

番茄自交系 85-6 单性结实及自交不亲和特性研究

曹依林¹, 曹作增¹, 韩欣静¹, 邢亚楠¹, 毕燕鸽¹, 郭旭东¹, 王 辉^{1,2}, 王 富^{1,2}, 朱文莹^{1,2}

(¹青岛农业大学园艺学院, 青岛 266109; ²山东省园艺作物基因改良工程实验室, 青岛 266109)

摘要: 对具有单性结实和自交不亲和特性的番茄自交系 85-6 进行了研究。通过花的外观观察、花粉活力测定和胚珠发育观察, 发现 85-6 具有正常的花结构, 花粉活力正常, 胚珠发育正常, 表明 85-6 不存在雌蕊或雄蕊的败育现象。通过自然自交、人工辅助自交和杂交发现, 85-6 在正常温度环境下存在自交不亲和的现象, 自交后得到无籽果实, 而作为母本或父本进行杂交时, 均可获得杂交后代。在花期遇到温度胁迫(日平均气温 < 10 °C 或 > 35 °C)后, 85-6 则可完成正常的授粉受精得到正常的有籽果实, 但受精后的果实发育迟缓, 果实变小, 且得到的种子萌发率只有 29.75%。在正常温度和温度胁迫条件下, 蕾期去雄后均可获得无籽果实, 表明 85-6 番茄具有单性结实的特性。通过对已报道的单性结实基因的序列比对, 发现 4 个单性结实相关结实基因 *pat-2*、*pat-k*、*pad-1*、*hydra* 在 85-6 和 79-1 之间不存在基因序列上的差异, 推测控制 85-6 单性结实的基因可能是一个新的基因。85-6 番茄材料的发现丰富了番茄单性结实和自交不亲和资源, 为番茄的单性结实和自交不亲和育种以及相关机制的研究提供了较好的重要材料。

关键词: 番茄; 单性结实; 自交不亲和

Study on Parthenocarpy and Self-incompatibility of Tomato Material 85-6

CAO Yilin¹, CAO Zuozeng¹, HAN Xinjing¹, XING Yanan¹, BI Yange¹,

GUO Xudong¹, WANG Hui^{1,2}, WANG Fu^{1,2}, ZHU Wenying^{1,2}

(¹College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109; ²Engineering Laboratory of Genetic Improvement of Horticultural Crops of Shandong Province, Qingdao 266109)

Abstract: This study investigated a special tomato inbred line 85-6 with the parthenocarpy and self-incompatibility. Through the observation of flower appearance, pollen viability and ovule development, 85-6 was found with normal flower structure, pollen activity and ovule development, thus ruling out the abortion of pistil or stamen. Based on the fertility variations of self-pollination, and artificially-assisted self-pollination and hybridization experiments at different temperature, 85-6 showed self-incompatibility under normal temperature conditions, and produced seedless fruit after self-pollination, as well as normal hybrid offspring whenever serving as male or female parents. Under temperature stress (daily average temperature <10 °C or >35 °C) at flowering stage, 85-6 became complete pollination and fertilization to obtain seeded fruits, and its offspring seeds showed 29.75% seed germination rate. After emasculation at the bud stage, whenever under normal or lower temperature conditions, 85-6 was able to produce seedless fruit, thus indicating the characteristics of parthenocarpy. Collectively, the material of 85-6, as a newly-identified germplasm showing the parthenocarpy

收稿日期: 2023-01-19 修回日期: 2023-04-20 网络出版日期: 2023-05-12

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230119001>

第一作者研究方向为番茄遗传育种, E-mail: 1097109189@qq.com

通信作者: 朱文莹, 研究方向为番茄分子育种与分子生物学, E-mail: zhuwy@qau.edu.cn;

王 富, 研究方向为番茄育种, E-mail: wangfuabcd@163.com

基金项目: 山东省农业良种工程项目(2020LZGC005); 科技特派员行动计划项目(21-1-4-ny-25-nsh); 山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-05); 青岛农业大学博士启动基金(663-1119028)

Foundation projects: Shandong Province Agricultural Improved Seed Project(2020LZGC005); Project of Action Plan of Science and Technology Commissioner(21-1-4-ny-25-nsh); Shandong Modern Agricultural Industrial Technology System Project(SDAIT-05); Doctor Start-up Fund from Qingdao Agricultural University(663-1119028)

and self-incompatibility, provided a basis for the parthenocarp and self-incompatibility breeding, and further deciphering the functional mechanisms.

Key words: tomato; parthenocarp; self-incompatibility

单性结实是指天然或人工作用下使胚珠不经授粉形成无籽果实的现象。根据其发生条件,一般可分为兼性单性结实和专性单性结实,兼性单性结实是指由遗传基因控制同时又受环境(高温、低温)刺激而形成的单性结实,既可产生无籽果实,也可产生有籽果实^[1]。专性单性结实指由遗传基因控制不随环境变化能稳定遗传的单性结实;也有人认为专性单性结实是由于雄性不育所引起的,其单性结实特性因为无法通过有性过程产生种子而形成,只能通过无性方法保存和繁殖^[2]。按是否需要授粉或其他刺激和诱导,番茄单性结实还可以分为自然单性结实和刺激性单性结实。自然单性结实指在自然条件下,不经传粉或其他任何刺激,便能发育结实。人们用营养繁殖方法,如扦插、嫁接等把这种番茄材料保存下来,形成了无籽品种。研究发现,无籽果实的内源激素含量与有籽果实有一定差异,无籽果实内源激素 IAA、GA 含量较高且在果实形成初期就大量合成,而有籽果实则在种子形成并发育后 IAA、GA 含量迅速上升^[3-4]。刺激性单性结实又称诱导单性结实,指需要通过某种外界因素的诱导才能引起单性结实现象^[5]。刺激引起单性结实的因素有很多种,按照其形成机理主要分为 4 类:环剥诱导单性结实、振动诱导单性结实、授粉诱导单性结实、化学诱导单性结实^[6-14]。

