

伊犁鲈微卫星位点的筛选及近缘物种通用性

海萨 李家乐* 刘峰 冯建彬

(上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 新疆水产研究所 乌鲁木齐 830000)

摘要: 为开发伊犁鲈(*Perca schrenkii*)分子标记用于鲈属鱼类种质资源保护,以伊犁鲈为材料,应用磁珠富集法进行了微卫星标记的筛选。从伊犁鲈尾鳍提取总DNA,进行酶切、接头连接、PCR扩增,再采用生物素标记(CA)₁₅探针及生物素标记(TG)₁₅探针扩增产物的杂交富集,经再次PCR扩增及T/A克隆,成功构建了伊犁鲈基因组微卫星富集文库。采用重复序列引物筛选获得阳性克隆,随机选取48个阳性克隆进行测序,测得序列46个,其中38个克隆含有微卫星序列,41个位点的微卫星重复数在8次以上。根据测得序列设计17对微卫星引物,均能在伊犁鲈群体中扩增获得目的条带。采用该17对引物对河鲈(*P. fluviatilis*)及黄金鲈(*P. flavescens*)群体样本进行扩增,10对引物具有通用性,其中6对在河鲈中具有高度多态性(PIC>0.5),5对在黄金鲈中具有高度多态性。

关键词: 伊犁鲈;河鲈;黄金鲈;微卫星标记;磁珠富集法

中图分类号: Q951 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)01-17-07

Isolation of Microsatellite Loci from *Perca schrenkii* and its Universal in Related Species

HAI Sa LI Jia-Le* LIU Feng FENG Jian-Bin

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;
Institute of Fisheries Science, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Wulumuqi 830000, China)

Abstract: Microsatellites DNA was isolated and enriched from genome of *Perca schrenkii* by magnetic beads, and were also applied to the other two species in the same genus, i. e. *P. fluviatilis* and *P. flavescens*, which aimed to get effective microsatellite primers in the germplasm resources conservation of the species in *Perca*. Genomic DNA of tail fin from *P. schrenkii* was extracted and digested with restriction enzyme. Restriction fragments were ligated with linkers and amplified with primers. PCR products were enriched by hybridization with biotin-labeled (CA)₁₅ and biotin-labeled (TG)₁₅ probes. After the selected DNAs amplified, cloned into T/A vectors and transformed into *E. coli* DH5, the microsatellite-enriched library of *P. schrenkii* was successfully constructed. 48 random clones were selected with repeat-sequence primers from the library and were sequenced. As a result, 38 microsatellite sequences were isolated, and the repeat times of motifs in 41 microsatellite loci were much more than 8. 17 pairs of primers were designed from the microsatellite loci all of which were polymorphism for *P. schrenkii*. These primers were also amplified in *P. fluviatilis* and *P. flavescens*, among which 10 pairs could be used, 6 pairs in *P. flavescens* and 5 in *P. fluviatilis* were high polymorphic (PIC>0.5).

Key words: *Perca schrenkii*; *P. flavescens*; *P. fluviatilis*; Microsatellite

基金项目 上海市重点学科建设项目(Y1101),上海高校水产养殖学E研究院建设项目(03E009);

*通讯作者, E-mail: jlli@shou.edu.cn;

第一作者介绍 海萨,男,高级工程师;研究方向:渔业资源与鱼类养殖;E-mail: hbahjan@126.com.

