

# 猕猴桃性别分子标记在软枣猕猴桃中的通用性验证

郭丹丹<sup>1</sup>, 钟云鹏<sup>1</sup>, 方金豹<sup>1</sup>, 黄武权<sup>2</sup>, 任建杰<sup>2</sup>, 齐秀娟<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院郑州果树研究所·中国农业科学院果树生长发育与品质控制重点开放实验室, 郑州 450009;

<sup>2</sup>浙江省绍兴市上虞区农业技术推广中心, 浙江绍兴 312300)

**摘要:**【目的】猕猴桃是功能性的雌雄异株植物, 在育种过程中进行实生苗早期性别鉴定研究具有重要意义。目前已有关于猕猴桃属植物早期性别鉴定分子标记开发的报道, 用于特定种群实生苗童期的性别鉴定。验证这些标记在其他来源种质资源中的通用性可扩大这些标记在猕猴桃属植物中的应用范围。【方法】利用已知性别的64份软枣猕猴桃材料, 采用普通PCR扩增的方法以及聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对已报道的两组猕猴桃性别分子标记A001、A002和A003, SmX和SmY1的通用性进行检验。【结果】(1) A001和A002在软枣猕猴桃中均能扩增出多态性片段, 且条带清晰明亮, 但未出现性别特异片段;(2) A003的PCR扩增结果凝胶图像中, 没有清晰的片段出现;(3) 在对已知性别的软枣猕猴桃资源的验证试验中, SmX的扩增结果图片显示, 所扩增的条带未表现出雌雄特异性, 准确率很低, 且条带微弱;(4) SmY1在软枣猕猴桃中能够扩增出多态性片段, 但未出现性别特异的片段。【结论】在本研究所用的软枣猕猴桃种质资源中, 两组标记均未表现出良好的通用性, 其性别扩增结果的雌雄鉴别率很低, 甚至不能扩增出清晰的片段, 故不能用于本研究所用软枣猕猴桃种质资源的性别鉴定。

**关键词:** 软枣猕猴桃; 性别标记通用性; SCAR; SSR

中图分类号: S663.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2019)05-0549-08

## Validation of kiwifruit sex molecular markers in *Actinidia arguta*

GUO Dandan<sup>1</sup>, ZHONG Yunpeng<sup>1</sup>, FANG Jinbao<sup>1</sup>, HUANG Wuquan<sup>2</sup>, REN Jianjie<sup>2</sup>, QI Xiujuan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory for Fruit Tree Growth, Development and Quality Control of CAAS, Zhengzhou 450009, Henan, China; <sup>2</sup>Agricultural Technology Extension Center of Shangyu District, Shaoxing 312300, Zhejiang, China)

**Abstract:** 【Objective】The kiwifruit varieties currently cultivated and grown mainly come from *Actinidia chinensis* Planch. In the production, *Actinidia arguta* (kiwiberry) is a new type of kiwifruit and it develops rapidly and becomes more and more popular among consumers in recent years. *Actinidia arguta* has begun to receive extensive attention in the kiwifruit community. Kiwifruit is a functional dioecious plant, and its sex differentiation is controlled by sex-determining genes, which are located in a pair of chromosomes like the XY/XX system with the Y chromosome specific in male individuals. Gender differentiation is independent of plant ploidy level. Generally, the juvenility of kiwifruit plant is about 5-7 years. Due to the complicated genetic background, male individuals of the seed offspring seem to be more than the female ones. However, the male and female individuals of kiwifruit seedlings are difficult to distinguish by the morphological features in the juvenile phase. At present, there have been some reports about the development of molecular markers for sex identification in kiwifruit, but these markers are effective only in *A. chinensis* Planch. or the restricted hybrid progeny. The versatility of the reported markers in the sex identification of *A. arguta* is still unclear. Some researches on the sex identification of *A. arguta* have been reported although its accuracy is still not satisfactory for the commercial use. 【Methods】We chose two sets of reported molecular markers: SSR markers A001, A002

收稿日期: 2018-12-20

接受日期: 2019-03-14

基金项目: 国家自然科学基金(31401825); 中国农业科学院郑州果树研究所基本科研业务费(1610192016204)

作者简介: 郭丹丹, 在读硕士研究生。研究方向为猕猴桃遗传育种。Tel: 18339913502, E-mail: 18339913502@163.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13903865864, E-mail: qixiujuan@caas.cn

and A003, and SCAR markers SmX and SmY1, and we randomly selected 64 accessions of *A. arguta*, whose genders were already known as research materials. Young leaves were taken from the healthy annual branches of mature *A. arguta* plants of similar age for genome DNA extraction. The accuracy of each marker was validated by ordinary PCR technique. we set 8 annealing temperature gradients to screen the appreciate system of each pair of primer before all the *A. arguta* materials were tested. To make sure that the results of PCR experiments are reliable, the validation experiments of each molecular marker were repeated at least three times. 【Results】The results showed that: (1) The three SSR markers, A001, A002 and A003, performed differently in *A. arguta* samples. There were polymorphic fragments amplified by A001 and A002 in the products of the *A. arguta* samples, but result pictures did not showed gender specificity. Marker A003 did not amplify polymorphic fragments in *A. arguta*. (2) When SmY1 was tested in the samples of *A. arguta*, there were some polymorphic fragments amplified, but the fragments showed in the pictures were irregular and they had no any difference between the males and the females; (3) when SmX was identified in *A. arguta* samples, there was no polymorphic fragment while the DNA ladder presented a clear image. 【Conclusion】The above results indicated that, in *A. arguta*, the two sets of molecular markers could not be used for sex identification of this species. Because of the complicated genetic background of kiwifruit, the reason of the result is still vague and worthy of further investigation. The author speculated that the position or sequence of the sex-specific region of *A. arguta* might be different from that of *A. chinensis* Planch.

