

番茄抗青枯病輔助育種分子標誌開發

Development of molecular markers for tomato bacterial wilt resistance-assisted breeding

周明燕¹、陳哲仁²、周佳霖³、邱燕欣⁴、張惠如⁵

一、前言

番茄除了加工、料理用外，也可以當作新鮮水果食用，在人類的食物中佔有重要地位。全球番茄栽培面積約 500 萬公頃、產量高達 1 億 7 千萬公噸 (FAOSTAT, 2017)，是全球僅次於馬鈴薯的第二大宗蔬菜作物，臺灣每年也有 4500~5000 公頃的栽培面積。隨著栽培複作指數提高，番茄土傳性病害也出現危害加重趨勢，特別是設施栽培模式者更是嚴重，影響番茄產量與品質；其中番茄青枯病 (Bacterial wilt) 最容易在結果期開始發病，原本欣欣向榮的植株一夜之間萎凋死亡，讓栽培者血本無歸、欲哭無淚，因此番茄青枯病又被農友稱為 "見錢死"。有報導指出青枯病導致雜交番茄產量減少 26%，嚴重時甚至損失可達 90.62 % (Dharmatti 等，2009)，足見該病害對番茄收益損害的嚴重程度。

二、病原菌生物特性

番茄青枯病係由 *Ralstonia solanacearum*

(Smith) Yabuuchi 所引起的一種細菌性土壤傳播病害，當細菌侵入植物根系後，會在導管大量繁殖累積大量的聚醣 (exopolysaccharide I, EPS I) 及 酵素 (如 polygalacturonase, PG、endo-1,4- β -D-glucanohydrolase, EC) 等，造成導管堵塞，阻礙植物水分傳導，因而引起植物枯萎。病原菌 *R. solanacearum* 寄主範圍廣，可以感染 50 多科 200 多種植物 (Tsuchiya, 2004)，其中以茄科植物受害最嚴重。病菌可隨病株殘體在土壤中越冬，並可在土壤中存活 1~6 年，病原菌可透過雨水、灌溉水、地下媒介昆蟲、操作工具等傳播，極難徹底清除。病原菌 *R. solanacearum* 為害，苗期不表現症狀，待開花著果期開始發病，發病初期中午高溫時植株上部葉片出現萎凋，傍晚恢復，這現象反覆數日，同時莖部也常出現不定根，隨後整株迅速枯萎死亡呈青枯狀 (圖 1, A)。橫切感病植株莖部，可以見到維管束變褐色，以手擠壓，有乳白色黏性菌液溢出，如切取一段感病莖

