

# 芦笋性别决定与性别分化研究进展

周劲松, 汤泳萍, 盛文涛, 罗绍春, 陈光宇

(江西省农业科学院生物工程中心, 南昌 330200)

**摘要:** 从芦笋性别表现及其决定的遗传基础、性别分化途径, 性别决定基因的定位以及性别分化特异表达基因的分离与分析等方面来综述芦笋性别决定与性别分化最新研究进展。目前, 已构建了围绕芦笋性别决定基因 *M* 比较精细的遗传图谱, 将 *M* 定位在 L5 染色体着丝点附近的 0.63 cM 区域内, 并构建了含有 8 个跨叠克隆群的物理图谱, 但由于大量重复序列的存在, 跨叠克隆之间的空隙不能闭合; 同时先后分离得到 11 个芦笋花器官发育特异表达基因, 并通过序列分析和原位杂交等技术对这些基因的功能进行了分析。最后, 对今后进一步研究提出了建议。

**关键词:** 芦笋; 性别决定; 性别分化

## Progress in Research on Sex Determination and Differentiation in *Asparagus officinalis* L.

ZHOU Jin-song, TANG Yong-ping, SHENG Wen-tao, LUO Shao-chun, CHEN Guang-yu

(Biotechnology Center, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200)

**Abstract** The paper generally introduced the progress on sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L., including sex expression, genetic basis of sex determination, the pathway of sex differentiation, sex determining gene mapping development of markers for the identification of sex, and isolation and function analysis of sex differential expression gene. So far, a region called the *M*-locus had located on a pair of homomorphic sex chromosomes controls the sexual dimorphism in asparagus and the region had been delimited to 0.63 cM near the centromere regions of L5 chromosome. A physical map enclosing the sex-determining regions with eight contigs had been established. However, the gaps between the contigs could not be closed due to a plethora of repetitive elements. On the other hand, 11 floral organ developmental expression genes had also been characterized and analyzed. Finally, several suggestions about the study of asparagus sex were given.

**Key words** *Asparagus officinalis* L.; Sex determination; Sex differentiation

性别分化作为植物个体发育的重要阶段, 具有复杂性、多样性等特点, 植物性别分化机理研究已成为当今生命科学领域的研究热点之一<sup>[1]</sup>。芦笋 (*Asparagus officinalis* L.) 是典型的雌雄异株植物<sup>[2]</sup>, 它的性别决定受到严格的遗传控制, 它的性别表型与同型性染色体 (Y 染色体) 的存在具有清晰的相关性, 施加外源植物激素对植物个体的单性花发育几乎没有影响<sup>[3]</sup>, 且芦笋染色体数目少 ( $2n = 2x = 20$ ), 基因组较小 ( $1.3 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^6$  Kbp/1C)<sup>[4]</sup>。

更引人注意的是, 芦笋的同型性染色体处于植物性染色体进化途径 (由无性染色体之分到产生异型性染色体) 的中间位置, 地位特别<sup>[5]</sup>。因此, 芦笋不仅可以作为研究雌雄异株植物 (仅约占种子植物的 6%) 性别决定与分化的模式系统, 还可以作为研究染色体进化和两性植物起源的模式植物<sup>[6]</sup>。与此同时, 芦笋又是一种深受消费者喜爱的营养保健型高档蔬菜, 素有“蔬菜之王”的美誉<sup>[2]</sup>。芦笋雄株的产量比同期生长条件相同的雌株高出 25% 以上<sup>[2]</sup>,

收稿日期: 2009-09-28 修回日期: 2010-04-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30771376); 江西省自然科学基金项目 (2007GZ01971)

作者简介: 周劲松, 硕士, 助理研究员, 研究方向为作物遗传育种及生物技术。E-mail: zjshear@sina.com

通讯作者: 陈光宇, 博士, 研究员。E-mail: genchks@hotmail.com

为提高芦笋产量, 全球正在大力开展芦笋全雄育种。可见, 芦笋性别研究不仅具有发育生物学上的理论意义, 而且具有重要的生产实践应用价值。本文将从芦笋性别决定的遗传基础、性别分化途径、性别决定基因的定位以及性别分化特异表达基因的分离与分析等方面来综述芦笋性别决定与性别分化最新研究进展, 以期对今后芦笋性别相关研究有所助益。

