番茄中不同*Ty*基因組合對於番茄黃化捲葉泰國病毒種之抗病力研究[1]

林煜恒[2]、吳靜霞[2]

摘　要

選育對於番茄黃化捲葉泰國病毒種(*Tomato yellow leaf curl Thailand virus*, TYLCTHV)具抗病能力之番茄品種，為臺灣番茄抗病育種重要方向之一。瞭解番茄中不同*Ty*基因組合對於TYLCTHV之抗(耐)病能力，有助於番茄抗TYLCTHV育種工作。本研究中單獨帶有*Ty1*基因及部分單獨帶有*Ty3*基因的番茄品系於接種TYLCTHV後，植株發病率及病毒檢出率皆為0%；部分單獨帶有*Ty2*基因之番茄品系，於接種後第28天病徵達3.7級，且植株發病率及病毒檢出率皆為17%；單獨帶有*ty5*之番茄品系雖於接種後各時期皆無病徵表現，然植株TYLCTHV檢出率為80%；同時帶有*Ty2*及*Ty3*之番茄各品系於接種TYLCTHV後各階段無病徵表現，其病毒檢出率最低為30%；同時帶有*Ty2*及*ty5*基因之番茄品系，於接種後各階段無病徵表現，然病毒檢出率為91%；同時帶有*ty5*及*Ty6*基因之番茄品系，於接種後各階段無病徵表現，病毒檢出率最低為17%。由研究結果可推論，臺灣進行番茄抗TYLCTHV育種時，如同時堆疊*Ty1*、*Ty2*及*Ty3*基因或*ty5*及*Ty6*基因，可使番茄在感染TYLCTHV後有最低之植株發病率及病毒檢出率，而使育成之番茄新品種(系)對於TYLCTHV有最佳抗(耐)病能力。

關鍵詞：番茄、抗病育種、番茄黃化捲葉泰國病毒種、*Ty*基因

前　言

番茄黃化捲葉病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)所誘發之番茄黃化捲葉病(Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD)為近年影響各國番茄生產最嚴重之病毒性病害(5)。番茄植株感染TYLCD 初期，生長點會出現輕微黃化及捲曲之病徵表現，至感染中期植株小葉會逐漸黃化、變形及縮小，感染後期植株節間縮短、萎縮，最終無法生產具商品價值之果實，甚至植株死亡，而造成農民巨大的經濟損失(18)。

[1]行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第0942號。
[2]行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

TYLCV 於分類上為雙生病毒科(Geminiviridae)、菜豆金黃嵌紋病毒屬(Begomovirus)之 DNA 病毒，其唯一的傳播媒介為銀葉粉蝨(*Bemisia tabaci*)[22]。1930 年於以色列發現 TYLCD 之後，陸續於亞洲、非洲、歐洲、澳洲、南美洲、北美洲、加勒比海及地中海地區亦皆出現 TYLCD[20]。TYLCV 依病毒 DNA 序列之差異而有不同生理小種，如其僅含有一個單股環狀 DNA，係單基因體組雙生病毒(monopartite geminivirus)；若含有兩個單股環狀 DNA，則為雙基因體組雙生病毒(bipartite geminivirus)；至今 TYLCV 已於世界各地發現上百個生理小種，顯示其具遺傳多樣性及廣泛之地理分佈[8]。

臺灣在 1987 年發表第一篇 TYLCV 正式報告，當時發現之生理小種被命名為 *Tomato leaf curl Taiwan virus* (TLCTWV)，其為單基因體組雙生病毒[9]，後於 2007 年亞蔬－世界蔬菜中心病毒組利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)檢測臺南地區番茄病毒種類，結果證實番茄黃化捲葉泰國病毒種(*Tomato yellow leaf curl Thailand virus*, TYLCTHV)已進入臺灣，並有取代 TLCTWV 之趨勢[12]。

TYLCTHV 係雙基因體組雙生病毒，其遺傳物質包含 DNA A 及 DNA B，且皆有雙向轉譯端。DNA A 上有 6 個 open reading frames (ORF)，其中 AV1 及 AV2 為正向股，AC1、AC2、AC3 及 AC4 為反義股；DNA B 上則有 2 個 ORF，BV1 為正向股，BC1 為反義股[27]。ORF AV1 負責轉譯非結構性蛋白質，大小約 30 kDa；ORF AV2 轉譯病毒外鞘蛋白質，分子量約 13.3 kDa[28]，AV1 及 AV2 轉譯出之蛋白質為誘發植株病徵表現之必需蛋白質[7,16,21,25]。雙基因體組雙生病毒之蛋白質外鞘參與病毒於細胞之間的移動以及病毒 DNA 於植體中之累積，增加植株病徵表現程度[27]；因此番茄植株感染雙基因體組雙生病毒後，病徵嚴重程度比感染單基因體組雙生病毒更高[26,27]。

