

AFLP 在动物遗传育种中的应用

李纪委, 江玲霞, 徐银学^{1,2*}

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏南京210095; 2. 江苏省太仓温氏家禽有限公司, 江苏太仓215411)

摘要 阐述了 AFLP 在动物品种(品系)的鉴定与保护、遗传图谱构建、遗传多样性、新基因发现和 DNA 甲基化等遗传育种研究中的应用。

关键词 AFLP; 品种鉴定; 遗传图谱; 遗传多样性; DNA 甲基化

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-08936-04

Application of AFLP Technique in Genetics and Animal Breeding

LI Ji-wei et al. (College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

Abstract The application of AFLP in animal genetics and animal breeding such as identification and conservation of animal breed, construction of genetic maps, genetic polymorphisms, discovery of new genes, and DNA methylation was reviewed in this paper.

Key words AFLP; Breed identification; Genetic maps; Genetic polymorphisms; DNA methylation

扩增片段长度多态性(AFLP)是由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos 发明的一种检测 DNA 多态性的新方法^[1]。是一种选择性扩增限制性片段的方法,是由 PCR 和 RFLP 技术相结合产生的一种新技术,具有 RFLP 技术的重复性好、可靠性强和 PCR 技术的高效性、方便性和安全性的优点^[2]。AFLP 具有 RFLP 和 RAPD 2 种方法的优点,其接头和引物适用于不同的生物类型,不需要了解基因组的信息,不管基因组 DNA 有多么复杂,理论上讲,用 AFLP 方法都可以检测出它们的多态性^[3]。它不仅具备了多态性丰富、共显性表达、不受环境影响、无复等位效应的特点,而且还具带纹丰富、用样量少、灵敏度高、快速高效的特殊优点^[4]。通过试验验证,AFLP 被认为是一种理想的有效的分子标记,已经用于品种鉴定、基因作图、基因表达等方面。目前,AFLP 不仅在水稻、小麦和棉花等主要农作物上得以应用,而且在羊、猪、牛和狗等动物遗传育种中也有广泛应用^[5]。

cDNA AFLP 技术是 Bachem 等以 AFLP 为基础发明的用于 RNA 指纹分析的方法,以反转录的 cDNA 为模板进行 AFLP 的分析^[6]。cDNA AFLP 作为一种研究基因表达的技术,结合了 RFLP 和 RT-PCR 的优点,不但具备 AFLP 的所有优点,而且重复性好、假阳性低,可以检测低丰度表达的 mRNA,准确反映基因间表达量的差别和鉴定未知基因。因此,它被广泛用于基因差异表达、表达基因遗传连锁作图和基因克隆等研究中。

1 动物品种(系)的鉴定与保护

AFLP 的最适应用范围,也是 Zabeau 和 Vos 申请专利的关键,是利用 AFLP 技术鉴定品种指纹、检测品种的质量和纯度、辨别真伪。因 AFLP 技术可以在较短的时间内检测出大量多态性标记,与 RAPD 和 RFLP 等标记一样,是基于对种质基因组 DNA 水平的差异进行检测,不受组织和器官种类、发育阶段、环境条件等诸多因素的影响,非常适合于品种(系)的鉴定和保护。

杨兴元等对西门塔尔牛、延边牛、南阳牛 3 个品种进行

基金项目 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号:2006AA10Z136)资助。

作者简介 李纪委(1982-),男,河南沈丘人,硕士研究生,研究方向:动物遗传育种与繁殖。* 通讯作者,教授,博士生导师,Email: xuyinxue@yahoo.com。

