

文章编号:1003-8701(2008)06-0025-05

# 大肠杆菌 Top10Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体 A 基因的克隆及生物信息学分析

麻鹏达,周磊,李毅丹,谭化,刘艳芝\*

(吉林省农业科学院生物技术中心,长春 130033)

**摘要:**根据细菌中存在的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体(Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter A, *nhaA*)的基因序列,采用 PCR 扩增的方法从大肠杆菌(*Escherichia coli*)Top10 中克隆到了 *nhaA* 基因(Accession Number: EU368045)。*nhaA* 开放阅读框为 1 167 bp,编码含有 388 个氨基酸残基,分子量为 41.3 kDa 的蛋白,预测等电点为 9.23。*nhaA* 含有 25 个碱性氨基酸,19 个酸性氨基酸,211 个疏水氨基酸及 63 个极性氨基酸。二级结构预测表明,该蛋白含约 50%的  $\alpha$ -螺旋、18%的延伸链、7%的  $\beta$ -转角和 25%的不规则卷曲。亲疏水性分析显示,*nhaA* 是疏水性蛋白。跨膜结构进行分析显示该蛋白含有 11 个跨膜区域。序列分析表明,大肠杆菌 Top10 *nhaA* 基因与大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌 HS、大肠杆菌 SECEC SMS-3-5 和大肠杆菌 CFT073 的 *nhaA* 基因同源性分别为 100%、98%、95%和 92%。大肠杆菌 Top10 *nhaA* 基因的克隆及生物信息学分析为今后对 *nhaA* 的进一步深入研究奠定了基础。

**关键词:**大肠杆菌 Top10; Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体基因;基因克隆;生物信息学分析

中图分类号:Q785

文献标识码:A

## Molecular Cloning and Bioinformatics Analysis of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter A Gene in *Escherichia coli* Top10

MA Peng-da, ZHOU Lei, LI Yi-dan, TAN Hua, LIU Yan-zhi\*

(Biotechnology Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033, China)

**Abstract:** *nhaA* (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter A) was cloned from *Escherichia coli* Top10 by PCR, with primers designed according to public *nhaA* sequences. The open reading frame of *nhaA* gene has 1167 bp in length and encodes a protein of 388 amino acid residues. The estimated molecular weight and isoelectric point of the putative protein were 41.3 kDa and 9.23, respectively. Components of amino acids encoded *nhaA* contained 25 basic amino acids, 19 acidic amino acids, 211 hydrophobic amino acids and 63 polar amino acids. The predicted secondary structure of the protein had about 50% alpha helices, 18% extended strand, 7% beta turn and 25% random coil. Hydrophobic analysis indicated that *nhaA* was a hydrophobic protein. *nhaA* contained 11 transmembrane segments. It shared 100%, 98%, 95% and 92% homologies in DNA sequence level with *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* HS, *E. coli* SECEC SMS-3-5 and *E. coli* CFT073, respectively. Molecular cloning and bioinformatics analysis of *nhaA* in *Escherichia coli* Top10 will be helpful for the further analysis of *nhaA*.

**Key words:** *Escherichia coli* Top10; Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter A gene; Gene clone; Bioinformatics analysis

收稿日期:2008-05-06

基金项目:本研究由抗逆聚合表达载体的构建及在模式植物中功能验证(20060548)项目资助

作者简介:麻鹏达(1979-),博士,助理研究员,主要从事植物分子生物学与基因工程研究。

通讯作者:刘艳芝,副研究员,Email: liuyz\_g@yahoo.com.cn

全球约 20%的耕作土地和几乎半数的可灌溉土地受到盐渍化的影响<sup>[1]</sup>,我国约有盐碱化和次生盐碱化土地 4 000 万 hm<sup>2</sup>,成为我国农业发展的主要限制因素<sup>[2]</sup>。盐胁迫对植物主要表现为两方面的伤害:渗透胁迫效应和离子胁迫效应。在盐胁迫的逆境条件下,植物体的光合、呼吸、蒸腾、吸收

和代谢等生命活动都会受到不同程度的干扰<sup>[3]</sup>。

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体广泛分布在细菌、动物和植物的细胞膜中。Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体在植物抵抗盐胁迫中起重要作用，细胞内过多的 Na<sup>+</sup> 从质膜向细胞外排放和 Na<sup>+</sup> 在液泡中的区域化分别是由位于质膜和液泡膜上的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体完成的<sup>[4-5]</sup>。研究表明，大肠杆菌中有两种基因编码了 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体，分别为 *nhaA* 和 *nhaB*<sup>[6-7]</sup>，这两种基因的产物对大肠杆菌的耐盐性是非常重要的。