番茄抗 TYLCD 育種可利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)以標記抗病基因，近年來已分別於 *Solanum pimpinllifolim*、*Solanum chilense*、*Solanum cheesmaniae*、*Solanum peruvianum* 與 *Solanum habrochaite*s 等野生番茄中發現許多與 TYLCV 相關之抗病基因，包括 *Ty1*、*Ty2*、*Ty3*、*Ty3a*、*Ty4*、*ty5* 及 *Ty6*[2,6]。Zamir 等人(1994)發現 *Solanum chilense* 抗病品系 LA1969 之抗病性由一個顯性基因與至少兩個修飾基因所控制，此一顯性基因被命名為 *Ty1*，是第一個被命名與 TYLCV 相關之抗病基因。*Ty1* 位於第 6 號染色體上編號 TG97 之位置，另外兩個修飾基因分別位於第 3 及 7 號染色體上[31]。Hanson 等人(2006)發現以 *Solanum habrochaites* (accession B6013)為親本育出之抗病品系 H24，其控制抗病之基因為一顯性基因，位於第 11 號染色體上編號為 TG36 之位置，並將其命名為 *Ty 2* [10]。Ji 和 Scott (2006)發現以 *Solanum chilense* (accession LA2779)為親本育出之抗病品系，其控制抗病之基因亦為一顯性基因，位於第 6 號染色體上編號 cLEG-31-P-16 和 T1079 之間，並將其命名為 *Ty 3* [13]。Agrama 和 Scott (2006)指出，*Solanum chilense* (accession LA2779 或 LA1932)作為抗病親本所育成之番茄抗病品系，其抗病性分別由具有 *Ty1* 基因座的區段、*Ty3* 基因座的區段及 *Ty3a* 基因座的區段所調控，*Ty3a* 基因座區段靠近調控番茄植株高度(*sp*)及葉片形狀(*c*)的基因座，此基因區段亦相當靠近 *Ty3* 基因座所在區段[1]。Ji 等人(2008)發現以 *Solanum chilense* 為親本育出之

抗病品系有一個位於第 3 號染色體上編號 C2_At4g17300 與 C2_At5g60610 之間的微效抗病基因，被命名為 *Ty 4* [14]。*Ty3* 基因對番茄植株感染 TYLCV 後病徵發展程度的影響佔 60%，而 *Ty4* 基因僅佔 16%[15]。*ty5* 基因在 2009 年於 *Solanum peruvianum* 經由種間雜交所選育出的抗病番茄‘Tyking’ 被發現，其位於第 4 號染色體上，為一隱性抗病基因[2,11]。*Ty-6* 則源於 *S. chilense* 抗病材料 LA2779 與 LA1938，定位在第 10 號染色體，為一顯性抗病基因[29]。

降低番茄栽培時 TYLCD 發生之最根本方式為使用抗病品種，而番茄品種(系)對於 TYLCD 之抗病能力，取決於番茄中不同 *Ty* 基因的組合與 TYLCV 生理小種之差異[24]。本研究於番茄苗期利用銀葉粉蝨接種 TYLCTHV，以瞭解番茄中不同 *Ty* 基因組合對於 TYLCTHV 之抗病能力，作為日後進行番茄抗 TYLCTHV 育種時之參考使用。

材料與方法

一、試驗材料

(一)植物材料及試驗地點

本研究所使用的材料為亞蔬－世界蔬菜中心選育之 14 個帶有不同 *Ty* 抗病基因組合之番茄品系，以不帶任何抗病基因的番茄‘Tanya’作為對照品種(如表一)。並於 2015 年 9 月至 12 月於亞蔬－世界蔬菜中心進行相關試驗。植物材料播種於 3 吋軟盆，利用滿地王三號(農友種苗股份有限公司)與蛭石以 1：1 比例混合後作為介質。發芽一週後，每週施用一次尿素(500 倍)及依得利(35%可濕性粉劑)，以防治細菌性葉枯病。播種後 1 個月，植株種植於病毒組玻璃溫室內，開始處理時移至病毒組 PH-36 網室。播種時間分別為 2015 年 9 月 8 日及 2015 年 9 月 25 日。

(二)銀葉粉蝨

本研究使用之銀葉粉蝨(*Bemisia tabaci*)為由病毒組提供之 B-type 生理小種，包括健康不帶病毒及帶病毒兩種銀葉粉蝨。健康不帶病毒之銀葉粉蝨飼養於與外界隔離之棉花養蟲室(25~26^{o}C)。

(三)病毒材料

本研究所使用之病毒為番茄黃化捲葉泰國病毒種(*Tomato yellow leaf curl Thailand virus*, TYLCTHV)[12]，係由病毒組分離純化後，以 TYLCTHV 感病番茄‘ANT22’及帶毒銀葉粉蝨，培養維持於病毒組 PH-36 網室內。

二、病毒接種方式

以播種後 2 週、3~4 片本葉之番茄苗為試驗材料。將植株置於病毒組 PH-36 網室內，經銀葉粉蝨傳毒 14 天後移出，並噴施稀釋 1,500 倍之益達胺殺蟲劑(Imidacloprid)，將植株上之銀葉粉蝨殺死。處理後之植株移至防蟲溫室內，進行發病率及病徵觀察。每處理 12 重複，每重複 1 株，以不帶有任何 *Ty* 抗病基因的番茄品種 Tanya 為對照組。

表一、15 個帶有不同 *Ty* 基因組合之番茄品系遺傳背景資料

Table 1. The genetic background information of 15 tomato breeding lines that carry different combinations of *Ty* resistant gene

Accession number	Distribution code	Internal code	*Ty1/Ty3*	*Ty2*	*ty5*	*ty6*	SHP	SZ	ST	Hab
1	AVTO9708	Tanya	S	S	S	S	PL	M	G	DT
2	AVTO1366	TMB-488 (TS-1-28-21-5-0)	Ty1	S	S	S	PL	M	P	SD
3	AVTO0301	CLN2498D	S	R	S	S	OB	M	G	DT
4	AVTO0922	CLN3024A	S[1]	R	S	S	BL	M	P	DT
5	AVTO1226	CLN3205B	Ty3	S	S	S	OB	M	G	DT
6	AVTO1288	CLN3552B	Ty3	S	S	S	OB	M	P	DT
7	AVTO1314	CLN3212C	S	S	R	S	GL	ML	G	SD
8	AVTO1122	CLN3150A-5	S	R	R	S	PL-BL	M	G	DT
9	AVTO1306	CLN3451D	3a	S	S	S	DGL	M	P	DT
10	AVTO1130	CLN3126A-7	3a	R	S	S	PL	M	G	DT
11	AVTO1010	CLN3070J	Ty3	R	S	S	PL	M	G	DT
12	AVTO1219	CLN3241H-27	Ty3	R	S	S	BL	MS-M	G	SD
13	AVTO1005	CLN3125P	Ty3	R	S	S	OB-R	M	G	SD
14	AVTO1346	F9-159	S	S	R	R	Pl	Sm	G	SD
15	VI059341	FLA456-4	S	S	R	R	R	MS	P	SD

R, S = homozygous for resistance or susceptibility, respectively.

