

文章编号:1000-0615(2004)04-0365-06

剑尾鱼 RW-H 近交系的遗传结构分析

李 霞^{1,2}, 白俊杰¹, 吴淑勤¹, 叶 星¹, 李凯彬¹, 潘厚军¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 上海水产大学生命与科学技术学院, 上海 200090)

摘要:筛选 31 条随机引物对剑尾鱼的第 8 代近交 RW-H 系 A、B、C 3 窝共 11 尾剑尾鱼个体基因组 DNA 进行 RAPD 扩增, 计算近交系个体间及不同窝间的相似系数及遗传距离。结果筛选的 31 条引物共扩增出 383 条带, 扩增片段的大小在 0.2~3kb。其中多态性带 30 条, 多态性带频率在 0~58.33%, 平均为 7.83%。近交系剑尾鱼不同个体拥有相同条带的比率较高。计算得到近交系的平均相似系数(S)为 0.9829(0.9716~0.9960), 平均等位基因频率(\bar{q})为 0.8692, 最低平均杂合率(\bar{H})为 0.1308。同时, 用 5 个微卫星标记对非选育剑尾鱼和近交系 RW-H 系的基因组进行分析, 检测等位基因的个数和大小, 结果 5 个微卫星座位在非选育剑尾鱼中显示为多态, 而在近交系 RW-H 系除 1 个位点出现等位基因外, 其余均为纯合子, 计算得到近交系的平均遗传相似系数为 0.9345, 两种方法均证明近交 RW-H 系第 8 代剑尾鱼有较高的遗传纯合度。

关键词: 剑尾鱼; 近交系; 遗传结构; 随机扩增多态 DNA; 微卫星

中图分类号: S917 文献标识码: A

Genetic structure analysis of *Xiphophorus helleri* RW-H inbred strain

LI Xia^{1,2}, BAI Jun-jie¹, WU Shu-qin¹, YE Xing¹, LI Kai-bin¹, PAN Hou-jun¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Swordtail fish (*Xiphophorus helleri* Heckel, 1848) is a kind of small-scaled tropic freshwater fish, which has many characteristics suitable for laboratory animals such as short propagation period, strong reproductive capacity and easy to breed. To date several inbred strains have been obtained by Pearl River Fisheries Research Institute, CAFS. Among the strains, RW-H strain has been inbred into the 11th generation. Researches indicated that this strain is more suitable for genetics, toxicology study and establishment of disease models because of some merits. Genetic purity is one of the most important indices for laboratory animals. So in this paper, RAPD and microsatellite markers were used to analyze the genetic purity of swordtail (*Xiphophorus helleri*) RW-H inbred strain for directing the breeding of swordtail as laboratory animal. About RAPD, 31 selected single primers were used to amplify genomic DNA of the inbred strain of swordtail. The amplified fragment bands were analyzed to calculate the similarity index and the genetic distance. 383 bands with the lengths between 200bp and 3kb were obtained, among them there were 30 polymorphic bands, the frequency of polymorphic bands was between 0-58.33% and the average was 7.83%. There was a high frequency of

收稿日期: 2003-01-31

资助项目: 国家公益研究专项资金资助项目(34043)和广东省重点项目(2KB07701T)

作者简介: 李霞(1977-), 女, 山东招远人, 硕士研究生。主要从事水产动物医学和鱼类分子遗传学研究

通讯作者: 吴淑勤(1956-), 女, 福建厦门人, 研究员, 主要从事鱼类免疫、水产药物评价和水生实验动物研究。Tel: 020-81616813,

E-mail: sqwxm@163.net

common band in different individuals. Based on RAPD patterns, the calculated similarity index within 11 samples of the inbred strain was 0.9829(0.9716 - 0.9960), the mean allelic frequency was 0.8692, and the minimum heterozygosity was 0.1308. At the same time, 5 microsatellite markers were used to analyze wild and inbred swordtail genomic DNA. The results showed that the wild was in polymorphism while inbred strain was in monomorphism except for one locus that displayed two alleles. The similarity index of inbred strain calculated from microsatellite analysis was 0.9345. Both results from RAPD and microsatellite methods indicate that the inbred strain of swordtail RW - H strain has reached a high degree of genetic purity.

