

草莓種原之重要性狀基因型鑑定

葉人豪*、韋立博

農業部苗栗區農業改良場

摘 要

草莓為八倍體物種，分子遺傳研究起步較晚，但在近代技術進步下已累積相當成果。本研究以數個重要性狀相關基因之分子標誌，對苗栗區農業改良場保存的 47 個草莓種原進行基因型鑑定。試驗結果顯示 MLS026、MLS034 與 MLS039 等 3 個種原帶有顯性連續開花基因 *PFRU*；有 35 個種原帶有草莓果實香味成分 mesifurane 生合成相關基因 *FaOMT*，其中 6 個種原 MLS008、MLS011、MLS018、MLS026、MLS029 與 MLS036 為顯性同結合基因型；抗炭疽病基因 *RCa2* 之分子標誌鑑定結果與已知外表型資料相悖，推測為病原菌種類差異所致；其餘 3 項抗病性基因相關分子標誌測試則尚未取得明確可應用之成果。後續研究尚待實際栽培進行外表型調查，驗證分子標誌預測準確性，未來可望納入本次未受試之國內其他種原，以期促進草莓遺傳研究與品種改良工作。

關鍵詞：草莓、分子標誌、連續開花、果實香味、抗病基因

*通訊作者電子郵件位址：yehjh@mdares.gov.tw

前 言

栽培種草莓 (*Fragaria ananassa*) 係薔薇科草莓屬多年生草本植物，為國人喜愛的特色水果，依農業統計年報 (農業部農糧署，2022)，2021 年全國草莓生產面積 509 公頃，產量 9,142 公噸，產值約 20 億元，其中以苗栗縣為主要產地，其生產面

積、產量及產值皆佔全國九成以上。草莓亦為國際上重要經濟作物，世界各國為其挹注大量研究資源，雖然其八倍體的遺傳特性較為複雜，相關研究進展起步不若模式植物或許多大宗農藝作物。但至 2000 年初期，各種基因型鑑定技術亦開始應用在草莓上，並獲得可靠的遺傳資訊，有大量研究以擴增片段長度多型性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 或簡單重複序列 (Simple sequence repeat, SSR) 等傳統分子標誌進行品種鑑定、親緣關係推算、建立連鎖圖譜與尋找數量性狀基因座 (Quantitative trait locus, QTL)，重要的基礎工具則如利用二倍體親緣物種－野生草莓 (*Fragaria vesca*) 基因體為參考序列，開發 SNP 微陣列基因型鑑定平台 IStraw 90 (Bassil *et al.*, 2015)。近年隨著高通量定序技術與生物資訊學的長足進步，草莓遺傳研究陸續獲得重要突破，例如以國際上重要栽培品種「Camarosa」定序組裝出第一個八倍體栽培種草莓的全基因體參考序列，使過往較為破碎、不完整且連鎖群排序編號混亂的連鎖圖譜得以有對照標準，並分析栽培種草莓與二倍體親緣物種的演化歷史 (Edger *et al.*, 2019)；比對多個栽培或野生種原與參考序列間的 DNA 多型性，開發出足以區別次基因體 (subgenome) 序列差異的 50K 及 850K SNP 微陣列，並發現八倍體草莓歷經百萬年的演化，其基因體已相當「二倍體化」，同源基因的排列位置與親緣種野生草莓有高度共線性 (Hardigan *et al.*, 2020)。

除了前述基礎工具及演化遺傳相關研究，分子育種方面也已有大量的研究成果。2018 年 Springer 出版薔薇科莓果類基因體專書，其中關於多倍體草莓抗病性之章節 (Nellist, 2018) 彙整了 14 個主要草莓病害的病徵、病原菌、危害區域、相關遺傳研究以及是否有發現抗病基因；關於草莓果實成熟與果實品質相關 QTL 之章節 (Pott *et al.*, 2018) 則敘述草莓果實發育及成熟過程、植物賀爾蒙調控機制、各代謝物反應途徑、轉錄調控因子以及相關的 QTL 研究。2019 年，由美國農業部和佛羅里達草莓研究與教育基金會出資的 RosBREED 研究計畫發布了草莓 DNA 測試手冊 (Oh *et al.*, 2019)，手冊中彙整並擷取與草莓性狀 DNA 分子標誌相關的前人研究，包括多個重要性狀基因 (連續開花、果實香味相關物質 γ -decalactone 和 mesifurane 生成、果實顏色，以及冠腐病 (*Phytophthora cactorum*)、角斑病 (*Xanthomonas fragariae*)、炭疽病 (*Colletotrichum acutatum*) 等 3 種病害之抗病性) 的現有分子標誌序列、試驗條件、判讀結果和對照品種，供希望針對該等性狀進行育種或分子遺傳研究的人員

可快速上手，促進草莓遺傳育種研究方向。

分子標誌輔助選種 (Marker-assisted selection, MAS) 為作物育種過程中直接依據個體基因型進行選拔的方法。理想上，若能發現調控目標性狀的基因座，並設計出與該基因座緊密連鎖的分子標誌，即可以高準確性、高通量、低成本且低技術門檻的方式，從目標族群快速篩選帶有該性狀的個體；在調查成本較高的性狀 (例如作物抗病性、果實相關性狀) 上，MAS 的效益更顯突出。MAS 技術已是作物育種上的重要工具，依前人文獻整理 (王，2021)，國內大專院校與農業研究單位自 2007 年開始逐漸應用 MAS，目標作物包括水稻、番茄、落花生、番椒、花椰菜、甘藍與青花菜，至今國內農業研究單位透過 MAS 育成新品種包括農藝作物水稻「臺南 16 號」(陳等，2012)、「臺南 19 號」(陳等，2019)、「臺農 85 號」(李等，2022) 與「台中秈 199 號」(吳、楊，品種審查中)，落花生「臺農 11 號」(戴、許，2017) 與「臺南 20 號」(陳，2022)，園藝作物則有番茄「花蓮 24 號 - 友愛」(王，2022) 與「台中 11 號」(林、吳，2022)。

草莓分子遺傳研究雖然起步較晚，但已憑藉新技術急起直追，近年如美國加州大學為因應州內草莓產業受萎凋病重挫，遂針對加州本地與跨國種原進行抗萎凋病外表型篩選與基因型鑑定，結合多種分子遺傳工具發現 5 個抗萎凋病基因 *Fw1-Fw5* (Pincot *et al.*, 2022)，並以 MAS 選育出多個適合不同栽培系統之抗萎凋病新品種。我國當前對於草莓分子遺傳研究極其有限，為探索現階段國內草莓育種工作應用 MAS 之可行性，本研究嘗試以前述草莓 DNA 測試手冊及相關文獻所載的多個重要性狀相關基因之分子標誌，針對本場現有 47 個草莓種原進行基因型鑑定，檢視其適用性與現有種原作為育種材料之可利用性。

材料與方法

一、試驗種原及核酸萃取

試驗種原來自苗栗區農業改良場所蒐集之草莓品種或品系合計 47 個 (表一)，核酸 (DNA) 萃取採 CTAB 法 (Doyle, 1991)，剪取草莓未展開葉秤重 0.1 g 後置於微量離心管中，使用液態氮冷凍葉片並將葉片組織研磨至粉末狀。加入 1,000 μ l

