

·综述·

DOI: 10.16605/j.cnki.1007-7847.2017.02.012

被子植物雌雄异株性别决定与性别连锁标记

杜彬彬¹, 李交昆², 唐璐璐^{1*}

(1. 中南大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410013; 2. 中南大学 资源加工与生物工程学院, 中国湖南 长沙 410083)

摘要: 雌雄异株是雌雄性别分离的一种性系统, 在被子植物中广泛分布。一般认为雌雄异株的性别决定受遗传、环境和激素三者的影响和调控。随着第二代测序技术和分子标记技术的发展, 对于被子植物雌雄异株性别决定的研究已深入到基因水平。现从性别决定机制及性别连锁的分子标记对被子植物雌雄异株的研究进行总结, 并对未来的研究方向进行了展望, 以期为深入研究雌雄异株的遗传机制及系统发生奠定基础。

关键词: 被子植物; 雌雄异株; 性别决定; 性别决定基因; 分子标记

中图分类号: Q941(78)

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2017)02-0159-07

Sex Determination and Molecular Markers in Dioecy of Angiosperms

DU Bin-bin¹, LI Jiao-kun², TANG Lu-lu^{1*}

(1. School of Life Sciences, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China; 2. School of Minerals Processing & Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, Hunan, China)

Abstract: Dioecy, a sexual system with separated male and female, is widespread among angiosperms. Sex-determination genes, environment and hormones are thought as determinants to the sex of dioecious individuals. With the development of “next-generation” sequencing technologies and molecular markers, the study on sex determination of dioecy has been focused on genetic level. Here, the mechanism of sex determination and molecular markers for gender were summarized, and some comments on future research directions were also proposed, which may lay a foundation for the study of genetic mechanisms and phylogeny of dioecy.

Key words: angiosperms; dioecy; sex determination; sex-determination gene; molecular marker

(*Life Science Research*, 2017, 21(2): 159-165)

相较于动物, 被子植物的性系统更为复杂和多变, 其性别决定机制是植物学研究中的基本问题, 具有重要的理论意义和现实意义^[1]。雌雄异株(dioecy)是雌花和雄花分别位于不同植株上的一种性系统, 广泛分布于被子植物各科中^[2-3]。雌雄两性在空间上的分离, 使得雌雄异株植物成为研究植物性别决定的良好材料^[4]。已有的研究表明, 环境、激素、遗传三类因素既相互独立又协同作用, 共同控制着植物的性别^[5-6]。近年来, 随着各种分子标记的广泛应用以及高通量测序技术的发展,

对被子植物雌雄异株的性别决定的研究已深入到基因水平, 在性别连锁标记及性别决定基因方面有了极大的进展。

1 影响被子植物雌雄异株性别决定的因素

雌雄异株植物最明显的特征在于繁殖器官(花)的性别分离, 其形态的决定是一个复杂的网络调控过程, 受到多个因素的影响。在此, 我们对已有研究报道进行总结, 将影响性别器官发育的因素归纳为三大类: 遗传因素(性染色体与性别决定

收稿日期: 2016-07-11; 修回日期: 2016-09-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31100173); 湖南省自然科学基金资助项目(2016JJ3136); 中南大学教师研究基金项目(2014JSJJ030)

作者简介: 杜彬彬(1991-), 男, 河南新乡人, 硕士研究生; *通讯作者: 唐璐璐(1979-), 女, 湖南长沙人, 博士, 中南大学副教授, 主要从事系统与进化植物学研究, E-mail: lltang@csu.edu.cn。

基因)、表观遗传与环境调节因素以及激素调节因素。

1.1 遗传因素

1.1.1 性染色体

对于被子植物性染色体的认识是一个逐步发展的过程: 先是在雌雄异株植物中发现了异型染色体, 然后才认识到植物性染色体的存在(性染色体相较于常染色体形态相差较大, 最初发现时称之为异型染色体)^[7]。

以性染色体为单位的被子植物雌雄异株的性别决定被分为3种: XX/XY型、X:A型和ZZ/ZW型, 分别以白麦瓶草(*Silene latifolia*, XX/XY)、酸模(*Rumex acetosa*, X:A)和杨属(*Populus*, ZZ/ZW)为代表^[8-10]。

植物的性染色体可以分为同型性染色体(XX与ZZ)和异型性染色体(XY与ZW)两种类型。目前, 人们在被子植物的13个科20个种中发现了同型性染色体, 至少4个科19个种中发现了异型性染色体^[11, 12]。具有性染色体的植物并不常见, 可能与多数雌雄异株植物进化时间较短有关, 许多雌雄异株植物性染色体于相对近期形成, 如麦瓶草属(*Silene*)植物最近1000万年才出现性染色体^[13]。但是, 一般认为所有的雌雄异株植物都具有进化出性染色体的潜能。虽然现阶段具有性染色体的雌雄异株植物较少, 但因为植物性染色体变化大, 且处于演化早期, 所以被认为是研究性染色体起源、进化与结构的良好材料^[12, 14]。此外, 有研究人员在白麦瓶草中发现了Y染色体特异性片段, 这为雄性的性别决定提供了遗传学证据^[15]。

