

大叶藻 EST-SSR 标记开发及其在大叶藻群体遗传多样性研究中的应用

刘福利¹ 刘坤^{1,2} 王飞久^{1*} 孙修涛¹ 汪文俊¹ 梁洲瑞¹ 马兴宇^{1,2}

(¹农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘要 本研究从 NCBI 的 EST 数据库中下载大叶藻 EST 序列共计 10 659 条, 从中得到 SSR 位点共 65 个, SSR 发生频率为 1.7%, 平均分布距离为 21.7 kb。其中三核苷酸为优势重复类型, 占 49.2%, 二核苷酸数量仅次于三核苷酸, 占 33.8%。基于 65 条含有 SSR 的 EST 序列, 设计并合成了 30 对引物, 其中 26 对引物的扩增产物单一, 片段大小与预测的相近或较大。在由 16 个大叶藻个体组成的群体中, 其中 8 对引物的扩增条带具有多态性。利用这 8 对引物对青岛汇泉湾大叶藻自然群体进行了遗传多样性分析, 结果表明, 8 个 SSR 共检测出 33 个等位基因, 平均每个 SSR 能检测出 4.1 个等位基因, 多个遗传多样性参数表明, 青岛汇泉湾大叶藻群体具有较高的遗传多样性 ($H_o=0.5382$; $H_e=0.5776$; $I=0.5607$)。本研究开发的 EST-SSR 标记, 可进一步丰富大叶藻 SSR 标记信息, 为大叶藻分子生态和群体遗传研究提供更多的标记选择。

关键词 大叶藻 EST SSR 遗传多样性

中图分类号 Q948.8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)04-0091-07

EST-SSR marker development and its application in population genetic diversity analysis of *Zostera marina*

LIU Fu-li¹ LIU Kun^{1,2} WANG Fei-jiu^{1*} SUN Xiu-tao¹

WANG Wen-jun¹ LIANG Zhou-rui¹ MA Xing-yu^{1,2}

(¹ Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Aquatic and Life School, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT In this study, a total of 10 659 *Zostera marina* EST sequences were downloaded from NCBI database, from which 65 EST-SSR loci were searched with the frequency of 1.7% and the average distributing distance of 21.7 kb. Out of all the repetitive motifs, the trimer was dominant at a ratio of 49.2%, followed by the dimer at a ratio of 33.8%. Based on the searched 65 EST sequences, 30 pairs of primers were designed and synthesized, of which 26 pairs had amplification products with unambiguous bands at similar or larger size than expected.

国家公益性行业(农业)科研专项(201003068)资助

* 通讯作者。E-mail: wangfj@ysfri. ac. cn, Tel: (0532)85838673

收稿日期: 2012-07-12; 接受日期: 2012-12-04

作者简介: 刘福利(1983-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事经济海藻研究。E-mail: liufl@ysfri. ac. cn, Tel: (0532)85838673

Using eight pairs of polymorphic primers in a population of 16 individuals, the genetic diversity of *Z. marina* population in Huiquan Bay, Qingdao was analyzed. A total of 33 alleles were obtained at an average of 4.1 alleles per locus, and the genetic diversity of the investigated population was relatively high ($H_o=0.5382$; $H_e=0.5776$). The EST-SSR markers developed in this study will provide data for molecular ecology and population genetics study of *Z. marina*.

KEY WORDS *Zostera marina* SSR EST Genetic diversity

大叶藻隶属于沼生目 Helobiae、大叶藻科 Zosteraceae、大叶藻属 *Zostera*, 生长于低潮带和潮下带浅海区, 是北半球沿海分布最广泛的一类海草, 在我国广泛分布于山东、河北、辽宁沿海。作为海草的一个优势种, 大叶藻可形成海草场, 是近海典型生态系统之一, 具有重要的生态和经济价值 (Orth *et al.* 2006; Hemminga *et al.* 2000)。然而, 由于人为因素干扰和气候变化 (Waycott *et al.* 2009), 在全球范围内大叶藻正经历着严重的衰退 (Short *et al.* 1996)。近年来有关大叶藻自然群体衰退原因的探究渐渐成为近海生态系统研究的焦点之一。生物群体的遗传结构和遗传多样性, 既是生物群体对环境长期适应的结果, 也是影响生物群体对环境适应力的关键影响因子。因此, 应用分子生态学和群体遗传学的原理和方法, 研究大叶藻群体遗传结构和遗传多样性与环境间的相互作用, 对解析大叶藻衰退原因具有重要意义。

