

大麻性别的分子标记

摘 要

雌雄异株植物大麻的性别一方面受遗传物质控制, 另一方面受环境因子的调控, 因此大麻是研究高等植物性别表达与环境相互关系的好材料。为了筛选大麻的全雌 (all-gynoecious) 和全雄 (all-androecious) 品系, 建立深入研究性别表达与环境相互关系的实验体系, 需要获得与大麻性别连锁的标记物。本研究利用随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 技术对不同性别大麻的基因组 DNA 进行了分析, 以期获得与大麻性别连锁的分子标记。(10 株雄性大麻或 10 株雌性大麻的单个 DNA 样品等量混合分别组成雄性或雌性 DNA 池 (DNA pool 或 bulked DNA), 以提供具有相同遗传背景的雌、雄性 DNA 样品。30 个随机引物分别用至少三个不同的循环程序进行 PCR 扩增, 结果在三个不同的扩增条件 (循环程序) 下, 分别得到三个与性别连锁的分子标记。其中, 用引物 S151 扩增得到一条约 400 bp 的雄性特异片段, 用引物 S101 扩增得到一条约 700 bp 的雌性特异片段, 用引物 S401 扩增得到一条约 2.5 kb 的雄性特异片段。对约 2.5 kb 的雄性特异片段进行了克隆和序列分析。) 序列分析结果表明该片段属非编码序列。用该特异性片段作探针进行的 Southern Blot 分析结果表明雌、雄性的杂交信号有量的区别, 没有质的区别, 这一结果与该片段含有重复序列有关。为了将 RAPD 标记转化为重复性和特异性更好的 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) 标记, 根据序列分析结果, 分别合成了 20 碱基和 22 碱基的特异性引物, 用该特异性引物进行 PCR 扩增, 结果雄株有一条 SCAR 标记, 而雌株没有。大麻雄性的 SCAR 标记可用于筛选全雌品系, 也可用于研究大麻的种系发生。

关键词: 大麻; 性别分子标记; RAPD; SCAR

Sex-linked DNA markers in the dioecious species *Cannabis sativa* L.

Abstract

The dioecious plant hemp (*Cannabis sativa* L.) is an excellent material for investigating the environmental regulation of sex expression, as its sex expression was controlled by genetic materials and regulated by environmental factors. Sex-linked markers are needed for screening all-gynoecious or all-androecious hemp lines, which can be used for developing experimental systems to study the sex expression and regulation in hemp. In this paper the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was employed with the objective of finding markers linked to sex determination in hemp. Ten male individual DNA samples or ten female individual DNA samples were prepared and contributed to two bulks of DNA: one was male DNA pool and another female DNA pool, with the intention of providing a common genetic background for each pool and leaving the sex-linked materials as the primary difference between the two pools. A total of 30 10-mer primers was tested under at least three different PCR cycling procedures. Three sex-linked RAPD markers were identified under three different PCR cycling procedures: the first one is about 400 bp male-associated fragment generated with S151 primer; the second one about 700 bp female-associated fragment generated with S101 primer; the third one about 2.5 kb male-associated fragment generated with S401 primer. The male-associated fragment about 2.5 kb was cloned and sequenced. Southern Blot analysis with the cloned fragment as a probe against genomic DNA or restriction fragments from male and female plants revealed that a high background signal in both sexes was produced, as was consistent with the presence of repetitive DNA sequences. In order to convert the RAPD marker into SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) marker, one 20-mer and another 22-mer specific primers were constructed and used for PCR amplifying. The male-linked dominant SCAR marker was obtained, which would favor the screening all-gynoecious hemp lines.

Key words: *Cannabis sativa* L, sexuality, molecular markers, RAPD, SCAR

目 录

└─┬─中文摘要

└─┬─英文摘要

└─┬─第一部分文献综述：高等植物性别的研究现状

└─┬─┬─1 植物性别的基本类型、性别决定过程及植物性别的进化

└─┬─┬─┬─1.1 植物性别的基本类型

└─┬─┬─┬─1.2 植物性别决定过程

└─┬─┬─┬─1.3 植物性别类型的进化

└─┬─┬─2 植物性别的遗传决定

└─┬─┬─┬─2.1 雌雄异株植物的性别决定机制

└─┬─┬─┬─2.2 雌雄同株异花植物的性别决定机制

└─┬─┬─┬─2.3 雌雄同花植物的性别决定与同源异型基因

└─┬─┬─3 植物性别表达的调控

└─┬─┬─┬─3.1 环境条件对性别表达的调控

└─┬─┬─┬─3.2 植物激素与性别表达

└─┬─┬─4 植物性别研究的分子生物学进展

└─┬─┬─┬─4.1 花器官特异蛋白及特异基因的研究

└─┬─┬─┬─4.2 性别分子标记的研究

└─┬─第二部分研究报告：大麻性别的分子标记

└─┬─┬─1 引言

└─┬─┬─2 材料和方法

└─┬─┬─┬─2.1 植物材料及处理

└─┬─┬─┬─2.2 菌株和质粒

└─┬─┬─┬─2.3 主要化学试剂

└─┬─┬─┬─2.4 实验方法

└─┬─┬─3 结果与分析

└─┬─┬─┬─3.1 大麻叶片总 DNA 提取

└─┬─┬─┬─3.2 随机扩增多态性 DNA (RAPD)

└─┬─┬─┬─3.3 PCR 产物的克隆

└─┬─┬─┬─3.4 阳性克隆的酶切鉴定和 PCR 分析

└─┬─┬─┬─3.5 序列分析结果

└─┬─┬─┬─3.6 Southern Blot 分析

└─┬─┬─┬─3.7 大麻性别的 SCAR 分子标记

└─┬─┬─┬─3.8 总结

└─┬─参考文献

└─┬─致谢

第一部分 文献综述

高等植物性别的研究现状

研究植物性别具有重要的理论和实际意义。理论上,性别研究是植物成花生理学、繁殖生理学和发育生理学的重要组成部分。此外,性别进化是研究植物系统进化的重要线索和依据,研究植物性别必将为研究植物的系统进化提供必要的资料 and 依据。在实践上,许多农作物和经济林木的产量均与植物的性别性状有着密切的关系,植物性别的研究成果可用于植物性别控制,开发新的雄性不育技术,用于杂交制种。也可以用于植物性别的早期鉴定,这对于以采收果实为主要目的或者雌雄性别经济性状相差很远的植物来说,很有意义。例如阿月浑子,猕猴桃,杜仲等的早期性别鉴定。此外,植物性别的早期鉴定在环境绿化方面也有特殊的意义。例如,用作行道树的杨树和银杏等的早期性别鉴定。

近年来,随着细胞生物学和分子生物学技术的迅速发展,对植物性别的研究已从形态学和细胞学水平深入到分子水平,使这一领域的工作取得长足进步。现就植物性别的基本类型、性别决定过程、植物性别的进化、植物性别的遗传决定、植物性别的环境调控及植物性别研究的分子生物学进展等方面作一扼要综述。

1. 植物性别的基本类型、性别决定过程及植物性别的进化

1.1 植物性别的基本类型

被子植物的生殖器官是花,典型的花包括花萼、花瓣、雄蕊和雌蕊四个组成部分,由于不同种类植物花的着生情况和花的组成不同,因而植物界表现出形形色色的性别特征。综合起来,可分为雌雄同花(两性花)和雌雄异花(单性花)两大类。自然界中,有72%(约120000种)的植物的花为两性花,既有雄蕊也有雌蕊,约10%左右植物的花是单性花(转引自 Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993),仅具有雄蕊或仅具有雌蕊一种性器官,这类植物分布在70个科中,是从两性花植物进化而来的(Grant et al., 1994)。目前所知的植物性别类型主要包括下列九种:

1. 两性花植物(hermaphrodite): 在同一花中具有雄蕊和雌蕊。
2. 雌雄同株植物(monoecious): 在同一植物体上具有雄花和雌花。
3. 雄花、两性花同株植物(andromonoecious): 在同一植物体上具有雄花和两性花。
4. 雌花、两性花同株植物(gynomoecious): 在同一植物体上具有雌花和两性花。
5. 杂性植物或雄花、雌花、两性花同株植物(polygamous): 在同一植物体上具有雄花、雌花和两性花。
6. 雌雄异株植物(dioecious): 雌花和雄花分别在不同的植物体上。
7. 雄花、两性花异株植物(androdioecious): 雄花、两性花分别在不同的植物体上。
8. 雌花、两性花异株植物(gynodioecious): 雌花、两性花分别在不同的植物体上。
9. 雄花、雌花、两性花异株植物(trioecious): 雄花、雌花、两性花分别在不同的植株上。

有的植物性别类型比较复杂,如瓜类一般是雌雄异花同株,但也有全雌性、全雄性、雌花和两性花、雄花和两性花以及雄花、雌花和两性花同株的类型(黄学林等, 1995)。

1.2 植物性别决定过程

单性花植物产生不完全花的过程有多种模式, 有一些种类如芦笋 (*Asparagus officinalis*)、女娄菜 (*Melandrium album*=*Silene latifolia*)、黄瓜 (*Cucumis sativus*)、玉米 (*Zea mays* L) 等植物的花, 在分化和发育过程中都经历了无性期、双性期和单性期, 花发育早期阶段是雌雄同体花, 发育到某一阶段时, 其中一个性器官停止发育或选择性败育, 只有雄蕊或者雌蕊发育成熟而成为单性花, 从而决定了花 (或植株) 的性别。除了不同植物种类性别决定时期不同外, 同一种类植物不同性别花的性别决定时期也不同。如芦笋 (*Asparagus officinalis*) 雌花中的雌雄蕊发育到减数分裂开始时, 花药发育受阻随后解体 (Bracale et al., 1991), 而雄花中的心皮发育受阻发生在减数分裂之后 (Galli et al., 1993), 并且心皮不解体 (Lazarte and Palsen 1979; Caporali et al., 1994)。女娄菜 (*Melandrium album*) 雌花发育早期虽产生花药原基, 但雄蕊不能进一步发育, 而雄花中的心皮原基在突起后发育即受阻 (Ye et al., 1991)。

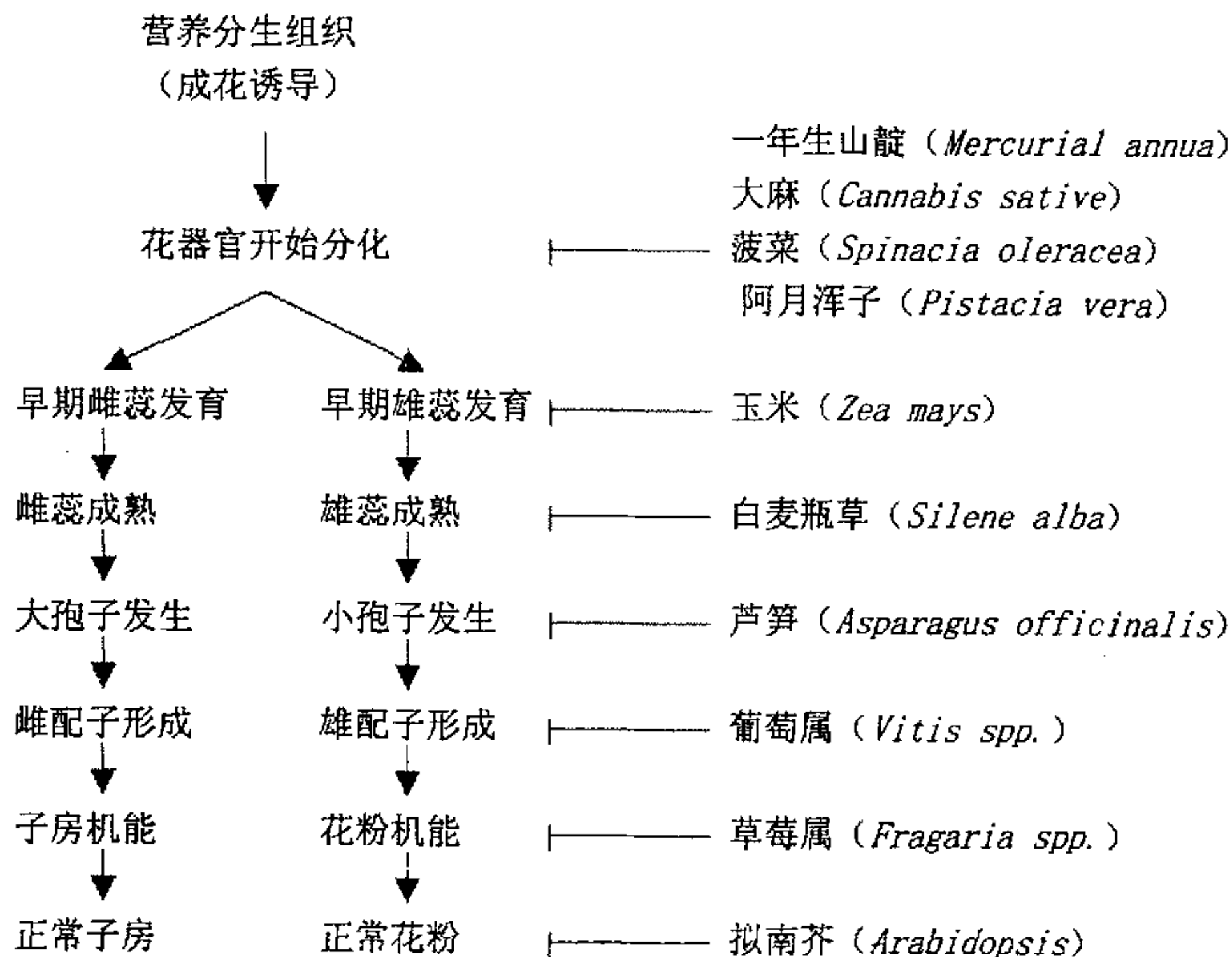


图1 典型雌雄同株和雌雄异株植物单性花建立的发育时期
(引自 Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993。略有改动)

大麻 (Mohan Ram and Nath, 1964)、菠菜 (Sherry, 1993)、一年生山黧 (Durand and Durand, 1991) 和阿月浑子 (Wannan and Quinn, 1991) 等植物的花发育具有另外一种模式, 花发育过程中不经历双性期, 花分生组织只产生一种性器官原基, 故只有雄蕊或只有心皮发育。此外, 这类植物的花瓣退化或缺失 (Grant et al., 1994)。用外源激素处理能逆转前三种植物的性别 (Heslop-Harrison, 1957; Chailakhyan, 1979), 说明这类植物的花分生组织

中仍然具有双性潜势，它们的性别决定可能在花序分化之前或花序分化启动时发生。图 1 列举了一些典型雌雄同株和雌雄异株植物单性花建立的发育时期。

1.3 植物性别类型的进化

植物性别类型的进化，也是植物性别研究的重要内容之一，一般认为植物是从两性花祖先进化来的。Charlesworth (1991) 提出单性花产生的过程可能至少需要两个独立的事件：第一步是由于群体内雄性不育突变形成雌性两性异体群体，第二步是两性花植株中单一突变导致雌性不育，或者雌性育性逐渐丧失，最后形成功能性雌雄异株（见图 2）。

支持雌雄异株植物的祖先来自雌性两性花异株植物的证据是：在两性花不稳定的雌性两性花异株的植物种群中，两性花逐渐转化为功能性的雄花是一个普遍现象（转引自 Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993），且雌花的雄性不育受核因子控制（Lloyd, 1974）；虽然有稳定存在的雌性两性花异株植物群体，但其雌花的雄性不育性属细胞质遗传（Ross, 1978）。

至于雄性两性异体途径（即先产生雌性不育）则很少见，因为在部分自花授粉种类中，异花花粉传到子房的机会较少，所以可以推测，产生雌性不育的突变，更不易固定下来。这意味着在遗传上雌性功能比雄性功能更有价值。

但是，也有几个雌雄异株植物的祖先似乎来自雌雄同株植物（Cronquist, 1988）。

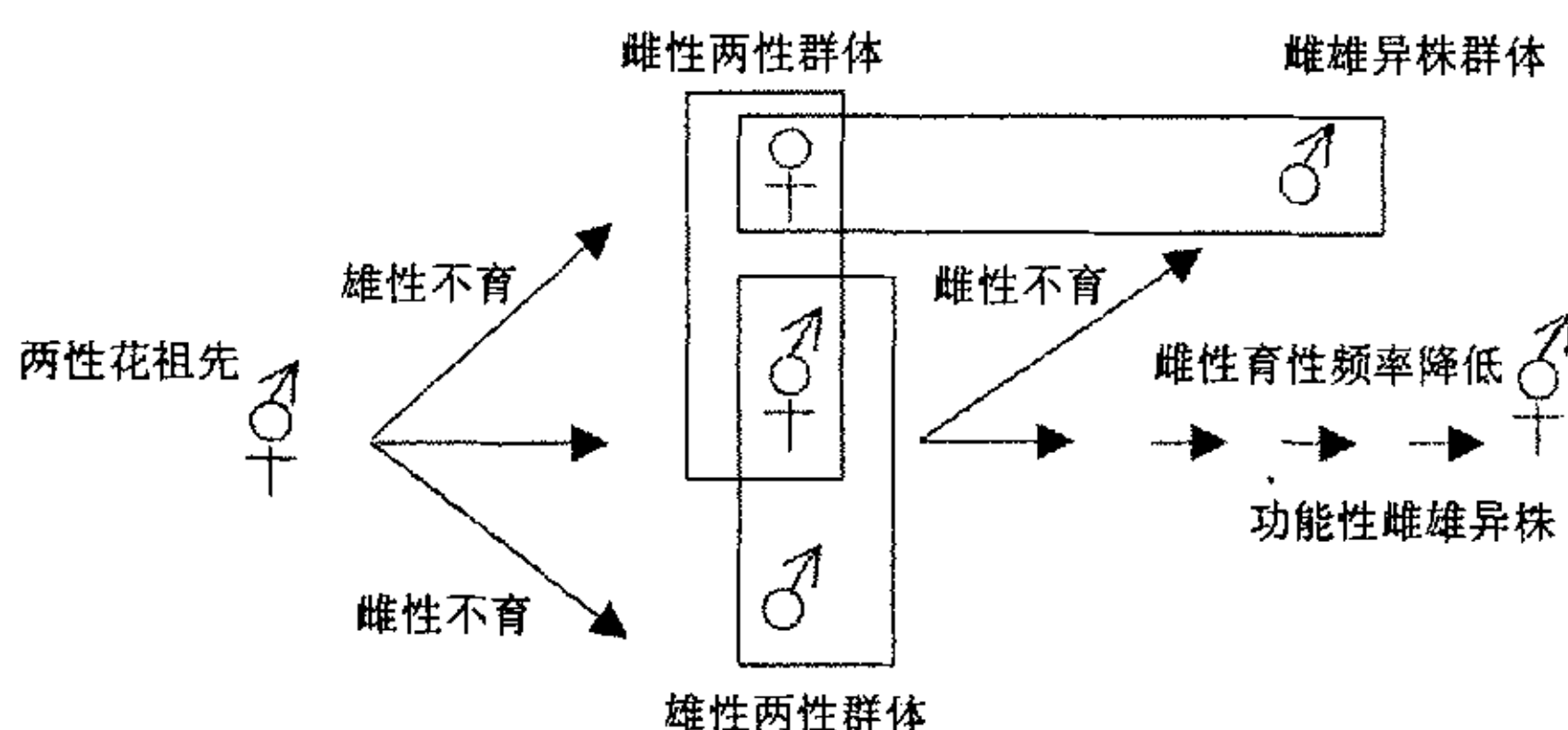


图 2 植物性别类型进化的主要途径（引自 Charlesworth, 1991）

植物性别类型的进化也涉及到性染色体的出现和进化。许多雌雄异株植物具有性染色体。由于雌雄异株性状独立于分类单位而在属于不同分类单位的许多种植物中形成，因此，比起哺乳动物和昆虫的性染色体来，植物的性染色体在进化上出现较晚（Mayer and Charlesworth, 1992）。例如，麦瓶草 Y 染色体主要由常染色质组成（Grant et al., 1994）。性染色体的进化理论认为，X、Y 染色体起源于同源染色体祖先，一旦性别决定基因形成，性染色体之间的交换便降低，以阻止不同性别决定因子间的重组，反过来导致 Y 染色体的功能在进化中慢慢丧失，最后达到剂量补偿（dosage compensation）（Charlesworth, 1996）。尽管有证据表明，酸模属的一些植物 Y 染色体异染色质化（Rejon, 1994），另有几种植物的 YY 型合子不能存活（Ye et al., 1990），但一般而言，植物 Y 染色体的进化尚未达到上述最后两个阶段。

同型和异型性染色体的形成是性染色体进化的两个不同阶段。同型性染色体代表着性染色体进化过程中的中间形式，异型性染色体代表着性染色体进化过程中的较高级形式。原性染色体来自一对同源染色体，其中原 X 染色体带有隐性的雄性不育和雌性可育连锁基因，原 Y 染色体带有显性的雄性可育和雌性抑制连锁因子 (Charlesworth, 1991)。雌性和雄性决定因子间的重组受到抑制以稳定群体的两性异株性状，从而导致同型性染色体的形成。其中，雄性为异配型 (XY)，雌性为同配型 (XX)。芦笋的性染色体属于同型性染色体，其 YY 型合子可以存活。如果与性别连锁的等位基因对于不同性别个体的适应性有相反的影响，那么性染色体之间的重组在进化中会受到进一步的限制以克服不利于适应的伴性遗传。性染色体间的重组降低会导致与性别决定因子连锁的有害基因在 Y 染色体上积累，最终导致 Y 染色体的退化，从而形成异型性染色体。而 X 染色体上的有害突变将由于 X 与 X 染色体间的重组而被淘汰。麦瓶草的性染色体属于异型性染色体，其 YY 型合子不能存活 (Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993)。

Janousek et al. (1996) 用去甲基化试剂 5-氮胞苷处理麦瓶草种子，诱导雄性产生了可遗传的雄性、两性花同株个体，但该性状的遗传表现出单亲遗传，即具有该性状的个体作为父本与野生型的母本进行杂交时该性状可遗传给后代，而作为母本时则不可遗传。Janousek et al. (1998) 的进一步研究指出上述遗传现象是由于母本不能将 Y 染色体传递给后代，即 Y 型胚囊不能存活。因此，推测麦瓶草的胚囊形成需要 X 染色体，或者发育中的胚乳需要 X 和 Y 染色体的平衡。这些研究表明，Y 染色体上缺乏 X 染色体上的一些必要的基因。Guttman and Charlesworth (1998) 首次鉴定到位于 X 染色体上的基因及该基因在 Y 染色体上的类似物，在分子水平上为性染色体的进化提供了证据。

