

中华猕猴桃 *fasciclin* 基因家族 生物信息学分析及克隆

周婉莹¹, 曲东¹, 张晓娟¹, 张文慧², 刘艳飞³, 张羽^{1*}

(¹陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000; ²安康市农业科学研究院, 陕西安康 725000;

³西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】探讨 *fasciclin* 基因在中华猕猴桃中的生物信息。【方法】对中华猕猴桃雌株 38 个 *fasciclin* 基因进行生物信息学分析和克隆其中一个与性别相关的 *fasciclin* 基因。【结果】38 个 *fasciclin* 基因编码 133~606 个氨基酸。丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点范围分别为 10~56 个、2~26 个、0~8 个。38 个 *fasciclin* 基因拥有 1~9 个 motif 结构(取值 10), 其中 Motif3 为共同具有。68.42% *fasciclin* 蛋白为不稳定疏水性蛋白。2 000 bp 启动子区共预测到 TFs 110 个, 较多的 TFs 依次为 BBR-BPC、TALE 和 AP2, 9 个基因没有预测到 TFs 结合位点。UPGMA 聚类法把 38 个 *fasciclin* 蛋白分成 2 类。基因克隆序列(723 bp)具有 *fasciclin* 保守结构域, 该序列只比对到 8 号染色体上。【结论】*fasciclin* 基因保守性不强; 克隆序列与中华猕猴桃雌雄性状显著关联, 但与美味猕猴桃雌雄无关联; 雌株中的同源区没有注释到基因。

关键词: 猕猴桃; *Fasciclin*; 生物信息; 性别; 克隆

中图分类号: S663.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)08-1144-12

Bioinformatics analysis and cloning of *fasciclin* gene family in kiwifruit

ZHOU Wanying¹, QU Dong¹, ZHANG Xiaojuan¹, ZHANG Wenhui², LIU Yanfei³, ZHANG Yu^{1*}

(¹School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, Shaanxi, China; ²Ankang Municipality Agricultural Sciences Research Institute, Ankang 725000, Shaanxi, China; ³College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: 【Objective】*Actinidia chinensis* var. *chinensis* and *A. chinensis* var. *deliciosa* are mostly valuable in the production of kiwifruit. Former research showed that male plants used as rootstocks had strong grafting advantages. Most of the rootstocks currently used in the production are 1-2 year old seedlings. Both female and male plants are used as rootstocks due to the lack of efficient method to distinguish the gender of the young seedlings, leading to the inconsistent growth and fruit quality of kiwifruit. Therefore, it is very important to identify the gender of kiwifruit at the seedling stage. It was reported that the *fasciclin* genes were associated with the gender and participated in plant growth and pollen fertility development. The work was designed to study the biological information of *fasciclin* gene family in *A. chinensis* var. *chinensis* to provide theoretical basis for exploring the role of *fasciclin* genes in the differentiation of the male and female plants of kiwifruit and developing markers for identifying the male and female plants at seedlings stage. 【Methods】The gene structure characteristics, evolutionary relationships, protein characteristics, promoter prediction, secondary structure of 38 *fasciclin* genes from the female plant of *A. chinensis* var. *chinensis* were analyzed by bioinformatics software. A gender-related *fasciclin* gene, named *FrBy*, was cloned from the male and female plants of *A. chinensis* var. *chinensis* and *A. chinensis* var. *deliciosa*, respectively. and the *FrBy* gene sequence was analyzed using exist-

收稿日期: 2020-03-14 接受日期: 2020-05-20

基金项目: 陕西省科技厅农业重大项目(17JS022、K3370219025)

作者简介: 周婉莹, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为分子植物育种。Tel: 19992354515, E-mail: 925893260@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13289626330, E-mail: yuzhang20160315@outlook.com

ing knowledge and affordable tools, including reference genome of the female plant named Red 5 of *A. chinensis* var. *chinensis*.【Results】The 38 *fasciclin* genes were distributed on the remaining 18 chromosomes except for 1, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 15, 16, 19 and 21 chromosomes. The genes encoded 133-606 amino acids in length, and the number of serine phosphorylation sites, threonine phosphorylation sites and tyrosine phosphorylation sites ranged from 10 to 56, 3 to 26 and 0 to 8, respectively. The majority of serine phosphorylation sites were found in PSS24547.1 protein, the *fasciclin* protein on chromosome 8. A total of 110 transcription factors (TFs) were predicted in the 2 000 bp promoter region. The first three TFs were *BBR-BPC*, *TALE* and *AP2*. They were all related to the sex development of plants. The binding sites of the TFs were not predicted from nine *fasciclin* genes, in which gene silencing might occur during evolution. The maximum motif structures were 9 and the minimum was 1 of the 38 *fasciclin* genes. The *PSS11741.1*, *PS01642.1* and *PSS24547.1* proteins were chosen as the most representative characteristic sequences to set up the homologous tertiary structure model. The tertiary structure analysis showed that the *PSS016442.1* mostly contained the α -helices. The *PSS24547.1* mostly contained the β -folds and random curls. The *PSS11741.1* least contained the β -folds and random curls. About 68.42 percent of 38 *fasciclin* proteins were hydrophobic proteins which were unstable. The 38 *fasciclin* proteins were clearly divided into two subgroups by UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means) method, among them, the *PSS24547.1* was in its own class. The *FrBy* gene with 723 bp sequence that cloned from the male plant possessed a *Fas* conserved domain, the 723 bp sequence was only aligned with a region on chromosome 8 of the reference genome of Red 5 (E-value is $5E-167$).【Conclusion】The study showed that the *fasciclin* genes were not conservative in the female plant of *A. chinensis* var. *chinensis* while the *FrBy* gene cloned from the male plant of *A. chinensis* var. *chinensis* was very conservative. The 723 bp sequence was significantly related to the gender character of *A. chinensis* var. *chinensis*. However the 723 bp sequence could not distinguish the gender of *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*, as a functional dioecious plant. The differentiation of varieties might occur earlier than that of gender in *A. chinensis*.

Key words: Kiwifruit; *Fasciclin*; Bioinformation; Gender; Clone

Fasciclin 基因家族是分布在动植物体中的一类古老的黏附因子,并参与各种生物过程中的细胞黏附和沟通。*fasciclin* 结构域(FAS 结构域)含有 128 个氨基酸残基,*fasciclin* 基因家族的蛋白包含一个或多个域,含有 FAS 结构域的蛋白属于 *fasciclin* 基因家族^[1],具有 FAS 结构域的蛋白质首先在蚱蜢中被鉴定出来^[2]。高等植物中有大量的 *fasciclin* 蛋白:拟南芥中有 21 种,其被注释为束状阿拉伯半乳糖蛋白(*fasciclin-like arabinogalactan proteins, Flas*)^[3],小麦(*Triticum aestivum*)中有 34 种,水稻(*Oryza ativa*)中有 24 种^[4]。目前,已有大量关于 *fasciclin* 基因参与植物性别的相关报道,2010 年 Li 等^[5]研究 *FLA3* (*fasciclin-like arabinogalactan proteins 3*)基因功能,结果表明,含有 FAS 结构域的 *FLA* 基因在植物花药发育中发挥重要作用,拟南芥