收稿日期: 2008-07-28, **修回日期:** 2008-11-10

伊犁鲈 (*Perca schrenkii*) 属鲈形目 (Perciforms) 鲈亚目 (Percoidae) 鲈科 (Percidae) 鲈属, 其地理分布仅限于中亚巴尔喀什湖及阿拉湖水系^[1], 在我国境内的伊犁河及额敏河有自然分布^[2,3]。伊犁鲈个体较大, 经济价值较高, 最大个体全长达 50 cm, 体重达 1.5 kg^[1], 为当地水域的主要经济鱼类之一。在 20 世纪 70 年代前, 巴尔喀什湖的平均年产量达 564.3 t, 占巴尔喀什湖总产量的 5.11%, 伊犁河流域的年均产量也达到 18.65 t^[1,2]。因梭鲈 (*Stizostedion lucioperca*) 等大型凶猛鱼类引入、水资源过度开发等导致生态环境恶化, 70 年代初巴尔喀什湖水系伊犁鲈的年均产量降到 5.8 t, 至 80 年代, 已基本从当地渔获物中消失^[1,2]。在国内, 尽管伊犁鲈在伊犁河及额敏河水系的水库中有一些小的群体存在, 但数量较少。近年来, 随着水库养殖业的发展, 伊犁鲈作为敌害物种被控制或清除^[4], 数量日益减少, 个体趋于小型化, 已濒临灭绝。

至今为止, 伊犁鲈相关研究仍主要集中在形态学和生态学水平, 尚未见分子生物学相关研究的报道。近年来, 应用分子标记进行种质资源保护及群体遗传学研究, 已成为保护生物学及群体遗传学的主要发展方向之一。在各类分子标记中, 微卫星标记由于其共显性遗传及重复性好等优点, 成为应用最广的分子标记之一。本研究拟采用改良磁珠富集法, 进行伊犁鲈微卫星标记开发, 并对开发的微卫星在同属的河鲈及黄金鲈中进行通用性检测, 以期用于鲈属鱼类种质资源保护及亲缘关系研究。

1 材料与方法

1.1 材料

伊犁鲈采自新疆伊犁河支流霍尔果斯河流域的 63 团水库, 河鲈 (*P. fluviatilis*) 采自乌伦古河水系的福海水库, 黄金鲈 (*P. flavescens*) 由上海爱格斯生态科技有限公司提供, 来源于美国。活体剪取尾鳍保存于无水乙醇。

T4 DNA 连接酶及链霉亲和素磁珠购自 Promega 公司, *Mse* 内切酶购自 NEB 公司,

pGEM-T 载体购自 Takara 公司, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 感受态细胞购自天根生化科技公司, 实验所用生物素标记探针、接头及引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

接头为:

Oligo *Mse* A: HO5 -TAC TCA GGA CTC AT-3 OH

Oligo *Mse* B: HO5 -GAC GAT GAG TCC TGA G-3 OH

Mse -N 混合组: 5 -GAT GAG TCC TGA GTA A(N)-3 (N = A, T, C, G)

生物素标记探针: 5 Biotin (CA)₁₅-3 OH, 5 Biotin (TG)₁₅-3 OH

1.2 方法

本研究参照 FIASCO (fast isolation by AHP sequences containing repeats) 法^[5] 构建了伊犁鲈微卫星文库。

1.2.1 基因组 DNA 的酶切、酶切片段和 *Mse* 接头的连接

连接混合液的预扩增 总 DNA 提取参照梁利群等^[6] 的方法从鳍条中提取, DNA 浓度调节至 0.5 μg/μl。取伊犁鲈基因组 DNA 1 μg, *Mse* 内切酶 37 酶切 3 h, 65 灭活 20 min; *Mse* 接头的制作: 200 μmol/L 的 Oligo *Mse* A 和 Oligo *Mse* B 各 50 μl 充分混匀, 96 变性 8 min, 缓慢冷却至室温; 酶切片段与 *Mse* 接头的连接: 2.5 μl *Mse* 接头 (20 μmol/L) 与 10 μl 酶切的基因组 DNA 片段用 1 μl T4 DNA 连接酶 (3 U/μl), 在 PCR 仪中 16 连接 12 h, 4 连接 6 h; 连接混合液的预扩增: 用 20 μmol/L *Mse* -N 引物组对 10 倍稀释的连接混合液进行 PCR 预扩增。PCR 预扩增反应体系: 10 × PCR Buffer 2 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μl, dNTP 混合物 (2.5 mmol/L) 1.6 μl, *Mse* -N 引物组 (20 μmol/μl) 10 μl, 10 倍稀释的连接反应液 5 μl, *Taq* 酶 (2.5 U/μl) 0.4 μl。反应条件为: 94 预变性 5 min; 94 变性 1 min, 53 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 20 个循环; 72 延伸 20 min, 4 保温。

