抗性Xa基因之個體，並於開花期進行回交三代（BC₃）。第二期作培育BC₃F₁材料，一樣利用分子標誌進行Xa基因之前景選拔，以篩選堆疊5個或3個抗性Xa基因之個體，收獲自交種子（BC₃F₂世代）。將於104年培育BC₃F₂世代，期望自BC₃F₂族群利用分子標誌選拔具同質結合Xa基因之個體。由於TY3 / IRBB66回交族群自BC₂F₁世代不具堆疊5個Xa基因之個體，



堆疊4個*Xa*基因的個體不具*xa5*或*xa13*基因。於104年將進行*Xa4/xa5/Xa7/ Xa21*與*Xa4/Xa7/xa13/Xa21*的雜交，以重新獲得堆疊5個*Xa*基因之TY3 / IRBB66回交個體。

參考文獻

1. 曾雅君、楊喬安、王子明、林大鈞、曾文彬、陳純葳、楊嘉凌、王強生 2013 水稻抗白葉枯病標誌輔助選拔系統之建立與回交子代之篩選。良質米研究團隊研發成果研討會專輯。臺中區農業改良場特刊第115號 p.81-93。
2. 張義璋、謝麗娟 1999 抗臺灣地區白葉枯病之稻品種篩選。中華農業研究 48:101-109。
3. 謝麗娟、張義璋、謝廷芳 2005 水稻白葉枯病抗病檢定方法之改良。臺灣農業研究54:15-22。
4. Huang, N., E. R. Angeles, J. Domingo, G. Magpantay, S. Singh, G. Zhang, N. Kumaravadivel, J. Bennett and G. S. Khush. 1997. Pyamiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor. Appl. Genet.* 95:313-320.
5. INGER Genetic Resources Center. 1996. Standard Evaluation System for Rice. 4th ed. IRRI, Philippines, pp.1-52.
6. Joseph, M., S. Gopalakrishnan, R. K. Sharma, V. P. Singh, A. K. Singh, N. K. Singh and T. Mohapatra. 2004. Combining bacterial blight resistance and basmati quality characteristics by phenotypic and molecular marker assisted selection in rice. *Molecular Breed.* 13(4):377-387.
7. Korinsak, S., S. Sriprakhon, P. Sirithanya, J. Jairin, S. Korinsak, A. Vanavichit and T. Toojiada. 2009. Identification of microsatellite markers (SSR) linked to a new bacterial blight resistance gene *xa33(t)* in rice cultivar Ba7. *Maejo Intl. J. Sci. Technol.* 3(2): 235-247.
8. Ou, S. H. 1985. Rice Diseases. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
9. Singh, S., J. S. Sidhu, N. Huang, Y. Vikal, Z. Li, D. S. Brar, H. S. Dhaliwal and G. S. Khush. 2001. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theor. Appl. Genet.* 102:1011-1015.
10. Zhang, Q. and T. W. Mew. 1985. Adult-plant resistance of rice cultivars to bacterial blight. *Plant Dis.* 69:896-898.