的植物核酸萃取溶液 (2X CTAB extraction buffer)，核酸萃取溶液的組成為 2% 溴化十六烷基三甲銨 (Cetyltrimethylammonium bromide)，1.4 M 氯化鈉 (Sodium chloride)，1% 聚乙炔吡咯烷酮 (Polyvinylpyrrolidone)，20 mM 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid)，pH = 8.0，100 mM 三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽溶液 (Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride, pH = 8.0)。混合均勻後，利用乾浴器 (DLAB Scientific HM100-Pro) 65°C 乾浴震盪 10 分鐘，以離心機 (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 8R Centrifuge) 設定 12,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至新的微量離心管。接著在真空抽氣櫃中加入 500 μ l (上清液一半體積) 的苯酚 - 氯仿 - 異戊醇混合液 (Phenol/chloroform/isoamy alcohol (25:24:1)) 混勻後靜置室溫 5 分鐘，12,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至新的微量離心管。加入 0.1 倍體積的 3 M 醋酸鈉 (Sodium acetate) 溶液、0.6 倍體積的異丙醇 (Isopropanol)，輕輕搖勻混合後放入 -20°C 冰箱使 DNA 沉降至少 30 分鐘。將已沉降之樣品以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，去除上清液後加入 1 ml 的 75% 乙醇 (Ethanol) 混和均勻冰上 5 分鐘，再以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液。將已去除上清液之樣品利用乾浴器蒸乾殘留的乙醇，加入 30 至 50 μ l 二次水 (Distillation-distillation H₂O) 回溶 DNA。

回溶後的 DNA 可在 -20°C 低溫下保存半年，為了利用聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 進行目標片段的擴增，需使用超微量分光光度計 (Thermo Scientific-NANODROP ONE) 測量樣本 DNA 濃度，再將樣本 DNA 分裝稀釋成濃度 1 ng/ μ l 至新的微量離心管中並保存於 4°C 冰箱。

表一、試驗草莓種原清單及各分子標誌表現

Table 1. Strawberry germplasm and presence or absence of molecular markers^w

Accession ID ^x	PFRU Codominant (226/508 bp) ^y	FaOMT (217/248 bp) ^y	FaRPe2 (132/186 bp) ^y
MLS001	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS002	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS003	+/-	+/-	+/+
MLS004	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS005	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS006	+/-	+/+ ^z	+/+

表一 (續)
Table 1 (continued)

MLS007	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS008	+/-	-/+	+/+
MLS009	+/-	+/-	+/+
MLS010	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS011	+/-	-/+	+/+
MLS012	+/-	+/+ ^z	-/+
MLS013	+/-	+/+ ^z	-/+ ^z
MLS014	+/-	+/+	+/+
MLS015	+/-	+/-	-/+ ^z
MLS016	+/-	+/-	+/+
MLS017	+/-	+/+	-/+
MLS018	+/-	-/+	-/+
MLS019	+/-	+/+	-/+ ^z
MLS020	+/-	+/-	-/+
MLS021	+/-	+/+	+ ^z /+
MLS022	+/-	+/+	-/+ ^z
MLS023	+/-	+/+	-/+ ^z
MLS024	+/-	+/+	+/+
MLS025	+/-	+/+	+/+
MLS026	+/+	-/+	+/+
MLS027	+/-	+/+	-/+
MLS028	+/-	+/-	+ ^z /+
MLS029	+/-	-/+	+/+
MLS030	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS031	+/-	+/+	+/+
MLS032	+/-	+/-	+/+
MLS033	+/-	+/-	+/+
MLS034	+/+	+/-	-/+ ^z

表一 (續)

Table 1 (continued)

MLS035	+/-	+/-	+/+
MLS036	+/-	-/+	+/+
MLS037	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS038	+/-	+/+ ^z	+/+ ^z
MLS039	+/+	-/+	+/+
MLS000A01-1	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS000A02-1	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS000A02-2	+/-	+/-	-/+ ^z
MLS000A03-1	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS000A03-2	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS000A03-3	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS000A04-1	+/-	+/+ ^z	+/+
MLS000A05-1	+/-	+/-	+/+

^w Markers associated traits : PFRU : perpetual flowering ; FaOMT : synthesis of mesifurane ; FaRPC2 : strawberry crown rot resistant.

^x MLS001 : Earliglow ; MLS002 : Tristar ; MLS003 : Tufts ; MLS004 : Cruz ; MLS005 : Sequoia ; MLS006 : 福羽 ; MLS007 : Solana ; MLS008 : Freson ; MLS009 : Tioga ; MLS010 : 春香 ; MLS011 : Camarosa ; MLS012 : Coral 實生苗 ; MLS013 : 女嶺 ; MLS014 : Camarosa(OP) ; MLS015 : 桃薰 ; MLS016: 泰國 ; MLS017 : 天來 1 號 ; MLS018: 天來 3 號 ; MLS019 : 春香 ; MLS020: 幸香 ; MLS021: 章姬 ; MLS022: 范 ; MLS023: 栢乙女 ; MLS024: 紅顏 ; MLS025: 印尼 ; MLS026 : 加拿大 ; MLS027 : 雪兔 ; MLS028 : 桃園 1 號 ; MLS029 : 桃園 4 號 ; MLS030 : 香水 ; MLS031 : 戀香 ; MLS032 : 戀 ; MLS033 : 甘王 ; MLS034 : 優雪 ; MLS035 : 佐賀清香 ; MLS036 : 奶油 ; MLS037 : 聖誕紅 ; MLS038 : 荷蘭 ; MLS039 : 天使 ; MLS000A01-1 to MLS000A05-1 : Miaoli District Agricultural Research and Extension Station (MDARES) breeding lines.

^y Bold numbers represent dominant allele's band length.

^z Ambiguous band.

二、重要性狀分子標誌

以 Oh *et al.* (2019) 所發布之草莓 DNA 測試手冊中所列分子標誌，多數為高解析度熔解分析 (High resolution melting, HRM) 或競爭性等位基因特異性分析 (Kompetitive allele-specific PCR, KASP) 方法判讀單一核苷酸多型性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 之分子標誌，兩者皆須使用具螢光偵測機能之即時定量 PCR (Real-time PCR) 儀器及相關軟體進行判讀。因筆者實驗室尚無相關儀器，故優先就文獻中可直接以一般 PCR 儀器及水平膠體電泳進行判讀之分子標誌進行測試，並補充未列入之其他相關文獻所開發之分子標誌，依所載序列 (表二) 訂購引子使用。各性狀簡述及判讀方式如下：

(一) 連續開花基因 *PFRU*

栽培種草莓開花受光週期與溫度影響，多數草莓品種為短日照型，僅單季開花，少數種原為日中性，對光週期不敏感，溫度條件適宜下，一年中可在多個季節連續開花。前人研究發現調控連續開花與否的關鍵為顯性基因 *PFRU* (Gaston *et al.*, 2013)，草莓 DNA 測試手冊列出對應的分子標誌之一：Bx215，若引子擴增出 128 bp 大小條帶，表示預測為連續開花基因型，反之無 128 bp 條帶者則預測為單季開花基因型。

