

# 黄姑鱼转录组 SSR 的开发与验证

龚诗琦<sup>1,2</sup>, 王志勇<sup>1,2</sup>, 肖世俊<sup>1,2</sup>, 林爱强<sup>1,2</sup>, 谢仰杰<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 利用 MISA 软件对黄姑鱼转录组测序数据进行分析, 共检索到微卫星 (simple sequence repeats, SSR) 位点 12 254 个, 其中单碱基、二碱基、三碱基重复分别约占 42.70%、32.11%、23.44%, 四碱基、五碱基、六碱基重复仅分别约占 1.60%、0.09%、0.06%。随机选出 80 个二至六碱基重复来设计 PCR 引物, 有 38 对引物通过扩增可获得目的条带。利用南海海区野生黄姑鱼样本对其中的 18 个具有多态性的 SSR 位点进行扩增效果验证和评价, 结果显示: 18 个 SSR 的平均等位基因数为 7.67, 平均有效等位基因数为 4.571, 平均观测杂合度为 0.3984, 平均期望杂合度为 0.7518, 平均多态信息含量为 0.6799, 其中有 15 个位点表现出高多态性 (多态信息含量 > 0.5)。与传统方法相比较, 利用转录组测序数据开发微卫星标记更加省时、高效。

**[关键词]** 黄姑鱼; 微卫星; 标记; 转录组; 测序

**[中图分类号]** S 917; S 965.325

## Development and Verification of SSR Based on Transcriptome of Yellow Drum, *Nibea albiflora*

GONG Shi-qi<sup>1,2</sup>, WANG Zhi-yong<sup>1,2</sup>, XIAO Shi-jun<sup>1,2</sup>, LIN Ai-qiang<sup>1,2</sup>, XIE Yang-jie<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** This paper identified 12 254 SSR loci from the transcriptome data of *Nibea albiflora* using MISA program. Among them, mononucleotides were the most frequent (42.70%), followed by dinucleotides (32.11%) and trinucleotides (23.44%), quadr-, penta- and hexa-nucleotides accounted for 1.60%, 0.09% and 0.06%, respectively. Eighty loci were chosen randomly to design the primers, and 38 primer sets produced strong PCR products matching their expected sizes, and 18 of them were polymorphic. The characteristics of 18 loci were estimated by using 30 individuals of yellow drum from South China Sea. The mean number of alleles was 7.67, and the mean effective number of alleles across loci was 4.571. The observed and expected heterozygosity per locus ranged from 0.000 to 0.828 and 0.235 to 0.917, with an average of 0.398 4 and 0.751 8, respectively. The average of polymorphism information content (PIC) was 0.679 9, and 15 loci were highly informative (PIC > 0.5). Compared with traditional approaches, this SSR isolation method is more time-saving and more effective.

**Keywords:** yellow drum (*Nibea albiflora*); SSR; loci; transcriptome; sequencing

[收稿日期] 2016-02-29

[修回日期] 2016-03-25

[基金项目] 福建省科技厅产学研合作项目 (2014N5011); 厦门南方海洋研究中心重大项目 (14GZY70NF34); 国家水产种质资源平台项目 (2015DKA30470)

[作者简介] 龚诗琦 (1991—), 女, 硕士生, 从事鱼类遗传育种研究. 通信作者: 谢仰杰 (1967—), 男, 副教授, 博士, E-mail: yjxie@jmu.edu.cn

## 0 引言

黄姑鱼 (*Nibea albiflora* Richardson) 属鲈形目 (Perciformes) 石首鱼科 (Sciaenidae) 黄姑鱼属 (*Nibea*)，主要分布于我国沿海、朝鲜半岛及日本南部沿海，是我国近海一种重要的经济鱼类<sup>[1-2]</sup>。我国在 20 世纪 80 年代中叶就有黄姑鱼人工育苗成功的报道<sup>[3-4]</sup>，其养殖特性虽与大黄鱼相近，但其成活率偏低，使其养殖业发展缓慢。由于刺激隐核虫感染引发的白点病成为养殖大黄鱼的严重疫病，而黄姑鱼不易受刺激隐核虫感染，从而使黄姑鱼的养殖受到重视。近年来，由于过度捕捞使黄姑鱼的野生资源量逐年减少，导致市场价格不断上升。开展黄姑鱼的育种技术研究，培育黄姑鱼优良品系，对于发展黄姑鱼的养殖具有重要意义。

