

分子標誌運用於臺灣馬鈴薯 抗晚疫病基因分析之初探

朱映瑞¹、連珮君²、王慧如²、蘇士閔³、孫永偉⁴、王至正³、邱燕欣³、文紀鑾⁵

一、前言

有鑑於馬鈴薯種薯品質之重要性，農委會防檢局在 98 年制定「馬鈴薯種薯病害驗證作業須知」，並匯集產官學界包括防檢局、中興大學、農業試驗所、臺中區改良場、臺南區改良場以及種苗場組成專家團隊到田間輔導，在團隊的通力合作下，從 G1 種薯就開始，連續繁殖世代 3-4 年的驗證把關。種苗場團隊在田間生產輔導觀察可知，田間不同品種對於晚疫病 (Late blight) 的抗感病不同，因此引發就本場近年收集之馬鈴薯材料進行抗晚疫病基因分析研究。

二、馬鈴薯晚疫病

晚疫病由病原真菌 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 所引起，是世界性的茄科作物重要病害，病原菌的菌絲或卵孢子殘存於馬鈴薯塊莖或番茄種子上，為本病害的首次感染源。在田間的二次感染傳播途徑主要藉由風雨飛濺或人畜攜帶，可於短時間內做長距離傳播。在臺灣冬季

低溫恰逢降雨，或是清晨低溫帶霧狀況，(16-22 °C，相對濕度大於 90-95%，維持 4-6 小時以上)，病原菌菌絲會分化為孢囊柄與檸檬狀頂端有乳頭狀孢囊，並在 12-15°C 低溫刺激下，在受害組織上會產生大量的游走孢子，游走子能藉水膜游動。快速侵染植株，造成大面積的危害，被害部位呈水浸狀黑褐化 (圖 1)，被感染部位以上的組織枯萎，嚴重時全株焦枯、死亡，嚴重時如火燒狀 (圖 2)，造成馬鈴薯收成損失。因此健康種薯、抗 (耐) 病品種與田間衛生與病害管理為馬鈴薯晚疫病綜合管理之重要環節。

三、馬鈴薯抗 (耐) 晚疫病育種分子標誌

抗 (耐) 病品種篩選，除了傳統抗病育種試驗外，在分子技術的快速發展下，導入分子標誌輔助選拔 (marker-assisted selection, MAS) 技術，檢測並篩選育種族群中帶有抗 (耐) 病的單株進行選拔。

針對晚疫病的抗病育種分子標誌的篩

¹ 種苗改良繁殖場繁殖技術課 替代役

² 種苗改良繁殖場繁殖技術課 約用助理

³ 種苗改良繁殖場種苗經營課 助理研究員

⁴ 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員 (退休)

⁵ 種苗改良繁殖場繁殖技術課 副研究員兼課長



圖 1. 晚疫病典型病徵，受害組織葉面病徵為褐化失水，葉背出現大量的孢囊，肉眼辨別為白色黴狀物。



圖 2. 馬鈴薯植株在田間嚴重發生晚疫病時，全株焦枯、死亡，猶如火燒狀。

選，在同為茄科的野生醋栗番茄 *Solanum pimpinellifolium* 上已找到與晚疫病抗性有關的基因座，包括 *Ph-1*、*Ph-2* 及 *Ph-3* 等，分別定位於第 7、10 和 9 號染色體上。而在馬鈴薯抗病基因研究上，在過去 10 年研究裡，目前許多馬鈴薯品種的抗病性是由 *S. demissum* ($2n = 6X = 72$)、*S. andigena* Hawkes ($2N = 4X = 48$) 和其他野生種導入。在 *S. demissum* 上，已知共有 11 個 R 基因。而原產於墨西哥的二倍體馬鈴薯 *S. bulbocastanum* ($2n = 2x = 24$) 也找到部分抗晚疫病基因，如 *Rpi-blb1* 基因或稱 RB 基因，在高發病壓力的環境下也能表現其廣效性的抗性 (broad spectrum resistance)。已知在不同的茄屬作物對於晚疫病菌的抗性上，有 63 個抗性相關基因，其中已在馬鈴薯基因圖譜定位並且經過選殖定序的超過 25 個，而這些抗病基

