

三疣梭子蟹多态性微卫星 DNA 标记的筛选及评价

韩智科^{1,2} 刘萍^{1*} 李健¹ 高保全¹ 陈萍¹

(¹农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 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, 201306)

摘 要 根据前人 FIASCO 方法构建的三疣梭子蟹微卫星富集文库, 对含微卫星的 DNA 序列设计了 71 对引物并对其进行了多态性筛选, 筛选出 21 对多态的微卫星引物, 对三疣梭子蟹 1 个野生群体的 30 个个体进行遗传多样性检测, 同时对引物进行评价。21 个位点共获得了 188 个等位基因, 平均每个位点扩增得到 8.9 个等位基因。不同引物获得的等位基因数差异较大, 从 3~13 个不等, 其中 Pot8、Pot37、Pot48、Pot53、Pot54、Pot66 六个位点分别获得了 11、12、12、11、13、11 个等位基因, 而 Pot46 仅获得了 3 个等位基因。等位基因的大小分布在 131~312bp, 基本符合引物设计时理论产物长度。21 个微卫星位点的期望杂合度的范围为 0.659~0.889, PIC 值均高于 0.5, 表明它们都有很高的杂合度, 均可用于三疣梭子蟹种群遗传结构分析, 为三疣梭子蟹品种选育、种系评估提供更多的微卫星 DNA 信息。

关键词 三疣梭子蟹 微卫星标记 多态性 遗传多样性

中图分类号 Q953 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)01-0072-07

Screening and evaluation of *Portunus trituberculatus* polymorphic microsatellite DNA markers

HAN Zhi-ke^{1,2} LIU Ping^{1*} LI Jian¹ GAO Bao-quan¹ CHEN Ping¹

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

(²Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT A microsatellite enriched library of *P. trituberculatus* was constructed following the FIASCO method. Seventy-one pairs of primers were designed according to the sequences containing microsatellite motifs. Twenty-one loci were polymorphic after the evaluation of 71 loci based on genetic diversity analysis of a wild population comprising of 30 individuals for. A total of 188 alleles were obtained with an average of 8.9 alleles per locus. The number of alleles per locus amplified was significantly different, ranging from 3 to 13. The number of alleles obtained for the loci Pot8, Pot37, Pot48, Pot53, Pot54, Pot66 was 11, 12, 12, 11, 13 and 11, respectively, and Pot46 got only three alleles. Allele size distribution was in the range of 131 ~ 312bp, which is basically in line with the design theory of primer product length. Twenty-one

国家高技术研究发展计划项目(2006AA10A406、2012AA10A409)和国家自然科学基金(30871933、40806067)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuping@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823291

收稿日期: 2011-01-21; 接受日期: 2011-02-22

作者简介: 韩智科(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究。E-mail: hzk579@163.com

microsatellite loci of expected heterozygosity were in the range of 0.659 ~ 0.889, and PIC values were higher than 0.5. The results indicated that they have a high heterozygosity, which can be used for *P. trituberculatus* population genetic structure, species breeding, and germ-line assessment of microsatellite DNA.

KEY WORDS *Portunus triuberculatus* Microsatellite marker Polymorphic Genetic diversity

三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 隶属于甲壳纲 Crustacea、十足目 Decapoda、梭子蟹科 Portunidae、梭子蟹属 *Portunus*(戴爱云等 1997),属于大型海洋经济蟹类。自 20 世纪 50 年代起,国内海洋生物工作者陆续开展了胚胎发育、生殖习性、同工酶分析、遗传标记等方面的研究工作(孙颖民等 1984;宋海棠等 1988;余红卫等 2005;高保全等 2007;郭天慧等 2004;金珊等 2004),但在梭子蟹的种质资源利用及保护方面的研究工作仍鲜有问津,特别是资源保护方面。近年来由于捕捞强度大及环境影响,有必要采取适当保护措施。因此,本研究旨在筛选评价三疣梭子蟹可用的微卫星标记,为以后探讨群体的遗传多样性水平提供基础性资料,同时为分子辅助育种提供方法手段。

