

跨种扩增筛选大鳄龟微卫星标记及遗传多样性分析

闵金金^{①②} 张加勇^① 郑荣泉^{①②*} 包得超^③

① 浙江师范大学生态研究所 金华 321004; ② 浙江师范大学特种水产研究所 金华 321004;

③ 浙江师范大学化学与生命科学学院 金华 321004

摘要: 跨种扩增是一种能够快速、有效地获得物种微卫星标记的方法。本研究利用在近缘种中已发表的微卫星 DNA 引物, 对大鳄龟 (*Macrolemys temminckii*) 进行跨种 PCR 扩增, 在合成的 69 对引物中获得 8 对具有多态性的微卫星位点。对 PCR 扩增产物进行统计, 得出观测杂合度 (H_o) 的范围是 0.041 7 ~ 0.954 5, 平均为 0.384 8; 期望杂合度 (H_e) 的范围为 0.041 7 ~ 0.811 8, 平均为 0.479 1; 多态信息含量范围为 0.040 0 ~ 0.759 2, 平均为 0.423 2; 经过卡方检验后, 部分微卫星位点符合哈迪-温伯格平衡。总体来说, 这些位点是研究大鳄龟遗传结构的良好分子标记。

关键词: 大鳄龟; 微卫星标记; 跨种扩增; 遗传多样性

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2013)06-926-07

Isolation of Microsatellite Markers by Cross-amplification and Genetic Diversity Analysis in *Macrolemys temminckii*

MIN Jin-Jin^{①②} ZHANG Jia-Yong^① ZHENG Rong-Quan^{①②*} BAO De-Chao^③

① Institute of Ecology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004;

② Institute of Special Aquaculture Source, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004;

③ College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract: The method of cross-amplification can be used to obtain microsatellite marker quickly and effectively. This study amplified microsatellite loci of *Macrolemys temminckii* using published microsatellite DNA primers from related species. In *M. temminckii*, 8 microsatellite loci which had polymorphism were found in 69 microsatellite markers. By analyzing PCR amplification products, a total of 30 alleles were detected, and the average number of alleles was 3.75. The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.041 7 to 0.954 5, and expected heterozygosity (H_e) was 0.041 7 to 0.811 8. PIC value was from 0.040 0 to 0.759 2, averaging 0.423 2. After chi-square test, some loci were found to correspond to Hardy-Weinberg equilibrium. In general, these loci are good molecular markers that can be used for studying genetic structure for *M. temminckii*.

Key words: *Macrolemys temminckii*; Microsatellite marker; Cross-amplification; Genetic diversity

基金项目 浙江省“十二五”水产育种重大专项 (No. 2012C12907-9), 浙江省重点科技创新团队自主确定项目 (No. 2010R50026-07), 浙江省大学生科技创新活动计划资助项目 (No. 2012R404068), 金华市科技局重点项目 (No. 2010-2-012);

* 通讯作者, E-mail: zhengrq@zjnu.cn;

第一作者介绍 闵金金, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物分子生物学; E-mail: zsd2011mjj@163.com。

收稿日期: 2013-01-21, **修回日期:** 2013-05-15

大鳄龟 (*Macrochelys temminckii*), 又名鳄鱼咬龟、鳄甲龟, 原产于北美洲的密西西比河流域, 是目前世界上最大的一种淡水龟。大鳄龟集食用、观赏、药用于一身, 是出肉率最高、生长速度最快的一种龟 (叶泰荣等 2007)。在原产地大鳄龟由于过度捕捉和贩卖, 种群数量急剧减少, 该物种已被世界自然保护联盟列为易危等级。近年来, 随着龟类养殖业的持续发展, 大鳄龟从国外进口繁育, 逐渐成为我国人工养殖的主要龟类品种之一。