微卫星标记 (simple sequence repeats, SSR) 因其具有多态性高、含量丰富和共显性遗传等优点，已广泛用于群体遗传学<sup>[5-6]</sup>、亲缘关系鉴定<sup>[7-8]</sup>、遗传图谱构建和 QTL 分析<sup>[9-10]</sup>等研究领域。然而，对于黄姑鱼微卫星标记的开发迄今还只有零星的报道<sup>[11-13]</sup>，可用的标记还很少。过去，微卫星标记的批量开发主要依靠构建微卫星富集文库，其程序复杂、成本高、效率低。近年来，随着 DNA 高通量测序技术的发展，利用其开发微卫星标记更加省时、省力、高效、廉价，因而微卫星标记被广泛应用<sup>[14-16]</sup>。因此，本研究拟采用转录组测序方法，开发黄姑鱼的微卫星标记，以期为黄姑鱼的遗传育种研究提供更多可用的分子标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

用于转录组测序的样品 (20 尾) 于 2014 年 12 月采自宁德市三都澳海域黄姑鱼养殖网箱，其中：稚鱼，全长约 2.5 cm，5 尾；幼鱼，全长约 6 cm 的 5 尾，全长约 22 cm 的 6 尾；成鱼，全长约 35 cm，雌雄各 2 尾。稚鱼剪取尾部，幼鱼和成鱼取部分鳍条、肝脏、肾脏、脾、皮肤、鳃、心脏、脑、肌肉、头肾、性腺等器官，保存于液氮中备用。

用于微卫星标记筛选的黄姑鱼样品为 2015 年 4 月采自中国南海海区的南海野生群体 (SOYD) 和东海海区的东海野生群体 (EAYD)，以及 2015 年 5 月采自福建宁德的本实验室与宁德市金铃水产科技有限公司联合选育的 F4 代黄姑鱼群体 (XYD)。用于微卫星标记多态性验证的样品为 SOYD 群体的黄姑鱼。以上样品皆剪取部分胸鳍，固定于 95% (体积分数) 的乙醇中，-20 ℃ 保存备用。

### 1.2 黄姑鱼总 RNA 的提取和转录组测序

用常规 Trizol 提取法 (美国 Invitrogen 公司) 分别提取黄姑鱼稚鱼、幼鱼、成鱼各组织的总 RNA。用全波长酶标仪 (Thermo) 测定总 RNA 质量浓度和 OD<sub>260/280</sub>，并用 1% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

对满足测序要求的各组织的总 RNA 进行等量混合，取混合后的样品 30 μg 送至北京贝瑞和康生物技术有限公司进行转录组测序。根据所测得的转录组序列数据，经拼接后，利用 MISA 软件检索全部非冗余 Unigenes 中的 SSR 位点，对于非混合型 SSR 位点，设定二碱基、三碱基、四碱基、五碱基、六碱基的重复次数至少为 6、5、5、5、5，设定单碱基重复微卫星序列的最小重复值为 10。

### 1.3 黄姑鱼基因组 DNA 的提取与检测

使用“细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒” (上海捷瑞, GK0122) 提取 DNA，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性，用全波长酶标仪测定 OD<sub>260</sub> 与 OD<sub>280</sub> 以确定 DNA 的质量好坏，并将 DNA 质量浓度调至 30 ng/μL，-20 ℃ 保存备用。

### 1.4 微卫星位点的初步筛选

分析转录组测序数据，从预测出的微卫星标记中选用碱基重复次数多的位点进行引物设计。设计原则：1) 引物序列距离核心序列大约 50 个碱基；2) 引物长度在 15 ~ 30 bp 之间，目标片段大小为 100 ~ 300 bp；3) CG 含量在 40% ~ 60% 之间，引物序列的退火温度在 50 ~ 65 ℃ 之间；4) 引物自身

及引物之间不应存在互补序列。共设计引物 80 对, 引物由深圳华大基因科技服务有限公司合成。

1.5 PCR 及多态性微卫星标记的筛选

10  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系包括: 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$  (30  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 10  $\times$  PCR buffer (含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\text{mmol/L}$  dNTPs 0.2  $\mu\text{L}$ , 10  $\text{mmol/L}$  引物对各 0.2  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  Taq 酶 0.1  $\mu\text{L}$ , 超纯水 7.3  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 退火温度 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 循环 30 次; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测引物扩增效果并进行退火温度的优化。采用 Qsep100 全自动核酸蛋白分析系统 (Bioptic) 对 PCR 扩增产物进行分析, 筛选具有多态性的微卫星标记。