## 1 芦笋性别及其决定的遗传基础

芦笋是典型的雌雄异株植物, 有雄株和雌株之分。它的性别差异主要体现在花器官上, 一般雄株上只开雄花, 雌株上仅着生雌花。芦笋雌雄花器官构造不同, 雌花的雌蕊正常, 有健全的子房和柱头, 雄蕊一律高度退化, 而雄花的雄蕊健全, 雌蕊退化不完全, 子房很小, 无柱头<sup>[7]</sup>。雄花因有花粉而呈金黄色, 雌花因无花粉而呈灰白色。雄花较细长, 大小依品种不同而各异, 一般长约 6mm, 直径 2.2~2.4mm, 淡黄色, 雌蕊退化, 内有 6 枚雄蕊; 相对于雄花来说, 雌花较粗、短, 一般长 3mm 左右, 直径 2.0~2.1mm, 绿白色, 雄蕊退化, 内有 1 枚雌蕊, 雌蕊的花柱明显, 柱头 3 裂<sup>[2]</sup>。

芦笋染色体数目  $2n=2x=2Q$  按大小和 Giemsa C 带可将它的 10 对染色体分为 5L (长)、1M (中) 和 4S (短)<sup>[8, 21]</sup>。根据成套三体材料杂交分离方式分析发现, 芦笋具有性染色体, 且将第 5 条长染色体 (L5) 确定为性染色体<sup>[8]</sup>。芦笋性染色体在形态学上是全等的。芦笋 X 染色体与 Y 染色体的大小、形态几乎完全一致, Y 染色体上具有与麦瓶草 Y 染色体相似的雄性活化基因和雌性抑制基因<sup>[9]</sup>。X、Y 染色体在细胞有丝分裂时可以配对, 但减数分裂过程中其性别决定基因所在的染色体部位的交换受到抑制, 从而保证了性别决定基因的分离<sup>[9]</sup>。

进一步研究发现, 芦笋这种性别决定基因是性染色体上的 1 对等位基因, 它控制着芦笋的性别分化, 而且决定雄性的基因相对于决定雌性的基因为显性, 性别机制属于 XY 异配子型<sup>[10-12]</sup>。雄性为 Mm, 雌性为 mm, 但自然群体中偶尔会发现极少数雄性株 (Mm) 会产生两性完全花, 引起自花或异花授粉, 产生雄雌比例 3:1 的后代 ( $Mm \times Mm \rightarrow IMM + 2Mm + 1mm$  即  $3 \delta + 1 \varphi$ )。这种具有两性花的植株称为雄性雌型株 (俗称两性植株), 其后代 MM 基因型个体表现为雄性, 称之为超雄株<sup>[7, 13]</sup>。与普通雄花相比, 两性株所产生的两性花不仅雄蕊健全, 6 枚雄蕊正常发育, 还有健全程度不同的雌蕊, 有子房, 较大, 但比普

通雌花小, 有柱头<sup>[7]</sup>。超雄株外表和花器官与普通雄株无明显差异。我国台湾研究者发现亦存在雄蕊及雌蕊均退化的不完全花, 其植株生长极其旺盛<sup>[2]</sup>, 可能仅是芦笋一种花器官突变体, 但未见后续研究报道。因此, 芦笋性别有 4 种表型 3 种基因型, 分别是普通雄株 (Mm)、雌株 (mm)、两性株 (亦为 Mm) 和超雄株 (MM)。其中超雄株 (MM) 是有活力的, 其他生物这种类似的雄性个体大都是没有活力的, 这种差别可能是由于芦笋性染色体进化程度低, Y 染色体与 X 染色体同型, Y 染色体退化程度低的结果。

此外, 在芦笋的性染色体上, 除了性别决定基因外, 还存在着一些性别修饰基因<sup>[9]</sup>。芦笋两性株染色体上就存在一种特殊的修饰基因, 它能阻碍雌蕊选择性退化, 使得不仅雄蕊健全, 还有健全程度不同的雌蕊, 有子房, 有柱头。普通雄株没有这种修饰基因, 雌蕊退化程度高。

