

黄瓜无苦味种质资源的 SSR 标记鉴定

张立杰³, 麻艳超^{1,2}, 李 康¹, 东方阳², 王建设¹

(1. 北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097;

2. 河北科技师范学院 生命科技学院, 河北 秦皇岛 066004; 3. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 鉴定无苦味种质, 选育无苦味品种是控制黄瓜苦味、改善品质的有效方法。利用黄瓜营养器官苦味基因的标记 SSR02309 和果实苦味基因的标记 SSR10795, 对 78 份种质资源进行苦味基因型分析, 表明黄瓜种质间和种质内苦味基因的标记基因型存在遗传变异性。明确了 78 份种质苦味基因的标记基因型。初步鉴定出 7 份无苦味种质。在田间逆境胁迫条件下, 利用感官品尝方法对标记鉴定的 7 份无苦味种质的苦味性状进行了感官品尝鉴定, 结果与标记鉴定的一致。为无苦味黄瓜品种改良奠定了技术与种质基础。

关键词: 黄瓜; 营养器官; 果实; 苦味基因; SSR 标记鉴定

中图分类号: S642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2015)02-0140-05

doi: 10.7668/hbxb.2015.02.025

Identification of Nonbitter Germplasm by SSR Markers in Cucumber

ZHANG Li-jie³, MA Yan-chao^{1,2}, LI Kang¹, DONGFANG Yang², WANG Jian-she¹

(1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Beijing 100097, China; 2. College of Life Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066004, China; 3. College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Identifying non-bitter germplasms and breeding non-bitter varieties are effective to control bitterness as well as to improve qualities in cucumber. In this study, SSR02309 marker linked to foliage bitter gene and SSR10795 marker linked to fruit bitter gene were used to identify the marker genotypes of 78 cucumber germplasm resources. The result showed genetic variation of marker genotypes exist among different germplasms and within same germplasms as well. The marker genotypes of 78 germplasms were confirmed, and 7 non-bitter cucumber varieties were preliminary identified by using the 2 markers. The sensory evaluation results by tasting such 7 cucumber varieties were consistent with the molecular identification results. This study laid technical and germplasm foundation for improving non-bitter cucumber varieties.

Key words: Cucumber; Foliage; Fruit; Bitter gene; SSR markers identification

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.), 别称胡瓜、刺瓜、王瓜, 双子叶植物纲, 葫芦科, 属一年生草本植物, 是主要的蔬菜作物之一。我国是世界上黄瓜种植面积最大的国家^[1], 黄瓜在我国长期的驯化过程中形成了华南系统和华北系统两大类^[2]。黄瓜果实不仅口感香脆, 还具有一定的营养价值和药用价值, 具有提高睡眠质量、祛脂、降压、抗衰及抗辐射等多种功能^[3-4]。

近年来, 黄瓜带苦味的问题日益突出, 不仅影响黄瓜品质^[5-7], 而且影响经济效益^[8-10]。黄瓜苦味由苦味素或葫芦素 (Cucurbitacins) 引起^[11-12], 苦味性状主要由遗传因素控制^[13-15], 同时也受环境因素的影响^[16]。黄瓜苦味遗传机理复杂, 营养器官苦味基因 *Bi* 与果实苦味基因 *Bt* 独立遗传, 但纯合基因型 *bibi* 对 *Bt* 存在隐性上位作用; 当处于杂合状态 *Bibi* 时, 即使控制果实苦味性状的基因 *Bt* 不存在,

收稿日期: 2015-02-11

基金项目: 北京农业育种基础研究创新平台建设项目 (D08070500690803)