針對 *PFRU* 的基因型鑑定，一併使用其他團隊 (Saiga *et al.*, 2023) 開發出的共顯性分子標誌，利用 1 個共通的正向引子與 2 個分別對應顯性或隱性等位基因序列片段的反向引子，擴增產生顯性的 508 bp 或隱性的 226 bp 兩種大小之條帶，藉此不僅可預測開花表現為單季型或連續型，亦可判別個體基因型為同型結合或異型結合。

(二) 香味成分 γ -decalactone 合成相關基因 *FaFAD1*

γ -decalactone (γ -癸內酯) 為具有強烈桃香味的化合物，廣泛存在於桃、杏、草莓果實中。Chambers *et al.* (2014) 研究證實草莓的 *FaFAD1* 基因與 γ -decalactone 生合成有關，該研究並以野生二倍體草莓 *Fragaria vesca* 基因體設計出顯性分子標誌，能產生 γ -decalactone 的栽培種草莓可利用 gene24414 引子擴增出 500 bp 的條帶。

草莓 DNA 測試手冊內使用 Sánchez-Sevilla *et al.* (2014) 開發的顯性分子標誌

qFaFAD1，則可擴增出 140 bp 大小的條帶，由條帶有無預測是否產生 γ -decalactone。

(三) 香味成分 mesifurane 合成相關基因 *FaOMT*

Mesifurane (2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone) 為呋喃類化合物，被形容為有雪莉酒香味，是構成草莓香味中的主要成分。Zorrilla-Fontanesi *et al.* (2012) 根據 mesifurane 生合成路徑相關基因 *FaOMT* 啟動子序列開發出 FaOMTSI/NO 共顯性分子標誌，能擴增出顯性的 248 bp 或隱性的 217 bp 兩種大小的條帶，帶有顯性等位基因則預測可產生 mesifurane，並可判別個體基因型為同型結合或異型結合。

(四) 抗炭疽病基因 *RCa2*

草莓炭疽病為全球多國草莓重要病害，病原菌分類複雜，基因型多樣，寄主亦涵蓋多種植物。針對病原菌之一 *Colletotrichum acutatum* 第 2 致病群，前人研究 (Lerceteau-Köhler *et al.*, 2005) 開發出 2 個 SCAR (Sequence characterized amplified region) 顯性分子標誌：STS-Rca2_417 與 STS-Rca2_240，若樣本帶有抗病基因 *RCa2*，分別可擴增出 417 bp 與 240 bp 之序列片段。

三、T-ARMS PCR 分子標誌設計

針對草莓 DNA 測試手冊中只有 HRM 或 KASP 分子標誌，需即時定量 PCR 儀器及相關軟體進行判讀之抗角斑病基因、抗炭疽病基因與抗冠腐病基因的分子標誌，另嘗試以吳和陳 (2018) 所示之四引子擴增阻滯突變系統 (Tetra-primer amplification refractory mutation system, T-ARMS) PCR 反應，設計一般 PCR 儀器與普通電泳設備即可判讀 SNP 的 T-ARMS PCR 分子標誌。試驗使用引子序列如 (表二)，各性狀概述、分子標誌設計流程及判讀方法簡述如下：

(一) 抗角斑病基因 *FaRXf1*

草莓角斑病由病原菌 *Xanthomonas fragariae* 造成，為草莓最主要的細菌性病害，全球多國皆有為害紀錄，影響果實產量，且目前化學防治效果有限。根據前人研究 (Oh *et al.*, 2020) 所使用的探針 AX-89840981 序列 (表二) 設計 T-ARMS PCR 引子，利用薔薇科基因體資料庫 (Genome Database for Rosaceae; Jung *et al.*, 2019) 中內建的 BLAST 軟體將探針序列與已解序之栽培種草莓「Camarosa」基因體比對，並根據文

獻鎖定在 Fvb6-2 染色體上之比對結果，擷取前後各 500 bp 長度的序列，輸入 T-ARMS PCR 引子線上設計網站 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1>)，標註 SNP 位點與該位點含氮鹼基資訊，再依照網站所設計出的十組引子對對種原進行測試，根據網站估算當該 SNP 位點為腺嘌呤 (Adenine, A) 時為不具抗病性的等位基因，擴增出 195 bp 大小的條帶，而當 SNP 位點為鳥嘌呤 (Guanine, G) 時為具抗病性的等位基因，依據不同引子比對組合擴增出 160~290 bp 大小的條帶，共有條帶 (Outer primer products) 也會因不同引子對組合擴增出 305~428 bp 大小不等的條帶。

(二) 抗炭疽病基因 *FaRCg1*

Colletotrichum gloeosporioides 同為草莓炭疽病病原菌之一，前人研究以全基因體關聯性分析偵測到抗病基因 *FaRCg1* 並設計對應之 HRM 分子標誌 (Anciro *et al.*, 2018)，依照探針 AX-89906235 設計 T-ARMS PCR 引子對，根據探針在 Fvb6-3 染色體上的位置，擷取前後各 500 bp 長度的序列並利用前述 T-ARMS PCR 引子設計網站設計偵測 SNP 位點的引子對組合，根據網站估算當該 SNP 位點為腺嘌呤 (Adenine, A) 時擴增出 227 bp 大小的條帶，當 SNP 位點為胸腺嘧啶 (Thymine, T) 則會依據不同引子對組合會擴增出 182~190 bp 大小的條帶，共有條帶根據不同引子對組合能擴增出 353~360 bp 大小的條帶。經使用「Camarosa」品種測試各引子對後選用共有條帶大小 354 bp、胸腺嘧啶 (Thymine, T) 條帶大小 183 bp 之引子對進行試驗，選用引子序列如表二。

(三) 抗冠腐病基因 *FaRPc2*

草莓冠腐病由疫病菌 *Phytophthora cactorum* 造成，染病植株病徵與炭疽病冠部感染類似，同一菌種亦可造成草莓果腐病 (Leather rot)。Noh *et al.* (2018) 針對草莓抗冠腐病基因 *FaRPc2*，開發出針對其 SNP 位點的 HRM 分子標誌 RPKASPH3，當 SNP 位點為腺嘌呤 (Adenine, A) 時預測有抗冠腐病特性。本篇研究依據 RPKASPH3 在 Fvb7-3 染色體上的位置，同上述 T-ARMS PCR 引子設計的方法開發能偵測 *FaRPc2* SNP 位點的引子對組合，測試選用之引子對當該 SNP 位點為腺嘌呤 (Adenine, A) 時能擴增出 132 bp 的條帶、SNP 位點為鳥嘌呤 (Guanine, G) 時能擴增出 186 bp 的條帶，共用條帶大小為 262 bp，引子序列如表二。