微卫星 DNA (microsatellite DNA) 以其多态性高、稳定性高、特异性高、共显性遗传等特点被广泛应用于遗传多样性分析、构建遗传连锁图谱、亲子鉴定等领域 (战爱斌等 2006)。该技术已在其他龟类的群体研究中得到应用, 如乌龟 (*Chinemys reevesii*) (章芸等 2010)、黄喉拟水龟 (*Mauremys mutica*) (Zhang et al. 2010)、三趾箱龟 (*Terrapene carolina triunguis*) (Buchman et al. 2009)、玳瑁龟 (*Eretmochelys imbricata*) (Zolgharnein et al. 2011)、绿海龟 (*Chelonia mydas*) (Dutton et al. 2009) 等。目前对于大鳄龟的研究主要涉及其形态和繁殖 (Teare et al. 2009)、生长 (朱新平等 2001) 和孵化 (Rauschenberger et al. 2004) 以及人工养殖技术 (蒋张林 2004), 有关大鳄龟分子生物学研究较少, 颜亮等 (2008) 研究测得大鳄龟的线粒体控制区序列。但仍缺乏大鳄龟的遗传结构及相应分子标记的研究, 这极大地制约了大鳄龟的规模化养殖和该产业的可持续发展。本文采用跨种扩增的方法对大鳄龟的微卫星位点进行筛选, 并对得到的微卫星引物进行多态性分析, 以期为大鳄龟的遗传资源保护和遗传育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集及基因组 DNA 的提取 实验所用大鳄龟样本采自浙江省金华市绿之洋养殖场, 各样本均来自不同亲本后代, 共 24 只, 活体剪取其尾部肌肉并保存于 -20°C 冰箱中备用, 以防止细胞的裂解和 DNA 的降解。通过标准

的蛋白酶 K 消化和酚/氯仿抽提的方法 (Sambrook et al. 2001) 提取基因组 DNA。取组织 150 ~ 200 mg 剪碎, 转移至 1.5 ml 离心管中, 加入 800 μl DNA 提取液和 7 μl 蛋白酶 K (20 mg/ml), 56°C 水浴下消化约 4 ~ 5 h, 加入饱和酚及氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提 2 次后, 用二倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA 3 h 左右, 70% 的酒精洗涤沉淀 2 ~ 3 次, 干燥 DNA, 最后将 DNA 溶于 100 ~ 150 μl TE 或双蒸水中, -20°C 放置。

1.2 主要试剂和仪器 用于 PCR 反应的 dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶及 DNA Marker 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 主要仪器包括: Eppendorf 5417R 高速冷冻离心机、Eppendorf 恒温混匀仪、ThermoDNA 干燥仪、BIO-RAD 电泳仪、BIO-RAD 梯度 PCR 仪、BIO-RAD 紫外凝胶成像系统。

1.3 微卫星位点的选取 以已发表的与大鳄龟亲缘关系较近物种的微卫星位点作为候选引物, 对大鳄龟基因组 DNA 进行跨种 PCR 扩增。微卫星引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 共合成引物 69 对。

1.4 跨种 PCR 扩增及检测 PCR 反应体系为 25 μl , 包括 2.5 μl 10 × Buffer, 10 mmol/L dNTPs 2 μl , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 1 μl , DNA 模板 1 μl 以及 *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μl) 0.2 μl , 加 ddH₂O 17.3 μl 。PCR 热循环程序: 95°C 预变性 5 min 后进入循环, 95°C 变性 30 s, 特异性退火温度 (T_a) 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 共 32 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 反应产物用 2% 的琼脂糖胶检测, 经凝胶成像系统拍照, 判断是否为目标条带。其中最适退火温度利用梯度 PCR 来摸索, 对于有扩增产物的位点, 优化其反应条件和反应体系, 直至获得特异性高且稳定的扩增条带。

1.5 数据分析 根据每个个体产生的条带位置确定其基因型, 由 Popgene 1.32 软件计算各位点的等位基因数目 (number of alleles, N_A), 观测杂合度 (observed heterozygosities, H_o) 和期望杂合度 (expected heterozygosities, H_E), 同时