重复序列的积累是动物性染色体中较为常见的现象^[16, 17]。过去几年中, 在一些雌雄异株植物的性染色体中也发现了重复序列的存在, 而且在一些模式雌雄异株植物如番木瓜(*Carica papaya*)、白麦瓶草和酸模中, 人们已经对重复序列的结构特征进行了充分的研究^[18-20]。Steflova等^[18]对酸模和白麦瓶草的Y染色体中的重复序列进行研究, 发现了衍生于叶绿体的DNA序列, 从而推测两物种Y染色体中的重复序列部分来源于叶绿体DNA序列的累积。番木瓜的性别类型分别由一对原始的性染色体控制, 其中雄性由Y染色体的雄性特异区域(MSY)决定, 雌雄同株由Y^h染色体的雌雄同株特异区域(HSY)决定^[21]。当MSY和HSY未发生重组时, 其上叶绿体衍生的DNA重复的平均次数是X染色体对应区域的12倍。此外, 一

段包含*rsp15*基因的叶绿体基因组片段在HSY上重复了23次, 这是典型的反转座子介导的重复序列。同时, 在X染色体和HSY上都具有的重复序列比较稀有, 叶绿体片段和线粒体片段分别仅为11%和12%, 表明HSY的重组被抑制后细胞器DNA片段会促进重复序列的累积。同样, 在番木瓜雄性特异区域也发现了大量重复序列^[20]。

近期研究发现, 重复序列在植物性染色体进化过程中也扮演了重要角色。性染色体进化的一个主要阶段就是重复序列的累积, 一些现象如异染色质化的触发和重组抑制现象的出现, 致使性染色体结构和形态发生分化, 从而引发Y染色体退化以及X染色体剂量补偿效应, 最终导致性染色体的进化^[22]。

1.1.2 性别决定基因

随着各种分子标记在被子植物性别决定机制研究中的应用, 许多与性别决定密切相关的基因或序列被发现, 被称为性别决定基因(sex-determination gene), 如*MADS-box*基因、*AP3*基因和*OGI*基因等^[23-26]。*MADS-box*基因家族广泛存在于雌雄异株植物中, 是研究最多的一类性别决定基因, 在酸模^[27]、白麦瓶草^[28]、石刁柏(*Asparagus officinalis*)^[29]、非洲油棕(*Elaeis guineensis*)^[29]和菠菜(*Spinacia oleracea*)^[30]等植物中均有报道, 并对其相关机制进行了探讨。*MADS-box*基因家族分散分布在基因组中, 在植物的不同发育阶段和不同部位均有表达, 尤其是在植物生殖生长阶段, 参与植物花的发育调控, 因此该类基因被认为在一些雌雄异株植物的性别分化中起重要作用^[31, 32]。麦瓶草属中, *AP3*基因同时存在于X染色体和Y染色体上, 并且位于性染色体进化的限制性重组区域, 而限制性重组是性染色体进化的前提。X染色体与Y染色体的*AP3*拷贝并没有显著差异, 但与常染色体相应区域的拷贝存在较大差异, 且Y染色体的*AP3*拷贝上的一个内含子中存在反转座子的累积, 经生物信息学分析确定*AP3*与雄性决定相关^[33]。*OGI*基因因为一个小片段的Y染色体连锁区域, 具有雄性决定功能, 其性别特异序列总长仅为1 Mb, 由常染色体上的*MeGI*基因复制到Y染色体上, 可以调节柿科君迁子(*Diospyros lotus*)雌性个体中一种小RNA的表达量, 从而表现出雌性抑制性状^[26]。

分子标记是性别决定基因的主要研究手段, 结合分子标记以及第二代测序技术, 新近发现了

许多相关基因以及性别特异性位点与标记, 具体将在第 2 部分进行阐明。

1.2 表观遗传与环境调控因素

在雌雄异株植物发育过程中遗传信息位点不存在差异而性别表型存在差异的现象称为性别决定的表观遗传调控(epigenetic control of sex determination)^[34]。表观遗传调控可以发生在转录水平(雄性和雌性基因组位点修饰、组蛋白修饰或 DNA 修饰)或转录后水平(RNA 修饰调控)。环境因素如温度、光照、营养和水分也可以决定许多植物性别的表达^[35, 36]。虽然环境调控性别决定的分子机制仍不明了, 但多数环境调控性别决定的体系很可能受表观遗传机制的调节, 因为植物需要通过 DNA 修饰或 RNA 表达来应对环境的改变^[22, 37]。毛果杨(*Populus trichocarpa*) 19 号染色体上的性别决定区域具有 sRNA 热点, 表明杨树的性别决定可能存在表观遗传机制的参与^[38]。有研究推测 miRNA 在黄瓜(*Cucumis sativus*)的单性花进化过程中担任重要的角色, 它可能因为环境压迫而选择性地使心皮败育^[39]。

