

棉花品种遗传纯度的 SSR 分子标记鉴定技术研究

刘国栋¹, 王芙蓉¹, 宫永超¹, 马和欢², 张 军^{1*}

(1. 农业部黄淮海棉花遗传改良与栽培生理重点实验室/山东棉花研究中心, 济南 250100; 2. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要: 为建立适合于 SSR 标记的棉花品种纯度鉴定方法, 利用 78 个 SSR 标记对 12 个棉花常规品种进行标记基因型分析。通过比较不同品种不同单株标记基因型, 发现棉花品种的非纯 SSR 位点存在 3 种主要类型。通过综合分析非纯 SSR 位点率和异型单株率对品种遗传纯度的影响, 建立了利用 SSR 标记在分子水平上鉴定棉花品种纯度的方法。利用该方法鉴定的 12 个棉花品种中有 3 个品种(C5、C9 和 C11)的遗传纯度在 98% 以上, 非纯 SSR 位点和异型株均较高的 2 个品种(C3 和 C6)遗传纯度分别为 67.31% 和 31.79%, 该方法弥补了以往分子纯度计算方法中只考虑单株混杂、不考虑 SSR 位点混杂的缺陷, 可比较客观地反映品种的遗传纯度状况。

关键词: 棉花品种; SSR; 非纯位点; 遗传纯度

中图分类号: S562.035 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2013)05-0382-06

A New Method for Identification of the Genetic Purity of Cotton Varieties by SSR Markers

LIU Guo-dong¹, WANG Fu-rong¹, GONG Yong-chao¹, MA He-huan², ZHANG Jun^{1*}

(1. Key Laboratory of Cotton Breeding and Cultivation in Huang-Huai-Hai Plain, Ministry of Agriculture, Shandong Cotton Research Center, Jinan, Shandong 250100, China; 2. Academy of Biological Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: To establish a method for genetic purity identification of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) varieties by SSR markers, marker genotypes of 12 conventional cotton genotype varieties were surveyed using 78 pairs of core SSR primers. By comparing SSR loci from different individuals of all tested cotton varieties, the non-homozygous SSR alleles of cotton variety were divided into three typical scenarios at the molecular level. Consequently, a method for the genetic purity identification of cotton varieties using SSR markers was proposed based upon analysis of the comprehensive influences of both non-homozygous SSR loci and the rate of heterotype individuals in the cotton varieties. For the genetic purity of 12 cotton varieties tested by this method, three varieties (C5, C9 and C11) were above 98%, while two varieties (C3 and C6) were 67.31% and 31.79%, respectively. The method proposed takes into account both the influences of farraginous individuals detected by SSR markers and the inherited non-homozygous SSR loci on the purity of a cotton varieties, and therefore, provides an effective and reliable way to identify the uniformity and stability of cotton varieties.

Key words: cotton (*Gossypium hirsutum* L.) variety; SSR; non-homozygous loci; genetic purity

品种纯度反映品种的一致性和稳定性, 是品种鉴定的一项重要指标。目前棉花品种的纯度鉴定以田间种植的表型鉴定为主。表型纯度鉴定周期长, 易受环境因素影响, 而且表型特征的判定标准不易把握。近年来, 虽然转 Bt 基因抗虫棉品种数目日益增多, 陆地棉品种间的遗传基础却越来越窄^[1-2], 传统的表型鉴定方法已经不能满足

实际需要, 迫切需要开发新的、可靠的品种纯度检测方法。DNA 分子标记技术因其分辨率高、重复性好和简单快速等优点适应了这一需求。在 DNA 分子标记技术中, SSR (Simple sequence repeats) 分子标记因其共显性遗传且多态性丰富成为目前品种分子鉴定实验中应用最广泛的一种分子标记^[3-5]。在品种纯度鉴定方面, SSR 标记主要

