

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系



碩士論文

Department of Agronomy

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

番茄晚疫病抗病基因座 *qPh2.1* 遺傳特性探討

Genetic characterization of the late blight resistant locus

*qPh2.1* in tomato

梁祐雅

Yu-Ya, Liang

指導教授：陳凱儀 博士

Advisor : Kai-Yi Chen, Ph.D.

中華民國 105 年 1 月

January 2016

## 致謝

像洗了個熱水澡，兩年半的碩士班生涯將走入歷史，回首九百多個日子，感謝一路上幫助我、指引我前進的人們，讓我成做更加勇敢的人。也因為有你們，才有這一點點成果的呈現。

感謝陳凱儀老師的指導讓我成長許多，老師總能以無比的耐心面對我的無知，用寬容看待我製造出的各種災難。在實驗室的日子總是開心的，兩年半以來，絲毫未減損我對科學的喜愛。論文撰寫，是挑戰最大的過程，想起毛毛寫在教師節賀卡上「謝謝老師教我什麼是細心」，不禁莞爾。

感謝農藝系的老師們傾囊相授，讓我對育種世界打開了不同的視野。感謝與口試委員們的討論，讓我能用更全面的觀點看待研究結果。感謝彭雲明老師、華德揚學長，讓我有頭緒面對攤在眼前的一堆數字。

感謝實驗室的大家：亞平學姐、竹茵學姐總是能耐心回答我許多奇奇怪怪的問題；阿修、阿咪、毛毛給我許多無比實際的幫助（無論課業或心理建設）；愛陵學姐願意回覆陌生人的臉書訊息，就此回來教我做實驗；瑋倫、兆平、品堯，以及心與我們同在的子芸，讓我有共同奮鬥的夥伴；隊長佳芸、副隊長依臻，謝謝妳們犧牲自己的苦痛供我建築快樂。

謝謝大學、研究所、籃球隊的同學們，在我需要吃喝玩樂、挑燈夜戰、活動筋骨的時候有人陪伴。謝謝八豆、小皮，讓我回家的每一夜晚都有餘興節目，讓我的身心靈有所依靠；謝謝舒婷在我需要人力支援時，無償擔任我的聲控機械手臂。

感謝母親對知識的態度、對科學的啟蒙，讓我走到今天。抱歉遲了半年，沒能和您一同穿碩士服畢業。感謝弟弟，在我離家求學的十三年來，接手家中的乖小孩角色，也為我分散砲火。最後，由衷感謝父母二十餘載無悔地付出與支持，使我不致匱乏。

一月二十四日 寫於體感溫度零度的台北城

## 中文摘要




本研究室先前的數量性狀基因座遺傳定位研究指出，野生番茄 L3708 (*Solanum pimpinellifolium* L.) 除了在第九對染色體具有晚疫病抗病基因 *Ph-3* 以外，於第二對染色體上亦具有另一個抗病基因 *qPh2.1*。延續先前研究結果，本研究使用與先前研究相同的野生番茄 L3708 與栽培番茄 T3224 雜交族群，以其衍生之自交 F<sub>3:4</sub> 子代為接種材料進行研究。並設定兩個研究目標：(1) *Ph-3* 抗病基因的精確定位；(2) 新抗病基因 *qPh2.1* 對於晚疫病抗病能力的確認，並評估 *qPh2.1* 基因座的遺傳特性。

研究結果指出，*qPh2.1* 確實能賦予番茄對晚疫病之抗性，其抗病對偶基因型相對於感病對偶基因型為隱性。根據番茄全基因體組參照序列 SL2.5，本研究將 *Ph-3* 抗病基因定位於番茄第九對染色體鹼基序列 71,356,855 bp 至 71,501,998 bp 區間；*qPh2.1* 則被定位於番茄第二對染色體鹼基序列 28,042,265 bp 的前方染色體區域。

關鍵字詞：番茄、晚疫病、抗病基因、*Ph-3*、*qPh2.1*。

## Abstract



Our previous QTL mapping study showed that the wild tomato accession L3708 (*Solanum pimpinellifolium* L.) harbors a new late blight resistant gene *qPh2.1* on chromosome 2, in addition to the *Ph-3* gene on chromosome 9. The aims of present study were as following: (1) *Ph-3* fine mapping; (2) genetic characterization of the resistance of *qPh2.1*. In the current study, the *qPh2.1* resistance to late blight disease was validated and characterized using isogenic lines derived from the previous F<sub>2:3</sub> genetic mapping population which was generated using L3708 as the resistant parent. Our results indicated that the resistant allele of *qPh2.1* was recessive to the susceptible allele. The *qPh-3* gene was delimited in the region between 71,356,855 bp to 71,501,998 bp; and the *qPh2.1* gene was delimited in the chromosomal region ahead of 28,042,265 bp on chromosome 2, according to the tomato SL 2.5 genomic reference sequences.

Keywords: Tomato, late blight, resistant gene, *Ph-3*, *qPh2.1*.

# 目錄



致謝.....	i
中文摘要.....	ii
Abstract.....	iii
目錄.....	iv
圖目錄.....	v
表目錄.....	vi
第一章 前言.....	1
第一節 晚疫病簡介.....	1
第二節 晚疫病抗病基因之研究.....	2
第三節 本研究室先前的相關研究.....	4
第二章 研究目的與研究策略.....	6
第三章 材料與方法.....	7
第一節 試驗材料.....	7
第二節 病原菌材料與病徵評估.....	12
第三節 DNA 抽取.....	14
第四節 分子標記設計與基因型定型 (genotyping) .....	15
第四章 結果與討論.....	19
第一節 病原菌生理小種之界定.....	19
第二節 <i>Ph-3</i> 之精確定位 (fine mapping) .....	19
第三節 <i>qPh2.1</i> 抗病能力 .....	21
第四節 <i>qPh2.1</i> 為隱性抗病基因 .....	22
第五節 <i>qPh2.1</i> 之精確定位 .....	24
第六節 番茄第二對染色體重組率分析.....	25
第五章 結論.....	26
引用文獻.....	27
附錄.....	40

## 圖目錄

圖一、 <i>Ph-3</i> 精確定位.....	30
圖二、進行 <i>qPh2.1</i> 基因座遺傳特性研究所選用的五個 F <sub>2</sub> 單株於第二對染色體 之基因型示意圖.....	31
圖三、 <i>Ph-3</i> 區間與前人研究定位之區間比較.....	32


## 表目錄

表一、CAPS 分子標記資訊.....	33
表二、保存之晚疫病菌株重新使用鑑別品種檢定致病力的結果.....	36
表三、接種 <i>Ph-3</i> 與 <i>qPh2.1</i> 不同基因型組合植株所呈現之病徵等級 .....	37
表四、探討 <i>qPh2.1</i> 遺傳特性以三個家系六次接種試驗結果之變方分析 .....	38
表五、六次試驗接種三個 <i>qPh2.1</i> 重組家系不同基因型呈現之病徵等級 .....	39



## 第一章 前言

### 第一節 晚疫病簡介



晚疫病 (late blight) 係由卵菌綱 (Oomycota) 病原菌 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 所引起之病害，對全世界番茄與馬鈴薯的栽培皆具有嚴重威脅。晚疫病與番茄、馬鈴薯同樣起源於中南美洲，隨著番茄、馬鈴薯的傳播而散布全世界 (Vleeshouwers et al., 2011)。晚疫病最早的田間紀錄是在 1843 年的紐約，根據紀載，病原菌於 1845 年隨著馬鈴薯船運抵達比利時，隨後即擴散到歐洲 (Agrios, 2005)。歷史上晚疫病最著名之危害發生於 1845 至 1850 年間的愛爾蘭，由於當時馬鈴薯主要栽培品種的高感病性，使晚疫病大規模蔓延造成嚴重飢荒，進而導致一百萬人死亡，及大量人口遷移。而晚疫病在番茄栽培上的危害也不容小覷，以 2009 年為例，單在美國晚疫病就造成番茄產值五千六百萬美元損失 (Nowicki et al., 2011)。

*P. infestans* 屬於半活體營養 (hemibiotrophic) 之病原菌，生活史可以分為活體營養 (biotrophic) 與死體營養 (necrotrophic) 二時期。前者為感染前期，由於 *P. infestans* 分泌 effector 抑制寄主植物細胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD)，或其他相應防禦機制，因此活體營養時期寄主植物未有病徵出現 (asymptomatic)。待 *P. infestans* 已在寄主植物體內廣泛擴散後，才會分泌其他蛋白調控病徵進程，促使寄主細胞死亡，進入死體營養期 (Lee and Rose, 2010)。在死體營養期，*P. infestans* 菌絲會伸出植物體產生孢子囊，而 *P. infestans* 的繁衍主要就是由孢子囊，或孢子囊內原生質所分化的游走孢子 (zoospores) 行無性繁殖。當游走孢子、孢子囊接觸到植物體後，在適當的環境下會在葉片表面萌芽，將感染胞 (infection vesicle) 穿入植物體，接著，在細胞內利用吸器 (haustorium) 吸收植物體養分，最後再次形成孢子囊伸出植物體，同時藉著水、風或植物體散播孢子 (Agrios, 2005)。晚疫病的病徵是葉面呈現如滾水燙傷狀、無明顯邊緣輪廓的



深色壞疽病斑，隨後，壞疽病斑便會迅速從葉片蔓延全株，感染地上部各器官，嚴重時可造成植株死亡。

晚疫病在臺灣，早在 1908 年即有記載 (蔡等, 2009)，但因 *P. infestans* 喜好冷涼、潮濕氣候，而臺灣地處亞熱帶氣候，加上國內主要番茄栽培地，例如：南投、高雄、台南等地冬季氣候皆較乾燥，不利 *P. infestans* 大規模擴散。再者，*P. infestans* 屬於異宗配合 (heterothallic) 病原菌，通常以孢子囊、游走孢子進行無性繁殖，無法發生遺傳變異；至於有性生殖，則是需要藉由 A1、A2 二種配對型 (mating type) 結合產生，而臺灣僅有 A1 配對型，故長久以來並未造成嚴重影響。然而，1998 年國內晚疫病菌系發生劇變，原本的 US-1 菌系為毒力較強 (more aggressive) 的 US-11 菌系取代。新的菌系對環境的適應性高，例如：新菌可以耐 28-29°C 的高溫，舊菌系最高只能耐 25-26°C；且新菌系生長速率較舊菌系快。此外，新菌系對部分殺菌劑亦產生抗藥性，如：滅達樂。此後，晚疫病開始對臺灣的番茄、馬鈴薯栽培生產，造成極大危害 (鄭, 2001)。

番茄晚疫病的病害管理策略，多以施用滅達樂、依得利等殺菌劑，或是亞磷酸溶液為主 (蔡等, 2009)。但以殺菌劑為主的田間管理方式，實非釜底抽薪之計。除了對環境不友善、農藥殘留等問題以外，隨著病原菌對殺菌劑產生抗藥性，也會使殺菌劑的功用逐漸失效，因此，最理想的病害管理策略是抗病品種的使用，並配合其他防治措施進行綜合防治。

## 第二節 晚疫病抗病基因之研究

植物的抗病機制可分為二大類型：對生理小種專一性抗病 (race specific resistance)，以及對生理小種非專一性抗病 (race non-specific resistance)。目前番茄晚疫病抗病基因的研究，仍以專一性抗病為主。

根據 gene-for-gene 理論 (Flor, 1971)，抗病基因對病原菌具有專一性，唯有抗病基因 (R 基因) 對應到特定病原菌非致病基因 (avirulence gene) 時，才能產

生抗病反應。此專一性的辨識，係來自 R 基因的蛋白產物，具有作為專一辨識病原菌分泌物質的受體 (receptor) 的功能 (Keen, 1990; Tao et al., 2000)。而非專一性的抗病機制通常是由多個抗病基因控制，包含不同抗病機制，藉由調控植物分泌抗病物質機制，或產生防禦性結構之過程，抵禦病原菌入侵 (Agrios, 2005)。因此，非專一性抗病多為延緩病徵發展速度，或是減緩田間疾病傳播速度；而非如同專一性抗病，能直接辨識病原菌入侵，進而開啟防禦機制。

根據過去針對番茄晚疫病的研究，已經有數個野生番茄的抗病基因為人所知。第一個發現的抗病基因 *Ph-1*，來自於 West Virginia 19、West Virginia 713 (*S. pimpinellifolium*)，位於番茄第七對染色體，*Ph-1* 為顯性 (dominant) 抗病基因，能抵禦 race T0 的 *P. infestans*。*Ph-1* 已經被導入栽培番茄中 (Peirce, 1971)，但隨著病原菌的演化，*Ph-1* 抗病基因逐漸失效。研究者自野生番茄 West Virginia 700 (*S. pimpinellifolium*) 發現新抗病基因 *Ph-2*。*Ph-2* 被定位於番茄第十對染色體長臂，是不完全顯性 (incomplete dominant) 的抗病基因 (Moreau et al., 1998; Zhang et al., 2014)。*Ph-2* 對 *P. infestans* 僅具部分抗性 (partial resistance)，亦即只能延緩病徵發展速度，而非阻斷晚疫病的發生，且 *Ph-2* 基因對毒力較強的生理小種多不具抵抗能力 (Nowicki et al., 2011)。然而，無論是 *Ph-1* 或是 *Ph-2*，皆無法完全抵抗部分亞洲國家的病原菌，例如：尼泊爾、印度、臺灣、菲律賓 (Chunwongse et al., 2002)。

研究者在野生番茄 L3708 (*S. pimpinellifolium*) 中發現新的抗病基因 *Ph-3* (Black et al., 1996, Chunwongse et al., 2002)，而此抗病基因能夠有效抵禦前述亞洲各國之病原菌。研究者以 CLN567 (*Solanum lycopersicum*) 與 L3708 雜交建立 F<sub>2</sub> mapping population，利用 RFLP 分子標記 (molecular marker) 建立連鎖圖譜 (linkage map)。並以在臺灣蒐集之 Pi16 菌系進行接種，此 Pi16 菌系能使攜帶 *Ph-1*、*Ph-2* 抗病基因之植株感病。研究結果指出，*Ph-3* 為專一性抗病之不完全顯性抗病基因，並被定位於第九對染色體長臂，接近 RFLP 分子標記 TG591A 處

(Chunwongse et al., 2002)。1998 年亞蔬 (AVRDC- The World Vegetable Center) 將此抗病基因導入栽培番茄，育成具 *Ph-3* 基因的抗病品種 CLN2037B (AVRDC., 1998)。

除了上述抗病基因以外，研究者從野生番茄 PSLP153 (*S. pimpinellifolium*) 中發現位於第一對染色體的抗病基因 *Ph-5-1* (Foolad et al., 2006)；以及從抗病種源 PI270443 中，發現位於第十對染色體的抗病基因 *Ph-5-2* (Merk and Foolad, 2012)。此外，野生番茄 LA1033 (*S. habrochaites*) 也被認為攜帶兩個晚疫病的抗病基因 (Lough and Gardner, 2000)。

至於非專一性抗病基因，則有來自野生番茄 LA2099 (*S. habrochaites*) 的 *lb4*、*lb5b*、*lb11b* (Brouwer and Clair, 2003; Nowicki et al., 2011)。以及野生番茄 LA1777 (*S. habrochaites*) 所攜帶的 *Rlbhq4a*、*Rlbhq4b*、*Rlbhq7*、*Rlbhq8*、*Rlbhq12* (Li et al., 2011)。

