

## 分子标记辅助聚合番茄抗病基因育种

朱明涛<sup>1</sup>, 孙亚林<sup>1</sup>, 郑莎<sup>1</sup>, 张晓黎<sup>1</sup>, 王涛涛<sup>1</sup>, 叶志彪<sup>2</sup>, 李汉霞<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070; <sup>2</sup>作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 利用番茄抗病基因 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2*、*Mi-1*、*Cf-9* 的分子标记辅助选择, 聚合抗烟草花叶病、抗枯萎病、抗根结线虫和抗叶霉病 4 个基因于番茄育种材料中。室内苗期接种鉴定和田间观察, 获得的含 4 个抗性基因的株系 L11、L19、L46 和 L51 对 4 种病害都达到了抗级 (R) 水平, 且具有较好的农艺性状, 可作为抗病育种亲本。

**关键词:** 番茄; 分子标记; 抗病性; 聚合育种

**中图分类号:** S 641.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 09-1416-07

## Pyramiding Disease Resistance Genes by Molecular Marker-Assisted Selection in Tomato

ZHU Ming-tao<sup>1</sup>, SUN Ya-lin<sup>1</sup>, ZHENG Sha<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-li<sup>1</sup>, WANG Tao-tao<sup>1</sup>, YE Zhi-biao<sup>2</sup>, and LI Han-xia<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; <sup>2</sup>National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** The elite lines of L11, L19, L46 and L51 containing *Tm-2<sup>a</sup>*, *I-2*, *Mi-1* and *Cf-9* resistant genes were obtained in tomato with the aid of the molecular marker assisted selection. Seedling inoculation of these inbred lines confirmed higher disease resistant levels. The results of field trials also showed that the four selected disease resistance lines have better agricultural characteristics and may be used for tomato disease resistance breeding program in the future.

**Key words:** tomato; marker-assisted selection; disease resistance; pyramiding breeding

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 生产中常遭受多种病害侵染, 特别是烟草花叶病毒病 (TMV) 枯萎病 (*Fusarium oxysporum*) 根结线虫病 (*Meloidogyne* spp.) 叶霉病 (*Cladosporium fulvum*) 等, 给番茄生产带来严重危害。利用 DNA 分子标记技术, 聚合多个抗性基因, 是培育具有持久抗性和综合抗性品种的有效策略。

番茄中至少有 12 个抗病基因已被分离鉴定, 其中抗 TMV 基因有 *Tm-1*、*Tm-2*、*Tm-2<sup>a</sup>* (Ohmori et al., 1995; Motoyoshi et al., 1996; Sobir et al., 2000); 抗枯萎病基因有 *I-1*、*I-2*、*I-3* (Sarfatti et al., 1991); 抗根结线虫基因有 *Mi-3*、*Mi-5*、*Mi-9* (Klein-Lankhorst et al., 1991; Xu et al., 2001);

收稿日期: 2010-05-25; 修回日期: 2010-08-02

基金项目: 国家“863”计划项目 (2007AA10Z178); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD01A7); 国家公益性行业科技计划项目 (nylyzx7-007); 现代农业产业技术体系建设专项 (Nycytx-35-gw02)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hxli@mail.hzau.edu.cn)

抗叶霉病基因有 *Cf-2*、*Cf-4*、*Cf-5*、*Cf-9* ( Jones et al. , 1994 ; Thomas et al. , 1995 )。这些抗病基因的分选鉴定为利用分子标记辅助育种奠定了基础。利用本实验室通过收集 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2*、*Mi-1*、*Cf-9* 的基因序列信息，寻找 SNP 位点，按 AS-PCR 原理设计的基因特异 PCR 引物，进行抗病基因扩增，辅助番茄各分离世代自交系的选择 ( 孙亚林，2008 )，这些标记具有基因功能标记特点，使用简单快捷，检测过程中无需酶切，准确度高，适合大批量植物分离材料的抗病分子检测。

本研究中利用创建的 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2*、*Mi-1* 和 *Cf-9* 基因标记，对含有这些抗病基因的番茄一代杂种的自交分离群体，进行单株抗病性鉴定和多抗性选择，获得了聚合 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2*、*Mi-1* 和 *Cf-9* 等 4 个抗病基因的自交系。这为番茄一代杂种多抗品种的培育创造了种质材料，同时也为番茄分子标记辅助其他性状的选育提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 番茄材料和接种菌株