FLA3 在生殖组织中含量很高,在花粉粒和花粉管中特异性表达,参与小孢子发育,通过纤维素沉积对花粉粒的形成起作用。*FLA3* 缺失突变体植株缺少蛋白质骨架导致异常花丝的形成和随后的花粉败育,含有约 50%的异常花粉颗粒,表现出花粉晚熟,且花粉粒发育异常和育性降低,*FLA3* 的过度表达会导致花丝缺陷伸长。2012 年 Tan 等^[6]在水稻中发现了一种糖蛋白 *MTR1* (*Microspore and tapetum regulator 1*),其控制水稻孢子体和生殖细胞发育。*MTR1* 的 FAS 结构域是正常花药发育和花粉育性所必需的,*MTR1* 在雄性生殖细胞中特异性表达,其突变体在绒毡层和小孢子发育过程中都表现出缺陷,导致雄性完全不育。2019 年郝小聪等^[7]研究了小麦中含有 FAS 结构域的 *TaFLA* 基因,发现其与水稻的 *MTR1* 基因功能类似。经研究发现

TaFLA 在正常发育的雄蕊中表现出特异性,该基因可能控制着小麦花药的正常发育,缺失或过量表达 *TaFLA* 都可能引起小麦花粉育性下降,从而引起小麦的雄性不育。

猕猴桃最有重要利用价值的为中华猕猴桃复合体 (*A. chinensis* Planch.) 中的中华猕猴桃原变种 (*A. chinensis* Planch. var. *chinensis*) 和美味猕猴桃变种 (*A. chinensis* Planch. var. *deliciosa* A. Chev.)。作为雌雄异株的果树,目前猕猴桃生产所用砧木多为 1~2 a(年)生的实生苗,由于没有很好的苗期区别雌雄性别的方法,导致砧木雌雄混杂,树体长势差异较大,给后期管理带来麻烦,在幼苗期鉴定猕猴桃的性别,缩短育种年限显得非常重要。2019年 Takashi 等^[8]研究猕猴桃性别时,鉴定到 1 个与中华猕猴桃性别相关的基因 (*Friendly Boy, FrBy*), 与 *fasciclin* 基因为直系同源基因, FAS 的敲除突变会导致雄性不育,花粉萌发率下降,绒毡层降解延长。目前还未见 *fasciclin* 基因在猕猴桃中的报道,笔者对中华猕猴桃 *fasciclin* 基因家族进行生物信息学分析并克隆 *FrBy* 基因,为猕猴桃雌雄分化及雌雄分子标记开发提供理论基础,为其他物种 *fasciclin* 基因的克隆、进化研究以及功能验证提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 *fasciclin* 基因家族生物信息学分析 通过在猕猴桃基因组 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/16401>) 中用“fas”词检索鉴定 *fasciclin* 基因家族。用 MEGA 5.05 (<https://www.megasoftware.net/index.php>) 的 UPGMA 法构建 *fasciclin* 蛋白进化树, Bootstrap 检验, 重复抽样 500 次。采用在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/prot-param/>) 分析蛋白质特性。采用在线软件 NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 分析蛋白质磷酸化。使用 ProtParam 在线分析工具对 *fasciclin* 蛋白进行理化性质分析。运用在线软件 PlantTFDB (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/prediction.php>) 分析 *fasciclin* 基因起始密码子上游 2 000 bp 序列的顺式作用元件等。对猕猴桃 *fasciclin* 基因家族进行 motif 分析, 将参数中的模体值设定为 10, 其他均为默认值。利用在线软件 ExPaSy 提供的 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/in-teractive>)

进行三维结构同源建模。

1.1.2 猕猴桃叶片 中华和美味猕猴桃雌雄株幼嫩叶片采集自安康农科院猕猴桃基地、汉中农科所猕猴桃试验地及陕果集团有限公司汉中猕猴桃研发中心, 共 85 份。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取、引物合成、PCR 扩增 采用 CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 法提取猕猴桃基因组 DNA, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶检测基因组 DNA。引物序列参考 Takashi 等^[8]的报道, 引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。PCR 扩增产物使用 2.0% 琼脂糖凝胶分离, Biospin 胶回收纯化。

1.2.2 克隆测序 将纯化的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上, 摇菌测序, 测序由杨凌天润奥科生物科技有限公司承担。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃 *fasciclin* 基因的鉴定及基因特性分析

共检索到 38 个 *fasciclin* 基因, 其中 1 个描述为“FAS1 domain protein”, 2 个描述为“FAS1 domain-containing protein”, 其余 35 个描述为“Fasciclin-like arabinogalactan”。对 38 个 *fasciclin* 基因进行分析(表 1), 发现 *fasciclin* 基因分布在 18 条染色体上。CDS (Coding DNA sequence) 序列最大为 4 457 bp (PSR98800.1), 最小为 402 bp (PSS15839.1)。38 条 *fasciclin* 基因编码长度为 133~606 个氨基酸的蛋白质, 其中 PSS24547.1 所含氨基酸数目最多(606 个), PSS15839.1 最少(133 个)。

2.2 猕猴桃 *fasciclin* 基因家族的系统发育

系统发育树显示, *fasciclin* 基因家族共形成 2 个分支, 第 I 类包含 1 个蛋白, 第 II 类包含 37 个蛋白(图 1)。第 II 类又分为 2 个亚群, 分别含有 11、26 个蛋白, 经分析发现, *fasciclin* 基因家族里分布在 LG8 染色体上的蛋白 PSS24547.1 独立进化, 具有独特的功能; 其余 37 个蛋白同源性比较强, 可能执行类似的功能。

2.3 *fasciclin* 基因家族的蛋白质特性分析

如表 2 所示, *fasciclin* 蛋白均包含 20 种常见氨基酸。蛋白序列长度最长为 606 aa (PSS24547.1); 最短为 133 aa (PSS15839.1)。分子质量最大为 65 270.30 ku (PSS24547.1), 最小为 14 857.33 ku

