

秦瑞云,王少净,刘新鑫,等.赤霉素(GA_3)对菠菜性别分化的影响及分子机制[J].江苏农业科学,2017,45(5):133-135.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.037

赤霉素(GA_3)对菠菜性别分化的影响及分子机制

秦瑞云,王少净,刘新鑫,杜亚茹,王冰肖,李忠徽,闫宁宁,李书粉,高武军,邓传良

(河南师范大学生命科学学院,河南新乡 453007)

摘要:以日本大叶菠菜为供试材料,采用温室内盆栽种植的方式,利用赤霉素(GA_3)进行处理,探讨其对雌雄异株植物菠菜性别分化的影响。结果表明,试验组在第 1 次处理后植株就有明显的生长,表现为植株茎秆变长、较对照组粗壮、开花期提前。与对照组相比,试验组雌雄比例(1.33)明显大于对照组(0.96)。此外,发生性反转植株中,雌株转变为雄株与雄株转变为雌株的比例为 1.14。利用 Y 染色体紧密连锁的雄性特异 T11A 分子标记对性反转植株进行检测,结果表明,雌株转变为雄株,雄性特异条带出现;雄株转变为雌株,雄性特异条带消失。本研究结果为进一步研究激素对菠菜性别分化影响的分子机制奠定了基础。

关键词:菠菜;赤霉素(GA_3);T11A 分子标记;性反转;性别分化

中图分类号: S636.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0133-02

菠菜(*Spinacia oleracea* L.)为藜科菠菜属一年生或二年生草本植物,染色体组成为($2n=2x=12$),具有生长周期短、表型丰富、营养价值高等特点,是一种大面积种植的蔬菜作物。菠菜系雌雄异株植物,其性别分化不但受到性别决定基因控制,还受到激素的影响^[1]。在早期研究中,Chailakhyan 等认为在长日照类型的菠菜中,赤霉素对性别表现的影响为促进雄性化^[2];El-Gizawy 等的研究也表明赤霉素处理菠菜具有促雄作用^[3-4];而曹宗巽等则报道赤霉素在菠菜中有促雌作用^[1]。由此可见,不同研究学者利用赤霉素处理菠菜,其诱导结果是有差异的。赤霉素对其他植物性别分化的影响也不尽相同,赤霉素可以促使某些植物雄性化,但是也可以导致某些植物雌性化,赤霉素对黄瓜雌性系性别分化的影响表现为能促进雄花分化,阻碍雌花分化^[5]。在赤霉素对小桐子处理的试验中,结果表明外施赤霉素诱导小桐子雌花中原来停止发育的雄蕊重新正常发育,进而将其变成两性花^[6]。在玉米不同的发育阶段,对叶面喷施赤霉素,能够使玉米雄花穗变成雌性、雄性不育或保持雄性可育^[7]。赤霉素还可以诱导宽叶慈菇雄株及三性花同株向雌株性别的转换^[8]。

尽管前期有不少学者研究了赤霉素对菠菜性别分化的影响,并得出了不同的结论,但是其研究结果只关注于赤霉素对菠菜外观形态特征的影响,至于赤霉素为什么会导致菠菜的性别转化缺乏深入的研究。本研究以日本大叶菠菜为供试材料,采用外源赤霉素处理受试菠菜植株,观察处理前后菠菜性别变化的情况,并利用菠菜 Y 染色体紧密连锁雄性特异标记 T11A 对性反转植株进行基因组检测,从分子水平探讨其对雌雄异株植物菠菜性别分化的影响,本研究结果为进一步揭示

赤霉素对菠菜性别分化影响的分子机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为日本大叶菠菜。2013—2014 年连续在河南师范大学植物组织培养室种植菠菜。种植前先将种子进行人工春化(4℃,7 d 左右),然后播种于含有培养土和蛭石(培养土、蛭石体积比为 1:1.5)的土壤(混合后放入植物组织培养室常用的小型花盆中),并给予充足的水分。培养条件为光照 14~16 h、黑暗 8~10 h 的长日照,均采用日光灯管照明,经照度计检测光照度为 3 000 lx,培养温度(20±2)℃,直至全部正常开花。

1.2 试验方法

1.2.1 赤霉素处理 将种植的菠菜随机分为 2 组,试验组和对照组,每组均为 100 株。对试验组进行处理,根据前期学者研究结果^[1],将赤霉素处理浓度定为 50 mg/L,对每株菠菜植株均匀喷洒赤霉素,对照组则喷水。每隔 3 d 用同一浓度赤霉素处理 1 次,处理后观察植株的变化,随后均正常浇水。试验组由于每棵植株开花时间略有差异,因此每隔 2 d 统计 1 次,统计时严格按照菠菜雌雄植株开花特点,准确区分绝对雌株、绝对雄株及两性株,直至试验组和对照组菠菜植株均全部正常开花。