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 助理研究員

³ 種苗改良繁殖場屏東種苗研究中心 助理研究員

⁴ 種苗改良繁殖場繁殖技術課 助理研究員

⁵ 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員兼課長

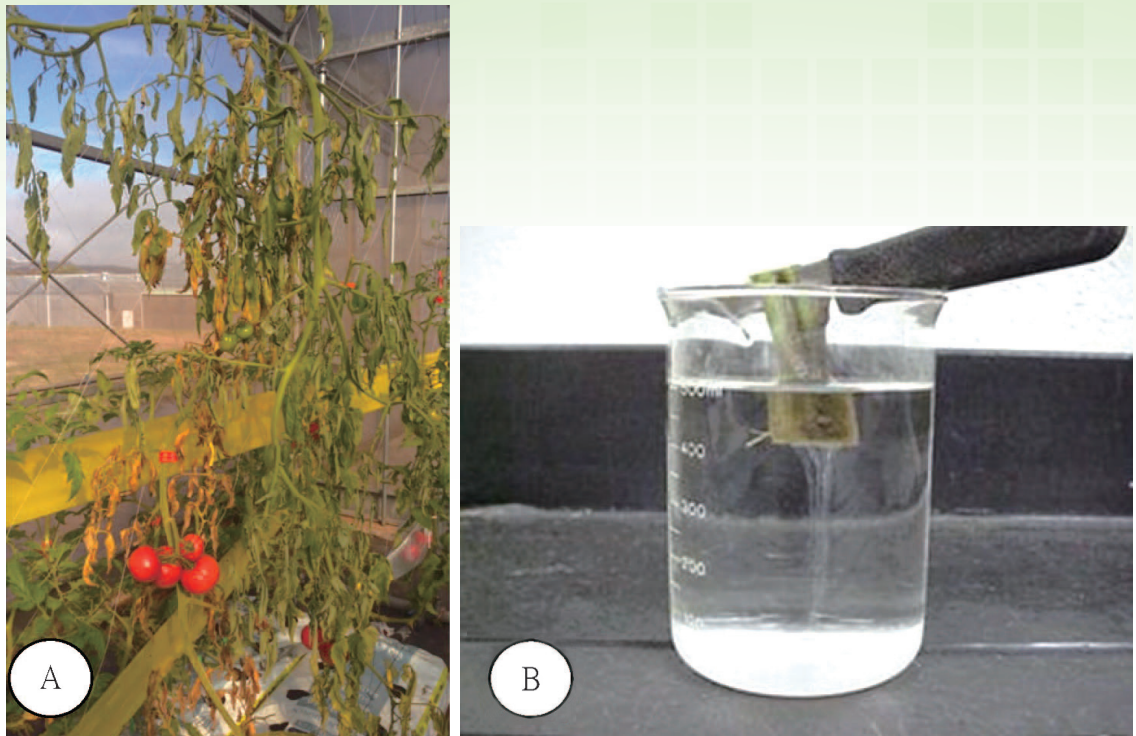


圖 1、植株感染青枯病菌呈青萎病徵 (A)；病株莖部橫切，會有絲狀菌液流出，為青枯病最主要特徵 (B) 圖片 B 來源：
<https://reurl.cc/Na3Dyx>

放入盛有清水的透明玻璃杯中，經數分鐘後，可見到大量病原細菌泥會由切口流出而呈乳白色煙霧狀 (圖 1, B)，可以精確診斷青枯病，並可與引起相似萎凋病、維管束褐變的其他真菌性病害區別之。

三、病原菌生理小種分類

青枯病 *R. solanacearum* 病原菌在高溫、多溼 (30℃、相對溼度 25% 以上) 季節最適宜發病，危害範圍涵括熱帶、亞熱帶地區，我國主要的種子出口市場如大陸華南地區、東南亞地區等青枯病危害普遍，造成巨大損失，因此對於抗病品種需求特別殷切。然而受到各區域的氣候條件影響，病原菌也發展出區域型生理小種，育種者須先掌握目標市場病害主要菌系及抗病材

料的抗性後，才能針對當地需求開發抗病品種。病原菌 *R. solanacearum* 分布範圍廣泛，在全球各地發展出不同的強勢菌系，學術研究上對 *R. solanacearum* 菌系的分類系統有三類：(一) 依據菌株來源及寄主範圍的差異，將青枯病菌區分為五個生理小種 (race 1~5)；(二) 依據細菌氧化醣及產酸能力區分為六種生化型 (biovar, bv1~6)；(三) 依病原菌的地理區域演化分成四種演化型 (Phylotype, Ph I ~IV)，三種分類方法之間沒有相關。據亞洲蔬菜中心研究指出臺灣田間收集到的 *R. solanacearum* 菌株如 TW-Pss 系列 (a、b、c) 分類為 race1、bv3、Ph I；而 TW-Pss186 的病原菌資訊則是 race1、bv4、Ph I (Wang 等, 2013)。由於抗病材料對不同的生理小

研究成果

種往往有不同程度的抗性表現，因此，開發 MAS 分子標誌，需要採用固定菌株與同質性抗病材料進行接種評估，較能開發出有效的分子標誌。

四、番茄材料抗性遺傳機制研究

先前發表的研究文獻指出番茄青枯病抗病材料的抗性來源應該屬於數量性狀基因 (QTL) 為主，在番茄第 3、4、6、7、8、10、12 號染色體皆存在與青枯病抗性相關的數量性狀 (QTL) 位點。其中以第 6 號 (Bw-6) 及第 12 號 (Bw-12) 染色體的抗病效力最明顯 (圖 2, Wang 等, 2000)，研究指出抗病品種需堆疊較多抗病基因方能獲得較佳抗病效果。已知 12 號染色體的抗性基因 *Bwr-12* 僅與第一演化型 (PhI) 青枯病菌株抗性有關，而 6 號染色體的抗性基因 *Bwr-6* 則與第一及第二演化型 (PhI

及 PhII) 的青枯病菌株抗性有關。世界蔬菜中心王肇芬博士 (2013) 研究結果也指出 *Bwr-12* 的主要功能與抑制莖內部病原菌增殖有關。抗病基因 *Bwr-12* 及 *Bwr-6* 對抗病力解釋程度分別為 17.9~56.1% 抗病力及 11.5~22.2%，從研究結果顯示番茄植株同時具備有 *Bwr-12* 及 *Bwr-6* 抗病基因時有最好的抗病性，同時也確認了番茄品系 "Hawaii7996" 對番茄青枯病 TW-Pss186 及 TW-TC 菌系具有穩定抗性。

