

doi:10.11937/bfyy.20190318

番茄灰叶斑病抗病基因 *Sm* 分子标记的建立

高 存, 宋 建 军, 杜 朝

(河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018)

摘 要:以抗病纯合体(*Sm/Sm*)、抗病杂合体(*Sm/sm*)和感病纯合体(*sm/sm*)番茄为试验材料,以提取的基因组 DNA 为模板,根据与抗病基因 *Sm* 紧密连锁的 RFLP 标记设计特异引物进行 PCR 扩增,对扩增产物进行序列分析寻找酶切位点,采用限制性内切酶酶切的方法,创建新的与番茄灰叶斑病抗病基因 *Sm* 紧密连锁的 CAPS 标记,以期为今后番茄抗病育种工作提供技术支撑。结果表明:创建的 T050 标记稳定、可靠,是一个共显性分子标记,可用于番茄抗病育种的辅助选择中。

关键词:番茄;灰叶斑病;*Sm* 基因;分子标记

中图分类号:S 641.201 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2019)22-0022-07

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)是世界上最重要的蔬菜作物之一,品种多、产量高、营养丰富、用途广泛。近年来,随着番茄栽培面积不断扩大,栽培形式和品种的多样化,番茄灰叶斑病(tomato gray leaf spot disease)在一些番茄种植区域流行危害并呈现逐年加重的趋势^[1]。引起番茄灰叶斑病的病原菌为半知菌亚门丝孢纲葡萄柄霉属真菌,据报道主要是由葡萄柄霉属的茄葡萄柄霉(*S. solani*)和番茄葡萄柄霉(*S. lycopersici*)感染所致^[2]。该病害发病时叶片出现灰色圆形不规则斑点,沿叶脉向周围扩散,使整个叶片干枯、脱落,最终造成番茄减产减收^[3]。病害主要通过病原菌产生的分生孢子随风、水及农事操作等途径传播^[4]。培育抗病品种是防治番茄灰叶斑病发生危害的根本途径,目前已发现并可利用的番茄灰叶斑病抗病基因只有一个 *Sm* 基因。

1949 年, HENDRIX 等^[5]利用抗病番茄材料

与感病番茄材料进行杂交和回交创建的分离群体,研究确定了番茄灰叶斑病抗性是由单一不完全显性基因 *Sm* 赋予的。1991 年, BEHARE 等^[6]通过纯合抗病材料‘Moneymaker’和感病材料‘Motelle’杂交,继而自交创建 F₂ 分离群体,构建了 *Sm* 基因的 RFLP 图谱,将 *Sm* 基因定位在 11 号染色体上。2009 年, HAMID 等^[7]进一步将 *Sm* 基因定位在 C2_At1g44790 和 C2_At4g10050 之间。RFLP 标记 CT55、C2_At4g10050 和 C2_At2g14260 与 *Sm* 基因连锁较为紧密。随后, JI 等^[8]利用 RFLP 标记 CT55 设计特异引物,对不同基因型的番茄材料进行 PCR 扩增,之后用限制性内切酶 *Taq* I 对扩增产物进行酶切,开发出一个隐性标记 CT55,只能区分抗病纯合,无法区分感病纯合与抗病杂合材料。2017 年, 高建昌等^[9]建立了一个与抗病基因 *Sm* 连锁的 Indel 标记,但是该标记的抗病条带和感病条带相距很近、不易辨认。这些分子标记的实用性及是否适用于其它育种系统还有待于进一步研究。同时,开发出与抗病基因紧密连锁、稳定可靠的新的分子标记是学者们面临的一个重要课题。

长期以来,传统育种的选择都是基于植株表型性状进行的。番茄的抗病性很容易受到环境因素的影响,因年份和季节不同而表现差异很大,此

第一作者简介:高存(1993-),女,硕士研究生,研究方向为番茄遗传育种。E-mail:836686018@qq.com.

责任作者:宋建军(1963-),男,博士,教授,现主要从事番茄遗传育种等研究工作。E-mail:songjj63@126.com.

