



专题与述评

分子标记技术在棉花品种鉴定上的研究进展

匡猛, 杨伟华, 许红霞, 王延琴, 周大云, 冯新爱, 王俊芳

(中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花品质监督检验测试中心,
河南 安阳 455000)

摘要: DNA 指纹技术的发展大体分为三个阶段: 第一代的分子标记是以 Southern 杂交为基础的 RFLP, 第二代分子标记是以 PCR 为基础的各种 DNA 指纹标记, 第三代分子标记是以单核苷酸多态性为基础的 SNP。本文概述了品种鉴定技术的研究与应用进展, 重点介绍了用于棉花品种鉴定的四种主要的分子标记技术: RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR, 对每一种分子标记的技术原理、在棉花品种鉴定上的应用研究状况及存在的优缺点进行了具体阐述。通过比较分析, 提出了 SSR 标记适用于棉花品种鉴定的独特优越性。并对基于 SSR 分子标记技术构建我国棉花品种 DNA 指纹库的重要意义与必要性进行了分析。

关键词: 棉花; 分子标记; 品种鉴定; DNA 指纹库

中图分类号: S562.035.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2009)04-0330-05

Research Progress of Molecular Marker Technology Applied in Cotton Variety Identification

KUANG Meng, YANG Wei-hua, XU Hong-xia, WANG Yan-qin, ZHOU Da-yun, FENG Xin-ai, WANG Jun-fang

(Cotton Research Institute, CAAS; Supervision, Inspection and Test Center of Cotton Quality, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: There are three phases of DNA fingerprint technology based on molecular marker: the first is RFLP based on Southern blot, the second are several markers based on PCR and the third is SNP (single nucleotide polymorphism). Research and application of variety identification technology was discussed, four main molecular marker technologies applied in cotton variety identification were introduced in detail as follow: RFLP, RAPD, AFLP and SSR. Technology principle, research and application status, advantage and disadvantage about each molecular marker applied in cotton variety identification were expatiated. As compared, the viewpoint was put forward: SSR marker was the most appropriate molecular marker in cotton variety identification, and the necessity of construction of Chinese cotton DNA fingerprint database based on SSR marker technology was analyzed.

Key words: cotton; molecular marker; variety identification; DNA fingerprint database

1 引言

在新品种审定及新品种的品种权授予前需要进行 DUS 测试, 确定该品种的特异性、一致性和稳定性; 在品种权纠纷案件中需要对争议品种进行鉴定, 判断品种权的归属; 在种子生产和贸易中为保证种子质量, 需要检测种子的纯度和真实性。

因此, 品种鉴定技术在育种、生产和贸易中发挥着非常重要的作用, 而检测方法则是品种鉴定的关键。目前国内外品种鉴定仍以形态鉴定为主, 参考同工酶和种子贮藏蛋白电泳图谱。但形态标记的表现受环境影响较大、鉴定工作量大、周期长、受季节限制。同工酶和种子贮藏蛋白标记多态性不够丰富, 同工酶还存在组织和器官特异性, 取材

收稿日期: 2008-06-10

作者简介: 匡猛(1982-), 男, 硕士, 研究实习员, kuangm@cricaas.com.cn

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(SJB0805)

有严格的一致性要求,所以鉴定结果不够稳定,尤其是在棉花品种鉴定中难以获得满意的结果。

近年来发展的分子标记是以 DNA 分子多态性为基础的一种遗传标记,能稳定遗传,可反映生物的个体和群体特征。由于它直接反映 DNA 水平上的差异,具有高度的专一性和特异性,不同物种、同一物种不同品种之间的 DNA 指纹各异,就像人类的指纹一样,成为当今最先进的指纹鉴定技术。一种理想的分子标记应具有以下特点:多态性高;重复性和稳定性好;带型清晰,容易统计;在染色体上均匀分布;共显性;简单快速,易自动化;开发和生产成本低廉。DNA 指纹技术的发展日新月异,第一代的分子标记是以 Southern 杂交为基础的 RFLP,第二代分子标记是以 PCR 为基础的各种 DNA 指纹标记,如 RAPD、AFLP、SSR、SCAR、ISSR 等,第三代分子标记是以单核苷酸多态性为基础的 SNP。本文就分子标记技术在棉花品种鉴定上的研究与应用状况做一概述。

