

基于锚定 PCR 技术对 10 种重要农业害虫 微卫星 DNA 位点的筛选及其特征分析

李 慧, 郎坤玲, 沈长朋, 李 洁, 陶云荔, 褚 栋*

青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东 青岛 266109

摘要:【背景】微卫星 DNA 广泛存在于真核和原核生物的基因组中, 具有多态性丰富、易于检测等特点, 在遗传图谱的构建、动植物遗传育种等方面被广泛应用。【方法】利用 5' 锚定 PCR 技术对桃小食心虫、桃蛀螟、玉米螟、二点委夜蛾、花蓟马、黄胸蓟马、棕榈蓟马、斑翅果蝇、稻水象甲、扶桑绵粉蚧 10 种重要农业害虫进行微卫星 DNA 筛选, 并分析各个物种的微卫星 DNA 的特点。【结果】不同物种的阳性克隆率、微卫星比率、克隆效率和冗余率存在不同程度的差异; 在核苷酸碱基数目上, 主要为二核苷酸重复序列, 占重复位点总数的 93.2% ~ 100%, 三、四核苷酸重复位点较少。在二核苷酸重复位点中, CA/TG 重复位点最为丰富, 占重复位点总数的 89.2% ~ 100%。这与使用的锚定引物密切相关; 10 种害虫的微卫星 DNA 平均重复次数为 6.7 ~ 8.9 次, 其中玉米螟具有最高的微卫星 DNA 重复次数 (34 次); 在序列类型上, 完全型序列占上述害虫序列总数的 91.0% ~ 100%。【结论与意义】5' 锚定 PCR 技术能够快速挖掘害虫的微卫星 DNA 位点, 本研究结果为这些害虫微卫星位点的进一步利用奠定了基础。

关键词: 农业害虫; 微卫星; 5' 锚定 PCR 技术; 克隆; 特征分析

Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from ten important agricultural pest insects using anchored PCR method

Hui LI, Kun-ling LANG, Chang-peng SHEN, Jie LI, Yun-li TAO, Dong CHU*

Key Laboratory of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: 【Background】Microsatellite DNA consists of both prokaryotic and eukaryotic genomes. The characteristics include rich polymorphism and easy detection. The technique has been applied in animal and plant genetics and breeding, for the construction for genetic maps. 【Method】Using the 5' anchored PCR method, microsatellite DNA from 10 important agricultural pests were isolated and analyzed, including *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae), *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Pyralidae), *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), *Proxenus lepigone* (Lepidoptera: Noctuidae), *Frankliniella intonsa* (Thysanoptera: Thripidae), *Thrips hamaiensis* (Thysanoptera: Thripidae), *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae), *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), *Lissorhoptrus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae) and *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). The characteristics of microsatellite DNA in these insects were analyzed. 【Result】The positive clone rates, microsatellite rates, cloning efficiency and redundancy rates of microsatellite DNA among the species were variable. Dinucleotide repeats were the most abundant repeat types (93.2% ~ 100%), while trinucleotide and tetranucleotide were rare. Among the dinucleotide repeats, AC/GT is the most abundant type (89.2% ~ 100%). This is closely related to the anchor primer; The average repeat number within these species was 6.7 ~ 8.9 and the highest repeat number (34) was detected in *O. nubilalis*; The types of microsatellite mainly consist of the perfect type (91.0% ~ 100%). 【Conclusion and significance】The anchored method can be used to reveal the microsatellite DNA in the agricultural pests, and can be used in monitoring and detection.

Key words: agricultural pest; microsatellite; 5' anchored PCR method; clone; characterization

微卫星 DNA (microsatellite DNA) 一般指基因组中由短的重复单元 (一般为 1 ~ 6 个碱基) 组成的 DNA 串联重复序列, 被称为短串联重复序列 (short tandem repeats, STRs) 或简单重复序列 (simple se-

收稿日期 (Received): 2014-01-15 接受日期 (Accepted): 2014-02-10

基金项目: 国家科技支撑计划课题 (12BAD19B06); 青岛市科技发展计划项目 (13-1-3-108-nsh); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-NF-02); 泰山学者建设工程专项经费

