



公開
 密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：050301M100

農業部苗栗區農業改良場112年度科技計畫研究報告

計畫名稱：**開發草莓潛伏性病害檢測技術及導入抗感病快篩技術於抗病育種** (第1年/全程4年)

(英文名稱) **Development of detecting strawberry latent infection disease technology and introducing screening technology for resistance in breeding**

計畫編號：112農科-5.3.1-苗-M1

全程計畫期間：自 112年1月1日 至 115年12月31日

本年計畫期間：自 112年1月1日 至 112年12月31日

計畫主持人：**賴巧娟**

研究人員：**葉人豪、朱盛祺、鐘珮哲**

執行機關：**行政院農業委員會苗栗區農業改良場**



1121132



一、執行成果中文摘要：

草莓為一具有高經濟價值之作物，主要產區集中在苗栗地區，約占全台九成。過去草莓產區主要以種植桃園1號(豐香)為主，逐漸轉為種植香水品種，雖然草莓炭疽病之發生略為減少，但卻促成新興病害草莓葉枯病的發生。葉枯病菌可感染草莓葉、冠部、根系、果實等部位，可造成2-3成以上的損害，因此本計畫為加速育成草莓抗病品種，確保國內草莓生產，促進產業發展，就本場保存之44個草莓種原進行對葉枯病抗感病性快篩試驗，篩選出24個抗性品種(系)。繁殖抗性種原並於草莓定植期種植於本場試驗田進行園藝性狀調查，以選取優良性狀種原作為育種親本。繁殖種苗經自然選拔留下20個種原，並持續調查生長勢、生長習性、始花期等，因各品種(系)生育情形各異，截至12月1日為止完成所有種原之生長勢與生長習性調查、5個種原之始花期調查，後續將於生長季間持續調查所有種原始花期與果實相關性狀。由前人研究已知「苗栗1號—戀香」為生長勢強、生長習性直立、大果、高甜度且果實風味優良之品種，本次試驗確認其對葉枯病具抗性，將優先選為育種親本。另，為快速檢測草莓植株是否帶有葉枯病，本計畫利用葉枯病菌之internal transcribed spacer(ITS)、 β -tubulin(*TUB*)及 translation elongation factor 1-alpha(*TEF-1 α*)基因序列為標的，設計專一性引子對，透過NCBI資料比對、以常見的草莓病原菌、腐生菌及草莓植株基因體為模板，篩選出3組(pair 04、05與10)對草莓新擬盤多毛孢屬真菌具專一性之引子對，最佳增幅溫度介於59-62°C，預期大小分別為223、359 與263 bp，pair 01與pair 04的敏感度分別為1-10 pg，pair 05為10-100 pg，將可於未來進行田間場域測試及驗證，並應用於草莓葉枯病菌之分子檢測，協助農民快速診斷草莓病害。

二、執行成果英文摘要：

Strawberry is a crop with high economic value. The main production areas are concentrated in Miaoli County, accounting for about 90% of Taiwan's total production areas. In the past, 'Taoyuan No. 1' is the main cultivated strawberry cultivar and gradually switched to 'Xiang-Shui'. Although the strawberry anthracnose disease has slightly decreased, the emerging disease, the strawberry leaf blight, begins to appear. The pathogen of leaf blight can infect strawberry leaves, crowns, roots, fruits and other parts, and can cause more than 20-30% disease lost. Therefore, in order to expedite the development of disease-resistant varieties of strawberries, ensuring domestic strawberry production and promoting industry advancement, this project conducted rapid screening tests for resistance to leaf blight disease among 44 strawberry germplasms preserved in MDARES. As a result, 24 resistant varieties (strains) were identified. The propagation of these disease-resistant germplasms was carried out, and during the strawberry planting season, they were cultivated in the experimental fields for horticultural trait assessment, aiming to select germplasms with superior horticultural trait as breeding parents. Through natural selection, 20 germplasms were retained and continuous assessing growth vigor, plant type, and initial flowering stage. Due to variations in the growth patterns of each variety (strain), as of December 1st, the assessment of growth vigor and plant type for all germplasms has been completed, along with the initial flowering stage assessment for 5 germplasms. Subsequent investigations throughout the growing season will focus on the initial flowering period and fruit-related characteristics of all germplasms. Previous studies have established 'Miaoli No. 1' as a variety characterized by strong vigor, upright plant type, large fruits,