2 DNA 分子标记技术

应用于棉花品种鉴定的 DNA 分子标记主要有四种:RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR,其特点和研究进展如下:

2.1 RFLP 标记技术

RFLP(restriction fragment length polymorphism,简称 RFLP)标记是一种限制性片段长度多态 DNA 标记。其基本原理是因 DNA 的碱基发生变异后,引起限制性内切酶识别位点的增减,用限制性内切酶酶切改变后的 DNA,产生长短、种类、数目不同的限制性片段,经电泳分离后,在凝胶上呈现不同的带型分布,通过与 DNA 探针进行 Southern 杂交和放射自显影后,即可揭示出 DNA 的多态性^[1]。自 1980 年 Bostein 等首次建议利用 RFLP 作为人类一种新的遗传标记以来,该技术在生物技术领域得到广泛应用。Meredith 用 111 个 RFLP 标记分析了美国 4 个主要植棉区 24 个当代品种,发现当代品种在杂合度、位点分离上有很大变异^[2]。Brubaker 和 Wendel 利用 RFLP 技术分析棉花种质多样性,认为陆地棉种质与棉属其它种相比遗传多样性水平较低^[3]。RFLP 作为一种可被利用的分子标记,在遗传上位点固定,数量大,几乎分布于全基因组,可检测位点的复等位性,核基因组的 RFLP 呈孟德尔方式遗传,共显性,不受环境影响,无上位性。但该方法 DNA 用量大,耗费成本高,操作繁琐,技术复杂,费时费力,且检测中需要的放射性同位素对人体有害。虽然现在已有一些非放射性同位素标

记方法问世,但它们的高价格和繁琐的实验操作步骤影响了在实际使用中的推广。

2.2 RAPD 标记技术

RAPD (random amplified polymorphic DNA,简称 RAPD)技术是由美国杜邦公司 Williams 和加利福尼亚生物研究所 Welsh 同时发展起来的一种新型遗传标记技术^[4-6]。它是建立在 PCR 基础之上,用一系列人工合成的含 10 个碱基随机排列的单链寡核苷酸为引物,对所研究的基因组 DNA 进行随机扩增,产生多态性的 RAPD 片段,这些扩增片段反映了基因组相应区域的多态性。RAPD 标记实验简单,随机引物不受限制,且不需要知道基因组的任何分子信息,可在短期内得到大量多态性片段。当分析所用的随机引物数足够大时,RAPD 标记所检测的标记信息几乎覆盖整个基因组,所以,RAPD 标记出现后,便在遗传学各个领域广为应用。尤其在种质资源鉴定方面及作物品种纯度和真实性鉴定方面受到广泛的重视。

Multani 和 Lyon 利用 RAPD 标记研究了 13 个陆地棉品种和一个海岛棉品种,分析结果很好地反应了被分析品种之间的关系,并能有效地区分亲缘关系较近的品种^[6]。Lqbal 等对 22 个陆地棉品种和 1 个亚洲棉品种进行了 RAPD 分析,认为陆地棉品种的遗传基础很窄,但利用 RAPD 标记可以进行品种纯度鉴定^[7]。1996 年郭旺珍等人最早利用 RAPD 技术对我国 9 个棉花主栽品种基因组进行 DNA 片段扩增,以研究棉花不同栽培品种的指纹图谱。结果表明,18 个不同的随机引物中有 13 个扩增出多态性 DNA 片段,展示了 RAPD 技术可从 DNA 水平上鉴别我国现有棉花推广品种的分子差异,用它鉴定品种纯度是可行的^[8]。王心宇等选用 18 个随机引物,对我国主要的短季棉品种作了 RAPD 多态性分析,并对各品种的指纹图谱进行了聚类 and 相似性分析^[9]。RAPD 方法的缺点主要是多数位点的标记带表现为显性,不能区别杂合子,更重要的是 RAPD 标记由于使用了较短的引物,其 PCR 易受实验条件的影响,重复性和稳定性差,有时甚至出现假阳性标记,严重影响实验结果的可靠性,因此在品种指纹鉴定中的应用受到一定限制。

