

## 低夜温下黄瓜生理生化指标的变化及对雌花形成的影响

刘欣童, 王春华, 辛明, 周秀艳\*, 秦智伟\*

东北农业大学园艺学院, 哈尔滨150030

**摘要:** 选用温敏型黄瓜‘C09-123’为试材, 设置3个不同的夜温处理, 调查其20节内雌花分化情况, 同时测定二叶一心茎尖内各激素(乙烯、赤霉素、生长素、脱落酸和玉米素)、糖(蔗糖、葡萄糖)、18种氨基酸含量以及相关基因的表达量。结果表明: 不同夜温处理下, 内源乙烯、葡萄糖和蔗糖的含量随处理温度的升高而降低, 生长素、赤霉素、脱落酸和玉米素未表现出相同的变化趋势; 黄瓜雌花分化率与内源激素和糖的相关性分析表明, 雌花分化率与葡萄糖含量极显著正相关( $P < 0.01$ )、与内源乙烯含量呈显著正相关( $P < 0.05$ ), 同时乙烯和葡萄糖含量均与蔗糖含量显著正相关; 乙烯合成所需的甲硫氨酸和天冬氨酸的含量也在低夜温下显著升高; 糖代谢中的关键酶己糖激酶和谷草转氨酶在生理和分子水平均表现出随处理夜温的升高而降低, 特别谷草转氨酶基因表达量在低夜温12°C时较18和24°C时提高了4倍, 并与乙烯合成关键基因(*CsACS2*和*CsACO2*)的表达量随温度升高的变化趋势一致。

**关键词:** 黄瓜; 低夜温; 性别分化; 糖; 氨基酸; 激素

黄瓜(*Cucumis sativus*)是葫芦科一年生草本植物, 也是性别表达研究的模式植物。由于其性别表现直接与产量和品质有关, 所以研究黄瓜的性别分化不论在理论上还是实际应用上都具有重要意义(邹晓艳2007; Yamasaki等2001; 金晓霞等2007)。从遗传学角度来看, 黄瓜的性别决定由3个主效基因*F*、*M*、*A*和4个微效基因*Tr*、*gy*、*In-F*、*m-2*共同决定(孟晶晶等2013), 其中*M*基因决定单性花的形成, 通过调控乙烯含量来抑制雄花且认为*M*基因化学实质是*CsACS2*基因, 为乙烯生物合成的关键基因(Yamasaki等2003; Li等2009)。

黄瓜的性别表达除受遗传因素的控制外, 也受环境因素和植物激素的影响。研究表明, 低温短日照可促进黄瓜雌性分化, 植物激素中乙烯是影响黄瓜雌性分化的关键(金晓霞等2007)。乙烯的生物合成、信号转导途径及同源异型基因的研究, 促进了在分子水平对黄瓜性别分化的机制研究(Chen等2012; Liu等2008; 刘进平2013)。研究证明, 赤霉素(GA)有促进雄性分化的作用, 生长素(IAA)、脱落酸(ABA)以及油菜素内酯(BR)在一定程度上可促进黄瓜雌性分化, 并有研究表明其均通过调控黄瓜体内乙烯含量的变化来影响雌性分化(Fujii等2000; Rudich和Halevy 1974; Papadopoulou和Grumet 2005; 张菊平2009)。糖类物质在植物体内既是能量的来源和结构物质, 又是一种信号物质(王玉华等2004)。糖信号和植物激素间存在复杂的互作关系(Leon和Sheen 2003)。己糖激酶(HK)是糖酵解的关键酶。蔗糖、葡萄糖均能被

HK磷酸化, 且HK是一个具有催化功能和调节功能的双功能酶(Xiao等2000)。氨基酸作为蛋白质的结构前体, 不仅影响蛋白质的代谢, 也参与了植物激素的合成。甲硫氨酸(Met)为植物激素乙烯的合成前体(陈新建等2002), 色氨酸(Trp)为生长素的合成前体(王家利等2012), 但是关于氨基酸与低温或者性别分化关系的研究还鲜有报道。

通过本课题组先期研究结果表明, 黄瓜‘C09-123’为温敏型试验材料, 其性别分化受夜间温度影响较为明显, 12°C的低温条件有利于‘C09-123’雌花形成(程国辉等2012)。然而低夜温促进黄瓜‘C09-123’雌花分化的原因尚不明确, 鉴于此本文以温敏型黄瓜品种‘C09-123’为试材, 研究不同夜温条件下雌花分化率与糖类物质、内源激素、氨基酸的变化规律以及与雌性形成的关系, 旨在揭示低夜温诱导黄瓜雌花分化的生理生化机制, 为黄瓜分子育种研究提供参考。

## 材料与方法

### 1 试验材料

选用温敏型黄瓜(*Cucumis sativus* L.) ‘C09-123’为材料(程国辉等2012), 种子由东北农业大学园艺学院黄瓜课题组提供。

收稿 2016-01-06 修定 2016-02-16

资助 “十二五”国家科技支撑计划(2012BAD02B03)。

\* 共同通讯作者(E-mail: qzw303@126.com; E-mail: zxy0604@126.com)。

## 2 植物培育及温度处理条件

试验材料于2014年10月至2015年5月按不同处理分批种植于东北农业大学设施园艺工程中心人工气候室内。将黄瓜‘C09-123’种子于65°C水浴10 min后置于室温浸种6 h, 28°C暗培养保湿催芽12 h后待用。用花卉营养土与蛭石1:1混匀后装入9 cm×9 cm的营养钵中, 浇透底水, 将催芽后的种子单株播种覆土。每个温度处理播种1 200株。设置培养温度26°C, 黑暗直至露出子叶, 调整培养箱温度和光周期, 光周期设为12 h/12 h(昼/夜, 下同), 光照强度600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 日温26°C, 夜温18°C, 湿度70%。待子叶全部展平后进行不同夜间温度处理: 低夜温 12°C、高夜温 24°C, 对照18°C; 日温均为26°C; 光周期保持12 h/12 h, 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。子叶展平后开始每隔5 d浇水一次, 以自来水和全营养液间隔定量施用。