收稿日期 2008-04-28

AFLP 指纹比较分析,结果表明:3 个牛品种都有其特殊的指纹图谱,而且有其特异的条带,从而为这 3 个牛品种的鉴别提供了科学依据^[7]。S. Sasazaki 等对日本黑牛和黑白花牛进行 AFLP 指纹图谱分析得到特异性片段,为今后鉴定不同的品种(品系)提供科学依据^[8]。高玉时等利用 6 对 AFLP 引物组合对中国 12 个地方鸡种进行了遗传检测,构建了各个品种(AFLP DNA 指纹图谱,根据 AFLP 分析结果,每个群体检测到数量不等的特异性条带,这些都是某一品种所具有的^[9]。从而表明,AFLP 指纹用于我国地方鸡品种间的鉴定是可行的。马巍等以 7 个警犬品种为试验材料进行 AFLP 分析得到 75 个特异性标记,并根据 UPGMA 法对 7 个警犬品种进行聚类分析^[10],为以后警犬品种的鉴定打下了基础。梁智勇等应用 AFLP 技术对 10 个品系小鼠进行分析,通过筛选获得特异性 AFLP 标记^[11]。R. Negri 等采用 AFLP 指纹技术区分了欧洲不同牛品种之间的进化及它们的亲缘关系^[12]。

任军等利用 12 对 AFLP 引物组合检测了 19 个中国地方猪种(群)、1 个培育猪种和 4 个欧美引进猪种,结果表明,AFLP 标记有着很高的多态检测效率,平均每个引物组合检测到 17.3 个多态标记,非常适合于猪种(群)遗传多样性分析和品种鉴定^[13]。E. Alves 等用 15 对引物组合对伊比利猪和杜洛克猪进行 AFLP 分析,结果发现,其中 14 个特异片段在伊比利猪上没有找到,只存在于杜洛克猪中^[14]。以上分析结果表明:应用 AFLP 标记技术可鉴定辨别来自于同一个基础群的不同猪品系;同时也说明该标记可用于区分遗传背景或外观形态极其相似的猪品系,为动物的遗传质量分析和品系鉴定提供参考资料。针对在分类上存在混淆的点带石斑鱼和协带石斑鱼,杜佳莹等用 AFLP 技术对 2 种石斑鱼及其杂种子代进行分子鉴定,研究结果将为 2 种石斑鱼种质资源的鉴定和保护及人工繁育的可持续性提供重要参考^[15]。M. Idiri 等选取不同品种的鱼进行 AFLP 分析,结果表明:每个品种都有独特的差异性片段,可以将这些品种区分开来^[16]。根据分析结果,可以判断外型相似的动物是否同属于一品种(系),也可以为市场上鉴定以假乱真的现象提供科学依据。

2 构建遗传图谱和 QLT 定位

遗传连锁图谱是利用遗传标记进行遗传连锁分析来反映遗传标记之间的相对关系,随着 RFLP、AFLP 等分子标记

的开发,遗传作图工作得到了飞速的发展。遗传连锁图谱的构建是遗传学研究的一个重要领域,它在分子标记辅助育种、基因定位与克隆、比较基因组作图等方面有重要的应用价值,也是动植物遗传育种和人类遗传病诊断的依据^[17]。因为 AFLP 技术呈孟德尔遗传,1 次反应可以检测大量的多态位点,且不需预先知道研究对象的遗传背景,因此在遗传背景了解相对较少的动物中,被广泛应用于连锁图谱的构建和 QTL 的定位。

Knorr 等利用 204 个 AFLP 分子标记增加了东方兰辛鸡遗传连锁图谱的密度,使连锁群总长增加了 25%,AFLP 标记位点在该图中均匀分布^[18]。王伟继等利用拟测交理论分别构建中国明对虾雌虾、雄虾的遗传连锁图谱,利用 F₂ 自交模型构建共同的 AFLP 分子标记连锁图谱^[19]。Mbore 等同时用微卫星和 AFLP 技术对 3 种对虾进行研究,结果从 246 个标记中检测到 44 个连锁群,并构建了简单的遗传连锁图谱^[20]。D.Lalias 等用 AFLP 和微卫星标记技术构建出欧洲可食牡蛎的遗传连锁图谱。他还首次采用 AFLP 技术构建出蓝贝雌性和雄性的遗传连锁标记图谱^[21]。L.Zhang 等采用 AFLP 和微卫星标记技术构建出与太平洋白虾性别有关的遗传连锁图谱^[22]。

