

水稻新型胞质不育系 L-orfH79 与其同核异质 YTA 的比较

李佳洋, 田泽, 李威涛, 刘学群, 王春台, 谭艳平*

(中南民族大学生命科学院, 生物技术国家民委重点实验室/武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 湖北武汉 430074)

摘要 [目的]验证新型胞质不育系 L-orfH79 与其同核异质的近等基因系 HL-CMS YTA 的区别。[方法]用 orfH79 和 orf290 这 2 种分子标记对 L-orfH79 和 YTA 进行分子鉴定, 并比较其花粉染色特性、花粉育性、结实率及 orfH79 表达量。[结果]分子标记鉴定结果显示 L-orfH79 只含有不育基因 orfH79, 不含有 orf290, YTA 同时含有 orfH79 和 orf290。L-orfH79 花粉的淀粉沉积比 YTA 更少, L-orfH79 花粉大小均匀, 而 YTA 的花粉形态不一。L-orfH79 花粉育性、套袋结实率及自然结实率(都低于 10%)略高于 YTA(都低于 5%)。当 L-orfH79 中引入恢复基因 Rf5 或者 Rf6 后花粉形态和颜色都恢复正常。抽穗期 L-orfH79 剑叶中的 orfH79 表达量低于 YTA, 在 L-orfH79 中引入 Rf5 或者 Rf6 后会减少 orfH79 的表达量。[结论]L-orfH79 是不同于 YTA 的新型胞质雄性不育系, L-Rf5、L-Rf6 可作为其恢复系。

关键词 水稻; 胞质雄性不育系; L-orfH79; 育性

中图分类号 S511 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)15-0097-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.15.027



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Comparison of New Cytoplasmic Sterile Lines L-orfH79 and Its Isonuclear Alloplasmic Sterile Lines YTA of Rice

LI Jia-yang, TIAN Ze, LI Wei-tao et al (Key Lab for Biotechnology of State Ethnic Affairs Commission, Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei 430074)

Abstract [Objective] In order to verify the difference between the new cytoplasmic male sterile line L-orfH79 and its isonuclear alloplasmic sterile lines HL-CMS YTA. [Method] L-orfH79 and YTA were identified by molecular markers orfH79 and orf290, of which pollen dyeing characteristics, pollen fertility, seed setting rate and expression level of orfH79 were compared. [Result] It showed that both orfH79 and orf290 in YTA, while L-orfH79 only contained orfH79 but not orf290 by molecular marker identification. The starch deposition of L-orfH79 pollen was less than that of YTA. The size of L-orfH79 pollen was uniform, but the morphology of YTA pollen was different. The pollen fertility, bagging seed setting rate and natural seed setting rate of L-orfH79 (all below 10%) were slightly higher than YTA (all below 5%). Pollen morphology and color returned to normal when the restorer gene Rf5 or Rf6 was introduced into L-orfH79. The expression of orfH79 in flag leaves of L-orfH79 was lower than that of YTA. The expression of orfH79 reduced in sterile line L-orfH79 after introducing Rf5 or Rf6. [Conclusion] L-orfH79 is a new cytoplasmic male sterile line that different from YTA. L-Rf5 and L-Rf6 can be used as restorer lines.

Key words Rice; Cytoplasmic male sterility; L-orfH79; Fertility

水稻细胞质雄性不育是在发育过程中雌蕊正常而花粉败育的现象, 属于母性遗传, 而特定的基因可以使其育性得到恢复。根据杂种 F₁ 代所产生的携带 S(rf) 基因型的雄配子的育性表型, 可将 CMS 细胞质划分为孢子体细胞质雄性不育 (sporophytic type) 和配子体细胞质雄性不育 (gametophytic type) 2 种类型^[1-2]。孢子体细胞质雄性不育其雄配子(花粉)的育性受孢子体(植株)的基因型控制, 而与雄配子本身所携带的核基因无关。配子体细胞质雄性不育其雄配子的育性直接由雄配子(花粉)本身的基因型所决定, 与孢子体(植株)基因型无关^[3]。水稻花粉败育分典败、圆败和染败, 用 I₂-KI 染色后分别呈现出皱缩不着色, 圆形不着色, 圆形着色浅且大小不一。1972 年, 朱英国院士利用红芒野生稻作母本、莲塘早栽培稻作父本杂交, 后代得到雄性不育株连续回交多代得到稳定的红莲型胞质雄性不育系 HL-CMS YTA, 属配子体不育, YTB 是 YTA 的同核异质保持系^[4]。orfH79 是 YTA 中 atp6 下游 200 bp 处的可编码 79 个氨基酸的

