

9种常见笛鲷微卫星位点筛选与遗传多样性分析

郭昱嵩^{1,2}, 王中锋^{1,2}, 刘楚吾¹, 陈志明¹, 刘筠²

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025; 2. 湖南师范大学生命科学院, 湖南 长沙 410081)

摘要: 利用从勒氏笛鲷 *Lutjanus russelli* 基因组文库中筛选得到 37 对微卫星引物对笛鲷属 9 个习见种红鳍笛鲷 *L. erythropterus*、紫红笛鲷 *L. argentimaculatus*、星点笛鲷 *L. stellatus*、约氏笛鲷 *L. johnii*、千年笛鲷 *L. sebae*、金带笛鲷 *L. fulvus*、金焰笛鲷 *L. fulviflamma*、画眉笛鲷 *L. vitta* 与奥氏笛鲷 *L. ophuysenii* 的微卫星位点进行筛选和分析。9 个种都能检测到的微卫星位点有 10 个, 部分种能检测到的有 13 个。9 种笛鲷 Hardy-Weinberg 平衡下的平均期望杂合度在 0.730—1.000, 平均观测杂合度在 0.716—0.915, 偏离指数(*D*)为-0.002—-0.214。微卫星位点杂合度的分析表明目前笛鲷属鱼类存在较高的遗传多样性水平。另发现 9 个种的笛鲷都出现了杂合子缺失的情况, 缺失的原因有待于进一步的研究予以解释。

关键词: 笛鲷属(*Lutjanus*); 微卫星 DNA; 遗传多样性

中图分类号: Q346.5; S931.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)03-0082-05

Isolation and genetic diversity analysis of microsatellites from nine species of familiar snappers

GUO Yu-song^{1,2}, WANG Zhong-duo^{1,2}, LIU Chu-wu¹, CHEN Zhi-ming¹, LIU Yun²

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Thirty-seven microsatellite loci were isolated from the genomic library of *L. russelli* with PCR. Cross-species isolations with those markers were carried out for nine familiar species of snappers (*L. erythropterus*, *L. argentimaculatus*, *L. stellatus*, *L. johnii*, *L. sebae*, *L. fulvus*, *L. fulviflamma*, *L. vitta* and *L. ophuysenii*), and their genetic diversities were also evaluated. There were 10 microsatellite loci isolated successfully in nine species and 13 loci in partial species. The average expected heterozygosity, average observed heterozygosity and Hardy-Weinberg departure index under Hardy-Weinberg equilibrium in the nine species of snappers were 0.730—1.000, 0.716—0.915, (-0.002) — (-0.214), respectively. The results indicate that the genetic diversities of genus *Lutjanus* is in a relatively high level. In addition, the clear explain of prevalent absence of heterozygotes in all research species may request further research on fishes of genus *Lutjanus*.

Key words: genus *Lutjanus*, microsatellite DNA, genetic diversity

笛鲷属(*Lutjanus*)鱼类隶属鲈形目(Perciformes)笛鲷科(Lutjanidae), 广泛分布于热带、亚热带海域, 大多为暖水性近底层肉食性鱼类。中国大部分笛鲷属鱼类均为南部重要的海水经济鱼类, 研究人员正在积极开展该属的遗传多样性研究。张俊彬等^[1]以南沙群岛采获的 11 种笛鲷属的后期仔鱼为材料, 进

行了基因组 DNA 的 AFLP 研究, 通过笛鲷仔鱼和成鱼 的 AFLP 电泳图谱的比较分析发现南沙海区笛鲷属鱼类种群个体间存在高度的基因流, 在此基础上进行了系统分化研究。朱世华等^[2]测定了 9 种中国笛鲷属鱼类的细胞色素 b 基因的部分序列, 经过与 9 种大西洋海域分布的笛鲷相应序列比对后揭示中

收稿日期: 2008-03-25; 修订日期: 2008-07-15。刘学东编辑

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671610), 国家科技支撑计划项目(2007BAD29B03)