### 第三節 本研究室先前的相關研究

本研究室於 2010 年開始，與亞蔬及農友種苗公司合作，重新評估野生番茄 L3708 對於晚疫病的抗病性。使用野生番茄 L3708 與不攜帶晚疫病抗病基因之臺灣栽培番茄 T3224 (*S. lycopersicum*) 雜交，產生 F<sub>2</sub> 子代作為遺傳定位族群 (mapping population)，再利用 120 個 F<sub>2</sub> 子代的基因型與衍生之 F<sub>2:3</sub> 子代的病徵外表型進行抗病基因座的遺傳定位分析。基因型的資料包含 45 個 VeraCode SNP 分子標記及 395 個 RAD (restriction site associated DNA) 分子標記。這 440 個分子標記均勻散佈於番茄十二對染色體上，平均每 3.56 cM 有一個分子標記。各個 F<sub>2:3</sub> 家系的病徵外表型則是分別接種自臺灣本地蒐集的兩種晚疫病菌株：Pi39A 與 Pi733 後，取得的感病程度外表型資料。Pi39A 屬於毒力較弱的 US-1 菌系 (clonal lineage)，經過鑑別品種試驗確認為生理小種 (race) T 1；Pi733 則屬於毒力較強之 US-11 菌系，生理小種則為 T 1, 2, 5 (Chen et al., 2014)。

該研究的數量性狀基因座遺傳定位 (QTL mapping) 結果指出，當接種毒力較弱的 Pi39A 時，在第九對染色體末端，介於染色體鹼基序列 66,536,154 bp 至 67,494,653 bp 間存在一抗病基因，此區間與前人研究中 *Ph-3* 抗病基因所在之 TG591A 位置吻合 (Chunwongse et al., 2002; Zhang et al., 2013; Chen et al., 2014)。然而，當接種毒力較強的 Pi733 菌株時，除了 *Ph-3* 基因以外，也在第二對染色體短臂處，發現一個能抵抗 Pi733 的新抗病基因 *qPh2.1* (Chen et al., 2014)。

## 第二章 研究目的與研究策略

本研究係延續先前晚疫病抗病基因遺傳定位的成果，設定兩個目標：(1) *Ph-3* 抗病基因的精確定位 (fine mapping)；(2) 新抗病基因 *qPh2.1* 對於晚疫病抗病能力的確認，並評估 *qPh2.1* 基因座的遺傳特性。

精確定位係利用染色體發生互換 (crossing over) 的原理進行，於候選基因區間設計數個分子標記，確認個體的重組區間後，再對應其病徵等級。亦即，比較抗病與感病個體之基因型差異，即可推測出抗病基因位置。本研究利用野生番茄 L3708 與栽培番茄 T3224 雜交之 F<sub>2:3</sub> 與 F<sub>3:4</sub> 子代，依據前述數量性狀基因座精確定位的原理，推斷出 *Ph-3* 與 *qPh2.1* 抗病基因的位置。此外，由於 *Ph-3* 為抗病能力極強之抗病基因，為避免基因上位性影響 *qPh2.1* 之表現，*qPh2.1* 之抗病能力評估是將 *Ph-3* 抗病對偶基因型排除後進行。

### 第三章 材料與方法

#### 第一節 試驗材料



所有番茄種子均播種於直徑 4.5 公分、深度 3.5 公分之塑膠穴盤，以根基旺 3 號栽培介質培養於 25°C/20°C (日溫/夜溫)、日照 14 小時之生長箱中。自種子萌芽後的栽培期間，每 10 日施肥一次 (花寶 5 號，N:P:K = 30: 10: 10)。進行晚疫病原菌接種的幼苗，於播種後 28 至 35 天，自生長箱中移出接種病原菌。以採收種子為目的之植株，則在萌芽三週後移入八吋塑膠花盆 (根基旺 2 號:泥炭土= 1: 1)，種植於 25°C/20°C (日溫/夜溫)、自然光照之人工氣候室。

番茄幼苗於晚疫病原菌接種完成後，立即移入攝氏 20 度、相對濕度 100%、完全黑暗的生長箱中，放置 24 小時。爾後，再將生長箱環境調整為攝氏 20 度、相對濕度 75%、每日光照 14 小時的生長環境。於病原菌接種後約 8-12 天，再進行病徵評估。所有接種試驗均包含三次重複，以隨機完全區集設計 (RCBD) 進行試驗。

依試驗目的不同，將試驗材料分為四類別如下：

#### 1. 鑑別品種 (differential host) 試驗

接種試驗進行前，為區別晚疫病菌之生理小種 (race) 類型；確保長期於甘油中保存之病原菌仍有致病力；並確認抗病親本所攜帶之抗病基因確實能抵抗病原菌。故必須先針對晚疫病菌進行鑑別寄主檢測，才能將病原菌於後續研究中使用。鑑別品種試驗，包含感病品種 TS-19 (*S. lycopersicum* accession L6160)、攜帶 *Ph-1* 抗病基因之 TS-33 (*S. lycopersicum* accession L6161)、攜帶 *Ph-2* 抗病基因之 WV700 (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* accession L6193)、攜帶 *Ph-3* 抗病基因之 CLN2037B (*S. lycopersicum* accession AVTO9808)、攜帶 *Ph-3* 及 *Ph-4* 抗病基因之 L3708 (*S. pimpinellifolium* accession L3708)，以及攜帶 *Ph-5* 抗病基因之 LA1033

(*S. habrochaites* accession LVI60017) 等六個取得自亞蔬的品種或收集系 (accession) 作為鑑別寄主。



## 2. 晚疫病抗病基因 *Ph-3* 精確定位

使用八個特定的  $F_2$  單株：KY-126、KY-127、KY-176、KY-214、KY-251、KY-317、KY-324、KY-354，所衍生的  $F_{2:3}$  家系作為試驗的起始材料。這些  $F_2$  單株為先前數量性狀基因座遺傳定位族群中的個體，由野生型番茄 L3708 (*Solanum pimpinellifolium*) 作為抗病親本，與感病親本栽培種番茄 T3224 (*Solanum lycopersicum*) 雜交產生 (Chen *et al.*, 2014)。這八個  $F_2$  單株皆於 *Ph-3* 基因座所在的染色體區間內 (分子標記 TG591 至 CT220a 之間)，於不同位置發生一次染色體重組的植株 (圖一)。且於 TG591 或 CT220a 其中一端已固定為感病基因型同型結合，另一端為異型結合。

本研究自成功發芽的 22 株 KY-126、19 株 KY-127、16 株 KY-176、24 株 KY-214、17 株 KY-251、20 株 KY-317、20 株 KY-324、20 株 KY-354、69 株 KY-202，共 227 株  $F_{2:3}$  子代中，對各家系於 *Ph-3* 基因座區間原為異型結合基因型的一端，以分子標記 TG591 或 CT220a，篩選出感病同型結合與抗病同型結合兩種基因型的個體。例如： $F_2$  單株 KY-251 於 CT220a 端為感病同型結合，於 TG591 端為異型結合，因此以 TG591 篩選其  $F_{2:3}$  子代，選出 TG591 處為感病同型結合，以及抗病同型結合兩種基因型之個體。被選出一端為抗病同型結合，另一端為感病同型結合的個體，自交後收取  $F_{3:4}$  種子進行接種試驗。區間兩端皆為感病基因型同型結合的個體則作為試驗對照組。

接種試驗所使用之  $F_{3:4}$  植株，源自各家系中相同基因型的  $F_3$  單株 (附錄表一)，收取各 50 顆自交種子混合 (bulk)，每次再選出 12 顆進行接種試驗。混合不同單株種子之目的，在於消弭遺傳背景差異。由於試驗材料並非高世代之重組自交系，不同個體的遺傳背景除了 *Ph-3* 基因座之外，多數仍為分離之區域。因

此，若植株外表型符合 *Ph-3* 基因座之基因型，即能推定其餘持續分離之遺傳背景對此性狀未構成顯著影響。



### 3. *qPh2.1* 基因晚疫病抗病能力研究

根據前人研究的基因型定型結果，已知 F<sub>2</sub> 單株 KY-202 於 *Ph-3* 及 *qPh2.1* 基因座皆為異型結合，因而選擇以 F<sub>2</sub> 單株 KY-202 所衍生的 F<sub>2:3</sub> 家系作為試驗的起始材料。自 69 株 KY-202 F<sub>2:3</sub> 子代中，分別使用與 *qPh2.1* 基因座連鎖的 TPH221 與 TPH252 CAPS 分子標記，以及與 *Ph-3* 基因座連鎖的 TG591 與 CT220a CAPS 分子標記進行基因型定型。當與個別基因座連鎖的兩個分子標記之基因型定型結果皆為相同基因型時，即推定該基因座為同型結合。篩選出兩基因座均為同型結合個體，亦即 *Ph-3* 與 *qPh2.1* 兩個基因座的基因型分別為 AA、AB、BA、與 BB 四種同型結合基因型。(前述的基因型代號，A 表示與抗病親本 L3708 相同之同型結合基因型；B 表示與感病親本 T3224 相同之同型結合基因型。AA 表示二基因座皆為抗病同型結合；AB 表示 *Ph-3* 基因座為抗病同型結合，*qPh2.1* 基因座為感病同型結合；BA 表示 *qPh2.1* 基因座為抗病同型結合，*Ph-3* 基因座為感病同型結合；BB 則表示二基因座皆為感病同型結合。) 這四種基因型組合的 F<sub>3</sub> 植株保留作為親本，自交產生 F<sub>4</sub> 種子。將相同基因型單株之自交種子各取 50 顆種子混合 (附錄表一)，隨機取出 12 顆種子發芽為幼苗，然後進行接種試驗。

KY-202 於 *Ph-3* 基因座係以分子標記 TG591 與 CT220a 篩選，然而第一部分 *Ph-3* 精確定位結果指出，*Ph-3* 位於 71,356,855 bp 至 71,501,998 bp 區間，距離原先篩選所用的 CT220a 有 546 kb。為確認以 TG591 與 CT220a 所選出之個體是否確實攜帶 *Ph-3* 基因，因此再以 TG591 上方之分子標記 TG328 確認所選植株 *Ph-3* 為抗病同型結合基因型。

KY-202 於 *qPh2.1* 基因座是以 TPH221 與 TPH252 CAPS 分子標記篩選，選出兩個分子標記皆為抗病同型結合者。然而，開始定位 *qPh2.1* 基因座後，以陸續新設計出的分子標記 TPH31-2、TPH22-1、TPH14-1、TPH13-1、TPH0-1 等位



於 TPH221 以上之分子標記，再度確認所選植株於 *qPh2.1* 之基因型時，發現 KY-202AA 於 TPH221 以上之基因型皆為異型結合。因此，本次研究中，並未對兩抗病基因同時存在時的堆疊效應 (pyramiding) 進行探討。



#### 4. 探討 *qPh2.1* 基因遺傳特性

此部分研究所使用之試驗材料，同樣由野生型番茄 L3708 (*S. pimpinellifolium*) 作為抗病親本，與感病親本栽培種番茄 T3224 雜交 F<sub>2</sub> 族群產生。為避免 *qPh2.1* 抗病能力試驗受 *Ph-3* 干擾，故試驗材料遺傳背景中必須先排除 *Ph-3* 抗病基因。根據前人研究的基因型定型結果，選擇 *Ph-3*、*qPh2.1* 基因座區間均為異型結合，且於第二對染色體前端有發生重組的四個 F<sub>2</sub> 單株 KY-98、KY-290、KY-299、KY-300，以這四個家系所衍生之 F<sub>2:3</sub> 種子作為試驗的起始材料。這四個家系於第二對染色體前端發生重組的位置皆位於 35.6 Mb 以上，是前人研究所推測之低遺傳重組率的異質染色體 (heterochromatin) 區域 (Sim et al. 2012)。

進行病原菌接種試驗的遺傳材料篩選步驟如下：首先於 F<sub>2:3</sub> 世代以分子標記篩選出 *Ph-3* 基因座為感病同型結合者，再以符合四個家系不同重組區間的分子標記，篩選出 *qPh2.1* 基因座為異型結合基因型的單株大量繁殖自交種子。KY-98 家系以分子標記 TG328、TG591 判定 *Ph-3* 基因座之基因型；KY-290、KY-299、KY-300 則以 TaqMan 分子標記篩選 (詳情請見以下第四.2 節)。各個家系選擇篩選 *qPh2.1* 基因座的分子標記並不相同 (表一)，細節如下所述：

(一) KY-98 家系於 34,649,212 bp 與 34,835,503 bp 間發生重組，34,835,503 bp 以下為抗病同型結合，於 34,649,212 bp 以上為異型結合 (圖二)。因此，以位於 34,649,212 bp 以上的分子標記 TPH221 與 TPH30-1 篩選其基因型。當兩個分子標記皆為異型結合時，即認定該個體於 *qPh2.1* 基因座為異型結合。(二) KY-290 家系於 26,995,285 bp 與 28,909,479 bp 間發生重組，28,909,479 bp 以下為抗病同型結合，於 26,995,285 bp 以上為異型結合。因此，以位於 26,995,285 bp 以上之分子標記 TPH26-1 篩選其基因型。(三) KY-299 家系於 30,988,124 bp 與

31,053,388 bp 間生重組，30,988,124 bp 以上為感病同型結合，於 31,053,388 bp 以下為異型結合。因此，以位於 31,053,388 bp 以下之分子標記 TPH31-2 篩選其基因型。(四) KY-300 家系於 29,463,028 bp 與 30,572,331 bp 間發生重組，30,572,331 bp 以下為抗病同型結合，於 29,463,028 bp 以上為異型結合。因此以位於 30,572,331 bp 以上之分子標記 TPH30-2 與 TPH26-1 篩選。當兩個分子標記皆為異型結合時，即認定該個體於 *qPh2.1* 基因座為異型結合。

本研究自 60 株 KY-98、60 株 KY-290、60 株 KY-299、60 株 KY-300，共 240 株 F<sub>3</sub> 子代中，分別篩選出用於採收種子的植株如下：(一) KY-98 選出 KY-98-7、KY-98-21、KY-98-28、KY-98-46 及 KY-98-58 共 5 株 F<sub>3</sub>。(二) KY-290 選出 KY-290-17、KY-290-27、KY-290-29 及 KY-290-34 共 4 株 F<sub>3</sub>。(三) KY-299 選出 KY-299-21、KY-299-29 及 KY-299-59 共 3 株 F<sub>3</sub>。(四) KY-300 選出 KY-300-15、KY-300-32、KY-300-47、KY-300-48 及 KY-300-49，共 5 株 F<sub>3</sub>。由於 KY-299 家系所選出的植株開花時間較遲，無法及時收取種子，因此最後並未併入本次試驗。

篩選出 *Ph-3* 為感病同型結合基因型，且 *qPh2.1* 為異型結合基因型的單株後，大量繁殖自交種子，最後以 F<sub>4</sub> 種子進行接種試驗。自交後收取的 F<sub>3:4</sub> 種子先分別保存，每次接種試驗的 48 顆種子則平均取自個別選出的 F<sub>3</sub> 單株。例如：KY-290 接種的 48 顆種子，來自 4 株選出的 F<sub>3</sub> 植株，每株取 12 顆 F<sub>3:4</sub> 種子。

