

## 番茄抗土傳性病害分子檢測技術開發探討 — 頸腐根腐病、黃萎病、根瘤線蟲

周明燕<sup>1</sup>、孫永偉<sup>2</sup>、陳哲仁<sup>3</sup>、周佳霖<sup>4</sup>

### 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蟲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)、冠狀根腐病 (Fusarium crown and root rot) 及根瘤線蟲 (Root knot nematodes) 等。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、番茄頸腐根腐病

#### (*Fusarium crown and root rot*, FCRR)

番茄頸腐根腐病是由 *Fusarium oxysporium* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) 所引起之病害，喜於冷涼地區發病 (18°C 左右)，除了番茄外，還能感染豆科、葫蘆科、藜科的一些植物。在美國 Florida 番茄產區 FCRR 是非常普遍的病害。FCRR 病原菌 (FORL) 可感染溫室內穴盤幼苗及田間的成熟植株。幼苗期感染時，會出現生長遲緩、植株黃化、子葉及下位葉枯萎；根莖交接處，會出現明顯的環狀褐色病變，根部腐爛，接著萎凋死亡。田間成株感染時在結果期開始出現病徵，下位葉開始出現黃化，植株在每日最高溫期間萎凋，晚上回復，此現象可重複出現數日，最後枯萎死亡。病株根尖完全腐爛，縱剖莖基部，會發現莖基微管束及根系褐變腐爛 (圖 1)。

<sup>1</sup> 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員

<sup>2</sup> 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員 (退休)

<sup>3</sup> 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

<sup>4</sup> 種苗改良繁殖場屏東種苗研究中心 助理研究員

圖 1. 番茄頸腐根腐病田間發病 (A) 及莖基部腐爛 (B) 情形  
<http://www.semena.org/agro/diseases/fusarium-crown-root-rot-e.htm>



此病害在 1974 年於日本被發現，是最早的發現紀錄，隨後在美國等許多國家都陸續被發現，是大陸型氣候地區常見的重要病害，臺灣目前尚未發現該病害為害，不過因應我國番茄種子國際化需求，特別是大陸華北地區，如山東壽光的設施生產複作指數高，發病率達 80% 以上，致死率達 30%，嚴重影響產量，已成為山東地區重要且普遍性番茄病害，抗 FCRR 已經是番茄品種必要特性，我國番茄育種導入抗 FCRR 抗病品種勢在必行。

研究指出野生種秘魯番茄 (*Solanum peruvianum*) 對 FCRR 帶有顯著抗性的單顯性基因 *Frl*。*Frl* 位於第 9 號染色體長臂，

且與 *Tm-2*、*ah* (導致苗期子葉胚軸花色素減少基因) 存在一定的連鎖關係，不過 Kim 等人 (2015) 發現 *Frl* 存在於第九條染色體短臂，鄰近著絲點區，與以前文獻所發表位於長臂相反，在該區，基因互換被嚴重抑制。對 *Frl* 基因分子標誌的研究已有一定進展，一系列 RAPD、CAPS、SCAR 標誌被報導。

本場針對該病害建立抗頸腐根腐病基因 *Frl* SCAR 共顯性分子標誌，利用 SCAR-*Frl*#20 引子組，可增幅出抗病材料 750bp、感病材料 200bp 之 DNA 條帶，條帶清楚容易判讀，可有效區別抗感病材料 (圖 2)。

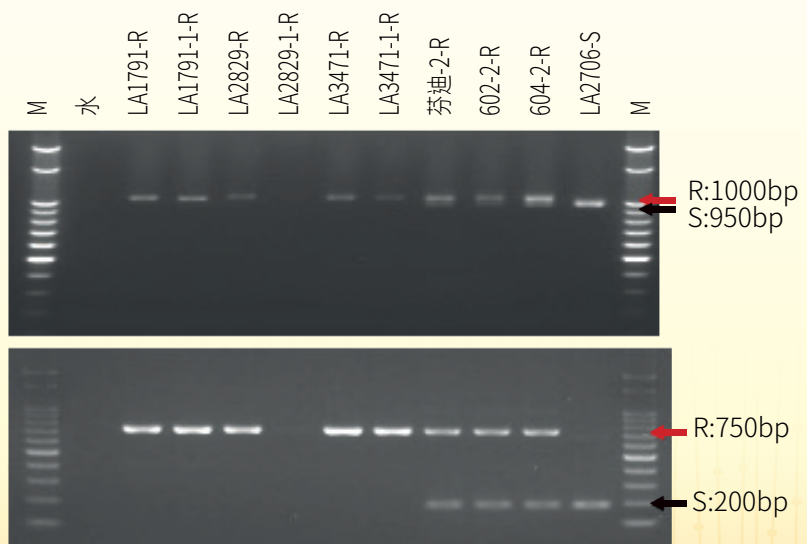


圖 2. 共顯性 SCAR-*Frl*#20 引子組 (下)，可增幅出抗病材料 750bp、感病材料 200bp 之 DNA 條帶，較文獻之 SCAR 引子 (上) 條帶清晰且容易判讀。