[1]CLN3024 is suspected of carrying a minor *Ty* gene near the *Ty1/Ty3* locus

SHP represents fruit shape: OB=oblong; PL=plum; BL=blocky; R=round

SZ represents fruit size; M, ML, MS are medium, medium large and medium small respectively

ST represents stem color. G=green hypocotyl color due to *ah* gene (anthocyaninless of Hoffman) which is linked with the *Tm2a* gene for resistance to *Tomato mosaic virus*.

Hab represents plant habit. DT=determinate; SD=semi-determinate

三、調查分析項目

(一)病徵調查

分別於接種病毒之前及接種後 7、14、21 及 28 天，調查植株病徵發生程度，其嚴重程度以發病指標 1~6 代表，1 為健康的植株；2 為生長點輕微黃化；3 為小葉出現黃化、葉緣輕微捲曲；4 為葉片大範圍黃化捲曲、小葉縮小；5 為節間縮短、植株萎縮；6 為停止生長。

(二)病毒 DNA 偵測

1. 病毒 DNA 萃取：利用 1.5 mL 離心管，自最靠近生長點之第一片葉，取葉圓片(直徑約 0.9 cm)做為樣本。萃取時加入 500 μL Dellaporta (100 mM Tris base, pH 8.0、8.5 mM Ethylene Diamine Tetraacetic Acid EDTA、500 mM NaCl、10 mM 2-mercaptoethanol)，以 Kontes 公司出品之研磨棒研磨樣品至全碎；加入 33 μL 之 20% sodium dodecyl sulfate (SDS)震盪混合後，放入加熱器，以 65℃加熱 10 分鐘熱後，再加入 160 μL 5 M Potassium acetate (KAC)震盪，置入離心機，以 13,500 g 離心 10 分鐘，將上清液倒入新的離心管中，再進行第二次離心，後取 500 μL 上清液，置入新的離心管中，加入 250 μL isopropanol 震盪後，再離心 10 分鐘。之後小心地將 isopropanol 倒出，再加入 500 μL 80% ethanol，離心 5 分鐘後，將 ethanol 倒出，於室溫下乾燥 1 小時，使 ethanol 完全揮發。乾燥後加入 500 μL 之 ddH_2O，並置於-20

℃冰箱儲存[9,23]。

2. 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)：取 5 μL 之 DNA 樣品，加入 2.5 μL 10x PCR reaction buffer (Invitrogen)、1.25 μL 50 mM $MgCl_2$ (Invitrogen)、2 μL 10 mM dNTP、13.15 μL ddH_2O 與 Taq DNA polymerase (5 U/μL, Invitrogen)、以及 primer PAL1v1978 (10 μM)與 PAR1c715 (10 μM)各 0.5 μL。利用 pMD18-T Vector (Takara, Dalian, China)進行 PCR 反應。PCR 設定 30 cycles，以 94℃做變性 1 分鐘，以 55℃做黏合 2 分鐘，以 72℃做 extention 2 分鐘。
3. 電泳：取 5 μL PCR 產物與 1 μL loading buffer 混合，置於 1.2 %洋菜膠片上，以 100 伏特電壓進行電泳半小時，之後將膠片置於 0.5 μg/mL EtBr 中浸泡 20~30 分鐘，於波長 312 nm 之紫外燈下觀測及照相。TYLCV 之 DNA 大小約為 1.5 Kb。