以 F<sub>4</sub> 種子進行接種，接種前先以分子標記對各單株進行 *qPh2.1* 區間之基因型定型，再將各單株之基因型與其接種後之病徵等級進行對照。各家系於 F<sub>4</sub> 世代使用之分子標記如下：(一) KY-98 使用 TPH0-1、TPH14-1 及 TPH28-2 三個分子標記；(二) KY-290 使用 TPH0-1 及 TPH27-1 兩個分子標記；(三) KY-300 使用 TPH0-1 及 TPH28-2 兩個分子標記。當分子標記皆為相同基因型時，即推定該個體於 *qPh2.1* 區間之基因型。

由於選出的 F<sub>3</sub> 個體於 *qPh2.1* 區間為異型結合，因此 F<sub>4</sub> 種子中，可能的基因型有三種：(一) 與 L3708 遺傳背景相同之同型合子 (基因型代號 A)；(二) 與

T3224 遺傳背景相同之同型合子 (基因型代號 B)；(三) 異型結合 (基因型代號 H)。故本批材料除能進行 *qPh2.1* 顯隱性檢測，同時亦能藉由不同個體重組區間之差異，進而確認晚疫病抗病基因座 *qPh2.1* 在染色體上的區間位置。

此部分的試驗，以三個不同的 F<sub>2</sub> 家系為單位，總共進行六次接種試驗，分別為：KY-98 進行一次接種、KY-300 進行二次接種、KY-290 進行三次接種 (附表六)。每次接種共有 F<sub>3:4</sub> 試驗植株 48 株，及抗病與感病對照組各 6 株。接種前即以分子標記判定各試驗單株於 *qPh2.1* 區間之基因型，再結合各單株接種後之病徵等級進行分析。進行統計分析時，僅使用所有分子標記之基因型皆定型成功，且具有病徵等級調查結果的個體。在進行基因型定型的過程中，發現由 KY-290 家系選出之 F<sub>3</sub> 單株 KY-290-17 在分子標記 TPH30-1 的基因型並非預期的抗病基因型 A，而是異型結合基因型 H，因而推論由此 F<sub>3</sub> 單株所衍生的 F<sub>4</sub> 植株可能是經過混雜的種子，不屬於 KY-290 家系，因而在後續的統計分析也予以排除。最終進行統計分析的植株數分別為：KY-98 一次試驗共 26 株；KY-290 的三次試驗分別為 26、30、與 34 株；KY-300 的二次試驗分別為 22 與 37 株 (附表六)。

## 第二節 病原菌材料與病徵評估

### 1. 病原菌材料

本研究使用的晚疫病病原 *Phytophthora infestans* Pi39A 菌株以及 Pi733 菌株，皆由亞蔬植物病理組王肇芬博士於 2011 年提供。Pi39A 為亞蔬於 1997 年於臺灣台南收集，屬於毒力 (aggressive) 較弱的 US-1 clonal lineage。而 Pi733 為亞蔬於 2007 年於臺灣南投收集，屬於毒力較強的 US-11 clonal lineage。

晚疫病病原菌培養參考亞蔬使用之方法 (Chen et al., 2009)，詳述如下：晚疫病病原菌培養於裝有 rye A 洋菜膠培養基之直徑 9 公分之塑膠培養皿 (每公升 rye A 洋菜膠培養基含：黑麥 60 g、蔗糖 20 g、洋菜膠 12 g，pH 值大於 5.5)，置

於 16°C 生長箱中黑暗培養。接種用的晚疫病菌則於接種前 14 天，取有活力之菌絲培養於 rye A 洋菜膠培養基。接種前必須先製備孢子囊懸浮液，製備方法為：(一) 將 10-15 ml 10°C 無菌水倒入長滿菌絲的培養基中。(二) 以 L 型玻璃棒刮下菌絲，連同培養皿中液體，倒入燒杯。(三) 再以雙層紗布過濾菌絲，即獲得孢子囊懸浮液。為控制接種條件一致，每次製備之孢子囊懸浮液，皆以顯微鏡與細胞計數器計算懸浮液中的孢子囊數，將孢子囊懸浮液濃度調整為  $5 \times 10^4$  個孢子囊/ml。最後，將此懸浮液置於 10°C 黑暗中培養 2-3 小時，靜待游走孢子 (zoospore) 釋出，即可用於晚疫病接種。

晚疫病接種，以 2 匹馬力之空氣壓縮機，銜接上壺式油漆噴槍進行。將黑暗培養後之孢子囊懸浮液均勻搖動後，倒入油漆噴槍儲存壺中，調整噴氣壓力、水霧程度至適當大小 (初噴地面呈濛霧狀而不濕)，再將孢子囊懸浮液均勻噴灑植株，即完成晚疫病接種。

## 2. 病徵評估

接種後的植株，根據亞蔬所設定的植株病徵等級 (Disease severity rating, DSR) 進行病徵評估 (Chen et al., 2009)。病徵等級分為 0-6 共七個等級 (附錄圖一)：等級 0 表示無任何病徵；等級 1 表示葉片面積 5 % 被感染、具有小型葉面病斑 (小於 2 mm)、莖部無病斑；等級 2 表示葉片面積 6-15 % 被感染、有局部壞疽葉面病斑、莖部無病斑；等級 3 表示葉片面積 16-30 % 被感染、且葉面病斑有接合的現象、莖部極輕微病斑 (但無水浸狀)；等級 4 表示葉片面積 31-60 % 被感染、葉面病斑邊緣有擴大的跡象、莖部有病斑 (大於 5 mm)；等級 5 表示葉片面積 61-90 % 被感染、葉面病斑乾化、莖部邊緣擴大的病斑；等級 6 表示葉片面積 91-100 % 被感染、葉面枯萎、廣泛的莖部損害，甚至植株死亡。病徵評估時機，是當感病對照品種 TS-19 達到病徵等級 6 時進行，本研究每次接種的病徵評估約是在接種後 8-12 天。

### 第三節 DNA 抽取



番茄 DNA 係以 CTAB 方式抽取 (Fulton *et al.*, 1995; Murray and Thompson, 1980)。萃取液配製與 DNA 抽取流程如下：

#### 1. 試劑配製

##### (1) DNA extraction buffer

稱量 Sorbitol (Sigma S-6021) 31.9 g、Tris.base (Tris aminomethane, Trizma<sup>R</sup>, Sigma T-1503) 6.1 g、EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt, Sigma E-5134) 0.93 g，加入二次蒸餾水至近 500 ml，以濃鹽酸調整 pH 值至 8.26，最後再將溶液體積補滿至 500 ml。

##### (2) Nuclei lysis buffer

每 500 ml Nuclei lysis buffer 含有：1M Tris (121.1g/L) 100 ml、0.25 M EDTA (sodium salt, 84.05 g/L) 100 ml、5 M NaCl (292.2 g/L, Sigma S-3014) 200 ml、CTAB (Hexaecyl trimetyl ammonium bromide, Sigma H-9151) 10 g、二次蒸餾水 100 ml。

將混和溶液以磁石攪拌器攪拌，待 CTAB 完全溶解後，再以濃鹽酸調整 pH 值至 7.5。

##### (3) Sarkosyl solution

每 500 ml 二次蒸餾水中，加入 25 g N-lauroylsarcosine sodium salt (Sigma, L-9150)，均勻混合。

##### (4) TE buffer

每 50 ml TE buffer 含有：1M Tris (121.1g/L) 0.5 ml、0.25M EDTA (sodium salt, 84.5g/L) 0.2 ml、二次蒸餾水 49.3 ml。

#### 2. DNA 抽取流程

##### (1) 葉片均質化

取 2-3 片番茄幼葉置入 1.5  $\mu$ L 微離心管中，加入二粒直徑 3 mm 鋼珠；加入 600  $\mu$ L 萃取液 (sodium bisulfate 114 mg 充分溶解於 12.5 ml DNA extraction buffer，再加入 nuclei lysis buffer 12.5 ml、5% Sarkosyl 5 ml)，以均質機 Tissue Lyser (QIAGEN, Hilden, Germany) 將葉片均質磨碎。再將混合的均質液，置於 65°C 水浴槽 30 分鐘。

#### (2) 去除雜質

靜置後，將樣品移至抽氣通風櫃，在每個樣品中加入 0.6 ml 氯仿混合液 (chloroform: isoamyl alcohol= 24:1)。蓋緊微離心管後，劇烈翻轉樣品 100 次，使氯仿混合液與葉片均質液均勻混合。以 10,000 rpm 將樣品離心 5 分鐘，再吸取上清液至新的微離心管。

#### (3) DNA 沉澱

在每個樣品中，加入等體積 (0.5 ml) 之異丙醇 (isopropanol)，輕輕翻轉微離心管 2-3 次，使上清液與異丙醇均勻混合，再以 10,000 rpm 將樣品離心 5 分鐘。離心後，即可看見 DNA 沉澱於微離心管底部。倒出微離心管中溶液，加入 0.2 ml 70% 酒精，再以 10,000 rpm 將樣品離心 5 分鐘。將酒精倒出後，靜置微離心管 60 分鐘，使管內多餘液體揮發。

最後，加入 0.1 ml TE buffer，放入 4°C 保存。

## 第四節 分子標記設計與基因型定型 (genotyping)

### 1. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) 分子標記

本實驗室過去已針對野生型番茄 L3708、栽培種番茄 T3224 利用次世代核酸定序技術進行全基因體組重新定序，並由這些定序資料使用 CLC Genomics Workbench 軟體，對照番茄全基因體組參照序列 SL2.5，找出 L3708 與 T3224 間具多型性 (polymorphism)、且有限制酶酵素切位處，藉以設計 CAPS 分子標記。

本研究於第二對染色體基因體組序列 0 Mb 至 33 Mb 之間，開發 53 個 CAPS 分子標記，並自其中選出 35 個判別效果較佳者，作為篩選第二對染色體重組區間使用 (表一)。


CAPS 分子標記的設計原則如下：首先找出兩親本在目標染色體區間具有單核苷多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的位置，並且從中篩選出能造成特定限制酶切割與否的 SNP 位置。將 SNP 位點兩側各 500 bp 的核酸序列輸入至 Primer 3 引子設計網頁 (version 0.4.0; <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)，設計出跨越此 SNP 位置之 PCR 正反向核酸引子。得到引子序列後，再將序列 BLAST 到 SOL Genomics Network Website (<https://solgenomics.net/>)，確認此組引子於基因體中除了目標片段以外，並無其他相同片段存在，確保基因型定型結果無混淆之虞。

*Ph-3* 與 *qPh2.1* 的研究，均使用 CAPS 分子標記針對植株進行基因型分析及篩選。在 *Ph-3* 基因精確定位的研究中，使用前人研究所設計的 3 個 CAPS 分子標記 TG328、TG591 與 CT220a (Chen et al., 2014)。而使用於 *qPh2.1* 基因座遺傳特性研究的 35 個分子標記 (表一)，則均勻散布於鹼基序列 2816 bp 至 37 Mb 區間，平均每 1.5 Mb 有一個分子標記。

以 CAPS 分子標記進行基因型分析的 PCR 反應中包含：10  $\mu$ L 2X PCR master mix (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)、DNA 1  $\mu$ L、目標引子 (forward/ reverse primers) 1  $\mu$ L、二次蒸餾水 8  $\mu$ L。反應完成後，取 1  $\mu$ L 的 PCR 產物按比例與限制酶酵素、緩衝液進行酵素剪切反應。最後，以 1.5% agarose 電泳分析。

## 2. TaqMan 分子標記

此分子標記主要於篩選大量個體時使用，目的為選出 *qPh2.1* 為異型結合，且 *Ph-3* 基因座為感病對偶基因同型結合基因型之植株。TaqMan 分子標記之設計，係本於 *Ph-3* 基因精確定位結果，利用 TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays 於 *Ph-3* 基因序列 exon 上的 SNP 位置設計一個 TaqMan 分子標記。



TaqMan 分子標記包含一組 PCR 擴增引子對以及兩種對偶基因型螢光探針。螢光探針包括寡核酸序列 (oligonucleotide)、螢光染劑 (reporter dye)、以及螢光激態抑制染劑 (quencher dye) 三部分，螢光染劑與螢光激態抑制染劑則分別以共價鍵連結於寡核酸序列的 5'端與 3'端。寡核酸序列的設計跨越 SNP 位點，使得兩種對偶基因型螢光探針除了帶有 VIC (釋放黃光) 與 FAM (釋放綠光) 兩種不同螢光染劑外，也具有不同 SNP 的寡核酸序列。成對的 PCR 擴增引子則設計於 SNP 位置的兩側。TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays 的原理是使用 PCR 擴增引子擴增含有 SNP 位置的 DNA 片段，而與擴增 DNA 片段核酸序列完全互補的螢光探針的寡核酸序列部分，則會在 DNA 片段擴增過程中斷裂，使螢光染劑與螢光激態抑制染劑分開，進而釋放出螢光。然後藉由偵測不同顏色螢光的訊號強度比值判定基因型。

本研究設計的 TaqMan 分子標記 *Ph-3*，SNP 位置對照番茄全基因體組參考序列 SL 2.5 位於第九對染色體 71,435,449 bp 處，SNP 為 [G/T]，其 PCR 正反向引子之鹼基序列分別為：CAGATTTTCTTGGTAAAGAGTTCAAAA CTGT 與 ACCTCTCGAAATAGTAATGTAGGCA。兩種螢光探針的寡核酸序列則分別為：TCCCCTCCGATGTATC (VIC) 與 AATCCCCTCCTATGTATC (FAM)。當偵測到 VIC 螢光時，表示該個體於此 SNP 位點之基因型與親本 L3708 相同；偵測到 FAM 螢光時，表示 SNP 位點之基因型與親本 T3224 相同；若二種螢光皆有測得，則表示為異型結合個體。TaqMan 分子標記的設計是透過 ThermoFisher Scientific 公司的網頁內建工具設計而成，其網址為 <https://www.thermofisher.com/tw/zt/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assays.html>



TaqMan 分子標記的 PCR 反應包含：0.5  $\mu$ L TaqMan probe、5  $\mu$ L buffer、1  $\mu$ L DNA、3.5  $\mu$ L 二次蒸餾水，PCR 反應與螢光產物偵測皆以「即時螢光定量分析儀」Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Germany) 進行。



## 第四章 結果與討論

### 第一節 病原菌生理小種之界定

晚疫病病原菌株經長期保存後，通常會改變其原有的致病性 (virulence) 與毒力 (aggressiveness) (Sobkowiak et al. 2012)。由於先前自亞蔬取得之病原菌於本研究進行前已保存至甘油中 (16°C) 一年，為求謹慎，於接種試驗前，重新檢測實驗室內留存之晚疫病菌株 Pi39A 與 Pi733 的致病力。遂將兩個菌株分別接種至 TS-19、TS-33、WV700、CLN2037B、L3708、LA1033 等六個鑑別寄主，進行病徵評估。

