以分子標誌篩選抗黃化捲葉病之番茄種原[1]

吳靜霞[2]、賴佳甫[3]、林煜恒[2]

摘　要

番茄栽培期間常因番茄黃化捲葉病而影響果實產量與品質，現行的防治措施無法有效控制病害發生，因此，培育抗病品種為最經濟的防治策略之一。本研究利用已發表的抗病性基因相關之分子標誌，分析雜交組合、自交系與回交組合等單株之抗性基因型。結果顯示分子標誌所增幅之產物，其核苷酸序列可比對至番茄基因組，並與已知的抗性基因序列一致。為了堆疊不同抗性基因或導入抗性基因，進行不同雜交組合，其中3個雜交組合之後裔可成功堆疊*Ty-1/Ty-3*與*Ty-2*，1個雜交組合之後裔導入*Ty-1/Ty-3*，3個F_2分離族群堆疊了異質結合的抗性基因型。為篩選優良自交系，進行抗性基因鑑定與園藝性狀調查，選拔出3個帶有同質結合*Ty-1/Ty-3*之優良純系，可作為後續抗病育種之親本。回交族群之前景選拔，共有6個單株堆疊2個抗性基因，將持續於回交世代選拔同質結合之抗性基因型。

關鍵詞：番茄、番茄黃化捲葉病、分子輔助育種

前　言

番茄(*Solanum lycopersicum*)為茄科茄屬之果菜類，原產於南美洲。依據聯合國糧農組織(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)統計，2016年番茄全球收穫面積約478萬公頃，占蔬菜總面積23.2%，為重要的經濟蔬菜，全球前三大生產國家為中國、美國與印度[9]。臺灣近5年收穫面積平均約5,198 ha，產量平均約13萬公噸，產值約41.5億元[1]。由於雜交一代(F_1)品種具有雜種優勢，種子價格高昂，預估全球番茄種子產業在2022年會達到10.4億美金，最大種子生產國為美國，其次為印度[23]。

番茄栽培過程中易發生許多病害，近年來又以番茄黃化捲葉病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)所引發之番茄黃化捲葉病(Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD)最為嚴重。TYLCD最早於1930年末在以色列被發現，隨著世界貿易擴展及世界番茄栽培面積增加，此病害已快速擴散至許多熱帶及亞熱帶國家[7]。臺灣在2005年首次報導番茄為泰國生理小種(*Tomato yellow leaf curl Thailand virus*, TYLCTHV)所感染，並迅速擴散[19]。TYLCV為雙生病毒科*Begomovirus*屬，此病毒包括許多不同的生理小種，透過銀葉粉蝨間接傳播病毒，其感染

[1] 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0938 號。
[2] 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。
[3] 行政院農業委員會臺中區農業改良場約僱技術員。

植物後，會經由韌皮部運移至細胞分裂作用旺盛之莖頂分生組織進行病毒複製，使莖頂附近葉片最先出現病徵，初期在生長點附近的葉片發生輕微黃化與捲曲；感染中期，葉片出現嚴重黃化、變形及縮小的現象；感染後期，有節間縮短、植株矮化的情形，最終導致果實品質與產量下降。由於病媒難以用藥劑防治，嚴重時會造成番茄約80%減產，且無法生產具商品價值之果實，造成農民的經濟損失[7]。目前對於TYCLD的防治措施為利用物理、化學及生物性綜合等方式，但效果不彰，而培育抗病品種為最經濟的防治策略之一[18]。