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划资助项目(16226308D-3)。

收稿日期:2019-06-11

时根据表型的度量多是不确切的,因而选择往往是困难且低效的^[10]。运用分子标记进行辅助选择不受时间、地域的限制,可以大大提高选择的准确性和有效性^[11]。创建番茄灰叶斑病抗病基因 *Sm* 的分子标记并应用于育种实际,必将进一步加快番茄抗病育种进程^[12-13]。在番茄抗病育种中常用的分子标记主要有 SSR 标记、SCAR 标记和 CAPS 标记等。CAPS 标记是一种酶切扩增多态性序列标记,多为共显性标记,能够区分抗病杂合体 and 纯合体,在番茄辅助选择育种中应用前景十分广阔^[14-16]。该研究以抗病纯合体(*Sm/Sm*)、抗病杂合体(*Sm/sm*)和感病纯合体(*sm/sm*)番茄为试验材料,根据与 *Sm* 基因紧密连锁的 RFLP 标记序列设计特异引物进行 PCR 扩增,对 PCR 扩增产物进行序列分析寻找酶切位点,创建能够清晰区分抗病纯合体、抗病杂合体和感病纯合体的 CAPS 分子标记。在此基础上,利用不同遗传背景种质材料对创建的分子标记有效性进行验证,并将该标记初步应用于育种材料的筛选与鉴定,旨在为番茄抗病育种提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

分子标记创建所用的番茄材料有 4 种,分别是抗病纯合体‘T18’(*Sm/Sm*)、抗病杂合体‘T702-3’和‘T702-6’(*Sm/sm*),以及感病纯合体‘T29’(*sm/sm*)。标记验证所用材料还选用了 7 种不同遗传背景、已知基因型的番茄材料,共计 11 种材料(表 1)。

表 1 分子标记建立和验证所用番茄材料
Table 1 Tomato materials used in molecular marker establishment and verification

编号 No.	品种 Cultivars	基因型 Genotype	材料来源 Source of materials
1	‘T702-1’	<i>Sm/sm</i>	河北科技大学
2	‘T702-2’	<i>Sm/sm</i>	河北科技大学
3	‘T29’	<i>sm/sm</i>	河北科技大学
4	‘T18’	<i>Sm/Sm</i>	河北科技大学
5	‘T702-4’	<i>Sm/Sm</i>	河北科技大学
6	‘T702-6’	<i>Sm/sm</i>	河北科技大学
7	‘T702-3’	<i>Sm/sm</i>	河北科技大学
8	‘T702-5’	<i>sm/sm</i>	河北科技大学
9	‘T30’	<i>sm/sm</i>	河北科技大学
10	‘T31’	<i>Sm/sm</i>	河北科技大学
11	‘T32’	<i>sm/sm</i>	河北科技大学

将获得的分子标记初步应用于育种材料的筛选和鉴定,所用育种材料共计 91 种,为 F₄~F₈ 世代的自交系,材料均来源于河北科技大学番茄育种课题组。

1.2 试验方法

1.2.1 特异引物设计

番茄抗病基因 *Sm* 被定位在 11 号染色体上,与之紧密连锁的 5 个 RFLP 标记分别是 C2_At1g44790、TG47、CT55、C2_At4g10050 和 C2_At2g14260(图 1)。参考 HAMID 等^[7]的方法,根据上述 RFLP 标记序列设计 5 对特异性引物。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物名称和序列见表 2。

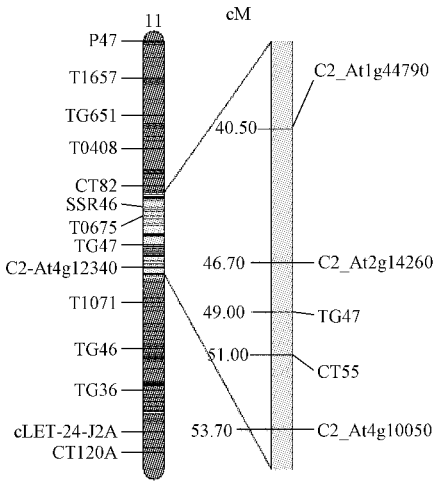


图 1 *Sm* 基因在番茄 11 号染色体上的定位
Fig. 1 Mapping of the disease-resistant locus *Sm* on tomato chromosome 11