## 2 芦笋性别分化途径

芦笋性别分化是由性别决定基因主导的, 基于性别决定基因控制雄蕊和心皮发育结构基因表达的模式<sup>[14-15]</sup>。在雄性和雌性的花器官发育早期, 两者花器官都有心皮和雄蕊 (图 1)。然而, 在随后的发育过程中, 雄蕊和心皮分别在雌性和雄性个体中停止发育。芦笋性别分化是选择性诱导或败育的结果 (图 1)。但是, 这种选择性作用模式在雌雄个体花器官发育过程中是不同的, 即在雌花中雄蕊退化, 而在雄花中子房停止发育但不退化, 其结果是芦笋雌株产生的雌花严格一致, 都含发育良好的雌蕊和退化的不育花药痕迹, 而在雄株中则含有退化程度不同的雌性器官, 从无花柱到含花柱乃至柱头的雌蕊<sup>[16]</sup>。电镜观察芦笋的性别分化过程, 确定两性花向单性花发育的转变时期是花柱开始发育的时刻, 雌花的雄蕊退化在此之后开始的<sup>[14]</sup>。许多研究显示, 性别决定基因在心皮和雌蕊原基出现的早期没有激活, 在发育后期才发挥作用。

在芦笋性别分化过程中, 内源激素水平与性别的表达有明显的关系。芦笋的幼雄花中生长素含量比处于相应发育时期的幼雌花高 3 倍<sup>[16]</sup>。芦笋雄花和雌花间蛋白质差异也较大, 用蛋氨酸 (35S-Met) 分别标记雌、雄花的子房后分析新合成的蛋白质, 并在相应时期提取 mRNA 进行体外翻译试验时发现, 雌花的子房在发育过程中存在翻译水平的调控, 缺乏这种调控可能是雄株子房不能发育的原因<sup>[17]</sup>。在两性花向单性花发育的转变

时期 2种性别花的双向多肽图谱有差异,且雌花中核糖核酸活性出现明显的峰值,可能与雄蕊的退化有关<sup>[17]</sup>。

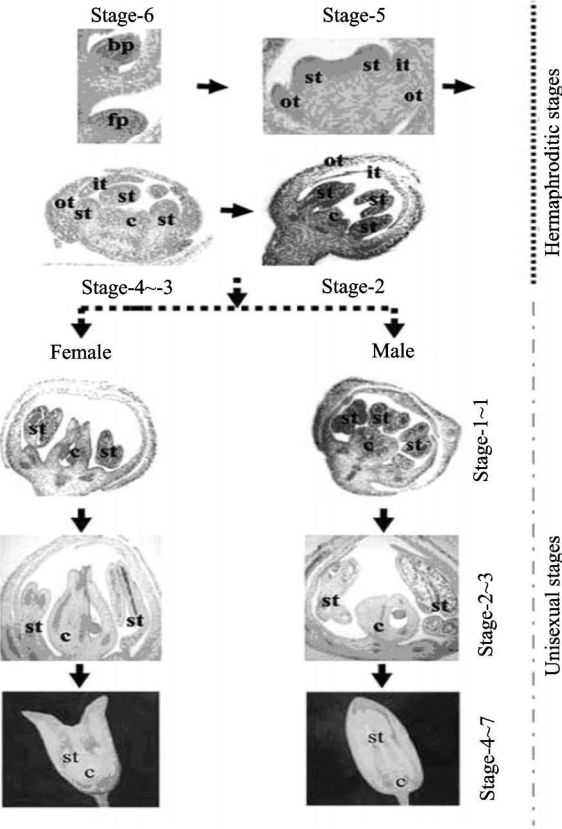


图 1 芦笋雌花和雄花雌雄同体发育时期 (从-6到-2时刻)

Fig 1 Development of male and female flowers in *A. officinalis*. Stages in hermaphroditic development (stages-6 to-2)

芦笋花有 6个被片(组成两层轮生体),6个雄蕊和1个3心皮雌蕊。被片原基在-6时刻早期就出现。雄蕊原基和心皮原基分别在-5时刻和-4时刻出现。被片覆盖雄蕊发生在-3时刻。单性发育时期(从-1到7时刻):雌雄花差异出现在-1时刻。在雌花中,花柱的形成伴随着雄蕊的退化。在雄花中,花柱和子房停止发育。bp 茎原基;fp 花原基;ot 外层被片;it 内层被片;st 雄蕊;c 心皮。本图参考引用 Caporali等<sup>[14]</sup>和 Park等<sup>[15]</sup>的资料