1.2.2 预扩增产物与生物素探针的杂交

70 μl 杂交缓冲液 (6 × SSC, 0.1% SDS) 与 5 μl Biotin (CA)₁₅ 生物素探针 (20 μmol/μl) 及 25 μl

PCR 产物混匀,95 °C 变性 15 min,68 °C 温浴 30 min,缓慢冷却至室温,加入 300 μl 的 TEN₁₀₀ (10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, pH=7.5) 溶液,混匀后 4 °C 保存备用。

1.2.3 磁珠杂交和洗脱 取一管链霉亲和素磁珠(0.6 ml)用 300 μl TEN₁₀₀ 缓冲液仔细洗涤 3 次,每次洗涤使用磁架固定磁珠,用 40 μl TEN₁₀₀ 缓冲液重悬磁珠备用。将加有 300 μl TEN₁₀₀ 缓冲液的杂交混合液加入经过预处理的磁珠中,在室温放置 30 min,不时搅动或吹打,避免磁珠沉淀。磁珠吸附完毕后,用磁架固定磁珠,移去杂交混合液。使用 400 μl TEN₁₀₀ 缓冲液于室温下洗涤磁珠 3 次,使用 400 μl 0.2 × SSC,0.1 % SDS 于室温下洗涤磁珠 3 次,再于 50 °C 下洗涤磁珠 10 min,最后用 400 μl 0.2 × SSC 于室温下洗涤磁珠 10 min,洗去残留的 SDS。加入 100 μl TE 9.0,混匀,95 °C 水浴 10 min,用磁架固定磁珠后,迅速吸出上清液,于 -20 °C 保存备用。

1.2.4 目的洗脱片段的精制和扩增 磁珠洗涤产物中加两倍体积的冰冻乙醇,于 -20 °C 下放置 2 h,12 000 r/min 于 4 °C 离心 20 min,小心移去乙醇,加入 700 μl 70 % 的乙醇浸泡 10 min,于 4 °C 离心 20 min,小心移去乙醇,室温下挥发乙醇后,加入 50 μl 的灭菌双蒸水,于 -20 °C 保存备用。用 *Mse*-N 引物组引物(20 μmol/μl)对精制的 DNA 片段进行 PCR 扩增。反应体系及反应条件与预扩增相同,30 个循环,4 °C 保存。PCR 产物用天根生物公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒切胶回收,回收片段大小为 250 ~ 1 000 bp。

1.2.5 富集片段的 T 载体连接和转化 回收的 DNA 片段与 pGEM-T 载体连接,转化到大肠杆菌 DH5 感受态细胞,37 °C 摇床培养 1 h,菌液涂于含 IPTG、X-Gal 的氨苄青霉素抗性 LB 平板上,37 °C 培养 12 h,挑取阳性克隆在含氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 °C 下 200 r/min 摇床上培养 12 h。用 *Mse*-N 引物组进行菌落 PCR 鉴定,用 M₁₃ 反向引物和 (CA)₁₂ 及 (TG)₁₂

核心序列引物再次进行菌落 PCR 鉴定,有扩增条带的送上海英骏生物公司测序。

1.2.6 引物适用性检测 测序获得序列用 SSR Hunter 软件查找微卫星序列,Premier Premier 5.0 软件进行引物设计。以伊犁鲈 5 个个体的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,8 % 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测引物的适用性。

1.2.7 近缘物种中的通用性研究 利用所筛选的 17 对伊犁鲈引物,分别对河鲈和黄金鲈各 20 个个体进行 PCR 扩增,8 % 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。利用 POPGEN 3.2 软件计算等位基因数 (alleles number) 和有效等位基因数 (number of effective alleles, Ne)、等位基因频率 (allele frequency)、杂合度 (heterozygosity)。借助 Excel 2003 根据 Botsein 等^[7] 的公式计算多态信息含量 (polymorphism information content, PIC), $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 P_i P_j$, 式中, P_i , P_j 分别表示某一位点上的第 i 和 j 个等位基因的频率, n 表示某一位点上的等位基因数。

