

藏马微卫星标记遗传多样性研究

商鹏¹ 郭新颖¹ 张健¹ 吴绿草¹ 段梦琪¹ 杨娜娜² 赵雨农¹ 李盼¹ 强巴央宗^{1*}

(1. 西藏农牧学院 动物科学学院, 西藏 林芝 860000;

2. 林芝市农牧局畜牧兽医总站, 西藏 林芝 860000)

摘要 为研究西藏藏马种群的微卫星多态性,应用生物素标记的微卫星探针与藏马基因组酶切片段杂交,通过链霉亲和素包被的磁珠捕获 150~1 000 bp 含有微卫星序列的 DNA 片段,连接到 pEASY-T1 载体中,构建藏马基因组微卫星富集文库。结果表明:从 2 380 个转化子中随机挑取 112 个阳性克隆进行测序后,经筛选比对发现,从 62 个微卫星中筛选出 39 个在马属基因组卫星库中未被检测到的微卫星;成功设计了 10 对藏马微卫星引物,经聚合酶链式反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)方法检测到 3 个具有多态性的微卫星标记,其中有 2 个多态性信息含量(PIC)值均大于 0.5。因此,这 3 个微卫星标记可应用于藏马遗传多态性检测、种群遗传结构等方面研究,为藏马遗传连锁图谱的构建、辅助育种、群体遗传学分析、基因组结构分析以及分子进化研究等提供依据。

关键词 藏马; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号 S821.1

文章编号 1007-4333(2019)09-0098-07

文献标志码 A

Development and research of the microsatellite markers of Tibetan horse

SHANG Peng¹, GUO Xinying¹, ZHANG Jian¹, WU Lvcao¹, DUAN Mengqi¹,
YANG Nana², ZHAO Yunong¹, LI Pan¹, Chanmbayangzom^{1*}

(1. Department of Animal Science, Tibet Agriculture and Animal Husbandry University, Linzhi 860000, China;

2. Animal Husbandry and Veterinary General Station of Linzhi, Linzhi 860000, China)

Abstract The aim of this study was to find microsatellite markers of Tibetan horse population in high altitude area of Tibet. The biotin-labeled microsatellite probes were used to hybridize with Tibetan horse genomic fragments. DNA fragments 150 - 1 000 bp containing microsatellite sequences were captured by streptavidin-coated magnetic beads and ligated into pEASY-T1 vector. An microsatellite sequences enriched insert library was constructed. The results showed that: A total of 112 positive clones were picked from 2 380 transformants for sequencing and 39 microsatellites were indentified from the Equine genomic satellite library out of 62 microsatellites. Ten pairs of Tibetan horse microsatellite primers were successfully designed. Three polymorphic microsatellite markers were detected by PCR-SSCP method, and two of which had PIC values greater than 0.5. In conclusion, the three microsatellite markers could be applied to the study of genetic polymorphism detection of Tibetan horses and the genetic structure of the population. This study provided genetic bases for the linkage map construction, breeding, population genetic analysis, genomic structure analysis and molecular evolution research of Tibetan horse.

Keywords Tibetan horse; microsatellite markers; genetic diversity

简单重复序列(Simple sequence repeat SSR)又称微卫星(Microsatellite),广泛分布于基因组中的

一类高变异串联重复 DNA 序列,其核心序列是 2~6 bp 的短核苷酸重复 5~20 次,并与两侧的侧翼序

收稿日期: 2019-01-05

基金项目: 西藏自治区重点研发与转化计划(XZ201801NB06);西藏自治区自然科学基金(XZ2017ZRG-33)

第一作者: 商鹏,副教授,主要从事高原动物遗传资源保护与功能基因组研究,E-mail:nemoshpmh@126.com

通讯作者: 强巴央宗,教授,主要从事高原动物遗传资源保护与利用研究,E-mail:qbyz628@126.com

列构成了微卫星座位^[1-3]。由于其具有高突变率,导致阵列长度的等位基因发生变化,这些重复是高变量共显性标记的丰富来源^[4-5]。在哺乳动物中,其突变率为每世代 $10^{-5} \sim 10^{-2}$ ^[6-7]。由于微卫星具有高水平的突变率和杂合性、双亲遗传模式等优势^[8],而且便于检测,费用低,因此被广泛用于许多物种的遗传标记^[9-10]。凌英会等^[11]对我国 23 个地方马种进行微卫星标记分析,发现我国地方马群有丰富的遗传多样性;徐龙鑫等^[12]对云南矮马进行了微卫星标记研究,发现云南矮马同样具有丰富的遗传多样性。

