

与黄瓜雌性性状连锁的 *cs-acs1g* 基因特异片段克隆与鉴定

程立宝^{1,2}, 秦智伟¹, 李淑艳³, 丁国华¹, 周秀艳¹

(¹东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; ²中国科学院植物研究所, 北京 100093; ³孝感学院生命技术学院, 孝感 432000)

摘要:【目的】快速、准确划分出黄瓜雌性系是蔬菜育种工作者面临的重大任务, 为了弥补目前物理方法鉴定的缺陷, 本试验开展分子水平上鉴定的研究。【方法】从 GenBank 中查找到 *cs-acs1g* 基因序列, 根据该序列设计两对引物, 然后从黄瓜 (C0208) 雌性系材料中克隆 2 个基因片段, 利用 PCR 扩增方法及田间调查手段相结合, 验证 *cs-acs1g* 基因的 2 个片段和雌性系之间的相互关系。【结果】*cs-acs1g* 基因的 1 013 bp 片段为黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 雌性系所特有, 非雌性系没有此片段, 而 *cs-acs1g* 基因的 540 bp 片段无品种特异性。【结论】利用雌性系特异基因进行植株鉴定可以应用到实践中, 是一种简便、快捷的可取方法。

关键词: 黄瓜; *cs-acs1g* 基因; 雌性系; 特异性

Cloning and Identification of Special *cs-acs1g* Gene-Linked to Gynoecious in Cucumber

CHENG Li-bao^{1,2}, QIN Zhi-wei¹, LI Shu-yan³, DING Guo-hua¹, ZHOU Xiu-yan¹

(¹Horticultural College of Northeast Agricultural University, Haerbin 150030; ²The Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093; ³Life Science and Technique College of Xiaogan University, Xiaogan 432000)

Abstract: 【Objective】This study was conducted to help identify gynoecium quickly and effectively. Our target was to develop a new method at the molecular level to overcome physical shortcomings. 【Method】We discovered the sequence of *cs-acs1g* gene from GenBank and designed two pairs of primers according to this gene. Two gene partials were cloned from gynoecium of cucumber (C0208). The relationship between *cs-acs1g* gene and gynoecium was validated through a combination of PCR method and investigations. 【Result】1 013 bp partial of *cs-acs1g* gene was unique to gynoecium of cucumber (*Cucumis sativus* L.) while this phenomenon didn't exist in gynoecium, 540 bp partial of this gene existed commonly in all the cucumber varieties. 【Conclusion】It was an available measure depending on gynoecium's special gene and enabled quick identification.

Keywords: Cucumber (*Cucumis sativus* L.); *cs-acs1g* gene; Gynoecium; Speciality

0 引言

【本研究的重要意义】黄瓜产量是衡量品种好坏的标准之一, 育种工作中, 雌性系 (即群体内多数为纯雌株, 少数为强雌株) 和纯强雌株系 (群体内全部或大部分为强雌株, 有时有少数纯雌株)^[1]是重要的种质资源, 是提高产量的前提和基础。然而如何快速、准确地进行资源鉴定这一问题尚未解决, 还是一项重大的挑战。目前, 划分黄瓜性型类别的主要方法是花

期通过调查后统计雌雄比和第一雌花节位, 但对于一些纯强雌株系来讲还没有一个确切的衡量标准。通常认为雌雄比较大, 第一雌花节位较低的品系为强雌株系, 对于一些雌性不是很强的品种, 其雌性系很容易和非雌性系相互混淆, 所以利用分子手段进行黄瓜资源划分变得非常必要。【前人研究进展】近些年来, 有许多关于性别分化机理研究的报道。郭素英^[2]等表明, 黄瓜性型分化受 F、m 和 a 等 3 个主效基因决定, 这些性别决定位点间的相互作用导致植株从纯雌株,

收稿日期: 2005-11-17; 接受日期: 2006-04-07

基金项目: 国家“863”计划项目 (2002AA07013)

