

张 芹,王延晖,王冰柯,等. 团头鲂基因组微卫星特征及 SSR 位点开发[J]. 江苏农业科学,2022,50(3):79-85.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.03.012

团头鲂基因组微卫星特征及 SSR 位点开发

张 芹,王延晖,王冰柯,屈长义

(河南省水产科学研究院,河南郑州 450044)

摘要:为充分挖掘和利用团头鲂种质资源,有效开展品种间遗传多样性分析及分子育种工作,利用生物信息学方法分析团头鲂基因组数据,共检测序列 18 243 条,其中,含有 SSR 位点的序列为 3 940 条,占总检测序列条数的 21.60%,检测出 SSR 位点共 350 898 个,平均约 3.1 kb 出现 1 个 SSR 位点。其中,二核苷酸重复的位点最多,占总 SSR 位点的 67.43%;三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复分别占 14.68%、14.83%、2.89% 和 0.16%。350 898 个 SSR 位点中共有 257 种重复基序,二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复基序类型占比最高的分别为 AT/AT(29.46%)、AAT/ATT(8.56%)、AGAT/ATCT(4.57%)、AATAT/ATATT(0.97%) 和 AACCT/AGGGTT(0.06%)。设计合成 288 对 SSR 荧光引物,有 149 对引物能够稳定扩增出与预期产物一致的条带,93 对引物表现出多态性。综上所述,该研究发掘团头鲂基因组 SSR 位点,设计和合成 SSR 引物,验证其多态性,为团头鲂分子指纹图谱构建、种质资源的创新利用奠定了基础。

关键词:团头鲂;基因组;SSR;多态性;种质资源;遗传多样性;分子育种

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)03-0079-07

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)隶属于鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)鲃亚科(Culterinae)鲂属(*Megalobrama*),为中国特有的淡水经济鱼类。由于团头鲂具有养殖成本低、生长快、成活率高、易捕捞、肉质好等优点,早在 20 世纪 60 年代就作为优良的草食性鱼类在全国推广,成为池塘养殖的主要品种之一^[1]。微卫星标记(microsatellite),又称为短串联重复序列(simple tandem repeats,STRs)或简单重复序列(simple sequence repeats,SSRs),是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列,由 2~6 个核苷酸的串联重复片段构成。SSR 分子标记具有重复性好、多态性高、对模板 DNA 要求低等优点^[2-4],已广泛应用于鲤鱼^[5]、扇贝^[6]、中华鲟^[7]等水生动物的种质资源鉴定及遗传多样性研究,是水生动物种质鉴定、亲缘关系及种质分类等研究的理想标记。采用传统方法开发 SSR 分子标记效率低且成本高^[8-9],与

转录组 SSR 相比,基因组 SSR 的多态性更高,且在基因组中分布广泛,从而获得更好的图谱覆盖率^[10]。利用高通量测序技术开发 SSR 分子标记能极大提高开发效率,并有效降低成本,已成功应用于多种水生动物的 SSR^[11-14]分子标记开发。

该研究旨在利用生物信息学方法分析团头鲂基因组数据,发掘 SSR 位点,了解其特征及分布规律,包括基序结构和类型、比例、重复次数,并设计和合成 SSR 引物,验证其多态性,为团头鲂种质资源的分子指纹图谱构建、品种间遗传多样性分析及分子育种的推进奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2020 年 9 月从河南省嵩县陆浑水库伊河鲂鱼种厂采集团头鲂伊河群体 100 尾,从湖北省鄂州国家级团头鲂原种场采集团头鲂华海 1 号群体 100 尾,所有个体测量体长、体质量,剪尾鳍用无水乙醇保存,并将样品带回河南省水产科学研究院实验室进行后续试验。

1.2 方法

1.2.1 团头鲂 DNA 的提取 采用磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化)提取团头鲂 DNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,采用超微量分光光度计

收稿日期:2021-06-02

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-45-45);
河南省基本科研业务费项目(编号:JBKY2021);国家淡水水产种质资源库项目(编号:FGRC18537);河南省农业产业技术体系项目(编号:S2014-10)。

作者简介:张 芹(1980—),女,河南辉人,硕士,高级水产师,主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail:zhangqin.2007@163.com。

(NanoDrop One spectrophotometer) 检测 DNA 浓度和纯度,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存。

1.2.2 SSR 位点的查找和引物的设计 从 NCBI 中搜索团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*), 得到团头鲂基因组序列信息, 将这段基因组序列下载下来后, 使用 MISA 软件进行 SSR 位点的搜索, 搜索的标准: 重复基元长度 $2\sim 6\text{ bp}$, 二核苷酸重复基序的最小重复数为 6; 三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复基序的最小重复数均为 5。2 个 SSR 序列间隔最小值为 100 bp 。