目前從野生種番茄中發現的抗黃化捲葉病基因包括*Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-3a*、*Ty-4*、*ty-5*與*Ty-6*，其中*Ty-1*至*ty-5*已開發與其連鎖的分子標誌[4,5]，並利用種間雜交方式，將抗性基因(*Ty-1*至*ty-5*)導入栽培品種。最早係自野生種*S. chilense*之抗病材料LA1969發現抗性基因*Ty-1*，位於第6號染色體，定位介於HBa0161K22與WU_M31分子標誌間，為一段預測有5個基因的70 kb區域內，其中3個基因編碼為RNA-dependent RNA polymerase (RDR)，推測其中RDR 蛋白質可能與產生siRNA之抗病機制有關，使病毒的DNA甲基化，抑制雙生病毒的轉錄作用，進而默化基因表現[24]；另從一系列*S. chilense*之抗病材料比對，此段抗性基因的區域內有12 bp (4個胺基酸)插入，並找到5個專一性的SNP[4]。*Ty-2*為單一顯性基因，從*L. hirsutum* f. *glabratum*之抗病材料H24發現，位於第11號染色體，介於RFLP分子標誌TG36與TG393之間，相距約14.6 cM[11]；另有學者從野生種*S. habrochaites*在C2_At1g07960 (82.5 cM)和cLEN-11-F24 (87 cM)分子標誌之間定位*Ty-2*[17]；接著進一步縮小至300 kb區域內，在UP8與M1分子標誌之間，經序列比對後，此區域內有5個基因[26]，其中2個基因編碼為nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat (NB-LRR)蛋白質，即*TYNBS1*與*TYNBS2*，前者與*Ty-2*為同源基因，與抗病性有關[25]。從*S. chilense*的抗病材料LA2779或LA1932定位3段區域，包括*Ty-1*與*Ty-3*基因座，其中*Ty-3*介於cLEG-31-P16 (20 cM)與C2_At5g41480 (26 cM)分子標誌之間，第3個則與有限生長和葉形的基因座相關[15]；而與*Ty-1*和*Ty-2*相比，*Ty-3*為非完全顯性的抗性基因，屬於加成效果(additive effect)[4]，且可抗番茄斑駁病毒(*Tomoto mottle virus*, ToMoV)，而*Ty-3*與*Ty-1*皆位於第6號染色體的長臂相近位置，顯示兩者可能為等位基因[4,24]；另外有學者從LA1932的種間材料中無法定位到*Ty-3*，因此在*Ty-3/ty-3*序列之間的indel區域重新設計引子定位出*Ty-3a*[4,15]。*Ty-4*來自野生種*S. chilense*之抗病材料LA1932，位於第3號染色體，並定位在C2_At4g17300 andC2_At5g60160分子標誌之間，相距2.3 cM，*Ty-4*屬於微效的抗性基因[16]。*ty-5*基因為一隱性基因，位於第4號染色體，係從3個野生種*S. peruvianum*與1個野生種*S. arcanum*雜交後選育的品系TY172中發現，緊鄰SINAC1分子標誌[3,14]；利用轉錄體分析，*ty-5*抗病性與28個基因表現有關，包括植物荷爾蒙訊息傳導、碳代謝、光合作用碳固定和Glutathione代謝之機制有關[6]。*Ty-6*源自*S. chilense*抗病材料LA2779與LA1938，定位在第10號染色體，可同時抗ToMoV與TYLCV，尚未開發出有效的分子標誌[20]；另有學者在該區域定位出1個QTL，該區域可編碼eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)蛋白質，與隱性抗病毒(potyvirus)基因有關[18]。

由於從單一抗病材料可定位出不同的抗性基因，如在LA2779中發現*Ty-3*與*Ty-6*，因此學者認為在同一品系堆疊不同的抗性基因，可提升植株的抗病能力。透過已知的基因序列，據以設計分子標誌，包括CAPS、SSR、SCAR、HRM等各種分子標誌已廣泛應用於輔助育種(marker-assisted selection, MAS)，如M2、P1-16、P6-25、C2_At4g17300與SINAC1可分別用來篩選*Ty-1*、*Ty-2*、*Ty-3*、*Ty-4*與*ty-5* [5,10,14,15,16,26]。此外，透過MAS能系統性的導入多個抗性基因，而堆疊來自不同種原的抗性基因，更能擴大植株的抗(耐)逆境能力，如堆疊*Ty-3*和*Ty-4*同質結合基因型的植株比帶有*Ty-1/ty-1*異質結合基因型與單獨帶有*Ty-3*者之抗病性高[16]，並能增加對ToMoV的抗性[4]；堆疊*Ty-1/Ty-3*和*Ty-2*[8,22]或堆疊*Ty-2*、*Ty-3*和*ty-5*時，其抗病性較僅有單一抗性基因的植株佳[21]；*Ty-6*堆疊*Ty-3*或*ty-5*均可提升植株的抗病性[20]；Hanson等人利用分子標誌輔助育種(MAS)成功地將6個抗性基因(黃化捲葉病、晚疫病、青枯病、萎凋病、灰斑病及菸草鑲嵌病毒)堆疊至番茄品系，僅花費6年時間獲得5個抗病自交系[12]。

傳統育種過程依據外表型進行篩選，此方法需要較多人力及較大栽培空間，成本花費極高；抗病育種更須透過接種試驗確認，易受環境、季節與氣候影響以及增加試驗區污染的風險，而造成鑑定結果之準確性不足等缺點。生物技術快速的發展，促使分子技術逐漸成熟及穩定，建立了許多作物的分子標誌，可應用於品種鑑定、性狀遺傳分析、分子標誌輔助育種等。分子標誌不僅分析快速且穩定，又具提供早期檢測等優勢，故發展分子輔助育種技術極為重要[12]。

本研究應用MAS技術於各雜交組合，以篩選具有抗性基因之後裔單株，同時鑑定各自交系是否帶有抗性基因，以作為育種親本；另一方面，在回交抗病育種中，利用與抗性基因座連鎖的分子標誌於苗期進行前景選拔。

材料與方法

一、植物材料

參試材料包括國內外種苗商販售之番茄品種，包括Moralburg 481、Moralburg 9102、Sinon T-40、Sinon T-82、Bucolic 25、Bucolic 922、Tezier 804、TSS ASVEG No.22、Akash Ganga、TMB147、TMB688、SV4224TH、NS524、US440、Sylviana等；另外從亞蔬-世界蔬菜中心取得CLN3552B、CLN3212C、CLN3126A-7、CLN3070J、CLN3853C、CLN3900C-23、F9-159等品系(表一)，部分品種/系經過雜交或多世代自交選拔作為親本，每個雜交組合重複3~5株，栽植於溫室內。