作者简介: 程立宝 (1975-), 男, 博士, 研究方向为植物分子生物学。Tel: 010-62836050; E-mail: chenglibao453453@163.com。通讯作者秦智伟 (1957-), 男, 教授, 研究方向为蔬菜作物遗传育种、生物技术及蔬菜采后处理、保鲜与加工。Tel: 0451-55190058; E-mail: qinzw@neau.edu.cn

纯雄株到两性株的一系列性别分化。陈惠明^[3]等阐述了黄瓜性别决定基因及其功能: F/f 是部分显性控制雌性基因; A/a 可增加雄性; M/m 基因决定单花结构。Trebish^[4]1997 年在试验中利用简并引物发现 *cs-acs1g* 基因和 F 位点相连,说明此基因和雌性系有相关关系。叶波平^[5]等报道了 *cs-acs1g* 基因和雌性系之间存在“有”和“无”的关系。同时提出 *cs-acs1g* 基因可能是黄瓜雌性系的分子标记。但陈劲枫^[6]等通过试验得出 *cs-acs1g* 基因和 F 位点没有相关关系,和黄瓜雌性系也不存在“有”和“无”的关系。Mibus H^[7]提出 *cs-acs1g* 基因为雌性系和亚雌性系特有,其中亚雌性系基因型为 F/f。同时,陈惠明^[8]也说明 *cs-acs1g* 基因和 F 位点确实存在相关关系。【本研究切入点】到现在为止,关于此基因的研究还停留在理论水平,是否能够应用到实践中,在实际应用中有多大价值还是未知数。【拟解决的关键问题】为了澄清上述对于 *cs-acs1g* 基因的争论,尽快找到雌性系特异性基因并且应用到实践中来,本试验先后从雌性系中克隆 2 个基因片段,利用 PCR 和田间调查相结合的方法,对 *cs-acs1g* 基因 2 个基因片段进行验证,为快速识别雌性系提供依据,为今后加快品种选育,提高育种效率打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

本试验于 2003~2005 年完成,室内试验在东北农业大学生命科学技术中心进行、田间试验在东北农业大学园艺学院瓜类课题组塑料大棚内进行。

1.2 试验材料

基因克隆所用材料为 C0208 (雌性系); 基因特异性鉴定所用的材料为: 雌性系材料 D0118、拉斯特和康德; 非雌性系材料为: L18-10-2、129-1、D0519、D0450、D0454 和津研 4 号; 参加田间调查的黄瓜材料为: (1) 雌性系: 拉斯特、康德、D0427; (2) 纯强雌株系: D0407、D0331、C0208; (3) 其它非雌性系: D0351、津春 4 号、D0432、L18-10-2、651、津春 3 号、D0432、609、津春 5 号、1058-1、2002-1、315、129、北进、D0442、D0450、D0454。本试验从育种实践角度出发,将“雌性系和纯强雌株系”^[1]一并视为雌性系。以上品种均由东北农业大学园艺学院瓜类课题组提供。

1.3 试验方法

1.3.1 材料处理及 DNA 的提取 基因克隆所采用的

黄瓜种子经流水清洗后,50℃清水浸泡 30 min,直接播种于苗盘中,播种时间为 2004 年 3 月中旬,基因组提取为子叶期利用 SDS 方法进行^[9]; 基因特异性鉴定所用的材料 2004 年 6 月浸种催芽,子叶期采用 SDS 方法提取黄瓜的总 DNA。田间调查的黄瓜材料在 2004 年 3 月 10~15 日浸种催芽,播种于苗盘中,待子叶长出后进行分苗,子苗移植于 8 cm×8 cm 的营养钵中,苗龄期为 45~50 d,4 月 25~30 日定植于塑料大棚内,每个品种定植 10 株,选取 5 株长势良好的株体利用黑墨水涂抹花瓣标记方法进行花期调查,调查时间为每天上午 8:00~9:00 点,做好记录,花期调查的内容有: 第一朵雌花节位、前 20 节内花的性别。

1.3.2 *cs-acs1g* 基因片段的克隆 根据 Trebish 在 GenBank 发表的序列 (U59813), 利用 Primer5.0 软件设计两对引物,由上海生工合成。