番茄是一种喜温蔬菜,其生长发育的最适温度为 20~25 °C,低温(<15 °C)和高温(>28 °C)环境均会影响番茄的坐果,导致其落花落果。而单性结实番茄具有在高温、低温等逆境条件下仍能正常坐果的特性,且研究表明,单性结实番茄发育成无籽果实,品质优,口感好,畸形果率降低,商品性好,并能提高果实耐贮性^[15-17]。樱桃番茄花量大,栽培中常常需要激素蘸花或熊蜂授粉,成本投入大,且激素使用不当容易造成叶片和果实的畸形,而单性结实番茄可以很好的克服这个问题,因此,具有单性结实特性的材料,在番茄育种中具有非常重要的价值和前景。

目前,已报道的番茄单性结实基因已有 *pat*、*pat2*、*pat3*、*pat4*、*pat4.1*、*pat4.2*、*pat5.1*、*pat9.1*、*pat-k*、*pad-1*、*hydra*,均为隐性基因,且常与雄性或雌性不

育连锁^[1, 18-22]。被广泛研究的番茄单性结实材料主要有 3 个,即含有 *pat* 基因的 Montfavet 191、含有 *pat2* 基因的 Severianin 和含有 *pat3/pat4* 基因的 RP75/79^[23]。其中,含有 *pat* 和 *pat3/pat4* 基因的材料本身存在雄性或雌性败育,在生产上难以推广应用^[24],因此在实际研究中多用含有 *pat2* 基因的材料。目前通过对 *pat2* 基因的转育,国际上已经育成不少优良的兼性单性结实材料和品种^[25-26]。此外,阮美颖等^[27]报道了单性结实番茄材料 CP28,单果种子数在不同位置花序间表现差异较大,且低温下子房内胚珠不能正常发育。以上关于番茄的单性结实研究中,大都是兼性单性结实的材料,鲜有专性单性结实的报道。

本研究中的单性结实材料樱桃番茄自交系 85-6,由粉贝贝自交分离后代经过多代自交后获得。通过蕾期去雄、自交、杂交、逆温处理、花粉活力检测等试验,验证该自交系材料的单性结实及自交不亲和的特性,以期为番茄单性结实及自交不亲和育种丰富育种材料,并为后续相关性状分子机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

单性结实番茄自交系 85-6,有限生长类型,粉色圆果樱桃番茄,单果重约 25 g;普通非单性结实自交系番茄 79-1,无限生长类型,粉色圆果樱桃番茄,单果重约 25 g。两份材料均由青岛农业大学园艺学院番茄育种课题组提供。

1.2 单性结实性状的鉴定

于 2021 年秋季和 2022 年春季种植,种植地点为青岛农业大学科研温室、青岛地平线蔬菜合作社种植基地。两种材料均种植 30 株,设 3 次重复,常规田间管理。田间自然自交坐果后,统计其坐果率及种子总数。

对 85-6 和 79-1 开花当天的花进行形态观察,主要观察花药的形态及颜色、柱头长短、柱头是否外露、花瓣形态、萼片形态,观察 85-6 与 79-1 在花的形态上是否存在明显差异。

对 85-6 和 79-1 开花前一天、开花当天、开花后 2、4、6、8 d 以及红熟期的子房进行观察,观察两份材

料子房膨大的情况,以及果实大小的差异。

采用蕾期去雄的方法,去雄35 d后,对去雄花进行坐果率统计。

田间实际种植过程中发现,在夏季塑料大棚连续多日高温和冬季日光温室内连续多日低温的情况下,对于单性结实材料85-6坐果情况和结种子情况均有较大的影响。因此,分别于2022年夏季、2022年冬季进行逆温胁迫鉴定评价。

2022年7月底,青岛地平线蔬菜专业合作社塑料大棚内温度持续高温,连续一周以上日平均气温 $>35\text{ }^{\circ}\text{C}$,对85-6和79-1高温坐果率和结实量进行统计;2022年12月15日开始,青岛鸿得源现代农业科技有限公司日光温室9:00开始通风,14:00关闭通风口,16:00左右覆盖保温被,持续一周,保持日平均气温 $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$,尤其夜温 $<8\text{ }^{\circ}\text{C}$,对两份材料的坐果率和结种子数进行统计。

采用Excel软件对检测数据进行统计分析作图,使用DPS数据处理软件对实验数据进行方差分析与显著性分析。

1.3 自交亲和性观察 采用TTC染色法进行花粉生活力的测定。取两份材料当天开放的花的少许花粉放在干净整洁的载玻片上,加1~2滴0.5% TTC溶液,搅匀后盖上盖玻片,静置10~15 min后置于显微镜(10×10)下镜检,凡被染成红色的花粉,其活力强视为可育花粉,淡红色次之,无色为没有活力或不育花粉。花粉活力(%)=(染色花粉粒数/花粉粒总数)×100%。

选取85-6与79-1长势相近的植株,各3株,于开花0 d、6 d和12 d取子房,固定在FAA固定液中,

4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。参考阮美颖^[27]的方法,采用常规石蜡切片法制片,番红固绿染色,切片后使用Leica 荧光正置DM2500显微镜观察切片并拍照,放大倍数为500×(目镜10×,物镜5×)。

对85-6和79-1分别进行人工授粉自交,于授粉后24 h对柱头取样,使用FAA固定液固定24 h以上,参考胡适宜^[28]的方法采用苯胺蓝染色,于全自动智能活细胞荧光显微成像系统EVOS FL Auto 2 Imaging System(赛默飞)下观察花粉在柱头上的萌发及在花粉管中的伸长情况。

