大珠母贝微卫星 DNA 标记的分离与筛选

柳 明^{1,2}, 喻达辉¹, 黄桂菊¹

(1. 农业部海水养殖生态与质量控制重点开放实验室,中国水产科学研究院 南海水产研究所,广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院,上海 201306)

摘要:采用生物素标记的(CA)₁₅探针和磁珠富集法构建了大珠母贝(Pinctada maxima)微卫星 DNA 文库, 随机挑选 1200 个菌落,经 PCR 筛选得到 298 个候选克隆,成功测序 246 个,分析获得 251 个微卫星序列, 其中完美型、非完美型和混合型分别占 63%、32%和 5%。除探针中使用的 CA 重复外,还得到 AT、 GT、TC、AG、GC、TAA、CAA、AGG、GATA、GACA、GTGC、CGTC、GACG、CTGT 等重复序 列。设计引物 90 对,挑选其中 30 对合成并筛选出 21 对能在大珠母贝基因组有效扩增的引物。种群 PCR 扩增后利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行检测,获得了 10 个多态位点,共检测出 59 个等位基 因,片段长度范围为 133~444 bp。各位点等位基因数 2~8 个,平均等位基因数 5.9 个;有效等位基因数为 1.342 3~6.000 0,平均为 4.124 0;多态性信息含量(CPI)为 0.222 5~0.811 8,平均 0.7179;期望杂合度(H_e)为 0.259 3~0.847 5,平均 0.717 9;观测杂合度(H_o)为 0.300 0~0.800 0,平均 0.533 3。这些微卫星多态性标记的 获得,为进一步开展大珠母贝遗传育种、保护生物学和种群遗传多样性等研究奠定了一定基础。

关键词:大珠母贝(*Pinctada maxima*);磁珠富集法;微卫星;遗传多样性 中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2010)08-0001-05

大珠母贝(Pinctada maxima), 俗称白蝶贝, 属于 软体动物门双壳纲异柱目珍珠贝科珠母贝属 (Pinctada)。主要分布于热带海域,如澳大利亚、菲 律宾、马来西亚、印度尼西亚等地[1]。大珠母贝经济 价值很高, 其肉(闭壳肌)质味道鲜美、营养丰富, 堪 称为宴席佳品。它的壳形独特、珍珠层厚而有美丽光 泽, 是名贵的工艺原料。用大珠母贝养殖出来的珍珠 颗粒大, 色泽好, 价格高, 既是贵重的装饰品, 又是 名贵药材。我国的大珠母贝资源本来就很少、属于国 家二级保护动物,过度利用使其更处于濒危状态, 因此不能直接用野生大珠母贝进行育珠生产而必须 使用人工繁殖个体。人工养殖贝育成的珍珠一致性 和质量都较高。然而大珠母贝的海区养殖一直难以 成功,幼贝出现大规模死亡现象,导致其珍珠养殖不 能实现产业化开发。其原因除了养殖环境恶化外、种 质资源的衰退也是重要原因之一。因此开展遗传选 育,改良种质是有效开发大珠母贝资源的重要途径。 在开发过程中、对选育群体进行遗传多样性分析和 监测是十分必要的。微卫星 DNA 是遗传多样性分析 和分子标记辅助育种最适遗传标记之一。但大珠母 贝的微卫星标记数量不多。Evans 等^[2]报道了 6 个多 态标记和 Smith 等^[3]报道了 8 个微卫星标记, 远不能 满足应用的需要,因此必须开发大量的微卫星标记。

本实验采用生物素-磁珠富集法和探针杂交相结 合的方法,构建了大珠母贝的微卫星富集文库,筛 选大珠母贝的微卫星标记,为大珠母贝的遗传育种、 保护生物学和种群遗传多样性等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

用于微卫星分离的大珠母贝样品于 2008 年 8 月 采集于海南三亚,用于微卫星多态引物筛选的大珠 母贝 30 个样品个体于 2007 年 7 月采集于海南三亚 养殖群体,取闭壳肌保存于 95%酒精中。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

