

文章编号:1000-0615(2007)06-0841-07

· 研究简报 ·

青石斑鱼微卫星标记的筛选及群体多态性分析

董秋芬, 刘楚吾, 郭昱嵩, 刘丽, 徐田军

(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

关键词: 青石斑鱼; 基因组文库; PCR法; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号: S 917

文献标识码: A

Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Epinephelus awoara*

DONG Qiu-fen, LIU Chu-wu, GUO Yu-song, LIU Li, XU Tian-jun

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Yellow grouper *Epinephelus awoara* is an economically important marine fish mainly distributed in northwest-Pacific, western central-Pacific and South China Sea, but the number of its population greatly decreased due to overfishing of grouper adults and juveniles, habitat damage and loss from bottom trawling, pollution, high demand for food and so on these years. *E. awoara* was listed in the 2005 IUCN Red List as a specie with DD (data deficient). Since molecular markers are very useful tools to estimate germplasm resources, variety identification, genetic diversity analysis and preparation of genetic linkage map, the microsatellites of *E. awoara* were isolated and thus its microsatellite markers and genetic diversity were analysed. Firstly a library of partial small size fractionated genomic DNA was constructed with the *E. awoara* from South China Sea. 96 microsatellites in 28 recombinant positive clones were obtained through PCR screening the library with M13 universal primers and simple tandem repeats primer (CA)₁₅. Among these microsatellites, there were 39 perfect ones (40.6%), 30 imperfect ones (31.3%), 7 compound perfect ones (7.3%) and 20 compound imperfect ones (20.8%). The results indicated that microsatellite sequences characterized by (CA/GT)_n were abundant in genomic DNA of *E. awoara*. 26 of 28 pairs of primers which were designed to analyze genomic DNA of *E. awoara* according to unique microsatellite flanking sequences with the software Primer 5.0 could be amplified expected bands, of which 13 microsatellite markers were assessed genetic diversity for 19 individuals. As a consequence, the data showed that the average observed heterozygosity (H_o), average expected heterozygosity (H_e), average polymorphism information content (PIC) and average Hardy-Weinberg departure value (D) of *E. awoara* were 0.598 2, 0.508 0, 0.472 2 and 0.150 3 respectively. The findings indicated that although the genetic diversity of *E. awoara* in South China Sea was rich, but it had been influenced by human behaviors to a certain extent.

收稿日期: 2006-10-08

资助项目: 广东省重大科技兴海项目(A200099A01); 湛江市988科技攻关项目(2000-121-17)

作者简介: 董秋芬(1981-), 男, 硕士研究生, 从事水产经济动物繁殖生物学和种质资源研究

通讯作者: 刘楚吾, Tel: 0759-2382044, E-mail: swyjs@gdou.edu.cn

Key words: *Epinephelus awoara*; genomic library; PCR method; microsatellite markers; genetic diversity

微卫星 DNA, 又称短串联重复序列 (STR) 或简单序列重复 (SSR), 是广泛存在于真核生物基因组中的简单重复 DNA 片段, 一般每个重复单位仅 1~6 个碱基, 重复数为 10~20 次, 其中动物体中以双核苷酸 (CA/GT)_n 最为常见^[1]。根据微卫星 DNA 核心序列两端的保守序列设计引物扩增基因组 DNA 便可以找到相应的微卫星标记。微卫星标记已广泛应用于人类和动植物遗传育种、遗传图谱绘制、数量性状位点定位、标记辅助选择、遗传多样性评估等方面的研究^[2]。

青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 属鲈形目鲈总科鲈科石斑鱼属, 主要分布于北太平洋西部、我国南海及东海南部。青石斑鱼营养价值高, 价格昂贵, 市场需求量大, 是重要的经济鱼类, 但目前养殖和常规捕捞量有限。青石斑鱼的栖息分散性、性别比不平衡性、世代间隔性和产卵集会型等特点^[3]使青石斑鱼易受到过度捕捞的威胁。同时海区的污染、生态条件恶化和海水水质的变差, 造成有些地区出现石斑鱼种数量减少的现象。在《2005 年世界自然保护联盟受威胁种群红色目录》中青石斑鱼被列为研究数据缺乏的物种^[4], 如果在对青石斑鱼展开全面的研究与调查后数据仍然不全面, 那么青石斑鱼则要被归类为受到威胁的物种。目前除了养殖技术、病害免疫和繁殖培育等方面外^[5], 对青石斑鱼的分子水平上的研究报道并不多^[6-7]。本研究通过构建青石斑鱼部分基因组 DNA 文库, 筛选青石斑鱼本身的微卫星序列, 为青石斑鱼的遗传多样性分析找到更多的分子标记, 在探讨中国南海海域的青石斑鱼群体遗传背景和现状的同时为青石斑鱼群体遗传结构的分析、遗传资源的保护利用、连锁图谱的构建和分子标记辅助育种等打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

