

文章编号: 1000-0615(2017)03-0339-08

DOI: 10.11964/jfc.20140709398

凡纳滨对虾引进群体与养殖群体遗传多样性的AFLP分析

叶宁, 包秀凤, 刘建勇*

(广东海洋大学水产学院, 湛江市海洋生态与养殖环境重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要: 为了解引进群体与国内养殖凡纳滨对虾群体遗传多样性水平, 提高我国凡纳滨对虾种质改良效果, 应用AFLP标记技术对外国引进群体和国内养殖凡纳滨对虾群体的遗传多样性进行分析。采用7对AFLP引物组合对7个群体(4个引进群体, 3个养殖群体) 210个个体进行扩增, 结果发现, 7个群体在100~500 bp共检测到105个位点, 其中多态性位点为90个, 多态位点比例为85.71%。4个引进群体(KONABA、SISMAN、OI、CHAD)的多态性位点百分率分别为62.5%, 57.29%, 61.21%, 61.46%; 3个国内养殖群体(ZX、ZK、GDOU)的多态性位点百分率分别为65.63%, 61.46%, 54.17%。7个群体的平均期望杂合度为0.202, 表明所检测的7个群体均具有较高的遗传多样性。AMOVA分析显示, 51.79%的变异来源于群体间, 群体的平均 Φ_{ST} 值为0.518, 表明凡纳滨对虾群体内遗传多样性非常丰富, 群体间相似性较大, 且存在较强的基因交流。本研究可为我国凡纳滨对虾种质改良提供基础资料。

关键词: 凡纳滨对虾; 遗传多样性; 遗传差异; 扩增片段长度多态性

中图分类号: Q 347; S 917.4

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)具有肉质鲜美、对水环境因子的变化适应能力强及便于运输等优点, 是在中国占绝对优势的养殖对虾品种^[1]。但由于科学良种选育和保种技术体系缺乏、病害检验检疫的松懈和累代养殖等导致我国多代养殖的凡纳滨对虾种质退化严重, 表现为生长缓慢、病害高发及规格参差不齐等现象, 这对我国对虾养殖业的经济效益及可持续发展造成了严重的影响^[1-2]。引进原种或改良现有养殖品种是恢复和优化凡纳滨对虾种质的有效途径, 在品种选育过程中, 必须在掌握群体遗传背景的基础上, 才能充分利用杂种优势加快育种进程, 所以在制定选育计划的同时, 应及时评估已有群体的遗传资源现状^[3]。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术是1992年荷兰科学家Vos等^[4]发明的以DNA双酶切位点为多样性

分析基础的分子生物学技术。AFLP具有信息量大、灵敏度高和多态性丰富及无需了解基因组序列信息等优点, 可以利用少量引物检测到大量的有效位点进行分析^[5]。目前, 利用AFLP标记技术, 已初步构建了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[6]、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)^[7]和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[8]等的遗传连锁图谱, 顾晓勇等^[9]、薛姝雯等^[10]和王豪杰等^[11]分别对凡纳滨对虾6个不同群体、不同家系和4个不同世代群体的遗传多样性进行了评估, 均验证了AFLP标记技术是一种研究群体间遗传多样性非常有效的工具。本实验运用AFLP标记技术分析和探讨了凡纳滨对虾引进群体与国内养殖群体的遗传多样性及遗传差异, 从分子水平上比较了引进群体与国内养殖群体的遗传变异情况, 为下一步凡纳滨对虾种质改良提供基础数据。

收稿日期: 2014-08-05 修回日期: 2015-11-26

资助项目: 广东省科技计划(2010B020201014); 广东省海洋与渔业局海洋渔业推广专项(A200899E04, A201001H05, A201101B05)

