

# 利用抑制差减杂交技术分离茄子单性结实相关 ESTs

周亚君<sup>1</sup>, 陈钰辉<sup>1</sup>, 刘富中<sup>1,\*</sup>, 张 映<sup>1,2</sup>, 连 勇<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

**摘 要:** 以茄子 (*Solanum melongena*) 单性结实品系 D-10 和非单性结实品系 03-2 的子房 cDNA 分别为试验组 (Tester) 和驱动组 (Driver), 利用抑制差减杂交 (SSH) 技术构建了正反两个 SSH-cDNA 文库, 分别包含 472 和 124 个克隆。通过测序、序列拼接后, 共获得 384 个 Unique ESTs。将其与非冗余蛋白数据库进行 BLASTx 比对, 在 E 值小于等于  $1e-10$  条件下, 有 257 个 ESTs 能找到相匹配的蛋白质, 其中 121 个 ESTs 与非冗余蛋白质数据库中已知功能的蛋白质具有高度的相似性。功能注释结果表明, 其生物过程、分子功能和细胞组分的 EST 分别为 107、102 和 119 条。推测与单性结实相关的 EST 有 5 条: 2 条 ESTs 属于 MADS-box 转录因子家族, 1 条与生长素增长蛋白同源, 1 条属于 P450 还原酶系, 1 条属于 MAPKK 家族; 另外 136 个 ESTs 代表了未知功能基因。

**关键词:** 茄子; 单性结实; 抑制差减杂交

**中图分类号:** S 641.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 12-1944-09

## Isolation of Parthenocarpy Related ESTs in Parthenocarpic Eggplant Using Suppression Subtraction Hybridization (SSH)

ZHOU Ya-jun<sup>1</sup>, CHEN Yu-hui<sup>1</sup>, LIU Fu-zhong<sup>1,\*</sup>, ZHANG Ying<sup>1,2</sup>, and LIAN Yong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Vegetables & Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** A forward and a reverse suppression subtraction hybridization (SSH) cDNA library with 472 and 124 positive clones were constructed respectively with cDNA from eggplant (*Solanum melongena*) parthenocarpic line D-10 ovary as the tester and cDNA from un-parthenocarpic line 03-2 ovary as the driver. After removing repeat and redundancy sequences, 384 expressed sequence tags (ESTs) were obtained. Protein homology search in non-redundant protein database revealed that, under E-value less than or equal to  $1e-10$ , 121 ESTs were highly homologous with known proteins, and 136 ESTs could be new genes. The results of gene ontology showed that 107, 102, 119 ESTs were involved in biological process, molecular function and cell component respectively. Five parthenocarpic related ESTs were obtained, including two MADS-box family, one auxin growth promoter protein, one cytochrome P450 NADPH-reductase and one MAPKK family.

**收稿日期:** 2010-03-01; **修回日期:** 2010-11-01

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (30771475); 国家 '863' 计划项目 (2006AA10Z1A6); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD13B06-3); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2060302-2-10); 农业部园艺作物遗传改良重点开放实验室项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lfzcaas@126.com)

**Key words:** eggplant; parthenocarpy; suppression subtraction hybridization

茄子单性结实性能克服低温引起的落花落果障碍, 坐果能力增强, 产量显著提高, 同时还可改进果实品质, 降低栽培成本。因此, 弄清茄子单性结实的机理, 对指导单性结实品种的育种工作, 选育耐低温、适宜保护地和露地早春栽培、优质无籽或少籽的茄子品种, 具有重要的意义。国内外学者研究认为茄子单性结实性是由隐性基因控制 (Restaino et al., 1998; 田时炳 等, 2003)。笔者发现了在低温下可自然结果, 形成无籽果实的圆茄单性结实材料, 选育出了单性结实性状稳定的可利用的株系 D-10 等。

在自然低温下的表达效应研究表明, 所获得的茄子单性结实材料的单性结实性表现主要受温度的影响, 属温度敏感型, 在低温下表达, 诱导单性结实基因表达的温度在 7 ~ 15℃ 之间, 在此温度范围内, 其单性结实率为 100%, 坐果率为 76.9% ~ 100%, 果实发育正常 (刘富中 等, 2005; 张映等, 2009)。经过遗传规律研究, 证明茄子单性结实材料 D-10 的单性结实性由单显性基因控制, 并获得 1 个与茄子单性结实基因紧密连锁的 AFLP 标记 E75/M53-70 (刘富中 等, 2008)。