嵌合片段, ORFH79 通过与红莲雄性不育水稻细胞质电子传递链复合体 III 亚基相互作用而损害线粒体功能最终导致不育^[5]。orfH79 与 BT-CMS 中的不育基因 orf79 有 96% 的同源性^[6-7]。HL-sp1 是从 YTA 克隆的与 orfH79 没有序列同源性的 HL-CMS 不育相关的候选基因片段^[8], 通过 Tail-PCR 将该片段扩大至 6.7 kb^[9], 在 HL-sp1 中预测到一个新的不育候选基因 orf290, 因此 YTA 中包含至少 2 种不育基因 orfH79 和 orf290^[10]。利用 orfH79 和 orf290 这 2 个分子标记, 从 102 份 AA 基因型野生稻中筛选得到了 6 个只含有 orfH79 而不含有 orf290 的品种, 经与 YTB 反复回交并结合分子标记筛选, 获得了与红莲水稻不育系 YTA 同核异质的近等基因不育系, 命名为 L-orfH79^[11]。前期实验室还以 YTA 作母本构建了 YTA 的同质异核近等基因恢复系 L-Rf5 和 L-Rf6^[12], 它们可以稳定地恢复 L-orfH79 的育性。该研究拟通过 DNA 水平、RNA 表达水平及花粉形态及育性几个方面比较具有相同的核背景但是细胞质不一样的 L-orfH79 和 YTA 的区别与联系, 为该不育系的科研价值和应用推广提供参考依据。

基金项目 湖北省技术创新专项重点项目(2018BFC360); 湖北省自然科学基金项目(2018CFB481); 中央高校基本科研业务费专项(CZY18029, CZP17017)。

作者简介 李佳洋(1992—), 男, 湖北来凤人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。* 通信作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事分子遗传学研究。

收稿日期 2019-03-16

1 材料与方法

1.1 材料 水稻粤泰 B(YTB)、粤泰 A(YTA)、L-orfH79、L-orf290、L-Rf5、L-Rf6 由中南民族大学武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室提供。ExTaq 酶、dNTP Mix、10×PCR Buffer、DL2000 DNA Marker、反转录试剂盒均购

买于 TaKaRa 公司;AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit50-prep 购于 Axygen 公司;TRIzol 购于 Thermo Fisher 公司;DNA 引物合成由天一辉远生物技术有限公司(武汉部)完成,该研究使用的引物名称、用途及序列如表 1。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of primer

| 引物名称 Primer name | 用途 Purpose | 序列(5'-3') Sequence(5'-3') |
|------------------------|-----------------------|------------------------------|
| OrfH79 F | L- <i>orfH79</i> 分子标记 | TGACAAATCTGCTCCGATG |
| OrfH79 R | | CTTACTTAGGAAAGACTAC |
| Orf290 F | L- <i>orf290</i> 分子标记 | TGCTGCGCTTCGAACGTATCGT |
| Orf290 R | | CTAGGAGGCTGAGTTTGTATCCTCA |
| SP1F | L- <i>orf290</i> 分子标记 | GAGGTCCACATCCTTCAATCG |
| SP1R | | GAGGTCCACAAACCTGAAG |
| Cob F | RT-PCR 的内参基因 | ATCAAATAATCCATTGGGTGT |
| Cob R | | CCAAAACATTAGGAGCAAAA |