微卫星是近 10 余年来发展起来的一种新型的分子遗传标记。它具有在基因组中数量大、分布广、多态性丰富、易于检测、呈孟德尔共显性遗传、可鉴别纯合子和杂合子等特点。自 20 世纪 90 年代以来,微卫星标记已经广泛应用于人类和一些重要种类动植物连锁群的构建和物理图谱的绘制。在海洋生物中,中国对虾 *Penaeus chinensis*、大西洋鲑 *Salmo salar*、雪蟹 *Chionoecetes opilio* 和真鲷 *Pagrosomas major* 等已经利用微卫星标记进行了许多工作。近年来,许多海洋生物工作者开始进行蟹类微卫星标记的开发和应用等研究,取得了一定进展。宋来鹏等(2008a,b)对三疣梭子蟹微卫星特征做了分析。目前可用微卫星标记还不足以满足相关遗传研究之需。就此本实验室开发了 71 对三疣梭子蟹微卫星标记引物,在筛选微卫星引物的基础上,筛选出 21 对微卫星多态性引物,并对这 21 对引物的多态性进行了评估,以期在三疣梭子蟹的品种选育、种系评估以及连锁图谱的构建提供信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用三疣梭子蟹样品于 2005 年 10 月中旬取自江苏省连云港海洲湾的野生群体亲蟹 200 只(高保全等 2007;樊祥国等 2009),随机取 30 只,样品运回实验室后,取大螯肌肉,置于灭菌的 1.5 ml Eppendorf 管中,编号, -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及检测

基因组 DNA 提取参照 Strauss(1989)的方法(略作修改)进行。

DNA 质量与浓度检测:DNA 溶液经 1% 琼脂糖凝胶电泳, Gene Finder 染色,紫外光下检测 DNA 质量,将溶液稀释至 50 ng/ μ l, -20 °C 冷冻保存,作为模板用于微卫星分析。

1.2.2 PCR 反应条件的优化与设定

首先建立微卫星引物 PCR 扩增条件。15 μ l 的反应体系,包括(10 \times)Buffer 1.5 μ l, 2.0 mmol/L MgCl₂ 1.2 μ l, 2 mmol/L dNTPs 0.375 μ l, 10 μ mol/L 引物 1.2 μ l, 5U 的 *Taq* 酶 0.12 μ l, 50 ng/ μ l 模板 DNA 1.2 μ l, 所用的模板是 30 个个体的 DNA。

PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 40 s,退火 1 min(表 2),72 °C 延伸 1 min,25 个循环;72 °C 延伸 5 min;4 °C 保存。

当出现扩增产物特异性不强的情况时,需对体系中的参数进行细微的调整。

1.2.3 PCR 反应产物的检测

PCR 扩增反应产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,140V 电压电泳 30min。PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,电泳后用 10% 的醋酸浸泡 0.5 h,1.5% 的硝酸银染色 30 min,显色液(甲醛,硫代硫酸钠,无水碳酸钠)显色 10min。

1.3 数据统计与分析

利用 Popgene 32 Version 1.31 和 Genepop V4,对所获得微卫星引物对三疣梭子蟹群体(30 个个体)进行遗传分析:对每一个微卫星位点的等位基因的数量进行统计,计算每个等位基因的频率,并对微卫星标记进行连锁不平衡分析。计算下列统计量:

参照 Botstein 等(1980)的方法计算多态性信息含量(Polymorphism Information Content, PIC):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2P_i^2 P_j^2$$

式中, P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 和第 j 个等位基因频率, m 为等位基因数。

