



利用分子標誌選育抗黃化捲葉病之番茄品系

作者：王啟正 助理研究員、
黃佳興 助理研究員
作物改良課
園藝研究室
電話：(03)8521108轉300

前言

番茄黃化捲葉病於1960年代首先發生於以色列及約旦地區，而臺灣則於1981年發現此病毒病害，至今在世界各地均有發生，此病害可造成番茄產量八成以上的損失，為番茄生產的一大限制因子。

番茄黃化捲葉病為一種銀葉粉蝨傳染之番茄黃化捲葉病毒（TYLCV）所造成的病害，番茄在受TYLCV感染後，病徵呈現葉片向上捲、葉柄下垂、葉脈呈紫色、節間縮短、葉片變小、變厚、植株呈淡黃色，生長受阻，有時頂端如同十字花科抽苔狀，植株只開花不結果，或結果品質亦差，對產量影響很大，若於開花前即受此病毒感染則將完全無收穫，嚴重者導致全園廢耕，造成農民極大的損失。然而網室栽培及殺蟲劑防治媒介昆蟲也僅能延緩病害的傳播，其媒介昆蟲銀葉粉蝨又容易產生抗藥性，因此唯有育成抗病品種才是根本解決之道。

近年來分子標誌輔助(選)育種(Molecular assisted selection, MAS)的技術已漸漸成熟，例如國際稻米研究中心在短短兩年內利用

回交育種及MAS技術將耐淹水基因*SUB1*導入水稻商業品種中，使新品種既保有原有優良品種特性又具有耐淹水性。近年來有關番茄抗黃化捲葉病毒分子標誌的研究也有許多報告出現，本場以利用分子標誌輔助番茄抗TYLCV雜交後代植株的選育，也證明此技術可有效鑑別育種後代的抗病性。

分子標誌與抗病基因染色體連鎖圖譜

隨著分子生物學的進步，已經有許多種類的分子標誌技術被開發，最好的分子標誌就是直接定位在基因的片段上，不管後代基因如何連鎖互換，此分子標誌都與其基因緊密結合，因此準確率是百分之百，然而這種功能性基因分子標誌，必須將基因選殖出來並證明其功能性，實驗上較為繁瑣廢時，加上許多作物的性狀為多基因所控制的，無法利用傳統的基因選殖方法來獲得基因的序列。

透過染色體連鎖圖譜可以了解目標性狀基因(包含主效基因及微效基因)位於染色體的相對位置，係調查分子標誌與目標性狀在後代分離族群連鎖互換率而獲得的圖譜資訊，互換率越低表示分子標誌與目標性狀的連鎖越緊



密，這種分子標誌為連鎖型的分子標誌。除了必須與目標性狀緊密連鎖以外，良好的分子標誌最好具有共顯性，此種標誌可以區分同質結合、異質結合抗病及不抗病的三種後代，利用性較高。另外分子標誌必須再現性高，可重複性高且能在不同實驗室之間彼此相互驗證。如再具有所需實驗人力少、步驟簡單、DNA品質及量要求不高等條件之分子標誌，則更有發展的潛力。

經由染色體遺傳連鎖圖譜分析，已經有5個主要的抗番茄黃化捲葉病基因座被定位在番茄染色體分子標誌連鎖圖譜中，此5個抗病基因跟其分子標誌都有高程度的連鎖關係，依照圖譜建立的時間分別將基因命名為 $Ty-1$ 、 $Ty-2$ 、 $Ty-3$ 、 $Ty-4$ 及 $Ty-5$ ，其中 $Ty-1$ 、 $Ty-3$ 及 $Ty-4$ 基因來自番茄野生種*Lycopersicon chilense*，分別位於6號及3號染色體上， $Ty-2$ 基因則是來自於*L. hirsutum*，位於11號染色體， $Ty-5$ 基因來自*L. peruvianum* (L) Mill. 野生種，位於4號染色體，其連鎖的分子標誌也被發表於報告中（表一），這些分子標誌經本場重複測試後，以 $Ty-2$ 基因及 $Ty-3$ 基因的分子標誌除了具有共顯性之外，也具有再現性高、實驗步驟簡單、DNA品質及量要求不高等條件，具有實際應用的潛力。

利用分子標誌輔助育種之優點與缺點

利用分子標誌輔助抗番茄黃化捲葉病毒育種有許多優點，可以在苗期抽取DNA進行檢測及篩選抗病後代植株，節省田間空間與管理人力。加上番茄黃化捲葉病毒僅能透過銀葉粉蝨傳染，無法利用人工機械接種，因此無法在苗期利用人工接種篩選抗病性，且維持及餵養單一病毒銀葉粉蝨技術困難，利用銀葉粉蝨接種到病徵出現需要20天以上，利用分子標誌篩

選所需時間較少。而且外表抗病的植株無法利用肉眼區分抗病基因為同質結合抗病性還是異質結合抗病性，若選到異質結合抗病性的植株，則後代抗病性狀會分離，必須進行後裔檢定，抗黃化捲葉病毒基因之分子標誌屬於共顯性的分子標誌，可以區分後代抗病基因為同質結合還是異質結合的植株，節省後裔檢定的時間。

