

棉花种质资源遗传多样性的 TRAP 分析

苗培明¹, 范玲^{1*}, 师维军², 乌买尔江², 徐利民², 马君²

(1. 新疆农业科学院核技术生物技术研究所, 乌鲁木齐 830091;

2. 新疆农业科学院经济作物研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要: 应用 TRAP 分子标记方法对 65 份棉花种质资源进行遗传多样性分析。从 100 对引物中筛选出 10 对引物, 用 TRAP-PCR 的方法共扩增出 252 条带, 其中 210 条为多态带, 比率为 83.33%。利用 NTSYSpc 2.1 遗传学统计分析软件中的 UPMGA 法对所获得的数据进行聚类分析, 建立了 65 份棉花种质资源的亲缘关系树状图。当遗传相似性系数(GS)为 0.84 时, 65 份种质资源可以分为 6 大类群。所获得的聚类结果与种质资源的地域来源和形态特征有一定的相关性。说明 TRAP 型的分子标记方法在棉花种质资源鉴定、分类等方面的研究上具有良好的应用前景。

关键词: 棉花; 种质; 遗传多样性; TRAP

中图分类号: S562.024 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2009)05-0420-07

Analysis of Genetic Diversity in Cotton Germplasm by TRAP Markers

MIAO Pei-ming¹, FAN Ling^{1*}, SHI Wei-jun², Wumaierjiang², XU Li-min², MA Jun²

(1. Institute of Nuclear and Biological Technologies, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China; 2. Institute of Economic Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

Abstract: The genetic diversity among 65 lines of cotton germplasm was analyzed by TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) markers. From 100 pair of primers, 10 pairs of polymorphic primers were selected. A total of 252 bands were amplified from 10 pairs of primers by TRAP-PCR, of which 210 bands (about 83.33%) were polymorphic. The 65 lines of cotton germplasm were clustered into six groups at GS (genetic similarities) = 0.8431 and the link map was set up by UPMGA method in NTSYSpc 2.1 (numerical taxonomy and multivariate analysis system). The results showed that the germplasm clusters had certain relationship with the germplasm origins and the morphologic characters. The results suggested that the new type of molecular marker method, TRAP, was suitable for genetic identification, cluster of cotton germplasm.

Key words: cotton; germplasm; genetic diversity; TRAP

TRAP (target region amplification polymorphism, 目标区域扩增多态性)方法是 2003 年建立起来的一种新型的基于 PCR 的分子标记方法^[1], 与其它分子标记方法相比较, TRAP 方法具有以下特点: (1) 操作简单; (2) 重复性好; (3) 效率高。TRAP 方法是基于已知的 cDNA 或

EST 序列信息, 使用长度为 16~20 核苷的固定引物与随机引物, 固定引物以公用数据库中目标基因的 cDNA 或 EST 序列设计而来; 随机引物是以一段富含 AT 或 GC 为核心、可与内含子或外显子区配对的随机序列。这一方法目前已经在向日葵^[1-2]、小麦^[3]、甘蔗^[4]、菜豆^[5]等农作物得到

收稿日期: 2008-06-18 作者简介: 苗培明(1980-), 男, 硕士研究生; * 通讯作者, fanling@xaas.ac.cn

基金项目: 国家“863”项目(2006AA10Z184), 新疆高技术研究发展计划项目(200611101)

成功应用。研究结果证明该方法对农作物群体品质、抗性的基因定位和遗传鉴别是很有效的,可广泛应用于农作物的遗传多样性分析、遗传图谱构建、突变体检测、基因定位、分子标记辅助选择等^[2-6]。对于棉花种质资源的遗传多样性的研究,国内学者主要利用的是 RFLP、RAPD、SSR 等分子标记方法^[7-9]。在国内外棉花种质资源遗传多样性的研究中,尚未见有利用 TRAP 分子标记方法的报道。本文利用 TRAP 标记对 65 份棉花种质的遗传多样性进行了分析,旨在为棉花种质资源的收集、保存、鉴定、创新和有效利用提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验采用的 65 份棉花种质,为新疆农业科学院经济作物研究所历年收集保存的品种(表 1)。酶、PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTPs 均购自上海生工。