按照传统的酚-氯仿法^[4] 提取基因组 DNA, 溶

Marine Sciences / Vol. 34, No. 8 / 2010

收稿日期: 2010-02-24; 修回日期: 2010-04-23

基金项目:国家 863 计划项目(2006AA10A415);国家科技支撑计划 项目(2007BAD29B01-5);广东省科技推广项目(A200701C02, A200-899C04, A200900A07);中央级公益性科研院所基本科研业务费资助 项目(2007TS07, 2009YD02)

作者简介:柳明(1984-),男,硕士研究生,从事海洋生物技术研究, E-mail: gameboyliuming31@163.com;喻达辉,通信作者,E-mail: pearlydh@163.com

于 100 μL 灭菌双蒸水中, -20℃保存待用。 1.2.2 基因组 DNA 酶切、接头连接与 PCR 扩增

基因组 DNA 用内切酶 Msel 酶切 3 h, 20 μL 反应 体系包括: 10×NEB Buffer2 2 µL, 100×BSA 0.2 µL, MseI (10 U/µL) 0.5 µL, 20 mg/LDNA 模板 3 µL, ddH₂O 14.3 μL。将酶切产物与双链接头(接头 A 序列 为: 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3', 接头 B 序列为: 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3') 于 16 ℃连接过夜, 反应体系如下: 10 mmol/L T4 DNA ligase 缓冲液 2 µL, 50 mmol/L 接头 1.8 µL, 酶切产物 11 µL, 400 U/µL 的 T4 DNA ligase 0.2 μL。连接产物用简并引物 MseI-N [5'-GAT GAG TCC TGA GTA A(N)-3']进行 PCR 扩增, PCR 反应总体积 20 uL、包括 10×PCR buffer 2.0 uL、 10 mmol/L dNTPs 0.4 µL, 50 mmol/L MseI-N 0.2 µL, 1U Taq 酶, 10×连接产物 2 µL。反应程序如下: 95 ℃ 预变性 5 min, 然后进行 PCR 循环。循环参数为: 95 ℃变性 30 s, 53 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 循环 数进行梯度筛选,分别做 14、17、20、23、26 个循 环、以确定最佳循环数、最后 72 ℃延伸 5 min。

1.2.3 探针杂交与磁珠富集

将杂交缓冲液 70 μL、PCR 产物 25 μL 和生物素 标记的(CA)₁₅探针(10 µmol/L)5 µL 混合, 于 65 ℃杂 交1h。结束后、将磁珠加入到100mL杂交液中、室 温温浴 30 min,移去杂交液并保存。用 400 µL 的 TEN1000^[5]于室温下洗涤磁珠 3 次、每次 5 min、保 留第 3 次的洗脱液。用 400 μL 的 0.2×SSC(含 0.1%SDS)洗3次,每次5min,保留第3次的洗脱液。 用 400 μL TEN1000 再洗 5 min, 保存洗脱液。加 100 μL TE 重悬磁珠, 100 ℃水浴 10 min, 将 DNA 从磁珠-探 针-DNA 混合物中分离,水浴结束后将离心管置于磁 架上, 吸出含有 DNA 片段的洗脱液, 然后立刻置于 冰上。用 100 μL TE 再次重悬磁珠,保存洗脱液。以 上述 6 管洗脱液为模板,用引物 MseI-N 进行 PCR 扩 增,将 PCR 扩增产物于 1.5%的琼脂糖凝胶上电泳, 检测富集效果。富集效果好的样品用 DNA Gel Extraction Kit(AXYGEN)回收纯化 PCR 产物, 纯化产物 按常规方法与pMD20-T载体16℃连接过夜,将连接 产物转化到大肠杆菌感受态细胞中进行培养、构建 微卫星富集文库。

1.2.4 富集文库的筛选、测序与引物设计

挑选单克隆, 接种到含有氨卞青霉素的 LB 培养 基中, 37 ℃振荡培养 2 h, 菌液用载体通用引物和探 针序列引物进行 PCR 筛选鉴定, 经 1.5%琼脂糖凝胶 中电泳检测,选取符合条件的候选克隆送上海生工 生物技术有限公司进行 DNA 测序。利用 Clustal X^[6] 对序列特征进行分析,并用引物设计软件 primer 5.0 对所得的微卫星序列设计引物。