藏马处在独特的高原环境,保持了纯正的耐寒、耐低氧和抗辐射等遗传特性,能够较好的适应高原低氧环境,是很好的高原低氧适应研究的动物模型^[12-13]。我国关于西藏本土藏马微卫星多态性的研究几乎空白,因此,本研究拟以西藏高海拔地区藏马为研究对象,采集藏马血样,提取基因组 DNA,利用微卫星通过与探针的特异性杂交,随机挑取阳性克隆转化子进行测序,在 NCBI 上进行 BLAST 比对,筛选出基于马属的全基因组测序新的候选微卫星标记,以期开发藏马遗传变异、遗传进化、群体结构等新的微卫星标记,为研究藏马群体结构和遗传变异等提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本试验所用藏马来自西藏日喀则市(海拔 4 000 m)和那曲市(海拔 4 500 m)各 40 匹,利用真空负压抽取血样,肝素钠抗凝,共采集 80 份藏马血样,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 微卫星开发

1.2.1 基因组 DNA 提取

利用 EasyPure Blood Genomic DNA Kit 试剂提取盒(北京全式金生物技术有限公司),按照操作流程从藏马血液样品中提取 DNA。

1.2.2 酶切反应

取藏马基因组 DNA 用 *Mse* I $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,酶切 4 h,后在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 20 min 灭活。酶切反应体系为 DNA 模板 $5.0\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ Buffer $1.0\text{ }\mu\text{L}$, *Mse* I 酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $3.5\text{ }\mu\text{L}$ 。酶切结束后,利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切的结果,OMEGA 胶回收试剂盒(USA)回收 300~1 000 bp 的 DNA 片段。

1.2.3 *Mse* I 接头的制备与连接

MagneSphere[®] Magnetic Separation Products

是 Promega 公司的链霉亲和素包被的磁珠。生物素标记探针包括 5'-(CA)₁₂-3'生物素、5'-(CGG)₈-3'生物素、5'-(AGC)₈-3'生物素、5'-(CTG)₈-3'生物素和 5'-(GATA)₆-3'生物素。接头所用粘性末端接头序列为:

Mse I-A 序列: 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3';

Mse I-B 序列: 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3';

Mse I-N 序列: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AN-3'。

将接头的 2 条单(寡)核苷酸链分别加热溶解至 $20.0\text{ }\mu\text{mol/L}$,按等体积比例混合 2 组单(寡)核苷酸链至 $10.0\text{ }\mu\text{mol/L}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,室温冷却 1 h,最终形成双链接头, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。将回收的片段与双链接头在 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。连接反应体系含模板 DNA $10.0\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ T₄ Buffer $2.0\text{ }\mu\text{L}$, *Mse*(A+B) $2.0\text{ }\mu\text{L}$, T₄ 酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $5.5\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.2.4 PCR 预扩增

使用 *Mse* I-N 引物,模板为稀释 10 倍的连接产物,进行 PCR 扩增,PCR 体系包含模板 DNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$, $2\times$ Mix Taq $10.0\text{ }\mu\text{L}$, *Mse* I-N ($20\text{ pmol}/\mu\text{L}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $8.5\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序包含 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min 补齐接头; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 变性, $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min 退火, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 90 s 延伸,从变性到延伸共有 30 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min 延伸。PCR 产物回收使用 OMEGA 胶回收试剂盒(USA),回收产物 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.5 生物素探针杂交

取 1.2.4 中的回收产物 $20.0\text{ }\mu\text{L}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min 水溶解链,结束立即至于冰上,加入 $80.0\text{ }\mu\text{L}$ $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的杂交缓冲液,与生物素标记的探针 5'-(CA)₁₂-3'生物素,5'-(CGG)₈-3'生物素,5'-(AGC)₈-3'生物素,5'-(CTG)₈-3'生物素,5'-(GATA)₆-3'生物素,构成 $100.0\text{ }\mu\text{L}$ 杂交体系。不同生物素探针杂交温度分别是 5'-(CA)₁₂-3'生物素为 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$,5'-(CGG)₈-3'生物素为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,5'-(AGC)₈-3'生物素和 5'-(CTG)₈-3'生物素为 $58\text{ }^{\circ}\text{C}$,5'-(GATA)₆-3'生物素为 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。进行过夜杂交,结束后缓慢冷却至室温,加入 $300.0\text{ }\mu\text{L}$ 的 TEN100 缓冲液混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.6 磁珠富集微卫星片段