作者简介: 张立杰 (1968-), 男, 宁夏同心人, 副教授, 硕士, 主要从事植物栽培与遗传育种研究。

通讯作者: 王建设 (1966-), 男, 宁夏青铜峡人, 副研究员, 博士, 主要从事蔬菜育种与栽培研究。

果实也会出现苦味,但苦的程度较含 *Bt* 基因的轻,出现苦味瓜的比例也低^[13,15]。目前,发现的营养器官苦味基因有 3 个,即 *Bi-1/bi-1*^[17]、*Bi-2/bi-2*^[18] 和 *Bi-3/bi-3*^[19];果实苦味基因有 2 个,即 *Bt/bt*^[20] 和 *Bt-2/bt-2*^[21]。李曼等^[22-23]将 *Bi-1* 基因定位于第 6 染色体,与侧翼标记 SSR02309 和 SSR00004 的遗传距离分别为 1.7、2.2 cM;Zhang 等^[19]将营养体苦味基因 *bi-3* 定位于第 5 染色体,与侧翼标记 SSR00116 和 SSR05321 之间的遗传距离 6.3 cM;张圣平等^[24]将黄瓜果实苦味基因 *Bt* 定位于第 5 染色体,与侧翼标记 SSR10795 和 SSR07081 的遗传距离分别为 0.8、2.5 cM。

控制苦味、改善品质的有效方法是选育无苦味的黄瓜品种。目前,用于检测黄瓜苦味的方法为感官品尝^[25]和化学检测^[26-27],但 2 种方法均有较大的局限性。感官品尝仅适用于少量植株的检测,易产生误差;化学检测较为繁琐,且测定结果也不够准确。因此,建立并利用快速、准确、简易的分子标记辅助育种技术体系,可用于鉴定无苦味种质,快速聚合营养器官和果实无苦味基因。

在前人完成黄瓜营养器官苦味基因(*Bi-1*)与果实苦味基因(*Bt*)染色体标记定位的工作基础上^[2,24,28],本试验利用与营养器官和果实苦味基因紧密连锁的 SSR 标记进行无苦味种质资源鉴定,旨在为无苦味黄瓜品种改良奠定种质与技术基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验在北京市农林科学院蔬菜研究中心完成。78 份黄瓜种质资源均为自交系,由该中心瓜类单倍体育种组提供,材料名称如表 1 所示,其中,30、32、37 为华南型;41、42 为欧洲型;45-329、45-911、113、115 为华北密刺型×欧洲型;其他均为华北密刺型。

引物由赛百盛公司合成,dNTP、*TaqE* 均购自赛百盛公司,Tris(USA 分装)、Acr 和 Bis(BBI 分装)、APS(Promega 分装)、TEMED(Fluka)及其余常规试剂(国产)购自北京化工集团。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 供试品种各取 5 粒种子,在培养皿培育发芽,待子叶展开时,每株取 2~3 cm²,放入离心管,提取基因组 DNA^[29],并保存于冰箱 -20℃ 条件下备用。

1.2.2 苦味性状的田间逆境胁迫鉴定 参顾客兴芳等^[13]的方法进行苦味性状的田间逆境胁迫鉴定。苗期常规管理。定植后,前期夜温控制在 12℃ 以

下,后期昼温高于 32℃,整个生长期控水,处于干旱状态下诱使苦味基因充分表达。选 3 位苦味敏感者,对营养器官及果实进行品尝鉴定。

1.2.3 PCR 反应体系及程序 采用优化的 7 μL PCR 反应体系:ddH₂O 4.0 μL,10×Buffer 0.7 μL,dNTP(2.5 mmol/L)0.5 μL,每条引物(5 pmol/L)0.35 μL,*Taq ase*(5 U/μL)0.1 μL,DNA 模板(30~50 ng/μL)1.0 μL。反应程序为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,共循环 35 次;最后 72℃ 延伸 5 min。

1.2.4 电泳及银染步骤 PCR 扩增产物的检测采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,用 8% 聚丙烯酰胺凝胶在六一仪器厂的垂直电泳槽上进行,180 V 恒电压下电泳 2 h,电泳参照乐晓萍等^[30]的方法银染。