1.2.2 性反转植株的分子检测 为了检测性反转产生的分子机制,进行如下处理:在赤霉素处理之前,剪取培养约 2 周的菠菜叶片,用改良的 2×CTAB 法提取每株菠菜的 DNA^[9-10],用菠菜 Y 染色体紧密连锁的雄性特异标记 T11A 分子标记^[11]鉴定菠菜的原始性别,引物序列为 T11A-F, 5'-CCCTAATTAACCTCTCTTTACCCAA-3'; T11A-R, 5'-TACAAGCCCCATTATCATAACAGTC-3'。T11A 反应体系(20 μL)为 0.5 μL 上游引物,0.5 μL 下游引物,14.4 μL H₂O,2 μL buffer,1.5 μL dNTP,0.1 μL *Taq* DNA 聚合酶;其扩增程序为 94℃ 2 min,94℃ 15 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,72℃ 10 min,4℃ 恒温;另外,对赤霉素处理后的菠菜植株的

收稿日期:2016-01-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:31000165);河南省高等学校青年骨干项目(编号:2014GGJS-050)。

作者简介:秦瑞云(1976—),女,山东菏泽人,硕士,主要从事植物分子遗传学研究。E-mail:QRY76@163.com。

通信作者:邓传良,博士,教授,主要从事植物分子遗传研究。E-mail:DCL75@163.com。

开花情况进行性别统计,将统计结果与处理前鉴定的菠菜原始性别进行比较,找出发生性别反转的植株,保存叶片,提取 DNA,并再次利用 T11A 对性反转植株进行鉴定,并借助琼脂糖凝胶电泳检测处理前后条带变化情况。

2 结果与分析

2.1 赤霉素处理对菠菜性别分化的影响

赤霉素处理后菠菜形态特征产生一些变化,与对照组相

比,试验组在第 1 次处理后植株有了明显的生长,表现为植株茎秆变长、明显粗壮、开花期提前。

赤霉素处理对菠菜性别分化的影响也非常明显,如表 1 所示,与对照组相比,试验组雌雄比例(1.33)明显大于对照组(0.96)。另外,在发生性反转植株中,雌株转变为雄株与雄株转变为雌株的比例为 1.14,结果表明 50 mg/L 赤霉素对雌雄异株菠菜的性别分化有明显的影响,既有利于雌株的分化又有利于雄株的分化。

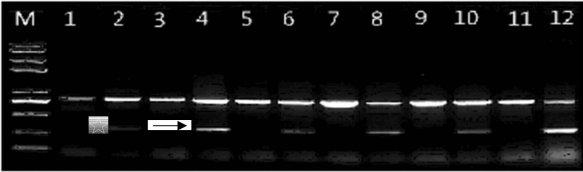
表 1 赤霉素(GA₃)对菠菜性别表现及开花的影响

处理	♀ 株		♂ 株		♀♂ 株		雌雄性别比率	雌株变雄株		雄株变雌株	
	数目	百分比(%)	数目	百分比(%)	数目	百分比(%)		数目	百分比(%)	数目	百分比(%)
GA ₃	52	53.6	39	40.2	6	6.2	1.33	8	8.2	7	7.2
对照	44	45.4	46	47.4	7	7.2	0.96	0	0	0	0

注:GA₃:50 mg/L 赤霉素;♀:雌株;♂:雄株;♀♂:雌雄同株。(未)开花及性反转百分比以总株数计算;♀、♂、♀♂百分比按开花数计算。

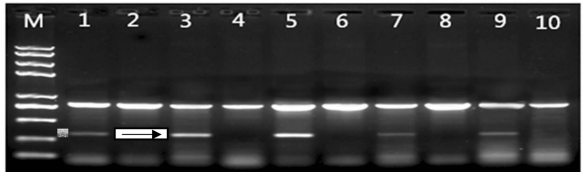
2.2 赤霉素处理性反转植株的分子检测

用菠菜 Y 染色体紧密连锁雄性特异的 T11A 分子标记对菠菜性反转植株进行检测,琼脂糖凝胶电泳结果显示,雌株转变为雄株,雄性特异条带出现(图 1);雄株转变为雌株,雄性特异条带消失(图 2)。