表 1 猕猴桃*fasciclin*的基因信息

Table 1 Gene information of *fasciclin* gene in kiwifruit

蛋白产物 Protein product	染色体 Chromosome	位点 Locus	链 Strand	编码DNA CDS/bp	氨基酸 Amino acid/aa	基因名称 Gene name
PSS34490.1	LG2	2 302 245~2 302 838	-	594	197	CEY00_Acc01589
PSS32929.1	LG3	7 085 795~7 086 526	-	732	243	CEY00_Acc03225
PSS23552.1	LG8	888 277~891 112	+	2 836	457	CEY00_Acc08375
PSS24187.1	LG8	14 415 710~14 416 981	-	1 272	423	CEY00_Acc09067
PSS24395.1	LG8	18 153 957~18 155 261	+	1 305	434	CEY00_Acc16969
PSS24547.1	LG8	20 898 470~20 900 290	-	1 821	606	CEY00_Acc09371
PSS21600.1	LG9	13 437 978~13 439 255	-	1 278	425	CEY00_Acc10649
PSS15839.1	LG12	6 226 658~6 227 059	+	402	133	CEY00_Acc13333
PSS15840.1	LG12	6 227 687~6 230 903	+	3 217	449	CEY00_Acc13334
PSS16079.1	LG12	12 218 575~12 219 816	-	1 242	413	CEY00_Acc13578
PSS14338.1	LG13	13 473 235~13 474 005	+	771	256	CEY00_Acc14935
PSS11741.1	LG14	10 695 999~10 697 237	+	1 239	412	CEY00_Acc16022
PSS11780.1	LG14	11 983 094~11 984 434	-	1 341	280	CEY00_Acc16058
PSS11809.1	LG14	12 479 096~12 480 343	+	1 248	415	CEY00_Acc16088
PSS11880.1	LG14	13 691 713~13 692 474	+	762	253	CEY00_Acc01332
PSS05671.1	LG17	1 548 968~1 549 696	+	729	242	CEY00_Acc18940
PSS05780.1	LG17	2 995 028~2 996 095	+	1 068	355	CEY00_Acc19049
PSS06027.1	LG17	9 616 816~9 618 039	-	1 224	407	CEY00_Acc19327
PSS06466.1	LG17	16 889 284~16 890 513	+	1 230	409	CEY00_Acc19163
PSS04017.1	LG18	1 964 361~1 964 996	-	636	211	CEY00_Acc19853
PSS01642.1	LG20	10 783 504~10 787 223	-	3 720	455	CEY00_Acc22998
PSR98175.1	LG22	8 564 580~8 565 515	+	936	311	CEY00_Acc24773
PSR98176.1	LG22	8 568 362~8 569 090	+	729	242	CEY00_Acc24774
PSR98800.1	LG22	17 583 038~17 587 494	-	4 457	461	CEY00_Acc25325
PSR95113.1	LG23	4 582 826~4 584 112	+	1 287	428	CEY00_Acc25868
PSR95179.1	LG23	5 538 271~5 540 144	-	1 874	234	CEY00_Acc25936
PSR92849.1	LG24	6 369 542~6 370 390	+	849	282	CEY00_Acc27452
PSR92850.1	LG24	6 373 006~6 373 800	+	795	264	CEY00_Acc27453
PSR92851.1	LG24	6 379 925~6 380 737	+	813	270	CEY00_Acc27454
PSR92852.1	LG24	6 383 313~6 384 041	+	729	242	CEY00_Acc27455
PSR91014.1	LG25	5 257 174~5 258 328	-	1 155	384	CEY00_Acc28330
PSR89978.1	LG26	16 638 622~16 639 362	+	741	246	CEY00_Acc30175
PSR90069.1	LG26	17 576 267~17 577 535	-	1 269	422	CEY00_Acc30266
PSR88170.1	LG27	10 315 369~10 316 388	-	1 020	339	CEY00_Acc31200
PSR86506.1	LG28	10 369 052~10 370 200	-	1 149	382	CEY00_Acc32128
PSR86606.1	LG28	11 645 664~11 646 404	+	741	246	CEY00_Acc32230
PSR86708.1	LG28	12 807 301~12 808 572	-	1 272	423	CEY00_Acc32332
PSR85400.1	LG29	16 869 820~16 871 043	+	1 224	407	CEY00_Acc33391

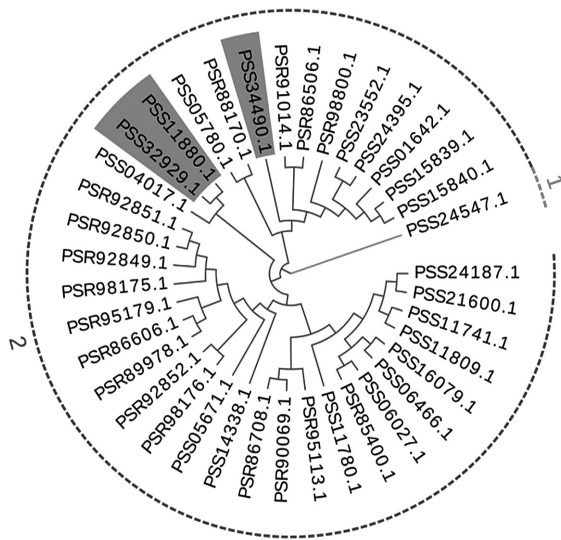


图 1 猕猴桃*fasciclin*蛋白系统进化树

Fig. 1 Bootstrap consensus tree of *fasciclin* in kiwifruit

(PSS15839.1); 等电点(pI)最高为 9.33 (PSR92851.1),最低为 4.44(PSR88170.1);不稳定性系数为 29.83~67.56,最大的蛋白为 PSS32929.1,最小的蛋白为 PSS16079.1,38 个 *fasciclin* 中 12 个为稳定蛋白($II < 40$),26 个为不稳定蛋白($II > 40$)。脂肪族氨基酸系数最大为 122.56 (PSS15839.1),最小为 82.72(PSS24547.1);带负电荷氨基酸残基数(Asp + Glu)最大值为 64 (PSS24547.1),最小值为 10(PSR95179.1),带正电荷氨基酸残基数(Arg+Lys)最大值为 60(PSS24547.1),最小值为 11(PSS32929.1、PSS15839.1、PSS14338.1、PSS05671.1、PSR86606.1)。亲水性分析发现 12 个 *fasciclin* 蛋白表现为亲水性(负值),是水溶性蛋白,26 个 *fasciclin* 蛋白均表现为疏水性,是疏水性

表2 猕猴桃 *fasciclin* 蛋白质特性分析Table 2 Analysis of protein characteristics of *fasciclin* protein in kiwifruit