1.2 仪器 C1000 touch thermal cycler PCR 仪(美国 Bio-Rad);Heraeus Pico 21 Centrifuge 微量台式冷冻离心机(德国);SBD50-1 水浴锅(丹麦 Heto-Holten);SS-325 TOMY 高压灭菌锅(日本 TOMY);Universal Hold II 凝胶成像系统(美国);Nikon SMZ1500 荧光体式显微镜(日本 Microscop);净化工作台(上海新苗医疗器械制造有限公司);NanoDrop One 微量核酸蛋白浓度测定仪(美国);QuantStudio 3 实时荧光定量 PCR 仪(美国)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取。采用 CTAB(hexadecyl trimethyl ammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵)法进行 DNA 样品抽提。取 50 mg 新鲜水稻叶片,装入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,用液氮迅速冷冻叶片,用研磨棒快速研磨叶片至质地均匀的粉末状,加入 650 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取液,充分混匀,放入 65 $^{\circ}$ C 的水浴锅中,每隔 15 min 轻柔颠倒混匀 1 次。水浴 1 h 后加入 650 μ L 氯仿,轻柔颠倒混匀 20 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,取 450 μ L 上清,加入 900 μ L 预冷的无水乙醇,轻柔混匀后冰浴 15 min。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用 75%乙醇洗涤后 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min(重复 2 次),自然风干至沉淀变为无色透明后加入 30 μ L TE 溶解沉淀,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 PCR 扩增检测。利用分子标记 *orfH79* 和 *orf290* 对水稻叶片的 DNA 进行 PCR 扩增,20 μ L 扩增体系包括 10 \times ExTaq Buffer 2 μ L、ExTaq DNA 聚合酶 0.1 μ L、dNTP Mix 1.6 μ L、引物 F 和 R 各 0.4 μ L、DNA 模板 25 ng、ddH₂O 补加至总体积为 20 μ L。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, X $^{\circ}$ C 退火 Y s,72 $^{\circ}$ C 延伸 55 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增 *orfH79* 的 X 为 55 $^{\circ}$ C, Y 为 50 s;扩增 *orf290* 的 X 为 62 $^{\circ}$ C, Y 为 50 s。PCR 扩增结束后,利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.3.3 花粉镜检及育性统计。采用 1% I₂-KI 染色法进行花粉镜检。取成熟且未裂开的小穗,立即用剪刀小心剪开

颖壳,取出花药,放在洁净干燥的载玻片上,取一滴 I₂-KI 染液,用镊子夹碎花粉粒,使花粉充分溶解到 I₂-KI 染液里,夹走多余杂质,利用体视显微镜观察花粉染色情况并统计。取小穗后进行套袋自交,成熟后统计套袋结实率和自然结实率。

1.3.4 RNA 提取。TRIzol 法,取水稻剑叶于 RNase free 并预冷的研钵中,加入液氮研磨至呈白色粉末状,加入 1 mL TRIzol 溶液,剧烈混匀后,冰上静置 5 min;再向 EP 管中加入 200 mL 氯仿,摇床上振荡 15 min,冰上静置 5 min,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 12 min(重复 2 次),用 RNase free tip 头小心吸取 500 μ L 上清至新的 1.5 mL RNase free EP 管中;加 333 μ L 的异丙醇,轻轻混匀后室温静置 10 min,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 12 min,有白色 RNA 沉淀出现;弃掉上清液,向 EP 管中加入 1 mL 75%乙醇(用 DEPC 水配制),洗涤沉淀 RNA,洗涤过程中用 tip 头小心吹打使沉淀漂浮起来,静置 5 min;4 $^{\circ}$ C 800 r/min 离心 5 min,弃掉上清液,重复洗涤 1 次;然后将 EP 管置于超净工作台上风干沉淀至无色透明状,加入 30 μ L RNase free 水溶解;充分溶解后用 65 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 变性,置于-80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.5 RNA 反转成 cDNA 以及 cDNA 的检测。RNA 琼脂糖电泳检测无降解后,取 1 μ L RNA 用于浓度测定,根据测定浓度,取 1 μ g RNA 反转录成 cDNA。首先去除 RNA 中的基因组 DNA,反应体系包括 5 \times g DNA Eraser buffer 2 μ L、1 μ g RNA、gDNA Eraser 1 μ L、RNase free ddH₂O 补充至 10 μ L。反应程序为 42 $^{\circ}$ C 2 min 后置于冰浴,马上再进行反转录。反转录反应是在去除 gDNA 反应体系中加入 RNase free ddH₂O 4 μ L、5 \times Primer Script buffer 4 μ L、RT Primer Mix 1 μ L、Primer Script RT Enzyme Mix 1 μ L。反转录反应程序为 37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C 保存。然后将 cDNA 用 RNase free ddH₂O 稀释 4 倍,即可作为 PCR 模板来进行 *cob* 检测。