作为抗性聚合材料的番茄 Longkeeper (  $F_2$  ) 是从国外引进的，含有 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2* 和 *Mi-1* 抗性基因；‘佳粉 15’ 为市售番茄品种，含有 *Cf-9* 抗性基因。A53 为本实验室早期选育的自交系，分子检测表明该自交系不含有上述 4 种抗性基因，作为接种鉴定的对照材料。苗期接种鉴定所用的烟草花叶病毒由东北农业大学李景富教授提供；枯萎病病菌、根结线虫和叶霉病菌由华中农业大学番茄研究室分离保存。

### 1.2 DNA 提取与分子标记检测

番茄 DNA 的提取参照 CTAB 法 ( Roger & Bendich , 1988 )，用于检测 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2*、*Mi-1* 和 *Cf-9* 基因标记为本实验室设计，见表 1。PCR 扩增的方法参见孙亚林 ( 2008 ) 的方法。反应体系为 20  $\mu$ L，包括 ddH<sub>2</sub>O 15.9  $\mu$ L，10  $\times$  PCR Buffer 2.0  $\mu$ L，dNTPs 0.5  $\mu$ L，Primer1 0.5  $\mu$ L，Primer2 0.5  $\mu$ L，*Taq* DNA 聚合酶 0.1  $\mu$ L，模板 DNA 0.5  $\mu$ L。PCR 热循环程序：94 变性 5 min；然后 94 1 min；58 1 min；72 80 s，进行 32 个循环；最后 72 延伸 8 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测，用凝胶图像分析系统 GDS2 7600 ( UVP ) 照相保存。

表 1 用于分子标记辅助选择的引物序列

Table 1 Primer sequences of 4 disease resistance genes used for marker-assisted selection

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
<i>Tm-2<sup>a</sup></i>	A1 : 5'-GCCTCATTCAACTTCCTTCTGG-3'
	A2 : 5'-GCCAGTATATAACGGTCTAAAC-3'
<i>I-2</i>	B1 : 5'-CCATCTCTCAAGGAAGTGC-3'
	B2 : 5'-GTAGTGGTGTGAGCAATGGGCA-3'
<i>Mi-1</i>	C1 : 5'-TTCTTAGCTAAACTTCAGCC-3'
	C2 : 5'-TTTTTCGTTTTTCCATGATTCTAC-3'
<i>Cf-9</i>	D1 : 5'-GTTCTTAICTTTAACACCCA-3'
	D2 : 5'-TCCCTCCAAATTACTTCC-3'

### 1.3 聚合基因的过程

2005 秋季将番茄 Longkeeper (  $F_2$  ) 定植于华中农业大学蔬菜基地，在幼苗期用 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2* 和

*Mi-1* 等 3 个分子标记检测 72 个单株, 得到同时含 3 种抗性单株 6 株。再分别以这 6 个单株作母本, 与含有 *Cf-9* 基因的‘佳粉 15’杂交, 获得杂交种子。在其后的自交群体中, 用 4 种抗病分子标记检测各分离世代的各个单株, 选择具有 4 抗的单株个体自交留种。连续自交选择 6 代后, 含 4 抗番茄株系材料的抗性不再有分离, 即可作为自交系利用。2009 年 1—6 月对选育出的含有 4 种抗病基因的自交系进行室内苗期抗性接种验证。

#### 1.4 苗期接种鉴定

TMV 病毒接种鉴定: 苗期摩擦法接种参考许向阳等 (2002a) 的方法。当植株 2~3 片真叶时, 选取大小一致的植株接种, 每株接种 2 片小叶, 3 周后记录发病情况, 设 3 次重复, 每次重复 30 株 (对照品种: A53)。TMV 群体抗性分类标准 (许向阳等, 2002a): 病情指数 = 0 为免疫;  $0 < \text{病情指数} < 2$  为高抗 (HR);  $2 < \text{病情指数} < 15$  为抗病 (R);  $15 < \text{病情指数} < 30$  为耐病 (MR); 病情指数  $> 30$  为感病 (S)。

枯萎病菌接种鉴定: 番茄枯萎病灌根法接种参考许向阳等 (2002a) 的方法。当植株 2~3 片真叶时, 选取大小一致的幼苗, 每株灌根菌液 10 mL, 菌液孢子浓度为  $10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 3 周后记录发病情况。设 3 次重复, 每次重复 30 株 (对照: 番茄品种 A53)。I-2 群体抗病性划分标准 (许向阳等, 2002a): 病情指数 = 0 为免疫;  $0 < \text{病情指数} < 10$  为高抗 (HR);  $10 < \text{病情指数} < 30$  为抗病 (R); 病情指数  $> 30$  为感病 (S)。

