

基于 AFLP 技术的凡纳滨对虾遗传多样性研究

薛姝雯¹, 刘小林¹, 李喜莲¹, 张 琼¹, 黄 皓², 相建海³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 海南南疆生物技术有限公司, 海南 三亚 572000; 3 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学开放实验室, 山东 青岛 266071)

【摘 要】 【目的】对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)人工繁育养殖群体进行遗传多样性评价, 获得家系间和家系内的差异, 为凡纳滨对虾遗传育种工作提供技术支持。【方法】采用 AFLP 分子标记技术, 对抽查的凡纳滨对虾 35 个家系共计 350 个样品进行遗传多样性分析, 统计多态性条带, 应用 Popgene Version 1. 31、Arlequin Version 3. 1、Mega 3. 1 软件, 计算各家系的 Shannon 指数、遗传分化系数 F_{st} 及基因流 N_m 等遗传参数, 采用 UPGMA 法, 根据 Nei's 遗传距离绘制家系间的聚类分析图。【结果】筛选的 10 对选择性引物共扩增出 312 个可用于分析的位点, 其中多态性位点 162 个, 占总标记数的 51. 92%; 凡纳滨对虾各个家系的多态位点百分率和 Shannon 指数分别为 12. 50%~32. 69% 和 0. 068 3~0. 181 7。所有家系中, 有 36. 38% 的变异存在于家系间, 有 63. 62% 的变异为家系内的遗传变异, 遗传分化系数 F_{st} 为 0. 363 8, 基因流 N_m 为 0. 937 2。【结论】凡纳滨对虾群体遗传多样性较为丰富, 具备一定的选择潜力, 在传代过程中已经形成了各自相对独立的遗传体系, 可以根据亲缘关系, 选择利用其中的个体作为育种材料。

【关键词】 凡纳滨对虾; AFLP; 遗传多样性

【中图分类号】 S966. 12⁺9. 6

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)11-0043-06

AFLP analysis of genetic diversity of shrimp *Litopenaeus vannamei*

XUE Shu-wen¹, LIU Xiao-lin¹, LI Xi-lian¹, ZHANG Qiong¹,
HUANG Hao², XIANG Jian-hai³

(1 Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Nanjiang Marine Biotechnology Company Limited, Sanya, Hainan 572000, China; 3 Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract: 【Objective】The study was done to evaluate the genetic diversity of cultured *Litopenaeus vannamei* in order to provide a technical basis for inheritance breeding work. 【Method】Amplified fragment length polymorphism(AFLP) technique has been used to analyze the genetic variation among a total of 350 individuals representing 35 families of *L. vannamei*. The number of polymorphic loci was counted. Popgene Version 1. 31, Arlequin Version 3. 1 and Mega 3. 1 were taken to calculate the genetic diversity index of the families of Shannon's genetic diversity index and the genetic differentiation index of F_{st} . Cluster analysis was performed between 350 individuals of 35 families using UPGMA method based the Nei's distance. 【Result】Ten pairs of selective primers produced 162 polymorphic markers out of 312 bands amplified. The percentage of polymorphic loci was 51. 92%. The percentage of polymorphic loci and Shannon index among

* [收稿日期] 2010-04-09

[基金项目] 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2006AA10A406); 中国科学院实验海洋生物学开放课题(Kf201002, Kf200703)

[作者简介] 薛姝雯(1983—), 女, 陕西蓝田人, 在读硕士, 主要从事水生生物遗传资源学研究。E-mail: takethere@126. com

[通信作者] 刘小林(1961—), 男, 陕西城固人, 教授, 博士生导师, 主要从事水生生物遗传资源学研究。

E-mail: liuxiaolin@nwsuaf. edu. cn

families was between 12.50%—32.69% and 0.068 3—0.181 7. AMOVA(Analysis of molecular variance) showed that 63.62% of genetic variation resided within families, while 36.38% of genetic variation resided between families, representing the genetic differentiation index of F_{st} 0.363 8. Via F_{st} , the N_m 0.937 2. 【Conclusion】 The *Litopenaeus vannamei* for examination was on a high level of genetic diversity, and had some indeed selective capacity. F_{st} showed that the most genetic variation resided within families, N_m showed that limited gene flowing was the main cause of the genetic variation, which indicated the whole 35 families formed a relatively independent system during breeding. The cluster analysis declined the evolution relationship among families, which could provide a basis for the future breeding work.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; AFLP; genetic diversity

