

文章编号:1000 - 0615(2005)01 - 0013 - 07

## 用 AFLP 方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异

岳志芹<sup>1,2</sup>, 王伟继<sup>1</sup>, 孔杰<sup>1</sup>, 戴继勋<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**利用 AFLP 技术对连续 4 年选育的中国对虾抗白斑病毒群体进行了遗传分析,并比较了不同的数据处理方法对遗传学参数的影响。7 个 *EcoR* / *Mse* 引物组合共产生 350 个位点,其中 202 个为多态位点。4 代群体的多态位点比例分别为:39.4286%,41.4286%,33.4286%,39.1429%,*Nei* 基因多样性指数分别为:0.1197,0.1259,0.1133,0.1249;4 代群体的 Shannon 多样性指数分别为 0.1831,0.1917,0.1702,0.1896。遗传多样性水平除了第 3 代群体标本明显较低外,其它 3 代基为接近,维持在一个恒定的水平。比较了 *Nei* 分析、Shannon 信息指数分析、AMOVA 分析得出的遗传学参数,建议 AMOVA 分析作为应用 AFLP 进行群体遗传学分析时首选的统计方法。在 AFLP 指纹图谱中发现共显性基因座,对其中 1 个基因座的两个 AFLP 片段进行了回收、克隆及测序。序列分析表明,多态性是由引物扩增区域内 4 个核苷酸的插入/缺失导致的,证明了 AFLP 标记并不完全是显性标记。实验表明 AFLP 技术灵敏度高,信息量大,适用于分析亲缘关系较近的个体或品系,在中国对虾分子标记辅助育种方面有应用潜力。

**关键词:**中国对虾;AFLP;遗传变异;抗病群体

中图分类号:S917

文献标识码:A

## AFLP analysis of four selected generations on disease-resistance trait of *Fenneropenaeus chinensis*

YUE Zhi-qin<sup>1,2</sup>, WANG Wei-ji<sup>1</sup>, KONG Jie<sup>1</sup>, DAI Ji-xun<sup>2</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China;

2. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used to detect the genetic variation of four successively selected specific-pathogen-resistance (SPR) generations. Seven *EcoR* and *Mse* primer combinations produced 202 polymorphic markers out of the total of 350 bands amplified. The proportions of polymorphic loci of the first, second, third and fourth generations were 39.4286%, 41.4286%, 33.4286% and 39.1429%, respectively. The *Nei* genetic diversity was 0.1197, 0.1259, 0.1133 and 0.1249, respectively. Shannon genetic diversity index was 0.1831, 0.1917, 0.1702 and 0.1896, respectively. The genetic diversity index of the third generation was low, while the index of the other three generations remains at a relatively constant level. The analysis showed that the SPR population has great potential in genetic breeding program. The genetic distance of four generations based on the *Nei* analysis ranged from 0.0282 to 0.0458. Partitioning of the genetic variation revealed that 80.54% is distributed within populations, which is similar to the value (86.72%) derived from AMOVA. Mantel tests showed good correlation of different genetic distance matrices. By comparing the genetic parameters obtained from different statistical methods, we recommended AMOVA the first choice in population genetics analysis with AFLP markers. Co-dominant loci were found in AFLP fingerprinting. Two fragments adjacent in gel positions were recovered, cloned and sequenced. The sequence analysis showed high similarity between them, which

收稿日期:2003-06-25

资助项目:国家“863”计划“中国对虾的遗传改良及中试示范”(2001AA620105);国家“863”计划“中国对虾抗病性状 AFLP 分子标记定位”(2002 AA628070)

作者简介:岳志芹(1975-),女,山东烟台人,博士,主要从事海洋生物种质资源及遗传育种。Tel: 0532 - 5823291, E-mail: yuezq21cn@sohu.com

通讯作者:孔杰, E-mail: kongjie@sina.com

indicated that they belong to the same locus. Our results proved that AFLP markers were not complete dominant markers. Our study suggests that AFLP is sensitive to detect genetic variability and effective to find markers and it is useful in marker assisted selection.

