



吕正鑫,刘青,廖光联,等.性别分子标记在毛花猕猴桃中的通用性验证[J].江西农业大学学报,2021,43(2):261-269.
LYU Z X,LIU Q,LIAO G L,et al.General validation of kiwifruit sex molecular markers in *Actinidia eriantha* Benth.[J].Acta agricul-
turae universitatis Jiangxiensis,2021,43(2):261-269.

性别分子标记在毛花猕猴桃中的通用性验证

吕正鑫¹,刘青¹,廖光联^{1,2},黄春辉¹,贾东峰¹,徐小彪^{1,2*}

(1.江西农业大学 农学院/猕猴桃研究所,江西 南昌 330045;2.江西农业大学 林学院,江西 南昌 330045)

摘要:【目的】猕猴桃是雌雄异株多年生木质藤本植物,其经济价值的主要载体为雌性植株的果实,将性别鉴定技术应用于早期实生苗对育种工作意义重大。目前已开发出可稳定鉴别中华猕猴桃和山梨猕猴桃种群性别的分子标记,可以检测出生物个体之间在核苷酸序列水平上的差异,极大降低了环境因素的干扰,验证这些标记在毛花猕猴桃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,从而在植株早期鉴定出其性别,以提高猕猴桃资源利用率。【方法】利用已知性别的10份江西野生毛花猕猴桃DNA样品作为材料,用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对PCR扩增产物进行检测,对退火温度进行多次筛选,确定最佳退火温度,对已报道的适用于某些猕猴桃品种的性别分子标记A001、A002、UDK96-009及UDK96-013等8个标记在毛花猕猴桃中的通用性进行验证。【结果】(1)8个分子标记中,A001、A002、UDK96-013和UDK96-019这4个标记均在毛花猕猴桃中能扩增出清晰明亮的多态性片段,但未能鉴别出有效的性别特异片段,因此不具备鉴定毛花猕猴桃性别的作用;(2)分子标记UDK96-009只在少量几个样品中扩增出较清晰的条带,但多态性较差,无法有效鉴定毛花猕猴桃的性别;(3)分子标记A003、UDK97-404和UDK97-408均无清晰的片段出现,同样无法鉴定出毛花猕猴桃的性别。【结论】本试验所使用的8个性别标记在毛花猕猴桃样品中扩增结果较差,未能在毛花猕猴桃中体现出良好的通用性,雌雄鉴定率较低,部分甚至无法扩增出清晰的条带,故这8个分子标记在鉴定毛花猕猴桃的性别上不具备通用性,无法用于毛花猕猴桃种质资源的性别鉴定。

关键词:毛花猕猴桃;分子标记;性别;鉴定

中图分类号:S663.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-2286(2021)02-0261-09

General Validation of Kiwifruit Sex Molecular Markers in *Actinidia eriantha* Benth.

LYU Zhengxin¹, LIU Qing¹, LIAO Guanglian^{1,2}, HUANG Chunhui¹,
JIA Dongfeng¹, XU Xiaobiao^{1,2*}

(1.College of Agronomy/Kiwifruit Institute of Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;
2.College of Forestry of Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: [Objective] Kiwifruit is a kind of dioecious perennial woody vine, the vitamin C content in fruit

收稿日期:2020-12-08 修回日期:2020-12-16

基金项目:国家自然科学基金项目(31760559)和江西省科技厅重点研发计划项目(20192ACB60002)

Project supported by National Natural Science Foundation of China(31760559)and the Jiangxi Provincial Department of Science & Technology(20192ACB60002)

作者简介:吕正鑫,orcid.org/0000-0002-3043-1384,13022213795@163.com;*通信作者:徐小彪,教授,博士,博士生导师,主要从事果树种质资源与生物技术研究,orcid.org/0000-0001-7357-6295,xbxu@jxau.edu.cn。