部分試驗材料已由前人進行接種試驗，使用之病毒為番茄黃化捲葉泰國病毒種(*Tomato yellow leaf curl Thailand virus*, TYLCTHV)，接種後7、14、21及28天調查病徵，計算植株發病率與罹病等級(Disease severity index, DSI)，共分為6級，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[2]；植株未發病者表示抗病(R)；植株出現病徵而罹病等級小於等於3者，表示耐病(T)；植株出現病徵而罹病等級大於3者，表示感病(S)。

表一、番茄品種/系之抗性基因型

Table 1. *Ty* resistance genes in tomato entries

Entry	Genetic Status	*Ty* gene	Field Identification[1]	Resource
SV4224TH	F_1 Hybrid	*Ty-1*/*Ty-3*	R	Seminis Co.
Sylviana	F_1 Hybrid	*Ty-1*/*Ty-3*	R	Enza zaden Co.
TMB147	F_1 Hybrid	*Ty-1*/*Ty-3*	R	Syngenta Co.
TMB688	F_1 Hybrid	*Ty-1*/*Ty-3*	R	Syngenta Co.
US440	F_1 Hybrid	*Ty-2*	T	US Agriseeds Co.
Akash Ganga	F_1 Hybrid	*Ty-2*, *ty-5*	T	Camson seeds Co.
Bucolic 25	F_1 Hybrid	*Ty-2*, *ty-5*	T	Bucolic Seeds Co.
Bucolic 922	F_1 Hybrid	*Ty-1*/*Ty-3*, *Ty-2*, *ty-5*	T	Bucolic Seeds Co.
Bucolic 9748	F_1 Hybrid	*Ty-1*/*Ty-3*	T	Bucolic Seeds Co.
TSS ASVEG No. 22	F_1 Hybrid	*Ty-2*	T	TSIPS, COA
NS524	OP	-	R	Namdhari Seed Co.
Ricca	F_1 Hybrid	-	NT	India
CLN3552B	Inbred Line	*Ty-3*	NT	AVRDC
CLN3212C	Inbred Line	*ty-5*	NT	AVRDC
CLN3126A-7	Inbred Line	*Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-3a*	NT	AVRDC
CLN3070J	Inbred Line	*Ty-2*, *Ty-3*	NT	AVRDC
F9-159	Inbred Line	*ty-5*	NT	AVRDC
CLN3853C	Inbred Line	*Ty-1*/*Ty-3*, *ty-5*	NT	AVRDC
CLN3900C-23	Inbred Line	*Ty-1*/*Ty-3*, *Ty-2*	NT	AVRDC
Tezier 804	F_1 Hybrid	*Ty-1*/*Ty-3*	NT	Tezier Co.
Moralburg 481	F_1 Hybrid	NT	NT	Moralburg Co.
Moralburg 9102	F_1 Hybrid	NT	NT	Moralburg Co.
T-40	F_1 Hybrid	NT	NT	Sinon Co.
T-82	F_1 Hybrid	NT	NT	Sinon Co.

[1]R: resistance (Incidence=0%, DSI = 1), T: tolerance (Incidence≠0%, DSI≤ 3), -: without *Ty* gene, NT: not tested.

二、核酸萃取技術

番茄葉片DNA萃取係採用自動化核酸萃取儀(Smart LabAssist-32，臺灣圓點奈米技術股份有限公司，臺灣)。取番茄三葉齡葉圓片3 cm，置於2 mL厚壁試管中，加入800 µL Lysis buffer，加入鋼珠震盪1 min，將葉片磨成粉末後，混合均勻，再靜置於室溫5 min。以8,000 g離心5 min，將上清液注入已預先分注試劑之96孔盤，放入自動化核酸萃取儀，依操作手冊選擇(BIO-W4-AUTO)程式，約40 min完成DNA萃取，以分光光度計(NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)測定DNA濃度，儲存於-20℃中備用。

三、聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

抗黃化捲葉病基因之引子序列及判斷抗性基因的片段大小如表二所示。每個樣品總體積為25 µl，內含DNA模版、5X Taq Master Mix (Fast-Run Taq Master Mix Kit，波仕特公司)、10

μM引子組及無菌蒸餾水。樣品混合後於GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA)進行，先以94℃反應10 min，接著依序以94℃反應1 min、55~60℃反應1 min (依不同引子調整溫度)及72℃反應1 min，上述三步驟共重覆30~35個循環，最後以72℃反應10 min。經聚合酶連鎖反應所增幅之產物，加入6x loading dye，以2~3.5 %的SFR agarose在TBE buffer中，於100 V電壓進行電泳分離約60 min，並以UV光檢視、照相及貯存影像於電泳影像分析系統(IS 2000 Digital Imaging System, Alpha Innotech Corporation)；為提升分析靈敏度，並利用毛細管電泳儀($Qsep_{100}^{TM}$ BiOptic Inc.，基智生物科技股份有限公司，臺灣)自動化分析產物片段。

表二、檢測抗番茄黃化捲葉病基因之分子標誌

Table 2. Molecular markers used for the detection of tomato yellow leaf curl resistance loci

