

番茄嵌紋病毒與抗病基因分子標誌介紹

孫永偉¹、蔡文錫²、郭宏遠³、張惠如⁴、莊淑貞⁵、張珈錡⁴、鍾文全⁶

一、前言

番茄嵌紋病毒(tomato mosaic virus, ToMV或稱tobacco mosaic virus, TMV)為菸草鑲嵌病毒屬(Tobamovirus)之RNA病毒,在全世界可感染超過150種植物,包含許多蔬菜、花卉、水果與雜草。該病毒感染番茄主要引起病癥為頂部葉片變狹小,葉緣變尖,葉表面凹凸不平呈黃綠相間嵌紋或褐色斑點,嚴重時捲曲枯乾,植株生長停滯或不結果,此病癥易與噴灑殺草劑、空氣污染損害、礦物質缺乏和其他植物疾病混淆,必須由專業人員以電子顯微鏡診斷確認。臺灣主要病毒株(virus strain)有3種,ToMV-0、ToMV-1、ToMV-2等,由移動蛋白(movement protein)控制病毒在寄主植物體內傳播。本病毒極易經由傷口傳播,感染病毒植株須立即拔除及銷毀,避免擴散。育成抗病品種為最有效防治手段之一。

目前已知番茄存在3種抗嵌紋病毒基因, $Tm-1$ 、 $Tm-2$ 、 $Tm-2^2$ 。 $Tm-1$ 基因來自野生種多毛番茄(*Solanum hirsutum*),位於第5條染色體,能夠干擾ToMV病毒複製,同質結合基因型(homozygous)能夠抑制99%病毒複製,

異質結合基因型(heterozygous)能夠抑制90%病毒複製。 $Tm-2$ 與 $Tm-2^2$ 基因均來自野生種秘魯番茄(*Solanum peruvianum*),位於第9條染色體中央著絲點(centromere)之等位基因,能夠抑制病毒之移動蛋白作用,造成病毒無法擴散,研究顯示 $Tm-2^2$ 基因對於3種病毒株均有極佳抗性與抗病持久性。

二、番茄抗嵌紋病毒基因($Tm-2$)共顯性分子標誌

開發抗病基因 $Tm-2$ 或 $Tm-2^2$ 專一性分子標誌對於協助育種者早期篩選抗病品系基因型具有相當大助益。雖然已知 $Tm-2$ 與 $Tm-2^2$ 抗病基因位於相同基因座,相當不易區分,但二者對於接種不同ToMV病毒株後,呈現不同抗病性反應。Lanfermeijer等人(2005)認為ToMV病毒之移動蛋白能夠誘導抗病寄主植物R蛋白作用,產生程序化細胞死亡(program cell death),造成寄主葉片局部壞死,即所謂過敏性反應(hypersensitive response)。Ohmori等人(1995)利用RAPD逢機引子篩選13組分子標誌,其中10組可檢測 $Tm-2$ 基因、3組可檢測 $Tm-2^2$ 基因, Motoyoshi等人(1996)利用其中10組 $Tm-2$ 之RAPD(random amplified polymorphic DNA)標誌開發出專一性較高的SCAR(sequence characterized amplified region,無須使用限制酶作用)標誌,但無法確認F2分離族群之 $Tm-2$ 基因型。

1 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員

2 世界蔬菜研究發展中心

3 種苗改良繁殖場品種改良保護課 副研究員

4 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

5 種苗改良繁殖場生物技術課 研究員

6 種苗改良繁殖場生物技術課 研究員兼課長

Shi 等人(2011)針對 *tm-2*(感病)、*Tm-2*、*Tm-2²* 基因分別開發專一性 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences, 無須使用限制酶作用) 分子標誌, 可作為協助育種者篩選抗病品種之有用工具。