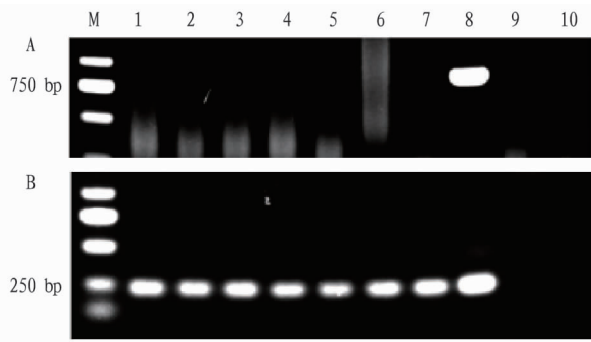
1.3.6 RT-PCR 检测表达量。利用 SYBR 染色法检测不同材料剑叶中 *orfH79* 的表达量。15 μ L qRT-PCR 反应体系包括 SYBR 7.5 μ L、引物 F 和 R(10 μ mol/L)各 0.6 μ L、cDNA 3 μ L、去离子水 3.3 μ L。扩增程序为 50 $^{\circ}$ C 20 s;95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60.5 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s;60 $^{\circ}$ C 1 min;95 $^{\circ}$ C 30 s;60 $^{\circ}$ C 15 s。以 *cob* 为内参基因,扩增完成后根据收集的数据和相关公式计算并作相对表达量柱状图。

2 结果与分析

2.1 新型胞质不育系 L-*orfH79* 不育基因的分子标记检测 用 *orfH79* 和 *orf290* 2 个分子标记在 L-*orfH79* 材料和 YTA、YTB 中扩增,结果表明 YTA 和 L-*orfH79* 材料都含有 *orfH79*,同时 YTA 还含有 *orf290*,但 L-*orfH79* 材料不含 *orf290*(图 1)。

2.2 新型胞质不育系 L-*orfH79* 花粉形态特征 对新型胞质不育系 L-*orfH79* 花粉用 1% I₂-KI 染色,相同观测条件下 L-*orfH79* 的淀粉沉积比 YTA 更少(图 2)。统计结果显示 L-*orfH79* 花粉几乎全为不育,85%属于圆败,8%属于典败,L-*orfH79* 花粉大小十分均匀。而 YTA 的花粉 84%属于圆败,

13%属于典败,形态不一。当 L-*orfH79* 中引入恢复基因 *Rf5* 或者 *Rf6* 后花粉形态和颜色都恢复正常。



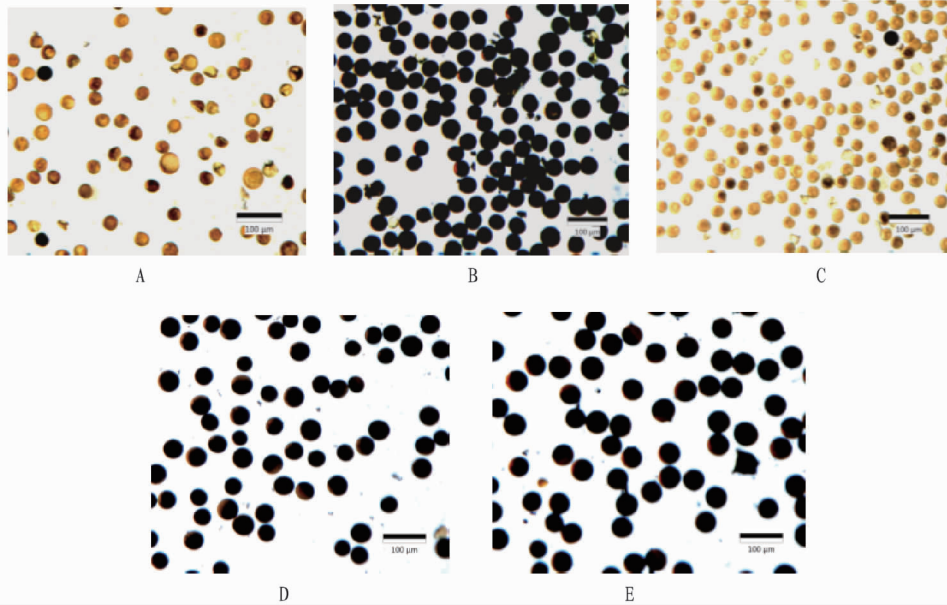
注:A. *orf290*; B. *orfH79*; M. DL2000; 1~7. 不同 L-*orfH79* 单株; 8. YTA; 9. YTB; 10. 水
Note: A. *orf290*; B. *orfH79*; M. DL2000; 1~7. Different L-*orfH79* plants; 8. YTA; 9. YTB; 10. Water