将得到的 SSR 位点信息经 Primer 5.0 软件设计引物, 通过严格的筛选, 得到 9 000 余条待选引物。引物筛选的标准: 去除重复单元全部由 G/C 碱基构成的位点(高 GC 序列不利于批量扩增); 每一条参考序列上只选取 1 个位点; 去除引物长度不是 20 的位点; 选取目的产物在 $110\sim 350\text{ bp}$ 的引物; 去掉重复单元重复次数 5、6 次及以下的位点; 不同位点间如果有 1 条或 2 条引物序列完全相同的, 只保留 1 个位点。

1.2.3 PCR 扩增及 SSR 检测 从 9 000 余条待选引物中随机挑选 288 对 SSR 引物, 其中, 每对引物的正向引物(F 引物)均加了通用 M13 接头序列(TGTAACGACGCGCCAGT), 另外合成加 FAM 荧光基团的 M13 荧光接头引物。选择 8 份团头鲂基因组 DNA 作为模板对引物进行筛选, 选择条带清晰、多态性好的引物进行后续试验。

采用两步 PCR 法进行扩增。第一步 PCR 反应体系($10.0\text{ }\mu\text{L}$): $2\times\text{ Taq PCR Master Mix } 5.0\text{ }\mu\text{L}$, 基因组 DNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$, 接头上游引物(10p) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, 下游引物(10p) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, ddH_2O $3.4\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ →

$52\text{ }^{\circ}\text{C}$ touch down 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 共 10 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 共 25 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 20 min 。第二步 PCR 反应体系($10.0\text{ }\mu\text{L}$): $2\times\text{ Taq PCR Master Mix } 5.0\text{ }\mu\text{L}$, 第一步 PCR 产物 $1.0\text{ }\mu\text{L}$, 荧光引物(10p) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, 下游引物(10p) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, ddH_2O $3.4\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 共 25 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 末端延伸 5 min 。

1.2.4 荧光毛细管电泳检测 PCR 产物进行定量稀释后, 取 $1\text{ }\mu\text{L}$ PCR 稀释产物加 $9\text{ }\mu\text{L}$ 甲酰胺(含 1% 内标)变性后上 DNA 测序仪 ABI 3730xl 进行毛细管荧光电泳检测。

1.2.5 结果处理 将毛细管电泳检测结果导入到 Gene Marker 分析软件中, 进行数据整理, 每对引物导出 PDF 峰图文件, 结果汇总统计后进行分析。

2 结果与分析

2.1 团头鲂基因组中 SSR 位点数及分布频率

将已获得的团头鲂基因组数据进行 SSR 位点分析, 共检测序列 18 243 条, 其中含有 SSR 位点的序列为 3 940 条, 占总检测序列条数的 21.60%, 检测出 SSR 位点共 350 898 个, 平均约 3.1 kb 出现 1 个 SSR 位点。含有 2 个及 2 个以上 SSR 位点的序列有 2 450 条。其中, 二核苷酸重复的位点 236 613 条, 占总 SSR 位点的 67.43%; 三核苷酸重复的位点 51 527 条, 占总 SSR 位点的 14.68%; 四核苷酸重复的位点 52 042 条, 占总 SSR 位点的 14.83%; 五核苷酸重复的位点 10 149 条, 占总 SSR 位点的 2.89%; 六核苷酸重复的位点 567 条, 占总 SSR 位点的 0.16% (图 1)。

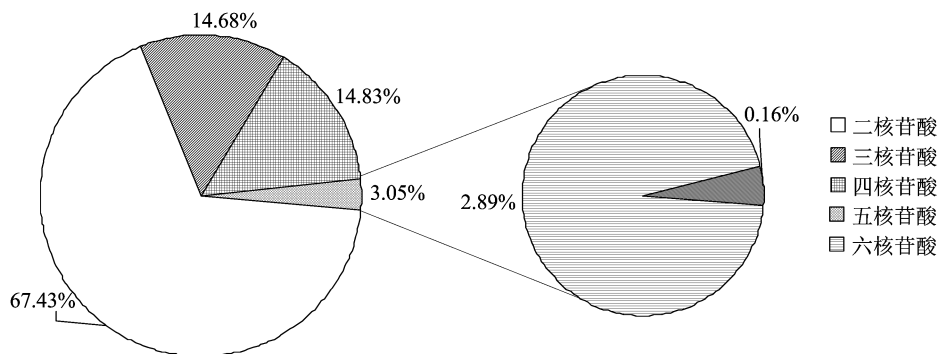


图1 团头鲂基因组不同重复类型 SSR 的分布比例

团头鲂基因组中含有丰富的 SSR 类型, 搜索得到的 350 898 个 SSR 位点中, 共检测出 1 106 种类

型的核苷酸重复, 不同核苷酸重复类型出现的比例相差较大, 其中, 二核苷酸重复类型最少, 只有 12

种,占 SSR 位点重复类型的 1.08%;三核苷酸重复类型 60 种,占 SSR 位点重复类型的 5.42%;四核苷酸重复类型 217 种,占 SSR 位点重复类型的 19.62%;五核苷酸的重复类型最多,达 556 种,占 SSR 位点重复类型的 50.27%;六核苷酸重复类型 261 种,占 SSR 位点重复类型的 23.60%。