表 2 PCR 扩增所用引物
Table 2 Primers for PCR amplification

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
T790 F	5'-TCGGTTTATCAAAGGCTATCGTC-3'
T790 R	5'-TGTTACTGTTCTACCTGGGAATTCTGG-3'
TG47 F	5'-TGCATCAAGACAACCACTCA-3'
TG47 R	5'-GGGTCCCACTCCAAGCTATACTA-3'
CT55 F	5'-CATCTGGTGAGCGGTGAAGTA-3'
CT55 R	5'-TCCGCCAAACAAAACAGTAATA-3'
T050 F	5'-ATCACCTTCTGCCTTTTCTTC-3'
T050 R	5'-ATCTGGGATCTGAATGTATCCTC-3'
T260 F	5'-AGGATCTATACCCCTCTATAGAGCC-3'
T260 R	5'-TTATTGGGTGAAGTCCCACTCC-3'

1.2.2 DNA 提取

所用番茄材料播种于 72 穴育苗盘中,长至 2~3 片真叶时选取上部幼叶,采用 CTAB 法提取番茄基因组 DNA^[17],利用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 纯度和浓度。将提取的 DNA 储存于 -20 ℃ 冰箱中备用。

1.2.3 PCR 扩增反应

将提取的番茄基因组 DNA 作为模板,利用设计合成的特异性引物进行 PCR。5 对引物的反应体系相同,总体系为 25 μ L(表 3)。

PCR 反应程序,引物 TG47 为 94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 10 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环后,72 ℃ 延伸 5 min;引物 T050 为 94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 10 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环后,72 ℃ 延伸 5 min;引物 T260 为 94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 10 s,57 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,30 个循环后,72 ℃ 延伸 5 min;引物 T790 与引物 CT55 的反应程序相同,均为 94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 10 s,57 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环后,72 ℃ 延伸 5 min。

表 3 PCR 反应体系
Table 3 PCR reaction system

成分 Constituent	体积 Volume/ μ L
2 \times PCR Bestaq MasterMix(爱必梦生物科技有限公司)	12.5
引物 F	0.5
引物 R	0.5
模板 DNA	1.0
灭菌双蒸水	10.5

1.2.4 TA 克隆与酶切位点分析

将 PCR 扩增产物进行 TA 克隆^[18-19],TA 克隆用 pTOPO-Blunt Simple 试剂盒进行连接 T 载体并转入大肠杆菌细胞中,‘T18’‘T29’‘T702-3’‘T702-6’材料分别挑 4 个单菌送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果进行比对分析,利用 GeneTool 软件寻找区别抗病基因型与感病基因型的特异酶切位点。

1.2.5 酶切反应

酶切体系为 *ScrF I* 酶(NEB 公司生产) 1 μ L,10 \times CutSmart[®] Buffer 4 μ L,PCR 产物 13 μ L,终体积用超纯水补足 40 μ L。37 ℃ 水浴

1 h,Loading buffer 终止反应。

1.2.6 凝胶电泳

PCR 扩增产物和酶切反应产物,均采用琼脂糖凝胶电泳检测。凝胶浓度为 2%,配置时加入核酸染料。电泳所用时间为 100 min,电压为 100 V。电泳结果用凝胶成像系统观察拍照。

1.3 数据分析

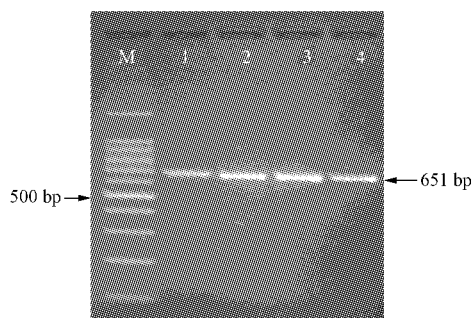
PCR 扩增产物经测序后,根据测序结果确定 DNA 条带大小。根据酶切位点的位置,确定酶切后产生的多态性片段大小。每次试验重复 3 次,以确保试验的可靠性。

2 结果与分析

2.1 分子标记建立

2.1.1 PCR 扩增结果

选用已知抗病基因型的 4 种番茄材料,以提取的番茄植株基因组 DNA 为模板,利用设计合成的 5 对特异引物进行 PCR 扩增。引物 T050 的 PCR 扩增结果如图 2 所示,抗病纯合基因型材料‘T18’(Sm/Sm)、抗病杂合基因型材料‘T702-3’和‘T702-6’(Sm/sm)以及感病纯合基因型材料‘T29’(sm/sm)均扩增出 1 条特异条带。扩增产物进行 TA 克隆并测序,结果表明 DNA 片段大小为 651 bp。其它 4 对引物也均扩增出相应的特异条带,但序列分析没有找到可用于区分抗病和感病基因型的酶切位点(图略)。



