

番茄抗土傳性病害抗病分子檢測 技術開發探討－青枯病、萎凋病

周明燕¹、孫永偉²、陳哲仁³、周佳霖⁴

一、前言

美味而營養的番茄在人類的食物中佔有重要地位，2014 年全球番茄栽培面積達到 502 萬公頃 (FAOSTAT)、產量高達 1 億 8 千萬公噸，是全球第二大宗的蔬菜作物。隨著栽培複作指數提高，番茄土傳性病害為害也出現加重趨勢，特別是設施栽培模式者更是嚴重，影響番茄產量與品質。全球常見的番茄土傳性病害主要有細菌為害的青枯病 (Bacterial wilt)、真菌為害的萎凋病 (Fusarium wilt)、黃萎病 (Verticillium wilt)、頸腐根腐病 (Fusarium crown and root rot)，及根瘤線蟲 (Root knot nematodes) 等病害。目前關於土壤傳播性病害防治，除了仰賴有限的藥物防治效果之外，也有透過嫁接抗病根砧、輪作、土壤消毒、生物防治等非農藥防治法來防治病害發生或遏止蔓延，減少損失，不過，育成抗病品種才是最根本的解決方法。傳統抗病品種選育往往會受到內、外在環境不穩定而影響篩選效能，近年來，透過分子輔助育種

(MAS) 技術之抗病基因分子標誌開發，可以協助育種者針對目標基因進行早期材料篩選，有助於縮短育種期程，提高育種效率。目前已經廣泛應用在作物育種上，本文將針對分子輔助育種技術在番茄土壤傳播性病害研發情形作概況介紹。

二、番茄青枯病 (Bacterial wilt)

番茄青枯病係由 *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi 所引起的一種細菌性病害，嚴重危害植物維管束，為害範圍含括熱帶、亞熱帶地區，大陸華南地區發生普遍，造成巨大損失。青枯病菌可以細菌狀態存在土壤數年，於高溫、多溼季節最適宜發病。將罹病株莖部橫切，可見維管束變褐色，以手擠壓，有乳白色黏性的菌液溢出是本病最明顯的病徵 (圖 1)。

青枯病抗病基因屬於數量性狀基因 (QTL) 為主，抗病品種需堆疊較多抗病基因方能獲得較佳抗病效果。綜合前人研究顯示，青枯病抗病基因分散在不同染色體，其中以第 6 號及第 12 號染色體的抗

¹ 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員

² 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員 (退休)

³ 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

⁴ 種苗改良繁殖場屏東種苗研究中心 助理研究員

病效力最明顯(圖2)，至於主效基因究竟位於哪一條染色體上，則仍未達成共識。已知12號染色體的抗性基因只與第一演化型(Phylotypes I)青枯病菌株有關，第6號染色體的抗性基因則與第一及第二演化型(Phylotypes I及II)的青枯病菌株有關。

關於青枯病抗病基因分子標誌研究，包括TG230(Danesh *et al.*, 1994)、TG564(Wang *et al.*, 2000)、TSCAR_{AAT} / CGA(Miao *et al.*, 2009)及SLM系列(Ho *et al.*, 2013)等已被陸續發表。本場也針對第12號染色體進行主效基因分子標誌研發及驗證測試(圖3)。

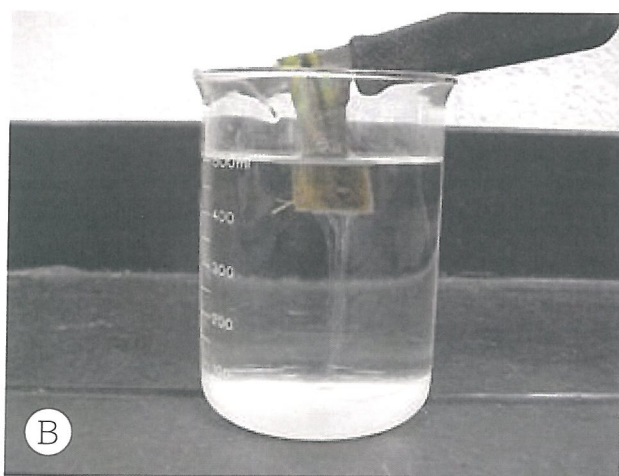


圖1. 植株感染青枯病菌呈青萎病徵(A)；病株莖部橫切，會有絲狀菌液流出，為青枯病最主要特徵(B)

https://www.google.com.tw/search?q=tomato+Bacterial+wilt&newwindow=1&dcr=0&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjUz47vpr_WAhWGa7wKHZJ0CQEQAUICigB&biw=1280&bih=934#imgsrc=CPz_XjefxE4FcM:https://www.clemson.edu/public/regulatory/plant_industry/pest_nursery_programs/plant_prob_clinic/fact_sheet_folder/bac_wilt_tomato.html