应用于杂交种 F_1 的纯度鉴定^[6-7]。杂交种有双亲的遗传信息,通过筛选双亲间有多态的 SSR 标记就能很好地区分杂交种及其亲本。Sundaram 等^[8]从 48 对 SSR 引物中筛选出 10 个引物鉴定 10 个水稻 (*Oryza sativa*) 品种及其胞质不育系和恢复系,并对水稻品种 IR58025A 进行了纯度鉴定。Naresh 等^[9]利用 74 个 EST-SSR(Expressed sequence tags-SSR)扫描了 3 个藏红花 (*Crocus sativus*) 杂交种亲本系,筛选到 5 个具有多态性的 SSR 标记;利用这些标记可以精确地鉴定杂交种的亲本以及杂交种纯度。分子标记技术在常规品种鉴定方面也有一些报道。Karakousis 等^[10]利用 130 对 SSR 引物分析了 40 个大麦 (*Hordeum vulgare*) 品种的标记基因型,确定 36 个 SSR 标记可以用于大麦品种的分子鉴定。关荣霞等^[11]利用 SSR 标记对大豆 (*Glycine max*) 的 4 个品种进行基因型鉴定。利用 SSR 标记进行棉花品种鉴定的相关研究也取得了一定进展。匡猛等^[12]筛选出 36 对多态性高、稳定性好且在染色体上分布均匀的引物作为核心引物,构建了中国棉花主栽品种的指纹图谱。张玉翠等^[13]利用分布在棉花 26 条染色体上的 40 对引物建立了 32 个主栽品种的指纹图谱。Johon 等^[14]从棉花 26 条染色体上选择了 105 个均匀分布的引物作为核心引物,对棉属 6 个种的 12 个基因型(其中包括 6 个陆地棉品种)进行多态性分析,结果表明,选用的核心引物能很好地揭示

棉属种间以及陆地棉种内的 DNA 多态性信息。利用分子标记对棉花品种进行纯度鉴定的研究主要是针对杂交种^[15-19],应用于常规品种的报道还比较少^[2]。

为探讨一种适合于 SSR 标记的品种纯度鉴定方法,本研究利用 78 对 SSR 引物对 12 个棉花常规品种进行了标记基因型分析,通过对不同棉花品种非纯 SSR 位点和单株标记基因型的分析,确定了一种基于非纯 SSR 位点率和异型单株率的分子遗传纯度鉴定方法,为今后棉花品种利用 SSR 标记进行分子遗传纯度分析提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为 2011 年参加黄河流域棉花品种区域试验的 12 个棉花常规品种 C1-C12,由中国农业科学院棉花研究所提供。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增与检测

每个棉花品种任意选取 20 粒种子,DNA 提取根据匡猛等^[20]报道的方法;PCR 扩增与银染检测根据张军等^[21]报道的方法。

1.3 SSR 分析

1.3.1 引物选择。根据多态性高、扩增清晰稳定、带型统计容易的基本原则,结合 SSR 引物在染色体上的分布情况,从本实验室前期工作中确定的多态性引物中选择 78 对 SSR 引物(表 1)进行棉