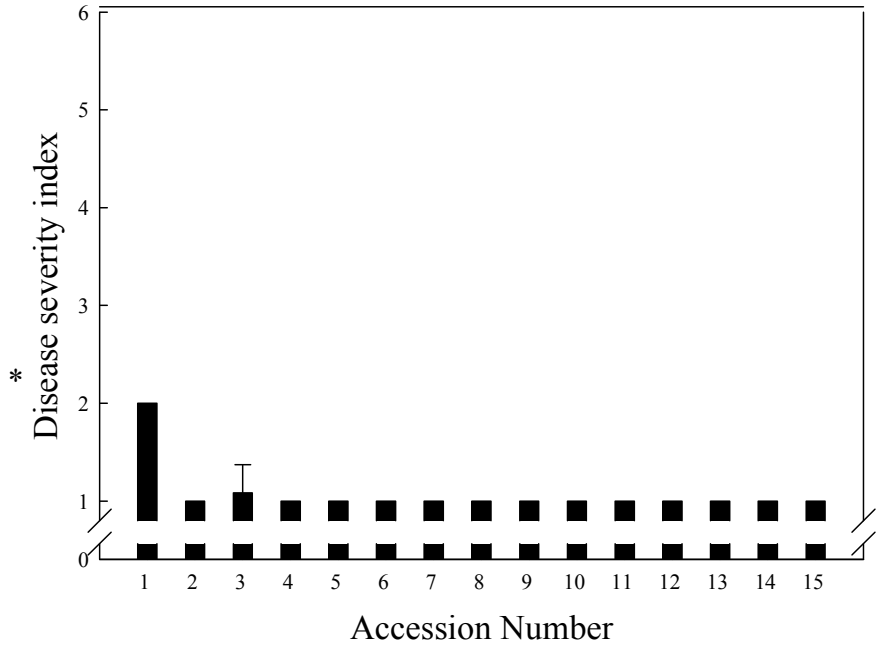
三、統計分析

統計方式為以最小顯著差異(least significant difference, LSD)比較平均數，處理或品種間達 5% 水準時，即代表具有顯著差異。

結　果

本研究利用亞洲蔬菜研究發展中心所提供帶有不同 *Ty* 基因組合之番茄育種品系 14 個，於番茄苗期以帶有 TYLCTHV 之銀葉粉蝨接種，並調查接種 TYLCTHV 後各時期各品系病徵表現、發病率以及植株中 TYLCTHV 有無，以瞭解不同 *Ty* 基因組合對於 TYLCTHV 之抗病能力。結果顯示，不帶有任何 *Ty* 基因之 1 號番茄於接種 TYLCTHV 後第 7 天植株病徵即達 2 級，顯著高於所有番茄品系，而 3 號番茄僅帶有一個 *Ty2* 基因，亦出現輕微的病徵達 1.1 級，而其餘各品系皆無病徵表現(圖一)。番茄接種 TYLCTHV 後第 14 天，作為感病對照組的 1 號番茄植株病徵表現達 4 級，顯著高於所有番茄品系；單獨帶 *Ty1* 基因的 2 號番茄出現輕微病徵，病徵等級為 1.7 級，除顯著低於 1 號及 3 號番茄，並與 5 號番茄無顯著差異，且其病徵等級皆顯著高於其它 11 個番茄品系；單獨帶 *Ty2* 基因的 3 號番茄病徵達 3 級，除顯著低於 1 號番茄，其病徵程度皆顯著高於其餘品系；單獨帶 *Ty3* 基因的 5 號番茄亦出現 1.8 級的病徵；其餘各品系番茄皆無病徵表現(圖二)。接種 TYLCTHV 後第 21 天，對照組的 1 號番茄植株病徵表現已達 5 級，顯著高於所有番茄品系；單獨帶有 *Ty2* 基因的 3 號番茄植株病徵程度維持在 3 級，除顯著低於 1 號番茄，其病徵程度皆顯著高於其它番茄品系；而其餘各品系皆無病徵表現(圖三)。接種後第 28 天，1 號番茄植株病徵達最高的 6 級，顯著高於所有番茄品系；單獨帶 *Ty2* 基因的 3 號番茄病徵程度達 3.7 級，除顯著低於 1 號番茄，其病徵程度皆顯著高於無病徵表現之其餘各品系(圖四)。調查及分析接種 TYLCTHV 後之植株發病比率及檢測植株中有無病毒，結果顯示，不帶任何抗病基因的 1 號番茄植株發病率達 100%，其所有植株亦皆檢測出 TYLCTHV 之存在。單獨帶有 *Ty1* 及 *Ty3* 基因的 2 號及 6 號番茄植株之發病率為 0，且所

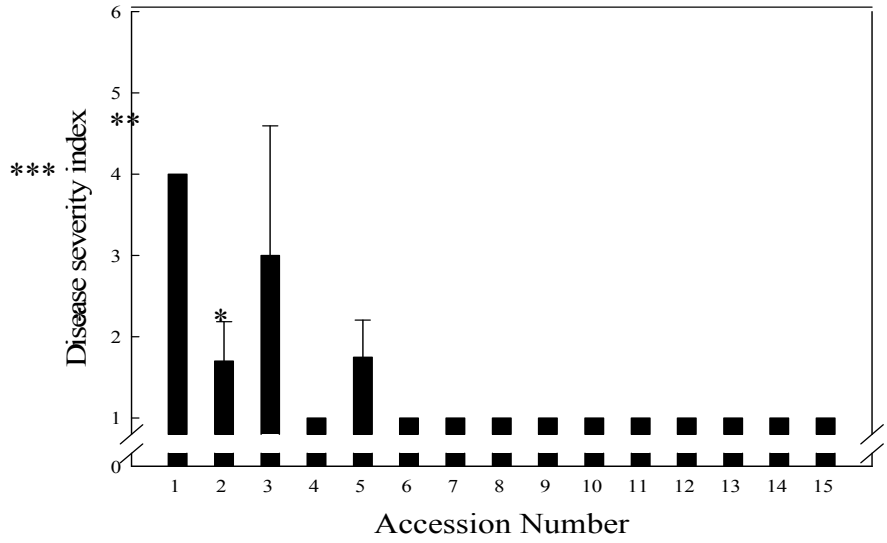
有植株皆未檢測出 TYLCTHV；然另一單獨帶有 *Ty3* 基因之 5 號番茄，其植株發病率為 30%，病毒檢出率亦達 80%；單獨帶有 *Ty2* 基因的 4 號番茄植株發病率為 0%，病毒檢出率為 9%，然另一單獨帶有 *Ty2* 基因的 3 號番茄植株發病率及病毒檢出率則皆為 17%。單獨帶有 *Ty3a* 基因的 9 號番茄植株發病率為 0%，然病毒檢出率為 67%。單獨帶有 *ty5* 基因的 7 號番茄植株發病率為 0%，病毒檢出率為 80%。同時帶有 *Ty2* 及 *Ty3* 基因的 11、12 及 13 號番茄品系，植株發病率皆為 0%，而病毒檢出率最低為 30%。同時帶有 *Ty2* 及 *Ty3a* 基因的 10 號番茄，其植株發病率為 0%，病毒檢出率為 20%。同時帶有 *Ty2* 及 *ty5* 基因的 8 號番茄，植株發病率為 0%，病毒檢出率為 91%。同時帶有 *ty5* 及 *Ty6* 基因的 14 及 15 號番茄品系，植株發病率皆為 0%，而病毒檢出率最低為 17% (表二)。