通信作者: 刘建勇, E-mail: liujy70@126.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料来源于湛江市海威水产养殖有限公司, 收集于2013年6—8月, 包括4个凡纳滨对虾引进群体[科纳湾群体(KONABA)、迈阿密群体(SISMAM)、夏威夷群体(OI)、泰国正大群体(CHAI)]和国内3个养殖群体[中科一号(ZHONGKE No. 1, 简称ZK)、中兴一号(ZHONGXING No.1, 简称ZX)、广东海洋大学遗传育种中心(GDOU)], 从7个群体中各随机选取30尾, 共210尾, 取虾尾肌肉于无水乙醇中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 实验方法

总DNA的提取、提纯及定量方法 用改良的《分子克隆实验指南》^[12]提取肌肉组织的基因组DNA方法提取虾尾节肌肉组织的基因组DNA。用紫外分光光度计读取基因组DNA在260和280 nm时的OD值, 获取OD260/OD280的比值, 初步判断基因组DNA的纯度和浓度。估算浓度根据公式: $\text{OD}260 \times \text{核酸稀释倍数} \times 0.05$ 进行估算。基因组DNA分装于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

AFLP扩增

(1) *EcoR* I 接头和*Mse* I 接头的合成。用于AFLP预扩增、选择扩增的引物序列、*EcoR* I 接头序列(*EcoR* I -1、*EcoR* I -2)、*Mse* I 接头序列(*Mse* I -1、*Mse* I -2)均由上海生物工程公司合成(表1)。

(2)限制性酶切的PCR反应体系。在200 μL 离心管中加入溶液: 6.0 μL 基因组DNA(50 ng/ μL), 2.0 μL 的 $10 \times$ *Mse* I buffer R(含BSA), *EcoR* I (12 U/ μL)和*Mse* I (10 U/ μL)各0.3 μL , 加灭菌ddH₂O直至20 μL 。PCR程序: 先在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h, 然后在80 $^{\circ}\text{C}$ 灭活酶15 min, 放在冰上简单离心收集。

(3)连接*EcoR* I 和*Mse* I 接头的体系。在200 μL 离心管中加入4.0 μL 的 $10 \times$ T₄DNA ligase buffer, *EcoR* I 接头(5 $\mu\text{mol/L}$)和*Mse* I 接头(50 $\mu\text{mol/L}$)各1.0 μL , 0.4 μL 的T₄DNA ligase (5 U/ μL), 加灭菌双蒸水直至20 μL 。反应程序: 先将以上混合液与酶切产物混合, 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 65 $^{\circ}\text{C}$ 处理10 min 然后将酶切连接产物的一半用作工作液, 置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用, 另一半则置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

(4)预扩增PCR反应体系。在200 μL 离心管中加入2.0 μL 模板(上一步连接产物), 2.0 μL $10 \times$ Taq

表1 用于AFLP预扩增、选择扩增的引物序列、*EcoR*I接头序列(*EcoR* I -1、*EcoR* I -2)、*Mse* I-接头序列(*Mse* I-1、*Mse* I-2)

Tab. 1 Oligonucleotide adaptors and primers used in AFLP analysis

接头或引物 adaptor or primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')
接头 Adaptor	
<i>EcoR</i> I -1	CTGACGCATGGTTAA
<i>EcoR</i> I -2	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>Mse</i> I-1	GACGATGAGTCCTGAG
<i>Mse</i> I-2	TACTCAGGACTCAT
预扩增引物 Primer of preamplification	
<i>EcoR</i> I +1	GACTGCGTACCAATTCA
<i>Mse</i> I +1	GATGAGTCCTGAGTAAC
选择性扩增引物 Primer for selective amplification	
E-ATC	GACTGCGTACCAATTCATC
E-AGG	GACTGCGTACCAATTCAGG
E-ACA	GACTGCGTACCAATTCACA
E-AGT	GACTGCGTACCAATTCAGT
E-AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG
E-AGC	GACTGCGTACCAATTCAGC
M-CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAA
M-CAT	GATGAGTCCTGAGTAACAT
M-CGA	GATGAGTCCTGAGTAACGA
M-CCA	GATGAGTCCTGAGTAACCA
M-CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG
M-CTC	GATGAGTCCTGAGTAACTC

buffer, 1.6 μL 的dNTPs (2.5 mmol/L), *Mse*+C引物(*M*₀)(10 mmol/L)和*Eco*+A引物(*E*₀)(10 mmol/L)各2.0 μL , 0.2 μL 的*Tap* DNA pol(5 U/ μL), 加灭菌双蒸水直至20 μL 。PCR反应程序: 先94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min; 然后经过30个循环, 每个循环包括94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min; 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