Pi39A 病株接種的結果顯示，無論鑑別寄主攜帶何種抗病基因；甚至為感病鑑別寄主，其病徵等級皆為未達感病程度之病徵等級 3 (表二)，後續其它接種試驗中，植株也未達感病程度 (附表二)。據此試驗結果得知，Pi39A 業已喪失致病能力，因此無法繼續使用。至於 Pi39A 接種初期，病徵等級變異程度大，係肇因於對晚疫病之病徵判斷不精確，將萎凋葉誤判為病葉所致。後續試驗於接種前均會先摘除斑黃葉片，以免影響病徵等級判斷。

Pi733 經過二次接種，其病徵評估結果顯示，各鑑別寄主之平均病徵等級如下：TS-19 (6)、TS-33 (6)、WV700 (2.4)、CLN2037B (1.75)、L3708 (1.25)、LA1033 (6) (表二)。其中，接種 Pi733 能使鑑別品種中 TS-19 (*Ph+*)、TS-33 (*Ph-1*)、LA1033 (*Ph-5*) 感病，因此，將 Pi733 之生理小種界定為 T 1, 5。

由於本次試驗使用的 Pi733，其生理小種已與原本 Pi733 的生理小種 T 1,2,5 不同。因此，將本次試驗使用之病原菌 Pi733 更名為 Pi733a，以與先前使用的 Pi733 做為區隔。

### 第二節 *Ph-3* 之精確定位 (fine mapping)



*Ph-3* 精確定位之試驗材料為：KY-126、KY-127、KY-176、KY-214、KY-251、KY-317、KY-324、KY-354 等八個重組系，以病原菌 Pi733a 進行接種。八個重組系分別於第九對染色體 *Ph-3* 區間不同處發生重組。於 F<sub>2:3</sub> 世代，以 TG591 及 CT220a 兩個 CAPS 分子標記篩選，獲得兩種親本型之同型合子植株，收取其自交種子後，即成為本試驗中使用的 F<sub>3:4</sub> 種子。其中，以基因型為感病親的同型合子的植株，做為接種試驗中該重組自交系之對照組。

接種結果發現，具有抗病親同型合子的八個重組系中存在感病程度不均的差異（附表三）。三次接種平均病徵等級分別為：5.6 (KY-126)、1.1 (KY-127)、1.7 (KY-176)、6 (KY-214)、1.2 (KY-251)、1.75 (KY-317)、5 (KY-324)、1.1 (KY-354)。根據病徵等級，可界定為抗病之重組系有：KY-127、KY-176、KY-251、KY-317、KY-354；界定為感病者有：KY-126、KY-214、KY-324（圖一）。將接種結果對照基因型發現，造成抗病與感病間的差異之染色體區間為鹼基序列 71,356,855 bp 至 71,501,998 bp（圖一）。詳細推論如下述：

由於 KY-126 接種後呈現感病，而此 KY-126 重組系於鹼基序列 71,501,998 bp 與 71,516,381 bp 間發生重組，71,516,381 bp 往後之序列皆為與抗病親相同之同型合子，據此，可將 *Ph-3* 基因座位置排除 71,516,381 bp 以後之區域。KY-214 於鹼基序列 71,613,096 bp 至 71,976,304 bp 間發生重組，71,976,304 bp 以後為抗病基因型，而 KY-214 病徵等級為感病，因此推測 *Ph-3* 基因座應在鹼基序列 71,976,304 bp 以前區域。KY-324 則是在鹼基序列 71,501,998 bp 以後皆為抗病基因型，然而，此重組系呈現感病外表型，故推測 *Ph-3* 基因座位於 71,501,998 bp 以前。綜合以上推論，*Ph-3* 基因座應位在鹼基序列 71,356,855 bp 至 71,501,998 bp 間。此推測亦吻合其餘五個重組系之外表型結果。

於本研究進行過程中，Zhang 等人也發表對 *Ph-3* 進行精確定位成果，該研究指出 *Ph-3* 位於 Co-dominant SCAR 分子標記 R2M1S 至 CAPS 分子標記 M67-3

之區間，並 clone 出 *Ph-3* 完成互補試驗，將其登錄為 GenBank accession number: KJ563933 (Zhang et al., 2014)。

本研究遂將結果與 Zhang 等人研究進行比較，根據番茄全基因體組參照序列 SL 2.4，分子標記 R2M1S 位於 66,763,344 bp；M67-3 則位於 66,797,181 bp。將二分子標記之正向、反向引子序列 BLAST 至 SOL Genomics Network Website 對照現行參照序列 SL 2.5，確認分子標記於染色體位置，俾便比較。結果顯示，R2M1S 位於 71,435,428 bp；M67-3 位於 71,449,313 bp。此區間與本研究中定位到 *Ph-3* 基因位置：71,356,855bp 至 71,501,998 bp，具有一致性（圖三）。該研究亦指出，*Ph-3* 屬於 CC-NBS-LRR (coiled-coil nucleotide-binding leucine-rich repeat) 的 R 基因，僅由單一 exon 構成 (Zhang et al., 2014)。

根據 *Ph-3* 精確定位結果，以及對照 Zhang 等人研究登錄於 GenBank 之基因序列發現，本研究使用之分子標記 TG591 即位於 *Ph-3* 基因上。並據此結果，在 *Ph-3* 基因的 cDNA 序列上設計出以 TaqMan 技術為基礎的 SNP 分子標記，大幅提升後續基因型定型之效率。

### 第三節 *qPh2.1* 抗病能力

本研究是根據先前 RAD 技術所獲得之高通量基因型定型結果，選出 *Ph-3* 與 *qPh2.1* 基因座皆為異型合子之 F<sub>2</sub> 單株 KY-202。以 CAPS 分子標記 TG328、TG591 及 TPH221、TPH252 分別定型其 F<sub>2:3</sub> 子代於 *Ph-3* 與 *qPh2.1* 基因座之基因型，篩選出除了在 *Ph-3* 與 *qPh2.1* 兩個基因座皆為抗病同型結合以外，兩個基因座之基因型皆為同型結合的三種組合，作為試驗材料之親本，每種基因型獲得的株數分別為：3 株 AB、3 株 BA、與 2 株 BB。三種基因型組合依據植株於 *Ph-3* 與 *qPh2.1* 兩個基因座之基因型分別命名為：KY-202AB (*Ph-3<sup>R</sup> Ph-3<sup>R</sup> / qPh2.1<sup>S</sup> qPh2.1<sup>S</sup>*)、KY-202BA (*Ph-3<sup>S</sup> Ph-3<sup>S</sup> / qPh2.1<sup>R</sup> qPh2.1<sup>R</sup>*) 與 KY-202BB (*Ph-3<sup>S</sup> Ph-3<sup>S</sup> / qPh2.1<sup>S</sup> qPh2.1<sup>S</sup>*)，再收取其自交 F<sub>3:4</sub> 種子進行接種。(A 表示與抗

病親本 L3708 相同之同型結合基因型，B 則表示與感病親本 T3224 相同之同型結合基因型。)

病原菌接種試驗共進行四次重複 (附表四)，變方分析的結果顯示，基因型效應呈極顯著 (附表五)。接著，以 Tukey's HSD test 比較四種基因型組合之病徵等級，其中，不具任何抗病基因之 KY-202BB，平均病徵等級為 5.89，與感病對照組無異；僅具 *Ph-3* 之 KY-202AB 與僅具 *qPh2.1* 之 KY-202BA 接種結果均呈現抗病，平均病徵等級分別為 2.77 及 2.92 (表三)。綜上所述，*qPh2.1* 確實具有晚疫病抗病能力，且因 KY-202AB 與 KY-202BA 兩者平均病徵等級無顯著差異，因此推定其對 Pi733a 之抗病能力與 *Ph-3* 強度相當。

本研究結果，驗證前人研究中提出 L3708 攜帶不只一個晚疫病抗病基因之推測。過去，亞蔬研究曾指出，具有 *Ph-3* 抗病基因之 L3708 衍生後代 (advanced lines) 與 L3708 於相同栽培地、接種相同病原菌時，相較於 L3708 抗病之結果，具 *Ph-3* 的 L3708 衍生後代卻呈現感病外表型。因此，該研究推測野生番茄 L3708 除了 *Ph-3* 外，亦攜帶第二個晚疫病抗病基因 *Ph-4* (AVRDC, 2002)。

另一推論則由康乃爾大學研究團隊提出，該研究利用 NC215E (*S. lycopersicum*) 與 L3708 雜交產生之 CU-R 家系，探討 *Ph-3* 基因之抗病能力。研究結果除指出攜帶同型結合 *Ph-3* 對偶基因之個體，較異型結合個體擁有較強抗病能力以外，該研究亦發現，接種 *P. infestans* 菌系 US-7、US-17 時，相較於僅具 *Ph-3* 抗病基因之鑑別品種 CLN2037B、CLN2037E，CU-R 家系之抗病能力顯著較強，因而推測，野生番茄 L3708 可能攜帶不只一個抗病基因 (Kim and Mutschler, 2006)。

#### 第四節 *qPh2.1* 為隱性抗病基因

前一個試驗的結果顯示，*qPh2.1* 基因座在 KY-202 家系能分離出抗病性不同的 KY-202BA 與 KY-202BB 植株，配合已知 *qPh2.1* 基因座位於第二對染色體的

前端，可推論 *qPh2.1* 基因座一定位在 KY-202 植株的異型結合染色體區間，亦即第二對染色體 35.6Mb 以上的染色體區間 (圖二)。

為了研究 *qPh2.1* 基因座的遺傳特性，根據 F<sub>2</sub> 世代之 RAD 基因型判定結果，找出在第二對染色體 35.6 Mb 以上發生染色體重組的四個 F<sub>2</sub> 單株，KY-98、KY-290、KY-299 與 KY-300。其中，KY-98、KY-290 與 KY-300 分別於第二對染色體的 34.6 Mb 以上、28.9 Mb 以上、以及 30 Mb 以上皆為異型結合的染色體區間 (圖二)，因而選取這三個家系作為試驗材料。首先使用分子標記確認這些家系後代的 *Ph-3* 基因座為帶有感病同型結合的基因型，但在第二對染色體前端區間為異型結合之個體，然後收取這些個體的自交種子，作為新的遺傳材料，觀察其後代的晚疫病抗病病徵是否具有分離的現象，並依此決定 *qPh2.1* 基因座的遺傳特性。

接種試驗分別使用一次 KY-98 家系、兩次 KY-300 家系、以及三次 KY-290 家系進行晚疫病病原菌接種試驗 (附表六)。六次接種試驗合併進行變方分析的結果顯示，不同基因型效應與分次接種效應皆達極顯著的統計水準 (表四)，因此再將每次接種結果獨立檢視。六次接種結果中，抗病同型結合基因型 (A) 之病徵等級均為最輕微；感病同型結合基因型 (B)、異型結合基因型 (H) 之病徵等級則較嚴重 (表五)。以 Tukey's HSD test 分別比較每次接種試驗中，三個不同基因型之平均病徵等級。結果顯示六次試驗中，感病同型結合基因型 (B) 與異型結合基因型 (H) 之病徵等級皆無顯著差異；而抗病同型結合基因型 (A) 之病徵等級，則與前述二者達顯著差異 (表五)。

上述推論結果顯示，三者病徵等級差異確實肇因於各植株基因型差異。其中，抗病同型結合 allele (A) 能賦予植株對晚疫病菌之抗病能力；感病型同型結合個體 (B) 與異型結合個體 (H) 之病徵等級以 Tukey's HSD 檢驗後未達顯著差異，且異型結合個體 (H) 之病徵等級亦被判定為感病，故推論 *qPh2.1* 抗病對偶基因型為隱性。

目前已知番茄抗病基因可能之類型有：RLP (receptor like protein)、RLK (receptor-like kinase)、TNL (Toll interleukin receptor/ nucleotide-binding site/ leucine-rich repeat)、Gnk2 (ginkbilobin-2)、Pto protein 等 (Andolfo et al., 2013)。然而，本研究結果指出 *qPh2.1* 為隱性抗病基因，因此排除其屬於 CC-NBS-LRR，或其它 receptor protein 之可能。在茄科作物中僅有馬鈴薯 Y 病毒 (potyvirus) 之抗病基因：*py-1*、*pvr1*、*pvr2* (Parrella et al., 2002)、*pvr6* (Ruffel et al., 2002) 與番茄黃化捲葉病毒病 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 發現隱性抗病基因 (Anbinder et al., 2009)。無論馬鈴薯或番茄，對於 *P. infestans* 皆未有隱性抗病基因之記載。關於晚疫病之隱性抗病基因，並無相似前人研究供參考。

另外，此試驗結果顯示不同次的病原接種結果，*qPh2.1* 抗病同型結合基因型的病徵等級雖然顯著不同於另外兩種基因型分類的病徵等級，但是病徵等級的範圍變異極大 (1.8~4.8) (表五)。造成此抗病表現型變異的主要因素，極可能是每次晚疫病病原接種使用之游走孢子濃度差異所致。回顧製備游走孢子的方法中，僅調整了孢子囊的濃度，並非調整游走孢子的濃度。而從接種至病徵紀錄的時間間隔為 8 至 12 天，這樣的時間差異也十分可能導致不同次接種試驗結果產生十分顯著的病徵等級變異。

## 第五節 *qPh2.1* 基因座之定位

前述的試驗結果，也能藉由比對三個家系不同的重組區間，推論 *qPh2.1* 基因座在染色體上的位置。

遺傳重組比對的結果，得知最上方的重組位置為 KY-290 的 28.9 Mb，故推測 *qPh2.1* 應位於第二對染色體鹼基序列 28.9 Mb 以上的區間。然而，KY-290 家系以 TPH27-1 與 TPH28-2 分析基因型之結果顯示，TPH28-2 皆為未分離基因型 A，但 TPH27-1 則可檢測到全部三種基因型。據此推測 KY-290 家系的重組應發

生於分子標記 TPH28-1 與 TPH27-1 之間，也能因而推論 *qPh2.1* 基因座的位置在 28,042,265 bp 之前的區域。



## 第六節 番茄第二對染色體重組率分析

鑑於數次接種試驗皆無法於 *qPh2.1* 區間尋得重組個體，因此本研究以重組率最高之 F<sub>2</sub> 世代，進行第二對染色體短臂重組率評估。以與本研究室先前研究產生之 L3708 與 T3224 雜交族群，將 F<sub>2</sub> mapping 族群中所使用的 500 個個體以分子標記 TPH0-1、TPH28-2 進行基因型定型，檢視兩個分子標記間是否發生重組。

結果顯示，419 個 DNA 樣本中僅有編號 155 及 290 的單株，於這兩個分子標記區間中發生重組，其重組率僅為 0.004 (附錄表八)。此結果驗證其他學者的研究成果：番茄第二對染色體 28.1 Mb 以前為異質染色體區間，罕有染色體重組發生 (Sim et al., 2012)。此現象與其它對染色體僅在中節附近無重組之現象大相逕庭。至於此現象確切發生原因尚待考究，推測也可能與番茄全基因體組參照序列中部分序列建構錯誤有關。過去番茄參照序列 SL 2.4，曾被發現許多 scaffold 排序錯誤或方向錯誤，例如：第二對染色體中節附近區域，即有六段序列順序排列錯誤 (Shearer et al., 2014)。