因的構型皆具備白胺酸重複 (leucine-rich repeat, LRR) 及核苷酸鍵結區 (nucleotide binding site, NBS)。

四、抗病基因篩選流程

使用之植物材料主要為本場收集之馬鈴薯品種 (系)，經由組織培養過程保存，確認無特定病原後，進行繼代保存。

馬鈴薯組織培養材料使用 DNA Kit 抽取。所萃取 DNA 經核酸定量儀定量為 25ng 後，作為 PCR 反應之模板。所偵測抗病基因所用的引子對如 (表一)，因其最適反應條件設置 PCR 步驟，PCR 產物在 1.5% 瓊脂糖凝膠電泳分離後判斷反應增幅條帶 (圖 3)，並利用條帶有無的差異性進行抗感病分群 (表二)。

五、接種試驗流程

溫室內鑑定晚疫病抗性：選取馬鈴薯品種 (系) 組織培養材料，經發根培養及

研究成果

表一、馬鈴薯抗 (耐) 晚疫病特異性標記引子對

基因座 (QTL)	染色體位置	引子 (標記) 名稱	引子序列 (5'→3')
R1	5	R1F/R	F: CACTCGTGACATATCCTCACTA
			R: CAACCCTGGCATGCCACG
R1	5	R1-1205	F: CACTCGTGACATATCCTCACTA
			R: GTAGTACCTATCTTATTTCTGCAAGAAT
R1	5	CosA	F: CTCATTCAAAATCAGTTTTGATC
			R: GAATGTTGAATCTTTTTGTGAAGG
R2	4	R2-2500	F: ATGGCTGATGCCTTTCTATCATTGC
			R: TCACAACATATAATTCCGCTTC
Rpi-blb3 (R2)	4	Th21	F: ATTCAAAATTCTAGTTCCGCC
			R: AACGGCAAAAAAGCACCAC
Rpi-abpt (R2)	4	R2-F1/R2-R3	F: GCTCCTGATACGATCCATG
			R: ACGGCTTCTTGAATGAA
R3a	11	R3-1380	F: TCCGACATGTATTGATCTCCCTG
			R: AGCCACTTCAGCTTCTTACAGTAGG
R3a	11	SHa-F/SHa-R	F: ATCGTTGTCATGCTATGAGATTGTT
			R: CTTCAAGGTAGTGGGCAGTATGCTT
R3b	11	R3bF4/R3bR5	F: GTCGATGAATGCTATGTTTCTCGAGA
			R: ACCAGTTTCTTGCAATTCCAGATTG
R3 family	11	R3-Clade1-F/ R3-Clade1-R	F: caccATGGAGATTGGSTTARCAATTGGTGGTG
			R: AMAKRYATTYCHATYGATNWBATGGTGGRA
R3 family	11	R3-Clade2-F/ R3-Clade2,3-R	F: caccATGGAKATTGGCTTGWCGWTTGGTGGKGC
			R: AYWGGDATYYCMHATYRMTAWHTATGGTGGRRAT
R3 family	11	R3-Clade3,4-F/ R3-Clade4-R	F: caccATGGADATTGGCTTAGCAGTTGGTKGT
			R: TCACAGSYATTYCYCATYGATCTKTATAGTGGA
R8	9	TG328	F: TGAATGGACTGGTGAATCTGC
			R: TTGGAAAGAATTGGCTTTTGA
RB/Rpi-blb1	8	RB-629	F: GAATCAAATTATCCACCCCACTTTTAAAT
			R: CAAGTATTGGGAGGACTGAAAGGT
RB/Rpi-blb1	8	Blb1-820	F: AACCTGTATGGCAGTGGCATG
			R: GTCAGAAAAGGGCACTCGTG
Rpi-bt1	8	Rpi-bt1-ps	F: CCAACATCTTACTTCATTCA
			R: GATACCGTTAGCTATAAGAC
Rpi-pta1	8	CT88	F: CACGAGTGCCCTTTTCTGAC
			R: ACAATTGAATTTTACACTT
Rpi-sto1	8	Ssto-448	F: GTGGAACGCCGTCCATCCTTAG
			R: TGCATAGGTGGTTAGATGTATGTTGATTA