表 1 78 个 SSR 引物信息

Table 1 Information of SSR preferred 78 SSR primers

引物 Primer	染色体 Chromosome	引物 Primer	染色体 Chromosome	引物 Primer	染色体 Chromosome	引物 Primer	染色体 Chromosome
NAU2083	Chr 1	BNL3255	Chr 8	HAU1123	Chr 14	NAU1103	Chr 21
NAU4073	Chr 1	NAU1369	Chr 8	NAU2190	Chr 14	CGR6410	Chr 22
NAU2265	Chr 2	CGR5707	Chr 9	NAU2272	Chr 14	NAU 2026	Chr 22
NAU2277	Chr 2	NAU3052	Chr 9	NAU 2173	Chr 14	BNL3140	Chr 23
BNL1053	Chr 3	JESPR274	Chr 9	NAU5467	Chr 14	NAU3100	Chr 23
NAU1071	Chr 3	DPL0296	Chr 10	NAU1070	Chr 14	NAU3515	Chr 24
TMB1963	Chr 3	NAU1233	Chr 10	NAU2343	Chr 15	HAU1846	Chr 24
CGR5590	Chr 5	DPL0431	Chr 10	TMHA60-F18	Chr 15	BNL3452	Chr 24
HAU2570	Chr 5	NAU2935	Chr 10	BNL1026	Chr 16	JESPR291	Chr 24
HAU0878	Chr 5	NAU5418	Chr 11	HAU2786	Chr 17	HAU2022	Chr 25
JESPR065	Chr 5	HAU2026	Chr 11	HAU1413	Chr 17	BNL0827	Chr 25
NAU4034	Chr 5	NAU5428	Chr 11	HAU2786	Chr 17	DPL0057	Chr 26
NAU1187	Chr 5 or Chr 19	NAU980	Chr 11	DPL0894	Chr 18	NAU5397	Chr 26
NAU1269	Chr 5 or Chr 19	NAU3748	Chr 11	DPL0556	Chr 19	HAU1934	-
NAU2274	Chr 5 or Chr 19	DPL0917	Chr 12	NAU1102	Chr 19	NAU1186	-
NAU874	Chr 6	NAU3519	Chr 12	NAU1255	Chr 19	CS62	-
NAU1043	Chr 7	DPL0308	Chr 13	CIR062	Chr 19	NAU 1196	-
NAU1085	Chr 7	CGR5390	Chr 13	NAU3405	Chr 19	NAU 868	-
BNL1694	Chr 7	CER0168	Chr 13	NAU3110	Chr 19		
NAU3793	Chr 8	DPL0260	Chr 14	DPL0376	Chr 21		

花品种 SSR 标记基因型分析。

1.3.2 数据分析。依据 SSR 扩增产物在凝胶图上的相对位置,对每个引物的扩增带型编号,同一品种的某个 SSR 位点中带型占多数的称为主要带型,记录为“1”;其他带型称为异型带,记录为“2”、“3”或“4”。最后将一个品种中所有非纯 SSR 位点的带型数据单独整理在一起,构成品种在分子水平上的非纯表现类型。

1.3.3 品种的分子遗传纯度分析。SSR 分子标记能在 DNA 水平上反映品种的 SSR 位点一致性和单株个体标记基因型的一致性,本文将 SSR 分子标记在品种群体中反映的 DNA 水平上的一致性称为品种的分子遗传纯度。SSR 分子标记检测的

分子遗传纯度受 2 个因素的影响,一是非纯 SSR 标记位点(图 1),另一个是所有非纯 SSR 位点中单株个体标记基因型间的差异情况。综合以上 2 个因素,本研究提出了利用 SSR 标记基因型结果计算棉花品种分子遗传纯度的公式:分子遗传纯度 = $1 - [(非纯 SSR 位点数 / 总 SSR 位点数) \times (异型单株数 / 总单株数)]$ 。非纯 SSR 位点数是指某品种单株个体间标记带型不一致的 SSR 位点的个数,总 SSR 位点数是指品种纯度检测中选用的所有 SSR 引物检测到的位点总数,异型单株数是指单株标记基因型不同于主要标记基因型的单株数,总单株数是指该品种纯度检测中选用的全部单株数。

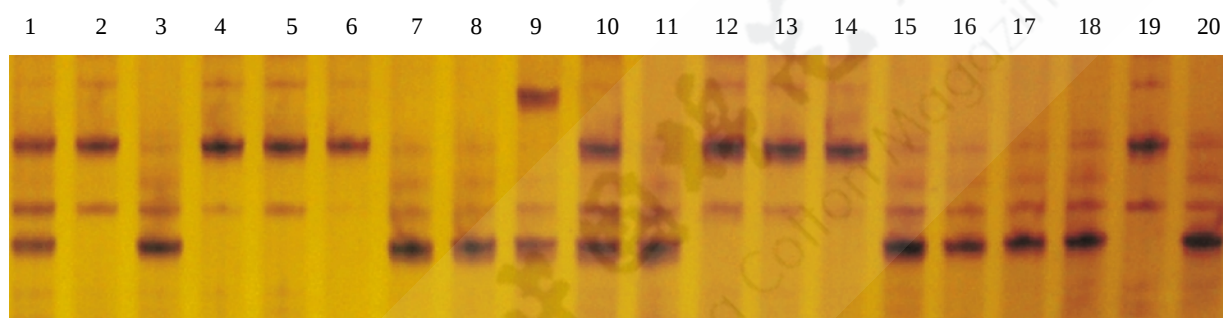


图 1 非纯 SSR 位点 JESPR065 在 20 个单株个体中的扩增结果

Fig. 1 DNA fragments amplified by SSR primer JESPR065 in non-homozygous SSR locus of 20 different individuals