根结线虫接种鉴定: 参照前人的方法 (许向阳等, 2002b; 张绍松等, 2008), 在接种前 5 d, 用营养液 (贝曼漏斗法) 无土培养繁殖南方根结线虫至二龄幼虫。根结线虫的接种采用灌根法。当植株 2~3 片真叶时, 选取大小一致的幼苗, 每株接种 5 000 条。设 3 次重复, 每次重复 30 株 (对照: 番茄品种 A53)。2 个月后将植株连根拔起, 用自来水洗净后使用 0.05% 的曙红对根结线虫卵块进行染色, 以根上是否存在卵块 (蓝色) 和卵块的数量作抗性评价。根结线虫抗性分级标准 (许向阳等, 2002b):  $0 < \text{病情指数 (卵块数)} < 25$  为抗病 (R); 病情指数 (卵块数)  $> 25$  为感病 (S)。

叶霉病接种鉴定: 采用喷雾法接种番茄叶霉病菌 (许向阳等, 2002a)。当植株 2~3 片真叶时, 选取大小一致幼苗, 在植株真叶背面喷雾接种, 菌液孢子浓度为  $10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 3 周后调查发病情况。设 3 次重复, 每次重复 30 株 (对照: 番茄品种 A53)。叶霉病群体抗病分级标准 (许向阳等, 2002a): 病情指数 = 0 为免疫;  $0 < \text{病情指数} < 5$  为高抗;  $5 < \text{病情指数} < 15$  为抗病 (R);  $15 < \text{病情指数} < 30$  为耐病 (MR); 病情指数  $> 30$  为感病 (S)。

#### 1.5 主要农艺性状数据调查

对分子标记辅助选择获得的 4 个自交系 L11、L19、L46 和 L51 与‘佳粉 15’进行田间比较, 观察农艺性状。栽培管理同常规。单果质量为 10 个果实的平均值, 坐果率为 12 株的平均值, 单株产量为 6 株的平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 分子标记鉴定抗性基因

在杂交后自交分离  $F_2$  群体过程中, 利用本实验室创建的 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2*、*Mi-1* 和 *Cf-9* 的标记选择含抗病基因的单株。在检测抗病植株的 PCR 产物时发现, 含有 *Tm-2<sup>a</sup>* 基因的材料能扩增出 472 bp 的片段, 而不含 *Tm-2<sup>a</sup>* 基因的材料则无扩增带, 如图 1 所示, 检测的 20 株  $F_3$  代分离群体中, 有 8 株含有 *Tm-2<sup>a</sup>* 基因, 而另外 5 株则无。

含 *I-2* 基因的材料能扩增出大约 500 bp 的片段，不含 *I-2* 基因的材料能扩增出大约 700 bp 的片段，如图 2 所示，在 PCR 检测的 15 株  $F_3$  代分离群体中，有 8 株含有 *I-2* 基因，而另外 7 株则无。

在含 *Mi-1* 基因的材料中能扩增出大约 556 bp 和 1 353 bp 的片段，而不含 *Mi-1* 基因的材料中只能扩增出大约 1 287 bp 的片段，如图 3 所示，PCR 检测的 13 株  $F_3$  代分离群体中，8 株含有 *Mi-1* 基因，而另外 5 株则无。

含 *Cf-9* 基因的材料能扩增出大约 514 bp 的片段，不含 *Cf-9* 基因的材料则无扩增带，如图 4 所示，在检测到的 14 株  $F_3$  中，9 株含有 *Cf-9* 基因，另外 5 株则无。

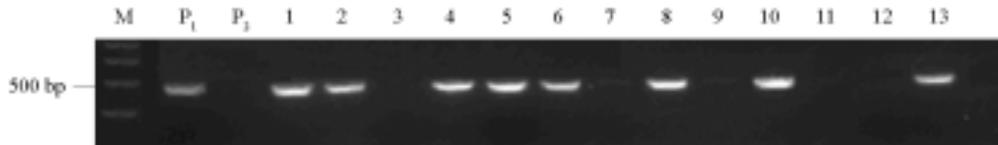


图 1 PCR 检测番茄  $F_3$  代分离群体的 *Tm-2<sup>a</sup>* 基因

M : Marker ;  $P_1$  : 阳性对照 ;  $P_2$  : 阴性对照 ; 1、2、4、5、6、8、10、13 : 含有 *Tm-2<sup>a</sup>* 抗病基因的植株 ;  
3、7、9、11、12 : 不含 *Tm-2<sup>a</sup>* 抗病基因的植株。