(5)电泳与贮存。取5 μL PCR产物用含有溴化乙锭替代物染料(GW)的1.5%琼脂糖凝胶电泳分离, 于LG2020D凝胶成像分析系统检测, 在100~1000 bp范围内会看到亮带; 取10 μL 预扩增产物稀释成工作液(1 : 30)用作下步选择性扩增

的模板(10 μL预扩增产物加入290 μL 1×TE); 剩余的5 μL置于-20 °C冰箱备用。

(6)选择性扩增反应体系。在200 μL离心管中加入2.0 μL预扩增产物(1 : 30稀释), 1.0 μL的10×*Taq* buffer, 0.8 μL的dNTPs (2.5 mmol/L), *Mse*+C引物(M0)(10 mmol/L)和*Eco*+A引物(E₀)(10 mmol/L)各1.0 μL, 0.1 μL的*Taq* DNA pol(5 U/μL), 加灭菌双蒸水直至10 μL。PCR反应程序: 先92 °C预变性2 min; 然后分为2个阶段: 94 °C变性30 s, 从64 °C每个循环降0.7 °C, 退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共12个循环; 接着94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共25个循环; 最后72 °C延伸10 min。

(7)AFLP引物筛选。本实验使用6条*Eco*R I引物和6条*Mse* I引物(表1)组合成36对引物组合。在7个群体中各挑取2个样品的基因组DNA, 共14个样品, 混合成部分基因池作为模板, 分别用36对AFLP引物组合进行选择性的扩增, 从中挑选出7对引物(E-ATC/M-CTC、E-AGT/M-CTC、E-AAG/M-CAA、E-AAG/M-CCA、E-AAG/M-CTC、E-AGC/M-CAT、E-AGC/M-CCA)对所有样品进行AFLP扩增。经8%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 拍照, 保存。

电泳数据分析处理 有条带记为“1”、无条带记为“0”, 根据1和0标记编辑符合程序要求

的输入数据文件, 利用相关遗传分析软件进行种群遗传多样性和遗传结构分析。

采用TFPGA软件^[13]分别计算多态位点百分数(percentage of polymorphic loci)和期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、遗传距离(genetic distance)、相似性系数(coefficient of similarity)。群体间的遗传分化可以用分化指数 F_{ST} 来表示。由于AFLP是显性标记, AMOVA分析通过计算的相似数 Φ_{ST} 来代替。显著性检测是用计算机模拟实验数据1000次后所得的频率分布与原有数据进行比较。运用WINAMOVA软件^[14], 基于1000次随机重置检测检验显著性。UPGMA树的构建由NTSYS-pc 2.02软件^[15]完成。

2 结果

2.1 AFLP扩增结果

利用7对选择性引物组合对7个凡纳滨对虾群体210个体进行了扩增, 在100~500 bp范围内共得到105个DNA片段, 其中多态条带为90个, 多态位点比例为85.71%。不同引物产生的扩增条带为11~19条, 平均每对引物组合扩增出15条带(图1); 扩增出的多态条带范围为9~18条, 多态检出率为80.00%~94.74%, 每对引物组合平均扩增出12.86多态性条带(表2)。

