

番茄抗晚疫病分子標誌 開發與應用

孫永偉¹、邱燕欣²、陳哲仁³、周明燕¹、鍾文全⁴、安寶貞⁵

一、前言

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 為茄科番茄屬作物，原產南美安地斯山脈之秘魯、厄瓜多、玻利維亞等地，番茄富含茄紅素及維生素 A、C、E 等物質，營養及保健價值高，於全世界蔬菜消費量僅次於馬鈴薯。全球生產面積超過 470 萬公頃，其中生產面積最大的國家為中國和印度，分別占全球生產面積的 21% 和 13.6%。2009 年全球番茄產量達 1 億 5,295 萬公噸，其中產量最大的國家是中國，產量為 4,536 萬公噸，占全球產量的 29.7%，遠高於第二名美國的 9.2%。根據 FAO 統計 (2011 年) 推估種子需求量年需約 1,060 公噸，主要市場在中國、印度。臺灣栽培面積為 5,143 公頃，臺灣番茄種苗需求產值以種子估算為新臺幣 0.5~2 億元，以種苗估算為新臺幣 1.5~9.2 億元；全球番茄種苗需求產值以種子估算為美金 17.3~63 億元，以種苗估算為美金 47.3~284 億元，經濟價值極高。

番茄生育過程極易遭受病蟲危害，

嚴重影響產量與品質。主要病蟲害有病毒、真菌、細菌及蟲害等，育成抗病品種一直是番茄最重要育種目標之一。1980 年代之前，番茄育種方式多採用外表型態選拔法 (phenotypic selection)，但缺點是易受環境影響、不適合數量性狀、低遺傳或隱性性狀。由於基因體序列與分子標誌技術日益進步，近年已開發多種檢測番茄抗病、感病與病害基因之分子技術，如逢機擴增多型性 DNA (RAPD, randomly amplified polymorphic DNA)、簡單重複序列 (SSR, simple sequence repeat；又稱微衛星序列 microsatellite)、擴增片段長度多型性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)、單核苷酸多型性 (SNP, single nucleotide polymorphism)、酶切擴增多型性序列 (CAPS, cleaved amplified polymorphic sequence)、特異性序列擴增區域 (SCAR, sequence characterized amplified region) 等。以下將簡單介紹番茄晚疫病害特徵、已知抗病品種、病原菌與作物抗感病基因分子檢測技術，供育種者或相關研究人員參考。

¹ 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員

² 種苗改良繁殖場繁殖技術課 助理研究員

³ 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

⁴ 種苗改良繁殖場生物技術課 研究員兼課長

⁵ 農業試驗所植病組 研究員兼組長 (退休)

二、晚疫病

番茄全株均可被晚疫病 (late blight, *Phytophthora infestans*) 感染，成株較幼苗略為耐病，幼苗染病後，可造成全株急速枯萎。莖部及葉柄被害時，起初出現淡褐色斑點，而後呈環狀黑褐色之稍凹陷病斑，俗稱黑骨病，嚴重時被害部位以上之組織枯萎下垂。好發於番茄冬季低溫高濕或雨季最嚴重真菌性病害，常導致 100% 植株死亡，產量、品質、貯藏性大幅降低，施藥成本大幅增加。晚疫病菌配對型 (mating type) 有 A1 與 A2 二種，1845 年最早報導馬鈴薯 A1 配對型，1847 年首次報導番茄晚疫病，1956 年在墨西哥被發現馬鈴薯 A2 配對型，二者可進行交配形成孢子，由於 A1 與 A2 有性重組機會增加，病原菌生理小種變異加快、致病力與寄主適合度不斷提高，導致品種抗性喪失與加重疫情擴散，目前番茄絕大多數為 A1 配對型。各國學者關注晚疫病菌另一焦點為生理小種 (race) 或分離株 (isolate) 組成、致病力與分布。亞洲蔬菜中心 (AVRDC) 分析鑑定臺灣番茄晚疫病菌有 10 個生理小種，T₁、T_{1,2}、T_{1,3}、T_{1,2,3}、T_{1,2,5}、T_{1,3,5}、T_{1,2,3,4}、T_{1,2,3,5}、T_{1,3,4,5} 與 T_{1,2,3,4,5}，其中 T_{1,2,3} 為主要菌株。

三、抗病品種與基因

自從 1840 年代發生馬鈴薯晚疫病，造成愛爾蘭大饑荒後，學者開始重視馬鈴薯與番茄晚疫病病理學與抗病遺傳學研究。一般番茄抗晚疫病性狀由 2 類基因控制，一類主要受 *Ph-1*、*Ph-2*、*Ph-3*、*Ph-4* 與 *Ph-5* 等基因控制，遺傳表現為 (不