此外,从 SSR 位点的平均分布距离来看,二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸重复在团头鲂基因组中分布距离较小,分别为 4.6、21.1、20.9 kb,而五核苷酸、六核苷酸重复位点的平均分布距离分别为 107.1 kb 和 1.9 Mb。二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸类型重复位点的密度远远高于其他 2 种类型重复位点的密度。

由图 2 可知,团头鲂基因组 SSR 中,二核苷酸重复单元长度为 12~144 bp,分布范围主要集中在

6~34 次,占 91%;三核苷酸重复单元长度为 12~144 bp,主要集中在 5~17 次,占 99%;四核苷酸重复单元长度在 20~200 bp,分布范围主要集中在 5~29 次,占 99%;五核苷酸重复单元长度为 25~225 bp,主要集中分布在 5~17 次,占 97%;六核苷酸重复单元长度 30~162 bp,分布范围主要集中在 5~15 次,占 99%。团头鲂基因组中不同重复 SSR 类型中的重复长度不同,且长度的变异较大。每种重复 SSR 类型都随着重复长度的递增,微卫星丰度呈递减趋势,即 SSR 长度越长,微卫星出现频率越低。

2.2 团头鲂基因组中 SSR 基序类型和频率

从团头鲂基序类型分布看,由表 1 可知,350 898 个 SSR 位点中共有 257 种重复基序,二核

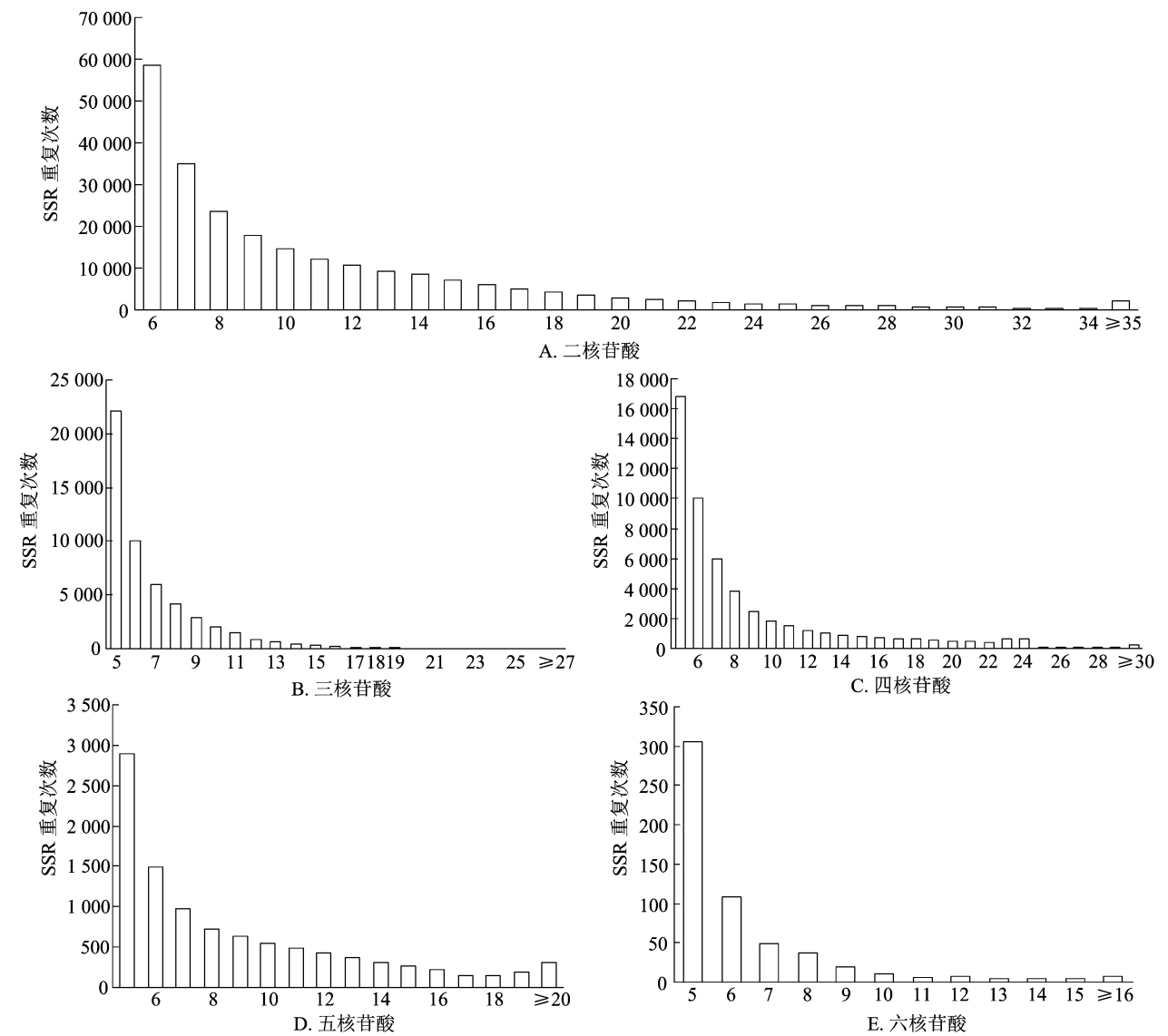


图2 不同 SSR 单元重复次数分布

苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复基序类型分别有 4、10、32、95、116 种。

二核苷酸重复基序类型有 4 种,即 AC/GT、AG/CT、AT/AT 和 CG/CG, 占总 SSR 位点类型的 67.43%, 其中,AT/AT 所占比例最高,为 29.46%, CG/CG 所占比例最低,为 0.12%;三核苷酸重复类

型基序有 10 种,其中,AAT/ATT 重复类型基序最多,为 8.56%;四核苷酸重复类型基序有 32 种,其中,AGAT/ATCT 所占比例最多(4.57%);五核苷酸重复类型基序以 AATAT/ATATT 所占比例最多(0.97%);六核苷酸重复类型以 AACCCT/AGGGTT 所占比例最高(0.06%)。

表 1 团头鲂基因组部分 SSR 基序类型的分布特征

SSR 类型	基序类型数	基序类型	出现次数	占总 SSR 重复基序比例 (%)
