

茄子抗青枯病之數量性狀基因座定位¹

王聖善、朱詠筑、蔡佩樺、吳雅芳²

摘 要

王聖善、朱詠筑、蔡佩樺、吳雅芳。2023。茄子抗青枯病之數量性狀基因座定位。臺南區農業改良場研究彙報 82：15-27。

青枯病抗性是茄子的重要園藝性狀之一，為了瞭解抗青枯病品系‘EG203’抵抗青枯病的遺傳機制，本研究先以茄子品種(系)‘EG203’與‘EG048’(感病品系)雜交所衍生 F₁ 與 F₂ 族群，各別進行國內 3 個青枯病菌株 Pss4、Pss97 以及 Pss190 的人工接種試驗，結果發現 F₁ 與 F₂ 族群的抗病能力，在不同菌株處理下有著不同遺傳表現。接著實驗以 91 株接種過 Pss4 菌株之 F₂ 個體，進行茄子抗青枯病之數量性狀基因座定位，實驗結果偵測到 2 個與青枯病抗性相關的主效基因座 *qBWR2* 與 *qBWR3*，*qBWR2* 可解釋約 27.5% 的外表型變異，*qBWR3* 則可解釋約 16.6% 的外表型變異。最後，本研究各別設計了一個與 *qBWR2*，以及 *qBWR3* 基因座緊密連鎖的 KASP (kompetitive allele specific PCR) 分子標誌，可供國內育種人員參考，用以提升茄子抗青枯病的育種效率。

現有技術：透過外表型選拔，選育具有優良青枯病抗病性的茄子品系。

創新內容：藉由分子標誌輔助選種，提升育種效率。

對產業影響：有助於增加茄子對青枯病抗病能力，降低生產風險。

關鍵字：KASP 分子標誌、抗病育種、次世代定序、雙限制酶位點標定定序方法

接受日期：2023 年 10 月 20 日

1. 農業部臺南區農業改良場研究報告第 561 號。

2. 農業部臺南區農業改良場助理研究員、助理研究員、研究助理與副研究員。712009 臺南市新化區牧場 70 號。

前 言

茄子 (*Solanum melongena* L.) 是國內常見的夏季與秋季蔬菜，除了作為鮮食蔬菜使用外，也常被做為番茄 (*Solanum lycopersicum*) 的根砧使用。青枯病 (Bacterial wilt) 是茄科作物栽培上常見的細菌性土傳病害，其致病的青枯病菌是由許多不同菌系所構成的複合種 (*Ralstonia solanacearum* species complex, *RssC*)，透過基因序列的比對，青枯病菌的種類可以被簡單地歸納為 5 個演化型 (phylotype)⁽⁹⁾，目前臺灣常見的青枯病主要是以第一演化型 (phylotype I) 的 race 1，以及第二演化型 (phylotype II) 的 race 3 為主^(7,11,14)。相較於其他茄科物種，茄子對青枯病的抗性較佳，是適合用來了解茄科作物抗青枯病機制的優良研究材料。

青枯病的抗性是國內茄子育種選拔的重要性狀之一，然而茄子抗青枯病屬於數量性狀遺傳，且抗病性評估容易遭受外在環境與接種技術的影響⁽¹⁸⁾，因此茄子抗青枯病的育種選拔效率不佳。如能透過分子標誌輔助選種 (marker-assisted selection, MAS) 在早世代時期，進行抗病茄子個體選拔，將有助於提升茄子抗青枯病的育種效率。茄子為 2 倍體植物，基因組由 12 對染色體所組成 ($2n = 24$)，透過全基因體解序結果顯示，茄子基因體組大約有 1.17 Gb 的鹼基對⁽²¹⁾，目前國際上已有許多關於茄科作物抗青枯病之數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTL) 文章被發表，主要包含番茄^(5,20)、茄子^(4,13,17,18)、番椒⁽⁸⁾及馬鈴薯^(10,22)。在茄子抗青枯病的數量性狀基因座實驗中，Lebeau 等人 (2013) 透過由 ‘AG91-25’ (抗病親本) 與 ‘MM738’ (感病親本) 所衍生的 178 個重組自交系 (recombinant inbred lines, RILs)，進行茄子抗青枯病的數量性狀基因座定位，獲得了一個來自抗病親本的主效 QTL (*ERsI*)，此 QTL 能夠協助茄子抵抗 3 個隸屬於 phylotype I 的青枯病菌株⁽¹³⁾。Salgon 等人 (2017) 使用 8 個青枯病菌株 (5 個隸屬於 phylotype I，另外 3 個分別隸屬於 phylotypeIIA、phylotypeIIB 與 phylotypeIII)，接種與 Lebeau 等人 (2013) 相同的分離族群，藉由 8 個不同菌株接種後的抗病性外表型，進行數量性狀基因座定位，實驗結果除了發現了一個與 Lebeau 等人 (2013) 相同的 *ERsI* 主效 QTL 外，也獲得了 2 個對不同演化型菌株具有廣效性的 QTLs⁽¹⁷⁾。Salgon 等人 (2018) 文章中則使用了 123 個由 ‘EG203’ (抗病親本) 與 MM738 (感病親本) 所衍生的雙單倍體族群 (doubled haploid, DH) 進行數量性狀基因座定位，分別獲得了 10 個抗青枯病 Pss4 菌株，與 3 個抗 R3598 菌株的 QTLs⁽¹⁸⁾。

