

# 中国对虾抗病性状遗传标记筛选及遗传多样性分析

李素红<sup>1,2</sup> 张天时<sup>1</sup> 孔杰<sup>1\*</sup> 孟宪红<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 青岛金海力水产科技有限公司, 266071)

**摘要** 对人工选育的 29 个中国对虾半同胞家系进行人工感染 WSSV 后, 选取存活时间最长和存活时间最短各 29 个个体, 组成抗病群体和感病群体。用 400 个随机引物进行 RAPD 分析, 得到与抗病正相关的特异性遗传标记 5 个, 与抗病负相关的特异性遗传标记两个。15 个随机引物在两个群体的扩增位点进行统计, 共得到 82 个位点, 其中多态位点 34 个, 占 41.46%, 两个群体的多态位点比例分别为 40.24% 和 37.8%。Shannon's 多样性指数估算两个群体的平均遗传多态度为 0.217 7, SLT 群体的遗传多态度为 0.219 0 略高于 SST 群体 0.216 3; 群体内的遗传变异 ( $H_{POP} / H_{SP}$ ) 0.964 5, 可见 96.45% 的遗传变异来自于群体内, 3.55% 的变异来源于群体间。统计各座位的基因频率计算出两个群体的遗传分化指数为 0.029 4, 表明两个群体并没有发生明显的遗传分化。

**关键词** 中国对虾 遗传标记 WSSV RAPD

**中图分类号** S945.1; Q959.223.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)02-0054-06

## Screen of white-spot-syndrome-virus (WSSV)-resistance molecular markers and analysis of genetic diversity in *Fenneropenaeus chinensis*

LI Su-hong<sup>1, 2</sup> ZHANG Tian-shi<sup>1</sup> KONG Jie<sup>1\*</sup> MENG Xian-hong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> Qingdao Jin Haili Fisheries Technology Co., Ltd, 266071)

**ABSTRACT** 29 sib-families of *Fenneropenaeus chinensis* which were obtained by selective breeding were artificially infected with WSSV. 29 samples with the longest survival time composed the WSSV-resistant group and 29 samples with the shortest survival time composed WSSV-susceptible group. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was employed to analyze these samples. The results were that 5 distinctive genetic markers with disease resistant trait and 2 distinctive genetic markers with disease susceptible trait were obtained. The genetic diversity of two groups was studied with 15 primers. 82 sites (DNA bands) were revealed, 34 of which were polymorphic, representing a percentage of 41.46%. The proportions of polymorphic amplified fragments of the WSS-resistant group and the WSSV-susceptible group were 40.24% and 37.8%, respectively. The mean Shannon's index of genetic diver-

国家科技部项目(05EFN216900377)和山东省自然科学基金项目(Y2004D05)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: kongjie@sina.com, Tel: (0532)85823291

收稿日期: 2008-01-08; 接受日期: 2008-03-28

作者简介: 李素红(1979-), 女, 硕士, 主要从事种苗工程与种质资源管理研究。E-mail: lisuhong1008@yahoo.com.cn, Tel: 13854251706

sity in two groups was 0.217 7. And the Shannon's index of the WSSV-resistant group was 0.219 0, which was a little higher than that of the WSSV-susceptible group's 0.2163. The average genetic variability of intra-population ( $H_{POP}/H_{SP}$ ) was 0.964 5, indicating 96.45% of genetic variability was from intra-population while 3.55% was from inter-population. The genetic differentiation index analyzed with the gene frequency of each site was 0.029 4 that indicated no genetic differentiation.