1.2 棉花 DNA 的提取与定量

棉花基因组 DNA 的提取参考 Paterson 等的方法^[10],并作适当修改。将提取的 DNA 样品,用生物分光光度计(Eppendorf)测吸光度值,并将 DNA 浓度稀释到 PCR 反应所需的浓度,置 -20℃ 冰箱中备用。

1.3 TRAP 引物

固定引物借助 PCR 引物设计软件 Premier 5 设计而来,设计在目标基因的保守区域,引物大小为 18 bp,设定最佳 T_m 值为 53℃。目标基因来自与棉花纤维伸长相关的基因^[11-14]:木葡聚糖内转糖基酶(XTH),扩展蛋白(EXP),蔗糖合酶(SuSy),酰基载体蛋白(ACP),阿拉伯半乳糖蛋白(AGP);与次生壁发育相关的基因^[15-16]:过氧化氢酶(PO);肉桂酰乙酰辅酶 A 还原酶(CCR),肉桂醇脱氢酶(CAD)。随机引物参考 Hu 和 Vick 的设计^[1]。引物均由北京华大基因研究中心合成。

表 1 供试材料及来源

Table 1 The origins of the cotton lines

序号	品种名称	来源地	序号	品种名称	来源地
C1	苏联棉 1541	前苏联	C34	CB1233	美国
C2	岱 6	澳大利亚	C35	TamcatCAB-CA	美国
C3	Arco1658	中国	C36	CB1135	美国
C4	MV15-20	美国	C37	阿克库尔干 2 号	乌兹别克斯坦
C5	墨 1761	墨西哥	C38	CB232	美国
C6	美棉 MLCH-313	美国	C39	DP5409	美国
C7	苏联棉 1539	前苏联	C40	MM-1	美国
C8	MC50-2	美国	C41	MM-8	美国
C9	MC50-76	美国	C42	S-6524	乌兹别克斯坦
C10	美 B-34-1	美国	C43	澳 97010 选系	澳大利亚
C11	Arco1657	中国	C44	sincos-80	美国
C12	苏联棉 1546	前苏联	C45	CB407	美国
C13	MC50-B	美国	C46	sicalav2	澳大利亚
C14	澳 1651(BT)	澳大利亚	C47	美棉 MLCH-217	美国
C15	MC50-55	美国	C48	MV2-76	美国
C16	澳 1526(BT)	澳大利亚	C49	MV2-BT	美国
C17	美 1440	美国	C50	澳 1657(BT)	澳大利亚
C18	美 F-25	美国	C51	JH19	美国
C19	美中棉 972(毛)	中国	C52	JH27	美国
C20	探科戈恩-3	美国	C53	安吉然 35 号	乌兹别克斯坦
C21	LARN910	美国	C54	JH30	美国
C22	MC50-1	美国	C55	JH09	美国
C23	澳 1655(BT)	澳大利亚	C56	JH32	美国
C24	澳 1645(BT)	澳大利亚	C57	CJ-1	中国
C25	澳 1654(BT)	澳大利亚	C58	新陆早 37-74	中国
C26	Ari97	美国	C59	高品质 1	中国
C27	美中棉 971(光)	中国	C60	海南 1-2	中国
C28	sicalav15	澳大利亚	C61	好 1	中国
C29	美双价棉(BT)	美国	C62	新海 16	中国
C30	CS50	澳大利亚	C63	新海 20	中国
C31	奥玛特 4 号(双行)	乌兹别克斯坦	C64	新陆早 6	中国
C32	白河 6 号	乌兹别克斯坦	C65	早 19	中国
C33	代脑	乌兹别克斯坦			

1.4 TRAP 反应体系

在 15 L 的 PCR 反应体系中,含 $10\times$ buffer $1.5\ \mu\text{L}$, $25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MgCl}_2$ $1.5\ \mu\text{L}$, $2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{dNTP}$ $2.0\ \mu\text{L}$, $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 固定引物 $0.75\ \mu\text{L}$, $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 随机引物 $0.15\ \mu\text{L}$, $100\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{DNA}$ $1\ \mu\text{L}$, Taq 酶 $0.2\ \mu\text{L}$ 。

1.5 PCR 扩增条件

94°C 预变性 4 min; 然后 94°C 变性 45 s, 35°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 进行 5 个循环; 接着 94°C 变性 1 min, 52°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 再进行 35 个循环, 最后 72°C 延伸 7 min。