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又称南美白对虾,自然分布于中、南美太平洋沿岸水域。与国内其他养殖对虾相比,凡纳滨对虾具有肉质鲜美、繁殖周期长、对水环境因子变化的抗逆能力强、离水存活时间长、生长快等优点,在对虾渔业及养殖工业中占有重要地位,是西半球最重要的养殖品种^[1],也是当今世界养殖对虾产量最高的三大品种之一^[2]。自 20 世纪 90 年代中期引进以来,已成为我国重要的海水养殖品种。

有关对虾的遗传育种工作起步较晚,但由于各种生物技术的迅猛发展,目前研究步伐明显加快。王霞等^[3]利用 7 个微卫星标记分析了 6 个凡纳滨对虾家系的亲本及其后代的基因型分离情况,7 个微卫星座位的累计排除概率为 0.99,且在有亲本存在的情况下,能够将 6 个家系分开,在育种选择中可以起到指导作用。Ricardo 等^[4]用 DNA 微卫星标记评价了凡纳滨对虾养殖群体的遗传结构和遗传多样性,并且估计了其近交水平,以便及时地引入杂交育种,制止当地由于近交引起的品质衰退。目前对凡纳滨对虾遗传多样性的分析方法主要有微卫星、限制性片段长度多态性(RFLP)和随机扩增 DNA 多态性分析(RAPD),而使用扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)方法的研究尚鲜有报道。

AFLP 是基于 PCR 扩增选择基因组 DNA 限制性酶切片段的一项 DNA 指纹技术^[5],可以在对研究对象基因组序列了解甚少的情况下,利用少量引物检测到大量的有效位点进行分析^[6]。该方法具有稳定性好,重复性及可比性强,标记的检测经济、快捷、有效且无需预知基因组的序列信息,易于自动化分析等优点。目前,AFLP 已经应用于水生动物遗传多样性分析^[7-8]、基因的表达与调控研究^[9]、遗传连锁图谱的构建^[10]等方面。本研究利用 AFLP 标记技术,研究了凡纳滨对虾 35 个家系养殖群体的遗

传变异水平,旨在从家系水平,以分子生物学手段分析凡纳滨对虾的遗传多样性,以期为进一步开展的凡纳滨对虾遗传育种研究提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用凡纳滨对虾于 2009-04 取自海南南疆生物技术有限公司板桥基地。该基地的养殖群体为本地来源的亲虾和引自美国夏威夷的凡纳滨对虾,经人工建立家系选择育种得到的第 6 代个体^[11]。共采集 35 个家系,每个家系随机采样 10 个个体,共 350 个个体,−80 ℃ 冷冻后空运至实验室,−20 ℃ 保存备用。对虾平均体长 12.31 cm,平均体质量 14.31 g。

1.2 基因组 DNA 的提取

凡纳滨对虾的 DNA 提取和定量方法参考刘萍^[12]的方法,提取的 DNA 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,并制成终质量浓度为 50 ng/μL 的模板 DNA 备用。

1.3 AFLP 反应

AFLP 反应参照 Vos 等的方法^[5],并稍作改动。

1.3.1 基因组 DNA 的双酶切和接头设计 限制性内切酶选用 *EcoR* I 和 *Mse* I (购自 Fermentas 公司)。引物及接头由上海捷瑞生物工程有限公司合成。选择性扩增 6 种 *EcoR* I 引物和 6 种 *Mse* I 引物,共 36 种引物组合,引物序列见表 1。

酶切体系为:模板 DNA 4 μL,酶切 Buffer (10×)4 μL, *EcoR* I 0.2 μL, *Mse* I 0.2 μL,超纯灭菌水定容至 40 μL。