1.6 统计分析

每个微卫星位点扩增的等位基因按其迁移率的不同, 从小到大依次定义为 A、B、C、……。根据各微卫星位点在每个样品中的电泳结果确定每个样品各微卫星位点的基因型。通过 POPGENE 3.2 软件计算各微卫星位点的等位基因数 ( $N_a$ )、有效等位基因数 ( $N_e$ )、观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ ), 并进行哈迪 - 温伯格平衡 (Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE)<sup>[17]</sup> 检测; 采用 PIC \_ CALC 0.6 软件 (中国水产科学研究院黄海水产研究所) 计算各微卫星位点的多态信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC)<sup>[18]</sup>, 按照参考文献 [19] 的标准, 当某位点  $\text{PIC} > 0.5$  时, 则该位点为高多态性位点。

2 结果与分析

2.1 黄姑鱼转录组微卫星分析

对序列组装和拼接后共得到 31 183 条 Unigenes (非冗余独立基因), 在 8541 个 Unigenes 中共检索到 12 254 个 SSR 位点, 其中单碱基重复出现的次数最多, 约占 42.70%, 其次是二碱基重复和三碱基重复, 各约占 32.11% 和 23.44%; 四碱基、五碱基和六碱基重复分别仅占 1.60%、0.09% 和 0.06% (见图 1)。

2.2 微卫星标记位点的开发

从二至六碱基重复、并且两端各具有 50bp 侧翼序列的微卫星位点中, 随机选 80 个进行引物设计, 合成 PCR 引物后进行 PCR 扩增。有 38 对引物成功扩增出稳定条带 (见图 2), 有 7 对扩增产物片段与预期产物片段大小不符, 另有 35 对引物未扩增成功或扩增产物出现明显杂带。

2.3 微卫星标记多态性筛选与检测

等量混合中国东海海区野生黄姑鱼 (5 尾)、南海海区野生黄姑鱼 (5 尾) 及福建宁德三都澳养殖黄姑鱼 (5 尾) 的 DNA, 采用 Qsep100 全自动核酸蛋白分析系统 (Bioptic) 对 80 对引物的 PCR 扩增产物进行分析, 筛选出条带较多的位点 18 个 (见图 3)。

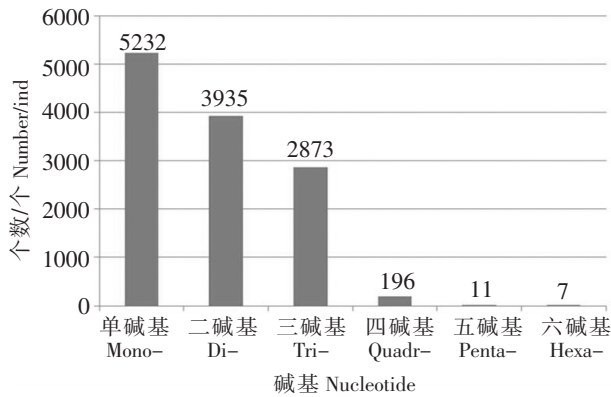


图 1 从黄姑鱼转录组数据中获得的微卫星位点数  
Fig.1 SSR loci obtained from transcriptome of yellow drum

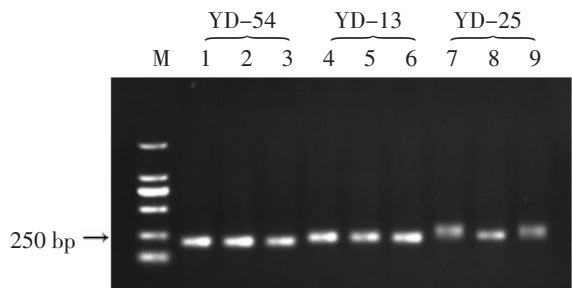


图 2 微卫星引物 YD-54、YD-13、YD-25 在三个 SOYD 个体上扩增的电泳图  
Fig.2 The PCR amplification results using SSR primer sets YD - 54, YD - 13 and YD - 25

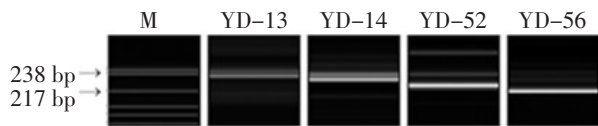


图 3 YD-13、YD-14、YD-52 和 YD-56 位点在混合 DNA 中的扩增情况  
Fig.3 The PCR product of SSR loci YD-13、YD-14、YD-52、YD-56 in mixed DNA