每个温度处理选留10株长势较为一致的幼苗进行盆栽管理, 处理温度、光周期保持不变, 直至其生长到20节用作雌性分化表型调查。雌花分化率为主蔓上着生雌花的节位数占总节位数的百分率。

## 3 样品制备

每个温度处理均于二叶一心时期进行生理指标样品和RNA样品的取样。每一重复随即选取10株长势一致的植株, 每个指标取3次重复。取茎尖(包括2 cm以下幼叶)剪碎混合, 称量, 用液氮速冻, 保存在-80°C备用; 氨基酸样品取鲜样于65°C下烘干至恒重备用。

## 4 测定项目及方法

谷草转氨酶(GOT)和己糖激酶(HK)采用苏州科铭常量法试剂盒进行测定, 乙烯(ETH)含量采用

气象色谱法(Miao等2011), 生长素(IAA)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA)和玉米素(ZT)均由中国农业大学王保民教授酶联免疫吸附试剂盒(ELISA)测定(Wang等2012); 蔗糖采用间二苯酚法, 葡萄糖采用蒽酮法(张志良等2009)进行测定。

氨基酸含量, 由北京市营养源研究所测定。样品处理: 色氨酸以4.2 mol NaOH水解; 以过甲酸氧化法处理测定胱氨酸; 其余氨基酸以6 mol HCl水解测定。检测方法: GB/T 5009.124-2003。

总RNA采用TRIzol法进行提取(Chen等2011)。使用反转录试剂盒(MBI)进行cDNA的合成。qRT-PCR引物设计使用Primer Premier 5.0 (Premier Bio-soft International, Palo Alto, CA), 引物设计序列见表1, 由上海生工合成引物序列。qRT-PCR采用Thermal Cycler Dice系统, 利用SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, Ohtsu, Japan), 内参基因选用Cucumber elongation factor 1a (*CsEF1a*) (Wan等2010), 上游引物5'-CCTTGGTGTCAAGCAGATGA-3', 下游引物5'-TGAAGACACCTCCTTGATGATTT-3', 使用iQ<sup>TM</sup>5软件进行分析, 数据处理方法采用2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup> 法(Kenneth和Thomas 2001)。

## 5 数据处理

统计分析、方差分析、显著性测验以及相关分析等利用Microsoft Excel 2003软件和DPS 7.05版数据处理系统完成, 图片处理采用Origin 8软件。

## 实验结果

### 1 不同夜温对黄瓜雌性分化的影响

不同夜温处理下黄瓜性别分化的情况如表2所示。随着处理温度的升高, 第一雌花节位升高;

表1 荧光定量选用基因及引物

Table 1 Primers of genes selected for qRT-PCR

基因名	GenBank登录号	引物(5'→3')
<i>CsACS2</i>	Csa4M049610.2	上游: CATTCTTGTTCTCTGTCCTTA 下游: AACTATTCCACTCCTGTCCTC
<i>CsaACO2</i>	Csa6M511860.1	上游: GATCAACGACACTGATTGGG 下游: TCCAGTTCAGCTGCAAATTC
<i>CsaHK1</i>	Csa2M000830.1	上游: TCCCTGTTAGGCAAACATCA 下游: CGCATGTCGAGTTTCAGTTT
<i>CsaASP5</i>	Csa2M382520.1	上游: TTGAGGCACTTATGCTGGAG 下游: GCAACACGTTGCTGCTTAAT
<i>CsEF1a</i>	Csa2M139820.1	上游: CCTTGGTGTCAAGCAGATGA 下游: TGAAGACACCTCCTTGATGATTT

表2 不同夜温处理对黄瓜雌性分化的影响

Table 2 The formation of cucumber female flowers effected by different night temperatures

处理温度/°C	第一雌花节位	雌花分化率/%
12	11.5±1.27 <sup>b</sup>	35.0±0.67 <sup>a</sup>
18	14.3±0.82 <sup>a</sup>	21.5±0.48 <sup>b</sup>
24	-	0 <sup>c</sup>

同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。-: 无雌花分化。

20节内的雌花分化率呈现降低的趋势, 低夜温12°C的雌花分化率为35.0%, 18°C时为21.5%, 24°C时20节内无雌花分化, 处理间差异显著。说明低夜温有利于黄瓜‘C09-123’的雌花形成。

## 2 不同夜温处理下黄瓜茎尖中内源激素和内源糖含量的变化

不同夜温处理下黄瓜茎尖中内源激素、葡萄

糖和蔗糖的含量变化如图1所示。总体上看, 在低夜温(12°C)条件下, 检测的5种激素中只有乙烯和脱落酸两种激素的含量显著高于对照(18°C)和高夜温(24°C), 其他3种激素在低夜温条件下表现不突出。随着处理夜温的升高, 内源乙烯含量呈现下降趋势且处理间差异显著, 即12°C>18°C>24°C(图1-A); 内源生长素含量呈抛物线的变化趋势, 即: 18°C>24°C>12°C, 且18°C处理下生长素含量显著高于12°C和24°C处理(图1-B); 内源脱落酸含量呈先降低后升高的变化趋势, 18°C处理下含量最少, 12°C处理下含量最多, 处理间差异显著(图1-C); 赤霉素含量逐渐增加, 且24°C处理显著高于12°C和18°C处理(图1-D); 玉米素含量则呈先增加后降低的趋势, 18°C处理下含量最多, 24°C处理下含量最少, 处理间差异显著(图1-E)。低夜温条件下, 黄瓜茎尖中蔗糖和葡萄糖的含量较18°C和24°C均有