表观遗传调控是被子植物雌雄异株进化不可或缺的部分。作为表观遗传调控研究中最深入的一部分, 有假设认为 DNA 甲基化是植物进化为雌雄异株过程中的首要步骤, 基因组 DNA 的高度甲基化抑制同源染色体的减数分裂重组, 这种表观遗传修饰产生的性别隔离最终导致性染色体的进化^[40]。目前, 关于环境与表观遗传对性别决定的调控仍然留有許多空白, 需要进一步深入探究, 以便对植物性别决定和性染色体进化有更深刻的理解。

1.3 激素调控因素

植物激素也是植物性别决定的重要调控因子。遗传学研究揭示, 激素可以调控许多种类植物性器官的发育。细胞分裂素代谢途径中一个等位基因的差异可能与葡萄(*Vitis vinifera*)的性别决定相关^[41]。甜瓜(*Cucumis melo*)可以通过乙烯合成途径中的 *CmACS-7* 基因和 *CmWIP1* 基因的相互作用来调控性别的表达; 而甜瓜 *CmWIP1* 的增强子发生 DNA 甲基化, 3'端非编码区插入一个转座子, 可以使甜瓜长出单性雌花。即在甜瓜的雌株上, *CmACS-7* 基因单独作用抑制雄蕊的发育; 而在雄株上, *CmACS-7* 会抑制 *CmWIP1*, 使甜瓜雄蕊得以正常发育^[42, 43]。甜瓜的性别由激素与表观遗传决定, 表明性别决定是一个综合过程, 除了遗传因素之外, 环境和激素也是此过程中重要的

调控因子。

植物激素或其抑制剂的外部施用也会影响植物性别表达。外部施加赤霉素通常使植物偏向雄性发育, 而乙烯使植物偏向雌性发育; 生长素和细胞分裂素通过相互作用也可以调节植物性别决定^[34]。

2 分子标记在性别决定分析中的应用

由于被子植物雌雄异株形态特征、生化指标和细胞学证据的有限性, 早期为了在幼年期或任意发育阶段确定植株性别, 人们开发出了基于分子标记的雌、雄性别鉴定方法。现在, 分子标记的方法已不仅应用于植株性别的鉴定, 更是用来发现并定位性别决定基因。随着分子标记技术和第二代测序技术的发展, 目前逐渐开始使用遗传分子标记 RAPD、AFLP、SCAR、ISSR 等手段来寻找并定位确切的性别连锁区域(sex-linking regions) (亦称性别决定基因)。基于此, 大量性别连锁标记被发现, 比如: 在异株泻根(*Bryonia dioica*)中已发现一个性别连锁的 SCAR 标记^[44]; 对番木瓜、弗州草莓(*Fragaria virginiana* Mill.) 和猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planchon)的性别连锁区域分别进行了遗传图谱与物理图谱的构建, 并进一步鉴定了其性别连锁标记^[45-47]。

现阶段, 用于雌雄异株植物性别连锁研究的分子标记主要可分为两大类: 基于 DNA 指纹的分子标记和基于 RNA 指纹的分子标记。基于 DNA 指纹的分子标记种类更多, 使用范围更广, 主要分为杂交分子标记和 PCR 标记, 其中杂交分子标记主要是指限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)标记; PCR 标记包含 DNA 随机扩增多态性(random amplified polymorphic DNA, RAPD)标记、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记、序列特征扩增区(sequence characterized amplified region, SCAR)标记、简单重复序列间多肽性(inter simple sequence repeat, ISSR)标记、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)标记、酶切扩增多态性序列(cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS)标记。基于 RNA 指纹的分子标记主要包括基因差异显示和 cDNA-AFLP^[6] (图 1)。