### 3 芦笋性别决定基因的定位与连锁的分子标记开发研究

性别决定基因的研究是性别分化中最高水平的研究,也是彻底解决性别表达机理的关键所在。围绕芦笋性别决定基因的定位,国内外先后进行了大量的工作,已找到了一些与该基因连锁的遗传标记,包括形态标记和生化标记<sup>[18-19]</sup>、DNA 分子标记<sup>[11-12, 20-22]</sup>。分子标记的获得不仅对芦笋性别鉴别

有重要作用,同时为芦笋性别决定基因最终克隆和功能分析奠定了遗传基础。

早期的形态标记和生化标记都是通过简单遗传分析确定的,一些 DNA 分子标记是利用统计分析软件构建芦笋整个基因组遗传图谱时定位得到的,另一些则是利用 AFLP 标记技术结合分离集团混合分析法进行的<sup>[11, 21]</sup>。Jamsari等<sup>[12]</sup>首先构建了超雄株(MM)基因组的 BAC 文库,然后运用 9 个 AFLP 和 2 个 STS 标记筛选出 13 个围绕性别决定基因的 BAC 克隆。BAC 克隆末端测序,共发展了 4 个基于 PCR 的标记,1 个是共显性,并利用了 802 株作图群体构建了围绕芦笋性别决定基因比较精细的遗传图谱,与芦笋性别决定基因最近的两侧标记,上侧的是 AFLP 标记 EM 4447.1, 0.86 cM;下侧的是 STS 标记 Asp1-T7 和 Asp2-Sp6 等,0.2 cM。Telgmann-Rauber 等<sup>[6]</sup>在前人基础上,将 M 定位在 L5 染色体着丝点附近分子标记 EM 3646 与 STS 3156 之间的 0.63 cM 区域内,然后利用 AFLP 和 STS 标记采用染色体步移策略搜寻 BAC 文库,构建了含有 8 个跨叠克隆群的物理图谱,但是由于大量重复序列的存在,跨叠克隆之间的空隙不能闭合。位于 M 位点一侧的两个跨叠克隆群是由两个距离 M 位点只有 0.25 cM 的标记建立的,却没有重叠。这个位置标记富集表明 M 区域的重组率下降。在 M 位点的另一侧 0.38 cM 处定位了一个跨叠克隆群。4 个紧密连锁的 BAC 克隆部分测序,找出了 64 个被公认的开放阅读框,仅有 23% 的 ORFs 显示与已知的蛋白质和 ESTs 相似。此外,在芦笋性别决定基因区域,富集重复序列,基因密度低。在 M 位点一侧 BAC 克隆的分子细胞遗传学和序列分析显示,这些 BAC 含有大量的重复序列,这些重复序列在每条染色体着丝点区域附近都有,这样就阻碍了性染色体上单拷贝 M 位点的定位。他们推测,芦笋、白瓶草、番木瓜代表了 XX/XY 性别决定系统的 3 个进化阶段,既然芦笋产生少量两性花和具有同型性染色体,这个物种可以作为进一步研究染色体进化和两性植物起源的模式植物。

同时,芦笋超雄株(MM)与雌株(mm)杂交后代全部为雄株(Mm),此过程称之为全雄育种,超雄株的筛选是芦笋全雄育种的关键。然而,超雄株与普通雄株即使在开花期表型上也没有任何差异,且芦笋从播种到开花大约需要 2 年时间,若利用与芦笋性别决定基因紧密连锁的 DNA 分子标记辅助选择,苗期分辨各种基因型,快速准确筛选出超雄株,可加快芦笋全雄育种进程,提高育种效率。为此,国内外在芦笋性别决定基