1.6 TRAP-PCR 扩增产物的分析

扩增产物用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行检测, $280\ \text{V}$ 电泳 3 h, 电泳完毕后, 采用银染法染色: 首先用 200 mL 的 10% 的乙醇(含有 1 mL 的冰醋酸)固定 5 min 后, 直接加入 0.4 mL 的硝酸银溶液($1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)进行染色, 5 min 后用蒸馏水瞬时漂洗 2 次。再用 200 mL 的 3% 氢氧化钠溶液(含有 40% 的甲醛 1 mL)进行显影, 3~5 min 后再次用蒸馏水进行漂洗, 即可用 GS800 校准型光密度仪(Bio-Rad)扫描并保存图像。

1.7 数据处理与统计分析

扫描图像中清晰可辨的电泳条带全部用于统计分析, 按扩增条带有无记数, 当某一扩增带出现时, 赋值为“1”, 无带赋值为“0”, 从而把图像资料转

换成数据资料。根据 Nei-Li 相似系数法(也称为 Dice 法)求得品种 i 和 j 之间的相似系数 S_{ij} :

$$S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$$

其中: N_i 表示品种 i 中的条带数目; N_j 表示品种 j 的条带数目; N_{ij} 表示品种 i, j 共有的条带数目。利用 NTSYSpc 2.1 遗传学统计分析软件中的 UPMGA 法对所获得的数据进行聚类分析^[17]。

2 结果与分析

2.1 TRAP 引物筛选与扩增结果

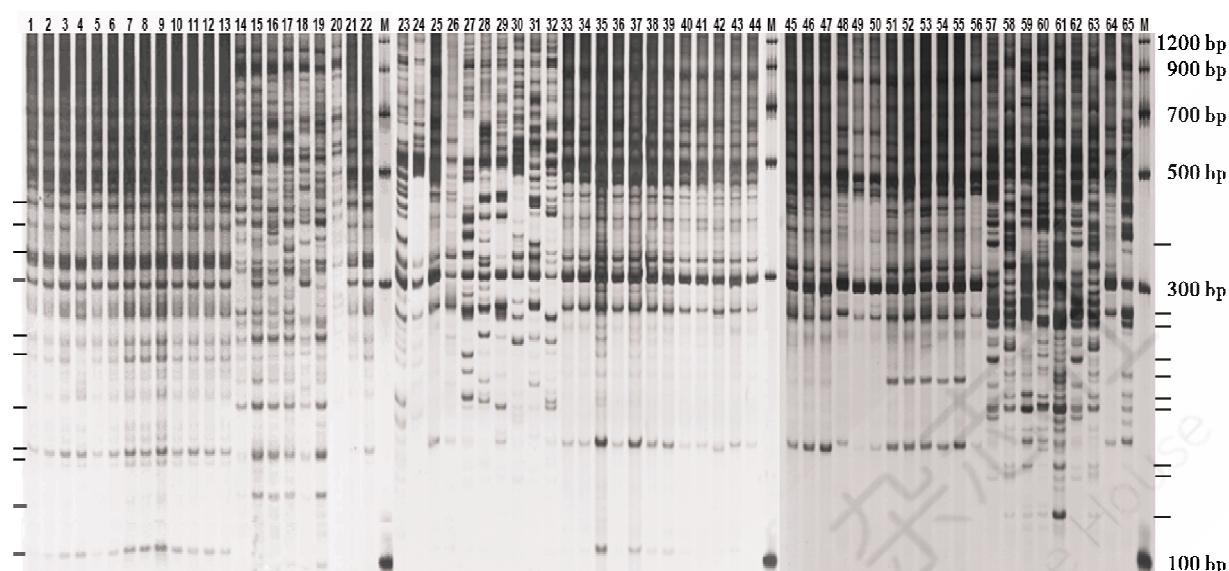
首先对 9 条固定引物和 12 条随机引物组合的引物进行筛选, 从中筛选出 10 对条带清晰、多态性好的引物。再利用这 10 对引物对供试 65 个棉花种质进行遗传多样性分析。分析结果表明: 10 对引物在供试的 65 个棉花种质上共扩增出 252 条带, 谱带大小在 100~1100 bp 之间, 其中多态性条带 210 条, 多出现在 500 bp 以下(图 1), 多态性程度平均为 83.33%(表 2)。表 2 中的 $F_1\sim F_9$ 为固定引物, 它们的序列分别对应来源于棉花的功能基因或 EST: EXP、ACP、Susy、AGP、XTH、PO、CCR4、CCR6 和 CAD。 $S_1\sim S_{10}$ 为随机引物。从表 2 中可以看出, 不同供试材料的扩增带不同, 这充分表现了棉花遗传背景的复杂性和 DNA 的多态性。其中, 引物对 $F_5 + S_5$ 的扩增图谱见图 1。