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性分析

本实验所用的 78 对 SSR 引物在 12 个品种中均能检测到 2 种以上的等位变异,平均等位变异数为 2.97 个,变化范围在 2~6。其中 56 对引物能检测到 3 种以上的等位变异,占 71.79%,表明这些引物具有较好的多态性,适合于棉花品种的分子遗传纯度鉴定。

2.2 棉花品种非纯 SSR 位点的标记基因型分析

在鉴定的 12 个棉花品种(C1-C12)中,不同品种的非纯 SSR 位点主要存在 3 种表现形式。品种 C1、C7 和 C10 属于第一种类型,它们的非纯 SSR 位点多,而且异型带集中于极少数单株;以 C1 品种为例,78 对 SSR 引物在 C1 品种中检测了 78 个位点,其中有 32 个位点出现异型带,而且这些异型带全部集中于 2 个单株中(表 2)。品种 C2、C9 和 C12 属于第二种类型,它们的非

纯 SSR 位点较少、但异型带随机分布;以 C2 品种为例,78 个 SSR 位点中,有 5 个位点处于非纯状态,且这 5 个位点在 20 个单株中造成 13 个单株的标记基因型与主要标记基因型不同。品种 C3、C4、C6 和 C8 属于第三种类型,它们的非纯 SSR 位点多,而且异型带随机分布;以 C3 品种为例,78 个 SSR 位点中,30 个位点为非纯 SSR 位点,占位点总数的 38.46%。C3 品种的所有 20 个单株中,几乎找不到主要标记基因型。非纯 SSR 位点的这 3 种表现形式基本涵盖了区试品种中标记基因型的各种混杂形式。

2.3 棉花品种的分子遗传纯度分析

利用 SSR 标记鉴定的分子遗传纯度不同于田间鉴定的品种纯度,它主要反映了品种在 DNA 分子水平上的一致性。本实验采用 78 对 SSR 引物对 12 个棉花品种进行分子遗传纯度鉴定(表 2),其中 3 个品种(C5、C9 和 C11)的遗传纯度在 98% 以上,品种 C5 的分子遗传纯度最高,为

99.87%。这些品种除极少数位点尚残存异型带外,遗传上基本一致。另有 5 个品种的分子遗传纯度虽也在 90%以上,但由于品种群体内非纯 SSR 位点还比较多,遗传上还不能稳定。其余 4 个品种的分子遗传纯度低于 90%。C6 品种的遗传纯度最低,只有 31.79%。

从品种的标记基因型总体分布看,品种 C1 和 C7 的非纯 SSR 位点数虽然比较多(分别为 32 和 26),非纯位点率为 41.03%和 33.33%,但由于非纯位点的异型带主要集中在少数几个单株上,

其异型单株率比较低,因此这 2 个品种的分子遗传纯度仍达到 95%以上;而品种 C2 和 C9 虽然异型单株率比较高(分别为 65%和 40%),但由于检测到的 78 个位点中大多数位点已经纯合(C2 品种 73 个,C9 品种 76 个),只有少数残存位点处于非纯状态,因此分子遗传纯度仍能达到 95%以上。由此可见,非纯 SSR 位点越多,异型带分布越分散,品种在 DNA 水平上的一致性越差,品种的分子遗传纯度越低,单纯依据非纯 SSR 位点率或异型单株率均不能准确反映品种的纯度。