Fig. 1 PCR detection of *Tm-2<sup>a</sup>* of the  $F_3$  generations of tomato

M : Marker ;  $P_1$  : Positive control ;  $P_2$  : Negative control ; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10 and 13 : Plants containing *Tm-2<sup>a</sup>* gene ;  
3, 7, 9, 11 and 12 : Plants without *Tm-2<sup>a</sup>* gene.

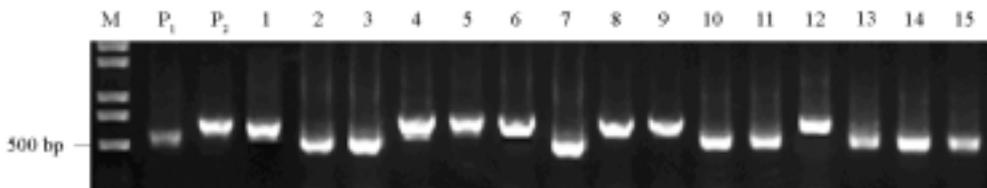


图 2 PCR 检测  $F_3$  代分离群体的 *I-2* 基因

M : Marker ;  $P_1$  : 阳性对照 ;  $P_2$  : 阴性对照 ; 2、3、7、10、11、13、14、15 : 含有 *I-2* 抗病基因的植株 ;  
1、4、5、6、8、9、12 : 不含 *I-2* 抗病基因的植株。

Fig. 2 PCR detection of *I-2* of the  $F_3$  generations

M : Marker ;  $P_1$  : Positive control ;  $P_2$  : Negative control ; 2, 3, 7, 10, 11, 13, 14 and 15 : Plants containing *I-2* gene ;  
1, 4, 5, 6, 8, 9 and 12 : Plants without *I-2* gene.

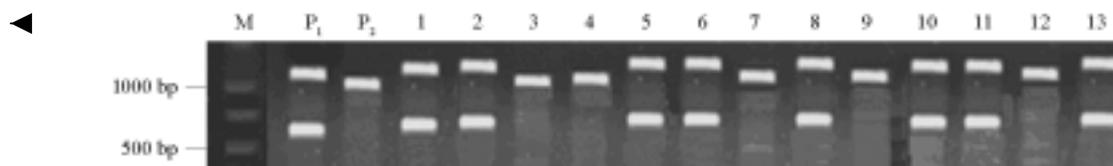


图 3 PCR 检测  $F_3$  代分离群体的 *Mi-1* 基因

M : Marker ;  $P_1$  : 阳性对照 ;  $P_2$  : 阴性对照 ; 1、2、5、6、8、10、11、13 : 含有 *Mi-1* 基因植株 ;  
3、4、7、9、12 : 不含 *Mi-1* 基因植株。

Fig. 3 PCR detection of *Mi-1* of the  $F_3$  generations

M : Marker ;  $P_1$  : Positive control ;  $P_2$  : Negative control ; 1, 2, 5, 6, 8, 10, 11 and 13 : Plants containing *Mi-1* gene ;  
3, 4, 7, 9 and 12 : Plants without *Mi-1* gene.

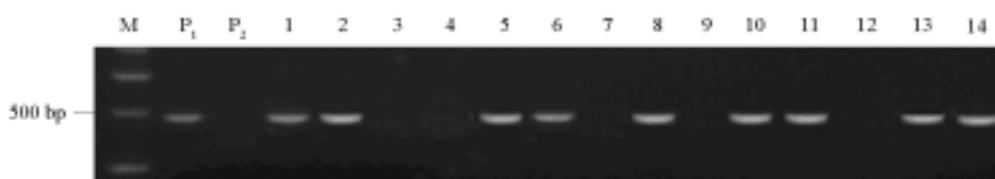


图 4 PCR 检测 F<sub>3</sub> 代分离群体的 *Cf-9* 基因

M : Marker ; P<sub>1</sub> : 阳性对照 ; P<sub>2</sub> : 阴性对照 ; 1、2、5、6、8、10、11、13、14 : 含有 *Cf-9* 基因植株 ;  
3、4、7、9、12 : 不含 *Cf-9* 基因植株。

Fig. 4 PCR detection of *Cf-9* of the F<sub>3</sub> generations

M : Marker ; P<sub>1</sub> : Positive control ; P<sub>2</sub> : Negative control ; 1, 2, 5, 6, 8, 10, 11, 13 and 14 : Plants containing *Cf-9* gene ;  
3, 4, 7, 9 and 12 : Plants without *Cf-9* gene.