表 2 引物序列和扩增结果

Table 2 Primer sequences and amplified results

引物	引物序列(5'-3')	总扩增条带	多态性条带	多态位点百分率/%
$F_1 + S_1$	F_1 : CCAAAACTGGCAGAGCAA S_1 : GGAACCACACATGAAGA	16	12	75.0
$F_2 + S_2$	F_2 : TGGAGCTGATTCTCTTGA S_2 : CTATCTCTCGGGACAAAAC	32	28	87.5
$F_3 + S_3$	F_3 : GGAAGCAAAGGACACTGTT S_3 : GACTGCGTACGAATTTCC	36	32	88.89
$F_4 + S_4$	F_4 : AACGTCACCAAGATCCCTC S_4 : GACTGCGTACGAATTTGGA	12	10	83.33
$F_5 + S_5$	F_5 : CAAAGGGAGGTTTAGAGA S_5 : GACTGCGTACGAATTTAAT	30	28	93.33
$F_6 + S_6$	F_6 : CAACTGGCTTACGACAAA S_6 : GACTGCGTACGAATTTGC	18	10	55.56
$F_7 + S_7$	F_7 : TCTTCCATAGGTGCAGTG S_7 : GACTGCGTACGAATTTGAC	20	14	70.0
$F_8 + S_8$	F_8 : AAGCATGTGCTCAAACAG S_8 : GACTGCGTACGAATTTGA	28	22	78.57
$F_9 + S_9$	F_9 : TGCAGGGATCACAGTGTA S_9 : GACTGCGTACGAATTTAAC	24	20	83.33
$F_9 + S_{10}$	F_9 : TGCAGGGATCACAGTGTA S_{10} : GACTGCGTACGAATTTGCA	36	34	94.44
总计		252	210	

注: $F_1\sim F_9$ 代表正向引物, 来自目标基因的保守区域; $S_1\sim S_{10}$ 代表逆向随机引物。



注:数字代表种质资源编号;M代表DNA Mark (100,300,500,700,900,1200 bp);两边短线代表特异条带的位置。

图1 F_5+S_5 引物对65个棉花种质TRAP-PCR扩增图谱

Fig. 1 The results of PCR amplification of F_5+S_5 TRAP primers on sixty-five cotton lines

2.2 聚类分析结果

在GS(遗传相似性系数)为0.84时(图2),65份棉花种质资源可以分为6类。第I类群有3个种质资源:CB1233、CB1135、TamcatCAB-CA。第II类群有2个种质资源:新海16、新海20。第III类群有2个种质资源:美中棉971(光)、美中棉972(毛)。第IV类群有3个种质资源:澳1526(BT)、澳1654(BT)、Ari97。第V类群包含共51个种质资源。第VI类群有4个种质资源:苏联棉1541、苏联棉1546、澳1645(BT)、澳1654(BT)。其中,第V类群在GS为0.86时可分为三个亚类。第一亚类中包含有11个种质资源,其中包括乌兹别克斯坦的4个(阿克库干2号、奥玛特4号、安吉然35号、代脑),澳大利亚的2个[澳1657(BT)、岱6],中国2个(Arcol658、Arcol657),美国1个(LARN910)及墨1761和苏联棉1539。第二亚类中包含有17个种质资源,其中包括中国的7个,美国的6个,乌兹别克斯坦的2个和澳大利亚的2个。第三亚类中包含有23个种质资源,其中美国的种质资源有20个,澳大利亚的有3个。

从种质资源的亲缘关系来看,聚合在第III类群的美中棉971(光)、美中棉972(毛)是中棉(即亚洲棉);聚合在第II类群中的新海16、新海20,属于长绒棉,与第V类群的第二亚类中的其它中国的样品亲缘关系较远,所以在聚类图上的相对位置上也相对较远(在GS为0.760时,就早早的与其它种质分开)。TRAP在揭示种质资源之间真实的遗传差异

