园 艺 学 报 2008, 35 (9): 1305 - 1309
Acta Horticulturae Sinica

茄子单性结实基因的遗传分析及 AFLP 分子标记

刘富中[1*], 万 翔[1,2], 陈钰辉[1], 连 勇[1], 宋 明[3]
([1] 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; [2] 四川资阳农业局, 四川资阳 641300; [3] 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716)

摘 要: 以茄子单性结实自交系 D-10 和非单性结实自交系 03-2 为试验材料, 研究了单性结实基因的遗传特性及其 AFLP 标记。对杂交后代 F_1、F_2、BC_1 单性结实性表现型分离比例的分析表明, 茄子 D-10 的单性结实性由单显性核基因控制, 其基因符号用 *Pat* 表示。采用 AFLP 分析技术和改良 BAS 法, 通过 512 对 E/M 引物组合的筛选, 获得 1 个与茄子单性结实基因紧密连锁的 AFLP 标记 E75/M53-70, 该标记与单性结实基因间的遗传图距为 15.38 cM, 可用于茄子单性结实性的鉴定和单性结实分子标记辅助育种, 加速茄子单性结实基因的转育和利用。

关键词: 茄子; 单性结实基因; 遗传规律; AFLP 标记
中图分类号: S 641.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-353X (2008) 09-1305-05

Inheritance of the Eggplant Parthenocarpy and AFLP Molecular Marker

LIU Fu-zhong[1*], WAN Xiang[1,2], CHEN Yu-hui[1], LIAN Yong[1], and SONG Ming[3]
([1] *Institute of Vegetables & Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100081, *China*; [2] *The Ziyang County Office of Agricultural, Ziyang, Sichuan* 641300, *China*; [3] *Department of Horticulture, Southwest University, Chongqing* 400716, *China*)

Abstract: Emphytic character and AFLP marker of eggplant parthenocarpic gene were studied by using materials of parthenocarpic selfing line D-10 and non-parthenocarpic selfing line 03-2. Analysing the separated rate of the parthenocarpic phenotype in F_1, F_2 and BC_1, we found that parthenocarpic gene of D-10 was controlled by single dominant nucleus gene and named as *Pat*. Using AFLP and BSA techniques with 512 pairs of E/M primers screening, we obtained one AFLP marker E75/M53-70 that linked with parthenocarpic gene. The genetic distance was 15.38 cM, which could be used as parthenocarpic identification and molecular marker-assisted selection.

Key words: eggplant; parthenocarpic gene; genetic regulation; AFLP molecular marker

研究茄子单性结实种质, 弄清单性结实基因的遗传规律, 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。有研究认为茄子单性结实是由隐性基因控制 (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株系 D-10 等, 并对其特性进行了研究 (刘富中 等, 2005), 但其遗传规律尚不清楚。目前, 检测茄子单性结实的方法一般采用自然逆境鉴定、蕾期去雄法和蕾期去柱头法 (田时炳 等, 1999; 刘富中 等, 2005), 但对田间大量单性结实植株的选择比较费时。本研究旨在探明茄子单性结实基因的遗传规律, 以期为单性结实

收稿日期: 2008-06-23; **修回日期**: 2008-08-08
基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771475); 国家 '863' 计划项目 (2006AA10Z1A6); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2060302-2-07); 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室项目 (2005-9)
* E-mail: lfzcaas@126.com

育种提供理论依据，同时采用集群分析法（BAS）和高通量的 AFLP 分析技术，筛选与茄子单性结实紧密连锁的标记，在苗期或直接用种子进行单性结实性的评价鉴定，缩短育种进程，为分子标记辅助育种和基因克隆奠定基础。

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变化在 7 ~ 17 ℃时，表现单性结实。

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。

*Mse*I、*Eco*R Ⅰ、*T*4-DNA 连接酶为 NEW ENGLAND BioLabs 公司产品；*Taq* DNA 聚合酶为 Promega 公司产品；dNTP、EDTA、Trise-base 和 RnaseA 为 Genievw 公司产品；引物和接头购自上海生工生物科技工程公司；Marker 购自北京天为时代科技有限公司；CTAB 为 Sigma 公司产品。

1.2 单性结实性的遗传分析

试验于 2003—2005 年在中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验地内进行。2003 年用 03-2（P_1）和 D-10（P_2）配制杂交组合。2004 年种植 F_1 代并自交、回交分别获得 F_2 和 BC_1 种子。