2. 植物性别的遗传决定

植物性别表现类型和单性花形成过程的多样性，反映了植物性别决定遗传基础的多样性。植物种类不同，性别决定的遗传控制方式有很大差别。

2.1 雌雄异株植物性别决定机制

绝大多数动物是雌雄异体，而植物中只有 4% 左右的被子植物是雌雄异体 (Hormaza et al., 1994)。本世纪初，人们在直翅目昆虫中发现性染色体后，就确定了性染色体决定性别的学说。二十年代人们也在许多雌雄异株植物中发现性染色体，现在已经发现有性染色体的植物有 25 科 70 多种 (冯昌全, 1994)，根据对植物性别特征和性染色体的分析，性染色体决定雌雄异株植物性别的方式主要有两类系统 (见表 1)。

一类是活性 Y 染色体作用系统，具有这类作用系统的植物如石竹科的麦瓶草 (*Silene alba*)，葫芦科的红瓜 (*Coccinia indica*)，百合科的芦笋 (*Asparagus officinalis*)，五桠果科的番木瓜 (*Carica papaya*) 及葡萄科的葡萄属 (*Vitis spp.*)，通常雄性具有异配型性染色体 (XY)，雌性具有同配型性染色体 (XX) (Bracale et al., 1991; Grant et al., 1994)。由 Y 染色体在性别决定中起主要作用。这种情形与哺乳动物一致。X 染色体是雌雄性都需要的。在麦瓶草中，Y 染色体上有显性雄性因子和雌性抑制因子 (Van Nigtevecht, 1966)，一个 Y 染色体可以抑制 3 个 X 染色体的作用，但是更多的 X 拷贝则可克服 Y 染色体的雄性效应。目前已获得麦瓶草两性同体和无性别突变体，以它们的 cDNA 克隆分析麦瓶草 X/Y 染色体系统，已经证实在两性同体和无性别突变体的性染色体上缺失了带有性别决定基因的区

域 (Grant et al., 1994)。Janousek et al. (1996) 用去甲基化试剂 5-氮胞苷处理麦瓶草种子, 诱导雄性产生了可遗传的雄性、两性花同株个体, 但对雌性无影响, 表明麦瓶草雄性对雌性的抑制作用依赖于特殊 DNA 序列的甲基化。

另一类性别决定系统是雌性染色体与常染色体平衡系统, 具有这类性别决定系统的植物与果蝇 (*Drosophila*) 和线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 一样, 由 X 染色体与常染色体比值决定性别 (Hodgkin, 1990), 如多倍体酸模草 (*Rumex acetatus*), X/常染色体比为 1.0 或更高时是雌性, X/常染色体比为 0.5 或更低时是雄性, X/常染色体比为 0.5-1.0 是雌雄间体或雌雄同体 (Parker and Clark, 1991)。这种植物的正常小孢子母细胞减数分裂时需要 Y 染色体, 但与麦瓶草不同, 酸模的 Y 染色体并不抑制雌蕊的发育。其它植物如啤酒花 (*Humulus lupulus*)、律草 (*Humulus Japonicus*) 和大麻 (*Cannabis sativa*) 也有与酸模相似的性别决定系统 (Parker and Clark, 1991)。

除上述两种机制外, 还发现类似鸟类性别遗传的异配雌性类型 (Grant et al., 1994), 如草莓 (*Fragaria elateria*) 和白豆杉 (*Pseudotaxus chienii*) 雄性具有同形染色体 (ZZ), 雌性具异形染色体 (WZ)。

表 1 具有性染色体植物的性别决定机制 (引自 Grant et al., 1994, 略有改动)

植物种类	雄性	雌性	性别决定机制
大麻科			
啤酒花 (<i>Humulus lupulus</i>)	XY	XX	X—常染色体
律草 (<i>Humulus japonicus</i>)	XY1Y2	XX	X—常染色体
大麻 (<i>Cannabis sativa</i>)	XY	XX	X—常染色体
石竹科			
麦瓶草 (<i>Silene latifolia</i>)	XY	XX	活性 Y
葫芦科			
红瓜 (<i>Cocainia indica</i>)	XY	XX	活性 Y
蓼科			
酸模 (<i>Rumex acetosa</i>)	XY1Y2	XX	X—常染色体
(<i>Rumex hastatulus</i>)	XY	XX	X—常染色体
	XY1Y2	XX	X—常染色体
蔷薇科			
草莓 (<i>Fragaria elateria</i>)	ZZ	WZ	异配雌性
裸子植物			
白豆杉 (<i>Pseudotaxus chienii</i>)	ZZ	WZ	异配雌性
五桠果科 (亚纲)			
番木瓜 (<i>Carica papaya</i>)	XY	XX	活性 Y
百合科			
芦笋 (<i>Asparagus officinalis</i>)	YY, XY	XX	活性 Y
石竹科			
<i>Silene otides</i>	XY	XX	活性 Y
葡萄科			
葡萄属 (<i>Vitis spp.</i>)	YY, XY	XX	活性 Y

值得注意的是，尽管在遗传表型上，植物与动物有相似的遗传规律，然而它们的性别决定可能有较大差别，例如，果蝇和线虫都是由 X 染色体与常染色体比值决定个体的性别，然而它们有各自不同的性别决定机制 (Hodgkin, 1990)。

自然界中有一些雌雄异株植物未发现异形染色体，对这类植物性别决定机理的研究发现，有些种类是由多个位点控制 (表 2)，在野生型喷瓜 (*Ecballium elaterium*) 中，由 a 位点的 3 个等位基因决定性别，雄性等位基因对雌雄同株等位基因是显性，雌雄同株等位基因对雌花是显性，菠菜也是类似的遗传方式 (Grant et al., 1994)。而山靛植株的性别则取决于三个基因位点，即 A, B₁, B₂ 的等位基因，具有显性 A 和一个或者两个 B 位点的植株是雄性，而具有显性 A 和两个隐性 b 位点、或者具有隐性 a 和一个或两个显性 B 位点植株为雌性 (Durand and Durand, 1991; Louis, 1989; Louis and Durand, 1978)。至于银杏 (*Ginkgo biloba*) 是否有性染色体尚有争议，Lee (1954) 发现银杏雌株有 4 条具随体染色体，雄株只有三条，可能该物种的性别决定与具随体染色体数目不同有关。

表 2 与性染色体无关的植物性别决定的遗传位点 (Grant et al., 1994)

雌雄异株植物				
性别决定机制	植物种类	性别决定位点的等位基因		
		雄株	雌雄同株	雌株
单一位点	葫芦科: 喷瓜 (<i>Ecballium elaterium</i>)	A	A ⁺	a/a
	藜科: 菠菜 (<i>Spinacia oleracea</i>)	Y	X ^m	X/X
多基因位点	大戟科: 山靛 (<i>Mercurialis annua</i>)	A, B ₁ , B ₂		A, b ₁ , B ₂
		A, B ₁ , b ₂		A, b ₁ , b ₂
		a, B ₁ , B ₂		a, b ₁ , B ₂
雌雄同株植物				
性别决定机制	植物种类	影响性别决定的基因位点		
		雄性化	雌雄同株	雌性化
多基因位点	葫芦科: 黄瓜 (<i>Cucumis sativis</i>)	a	m, m-2, Tr	F, gy, InF
	禾本科: 玉米 (<i>Zea mays</i>)	d1, d2, d3, d5, D8, D9, sk, anl		ts1, ts2, ts4, Ts5, Ts6

2.2 雌雄同株异花植物的性别决定机制

在雌雄同株异花植物中，由于在一株植物上产生两种不同性别的花，因而必须有调节在何处和在何时产生雄花或雌花的基因，以及确定产生单性花的基因。这类植物中，很多种类的初期花芽都具有两性器官，在性别决定过程中，其中一个性器官的发育受到抑制或退化，最后发育成单性花。对黄瓜性别表达的遗传学分析，证明黄瓜植株的性别受多个位点控制，并已鉴定出影响黄瓜性别表达的七个不连锁基因位点 (表 2, 3)。其中 m、m-2 和 Tr 调节雄花和雌花着生的位置和时间，而显性 F (Female) 是控制雌花产生的主要基因位点，F 位点还受到 gy (gynodioecious) 和雌性增强子 InF (Intensifier) 的修饰，a (androdioecious) 位点则在 F 为纯合隐性时控制雄花产生 (Malepszy and Niemirowicz-

Szczytt, 1991)。

表3 控制黄瓜性别的基因

基因	别名	特征
a	—	雄性 (<i>androdioecious</i>)。如果 <i>F</i> 为隐性时主要确定雄花产生。
F	Acr、acr ^F 、D、st	雌性 (<i>Female</i>)。雌性高度表达, 与 <i>a</i> 基因和 <i>M</i> 基因互作, 强烈地被环境条件和基因背景所修饰。
gy	g	全雌 (<i>gynodioecious</i>)。高度雌性表达的隐性基因。
In-F	F	雌性表达增强子 (<i>Intensifier</i>)。增强 <i>F</i> 基因植株的雌性表达。
M	a、g	雄花、两性花同株 (<i>andromonoecious</i>)。植株基因型为 <i>m/m</i> , <i>fff</i> 表现雄花、两性花同株; <i>M/M</i> 、 <i>fff</i> 表现雌雄同株; <i>M/M</i> 、 <i>F/F</i> 为全雌花; <i>m/m</i> 、 <i>F/F</i> 为完全花。
m-2	h	雄花两性花同株基因-2 (<i>andromonoecious-2</i>)。双性花具有正常子房。
Tr	—	三性花同株 (<i>Trimonoecious</i>)。在植物发育中产生一系列雄花、双性花和雌花, 双性花有雄花改变来的半下位子房。

玉米 (*Zea mays* L.) 是研究雌雄同株异花植物性别决定的另一个优良模式植物, 有关性别决定的遗传学和分子生物学研究都比较深入。玉米的顶部和腋部花序发端时都具有两性花原基, 在花发育过程中, 顶端花序逐渐发育为带雄蕊的雄花序, 腋花序则发育成带柱头的雌花序即果穗, 性别决定过程包含了已形成的性器官细胞死亡以及花序中第二性特征的变化过程。在果穗中, 每个小穗第一小花的雄蕊和整个第二小花原基退化, 第一小花的雌蕊继续发育到成熟; 在雄穗中, 每个小穗的两个小花均保持功能, 在雄蕊发育到性成熟的过程中, 雌蕊原基退化 (Cheng et al. 1983; Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993)。在玉米中已发现由单基因决定的遗传变异不下 1000 个, 有 30 多个突变位点与繁殖器官的形态结构改变有关 (宋同明, 1989), 证明玉米花序的性别由多个不连锁的位点控制 (表 2, 表 4)。

在玉米雄穗结实突变体 (*tasselseed*, *ts*) 中, 已鉴定出 *ts1*、*ts2*、*Ts3*、*ts4*、*Ts5* 和 *Ts6* 基因位点对雄穗产生雄花有功能 (Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993), *ts1* 和 *ts2* 两个位点调节雄穗中产生雄花或雌花, 它们的突变并不影响营养体的发育, 而专门影响正常的性别决定过程, 使雄穗小花中的心皮退化受阻, 并使雄蕊退化, 推测这些基因是控制雄性或雌性器官退化的开关 (Grant et al., 1994)。 *ts1* 和 *ts2* 突变也影响小穗的第二性征, 例如, 引起雄穗小穗基部无柄, 颖片较短, 薄而半透明, 不象野生型植株的雄穗那样, 颖片和包叶发育成为能进行光合作用、表面有表皮毛的器官, 突变体雄穗中的雌花象果穗中的一样没有任何包被。虽然小穗雌性化, 但仍保留了野生型雄穗的分枝及两个小花都发育的特征。 *ts2* 突变对果穗也有一定的影响, 野生型玉米果穗中, 每个小穗第二小花败育, 仅留一个可孕小花受精, 但 *ts2* 突变体果穗中第二小花常发育到成熟, 导致受精后每个小穗有双籽 (Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993)。其他很多影响果穗花发育的玉米突变体, 并不象 *ts1* 和 *ts2* 突变体那样特别地改变花原基性别的命运 (Irish and Nelson, 1989; Veit et al., 1993)。 *ts4* 和 *Ts6* 突变导致不规则的花组织增生、花器官原基畸变以及在正常情况下退化的性器官在雄穗和果穗中发育, 这两个基因的作用可能是间接的 (Dellaporta and

Calderon-Urrea, 1993)。Ts5 是一影响性别决定过程的显性突变，其突变体的雄穗由基部到顶部，表现出由雌花到雄花发育的梯度，这种突变特别地影响了雌蕊的选择性败退，可能其在性别决定中的某一个重要步骤起决定作用 (Irish and Nelson, 1989; Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993)。

表 4 影响玉米性别决定的突变体及控制基因

突变体	基因	雄穗表现型	果穗表现型
雌性化			
tasselseed1, tasselseed2	ts1, ts2	所有小花雌性化	不规则双行小花发育
Tasselseed3, tasselseed4	Ts3, ts4	小花不规则增生，雌性化，雄穗体积减少	小花不规则增生，偶亦产生分枝
Tasselseed5	Ts5	几乎不正常，基部的一些小花为完整花或雌性小花	正常
Tasselseed6	Ts6	小花不规则增生，雌性化，雄穗体积减少	小花不规则增生，偶亦产生分枝
雄性化			
dwarf1, dwarf2, dwarf3, dwarf5, Anther ear 1	d1, d2, d3, D5, An1	雄穗分枝少，株矮，对 GA 敏感	果穗产生双性花和雄花
silkless	sk	雄花发育不完全	果穗不长花丝
Dwarf8, Dwarf9	D8, D9	显性矮生，类似于 d1，但对 GA 无反应	

从赤霉素 (GA) 亏缺的玉米矮生突变体 (*dwarf*) 中，鉴定出影响果穗中雌花发育的基因，包括 *d1*、*d2*、*d3*、*d5*，这些突变体对外源 GA 敏感，基因的突变导致果穗中产生雄花或雌雄同花，而雄穗是正常的，由此认为 GA 参与调节雄蕊败退、雌性发育的过程，而且可能是玉米性别决定的原初信号 (Irish and Nelson, 1989; 1994)，而显性突变体 *D8* 和 *D9* 植株的 GA 含量正常，而且不对外源 GA 发生反应 (Harberd, 1989; Winkler, 1995; Fujioka, 1988; Reid, 1994)，推测该突变可能干扰了 GA 信号的接收。此外，影响玉米雌花发育的基因 *sk* (*silkless*) 也与激素代谢无关 (转引自 Grant et al. 1994)。

对 *Ts* 和 *dwarf* 双突变体研究表明，这两种突变具有加和效应 (Irish, 1994)，即在果穗中产生雌雄同花和雄穗中产生雌花，说明在性别决定过程中，*Ts* 控制的途径和 GA 控制的途径是独立 (Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993)。目前已克隆出 *Ts2* 基因 (DeLong et al., 1993)，它被认为是第一个被克隆到的性别决定基因 (Grant et al., 1994)，原位杂交分析表明，在玉米雄花序的小花中心皮退化前的短期内，*Ts2* mRNA 水平在心皮原基中最高，在其它几轮花器官中的表达较低，序列分析证明 *Ts2* 序列与乙醇脱氢酶家族有同源性 (DeLong et al., 1993)，这些酶具有同样的修饰羟基环结构 (如 GA 和甾醇类) 的酶活性，雌性化激素可改变它们的功能 (Grant et al., 1994)。

2.3 雌雄同花植物的性别决定与同源异型基因

典型的两性花的结构由外而内可分为四轮：第一轮是花萼，第二轮是花瓣，第三轮是雄蕊，第四轮是雌蕊或心皮。两性花发育早期，花分生组织分成几个同心圆或花轮，分别

发育相应的花器官。根据对模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 同源异型突变体的研究, Coen and Meyerowitz (1991) 提出控制花器官特异性的 ABC 模型 (图 3), 认为两性花每一轮花器官的特异性, 是由不同组合的同源异型基因 (另见本综述的 4.1 部分) 在花分生组织中特异表达的结果。ABC 模型的要点: (1) 花分生组织由外而内简化为 4 轮: 1、2、3、4 轮; (2) 同源基因分为 A、B、C 三组, A 组基因在 1、2 轮特异表达, B 组基因在 2、3 轮特异表达, C 组基因在 3、4 轮特异表达; (3) 花器官原基的命运由各组同源异型基因在相应的各轮花分生组织中特异表达所决定, A 组基因单独表达形成萼片原基, A、B 组基因共同表达形成花瓣原基, B、C 组基因共同表达形成雄蕊原基, C 组基因单独表达形成雌蕊原基。

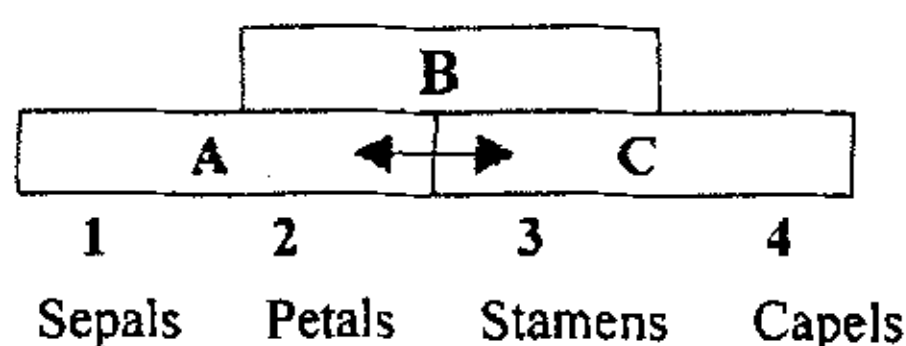


图 3 控制花器官特异性的 ABC 模型

拟南芥 *AG* 基因 (*AGAMOUS*) 属于 C 组基因, 在花的内两轮中特异表达, 该基因发生突变将导致花不产生性器官 (Yanofsky et al., 1990), 由于 C 组基因与 A 组基因相互拮抗, 即 A 组基因抑制 C 组基因在 1、2 轮的表达, 即 C 组基因抑制 A 组基因在 3、4 轮的表达, 故 *ag* 突变体的表型是在雄蕊着生的位置长出花瓣, 在心皮着生的位置长出一朵小花, 形成 (P.S.P)_n 结果的无性花。拟南芥 *AP3* (*APETALA3*) 和 *PI* (*PISTILLATA*) 基因属于 B 组基因, 在第二轮 (花瓣) 和第三轮 (雄蕊) 中特异表达, 这两个基因的任意一个突变, 将导致雄蕊转变为心皮而形成全雌花, 花瓣也转变为花萼, 以致于花形成两轮花萼包围着一轮或两轮心皮 (Jack et al., 1992)。此外, 还在拟南芥中鉴定出在雄蕊和心皮界线组织中表达的基因 *FLO10* (Schultz et al., 1991) 或称 *SUPERMAN* (Bowman et al., 1992), 它们抑制 *AP3* 和 *PI* 在最内轮 (心皮) 中表达, 所以, 它们的突变将导致产生额外的雄蕊并使心皮缩小或缺失。可见, 在拟南芥中, 由 *AG*、*AP3*、*PI* 和 *FLO10* (*SUPERMAN*) 一起影响生殖器官的性别。

金鱼草花同源异型基因 *PLE* (*PLENA*) (Bradley et al., 1993) 在基因结构和功能上与拟南芥的 *AG* 基因相同, *DEF* (*DEFICIENS*) 和 *GLO* (*GLOBOSA*) 基因 (Coen and Carpenter, 1993; Schwarz-Sommer et al., 1990; 1992) 分别与拟南芥的 *AP3* 和 *PI* 基因具有同源性。在其它几种亲缘关系较远的植物包括番茄 (Pnueli et al., 1991)、矮牵牛 (Angenent et al., 1992) 以及具一些单性花植物如玉米 (Schmidt et al., 1993)、麦瓶草 (Hardenack et al. 1994) 和芦笋 (Miller et al. 1995) 等都克隆到结构与功能与拟南芥花器官特异基因同源的基因, 表明这类基因可能通过同样的机制在所有被子植物中调节器官发育。

Grant et al. (1994) 认为, 开花植物中最基本的性别决定基因就是控制心皮和雄蕊形成的同源异型基因。Dellaporta and Calderon-Urrea (1993) 却认为植物由双性分生组织形成单性花, 是性别决定基因在同源异型基因下游起作用的结果, 或者其作用独立于同源异型基因。因此, 应用现代分子生物学技术探讨性别决定基因作用机制以及性别决定基因与同源异型基因的关系, 已成为当前植物性别研究的重要内容之一。此外, 激素信号与性别

决定基因及花特异基因表达的关系，也是十分有趣而有意义的研究课题。随着研究的不断深入，植物性别决定机制终将为人们所揭示。

3. 植物性别表达的调控

3.1 环境条件对性别表达的调控

环境条件包括光强、日长、温度、水分状况、矿质营养和环境温度等可能会影响植物性别决定。

根据 Chailakhyan (1979) 等人的研究，光、温、水、肥及植物激素等影响大麻、黄瓜、菠菜等植物的性别表达。例如，短日、弱光、低温以及土壤中充足的水分和充足的氮素供应利于雌性的形成，反之则利于雄性的形成。

Takeo et al. (1995) 发现不定型日中性植物无刺猪毛菜 (*Salsola komorovii* Iljin) 在 LD 下所有的花都是两性花，SD 下全是雌花，日中性 (ID) 下两性花和雌花都有，如在 LD 下培养再转到 SD 下，则产生两性花。而且，花的性别与营养生长程度没有相关性，这种植物在不同光周期中形成两性花或雌花的变化是由雄蕊原基的发育与否来决定的，在 SD 条件下，雄花发育受到抑制 (Oyamada, 1983)，其它很多物种花的性别也是通过雄蕊原基发育的调节决定的 (Dellaporta and Calderon-Urrea, 1993)。

二行芥属 (*Diplotaxis harra*) 在低光强下是雄性不育的 (Evenari and Gutterman, 1966)、黄瓜 (Koistra, 1967)、油棕榈 (Williams and Thomas, 1970) 和兰科的 *Cycnoches Spp.* 及 *Catascum Spp.* (Gregg, 1975) 在低光强下形成雌花，Heslop-Harrison (1957) 认为光强对性别表达的影响是通过光合速率控制的。植物性器官发育对温度要求也有明显的差异，太行花 (*Taihangia rupestris*) 雄蕊发育的最适温度范围比雌蕊低 (陆文燊, 1996)。

近年来研究及推广应用比较热门的两系法杂交小麦和杂交水稻，其光温敏型雄性不育系也是性别表达受环境调控的典型例子 (张爱民和黄铁城, 1998; 董哲, 1998)。

3.2 植物激素与性别表达

植物性别表达通常被认为是由植物激素调节的 (Chailakhyan, 1979; McArthur and Freeman, 1982; Durand and Durand, 1984; Chailakhyan and Khriain, 1987; Metzger, 1988; Irish and Nelson, 1989)。早在 1925 年，Bery 就提出，与动物相同，植物体内存在雄性和雌性特异的植物激素。Chailakhyan 于 1937 提出植物性激素特异地存在于从营养生长向开花的转变中，雄株在此转变过程中存在雄性激素，雌株在此转变过程中存在雌性激素，雌雄同株中两种激素都有。但到目前为止，人们尚未获得影响植物性别分化特有的雄性或雌性激素。已有大量的资料报道各种植物激素对植物性别表达的影响，但往往缺乏系统和深入的研究，并且受到使用激素种类、激素剂型、使用方法等因素的影响，使得性别表达中的激素调节研究更加复杂化。植物雌、雄株或雌、雄蕊内源激素含量，已在黄瓜、玉米、芦笋、山萘等多种性型植物上进行过研究，发现雌、雄性的性器官或叶片及茎尖有不同的内源活性物质含量 (表 5)。