多态位点杂合度(观测值): H_o 为杂合子观察数与观察个体总数之比。多态位点杂合度(期望值):

$$H_e = 1 - \sum P_i^2$$

式中, P_i 为该位点上第 i 个等位基因的频率。

2 结果

2.1 微卫星引物

本研究所用微卫星标记信息见表 1。

表 1 三疣梭子蟹 21 对微卫星引物序列

Table 1 Primer sequences of 21 microsatellite loci for *P. trituberculatus*

克隆编号 No. (locus)	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	微卫星核心序列 Core repeats	GenBank 登录号 GenBank accession number
Pot4	F: ATGTAACCCTACGCCACACG R: GGACAGATACATACAGAACCAGTTG	(TC)25	GQ463623
Pot7	F: ATCGTGACCTGAGAAGAGCA R: CCCAAACTGGCTAATCAATG	(TCA)8(GCA)5 (TAG)4CAG(TAG)6	GQ463626
Pot8	F: CCACACGAAAAATGCAACTG R: TCACCGTGCAGAAATTGAAAAG	(GA)12	GQ463627
Pot10	F: GAACGAAAGGCTGGGTAAAT R: TTCTTGACACCTGCCATCA	(CA)31	GQ463629
Pot13	F: TGTTGCTGGTGTGTGTGTTTC R: GGTATCTCATAAAGCCGGAAT	(AG)14	GQ463632
Pot17	F: TTTGCTCTTACCTTCTCACC R: ATGCAATCATGTTTTCGTCT	(TAG)16...(TAG)14	GQ463636
Pot18	F: CGCTGTATCATAGCCCTTGC R: GGGCTTTGGAAAAGATGTGA	(AC)9AT(AC)22AT(AC)4GG(AC)15	GQ463637
Pot25	F: AGGAAAATGAGACGCACAGG R: CGAAAACACCAACTTCACAGG	(TTA)16	GQ463644
Pot28	F: TAACTGCCACGAAACCCATC R: CAAAAAGGGGAGTAGCGAAA	(CT)23	GQ463647
Pot37	F: CACCACTAAATTGGCCTGTC R: CCTTCCTGAGCTTTGGCTTA	(AG)23	GQ463656

续表 1

克隆编号 No. (locus)	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	微卫星核心序列 Core repeats	GenBank 登录号 GenBank accession number
Pot41	F: AAAGAACGCGGTCCTACTGAAT R: ACACTGAAATTCCGCCAAAG	(GA)12	GQ463660
Pot42	F: TCATCACACAGGCTCACTCA R: CATCTTCCACCTTCCCTCAA	(CT)10	GQ463661
Pot46	F: GATGAAAAGACGTGATGGAT R: ACCTCTACTTCCCTCTCTTTCT	(GA)8	GQ463665
Pot47	F: TGATTTCAAATGCCGACAAG R: ATGATGGAGTGGATGGGAAA	(GA)8	GQ463666
Pot48	F: CTTACGTTTCCGTTTTTCG R: GGTGGGAGACAATCTTGACC	(CT)12	GQ463667
Pot50	F: CTGTTTATGGCGTTTTTGGT R: CATTTTGTTCACAGTTGCT	(AG)26	GQ463669
Pot51	F: ACACTGAACCGAAAGGCAAT R: TTTATCGGGCAAAGGAAAGA	(AG)16	GQ463670
Pot53	F: TTGCTGCTGCTGTTACTGCT R: CCTCCTCGTAACTTGGGATG	(TAC)10...(TAC)18	GQ463672
Pot54	F: CGTCGTATGCCTGAAGTGAG R: TCCTCTTCCCTCCAACCAAGA	(GT)30	GQ463673
Pot62	F: CGCTACAGCGACGTAAATA R: TGCTAGATGAACTGCGACTA	(AC)26	HQ201381
Pot66	F: TGACAACCTCAGCCATTGAGC R: CATCACCTCCCTTCTCTTG	(GA)16	HQ201385

2.2 引物初步筛选结果

首先进行初步筛选,对每对引物的 PCR 反应条件进行摸索,如 DNA 模板浓度、Mg²⁺ 浓度、退火温度等。对所设计的 71 对引物的 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,得到条带清晰的琼脂糖电泳图(图 1)。

2.3 多态性微卫星引物的筛选结果

经过 PCR 扩增、非变性聚丙烯酰胺电泳和硝酸银染色后得到单态的标记 17 个;多态性的标记 54 个,其中的 21 个适合进行微卫星多态性分析,其余 33 个标记因多态性低而未被采用。图 2 为 Pot54 位点在三疣梭子蟹 30 个个体中扩增得到的电泳图谱的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

