

怎樣作好抗稻熱病育種

吳 信 淦

中央研究院植物研究所

摘要：一地區的稻熱病通常每隔三至五年會流行一次。發病嚴重時，稻米產量的損失幾達半數。防治的方法中最經濟有效的是育成抗病品種。各稻米生產地區都有抗稻熱病品種的育成，但新品種的抗病性都面臨著被該地區新崛起的稻熱病菌小種攻破的危機。這種危機直至最近依然未曾解除。從事抗稻熱病的育種家經過長期的努力，學習到抗病育種牽涉到兩種在大自然對立的生物，即稻和稻熱病菌。因此積極地從種源庫保存的稻種中尋找抗稻熱病的基因以及利用稻判別品種檢定一地區稻熱病菌小種的分佈。國際稻熱病病圃的設立確實協助育種家獲得不少抗病育種的材料。從稻熱病菌的基礎研究得知稻熱病菌具單核，為子囊菌，單元體期有九條染色體。最大的收穫是對稻熱病菌族群的了解。存在於一地區的稻熱病菌利用DNA指紋技術可分為屬於該地區的若干譜系，每一譜系對少數品種有致病性且涵蓋過去所定的一或少數幾個小種。這樣分法比以小種分的要合理得多，其所依據的是DNA的編制。其次是稻熱病菌遺傳輿圖的建立、非致病性基因在遺傳輿圖上的定位以及非致病性基因的分離。對一品種專一性的非致病性基因會阻止一小種感染該品種。對一非致病性基因而言，稻品種有一相對的抗病基因。稻抗稻熱病小種的基因已可利用分子標記定位於到染色體上。持久抗病性由微效基因控制，此等基因的定位也已屬可行。抗病基因的定位是分離該基因的前奏，跟隨的是將抗病基因轉殖進入感病品種，雖則目前尚未有確實成功的報告。上述的進展將在口頭上作比較詳盡的報告，並據此對本省抗稻熱病育種做些小小的建議。

關鍵詞：稻熱病、DNA指紋、致病性、抗病。

本省稻熱病的流行與抗病育種的成效

本省稻熱病發生較嚴重的在過去1963-1974的十二年間有兩年發病面積幾乎達四分之一，發病嚴重地區產量的損失可高達40%⁽¹⁾。最近十年中，除傍山的田區外，幾無稻熱病發生。抗稻熱病的育種工作，數十年來一直是稻作育種課題的一部份。主要是將具有抗性的品種(系)與栽培品種雜交，於第三、四分離世代在稻熱病統一病圃(包括旱地病圃)中篩選，所得抗病品系分送各改良場作農藝性狀的選拔。最後依高級區域試驗的數據，精選高產質優的品種。當抗親的親緣較遠時，則實施回交育種法，台稈13號就是這樣育成的。如此育成的品種，一般雖有中等以上的抗性，但不能持久。換言之，新品種在推廣之後的2-3年間就失去抗性。這種現象，也常見於生產稻米的其他國家。

新育成品種不能持久抗病的可能原因

眾所週知，抗病性可分為直式和橫式兩種。到目前為止，育種家所選育的大都是由直式抗病基因所提供的抗病性。所謂直式抗病基因是針對某些小種而言。如此，當一新的小種興起，原有抗病品種因不具有抗該等小種的抗病基因，於是淪為感病品種。稻熱病菌的生理小種，以一組若干個判別品種的抗感反應判別之。構成一組判別品種的數目不同，能判別的小種數目也就不同。國際判別稻種含有八個品種，能判別256個小種⁽¹²⁾。本省主要小種為IG及IH群，各別對籼、粳型的判別品種為感病反應⁽¹⁾。後者可能和本省所用的抗病親本，大都是粳型的有關。如果新育成的抗病品種具有籼型血統，則有感染籼型稻能力的小種便有機可乘，興起而取代之。歐氏認為稻熱病菌變異很大，這是新品種不能持久抗病的原因之一；且小種的判別結果，視所用的判別品種數而言，用七個判別品種所檢定的一小種，在用八個判別品種時可能判別成為二個小種⁽²⁾。從事抗稻熱病的育種家經過長期的努力，學習到抗病育種牽涉到兩種在大自然對立的生物，即稻和稻熱病菌。吾人對稻熱病菌遺傳知識缺乏，可能也是新品種不能持久抗病的原因之一。