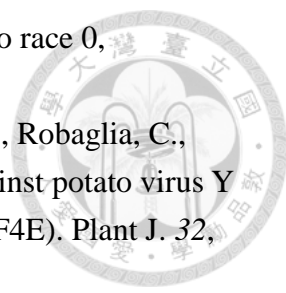
## 第五章 結論

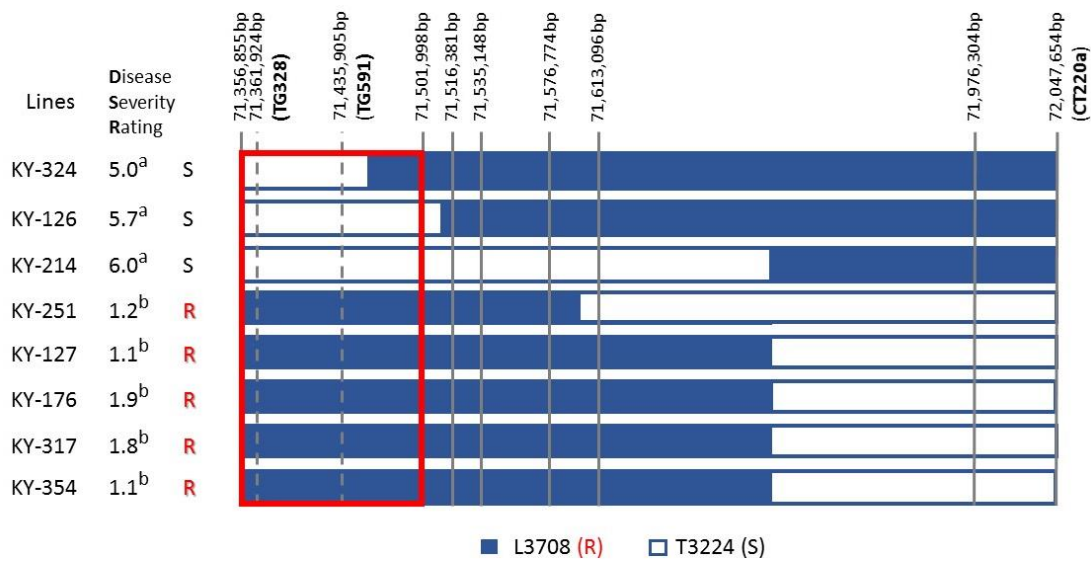
依據本研究設定之目標，總結本研究結果如下：(1) 將 *Ph-3* 定位於番茄第九對染色體 71,356,855 bp 至 71,501,998 bp 區間；(2) 確認 *qPh2.1* 基因確實具有抗病能力，且為隱性抗病基因；(3) *qPh2.1* 基因定位於番茄第二對染色體 28,042,265 bp 以前區域。

## 引用文獻

- 鄭安秀. (2001) 番茄與馬鈴薯晚疫病. 台南區農業專訊第 37 期 : 13-16.
- 蔡志濃、安寶貞、王姻婷、王馨媛、胡瓊月. (2009) 利用中和後之亞磷酸溶液防治馬鈴薯與番茄晚疫病. 台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 58 (3) : 185-195.
- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5<sup>th</sup> ed., page: 20, 136, 425. London: Elsevier “r5Press.
- Anbinder, I., Reuveni, M., Azari, R., Paran, I., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Lapidot, M., and Levin, I. (2009). Molecular dissection of tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. Theor. Appl. Genet. 119, 519–530.
- Andolfo, G., Sanseverino, W., Aversano, R., Frusciante, L., and Ercolano, M.R. (2013). Genome-wide identification and analysis of candidate genes for disease resistance in tomato. Mol. Breed. 33, 227–233.
- AVRDC (1998) 1998 Progress Report. Shanhua, Tainan, Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center. 8-9.
- AVRDC (2002) 2002 Progress Report. Shanhua, Tainan, Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center. 20-22.
- Black LL, Wang TC, Hanson P, Chen JT (1996) Late blight resistance in four wild tomato accessions: effectiveness in diverse locations and inheritance of resistance. J Phytopathol. 86:S24
- Brouwer, D.J., and Clair, D.A.S. (2003). Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. Theor. Appl. Genet. 108, 628–638.
- Chen, A.-L., Liu, C.-Y., Chen, C.-H., Wang, J.-F., Liao, Y.-C., Chang, C.-H., Tsai, M.-H., Hwu, K.-K., and Chen, K.-Y. (2014). Reassessment of QTLs for late blight resistance in the tomato accession L3708 using a restriction site associated DNA (RAD) linkage map and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. PLoS ONE 9, e96417.
- Chen, C.-H., Wang, T.-C., Black, L., Sheu, Z.-M., Perez, F., and Deahl, K. (2009). Phenotypic and genotypic changes in the *Phytophthora infestans* population in Taiwan – 1991 to 2006. J. Phytopathol. 157, 248–255.
- Chunwongse, J., Chunwongse, C., Black, L., & Hanson, P. (2002). Molecular mapping of the *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato. Journal of horticultural science & biotechnology. 77(3), 281-286.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annual review of phytopathology. 9(1), 275-296.

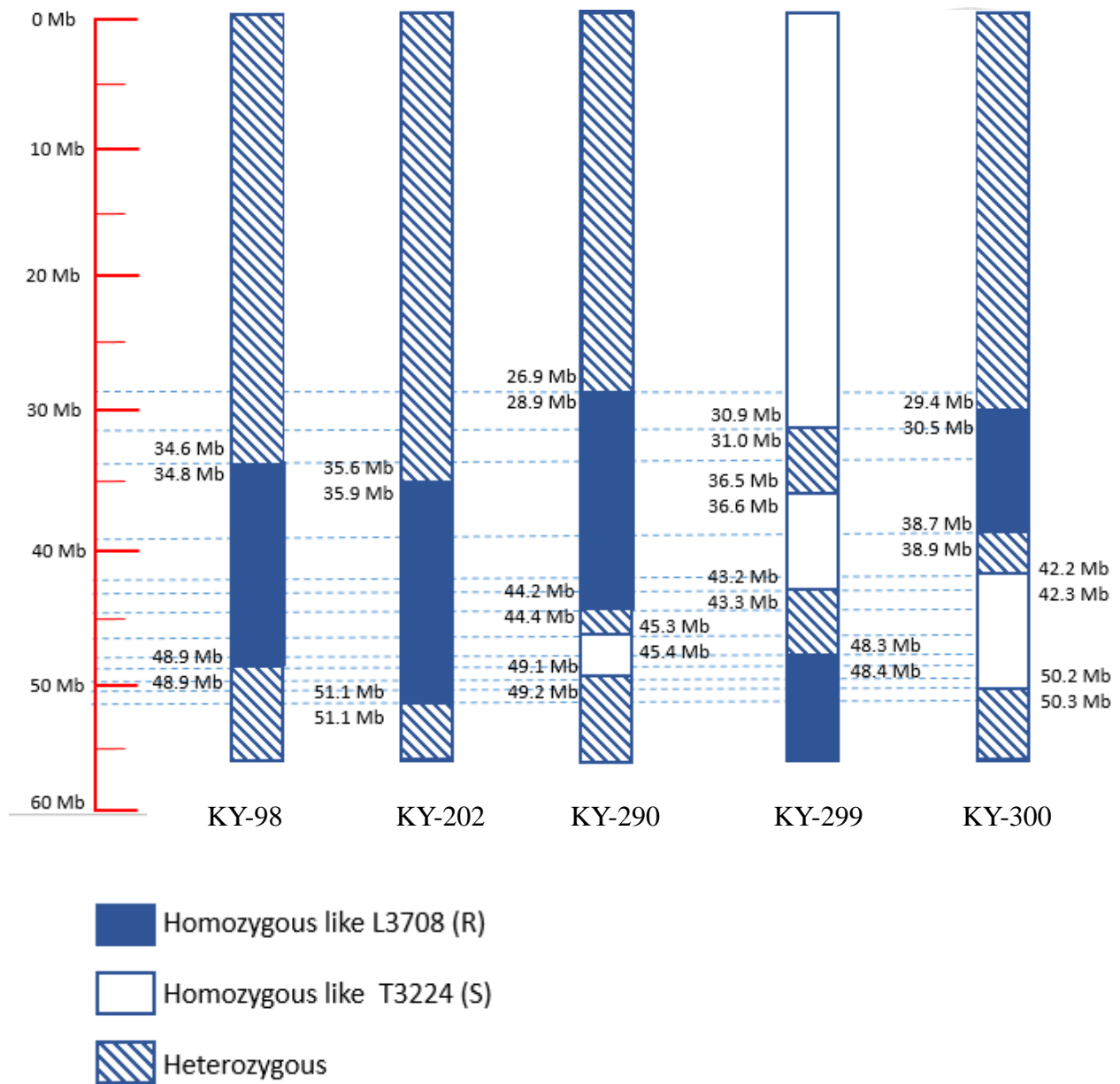
- Foolad, M. R., Merk, H., Ashrafi, H., and Kinkade, M. (2006). Identification of new sources of late blight resistance in tomato and mapping of a new resistance gene. In 22 nd Annual Tomato Disease Workshop. 4-8
- Fulton, T. M., Chunwongse, J., & Tanksley, S. D. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 13(3), 207-209.
- James, C. (1971). An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. *Canadian Plant Disease Survey*. 51:39-65.
- Keen, N.T. (1990). Gene-For-Gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24, 447–463.
- Kim, M.-J., and Mutschler, M.A. (2006). Characterization of late blight resistance derived from *Solanum pimpinellifolium* L3708 against multiple isolates of the pathogen *Phytophthora infestans*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 131, 637–645.
- Lee, S.-J., and Rose, J.K. (2010). Mediation of the transition from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic plant pathogens by secreted effector proteins. *Plant Signal. Behav.* 5, 769–772.
- Li, J., Liu, L., Bai, Y., Finkers, R., Wang, F., Du, Y., Yang, Y., Xie, B., Visser, R.G.F., and Heusden, A.W. van (2011). Identification and mapping of quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in *Solanum habrochaites* LA1777. *Euphytica* 179, 427–438.
- Lough, R.C., and Gardner, R.G. (2000). 551 Inheritance of tomato late blight resistance derived from *Lycopersicon hirsutum* LA1033 and identification of molecular markers. *HortScience* 35, 490–490.
- Merk, H.L., and Foolad, M.R. (2012). Parent–offspring correlation estimate of heritability for late blight resistance conferred by an accession of the tomato wild species *Solanum pimpinellifolium*. *Plant Breed.* 131, 203–210.
- Moreau, P., Thoquet, P., Olivier, J., Laterrot, H., and Grimsley, N. (1998). Genetic mapping of *Ph-2*, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 11, 259–269.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*. 8(19), 4321-4326.
- Nowicki, M., Foolad, M.R., Nowakowska, M., and Kozik, E.U. (2011). Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. *Plant Dis.* 96, 4–17.
- Parrella, G., Ruffel, S., Moretti, A., Morel, C., Palloix, A., and Caranta, C. (2002). Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theor. Appl. Genet.* 105, 855–861.

- 
- Peirce, L. C. (1971). Linkage tests with Ph conditioning resistance to race 0, *Phytophthora infestans*. Rep. Tomato Genet. Coop. 21:30.
- Ruffel, S., Dussault, M.-H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). Plant J. 32, 1067–1075.
- Shearer, L.A., Anderson, L.K., Jong, H. de, Smit, S., Goicoechea, J.L., Roe, B.A., Hua, A., Giovannoni, J.J., and Stack, S.M. (2014). Fluorescence in situ hybridization and optical mapping to correct scaffold arrangement in the tomato genome. G3 GenesGenomesGenetics 4, 1395–1405.
- Sim, S.-C., Durstewitz, G., Plieske, J., Wieseke, R., Ganal, M.W., Van Deynze, A., Hamilton, J.P., Buell, C.R., Causse, M., Wijeratne, S., et al. (2012). Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic maps in tomato. PLoS ONE 7, e40563.
- Sobkowiak, S., Zarzycka, H., & Śliwka, J. (2012). The influence of long-term storage in liquid nitrogen on survival and pathogenicity of *Phytophthora infestans* isolates. Journal of Plant Protection Research. 52(4), 479-485.
- Tao, Y., Yuan, F., Leister, R.T., Ausubel, F.M., and Katagiri, F. (2000). Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site–leucine-rich repeat resistance gene RPS2. Plant Cell 12, 2541–2554.
- Vleeshouwers, V.G.A.A., Raffaele, S., Vossen, J.H., Champouret, N., Oliva, R., Segretin, M.E., Rietman, H., Cano, L.M., Lokossou, A., Kessel, G., et al. (2011). Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. Annu. Rev. Phytopathol. 49, 507–531.
- Zhang, C., Liu, L., Wang, X., Vossen, J., Li, G., Li, T., Zheng, Z., Gao, J., Guo, Y., Visser, R.G.F., et al. (2014). The *Ph-3* gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. Theor. Appl. Genet. 127, 1353–1364.

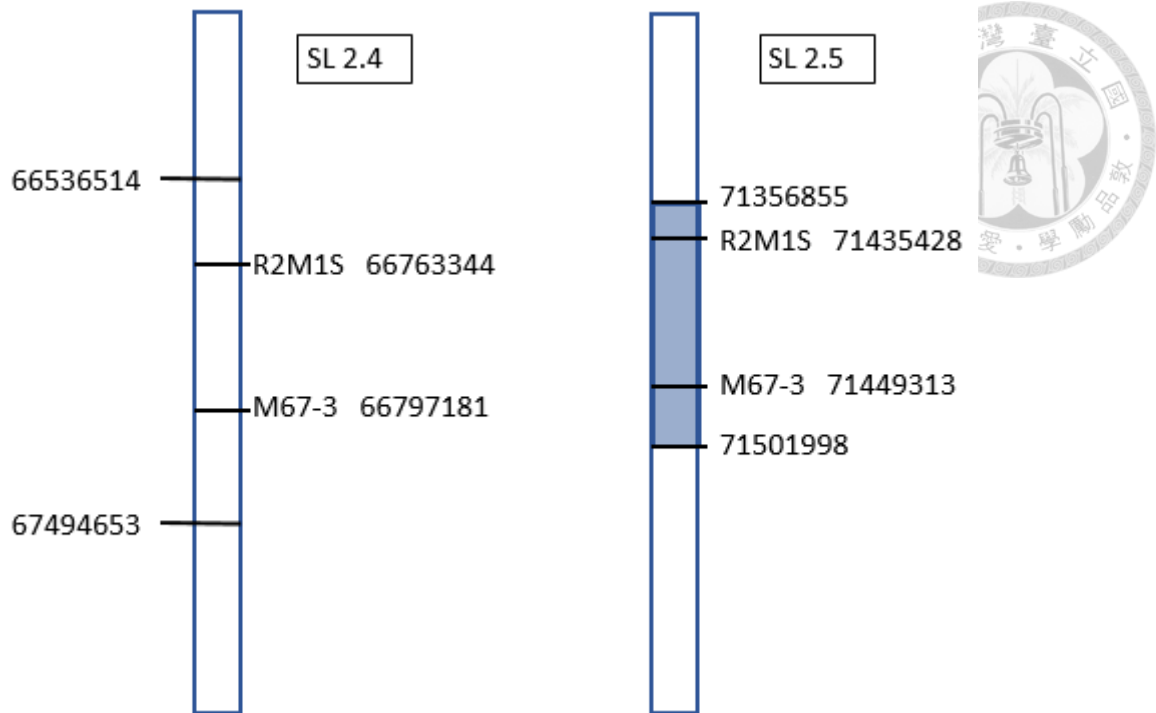


圖一、*Ph-3* 精確定位。圖中每個橫條代表一個重組系在 *Ph-3* 附近染色體區間的基因型：實心橫條代表與抗病親本 L3708 相同之同型結合基因型；空心橫條代表與感病親本 T3224 相同之同型結合基因型。緊臨每個橫條左方的英文字母，R 代表此重組系抗病，S 則代表此重組系感病。每個橫條左方字串分別為：重組系名稱、病徵等級、抗感判定。圖上方的數字代表分子標記標註於基因體參考序列上的位置，TG591 與 CT220a 為 CAPS 分子標記的名稱，而沒有標註名稱的分子標記都屬於 RAD 技術鑑別的 SNP 分子標記。

