

玉米赤霉烯酮与大麻的性别表达

于静娟^① 韩玉珍 赵德刚 傅永福 孟繁静
(生物学院)

摘 要 大麻(*Cannabis sativa* L.)发育过程中内源玉米赤霉烯酮含量发生规律性变化,茎尖内源玉米赤霉烯酮在花原基出现前和花期前出现含量高峰,在达到花期前的真叶内出现 ZEN 含量高峰。外源玉米赤霉烯酮处理提高大麻的雄株/雌株比例,而 6-BA 处理则提高大麻雌株/雄株比,同时 ZEN 处理降低性别决定关键时期的 CTK 含量,首先降低大麻真叶内的 CTK 含量,而后降低茎尖内的 CTK 含量。说明 ZEN 可能通过降低细胞分裂素的含量来促进大麻的雄性表达。

关键词 性别表达; 玉米赤霉烯酮; 大麻

中图分类号 Q945.332

Zearalenone and Sex Expression of Hemp

Yu Jingjuan Han Yuzhen Zhao Degang Fu Yongfu Meng Fanjing
(College of Biology)

Abstract There are two peaks of ZEN contents in shoot apex of hemp (*Cannabis sativa* L.). They appeared before the formation of flower primordia and blossoming. There is a peak of the endogenous ZEN content in leaves before blossoming. Exogenous ZEN and 6-BA improved the ratio of male/female and female/male plant respectively. Exogenous ZEN reduced the endogenous CTK level at the critical period of sexual differentiation.

Key words sexual expression; zearalenone; hemp

植物性别决定的调控机制一直是人们感兴趣的问题,这一过程的研究不仅对揭示植物生殖器官发育的机理具有重要的理论意义,而且在农业生产实践中亦具有十分重要的现实意义。研究表明,植物的性别决定过程既受遗传基因的控制,又受多种环境因素的影响。人们从生理学角度广泛研究了植物各营养器官、植物激素以及光、温、水、矿质元素等对性别分化的影响,植物激素对植物性别的调控作用的研究尤为广泛和深入。然而,植物激素对植物性别表达的调控机制还有待进一步研究。玉米赤霉烯酮(Zearalenone,简称 ZEN)为玉米赤霉菌的一种次生代谢产物^[1],属于二羟基苯甲酸内酯类化合物^[2]。早期研究证明,该物质不仅具有动物雌性激素的作用^[3],而且也是某些真菌的一种性激素^[4]。1980 年李季伦等首次报道了冬小麦越冬茎尖内有玉米赤霉烯酮类似物的存在,并发现该物质与春化作用密切相关^[5]。孟繁静等在确证了这一现象的基础上,在其他许多冬性植物中也发现了这种物质的存在^[6,7],并从小麦越冬茎尖中分离和纯化了该物质,经鉴定证明它就是玉米赤霉烯酮^[8],ZEN 是高等植物内源产生的一类活性物质,可能参与植物发育的一些关键过程如生殖过程^[9,10]。最近研究发现,ZEN 液浸种处理菠菜,可提高这类雌雄异株异花植物的雄株比例,显示 ZEN

收稿日期: 1996-10-29

①于静娟,北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区),100094

对性别表达有影响。大麻是雌雄异株短日植物,在田间雌/雄比例接近 1:1;缩短日照可以促进开花。生活周期短,容易管理,是研究性别表达的好材料。有关激素外源处理的研究表明,通过 GA 处理水培大麻幼苗的根系,可增加雄株比例;而 6-BA 增加雌株比例^[11]。GA 增加去根苗的雄株比例;6-BA 增加去根苗的雌性株比例。但对大麻植株内源激素水平及激素间的相互作用的研究未见报道。

本文通过研究大麻性别表达过程中内源 ZEN 含量变化与大麻生长发育的关系;玉米赤霉烯酮对大麻性别表达和内源激素含量的影响,探索玉米赤霉烯酮对大麻性别表达的调控机制。