采用人工授粉的方式对85-6和79-1分别进行自交和杂交(正反交),并于果实成熟采收后统计坐果率和种子数量。

1.4 已报道的单性结实相关基因的验证

为了阐明控制85-6番茄单性结实的基因是否与前人报道的一致,对前人已经定位和克隆的控制番茄单性结实的主要基因 *pat-2*、*pat-k*、*pad-1*、*hydra*,在85-6和79-1番茄中进行了基因全长的扩增和序列比对。扩增引物序列见表1,由擎科生物科技有限公司(青岛合成部)合成。PCR扩增体系:DNA模板2 μL ,正向引物1 μL (10 mmol/L),负向引物1 μL (10 mmol/L),2×3G Taq Master Mix 10 μL , ddH₂O 6 μL ,共20 μL 。PCR扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 33个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增后对PCR产物使用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测,利用凝胶回收试剂盒(Tiagen)进行目的片段回收,送由擎科生物科技有限公司(青岛)进行测序并拼接,最后使用Geneious Prime软件将测序结果进行序列比对和分析。

表1 前人已报道的单性结实相关基因

Table 1 Parthenogenesis genes have been reported previously

基因ID Gene ID	全长(bp) Full length	染色体位置 Chromosome position	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	参考文献 References
<i>pat-2</i> (<i>Solyc04g080490</i>)	1905	ch04:62628881~62626977	F:GCGTGGGTTAGGACTGAACA R:GCGGCATCATGAGTGGTCTA	[29]
<i>pat-k/SLAGL6</i> (<i>Solyc01g093960</i>)	5178	ch01:77797922~77792745	F1:TGTTGCAAGAAGAGATATCCAAGA R1:AGAACCAAAAACCCCTTCTCA F2:TGCAGCACTTACACAAGCAC R2:TGGAAAGTGAAAAAGACTTAGCA F3:TGTGTTGCAAAAATGAAAACTTGT R3:CCTGTGTTTCTCTTTCACCACA F4:GCCTTGAAATCAGTAAGAGTATTGGT R4:CACCAAGATGACGCTCCTGA F5:GAACAGATGGAGGAGCTTCGT R5:TCGATCCTTTGTTTTGCTCACT	[19]

表 1 (续)

基因 ID Gene ID	全长(bp) Full length	染色体位置 Chromosome position	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	参考文献 References
<i>pad-1</i> (<i>Solyc03g120450</i>)	6384	ch03:63283055~63276672	F1:CTAAGGCACAAAAAGGGAAGGC R1:TGTCACTCCAAACATCATGGGA F2:GATTATGACTGGCCACTGAGCT R2:AGCCCTACCACATTCTAGTCT F3:GCCGGTGCAAATCAGGTAAAAT R3:AAACATAACGACCGAATCCCCA F4:GGTGTCTCAATAGTGCTCCAA R4:ACCATCATCATTCGTCCACAGA F5:TGTTAATCCCGCAATCCATCA R5:AGAGGTGTCATACATGCTGGTT F6:AGTGACTCTTGACACAACCAGA R6:GCTAGTGCCATGTTTCAGTTCA	[21]
<i>Hydra</i> (<i>Solyc07g063670</i>)	1310	ch07:65909866~65911175	F:AAACACCATAGCTAGCCAGACC R:TTGTTGTTTTCAATCCGTCCCG	[22]

F表示正向引物,R表示反向引物

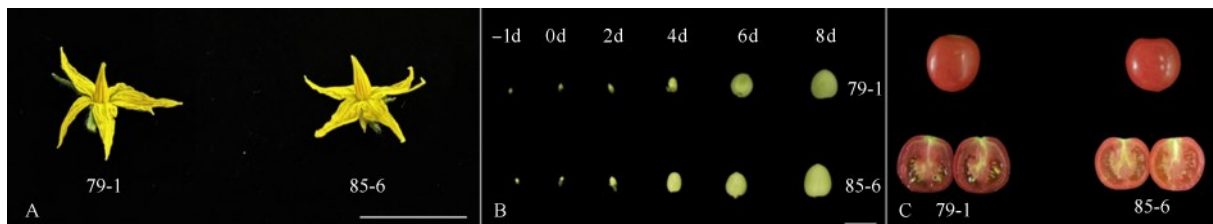
F means forward primer, R means reverse primer

2 结果与分析

2.1 单性结实番茄 85-6 坐果率与种子数

从图 1A 可以看出,自然条件下,单性结实与非单性结实番茄在花的形态结构上无明显差异。单性结实番茄 85-6 的花形态发育正常,无雄蕊或雌

蕊畸形,成熟果实为无籽果实;而 79-1 为有籽果实,两者的果实大小无明显差别(图 1C)。通过对不同时期果实发育情况观察发现,在果实发育早期(开花前 1 d 到开花后 6 d),单性结实番茄子房明显比非单性结实番茄的子房膨大速度快(图 1B)。



A: 两份材料花的形态;B: 常温下两份材料开花前 1d、开花当天、开花后 2、4、6、8d 的子房;C: 两份材料常温下成熟果实形态;Bars=1cm
A: Morphological observation of flowers;B: Ovary development on the day before flowering, the day after flowering and the 2nd, 4th, 6th and 8th days after flowering of the two materials; C: Mature fruit morphology of two materials at normal temperature; Bars=1cm

图 1 85-6 与 79-1 番茄花与果实形态

Fig. 1 Morphology of flowers and fruits of tomato lines 85-6 and 79-1

2.2 单性结实特性

通过田间调查发现,85-6 和 79-1 在正常温度下,自然自花授粉后坐果率无显著性差异,79-1 平均单果种子数为 23.7~25.6,而 85-6 种子数量明显少

于 79-1,绝大多数果实均为无籽果实,2021 年秋季收获的果实中,只有 1 个果实内有 1 粒种子,其余 36 个果实内均未有种子;2022 年春季收获 218 个果实,只得到 6 粒种子,平均单果种子数仅为 0.03(表 2)。

表 2 85-6 与 79-1 番茄自然条件下坐果率与结种数统计

Table 2 Statistics on fruit setting rate and seed number of 85-6 and 79-1 under natural conditions