P₁ (1 013 bp 基因片段) 引物的设计:

引物 1 5'-GATGGGTCTTGCCGAGAA-3'; 引物 2: 5'-GAGCGAAGCTGGACATTTTAGT-3'

P₂ (540 bp 基因片段) 引物的设计:

引物 1: 5'-GGCGGAAATTAGAGGAAACAAA-3'
引物 2: 5'-CCCAAAAACGGTCCCAGA-3'

PCR 反应体系: 上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 1 μl, dNTP (2 mmol·L⁻¹) 2 μl, 黄瓜基因组 (c0208: 1 μmol·L⁻¹) 1 μl, Taq DNA 聚合酶 (5 U·μl⁻¹) 0.2 μl, 10×Buffer 2.5 μl, MgCl₂ 25 mmol·L⁻¹ 2 μl, ddH₂O 15.3 μl, 总体系为 25 μl。

PCR 反应程序: 94℃预变性 7 min; 94℃变性 1 min; 54℃退火 1 min; 72℃延伸 1 min; 72℃延伸 10 min; 4℃终止反应,共 35 个循环。

PCR 产物的连接、转化、酶切鉴定及测序: PCR 产物经过 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,片段长度与目标片段大小相符合,利用上海华舜生物公司琼脂糖凝胶回收试剂盒回收产物,然后连接 PGEM-T-easy vector 载体、转化、蓝白斑鉴定,提取质粒后经过 *Eco*I 酶切,鉴定阳性克隆,测序由上海生工完成。

2 结果与分析

2.1 2 个 *cs-acs1g* 基因片段的克隆

从黄瓜雌性系材料 (C0208) 得到 PCR 产物可以看出,2 个目的片段分别在 500~600 bp 和 900~1 000 bp 之间,符合要求的目基因片段的大小,利用试剂盒提取质粒后经 *Eco*I 酶切。把质粒进行测序 (上海生工完成),测序结果经比对后同源性都为 99%,基因

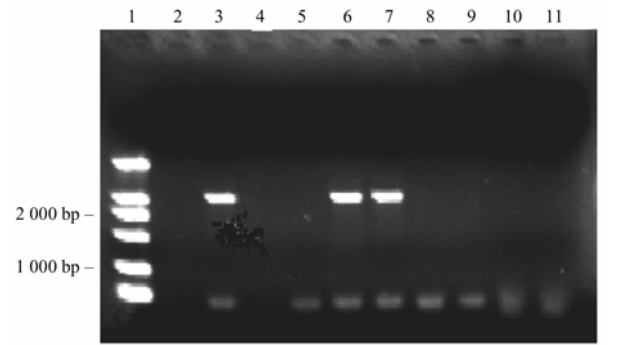
片段大小为 540 bp 和 1 013 bp, 分别位于 1997 年 Trebitsh 发表序列的 295~835 bp 和 12~1 025 bp, 其中 540 bp 基因片段为 1 013 bp 基因片段的中间部分 (Trebitsh 发表的基因片段为 1 025 bp)。

2.2 *cs-acs1g* 基因片段特异性验证

2.2.1 利用 P₁ 引物对 9 个品种进行 PCR 反应 图 1 是利用 P₁ 为引物, 对几种已知的不同性别类型的黄瓜进行 PCR 扩增的结果, PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳表明, 所利用的 3 种雌性品种都扩增出特异带 (3 道、6 道和 7 道), 而非雌性系没有出现特异带。因此可以初步说明上述克隆的 1 013 bp 基因片段为雌性系特有。

2.2.2 利用 P₁、P₂ 引物对 23 份黄瓜种质资源进行筛选 由图 2 可以看出, 利用 P₁ 作为引物分别在 2、5、11、16、17、19 泳道扩增出特异条带, 其它泳道没有 PCR 产物。图 3 是利用 P₂ 引物对相同的 23 个品种在同样条件下进行 PCR 反应, 全部扩增出产物, 表明以 P₂ 为引物所得到的产物没有特异性。