of *Actinidia eriantha* Benth. is 3–4 times higher than that in *A. chinensis* Planch. The plants of *Actinidia eriantha* have high resistance to environmental stresses. Their fruits are rich in minerals with good flavor and taste. *A. eriantha* is a kind of potential germplasm resource for high-quality new variety breeding. Dioecism is common for fruit trees, and the economic values of fruit trees are often greatly different due to the differences in sex. In production, kiwifruit fruits are produced by female plants, which are the main resources of economic value. However, male plants are mostly used as pairing trees for pollination and do not directly generate economic value. The juvenile period of kiwifruit is relatively long, generally 5–7a, while sexual identification is difficult in the juvenile period. It is significant to conduct early sex identification research by sex molecular markers for seedlings in the breeding process, which plays an important role in plantation configuration and breeding of new varieties. At present, molecular markers have been developed and that can be used to stably identify the sexes of specific populations of *A. chinensis* and *Actinidia rufa*, which also can be used to detect differences in nucleotide level among biological individuals, greatly reducing the interferences caused by environmental factors. Verifying the versatility of these molecular markers in the germplasm resources of *A. eriantha* can expand the application range of them in *Actinidia* species, thereby may be useful for identifying their sex in the early plant period and improving the utilization of kiwifruit resources. [Method] Eight kinds of reported molecular markers were used in this study. PCR products from DNA templates extracted from 10 different wild *A. eriantha* plants grown in Jiangxi with known sex were detected by polyacrylamide gel electrophoresis. In order to get clear and bright bands, the amplification temperature was screened for many times to find the possible most appropriate annealing temperature for these eight molecular markers in *A. eriantha*. [Result] The results showed that: (1) among the eight molecular markers, four markers, A001, A002, UDK96–013 and UDK96–019, could amplify clear and bright polymorphic fragments, the DNA ladder presented clear images, but effective sex-specific fragments were not identified, therefore, there did not function in identifying sex of kiwifruit; (2) the molecular marker, UDK96–009, only amplified clear bands in a few samples, but the polymorphism was poor, so it could not effectively identify the sex of *A. eriantha*; (3) the primers of molecular markers of A003, UDK97–404 and UDK97–408 did not amplify clear fragments, and it is also impossible to identify the sex of *A. eriantha*. [Conclusion] The eight sex-related molecular markers used in this experiment had poor amplification results in *A. eriantha* samples, and failed to show good versatility, the accuracy of male and female identification was low, some of them even did not amplify clear bands, so these 8 molecular markers are not universal in identifying the sex of *A. eriantha*, and they can not be used for sex identification in *A. eriantha* germplasm resources. Because of the complicated genetic background of kiwifruit, the reasons for the poor commonality of sex markers are unclear, and further research is needed to explain these results. It is speculated that the reason for this is that the sex determination of kiwifruit complies with Mendelian inheritance laws and is characterized by single gene control. However, the existing research is insufficient. Further study is needed to find means for sex determination of kiwifruit.

Keywords: *A. eriantha*; molecular markers; sex; identification

【研究意义】毛花猕猴桃(*Actinidia eriantha* Benth.)为猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia*)雌雄异株的多年生藤本果树,作为我国特有的猕猴桃种质资源,在长江以南200~1 000 m海拔处的山区广泛分布^[1]。目前世界猕猴桃的主栽品种比较单一,随着猕猴桃产业的发展,消费水平的升级,培育新的栽培品种具有重要意义^[2]。毛花猕猴桃果实维生素C含量为中华猕猴桃的3~4倍^[3],且具有抗逆性强、富含矿物质及风味好、口感佳等优点,有巨大的发展潜力,是潜在的优质猕猴桃种质资源选育的新品种^[4]。雌雄异株现象在果树作物中普遍存在,植株自身的经济价值往往因性别的差异而有很大不同。从形态学上看,猕猴桃科(Actinidiaceae)为功能性雌雄异株植物,目前生产上以雌株果实产生经济价值,其经济价值明显高于雄株,雄株在生产上多作为授粉配对用树,虽然雄花的花青苷含量较高、花色明艳、具有一定

观赏价值,但现阶段毛花猕猴桃的育种工作仍集中在优质雌株的选育方面。猕猴桃实生育种过程中童期较漫长,一般为5~7 a^[5],雌雄异株和幼苗期的性别很难分辨,对品种改良和育种工作造成阻碍。因此,对幼苗早期性别鉴定技术的研究将在极大程度上节约育种成本并缩短育种周期,在生产和遗传育种上都有重要意义。【前人研究进展】前人尝试利用形态学^[6]、生理生化^[7]和同工酶^[8]等方法鉴别猕猴桃的性别,但常因环境因素的影响导致结果准确度不高,随着分子生物学的发展,利用分子标记技术在基因层面鉴定亲缘关系的方法越来越受到学者们的青睐。SSR(simple sequence repeat)分子标记以个体间核苷酸序列变异为基础,可直接反映出生物个体遗传变异,可以检测出生物个体之间在核苷酸序列水平上的差异^[9],极大降低了环境因素的干扰,目前已在遗传多样性分析、指纹图谱构建及分子标记辅助育种等各个方面有广泛的应用^[10],在猕猴桃等雌雄异株植物中可有效鉴定早期性别。目前,在开发猕猴桃属植物性别鉴定分子标记的研究上取得了一些进展,但暂未有毛花猕猴桃上的相关报道。使用山梨猕猴桃(*Actinidia rufa*)和中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)原变种的种间杂交后代F₁群体进行试验,在174个F₁代个体中进行验证,利用RAD-seq技术开发的SSR(simple sequence repeats)标记,最终筛选出A001、A002和A003这3个有较好特异性的分子标记;A001为雌性特异标记,具有较高的鉴定准确性;A002和A003在雌、雄个体中均具有良好的差异性 & 多态性,可用于植株性别的鉴定;A003能够区分山梨猕猴桃和中华猕猴桃原变种;组合使用A001和A002这2个标记可有效鉴定中华猕猴桃和山梨猕猴桃性别^[11]。UDK96-009、UDK96-013、UDK96-019、UDK97-404及UDK97-408为‘和平红阳’猕猴桃上筛选出的在雌、雄株上表现出良好的差异性 & 多态性的SSR标记,其多态性百分比均在88.9%以上,可鉴定植株性别^[12]。