近年來稻熱病菌遺傳研究的進展

稻熱病菌有性世代的發現：稻熱病菌(*Pyricularia oryzae*)向來只產生分生孢子，只行無性世代。Hebert將從禾本科指粟(*Eleusine coracana*)、垂愛草(*Eragrostis curvula*)等雜草上分離的菌株與稻株上分離的雜交，得到子囊孢子，是為可與無性世代交替的有性世代，且稱從雜草上分離的為*Pyricular grisea*⁽⁶⁾。後統一命名此兩種來源的菌株為*Magnaporthe grisea*⁽²¹⁾。Kato等人證實稻熱病菌的交配型由單對基因所控制，稱為A與a⁽⁷⁾。為避免誤會為顯隱性關係，Yoder等人改稱為MAT1-1(相當於A)及MAT1-2(相當於a)⁽²¹⁾。不同交配型的菌株間雖能雜交，稔實率極低，成為稻熱病菌遺傳研究的障礙。此障礙直到法國學者在稻株上分離到交配型為MAT1-2的菌株(稱為GUY 11)後才部分消除。

染色體數目和連鎖群：稻熱病菌有性世代的發現提供了觀察幼小子囊內減數分裂的可能性，日人報告減數第一分裂中期看到6個二價體⁽¹⁷⁾。Wu與Sung用指粟上分離的菌株與稻株上分離的四個小種雜交，於粗絲期及中期分別看到9對及8個二價染色體⁽²⁰⁾。Leung與Willianus於粗絲期及肥厚期均看到6個二價體⁽⁸⁾。Chen使用GUY 11與本地小種雜交得稔實率較高的子實體，於幼小子實體內的粗絲晚、中期及第一分裂中期均確立稻熱病菌的染色體數目為9， $N=9$ ⁽³⁾。Romao和Hamer利用散布於稻熱病菌染色體組DNA的重複片段作出稻熱病菌的連鎖群，且歸為8群⁽¹³⁾。此與上述染色體數目為9的結果十分近似。稻熱病菌染色體數目及連鎖群的確立是其遺傳研究的基本。

指紋分析：指紋分析是利用DNA分子標記為探針剖析一生物族群中各個體染色體組DNA的組成⁽⁴⁾。Levy等人用重複片段MGR586為探針，探測美國稻熱病菌若干小種各菌株染色體組DNA經EcoR1切後多形性環帶分布的異同。根據指紋的異同，大部份屬於不同小種的菌株可歸為同一譜系，也有一小種的菌株可歸屬為二譜系的。追蹤比較小種IG-1 13個菌株(此等菌株在30年間於三個州內採集得的)的指紋，其歸屬於二譜系的關係不變⁽¹⁰⁾。此結果顯示以指紋區分菌株歸屬於何一譜系相當正確，也似乎推翻了歐氏所稱稻熱病菌變異無窮的說法。指紋檢定的對象是染色體組

DNA的鹼基組成，不受氣候環境的影響。氣候環境卻免不了會影響到小種檢定時人工接種的抗感反應。哥倫比亞的115菌株曾用指紋法歸屬為6個譜系，每譜系包含若干小種，其小種間對八個國際判別品種感反應的差異只見於少數一個判別品種。指紋法也將31個II-1小種的菌株（對八個判別品種均為抗反應）歸屬於譜系中⁽¹¹⁾。菲律賓的234個菌株，可歸為六個譜系，每譜系有3-4個小種（總計21個）。各譜系對一品種的感反應不為逢機，抗反應則前後有一致的表現⁽²²⁾。該地區的譜系組成較美國及哥倫比亞的複雜，但仍為制定抗病育種策略時的重要數據。