## 2.2 纯合 4 抗自交系分子标记检测

在 L11 (F<sub>6</sub>) 的 202 个植株中随机抽取 5 株进行 4 个基因的分子标记检测, 如图 5 所示。检测结果表明 5 个植株均含有 4 个抗性基因。

在自交后代的筛选过程中, 在 F<sub>5</sub>~F<sub>7</sub> 代, 经过分子标记检测, 得到在 3 代自交过程中抗性没有分离的 4 个抗性自交系, L11、L19、L46、L51。

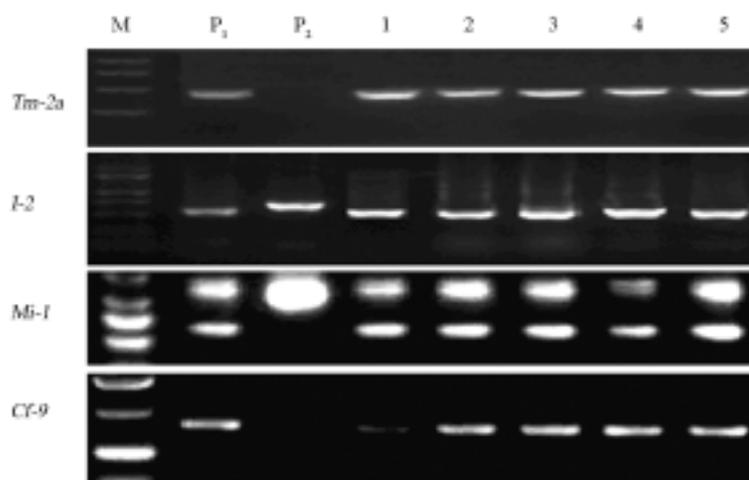


图 5 4 个标记基因对 F<sub>6</sub> 单株的 PCR 检测

M : Marker ; P<sub>1</sub> : 阳性对照, P<sub>2</sub> : 阴性对照 ; 1、2、3、4、5 : 含有 4 个抗病基因的单株。

Fig. 5 PCR detection of four pairs of gene marker for F<sub>6</sub> individuals

M : Marker ; P<sub>1</sub> : Positive control ; P<sub>2</sub> : Negative control ;  
1, 2, 3, 4 and 5 : Plants containing four genes.

## 2.3 番茄纯合 4 抗自交系苗期抗病鉴定

2009 年对经过基因标记选择, 聚合有 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2*、*Mi-1* 和 *Cf-9* 基因的 F<sub>7</sub> 代自交系进行室内苗期接种鉴定, 结果见表 2。通过室内苗期接种烟草花叶病毒 (TMV) 可知, ‘佳粉 15’ 的病情指数最高为 52.36, 表现为感病, L19 的病情指数为 1.32, 为高抗, 其余 3 个纯合株系的病情指数都在 11.71 以下, 属抗性水平; 在枯萎病的接种试验中, ‘佳粉 15’ 感病, 4 个纯合株系的病情指数都在 22.87 以下, 属抗性水平; 根结线虫的接种结果表明, 4 个纯合株系均表现出抗性水平以上。在接种叶霉病的试验中, L19、L46、L51 和抗性亲本 ‘佳粉 15’ 一样表现出高抗水平, 只有 L11 的病情指数为 5.36, 在高抗以下, 但达到了抗性水平。

表 2 自交系苗期室内接种鉴定结果

Table 2 Identification of four inbred lines and parents for their disease resistances through inoculation at tomato seedling stage