1 材料和方法

1.1 植物材料

大麻栽培品种(*Cannabis sativa* L.)。子叶出土后 5 d,进行短日培养,雄株 27 d 开花,雌株 33 d 开花。

1.2 材料处理

将筛选的成熟大麻种子,用 0.1% HgCl₂ 表面消毒 15 min,流水冲洗后在 25℃ 的恒温培养箱内催芽 48 h,选萌发一致的种子播于温室内盛蛭石塑料花盆中,以 Hoagland 完全培养液培养,定期浇灌培养液,在每天 16 h 光照条件下,待子叶出土 5 d 后,进行不同的光周期处理。一部分进行短日(SD)诱导处理(光/暗 8 h/16 h),一部分继续保持在长日条件(LD)下(光/暗 16 h/8 h)。每隔 5 d 取样,测定茎尖、真叶和子叶中玉米赤霉烯酮的含量动态变化。子叶出土后 5 d 的大麻幼苗,转入短日下第 3 天,开始分别浇以 ZEN 液和 6-BA 液,以后每隔 3 d 浇灌一次,连续处理 3 次。同时每隔 5 d 取样,测定内源细胞分裂素的含量变化,并后每隔 3 d 浇灌一次,连续处理 3 次。同时每隔 5 d 取样,测定内源细胞分裂素的含量变化,并且,最后统计两种激素处理的雌雄株比例。ZEN 和 6-BA 处理:将 ZEN 和 6-BA 的母液,加入 Hoagland 营养液中,使终浓度为:ZEN 为 0.1 mg·L⁻¹,6-BA 为 30 mg·L⁻¹,进行浇根处理。

1.3 ZEN 提取及含量测定

取大麻植株(30~50 株),用蒸馏水冲洗干净,剥取茎尖、子叶和真叶(倒数第一对),吸水纸吸去表面水分,迅速称重,加 0.5 mL 80% 甲醇于研钵中充分研磨,将提取液及残渣转入刻度试管,用 80% 甲醇冲洗研钵,将冲洗液一并转入刻度试管,提取液在 20℃ 下保存待测。

ZEN 含量的测定采用直接酶联免疫技术(ELISA),按陈新建等(1989)方法并略作改进^[12],先将各种处理材料的 ZEN 80% 甲醇提取液,离心(4 000 r·min⁻¹)5 min,取(0.5 mL)上清液于指形管中,42℃ 下氮气吹干,各加 0.5~1.0 mL TBS 缓冲液(0.05 mmol·L⁻¹ Tris 1 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 0.1% 明胶)复溶,在涡旋振荡器上充分混匀,4℃ 保存过夜。测定时,取 100 μL 于包被过兔抗 ZEN 抗体的酶联板(40 孔,天津有机材料制品厂出品)上进行测定。每块板都设有 ZEN 标准系列溶液(0.2~102.4 ng·mL⁻¹)。经保温反应后在酶联仪上,以标准液中最大浓度调零,测定各孔的 OD 值(410 nm)Bx,以 0 浓度孔的

OD 值为最大 OD 值, 计算各孔显色值的 logit 值: $\text{logit}(Bx/B_0) = \ln[(Bx/B_0)/(1 - Bx/B_0)] = \ln[Bx/(B_0 - Bx)]$ 用各 ZEN 标准浓度 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的自然对数与各浓度显色值的 logit 值求出回归方程, 利用回归方程计算各样品孔中 ZEN 含量。所有数据均用计算机处理。

1.4 细胞分裂素的提取及含量的测定

细胞分裂素的提取及测定方法同 ZEN 测定法, 仅所设标准系列溶液为 $3.9 \sim 1\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 结果

2.1 大麻性别表达过程中内源玉米赤霉烯酮含量的变化

①大麻子叶出土后 5 d, 给予不同的光周期处理, 对分别生长在短日和长日条件下的大麻茎尖内源 ZEN 含量测定结果表明(图 1), 茎尖内的 ZEN 含量在成花诱导的短日条件下始终高于非诱导的长日条件下的, 并且在花原基出现前(短日下第 10 天)和花期前(短日下第 20 天), 分别出现 ZEN 含量高峰。②已有研究表明, 完全展开的叶片对光周期反应最敏感。对生长在不同日长条件下的第一对真叶内源 ZEN 含量测定结果如图 2, 在短日诱导开始的初期, ZEN 含量急剧下降, 在第 5 天时含量较高, 到第 10 天和第 15 天时的含量非常低, 随后又上升, 到第 20 天时出现一含量高峰。在非诱导的长日条件下, 只在第 5 天时 ZEN 含量较高(低于 SD 下)外, 含量一直较低。③对大麻子叶的内源 ZEN 测定结果表明, 在诱导和非诱导条件下的变化情况相同(图略)。子叶出土后 5 天时, 含量较高, 以后急剧下降, 到短日下第 5 天后, 含量较低, 并保持相对稳定。