Key words: *Xiphophorus helleri*; inbred strain; genetic structure; RAPD; microsatellite

剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)具有体型小、繁殖周期短、繁殖力强、易饲养等特点。20世纪80年代起,中国水产科学研究院珠江水产研究所开始对剑尾鱼进行实验动物化培育,目前RR - B(红眼红体)近交系已培育达22代,RW - H系(红眼白体)也已近交培育达11代。研究表明,剑尾鱼在水环境污染监测、动物疾病模型建立及遗传学研究等方面已初步显示出较好的应用前景^[1-3]。其中红眼白体色的RW - H品系作为实验动物有以下优点:1)实验证明该品系对多种药物比其它品系敏感,是毒性实验和水体污染监测的好材料;2)由于体色为白色,可以直观地观察到某些病变,有利于水产动物疾病模型的建立;3)红眼和白体的基因均为隐性基因,对于水生动物遗传和变异的研究具有重要的应用价值,是重点培育的水生实验动物品系之一。遗传纯度是纯系培育的基础,也是实现标准实验动物的一项主要指标,从分子水平测定其遗传纯度具有重要的意义。随机扩增多态DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)自1990年Williams等^[4]提出以来,在动物、植物和微生物种属鉴定,亲缘关系划分,种群多态性分析及遗传图谱的构建中得到广泛应用^[5-8]。在近交系的纯合度检测方面,有对小鼠、猪、牛等近交系的研究报道^[9],但对鱼类的报道甚少^[10]。微卫星(microsatellite)是近年来发展起来的一种分子标记,以少数几个核苷酸(一般为2~5个)为单位多次串联重复的DNA序列,以双核苷酸重复最为常见。微卫星具有十分丰富的多态性,目前它作为多态DNA标记在群体进化研究、核基因组研究、遗传连锁分析和进行基因组作图及基因定位等方面已得到广泛应用^[11-13],同时也是遗传背景分析(家系、家谱分析)、群体遗传结构和遗传纯度分析的有效手段^[14-16]。为了检测RW - H系的遗传纯度,本实验采用RAPD技术和

微卫星标记对剑尾鱼基因组DNA进行分析,测定该品系第8代不同窝别和个体的平均遗传相似系数和遗传距离,为剑尾鱼实验动物化的培育工作和相关研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

检测用近交系剑尾鱼11尾(雌6尾,雄5尾)来自珠江水产研究所水生实验动物培育基地,由第8代近交系(红眼白体的RW - H系)的3窝(A、B、C窝)鱼中随机挑取,其中A窝和B窝各4尾,C窝3尾;用于引物筛选的剑尾鱼6尾,是从市面购买的观赏用鱼(以下称非选育剑尾鱼)。

1.2 试剂

10× Buffer、Taq酶、MgCl₂、dNTP和随机引物均为上海生工公司产品。Wizard基因组DNA提取与纯化试剂盒购自Promega公司。限制性内切酶、T4 DNA连接酶及相关试剂购自Promega公司或华美生物工程公司。Agarose Gel DNA Extraction Kit和Wizard DNA Purification System分别为ROCH和Promega公司产品。引物(AC)₇、(GT)₇重复序列和微卫星引物由上海生工公司合成。大肠杆菌DH5α和质粒pUC18由本实验室保存。

1.3 剑尾鱼基因组DNA样品的制备

取肝脏20mg,用Wizard基因组DNA提取与纯化试剂盒介绍的方法提取基因组DNA。电泳检测DNA的完整性和纯度并估计其浓度,4℃冰箱保存备用。

1.4 近交系的RAPD分析

1.4.1 随机引物的筛选 随机引物80条(编号为S61-100, S461-480, S501-520)购自上海生工公司,通过对非选育剑尾鱼的RAPD分析,筛选多态性丰富稳定的引物31条应用于本实验(引物