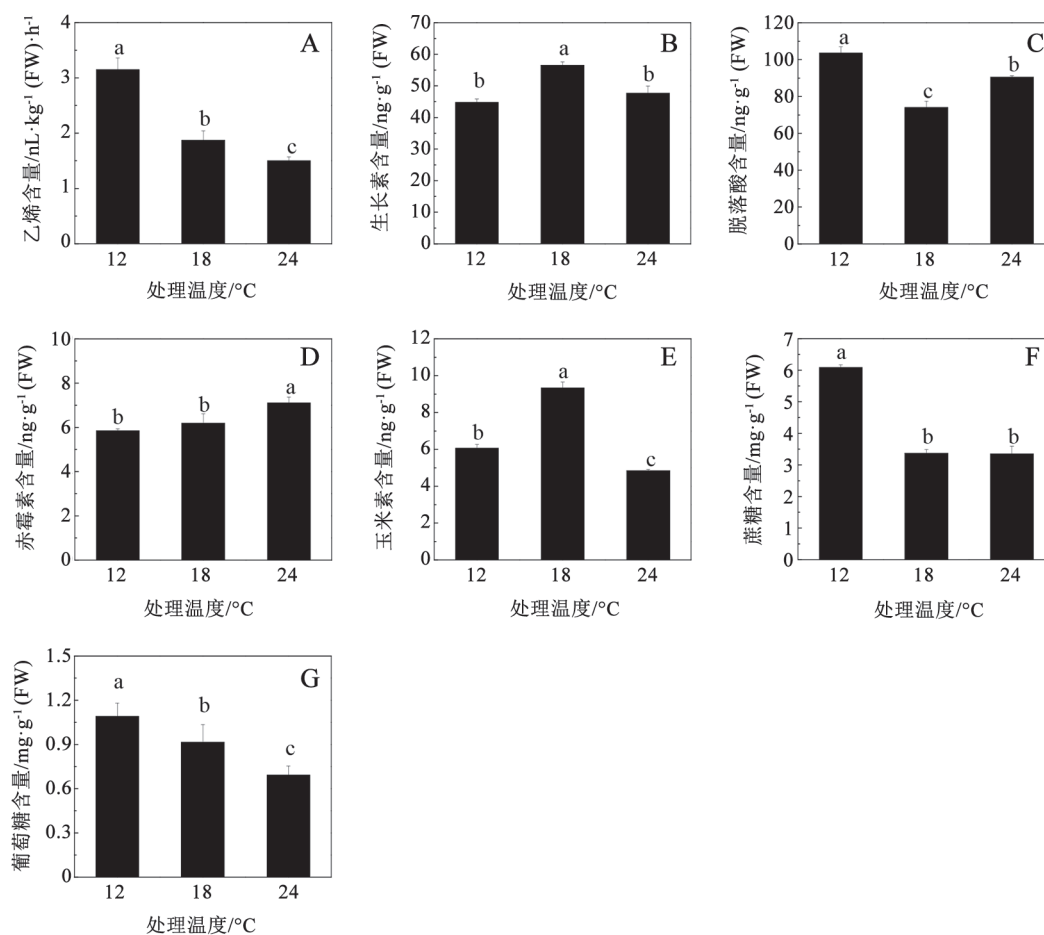


图1 不同夜温下黄瓜茎尖内源激素和内源糖的变化

Fig.1 Changes of cucumber shoot apex endogenous hormone and sugar contents under different night temperatures

各柱形上不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ); 下图同此。

显著提高。蔗糖的含量在低夜温12°C中较18°C和24°C提高近1倍(图1-F); 葡萄糖的含量随着处理夜温的升高而降低, 即12°C>18°C>24°C, 处理间差异显著(图1-G)。

### 3 不同夜温黄瓜内源激素、内源糖与雌花分化的相关性

由表3可知, 黄瓜‘C09-123’的雌花分化率与内源乙烯、脱落酸、玉米素、蔗糖以及葡萄糖呈正相关, 其中与乙烯呈显著正相关, 与葡萄糖呈极显著正相关, 相关系数分别为0.95和1.00。雌花分化

率与生长素、赤霉素呈现负相关, 但相关性不显著。说明内源乙烯和葡萄糖含量对黄瓜雌花分化率有影响。此外, 内源乙烯与葡萄糖、蔗糖的含量也呈显著正相关, 相关系数分别为0.95和0.97。

### 4 不同夜温处理下黄瓜茎尖中氨基酸含量的变化

本研究测定了不同夜温下黄瓜茎尖内18种氨基酸含量(表4)。总的来说, 在低夜温(12°C)条件下, 除色氨酸(Trp)和胱氨酸(Cys)外, 其余16种氨基酸含量均显著高于对照(18°C)和高夜温(24°C)。在低夜温12°C中, 天冬氨酸(Asp)、甲硫氨酸(Met)、

表3 不同夜温下黄瓜内源激素、糖与雌花分化相关性分析

Table 3 Correlation analysis with endogenous hormones, sugar and sex differentiation of cucumber under different night temperatures