四、基因型鑑定

(一) 儀器與設定條件

使用核酸擴增儀 (Applied Biosystems™ Veriti™ ThermalCycler, 96-Well) 進行 PCR 擴增目標片段，程序設定如下：(Stage1 × 1cycle) 94°C, 5 min，(Stage2 × 35 cycle) 94°C, 1 min > 55°C, 1 min > 72°C, 45 sec，(Stage 3 × 1cycle) 72°C, 15 min，(Stage4 × 1cycle) 25°C, ∞ min。

水平膠體電泳使用 Mupid-2plus 水平電泳槽進行目標片段的分離，電壓與時間設定條件為 100 V, 30 min。

結果分析採用多光源激發膠體分析系統 (Dolphin-Doc plus image system)，配合影像分析軟體 (Dolphin-1D analysis software) 對水平膠體電泳分離之 DNA 膠體條帶拍照攝影，膠體曝光時間設定範圍 100~1,000 ms，視 DNA 條帶訊號強度調整。

(二) PCR 試劑與電泳膠體配置

本研究中所配置的 PCR 試劑總體積為 25 μl，內含五倍耐熱聚合酶預混組 (GeneMark-PCR Master Mix II) (5X), 5 μl、對應正向引子稀釋液 (10 μM), 2.5 μl、對應反向引子稀釋液 (10 μM), 2.5 μl、待測樣本 DNA 稀釋液 (1 ng/μl), 15 μl。正反引子在 PCR 試劑總體積為 5 μl，如果該次 PCR 所使用的引子數為兩個以上則個別引子體積為： $5 / (\text{所使用引子總數}) = (\text{個別引子體積} (\mu\text{l}))$ 。當 PCR 反應結束時，在每個微量離心管中加入核酸染劑 (6 × DNA loading buffer) 5 μl，並混合均勻使最終反應產物總體積為 30 μl。

在 DNA 水平膠體電泳實驗中，所鑄成的膠體成分為 1.5~2.0% 低熔點瓊脂糖，瓊脂糖濃度可根據目標片段大小而做調整，膠體使用電泳緩衝液 (1 × TBE, GeneMark™) 作為溶劑，水平電泳槽中也同樣使用電泳緩衝液 (1 × TBE) 以建立膠體電泳中的電場來源。

表二、已發表分子標誌之重要性狀相關基因，對應之引子或探針名稱與其序列

Table 2. Names and sequences of primers or probes for published molecular markers targeting genes related to important traits

Traits	Target gene	Primer/probe name	Primer sequences (5' to 3')	Reference
<i>Flowering</i>				
Perpetual flowering	<i>FaPFRU</i>	Bx215-FaPFRU-F	CAATTTCCCGCCAAAAAGTAA	Perrotte <i>et al.</i> , 2016
		Bx215-FaPFRU-R	GTTTGTGGAGCTTCGAGCAAAGTT	
		PFRU_common_Fw	AAAGCTGGAAAAGCTCTGGTA	Saiga <i>et al.</i> , 2023
		PFRU_SF_Rv	GGAGAGGTCCCATTTATAAACCCAAAAGTG	
		PFRU_PF_Rv	AATGCGGCAAGTCCTACGAC	
<i>Fruit flavor</i>	<i>FaFAD1</i>	gene 24414-F	CGGGATTAATGGTTTGTGTGACCGACC	Chambers <i>et al.</i> , 2014
		gene 24414-R	GTAGAAGAGAGAGACCAAGACGAG	
		qFaFAD1-F	TCTGTACTCTACCGCCTTGC	Sánchez-Sevilla <i>et al.</i> , 2014
		qFaFAD1-R	TCGTAGTGTGGCAGTGAAGG	
		FaOMTSI/NO-F	CGATCATTTCGAAAAGGACTAGT	
Mesifurane	<i>FaOMT</i>	FaOMTSI/NO-R	AAGCAGGGTTAGTTGTGGAGA	Zorrilla-Fontanesi <i>et al.</i> , 2012
		<i>Disease resistance</i>		
<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>FaRea2</i>	CAC_240_2F	GCCACGTCACTAGTCAAATTCAA	Lerceteau-Köhler <i>et al.</i> , 2005
		CAC_240_2R	TCATGGACAGTGGTCTCAGC	
		CAC_417_3F	ACCATGCAGAACGTTCAAGATAT	
		CAC_417_3R	TCCCAGCTGAAGATCAATGTAGT	

表二 (續)

Table 2. (continued)

<i>Xanthomonas fragariae</i>	<i>FaRXf1</i>	AX-89840981	CAAGCACGAAACAACATCAGCATCAGAAAACCTCG ATA[G/A]ACTAACTTGGTTATCTCATACATTATTG CATAGGC	Oh <i>et al.</i> , 2020
	FaRXf1-Forward inner primer (A allele)		CAACATCAGCATCAGAAAACCTCGAGAA	This study
	FaRXf1-Reverse inner primer (G allele)		GCAATAATGTATGAGATAACCAAGTTAATTC	
	FaRXf1-Forward outer primer		AACAAGAAAIIGGGTAAACAAAATATCGA	
	FaRXf1-Reverse outer primer		ATTTTTTTTTTGGTAGGAGTTGATTGAA	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>FaRCg1</i>	AX-89906235	AACACCTAAGTATTTTCTAAATAAGAAAACAGAA CC[AT]GC AAAATGCCAATTAACAAAATCTGC	Anciro <i>et al.</i> , 2018
	FaRCg1-Forward inner primer (A allele)		AGAAAAGAAACCGACAAAATGCCAATTAAGAA	This study
	FaRCg1-Reverse inner primer (T allele)		CTATCCGGGAGTGTGAGGCAGTTA	
	FaRCg1-Forward outer primer		TTGCTGATCGAICTACCCCATGTTCTGCTT	
	FaRCg1-Reverse outer primer		CCTTCTGGTGCAAGGGGTATGTTCACT	
<i>Phytophthora cactorum</i>	<i>FaRPc2</i>	RPCKASPH3	TGGATATTAITTTAGCATCAAAATCAGAAAACCTG GAAGCAAAAAGTTTGTGAAGTGGAGAAAAGTGG TCA[A/G]CTGTGTGTGAAGTCT	Noh <i>et al.</i> , 2018
	FaRPc2-Forward inner primer (G allele)		GATGCAGAAAATGGCAGATGCTCCGGTGTCAAG TTCAGATGAGAAAGAATGCTCTT	This study
	FaRPc2-Reverse inner primer (A allele)		AAGTTTGTGAAGTGGAGAAAAGTGGATAAG ATTTCTGCATCAGACTTCAACACCCCGT	
	FaRPc2-Forward outer primer		CACAAAAGCGGTGCATATGTTACTGG	
	FaRPc2-Reverse outer primer		GAGAGATGTGATTTTGGCATCTCCTGA	