作为第二代分子标记的代表, 简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 又称微卫星 (Microsatellite) 标记, 具有高丰度、高重复性、多等位基因和共显性遗传等优点, 一直是分子生态学和群体遗传学的首选标记 (Powell *et al.* 1996; Nybom 2004)。根据来源不同, SSR 标记可分为基因组 SSR (Genomic SSR) 和表达序列标签 SSR (EST-SSR), 前者需要建库和测序导致成本较高 (Zane *et al.* 2002), 而随着公共数据库里 EST 数据的积累, EST 序列渐渐成为开发 SSR 标记的重要资源。相对于 Genomic SSR, EST-SSR 具有开发成本低、可在近缘物种中交叉使用和可作为功能性标记等优点 (Varshney *et al.* 2005)。对大叶藻而言, Reusch 等 (1999、2000) 应用富集文库的方法开发了 12 个 Genomic SSR; Peng 等 (2012) 应用富集文库的方法开发了 19 个 Genomic SSR 标记; Oetjen 等 (2007) 利用他们构建的 EST 数据库中的 1 103 条序列开发了 14 个 EST-SSR 标记。此后, 又有一批新的 EST 数据被添加到公共数据库 (Reusch *et al.* 2008; 刘利民等 2010), 截止 2012 年 6 月, NCBI 数据库中大叶藻的 EST 序列已高达 10 659 条。为了进一步丰富大叶藻 SSR 标记信息, 增加 SSR 标记在大叶藻基因组的覆盖度, 为大叶藻分子生态和群体遗传研究提供更多的标记选择, 最终为更全面地了解大叶藻遗传多样性和遗传结构服务, 本研究利用最新的大叶藻 EST 信息, 从中开发一批新的 EST-SSR 标记, 并应用这些 EST-SSR 标记分析评价了山东省青岛市汇泉湾大叶藻群体的遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 大叶藻样本

本研究所应用的大叶藻样品, 于 2011 年 6 月 17 日采自山东省青岛市汇泉湾。随机取样, 样本间至少间隔 2m, 样本量为 24 个个体。采集好的样品用海水初步清洗, 装入封口袋, 做好标记带回实验室, 用灭菌海水清洗, 彻底清除附着物, 于 -20°C 保存以备基因组 DNA 提取。

1.2 大叶藻基因组提取

大叶藻基因组 DNA 采用 TianGen 植物基因组提取试剂盒 (TianGen 生物技术有限公司, 北京) 进行提取, 具体步骤参见其说明书。应用电泳和 DNA 定量仪两种方法检测基因组 DNA 的质量。

1.3 大叶藻 EST-SSR 标记开发

大叶藻的 EST 来自 NCBI (美国国家生物技术信息中心) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

dbEST)。从数据库直接获取的 EST 中包含一些低质量片段,在搜索 SSR 前应对这些 EST 进行预处理,然后应用在线软件 SSRIT(<http://acorn.cshl.org/db/searches/ssrtool>)搜索 EST 中的 SSR 序列。搜索的标准为:重复序列不少于 18~20 核苷酸,即二核苷酸(Dimer)重复至少 10 次,三核苷酸(Trimer)至少重复 6 次,四核苷酸(Tetramer)至少重复 5 次,五核苷酸(Pentamer)至少重复 4 次,六核苷酸(Hexamer)至少重复 3 次以上。应用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物,扩增片段长度在 150~350 bp 之间,最长不超过 500 bp,引物由上海生工生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系和程序参考 Oetjen 等(2007),不同引物对的退火温度不同,具体参考表格 2。PCR 扩增产物应用 8%的聚丙烯酰胺凝胶进行分离,电泳结束后参照 Bassam 等(1991)的方法进行银染显色。

1.4 青岛汇泉湾大叶藻群体遗传多样性的 EST-SSR 分析

利用筛选的 8 对大叶藻 EST-SSR 标记,对青岛汇泉湾大叶藻自然群体($n=24$)进行基因分型,评价其遗传多样性水平。

1.5 数据处理

EST-SSR 标记开发成功的标准为:EST-SSR 标记的引物对能在 PCR 反应中扩增出单一的目的条带,没有或仅有微弱的非特异性扩增,并且在检验群体中表现出一定的多态性。利用 POPGENE Version 1.31(Yeh *et al.* 1999)软件计算群体的遗传多样性参数:等位基因数 N_a 、有效等位基因数 N_e 、Shannon 多样性指数 I 、观察杂合度 H_o 、期望杂合度 H_e 。应用在线软件 Genepop(<http://genepop.curtin.edu.au/>)检验各 EST-SSR 标记位点是否在大叶藻群体中遵循 Hardy-Weinberg 平衡,检验 EST-SSR 标记位点间是否存在连锁不平衡。