预处理磁珠:首先用 $300.0\text{ }\mu\text{L}$ 的 TEN100 缓

冲液洗涤 500.0 μL 的磁珠 3 次,洗涤完毕后,用 50.0 μL TEN100 溶液悬浮磁珠;磁珠杂交:将含有 300.0 μL TEN100 的杂交混合液加入到预处理的磁珠中,恒温震荡培养箱中 150 r/min 室温震荡 30 min,避免磁珠的沉淀,这样可以更有效地吸附杂交后的 DNA。磁珠的洗涤:磁珠吸附结束,磁架固定住磁珠,移除杂交混合液。使用 400.0 μL 0.2 \times SSC 加上 0.1% SDS 溶液在常温下洗涤 3 次磁珠,每次 5 min,需要不停的搅动或吹打以上混合物。漂洗 3 次后再用 400.0 μL 55 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.2 \times SSC 加 0.1% SDS 溶液洗涤 1 次,同样的固定磁珠,移除洗涤液。加入 50.0 μL TE 8.0,用移液器拍打均匀,然后于 PCR 仪中 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 min。立即用磁架固定磁珠,迅速吸出上清液,冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.7 富集微卫星的连接与转化

以富集的微卫星片段为模板 DNA 进行 PCR 扩增,扩增体系包含模板 DNA 1.5 μL , 2 \times Mix Taq 10.0 μL , Mse I-N (20 pmol/ μL) 1.0 μL , ddH₂O 7.5 μL 。再将其 PCR 产物进行纯化作为模板 DNA,用 Promega 家的 T₄ 连接酶将纯化产物与 pGEM-T 载体 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接。连接体系包含模板 DNA 2.0 μL , T₄ 酶 10.0 μL , 10 \times T₄ Buffer 1.0 μL , ddH₂O 5.5 μL 。将连接产物转化进感受态细胞(大肠杆菌 DH5 α 菌株),然后在有氨苄的 LB 固体培养基中涂板,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。蓝白斑筛选挑取重组子,在含有氨苄的 LB 液体培养基中培养 3 h 至微浑浊。

1.2.8 建立磁珠富集的微卫星基因序列文库

以菌液为模板,用引物 Mse I-N 进行 PCR 扩增,以此来筛出阳性克隆。通过凝胶电泳结果筛选出单一条带,将目的片段大于 250 bp 的菌液送北京华大基因有限公司测序。将测序结果在 NCBI 上进行 BLSAT 比对,去除比对结果与马属微卫星高度相似的序列。挑选出微卫星和两侧翼区都足够长的序列,用 Primer 5.0 软件来设计引物。为了便于基因分型步骤,扩增片段长度限定在 100~300 bp, T_m 值在 50~60 $^{\circ}\text{C}$, PCR 优化设计的引物各自的反应条件。引物由北京华大基因有限公司合成。对所有合成的引物以 DNA 为模板进行 PCR 反应,通过梯度 PCR 最终确定每个引物的最佳退火温度。扩增体系共 10.0 μL , 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 变性,30 s 退火,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s 延伸,共计 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min 延伸。反应体系包含模板 DNA 0.5 μL , 2 \times Mix Taq 5.0 μL , 每条引物(F+

R) 0.5 μL , ddH₂O 4.0 μL 。PCR 扩增产物的检测:取 3.0 μL 的扩增产物,2% 琼脂糖凝胶电泳确定最佳退火温度。

1.2.9 微卫星多态性筛选

选取 80 份(2 个群体)藏马血液 DNA 作为扩增模板,在最佳退火温度下扩增筛选出多态性引物,PCR 产物用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测并进行银染显色,拍照保存。

1.2.10 数据统计

根据 DNA Marker 统计材料在某一位点目的片段大小,用 Genepop 4.0 软件计算等位基因数(Ne)、期望杂合度(He)、观察杂合度(Ho)、Hardy-Weinberg 平衡(HWE)和多态性信息含量(PIC)。