二核苷酸	4	AC/GT	98 201	27.99
		AG/CT	34 623	9.87
		AT/AT	103 374	29.46
		CG/CG	415	0.12
三核苷酸	10	AAT/ATT	30 026	8.56
		AAC/GTT	6 744	1.92
		AAG/CTT	4 034	1.15
		ATC/ATG	3 475	0.99
四核苷酸	32	AGAT/ATCT	16 042	4.57
		ATCC/ATGG	9 091	2.60
		AAAT/ATTT	9 071	2.59
		ACAG/CTGT	3 996	1.14
五核苷酸	95	AATAT/ATATT	3 411	0.97
		AAAAT/ATTTT	2 322	0.66
		AATAG/ATTCT	677	0.19
		AAAAC/GTTTT	654	0.19
六核苷酸	116	AACCCT/AGGGTT	215	0.06
		AAAGAG/CTCTTT	23	0.01
		AGATAT/ATATCT	23	0.01
		ACACGC/CGTGTG	21	0.01

2.3 团头鲂基因组多态性 SSR 引物的筛选

以 8 份团头鲂 DNA 为材料,对设计合成的 288 对 SSR 荧光引物进行多态性筛选,有 149 对引物能够稳定扩增出与预期产物一致的条带,引物有效率为 51.7%;93 对引物表现出多态性。由表 2 可知,多态性引物占 32.3%;其中,18 对引物表现出高度多态性,等位基因数大于 3,可以稳定扩增且没有杂峰。由图 3 可知其中 1 对引物 HNF209 在 4 份团头鲂材料中的毛细管电泳检测结果。

3 讨论与结论

在团头鲂基因组序列共检测出 SSR 位点 350 898 个,平均约 3.1 kb 出现 1 个 SSR 位点,低于木荷^[15]、甘草^[16]等植物,高于卵形鲳鲹^[17]、翘嘴鲮^[18]等水生生物中 SSR 位点的出现频率,说明团头

鲂基因组 SSR 位点较为丰富。

在大多数物种基因组中,具有短核苷酸重复基元(单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸)的序列较长核苷酸重复基元(四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸)的序列更丰富^[19]。在团头鲂 SSR 序列中,随着核苷酸重复基元的增加,其数量迅速减少,其中,二核苷酸重复的位点 236 613 条,占总 SSR 位点的 67.43%,六核苷酸重复的位点占总 SSR 位点的 0.16%。这个结果与卵形鲳鲹^[17]、胡子鲇^[20]和长体圆鲹^[21]等鱼类的研究结果相似。