1.2.5 微卫星多态引物的筛选

将引物稀释成 10 μ mol/L, 取海南三亚养殖群体 共 30 个个体, 进行 PCR 扩增, 体系如下: 10×PCR buffer 2.0 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.4 μ L, 10 μ mol/L 正、反向引物各 0.5 μ L, 5 g/L *Taq* 酶 0.2 μ L, 20 mg/L DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 14.4 μ L。通过调整退火温度, 来获得最佳 PCR 条件,将 PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝 胶进行电泳, EB 染色,将有目的条带出现的 PCR 产 物再进行 5%(w/v)聚丙烯酰胺凝胶电泳,筛选具有多 态性的引物。

1.3 数据统计与分析

统计每个位点的等位基因数量(A),用 Pop-Gen1.32 软件^[7]来计算群体的有效等位基因数(A_e)、 观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)、Hardy-Weinberg 平衡偏离指数(D)以及卡方检验(P_{HW})。根据 Botstein 等^[8]的公式计算每个微卫星位点的多态性信息含量 (C_{PI}),计算公式如下:

$C_{\rm PI} = 1 - \sum f_i^2 - \sum \sum 2f_i^2 f_i^2$

式中*f_i*和 *f_j*分别表示某一位点第 *i* 个和第 *j* 个等位基因在群体中的频率。

2 结果与分析

2.1 微卫星 DNA 的分离筛选

用内切酶 Msel 对基因组 DNA 进行酶切后用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,发现酶切片段主要集中 在 200~1 000 bp,符合构建基因组文库的要求。通过 探针杂交,磁珠吸附,清洗和洗脱,PCR 扩增,载体 连接和转化等步骤,构建了大珠母贝基因组微卫星 富集文库,共获得近 2 000 个阳性克隆,随机挑选 1 200 个克隆进行 PCR 检测。选取具有稳定扩增带的 阳性克隆 298 个进行测序,分析测序结果获得了 211 个含有重复次数大于或等于 6 的微卫星序列。211 个 序列共含有 251 个微卫星位点,一般每个克隆含有 1~3 个位点,其中 1 个克隆含有 6 个位点,微卫星序 列长度大小范围为 101~787 bp。对所得微卫星位点 进行分类,发现(CA/GT),微卫星重复序列 204 个,占 了绝大多数,此外还发现了 AG、AT、GC、TC、CAA、 AGG、GATA、GACA、GTGC、GACG等重复类型。 根据 Weber^[9]提出的微卫星序列分类标准,在所获得 的微卫星位点中,完美型159个,占63%;非完美型 80个,占32%;复合型12个,占5%。

2.2 微卫星引物的筛选

根据包含微卫星位点的序列、用引物设计软件

表1 10 对多态性微卫星引物序列

Tab. 1 Sequences of ten pairs of polymorphic microsatellite primers

位点 引物序列(5'-3') GeneBank 序列号 片段长度(bp) 退火温度(℃) F: CAAAGTCCAAGGGCTATTA M140 HM357117 208~223 58 R: TCTGGCGTCTCCACTGTAT F: GGGTCAGCCAATAAGAGC M393 HM357118 419~434 57 R: AAACACGGGTCACAAACA F: TTTAGCCGAAGTCCACTG HM357119 252~267 M412 58 R: ATATGCGAGCGAACAATC F: TCAACTAAGAACTGGGGTCA M622 HM357120 156~166 55 R: GTGGTCAGACGAAGGAAAGT F: AGGGTCAGGGTTCTGTTTC 198~213 M781 HM357121 49 R: CTTTGGGAGTGAGGAATGA F: TTTGCTTTTGTTTACTTGC M821 HM357122 247~262 52 R: TCTTTTGTCGAAATCACGT F: GGTAGTGGGAAGTAACCTGG M925 HM357123 414~444 58 R: AGATCGCTTGTAATGGGAAT F: ATTGAGGGTTTCATATTGC M1265 HM357124 133~148 52 R: GGTCACTTTTCCTTTGCT F: CGAGGTTTCACTATCCGTAA M1331 HM357125 164~189 55 R: CAGAGTCCGAACTTGAGCAT F: GGCGTGAAATGAAAGACAGT HM357126 205~230 M1758 58 R: AATTTGGGTGTTTGCTTGTT