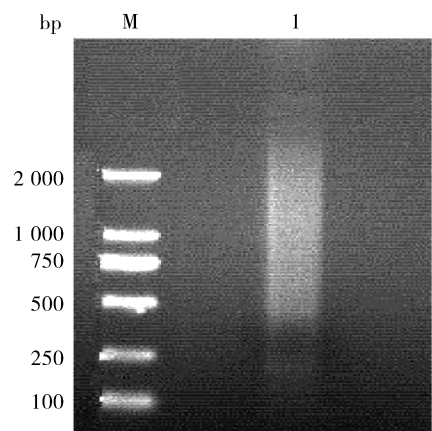
2 结果与分析

2.1 藏马 DNA 的提取结果

使用 DNA 试剂盒提取藏马血液基因组 DNA,用 1% 的琼脂糖凝胶检测 DNA 提取质量,条带清晰单一,没有发生降解,可用于下一步试验。

2.2 藏马基因组 DNA 酶切结果

取 1 μg 藏马基因组 DNA,用 Mse I 限制性内切酶进行酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果,在 150~1 000 bp 之间出现了连续的弥散性条带(图 1),说明酶切比较完全,可以进行下一步试验。



M, DNA 分子标记 DL2 000; 1, 酶切产物。

M, DNA Marker DL2 000; 1, the products of enzyme digestion.

图 1 凝胶电泳检测酶切结果

Fig. 1 Results of enzyme digestion detected by gel electrophoresis

2.3 磁珠杂交洗脱富集片段的扩增结果

纯化后的预扩增产物,与杂交混合液进行杂交、

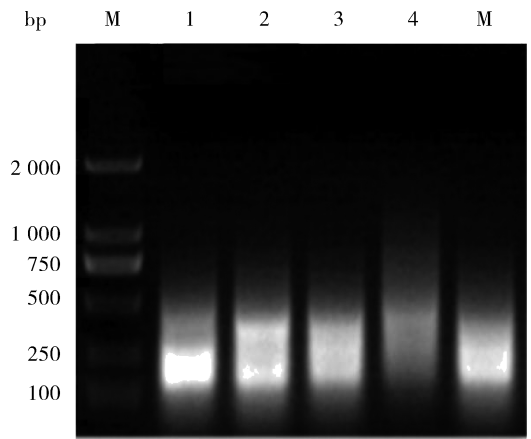
洗脱和富集磁珠，富集的产物用 PCR 扩增，在 250~750 bp 范围内发现了扩增的片段(图 2)；条带符合预期片段长度，因此富集片段可以用于下一步的转化克隆。

2.4 微卫星片段的连接、转化以及 PCR 验证结果

对富集的片段连接、转化，然后挑取白色的单个菌落，使用引物 *Mse* I N 进行菌液 PCR，部分结果如图 3 所示，从中挑选条带明亮清晰产物，筛除假阳性，用于后续测序分析。

2.5 测序结果分析

挑选出 112 个单克隆进一步进行 DNA 测序，发现其中 62 个包含重复序列，富集的效率达 55.36%。将其目的片段分别在 NCBI 上进行 BLAST 比对，筛选出在马属全基因组中未被检测到的微卫星为 39 个。其中包含核心序列 (TG)₉、(AGC)₈、(CA)₂₅ 的微卫星，结果比较理想。

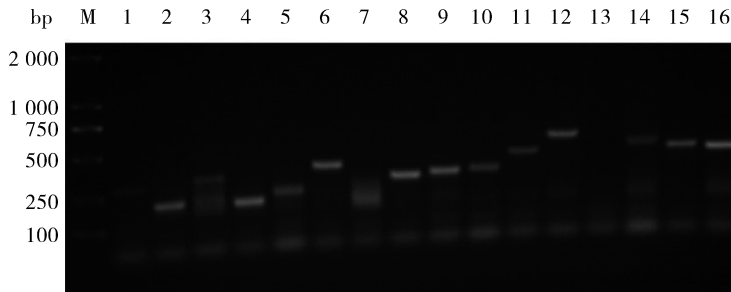


M, DNA 分子标记 DL2 000; 1~5 分别是 CA, AGC, CTG, GATA, AAAC 扩增产物。

M, DNA Marker DL2 000, 1, 2, 3, 4 and 5 are respectively the amplification products of CA, AGC, CTG, GATA and AAAC.

图 2 微卫星富集片段的扩增

Fig. 2 Amplification of microsatellite enrichment fragments



M, DNA 分子标记 DL2 000; 1~16, 克隆编号。

M, DNA Marker DL2 000; 1-16, clone number.