作者简介: 李慧, 女, 硕士研究生。研究方向: 有害生物检疫与生物入侵。E-mail: lihuiqau@163.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: chinachudong@sina.com

quence repeats, SSRs)。微卫星 DNA 广泛分布于真核生物的基因组中,在原核生物的基因组中也有少量分布(罗文永等,2003)。微卫星 DNA 符合孟德尔遗传模式,共显性遗传,通常具有丰富的多态性,易于检测,是一类很好的分子标记(代金霞,2005;何平,1998;刘佳妮等,2008)。微卫星 DNA 分子标记有广泛的应用价值,现已被应用于入侵害虫的起源、入侵途径及模式和种群扩散等研究中(褚栋等,2007、2012;高长生等,2011;Chu *et al.*, 2011)。

微卫星 DNA 的获得方式主要有几种途径:(1)筛选基因文库法,用含有微卫星的探针在基因文库中筛选含有微卫星序列的阳性克隆并测序,再根据微卫星 DNA 两端的侧翼序列设计引物,最后用该引物对应的微卫星 DNA 位点做定性分析(Rassmann *et al.*, 1991)。此方法工作量大,效率低。(2)微卫星富集法,用含微卫星序列的探针进行杂交富集,构建其富集文库(Kandpal *et al.*, 1994; Karagyozev *et al.*, 1993)。这种方法操作较复杂,大量扩增目的片段的同时,产生了大量的冗余序列(张增翠和侯喜林,2004)。(3)搜索 GenBank、EMBL 和 DDBJ 等公共数据库以获得含 SSR 序列的方法,开发的微卫星位点的多态性一般不是很高(段惠生等,2012)。近年来,由于锚定 PCR 技术简便、高效、多态性好,在微卫星筛选中得到了广泛应用(盛良明等,2007;张俊鹏等,2012)。该方法是由 Fisher *et al.* (1996)提出,用锚定简并微卫星引物对基因组 DNA 进行扩增。此方法是一种分离微卫星的简单、快捷的方法,避免了 SSR 富集的随机性,具有明确的目的性和较强的富集能力,提高了微卫星的分离效率,且通常每个序列都含有 2 个完整的微卫星位点,开发效率极高(张增翠和侯喜林,2004)。

目前,桃小食心虫 *Carposina sasakii* Matsumura、桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* (Guenée)、玉米螟 *Ostrinia nubilalis* (Hübner)、二点委夜蛾 *Proxenus lepigone* (Moschler)、花蓟马 *Frankliniella intonsa* (Trybom)、黄胸蓟马 *Thrips hamaiensis* (Morgan)、棕榈蓟马 *Thrips palmi* Karny、斑翅果蝇 *Drosophila suzukii* (Matsumura)、稻水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel、扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 等这些重要农业害虫的微卫星位点尚未见报道。本试验用锚定 PCR 技术对上述 10 种重要农业害虫进行微卫星 DNA 位点筛选,并对微卫星

DNA 序列进行分析比较,旨在探索该方法在农业害虫微卫星 DNA 筛选中的有效性,为进一步挖掘农业害虫的微卫星位点及研究其种群迁移扩散等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及 DNA 提取

本研究中所用的物种均放于 95% 乙醇中, -20 ℃ 下保存。基因组 DNA 的提取方法参照 Chu *et al.* (2005),供试虫体样本数量均为 1 头,提取的 DNA 放于 -20 ℃ 下保存。

1.2 锚定 PCR 扩增

以提取的基因组 DNA 为 PCR 反应的模板,使用根据需要设计的 5' 锚定简并引物 NNNNNNNN-KKVRVRV(CA)₆ 进行扩增。建立 50 μL 反应体系,体系中含有 DNA 模板 3 μL、buffer 5 μL、dNTPs 1 μL、简并引物 1 μL (10 μmol · L⁻¹)、ddH₂O 39.5 μL、Taq 酶 0.5 μL。PCR 反应程序:94 ℃ 预变性 4 min, 35 个循环(94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 复性 45 s, 72 ℃ 延伸 2 min), 72 ℃ 再延伸 7 min。

1.3 克隆与测序

将扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)切胶回收长度 500 ~ 750 bp 的 DNA,与 PMD18-T 连接并转入大肠杆菌 Trans1-T₁ 感受态细胞,涂抹于含有氨苄西林(0.1 mg · mL⁻¹)的 LB 琼脂平板上。挑取单菌落,放于含有氨苄西林(0.1 mg · mL⁻¹)的 LB 液体培养基中振荡培养。取 2 μL 菌液,用通用引物 M13 对插入片段进行 PCR 扩增。13 μL 反应体系中含有菌液 2 μL、buffer 1.3 μL、dNTPs 0.26 μL、M13 通用引物 0.26 μL (10 μmol · L⁻¹)、ddH₂O 9.3 μL、Taq 酶 0.13 μL。PCR 程序:94 ℃ 预变性 4 min, 35 个循环(94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 复性 45 s, 72 ℃ 延伸 2 min), 72 ℃ 再延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,挑选阳性克隆。