and excellent fruit flavor. This experiment confirms its resistance to leaf blight disease, thus prioritizing its selection as a breeding parent. Also, this project uses the internal transcribed spacer (ITS), β -tubulin (*TUB*) and the translation elongation factor 1-alpha (*TEF-1 α*) gene sequence as the target for specific primer pairs design. Through NCBI sequence blasting and specificity test against common strawberry pathogens, saprophytes and the strawberry genome. The 3 primer pairs (Pair 04, 05 and 10) were specific to *Neopestalotiopsis* genus. The optimal amplification temperature is between 59-62°C, the expected sizes are 223, 359 and 263 bp respectively. The sensitivity of pair01 and pair04 is 1-10 pg, and the sensitivity of pair 05 is 10-100 pg. Those primer pairs were the candidates for field testing in the future. We expected that the primers could be applied to detect leaf blight in strawberry and to diagnose the disease for farmers in the field.

三、計畫目的：

1. 以快篩技術篩檢本場種原庫對葉枯病之抗感病性，以抗病性佳及適當園藝性狀種原為育種親本，建立雜交族群。
2. 完成草莓葉枯病分子檢測技術引子對設計及條件測試。

四、重要工作項目及實施方法：

(一)抗感病快篩技術應用於耐病育種

1. 本場草莓種原庫之葉枯病抗感病性篩檢

葉枯病菌 (*Neopestalotiopsis rosae*) 孢子自25°C，1/4 馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)培養約10-14天之菌落上，以含有0.01% DSS (Dioctyl sulfosuccinate sodium)之無菌水洗下，再以血球計數器計算孢子濃度並調整至 1×10^6 spores/mL。於本場現有種原庫摘取各品種之第3-4片展開葉，將葉片放於保鮮盒中，並加入無菌水保濕。每片小葉分成左右兩側，並以無菌針頭穿刺小洞形成傷口，再將濃度 1×10^6 spores/mL含有0.01% DSS之5 μ L孢子液滴於穿刺小洞上，同一片小葉另一次則滴上未含有葉枯病菌孢子之0.01% DSS，保鮮盒置於25°C，光照16小時，黑暗8小時之生長箱，於7天後觀察小葉接種處壞疽情形。將葉片拍照記錄後，測量病斑之長與寬數值，隨後進行統計分析。

2. 高抗病性種原園藝性狀調查

繁殖快篩選出高抗病性種原種苗，並於定植期定植田間以慣行栽培管理，依「草莓品種試驗檢定方法」進行所選種原之重要特性調查。試驗採完全隨機設計，每一種原及對照品種營養繁殖苗種植至少各20株，3重複，質的性狀以觀察15株為原則，量的性狀以調查10株為原則。調查項目包括「草莓品種性狀表」所列之植株生長習性（株型開張或直立）、匍匐蔓數（於育苗期調查）、果實大小、果實形狀、果實顏色、始花期、開花結果習性，此外並調查單株產量、果重、果實甜度及酸度等重要園藝性狀。依性狀綜合表現選出兼具抗病性及適當園藝性狀之種原，供後續用作育種親本，與園藝性狀優良之現行栽培品種建立雜交族群。

(二)葉枯病分子檢測技術引子對設計及條件測試

將蒐集自田間之葉枯病菌於PDA培養基於25°C環境培養10-14天，再以Plant genomic DNA purification kit進行核酸萃取，先以ITS1/ITS4引子對進行PCR增幅，將增幅出之PCR產物送定序，比對序列基因庫為*Neopestalotiopsis rosae*之分離株，以軟體MEGA v10 排列基因序列，並於較保守或與其他*Neopestalotiopsis* sp.有差異處之基因序列上設計引子對，透過PCR