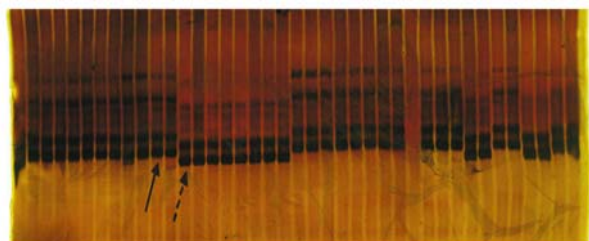
1.2.5 数据统计 对于黄瓜种质资源,营养器官无苦味标记 SSR02309 的引物扩增的上带产物与苦味基因 *BiBi* 连锁,下带产物与无苦味基因 *bibi* 连锁。果实无苦味标记 SSR10795 的引物扩增的上带产物与无苦味基因 *btbt* 连锁,下带产物与苦味基因 *BtBt* 连锁。为了便于分析,将有与目标基因连锁标记的扩增产物计为 1;反之,将没有与基因连锁标记的扩增产物计为 0。

2 结果与分析

2.1 种质间与种质内黄瓜苦味性状标记位点的遗传变异性

利用与黄瓜营养器官和果实苦味基因紧密连锁的 SSR 标记 SSR02309 和 SSR10795 的引物,对 78 份种质资源的基因组 DNA 进行了扩增,结果如图 1~2 所示。从图 1~2 看出,这 2 个 SSR 标记在 78 份种质资源间存在多态性,说明 2 个 SSR 标记存在初步鉴定无苦味种质的可能性。

统计引物扩增的多态性条带,结果如表 1 所示。从表 1 看出,黄瓜苦味基因或无苦味基因的标记位点不仅在 78 份种质间存在遗传变异性,而且在种质内也存在遗传变异性,说明苦味基因或无苦味基因的标记基因型可能与群体遗传结构有关。如 41 号种质,属于欧洲型,苦味基因的标记基因型为 *BiBibbt*;44-376 种质,属于华北密刺型,苦味基因的标记基因型为 *bibibbt*;47-57 种质,属于华北密刺型,群体内同时存在 *BiBibbt* 与 *bibibbt* 这 2 种标记基因型材料。因此,对于苦味基因的标记基因型存在遗传变异的种质,可望利用标记辅助选择技术初步鉴定无苦味种质,以挖掘种质的应用潜力。



实线箭头表示营养体苦味标记;虚线箭头表示营养体无苦味标记。
Solid arrow indicates foliage bitter marker; Dotted arrow indicates foliage non-bitter marker.

图 1 黄瓜营养器官无苦味种质的标记 SSR02309 鉴定
Fig. 1 Cucumber foliage non-bitter germplasm identification using SSR02309

通过 78 份种质资源的标记基因型分析,首先,初步鉴定了 7 份无苦味种质。主要有 3 种情况:①营养器官和果实可能均无苦味的种质(bibibtbt)有 3 份,即 113、115 和 44-376,113 和 115 均为从欧洲型与华北密刺型杂交组合选育的中间型材料,44-376 为华北密刺型。②2 份华北密刺型种质资源,通过 SSR 标记鉴定,证实群体内可能存在营养器官和果实均无苦味的株系(bibiBtbt)。47-57,4 株中有 2 株;104-43,3 株中有 1 株。③营养体不苦,但携带果实苦味标记的种质有 2 份(bibiBtBt),41 和 42 号种质,均为欧洲型。其次,标记鉴定初步明确了华北密

刺型和华南型黄瓜苦味基因的标记基因型(bibt-Bi-),可能果实不苦,但营养器官苦。其中 45-383、11、1、57-12、236、116、258-11、B11、57-98、237、282、254-126、58-170、167-84、70-15、267-14、190-52、57-169、46B、B21、280、235、192-320、46A、234、48、298、63、78-273、59-143、253-152、141-364、47-70、141-673、57-262、167-17、45-329、253-1、255、126-38、253-153、56-8、255-581、112、254-277、45-911、175A、57-190、164-223、74-136、302、126-4、74-31、281 等为华北密刺型黄瓜种质;30、32、37 为华南型黄瓜种质。



实线箭头表示果实苦味标记;虚线箭头表示果实无苦味标记。
Solid arrow indicates fruit bitter marker; Dotted arrow indicates fruit non-bitter marker.