2 结果

2.1 基因组 DNA 质量检测

电泳检测所提取基因组 DNA 样品的质量,结果显示每一样品在电泳时均形成明显的一条主带,与分子量标准对照,大小约为 23 kb。DNA 定量仪测定所得的 DNA 溶液 OD 值在 1.6~1.8 之间,所得 DNA 样品的浓度在 20~50 ng/ μ l 左右。电泳和定量仪的检测结果表明所获得大叶藻基因组 DNA 样本质量较高,可以用于下游的实验。

2.2 大叶藻 SSR 在 EST 中的分布特征

从 NCBI 的 EST 数据库中下载大叶藻 EST 序列共计 10 659 条,经过预处理后,选择其中高质量的、无冗余 EST 序列 3823 条用于 SSR 搜索,结果共搜索得到 65 个 SSR,SSR 在 EST 序列中的发生频率为 1.7%(含有 SSR 的 EST 与无冗余 EST 总数之比),EST-SSR 的平均分布距离为 21.7 kb。在 65 个大叶藻 EST-SSR 中,其中二核苷酸共有 22 个,三核苷酸共有 32 个,四核苷酸共有 8 个;五核苷酸和六核苷酸分别共有 2 个和 1 个(表 1)。其中三核苷酸为优势重复类型,共占 EST-SSR 总数的 49.2%,二核苷酸数量仅次于三核苷酸,占 33.8%,而六核苷酸重复类型最少,仅有 1 个,仅占 1.5%(表 1)。共检测到 34 个重复单元类型,二核苷酸到六核苷酸中检测到重复单元类型分别有 6、19、6、2 和 1 个(表 1)。二核苷酸至六核苷酸平均单元

表 1 大叶藻 EST-SSR 中不同重复单元及其频率

Table 1 Repetitive motif type and frequency of EST-SSR in *Z. marina*

重复单元 Motif	数量 Number	比例 Ratio(%)	单元类型数 No. of motif	最大重复数 Maximum repeat
二核苷酸 Dimer	22	33.8	6	36
三核苷酸 Trimer	32	49.2	19	10
四核苷酸 Tetramer	8	12.3	6	8
五核苷酸 Pentamer	2	3.1	2	6
六核苷酸 Hexamer	1	1.5	1	4

长度变化范围差异很大,二核苷酸的最大重复次数最大,可达36次,六核苷酸的最大重复次数最小,只有4次(表1)。

2.3 大叶藻 EST-SSR 标记引物设计和筛选

基于搜索得到的65条含有SSR的大叶藻EST序列,设计并合成了30对引物(表2)。随机取4个大叶藻个体,对30对引物进行初步筛选。结果表明30对引物均有扩增产物,其中有4对引物非特异性扩增较多,目的条带不明确,将这些引物对舍弃;其余26对引物的扩增产物单一,片段大小与预测的相近或较大,保留这些扩增产物清晰、明亮的引物对,并将它们作为成功开发的大叶藻EST-SSR标记(表2)。然后,随机取16个大叶藻个体,筛选在16个个体间具有多态性的引物对,结果表明其中8对引物对的扩增条带具有多态性(表2),每对引物在16个个体中最多能扩增出5个等位基因,最少能扩增出两个等位基因,共扩增出28个等位基因,平均每对引物扩增出3.5个等位基因。其余18对引物在16个个体中都能扩增出清晰明亮的预期条带,但是都不具有多态性,至于它们是否确实不具多态性还需要在其他大叶藻群体中进一步检验。