团头鲂基因组 SSR 各重复类别中,从 SSR 位点的平均分布距离来看,六核苷酸重复(1.9 Mb) > 五核苷酸重复(107.1 kb) > 三核苷酸重复(21.1 kb) > 四核苷酸重复(20.9 kb) > 二核苷酸重复(4.6 kb)。

团头鲂基因组 SSR 重复类型中,二核苷酸重复

表 2 筛选的 18 对团头鲂基因组 SSR 位点引物信息

引物名称	SSR 类型	重复单元	引物序列(5′-3′)	等位基因大小范围 (bp)	PIC
HNf022	FAM	(GATA)8	F:TCAGCTGAGGGATGGATGGA;R:AAGGGAGGCTCACTGTTTCG	167~179	0.663
HNf047	HEX	(AGT)11	F:GAGCTCCTCAGAAGGGCTTC;R:CTTTGGGTTCGCTCGACTGA	240~253	0.669
HNf050	TAMRA	(AAAG)12	F:GATAGTGAGCAGCAGCAGGA;R:CCCAGCATGCTTTGTGTAGG	258~306	0.809
HNf112	FAM	(TTTG)7	F:AGGTGTTGTGGGCTCATCAG;R:GATTACAGTCTGGCGTCTT	167~187	0.684
HNf257	HEX	(ATCT)12	F:AGAAGGCACCCTGGCAATTT;R:ACCGGTCTCATGTTACGCTG	252~271	0.522
HNf262	TAMRA	(AAT)12	F:AGGCTTTGCGACGCTGTATA;R:TGCTTACCAAGGCTGCATTT	266~296	0.350
HNf099	FAM	(AAT)10	F:AAAGAAGTCGCTCCGGCTAC;R:GCATTCTCCACAAGTGTGCC	270~285	0.485
HNf209	HEX	(ATT)12	F:CCATGTGCTTTCCGGGTTTC;R:ACGGTAGTGTATGTGCGTGT	162~183	0.748
HNf249	TAMRA	(GAAG)12	F:AGGATGGATGGATGGGTGGA;R:TGTAATGCGCCAACTGTTGA	248~271	0.572
HNf062	FAM	(AAATA)6	F:ACTGGTGGGCCATTTCCATT;R:ACTCTTCAGGACTCCCACGT	252~271	0.568
HNf157	HEX	(GTTT)6	F:GGCAGCTGAGACACATGAGT;R:GGCAGCAGAATACAGGGCTT	287~303	0.620
HNf023	FAM	(TAGA)15	F:GCTGGCTCATCACCTTGGA;R:ACAGAGCAGGCTCATTGTCC	289~337	0.683
HNf079	HEX	(GATA)6	F:AGCTGGTAGTTGGCCACATC;R:TCCTGAGTCTCCCAGTGTC	231~282	0.572
HNf124	FAM	(CTAT)18	F:GCGGGCGTCCTCATTAATGA;R:ACAGATGAAGGACACCGACG	231~290	0.843
HNf252	HEX	(AAAAC)8	F:GGCTCCAGTGGTCAAGTGAA;R:GCAGTGCCAGATGGTCTTAA	209~224	0.657
HNf279	TAMRA	(ATCT)5	F:CACGCAGTTTAGACGCTGTG;R:AGTGTCTCAGCAGCACTAA	293~313	0.190
HNf106	FAM	(TTCTA)11	F:AGGTGCTTACATGCCGAAGT;R:GCGAACTGGATATTGCCGTC	254~306	0.793
HNf149	FAM	(AAAGA)15	F:TCTCGTGCACCTCCTACAAT;R:TCGCGGAAATCAGCACTTCA	251~311	0.812

类型最少,五核苷酸的重复类型最多。二核苷酸至六核苷酸重复类别中,数量最多的重复基序类型分别为 AT/AT、AAT/ATT、AGAT/ATCT、AATAT/ATATT 和 AACCT/AGGGTT,说明团头鲂基因组中大量存在这些富含 A/T 核酸的优势重复基序。这一结果与裸体异鳔鳅^[22]类似,二碱基重复单元是裸体异鳔鳅 SSR 中最主要类群,以 AC/TG、AT/TA 2 种类型最多,分别占到二碱基重复单元总数 49.36% 和 29.13%。在三碱基中 AAT 和 ATC 是出现频率最高的单元,比例分别为 56.01% 和 13.46%,高于其他 6 种类型的总和。四碱基重复单元中以 AAAG、AAAT 和 AGAT 次数最多,总共占到四碱基重复单元的 46.26%。五碱基重复单元中,以 AATAT 的重复数量最多。该研究的结果与甘草^[16]和石榴^[23]等物种的碱基偏好性类似,均以 A/T 为主要重复单元。甘草 SSR 中包含 284 种类型丰富的重复基元,优势基元依次为 A/T (58.28%)、AG/CT (10.48%)、AT/AT (10.48%)、AC/GT (5.12%)、AAT/ATT (3.57%)。石榴基因组 SSR 序列存在明显的偏好性,单核苷酸重复型 SSRs 以 (A/T)_n 为主,占 95.82%;二核苷酸重复型 SSRs 以 (AT/TA)_n 最多,占 63.97%,A/T 碱基在石榴基因组 SSR 序列中占了主导地位。而孔嘴兰等对长体