**Key words:** *Actinidia arguta*; Sex-identification marker; SCAR; SSR

世界猕猴桃产业的发展起源于20世纪初,而我国猕猴桃产业发展始于上世纪70年代末期。早期生产上栽培种植的品种主要来自于中华猕猴桃复合体(*Actinidia chinensis* Planch.)中的中华猕猴桃原变种(*Actinidia chinensis* Planch. var. *chinensis*)和美味猕猴桃变种(*A. chinensis* Planch. var. *deliciosa* A. Cheval.)。目前产业发展由传统采后需要后熟方能食用,向无需后熟即可食用的软枣猕猴桃(*A. arguta*)种类延伸。软枣猕猴桃果实可带皮食用,适合休闲采摘,成熟果实呈现绿色或全红,具有丰富的化学药用成分和低卡路里特征<sup>[1]</sup>,特别是全红类型还富含花色苷,产业发展潜力大且发展迅速,目前是城郊地区都市型农业新兴经济作物之一。从形态上来看,猕猴桃属植物花类型为完全花,但绝大多数种类属于功能性雌雄异株。在实生育种过程中童期一般为5~7 a(年)<sup>[2]</sup>,由于其特殊的遗传背景,后代常出现雄性多于雌性的现象<sup>[3-4]</sup>。作为果树植物,目前生产上对雌株的经济价值和需求明显大于雄株,育种工作仍主要集中在雌性品种选育方面。因此,开发用于幼苗早期性别鉴定的技术或标记,将节约大量的人力、物力、时间等育种成本,加速育种进程。前人尝试利用生理生化鉴定、同工酶分析等方法进行

雌雄性别的鉴定<sup>[5-6]</sup>,但其结果易受环境因素影响,准确性不高。

DNA分子标记以个体间核苷酸序列变异为基础,是生物个体遗传变异的直接反映,可以检测出生物个体之间在核苷酸序列水平上的差异<sup>[6]</sup>,为雌雄异株植物早期性别鉴定提供了新的途径。目前,已经有一些关于猕猴桃属植物性别鉴定分子标记研究的报道。其中,SmX和SmY1是由Gill等通过集团分离分析法(Bulk Segregant Analysis, BSA),利用二倍体中华猕猴桃原变种实生群体开发的SCAR(sequence characterized amplified region)标记<sup>[7-8]</sup>,SmX是雌性特异的标记,而SmY1为雄性特异标记;其中SmX仅能鉴定3个家系中的1个家系中植株的性别,而不能用于另外2个家系,而SMY1准确率达88%,能够有效区分中华猕猴桃性别。A001、A002和A003是Zhang等<sup>[9]</sup>在山梨猕猴桃(*Actinidia rufa*)和中华猕猴桃原变种的种间杂交F<sub>1</sub>代群体中,利用RAD-seq技术开发的SSR(simple sequence repeats)标记,其可靠性在该研究中所用群体的174个F<sub>1</sub>代个体中得到验证;A001是雌性特异标记,在该F<sub>1</sub>代的性别鉴定中表现出良好的准确性;A002和A003在雌性个体和雄性个体中分别扩增出大小不同的差

异性片段,从而鉴定植株性别;仅使用 A003 能够区分原文材料中山梨猕猴桃和中华猕猴桃原变种;将 A001 和 A002 配合使用可以鉴定研究中所用到的所有中华猕猴桃和山梨猕猴桃的性别。目前这些标记仅在原文研究所涉及的材料中进行了应用验证,对开发标记材料以外的试材,如软枣猕猴桃等目前常规栽培种类性别鉴定中的通用性尚未明确。关于软枣猕猴桃性别标记的研究虽然也有报道,但其研究中并没有发现性别特异的条带,且结果需要对多个并不稳定的多态性条带进行复杂的聚类分析,聚类分析结果与样品的性别匹配率为 70%;整个过程操作复杂,所需人力和时间成本较高,且其结果稳定性易受试验操作影响<sup>[10]</sup>。笔者利用已知性别的软枣猕猴桃种质资源作为材料,旨在探讨 SmX、SmY1 和 A001、A002、A003 两组分子标记在软枣猕猴桃性别鉴定中的通用性,以期软枣猕猴桃育种群体的早期性别分子鉴定提供可靠的方法,加速育种进程。

## 1 材料和方法

### 1.1 试材及取样

试验于 2017—2018 年进行,试材来源于国家农作物种质资源平台郑州猕猴桃子平台——中国农业科学院郑州果树研究所郑州猕猴桃资源圃和中国农

业科学院新乡综合试验基地,采用已知性别的软枣猕猴桃样品 64 份(其中雌性 35 株,雄性 29 株)。选择树龄相近、生长结果正常的成龄植株,取其一年生枝蔓上的幼嫩叶片,采下后立即带回实验室经液氮处理后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存待用。