表2 大叶藻 EST-SSR 标记的引物信息

Table 2 Primer information for EST-SSR markers of *Z. marina*

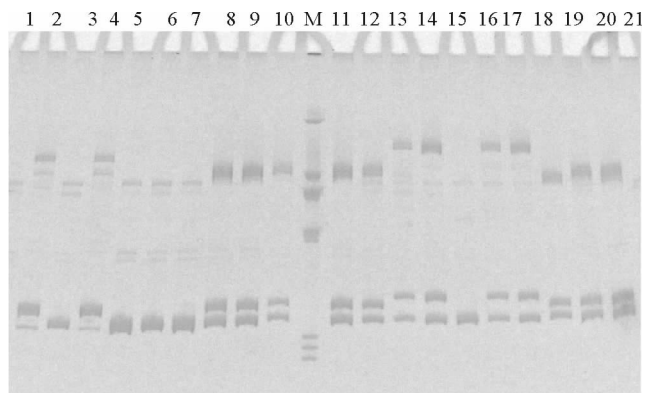
编号 Number	序列号 Accession No.	序列(5'-3') Sequence	重复单元 Repetitive unit	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物长度 Length of amplicon	多态性 Polymorphism
1	HS090967	GAAGGCGACCACCGTCACTC	AG	62.5	379	无 No
		ATCCACCACCAAACCGAACA		60.6		
2	AM768889	TGCCATCATCTCACTTACGC	TC	50	217	无 No
		TGACCGCAATAGGACAACCA		50		
3	AM408843	CGTAGATAACGACCGCAGAG	CTT	56.1	194	有 Yes
		GAGGGACGGAGGAGATGAAG		58.3		
4	HS091441	GCCACTCAAAACATACAAAA	TCT	51.1	166	有 Yes
		ATAGCAAAAAGAAACCCAGAT		51.2		
5	AM766590	TAACTCTGCGAATCCTCCTG	TTC	55.3	355	无 No
		AACCTGCTTCTCCACTGTAT		55.6		
6	AM768799	CGTCTTCATCCCTACCACCA	TTC	58	104	有 Yes
		ATTGCTTTGCTGTCGTCCTC		57.5		
7	AM767326	GGAACAAGAATGATAAACGGACAA	ATAG	60.4	352	有 Yes
		CGGGAGCAGAAGAGGTGAAA		60.1		
9	HS090290	TCTCCAACGCTTCTTCTCCG	TA	62.3	648	无 No
		CAAATACATCCTCAAGTCCG		52.9		
10	AM772587	TCAGTCACGGTTCCTACGA	GAC	58.5	231	无 No
		ATACGGGCTACCCACTCT		59.2		
11	AM770310	AGGTTTGACCAACGGAGATT	TCT	55.8	254	无 No
		GACCTGCTTCACAAAGACGA		56		
12	HS091741	GATGATCCTTCCGATCCTAG	TGA	53.5	181	无 No
		TTCAGATTCTTTCCACAA		55.3		
14	FC822541	TTTCATTTCCATTTCCACC	AG	57.3	394	无 No
		ATCCCAAAGTGCCAAACCTA		57.2		
15	FN435338	GCCACTTCCGTAGTTGCTGT	AG	57.7	391	有 Yes
		ACAAATACGACCCAAACTGC		55.2		

续表 2

编号 Number	序列号 Accession No.	序列(5'-3') Sequence	重复单元 Repetitive unit	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物长度 Length of amplicon	多态性 Polymorphism
16	AM768896	GATTCTTCTCCCTTGGTTGC CCTTGGAGGAGTCTGAAAAAT	TA	56.2 53.3	202	无 No
18	AM771969	AGAAGCGTCTCCCTAAGCAA AACCTGCTTGAGAACCTTGA	AAG	57 54.7	113	无 No
19	AM769444	CTGCTTCTCTGTTTCCACGAT GCGACGGTCAGACTCCAAAT	AAG	61 59.8	191	无 No
20	HS091722	CTACCGTCAGGTTTCTACTT ACTAATCCACTTCAAGCCAC	AAT	48.8 51.6	99	无 No
21	AM769845	TTTGTTAGGTCGAAACTCCG CAAGGCATCCATTCTTACTCAG	AGA	55.9 56.9	233	无 No
22	AM769767	AATGGAAAATATGATGGGATG ATGTGGTTGACTCGGTAGAA	CCA	52.2 52.5	154	无 No
24	AM766914	GGGACTCAATAATTCACAGAGA ATGGGCTACCAGACGAAACT	AG	53.7 56.3	221	无 No
25	AM766316	GGGGACTCACTCAATAATTCAC ATGGGCTACCAGACGAAACT	AG	55.5 56.3	224	有 Yes
26	AM766373	ACATCCAAACCCATTTACCG TCCTTCACAAGCGAAGCACA	GGA	57.3 60	239	无 No
27	AM767889	GAGACAACATCTACCCAAGACA TGACAGACCGAGACCTGAAT	TTTGA	54.1 54.7	181	无 No
28	AM772850	GGGGACGCCTCTTTTTTCTCT TCAACCCTGGGAATACCATCTT	CT	62.2 60.1	377	有 Yes
29	AM771411	AAAAGACAGAGCCTATCAAC CAGTACAGGGTTTAGTTTAGAT	ATC	48.6 48.4	294	有 Yes
30	HS090390	TCCTGCTCTGACTATCTCCA AACCACAGATCAAATCTAAGAC	TGGC	52.5 50.6	353	无 No