编号和序列见表 1)。

1.4.2 PCR 扩增与电泳检测 方法见文献 [10]。

1.4.3 数据分析 相似系数(S)的计算:RAPD 图谱中近交系不同个体间的相似系数根据下列公式计算^[10]: $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中, N_x 和 N_y 分别为两个体 x 和 y 扩增的总带

数, N_{xy} 为两个体 x 和 y 共有带数), 平均相似系数(\bar{S})通过对个体间的相似系数简单平均而求得。任意两个体间的遗传距离(D)根据两个体的相似系数(S)来计算, 即 $D = 1 - S$ 。

平均等位基因频率(\bar{q})和最低平均杂合率(\bar{H})的计算: $\bar{q} = 1 - \sqrt{1 - \bar{S}}$, $\bar{H} = \sqrt{1 - \bar{S}}$

表 1 31 条引物对 11 尾近交系剑尾鱼基因组 DNA 的扩增结果
Tab.1 RAPD results in 11 inbred swordtail fish by 31 single primers

引物 primer	序列 sequence	条带总数 total of bands	多态性条带数 number of poly-morphic bands	多态性条带频率(%) frequency of poly-morphic bands
S62	GTGAGGCGTC	13	1	7.69
S65	GATGACCGCC	12	0	0
S68	TGGACCGGTG	11	0	0
S72	TGTCATCCCC	8	0	0
S73	AAGCCTCGTC	5	0	0
S76	CACACTCCAG	12	5	41.67
S77	TTCCCCCAG	17	3	17.65
S81	CTACGGAGGA	14	1	7.14
S82	GGCACTGAGG	9	0	0
S86	GTGCCTAACC	11	1	9.09
S87	GAACCTGCGG	15	0	0
S88	TCACGTCCAC	10	1	10.00
S91	TGCCCGTCGT	18	0	0
S92	CAGCTCACGA	16	0	0
S95	ACTGGGACTC	11	1	9.09
S97	ACGACCGACA	18	1	5.56
S461	GTAGCACTCC	14	0	0
S462	TCGGCAGCA	12	0	0
S466	GTGGGCTGAC	6	0	0
S467	GTCCATGCCA	14	2	14.29
S469	GTGGTCCGCA	17	1	5.88
S473	GGAGTGCCTC	14	0	0
S474	CCAGCCGAAC	15	1	6.67
S476	CCAAGCTGCC	9	0	0
S478	GGCTTGGCCT	11	0	0
S501	TGCGGGTCCT	7	0	0
S504	CCCGTAGCAC	12	7	58.33
S509	TGAGCACGAG	14	2	14.29
S511	GTAGCCGTCT	15	0	0
S513	GGACGACAAG	13	2	15.38
S514	CAGGATTCCC	10	1	10.00
总和(total)		383	30	平均(average)7.83

1.5 微卫星标记的筛选和检测

1.5.1 微卫星标记 根据本实验室从剑尾鱼部分基因组文库克隆筛选到的 9 个微卫星克隆中的 3 个微卫星(GenBank 登录号分别为 AY204221、AY204222 和 AY204223)标记, 加上 Seckinger 报道的剑尾鱼属的 2 个微卫星标记(GenBank 登录号

分别为 AF368433 和 AF368430)^[17]共 5 个微卫星为标记用于纯度检测。

1.5.2 设计微卫星引物扩增剑尾鱼基因组 DNA 用表 2 的 5 对微卫星标记引物扩增剑尾鱼基因组 DNA, PCR 产物经 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳。扩增引物序列和退火温度等见表 2。