本文运用 PCR 技术从大肠杆菌 Top10 菌株基因组中扩增出 *nhaA* 基因片段，并对其进行了生物信息学分析，对于了解 *nhaA* 基因的结构与功能，以及进一步了解该类基因在耐盐作用机理具有重要意义。同时为利用细菌耐盐基因来改良作物性状，培育耐盐作物新品种提供了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  和 Top10 菌株为本实验室保存菌种。PCR 产物回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。pMD18-T 载体、DNA marker 和限制性内切酶、ExTaq 酶均购自 Takara 公司。

### 1.2 *nhaA* 基因的克隆

大肠杆菌 DNA 的提取依据文献[8]进行。根据已报道的大肠杆菌 *nhaA* 基因 (AY449719)，设计 PCR 引物序列为：

P1: 5′-GTGAAACATCTGCATCGATTCTTTA  
GCAG-3′

P2: 5′-TCAAACGTGATGGACGCAAACGAAC  
GCC-3′

依照 TaKaRa Ex Taq 操作指南进行，扩增参数：94℃ 5 min，94℃ 45 s，55℃ 45 s，72℃ 1 min，30 个循环，72℃ 10 min，反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。按照上海生工生物工程有限公司凝胶回收试剂盒说明书进行 PCR 产物的回收。回收获得的 *nhaA* 基因片段与 pMD18-T 载体在 T4 DNA 连接酶的作用下 16℃ 过夜，使 *nhaA* 基因连接到 pMD18-T 的载体上，转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。对构建的质粒 pMD18-T/*nhaA* 进行小量提取，提取后的质粒用 HindⅢ、EcoRI 双酶切进行鉴定，酶切反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。对鉴定为阳性的克隆委托上海生工生物

工程有限公司进行测序。

### 1.3 *nhaA* 基因的生物信息学分析

应用 DNASTar7.0 软件对 *nhaA* 基因编码蛋白质的理化性质进行分析；应用 ProtScale 和 SOPMA 预测其编码蛋白的二级结构；应用 Motif-Scan 和 ScanProsite 分析 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白序列中的基序和结构域；应用 PSORT、SOSUI、SignalP3.0 和 Swiss-Model 等程序对 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体亚细胞定位、跨膜区、信号肽及三维结构等进行预测；应用 Blast 在线工具和 DNAMAN6.0 软件进行核苷酸序列的同源性比对；应用 Clustal X 和 Treeview 软件构建分子进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠杆菌 Top10 *nhaA* 基因的克隆

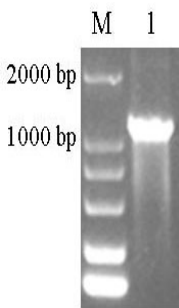


图 1 PCR 扩增产物电泳图谱  
M,Marker DL2000 ;1,PCR 产物

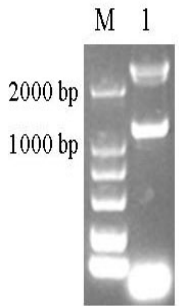


图 2 重组质粒酶切分析结果  
M,MarkerDL2000 ;1,pMD18-T/*nhaA* HindⅢ和 EcoRI 酶切

以 *nhaA* 基因序列设计的 PCR 引物，对提取的大肠杆菌基因组 DNA 进行扩增，扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定(图 1)，可见一条约 1 100 bp 的条带，与预计的 *nhaA* 基因片段 1 167 bp 大小一致。PCR 扩增的 *nhaA* 基因片段，回收后与测序载体 pMD18-T 连接，构建形成重组质粒 pMD18-T/*nhaA*。重组质粒用 HindⅢ和 EcoR 酶切，琼脂糖凝胶电泳显示出酶切获得的约 1 100 bp 的 DNA 片段(图 2)，与连接的 *nhaA* 基因片段

大小相同 ,证明构建的正确性。对 pMD18- T/*nhaA* 重组质粒送上海生工测序 , 测序结果已在国际基因库(GenBank)申请 ,接受号为 EU368045。