任军等根据 AFLP 分析结果计算了 24 个猪种(群)间的遗传相似系数,据此构建了 UPGMA 聚类关系图,结果表明,AFLP 标记有着很高的多态检测效率,平均每个引物组合检测到 17.3 个多态标记^[13]。他还采用 AFLP 技术对国内外 45 个猪种基因组进行了指纹图谱的构建,并检测到 28 个多态性标记^[23]。Xiao Q 等人根据牛肉大理石纹脂肪含量不同把牛肉分成 2 个等级,用 AFLP 技术找出与大理石纹脂肪含量相关的 QTL 连锁图谱,并根据人的序列把它们定位在相应的染色体上^[24]。S.Kikuchi 等同时利用 AFLP 和微卫星标记技术构建了鹌鹑的遗传连锁图谱^[25]。B.S.Sharma 等根据奶牛抵抗乳房炎的程度不同,将其分成临床抵抗性强和易感染 2 个组;用 AFLP 进行分析,找出了它们的差异,绘制出了遗传连锁图谱,并对它们进行定位^[26]。K.Wimmers 等选择杜洛克和柏林猪 F₂ 代杂种猪作为试验材料,利用 48 对 AFLP 引物组合研究并寻找影响眼肌面积、胴体长等的基因座^[27]。AFLP 标记分析结合基因型的选择可以作为一种检测家畜中包含有 QTL 的染色体组区域的方法^[27],为标记辅助选择育种提供了有力的参考。

3 遗传多样性和亲缘关系的分析

遗传多样性是生物学研究中的一个重要领域,是生物多样性的基础,是评价自然生物资源的重要依据,同时也是合理利用自然生物资源、种质资源开发和保护、生物遗传育种及改良的基础,对起源进化、分类鉴定及遗传育种等都有重要意义。随着分子遗传技术的发展,AFLP 技术能更全面、准确地分析种群的遗传变异及不同品种资源的遗传独特性,还可以进行不同种群亲缘关系分析,计算种群间的遗传距离,为种质资源的合理利用和保护提供科学的理论依据。

L.Olivier 等 34 位学者(来自 9 个国家)对 68 个分布在欧洲 16 国的猪品种和品系,包括地方品种、各国对国际品种引进后经改良育成的本国新品种或新类群、纯系和合成系,外

加 1 个中国梅山猪和 1 个欧洲野猪,利用微卫星标记 50 个座位)和 AFLP 标记(148 个座位)进行了品种间和品种内的遗传多样性的研究,于 2005 年发表了欧洲猪品种间遗传多样性的研究成果,他们的工作值得借鉴^[28]。吴丰春等以 AFLP 标记研究了贵州小型香猪遗传多态性方面的应用和该品系猪个体基因组 DNA 的 AFLP 的扩增结果,用 10 条 AFLP 引物组合检测出 17 头猪的 116 个位点,结果表明,AFLP 标记在贵州小型香猪中能产生丰富多态性,适宜于其遗传检测^[29]。J.L.Fouler 等应用 AFLP 技术分析来自 14 个不同国家地区的 3 个猪种共 59 个样品,结果发现,不同的品种之间都有各自的特异性条带,即使来自同一国家地区的同一品种也存在条带的差异^[30]。这些说明它们之间存在遗传多样性。K.S.Kim 等利用 3 对 AFLP 引物对韩国 6 个猪种(包括 1 个本地品种)进行遗传变异和遗传关系的研究,结果表明:韩国地方猪种遗传变异不大,与引进猪种的亲缘关系较远^[31]。这与以前应用微卫星分析所得结果相一致。M.S.Gitoba 等利用 148 个 AFLP 标记引物对 58 个欧洲猪种和 1 个中国猪种进行了基因型分析,并与以前用 50 对微卫星标记同样品所得结果进行了比较分析,发现两者差异不大,数据间还可以相互补充^[32]。这表明 AFLP 标记可结合微卫星对猪的遗传多样性进行评估分析。Covilo 等用 12 对 AFLP 引物鉴定具有较高近亲繁殖率的 2 个伊比利猪群体的基因型,揭示品系特异多态性和在种群保护和管理方面的应用^[33]。