	雌花分化率	乙烯	生长素	赤霉素	脱落酸	玉米素	蔗糖	葡萄糖
雌花分化率	1	0.95*	-0.11	-0.79	0.32	0.38	0.80	1.00**
乙烯		1	-0.41	-0.56	0.60	0.08	0.95*	0.97*
生长素			1	-0.52	-0.98*	0.88	-0.69	-0.17
赤霉素				1	0.32	-0.87	-0.26	-0.75
脱落酸					1	-0.75	0.83	0.38
玉米素						1	-0.25	0.33
蔗糖							1	0.83
葡萄糖								1

\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ 。

表4 不同夜温处理下黄瓜茎尖18种氨基酸含量的变化

Table 4 Cucumber shoot apex individual amino acids contents under different night temperatures

氨基酸名称	氨基酸含量/g·100 g <sup>-1</sup> (DW)		
	12°C	18°C	24°C
天冬氨酸(Asp)	3.61±0.082 <sup>a</sup>	3.13±0.074 <sup>b</sup>	3.05±0.070 <sup>b</sup>
苏氨酸(Thr)	1.43±0.045 <sup>a</sup>	1.17±0.020 <sup>b</sup>	1.08±0.015 <sup>c</sup>
丝氨酸(Ser)	1.74±0.053 <sup>a</sup>	1.48±0.042 <sup>b</sup>	1.22±0.021 <sup>c</sup>
谷氨酸(Glu)	4.15±0.112 <sup>a</sup>	3.37±0.031 <sup>b</sup>	3.20±0.081 <sup>c</sup>
甘氨酸(Gly)	1.81±0.040 <sup>a</sup>	1.43±0.020 <sup>b</sup>	1.36±0.050 <sup>c</sup>
丙氨酸(Ala)	2.37±0.064 <sup>a</sup>	1.70±0.021 <sup>c</sup>	1.86±0.036 <sup>b</sup>
缬氨酸(Val)	1.96±0.050 <sup>a</sup>	1.64±0.020 <sup>b</sup>	1.51±0.058 <sup>c</sup>
甲硫氨酸(Met)	0.59±0.015 <sup>a</sup>	0.43±0.025 <sup>b</sup>	0.38±0.042 <sup>b</sup>
异亮氨酸(Ile)	1.62±0.055 <sup>a</sup>	1.32±0.015 <sup>b</sup>	1.25±0.035 <sup>b</sup>
亮氨酸(Leu)	2.91±0.067 <sup>a</sup>	2.30±0.044 <sup>b</sup>	2.18±0.085 <sup>b</sup>
酪氨酸(Tyr)	1.33±0.084 <sup>a</sup>	1.11±0.055 <sup>b</sup>	1.11±0.066 <sup>b</sup>
苯丙氨酸(Phe)	1.62±0.049 <sup>a</sup>	1.45±0.046 <sup>b</sup>	1.39±0.036 <sup>b</sup>
赖氨酸(Lys)	2.25±0.051 <sup>a</sup>	1.91±0.020 <sup>b</sup>	1.42±0.031 <sup>c</sup>
组氨酸(His)	0.75±0.017 <sup>a</sup>	0.65±0.012 <sup>b</sup>	0.58±0.015 <sup>c</sup>
精氨酸(Arg)	2.17±0.047 <sup>a</sup>	1.66±0.010 <sup>b</sup>	1.56±0.061 <sup>c</sup>
脯氨酸(Pro)	1.60±0.076 <sup>a</sup>	1.27±0.055 <sup>b</sup>	1.24±0.065 <sup>b</sup>
色氨酸(Trp)	0.39±0.000 <sup>a</sup>	0.38±0.000 <sup>a</sup>	0.40±0.000 <sup>a</sup>
胱氨酸(Cys)	0.31±0.000 <sup>b</sup>	0.26±0.000 <sup>b</sup>	0.43±0.000 <sup>a</sup>

同行数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。



异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)和脯氨酸(Pro)含量显著高于18°C和24°C,且18°C与24°C差异不显著;苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)和精氨酸(Arg)这8种氨基酸含量随处理温度的升高呈现下降趋势,且处理间差异显著;丙氨酸(Ala)含量随处理温度升高呈现先降低后升高的趋势,其中12°C处理时含量最高,18°C处理时含量最低;色氨酸(Trp)含量在3个夜温处理中无显著差异;胱氨酸(Cys)含量在高夜温24°C中含量显著高于12°C和18°C的夜温处理。甲硫氨酸为乙烯合成直接前体(陈新建等2002)。甲硫氨酸所属天冬氨酸族氨基酸中天冬氨酸、甲硫氨酸和异亮氨酸的含量变化趋势一致。

### 5 内源糖影响天冬氨酸含量的关键酶和相关基因的变化

为探究内源糖变化与天冬氨酸族氨基酸合成的关系,本研究选取其中关键酶在生理与分子水

平上同时进行测定,并测定乙烯合成关键基因的相对表达量,如图2和3所示己糖激酶(HK)和谷草转氨酶(GOT)活性以及己糖激酶基因(*CsHK1*)、谷草转氨酶基因(*CsASP5*)和乙烯合成关键基因(*CsACS2*、*CsACO2*)的表达量均随处理夜温升高而降低。在12°C条件下,己糖激酶基因(*CsHK1*)的相对表达量显著高于18°C和24°C,而在18°C和24°C下差异不显著(图2-A);*CsHK1*调控合成的己糖激酶(HK)的活性也在12°C下显著升高,与*CsHK1*变化趋势一致(图3-A);谷草转氨酶基因(*CsASP5*)的相对表达量较18°C和24°C提高近4倍,且与18°C、24°C差异显著,18°C与24°C无明显差异(图3-B);由*CsASP5*调控合成的谷草转氨酶(GOT)的活性也随着处理夜温的升高而降低,处理间差异显著(图2-B)。*CsACS2*的相对表达量为12°C>18°C>24°C,处理间差异显著;*CsACO2*表达量在低夜温中较对照和高夜温提高近3倍,对照与高夜温中差异不明显(图3-C和D)。