圖一、番茄 15 個品系接種番茄黃化捲葉泰國病毒後 7 天之發病指標

Fig. 1. The disease severity index in 15 tomato lines after inoculation with *Tomato yellow leave curl Thailand virus* (TYLCTHV) for 7 days

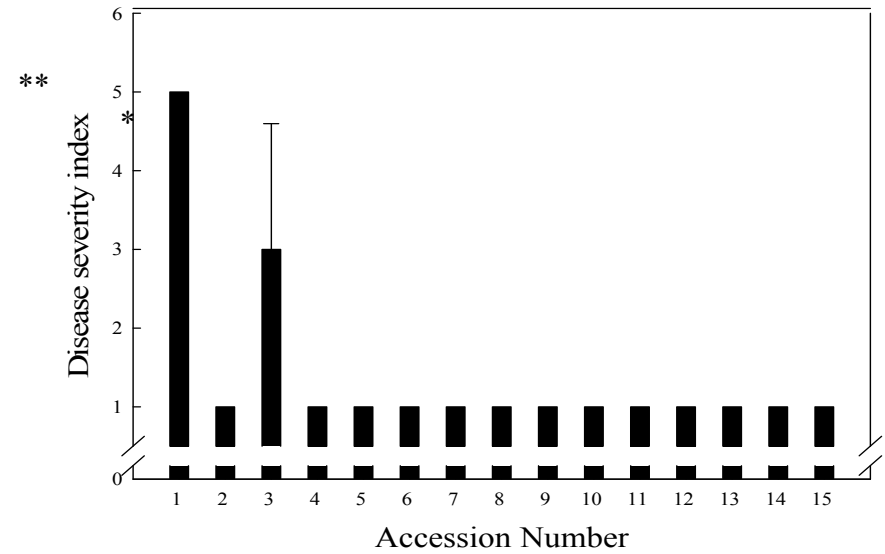
*denotes significant difference at $p < 0.05$ among lines by Fisher's protected least significant difference (LSD) test. Bar indicates standard error (SE).



圖二、番茄 15 個品系接種番茄黃化捲葉泰國病毒後 14 天之發病指標

Fig. 2. The disease severity index in 15 tomato lines after inoculation with *Tomato yellow leave curl Thailand virus* (TYLCTHV) for 14 days

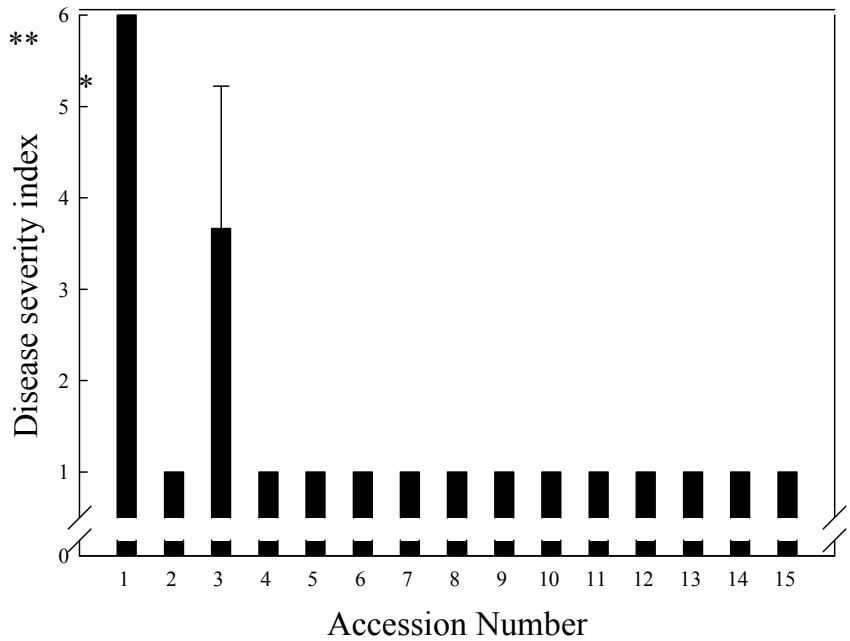
*,**,*** denotes difference significant at $p < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$ among lines by Fisher's protected least significant difference (LSD) test, respectively. Bar indicates standard error (SE).



圖三、番茄 15 個品系接種番茄黃化捲葉泰國病毒後 21 天之發病指標

Fig. 3. The disease severity index of 15 tomato lines after inoculation with *Tomato yellow leave curl Thailand virus* (TYLCTHV) for 21 days

*,** denotes difference significant at $p < 0.05$ and $P < 0.01$ among lines by Fisher's protected least significant difference (LSD) test, respectively. Bar indicates standard error (SE).



圖四、番茄 15 個品系接種番茄黃化捲葉泰國病毒後 28 天之發病指標

Fig. 4. The disease severity index in 15 tomato lines after inoculation with *Tomato yellow leave curl Thailand virus* (TYLCTHV) for 28 days

*,** denotes difference significant at $p < 0.05$ and $P < 0.01$ among lines by Fisher's protected least significant difference (LSD) test, respectively. Bar indicates standard error (SE).