表 2 SSR 引物的遗传纯度鉴定结果
Table 2 The results of genetic purity by core SSR primers

品种 Cultivar	SSR 总位点 Total number of SSR loci	非纯 SSR 位点 Number of non-homozygous SSR loci	非纯 SSR 位点率 Ratio of non-homozygous SSR loci / %	总单株数 Total number of individuals	异型单株数 No. of different genotypes individuals	异型单株率 Ratio of different genotypes individuals / %	分子遗传纯度 Molecular genetic purity / %
C1	78	32	41.03	20	2	10	95.90
C2	78	5	6.41	20	13	65	95.83
C3	78	30	38.46	20	17	85	67.31
C4	78	19	24.36	20	13	65	84.17
C5	78	2	2.56	20	1	5	99.87
C6	78	56	71.79	20	19	95	31.79
C7	78	26	33.33	20	2	10	96.67
C8	78	14	17.95	20	18	90	83.85
C9	78	2	2.56	20	8	40	98.97
C10	78	36	46.15	20	4	20	90.77
C11	78	5	6.41	20	1	5	99.68
C12	78	6	7.69	20	8	40	96.92

3 结论与讨论

利用 SSR 标记进行品种纯度鉴定在很多作物中已有报道^[6-11],在棉花该方面研究也取得了一定进展^[15-18]。这些研究主要利用 SSR 标记先确定杂株再计算品种纯度(一般是单株中 2 个或 2 个以上杂带便判定为杂株),只考虑单株混杂,忽视了 SSR 位点混杂。

为了探讨棉花品种在分子水平上的混杂形式,本研究利用 78 对 SSR 引物分析了 12 个棉花品种的标记基因型,发现棉花品种在分子水平上主要存在 3 种混杂类型:(1)品种内非纯 SSR 位点多而且非纯位点的异型带比较集中,主要集中在一个或几个单株上。结合育种实践,作者认为这种类型应属于品种混杂或高代混系选育的品种(如品种 C1、C7 和 C10);(2)品种内存在少数

的非纯 SSR 位点,而且每个位点的异型带随机分布。其中有的位点 2 种带型的比率接近 1:1。石海波^[22]、王立新^[23]等在对小麦品种进行分子标记鉴定时有过类似的报道。这种非纯 SSR 位点的存在,可能是由于标记位点与表型性状的关联度不高,对田间育种选择没有实际意义,所以群体中 2 种带型分布的比例接近。而有的位点中 2 种带型的比例相差悬殊,该类型位点称为高度偏分布非纯 SSR 位点,王立新等^[24]对该类型的位点有过报道,这种非纯 SSR 位点的存在是由于剩余杂合位点在后代中不断分离造成的。前一种非纯 SSR 位点可以通过高代单株选择使位点纯合下来,而高度偏分布非纯 SSR 位点经过育种选择后,异型带就会越来越少。(3)品种内非纯 SSR 位点多而且几乎每个单株上都有异型带的存在。显然,这种类型的品种是由于育种选择的代数比较低,许多

位点在群体中还没有纯合下来,品种在遗传上还不稳定,严格意义上还不能称其为品种。以上 3 种类型基本涵盖了棉花品种在 SSR 标记基因型水平上的混杂表现,为今后开展品种遗传纯度鉴定奠定了基础。

本研究在充分考虑非纯 SSR 位点率和异型单株率对品种遗传纯度影响的基础上,建立了新的分子遗传纯度鉴定的方法,该方法能比较准确地反映品种在分子水平上的纯合程度。如品种 C9,如果按照以往的研究方法把 2 个或 2 个以上的异型带判定杂株,C9 的异型株率为 40% (8/20),遗传纯度为 60%,该品种将被判定为不合格品种。实际上该品种的混杂仅是由于 78 个 SSR 位点中的 2 个位点不纯造成的。由于许多 SSR 标记位于基因的非编码区,分子水平上的差异在表型上不一定表现出来,仅根据少数异型位点判定杂株计算的纯度结果就会实际偏低。而利用本研究提出的方法计算 C9 品种的遗传纯度为 98.97%,较准确地反映了该品种的遗传构成。该方法将由非纯 SSR 位点造成的品种遗传背景混杂作为影响品种遗传纯度的一个主要因素,弥补了以往计算方法中只考虑单株混杂、不考虑 SSR 位点混杂的缺陷,为今后利用分子标记鉴定品种纯度提供了比较可靠的方法。