2.3 AFLP 标记技术

AFLP(amplified fragment length polymorphism,简称 AFLP)是由荷兰科学家 Zabea Mare 和 Vos Pieter 发明的一项检测 DNA 多态性的新技术^[10-11],1993 年获欧洲专利局专利。AFLP 技术结合了 PCR 和 RFLP 的优点,已被广泛应用于

遗传育种的各个领域。

著名的美国先锋公司首先应用 AFLP 技术进行玉米自交系和杂交种的鉴定工作,建立指纹档案,保护品种专利。Pillay 等对 11 份陆地棉、2 份海岛棉、2 份亚洲棉和 2 份草棉进行了 AFLP 分析,结果表明,AFLP 在不同棉种遗传多样性分析中不仅带型稳定而且多态性丰富^[12]。Abdalla 等用 16 个 AFLP 引物组合对草棉、亚洲棉、雷蒙德氏棉、海岛棉和陆地棉进行了研究,多态性达 31%,明显高于 RAPD 标记^[13];宋国立等介绍了一种适合于棉花研究的 AFLP 银染方法,并利用 26 对 AFLP 引物对 8 个棉花品种进行了指纹图谱分析,能将 8 个品种区分开来,表明了 AFLP 在指纹图谱绘制上的有效性^[14]。朱云国等应用 AFLP 同位素标记法,获得了棉花细胞质雄性不育系、保持系、恢复系及其杂种 F_1 的 DNA 指纹图谱,较为详尽地介绍了有关 AFLP 的技术核心及注意点,并探讨了其适用于棉花研究的方法。结果表明,AFLP 是一种十分有效的 DNA 指纹技术,它具有多态性丰富、稳定性高、重复性好等优点^[15]。王学德等应用 AFLP 技术,获得了棕色棉“三系”(不育系、保持系和恢复系)及杂种 F_1 的 DNA 指纹图谱^[16]。王省芬以 20 世纪 50 年代我国开展抗病育种研究以来培育的 143 份品种和 14 份国外品种为材料,在鉴定结果的基础上,根据抗性表现、育成年代、推广面积和育成省份,选用 117 份抗病品种进行品种 AFLP 指纹图谱的构建,通过对影响 AFLP 技术关键因素的摸索,建立了新的适于棉花品种指纹图谱构建的 AFLP 标准技术体系^[17]。但由于 AFLP 技术已经申请了专利,受专利权保护而限制了它在商业及生产上的应用;同时,基因组不完全酶切会影响实验结果,所以实验对 DNA 纯度和内切酶的质量要求较高,操作程序长、步骤多,并要求很高的实验技能和精密的仪器设备,因而难以在作物品种鉴定上普及使用。

2.4 SSR 标记技术

SSR (simple sequence repeat, 简称 SSR) 也叫微卫星 DNA,是建立在 PCR 基础上的第二代分子标记,由 1~6 个核苷酸(一般为 2~5 个)组成的短序列首尾衔接重复多次构成,在基因组中串联重复排列。SSR 的研究始于动物基因组,Hamada 等最早发现了由二核苷酸 CA/GT 重复多次构成的一段 DNA^[18]。Tautz 等研究证明 SSR 在真核生物中存在普遍性与广泛性^[19]。微卫星标记已经成为最近几年来分子遗传学研究中优先选择的工具。