‘EG203’ 是亞蔬－世界蔬菜中心 (World Vegetable Center, AVRDC) 在 1990 年代，篩選出來對青枯病具有優良抗病性的抗病品種之一⁽²⁾，也是目前國內最常見的抗青枯病根砧品種。前人研究以 12 個分屬於 3 種不同演化型的青枯病菌株接種 ‘EG203’，結果發現，‘EG203’ 對於試驗中的 7 個青枯病菌株能產生高抗病能力⁽¹²⁾。青枯病菌株種類多樣，不同國家地區間流行的菌株差異甚大，且青枯病發病情況容易受環境影響，為了獲得可運用在國內抗青枯病育種的數量性狀基因座，本研究使用由國內茄科作物田區，分離出的青枯病菌株 Pss4、Pss97，以及 Pss190 進行研究，接種國內使用最廣泛的抗青枯病 ‘EG203’ 品系，透過與不抗病的 ‘EG048’ 品系雜交所衍生的 F_2 族群，進行青枯病抗性的遺傳分析。Pss4 為國內番茄栽培田區所分離的青枯病菌株，具備穩定的致病力，因此，實驗最後選擇以 Pss4 菌株接種後的 F_2 族群，進行茄子抗青枯病的數量性狀基因座定位，作為茄子抗青枯病分子標誌輔助選種之分子標誌開發基礎，提升國內抗茄子抗青枯病的育種效率。

材料方法

一、茄子抗病性分離族群之建立

為了進行茄子抗青枯病的遺傳分析與數量性狀基因座定位，本研究以亞蔬－世界蔬菜中心引種的‘EG203’與‘EG048’品系，經過 7 個世代的自交純化後，各選拔出一個園藝性狀穩定的‘EG203’與‘EG048’自交系，進行試驗研究。實驗藉由純化過後的抗青枯病根砧自交系‘EG203’作為抗病親本，以自交系‘EG048’作為感病親本，進行雜交後衍生出 45 株 F_1 個體，與 300 株 F_2 分離個體，用以進行後續各種青枯病菌株的接種實驗，以及 KASP (kompetitive allele specific PCR) 分子標誌的基因型判別測試。

二、茄子抗青枯病外表型評估

F_2 族群的抗青枯病特性於 108 年秋季進行評估，實驗使用 3 個由亞蔬－世界蔬菜中心所蒐集，隸屬於第一演化型 (phylotype I) 的青枯病菌株 Pss4、Pss97 及 Pss190 進行茄子植株的人工接種，每個菌株分別接種 15 株‘EG203’、15 株‘EG048’、15 株 F_1 ，以及 100 株由‘EG203’與‘EG048’雜交所衍生的 F_2 個體。所有青枯病接種工作均在臺南區農業改良場接種溫室內執行，於茄子植株生長達 4 ~ 5 葉齡時，以人工斷根後澆灌青枯病菌液 (30 mL, 10^8 cfu/mL) 的方式，進行人工接種，並於接種後的第 7、14、21 及 28 日時，評估每株植株個體的危害指數 (disease severity index, DSI)。病害指數則依據接種後發病的嚴重程度進行分級，將接種後的發病狀況分為 6 個等級，其中以植株健康沒有病徵作為 0 級；1 個葉片部分萎凋為 1 級；2 或 3 個葉片萎凋為 2 級；除了頂端 2 或 3 個葉片，其他葉片都萎凋為 3 級；所有葉片都萎凋但植株尚未死亡作為第 4 級；植株完全死亡為第 5 級。

三、基因型分析與遺傳圖譜建立

實驗取 100 株接種過 Pss4 菌株的 F_2 個體葉片，以及兩雜交親本各 5 株，以 CTAB 方式⁽¹⁵⁾ 萃取植物的基因體組 DNA，並以分光光度計定量，用以剔除 DNA 品質不佳，或 DNA 總量不足 600 ng 的個體。實驗最後選取 92 株接種過 Pss4 菌株的 F_2 個體、4 株‘EG203’，以及 4 株‘EG048’共 100 個樣品，並將所有樣品均勻分成 2 組，各別進行雙限制酶位點標定定序方法 (double digest restriction-site Associated DNA, ddRAD) 的定序圖書庫建構，建庫方法則以 Peterson 等人 (2012) 的實驗流程⁽¹⁶⁾ 進行修改，圖書庫的建構選擇以 *Pst*I 與 *Mse*I 進行雙酶切反應，之後再接上帶有各別核酸條碼 (barcode) 序列的 P1 轉接引子 (adapter)。建構完成的 ddRAD 定序圖書庫則委由基龍米克斯公司以 Illumina X-Ten 次世代定序平臺進行 150 bp paired-end 的核酸定序，每組圖書庫各定序 1 個 lanes。核酸定序所獲得之原始資料委託昕穎生醫技術股份有限公司，以 Stacks2.0 de-novo pipeline⁽⁶⁾，執行親本與 92 株 F_2 個體的基因座目錄建立、基因型定型，以及單一核苷酸位點的探勘與篩選。初步篩選到的單一核苷酸位點再以參數 -r 指定剔除於參試樣品中少於 50 個樣品的基因座，並以參數 -m 指定剔除每一基因座的定序深度 (read depth) 少於 10 之位點。最後再將次世代定序所獲得之基因型結果，透過 R/qtl 套件⁽³⁾ 進行遺傳圖譜建立。建立連鎖群前，先透過 R/qtl 套件去除一株樣品讀序較少，且基因型缺值嚴重的 F_2 個體，也排除一些在族群中基因型分離比 (AA : AB : BB) 不符合 1 : 2 : 1 的單一核苷酸多型性位點 (single nucleotide polymorphism, SNP) 後，再進行連鎖群建立。連鎖群建立之後再以 R/qtl 套件中的 dropone 函數，去除會影響連鎖群較大的位