Gene	Marker	Sequence	Type[1]	Reference
Ty-1/ *Ty-3*	M2-F	5'-GATCCGTTGATTGAAGAAAT-3'	SCAR	5
	M2-R	5'-AGGAAGAGGAGAGACAATCC-3'		
Ty-2	P1-16-F	5'-CACACATATCCTCTATCCTATTAGCTG-3'	SCAR	26
	P1-16-R	5'- CGGAGCTGAATTGTATAAACACG -3'		
Ty-3/ *Ty-3a*	P6-25-F	5'- GGTAGTGGAAATGATGCTGCTC-3'	SCAR	15
	P6-25-R	5'- GCTCTGCCTATTGTCCCATATATAACC-3'		
ty-5	TM273-F	5'- GGTGCTCATGGATAGCTTAC -3'	SSR	5
	TM273-R	5'- CTATATAGGCGATAGCACCAC-3'		

[1]SCAR: sequence characterized amplified regions; SSR: simple sequence repeat.

結果與討論

一、抗性基因座之分子標誌序列分析

為了確認前人設計之分子標誌的可靠性，首先分析已知的抗性與感性材料之抗性基因型，其所增幅PCR產物之核苷酸序列與NCBI資料庫比對(表三)。序列特徵化增幅區域(sequence characterized amplified region, SCAR)分子標誌M2可鑑定*Ty-1*/*Ty-3*抗性基因，在抗性材料TMB147中可增幅264 bp片段，在感性材料Bucolic 25中可增幅252 bp片段，前者的產物序列比對結果顯示，產物位於第6號染色體，34.3 Mb (SL2.5)，基因序列註解為*Solyc06g051190.2.1*，編碼為RNA-dependent RNA polymerase (RDR)，與前人研究結果[4,24]符合。SCAR分子標誌P1-16可鑑定*Ty-2*抗性基因，在抗性材料TSS ASVEG No. 22中可增幅300 bp片段，在感性材料中可增幅600 bp片段，前者的產物序列比對結果顯示，位於第11號染色體，54.3 Mb (SL2.5)，該區域包含編碼為CC-NBS-LRR (*Solyc11g069660.1*)及R3a-like (*Solyc11g069670.1*)之抗病蛋白質，與前人研究結果[26]相符。SCAR分子標誌P6-25可鑑定抗性基因*Ty-3*、*Ty-3a*與感病基因*ty-3*，分別增幅出450 bp、630 bp與320 bp片段，序列比對結果顯示為*Ty-3a*序列，E-value為1e-95，相似度為85%。簡單重複序列(simple sequence repeat, SSR)分子標誌TM273可鑑定*ty-5*抗性基因，在抗性材料CLN3212C與F9-159中可增幅179 bp片段，在感性材料CLN3126A-7與

CLN3900C-23中可增幅173 bp片段，序列比對結果顯示，位於第4號染色體，31.9 Mb (SL2.5)，進一步分析在抗、感性材料的重複序列，前者為$(TGA)_{11}$，後者為$(TGA)_9$ (圖一)。

表三、番茄材料經分子標誌所增幅產物與番茄基因組序列比對

Table 3. Sequence identity between amplified products of molecular markers in tomato accessions and corresponding sequences of *S. lycopersicum* and *S. pennellii* genomes

Marker	Chromosome	Gene	Accession	Definition	Sequence Identity (%)
M2	06	*Ty-1*/ *Ty-3*	CP023762	*Solanum lycopersicum* cultivar I-3 chromosome 6	100
			XM_010323869	PREDICTED: *Solanum lycopersicum* probable RNA-dependent RNA polymerase 3 (LOC101263417), transcript variant X2, mRNA	100
			HG975518	*Solanum lycopersicum* chromosome ch06, complete genome	100
			HG975445	*Solanum pennellii* chromosome ch06, complete genome	98
P1-16	11	*Ty-2*	HG975450	*Solanum pennellii* chromosome ch11, complete genome	97
			CP023767	*Solanum lycopersicum* cultivar I-3 chromosome 11	95
P6-25	06	*Ty-3*/ *Ty-3a*	JQ929641	*Solanum lycopersicum* sequence linked to *Ty3a* genomic sequence	85
			HG975445	*Solanum pennellii* chromosome ch06, complete genome	91
TM273	04	*ty-5*	CP023760	*Solanum lycopersicum* cultivar I-3 chromosome 4	100
			HG975516	*Solanum lycopersicum* chromosome ch04, complete genome	99



圖一、番茄材料以 TM273 分子標誌經聚合酶連鎖反應所增幅產物之 *ty-5* 核苷酸序列
抗性材料 506 與 512 分別為 CLN3212C 與 F9-159；感性材料 180 與 550 分別為 CLN3126A-7 與 CLN3900C-23。

Fig. 1. DNA sequence of *ty-5* determined by sequencing PCR products amplified using TM273 molecular marker in tomato. Resistance lines 506 and 512 were CLN3212C and F9-159, respectively. Susceptible lines 180 and 550 were CLN3126A-7 and CLN3900C-23, respectively.