2.2.3 田间试验调查结果 由表可以看出: 拉斯特、D0427、D0407、D0331、康德、C0208 从第一雌花节位和雌雄比两方面具备了雌性系的特征, 而其它品种没有雌性系的特征。综合图 2、3 分析, 由 P₁ 引物对 23 份试验材料 PCR 扩增结果和田间调查结果相吻合, 吻合度达到 100%, 表明了 *cs-acs1g* 基因的 1 013 bp 基因片段为雌性系所特有; 相反, 以 P₂ 为引物在所有供试品种中都出现扩增产物, 结合田间调查说明 540 bp 基因片段没有特异性。



1. DNA marker (DGL2000); 2. 空白对照; 3. D0118; 4. L18-10-2; 5. 129-1; 6. 拉斯特; 7. 康德; 8. D0432; 9. D0454; 10. D0450; 11. 津研 4 号

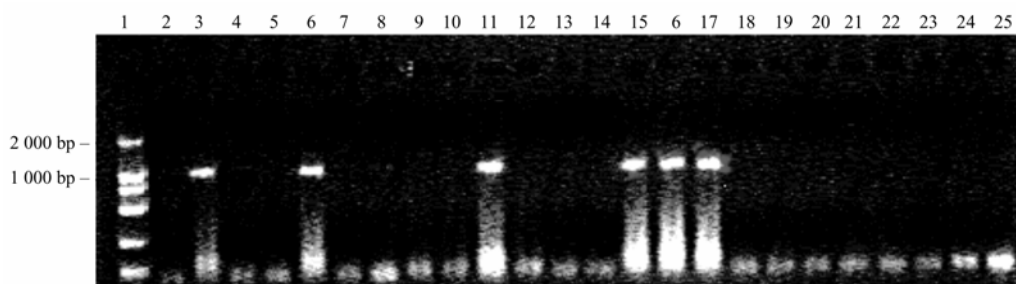
1. DNA marker (DGL2000); 2. Blank control; 3. D0118; 4. L18-10-2; 5. 129-1; 6. Lasete; 7. Kangde; 8. D0432; 9. D0454; 10. D0450; 11. Jinyan 4

图 1 不同性别类型黄瓜 PCR 鉴定图

Fig. 1 Identification figure of different genotype with PCR

3 讨论

众所周知, 瓜类果实的形成是遗传基因和环境相互作用的结果^[10, 11]。从遗传角度来讲, 控制黄瓜雌花分化来自于一个基因家族, 家族成员包括 *cs-acs1*、*cs-acs2*、*cs-acs3*、*cs-acs4* 基因^[12]。在黄瓜雌性系中, *cs-acs1g* 基因属于 *cs-acs1* 基因, 是雌性系所特有^[4], 这和本试验克隆的 1 013 bp 基因片段相吻合, 然而此基因的 540 bp 片段没有性型特异性, 这和陈劲枫^[6]得到的试验结果相同 (其报道的基因片段大约为 0.8 kb

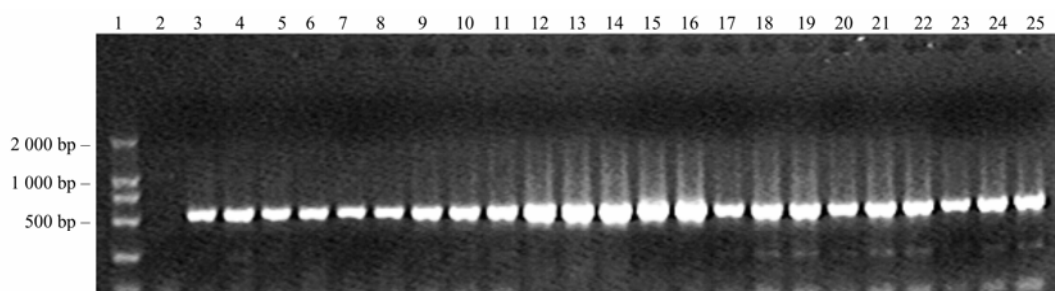


1. DNA marker (DGL2000); 2. 空白对照; 3. 拉斯特; 4. 津春 4 号; 5. D0432; 6. D0427; 7. L18-10-2; 8. 651; 9. 津春 3 号; 10. D0519; 11. D0407; 12. 609; 13. 津春 5 号; 14. 1058-1; 15. 康德; 16. D0331; 17. C0208; 18. D0315; 19. 315; 20. 2002-1; 21. 129; 22. 北进; 23. D0442; 24. D0450; 25. D0454