抑制差减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH) 是一种比较和分离不同细胞系、不同组织或同一细胞系、同一组织在不同条件下差别表达基因的方法, 具有速度快、效率高、敏感度高、假阳性率低等优点 (Diatachenko et al., 1996), 已成功应用于分离植物发育过程中不同发育阶段和不同组织器官中的组织特异性表达的基因, 以及分离各种生物、非生物胁迫条件下诱导表达的相关基因 (黄鑫 等, 2006; 茆振川 等, 2007; 谢吉容 等, 2007; 张玉刚 等, 2007; 樊晶 等, 2008; 王继刚 等, 2008; 郭爽 等, 2009)。

本研究旨在利用抑制性差减杂交技术 (SSH) 构建茄子单性结实相关基因的 cDNA 文库, 分离获得与茄子单性结实基因相关的 cDNA 片段, 通过基因功能注释与分类分析, 初步了解茄子单性结实表达涉及的基因种类、功能和数量, 为单性结实基因功能鉴定及进一步深入研究茄子单性结实基因的表达和调控机制奠定理论基础和提供基因材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

茄子单性结实自交系 D-10 是由耐寒性强的圆茄单性结实株经自交选育而成, 株高 60 cm, 半直立, 开展度 50 ~ 60 cm, 首花节位着生于主茎第 6 ~ 7 节, 果实扁圆, 果皮黑紫色, 有光泽, 商品果纵径 8 cm, 横径 10 cm, 单果质量 250 ~ 400 g。早熟, 低温下坐果能力强, 在开花结果期间日最低温度在 7 ~ 17℃ 之间变化时, 表现单性结实, 果实正常生长发育。当温度适宜后, 植株上部果实内产生种子。

03-2 是从圆茄地方品种中经多代单株系统选育出的非单性结实自交系, 在开花结果期间日最低温度在 7 ~ 17℃ 之间变化时果实不能正常膨大 (刘富中 等, 2005)。

2008 年春季在中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验地内露地种植试验材料, 开花结果期间日最低温度在 9 ~ 17℃ 之间变化, 单性结实特性完全表达。取开花当天的门茄子房, 用液氮迅速处理, 置于 -80℃ 冰箱中保存备用。

### 1.2 总 RNA 的提取

分别取单性结实和非单性结实材料开花当天的门茄子房, 液氮充分研磨, 按照植物 RNAout 提

取试剂盒（北京恩泽公司）操作方法提取总 RNA。用 1.0% 变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性，利用紫外分光光度计法测定其浓度和纯度。

### 1.3 茄子的抑制差减杂交及差减 cDNA 文库的构建

抑制差减杂交具体操作按照 Clontech 公司的差减杂交试剂盒 PCR-select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit 说明书进行。正向抑制差减杂交以单性结实材料 D-10 开花当天的门茄子房 cDNA 作为试验组（Tester），非单性结实材料 03-2 开花当天的门茄子房 cDNA 作为驱动组（Driver）。反向抑制差减杂交以非单性结实材料 03-2 为试验组（tester），单性结实材料 D-10 为驱动组（driver）。

以 500 ng 总 RNA 为起始量，经 Super smart<sup>TM</sup> cDNA synthesis kit（Clontech 公司）合成双链 cDNA 后，再经 *Rsa* I 酶切消化、接头连接、正反两次差减杂交和两次 PCR 完成整个抑制差减杂交过程。

将差减后的第 2 次 PCR 产物纯化后，与 pGEM-T Easy 载体（Promega）连接，利用热激法将连接产物转化大肠杆菌菌株 JM109（Promega 公司），涂于含有 Amp/X-gal/IPTG 的 LB 培养基上，37 °C 过夜培养；经蓝白斑筛选，挑取所有阳性克隆到含有 Amp 抗性 LB 液体培养基中，37 °C 震荡过夜培养。

### 1.4 插入片段的 PCR 鉴定及序列分析

取 2 μL 菌液为模板，以 T7 和 SP6 通用引物进行 PCR 扩增，鉴定差减 cDNA 片段的大小。将所有阳性克隆送交北京金唯智技术服务有限公司进行测序，去除低质量序列和载体序列并对所获得的高质量 EST 序列进行拼接，得到的非冗余 ESTs（Unique ESTs）与非冗余蛋白质数据库（non-redundant protein database）进行 BLASTx 比对，然后进一步通过 Gene Ontology（GO）进行功能分类。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 质量和双链 cDNA 纯化结果

本试验获得了高质量的总 RNA（图 1）。经 1.0% 甲醛琼脂糖变性电泳，茄子门茄子房总 RNA 集中在 28S 和 18S rRNA 区域，且两者的条带亮度比值接近 2:1，说明总 RNA 的完整性较好；经紫外分光光度计检测， $A_{260/280}$  位于 1.8~2.1 之间，说明总 RNA 纯度比较高，符合建库要求。