用 30 尾采自南海海域的野生黄姑鱼对 18 个能够扩增出稳定条带的位点进行多态性检测，结果发现 18 个位点都具有多态性（见表 1）。

表 1 18 个黄姑鱼微卫星位点的多态信息  
Tab. 1 The information of 18 polymorphic SSR markers for *N. albiflora*

位点 Locus	重复基序 Repeat motif	引物序列 Primer sequences5′-3′	片段大小 Size range /bp	$T_m$ /℃	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	PIC
YD-33	GT	F:AGAGTCAAGAGTTACAGTGCTGT R:CTTGGAGTTGGGAGAGAGATC	160~170	58	8	4.83	0.600	0.806	0.763
YD-38	CTT	F:GCATCTGTTGGCTTTGAGG R:CAGCAATGTTAAGACGGAGTT	188~231	59	5	2.76	0.033	0.648	0.566
YD-43	TG	F:GAGCTCCCATTTCTGTCTG R:CCATATCGACAAGACCATCC	221~253	60	10	7.12	0.467	0.874	0.844
YD-54	TGAA	F:ACCTCCCTTTCAGACTG R:CTACATTGGCAGCGATTA	209~237	58	11	8.78	0.100	0.901	0.875
YD-46	CGA	F:TATAGTCAAGTCTGCGCGG R:CACTGTCGCTTGGTCTGC	194~233	59	9	5.31	0.200	0.825	0.792
YD-57	TCC	F:CCTGTCTGTCTTCTCCACTC R:AGGTTTAAGGCCGATCGT	310~298	57	9	3.59	0.379	0.733	0.687
YD-25	TC	F:TTCACCCTCTACTGCATGAG R:CCCACCTCAGTTCTTCTC	257~291	60	15	10.13	0.690	0.917	0.893
YD-24	TCCGG	F:TTGAACGTTGACACTAAATCCAC R:GTCTCCGTCACCTCGCTG	160~185	60	7	2.89	0.500	0.898	0.597
YD-26	CAGGT	F:CCAACGTGTCCAAAATGTCAG R:CAAGATGAGACAGAGCCACCG	140~175	62	4	3.18	0.233	0.697	0.624
YD-14	AC	F:TAGCATCTCCAACACCAAAT R:AACTACTCCGATATCTGCCA	217~233	57	7	5.13	0.633	0.818	0.778
YD-13	TA	F:TCTATCAATCCACAGTGTG R:CGAGGAAGACGTTTGAAA	218~259	57	8	4.85	0.828	0.807	0.768
YD-52	AGGA	F:CCAACCATCTTCCTCAAC R:AGGACACCAGTGAGAGAGC	206~214	57	2	1.30	0.133	0.235	0.204
YD-41	AGA	F:TCACGTTGAGGATAGAGAGAG R:GTAGAGGTGCGCTGTGAT	188~206	55	4	2.24	0.000	0.564	0.483
YD-60	GTAT	F:CAGTTGACCATAATGACTCAC R:GGACAGGTGCTTGCA	160~204	54	7	4.05	0.300	0.765	0.711
YD-56	ACT	F:CGACTTTGTGTACGTGGAG R:CATTGTGGCTGTGGTAGTT	201~213	57	5	1.59	0.625	0.375	0.347
YD-10	CAGCCG	F:GCGGGAGTTTGGTGAAGGTT R:AAGTGCTGTTGAGGTGTTGTGAT	207~231	59	8	5.37	0.567	0.828	0.787
YD-23	GGAT	F:TTACAACAGCTCATTACCAG R:GTCCTCTCTTCTCTCTTTC	170~206	57	9	4.64	0.733	0.798	0.756
YD-31	AC	F:GTTAGAGACACTGCTTCCTGT R:CCTAAAGACATCCAGCCTG	147~179	62	9	4.56	0.413	0.797	0.763
平均 Mean					7.7	4.571	0.3984	0.7518	0.6799

从 18 个位点共检测到等位基因 138 个，各位点等位基因数（ $N_a$ ）介于 2~15 之间，平均 7.67 个；有效等位基因（ $N_e$ ）介于 1.30~10.13 之间，平均 4.571 个；各位点观测杂合度（ $H_o$ ）在 0.000~0.828 之间，平均为 0.3984；期望杂合度（ $H_e$ ）介于 0.235~0.917 之间，平均为 0.7518；平均多态信息含