青石斑鱼样品采自中国南海湛江海域, 鉴定^[8]后从尾静脉取血液于 ACD 抗凝剂 (81.7 nmol·L⁻¹ 右旋葡萄糖, 22.8 nmol·L⁻¹ 柠檬酸, 44.9 nmol·L⁻¹ 柠檬酸钠) 中抗凝, -70℃ 保存。实验所用的限制性内切酶 *Dra* I 和 *Hae* III、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、PCR Marker、pBR322/*Msp*

I DNA Markers 购自北京华美生物工程公司。pUCm-T 载体 PCR 产物克隆试剂盒、引物 (CA)₁₅ 重复序列和 M₁₃ 通用引物购自上海生工生物工程技术有限公司。大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存的菌种。实验所用的其他试剂均为分析纯。

1.2 青石斑鱼部分基因组文库的构建

按文献[9]的方法从血液样品中提取基因组 DNA。经限制性内切酶 *Dra* I 和 *Hae* III 双酶切后, 通过 PCR 反应在酶切产物末端加上 A 碱基, 将反应产物抽提纯化后在 16℃ 下与 T-载体连接 4 h, 连接后转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 涂布于已添加 X-gal 的氨苄青霉素 LB 平板上, 37℃ 培养过夜。用无菌的牙签挑取白色单菌落, 接入 1.5 mL 的离心管, 以 220 r·min⁻¹ 37℃ 于恒温振荡器中振荡培养过夜后, -70℃ 超低温保藏备用。

1.3 PCR 法快速筛选含微卫星序列的阳性克隆

以菌液为模板, 用 M₁₃ 通用引物和微卫星核心序列双核苷酸引物 (CA)₁₅ 进行 PCR 扩增, PCR 反应体积为 15 μL, 其中含 10× Buffer 1.5 μL, dNTPs (2 nmol·L⁻¹) 1.5 μL, Mg²⁺ (25 nmol·L⁻¹) 1.2 μL, 30 pmol·L⁻¹ 的 5' 和 3' 端引物各 1.0 μL, *Taq* 酶 0.2 μL, 模板菌液 1.0 μL, 无菌水 7.6 μL。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 3 min 后进入循环体系, 94℃ 变性 42 s, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min^[10]。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 Tanon GIS-2008 型凝胶成像系统拍照, 保存待分析。

1.4 阳性克隆的序列测定及结果分析

挑取 PCR 结果为阳性的克隆菌液委托上海生工生物工程技术有限公司测序, 然后用 SSRHunter 1.3 软件寻找测序结果中所含的微卫星 DNA 核心序列和两端的保守序列, 分析微卫星特征并将微卫星序列提交至 GenBank。

1.5 微卫星引物的设计

根据微卫星序列两端足够长的侧翼序列用 Primer 5.0 软件设计引物, 引物长度为 20 bp 左右, (G+C)% 为 40%~60%, Tm 值为 55~60℃, 产物长度 50~400 bp, 委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.6 微卫星位点的多态性扩增

利用合成的引物对青石斑鱼基因组 DNA 进行 PCR 扩增分析,PCR 反应体积为 15 μL ,其中含 10 \times Buffer 1.5 μL ,dNTPs (2nmol $\cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , Mg^{2+} (25 nmol $\cdot \text{L}^{-1}$) 0.9 μL ,30 pmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的 5'和 3'端引物各 1.5 μL ,*Taq* 酶 0.2 μL ,模板 DNA 0.8 μL , 无菌水 7.6 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后进入循环体系,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 42 s,45 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,硝酸银染色,拍照保存。

1.7 数据统计指标

根据每个个体产生的条带的位置确定基因型,利用 GENPOP Version 3.4 处理数据,计算等位基因数、观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e),并进行多态性信息含量(PIC)、群体平均杂合度(H_p)和 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(D)的计