注: F 表示正向引物; R 表示反向引物

2.3 微卫星位点多态性分析

使用 PopGen1.32 软件对所得的微卫星多态性位 点进行数据分析,由表 2 可知, 10 个位点共获得 59

个等位基因,其中M412位点检测出的等位基因最多 (8个), M393位点的等位基因最少(2个), 大部分位点 为 5~7个,大小在 133~444 bp之间,表现出高度多态

表 2	10	个微]	1星多?	您性位	点的数排	据统计	
Tab	2	The et	tinting.	ofton		atallita	lasi

Tab. 2 The statistics of ten microsatellite for
--

ind, a the statistics of ten interosatelinte loci										
	A	A_e	H_o	H_e	D	$P_{\rm HW}$	C_{PI}			
M140	7	2.4759	0.6000	0.6062	-0.0102	0.0311	0.5630			
M393	2	1.3423	0.3000	0.2593	0.1570	0.3655	0.2225			
M412	8	5.0139	0.5333	0.8141	-0.3449	0.0000	0.7729			
M622	5	4.3062	0.3667	0.7808	-0.5304	0.0000	0.7281			
M781	4	3.3708	0.8000	0.7153	0.1184	0.0553	0.6485			
M821	7	4.6632	0.6333	0.7989	-0.2073	0.0000	0.7568			
M925	7	5.5728	0.5333	0.8345	-0.3609	0.0032	0.7908			
M1265	6	5.3254	0.5333	0.8260	-0.3544	0.0001	0.7841			
M1331	7	6.0000	0.5000	0.8475	-0.4100	0.0001	0.8118			
M1758	6	3.1690	0.5333	0.6960	-0.2338	0.6906	0.6356			
平均值	5.9	4.1240	0.5333	0.7179	-0.2177	0.1146	0.6714			

注: A. 等位基因数; A. 有效等位基因数; H. 观测杂合度; H. 期望杂合度; D. 遗传偏离指数 D=(H₀-H_e)/H_e; P_{HW}. 哈代-温伯格平衡显著 性检验 0.05 水平的 P 值; CPI: 多态信息含量

primer 5.0 设计引物, 共设计引物 90 对, 随机挑选了 其中 30 对送去上海生物工程有限公司合成。通过优 化 PCR 反应条件, 筛选出 21 对能够稳定扩增的引物。 将有目的条带出现的 PCR 产物再进行 5%(w/v)聚丙烯 酰胺凝胶电泳,筛选出10对多态性引物(表1)。

性。有效等位基因数(*A*_e)为 1.342 3~6.000 0, 平均为 4.124 0; 观测杂合度(*H*_o)的范围为 0.300 0~0.800 0, 平均为 0.533 3; 期望杂合度(*H*_e)范围为 0.259 3~ 0.847 5, 平均为 0.717 9; 多态性信息含量(*C*_{PI})在 0.222 5~0.811 8 之间, 平均为 0.671 4。根据杂合度计 算的遗传偏离指数(*D*),发现除了 M393和 M781 位点 为正值外,其余各位点均表现为不同程度的杂合子 缺失。根据 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验(*P*_{HW}), 只有 M393、M781 和 M1758 位点处于平衡状态 (*P*_{HW}>0.05),其他位点都不同程度地偏离了平衡。

3 讨论

磁珠富集法是一种简单快速的筛选微卫星的方 法,通过带有链霉亲和素的磁珠亲和捕捉生物素标 记的微卫星探针结合的 DNA 基因组片段、从而获得 高度富集微卫星小插入片段的基因组文库、且获得 的微卫星重复序列的比例比小克隆的比例高^[10],目 前国内外较多采用这种方法^[11,12]。本实验在所测 298 个克隆中有 211 个含有微卫星序列、阳性克隆率高 达 70.81%。姬长虹等^[13]的报道为 95.3%, 李小宁等^[14] 为 88.5%, 说明此法是一种高效快速的微卫星标记 分离方法。但贝类多态位点的筛选效率相对较低、需 要设计大量的引物才能获得为数不多的多态标记[15], 本实验合成的 30 对引物中仅有 10 对扩增出具有多 态性的目的条带、曲妮妮等^[16]在筛选合浦珠母贝微 卫星标记的研究中 49 对引物只有 9 对具有多态性。 出现这类情况的原因可能与贝类个体之间的遗传变 异程度较大有关。Arias 等^[17]对扇贝的 SNPs 检测, 发现大约 100 个碱基就出现 1 次 SNP。Sauvage 等^[18]对太平洋牡蛎(Crassostrea gigas)的研究,发现 在编码区平均每60 bp 出现1 次 SNPs, 在非编码区 每 40 bp 就出现 1 次 SNPs。这些高频率的点突变为 微卫星引物的扩增筛选带来了很大困难。