**KEY WORDS** *Fenneropenaeus chinensis* Genetic markers WSSV RAPD

中国对虾曾经是我国重要的渔业资源,但自从1993年WSSV暴发以来,中国对虾养殖业从此一蹶不振。WSSV成为制约中国对虾养殖业发展的“瓶颈”。科研工作者一方面从WSSV本身着手研究病毒的结构特性及致病机理,另一面对中国对虾进行遗传改良,以期培育出抗病新品种。由于大多数经济动物的重要经济性状(如生长、抗病等)受多个数量基因座位(QTL)和环境因子共同作用而表现出数量性状的遗传特点,经典的遗传育种研究方法往往无法区别一个重要性状产生是由哪一个具体的基因控制。为了达到遗传改良的目的,越来越多的科学家把目光投向筛选和建立有效的遗传标记上,并取得了有意义的进展(Pruder *et al.* 1995; Wyban *et al.* 1995; Carr *et al.* 1994)。刘萍等(2002)将中国对虾人工感染WSSV病毒选取感染10 d后但仍健康的对虾为实验材料,利用RAPD技术进行分析得到18个与抗病相关的遗传标记;孟宪红等(2005)利用RAPD技术对中国对虾抗WSSV选育的群体及未经选育的群体进行分析,共筛选出5个与抗病相关的特异性标记。本研究对中国对虾抗病选育群体进行人工攻毒实验,分离出两个抗病能力不同的群体。利用RAPD技术分析两个抗病能力不同群体的遗传多样性,并期望得到真正与抗病相关的遗传标记,为抗病品种选育提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

2004年11月~2005年3月期间,通过自然交尾和人工授精技术,建立实验所用的29个半同胞家系。2005年8月,每个家系各取29尾(共1682个个体)在黄海水产研究所小麦岛实验基地进行人工实验攻毒。所有实验对虾按每个家系取10尾平均分为3份,每份大约580尾对虾,分别饲养在隔离的养殖缸(3m<sup>2</sup>)内。攻毒前实验动物饥饿1 d,然后分早、晚两次共饲喂10%体重、含WSSV的粉碎南美白对虾,连续饲喂2 d。实验用海水均经过砂滤,每天换水4次,总的换水量为300%,实验期间水温控制在25.5±0.9℃。除饲喂感染组织,试验动物每天两次饲喂含25%蛋白质的商品饵料。每2 h从养殖缸内捞出死亡或濒死的对虾,吸干体表水分,并记录它们的标记颜色、所在缸号和取出时间,放在-20℃条件下冷冻保存。实验结束后,根据存活时间进行排序,本实验从两端取存活时间最长和存活时间最短的个体各29尾,组成抗病群体(The longest survival time, LST)和感病群体(The shortest survival time, SST)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 DNA的提取

取虾尾部肌肉,采用常规的酚/氯仿抽提法,具体操作见刘萍等(2000)。基因组DNA用高压灭菌的ddH<sub>2</sub>O稀释至100ng/ml,-20℃保存备用。

#### 1.2.2 RAPD反应体系

RAPD反应总体积15μl,其中包括10×PCR反应缓冲液2.5μl(成分:100 mmol/l Tris-Cl,500mmol/ml KCl,0.01% Gelatin,pH 8.4);25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5μl;dNTP(各2.5mmol/L) 1.2μl;引物(5 μmol/L) 1 μl;Taq酶(5 U/μl)0.12 μl;基因组DNA(10 ng/μl)1μl;用ddH<sub>2</sub>O补足体积。样品在PE29600型PCR扩增

仪上进行扩增,94℃变性5 min;94℃ 1 min,36℃ 1 min,72℃ 2min,45个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。

### 1.2.3 引物筛选

为了筛选尽可能多的引物,同时为了节省实验经费,本实验对引物进行了3次筛选。首先随机取5个模板混合在一起,以混合DNA为模板,从400个引物中筛选出扩增清晰,扩增条带大于2的引物。然后根据Michelmores等(1991)提出的BSA方法,把攻毒实验分离出的两个群体各自的DNA等量混合,终浓度为10ng/μl。以两个混合DNA池为模板,对初步筛选出的引物进行再次扩增,选出在两个混合模板间扩增有差异的引物用于两个群体各10个个体进行扩增,再次选择在两个群体间条带差异率在50%的引物,然后再用于两个群体所有个体的扩增。

### 1.2.4 结果检测

取5μl扩增产物用2%的琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色,然后用Gel Doc1000凝胶成像仪进行图像处理。

### 1.2.5 数据统计

统计各样品的RAPD标记数,计算清晰和稳定的谱带,将RAPD电泳谱带位点上有扩增带的记为“1”,无扩增带的记为“0”,将0、1矩阵数据输入计算机,用Popgene Version1.32生物软件进行处理。统计各多态性条带在两个群体中出现的百分率,用 $\chi^2$ 检验差异显著性,显著性水平设为0.05。将RAPD条带看作是含两个复等位基因的位点系统,假设群体处于Hardy-Weinberg平衡对各群体的遗传参数进行计算:

多态位点比例:  $P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$

Shannon多样性指数量化分析遗传多样性(Wachira *et al.* 1995; King *et al.* 1978)

$H^1 = -\sum X_i \ln X_i$  ( $X_i$ 为位点*i*在某一群体中的出现频率)

$n$ 个不同群体内的平均多样性:  $H_{POP} = -\sum H^1 / n$ ,  $n$ 为研究的群体数。

群体多样性:  $H_{SP} = -\sum X \ln X$ ,  $X$ 为*n*个群体中的综合表型频率。

根据此计算:群体内遗传多样性所占的比例:  $H_{POP} / H_{SP}$

群体间遗传多样性所占的比例:  $(H_{SP} - H_{POP}) / H_{SP}$

Nei(1972)群体间的相似性系数:  $I = \sum (X_i Y_i) / \{ \sum (X_i)^2 \sum (Y_i)^2 \}^{1/2}$

加上偏差矫正后(Nei1972)为:  $I = (2n-1) \sum (X_i Y_i) / \{ \sum (2n(X_i)^2 - 1) \sum (2n(Y_i)^2 - 1) \}^{1/2}$

式中: $X_i, Y_i$ 分别为*X*和*Y*群体第*i*个位点的等位基因频率

Nei(1972)群体间遗传距离:  $D_A = -\ln I$

### 1.2.6 差异条带回收

对表型频率差异显著的条带进行回收。回收方法参照《分子克隆》(萨姆布鲁克等 1992)用锋利的刀片把表型频率差异显著的条带切下,放入一干净的离心管内,碾碎,加入两倍体积的无菌水,室温下放置过夜。次日离心,取上清液为模板进行PCR扩增。反应体系为60 μl, DNA模板3 μl,其他反应条件不变。扩增反应结束后于1.5%的琼脂糖上电泳,以检测回收是否为目的片断。

## 2 结果

### 2.1 两个群体的特异性位点

用400个引物对中国对虾两个抗病力不同的群体进行分析,统计各多态位点在两个群体中的表型频率。应用 $\chi^2$ 检验比较多态位点在两个群体中的表型频率,结果见表1。从表1可以看出7个位点的表型频率在两个群体中差异显著或极显著。其中5个位点在SLT群体中表型频率显著高于SSL群体;两个位点在SSL群体中的表型频率显著高于SLT群体。本试验对S1020-1、S1020-4、S1176-4及S446-2 4个位点条带进行了成功回收,下一步测序工作正在进行。其中引物S1020产生两个表型频率差异显著的位点,该引物在两个群体中的扩增及回收情况见图1。