由于部分标记方法的缺陷性(技术繁琐、效率低下、试剂毒性、可重复性低等), 现在使用较为广

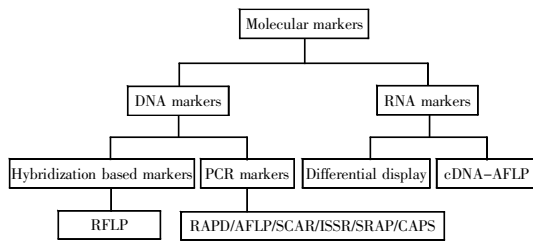


图1 用于植物性别连锁研究的分子标记

Fig.1 Molecular markers for sex-linkage studies of plants

泛的主要有 RAPD、AFLP、SCAR、ISSR 4 种。

2.1 RAPD 的应用

RAPD 标记主要基于 DNA 指纹差异和 PCR 技术, 广泛应用于不同物种分化研究、连锁图谱的构建、物种的鉴定、基因分型、系统发育学研究等^[48-50]。2002 年, Shirkot 等^[51]通过对猕猴桃(*A. deliciosa* var. *deliciosa*) 34 对引物进行筛选, 发现了 6 个雌性特异性标记和 2 个雄性特异性标记。随后, Agrawal 等^[52]分别通过希蒙得木(*Simmondsia chinensis*)的 4 个雄性变种和 4 个雌性变种对以上发现的性别特异性标记进行了进一步的筛选, 得到雄性特异的 RAPD 标记 OPG-05, 表明 RAPD 是筛选性别决定标记的一个有效手段。2012 年, Samantaray 等^[53]在菱叶(*Piper betle*)中(11 雄 8 雌)也检测到了这一标记。这些标记的进一步验证, 证实了此类标记的稳定性。许多报道都表明 RAPD 标记与性别紧密连锁, 通过 Southern 杂交, 性别特异性 RAPD 标记的可靠性也得到了验证^[54]。然而, 在一些雌雄异株植物中, Southern 杂交却会出现雌雄两性都有背景信号的现象, 从而无法准确鉴定雄性和雌性, 出现这种现象的原因可能是雌雄个体间存在离散的 DNA 重复序列以及 DNA 片段的高度同源性^[55]。

由于引物退火温度较低, 且对实验条件极其敏感, RAPD 的重现性较差, 可靠性欠佳^[56, 57]。但是, 由于费用少、操作简便、设备要求低、无需放射性探针等优点, RAPD 技术已经成为研究植物性别连锁的重要工具, 在这一领域开辟了一条新的途径。

2.2 AFLP 的应用

AFLP 技术是一种通过 PCR 扩增来揭示随机基因组变异的方法。现今已发现的性别特异性 AFLP 标记见于各类雌雄异株植物性别的早期鉴定, 同时也常用于性别决定基因的查找及定位研究。

番木瓜的雄性特异区域的基因进化更为迅速, 很可能是因为此区域发生了基因退化或者染

色体重排^[58]。番木瓜的性染色体(染色体 LG1, 图2)包含有特异的性别决定区域, 通过 AFLP 法发现并使用的性连锁标记多为不明功能的 DNA 序列, 并不位于编码区。在 LG1 上共发现 342 个标记, 其中 225 个标记与性别存在共分离, 这表明番木瓜的性别决定基因分布于这 225 个标记所在的区段。LG1 染色体上相对较小的雄性特异区域中发现了相当多的伴性共分离标记: 约 4.4 Mb 长度的区域共发现 225 个共分离标记, 而剩下的约 41 Mb 的区域中只发现了 117 个标记^[59]。这一差异表明 X 与 Y 同源染色体间在此区域存在高度的分化, 暗示着这是一段雄性特异区域。

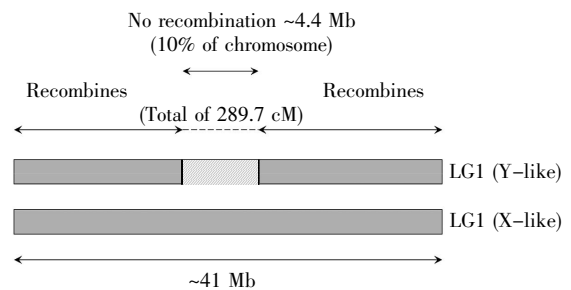


图2 番木瓜性染色体示意图(根据 Charlesworth^[59]的报道修改)

图示番木瓜性染色体的遗传图谱和物理图谱以及性别决定基因 LG1, 图中遗传图谱中间很小的一段为雄性特异性区域。

Fig.2 Schematic illustration of sex chromosomes of papaya (modified from Charlesworth^[59])

Genetic linkage map and physical map of papaya sex chromosomes and the sex determining gene LG1 are shown. Male-specific region is small in the genetic linkage map.

此外, Jamsari 等^[60]通过石刁柏的 F2 代构建了 Hind III 的 BAC 文库, 筛选出 9 对性别连锁的 AFLP 引物和 2 对 STS 引物, 其中在 Y 染色体上有 6 个性别连锁标记, 定位在 5 号染色体长臂的 4.6 cM 处。同样在石刁柏中, Nakayama 等^[61]发现了另一 AFLP 引物 Asp1-T7 spf, 其扩增产物为 308 bp 处的一段雄性特异片段。Agarwal 等^[62]使用引物合并的方法, 分别将 EcoRI-GC/MseI-GCG 以及 EcoRI-TAC/MseI-GCG 合并, 在希蒙得木中开发出 2 段雄性特异性标记, 分别为 525 bp 和 325 bp。还有一类非常特殊的标记, 仅存在于单一性别个体中。如在杜仲(*Eucommia ulmoides*)中发现的一段 350 bp 的 AFLP 标记, 在所有已检测的杜仲样本中, 仅存在于雄性个体中^[63]。总之, 上述标记的发现是性染色体进化和性别决定分子机制研究的重要基础。

AFLP 标记的技术和成本要求相对较高, 现代研究更倾向于将 AFLP 标记转换为更可靠且更具位点特异性的 SCAR 标记^[63]。在雌雄异株植物性别决定分析中, AFLP 已经成为不可缺少的一种技术。

2.3 SCAR 的应用

SCAR 标记是为了克服 RAPD 标记过于敏感的缺点而开发的, 可以将 RAPD 标记转换为更加可靠且稳定的标记。因此, 现在通常将 RAPD 标记和 AFLP 标记转换为 SCAR 标记以克服它们过于敏感或对技术和成本要求高的问题。