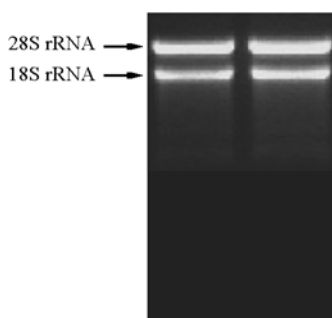


图 1 总 RNA 电泳检测结果

Fig. 1 Electrophoresis analysis of total RNA

以 500 ng 总 RNA 为起始量，经 Super smart<sup>TM</sup> cDNA synthesis kit（Clontech 公司）合成双链 cDNA，然后进行纯化。纯化后条带亮度比纯化前弱，且条带轻微上移，说明纯化效率较高，可以进行后续试验（图 2）。

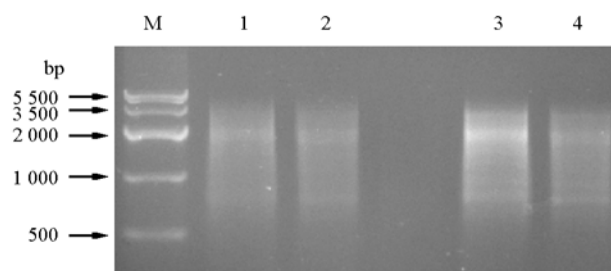


图 2 cDNA 纯化前后的电泳检测结果

M: Marker IV; 1: 非单性结实茄子纯化前的双链 cDNA; 2: 非单性结实茄子纯化后的双链 cDNA;  
3: 单性结实茄子纯化前的双链 cDNA; 4: 单性结实茄子纯化后的双链 cDNA。

Fig. 2 Electrophoresis analysis of ds cDNA before and after purification

M: Marker IV; 1: Unpurified ds cDNA from non-parthenocarpic eggplant ovary; 2: Purified ds cDNA from non-parthenocarpic eggplant ovary; 3: Unpurified ds cDNA from parthenocarpic eggplant ovary;  
4: Purified ds cDNA from parthenocarpic eggplant ovary.

## 2.2 茄子 SSH 文库的评价

差减效率高决定了 SSH 是否成功, 通过比较对照差减、正向差减和反向差减前后已知 cDNA 的丰度来评价差减效率。

在人类骨骼肌 cDNA (含 0.2%  $\Phi$ X174/*Hae*III 消化的 DNA) 的对照差减杂交结果中, 差减前后产物的带型有明显差别, 而且差减后的产物带型与试剂盒中提供的 PCR control-subtracted cDNA 的相同, 由此说明对照差减杂交是成功的 (图 3)。

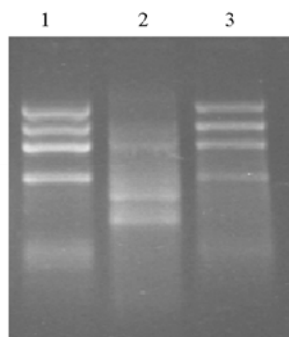


图 3 对照差减效率的检测

1: 人类骨骼肌 cDNA 差减后的第 2 次 PCR 产物; 2: 人类骨骼肌 cDNA 未差减的第 2 次 PCR 产物;  
3: 差减的对照 cDNA。

Fig. 3 Detection of control subtraction efficiency

1: Secondary PCR products of subtracted control skeletal muscle tester cDNA; 2: Secondary PCR products of unsubtracted control skeletal muscle tester cDNA; 3: PCR control-subtracted cDNA.

利用茄子看家基因  $\beta$ -actin 的一对特异引物对差减和未差减产物进行 PCR 扩增, 以差减前后看家基因  $\beta$ -actin 达到同一亮度时循环数的差异作为衡量正向和反向差减效率高低的标。如图 4 所示, 正向未差减的样品在 28 个循环出现, 正向差减后的样品在 33 个循环出现很弱的扩增条带, 差减样品出现的循环数迟于未差减样品出现的循环数, 即差减杂交后看家基因  $\beta$ -actin 的丰度降低, 说明正向差减是有效的, 反向差减也是有效的 (图 5)。