1121132



之溫度梯度測試、不同鎂離子濃度添加，將產物利用膠體電泳分析是否有專一條帶，以挑選最佳PCR條件及引子對。

五、結果與討論：

1. 抗感病快篩技術應用於耐病育種

為測試本場草莓種原庫對葉枯病菌的抗感病性，目前本場草莓種原庫種植共44個種原，每個品種(系)繁殖各10株以上，作為本計畫葉枯病抗感病性快篩試驗材料。草莓品種(系)對葉枯病抗感病性快篩使用有傷口之離葉接種方式進行分析，所使用之草莓品種(系)共44個。接種7天後之結果顯示香水、Earliglo、Tufs、Y2、聖誕紅、荷蘭、E03等7個品種(系)對葉枯病為感病，但桃園1號(豐香)、苗栗1號(戀香)、Spain、TS13、Sequio、福羽、Solana、Freson、Tioga、Camarosa、Coral、女嶺、桃薰、泰國、天來3號、春香、范、紅顏、佐賀清香、33_1、E05、TS26、加拿大、雪兔等24個品種(系)則對葉枯病具有抗性，Tristar、Crus、TS4、天來1號、幸香、章姬、枋乙女、印尼、T4、甘王、優雪、奶油、岱等13個品種(系)之病斑大小介於香水(感性品種)和桃園1號(抗性品種)之間，統計分析無顯著差異。

針對24個品種(系)繁殖種苗並於草莓定植期10/11種植於本場高架設施試驗田，經自然選汰留下20個品種(系)進行調查。各品種(系)生長狀態不一，截至12/1止，完成所有品種(系)之生長勢與生長習性調查，其中紅顏始花期為11/20，TS13、幸香、E05與桃園1號(豐香)等4個品種(系)之始花期為12/1，共5個品種(系)完成始花期調查，其餘品種(系)尚未達到50%植株開花(詳如表一)，所有品種(系)尚未進入果實採收期。

由前人研究已知本場107年育成品種「苗栗1號—戀香」為生長勢強、生長習性直立、大果、高甜度且果實風味優良之品種，經本次接種試驗確認其對葉枯病具抗性，後續將優先選為育種親本之一。

2. 草莓葉枯病菌之序列比對與引子對設計

草莓葉枯病之病原菌為*Neopestalotiopsis rosae*，該屬於2014年經由形態學與親緣分析的證據，由*Pestalotiopsis*屬當中分離出來(Maharachchikumbura *et al.*, 2014)，分為*Pestalotiopsis*、*Neopestalotiopsis*與*Pseudopestalotiopsis*，這三個屬相當類似，光是藉由觀察孢子形態難以正確判斷，需藉由分子工具的協助才能鑑別，因此本計畫所設計之引子使用*N. rosae*之internal transcribed spacer (ITS)、 β -tubulin (*TUB*)與translation elongation factor 1-alpha (*TEF*)之序列做為目標，先與NCBI資料庫當中已有的三個屬的基因序列進行比對，並挑選有差異之區域進行引子對設計，於ITS、*TUB*與*TEF*當中，皆可以觀察到差異較大的區域，但在*Neopestalotiopsis*屬當中，各個種之間的序列差異較小，其中於ITS當中幾乎沒有差異，在*TUB*與*TEF*當中有些微差異。

由差異較大區域進行引子的設計，共設計出12組因子對，各組引子再藉由與NCBI genome database中的序列進行比對(比對目標包含草莓常見之病原菌、腐生菌與草莓基因體序列等)，各個比對結果排除E-value小於1的引子(代表專一性較差)，最後得到11組引子對(表二)，其中6對為正反兩股皆具高專一性，5對為只有其中一股專一性較差。

3. 梯度聚合酶連鎖反應

為了解每組引子對之適合增幅溫度(annealing temperature)範圍，以草莓葉枯病*Neopestalotiopsis rosae*之genomic DNA做為PCR模板，將11組引子對進行梯度聚合酶連鎖反應，所有PCR結果皆顯示單一條帶，代表專一性佳，其中3組引子對(第2、3與4)之最佳annealing溫度介於56-59°C，3組(第5、6與7)介於59-62°C，5組(第1、8、9、10與11)介於62-65°C。