### 1.2 基因组 DNA 的获取

使用北京普乐海生物科技有限公司生产的植物基因组 DNA 快速提取试剂盒,CTAB 法提取样品基因组 DNA。取冷冻叶片组织 100~200 mg,装入事先放好 1 粒钢珠的 2 mL EP 管中,再次于液氮中冷冻,用磨样机研磨至细粉状。具体提取步骤按照试剂盒说明进行。所得 DNA 用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法检测其质量及完整性。将模板 DNA 质量浓度稀释至  $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。其中离心机为 eppendorf Centrifuge 5810 R 型,微量紫外分光光度计为 NANODROP 1000 型,所用凝胶成像系统生产商为北京君意东方电泳设备有限公司,型号为 JY04S-3E。

### 1.3 标记来源

A001, A002 及 A003 来自 Zhang 等<sup>[9]</sup>; SmX 及 SmY1 标记扩增参考 Gill 等<sup>[7]</sup>的方法。所用引物均由上海生工生物工程有限公司合成,引物信息具体见表 1。

表 1 本研究所用的 5 个猕猴桃性别标记引物信息

Table 1 Five kiwifruit gender marker primers used in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	退火温度 Annealing temperature / $^{\circ}\text{C}$	产物预期大小 Fragment size /bp
A001	F: TCAATGCATTTAGACATTCCTTTGTCCA R: TGGGTAAACATAACCACATGCCAAC	54	202 Female 0 Male
A002	F: TACTGACGGTCACTCCCTAATCCC R: CATGGATGGAAGTGGTGGAGGAAG	56	219 Female 230 Male
A003	F: GCAAGCGGGGTAAATTTGTACAG R: GGATAGGAGGAGCTTTACGGACCT	56	304 Female 287 Male
SmX	F: AGGAGTCGGAGAGAGTAGAGAAG R: AGGAGTCGGATGACCGTTGGTGA	68	950
SmY1	F: TCGCAATTCGTTAGGGATGATGCG R: CATAATCAACCATCCATAAAAACCAT	58-54 Touchdown	770

### 1.4 A001、A002、A003、SmX、及 SmY1 性别标记在软枣猕猴桃材料中的体系优化试验

在预实验阶段,笔者利用参考文献中的 PCR 条件,以上述 5 个分子标记为引物,以 16 株软枣猕猴桃(雌性 8 株,雄性 8 株)的 DNA 样品为模板,对试验体系进行优化,所得产物中均未发现性别特异条带。因此,为了更好地验证其通用性,进行了体系优化试验。选择 6 个雄性样品和 6 个雌性样品 DNA 作为模

板进行体系优化试验,筛选合适的退火温度,优化试验的体系和程序如下:使用  $20\text{ }\mu\text{L}$  反应体系,含  $10\text{ }\mu\text{L}$   $1\times\text{ Taq MasterMix (Dye)}$ ,正向和反向引物各  $400\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $20\text{ ng}$  模板 DNA; PCR 扩增程序为,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $52\sim 68\text{ }^{\circ}\text{C}$  (分别是  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $53.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $55.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $58.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $61.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $64.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $67\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ )  $30\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$   $40\text{ s}$ , 35 个循环,最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$   $2\text{ min}$ 。PCR 扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电

泳及 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,以每个标记所对应的产物中多态性条带清晰、长度一致为合适退火温度的检测依据。

### 1.5 A001、A002、A003、SmX 及 SmY1 性别标记在软枣猕猴桃中的通用性验证

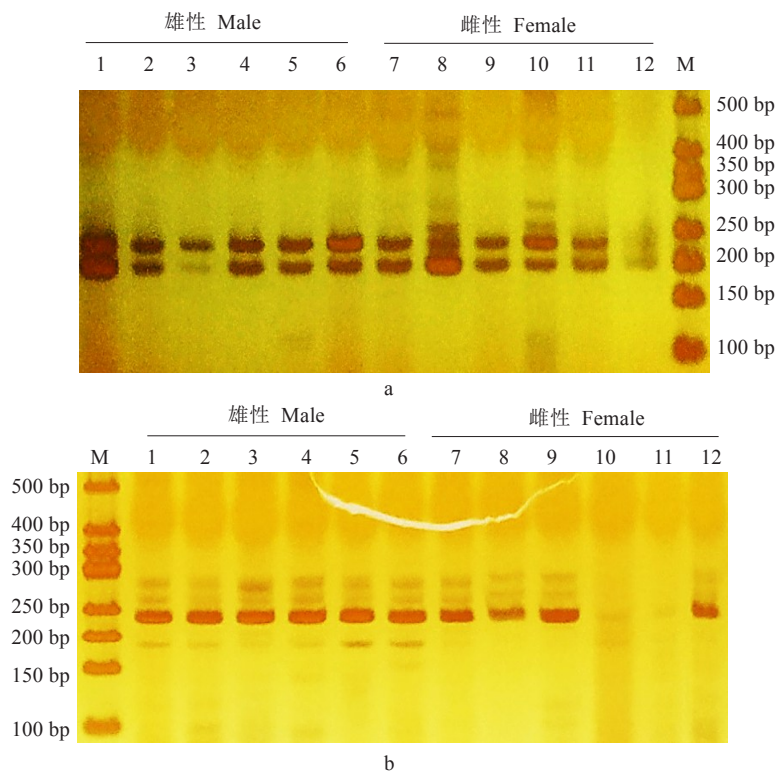
使用合适的退火温度验证各个标记在其他软枣猕猴桃样品中的通用性,PCR 体系仍使用 20  $\mu$ L 反应体系,扩增程序的其他步骤与 1.4 中优化试验的程序相同。PCR 扩增产物采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 A001、A002 和 A003 标记在已知性别软枣猕猴桃