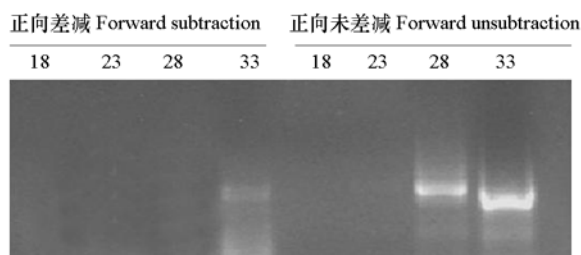


图 4 正向差减效率的检测

正向差减: 以正向差减产物为模板扩增 18、23、28 和 33 个循环的 PCR 产物;

正向未差减: 以正向未差减产物为模板扩增 18、23、28 和 33 个循环的 PCR 产物。

Fig. 4 Test of forward subtraction efficiency

Forward subtraction: PCR products of the forward subtracted secondary PCR product after 18, 23, 28 and 33 cycles;

Forward unsubtraction: PCR products of the forward unsubtracted secondary PCR product after 18, 23, 28 and 33 cycles.

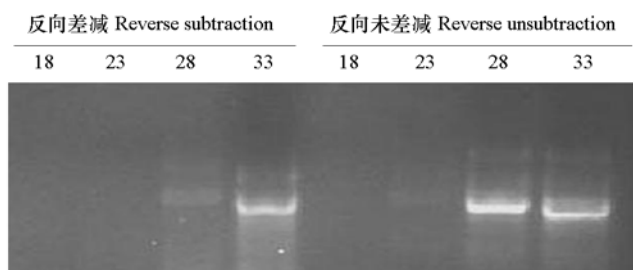


图 5 反向差减效率的检测

反向差减: 以反向差减产物为模板扩增 18、23、28 和 33 个循环的 PCR 产物;

反向未差减: 以反向未差减产物为模板扩增 18、23、28 和 33 个循环的 PCR 产物。

Fig. 5 Test of reward subtraction efficiency

Reverse subtraction: PCR products of the reverse subtracted secondary PCR product after 18, 23, 28 and 33 cycles;

Reverse unsubtraction: PCR products of the reverse unsubtracted secondary PCR product after 18, 23, 28 and 33 cycles.

### 2.3 差减 cDNA 文库的构建和插入片段的 PCR 鉴定

第 2 次 PCR 产物经纯化后, 克隆到 pGEM-T Easy 载体中 (Promega 公司), 构建茄子单性结实 SSH 文库。随机取菌液为模板, 以 T7 和 SP6 通用引物进行菌液 PCR, 2%琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小, 电泳结果显示插入片段主要分布在 250~2 000 bp 之间, 呈随机分布, 平均大小 750 bp 左右, 其中一部分克隆的 PCR 电泳结果如图 6 所示。

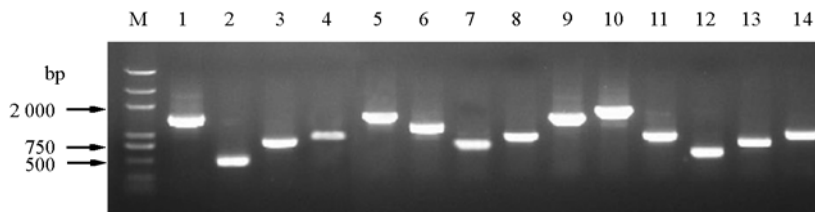


图 6 差减文库中部分克隆的 PCR 检测

M: Trans 2K plus marker; 1~14: 随机挑选的克隆。

Fig. 6 PCR identification of inserted fragments in subtractive cDNA library

M: Trans 2K plus marker; 1~14: 14 clones selected randomly.

## 2.4 EST 序列分析

从正、反 SSH 文库中获得的 596 个阳性克隆进行测序后, 共得到 534 个高质量 ESTs。经过 Phrap 软件去载体、序列拼接后, 共得到 384 个 Unique ESTs, 其中 323 个 singletons, 61 个 contigs。将这些 ESTs 与非冗余蛋白质数据库 (non-redundant protein database) 进行 BLASTx 比对, 将 E 值小于等于  $1e-10$  的 ESTs 视为已知基因, 共 257 个, 占全部 ESTs 的 66.9%, 其中 120 个 ESTs 与非冗余蛋白质数据库中已知功能的蛋白具有高度的相似性, 137 个 ESTs 代表未知功能基因。127 个 ESTs 在非冗余蛋白质数据库中没有找到相匹配的蛋白质或 E 值大于等于  $1e-10$ 。在功能已知的 ESTs 中, 发现了一些可能跟花器官发育相关的基因, 如转录因子 MADS-box、锌指蛋白基因等; 以及信号传导相关基因, 如编码激酶基因、MAPKK 基因、WRKY 基因等。SSH-cDNA 文库中部分 ESTs 的 BLASTx 结果见表 1。