完全) 顯性的性狀；另一類是受多基因控制的數量性狀。目前已知 3 個抗病基因 *Ph-1*、*Ph-2*、*Ph-3* 來自野生醋栗番茄 (*S. pimpinellifolium*)，分別位於 7、10、9 號染色體。*Ph-1* 對菌株 T₀ 為單一顯性抗病基因，全球晚疫病主要菌株為 T₁，但 *Ph-1* 對菌株 T₁ 不具抗性，故近年相關研究較少。*Ph-2* 為不完全顯性抗病基因，位於 10 號染色體長臂，能夠延緩菌株 T₁ 危害，但當病原菌密度高，則無抗病或耐病效果差，該基因位於分子標誌 CP105 與 TG233 之間。近年由亞洲蔬菜中心於番茄 L3708 品系 (相似種 LA1269 或 PI365957) 發現 *Ph-3* 基因，為不完全顯性基因，位於 9 號染色體長臂，靠近分子標誌 TG591，抗病性非常強。已有研究開發出共顯性 CAPS 分子標誌，應用於輔助育種篩選抗病品種。雖然 *Ph-3* 基因抗病力較強，但隨病原菌持續變化，任何單一抗病基因均無法完全抵抗晚疫病危害，若番茄植株同時具有 *Ph-2* 與 *Ph-3* 抗病基因，對於大多數晚疫病 T₁ 菌株均呈現極佳抗病效果。

四、分子標誌

晚疫病生理小種雖眾多，選育抗病品種一直是番茄育種的重要目標，傳統以接種的方式所進行的抗病性檢定，除了要有一定的設施隔離避免病原外傳污染外，常需要較長的時間及較多的人力物力，而且會因為環境條件、接種技術等影響而導致鑑定結果不穩定。目前分子標誌技術為抗病基因早期篩選有利的方法之一。種苗場使用番茄抗病品種 (AVTO1219、AVTO1311、AVTO1315) 與

感病品種 (VI005642) 穴盤苗接種晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*, A1 配對型菌株編號為 212024, 由農試所安寶貞博士提供) 後, 密封於透明塑膠袋內, 1 週後觀察植株發病情形, 結果顯示, 感病品種 100% 發病死亡; 3 個抗病品種即使徒長情形嚴重, 仍完全無任何病徵出現 (圖 1), 其為雙抗 (*Ph-2* + *Ph-3*) 品種, 抗病效果極為顯著。研究測試國外文獻之 *Ph-2* 專一性分子標誌 Ph2-CAPS 分子標誌搭配限制酶 (HinfI) 切反應, 具抗病基因 (R) 樣品出現 350 bp 之 DNA 條帶, 感病基因 (S) 出現 300 bp 之 DNA 條帶, 異質結合基因型 (RS) 同時出現 300 與 350 bp 之 DNA 條帶; 本研究開發高專一性共顯性 SCAR 分子標誌 (Ph2TG422-SCAR), 免用限制酶能夠同時擴增抗病與感病基因 400 與 570 bp 之 DNA 條帶, 清晰易判讀 (圖 2)。有關 *Ph-3* 專一性分子標誌, 比較番茄抗病 (R)、感病 (S) 與異質結合基因型 (RS) 品系, 進行國外文獻分子標誌 Ph3-CAPS (配合使用 MspI 限制酶反應) 與本研究開發分子標誌 Ph3M67-SCAR (免用限制酶) 進行 PCR 反應, 二者均能區分抗病與感病品種差異性, 利用 Ph3M67-SCAR 分子標誌可同時擴增抗病與感病植株 DNA 條帶, 大小分別為 350 及 250 bp (圖 3), DNA 條帶較國外常用分子標誌清晰易判讀。本研究篩選 3 組檢測晚疫病菌株專一性分子標誌 (Pi-2、Pi-3、Pi-4), 可分別擴增晚疫病菌株 0.5、1.0 及 0.65 kb 之 DNA 條帶 (圖 4)。本場目前已建立專一性分子標誌 Ph2TG422-SCAR, 可同時擴增抗感晚疫病 *Ph-2* 基因之 DNA

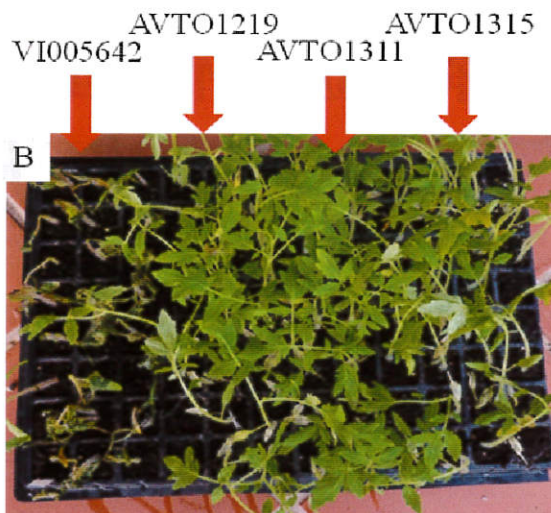
條帶, 分子量分別為 400 bp 及 570 bp; 分子標誌 Ph3M67-SCAR 可同時擴增抗感晚疫病 *Ph-3* 基因之 DNA 條帶, 分子量分別為 350 及 250 bp; 另 Pi-2 與 Pi-3 分子標誌可鑑定番茄晚疫病病原菌, 所開發分子標誌檢測結果與亞洲蔬菜中心及國內育種者或種子公司品種已知的抗感性吻合, 可作為育種者早期判斷番茄育成系之抗病基因型, 可大幅提升育種效率, 具有高市場潛力及產業應用價值。