### 桃样品中的体系优化及验证结果

利用软枣猕猴桃 6 个雄性样品和 6 个雌性样品设计试验,进行 A001、A002 和 A003 三个标记的扩增体系优化。A001 标记在软枣猕猴桃中的最适退火温度在 68  $^{\circ}$ C,在图 1-a 所示 68  $^{\circ}$ C 退火温度时,扩增产物中出现两条多态性片段,但并没有表现出性别差异;A002 标记在软枣猕猴桃中的最适退火温度在 65  $^{\circ}$ C,在图 1-b 所示 65  $^{\circ}$ C 退火温度时的,得到一条清晰的多态性条带,且在 6 个雌性样品中,有两个样品没有条带出现;A003 标记扩增产物中,未检测出任何清晰的多态性条带。故在进一步的验证试验中,仅利用标记 A001 和 A002 进行验证,放弃使用 A003。



a 为 A001 标记在退火温度 68 $^{\circ}$ C; b 为 A002 标记在退火温度 65 $^{\circ}$ C。

a is the performance of A001 in *A. arguta* at annealing temperature of 68  $^{\circ}$ C; b is the performance of A002 in *A. arguta* at annealing temperature of 65  $^{\circ}$ C.

图 1 A001 及 A002 标记在体系优化后的最适退火温度分别为 68  $^{\circ}$ C 和 65  $^{\circ}$ C 时验证结果

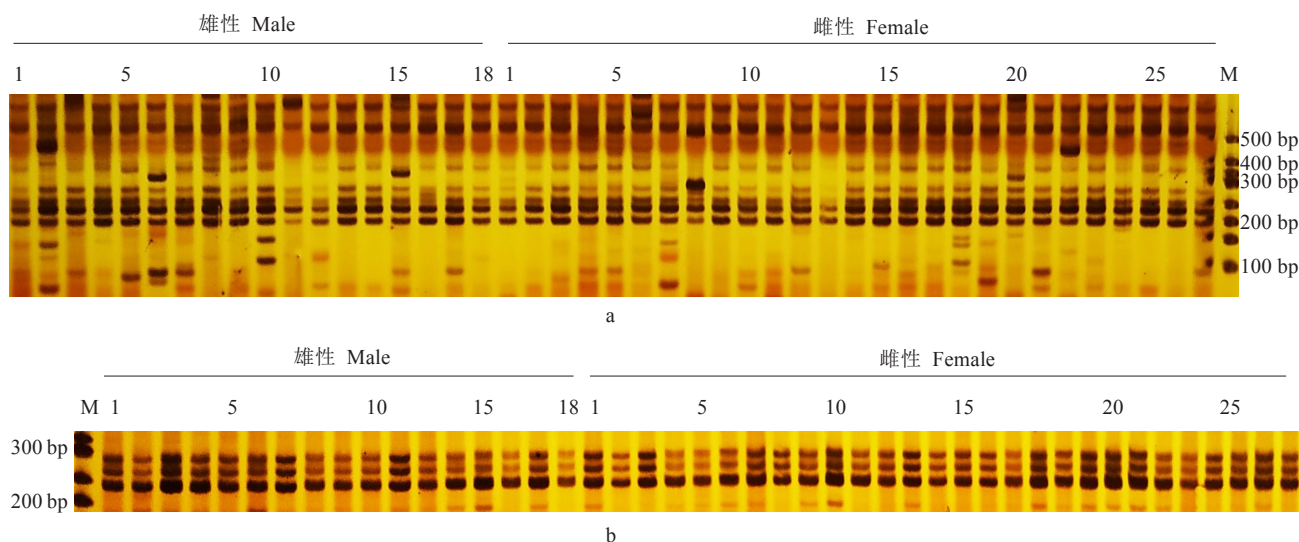
Fig. 1 The optimum annealing temperatures of A001 and A002 after system optimization are 68  $^{\circ}$ C and 65  $^{\circ}$ C, respectively

验证试验中,分别利用 29 个雄性样品和 35 个雌性样品对 A001 和 A002 两个标记在软枣猕猴桃中的通用性进行验证,图 2 显示了两个标记在部分样品基因组 DNA 中的扩增结果。A001 和 A002 的扩增产物中,均有多态性片段出现,但两个标记对软枣猕猴桃种质资源都没有表现出性别特异性。

### 2.2 SmX、SmY1 标记在已知性别软枣猕猴桃样品

### 中的体系优化及验证结果

利用 12 份软枣猕猴桃样品基因组 DNA 进行 SmY1 和 SmX 标记的体系优化试验,结果显示:SmY1 在软枣猕猴桃基因组 DNA 中扩增最适退火温度为 67  $^{\circ}$ C,见图 3,且扩增出的片段长度分别为 400 bp 左右和 200 bp 左右,明显小于参考文献中 SmY1 的产物片段长度(参考文献中,该引物的产物



a 为 A001 标记在软枣猕猴桃基因组 DNA 中的扩增结果;b 为 A002 标记在软枣猕猴桃基因组 DNA 中的扩增结果。  
a is the result of A001 in *A. arguta*; b is the result of A002 in *A. arguta*.