2.2 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白理化性质分析

应用 DNASTar7.0 软件对 *nhaA* 基因编码蛋白质的理化性质进行分析 , 发现该基因包含全编码区 , 编码 388 个氨基酸序列。对所推测氨基酸序列进行分析表明 ,该蛋白分子量为 41.3kDa ,等电点为 9.23 ,pH7.0 时的电荷为 7.16 ;碱性氨基酸 (K、R)25 个 ;酸性氨基酸(D、E)19 个 ;疏水氨基酸 (A、I、F、W、V)211 个 ; 极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y)63 个。

2.3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白二级结构预测

通过 SOPMA 预测大肠杆菌 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白的二级结构(图 3) ,表明该蛋白含约 50%的  $\alpha$ -螺旋、18%的延伸链、7%的  $\beta$ -转角和 25%的不规则卷曲。根据 Ausubel<sup>[9]</sup>的理论(蛋白质或蛋白结构域分为以下几类 :全  $\alpha$  型蛋白 ,%H>45%且%E<5% ;全  $\beta$  型蛋白 ,%H<5%且%E>45% ; $\alpha$ - $\beta$  型蛋白 ,%H>30%且%E>20% ;其他为混合型蛋白) , Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白为混合型蛋白。

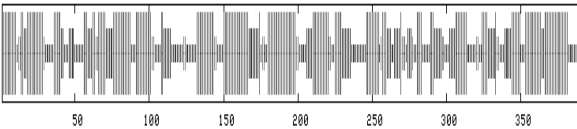


图 3 大肠杆菌 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白二级结构的预测

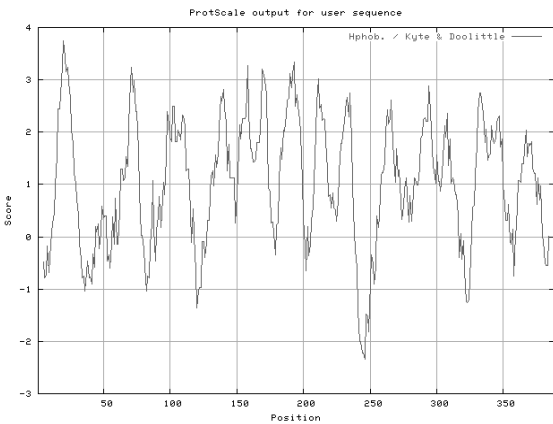


图 4 大肠杆菌 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白疏水性 / 亲水性的预测

用 ProtScale 预测大肠杆菌 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白氨基酸序列的疏水性 / 亲水性的结果 (图 4)表明 ,多肽链第 246 位的丝氨酸(Ser)具有最低的分值 -2.333 ,第 20 位的异亮氨酸(Ile)具有最高的分值 3.744。依据氨基酸分值越低亲水性越强

和分值越高疏水性越强(参考软件 ProtScale)的规律 ,可以看出 ,在第 246 位的 Ser 亲水性最强 ,第 20 位的 Ile 疏水性最强 ,而就整体来看 ,疏水性氨基酸均匀分布在整個肽链中 ,且多于亲水性氨基酸。因此 ,整个多肽链表现为疏水性 ,没有明显的亲水区域 ,可认为大肠杆菌 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白是疏水性蛋白 ,说明该逆转运蛋白符合膜蛋白的特征。

利用 MotifScan 和 ScanProsite 分析发现 , Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白中共有 8 个 N- 豆蔻酰化位点 ,1 个亮氨酸拉链结构 ,1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(表 1)。

表 1 利用 MotifScan 和 ScanProsite 对 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白功能域的预测

| 功能域信息        | 相匹配的氨基酸序列区                                                  |
|--------------|-------------------------------------------------------------|
| N- 豆蔻酰化位点    | 32-37,86-91,201-206,223-228,230-235,291-296,332-337,364-369 |
| 亮氨酸拉链结构      | 53-74                                                       |
| 蛋白激酶 C 磷酸化位点 | 90-92                                                       |

2.4 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白跨膜区和信号肽的预测

运用 SOSUI 软件对大肠杆菌 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白跨膜结构进行分析 , 结果显示该蛋白含有 11 个跨膜区域 , 其中 8 个初级螺旋 ,3 个二级螺旋(图 5)。