2.4 数据统计与分析

利用微卫星引物对三疣梭子蟹海洲湾群体 30 个个体进行遗传多样性分析。对每一个微卫星位点的等位基因数目

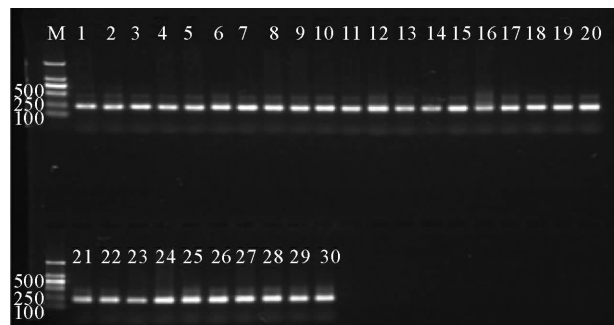


图 1 Pot34 引物以 DNA 为模板进行 PCR 扩增的琼脂糖电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis for PCR amplification product using Pot34 as primer and DNA as template

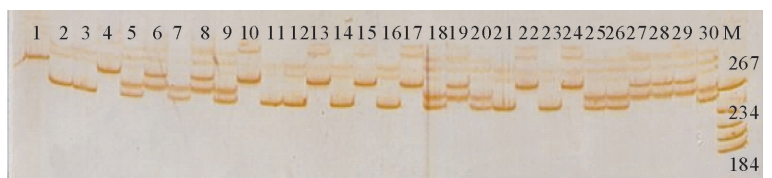


图 2 微卫星位点 Pot54 在三疣梭子蟹 30 个个体中扩增得到的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 2 Non-denaturing polyacrylamide gel image of locus Pot54 in 30 individuals of *P. trituberculatus*

(其中纯合个体的等位基因按两次计算)进行统计。根据各个微卫星位点各种基因型频率计算其观察杂合度,根据各个微卫星位点的等位基因频率,分别计算它们的期望杂合度和多态信息含量(*PIC*),计算结果列于表2。

表2 三疣梭子蟹21对微卫星引物退火温度及其评价

Table 2 Optimal annealing temperature and evaluation of 21 microsatellite loci for *P. trituberculatus*

克隆编号 No. (Locus)	退火温度(°C) Annealing temperature	扩增片段长 度范围 Range(bp)	等位基因数 Allele number	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>PIC</i>	P-val
Pot4	60	167~236	7	0.704	0.767	0.714	0.014 1
Pot7	58	178~246	6	0.926	0.859	0.826	0.007 1
Pot8	60	174~239	11	1.000	0.89	0.862	0.503 4
Pot10	60	165~247	9	0.963	0.853	0.817	0.009 0
Pot13	58	172~243	9	0.926	0.884	0.853	0.000 0*
Pot17	55	216~256	10	0.778	0.811	0.774	0.003 9*
Pot18	60	214~276	7	0.857	0.821	0.782	0.103 0
Pot25	60	205~297	9	0.821	0.873	0.841	0.020 4
Pot28	60	131~189	9	0.852	0.871	0.839	0.014 5
Pot37	58	167~221	12	0.923	0.888	0.859	0.010 6
Pot41	60	154~224	9	1.000	0.886	0.856	0.028 3
Pot42	60	183~265	6	1.000	0.716	0.659	0.440 0
Pot46	55	231~312	3	0.778	0.723	0.679	0.684 7
Pot47	60	227~307	9	0.778	0.892	0.862	0.000 0*
Pot48	60	152~205	12	1.000	0.854	0.819	0.000 0*
Pot50	58	173~257	9	0.792	0.798	0.755	0.000 0*
Pot51	60	216~258	9	0.885	0.857	0.822	0.001 0*
Pot53	60	234~281	11	0.862	0.891	0.863	0.546 3
Pot54	60	206~247	13	1.000	0.913	0.889	0.866 5
Pot62	57	143~241	9	0.821	0.873	0.842	0.523 2
Pot66	57	136~239	11	0.464	0.889	0.859	0.000 0*