2 结 果

2.1 伊犁鲈微卫星位点的筛选结果 伊犁鲈总 DNA 经 *Mse* 内切酶酶切,获得 100 ~ 2 000 bp 的酶切片段(图 1A),酶切片段连接接头经

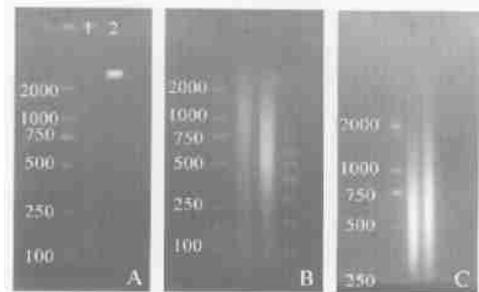


图 1 酶切、连接接头和富集片段 PCR 扩增效果

Fig. 1 Results of the DNA digestion, ligation and enriched fragments of PCR amplification

A: 酶切(1)与基因组 DNA (2); B: 连接接头;

C: 富集片段的 PCR 扩增。

A: Restriction reaction (1) and genome DNA (2); B: Ligation connector; C: PCR amplification of enrichment segments.

20 个循环的 PCR 扩增(图 1B)后,利用磁珠富集法回收含微卫星序列片段,并用 *Mse*-N 引物组进行 PCR 扩增,获得 250 ~ 750 bp 的片段(图 1C)。磁珠富集片段与 pGEM-T 载体连接,再转化到大肠杆菌 DH5 感受态细胞,获得 613 个阳性克隆,部分阳性克隆经 2 次 PCR 筛选,得到的 48 个阳性克隆进行测序。成功获得测序结果的 46 个阳性克隆中,共有 38 个阳性克

隆含 8 次重复以上的微卫星序列,占 82.6%。含 41 微卫星位点,TG/GT 重复 29 个(70.7%),AC/CA 重复为 12 个(29.3%)。设计的 17 对引物(GenBank 登录号 EU780049 ~ EU780064, EU812992)以伊犁鲈 5 个个体的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,获得预期大小的 PCR 产物。引物序列、退火温度和重复序列见表 1。

表 1 伊犁鲈微卫星引物及其核心重复序列

Table 1 Microsatellite marker primers and their repeat sequences in *Perca schrenkii*

微卫星标记 Microsatellite marker	引物 5-3 Primer sequence	大小 Size (bp)	重复序列 Repeat sequence	退火温度() Optimum annealing temperature
YP01	F ACAGAGAGACAGGTGAGTG R CAGGAACAGATGGAGACC	152	(TG) ₃₃	57
YP02	F TACTGGAGAGGGATGTTGG R AGTGGICTGCATCTTGITTA	160	(TG) ₂₈	45
YP03	F CAGTGGATGAAAATGAACG R CCTGAGTCTCCTGGATGAT	236	(GT) ₃₉	55
YP04	F CCCAGGTGTAAGGAT R CAGGGCAGGTTCAGTGTC	98	(GA) ₂ C(GT) ₆ AGAA(AC) ₂	56
YP05	F CGGCAATGATGAACTACAC R TAAACTCAACAAGCACCC	147	(GT) ₁₀	56
YP06	F ACAGCAGTGACAGTTGAGT R CCACAGAGTAAAGTAAAGC	261	(AC) ₂₁	56
YP07	F ACGGCAAGTATTGTTTGG R CATCACAACAGCCTGCCAC	125	(TG) ₁₂	52
YP08	F AGTGTGATGAACCTGC R CTGCCTATCACCCCTCTA	116	(GT) ₁₇ G ₁₂	54
YP09	F GTGTTACGCTTCATAGTGGTG R CATAGTCTAAGGCAAGTTCA	331	(AC) ₃₄	58
YP10	F ATACGAAAA GCGACTGAC R TCCCCA AAA GATA GTC AAAC	126	(AC) ₁₇	54
YP11	F CACTGGGATAAGACAGAAAG R CTCTGTAAGTGTCCCTCAT	234	(GT) ₁₉	58
YP12	F GGGAAAAACCAAAGTGT F TGAGTCTCCATTGATTCC	191	(AC) ₂₃	47
YP13	F CTTATGGTGACAATGACC R GCAGATGACACATGACAAG	161	(GT) ₄₀	51
YP14	F CAGGTCTGTTGTTTTCAC R AGCCAACCTGTGAAAGAG	187	(CA) ₁₃	46
YP15	F GATGTAACTTGA GGGGAAAC R AACGGTATGTTCA GATGCT	144	(GT) ₂₀ C(CC) ₆	58
YP16	F GGTTGACTTGAAAGC GACAT R ACCCTACCTACAGCACATT	212	(TG) ₁₁ ; (GT) ₈	46
YP17	F GCTCTGTGCTGCTGACTTTG R ACCGTTGATGAATGCTGCTA	156	(TG) ₁₇	57