P.Ajmore-Marsa 等采用 AFLP 技术检测意大利褐牛、玛列姆牛和经高度选择的荷斯坦 弗里生牛品种间(内) AFLP 多态性,得到了品种间的遗传距离,并估计了它们的相对遗传距离及亲缘关系^[34]。他还采用了 7 对 AFLP 引物组合分析了 7 个意大利山羊种群内和种群间遗传多样性,其中,6 个山羊种群遗传多样性与地理分布有关,只有 1 个种群的遗传多样性与地理距离无关,可能受迁移、基因流和起源的影响^[35]。曹少先等运用 AFLP 和 RAPD 2 种标记对波尔山羊、徐淮山羊和海门山羊进行分析,结果表明:徐淮山羊与海门山羊具有最近的亲缘关系,而波尔山羊与徐淮山羊的亲缘关系较波尔山羊与海门山羊的亲缘关系近^[36]。苟本富等用 AFLP 和 RAPD 技术对南江黄羊基因组 DNA 研究,结果表明,南江黄羊存在遗传多样性^[37]。同时他还把 AFLP 标记应用到乌羊遗传多样性上,结果证明是可行的。

胡小芬等利用 15 对 AFLP 引物组合检测了 8 个地方鸡种、1 个培育品种和 1 个外来品种的遗传变异,计算了 10 个鸡种的遗传相似系数,结果表明:地方鸡种和引进品种之间的亲缘关系较远;南城黑鸡和余干黑鸡的遗传距离最近,两者有着极密切的亲缘关系^[38]。高玉时等利用 20 个微卫星标记和 6 对 AFLP 引物组合对中国 19 个地方鸡种进行了遗传检测,并根据 2 种标记分析的遗传距离进行了聚类分析,结果表明,它们之间具有较大的一致性,并与所保存地方鸡种的地理分布、现实状况相吻合^[39]。这表明应用 AFLP 指纹分析可以分析遗传多样性和品种间的亲缘关系。M.De Marchi 等对意大利本地 4 个鸡种进行 AFLP 技术分析,结果发现它们之间存在遗传多样性^[40]。C.W.Huang 等用 16 对 AFLP 引物组合分析了 103 只绿头鸭,结果表明不同个体之间存在遗

传多样性,从亲缘关系来看所有后代都来自其中亲本的一个形状^[41]。鄢绯寰等利用 AFLP 技术分析我国 8 种常见家鸭和 2 种野鸭基因组 DNA 的多态性^[42]。王志勇等从 AFLP 指纹和标记基因序列分析我国养殖的 4 种鲍的亲缘关系^[43]。K. K. Das nahapatra 等采用 AFLP 技术评估小鼠近亲交配程度,并计算了它们之间的亲缘关系^[44]。

4 性别鉴定

为了获得畜牧业生产经济利益的最大化和防治连锁性遗传病的发生,人们有目的地对性别进行控制。性别控制的前提是动物的早期性别鉴定。由于 AFLP 技术具有强有力的多态性检出能力,能分辨出极细微基因组的变化,因此 AFLP 技术在很多的物种中已成功地筛选到了与个体性别连锁的标记。Giffiths 等将 AFLP 技术用于鱼类性别鉴定,并且在三刺鱼中分离到了 2 个基因紧密连锁的 AFLP 标记^[45]。在一些种的遗传性鉴别中,AFLP 可以识别 XY 或 WZ 性染色体,与用核型分析或通过育种鉴别的结果是一样的,并且比它们更简便快速;另外,AFLP 技术还可以用于虾类和鸟类的性别鉴定^[46]。K. Khamantong 等用 256 对 AFLP 引物组合对斑节对虾进行性别特异性连锁鉴定,成功地筛选出与性别连锁的标记^[47],为今后的斑节对虾的性别鉴定提供科学依据。

S. L. Chen 等用 64 对 AFLP 引物组合对半滑舌鳎进行性别之间差异的分析,结果发现,1 个 350 bp 的差异片段在雄性个体中找不到,只存在于雌性个体中^[48]。A. Felip 等^[49]用 AFLP 技术分析了与虹鳟鱼性别连锁几个标记,构建连锁图谱,并把它们定位在相应的染色体上。Jian Z C 等将 cDNA-AFLP 技术用于红鳍东方鲀性别鉴定,结果从差异片段中发现 5 个与性别控制有关的序列,其中,TDF1、TDF2、TDF4 和 TDF5 只能在成熟和未成熟的雌性中得到验证,而 TDF3 只能在雄性中得到证明;用同样的样品进行 DNA 水平上的 AFLP,只检测到 TDF5 存在^[50]。利用该技术可以在动物生长的早期就可以知道动物的性别,这些具有重大的生产应用价值。