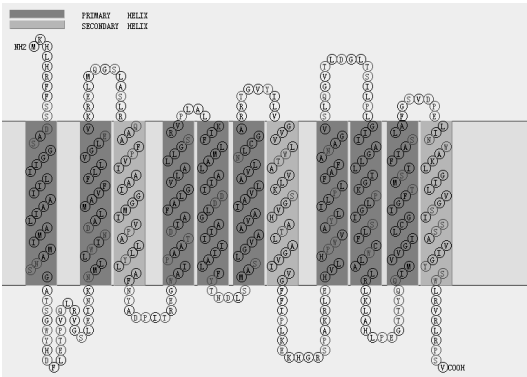


图 5 用 SOSUI 预测 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白的跨膜区域

通过 SignalP3.0 分析结果显示 , 该蛋白和绝大多数 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体一样 , 存在信号肽序列 ,信号肽切割位点位于 31 ~ 32(NN)或 33 ~ 34 (HMM)。

2.5 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白亚细胞定位及三级结构预测

PSORT 预测结果显示 ,Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向运输体蛋白的亚细胞定位可能性如下 :Cytoplasmic 0、Cytoplasmic Membrane 10、Periplasmic 0、Outer Membrane 0、Extracellular 0。说明该蛋白定位于细胞质膜上。

利用 Swiss-Model 数据库预测该蛋白的三级结构,结果如图 6 所示。



图 6  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向运输体蛋白三级结构的预测结果

## 2.6 同源比对与系统树构建

```

E.coli Top10 GTGPAACATCGCATCGATCTTTTGCAGTGAT GCTCGG 40
E.coli DH5a GTGPAACATCGCATCGATCTTTTGCAGTGAT GCTCGG 40
E.coli HS GTGPAACATCGCATCGATCTTTTGCAGTGAT GCTCGG 40
E.coli SECEC GTGPAACATCGCATCGATCTTTTGCAGTGAT GCTCGG 40
E.coli CFT073 GTGPAACATCGCATCGATCTTTTGCAGTGAT GCTCGG 40
Consensus GTGPAACATCGCATCGATCTTTTGCAGTGAT GCTCGG
E.coli Top10 GAGGATTATTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT 80
E.coli DH5a GAGGATTATTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT 80
E.coli HS GAGGATTATTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT 80
E.coli SECEC GAGGATTATTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT 80
E.coli CFT073 GAGGATTATTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT 80
Consensus GAGGATTATTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT
E.coli Top10 TATGCGCAATGCGCGGCAACACAGTGGAT GGTATACGAC 120
E.coli DH5a TATGCGCAATGCGCGGCAACACAGTGGAT GGTATACGAC 120
E.coli HS TATGCGCAATGCGCGGCAACACAGTGGAT GGTATACGAC 120
E.coli SECEC TATGCGCAATGCGCGGCAACACAGTGGAT GGTATACGAC 120
E.coli CFT073 TATGCGCAATGCGCGGCAACACAGTGGAT GGTATACGAC 120
Consensus TATGCGCAATGCGCGGCAACACAGTGGAT GGTATACGAC
E.coli Top10 TTTTCTGAGACCGCGGTTTCAGCTCGGGT TGGTTACTTTC 160
E.coli DH5a TTTTCTGAGACCGCGGTTTCAGCTCGGGT TGGTTACTTTC 160
E.coli HS TTTTCTGAGACCGCGGTTTCAGCTCGGGT TGGTTACTTTC 160
E.coli SECEC TTTTCTGAGACCGCGGTTTCAGCTCGGGT TGGTTACTTTC 160
E.coli CFT073 TTTTCTGAGACCGCGGTTTCAGCTCGGGT TGGTTACTTTC 160
Consensus TTTTCTGAGACCGCGGTTTCAGCTCGGGT TGGTTACTTTC
E.coli Top10 TATCAACATGACATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 200
E.coli DH5a TATCAACATGACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 200
E.coli HS TATCAACATGACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 200
E.coli SECEC TATCAACATGACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 200
E.coli CFT073 TATCAACATGACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 200
Consensus TATCAACATGACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
E.coli Top10 GATGCGGTTATTTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT 240
E.coli DH5a GATGCGGTTATTTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT 240
E.coli HS GATGCGGTTATTTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT 240
E.coli SECEC GATGCGGTTATTTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT 240
E.coli CFT073 GATGCGGTTATTTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT 240
Consensus GATGCGGTTATTTTCTTATTTGCGGTTATTTGCGATGAT