图2 A001 和 A002 标记在软枣猕猴桃基因组 DNA 中均未表现出性别特异性  
Fig. 2 A001 and A002 are both not gender-specific in *A. arguta* samples

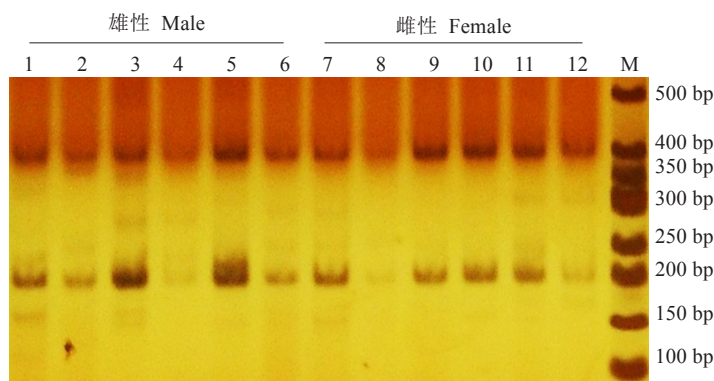


图3 退火温度为 67 °C 时 SmY1 标记在软枣猕猴桃基因组 DNA 中的表现  
Fig. 3 Performance of SmY1 in *A. arguta* at annealing temperature of 67 °C

长度)770 bp,且条带微弱大小不一;退火温度低于 64.9 °C 时不能有效扩增出多态性片段。SmX 标记在利用 6 个雄性样品和 6 个雌性样品为材料的初步验证试验中,SmX 标记的扩增结果没有在任何一个样品中扩增出清晰并且一致的条带,没有性别特异性。

因为两个标记在所用材料中均未表现出良好的多态性及性别特异性,故两个标记均未继续扩大样本验证。

### 3 讨论

对猕猴桃等雌雄异株植物育种阶段的实生苗童期进行性别鉴定研究具有重要意义。在 SmX 和

SmY1 标记开发过程中,所采用的群体是以二倍体中华猕猴桃原变种为亲本的 3 个家系,包括亲本和  $F_1$  子代<sup>[7]</sup>;使用 BSA 方法,首先从 3 个家系的  $F_1$  代中,根据性别选择 24 个雄株和 20 个雌株构成两个集团;将这两个集团样品的 DNA 等量混合,分别建立不同性别的“基因混池”;将这些样本用大量的随机引物进行测试,生成随机扩增多态 DNA (RAPD) 条带;与性别决定无关的变异对两个混池是共同的,而混合样本之间的任何多态性都与性别决定相关联;将得到的 RAPD 标记转化为 SCAR 标记,增加其稳定性和可靠性。这种利用 BSA 混池测序进行性别鉴定的研究方法在马尾藻<sup>[11]</sup>、巨体舌鱼<sup>[12]</sup>和黄连木<sup>[13]</sup>的性别鉴定研究中均有应用;将 SCAR 标记 SmX 及

SmY1 在已知性别的总数为 120 个中华猕猴桃原变种群体中验证表明, SmY1 具有良好的准确性<sup>[7]</sup>, 准确率可达 88% 以上; 而 SmX 仅在其中 BSA 分析所用到的其中一个家系中表现出稳定的性别特异性。此前, 有研究将 SmX 和 SmY 在中华猕猴桃原变种的一个品种 ‘Rainbow Red’ 中做出验证, 其结果显示 SmY1 的准确率可达 95%, 而 SmX 的准确率不及前者<sup>[14]</sup>。经本试验验证, 在软枣猕猴桃中, SmY1 虽然在退火温度为 67 °C 时能够扩增出清晰的条带, 但不具有性别特异性, 而 SmX 在软枣猕猴桃中未能扩增出任何清晰的多态性片段, 说明软枣猕猴桃基因组 DNA 中很可能并没有与 SmX 引物对应的片段。

限制性相关 DNA (RAD) 序列分析可以在限制位点内产生显性标记, 并在限制位点附近产生共显性标记<sup>[15]</sup>。利用新一代 RAD 测序 (RAD-seq) 技术能够有效检测 DNA 多态性, 而不需要事先获取被检测物种的基因组序列。如在开心果的 F<sub>1</sub> 分离群体中, 利用 RAD-seq 技术对性别连锁 SNP 标记进行鉴定, 得到的性别连锁分子标记将会帮助在育种过程中进行标记辅助选择, 从而降低育种成本<sup>[16]</sup>。RAD-seq 技术在大多数模式生物和一些非模式生物中有广泛的应用, 已构建了小菜蛾<sup>[17]</sup>、链孢霉<sup>[18]</sup>和西瓜<sup>[19]</sup>等的连锁图谱。猕猴桃性别鉴定标记 A001、A002 和 A003 就是通过高密度 RAD-seq 基因图谱技术得到的 SSR 标记<sup>[9]</sup>, 但是本研究在验证上述 3 个标记的通用性时发现, 3 个 SSR 标记在软枣猕猴桃材料中均不表现性别特异, 可能受软枣猕猴桃与中华猕猴桃复合体之间的亲缘关系相对较远<sup>[20]</sup> 因素的影响。