黄连木(*Pistacia chinensis*)是一种起源于中国的雌雄异株植物, 其性别发育早期很难通过外观辨别。Sun 等^[64]首先通过 21 对 RAPD 引物和 20 对 ISSR 引物发现了 2 对性别特异引物(S1 和 S281), 分别可以扩增出 473 bp 与 1 242 bp 雌性特异性片段。之后, 他们使用引物 S281-1 和 S281-2 成功将片段 S281 (FS281)转化为 SCAR 标记。在退火温度为 64 °C 时, 该 SCAR 标记可以扩增出一条 636 bp 的雌性特异性序列。目前, 关于雌雄异株植物性别连锁的 SCAR 标记已在许多物种中被报道, 如石刁柏^[55]、紫苜蓿(*Medicago sativa*)^[65]、番木瓜^[66, 67]、南蛇藤(*Celastrus orbiculatus* Thunb)^[68]、杜仲^[63]、阿月浑子(*Pistacia vera*)^[69]、日本桃叶珊瑚(*Aucuba japonica*)^[70]等。

SCAR 标记经过专门的序列设计, 在实验中变化较小, 具有很好的可重复性, 使用简单, 结果可靠, 适合多重 PCR 分析, 广泛应用于雌雄异株植物的性别鉴定等领域。

2.4 ISSR 的应用

ISSR 标记是一种基于微卫星(simple sequence repeat, SSR)丰度和高度可变性的 DNA 指纹技术。现已在细叶菖蒲(*Calamus tenuis*)和番木瓜中发现基于 ISSR 的雌性性别特异性标记^[71, 72]。而且, 雄性性别特异性 ISSR 标记在许多物种中也有报道, 如番木瓜^[72]、葎草(*Humulus japonicus*)^[73, 74]、希蒙得木^[75]、海枣(*Phoenix dactylifera*)^[76]、栝楼(*Trichosanthes dioica*)^[77]等。在栝楼中, 将雄性特异性 ISSR 片段 TdMSM (800 bp)转入一段序列标签标记 Td-STSM 中, 在所有雄性个体中都可以扩增出一段 720 bp 的片段, 这表明它与雄性性别决定紧密连锁^[77]。而且, 该研究还通过 Southern 印记法发现 TdMSM 可能位于染色体上与雄性特异相关的单拷贝位点处, 表明雌雄两性可能通过激活染色体

不同区域进行分化。

ISSR 技术简单、快速, 即使基因组中核酸组合较少, 在性别连锁标记研究中也相当有效。同时, 其还可以连锁编码区与非编码区^[6]。但是, ISSR 中内含子序列的性别特异性标记参与和影响性别决定的机制还有待进一步研究。

3 展望

目前, 被子植物雌雄异株的研究仅停留在利用分子标记查找并定位性别连锁基因阶段。而且, 对于已发现的许多相关的性别连锁标记或区域, 也只有部分应用于实践, 如植物雌雄异株的鉴定。可以看到, 尽管有许多学者通过对不同雌雄异株植物的研究发现, Y 染色体上重复序列与性别决定相关^[18-21]; RAPD 标记 *OPG-05* 和 ISSR 片段 TdMSM 为雄性特异^[52, 77]; 细叶菖蒲和番木瓜中存在 ISSR 雌性特异标记^[71, 72]。但有关被子植物雌雄异株分化的研究仍面临一系列问题, 比如: 如何通过已经掌握的分子标记与性别连锁区域揭示其性别决定机制; 如何找到直接的证据以阐明其原理。分子标记是研究被子植物性别分化过程中重要的一环, 但因为其只能揭示部分性别分化的遗传机制, 所以还需细胞生物学与生物化学相关研究的配合。因此, 对于雌雄异株出现的机制仍需进一步的研究。

参考文献(References):

- [1] Renner S S. Pathways for making unisexual flowers and unisexual plants: moving beyond the “two mutations linked on one chromosome” model[J]. American Journal of Botany, 2016, 103(4): 587-589.
- [2] Renner S S. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database[J]. American Journal of Botany, 2014, 101(10): 1588-1596.
- [3] Dufay M, Champelovier P, Kafer J, et al. An angiosperm-wide analysis of the gynodioecy-dioecy pathway[J]. Annals of Botany, 2014, 114(3): 539-548.
- [4] Boualem A, Troade C, Camps C, et al. A cucurbit androecy gene reveals how unisexual flowers develop and dioecy emerges[J]. Science, 2015, 350(6261): 688-691.
- [5] Barrett S C H, Hough J. Sexual dimorphism in flowering plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(1): 67-82.
- [6] Heikrujam M, Sharma K, Prasad M, et al. Review on different mechanisms of sex determination and sex-linked molecular markers in dioecious crops: a current update[J]. Euphytica, 2015, 201(2): 161-194.
- [7] Atak A, Aydin B, Abdurrahim Kahraman K. Sex determination of kiwifruit seedlings with molecular markers[J]. Acta Horticulturae, 2014, 1048: 197-203.
- [8] Ainsworth C, Rahman A, Parker J, et al. Intersex inflorescences of *Rumex acetosa* demonstrate that sex determination is unique to each flower[J]. The New Phytologist, 2005, 165(3): 711-720.