注: *表示严重偏离哈迪-温伯格平衡的位点, *H_o*:观测杂合度、*H_e*:期望杂合度、*PIC*:多态信息含量、P-val:连锁不平衡的*P*值

从表2可以看出,在三疣梭子蟹30个样本的21个微卫星位点中,共获得了188个等位基因,平均每个位点扩增得到8.9个等位基因。不同引物获得的等位基因数差异较大,从3~13个不等,其中Pot8、Pot37、Pot48、Pot53、Pot54、Pot66六个位点分别获得了11、12、12、11、13、11个等位基因,而Pot46只获得了3个等位基因,等位基因的大小为131~312bp,基本符合引物设计时理论产物长度。期望杂合度的范围从0.716~0.913,表明它们都有较高的杂合度。*PIC*值为0.659~0.889,21个位点的*PIC*值高于0.5,表明这些微卫星位点在三疣梭子蟹中均具有较高的信息含量。位点Pot66的观察杂合度与期望值有较大的出入,其他微卫星位点的这两值均基本相符。

3 讨论

3.1 微卫星标记引物设计中微卫星序列的选取

在微卫星标记的引物设计中微卫星序列的选取是非常重要的和关键的。微卫星的核心序列有各种各样的类型,关于何种类型核心序列的微卫星筛选出微卫星标记的可能性较大,一直以来众说纷纭。张天时等(2004)对各种类型核心序列进行了部分研究。结果表明,在扩增出PCR产物中的微卫星引物中,多态性的比例相对来说还是比较高的。筛选出的微卫星标记的核心序列主要为两个碱基、3个碱基或4个碱基为基本重复单位的

序列,这与 Pongsomboon 等(2000)和 Xu 等(2001)斑节对虾 *Penaeus monodon* 中以三碱基和四碱基为基本重复序列的微卫星标记筛选效果较好的结果相符。同样,在本实验中,筛选出多态引物的 21 条微卫星序列的核心序列以两个碱基、3 个碱基为基本重复单位,21 个微卫星位点的杂合度、多态信息含量均很高,显示出丰富的多态性,实验结果与以上研究成果相符合。

在微卫星核心序列的重复次数方面,Weber(1990)认为,只有在双碱基重复序列次数大于 12 次时,微卫星标记才有可能表现出较高 PIC 值,才可以进行相应的多态性分析。如位点 Pot46 和 Pot47,以(GA)为基本重复单位,最多重复次数只有 8 次,所以等位基因数目少,分别为 3 个和 9 个,杂合度和 PIC 值也偏低。Xu 等(2001)曾在斑节对虾进行微卫星引物设计,最后的结果也表明,凡是核心序列重复次数较少的微卫星标记,其结果或单态或等位基因数目非常少,PIC 值也偏低。因此在选用的微卫星序列的核心序列的重复次数上应在一个较高的水平上,避免出现由于微卫星核心序列过短,造成微卫星标记筛选中多态性比较低而造成浪费。

3.2 无效等位基因

在筛选出来的 21 对引物中,有 3 个个体在 5 对引物中未扩增出条带。这可能是因为在该位点上出现了无效等位基因(Nullallele)。无效等位基因的出现是因群体中个别个体的引物结合位点的碱基出现缺失、突变或插入,在进行 PCR 扩增时引物与模版 DNA 无法结合,从而不能扩增出目的片段。Ardren 等(1999)和李 莉(2003)分别在虹鳟 *Salmo gairdneri* 和长牡蛎 *Ostrea gigas* 的微卫星遗传标记中发现过无效等位基因。分析结果发现,7 个座位的观测杂合度和期望杂合度存在较大差异,经哈迪-温伯格平衡检验,是由于杂合子的严重缺乏($P < 0.005$,表中 * 所示)造成的。相关分析指出杂合子缺失大多由于无效等位基因引起。由于微卫星序列点突变频率($10^{-2} \sim 10^{-5}$)和复制滑脱频率($10^{-3} \sim 10^{-4}$)很高,无效等位基因在哺乳类、鱼类、甲壳类在内的许多生物中都有报道(Pemberton *et al.* 1995; Jones *et al.* 1998; Sugaya *et al.* 2002)。所以在种群研究中,如果无效等位基因存在而不被考虑,就会导致群体中纯合子过剩或杂合子缺失,从而出现观测杂合度与期望杂合度偏离的现象。