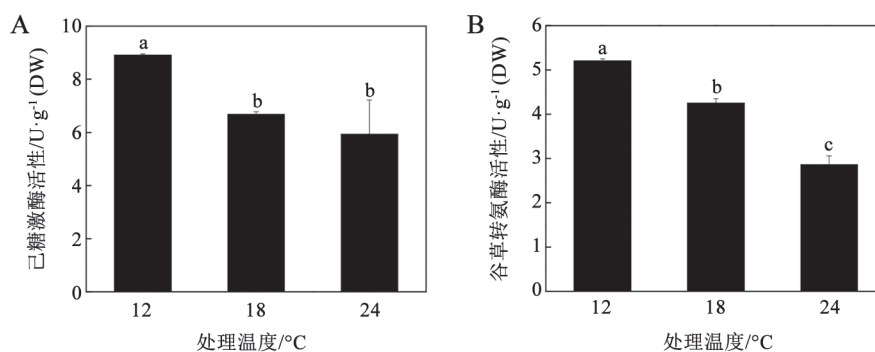


图2 不同夜温对黄瓜茎尖己糖激酶(HK)和谷草转氨酶(GOT)活性

Fig.2 Cucumber shoot apex hexokinase (HK) and glutamic oxalacetic transaminase (GOT) activities under different night temperatures

## 讨 论

黄瓜的性型分化是遗传因素与环境因素共同决定的(Yamasaki等2003)。Yamasaki等(2003)认为除个别黄瓜品种外,低温都有利于黄瓜雌花的形成。子叶展开后10~30 d内进行低温处理,并保持大的温差(夜温14~15°C,昼温25~28°C),光照时间控制在8 h·d<sup>-1</sup>,是黄瓜雌花分化的最佳条件。程国辉等(2012)研究表明,黄瓜‘C09-123’在夜温12°C雌花分化率达到最大,而24°C时10节内无雌花分化,且该品种受光照时长影响差异不显著。本研究中

黄瓜‘C09-123’雌花分化率随处理夜温的升高而降低,表现为:12°C>18°C>24°C,24°C处理下20节内无雌花形成。

植物激素与黄瓜性别分化的关系一直是研究的热点。有研究表明,黄瓜雌花分化与内源乙烯含量呈显著正相关,而ABA参与调控雌花分化,但ABA本身并不会改变乙烯以及雌花的形成(Miao等2011),也有研究认为ABA对黄瓜性别发育的影响很小;同时GA被普遍认为是促进雄花发育的激素;而内源IAA可能是黄瓜性别表达的关键性激

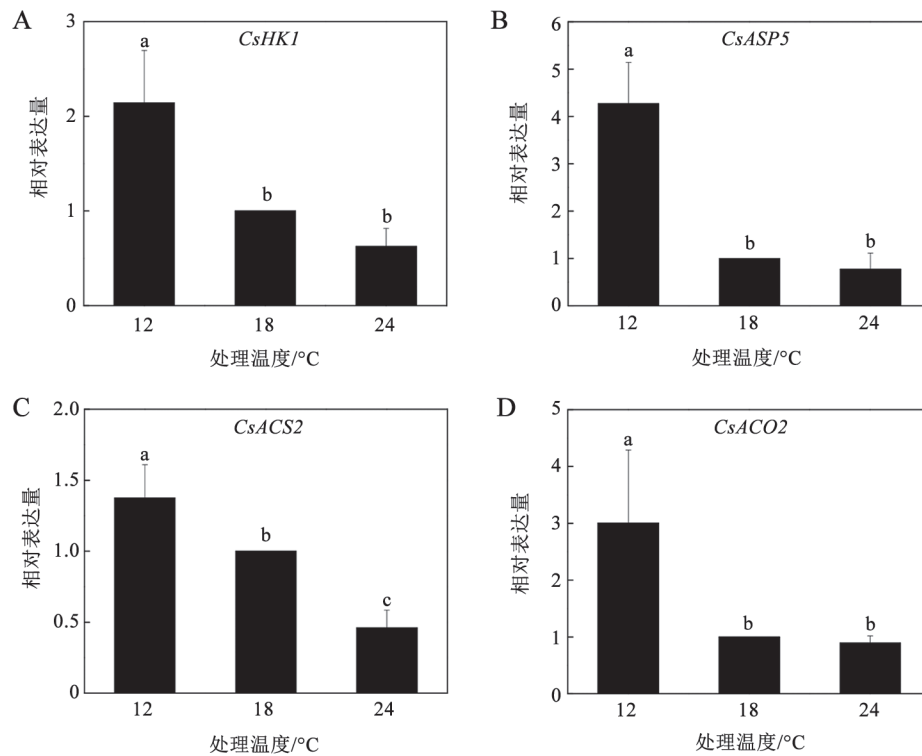


图3 不同夜温对黄瓜茎尖有关基因表达的影响

Fig.3 Genes relative expression of cucumber under different night temperature

素, 低水平IAA促进雄花发育, 高水平的IAA则促进雌花发育, 且IAA的促雌作用可能是通过调控乙烯的合成实现的(陈学好等2002; 曹毅等2002; 梁永宏等2010)。本研究中, 黄瓜雌花分化率与内源乙烯和内源ABA的含量呈正相关, 且与乙烯含量呈显著相关, 而GA、IAA与雌花分化率呈负相关。不同夜温下黄瓜雌花分化率可能是受内源乙烯含量变化诱导的。