點，完成遺傳圖譜建立。最後透過 MapChart (version 2.2)⁽¹⁹⁾ 軟體，完成茄子視覺化遺傳圖譜繪製。

四、數量性狀基因座定位分析

數量性狀基因座的探勘使用 R/qtl 套件進行分析。F₂ 族群在接種青枯病 Pss4 菌株後 7、14、21 及 28 天的病害指數分佈均不符合常態分佈，此外，在 Pss4 菌株接種後的第 21 及 28 天的病害指數分佈呈現明顯的雙峰分佈，因此實驗以 2 個在 R/qtl 套件中，適合運用在非常態分佈外表型的兩個 model，‘Nonparametric’ 與 ‘binary’，進行數量性狀基因座之區間定位 (interval mapping, IM)。使用 ‘binary’ model 前，需先將族群中的病害指數區分為抗病 (0) 與感病 (1) 兩個級距，因此本實驗將族群中，病害指數為 0、1 及 2 的個體外表型判定為抗病 (0)，病害指數為 3、4 及 5 的個體外表型判定為感病 (1)，以人工方式將連續分布的病害指數外表型轉換為二項分布 (binomial distribution) 的外表型，以符合統計分析的前提。QTL 定位的閾值則使用 R/qtl 套件中 1,000 次的重排試驗，找出 $\alpha = 0.05$ 的 LOD (logarithm of odds) score 作為本次實驗的門檻。篩選出數量性狀基因座後，使用 lodint 函數計算 2 個 QTLs 的 1.5-LOD support 區間，最後再以 makeqtl 以及 fitqtl 兩個函數進行數量性狀基因座的外表型解釋程度與加性效應估算。

五、抗青枯病連鎖分子標誌之開發與茄子抗青枯病基因型分析

透過遺傳圖譜資料，篩選出兩個抗病 QTLs 位於 1.5-LOD support 區間的所有 SNPs，接著再藉由王等 (2019) 文章中的方法⁽¹⁾ 將部分親本間的 SNPs 位點設計成為 KASP 分子標誌，並以 30 個由 CTAB 方法萃取的 F₂ 個體核酸，以及兩親本 (EG048 與 EG203) 核酸進行 KASP 分子標誌的基因型分析，以確保分子標誌分群良好。基因型分析的每個樣品反應總體積為 5 μ L，其中包含 2.5 μ L 2X KASP Genotyping Master Mix (LGC Genomics, Hoddlesdon, UK)、0.07 μ L KASP 分子標誌、1 μ L 基因組 DNA、1.43 μ L 二次蒸餾水。連鎖聚合反應 (polymerase chain reaction, PCR) 採用熱循環反應器 Biometra-Tprofessional Thermal cycler (Biometra, Gottingen, Germany)，先以 94°C 反應 15 分鐘後，接著以 94°C 20 秒，61°C 60 秒，循環 10 次，並將引子黏合/延長的溫度依每個循環降 0.6°C 的規律由第一個循環時的 61°C 逐漸下降到第十個循環時的 55°C，接著再以 94°C 20 秒，55°C 60 秒，循環 35 ~ 40 次。最後，我們將於熱循環反應器反應完成之 PCR 產物移往即時聚合酶連鎖反應器 CFX96 Connect (BioRad, Singapore)，在溫度條件為 37°C 時讀取螢光數值。實驗所使用的 KASP 分子標誌資訊如表 1。

表 1. 本篇文章中，基因型分析所使用的分子標誌資訊

Table 1. Kompetitive allele-specific PCR (KASP) markers used in this study

QTL	Marker	Primer sequences (5' to 3')
<i>qBWR2</i>	BW2_126463	Primer Seq Allele X AAGCTGAGTGTGCCAAGAGAAGG
		Primer Seq Allele Y AAGCTGAGTGTGCCAAGAGAAGC
		Primer Seq common ACACAACCTCTCCAGTCGCC
<i>qBWR3</i>	BW3_40239	Primer Seq Allele X TATGTAGGTTAGAAAAAGGAAGAGAAACAA
		Primer Seq Allele Y TGTAGGTTAGAAAAAGGAAGAGAAACAC
		Primer Seq common GCTCGTTTGCTGAATGCTACC