3.3 微卫星标记遗传标记评价

本实验 21 个微卫星标记在 30 个样本中观测到 3~13 个等位基因,而 Pongsomboon 等(2000)、Xu 等(2001)在斑节对虾中筛选得到多态性最高的微卫星标记其等位基因最多分别达到 29 和 25 个,大大高出本研究中所得最大等位基因数,可能是非变性聚丙烯酰胺电泳以及在微卫星位点的等位基因统计中出现的偏差对分析微卫星电泳结果有局限性。由于微卫星的较强多态性,常常使得两条电泳带(等位基因)之间仅仅只有几个碱基的差别,反映在电泳胶上可能非常近,在区分两条带时很可能造成误判,将两条非常近的带误以为 1 条带。因此,建议使用测序仪的毛细管电泳结合荧光标记再结合其中的 Genescan 功能进行分析。

3.4 微卫星位点作为遗传标记的应用

用 Popgen 分析微卫星标记的连锁不平衡,结果发现 Pot4 与 Pot10、Pot41 与 Pot42、Pot47 与 Pot48、Pot54 与 Pot62 在 $P < 0.01$ 时连锁不平衡,所以不能用于连锁图谱的构建,而其余的多态性标记连锁平衡,能用于连锁图谱的构建工作。

遗传标记的多态性程度及其应用价值一般可用杂合度(H)、多态信息量(PIC)、个体识别力(DP)和非父排除率(PPE)来衡量。根据 Botstein 等(1980)提出的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,该基因座为高度多态基因座;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态基因座;当 $PIC < 0.25$ 时,则为低度多态基因座。本实验结果显示 21 个微卫星位点多态信息含量 $PIC > 0.5$,为高度多态性,在三疣梭子蟹群体遗传学研究中能提供确切的遗传信息。SSR 标记在不同的群体中存在差异,有的等位基因为个别群体所特有,可作为群体遗传差异的特异带(王 杰等 2006)。Barker(1994)研究指出,在利用 SSR 标记进行遗传距离分析时,要求 SSR 标记的等位基因数不少于 4 个,少于 4 个或没有扩增条带的 SSR 标记应该排除。基于这一结论,本实验筛选出的 21 对引物中有 20 对引物的等位基因数大于 4,可利用这些位点来进行不同群体三疣梭子

蟹的群体间遗传距离分析。罗云等(2010)利用 SSR 标记技术结合“拟测交”策略,以三疣梭子蟹莱州湾、舟山野生群体杂交产生的 F2 代家系为作图群体,初步构建了三疣梭子蟹雌、雄性遗传连锁图谱,图谱中遗传标记分布比较均匀,充分说明了 SSR 标记应用的合理性。