氨基酸是蛋白质的基本组成单位, 同时部分植物激素也为氨基酸的衍生物。植物体内各种氨基酸含量的变化, 直接影响植物体内蛋白质和植物激素的种类。有关氨基酸在性别分化方面的研究鲜有报道, 但氨基酸在应答非生物胁迫方面的研究已早有报道。研究表明, 在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉胁迫下, 除Met和Trp外, 各氨基酸含量均有升高, 且Asn、Lys、Gln和Pro显著增加(Chaffei等2004)。Gly、Ser、Asp和Ala的含量在各非生物胁迫下均会增加(Rani 2007)。本试验中, 处理夜温 $12^\circ\text{C}$ 与 $24^\circ\text{C}$ 、 $18^\circ\text{C}$ 相比, 所引起的氨基酸含量的变化是复杂多样的。其中乙烯合成前体Met含量在 $12^\circ\text{C}$

下显著升高, 而在 $18^\circ\text{C}$ 和 $24^\circ\text{C}$ 无明显差异。与Met差异模式相同的6个氨基酸, Asp、Ile、Leu、Tyr、Phe和Pro, 其中Asp、Met和Ile均来自于天冬氨酸族的氨基酸, 其共同碳架为草酰乙酸。Leu来自于丙氨酸族, 其碳架为丙酮酸。Pro来自于谷氨酸族, 其碳架为 $\alpha$ -酮戊二酸。而Try和Phe为芳香族氨基酸。草酰乙酸、丙酮酸以及 $\alpha$ -酮戊二酸均是糖代谢的中间产物。由此推断, 可能是天冬氨酸族氨基酸的代谢增强, 增加了乙烯的合成量。

蔗糖和葡萄糖均可作为信号分子, 蔗糖的信号转导分为依赖己糖激酶和不依赖己糖激酶的两个途径(王玉华等2004)。前人研究表明, 施用外源葡萄糖能使乙烯的合成增加, 并且促进雌花的分化; 同时低夜温诱导的黄瓜性别表达是通过己糖激酶参与的糖信号途径来实现的(Rolland等2006; Miao等2011)。本研究中, 蔗糖和葡萄糖的含量均随处理温度的增加呈降低的趋势, 且与雌花分化率表现正相关, 与乙烯含量变化显著正相关。夜温 $12^\circ\text{C}$ 处理下, 糖信号和代谢关键的己糖激酶活性显著升高, 指导该酶合成的*CsHK1*相对表达量也

显著增加,说明低夜温可能促进了糖进入依赖己糖激酶的代谢途径。糖代谢中间产物草酰乙酸与谷氨酸通过谷草转氨酶(GOT)生成天冬氨酸(Asp), GOT是这一过程的关键酶,本试验中夜温12°C下GOT在生理和分子水平都显著提高,说明低夜温显著促进了CsASP5在转录以及蛋白水平的表达。表明糖代谢可能由中间产物草酰乙酸流向天冬氨酸族氨基酸的代谢。同时,12°C下乙烯合成关键基因CsACS2和CsACO2的相对表达量显著高于18°C和24°C。因此,低夜温下糖可能作为代谢底物或信号参与代谢,使碳骨架流向天冬氨酸族氨基酸代谢,同时天冬氨酸族甲硫氨酸的积累促进了乙烯的合成。

本研究在已有糖酵解和氨基酸代谢通路的基础上提出了一个假想模型(图4),为后续试验做简单参考。低夜温一是可能通过降低夜间呼吸作用所消耗的糖,达到了糖积累的效果,二是可能触发了糖信号,使光合作用得到的葡萄糖以蔗糖的形式向茎尖运输,到达茎尖又分解为己糖达到糖积累的效果。进而糖的积累触发了依赖己糖激酶的糖代谢途径进行,代谢中产物草酰乙酸以GOT为信号与谷氨酸结合形成天冬氨酸,进入天冬氨酸族氨基酸代谢,增加甲硫氨酸合成,从而植物体内乙烯生物合成,进而促进雌花分化。低夜温有利于黄瓜茎尖糖的积累与其中间产物向乙烯合成方向的流动,从而促进了黄瓜的雌性分化。