和稻熱病菌病原性、致病性有關的基因：角質酶為酯酶，能切角質的酯鍵。一般相信與真菌的致病性有關。稻熱病菌的角質酶基因 *CUT1*，已被選殖。其序列長度為2Kb，由此DNA序列推斷的蛋白有228個氨基酸。角質酶的表現可由角質誘發。稻熱病菌染色體組中通常只有一個角質酶基因，當更多份數的角質酶基因轉殖後，角質酶的活性便大量增加。如將角質酶基因的序列破壞（插入一選擇標記基因於其序列）後轉殖篩選所得 *cut1* 突變體，其角質酶的活性減低，但不完全消失。突變體 *cut1* 感染效果與未轉殖的親本菌株一樣，病斑外觀及產胞數亦然，顯示 *cut1* 基因不是稻熱病菌的致病性所必需⁽¹⁴⁾。

稻熱病菌在感染過程中表現的基因，被視為與致病性有關的基因。*MPG1* 便是在這樣原則下用cDNA差別篩選法選殖到的，它的mRNA在感染早期伴著吸附器形成期為最多。基因的產物為一小的、分泌性的嫌水蛋白分子。突變體 *mpg1* 使發病延緩，吸附器的形成受阻。因此，此等嫌水性蛋白之有無可能為致病性的重要關鍵⁽¹⁶⁾。

SMO 基因座控制分生孢子的形狀（通常為 $22 \times 8 \mu\text{m}$ ，由三個細胞組成的長圓錐形）。從稻株稻熱病病斑上分離的突變體 *smo* 的孢子接近圓形。此圓形分生孢子與致病性的低減兩性狀呈共分離，故推測 *SMO* 基因座亦控制了致病性⁽⁵⁾。

控制寄主物種專一性的基因，*PWL2*：將兩個會感染稻的菌株（其一能感染垂愛草，另一則否）雜交，後代中感染及不感染垂愛草的各半，顯示有一對基因控制對垂愛草的感染能力。復將後代中不感染垂愛草的菌株接種於垂愛草，出現少數感病病斑，後證實為天然突變所致。設 *PWL2* 基因座上，對偶基因 *pwl2* 控制對垂愛草的感染能力，則不感染垂愛草的為 *PWL2*，後代菌株中，當 *PWL2* 突變為 *pwl2* 時，則能感染垂愛草。指紋分析其DNA，證實非為實驗材料的混雜所致。對偶基因 *PWL2* 已被選殖，經轉殖獲得有對偶基因 *PWL2* 的菌株，失去對垂愛草的感染能力但仍能感染稻株。故寄主物種專一性基因 *PWL2*，猶如一非致病性基因阻止另一寄主物種內若干品種的感染。*PWL2* 基因的產物為一親水性可分泌的蛋白，約16KD。突變基因 *pwl2* 與 *PWL2* 基因序列的差別僅為一個鹼基被取代⁽¹⁵⁾。

Leung 等人⁽⁹⁾ 用兩感染稻株的菌株雜交，得 Pos1 及 Pos2 兩個致病性基因分別對兩個稻品種（系）顯示感病反應。分析另一兩菌株的雜交組合得另兩個致病基因 *pos3* 及 *pos4* 分別對另兩個品種（系）顯示感病反應。

從禾本科雜草上分離的菌株雖可和從稻株上分離的菌株間作雜交，但稔實率低。Valent 等人⁽¹⁸⁾ 用能感染垂愛草，且子囊孢子高稔的菌株與能感染稻及垂愛草但子囊孢子低稔的菌株雜交，然後以能感染稻株的親本菌株為輪迴親本回交六次，期能獲得高稔且感染稻的後代，作遺傳分析。從對不同寄主（垂愛草及稻）的病原性及對稻不同品種的致病性的分離數據推論，該雜交組合的兩親有此兩型基因的差別。第一型為對稻的病原性基因，決定病斑的大小，由感染稻的菌株所提供。此等病原性基因不扮演感染垂愛草的角色，因兩親及所有後代菌株均能感染垂愛草。第二型為對