种植季节 Seasons	自交系 Inbred lines	坐果率(%) Fruit setting rate	果实数 Number of fruits	种子数 Number of seeds	单果平均种子数 Average number of seeds per fruit
2021 年秋季 Autumn 2021	85-6	93.32±3.87	37	1	0.027
	79-1	91.30±4.15	36	922	25.61
2022 年春季 Spring 2022	85-6	93.32±3.87	218	6	0.028
	79-1	91.30±4.15	41	973	23.73

由表3和图2可以看出,蕾期去雄处理后,单性结实番茄85-6仍能保持较高的坐果率,坐果率为91.26%,并且结出正常大小的无籽果实(图2B);而非

单性结实番茄79-1蕾期去雄后,大部分子房均无法正常膨大,只有少数子房虽能够膨大但膨大速度非常慢,且无法正常成熟(图2A),坐果率降低为5%左右。

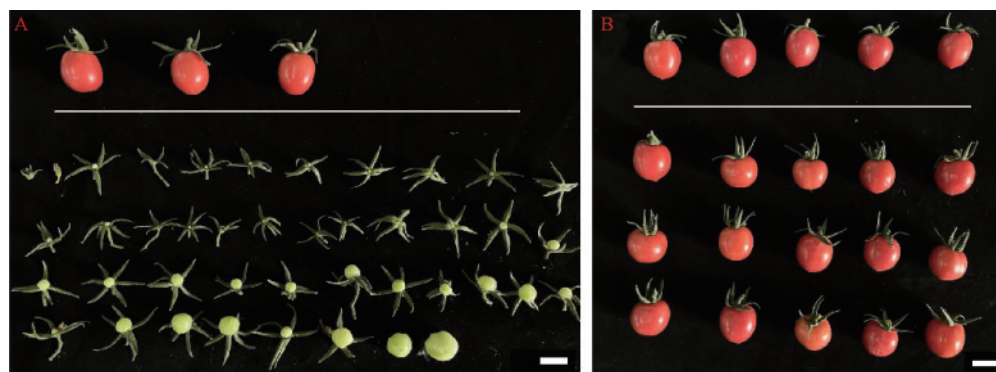
表3 85-6与79-1去雄后的坐果率与结种数统计

Table 3 Statistics of fruit setting rate and seed number of 85-6 and 79-1 after emasculation

自交系 Inbred lines	坐果率(%) Fruit setting rate	收获果实数 Number of fruits	种子数 Number of seeds
85-6	91.26±3.01a	43	0
79-1	5.10±6.08b	1	0

同列数据后不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平下差异显著;下同

Different letters after the same column data indicate significant differences at the level of $P < 0.05$; The same as below



A: 79-1; B: 85-6; A、B图横线上为自然情况下未去雄时成熟果实,横线下所有果实均为去雄后35d的果实;Bars=2cm

A: 85-6; B: 79-1; On the horizontal lines of figures A and B, all the fruits are mature in natural conditions, and all the fruits under the horizontal lines are 35 days after emasculation; Bars=2cm

图2 蕾期去雄后85-6和79-1的坐果及果实发育情况

Fig. 2 Fruit setting and fruit development of two materials after emasculation in bud stage

2.3 逆境温度胁迫下坐果和结实情况分析

逆温($> 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的高温和 $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温)会导致具有兼性单性结实特性的番茄产生单性结实,为了验证85-6番茄是否为兼性单性结实番茄,对花期持续高温和持续低温环境下,两份材料的坐果和结实情况进行了田间调查分析。结果显示,在夏季塑料大棚日平均气温 $> 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和冬季日光温室日平均气温 $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的情况下,对单性结实和非单行结实番茄的坐果和结实均有一定的影响。相比正常温度,连续高温或低温环境下,非单性结实番茄79-1坐果率明显下降,分别为74.85%和80.62%(表4),且果实变小(图3A)。而单性结实番茄85-6在高温和低温环境下坐果率虽比正常温度下坐果率有所下降,但显著高于非单性结实番茄79-1的坐果率,分别为83.45%和94.21%。85-6番茄在高温或低温下的果实明显变小,大部分果实转色时间延长甚至无法正常转色,且均能够产生少量的种子,平均单果种子数约为8.3,发芽试验显示,种子平均发芽率仅为29.75%(图3B、表4)。

2.4 自交亲和性表现

对染色后的花粉进行镜检后发现,两份材料花粉活力并无显著性差异,85-6的花粉活力为56.33%,79-1的花粉活力为52.67%(表5、图4)。

从开花当天子房的石蜡切片中可以看到,85-6与79-1均有正常发育且形态饱满的胚珠,数量从几粒到十几粒不等(图5),由此表明85-6材料中不存在雌蕊败育的情况。

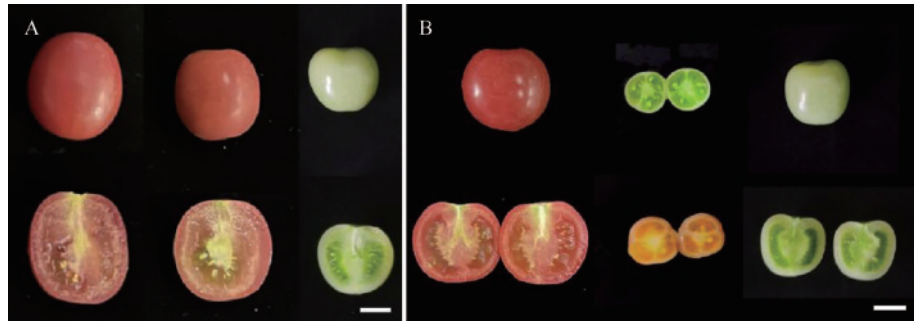
观察发现单性结实番茄85-6自交授粉24h后,花粉在柱头上能够正常萌发,但是花粉管不能在柱头内正常伸长(图6A),由此表明,85-6番茄存在着自交不亲和的特性。而非单性结实番茄79-1自交授粉后花粉不仅能够正常萌发,且花粉管能够在柱头内正常伸长到达胚珠(图6B)。