利用 SSR 标记鉴定品种的遗传纯度,其准确性与实验选用的 SSR 引物及检测的样本量有很大关系。理论上讲,检测的样本数越多,准确性越高,因此应尽可能扩大检测样本的数量。选择标记时,应尽量覆盖到棉花的 26 条染色体,在每条染色体上选 2 个或 2 个以上标记,标记间间隔一定的距离。为使鉴定结果更准确地反映品种表型上的一致性,应尽量选择 EST-SSR 作为遗传纯度鉴定的核心引物。本研究选用的 78 个 SSR 标记涉及到棉花的 24 条染色体,缺少 Chr 4 和 Chr 20 两条染色体上的标记,因此引物的选择还需要进一步完善。另外,在样本容量上本研究选用 20 个单株,样本数较少,需要进一步扩大样本数,使结果更为准确可靠。

参考文献:

- [1] 孙 宁,杨付新,付小琼,等. 国家棉花区试新品种的 SSR 指纹图谱分析[J]. 棉花学报,2011,23(3):279-283.
- [2] SUN Ning, Yang Fu-xin, Fu Xiao-qiong, et al. SSR marker fingerprinting of cotton varieties in national regional trials[J]. Cotton Science, 2011, 23(3): 279-283.
- [3] 刘国栋,钟 文,曲辉英,等. 棉花品种基因纯度和特异性的 SSR 标记分析[J]. 中国农学通报,2011,27(30):49-54.
- [4] LIU Guo-dong, Zhong Wen, Qu Hui-ying, et al. Analysis on gene purity and specificity of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) varieties by SSR marker [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(30): 49-54.
- [5] 罗黎明,刘 丽,于丽娟,等. DNA 分子标记技术在玉米种子纯度鉴定中的应用[J]. 生物技术进展,2011,1(1):7-13.
- [6] LUO Li-ming, Liu Li, Yu Li-juan, et al. Application of molecular marker technology in seed purity identification of maize[J]. Current Biotechnology, 2011, 1(1): 7-13.
- [7] 罗 冉,吴委林,张 旸,等. SSR 分子标记在遗传育种中的应用[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(1):137-143.
- [8] LUO Ran, Wu Wei-lin, Zhang Yang, et al. SSR marker and its application to crop genetics and breeding[J]. Genomics and Applied Biology, 2010, 29(1): 137-143.
- [9] 匡 猛,杨伟华,许红霞,等. 分子标记技术在棉花品种鉴定上的研究进展[J]. 棉花学报,2009,21(4):330-334.
- [10] KUANG Meng, Yang Wei-hua, Xu Hong-xia, et al. Research progress of molecular marker technology applied in cotton variety identification[J]. Cotton Science, 2009, 21(4): 330-334.
- [11] 田 蕾,关荣霞,刘章雄,等. 用 SSR 标记鉴定大豆杂交组合 F₁ 的方法研究[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(4):443-447.
- [12] TIAN Lei, Guan Rong-xia, Liu Zhang-xiong, et al. Variety identification of soybean hybrids using SSR markers[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2008, 9(4): 443-447.
- [13] 曲 亮,陈卫江,李 莓,等. SSR 标记技术在甘蓝型油菜杂交种纯度鉴定中的应用[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2009,35(3):229-232.
- [14] QU Liang, Chen Wei-jiang, Li Mei, et al. Application of SSR molecular marker technique on purity identification of hybrid in rapeseed [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2009, 35(3): 229-232.
- [15] SUNDARAM R M, Naveenkumar B, Biradar S K, et al. Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment[J]. Euphytica, 2008, 163(2): 215-224.
- [16] NARESH V, Yamini K N, Rajendrakumar P, et al. EST-SSR marker-based assay for the genetic purity assessment of safflower hybrids[J]. Euphytica, 2009, 170(3): 347-353.
- [17] KARAKOUSIS A, Barr A R, Chalmers K J, et al. Potential of SSR markers for plant breeding and variety identification in Australian barley germplasm[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2003, 54(12): 1197-1210.