作者简介: 郭昱嵩(1980—), 女, 湖南省桂东县人, 博士, 讲师, 从事海洋生物分子遗传学研究。E-mail: gysrabbit@163.com

通讯作者: 刘楚吾, E-mail: swyjs@gdou.edu.cn

国南海笛鲷分化较早并且分歧较大, 并支持红鳍笛鲷 *Lutjanus erythropterus* 与红笛鲷 *L. sanguineus* 是同种异名的观点。肖翔等^[3], 王中铎等^[4]通过对笛鲷属鱼类 mtDNA 的 RFLP 研究, 揭示了笛鲷属鱼类的亲缘关系与系统发生。刘丽等^[5]运用 RAPD 及 SSR 技术对笛鲷属的画眉笛鲷 *L. vita*、金带笛鲷 *L. fulvus*、金焰笛鲷 *L. fulviflamma*、千年笛鲷 *L. sebae* 和星点笛鲷 *L. stellatus* 等 5 种鱼的遗传多样性及其分子标记进行了研究, 郭昱嵩等^[6]运用 PCR 法快速筛选勒氏笛鲷 *L. russelli* 基因组文库, 获得了 53 个 (CA)_n (n 7) 重复序列及少量其他类型重复单元。

近年来, 国外针对笛鲷所开展的种质资源研究迅速增多。如 Ovenden 等^[7]分析了澳大利亚昆士兰州三个紫红笛鲷地理种群和澳大利亚西海岸一个种群的四个两碱基重复微卫星位点, 得出杂合度在 0.602—0.930 范围的结果, 并分析 mtDNA 控制区和 ATPase 的部分序列, 揭示 mtDNA 序列不能清晰反映地域种群关系, 得出澳大利亚的紫红笛鲷存在着一个高水平基因流的结论。Dorenbosch 等^[8]用 AFLP 技术分析了西印度洋金焰笛鲷间地域隔离种群的遗传结构, 发现种群之间遗传距离非常小, 认为西印度洋的金焰笛鲷生存环境是一个大的开放结构。Loong 等^[9]筛选并分析了 9 个红鳍笛鲷的多态微卫星位点, 包括 8 个四碱基重复和 1 个 CA 重复。

勒氏笛鲷、红鳍笛鲷、紫红笛鲷、星点笛鲷、约氏笛鲷、千年笛鲷均已开展广泛的人工养殖工作, 部分种人工繁育技术已经成熟, 并已开展种间杂交研究。对其进行遗传多样性分析, 评估种质资源情况是非常必要与迫切的。本研究对笛鲷属习见种进行了微卫星位点的筛选, 并分析了其遗传多样性, 对种质资源情况进行了初步评估, 为合理利用笛鲷资源、科学进行笛鲷的人工繁育和遗传育种工作提供科学依据与借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

红鳍笛鲷、紫红笛鲷 *L. argentimaculatus*、星点笛鲷、约氏笛鲷 *L. johnii*、千年笛鲷、金带笛鲷、金焰笛鲷各 19 尾, 画眉笛鲷 9 尾与奥氏笛鲷 *L. ophuysenii* 10 尾采自湛江近海。尾静脉取血, 加 1/6 的 ACD 抗凝, -70 °C 低温保存。

1.2 总 DNA 的提取

总 DNA 的制备参照 Sambrook^[10]的方法, 从冻存血液中提取。经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测纯度, 紫外分光光度计定量后 4 °C 下保存备用。

1.3 PCR 反应

将 37 对从勒氏笛鲷筛选得到的微卫星引物^[11]对南海海域常见的 9 种笛鲷群体进行扩增。反应体系为: 总体积 10 μL, 含 1 μL 10×PCR Buffers (Bio Basic Inc., 10mM Tris-HCl (pH9.0), 10mM KCl, 10mM ((NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄), dNTPs 0.2 mM, 引物各 0.5 μM, Taq plus 聚合酶 1U, 总 DNA 约 10ng。扩增条件: 94 °C 预变性 3min; 94 °C 变性 30s, 退火温度 (T_a) 下退火 30s, 72 °C 延伸 45s, 循环 30 次; 最后 72 °C 延伸 5min。PCR 产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 染色基本按 Sanguinetti 等^[12]的方法进行, 实验中根据室温对染色与显影的时间略作调整。

1.4 数据统计方法

根据每个个体产生的条带的位置确定基因型, 利用 GENEPOP Version 3.4 计算等位基因数 (N_a)、等位基因频率 (P_i)、H-W 平衡标准进行 χ^2 检验的概率值 (P) 经 Bonferroni correction 校正^[13]、基因连锁不平衡检测 (genotypic disequilibrium)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o) 和期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e), 并进行多态信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC)^[14] 和 Hardy-Weinberg 平衡偏离指数 (D , $D = (H_o - H_e)/H_e$) 的计算。