采用去雄后人工辅助授粉进行自交及正反交试验结果显示,85-6人工辅助授粉自交的情况下,能够保持较高的坐果率(94.7%),但果实内大多无种子形成;79-1自交则形成正常的有籽果实;正反交后两者均能保持较高的坐果率,并能形成种子(表6)。

表 4 温度胁迫下 85-6 和 79-1 的坐果率统计

Table 4 Statistics of fruit setting rate of two materials 85-6 and 79-1 under temperature stress

自交系 Inbred lines	正常温度下坐果率(%) Fruit setting rate at normal temperature	高温胁迫后坐果率(%) Fruit setting rate after high temperature stress	低温胁迫后坐果率(%) Fruit setting rate after low temperature stress	单果种子数 Number of seeds per fruit	种子发芽率(%) Rate of emergence
85-6	94.78±3.81a	83.45±8.21a	94.21±8.45a	8.3±2.00b	29.75±2.75b
79-1	92.83±8.54a	74.85±0.78b	80.62±4.69b	19.8±3.01a	99±0.81a



A: 79-1; B: 85-6; A、B图从左至右依次为常温、夏季高温、冬季低温的坐果及结实情况; Bars=1 cm

A: 79-1; B: 85-6; In figures A and B, from left to right, the fruit setting and fruiting conditions are normal temperature, high temperature in summer and low temperature in winter; Bars=1 cm

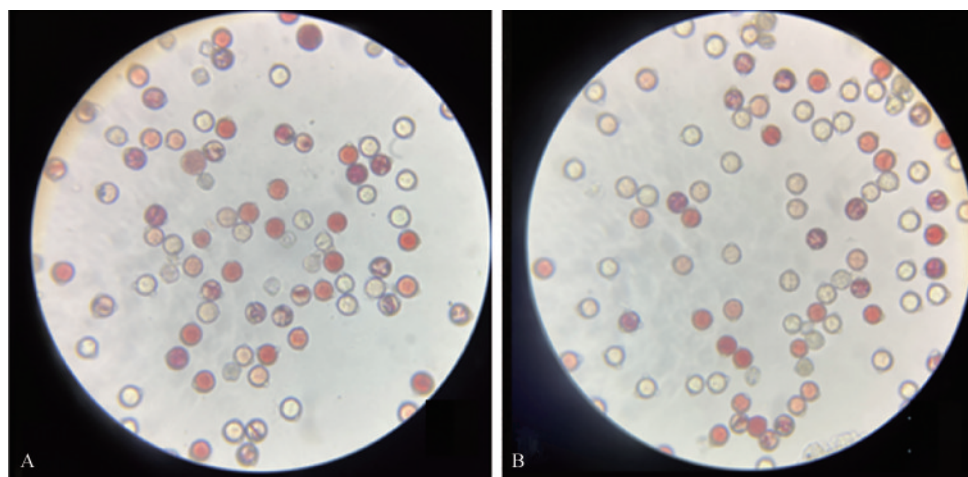
图 3 温度胁迫对 79-1 和 85-6 果实坐果及结实情况的影响

Fig.3 Effects of temperature inversion stress on fruit setting and seed fruiting of 79-1 and 85-6

表 5 85-6 与 79-1 番茄花粉活力统计

Table 5 Statistics on pollen vigor of 85-6 and 79-1

自交系 Inbred lines	花粉活力(%) Pollen vigor	花粉数量 Pollen number
85-6	56.33±2.08	72±4.56
79-1	51.67±1.52	79±6.79



A 为 10×物镜下 85-6 花粉活力观察; B 为 10×物镜下 79-1 花粉活力观察

A Shows the observation of 85-6 pollen vitality under 10× objective lenses; B Shows the observation of 85-6 pollen vitality under 10× objective lenses