应用外源激素处理可影响菠菜、大麻、葡萄、玉米和芦笋等多种植物的性别表达，引起一些植物的植株或花发生性逆转 (表 6)。植物性别在外源激素的作用下可以逆转，说明小花原基具有双性潜势，激素可以调节性别决定基因的表达，改变性别决定的程序；也

说明了在单性花植株花器官中, 同时具有雄蕊和雌蕊发育所需的基因, 单性花的出现是由于相反性别花器官发育所需要的基因表达受到抑制。

表 5 植物不同性别植株或性器官内源活性物质含量比较

生长物质种类	植物种类	检测器官	含量比较	参考文献
生长素	黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)	茎尖	雌株>雌雄同株	Rudich et al. (1972)
	芦笋 (<i>Asparagus officinalis</i>)	幼花	雄株>雌株	Marziani Longo et al. (1990)
	山靛 (<i>Mercurialis annua</i>)		雌株>雄株	Hamdi et al.(1987); Durand et al.(1991)
细胞分裂素	山靛 (<i>Mercurialis annua</i>)		反式玉米素仅存于雌株中, 反式玉米素单核苷酸仅存于雄株中	Louis et al.(1990)
赤霉素	芦笋 (<i>Asparagus officinalis</i>)		雄株>雌株	Marziani et al. (1990)
	玉米 (<i>Zea mays</i>)	花序	雌花序>雄花序	Rood (1980)
	黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)	幼雄芽分化期	雌雄同株>雄株	Wang and Zhou (1991)
脱落酸	大麻 (<i>Cannabis sativa</i>)	叶片、花序	雌株>雄株	Galoch (1980)
	黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)	茎端	雌雄同株>雌株	Frieland et al. (1977)
		茎端、叶片	雌株>雌雄同株	Wang and Zhou (1991); Rudich et al. (1972)
乙烯	黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)	花芽	雌花芽>雄花芽	Rudich (1972)
玉米赤霉烯酮	烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	花器官	雄蕊>雌蕊	Fu et al.(1995)
	小麦 (<i>Triticum aestivum</i>)	花器官	雄蕊>雌蕊	赵德刚等 (1996)
	日本牵牛 (<i>Pharbitis nil</i>)	花器官	雄蕊>雌蕊	赵德刚等 (待发表)
	蓖麻 (<i>Ricinus communis</i>)	花器官	雄蕊>雌蕊	赵德刚等 (待发表)
多胺				
精胺	花旗松 (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	性芽	雄性芽>雌性芽	Daoudi et al.(1991)
腐胺	花旗松 (<i>Pseudotsuga menziesii</i>)	营养芽	仅含腐胺, 不含精胺	Daoudi et al.(1991)
甾类激素				
睾酮	百合 (<i>Lilium longiflorum</i>)	花器官	雄蕊>雌蕊	杨中汉 (1994)
雌激素	百合 (<i>Lilium longiflorum</i>)	花器官	雌蕊>雄蕊	Zhang et al. (1991)
雌二醇	白菜 (<i>Brassica ekinensis</i>)	花器官	雌蕊>雄蕊	Zhang (1992)
孕酮	海罂粟	花器官	雌蕊>雄蕊	Simons (1989)
雌激素	玉米 (<i>Zea mays</i>)	花器官	雌蕊>雄蕊	Simons (1989)
雄激素	海罂粟	花器官	雄蕊>雌蕊	Simons (1989)
	玉米 (<i>Zea mays</i>)	花器官	雄蕊>雌蕊	Simons (1989)

从激素在性别表达中的作用来看, 对所有单性花植物没有共同的效应。例如 GA 在玉米中起雌性化作用 (Hansen et al., 1976), 在菠菜 (Chailakhyan, 1979) 和芦笋 (Lazarte and Garrison, 1980) 中恰恰相反; 细胞分裂素 (CTK) 引起菠菜和大麻 (Chailakhyan, 1979) 雄性向雌性转变, 但对其它种类如黄瓜和玉米则无明显的作用 (转引自 Grant et al., 1994)。Chailakhyan (1979) 以及 Durand and Durand (1984) 认为花分生组织中激素间的比例对性别的影响, 比激素含量更重要。

表 6 生长物质对雌雄同株异花植物和雌雄异株植物性别表达的影响

生长物质种类	作用	植物种类	参考文献
生长素类 (IAA)	雌性化	大麻 (<i>Cannabis sativa</i>)	Heslop-Harrison (1956)
		黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)	Frankel and Galun (1977)
		菠菜 (<i>Spinacia oleracea</i>)	Chailakhyan and Khryanin (1978)
细胞分裂素 (BAP、KT)	雄性化	山靛 (<i>Mercurialis annua</i>)	Champault (1969,1973)
		啤酒花 (<i>Humulus Lupulus</i>)	Heslop-Harrison (1963)
		大麻 (<i>Cannabis sativa</i>)	Galoch (1978)
	雌性化	山靛 (<i>Mercurialis annua</i>)	Durand (1969)
		大麻 (<i>Cannabis sativa</i>)	Chailakhyan (1979)
		菠菜 (<i>Spinacia oleracea</i>)	Chailakhyan and Khryanin (1978)
		丝瓜 (<i>Luffa cylindrica</i>)	Takahashi et al. (1980)
		葡萄 (<i>Vitis vinifera</i>)	Negi and Olmo (1966)
		大麻 (<i>Cannabis sativa</i>)	Galoch (1978)
		玉米 (<i>Zea mays</i> L)	Hansen et al. (1976)
赤霉素 (GA ₃)	雌性化		Krishnamoorthy and Talukder (1976)
		菠菜 (<i>Spinacia oleracea</i>)	曹宗巽等 (1980)
		蓖麻 (<i>Ricinus communis</i>)	Shifriss (1961)
	雄性化	芫荽 (<i>Coriandrium sativum</i>)	Amruthavalli (1978)
		菠菜 (<i>Spinacia oleracea</i>)	Chailakhyan (1979)
		黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)	Frankel and Galun (1977)
		大麻 (<i>Cannabis sativa</i>)	李曙轩等 (1979); Wang and Zhou (1991)
		芦笋 (<i>Asparagus officinalis</i>)	Chailakhyan and Khryanin (1978)
			Lazarte and Garrison (1980)
		大麻 (<i>Cannabis sativa</i>)	Mohan Ran et al. (1970,1979); Galoch (1978)
乙烯 (乙烯利)	雌性化	南瓜 (<i>Cucurbita moschata</i>)	Splitstoesser (1970)
		桑树 (<i>Morus nigra</i>)	Jaiswal et al. (1980)
		笋瓜 (<i>Cucurbita maxima</i>)	Happing et al. (1979)
		西葫芦 (<i>Cucurbita pepo</i>)	Kopecwicz (1972)
		黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)	Murray and Miller (1968); 李曙轩等 (1979); Wang and Zhou (1991)
		瓠瓜 (<i>Lagenaria leucantha</i>)	李曙轩等 (1979,1981); 应振土等 (1987)
脱落酸 (ABA)	雄性化	菠菜 (<i>Spinacia oleracea</i>)	曹宗巽 (1980)
	雌性化	菠菜 (<i>Spinacia oleracea</i>)	Chailakhyan and Khryanin (1978)
		大麻 (<i>Cannabis sativa</i>)	Chailakhyan and Khryanin (1978)
		黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)	Rudich et al. (1974)
			Friedlander et al. (1977)

关于高等植物性别表达的激素调控目前有两种假说: 一种是双激素平衡假说, 另一种是单激素假说 (Yinn and Quinn, 1992; 1995a; 1995b)。一般而言, 细胞分裂素、生长素和乙烯诱导产生雌花或雌性植株, 赤霉素诱导产生雄花或雄性植株, 因此, 双激素平衡假

说认为两类激素的相对水平决定高等植物的性别表达。例如较高的 GA 水平诱导产生雄花或雄株, 较高的 CTK 水平诱导产生雌花或雌株。Yinn and Quinn (1992; 1995a; 1995b) 提出的单激素假说则认为, 植物性别受一种激素(性激素)调控, 植物细胞同时具有雄性和雌性受体, 植物内源激素浓度范围和雌雄受体对性激素的不同的敏感程度相互作用共同调节性别表达。Yinn and Quinn (1995a; 1995b) 用野牛草和黄瓜作材料对单激素假说进行了验证。

4. 植物性别研究的分子生物学进展

植物性别研究的分子生物学进展除了上述在植物性别决定基因等方面的进展外, 在花器官特异基因及在性别的分子标记研究方面取得了更多更快的进展。

4.1 花器官特异蛋白及特异基因的研究

基因表达具有组织特异性。在不同花器官中特异表达的基因和蛋白一直是人们感兴趣的课题。早期对花器官特异蛋白研究较多, 如在郁金香(Baber and Steward, 1968)、日本牵牛(Kutlunow et al., 1990; Bassett et al., 1988)、烟草(Clarke et al., 1977; Evans et al., 1988)、大麦(Pedersen et al., 1987)、番茄(Sawhney et al., 1985)、百合(Wang et al., 1992)、蒺藜草属植物(*cenchrus ciliaris*) (Gounarys et al., 1991)、芦笋(Caporali, 1994)等多种植物中发现了各自的花器官特异蛋白质。随着分子生物学方法和技术的发展与应用, 花器官特异基因的研究取得了激动人心的进展。可将花器官特异基因的研究分为两类: 花器官同源异型基因的研究及其它花器官特异基因的研究。

同源异型基因的克隆和分析始于果蝇(*Drosophila melanogaster*)的同源异型突变体的研究, 同源异型基因是指突变后将身体的一部分转变为另一部分(例如, 果蝇在生长触角的部位长出了腿)的基因。植物花器官的同源异型基因可分为两类: 分生组织特异性基因及花器官特异性基因, 由这些基因控制顶端分生组织由营养生长向生殖生长的转变以及花器官的形态建成。但这种分类不是绝对的, 其功能有重复之处。

Sommer et al. (1990) 和 Yanofsky et al. (1990) 分别最先克隆出第一个金鱼草花同源异型基因 *DEF* 及第一个拟南芥花同源异型基因 *AG*。比较这两个基因编码的氨基酸序列发现, 他们与脊椎动物的血清反应因子 SRF (Norman et al., 1988) 和酵母的由 MCM1 编码的 PRTE 转录因子 (Herskowitz, 1989) 有一段共同的高度保守的氨基酸序列, 这段高度保守的序列被称为 MADS (MCM1、*AGMAOUS*、*DEFICENS*、SRF) box, 把具有 MADS box 序列的基因称为 MADS box 基因。随后, 以 MADS box 为探针, 在拟南芥(Ma et al., 1991)、金鱼草(Schwarz-Sommer et al., 1992; Huijter et al., 1992)、矮牵牛(Angenent et al., 1992; 1995; Kush et al., 1993)、番茄(Pnueli et al., 1991; 1994)、水稻(Chung et al., 1993)、玉米(Fischer et al., 1995; Schmidt et al., 1993; TheiBen et al., 1995)、麦瓶草(Hardenack et al., 1994)等多种植物中克隆到 MADS box 基因。

除了同源异型基因外, 人们对雌蕊及雄蕊特异基因研究较多。雌蕊特异基因研究最多的是编码与自交不亲和有关的糖蛋白基因(S-基因), 已经从孢子体及配子体自交不亲和品系中分离出 S-基因(黄绍兴和阎隆飞, 1995)。孢子体自交不亲和基因主要在柱头表达(Nasrallah et al., 1988), 配子体自交不亲和基因主要在柱头的传导组织和花粉管生长的胎座组织中表达, 在花粉粒或萌发花粉管中则检测不到这些基因的表达(Cormish et al.,

1987)。后来证明烟草 S-基因产物与已知的核糖核酸酶是同源的,具有核糖核酸酶活性 (McClure et al., 1989)。Gasser et al. (1989, 1991) 以番茄为材料分离和鉴定了其它几个雌蕊特异基因。他们分别分离番茄三个时期 (减数分裂起始、刚完成减数分裂和开花期) 雌蕊的 RNA, 构建相应的 cDNA 文库, 以幼苗的 RNA 作为探针分析三个阶段雌蕊中基因表达情况, 得到了三个雌蕊特异的克隆子。

由于雌蕊特异基因在雄性不育研究中的重要意义及其在生产实践上潜在的利用价值, 因此, 雌蕊特异基因的克隆和分析是发育分子生物学的热点之一。目前已从多种植物中分离和鉴定了多个花药和花粉特异基因, 雌蕊特异基因的启动子已用于创造雄性不育的转基因植物, 例如 Mariani et al. (1990; 1992) 利用烟草花药绒毡层特异表达基因 TA29 的启动子与 RNase T1 或 Barnase 连接, 通过农杆菌法转入烟草和油菜中, 均获得了雄性不育的转化株。随后将雄性不育基因紧密连锁到抗除草剂基因 Bar 上, 通过喷洒除草剂杀死敏感的可育株, 达到保持和繁殖具有抗性的雄性不育株的目的, 从而得到保持系。根据 Barnase 的抑制因子 Bastar 能够与其形成一对一的复合体, 使其失去核糖核酸酶活性的原理, 用 Bastar 代替 Barnase 构建嵌合基因, 用于创造恢复系。目前, 这一套基因工程雄性不育、保持和恢复系统已成功应用到油菜、花椰菜、菊苣、莴苣、番茄、棉花和玉米上, 被视为基因工程创造雄性不育的比较完善的系统 (张爱民和黄铁城, 1998)。

4.2 性别分子标记的研究

植物性别二形性指雌雄植株间形态上和生理生化上的差异。植物的第一性别特征 (花器官) 出现较晚, 因此多年来人们试图寻找雌雄异株植物的第二性别特征。本世纪初就有人试图找出大麻和菠菜除花以外的性别特征, 但仅在开花后才在生长习性上表现出差别, 如菠菜雌株相对体积大, 产生较多叶片, 寿命较长等; 大麻雌株木质化程度较雄株深, 有发育良好的初生和次生纤维 (Chailakyan et al. 1987) 等。对木本植物如桐油树 (*Aleurites*)、柳树 (*Salix*)、白杨 (*Populus*) 和黑白杨树 (*Populus nigra*) 的雌雄株在形态和解剖学上的差异也有人进行了研究 (Starava, 1969; Chailakyan et al., 1987)。人们在比较雌、雄性植株生理生化上的差异时, 发现大麻雄株叶片蛋白质含量低于雌株, 且雄株蛋白含更多的精氨酸和赖氨酸, 雌株蛋白含更多的组氨酸和酪氨酸 (Chailakyan, 1979)。大麻和菠菜花簇和叶片均比雄株有更多的核酸 (DNA 和 RNA)。野牛草 (*Buchloe dactyloides*) 作草坪用植物时, 其雌株优于雄株, 雌株的雌花序深埋于叶簇中, 且雌株有更强的抗锈病能力, 但雄株有更强的保水力。也有研究发现色素 (特别是类胡萝卜素)、纤维素和碳水化合物含量、含水量以及一些生理过程如光合、呼吸及蒸腾等在雌雄性植株间都有明显的差异 (Chailakyan et al. 1987), 但其结果受发育时期的影响, 再现性和重复性较差。自从 70 年代发现同工酶在植物中普遍存在以来 (Shannon et al., 1968; Scandalios, 1974), 过氧化物酶、酯酶等的同工酶常用来作为植物的遗传标记。应用同工酶技术研究植物的性别标记也有报道。Penel et al. (1972) 发现菠菜雄株叶片中的过氧化物酶的酶活高于雌株, 推测菠菜的性别表达与过氧化物酶同工酶数目有关。曹宗巽等 (1980) 证实, 菠菜雄株比雌株同工酶条带少 (曹宗巽等, 1980)。研究表明, 大麻和菠菜雄株的过氧化物酶同工酶比雌株的少一条带 (Tsao, 1988)。从山靛中检测到 3 条过氧化物酶同工酶带是雄花特异的, 以其制成的抗血清进行组织免疫学定位发现, 它们很早就开始合成, 直到花粉母细胞分裂成小孢子组织时仍然存在, 而在雌花的任何组织中都检测不到它们的存在。

(Durand and Durnad, 1984)。但银杏 (*Ginkgo Biloba*) 的过氧化物酶同工酶是雌株比雄株多两条带 (钟海文等, 1982)。中华猕猴桃 (*Asetinidla Chinensis*) 雌、雄株组织培养的茎段、愈伤组织和悬浮培养细胞的过氧化物酶活性是雌性高于雄性, 并在雄株的培养物中出现有几个特异的过氧化物酶同工酶谱带 (Hirsch, 1984)。芦笋的过氧化物酶同工酶谱中也有 5 条是花特异的, 其中 3 条为花药特异, 在未发生性别分化的花芽中, 两种性别的花都有这几条带, 在雌花中, 当雄蕊发育受阻的同时, 这几条带消失; 而在雄花中则可维持较长一段时间, 此时雌蕊发育早已受阻。此外, 人们还注意到激素调节植物性别表达时出现的同工酶谱变化。在用乙烯利处理黄瓜可促进雌花增多, 同时发现加强了过氧化物酶同工酶某个带 (Retig, et al. 1972), 用 GA 和乙烯利处理菠菜, 增加了雌雄植株间过氧化物酶同工酶数目和样式的差异 (曹宗巽, 1980)。用 CTK 处理山靛雄株 (雌性化), 其三条雄花特异的过氧化物酶同工酶活性降低 (Durand and Durand, 1984)。但环境条件及激素对性别分化的影响是否通过引起某些酶的同工酶变化而起作用, 仍然没有直接证据。

上述研究结果作为性别的标记是远远不够的, 因为, 已开花的成年雌、雄植株在形态上和生理生化上的差异并不能代表幼苗的情况。随着分子生物学新技术和新方法的出现, 从基因组 DNA 及基因水平上对雌雄异株植物进行分子标记成为可能。近年来, 性别的分子标记技术已用于性别决定、性别进化和系统发生的研究中。目前, 用作遗传标记的方法和技术包括 RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (O'Brien, 1990)、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990; Welsh and McClelland, 1990)、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Lin and Kuo, 1995)、SSRs (Simple Sequence Repeats) (Powell et al., 1996)、SSCP (Single-strand-conformation polymorphism) (Hongyo et al., 1993)、RDA (Representational Display Analysis) (Lisitsyn et al., 1993; Donnison et al., 1996) 其中, RFLP、RAPD、SSCP 和 RDA 在性别研究中的应用已有报道。

Longo (1994) 从 50 个芦笋的基因组克隆中用 EcoRI 和 Hind III 酶切后进行 RFLPs 分析, 得到一个与性别连锁的克隆。Biffi and Rostivo (1995) 获得三个与性别决定因子连锁的限制性片段长度多态性 (RFLP) 标记。

RAPD 技术上由 Williams 等人于 1990 年提出。与此同时, Welsh and McClelland (1990) 发表了一种类似的方法, 即随机引物 PCR (AP-PCR)。Caetano-Anolles and Bassam (1993) 则提出了另外一种与 RAPD 原理类似的技术, 即 DNA 放大指纹 (DAF), 三种方法的不同在于随机引物的长度以及检查扩增结果的电泳和染色方法不同。RAPD 技术现已广泛应用于基因制图、基因诊断、分子进化与分类、生态学、植物抗病性以及植物质量性状的标记等研究领域。由于 RAPD 分子标记是用 10 碱基随机引物进行 PCR 扩增得到的, 对反应条件 (包括反应体系各组分的相对含量以及循环程序) 的变化很敏感, 因此, 存在重复性较差的问题。而 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) 分子标记是根据 RAPD 分子标记的序列分析结果用 20—28 碱基的特异引物进行 PCR 扩增得到的, 因此特异性和重复性均较好。SCAR 分子标记的另一优点是 SCAR 分子标记可能是共显性的 (Paran and Michelmore et al., 1993), 即除了目的性状具有相关的分子标记 (相当于 RAPD 分子标记) 外, 非目的性状也有不同于目的性状的分子标记。共显性是 SCAR 分子标记的理想情况。因为, 根据共显性标记可以判断个体是纯合体还是杂合体。SCAR 标记的一种复杂的情况是, 非目的性状与目的性状一样也出现相应的标记带, 多态性消失。可采用提高退火温度、

限制性内切酶消化相应的片段等方法恢复多态性 (Paran and Michelmore, 1993)。

对于具有性染色体 (雄性异配) 的雌雄异株植物而言, 雄性除 Y 染色体以外的其它任何染色体都有可能随机分配到雌性中, 而雌性的任何染色体都有可能随机分配到雄性中, 所以性别的分子标记应该是位于 Y 染色体上的雄性特异带。

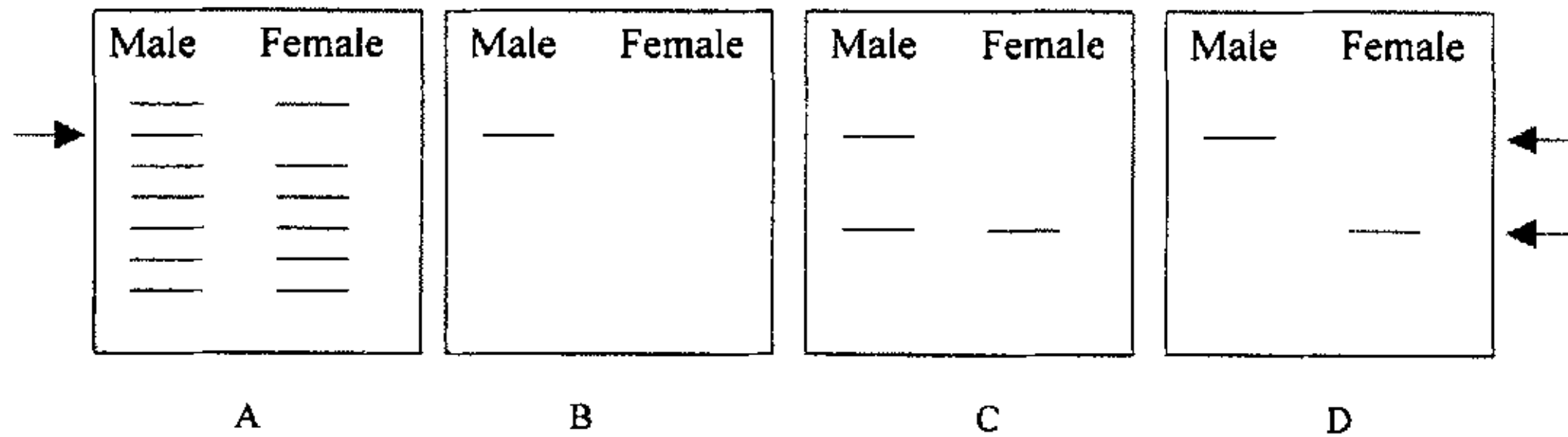


图4 雄性的 RAPD 和 SCAR 分子标记图解

A 图表示 RAPD 分子标记; B、C、D 图表示 SCAR 分子标记, 其中 B 图为显性 SCAR 分子标记, C、D 表示共显性 SCAR 分子标记。对于具有性染色体 (异配雄性) 的雌雄异株植物而言, C 图中雄性为 XY 型, D 图中雄性为 YY 型。