結果與討論

一、連續開花性狀分子標誌表現

利用草莓 DNA 測試手冊中的 Bx215 分子標誌測試本場收集之 47 個草莓種原是否帶有連續開花基因，試驗結果顯示，Bx215 對所有受試種原皆在 100 至 200 bp 範圍間同一位置有擴增片段，包括已知為單季型的國內主要栽培品種 MLS028 (桃園 1 號)、MLS030 (香水)，以及文獻紀錄為單季型的 MLS001 (Earliglow) 及 MLS011 (Camarosa) 等。在 DNA 測試手冊中亦有註記，單季型品種「Earliglow」、「Elsanta」及「Sweet bliss」亦會擴增出 Bx215 的 128 bp 條帶，因此無法有效預測譜系中有前述品種的種原的開花特性。本次測試結果顯示 Bx215 在本場種原內表現無差異性，且與部分種原已知外表型不符，故不適用於本場種原。

此外，以 Gaston 等人發表之 PFRU 共顯性分子標誌測試本場種原，試驗結果並非只擴增出 508 bp 條帶的顯性同結合基因型種原，反而全數受試種原皆擴增出單季型的 226 bp 條帶，其中 3 個種原：MLS026 (加拿大)、MLS034 (優雪)、MLS039 (天使) 同時擴增出連續開花型的 508 bp 條帶，為異結合基因型 (表一)。

共顯性分子標誌初步發現 3 個可能帶有 *PFRU* 的種原，另一方面，品種資料記載為日中性型的種原 MLS002 (Tristar) 卻未擴增出 508 bp 片段。國內尚無針對前述 4 個種原開花習性的試驗紀錄，另也有文獻顯示可能有未知的上位性基因影響 *PFRU* 表現 (Lewers *et al.*, 2019)，故前述種原尚待實際進行外表型調查，驗證該等種原在國內栽培條件能否表現連續開花特性。

二、果實香味相關性狀分子標誌表現

針對與構成桃香味有關之 γ -decalactone 生合成相關的 *FaFAD1*，檢測對應之分子標誌 gene24414 與 qFaFAD1，結果顯示兩者在 47 個受試種原皆未擴增出條帶，而後者僅有模糊雜訊；依照 DNA 測試手冊所設條件，qFaFAD1 之黏合溫度為 55°C，經測試若放寬為 50°C 將產生多條雜訊條帶，仍無法有效判讀基因型。針對 *FaFAD1* 之基因型判讀，有待未來進一步研究。

與構成雪莉酒香味有關之 mesifurane 生合成相關的 *FaOMT*，檢測對應之共顯性分子標誌 FaOMTSI/NO，結果顯示在受試種原內皆擴增出 217 bp 或 (及) 248 bp

條帶，有 35 個種原帶有預測可產生 mesifurane 的 248 bp 條帶，但其中 18 個種原在 248~300 bp 之間出現另一段非預期條帶，有 6 個種原明確僅擴增出 248 bp 條帶：MLS008 (Freson)、MLS011 (Camarosa)、MLS018 (天來 3 號)、MLS026 (加拿大)、MLS029 (桃園 4 號)、MLS036 (奶油)，這些種原應為顯性同結合基因型，可望作為有效導入 *FaOMT* 的育種親本。

國內對草莓果實香氣成分之研究則相當有限，本場研究彙報 (張、宋，2013) 曾以氣相層析質譜儀比較「桃園 1 號」(MLS028) 與「香水」(MLS030) 品種之香氣成分，其中「香水」有偵測到 γ -decalactone，「桃園 1 號」則無，mesifurane 則是在 2 個品種中都有偵測到。國外文獻曾以氣相層析質譜儀偵測多個日本草莓品種之香氣物質 (Tsukamoto *et al.*, 2009)，其中在「桃園 1 號」的選種親本「Toyonoka」有偵測到 γ -decalactone 與 mesifurane。兩組試驗結果差異成因，以及其他種原果實之香味成分，皆待進一步驗證，現階段初步判讀出 6 個 *FaOMT* 顯性同結合基因型之種原，可作為草莓果實香味分子標誌輔助育種之起點。

三、抗炭疽病基因分子標誌無法篩選對我國主要菌種抗病性

本場草莓種原前經炭疽病抗性外表型篩選 (吳等，2022)，發現 MLS006 (福羽)、MLS012 (Coral)、MLS013 (女嶺)、MLS000A03-1 (TS4)、MLS000A03-2 (TS13) 對國內高致病力炭疽病菌 *Colletotrichum siamense* ML133 及 *C. fructicola* ML356 具抗病性，而主要栽培品種之一的 MLS028 (桃園 1 號) 為感病品種；另比對本場種原名單與 *RCa2* 分子標誌原始文獻 (Lerceteau-Köhler *et al.*, 2005) 所測試之基因型，本場保有且文獻亦曾測試之品種包括 MLS003 (Tufts)、MLS004 (Cruz)、MLS005 (Sequoia) 及 MLS009 (Tioga)，故抽選部分上述種原優先進行分子標誌測試。

RCa2 分子標誌測試結果如表三，STS-Rca2_417 與 STS-Rca2_240 無法呈現種原抗感病性，在多個抗病品種未擴增出條帶，而在感病品種 MLS028 (桃園 1 號) 反而都出現條帶。

吳等 (2022) 進行之國內草莓種原炭疽病抗感病性調查係接種 *C. siamense* 與 *C. fructicola* 兩種國內主要炭疽病菌株，而 *RCa2* 分子標誌為針對 *C. acutatum* 第 2 致病

群所開發。Miller-Butler *et al.* (2019) 將已知對 *C. gloeosporioides*、*C. fragariae* 與 *C. acutatum* 等 3 種炭疽病菌抗感病性之種原進行 *RCa2* 分子標誌測試，統計結果顯示該分子標誌針對 *C. acutatum* 第 2 致病群以外的菌株的抗感病性預測結果皆不慎理想，推測係因抗病基因物種專一性，其他菌種的致病能力無法由 *RCa2* 抑制。本次試驗顯示 *RCa2* 分子標誌同樣不適用於預測對 *C. siamense* 與 *C. fructicola* 菌株之抗感病性。因此，針對我國草莓炭疽病主要致病菌株抗性之檢測基因，未來有待進一步研究找尋。

表三、已知炭疽病抗感病性種原之 *RCa2* 分子標誌表現

Table 3. Presence or absence of *RCa2* markers in known anthracnose resistant germplasm

Accession ID	STS-Rca2_240	STS-Rca2_417	Resistant/Susceptible
MLS003	+	+	R ^y
MLS006	+	+	R
MLS009	-	+	R ^y
MLS012	-	+	R
MLS013	-	+	R
MLS028	+	+	S
MLS030	+	-	R ^z
MLS031	+	+	R
MLS000A03-1	+	+	R
MLS000A03-2	-	+	R