注:M, 100 bp DNA ladder; 1. ‘T18’; 2. ‘T29’; 3. ‘T702-3’; 4. ‘T702-6’。

Note: M, 100 bp DNA ladder; 1. ‘T18’; 2. ‘T29’; 3. ‘T702-3’; 4. ‘T702-6’。

图 2 引物 T050 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results using T050 primers

2.1.2 酶切位点分析

将 PCR 产物进行 TA 克隆并测序,通过 BLAST 进行比对分析。结果显示只有引物 T050 的 PCR 产物序列可以反映材料的感病和抗病性。抗病纯合材料‘T18’与感病纯合材料‘T29’的扩增产物在第 299 位上存在差异,是一个 SNP(图 3)。抗病杂合材料‘T702-3’和‘T702-6’的扩增产物 2 种序列都有,与‘T18’和‘T29’一致。选取

纯合材料的测序结果,以 GeneTool 分析扩增产物差别区域的酶切位点,课题组发现感病纯合材料‘T29’的扩增产物具有一个限制性内切酶 *ScrF I* 的识别和作用位点 CCNNGG,而抗病纯合材料‘T18’则一个也没有。因此,通过 *ScrF I* 酶切,应该能够建立一个可以区分抗病纯合、抗病杂合和感病纯合基因型材料的 CAPS 标记。

T18	ATCACCCCTCTGCCTTTTCTTCTGCTCCTACTCGCCCTCCCAATTCAGTAAGTTCATTTATGTGTTTATTTTCCCAATT	80
T29	ATCACCCCTCTGCCTTTTCTTCTGCTCCTACTCGCCCTCCCAATTCAGTAAGTTCATTTATGTGTTTATTTTCCCAATT	80
Consenatcacccttctgccttttcttctgctcctactcgccctcccaatcagtaagttcattttatgtgtttattttccccaatt		
T18	TTAAATTGTAATTTTGAGTGCTGTATGGATCGTTGGTTTCTAATGAATTTGATTGAAACATGTGATTCACATTCTTGTA	160
T29	TTAAATTGTAATTTTGAGTGCTGTATGGATCGTTGGTTTCTAATGAATTTGATTGAAACATGTGATTCACATTCTTGTA	160
Consentlaaattlgtaatttllgagtgctgtatggatcgltgglltclaaatgaattllgattllgaacatgtgattcaccattcttllgta		
T18	GTTGTTTCCTGTTGAAAGTTCAATCTGTGTTAAAGGAACTAGTAGCTTGTGTTTAGTGTTAAACAACTCTATTATGAAAA	240
T29	GTTGTTTCCTGTTGAAAGTTCAATCTGTGTTAAAGGAACTAGTAGCTTGTGTTTAGTGTTAAACAACTCTATTATGAAAA	240
Consengttgtttctctgttgaaagttcaatctgtgttaaaggaaactagtagcttgttttagtggttaacaactctctattatgaaaa		
T18	AATTTACTTCATGCTAGCATATTCAAGGGTTTGCTTCTAGGTGAGCTCGTCATACCACTTGTCTAGTGTGGGTTATCC	320
T29	AATTTACTTCATGCTAGCATATTCAAGGGTTTGCTTCTAGGTGAGCTCGTCATACCACTTGTCTAGTGTGGGTTATCC	320
Consenaatttacttcatgctagcatattcaaggglllgcttclaggtgagctcgctacacacagcttllgtctagtgltgggllatcc		
T18	TATGTGGTTTGTGACATGAGTGGAGTTTTTACCATGTGCACATCCAAAGGGTAGCGGCTGCGGATTTTTAGTCATAAAAA	400
T29	TATGTGGTTTGTGACATGAGTGGAGTTTTTACCATGTGCACATCCAAAGGGTAGCGGCTGCGGATTTTTAGTCATAAAAA	400
Consentatgtggtttgtgacatgagtgaggattttaccatgtgcacatccaaagggtagcggtgaggatttttagtcataaaaa		
T18	TATATTAGTTGGGGGTTGGGAGTATGGGGAGTTCTTTTAGTGCTTTAGGTCAGATAAAGGTGCTCTATTGCAATTCA	480
T29	TATATTAGTTGGGGGTTGGGAGTATGGGGAGTTCTTTTAGTGCTTTAGGTCAGATAAAGGTGCTCTATTGCAATTCA	480
Consentatattagttgggggttgggagtatggggagttcttttagtgcttttaggtcagataaaggtgtctctatttgcaattca		
T18	AAACCAGAATTCAGAACTGTAGAAATTTATTTTTTTTGTATTAGTTGTATTAAAGTATTATTGGGCTGAAAAATTTATCT	560
T29	AAACCAGAATTCAGAACTGTAGAAATTTATTTTTTTTGTATTAGTTGTATTAAAGTATTATTGGGCTGAAAAATTTATCT	560
Consenaaccagaattctagaactgtagaatttatttttttllgatttagtllgtatttaagtatttllggctgaaaaatttattct		
T18	TAATTCCTCTGCAGGACTTCTTCACAGAAATATGCACCTTTAGACTGGTCACATTATTTTGTATCAAGAGGATGACATTC	640
T29	TAATTCCTCTGCAGGACTTCTTCACAGAAATATGCACCTTTAGACTGGTCACATTATTTTGTATCAAGAGGATGACATTC	640
Consentlaattctctctgcaggacttcttcacagaaatattgcacctttagactgggtcacatttlllgtatcaagaggatgacattc		
T18	AGATCCCA	650
T29	AGATCCCA	650
Consenagatccca		