※ 病徵等級分群以 Tukey's HSD test 進行



圖二、進行 *qPh2.1* 基因座遺傳特性研究所選用的五個 F<sub>2</sub> 單株於第二對染色體之基因型示意圖。其中四個單株在第二對染色體 35.6 Mb 以上的染色體區間發生遺傳重組。



圖三、*Ph-3* 區間與前人研究定位之區間比較。左圖為 *Ph-3* 基因於 SL 2.4 參照序列位置，66,536,514 至 66,794,653 為先前本研究室定位之區間；R2M1S 至 M67-3 則為 Zhang 等人定位區間。右圖為將 R2M1S、M67-3 對照至參照序列 SL 2.5 後，與本研究定位 *Ph-3* 區間 (71,356,855-71,501,998) 之結果比較。

表一、CAPS 分子標記資訊

<i>qPh2.1</i> 數量性狀基因座區域 (第二對染色體)								
名稱	SNP 位置(bp)	SNP [T3224/L3708]	限制酶	PCR 產物大小 (bp)			PCR 反應之核酸引子序列	
				未酶切	酶切 T3224	酶切 L3708	正向引子序列	反向引子序列
TPH 0_1	2816	[A/T]	DdeI	302	184+113	302	AAACTTAGGATTCATAATTTGTATGG	CCTCCATTGATGAAGCCTTG
TPH 12_2	1283162	[TT/AA]	Hinfl	660	660	183+477	GCTTGCATTTTTCGGTGTGT	TAATCAAAACACCCCACCAC
TPH 13_1	1373369	[G/C]	AluI	655	665	478+187	CATAGGCCAACCCAAAGGTA	AGAATGGTACGGAAGCATTGA
TPH 14_1	1469407	[G/T]	DdeI	723	723	627+96	CAAAAGAATGCACGGAGTGA	TGACATTCACCTACCAAGG
TPH 6_3	6208229	[T/A]	HindIII	660	459+201	660	TGGCCTCTCAAGATTACCG	AACCCCTTTTGCTTGAACCT
TPH 12_4	12883750	[G/C]	HincII	648	484+164	648	ATGCTACGCCAAACCTCATC	AGACGTTGGTCGTTTCATCC
TPH 15_1	15003402	[G/C]	HhaI	675	675	224+451	TCACGTCGATGGAATTTACG	CACCAAAGATGTTCTCCTCACA
TPH 16_1	16013343	[A/C]	DraI	709	709	285+424	CAAGTGGGGTAGCACTTGGT	CGGGGATTCTCCCTGATATT
TPH 17_3	17008186	[C/G]	XbaI	602	602	346+256	CTTCAGGATTCACGCTTCA	TGAAGAATGGTCGCTCCACT
TPH 17_2	17034063	[C/T]	TaqI	624	160+120+344	160+464	AGACGGAAAAGGTCATGTGG	GGCTTTGAGAGCGTCTGGTA
TPH 20_1	20000945	[T/C]	EcoRV	762	451+132+179	583+179	CAAAACGGATCGTTTGGTCT	GTTTCACCCGGAAGTTTTCA
TPH 22_1	22003541	[C/T]T	Hinfl	467	110+357	467	AATGGAAGACTTTCGCTTGC	AAGTTTAGGCGATGGTATCGAA
TPH 23_2	23010103	[T/C]	RsaI	671	199+472	671	GCCCATAGAAAGCCAAACAA	CATGGCAAAACCTTTCAACA
TPH 24_1	24002601	[G/T]	HaeIII	647	347+300	647	AACCTGGTTCGCCAGATTTA	AAATGGACCGAAGCCTACCT
TPH 24_2	24018425	[A/G]	HindIII	608	205+403	608	TCACAACCTTTCAAATCTTCCA	CCCGAGCCAACAATATAGTCA
TPH 25_1	25006776	[G/A or C]	TaqI	698	403+295	698	ATGTTGAACGTGTTGGCTCA	TCATAATAGCCACCCCCAAA
TPH26_1	26052231	[C/T]	MspI	762	421+341	762	ATGGTTTGAAGTGGGTGAGC	ATGGTTTGAAGTGGGTGAGC
TPH27_1	27002423	[G/A]	HhaI	770	431+339	770	CGATCTTGCCTTTGGCTAAT	CGATCTTGCCTTTGGCTAAT
TPH28_1	28041076	[C/T]	AluI	550	370+180	550	GCAATCTCGATTACAACGA	GCAATCTCGATTACAACGA
TPH28_2	28042265	[T/C]	TaqI	733	380+353	733	ATCAGCCATTTCCCTGAGTG	ATCAGCCATTTCCCTGAGTG



表一 (續)、CAPS 分子標記資訊

*qPh2.1* 數量性狀基因座區域 (第二對染色體)

名稱	SNP 位置(bp)	SNP [T3224/L3708]	限制酶	PCR 產物大小 (bp)			PCR 反應之核酸引子序列	
				未酶切	酶切 T3224	酶切 L3708	正向引子序列	反向引子序列
TPH30_1	30046458	[C/T]	DdeI	607	287+200+120	320+287	GTTTCGTAGCGCTTTCTTCG	GTTTCGTAGCGCTTTCTTCG
TPH30_2	30048163	[G/T]	Hinfl	756	355+268+133	623+133	CGAATATCACTTGCCAACGA	CGAATATCACTTGCCAACGA
TPH31_2	31072085	[G/A]	HindIII	570	297+273	570	TCATTTGTCCCACTTGACA	TCATTTGTCCCACTTGACA
TPH32_1	32978470	[C/T]	TaqI	682	419+209+54	628+54	CATGTATGGCTGCATTTTCG	CATGTATGGCTGCATTTTCG
TPH33_3	33311267	[T/C]	DraI	529	318+211	529	ATGGCAAATGTTTGGTGGAT	ATGGCAAATGTTTGGTGGAT
TPH211	34423763	[C/G]	DdeI	474	287+187	474	GAGACGAGCTCCTTACAATTTTC	CAACCAATTATGTATCCCGACTG
TPH212	34424860	[A/G]	XbaI	712	325+387	712	AACTTGATACATTAACCCTTGACG	TTGGTCGTTCAAGCATCTGC
TPH221	35322491	[C/T]	HpyCH4IV	519	300+219	519	GGTCATAACCCGCCAAGTTT	TTTTTGGTTCCTGCGGAAT
TPH222	35326507	[G/A]	DpnII	412	273+109+30	273+139	GCGAAACACGAAAAGGTA	TGATGCCACGTAAGACACAAA
TPH231	36222956	[G/A]	HpyCH4IV	600	389+211	600	TCGGGCGGTGTAAGGTATAA	AGGGAGGAACGGGTTTAAGA
TPH232	36229196	[T/C]	DpnII	537	377+160	287+160+90	TTGTTACAGCGGTAAGGATGG	CACTGAAATTTAGCTGCTCCAA
TPH241	37121894	[A/G]	RsaI	442	384+58	442	GGGCGGGAAAAGTCAAATA	ATGGGTGGGAGGGTAAAAG
TPH242	37124036	[C/G]	RsaI	436	114+322	436	TTGGGGTTAGCTTTTAAAGGA	ACATTGAAGGCCGACTTTTT
TPH251	37631525	[G/T]	XbaI	417	189+228	417	TTCAATTAAGGGCGGAGAGA	TCGATGATTTGAAAGGGAAT
TPH252	37642896	[G/T]	RsaI	436	189+247	436	ATCAATTAACGCCGTCAGC	GGTGAAACACTCCCACCAGT

表一 (續)、CAPS 分子標記資訊

*Ph-3* 數量性狀基因座區域 (第九對染色體)

名稱	SNP	SNP	限制酶	PCR 產物大小 (bp)			PCR 反應之核酸引子序列	
	位置(bp)	[T3224/L3708]		未酶切	酶切 T3224	酶切 L3708	正向引子序列	反向引子序列
TG328	71361924	[T/C]	BstNI	662	662	406+256	GTTTCGTAGCGCTTTCTTCG	GTTTCGTAGCGCTTTCTTCG
TG591	71435905	InDel	Hinfl	748	389+359	389+265+94	CGAATATCACTTGCCAACGA	CGAATATCACTTGCCAACGA
CT220a	72047654	[A/G]	Hinfl	469	387	114+273	TCATTTGTCCCACACTTGACA	TCATTTGTCCCACACTTGACA

表二、保存之晚疫病菌株重新使用鑑別品種檢定致病力的結果。鑑別品種名稱下方的兩個數值分別表示同一批特定鑑別品種幼株接種晚疫病菌株 Pi39A 與 Pi733a 後，評估的病徵等級 (Disease Severity Rating, DSR) 平均值，括號內則為判定為抗病 (R) 或是感病 (S)。Pi39A 與 Pi733a 都接種兩次。

菌株	批 次	鑑別品種					
		TS-19	TS-33	WV700	CLN 2037B	L3708	LA1033
Pi39A	1	2.6 (R)	2.3 (R)	1.5 (R)	0.8 (R)	2.2 (R)	0.0 (R)
Pi39A	2	0.2 (R)	0.1 (R)	0.1 (R)	0.5 (R)	0.1 (R)	0.0 (R)
Pi733a	1	6.0 (S)	6.0 (S)	2.4 (R)	1.8 (R)	1.3 (R)	6.0 (S)
Pi733a	2	5.8 (S)	5.2 (S)	1.7 (R)	1.5 (R)	1.0 (R)	6.0 (S)

表三、接種 *Ph-3* 與 *qPh2.1* 不同基因型組合植株所呈現之病徵等級

	不同基因型組合		
	KY-202AB ( <i>Ph-3<sup>R</sup> Ph-3<sup>R</sup></i> / <i>qPh2.1<sup>S</sup> qPh2.1<sup>S</sup></i> )	KY-202BA ( <i>Ph-3<sup>S</sup> Ph-3<sup>S</sup></i> / <i>qPh2.1<sup>R</sup> qPh2.1<sup>R</sup></i> )	KY-202BB ( <i>Ph-3<sup>S</sup> Ph-3<sup>S</sup></i> / <i>qPh2.1<sup>S</sup> qPh2.1<sup>S</sup></i> )
病癥等級	2.8 <sup>b</sup>	2.9 <sup>b</sup>	5.9 <sup>a</sup>

※ 病癥等級分群以 Tukey's HSD test 進行

表四、探討 *qPh2.1* 遺傳特性以三個家系六次接種試驗結果之變方分析

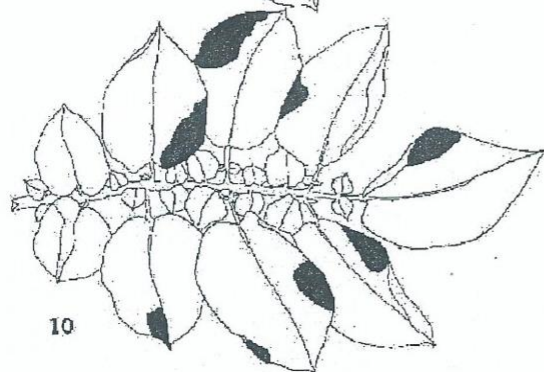
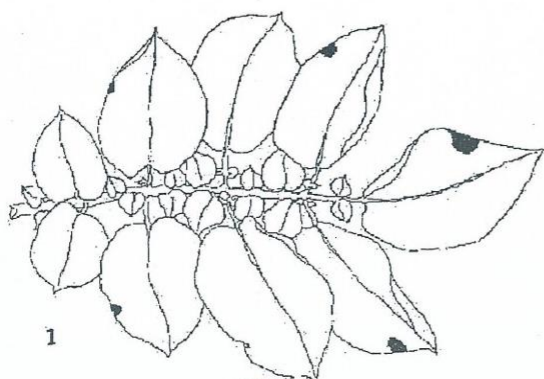
Source	Df	Sum Sq	MS	F value	Pr (> F)
Genotype	2	197.87	98.94	103.245	< 2e-16 ***
Trials	5	26.58	5.32	5.547	9.39e-5 ***
Residuals	167	160.03	0.96		

表五、六次試驗接種三個 *qPh2.1* 重組家系不同基因型呈現之病徵等級

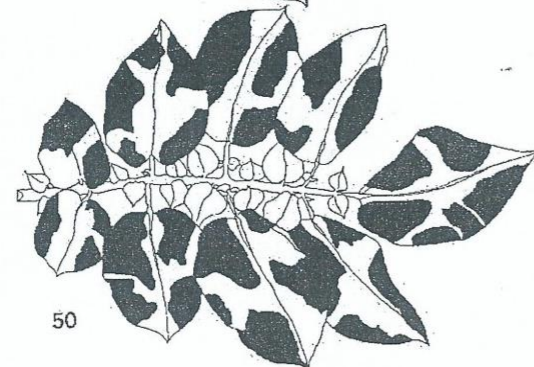
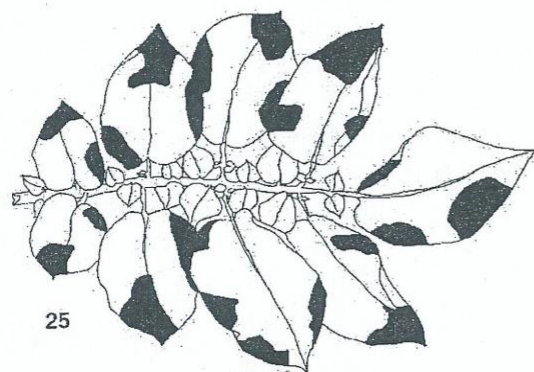
	Genotype		
	A ( <i>qPh2.1<sup>R</sup> qPh2.1<sup>R</sup></i> )	H ( <i>qPh2.1<sup>R</sup> qPh2.1<sup>S</sup></i> )	B ( <i>qPh2.1<sup>S</sup> qPh2.1<sup>S</sup></i> )
Trials 1 (KY-98)	3.9 <sup>b</sup>	5.7 <sup>a</sup>	6.0 <sup>a</sup>
Trials 2 (KY-290)	2.9 <sup>b</sup>	5.1 <sup>a</sup>	5.9 <sup>a</sup>
Trials 3 (KY-290)	1.8 <sup>b</sup>	5.1 <sup>a</sup>	6.0 <sup>a</sup>
Trials 4 (KY-290)	2.1 <sup>b</sup>	5.1 <sup>a</sup>	5.6 <sup>a</sup>
Trials 5 (KY-300)	4.8 <sup>b</sup>	5.8 <sup>a</sup>	6.0 <sup>a</sup>
Trials 6 (KY-300)	3.0 <sup>b</sup>	4.9 <sup>a</sup>	5.7 <sup>a</sup>