因定位的同时,也在大力进行与芦笋性别决定基因紧密连锁的 DNA 分子标记开发转化工作。Jamsari等<sup>[12]</sup>转化开发了 4 个基于 PCR 的 STS 标记。卢龙斗等<sup>[23]</sup>获得一个雌性性别连锁的 RAPD 标记,并转化为雌性特异的 SCAR 标记。Nakayama等<sup>[24]</sup>将前人开发的 STS 标记 A<sub>sp</sub>I-T7 转化更为稳定易于扩增的分子标记 A<sub>sp</sub>I-T7SE。目前,已获得的分子标记绝大多数是 AFLP、RAPD 等标记,很多是显性标记,这类标记难以直接利用进行芦笋超雄株辅助选择,而且许多还不具有通用性,在其他群体中没有多态性,共显性标记太少,只有 2 个: STS3660(4 1 dM)、A<sub>sp</sub>2-Sp6(0 2 dM),多态性也不够好。因此,需要继续开发转化与芦笋性别决定基因紧密连锁的 DNA 分子标记,特别是共显性标记。

#### 4 芦笋花器官发育特异表达基因的分 离与分析研究

芦笋性别分化过程中除了受性别决定基因作用外,还存在着许多其他特异表达基因参与作用。植物雌雄性别间的差异主要表现在花器官构造上,性别分化研究主要是通过研究花器官发育而进行的,芦笋上亦是如此。近年来,关于芦笋性别分化的分子生物学研究受到重视,已经先后分离得到 11 个与芦笋花器官发育相关的特异基因,并通过序列分析和原位杂交等技术对这些基因的功能进行了分析。

Caporali等<sup>[25]</sup>用金鱼草 PLENA 基因的 MADS 盒基序为探针筛选芦笋雌花特异表达的 cDNA 文库,分离出芦笋第一个 MADS 盒基因 AOM1,它不仅在花器官中而且在花序和花分生组织中均有表达,在雄花和雌花有着相似表达过程,似乎不涉及到芦笋性别分化。Losa等<sup>[26]</sup>利用分离 AOM1 同样的方法和相同的 cDNA 文库,分离出芦笋另外 2 个 MADS 盒基因: AOM3 和 AOM4。二者不仅在花器官中表达,也在芽顶端区域的几种不同分生组织中表达,且仅限于开花时期表达,编码公认的转录因子,具有典型的 MKC 结构,是描述花器官发育经典的 ABC 模型中的 A 功能的基因, AOM3 属于 AGL6 亚族,而 AOM4 属于 A. *italiana* 的 SEP 基因家族。AOM3 和 AOM1/AOM4 的表达模式在整个花器官发育过程中是一样的,与 SEP 基因的表达模式相似。AOM3 和 AOM4 在花期作为分生组织特性基因赋予芽和顶端的分生组织以花序分生组织的特性,而赋予侧生分生组织以花分生组织的特性。这表明 AOM3 和 AOM4 与茎端的生殖功能相关联,它们在开花时期可能受到了性别决定基因的作用,

促使了芽顶端从营养阶段向生殖阶段的转变。Pak 等<sup>[15, 27]</sup>运用 RACE( rapid-amplification of cDNA ends)克隆方法先后分离得到 5 个芦笋具有 B 功能和 C 功能的基因 cDNA 克隆,其中 1 个 B 功能的类 DEFIC IENS(DEF)基因: AODEF(2003); 2 个 B 功能的类 GLOBOSA(GLO)基因<sup>[27]</sup>: AOGLOA、AOGLOB, C 功能的 2 个类 AGAMOUS(AG)基因<sup>[28]</sup>: AOAG1 和 AOAG2。Southern 杂交显示, AODEF、AOGLOA 和 AOGLOB 为单拷贝基因, AOAG1 有几个拷贝。Northern blot 杂交显示,这些基因在花芽中特异表达。荧光原位杂交显示, ADEF、AOGLOA 和 AOGLOB 基因都只在雌花和雄花中的轮 2 和轮 3(内轮被片和雄蕊),不在轮 1(外轮被片)中表达。芦笋中这些 B 功能基因不涉及到外轮被片的发育,这表明芦笋不适合百合科修改的 ABC 模型。其中, AODEF 基因在花发育的两性花阶段在雌雄花的第 2、3 轮花器官中强烈表达,而过渡到单性花发育阶段后, AODEF 的表达在雌雄花中的表达出现了差异:在雄花中 AODEF 基因在内轮被片和雄蕊中表达;而在雌花中, AODEF 表达产物从雄蕊中消失,仅在内轮被片中检测到。 AODEF 基因在雄花中的表达与雄蕊的发育相吻合,而在雌花中表达的失活与其中雄蕊的发育停滞相关联。这些结果表明,在芦笋发育的后期阶段即单性花时期,性别决定基因直接或间接地控制着 AODEF 的表达<sup>[15, 29]</sup>。Kanno 等<sup>[30]</sup>也是运用 RACE 克隆方法分离得到 3 个 SEP 类基因 AO-MADS1、AOMADS2、AOMADS3、AOMADS1/AOM1、AOMADS2/AOM4 相似性极高,可能分别是同一基因。