- [9] Pakull B, Groppe K, Mecucci F, *et al.* Genetic mapping of linkage group XIX and identification of sex-linked SSR markers in a *Populus tremula* × *Populus tremuloides* cross[J]. Canadian Journal of Forest Research, 2011, 41(2): 245–253.
- [10] Muyle A, Zemp N, Deschamps C, *et al.* Rapid *de novo* evolution of X chromosome dosage compensation in *Silene latifolia*, a plant with young sex chromosomes[J]. PLoS Biology, 2012, 10(4): e1001308.
- [11] Kumar S, Kumari R, Sharma V. Genetics of dioecy and causal sex chromosomes in plants[J]. Journal of Genetics, 2014, 93(1): 241–277.
- [12] Charlesworth D. Plant contributions to our understanding of sex chromosome evolution[J]. The New Phytologist, 2015, 208(1): 52–65.
- [13] Bergero R, Charlesworth D. Preservation of the Y transcriptome in a 10-million-year-old plant sex chromosome system[J]. Current Biology, 2011, 21(17): 1470–1474.
- [14] Vyskot B, Hobza R. The genomics of plant sex chromosomes[J]. Plant Science, 2015, 236: 126–135.
- [15] Moore R C, Kozyreva O, Lebel-Hardenack S, *et al.* Genetic and functional analysis of *DD44*, a sex-linked gene from the dioecious plant *Silene latifolia*, provides clues to early events in sex chromosome evolution[J]. Genetics, 2003, 163(1): 321–334.
- [16] Matsubara K, O'Meally D, Azad B, *et al.* Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in Sauropsida[J]. Chromosoma, 2016, 125(1): 111–123.
- [17] Fernanda Yano C, Bertollo L A C, Molina W, *et al.* Genomic organization of repetitive DNAs and its implications for male karyotype and the neo-Y chromosome differentiation in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae)[J]. Comparative Cytogenetics, 2014, 8(2): 139–151.
- [18] Steflova P, Hobza R, Vyskot B, *et al.* Strong accumulation of chloroplast DNA in the Y chromosomes of *Rumex acetosa* and *Silene latifolia*[J]. Cytogenetic and Genome Research, 2014, 142(1): 59–65.
- [19] Steflova P, Tokan V, Vogel I, *et al.* Contrasting patterns of transposable element and satellite distribution on sex chromosomes (XY₂) in the dioecious plant *Rumex acetosa*[J]. Genome Biology and Evolution, 2013, 5(4): 769–782.
- [20] Vanburen R, Ming R. Organelle DNA accumulation in the recently evolved papaya sex chromosomes[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2013, 288(5–6): 277–284.
- [21] Wang J, Na J K, Yu Q, *et al.* Sequencing papaya X and Y^h chromosomes reveals molecular basis of incipient sex chromosome evolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2012, 109(34): 13710–13715.
- [22] Li S, Zhang G, Yuan J, *et al.* Repetitive sequences and epigenetic modification: inseparable partners play important roles in the evolution of plant sex chromosomes[J]. Planta, 2016, 243(5): 1083–1095.
- [23] Ho H, Low J Z, Gudimella R, *et al.* Expression patterns of inflorescence- and sex-specific transcripts in male and female inflorescences of African oil palm (*Elaeis guineensis*)[J]. Annals of Applied Biology, 2016, 168(2): 274–289.
- [24] Deng C, Wang N, Li S, *et al.* Isolation of differentially expressed sex genes in garden asparagus using suppression subtractive hybridization[J]. Journal of Plant Research, 2015, 128(5): 829–838.
- [25] Bhowmick B K, Nanda S, Nayak S, *et al.* An APETALA3 MADS-box linked SCAR marker associated with male specific sex expression in *Coccinia grandis* (L). Voigt[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 176: 85–90.
- [26] Akagi T, Henry I M, Tao R, *et al.* A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons[J]. Science, 2014, 346(6209): 646–650.
- [27] Ainsworth C, Crossley S, Buchanan-Wollaston V, *et al.* Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression[J]. The Plant Cell, 1995, 7(10): 1583–1598.