F:正向引物;R:反向引物。F:Forward primer;R:Reverse primer.

2.2 伊犁鲈微卫星引物在其他 2 种鲈属鱼类中的通用性 17 对伊犁鲈微卫星引物中,10 对引物在河鲈和黄金鲈中能扩增出相应大小的产物,4 对引物在河鲈 20 个体中扩增出片段大小相同的 1 条谱带,而在黄金鲈中为 2 对。位点 YP11 在黄金鲈的 1 个个体中未扩增出条带,以无效等位基因(null allele)来处理(图 2)。在河

鲈中,6 个位点的等位基因数大于或等于 4,4 个位点的期望杂合度大于 0.7,6 个位点属高度多态位点($PIC > 0.5$);在黄金鲈中,6 个位点的等位基因数大于或等于 4,5 个位点的期望杂合度大于 0.7,5 个位点属高度多态位点,3 个位点属中度多态位点($0.25 < PIC < 0.5$)(表 2)。



图 2 部分伊犁鲈微卫星引物在近缘物种中的 PCR 扩增效果

Fig. 2 PCR amplification results of some *P. schrenkii* microsatellite primers on its related species

M: 标准 DNA 分子量标记; 1~20: 部分引物在河鲈和黄金鲈中的扩增片段。

M: Standard DNA Marker; 1 - 20: Amplification fragment of some primers in *P. fluviatilis* and *P. flavescens*.

表 2 河鲈及黄金鲈中 10 个微卫星位点的杂合度、有效等位基因数、多态信息含量

Table 2 Number of observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), number of effective alleles (N_e), polymorphism information content (PIC) at 10 microsatellite loci of *P. fluviatilis* and *P. flavescens*

微卫星位点 Microsatellite loci	观测杂合度 H_o		期望杂合度 H_e		多态信息含量 PIC		有效等位基因数 N_e	
	河鲈 <i>P. fluviatilis</i>	黄金鲈 <i>P. flavescens</i>						
YP2	1.000 0	0.487 2	0.000 0	0.512 8	-	0.375 0	1.000 0	2.000 0
YP3	0.197 4	0.244 9	0.802 6	0.755 1	0.750 4	0.691 5	4.597 7	3.791 5
YP4	0.312 8	0.487 2	0.687 2	0.512 8	0.612 3	0.375 0	3.030 3	2.000 0
YP6	0.262 8	0.438 5	0.737 2	0.561 5	0.667 3	0.444 5	3.555 6	2.209 9
YP7	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0	-	-	1.000 0	1.000 0
YP8	0.337 2	0.146 2	0.662 8	0.853 8	0.581 9	0.809 2	2.826 9	5.970 1
YP9	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0	-	-	1.000 0	1.000 0
YP11	0.194 9	0.169 2	0.805 1	0.830 8	0.750 4	0.784 8	4.651 2	5.263 2
YP15	1.000 0	0.219 2	0.000 0	0.780 8	-	0.724 2	1.000 0	4.188 5
YP17	0.225 6	0.219 2	0.774 4	0.780 8	0.719 2	0.725 6	4.081 6	4.188 5

- : 示无多态性。- : No polymorphism.