**Key words:** *Fenneropenaeus chinensis*; amplified fragment length polymorphism (AFLP); genetic variation; specific-pathogen-resistance (SPR) population

中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*), 属于对虾科 (Penaeidae), 明对虾属 (*Fenneropenaeus*), 主要分布于我国黄海、渤海以及朝鲜半岛沿海, 是我国北方重要的渔业对象及海水养殖虾类<sup>[1]</sup>。近年来, 由于过度捕捞、栖息地生态环境污染等因素, 中国对虾的自然资源在迅速衰减<sup>[2]</sup>, 因此对虾养殖业的地位日益突出。但是病害问题一直困扰着对虾养殖业, 另外, “野捕家养”的苗种供应系统也不能满足对虾健康养殖可持续发展的需要。培育优质高产抗逆的品种, 是对虾养殖业迫切需要解决的问题。我国自 1998 年起开始人工选育抗病性强的群体, 至今已获得抗病对虾群体第四代, 其抗病性明显提高<sup>[3]</sup>。但是伴随人工选育过程, 经常发生近交几率增加, 有效群体数目减少等, 有可能导致遗传变异降低, 从而遗传响应减少<sup>[4]</sup>。因此, 有必要对其遗传变异进行检测, 从分子水平了解其遗传结构的变化, 以制订相应的科学措施从而保证育种工作顺利进行。

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 技术<sup>[5]</sup>作为一种新型的分子标记, 具有信息量大、灵敏度高、多态性丰富等优点, 在海洋生物中被广泛应用于遗传多样性的检测<sup>[6,7]</sup>、种质鉴定<sup>[8,9]</sup>、遗传连锁图谱的构建<sup>[10,11]</sup>、基因的差异表达研究<sup>[12]</sup>等方面。在对虾类中, 应用 AFLP 标记已初步构建了日本对虾及斑节对虾的连锁图谱<sup>[13,14]</sup>。本研究利用 AFLP 技术分析中国对虾连续选育的 4 代抗病群体, 跟踪其遗传变异的变化, 探讨选育过程对其遗传结构的影响, 为中国对虾的遗传育种提供理论资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中国对虾选育的基础群体 (founder population) 系 1998 年自山东威海外海 123°E, 37°N 附近海域采捕的中国对虾。后代苗种放于对虾养殖池中, 连续 4 年从染病 (WSSV) 存活的个体中选留亲虾进行选育, 具体方法参考文献 [3]。1998、1999、2000、2001 年分别采集虾样, 保存于 -80 冰箱中, 分别命名为 G1、G2、G3、G4, 样本数均为

12。

### 1.2 AFLP 反应及检测

采用常规酚、氯仿法提取中国对虾基因组 DNA。AFLP 分析参见 Vos 等<sup>[5]</sup>, 稍做改动, 选择性扩增所用的引物组合为: E32M61 (AAC + CTG), E38M48 (ACT + CAC), E38M58 (ACT + CGT), E39M48 (AGA + CAC), E39M54 (AGA + CCT), E39M55 (AGA + CTG), E42M54 (AGT + CCT)。

### 1.3 数据统计与分析

首先按电泳图谱中扩增条带的有无, 转化为 1、0 原始数据矩阵。采用两类方法进行分析, 其一是将标记视为表型性状, 直接利用原始二元数据矩阵 (表型矩阵) 进行计算, 如 Shannon 信息指数及 AMOVA 分析; 其二是将每一条带作为 1 个位点, 进行 Hardy-Weinberg 平衡假设及 “隐性纯合子一致” 假设, 转换成基因频率矩阵后进行统计, 如 Nei 分析。遗传结构的分析主要包括群体内遗传变异水平的检测以及群体间遗传距离的评价两个方面。统计的遗传学参数主要有:

Nei 分析 Nei 基因多样性指数:  $H = 1 - \sum P_i^2$ ,  $P_i$  为单个位点上的等位基因的频率。

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

其中,  $X_i$ ,  $Y_i$  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:  $D = -\ln I$

利用 4 个群体内个体间的遗传相似度数据, 用 SPSS 软件包进行四代群体的遗传多样性差异显著性检验。

Shannon 多样性指数分析 群体内基因多样性指数:  $H^0 = -\sum X_i \ln X_i / N$

其中,  $X_i$  为位点  $i$  在某一群体中的出现频率,  $N$  为该群体中检测到的位点总数。

$n$  个不同群体内的平均多样性:  $H_{POP} = -\sum H_0 / n$

其中,  $n$  为研究的群体数。

群体多样性:  $H_{SP} = -\sum X \ln X / n$

其中,  $X$  为位点  $i$  在  $n$  个群体中的总显性频率。

根据此分别计算群体内 ( $H_{POP}/H_{SP}$ ) 及群体间 ( $(H_{SP} - H_{POP})/H_{SP}$ ) 遗传多样性所占的比例。

以上分析采用 POPGENE 软件进行统计。

利用 Arlequin 软件进行分子方差分析 (AMOVA) 将 4 代群体进行分组,通过等级剖分计算组间、组内/群体间及群体内的方差组分期望值,分别计算各个等级变异对总遗传变异的贡献率及群体间遗传距离。

Reynold 遗传距离:  $D = -\log(1 - S_T)$

Slatkin 遗传距离:  $D = S_T / (1 - S_T)$

Mantel 检验 为了评价各种分析方法的一致性情况,利用 Mantel 检验分析各种遗传距离矩阵之间的相关性。

## 2 结果

### 2.1 AFLP 扩增结果

本研究采用 7 对引物组合,共产生 350 条清晰的带,扩增片段大小为 0.1 ~ 2.0 kb。其中,多态片段为 202 条,多态位点比例为 57.7%。不同引物的扩增结果之间存在差异,产生的扩增条带数从 29 到 70 不等,多态检出率的范围为 48.6% ~ 68.9% (表 1)。图 1 表示引物 E38M48 在中国对虾中的扩增图谱。

### 2.2 中国对虾四代抗病选育群体内的遗传变异及群体间的遗传距离

4 代群体内的多样性指数 4 代群体的多态位点比例分别为 39.4286%, 41.4286%, 33.4286%, 39.1429%。Nei 基因多样性指数分别为 0.1197, 0.1259, 0.1133 和 0.1249。4 代群体的 Shannon 多样性指数分别为 0.1831, 0.1917, 0.1702 和 0.1896, 4 代群体总的多样性指数为 0.2280。