猕猴桃染色体倍性复杂, 中华猕猴桃原变种大多为二倍体和四倍体<sup>[21]</sup>, 而软枣猕猴桃倍性复杂, 有二倍体、四倍体、六倍体和八倍体等<sup>[22]</sup>。前述报道开发标记利用的试验材料中, 中华猕猴桃原变种和山梨猕猴桃均为二倍体, 我们验证的材料软枣猕猴桃均为四倍体。尽管猕猴桃的 25 号染色体已被确定为性染色体<sup>[9, 23]</sup>, 其功能与 XX/XY 相似<sup>[24]</sup>, 但尚未进化出形态上的明显差异, 其性别表型形成的机理也尚不清晰。据报道, 在被子植物性染色体进化的六个时期中<sup>[25]</sup> 的第二个时期, 雌性和雄性不育位点的重组受到抑制, 同时有一个小的雄性特异区在原始 Y 染色体上形成, 并且出现了全雄及全雌植株, 此时期的代表植物是芦笋<sup>[26]</sup>。经过对比, 芦笋性别分化的表现与猕猴桃非常相似<sup>[27]</sup>。Fraser 等<sup>[28]</sup> 在其对

SCAR 标记 SmX 和 SmY1 的定位研究中, 将雄性性别标记 SmY1 定位在了染色体亚端粒区, 该区域的重组受到抑制, 而缺乏重组恰是性别决定区域的典型特征<sup>[29]</sup>。此结果与对上述第二时期的描述一致, 故我们推测猕猴桃的性染色体处于进化的第二个时期。由于猕猴桃的 Y 染色体仍处于进化的早期阶段, 没有进化完全的 Y 染色体, 故笔者推测, 软枣猕猴桃的性别特异区域的位置或序列可能会与中华猕猴桃原变种有一定的差异。

另有研究表明, 植物激素、遗传因子、表观遗传修饰等可能通过相互之间的共同作用来决定植物性别, 它们的这种既相互独立又协同作用的动态过程, 使性别表型具有多样性<sup>[26]</sup>。Zhao 等<sup>[30]</sup> 在其对软枣猕猴桃不同性别花的转录组研究中发现, 处于发育后期的雄花中, *PME* (果胶甲酯酶基因) 的表达水平是雌花的 72 倍; 而 *ACO*, *MAN1*, 和 *MYC2* 的表达水平又远低于雌花。*PME* 与果实的成熟、器官脱落、小孢子发育、花粉管伸长、种子萌发和抗病性等都有关系, 但可能并不直接参与雌雄异株植物的性别决定<sup>[31]</sup>。Akaji 等<sup>[23]</sup> 在猕猴桃中的研究结果也表明, 在猕猴桃 25 号染色体的 Y-特定区域, 有一个雄性特异基因 *SyG1*, 编码一种 C 型细胞分裂素反应调节因子的合成, 且具有保守性, 能够控制猕猴桃雄花的雌蕊在发育过程中退化, 由此推断, 猕猴桃的雄性性状形成与一个细胞分裂素响应调节因子的作用有关。细胞分裂素对猕猴桃性别决定的调控作用虽未见报道, 但有研究表明其对乌毛蕨 (*Blechnum spicant* L.) 雄配子体的形成具有较强的诱导作用<sup>[32]</sup>。

除本研究所选取的两组猕猴桃性别分子标记外, 据报道 RAPD 标记 S1032-850 是在美味猕猴桃原变种中开发, 可鉴定中华猕猴桃原变种和美味猕猴桃原变种植株的性别<sup>[33]</sup>, 但该标记尚未转化为相对更稳定的 SCAR 标记, 且由于结果更稳定等诸多优点, SSR 和 ISSR 已经成为目前分子标记研究中的主要形式, 故在本研究中并未验证该标记的通用性。另外, 除中华猕猴桃原变种外, 已经有多种雌雄异株植物的性别标记报道, 如柿 (*Diospyros kaki* Thunb)<sup>[34-35]</sup>、椰枣 (*Phoenix dactylifera*)<sup>[36]</sup>、银杏 (*Ginkgo biloba* L.)<sup>[37]</sup> 及番木瓜 (*Carica papaya* L.)<sup>[38-39]</sup> 等。近年来, 软枣猕猴桃发展迅速, 尤其是在休闲采摘、观光农业等方面越来越受到重视和消费者的喜爱。对于育种工作者而言, 快速、高效、准确地进行早期

实生苗性别鉴定分子标记开发是一个亟待解决的问题。随着现代分子生物学技术的不断发展,通过基因组学手段挖掘和筛选雌、雄特异的分子标记,可加快田间育种进度,降低育种成本,更好的促进产业的健康和可持续发展。

