

棉花多重 PCR 技术及其对杂交棉纯度鉴定的初步研究

陈浩东^{1,2}, 刘方¹, 王为^{1,3}, 肖才升², 李庠², 王琳¹, 李育强^{2*}, 王坤波^{1*}

(1. 中国农业科学院棉花研究所 / 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南 安阳 455000; 2. 湖南省棉花科学研究所 / 国家杂交棉研究推广中心, 湖南 常德 415101; 3. 江苏沿海地区农业科学研究所, 江苏 盐城 224002)

摘要: 选取在湘杂棉系列品种间表现出多态性稳定的部分 SSR 引物, 基于其扩增片段大小的不同来组合引物, 进行棉花多重 PCR 扩增。结果表明, 在与单一 PCR 扩增相同反应条件下, 仅根据扩增片段大小不同的原则, 可使 80% 的两重 PCR 组合获得正常扩增。利用两重 PCR 组合正常扩增的引物进行三重、四重 PCR 反应时, 均可获得正常扩增的产物, 在此基础上提出棉花上简化的多重 PCR 优化程序。并将多重 PCR 技术应用于杂交棉种子纯度检测, 清楚地鉴定出母本种子混杂和其它杂交棉种子的混杂, 从而为棉花杂交种的快速准确鉴定奠定了技术基础。

关键词: 棉花; SSR; 多重 PCR; 纯度检测

中图分类号: S562.035.3: Q78 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2011)01-0022-06

Preliminary Study on Multiplex PCR Technique and Its Application in Hybrid Cotton Seed Purity Test

CHEN Hao-dong^{1,2}, LIU Fang¹, WANG Wei^{1,3}, XIAO Cai-sheng², LI Xiang², WANG Lin¹, LI Yu-qiang^{2*}, WANG Kun-bo^{1*}

(1. Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China; 2. Cotton Sciences Research Institute of Hunan, National Hybrid Cotton Research Promotion Center, Changde, Hunan 415101, China; 3. Agricultural Sciences Research Institute of Coastal Region of Jiangsu, Yancheng, Jiangsu 224002, China)

Abstract: A series of stable polymorphism SSR primers in Xiangzamian series cultivars were used to construct various primer combinations according to the difference of their amplified band's size for multiplex PCR amplification of cotton. Eighty percent of double PCR amplified normally based on the principle of amplified fragments size difference under the same conditions as their single PCR reactions. Besides, triplex and quadruple PCR were also amplified normally using primers of double PCR with good results. So we proposed a simplified protocol of multiplex PCR assay in cotton. The multiplex PCR technology was used to detect the purity of hybrid cotton seeds which clearly identified impurity and blend of female parent seeds and also other hybrid cotton seeds. It can be used as a reference for the rapid and accurate identification of cotton hybrids.

Key words: cotton; SSR; multiplex PCR; identification of seed purity

多重 PCR (multiplex PCR, M-PCR) 又称多重引物 PCR 或复合 PCR, 是在常规 PCR 的基础上加以改进的, 即在一个 PCR 反应体系中加入两对或更多特异性引物, 针对同一个或多个 DNA 模板的不同区域扩增多个目的片段的 PCR 技术^[1]。其反应原理和操作过程与常规 PCR 相同, 但与单

一引物 PCR 扩增相比, 具有高效快捷、成本低廉等优点^[2]。自从 1988 年 Chamberlain 等^[1]首先提出这一概念以来, 就迅速在动物、微生物及人类相关研究上得到广泛的应用和深入研究。多重 PCR 技术在植物上应用起步较晚, 研究与应用相对较少^[3]。但近年来随着对多重 PCR 认识的加深, 在

收稿日期: 2010-09-06

作者简介: 陈浩东 (1983-), 男, 在读博士, chdmks@163.com; * 通讯作者: lizhong863@sina.com, wkbcri@hotmail.com

基金项目: 国家 863 计划 (2009AA101104), 国家科技支撑计划 (2006BAB01A05), 国家自然科学基金 (30900911)