RAPD 技术在雌雄异株植物的性别标记方面的研究已有多篇文献报道。Mulcahy et al. (1992) 从 60 个随机引物中筛选出 4 个引物, 得到 4 个麦瓶草 Y 染色体的 RAPD 分子标记; Hormaza et al. (1994) 从 700 个引物中筛选出 1 个引物, 得到 1 个 945 bp 的阿月混子雌性特异带; Sakamoto et al. (1995) 从 15 个引物中筛选出 1 个引物, 得到 1 个 730 bp 的雄性特异带, 序列分析表明该雄性特异带是非编码序列; Mandolino et al. (1996) 则得到一条 400 bp 的雄性特异带; Harvey et al. (1997) 从 500 个引物中筛选出 2 个引物, 得到 2 条分别与猕猴桃的 X、Y 染色体连锁的特异带, Gill et al. (1998) 将该特异带转化为 SCAR 分子标记, 并用于研究猕猴桃的种系发生; Zhang et al. (1998) 将得到的麦瓶草 RAPD 标记转化为 SCAR 标记, 用于麦瓶草系统发生的研究; Ruas et al. (1998) 从 158 个引物中筛选出 1 个引物, 得到 1 个 2075 bp 的雄性特异带, 序列分析表明该雄性特异带是非编码序列。

与 RFLP 和 RAPD 技术不同, Guttman and Charlesworth (1998) 利用的 SSCP (multiplex cold SSCP) 技术是根据麦瓶草已克隆的 4 个基因的序列合成特异引物, 扩增 200—400 bp 的基因片段, 扩增产物用于获得 SSCP 标记物。根据 SSCP 标记物在父母本及子代的分布情况, 结合对上述 PCR 扩增产物的克隆测序分析, 最后将 MROS3 (male reproductive organ specific gene) 基因定位于 X 染色体。随后, 利用巢式 PCR 技术, 扩增得到位于 Y 染色体上的一条雄性特异带, 测序分析结果表明, 该条带与 MRO3 部分同源, 推测是退化的 MRO3 基因的类似物。Guttman and Charlesworth (1998) 的研究在分子水平上为 X、Y 染色体在进化上具有共同祖先的假说提供了证据。

Donnison et al. (1996) 利用基因组减法 RDA 得到了一些与麦瓶草 Y 染色体连锁的分子标记, 并将其中的 4 个 RDA 标记用于性别决定基因的遗传作图。

第二部分 研究报告

大麻性别的分子标记

1 引言

近年来,随着细胞生物学和分子生物学技术的迅速发展,对植物性别的研究已从形态学和细胞学水平深入到分子水平,使得这一领域的研究工作取得了长足的进步。RAPD 技术是由 Williams 等人于 1990 年提出的,现广泛应用于基因制图、基因诊断、分子进化与分类、生态学、植物抗病性以及植物质量性状的标记等研究领域。RAPD 技术在雌雄异株植物的性别标记方面的研究已有多篇文献报道 (Mulcahy et al., 1992; Hormaza et al., 1994; Sakamoto et al., 1995; Mandolino et al., 1996; Harvey et al., 1997; Ruas et al., 1998; Zhang et al., 1998; Gill et al., 1998)。由于 RAPD 分子标记是用 10 碱基随机引物进行 PCR 扩增得到的,对反应条件 (包括反应体系各组分的相对含量以及循环程序) 的变化很敏感,因此,存在重复性较差的问题。而 SCAR 分子标记是根据 RAPD 分子标记的序列分析结果用 20—28 碱基的特异引物进行 PCR 扩增得到的,因此特异性和重复性均较好。SCAR 分子标记的另一优点是 SCAR 分子标记可能是共显性的 (Paran and Michelmore et al., 1993)。雌雄异株植物性别的 SCAR 分子标记可用于鉴定在外界环境条件的作用下性别发生逆转的个体。也可用于筛选全雄或全雌品系,并以此建立实验体系,深入研究环境条件对性别表达的影响。

植物的全雄或全雌品系在植物性别表达和调控的研究上以及在农业生产实践上都有应用。有人用组织培养的方法,用雌雄异株的菠菜品系建立了全雄和全雌实验体系并以此研究菠菜性别的逆转情况。在自然条件下筛选得到的黄瓜全雌品系,已用于杂交黄瓜的生产 (Wehner and Miller, 1985)。目前研究和应用比较热门的两系法生产杂交小麦 (张爱民和黄铁城, 1998) 和杂交水稻 (童哲, 1998), 其雄性不育系实际上也可看作是与全雌黄瓜具有某些共同特征的全雌品系。只是两者在雄性不育的机理、恢复雄性育性的外界条件及恢复育性后的性别表现等方面有所不同。

大麻是雌雄异株植物,在田间雌雄比例接近 1:1;大麻也是短日植物,在短日处理条件下可提早开花,缩短生活周期;大麻还具有容易栽培和管理的优点。因此,大麻是研究性别的好材料。大麻性别表达受多种环境因子的影响。光、温、水、肥及植物激素等均影响大麻的性别表达 (Chailakhyan, 1979)。短日、弱光、低温以及土壤中充足的水分和氮素利于雌性的形成,反之则利于雄性的形成。GA 利于雄株产生;IAA、乙烯利于雌株产生。玉米赤霉烯酮则对大麻具有雄性化作用 (于静娟, 1996)。迄今为止,已有两篇关于大麻性别分子标记的研究报道。Sakamoto 等 (1995) 用 15 个随机引物扩增得到一条 700 bp 和一条 500bp 的雄性特异带;Mandolino 等 (1996) 则得到一条 400 bp 的雄性特异带。但两者均没有将 RAPD 分子标记转化为 SCAR 分子标记。

如前所述,外界环境条件影响大麻的性别表达,因此,理论上有可能根据 SCAR 分子标记筛选出全雄或全雌品系。设想筛选流程如下 (以得到雄性的 SCAR 显性分子标记为例):在外界环境条件有利于雌性向雄性逆转的条件下培养大麻,筛选表型上是雄性而遗传上是雌性 (不具有 SCAR 分子标记) 的植株作父本,用表型上和遗传上都是雌性的植株

作母本, 得到杂交后代。杂交后代同亲本一样不具有 SCAR 分子标记, 因此是全雌后代。全雌后代继续在有利于雌性向雄性逆转的条件下培养并进行杂交, 得到的仍然是全雌后代。如能得到雌性的 SCAR 显性标记, 则可用于筛选全雄品系。假如能将雄性的 RAPD 标记转化为 SCAR 共显性标记, 则可同时筛选全雄和全雌品系。如能按上述筛选流程得到大麻的全雌或全雄品系, 则可用更为精确的方式研究外界环境条件(例如光周期、植物激素、玉米赤霉烯酮等)对植物性别的影响。在实践上也可用作培育不同品系间杂交大麻的材料。例如, 可在诱导条件下, 使全雌大麻的性别发生逆转, 从而达到繁育和保持全雌大麻的目的; 可在非诱导条件下, 将全雌大麻作为杂交制种的母本。

本研究的目的是利用 RAPD 技术获得与大麻性别连锁的分子标记, 用于大麻性别表达和调控的下一步研究中。

2 材料和方法

2.1 植物材料及处理

本研究所用植物材料大麻(*Cannabis sativa* L.)为荨麻目(Urticales)大麻(Cannabaceae)科大麻属植物。所用品种云麻一号, 为严格的雌雄异株植物, 由云南省农科院杨明先生惠赠。云麻一号种子播种于花盆中, 在中国农业大学科学园温室内培养。每日 16 小时光期, 8 小时暗期。待植株长至 100—150cm 高时, 每日 8 小时光期, 16 小时暗期, 诱导开花。开花后, 分别取雌、雄株的幼嫩叶片提取 DNA。

2.2 菌株和质粒

菌 株	性 质
<i>E.coli</i> JM101	supE thiΔ(lac, pro), thi, strA, endA, sbcB15, HsdR, SupE/F, traD36, proA ⁺ , proB ⁺ , lacI ⁹ , lacZ, ΔM15
质粒载体	性 质
PGEM-T	含 Amp ^r , LacZ' 及多克隆位点

菌种 *E.coli* JM101 由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室提供。pGEM^R-T Easy Vector Systems I 购自 Promega 公司。

2.3 主要化学试剂

Taq 酶购自中国农业大学农业生物技术国家重点实验室。

RNase A、dNTPs、引物(包括 10 碱基随机引物及 24 碱基引物)、IPTG、X-Gal、溶菌酶、琼脂糖等购自上海生工公司。

各种限制性内切酶、λ DNA/HindIII+EcoR I、Tryptone、Yeast Extract、氨苄青霉素(Amp)等购自北京经科化学试剂经营公司。

Nick Translation Kit 试剂盒购自 Promega 公司。

2.4 实验方法(主要参考 Sambrook, 1989; 卢圣栋, 1993; 姜泊等, 1996)

2.4.1 培养基的配制

1. SOC 培养基: 于 98ml 蒸馏水中溶解 2.0 g Tryptone, 0.5 g Yeast Extract, 1 ml 1 M

KCl, 1 ml 0.25 M NaCl (调 pH 至 7.0), 高压灭菌后各加 1 ml 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌的 2 M Mg^{2+} (含 1 M MgCl_2 及 1 M MgSO_4) 储备液和经 0.22 μm 滤膜过滤除菌的 2 M 葡萄糖溶液。

2. LB 液体培养基: Tryptone 10 g, Yeast Extract 5 g, NaCl 10 g, 加蒸馏水定溶至 1000 ml (pH 7.0), 分装后高压灭菌。

3. LB 固体培养基: 每升液体培养基中加有 15 g 琼脂粉, 高压灭菌后铺制平板。

4. LB 固体选择培养基: LB 固体培养基在铺制平板前, 待温度降至 50℃左右时, 加入抗生素, 摇匀后铺板。

2.4.2 溶液的配制

2.4.2.1 常用缓冲液及试剂的配制

1. TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-Cl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA (pH8.0), 高压灭菌。

2. 5×TBE 缓冲液 (250 ml): 13.6 g Tris, 6.9 g 硼酸, 5 ml 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)。

3. EB 储备液 (10 mg/ml): 1 g EB 溶于 100 ml 水中, 4℃保存。

4. 上样缓冲液: 0.25% 溴酚蓝, 40% (W/V) 蔗糖水溶液。

5. 3 M NaAC (pH5.2): 24.604 g 无水乙酸钠溶于 80 ml 水中, 用冰乙酸调 pH 至 5.2, 定溶至 100 ml, 高压灭菌。

6. 1 M Tris-Cl: 121.4 g Tris 碱, 溶于 800 ml ddH₂O 中, 用盐酸调 pH 至 8.0, 定溶至 100 ml, 高压灭菌。

7. 0.5 M EDTA: EDTA 186.1 g 溶于 800 ml ddH₂O 中, 用 NaOH 调 pH 至 8.0, 定溶至 1000 ml, 高压灭菌。

8. 100 mM CaCl_2 溶液的配制: 1.1 g 无水 CaCl_2 溶于 ddH₂O 并定溶至 100 ml, 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后置于无菌试剂瓶中, 于 4℃保存。

9. IPTG (100 mg/ml): 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 100 mg 溶于 1 ml 无菌水中, -20℃保存。

10. X-gal (20 mg/ml): 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 25 mg 溶于 1.25 ml 二甲基甲酰胺中, 铝箔包住避光, -20℃保存。

11. 氨苄青霉素 (Amp) 贮液 (100 mg/ml): 每小瓶青霉素 (500 mg) 加 5 ml 无菌水溶解, 分装后于 -20℃下保存。

12. RNaseA (10 mg/ml): 溶于含 10 mM Tris-Cl (pH7.5) 和 15 mM NaCl 的溶液中, 100℃煮沸 10 min 以灭活可能的 DNase, 分装后于 -20℃保存。

13. 溶菌酶溶液 (50 mg/ml): 10 mM Tris-Cl (pH8.0) 配制, 可每 200 μl 分装成小份, 于 -20℃冻存, 每小份一经使用, 剩余部分不能再用。

14. 饱和酚: 重蒸酚于 68℃水浴中加热熔化, 热酚液中加入 8-羟基喹啉至终浓度 0.1%, 加入等体积 0.5 M Tris-Cl (pH8.0) 反复摇匀混合, 两相分开后移去上相, 用 0.1 M Tris-Cl (pH8.0) 反复平衡直至上相或酚相 pH 值大于 7.8。最后加 0.1 体积的 0.1 M Tris-Cl (pH8.0) (含 0.2% 的 β -巯基乙醇), 于棕色瓶中 4℃保存。

2.4.2.2 有关总 DNA 提取的溶液配制

1. SDS 裂解缓冲液: 50 mM Tris-Cl (pH7.6), 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, 巯基乙醇 10 mM (高压灭菌后加)。

2. TNE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-Cl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA pH8.0, 高

压灭菌。

2.4.2.3 有关质粒 DNA 提取的溶液配制

1. 溶液 I: 50 mM 葡萄糖, 25 mM Tris-Cl pH8.0, 10 mM EDTA- Na_2 pH8.0, 高压灭菌。
2. 溶液 II: 0.2 M NaOH, 1% SDS, 现用现配。(储备液: 0.4 M NaOH 和 2% SDS 分开配制, 高压灭菌)。
3. 溶液 III: 60 ml 5 M 醋酸钾, 11.3 ml 冰醋酸, 无菌水定溶至 100 ml, pH4.8。
4. 纯化质粒 DNA 的 PEG-8000 或 PEG-6000 溶液: 13 克 PEG-8000 或 PEG-6000 (13%) 和 9.36 g NaCl (1.6 M) 溶于 ddH₂O 并定溶至 100 ml, 高压灭菌。
5. Cracking buffer: 0.1 M NaOH, 0.001 M EDTA pH8.0, 1% SDS, 0.05% 溴甲酚绿, 10% 甘油。
6. TE 溶液: 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl (PH 8.0), 1 mM EDTA (PH 8.0)。

2.4.2.4 有关 Southern Blot 分析的溶液配制

1. 20×SSC: 3 M NaCl (175 g/L), 0.3 M 柠檬酸三钠·2H₂O (88 g/L), 用 1 M HCl 调 pH 至 7.0。
2. 中和液: 1 M Tris-Cl (pH 7.4), 1.5 M NaCl, 保存于室温。
3. 变性液: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl。
4. 预杂交液: 6×SSC, 50% 甲酰胺, 0.5% SDS, 5×Denhardt, 100 μg/ml 变性断裂鲑精 DNA。
5. 杂交液: 同预杂交液。
6. Sephadex G-50 凝胶: 将 10 g 的中级 Sephadex G-50 (可得 160 ml 悬液) 加入 500 ml 的烧杯中, 用无菌蒸馏水反复洗涤溶胀的凝胶, 以除去可溶性的葡聚糖。TE buffer (pH7.6) 平衡凝胶, 高压灭菌后于室温保存。
7. X 光片显影液: 将 800 ml H₂O 加热至 50℃, 逐个加入下列物质 (应待前一物质完全溶解后方加入后一种物质): 4.0 g 对甲氨基酚磷酸盐 (米吐尔); 65.0 g 无水亚硫酸钠; 10.0 g 对苯二酚 (海得尔); 45.0 g 无水碳酸钠; 5.0 g 溴化钾。用 H₂O 补至 1L, 盛棕色瓶中于 4℃ 保存。
8. X 光片定影液: 将 650 ml H₂O 加热至 50℃, 逐个加入下列物质 (应待前一物质完全溶解后方加入后一种物质): 240.0 g 硫代硫酸钠 (海波); 15.0 g 无水碳酸钠; 15 ml 98% 乙酸; 15.0 g 硫酸铝钾 (明矾)。用 H₂O 补至 1L, 盛棕色瓶中于 4℃ 保存。

2.4.3 大麻幼叶总 DNA 的制备 (SDS 法) (参照 Jung et al 1990)

大量制备

1. 取幼嫩叶片 2 g, 洗净, 吸干表面水分, 在液氮中充分研磨成粉末, 倒入 50 ml 离心管中, 加 8 ml SDS 裂解缓冲液, 轻轻摇动混匀, 室温放置 10—15 min。
2. 加入 4 ml Tris 饱和酚, 摇匀, 室温放置 5—10 min。
3. 加 4 ml 氯仿/异戊醇 (24:1) 充分混匀, 室温放置 5 min 左右。
4. 4℃, 5000 g×10 min 离心。
5. 上清液再用酚/氯仿抽提一次。
6. 4℃, 5000 g×10 min 离心。
7. 取上清液, 加入等体积异丙醇, 室温放置 5 min 沉淀 DNA。

8. 灭菌吸头将沉淀挑出, 沉淀用 70%乙醇洗一次, 空气干燥。
9. 溶于 700 μ l TNE(含 50 μ g/ml RNaseA)中, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。
10. 酚/氯仿抽提一次, 氯仿抽提一次。上清液加等体积异丙醇, 室温放置 5 min 沉淀 DNA。
11. 灭菌吸头将沉淀挑出, 沉淀用 70%乙醇洗一次, 空气干燥后溶于 200 μ l TE 缓冲液 (pH 8.0) 中, 置-20 $^{\circ}$ C 保存。电泳检查提取质量及并用紫外分光光度仪测定 DNA 浓度。

小量制备

1. 取幼嫩叶片 0.2 g, 洗净, 吸干表面水分, 在液氮中充分研磨成粉末, 倒入 1.5 ml 离心管中, 加 0.7 ml SDS 裂解缓冲液, 轻轻摇动混匀, 室温放置 10—15 min。
2. 加入 0.4 ml Tris 饱和酚, 摇匀, 室温放置 5—10 min。
3. 加 0.4 ml 氯仿/异戊醇 (24:1) 充分混匀, 室温放置 5 min 左右
4. 4 $^{\circ}$ C, 5000 g $\times$ 10 min 离心。
5. 上清液再用酚/氯仿抽提一次。
6. 4 $^{\circ}$ C, 5000 g $\times$ 10 min 离心。
7. 取上清液, 加入等体积异丙醇, 室温放置 5 min 沉淀 DNA。
8. 灭菌吸头将沉淀挑出, 沉淀用 70%乙醇洗一次, 空气干燥。
9. 溶于 500 μ l TNE(含 50 μ g/ml RNaseA)中, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。
10. 酚/氯仿抽提一次, 氯仿抽提一次。上清液加 2 倍体积乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 20 min 沉淀 DNA。
11. 灭菌吸头将沉淀挑出, 沉淀用 70%乙醇洗一次, 空气干燥后溶于 100 μ l TE 缓冲液 (pH 8.0) 中, 置-20 $^{\circ}$ C 保存。电泳检查提取质量及并用紫外分光光度仪测定 DNA 浓度。

雄株混合 DNA (bulk DNA) (DNA 池, DNA pool) 及雌株混合 DNA 的制备: 分别取 10 株雄株或雌株的幼嫩叶片各 0.2g 混合后大量提取 DNA 得到混合 DNA, 或者小量提取 DNA 后, 分别取等量的 10 株雄株或雌株的 DNA 混合得到混合 DNA。

2.4.4 用 10 碱基随机引物进行 PCR 扩增

在无菌的 0.5 ml PCR 薄壁管中依次加入下列组分:

无菌水	15 μ l
10X 扩增缓冲液	2.5 μ l
dNTPs (1 mM)	2.5 μ l
随机引物 (5 μ M)	2 μ l
模板 DNA (1.25-20 ng/ μ l)	2 μ l
Tag DNA 聚合酶 (1 U/ μ l)	1 μ l

将上述反应混合物混匀并稍加离心后, 在 Hybaid 公司生产的 PCR 仪 (PCR Sprint Temperature Cycling System) 上按下面的循环程序进行 PCR 扩增反应:

循环程序 1

Stage 1

Stage 2	预变性	94℃	3 min
	变性	94℃	30 s
	复性	45℃	1 min
	延伸	72℃	1 min
	循环数		10
Stage3	变性	94℃	30 s
	复性	40℃	1 min
	延伸	72℃	1 min
	循环数		15
Stage4	变性	94℃	30 s
	复性	35℃	1 min
	延伸	72℃	1 min
	循环数		20
Stage5	最后延伸	72℃	8 min
循环程序 2			
Stage 1	预变性	94℃	3 min
	变性	94℃	30 s
Stage 2	复性	45℃	30 s
	延伸	72℃	1 min
	循环数		10
	变性	94℃	20 s
Stage3	复性	40℃	20 s
	延伸	72℃	1 min
	循环数		15
	变性	94℃	15 s
Stage4	复性	35℃	15 s
	延伸	72℃	1 min
	循环数		20
	最后延伸	72℃	8 min
Stage5			

循环程序 3

Stage 1

预变性	94℃	3 min
-----	-----	-------

Stage 2

变性	94℃	30 s
复性	60℃	1 min
延伸	72℃	1 min
循环数		10

Stage3

变性	94℃	30 s
复性	55℃	1 min
延伸	72℃	1 min
循环数		15

Stage4

变性	94℃	30 s
复性	50℃	1 min
延伸	72℃	1 min
循环数		20

Stage5

最后延伸	72℃	8 min
------	-----	-------

0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

2.4.5 PCR 产物的克隆与序列分析

2.4.5.1 PCR 产物的回收 (姜泊等, 1996)

1. 从琼脂糖凝胶中将含有拟回收 DNA 片段的胶块切下, 置于 Ep 管内。
2. 用玻璃棒将胶块充分捣碎, 加等体积平衡酚混匀后, 置液氮中 10 min。
3. 10,000 g×5 min 离心。
4. 将水相转移到另一 Ep 中。
5. 在原 Ep 管中加 200 μ l TE 缓冲液 (pH8.0), 充分混匀, 必要时用玻璃棒将胶块再次捣碎, 置液氮中 10 min。
6. 10,000 g×5 min 离心, 将水相转移并合并至含有上次水相的 Ep 管中。
7. 加等体积酚和氯仿: 异戊醇各抽提一次。
8. 在转移出的水相中加 0.1 倍体积的 3 M NaAc (pH5.2) 和 2.5 倍体积预冷无水乙醇, -20℃沉淀 3 min。
9. 12,000 g×15 min 离心, 弃上清, 用 70%乙醇洗两遍, 真空抽干, 溶于 20 μ l TE buffer 中 (pH8.0), -20℃保存备用。