2005 年在加温日光温室中育苗：2 月 25 日浸种催芽，3 月 1 日播种，4 月 23 日露地种植亲本 03-2、D-10、F_1、F_2、BC_1，其中 P_1 39 株，P_2 36 株，F_1（$P_1 \times P_2$）25 株，F_1（$P_2 \times P_1$）25 株，F_2 131 株，BC_1 88 株。

4 月 23 日之前苗期的日最低温度变化为 15 ~ 20 ℃，4 月 23 日—5 月 10 日的日最低温度变化为 9 ~ 17 ℃，日平均最低温度 13.2 ℃。试验处理于 4 月 28 日—5 月 10 日的自然低温状态下进行，在花朵开放前 1 ~ 2 d，用镊子去掉雌蕊的柱头，使其不能授粉，以诱使单性结实性的充分表达（刘富中等，2005）。

于 5 月 25 日调查单性结实的分离情况，去柱头后果实横径大于或等于 4 cm 的是单性结实株，去柱头后子房脱落、不膨大或果实横径小于 4 cm 的是非单性结实株。根据 F_1、F_2 代和 BC_1 代不同植株单性结实性和非单性结实性的分离比，分析单性结实基因的显隐性，用适合性测验确定单性结实基因的遗传方式。

1.3 基因组 DNA 的提取

用亲本和群体材料的嫩叶提取总 DNA。具体过程参照万翔等（2005）的改良 CTAB 法。

取 1.5 mL 的离心管管盖大小的幼嫩真叶 2 ~ 4 片，用液氮研磨成粉末，加 65 ℃ 预热的 750 μL 2% CTAB（内有 0.2% PVP 和 4 $\mu L \cdot mL^{-1}$ β – 巯基乙醇），65 ℃ 水浴 1 h 以上。

将离心管取出冷却至室温，加氯仿/异戊醇（体积比 24∶1）750 μL 充分混匀，18 ℃ 8 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min。

取上清液，加入经 4 ℃ 预冷的异丙醇 600 μL，轻轻混匀，放入冰中或在 –20 ℃ 下沉淀至 DNA 沉淀显现。

18 ℃ 8 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 ~ 10 min，取沉淀加 4 ℃ 预冷的 70% 乙醇 500 μL 洗涤，轻弹管壁将沉淀弹松。18 ℃ 8 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 4 min，取沉淀加 4 ℃ 预冷的 70% 乙醇 500 μL 再洗涤一次，轻弹管壁。

18 ℃ 8 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 4 min，倒出 70% 乙醇，自然风干。加 100 μL 10 $mmol \cdot L^{-1}$ TE 溶解。加 1% 体积的 RNase（10 $mg \cdot mL^{-1}$），37 ℃ 水浴 1 ~ 2 h，最后 –20 ℃ 保存用于 AFLP 分析。

1.4 单性结实和非单性结实池的构建

根据 F_2 群体开花结果期单性结实性的调查结果，选取 15 个单性结实单株和 15 个非单性结实单株，分别将其 DNA 等量混合构建单性结实池和非单性结实池。

1.5 AFLP 分析

采用在 Vos 等（1995）分析基础上优化的 AFLP 技术体系（万翔 等，2005）。用 *Eco*R I-*Mse*I 两种限制性内切酶进行酶切，酶切基因组 DNA 用量为 100 ng，酶切—连接适宜时间为 10 h，预扩增产物适宜稀释倍数为 30 ~ 50 倍。选择性扩增结束后在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离扩增产物，银染法进行染色。

1.6 分子标记筛选及验证

先利用父母本进行引物初选。同时以父母本植物学性状相近的自交系各 5 株的 DNA，分别混合成单性结实池和非单性结实池，与亲本同时进行谱带表现有差异的引物组合的筛选。将初筛出的表现有差异的引物组合在单性结实池和非单性结实池上初步验证，若表现一致，即初步认为该标记与单性结实基因连锁。

进一步扩大到整个 F_2 群体及 F_1 群体进行验证，统计多态性条带的分离情况。有带者赋值为 1，无带者赋值为 0，不清楚或数据缺失者赋值为 “ + ”，采用软件 JoinMap3.0 分析标记与单性结实基因间的连锁距离。