2 结果与分析

2.1 微卫星引物适用性分析

将 37 对从勒氏笛鲷筛选得到的微卫星引物对 9 种笛鲷群体进行扩增, 筛选得到 23 对引物。23 对微卫星引物分别对 9 种笛鲷的适用情况见表 1。其中对 9 种笛鲷都适用的引物有 10 对引物, 只对部分种的笛鲷适用的有 13 对。图 1 和图 2 是部分微卫星位点在笛鲷属鱼类中的分布情况。图 1 中位点 *Lru* 004 在金焰笛鲷个体 7 的检测中出现零等位基因。

2.2 遗传多样性分析

由多态微卫星位点的等位基因数 (N_a)、等位基因频率计算期望杂合度 (H_e)、观测杂合度 (H_o)、Hardy-Weinberg 平衡 χ^2 检验的概率值 (P)、Hardy-Weinberg 偏离指数 (D) 以及多态信息含量 (PIC) (表 2); 并计算了 9 个种的平均等位基因数和

表 1 23 对微卫星引物对 9 种笛鲷的适用情况

Tab. 1 Cross-species isolation for nine species *Lutjanus* with 23 microsatellite primer pairs

微卫星位点	H	Z	X	Y	Q	JD	JY	HM	AS
<i>Lru033</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>Lru001</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru034</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>Lru038</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Lru010</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru039</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lru011</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru012</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Lru041</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Lru042</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru043</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Lru019</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru013</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru014</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru002</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru003</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lru020</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru004</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Lru023</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Lru025</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru005</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Lru029</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lru031</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: H: 红鳍笛鲷, Z: 紫红笛鲷, X: 星点笛鲷, Y: 约氏笛鲷, Q: 千年笛鲷, JD: 金带笛鲷, JY: 金焰笛鲷, HM: 画眉笛鲷, AS: 奥氏笛鲷; “+”表示适用; “-”表示不适用。

表 2 9 种笛鲷的多态位点数、Hardy-Weinberg 平衡下微卫星位点数、等位基因数、Hardy-Weinberg 偏离指数、期望杂合度、观测杂合度与高度多态位点数(PIC>0.5)

Tab. 2 The number of polymorphic loci, the number of loci under Hardy-Weinberg equilibrium, the number of polymorphic alleles, Hardy-Weinberg departure value (D), observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E) and the number of high polymorphic loci (PIC>0.5) in the nine species of snappers

物种	H	Z	X	Y	Q	JD	JY	HM	AS
多态位点数	14	13	13	15	5	11	17	14	10
平衡下位点数	6	6	5	10	2	5	12	14	5
等位基因数	3—13	3—14	2—11	3—18	4—18	2—15	2—18	2—12	3—11
偏离指数	0.028—2.559	0.010—0.450	0.029—∞	0.000—1.270	0.053—0.500	0.078—1.790	0.013—0.500	0.036—1.191	0.072—0.500
期望杂合度	0.111—1.000	0.842—1.000	0.000—1.000	0.133—1.000	0.833—1.000	0.118—1.000	0.118—1.000	0.222—1.000	0.875—1.000
观测杂合度	0.391—0.933	0.550—0.915	0.515—1.000	0.302—0.944	0.645—0.947	0.224—0.924	0.114—0.928	0.542—0.964	0.550—0.928
高度多态位 点数	12	12	11	14	5	8	14	13	9
(PIC>0.5)									

注: 各物种代码同表 1。

表 3 9 种笛鲷的平均等位基因数、Hardy-Weinberg 平衡下微卫星位点的杂合度平均值与平均 Hardy-Weinberg 平衡偏离指数

Tab. 3 The mean number of alleles, mean observed heterozygosity (H_O), mean expected heterozygosity (H_E) under Hardy-Weinberg equilibrium and mean Hardy-Weinberg departure value(D) of the microsatellites in the nine species of snappers

物种	H	Z	X	Y	Q	JD	JY	HM	AS
平均等位基因数	7.71	7.23	8.31	8.47	8.20	7.09	9.00	7.21	6.50
H _O 平均值	0.768	0.790	0.821	0.776	0.915	0.784	0.716	0.819	0.786
H _E 平均值	0.823	0.952	0.978	0.901	0.917	0.897	0.730	0.872	1.000
D 平均值	-0.067	-0.170	-0.161	-0.139	-0.002	-0.126	-0.020	-0.061	-0.214