### 2.2 两群体的DNA多态性

用扩增条带清晰,初次在两个混合基因池中有差别的15个引物对SLT和SST两个群体进行扩增,共得

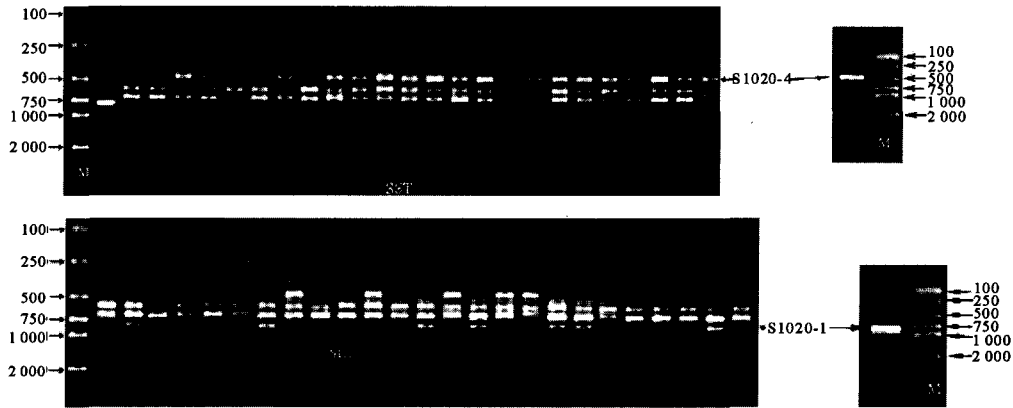


图 1 引物 S1020 在两个群体 LST 和 SST 中扩增图谱及回收片断

Fig.1 Electrophoretograms of RAPD in two groups of the primer S1020

到 82 个位点。其中,多态位点 34 个,占 41.46%。引物 S10 在两个群体中均为单态,其余 14 个引物每个产生的多态位点为 1~6 个。每个引物平均提供 5.47 个标记,分子量范围为 200~2 000 bp。两个群体的多态位点比例分别为 40.24%、37.8%(表 2)。Shannon's 多样性指数估算两个群体的平均遗传多态度为 0.203 2,SLT 群体的遗传多态度为 0.204 4 略高于 SST 群体 0.201 9;群体内的遗传变异( $H_{POP} / H_{SP}$ )0.964 5,群体间的遗传变异( $1 - H_{POP} / H_{SP}$ )是 0.035 5(表 3),可见 90.02%的遗传变异来自于群体内,9.98%的变异来源于群体间。Shannon's 多样性指数只是根据扩增产物的有无来确定某一 DNA 片段的表型频率计算群体的遗传多态度,而 Nei's 指数通过假定某一位点上有两个等位基因,统计各座位的基因频率计算出两个群体的遗传距离为 0.009 5,遗传分化指数为 0.029 4(表 2)。

### 3 讨论

#### 3.1 影响中国对虾攻毒死亡的因素

在对中国对虾人工攻毒实验过程中,除了感染 WSSV 还有很多因素影响中国对虾的死亡率,如环境因子的控制情况,对虾摄食的偏好性和选择性等。因此,针对这种情况本课题组还专门设计了另外一组实验,即对同一一些家系同时进行人工攻毒实验和自然感染实验,以探讨两种感染方式对实验对象抗

表 1 中国对虾两个群体中多态位点表型频率的比较

Table 1 Comparison of the phenotype frequency of polymorphism loci in two populations of *F. chinensis*

| 引物<br>Primer | SLT                          |                                  | SST                          |                                  | $\chi^2$ -value |
|--------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-----------------|
|              | 位点总数<br>Total loci<br>number | 显性位点数<br>Dominate loci<br>number | 位点总数<br>Total loci<br>number | 显性位点数<br>Dominate loci<br>number |                 |
| s240-1       | 29                           | 22                               | 29                           | 20                               | 0.35            |
| s240-2       | 29                           | 9                                | 29                           | 8                                | 0.08            |
| s240-3       | 29                           | 1                                | 29                           | 3                                | 1.07            |
| s240-7       | 29                           | 17                               | 29                           | 17                               | 0               |
| s240-8       | 29                           | 28                               | 29                           | 29                               | 1.02            |
| s261-1       | 29                           | 20                               | 29                           | 24                               | 1.51            |
| s261-2       | 29                           | 5                                | 29                           | 8                                | 0.89            |
| s261-3       | 29                           | 24                               | 29                           | 27                               | 1.46            |
| s261-4       | 29                           | 2                                | 29                           | 5                                | 1.46            |
| s261-5       | 29                           | 21                               | 29                           | 11                               | 6.97**          |
| s261-6       | 29                           | 13                               | 29                           | 17                               | 1.1             |
| s306-3       | 29                           | 5                                | 29                           | 2                                | 1.46            |
| s306-4       | 29                           | 25                               | 29                           | 21                               | 1.68            |
| s1006-1      | 29                           | 19                               | 29                           | 20                               | 0.08            |
| s1006-5      | 29                           | 15                               | 29                           | 14                               | 0.07            |
| s1090-1      | 29                           | 12                               | 29                           | 10                               | 0.29            |
| s1090-2      | 29                           | 6                                | 29                           | 7                                | 0.1             |
| s1090-4      | 29                           | 12                               | 29                           | 15                               | 0.62            |
| s1090-5      | 29                           | 4                                | 29                           | 12                               | 5.52*           |
| s504-3       | 29                           | 3                                | 29                           | 0                                | 3.16            |
| s504-4       | 29                           | 14                               | 29                           | 13                               | 0.07            |
| s504-5       | 29                           | 3                                | 29                           | 8                                | 2.8             |
| s358-4       | 29                           | 19                               | 29                           | 17                               | 0.29            |
| s358-5       | 29                           | 18                               | 29                           | 24                               | 3.11            |
| s324-2       | 29                           | 7                                | 29                           | 11                               | 1.29            |
| s366-4       | 29                           | 4                                | 29                           | 15                               | 9.47**          |
| s1020-1      | 29                           | 21                               | 29                           | 8                                | 11.66**         |
| s1020-4      | 29                           | 5                                | 29                           | 19                               | 13.93**         |
| s475-3       | 29                           | 9                                | 29                           | 3                                | 3.78            |
| s475-4       | 29                           | 11                               | 29                           | 13                               | 0.28            |
| s446-2       | 29                           | 9                                | 29                           | 0                                | 10.65**         |
| s446-3       | 29                           | 15                               | 29                           | 17                               | 0.28            |
| s1176-3      | 29                           | 9                                | 29                           | 11                               | 0.31            |
| s1176-4      | 29                           | 4                                | 29                           | 16                               | 10.99**         |