## 三、番茄黃萎病 (*Verticillium wilt*)

番茄黃萎病 (*Verticillium wilt*) 在南非、美國、加拿大、義大利、法國等國家都是番茄的重要病害；近十年在中國大陸也由次要病害躍升為主要病害，特別是關中、黑龍江等地區病害蔓延嚴重。番茄黃萎病屬真菌性病害，病原為 *Verticillium dahliae* Kleb. 與 *V. albo-atum*，菌絲體無色或褐色，非專屬性寄生菌，危害棉花、馬鈴薯、番茄、茄子等 660 種作物；發病適溫在 25°C 左右，當氣溫 22°C ~28°C 間最易發病 (雷與李, 2011)。病菌主要在導管內繁殖，阻礙水分上升，並產生毒素，引致系統性病徵。感病植株呈現黃化矮小，葉緣及葉脈間的組織黃褐，上部幼葉以小葉脈為中心黃化，形成明顯的楔形黃斑。黃斑首先出現在側脈之間，沿著葉脈擴大，形成「V」型黃斑，逐漸枯死。病株莖基部，導管變淺褐色，病株並不迅速枯死，沒有乳白色的黏液流出，有別於萎凋病、青枯病的急性枯萎病徵 (圖 3)。番茄黃萎

病菌已經發現兩個生理小種 (race)，race1 發現較早，分布廣泛；race2 直到 1957 年才發現，中國大陸東北地區的黃萎病屬於 race1 感染 (越 2002)。race1 只感染缺乏抗性基因的品種，race2 則感染所有栽培品種 (OKIE and Gardner 1982)。

番茄抗黃萎病 race1 的強弱取決於一個單個控制基因 *Ve*，是由 *S. peruvian* 野生番茄衍生而來。1998 年 N. Diwan 等利用 RFLP 進行 *Ve* 的基因定位，認為該基因位於番茄的第 9 條染色體短臂上，單一位點緊密地與 RFLP 分子標誌 GP39 相連，但不能排除黃萎病抗性反應的基因修飾因子位於番茄染色體組的其它位置。*Ve-2* 抗病基因對於 race 1 的抗病性仍有爭議，Kawchuk 等人 (2001) 篩選到兩個緊密相連、反向排列的基因 *Ve-1* 和 *Ve-2*，但 Fradin (2009) 研究指出在番茄中只有 *Ve-1* 而非 *Ve-2* 主導番茄對 *Verticillium dahliae* Kleb. 與 *V. albo-atum* 生理小種抗性。



圖 3. 黃萎病菌為害之植株黃化矮小，逐漸枯死。病株莖基部，導管變淺褐色，病株並不迅速枯死，沒有乳白色的黏液流出，有別於萎凋病、青枯病的急性枯萎病徵。

圖片來源：

(A) [http://en.wikipedia.org/wiki/Verticillium\\_wilt](http://en.wikipedia.org/wiki/Verticillium_wilt)

(B) <http://www.extension.umn.edu/garden/yard-garden/vegetables/verticillium-wilt-of-tomatoes-and-potatoes/>

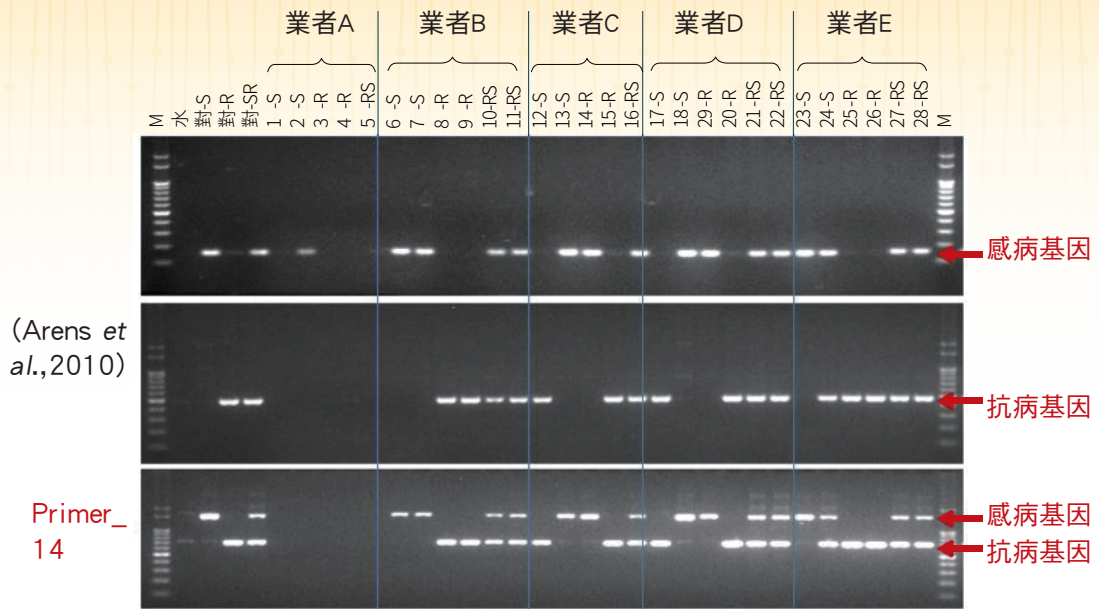


圖 4. 共顯性 SCAR-Ve-I#14 可同時增幅出抗病材料 1500bp、感病材料 690bp 之 DNA 條帶，較文獻之引子需分別偵測更有效率及節省成本。