1.5.3 等位基因频率和遗传相似系数的计算
 据 Nei 氏介绍的方法计算等位基因频率和遗传相似系数,某一等位基因的频率等于该等位基因纯

合子频率加上 1/2 含有该等位基因的杂合子频率。遗传相似系数计算参照以上 RAPD 计算公式。

表 2 微卫星标记及其引物

Tab.2 Microsatellite markers and their primers in swordtail

微卫星座位 locus	引物序列(5'-3') primer sequence	等位基因大小(bp) length variation of alleles	等位基因数 no. of alleles	重复序列 repeat of cloned allele	退火温度(℃) annealing temperature
Y204222	F:TCATTTAIGT CGTCCTTCG R:TTACCAAGCTT CAGATGCAGG	450 ~ 465	2	(TC) ₃ ... (AG) ₃ (GCC) (TC) ₇ CT (TC) _{4.5} ... (TCC) (T) ₄ (CTT) (TCC) ₃ ... (CT) ₃ TG(CT)(T) ₄ (CT) ₂ GT (CT) _{2.5} ... (CA) ₅ ... (CA) ₃ G(CA)GG (CT) _{3.5} A(CA)AA(CA)GGAA(TG) ₃	52
AY204221	F:TGATGTCCAG AGCACCCGT R:GCGCATGGC TGAATTATCTG	380 ~ 420	3	(TA) ₂ CTG(TA) ₈ CA(TA) ₈	58
AY204223	F:GGCTACTGG CTGAGAAGTGT R:AGACCGCCC TAAAGTATTGC	343 ~ 385	3	(A) ₆ (CAAA) AA (CAAA) A (CAAA) ₁₀ ... (AT) ₃ ... (GA) ₃	58
AF368430	F:TCATCTGGAG CAGGCACAIG R:GCGTTTGGT TTCCTACTGAC	265 ~ 285	2	(CA) ₁₅	57
AF368433	F:CCCAGTTTTA TTATTATCAT R:GGAAGAGAT TTTATTATTAT	150 ~ 177	3	(TAA) ₁₀	48

2 结果

2.1 RAPD 检测结果

2.1.1 引物筛选及 PCR 扩增结果 通过对非选育剑尾鱼的 RAPD 扩增,从 80 条随机引物中筛选出 31 条多态性丰富的引物。这些引物对近交系

剑尾鱼个体的基因组 DNA 进行扩增,表明均有良好的扩增结果(部分结果见图 1),共扩增出 383 条带,即检测了 11 尾近交系剑尾鱼的 383 个位点,其中多态性条带 30 条,多态性条带频率在 0 ~ 58.33%,平均为 7.83%(表 1)。扩增片段的大小在 0.2 ~ 3kb。

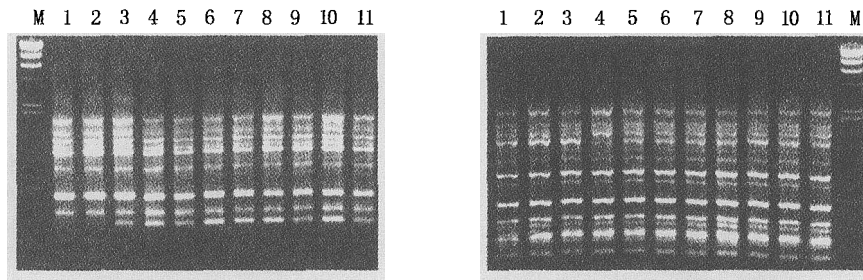


图 1 随机引物对近交系的扩增

Fig.1 Amplified bands of inbred strain

左:引物 S86;右:引物 S92;1-11:近交系的不同个体;M:λDNA/Hind III Marker

left: primer S86; right: primer S92; 1-11: 11 individuals of inbred strain; M: λDNA/Hind III Marker

2.1.2 近交系的遗传纯度 应用 31 条随机引物对近交系剑尾鱼 11 尾个体基因组 DNA 进行扩增,根据 RAPD 谱带计算不同个体间的

相似系数(S)和遗传距离(D)(表 3)。从计算结果看,近交系剑尾鱼的遗传相似系数平均为 0.9829(0.9716 ~ 0.9960),平均等位基因频

率为 0.8692,最低平均杂合率为 0.1308。A 窝和 B 窝间的相似系数(S_{AB})为 0.9840;A 窝和 C 窝间的相似系数(S_{BC})为 0.9797。