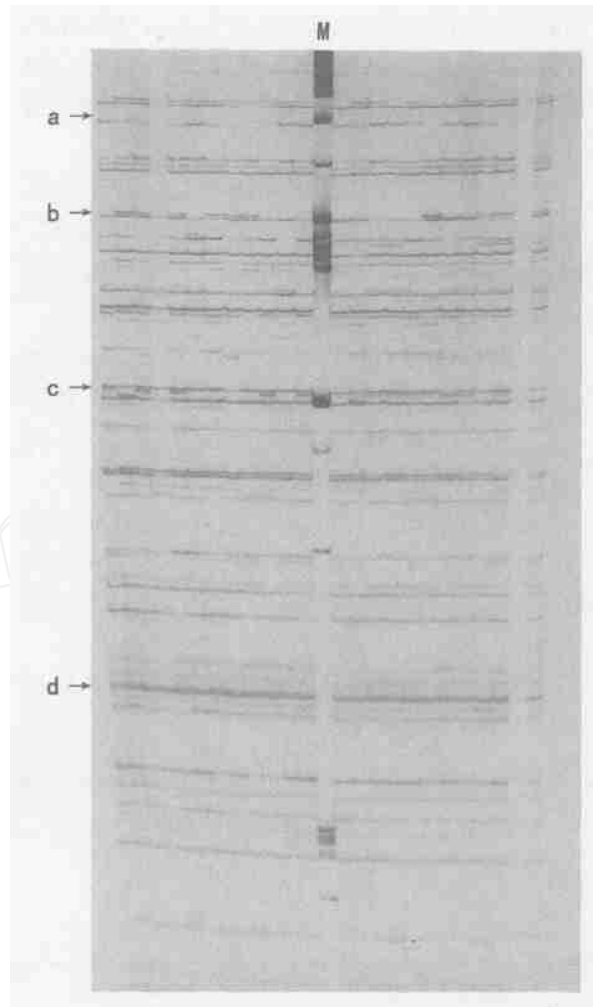


图 1 引物 E38M48 (ACT + CAC) 中国对虾抗病选育群体中的扩增图谱

Fig. 1 AFLP band patterns generated by primer combinations E38M48 in the *F. chinensis*  
M: 分子量标准 M 左右两侧泳道分别为 G1、G2 个体  
箭头 a, b 所示为多态, c, d 所示为单态  
M: marker; the lanes in the left and right side of M were G1, G2, respectively Arrow a, b indicated polymorphic bands, arrow c, d indicated monomorphic bands

表 1 不同引物组合的扩增结果

Tab. 1 Number of bands generated by primer combinations

引物组合 primer combinations	总条带数 no. of total bands	单态性条带数 no. of monomorphic bands	多态性条带数 no. of polymorphic bands	多态位点比例 (%) percentage of polymorphism
E32M61	60	30	30	50.0
E38M48	70	30	40	57.1
E38M58	29	9	20	68.9
E39M48	37	19	18	48.6
E39M54	50	18	32	64.0
E39M55	54	26	28	51.8
E42M54	50	16	34	68.0
总计 total	350	148	202	57.7

SPSS 检验结果表明,在 0.05 水平上,4 代群体的遗传多样性程度有一定的差异,G3 与 G1、G2、G4 差异显著,其他 3 代之间差异不显著(数据未列出)。

群体间的遗传距离 利用 Nei 分析,计算的 4 代群体的遗传距离(表 2)介于 0.0282 ~ 0.0458,其中 G1 与 G2 的遗传距离最小(为 0.0282);G1 与 G3 的遗传距离最大(为 0.0458)。

根据  $S_T$  计算的遗传距离列于表 3。Reynolds 遗传距离与 Slatkin 遗传距离数值非常接近,趋势一致,都表现为 G1 与 G2 的遗传距离最小,而 G1 与 G3 的遗传距离最大。

比较表 2、表 3 可以看出,两种数据分析方法得出的遗传距离具有相同的趋势,且  $S_T$  遗传距离矩阵大于 Nei 遗传距离矩阵,表明 AMOVA 分析对群体遗传变异的分辨程度要大于后者。

群体变异来源分析 由 Shannon 多样性指

数分析,群体内个体间多样性所占的比例( $H_{POP}/H_{SP}$ )为 0.8054,群体间的多样性所占的比例 $[(H_{SP}-H_{POP})/H_{SP}]$ 为 0.1946。表明 80.54%的遗传变异是由群体内不同个体之间的差异造成的,而 19.46%的多样性来自群体间的变异。用 AMOVA 进行遗传变异方差分析,将第 1 代、第 2 代群体分为一组,将第 3 代、第 4 代群体分为另一组,通过等级剖分分析,得出各等级变异在总变异中所占的比例(表 4)。结果表明:组间的变异只占 4.97%,各群体间的变异占总变异的 8.31%,86.72%的变异存在于群体内个体之间,与由 Shannon 指数计算出的比例(80.54%)接近,二者得出的结论一致。