圆鲂的研究结果显示,二核苷酸重复基元中 AC/GT 类型最多,占二核苷酸重复基元的 68.40%^[21]。卵形鲳^[17]中基因组二核苷酸重复基元以 TG 和 AC 的重复数最多,占二核苷酸重复基元总数的 44.75%。相瑜等研究发现,三疣梭子蟹基因组二核苷酸重复基元以 CT 和 AG 的重复数较多,合计占 50.00%^[24]。这可能与物种间的差异及其选择进化机制不同有关,且不同基因组区域中的 SSR 可能具有不同特征,从而执行不同的功能^[25]。团头鲂 EST-SSR 位点中 AC/GT 重复位点所占比例高达 65.39%^[26],与本研究在基因组 SSR 位点的结果也不同,这种偏向性的结果也可能与 SSR 位点查找工具中的参数设置有关^[27]。

Weber 发现完美重复序列 PIC 值随着重复次数的增加呈现增加的趋势^[28]。该研究中,三核苷酸、四核苷酸和五核苷酸重复型 SSR 位点的 PIC 值与 SSR 长度均呈正相关,与石榴中的结果^[23]一致,说明我们以后在选择 SSR 标记时应相应选择重复次数较多、序列较长的 SSR 位点,可能会获得更高的多态性水平。