稻有致病性的基因，由單一基因座控制，有此致病性基因座的菌株與稻不同品種的反應非抗即感。從該等雜交組合的遺傳分析獲得三個各對一品種而言的非致病性基因，即 *Avr1-co39*，*Avr1-M201* 及 *Avr1-YAMO*。此等非致病性基因得自不感染稻的親本菌株。

稻對稻熱病的抗病基因

Wang 等人⁽¹⁹⁾ 利用從一抗感兩親雜交組合所得的300多個F7重組自交系及酶切長度多形性(RFLP)分子標記，把兩個可抗五個小種的基因座定位於第四對染色體上分子標記 RG498及 RG788之間及第十一對染色體上的分子標記RG103A及RG16之間。至於控制橫式抗病性(病斑數目)的基因則分布在第八對染色體的10個片段上，每一片段由一個或多個RFLP分子標記所標示。過去已知的三個直式抗病基因也落在上述10個片段中的三個。綜合上述結果顯示所用雜交組合中的抗親含有直式及橫式兩種抗病基因。

對本省抗稻熱病育種工作的建議

回顧了世界各地（包括本地）對稻熱病菌的基礎研究之後，得知稻熱病菌屬於子囊菌，有九條染色體及八個連鎖群。由此可見，稻熱病菌的變異不致雜亂無章。雖則在若干地區（如菲律賓）其變異較大，也可用DNA指紋將其歸成譜系。用一特定的DNA片段(如MGR586)，不僅可以區別何些菌株的寄主是稻，何些是雜草；且一地區內譜系的種類和各類的頻度可與另一地區內的比較其異同。此正和各地區過去採用國際判別品種判別稻熱病菌小種分布的結果一樣，但後者的正確性不如指紋法。

一地區稻熱病菌的譜系一旦確立，且逐年追蹤，所得的數據即可用以篩選當地栽培品種、保存的種源品系或其他來源的種源品系，何者具有能抗該等譜系的抗病基因。

和稻熱病菌病原性、致病性有關基因的遺傳分析結果顯示致病性是由基因控制的。致病性基因的選殖、定性和轉殖將可進一步顯示致病的機制是什麼。另一方面，抗稻熱病的基因有主效基因和微效基因，此等基因賦予稻品種的直式和橫式抗病性。抗病基因在稻連鎖群上的定位以及作出各基因在一連鎖群上與特定分子標記間關係的可能性已經確立。此使抗病育種家有直、橫兩式的抗病基因可用，且可期望育成持久性抗病品種。

一地區抗稻熱病的育種策略決定之後，如何將抗病基因納入感病的栽培品種使其抗病是育種家的本行。但由於實際上今後所謂抗病基因是用分子標記標示的DNA片段而不是基因本身，抗病基因常在某些分子標記附近或兩分子標記之間。分子標記可用電泳膠體看到其存在與否。因此，育種家需要一些技巧，以確定當選的稻株中有所需的抗病基因存在。

根據上述，為作好本省抗稻熱病抗病育種擬作如下的建議：

1. 引進MGR586殖系，找出本省稻熱病菌譜系之分布。
2. 以稻的分子標記標示對本省稻熱病菌主要譜系的抗病基因，包括直式的和橫式的抗病基因。
3. 分離需求的抗病基因並轉殖於感病的栽培品種。或利用雜交、回交育種法，但在適當的分離世代利用分子標記的標示篩選具有需求的抗病基因的品系。
4. 鼓勵從事植病、遺傳及育種工作者三方面的合作。