### 参考文献 References:

- [1] ANNA W M, EDYTA K V, KATARZYNA K, MALGORZATA K, EWA B W, BOŻENA K, RENATA K, WIOLETTA S. Dietary Intake and Content of Cu, Mn, Fe, and Zn in Selected Cereal Products Marketed in Poland[J]. *Biological Trace Element Research*, 2019, 187: 568-578.
- [2] 李旭,曹万万,姜丹,孙贺,朴一龙.软枣猕猴桃雌雄株光合特性差异研究[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(13): 108-112.  
LI Xu, CAO Wanwan, JIANG Dan, SUN He, PIAO Yilong. Study on difference of photosynthetic characteristics between female and male *Actinidia arguta* (Seib. et Zucc.) Planch. ex Miq [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 2015, 31(13): 108-112.
- [3] SEAL A G, FERGUSON A R, SILVA H N, ZHANG J L. The effect of 2n gametes on sex ratios in *Actinidia*[J]. *Sex Plant Reprod*, 2012, 25(3):197-203.
- [4] KHUKHUNAISHVILI R G, DZHOKHADZE D I. Electrophoretic study of the proteins from *Actinidia* leaves and sex identification [J]. *Applied Biochemistry & Microbiology*, 2006, 42(1): 107-110.
- [5] 李旭,曹万万,姜丹,刘迪,朴一龙.基于形态观察法和生理生化法的软枣猕猴桃性别鉴别研究[J]. *北方园艺*, 2014(24): 6-9.  
LI Xu, CAO Wanwan, JIANG Dan, LIU Di, PIAO Yilong. Study on sex identification of *Actinidia arguta* by morphology and physiological biochemical[J]. *Northern Horticulture*, 2014 (24): 6-9.
- [6] 陈晓玲,梁红,朱东华.猕猴桃不同性别过氧化物酶及酯酶同工酶分析[J]. *农业与技术*, 2004, 24(1): 40-43.  
CHEN Xiaoling, LIANG Hong, ZHU Donghua. Analysis of EST and POX isozyme in the sex of *Actinidia*[J]. *Agriculture and Technology*, 2004, 24(1): 40-43.
- [7] GILL G P, HARVEY C F, GARDNER R C, FRASER L G. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 1998, 97(3): 439-445.
- [8] HARVEY C F, GILL G P, FRASER L G, MCNEILAGE M A. Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1997, 10(3):149-154.
- [9] ZHANG Q, LIU C Y, LIU Y F, BUREN R V, YAO X H, ZHONG C H, HUANG H W. High-density interspecific genetic maps of kiwifruit and the identification of sex-specific markers [J]. *DNA Research*, 2015, 22(5): 367-375.
- [10] 李旭,吴松权,姜明亮,朴一龙.软枣猕猴桃性别相关的 SRAP 分子标记[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(8): 69-71.  
LI Xu, WU Songquan, JIANG Mingliang, PIAO Yilong. Gender-related SRAP molecular markers of *Actinidia arguta*[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2016, 44(8): 69-71.
- [11] LIU F L, SUN X T, WANG W J, LIANG Z R, WANG F J. Development of a female-specific RAPD marker for *Sargassum thunbergii* gender identification using bulked segregant analysis [J]. *Aquatic Botany*, 2012, 102(5): 79-81.
- [12] ALMEIDA I G, IANELLA P, FARIA M T, PAIVA S R, CAETANO A. Bulked segregant analysis of the pirarucu (*Arapaima gigas*) genome for identification of sex-specific molecular markers [J]. *Genetics & Molecular Research*, 2013, 12(4): 6299-6308.
- [13] HORMAZA J I, DOLLO L, POLITO V S. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis[J]. *Tagtheoretical & Applied Geneticstheoretische Und Angewandte Genetik*, 1994, 89(1): 9-13.
- [14] SATORU M, HIDEYUKI K, SHINYA Y, MOTOHIRO T. The validity of marker-assisted selection using sex linked SCAR markers in kiwifruit (*Actinidia chinensis* 'Rainbow Red') seedlings[J]. *Journal of Science and High Technology in Agriculture*, 2015, 27(2): 68-74.
- [15] PFENDER W F, SAHA M C, JOHNSON E A, SLABAUGH M B. Mapping with RAD (restriction-site associated DNA) markers to rapidly identify QTL for stem rust resistance in *Lolium perenne*[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2011, 122(8): 1467.
- [16] KAFKAS S, KHODAEIAMINJAN M, GVNEY M, KAFKAS E. Identification of sex-linked SNP markers using RAD sequencing suggests ZW/ZZ sex determination in *Pistacia vera* L. [J]. *Bmc Genomics*, 2015, 16(1): 1-11.
- [17] BAXTER S, DAVEY J W, JOHNSTON J S, SHELTON A M, HECKEL D G, JIGGINS C, BLAXTER M L. Linkage mapping and comparative genomics using Next- Generation RAD sequencing of a Non- Model organism[J]. *Plos One*, 2011, 6(4): e19315.
- [18] ZACHARY A, LEWIS, SHIVER A L, STIFFLER N, MILLER M R, JOHNSON E A, SELKER E U. High-density detection of restriction-site-associated DNA markers for rapid mapping of mutated loci in *Neurospora*[J]. *Genetics*, 2007, 177(2): 1163-1171.
- [19] REN Y, MCGREGOR C, ZHANG Y, GONG G Y, ZHANG H Y, GUO S G, SUN H H, CAI W T, ZHANG J, XU Y. An integrated genetic map based on four mapping populations and quantitative trait loci associated with economically important traits in watermelon (*Citrullus lanatus*) [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 1-11.
- [20] 黄宏文.猕猴桃属:分类、资源、驯化、栽培[M].北京:科学出版社, 2013.  
HUANG Hongwen. *Actinidia*: Taxonomy, Germplasm, Domestication, Cultivation[M]. Beijing: Science Press, 2013.
- [21] FERGUSON A R, O'BRIEN I E W, YAN G J. Ploidy in *Actinidia*[J]. *Acta Horticulturae*, 1997, 444: 67-72.