植物有关领域开始广泛应用,包括植物种质鉴定^[4]、转基因植物检测^[5-7]、植物病虫害检测^[8]、分子育种^[9-10]等。但是该技术在植物种子纯度检测上^[11]鲜见报道,尤其在杂交棉种子纯度检测应用上还未见报道。本试验曾在构建湘杂棉指纹图谱研究中,筛选出 31 对在湘杂棉系列品种间表现出稳定多态性的 SSR 引物^[12]。本文选取其中部分多态性引物,通过不同的引物组合,建立起棉花多重 PCR 扩增技术体系,并将该技术首次应用于杂交棉种子纯度的检测,实现了对杂交棉种子纯度的快速准确鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为湖南省棉花科学研究所选育的湘杂棉 6 号、10 号及各自的父母本。

1.2 SSR 引物

根据已有研究基础^[12],并参考 <http://www.cottonmarker.org> 网站中引物的信息,确定了 14 对稳定性较好的多态性 SSR 引物,用于多重 PCR 的研究(表 1)。引物由上海生工合成。在常规 PCR 扩增基础上,引物的选择和分组只使用一个原则:同一组合的引物扩增片段大小不能相同。

表 1 供试 SSR 引物信息

Table 1 Information of candidate SSR primers

引物编号 Primer No.	扩增片段 Size of fragment /bp	引物序列 Primer sequence(5' to 3')	退火温度 Annealing temperature /°C
CSSR014	250~270	GAGATCCATGCTAACGTCTTACAAA ATGGGAGGAGGGAGTGGAA	60.9 61.8
SSR007	230~240	GACAGTCAAACAGAACAGATATGC TTACACGACTTGTTCCACG	57.9 59.6
SSR011	160~230	GCAAACACCATCCTACCACAA GGTTCTATGATCAAGGCTTGGTTT	60.8 61.8
SSR004	180~201	AAAAATCAGCCAAATTGGGA CGTCAACAATTGTCCCAAGA	59.4 59.5
SSR003	201~220	TAATAAAAGGGAAAGGAAAGAGTT TATGGCTCTAGAATATTCCCTCG	56.2 58.8
SSR002	180~230	AGGGTCTGTCATGGTTGGAG CATGCATGCGTACGTGTGTA	60.0 60.2
SSR016	180~200	CCCAACCTCTGATCACCTCTATAC CTTTCCCACTCGTAACAAGGTAAA	60.3 60.7
SSR018	200~217	CATGATGCACACTTCACACA CGGTTAAGCTTCCAGACATT	57.5 57.0
SSR010	100~140	AGTAATGGAACCTCAGACCCAATGT CTACAACCCTTGAAGCAAATTACC	60.2 60.3
SSR009	123~130	CCTCCCTCACTTAAGGTGCA ATGTTGTAAGGGTCAAGGC	60.2 60.0
SSR001	110~140	GGGTTTTCTGGGTATTTATACAACA TCATCCACTTCAGCAGCATC	59.5 59.9
SSR006	105~115	CACCATTGTGGCAACTGAGT GGAAAAGGGAAAGCCATTGT	59.6 60.3
SSR013	217~250	GACCTTGATTGATCAGTGCTACC ATTAATTTGTGGAGCAACCACC	60.0 60.1
SSR012	217~238	GAAGGAACCTCGTGATTATTTGAG GACCGGTAGACAGAGATGAGAAAT	60.4 60.0

1.3 试验方法

1.3.1 棉花基因组 DNA 的提取。参照 Paterson 等^[13]和 Zhang Jin-fa 等^[14]的 CTAB 法从子叶中快速提取棉花基因组 DNA。

1.3.2 多重 PCR 扩增反应和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。PCR 反应总体积为 10 μL , 其中含有

Mg^{2+} (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , dNTPs (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.6 μL , TaqDNA 聚合酶 (1U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 10 \times Reaction buffer 1.0 μL , 模板 DNA (50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , ddH₂O 6.2 μL 。DNA 扩增反应是在 Eppendorf Mastercycler PCR 仪上进行的。反应程序具体如

下:先95℃预变性45 s,然后是94℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸45 s经28个循环,最后94℃变性1 min,55℃退火45 s,72℃延伸1 min,4℃保存至结束。

8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测:采用BIO-RAD公司PowerPac HCTM电泳仪,北京六一仪器厂DYCZ-30电泳槽装置。电泳缓冲液为1×TBE,在扩增产物中加入1.5 μL溴酚蓝上样缓冲液混合均匀,取1.8 μL加入点样孔,190 V恒压电泳45 min。电泳结束后取下凝胶,银染显色程序参考Bassam等^[15]和张军等^[16]并稍作修改,程序如下:

固定:固定液(H₂O 340 mL + 95%酒精 40 mL + 10%乙酸 20 mL)固定5~6 min,可水平缓慢摇动。固定结束后,用蒸馏水洗两遍。

染色:染色液(AgNO₃ 0.6 g + H₂O 300 mL)染色12 min,期间水平缓慢摇动。染色结束后,用蒸馏水洗两遍。

显色:显色液(NaOH 6 g + 甲醛 4 mL + 0.2% Na₂S₂O₃ 4 mL + H₂O 400 mL)倒入迅速震荡使显色液均匀作用,然后平行摇动,直到显影。显影清晰后,倒掉显色液,加蒸馏水洗涤聚丙烯酰胺凝胶2次,彻底清洗显影液,以免保存凝胶变色。

终止:终止液(Na₂CO₃ 3 g + H₂O 400 mL)中暂时保存,并用数码相机拍照保存。

2 结果分析

2.1 SSR引物的分组

引物分组参考王凤格等^[3]方法。根据引物扩增片段的大小范围,从表1中选取12对多态性较好的引物按其扩增片段由大到小的顺序排列如图1,其中位于同一行的为扩增片段大小接近或有交叉片段的引物。位于同一行的引物不进行两重PCR组合,利用不同行的引物从上到下的顺序分别组合一次进行PCR扩增。有些引物虽然列为同一行,如扩增条带并无重叠,也可以组合使用,比如引物SSR010和SSR006。