基因座 (QTL)	染色體位置	引子 (標記) 名稱	引子序列 (5'→3')
Rpi-vnt1.1	9	T1190	F: GTTCGCGTTCTCTGTTACTGG R: GTTGCATGGTTGACATCAGG
Rpi-vnt1.2	9	Svnt13M5.17	F: CTGAGGTGCAGCCAATAAC R: CCAGTGAGAAACAGCTTCTC
Rpi-vnt1.3	9	NBS3B	F: CCTTCCTCATCCTCACATTAG R: GCATGCCAACTATTGAAACAAC
Rpi-blb2	6	24L	F: GAGATTCTCAAAGGTGTCTTCC R: AACCTGTGCTTTCCCATTCG
QTL_phu-stn	3	GP198F/R	F: GTAATTTCGAGGAAGGAGAAG R: TCACCTTGGTGCTTCTGTCTG
Rpi-avl1	11	N2527	F: GAAACACAGGGGAATATTCACC R: CCATRTCTTGWATTAAGTCATGC
Rpi-dlc1	9	S1d5-a	F: CGCCTCTTTCTCTGAATTC R: GATCTGGGATGGTCCATTC
Rpi-ber1	10	Q133	F: ATCATCTCCTCAAAGAATCAAG R: ATCTCCCCATTGACAACCA
Rpi-phu1	9	GP94 (OPB07+TG/GT)	OPB07TG: GAAACGGGTGTG OPB07GT: GAAACGGGTGGT
Rpi-cap1	11	N127	F: TAGAGAGCATTAAAGAAGCTGC R: TTTTGCCTACTCCCGCATG

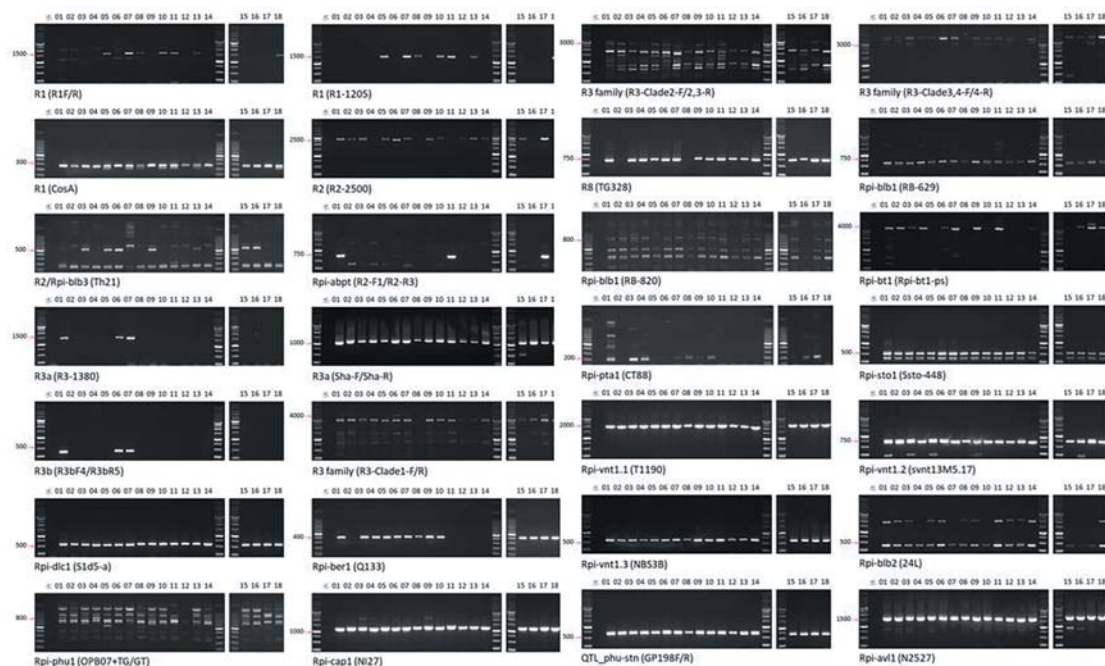


圖 3. 抗感病特异性標記引子對電泳結果

表二、利用抗感病特異性標記條帶有無進行抗感病分群

馬鈴薯品系代號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
抗感基因座																		
R1 (R1-F/R)	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R
R1 (R1-1205)	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R
R1 (CosaA)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
R2 (R2-2500)	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
R2/Rpi-b1b3 (Tb21)	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S
Rpi-abpt (R2-F1/R2-R3)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R3a (R3-1380)	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R3a (Sha-F/Sha-R)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
R3b (R3b-F4/R3b-R5)	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R3 family (R3-Clade1-F/R)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
R3 family (R3-Clade2-F/2,3-R)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
R3 family (R3-Clade3,4-F/4-R)	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S
R8 (TG328)	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
RB/Rpi-b1b1 (RB-629)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
RB/Rpi-b1b1 (RB-820)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rpi-bt1 (Rpi-bt1-ps)	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R
Rpi-pt1 (CT88)	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S
Rpi-sto1 (Ssto-448)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rpi-vnt1.1 (T1190)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rpi-vnt1.2 (svnt13M5.17)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rpi-vnt1.3 (NBS3B)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rpi-b1b2 (24L)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
QTL_phu-stn (GP198F/R)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rpi-avl1 (N2527)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rpi-d1c1 (S145-a)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rpi-ber1 (Q133)	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R
Rpi-phu1 (OPB07+TG/GT)	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S
Rpi-cap1 (N127)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