蛋白产物 Protein product	长度 Number of amino acids	分子质量 Molecular weight	等电点 pI	不稳定系数 Instability index, II	脂肪族氨基酸系数 Aliphatic index	亲疏水性 Grand average of hydropathicity, GRAVY	天冬氨酸/谷氨酸 Asp/Glu	精氨酸/赖氨酸 Arg/Lys
PSS34490.1	197	22 030.46	5.31	48.32	99.75	0.107	27	23
PSS32929.1	243	25 925.26	6.13	67.56	95.56	0.263	14	11
PSS11880.1	253	27 706.31	8.40	64.91	86.32	0.020	14	16
PSS23552.1	457	49 633.66	5.73	53.29	97.11	-0.121	55	44
PSS24187.1	423	43 840.06	5.45	44.57	97.38	0.190	36	29
PSS24395.1	434	47 341.05	5.93	55.09	95.94	-0.144	51	43
PSS24547.1	606	65 270.30	6.61	47.69	82.72	-0.217	64	60
PSS21600.1	425	43 666.94	5.57	39.82	99.69	0.248	34	28
PSS15839.1	133	14 857.33	6.58	55.30	122.56	-0.029	12	11
PSS15840.1	449	48 884.84	5.74	51.99	101.71	-0.090	53	41
PSS16079.1	413	43 554.77	5.67	29.83	98.09	0.154	37	27
PSS14338.1	256	26 952.63	5.19	49.22	92.97	0.166	18	11
PSS11741.1	412	42 409.37	5.42	55.59	94.27	0.168	33	26
PSS11780.1	280	29 374.28	4.81	54.23	89.89	-0.012	32	23
PSS11809.1	415	42 487.42	5.30	50.97	91.76	0.133	34	26
PSS05671.1	242	25 353.62	4.94	30.93	89.88	-0.043	16	11
PSS05780.1	355	39 718.66	8.25	44.12	103.52	0.092	25	27
PSS06027.1	407	43 592.76	5.50	36.38	87.57	-0.037	43	33
PSS06466.1	409	42 995.11	5.81	31.98	97.14	0.140	35	27
PSS04017.1	211	24 528.02	6.05	37.04	88.20	-0.199	24	20
PSS01642.1	455	49 485.51	5.69	52.10	99.27	-0.087	54	42
PSR98175.1	311	32 399.23	9.73	40.99	93.12	0.111	11	22
PSR98176.1	242	26 460.71	9.14	41.74	101.12	0.126	15	19
PSR98800.1	461	50 460.69	5.74	51.77	100.24	-0.145	60	49
PSR95113.1	428	61 004.26	5.21	46.40	99.57	0.211	48	31
PSR95179.1	234	24 542.95	8.74	32.79	86.28	0.080	10	12
PSR92849.1	282	29 314.85	9.10	43.83	100.67	0.318	12	16
PSR92850.1	264	27 451.70	8.69	35.67	101.59	0.296	13	15
PSR92851.1	270	27 985.24	9.33	38.88	99.33	0.289	12	16
PSR92852.1	242	26 484.82	7.77	47.50	99.92	0.156	16	17
PSR91014.1	384	41 105.54	6.29	41.12	103.67	0.305	27	22
PSR89978.1	246	26 111.65	4.81	34.99	94.72	0.075	16	12
PSR90069.1	422	44 648.05	5.06	47.50	106.75	0.273	37	25
PSR88170.1	339	36 601.55	4.44	42.66	94.01	0.178	37	18
PSR86506.1	382	41 125.55	5.78	43.61	98.09	0.259	33	24
PSR86606.1	246	26 046.58	4.83	31.35	90.33	0.092	15	11
PSR86708.1	423	44 451.73	4.67	45.72	106.55	0.311	35	20
PSR85400.1	407	43 746.85	5.49	36.81	88.28	-0.078	44	34

蛋白。分析表明, *fasciclin* 基因家族蛋白质的长度、分子质量、等电点的最大值和最小值相差大, 均为 2 倍以上, 有 26 个蛋白为不稳定、疏水性蛋白, 推断该基因家族不保守。

2.4 *fasciclin* 基因家族的启动子区域分析

猕猴桃 38 个 *fasciclin* 基因共预测到被鉴定的

110 个 TFs 的 479 个结合位点, 按 *P*-value 由小到大排列, 前 3 位 TFs 为 BBR-BPC、TALE 和 AP2, 9 个基因没有预测到 TF 结合位点, 9 个 *fasciclin* 基因可能发生了沉默。已有研究表明, BBR-BPC 结合因子中 BPC 在所有的花器官中都有表达, 尤其是在胚珠中表达量高, BBR 是特征性的核定位信号(NLS)序

列,在C端延伸至90个氨基酸的DNA结合结构域和一个假定的N端激活结构域。BBR在烟草中的过度表达可以导致叶片形状的显著改变^[9]。TALE转录结合因子可控制分生组织的形成和维持,在器官形态发生、器官位置以及生殖期等多个方面起作用^[10]。AP2家族转录结合因子的蛋白参与与生长发

育相关的多种生物过程的转录调控以及植物对环境刺激的各种反应,AP2家族的基因参与了发育过程的调控,如花的发育、小穗分生组织的确定、叶表皮细胞的鉴定和胚胎的发育^[11]。这3种TFs都与植物的性别发育有关,说明该基因家族与植物的性别发育密切相关(表3)。

表3 猕猴桃*fasciclin*基因启动子区结合位点预测(Threshold P -value $\leq 1e-7$)

Table 3 Prediction of binding sites in promoter region of *fasciclin* gene in kiwifruit (Threshold P -value $\leq 1e-7$)

蛋白产物 Protein product	结合位点预测结果(根据后验概率排序) Site prediction results (Ordered according to the posterior probability)
PSS34490.1	BBR-BPC,GRAS
PSS32929.1	No TF Binding site
PSS11880.1	No TF Binding site
PSS23552.1	AP2, BBR-BPC, TALE
PSS24187.1	AP2, Nin-like
PSS24395.1	AP2, BBR-BPC,
PSS24547.1	BBR-BPC
PSS21600.1	No TF Binding site
PSS15839.1	AP2, BBR-BPC, ERF, LBD
PSS15840.1	AP2, BBR-BPC, C2H2, ERF
PSS16079.1	No TF Binding site
PSS14338.1	No TF Binding site
PSS11741.1	BBR-BPC, C2H2, Trihelix
PSS11780.1	No TF Binding site
PSS11809.1	BBR-BPC, Trihelix
PSS05671.1	Dof, ERF, GATA
PSS05780.1	AP2, BBR-BPC, TALE, TCP
PSS06027.1	BBR-BPC, TALE
PSS06466.1	BES1, TCP
PSS04017.1	BBR-BPC, TALE
PSS01642.1	AP2, B3, BBR-BPC, C2H2, ERF
PSR98175.1	B3, BBR-BPC, TALE
PSR98176.1	No TF Binding site
PSR98800.1	BBR-BPC, TALE
PSR95113.1	BBR-BPC, TCP
PSR95179.1	BBR-BPC, MYB, TALE
PSR92849.1	BBR-BPC, ERF, GATA, TALE
PSR92850.1	BBR-BPC
PSR92851.1	AP2, BBR-BPC, GRAS, MYB_related
PSR92852.1	AP2, BBR-BPC, Dof
PSR91014.1	BBR-BPC, ERF, ZF-HD
PSR89978.1	No TF Binding site
PSR90069.1	BBR-BPC, GATA
PSR88170.1	No TF Binding site
PSR86506.1	AP2, BBR-BPC, GRAS, TCP
PSR86606.1	BBR-BPC, TALE
PSR86708.1	BBR-BPC, TALE
PSR85400.1	BBR-BPC, TALE

2.5 *fasciclin* 基因蛋白质的磷酸化预测分析

蛋白质磷酸化是指由蛋白质激酶催化的将 ATP 的磷酸基转移到底物蛋白质氨基酸残基(丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)上的过程,是一种分子开关形式。酶的活性与蛋白磷酸化作用有关^[12],磷酸化改变了蛋白表面电荷分布,静电力使构象发生变化,暴露活性位点。使用 NetPhos 3.1 软件对猕猴桃基因组中 *fasciclin* 蛋白的磷酸化位点进行分析,结果发现(表 4),丝氨酸磷酸化位点(Ser)最多为 56 个(PSS24547.1),最少为 10 个(PSS15839.1);苏氨酸磷酸化位点(Thr)最多为 26 个(PSS24187.1),最少为 3 个(PSS15839.1);酪氨酸

磷酸化位点(Tyr)最多为 8 个(PSR98800.1),最少为 0 个(PSR92852.1、PSR89978.1、PSR90069.1、PSR86606.1、PSR86708.1)。结果表明,PSS24547.1、PSS24187.1 的丝氨酸、苏氨酸磷酸化位点多,有较强的激活酶活力,而 PSS15839.1、PSS15839.1 的丝氨酸、苏氨酸磷酸化位点最少,激活酶活力最弱。PSR98800.1 的酪氨酸磷酸位点多,除了可以较强激活酶活力之外,还更能促进其与其他蛋白质相互作用而形成多蛋白复合体,PSR92852.1、PSR89978.1、PSR90069.1、PSR86606.1、PSR86708.1 没有酪氨酸磷酸位点,激活酶活力和形成复合物的能力最弱。