2.4.5.2 特异片段的克隆及鉴定

感受态细胞的制备(Sambrook 等, 1989。略加改进)。

1. 取甘油中保存的 JM101 在 M-9 琼脂培养基上划线, 接种针挑取单一菌落于 LB 培养基上划线, 37℃ 培养过夜, 4℃ 保存。
2. 从 LB 平板上挑取一个单菌落, 转到含有 3 ml LB 的培养基的试管内, 37℃ 振荡培养过夜。
3. 取 0.5 ml 过夜菌加到含 100 ml LB 的三角瓶中, 37℃ 剧烈振荡 (150~200 rpm) 培养 2~3 h, 使 OD₆₀₀ 达到 0.3~0.4 时立即冰浴 10 min, 无菌条件下转到预冷的 50 ml 灭菌离心管中。
4. 4℃, 4,000 g × 10 min 离心, 倒弃培养液, 滤纸上倒置 1 min, 使残留的培养液流尽。
5. 加用冰预冷的 0.1 M CaCl₂ (无菌) 悬浮菌体, 冰浴 30 min。
6. 4℃, 4,000 g × 10 min 离心, 倒弃上清液, 滤纸上倒置 1 min, 使 CaCl₂ 溶液流尽。
7. 再加 4 ml 用冰预冷的 0.1 M CaCl₂ 悬浮菌体 (重悬浮菌时操作要轻)。
8. 置 4℃ 冰箱中 12~24 h 即可用于转化。

连接反应

参照 pGEM-T Easy Vector Systems I 说明书, 将 pGEM-T Easy 载体稍加离心, 在 0.5 ml 无菌 Ep 管中建立如下连接反应体系:

T ₄ DNA 连接酶缓冲液 (2×)	5 μl
pGEM ^R -T (50 ng/μl)	1 μl
T ₄ DNA 连接酶 (3 U/μl)	1 μl
PCR 扩增产物	3 μl
ddH ₂ O	0 μl
总反应体积	10 μl

另取两个 Ep 管, 一个以试剂盒提供的对照 DNA 2 μl 代替上述反应体系的 PCR 扩增产物, 作为连接和转化的阳性对照。另一个则在反应体系中不加 DNA, 作为连接和转化的阴性对照。用加样器吸打混合反应液, 14℃ 连接过夜。

连接产物在 12~72 h 内均可用于转化。

转化

参照 Sambrook 等 (1989) 的方法进行转化:

1. 取 200 μl 感受态细胞转到 1.5 ml 灭菌的离心管中, 无菌条件下取 4 μl 连接产物, 加入到感受态细胞中, 用加样器吸打轻轻混匀, 冰浴 30 min。
2. 热击 90 s, 迅速转移到冰浴中置 2 min。
3. 加入 800 μl SOC 培养基, 37℃ (150 rpm) 预培养 45 min。
4. 取 20 μl 20 mg/ml X-gal 及 20 μl 100 mg/ml IPTG 加到含 100 μg/ml Amp 的 LB 培养基平板上。取 100 μl 预培养 45 min 的菌液加到平板上, 用铺菌器轻轻将菌液铺匀, 在超净工作台上放置 15 min 左右。待液体完全渗入培养基后, 37℃ 倒置培养 12~16 h。如有必要, 可将剩余菌液于 4℃ 下 1000 g × 10 min 离心, 细菌沉淀用 100 μl 菌液重悬后铺板。

参照 pGEM-T Easy Vector Systems I 说明书进行转化:

1. 取 50 μl 感受态细胞转到 1.5 ml 灭菌的离心管中, 无菌条件下取 2 μl 连接产物, 加入到感受态细胞中, 轻弹离心管以混匀内容物, 置冰上 20 min。
2. 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热击 50 s (不要摇动), 迅速转移到冰浴中置 2 min。
3. 加入 950 μl SOC 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ (150 rpm) 预培养 1.5 h。
4. 取 20 μl 20 mg/ml X-gal 及 20 μl 100 mg/ml IPTG 加到含 100 $\mu\text{g/ml}$ Amp 的 LB 培养基平板上。取 100 μl 预培养 1.5 h 的菌液加到平板上, 用铺菌器轻轻将菌液铺匀, 在超净工作台上放置 15 min 左右。待液体完全渗入培养基后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 12~16h。如有必要, 可将剩余菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 1000 $\text{g} \times 10 \text{ min}$ 离心, 细菌沉淀用 100 μl 菌液重悬后铺板。

剩余连接产物可置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放。上述两种方法中, 第二种方法转化率略高。

2.4.6 阳性克隆的筛选鉴定

划线: 待转化得到的单菌落长到直径 1 mm 左右时, 将培养皿放到 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 1 h, 使蓝、白斑更清楚, 用接种针将白色菌落转移到新的含 Amp 的固体 LB 平板上划线培养, 划线长度 1.5 cm。37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜。

裂解鉴定: 用牙签挑取少量菌落涂抹于 1.5 ml Ep 管底部, 加 10 μl ddH₂O, 剧烈振荡使菌悬浮, 然后加入 10 μl 2 $\times$ Cracking Buffer, 剧烈振荡 30 s 后, 静置 5 min。走 0.8-1.0% 琼脂糖电泳。在紫外灯下观察, 与对照菌落的质粒 (蓝色菌落的 pGEM-T Easy 质粒或插入了对照 DNA 的 pGEM-T Easy 质粒) 相比较, 找出比对照菌落质粒条带拖后的菌落质粒, 培养相应的菌落提取质粒进一步进行酶切鉴定。

碱解法小量提取质粒 DNA (卢圣栋, 1993):

1. 挑取少量初步鉴定为阳性克隆的单菌落, 接种于含 100 $\mu\text{g/ml}$ Amp 的 2 ml LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇培过夜。
2. 将菌液转到 1.5 ml 小离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 $\text{g} \times 30 \text{ s}$ 离心收集菌体。
3. 1 ml STE 溶液重悬细菌沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 $\text{g} \times 30 \text{ s}$ 离心收集菌体。如有必要, 重复用 STE 溶液洗涤细菌沉淀一次。
4. 尽量吸净上清液, 加 100 μl 预冷的溶液 I, 剧烈振荡使细菌悬浮均匀, 置冰上。加 200 μl 新配制的溶液 II, 快速颠倒离心管, 混匀后冰浴 3 min。在冰上加入 150 μl 预冷的溶液 III, 温和振荡, 置冰上 3~5 min。
5. 4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 $\text{g} \times 5 \text{ min}$ 离心, 上清液转移到另一离心管, 加等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提两次, 12,000 $\text{g} \times 2 \text{ min}$ 离心。
6. 小心吸取上清液转入新管, 加 1/10 倍体积的 3 M NaAc (pH5.2), 2 倍体积无水乙醇, 混匀后, 在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 30 min。
7. 12,000 $\text{g} \times 10 \text{ min}$ 离心收集 DNA, 沉淀用 70% 乙醇洗涤一次, 真空抽干沉淀, 溶于 20 μl TE 缓冲液 (pH8.0) 中, 加入 20 μl RNaseA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 待作酶切鉴定。

酶切鉴定: 根据 pGEM-T Easy 载体的酶切图谱建立酶切体系:

酶切体系 1

待酶切质粒	2 μ l
10 $\times$ Buffer H	1 μ l
EcoR I (1 U/ μ l)	2 μ l
ddH ₂ O	5 μ l

酶切体系 2

待酶切质粒	2 μ l
10 $\times$ Buffer H	1 μ l
Nco I (1 U/ μ l)	2 μ l
Pst I (1 U/ μ l)	2 μ l
ddH ₂ O	3 μ l

酶切体系 3

待酶切质粒	2 μ l
10 $\times$ Buffer H	1 μ l
EcoR I (1 U/ μ l)	2 μ l
Nco I (1 U/ μ l)	2 μ l
ddH ₂ O	3 μ l

酶切体系 4

待酶切质粒	2 μ l
10 $\times$ Buffer H	1 μ l
EcoR I (1 U/ μ l)	2 μ l
Pst I (1 U/ μ l)	2 μ l
ddH ₂ O	3 μ l

酶切体系 5

待酶切质粒	2 μ l
10 $\times$ Buffer H	1 μ l
Nco I (1 U/ μ l)	2 μ l
ddH ₂ O	5 μ l

酶切体系 6

待酶切质粒	2 μ l
10 $\times$ Buffer H	1 μ l
Pst I (1U/ μ l)	2 μ l
ddH ₂ O	5 μ l

上述酶切体系混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。建立酶切体系 3—6 的目的是了解插入片断的限制性酶切位点 (Nco I、Pst I 和 EcoR I)。

PCR 鉴定: 以待鉴定质粒 DNA 为模板, 用相应的 10 碱基引物进行 PCR 扩增, 鉴定

质粒是否插入了目的片段。

除了用质粒 DNA 代替大麻总 DNA 外, 鉴定质粒 DNA 的反应体系及循环程序与扩增特异片断的反应体系和循环程序可以完全一样。采用下面的循环程序效果更佳。

循环程序:

Stage 1

预变性	94℃	1 min
-----	-----	-------

Stage2

变性	94℃	1 min
复性	55℃	1 min
延伸	72℃	1 min
循环数		30

Stage3

最后延伸	72℃	8 min
------	-----	-------

0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

2.4.7 阳性克隆的序列分析

碱解法大量提取质粒 DNA, 制备双链模板 DNA (Sambrook et al., 1989):

1. 挑取阳性克隆的菌落, 接种于 500 ml 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37℃振荡培养过夜。
2. 将菌液转到 50 ml 离心管中, 4℃, 4,000 g×10 min 离心收集菌体。
3. 尽量吸净上清液, 加入 4 ml 溶液 I, 涡旋振荡, 使菌体重新悬浮, 然后加入 100 μl 新配制的溶菌酶 (50 mg/ml), 摇匀。
4. 加 8 ml 新配制的溶液 II, 盖紧盖, 缓缓地颠倒离心管数次以充分混匀, 于室温下放置 5~10 min。
5. 加入 6 ml 预冷的溶液 III, 盖紧盖, 将离心管平放, 慢慢转动数次, 使内容物不再有分明的两个液相, 冰上放置 10 min, 4℃, 8,000 g×10 min 离心, 上清转入新管。
6. 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 充分混匀, 室温放置 10 min, 1,000 g×10 min 离心。弃上清, 抽干沉淀, 溶于 600 μl TE (pH8.0) 中, 转到 1.5 ml Ep 管。
7. 加 600 μl 预冷的 5 M LiCl 溶液, 充分混匀, 4℃, 1,000 g×15 min 离心。
8. 上清转入新管, 加等体积异丙醇, 充分混匀, 室温 12,000 g×15 min 离心, 沉淀用 70%乙醇洗一次, 真空抽干。
9. 用 500 μl 含 Rnase A (20 mg/ml) 的 TE (pH8.0) 溶解沉淀。37℃水浴 30 min。
10. 加入 500 μl 含 13% (W/V) 聚乙二醇 (MW8000) 的 1.6 M NaCl 充分混匀, 室温 12,000 g×5 min 离心。
11. 弃上清, 质粒 DNA 沉淀用 400 μl TE 溶解, 用酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提 2 次, 氯仿抽提 1 次。
12. 上清液转入新离心管, 加 1/10 倍体积 3 M NaAc (pH5.2), 2 倍体积无水乙醇, -20℃沉淀 30 min。
13. 12,000 g×15 min 离心, 沉淀用 70%乙醇洗一次, 真空抽干后, 溶于 100 μl TE

(pH8.0) 中, -20°C 保存备用。

DNA 序列分析: 样品送交北京鼎国公司, 使用 ABI Prism 377 测序仪进行序列分析。

2.4.8 Southern Blot 分析

2.4.8.1 大麻雌雄株基因组 DNA 的限制性酶切

分别以三种内切酶 (EcoR I、Hind III 和 BamH I) 和两种基因组 DNA (雌株和雄株) 在 0.5 ml Ep 管中建立如下的酶切体系:

酶切体系 1 和 2

雄株或雌株基因组 DNA ($0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	20 μl
10 $\times$ Buffer H	3 μl
EcoR I ($10\ \text{U}/\mu\text{l}$)	2 μl
ddH ₂ O	5 μl

酶切体系 3 和 4

雄株或雌株基因组 DNA ($0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	20 μl
10 $\times$ Buffer E	3 μl
Hind III ($10\ \text{U}/\mu\text{l}$)	2 μl
ddH ₂ O	5 μl

酶切体系 5 和 6

雄株或雌株基因组 DNA ($0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	20 μl
10 $\times$ Buffer E	3 μl
BamH I ($10\ \text{U}/\mu\text{l}$)	2 μl
ddH ₂ O	5 μl

将上述酶切体系短暂离心数秒, 置 37°C 水浴中 6 小时以上。之后加 8 μl 的 6 $\times$ 载样缓冲液终止反应。

2.4.8.2 限制性酶切片段的转移和固定 (毛细管转移法)

1. 将上述酶切体系进行琼脂糖凝胶电泳。电泳完毕后, 切去凝胶的边沿部分, 并切去一角作为标记。

2. 将胶置于 0.2 M HCl 中处理 10~20 min 至溴酚蓝转成桔黄。

3. 弃去 HCl 溶液, 用去离子水漂洗 2 次。随后浸泡于变性液中 15~45 min, 至溴酚蓝重新变蓝后换用中和液处理 15~30 min。

4. 安装转移槽, 并注入足量转移液。

5. 裁剪适当大小的尼龙膜及滤纸片 (3~5 张), 同时剪去膜的一角作为标记, 并用铅笔在膜下端编号或写上有关资料, 如时间、样品及所用内切酶等。

6. 将膜平铺在去离子水的表面, 直至滤膜从下到上湿透为止, 然后将其转移至转移液 (20 $\times$ SSC) 中至少浸泡 5 min。操作时要求戴一次性手套, 用平头镊。

7. 将 1~2 张预先浸泡于转移液中的滤纸片铺到转移台上, 倒上少许转移液后用玻棒驱赶气泡。用大小合适的 X 光片将胶从中和液中托起倒置于转移台上, 注意不要留下气泡。将浸泡好的尼龙膜铺到胶上, 应使正面与胶接触, 并使胶和尼龙膜的标记方向一致。检查和排除气泡后, 铺上 2~3 层预先浸泡于转移液中的滤纸片, 放上 10~15 cm 高的吸水纸堆, 上面加一块玻璃板, 然后压上 0.5 kg 的重物。

8. 持续转移 24 h 以上。每当纸巾浸湿后更换新的纸巾。

9. 转移完毕, 移去吸水纸, 用平头镊将膜取出, 在 $6\times\text{SSC}$ 中浸泡 5 min, 用吸水纸吸干后, 夹在两层干净的滤纸片中, 于烘箱中 80°C 烤 0.5~2 h。

2.4.8.3 放射性同位素探针的标记(切刻平移法)及纯化

根据 Nick Translation System 试剂盒的说明稍加修改, 建立如下的反应体系:

dGTP	3 μl
dCTP	3 μl
dTTP	3 μl
^3H -dATP (300 Ci / mmol and 10 mCi / ml)	3 μl
Sample DNA (PCR 产物, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5 μl
5 $\times$ Buffer	5 μl
DNA polymerase I / Dnase I mix	5 μl
ddH ₂ O	23 μl

上述反应体系混匀后, 于 15°C 反应 60 min。之后加 5 μl 终止液终止反应。

探针纯化采用 Sephadex G-50 柱层析法, 具体步骤如下:

1. 将 1 ml 灭菌移液器头用少许灭菌的玻璃棉填堵即做成一简单的层析柱。
2. 在层析柱中加 1 ml Sephadex G-50 凝胶, 用数倍于柱床体积的 TE buffer 洗柱。
3. 将探针标记反应体系(可用 TE buffer 稀释至 100 μl)加于凝胶顶部(加样体积应在 200 μl 以下)。用 100 μl TE buffer 洗涤样品管, 洗液加于凝胶顶部。待样品进入凝胶后, 不时在凝胶顶部补加 TE buffer。用灭菌的 1.5 ml Ep 管收集流出液, 每管约 200 μl 。用盖革计数器监测放射性物质的进程。

4. 合并第一放射活性峰的各组分, 于 -20°C 存放。如体积过大, 可用乙醇沉淀浓缩。

5. 杂交前需要对探针进行变性。方法是: 沸水浴中煮 10 min 后立即置冰浴 10 min。

2.4.8.4 预杂交和杂交

1. 用 $6\times\text{SSC}$ 润湿杂交膜。
2. 将杂交膜的背面紧贴于杂交管, 按约 1 ml/cm² 膜加入预杂交液, 在 68°C 杂交箱中滚动 3 h。
3. 将杂交管中的预杂交液倒掉, 换上等体积的 68°C 预热的杂交液, 加入变性探针, 68°C 杂交箱中滚动杂交过夜。
4. 倒掉杂交液, 加入 $2\times\text{SSC}/0.2\%$ SDS 的洗膜液, 于 62°C 杂交箱中滚动 20 min。
5. 用等体积的 $2\times\text{SSC}/0.2\%$ SDS 替换上述洗膜液, 于 62°C 杂交箱中滚动 15 min。
6. 倒掉洗膜液, 室温下用 $2\times\text{SSC}$ 漂洗膜, 吸干多余的液体, 用保鲜膜包裹后放射自显影。

2.4.8.5 放射自显影

1. 在暗室中按增感屏—X 光片—杂交膜—增感屏的顺序放置杂交膜和 X 光片(将 X 光片剪去一角作为标记)。
2. 将暗盒置于 -20°C 自显影 5—7 d。
3. 将 X 光片取出, 室温下于暗室中冲洗。方法是: 将 X 光片置于显影液中显影 3~5 min, 清水冲洗后置于定影液中定影 5~15 min。流水冲洗。

2.4.9 用特异性引物进行 PCR 扩增

根据 DNA 序列分析结果, 合成两个 20—28 碱基的引物, 以不同性别的大麻总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

在无菌的 0.5 ml PCR 薄壁管中依次加入下列组分建立反应体系:

无菌水	14 μ l
10X 扩增缓冲液	2.5 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
引物 1 (12.5 μ M)	2 μ l
引物 2 (12.5 μ M)	2 μ l
模板 DNA (25 ng/ μ l)	2 μ l
Tag DNA 聚合酶 (1 U/ μ l)	1.5 μ l

将上述反应混合物混匀并稍加离心后, 在 Hybaid 公司生产的 PCR 仪 (PCR Sprint Temperature Cycling System) 上按下面的循环程序进行 PCR 扩增反应:

Stage 1			
	预变性	94 $^{\circ}$ C	3 min
Stage 2			
	变性	94 $^{\circ}$ C	1 min
	复性	60 $^{\circ}$ C	1 min
	延伸	72 $^{\circ}$ C	1 min
	循环数		40
Stage3			
	最后延伸	72 $^{\circ}$ C	8 min

0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

3 结果与分析

3.1 大麻叶片总 DNA 提取

从大麻幼嫩叶片中提取的总 DNA, 经电泳检查, 可初步确定 DNA 的长度和分子量大小以及 DNA 是否降解等, 本实验提取的总 DNA 走 0.6% 琼脂糖电泳, 分子量在 49 kb 以上, 表明 DNA 提取质量较高 (图 5)。

3.2 随机扩增多态性 DNA (RAPD)

用 10 碱基随机引物进行的 PCR 扩增对扩增条件比较敏感。除了反应体系各组分的相对含量对扩增结果有较大影响外, 不同的循环程序扩增结果也会有差异, 有时差异甚至很显著。经过一段时间的摸索, 我们筛选出三个不同的循环程序分别用于同一引物的扩增, 这种做法是基于如下设想: 既然不同的循环程序可能会有不同的扩增结果, 并且在很难确定哪个循环程序的扩增结果更可靠的情况下, 设计几种不同的循环程序进行扩增, 就可以在随机引物种类相等的情况下增大获得 RAPD 分子标记的几率。因此, 我们在研究大麻

性别的 RAPD 分子标记时采取的策略是：基本上根据现有文献报道的最小值来确定反应体系各组分的相对含量（如 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mM，dNTPs 浓度为 0.1 mM，Taq DNA 多聚酶为 1 U/25 μ l 反应体系，引物为 0.4 μ M。），在反应体系各组分相对含量固定不变的情况下，每种随机引物至少用三种不同的循环程序分别进行扩增。设计循环程序 2 的目的是缩短循环程序 1 退火时间，设计循环程序 3 的目的是提高循环程序 1 的退火温度。而较短的退火时间和较高的退火温度被认为能提高扩增反应的特异性。

本实验用到的 30 个随机引物编号和序列（见上海生工公司 98 年产品目录）如下：

编号	序列 (5'到 3')	编号	序列 (5'到 3')
S1	GTTTCGCTCC	S151	GAGTCTCAGG
S11	GTAGACCCGT	S159	ACGGCGTATG
S21	CAGGCCCTTC	S201	GGGCCACTCA
S31	CAATCGCCGT	S251	AGACCCAGAG
S41	ACCGCGAAGG	S301	CTGGGCACGA
S51	AGCGCCATTG	S351	ACTCCTGCGA
S61	TTCGAGCCAG	S401	GTTGGTGGCT
S71	AAAGCTGCGG	S448	CCTCCAGTGT
S81	CTACGGAGGA	S451	GACAGGAGGT
S91	TGCCCGTCGT	S501	TGCGGGTCCT
S101	GGTCGGAGAA	S551	TAACCCTTCA
S111	CTTCCGCAGT	S601	GCTTTCCGAG
S121	ACGGATCCTG	S651	TGCTTGTAAG
S131	TTGGTACCCC	S701	TGGGGAACCT
S141	CCCAAGGTCC	S751	CATCGGCCCT

其中用编号为 S151、S101 和 S401 的引物扩增得到了多态性片段。

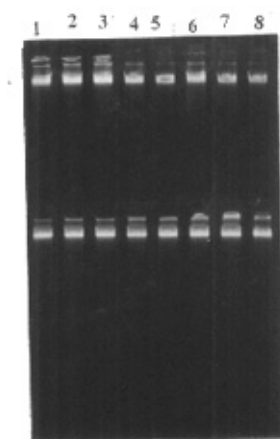


图 5 大麻叶片总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

1—7. 上：雄株 DNA；下：雌株 DNA 8. λ DNA

3.2.1 用 S151 进行 PCR 扩增得到的多态性 DNA（循环程序 1）

引物 S151 分别用三种循环程序扩增的结果是：只有循环程序 1 能够得到多态性片段，循环程序 2 虽能够扩增出几条条带，但雌雄性别间没有多态性，循环程序 3 不能扩增出任何条带。用循环程序 1 扩增得到一条约 400 bp 的雄性特异性片段（图 6、7）。

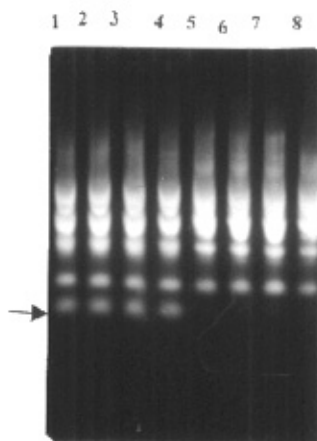


图6 不同浓度的雄株或雌株 DNA 池用引物 S151 进行 PCR 扩增的结果

1—4 泳道为雄株 DNA 池，浓度分别为 20, 10, 5, 2.5 ng/25 μ l 反应体系；5—8 泳道为雌株 DNA 池，浓度分别为 20, 10, 5, 2.5 ng/25 μ l 反应体系。箭头示约 400 bp 的雄性特异片段。