图 4 85-6 与 79-1 花粉活力

Fig.4 Observation on pollen vigor of 85-6 and 79-1

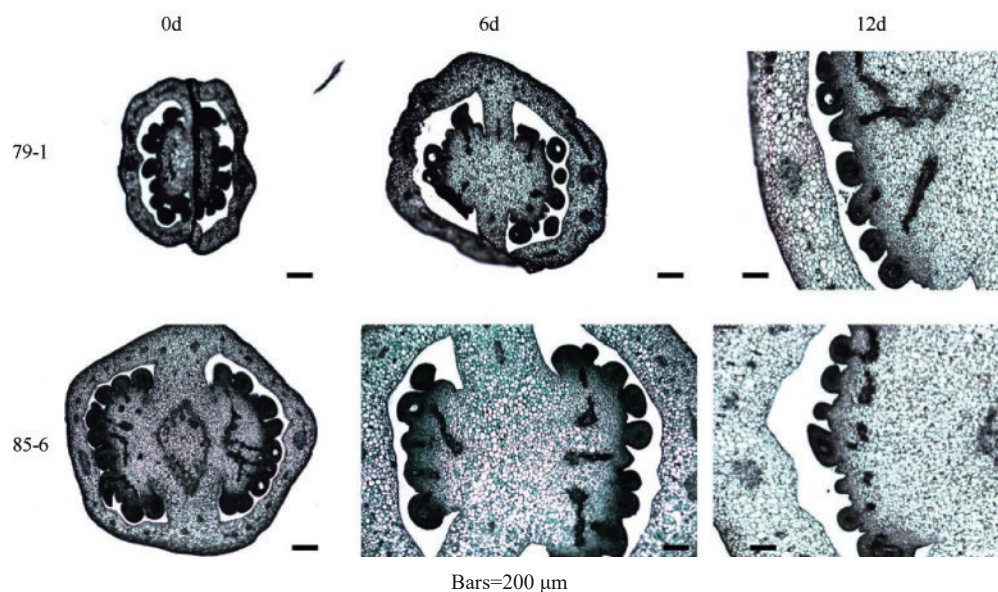
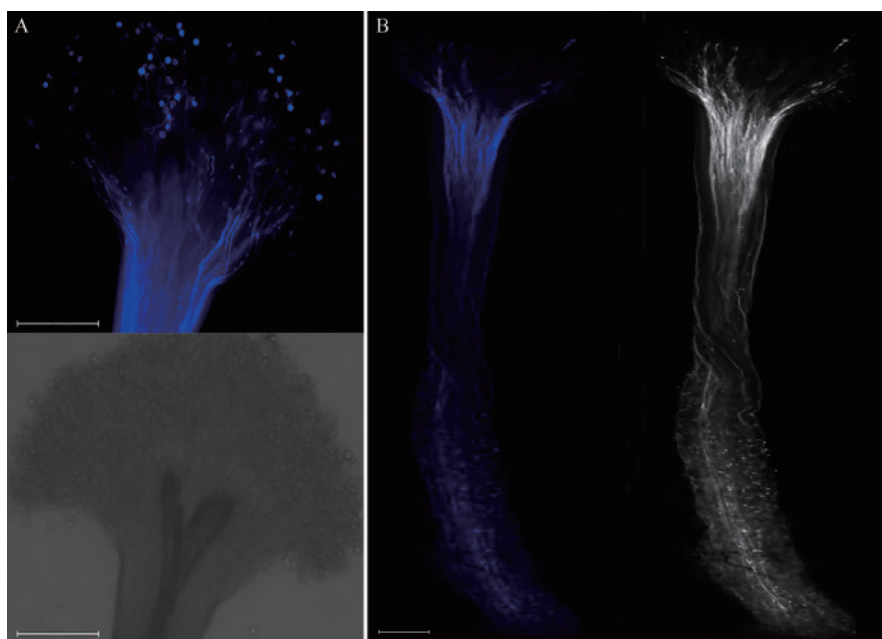


图5 85-6与79-1子房内的胚珠
Fig.5 Observation on ovule development



A: 85-6 自交后花粉萌发情况, 上图为荧光下观察, 下图为明场下观察; B: 79-1 自交后花粉萌发和花粉管伸长情况, 左图荧光下观察, 右图为明场下观察(10×下观察, Bars=250μm)

A: Pollen germination after self-pollination of 85-6, the above figure shows the observation under fluorescence, and the following figure shows the observation under bright field; B: Pollen germination and pollen tube elongation after self-pollination of 79-1, The left figure shows the observation under fluorescence, and the right figure shows the observation under bright field(Observed under 10×, Bars=250μm)

图6 85-6和79-1自交24h后花粉在柱头的萌发情况

Fig.6 Pollen germination on stigma after 24 hours of self-pollination of 85-6 and 79-1

表 6 自交及杂交坐果率及种子数

Table 6 Statistics on fruit setting rate and seed number of self-cross and hybrid

处理 Treatments	坐果率(%) Fruit setting rate	果实数量 Number of fruits	种子数 Number of seeds	单果种子数 Number of seeds per fruit
85-6 人工自交 Artificial assisted selfing of 85-6	94.7±4.7	20	1	0.05
79-1 人工自交 Artificial assisted selfing of 79-1	92.3±3.5	20	346	17.30
85-6×79-1	91.67±2.05	4*	42	10.50
79-1×85-6	92.31±5.6	12	75	6.25

* 杂交果实数为 15, 但是果实转色后温室爆发青虫, 大部分果实被虫子吃掉, 最后只统计到了 4 个果实

* The number of hybrid fruits is actually 15, but due to the outbreak of pests in greenhouse, most of the fruits were eaten by caterpillars, and finally only 4 fruits were counted

2.5 单性结实相关基因的验证

Nunome 等^[29]将 *pat-2* 定位到 4 号染色体上, 并被发现编码一个锌指同源结构域蛋白, 研究发现该基因在单性结实番茄中存在一个 1351 bp 的缺失。Takisawa 等^[20]将控制番茄单性结实的基因 *pat-k* 进行了精细定位, 发现 *pat-k* 即为 *SLAGL6*, 该基因的突变使番茄 *MPK-1* 出现单性结实特性, 其突变形式为在基因的 197 bp 处插入了 4782 bp (该插入片段包含一个 LTR 逆转录转座子 *CopiaSL37*)。Gracia 等^[22]利用番茄单性结实突变体 *hydra*, 将控制番茄兼性单性结实的基因 *hydra* 确定为 Solyc07g063670, 在突变体 *hydra* 中, 该基因在第 3 外显子处插入了一段 366 bp 的 SPL-like 基因。Matsuo 等^[21]将茄子单性结实基因 *pad-1* 进行了精细定位, 并在番茄中将其同源基因 *Slpad-1* 进行了 RNAi, 得到了具有单性结实特性的番茄转基因植株。我们对上述已经确定的番茄单性结实基因在 85-6 和 79-1 中进行了序列比对, 比对结果发现, 4 个基因在 85-6 和 79-1 中均无任何序列上的差异。

3 讨论

本研究发一份新的番茄单性结实材料 85-6, 该材料与前人报道的单性结实材料所具有的特性均有所不同。在目前已经发现的单性结实材料中, *pat* 番茄突变体的雄蕊和胚珠存在部分畸变^[19], 含有 *pat2*、*pat3/4* 基因的单性结实番茄皆为隐形突变的兼性单性结实且有 *pat3/pat4* 基因的材料本身存在一定的缺陷^[18, 24]。目前番茄中被广泛研究的单性结实资源主要有 3 个, 即含有 *pat* 基因的 Montfavet 191、含有 *pat2* 基因的 Severianin 和含有 *pat3/pat4* 基因的 RP75/79^[23]。其中, 含有 *pat* 基因的材料为雌性不育型, 含有 *pat3/pat4* 基因的材料本身