Mantel 检验 利用 Mantel 检验,分析由 POPGENE 和 AMOVA 得出 4 代群体之间的遗传距离和分化指数矩阵的相关性,相关系数列于表 5。三种遗传距离矩阵有很好的相关性( $R > 0.95$ ),其

表 2 4 代选育群体的 Nei 遗传距离及相似性系数(基于 Hardy-Weinberg 平衡假设)

Tab. 2 Genetic distance and similarity of four selectively bred populations

	G1	G2	G3	G4
G1	-	0.9722	0.9552	0.9669
G2	0.0282	-	0.9618	0.9710
G3	0.0458	0.0389	-	0.9713
G4	0.0336	0.0294	0.0291	-

注:对角线以下为遗传距离,对角线以上为相似性系数

Notes: Figures under and above the diagonal line are genetic distance and similarity, respectively

表 3 AMOVA 分析基于  $S_T$  计算的遗传距离

Tab. 3 Genetic distance based on  $S_T$  derived from AMOVA

	G1	G2	G3	G4
G1	-	0.0749	0.2218	0.1089
G2	0.0722	-	0.1858	0.1021
G3	0.2003	0.1704	-	0.1185
G4	0.1033	0.0972	0.1120	-

注:对角线以下为 Reynold 遗传距离,对角线以上为 Slatkin 遗传距离

Notes: The figures under and above the diagonal line are Reynold's and Slatkin's genetic distance, respectively

表 4 中国对虾 4 代选育群体的 AMOVA 分析

Tab. 4 Data derived from AMOVA of *F. chinensis* four selectively bred generations

变异来源 source of variation	自由度 degree of freedom	方差总和 sum. of squares	变异组分 estimated variance of components	所占比例 percent of variation	-统计量 -statistics
组间 among regions	1	82.979	1.34896	4.97%	0.04971
组内群体间 among populations	2	101.208	2.25600	8.31%	0.13284
群体内 within populations	44	1035.417	23.53220	86.72%	0.08748
总计 total	47	1219.604	27.13715		

中基于  $s_T$  计算的两个遗传距离矩阵的相关程度最高,为 0.9999。

表 5 遗传距离及分化系数矩阵之间的 Mantel 检验  
Tab.5 Mantel tests among matrices of genetic distance and genetic differentiation index obtained from different methods

	遗传距离 genetic distance		
	Nei	Reynolds	Slatkin
Nei	-		
Reynolds	0.9515	-	
Slatkin	0.9542	0.9999	-

## 2.3 共显性基因座位

在多态位点中发现了共显性基因座位,如图 2 所示。对 a、b 两个片段进行回收、克隆、测序。结果表明,a、b 两个片段大小分别为 170 bp、166 bp。序列相似度很高,差异仅是由于 4 个碱基插入/缺失引起的,可证实 a、b 是属于同一个共显性基因座位。