连接体系为:酶切样品 15 μL, T4 Buffer (10×) 2.5 μL, *EcoR* I Adaptor (2.5 pmol/L) 2.0 μL, *Mse* I Adaptor (25 pmol/L) 2.0 μL, T4 DNA Ligase 2 U,超纯灭菌水定容至 25 μL。

1.3.2 限制性片段的预扩增及选择性扩增 预扩

增体系为:酶切连接产物 4 μL, dNTP (10 mmol/mL)0.4 μL,引物 E(10 pmol/μL) 0.6 μL,引物 M(10 pmol/μL)0.6 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL, PCR Buffer(10×)2.5 μL,超纯灭菌水定容至 25 μL。扩增程序为:95 ℃ 2 min,95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 10 min,30 个循环。预扩增产物稀释 20 倍后进行选择性扩增。

选择性扩增 PCR 体系为:预扩增稀释液 2 μL, dNTP(10 mmol/mL)0.2 μL,引物 E(10 pmol/μL) 0.3 μL,引物 M(10 pmol/μL)0.3 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.1 μL, PCR Buffer(10×)1.25 μL,

超纯灭菌水定容至 8.35 μL。扩增程序为:95 ℃ 2 min,95 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,然后,退火温度为每一个循环降低 0.7 ℃,共 13 个循环;之后继续 95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,扩增 30 个循环。

根据预试验结果,从中筛选重复性较好、多态性较高的 10 对引物组合进行扩增反应。这 10 对引物组合分别为:E1M1、E2M2、E2M3、E2M4、E3M2、E3M3、E4M3、E4M4、E5M3、E6M4。

1.3.3 扩增产物的凝胶电泳 扩增产物在 80 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶上进行恒功率电泳,参照文献 [13]进行银染,拍照、记录并分析。

表 1 AFLP 选择性扩增引物序列

Table 1 Selective amplification primer sequences of AFLP

<i>Eco</i> R I 引物 Primer <i>Eco</i> R I	序列 Sequence	<i>Mse</i> I 引物 Primer <i>Mse</i> I	序列 Sequence
E1	GAC TGC GTA CC AATTC AGG	M1	GAT GAG TCC TGAG TAA CTA
E2	GAC TGC GTA CC AATTC ACT	M2	GAT GAG TCC TGAG TAA CAA
E3	GAC TGC GTA CC AATTC AGA	M3	GAT GAG TCC TGAG TAA CTG
E4	GAC TGC GTA CC AATTC AAG	M4	GAT GAG TCC TGAG TAA CAG
E5	GAC TGC GTA CC AATTC AAT	M5	GAT GAG TCC TGAG TAA CCA
E6	GAC TGC GTA CC AATTC ATG	M6	GAT GAG TCC TGAG TAA CAC

1.4 数据统计与分析

根据电泳图谱扩增条带的有无,每个 DNA 谱带记为 1 个单位,在同一位点,如果有带记为“1”,无带则记为“0”。对于试验所涉及的所有样本个体,统计所有迁移率不同的条带记录总数,其中个体间有差异的条带数计入多态性条带总数;以确定的多态性条带为基准,比对各个样本个体,统计个体多态性条带数,各家系所有样本个体多态性条带数总和计入家系多态性条带数。

采用 Popgene Version 1.31^[14] 软件,对全部家系的所有个体以及各个家系的个体,分别计算多态位点百分率、Shannon 指数、Nei’s 遗传距离等参数。利用 Arlequin Version 3.1^[15] 软件,对所有家系进行 Analysis of Molecular Variance(AMOVA)分析,得到遗传分化系数 F_{st} ,并根据 $F_{st}=1/(4Nm+1)$ 计算基因流 Nm 。利用 Mega 3.1^[16] 软件,根据 Nei’s 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾的遗传参数

采用 10 对 AFLP 引物组合,对 35 个凡纳滨对虾选育家系的 350 个个体进行比较分析,共得到 312 个可用于分析的位点,其中 162 个位点呈现出多态性,占总标记数的 51.92%,平均每对引物扩增