M—Trans DNA Marker II; 1、3、5、7、9、11—处理前(雌株);2、4、6、8、10、12—处理后(雌株);箭头所示为雄性特异条带

图1 50 mg/L 赤霉素处理菠菜雌株转变为雄株的琼脂糖凝胶电泳检测结果



M—Trans DNA Marker II; 1、3、5、7、9、11—处理前(雄株);2、4、6、8、10、12—处理后(雌株);箭头所示为雄性特异条带

图2 50 mg/L 赤霉素处理菠菜雄株转变为雌株的琼脂糖凝胶电泳检测结果

3 讨论

关于植物的性别分化,分子水平上的研究表明,植物的性别分化就是性别决定基因在诱导信号等作用下,发生去阻遏作用,使特异基因选择性地表达,从而实现性别分化程序表达的过程^[2]。赤霉素作为一种诱导信号,在高等植物的各个生长发育阶段都具有重要的调控作用^[3]。外源赤霉素常常用作调节植物生长和性别分化。赤霉素经常被认为是男性荷尔蒙,赤霉素处理可以诱导黄瓜和菠菜的雌株雄性化^[12]。在番木瓜上喷施赤霉素抑制剂,可以诱导雄株上出现心皮发育,说明了赤霉素在保持番木瓜雄性特征中的作用^[13]。

性反转是指生物个体从一种性别特征转变为另一种相反的性别特征的性别转变现象。这一现象在动物中比较常见,也研究的比较透彻。李尚伟等利用抑制性差减杂交技术

(SSH),结合 SMART cDNA 合成和 RACE-PCR 方法,从性反转雄鱼性腺中克隆到钙调蛋白基因(*ECaM*),进一步分析表明 *ECaM* 基因可能是促使石斑鱼由雌向雄转变的重要功能基因之一^[14]。刘晓翌等探讨了人类性反转综合征发生与性别分化相关基因 *SRY*、*SOX9* 之间的关系,研究结果表明 *SRY* 易位是导致性反转发生的重要原因之一,某些性反转的发生可能与 *SOX9* 基因异常有关^[15]。性反转现象在植物中也时有发生,但是对其分子机理研究未见相关报道。本研究利用菠菜 Y 染色体紧密连锁雄性特异的 T11A 分子标记对菠菜性反转植株进行检测,结果表明,赤霉素处理菠菜可以导致雌株转变为雄株,也可以导致雄株转变为雌株;雌株转变雄株,雄性特异条带出现;雄株转变为雌株,雄性特异条带消失。目前,未有决定菠菜性别基因克隆的报道,如果利用抑制性差减杂交技术筛选到菠菜性反转前后的差异表达基因,将可能会为揭示菠菜发生性反转的分子机制提供线索。此外,在菠菜性反转过程中,Y 染色体紧密连锁雄性特异的 T11A 分子标记为什么会出现或者消失,以及其与性别决定基因的关系还需要进一步进行深入研究。

参考文献:

[1] 曹宗巽,梅慧生,杨中汉,等. 赤霉素和乙烯利对菠菜性别表现的控制及其与同工酶的关系[J]. 植物生理学报,1980,6(2):150-156.

[2] Chailakhyan M K, Khryanin V N. The role of leaves in sex expression in hemp and spinach[J]. Planta,1979,144(2):205-207.

[3] El-Gizawy A M, El-Oksh I, Sharaf A, et al. Effect of gibberellic acid and alar on flowering and seed yield of spinach[J]. Egyptian Journal of Horticulture,1992,19(2):191-200.

[4] Sherry R A, Eckard K J, Lord E M. Flower development in dioecious *Spinacia oleracea* (Chenopodiaceae) [J]. American Journal of Botany,1993,80(3):283-291.

[5] Pike L M, Peterson C E. Gibberellin A4/A7, for induction of staminate flowers on the gynoeocious cucumber(*Cucumis sativus* L.) [J]. Euphytica,1969,18(1):106-109.

[6] 皮雪静,潘帮珍,徐增富. 赤霉素诱导小桐子产生两性花[J]. 植物分类与资源学报,2013,35(1):26-32.

[7] Hansen D J, Bellman S K, Sacher R M. Gibberellic acid - controlled sex expression of corn tassels[J]. Crop Science,1976,16(3):371-374.

徐建明,郑磊磊,郑云南,等. 淮安市食用栝楼籽品种的搭架栽培技术[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):135-136.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.038

淮安市食用栝楼籽品种的搭架栽培技术

徐建明¹, 郑磊磊², 郑云南², 杨文杰¹, 郑满法²

(1. 江苏省区域现代农业与环境保护协同创新中心/淮阴师范学院, 江苏淮安 223300; 2. 江苏金福农业科技有限公司, 江苏淮安 223311)

摘要:在江苏省淮安市采用搭架栽培推广种植食用栝楼籽品种的基础上,从选地整地、搭棚架、分根繁殖、田间管理、病虫害防治和采收处理等方面,全面系统介绍了食用栝楼籽品种的搭架栽培技术措施,为进一步在淮安及其周边地区推广食用栝楼提供技术支撑。