參考文獻

1. 吳信淦、陳正次、謝維德、王玉斌。1976。加強臺灣省稻熱病防治的建議。總統蔣公逝世週年紀念論文集。445-462。
2. 歐世璜。1971。抗稻熱病育種的新途徑；邱人璋編稻作病害：31-48。(水稻病害討論會彙刊農村復興委員會，台北9月9-12日，1969)。
3. 陳儀容。1993。稻熱病菌染色體組的編制。國立台灣大學農藝研究所論文。pp68。
4. Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J., and Gresshoff, P. M. 1992. Primer-template interaction during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.* ,235:157-165
5. Hamer, J. E., and Givan, S. Genetic mapping with dispersed repeated sequence in the rice blast fungus: Mapping the SMO locus. *Mol. Gen. Genet.* 223:487-495.
6. Hebert, T. 1971. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology* 61:83-87.
7. Kato, H., Yamaguchi, T., and Nishihara, N. 1976. The perfect state of *Pyricularia oryzae* Cav. in culture. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 48:507-510.
8. Leung, H., and Williams, P.H. 1987. Nuclear division and chromosome behavior during meiosis and ascosporeogenesis in *Pyricularia oryzae*. *Can. J. Bot.* 65:112-123.
9. Leung, H. Borromeo, E.S. Bernardo, M.A., and Nottoghem, J.L. 1988. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 78:1227-1233.
10. Levy, M., Romeo, J., Marchetti, M. A., and Hamer, J. E. 1991. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *Plant Cell* 3: 95-102
11. Levy, M., Correa-Victoria, F.J. Zeigler, R.S. Xu, S., and Hamer, J.E. 1993. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology* 83:1427-1433.
12. Ling, K.C. 1968. Standardization of the international race number of *Pyricularia oryzae* Cav. (Mimeograph, IRRI).
13. Romao, J., and Hamer, J.E. 1992. Genetic organization of a repeated DNA sequence family in the rice blast fungus. *PNAS* 89:5316-5320.
14. Sweigard, J.A., Chumley, F.G., and Valent, B. 1992. Cloning and analysis of CUT1, a cutinase gene from *Magnaporthe grisea*. *Mol. Gen. Genet.* 232:174-182.
15. Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Kang, S., Farrall, L., Chumley, F.G., and Valent, B. 1995. Identification, cloning, and characterization of PWL2, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *The Plant Cell* 7:1221-1233.
16. Talbot, M.J., Ebbole, D.J., and Hamer, J. E. 1993. Identification and characterization of MPG 1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 5: 1575-1590.
17. Tanaka, J., Murata, N., and Kato, H. 1979. Behavior of nucleic and chromosomes during ascus development in the mating between either rice strain or weeping lovegrass strain and ragi

- strain of *Pyricularia*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 45:182-191.
18. Valent, B., Farrall, L., and Chumley, F. G. 1991. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. Genetics 127:87-101.
 19. Wang, G. L., Mackill, D. J., Bonman, J. M., McCouch, S. R., Champoux, M. C., and Nelson, R. J. 1994. RFLP Mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136:1421-1434.
 20. Wu, H.K. and Sung, S.L. 1984. Chromosomes in rice blast fungus. Bot. Bull. Acad. Sini. 25:219-227.
 21. Yoder, O. C., Valent, B. and Chumley, F. 1986. Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. Phytopathology 76:383-385.
 22. Zeigler, R. S., Cuoc, L. X., Scott, R. P., Bernardo, M. A., Chen, D. H., Valent, B., and Nelson, R. J. 1995. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. Phytopathology 85:443-451.

How to Improve Rice Blast Resistance in Taiwan

Hsin-Kan Wu

Institute of Botany, Academia Sinica

Abstract

After reviewing the achievements of rice breeding in the past several decades, the author found that it was very successful in high yield but not in blast resistance. The failure in getting persistent resistance may be attributed to the lack of generic information of the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. In the recent years, however, this bottleneck has been partially removed. Genetical studies reveal that the fungus has genes of pathogenicity as well as virulence. Virulence related genes (MPG1, SMO) have been cloned and characterized. Molecular markers were used in finger-printing blast field isolates into lineage group. It would be very optimistic in obtaining better resistance if our rice breeders are encouraged to indulge collaboratively with geneticists and pathologists in tagging genes resistant to the local assorted virulent genes and identifying their presence in the improved rice varieties.

Key words: rice blast resistance, pathogenicity, finger printing.