对各位点进行哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 卡方检验, 根据马可夫链算法 (Markov chain algorithm) 得到精确 P 值 (P_{H-W})。然后利用 Microsatellite toolkit 计算每个位点的多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取 在本实验室研究的基础上对酚氯仿法加以改善, 提取大鳄龟尾部肌肉组织的基因组 DNA。提取的 DNA 样品

全部稀释至 150 μ l 后, 取 3 μ l 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 大鳄龟的基因组 DNA 电泳结果见图 1。

2.2 微卫星引物的筛选和扩增 经过优化反应条件, 在 69 对微卫星引物中有 12 对能扩增出稳定的产物, 但只有 8 对引物的扩增片段有较稳定的多态性, 其余都表现为单态, 这 8 对引物的 GenBank 注册号、引物序列、重复单元、扩增产物长度以及根据梯度 PCR 得到的最佳退火温度详见表 1, 部分引物扩增结果见图 2。

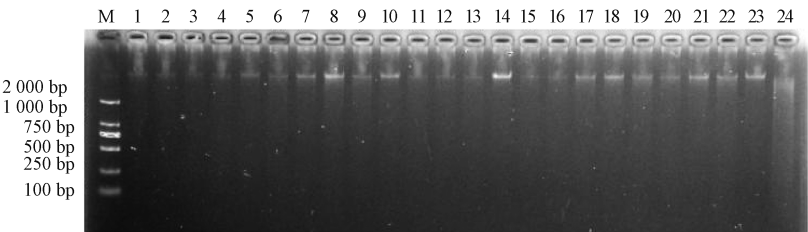


图 1 大鳄龟 DNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 The 1% agarose gel electrophoregram of *Macroclemys temminckii* DNA

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1 ~ 24. 24 个大鳄龟个体。

M. DL2000 DNA marker; 1 - 24. 24 individuals of *Macroclemys temminckii*.

表 1 大鳄龟的微卫星位点

Table 1 The summary of microsatellite loci of *Macroclemys temminckii*

位点名称 Locus	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物序列(5'—3') Primer sequences	重复序列 Repeat sequence	产物长度 Size range (bp)	退火温度(℃) Annealing temperature
PX2	GQ848294	TGAAGGTGCGTGCTGGTC GGCGGTGTTAGTCATCAGTTT	(TC) ₁₃ (AC) ₁₇	250 ~ 274	52. 8
PX49	GQ848307	GTCCCCAGCCACCTCTTC AGCCAGACAGATTGAGCC	(GT) ₃₄	180 ~ 200	55. 5
BHT9	GU236493	GGGACACCCTGACATTAA CAGGAAGAGCAGTCCGTTG	(AC) ₁₉	278 ~ 300	53. 2
BHT32	GU236495	GTGGGAAAGGAAGGGACA AACTTGGGTGCAGAGGGA	(CA) ₂₄	238 ~ 280	52. 8
BHT64	GU236504	TACAGGTGGAGAAATGCA TACTAAAGCGAGGGACGA	(GT) ₂₃	231 ~ 280	52. 0
LB106	HM217008	GGAGGAGGTTTAGGTTCCAGG AACCAAGCTTCACAATCATTCG	(TG) ₁₃	138 ~ 162	61. 3
Cc-2	EF679214	CCCCATAACACCACATCTC AGGTCACAAATGGAGCAAGC	(TA) ₄ (GA) ₁₃	225 ~ 233	55. 5
Cc-8	EF679216	TGATGGAAACCCCTTCAAAC TGTCACGGAGACACAAACATT	(GT) ₈ (AT) (GT) ₄	182 ~ 204	51. 2