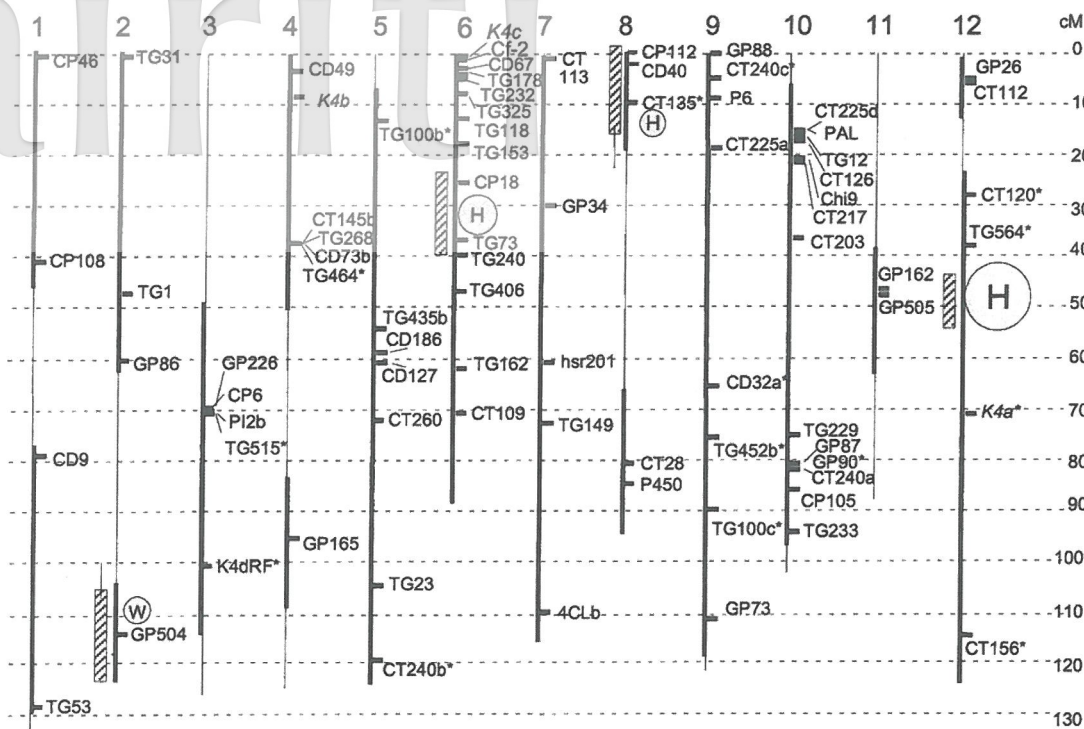


圖 2. 由抗病品種 Hawaii 7996 與 Hawaii 7998 發現存在顯性抗病基因，使用不同抗病品種與病原菌株，篩選出數個 QTLs 基因，分別位於 3、4、6、7、8、10 及 12 號染色體。(Wang, *et. al.*, 2000)