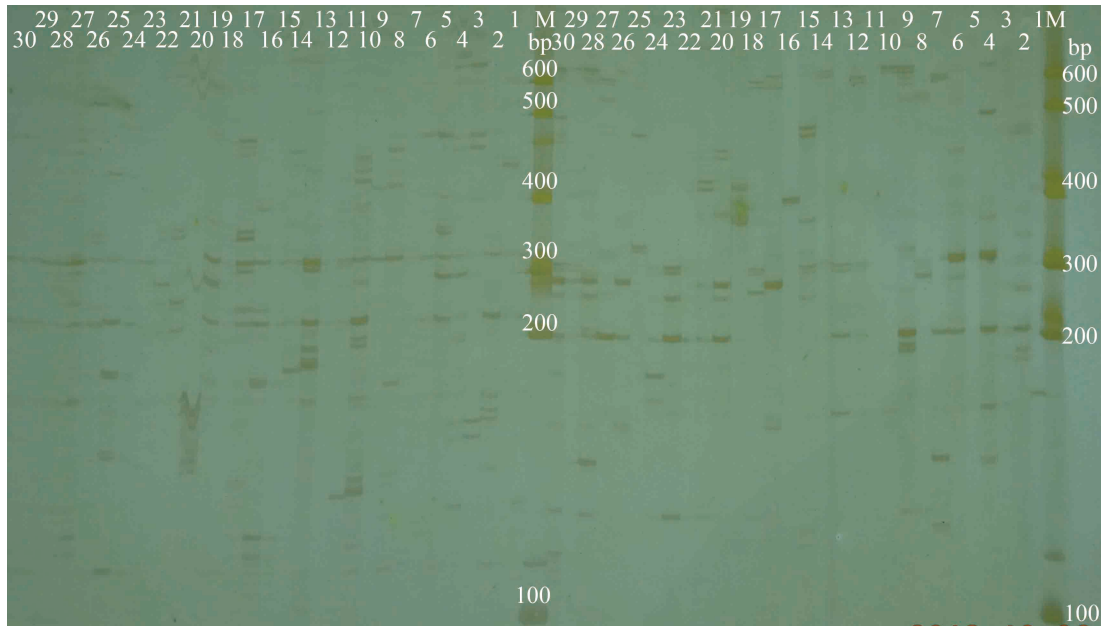


图1 采用E-ATC/M-CTC引物组合对科纳湾群体(左)和迈阿密群体(右)进行AFLP扩增结果

Fig. 1 AFLP pattern of KONABA population and SISMAM population using combination E-ATC/M-CTC

表 2 各引物组合扩增位点和多态性位点数、多态性位点比例

Tab. 2 Number of amplified loci and polymorphic loci, percentage of polymorphic loci of the seven pairs of primer combinations

引物组合 primer combinations	总扩增位点数 no. of amplified loci	多态位点数 no. of polymorphic loci	多态位点比例/% percentage of polymorphic loci
E-ATC/M-CTC	15	12	80.00
E-AGT/M-CTC	16	13	81.25
E-AAG/M-CAA	14	13	92.86
E-AAG/M-CCA	19	18	94.74
E-AAG/M-CTC	12	10	83.33
E-AGC/M-CAT	11	9	81.82
E-AGC/M-CCA	18	15	83.33
总计 total	105	90	85.71
平均值 average	15.00	12.86	85.73

2.2 遗传多样性

基于7个凡纳滨对虾群体扩增出的105个 AFLP片断, 计算每个群体的多态位点百分率以及平均杂合度, 各群体的多态位点百分率和平均期望杂合度分别为54.17%~65.63%和0.164~

0.236, 平均值分别为60.53%和0.202(表3)。其中 ZX群体的多态位点百分率及平均期望杂合度均最高, 而GDOU群体的多态位点百分率和平均期望杂合度均最低。各个群体的多态位点百分率和平均期望杂合度均显著低于物种水平上的相应值92.85%和0.378(表3)。