注:方框内为酶切识别位点。

Note: The identification site of enzyme digestion is shown in the box.

图 3 抗病纯合植株 T18 和感病纯合植株 T29 的 T050 扩增序列对比

Fig. 3 Comparison of T050 amplified sequences of T18 and T29

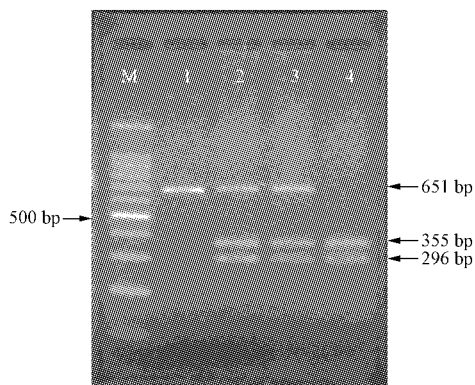
2.1.3 酶切结果

引物 T050 的 PCR 扩增产物经限制性内切酶 *ScrF I* 酶切后,不同基因型的材料间呈现出酶切多态性。抗病纯合基因型材料‘T18’酶切后仍为 1 条片段大小为 651 bp 的特异条带;感病纯合基因型材料‘T29’酶切后产生了 2 条特异条带,片段大小分别为 355、296 bp;抗病杂合基因型材料‘T702-3’和‘T702-6’酶切后均产生了 3 条特异条带,片段大小分别为 651、355、296 bp(图 4)。

产生的特异片段大小与预期的片段大小相一致,该分子标记能够清晰地区分抗病纯合体和抗病杂合体,是一个共显性 CAPS 标记,命名为 T050。

2.2 分子标记的验证

分子标记的实用性和适用范围,取决于分子标记的稳定性和可靠性。当改变分子标记的亲本时,分子标记与目的基因之间的交换值没有较大变化,这样才能保证分子标记在辅助选择中的有效性。该研究选用 11 种不同遗传背景的番茄种



注:M, 100 bp DNA ladder; 1: T18'; 2: T702-3'; 3: T702-6'; 4: T29'。

Note: M, 100 bp DNA ladder; 1. 'T18'; 2. 'T702-3'; 3. 'T702-6'; 4. 'T29'.

图4 引物 T050 PCR 扩增产物的酶切结果

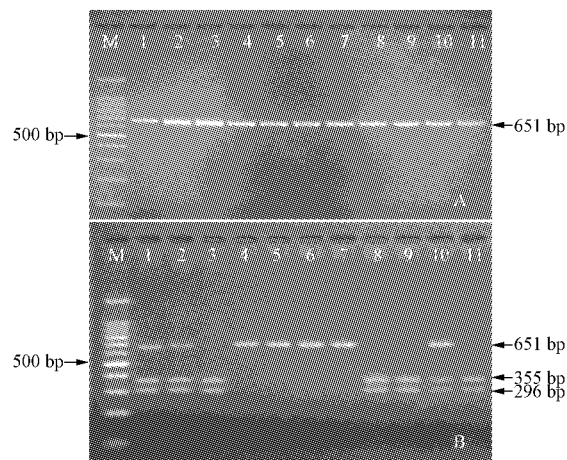
Fig. 4 *ScrF I* enzyme digestion of PCR products using T050 primers