在动物基因组中微卫星大约 6~10 kb 就出现一次^[19],其中二碱基重复类型(CA/GT,AG/TC,AT/TA)的微卫星最为常见^[20,21]。本实验采用了其中的(CA)₁₅ 探针,在所得的 251 个微卫星位点中,含(CA/GT)*n* 的有 204 个,约占总数的 81%,其次是(AG/TC)*n* 和 (AT)*n*,各有 24 和 6 个,分别占总数的 10%和 2%。 结果表明在大珠母贝中除了有大量的双碱基序列外, 还有其他三碱基、四碱基和四碱基以上的微卫星序 列,因此可以考虑采用其他类型的探针研究开发大 珠母贝基因组微卫星,以便获得更多的微卫星分子 标记。

微卫星核心序列突变率相对较高,造成了微卫 星核心序列重复次数的变化、这是微卫星多态性的 基础^[22]。Ellegren^[23]认为真核生物中微卫星重复碱基 重复序列长度大多在 30 次重复以下,本实验所得序 列重复次数在 8~25 的有 58%, 与上述分析微卫星的 结论相似。关于微卫星重复数与多态性的关系、多数 学者认为微卫星重复次数与多态性之间存在正相关, Valdes^[24]认为重复次数低于 5 的微卫星几乎检测不 出多态性,一般微卫星的核心序列重复次数越高, 其等位基因数也就越多、即多态性也就越高^[25]。但较 长的(AT)n 容易形成二级结构而造成 PCR 效率下降, 以及在电泳分离中造成较大误差、并会给测序工作 带来一些麻烦^[26]。本研究所得的大珠母贝微卫星序 列中,除去(AT)n 重复单元以外,重复次数在 5 次以 上的约占 94%。因此理论上讲,设计的引物可以进行 群体的遗传多样性研究

杂合度是度量群体变异的一个重要参数^[27]、包 括观测杂合度和期望杂合度。本实验所获得的 10 个 微卫星位点有 8 个位点的观测杂合度低于期望杂合 度, 其范围相应地低于 Smith 等^[3]报道的 $H_0(0.479\sim$ 0.891) 和 H_e(0.872~0.972), 与 Evans 等^[2] 报道的 $H_0(0.172\sim0.813)$ 和 $H_c(0.163\sim0.878)$ 比较接近, 与谷 龙春等^[28]报道的 H_o(0.167~0.833)相近, 而略低于其 H_e(0.658~0.915)。C_{PI} 值是等位基因频率和数目变化 的函数, 是衡量片段多态性的较好指标, 能反映出 某个遗传标记所含的遗传信息容量。根据 Bostein `等^[8]提出的衡量基因变异程度高低的多态信息含量 指标,当 $C_{\rm PI} > 0.5$ 时,该基因座为高度多态基因座; 当 0.25 < C_{PI} < 0.5 时,为中度多态基因座;当 C_{PI}< 0.25 时,则为低度多态基因座。试验中开发的10个 微卫星基因座除 M393 为低度多态性外、其他 9 个均 为高度多态性、表明这些微卫星位点适合大珠母贝 的遗传多样性研究。结果为进一步开展大珠母贝的 遗传多样性、遗传连锁图谱构建和遗传选育等研究 工作奠定了一定基础。

参考文献:

- [1] 姜因萍,何毛贤.大珠母贝的研究概况[J].海洋科学, 2009, **33**(2): 92-96.
- [2] Evans B S, Knauer J, Taylor J U, *et al.* Development and characterization of six new microsatellite markers for the silver-or gold-lipped pear oyster, *Pinctada*

海洋科学 / 2010 年 / 第 34 卷 / 第 8 期

maxima (Pteriidae) [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(3): 835-837.