注: \* 为差异显著, \*\* 为差异极显著

病力的反应情况。最后结果证明,两种感染方式试验结果的符合程度在70%以上,说明无论是人工感染实验还是自然感染实验在一定程度上都能够反映中国对虾对WSSV的抗病力情况。在本实验中,用人工感染方式来检测实验对象的抗病力是可靠的,同样,分离出的抗病群体和感病群体也具有科学意义。

### 3.2 中国对虾两个群体的特异性位点

RAPD技术是美国杜邦公司的Williams等于1990年在PCR基础上发展起来的一种分子标记,其优点是在没有任何基因组DNA序列资料的情况下能进行遗传变异的比较,且具有简单、易于操作等优点,比扩增片段长度多态性(AFLP)分析速度快且经济,且具有后者多态性较高的优点,而微卫星技术受到引物数量的限制(目前本实验室只有20多对中国对虾微卫星引物)扩增位点有限,因此RAPD技术还被广泛的用于遗传多样性分析,遗传连锁图谱构建和标记筛选等分子生物学的研究。RAPD技术还被广泛的应用于动植物的与质量性状和数量性状相关的标记筛选,杜立新等(2005)用RAPD技术得到荷斯坦牛与产奶量相关的分子标记,并成功转化成了SCAR标记;陈永燕等(1999)用RAPD-BSA技术筛选出水稻稻瘟病抗性相连锁的标记。

抗病性状一般有多个基因控制。分子标记辅助育种主要用于单基因或少数基因的遗传转移和抗病性状多个基因的聚合。在抗病性育种实践中,单个基因控制的抗性品种容易被病原体克服而造成大面积流行。因此,利用分子标记技术对抗病基因进行标记和定位,然后将不同的抗性基因

聚合到一个优良品种中,可能会产生新的抗性或使抗性得到提高,从而有利于培育具有持久抗性的品系或品种(周锦霞等 2005)。Huang等(1997)用分子标记在杂交F4代将4个抗白叶枯基因(Xa-44, Xa-5, Xa-13和Xa-21)聚于IRBB60品系中。王心宇等(2001)采用在早代进行抗性鉴定,较晚世代(F4代)进行抗性鉴定结合分子标记辅助选择的策略,利用了与3个小麦白粉病抗性基因紧密连锁或共分离的RFLP标记和PCR标记(SCAR标记),对含有这些基因的优良品系间配制的杂交组合的F4代进行了分子标记辅助育种选择,并结合抗性鉴定,筛选到共36株结合其中两个抗性基因的植株。

本研究利用RAPD技术对在攻毒过程中分离出的两个群体进行分析,得到7个在两个群体中表型频率差异显著的位点,其中5个位点在SLT群体中的表型频率显著高于SST群体,说明这5个位点可能与抗病性状相关。另外,两个位点S1020-4和S1176-4在SST群体中的表型频率显著高于在SLT群体,说明这两个位点可能是与抗病负相关的特异性遗传标记。其中引物S1020产生两个特异性位点,一个与抗病正相关位点S1020-1,一个负相关位点S1020-4。利用这些与抗病相关的遗传标记进行辅助育种,可以大大加快育种进程。