2 结果与分析

2.1 茄子单性结实性遗传分析

用单性结实品系与非单性结实品系杂交，亲本、F_1、F_2 和 BC_1 植株单性结实性状的分离情况及遗传分析结果见表 1。

表 1 茄子亲本及后代单性结实性状的分离

Table 1 Segregation of parthenocarpy in parents, F_1, F_2 and BC_1 generation

世代 Progeny	总株数 Number of total plants	单性结实株 Number of parthenocarpic plants	非单性结实株 Number of non-parthenocarpic plants	期望值 Theoretical ratio	χ^2	$\chi^2_{0.05}$	显著性 Significance
P_1	39	-	39	-	-	-	-
P_2	36	36	-	-	-	-	-
$F_1(P_1 \times P_2)$	25	25	-	-	-	-	-
$F_1(P_2 \times P_1)$	25	25	-	-	-	-	-
F_2	131	93	38	3:1	1.12	3.841	不显著 No significance
BC_1	88	51	37	1:1	2.22	3.841	不显著 No significance

非单性结实亲本 P_1 去除柱头后子房不能正常膨大，萎蔫或停止生长，坐果率为 0，单性结实率为 0，表现为完全非单性结实性。

单性结实亲本 P_2 及其与非单性结实亲本 P_1 的杂交种 F_1，蕾期去柱头后果实均能正常生长发育，果实内无种子，表现为完全单性结实，说明单性结实性表现为显性，非单性结实性表现为隐性。

正交（$P_1 \times P_2$）组合中，F_1 表现为单性结实性，反交（$P_2 \times P_1$）组合中，F_1 也表现为完全单性结实，正反交结果一致，说明该性状受细胞核基因控制。

F_2 群体中，单性结实与非单性结实株分离比例接近 3:1，经 χ^2 测验，概率值均大于 0.05。

BC_1 群体中，单性结实与非单性结实性的分离比例接近 1:1，χ^2 测验不显著。

以上结果表明，茄子单性结实品系D-10的单性结实性由单显性核基因控制，定名为*Pat*。

2.2 AFLP多态性引物的筛选

利用108对AFLP引物组合对亲本和所建自交系单性结实池和非单性结实池进行筛选，从中筛选出22对有差异的引物，其中只有一对引物E37/M44在亲本与池间表现一致，认为其可能是所求分子标记。

将该引物进一步用在F_2群体所建立的单性结实池和非单性结实池上进行验证，结果并未发现表现一致的差异。可能是所建池中有交换单株影响，于是改池为组。在F_2群体中选取单性结实和非单性结实各5株分别组成单性结实组和非单性结实组，对入选引物E37/M44进行单株验证。结果在单性结实组中差异谱带表现不一致，表明E37/M44不是所求分子标记。

扩大引物组合达512对，利用亲本对E_{+3}/M_{+3}和E_{+2}/M_{+2}引物进行筛选，获得有差异的引物组合后，直接对单性结实组和非单性结实组中的单株进行验证，以避免交换单株的影响，最终筛选到1对表现较一致的引物组合E75/M53。该引物表现为单性结实有带，非单性结实无带，大小为70 bp。因此，初步认为该引物可能与单性结实基因连锁。

2.3 与单性结实基因连锁的分子标记的获得

为进一步确定E75/M53-70标记的正确性及其与单性结实基因的连锁关系，将其对P_1、P_2、F_1、F_2群体的单株进行验证。结果表明，引物E75/M53在单性结实亲本中均表现为有带，在非单性结实亲本中无带，在$P_1 \times P_2$的F_1中均表现为有带，与单性结实亲本中的带一致（图1）。

用引物E75/M53对117个F_2群体的单株进行验证，统计清晰可见的带数。结果表明（图1），在F_2群体中，有17株发生了交换，交换率为0.15。

E75/M53引物扩增特征片段和单性结实基因的分离一致，经χ^2测验，得$P = 0.277 < \chi^2_{0.05} = 3.841$，差异不显著，符合3:1规律，说明该标记与单性结实基因紧密连锁。这一结果也进一步从分子水平上验证了根据田间表型进行遗传分析结果的正确性。经JoinMap3.0统计处理，E75/M53-70与单性结实基因间的遗传图距为15.38 cM。