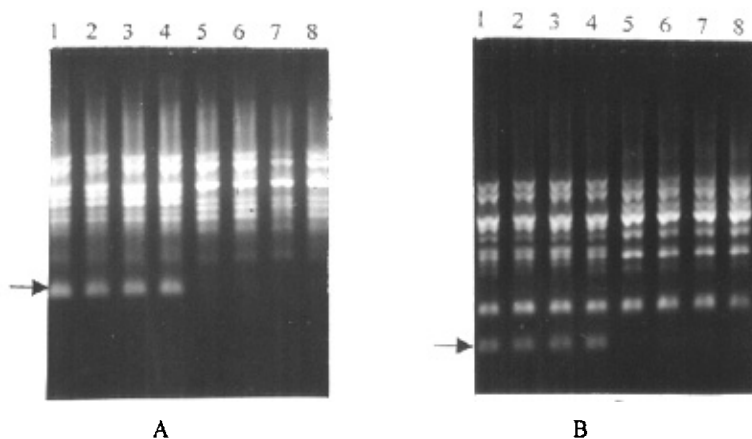


图7 单个雄株或雌株 DNA 用引物 S151 进行 PCR 扩增的结果

图 A 显示参与组成 DNA 池的单株 DNA (10 ng/25 μ l) 用 S151 扩增的部分结果。其中 1—4 泳道为雄株 DNA；5—8 泳道为雌株 DNA。箭头示约 400 bp 的雄性特异片段。

图 B 显示未参与组成 DNA 池的单株 DNA (10 ng/25 μ l) 用 S151 扩增的部分结果。其中 1—4 泳道为雄株 DNA；5—8 泳道为雌株 DNA。箭头示约 400 bp 的雄性特异片段。

3.2.2 用 S101 进行 PCR 扩增得到的多态性 DNA (循环程序 2)

引物 S101 分别用三种循环程序扩增的结果是：只有循环程序 2 能够得到多态性片段，循环程序 1 虽能够扩增出几条条带，但雌雄性别间没有多态性，循环程序 3 不能扩增出任何条带。用循环程序 1 扩增得到一条雌性特异性片段 (图 8)。普遍认为，大麻具有性染

染色体, 雄性为异配型, 雌性为同配型 (Grant et al., 1994)。若如此, 则大麻具有雌性特异性片段不大可能。但也有人认为, 大麻是否存在性染色体尚有争议 (Hormaza et al., 1994)。因此, 用 S101 进行的 PCR 扩增是否能得到雌性特异性片段尚需进一步实验证实。

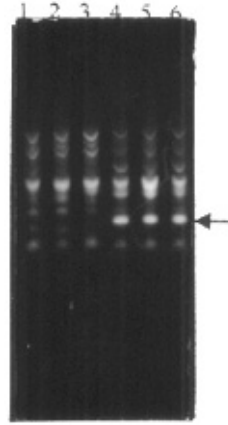


图 8 不同浓度的雄株或雌株 DNA 池用引物 S101 进行 PCR 扩增的结果

1—3 泳道为雄株 DNA 池, 浓度分别为 20, 10, 5 ng/25 µl 反应体系; 4—6 泳道为雌株 DNA 池, 浓度分别为 20, 10, 5 ng/25 µl 反应体系。箭头示约 700 bp 的雌性特异片段。

3.2.3 用 S401 进行 PCR 扩增得到的多态性 DNA (循环程序 3)

引物 S401 分别用三种循环程序扩增的结果是: 只有循环程序 3 能够得到多态性片段, 循环程序 1 和 2 虽能够扩增出几条条带, 但雌雄性别间没有多态性。用循环程序 3 扩增得到一条约 2.5 kb 的雄性特异性片段 (图 9、10、11、12)。从图 9、10 中可以看出, 在一定范围内, 不同浓度的 DNA 模板以及不同浓度的 Mg^{2+} 在本实验条件下对扩增结果影响不大。循环程序 3 中的退火温度之高 (60、55、50℃) 在有关 RAPD 的文献中是罕见的。根据标准算法, 用 S401 进行 PCR 扩增的退火温度应为: $T_m + 5 = 4(G + C) + 2(A + T) + 5 = 4 \times 6 + 2 \times 4 + 5 = 37^\circ C$, 因此, 有关 RAPD 文献中的退火温度一般低于 40℃。为了确证 S401 在 60℃ 的退火温度下也能够扩增目的片段, 以插入了目的片段的质粒 (见结果与分析的 3.4 部分) 为模板进行 PCR 扩增, 结果表明 S401 在 60℃ 的退火温度下也能够很好地扩增目的片段。说明循环程序 3 中的退火温度是可行的。但是, 如果单独用一种退火温度以大麻基因组 DNA 为模板进行扩增, 则难以扩增出雄性特异片段。

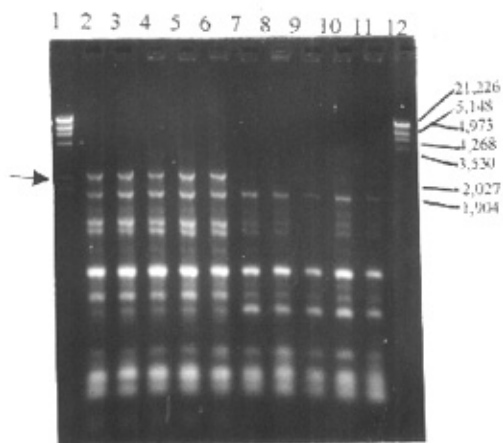


图 9 不同浓度的雄株或雌株 DNA 池用引物 S401 进行 PCR 扩增的结果

2—6 泳道为雄株 DNA 池，浓度分别为 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ng/25 μ l 反应体系；7—11 泳道为雌株 DNA 池，浓度分别为 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ng/25 μ l 反应体系；1 和 12 泳道为 λ /HindIII+EcoR I DNA marker。箭头示约 2.5 bp 的雄性特异片段。

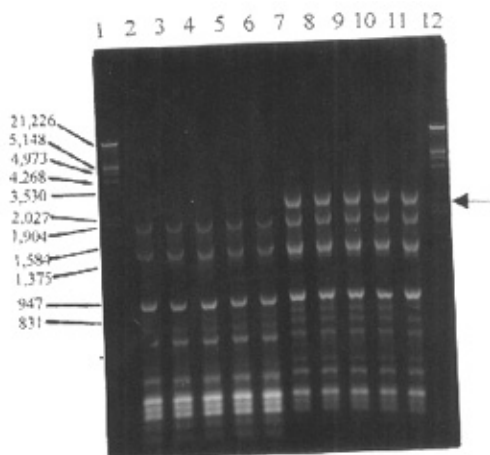


图 10 雄株或雌株 DNA 池用引物 S401 在不同 Mg^{2+} 浓度下进行 PCR 扩增的结果

2—6 泳道为雌株 DNA 池 (5 ng/25 μ l)， Mg^{2+} 浓度分别为 1.5 mM, 1.8 mM, 2.1 mM, 2.4 mM, 3.0 mM；7—11 泳道为雄株池 DNA (5 ng/25 μ l)， Mg^{2+} 浓度分别为 1.5 mM, 1.8 mM, 2.1 mM, 2.4 mM, 3.0 mM；1 和 12 泳道为 λ /HindIII+EcoR I DNA marker。箭头示约 2.5 bp 的雄性特异片段。

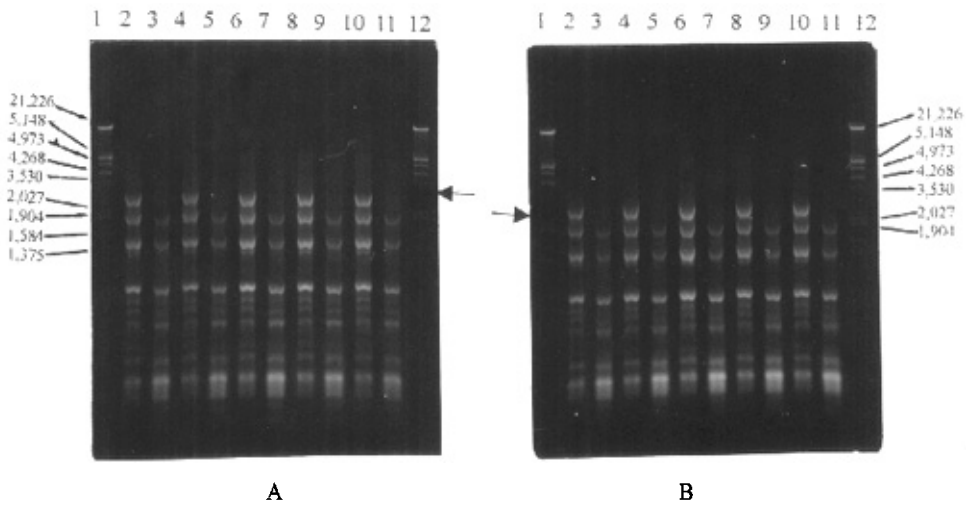


图 11 参与组成 DNA 池的单株 DNA 用引物 S401 进行 PCR 扩增的结果

2, 4, 6, 8, 10 泳道为雄株 DNA; 3, 5, 7, 9, 11 泳道为雌株 DNA; 1 和 12 泳道为 λ /HindIII+EcoRI DNA marker。箭头示约 2.5 bp 的雄性特异片段。

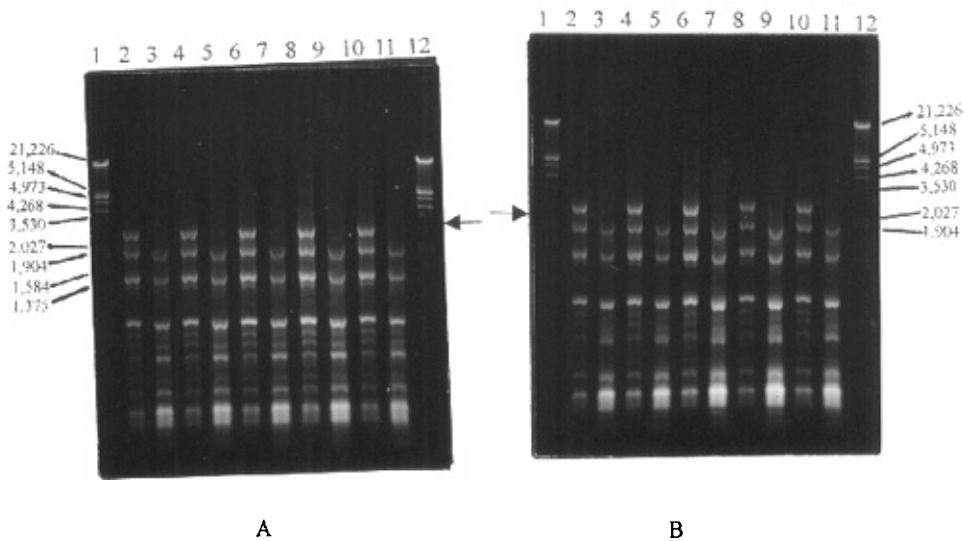


图 12 未参与组成 DNA 池的单株 DNA 用引物 S401 进行 PCR 扩增的结果

2, 4, 6, 8, 10 泳道为雄株 DNA; 3, 5, 7, 9, 11 泳道为雌株 DNA; 1 和 12 泳道为 λ /HindIII+EcoRI DNA marker。箭头示约 2.5 bp 的雄性特异片段。

3.3 PCR 产物的克隆

冻溶法回收用随机引物 S401 扩增得到的雄性特异带, 然后克隆到 pGEM-T Easy 载体上。克隆路线如图 13。

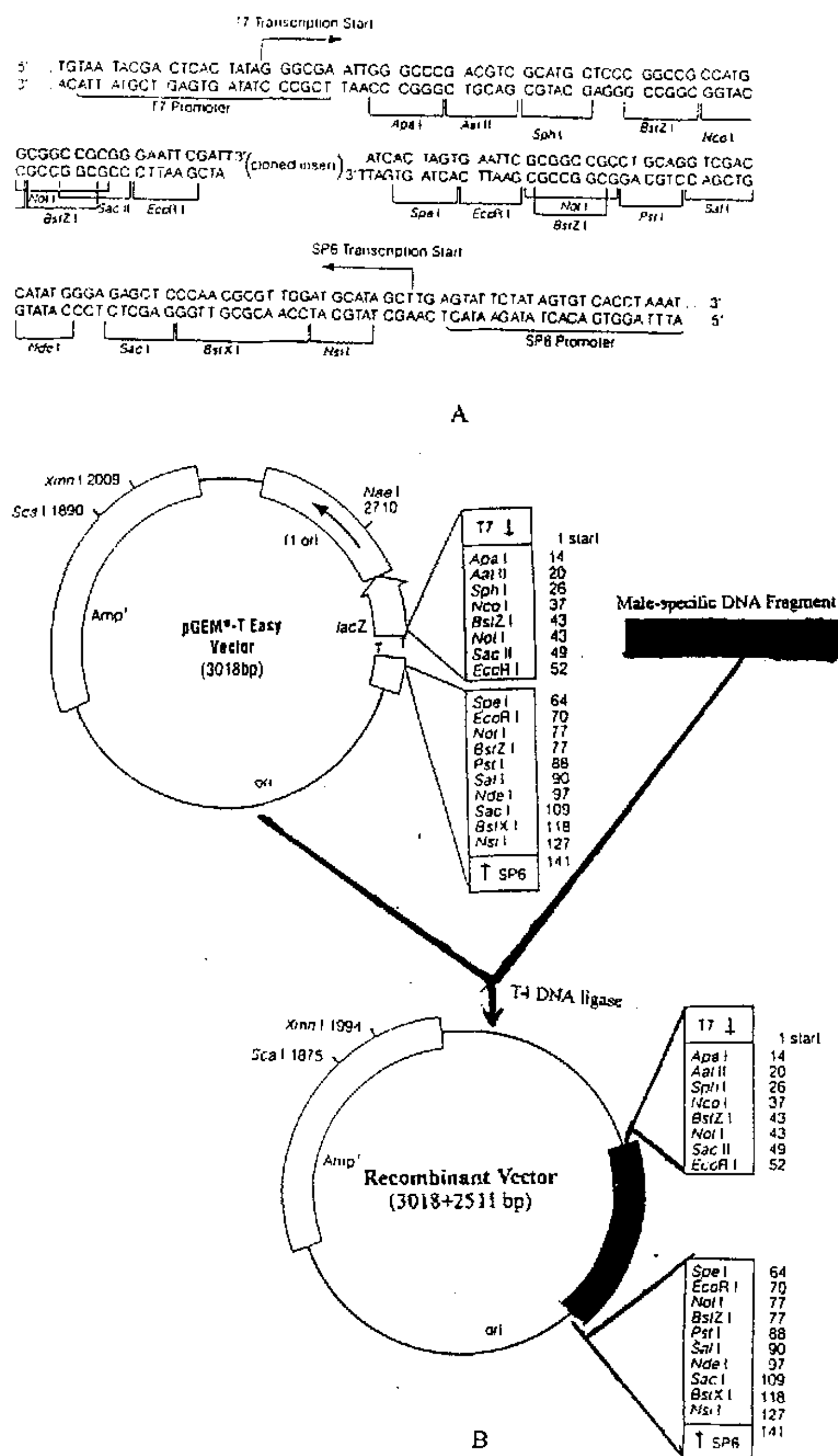


图 13 大麻雄性特异片段的克隆策略

图 A 显示 pGEM-T Easy 载体的启动子和多克隆位点, 上面一条链的序列相应于 T7 RNA 多聚酶合成的 RNA, 下面一条链的序列相应于 SP6 RNA 多聚酶合成的 RNA。图 B 显示克隆策略。

3.4 阳性克隆的酶切鉴定和 PCR 分析

用目的片段与 pGEM-T Easy 质粒载体的连接体系转化 JM101。转化后在涂有 IPTG 和 X-gal 的 Amp LB 平板上 37℃ 培养细菌。由于重组质粒中 β -半乳糖苷酶基因已破坏，已转化的 JM101 细菌不能分解 X-gal，因而含重组质粒的菌落在培养板上呈白色。转化后获得 88 个白色克隆，将其中的 28 个白色克隆作 Cracking 鉴定，结果有 18 个克隆的质粒迁移率明显较对照（蓝色菌落的 pGEM-T Easy 质粒或插入了对照 DNA 的 pGEM-T Easy 质粒）慢。培养质粒滞后的一个菌落小量碱解法提取质粒 DNA。用 EcoR I 单酶切及 Nco I 和 Pst I 双酶切后，走 0.8% 琼脂糖凝胶电泳，结果发现 EcoR I 单酶切及 Nco I 和 Pst I 双酶切都能切下两条带，并且，两条带的总长度加起来大约相当于目的片段的总长度（图 14A），说明质粒插入了目的片段。进一步用 S401 进行的 PCR 鉴定也证实了这一点。从图 14A 可看出，用 S401 进行的 PCR 扩增得到了一条 2 kb 以上的条带。至于另外一条亮度稍差的带，则是在 PCR 扩增过程中以算术级数增加的缺口质粒 DNA，从该条带在图中的相对位置也可以证明这一点。

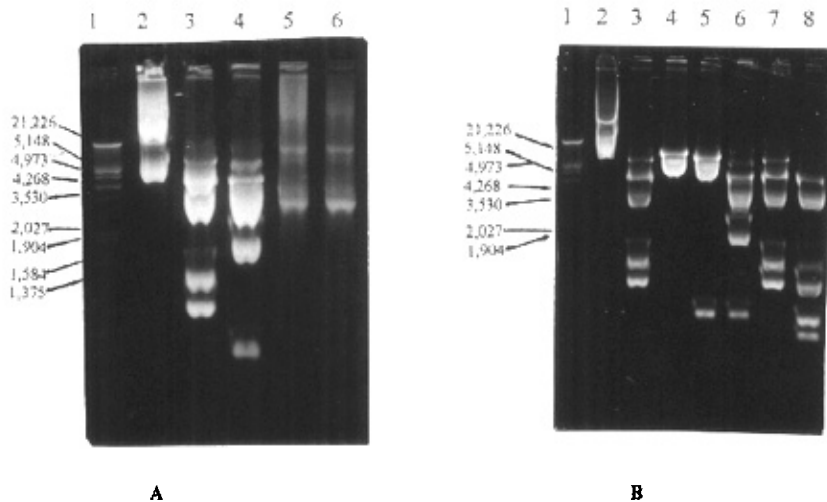


图 14 阳性克隆的酶切鉴定及 PCR 鉴定

- A 1. λ HindIII+EcoR I DNA marker; 2. 质粒 DNA 对照; 3. EcoR I 单酶切; 4. Nco I 和 Pst I 双酶切; 5. 用 S401 进行的 PCR 扩增结果; 6. 同 5, 但进行 PCR 扩增的循环程序不同。
- B 1. λ HindIII+EcoR I DNA marker; 2. 质粒 DNA 对照; 3. EcoR I 单酶切; 4. Pst I 单酶切; 5. Nco I 单酶切; 6. Nco I 和 Pst I 双酶切; 7. Pst I 和 EcoR I 双酶切; 8. Nco I 和 EcoR I 双酶切。

为进一步获得和相互印证目的片段的 EcoR I、Nco I 和 Pst I 三种限制性内切酶的酶切图谱，分别用这三种酶单切及两两双切，酶切结果见图 14B。根据 pGEM-T Easy 质粒的酶切图谱及图 14B 的酶切分析结果，可构建目的片段的酶切图（图 15）。

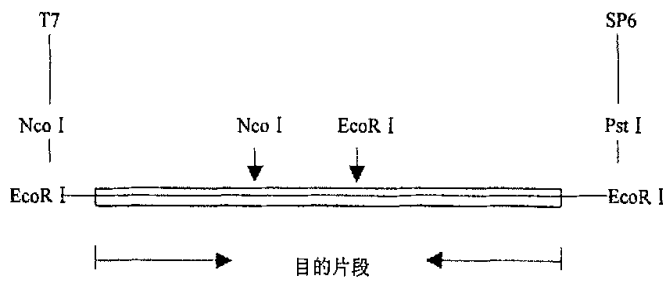


图 15 目的片段的限制性内切酶图谱初步分析

竖线条表示 pGEM T-Easy 质粒本身的序列及酶切位点，横线条表示目的片段，线条间的文字表示限制性内切酶酶切位点。因为 EcoR I 单切可以切出两条带，所以目的片段有一个 EcoR I 酶切位点；因为 Nco I 单切可以切出一条带，所以目的片段有一个 Nco I 酶切位点；因为 Pst I 单切不能切下任何条带，所以目的片段没有 Pst I 酶切位点；因为 Nco I 单切切下的条带较小且小于 EcoR I 单切切下的两条带，所以目的片段上的 Nco I 酶切位点靠近质粒上的 Nco I 酶切位点，且位于目的片段上 EcoR I 位点的左侧；因为 EcoR I 单切切下的较大的一条带在 Nco I 和 EcoR I 双切时被 Nco I 切断，所以目的片段上 EcoR I 位点距离质粒上左侧 EcoR I 位点较远。

3.5 序列分析结果

为了获得雄性特异性片段（RAPD 分子标记）的遗传信息，并将大麻性别的 RAPD 分子标记转化为特异性高、重复性好的 SCAR（Sequence characterized amplified regions）分子标记，以酶切及 PCR 鉴定为阳性克隆的质粒（即含插入片段的双链 cccDNA）作为模板，用该质粒上克隆位点两侧的 SP6 及 T7 通用引物从正向和反向进行序列分析（两个反应，每反应能准确测序约 500 bp），然后根据前面反应的测序结果，先后又合成 3 个引物，从正向和反向继续进行序列分析。序列分析结果如图 16、17。该序列含有多个终止子，属非编码序列。该序列含有重复 6 次的 TTTTTT 序列和重复 3 次的 AAAAAA 序列。从现有文献来看，利用 RAPD 得到的 DNA 标记序列都是非编码序列，且多含有分散存在的重复序列。本实验利用 RAPD 得到的雄性 DNA 特异片段也不例外。植物基因组中约 90% 的 DNA 序列为非编码序列，因此，容易理解用 RAPD 技术扩增到非编码序列的几率更大。另外，根据性染色体进化的理论，位于 Y 染色体上的雄性 DNA 标记物也更可能是非编码序列。但非编码序列的生物学意义仍是有待探讨的问题。