图 2 黄瓜果实无苦味种质的标记 SSR10795 鉴定
Fig. 2 Cucumber fruit non-bitter germplasm identification using SSR10795

表 1 黄瓜无苦味种质的标记鉴定

Tab. 1 Identification of non-bitter cucumber germplasm

品种	Bt	bt	Bi	bi	品种	Bt	bt	Bi	bi	品种	Bt	bt	Bi	bi
37	1	1	1	0	115	0	1	0	1	47-57	0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	0	1		0	1	0	1
	0	1	1	0		0	1	0	1		0	1	0	1
42	1	1	0	1	280	0	1	1	0		0	1	1	0
	1	1	0	1		0	1	1	0	253-153	0	1	1	0
	1	0	0	1		0	1	1	0		0	1	1	0
	1	0	0	-	235	0	1	1	0		0	1	1	0
45-383	1	0	0	1		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0	41	1	0	0	1	57-17	0	1	1	0
	0	1	1	0		1	0	0	1		1	1	1	0
11	0	1	1	0		1	0	0	1		1	0	1	0
	0	1	1	0		1	0	0	1		1	0	1	0
	0	1	1	0	192-320	0	1	1	0	175-2	0	0	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
2	0	1	1	0		0	1	1	0	56-8	0	1	1	0
	0	1	1	0	46A	0	1	1	0		0	1	1	0
	1	0	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0	255-581	0	1	1	0
1	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0	234	0	1	1	0		0	1	1	0
113	0	1	0	1		0	1	1	0	192-72	0	1	1	0
	0	1	0	1	48	0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	0	1		0	1	1	0		0	1	1	0
225-168	0	1	-	-		0	1	1	0		0	0	1	0
	0	1	1	0	298	0	1	1	0	112	0	1	1	0
57-12	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0	7	0	1	1	0	254-277	0	1	1	0
236	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	0	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0	63	0	1	1	0	32	0	1	1	0
116	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0

续表 1:

品种	Bt	bt	Bi	bi	品种	Bt	bt	Bi	bi	品种	Bt	bt	Bi	bi
	0	1	1	0	78-273	0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
258-11	0	1	1	0		0	1	1	0	267	0	1	1	0
	0	1	1	0	59-143	0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	0	0
B11	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0	253-152	0	1	1	0	45-911	0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
57-98	0	1	1	0	141-364	0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0	125A	0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	0	0
	0	1	1	0	47-70	0	1	1	0		0	1	1	0
237	0	1	1	0		0	1	1	0	175A	0	1	1	0
	0	1	1	0	141-673	0	1	1	0		0	1	1	0
303	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0	57-190	0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
282	0	1	1	0	45-71	0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		1	1	1	0	164-223	0	1	1	0
	0	1	1	0	175-1	0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
254-126	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	0	1	0	74-136	0	1	1	0
	0	1	1	0	57-262	0	1	1	0		0	1	1	0
58-170	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
167-84	0	1	1	0	104-43	0	1	1	0	125B	0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	0	0
	0	1	1	0		0	1	0	1	58-177	0	1	1	0
	0	1	1	0	44-376	0	1	0	1		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	0	1		0	1	1	0
70-15	0	1	1	0		0	1	0	1		0	1	1	0
	0	1	1	0	167-17	0	1	1	0	164-5	1	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		1	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		1	1	1	0
267-14	0	1	1	0		0	1	1	0	302	0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0	45-329	0	1	1	0	126-4	0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0	30	0	1	1	0
190-52	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0	74-31	0	1	1	0
57-169	0	1	1	0	253-1	0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
46B	0	1	1	0		0	1	1	0	281	0	1	1	0
	0	1	1	0	255	0	1	1	0		0	1	1	0
B21	0	1	1	0	126-38	0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0		0	1	1	0
	0	1	1	0		0	1	1	0					

注:1. 扩增出与基因连锁的标记条带;0. 未扩增出与基因连锁的标记条带。
Note:1. Indicates gene linked marker strip was amplified;0. Indicates no gene linked marker strip was amplified.