- [3] Smith C, Benzie J A H, Wilson K J. Isolation and characterization of eight microsatellite loci from silver-lipped pearl oyster *Pinctada maxima*[J]. Molecular Ecology Notes, 2003, 3 (1): 125-127.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Labortory Manual[M]. NewYork: Cold Spring Harbour Press, 1989. 463-468.
- [5] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. Molecular Ecology, 2002, 11: 1-16.
- [6] Jeffs P. Multiple sequence alignment with Clustal X[J].
 Computer Corner, 1998, 23(1): 78-80.
- [7] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of Co-dominant and dominant markers and quantitative traits [J]. Belgian Journal of Botany, 1997,129: 157.
- [8] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Constructio of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [9] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7(3): 524-530.
- [10] 孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 磁珠富集法与小片段 克隆法筛选鲤微卫星的比较研究[J]. 中国水产科学, 2005, **12**(2): 126-132.
- [11] Li Q, Kijima A. Identification of novel microsatellite loci in the Pacific oyster (*Crassastrea gigas*) by magnetic bead hybridization selection[J]. Tohoku Journal of Aqricultural Research, 2002, 53 (1-2): 25-32
- [12] 孙效文, 鲁翠云, 梁利群. 磁珠富集法分离草鱼微卫 星分子标记[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 482-486.
- [13] 姬长虹, 孙效文. 用磁珠富集法快速制备银鲫微卫星标记[J]. 大连水产学报, 2007, 22(6): 460-464.
- [14] 李小宁,张殿昌,江世贵,等. 合浦珠母贝微卫星
 DNA 标记分离与分析[J]. 福建水产,2009, 13(5):
 48-54.
- [15] Herbinger C M, Smith C A, Langy S. Development and characterization of novel tetra- and dinucleotide microsatellite markers for the French Polynesia black-lipped pearl oyster, *Pinctada margaritifera*[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 107-109.

- [16] 曲妮妮, 龚世圆, 黄桂菊, 等. 基于 FIASCO 技术的 合浦珠母贝微卫星标记分离与筛选研究[J]. 热带海 洋学报, 2010, 29(3): 1-8.
- [17] Arias A, Freire R, Boudry P, et al. Single nucleotide polymorphism for population studies in the scallops Aequipecten opercularis and Mimachlamys varia[J]. Conserv Genet, 2008, 56: 1000-1007.
- [18] Sauvage C, Bieme N, Lapegue S, et al. Single Nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster Crassostrea gigas[J]. Gene, 2007, 406(1-2): 13-22.
- [19] Wang Y, Guo X. Chromosomal rearrangement in Pectinidae revealed by rRNA loci and implications for bivalve evolution[J]. Biological Bulletin, 2004, 207(3): 247-256.
- [20] Chistiako D A, Helleman B, Volckaert F A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics[J]. Aquaculture, 2006, 255(1-4): 1-29.
- [21] Brenner S, Elgar G, Sandford R, *et al.* Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome [J]. Nature, 1993, 366: 265-268.
- [22] 刘志毅,相建海. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物 遗传分子中的应用[J]. 海洋科学, 2001, **25**(6): 11-13.
- [23] Ellegren H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation[J]. Trends in Genetics, 2002, 18: 70.
- [24] Valdes A M. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited[J]. Genetics, 1993, 133(3): 737-749.
- [25] Ma Z Q, Roder M, Sorrells. Frequencies and sequence characteristics of di, tri-, and tetra-nucleotide microsatellite in wheat[J]. Genome, 1996, 39(1): 123-130.
- [26] 林能锋,苏永全,丁少雄,等.赤点石斑鱼微卫星 DNA 筛选[J]. 福建农业学报, 2007, **22**(2): 115-119.
- [27] 陈微,张全启,于海洋,等.牙鲆微卫星标记的筛选 及群体多态性分析[J].中国水产科学,2005,12(6): 682-687.
- [28] 谷龙春,黄桂菊,喻达辉,等.大珠母贝两个野生群 体遗传多样性的微卫星分析[J]. 渔业科学进展,2009, 30(4):98-101.

(下转第22页)