4. 引子對專一性測試

為了解每組引子對於草莓的常見病原菌與腐生菌之專一性，實驗設計測試以草莓分離的真菌病原菌(*Colletotrichum* spp., *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Phytophthora* sp.)、腐生菌(*Trichoderma* sp.)、葉枯病菌之相似菌(*Neopestalotiopsis* spp., *Pestalotiopsis* spp.)、





細菌病原菌(*Xanthomonas fragariae*)與草莓(*Fragaria x ananassa*)之genomic DNA做為PCR模板，於最佳annealing溫度進行PCR反應，並以ITS做為真菌的PCR control；16S基因做為細菌的PCR control，ACTIN基因做為植物的PCR control，各電泳膠片皆以*N. rosae*做為positive control。於測試真菌病原菌與腐生菌之結果顯示引子第2、4、5、6、10與11組無條帶出現，代表無非專一性反應。於測試細菌病原菌與草莓之結果顯示引子第1、2、4、5、7、10與11組無條帶出現，代表無非專一性反應。於測試葉枯病菌之相似菌(*Pestalotiopsis* spp.)之結果顯示引子第4、5、6、7、9與11組無條帶出現，代表無非專一性反應，但在測試非*N. rosae*種(*Neopestalotiopsis* spp.)之結果顯示各組引子對皆出現單一條帶，代表對草莓葉枯病菌*N. rosae*與*Neopestalotiopsis*屬之真菌具有專一性。經由上述專一性測試，引子對第4與第5組與具有較佳之專一性，第10組只有在對*Pestalotiopsis* sp. 中的一株菌有非常微弱的訊號，其他專一性皆較其他組引子隊為佳，因此後續之引子對之敏感度測試便以這3組較佳之引子對(第4、5與10)進行測試。

5. 引子對之敏感度(偵測極限)測試

為了解設計之引子對之偵測極限，依各組適合之增幅溫度作為PCR黏合溫度，以草莓葉枯病菌*N. rosae* ML2411之1 ng 至 10 fg genomic DNA作為模板，條件為35個循環進行偵測極限之測試，結果顯示第4與10組引子在此條件下偵測極限約為10 pg - 1 pg，且1 pg之條帶結果訊號極弱，不容易觀察(圖一-圖三)，而第5組引子之偵測極限約為100 pg - 10 pg，且10 pg之條帶結果訊號極弱，不容易觀察。而後藉由調整dNTP之濃度(2倍)與PCR cycle數(40 cycles)，結果顯示在40個循環下，第4與10組引子之1 pg之條帶訊號略為增強(圖四-圖五)，且第5組引子之10 pg條帶訊號也略為增強，且皆無其他非專一性訊號，較易判讀(圖六)。

六、結論：

本計畫由本場保存之44個草莓種原篩選出24個對草莓葉枯病具有抗性之品種(系)，並繁殖該等種原之種苗及調查園藝相關性狀。截至12月1日止已完成20個種原之生長勢與生長習性調查與5個品種之始花期調查，後續將於草莓生長季持續調查剩餘品種(系)之始花期與果實品質相關性狀。另為得到能用於偵測草莓葉枯病之專一性引子，利用草莓葉枯病菌(*N. rosae*)之ITS、*TUB*、*TEF*做為目標進行引子設計，並以序列比對篩選出11組較佳之引子對，進行後續引子對之專一性測試與靈敏度測試，並得到3組較佳之引子對，可供後續之應用。然而這些引子對於*Neopestalotiopsis*屬之真菌皆具有反應，其原因可能為ITS、*TUB*、*TEF*在*Neopestalotiopsis*屬當中屬於保守性較高之區域或基因，也代表*Neopestalotiopsis*屬當中各個種在演化上較為接近與相似。目前國內草莓之葉枯病由*N. rosae*單一種病原菌所造成，除了病原菌，實際上於草莓植株上有分離到少數*Neopestalotiopsis*屬之真菌(非*N. rosae*)，初步測試對草莓不具有病原性。而這些非*N. rosae*的真菌分離到的比例很低，預估未來檢測時大部分陽性的結果應會是具病原性之*N. rosae*，因此可做為檢測草莓葉枯病之分子檢測技術，協助農民快速診斷草莓病害。

七、參考文獻：

- 吳岱融。2021。草莓產業品種與苗栗1號之育成。苗栗區農業改良場特刊第5:114-117。
Maharachchikumbura, S. S. N., K. D. Hyde, J. Z. Groenewald, J. Xu, and P. W. Crous. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*. 79:121-186.