- [11] 关荣霞,刘 燕,刘章雄,等. 利用 SSR 方法鉴定大豆品种纯度[J]. 分子植物育种,2003,1(3):357-360.
- GUAN Rong-xia,Liu Yan,Liu Zhang-xiong,et al. Purity identification of soybean varieties with SSR technique [J]. Molecular Plant Breeding,2003,1(3): 357-360.
- [12] 匡 猛,杨伟华,许红霞,等. 中国棉花主栽品种 DNA 指纹图谱构建及 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2011,44(1):20-27.
- KUANG Meng,Yang Wei-hua,Xu Hong-xia,et al. Construction of DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity with SSR markers for cotton major cultivars in China[J]. Scientia Agricultura Sinica,2011,44(1): 20-27.
- [13] 张玉翠,杨伟华,匡 猛,等. 32 个棉花主栽品种 DNA 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 棉花学报,2012,24(2):120-126.
- ZHANG Yu-cui,Yang Wei-hua,Kuang Meng,et al. Construction of DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity with SSR markers for 32 leading cotton cultivars[J]. Cotton Science,2012,24(2): 120-126.
- [14] JOHON Z Y,David D F,Russell J K,et al. Development of a core set of SSR markers for the characterization of *Gossypium* germplasm[J]. Euphytica,2012,187(2): 203-213.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 许兰杰,聂战胜,詹克慧. 利用 SSR 标记鉴定棉花杂交种兴杂 2 号纯度的研究 [J]. 中国农学通报,2008,24(6):202-206.
- XU Lan-jie,Nie Zhan-sheng,Zhan Ke-hui. Purity detection of cotton hybrid Xingza NO.2 by SSR markers[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2008,24(6): 202-206.
- [18] 陈浩东,刘 方,王 为,等. 棉花多重 PCR 技术及其对杂交棉纯度鉴定的初步研究 [J]. 棉花学报,2011,23(1):22-27.
- CHEN Hao-dong,Liu Fang,Wang Wei,et al. Preliminary study on multiplex PCR technique and its application in hybrid cotton seed purity test [J]. Cotton Science,2011,23 (1): 22-27.
- [19] 匡 猛,杨伟华,张玉翠,等. 棉花杂交种纯度的 SSR 标记检测及其与田间表型鉴定的相关性[J]. 作物学报,2011,37(12):2299-2305.
- KUANG Meng,Yang Wei-hua,Zhang Yu-cui,et al. Cotton hybrid purity tested by SSR markers and its correlation with phenotype identification in field[J]. Acta Agronomica Sinica,2011,37(12): 2299-2305.
- [20] 匡 猛,杨伟华,许红霞,等. 单粒棉花种子 DNA 快速提取方法[J]. 分子植物育种,2010,8(4):1-5.
- KUANG Meng,Yang Wei-hua,Xu Hong-xia,et al. A rapid method of DNA extraction from single cotton seed[J]. Molecular Plant Breeding,2010,8(4): 1-5.
- [21] 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.
- [22] 石海波,王立新,李宏博,等. 利用 SSR 标记区别小麦品种种子混杂和 SSR 位点不纯的研究[J]. 分子植物育种,2006,4(4):513-519.
- SHI Hai-bo,Wang Li-xin,Li Hong-bo,et al. Division of seeds motley and SSR loci impurity in wheat cultivars using SSR markers[J]. Molecular Plant Breeding,2006,4(4): 513-519.
- [23] 王立新,常利芳,李宏博,等. 小麦种子纯度的分子标记检测方法[J]. 麦类作物学报,2009,29(1):1-8.
- WANG Li-xin,Chang Li-fang,Li Hong-bo,et al. Method of wheat seeds purity testing by molecular markers[J]. Journal of Triticeae Crops,2009,29(1): 1-8.
- [24] 王立新,季 伟,李宏博,等. 以 DNA 位点纯合率评价小麦品种的一致性和稳定性[J]. 作物学报,2009,35(12):2197-2204.
- WANG Li-xin,ji Wei,Li Hong-bo,et al. Evaluating uniformity and stability of wheat cultivars based on ratio of homozygous DNA locus[J]. Acta Agronomica Sinica,2009,35(12): 2197-2204.