1.4 序列测定与分析

随机选取片段大小为 500 ~ 750 bp 的 50 个阳性克隆进行测序。利用 Sequencher 5.0 Demo 软件(<http://www.genecodes.com/>)去除冗余序列,再用 SSR Hunter 1.3 软件对 DNA 序列进行 SSR 位点的搜索,设置重复数至少为 5,构成重复元件的核苷酸数最多为 6 个。

2 结果与分析

2.1 简并引物的扩增及 PCR 产物的克隆与测序

用含有 CA 重复单元的 5' 锚定简并引物扩增 10 个物种的 DNA, 扩增片段较弥散, 多集中于 200 ~ 2000 bp。经 PCR 筛选, 各个物种的克隆片段在 500 ~ 750 bp 之间。阳性克隆率在 10 个物种中有较大的差异, 最高为棕榈蓟马 (95.8%), 最低为黄

胸蓟马 (20.9%), 平均阳性克隆率为 57.8%。10 个物种的微卫星比率在 70.8% ~ 100% 之间, 最高为扶桑绵粉蚧 (100%), 最低的是二点委夜蛾 (70.8%), 微卫星平均比率为 91.3%。克隆效率差异较大, 最高为稻水象甲 (88.2%), 最低为黄胸蓟马 (19.9%), 克隆平均效率为 52.8% (表 1)。

表 1 微卫星文库的筛选结果
Table 1 The screening result of microsatellite library

物种 Species	编码 Code	挑取克隆数 (个) Number of selective clones	阳性克隆数 (个) Number of positive clones	阳性克隆率* Positive clone rate (%)	测序成功数 (个) Number of clones sequenced	含微卫星 克隆数(个) Number of microsatellites identified	微卫星比率** Microsatellite rate (%)	克隆效率*** Cloning efficiency (%)
桃小食心虫 <i>Carposina nipponensis</i>	CN	89	65	73.0	41	39	95.1	69.5
桃蛀螟 <i>Conogethes punctiferalis</i>	CP	65	56	86.2	44	43	97.7	84.2
玉米螟 <i>Ostrinia nubilalis</i>	ON	72	50	69.4	38	38	100.0	69.4
二点委夜蛾 <i>Proxenus lepigone</i>	PL	120	84	70.0	48	34	70.8	49.6
花蓟马 <i>Frankliniella intonsa</i>	FI	136	65	47.8	43	36	83.7	40.4
黄胸蓟马 <i>Thrips hawaiiensis</i>	TH	211	44	20.9	44	42	95.6	19.9
棕榈蓟马 <i>Thrips palmi</i>	TP	72	69	95.8	42	38	90.5	86.7
斑翅果蝇 <i>Drosophila suzukii</i>	DS	69	45	65.2	46	39	84.8	55.3
稻水象甲 <i>Lissorhoptrus oryzophilus</i>	LO	72	65	90.3	44	43	97.7	88.2
扶桑绵粉蚧 <i>Phenacoccus solenopsis</i>	PS	104	51	49.0	45	45	100.0	49.0

* 阳性克隆率指阳性克隆占有所有克隆的百分比; ** 微卫星比率指含有微卫星的克隆占有所有阳性克隆的百分比; *** 克隆效率指含有微卫星的克隆占有所有克隆的百分比。

* Positive clone rate refers to the percentage of positive clones in all clones; ** Microsatellite rate refers to the percentage of microsatellites identified in all positive clones; *** Cloning efficiency refers to the percentage of microsatellites identified in all clones.