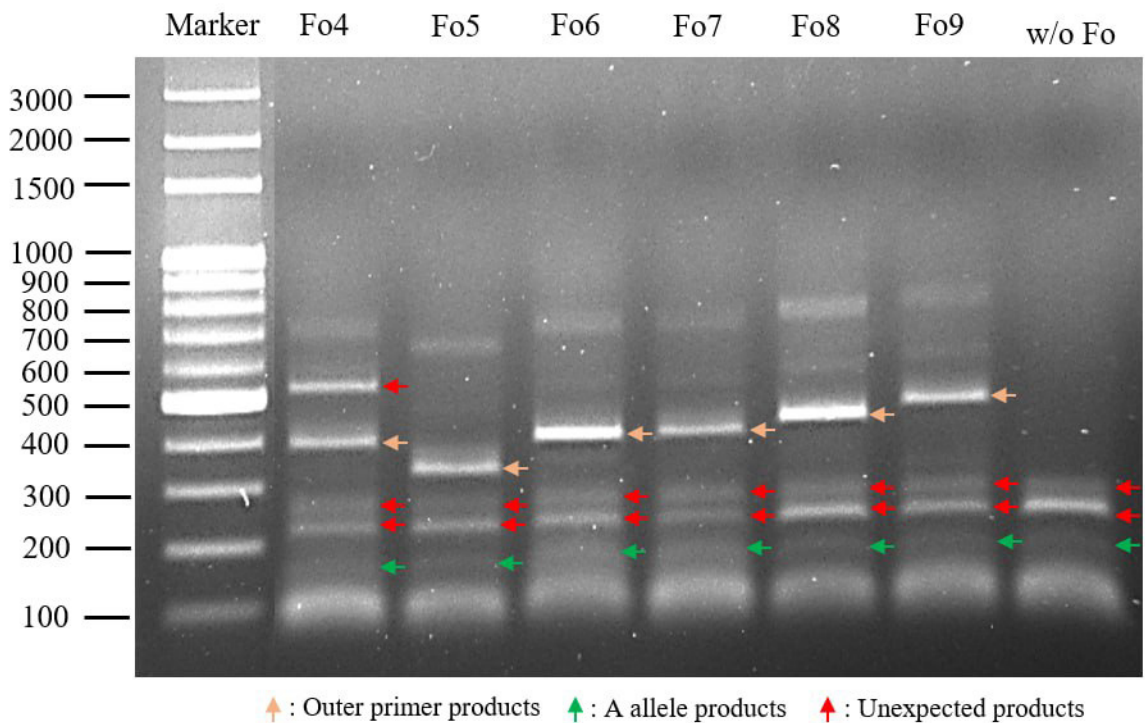
^y resistant to *Colletotrichum acutatum* pathogenicity group 2 (Lerceteau-Köhler *et al.*, 2005).

^z leaf resistance

四、設計 T-ARMS 分子標誌測試結果

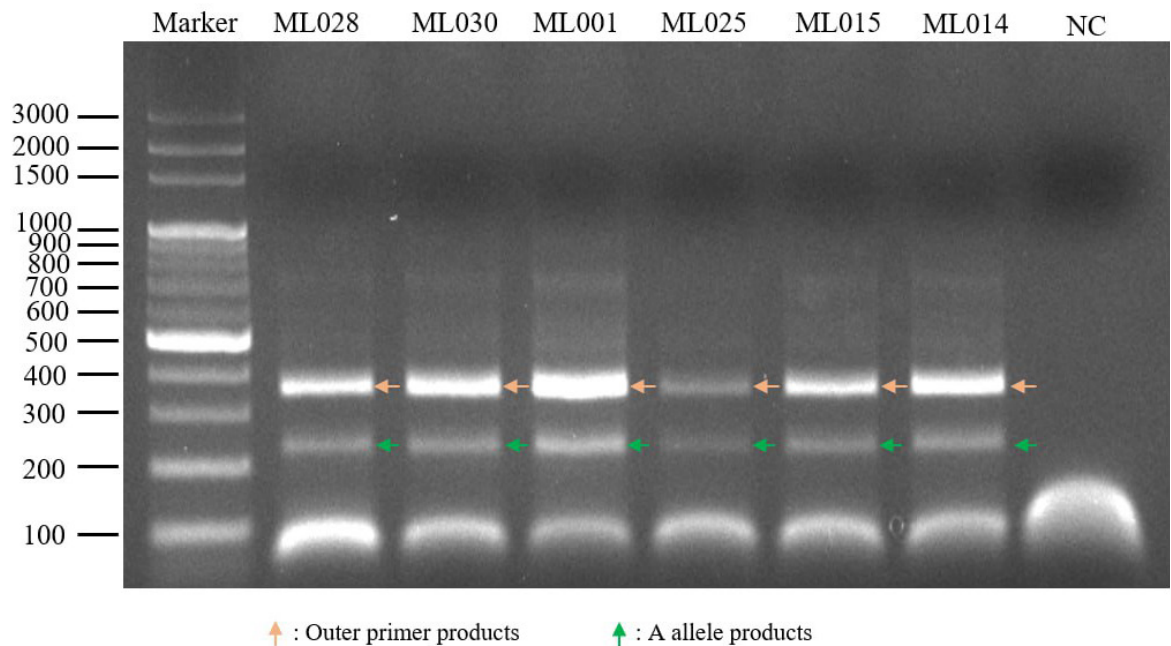
本次試驗針對 3 個需即時定量 PCR 儀器之分子標誌嘗試設計 T-ARMS 分子標誌替代使用，試驗結果，抗角斑病基因 *FaRXf1* 之分子標誌在以參考序列品種「Camarosa」測試時，不具抗性基因理應只有 195 bp 條帶，但實際測試不同組合的

引子對皆會在 200~300 bp 間產生數個非預期的條帶 (圖一)。其他未測試引子對組合則是因腺嘌呤與鳥嘌呤條帶大小接近，因此以一般膠體電泳難以判讀基因型。以抗炭疽病基因 *FaRCg1* 之分子標誌測試本場收集部分已知外表型抗感病性差異的種原，結果顯示所有測試種原皆可擴增出共有條帶及腺嘌呤條帶 (基因型為 A/A)，故未能如前人研究結果，明顯區分抗感病性 (圖二)；抗冠腐病基因 *FaRPc2* 之分子標誌測試本場全數種原，其中 35 個種原擴增條帶呈現 A/G 異結合抗病基因型，包括主要品種 MLS028 (桃園 1 號) 及 MLS030 (香水)，其餘 12 個為 G/G 感病基因型，未發現 A/A 同結合抗病型種原 (表一)。



圖一、以參考品種「Camarosa」設計偵測 *FaRXf1* 之 T-ARMS PCR 引子對測試。Fo4~Fo9：引子設計程式產生之不同引子對組合；w/o Fo：未加入共有條帶引子結果

Fig. 1. T-ARMS PCR primer pairs for *FaRXf1* designed by 'Camarosa' reference genome. Fo4-Fo9: primer pairs generated by primer design program; w/o Fo: without outer primers



圖二、以已知炭疽病抗感病性差異種原對 *FaRCg1* 之分子標誌測試

Fig.2. *FaRCg1* marker tested by known phenotype (resistant or susceptible) germplasms