的 DNA 片段数为 31.2 条,多态位点百分率在 12.50%~32.69%,Shannon 指数在 0.068 3~0.181 7(表 2),不同家系间的遗传参数表现出了较为明显的差异。

2.2 凡纳滨对虾的分子变异分析

将 35 个家系作为 35 个独立群体,利用 Arelquin 3.1 软件进行 AMOVA 分析。结果(表 3)显示,总遗传变异中有 36.38% 的变异存在于家系间,家系内的遗传变异为 63.62%,由此可知,遗传分化系数 $F_{st}=0.363 8$,说明选育群体的遗传变异大部分来源于群体内个体间的遗传差异。

通过遗传分化系数 F_{st} 可以得出凡纳滨对虾家系间基因流 $Nm=\frac{1}{4F_{st}}-\frac{1}{4}=0.937 2$,表明有限的基因流是促使群体发生遗传分化的主要原因。

2.3 凡纳滨对虾的遗传聚类分析

根据计算出的 Nei’s 遗传距离可知,家系间的遗传距离介于 0.035 9~0.087 3。应用 Mega 3.1 软件,以遗传距离为基础绘制 35 个家系的遗传关系聚类图(图 1),更为清晰直观地表明了各个家系之间的遗传关系。在选择育种过程中,可以此为依据,结合经济性状合理筛选亲本虾苗进行繁殖,以防近交衰退。

表 2 凡纳滨对虾遗传多样性的 AFLP 分析结果

Table 2 AFLP analysis of genetic diversity among *L. vannamei*

家系 Family	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态位点 百分率/% PPB	Shannon 指数 Shannon index	家系 Family	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态位点 百分率/% PPB	Shannon 指数 Shannon index
H1	50	16.03	0.080 9	J3	50	16.03	0.088 0
H2	39	12.50	0.068 3	J4	42	13.46	0.074 4
H3	55	17.63	0.097 7	J7	50	16.03	0.096 2
H4	53	16.98	0.090 1	J9	61	19.55	0.107 8
H5	45	14.42	0.079 1	L1	47	15.06	0.085 2
H6	44	14.10	0.081 1	L2	56	17.95	0.104 0
H9	46	14.74	0.087 2	M1	71	22.76	0.125 2
H10	61	19.55	0.105 9	M2	50	16.03	0.081 1
I3	56	17.95	0.102 1	M3	69	22.12	0.121 5
I4	60	19.23	0.107 2	M4	62	19.87	0.109 0
I5	55	17.63	0.101 1	M5	73	23.40	0.128 7
I6	52	16.67	0.090 2	M7	45	14.42	0.081 4
I7	70	22.44	0.117 2	M8	102	32.69	0.181 7
I8	53	16.99	0.098 7	M9	71	22.76	0.125 4
I9	64	20.51	0.108 2	N2	64	20.51	0.113 2
I10	60	19.23	0.105 9	N3	54	17.31	0.095 5
J1	57	18.27	0.102 7	N5	46	14.74	0.086 3
J2	44	14.10	0.080 0	总计 Total	162	51.92	0.215 9

表 3 凡纳滨对虾的分子变异分析(AMOVA)

Table 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) of *L. vannamei*

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	占总遗传变异的比例/% Percentage of variation	<i>P</i>
家系间 Among populations	32	12.567	0.101 54	36.38	<0.001
家系内 Within populations	317	32.963	0.177 58	63.62	<0.001
总计 Total	349	45.530	0.279 12		