2.2 微卫星类型

去除重复序列后进行微卫星搜索和分类统计, 结果表明, 冗余率 (重复序列的数量/总序列的数量) 在不同物种间差异较大, 最低为棕榈蓟马 (2.3%), 最高为扶桑绵粉蚧 (71.7%) (图 1)。各个物种平均每条序列含微卫星位点数为 1.9 ~ 2.4, 桃小食心虫、扶桑绵粉蚧和稻水象甲的平均位点数小于 2, 其他物种均大于 2。

从微卫星位点 (核苷酸碱基组成) 分布类型的角度分析, 除简并引物中所含有的 CA/TG 重复序列外,

还发现其他类型的重复序列, 如: 二核苷酸 AT、GC、CT/AG 等 3 种重复单元; 三核苷酸 AAC、GGT、GCA、GCC、TCC 等 10 种重复单元; 四核苷酸 TCGC、GACA、GTGC、ATCT、TGTC 等 5 种重复单元。不同物种以二核苷酸 CA/TG 重复序列数目最多, 在 89.2% ~ 100% 之间, 二核苷酸 (CT/AG、AT、GC)、三核苷酸和四核苷酸所占比例较低。其中, 花蓟马、扶桑绵粉蚧和稻水象甲二核苷酸的比例为 100%, 扶桑绵粉蚧的 CA/TG 重复为 100% (表 2)。从微卫星位点 (重复次数) 分布类型的角度分析, 10

个物种中,具有最高重复次数的是玉米螟,达 39 次,其最低重复次数为 5 (SSR hunter 的最低重复次数设置为 5 次)。大部分物种的 SSR 序列较短,如桃小食心虫的 SSR 片段长度为 10 ~ 36 bp,玉米螟的 SSR 片段长度为 10 ~ 78 bp。各个物种的平均重复次数为 6.7 ~ 8.9 次(图 2)。

根据 Weber(1990)的微卫星分类标准,本研究中涉及的 10 个物种的微卫星类型 90% 以上都是完全型,不完全型和复合型的 SSR 所占比例较少。不完全型的微卫星比率最高的物种为玉米螟(5.7%),复合型的微卫星比率最高的物种为桃小食心虫(5.0%)。其中,扶桑绵粉蚧和桃蛀螟的微卫星类型均为完全型(图 3)。

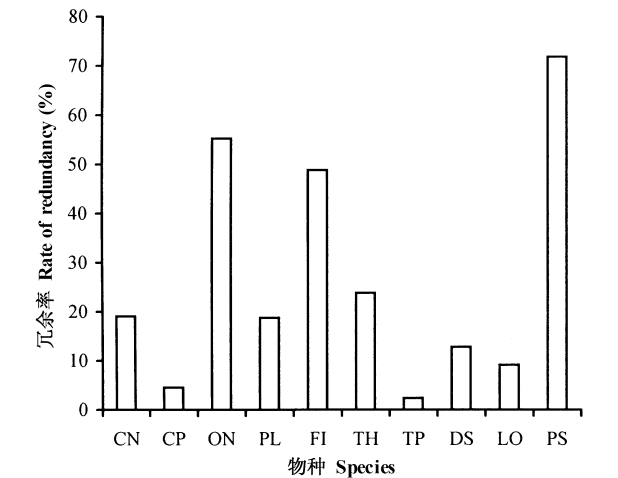


图 1 序列冗余率分布

Fig. 1 Distribution of redundancy rates of the analysed sequences
CN = *Carposina nipponensis*, CP = *Conogethes punctiferalis*, ON = *Ostrinia nubilalis*, PL = *Proxenus lepigone*, FI = *Frankliniella intonsa*, TH = *Thrips hawaiiensis*, TP = *Thrips palmi*, DS = *Drosophila suzukii*, LO = *Lissorhoptrus oryzophilus*, PS = *Phenacoccus solenopsis*.

表 2 微卫星位点类型分布(基于核苷酸碱基数目)
Table 2 Distribution of microsatellite types (based on nucleotide numbers)

物种 Species	二核苷酸 Dinucleotide share (%)					三核苷酸* Trinucleotide (%)	四核苷酸** Tetranucleotide (%)
	CA/TG	CT/AG	AT	GC	合计 Total		
桃小食心虫 <i>Carposina nipponensis</i>	92.3	1.5	1.5	3.1	98.5	—	1.5
桃蛀螟 <i>Conogethes punctiferalis</i>	89.8	2.3	—1.1	93.2	3.4	3.4	—
玉米螟 <i>Ostrinia nubilalis</i>	89.2	2.7	—	5.4	97.3	2.7	—
二点委夜蛾 <i>Proxenus lepigone</i>	92.2	2.0	2.0	2.0	98.0	—	2.0
花蓟马 <i>Frankliniella intonsa</i>	92.9	2.4	—	4.8	100.0	—	—
黄胸蓟马 <i>Thrips hawaiiensis</i>	89.7	—	—	4.4	94.1	5.9	—
棕榈蓟马 <i>Thrips palmi</i>	93.5	1.3	—	1.3	96.1	3.9	—
斑翅果蝇 <i>Drosophila suzukii</i>	90.1	4.9	—	—	95.1	4.9	—
稻水象甲 <i>Lissorhoptrus oryzophilus</i>	97.3	1.4	—	1.4	100.0	—	—
扶桑绵粉蚧 <i>Phenacoccus solenopsis</i>	100.0	—	—	—	100.0	—	—