馴化後，定植於 72 格穴盤苗，經 8 週存活與發根健化後，進行晚疫病接種試驗，接種用的晚疫病菌株 (菌株代號為 214006 與 215024) 為農業試驗所的安寶貞博士分離保存之菌株 (交配型 A-1)。

選出的品系種植至第三片葉長出，並在接種前種植在霧氣室內。接種後保持 100% 的相對濕度，與每日 10 小時光照與 14 小時黑暗，日夜溫設定為 25/20℃ 間，游走子懸浮液配置濃度為 10^4 zoospores/ml，均勻噴灑至接種植株體。於感病對照組發病後，依據植株病徵表現 (表三)，進行晚疫病罹病程度的判定，結果如圖 4。

六、結果討論

由表二可知，樣品 1 號在 28 種受檢標記中，有 24 種呈現陽性反應；而另一抗 (耐) 晚疫病品種 - 樣品 11 號則有 21 種呈現陽性反應。但是在感 (不耐) 晚疫病品種 - 樣品 10 也有多達 20 種標記呈現抗性標記陽性反應，故推測已有許多抗性標記在臺

灣的環境下已失去判別功能。因此，我們以上述三種在臺灣對晚疫病有明確抗感性的馬鈴薯，作來篩選出可能的抗性標記的樣態。

挑出 2 種抗晚疫病品種及 1 種感病品種，進行 28 種受檢標記的趨集性分析，若抗病品種在該種受檢標記結果為陽性 (具備條帶)，同時感病品種在該種受檢標記結果為陰性 (不具備條帶)，則表中呈現雙圈。由表四歸納出抗感病標記有四種，分別為 Rpi-abpt (R2-F1/R2-R3)、R3 family (R3-Clade2-F/2,3-R)、Rpi-bt1 (Rpi-bt1-ps)，和 Rpi-phu1 (OPB07+TG/GT)。此外，Rpi-b1b2 (24L) 在所有受檢測品種中皆成陽性反應，但在我們的實驗條件下，可看出其表現量在抗 (樣品 1 號和樣品 11 號)、感 (sample 10) 品種間有明顯的差異，經重複驗證，結果一致。

R3 family (R3-Clade2-F/2,3-R) 僅出現於兩種已知的抗 (耐) 馬鈴薯品種 sample 01 和 11 上，因此可作為抗 (耐) 品種篩

表三、馬鈴薯晚疫病罹病評估表

罹病指數	植株病徵表現	罹病度 (%)	抗感病表現
0	沒有明顯的症狀	0	免疫
1	總葉面積的 10% 左右，通常發生在下位葉	0.01-10	高抗性
2	佔植物總面積約 25% 的葉子被感染	10.01-25	抗性
3	佔植物總面積約 50% 的葉子被感染	25.01-40	可忍受
4	佔植物總面積約 75% 的葉子被感染	40.01-60	敏感性
5	葉子枯萎，植物死亡	>60.01	高敏感性