表 4 猕猴桃 *fasciclin* 蛋白的磷酸化位点

Table 4 Physicochemical properties and phosphorylation sites of *fasciclin* protein in kiwifruit

蛋白产物 Protein product	丝氨酸 Ser	苏氨酸 Thr	酪氨酸 Tyr	蛋白产物 Protein product	丝氨酸 Ser	苏氨酸 Thr	酪氨酸 Tyr
PSS32929.1	16	9	1	PSS01642.1	26	15	6
PSS11880.1	20	7	2	PSR98175.1	23	11	2
PSS23552.1	24	15	6	PSR98176.1	17	8	1
PSS24187.1	29	26	3	PSR98800.1	29	12	8
PSS24395.1	27	15	6	PSR95113.1	28	14	1
PSS24547.1	56	16	4	PSR95179.1	13	11	1
PSS21600.1	34	18	3	PSR92849.1	19	8	3
PSS15839.1	10	3	1	PSR92850.1	14	7	2
PSS15840.1	23	12	6	PSR92851.1	13	9	2
PSS16079.1	23	20	4	PSR92852.1	15	7	0
PSS14338.1	24	14	3	PSR91014.1	16	16	4
PSS11741.1	38	29	2	PSR89978.1	14	10	0
PSS11780.1	27	7	3	PSR90069.1	34	17	0
PSS11809.1	36	25	3	PSR88170.1	35	11	3
PSS05671.1	13	10	2	PSR86506.1	20	16	1
PSS05780.1	27	10	2	PSR86606.1	12	12	0
PSS06027.1	22	19	2	PSR86708.1	32	17	0
PSS06466.1	25	18	4	PSR85400.1	20	20	2
PSS04017.1	13	4	5	PSS34490.1	17	5	2

2.6 *fasciclin* 基因家族的 motif 分析

模体(motif)即超二级结构,简言之,就是二级结构有规律的组合。例如螺旋-环-螺旋、 β -折叠的组合、 α -螺旋组合等,再比如亮氨酸拉链、锌指结构都是典型的模体。它具有序列特异性的蛋白质结合位点,或者涉及重要的生物学功能,某些蛋白质因子与 DNA 大沟结合的部位靠的就是某些特异的模体。基因家族的所有基因或者大部分基因有一个或者多个 motif,这些 motif 可以描述出该基因

家族的特征,从而进一步认识该基因。笔者分析了猕猴桃 38 个 *fasciclin* 基因的 10 个 motif 结构模型(图 2),PSS11809.1、PSS11741.1 和 PSR86708.1 蛋白含有其中的 9 个 motif 结构,含有 8 个 motif 的蛋白有 PSR85400.1、PSS06027.1、PSS24187.1、PSS21600.1、PSS06466.1、PSS16079.1 和 PSR90069.1, PSS15839.1、PSS34490.1 和 PSS04017.1 蛋白只含有 1 个 motif 结构。分析表明,38 个 *fasciclin* 基因间 motif 结构差异明显,预示着该基因在进化过程中

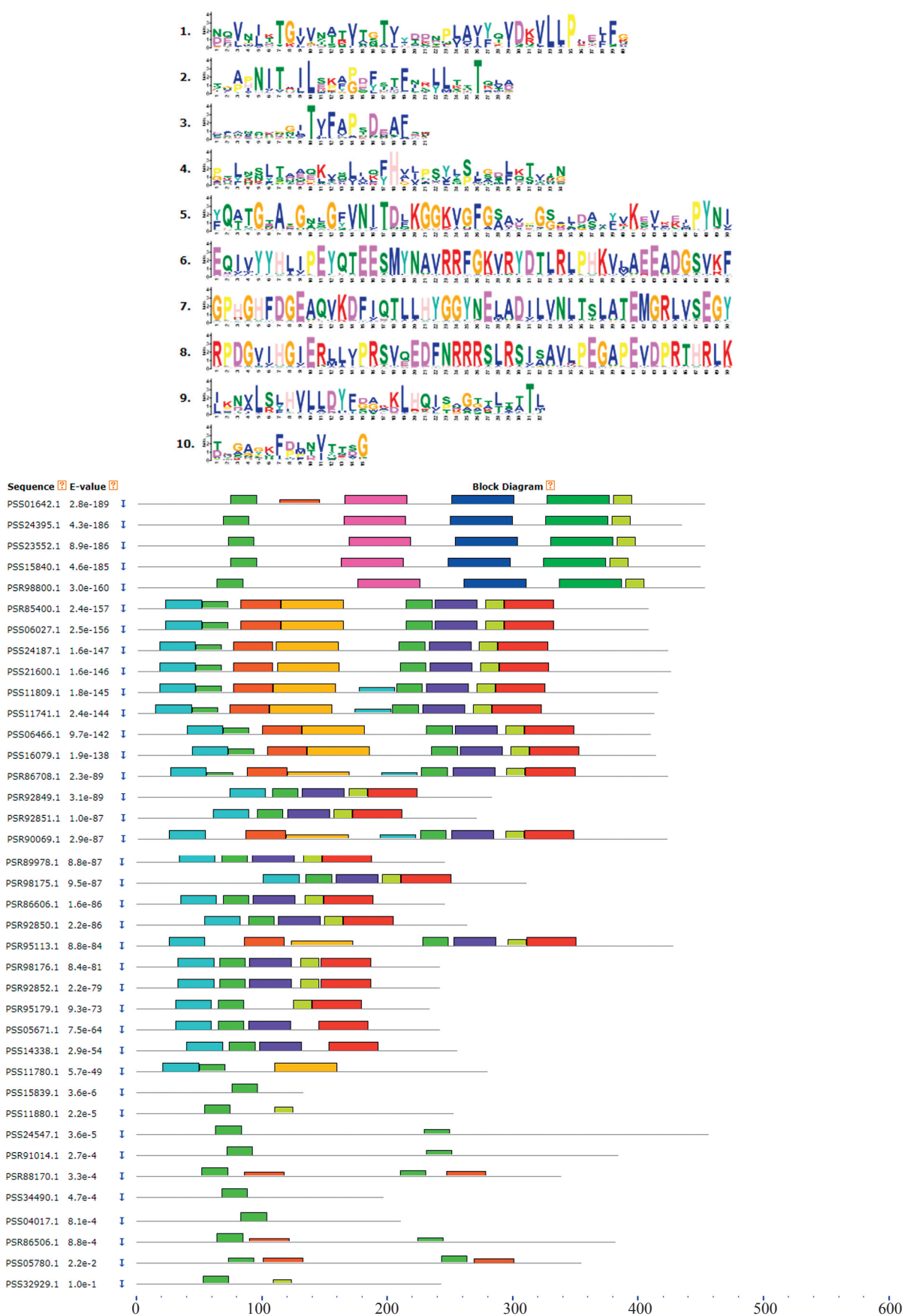


图2 *fasciclin* 基因片段 motif
Fig. 2 Motif of *fasciclin* gene fragment

不保守,其中 38 个 *fasciclin* 基因都含有 motif 3 结构模型,可能以此来完成保守的功能。通常,含有较多 motif 结构的蛋白往往执行更为特异的功能,或在功能上相互协调使该基因家族成员功能不断完善,进而发现新的家族成员。本研究含有 9 个 motif 结构的 3 个蛋白(PSS11809.1、PSS11741.1 和 PSR86708.1)可能发挥了这样的功能。