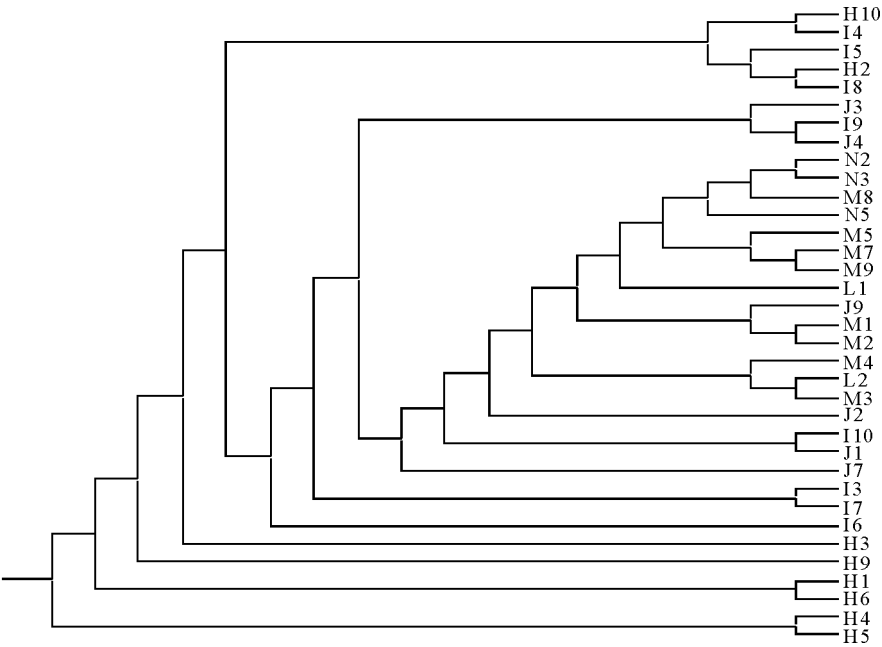


图 1 凡纳滨对虾 35 个家系 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类结果

Fig. 1 UPGMA tree of 35 families of *L. vannamei* based on Nei's genetic distance

3 讨 论

我国的凡纳滨对虾养殖规模与产量已经达到了一定水平,是目前市场对虾业主流的销售品种,从引种选育至今,已经形成了一套较为完善的养殖技术,但国内对于这一优良养殖品种的遗传育种和遗传资源学研究还亟待深入。选择具有一定代表性的凡纳滨对虾群体进行遗传分析,是进行种质改良和繁育的重要理论和技术基础。

颀晓勇等^[17]对凡纳滨对虾 6 个养殖群体的遗传多样性进行了 AFLP 比较分析,发现进口凡纳滨对虾群体遗传多样性水平高于本地群体,平均多态位点百分率为 58.12%~78.79%。李锋等^[18]对 2 个凡纳滨对虾亲本群体进行了 RAPD 研究,发现 2 个亲本的遗传多样性存在较大差异,其多态位点百分率分别为 61.54%和 50.52%。孟鹏等^[8]对中国对虾 40 个家系 200 个样本,采用 10 对 AFLP 选择性扩增引物共扩增出 307 个条带,多态位点百分率为 61.56%。本研究在预试验中,从 36 对引物组合中筛选出 10 对多态性较高、稳定性较好的引物组合,共对 35 个家系 350 尾凡纳滨对虾个体利用 AFLP 技术进行了扩增,多态位点百分率为 51.92%,结果较为理想,可以有效地用于凡纳滨对虾群体的遗传多样性分析。

在遗传多样性研究中,一般以遗传距离、Shannon 指数等指标来判定遗传多样性水平的丰富程度。本研究结果表明,凡纳滨对虾家系间的 Shannon 指数为 0.068 3~0.181 7,Nei's 遗传距离为 0.035 9~0.087 3,这与李锋等^[18]得到的结果较为一致。本研究所有样品均为随机取样,且养殖基地各家系均在池塘饲喂,对水环境有严格要求,基本上可以保证取样策略不会对遗传变异程度造成较大影响;且本研究每个家系取 10 个个体,取样数目相对丰富,能满足基本的统计分析要求,因此对于种群遗传多样性水平的影响不大。

遗传分化系数 F_{st} 反映了种间遗传分化的程度,是分析遗传结构的主要指标之一,常用于评价种间遗传变异的来源。按照理论, F_{st} 介于 0~0.05 可以认为群体间遗传分化较弱,介于 0.05~0.15 表示群体遗传分化中等,介于 0.15~0.25 表示群体遗传分化较大,当 F_{st} 大于 0.25 时,则表示遗传分化很大^[19]。本研究结果表明,36.38%的变异存在于家系间,家系内的遗传变异占总变异的 63.62%,即遗传分化系数 F_{st} 为 0.363 8,说明凡纳滨对虾的遗