二、雜交組合後裔之抗性基因型鑑定

在同一單株堆疊不同的基因(gene pyramiding or gene stacking)，不僅可提升性狀的表現，擴大品種的遺傳基礎(genetic basis)，尚能增加植株對抗病原菌的耐受力[8,22]；另一方面，可利用雜交方式將抗性等位基因導入不具有等位抗性基因的自交系(表四)，例如編號1號之雜交組合(105-O-9)，係將帶有*Ty-2*之亞蔬22號自交系作為母本，與帶有*Ty-1/Ty-3*抗性等位基因之TMB147自交系進行雜交，共獲得堆疊此2個抗性基因的2個F_1單株；而編號2號之雜交組合(105-O-11)，係將不具有*Ty-1~ty-5*之抗性等位基因但接種具抗性反應之NS524自交系作為母本，與帶有*Ty-1/Ty-3*抗性等位基因之TMB147自交系雜交，共獲得導入抗性基因的2個F_1單株；編號3號之雜交組合(105-R-8)，係將帶有*Ty-2*抗性等位基因之亞蔬22號自交系作為母本，與帶有*Ty-1/Ty-3*抗性等位基因之TMB688自交系進行雜交，獲得4個F_1單株，其中1個單株堆疊此2個抗性同質結合基因型。編號4號之雜交組合(105-R-12)，係將帶有*Ty-1/Ty-3*抗性等位基因之Sylviana自交系，與帶有*Ty-2*抗性等位基因之亞蔬22號自交系進行雜交，獲得1個F_1單株堆疊2個抗性基因座。編號5號之雜交組合(105-Y-3)，係將帶有*Ty-1/Ty-3*抗性等位基因之SV4224TH自交系作為母本，與帶有*Ty-2*與*ty-5*抗性等位基因之Bucolic 25自交系進行雜交，再經自交後，F_2分離族群共有3個單株，其中1個單株堆疊3個抗性基因，惟*ty-5*係隱性基因，故尚須持續自交以選拔同質結合的*ty-5*。總計獲得3個F_1雜交組合有堆疊2個抗性基因(*Ty-1/Ty-3*與*Ty-2*)，1個F_1雜交組合導入*Ty-1/Ty-3*，3個F_2分離族群堆疊異質結合的抗性基因型(*Ty-2*與*ty-5*)。

為了能快速得到較高的雜種優勢，利用三系雜交(three-way cross)累積多個顯性等位基因，如編號8至14號等6個雜交組合，堆疊2個異質結合的抗性基因型(除編號10號堆疊*Ty-1/Ty-3*與*ty-5*，其餘堆疊*Ty-1/Ty-3*與*Ty-2*)，後續須從分離族群選拔同質結合的抗性基因型，並配合園藝性狀調查，以獲得具有較多優良性狀之自交系，評估作為雜交親本。

表四、番茄雜交組合後裔之抗性基因型 *Ty-1/Ty-3*、*Ty-2* 與 *ty-5* 鑑定

Table 4. Identification of resistant genes *Ty-1/Ty-3*, *Ty-2* and *ty-5* in progenies of crosses in tomato

ID	Genotype	Generation	Locus[1]		
			Ty-1/Ty-3	*Ty-2*	*ty-5*
1	105-O-9 TSS ASVEG No.22 × TMB147	F_1	**H**	**H**	**S**
2	105-O-11 NS524 × TMB147	F_1	**R**	**S**	**S**
3	106-R-8 TSS ASVEG No.22 × TMB688	F_1	**R**	**R**	**S**
4	106-R-12 Sylviana × TSS ASVEG No.22	F_1	**R**	**H**	**S**
5	105-Y-3 SV4224TH × Bucolic 25	F_2	**R**	**R**	**H**
6	105-Y-7 US 440 × Bucolic 25	F_2	**S**	**H**	**R**
7	105-Y-8 US 440 × Bucolic 25	F_2	**S**	**H**	**H**
8	106-B-141 (TSS ASVEG No.22 × NS524) × Sylviana	Three way hybrid	**H**	**H**	**S**
9	106-B-142 (TSS ASVEG No.22 × Ricca) × TMB688	Three way hybrid	**H**	**H**	**S**
10	106-B-144 Akash Ganga × (TSS ASVEG No.22 × Ricca)	Three way hybrid	**H**	**S**	**H**
11	106-Su-148 (TSS ASVEG No.22 × Ricca) × Sylviana	Three way hybrid	**H**	**H**	**S**
12	106-Su-150 (TSS ASVEG No.22 × Ricca) × T-82	Three way hybrid	**H**	**H**	**S**
13	106-Su-153 Tezier 804 × (TSS ASVEG No.22 × Ricca)	Three way hybrid	**H**	**H**	**S**
14	106-Su-168 (TSS ASVEG No.22 × Ricca) × Tezier 804	Three way hybrid	**H**	**H**	**S**

[1]R: homozygous for resistance; H: heterozygous; S: homozygous for susceptibility.