討　論

番茄中不同 *Ty* 抗病基因組合及 TYLCV 生理小種之差異，影響番茄品種(系)對於 TYLCD 之抗病程度[24]。近年來 TYLCTHV 逐漸取代 TYLTWV，成為導致臺灣栽培番茄時發生 TYLCD 之主要病毒生理小種，許多原對於 TYLTWV 具抗病性之番茄品種，近年來亦失去對 TYLCD 之抗病能力[12]。因此本研究期瞭解番茄中不同 *Ty* 基因及其組合對於 TYLCTHV 抗病力之影響，作為番茄抗 TYLCTHV 育種時之參考。

本研究比較單獨帶有 1 個 *Ty* 基因的番茄材料對於 TYLCTHV 之抗病能力，以部分單獨帶有 *Ty1* 或 *Ty3* 者，對於 TYLCTHV 有最低之植株發病率及病毒檢出率，且大多數番茄品系於接種後各時期皆無病徵表現，部分番茄品系雖於接種 TYLCTYV 後第 14 天，有觀察到輕微病徵，然至接種後第 28 天植株確有健康回復現象。基因座定位研究指出，*Ty1* 及 *Ty3* 基因為等位基因，並負責編譯一個依賴 RNA 之 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase)，目前推測此依賴 RNA 之 RNA 聚合酶在植物感染雙生病毒後，可使病毒 DNA 甲基化，以抑制病毒轉錄作用，進而使病毒基因靜默[30]。又部分單獨帶 *Ty3* 基因之番茄品系，雖於接種後各時期之病徵皆小於 2 級，然植株發病率及

病毒檢出率確較高於部分單獨帶有 *Ty1* 或 *Ty2* 基因之番茄材料。相關研究指出，相較於 *Ty1* 及 *Ty2* 係單一顯性之抗病基因，*Ty3* 則為不完全顯性之抗病基因，其抗病特性屬於加成效果[4]。單獨帶有 *Ty3a* 或 *ty5* 基因之番茄植株，於接種 TYLCTHV 後各時期，植株皆無病徵表現，然皆有 60%以上之植株檢測出病毒，故可推測，TYLCTHV 感染了帶有單一 *Ty3a* 或 *ty5* 抗病基因之番茄後，即使植株無病徵顯現，病毒仍可於植株內順利進行遺傳物質複製及累積。

表二、不同 *Ty* 基因組合的番茄接種番茄黃化捲葉泰國病毒後之抗病力

Table 2. Disease resistant ability to *tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) after inoculation in tomato lines with different *Ty* gene combinations

Accession number	*Ty* gene	Days After Inoculation (DAI)				Disease plants (%)	PCR+ (%)
		7	14	21	28		
1	S	2.0	4.0	5.0	6.0	100	100
2	*Ty1*	1.0	1.7	1.0	1.0	0	0
3	*Ty2*	1.1	3.0	3.0	3.7	17	17
4	*Ty2*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	9
5	*Ty3*	1.0	1.8	1.0	1.0	30	80
6	*Ty3*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	0
7	*ty5*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	80
8	*Ty2+ty5*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	91
9	*Ty3a*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	67
10	*Ty2+Ty3a*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	20
11	*Ty2+Ty3*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	33
12	*Ty2+Ty3*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	100
13	*Ty2+Ty3*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	30
14	*ty5+Ty6*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	25
15	*ty5+Ty6*	1.0	1.0	1.0	1.0	0	17

許多植物與病原相互作用的研究已證實，利用雜交或回交育種方法堆疊 2~3 個抗病基因，可使植物獲得廣泛且較強之抗病能力。蔬菜作物中已有許多利用堆疊多個抗病基因，成功抵抗病毒性病害的例子，如菜豆普通嵌紋病毒(*Bean common mosaic virus*, BCMV)及番椒葉脈斑駁病毒(*Pepper veinal mottle virus*, PVMV)[3,17]。

本研究中同時帶有 *Ty2* 及 *Ty3* 基因之番茄品系，於接種 TYLCTHV 後各時期皆無病徵表現，植株病毒檢出率介於 30~100%。Prasanna 等人(2015)亦證實，*Ty3* 基因對於許多單基因體組雙生病毒及雙基因體組雙生病毒皆表現相當高的抗病能力，如能在育種過程中與 *Ty2* 基因進行堆疊，將可增強其對於 TYLCV 之抗病能力[24]。同時帶有 *Ty2* 及 *Ty3a* 基因的番茄在接種 TYLCTHV 後各時期皆無病徵表現，且植株病毒檢出率亦較單獨帶有 *Ty3a* 基因者低，Mejia 等人(2007)指出，同時堆疊

Ty2 與 *Ty3a* 基因將使植株對於雙基因體組雙生病毒產生更佳之抗病能力[19]。同時帶有 *Ty2* 及 *ty5* 基因的番茄，雖於接種後各時期皆無病徵表現，然而其植株內病毒檢出率為 91%，皆較單獨帶有 *Ty2* 或 *ty5* 番茄高。而同時帶有 *ty5* 及 *Ty6* 基因的番茄於接種 TYLCTHV 後各時期植株皆無病徵表現，且植株病毒檢出率亦皆低於 30%。*ty5* 基因為隱性抗病基因，當 *ty5* 堆疊其它 *Ty* 基因時，可使番茄對於 TYLCV 產生較高之抗病能力[11]，Scott 和 Hutton (2015)亦證實，同時堆疊 *ty5* 及 *Ty6* 基因可有效提升番茄對 TYLCD 之抗病能力[29]，與本研究結果相符。