3 讨论

真核动物基因组中二核苷酸微卫星序列

(CA) $_n$ 或 (GT) $_n$ 十分丰富,在哺乳动物中每 50 ~ 150 kb 就会出现一次^[8]。勒氏笛鲷 (*Lutjanus russelli*)^[9]、河鲈 (*Takifugu rubripes*)^[10]、鳙鱼

(*Aristichthys nobilis*)^[11]、青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*)^[12] 等鱼类微卫星序列的研究结果显示,大多数鱼类基因组中 (CA)_n 或 (GT)_n 非常丰富。本研究根据这一结果,以 (CA)₁₅ 和 (GT)₁₅ 为探针,采用磁珠富集法筛选伊犁鲈微卫星序列的阳性克隆,利用 M₁₃ 反向引物和 (CA)₁₂ 及 (TG)₁₂ 核心序列引物再次进行 PCR 筛选。这一方法提高了阳性克隆序列中包含微卫星序列片段的准确率 (82.6%),降低了实验成本,同时增加了核心序列 (CA)_n 或 (GT)_n 的专一性,未检测到核心序列 3 个碱基或 3 个碱基以上的微卫星序列。

不同学者对微卫星核心序列的重复次数定义不一致,Scott^[13] 和高焕等^[14] 对二碱基核心重复序列的使用标准为 7 次或 7 次以上的重复,而 Becker 等^[15] 所用的标准为 5 或 5 以上。但只有在二碱基重复序列重复次数大于 12 次时,微卫星标记才有可能表现出较高的多态信息含量值^[16],重复次数多的微卫星既能在种间又能在种内产生多态性,但重复次数少的微卫星,仅能在种间产生多态性^[17]。本研究首次筛选 17 对伊犁鲈微卫星引物,其中有 13 对引物的重复次数大于 12 次,对伊犁鲈种群结构、遗传多样性及群体现状等研究有很高的利用价值,同时适合在近缘物种间的通用性研究。

遗传标记的多态性程度及其应用价值一般可用有效等位基因数、杂合度及多态信息量等指标来衡量。Bostein 等^[7] 提出的衡量基因变异程度高低的多态信息含量指标:当 PIC > 0.5 时,该基因座为高度多态基因座;当 0.25 < PIC < 0.5 时,为中度多态基因座;当 PIC < 0.25 时,则为低度多态基因座。本研究结果显示,伊犁鲈 17 对微卫星引物中,6 对引物在河鲈中具有高度多态性 (PIC > 0.5),而黄金鲈中 5 对引物具有高度多态性 (PIC > 0.5)、3 对引物具有中度多态性 (0.25 < PIC < 0.5)。说明鲈属鱼类微卫星侧翼序列在属内种间有保守性,同属鱼类中某一物种微卫星引物对该属其他物种中有一定的通用性。林能锋等^[18] 证明,大黄鱼

(*Pseudosciaena crocea*) 微卫星标记引物在黄鱼亚科鱼类中有较高的通用性,而马洪雨等^[19] 的研究结果显示,鲤 (*Cyprinus carpio*) 微卫星引物在同一科不同亚科的麦穗鱼 (*Pseudorasbora parva*) 中有通用性。这些研究结果证实了微卫星侧翼序列在属内种间和有较近亲缘关系的属间相当保守,且在基因组中有部分微卫星位点在亲缘关系较远的分类群间也有一定保守性的观点^[20-23]。

Barker^{*} 研究指出,在利用微卫星标记进行遗传距离分析时,要求微卫星标记的等位基因数不少于 4 个,少于 4 个或没有扩增条带的微卫星标记应该排除。本研究 YP3、YP4、YP6、YP8、YP11 和 YP17 等引物在河鲈中,YP3、YP8、YP11、YP15 和 YP17 等引物在黄金鲈中的 PIC > 0.5,等位基因数等于或大于 4。这些引物在河鲈或黄金鲈的群体遗传学研究领域中能提供确切的遗传信息,可利用这些位点来进行群体间遗传距离分析。