大量的研究表明,利用微卫星多态性能够对生物群体间和群体内的遗传变异和遗传关系进行较为准确的分析。Liu 等利用 SSR 对棉花种质保存系进行了遗传分类评价,认为 SSR 标记可以在遗传育种中鉴定材料的遗传多样性,同时也可以用来评价未来种质系的完整性^[20]。武耀廷等报道利用 SSR 标记检测了 30 个陆地棉栽培品种和 4 个高优势杂交种亲本的多态性,并建立了杂交种的 SSR 指纹图谱,用于它们的分子鉴定和纯度检测^[21]。刘勤红等利用 SSR 标记进行了鲁棉研 15 杂交种纯度鉴定的研究,并获得了十几个足以区分鲁棉研 15 父母本及其 F_1 的标记位点,为鲁棉研 15 杂交种的纯度鉴定提供了一个准确、稳定和快捷、实用的方法^[22]。马轩等利用 SSR 技术建立了 18 个彩色棉品系的 DNA 指纹图谱,在 110 对 SSR 引物中筛选到 10 对扩增效果较好的引物,应用其中的 4 对构建了 18 个彩色棉的分子检索模式图^[23]。朱美霞等以 86-1、冀棉 668、新棉 99B、中棉所 19 及中棉所 12 共 5 个棉花栽培品种为材料,利用 15 对 SSR 引物对其随机选择个体进行分析,确定分析品种纯度所需引物数,为棉花品种资源的保存及品种指纹图谱的建立提供理论依据^[24]。秦利等以新疆近 50 年来的 50 个陆地棉种质资源及品种为试材,从 50 对 SSR 引物中筛选出 10 对多态性好的引物,从中筛选 3 对引物对当前新疆主栽品种进行了指纹图谱构建和杂交种纯度鉴定的实践验证^[25]。殷剑美等以杂交棉苏杂 118 及其父母本为材料,筛选在两个亲本间具有多态性, F_1 中表现为杂合带的共显性 SSR 标记,为该品种的真实性鉴定和纯度检测提供了分子依据^[26]。研究人员普遍认为 SSR 标记具有很高的多态性,非常适用于品种鉴定研究和 DNA 指纹图谱的构建。本课题通过采用一批骨干亲本为筛选材料,获得了 25 对多态性较高、在染色体上分布均匀的 SSR 核心引物,并构建了来自我国主要棉区的 33 份棉花主栽品种的 DNA 指纹图谱。其中,23 对具有多态性,多态性高达 92% (另发表)。

3 结论与展望

与其它标记相比,以微卫星序列为基础的 SSR 标记在 DNA 指纹鉴定上显示了独特的优越性,SSR 标记数量丰富,覆盖整个基因组,揭示的多态性高;具有复等位基因的特性,提供的信息量高;以孟德尔方式遗传,呈共显性;每个位点由设计的引物序列决定,便于不同实验室相互交流合作开发引物,获得的资料能够在不同的实验室重

复并共享。虽然 SSR 引物的开发费用较高,但由于其巨大的应用潜力,一些主要农作物的 SSR 引物开发正在进行中。目前许多物种已拥有庞大的基因序列,且相关数据在互联网上共享,使开发 SSR 引物的数量大大增加,费用大幅度降低。仅在棉花数据库上已公开的棉花 SSR 引物已达 9000 多对,并且每隔一段时间就有新的引物增加,为该技术在棉花品种鉴定应用提供了良好的条件。指纹技术的发展是无止境的,今后应一方面加速新型 DNA 指纹技术的开发,一方面加强经典 DNA 指纹技术的改进,在此基础上建立一套完善的 DNA 指纹鉴定体系,实现 DNA 指纹鉴定的简单化、自动化和商业化。

此外,以分子标记技术为基础构建 DNA 指纹库的研究在国内外已广泛报道。其中,DNA 指纹数据库的构建研究在人类上最为成熟,已进入了实际应用阶段。国际植物品种权保护组织(UPOV)在 BMT 测试指南草案中已将构建 DNA 指纹数据库的标记方法确定为 SSR 和 SNP,其中 SSR 标记因其技术比较成熟,成为当前各个作物建库的首选标记^[27]。我国国家种质库目前已搜集整理棉花种质资源 8000 多份^[28]。自 2005 年 5 月 20 日,棉花被列入植物新品种保护名录。截至 2007 年 8 月 31 日,仅仅在两年多的时间里,申请棉花新品种保护的品种就达 136 个,成为继玉米、水稻、小麦、大豆之后的第 5 类申请保护数量最多的农作物。近年来,我国培育和审定棉花新品种的速度加快,推向生产的速度也快。棉花的品种类型十分丰富,常规棉、杂交棉、转基因抗虫棉等等无所不有。同时,由于少数骨干亲本的集中应用,棉花品种间的遗传差异越来越小,且随着转基因等新技术在棉花育种中的应用,在原品种基础上仅改良少数甚至单个性状的依赖性派生品种大大增加。上述诸方面因素使得完全根据形态性状进行棉花品种的辨别越来越困难,给品种资源的收集、整理、鉴定筛选及品种的选育、保护及棉花开发中的种子生产、经营、管理、维权等诸环节带来不同程度的困难,给品种权拥有者、使用者或生产上造成严重损失。