从 38 个 *fasciclin* 蛋白中选取 3 条最具代表性的序列(PSS11741.1、PSS01642.1、PSS24547.1),利用 Swiss-Model 进行同源三级结构建模(图 3)。这 3 种序列都至少含有 155 个 α -螺旋和 67 个 β -折叠,但其三级结构不完全相同,PSS01642.1 含有的 α -螺旋最多,PSS24547.1 含有的 β -折叠、无规卷曲最多,PSS11741.1 含有的 β -折叠无规卷曲最少。

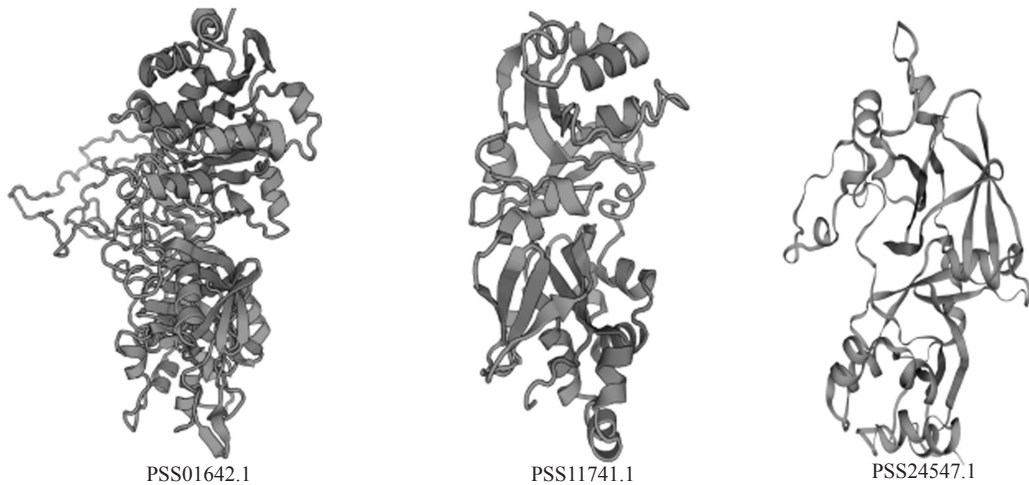


图3 猕猴桃*fasciclin*基因家族的蛋白三级结构

Fig. 3 Protein tertiary structure of the *fasciclin* genes family in kiwifruit

这些蛋白包含的 α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲的数目和长度不同,结构差异较大,进而行使不同的功能。

2.7 *FrBy* 基因克隆

研究发现,*FrBy* 基因能区别中华猕猴桃雌雄株,即在雌株中扩增不出特异性条带,只在雄株中扩增出 723 bp 的特异性条带(图 4-A),723 bp 序列(图 5)经鉴定具有 *fasciclin* 保守结构域。723 bp 的

序列在中华猕猴桃雌株中的比对结果如图 6 所示,由于目前公共数据库只有中华猕猴桃雌株 Red5 的基因组序列公布,723 bp 的序列只与雌株 8 号染色体上的一段序列比对上(E 值为 $5E-167$),分析发现雌株中的 *fasciclin* 同源序列中因有太多的终止密码子而没有基因注释到。*FrBy* 基因不能区分美味猕猴桃雌雄株(图 4-B)。

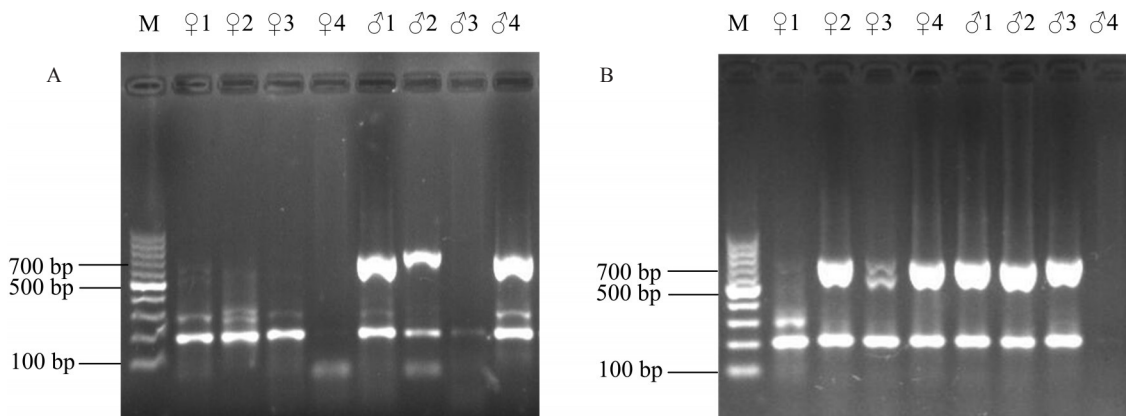


图4 *FrBy*基因在中华猕猴桃和美味猕猴桃中的扩增

Fig. 4 Amplification of *FrBy* gene in *Actinidia chinensis* and *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*

```

ATGGCAAAGTGGTCTCTCTCCATTCCTCCTAGTGGCGCTCACCCCTCGGGCCCCCTGT
GTCAAAGATCACAGCCATCTCCAACACCACAGCCACAGCCACCGTGGGCGGAGGAGGA
GCTCCAAGAAGAAATGGTCAACAACATAATCATGGCCCTAAACGCCCGGAAACTTT
GAGAGGTGGGCCAGCCTCTCTCGGCGGTGGCCAACCCCTCCAGCCTCCCTCTCAGCG
CCACCCATTATCCCGAGCGATGCTGCCCTCTCTCACTTTCCGGCAAGTAGCAGCAGT
AGTAGTAATTCTCCAATGGGCTTTGACCCATTCAATAATCCCATACCACATAGTCCCCAA
CGCCTCACCTTCTCACAGCTCCAACCTTTCAAACCAACACTCGCCTTCCACTCTTT
ACCGTCCAATTCCATTCTACTACTAACTCTTTCTCTAACTTCGCCCTCGATGCCTC
TCCTATCACCCATCCCGACCTCTACCTCGACTCTGCCGTCTCCCTCCATGGCATCACCA
CGTCTTTGATTACTCCCTTTATGGCGATGTCTCTCCTCTGCCTCCACCGGTTACCGTGGC
AGAGCCGCCGCCACCACCGCCACTGCATTTCCGAGGTCTGATGCGGCGTCGACGCTG
ATCATGAGCTTGGGCTGTGCTTTGGGTTGGACATTGTTTTCTGGTTGGTTATTTTAGG
GTTTGGGTTGTAA
    
```