传变异主要来自于家系内的不同个体之间,遗传分化很大,这与童馨等^[20]的研究结果一致,表明在多次的人工养殖和选育中还未发生严重的近交,但可能由于人工选择导致等位基因频率的改变,从而引起凡纳滨对虾群体遗传多样性的改变,不同家系的凡纳滨对虾群体在传代过程中已经各自形成了遗传上相对独立的体系。目前,我国南方海域养殖的一些凡纳滨对虾群体已经较好地完成了进口良种的本地驯化过程,在以后的生产中可以将其作为育种材料,以达到降低进口成本和有效利用资源的目的。

基因流是指基因在种内以及种间的移动现象,是影响群体内部和群体之间遗传变异程度的重要因素^[21]。同时,基因流和突变也是将新的遗传因素带到某一群体仅有的 2 种方式,所以在研究群体遗传结构时,对群体的基因流进行考察非常必要。王长忠等^[22]对长江下游地区 4 个克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)群体的遗传多样性状况进行本底调查认为,基因流 N_m 在不同群体间表现出差异,可以客观反映两群体的基因交流情况。本研究根据理论分析认为,凡纳滨对虾各个家系间的基因流动较小,有限的基因流是促使群体发生遗传分化的主要原因^[23]。这可能是由于本研究的供试材料为人工选择产生的家系,在家系繁育过程中只取生长快、长势好的个体为亲本,因此在一定程度上限制了交配范围,使可能由于近交产生的孱弱个体被淘汰,而使种内遗传变异增大。同时,根据聚类分析的结果,利用远源优势,选择亲缘关系较远的家系进行杂交,也可以在一定程度上改善子代的品质,提高其经济利用价值。

4 结 论

AFLP 技术可以很好地应用于凡纳滨对虾的遗传多样性研究中,多态信息较为丰富。本研究的不同凡纳滨对虾家系已经分化形成了相对独立的遗传体系,可以根据亲缘关系远近选择利用其中的家系个体作为育种材料,降低成本,提高经济价值。

[参考文献]

- [1] Dawn M, Xu Z K, Gladys Z, et al. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, penaeus (*Litopenaeus vannamei*) [Crustacea: Decapoda] [J]. Marine Biotechnology, 2003, 5: 311-330.
- [2] 吴琴瑟. 虾蟹养殖高产技术 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 1992: 16-19.
- Wu Q S. Shrimp crab cultivation high yield technology [M].