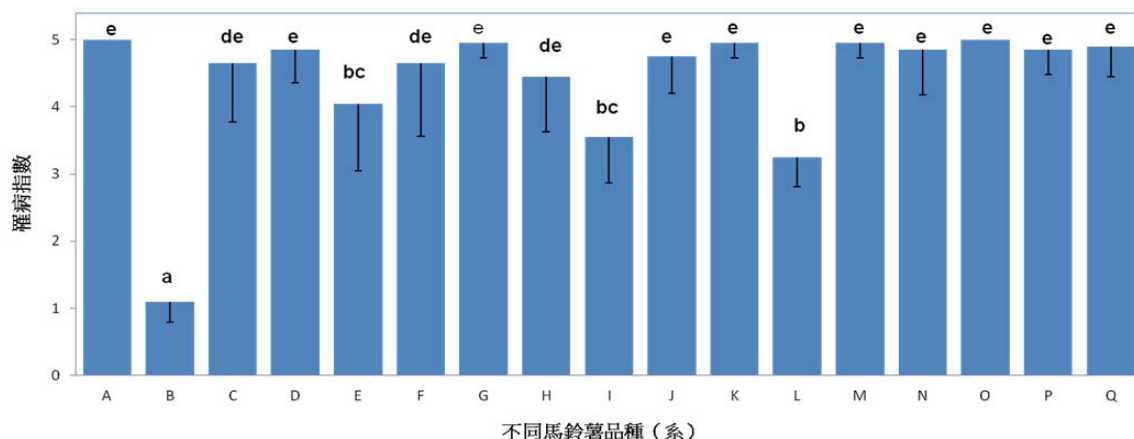


圖 4. 不同馬鈴薯品種 (系) 對於晚疫病菌感受性

選的標記；而 Rpi-bt1 (Rpi-bt1-ps) 和 Rpi-phu1 (OPB07+TG/GT) 則廣泛出現於供試馬鈴薯中，則不建議作為後續篩選之標地基因。

在本次晚疫病接種試驗中，將所測試 17 種馬鈴薯品種 (系) 對於所接種的晚疫病菌感受性分作 5 大群 (圖 4)，僅有一品系呈現抗性表現，其他屬於敏感性及高敏感性。部分基因檢測具抗性之材料尚未進行接種試驗，仍待後續進行接種試驗結果。

七、未來展望

生物個體對外界環境的具體表現的性狀，由基因直接或間接的操控著。隨著分子生物技術的演變，近代次世代基因解序，甚至是表觀基因體學 (epigenetic) 的新進展，提供品種判斷、園藝性狀選別、抗病育種篩選等各領域之運用。利用抗 (感) 病基因分子標誌分群及接種試驗上，可以得到印證。

分子標誌運用在馬鈴薯抗病育種起始於 1998 年，針對抗馬鈴薯病毒 Y (Potato

研究成果

Virus Y) 為標的，檢定 RYSC3 基因標記。繼而開發馬鈴薯黃金線蟲 (*Globodera rostochiensis*)、馬鈴薯包囊線蟲 (*Globodera pallida*)、馬鈴薯病毒 A(Potato Virus A) 以及本篇所探討的晚疫病。馬鈴薯是全球第 4 大的糧食作物，運用廣泛，除了食用之外，還包括

馬鈴薯加工食品、澱粉加工、畜牧飼料等，世界馬鈴薯的面積一直保持在 2,000 萬公頃，近 10 年來，生產區重心逐漸至歐美國家偏轉至亞洲及非洲國家，病蟲害相也隨著栽種區域氣候而改變，利用分子標的選育適當品種，也可加速選育流程。

表四、抗感品種間晚疫病標記的分布

抗病基因座	抗病品種 1/ 抗病品種2	抗病品種 1/ 感病品種	抗病品種2/ 感病品種	抗病品種 1/ 抗病品種2/ 感病品種
R1 (R1F/R)				
R1 (R1-1205)				
R1 (CosA)	◎			
R2 (R2-2500)	◎			
Rpi-blb3 (Th21)				
Rpi-abpt (R2-F1/R2-R3)	◎	◎	◎	◎
R3a (R3-1380)		◎		
R3a (Sha-F/Sha-R)	◎			
R3b (R3bF4/R3bR5)		◎		
R3 family (R3-Clade1-F/R)				
R3 family (R3-Clade2-F/2,3-R)	◎	◎	◎	◎
R3 family (R3-Clade3,4-F/4-R)				
R8 (TG328)				
Rpi-blb1 (RB-629)	◎			
Rpi-blb1 (RB-820)	◎			
Rpi-bt1 (Rpi-bt1-ps)	◎	◎	◎	◎
Rpi-ptal1 (CT88)				
Rpi-sto1 (Ssto-448)	◎			
Rpi-vnt1.1 (T1190)	◎			
Rpi-vnt1.2 (svnt13M5.17)	◎			
Rpi-vnt1.3 (NBS3B)	◎			
Rpi-blb2 (24L)	◎			○
QTL_phu-stn (GP198F/R)	◎			
Rpi-avl1 (N2527)	◎			
Rpi-dlc1 (S1d5-a)	◎			
Rpi-ber1 (Q133)				
Rpi-phu1 (OPB07+TG/GT)	◎	◎	◎	◎
Rpi-cap1 (NI27)	◎			

註：朱映瑞先生為 105/106 年度分發至種苗改良繁殖場服務於繁殖技術課之替代役男，目前為清華大學醫學生物科技博士候選人，該員於本場服役期間，不吝分享其博士研究內容，不僅協助相關公共事務，更發揮其研究精神，時常與同仁討論研究內容，提供多樣的想，擴展試驗研究的廣度與深度。