```

图 7  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向运输体基因的同源性比较

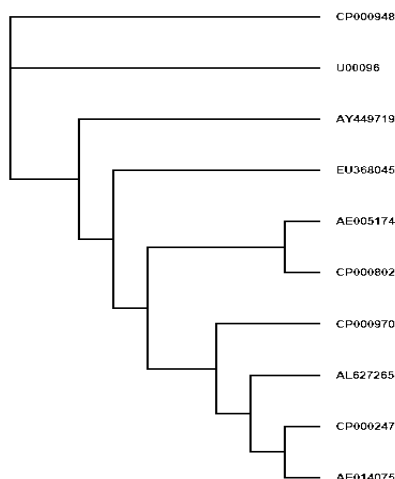


图 8 *nhaA* 的进化树分析

(CP000948 *E.coli* DH10B U00096 *E. coli* str. K-12 AY449719 *E. coli* DH5alpha EU368045 *E. coli* Top10 AE005174 *E. coli* O157:H7 EDL933; CP000802 *E. coli* HS CP000970 *E. coli* SECEC SMS-3-5; AL627265, *Salmonella enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) CT18 CP000247 *E. coli* 536 AE014075 *E. coli* CFT073)

用 DNAMAN6.0 对 *E.coli* Top10 *nhaA* 基因与 *E.coli* DH5α *E. coli* HS *E. coli* SECEC SMS-3-5 和 *E.coli* CFT073 的 *nhaA* 基因进行同源性分析,结果如图 7 所示。其同源性分别为 100%、98%、95% 和 92%,表明所克隆的 cDNA 为 *nhaA* 基因,测定序列包含了 *nhaA* 基因完整的读码框架。

利用 TreeView 软件对来自 *nhaA* 基因进行分子聚类分析,构建 *nhaA* 基因的进化树(图 8)。进化树分析表明: *E.coli* Top10 *nhaA* 基因与 *E.coli* HS 亲缘关系较近,而与 *E.coli* DH10B 亲缘关系较远。序列比对结果以及进化树分析都表明 *nhaA* 应为编码大肠杆菌质膜上的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向运输体蛋白一类的基因。

## 3 讨论

耐盐性是一个复杂的性状,是多基因相互作用的结果。然而有研究表明,转单一的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向运输体蛋白基因能够明显地提高作物的耐盐性<sup>[10-11]</sup>,其原因可能是  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向运输体蛋白基因转化进入植物细胞后激活了一系列与耐盐相关的基因,从而明显地提高了植物耐盐性。因此,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向运输体蛋白对耐盐性的研究具有重要的意义。本研究采用 PCR 的方法从大肠杆菌 Top10 中克隆了 *nhaA* 基因。*nhaA* 开放阅读框为 1 167 bp,编码含有 388 个氨基酸残基,分子量为 41.3 kDa 的蛋白,预测等电点为 9.23。*nhaA* 含有 25 个碱性氨基酸、19 个酸性氨基酸、211 个疏水氨基酸及 63 个极性氨基酸。二级结构预测表明,该蛋白含约 50% 的  $\alpha$ -螺旋、18% 的延伸链、7% 的  $\beta$ -转角和 25% 的不规则卷曲。亲疏水性分析显示, *nhaA* 是疏水性蛋白。跨膜结构进行分析显示该蛋白含有 11 个跨膜区域。序列分析表明大肠杆菌 Top10 *nhaA* 基因与大肠杆菌 DH5α、大肠杆菌 HS、大肠杆菌 SECEC SMS-3-5 和大肠杆菌 CFT073 的 *nhaA* 基因同源性分别为 100%、98%、95% 和 92%。该研究为进一步研究细菌的耐盐机制,以及为利用该基因改良农作物品种方面奠定了理论基础。

## 参考文献:

- [1] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2001, 6 (2): 66-71.
- [2] 赵可夫,李法曾. 中国盐生植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 1, 311.
- [3] Munns R, Terrnaat A. Whole plant response to salinity[J].

Australian Journal of Plant Physiology, 1986, (13): 143-160 .

[4] Blumwald E, Poole R J. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of Beta Vulgaris [J]. Plant Physiol, 1985(78): 163-167 .

[5] Rausch T, Kirsch M, Lrw R, et al.Salt stress responses of higher plants: the role of proton pumps and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter [J]. Plant Physiol, 1996(148): 425-433 .

[6] Barkla B J, Pantoja O. Physiology of ion transport across and tonoplast of higher plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996(47): 159-184 .

[7] Pinner E, Padan E, Schuldiner S. Cloning, sequencing, and expression of the nhaB gene, encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in Escherichia coli[J]. J Biol Chem, 1992(267): 11064-11068 .

[8] Taglicht D, Padan E, Schuldiner S. Overproduction and purification of a functional Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter coded by nhaA (ant) from Escherichia coli[J]. J Biol Chem, 1991(266): 11289-11294 .