表 3 凡纳滨对虾7个群体遗传多样性的比较分析

Tab. 3 Genetic diversity of seven *L.vannamei* stocks

群体 populations	ZX	ZK	GDOU	KONABA	SISMAM	OI	CHAI	平均值 mean	总和 total
样品数 no. of samples	30	30	30	30	30	30	30	30	210
多态位点百分率/% percent of polymorphic bands	65.63	61.46	54.17	62.5	57.29	61.21	61.46	60.53	92.85
平均杂合度 average heterozygosity	0.236	0.189	0.164	0.231	0.169	0.212	0.216	0.202	0.378

2.3 遗传分化

基于AFLP计算的群体之间两两配对的 Φ_{ST} 值介于0.426~0.577(表4), 平均为0.518($P<0.0010$), 表明各群体之间存在着显著的遗传分化。OI群体与CHAI群体间的 Φ_{ST} 值最小为0.426, OI群体与KONABA群体间的 Φ_{ST} 值最大为0.577。Exact test的结果表明, 各个群体两两配对的 Φ_{ST} 值均表现出显著性差异。

2.4 AMOVA分析

基于AFLP数据的7个凡纳滨对虾群体的AMOVA分析发现, 51.79%变异来源于群体间, 48.21%变异来源于群体内(表5)。随机排列检验显示群体间差异极显著($P=0.000$)。

2.5 遗传距离及聚类分析

计算所得群体间遗传相似性系数和遗传距离, 经偏差校正, 不同群体间的遗传相似性系数为0.660~0.796, 遗传距离为0.229~0.495(表6)。基于AFLP数据计算两两群体间的Nei氏遗传距离, 用软件TFPGA建立了7个群体的UPGMA系统树发现, OI与CHAI群体先聚为一支, 再依次与ZK、ZX群体聚为一支, 之后与另一小支KONABA SISMAM群体聚合为一大支, 而GDOU群体为单独一大支, 与其他群体最终聚为一支(图2)。

3 讨论

3.1 AFLP标记技术及检测效果评价

AFLP标记为高灵敏度、信息量大、快速且

表4 不同凡纳滨对虾群体间两两配对的 Φ_{ST} 值Tab. 4 Pairwise Φ_{ST} values between populations of *L.vannamei*

群体 populations	ZX	ZK	GDOU	KONABA	SISMAM	OI
ZX						
ZK	0.506*					
GDOU	0.556*	0.521*				
KONABA	0.512*	0.502*	0.565*			
SISMAM	0.533*	0.522*	0.556*	0.518*		
OI	0.474*	0.451*	0.522*	0.577*	0.508*	
CHAI	0.490*	0.525*	0.551*	0.513*	0.520*	0.426*

注: *表明配对的 Φ_{ST} 值存在显著差异($P<0.05$)Notes: * indicates that the populations are genetically significantly different ($P<0.05$)

表5 基于凡纳滨对虾不同群体AFLP数据的分子遗传变异(Two-level hierarchical AMOVA)分析

Tab. 5 Two-level hierarchical AMOVA analysis based on AFLP phenotypes of *L.vannamei* populations

变异来源 source of variation	自由度 df	方差总和 SS	均方 SM	变异组分 variance component (absolute)	所占比例/% variance component
群体间 among populations	6	2222.79	370.47	11.98 Va	51.79*
群体内 within populations	203	2263.20	11.15	11.15 Vb	48.21
总计 total	209	4485.99	381.62	35.13	100.00

注: *表明群体间存在极显著分子遗传差异($P<0.01$)Notes: * indicates that the genetic difference between populations are highly significant ($P<0.01$)

表6 凡纳滨对虾7个群体之间的Nei's遗传距离(左下角)及遗传相似性系数(右上角)

Tab. 6 Nei's genetic distance (below diagonal) and genetic identity (above diagonal) of seven *L.vannamei* populations

群体 populations	ZX	ZK	GDOU	KONABA	SISMAM	OI	CHAI
ZX		0.699	0.640	0.670	0.667	0.722	0.716
ZK	0.359		0.664	0.692	0.699	0.769	0.690
GDOU	0.446	0.410		0.660	0.673	0.676	0.675
KONABA	0.401	0.368	0.416		0.710	0.610	0.685
SISMAM	0.405	0.359	0.397	0.343		0.721	0.711
OI	0.326	0.263	0.391	0.495	0.327		0.796
CHAI	0.334	0.372	0.393	0.379	0.342	0.229	