图 3 部分阳性克隆筛选结果

Fig. 3 Screening and identification of SSR-containing positives clones

2.6 特异性和多态性引物的设计筛选

从上述筛选的 62 个微卫星序列中选取了 20 条比较理想的重复片段序列，进行特异性引物设计，用 Primer 5.0 设计软件设计引物，共设计出 17 对引物。选出部分藏马 DNA 样品作为受试样对设计的 17 对引物进行 PCR 扩增检测，利用琼脂糖电泳从 50 °C 开始检测最佳的退火温度，最终得到预期目的片段大小和特异性扩增的条带，获得了 10 对有效引物，基本信息见表 1。

2.7 引物多态性检测

经 PCR-SSCP 进一步检测，最终获得 3 对多态性微卫星标记引物。运用 Genepop4.0 软件计算等位基因数 (Ne)、观察杂合度 (Ho)、期望杂合度 (He)、Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) 和多态性信息

含量 (PIC)^[14]，结果表明 (表 2)：3 对 SSR 引物，共计产生 11 个等位基因，每个位点产生的等位基因在 2 个以上，最多有 4 个等位基因；平均每个位点有 3 个等位基因；观测杂合度从 0.066 7 到 0.200 0，期望杂合度从 0.353 1 到 0.448 0，多态信息含量从 0.479 5 到 0.561 2，平均含量是 0.513 8，其中 2 对 SSR 引物偏离了哈迪温伯格平衡。

3 讨论

本研究在试验设计时，排除了 NCBI 上与马微卫星位点同源的高度相似序列，所以从测序结果中，筛选出新的微卫星标记只有 3 个，相比马基因组 DNA 的大小明显偏少，也进一步说明全基因组测序是有待完善。本研究采用的磁珠富集开发微卫星位

表1 藏马微卫星引物及其核心序列

Table 1 Tibetan horse microsatellite primers and their core sequences

引物编号 Primer number	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	重复核心序列 Repetitive core sequence	退火温度/°C T_m	扩增产物大小/bp Amplification of product size
ZM1	F:GGGAGAAGGCAGTGGAAAG R:GCCCACCTGAGATTCCAC	(AGC) ₇	53	179
ZM2	F:GCCTCAGTATGCCTATCCAC R:TCTTTGAACACTAGCTTTGC	(AGC) ₄	53	188
ZM3	F:GGGGAGTGATAAGAAACGA R:GGGTGGGAGAACAGGAAGT	(AGC) ₇	55	235
ZM4	F:TGGCTCAAGCACCAAACA R:CTCCAGTGATCTAGTCAAGTC	(CA) ₉	53	130
ZM5	F:CACCCACCATTGCTCATC R:CCAGTTCAAAGCCAGATAG	(AGC) ₈	55	285
ZM6	F:GGGAGAAGGCAGTGGAAAG R:TCTGACCGGCCAAAGTA	(AGC) ₅	53	209
ZM7	F:AGCTGCCAGCACCGTCTA R:CTGGGCTCTGTGGGATAA	(CA) ₅	55	275
ZM8	F:ATTCTTGCCGACACCTCT R:GTTGGCTTCCGTTTCATA	(CA) ₉	53	140
ZM9	F:CCCCAGCTTTCTCGTTTCA R:GCACCTCACCTTTGCTAT	(CA) ₂₅	53	223
ZM10	F:GTTGTTGATGTAGGGTTGTG R:CTCATTTCTTGCCGCTTT	(AGC) ₈	53	189

表2 3对SSR引物特征

Table 2 Characterization of three SSR primer pairs

引物编号 Primer number	等位基因数 Number of effective alleles	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	哈迪温格尔 平衡 Hardy-Weinberg equilibrium	多态性信息 含量 Polymorphism information content
ZM1	4	0.200 0	0.448 0	NF	0.479 5
ZM5	4	0.066 7	0.353 1	*	0.561 2
ZM10	3	0.166 7	0.410 7	*	0.514 1

注:NF,没有偏离哈迪温伯格平衡;*,偏离哈迪温伯格平衡($P<0.05$)

Note:NF represents not significant from Hardy-Weinberg equilibrium; * represents significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$).