## 3 讨论

### 3.1 中国对虾抗病选育群体的遗传多样性

在中国对虾的遗传多样性分析方面,利用同

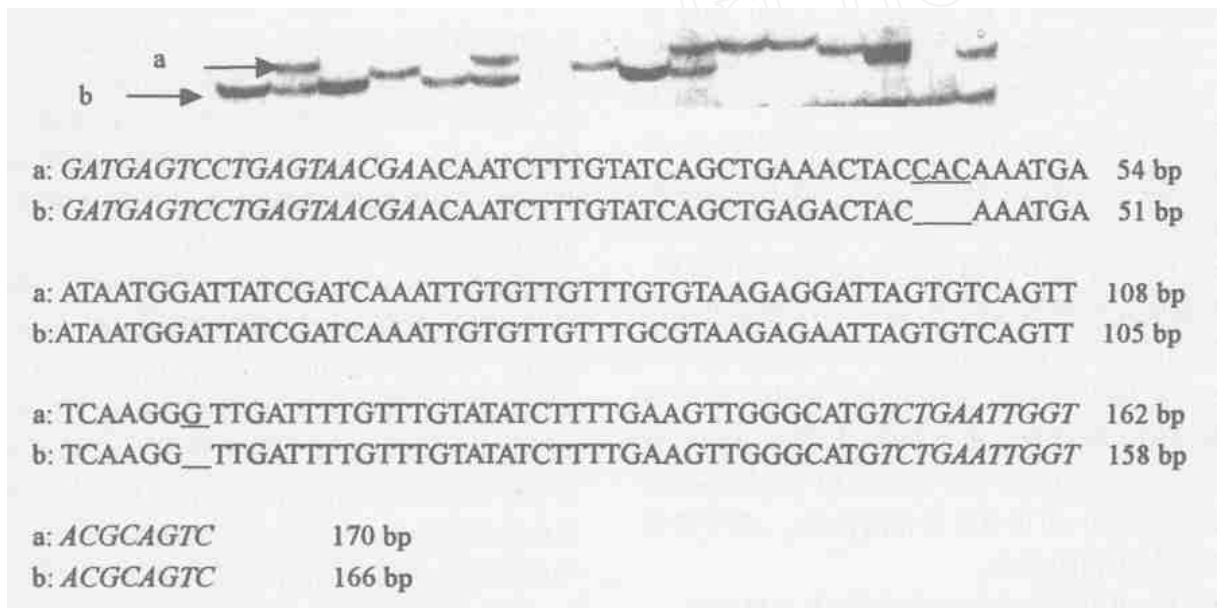


图 2 一个共显性基因座位及其序列分析  
(引物序列用斜体表示,碱基插入/缺失用下划线表示)

Fig. 2 One co-dominant loci and its sequence analysis

(The italics are primer sequences, the different-sized fragments at this locus result from insertion-deletion mutations, which are indicated by underlying)

工酶、RAPD 技术探讨不同地理群体之间、野生群体与养殖群体之间的遗传差异已有诸多报道<sup>[15,16]</sup>。本文首次利用 AFLP 技术分析了中国对虾的人工选育群体。由于未见其他对虾的 AFLP 遗传多样性分析的报道,不能进行横向比较,我们同扇贝的 AFLP 分析数据进行了比较。中国对虾四代群体的遗传相似度为 0.9552 ~ 0.9722 之间,而 AFLP 分析栉孔扇贝的 3 个不同地理群体内的遗传相似度为 0.6309 ~ 0.6754 之间<sup>[7]</sup>,表明中国对虾的遗传变异程度比较低,与同工酶、RAPD、

mtDNA 测序等分析得出的结论相一致<sup>[15-17]</sup>。

本研究所用的抗病材料是经过传统的群体选择(mass selection)而获得的,即每一代选取抗病性强的个体作为亲本繁衍子代。长期的选育工作需要保持足够的遗传变异水平及一定的遗传响应。但人工选育过程中,随机遗传漂变、近交、瓶颈效应等不确定因素的发生,会导致种群遗传多样性水平下降。如日本对虾引入意大利后,Sbordoni 等<sup>[18]</sup>利用同工酶技术跟踪其遗传结构的变化,发现第 1 代至第 6 代的平均杂合度从 0.102 持续下

降至 0.039。分析原因是在引入第 1 代后不久即发生瓶颈效应,实际产卵亲虾数仅为 4。在黑鲷及扇贝的养殖过程中也发现了有效群体数量较少及近交效应导致遗传变异水平下降的现象<sup>[4,19]</sup>。本研究结果显示,中国对虾 4 代抗病选育群体的遗传变异水平有了一定的变化,第 3 代群体变异水平较低,与其他 3 代差异较大。这可能是由于取样量较少(每一代仅取 12 个)造成的;另外,人工选育是一个复杂的过程,每一代的外部环境及人工选择压力会造成群体遗传变异水平的波动。利用 Shannon 指数和 AMOVA 分析,遗传变异大多数来自群体内个体之间的变异(80.54% 和 86.72%),这表明选育过程中,近交及瓶颈效应发生的可能性不大,遗传多态性的改变主要是由人工选择造成的。这与选育的世代比较短有关,另外也与选育过程中采取的措施密不可分:(1) 留取足够数目的亲虾,每一代的亲虾数量在 200 尾以上;(2) 收集虾卵时分批次进行而不是集中采集,因为虾类是高繁殖力生物,这样可以避免由于产卵时间的不同步性而造成的实际有效亲本数量太少;(3) 严格控制交尾,选留后代覆盖面广,这些措施都有助于保持有效亲本数量,是育种过程中避免近交衰退的有效手段。结果表明 4 代群体有较大的选育潜力,可以继续保持遗传响应,最终保证选种育种工作的成功。