高效、并呈孟德尔遗传等特征的标记,且在不知道生物基因组信息的条件下,就能检测亲缘关系非常近的材料之间的差异^[16]。AFLP技术要求足够多的样本量,一般建议其样品量是SSR标记的2~10倍^[17],但在实际操作中要求的取样数量较少。在对虾类遗传多样性研究中,AFLP技术分析的样本数量每个群体大多在10~30个个体之间^[9-11]。本研究利用AFLP标记分析了我国凡纳滨

对虾4个引进群体和3个国内养殖群体共210个个体,平均每个群体样本量为30个。根据遗传分析的目标不同,需要分析AFLP片段位点的差异来分析其遗传变异情况^[18]。Liu等^[19]研究中国沿海不同地理群体鲷(*Mugil cephalus*)的遗传多样性表明,AFLP技术用于检测鲷基因组的遗传变异是非常有效的。Hu等^[20]利用AFLP与SSR标记分析比较莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn)的遗传多样性时

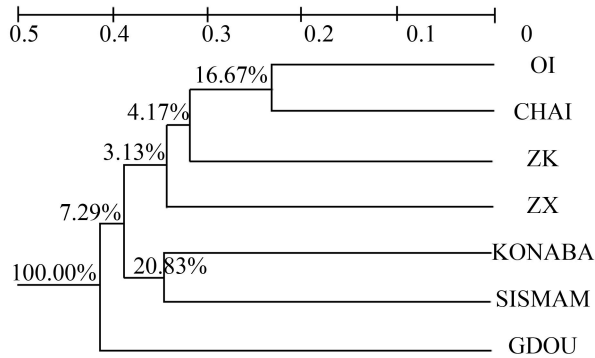


图2 凡纳滨对虾7个群体聚类分析图

Fig. 2 UPGMA tree of the seven *L.vannamei* populations

也发现,用AFLP标记比用SSR评估遗传分化及亲缘关系更为准确。AFLP技术能够检测出大量的基因位点,但AFLP标记一般不能将杂合性的条带与纯合性的条带清晰分辨开来,因此在分析遗传结构时,多选用AMOVA法和UPGMA法,无需假定Hardy-Weinberg平衡^[21]。

3.2 遗传多样性

在水产动物育种过程中,选择育种的过程导致群体内的遗传多样性降低,缺乏合理的管理也容易产生近交衰退而形成群体内遗传多样性的迅速下降。在引种初期,中国引进的凡纳滨对虾群体通常表现出优良性状(如生长速度),但随着养殖时间的延长,引进群体的部分优良特征逐渐消失。其原因可能是由于生产单位选用个体选择方法进行筛选及留种,而留种亲虾的筛选大多来源于某一池塘或者某一群体,经过连续几代的重复筛选和使用,这些亲虾或者其后代出现很高的近亲交配机率,因而使养殖群体趋于单一,一些杂合基因变为纯合^[9]。此外,王鸿霞等^[22]利用微卫星标记检测亲代对子代的遗传贡献率,发现只有8个个体对其子代群体的基因库有所贡献,而不同个体间的贡献率存在着差别,其贡献率范围为8.57%~54.28%,其中有2个个体对其子代的基因库无贡献。本研究发现,各群体间虽存在差异,但此差异的存在不能完全说明是由于地理群体不同造成的。可见,在凡纳滨对虾选育过程中,需要及时检测其遗传多样性水平,加之科学的管理,才能在遗传改良的同时,维持选育群体较高的遗传多样性水平。