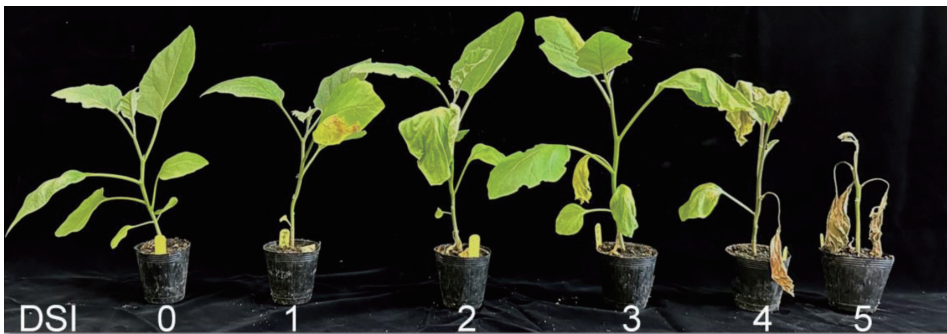


圖 1. 茄子在接種青枯病菌株後的病害指數 (disease severity index, DSI) 分級情形

Fig. 1. The 0 to 5 disease severity index (DSI) for measuring disease severity

結 果

一、茄子抗病分離族群對不同青枯病菌株之外表型調查

為了瞭解茄子抗青枯病自交系 ‘EG203’ 對不同青枯病菌株的抗病能力，本研究以 ‘EG203’ (具青枯病抗性的茄子自交系)、‘EG048’ (不具青枯病抗性的茄子自交系)，以及由 ‘EG203’ 和 ‘EG048’ 雜交所衍生的 F_1 與 F_2 族群，進行 3 種由國內茄科田區所分離的青枯病菌株 (Pss4、Pss97 與 Pss190) 的抗病特性遺傳分析。研究結果顯示，‘EG203’ 在人工接種 Pss4 菌株後的 28 天內的病害指數均為 0，‘EG048’ 與 F_1 族群在接種 Pss4 菌株 14 天後已全數死亡，病害指數均為 5。而 F_2 族群在接種 Pss4 菌株 7 天後開始出現明顯的萎凋病癥，並在接種 14 天後，病害指數逐漸呈現雙峰分佈 (圖 2a ~ d)。「EG203」、「EG048」、 F_1 以及 F_2 族群在人工接種 Pss97 菌株後的發病情況與接種 Pss4 菌株相似，‘EG203’ 在接種 Pss97 菌株後的 28 天內的病害指數均為 0，‘EG048’ 在接種後的 14 天病害指數大多數為 5，而 F_2 族群在接種 14 天後，病害指數逐漸呈現雙峰分佈。比較不一樣的是 F_1 族群，在人工接種 Pss97 菌株後仍具有部分抗性，雖然多數個體在接種 14 天已死亡，但仍有少數個體具有不錯的抗青枯病能力 (圖 2e ~ h)。然而在 Pss190 菌株接種試驗結果與上述兩組合差異甚大，多數的 ‘EG203’、 F_1 族群與 F_2 個體在接種 Pss190 菌株後的 28 天內的病害指數均為 0，而 ‘EG048’ 則在接種的 7 天後陸續出現病癥，並於接種的 14 天後相繼死亡 (圖 2i ~ l)。根據上述實驗研究結果顯示，分離族群的抗病能力，在不同菌株之下可能由不同遺傳機制 (不同的抗病基因組合) 所控制。

二、遺傳圖譜之建立

為了瞭解茄子自交系 ‘EG203’ 抗青枯病的遺傳機制，本研究從上述的 3 組青枯病菌株接種實驗中，選擇接種過 Pss4 菌株的 F_2 族群，進行 ‘EG203’ 抗 Pss4 菌株之數量性狀基因座定位。藉由 ddRAD_seq 定序方法，在所有分析樣品中總共獲得了 1,541,208,450 條定序長度為 150 bp paired-end 的 DNA 序列。透過 Stacks2.0 套件中 de-novo pipeline 的分析流程，在親本間初步獲得了 6,077 的 SNPs，經篩選，實驗最後選取了 1,483 個可靠的 SNPs 進行分離族群的遺傳圖譜建立，並獲得了總長度為 2,146.7 cM (centimorgan)，平均密度為 1.4 cM 的 12 個連鎖群 (圖 3) (表 2)。

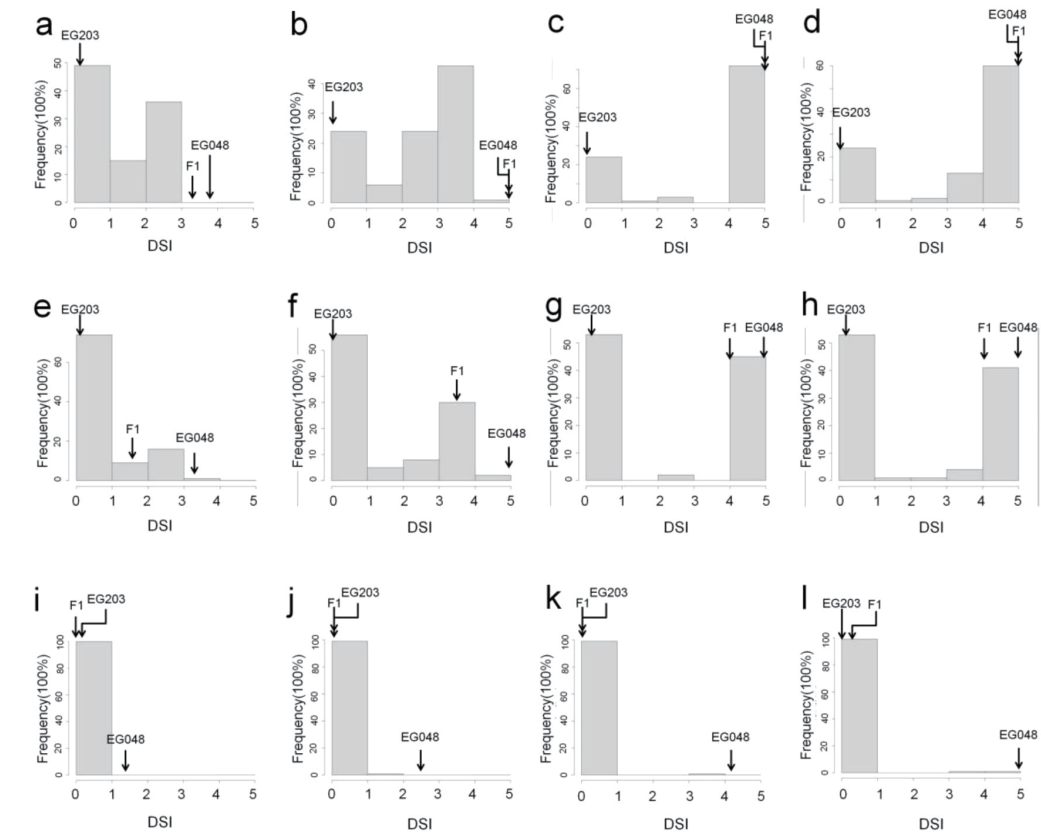


圖 2. ‘EG203’ 與 ‘EG048’ 雜交所衍生的 F_2 族群，在接種 3 種不同青枯病菌株後，第 7 ~ 28 天的病害指數 (disease severity index, DSI) 分布圖。(a ~ d) 族群在接種 Pss4 菌株後第 7、14、21 及 28 天的病害指數分布。(e ~ h) 族群在接種 Pss97 菌株後第 7、14、21 及 28 天的病害指數分布。(i ~ l) 族群在接種 Pss190 菌株後第 7、14、21 及 28 天的病害指數分布