H-W 平衡下位点杂合度的平均值, 平均杂合度的 D 值(表 3)。9 个种的平均等位基因数为 6.50—9.00, H_O 平均值为 0.716—0.915, H_E 平均值为 0.730—1.000, 平均杂合度的 D 值为-0.002—-0.214。

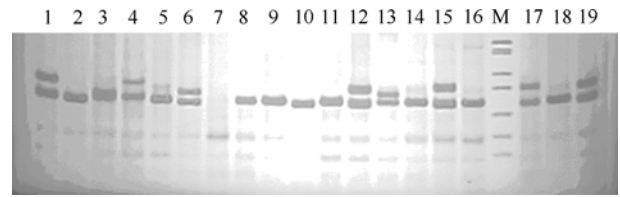


图 1 位点 *Lru 004* 在金焰笛鲷中的分布情况

M: pBR322 DNA/Msp I Markers; 1—19: 19 individuals; 7 denote null allele individual

Fig. 1 Amplification profile of the SSR locus *Lru 004* in *L. fulviflamma*

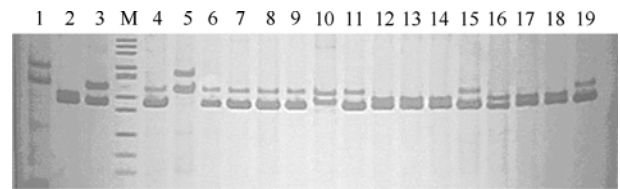


图 2 位点 *Lru 005* 在红鳍笛鲷中的分布情况

M: pBR322 DNA/Msp I Markers; 1—19: 19 individuals

Fig. 2 Amplification profile of the SSR locus *Lru 005* in *L. erythropterus*

注: 各物种代码同表 1。

3 讨论

3.1 种间微卫星引物适用性分析

微卫星具有丰富的多态性和信息量、分析操作简单、共显性特点、使用样品少等优点。筛选微卫星引物的费用高, 耗时长, 并且具有物种专一性, 利用已获得的微卫星引物对邻近种进行筛选不失为简单快捷的一种方法。已有大量的引用已发表引物对邻近种进行筛选和分析的报道。Galbusera 等^[15]用 40 对微卫星引物对雀形目 13 种鸟类进行筛选, 发现适用范围越广的引物其对应多态性越高。Lillandt 等^[16]筛选了北噪鸦 *Perisoreus infaustus* 的微卫星 DNA, 并运用得到的 9 个微卫星多态位点对 4 种鸟类进行了初步的种间适用性分析。Strecker^[17]用 *Cyprinodon* 属已发表的引物对 6 种鳉进行种间扩增, 11 个微卫星位点呈现了中度或高度的多态。本研究用 37 对勒氏笛鲷的微卫星引物对同属的其他 9 种笛鲷进行种间适用性分析表明 23 对引物能应用于其他种, 并且有 10 对引物对笛鲷属 10 种鱼类都适用, 呈现多态性, 能进行遗传多样性分析。

本研究中检测到少量的零等位基因。所谓零等位基因(Null allele)即对微卫星位点进行检测时, 等位基因带型很弱甚至不能识别。自从 Callen 等^[18]1993 年首次报道了人类双碱基重复微卫星位点零等位基因的起源与存在之后, 有关零等位基因的便陆续有报道^[19-20]。一般认为点突变是零等位基因出现的主要原因, 然而位点与引物结合部位间大片段插入或缺失, DNA 质量差, 位点突变大幅度改变了产物大小等也能导致零等位基因出现。在运用微卫星引物进行跨物种微卫星位点的筛选过程中, 零等位基因的现象尤为明显^[21]。选择保守的引物则可能减少零等位基因的出现^[22], 或对同一样品进行多次独立的 PCR, 也是识别零等位基因并保证其真实性的一种有效方法^[23]。

3.2 笛鲷属鱼类杂合子缺失现象的原因分析

杂合子缺失, 尤其是杂合子完全缺失将导致有些基因从基因库中消失, 造成种群遗传多样性的降低, 从而降低其适应环境的能力。本文中综合偏离指数均呈现了负值, 表明所分析的 9 种笛鲷杂合子存在着缺失情况。其中奥氏笛鲷杂合子缺失最为严重, 综合偏离指数达到了 0.214, 紫红笛鲷次之, 偏离指数为 0.170。Ovenden 等^[7]分析了澳大利亚昆士兰州三个紫红笛鲷地理种群和澳大利亚西海岸一个种群的四个两碱基重复微卫星位点, 得出杂合度在