【本研究切入点】目前标记A001、A002和A003不仅在前人研究所涉及的材料中进行了应用验证,在其它品种如软枣猕猴桃上也已进行了通用性验证^[13],其余标记目前尚未有在其它栽培种类上的通用性验证。【拟解决的关键问题】目前关于毛花猕猴桃性别标记的报道较少,本试验利用已知性别的野生毛花猕猴桃种质资源作为材料,旨在探讨A001、A002、A003和UDK96-009、UDK96-013、UDK96-019、UDK97-404、UDK97-408两组分子标记在毛花猕猴桃性别鉴定中的通用性,以期为毛花猕猴桃育种群体的早期性别分子鉴定提供快捷、高效的方法,优化生产上早期的雌雄配比,加快育种进程。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验于2018—2019年进行,材料来自江西省麻姑山,采用已知性别的毛花猕猴桃样品10份(雌、雄各5株)。选择标准为树势较强、生长结果正常的成龄植株,采下其一年生枝蔓上的幼嫩叶片置于冰盒,随后立即带回实验室,转移至装满吸水硅胶的自封袋中,充分脱水干燥后保存待用。

1.2 标记来源

A001、A002及A003来自Zhang等,UDK96-009、UDK96-013、UDK96-019、UDK97-404及UDK97-408来自杨妙贤等,所用引物由上海生工生物工程有限公司合成提供,引物信息具体见表1。

1.3 DNA提取

使用北京华越洋生物科技有限公司生产的植物基因组DNA快速提取试剂盒,改良后的CTAB法提取DNA,选取猕猴桃雌雄株幼嫩叶片,放入自封袋中用硅胶充分脱水干燥,称取叶片100~200 mg,用磨样机研磨至细粉状。具体提取步骤均参照试剂盒说明书进行。所得DNA使用紫外分光计进行检测,并配合1%(ω)琼脂糖凝胶电泳法检测其质量及完整性是否合格。将模板DNA质量浓度稀释至20 ng/mL,保存于-20℃备用。

1.4 PCR扩增

PCR扩增程序:94℃预变性3 min,94℃变性30 s,47~64℃退火30 s,72℃延伸30 s,共28~34个循环,最后72℃延伸10 min于12℃保存。对不同引物的退火温度进行多次检验,筛选出最佳退火温度,以期每个标记所对应的产物中能产生清晰且长度一致的多态性条带。PCR扩增产物采用8%(ω)非变性PAGE电泳,快速银染法对条带进行检测,拍照记录后进行分析。

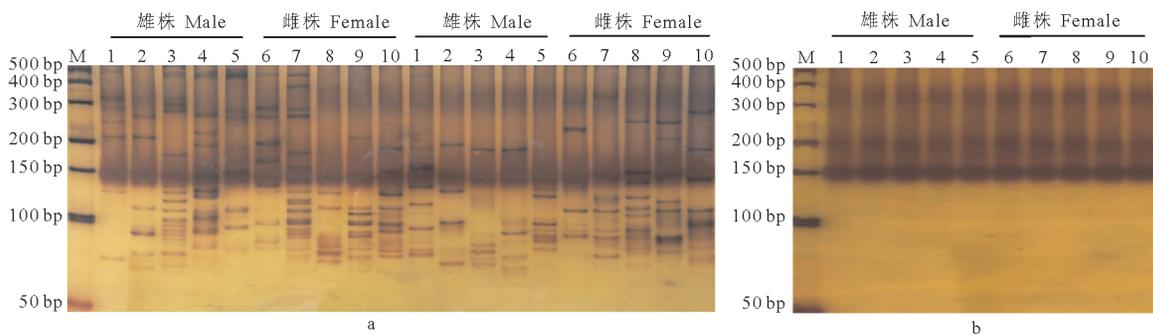
表 1 8 个猕猴桃性别标记引物信息
Tab.1 Information of eight kiwifruit gender marker primers

| 引物名称 Primer name | 序列(5'-3') Sequences(5' - 3') | 退火温度/℃ Annealing temperature | 鉴定标准 Judgement standard |
|---------------------|---|---------------------------------|------------------------------|
| A001 | F:TCAATGCATTTAGACATTCCTTTGTCCA R:TGGGTAAACATAACCACATGCCAAC | 54 | 202 bp Female 0 bp Male |
| A002 | F:TACTGACGGTCACTCCCTAATCCC R:CATGGATGGAAGTGGTGGAGGAAG | 56 | 219 bp Female 230 bp Male |
| A003 | F:GCAAGCGGGGTAAATTTGTACAG R:GGATAGGAGGAGCTTTACGGACCT | 56 | 304 bp Female 287 bp Male |
| UDK96-009 | F:CACTCACATGCCTTTACACACA R:AAGAGGCCACCAAAAACCTT | 51 | Polymorphism |
| UDK96-013 | F:ACGTGACTTGGTTTTTGAAGG R:CACTCGGATCAGCTCTCCTC | 55 | Polymorphism |
| UDK96-019 | F:ATACACTGAAGCGCCGC R:AAGCAGCCATGTGCATACG | 47 | Polymorphism |
| UDK97-404 | F:CGGCATTTTCTTTTAATGACC R:TTGCCTTGCTCTTGTTTCATG | 52 | Polymorphism |
| UDK97-408 | F:GTGCTCCTCCGTCATGTAT R:CGTCCTCTCTTCGCCATTTA | 64 | Polymorphism |