表2 RAPD图谱的遗传分析

Table 2 Genetic analyses of RAPD electrophoretogram

| 群体<br>Groups | 总的位点数<br>Total loci<br>number | 多态位点数<br>Polymorphism<br>loci number | 多态位点比例<br>Polymorphism<br>Polymorphism<br>(%) | 遗传距离<br>Genetic<br>distance | 遗传分<br>化指数<br>Gst |
|--------------|-------------------------------|--------------------------------------|---|-----------------------------|-------------------|
| SLT          | 82                            | 33                                   | 40.24   | 0.009 5                     | 0.029 4           |
| SST          | 82                            | 31                                   | 37.80   |                             |                   |

表3 中国对虾两个群体的遗传多态性分析

Table 3 Genetic diversity within and between the two populations of *F. chinensis*

| 引物<br>Primer     | $H_0$   |         | $H_{SP}$ | $H_{POP}$ | $H_{POP}/H_{SP}$ | $1-H_{POP}/H_{SP}$ |
|------------------|---------|---------|----------|-----------|------------------|--------------------|
|                  | LST     | SST     |          |           |                  |                    |
| S358             | 0.268 8 | 0.264 0 | 0.270 6  | 0.266 4   | 0.984 5          | 0.015 5            |
| S324             | 0.064 1 | 0.086 1 | 0.076 1  | 0.075 1   | 0.986 9          | 0.013 1            |
| S240             | 0.284 9 | 0.216 1 | 0.260 0  | 0.250 5   | 0.963 5          | 0.036 5            |
| S261             | 0.366 3 | 0.349 7 | 0.367 2  | 0.358 0   | 0.974 9          | 0.025 1            |
| S304             | 0.111 0 | 0.095 0 | 0.104 6  | 0.103 0   | 0.984 7          | 0.015 3            |
| S306             | 0.258 6 | 0.256 1 | 0.257 5  | 0.257 4   | 0.999 4          | 0.000 6            |
| S366             | 0.042 9 | 0.102 5 | 0.080 6  | 0.072 7   | 0.902 0          | 0.098 0            |
| S446             | 0.259 1 | 0.161 1 | 0.224 7  | 0.210 1   | 0.935 0          | 0.065 0            |
| S475             | 0.243 0 | 0.194 4 | 0.223 5  | 0.218 7   | 0.978 5          | 0.021 5            |
| S504             | 0.201 8 | 0.201 8 | 0.208 8  | 0.201 8   | 0.966 5          | 0.033 5            |
| S1006            | 0.258 6 | 0.256 1 | 0.257 5  | 0.257 4   | 0.999 4          | 0.000 6            |
| S1020            | 0.286 8 | 0.267 8 | 0.307 1  | 0.277 3   | 0.903 0          | 0.097 0            |
| S1090            | 0.241 7 | 0.290 2 | 0.270 5  | 0.266 0   | 0.983 2          | 0.016 8            |
| S1176            | 0.178 2 | 0.287 8 | 0.247 3  | 0.233 0   | 0.942 2          | 0.057 8            |
| 均值<br>Mean value | 0.219 0 | 0.216 3 | 0.225 4  | 0.217 7   | 0.964 5          | 0.035 5            |

### 3.3 中国对虾的遗传多样性

中国对虾的遗传多态度一般较低,石拓等(2001)用 RAPD 技术对中国对虾朝鲜半岛西岸产卵群体、朝鲜半岛西岸越冬群体和黄、渤海沿岸及人工累代养殖群体 4 个群体进行分析,发现 4 个群体的遗传多态位点在 20%~33.3%之间;何玉英等(2004)对中国对虾快速生长人工选育群体进行 RAPD 分析,结果表明,3 个世代的多态性在 33%~38%之间。本文从 400 个引物中经过 3 次筛选,得到 14 个引物对两个抗病能力不同的群体进行扩增,两个群体的遗传多态度分别为 40.24%和 37.80%,比前人的结果略高,其原因有可能是对引物的选择强度太大,人为的淘汰了很多多态性低的引物或单态引物。