0.602—0.930 范围的结果, 并分析 mtDNA 控制区和 ATPase 的部分序列, 揭示 mtDNA 序列不能清晰反应地域种群关系, 从而得出澳大利亚的紫红笛鲷存在着一个高水平基因流的结论。Dorenbosch 等^[8]用 AFLP 技术分析了西印度洋空金焰笛鲷间隔种群的遗传结构, 发现种群之间遗传距离非常小, 认为西印度洋的金焰笛鲷生存环境是一个大的开放结构, 支持存在明显的基因流。

根据 H-W 平衡标准对 9 个笛鲷种群进行 χ^2 检验的概率值(P)的分析结果表明, 经过 Bonferroni correction 后, 每个种群都有位点不同程度的偏离 Hardy-Weinberg 平衡。基因连锁不平衡检测表明千年笛鲷有 1 对, 星点笛鲷有 2 对微卫星位点的不平衡达到了显著性差异($P < 0.01$)。这是由于杂合体缺失或纯合体过量、或稀有纯合体和其他杂合体、常见或稀有杂合体、最常见基因纯合体的比例失调所致, 说明可能存在以下一种或多种情况^[24]: (1) 该种群的繁殖方式不完全是随机交配的, (2) 自然选择的作用导致基因频率的变化及基因漂变等, (3) 相邻种群的基因经杂交正在进入所研究的区域, (4) 基因成分发生了变化, 等等。

若杂合体缺乏、纯合体过多, $D < 0$; 杂合体若完全缺失(全部为纯合体)时 $D = \infty$; 反之, $D > 0$; 若 $D = 0$ 说明符合 H-W 平衡, 该种群是随机交配的。作者认为, 根据 H-W 平衡标准进行 χ^2 检验的概率值(P)和 D 值分析, 两者相结合更能客观、全面地反映种群多态位点的遗传平衡状况, 已有学者用 P 值和 D 值结合来评价鲈鱼种群的遗传平衡状况^[25]。

关于杂合体缺失的原因争论很大, 可能与自然选择、种群内交、零等位基因、Wahlund 效应和性连锁座位等原因有关, 但至于与哪种或哪几种更相关, 还有待于进一步研究^[26]。具体到本研究, 作者认为可能的原因有 3 个: (1) 分布在中国的笛鲷属鱼类都是岩礁鱼类, 聚集在某些岩礁区产卵之后, 幼体随着洋流漂浮分散开来, 形成一个群体大环境, 因此笛鲷属鱼类种群内交可能是杂合子缺失的一个方面。(2) 杂合子缺失与目前笛鲷属鱼类开展大规模的人工育苗及养殖可能也有关。应及时采取相应的保护措施, 防止过度的捕捞和盲目人工繁育等使其资源量严重衰减, 以免对种质资源和遗传多样性产生影响。(3) 分析过程中发现有零等位基因。

3.3 笛鲷属鱼类种质资源情况

结合勒氏笛鲷^[11]的平均杂合度, 笛鲷属 10 个物种的平均杂合度进行横向比较: 奥氏笛鲷的期望杂

合度最高(1.000), 金焰笛鲷的最低(0.730)。Dewoody 等^[27]基于 78 种鱼类与非鱼类的微卫星位点比较得出统计数据为: 非鱼类平均杂合度为 0.58, 淡水鱼类为 0.46, 海水鱼类为 0.79, 洄游性鱼类为 0.68。与本文的结果相比较, 金焰笛鲷(0.730)和勒氏笛鲷(0.754)的平均杂合度低于海水鱼类平均值(0.79), 剩余 8 种笛鲷的平均杂合度都高出平均值。10 种笛鲷的平均杂合度为 0.882, 高于海水鱼类的统计数据,

表明目前笛鲷属鱼类的种质资源状况尚好。

从以上结果我们可以得出结论, 笛鲷属的 10 种鱼类虽然具有较高的变异水平, 但存在着普遍的杂合子缺失情况, 缺失的确切原因有待于进一步的研究予以解释。但杂合子在生长、繁殖能力及抗逆性等方面均比纯合子强, 因此如何保护笛鲷属鱼类自然群体的遗传多样性、更好地利用笛鲷资源是目前需要注意的问题。