上,能正确地反映出种质资源间的亲缘关系。

从种质资源的地理来源来看,来自不同国家的65份棉花种质中各个国家的种质在聚类图中基本上可以聚合在一起。来自美国的有31个种质,主要聚合在聚类图上的第I和第V类群的第二和第三亚类中。来自乌兹别克斯坦的样品共6个种质,主要聚合在V类群的第一亚类与第二亚类中。来自中国的种质共有13份,在聚类图上的第II、III类群与第V类群的第二亚类中。说明TRAP方法在棉花种质资源鉴定、分类等方面的研究上具有良好的应用前景。澳大利亚的样品共11份(多是转基因资源),这些样品的分布比较分散,主要分布在第IV类群、第VI类群与第V类群的三个亚类中。看起来好像与地理来源无相关性,这可能是由于澳大利亚的棉花品种从美国引进得较多,而且本实验所用的品种中有许多是转基因资源,由于外源基因的引入,使这些种质的遗传背景发生了改变。因此,在聚类图上的分布比较散,而没有像其它国家的样品一样聚合在一起。

TRAP与形态特征方面的相关性主要体现在以下方面。来自美国的CB1233、CB1135、TamcatCAB-CA这3个种质资源在第I类群中聚合在一起。三者的棉铃都较大,纤维的强度也比较高。美中棉971(光)和美中棉972(毛)这两份材料都是鸡脚叶,无蜜腺。澳1526(BT)、澳1654(BT)、Ari97的3个种质资源在第IV类群中聚合在一起,三者都具有优良的抗虫特性。