2 结果与分析

2.1 A001、A002 和 A003 标记在毛花猕猴桃样品中的验证结果

A001 和 A002 2 个标记在 10 个已知性别的毛花猕猴桃雌雄样品基因组 DNA 中的扩增结果显示,在 A001 和 A002 的扩增产物中均出现了多态性条带,但并未在雌雄株之间发现明显的规律,即 2 个标记对毛花猕猴桃种质资源均未能表现出性别特异性(图 1a);对 A003 标记的扩增结果进行观测分析,未能检测出清晰的多态性条带(图 1b)。



a 中 1~10 分别为 A001 标记在退火温度为 54 ℃、A002 标记在退火温度为 56 ℃ 的扩增结果;b 为 A003 标记在退火温度为 56 ℃ 的扩增结果

a is the amplification results of A001 at annealing temperature of 54 ℃ and A002 at annealing temperature of 56 ℃ at 1 to 10 lane respectively; b is the amplification results of A003 at annealing temperature of 56 ℃

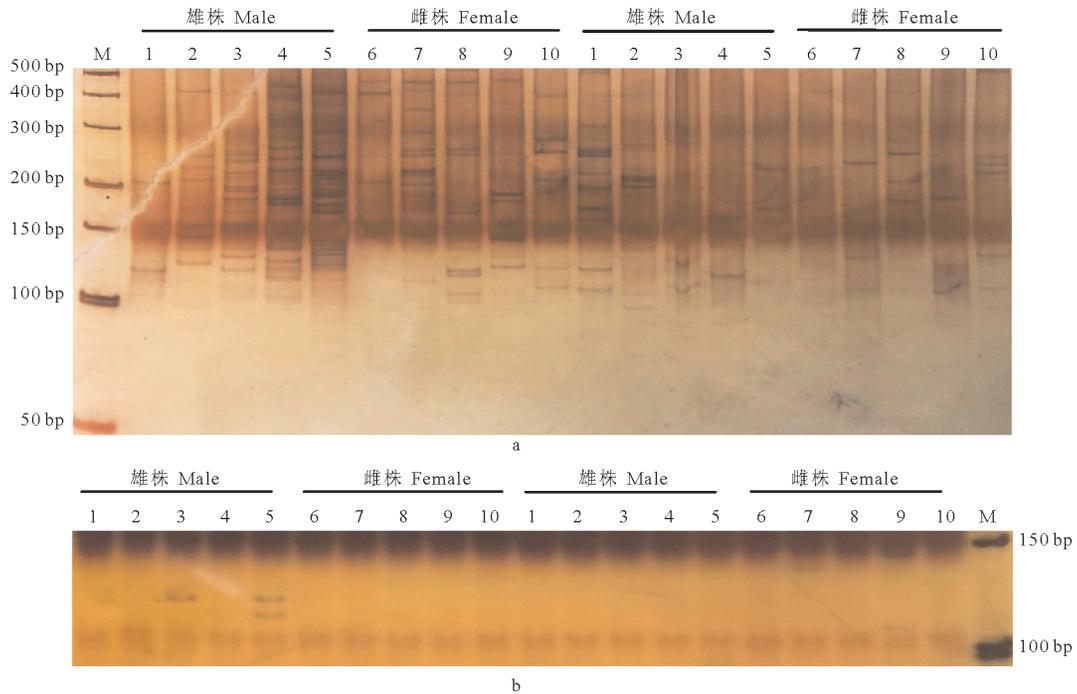
图 1 A001、A002 和 A003 标记的验证结果

Fig.1 The outcome of A001, A002 and A003

2.2 UDK96-009、UDK96-013 等 5 个标记在毛花猕猴桃样品中的验证结果

在对毛花猕猴桃基因组 DNA 扩增最适退火温度的多次检验后,UDK96-009 标记均无法检测出清晰

的多态性条带,结果与A003标记结果类似,无良好多态性;UDK96-013和UDK96-019标记的扩增产物中均出现了多态性片段,但并未在雌雄株之间发现明显的规律,即2个标记对毛花猕猴桃种质资源均未能表现出性别特异性(图2a);UDK97-404和UDK97-408标记分别在退火温度为52℃和64℃时部分样品扩增出少量多态性条带(图2b),无良好多态性。



a中1~10分别为UDK96-013标记在退火温度为56℃、UDK96-019标记在退火温度为47℃的扩增结果;b中1~10分别为UDK97-404标记在退火温度为52℃、UDK97-408标记在退火温度为64℃的扩增结果

a is the amplification results of UDK96-013 at annealing temperature of 56℃ and UDK96-019 at annealing temperature of 47℃ at 1 to 10 lane respectively; b is the amplification results of UDK97-404 at annealing temperature of 52℃ and UDK97-408 at annealing temperature of 64℃ at 1 to 10 lane respectively