- 2nd ed. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1992: 16-19. (in Chinese)
- [3] 王 霞, 刘小林, 张继泉, 等. 微卫星用于凡纳滨对虾育种过程中亲权分析及遗传多样性的变化监测 [J]. 水产学报, 2009, 33(5): 832-839.
- Wang X, Liu X L, Zhang J Q, et al. Kinship analysis and genetic variation monitoring in *Litopenaeus vannamei* breeding program using microsatellite DNA markers [J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(5): 832-839. (in Chinese)
- [4] Ricardo P E, Fidencio H M, Pedro C. Genetic diversity status of White shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* broodstock in Mexico [J]. Aquaculture, 2009: 44-50.
- [5] Vos P, Hogers R, Kuiper M, et al. AFLP: a new technique for DNA finger printing [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [6] 岳志芹, 王继伟, 孔 杰, 等. 用 AFLP 方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异 [J]. 水产学报, 2005, 29(1): 13-19.
- Yue Z Q, Wang J W, Kong J, et al. AFLP analysis of four selected generations on disease-resistance trait of *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(1): 13-19. (in Chinese)
- [7] 符 云, 钟金香, 张汉华, 等. 罗非鱼 3 个养殖群体的遗传多样性及特异性 AFLP 标记研究 [J]. 南方水产, 2008, 4(6): 50-55.
- Fu Y, Zhong J X, Zhang H H, et al. Genetic diversity and specific AFLP bands in three cultured tilapia strains [J]. South China Fisheries Science, 2008, 4(6): 50-55. (in Chinese)
- [8] 孟 鹏, 刘晓敏, 孔 杰, 等. 中国对虾家系水平遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 海洋水产研究, 2008, 29(3): 21-26.
- Meng P, Liu X M, Kong J, et al. AFLP analysis of family level genetic diversity of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Marine Fisheries Research, 2008, 29(3): 21-26. (in Chinese)
- [9] Amy L R, Danny L, Luo R, et al. Genes dependent on zebra fish cyclops function identified by AFLP differential gene expression screen [J]. Genesis, 2000, 26(1): 86-97.
- [10] Stephen S M, Vicki W, Gerard P D, et al. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. Aquaculture, 1999, 173: 19-32.
- [11] 陈 锚, 吴长功, 相建海, 等. 凡纳滨对虾的选育与家系建立 [J]. 海洋科学, 2008, 32(11): 5-8.
- Chen M, Wu C G, Xiang J H, et al. Selective breeding and pedigree foundation of *Litopenaeus vannamei* [J]. Marine Sciences, 2008, 32(11): 5-8. (in Chinese)
- [12] 刘 萍. 中国对虾黄渤海中国沿岸种群遗传多样性的研究 [D]. 青岛: 青岛海洋大学, 1998.
- Liu P. Genetic diversity analysis in two Huang-Bo sea stock families of *Penaeus chinensis* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 1998. (in Chinese)
- [13] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 8.
- Sambrook J, Russell D W. Molecule clone experiment guide [M]. Translated by Huang P T, Jin D Y, Li M F, et al. 3rd edition. Beijing: Science Press, 2002: 8. (in Chinese)
- [14] Francis C Y, Rong C Y. Popgene Version 3. 1; Microsoft window-based freeware for population genetic analysis [CP]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [15] Laurent E, Guillaume L, Stefan S. Arlequin Version 3. 1; An integrated software package for population genetics data analysis [CP]. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2006.
- [16] Sudhir K, Koichiro T, Masatoshi N. Mega 3. 1; Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [17] 颜晓勇, 苏天凤, 陈 文, 等. 凡纳滨对虾 6 个养殖群体遗传多样性的比较分析 [J]. 南方水产, 2008, 4(6): 42-49.
- Jie X Y, Su T F, Chen W, et al. Analysis on genetic diversity of six cultured stocks of *Litopenaeus vannamei* [J]. South China Fisheries Science, 2008, 4(6): 42-49. (in Chinese)
- [18] 李 锋, 刘楚吾, 林继辉. 两个凡纳滨对虾亲本群体的 RAPD 研究 [J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(4): 1-5.
- Li F, Liu C W, Lin J H. Genetic diversity analysis of two groups of primary parents of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2003, 23(4): 1-5. (in Chinese)
- [19] Sewall Wright. Evolution and the genetics of population [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1984.
- [20] 童 馨, 龚世圆, 喻达辉, 等. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 不同世代养殖群体的遗传多样性分析 [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(2): 214-220.
- Tong X, Gong S Y, Yu D H, et al. Genetic diversity of cultured pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) stocks of different generations in China [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(2): 214-220. (in Chinese)
- [21] 曲若竹, 吕红丽, 侯 林. 群体遗传结构中的基因流 [J]. 遗传, 2004, 26(3): 377-382.
- Qu R Z, Lü H L, Hou L. The gene flow of population genetic structure [J]. Hereditas, 2004, 26(3): 377-382. (in Chinese)
- [22] 王长忠, 李 忠, 梁宏伟, 等. 长江下游地区 4 个克氏原螯虾群体的遗传多样性分析 [J]. 生物多样性, 2009, 17(5): 518-523.
- Wang C Z, Li Z, Liang H W, et al. Genetic diversity in four *Procambarus clarkii* populations in the lower reaches of the Yangtze River [J]. Biodiversity Science, 2009, 17(5): 518-523. (in Chinese)
- [23] Sewall Wright. The genetical structure of populations [J]. Annals of Eugenics, 1951, 15: 323-354.