一般而言，有些不抗病番茄植株在溫度較低時病徵不明顯，若以外表病徵判斷及選拔比較容易選到不具有抗病基因之植株，且在選拔抗病植株時，無法利用外表抗病性狀分辨抗病後代的抗病性為一個基因或兩個基因造成的，利用兩個抗病的分子標誌篩選可育出具有兩個抗病基因的品系。此外，若具有許多分子標誌的連鎖圖譜資訊，只需要兩代的回交及一代自交，便可將抗病性狀導入高品質之自交系中，其他性狀可與原品系完全相同，而傳統之回交育種必須經過六代以上的回交及一代自交才能育出一個接近原有品質的抗病品系。

MAS技術雖然可以提早篩選及節省田間空間及人力，但相對增加實驗室的工作，傳統抽取DNA方式及PCR電泳耗時耗力，在國外大型種苗公司已經使用機械快速抽DNA、機械手臂輔助PCR及毛細管電泳等機械來節省人力。另外，若育種族群很大時，經由連鎖圖譜計算獲得的分子標誌與抗病基因會出現少數分離情形，也就是說會有不抗病的後代植株被誤判，只能尋找與抗病性狀更緊密連鎖的分子標誌來克服此情形。

番茄抗黃化捲葉病毒種原與育種現況

目前番茄栽培種（*Lycopersicon esculentum*）中並沒有具高抗番茄黃化捲葉病的種原，在數種野生種中如*L. chilense*



Dun、*L. hirsutum*、*L. peruvianum* (L.) Mill、*L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill、*L. cheesmanii* Riley等都有發現高抗病性的種原。而早自1974年就有學者開始進行種間雜交，將抗病的基因導入栽培種中，例如1990年有學者在印度從番茄野生種*L. hirsutum f. glabratum* 的B6013品系中選出六個抗番茄黃化捲葉病的品系，其中的H24品系為具有 $Ty-2$ 抗病基因品種之來源。

亞洲（世界）蔬菜研究中心已經利用源自*L. hirsutum f. glabratum* 的H24品系進行抗病育種，經由與各區農業改良場所合作已經有大果抗病番茄花蓮亞蔬18號、桃園亞蔬20號，小果番茄花蓮亞蔬21號、種苗亞蔬22號的品種命名與推廣，這些抗病品種帶有 $Ty-2$ 基因。根據了解該中心育種部門已經利用分子標誌來進行同時具有 $Ty-1$ 、 $Ty-2$ 、 $Ty-3$ 的大果番茄品系育種。

來自美國及歐洲種苗公司也有一些番茄抗病品種，如先正達公司、Enza Zaden公司等，其中先正達公司的大果綠肩抗病品種最近在台灣流行種植，本場分子標誌檢測這些來自美國及歐洲的番茄抗病品種顯示都帶有 $Ty-3$ 基因。

本場從97年開始收集抗病番茄種原及分子標誌相關文獻，在98年已經實驗確定文獻中抗病基因的分子標誌的穩定性，並開發了葉片快速PCR技術，省去抽取大量育種後代的DNA工作，可在子葉苗期快速大量的檢測植株之抗病

基因，在98、99年已經利用此技術進行雜交後代的篩選工作，目前已經進行到F4世代，經連續兩世代田間觀察，經分子檢測具有抗病基因的植株，種植在田間觀察外表性狀，並沒有病徵，感病對照組RedR-0-0、Yel-0-等品系卻出現中等至嚴重的病徵（圖一），證實此分子標誌具有高可信度。預計至F5世代可選出抗病基因同質結合之親本品系。

結語

面對粉蝨媒介傳染的番茄捲葉病毒病猖獗蔓延，目前尚無有效藥劑可資防治，尤其是夏季病徵嚴重時生產農戶束手無策。番茄夏作可栽種的品種如花蓮亞蔬5號，桃園亞蔬9號及台中亞蔬10號等，都不具番茄捲葉病毒病的抗病性，近年來推出的桃園亞蔬20號、花蓮亞蔬21號及種苗亞蔬22號具有抗黃化捲葉病、耐熱之優點，黃色系品種尤以花蓮亞蔬21號最受歡迎，因此抗黃化捲葉病毒育種十分重要，然而面對病毒型的演化，以上具有 $Ty-2$ 基因（抗台灣病毒型）的品種已有部分罹病現象，報告顯示為泰國病毒型所致，而具有 $Ty-3$ 基因的品系可抗泰國病毒型，因此育成同時篩選具有兩個抗病基因之品系十分重要，利用分子標誌輔助育種最適合這種同時篩選兩個抗病基因的育種工作，因此利用分子標誌輔助選種及育種將可增加育種效率，縮短多性狀或多抗病基因育種的年限。



表一 番茄抗黃化捲葉病毒基因種原及染色體位置、連鎖之分子標誌

基因	來源	染色體	染色體位置 (cM)	連鎖之分子標誌
Ty-1	<i>L. chilense</i> LA1969	CH6	4-8.6	TG297 TG97
Ty-2	<i>L. hirsutum</i> H24	CH11	84-92	TG36
Ty-3	<i>L. chilense</i> LA2779	Ch6	25-27	cLEG-31-P-16 T1079
Ty-4	<i>L. chilense</i>	Ch3	81-83.3	C2 At4g17300 C2 At5g60610
Ty-5	<i>L. peruvianum</i> (L) Mill. Line TY172	Ch4	13.5-17.1	SINAC1



▲經分子標誌篩選感病(左)與抗病(右)植株於田間生長情形