质材料,对上述创建的 T050 CAPS 标记的可靠性与有效性进行了验证。

T050 标记的验证结果如图 5 所示,无论抗病纯合基因型、抗病杂合基因型和感病纯合基因型,11 种不同的番茄种质材料,经 PCR 扩增均得到 1 条片段大小为 651 bp 的特异条带(图 5A)。扩增产物经 *ScrF I* 酶切后,抗病纯合基因型的 4 种材料产生了 1 条片段大小为 651 bp 的特异条带;感病纯合基因型的 4 种材料均产生了 2 条片段大小为 355、296 bp 的特异条带;抗病杂合基因型的 3 种材料均产生了 3 条片段大小为 651、355、296 bp 的特异条带(图 5B)。这些结果充分表明,创建的 T050 标记在不同遗传背景的番茄种质材料中能够准确清晰地地区分抗病、感病和杂合基因型材料,表现稳定可靠、有效性高。

2.3 分子标记的初步应用

利用创建的 T050 分子标记,对 91 种番茄育种材料的抗病性进行了初步鉴定和筛选。PCR 扩增结果显示,91 种番茄育种材料均扩增出 1 条片段大小为 651 bp 的特异条带(图略)。经 *ScrF I* 酶切后,在 91 种番茄育种材料中,有 20 种材料只产生了 1 条片段大小为 651 bp 的特异条带,为抗病纯合基因型(*Sm/Sm*)材料;有 65 种材料均产生了 2 条片段大小为 355、296 bp 的特异



注:M, 100 bp DNA ladder; 1. 'T702-1'; 2. 'T702-2'; 3. 'T29'; 4. 'T18'; 5. 'T702-4'; 6. 'T705-6'; 7. 'T702-3'; 8. 'T702-5'; 9. 'T30'; 10. 'T31'; 11. 'T32'。

Note: M, 100 bp DNA ladder; 1. 'T702-1'; 2. 'T702-2'; 3. 'T29'; 4. 'T18'; 5. 'T702-4'; 6. 'T705-6'; 7. 'T702-3'; 8. 'T702-5'; 9. 'T30'; 10. 'T31'; 11. 'T32'.

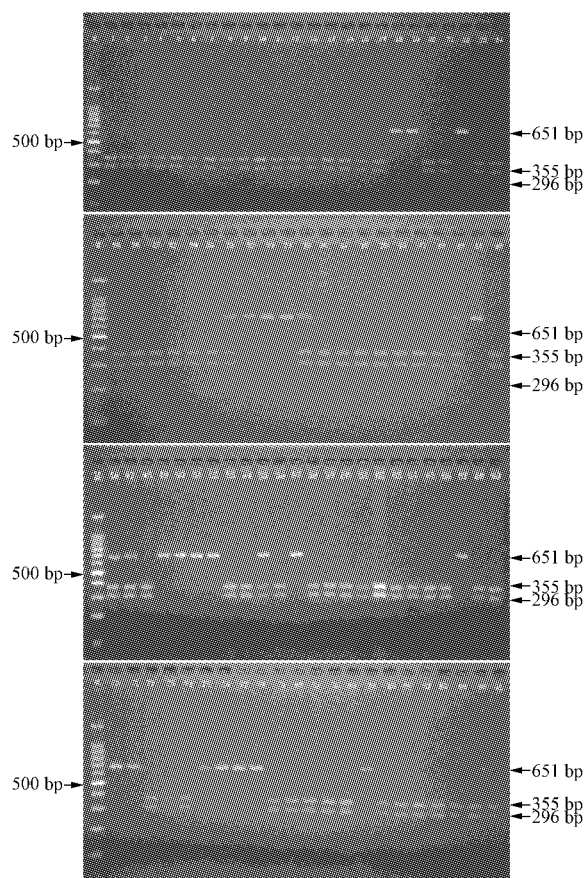
图5 引物 T050 的 PCR 扩增结果(A)及 *ScrF I* 酶切结果(B)

Fig. 5 PCR amplification results (A) and *ScrF I* enzyme digestions of PCR products (B)