* 包括重复单位 CTG、GCA、GCC、TCC、GAA、AGA、TTA、TCC、AAC、CCA; ** 包括重复单位 TGTC、GTGC、ATCT、TCTG、GACA。
* including the repeat unit as follows: CTG, GCA, GCC, TCC, GAA, AGA, TTA, TCC, AAC, CCA; ** including the repeat unit as follows: TGTC, GTGC, ATCT, TCTG, GACA.

3 讨论

本研究表明,10 个物种中阳性克隆率最高为 95.8%,平均阳性克隆率为 57.8%,高于通过探针杂交法获得的阳性克隆率(安建东等,2011;郝卓然等,2012;吉亚杰和张德兴,2004)。本研究中,微卫

星比率最高为 100%,微卫星平均比率为 91.3%,高于通过探针杂交法获得的微卫星比率(程月琴等,2013;张国彦和翟保平,2008)。盛良明等(2007)利用锚定 PCR 技术测定结果表明,阳性克隆率和微卫星比率均达到了 100%;张俊鹏等(2012)也证明利

用该技术筛选的微卫星比率极高,达 97.7%。徐波等(2012)对使用磁珠富集法与锚定 PCR 法开发背瘤丽蚌 *Lamprotula leai* (Gray) 微卫星标记进行比较,发现锚定 PCR 技术获得的阳性克隆比率高。此外,本试验也发现 10 个物种的冗余率(2.3% ~ 71.7%)、假阳性率(0 ~ 29.2%)之间差异较大。

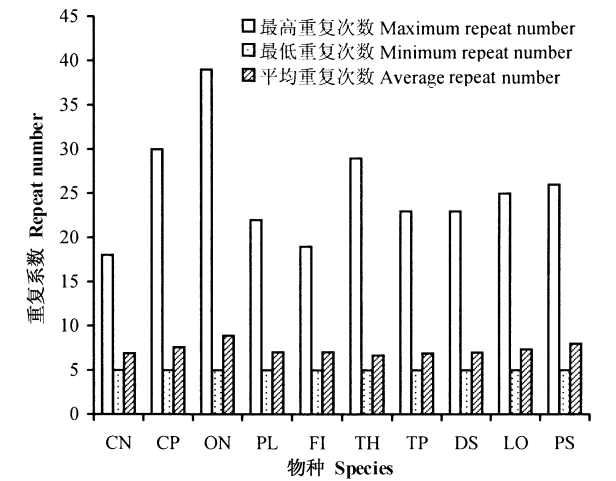


图 2 微卫星重复次数分布图

Fig. 2 Distribution of repeat number of microsatellite in the species analysed
CN = *Carposina nipponensis*, CP = *Conogethes punctiferalis*, ON = *Ostrinia nubilalis*, PL = *Proxenus lepigone*, FI = *Frankliniella intonsa*, TH = *Thrips hawaiiensis*, TP = *Thrips palmi*, DS = *Drosophila suzukii*, LO = *Lissorhoptrus oryzophilus*, PS = *Phenacoccus solenopsis*.

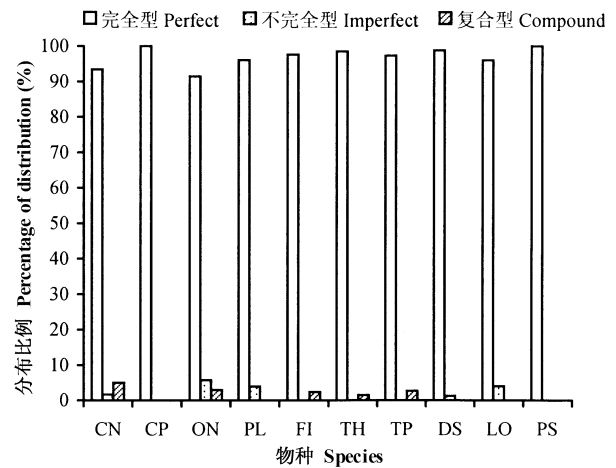


图 3 微卫星类型分布[基于 Weber(1990)标准]