抗冠腐病基因分子標誌試驗結果耐人尋味。冠腐病非國內主要草莓病害，而其病原菌——疫病菌 *P. cactorum* 也會造成果腐病，果腐病即為國內草莓果實遭遇連日降雨或環境濕度高時容易發生的病害。雖無法排除國內種原普遍帶有抗冠腐病基因之可能，且因草莓種苗主要採無性繁殖，異結合基因型並不影響種苗之性狀維持；然而本次試驗結果另一個更可能的原因在於栽培種草莓的八倍體特性。T-ARMS 引子雖以 Fvb7-3 染色體序列進行設計，但將引子序列與全基因體參考序列比對，發現這些引子也可能對上其他次基因體之序列，並擴增出相近甚至相同片段大小的非目標產物，導致基因型誤判。目前資料尚難論斷試驗結果的實際意義，仍需要實際外表型調查資料，以及至少部分樣品進行 KASP 分子標誌之基因型鑑定，比對驗證 T-ARMS 分子標誌是否可作為替代。

結 論

本試驗以數個國外已發表的草莓重要性狀分子標誌對本場草莓種原進行基因型鑑定，篩選出 3 個種原預測帶有連續開花基因 *PFRU*，另有 3 個種原預測同時帶有 γ -decalactone 生合成相關基因 *FaFAD1* 及 mesifurane 生合成相關基因 *FaOMT*，抗病性相關基因分子標誌之測試結果則暫無斬獲。因多數受試種原缺乏在國內栽培環境的相關外表型性狀調查紀錄，對於目標基因後續的遺傳或育種研究，仍需先取部分代表性種原進行田間試驗，驗證分子標誌預測準確性。

囿於實驗室設備限制，本試驗嘗試設計 T-ARMS PCR 分子標誌以替代需使用即時定量 PCR 儀器偵測 SNP 類型的分子標誌，惟目前 3 組測試未取得明確可應用的成果，八倍體作物是否可由 T-ARMS PCR 設計出適用的分子標誌，仍待進一步嘗試。

本次試驗以本場種原初探草莓以分子標誌輔助選種之可能性，後續將持續蒐集重要性狀之分子標誌相關文獻並進行測試，同時盼能進一步與相關場試所合作，廣納國內育成、保存種原、產業自行引進或育成品種，擴大國內草莓遺傳資源研究，共謀我國草莓產業福祉。

誌 謝

本試驗草莓種原植株材料由本場生物防治研究中心陳春瑢小姐栽培管理，特此致謝。

引用文獻

- 王聖善。2021。分子標誌輔助選種技術運用在作物品種改良介紹。臺南區農業專訊 118：19-21。
- 王啟正。2022。番茄新品種花蓮 24 號友愛。花蓮區農技報導 139：1-3。
- 李長沛、吳東鴻、顏信沐、賴明信、黃守宏。2022。香米家族新成員－抗褐飛蝨早熟水稻新品種台農 85 號。農業試驗所技術服務季刊 33(1)：1-6。
- 林煜恒、吳靜霞。2022。番茄台中 11 號之育成。臺中區農業改良場研究彙報 155：1-15。
- 吳佳宜、吳岱融、李怡蓓、鐘珮哲、羅國偉、鍾嘉綾。2022。臺灣草莓種原對炭疽病菌

- 之抗性篩檢。植物醫學 64(4)：123-130。DOI 10.6716/JPM.202212_64(4).0001
- 吳東鴻、陳昱蓉。2018。應用非酶切系統偵測單一核苷酸變異。農業試驗所技術服務季刊 115：14-18。
- 陳榮坤、林彥蓉、羅正宗。2012。水稻新品種臺南 16 號之育成。臺南區農業改良場研究彙報 60：1-12。
- 陳榮坤、蔡世宗、林順福、羅正宗、吳炳奇、李杏芳、楊智哲。2019。水稻新品種臺南 19 號之育成。臺南區農業改良場研究彙報 74：1-13。
- 陳國憲。2022。落花生「臺南 20 號」之育成。臺南區農業改良場研究彙報 80：19-35。
- 張訓堯、宋妤。2013。草莓「桃園 1 號」及「香水」品種香氣成分之比較。苗栗區農業改良場研究彙報 3:25-32。
- 農業部農糧署。2022。110 年農業統計年報。
- 戴宏宇、許育鳴。2017。應用分子標誌輔助選育高油酸落花生介紹。農業試驗所技術服務季刊 28(2): 10-12。
- Anciro, A., J. Mangandi, S. Verma, N. Peres, V. M. Whitaker, and S. Lee. 2018. FaRCg1: a quantitative trait locus conferring resistance to *Colletotrichum* crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in octoploid strawberry. *Theor. Appl. Genet.* 131:2167-177. DOI 10.1007/s00122-018-3145-z.
- Bassil, N. V., T. M. Davis, H. Zhang, S. Ficklin, M. Mittmann, T. Webster, L. Mahoney, D. Wood, E. S. Alperin, U. R. Rosyara, H. Koehorst-vanc Putten, A. Monfort, D. J. Sargent, I. Amaya, B. Denoyes, L. Bianco, T. V. Dijk, A. Pirani, A. Iezzoni, D. Main, C. Peace, Y. Yang, V. Whitaker, S. Verma, L. Bellon, F. Brew, R. Herrera, and E. V. D. Weg. 2015. Development and preliminary evaluation of a 90 K Axiom® SNP array for the allo-octoploid cultivated strawberry *Fragaria* × *ananassa*. *BMC Genomics.* 16:155. DOI 10.1186/s12864-015-1310-1.
- Chambers, A. H., J. Pillet, A. Plotto, J. Bai, V. M. Whitaker, and K. M. Folta. 2014. Identification of a strawberry flavor gene candidate using an integrated genetic-genomic-analytical chemistry approach. *BMC Genomics.* 15:217. DOI 10.1186/1471-2164-15-217.
- Doyle, J. 1991. DNA protocols for plants. *Molecular Techniques in Taxonomy.* 283-293. DOI 10.1007/978-3-642-83962-7_18.