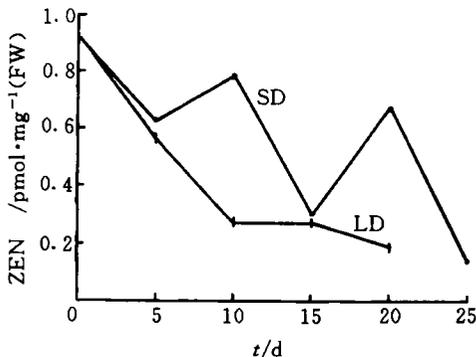


图 1 不同的日长下, 大麻茎尖内源 ZEN 含量的变化

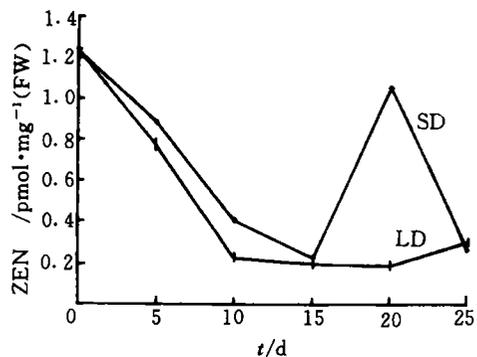


图 2 不同的日长下, 大麻真叶内源 ZEN 含量的变化

2.2 外源激素处理对大麻性别表达的影响

从 SD 第 3 天开始对大麻幼苗分别以 ZEN 和 6-BA 液进行浇根处理, 以后每隔 3 d 浇灌一次, 共处理 3 次, 最后对雌雄株的统计结果见表 1, ZEN 提高大麻株/雌株比, 而 6-BA 则提高雌株/雄株比。

2.3 ZEN 处理对内源细胞分裂素的影响

ZEN 处理方法同 2.2, 在短日诱导条件下的不同时期, 取植株不同部位(茎尖, 真叶), 测定其 CTK 含量, 结果如图 3, 4. ZEN 处理后, 在短日第 5 d 时, 茎尖 CTK 含量都略高于对照。在短日第 10 天时, CTK 含量明显低于对照。第 10 天后, CTK 含量变化不明显。

ZEN 处理后, 真叶内的 CTK 含量在短日第 5 天时, 显著低于对照, 第 5 天后, CTK 含量变化不明显。

表 1 外源激素处理对大麻性别分化的影响

处 理	雌 株	雄 株	株 数	雄/雌比
CK	62	55	117	0.887
ZEN	47	61	108	1.298
6-BA	66	49	115	0.742

3 讨论

3.1 玉米赤霉烯酮和大麻的性别表达

研究证明, ZEN 普遍存在于高等植物体内, 与植物成花的光、温诱导, 花芽分化以及开花过程密切相关^[6~8, 13~18], 它对菠菜的性别分化亦有影响(赵德刚等, 待发表)。本实验系统比较了在大麻的生长发育过程中茎尖、真叶和子叶的内源 ZEN 含量。发现在花原基出现前, 即短日第 10 d 时, 茎尖的内源 ZEN 含量出现高峰, 这可能是出现花原基的信号, 高峰出现后, 起始由营养生长向生殖生长的转变, 随后是性别决定的关键时期。所得结果同样证明了 ZEN 参与植物成花过程, 或可能在植物由营养生长向生殖生长转变的关键时期起作用, 并参与大麻的性别分化。