量  $PIC = 0.6799$ , 其中高多态性位点 ( $PIC > 0.5$ ) 15 个, 中多态位点 ( $0.5 > PIC > 0.25$ ) 2 个, 低多态位点 ( $PIC < 0.25$ ) 1 个; 除位点 YD-33、YD-13 处于 Hardy-Weinberg 平衡, 位点 YD-52 显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡外 ( $0.01 < P < 0.05$ ), 其余位点皆极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.01$ )。图 4 为 YD-26 和 YD-41 位点在野生群体 SOYD 中的扩增情况。

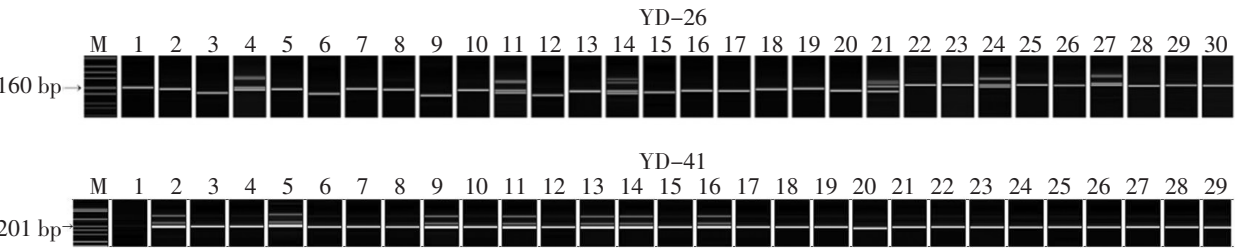


图 4 YD-26、YD-41 位点在野生群体 SOYD 中的扩增情况  
Fig.4 The PCR product of SSR loci YD-26 and YD-41 in SOYD population

3 讨论

传统的文库构建方法需经过构建初始小片段基因组文库、限制性内切酶酶切与连接、选择性杂交、SSR 文库构建等步骤<sup>[20]</sup>, 整个过程繁琐又耗时长, 且每次只能开发固定重复序列 (对应于杂交使用的探针) 的微卫星。与传统 SSR 标记开发技术相比, 利用转录组测序数据可以在短时间内批量开发出 SSR 标记。近年来, 利用转录组测序数据来开发水产养殖生物 SSR 标记的相关研究报道越来越多。Xie 等<sup>[21]</sup>对坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 进行转录组测序, 设计高质量引物 824 个, 随机挑选 100 对引物在 6 个坛紫菜品系中进行基因组扫描, 有 87 对引物成功扩增。张群英等<sup>[22]</sup>采用中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 转录组测序开发了 15 对多态性位点 EST-SSR 引物, 并利用其对中华鳖进行遗传多样性和生长性状相关性分析。李彩娟<sup>[23]</sup>通过 Illumina 高通量测序平台对大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 进行转录组测序, 得到核心序列大于 12 bp 的 SSR 标记 15 106 个, 并用从中筛选得到 38 个多态性的位点。本研究通过分析转录组测序数据, 共获得微卫星位点 12 254 个, 后续步骤只需进行 PCR 扩增及多态性筛选即可, 工作量小且效率较高。并且, 本研究是基于多组织多阶段 RNA 样本得出的转录组数据, 包含有更全面的遗传信息, 可为今后的遗传多样性研究提高准确性。因而, 利用转录组测序数据开发 SSR 标记具有广阔的前景。

在本研究中, 黄姑鱼转录组微卫星扩增效率为 47.5%, 那些未能扩增出产物或扩增产物片段与预期产物片段大小不符的引物, 可能是由于所设计的引物序列位于两个外显子上, 或者基因组对应序列含有内含子而不具备 SSR 序列特征<sup>[24]</sup>。

目前, 已经报道的黄姑鱼微卫星标记数目还不多, 部分来自传统法开发的微卫星标记, 还有部分来自其他石首鱼科的跨种扩增<sup>[11-13,25]</sup>, 尚未见到通过转录组测序数据大量开发黄姑鱼微卫星标记的报道。本文首次利用转录组数据开发黄姑鱼的微卫星标记, 得到 38 个能够扩出清晰条带的位点。并将其中具有多态性的 18 个位点用于南海海域野生黄姑鱼群体遗传多样性分析, 得到平均等位基因数为 7.67, 平均有效等位基因数为 4.571, 平均观测杂合度为 0.3984, 平均期望杂合度为 0.7518, 平均多态信息含量 0.6799, 并有 15 个位点表现出高多态性。这 15 个具有高多态性的位点今后可直接应用在黄姑鱼群体遗传多样性分析、种质资源分析、遗传图谱构建和 QTL 定位等方面的研究。