Fig. 2. Frequency distribution of disease severity index (DSI) in the eggplant ‘EG203’ × ‘EG048’ F_2 population at 7, 14, 21 and 28 days after inoculation with three *Ralstonia solanacearum* species complex strains. (a-d) Frequency distribution of DSI for strain Pss4. (e-h) Frequency distribution of DSI for strain Pss97. (i-l) Frequency distribution of DSI for strain Pss190

表 2. 茄子 12 條連鎖群的詳細統計資訊

Table 2. Detailed statistical information on 12 linkage groups in eggplant

Linkage Groups	Length (cM)	No. of markers	Average density (cM)	max. spacing (cM)
1	245.6	181	1.4	10.9
2	215	157	1.4	13.8
3	213.9	151	1.4	14.7
4	187.9	150	1.3	14
5	163.9	148	1.1	9
6	159.6	119	1.4	10.1

表 2. 茄子 12 條連鎖群的詳細統計資訊 (續)

Table 2. Detailed statistical information on 12 linkage groups in eggplant (continued)

Linkage Groups	Length (cM)	No. of markers	Average density (cM)	max. spacing (cM)
7	161.3	117	1.4	15.7
8	146.7	99	1.5	15.7
9	149.6	92	1.6	13.5
10	190.6	93	2.1	15.6
11	176.1	91	2	22.7
12	136.4	85	1.6	17.9
Total	2,146.7	1,483	1.4	22.7

cM. centimorgan

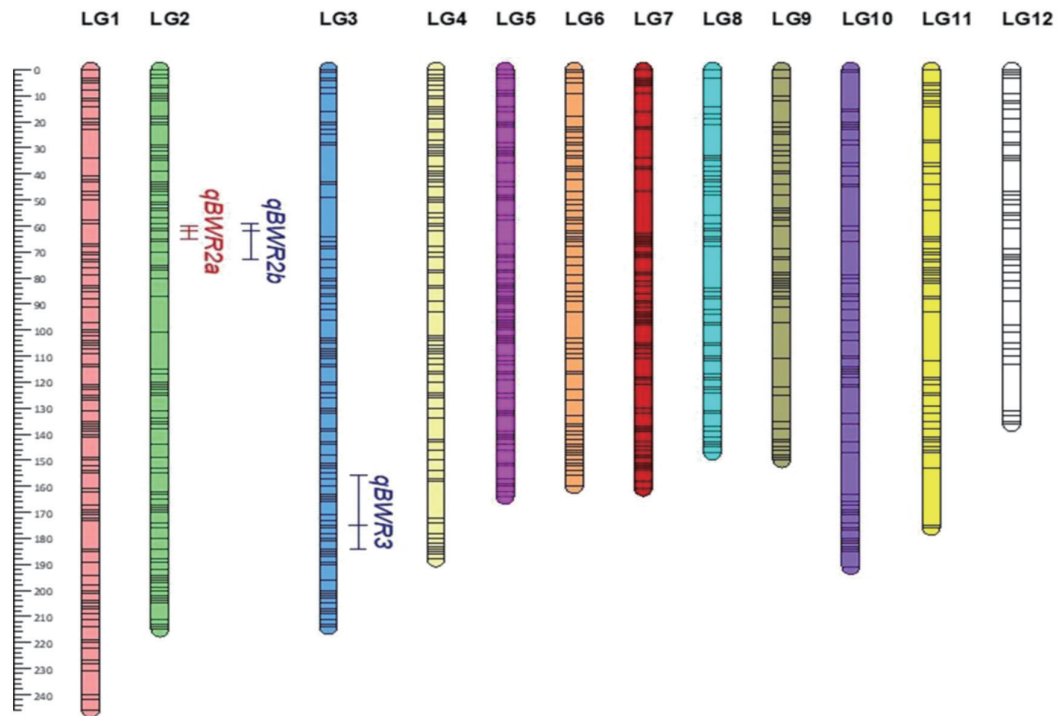


圖 3. 以 ‘EG203’ 與 ‘EG048’ 雜交衍生的 F_2 族群，所建構的茄子遺傳圖譜，及抗青枯病數量性狀基因座定位結果。12 個不同顏色的長條代表 12 個獨立連鎖群；長條圖形上方文字代表個別連鎖群名稱；圖左方的比例尺代表各連鎖群相對的遺傳距離，單位為 cM (centimorgan)；長條圖形右邊區間代表統計顯著的抗病數量性狀基因座的 1.5-LOD support 區間

Fig. 3. Genetic map of ‘EG203’ $\times$ ‘EG048’ F_2 population. The 12 bars represent 12 linkage groups. The markers’ genetic positions are symbolized by horizontal lines on the LG bars; Quantitative trait loci (QTLs) and their 1.5-LOD support interval are represented on the right of their respective chromosomes by red and blue lines, and their names are on the right of each QTL

三、茄子抗 Pss4 菌株特性之數量性狀基因座定位

透過分析 91 株接種過青枯病菌株 Pss4 的 F_2 個體的基因型資料，以及在 Pss4 菌株接種後第 7、14、21 與 28 日的病害指數數據，透過 R/qtl 套件中的 2 個區間定位模式（‘binary’ 與 ‘Nonparametric’ model），進行茄子抗 Pss4 菌株之數量性狀基因座定位。實驗結果顯示，人工接種 21 與 28 日後的病害指數，在 2 種 QTL 分析模式中，均未能偵測到任何顯著與青枯病抗性相關的 QTL，然而在人工接種後第 7 日的病害指數數據中，在使用 ‘binary’ model 時，可獲得一個位在第二條連鎖群的 QTL ($qBWR2a$)，此 QTL 位於第 2 條連鎖群的 61.9 cM，可解釋約 20.8% 的外表型變異（圖 3）（表 3）。在人工接種後第 14 日的病害指數數據中，則在使用 ‘Nonparametric’ model 時，可獲得 2 個與青枯病抗性相關的 QTLs ($qBWR2b$ 與 $qBWR3$)。 $qBWR2b$ 位在第二條連鎖群的 61.9 cM 位置，可解釋約 27.5% 的外表型變異； $qBWR3$ 位在第三條連鎖群的 174.7cM 位置，可解釋約 16.6% 的外表型變異，而 2 個 QTLs 總共可解釋約 37.86% 的外表型變異（圖 3、4）（表 3）。在人工接種後第 7 日與第 14 日的病害指數中，均發現了一個位於第二條染色體 61.9 cM 位置的 QTL，初步推估此 2 個 QTLs 應屬於同一個基因座，因此在接下來的文章中，稱此基因座為 $qBWR2$ 。