表一、抗葉枯病種原之園藝性狀調查(截至 12/1 結果)

品種(系)	生長勢	株型	始花期
6	中	半開張	
23	中	開張	
加拿大	弱	半開張	
10	中	開張	
22	強	開張	
TS13	強	直立	12 月 1 日
幸香	中	半開張	12 月 1 日
佐賀清香	中	開張	
33-1	強	半開張	
范	強	半開張	
E05	強	半開張	12 月 1 日
戀香	強	直立	
19	弱	開張	
Spain	中	半開張	
桃 1	強	開張	12 月 1 日
泰國	強	開張	
TS26	中	半開張	
桃薰	中	半開張	
9	強	半開張	
紅顏	強	直立	11 月 20 日

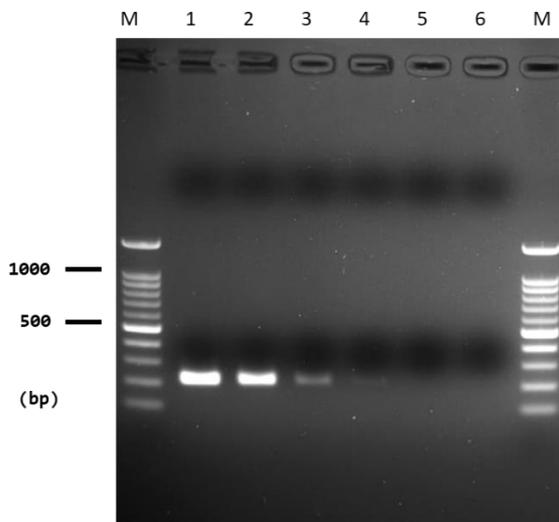




表二、草莓葉枯病菌引子對資料

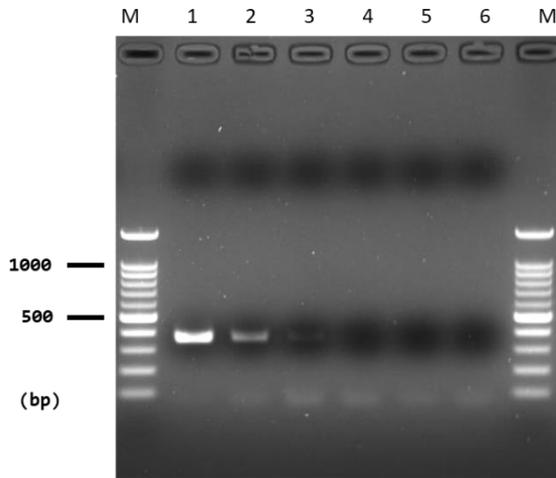
Table 2. The primers of Strawberry leaf blight in the study.

primer pair	primer name	expected size	primer sequence (5'-3')
Pair 01	01_Neo_F_ITS	384 bp	CCTCGGCAGAAGTTATAGGTCT
	01_Neo_R_ITS		ATAGCACCTAACAAAAGCGAGA
Pair 02	02_Neo_F_ITS	266 bp	ATTTTATGTAATCTGAGCGTCT
	02_Neo_R_ITS		GCCGTTGTATTTTCAGGAAC
Pair 03	03_Neo_F_ITS	141 bp	TCATCGAATCTTTGAACGCACA
	03_Neo_R_ITS		CGCCGTTGTATTTTCAGGAAC
Pair 04	04_Neo_F_TEF	223 bp	AGTCATTTATTGATTCCCGTCA
	04_Neo_R_TEF		TAGCAATTGTTCAAAGTGGGTC
Pair 05	05_Neo_F_TEF	359 bp	AAATTATTTTCGCTCCTTCCAC
	05_Neo_R_TEF		TAGTCAAGTGTCTTATGGAGCAG
Pair 06	06_Neo_F_TEF	165 bp	CTTCAAGTACGCCTGGGTT
	06_Neo_R_TEF		TTAGTCAAGTGTCTTATGGAGCAG
Pair 07	07_Neo_F_TEF	274 bp	TTCTTATCACAGCCCCACCT
	07_Neo_R_TEF		TTAGTCAAGTGTCTTATGGAGCAG
Pair 08	08_Neo_F_TUB	233 bp	ACAGCGACAACAGATTCATCCG
	08_Neo_R_TUB		TACATACCAGAAGGCAGCACCA
Pair 09	09_Neo_F_TUB	147 bp	ACAGCGACAACAGATTCATCCG
	09_Neo_R_TUB		GCATGTTACTTACGCACTGACC
Pair 10	10_Neo_F_TUB	263 bp	CACGGCCTCAATACGACGTT
	10_Neo_R_TUB		GCCTCGTTGAAGTAGACGCTCA
Pair 11	11_Neo_F_TUB	151 bp	CCCCGAACAGTGAATTAGGTC
	11_Neo_R_TUB		TCAGCCTACAAGCTTAACAGGA