1. DNA marker (DGL2000); 2. Blank control; 3. Lasete; 4. Jinyan 4; 5. D0432; 6. D0427; 7. L18-10-2; 8. 651; 9. Jinchun 3; 10. D0519; 11. D0407; 12. 609; 13. Jinchun 5; 14. 1058-1; 15. Kangde; 16. D0331; 17. C0208; 18. D0351; 19. 315; 20. 2002-1; 21. 129; 22. Beijing; 23. D0442; 24. D0450; 25. D0454

图 2 利用 P₁ 引物对 23 个黄瓜品种 PCR 扩增的结果

Fig. 2 PCR amplified results with P₁ primer for 23 varieties of cucumber



1. DNA marker (DGL2000); 2. 空白对照; 3. 拉斯特; 4. D0351; 5. 津春 4 号; 6. D0427; 7. D0432; 8. L18-10-2; 9. 651; 10. 津春 3 号; 11. D0519; 12. D0407; 13. 609; 14. 津春 5 号; 15. 1058-1; 16. 2002-1; 17. D0331; 18. 康德; 19. 315; 20. C0208; 21. 129; 22. 北进; 23. D0442; 24. D0450; 25. D0454

1. DNA marker (DGL2000); 2. Blank Control; 3. Lasete; 4. Jinyan 4; 5. D0432; 6. D0427; 7. L18-10-2; 8. 651; 9. Jinchun 3; 10. D0519; 11. D0407; 12. 609; 13. Jinchun 5; 14. 1058-1; 15. Kangde; 16. D0331; 17. C0208; 18. D0351; 19. 315; 20. 2002-1; 21. 129; 22. Beijin; 23. D0442; 24. D0450; 25. D0454

图 3 利用 P₂ 引物对 23 个品种 PCR 扩增的结果

Fig. 3 PCR amplified result with P₂ primer for 23 varieties of cucumber

表 花期雌雄比、第一朵雌花节位田间调查结果 (前 20 节)

Table Investigation of proportion of females and male flowers and location of first female flower node

品种	第一雌花节位	雌/雄	品种	第一雌花节位	雌/雄
Varieties	First node of female flowers	Female/male flowers	Varieties	First node of female flowers	Female/male flowers
拉斯特 Lasete	3.4	111/27	1058-1	3	69/104
D0351	4.8	85/444	2002-1	4	62/270
津春 4 号 Jinchun 4	4.4	43/170	D0331	4.2	120/66
D0427	3.6	128/12	康德 Kangde	3.4	无雄花 No male flower
D0432		无雌花 No female flower	315	4.4	87/212
L18-10-2	5.8	86/353	C0208	3	109/59
651	3.4	77/58	129	7	38/128
津春 3 号 Jinchun 3	6	55/201	北进 Beijin	6.2	61/66
D0519		无雌花 No female flower	D0442	12.6	7/195
D0407	6.4	109/9	D0450	10.25	14/211
609	4.6	63/215	D0454	11.8	13/200
津春 5 号 Jinchun 5	4.6	58/189			

左右), 说明此基因的 295~835 bp 之间序列无特异性。Mibus H^[7]和陈惠明^[8]都阐述了 *cs-acs1g* 基因的特异性部分在此基因片段的前端, 这和本试验的结果有相同之处, 为什么此基因的 540 bp 片段没有特异性而 1 013 bp 有特异性, 说明 *cs-acs1g* 基因并非全部序列都特异, 基因特异片段长度有多大, 目前尚不能够确定, 但通过 1 013 bp 和 540 bp 两个片段克隆的研究, 可以对此基因特异序列进行初步的定位, 为今后进行此基因及其功能的研究提供必要的理论依据。综合本试验结果和其它报道来看, 此基因特异性部分可能是感受外界环境因子的一段核苷酸序列, 能够和外界环境因子相互作用, 影响下游基因以及其它基因的表达, 进而控制性型分化, 如果能够明确这段特异核苷酸序列, 势必对今后了解雌花形成的分子机理有着重要的