- [28] Penny R H, Montgomery B R, Delph L F. X linkage of AP3A, a homolog of the Y-linked MADS-box gene *AP3Y* in *Silene latifolia* and *S. dioica*[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18972.
- [29] 周劲松, 汤泳萍, 盛文涛, 等. 芦笋性别决定与性别分化研究进展[J]. 植物遗传资源学报(Zhou Jin-song, Tang Yong-ping, Sheng Wen-tao, *et al.* Progress in research on sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L.[J]. Journal of Plant Genetic Resources), 2010, 11(5): 600–604.
- [30] Sather D N, Golenberg E M. Duplication of AP1 within the *Spinacia oleracea* L. *API/FUL* clade is followed by rapid amino acid and regulatory evolution[J]. Planta, 2009, 229(3): 507–521.
- [31] Masiero S, Colombo L, Grini P E, *et al.* The emerging importance of type I MADS box transcription factors for plant reproduction[J]. The Plant Cell, 2011, 23(3): 865–872.
- [32] Di Stilio V S, Kramer E M, Baum D A. Floral MADS box genes and homeotic gender dimorphism in *Thalictrum dioicum* (Ranunculaceae) – a new model for the study of dioecy[J]. The Plant Journal, 2005, 41(5): 755–766.
- [33] Cegan R, Marais G A, Kubekova H, *et al.* Structure and evolution of *Apeta3*, a sex-linked gene in *Silene latifolia*[J]. BioMed Central Plant Biology, 2010, 10: 180.
- [34] Aryal R, Ming R. Sex determination in flowering plants: papaya as a model system[J]. Plant Science, 2014, 217–218: 56–62.
- [35] 陈娟, 李春阳. 环境胁迫下雌雄异株植物的性别响应差异及竞争关系[J]. 应用与环境生物学报(Chen Juan, Li Chun-yang. Sex-specific responses to environmental stresses and sexual competition of dioecious plants[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology), 2014, 20(4): 743–750.
- [36] Adam H, Collin M, Richaud F, *et al.* Environmental regulation of sex determination in oil palm: current knowledge and insights from other species[J]. Annals of Botany, 2011, 108(8): 1529–1537.
- [37] Milewicz M, Sawicki J. Mechanisms of sex determination in plants[J]. Casopis Slezkeho Zemskeho Muzea (A), 2012, 61(2): 123–129.
- [38] Tuskan G A, Difazio S, Faivre-Rampant P, *et al.* The obscure events contributing to the evolution of an incipient sex chromosome in *Populus*: a retrospective working hypothesis[J]. Tree Genetics & Genomes, 2012, 8(3): 559–571.
- [39] Sun J J, Li F, Li X, *et al.* Why is ethylene involved in selective promotion of female flower development in cucumber?[J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(8): 1052–1056.
- [40] Mirouze M, Lieberman-Lazarovich M, Aversano R, *et al.* Loss of DNA methylation affects the recombination landscape in *Ara-bidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2012, 109(15): 5880–5885.
- [41] Fechter I, Hausmann L, Daum M, *et al.* Candidate genes within a 143 kb region of the flower sex locus in *Vitis*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2012, 287(3): 247–259.
- [42] Martin A, Troadec C, Boualem A, *et al.* A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon[J]. Nature, 2009, 461(7267): 1135–1138.
- [43] Boualem A, Fergany M, Fernandez R, *et al.* A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons[J]. Science, 2008, 321(5890): 836–838.
- [44] Oyama R K, Volz S M, Renner S S. A sex-linked SCAR marker in *Bryonia dioica* (Cucurbitaceae), a dioecious species with XY sex-determination and homomorphic sex chromosomes[J]. Journal of Evolutionary Biology, 2009, 22(1): 214–224.
- [45] Zhang Q, Liu C, Liu Y, *et al.* High-density interspecific genetic maps of kiwifruit and the identification of sex-specific markers[J]. DNA Research, 2015, 22(5): 367–375.
- [46] Spigler R B, Lewers K S, Main D S, *et al.* Genetic mapping of sex determination in a wild strawberry, *Fragaria virginiana*, reveals earliest form of sex chromosome[J]. Heredity, 2008, 101(6): 507–517.
- [47] Liu Z, Moore P H, Ma H, *et al.* A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution[J]. Nature, 2004, 427(6972): 348–352.