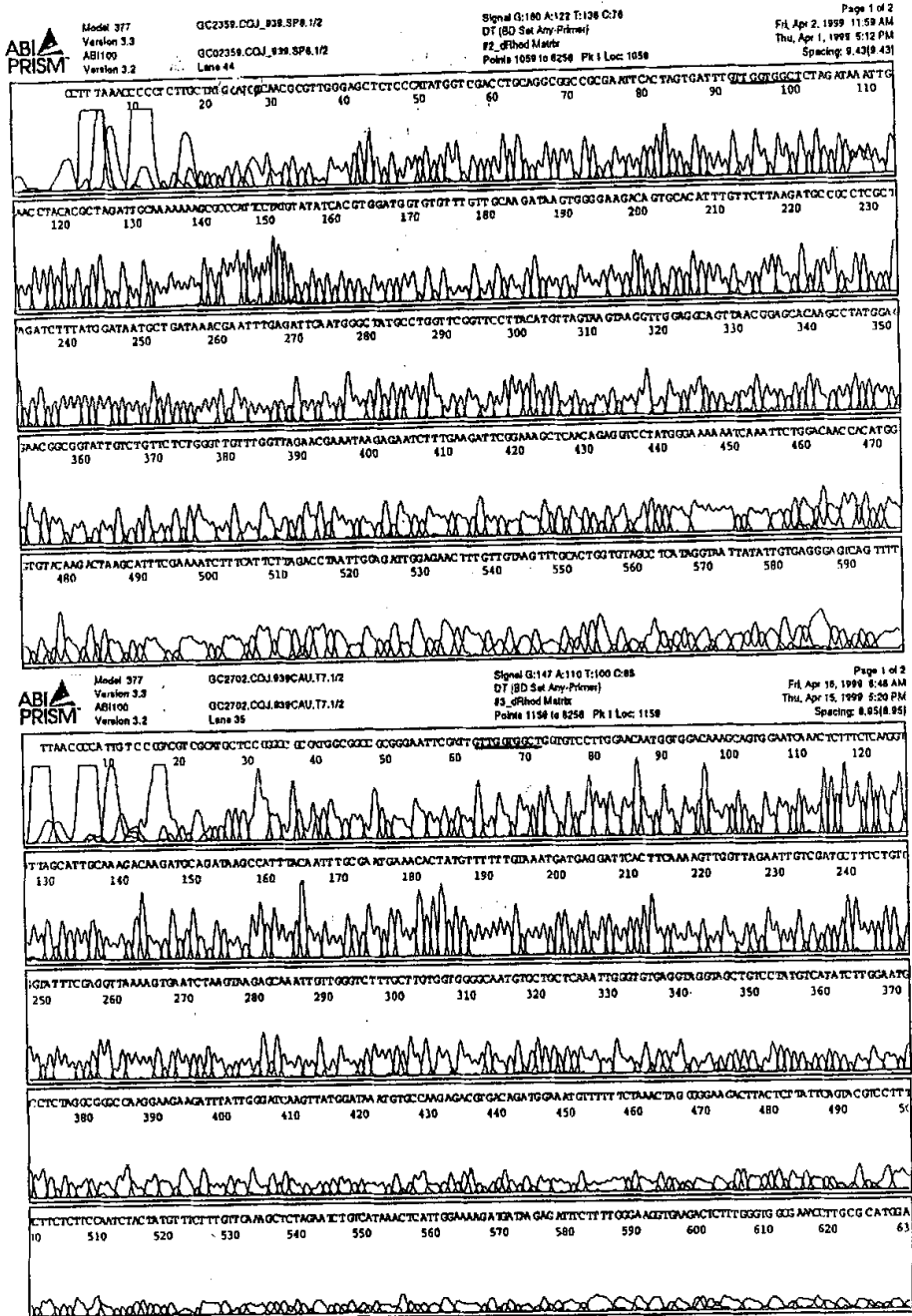


图 16 阳性克隆质粒插入片段的序列分析

上图显示以质粒 DNA 的 T7 序列为引物的测序结果，下图显示以质粒 DNA 的 SP6 序列为引物的测序结果。加下划线的部分为 S401 引物序列。

T7→GTGGTGGCTGGTGTCTTGGAACAATGGTGGACAAAGCAGTGAATCAAACCTCTTCTCA
 AGGTTTAGCATTGCAAGACAAGATGCAGATAAGCCATTTACAATTTGCGAATGAAACACTATGTTTTTTGTAAATGA
 TGAGGATTCACCTTCAAAGTTGGTTAGAATTGTCGATGCTTTCTGTGGTATTTCGAGGTTAAAAGTGAATCTAAGTAA
 GAGCAAATTGTTGGGTCTTGTCTGTGGTGGGGCAATGTGCTGCTCAAATTGGGTGTGAGGTAGGTAGCTGTCTATG
 TCATATCTTGGAATGCCTCTAGGCGGGCCAAGGAAGAAGATTTATGGGATCAAGTTATGGATAAATGTGCCAAGAGA
 CGTGACAGATGGAATGTTTTTCTAACTAGCGGAAGACTTACTCTTATTCAGTACGTCCTTTCTTCTCTCCAAT
 CTACTATGTTTCTTGTTCAAAGCTCTAGAATCTGTCATAAACTCATTGGAAGAGATGATAAGAGATTTCTTTTGGGA
 AGGTGAAGACTCTTTGGGTGGTGAACCTTGGTGGCATGGAAGGAAGTGTGTAGACC~~AAAAATGAAGGGGTCTTGCCA~~
 TTGGAAGATTAGATATGAGAAACAAGGGGTGCTTATGAAATGGATTGGAGATATCCCTTAGAACCTAATACACTTT
 GGCATAAAGTTATTAATAATCGTTACGGTAAGGCAGAGAATTTTCTGGCATAAAAAAGGGGTGATAGATTATCT~~CC~~
~~ATGGGGCCCTTGAAGGATAATGCAGATCTATATGAAGAGTACCTAGCGTTGAACATTTTAGAGTTGGAAGGTGTTA~~
 GTATACGTTTGGGGAAGATGTGTAGATTGGGGAATCCTCTTTGAAGAATCGTTTTTGGATTAGCTGTGGTTCTA
 GAGCCAAGAACAAGAGTATTAAGATCTTGTGCCATTCAAGGTGAGGTGTACATGTAGTAGTATGCTGAAACITTA
 AGTCAGACGAAGCTTGATGGAGAGGGAATACCTAGCCTATTAGAGTTGTTACAATAGTTGGAACATGTTAGATTGCT
 TAATGTGTGGATGATAGTAGATTGTGAAACTAGATTGAGTGGGGTCTTCTCTTGCAATCTATATTCAAATTGCGA
 ATCAGAACCAAGAAACGTGTTATGGACTAAGATCTAT~~AAAAAGTAGAGGCCCTCTAAAAACAAGTCTTCGGTTG~~
 GTTAGTGGCTCTAGGTAAGATAAATGTGCACAAAATGATGCAAGAGGAGACCATTCTGTGTATTTCCCGAGAGTG
 GTGTGCTGTGCTGTAAGGATTGAGAAGACTTGTCCCGCTGTTTTTGGATTGTAGCTTCGCACACAATCTCTGGCTT
 CTCTGTGTAAT~~GAATTC~~GGTGTCCACCAAGTATTGCTGGTGTTAAATAATTATTTAGGATTATTTAGTCTTTTAT
 GTTAGTTGCCTATATAAGGCTTCTTATTAGTTGTATTAGTTATATTCTATTACTCTTGACTTTACAATTCAATGAAA
 CCCAAGTTTCTCTACATCTCTTCTATTCTTTATTTGGTTATTCTACTCAAATAATTATCACCGATTCAATAACTCTAA
 TGATCATAAGCAAAGTGATTGGCAGTAAGCGCATAGTTTGTATGGAGATTGCAGTTATGGCTATTCCTAAGCAA
 TGTGGCTAAAAAGAAATAGCAGAATTTCAAAGGGTTGAATATCAGATTTGGACTGCCACTTCGGTTTACAATAG
 AAGCACTTTGAGGACTTGACATCTTTTTTGA~~AAAAAGAGAACGAGGCCATTGACTTAGACTAGCCCCATCTCGAT~~
 ATGGATATAAATCCTCGCTGTGGCGGAGGAATACTGTGGTTACAAAAATAAGCAGGTTCCACAGCTTTATCCAAAG
 CTAGGGACACTAAAACAAACCTCGCTGCTGTCTAATCAAATAAACTTCTGACTCCCTAGGGGCATAACGCAAAAC
 TGACTCCCTCACAATATAATTACCTATGAGGCTACCCAGTGCAAACTTACAACAAAGTTCTCCAATCTCCAATTAGG
 TCTAAGAATGAAAGATTTTCGAAATGCTTAGTCTTGACACCCATGTGGTTGTCCAGAATTGATTTTTTCCCATAGGA
 CCTCTGTTGAGCTTTCCGAATCTTCAAAGATTCTCTTATTTCGTTCTAACCAACAACCCAGAGAACAGACAATACCG
 CCGTTCTCCATAGGCTTGTGCTCCGTTAACTGCCTCCAACCTTACTTACTAACATGTAAGGAACCGAACCAGGCATAG
 CCCATTGAATCTCAAATTCGTTTATCAGCATTATCCATAAAGATCTAGCGAGGCGGCATCTTAAGAACAAATGTGCAC
 TGTCTTCCCCTTATCTTGAACAAACACACCATCCACGTGATATACATAGGAATGGGCGCTTTTTTGGCAATCTAG
 CGTGTAGGTTCAATTTATCTAGAGCCACCAAC
 GTTAAATAGATCTCGGTGGTTG←SP6

图 17 雄性特异片段的全序列

图中, 粗体部分代表 SCAR 分析中用到的引物序列, 粗体中加下划线的部分代表引物 S401 序列。
 方框中的序列为限制性内切酶的酶切位点, 其中上面的方框为 Nco I 酶切位点, 下面的方框为 EcoR I 酶切位点。其它加下划线的序列为 6 个 A 或 T 串连构成的重复序列。

根据序列分析结果,可构建该目的片段的酶切图谱。由图 18 可以看出,根据序列分析结果构建的酶切图谱与根据酶切结果构建的酶切图谱(图 15)是吻合的。

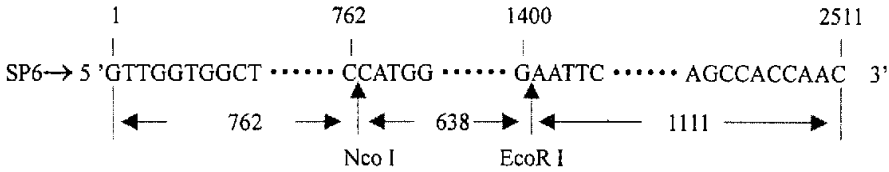


图 18 目的片段的限制性内切酶图谱分析

3.6 Southern Blot 分析

以目的片段为探针,对大麻雌、雄株基因组 DNA 及其酶切片段进行杂交,结果如图 19。从杂交结果可知,雌、雄性杂交信号只有量上的差异,而没有质上的差异。

从现有文献报道来看,用 RAPD 分子标记作探针基因组 DNA 酶切片段进行的 Southern Blot 分析都没有质的差异,甚至连量的差异也没有。这是由于 RAPD 分子标记序列中含有分散的、多拷贝的序列,且这些重复序列也分布在染色体的其它部位或其它染色体上造成的。本实验 Southern Blot 分析结果类似于有关文献,说明目的片段含有重复序列,这与序列分析结果是一致的。

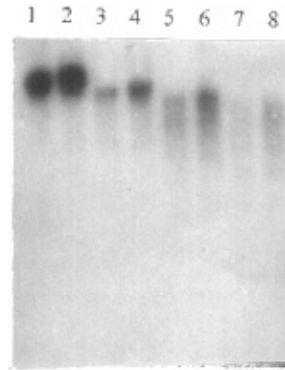


图 19 大麻雌雄株基因组 DNA 的 Southern Blot 分析

1、3、5、7 泳道为雄株基因组 DNA,其中 3、5、7 分别为基因组的 EcoR I、BamH I、Hind III 酶切片段,1 为未经酶切的基因组 DNA; 2、4、6、8 泳道为雌株基因组 DNA,其中 4、6、8 分别为基因组的 EcoR I、BamH I、Hind III 酶切片段,2 为未经酶切的基因组 DNA

3.7 大麻性别的 SCAR 分子标记

RAPD 分子标记是用 10 碱基随机引物进行 PCR 扩增得到的,对反应条件(包括反应体系各组分的相对含量以及循环程序)的变化很敏感,因此,存在重复性较差的问题。而 SCAR 分子标记是根据 RAPD 分子标记的序列分析结果用 20—28 碱基的特异引物进行 PCR 扩增得到的,因此特异性和重复性均较好。为了将大麻雄性的 RAPD 分子标记转化为 SCAR 分子标记,根据用 10 碱基随机引物 S401 扩增得到的雄性特异性片段的序列分析结果,分别按照该片段两端的 5'—3'链上碱基序列合成如下两个引物:

5' GTTGGTGGCTCTAGATAAATTG 3'

5' GTTGGTGGCTGGTGCCTTG 3'

用这两个引物扩增得到了一个显性的雄性SCAR分子标记，扩增结果见图20。

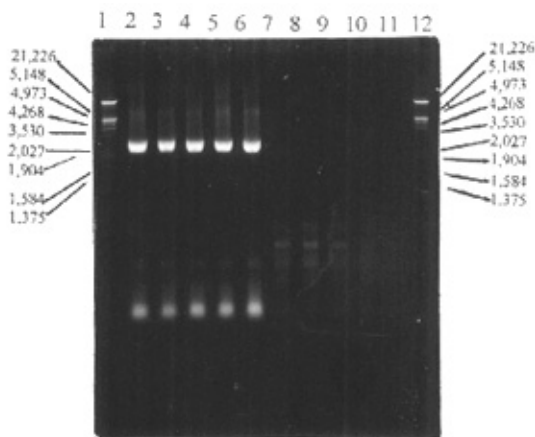


图 20 大男性性的 SCAR 分子标记

图中 2—6 泳道为雄株 DNA；7—11 泳道为雌株 DNA；1 和 12 泳道为 λ /HindIII+EcoR I DNA marker。

3.8 总结

本实验的目的是利用 RAPD 技术对严格的雌雄异株大麻—云麻一号的性别进行分子标记，并将 RAPD 标记物转化为 SCAR 标记物。所得结果如下：

1. 从 30 个随机引物中分别用 3 个不同的扩增循环程序筛选出 3 个随机引物，得到 3 条多态性片段。其中，用引物 S151 得到一条约 400 bp 的雄性多态性片段，用引物 S201 得到一条约 700 bp 的雌性多态性片段，用引物 S401 得到一条 2511 bp 的雄性多态性片段。本实验着重对 S401 的扩增结果进行了进一步的分析。

2. 对引物 S401 扩增得到的雄性特异片段进行了克隆和序列分析，结果表明该 DNA 片段是非编码序列，这一结果类似于其它有关性别分子标记的研究。

3. 用引物 S401 扩增得到的雄性特异片段作探针进行 Southern Blot 分析，结果表明，雌、雄性的杂交信号有量的区别，没有质的区别，这与该片段含有重复序列有关。这一结果类似于其它有关性别分子标记的研究。

4. 根据序列分析结果，分别合成 20 和 22 碱基的特异引物，分别以雌、雄性 DNA 为模板进行 PCR 扩增。结果表明，用引物 S401 得到的雄性 RAPD 分子标记可以转化为显性 SCAR 分子标记。

S201 的扩增结果与大麻具有性染色体的观点是矛盾的，但大麻是否具有性染色体尚有争议，因此，S201 的扩增结果尚需进一步证实。为了提高随机引物的利用效率，每个随机引物分别用三个不同的循环程序进行扩增，这种做法尚无文献报道。此外，用 S401 进行 PCR 扩增时，循环程序的退火温度之高尚未有文献报道。这些方法学上的尝试或许有一定的参考价值。本实验得到的大男性性的 SCAR 分子标记，可用于筛选大麻的全雌品系，也可用于研究大麻的种系发生。

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. 植物生理学报. 1980, 6 (2): 149~155
2. 范双喜, 宋学锋. 石刁柏性别表现与同工酶的关系. 华北农学报. 1995, 10 (2): 67~71
3. 冯昌全. 植物的性别决定与伴性遗传. 生物学通报. 1994, 29 (5): 25
4. 傅永福, 孟繁静. 玉米赤霉烯酮与冬小麦的生长与发育. 作物学报. 1994, 20: 271~276
5. 管启良, 林立, 俞仲各. 白豆杉的核型和性染色体的研究. 遗传学报. 1993, 20 (2): 155~158
6. 国风利, 孟繁静. 一种新型矮牵牛花突变体的研究. 植物学报. 1997, 39 (8): 707~711
7. 韩玉珍, 孟繁静. 玉米赤霉烯酮影响微青萍生长发育的研究. 科学通. 1990, 22: 1744~1746
8. 何梅, 李懋学. 银杏雌株染色体 Ag-NOR 的研究. 遗传. 1996, 18 (3): 3~5
9. 黄绍兴和阎隆飞. 植物发育过程中特异基因的表达. 植物生理学通讯. 1995, 31 (3): 161~166
10. 邵宏波, 初立业. 高等植物的性别研究及其特点. 生命科学. 1994, 6 (1): 11
11. 赵大中, 陈民, 种康, 谭克辉. 高等植物发育基因的分离方法. 植物生理学通讯. 1997, 33 (4): 312~317
12. 舒群芳等. 植物基因克隆的策略和方法. 植物学通报. 1996, 16 (1): 80~85
13. 张立平等. 雌雄异株葡萄的性别鉴定研究. 植物学通报. 1998, 15 (4): 63~67
14. 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控. 科学出版社, 北京. 1995
15. 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学实验方法. 人民军医出版社, 北京. 1996
16. 柯文山. 植物种群性别生态. 植物学通报. 1994, 11 (增刊): 15~20
17. 李季伦, 朱彤霞, 张 簏等. 玉米赤霉烯酮的研究. 北京农业大学学报. 1980, (1): 13~28
18. 李曙轩, 傅柄通. 黄瓜及瓠瓜的性别表现与激素控制. 植物生理学报. 1979, 5 (1): 83~92
19. 李曙轩. 乙烯利及赤霉酸对瓠瓜性别的影响. 植物生理学报. 1981, 7 (3): 265~272
20. 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 高等教育出版社, 北京. 1993
21. 陆文燊. 太行花性器官发育的研究—两性花中雌雄性器官发育对温度的不同要求. 植物学报. 1996, 38 (3): 174~179
22. 孟繁静, 张 簏. 玉米赤霉烯酮的研究 (续). 北京农业大学学报. 1981, 2: 101~103
23. 汪俏梅, 曾广文. 高等植物性别分化的诱导信号. 植物生理学通讯. 1997, 33 (2): 147~151
24. 杨中汉, 唐因, 曹宗巽. 兰州百合生殖器官中甾酮含量的变化. 植物学报. 1994, 36 (3): 215~220
25. 应振土, 李曙轩. 乙烯控制瓠瓜性别分化的机理研究. 中国科学 (B 辑). 1991, (3): 276~283
26. 应振土, 李曙轩. 乙烯、乙烯利和 ACC 对瓠瓜性别的影响. 园艺学报. 1987, 14: 42~

48

27. 赵德刚. 高等植物性别决定机理的研究. 中国农业大学博士学位论文. 1997
28. 钟海文, 杨中汉. 根据过氧化物酶同工酶谱鉴定银杏的性别. 林业科学. 1982, 18: 1
29. 宋同明. 玉米遗传与玉米基因突变性状彩图. 科学出版社, 北京. 1989
30. 童哲. 光敏核不育水稻的发育生物学研究评述. 植物学报. 1998, 40 (3): 189~199
31. 张爱民, 黄铁城. 正在走向生产的杂种小麦—第一届国际杂种小麦研讨会论文集. 中国农业大学出版社, 北京. 1998
32. Ainsworth C, Crossley S, Buchanan-Wollaston V et al., Male and Female of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. The Plant Cell. 1995, 7: 1583~1598
33. Ainsworth C, Shephard H, Liu JP et al. Studies on sex determination in plants with X: Autosome dosage systems. Flower News Letter. 1997, 5: 18~23
34. An G. Regulatory genes controlling flower time or floral organ development. Plant Molecular Biology. 1994, 25: 335~337
35. Angenent et al. A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. The Plant Cell. 1995, 7: 1569-1582
36. Angenent GC, Busscher M, Franken J et al. Differential expression of two MADS box genes in wild-type and mutant petunia flowers. Plant Cell. 1992, 4: 983~993
37. Bassett CL et al. Floral specific polypeptides of the Japanese morning glory. Planta. 1988, 175: 22
38. Bensen RJ, Johal GS, Crane VC et al. Cloning and characterization of the maize *An1* gene. The Plant Cell. 1995, 7: 75~84
39. Biffi R, Restivo FM, Tassi F. A restriction fragment length polymorphism probe for early diagnosis of gender in *Asparagus officinalis* L. HortScience. 1995, 30 (7): 1463~1464
40. Bowman JL, Sakai H, Jack T et al. *SUPERMAN*, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. Development. 1992, 114: 599~615
41. Bracale I, Caporali E, Galli MG et al. Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. Plant Sci. 1991, 80: 67~77
42. Caetano-Anolles G and Bassam BJ. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primer. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1993, 42: 189-200
43. Caporali E, Carboni A, Galli MG et al. Development of male and female flower in *Asparagus officinalis*. search for point of transition from hermaphroditic to unisexual developmental pathway. Sex plant reprod. 1994, 7: 239~249
44. Carpenter R, Coen ES. Floral homeotic mutations produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. Genes Dev. 1990, 4: 1483~1493
45. Chailakhyan M.Kh, Khrianin VN. In *Sexuality in Plants and Its Hormonal Regulation*. K.V. Thimann ed.(transl. V. Lorvoch). Springer-Verlag New York Inc, P51~59. 1987.
46. Chailakhyan MK. Genetic and hormonal regulation of growth, flowering and sex expression in plant. American Journal Botany. 1979, 66: 717~736