条带,为感病纯合基因型(*sm/sm*)材料;有 6 种材料均产生了 3 条片段大小为 651、355、296 bp 的特异条带,为抗病杂合基因型(*Sm/sm*)材料(图 6)。筛选得到的 20 种抗病纯合基因型材料,为今后的番茄抗病育种奠定了物质基础。

3 结论与讨论

该研究以已知抗病基因型的番茄种质为试验材料,根据与 *Sm* 基因紧密连锁的 RFLP 标记序列设计特异引物,经 PCR 扩增及扩增产物的序列分析寻找酶切位点,建立了一个新的与抗病基因 *Sm* 紧密连锁的 CAPS 标记,命名为 T050 标记。利用 T050 引物进行 PCR 扩增,抗病纯合基因型、抗病杂合基因型和感病纯合基因型材料均得到 1 条片段大小为 651 bp 的特异条带。经限制性内切酶 *ScrF I* 酶切后,抗病纯合基因型材料产生 1 条片段大小为 651 bp 的特异条带,感病纯合基因型材料产生 2 条片段大小为 355 bp 和 296 bp 的特异条带,抗病杂合基因型材料产生 3 条片段大小为 651、355、296 bp 的特异条带。该标记能



注: M, 100 bp DNA ladder; 1~91 为不同的番茄育种材料。

Note: M, 100 bp DNA ladder; 1~91, Numbers for different tomato breeding materials.

图 6 91 个材料的酶切结果

Fig. 6 *ScrFI* enzyme digestion of PCR products for 91 materials

够清楚地区分抗病杂合体和抗病纯合体,在不同遗传背景番茄种质材料中表现稳定可靠,是一个比较理想的共显性 CAPS 标记。将建立的 T050 分子标记应用于抗病育种材料的筛选与鉴定,初步筛选获得抗病纯合基因型材料 20 份。

培育抗病品种是防治番茄灰叶斑病的根本途径,在抗病育种过程中筛选抗病材料是一个最重要的关键环节。分子标记辅助选择可以在 DNA 水平上鉴定出抗病位点,克服田间自然鉴定周期长、易受外界环境影响的缺点,提高选择的准确性和育种效率。因此,将分子标记技术与传统育种方法相结合,已成为番茄抗病育种工作的必然趋势。CAPS 分子标记是一种酶切扩增多态性序列标记,通常具有共显性的特点,是番茄分子标记辅

助选择育种中应用最广泛的技术之一。JI 等^[8]以 CT55 RFLP 标记序列设计特异引物,经 PCR 扩增和限制性内切酶酶切后,建立了一个隐性 CAPS 标记。该研究中,课题组利用相同的 CT55 引物,PCR 扩增出了特异条带,但酶切后没有获得酶切多态性,这可能与研究中所用的种质资源材料不同有关。高建昌等^[9]利用不同基因型的番茄材料,建立了一个与抗病基因 *Sm* 连锁的 Indel 标记,可以区分抗病杂合体和抗病纯合体,但抗病条带和感病条带的片段大小仅差 12 bp,琼脂糖凝胶电泳不易分辨。相比之下,该研究建立的 T050 标记条带清晰、容易分辨,更便于在实际的辅助选择中应用。T050 标记是基于 C2 _ At4g10050 RFLP 标记转化成的共显性 CAPS 标记,虽然不一定适用于所有的育种体系,但至少适用于该育种体系或种质资源材料遗传背景相近的其它育种体系。建立的 T050 标记尽管与抗病基因紧密连锁,但它与抗病基因之间确切遗传距离尚不清楚,有待于进一步研究。迄今为止,抗病基因 *Sm* 的克隆和序列信息尚鲜见报道,创建与抗病基因更加紧密连锁的新的分子标记也是今后的重要课题。

抗番茄灰叶斑病已经成为番茄育种的重要育种目标之一,番茄灰叶斑病抗病基因分子标记的建立是辅助选择育种的关键所在。该研究根据抗病基因 *Sm* 附近的 RFLP 标记序列设计特异引物,经 PCR 扩增和限制性内切酶酶切,建立了一个稳定性好、可靠性高的共显性 CAPS 标记,这将为抗番茄灰叶斑病分子标记辅助选择育种提供有力的技术支撑。利用建立的分子标记筛选获得的抗病育种材料,为番茄灰叶斑病抗病育种奠定了物质基础,从而大大推动番茄灰叶斑病抗病育种工作进展。