图 1 不育基因的 PCR 检测

Fig. 1 The detection of sterility genes by PCR

2.3 新型胞质不育系 L-*orfH79* 育性特征 分别统计 8 株 L-*orfH79* 与 YTA 的育性,结果如表 2。就花粉育性而言,L-*orfH79* 为 8.0%,略高于 YTA 的 3.5%;L-*orfH79* 的套袋结实率为 6.9%,比 YTA 的 3.1%略高;自然结实率 L-*orfH79* 为 8.5%,略高于 YTA 的 4.7%。综上所述,从花粉育性、套袋结实率、自然结实率 3 个方面都说明 L-*orfH79* 不同于 YTA, YTA 的育性更低且更稳定,但是 L-*orfH79* 的育性也十分接近一个成熟不育系的育性。

2.4 不育基因 *orfH79* 相对表达量的比较分析 为了分析 YTA 和 L-*orfH79* 在不育基因 *orfH79* 表达量上的区别以及恢复基因 *Rf5*、*Rf6* 对 *orfH79* 表达量的影响,提取 YTA、L-*orfH79*、L-*orfH79*/L-*Rf5*、L-*orfH79*/L-*Rf6* 抽穗期剑叶中 RNA,反转成 cDNA 后用内参基因 *cob* 检测其质量,检测结果显示质量很好(图 3),可以进行后续表达量分析。不同材料中 *orfH79* 的表达量测定结果表明 L-*orfH79* 抽穗期剑叶中 *orfH79* 的表达量低于 YTA 中,在 L-*orfH79* 中引入 *Rf5* 或者 *Rf6* 后会减少 *orfH79* 的表达量(图 4)。



注:A. YTA; B. YTB; C. L-*orfH79*; D. L-*orfH79*/L-*Rf5*; E. L-*orfH79*/L-*Rf6*

图 2 花粉形态特征

Fig. 2 The pollen morphological characteristics

表 2 L-*orfH79* 与 YTA 的育性统计

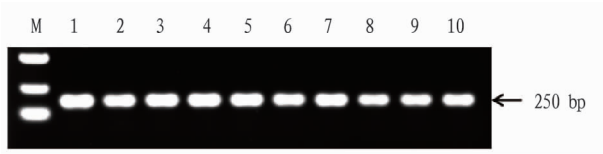
Table 2 Fertility statistics of L-*orfH79* and YTA

| 单株 Individual plant | 花粉育性 Pollen fertility | | 套袋结实率 Bagging seed setting rate | | 自然结实率 Natural seed setting rate | |
|------------------------|-----------------------|---------|---------------------------------|---------|---------------------------------|---------|
| | L- <i>orfH79</i> | YTA | L- <i>orfH79</i> | YTA | L- <i>orfH79</i> | YTA |
| 1 | 3.3 | 2.0 | 0.8 | 2.7 | 2.2 | 3.6 |
| 2 | 7.9 | 4.5 | 11.6 | 4.4 | 15.8 | 5.5 |
| 3 | 12.8 | 3.6 | 12.5 | 2.3 | 15.2 | 4.3 |
| 4 | 8.3 | 1.7 | 3.7 | 1.8 | 4.4 | 2.3 |
| 5 | 2.1 | 6.0 | 1.9 | 5.5 | 4.0 | 6.4 |
| 6 | 7.5 | 3.4 | 9.5 | 2.1 | 11.3 | 4.8 |
| 7 | 14.1 | 3.3 | 8.2 | 2.9 | 6.4 | 5.7 |
| $\bar{X} \pm SD$ | 8.0±4.4 | 3.5±1.0 | 6.9±5.1 | 3.1±1.1 | 8.5±5.6 | 4.7±1.1 |