孔嘴兰等通过对长体圆鲂基因组进行 RAD-Seq 高通量测序,共获得 58 180 条微卫星序列,选取 112 条二核苷酸、三核苷酸重复的微卫星序列设计

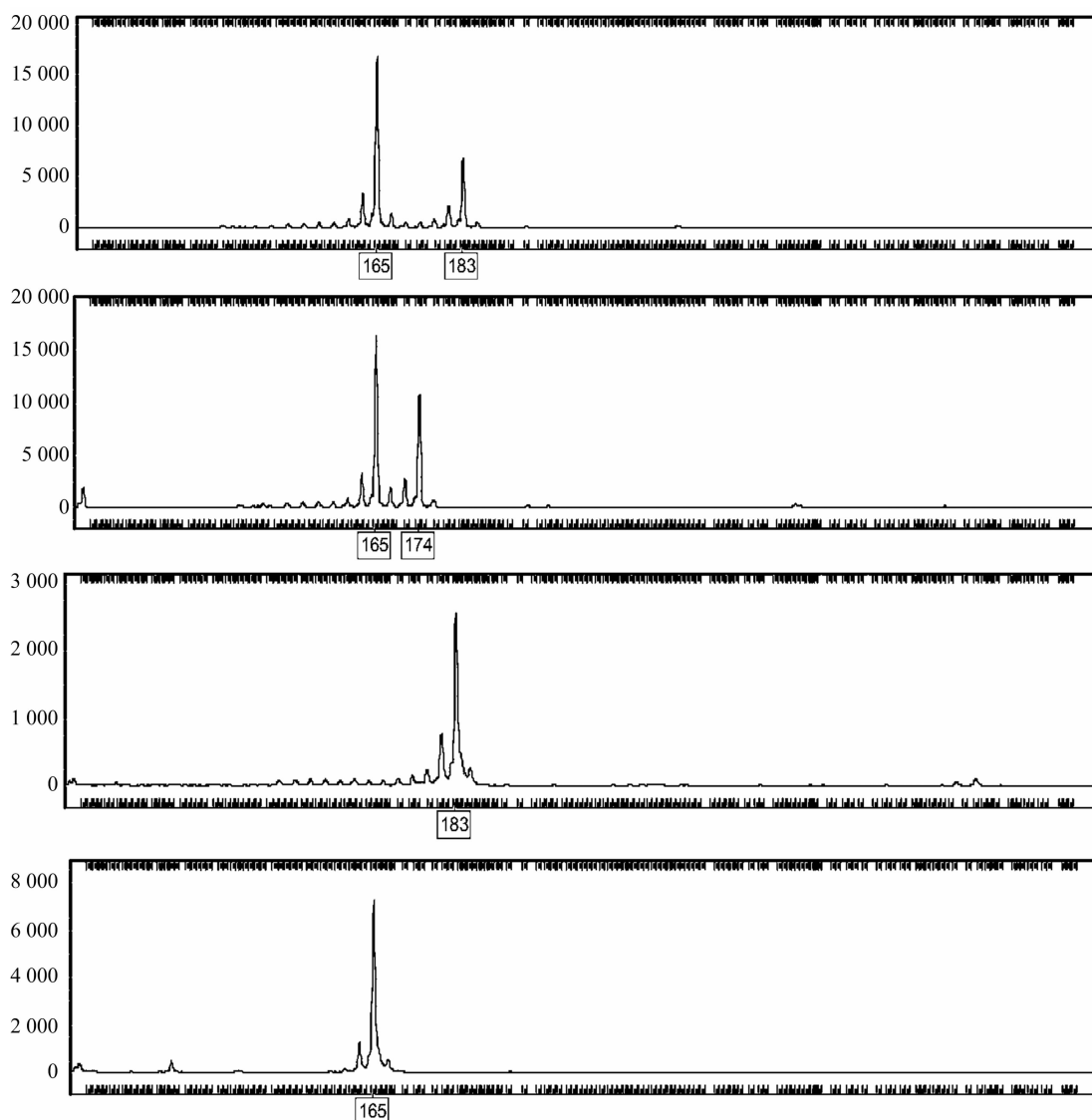


图3 引物 HNF209 在 4 份团头鲂材料中的毛细管电泳检测结果

引物,经筛选后,共获得 27 个具有多态性的微卫星标记^[21]。曾晓芸等对裸体异鳔鲃 SSR 位点进行开发,设计合成 50 对引物,筛选出具有多态性的微卫星引物共 23 对^[22]。而刘瑞成等在宽口光唇鱼的微卫星开发中,163 个合成的微卫星引物中仅得到 18 个多态性高的微卫星引物,筛选效率仅为 11.04%^[29]。An 等开发的许氏平鲈 Genomic - SSR 位点 14 对有效扩增,其中 13 对多态,多态检测率高达 92.86%^[30]。张永德等从测试的 50 个卵形鲳鲷 SSR 位点中成功鉴定出 29 个多态性 SSR 位点 (58.00%)^[17]。房祖业等通过对大刺鲃简化基因组测序,筛选了 105 对微卫星引物,最终获得 50 对能在大刺鲃群体中稳定扩增的微卫星引物,并测出其中有 38 对标记在大刺鲃群体中表现出多态性,总

筛选效率为 36.2%^[31]。本研究对 288 对 SSR 荧光引物进行多态性筛选,有 149 对引物能够稳定扩增出与预期产物一致的条带,引物有效率为 51.7%; 93 对引物表现出多态性,多态性引物占 32.3%;高于长体圆鲂、裸体异鳔鲃和宽口光唇鱼的 SSR 筛选效率,低于许氏平鲈、卵形鲳鲷和大刺鲃的 SSR 位点多态性检测率。

该研究首次利用生物信息学技术,对团头鲂基因组 SSR 序列进行搜索和分析,发掘了大量团头鲂 SSR 位点,统计分析团头鲂基因组 SSR 数量、长度、频率和密度等生物信息学特征,丰富团头鲂分子标记类型,为团头鲂群体遗传结构和遗传多样性分析提供数据基础,有利于加快建立团头鲂种质资源评价与保护机制,也有利于进一步研究团头鲂种质资

源多样性和品种选育。

致谢:感谢华中农业大学王卫民教授在团头鲂样品采集过程中给予的帮助。

参考文献:

- [1] 王为民. 团头鲂养殖产业现状[J]. 科学养鱼,2009(4):44-45.
- [2] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Research,1989,17(16):6463-6471.
- [3] Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes:survey and analysis[J]. Genome Research,2000,10(7):967-981.
- [4] Ellegren H. Microsatellites:simple sequences with complex evolution[J]. Nature Reviews:Genetics,2004,5(6):435-445.
- [5] Wang D, Liao X L, Cheng L, et al. Development of novel EST-SSR markers in common carp by data mining from public EST sequences[J]. Aquaculture,2007,271(1/2/3/4):558-574.
- [6] Zhan A B, Bao Z M, Wang X L, et al. Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags[J]. Fisheries Science,2005,71(6):1341-1346.
- [7] Xiong L W, Wang Q, Wang S B, et al. Description of 21 microsatellites for the Chinese bitterling, *Rhodeus sinensis* Günther, 1868[J]. Journal of Applied Ichthyology,2017,33(5):940-942.
- [8] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation;a review[J]. Molecular Ecology,2002,11(1):1-16.
- [9] 鲁翠云,孙效文,曹洁,等. 磁珠富集法筛选白鲢的卫星分子标记[J]. 农业生物技术学报,2005,13(6):772-776.
- [10] Wang Y W, Samuels T D, Wu Y Q. Development of 1,030 genomic SSR markers in switchgrass[J]. Theoretical and Applied Genetics,2011,122(4):677-686.
- [11] 杨兵,林琳,李纯厚,等. 基于高通量测序的二长棘鲷卫星标记开发与评价[J]. 南方水产科学,2015,11(4):116-120.
- [12] 高峰涛,邵长伟,崔忠凯,等. 基于高通量测序的青石斑鱼基因组卫星开发及评价[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2017,47(4):52-57.
- [13] 吕振明,侯龙,龚理,等. 基于 de novo 高通量测序的曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*) ESTs 中卫星位点筛选与特征分析[J]. 海洋与湖沼,2017,48(4):877-883.
- [14] 熊良伟,王帅兵,岳丽佳,等. 宽体金线蛭基因组 SSR 序列特征分析及其分子标记开发[J]. 南方农业学报,2018,49(11):2298-2303.
- [15] 林艳,何紫迪,毛积鹏,等. 木荷基因组 SSR 位点开发及初步分析[J]. 热带作物学报,2018,39(9):1766-1771.
- [16] 詹海仙,王颖莉,杜晨晖,等. 基于甘草全基因组序列的 SSR 分子标记开发[J]. 分子植物育种,2020,18(18):6093-6100.
- [17] 张永德,文露婷,罗洪林,等. 卵形鲳鲹基因组调研及其 SSR 分子标记的开发应用[J]. 南方农业学报,2020,51(5):983-994.
- [18] 袁文成,黄鹤忠,李文龙,等. 翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*) 转录组 EST-SSR 位点的信息分析及其多态性检测[J]. 海洋与湖沼,2015,46(2):403-409.
- [19] Labbé J, Murat C, Morin E, et al. Survey and analysis of simple sequence repeats in the *Laccaria bicolor* genome, with development of microsatellite markers[J]. Current Genetics,2011,57(2):75-88.
- [20] Srivastava S, Kushwaha B, Prakash J, et al. Development and characterization of genic SSR markers from low depth genome sequence of *Clarias batrachus* (Magur)[J]. Journal of Genetics,2016,95(3):603-609.
- [21] 孔啸兰,李敏,陈作志,等. 基于 RAD-seq 技术的长体圆鲂二、三核苷酸重复卫星标记开发与评价[J]. 南方水产科学,2019,15(3):97-103.
- [22] 曾晓芸,杨宗英,田辉伍,等. 基于 Mi-Seq 高通量测序分析裸体异鳔鳅卫星组成[J]. 淡水渔业,2015,45(1):3-7.
- [23] 洪文娟,郝兆祥,刘康佳,等. 基于石榴全基因组序列的 SSR 标记开发及鉴定[J]. 北京林业大学学报,2019,41(8):38-47.
- [24] 相瑜,任丽平,王日昕. 三疣梭子蟹卫星标记的筛选及特征分析[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版),2013,32(5):421-425.
- [25] Sonah H, Deshmukh R K, Sharma A, et al. Genome-wide distribution and organization of microsatellites in plants:an insight into marker development in *Brachypodium*[J]. PLoS One,2011,6(6):e21298.
- [26] 曾聪,高泽霞,罗伟,等. 基于 454 GS FLX 高通量测序的团头鲂 ESTs 中卫星特征分析[J]. 水生生物学报,2013,37(5):982-988.
- [27] 阎毛毛,戴晓港,李淑娟,等. 松树、杨树及桉树表达基因序列卫星比对分析[J]. 基因组学与应用生物学,2011,30(1):103-109.
- [28] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n · (dG-dT)_n polymorphisms[J]. Genomics,1990,7(4):524-530.
- [29] 刘瑞成,张富铁,但胜国,等. 宽口光唇鱼卫星位点的筛选与特征分析[J]. 四川动物,2013,32(2):161-166.
- [30] An H S, Park J Y, Kim M J, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for the heavily exploited rockfish *Sebastes schlegelii*, and cross-species amplification in four related *Sebastes* spp. [J]. Conservation Genetics,2009,10(6):1969-1972.
- [31] 房祖业,陈晓东,吴咏诗,等. 大刺鲃(*Mastacembelus armatus*) 二、三、四碱基重复卫星标记的筛选和特征分析[J]. 海洋与湖沼,2018,49(1):174-182.