種苗改良繁殖場與亞洲蔬菜研究發展中心合作, 利用不同抗病基因型 (*Tm-2*、*Tm-2²*、感病) 番茄為試驗材料, 由 NCBI 基因庫搜尋資料, 設計 *Tm-2* 專一性引子 (Tm2-697), 並與 Lanfermeijer 等人(2005)開發之分子標誌 (Tm2-SNP90) 進行比較。初步獲得研究結果顯示, 國外文獻分子標誌 (Tm2-SNP90) 可將番茄抗嵌紋病毒基因 (*Tm-2* 及 *Tm-2²*) 擴增出 179 bp 之 DNA 條帶及番茄感嵌紋病毒基因 (*tm-2*) 擴增出 382 bp 之 DNA 條帶, 但鑑別之 DNA 條帶相當微弱, 易造成誤判結果; 種苗改良繁殖場開發專一性引子 (Tm2-697) 可同時擴增番茄抗病 (*Tm-2* 及 *Tm-2²*) 與感病基因 (*tm-2*) 650 與 450 bp 之 DNA 條帶, 獲得之專一性 DNA 條帶清晰明確 (如圖)。上述分子標誌反覆經過不同種子公司提供已確定之抗病品種確認可用於檢測番茄抗感嵌紋病毒基因型 (*tm-2* 及 *Tm-2*)。唯目前分子標誌技術尚無法鑑定強抗病基因 (*Tm-2²*), 相當值得研究人員進一步開發。

三、結論

由於番茄嵌紋病毒傳染力及對番茄危害非常嚴重, 育成抗病品種為最有效防治方式之一, 各國番茄種子公司對於具有強抗病基因 (*Tm-2²*) 之品種需求相當殷切, 利用分子標誌輔助育種技術, 可早期

(幼苗階段) 鑑定抗病基因及基因型 (R/R、R/S、S/S), 加速育成自交系或雜交一代抗病番茄品種 (系)。雖已有研究報告顯示可檢測抗番茄嵌紋病毒基因型之分子標誌, 但需使用昂貴之限制酵素且無法同時顯示感病植株, 揭露之資訊較少。本場與亞蔬-世界蔬菜中心合作研發之分子標誌只以單純 PCR 反應 (免用限制酵素) 即可明確顯示植株抗病基因型, 雖然目前技術尚無法區分抗病基因 *Tm-2* 與 *Tm-2²* 差異性, 相信不久之將來, 必能完成 *Tm-2²* 基因之專一性分子標誌, 協助國內育種者快速篩選高抗病植株, 大幅提升育種效率與國產抗病品種之國際競爭力。

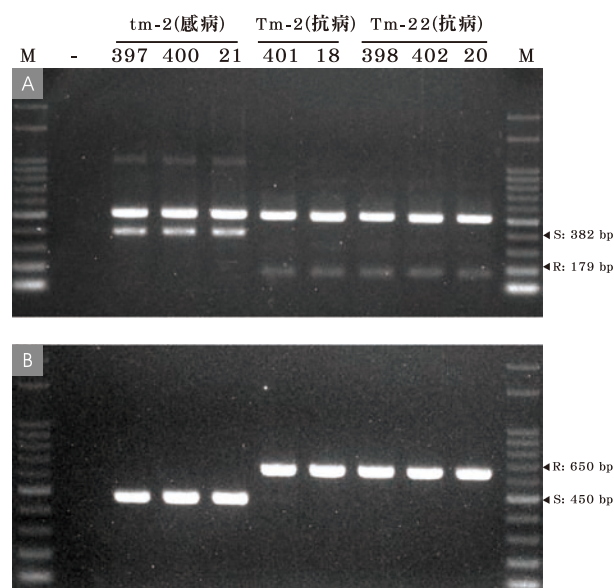


圖1.比較國外文獻(A, Tm2-SNP90)與本場(B, Tm2-697)研發檢測番茄抗嵌紋病毒基因(Tm-2)與感病基因(*tm-2*)專一性分子標誌之差異性, 此二分子標誌可檢測抗感病基因及基因型 (R/R、R/S、S/S)。本技術可協助育種者早期鑑定及篩選番茄育成成品系之抗病基因型。