三、抗TYLCV番茄自交系之選拔

近年來，分子標誌在自交系的選拔中發揮重大作用，尤其是針對抗病性狀的輔助選拔，具備速度快且準確性高的特點，但由於病原生理小種多、易變異，故早期育種過程仍須仰賴田間接種試驗之鑑定(2)。本研究利用經田間發病情形確認為抗性的品種進行自交系選育，並於各世代進行抗性基因型之鑑定(表五)。結果顯示，4個單株帶有同質結合*Ty-1/Ty-3*與*Ty-2*之抗性等位基因(編號10、11與12號)，4個單株帶有同質結合*Ty-1/Ty-3*與*ty-5*之抗性等位基因(編號2、14與15號)；F_2分離族群除編號10、11、12、14號為同質結合之抗性基因型，其餘F_2族

群尚須再自交固定基因；另外編號4、5與7號等3個自交系之抗性基因型(*Ty-1/Ty-3*)為同質結合，且已自交7代，視為純系，並配合植株特性與果實性狀調查，選拔為優良自交系；而編號6、8與9號雖已自交8代，但群內單株之抗性基因型不一致。由於部分參試材料之抗性基因型未知，經本研究初步鑑定Moralburg 481、Sinon T-40與Sinon T-82等品種可能帶有*Ty-1/Ty-3*之抗性等位基因，Moralburg 9102可能帶有*Ty-1/Ty-3*與*ty-5*。另外，CLN3552B與Agash Ganga在F_2分離族群中分別檢測到*Ty-2*與*Ty-1/Ty-3*之抗性等位基因，而US440在F_2分離族群中檢測到*Ty-1/Ty-3*與*ty-5*之抗性等位基因，此三個分離族群皆與表一所列抗病基因不一致，推測可能係採種污染，但由於族群內單株樣本較少，將重新鑑定親本與擴大F_2族群數量，以釐清原因。

表五、番茄自交系之抗性基因型 *Ty-1/Ty-3*、*Ty-2* 與 *ty-5* 鑑定
Table 5. Identification of resistant genes *Ty-1/Ty-3*, *Ty-2* and *ty-5* in inbred lines of tomato

ID	Genotype	Generation	Plant No. (Resistant/total)	Locus[1]		
				Ty-1/Ty-3	*Ty-2*	*ty-5*
1	105-Y-17, Bucolic 922	F_3	2/10	**H**	**S**	**R**
2	105-Y-17, Bucolic 922	F_3	2/10	**R**	**S**	**R**
3	105-Y-41, Moralburg 481	F_2	3/3	**H**	**S**	**S**
4	105-W-33, Tezier 804	F_7	6/6	**R**	**S**	**S**
5	105-W-40, Tezier 804	F_7	7/7	**R**	**S**	**S**
6	105-W-48, Sinon T-40	F_8	4/6	**R**	**S**	**S**
7	105-W-50, Sinon T-82	F_8	5/5	**R**	**S**	**S**
8	105-W-55, Sinon T-82	F_8	4/5	**R**	**S**	**S**
9	105-W-68, Sinon T-82	F_8	6/7	**R**	**S**	**S**
10	105-W-71, CLN3552B	F_2	2/2	**R**	**R**	**S**
11	105-W-74, CLN3126A-7	F_2	1/1	**R**	**R**	**S**
12	105-W-75, CLN3070J	F_2	1/1	**R**	**R**	**S**
13	105-W-85, US440	F_2	1/2	**R**	**H**	**S**
14	105-W-85, US440	F_2	1/2	**R**	**S**	**R**
15	105-W-86, Akash Ganga	F_2	1/2	**R**	**H**	**R**
16	105-W-90, Bucolic 922	F_2	1/6	**H**	**S**	**H**
17	105-W-96, Moralburg 9102	F_2	2/5	**R**	**S**	**H**

[1]R: homozygous for resistance; H: heterozygous; S: homozygous for susceptibility.

四、回交族群之抗性基因型鑑定

由於基因型選拔不受環境因子影響，將分子標誌應用在回交育種過程中，可有效導入1個或2個以上基因至輪迴親[13]，且能利用分子標誌在苗期進行前景選拔，於每一回交世代進行背景選拔，可提升選拔效率，快速回復輪迴親之背景。本研究建立5個BC_1族群(表六)，並利用分子標誌進行前景分析，如編號1、3、4與5號之BC_1，預期能將不同的抗性基因導入輪迴親，編號1號有3個單株堆疊*Ty-1/Ty-3*與*Ty-2*之抗性等位基因，其中2個單株為同質結合

*Ty-1/Ty-3*與*Ty-3a*，1個單株為異質結合*Ty-1/Ty-3*與*Ty-3a*，而*Ty-2*皆為異質結合基因型；編號3號有3個單株帶有異質結合*Ty-1/Ty-3*與*Ty-2*之抗性等位基因；編號4號僅帶有異質結合*Ty-1/Ty-3*與*Ty-3a*，並未成功導入*Ty-2*，推測貢獻親(106-R-12)係根據園藝性狀選拔，而未選拔到堆疊*Ty-1/Ty-3*與*Ty-2*抗性等位基因之植株；編號5號與編號4號之貢獻親相同，因此BC_1族群僅鑑定1個*Ty-2*抗性基因。編號2號之貢獻親(105-O-11)係帶有*Ty-1/Ty-3*之抗性等位基因，因此，進一步分析回交族群後裔，均帶有*Ty-1/Ty-3*與*Ty-3a* (部分植株為抗性異質結合基因型)。綜上，共篩選到6個單株(編號1號與3號各有3株)堆疊2個以上抗性基因(*Ty-1/Ty-3*與*Ty-2*)，將持續於回交世代選拔抗性同質結合基因型，同時，須針對回交親本建立高密度且具多型性之分子標誌，使在較少回交世代中，即可選拔到回復輪迴親背景超過95%的基因型。