5 新基因的发现

利用 cDNA-AFLP 可以较多地发现 and 分离差异表达的 cDNA 片段,已经是公认的鉴定差异表达基因的有效方法^[51-52]。将 cDNA-AFLP 技术与 RACE、电子克隆以及全长 cDNA 文库等全长克隆技术结合起来可以得到目的片的全长 cDNA。

Rubinstein 等进行了斑马鱼的 *cyc* 野生型及 *cyc* 突变体的 cDNA-AFLP 分析,发现了 2 个新基因 *Gestin* 和 *Calreticulin*,并研究了它们在不同组织及发育时期的表达^[53]。K. Cappelli 等采用 cDNA-AFLP 对马进行了研究,从差异片段中发现了磷酸酶 2 (PON2) 和因尿黑酸 1,2-加双氧酶 (HGD) 2 个新的基因,且在 NCBI 上检索到与人的同源性较高^[54]。K. Cappelli 等采用同样的方法克隆出与马的忍耐性有关的 IL8、RBBP6、Eif4g3、hsp90 4 个基因^[55]。Fukuda 等利用 cDNA-AFLP 技术分析了小鼠可转移的骨肉瘤 cDNA,克隆得到了 4 个与骨肉瘤高转移性状连锁系列的基因,将它们与一些已知其功能的基因进行比较,发现骨肉瘤的转移与骨架蛋白表达的改变、生物膜成分及增殖的改变相关^[4]。Maji na 等应用同样的方法克隆出与肾癌发生相关的 1 种新基因 Nban^[56]。

这表明 AFLP 法适用于肿瘤相关基因的筛选与检测,是研究肿瘤发病机制的一种较为理想的方法。

6 参与甲基化的研究

DNA 甲基化是真核细胞基因组主要的修饰方式之一,DNA 甲基化程度对基因的表达有重要的调控作用。研究表明,胚胎发育、X 染色体失活、基因印迹、某些疾病和肿瘤的发生与 DNA 甲基化都有着密切的联系^[57]。随着甲基化研究的深入,检测甲基化的方法也不断改进更新。新近出现的一种检测基因组甲基化状况的方法:甲基化敏感扩增多态性 (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism, MSAP) 就是在 AFLP 的基础上稍作修改而成的。这种方法的原理就是以对甲基化敏感的限制性内切酶酶基因组 DNA,通过 AFLP 分析来检测甲基化的状况^[58]。通过检测基因组甲基化的变化情况,可以帮助人们进一步了解 DNA 甲基化与动植物生长发育变化的规律、DNA 甲基化与某些疾病的关系。通过 AFLP 分析人们可以知道基因组发生 DNA 甲基化的具体位置,为研究和治疗一些疾病提供科学理论依据。

甲基化敏感扩增多态性主要应用在杂种优势和某些疾病方面的研究。杂种优势的利用是提高屠宰率、胴体重、瘦肉率和眼肌面积等胴体性状生产水平的措施之一。众多的研究表明,杂种优势的产生归根到底是亲子代基因差异表达的结果。基因活性的调节机制在杂种优势等复杂现象中起着重要的作用。DNA 甲基化是基因表达调控机制之一,因此直接研究 DNA 甲基化差异对胴体性状的影响可能揭示杂种优势产生的规律。蒋曹德等应用 MSAP 技术分析了猪个体 DNA 甲基化的差异与胴体形状之间的关系^[59]。徐青等建立了荧光标记的甲基化敏感扩增多态性方法来检测鸡基因组甲基化的变化情况^[60]。唐韶青等应用 MSAP 技术,检测和分析了猪、牛、羊、小鼠、鸡和鸭基因组的甲基化程度^[61],为寻找物种间的甲基化差异,探讨动物基因组全甲基化水平与动物进化及基因表达调控等方面的关系奠定了基础。