番茄對於 TYLCTHV 之抗病能力主要可從感染病毒後之植株病徵表現、發病率及植株中病毒存在情形進行評估。由本研究結果可得知，單獨帶有 *Ty1* 基因及部分單獨帶有 *Ty3* 基因之番茄品系於接種 TYLCTHV 後，植株發病率及病毒檢出率皆為 0%。部分單獨帶有 *Ty2* 基因者於接種 TYLCTHV 後各時期，植株病徵程度及發病率皆較同時帶有 *Ty2* 及 *Ty3* 基因的番茄高，可知 *Ty3* 基因的加入可降低番茄植株在感染 TYLCTHV 後之病徵表現程度及發病率。同時帶有 *Ty2* 及 *Ty3* 基因的番茄，雖於接種 TYLCTHV 後無病徵表現，然其病毒檢出率仍介於 30~100%，因此如於番茄中堆疊 *Ty1*、*Ty2* 及 *Ty3* 基因應可同時降低番茄感染 TYLCTHV 後之植株發病率及病毒檢出率。研究結果亦顯示，同時帶有 *ty5* 及 *Ty6* 基因的番茄，不僅在接種 TYLCTHV 後各階段無病徵表現，且植株中病毒檢出率亦皆低於 30%。因此臺灣進行番茄抗 TYLCTHV 育種時，如可於番茄中同時堆疊 *Ty1*、*Ty2* 及 *Ty3* 基因，或同時堆疊 *ty5* 及 *Ty6* 基因，應可使番茄在感染 TYLCTHV 後有最低之植株發病率及病毒檢出率，而使選育出之番茄新品種(系)對於 TYLCTHV 有最佳抗(耐)病能力。惟進行相關抗病育種時，應先瞭解不同 *Ty* 基因組合之雜交成功率，以及不同 *Ty* 基因與番茄各項園藝性狀之遺傳相關性，方可在最短時間內選育出符合市場需求且具優良抗病能力的番茄品種(系)供農民使用。

誌　　謝

本研究承蒙亞洲蔬菜研究發展中心病毒組及育種組協助提供試驗材料、病毒接種及分析場地，謹致謝忱。

參考文獻

1. Agrama, H. A. and J. W. Scott, 2006. Quantitative trait loci for tomato yellow leaf curl virus and tomato mottle virus resistance in tomato. J. Am. Hortic. Sci. 131: 267-272.
2. Anbinder, I., M. Reuveni, R. Azari, I. Paran, S. Nahon, H. Shlomo, L. Chen, M. Lapidot and I. Levin. 2009. Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from Solanum peruvianum. Theor. Appl. Genet. 119: 519-530.
3. Caranta C., A. Palloix, K. Gebre-Selassie, V. Lefebvre, B. Moury and A. M. Daubeze. 1996. A complementation of two genes originating from susceptible Capsicum annuum lines confers a new

and complete resistance to pepper veinal mottle virus. Phytopathology 86: 739-43.

4. Caro, M., M. G. Verlaan, O. Julián, R. Finkers, A. M. A. Wolters, S. F. Hutton, J. F. Scott, R. Kormelink, R. G. F. Visser, M. J. Dı´ez, A. Pe´rez-de-Castro and Y. Bai. 2015. Assessing the genetic variation of Ty-1 and Ty-3 alleles conferring resistance to tomato yellow leaf curl virus in a broad tomato germplasm. Mol. Breed. 35: 132-144.
5. Czosnek, H. and H. Laterrot. 1997. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. Arch. Virol. 142: 1391-1406.
6. Chen, H. M., Y. L. Chen, M. Yoshida, P. Hanson and R. Schafleitner. 2015. Multiplex PCR for detection of tomato yellow leaf curl disease and root-knot nematode resistance genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Int. J. Plant Breed. Genet. 2: 44-56.
7. De Kouchkovsky, F., I. Jupin, L. Wartig, M. Bendhamane, A. Kheyr-Pour, F. Jouanneau, G. P. Accotto and B. Gronenborn. 1993. Molecular biology of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and potential ways to control the disease. Technomic Publishing. p.227-238.
8. Fauquet, C. M. and J. Stanley. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. Archives of Virology 150, 2151-79.
9. Green, S. K., Y. Sulgo and D. E. Lesemann. 1987. Leaf curl virus on tomato in Taiwan province. FAO plant prot. Bull. 35: 62.
10. Hanson, P., S. K. Green and G. Kuo. 2006. Ty-2, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. Tomato Genet. Coop. Rep. 56: 17-18.
11. Hutton, S. F., J. W. Scott and D. J. Schuster. 2012. Recessive Resistance to Tomato yellow leaf curl virus from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as Ty-5 on chromosome 4. Hort. Sci. 47: 324-327.
12. Jan, F. J., S. K. Green, S. L. Shih, L. M. Lee, H. Ito, J. Kimbara, K. Hoaoi and W.S. sai. 2007. Report of Tomato yellow leaf curl Thailand virus in Taiwan. Plant Dis. 91: 1363.
13. Ji, Y. and J. W. Scott. 2006. Ty-3, a begomovirus resistance locus linked to Ty-1 on chromosome 6 of tomato. Tomato Genet. Coop. Rep. 56: 22-25.
14. Ji, Y., J. W. Scott, D. P. Maxwell and D. J. Schuster. 2008. Ty-4, a tomato yellow leaf curl virus resistance gene on chromosome 3 of tomato. Tomato Genet. Coop. Rep. 58: 29-31.
15. Ji Y., J. W. Scott, D. J. Schuster and D. P. Maxwell. 2009. Molecular mapping of Ty-4, a tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. Journal of American Society of Horticultural Science 134, 281-8.
16. Kheyr-Pour, A., M. Bendahmane, V. Matzeit, G. P. Accotto, S. Crespi and B. Gronenborn. 1991.

Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. Nucl. Acids Res. 19: 6763-6769.

17. Kelly J. D., L. Afanador and S. D. Haley. 1995. Pyramiding genes for resistance to Bean common mosaic virus. Euphytica 82, 207-12.
18. Lapidot, M. and M. Friedmann. 2002. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminivirus. Assoc. of Appl. Biol. 140: 109-127.
19. Mejia, L., R. E. Teni, B. E. Garcia, A. C. Fulladolsa and L. Mendez. 2010. Preliminary observations on the effectiveness of five introgressisons for resistance to begomoviruses in tomatoes. Rpt. Tomato Genet. Coop. 60: 41-53.
20. Moriones E. and J. Navas-Castillo. 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. Virus Research 71, 123-34.
21. Navot, N, E. Pichersky, M. Zeidan, M., D. Zamir and H. Czosnek. 1991. Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genome component. Virol. 185: 151-161.
22. Nakhla, M. K. and D. P. Maxwell. 1998. Epidemiology and management of tomato yellow leaf curl disease. In: Plant Virus Disease Control, p.565-583. St. Paul, MN: APS Press.
23. Pico, B., M. J. Diez and F. Nuez. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus - a review. Scientia Hort. 67: 151-196.
24. Prasanna, H. C., D. P. Sinhaa, G. K. Raia, R. Krishnaa, S. P. Kashyapa, N. K. Singha, M. Singha and V.G. Malathib. 2014. Pyramiding Ty-2 and Ty-3 genes for resistance to monopartite and bipartite tomato leaf curl viruses of India. Plant Pathology. 64, 256-264.
25. Ridgen, J. E., I. B. Dry, P. M. Mullineaux and M.A. Rezaian. 1993. Mutagenesis of the virion-sense open reading frames of Tomato leaf curl geminivirus. Virology 193: 1001-1005.
26. Rochester, D. E., W. Kositratana and R.N. Beachy. 1990. Systemic movement and symptom production following agroinoculation with a single DNA of tomato yellow leaf curl geminivirus (Thailand). Virology 178: 520-526.
27. Rochester, D. E., J. J. de Paulo, C. M. Fauquet and R.N. Beachy. 1994. Complete nucleotide sequence of the gemonivirus tomato yellow leaf curl virus, Thailand isolate. J. Gen. Virol. 75: 477-485.
28. Rojas, M. R., H. Jiang, R. Salati, B. Xoconostle-Casares, M. R. Sudarshana, W. J. Lucas and R. L. Gilbertson. 2001. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite Begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. Virol. 291: 110-125.
29. Scott, J. W. and S. F. Hutton. 2015. Fla. 8638B and Fla. 8624 Tomato Breeding Lines with Begomovirus Resistance Genes ty-5 Plus Ty-6 and Ty-6, respectively. Hort Science. 50: 1405-1407.

30. Verlaan, M. G., S. F. Hutton and R. M. Ibrahem. 2013. The Tomato yellow leaf curl virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. PLoS Genetics 9, e1003399.
31. Zamir, D., I. Ekstein-Michelson, Y. Zakay, N. Navot, M. Zeidan, M. Sarfatti, Y. Eshed, E. Harel, T. Pleban, O. Hv, N. Kedar, H.D. Rabinowitch and H. Czosnek. 1994. Mapping and introgression of a tomatoyellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1. Theor. Appl. Genet. 88: 141-146.

Study on the Disease Resistant Ability to *Tomato Yellow Leaf Curl Thailand Virus* (TYLCTHV) in Tomato Lines with Different Combinations of *Ty* Genes[1]

Yu-Heng Lin[2] and Jui-Shin Chang[2]

ABSTRACT

Breeding tomato varieties (lines) resistant to *tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) is one of the important strategies for disease resistance breeding of tomato in Taiwan. Understanding the disease resistant ability to TYLCTHV among different combinations of *Ty* genes in tomato will be helpful for TYLCTHV resistance breeding. In this study, the disease incidence and virus detected rate of the tomato breeding line with single *Ty1* gene and part breeding lines with single *Ty3* were showed both 0% at 28 days after inoculating with TYLCTHV. Some of the tomato breeding lines with single *Ty2* gene showed 3.7 of severity index on 28 days after inoculation with the plant disease incidence and virus detected rate both 17%. The breeding line with single *ty5* gene showed no disease symptoms in each stage after inoculation, the detection rate of TYLCTHV in the plants was 80%. The tomato breeding lines with the *Ty2* and *Ty3* gene combination showed no disease symptoms in all stages after inoculation with TYLCTHV, and the lowest virus detection rate was 30%. The tomato line with the *Ty2* and *ty5* gene combination showed no disease symptoms in all stages after inoculation, but the virus detection rate was 91%. The tomato lines with the *ty5* and *Ty6* gene combination all showed no disease symptoms in all stages after inoculation, and the lowest virus detection rate was 17%. The results showed the best TYLCTHV resistance ability of tomato varieties (lines) can be obtained by pyramiding with *Ty1*, *Ty2* and *Ty3* genes, or pyramiding with *ty5* and *Ty6* genes in tomato TYLCTHV resistance breeding procedure in Taiwan.

Key words: tomato, disease resistance breeding, *tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV), *Ty* gene

---

[1]Contribution No. 0942 from Taichung DARES, COA.

[2]Assistant Researcher of Taichung DARES, COA.