本場針對黃萎病抗病基因 *Ve-1* 建立 SCAR 共顯性分子標誌，利用 SCAR-Ve-I#14 引子組，可同時增幅出抗病材料 1500bp、感病材料 690bp 之 DNA 條帶，較文獻引子必須進行兩次 PCR，更有效率判讀區別抗感病材料 (圖 4)。

#### 四、番茄根瘤線蟲

##### (Root knot nematodes)

我國茄科蔬菜作物多種植於砂質土、砂質壤土、壤土甚至黏重土或堰土的排水良好地區，這些環境很適合根瘤線蟲孳息繁衍，基於根瘤線蟲寄主廣泛，往往前期作物是瓜類、豆類、根菜類或莖菜類等作物而提高了土壤中線蟲密度；農民為了提高收益而採行間作耕作模式也常常成為根瘤線蟲製造良好接種環境，根瘤線蟲為害成為番茄重要的土壤傳播型蟲害，且由於根瘤線蟲的為害，常降低寄主對某種重要病害如青枯病、白絹病等之抵抗力，形成間接為害。

根瘤線蟲經由前作之殘留植株根體或卵傳播，線蟲在根部形成根瘤，阻礙養分輸送及水分運輸，造成植株生長不良、黃化、枯萎甚至死亡 (圖 5)。根瘤線蟲以 *Meloidogyne incognita* 為害最為普遍，*M. javanica* 次之，而 *M. arenaria* 及 *M. hapla* 發生較少；以二齡幼蟲侵害寄主根部，土溫 20-30°C 是其生長最適溫度。

在番茄上已發現 9 個抗根瘤線蟲基因，*Mi-1*、*Mi-9* (第 6 號染色體)、*Mi-2*、*Mi-3* (第 12 號染色體)、*Mi-4*、*Mi-5*、*Mi-6*、*Mi-7*、*Mi-8*、等基因。位於第 6 號染色體上的 *Mi-9* 基因即使生長於 32°C 高溫環境，仍有明顯抗性，對產業應用價值將非常大。

本場針對根瘤線蟲抗病基因 *Mi-1* 建立 SCAR 共顯性分子標誌，改善 CAPS 標誌需要酶切及不容易判讀缺點，開發共顯性 SCAR 引子，可以經由一次 PCR 增幅出抗感病條帶，更具產業應用性。



圖 5. 線蟲在根部形成根瘤，阻礙養分輸送及水分運輸，造成植株生長不良、黃化、枯萎甚至死亡。

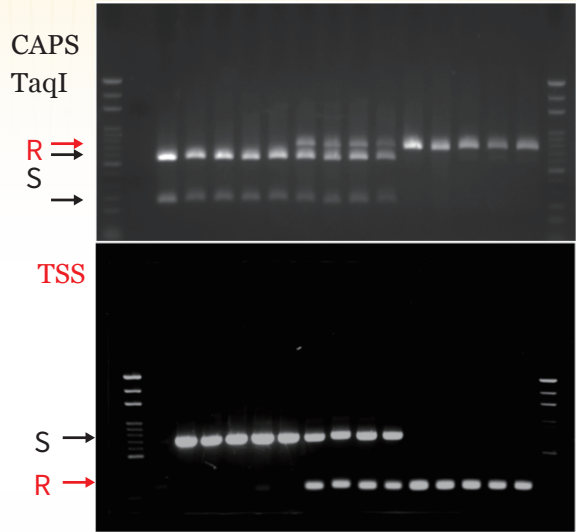


圖 6. 共顯性 SCAR-Mi-TSS 引子組(下)，可同時增幅抗 / 感病材料條帶，較文獻需要酶切之 CAPS 引子(上)更有效率及產業應用性。

## 五、結語

根瘤線蟲常發生於連作旱地，危害情形十分普遍；番茄頸腐根腐病及黃萎病好發於涼溫高濕型環境，在臺灣地區並未曾有該病害為害紀錄，但卻是大陸型地區重要的病害，特別是華北地區設施栽培環境下嚴重危害番茄生長，抗病品種需求殷切。中國大陸是我國番茄種子外銷主要市場，培育出具備優良性狀且抗病性高的品種乃是維繫種子市場競爭力的主要關鍵，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。