※ 病徵等級分群，僅就每次 trial 中三種基因型之平均病徵等級，以 Tukey's

HSD test 進行。



PERCENTAGE LEAF AREA COVERED



PERCENTAGE LEAF AREA COVERED

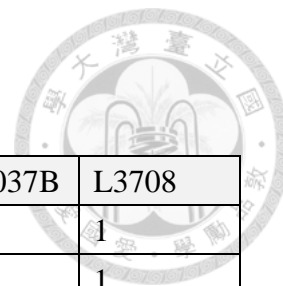
附錄圖一、病徵等級感染葉面積判斷標準 (James, 1971)

附錄表一、*Ph-3* fine mapping 及 *qPh2.1* 抗病能力研究使用之 F<sub>2:4</sub> 種子來源

F <sub>2</sub> Lines	Genotype (TG591/ CT220a)	F <sub>2:3</sub> 親本編號	<i>qPh2.1</i> 基因型
KY-126	BB	1	B
	BA	14 21	A B
KY-127	AB	32、33、41	A
	BB	35、39、40	A
KY-176	AB	42、47 48	A B
	BB	46、52 54、57	H B
KY-214	BA	71 77、78	H B
	BB	68、69、79 81	H B
KY-251	AB	94、95 96	A H
	BB	93、98	H
KY-317	AB	99、112	A
	BB	102、106、115	A
KY-324	BA	121	A
	BB	128	A
KY-354	AB	139 141	B A
	BB	145	H
Lines	Genotype ( <i>Ph-3/ qPh2.1</i> )	F <sub>2:3</sub> 親本編號	
KY-202	AA/ BB	190、215、222	
	AA/H	245	
	BB/ AA	199、218、241	
	BB/ BB	200、212	



附錄表二、Pi39A 實際接種病徵等級紀錄



(一) 鑑別品種第一次接種結果

品種	TS-33	LA1033	TS-19	WV700	CLN2037B	L3708
各重複 單株之 DSR	3	0	2	0	0	1
	3	0	3	2	0	1
	3	0	3	1	2	2
	2	0	3	3	1	1
	2	0	1	3		1
	1	0	1	0		3
	2	0	4	3		3
	3	0	4	1		3
	2	0	3	1		3
		0	2	1		4

(二) 鑑別品種第二次接種結果

品種	LA1033	L3708	CLN2037B	WV700	TS-33	TS-19
各重複 單株之 DSR	0	0	1	0	0	0
	0	1	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0		0	0	0
	0	0		0	0	1
	0	0		0	1	
		0		1	0	



附錄表二 (續)、Pi39A 實際接種病徵等級紀錄

(三) *Ph-3* fine mapping lines 第一次接種結果

Lines	127AB	127BB	176AB	176BB	TS-19	CLN-2037B	214BA	214BB	317AB	317BB
各 重 複 單 株 之 D S R	0	0	2	1	3	1	1	1	0	1
	0	0	3	1	3	1	1	1	0	0
	1	0	0	3	3	0	2	0	0	0
	1	0	1	3	3	0	2	0	0	0
	0	1	1	4	2	1	3	1	0	1
	0	1	2	1	3	0	3	3	0	1
	1	1	0	2	0	2	1	1	0	1
	0		1	2	1	0	3	1	0	1
	1			1	3		3	0	0	0
	0			1	1		0	1	1	1
	2			1	0		1			
	1					2				

(四) *Ph-3* fine mapping lines 第二次接種結果

Lines	TS-19	127AB	127BB	2037	176AB	176BB	214BA	214BB	251AB	251BB
各 重 複 單 株 之 D S R	1	2	0	0	1	1	1	2	0	0
	0	0	0	0	1	1	2	1	0	1
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
	1	0	3	0	1	1	1	1	0	0
	3	0	3	0	0	1	2	1	1	0
	0	1	1	1	1	1	2	0	1	1
	2	1	2		1	1	1	2	2	0
	1	1			2	1	0	1	0	0
	1	1			1	1		1		0
		2			0	1		2		
					0	2		1		



附錄表二 (續)、Pi39A 實際接種病徵等級紀錄

(五) *Ph-3* fine mapping lines 第三次接種結果

Lines	354AB	2037	324BA	354BB	TS-19	324BB
各重複 單株之 DSR	0	0	1	0	1	1
	0		1	0	1	0
	0		0	0	1	0
	0		0	0	1	0
	0		1	0	1	0
	0		0	1		0
	0		1	0		
	0		0	0		
	0		0	0		
	0		0	0		

(五) *Ph-3* fine mapping lines 第三次接種結果

Lines	126BB	317AB	TS-19	126BA	2037	317BB
各重複 單株之 DSR	3	3	2	6	1	1
	2	3	2	5	1	2
	4	0	1	1	1	1
	3	2	2	6		1
	3	1	1	5		1
	3	1		6		0
	2	3		5		1
	2	1		5		1
	5	2		4		1
	4	3				
	6	1				
	3					



附錄表三、Pi733a 實際接種病徵等級紀錄

(一) 鑑別品種第一次接種結果

品種	WV700	LA1033	L3708	TS-19	TS-33	CLN2037B
各重複 單株之 DSR	2	6	1	6	6	2
	3	6	1	6	6	2
	2	6	1	6	6	1
	2	6	1	6	6	2
	2	6	1	6	6	2
	2	6	1	6	6	1
	3	6	2	6	6	2
	4		2		6	2
	2				6	

(二) 鑑別品種第二次接種結果

品種	WV700	LA1033	L3708	TS-19	TS-33	CLN2037B
各重複 單株之 DSR	2	6	1	6	6	1
	2	6	1	6	6	2
	2	6	1	6	6	1
	1	6	1	6	1	2
	1	6	1	5	6	2
	2	6	1	6	6	1



附錄表三 (續)、Pi733a 實際接種病徵等級紀錄

(三) *Ph-3* fine mapping lines 第一次接種結果

Lines	126BB	126BA	127AB	127BB	176AB	176BB	214BA	214BB
各 重 複 單 株 之 D S R	6	6	1	6	2	6	6	6
	6	6	1	6	2	6	6	6
	6	6	2	6	6	6	6	6
	6	6	2	6		2	6	6
	6		1	6		5	6	6
	6			6		4	6	6
	6	6	2	5	2	6	6	6
	6	6	1	6	2	6	6	5
	6	6	1	6	2	6	6	6
	6	6	1	6	2	6	6	6
	6	5	1	6	2	6	6	6
	6	6		6	4	6	6	6

Lines	251AB	251BB	317AB	317BB	324BA	324BB	354AB	354BB
各 重 複 單 株 之 D S R	2	6	1	6	5	5	3	3
	2	6	2	6	5	6	1	4
	1	6	2	6	5	6	1	6
	1	6	2		3	5	1	5
	1	6			5	3	1	6
	1	6			5	5	1	6
	2	6	2	6	4	3	1	3
	1	6	1	6	5	3	1	6
	1	6	1	6	4	4	1	4
	1	6	2		4	3	1	6
	1		2		3	3	1	5
	1				4	3	1	4



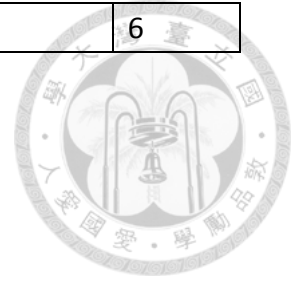
附錄表三 (續)、Pi733a 實際接種病徵等級紀錄

(四) *Ph-3* fine mapping lines 第二次接種結果

Lines	126BB	126BA	127AB	127BB	176AB	176BB	214BA	214BB
各 重 複 單 株 之 D S R	6	6	1	4	1	6	6	1
	6	5	1	6	2	6	6	1
	6	6	1	5	1	6	6	6
	6	5	1	4	1	6	6	5
	6	4	1	4	1		6	6
		6	1	2	2		6	
	6	6	1	5	1	6	5	2
	6	4	1	5	2	6	6	1
	6	6	1	6	1	6	6	6
	6	6	1	6	1		6	6
	6		1	5	1		6	6
			1	5			6	6

Lines	251AB	251BB	317AB	317BB	324BA	324BB	354AB	354BB
各 重 複 單 株 之 D S R	1	6	1	6	6	6	1	6
	1	6	3	6	5	6	1	6
	1	6	1	6	5	6	1	6
	1	6	1	6	5	6	1	6
	1	6	2		6	4	1	6
	1	6			5	4	1	6
	1	6	2	2	6	5	1	6
	1	6	1	1	6	5	1	6
	1	6	2	2	6	4	1	6
	1	6	2	2	6	4	1	6
	1	6	3	3	6	4	1	6

	2	6	2	2	6	4		6
--	---	---	---	---	---	---	--	---

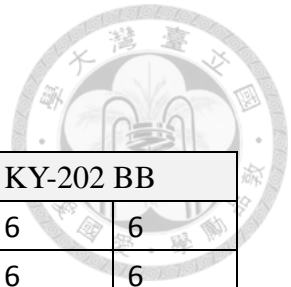


附錄表三 (續)、Pi733a 實際接種病徵等級紀錄

(五) *Ph-3* fine mapping lines 第三次接種結果

Lines	126BB	126BA	127AB	127BB	176AB	176BB	214BA	214BB	
各 重 複 單 株 之 D S R	6	4	1	2	1	1	6		
	6	3	1	3	1	2	6		
	6	2	1	5	1	3	6		
	6	3	1	6	1	6	6		
	6	2	1	4	1		6		
			1	3	1		6		
	6	4	1	5	1	6	6		
	6	3	1	4	1	3	6		
	6	2	1	4	1	6	6		
	6	2	1	5	1	2	6		
				1	5	1	6	6	
				1	2	1		6	

附錄表四、確認 *qPh2.1* 抗病能力四次重複接種病徵等級紀錄



(一) 第一次接種結果

	KY-202 AA		KY-202 AB		KY-202 BA		KY-202 BB	
各重 複單 株之 DSR	1	1	5	6	4		6	6
	1	2	6		4		6	6
	1	1	1		4		6	6
	1	1	1		3		6	6
	1	2	1		5		6	6
	1	1	3		4		6	6

(二) 第二次接種結果

	KY-202 AA		KY-202 AB		KY-202 BA		KY-202 BB	
各重 複單 株之 DSR	1	1	1		2	2	6	6
	1	1	1		3	3	6	6
	1	1	1		3		6	6
	1		1		3		6	6
	1		1		3		6	6
	2				3		6	6

(三) 第三次接種結果

	KY-202 AA		KY-202 AB		KY-202 BA		KY-202 BB	
各重 複單 株之 DSR	2		1		1	2	6	6
	2		1		1		6	6
	2		2		2		6	6
	1		1		1		6	6
	2		1		6		6	4
	2				1		6	

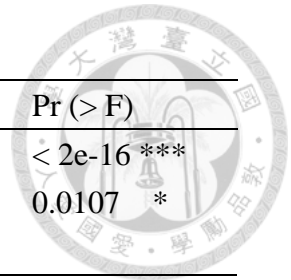
(四) 第四次接種結果

	KY-202 AA		KY-202 AB		KY-202 BA		KY-202 BB	
各重 複單 株之 DSR	1	1	1	6	2	1	6	5
	2	1	5	6	1		6	5
	1	2	1		1		6	6
	1	2	2		2		6	6
	1		1		1		6	5
	1		1		6		6	



附錄表五、確認 *qPh2.1* 抗病能力接種結果之變方分析

Source	Df	Sum Sq	MS	F value	Pr (> F)
Genotype (G)	2	228.20	114.10	60.124	< 2e-16 ***
Replicate (R)	3	22.48	7.49	3.948	0.0107 *
Residuals	93	176.49	1.90		



附錄表六、以縮小 *qPh2.1* 區間為目的之三個重組家系接種結果與基因型對照。

KY-98 家系以 TPH0-1、TPH14-1、TPH28-2 三個分子標記基因型定型；KY-290 起初以 TPH0-1、TPH27-1 (或 TPH28-2) 進行基因型定型；KY-300 家系則以 TPH0-1、TPH28-2 兩個分子標記進行基因型定型。兩個分子標記之基因型及病徵外表型值皆有者，方選為 ANOVA 統計數據。獲選納入統計數據之各植株，再編號處以黑色標記。

KY-290 起初以 TPH0-1、TPH28-2 進行基因型定型，然而大多數 KY-290 植株於 TPH28-2 皆為 A 基因型，與 TPH0-1 之基因型相異。如此高頻率發生重組情形十分可疑，推測可能是因為 KY-290 家系於 26,995,285 bp 與 28,909,479 bp 間發生重組，28,909,479 bp 以下為為抗病同型結合 (A)，於 26,995,285 bp 以上為異型結合 (H)。TPH28-2 位於 28,042,265 bp，被包含在重組區間中，因此大量 A 基因型出現，可能是由於染色體重組發生在 TPH28-2 以上的緣故。故基因型分析結果改以 TPH0-1 與 TPH28-2 上方分子標記 TPH27-1 進行。

至於 TPH0-1 與 TPH28-2 基因型一致者，該植株於兩個分子標記之基因型均為 B 或 H，與前述推測染色體重組發生在 TPH28-2 以上的結果不符，因此懷疑是種子遭受污染。追溯播種紀錄後，發現這些 TPH28-2 基因型不為 A 的個體，均來自編號 KY-290-27 的 F<sub>2:3</sub> 單株。故以 28,909,479 bp 以下之分子標記 TPH31-2 分析 KY-290-17 之基因型，確認 KY-290-17 個體於 28,909,479 bp 以下之基因型是否與 KY-290 同為 A。

結果顯示，KY-290-17 於 TPH0-1、TPH13-1、TPH14-1、TPH25-1、TPH28-2 及 TPH31-2 位置之基因型均為 H。推測 KY-290-17 應不屬於 KY-290 家系，因此最後接種結果數據分析中，不納入來自 KY-290-17 衍生之 F<sub>3:4</sub> 個體。排除的數據分別為：KY-290 第一次接種，編號 1-16；KY-290 第二次接種，編號 25-36；KY-290 第三次接種，編號 13-24。至於 KY-290 第二次接種，編號 20 之個體不納入數據分析，則是由於此個體重複進行三次基因型分析之資料不完全相符，為確保資料可信度，遂決定在分析中排除此個體資料。

三個家系共六次接種試驗，完整基因型與病徵等級資料如下表：

(一) *qPh2.1* 區間三個重組家系接種結果與基因型對照。接種家系：KY-98，第一次接種結果。

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0_1	H	H	A	A	A	A	B	H	A	B
14_1	H	H	A	A	A	A	B	H	A	B
6_3		H								B
28-2	H	H	A	A	A	A	B	H	A	B
DSR	6	5	3	3	5	4	6	6	4	6
No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0_1	H	H	A	B	H	B		H	A	A
14_1	H	H	A	B	H	B		H	A	A
6_3				B						
28-2	H	H	A	B	H	B	A	H	A	A
DSR	6	6	3	6	6	6	6	4	3	3
No.	21	22	23	24	25	26	27	28		
0_1		A	H	A	B	H	A	B		
14_1		A	H	A	B	H	A	B		
6_3			H		B	H		B		
28-2	B	A	H	A	B	H	A	B		
DSR	6	6	6	6	6	6	3	6		