五、本場開發的抗青枯病分子標誌技術

爲了協助業者加速抗青枯病品種研發，本場優先針對抗性表現明顯的 12 號染色體上 *Bwr-12* 進行主效基因高關聯性分子標誌研發。Kim 等人 (2018) 以全基因組重測序列分析了番茄全基因組單核苷酸多

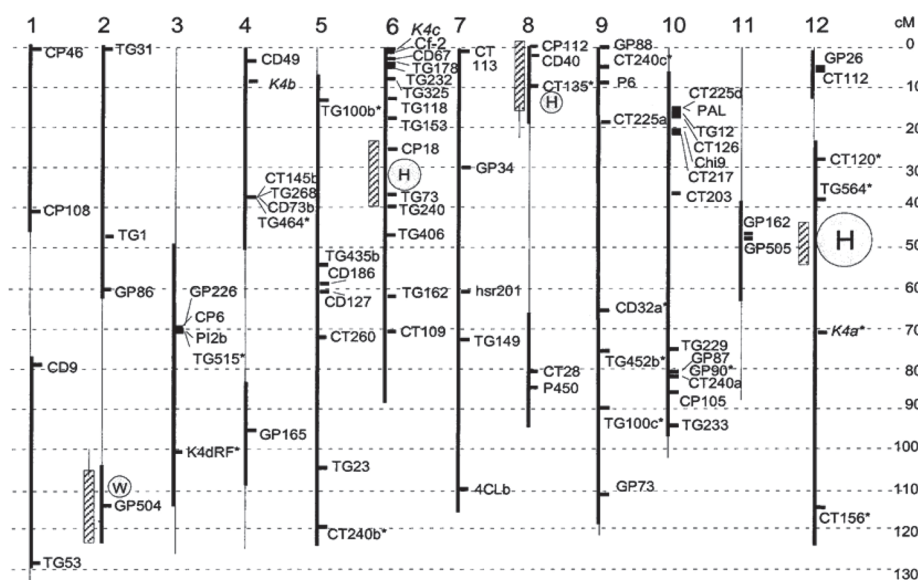


圖 2、由抗病品種 Hawaii 7996 與 Hawaii 7998 發現存在顯性抗病基因，使用不同抗病品種與病原菌株，篩選出數個 QTLs 基因，分別位於 3、4、6、7、8、10 及 12 號染色體。(Wang, et. al., 2000)

態性 (SNP)，認為 *Solyc12g009690.1* 基因可能與 *Bwr-12* 基因緊密連鎖，本場在 *Solyc12g009690.1* 基因附近進行 SNP 探勘及設計分子標誌進行多型性測試，篩選出一組 SNP 標誌 Bwr12-TSS 對番茄青枯病第 12 號染色體抗性基因具有多型性，分別對

抗感病材料增幅出 917bp 及 533bp 片段 (圖 3)。運用異質結合的雜交一代番茄品種 "亞蔬 20 號" 分離後代 (F2) 接種 PT01 菌株 (Race 1) 進行 Bwr12-TSS 分子標誌效力驗證 (圖 4)，接種 14 日後調查基因型與表現型的一致性結果達 76.4% (圖 5)，優於目前慣用的