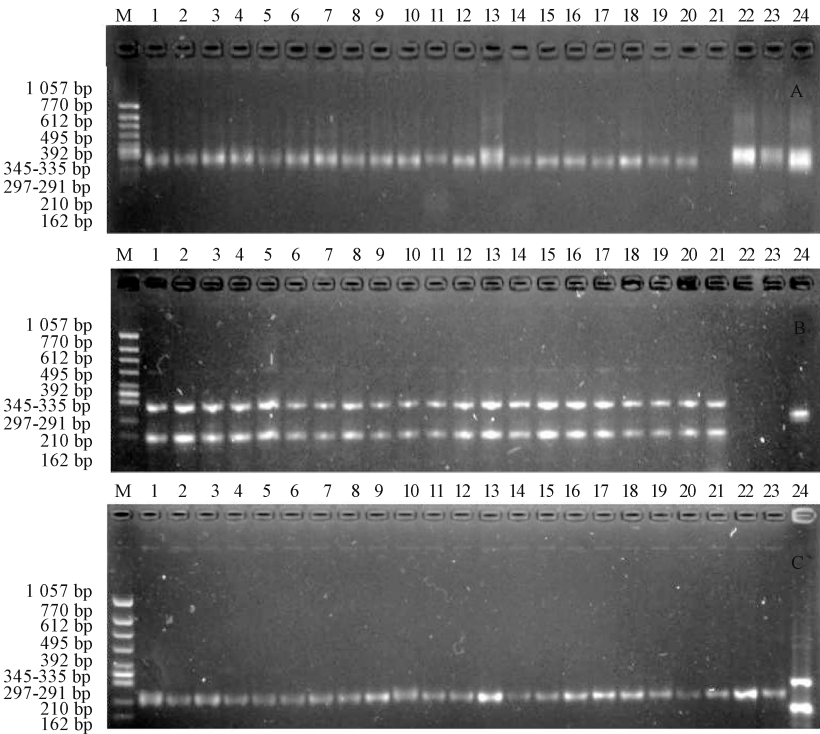


图 2 24 个大鳄龟个体微卫星琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 The agarose gel electrophoregram of microsatellite loci in 24 individuals of *Macrolemys temminckii*
A、B、C 分别为微卫星位点 BHT9、BHT32 和 BHT64 的图谱;M. DNA 分子量标准 Φ X174-Hinc II digest;1 ~ 24. 24 个大鳄龟个体。
A, B, C referred as electrophoretic patterns of microsatellite loci BHT9, BHT32 and BHT64; M. DNA Marker Φ X174-Hinc II digest;
1 ~ 24. 24 individuals of *Macrolemys temminckii*.

2.3 多态信息含量、遗传杂合度及 Hardy-Weinberg 检验 用筛选出的 8 个具有多态性的微卫星位点对 24 个大鳄龟的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增和电泳检测。经过 Popgene 1.32 软件和 Microsatellite toolkit 处理得到的等位基因数、观测杂合度、期望杂合度等详见表 2。

表 2 大鳄龟 8 个微卫星位点的等位基因数、杂合度、多态信息含量和 P 值						
Table 2 Number of alleles (N_A), Heterozygosity (H), polymorphism information content (PIC) and P value for testing HWE(P_{H-W}) of 8 microsatellite loci in <i>Macrolemys temminckii</i>						
位点名称 Locus	个体数 Number of samples analyzed (N)	等位基因数 Number of alleles (N_A)	观测杂合度 Observed heterozygosity (H_0)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_E)	多态信息含量 Polymorphism information content (PIC)	P 值 P value
PX2	24	4	0.545 5	0.677 6	0.598 6	0.282 7
PX49	24	5	0.571 4	0.811 8	0.759 2	0.010 3
BHT9	24	2	0.173 9	0.231 9	0.201 1	0.193 3
BHT32	24	3	0.954 5	0.555 0	0.436 7	0.000 0
BHT64	24	5	0.041 7	0.671 1	0.590 2	0.010 2
LB106	24	4	0.250 0	0.233 2	0.219 0	0.940 1
Cc-2	24	3	0.041 7	0.041 7	0.040 0	1.000 0
Cc-8	24	4	0.500 0	0.610 8	0.541 0	0.000 0

在 8 个多态性位点中共检测出 30 个等位基因,每个位点产生的等位基因数从 2 至 5 个不等,平均为 3.75 个。24 个大鳄龟个体的观测杂合度为 0.041 7~0.954 5,平均为 0.384 8。该群体 8 个位点的期望杂合度 0.041 7~0.811 8,平均为 0.479 1。8 个微卫星位点在 24 个个体的 PIC 值介于 0.040 0~0.759 2,平均为 0.423 2。