影响。有趣的是除了此基因控制雌性系之外, 还存在另外一个基因也控制雌性系^[5], 但对这个基因的了解很少。

外界环境在很大程度上影响黄瓜的性型, 例如 ETH、IAA 能诱导雌花形成, 使雌花数量增多^[13-15], 苗期的光照强度和温度的高低同样会影响花芽分化和最后的性别决定, 这给鉴定工作带来很多麻烦。虽然苗期鉴别雌性系的方法很多, 主要是物理和化学方法, 例如溴麝香草酚蓝法、还原辅酶和 TTC 法等, 但鉴定结果不具备普遍性^[16]。近几年来在石刁柏中成功的利用 SSR 技术、RAPD 技术进行资源划分^[17], 然而在黄瓜中还没有报道, 利用分子标记技术来鉴定雌性系是未来几年黄瓜育种工作的发展方向。 *cs-acs1g* 基因能不能是雌性系的分子标记还有待于进一步试验说明,

但可以肯定说它是雌性系特有基因, 这为我们今后的研究打下基础。黄瓜的性型分化, 一方面是由遗传基因控制, 另一方面也受环境条件的影响。目前普遍认为鉴别黄瓜性型还依赖于传统田间调查, 而田间调查的结果由于受栽培环境的影响, 经常会出现判断上误差。同时对于普通的遗传育种而言, 鉴别某一个品种的类型要经过很长时间, 因此会消耗大量的人力、物力。尤其是在没有确切划分黄瓜性型的量化标准的情况下, 鉴别一些纯强雌性系、雌性系和弱雌性系, 由于雌雄比和第一雌花节位有时与非雌性系比较相近, 这就给雌性系的鉴定带来较大的困难。如果引入生物学手段再结合田间调查进行综合鉴定, 在很大程度上可以克服外界环境给田间调查带来的影响, 也克服分子生物学试验过程中由于假阳性的现象造成主观和客观上的误差, 因此提高了选择的准确性, 加快了选择进度。

4 结论

4.1 本试验利用两对 PCR 引物, 从 C0208 黄瓜品种中克隆两个不同长度的基因片段, 其中长的片段包括短的片段。通过不同性型黄瓜品种的 PCR 鉴定, 证明了 *cs-acs1g* 基因中 1 013 bp 基因片段为雌性系特有, 非雌性系没有此基因; 而 540 bp 长度的片段无特异性。

4.2 根据 1 013 bp 基因片段设计一对引物, 对 23 份黄瓜品种进行资源鉴定, 从中识别出 6 份雌性系材料 (其中包括 1 份雌性系和 5 份纯强雌性系), 非雌性系材料 17 份, 花期调查结果证明了 PCR 鉴定结果准确性达到 100%。