附錄表六 (續)、以縮小 *qPh2.1* 區間為目的之三個重組家系接種結果與基因型對照。

(二) *qPh2.1* 區間三個重組家系接種結果與基因型對照。接種家系：KY-290，第一次接種結果。

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0-1	H	H	B		H	H	H	H	A	B
27-1			B		H				A	
28-2	H	H	B		H	H	H	H	H	B
DSR	4	4	6	4	4	4	6	6	3	6
No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0-1	A	H	B	H	H		B	A	B	B
27-1							B		B	B
28-2	A	H	B	H	H		A	A	A	A
DSR	4	4	6	6	4	5	6	2	6	6
No.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
0-1	A		B	B	A		B	H		
27-1			B	B	A		B	H		
28-2	A		A	A	A		A	H		
DSR	1	1	6	6	5	5	6	4	3	6
No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
0-1	A	H	H	H	H	B		A	H	A
27-1	A	H	H	H	H	B			H	A
28-2	A	A	A		A	A		A	A	A
DSR	1	4	6	6	6	6		4	4	3
No.	41	42	43	44	45	46	47	48		
0-1	B	H	H	B	A	B	H			
27-1	B	H	H	B	A	B	H			
28-2	A	A	A	A	A	A	H			
DSR	6	6	6	5	4	6	4	4		

附錄表六 (續)、以縮小 *qPh2.1* 區間為目的之三個重組家系接種結果與基因型對照。

(二) *qPh2.1* 區間三個重組家系接種結果與基因型對照。接種家系：KY-290，第二次接種結果。

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0-1	H	A	H	B	H				H	
27-1	H	A	H	B	H				H	
28-2	A	A	A	A	A				A	
DSR	1	1	6	6	3	2			6	
No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0-1	H	A	B	H	A	H		B	H	B
27-1	H		B	H		H		B	H	B
28-2	A	A	A	A	A	A		A	A	B
DSR	6	1	6	6	2	4		6	6	5
No.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
0-1	H	H	H	B	H	H	H	H	H	B
27-1	H	H	H	B						
28-2	A	A	A	A	H	H	H	H	H	B
DSR	6	5	5	6	6	6	6	5	4	6
No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
0-1	B	A	A	H	A	B	B	H	H	H
27-1							B	H	H	H
28-2	B	A	A	H	A	B	A		A	A
DSR	6	4	6	6	2	6	6	6	6	6
No.	41	42	43	44	45	46	47	48		
0-1	B	B	A	A	H	H	H	H		
27-1	B	B			H	H	H	H		
28-2	A	A	A	A	A	A	A	A		
DSR	6	6	2	3	5	6	5	4		

附錄表六 (續)、以縮小 *qPh2.1* 區間為目的之三個重組家系接種結果與基因型對照。

(二) *qPh2.1* 區間三個重組家系接種結果與基因型對照。接種家系：KY-290，第三次接種結果。

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0-1	H		H	H	H	H	H	A	H	B
27-1	H		H	H	H	H	H		H	B
28-2	A		A	A	A	A	A	A	A	A
DSR	6		6	5	5	4	4	2	5	6
No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0-1	A	H	B	H	H	H	B	H	H	B
27-1		H								
28-2	A	A	B	H	H	H	B	H	H	B
DSR	2	5	6	6	5	5	6	5	5	6
No.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
0-1	H	B	B	H	H	H	A	A	H	H
27-1			B	H	H	H	A	A	H	H
28-2	H	B	B	H	A	A	A	A	A	A
DSR	6	6	6	6	5	5	3	3	6	5
No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
0-1	H	B		H	H	H	H	H	B	A
27-1	H	B	H	H	H	H	H	H	B	A
28-2	A	A		A	A	A	A	A	A	A
DSR	6	6	3	5	5	5	6	6	6	2
No.	41	42	43	44	45	46	47	48		
0-1	H	A	A	A	H	B	H	A		
27-1	H	A	A	A	H	B	H	A		
28-2	A	A	A	A	A	A	A	A		
DSR	5	3	1	2	3	4	5	1		

附錄表六 (續)、以縮小 *qPh2.1* 區間為目的之三個重組家系接種結果與基因型對照。

(三) *qPh2.1* 區間三個重組家系接種結果與基因型對照。接種家系：KY-300，第一次接種結果。

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0-1	H	A	H	H	B	A	H	B	H	H
28-2	H	A	H	H	B	A	H	B	H	H
DSR	6	4	6	6	6	5	6	6	6	6
No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0-1	B	B	A	H	H	B		H	A	
28-2	B	B	A	H	H			H	A	
DSR	6	6	4	6	6	6	6	4	6	
No.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
0-1	H	H	B		H		B			
28-2	H	H	B		H		B	A		
DSR	6	6	6	6	6		6	3		
No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
0-1					H	B				
28-2										
DSR					5	6		5		
No.	41	42	43	44	45	46	47	48		
0-1										
28-2										
DSR										

附錄表六 (續)、以縮小 *qPh2.1* 區間為目的之三個重組家系接種結果與基因型對照。

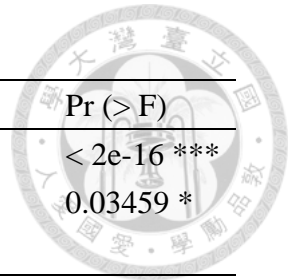
(三) *qPh2.1* 區間三個重組家系接種結果與基因型對照。接種家系：KY-300，第二次接種結果。

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0-1							H		H	
28-2							H		H	
DSR							6		6	
No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0-1	B	A	B	A			B		B	B
28-2	B	A	B	A			B		B	B
DSR	6	3	5	3			6		6	6
No.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
0-1	B	H	H	A	A	A	B	B	B	H
28-2	B	H	H	A	A	A	B	B	B	H
DSR	6	3	6	3	1	4	6	6	6	6
No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
0-1	H	H	B	H	B	H	B	H	H	H
28-2	H	H	B	H	B	H	B	H	H	H
DSR	4	5	6	4	6	6	3	4	5	6
No.	41	42	43	44	45	46	47	48		
0-1	B	H	A	H	B	H	B	H		
28-2	B	H	A	H	B	H	B	H		
DSR	6	3	4	3	6	6	6	6		



附錄表五、以 ANOVA 分析三個 *qPh2.1* 重組家系接種結果

Source	Df	Sum Sq	MS	F value	Pr (> F)
Genotype (G)	2	157.608	78.804	78.292	< 2e-16 ***
Lines (L)	2	6.907	3.453	3.431	0.03459 *
Residuals	172	173.124	1.007		



附錄表六、KY-202 抗病同型結合染色體區間與 KY-98、290、300 染色體區間之比較

Chr.	KY-202 同型結合區域	KY-98	KY-290	KY-300
1	77 Mb – 92 Mb	84 Mb – 89 Mb	H	B
5	6 Mb – 57 Mb	B	2 Mb – 63 Mb	H
6	48 Mb –	H	B	H
7	– 59 Mb	B	2 Mb – 58 Mb	B
10	58 Mb – 59 Mb	B	B	H
11	1 Mb – 56 Mb	5 Mb – 7 Mb	H	H

基因型為 F<sub>2</sub> 族群 RAD 基因型定型結果

附錄表七、以 R 進行分析所使用之程式碼 (code) 與分析結果



## 1. KY-202 接種結果分析

### (1) 程式碼

```
library(agricolae)

setwd("C:/Users/YoLiang-1/Desktop/R")

data<-read.table("202.txt",header=T)

## analysis 202

result.1<-lm(DSR ~ genotype+block, data=data)

anova(result.1)

## HSD

result.202.1<-aov(DSR ~ genotype+block, data=data)

hsd.result<-HSD.test(result.202.1,"genotype", group=TRUE)

hsd.result
```

### (2) 分析結果

```
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
genotype    2  228.20   114.10   60.124 <2e-16 ***
block        3   22.48    7.49    3.948 0.0107 *
Residuals   93  176.49    1.90
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

$means
      DSR      std  r Min Max
2L 2.777778 2.172084 27  1  6
3L 2.923077 1.671480 26  1  6
4L 5.891304 0.378785 46  4  6

$comparison
NULL

$groups
  trt  means M
1  4L 5.891304 a
2  3L 2.923077 b
3  2L 2.777778 b
```

## 2. 以三家系縮小 *qPh2.1* 區間接種結果分析



### (1) 程式碼

```
##analysis qPh2.1 fine mapping
setwd("C:/Users/YoLiang-1/Desktop/R")
data2<-read.table("ino data.txt",header=T)
#full model
result.1<-lm(DSR ~ block+genotype*line, data=data2)
anova(result.1)

## HSD test
aov.result<-aov(DSR ~ genotype+line, data=data2)
hsd.result<-HSD.test(aov.result,"genotype", group=TRUE)
hsd.result
```

### (2) 分析結果

#### Analysis of Variance Table

Response: DSR

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
genotype	2	197.873	98.936	103.2452	< 2.2e-16 ***
block	5	26.577	5.315	5.5468	9.394e-05 ***
Residuals	167	160.030	0.958		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

因為 genotype 效應與六次接種的 block 效應均極顯著效應，因此「genotype + block」為最終分析 model。

### (3) HSD test

\$groups

	trt	means	M
1	4L	5.891304	a
2	3L	2.923077	b
3	2L	2.777778	b

附錄表八、L3708 x T3224 F<sub>2</sub> 族群 500 個體重組率

編號	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
TPH0-1	A	H	B	A	H	B	B	A	A	B	H	A	B	H	A	H	A	A	B	B	B	A
TPH28-2	A	H	B	A	H	B	B	A	A	B	H	A	B	H	A	H	A	A	B	B	B	A
編號	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
TPH0-1	H	H	A	A	H	H	H	A	B	B	H	H	B	B	H	A	H	B	H	H	H	A
TPH28-2	H	H	A	A	H	H	H	A	B	B	H	H	B	B	H	A	H	B	H	H	H	A
編號	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
TPH0-1	H	A	B	H	A	A	H	H	H	B	H	B	H	B	H	A	H	B	H	A	A	B
TPH28-2	H	A	B	H	A	A	H	H	H	B	H	B	H	B	H	A	H	B	H	A	A	B
編號	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89
TPH0-1	A	H	H	A	H	H	H	H	A	A	B	A	B	H	A	A	A	H	A	A	A	A
TPH28-2	A	H	H	A	H	H	H	H	A	A	B	A	B	H	A	A	A	H	A	A	A	A
編號	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111
TPH0-1	A	H	A	A	B	H	H	A	A	B	B	H	H	A	H	A	B	H	H	H	H	H
TPH28-2	A	H	A	A	B	H	H	A	A	B	B	H	H	A	H	A	B	H	H	H	H	H
編號	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	125	128	129	130	131	132	133	134	135	136
TPH0-1	A	B	A	H	H	A	A	A	H	H	B	H	B	H	H	B	A	B	H	A	H	H
TPH28-2	A	B	A	H	H	A	A	A	H	H	B	H	B	H	H	B	A	B	H	A	H	H
編號	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158
TPH0-1	B	B	H	H	B	B	H	A	H	A	H	A	A	B	H	H	B	H	H	H	H	A
TPH28-2	B	B	H	H	B	B	H	A	H	A	H	A	A	B	H	H	B	H	B	H	H	A

附錄表八 (續)、L3708 x T3224 F<sub>2</sub> 族群 500 個體重組率

編號	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	179	181	182	188	189	201	202
TPH0-1	B	A	B	A	B	A	A	H	H	H	H	A	H	H	H	A	H	A	H	A	H	H
TPH28-2	B	A	B	A	B	A	A	H	H	H	H	A	H	H	H	A	H	A	H	A	H	H
編號	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	226
TPH0-1	A	B	H	B	H	H	H	H	B	H	H	H	H	H	B	B	A	B	H	A	B	H
TPH28-2	A	B	H	B	H	H	H	H	B	H	H	H	H	H	B	B	A	B	H	A	B	H
編號	228	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	247	249	252	253	254	255	256	257
TPH0-1	H	A	A	H	A	A	B	H	A	B	H	H	H	H	H	B	A	A	H	H	H	A
TPH28-2	H	A	A	H	A	A	B	H	A	B	H	H	H	H	H	B	A	A	H	H	H	A
編號	258	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	276	277	278	279	285	286
TPH0-1	H	H	H	A	B	A	B	H	H	A	A	A	H	B	H	B	H	B	B	B	H	H
TPH28-2	H	H	H	A	B	A	B	H	H	A	A	A	H	B	H	B	H	B	B	B	H	H
編號	287	288	289	290	291	292	293	294	298	299	304	307	318	319	320	323	325	326	328	330	335	337
TPH0-1	A	H	H	H	H	A	A	H	B	B	H	B	B	A	H	H	H	H	H	H	H	H
TPH28-2	A	H	H	A	H	A	A	H	B	B	H	B	B	A	H	H	H	H	H	H	H	H
編號	338	340	343	344	345	346	347	348	349	350	351	353	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364
TPH0-1	B	A	A	H	B	A	A	H	H	H	H	H	A	B	H	A	H	H	B	H	B	A
TPH28-2	B	A	A	H	B	A	A	H	H	H	H	H	A	B	H	A	H	H	B	H	B	A
編號	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387
TPH0-1	B	A	A	B	A	A	A	B	H	B	H	H	B	B	A	H	H	H	B	H	H	A
TPH28-2	B	A	A	B	A	A	A	B	H	B	H	H	B	B	A	H	H	H	B	H	H	A

附錄表八 (續)、L3708 x T3224 F<sub>2</sub> 族群 500 個體重組率

編號	388	389	390	391	392	393	394	395	396	398	399	400	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411
TPH0-1	H	B	A	B	B	B	B	A	B	H	H	H	B	A	H	H	H	A	H	B	A	H
TPH28-2	H	B	A	B	B	B	B	A	B	H	H	H	B	A	H	H	H	A	H	B	A	H
編號	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433
TPH0-1	H	H	B	H	B	B	A	B	H	A	H	H	A	H	B	H	H	H	B	H	H	A
TPH28-2	H	H	B	H	B	B	A	B	H	A	H	H	A	H	B	H	H	H	B	H	H	A
編號	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455
TPH0-1	A	H	B	H	H	H	H	H	H	B	B	B	H	B	B	H	A	H	H	B	A	A
TPH28-2	A	H	B	H	H	H	H	H	H	B	B	B	H	B	B	H	A	H	H	B	A	A
編號	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477
TPH0-1	H	H	A	H	H	A	B	A	B	H	H	H	H	H	A	H	A	H	H	A	B	H
TPH28-2	H	H	A	H	H	A	B	A	B	H	H	H	H	H	A	H	A	H	H	A	B	H
編號	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499
TPH0-1	H	H	B	H	H	B	H	H	H	A	B	H	H	B	B	H	A	H	H	H	H	H
TPH28-2	H	H	B	H	H	B	H	H	H	A	B	H	H	B	B	H	A	H	H	H	H	H
編號	500																					
TPH0-1	A																					
TPH28-2	A																					