参 考 文 献

- 王杰,华太才,欧阳熙,益西多杰,姬秋梅. 2006. 藏山羊微卫星 DNA 多态性研究. 西南民族大学学报:自然科学版,32(3):538~544
- 朱冬发,余红卫,王春琳. 2005. 三疣梭子蟹个体发育早期的同工酶谱变化. 水产学报,29(6):751~756
- 刘志毅,相建海. 2001. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分析中的应用. 海洋科学,25(6):1~13
- 孙颖民,闫愚,孙进杰. 1984. 三疣梭子蟹的幼体发育. 水产学报,8(3):219~226
- 李莉. 2003. 长牡蛎遗传标记的筛选和遗传图谱的构建. 见:中国科学院研究生院博士学位论文
- 宋来鹏,刘萍,李健,刘振辉. 2008. 三疣梭子蟹基因组微卫星特征分析. 中国水产科学,15(5):738~744
- 宋来鹏,刘萍,李健,刘振辉. 2008. 三疣梭子蟹基因组小卫星特征分析. 水产学报,32(6):838~846
- 宋海棠,丁跃平,许源剑. 1988. 浙江北部近海三疣梭子蟹生殖习性的研究. 浙江水产学院学报,7(1):39~46
- 陈惠群,金珊,王国良,谢觉晓. 2004. 三疣梭子蟹血淋巴细胞及血液生化指标的初步研究. 水产科学,23(6):1~4
- 张天时,刘萍,孔杰,王清印. 2004. 中国对虾微卫星 DNA 引物的设计及筛选. 中国水产科学,11(6):567~571
- 罗云,高保全,刘萍,李健. 2010. 三疣梭子蟹遗传连锁图谱的初步构建. 渔业科学进展,31(3):56~65
- 高保全,刘萍,李健,戴芳钰,马牲. 2007. 三疣梭子蟹 4 个野生群体形态差异分析. 中国水产科学,14(2):223~228
- 高保全,刘萍,李健,戴芳钰. 2007. 三疣梭子蟹野生群体同工酶的遗传多态性分析. 水产学报,31(1):1~6
- 郭天慧,孔晓瑜,陈四清,喻子牛. 2004. 三疣梭子蟹线粒体 DNA、16S rRNA 和 COI 基因片段序列的比较研究. 中国海洋大学学报(自然科学版),34(1):22~28
- 樊祥国,高保全,刘萍,李健. 2009. 三疣梭子蟹 4 个野生群体遗传差异的同工酶分析. 渔业科学进展,30(4):84~89
- 戴爱云,冯钟琪,宋玉枝,黄志翔,吴赫昌. 1977. 三疣梭子蟹渔业生物资源的初步调查. 动物学杂志,(2):30~33
- Ardren, W. R., and Borer, S. 1999. Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss*. J. Hered. 90(5):529~536
- Barker, J. S. F. 1994. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proceeding of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Ontario: University of Guelph, 501~508
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics,32(3):314~331
- Jones, A. G., Stockwell, C. A., and Walker, D., and Avise, J. C. 1998. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish. J. Hered. 89(4):339~342
- Liu, P., Meng, X. H., Kong, J., He, Y. Y., and Wang, Q. Y. 2006. Polymorphic analysis of microsatellite DNA in wild populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Aquaculture Research, 37(6): 556~562
- Norris, A. T., Bradley, D. G., and Cunningham, E. P. 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. Aquaculture,182(1-2):73~83
- Pemberton, J. M., Slate, J., Bancroft, D. R., and Barrett, J. A. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: A caution for parentage and population studies. Mol. Ecol. 4(2):249~252
- Perez-Enriquez, R., Takagi, M., and Taniguchi, N. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA makers. Aquaculture,173(1-4):413~423
- Pongsomboon, S., Whan, V., Moore, S., S. and Tassanakajon, A. 2000. Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. Science Asia,26(1):1~6
- Strauss, W. M. 1989. Preparation of genomic DNA from mammalian tissues. Current Protocol in Molecular Biology. New York: John Wiley and sons, 221~222
- Sugaya, T., Ikeda, M., Mori, H., and Taniguchi, N. 2002. Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use for kinship estimation in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Fish. Sci. 68(2):299~305
- Urbani, N., Sevigny, J. M., Sainte Marie, B. et al. 1998. Identification of microsatellite markers in the snow crab *Chionoecetes opilio*. Molecular Ecology,7(3):357~358
- Vigouroux, Y., Jaqueth, J. S., and Matsuoka, Y. et al. 2002. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. Mol. Biol. Evol. 19(8): 1251~1260
- Weber, J. L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)n. (dG-dT)n polymorphisms. Genomics,7(4):524~530
- Xu, Z. K., Primavera, J. H., and Pena, L. D. et al. 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. Aquaculture,199(1-2):13~40