47. Chailakhyan MK, Khryanin VN. Effect of growth regulation and role of roots in sex expression in spinach. *Planta*. 1978, 142:207~210
48. Charlesworth B. The evolution of sex chromosomes. *Science*. 1991, 251: 1030~1033
49. Charlesworth B. The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr. Biol*. 1996, 6: 149-162
50. Cheng PC, Greyson RI, Walden DB. Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *American Journal Botany*. 1983, 70 (3): 450~462
51. Chung Y-Y et al. Early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS box gene. *Plant Mol Biol*. 1993, 226: 657-665
52. Coen ES, Carpenter R. The metamorphosis of flowers. *Plant Cell*. 1993, 5:1175~1181
53. Coen ES. Meyerowitz EM. The war of the whorls genetic interaction controlling flower development. *Nature*. 1991, 353: 31~37
54. Cormish EC et al. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*. 1987, 326: 99
55. Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants. Bronx NY: New York Botanical Gardens. 1988
56. Daoudi EH, Bonnet-Masimbert, Martin-Tanguy J. Polyamine development in buds and shoots of *Pseudotsuga menziesii* after the transition from vegetative to sexual development. *Annales-des Science Forestieres*. 1991, 48 (4): 367~376
57. Dellaporta SL and Calderon-Urrea. Sex Determination in flowering plants. *The Plant Cell*. 1993, 5: 1241~1251
58. DeLong A, Calderon-Urrea A, Dellaporta SL. Sex determination gene *TASSELSEED2* of Maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell*. 1993, 74: 757~768
59. Donnison IS, Stokely J and Vyskot B et al. Isolation of Y chromosome-specific sequence from *Silene latifolia* and mapping of male sex determining genes using representation difference analysis. *Genetics*. 1996, 144: 1893-1901
60. Doyle J et al. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990, 12:13~15
61. Durand B, Durand R. Sex determination and reproductive organ differentiation in *Mercurialis*. *Plant Science*. 1991, 80: 49~65
62. Durand R, Durand B. Sexual differentiation in higher plants. *Physiol Plant*. 1984, 60: 267
63. Estruch JJ, Granell A, Hansen G et al. Floral development and expression of floral homeotic genes are influenced by cytokinins. *The Plant Journal*. 1993, 4 (2): 379~384.
64. Evans PT et al. Biochemical differentiation in the tobacco flower probed with monoclonal antibodies. *Planta*. 1988, 175: 259
65. Evenari M, Gutterman Y. The photoperiodic response of some desert plants. *Z. Pflanzenphysiol*. 1966, 54: 7~27
66. Fischer A et al. Chromosomal mapping of the MADS box multigene family in *Zea mays* reveals dispersed distribution of allelic gene as well as transposed copies. *Nucleic Acids Res*. 1995, 23: 11901-11911

67. Friedlander M, Atsmon D, Galun E. Sexual differentiation in cucumber: the effects of abscisic acid and other growth regulators on various sex genotype. *Plant Cell Physiol.* 1977, 18 (1): 681~691
68. Fu Yong-fu, Hong-ying Li, Fan-jing Meng. The possible role of zeaxenone in the floral gradient in *Nicotiana tabacum* L. *J Plant Physiol.* 1995, 147: 197~202.
69. Fujioka S, Yamana Y et al. The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (D8) of maize accumulates native gibberellins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988, 85: 9031
70. Galli MG, Bracale M, Savini C, Raffaldi F et al. Different kinds of male flowers in the dioecious plant *Asparagus officinalis* L. *Sex Plant Reprod.* 1993, 6: 16~21
71. Galoch E. The hormonal control of sex differentiation in dioecious plants of hemp (*Cannabis sativa*). *Acta Soc Bot Pol* 1978, 47: 135~161
72. Garcia-Maroto F, Salamini F, Rohde W. Molecular cloning and expression patterns of three alleles of the deficiens homologous gene *St-deiciens* from *Solanum tuberosum*. *Plant Journal.* 1993, 4: 771~780
73. Gasser CS et al. Isolation of tissue-specific cDNAs from tomato pistils. *Plant Cell.* 1989, 1: 15
74. Gasser CS. Molecular studies on the differentiation of floral organs. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio.* 1991, 42: 621
75. Gill GP, Havey CF and Garder RC. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*. *Theor Appl Genet.* 1998, 97: 439-445
76. Gounarys I et al. Stamen-specific proteins of buffalogress (*Cenchrus ciliaris*). *J. Plant Physiol.* 1991, 137: 473
77. Grant S, Donnison IS, Hardenack S et al. Studies of the genetics of sex determination in dioecious *Silene latifolia* by the front and the back doors. *Flowering Newslett.* 1996, 21: 21~26
78. Grant S, Houben A, Vyskot B et al. Genetics of sex Determination in flowering plant. *Developmental genetics.* 1994, 15: 214~230
79. Grant S, Hunkirchen B, Saedler H. Developmental differences between male and females flowers in the dioecious plant *Silene latifolia*. *The Plant Journal.* 1994, 6 (4): 471~480
80. Gregg KB. The effect of light intensity on sex expression in species of *Cynoches* and *Catasetum* (Orchidaceae). *Selbyana.* 1975, 1: 101~113
81. Guttman DS and Charlesworth D. An X-linked gene with a degenerate Y-linked homologue in a dioecious plant. *Nature.* 1998, 393: 262-266
82. Hamdi S, Teller G, Louis JP. Master regulatory genes, auxin levels and sexual organogenesis in the dioecious plant *Mercurialis annua*. *Plant Physiol.* 1987, 85: 393~399
83. Hansen DJ, Bellman SK, Sacher RM. Gibberellic acid-controlled sex expression in corn tassels. *Crop Sci.* 1976, 16: 371~374
84. Harberd NP, Freeling M. Genetics of dominant gibberellin-insensitive dwarfism in maize. *Genetics.* 1989, 121: 827~838
85. Hardenack et al. Comparison of MADS box gene expression in developing male and female

- flowers of the dioecious plant white campion. *The Plant Cell*. 1994, 6: 1775~1787
86. Havey CF, McNeillage MA and Gill GP. Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. Chinensis*. *Sex Plant Reprod*. 1997, 10: 149-154
87. Hardenack S et al. Comparison of MADS box gene expression in development male and female flowers of the dioecious plant white campion. *Plant Cell*. 1994, 6: 1775-1787
88. Herskowitz I. A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature*. 1989, 342: 749-757
89. Hirsch AM, Fortune D. Peroxidase activity and isoperoxidase composition in cultured stem tissue, callus and cell suspensions of *Actinidia Chinensis*. *Zpfanainphysiol Bd*. 1984, 113 (5): 129
90. Hodgkin J. Sex determination compared in *Drosophila* and *Ceanorhabditis*. *Nature*. 1990, 344: 721~728
91. Hongyo T, Buzard GS and Calvert RJ et al. 'Cold SSCP': a simple, rapid and nonradioactive method for optimized single-stranded conformation polymorphic analyses. *Nucleic Acids Res*. 1993, 21: 3637-3642
92. Hopping ME, Hawthorne BT. Effects of ethrel 48 on sex expression and yield in pumpkins. *J. Exp. Agric*. 1979, 7: 399~403
93. Hormaza JI, Dollo L, Polito VS. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor Appl. Genet*. 1994, 89: 9~13
94. Hormaza JI, Polito VS. Pistillate and Staminate flower development in dioecious *Pistacia vera* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany*. 1996, 83 (6): 759~766
95. Huijser P, Klein J et al. Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J*. 1992, 11: 1239~1249
96. Iizuka M, Janick J. Sex chromosome variation in *Spinacia oleracea* L. *Journal of Heredity*. 1971, 62: 349~352
97. Irish EE. Regulation of sex determination in maize, *BroEssays*. 1996, 18 (5): 533-569
98. Irish EE, Langdale JA, Nelson TM. Interactions between *tassel seed* genes and other sex determining genes in maize. *Dev. Genet*. 1994, 15: 155~171
99. Irish EE, Nelson TM. Sex determination in monoecious and dioecious plants. *Plant Cell*, 1989, 1: 737~744
100. Irish EE, Nelson TM. Vegetative to floral conversion occurs in multiple steps in maize tassel development. *Development*. 1991, 112: 891~898
101. Jack T, Brockman LL, Meyerowitz EM. The homeotic gene *apetala3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*. 1992, 68: 683~697
102. Janick J, Stevenson EC. Genetics of the monoecious character in spinach. *Genetics*. 1955, 40: 429~437
103. Janousek B, Grant SR and Vyskot B. Non-transmissibility of the Y chromosome through the

- female line in androhermaphrodite plants of *Melandrium album*. *Heredity*. 1998, 80: 576-483
104. Janousek B, Siroky J and Vyskot B. Epigenetic control of sexual phenotype in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol Gen Genet*. 1996, 250: 483-490
105. Koistra E. Femaleness in breeding glasshouse cucumbers. *Euphytica*. 1967, 16: 1~17
106. Kopcewicz J, Chrominski A. Estrogens in 2-chloroethyphosphonic acid induced femaleness of *Cucurbita pepo* L. *Experientia*. 1972, 28 (5): 603~604
107. Krishnamoorthy HN, Talukdar AR. Chemical control of sex expression in *Zea mays* L. *Z.Pflanzenphysiol*. 1976, 79: 91~94
108. Kush A et al. The cDNA sequence of two MADS box proteins in petunia. *Plant Physiol*. 1993, 1102: 11051-11052
109. Kutlunow AM et al. Different temporal and spartial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell*. 1990, 2: 1201
110. Lazarte JE, Garrison A. Sex modification in *Asparagus officinalis* L. *J Am Hort Sci*. 1980, 105: 691~694
111. Lee CL. *Amer. J. Bot*. 1954, 41: 545~549
112. Lin JJ and Kuo J. AFLP. A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus*. 1995, 17: 70-71
113. Lisitsyn et al. Cloning the difference between two complex genomes. *Science*. 1993, 259: 946-951
114. Longo CP. Genes controlling sex expression. *In Genetic Control of Self-Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants*. by EG Williams (eds). pp245~265.1994.
115. Louis JP. Genes for the regulation of sex differentiation and male fertility in *Mercurialis annua* L. *Journal Hered*.1989, 80:104~114
116. Louis JP, Augur C, Teller G. Cytokinins and differentiation processes in *Mercurialis annua*. *Plant Physiol*. 1990, 94:1535~1541
117. Louis JP, Durand B. Studies with the dioecious angiosperm *Mercurialis annua* L. (2n=16): Correlation between genic and cytoplasmic male sterility, sex segregation and feminizing hormone s(cytokinins). *Mol. Gen Genet*. 1978, 165: 309~312
118. Ma et al. AGL1-AGL6, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes and Development*. 1991, 5: 584-495
119. Malepszy S, Niemirowicz-Szczytt K. Sex determination in cucumber (*Cucumis sativas*) as a model system for molecular biology. *Plant Sci*. 1991, 80: 39~47
120. Mandolino et al. Hemp breeding: biotechnological aspects. *Sementi-Elette*. 1996,42 (2): 57-60
121. Mariani et al. *Nature*. 1990, 347: 737-741
122. Mariani et al. *Nature*. 1992, 357: 384-387
123. Marziani Longo GP, Rossi G, Scaglione G et al. Sexual differentiation in *Asparagus officinalis* L. III. Hormonal content and peroxidase isozymes in female and male plants. *Sex Plant Reprod*. 1990, 3: 236~243

124. Mayer SS and Charlesworth D. Genetic evidence for mutiple origins of dioecy in the hawaiian shrub *wikstroemia* (Thymelaeaceae). *Evolution*. 1992, 46: 207-215
125. McArthur ED, Freeman DC. Sex expression in *Atriplex canescens*: genetics and environment. *Batanical Gazette*. 1982, 143: 476~482
126. McClure BA, Haring V, Ebert RP. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*. 1989, 342: 955~957
127. Meagher TR. Sex determination in plants. In *Plant reproductive ecology: patterns and strategies*, Edited by J. Lovett Doust and L. Lovett Doust. Oxford University Press, New York, pp.125~138. 1988
128. Metzger JD. The role of gibberellins in reproductive development. *Bulletin of the Plant Growth Regulator Society of America*. 1988, 16: 13~19
129. Miller HG, Kocher TD, Loy KB. New MADS box domains in *Asparagus officinalis* L. *Sex Plant Reprod*. 1995, 8:3 18~320
130. Mohan Ram HY, Jaiswal VS. Induction of male flowers on female plants of *Cannabis Sativa* by 2-chloroethane phosphonic acid. *Experientia*. 1970, 26: 214~216
131. Mohan-Ram HY, Nath R. The morphology and embryology of *Cannabis sativa* Linn. *Phytomorphology*. 1964, 14: 44~429
132. Mulcahy DL, Weeden NF, Kesseli R et al. DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sex Plant Roprod*. 1992, 5: 86~88
133. Murray AL, Miller CH. Cucumber sex expression modified by 2-choroethanesulphonic acid. *Science*. 1968, 162: 1396~1397
134. Nasrallah JB et al. Self-incompatibility genes of *Brassica oleracea*: expression, isolation, and structure. *PNAS USA*. 1988, 85: 5561
135. Negi SS, Olmo HP. Sex-conversion in a male *Vitis vinifera* L by a kinin. *Science*. 1966, 156: 1624~1625
136. Norman C, Runswick M, Pollack R et al. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*. 1988, 55: 989~1003
137. Oyamada M, Kuroda Y, Ishizawa Y et al. Studies on seed germination and flowering in salt-wort. *Bull. Yamagata Pref. Hort. Exp. St.* 1983, 2: 11~32
138. Parant I and Michelmore RW. Development of PCR-based markers linked to downy mildew resistance in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 1993, 85 (8): 985 – 993.
139. Pareddy DR, Greyson RJ. In vitro culture of immature tassels of an inbred field variety of *Zea mays*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 1985, 5: 119~128
140. Parker JS. Sex chromosomes and sexual differentiation in flowering plants. *Chromosomes Todays*. 1990, 10: 187~198
141. Parker JS, Clark MS. Dosage sex~chromosomes system in plants. *Plant Science*. 1991, 80: 79~92
142. Pedersen S et al. Overlap of gametophytic and sporophytic expression in barley. *Theor Appl*

- Gen. 1987, 75: 200
143. Penel CL, Greppin H. Evolution of the auxin~oxidase and peroxidase activity during the spinach's photoperiodic induction and sexuaistion. *Plant Cell Physiol.* 1972, 13 (1): 151~156
144. Pnueli L et al. Isolation of the tomato AGAMOUS gene TAG1 and analysis of its homeotic rile in transgenic plans. *Plant Cell.* 1994, 6: 175-186
145. Pnueli L et al. The MADS box gene family in tomato: Temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant Journal.* 1991, 1:255~266
146. Powell W et al. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1996, 1:215-222
147. Reid LB. Plant hormone mutants. *J. Plant Growth Regul.* 1994, 12: 207~226
148. Rejon et al. Cytogenetic and molecular analysis of the mutiple sex chromosome system of *Rumex acetosa*. *Heredity.* 1994, 72: 209-215
149. Retig N, Rudich J. Peroxidase and IAA oxidase activity and isoenzyme patterns in cucumber plants, as affected by sex expression and ethephon. *Physiol. Plant.* 1972, 27: 156~160
150. Rood SB, Pharis RP, Major DJ. Changes of endogenous gibberellin~like substances with sex reversal of the apical influence of corn. *Plant Physiol.* 1980, 66: 793~796
151. Rostivo FM, Tassi F, Biffi R et al. Linkage arrangement of RFLP loci in progenies from crosses between doubled haploid *Asparagus officinalis* L clones. *Theor Appl Genet* 1995, 90: 124~128
152. Ruas CF, Fairbanks DJ and Evans RP et al. Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex Garrettii* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany.* 1998, 85 (2): 162-197
153. Rudich J, Halevy AH. Involvement of abscisic acid in the regulation of sex expression in the cucumber. *Plant Cell Physiol.* 1974, 15: 635~637
154. Rudich J, Halevy AH, Kedar N. Ethylene evolution from cucumber plants as related to sex expression. *Plant Physiol.* 1972, 49: 998~999
155. Sakamoto K, Shimomomura K, Komeda Y et al. A male-Associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L. *Plant Cell Physiol.* 1995, 36 (8): 1549~1554
156. Sambrook J et al. *Molecular Cloning , Laboratory manual*, 2nd Ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. 1989
157. Sawhney et al. Soluble proteins of the mature floral organs of tomato. *J Plant Physiol.* 1985, 121: 265
158. Scandalios LM. Isozyme in development and differentiation. *Ann Rev Plant Physiol.* 1974, 25: 225~258
159. Schmidt RJ, Veit B, Mandel A et al. Identification and molecular characterization of *ZAG1*, the maize homolog of the arabidopsis floral homeotic gene *AGAMOUS*. *The Plant Cell.* 1993, 5: 729~737
160. Schultz EA, Pickett FB, Haughn GW. The *Flo10* gene product regulates the expression

- domain of Homeotic genes *AP3* and *PI* in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell*. 1991, 3: 1221~1237
161. Schwarz-Sommer Z, Hue I, Huijser P et al. Characterization of the *Antirrhinum* floral Homeotic MADS-box gene *deficiens*: Evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J*. 1992, 11: 251~263
162. Schwarz-Sommer Z, Huijser P, Nacken W et al. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*. 1990, 250: 931~936
163. Shannon LM. Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 1968, 19: 187~210
164. Sherry RA, Eckard KJ, Lord EM. Flower development in dioecious *Spinacia oleracea* (Chenopodiaceae). *American Journal Botany*. 1993, 80: 283~291
165. Shifriss O. Gibberellin as sex regulator in *Ricinus communis*. *Science*. 1961, 133: 2061~2062
166. Simons RG, Grinwich DL. Immunoreactive detection of four mammalian steroids in plants. *Can J Bot*. 1989, 67: 288~298
167. Sommer H, Beltran JP, Huijser P et al. *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: The protein shows homology to transcription factors. *EMBOJ*. 1990, 9: 605~613
168. Splittstoesser WE. Effects of 2-chloroethylphosphonic acid and gibberellic acid on sex expression and growth of pumpkins. *Physiol. Plant*. 1970, 23: 762~768
169. Takeno K et al. Sex determination of flowers of *Salsola Komarovii Iljin* by photoperiod. *J. Plant Physiol*. 1995, 146: 672~676
170. TheiBen G et al. Structural characterization, chromosomal localization and phylogenetic evaluation of two pairs of AGAMOUS like MADS box genes from maize. *Gene*. 1995, 156: 155-166
171. Tsao TH (Cao Zong-Xun) Sex expression in flowering. *Acta Phytophysiological Sinica*. 1988, 14: 203
172. Van Nigtevecht G. Genetic studies in dioecious *Melandrium*. II. Sex determination in *Melandrium album* and *Melandrium dioicum*. *Genetica*. 1966, 37: 307~344
173. Veit B, Schmidt RJ, Hake S, Yanofsky MF. Maize floral development: New genes and old mutants. *Plant Cell*. 1993, 5: 1205~1215
174. Wang Yong-yin, Zhou Xie. The relationship between the ABA/GA4 ratio in shoot apex and sex differentiation of cucumber(*Cucumis sativus* L.). *Acta Phytophysiological Sinica*. 1991, 17 (4): 356~364
175. Wehner TC and Miller CH. Effect of gynoeocious expression on yield and earliness of a fresh-marked cucumber hybrid. *J Amer Soc Hort Sci*. 1985, 110 (4): 464-466
176. Weigel D, Meyerowitz EM. Activation of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Science*. 1993, 261: 1723~1726
177. Weigel D, Meyerowitz EM. The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*. 1994, 78: 203~209
178. Weiss D et al. Identification of endogenous gibberellins in petunia flowers. *Plant Physiol*. 1995, 107: 695~702

179. Welsh J and McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18: 7213-7218
180. Williams et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18: 6531-6535
181. Winkler RG, Freeling M. Physiological genetics of the dominant gibberellin~ nonresponsive maize dwarfs, *Dwarf 8* and *Dwarf 9*. *Planta.* 1994, 193: 341~348
182. Winkler RG, Helentjaris T. The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450~mediated early step in gibberellin biosynthesis. *The Plant Cell.* 1995, 7: 1307~1317
183. Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL et al. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature.* 1990, 346:35~39
184. Ye D, Olivira M, Veuskens J et al. Sex determination in the dioecious *Melandrium*. The X/Y chromosome system allows complementary cloning strategies. *Plant Sci.* 1991, 80, 93~106
185. Ye D et al. Sex determination in the dioecious *Melandrium*. I. First lessons from androgenic haploids. *Sex Plant Reprod.* 1990, 3: 179-186
186. Yin T and Quinn JA. Tests of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany.* 1995b, 82 (12): 1537~1546
187. Yin T and Quinn JA. Tests of a mechanistic model of one~hormone regulating both sexes in *Buchloe Dactyloides* (Poaceae). *American Journal of Botany.* 1995a, 82 (6): 745~751
188. Yin T and Quinn JA. A mechanistic model of one~hormone regulating both sexes in flowering plants. *Bulletin of the Terrey Botanical Club.* 1992, 119 (4): 431~441
189. Yin T and Quinn JA. Effects of exogenous growth regulators and a gibberellin inhibitor on sex expression and growth from in buffalograss (*Buchloe dactyloides*), and their ecological significance. *Bulletin of the Terrey Botanical Club.* 1994, 121 (2): 170~179
190. Zhang YH et al. Y chromosome specific markers and the evolution of dioecy in the genus *Silene*. *Genome.* 1998, 41: 141-147
191. Zhang Jin~Song; Yang Zhong~Han, Tsao TH. The abundance of estrogen in female reproductive organs of plants. *Chinese J Bot.* 1992, 4 (1): 66~69

致谢

本论文是在韩玉珍副教授、傅永福副教授、赵德刚副教授（北京林业大学）、孟繁静教授、国凤利副教授等几位老师的悉心指导下完成的。从论文的选题、实验设计、实验操作到论文的写作，无不凝聚着几位老师的心血和关怀，作者十分感谢几位老师三年来在学习上和生活上给予的亲切指导、热情鼓励和深切关怀。

在导师韩玉珍副教授赴港留学期间，傅永福和赵德刚两位老师对我的论文工作给予很多具体指导和帮助。孟繁静教授作为我们实验室的创始人，虽然已经退休且身体不大好，但仍然时刻关心实验室的工作，关心学生的学习和生活情况。作者无法忘记先生在重感冒及咳嗽导致嗓子嘶哑得说不出话来的情况下修改作者的开题报告的情形，先生的这种对工作、对学生的高度责任感和对科学的奉献精神令作者十分感动和敬佩。

作者也十分感谢本实验室郭晓丽副教授三年来在生活、学习和实验上给予作者的热情帮助、鼓励和指导。实验过程中还得到本实验室阙月美副教授、师姐李睿、师弟王敏杰、师妹刘卫平的大力帮助。在此，作者向他们致以真诚的谢意！

作为中国农大“211”重点学科建设之一的植物生理生化实验室为本论文的顺利完成提供了便利的条件，作者向为此付出辛勤劳动的植物生理生化的先生和老师们的致以崇高的敬意！本实验还得到中心实验室梁丽萍、周海鹰老师，农业生物技术国家重点实验室同位素室的李钧仪老师的大力协助，实验用大麻种子由云南农科院杨明和陈其本先生惠赠。

实验过程中，得到同舍好友徐文忠、毛同林、李新鹏，博士生汪晓峰、黄善金、李成霞、苗龙、张宏民、周云，硕士生康蕴、韩静、孟凡霞、刘艳宁、余和芬、刘璞、高启祥、刘毅敏、刘康、尹敬伟，本科生王瑜、徐莉等同学的无私帮助。

在此，作者一并致以最衷心的感谢。

作者还要感谢河南职业技术师范学院朱明哲先生、李秀菊博士，河南农业大学的陈新建教授，中国科技大学研究生院的吴晓东博士及作者的大学老师、现在清华大学生命科学与技术系攻读博士学位的李国富老师给予的鼓励和帮助。

最后，感谢妻子牛淑芬女士多年来的理解和支持，感谢我的家人和亲人们！

陈其军

1999.5