Fig. 3 Distribution of microsatellite types [based on Weber (1990)]
CN = *Carposina nipponensis*, CP = *Conogethes punctiferalis*, ON = *Ostrinia nubilalis*, PL = *Proxenus lepigone*, FI = *Frankliniella intonsa*, TH = *Thrips hawaiiensis*, TP = *Thrips palmi*, DS = *Drosophila suzukii*, LO = *Lissorhoptrus oryzophilus*, PS = *Phenacoccus solenopsis*.

在所有动物基因组中,(CA)_n 微卫星的含量最为丰富 (Brenner *et al.*, 1993)。因此,本研究使用 (CA)_n 简并引物来研究 10 个物种,以获得更多的

微卫星位点。本试验中,二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸重复单元在鳞翅目、缨翅目、双翅目、同翅目和鞘翅目中差异不明显,二核苷酸在不同目间的比例为 95.1% ~ 100%,三核苷酸的比例为 0 ~ 4.9%,四核苷酸为 0 ~ 1.73%,较高的二核苷酸比例可能与锚定引物筛选方法有关。

本试验所设计的锚定简并引物中含有 6 个微卫星重复,测序结果表明,获得的克隆两端大部分至少含有 6 个二核苷酸重复,并且每条序列大部分都含有 2 个以上的微卫星位点,说明锚定简并引物扩增可以有效获得微卫星 DNA 位点。本试验中分离的微卫星的平均重复数为 6.35 ~ 7.50 次,最高重复次数为 34 次。马丽华(2008)通过该方法获得的微卫星的平均重复数为 7.19 次。而通过磁珠富集法获得的微卫星的重复次数大部分都在 10 次以上 (安建东等,2011;连灏等,2012)。这些结果表明,锚定 PCR 技术获得的微卫星重复数低于磁珠富集法 (马丽华,2008;徐波等,2012)。

Weber (1990) 按照微卫星核心序列的不同将微卫星分为 3 种类型:完全型 (perfect)、不完全型 (imperfect) 和复合型 (compound)。本试验中,10 个物种的微卫星类型 90% 以上都是完全型,不完全型和复合型的微卫星 DNA 所占比例较小。完全型微卫星 DNA 是动物基因组中比例最大的结构类型,而不完全型和复合型微卫星比例的高低在不同物种中存在差异 (连灏等,2012;马雅军等,2008;王蕾等,2009;张丽等,2009)。

分子遗传标记是近来现代遗传标记学发展较快的领域之一,微卫星则被认为是各类分子遗传标记中最有价值的一种。随着生物统计学研究的不断深入,微卫星在度量品种遗传多样性、估测品种间遗传距离及构建系统发生树等研究中显示出巨大优势,其应用前景非常广阔 (徐兴莉和杨虎,2011)。本研究采用 5'锚定 PCR 技术大大降低了研究成本,提高了筛选效率,是从物种基因组中分离微卫星位点的一个较好策略。

参考文献

安建东, 黄家兴, 董捷, 周冰峰. 2011. 火红熊蜂微卫星标记的筛选及种特异性分析. 昆虫学报, 54(12): 1423 - 1432.
程月琴, 焦振彬, 张佩, 叶永忠, 王红卫. 2013. 地黄微卫星富集文库构建及特性分析. 种子, 32(5): 12 - 16.