2.2 无苦味种质的田间逆境胁迫鉴定

在田间逆境胁迫条件下,通过感官品尝鉴定,证实标记鉴定的 7 份无苦味种质 113、115、44-376、41、42、47-57 和 104-43 均无苦味,而对照 234 和 253-152 表现为苦味。说明苦味 SSR 标记可用于无苦味基因的初步鉴定。

3 讨论

检测黄瓜苦味的方法多为感官品尝和化学检测,但二者均有较大的局限性。感官品尝仅适用于少量植株的检测,易产生较大误差;化学检测较为繁

琐,且测定结果不够准确。
在前人黄瓜营养器官苦味基因(*Bi*)与果实苦味基因(*Bt*)染色体定位的研究基础上,本试验利用黄瓜无苦味基因紧密连锁的 SSR 标记,分析了 78 份黄瓜种质资源的无苦味基因的标记基因型,证实无苦味基因的标记位点在种质间与种质内可能存在遗传变异性。说明依据种质资源的遗传结构,借助无苦味基因的分子标记辅助育种技术,挖掘无苦味种质是完全有可能的。
本试验所选用的苦味基因的连锁 SSR 标记,距离控制苦味基因仍有一段遗传距离,在鉴定过程中,

可能会出现误差。为此,对本试验标记鉴定的 7 份可能对育种有潜在应用价值的无苦味种质,在田间逆境胁迫条件下,又进行了感官品尝鉴定,结果与分子标记鉴定结果相符。说明 SSR 标记鉴定方法可初步用于无苦味种质鉴定。

在今后的研究中,可以根据 Zhang 等^[19]对 *bi-1* 候选基因 Cas008595 的推测结果,开发出距离苦味基因更近的分子标记,从而在今后利用分子标记进行无苦味种质鉴定的应用中,有效提高试验效率和结果准确率。

本试验明确了华北密刺型和华南型黄瓜种质资源的苦味基因的标记基因型 *btbtBi-*,为无苦味黄瓜育种的长远发展奠定了种质与技术基础,必将提升育成品种的科技含量和市场竞争能力。

参考文献:

- [1] 周长久. 蔬菜种质资源概论[M]. 北京:北京农业大学出版社,1995:163-171.
- [2] 刘世琦,于贤昌. 蔬菜栽培学[M]. 北京:金盾出版社,1998.
- [3] 中国农业百科全书蔬菜卷编辑委员会,中国农业百科全书编辑部. 中国农业百科全书:蔬菜卷[M]. 北京:农业出版社,1990:108.
- [4] 裴孝伯,解静,王跃,等. 嫁接处理对黄瓜果实 *Vc*·可溶性糖和蛋白质的影响[J]. 安徽农业科学,2009,37(2):557-558,607.
- [5] Kano Y, Goto H. Relationship between the occurrence of bitter fruit (*Cucumis sativus* L. cv. Kagafutokyuri) and the content of amino acid, protein and HMG-CoA reductase in the leaf[J]. International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits, 2000, 575:797-803.
- [6] Kano Y, Yamabe M, Ishimoto K. The occurrence of bitter cucumber in relation to pitting, fruit size, plant age, leaf nitrogen content and rootstock[J]. Japan Soc Hort Sci, 1997, 66:321-329.
- [7] 李红丽,于贤昌,王华森,等. 嫁接和嫁接砧木对黄瓜果实品质的影响[J]. 西北农业学报,2005,14(1):129-132.
- [8] 冯春梅,莫云彬,陈海平. 不同砧木嫁接对黄瓜抗病性及主要经济性状的影响[J]. 中国农学通报,2006,22(6):283-284.
- [9] Zhao X, Chambers E, Matta Z, et al. Consumer sensory analysis of organically and conventionally grown vegetables[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(2):S87-S91.
- [10] Ertek A, Sensoy S, Gedik I, et al. Irrigation scheduling based on Pan evaporation values for cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown under field conditions[J]. Agricultural Water Management, 2006, 81(1-2):159-172.
- [11] 顾兴芳,方秀娟,张孟玉,等. 黄瓜苦味研究概况[J]. 园艺学报,2000,27(z1):504-508.
- [12] 温运河. 黄瓜出现苦味的诱因及预防措施[J]. 吉林蔬菜,1997(4):17.
- [13] 顾兴芳,张圣平,国艳梅,等. 黄瓜苦味遗传分析[J]. 园艺学报,2004,31(5):613-616.
- [14] 国艳梅. 黄瓜苦味遗传规律研究及 AFLP 分子标记[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2003.
- [15] 顾兴芳,张素勤,张圣平. 黄瓜果实苦味 *Bt* 基因的 AFLP 分子标记[J]. 园艺学报,2006,33(1):140-142.
- [16] Deheer C J, Tallamy D W. Affinity of spotted cucumber Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae to cucurbitacins[J]. Environmental Entomology, 1991, 20(4):1173-1175.
- [17] Lawrence K P, Wehner T C. Review of genes and linkage groups in cucumber[J]. HortScience, 1990, 25(6):605-615.
- [18] Barham W S. The inheritance of a bitter principle in cucumbers[J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1953, 62:441-442.
- [19] Zhang S P, Miao H, Sun R F, et al. Localization of a new gene for bitterness in cucumber[J]. Journal of Heredity, 2013, 104(1):134-139.
- [20] Wehner T C, Liu J S. Two-gene interaction and linkage for bitter free foliage in cucumber[J]. Amer Soc Hort Sci, 1998, 123(3):401-403.
- [21] Walters S A, Shetty N V, Wehner T C. Segregation and linkage of several genes in cucumber[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2001, 126(4):442-450.
- [22] 李曼,龚义勤,苗晗,等. 黄瓜营养体苦味基因 *Bi* 的定位[J]. 园艺学报,2010,37(7):1073-1078.
- [23] Miao H, Zhang S P, Wang X W, et al. A linkage map of cultivated cucumber (*Cucumis sativus* L.) with 248 microsatellite marker loci and seven genes for horticulturally important traits[J]. Euphytica, 2011, 182(2):167-176.
- [24] 张圣平,苗晗,程周超,等. 黄瓜果实苦味基因 *Bt* 的初步定位[J]. 园艺学报,2011,38(4):709-716.
- [25] Andeweg J M, De bruyn J W. Breeding of non-bitter cucumbers[J]. Euphytica, 1959, 8(1):13-20.
- [26] Rice C A, Rymal K S, Chambliss O L, et al. Chromatographic and mass spectral analysis of cucurbitacins of three *Cucumis sativus* cultivars[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1981, 29(1):194-196.
- [27] Van Keulen H A. Fluorodensitometric estimation of cucurbitacin-C in leaves of *Cucumis sativus* L. [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 1981, 31(2):129-137.
- [28] 池秀蓉,顾兴芳,张圣平,等. 黄瓜无苦味基因 *bi* 的分子标记研究[J]. 园艺学报,2007,34(5):1177-1182.
- [29] 卢圣栋. 现代分子生物学[M]. 北京:高等教育出版社,1993.
- [30] 乐晓萍,杜鹏,张钦宪,等. 聚丙烯酰胺凝胶银染技术改良[J]. 河南医科大学学报,2001,36(4):395-396.