株系 Line	烟草花叶病毒 TMV	枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	南方根结线虫 <i>M. incognita</i>	叶霉病菌 <i>C. fulvum</i>
L11	R ( 11.71 )	R ( 12.19 )	R ( 14.30 )	R ( 5.36 )
L19	HR ( 1.32 )	R ( 17.01 )	R ( 5.42 )	HR ( 1.70 )
L46	R ( 8.60 )	R ( 13.66 )	R ( 15.56 )	HR ( 2.70 )
L51	R ( 9.96 )	R ( 22.87 )	R ( 10.77 )	HR ( 1.42 )
佳粉 15 Jiafen 15	S ( 52.36 )	S ( 61.68 )	S ( 56.32 )	HR ( 2.12 )

注：HR：高抗；R：抗病；S：感病；括号内为病情指数。

Note：HR：High resistance；R：Resistance；S：Susceptible；Disease index are in brackets.

## 2.4 番茄 4 抗自交系的农艺性状

将获得含有 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2*、*Mi-1* 和 *Cf-9* 基因的 4 个纯合抗病 F<sub>7</sub> 代株系，以及两亲本的单果质量、坐果率和单株产量进行了田间观察和比较，所得结果用 SAS 软件进行方差分析，结果见表 3。由表 3 可以看出，通过杂交和自交改良后得到的抗性株系聚合了双亲的优良性状，在单株产量方面与‘佳粉 15’并无显著差异，株系 L11 在坐果率方面高于‘佳粉 15’，单株产量达到 1.88 kg 接近佳粉 15，并且含有 4 个抗病基因，这说明 L11 株系综合性状要优于‘佳粉 15’。

表 3 抗性自交系及‘佳粉 15’的农艺性状比较

Table 3 Comparison of agronomic traits between resistant lines and ‘Jiafen 15’

株系 Inbred lines	单果质量/g Single fruit mass	坐果率/% Fruit setting rate	单株产量/kg Yield per plant
L11	199.22 ab	54.30 a	1.85 A
L19	190.36 ab	53.58 a	1.78 AB
L46	186.25 b	52.66 ab	1.68 AB
L51	184.38 b	50.28 ab	1.65 AB
佳粉 15 Jiafen15	213.62 a	54.12 a	1.89 A

## 3 讨论

本试验经过两个杂交一代亲本的 1 次杂交和 6 代自交，结合抗性分子标记选择，获得了同时含有 *Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2*、*Mi-1*、*Cf-9* 基因的 4 个纯合抗病株系 L11、L19、L46 和 L51，与传统育种方法相比较，减少了选择的盲目性，提高了育种效率。而用传统的育种方法要达到将多个抗性基因累加在一起是相当困难的，不仅费时费工，而且很难对多个抗性进行检测和鉴定。为了验证分子标记的准确性，在选择的最末世代，进行接种鉴定确定抗病株系是必要的。在育种中可以利用的分子标记较多，本研究中利用的是抗病基因功能标记，在对分离群体中含目标基因的单株进行选择，不存在抗病基因与抗病标记的分离和重组交换情况。因此，本实验室开发的这套分子标记简单、稳定、可靠。这套功能 PCR 标记克服了 SSR 标记多态性低、RAPD 标记不能确定差异位点的缺点，适于大规模辅助选择育种。翟文学和朱立煌（1999）认为利用分子标记等技术和方法聚合多个抗性基因，是培育具有持久抗性和综合抗性品种的有效策略。倪大虎等（2007）认为利用分子标记辅助育种聚合不同类型的抗性基因可以独立表达。本试验再次证实了辅助聚合不同类型的抗性基因的有效性，所获得的自交系中，*Tm-2<sup>a</sup>*、*I-2*、*Mi-1*、*Cf-9* 的抗病性均能独立表达，抗性和亲本相当。为提高分子标记

的经济、有效性,作者拟进一步丰富抗病基因分子标记,同时完善多重标记系统,使1次PCR反应可同时鉴定某一单株的多个抗病基因。

本试验中得到的L11、L19、L46、L51自交系对烟草花叶病毒、枯萎病、根结线虫、叶霉病均表现出抗性,但其对不同生理小种抗性的水平和持久性还有待进一步研究。在利用分子标记辅助聚合抗病基因过程中,在选择抗病植株的同时还要兼顾其他性状,例如果形、果实质量、品质等,这样就可以得到不但抗病而且其它性状也优良的自交系,为番茄优势育种创造好的材料。