图2 UDK96-013、UDK96-019和UDK97-404、UDK97-408标记的验证结果

Fig.2 The outcome of UDK96-013,UDK96-019 and UDK97-404,UDK97-408

3 讨论

对猕猴桃早期性别鉴定方法的研究在实践中有重要意义,作为雌雄异株的经济作物,猕猴桃雌株产生的经济价值往往远高于雄株,但因其童期较长且到达丰产的成熟期过长^[5],导致早期雌、雄株很难分辨,所以在生产上合理配置雌雄个体对提高产量及经济效益显得尤为关键。毛花猕猴桃的雄株相较于其它品种猕猴桃雄株不仅具有授粉的传统作用,更具有花色艳丽、花青素含量高的特点^[4],在实际生产中可作为观赏花推广,其花瓣中富含的花青素在抗氧化、抗癌及预防慢性代谢性疾病等方面有着良好的功效^[15]。王金硕等^[16]在对雄性软枣猕猴桃的研究发现,合理配置雄株具有确保产量、增加果实大小、减少畸形果和提高果实品质等优点,所以合理配置雄株,可进一步提高其经济价值。

目前对猕猴桃性别鉴定的方法主要有形态学标记、生理生化、同工酶鉴定和DNA分子标记等。形态学鉴定主要通过对生殖器官的研究进而区分雌雄株,观察雌雄株独有的器官或观察其在发育过程中的独特变化进而判断性别,对软枣猕猴桃和狗枣猕猴桃的生殖器官进行形态学解剖,发现其雌花中的雄蕊退化,雄花中的雌蕊退化,但总体上雌花与雄花在表型上非常相似^[17];软枣猕猴桃雌株叶痕间距和皮孔密度显著大于雄株,而枝条颜色、横切解剖结构、叶柄粗细长短和叶纵横径之比均未出现显著差异^[6]。生理生化是以雌雄植株在新陈代谢、特异蛋白质和生理指标等方面所体现出的差异为依据,对差异的分析鉴定雌雄株性别的一种方法,李旭等^[6]通过BTB法、TTC法和总酚含量测定等方法,测定软枣猕猴桃雌雄株在生理生化上的差异,在芦笋^[18]、栝楼^[19]、杨梅^[20]和复叶槭树^[21]等植物上

有相似结果,但这些方法目前只应用在成熟植株上,对童期植株是否使用还有待进一步研究。同工酶属于分子水平的指标,雌雄株间的某些本质差异可以通过其得以表现,这种方法通过对组织、发育及物种之间的特异性的检测分析,找出编码相应酶的等位基因间的差异^[22],因此同工酶是基因差异在表达水平的体现。如陈晓玲等^[23]采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对6个猕猴桃品种雌雄株的酯酶同工酶和过氧化物酶进行检测分析后发现,两者在不同猕猴桃品种中均存在一定差异,但对雌雄株进行酶谱分析时无特征条带出现,同工酶在鉴别猕猴桃性别的研究上目前依旧主要集中在成熟植株上,童期植株的适用性鲜有研究。DNA分子标记(DNA molecular markers)是DNA水平遗传变异的直接反映,与其它方法相比,具有采样要求低、测定结果易标准化和鉴定结果准确性高等优点^[24],目前RAPD、SCAR和AFLP等DNA分子标记常被用于猕猴桃性别鉴定研究,通过PCR技术与群体分离分析方法(Bulked Segregant Analysis, BSA)的结合,可在早期对雌雄异株植物的性别进行鉴定,其方法是根据目标性状将分离群体分为2组,构建在目标基因区段存在差异的2个基因混合池,提取基因池中DNA作为模板进行RAPD分析,2个基因混合池间多态性有差异的标记与目的基因必定产生关联,Gill等^[25]使用该方法开发出可用于鉴定中华猕猴桃原变种为亲本的3个家系(包括亲本及其产生的F1代)的SmY1和SmX,在马尾藻、巨体舌鱼和黄连木的性别鉴定研究中均有应用这种BSA混池测序技术,有较好的通用性。通过RAD-seq基因图谱技术得到了本试验所使用的A001、A002和A003这3个SSR分子标记,该技术能有效检测DNA多态性,且可对基因组序列尚不清楚的物种进行检测,大多数模式生物及部分非模式生物都有应用,如开心果和西瓜等。除本试验中所选用的8个标记,已开发出可用于鉴定中华猕猴桃原变种和美味猕猴桃原变种植株性别的RAPD标记S1032-850,但其尚未转化为相对更稳定、准确率更高的SCAR标记^[26],所以本文并未对其在毛花猕猴桃中的通用性进行验证。