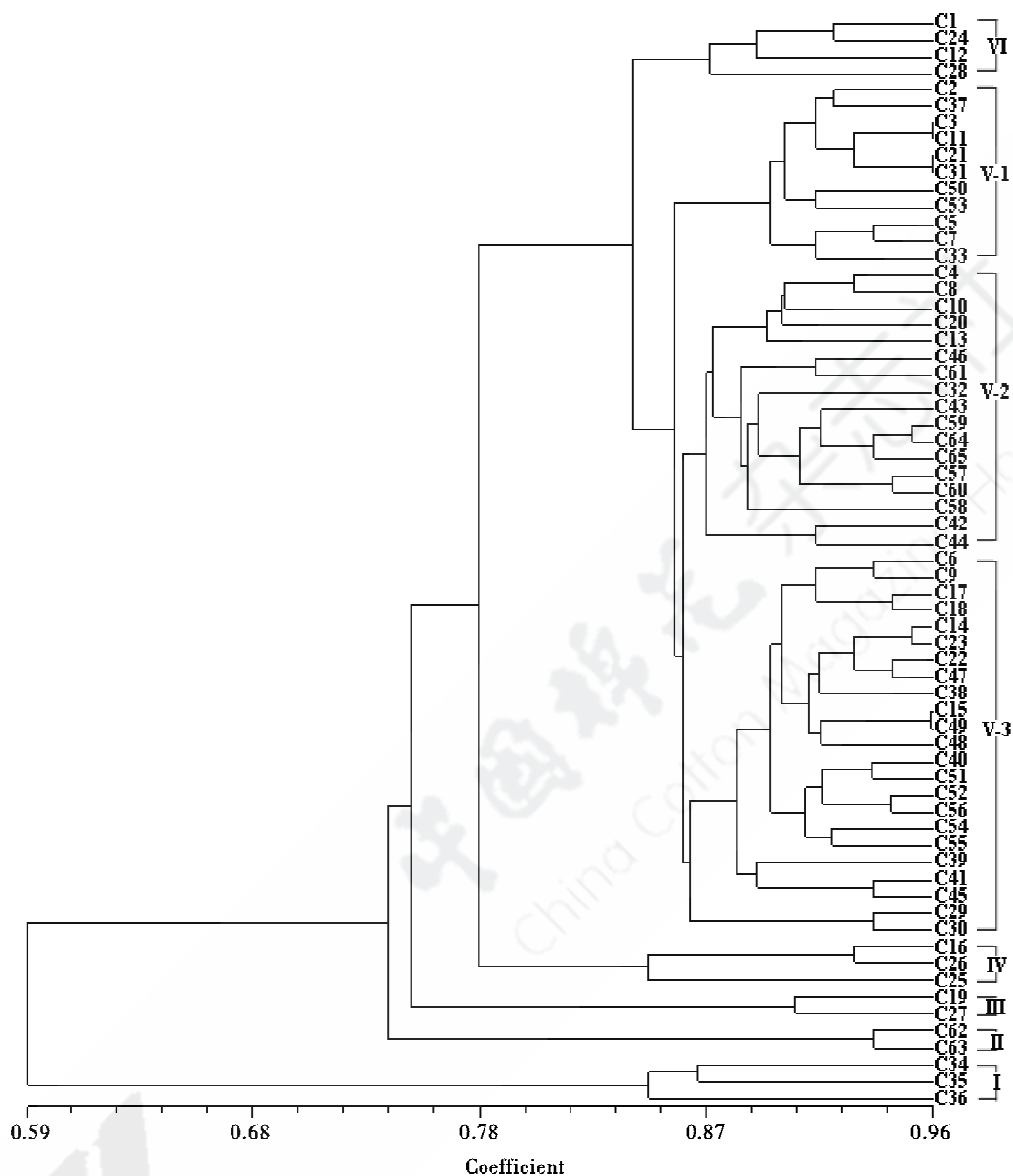


图 2 65 份棉花材料的 TRAP 标记聚类图

Fig. 2 Dendrogram for 65 cotton lines based on TRAP markers by UPGMA method

3 结论与讨论

实验表明, TRAP 标记方法具有多态性好、易于使用、效率高、重现性好等优点。与 RAPD 方法相比, TRAP 方法不但具有 RAPD 方法的优点, 且实验的可重复性较 RAPD 方法好。TRAP 与广泛使用的 SSR 方法相比, TRAP 标记的多态性更好, 扩增效率高, 且固定引物与随机引物可自由组配, 可得到多种引物组合。

TRAP 是一种简便的 DNA 分子标记方法。其固定引物来自功能基因序列, 使筛选的标记目标性强。目前, 在棉花基因库中, 有丰富的 EST 和

cDNA 全长的功能基因序列, TRAP 分子标记提供了利用这些数据的可能, 同时, 研究者可根据研究目的选择感兴趣的功能基因来设计引物。本研究从 100 对引物中筛选出 10 对引物, 有效启动了基因组 DNA 的扩增, 并在不同的种质资源之间可见多态性。但是与 SSR 方法相比, TRAP 有时产生的多态性 DNA 电泳图谱比较复杂, 会给实验分析检测结果带来一定的困难。因此, 严格筛选主带易于区分的引物十分重要。建议进行聚类分析时选择引物的个数不一定要多, 但多态性要好且扩增带易于鉴别区分。

如前所述, 本研究的固定引物来自与纤维细胞

伸长及次生壁发育相关功能基因的保守区域。但对其扩增多态性的聚类结果显示,其多态性首先显示在亲缘关系上,如长绒棉、亚洲棉和陆地棉;其次是种质的地理来源,如来源于美国、中国和乌兹别克斯坦。这些亲缘关系和地缘关系有差异的种质显然也存在着品质差异。然而,对于这些引物的品质标记效果仍需要深入的研究。

遗传多样性是物种遗传信息的总和,是生物多样性和遗传育种研究的核心和基础。遗传多样性的丰富与否,决定了该物种对环境适应能力的强弱,同时也决定其利用潜力的大小。棉花种质资源的研究和利用在我国棉花新品种选育和棉花生产发展中起了重要的作用^[18-19]。棉花种质资源遗传多样性的 TRAP 分析可为传统种质资源的研究提供相对准确和深入的理论依据,而且可为制订新品种的选育策略、亲本选配、后代遗传变异程度及杂种优势水平的预测提供预见性指导和依据。本研究利用 TRAP 分子标记方法,对所收集的 65 份来自不同国家的棉花种质资源在分子水平上进行遗传多样性和亲缘关系分析。聚类分析的结果不但可以为快速、有效地进行亲本选配提供科学的依据,还有利于制定正确保存这些品种资源的策略,为棉花遗传改良和资源的利用建立了良好的基础。

参考文献:

- [1] HU Jin-guo, Vick B A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2003, 21: 289-294.
- [2] HU Jin-guo. Defining the sunflower (*Helianthus annuus* L.) linkage group ends with the *Arabidopsis*-type telomere sequence repeat-derived markers[J]. *Chromosome Research*, 2006, 14: 535-548.
- [3] LIU Z H, Anderson J A, Hu J, et al. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111: 782-794.
- [4] ALWALA S, Suman A, Arro J A, et al. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections[J]. *Crop Science*, 2006, 46: 448-455.
- [5] MIKLAS P N, HU Jin-guo, Grunwald N J, et al. Potential application of TRAP (targeted region amplified polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean[J]. *Crop Science*, 2006, 46: 910-916.
- [6] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 等. 新型分子标记 SRAP 与 TRAP 及其应用[J]. *遗传*, 2004, 26(5): 777-781.
LIU Li-wang, GONG Yi-qin, HUANG Hao, et al. Novel molecular marker systems-SRAP and TRAP and their application[J]. *Hereditas*, 2004, 26(5): 777-781.
- [7] 徐秋华, 张献龙, 聂以春. 长江地区与黄河地区棉花资源的 RAPD 分析[J]. *遗传学报*, 2001, 28(7): 683-690.
XU Qiu-hua, Zhang Xian-long, Nie Yi-chun. Genetic diversity evaluation of cultivars (*G. hirsutum* L.) from the Changjiang River Valley and Yellow River Valley by RAPD marker[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(7): 683-690.
- [8] 王省芬, 马峙英, 张桂寅, 等. 我国棉花抗枯、黄萎病骨干品种(系)基于 AFLP 的遗传多样性[J]. *棉花学报*, 2005, 17(1): 23-28.
WANG Xing-fen, MA Zhi-ying, ZHANG Gui-yin, et al. Genetic diversity of Chinese key cottons with *Fusarium* and *Verticillium* wilts resistance based upon AFLPs[J]. *Cotton Science*, 2005, 17(1): 23-28.
- [9] CHEN Guang, Du Xiong-ming. Genetic diversity of source germplasm of upland cotton in China as determined by SSR marker analysis[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(8): 733-745.
- [10] PATERSON A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis[J]. *Plant Molecular Biology Report*, 1993, 11(2): 122-127.
- [11] COSGROVE D J. Loosening of plant cell walls by expansins[J]. *Nature*, 2000, 407: 321-326.
- [12] RUAN Y L, Llewellyn D J, Furbank R T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development[J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 952-964.
- [13] SUN Yan, Veerabonma S, Abdel-Mageed H A, et al. Brassinosteroid regulates fiber development on cultured cotton ovules[J]. *Plant Cell Physiology*, 2005, 46(8): 1384-1391.
- [14] 上官小霞, 王凌健, 李燕娥, 等. 棉花纤维发育的分子机理及品质改良研究进展[J]. *棉花学报*, 2008, 20(1): 62-69.

- SHANGGUAN Xiao-xia, Wang Ling-jian, Li Yan-e, et al. Progress in studies on molecular mechanism of cotton fiber development and quality improvement [J]. Cotton Science, 2008, 20(1): 62-69.
- [15] POTIKHA T S, Collins C C, Johnson D I, et al. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers [J]. Plant Physiology, 1999, 119: 849-858.
- [16] HOVAV R, Udall J A, Hovav E, et al. A majority of cotton genes are expressed in single-celled fiber [J]. Planta, 2008, 227: 319-329.
- [17] NEI M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979, 76: 5269-5273.
- [18] 喻树迅, 魏晓文. 我国棉花的演进与种质资源 [J]. 棉花学报, 2002, 14(1): 48-51.
- YU Shu-xun, Wei Xiao-wen. Cotton evolution and its variety resource in China [J]. Cotton Science, 2002, 14(1): 48-51.
- [19] 杜雄明, 周忠丽, 贾银华, 等. 中国棉花种质资源的收集与保存 [J]. 棉花学报, 2007, 19(5): 346-353.
- DU Xiong-ming, Zhou Zhong-li, JIA Yin-hua, et al. Collection and conservation of cotton germplasm in China [J]. Cotton Science, 2007, 19(5): 346-353. ●

中国棉花杂志
China Cotton Magazine