也存在一定的缺陷^[24]。阮美颖等^[27]报道的单性结实材料 CP28, 正常温度下单果种子数在 6.44~7.41 之间, 不同位置花序间表现差异较大; 在低温下子房内几乎没有胚珠, 形成无籽果实。本研究发现 85-6 番茄其单性结实的特性与上述已报道的材料特性均不相同; 85-6 与 79-1 在自然条件下花的形态没有显著差异, 均具有正常的花器官; 85-6 在自然条件下人工自交和去雄后都可以结出无籽果实, 这一特性与目前发现的单性结实番茄材料均不同。且不论是在正常温度还是逆温环境下, 85-6 蕾期去雄后可正常坐果, 果实正常膨大并发育成熟, 且成熟果实的大小与正常果实无明显差别, 表明其单性结实特性不受环境的影响, 因此判断, 番茄 85-6 属于专性单性结实材料。为了进一步探究 85-6 无法产生种子的原因, 本研究对 85-6 进行了花粉活力检测、花粉在柱头上的萌发、自交和正反交试验以及胚珠结构发育的观察, 结果表明 85-6 番茄不存在雄蕊或雌蕊败育的情况, 进一步表明其单性结实特性并非由雌蕊或雄蕊的败育引起的; 而且自然自交花粉萌发状况、人工自交和杂交试验结果表明 85-6 可能存在着自交不亲和的特性, 而该特性在花期持续逆温(日平均气温 > 35℃ 或 < 10℃)的情况下能够被打破; 此外, 对于已报道的番茄单性结实相关的基因(*pat-2*、*pat-k*、*pad-1*、*hydra*^[19-22, 29]) 在 85-6 和 79-1 中也进行了序列比对, 发现这 4 个基因序列在两份材料中完全一致, 均无前人报道中的序列差异, 由此推测控制该材料单性结实特性的基因可能是一个新的基因。

单性结实番茄在高低温逆境下具有自然结实能力很强、可稳定遗传、品质高、无畸形果、无籽果实等优势, 是未来番茄栽培的重要研究方向之一。而自交不亲和性番茄作为母本在杂交制种中可以

省去去雄操作,省时省工,是番茄育种中的一个重要的性状。虽然有关番茄单性结实的资源发现得比较早,但对于单性结实的机制仍缺乏更为广泛和深入的研究,且在实际的农业生产中极度缺少可应用的单性结实及自交不亲和的品系。本研究丰富了番茄育种材料资源,为多抗性单性结实新品种的培育奠定了基础,且为相关机制的研究提供了较好的研究材料。

4 结论

本研究单性结实材料樱桃番茄自交系85-6,由粉贝贝自交分离后代经过多代自交后获得。通过蕾期去雄、自交、杂交、逆温处理、花粉活力检测等试验,结果表明,85-6番茄在常温下存在单性结实的特性,且该性状可以稳定遗传;且85-6番茄花粉能够正常萌发,具有较高的花粉活力,但人工自交授粉却表现为自交不亲和特性;而在持续高温(日平均气温 $>35^{\circ}\text{C}$)或持续低温(日平均气温 $<10^{\circ}\text{C}$)的情况下,能够完成自交授粉受精并形成种子,但果实较小,且转色时间延长,所形成的种子发芽率较低,约为30%。通过与已报道的番茄单性结实基因序列的比对,发现控制该番茄材料单性结实的基因可能是一个新的基因。

参考文献

- [1] 陈学好,陶俊,曹磊生.园艺作物单性结实的类型.生物学通报, 2001, 35(9): 6-7
Chen X H, Tao J, Cao P S. Types of parthenocarpy in horticultural crops. Bulletin of Biology, 2001, 35(9): 6-7
- [2] 南思楠,邹薛,闫道良.植物单性结实的发生诱因及其机制研究.安徽林业科技, 2021, 47(5): 11-15, 35
Nan S N, Zou X, Yan D L. Study on inducements and mechanism for parthenocarpy in plants. Anhui Forestry Science & Technology, 2021, 47(5): 11-15, 35
- [3] 凌丹燕,张清杨,刘姝,丁燕倩,吴旭峰,孙莉莉,郭卫东,廖芳蕾.植物生长素影响单性结实的研究进展.浙江师范大学学报:自然科学版, 2015, 38(2): 201-205
Ling D Y, Zhang Q Y, Liu S, Ding Y Q, Wu X F, Sun L L, Guo W D, Liao F L. The progress of parthenocarpy in plant. Journal of Zhejiang Normal University: Natural Science Edition, 2015, 38(2): 201-205
- [4] 许楚楚.利用植物生长物质诱导梨单性结实的研究.杭州:浙江大学, 2017
Xu C C. Study on parthenocarpy induced by plant growth substances in pears. Hangzhou: Zhejiang University, 2017
- [5] Cheng C X, Jiao C, Singer S D, Gao M, Xu X Z, Zhou Y M. Gibberellin-induced changes in the transcriptome of grapevine (*Vitis labrusca*×*V. vinifera*) cv. Kyoho flowers. BMC Genomics, 2015, 16(1): 2-16
- [6] Serrani J C, Fos M, Atarés A, García-Martínez J L. Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv Micro-Tom of tomato. Journal of Plant Growth Regulation, 2007, 26:211-221
- [7] Abad M, Monteiro A A. The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions: A review. Scientific Horticulture: Amsterdam, 1989, 38: 167-192
- [8] Gustafson F G. Parthenocarpy: Natural and artificial. Botanical Review, 1942, 8: 599-654
- [9] Fos M, Nuez F, García-Martínez J L. The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. Plant Physiology, 2000, 122: 471-479
- [10] Molesini B, Pandolfini T, Rotino G L, Dani V, Spena A, Biotechnology D. Aucsia gene silencing causes parthenocarpic fruit development in tomato. Plant Physiology, 2009, 149(1): 534-548
- [11] Pandolfini T, Rotino G L, Camerini S, Defez R, Spena A. Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: High quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. BMC Biotechnology, 2002, 2: 1-11
- [12] de Jong M, Wolters-Arts M, Feron R, Mariani C, Vriezen W H. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (*SLARF7*) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. Plant Journal, 2009, 57: 160-170
- [13] Goetz M, Hooper L C, Johnson S D, Rodrigues J C M, Vivian-Smith, Koltunow A M. Expression of aberrant forms of *AUXIN RESPONSE FACTOR8* stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato. Plant Physiology, 2007, 145: 351-366
- [14] Liu S, Zhang Y, Feng Q, Qin L, Pan C, Lamin-Samu A T, Lu G. Tomato *AUXIN RESPONSE FACTOR 5* regulates fruit set and development via the mediation of auxin and gibberellin signaling. Scientific Reports, 2018, 8: 1-16
- [15] Rounis V, Skarmoutsos K, Tsaniklidis G, Nikoloudakis N, Delis C, Karapanos I, Aivalakis G. Seeded and parthenocarpic cherry tomato fruits exhibit similar sucrose, glucose, and fructose levels, despite dissimilarities in UGPase and SPS gene expression and enzyme activity. Journal of Plant Growth Regulation, 2015, 34: 47-56
- [16] 王利英,石瑶,刘文明,于海龙.番茄单性结实遗传效应分析和新材料的选育.天津农业科学, 2008(2): 38-40
Wang L Y, Shi Y, Liu W M, Yu H L. Genetic effect of parthenocarpy and new lines selection in tomato. Tianjin Agricultural Science, 2008(2): 38-40
- [17] Mao Z C, Yu Q J, Zhen W, Guo J Y, Hu Y L, Gao Y, Lin Z P. Expression of *ipt* gene driven by tomato fruit specific promoter and its effects on fruit development of tomato. Chinese Science Bulletin, 2002, 11: 928-933, 969
- [18] Wang L Y, Shi Y, Liu W M, Yu H L. Genetic effect of parthenocarpy and new lines selection in tomato. Tianjin