[ 参考文献 ]

[1] 朱元鼎. 中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述. 上海: 上海科学技术出版社, 1963: 50-51.  
[2] 朱元鼎. 福建鱼类志: 下卷. 福州: 福建科学技术出版社, 1985: 117-118.  
[3] 陈超, 徐延康, 雷霖霖. 黄姑鱼人工育苗初步试验. 水产科学, 1989, 8(1): 7-11.

- [4] 雷霖霖, 陈超, 徐延康, 等. 黄姑鱼工厂化育苗技术研究. 海洋科学, 1992, 6: 5-10.
- [5] 赵广泰, 刘贤德, 王志勇, 等. 大黄鱼连续 4 代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析. 水产学报, 2010, 34(4): 500-507.
- [6] VALLES-JIMENEZ R, CRUZ P, PEREZ-ENRIQUEZ R. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. Marine Biotechnology, 2004, 6(5): 475-484.
- [7] TESTOLIN R, MARRAZZO T, CIPRIANI G, et al. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. Genome, 2000, 43(3): 512-520.
- [8] 孙昭宁, 刘萍, 李健, 等. 微卫星 DNA 标记用于中国对虾亲子关系的鉴定. 渔业科学进展, 2007, 28(3): 8-14.
- [9] 李宏俊. 海湾扇贝微卫星标记的开发及遗传连锁图谱的构建 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009.
- [10] YE H, LIU Y, LIU X, et al. Genetic mapping and QTL analysis of growth traits in the large yellow croaker *Larimichthys crocea*. Marine Biotechnology, 2014, 16(6): 729-738.
- [11] MA C, MA H, MA L, et al. Isolation and characterization of 16 polymorphic microsatellite markers from *Nibea albiflora*. Fisheries Science, 2011, 77(5): 707-711.
- [12] XU D D, LOU B, LI S L, et al. Isolation and characterization of novel microsatellite loci in *Nibea albiflora*. Genetics and Molecular Research, 2013, 12(4): 6156.
- [13] XING S, SHAO C, LIAO X, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from a dinucleotide-enriched genomic library of spotted maigre (*Nibea albiflora*). Conservation Genetics, 2009, 10(3): 789-791.
- [14] TRIWITAYAKORN K, CHATKULKAWIN P, KANJANAWATTANAWONG S, et al. Transcriptome sequencing of *Hevea brasiliensis* for development of microsatellite markers and construction of a genetic linkage map. DNA Research, 2011, 18(6): 471-482.
- [15] YU Z, LI H, LIU L, et al. Rapid development of microsatellite markers from the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using next generation DNA sequencing technology. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 51: 314-319.
- [16] LI Q, ZHANG J, YAO J, et al. Development of *Saccharina japonica* genomic SSR markers using next-generation sequencing. Journal of Applied Phycology, 2015: 1-4.
- [17] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.
- [18] 王婷, 黄智慧, 马爱军, 等. 基于转录组数据的大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) SNP 标记开发及多态性分析. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1300-1307.
- [19] BOTSTEIN 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.
- [20] 敖日格乐, 贾晓, 葛台明. SSR 分子标记的开发策略概述. 湖北民族学院学报 (自然科学版), 2009, 27(4): 462-467.
- [21] XIE C, LI B, XU Y, et al. Characterization of the global transcriptome for *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and development of cSSR markers. BMC Genomics, 2013, 14(1): 107.
- [22] 张群英, 黄鹤忠, 袁文成, 等. 中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) EST-SSR 标记与生长性状相关分析. 海洋与湖沼, 2013, 44(6): 1654-1659.
- [23] 李彩娟. 基于第二代测序的大鳞副泥鳅微卫星分子标记的开发与应用. 苏州: 苏州大学, 2014.
- [24] VARSHNEY R K, GRANER A, SORRELLS M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends in Biotechnology, 2005, 23(1): 48-55.
- [25] JIANG L, ZHU A. New microsatellite markers for large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and cross-amplification in closely related species. Journal of Genetics, 2014, 93(3): 1-5.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)