2.2 多重PCR扩增结果

根据图1从上至下,对不同行的引物完全排列组合,分别进行一次两重PCR扩增,共有45种组合方式。扩增反应体系及扩增程序与单一PCR

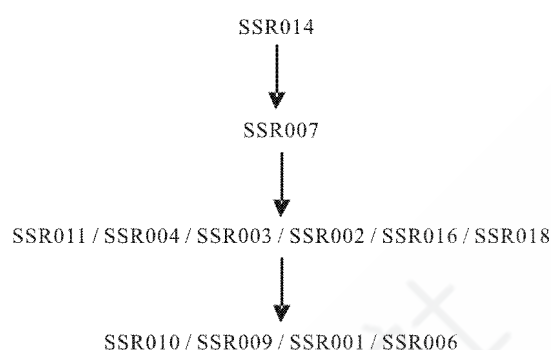


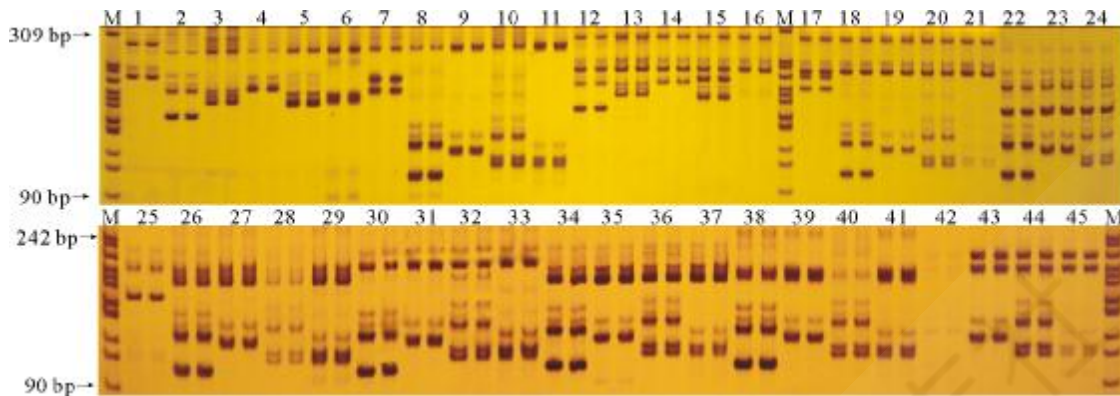
图1 12对引物的扩增片段大小范围排序

Fig. 1 The order of 12 primers based on their amplified band's size

完全相同。由图2可见45个两重PCR扩增结果出现四种情况:两对均正常扩增(共36对)、一对引物正常扩增而另一对扩增较弱(共5对,分别是SSR014-SSR011, SSR014-SSR003, SSR007-SSR006, SSR016-SSR001, SSR018-SSR006)、两对引物均扩增较弱(共2对,分别为SSR004-SSR001, SSR018-SSR010)、一对引物正常扩增而另一对几乎未扩增出条带(共2对,分别为SSR007-SSR016, SSR011-SSR006)。在只以扩增片段分子量大小不同为分组原则的情况下,80%的两重PCR组合获得了正常扩增。在两重PCR扩增正常的基础上,不改变PCR扩增体系,进行了三重与四重PCR的扩增,同时对组合中的引物进行单一PCR扩增,并在同一块凝胶上进行电泳检测作为对照,结果分别如图3和图4。单一引物扩增的条带在三重与四重PCR扩增时都能得到正常扩增,只是四重PCR扩增时引物SSR006扩增的条带有弱化现象,而一些单一引物扩增时的扩增很弱的条带会在多重PCR中突然增强(如图3和图4中箭头所指)。这表明,不同引物之间在扩增时会互相影响,出现不同的上、下游引物重新组合,从而导致某些主带弱化和附带增强,甚至扩增出新条带,但这些都不影响主带的读取。此时使用的引物均是在湘杂棉10号亲、子代间表现共显性的引物,这些扩增正常的多重PCR可直接应用于湘杂棉10号种子的纯度检测和指纹图谱的构建。

2.3 多重PCR检测杂交棉种子纯度

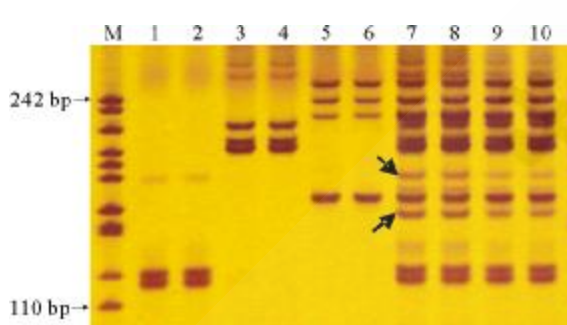
图5结果显示,49粒样品(共51个泳道,2,3号泳道是亲本对照)中48粒是真正的湘杂棉6



M: Marker; 所用引物组合分别为(Primers used):1~11: SSR014-SSR007, SSR011, SSR004, SSR003, SSR002, SSR016, SSR018, SSR010, SSR009, SSR001, SSR006; 12~21: SSR007-SSR011, SSR004, SSR003, SSR002, SSR016, SSR018, SSR010, SSR009, SSR001, SSR006; 22~25: SSR011-SSR010, SSR009, SSR001, SSR006; 26~29: SSR004-SSR010, SSR009, SSR001, SSR006; 30~33: SSR003-SSR010, SSR009, SSR001, SSR006; 34~37: SSR002-SSR010, SSR009, SSR001, SSR006; 38~41: SSR016-SSR010, SSR009, SSR001, SSR006; 42~45: SSR018-SSR010, SSR009, SSR001, SSR006。

图 2 两重 PCR 扩增的 45 种结果

Fig. 2 The forty five amplification results of double PCR



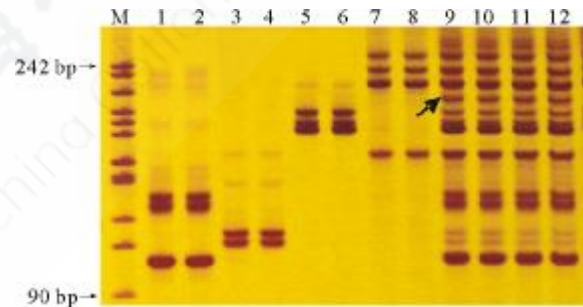
M: Marker; 1, 2: 单引物 SSR009; 3, 4: 单引物 SSR018; 5, 6: 单引物 SSR013; 7~10: 三引物混合。

M: Marker; 1, 2: Primer used is SSR009; 3, 4: Primer used is SSR018; 5, 6: Primer used is SSR013; 7~10: Three primers mixed.