本研究应用磁珠富集法首次筛选了 17 对伊犁鲈微卫星引物,为从基因组水平研究伊犁鲈种群结构、遗传多样性及群体现状等提供了有力工具,对伊犁鲈种质资源的保护及开发利用具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 4, 1989, 124 ~ 190.
- [2] 任穆连, 郭炎, 张清礼等. 伊犁河鱼类资源及渔业. 哈尔滨: 黑龙江科学出版社, 1998, 284 ~ 296.
- [3] 中国科学院动物研究所, 中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所, 新疆维吾尔自治区水产局. 新疆鱼类志. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1979, 53 ~ 55.
- [4] 陈宏, 廖文林, 马建军等. 新疆额敏河伊犁鲈年龄及生长研究. 石河子大学学报 (自然科学版), 2000, 4(4): 289 ~ 294.
- [5] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for

* Barker J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proceeding of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Ontario: University of Guelph, 1994, 501 ~ 508.

- microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol*, 2002, **11**: 1 ~ 16.
- [6] 梁利群,孙效文,王鹏等. 利用鳍条提取样品总 DNA 初探. *生物技术*, 1994, **4**(1): 45 ~ 46.
- [7] Botsein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, **32**(3): 314 ~ 331.
- [8] Orit G, Pearse D E, Avise J. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, **94**: 10 745 ~ 10 749.
- [9] 郭昱嵩, 王中铎, 刘楚吾等. 勒氏笛鲷微卫星位点的筛选及特征分析. *遗传*, 2007, **29**(3): 355 ~ 359.
- [10] 崔建洲, 申雪艳, 杨官品等. 红鳍东方鲀基因组微卫星特征分析. *中国海洋大学学报*, 2006, **36**(2): 249 ~ 254.
- [11] 鲁翠云, 孙效文, 梁利群. 鳙鱼微卫星分子标记的筛选. *中国水产科学*, 2005, **12**(2): 192 ~ 196.
- [12] 刘立, 刘楚吾, 郭昱嵩等. 青石斑鱼微卫星 DNA 标记的筛选及群体遗传多样性分析. *中国水产科学*, 2008, **15**(1): 22 ~ 29.
- [13] Scott K D, Egger P. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, **100**: 723 ~ 726.
- [14] 高焕, 刘萍, 孟宪红等. 中国对虾基因组微卫星特征分析. *海洋与湖沼*, 2004, **35**(5): 424 ~ 431.
- [15] Becker J, Heun M. Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology*, 1995, **27**: 835 ~ 845.
- [16] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)n(dGdT)n polymorphisms. *Genomics*, 1990, **7**: 524 ~ 530.
- [17] Smulders M J M, Bredemeijer G, Rus-kortekaas W, *et al.* Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor Appl Genet*, 1997, **97**: 264 ~ 272.
- [18] 林能锋, 苏永全, 丁少雄等. 大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科几个近缘种中的通用性研究. *中国水产科学*, 2008, **15**(2): 237 ~ 343.
- [19] 马洪雨, 岳永生, 于艳等. 鲤微卫星引物对麦穗鱼的适用性初步研究. *水生生物学报*, 2007, **31**(2): 278 ~ 281.
- [20] McConnell S K, Hamilton L, Morris D, *et al.* Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 1995, **137**: 19 ~ 30.
- [21] Morris D B, Richard K R, Wright J M. Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic studies of salmonids. *Can J Fish Aquat Sci*, 1996, **53**: 120 ~ 126.
- [22] Rico C, Rico I, Hewitt G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc R Soc Lond*, 1996, **263**: 549 ~ 557.
- [23] Presa P, Guyomard R. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *J Fish Biol*, 1996, **49**: 1 326 ~ 1 329.