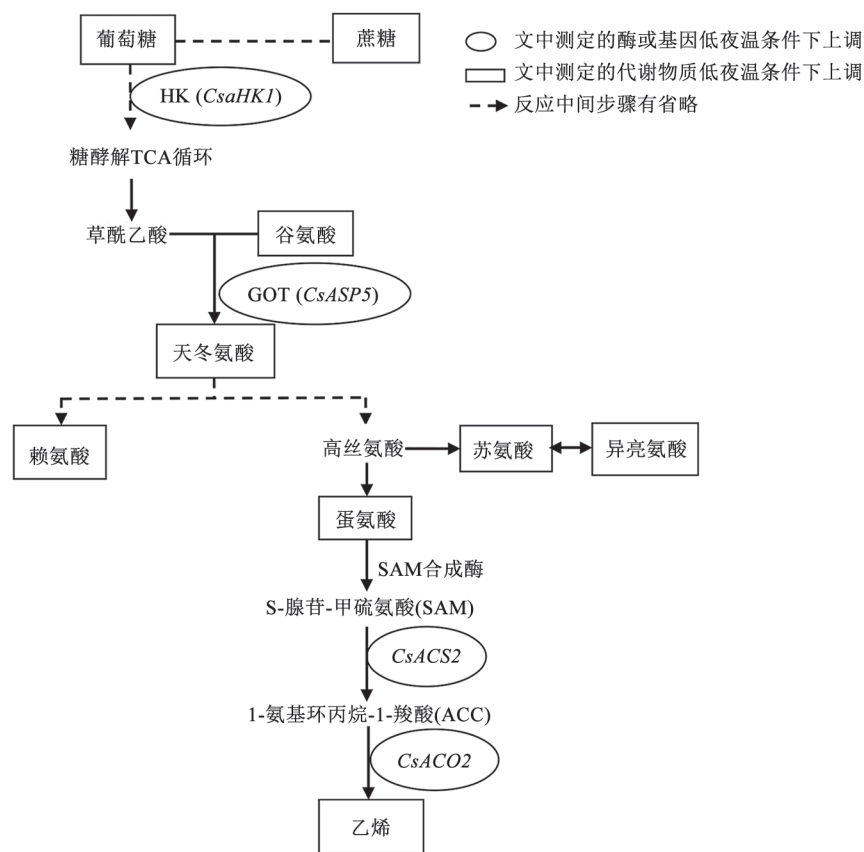


图4 低夜温促进黄瓜雌花分化的假想模型

Fig.4 The hypothetical model about low night temperature promoting the formation of cucumber female

### 参考文献

Cao Y, Ren JJ, Li CM, Wang Y (2002). Effect of ethrel and gibberellin on sex expression in cucumber. J Southwest Agric Univ, 24 (1): 42-44 (in Chinese with English abstract) [曹毅, 任吉君, 李春梅,

王艳(2002). 乙烯利和赤霉素对黄瓜性别表现的影响. 西南农业大学学报, 24 (1): 42-44]

Chaffei C, Pageau K, Suzuki A, Houda G, Ghorbel MH, Masclaux DC (2004). Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safe-

- guard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol*, 45 (11): 1681–1693
- Chen XJ, Liu GS, Chen ZK, Zhi YB, Yi ML, Liu HX (2002). A review of the pathway of ethylene biosynthesis and the relevant genetic engineering. *J Trop Subtropical Bot*, 10 (1): 83–98 (in Chinese with English abstract) [陈新建, 刘国顺, 陈占宽, 郅玉宝, 易明林, 刘鸿先(2002). 乙烯生物合成途径及其相关基因工程的研究进展. *热带亚热带植物学报*, 10 (1): 83–98]
- Chen R, Tian M, Wu X, Huang Y (2011). Differential global gene expression changes in response to low nitrogen stress in two maize inbred lines with contrasting low nitrogen tolerance. *Genes Genom*, 33 (5): 491–497
- Chen XH, Zeng GW, Cao PS (2002). Relationship between endogenous plant hormones and floral sex differentiation in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiol Commun*, 38 (4): 317–320 (in Chinese with English abstract) [陈学好, 曾广文, 曹磊生(2002). 黄瓜花性别分化和内源激素的关系. *植物生理学通讯*, 38 (4): 317–320]
- Chen YH, Fu XM, Wu H, Zang J (2012). *CsACO4*, an ACC oxidase gene regulating male differentiation in cucumber. *Afr J Biotechnol*, 11 (67): 13069–13074
- Cheng GH, Qin ZW, Feng Z, Wang CH (2012). The impact of photoperiod and temperature on sex differentiation of cucumber varieties 'C09-13'. *Northern Hort*, (15): 35–37 (in Chinese with English abstract) [程国辉, 秦智伟, 冯卓, 王春华(2012). 光周期和温度对黄瓜品种'C09-123'性别分化的影响. *北方园艺*, (15): 35–37]
- Fujii N, Kamada M, Yamasaki S, Takahashi H (2000). Differential accumulation of *Aux/IAA* mRNA during seedling development and gravity response in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Mol Biol*, 42 (5): 731–740
- Jin XX, Qin ZW, Dong YL (2007). Research of cucumber sex differentiation. *China Vegetables*, (2): 38–42 (in Chinese with English abstract) [金晓霞, 秦智伟, 董延龙(2007). 黄瓜性别分化研究进展. *中国蔬菜*, (2): 38–42]
- Kenneth JL, Thomas DS (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  methods. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Leon P, Sheen J (2003). Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci*, 8 (3): 110–116
- Li Z, Huang S, Liu S, Pan J, Zhang Z, Tao Q, Shi Q, Jia Z, Zhang W, Chen H, et al (2009). Molecular isolation of the *M* gene suggests that a conserved-residue conversion induces the formation of bisexual flowers in cucumber plants. *Genetics*, 182 (4): 1381–1385
- Liang YH, Li GL, Guo T, Wei Q (2010). The molecular mechanism of sexual differentiation in cucumber. *Chin Bull Life Sci*, 22 (11): 1177–1183 (in Chinese with English abstract) [梁永宏, 李广林, 郭韬, 魏强(2010). 黄瓜性型分化的分子机制. *生命科学*, 22 (11): 1177–1183]
- Liu JP (2013). Advances in research on key enzyme genes of ethylene biosynthesis. *Chinese J Trop Agric*, 33 (1): 51–57 (in Chinese with English abstract) [刘进平(2013). 乙烯生物合成关键酶基因研究进展. *热带农业科学*, 33 (1): 51–57]
- Liu S, Xu L, Jia Z, Xu Y, Yang Q, Fei Z, Lu X, Chen H, Huang S (2008). Genetic association of *ETHYLENE-INSENSITIVE3*-like sequence with the sex-determining *M* locus in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 117 (6): 927–933
- Meng JJ, Qin ZW, Zhou XY, Xin M (2013). Progress of study on functional genes in cucumber. *Acta Hort Sin*, 40 (9): 1767–1778 (in Chinese with English abstract) [孟晶晶, 秦智伟, 周秀艳, 辛明(2013). 黄瓜功能基因研究进展. *园艺学报*, 40 (9): 1767–1778]
- Miao M, Yang X, Han X, Wang K (2011). Sugar signaling is involved in the sex expression response of monoecious cucumber to low temperature. *J Exp Bot*, 62 (2): 797–804
- Papadopoulou E, Grumet R (2005). Brassinosteroid-induced femaleness in cucumber and relationship to ethylene production. *Hort Sci*, 409 (6): 1763–1767
- Rani G (2007). Changes in protein profile and amino acids in *Cladophora vagabunda* (Chlorophyceae) in response to salinity stress. *J Appl Phycol*, 19 (6): 803–807
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 675–709
- Rudich J, Halevy AH (1974). Involvement of abscisic acid in the regulation of sex expression in the cucumber. *Plant Cell Physiol*, 15 (4): 635–642
- Wan H, Zhao Z, Qian C, Sui Y, Malik A, Chen J (2010). Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Anal Biochem*, 399 (2): 257–261
- Wang JL, Liu DC, Guo XL, Zhang AM (2012). Research advances in auxin biosynthesis. *Chin Bull Bot*, 47 (3): 292–301 (in Chinese with English abstract) [王家利, 刘冬成, 郭小丽, 张爱民(2012). 生长素合成途径的研究进展. *植物学报*, 47 (3): 292–301]
- Wang Y, Li B, Du M, Egrinya AE, Wang B, Duan L, Li Z, Tian X (2012). Mechanism of phytohormone involvement in feedback regulation of cotton leaf senescence induced by potassium deficiency. *J Exp Bot*, 63 (16): 5887–5901
- Wang YH, Yang Q, Chen M (2004). Sugar sensing and signaling in plants. *Chin Bull Bot*, 21 (3): 273–279 (in Chinese with English abstract) [王玉华, 杨清, 陈敏(2004). 植物糖感知和糖信号传导. *植物学通报*, 21 (3): 273–279]
- Xiao W, Shen J, Jang JC (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biol*, 44 (4): 451–461
- Yamasaki S, Fujii N, Matsuura S, Mizusawa H, Takahashi H (2001). The *M* locus and ethylene-controlled sex determination in andromonoecious cucumber plants. *Plant Cell Physiol*, 42 (6): 608–619
- Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H (2003). Photoperiodic regulation of *CS-ACS2*, *CS-ACS4* and *CS-ERS* gene expression contributes to the femaleness of cucumber flowers through diurnal ethylene production under short-day conditions. *Plant Cell Environ*, 26 (4): 537–546
- Yamasaki S, Matsuura S, Takahashi H (2003). Characterization of ethylene effects on sex determination in cucumber plants. *Sex Plant Report*, 16: 103–111
- Zhang JP (2009). Sex determination of cucumber flowers. *Bull Biol*,