3 讨论

通过与 YTB 反复回交多代,并用分子标记 *orfH79* 和

orf290 筛选得到只含有 *orfH79* 的不育系 L-*orfH79* 和同时含有 *orfH79* 和 *orf290* 的不育系 YTA。有研究表明这种构建不



注: M. Marker; 1. YTA; 2~4. *L-orfH79*; 5~7. *L-orfH79/L-Rf5*; 8~10. *L-orfH79/L-Rf6*

图3 cDNA 质量检测

Fig. 3 The detection of cDNA quality

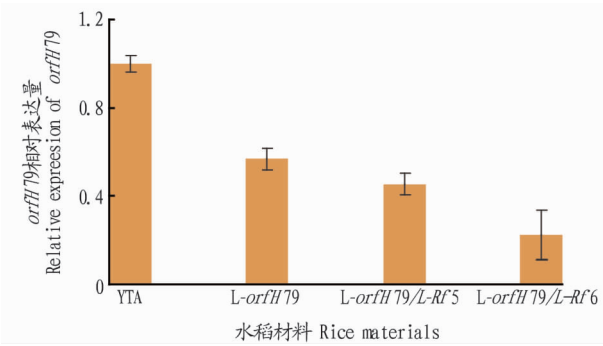


图4 *orfH79* 的表达量

Fig. 4 Expression of *orfH79*

育系的方式可以得到核背景一样但细胞质不同的不育系^[13-14]。该研究从 DNA 水平、RNA 水平和花粉镜检以及结实率统计等方面对 *L-orfH79* 和 YTA 进行了比较,发现它们有本质的区别,*L-orfH79* 比 YTA 少了不育基因 *orf290*,且 YTA 中的 *orf290* 在不同部位都有一定的表达量^[15]。*L-orfH79* 中 *orfH79* 的相对表达量低于 YTA,但是却有着和 YTA 相近的不育特征,这都说明了 *L-orfH79* 是一种不同于 YTA 的不育系,且育性可以被恢复基因 *Rf5* 或 *Rf6* 通过下调 *orfH79* 的表达量而恢复。这为红莲型水稻胞质雄性不育的

(上接第 92 页)

池。暂养池上的遮光布有利于乌贼安静,体色变成与池底一样的颜色,有利于乌贼的捕食和隐蔽^[3]。该试验发现,活虾和活蟹作为金乌贼亲体的饵料较为适宜;为保证金乌贼成体室内暂养的充足营养,选择活体小蟹子、脊尾白虾和沙蚕作为金乌贼的饵料,逐渐过渡到冰鲜小杂鱼。小蟹子运动能力较弱,有利于刚入池的乌贼摄食,而脊尾白虾和沙蚕营养丰富,有利于乌贼恢复体力,增强抗病能力,从而提高成活率。通过以上各个环节,暂养后乌贼成活率高达 90%。然而,金乌贼养殖相关研究还有待养殖户与科研工作者在生产实践中继续深入探讨。

参考文献

- [1] 崔春辉,王兴强,曹梅,等. 海洋头足类人工养殖产业浅析[J]. 安徽农学通报,2018,24(11):104-106.
- [2] 崔春辉,王兴强,曹梅,等. 头足类产业化养殖技术研究[J]. 安徽农学通报,2017,23(15):119-122.
- [3] 崔春辉,王兴强,曹梅,等. 金乌贼苗种繁育及土池养殖技术[J]. 淮海

核质互作机理研究提供了种质资源。丰富了三系杂交水稻的多样性,将为不育基因后期理论研究和应用研究提供基础。但是 *L-orfH79* 和 YTA 主要不育机理的区别还需要进一步研究。