图5 *FrBy*基因序列

Fig. 5 Sequence of *FrBy* gene

Actinidia chinensis var. chinensis cultivar Red5 chromosome LG19, whole genome shotgun sequence
 Sequence ID: [CM009672.1](#) Length: 15405244 Number of Matches: 2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
462 bits(250)	1e-128	250/250(100%)	0/250(0%)	Plus/Minus

Features: [Two-component response regulator like](#)

Query 1	ATGGGGAATTC AAGCACAAAGTGTAGTGGAAAGTAGCAAAAATTGCCTGGCAACAGGGAAC	60
Sbjct 5058433	ATGGGGAATTC AAGCACAAAGTGTAGTGGAAAGTAGCAAAAATTGCCTGGCAACAGGGAAC	5058374
Query 61	AAGTTCCTCCGTCTTGTGGTGGATGATGACCCCTGTAGTCCAAAGAATCCACAGGGTGTT	120
Sbjct 5058373	AAGTTCCTCCGTCTTGTGGTGGATGATGACCCCTGTAGTCCAAAGAATCCACAGGGTGTT	5058314
Query 121	TTGAATAGATTGGTTTTGAAACCAAGTGGTGGGAAATGGGAAAGAAGCTGTTGATTG	180
Sbjct 5058313	TTGAATAGATTGGTTTTGAAACCAAGTGGTGGGAAATGGGAAAGAAGCTGTTGATTG	5058254
Query 181	TATTGCTCGGGTCTTCTTTCCATTTGGTCTCATGGATATGGAATGCCTGTCATGGAT	240
Sbjct 5058253	TATTGCTCGGGTCTTCTTTCCATTTGGTCTCATGGATATGGAATGCCTGTCATGGAT	5058194
Query 241	GGTCCCAGG 250	
Sbjct 5058193	GGTCCCAGG 5058184	

图6 *FrBy*基因在中华猕猴桃 Red5 参考基因组的比对

Fig. 6 Alignment of *FrBy* gene with the Red5 sequence in *Actinidia chinensis*

3 讨论

在中华猕猴桃原变种和美味猕猴桃变种构成的复合体内,有二倍体、四倍体、六倍体、八倍体等^[13]多种倍性复杂的变种,导致该属植物性别鉴定一直没有种间通用的有效方法。可能在多倍化过程中发生了基因丢失、沉默、突变,以及染色体交换与重排等遗传学事件,导致不同变种的性别调控网络发生了变化。雌雄异株植物在生产中的作用往往不同,为了使它们各自的利用率达到最大化,前人通过猕猴桃叶片可溶性糖含量、同工酶酶谱、叶绿素含量、保护酶活性等生理指标的研究^[14-20],旨在找到区别雌雄株的指标,但这些指标由于受环境影响较

大而不稳定。分子标记在猕猴桃雌雄株中的鉴定也有报道,1998年 Gill 等^[21]从中华猕猴桃中鉴定的性别连锁 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 标记,由此 RAPD 标记转换的 SCAR (sequence characterized amplified regions) 比对在中华猕猴桃雌株 25 号染色体物理位置 5 812 462~5 813 320 处,此区域没有注释到基因;2005 年姚春潮等^[22]在美味猕猴桃×中华猕猴桃杂交的 F₁ 中获得的雄性特异标记和 Gill 等^[21]报道的一致。2015 年张琼等^[23]在山梨猕猴桃♀×中华猕猴桃♂的种间杂交 F₁ 代群体中,利用 RAD-seq (restriction site-associated DNA sequencing) 技术开发的 SSR (simple sequence repeats) 标记在中华猕猴桃雌株 25 号染色体物理

位置 2 612 027~2 612 317 处,此区域没有注释到基因;2018 年 Takashi 等^[24]报道 53%的雄性特异片段推测到 25 号染色体上,中华猕猴桃 25 号染色体上的基因可能在性别分化中发挥了很重要的作用。2018 年 Hale 等^[25]用 GBS (genotyping-by-sequencing) 技术在美国的软枣和狗枣猕猴桃中开发了性别连锁标记 aC36306 和 kC72369, aC36306 与精氨酸脱羧酶连锁, kC7236 标记在 *TVP38/TMEM64 family membrane protein like* 基因序列的内部。对以上报道的标记,笔者在中华和美味猕猴桃的自然群体中进行了雌雄株鉴定,都没有筛选到能 100% 鉴定的分子标记,可能是由于定位群体多为特异群体,开发的标记只适应特定的材料,也可能定位的连锁标记与性别决定基因的遗传距离较远,会发生标记位点与性别基因之间的交换,导致假阳(阴)性检测结果。从中华猕猴桃全基因组的关联研究发现,猕猴桃属进化中可能先有变种形成,后有雌雄分化形成,导致中华、美味、狗枣和软枣猕猴桃变种的性别分化机制不一致。因此,开发适应自然群体及不同猕猴桃变种的雌雄共分离标记非常重要。

4 结 论

从中华猕猴桃雌株 *fasciclin* 基因家族的生物信息看, *fasciclin* 基因不保守,可能为适应雌雄同株向雌雄异株进化及多倍化的需要,而本研究在中华猕猴桃雄株中克隆的含有 FAS 结构域的 *FrBy* 基因很保守,暗示了其与中华猕猴桃性别的关联性较强,雌株中 *FrBy* 的同源序列因有太多的终止密码子而没有注释到基因,也揭示了 *FrBy* 突变体中基因失活的一种机制。

参考文献 References:

- [1] 吕亮杰,陈希勇,胡梦芸,刘玉平,孙丽静,马乐,李辉. 小麦 SBP 基因家族生物信息学分析[J]. 华北农学报, 2018, 33(6): 8-16.
LÜ Liangjie, CHEN Xiyong, HU Mengyun, LIU Yuping, SUN Lijing, MA Le, LI Hui. Bioinformatics identification of SBP genes and expression profiles in wheat[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2018, 33(6): 8-16.
- [2] BASTIANI M J, HARRELSON A L, SNOW P M, GOODMAN C S. Expression of fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper[J]. Cell, 1987, 48(5): 745-755.
- [3] JOHNSON K L, JONES, B J, BACIC A., SCHULTZ C J. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multi-gene family of putative cell adhesion molecules[J]. Plant Physiology, 2003, 133(4): 1911-1925.
- [4] FAIK A, ABOUZOUHAIR J, SARHAN F. Putative fasciclin-like arabinogalactan-proteins (FLA) in wheat (*Triticum aestivum*) and rice (*Oryza sativa*): Identification and bioinformatic analyses[J]. Molecular Genetics & Genomics, 2007, 277(1): 97.
- [5] LI J, YU M, GENG L L. The fasciclin-like arabinogalactan protein gene, FLA3, is involved in microspore development of *Arabidopsis*[J]. Plant Journal, 2010, 64(3): 482-497.
- [6] TAN H X, LIANG W Q, HU J P. MTR1 encodes a secretory fasciclin glycoprotein required for male reproductive development in rice [J]. Developmental cell, 2012, 22(6): 1127-1137.
- [7] 郝小聪,徐磊,汪德州,房兆峰,柳珊,孙瑞,王伟伟,赵昌平,高世庆,唐益苗. 小麦类成束阿拉伯半乳糖蛋白编码基因 TaFLA 的克隆与表达分析[J]. 麦类作物学报, 2019, 39(11): 1276-1283.
HAO Xiaocong, XU Lei, WANG Dezhou, FANG Zhaofeng, LIU Shan, SUN Rui, WANG Weiwei, ZHAO Changping, GAO Shiqing, TANG Yimiao. Cloning and expression analysis of TaFLA encoding a fasciclin-like arabinogalactan protein in wheat [J]. Journal of Triticeae Crops, 2019, 39(11): 1276-1283.
- [8] TAKASHI A I, SARAH M P, ERIKA V G, ISABELLE M H, SHIGEO S S, MINORI S, ALANA F, MARK A M, MIKAELA J D, TIANCHI W, RIA R, CHARLOTTE V, PAUL D, ANDREW C A, KENJI B, IKUO K, RYUTARO T. Two Y chromosome-encoded genes determine sex in kiwifruit[J]. BioRxiv, 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/615666>.
- [9] SANTI L, WANG Y, STILE M R, BERENDZEN K, WANKE D, ROIG C, POZZI C, MULLER K, MULLER J, ROHDE W, SALAMINI F. The GA octodinucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene Bkn3[J]. Plant Journal, 2003, 34(6): 813-826.
- [10] HAMANT O, PAUTOT V. Plant development: a TALE story[J]. Comptes Rendus-Biologies, 2010, 333(4): 371-381.
- [11] NOLE-WILSON S, KRIZEK B A. DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(21): 4076-4082.
- [12] 陈丹丹,刘宏波,姜竹,李昊根,段芊芊,韩妮沙,郑月萍,郑志富. 拟南芥 GPAT9 的磷酸化位点对酶活性的影响分析[C]//中国作物学会油料作物专业委员会第八次会员代表大会暨学术年会综述与摘要集. 北京:中国作物学会, 2018: 179.
CHEN Dandan, LIU Hongbo, JIANG Zhu, LI Haogen, DUAN Qianqian, HAN Nisha, ZHENG Yueping, ZHENG Zhifu. Effect of GPAT9 phosphorylation site on enzyme activity in *Arabidopsis*[C]// Summary of the Eighth Member Congress and Academic Annual Meeting of the Oil Crops Professional Committee of the Chinese Crop Society. Beijing: The Crop Science Society of China, 2018: 179.
- [13] 闫春林. 中华猕猴桃复合体染色体倍性与 cpDNA 单倍型的

- 地理分布变异[D]. 武汉:中国科学院研究生院(武汉植物园), 2016.
- YAN Chunlin. Geographic distribution of variation chromosome ploidy and cpDNA haplotype in *Actinidia chinensis* complex[D]. Wuhan: Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, 2016.
- [14] 朱大业,尹光天,漆旺保. 中华猕猴桃雌雄株可溶性糖含量的差异[J]. 中南林学院学报, 1983, 8(2): 160-163.
- ZHU Daye, YIN Guangtian, QI Wangbao. Difference in soluble sugar content of male and female plants of *Actinidia chinensis* [J]. Journal of Central South Forestry University, 1983, 8(2): 160-163.
- [15] 晁无疾,张铜会. 猕猴桃雌雄株间同工酶差异研究[J]. 中国果树, 1987(2): 42-44.
- CHAO Wuji, ZHANG Tonghui. Studies on differences of isoenzymes between male and female plants of kiwifruit[J]. China Fruits, 1987(2): 42-44.
- [16] 韩桂军,贾存智,邓娴,韩小春,孟长军,毛祝新,张莹. 不同倍性紫果猕猴桃雌雄株光合特性及叶绿素的含量[J]. 贵州农业科学, 2017, 45(10): 40-43.
- HAN Guijun, JIA Cunzhi, DENG Xian, HAN Xiaochun, MENG Changjun, MAO Zhuxin, ZHANG Ying. Photosynthetic characteristics and chlorophyll content between male and female plants with different ploidy in *Actinidia arguta* var. *purpurea*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2017, 45(10): 40-43.
- [17] 孙贺,李旭,曹万万,姜丹,朴一龙. 软枣猕猴桃雌雄株 Vc 和色素含量及保护酶活性差异[J]. 延边大学农学学报, 2015, 37(2): 107-110.
- SUN He, LI Xu, CAO Wanwan, JIANG Dan, PIAO Yilong. Differences in protective enzyme activity and contents of Vc and pigments between female and male plants of *Actinidia arguta* (Seib. et Zucc.) Planch. ex Miq.[J]. Agricultural Science Journal of Yanbian University, 2015, 37(2): 107-110.
- [18] 李晓艳,王振兴,秦红艳,范书田,艾军. 软枣猕猴桃雌雄株花蕾发育过程中内源激素的动态变化[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(3): 281-286.
- LI Xiaoyan, WANG Zhenxing, QIN Hongyan, FAN Shutian, AI Jun. Dynamic variation of endogenous hormone during male and female flower buds development of *Actinidia arguta*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2016, 38(3): 281-286.
- [19] 郑涵予,李越,金香花,赵阳,罗广军. 软枣猕猴桃雌雄株生长过程中植株形态及主要次生代谢产物变化[J]. 延边大学农学学报, 2018, 40(4): 16-21.
- ZHENG Hanyu, LI Yue, JIN Xianghua, ZHAO Yang, LUO Guangjun. The variation of plant morphology and secondary metabolite of male and female *Actinidia arguta* during growth[J]. Agricultural Science Journal of Yanbian University, 2018, 40(4): 16-21.
- [20] 徐聆粤,姜丹,郭梦玉,黄圆博,朴一龙. 软枣猕猴桃雌雄株叶片中多胺含量的高效液相色谱检测[J]. 延边大学农学学报, 2016, 38(3): 220-225.
- XU Lingyue, JIANG Dan, GUO Mengyu, HUANG Yuanbo, PIAO Yilong. Determination of polyamine content in leaves of the male and female plants of *Actinidia arguta* by HPLC[J]. Agricultural Science Journal of Yanbian University, 2016, 38(3): 220-225.
- [21] GILL G P, HARVEY C F, GARDNER R C, FRASER L G. Development of sex-linked PCR marker for gender identification in *Actinidia*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97: 439-445.
- [22] 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): 12-16.
- 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): 12-16.
- [23] 张琼,黄宏文,刘春燕,钟彩虹,龚俊杰. 用于猕猴桃杂交群体雌雄性别鉴定的 SSR 分子标记 A003: 中国, 201410523043.8 [P]. 2014-09-30.
- ZHANG Qiong, HUANG Hongwen, LIU Chunyan, ZHONG Caihong, GONG Junjie. SSR molecular marker A003 for sex identification of kiwifruit hybrid populations: China, 01410523043.8[P]. 2014-09-30.
- [24] TAKASHI A, ISABELLE M H, HARUKA O, TAKUYA M, KENJI B, IKUO K, RYUTARO T. A y-encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in kiwifruit[J]. Plant Cell, 2018, 30(4): 780-795.
- [25] HALE I, MELO A T O, GUSTAFSON H. Sex-linked molecular markers for two cold-hardy kiwifruit species, *Actinidia arguta* and *A. kolomikta*[J]. European Journal of Horticultural Science, 2018, 83(4): 236-246.