鉴于上述种种问题,急需从 DNA 分子水平给予每个棉花品种以一个能够准确表明其身份的身份号码,这是品种鉴定实现产业化的前提,也是品种鉴定技术的发展趋势。非常有必要在已有的 DNA 指纹技术研究和应用基础上进行我国棉花品种标准 DNA 指纹库构建的研究。这不仅对保护棉花育成品种的知识产权和育种家的权益、提高种子市场的种子质量具有重要意义,而且对

棉花种子纯度、真实性的司法鉴定,植物新品种权保护,规范品种管理,控制品种多、乱、杂,打击假冒伪劣,以及进一步理清我国棉花种质亲缘关系等都是非常必要的。

参考文献:

- [1] 王平荣,邓晓建. 分子标记及其在作物遗传育种研究中的应用[J]. 种子,2001(3):38-41.
WANG Ping-rong, Deng Xiao-jian. Molecular marker and its applications in crop genetics and breeding[J]. Seed,2001(3):38-41.
- [2] MEREDITH W R. Use molecular markers in cotton breeding[C]//Constable G A, Forrester NW. Challenging the future;Proceeding of the world cotton research conference-1. Melbourne; CSIRO, 1995; 1005-1008.
- [3] BRUBAKER C L, Wendel J F. RFLP diversity in cotton[M]. NH, USA; Science Publishers, 2001; 81-102.
- [4] WILLIAMS J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 18; 6531-6535.
- [5] WELSH J. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) [J]. T A G, 1991, 82; 473-476.
- [6] MULTANI D S, Lyon B R. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers [J]. Genome, 1995, 38(5); 1005-1008.
- [7] IQBAL M J, Aziz N, Saeed N A. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94; 139-144.
- [8] 郭旺珍,张天真,潘家驹,等. 我国棉花主栽品种的 RAPD 指纹图谱研究[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(2); 129-134.
GUO Wang-zhen, Zhang Tian-zhen, Pan Jia-ju, et al. Analysis of RAPD fingerprinting on main cotton cultivars in China[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 1996, 4(2); 129-134.
- [9] 王心宇,郭旺珍,张天真,等. 我国短季棉品种的 RAPD 指纹图谱分析[J]. 作物学报, 1997, 23(6); 669-676.
WANG Xin-yu, Guo Wang-zhen, Zhang Tian-zhen, et al. Analysis of RAPD fingerprinting on shortseasoned cotton cultivars in China[J]. Acta Agronomica Sinica, 1997, 23(6); 669-676.
- [10] ZEBEAU M, Vos P. Selective restriction fragment amplification; a general method for DNA fingerprinting; European Patent Office, 92402629. 7[P]. 1993.
- [11] VOS P, Zabeau M. AFLP; a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23; 4407-4414.