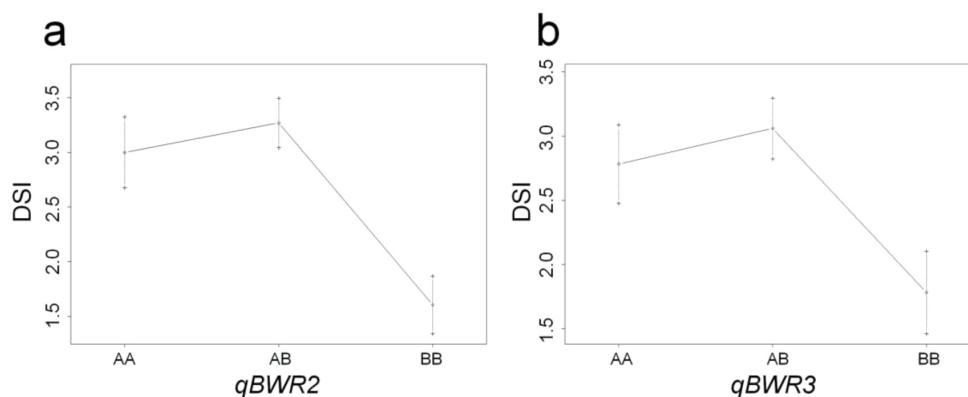


圖 4. 「EG203」×「EG048」 F_2 族群的病害指數 (disease severity index, DSI) 與抗病 QTL 基因型之效應分析。(a) 族群中帶有不同 $qBWR2$ 基因型的病害指數。(b) 族群中帶有不同 $qBWR3$ 基因型的病害指數。基因型 AA 代表帶有來自感病「EG048」親本的同質結合基因型個體；BB 代表帶有來自抗病「EG203」親本的同質結合基因型個體；AB 為異質結合基因型個體

Fig. 4. Plot of the disease severity index (DSI) against the genotype at QTL, $qBWR2$ and $qBWR3$. (a) Effect of the DSI against the genotype at $qBWR2$. (b) Effect of the DSI against the genotype at $qBWR3$. AA represented homozygous genotype of susceptible parent ‘EG048’; BB represented homozygous genotype of resistant parent ‘EG203’; AB represented heterozygous genotype. Error bars are ± 1 SD

四、茄子抗青枯病的連鎖分子標誌開發

為了將上述與青枯病抗性相關 QTLs 區間之 SNPs，轉換成可快速且精準運用於青枯病分子標誌輔助選種的分子標誌，透過比對遺傳圖譜資料，實驗於兩個抗病基因座 ($qBWR2$ 與 $qBWR3$) 的 1.5-LOD support 區間中，分別挑選 4 個 SNPs，將其轉換為

KASP 分子標誌，接著再以兩親本，以及 30 個由 ‘EG203’ 與 ‘EG048’ 雜交衍生出的 F_2 個體，進行 KASP 分子標誌的基因型判別測試。測試結果顯示，每個抗病基因座各別獲得一個基因型分群良好的分子標誌 (圖 5)。此外，所有分子標誌與統計上 LOD 最大的位置之間的遺傳距離均小於 1.0 cM，適合運用於茄子抗青枯病的基因型分析。

表 3. 茄子抗青枯病 Pss4 菌株的數量性狀基因座詳細資訊

Table 3. Detailed statistical information on the QTLs of eggplant resistant to bacterial wilt Pss4 strain

Traits	QTL	LG ^a	Interval (cM)	LOD ^b	PVE(%) ^c	Additive effect
DSI_7 days	<i>qBWR2a</i>	LG2	60.1 ~ 64.8	4.609	20.8	-0.2011
DSI_14 days	<i>qBWR2b</i>	LG2	59.0 ~ 73.0	7.246	27.5	-0.7586
	<i>qBWR3</i>	LG3	156.0 ~ 183.7	4.688	16.6	-0.5188

^a LG, linkage group.

^b LOD, logarithm of odds.

^c PVE, variance explained by the QTL.

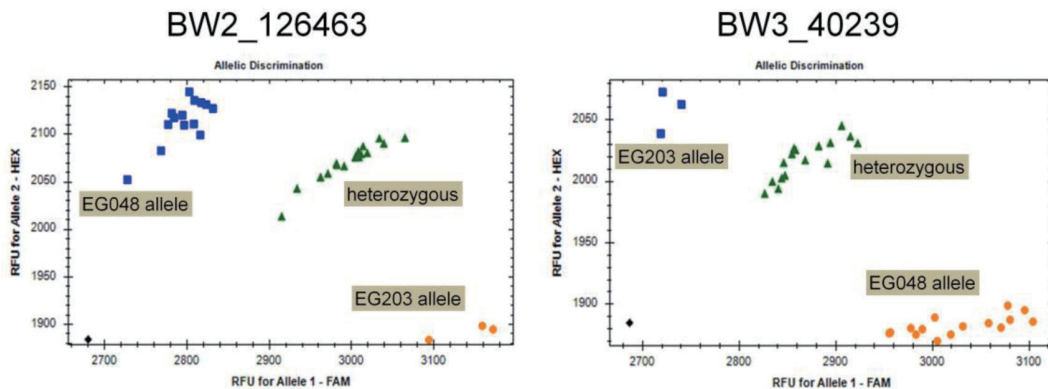


圖 5. 兩個與抗青枯病 QTL 連鎖之 KASP (kompetitive allele specific PCR) 分子標誌於兩親本，以及 30 個 F_2 參試品種的分群狀況 (藍色正方形代表此個體帶有同質結合的 HEX 螢光訊號基因型；橘色圓形代表此個體帶有同質結合的 FAM 螢光訊號基因型；綠色三角型則為異質結合基因型個體；黑色菱形則為無核酸模板對照組)