## References

- Jones D A, Thomas C M, Hammond-Kosack K E, Balint-Kurti P J, Jones J D G. 1994. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, 266 : 789 – 793.
- Klein-Lankhorst R M, Vermunt A, Weide R, Liharska T, Zabel P. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor Appl Genet*, 83 : 108 – 114.
- Motoyoshi F, Ohmori T, Murata M. 1996. Molecular characterization of heterochromatic regions around the *Tm-2* locus in chromosome 9 of tomato. *Symp Soc Exp Biol*, 50 : 65 – 70.
- Ni Da-hu, Yi Cheng-xin, Yang Jian-bo, Wang Xiu-feng, Zhang Yi, Zhang Qi, Wang Chun-lian, Zhao Kai-jun, Wang Wen-xiang, Li Li. 2007. Pyramiding *Pi9* (*t*) and *Xa23* genes by molecular marker-assisted selection. *Mol Plant Breeding*, 5 (4) : 491 – 496. (in Chinese)
- 倪大虎, 易成新, 杨剑波, 汪秀峰, 张毅, 章琦, 王春连, 赵开军, 王文相, 李莉. 2007. 利用分子标记辅助选择聚合 *Pi9* (*t*) 和 *Xa23* 基因. *分子遗传育种*, 5 (4) : 491 – 496.
- Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F. 1995. Identification of RAPD markers linked to the ToMV resistance genes *Tm-2* and *Tm-2<sup>a</sup>* in tomato locus in tomato. *Theor Appl Genet*, 90 : 307 – 311.
- Roger S D, Bendich A J. 1988. Extraction of DNA from plant tissue. *Plant Mol Biol*, A6 : 1 – 10.
- Sarfatti M, Abu Abied M, Katan J, Zamir D. 1991. RFLP mapping of I-1 a new locus in tomato conferring resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1. *Theor Appl Genet*, 82 : 22 – 26.
- Sobir, Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F. 2000. Molecular characterization of the SCAR markers tightly linked to the *Tm-2* locus of the genus *Lycopersicon*. *Theor Appl Genet*, 101 : 64 – 69.
- Sun Ya-lin. 2008. Development of gene marker for four resistance gene and gene assisted selection in tomato [M. D. Dissertation]. Wuhan : Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 孙亚林. 2008. 番茄四个抗病基因的基因标记的创建与辅助选择[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Thomas C M, Vos P, Jones D A, Norcott K A, Chadwick B P, Jones J D. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Plant J*, 8 : 785 – 794.
- Xu J, Narabu T, Mizukubo T, Hibi T. 2001. A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Phytopathology*, 91 : 377 – 382.
- Xu Xiang-yang, Li Jing-fu, Sun Qing-fang. 2002a. Tobacco mosaic virus disease, fusarium wilt and leaf mold seedling inoculation multi-resistance. *Northern Horticulture*, (3) : 38 – 40. (in Chinese)
- 许向阳, 李景富, 孙清芳. 2002a. 番茄 TMV、叶霉病、枯萎病苗期多抗性鉴定方法研究. *北方园艺*, (3) : 38 – 40.
- Xu Xiang-yang, Li Jing-fu, Zhang Yu, Li Gui-ying. 2002b. Study on the method of identification for multiple disease resistance in tomato seedling on TMV leaf mould and root knot nematode. *Journal of Northeast Agricultural University*, 33 (1) : 34 – 38. (in Chinese)
- 许向阳, 李景富, 张玉, 李桂英. 2002b. 番茄 TMV、叶霉病和根结线虫苗期多抗性鉴定方法的研究. *东北农业大学学报*, 33 (1) : 34 – 38.
- Zhai Wen-xue, Zhu Li-huang. 1999. Rice bacterial blight resistance genes and their utilization in molecular breeding. *Progress in Biotechnology*, 19 (6) : 9 – 15. (in Chinese)
- 翟文学, 朱立煌. 1999. 水稻白叶枯病抗性基因的研究与分子育种. *生物工程进展*, 19 (6) : 9 – 15.
- Zhang Shao-song, Li Cheng-yun, Zhou Xiao-gang, Ding Yu-mei, Sun Mao-lin. 2008. Study on the method of separating root-knot nematodes and inoculating to tomato seedlings. *Southwest Journal of Agricultural Science*, 21 (3) : 659 – 663. (in Chinese)
- 张绍松, 李成云, 周晓罡, 丁玉梅, 孙茂林. 2008. 番茄根结线虫分离和苗期接种方法研究. *西南农业学报*, 21 (3) : 659 – 663.