表 3 个体间的相似系数和遗传距离

Tab.3 Similarity index and genetic distance among individuals

	A				B				C		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		0.0203	0.0188	0.0147	0.0134	0.0174	0.0256	0.0256	0.0148	0.0203	0.0259
2	0.9797		0.0136	0.0175	0.0202	0.0242	0.0204	0.0217	0.0203	0.0205	0.0233
3	0.9812	0.9864		0.0121	0.0094	0.0120	0.0095	0.0095	0.0202	0.0149	0.0177
4	0.9853	0.9825	0.9879		0.0080	0.0080	0.0162	0.0135	0.0161	0.0176	0.0204
5	0.9866	0.9798	0.9906	0.9920		0.0040	0.0134	0.0134	0.0160	0.0189	0.0244
6	0.9826	0.9758	0.9880	0.9920	0.9960		0.0134	0.0134	0.0160	0.0229	0.0284
7	0.9744	0.9796	0.9905	0.9838	0.9866	0.9866		0.0041	0.0229	0.0150	0.0205
8	0.9744	0.9783	0.9905	0.9865	0.9866	0.9866	0.9959		0.0256	0.0150	0.0178
9	0.9852	0.9797	0.9798	0.9839	0.9840	0.9840	0.9771	0.9744		0.0203	0.0231
10	0.9797	0.9795	0.9851	0.9824	0.9811	0.9771	0.9850	0.9850	0.9797		0.0069
11	0.9741	0.9767	0.9823	0.9796	0.9756	0.9716	0.9795	0.9822	0.9769	0.9931	

注:1~11 为不同个体;A、B、C 为不同窝次;对角线以上为遗传距离,对角线以下为相似系数

Notes:1~11: different individuals; A, B, C: different brood; Numbers above the diagonal are genetic distances and numbers below are similarity index

2.2 微卫星检测结果

5 个微卫星座位的扩增结果见表 2,在非选育剑尾鱼中呈多态,而在 RW-H 近交系除了座位 AF368433 出现两个等位基因外,其它 4 个座位均为单个等位基因纯合,计算得到的等位基因频率

见表 4,平均遗传相似系数为 0.9345。图 2 为座位 AY204223 的引物对非选育扩增出的 3 个等位基因,大小分别为 343bp、370bp、385bp,对近交系扩增的等位基因只有 1 个,大小为 343bp。

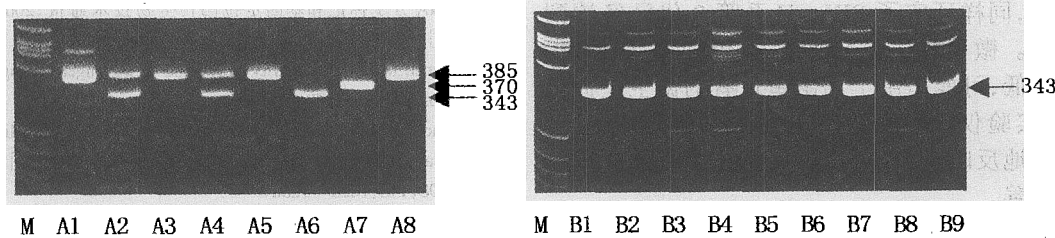


图 2 座位 AY204223 对非选育剑尾鱼和 8 代 RW-H 近交系扩增的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.2 Analysis of PCR products for locus AY204223 amplifying genomic DNA of swordtails

左:A1~A8 为非选育剑尾鱼不同个体;右:B1~B9 为 8 代 RW-H 近交系不同个体); M:Marker pBR322 DNA/Hae III
left: different individuals of wild swordtails; right: different individuals of inbred strain; M: Marker pBR322 DNA/Hae III