本结果表明,群体平均多态位点占了60.68%,不同群体的大小顺序为ZX>KONABA>CHAI=ZK>OI>SISMAM>GDOU;群体平均杂合度是0.202,不同群体之间的顺序为ZX>KONABA>CHAI>OI>ZK>SISMAM>GDOU,2个指标表现出的变化趋势较近,总体上各个群体均表现出较丰富的遗传多样性。较高水平的遗传多样性意味着适应环境变化的能力较强,其蕴藏着较高水平的进化潜力和遗传改良潜力。

3.3 遗传结构

在此研究中,使用 Φ_{ST} 值代替 F_{ST} 值反映了群体间的遗传分化程度,平均 Φ_{ST} 值为0.518($P<0.0010$),各个群体两两配对的 Φ_{ST} 值均表现出显著的遗传分化。AMOVA的分析结果表明:群体间变异占51.79%,群体内的变异占48.21%,这与利用其他标记如SSR研究凡纳滨对虾不同世代养殖群体的遗传变异时发现的遗传变异大部分来源于群体内^[23]的结果不一致。本研究认为,由于没有科学的管理、分析和指导,育苗场不加控制地随意混合交配,导致相对封闭育种的群体出现了种质混杂,容易导致不同群体内部分个体产生近亲交配,从而出现这种现象。本研究中各个群体间的遗传距离为0.229~0.495,遗传相似性系数为0.660~0.796,而阮晓勇等^[9]研究发现凡纳滨对虾进口群体与本地群体间的遗传距离为0.047~0.126,遗传相似性为0.881~0.9504,这可能是由于长期的人工选育导致了基因漂变。

参考文献:

- [1] 马春艳,马洪雨,马凌波,等.凡纳滨对虾引进群体和2个养殖群体遗传变异的微卫星分析[J].海洋渔业,2011,33(1):1-8.
Ma C Y, Ma H Y, Ma L B, et al. Microsatellite analysis on genetic variation of imported *Litopenaeus vannamei* population and cultured stocks[J]. Marine Fisheries, 2011, 33(1): 1-8 (in Chinese).
- [2] 阮晓红,罗坤,栾生,等.凡纳滨对虾7个引进群体的生长性能评估[J].水产学报,2013,37(1):34-42.
Ruan X H, Luo K, Luan S, et al. Evaluation of growth performance in *Litopenaeus vannamei* populations introduced from other nations[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(1): 34-42 (in Chinese).
- [3] 熊建华,赵永贞,高永华,等.凡纳滨对虾良种培育研

- 究进展[J]. 南方农业学报, 2011, 42(5): 556-561.
- Xiong J H, Zhao Y Z, Gao Y H, *et al.* Advances in breeding improved varieties of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2011, 42(5): 556-561 (in Chinese).
- [4] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [5] 岳志芹, 王伟继, 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 W J, 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).
- [6] 李健, 刘萍, 王清印, 等. 中国对虾遗传连锁图谱的构建[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 161-173.
- Li J, Liu P, Wang Q Y, *et al.* The construction of a genetic linkage map of marine shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(2): 161-173 (in Chinese).
- [7] 刘卫东, 鲍相渤, 宋文涛, 等. 虾夷扇贝遗传连锁图谱的初步构建[J]. 遗传, 2009, 31(6): 629-637.
- Liu W D, Bao X B, Song W T, *et al.* The construction of a preliminary genetic linkage map in the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis*[J]. Hereditas (Beijing), 2009, 31(6): 629-637 (in Chinese).
- [8] 李莉, 郭希明. 利用 RAPD 和 AFLP 标记初步构建太平洋牡蛎的遗传连锁图谱[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(5): 541-551.
- Li L, Guo X M. The construction of a preliminary genetic linkage map in the Pacific oyster using RAPD and AFLP markers[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2003, 34(5): 541-551 (in Chinese).
- [9] 颀晓勇, 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.
- Xie 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).
- [10] 薛姝雯, 刘小林, 李喜莲, 等. 基于 AFLP 技术的凡纳滨对虾遗传多样性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(11): 43-48.
- Xue S W, Liu X L, Li X L, *et al.* AFLP analysis of genetic diversity of shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2010, 38(11): 43-48 (in Chinese).
- [11] 王豪杰, 蔡生力, 叶斐菲, 等. 4 个不同世代凡纳滨对虾群体 AFLP 遗传多样性分析[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(6): 739-743.
- Wang H J, Cai S L, Ye F F, *et al.* AFLP analysis on genetic diversity of four different generations of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(6): 739-743 (in Chinese).
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 8.
- Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. Huang P T, Jin D Y, Li M F, *et al.*, trans. Beijing: Science Press, 2002: 8 (in Chinese).
- [13] Miller M P. Tools for population genetic analysis (TFPGA), Version 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data[M]. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, USA, 1997.
- [14] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. Genetics, 1992, 131(2): 479-491.
- [15] Rohlf F J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system[M]. New York: Applied Biostatistics Inc., 1998.
- [16] 王伟继, 岳志芹, 孔杰, 等. AFLP 分子标记技术的发展及其在海洋生物中的应用[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 80-85.
- Wang W J, Yue Z Q, Kong J, *et al.* Development of AFLP and its application in marine organism[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(1): 80-85 (in Chinese).
- [17] Mariette S, Le Corre V, Austerlitz F, *et al.* Sampling within the genome for measuring within-population diversity: Trade-offs between markers[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(7): 1145-1156.
- [18] Mendelson T C, Shaw K L. Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity[J]. Methods in Enzymology, 2005, 395: 161-177.
- [19] Liu J Y, Lun Z R, Zhang J B, *et al.* Population genetic