可见,这些芦笋花器官特异基因似乎都不涉及到芦笋性别分化作用,其中 AOM1、AOM3、AOM4 是以拟南芥、金鱼草等模式植物上已知的 MADS 框基序序列为探针筛选雌花 cDNA 文库分离出来的,其余 8 个都是根据已知的 MADS 框基序序列设计特异引物采用 RACE 方法获得的,故得到的这些基因都能在其他植物上找到相对应的同源基因,这就有可能限制了芦笋独特花发育基因的发掘,且芦笋中尚存在未被发现的 ABC 功能基因,也并未分离得到 D、E 功能基因,特别是与芦笋性别分化相关的基因包括性别决定基因,这些就需要采用新的方法和手段继续分离芦笋花器官发育与性别分化差异表达基因。

#### 5 展望

芦笋性别决定与分化因具有重要的发育生物学和经济价值而被倍受关注,目前已取得了一定的研究进展,但是,由于它的性别决定基因处于着丝点附近,

这个区域富集重复序列, 跨叠克隆群没有重叠, 性别决定基因难以直接克隆; 分离出的花器官发育特异表达基因都是与芦笋性别决定与分化无直接关系, 整个芦笋性别决定与分化基因网络仍然是个谜, 其分子机理的神秘面纱仍未被揭开。因此, 对芦笋性别发育分子生物学机理的研究还处于初级阶段, 需要大力加强研究。今后研究可以从以下 2 个方面开展: 一是直接针对性别决定基因, 以芦笋两性株或其他性别突变体等为材料, 构建遗传作图群体, 采用图位克隆策略, 分离芦笋性别决定基因, 分析其功能, 进而研究性别分化机理; 二是着眼于性别分化差异表达基因, 先分离芦笋性别分化差异表达基因, 在分离得到这些基因的基础上, 再对其时空表达及其调控进行研究, 并结合遗传学分析, 就有可能最终确定芦笋性别分化机理。现对于性别决定基因, 可构建更大新的作图群体, 采用不同类型的分子标记, 进一步精细定位, 增加标记密度, 为性别决定基因染色体步移和基因克隆创造条件; 同时辅以最新分子生物学技术如染色体显微解剖分离法、染色体流式分选、多色荧光原位杂交技术等, 将有助于性别决定基因的分离。对于芦笋性别分化差异表达基因, 寻找和挖掘芦笋性别分化突变体或两性花, 采用抑制性差减杂交等植物差异表达基因克隆技术, 基因表达谱芯片以及 RNAi 等技术分离分析芦笋性别分化差异表达基因, 同时运用比较基因组学和进化观点, 加速芦笋性别分化机理研究。我们相信, 在不久的将来芦笋性别决定与分化的分子机理研究将会有重大突破, 其研究结果也会应用到芦笋全雄育种上来, 以提高育种效率。