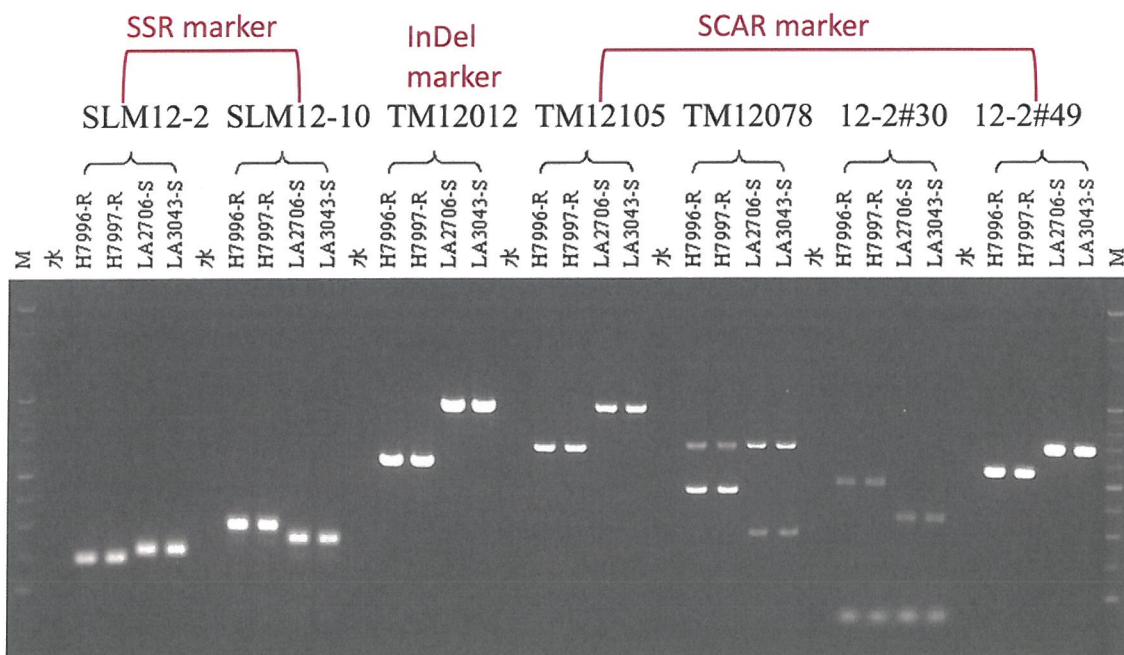


圖 3. 本場針對番茄第 12 號染色體抗青枯病主效基因已開發 4 組 SCAR 標誌、1 組 InDel 標誌進行驗證測試。

三、萎凋病 (*Fusarium wilt*)

番茄萎凋病是由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*(FOL) 所引起的維管束疾病，病原菌生長適溫 27~28°C，從 5~38°C 皆可存活，可在土壤中越冬，透過雨水、灌溉水及土壤傳播，是番茄非常嚴重的真菌性病害。番茄萎凋病一般在開花結果期開始發病，發病初期側邊下位葉開始枯黃，由下而上褐化枯死，剖開莖部，可看到維管束褐化，置於清水中，不會有白色煙霧狀菌液滲出，是與青枯病最明顯的差異點 (圖 4)。番茄萎凋病病原菌之生理小種有 race1 (大陸為主)、race2 (臺灣主要)、race3 (國外主要)。主要抗病基因 *I-1* (抗 race1)、*I-2* (抗 race2)、*I-3* (抗 race3)，分別來自野生番茄 *S. pimpinellifolium* 及 *S. pennellii*。

關於萎凋病抗病基因分子標誌研究，針對抗病基因 *I-1* (抗 race1) 有標誌 At2 及 TG523(Arens *et al.*, 2010)；抗病基因 *I-2* (抗 race2) 有標誌 TFus, TG36, TG105, Z1063 (El Mohtar *et al.*, 2007)；抗病基因 *I-3* (抗 race3) 有標誌 P7-43B, P7-43DF, PTG-190, RGA332, TG20, TG128, Got-2(Barillas *et al.*, 2008)。

本場針對該病害建立抗萎凋病基因 *I-2* 及 *I-3* 之分子標誌。利用 I2/Fu 引子組可擴增抗病基因 (*I-2*) 0.7 kb、擴增感病基因 (*i-2*) 2.3 kb 及萎凋病原菌 (*Fusarium* spp.) 1.1 kb 之 DNA 條帶 (圖 5)。利用 I3PTG190-SCAR 引子組可擴增抗病基因 (*I-3*) 210 bp、感病基因 (*i-3*) 310 bp 之 DNA 條帶 (圖 6)。上述分子標誌可協助育種者早期篩選抗病植株、確認抗感病基因型及病毒感染情形，提高育種效率。



圖 4. 番茄萎凋病一般在開花結果期開始發病，發病初期側邊下位葉開始枯黃，由下而上褐化枯死 (A)，剖開莖部，可看到維管束褐化 (B)

https://www.google.com.tw/search?newwindow=1&dcr=0&biw=1280&bih=885&tbm=isch&sa=1&q=fusarium+wilt+tomato&oq=Fusarium+wilt&gs_l=psy-ab.1.1.0i19k1l4.11665545.11665545.0.11669847.1.1.0.0.0.583.583.5-1.1.0....0...1.1.64.psy-ab..0.1.582....0.op_Jo6irjFQ#imgsrc=7ErwXmbufuMFGM:

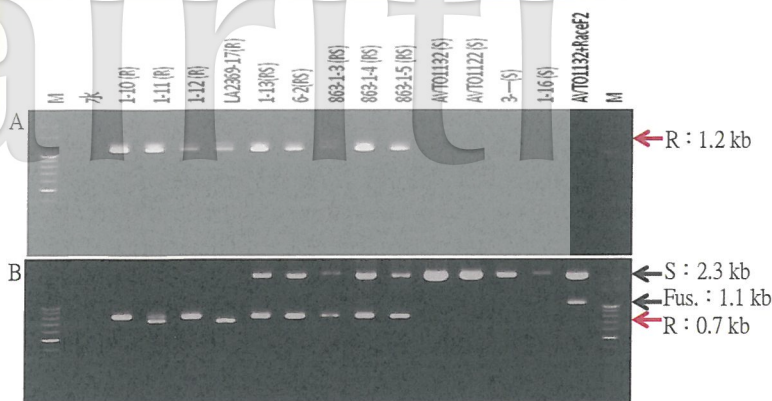


圖 5. 本場利用 I-2/Fu 引子組 (B) 可擴增番茄抗病基因 (*I-2*) 0.7 kb 之 DNA 條帶，感病基因 (*i-2*) 2.3 kb 之 DNA 條帶，萎凋病原菌 1.1 kb 之 DNA 條帶；A 為國外顯性抗病基因引子組檢測結果。R：抗病條帶；S：感病條帶；Fus：萎凋病菌條帶。

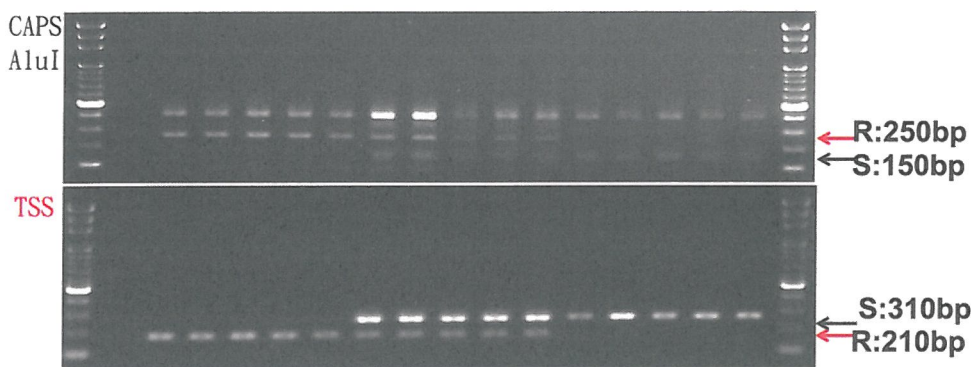


圖 6. 本場利用 I-3 SCAR 引子組可擴增番茄抗病基因 (*I-3*) 210 bp 之 DNA 條帶，感病基因 (*i-3*) 310 bp 之 DNA 條帶；國外目前多使用 I-3 CAPS 限制酶切反應。

四、結語

番茄青枯病及萎凋病都是嚴重危害番茄的重要病害，特別是本省番茄的主要栽培期也是這兩種病害好發期，為害嚴重時產量及品質都明顯降低，影響收益，為了避免栽培農友大量使用藥劑防治造成生產成本及食安問題，抗病品種的研發需求殷切。抗病基因分子標誌的研發可以協助進行材料篩選及雜交後裔早期篩選，協助精準育種、提升育種效率，是育種者的最佳輔助工具。

隨著分子生物技術發展突飛猛進，分子輔助育種已經被認為是作物育種研發的必要工具，特別是已經完全解序的番茄作物，更容易透過分子技術來達到產業精準育種的運用目的。然而，生命總會找到出口，隨著抗病基因的陸續發現及導入，病原菌也不斷演化突破，這場病原菌與作物長遠以來的戰爭並不會隨著人類知能提升而停止，也因此，研究人員只能隨之精進，加入這場永無止境的競爭。