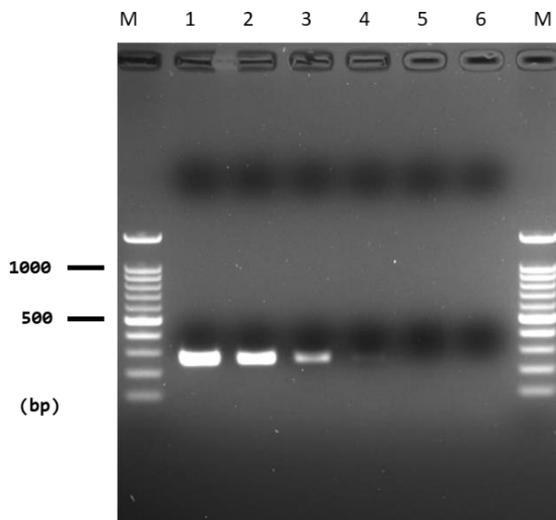




圖一、引子對 (pair 04) 於 35 cycles 之偵測極限測試。使用 *Neopetalotiopsis rosae* 之 genomic DNA 作為 PCR 模板。Lane 1, 1 ng. Lane 2, 100 pg. Lane 3, 10 pg. Lane 4, 1 pg. Lane 5 100 fg. Lane 6 10 fg. M, 100 bp marker.

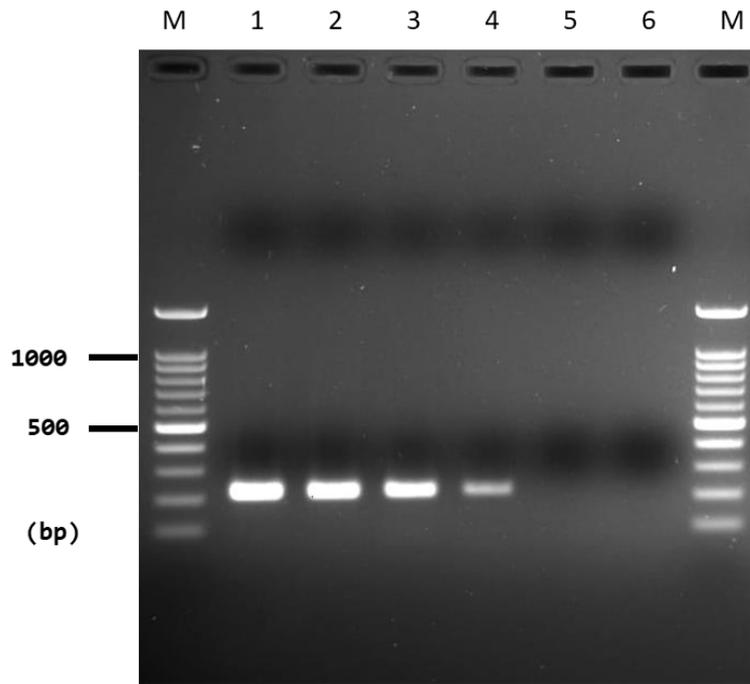


圖二、引子對 (pair 05) 於 35 cycles 之偵測極限測試。使用 *Neopetalotiopsis rosae* 之 genomic DNA 作為 PCR 模板。Lane 1, 1 ng. Lane 2, 100 pg. Lane 3, 10 pg. Lane 4, 1 pg. Lane 5 100 fg. Lane 6 10 fg. M, 100 bp marker.