[9] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al . Current protocol in molecular biology[M], Greene Publishing/Wiley Inter-science, New York, N.Y :1990 .

[10]Burkhard R. Predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks [J].Methods Enzymol, 1996 (266): 525 - 539 .

[11]Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerance tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit [J]. Nat Biotechnol, 2001(19): 765-768 .

[12]Porat R, Pavoncello D, Hayyim G B. A heat treatment induced the expression of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport gene (cNHX1) in citrus fruit[J]. Plant Science, 2002(162): 957-963 .

(上接第 19 页)

### 3.3 抗病性

2005 ~ 2006 年经白城市植保站田间鉴定结果表明 :洮葵 1 号高抗褐斑病 ,抗菌核病。

## 4 栽培技术要点

### 4.1 选地

洮葵 1 号具有抗旱、耐瘠薄的特点 ,对茬口要求不严格 ,一般地块均可种植 ,但避免重茬、迎茬 ,低洼易涝地块也不宜种植 ,上茬施过杀双子叶杂草除草剂的地块不能种植。

### 4.2 整地、施肥

洮葵 1 号根系较发达 ,播种前深翻地 20 ~ 25 cm ,结合翻地每公顷施入农家肥 30 000 ~ 40 000 kg。播种时施种肥葵花专用肥 200 kg/hm<sup>2</sup> ,条施、穴施 ,提高肥料的利用率。害虫较多的地块 ,可结合翻、耙地施入辛硫磷乳油毒土防治地下害虫。

### 4.3 播种

大田最早播种必须在 10 cm 土层连续 5 d 稳定通过 10℃后方可播种 ,但各地区要因地制宜调整好播种期 ,使开花授粉期避开雨季。吉林省最适播种期为 6 月 1 ~ 15 日 ,辽宁最适的播种期在 6 月 10 ~ 25 日。

### 4.4 种植密度

肥沃地块每公顷保苗 18 000 ~ 20 000 株 ,贫瘠地块每公顷保苗 22 000 ~ 24 000 株。采用垄上开沟点播的方式播种 ,覆土 4 ~ 6 cm ,稍晾后镇压保墒。

### 4.5 中耕除草

在苗期应中耕 2~3 次 ,一对真叶期间苗 ,二对真叶期定苗 ,实行早铲早趟 ,最后一次中耕应深培土 ,防止倒伏。

### 4.6 灌水

向日葵抗旱、耐盐碱 ,但关键时期缺水会造成大幅度减产 ,特别是现蕾至开花期如天气干旱应及时灌水 ,有条件的地块应在现蕾期、开花期、灌浆期灌 3 次水更好。

### 4.7 病虫害防治

主要通过秋耕深翻、轮作和调整播种期等农业措施减轻病虫害。结合化学方法进行防治 播种时可用霜霉灵、甲虫灵等拌种防治霜霉病、黄萎病。苗期发现地老虎等地下害虫 ,可用敌敌畏乳油喷施或 90%晶体敌百虫拌谷糠制成毒饵撒施于田间。

### 4.8 授粉与收获

向日葵是虫媒异花授粉作物 ,主要以蜜蜂传粉为主 ,开花授粉时为保证充分传粉结实 ,每公顷生产田最好有 1 ~ 2 箱蜂源 ,或进行 2 ~ 3 次人工辅助授粉 ,以提高结实率。当茎秆、花盘背部变黄、叶片衰老、籽粒外壳变硬时 ,及时收获和晾晒 ,防止霉变和鸟鼠害。

## 5 适应地区

根据试验示范结果 ,洮葵 1 号主要适应吉林省各个产区及内蒙、黑龙江、辽宁等地区种植。

### 参考文献 :

[1] 梁一刚 . 向日葵优质高产栽培法 [M] . 北京 : 金盾出版社 , 1992 .

[2] 陈佳琴 , 黄建斌 , 覃兰英 . 向日葵品种比较试验 [J] . 耕作与栽培 , 2007(2) : 34 .

[3] 雷中华 , 向理军 , 石必显 . 向日葵 9 个主要性状之间的相互关系分析 [J] . 新疆农业科学 , 2006 , 43(S1) : 31-33 .

[4] 郑洪源 , 王文浩 , 刘文俊 , 等 . 大粒食用葵晋葵 7 号新品种选育及产业化 [J] . 陕西农业科学 , 2007(4) : 45-47 .