## 参考文献

- [1] Xu Z H, Chong K. Plant developmental biology in china past present and future [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(9): 1085-1095
- [2] 陈光宇. 芦笋无公害生产技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 28-29
- [3] Franken A A. Sex characteristic and inheritance of sex in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) [J]. Euphytica, 1970, 19: 277-287
- [4] Bennett M D, Leitch I J. Plant genome size research: a field in focus [J]. Annals of Botany, 2005, 95: 1-6
- [5] Vyskot B, Hobza R. Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog [J]. Trends in Genetics, 2004, 20(9): 432-437
- [6] Telmann-Rauber A, Jansari A, Kinney M S, et al. Genetic and physical maps around the sex-determining M locus of the dioecious plant asparagus [J]. Mol Genet Genomics, 2007, 278: 221-234
- [7] 陈光宇, 周劲松, 汤泳萍, 等. 芦笋两性株调查与初步利用研究 [J]. 江西农业学报, 2007, 19(9): 31-34
- [8] Charlesworth D. Plant sex determination and sex chromosomes [J]. Heredity, 2002, 88: 94-101
- [9] 赵光强. 植物的性、性染色体及性别决定 [J]. 生物学通报, 2002, 37(12): 19-21
- [10] Flory W S. Genetic and cytological investigations on *Asparagus officinalis* [J]. Genet Princeton, 1932, 17: 432-467
- [11] Reamon-Büttner SM, Jung C, et al. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 432-438
- [12] Jansari A, Nitz I, Reamon-Büttner SM, et al. BAC-derived diagnostic markers for sex determination in asparagus [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 1140-1146
- [13] 周劲松, 汤泳萍, 罗绍春, 等. DNA 分子标记早期快速鉴别芦笋雌雄株 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(3): 363-366
- [14] Caporali E, Carboni A, Gallini G, et al. Development of male and female flowers in *Asparagus officinalis* L. Search for point of transition from hermaphroditic to unisexual developmental pathway [J]. Sex Plant Reprod, 1994, 7: 239-249
- [15] Park J H, Ishikawa Y C, Yoshida T, et al. Expression of AODEF, a B-functional MADS-box gene, in stamens and inner tepals of the dioecious species *Asparagus officinalis* [J]. Plant Cell Physiology, 2003, 51: 867-875
- [16] Bracale M, Caporali E, Gallini G, et al. Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* [J]. Plant Science, 1991, 80: 67-77
- [17] Bracale M, Gallini G, Falavigna A, et al. Sex differentiation in *Asparagus officinalis* L. II. Total and newly synthesized proteins in male and female flowers [J]. Sex Plant Reprod, 1990, 3(3): 23-30
- [18] 范双喜, 宋学峰. 芦笋过氧化物同工酶与性别表现的关系 [J]. 华北农学报, 1995, 10(2): 18-23
- [19] Maestri E, Restivo F M, Marziani Longo G P, et al. Isozyme gene markers in the dioecious species *Asparagus officinalis* L. [J]. Theor Appl Genet, 1991, 81: 613-618
- [20] Jiang C, Lewis M E, Sink K C. Combined RAPD and RFLP molecular linkage map of asparagus [J]. Genome, 1997, 40: 69-76
- [21] Reamon-Büttner SM, Schondelmaier J, Jung C. AFLP marker tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. [J]. Molecular Breeding, 1998, 4: 91-98
- [22] Gebler P, Wolko L, Knaflowski M. Identification of molecular markers for selection of supermale (YY) asparagus plants [J]. J Appl Genet, 2007, 48(2): 129-131
- [23] 卢龙斗, 李瑞丽, 高武军, 等. 芦笋雌性特异性片段的克隆和分析 (简报) [J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39(3): 281-284
- [24] Nakayama H, Ito T, Hayashi Y, et al. Development of sex-linked primers in garden Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) [J]. Breeding Science, 2006, 56: 327-330
- [25] Caporali E, Losa A, Spada A, et al. The MADS box genes *AOM1* expressed in reproductive meristems and flowers of the dioecious species *Asparagus officinalis* [J]. Sex Plant Reprod, 2000, 13: 151-156
- [26] Losa A, Caporali E, Spada A, et al. *AOM3* and *AOM4*: two MADS box genes expressed in reproductive structures of *Asparagus officinalis* [J]. Sex Plant Reprod, 2004, 16: 215-221
- [27] Park J H, Ishikawa Y C, Odhiambo T, et al. Two gibberellin-like genes are expressed in second and third whorls of homochlamydeous flowers in *Asparagus officinalis* L. [J]. Plant Cell Physiology, 2004, 45: 325-332
- [28] Kanno A, Park J H, Yun P Y, et al. Isolation and characterization of floral organ identity genes from *Asparagus officinalis* L. [J]. SHS Acta Horticulturae, 2002, 589: 267-272
- [29] 高武军, 姬艳克, 肖理会, 等. 雌雄异株植物性别决定相关功能基因研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(1): 125-129
- [30] Kanno A, Hienuki H, Ito T, et al. The structure and expression of SEPALLATA-like genes in *Asparagus* species (Asparagaceae) [J]. Sex Plant Reprod, 2006, 19: 133-144