7 结语

目前,AFLP 技术由于具有多态性强、分辨率高、重复性好等优点,已经成为生命科学各领域,尤其是分子遗传学研究的一种重要工具和手段。但该技术也存在着一些不足之处,如对样本的质量要求很高从而易于导致偏差,设备费用较高等。近年来,随着技术的不断改进和完善,该方法更加方便和易于操作,已经广泛用于遗传图谱构建、遗传多态性分析、品种鉴定、基因表达、杂种优势预测等方面。

参考文献

- [1] ZABEAUM, VOS P. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting: Paris: European Patent Application 94202629. 7 [P]. 1993.
- [2] VOS P, HOGERS R, BLEEKEN M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [3] VANECHOUTTE M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature [J]. *Mol Biotechnol*, 1996, 6(2): 115-142.
- [4] FUKUDA T, KIDO A, KAINO K, et al. Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA AFLP method [J]. *Biochemical and Biophysical*, 1999, 261(1): 35-40.
- [5] 翁跃进. AFLP——一种 DNA 分子标记新技术 [J]. *遗传*, 1996, 18(6): 29-31.
- [6] BACHEMC W, VANDER HOEVEN R S, DE BRUIJNS M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based

- on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development[J]. *Hort Journal*, 1996, 9: 745 - 753.
- [7] 杨兴元, 许尚忠, 于汝梁, 等. 遗传标记 AFLP 在西门塔尔牛、延边牛、南阳牛品种鉴定中的应用[J]. *黄牛杂志*, 2003, 29(5): 8 - 11.
- [8] SASAZAKI S, ITOH K, ARIMITSU S, et al. Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle[J]. *Meat Science*, 2004(67): 275 - 280.
- [9] 高玉时, 屠云洁, 钱勇, 等. 12 个地方鸡种遗传多态性的 AFLP 指纹分析[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 498 - 502.
- [10] 马巍, 叶俊华, 马长书, 等. 应用 AFLP 分析 7 种警犬的遗传多样性[J]. *广东农业科学*, 2007(7): 85 - 88.
- [11] 梁智勇, 史景泉, 魏泓, 等. 10 个品系小鼠的 AFLP 分析[J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25(2): 155 - 159.
- [12] NEGRINI R, NJMANI J, MILANESI E, et al. European cattle genetic diversity consortium. Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting[J]. *Animal Genetics*, 2007, 38(1): 60 - 66.
- [13] 任军, 黄路生, 艾华水, 等. 24 个中外猪种(群)的 AFLP 多态性及其群体遗传关系[J]. *遗传学报*, 2002, 29(9): 774 - 781.
- [14] ALVES E, CASTELLANOS C, OMLO C, et al. Differentiation of the raw material of the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism[J]. *Meat Science*, 2002, 61(2): 157 - 162.
- [15] 杜佳莹, 丁少雄, 王军, 等. 两种石斑鱼及其杂种子代的分子鉴定[J]. *海洋学报*, 2006, 28(6): 94 - 99.
- [16] MALIN M, MARZANO F N, FORTES G G, et al. Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database[J]. *Aquaculture*, 2006(261): 487 - 494.
- [17] OISEN M, DENBIEMAN M, KUIPER MT R, et al. Use of AFLP markers for Gene mapping and QTL Detection in the Rat [J]. *Genomics*, 1996, 37(3): 289 - 294.
- [18] NORR C, CHENG H H, DODGSON J B. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry[J]. *Animal Genetics*, 1999, 30(1): 28 - 35.
- [19] 王伟继, 孔杰, 董世瑞, 等. 中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建[J]. *动物学报*, 2006, 52(3): 575 - 584.
- [20] MOORE S S, WHAN V, DAVIS GP, et al. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 1999, 173(1): 19 - 32.
- [21] LALLIAS D, LAPGLIE S, HECQUET C, et al. AFLP based genetic linkage maps of the blue mussel (*Mytilus edulis*) [J]. *Animal Genetics*, 2007, 38(4): 340 - 349.
- [22] ZHANG L, YANG C, ZHANG Y, et al. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Sex-linked microsatellite markers and high recombination rates[J]. *Genetics*, 2007, 131(1): 37 - 49.