算^[11-12]。

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

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 \quad D = (H_o - H_e)/H_e$$

P_i 和 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, m 为等位基因数。

2 结果与分析

2.1 PCR 法筛选含微卫星的阳性克隆

本实验共得到了 900 个重组阳性克隆,以 M_{13} 通用引物和微卫星核心序列引物(CA)₁₅ 对其进行 2 次 PCR 扩增,共得到 33 个可能含有微卫星序列的 PCR 阳性克隆。图 1 为第一次 PCR 筛选电泳图。由图可知泳道 B₁、B₂ 和 B₃ 出现了一条小于泳道 A 的条带,说明 1、2 和 3 号克隆可能含有微卫星位点。

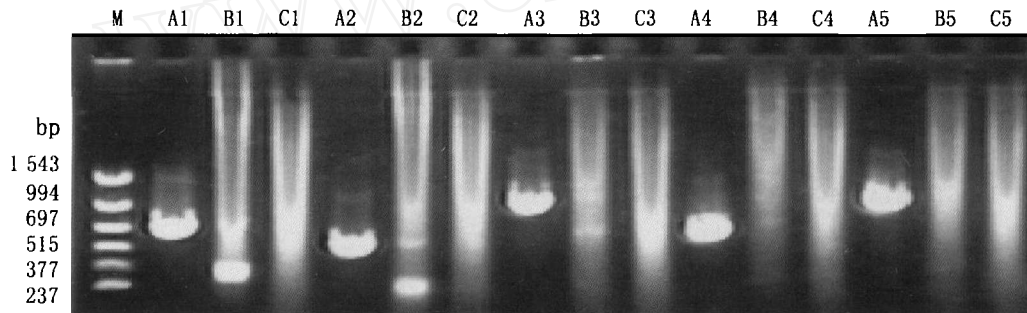


图 1 PCR 法筛选青石斑鱼微卫星序列的电泳图

Fig. 1 Analysis of PCR products for screening clones containing microsatellites in *E. awoara*

M 为 PCR Markers, A 为引物 M_{13}^+ / M_{13}^- 扩增结果, B 为 $M_{13}^+ / (CA)_{15}$ 扩增结果, C 为 $(CA)_{15} / M_{13}^-$ 扩增结果, B₁、B₂ 和 B₃ 说明 1、2 和 3 号克隆可能含有微卫星位点

Lane M: molecular size marker (DL1543); Lane A: The products of clones by M_{13}^+ / M_{13}^- ; Lane B: The products of clones by $M_{13}^+ / (CA)_{15}$; Lane C: The products of clones by $(CA)_{15} / M_{13}^-$; Lane B₁, Lane B₂ and Lane B₃ show the probable microsatellite loci in clones No. 1, 2 and 3

2.2 阳性克隆的序列测定及结果

进行测序的 33 个 PCR 阳性克隆中,除 5 个克隆信号较弱外,剩余的 28 个克隆共含有 96 个微卫星。其中 (CA/GT)_n 55 个,占 57.2%, (AG)_n 12 个,占 12.5%, (AT)_n 8 个,占 8.3%, (CG)_n、(GTC)_n、(GACA)_n、(TTTTTTTA)_n 等其他重复序列各自所占的比例都很小。在这些微卫星核心序列中,重复次数大多集中在 8~25 次,占 60%。而按照 Weber^[13] 提出微卫星的评价标准,本实验获得的青石斑鱼微卫星序列中完美型(perfect) 40 个,占 41.7%;非完美型(imperfect)

29 个,占 30.2%;混合完美型(compound perfect) 7 个,占 7.3%;混合非完美型(compound imperfect) 20 个,占 20.8%。将序列提交至 GenBank,审核后获得本研究中青石斑鱼微卫星序列的登陆号(DQ914892 ~ DQ914916)。篇幅所限,表 1 列举了部分微卫星核心序列、类别和 GenBank 的登陆号。图 2 为青石斑鱼基因组中微卫星的特征序列图。