经 Bonferroni 校正后,Hardy-Weinberg 平衡的卡方检测发现,PX2、BHT9、LB106、Cc-2 位点未偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$),其余位点均处于偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态($P < 0.05$)。利用 Micro-checker 软件对偏离平衡的位点进行无效等位基因的检测,发现 PX49 和 BHT64 存在无效等位基因。

3 讨论

3.1 微卫星标记的筛选 微卫星标记的筛选方法包括:(1)通过构建特定大小片段的基因组文库筛选微卫星标记(徐金会等 2009);(2)构建微卫星富集文库筛选微卫星标记(海萨等 2009,章芸 2010,朱树人等 2011);(3)在 PCR 引物的 5'端加上简并锚定引物,通过省略筛选基因组文库得到该物种相对应的微卫星标记(冯友仁等 2000);(4)从已经公布的序列中(尤其是 EST 文库)筛查微卫星标记(徐鹏等 2003,石耀华等 2008);(5)利用近缘种之间引物的通用性得到目的物种的微卫星标记(孙波等 2009)。

微卫星 DNA 由核心序列和其两侧保守的侧翼序列组成,由于侧翼序列在进化上相对保守,根据侧翼序列设计的引物往往可以跨种通用,因此利用亲缘关系较近的物种已经发表的微卫星标记筛选目的物种的微卫星位点可以说是简便有效的方法,而且也有很多研究表明引物可以跨属甚至跨科通用(Monzon-Argueello et al. 2008, Roden et al. 2011, Davy et al. 2012)。Hackler 等(2006)利用构建部分基因组文库法筛选得到大鳄龟 2 个三核苷酸微卫星位点和 7 个四核苷酸微卫星位点。本实验利用

跨种扩增筛选大鳄龟微卫星标记,利用平胸龟(*Platysternon megacephalum*)(Peng et al. 2010, Yu et al. 2011)、太平洋丽龟(*Lepidochelys olivacea*)(Aggarwal et al. 2008)等已发表的微卫星引物进行大鳄龟的微卫星位点扩增,从合成的 69 对引物中筛选得到 8 对多态性引物。与其他龟类相比,本实验大鳄龟跨种扩增率较低。如 Roden 等(2011)利用棱皮龟(*Dermochelys coriacea*)中筛选的 14 对微卫星引物对太平洋丽龟、玳瑁龟、蠵龟(*Caretta caretta*)等进行了扩增,发现其中的 7 对是可以稳定扩增并且呈多态性的;Monzon-Argueello 等(2008)利用蠵龟的 12 对微卫星引物对绿海龟、玳瑁龟和棱皮龟进行了扩增,最终分别得到了 8 对、11 对和 3 对多态性引物。本实验扩增得到的 8 对引物中的 5 对均来自平胸龟,一定程度上说明了这两物种的亲缘关系,支持了郑将臣等(2011a,b)的研究观点,认为平胸龟应归于鳄龟科的一个属。

3.2 群体遗传多样性分析 群体的多态信息含量和遗传杂合度都可用来衡量群体内的遗传多样性,其数值越大,说明基因丰富度越高,该生物群体具有更大的适应环境变化和自然选择的能力(鲁双庆等 2005, Chen et al. 2012)。本研究在 8 个多态性位点中共检测出 30 个等位基因,平均观测杂合度是 0.384 8,平均期望杂合度是 0.479 1,总体上该群体的基因丰富度较高。

核心部分碱基重复数目的不同是微卫星多态性的基础,微卫星的多态性水平可用多态信息含量值(PIC)衡量。一般情况下,PIC 能反映出某个遗传标记所包含的或所能够提供的遗传信息容量。Botstein 等(1980)首先提出了衡量基因变异程度高低的的多态信息含量指标,当 $PIC > 0.5$ 时,该位点可提供丰富的遗传信息,为高度多态性位点;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,该位点能够较为合理地提供遗传信息,为中度多态性位点;而当 $PIC < 0.25$ 时,该位点提供的遗传信息较差,为低度多态性位点。从本研究的结果中可以看出,8 个位点的平均多态信息含