- [48] Patil C G, Baratakke R C, Sandigwad A M. Development of a RAPD-based SCAR marker for sex identification in *Momordica dioica* Roxb[J]. Israel Journal of Plant Sciences, 2012, 60(4): 457–465.
- [49] Samantaray S, Geetha K A, Hidayath K P, et al. Identification of RAPD markers linked to sex determination in guggal [*Commiphora wightii* (Arnott.) Bhandari][J]. Plant Biotechnology Reports, 2010, 4(1): 95–99.
- [50] Khadka D K, Nejidat A, Tal M, et al. DNA markers for sex: molecular evidence for gender dimorphism in dioecious *Mercurialis annua* L.[J]. Molecular Breeding, 2002, 9(4): 251–257.
- [51] Shirkot P, Sharma D R, Mohapatra T. Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* by RAPD markers[J]. Scientia Horticulturae, 2002, 94(1–2): 33–39.
- [52] Agrawal V, Sharma K, Gupta S, et al. Identification of sex in *Simmondsia chinensis* (Jjoba) using RAPD markers[J]. Plant Biotechnology Reports, 2007, 1(4): 207–210.
- [53] Samantaray S, Phurailatpam A, Bishoyi A K, et al. Identification of sex-specific DNA markers in betel vine (*Piper betle* L.)(J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2012, 59(5): 645–653.
- [54] Parasnis A S, Gupta V S, Tamhankar S A, et al. A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings[J]. Molecular Breeding, 2000, 6(3): 337–344.
- [55] Gao W, Li R, Li S, et al. Identification of two markers linked to the sex locus in dioecious *Asparagus officinalis* plants[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2007, 54(6): 816–821.
- [56] Jones N, Ougham H, Thomas H, et al. Markers and mapping revisited: finding your gene[J]. The New Phytologist, 2009, 183(4): 935–966.
- [57] Mohasseb H A, El-Bahr M K, Adam Z M, et al. In vitro clonal propagation of jjoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schn.)(J]. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2009, 3(4): 3128–3136.
- [58] Marais G A, Nicolas M, Bergero R, et al. Evidence for degeneration of the Y chromosome in the dioecious plant *Silene latifolia*[J]. Current Biology, 2008, 18(7): 545–549.
- [59] Charlesworth D. Plant evolution: modern sex chromosomes[J]. Current Biology, 2004, 14(7): R271–R273.
- [60] Jamsari A, Nitz I, Reamon-B Tner S M, et al. BAC-derived diagnostic markers for sex determination in asparagus[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(6): 1140–1146.
- [61] Nakayama H, Ito T, Hayashi Y, et al. Development of sex-linked primers in garden asparagus (*Asparagus officinalis* L.)(J]. Breeding Science, 2006, 56(3): 327–330.
- [62] Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Development of sex-linked AFLP markers in *Simmondsia chinensis*[J]. Plant Breeding, 2011, 130(1): 114–116.
- [63] Wang D W, Li Y, Li Z Q. Identification of a male-specific amplified fragment length polymorphism (AFLP) and a sequence characterized amplified region (SCAR) marker in *Eucommia ulmoides* Oliv. (J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(1): 857–864.
- [64] Sun Q, Yang X, Li R. SCAR marker for sex identification of *Pistacia chinensis* Bunge (Anacardiaceae)[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(1): 1395–1401.
- [65] Wang Y, Bi B, Yuan Q H, et al. Association of AFLP and SCAR markers with common leafspot resistance in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa*)[J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(1): 606–616.
- [66] Rukam T S, Parakhia M V, Rathod V M, et al. Development of inter simple sequence repeat based SCAR marker for sex determination in *Carica papaya*[J]. Research Journal of Biotechnology, 2015, 10(12): 91–97.
- [67] Chaturvedi K, Bommisetty P, Pattanaik A, et al. PCR detection assay for sex determination in papaya using SCAR marker[J]. Acta Botanica Croatica, 2014, 73(2): 291–298.
- [68] 魏丽娟, 张娟, 刘林德, 等. 南蛇藤雌性性别相关的 RAPD 和 SCAR 标记[J]. 植物研究(Wei Li-juan, Zhang Juan, Liu Linde, et al. Female-specific RAPD and SCAR markers in *Celastrus orbiculatus*)[J]. Bulletin of Botanical Research, 2014, 34(5): 687–693.
- [69] Esfandiyari B, Davarynejad G H, Shahriari F, et al. Data to the sex determination in *Pistacia* species using molecular markers[J]. Euphytica, 2012, 185(2): 227–231.
- [70] Maki M. Development of SCAR markers for sex determination in the dioecious shrub *Aucuba japonica* (Cornaceae)[J]. Genome, 2009, 52(3): 231–237.
- [71] Sarmah P, Sarma R N. Identification of a DNA marker linked to sex determination in *Calamus tenuis* Roxb., an economically important rattan species in northeast India[J]. Molecular Breeding, 2011, 27(1): 115–118.
- [72] Da Costa F R, Santana Pereira T N, Candido Gabriel A P, et al. ISSR markers for genetic relationships in Caricaceae and sex differentiation in papaya[J]. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 2011, 11(4): 352–357.
- [73] Aleksandrov O S, Divashuk M G, Karlov G I. Development of a sex-specific molecular marker for Japanese hop *Humulus Japonicus* Siebold & Zucc[J]. Russian Journal of Genetics, 2011, 47(8): 1016–1020.
- [74] 高武军, 沙涛, 姬艳克, 等. 蕲草雄性连锁的 ISSR 标记克隆及 SCAR 标记的建立[J]. 热带亚热带植物学报(Gao Wu-jun, Sha Tao, Ji Yan-ke, et al. Clone and development of ISSR and SCAR markers linked to male *Humulus scandens* L.)(J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2010, 18(3): 283–287.
- [75] Heikrujam M, Sharma K, Kumar J, et al. Validation of male sex-specific UBC-807(1200) ISSR marker and its conversion into sequence tagged sites marker in Jjoba: a high precision oil yielding dioecious shrub[J]. Plant Breeding, 2014, 133(5): 666–671.
- [76] Younis R A A, Ismail O M, Soliman S S. Identification of sex-specific DNA markers for date palm using RAPD and ISSR techniques[J]. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2008, 4(4): 278–284.
- [77] Nanda S, Kar B, Nayak S, et al. Development of an ISSR based STS marker for sex identification in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.)(J]. Scientia Horticulturae, 2013, 150: 11–15.