表六、番茄回交族群辨識 *Ty-1/Ty-3*、*Ty-2*、*Ty-3* 與 *ty-5* 之前景選拔

Table 6. Identification of resistant genes *Ty-1/Ty-3*, *Ty-2*, *Ty-3*, and *ty-5* by foreground selection in backcross population of tomato

ID	Genotype	Plant No.	Locus[1]			
			Ty-1/Ty-3	*Ty-2*	*Ty-3*	*ty-5*
1	106-Su-4 (105-O-9) × TMB147	3/8	**R**	**S**	***Ty-3a***	**S**
		2/8	**H**	**S**	***Ty-3a*, H**	**S**
		2/8	**R**	**H**	***Ty-3a***	**S**
		1/8	**H**	**H**	***Ty-3a*, H**	**S**
2	106-Su-6 (105-O-11) × TMB147	2/8	**R**	**S**	***Ty-3a***	**S**
		4/8	**R**	**S**	***Ty-3a*, H**	**S**
		2/8	**H**	**S**	***Ty-3a*, H**	**S**
3	106-Su-143、106-Su-144 (106-R-8) × TMB688	3/10	**S**	**S**	**S**	**S**
		3/10	**H**	**H**	***Ty-3a*, H**	**S**
		2/10	**S**	**H**	**S**	**S**
		2/10	**H**	**S**	***Ty-3a*, H**	**S**
4	106-Su-151 (106-R-12) × Sylviana	4/5	**H**	**S**	***Ty-3a*, H**	**S**
		1/5	**H**	**S**	**S**	**S**
5	106-Su-155 (106-R-12) × TSS ASVEG No. 22	2/5	**S**	**R**	**S**	**S**
		2/5	**S**	**H**	**S**	**S**
		1/5	**S**	**S**	**S**	**S**

[1]R: homozygous for resistance; H: heterozygous; S: homozygous for susceptibility.

結　　語

本研究利用與抗番茄黃葉病基因連鎖的分子標誌分析育種親本之基因型，而為了堆疊不同抗性基因或導入抗性基因，進行不同的雜交組合，並於苗期鑑定植株是否帶有抗性基因；為選拔優良自交系，進行抗性基因鑑定與園藝性狀調查，選出3個帶有同質結合*Ty-1/Ty-3*之優

良純系，可作為後續抗病育種之親本。番茄回交族群之前景選拔，共篩選6個單株堆疊2個抗性基因，將持續於回交世代選拔出同質結合之抗性基因型。

致　　謝

本研究由行政院農業委員會科技計畫補助(計畫名稱：全紅番茄分子標誌輔助抗黃化捲葉病毒育種及快速育成自交系之應用，計畫編號：106農科-8.6.5-中-D1)，承蒙本場蔬菜研究室提供育種材料與協助田間栽培，本場生技研究室協助試驗分析，謹致謝忱。

參考文獻

1. 行政院農業委員會統計室　2012-2016　中華民國101年至105年農業統計年報　行政院農業委員會。
2. 林煜恒、張瑞炘　2017　番茄抗黃化捲葉病毒病種原篩選　臺中區農業改良場研究彙報 135: 11-24。
3. 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.
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. 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.
6. Chen, Q., X. Xu, J. Jiang and J. Li. 2018. Transcriptome resequencing analysis of the responses of *ty-5*-mediated resistance to TYLCV via in resistant vs. susceptible tomato cultivars. Peer J. preprints, https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.26578v1.
7. Czosnek, H. and H. Laterrot. 1997. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. Arch. Virol. 142: 1391-1406.
8. Elbaz, M., P. Hanson, S. Fgaier and A. Laarif. 2016. Evaluation of tomato entries with different combinations of resistance genes to tomato yellow leaf curl disease in Tunisia. Plant Breed. 135: 525-530.
9. FAOSTAT. Statistical Database. http://www.fao.org/faostat/en/.