目前对猕猴桃性别鉴定方法的研究主要集中于上述几种方法,随着分子研究技术的不断进步,对性别分化相关基因的研究不断深入,性别鉴定的研究深度便捷度、和准确度都有了很大的提升。植物体中的微RNA(microRNA miRNA)长约21 nt,通过转录后基因调控的方式参与调节多种植物发育和内外应答反应,如花器官发育和花的性别分化等^[27]。近年来,基于miRNA深度测序研究基因功能已在木瓜^[28]、玉米^[29]和杨树^[30]等多种植物之中都有应用。闫明科等^[31]运用高通量测序技术及生物信息学进行分析,对猕猴桃雌、雄花中表达的小RNA(sRNA)进行鉴定,得出其中进化上保守的miRNA,推测出新的雌、雄花特异miRNA,筛选出一批差异表达的miRNA并预测了其靶基因,从遗传学角度为猕猴桃雌、雄株的性别分化研究奠定基础^[31]。但有研究表明,植物的性别并不绝对取决于其遗传因子,植物激素和表观遗传修饰等因素也在一定程度上产生影响,因素之间相互独立又共同作用,在以花为主的被子植物生殖器官表型上这些因素的作用结果得到表现,使得性别表型产生多样性。猕猴桃染色体倍性复杂,如中华猕猴桃主要为二倍体和四倍体^[32],美味猕猴桃倍性较多,有四倍体、五倍体和六倍体^[33],毛花猕猴桃几乎均为二倍体^[34]。从遗传学角度来看,猕猴桃杂交后代群体的性别分化符合XY型性染色体性别决定系统^[35];对核型的进一步观察^[36]和多基因连锁图谱的构建^[37],发现中华猕猴桃的XY染色体的长度及外观形态非常类似,在被子植物性染色体进化的六个时期中^[38]的第二个时期,Y染色体上的亚端粒部位存在某些性别决定位点不能与X染色体自由重组,而这些缺乏重组的位点正是性别决定部位的特点^[39],同时在原始Y染色体上有一个小的雄性特异区形成,并且出现了全雄及全雌植株。据此发现,猕猴桃的性别分化表现与芦笋类似,认为猕猴桃的性染色体应处于进化阶段的第二个时期,此时Y染色体未能进化完全,仍处于早期进化阶段。文中所使用的8个标记均在中华猕猴桃原变种中得到验证,但在毛花猕猴桃上不具通用性,推测与以上原因有关,认为毛花猕猴桃可能在性别特异区域位置或序列上与原文研究的猕猴桃品种有差异所导致。

此外,在其它雌雄异株植物上也有诸多性别标记的报道,如杜仲^[40]、甜瓜^[41]和柿^[42]等都已开发出一系列用于鉴定性别的标记。本文所使用的8对标记均未有效鉴别出毛花猕猴桃的性别,分析认为是猕猴桃性别决定符合孟德尔遗传定律,表现为单基因控制的特点,但是现有研究仍然没有找到猕猴桃性别决

定相关的 QTL。目前已有报道的的性别决定相关 marker 在猕猴桃属不同种间存在局限性,因而,除了已报道的若干种外,其它猕猴桃种的性别鉴定需要开发新的分析标记。随着分子生物技术的不断进步,今后猕猴桃性别鉴定的研究也会更倾向于基因层面,但在探明其性别表型形成的机理之前,利用多种鉴别方法相结合进行性别鉴定,可在育种早期高效、精准的鉴定性别,可降低育种成本,加快田间育种进度,在发育早期更合理的配置雌雄植株,降低不必要的损耗,更好更快地促进育种产业的发展,为实现可持续发展做出保障。

参考文献 References:

- [1] VARKONYI G, ERIKA L, ROBYN H, et al. Kiwifruit floral gene APETALA2 is alternatively spliced and accumulates in aberrant indeterminate flowers in the absence of miR172[J]. *Plant molecular biology*, 2012, 78(4):417-429.
- [2] 栗琪,李作洲,黄宏文.猕猴桃野生居群的 SSR 分析初报[J]. *武汉植物学研究*, 2004, 22(2):175-178.
LI Q, LI Z Z, HUANG H W. Preliminary study on SSR analysis in natural populations of *Actinidia* [J]. *Plant science journal*, 2004, 22(2):175-178.
- [3] 钟彩虹,张鹏,姜正旺,等.中华猕猴桃和毛花猕猴桃果实碳水化合物及维生素 C 的动态变化研究[J]. *植物科学学报*, 2011, 29(3):370-376.
ZHONG C H, ZHANG P, JIANG Z W, et al. Dynamic changes of carbohydrate and vitamin C in fruits of *Actinidia chinensis* and *A. eriantha* during grown season[J]. *Plant science journal*, 2011, 29(3):370-376.
- [4] SEAL, A G. The plant breeding challenges to making kiwifruit a worldwide mainstream fresh fruit [J]. *Acta horticulturae*, 2003, 610:75-80.
- [5] 李旭,曹万万,姜丹,等.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 X, CAO W W, JIANG D, et al. 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.
- [6] 李旭,曹万万,姜丹,等.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 X, CAO W W, JIANG D, et al. Study on sex identification of *Actinidia arguta* by morphology and physiological biochemical [J]. *Northern horticulture*, 2014(24):6-9.
- [7] 石进校,刘应迪,李菁,等.美味猕猴桃米良 1 号的过氧化物酶活性[J]. *吉首大学学报(自然科学版)*, 2001, 22(2):36-37.
SHI J X, LIU Y D, LI Q, et al. Study on POD Activate of Kiwifruit [J]. *Journal of Jishou university (natural sciences edition)*, 2001, 22(2):36-37.
- [8] 王妹清,赵英琪,刘建朝,等.猕猴桃雌雄植株过氧化物酶同工酶的研究[J]. *经济林研究*, 1989, 7(2):30-33.
WANG M Q, ZHAO Y Q, LIU J C, et al. Electrophoretic study of peroxidase isoenzymes in male and female plants of *Actinidia* [J]. *Economic forest researches*, 1989, 7(2):30-33.
- [9] 刘明,王继华,王同昌. DNA 分子标记技术[J]. *东北林业大学学报*, 2003, 31(6):65-67.
LIU M, WANG J H, WANG T C. DNA molecular markers [J]. *Journal of northeast forestry university*, 2003, 31(6):65-67.
- [10] 黄秦军,苏晓华,张香华. SSR 分子标记与林木遗传育种[J]. *世界林业研究*, 2002, 15(3):14-21.
HUANG Q J, SU X H, ZHANG X H. Microsatellite marker and its application in tree genetics and breeding [J]. *World forestry research*, 2002, 15(3):14-21.
- [11] ZHANG Q, LIU C Y, LIU Y F, et al. High-density interspecific genetic maps of kiwifruit and the identification of sex-specific markers [J]. *DNA research*, 2015, 22(5):367-375.
- [12] 杨妙贤,刘文,周玲艳,等.利用多分子标记分析‘和平红阳’猕猴桃的性别差异[J]. *果树学报*, 2014, 31(1):13-19.
YANG M X, LIU W, ZHOU L Y, et al. Analysis of gender difference of *Actinidia chinensis* ‘Hepinghongyang’ using multiple-markers [J]. *Journal of fruit science*, 2014, 31(1):13-19.
- [13] 郭丹丹,钟云鹏,方金豹,等.猕猴桃性别分子标记在软枣猕猴桃中的通用性验证[J]. *果树学报*, 2019, 36(5):549-556.
GUO D D, ZHONG Y P, FANG J B, et al. Validation of kiwifruit sex molecular markers in *Actinidia arguta* [J]. *Journal of*

- fruit science, 2019, 36(5): 549-556.
- [14] 钟敏, 廖光联, 李章云, 等. 野生毛花猕猴桃雄花花器性状及 SSR 遗传多样性研究[J]. 果树学报, 2018, 35(6): 658-667.
- ZHONG M, LIAO G L, LI Z Y, et al. Genetic diversity of wild male kiwifruit (*Actinidia eriantha* Benth.) germplasms based on SSR and morphological markers[J]. Journal of fruit science, 2018, 35(6): 658-667.
- [15] 钟兰兰, 屠迪, 杨亚, 等. 花青素生理功能研究进展及其应用前景[J]. 生物技术进展, 2013, 3(5): 346-352.
- ZHONG L L, TU D, YANG Y, et al. Research progress on physiological functions of anthocyanins and their application prospects[J]. Current biotechnology, 2013, 3(5): 346-352.
- [16] 王金硕, 李立才, 李万洪, 等. 雄性软枣猕猴桃的作用及利用方式[J]. 人参研究, 2020, 32(2): 57-58.
- WANG J S, LI L C, LI W H, et al. Role and utilization of male *Actinidia eriantha*[J]. Ginseng research, 2020, 32(2): 57-58.
- [17] 王立军. 软枣猕猴桃的解剖学研究[J]. 吉林农业大学学报, 1990, 12(4): 34-38.
- WANG L J. Anatomical study of *Actinidia eriantha*[J]. Journal of Jilin agricultural university, 1990, 12(4): 34-38.
- [18] 杨俊杰, 张天翔, 蔡坤秀, 等. 用溴麝香草酚蓝鉴别芦笋成年植株的雌性[J]. 福建热作科技, 2008, 33(4): 18-19.
- YANG J J, ZHANG T X, CAI K X, et al. Identification of male and female asparagus plants with bromothymol blue[J]. Fujian science & technology of tropical crops, 2008, 33(4): 18-19.
- [19] 李珊, 程舟, 李彦, 等. 雌雄栝楼植株内含物比较研究[J]. 中草药, 2008, 39(2): 260-263.
- LI S, CHENG Z, LI Y, et al. Comparison of inclusions in female and male trichosanthes kirilowii individuals[J]. Chinese traditional and herbal drugs, 2008, 39(2): 260-263.
- [20] 李国梁, 林伯年, 沈德绪. 酚类物质在鉴别园艺雌雄性植物中的应用研究[J]. 园艺学报, 1993, 20(4): 397-398.
- LI G L, LIN B N, SHEN D X. Sex identification of horticultural dioecious plants by phenolics analysis[J]. Acta horticulturae Sinica, 1993, 20(4): 397-398.
- [21] 赵林森, 程向阳, 徐锡增, 等. 复叶槭雌雄株叶片中水溶性酚类物质的比较分析[J]. 新疆农业大学学报, 1998, 21(3): 229-232.
- ZHAO L S, CHENG X Y, XU X Z, et al. Comparative analysis on water soluble phenolic substances in male and female plant leaves of *Acer negundo* L.[J]. Journal of Xinjiang agricultural university, 1998, 21(3): 229-232.
- [22] 杨光瑞, 洪霞, 何海宁, 等. 同工酶检测方法及其研究进展[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(7): 21-24.
- YANG G R, HONG X, HE H N, et al. Isozyme detection method and its research progress[J]. Journal of Anhui agricultural sciences, 2019, 47(7): 21-24.
- [23] 陈晓玲, 梁红, 朱东华. 猕猴桃不同性别过氧化酶及酯酶同工酶分析[J]. 农业与技术, 2004, 24(1): 40-43.
- CHEN X L, LIANG H, ZHU D H. Analysis of est and pox isozyme in the sex of *Actinidia*[J]. Agriculture and technology, 2004, 24(1): 40-43.
- [24] POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. Molecular breeding, 1996, 2(3): 225-238.
- [25] GILL G P, HARVEY C F, GARDNER R C, et al. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*[J]. Theoretical & applied genetics, 1998, 97(3): 439-445.
- [26] 姚春潮, 王跃进, 刘旭峰, 等. 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 C C, WANG Y J, LIU X F, et al. Obtainment and application of RAPD marker S1032-850 linked to male gene in *Actinidia*[J]. Journal of agricultural biotechnology, 2005, 13(5): 557-561.
- [27] TAYLOR R S, TARVER J E, HISCOCK S J, et al. Evolutionary history of plant microRNAs[J]. Trends in plant science, 2014, 19(3): 175-182.
- [28] SONG Y P, MA K F, CI D, et al. Sexual dimorphism floral micro RNA profiling and target gene expression in andromonoecious poplar (*Populus tomentosa*)[J]. Plos one, 2013, 8(5): e62681.
- [29] ARYAL R, JAGADEESWARAN G, ZHENG Y, et al. Sex specific expression and distribution of small RNAs in papaya[J]. BMC genomics, 2014, 15(1): 20.
- [30] CHUCK G, MEELEY R, IRISH E, et al. The maize tasselseed4 micro RNA controls sex determinat and meristem cell fate by

- targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1[J].Nature genetics,2007,39(12):1517-1521.
- [31] 闫明科,徐强,刘春燕,等.基于microRNA深度测序的猕猴桃性别分化初探[J].园艺学报,2015,42(7):1260-1272.
YAN M K,XU Q,LIU C Y, et al.Preliminary investigation on sex differentiation of *Actinidia chinensis* by high-throughput microRNAs sequencing[J].Acta horticulturae Sinica,2015,42(7):1260-1272.
- [32] FERGUSON A R,O'BRIEN I E W,YAN G J.Ploidy in *Actinidia*[J].Acta horticulturae,1997,444:67-72.
- [33] 曾华,李大卫,黄宏文.中华猕猴桃和美味猕猴桃的倍性变异及地理分布研究[J].武汉植物学研究,2009,27(3):312-317.
ZENG H,LI D W,HUANG H W.Distribution pattern of ploidy variation of *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*[J].Plant science journal,2009,27(3):312-317.
- [34] 廖光联,陈璐,钟敏,等.88个猕猴桃品种(系)及近缘野生种的倍性变异分析[J].江西农业大学学报,2018,40(4):689-698.
LIAO G L,CHEN L,ZHONG M, et al.An analysis of ploidy in eighty-eight *Actinidia* cultivars (strains) and their wild relatives[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2018,40(4):689-698.
- [35] MC NEILAGE M .Progress in breeding hermaphrodite kiwifruit cultivars and understanding the genetics of sex determination//Ⅲ International Symposium on kiwifruit[J].Acta horticultural,1995,444:73-78.
- [36] 胡冬南,王子坚,江春艳,等.青钱柳幼树花性别分化规律[J].福建林学院学报,2013,33(1):52-55.
HU D N,WANG Z J,JIANG C Y, et al.Study on the flower sex differentiation regular of young *Cyclocarya paliurus*[J].Journal of forest and environment,2013,33(1):52-55.
- [37] FRASER L,TSANG G,DATSON P, et al.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.
- [38] RAY M,BENDAHDANE A,RENNER S S.Sex chromosomes in land plants[J].Annual review plant biology,2011,62(1):485-514.
- [39] 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.
- [40] 林开勤,赵德刚,李岩,等.杜仲性别相关EST-SSR标记的开发[J].林业科学,2016,52(10):146-152.
LIN K Q,ZHAO D G,LI Y, et al.Development of gender-related EST-SSR markers in *Eucommia ulmoides*[J].Scientia silvae sinicae,2016,52(10):146-152.
- [41] 张慧君,王学征,高鹏,等.甜瓜性别分化的研究进展[J].园艺学报,2012,39(9):1773-1780.
ZHANG H J,WANG X Z,GAO P, et al.Progress of study on sex differentiation in melon[J].Acta horticulturae Sinica,2012,39(9):1773-1780.
- [42] 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.