### 3.2 AFLP 分子标记技术的显性/共显性探讨

一般假设 AFLP 是一种显性标记,即不能区分显性纯合子与杂合子。但是,现在越来越多的研究表明 AFLP 标记并不完全是显性标记。在大麦<sup>[20]</sup>、高粱<sup>[21]</sup>、桃子<sup>[22]</sup>的研究中,发现 AFLP 共显性位点占多态位点的 4%~15%。由 AFLP 的反应机理可以推知,引物结合区(包括酶切位点及选择性碱基)出现碱基替换、缺失或插入会使 PCR 片段缺失,这种变异产生的多态以显性方式表现,即该位点的 AFLP 片段仅有两种方式:有或无;而发生在 PCR 扩增区域内的变异将以共显性方式表现,即表现为电泳图谱中不同片段大小的扩增子<sup>[23]</sup>。另外 PCR 扩增区域包含微卫星序列也是 AFLP 呈现共显性特点的重要因素<sup>[23]</sup>。Moore 等<sup>[13]</sup>在日本对虾(*Penaeus japonicus*)的 AFLP 研究中,即发现共显性基因座位,测序结果显示该区域包含微卫星序列 C11(CT)10。本实验中发现了共

显性基因座位,多态性是由于 PCR 扩增区域内 4 个核苷酸的插入/缺失引起的。本实验结合其他的研究,证明 AFLP 片段并不完全是显性标记。

### 3.3 AFLP 在群体遗传学研究中不同数据处理方法的应用探讨

AFLP 标记并非完全显性标记,但是实际应用中往往将其视为显性标记,这使得它在进行群体遗传学分析时数据处理与解释比较复杂。近年来已有学者对此进行探讨并比较了各种分析方法对各种遗传参数的影响<sup>[23,24]</sup>。在本实验中,我们采用了 Shannon 多样性指数、Nei 基因多样性指数及 AMOVA 分析。在遗传多样性指数上,Nei 分析及 Shannon 分析得出了完全一致的趋势,而在遗传距离上,Nei 分析及 AMOVA 分析的相关性较好,但是 AMOVA 分析得出的遗传距离数值要高一些(表 2、表 3)。这与二者不同的数据处理基础有关:Nei 分析借鉴同工酶的数据统计处理方法,基于基因频率矩阵进行统计,将每一条带视为一个独立的基因座(locus),包含两个等位基因;且假设某一条带缺失的位点为“隐性基因纯合”,但 AFLP 分析中,不同的个体可能是由于在酶切位点或选择性碱基位置发生变异,也可能是由于 PCR 扩增区域内的变异导致某一条带缺失。由于上述原因,将高估所分析的基因座数目,而低估每个基因座位的遗传变异,在遗传学参数的数值上表现为等位基因频率偏高,群体内遗传多态度偏低。而 AMOVA 分析不必作 Hardy-Weinberg 平衡假设,避免了数学假设带来的系统误差;而且,它亦无纯合隐性个体的等位基因是完全一致的假设,因此更符合 AFLP 的特点;此外,可以利用显著性检测分析遗传多样性的数值结果。因此在应用 AFLP 分析群体遗传结构时,我们倾向于 AMOVA 作为优先选择的数据统计方法。