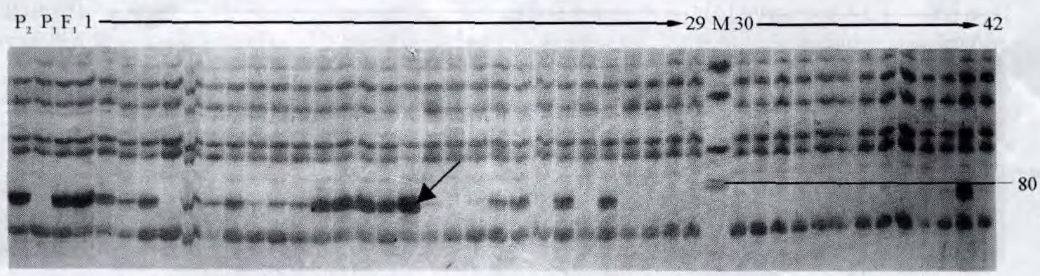

图1 E75/M53在父本、母本、F_1、F_2单株中的验证

P_2：单性结实亲本；P_1：非单性结实亲本；1～29为单性结实株；30～42为非单性结实株；5、18、19、22、24、26、27、28、29、41为交换单株；M：marker；箭头指示标记带。

Fig. 1 Vetification of primer E75/M53 in female parent, male parent, F_1 and F_2 plants

P_2: Parthenocarpic parent; P_1: Non-parthenocarpic parent; 1–29: Parthenocarpic plants; 30–42: Non-parthenocarpic plants; 5, 18, 19, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 41: Cross-over plants; M: Marker; Arrow indicates the marker band.

3 讨论

有关茄子单性结实的遗传报道不多，一般认为是由隐性基因控制的（Restaino et al.，1998；田时炳 等，2003），且单性结实性状的遗传不符合“加性—显性”遗传模型，存在着非等位基因间的上位作用（田时炳 等，2003）。

本试验通过单性结实亲本与非单性结实亲本的 F_1、F_2及 BC_1分离后代的研究表明，以单性结实为亲本配制的 F_1代均表现为单性结实。F_2群体中单性结实与非单性结实株分离比例符合 3∶1，BC_1群体中单性结实与非单性结实性的分离比例接近 1∶1，经适合性测验不显著。因此，可认为茄子单性结实品系 D-10 的单性结实性由单显性核基因控制，定名为 *Pat*。这表明茄子单性结实的遗传机制较复杂，存在多个单性结实基因的控制，不同材料的遗传特性不尽相同。

分子标记可极大加速有益基因的遗传转育，但目前尚未有茄子单性结实基因标记的报道。本研究中通过 F_2分离群体在国内外首次获得 1 个与茄子单性结实基因连锁的 AFLP 标记 E75/M53-70，该标记表现为单性结实有带，非单性结实无带，与单性结实基因间的遗传图距为 15.38 cM。利用该标记可在苗期从 DNA 水平上对茄子材料进行单性结实性鉴定，减少大量的田间筛选工作，并可用于茄子分子标记辅助育种，提高育种效率，该研究结果为进一步克隆所获得的茄子单性结实基因、研究其表达和调控机制奠定了良好的基础，并将促进我国茄子单性结实基因的转育和利用，加速茄子的育种进程。

References

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的影响. 园艺学报，32 (6): 1021 - 1025.

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. Genetic analysis of parthenocarpy 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.

Tian Shi-bing, Liu Jun-shao, Pi Wei, Zhao Xiao-feng, Yang Zhi-yuan. 1999. Preliminary study on parthenocarpy of eggplant (*Solanum melongena* L.) under low temperature. China Vegetables, (5): 28. (in Chinese)

田时炳，刘君绍，皮　伟，赵晓风，杨治元. 1999. 低温下茄子单性结实观察试验初报. 中国蔬菜，(5): 28.

Vos P, Hogers R, Bleeker M. 1995. AFLP: A new technique for dna fingerprinting. Nucleic Acide Research, 23 (21): 4407 - 4414.

Wan Xiang, Liu Fu-zhong, Song Ming, Chen Yu-hui, Lian Yong. 2005. Optimization and establishment of the AFLP technological system for eggplant. Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science, 27 (2): 226 - 229. (in Chinese)

万　翔，刘富中，宋　明，陈钰辉，连　勇. 2005. 茄子 AFLP 技术体系的优化与建立. 西南农业大学学报：自然科学版，27 (2): 226 - 229.