- 44 (6): 7–10 (in Chinese) [张菊平(2009). 黄瓜花的性别决定. 生物学通报, 44 (6): 7–10]
- Zhang ZL, Qu WJ, Li XF (2009). Plant Physiology Experiment. Beijing: Higher Education Press, 103–107 (in Chinese) [张志良, 瞿伟菁, 李小方(2009). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 103–107]
- Zou XY (2007). Genetic dissection of sex expression and studies on the distribution and expression of genes related to sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) (Master's thesis). Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese with English abstract) [邹晓艳(2007). 黄瓜性型遗传规律及性别决定相关基因的分布和表达研究(硕士论文). 北京: 中国农业科学院]

## Changes of cucumber physiological and biochemical indexes and their effects on formation of female flowers under low night temperature

LIU Xin-Tong, WANG Chun-Hua, XIN Ming, ZHOU Xiu-Yan\*, QIN Zhi-Wei\*

College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** Temperature-sensitive cucumber ‘C09-123’ was selected as the material, and three different night temperature treatments were set up for this research. The formation of female flowers within 20 nodes was investigated. Meanwhile, the biomass of endogenous hormone (ethylene, GA, IAA, ABA and ZT), sugars (sucrose and glucose), individual amino acids, and the relative expression of the related genes in shoot apex were measured. Results showed that the biomass of endogenous ethylene, glucose and sucrose decreased with the increased night temperatures. But the biomass of IAA, GA, ABA and ZT did not show the same tendency. Correlation analysis showed that cucumber female flower differentiation rate and glucose content were highly significant positive correlation; Female flower differentiation rate and the endogenous ethylene content were significantly positive correlation. At the same time, both ethylene and glucose were significant positive correlated with sucrose content. Methionine and aspartic which were needed in ethylene synthesis also increased significantly under low night temperature. Glucose metabolism key enzyme hexokinase and glutamic oxalacetic transaminase decreased with the increased night temperatures under both physiological and molecular levels, especially the expression of *CsASP5* in 12°C compared with 18°C and 24°C increased by 4 times. The relative expression of ethylene synthesis genes (*CsACS2* and *CsACO2*) showed the same tendency.

**Key words:** cucumber (*Cucumis sativus*); low night temperature; sex differentiation; sugar; amino acid; hormone

Received 2016-01-06 Accepted 2016-02-16

This work was supported by “Twelfth Five-Year” National Science and Technology Support Plan (Grant No. 2012BAD02B03).

\*Co-corresponding authors (E-mail: zxy0604@126.com; E-mail: qzw303@126.com).