- [22] 刘虹,刘锡红,刘秋宇,李刚,覃瑞. 利用叶绿体基因组高变片段对 7 个软枣猕猴桃居群遗传多样性的研究[J]. 植物学研究, 2014(3): 238-248.  
LIU Hong, LIU Xihong, LIU Qiuyu, LI Gang, QIN Rui. Study on genetic diversity of 7 populations of actinidia by using chloroplast genome fragment[J]. Botanical Research, 2014(3): 238-248.
- [23] AKAGI T, HENRY I M, OHTANI H, MORIMOTO T, BEPPU K, KATAOKA I, TAO R. A Y-encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in kiwifruit[J]. Plant Cell Advance Publication, 2018, 30(4): tpc.00787.2017.
- [24] TESTOLIN R, CIPRIANI G, COSTA G. Sex segregation ratio and gender expression in the genus *Actinidia*[J]. Sex Plant Reprod, 1995, 8(3): 129-132.
- [25] RAY M, BENDAHDANE A, RENNER S S. Sex chromosomes in land plants[J]. Annual Review Plant Biology, 2011, 62(1): 485-514.
- [26] 丁一,徐启江. 被子植物成花诱导和性别决定机制的研究进展[J]. 植物生理学报, 2014, 50(1): 19-36.  
DING Yi, XU Qijiang. Progress on floral induction and sex determination in angiosperm[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(1): 19-36.
- [27] 周劲松,汤泳萍,盛文涛,罗绍春,陈光宇. 芦笋性别决定与性别分化研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(5): 600-604.  
ZHOU Jinsong, TANG Yongping, SHENG Wentao, LUO Shaoshun, CHEN Guangyu. Progress in research on sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11(5): 600-604.
- [28] FRASER L G, TSANG G K, DATSON P M, SILVA H N D, HARVEY C F, GILL G P, CROWHURST R N, MCNEILAGE M A. A gene-rich linkage map in the dioecious species *Actinidia chinensis* (kiwifruit) reveals putative X/Y sex-determining chromosomes[J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 102.
- [29] HE Z C, ZHONG Y, HUANG H W. Cytogenetic study of diploid *Actinidia chinensis* - karyotype, morphology of sex chromosomes at primary differentiation stage and evolutionary significance[J]. Acta Horticulturae, 2003, 208(1): 6.
- [30] ZHAO C L, WANG Y, LI J Y, LIU Z P, LIU H S, YAO S Y, REN Y Y. Identification and characterization of sex related genes in *Actinidia arguta* by suppression subtractive hybridization[J]. Scientia Horticulturae, 2018, 233: 256-263.
- [31] FUTAMURA N, MORI H, KOUCHI H, SHINOHARA K. Male flower-specific expression of genes for polygalacturonase, pectin methyltransferase and  $\beta$ -1, 3-Glucanase in a dioecious willow (*Salix gilgiana* Seemen) [J]. Plant Cell Physiol, 2000, 41(1): 16-26.
- [32] MENENDEZ V, REVILLA M A, FERNANDEZ H. Growth and gender in the gametophyte of *Blechnum spicant* L.[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2006, 86: 47-53.
- [33] 姚春潮,王跃进,刘旭峰,龙周侠. 猕猴桃雄性基因 RAPD 标记 S1032-850 的获得及其应用[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(5): 557-561.  
YAO Chunchao, WANG Yuejin, LIU Xufeng, LONG Zhouxia. Obtainment and application of RAPD marker S1032-850 linked to male gene in *Actinidia*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2005, 13(5): 557-561.
- [34] 张平贤,何欢,罗正荣,杨勇,王仁梓,张青林. DISx-AF4S 标记在柿及其杂交后代性别鉴定中的有效性研究[J]. 园艺学报, 2016, 43(1): 47-54.  
ZHANG Pingxian, HE Huan, LUO Zhengrong, YANG Yong, WANG Renzi, ZHANG Qinglin. Validation of male sex-linked DISx-AF4S marker in persimmon and F<sub>1</sub> progenies[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(1): 47-54.
- [35] AKAGI T, HENRY I M, TAO R, COMAI L. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons[J]. Science, 2014, 346(6209): 646.
- [36] CHERIF E, ZEHDY S, CASTILLO K, CHABRILLANGE N, ABDOULKADER S, PINTAUD J C, SANTONI S, AMEL S H, GLEMIN S, FREDERIQUE A B. Male-specific DNA markers provide genetic evidence of an XY chromosome system, a recombination arrest and allow the tracing of paternal lineages in date palm[J]. New Phytologist, 2013, 197: 6.
- [37] 朱晓利. 银杏雌雄株性别鉴定的分子标记研究[D]. 扬州:扬州大学, 2010.  
ZHU Xiaoli. Studies on molecular makers for sexual identification of female and male plants in *Ginkgo biloba* L. [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2010.
- [38] ARYALA R, MING R. Sex determination in flowering plants: papaya as a model system[J]. Plant Science An International Journal of Experimental Plant Biology, 2014, 217/218(1): 56-62.
- [39] 何尧声,沈文涛,黎小瑛,王明钦,周鹏. 利用多重 PCR 技术快速鉴定番木瓜性别[J]. 热带作物学报, 2008, 29(3): 347-351.  
HE Yaosheng, SHEN Wentao, LI Xiaoying, WANG Mingqin, ZHOU Peng. Rapid identification of papaya sex type by multiplex polymerase chain reaction[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2008, 29(3): 347-351.