2.3 微卫星引物的设计

根据微卫星序列的侧翼序列设计了 28 对引物,引物的命名与克隆编号相对应。用于本实验

2.5 微卫星位点的多态性分析

根据引物的扩增结果,选择其中多态性较好的 13 对引物的扩增数据进行观测杂合度(H_o)等的统计分析(表 2)。在 13 个微卫星位点上共获得了 48 个等位基因,大部分为 2~3 个,大小在 65~369 bp 之间,表现出高度多态性。根据基因型计算所得的观测杂合度(H_o)的范围在 0.111 1~1.000 0 之间,在位点 D496 和 D504 中达到了 1。期望杂合度(H_e)的范围较小,从 0.149 1 到 0.891 8,其中位点 D504、D548-1 和 D629 的观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)有较大的差异,但整个群体的平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)(群体平均杂合度)相近,分别为

0.598 2 和 0.507 8。平均多态含量为 0.472 2,其中位点 D469 最低为 0.140 1,位点 D496 最高为 0.864 4。按照 Botstein 等^[14]的分类方法,位点 D161、D463-1、D496、D504、D548-1、D568-2 和 D762 属于高度多态性位点,位点 D255、D260、D545 和 D629 属中度多态性,位点 D316 和 D469 则属低度多态位点。Hardy-Weinberg 平衡指数(D)的变化范围较大,从 -0.6181 到 0.7325,由此平均值变得很小,为 0.1503。位点 D161、D255、D316、D496、D504、D545、D548-1 和 D629 都出现了杂合过剩现象,特别是位点 D504,其 Hardy-Weinberg 平衡指数已达 0.732 5。而位点 D260 和 D762 则出现了缺失,前者缺失较严重。

表 2 青石斑鱼 13 个微卫星座位的等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多态信息含量、Hardy-Weinberg 平衡指数以及群体平均杂合度

Tab. 2 Number of alleles, allele size range, observed heterozygosity(H_o), expected heterozygosity(H_e), polymorphism information content(PIC), Hardy-Weinberg departure value(D) and heterozygosity at the 13 microsatellites loci assessed in *E. awoara*

微卫星标记 microsatellite marker	等位基因数 no. of alleles	等位基因大小(bp) allele size range	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	多态信息含量 (PIC)	平均偏离指数 (D)
D161	3	118~160	0.8947	0.6301	0.5802	0.4199
D255	2	215~230	0.3333	0.2843	0.2585	0.1724
D260	2	212~240	0.1111	0.2909	0.2585	-0.6181
D316	2	215~241	0.2632	0.2339	0.2155	0.1253
D463-1	5	95~124	0.5882	0.5625	0.5319	0.0457
D469	2	200~218	0.1579	0.1491	0.1401	0.0590
D496	11	159~215	1.0000	0.8918	0.8644	0.1213
D504	3	237~283	1.0000	0.5772	0.5270	0.7325
D545	2	338~369	0.4211	0.3392	0.3048	0.2415
D548-1	7	65~86	0.9444	0.7990	0.7657	0.1820
D568-2	4	249~271	0.7647	0.7206	0.6767	0.0612
D629	2	207~229	0.6316	0.4386	0.3854	0.4400
D762	3	119~139	0.6667	0.6863	0.6296	-0.0286
平均值 mean	3.69		0.5982	0.5078	0.4722	0.1503

3 讨论

PCR 法筛选微卫星序列操作简便快捷,可直接用菌液为模板而省去了提取质粒的操作,同时避免了同位素污染环境、危害人体等缺点^[10],已被广泛用于各物种的微卫星筛选,如大黄鱼、中国对虾、剑尾鱼^[15]等。但 PCR 法过于灵敏,经常会出现非特异性条带,要减少非特异带的产生可通过改善 PCR 条件或通过设立阴性克隆的对照来筛选,本实验还利用 2 次 PCR 法进行筛选从而提高了筛选精确度。许多学者的研究表明鱼类微卫星中以(CA/GT)_n的数量居多^[1,16],因此本研究

首先利用(CA)₁₅引物通过 PCR 法从 900 个克隆筛选出了含有(CA/GT)_n和其他类型的重复序列的 28 个阳性克隆,即每检测大约 30 个克隆就有 1 个阳性克隆。由于每个克隆中插入片的平均大小为 800 bp,由此可计算出在基因组中大概每 2.5 kb 就有 1 个微卫星。在所得的 96 个微卫星序列中,(CA/GT)_n共有 55 个,占 57.2%,这表明了(CA/GT)_n在青石斑鱼基因组中含量丰富且分布广泛。本研究所得完美型的微卫星占 41.7%,与剑尾鱼、鲤^[16]等鱼类的微卫星情况大体相符。本研究还表明,在青石斑鱼中除了大量的双碱基重复序列外,还有其他三碱基、四碱基