量为 0.423 2, 高度多态性位点占总位点数的 50%。

当群体处于 Hardy-Weinberg 平衡时, 各等位基因在群体中的分布频率应该是相对稳定的, 观测杂合度和期望杂合度之间没有显著的差异。经卡方检验, 发现 PX49、BHT32、BHT64、Cc-8 微卫星位点显著地偏离了 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.05$)。出现 Hardy-Weinberg 不平衡的原因, 通常是由于华伦德效应 (Wahlund effects)、近亲繁殖、无效等位基因等导致的杂合度不足 (Zheng et al. 2009, 叶容晖 2009)。通过 Micro-checker 软件对位点进行检测, 发现 PX49、BHT64 微卫星标记存在无效等位基因, 这可能是造成偏离 Hardy-Weinberg 平衡的主要原因。养殖群体由于其长期高强度的人工选择和高密度养殖以及分析样本数目较少等都可能使部分位点杂合子缺失, 这也可能是造成偏离 Hardy-Weinberg 平衡的原因 (杨成等 2008)。

总的来说, 筛选出的 8 个微卫星位点是适用于大鳄龟种群遗传学分析的良好分子标记, 可进一步用于大鳄龟的遗传多样性和群体遗传结构的研究。

参 考 文 献

- Aggarwal R K, Lalremruata A, Velavan T P, et al. 2008. Development and characterization of ten novel microsatellite markers from olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Conservation Genetics*, 9(4): 981–984.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3): 314–331.
- Buchman A B, Deaton R, Randle C P, et al. 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the three-toed box turtle (*Terrapene carolina triunguis*) and cross-amplification in other terrapene species. *Molecular Ecology Resources*, 9(4): 1169–1171.
- Chen Q, Wang C H, Lu G Q, et al. 2012. Microsatellite genetic diversity and differentiation of native and introduced grass carp populations in three continents. *Genetica*, 140(4/6): 115–123.
- Davy C M, Leifso A E, Conflitti I M, et al. 2012. Characterization of 10 novel microsatellite loci and cross-amplification of two loci in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Conservation Genetics Resources*, 4(3): 695–698.
- Dutton P H, Frey A. 2009. Characterization of polymorphic microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology Resources*, 9(1): 354–356.
- Hackler J C, van den Bussche R A V, Leslie D M. 2006. Characterization of microsatellite DNA markers for the alligator snapping turtle, *Macrochelys temminckii*. *Molecular Ecology Notes*, 7(3): 474–476.
- Monzon-Arguuello C, Munoz J, Marco A, et al. 2008. Twelve new polymorphic microsatellite markers from the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) and cross-species amplification on other marine turtle species. *Conservation Genetics*, 9(4): 1045–1049.
- Peng J, Yu D, Hu S, et al. 2010. New microsatellite resources in Chinese big-headed turtle (*Platysternon megacephalum*). *Conservation Genetics Resources*, 2(1): 55–57.
- Rauschenberger R H, Trauth S E, Farris J L. 2004. Incubation of alligator snapping turtle (*Macrochelys temminckii*) eggs in natural and agricultural soils. *Applied Herpetology*, 1(3/4): 299–309.
- Roden S E, Dutton P H. 2011. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) and cross-species amplification. *Conservation Genetics Resources*, 3(1): 49–52.
- Sambrook J, Russell D W. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor-Laboratory Press, 26–118, 611–627.
- Teare A R, Rostal D C. 2010. Reproductive biology of the alligator snapping turtle (*Macrochelys temminckii*). *Integrative and Comparative Biology*, 49(S1): 314.
- Yu D M, Peng J J, Hu S J, et al. 2011. Development of 19 dinucleotide microsatellite markers from the enriched library of *Platysternon megacephalum*. *Biochemical Genetics*, 49(7/8): 443–448.
- Zhang Y, Zhang J Y, Zheng R Q. 2010. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the Asian yellow pond turtle, *Mauremys mutica* (Cantor, 1842). *Aquaculture Research*, 41(9): 353–356.
- Zheng R Q, Ye R H, Yu Y Y, et al. 2009. Fifteen polymorphic microsatellite markers for the giant spiny frog, *Paa spinosa*. *Molecular Ecology Resources*, 9(1): 336–338.
- Zolgharnein H, Salari-Aliabadi M A, Forougmmand A M, et al. 2011. Genetic population structure of hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) using microsatellite analysis. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(1): 56–62.