- Edger, P. P., T. J. Poorten, R. VanBuren, M. A. Hardigan, M. Colle, M. R. McKain, R. D. Smith, S. J. Teresi, A. D. L. Nelson, C. M. Wai, E. I. Alger, K. A. Bird, A. E. Yocca, N. Pumplun, S. Ou, G. Ben-Zvi, A. Brodt, K. Baruch, T. Swale, L. Shiue, C. B. Acharya, G. S. Cole, J. P. Mower, K. L. Childs, N. Jiang, E. Lyons, M. Freeling, J. R. Puzey, and S. J. Knapp. 2019. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nat. Genet.* 51:541-547. DOI 10.1038/s41588-019-0356-4.
- Gaston, A., J. Perrotte, E. Lerceteau-Köhler, M. Rousseau-Gueutin, A. Petit, M. Hernould, C. Rothan, and B. Denoyes. 2013. *PFRU*, a single dominant locus regulates the balance between sexual and asexual plant reproduction in cultivated strawberry. *J. Exp. Bot.* 64 (7):1837-1848. DOI 10.1093/jxb/ert047.
- Hardigan, M. A., M. J. Feldmann, A. Lorant, K. A. Bird, R. Famula, C. Acharya, G. Cole, P. P. Edger, and S. J. Knapp. 2020. Genome synteny has been conserved among the octoploid progenitors of cultivated strawberry over millions of years of evolution. *Front. Plant Sci.* 10:1789. DOI 10.3389/fpls.2019.01789.
- Jung, S., T. Lee, C.-H. Cheng, K. Buble, P. Zheng, J. Yu, J. Humann, S. P. Ficklin, K. Gasic, K. Scott, M. Frank, S. Ru, H. Hough, K. Evans, C. Peace, M. Olmstead, L. W. DeVetter, J. McFerson, M. Coe, J. L. Wegrzyn, M. E. Staton, A. G. Abbott, and D. Main. 2019. 15 years of GDR: new data and functionality in the genome database for rosaceae. *Nucleic Acids Res.* 47:D1137-D1145. DOI 10.1093/nar/gky1000.
- Lerceteau-Köhler, E., G. Guérin and B. Denoyes-Rothan. Identification of SCAR markers linked to *Rca2* anthracnose resistance gene and their assessment in strawberry germplasm. 2005. *Theor. Appl. Genet.* 111:862–870. DOI 10.1007/s00122-005-0008-1
- Lewers, K. S., P. Castro, J. F. Hancock, C. K. Weebadde, J. V. Die & L. J. Rowland. 2019. Evidence of epistatic suppression of repeat fruiting in cultivated strawberry. *BMC Plant Biol.* 19:386. DOI 10.1186/s12870-019-1984-7.
- Miller-Butler, M. A., B. J. Smith, B. R. Kreiser, and E. K. Blythe. 2019. Comparison of anthracnose resistance with the presence of two SCAR markers associated with the *Rca2* gene in strawberry. *HortScience.* 54(5):793-798. DOI 10.21273/HORTSCI13805-18.
- Nellist, C. F. 2018. Disease resistance in polyploidy strawberry. The genomes of Rosaceous berries and their wild relatives. 79-94. DOI 10.1007/978-3-319-76020-9_1.
- Noh, Y. H., Y. Oh, J. Mangandi, S. Verma, J. D. Zurn, Y.-T. Lu, Z. Fan, N. Bassil, N. Peres, G. Cole, C. Acharya, R. Famula, S. Knapp, V. M. Whitaker, and S. Lee. 2018. High-throughput marker assays for *FaRPa2*-mediated resistance to *Phytophthora* crown rot in octoploid strawberry. *Mol. Breeding.* 38:104. DOI 10.1007/s11032-018-0861-7.

- Oh Y., S. Chandra and S. Lee. 2020. Development of subgenome-specific markers for FaRXf1 conferring resistance to bacterial angular leaf spot in allo-octoploid strawberry. *Int. J. Fruit Sci.* 20 (sup2):S198-S210. DOI 10.1080/15538362.2019.1709116.
- Oh, Y., J. D. Zurn, N. Bassil, P. P. Edger, S. J. Knapp, V. M. Whitaker, and S. Lee. 2019. The strawberry DNA testing handbook. *HortScience.* 54(12) : 2267-2270. DOI 10.21273/HORTSCI14387-19.
- Perrotte J., A. Gaston, A. Potier, A. Petit, C. Rothan, and B. Denoyes. 2016. Narrowing down the single homoeologous FaPFRU locus controlling flowering in cultivated octoploid strawberry using a selective mapping strategy. *Plant Biotechnol. J.* 14(11):2176-2189. DOI 10.1111/pbi.12574.
- Pincot, D. D. A., M. J. Feldmann, M. A. Hardigan, M. V. Vachev, P. M. Henry, T. R. Gordon, M. Bjornson, A. Rodriguez, N. Cobo, R. A. Famula, G. S. Cole, G. L. Coaker, and S. J. Knapp. 2022. Novel Fusarium wilt resistance genes uncovered in natural and cultivated strawberry populations are found on three non-homoeologous chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 135:2121–2145. DOI 10.1007/s00122-022-04102-2.
- Pott, D. M., J. G. Vallarino, S. Osorio, and I. Amaya. 2018. Fruit ripening and QTL for fruit quality in the octoploid strawberry. *The Genomes of Rosaceous Berries and Their Wild Relatives.* 95-113. DOI 10.1007/978-3-319-76020-9_1.
- Saiga, S., M. Tada, T. Segawa, Y. Sugihara, M. Nishikawa, N. Makita, M. Sakamoto, K. Tanaka, T. Wada, and H. Takagi. 2023. NGS-based genome wide association study helps to develop co-dominant marker for the physical map-based locus of *PFRU* controlling flowering in cultivated octoploid strawberry. *Euphytica.* 219:6. DOI 10.1007/s10681-022-03132-7.
- Sánchez-Sevilla, J. F., E. Cruz-Rus, V. Valpuesta, M. A. Botella, and I. Amaya. 2014. Deciphering gamma-decalactone biosynthesis in strawberry fruit using a combination of genetic mapping, RNA-Seq and eQTL analyses. *BMC Genomics.* 15:218. DOI 10.1186/1471-2164-15-218.
- Tsukamoto, N., K. Fukuhara, X. X. Li, S. Yamashita, S. Yui, Y. Inaba, M. Okimura, H. Ikeura and Y. Hayata. 2009. Analysis of aroma components of Japanese strawberry cultivars by GC-O. *Acta Hort.* 842:851-856. DOI 10.17660/ActaHortic.2009.842.188
- Zorrilla-Fontanesi, Y., J.-L. Rambla, A. Cabeza, J. J. Medina, J. F. Sánchez-Sevilla, V. Valpuesta, M. A. Botella, A. Granell, and I. Amaya. 2012. Genetic analysis of strawberry fruit aroma and identification of O-methyltransferase *FaOMT* as the locus controlling natural variation in mesifurane content. *Plant Physiol.* 159(2):851–870. DOI 10.1104/pp.111.188318.

Genotypic identification of strawberry germplasm based on important trait molecular markers

Jen-Hao Yeh*, Li-po Wei

Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Ministry of Agriculture

ABSTRACT

Strawberry is an octoploid species with relatively late initiation of molecular genetic research. However, with the advancement of modern technologies, significant progress has been made. In this study, 47 strawberry accessions preserved at MDARES were screened for molecular markers associated with several important traits. The results showed that three accessions, MLS026, MLS034, and MLS039, were predicted to carry the dominant perpetual flowering gene *PFRU*. The predicted number of accessions carrying the genes related to the synthesis of mesifurane, which contributing to strawberry fruit aroma, were 35. Among them, six accessions, MLS008, MLS011, MLS018, MLS026, MLS029 and MLS036 are dominance homozygote genotypes. The molecular marker identification of the anthracnose resistance gene *RCa2* contradicted with known phenotypic data, suggesting it might be attributed to differences in the pathogenic fungal species. The tests for the other three disease resistance-related genes did not yield conclusive and applicable results. Further studies required actual cultivation for phenotypic investigations to validate the accuracy of molecular marker predictions. Additionally, the inclusion of untested accessions in this study was anticipated, which would contribute to advancing strawberry genetic research and breeding efforts domestically.

Keywords: strawberry, molecular marker, perpetual flowering, fruit flavor, disease-resistant gene

* Corresponding author email: yehjh@mdares.gov.tw