和四碱基以上的微卫星序列。序列重复次数有60%在8~25次之间,这点与Ellegren^[17]分析微卫星的结论相似,他认为真核生物中长度大多在30次重复以下。

世界各地学者^[18-23]通过筛选微卫星或引用已有的石斑鱼及石斑鱼近缘属的微卫星引物对蜂巢石斑鱼(*E. merra*)、夏威夷石斑鱼(*E. quernus*)等石斑鱼进行了微卫星的研究和报道,但除了Satyendra等^[31]引用近缘物种微卫星引物筛选出青石斑鱼的8个微卫星标记外,还未见有关分离青石斑鱼微卫星的报道。本实验获得了青石斑鱼96个微卫星序列和13个具有多态性的微卫星标记,比已报道的其他石斑鱼的微卫星序列数量和微卫星标记数量都要多。根据对所得数据的分析,本研究的13个微卫星标记的等位基因数、观测杂合度、期望杂合度的范围比Satyendra等^[31]所得的范围(分别是3~6、0.291~0.958和0.348~0.716)广,这与微卫星标记的数目有直接的关系。

群体杂合度的高低反映了群体在多个基因上的遗传变异及群体遗传多样性丰富度。本研究中青石斑鱼群体平均杂合度即平均期望杂合度(H_e)为0.5080,平均观测杂合度(H_o)为0.5982,说明青石斑鱼遗传多样性较高。位点D504、D548-1和D629的 H_o 和 H_e 存在较大的差异,这可能是由这3个位点上的无效基因所引起的,在PCR扩增过程中,当无效等位基因不被识别出来的时候就会导致群体中纯合子过剩或杂合子缺失,从而导致 H_o 和 H_e 出现偏离。多态信息含量(PIC)是一个评价基因座位在群体中的多样性程度的标准。本实验中所用的26个微卫星位点中有13个具有多态性,多态信息含量在0.1401~0.8442之间,多态性位点占总位点数的50%,其中高度多态位点有7个(D161、D463-1、D496、D504、D548-1、D568-2、D762),中度多态位点有4个(D255、D260、D545、D629),剩余2个位点(D316、D469)则属低度多态位点。Hardy-Weinberg遗传偏离指数(D)反映了 H_o 和 H_e 两者之间的平衡关系, D 值越接近0,基因型的分布越接近于平衡状态, D 值为正时反映杂合子过剩, D 值为负时则处于杂合子缺失状态。杂合子过剩现象一般出现在研究对象为相对小的群体或者封闭群体,如一个养殖群体里面的子代群体是由有

限的亲本所产生,创造者效应(founder effect)和瓶颈效应(bottleneck effect)会导致连锁不平衡现象^[11]。而杂合子缺失除了与无效基因和研究样本范围大小有关外,还可能由种群退化、性别比例不均衡、亲缘近交和人为干扰程度大等导致稀有碱基的丢失所致^[22]。本研究中的D变化范围较大,从-0.6181到0.7325,同时出现了杂合子过剩(8个位点)与缺失(2个位点)现象。本研究所用的青石斑鱼样品采自湛江海域的3个不同地点,且实验样本数达到了19尾,只有在利用引物D255、D260、D545和D629进行PCR多态性扩增时少数几个个体没有扩增产物外,其他9对引物的扩增产物都较清晰稳定。由此本实验的杂合子过剩和缺失与种群本身的结构有密切的关系,可能是由于过度捕捞等人为干扰使其种群结构和性别比例受到影响。因此,从本研究可以看出中国南海海域的青石斑鱼群体多态性水平较高,遗传多样性丰富,但是种群结构和种质资源受到了人类活动的一定影响。务必要加强对青石斑鱼遗传多样性的保护,并保护海洋生态环境和控制捕捞量,使青石斑的遗传多样性处于一个相对稳定的丰富程度。还要加紧对青石斑鱼遗传育种、分子标记辅助育种等方面的研究,提高青石斑养殖产量以满足市场需求,从而减少对青石斑自然种群的压力的压力。