表 4 微卫星测定的 RW-H 近交系的等位基因频率

Tab.4 Microsatellite allele frequencies at 10 STR loci in RW-H inbred strain

微卫星座位 locus	等位基因频率 frequencies	微卫星座位 locus	等位基因频率 frequencies
AY204222	a 1.0000	AY204223	a 1.0000
AY204221	a 1.0000	AF368430	a 1.0000
AF368433	a 0.8000 b 0.2000		

3 讨论

RAPD 和微卫星是近年来发展起来的分子标记,前者具有遗传信息丰富、准确度高、可比性强和

易操作等特点;后者则具有分布广泛、多态性丰富、易于检测、呈孟德尔共显性遗传等特点,本实验通过这两种分子标记对剑尾鱼近交系的遗传纯度进行了检测,两种方法测定的结果都表明剑尾鱼 RW-H 系经 8 代近交培育已达到了较高的遗传纯度。

由于水生实验动物标准尚未出台,近交系的标准还未能确定,但根据我国制定的《哺乳类实验动物的遗传质量控制》国家标准,对近交系的定义为“经至少 20 代的全同胞兄妹交配培育而成,品系内所有个体都可追溯到起源于第 20 代或以后代数的一对共同祖先,该品系为近交系”^[18],如果参照这一标准,选育了 8 代的 RW-H 系剑尾鱼还远未达

到近交系的指标。但本实验 RAPD 方法计算的第 8 代 RW-H 系剑尾鱼个体间的相似系数已经达到 0.9829, 已达到了较高的遗传纯度。吴开平等^[9]用 RAPD 方法研究西双版纳小型猪的遗传纯度时得出第 14 代的 JS 亚系的 3 个家系内相似系数分别为 0.9790、0.9478 和 0.9080, 认为已达到所需的遗传纯度。我们曾用同样的方法测定了剑尾鱼近交系 RR-B 系 19 代的遗传纯度, 检测得到其遗传纯度即相似系数为 0.9839^[10], 而 RW-H 系的第 8 代个体间的相似系数已经达到 0.9829, 已超过西双版纳小型猪第 14 代的 JS 亚系的遗传纯度, 与 RR-B 系 19 代的遗传纯度基本相同。这可能跟 RW-H 系的最初来源有关, 由于红眼和白体均为隐性基因(我们的杂交实验进一步证明了这一点), 控制眼色和体色的基因是纯合的, 与其它体色剑尾鱼相比可能纯合度更高, 这可能是选育了 8 代已经有较高遗传纯度的主要原因。因此, 从分子水平上评估近交系的遗传纯度可能会更加准确。

另外, 5 个微卫星标记的遗传检测结果在非选育剑尾鱼中呈多态, 共检测到 13 个等位基因, 平均每个座位 2.6 个; 在近交系中微卫星标记除座位 AF368433 出现两个等位基因外, 其他 4 个座位均为单个等位基因纯合, 计算得到平均遗传相似系数为 0.9345, 同样证实了 RW-H 系第 8 代已经达到高度纯合。微卫星方法计算的遗传纯度比 RAPD 的结果稍低, 可能是由于剑尾鱼现有的微卫星标记很少, 本实验仅检测了微卫星的 5 个座位, 因此还不能很好地反映整体遗传纯度, 相关工作还有待于进一步完善。

RAPD 方法测定了不同窝次之间的遗传差异, 结果表明差异很小, 说明 RW-H 系第 8 代的整个群体遗传结构比较均一, 已基本达到实验动物近交系要求即遗传背景相同, 个体遗传基因及表型高度一致, 遗传质量均一, 有望成为标准的水生实验动物的一个新的品系。

参考文献:

- [1] Wu S Q, Huang Z B, Yu R L, et al. Approach for the application of *Xiphophorus helleri* as experiment animal[A]. Proceeding of the Fourth Asian Fisheries Forum[C], 1995. 101-107.
- [2] Huang Z B, Wu S Q, Shi C B, et al. Study on biological characteristics of swordtail, *Xiphophorus helleri* [J]. J Fish Sci China, 2000, 7(3): 107-109. [黄志斌, 吴淑勤, 石存斌, 等. 剑尾鱼的若干生物学特性研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 107-109.]
- [3] Pan H J, Wu S Q, Li K B, et al. Application of *Xiphophorus helleri* to detection of virulence of fish pathogenic bacteria[J]. J Fish China, 2000, 24(5): 467-471. [潘厚军, 吴淑勤, 李凯彬, 等. 剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用[J]. 水产学报, 2000, 24(5): 467-471.]
- [4] Williams J G, Kubelik A R, Llivak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [5] Williams D J, Kazianis S, Walter R B. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of largemouth bass subspecies and their integrades [J]. Transaction of the American Fisheries Society, 1998, 127: 825-832.
- [6] John H P. A genetic linkage map for zebrafish[J]. Science, 1994, 264: 699-703.
- [7] Negro J J, Torres M J, Godoy J A, et al. RAPD analysis for detection and eradication of hybrid partridges (*Alectoris rufa* × *A. graeca*) in Spain[J]. Biological Conservation, 2001, 98: 19-24.
- [8] Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp [J]. Fish Sci China, 2000, 7(1): 1-5. [孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报)[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 1-5.]
- [9] Wu K P, Wei H, Zeng Y Z. RAPD analysis of *Xishuangbanna miniature pig* inbred JS substrain [J]. Chinese Journal of Laboratory Animal Science, 2000, 10(3): 129-133. [吴开平, 魏泓, 曾养志. 西双版纳小型猪近交 JS 亚系 RAPD 分析[J]. 中国实验动物学杂志, 2000, 10(3): 129-133.]
- [10] Li X, Wu S Q, Bai J J. Analysis of genetic purity of swordtail fish inbred strain by RAPD[J]. Acta Laboratorium Animal Science Sinica, 2003, 11(1): 1-4. [李霞, 吴淑勤, 白俊杰. 剑尾鱼近交系遗传纯度的 RAPD 分析[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(1): 1-4.]
- [11] Zhao S Q, Wu W H. DNA molecular markers and mapping[J]. Biotechnology Information, 2000(6): 1-4. [赵淑清, 武维华. DNA 分子标记和基因定位[J]. 生物技术通报, 2000(6): 1-4.]
- [12] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. Mol Biol Ecol, 1990, 7: 478-484.
- [13] Thomas D K, Lee W J, Halina S, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Genetics, 1998, 148: 1225-1232.
- [14] Zhang X Q, Lv X M, Yang Y H, et al. Population genetic variability of microsatellite polymorphisms and RAPDs in Chinese chicken breeds in Guangdong [J]. Acta Genetica Sinica, 1998, 25(2): 112-119. [张细权, 吕雪梅, 杨玉华, 等. 用微卫星多态性和 RAPD 分析广东地方鸡种的群体遗传变异[J]. 遗传学报, 1998, 25(2): 112-119.]
- [15] Anne R, Nicholas G E, Peter M, et al. Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their ancestral Canadian population: comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation [J]. Aquac, 1999, 173: 459-469.
- [16] Zhang Y P, Wang W, Su B, et al. Microsatellite DNAs and kinship identification of giant panda [J]. Zoological Research, 1995, 16(4): 301-306. [张亚平, 王文, 宿兵, 等. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用[J]. 动物学研究, 1995, 16(4): 301-306.]
- [17] Seckinger J, Brinkmann H, Meyer A. Microsatellites in the genus *Xiphophorus*, developed in *Xiphophorus montezumae* [J]. Molecular Ecology Notes, 2002.
- [18] Chen Z C, Wu D S. Laboratory animal science [M]. Changsha: Hunan Science Technology Publishing House, 2001. 248-252. [陈主初, 吴端生. 实验动物学 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001. 248-252.]