- [23] 任军, 黄路生, GARY EVENS, 等. 猪基因组 AFLP 指纹图谱的构建[J]. *农业生物技术学报*, 2003, 11(2): 179 - 182.
- [24] XIAO Q, WU WOT A, WUX L, et al. A simplified QTL mapping approach for screening and mapping of novel AFLP markers associated with beef marbling[J]. *J Biotechnol*, 2007, 127(2): 177 - 187.
- [25] KIKUCHI S, FUJIMA D, SASAZAKI S, et al. Construction of a genetic linkage map of Japanese quail (*Coturnix japonica*) based on AFLP and microsatellite markers[J]. *Animal Genetics*, 2005, 36(3): 227 - 231.
- [26] SHARMA B S, JANSENG B, KARROWNA A, et al. Detection and characterization of amplified fragment length polymorphism markers for diarrhoeal mastitis in Canadian Holsteins[J]. *J Dairy Sci*, 2006, 89(9): 3653 - 3663.
- [27] WMMERS K, MRAN E, PONSUKSII S, et al. Detection of quantitative trait loci for carcass traits in the pig by using AFLP[J]. *Mamm Genome*, 2002, 13(4): 206 - 210.
- [28] OLIVIER L, ALDERSON L, GANDIN GC, et al. An assessment of European pig diversity using molecular markers: Partitioning of diversity among breeds[J]. *Conservation Genetics*, 2005, 6(5): 729 - 741.
- [29] 吴丰春, 魏泓, 甘世祥, 等. 贵州小型香猪基因组 DNA 的 AFLP 检测研究[J]. *遗传*, 2001, 23(5): 423 - 426.
- [30] FOULLEY J L, VAN SCHRIEK M G M, ALDERSON L, et al. Genetic diversity analysis using lowly polymorphic dominant markers: The example of AFLP in Hgs [J]. *Journal of Heredity*, 2006, 97(3): 244 - 252.
- [31] KYUNG SEOK KIM, JUNG SOU YEO, JAE WOO KIM. Assessment of genetic diversity of Korean native pig (*Sus scrofa*) using AFLP markers [J]. *Genes and Genetic Systems*, 2002, 77(5): 361 - 368.
- [32] SANCHEZ STOBAL M, CHEVALET C, PELEMAN J, et al. Genetic diversity in European pigs utilizing amplified fragment length polymorphism markers[J]. *Animal Genetics*, 2006, 37(3): 232 - 238.
- [33] OMLO C, CERVERA MT, CASTELLANOS C, et al. Characterization of Iberian pig genotypes using AFLP markers[J]. *Animal Genetics*, 2000, 31(2): 117 - 122.
- [34] AJMONE MARSAN P, NEGRINI R, MILANESI E, et al. Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by diallelic AFLP markers[J]. *Animal Science*, 2002, 33(4): 280 - 286.
- [35] AJMONE MARSAN P, NEGRINI R, CREPALDI P, et al. Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers[J]. *Animal Science*, 2001, 33(5): 281 - 288.
- [36] 曹少先, 杨利国, 姜勋平, 等. 波尔山羊和江苏本地山羊的 AFLP 和 RAPD 分析[J]. *中国农业科学*, 2002, 35(10): 1291 - 1296.
- [37] 苟本富, 魏泓. 南江黄羊基因组 DNA 的 AFLP 和 RAPD 研究[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(17): 1778 - 1781.
- [38] 胡小芬, 高军, 艾华水, 等. 江西地方鸡种 AFLP 多态性及其群体遗传关系[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(6): 662 - 667.
- [39] 高玉时, 钱勇, 屠云洁, 等. 19 个地方鸡种遗传变异的微卫星和 AFLP 指纹分析[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2005, 33(12): 6 - 12.
- [40] DE MARCH M, DALMATI C, TARGHETTA C, et al. Assessing genetic diversity in indigenous Veneto chicken breeds using AFLP markers[J]. *Animal Genetics*, 2006, 37(2): 101 - 105.
- [41] HUANG C W, CHENG Y S, ROUMER R, et al. AFLP fingerprinting for paternity testing in ducks[J]. *Br Poult Sci*, 2007, 48(3): 323 - 330.