图 3 湘杂棉 10 号 DNA 三重 PCR 扩增结果

Fig. 3 Amplification results of triplex PCR for DNA of Xiangzamian 10

号种子; 与双亲对比, 26 号泳道应该是母本种子的混杂, 说明这批湘杂棉 6 号取样的纯度是 97.96%, 与另外进行的田间纯度鉴定结果(97.8%) 基本一致。图 6 是用 SSR013, SSR012 双引物对湘杂棉 10 号 41 粒样品 (共 45 个泳道, 1, 2, 3, 4 号泳道是亲本对照)SSR 扩增结果的电泳检测图片, 样品中包括掺入其它杂交棉种子和湘杂棉 10 号母本种子各 2 粒, 人为制造混杂, 以验证双重



M: Marker; 1, 2: 所用引物为 SSR010; 3, 4: 所用引物为 SSR006; 5, 6: 所用引物为 SSR002; 7, 8: 所用引物为 SSR013; 9~12: 四引物混合。

M: Marker; 1, 2: Primer used is SSR010; 3, 4: Primer used is SSR006; 5, 6: Primer used is SSR002; 7, 8: Primer used is SSR013; 9~12: Four primers mixed.

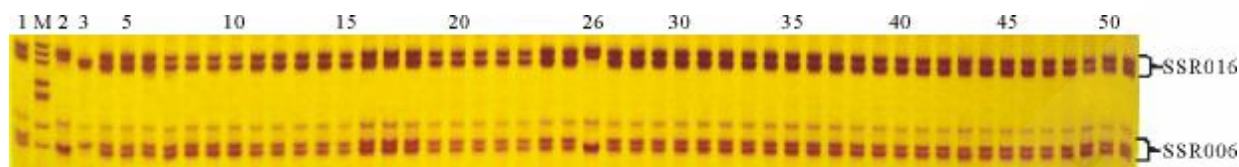
图 4 湘杂棉 10 号 DNA 四重 PCR 扩增结果

Fig. 4 Amplification results of quadruple PCR for DNA of Xiangzamian 10

PCR 对杂交棉种子纯度的检测能力。13, 21, 33, 38 号泳道的样品不是湘杂棉 10 号的种子。与双亲对比, 13 号和 21 号泳道应该为母本种子混杂, 而 33 号和 38 号泳道不是混杂的母本种子, 应该是人为混杂的其它杂交棉种子。对于 33 号泳道的种子混杂, 如单独使用 SSR013 引物, 则能同时扩增出双亲条带, 无法实现与湘杂棉 10 号杂交种子的区分。同样, 如单独使用 SSR012 引物则无法

鉴别出 38 号泳道种子的真假。SSR013 和 SSR012 两对引物组合使用,进行双重 PCR 反应则把这两种混杂情况均可鉴别出来。该结果表

明,利用双重甚至多重 PCR,不仅能有效、准确地鉴别出杂交种子中混杂的亲本种子,同时对于鉴别混杂于其中的其它杂交棉种子也是有效的。

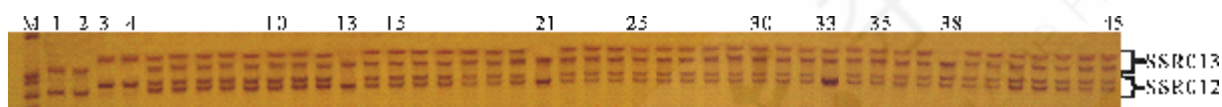


M: Marker; 2: 母本对照; 3: 父本对照; 26: 母本混杂; 其余均为湘杂棉 6 号。

M: Marker; 2: Female parent; 3: Male parent; 26: The motley of female parent seed; Others: Xiangzhamian 6.

图 5 SSR016、SSR006 双引物对湘杂棉 6 号 49 个单粒种子的 SSR 扩增结果

Fig. 5 Amplification results of double PCR of primers SSR016、SSR006 with template DNA of 49 seeds of Xiangzhamian 6



M: Marker; 1,2: 母本对照; 3,4: 父本对照; 13,21,33,39: 混杂种子; 其余均为湘杂棉 10 号。

M: Marker; 1,2: Female parent; 3,4: Male parent; 13,21,33,39: The motley of other hybrid seeds; Others: Xiangzhamian 10.