参考文献

- [1] 张俊彬, 黄良民, 陈真然. AFLP 技术在笛鲷的仔鱼鉴定及其分类学上的研究[J]. 海洋学报, 2005, 27(2): 165-171.
- [2] 朱世华, 杨迎春, 沈锡权, 等. 从细胞色素 b 基因序列探讨笛鲷属的分子系统发生关系[J]. 动物学报, 2006, 52(3): 514-521.
- [3] 肖翔, 刘楚吾. 4 种笛鲷属鱼类 mtDNA 的 RFLP 研究[J]. 热带海洋学报, 2005, 24(6): 22-30.
- [4] 王中铎, 刘楚吾, 郭昱嵩. 5 种笛鲷 mtDNA 及 Cyt b 基因片段的 RFLP 比较[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 327-332.
- [5] 刘丽, 刘楚吾. 5 种笛鲷属鱼类的遗传多样性及分子标记[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(003): 349-355.
- [6] 郭昱嵩, 王中铎, 刘楚吾, 等. 勒氏笛鲷微卫星位点的筛选及特征分析[J]. 遗传, 2007, 29(3): 355-359.
- [7] OVENDEN J R, STREET R. Genetic population structure of mangrove jack, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal) [J]. Marine and Freshwater Research, 2003, 54(2): 127-137.
- [8] DORENBOSCH M, POLLUX B J, PUSTJENS A Z, et al. Population structure of the Dory snapper, *Lutjanus fulviflamma*, in the western Indian Ocean revealed by means of AFLP fingerprinting[J]. Hydrobiologia, 2006, 568(1): 43-53.
- [9] LO L O, ZHU Z E, YUE G E. Multiplex genotyping of novel tetranucleotide microsatellites from a marine foodfish species crimson red snapper (*Lutjanus erythropterus*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(2): 524-526.
- [10] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular Clone: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] GUO YU-SONG, WANG ZHONG-DUO, LIU CHU-WU, et al. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from Russell's snapper (*Lutjanus russellii*)[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7: 1219-1221.
- [12] SANGUINETTI C L, DIAS NETO E S A. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. Biotechniques. 1994, 17: 915-919.
- [13] BONFERRONI CE Il calcolo delle assicurazioni su gruppi diteste[C]//Studi in Onore Del Professore Salvatore Ortu Carboni. Rome, Italy, 1935.
- [14] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [15] GALBUSERA P, VAN D S, MATTHYSEN E. Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds[J]. Conservation Genetics, 2000, 1(2): 163-168.
- [16] LILLANDT B O, BENSCHE S, HANSSON B, et al. Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci in the Siberian jay (*Perisoreus infaustus*) [J]. Hereditas, 2002, 137(2): 157-160.
- [17] STRECKER U. Characterization and cross-species amplification of microsatellite loci in a Cyprinodon species flock [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(3): 843-846.
- [18] CALLEN D F, THOMPSON A D, SHEN Y, et al. Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)_n microsatellite markers[J]. American Journal of Human Genetics, 1993, 52: 922-927.
- [19] PAETKAU D, STROBECK C. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears[J]. Molecular ecology, 1995, 4(4): 519-520.
- [20] PEMBERTON J M, SLATE J, BANCROFT D R, et al. Non-amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and fingerprinting studies [J]. Molecular ecology, 1995, 4(2): 249-252.
- [21] HEDGECOCK D, LI G, HUBERT S, et al. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Journal of Shellfish Research, 2004, 23(2): 379-385.
- [22] LEHMANN T, HAWLEY W A, COLLINS F H. An Evaluation of Evolutionary Constraints on Microsatellite Loci Using Null Alleles[J]. Genetics, 1996, 144(3): 1155-1163.
- [23] TABERLET P, CAMARRA J J, GRIFFIN S, et al. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population[J]. Molecular Ecology, 1997, 6(9): 869-876.
- [24] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [25] 徐成, 王可玲, 张培军. 鲈鱼群体生化遗传学研究 II. 种群生化遗传结构及变异[J]. 海洋与湖沼. 2001, 32(3): 248-254.
- [26] ZOUROS E. On the relation between heterozygosity and heterosis: an evaluation of the evidence from marine mollusks[J]. Isozymes. Current Topics in Biological and Medical Research, 1987, 15(3): 255-270.
- [27] DEWOODY J A, AVISE J C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with

other animals[J]. Journal of Fish Biology, 2000, 56(3): 461-473.