表 1 SSH-cDNA 文库中的部分 EST 片段 BLASTx 结果  
Table 1 BLASTx result of some ESTs in SSH cDNA library

克隆 Clone No.	长度/bp Length	同源比对结果 BLASTx result	来源 Source	E 值 E-value
Singleton 1	1 027	生长调节蛋白 Putative auxin growth promotor protein	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	1.00E-151
Singleton 5	1 089	腺苷激酶 Adenosine kinase isoform 1T-like protein	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	1.00E-122
Singleton 13	1 086	GTP 结合蛋白 Small GTP-binding protein Sar1Bnt-like protein	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	2.00E-97
Singleton 16	1 091	ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基 ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	4.00E-80
Singleton 19	829	开花基因 CONSTANS 互作蛋白 Putative CONSTANS interacting protein 2b	辣椒 <i>Capsicum chinense</i>	2.00E-76
Contig 11	1 209	应激反应蛋白 Hypersensitive-induced response protein	玉米 <i>Zea mays</i>	9.00E-73
Contig 12	695	ATP 结合蛋白 ATP binding protein, putative	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	3.00E-72
Singleton 27	482	SEPALLATA1 同源蛋白 SEPALLATA1-like MADS-box	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	3.00E-68
Singleton 29	1 091	SEPALLATA3 同源蛋白 SEPALLATA3-like MADS-box	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	9.00E-67
Singleton 40	397	WRKY 转录因子 Double WRKY type transfactor	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	2.00E-54
Singleton 42	1 030	60S 核糖体蛋白 Similar to 60S ribosomal protein L35	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	4.00E-53
Singleton 45	1 152	促分裂原活化蛋白激酶 MAPKK	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	7.00E-52
Contig 14	378	细胞质的二磷酸核苷激酶 Cytosolic nucleoside diphosphate kinase	马铃薯野生种 <i>Solanum chacoense</i>	5.00E-50
Singleton 49	437	NADPH - 细胞色素 P450 还原酶 Cytochrome P450 NADPH-reductase	矮牵牛 <i>Petunia × hybrida</i>	6.00E-48
Singleton61	728	转录调节因子 Transcription regulator, putative	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	3.00E-39
Contig 25	682	ATP 合成酶 H 亚基 Similar to ATP synthase subunit H protein	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	3.00E-33
Singleton 70	1 038	锌指蛋白 Zinc finger protein, putative	马铃薯野生种 <i>Solanum demissum</i>	7.00E-31
Singleton 74	1 083	GTP 结合蛋白 GTP-binding protein	辣椒 <i>Capsicum annum</i>	2.00E-25
Singleton 77	1 042	反转录转座子蛋白 Putative retrotransposon protein, identical	马铃薯野生种 <i>Solanum demissum</i>	1.00E-23

## 2.5 功能分类

在 Swissport 蛋白质数据库中对获得的 Unique ESTs 进行 Gene ontology (GO) 分类分析, 结果

表明: 这些 Unique ESTs 分别属于细胞组分 (cell component), 生物过程 (biological process) 和分子功能 (molecular function) 三大种类, 其中 119 个 ESTs 属于细胞组分, 107 个 ESTs 属于生物过程, 102 个 ESTs 属于分子功能。

在细胞组分二级分类中共涉及 5 种功能: 细胞 (Cell, 50), 占 42%, 细胞成分 (cell part, 50), 占 42%, 细胞器 (organelle, 14), 占 12%, 细胞外区域 (extracellular region, 4), 占 3%, 大分子复合体 (macromolecular complex, 1), 占 1%; 在生物过程二级分类中共涉及 7 种功能: 代谢过程 (metabolic process, 63), 占 58%, 细胞过程 (cellular process, 37), 占 35%, 区域定位 (establishment of localization, 2), 占 2%, 定位 (localization, 2), 占 2%, 基因表达 (gene expression, 1), 占 1%, 病毒复制 (viral reproduction, 1), 占 1%, 生物黏合 (biological adhesion, 1), 占 1%; 在分子功能二级分类中共涉及 7 种大功能: 结合 (binding, 52), 占 51%, 催化活性 (catalytic activity, 37), 占 36%, 结构分子活性 (structural molecule activity, 6), 占 6%, 分子信号转导活性 (molecular transducer activity, 3), 占 3%, 转运活性 (transporter activity, 2), 占 2%, 酶调控蛋白活性 (enzyme regulator activity, 1), 占 1%, 抗氧化活性 (antioxidant activity, 1), 占 1%。