- structure of striped mullet, *Mugil cephalus*, along the coast of China, inferred by AFLP fingerprinting[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, 37(4): 266-274.
- [20] Hu J H, Pan L, Liu H G, *et al.* Comparative analysis of genetic diversity in sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) using AFLP and SSR markers[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 3637-3647.
- [21] Boivin K, Deu M, Rami J F, *et al.* Towards a saturated sorghum map using RFLP and AFLP markers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98(2): 320-328.
- [22] 王鸿霞, 吴长功, 相建海. 凡纳滨对虾繁殖中不同亲本对子代遗传贡献率的差异[J]. *动物学报*, 2006, 52(1): 175-181.
- Wang H X, Wu C G, Xiang J H. Difference of parental contributions in the reproduction of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, 52(1): 175-181 (in Chinese).
- [23] 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).

AFLP analysis of genetic diversity of imported *Litopenaeus vannamei* populations and cultured stocks

YE Ning, BAO Xiufeng, LIU Jianyong*

(College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: The white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, is one of the most important aquaculture species in China. The broodstocks used in China are mainly introduced from abroad. Recently, several new domestic white shrimp strains have been bred and used as broodstock. To further strengthen the genetic breeding of white shrimp, it is necessary to understand genetic diversity status of different strains. In the present study, the amplified fragment length polymorphism (AFLP) was employed to analyze the population genetic diversity and genetic difference between four introduced populations and three domestic breeding populations. A total of 105 fragments in length of 100~500 bp were identified from 210 individuals using seven AFLP primer combinations, of which 90 of 105 fragments were polymorphic, and the proportion of polymorphic loci was 85.71%. The polymorphic loci within populations varied from 54.17% to 65.63%, with an average of 60.53%, and the mean heterozygosities ranged from 0.164 to 0.236, with an average of 0.202. AMOVA analysis revealed that 51.79% of genetic variations derived from populations, the estimated Φ_{ST} value over all polymorphic loci across the seven populations was 0.518, indicating significant genetic differences between populations and strong population structure. Furthermore, these results could provide theoretical supports for germplasm improvement of *L. Vannamei*.

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

Corresponding author: LIU Jianyong. E-mail: liujy70@126.com

Funding projects: Guangdong Province Project of China (2010B020201014); Special Funds for Promotion of Marine Fisheries of Guangdong Province (A200899E04, A201001H05, A201101B05)