微卫星的一个潜在价值是一个物种所产生的微卫星引物能应用于相关的物种,学者们对石斑鱼微卫星的研究也表明一种石斑鱼的微卫星引物对其他石斑鱼有一定的适用性,因此本研究所得的26个微卫星引物(相关信息可在GenBank搜索到)都可尝试性地被用于其他石斑鱼微卫星多态性、遗传多样性和种群进化等研究,为种质资源保护提供理论依据,从而为石斑鱼属鱼类的可持续发展利用提供科学指导。

参考文献:

- [1] Maguire T L, Edwards K J, Saenger P, et al. Characterization and analysis of microsatellite loci in mangrove species, *Avicennia marina* (Fork) Vierh. (Avicenniaceae) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101: 279-285.
- [2] 宋国华, 刘田福. 微卫星标记及其在实验动物中的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2005, 15(4): 244-248.

- [3] Satyendra K U, Su Y Q, Wang J, *et al.* Identification and characterization of microsatellite markers for yellow grouper *Epinephelus awoara* and bluelines hind *Cephalopholis formosa* [J]. *High Technology Letters*, 2005, 11(3): 329-322.
- [4] Shuk M C, Ng W C. *Epinephelus awoara* [Z]. IUCN Red List of Threatened Species, 2005 [2006-09-10]. <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/61336/all>.
- [5] 尹绍武, 黄海, 张本, 等. 石斑鱼遗传多样性的研究进展 [J]. *水产科学*, 2005, 24(8): 46-49.
- [6] 项方, 邹记兴, 邓凤娇, 等. 用细胞色素 b 部分序列研究斑马鱼的分子分类与系统发育 [J]. *动物学杂志*, 2004, 39(51): 13-18.
- [7] 庄轩, 丁少雄, 郭丰, 等. 基于细胞色素 b 基因片段序列研究中国近海石斑鱼鱼类系统进化关系 [J]. *中国科学 C 辑(生命科学)*, 2006, 36(1): 27-34.
- [8] 成庆泰, 郑葆珊. *中国鱼类系统检索* [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 287-291.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. *分子克隆试验指南(第 3 版)* [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 30-35.
- [10] 徐鹏, 周岭华, 相建海. 用 PCR 法快速筛选中国对虾含微卫星的重组阳性克隆 [J]. *水产学报*, 2001, 25(2): 127-130.
- [11] 刘云国, 陈松林, 李八方. 牙鲆养殖群体遗传变异的微卫星标记研究 [J]. *海洋水产研究*, 2005, 26(5): 28-32.
- [12] 耿波, 孙效文, 梁利群. 利用 17 个微卫星标记分析鳙鱼的遗传多样性 [J]. *遗传*, 2006, 28(6): 683-688.
- [13] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n、(dG-dT)_n polymorphisms [J]. *Genomics*, 1990, 7: 524-530.
- [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: 314-331.
- [15] 李霞, 白俊杰, 吴淑勤, 等. 剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11(3): 197-201.
- [16] 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选 [J]. *动物学研究*, 2001, 22(3): 238-241.
- [17] Ellegren H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation [J]. *Trends in Genetics*, 2002, 18: 70.
- [18] Nugroho E, Takagi M, Sugama K, *et al.* Detection of GT microsatellite loci and their polymorphism for grouper of the genus *Epinephelus* [J]. *Fisheries Science*, 1998, 64: 836-837.
- [19] Malia A J R, Glenn C G, George K R. Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the Hawaiian grouper *Epinephelus quernus* (Serranidae) for population genetic analyses [J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5: 126-129.
- [20] Rhoes K L, Lewis R L, Chapman R W, *et al.* Genetic structure camouflage grouper, *Epinephelus ployphkadion* (Pisces: Serranidae), in the western central Pacific [J]. *Marine Biology*, 2003, 142: 771-776.
- [21] Innocentiis S De, Sola L, Cataudella S, *et al.* Allozyme and microsatellite loci provide discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the Mediterranean Sea [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10: 2163-2175.
- [22] Suci A, Uthairat N N, Worawut K. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. *Marine Biotechnology*, 2005: 1-10.
- [23] Zatzoff M S, Ball A O, Chapman R W. Characterization of polymorphic microsatellite loci from black grouper, *Mycteroperca bonaci* (Teleostei: Serranidae) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2: 217-219.