- [42] 鄢绯寰, 左正宏, 陈美, 等. 我国部分家鸭和野鸭遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2005, 44(5): 729 - 733.
- [43] 王志勇, 柯才焕, 王艺磊, 等. 从 AFLP 指纹和标记基因序列看我国养殖的四种鲍的亲缘关系[J]. *高技术通讯*, 2004(12): 93 - 98.
- [44] DASMAHAPATRA K K, LACY R C, AMOS W. Estimating levels of inbreeding using AFLP markers[J]. *Heredity*, 2007, 100: 286 - 295.
- [45] GRIFHTHS R, ORR K J, ADAMA, et al. DNA sex identification in the three-spined stickleback[J]. *Journal of Fish Biology*, 2000, 57(5): 1331 - 1334.
- [46] GRIFHTHS R, ORR K. The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex specific markers[J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8(4): 671 - 674.
- [47] KHAMNAMTONG B, THUMRUNGTANAKIT S, KIINBUNGA S, et al. Identification of sex-specific expression markers in the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 39(1): 37 - 45.
- [48] CHEN S L, LI J, DENG S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cymoglossus semilaevis*) [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2007, 9(2): 273 - 280.
- [49] FEIP A, YOUNG WP, WHEELER P A, et al. An AFLP based approach for the identification of sex linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 2005, 247: 35 - 43.
- [50] JIAN Z C, XUE Y S, QING L G, et al. Identification of sex markers by cDNA AFLP in Takifugu rubripes [J]. *Aquaculture*, 2006, 257(1/4): 30 - 36.
- [51] SIMOES ARAUJO J L, RODRIGUES R L, DE GERHARDT L A B, et al. Identification of differentially expressed genes by cDNA AFLP technique during heat stress in cowpea nodules [J]. *FEBS Lett*, 2002, 515: 44 - 50.
- [52] GUO J, JIANG R H, KAMPHUIS L G, et al. A cDNA AFLP based strategy to identify transcripts associated with virulence in *Phytophthora infestans* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2006, 43: 111 - 123.
- [53] RUBINSTEIN AL, LEE D, LUO R, et al. Genes dependent on zebrafish cydops function identified by AFLP differential gene expression screen [J]. *Genesis*, 2000, 26: 86 - 97.
- [54] CAPELLI K, FORCEDDU A, VERINI-SUPLIZI A, et al. cDNA AFLP based techniques for studying transcript profiles in horses [J]. *Veterinary Science*, 2005, 79: 105 - 112.
- [55] CAPELLI K, VERINI-SUPLIZI A, CAPOMACCI O S, et al. Analysis of peripheral blood non-nuclear cells gene expression in endurance horses by cDNA AFLP technique [J]. *Veterinary Science*, 2007, 82: 335 - 343.
- [56] MAI M S, KAIINO K, FUKUDA T, et al. A novel gene "Niban" upregulated in renal carcinogenesis. Cloning by the cDNA amplified fragment length polymorphism approach [J]. *Japanese Journal of Cancer Research*, 2000, 91(9): 869 - 874.
- [57] MOMPALER R L, BOVENZI V. DNA methylation and cancer [J]. *Cell Physiology*, 2000, 183(2): 145 - 154.
- [58] PORIIS E, ACQUADRO A, COMINO C, et al. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. *Hort Sci*, 2004, 166(1): 169 - 178.
- [59] 蒋曹德, 邓昌彦, 熊远著. 猪个体 DNA 甲基化百分差异与胴体性状的关系[J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(2): 179 - 185.
- [60] 徐青, 孙东晓, 张沅. 一种检测鸡基因组甲基化的新方法: F-MSAP [J]. *科学通报*, 2005, 50(17): 1874 - 1878.
- [61] 唐韶青, 张沅, 徐青, 等. 不同动物部分组织基因组甲基化程度的差异分析[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 507 - 510.