- Agricultural Sciences, 2008, 14(2): 38-40
- [19] Takisawa R, Maruyama T, Nakazaki T, Kataoka K, Saito H, Koeda S, Nunome T, Fukuoka H, Kitajima A. Parthenocarpy in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar 'MPK-1' is controlled by a novel parthenocarpic gene. The Horticulture Journal, 2017, 86(4): 487-492
- [20] Takisawa R, Nakazaki T, Nunome T, Fukuoka H, Kataoka K, Saito H, Habu T, Kitajima A. The parthenocarpic gene Pat-k is generated by a natural mutation of *SLAGL6* affecting fruit development in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). BMC Plant Biology, 2018, 18: 1-12
- [21] Matsuo S, Miyatake K, Endo M, Urashimo S, Kawanishi T, Negoro S, Shimakoshi S, Fukuoka H. Loss of function of the *Pad-1* aminotransferase gene, which is involved in auxin homeostasis, induces parthenocarpy in Solanaceae plants. PNAS, 2020, 117(23): 12784-12790
- [22] Gracia R P, Roque E, Medina M, Rochina M, Hamza R, Angarita-Díaz M P, Moreno V, Pérez-Martín F, Lozano R, Cañas L, Beltrán J P, Gómez-Mena C. The parthenocarpic hydra mutant reveals a new function for a SPOROXYTELESS-like gene in the control of fruit set in tomato. New Phytologist, 2017, 214(3): 1198-1212
- [23] 张祥胜, 陈日远, 刘厚诚. 蔬菜单性结实研究进展//中国园艺学会第五届青年学术研讨会. 中国园艺学会第五届青年学术讨论会论文集. 广州: 广州出版社, 2002: 396-404
- Zhang X S, Chen R Y, Liu H C. Research progress on parthenocarpy of vegetables//The 5th Youth Symposium of China Horticultural Society. Proceedings of the 5th Youth Symposium of China Horticultural Society. Guangzhou: Guangzhou Publishers, 2002: 396-404
- [24] 张少丽, 邵景成, 胡志峰, 魏兵强. 番茄单性结实研究进展. 园艺学报, 2016, 43(1): 183-192
- Zhang S L, Shao J C, Hu Z F, Wei B Q. Research advance in tomato parthenocarpy. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(1): 183-192
- [25] 张映, 陈钰辉, 连勇, 刘富中. 园艺植物单性结实的分子研究进展. 园艺学报, 2018, 45(7): 1402-1414
- Zhang Y, Chen Y H, Lian Y, Liu F Z. Research progress on molecules of parthenocarpy in horticultural plants. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(7): 1402-1414
- [26] Liu W M, An Z X. The researches about the parthenocarpic tomato and eggplant in Japan. Journal of Changjiang Vegetables, 2006, 4: 38-39
- [27] 阮美颖, 叶青静, 程远, 王荣青, 李志邈, 姚祝平, 万红建, 周国治, 陶佳翠. 单性结实樱桃番茄种质材料研究与抗病新种质创制. 植物遗传资源学报, 2020, 21(5): 1148-1155
- Ruan M Y, Ye Q J, Cheng Y, Wang R Q, Li Z M, Yao Z P, Wan J H, Zhou Z G, Tao J C. Study on germplasm materials of parthenocarpic cherry tomato and creation of new germplasm with disease resistance. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(5): 1148-1155
- [28] 胡适宜. 植物胚胎学实验方法(五)检查花粉在柱头上萌发和花粉管在花柱中生长的制片法. 植物学通报, 1994, 11(2): 58-60
- Hu S Y. Experimental methods of plant embryology (V) A slice method for checking pollen germination on stigma and pollen tube growth in style. Chinese Bulletin of Botany, 1994, 11(2): 58-60
- [29] Nunome T I, Honda A, Ohya H, Fukuoka H, Yamaguchi, K Miyatake. Parthenocarpy regulation gene and use thereof. Patent WO: EP2883955(A1), 2015-06-17