References

- [1] 谭其猛. 蔬菜育种. 北京: 农业出版社, 1980: 204-205.
Tan Q M. *Vegetable Breeding*. Beijing: Agricultural Press, 1980: 204-205. (in Chinese)
- [2] 郭素英, 张兴国, 侯瑞贤, 孙涌栋, 毕喜红, 苏承刚. 黄瓜性型分化机理研究进展. 西南园艺, 2005, 33(增): 77-78, 88.
Guo S Y, Zhang X G, Hou R X, Sun Y D, Bi X H, Su C G. The development of the mechanism of sex differentiation in cucumber. *Southwest Horticulture*, 2005, 33 (Suppl.): 77-78, 88. (in Chinese)
- [3] 陈惠明, 卢向阳, 许亮, 易克, 田云. 黄瓜性别决定相关基因和性别表达机制. 植物生理学通讯, 2005, 41(1): 7-13.
Chen H M, Lu X Y, Xu L, Yi K, Tian Y. Sex Determination genes and sex expression mechanism in cucumber. *Plant Physiology Communications*, 2005, 41 (1): 7-13. (in Chinese)
- [4] Trebish T, Staub J E, O'Neill S D. Identification of a l-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene linked to the *Female(F)* locus that enhance female sex expression in cucumber. *Plant physiology*, 1997, 113: 987-995.
- [5] 叶波平, 吉成均, 杨玲玲, 杨中汉, 王永健, 曹宗巽. 不同性别表型黄瓜基因组中雌性系特异的 ACC 合酶基因. 植物学报, 2000, 42(2): 164-168.
Ye B P, Ji C J, Yang L L, Yang Z H, Wang Y J, Cao Z X. Studies on a gynoecious-specific ac synthase gene in different sexual phenotypes of cucumber genome. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42 (2): 164-168. (in Chinese)
- [6] 娄群峰, 陈劲枫, Molly Jahn, 陈龙正, 耿红, 罗向东. 黄瓜全雌性基因连锁的 AFLP 和 SCAR 分子标记. 园艺学报, 2005, 32(2): 256-261.
Lou Q F, Chen J F, Jahn M, Chen L Z, Geng H, Luo X D. Identification of AFLP and SCAR molecular markers linked to gynoecious loci in *Cucumis sativus* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32(2): 256-261. (in Chinese)
- [7] Mibus H, Tatlioglu T. Molecular characterization and isolation of the *F/f* gene for femaleness in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 2004, 109:1669-1676.
- [8] 陈惠明, 许亮, 卢向阳, 易克, 许勇, 张海英, 刘晓虹. 黄瓜雌性性状主控基因 *CsACS1G* 的分析及其定位. 分子植物育种, 2005, 3(4): 520-524.
Chen H M, Xu L, Lu X Y, Yi K, Xu Y, Zhang H Y, Liu X H. Analysis on *CsACS1G* Gene determining gynoecious and location in cucumber. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(4): 520-524. (in Chinese)
- [9] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第二版). 北京: 科学出版社, 2002: 744-746.
Wang G L, Fang H J. *Plant Gene Engineering (2nd)*. Beijing: Science Press, 2002: 744-746. (in Chinese)
- [10] Malepszy S, Niemirowicz-Szczytt K. Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) as a model system for molecular biology. *Plant Science*, 1991, 80(1-2):39-47.
- [11] Papadopoulou E, Little H A, Hammar S A, Grumet R. Effect of modified endogenous ethylene production on sex expression, bisexual flower development and fruit production in melon (*Cucumis melo* L.). *Sex Plant Reprod*, 2005, 18: 131-142.
- [12] Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H. Photoperiodic regulation of *CS-ACS2*, *CS-ACS4* and *CS-ERS* gene expression contributes to the femaleness of cucumber flowers through diurnal ethylene production under shortday condition. *Plant, Cell and Environment*, 2003, 26:

- 537-546.
- [13] 陈学好, 曾广文, 曹碚生. 黄瓜花性别分化和内源激素的关系. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 317-320.
- Chen X H, Zeng G W, Cao P S. Relationship between endogenous plant hormones and floral sex differentiation in cucumber (*Cucumis sativus*). *Plant Physiology Communications*, 2002, 38(4): 317-320. (in Chinese)
- [14] Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H. Characterization of ethylene effects on sex determination in cucumber plants. *Sex Plant Reprod*, 2003, 16: 103-111.
- [15] 陈学好, 陈艳萍, 曹碚生, 曾广文. 黄瓜雌雄株性别苗期化学鉴别方法. 中国蔬菜, 2002, (4): 4-6.
- Chen X H, Chen Y P, Cao P S, Zeng G W. Chemical identification of gynococious and androecious cucumber at seeding stages. *China Vegetables*, 2002, (4): 4-6. (in Chinese)
- [16] Jiang L, You R L, Li M X, Shi C. Identification of sex-associated RAPD marker in *Ginkgo biloba*. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(6): 742-747.

(责任编辑 曲来娥)