- [12] PILLAY M, Myers G O. Genetic diversity in cotton assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers[J]. *Crop Sci*, 1999, 39: 1881-1886.
- [13] ABDALLA A M, Reddy O U K, El-zik K M, et al. Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 222-229.
- [14] 宋国立, 张春庆, 贾继曾, 等. 棉花 AFLP 银染技术及品种指纹图谱应用初报[J]. *棉花学报*, 1999, 11(6): 281-283.
SONG Guo-li, Zhang Chun-qing, Jia Ji-zeng, et al. Cotton AFLP analysis with silver-staining and primary report of variety fingerprinting based on it[J]. *Cotton Science*, 1999, 11(6): 281-283.
- [15] 朱云国, 王学德, 李悦有. 用 AFLP 技术构建棉花雄性不育三系及其杂种 F₁ 的 DNA 指纹图谱[J]. *棉花学报*, 2001, 13(3): 158-160.
ZHU Yun-guo, Wang Xue-de, Li Yue-you. DNA fingerprinting analysis of cytoplasmic male sterile, maintainer, restorer line and hybrid (F₁) in upland cotton by using AFLP technique[J]. *Cotton Science*, 2001, 13(3): 158-160.
- [16] 王学德, 李悦有. 彩色棉雄性不育系、保持系和恢复系的选育及 DNA 指纹图谱的构建[J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2002, 28(1): 1-6.
WANG Xue-de, Li Yue-you. Development of cytoplasmic male-sterile, maintainer and restorer lines in colored cotton and construction of their DNA fingerprints[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural University: Agric & Life Sci*, 2002, 28(1): 1-6.
- [17] 王省芬. 中国棉花抗枯、黄萎病品种的抗性与 DNA 指纹图谱研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2003.
WANG Xing-fen. Studies on disease resistance and dna fingerprinting of chinese cotton varieties with *Fusarium* and *Verticillium* Wilt resistance [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2003.
- [18] HAMADA H, Petrino M G, Kakunage. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes [J]. *Proc Nail Acad Sci USA*, 1982, 79(11): 6465-6469.
- [19] TAUTZ D, Rerz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12(10): 4127-4138.
- [20] LIU S, Cantrell R G, Me Carty J C, Jr. Simple sequence repeat-based assessment of genetic of genetic diversity in cotton race stock accessions [J]. *Crop Sci*, 2000, 40: 1459-1469.
- [21] 武耀廷, 张天真, 郭旺珍, 等. 陆地棉品种 SSR 标记的多态性及用于杂交种纯度检测的研究[J]. *棉花学报*, 2001, 13(3): 131-133.
WU Yao-ting, Zhang Tian-zhen, Guo Wang-zhen, et al. Detecting polymorphism among upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars and their roles in seed purity of hybrids with SSR markers[J]. *Cotton Science*, 2001, 13(3): 131-133.
- [22] 刘勤红, 王芙蓉, 张 军, 等. 利用 SSR 标记鉴定鲁棉研 15 号杂交种纯度的研究[J]. *山东农业科学*, 2003(2): 7-16.
LIU Qin-hong, Wang Fu-rong, Zhang Jun, et al. Purity detection of Lumianyan 15 hybrid with SSR markers[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2003(2): 7-16.
- [23] 马 轩, 杜雄明, 孙君灵. 18 个彩色棉品系的 SSR 指纹分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2003, 4(4): 305-310.
MA Xuan, Du Xiong-ming, Sun Jun-ling. SSR fingerprinting analysis on 18 colored cotton lines[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2003, 4(4): 305-310.
- [24] 朱美霞, 李英芝, 王建书, 等. 利用 SSR 方法鉴定棉花品种纯度[J]. *安徽农业科学*, 2005, 33(11): 2010-2016.
ZHU Mei-xia, Li Ying-zhi, Wang Jian-shu, et al. Purity identification of cotton varieties with SSR technique[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2005, 33(11): 2010-2016.
- [25] 秦 利, 李 冰, 范 玲, 等. 新疆陆地棉 SSR 标记指纹图谱构建和杂种纯度鉴定研究杂种纯度鉴定研究[J]. *新疆农业科学*, 2005, 42(6): 399-401.
QIN Li, Li Bing, Fan Ling, et al. Analysis on establishment of finger printing of SSR mark for upland cotton and purity of hybrid seed in Xinjiang[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2005, 42(6): 399-401.
- [26] 殷剑美, 陈旭升, 狄佳春, 等. 杂交棉苏杂 118 的 SSR 指纹图谱构建[J]. *江苏农业科学*, 2007(4): 29-31.
YIN Jian-mei, Chen Xu-sheng, Di Jia-chun, et al. Establishment of finger printing of SSR mark for Suza 118 hybrid[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2007(4): 29-31.
- [27] UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants). Guidelines for molecular marker selection and database construction, BMT Guidelines (proj. 3) [M]. Geneva: UPOV, 2005: 3-6.
- [28] 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.