参考文献

- [1] 李戊清. 我国灰叶斑病研究进展[J]. 中国植保导刊, 2015 (3): 24-27.
- [2] BRUNO E C, LEONARDO S B, AILTON R, et al. Identification of *Solanum* (*S. lycopersicon*) accessions with resistance to *Stemphylium solani* and *S. lycopersici*[J]. Horticultura Brasileira, 2010, 28: 178-184.
- [3] 刘安敏, 孙家栋, 陶秀珍, 等. 保护地番茄灰叶斑病的发生与综合防治[J]. 中国植保导刊, 2004(4): 23-24.

- [4] 杨琦凤,潘光辉. 重庆地区番茄灰叶斑病的发生与防治[J]. 南方农业,2012(6):28-29.
- [5] HENDRIX J W, FRAZIER W A. Studies of the inheritance of *Stemphylium* resistance in tomatoes[J]. Hawaii Agric Exp Stn Tech Bull, 1949, 8:4-23.
- [6] BEHARE J, LATERROT H, SARFATTI M, et al. Restriction fragment length polymorphism mapping of the *Stemphylium* resistance gene in tomato[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1991, 4(5):489.
- [7] HAMID A, MATTHEW K, MAJID R, et al. A new genetic linkage map of tomato based on a *Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium* RIL population displaying locations of candidate pathogen response genes[J]. Genom, 2009, 52(11):935-956.
- [8] JI Y, SCOTT J W. A CAPS marker linked to the tomato gray leafspot (*Stemphylium* sp.) resistance gene *Sm*[J]. Rep Tomato Genet Coop, 2009, 59:29-31.
- [9] 高建昌, 苏晓梅, 杜永臣, 等. 与番茄抗灰叶斑病基因 *Sm* 连锁的 Indel 标记及其扩增引物与应用: 201510855183[P]. 2017-06-09.
- [10] 尹贤贵, 王小佳, 张赞, 等. DNA 分子标记及其在番茄遗传育种中的应用[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(6):465-470.
- [11] 国艳梅, 杜永臣, 王孝宜, 等. 番茄黄化卷叶病毒病(TYL-CV)的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(5):30-35.
- [12] 吴媛媛, 李海涛, 张子君, 等. 番茄抗病基因分子标记研究进展[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(2):27-31.
- [13] 赵丽萍, 赵统敏, 余文贵, 等. 番茄灰叶斑病研究进展[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(6):1524-1530.
- [14] 郝炯, 渠云芳. DNA 分子标记在作物育种中的应用[J]. 山西农业科学, 2009, 37(3):81-85.
- [15] 王军卫, 张改生, 刘宏伟, 等. 分子标记在作物遗传育种中的应用进展[J]. 陕西农业科学, 2001(1):1-5.
- [16] LAMMERTS B, BACKES G, VRIEND H. The role of molecular markers and marker assisted selection in breeding for organic agriculture[J]. Euphytica, 2010, 175:51-64.
- [17] 张楠, 谢放. 高质量加工番茄基因组 DNA 提取方法的改进[J]. 湖南农业科学, 2011(15):16-20.
- [18] 许艺珊, 何晶晶, 沈婉娟, 等. TA 克隆技术的原理与应用[J]. 技术与应用, 2015(6):89-90.
- [19] 殷宪伦, 王春涛, 孔洋翔, 等. 利用 TA 克隆的方法简便构建入门克隆[J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(4):397-402.

Establishment of Molecular Marker for *Sm* Gene Resistant to Tomato Gray Leaf Spot

GAO Cun, SONG Jianjun, DU Chao

(College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018)

Abstract: Resistant homozygous (*Sm/Sm*), resistant heterozygotes (*Sm/sm*) and susceptible homozygous (*sm/sm*) were used as experimental materials. Based on the published RFLP markers tightly linked to *Sm*, specific primers were designed for PCR amplification. Sequence analysis of amplified products was studied to find enzyme cleavage sites. A new CAPS marker was created closely linked to the tomato gray leaf spot disease resistance gene *Sm*, in order to provide technical support for tomato breeding in the future. The results showed that T050 marker obtained was a stable and reliable codominant molecular marker, which could be used in marker assistant selection for tomato disease resistance breeding.

Keywords: tomato; gray leaf spot disease; *Sm* gene; molecular marker