2.4 青岛汇泉湾大叶藻群体遗传多样性的 EST-SSR 分析

利用筛选出来的 8 对大叶藻 EST-SSR 引物,对 24 个个体组成的青岛汇泉湾大叶藻自然群体进行遗传多样性分析。结果表明,这些 SSR 标记中,最多能检测出 5 个等位基因,最少能检测出 3 个等位基因,8 个 SSR 共检测出 33 个等位基因,平均每个 SSR 能检测出 4.1 个等位基因。图 1 为其中第 29 号引物对在大叶藻自然群体中的扩增电泳图。利用 POPGENE 软件计算了青岛汇泉湾大叶藻自然群体的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Shannon 多样性指数(I)、观察



1~21: 其中 21 个大叶藻个体; M: DL2000 marker

1~21: 21 *Z. marina* individuals; M: DL2000 marker

图 1 引物对 29 在汇泉湾大叶藻群体中的扩增电泳

Fig. 1 Electrophoresis patterns of *Z. marina* using the primer No. 29

杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)(表3)。这些参数揭示出青岛汇泉湾大叶藻自然群体具有较高的遗传多样性。这些 EST-SSR 位点在青岛汇泉湾大叶藻自然群体中符合 Hardy-Weinberg 平衡,并且这些位点相互独立,彼此间处于连锁平衡状态($P < 0.01$)。

表3 青岛汇泉湾大叶藻自然群体的遗传多样性
Table 3 Genetic diversity of *Z. marina* population in Huiquan Bay, Qingdao

N_a	N_e	I	H_o	H_e
4.123 5±0.240 5	3.987±0.414 6	0.560 7±0.108 0	0.538 2±0.038 9	0.577 6±0.023 1

3 讨论

由于 Genomic SSR 开发过程繁杂、成本较高,大叶藻 Genomic SSR 分子标记罕有报道(Reusch *et al.* 1999,2000;Peng *et al.* 2012);对 EST-SSR 而言,虽然公共数据库中已有大量的大叶藻 EST(Reusch *et al.* 2008;刘利民 2010),但是目前仅有 Oetjen 等(2007)利用他们构建的 EST 数据库中的 1 103 条序列开发了 14 个 EST-SSR 标记。本研究利用最新的大叶藻 EST 信息,从中开发了 26 个新的 EST-SSR 标记,可进一步丰富大叶藻 SSR 标记信息,增加 SSR 标记在大叶藻基因组的覆盖度,为大叶藻分子生态和群体遗传学提供更多的标记选择,从而服务于大叶藻遗传多样性和遗传结构等相关研究。

大叶藻 EST 序列中含 SSR 的比率 1.7%,稍微偏离了 EST 文库中大约 2%~11% 的 EST 序列中含有 SSR 的推测(Cordeiro *et al.* 2001)。大叶藻 EST 序列平均每 21.7 kb 含有一个 SSR,故其 EST-SSR 的密度高于玉米(28.3 kb)和大豆(23.8 kb)(Gao *et al.* 2003),而低于拟南芥(14.9 kb)、小麦(15.6 kb)、棉花(20.0 kb)、水稻(11.8 kb)、大白菜(10.3 kb)和油菜(4.34 kb)(李永强等 2004;葛佳等 2005;李小白等 2007)。值得注意的是,不同的研究者得到的 EST-SSR 密度存在差异,这可能与 EST 的数量、搜索 SSR 软件的算法与 SSR 标准的参数设定等多种因素有关。

大叶藻 EST-SSR 中三核苷酸重复所占的比例最高为 49.2%,与已报道的甘蔗、棉花、水稻、玉米、小麦、大白菜、番茄、香蕉和拟南芥中三核苷酸类型所占比例最高的结果一致(Cardle *et al.* 2000;王静毅等 2008)。在所有大叶藻重复单元类型中,出现频率最高的是 AAG/CTT,占有三核苷酸重复类型总数的 26.3%,与甘蓝、大白菜、油菜、拟南芥和大豆中都是 AAG/CTT 出现频率最高的结果相一致。Gao 等(2003)推测双子叶植物中 AAG/CTT 重复丰度很高,尽管大叶藻属于单子叶植物,但是其 AAG/CTT 重复类型频率最高,这可能提示单子叶植物中也具有高丰度的 AAG/CTT 重复。