Fig. 5. Allelic discrimination plots obtained for 2 kompetitive allele specific PCR (KASP) assays on parents and 30 F_2 samples (Orange circles and blue squares represent the homozygous genotypes, the green triangle represent heterozygous genotypes and the black diamond on the bottom left of the plot are no template controls)

討 論

為了強化茄子的耐生物逆境特性，減少每年因病蟲害所造成的農業災損，本研究透過 91 株由 ‘EG203’ 與 ‘EG048’ 雜交衍伸的 F_2 個體進行抗病數量性狀基因座定位，偵測到 2 個與 Pss4 青枯病菌株抗性相關的數量性狀基因座，*qBWR2* 與 *qBWR3*，藉由比對 *qBWR2* 與

qBWR3 在茄子，以及其他茄科作物之染色體區間發現，*qBWR2* 所在區間與番茄的第 6 條染色體同源，物理圖譜位於番茄第 6 條染色體的 30.1 ~ 39.4 Mb，經比對其他茄科抗青枯病基因座定位文章結果發現，此區間與 Wang 等人 (2013) 以番茄為研究材料所發現的 *Bwr-6* (36.9 ~ 38.8 Mb)，以及 Salgon 等人 (2018) 以茄子為研究材料所發現的 *ERPR6* (25.7 ~ 38.9 Mb) 區間重疊^(18,20)；而 *qBWR3* 所在區間則與番茄的第 3 條染色體同源，物理圖譜位於番茄第 3 條染色體的 66.5 ~ 74.8 Mb，經比對發現，此區間也與 Wang 等人 (2013) 在番茄上所發現的 *Bwr-3* (61.2 ~ 70.8 Mb) 以及 Salgon 等人 (2018) 在茄子上所發現的 *ERPR3b* (65.2 ~ 67.8 Mb) 區間重疊^(18,20)。*ERPR3b* 以及 *ERPR6* 是前人文獻中，茄子品系 EG203 抗 Pss4 菌株中的主效抗病基因座⁽¹⁸⁾，而 *Bwr-6* 則是番茄抗病品系 Hawaii79962，抵抗青枯病的主效抗病基因座之一⁽²⁰⁾。青枯病的發病情況容易受到不同環境與雜交組合的遺傳背景影響，本研究所定位到的 2 個抗病 QTLs 與前人研究結果相似，顯示這 2 個 QTLs 能在不同栽培環境與雜交組合之間，都能有好的抗病表現，適合做為茄子抗青枯病的基因型篩選依據。

前人研究發現，茄子品系 'EG203' 抗 Pss4 菌株特性，應屬多基因控制的水平抗性 (horizontal resistance) 遺傳⁽¹⁸⁾。相較於前人文獻，本研究透過數量性狀基因座定位分析，僅獲得了 2 個與青枯病抗性相關的 QTLs，所定位到之基因座明顯比文獻中來的少，推測主因為本研究一開始所使用的族群個體數偏小，且僅使用一個季度環境來評估個體抗 Pss4 的能力，因此僅能獲得少數關於茄子抗 Pss4 相關的主效 QTLs，未來若能透過較大族群的重組自交系，藉由不同季度環境下重複評估各品系對青枯病的抗病能力，或許較易偵測到族群中，對於外表型變異解釋能力較小的 QTLs，抑或是與環境效應有交感的 QTLs，以獲得較完整的研究結果。然而，使用較少族群所偵測到的 QTLs，通常為對外表型變異解釋較強的主效 QTLs，而這些主效 QTLs 因為能解釋的外表型遺傳變異較高、加性效應較大，且通常在不同環境間表現較為穩定，較適合作為分子標誌輔助選種運用。因此本研究認為 *qBWR2* 與 *qBWR3* 兩個 QTLs 仍應可協助國內茄子育種專家選育抗青枯病的茄子品種，並提升國內茄子抗青枯病育種的選拔效率。

結 論

本研究透過國內使用最廣的抗病親本 'EG203'，與感病親本 'EG048' 所衍生的 F₂ 族群，進行茄子抗青枯病的遺傳分析，以及數量性狀基因座定位，獲得了 2 個來自親本 'EG203' 的主效抗病基因座，*qBWR2* 與 *qBWR3*。此外，文章中也各別設計了一個與 *qBWR2*，以及 *qBWR3* 基因座緊密連鎖的分子標誌，可供國內茄子育種專家，進行茄子抗青枯病之分子標誌輔助選種運用。

誌 謝

感謝農業部臺南區農業改良場科技計畫經費支持【109 農科 -4.6.2- 南 -N、1110 農科 -4.6.2- 南 -N1、111 農科 -4.6.2- 南 -N1】。