### 3 讨论

作者在获得的 ESTs 中发现了分别与 *SEPALLATA1* 和 *SEPALLATA3* 同源的 2 个基因, 氨基酸相似性均为 84%。*SEPALLATA1/2/3* 属于 MADS-box 基因家族。MADS-box 基因除了调节花器官发育外 (Eckardt, 2003), 还调控种子的发育 (Angenent et al., 1995; Colombo et al., 1995)。种子是由胚珠受精后发育而成, *SEP* 基因的表达影响胚珠的正常发育。*SEP* 转录因子活性的降低或丧失可导致胚珠发育的功能缺失, 胚珠转变为心皮组织 (Pinyopich et al., 2003; Rebecca et al., 2003), 从而导致果实无籽或少籽。Yao 等 (2001) 认为苹果 MADS-box 转录因子中一个转座子的插入突变可能导致果实单性结实, 原因是由于这种插入突变终止了 *MdPI* 基因 (属于 MADS-box 基因家族) 的正常表达, 使得 *MdPI* MADS-box 转录因子的活性丧失。植物的 MADS 盒蛋白的二聚体化是基因调节的一种重要方式, MADS 盒蛋白因子以二聚体形式与 MADS 盒基因相结合从而实现对发育过程的调节。胚珠发育功能缺失很可能是因为 *SEP* 转录因子丰度低, 无法成功形成蛋白复合体而导致的 (Rebecca et al., 2003)。因此, 茄子单性结实现果实的形成可能是因为子房细胞内 *SEP* 转录因子丰度低而导致胚珠发育功能缺失, 从而无法形成种子。

一条 EST 编码后的产物与番茄 MAPKK 同源, 氨基酸相似性为 90%。MAPKs (mitogen-activated protein kinases) 在细胞分裂和分化过程中起着重要调节作用。而 MAPKs 的激活是通过 MAPKs 激酶实现的。马铃薯 (*Solanum chacoense*) ScFRK2 是 MAPKKKs 的一种, 该激酶过量表达可导致胚珠形成功能丧失, 这是由于 ScFRK2 改变了花器官 D 类同源基因 *ScFBP11* 的表达, *FBP7* 和 *FBP11* 是从矮牵牛突变体中分离出的 D 类 MADS-box 基因, 这两个基因是胚珠特异性基因, 其作用与胚珠的发育相关 (Angenent et al., 1995; Colombo et al., 1995), ScFRK2 激酶可能直接或间接与 *FBP7/11* 互作, 从而控制胚珠的形成 (Madoka, 2006)。茄子单性结实性状可能是因为子房内 MAPKK 过量表达, 导致胚珠功能丧失, 从而形成无籽果实。

植物果实的坐果成败是通过子房授粉受精来完成的, 授粉受精产生生长信号合成大量植物生长物质如生长素, 细胞分裂素和赤霉素等, 胚中产生的内源激素激活了细胞的分裂和膨大, 从而刺激果实的坐果和发育 (Gillaspy et al., 1993; Rodrigo et al., 1998)。自然条件下, 非单性结实植物的子房只有通过授粉和受精, 启动控制果实膨大生长基因的表达后才能坐果, 进入果实膨大生长期, 否则衰老脱落。具有单性结实能力的品种, 其子房中在开花前就含有大量的生长素, 细胞分裂素和

赤霉素等植物生长物质, 因而不经过授粉受精也能诱导果实的正常坐果和生长发育。在开花初期, 番茄的天然单性结实果中 GAs 的含量比不能单性结实果中的要高 (Mapelli et al., 1978), 自然单性结实的黄瓜子房中内源 IAA 含量是不易单性结实子房的两倍 (Kim et al., 1994), Rotino 等 (1997) 通过嵌合生长素生物合成基因提高子房中的生长素含量, 获得了转基因无籽茄子和番茄。在获得的 ESTs 中发现了与生长素增长蛋白同源的基因, 其氨基酸序列相似性为 93%。茄子单性结实品系 D-10 的子房不经过授粉受精就能发育成果实, 很可能是由于子房内生长素增长蛋白过量表达, 增加了生长素浓度, 促进子房细胞分裂与伸长引起的。

在获得的与细胞色素相关的 ESTs 中, 其中一条 EST 编码后的产物与 NADPH 细胞色素 P450 还原酶同源, 氨基酸相似性为 87%。细胞色素 P450 酶系中, 起中心作用的是细胞色素 P450, 并需要 NADPH 细胞色素 P450 还原酶的活化。拟南芥 *CYP78A9* 编码细胞色素 P450, 该基因过量表达能诱导无籽果实的产生 (Toshiro & Elliot, 2000)。推测茄子的单性结实性可能是由于 NADPH 细胞色素 P450 还原酶的过量表达, 活化了细胞色素 P450 编码基因, 促进了赤霉素的生物合成, 从而诱导子房细胞分裂与伸长 (Chris & Peter, 2001), 其功能尚需进一步研究。