利用本研究筛选的 8 个 EST-SSR 标记分析评价了青岛汇泉湾大叶藻自然群体的遗传多样性,结果表明该大叶藻群体具有较高的遗传多样性($H_o=0.5382$; $H_e=0.5776$)。另外,刘志鸿等(1998)、李渊等(2011)分别应用同工酶和 AFLP 技术研究,表明青岛地区大叶藻种群具有较高的遗传多样性,与本研究结果相一致。这些研究都证明了青岛大叶藻群体具有较高的遗传多样性水平,暗示其具有较强的环境适应力。然而,近年来青岛地区的大叶藻群体却有衰退趋势,这可能因为生境条件变化幅度超出了大叶藻的适应范围。引起生境条件变化的因素很多,包括气候变化、海洋酸化,尤其是人为因素的影响,如近海污染、围海造田和近岸工程等。大叶藻组成的海草场是近海典型生态系统之一,具有重要的生态和经济价值。因此,应采取科学有效的保护措施,一方面通过多种方法提高大叶藻群体自身的环境适应力,另一方面要尽量减少人为干扰,来保育大叶藻群体,以发挥其重要的生态效应。

参 考 文 献

- 王静毅,陈业渊,刘伟良,武耀廷. 2008. 香蕉 EST-SSRs 的标记与开发与应用·遗传,30(7):933-940
 刘利民,孔凡娜,茅云翔,杨惠. 2010. 大叶藻全长 cDNA 文库的构建. 中国海洋大学学报,40(11):85-89
 刘志鸿,董树刚,牟海津,杨永杰,高明君. 1998. 青岛汇泉湾大叶藻种群遗传多样性的研究. 海洋水产研究,2(19):27-32
 李渊. 2011. 大叶藻科的系统发育与大叶藻居群遗传学研究. 见:中国海洋大学硕士学位论文

- 李小白,张明龙,崔海瑞. 2007. 油菜 EST 资源的 SSR 信息分析. 中国油料作物学报, 29(1):20-25
- 李永强,李宏伟,高丽锋,何蓓茹. 2004. 基于表达序列标签的微卫星标记(EST-SSRs)研究进展. 植物遗传资源学报, 5(1):91-95
- 葛佳,谢华,崔崇士,洪剑明,马荣才. 2005. 大白菜表达序列标签 SSR 标记分析. 农业生物技术学报, 13(4):423-428
- Bassam JB, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem 196(1):80-83
- Cardle L, Ramsay L, Milbourne D *et al.* 2000. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. Genetics 156(2): 847-854
- Cordeiro GM, Casu R, McIntyre CL *et al.* 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. Plant Sci 160(6): 1115-1123
- Gao LF, Tang JF, Li HW *et al.* 2003. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. Molecular Breeding 12(3): 245-261
- Hemminga M, Duarte C M. 2000. Seagrass Ecology. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Mol Ecol 13(5):1143-1155
- Oetjen K, Reusch TBH. 2007. Identification and characterization of 14 polymorphic EST-derived microsatellites in eelgrass (*Zostera marina*). Mol Ecol Notes 7(5): 777-780
- Orth RJ, Carruthers TJB, Dennison WC *et al.* 2006. A global crisis for seagrass ecosystems. BioScience 56(12): 987-996
- Peng J, Zhang L, Jiang X *et al.* 2012. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Zostera marina* and their cross-species amplification in *Zostera caespitosa*. Conservation Genet Resou 4(2): 455-458
- Powell W, Machray GC, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Sci 1(7): 215-222
- Reusch TBH. 2000. Five microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* and a test of cross-species amplification in *Z. noltii* and *Z. japonica*. Mol Ecol 9(3): 371-373
- Reusch TBH, Stam WT, Olsen J. 1999. Microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* reveal marked polymorphism with and among populations. Mol Ecol 8(2): 317-321
- Reusch TBH, Veron AS, Preuss C *et al.* 2008. Comparative analysis of Expressed Sequence Tag (EST) libraries in the Seagrass *Zostera marina* subjected to temperature stress. Mar Biotechnol 10(3):297-309
- Short FT, Wyllie-Escheverria S. 1996. Natural and human induced disturbance of seagrasses. Environmental Conserv 23(1):17-27
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends Biotech 23(1):48-55
- Waycott M, Duarte CM, Carruthers TJB *et al.* 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 106(30):12377-12381
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T and 2 others. 1997. POPGENE: the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Mol Ecol 11(1):1-16