图 6 SSR013、SSR012 双引物对湘杂棉 10 号 41 个单粒种子的 SSR 扩增结果

Fig. 6 Amplification results of double PCR of primers SSR013、SSR012 with template DNA of 41 seeds of Xiangzhamian 10

3 讨论

本实验采用与单一 PCR 相同的反应条件,仅按引物扩增产物分子量大小不同的原则来组合引物,进行棉花 SSR 双重 PCR 扩增,80%的引物组合都得到了正常扩增。研究中所使用的棉花 SSR 引物(表 1)均选自文中提及的网站,由不同研究者开发。尽管各引物理论退火温度不同,但均在较小范围内波动,所以实验过程中不同的引物组合均采用 55℃ 的退火温度,结果大部分都获得了正常扩增。表明如果从文中提及的网站上选取棉花 SSR 引物,由于引物开发者在引物设计时已把退火温度考虑在内,研究者使用这些引物进行多重 PCR 研究时,无需再进行退火温度的优化。该研究结果支持了王风格等^[9]和白雪霞等的观点^[17],说明不同物种的多重 PCR 反应程序优化结果可以相互借鉴。Arlorio 等^[18]和 Ma 等^[9]及他人采用的都是与其对应的单一 PCR 完全相同的反应条件,也都取得了令人满意的结果。然而也有研究认为,由于多重 PCR 比单一 PCR 的实验设计复杂,技术难度大,反应条件要根据实验结果反复修改、优化^[2,18]。本文一部分组合未能获得正常扩增,分析组合中两对引物的序列信息,发现

同一组合中的引物之间存在较严重的互补情况。如 SSR014 的上游引物与 SSR011 的下游引物在 3' 末端处有三碱基互补,而 SSR004 的上游引物中存在单碱基 A 重复,SSR001 的下游引物存在单碱基 T 重复。该结果表明引物之间的相互作用是引起多重 PCR 不能正常扩增的一个重要原因。因此,进行多重 PCR 试验时,引物的选择和分组要遵循两条原则:一是尽量避免同一组合的引物之间有相互作用,二是同一组合的引物扩增片段在凝胶上位置不能重叠。所以,我们认为,只要选用与稳定有效的单一 PCR 相同的反应条件,并遵循引物组合的一般原则,就能够直接应用到多重 PCR,而不需要经过大量繁琐的优化程序。

杂交棉种子纯度的鉴定,在应用上具有重要的意义。目前杂交棉种子纯度鉴定主要是冬季在海南田间种植鉴定,但田间鉴定需在棉花的整个生育期进行,鉴定周期长,异地鉴定费用高,而且通常在种子销售完后才得到鉴定的结果。本实验利用双重 PCR 技术完成了对杂交棉种子纯度的鉴定,过程方便、快捷,结果准确、可靠,为杂交棉的种子纯度鉴定提供了新的思路。对亲缘关系较近的品种间混杂,进行一次两重 PCR 反应有时很

难检测出来,此时采用三重、四重甚至多重 PCR 可以进一步简化实验,提高结果的可靠性。本实验在双重 PCR 正常扩增的情况下,进行三重、四重 PCR 扩增,也均能得到正常的扩增结果。以上研究结果为进一步简化棉花 SSR 多重 PCR 的程序及优化提供了有益参考。但是对于杂交棉种子中混入非亲本的其它种子,还需要选用较多引物进行组合,甚至采用多次多重 PCR 反应才能达到准确鉴别的目的。具体选用多少对引物才能使结果较为可靠,还需要视情况进行研究确定。

参考文献:

- [1] CHAMBERLAIN J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(23): 11141-11156.
- [2] 黄银花,胡晓湘,徐慰倬,等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素[J]. *遗传*, 2003, 25(1): 65-68.
HUANG Yin-hua, Hu Xiao-xiang, Xu Wei-zhuo, et al. The factors affecting the efficiency of mutiplex PCR[J]. *Hereditas*, 2003, 25(1): 65-68.
- [3] 王风格,赵久然,余花娣,等. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究 III. 多重 PCR 技术在玉米 SSR 引物扩增中的应用[J]. *玉米科学*, 2003, 11(4): 3-6.
WANG Feng-ge, Zhao Jiu-ran, She Hua-di, et al. Series of research on establishing DNA fingerprinting database of Chinese new maize cultivars III. Multiplex PCR applied in maize SSR amplification[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2003, 11(4): 3-6.
- [4] 许瑾,徐涛,朱水芳. 多重 PCR 技术在鉴定菜豆中的应用[J]. *检验检疫学报*, 2010, 20(1): 7-10.
XU Jin, Xu Tao, Zhu Shui-fang. Application of multiple PCR to identify *Phaseolus vulgaris*[J]. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2010, 20(1): 7-10.
- [5] 高玉龙,焦芳婵,徐照丽,等. 多重 PCR 在烟草转基因检测中的应用[J]. *生物技术通报*, 2008(2): 140-142.
GAO Yu-long, Jiao Fang-chan, Xu Zhao-li, et al. Application of multiplex polymerase chain reaction to detection of transgenic tobacco[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(2): 140-142.
- [6] 邵碧英,陈文炳,杨婕. 马铃薯及其制品中转基因成分的多重 PCR 检测[J]. *食品科学*, 2006, 27(1): 178-181.
SHAO Bi-ying, Chen Wen-bing, Yang Jie. Multiplex PCR detection of genetically modified components in potato and its products[J]. *Food Science*, 2006, 27(1): 178-181.
- [7] 邵碧英,江树勋,陈文炳,等. 番茄、甜椒中转基因成分和内源基因的多重 PCR 检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2004, 25(10): 219-223.
SHAO Bi-ying, Jiang Shu-xun, Chen Wen-bing, et al. Development the multiplex PCR detection method of genetically modified components and inner gene in tomato and sweet pepper[J]. *Food Science*, 2004, 25(10): 219-223.
- [8] 张显勇,蔡文伟,杨本鹏,等. 甘蔗花叶病和宿根矮化病多重 PCR 检测方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(12): 4321-4327.
ZHANG Xian-yong, Cai Wen-wei, Yang Ben-peng, et al. Development of a multiplex PCR protocol for the detection of SCMV and *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli*, *Ixx*, the causal bacterium of sugarcane RSD[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(12): 4321-4327.
- [9] MA W, Zhang W, Gale K R. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat[J]. *Euphytica*, 2003, 134(1): 51-60.
- [10] 卢龙斗,侯彩玲,陈龙,等. 小麦糯性基因的多重 PCR 分子鉴定[J]. *遗传*, 2009, 31(8): 844-848.
LU Long-Dou, Hou Cai-Ling, Chen Long, et al. Molecular identification on Waxy genes in wheat using multiple-PCR[J]. *Hereditas*, 2009, 31(8): 844-848.
- [11] 吴明生,贾希海,律宝春,等. 多重引物 SSR 技术鉴定玉米杂交种子纯度的研究[J]. *玉米科学*, 2006, 14(50): 38-40.
WU Ming-sheng, Jia Xi-hai, Lu Bao-chun, et al. Identification purity of maize F₁ hybrids using multiplex PCR of SSR marker[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2006, 14(5): 38-40.
- [12] 李育强,陈浩东,洪亚辉,等. 湘杂棉 SSR 指纹图谱的构建及应用[J]. *棉花学报*, 2009, 21(3): 175-178.
LI Yu-qiang, Chen Hao-dong, Hong Ya-hui, et al. Construction and application of SSR fingerprints of Hunan hybrid cotton[J]. *Cotton Science*, 2009, 21(3): 175-178.
- [13] PATERSON A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11(3): 122-127.
- [14] ZHANG Jin-fa, Stewart J McD. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA[J]. *Journal of Cotton Science*, 2000, 4: 193-201.
- [15] BASSAM B J, Caetano-anoles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. *Anal Biochem*, 1991, 196: 80-83.
- [16] 张军,武耀廷,郭旺珍,等. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测[J]. *棉花学报*, 2000, 12(5): 267-269.
ZHANG Jun, Wu Yao-ting, Guo Wang-zhen, et al. Fast screening of microsatellite markers in cotton with PAGE / silver staining[J]. *Cotton Science*, 2000, 12(5): 267-269.
- [17] 马雪霞,王凯,郭旺珍,等. 棉花 SSR 多重 PCR 技术的初步研究和利用[J]. *分子植物育种*, 2007, 5(5): 648-654.
MA Xue-xia, Wang Kai, Guo Wang-zhen, et al. Multiple SSR-PCR techniques and their application in cotton[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2007, 5(5): 648-654.
- [18] ARLORIO M, Coisson D J, Cereti E, et al. Polymerase chain reaction (PCR) of puroindoline b and ribosomal / puroindoline b multiplex PCR for the detection of common wheat (*Triticum aestivum*) in Italian pasta[J]. *European Food Research and Technology*, 2003, 216: 253-258. ●