有关茄子单性结实基因的分离尚未见报道。本研究中利用 SSH 技术分离茄子单性结实材料中差异表达、与单性结实基因相关的 cDNA 片段, 构建差减 cDNA 文库, 通过文库测序、EST 序列分析和功能注释, 从中筛选出可能与茄子单性结实相关的 ESTs, 包括 MADS-box 家族的 *SEPALLATA1* 和 *SEPALLATA3*, 生长素增长蛋白, 细胞色素 P450 酶系和 MAPKK 家族; 获得一些与信号传导相关的 ESTs, 如编码激酶基因、MAPKK 基因、WRKY 基因等。后续试验需要获得这些基因的全长, 并进行基因功能注释, 从而进一步深入研究茄子单性结实的分子机理。

## References

- Angenent G C, Franken J, Busscher M, van Dijken A, van Went J L, Dons H J M, van Tunen A J. 1995. A novel class of MADS-box genes is involved in ovule development in petunia. *Plant Cell*, 7: 1569 - 1582.
- Chris A H, Peter M C. 2001. The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *PNAS*, 98 (4): 2066 - 2070.
- Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons H J M, Angenent G C, van Tunen A J. 1995. The petunia MADS-box gene *FBP11* determines ovule identity. *Plant Cell*, 7: 1859 - 1868.
- Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Siebert P D. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for gene-rating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (12): 6025 - 6030.
- Eckardt N A. 2003. MADS monsters: Controlling floral organ identity. *Plant Cell*, 15: 803 - 805.
- Fan Jing, Li Zheng-guo, Gao Xue, Yang Ying-wu, Deng Wei. 2008. Cloning of *CsNAC* gene from navel orange and its expression analysis during the storage of fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (12): 1803 - 1808. (in Chinese)
- 樊 晶, 李正国, 高 雪, 杨迎伍, 邓 伟. 2008. 脐橙 *CsNAC* 基因的克隆及其在果实贮藏过程中的表达分析. *园艺学报*, 35 (12): 1803 - 1808.
- Guo Shuang, Shen Huo-lin, Yang Wen-cai, Yang Juan, Wang Wen. 2009. Isolation of fertility restoration-related ESTs in pepper cytoplasmic male sterility lines using SSH. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (10): 1443 - 1449. (in Chinese)
- 郭 爽, 沈火林, 杨文才, 杨 娟, 王 雯. 2009. 利用抑制消减杂交技术分离辣椒细胞至雄性不育性恢复相关 ESTs. *园艺学报*, 36 (10): 1443 - 1449.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W. 1993. Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell*, 5: 1439 - 1451.
- Huang Xin, Dai Si-lan, Meng Li, Zheng Guo-sheng. 2006. The application of suppression subtractive hybridization (SSH) on isolation plant different genes. *Molecular Plant Breeding*, 14 (5): 735 - 746. (in Chinese)
- 黄 鑫, 戴思兰, 孟 丽, 郑国生. 2006. 抑制性差减杂交 (SSH) 技术在分离植物差异表达基因中的应用. *分子植物育种*, 4 (5):



735 - 746.