五、未來展望

番茄生育過程中常遭受許多病害侵襲, 培育優良的抗病品種一直是番茄育種工作者的重要目標。利用傳統育種方式篩選及純化抗病品種相當耗時, 現代分子標誌技術的迅速發展為番茄抗病育種工作者提供了有利的輔助工具, 已為番茄育種開闢新途徑。目前已經找到一些與抗病 (病毒病、細菌及真菌性病害) 或抗逆境緊密連鎖的質 (單一基因) 與量 (QTLs) 基因的分子標誌, 可確認篩選品種抗病與感病基因型, 分子標誌亦可以在眾多番茄資源材料中, 快速挑選出優良性狀品種, 大幅縮短育成新品種所需時間。雖然許多文獻發表番茄抗病 RFLP、AFLP、RAPD、CAPS 等分子標誌, 但這些標誌常有操作繁瑣、檢測成本高昂或無法同時判別感病基因的缺點, 降低分子標誌應用性。因此, 找到與抗病基因緊密連鎖且可同時鑑定番茄植株抗感病及病原基因型的簡易 SCAR 分子標誌, 配合病原菌接種與實際田間抗病表現, 可協助增進國內育成抗病品種之國際競爭力。



穴盤苗接種後封於塑膠袋內



穴盤苗接種 1 週後植株外觀

圖 1. 番茄抗病 (AVTO1219、AVTO1311、AVTO1315) 與感病 (VI005642) 穴盤苗接種晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 後，密封於透明塑膠袋內 (A)，1 週後觀察植株發病情形 (B)。

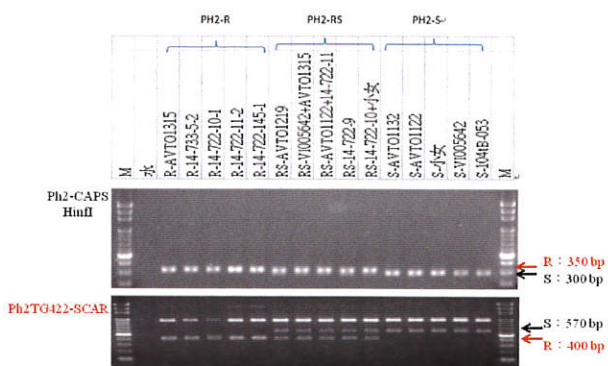


圖 2. 比較番茄抗病 (R)、感病 (S) 與異質結合基因型 (RS) 品系，進行 Ph2-CAPS (配合使用 *HinfI* 限制酶反應) 與 Ph2TG422-SCAR (免用限制酶) 分子標誌進行 PCR 反應之電泳圖譜差異性。

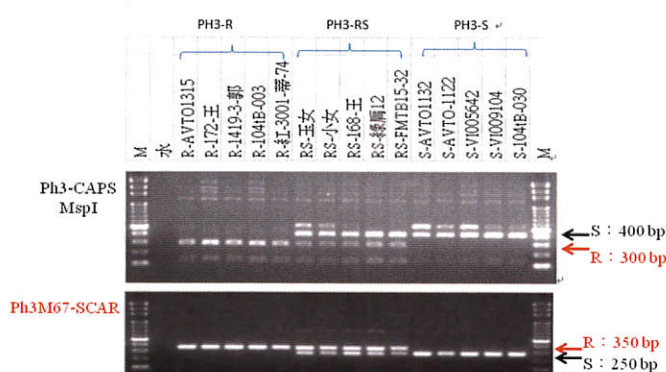


圖 3. 比較番茄抗病 (R)、感病 (S) 與異質結合基因型 (RS) 品系，進行 Ph3-CAPS (配合使用 *MspI* 限制酶反應) 與 Ph3M67-SCAR (免用限制酶) 分子標誌進行 PCR 反應之電泳圖譜差異性。

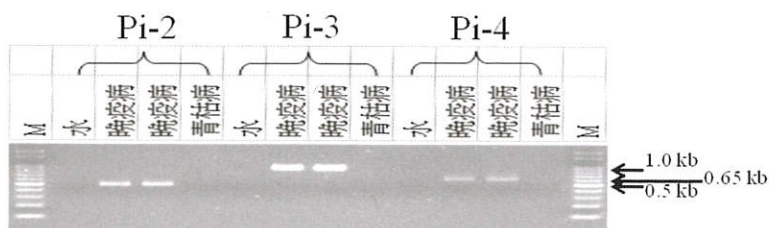


圖 4. 本研究篩選 3 組晚疫病菌專一性分子標誌 (Pi-2、Pi-3、Pi-4)，可分別擴增晚疫病菌株 0.5、1.0 及 0.65 kb 之 DNA 條帶。