参考文献

- [1] LAUGHNAN J R, GABAY-LAUGHNAN S. Cytoplasmic male sterility in maize[J]. Ann Rev Genet, 1983, 17: 27-48.
- [2] SCHNABLE P S, WISE R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration[J]. Trends Plant Sci, 1998, 3(5): 175-180.
- [3] 朱英国. 水稻雄性不育生物学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000: 111-112, 115.
- [4] 武汉大学遗传研究室. 红芒野稻—莲塘早不育系花粉败育过程的细胞形态学观察[J]. 武汉力学学报(自然科学版), 1977(1): 5-12.
- [5] WANG K, GAO F, JI Y X, et al. ORFH79 impairs mitochondrial function via interaction with a subunit of electron transport chain complex III in Honglian cytoplasmic male sterile rice[J]. New phytologist, 2013, 198(2): 408-118.
- [6] 龙伟雄, 廖佛才, 郑卓, 等. 水稻配子体细胞质雄性不育基因 *orf79/orfH79* 的变异多态性研究[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2014, 35(5): 101-106.
- [7] 易平, 汪莉, 孙清萍, 等. 红莲型细胞质雄性不育线粒体相关嵌合基因的发现[J]. 科学通报, 2002, 47(2): 130-133.
- [8] 刘学群. 水稻红莲型细胞质雄性不育候选基因的筛选与恢复基因的精细定位[D]. 武汉: 武汉大学, 2004.
- [9] 李不顺, 刘学群, 王春台, 等. TAIL-PCR 对红莲型水稻不育系特异片段 *HL-sp1* 侧翼序列的分析[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(2): 123-126.
- [10] 杨梦醒, 姜慧, 田泽, 等. 水稻线粒体基因 *orf290* 功能的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(6): 1-6.
- [11] 刘京. 水稻两种新型胞质不育系及其恢复系的筛选[D]. 武汉: 中南民族大学, 2015.
- [12] 华宇峰. 红莲型 CMS 近等基因恢复系及同核异质不育系的构建[D]. 武汉: 中南民族大学, 2014.
- [13] 李阳生, 李绍清, 朱仁山, 等. 生物技术在水稻超高产育种中的应用[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(5): 701-706.
- [14] 刘京, 刘杰, 喻博伦, 等. 新型不育胞质在栽培稻中的分布与鉴定[J]. 中国农学通报, 2015, 31(23): 43-46.
- [15] 陈为, 周杰, 谭艳平, 等. 水稻 HL-CMS 中 2 个雄性不育候选基因表达模式的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4): 394-397.

工学院学报(自然科学版), 2018, 27(4): 89-92.

- [4] 崔春辉, 王力, 王兴强, 等. 金乌贼人工养殖技术[J]. 现代农业科技, 2018(14): 229-230, 233.
- [5] 董志国, 李晓英, 张庆起, 等. 三疣梭子蟹增殖过程对野生种群的遗传影响: 以海州湾为例[J]. 生态学报, 2013, 33(23): 7332-7339.
- [6] 李志辉, 马杭柯, 张培, 等. 不同养殖密度对脊尾白虾生长和水体氨氮含量的影响[J]. 海洋渔业, 2018, 40(5): 581-586.
- [7] 张冬冬, 徐官根, 李晓英, 等. 文蛤“万里红”和“万里 2 号”稚贝池塘养殖生长性能比较研究[J]. 海洋渔业, 2018, 40(4): 474-480.
- [8] 张美玲, 高清, 李晓峰, 等. 菲律宾蛤仔、海蜇、斑节对虾生态综合养殖试验[J]. 科学养鱼, 2018(11): 50-51.
- [9] 国家海洋环境监测中心. 海洋监测规范第 4 部分: 海水分析: GB 17378. 4-2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [10] 胡振雄, 刘利平. 凡纳滨对虾综合养殖的分类、存在问题及对策[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 202-204.
- [11] 赵广学, 刘利平, 李彦, 等. 凡纳滨对虾综合养殖与单养池塘的水质变化及产出效果比较[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(10): 202-206.
- [12] 江航, 沈新强, 蒋玫. 文蛤滩涂养殖海域水体有机污染综合评价[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(10): 2927-2930, 2933.
- [13] 周伟, 王洋, 孙学亮, 等. 养殖密度对斑节对虾肌肉品质的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 69-75.
- [14] 王兴强, 曹梅, 陈百尧. 一种贼虾混养池塘中金乌贼的收获与暂养方法: CN105994016A[P]. 2016-10-12.