- Kim I S, Okubo H, Fujieda K. 1994. Studies on parthenocarp in *Cucumis sativus* L. IV. Effects of exogenous growth regulators on inductions of parthenocarp and endogenous hormone levels in cucumber ovaries. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 35 (3): 187 - 195.
- Liu Fu-zhong, Lian Yong, Chen Yu-hui, Song Yan. 2005. The effect of temperature and bud stage treatment on parthenocarpic gene expression of eggplant. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (6): 1021 - 1025. (in Chinese)
- 刘富中, 连 勇, 陈钰辉, 宋 燕. 2005. 温度和蕾期去雄及去柱头处理对茄子单性结实性的影响. *园艺学报*, 32 (6): 1021 - 1025.
- Liu Fu-zhong, Wan Xiang, Chen Yu-hui, Lian Yong. 2008. Inheritance of the eggplant parthenocarp and AFLP molecular marker. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (9): 1305 - 1309. (in Chinese)
- 刘富中, 万 翔, 陈钰辉, 连 勇. 2008. 茄子单性结实基因的遗传分析及 AFLP 分子标记. *园艺学报*, 35 (9): 1305 - 1309.
- Madoka G, Martin O, Charles B, Faiza T, Andre N, Daniel P M. 2006. Loss of ovule identity induced by over expression of the fertilization-related kinase 2 (ScFRK2), a MAPKKK from *Solanum chacoense*. *Journal of Experimental Botany*, 57 (15): 4171 - 4187.
- Mao Zhen-chuan, Xie Bing-yan, Yang Yu-hong, Feng Dong-xin, Feng Lan-xiang, Yang Zhi-wei. 2007. Analysis of early expression genes resistance to root knot nema tode in *N* gene pepper by SSH. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (3): 629 - 636. (in Chinese)
- 茆振川, 谢丙炎, 杨宇红, 冯东昕, 冯兰香, 杨之为. 2007. 辣椒 *N* 基因介导抗根结线虫作用早期表达基因的抑制性消减杂交 SSH 分析. *园艺学报*, 34 (3): 629 - 636.
- Mapelli S, Fropa C, Torti G, Soressi G P. 1978. Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiol*, 19: 1281 - 1288.
- Pinyopich A, Ditta G S, Baumann E, Wisman E, Yanofsky M F. 2003. Unraveling the redundant roles of MADS-box genes during carpel and fruit development. *Nature*, 424: 85 - 88.
- Rebecca Favaro, Anusak Pinyopich, Raffaella Battaglia, Maarten Kooiker, Lorenzo Borghi, Gary Ditta, Martin F Yanofsky, Martin M K, Lucia Colombo. 2003. MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15: 2603 - 2611.
- Rodrigo M J, García-Martínez J L. 1998. Hormonal control of parthenocarpic ovary growth by the apical shoot in pea. *Plant Physiol*, 116: 511 - 518.
- Rotino G L, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A. 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnology*, 15: 1398 - 1401.
- Restaino F, Perrone D, Correale A. 1998. New parthenocarpic genotypes of eggplant suitable for greenhouse cultivation // Palloix A, Daunay M C. Xth meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant. Paris: INRA Paris: 273.
- Tian Shi-bing, Liu Fu-zhong, Wang Yong-qing, Luo Zhang-yong, Chen Yi-kang, Liu Jun-shao, Lian Yong. 2003. Genetics analysis of parthenocarp in eggplant. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (4): 413 - 416. (in Chinese)
- 田时炳, 刘富中, 王永清, 罗章勇, 陈义康, 刘君绍, 连 勇. 2003. 茄子单性结实性的遗传分析. *园艺学报*, 30 (4): 413 - 416.
- Toshiro Ito, Elliot M Meyerowitz. 2000. Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, *CYP78A9*, induces large and seedless fruit in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12: 541 - 550.
- Wang Ji-gang, Zhang Kun, Xu Qi-jiang, Li Yu-hua. 2008. Construction and analysis of *Eustoma grandiflorum* subtracted cDNA library. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (7): 1075 - 1080. (in Chinese)
- 王继刚, 张 坤, 徐启江, 李玉花. 2008. 草原龙胆盐胁迫差减文库的构建及分析. *园艺学报*, 35 (7): 1075 - 1080.
- Xie Ji-rong, Liang Guo-lu, Tang Kai-xue, Zhang Hao, Cheng Zai-quan, Huang Xing-qi. 2007. Construction and analyses of SSH cDNA libraries of rose floral color and scent mutant. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (3): 688 - 694. (in Chinese)
- 谢吉容, 梁国鲁, 唐开学, 张 灏, 程在全, 黄兴奇. 2007. 月季突变体抑制差减杂交 cDNA 文库构建及分析. *园艺学报*, 34 (3): 688 - 694.
- Yao Jia-long, Dong Yi-hu, Morris Bret A M. 2001. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *PANS*, 98 (3): 1306 - 1311.
- Zhang Ying, Liu Fu-zhong, Chen Yu-hui, Lian Yong. 2009. Characteristics of eggplant parthenocarp at low temperature. *China Vegetables*, (2): 16 - 20. (in Chinese)
- 张 映, 刘富中, 陈钰辉, 连 勇. 2009. 低温下茄子单性结实特性的研究. *中国蔬菜*, (2): 16 - 20.
- Zhang Yu-gang, Xu Xue-feng, Li Tian-zhong, Wang Yi, Kong Jin, Han Zhen-hai. 2007. Isolation of Fe deficiency-induced genes by suppression subtractive hybridization in *Malus xiaojinensis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (3): 555 - 560. (in Chinese)
- 张玉刚, 许雪峰, 李天忠, 王 忆, 孔 瑾, 韩振海. 2007. 抑制性消减杂交分离苹果缺铁诱导的相关基因. *园艺学报*, 34 (3): 555 - 560.