10. González-Cabezuelo J. M., J. Capel, J. Abad, D. M. Tomás, R. Fernández-Muñoz, E. Moriones and R. Lozano. 2012. Genotyping selection for resistance against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) conferred by *Ty-1* and *Ty-3* genes in tomato. Mol. Breed. 30: 1131-1142.
11. Hanson, P., D. Bernacchi, S. Green, S. D. Tanksley, M. Venkataramappa, A. S. Padmaja, H. Chen, G. Kuo, D. Fang, J. Chen, V. Muniyappa, H. M. Chen and J. T. Chen. 2000. Mapping a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125: 15-20.
12. Hanson, P., S. F. Lu, J. F. Wang, W. Chen, L. Kenyon, C. W. Tan, K. L. Tee, Y. Y. Wang, Y. C. Hsu, R. Schafleitner, D. Ledesma and R. Y. Yang. 2016. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. Sci. Hort. 201: 346-354.
13. Hutton, S. F. and J. W. Scott. 2017. Fla. 7907C: A Fla. 7907 near-isogenic tomato inbred line containing the *Begomovirus* resistance gene, *Ty-1*. Hortscience 52: 658-660.
14. 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. Hortscience 47:324-327.
15. Ji, Y., B. Betteray, J. Smeets, K. S. Jensen, L. Mejia, J. W. Scott, M. J. Havey and D. P. Maxwell. 2007. Co-dominant SCAR Marker, P6-25, for Detection of *Ty-3*, *Ty-3a*, and *Ty3b* introgressions from three *Solanum chilense* accessions at 25 cM of chromosome 6 of *Begomovirus*-resistant tomatoes. http://www.plantpath.wisc.edu/GeminivirusResistantTomatoes/Markers/MAS-Protocols/P6-25-locus.pdf.
16. Ji, Y., J. W. Scott and D. J. Schuster. 2009. Molecular mapping of *Ty*-4, a new tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 134: 281-288.
17. Ji, Y., J. W. Scott and D. J. Schuster. 2009. Toward fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato. Hort. Sci. 44: 614-618.
18. Kadirvel, P., R. de la Pena, R. Schafleitner, S.Huang, S. Geethanjali, L. Kenyon, W. Tsai and P. Hanson. 2013. Mapping of QTLs in tomato line FLA456 associated with resistance to a virus causing tomato yellow leaf curl disease. Euphytica 190: 297-308.
19. Kenyon, L., W. S. Tsai, S. L. Shih and L. M. Lee. 2014. Emergence and diversity of begomoviruses infecting solanaceous crops in East and Southeast Asia. Virus Res. 186: 104-113.
20. 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. Hortscience 50: 1405-1407.

21. Siddique, R., A. Rehman, G. Rasool, I. Amin, S. Mansoor and F. Khan. 2016. Response of *Ty*-resistant tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars to Begomoviruses and their gas chromatography mass spectrometry analysis. Pak. J. Sci. 68: 391-401.
22. Tabein, S., S. A. A. Behjatnia, L. Laviano, N. Pecchioni, G. P. Accotto, E. Noris and L. Miozzi. 2017. Pyramiding *Ty-1*/*Ty-3* and *Ty-2* in tomato hybrids dramatically inhibits symptom expression and accumulation of tomato yellow leaf curl disease inducing viruses. Arch. Phytopathol. Plant Protect. 50: 213-227.
23. Mordor Intelligence LLP. 2017. Tomato seeds market-global industry analysis, growth, trends, and forecasts (2017-2022). Mordor Intelligence LLP, India.
24. Verlaan, M. G., S. F. Hutton, R. M. Ibrahem, R. Kormelink, R. G. F. Visser, J. W. Scott, J. D. Edwards and Y. Bai. 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 Genet. 9: e1003399. doi:10.1371/ journal.pgen.1003399.
25. Yamaguchi, H., J. Ohnishi, A. Saito, A. Ohyama, T. Nunome, K. Miyatake and H. Fukuoka 2018. An NB-LRR gene, *TYNBS1*, is responsible for resistance mediated by the *Ty-2 Begomovirus* resistance locus of tomato. Theor. Appl. Genet. 131:1345. http://dx.doi.org/10.1007/s00122-018-3082-x.
26. Yang, X., M. Caro, S. F. Hutton, J. W. Scott, Y. Kuo, X. Wang, M. H. Rashid, D. Szinay, H. de Jong, R. G. Visser, Y. Bai and Y. Du. 2014. Fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato. Mol. Breed. 34: 749-760.

Molecular Screening on Tomato Germplasm for Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance [1]

Ching-Hsia Wu[2], Jia-Fu Lai[3] and Yu-Heng Lin[2]

ABSTRACT

Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) is a severe threat to tomato yield and quality. However, the protection strategies for controlling TYLCD have not been effective so far. Therefore, the development of resistant cultivars against the TYLCD is one of the most effective method to manage the disease. In this study, molecular markers linked to targeted resistant loci were used to screen in several tomato breeding lines. The results showed that the sequences of PCR amplified products were aligned to that of the tomato reference genome and specific loci for the TYLCD resistance. In order to pyramid genes conferring resistance or introduce resistant gene, different hybrids were generated. *Ty-1/Ty-3* and *Ty-2* were stacked in three F_1 populations, *Ty-1/Ty-3* was introduced in one F_1 population. Three F_2 populations were detected containing heterozygous resistant genes. The combined results of identification of resistant genes and evaluation of horticultural traits indicated that three inbred lines harbouring homozygous *Ty-1/Ty-3* have potential for release as hybrid parental lines. For foreground selection in backcross breeding, six individuals were pyramiding successfully with two resistant genes, fully homozygous lines in successive generations will be developed.

Key words: tomato, tomato yellow leaf curl virus, marker-assisted selection

---

[1]Contribution No. 0938 from Taichung DARES, COA.

[2]Assistant Researcher of Taichung DARES, COA.

[3]Technician of Taichung DARES, COA.