根据 Wright(1978)关于遗传分化系数的解释,遗传分化系数在 0~0.05 之间的群体之间没有遗传分化。根据基因频率计算出的两个抗病能力不同群体之间的遗传分化系数为 0.029 4,同时遗传距离为 0.009 5,说明尽管两个子代群体在对 WSSV 抗病力上有很大差异,但并没有发生明显的遗传分化。姬广海等(2003)应用 RAPD 技术对水稻抗白叶枯病品种的遗传多样性进行分析发现,抗病品种与感病品种遗传差异很大。本实验两个抗病能力不同群体的遗传差异不显著。因此,仅通过本次分析不能明确回答两个子代群体对 WSSV 抵抗能力不同的特性是否源于两个群体间的遗传变异这一问题,还有待于进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 王心宇,陈佩度,张守忠. 2001. 小麦白粉病抗性基因的聚合及其分子标记辅助选择. 遗传学报, 28(7):640~646
- 石拓,庄志猛,孔杰,刘萍,刘振辉,孟宪红,邓景耀. 2001. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析. 自然科学进展, 11(4): 360~364
- 刘萍,孟宪红,孔杰,李健,王伟. 2002. 对虾抗病性状遗传标记的 RAPD 分析. 水产学报, 26(3):270~274
- 刘萍,孔杰,石拓,庄志猛,邓景耀. 2000. 中国对虾黄渤海沿岸地理群的 RAPD 分析. 海洋学报, 22(5): 88~93
- 何玉英,刘萍,李健. 2004. 中国明对虾第 1 代和第 6 代人工选育群体的遗传结构分析. 中国水产科学, 11(6):572~575
- 陈永燕,王群,杨得,张亚平. 1999. 筛选与水稻稻瘟病抗性相连锁的 RAPD 标记. 云南大学学报(自然科学版), (S3):136~137
- 杜立新,万海伟,王爱华,李宏滨. 2005. 用 RAPD 技术筛选中国荷斯坦产奶量性状遗传标记. 畜牧兽医学报, 36(9): 882~886
- 孟宪红,孔杰,刘萍,马春艳,李颖. 2005. 中国明对虾抗白斑综合征病毒分子标记的筛选. 中国水产科学, 12(1): 14~19
- 周锦霞,敖光辉,魏琴,周黎军. 2005. 分子标记辅助选择及其在植物抗病育种中的作用. 宜宾学院学报, 6: 90~92
- 姬广海,钱君,张世光,魏兰芳,陈兴全. 2003. 云南水稻抗白叶枯病品种的遗传多样性初报. 中国水稻科学, 17(2): 118~122
- 萨姆布鲁克, J., 弗里奇, E. F., 曼尼阿蒂斯, T. 1999. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 32~41
- Carr, W., Sweeney J., and Swingle, J. 1994. The Oceanic Institute's SPF shrimp breeding program status. USMSFP (US Marine Shrimp Farming Program) 10th Anniversary Review GCRL: Special Publication, 47~54
- Huang, N., Angeles, E. R., Domingo, J., Magoantay, G., Singh, S., Zhang, G., Kumaravadivel, N., Bennett, J., and Khush, G. S. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker assisted selection using RFLP and PCR. Theor. Appl. Genet. 95:313~320
- King, L. M., and Schaal, B. A. 1989. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. Evolution, 42: 1 117~1 119
- Michelmore, R. W., and Keaeali, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis; a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 88:9 828~9 832
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283~292
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583~590
- Pruder, G. D., Brown, C. L., Sweeney, J. N., and Carr, W. H. 1995. High health shrimp systems; seed supply the oryand practice. In: CL Browdy and Hopkins, JS. (Editors), Swimming Through Troubled Waters, Proceedings of the special session on shrimp farming, 1-4 February, CA: World Aquaculture Society, LA: Baton Rouge, 40~52
- Wachira, F. N., Waugh, R., Hackett, C. A., and Powell, W. 1995. Detection of genetic diversity in tea (*Camelliasinensis*) using RAPD markers. Genome, 38(2): 201~210
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6 531~6 535
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations. Volume 4 IL, Chicago: Univ. of Chicago Press, 79~103
- Wyban, J. A., Swingle, J. S., Sweeney, J. N., and Pruder, G. D. 1995. Specific pathogen free *Penaeus vannamei*. World Aquaculture, 24: 39~45