- 冯友仁, 牛安欧. 2000. 微卫星简单重复序列锚定 PCR 扩增技术(SSR-PCR)及其在寄生虫基因研究中的应用. 实用寄生虫病杂志, 8(1): 33–36.
- 海萨, 李家乐, 刘峰, 等. 2009. 伊犁鲈微卫星位点的筛选及近缘物种通用性. 动物学杂志, 44(1): 17–23.
- 蒋张林. 2004. 鳄鱼人工养殖技术. 中国林副特产, (1): 31.
- 鲁双庆, 刘臻, 刘红玉, 等. 2005. 鲫鱼 4 群体基因组 DNA 遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析. 中国水产科学, 12(4): 371–376.
- 石耀华, 洪葵, 郭希明, 等. 2008. 马氏珠母贝 EST 微卫星的筛选. 水产学报, 32(2): 174–181.
- 孙波, 鲍毅新, 张龙龙, 等. 2009. 大鼠及小鼠微卫星引物在社鼠中的跨种扩增. 动物学杂志, 44(6): 145–150.
- 徐金会, 王琳琳, 薛慧良, 等. 2009. 喜马拉雅旱獭种群微卫星变异及遗传多样性. 动物学杂志, 44(2): 34–40.
- 徐鹏, 周令华, 田丽萍, 等. 2003. 从中国对虾 ESTs 中筛选微卫星标记的研究. 水产学报, 27(3): 213–218.
- 颜亮, 张雁, 汪宁, 等. 2008. 鳄鱼科和平胸龟科线粒体控制区序列分析和结构比较. 动物学研究, 29(2): 127–133.
- 杨成, 朱新平, 郝君, 等. 2008. 鲛鱼微卫星标记的分离与鉴定. 上海水产大学学报, 17(2): 158–163.
- 叶容晖. 2009. 棘胸蛙微卫星分子标记筛选及其种群遗传分析. 浙江: 浙江师范大学硕士学位论文, 6–20.
- 叶泰荣, 李家乐, 李应森. 2007. 鳄龟的营养成分分析. 现代渔业信息, 22(6): 6–9.
- 战爱斌, 包振民, 陆维, 等. 2006. 仿刺参的微卫星标记. 水产学报, 30(2): 192–196.
- 章芸. 2010. 两种淡水龟微卫星标记的筛选及乌龟养殖群体遗传多样性分析. 浙江: 浙江师范大学硕士学位论文, 17–35.
- 章芸, 俞丹娜, 杜卫国, 等. 2010. 微卫星标记分析乌龟养殖群体的遗传多样性. 水产学报, 34(11): 1636–1644.
- 郑将臣, 万全, 程起群, 等. 2011a. 基于两个核基因序列研究龟鳖类的系统进化特征. 大连海洋大学学报, 26(5): 452–457.
- 郑将臣, 万全, 程起群, 等. 2011b. 基于 16S rRNA 序列探讨龟鳖类的遗传分化和系统发生. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 37(2): 199–205.
- 朱树人, 李忠全, 冯晓宇, 等. 2011. 乌鳢和斑鳢微卫星制备及其对自交与杂交 F1 代的初步鉴定. 动物学杂志, 46(4): 1–7.
- 朱新平, 陈永乐, 刘毅辉, 等. 2001. 黄喉拟水龟、三线闭壳龟、鳄鱼的生长比较研究. 水产学报, 25(6): 507–511.