- 褚栋, 李显春, 张友军. 2012. 基于微卫星标记对中国 Q 型烟粉虱早期入侵种群与 B 型烟粉虱种群的遗传结构分析. 昆虫学报, 55(12): 1376–1385.
- 褚栋, 张友军, 万方浩. 2007. 分子标记技术在入侵生态学中的应用. 应用生态学报, 18(6): 1383–1387.
- 代金霞. 2005. 微卫星 DNA 标记技术及其应用. 农业科学研究, 26(1): 67–70, 79.
- 段惠生, 张安盛, 赵传志, 于毅, 褚栋. 2012. 西花蓟马 EST-SSR 信息分析标记筛选及其与 Genomic-SSR 的多态性比较. 昆虫学报, 55(6): 634–640.
- 高长生, 国栋, 刘国霞, 陶云荔, 张友军, 褚栋. 2011. Q 型烟粉虱东地中海种群遗传多样性的 mtCOI 与 SSR 分析. 昆虫学报, 54(12): 1416–1422.
- 郝卓然, 梁利群, 常玉梅, 任波. 2012. 扁吻鱼微卫星分子标记的筛选及特征分析. 华北农学报, 27(增刊): 40–45.
- 何平. 1998. 真核生物中的微卫星及其应用遗传. 遗传, 20(4): 42–47.
- 吉亚杰, 张德兴. 2004. 鳞翅目昆虫基因组中微卫星 DNA 的特征以及对其分离的影响. 动物学报, 50(4): 608–614.
- 连灏, 石米娟, 杜富宽, 江遥, 黄容, 廖兰杰, 汪亚平, 朱作言. 2012. 草鱼(AG)微卫星标记克隆及特征分析. 水生生物学, 36(1): 29–34.
- 刘佳妮, 桂富荣, 李正跃. 2008. SSR 分子标记技术在入侵昆虫学研究中的运用. 植物保护, 34(3): 7–11.
- 罗文永, 胡骏, 李晓方. 2003. 微卫星序列及其应用. 遗传, 25(5): 615–619.
- 马丽华. 2008. 应用 5' 锚定 PCR 开发谷子微卫星标记. 石家庄: 河北师范大学.
- 马雅军, 樊勇, 吴静. 2008. 雷氏按蚊多态微卫星 DNA 位点的筛选和特征. 寄生虫与医学昆虫学报, 15(3): 150–153.
- 盛良明, 薛华柏, 王化坤, 徐春明, 王三红, 章镇. 2007. 利用 5' 锚定 PCR 技术分离枇杷微卫星标记. 江苏农业学报, 23(1): 50–53.
- 王蕾, 刘继红, 张立冬, 孙效文. 2009. 牙鲆基因组(CAG)_n 微卫星 DNA 特征分析. 中国水产科学, 16(6): 807–815.
- 徐波, 汪桂玲, 李家乐. 2012. 磁珠富集法与 5' 锚定 PCR 法开发背瘤丽蚌微卫星标记的比较. 生态学杂志, 31(4): 923–930.
- 徐兴莉, 杨虎. 2011. 微卫星 DNA 标记技术的特点及其在动物研究中的应用. 畜禽业, (12): 34–35.
- 张国彦, 翟保平. 2008. 东方粘虫(*Pseudaletia separate* (Walker))微卫星富集文库的构建与分析. 生态学报, 28(8): 3860–3867.
- 张俊鹏, 孙典巧, 王日昕, 徐田军. 2012. 刺参 CT/AG 微卫星标记的筛选. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 31(2): 97–102.
- 张丽, 樊勇, 马雅军. 2009. 中华白蛉微卫星 DNA 序列的分离和多态位点筛选的初步研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 27(6): 503–507.
- 张增翠, 侯喜林. 2004. SSR 分子标记开发策略及评价. 遗传, 26(5): 763–768.
- Brenner S, Elgar G, Sandford R, Macrae A, Venkatesh B A and Paricio S. 1993. Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*, 366: 265–268.
- Chu D, Gao C S, De Barro P, Wan F H and Zhang Y J. 2011. Investigation of the genetic diversity of an invasive whitefly (*Bemisia tabaci*) in China using both mitochondrial and nuclear DNA markers. *Bulletin of Entomological Research*, 101: 467–475.
- Chu D, Zhang Y J, Cong B, Xu B Y, Wu Q J and Zhu G R. 2005. Sequences analysis of mtDNA COI gene and molecular phylogeny of different geographical populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Agricultural Sciences in China*, 4: 533–541.
- Fisher P J, Gardner R C and Richardson T E. 1996. Single locus microsatellite isolated using 5'-anchored PCR. *Nucleic Acids Research*, 24: 4369–4371.
- Kandpal R P, Kandpal G and Weissman S M. 1994. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 91(1): 88–92.
- Karagoyozov L, Kalcheva I D and Chapman V M. 1993. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research*, 21: 3911–3912.
- Rassmann K, Schlotterer C and Tautz D. 1991. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12(2–3): 113–118.
- Weber J L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n. (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7: 524–554.

(责任编辑:杨郁霞)