### 参考文献:

- [1] 邓景耀,叶昌臣,刘永昌. 渤海的对虾及其资源管理[M]. 北京:海洋出版社,1990. 36-164.
- [2] 邓景耀,庄志猛. 渤海对虾补充量变动原因的分析及对策研究[J]. 中国水产科学,2001,7(4):125-128.
- [3] 张庆文,刘萍,王伟继,等. 中国对虾抗病群体选育的初步研究[J]. 海洋水产研究,2002,23(2):53-57.
- [4] Taniguchi N, Sumatadinata K, Iyama S. Genetic change in the first and second generations of hatchery stock of black seabream[J]. Aquac, 1983, 35: 309-320.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407-4414.

- [6] 杨锐,刘必谦,骆其君,等.利用扩增片段长度多态性(AFLP)研究坛紫菜的遗传变异[J].高技术通讯,2002,1:83-86.
- [7] 潘洁,包振民,赵洋,等.栉孔扇贝不同地理群体的遗传多样性分析[J].高技术通讯,2002,12:78-82.
- [8] Liu Z, Nichols A, Li P, *et al.* Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. frucatus*), and their F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, and backcross hybrids [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, 258: 260 - 268.
- [9] Congiu L, Dupanloup I, Patarnello T, *et al.* Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon[J]. *Mol Ecol*, 2000, 10: 2355 - 2359.
- [10] Agresti J J, Seki S, Cnaani A, *et al.* Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci [J]. *Aquac*, 2000, 185: 43 - 56.
- [11] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids [J]. *Genetics*, 1998, 148: 839 - 850.
- [12] Rubinstein A L, Lee D, Luo R, *et al.* Genes dependent on Zebrafish *Cyclops* function identified by AFLP differential gene expression screen[J]. *Genesis*, 2000, 26: 86 - 97.
- [13] Moore S S, Whan V, Davis G P, *et al.* The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Aquac*, 1999, 173: 19 - 32.
- [14] Wilson K, Li Y, Whan V, *et al.* Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism [J]. *Aquac*, 2002, 204: 297 - 309.
- [15] Wang W J, Kong J, Bao Z M, *et al.* Genetic variation in *Penaeus chinensis* shrimp by isozyme analysis [J]. *Biodiversity Science*, 2001, 9: 241 - 246.
- [16] 庄志猛,石拓,孔杰,等.中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析[J].自然科学进展,2001,11:432-438.
- [17] Quan J, Lv X, Zhuang Z, *et al.* Low genetic diversity of *Penaeus chinensis* as revealed by mitochondrial COI and 16s rRNA gene sequences [J]. *Biochemical Genetics*, 2001, 39: 279 - 284.
- [18] Sbordoni V, de Mattheis E, Cobolli Sbordoni M, *et al.* Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda) [J]. *Aquac*, 1986, 57: 239.
- [19] Blake S G, Graves J E. Mitochondrial DNA variation in the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819), and the Atlantic calico scallop, *Argopecten gibbus* (Dall, 1758) [J]. *J Shellfish Res*, 1995, 14: 79 - 85.
- [20] Waugh R, Bonar N, Baird E, *et al.* Homology of AFLP products in three mapping populations of barley [J]. *Mol Gen Genet*, 1997, 255: 311 - 321.
- [21] Boivin K, Deu M, Rami J F, *et al.* Towards a saturated sorghum map using RFLP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 320 - 328.
- [22] Lu Z X, Sosinski B, Reighard G L, *et al.* Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks [J]. *Genome*, 1998, 41: 199 - 207.
- [23] Wong A, Forbes M R, Smith M L. Characterization of AFLP markers in damselflies: prevalence of codominant markers and implications for population genetic applications [J]. *Genome*, 2001, 44: 677 - 684.
- [24] Krauss S L. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers [J]. *Mol Ecol*, 2000, 9: 1241 - 1245.