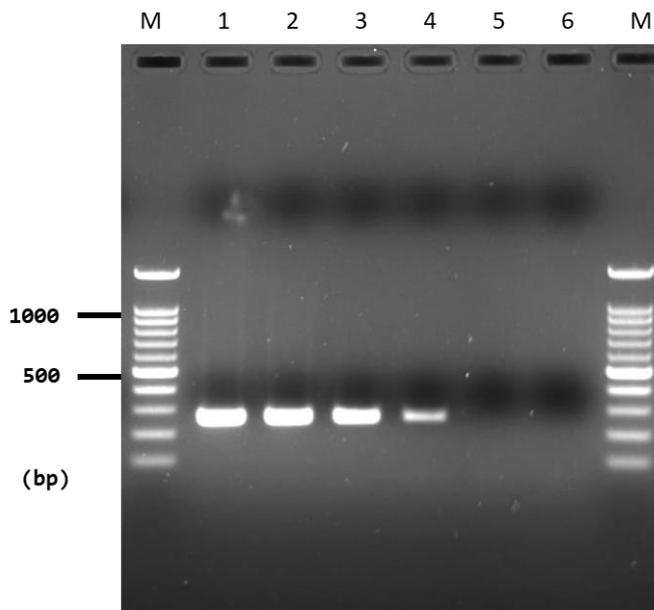


圖三、引子對 (pair 10) 於 35 cycles 之偵測極限測試。使用 *Neopetalotiopsis rosae* 之 genomic DNA 作為 PCR 模板。Lane 1, 1 ng. Lane 2, 100 pg. Lane 3, 10 pg. Lane 4, 1 pg. Lane 5 100 fg. Lane 6 10 fg. M, 100 bp marker.



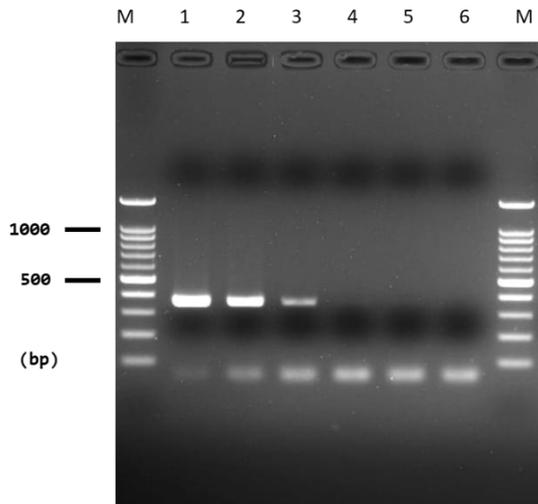


圖四、引子對 (pair 04) 於 40 cycles 之偵測極限測試。使用 *Neopetalotiopsis rosae* 之 genomic DNA 作為 PCR 模板。Lane 1, 1 ng. Lane 2, 100 pg. Lane 3, 10 pg. Lane 4, 1 pg. Lane 5 100 fg. Lane 6 10 fg. M, 100 bp marker.



圖五、引子對 (pair 10) 於 40 cycles 之偵測極限測試。使用 *Neopetalotiopsis rosae* 之 genomic DNA 作為 PCR 模板。Lane 1, 1 ng. Lane 2, 100 pg. Lane 3, 10 pg. Lane 4, 1 pg. Lane 5 100 fg. Lane 6 10 fg. M, 100 bp marker.





圖六、引子對 (pair 05) 於 40 cycles 之偵測極限測試。使用 *Neopetalotiopsis rosae* 之 genomic DNA 作為 PCR 模板。Lane 1, 1 ng. Lane 2, 100 pg. Lane 3, 10 pg. Lane 4, 1 pg. Lane 5 100 fg. Lane 6 10 fg. M, 100 bp marker.