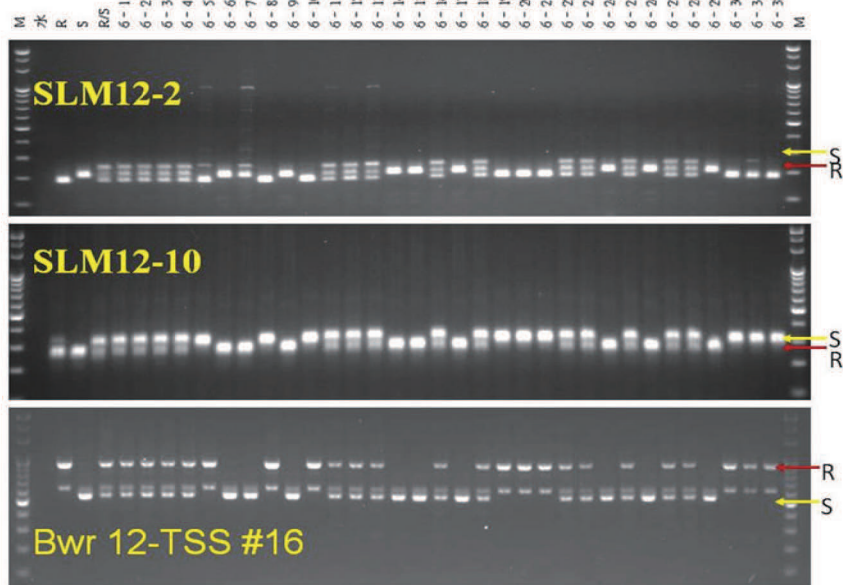


圖 3、Bwr12-TSS 分子標誌對番茄青枯病第 12 號染色體抗性基因具有多型性，分別對抗感病材料增幅出 917bp 及 533bp 片段，對基因型判定較前人 SML12-2 及 SLM12-10 分子標誌更清晰易讀。



圖 4、PT01 菌株 (Race 1) 接種 14 日後，試驗材料分離後代 (中) 罹病率 55%，對照組抗病材料 Hawaii7996 (左) 罹病率 14%，感病材料 KY301 (右) 罹病率 94%。

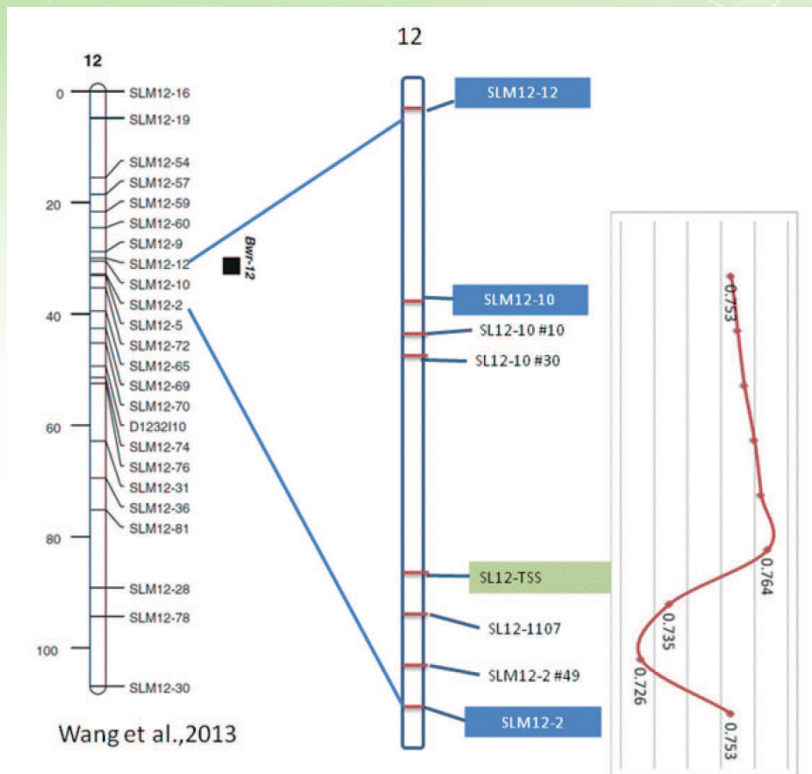


圖 5、與 Bwr-12 抗性基因相關之分子標誌在第 12 號染色體之物理圖譜。曲線區顯示不同分子標誌接種 14 日後表現型與基因型一致性，本場開發之 SNP 分子標誌 Bwr12-TSS 與接種外表型一致性優於其他比較標誌。

SSR 文獻標誌 SLM12-2 及 SLM12-10，且 PCR 後的水平電泳膠片結果更容易判讀，經本場多方測試評估推薦應用於番茄抗青枯病品種研發組合材料的篩選。

六、結語

目前關於番茄青枯病的防治並無有效的藥物防治，嫁接抗病根砧是最主要的防治手段，其他也有透過輪作、土壤消毒等物理方法或是施用澱粉芽孢桿菌等生物防治來防治青枯病發生或遏止蔓延，若能進行抗病品種選育，除了能降低生產成本減少損失外，也能提高品種海外市場競爭力。傳統抗病品種選育往往會受到內、外在環

境不穩定而影響抗病力檢定篩選效能，隨著分子生物技術發展突飛猛進，分子輔助育種 (marker-assisted selection, MAS) 技術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，本場針對番茄第 12 號染色體青枯病主要抗性基因所研發的標誌 Bwr12-TSS 可以協助育種者進行番茄青枯病抗病材料及雜交後裔篩選，除此之外，本場也已開始進行第六號染色體抗性分子標誌的研發，期待能提供業界更完整的育種輔助工具，促成番茄青枯病抗病品種研發。