引用文獻

1. 王聖善、朱詠筑、蔡佩樺、楊藹華。2019。利用 SNP 分子標誌建立胡瓜雜交種子純度檢

- 測技術。臺南區農業改良場研究彙報 74：27-35。
2. 陳農哲。1998。茄子育種。蔬菜育種技術研習會專刊。臺灣省農業試驗所。臺中。285-303。
 3. Broman, K. W., H. Wu, S. Sen and G. A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889-890.
 4. Cao, B. H., J. J. Lei, Y. Wang and G. J. Chen. 2009. Inheritance and identification of SCAR linked to bacterial wilt-resistance in eggplant. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 5201-5207.
 5. Carmeille, A., C. Caranta, J. Dintinger, P. Prior, J. Luisetti and P. Besse. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 113: 110-121.
 6. Catchen, J., P. A. Hohenlohe, S. Bassham, A. Amores and W. A. Cresko. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol. Ecol.* 22: 3124-3140.
 7. Chiou, Y.S. 2002. Characteristics of strains of *Ralstonia solanacearum* recently affecting potatoes in central Taiwan. Master Thesis, National Chung Hsing University, 46 pp. (in Chinese)
 8. Du, H., C. Wen, X. Zhang, X. Xu, J. Yang, B. Chen and S. Geng. 2019. Identification of a major QTL (qRRs-10.1) that confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in pepper (*Capsicum annuum*) using SLAF-BSA and QTL mapping. *Int J Mol Sci.* 20: 5887.
 9. Fegan, M. and P. Prior. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? Pages 449-461 in: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. APS Press, St. Paul, MN, 510 pp.
 10. Habe, I., K. Miyatake, T. Nunome, M. Yamasaki and T. Hayashi. 2019. QTL analysis of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in potato. *Breed Sci.* 69: 592-600.
 11. Hsu, S.T. 1991. Ecology and control of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 33: 72-79. (in Chinese)
 12. Lebeau, A., M.C. Daunay, A. Frary, A. Palloix, J.F. Wang, J. Dintinger, F. Chiroleu, E. Wicker and P. Prior. 2010. Bacterial Wilt Resistance in Tomato, Pepper, and Eggplant: Genetic Resources Respond to Diverse Strains in the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Phytopathology.* 101: 154-165.
 13. Lebeau, A., M. Gouy, M. C. Daunay, E. Wicker, F. Chiroleu, P. Prior, A. Frary, and J. Dintinger. 2013. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theor. Appl. Genet.* 126: 143-158.
 14. Lin, C.H. 2008. Application of population profiling and detection of *Ralstonia solanacearum* on integrated management of tomato bacterial wilt. Doctoral Dissertation, National Chung Hsing University, 101 pp.
 15. Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
 16. Peterson, B. K., J. N. Weber, E. H. Kay, H. S. Fisher and H. E. Hoekstra. 2012. Double Digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE* 7(5): e37135.
 17. Salgon, S., C. Jourda, C. Sauvage, M. Daunay, B. Reynaud, E. Wicker and J. Dintinger. 2017.

- Eggplant resistance to the *Ralstonia solanacearum* species complex involves both broad-spectrum and strain-specific quantitative trait loci. *Front. Plant Sci.* 8: 828.
18. Salgon, S., M. Raynal, S. Lebon, J. M. Baptiste, M. C. Daunay, J. Dintinger and C. Jourda. 2018. Genotyping by sequencing highlights a polygenic resistance to *Ralstonia pseudosolanacearum* in Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 19: 357.
19. Voorrips, R. E. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 93: 77-78.
20. Wang, J. F., F. I. Ho, H. T. H. Truong, S. M. Huang, C. H. Balatero, V. Dittapongpitch and N. Hidayati. 2013. Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica*. 190: 241-252.
21. Wei, Q., J. Wang, W. Wang, T. Hu, H. Hu, C. Bao. 2020. A high-quality chromosome-level genome assembly reveals genetics for important traits in eggplant. *Hortic Res* 7:153.
22. Yanping, Z., L. Hui, Z. Hairui and G. Gao. 2013. Identification and utility of SRAP markers linked to bacterial wilt resistance gene in potato. *Vegetos* 26: 131-138.

Identification of quantitative trait loci for bacterial wilt disease resistance in eggplant¹

Wang, S. S., Y. C. Chu, P. H. Tsai and Y. F. Wu²

Abstract

Bacterial wilt is one of the most serious diseases of solanaceous crops in Taiwan. To determine the quantitative trait loci (QTLs) of resistance to *Ralstonia solanacearum* species complex (*RssC*) in eggplant, a F₂ population derived from a cross between resistant eggplant variety 'EG203' and susceptible variety 'EG048' was created. This population was subsequently subjected to evaluations against three distinct *RssC* strains, namely Pss4, Pss97, and Pss190. The observed distribution patterns of disease severity index (DSI) revealed a trio of varied genetic mechanisms that seem to underlie resistance against the three *RssC* strains. Through QTL mapping specific to resistance against the Pss4 *RssC* strains, two QTLs, namely *qBWR2* and *qBWR3* were detected. These identified QTLs accounted for 27.5% and 16.6% of the total phenotypic variability, respectively. Our findings provide a better understanding of BW-resistance in eggplant, and could be used to improve breeding efficiency.

What is already known on this subject?

Several quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance to bacterial wilt in solanaceous crops have been identified in previous studies.

What are the new findings?

We developed potential molecular markers of resistance to bacterial wilt. It will improve the efficiency of breeding selection to breed elite eggplant variety.

What is the expected impact on this field?

It aids in augmenting eggplant's resistance against bacterial wilt disease, thereby enabling farmers to mitigate production risks.

Key words: Kompetitive allele-specific PCR, Resistance breeding, Next generation sequencing, Double digest restriction site associated DNA sequencing

Accepted for publication: October 20, 2023

1. Contribution No. 561 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station.

2. Assistant Researcher, Assistant Researcher, Research Assistant and Associate Researcher, Tainan District Agricultural Research and Extension Station. 70 Muchang, Hsinhua, Tainan 712009, Taiwan, R.O.C.