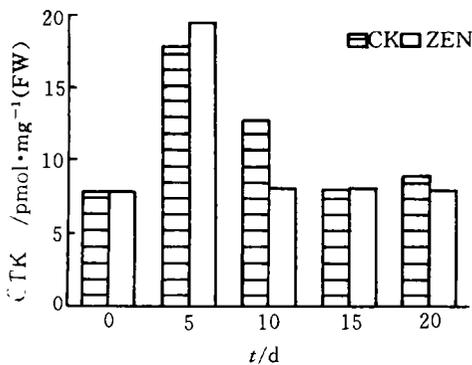


图 3 ZEN 处理对大麻茎尖内源细胞分裂素的影响

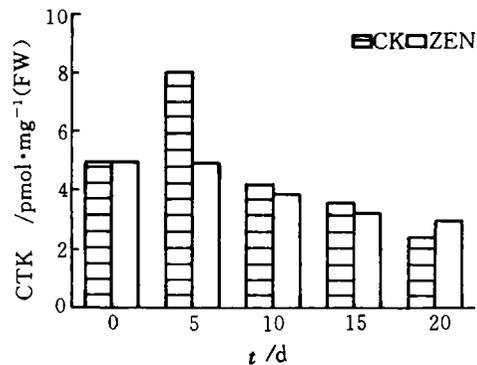


图 4 ZEN 处理对大麻真叶内源细胞分裂素的影响

在达到花期前的茎尖、真叶内出现 ZEN 含量高峰, 这些峰值的出现可能与花期到来有关。这与大豆中的实验结果^[19]一致。

在出苗后第 5 天时子叶中 ZEN 的含量较高, 以后一直处于非常低的水平, 这可能由于在生长发育过程中逐渐进入衰老状态。此时内源 ZEN 已向外转运或降解这个现象在诱导和

非诱导条件下的变化趋势相同,说明子叶对光照不敏感。

3.2 ZEN 对大麻性别表达的调控

短日下第 10 天后花原基开始出现,这是由营养生长向生殖生长转变的关键时期,也恰是决定植株性别去向的关键时期,此时的植物内源激素和活性物质含量对性别决定非常重要。实验结果表明,ZEN 处理降低了细胞分裂素在这一关键时期的含量,首先发生在真叶(SD 下第 5 天),而后在茎尖内(SD 下第 10 天),且 ZEN 处理增加雄株比例,具有雄性化作用,与对菠菜的作用相同,说明 ZEN 可能是通过降低内源细胞分裂素的含量调控大麻的性别表达。

参 考 文 献

- 1 陈新建,刘泓川,孟繁静. 玉米赤霉烯酮的直接酶联免疫分析. 植物生理学通讯,1989,(5):61~63
- 2 傅永福. 玉米赤霉烯酮的生物学效应. 北京农业大学硕士研究生论文,1992
- 3 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
- 4 傅永福,孟繁静. 玉米赤霉烯酮与植物生长发育的研究. 作物高产高效生理学研究进展. 见邹琦,王臣主编. 北京:科学出版社,1994b,170~177
- 5 韩玉珍,孟繁静. 油菜的玉米赤霉烯酮类似物与春化作用. 北京农业大学学报,1986,12:386~400
- 6 韩玉珍,孟繁静. 玉米赤霉烯酮影响微青萍生长发育的研究. 科学通报,1990,36(12):1 174~1 175
- 7 李季伦,朱彤霞,张箴,李永生,孟繁静. 玉米赤霉烯酮的研究. 北京农业大学学报,1980,(1):13~28
- 8 李秀菊. 植物激素及同化物变化与大豆生殖器官的建成与败退. 中国农业大学博士论文,1995
- 9 孟繁静,张箴. 玉米赤霉烯酮的研究(续). 北京农业大学学报,1981,2:101~103
- 10 孟繁静,阙月美,张蜀秋. 冬性植物内类玉米赤霉烯酮与春化作用的关系. 植物学报,1986,28(6):622~627
- 11 孟繁静等. 冬小麦越冬茎尖中的玉米赤霉烯酮. 中国科学(B辑),1988,12:1261~1266
- 12 阙月美等. 梁振兴,韩玉珍,孟繁静. 冬小麦和棉花有性生殖时期玉米赤霉烯酮含量的变化. 北京农业大学学报,1990,16:153~155
- 13 王晖,于静娟,孟繁静. 冬小麦不同发育时期内源玉米赤霉烯酮含量变化对抽穗的影响. 北京农业大学学报,1992,18:46,52
- 14 杨广笑. 玉米赤霉烯酮在光温诱导植物成花中的作用. 北京农业大学博士学位论文,1994
- 15 Khrianin V N, Milyaeva E L. The influence of gibberellin on the differentiation of stem apices in hemp. Dokl. AN SSR. 1977,234:982~984(R)
- 16 Nelson RR et al. Effect of F-2, an estrogenic metabolite from *Fusarium* on sexual reproduction of certain ascomycetes. Phytopath. 1968,58:1061~1062
- 17 Stobe M et al. Isolation of an anabolic uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. Nature, 1962,196:1318
- 18 Urry WH et al. The structure of Zearalenone. Tetrahedron Letters, 1966,27:3109~3114
- 19 Wolf J C, Mirocha C J. Regulation of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium rosum* "Graminearum") by F-2. Can Microbiol, 1973,19:725~734