关键词:食用栝楼;搭架;栽培技术

中图分类号: S318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0135-02

栝楼别称瓜蒌、药瓜、吊瓜等,为葫芦科栝楼属多年生草质藤本植物,雌雄异株。栝楼品种繁多,全世界栝楼属植物共有 80 余种,主要分布于东南亚及澳大利亚北部;我国有栝楼属植物 40 多种,主要分布在安徽、山东、河南、浙江、四川、云南等地^[1]。根据用途栝楼可分为药用品种和食用品种两大类,20 世纪 90 年代以来,随着对栝楼资源研究的不断深入,研究人员发现,栝楼除具有传统药用价值外,还具有很高的营养价值和保健作用。栝楼籽含有丰富的不饱和脂肪酸、蛋白质、氨基酸,并含有三贴皂苷、多种维生素以及钙、铁、锌、硒等多种微量元素。研究表明,其籽仁蛋白质含量为 30.04%,油脂含量更是高达 56%,其中主要成分为油酸、亚油酸、栝楼酸等不饱和脂肪酸;而且栝楼籽籽肉饱满、风味独特,是良好的保健休闲食品^[2-6]。

目前,栝楼在江苏、浙江、安徽、湖北、河南、山东等省有较大的种植面积,种植面积已超过 5 000 hm²,特别是籽用栝楼品种。栝楼适合温暖湿润的气候,以土层厚、疏松肥沃、排水良好的土壤为佳。当前农业生产上已经初步形成了平地栽培、搭架栽培、田间套作栽培 3 种模式。江苏淮安市于 10 年前开始种植栝楼^[7],2014 年开始引进推广搭架栽培食用栝楼

籽品种,3 年来发展势头良好,搭架栽培具有 1 年投入、多年收益的优点。本研究结合生产实际介绍搭架栽培食用栝楼品种的相关技术,为在江苏淮安及其周边地区进一步推广种植食用栝楼提供技术支撑。

1 选地整地

栝楼生长习性是既怕旱,又怕涝,因此,种植栝楼的地块最好选择既能排水、又能灌溉的沙质土壤,同时,忌选盐碱地。一般在霜冻来临前深翻土地,有利于冬季低温冻杀部分害虫、病菌及有害微生物等。另外,在深翻前施用腐熟好的农家肥 15 000 kg/hm² 或商品有机肥 7 500 kg/hm²。从第 2 年起,按照 15 000 kg/hm² 基肥用量,在深翻前施用腐熟好的农家肥基础上,加施 450~750 kg/hm² 的过磷酸钙、15~30 kg/hm² 的硼肥。并于栽种前 7 d,清除地块内的杂草及杂物,整地起垄,垄面宽 2.5 m,垄与垄间开沟,沟宽 1.0 m、沟深 0.4 m。田间做到旱能灌、涝能排,垄面无积水。

2 搭棚架

搭设棚架能够使繁茂的栝楼茎蔓分布均匀,且有更好的通风透光。棚架高 1.8 m,可用长 2 m 的水泥预制柱,下埋 20~30 cm,1 行栝楼 1 行立柱,立柱间隔 3.5 m,2~3 行间搭一横架。在架子上面、两端、中间及对角拉缠钢丝(选用 2.2 号镀锌钢丝),然后在钢丝上面覆盖 1 层尼龙网即可。棚架使用寿命一般在 10 年以上,每 2~3 年只需更换尼龙网即可。待栝楼出苗后,在每株栝楼旁边埋插竹竿,用尼龙线将竹竿连

收稿日期:2016-07-05

基金项目:江苏省苏北科技发展规划科技富民强县项目;淮安市现代农业科技项目(编号:HAN2015031)。

作者简介:徐建明(1963—),男,江苏张家港人,硕士,研究员,主要从事植物生理生态方面的研究。E-mail: xujiammy@163.com。

[8] Tanimoto T. Modification of sex expression in *Sagittaria latifolia* by the application of gibberellic acid and paclobutrazol[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2007, 76(1): 47-53.

[9] 宋国立,崔荣霞,王坤波,等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA [J]. 棉花学报, 1998, 10(5): 273-275.

[10] Olexová L, Lubomira D, Kuchta T. Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps[J]. European Food Research and Technology, 2004, 218(4): 390-393.

[11] Onodera Y, Yonaha I, Niikura S, et al. Monoecy and gynodioecy in *Spinacia oleracea* L.: morphological and genetic analyses [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 118(3): 266-269.

[12] Chailakhyan M K. Genetic and hormonal regulation of growth, flowering, and sex expression in plants[J]. American Journal of Botany, 1979, 66(6): 717-736.

[13] Kumar A, Jaiswal V S. Sex reversal and fruit formation on male plants of *Carica papaya* L by ethrel and chlorfloreneol [J]. Proceedings, Plant Sciences, 1984, 93(6): 635-641.

[14] 李尚伟,文建军,刘世贵,等. 石斑鱼性反转相关基因 *ECaM* 的克隆及表达特征分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(2): 147-153.

[15] 刘晓望,付 姣,肖晓素,等. 性反转综合征患者 *SRY*、*SOX9* 基因检测[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008(9): 30-31.