点的方法,该方法具有操作简单、特异性好、效率高等特点,是现阶段微卫星标记挖掘的主流方法。所开发出的3对SSR引物中,有2对偏离Hardy-Weinberg平衡,其原因可能是样品收集的藏马群体受到选择、遗传漂变、交配发生偏移等影响,也可能放牧方式中无法避免近亲交配,造成基因丢失,从而造成了哈代-温伯格不平衡状态^[15]。微卫星无效等位基因主要是由于SSR侧翼序列突变等导致基因无法正常扩增,其可通过改变引物与侧翼序列的结合位点来消除或避免^[16]。如果新引物能有效扩增某基因片段,此时该位点就不存在无效等位基因^[17]。可见,微卫星无效等位基因与引物的结合位点(变异)直接相关,并非基因本身的自然特性^[17]。有效等位基因是度量群体遗传多样性的指标,等位基因在群体中分布越均匀,有效等位基因数越接近所检测到的等位基因的绝对值^[18]。当 $PIC > 0.5$ 时,说明在整个测定群体中该基因座存在高度多态性^[19],而PIC指标可以体现群体中基因的一致性、遗传变异、选择潜力等指标。本研究中3对SSR引物在80份供试材料中共检验出11个等位基因,平均多态信息含量(PIC)为0.5183,平均观测杂合度(H_o)为0.1444,平均期望杂合度(H_e)为0.404,说明3个微卫星位点都具有多态性,遗传多样性丰富,且西藏藏马的遗传变异较大,选择和选育空间较大。在本试验中,有些藏马个体没有扩增出条带,可能是由于同1个体的相等等位基因座位的1个等位基因扩增出来,而另1个没有扩增出来,究其原因,可能是扩增条带侧翼区存在不同变异类型,影响了扩增效率。在后续研究中可完善侧翼区序列,调整扩增引物序列,增加简并引物序列,以提高扩增效率和应用效率。

4 结 论

本研究应用生物素标记的微卫星探针与藏马基因组酶切片段杂交,将磁珠捕获150~1000 bp含有微卫星序列的DNA片段,连接到pEASY-T1载体中,构建富集微卫星序列的插入文库。从2380个转化子中随机挑取112个阳性克隆进行测序,经过筛选比对,筛选出39个与马属基因组卫星库中未被检测到的微卫星。成功设计了10对藏马微卫星引物,经PCR-SSCP方法检测到3个具有多态性的微卫星标记。这3个微卫星标记可应用于藏马的遗传多态性检测、种群遗传结构等方面的研究,将为藏

马遗传连锁图谱的构建、辅助育种、群体遗传学分析、基因组结构分析以及分子进化研究等提供基础。

参考文献 References

- [1] dos Santos E J M. Statistical approaches and methods in population genetics using microsatellite data[M]. In: Epplen J T, Lubjuhn T, eds. *DNA Profiling and DNA Fingerprinting*, New York: Springer Nature, 1999: 215-228
- [2] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(16): 6463-6471
- [3] Sharma P C, Grover A, Kahl G. Mining microsatellites in eukaryotic genomes[J]. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25(11): 490-498
- [4] Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. *Molecular Breeding*, 1996, 2(3): 225-238
- [5] Khajuria Y P, Saxena M S, Gaur R, Chattopadhyay D, Jain M, Parida S K, Bhatia S. Development and integration of genome-wide polymorphic microsatellite markers onto a reference linkage map for constructing a high-density genetic map of chickpea[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125583
- [6] Dallas J F. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant strains of mouse[J]. *Mammalian Genome*, 1992, 3(8): 452-456
- [7] 庾蕾, 李建金, 伍新尧, 曹露媚, 刘秋玲, 曾艳红, 区敬华. 三个短串联重复序列位点的等位基因遗传变异研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2002(4): 308-312
Yu L, Li J J, Wu X Y, Cao L M, Liu Q L, Zeng Y H, Qu J H. Study on the mutation of human short tandem repeats at three loci[J]. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2002(4): 308-312 (in Chinese)
- [8] Zhivotovskiy L A, Bennett L, Bowcock A M, Feldman M W. Human population expansion and microsatellite variation[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(5): 757-767
- [9] Palma-Silva C, Cavallari M M, Barabá T, Lexer C, Gimenes M A, Bered F, Bodanese-Zanettini M H. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2010, 7(4): 654-657
- [10] Shen Z, Duan J, Ma L. Genetic diversity of *Xanthoceras sorbifolium* Bunge germplasm using morphological traits and microsatellite molecular markers[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0177577
- [11] 凌英会, 成月娇, 王艳萍, 关伟军, 韩建林, 傅宝玲, 赵倩君, 何晓红, 浦亚斌, 马月辉. 应用微卫星标记分析23个中国地方马种的遗传多样性[J]. *生物多样性*, 2009, 17(3): 240-247

- Ling Y H, Cheng Y J, Wang Y P, Guan W J, Han J L, Fu B L, Zhao Q J, He X H, Pu Y B, Ma Y H. Genetic diversity of 23 Chinese indigenous horse breeds revealed by microsatellite markers[J]. *Biodiversity Science*, 2009, 17(3): 240-247 (in Chinese)
- [12] 徐龙鑫, 林瑞意, 李爱萍, 杨海兵, 杨胜林. 利用微卫星标记分析云南矮马的遗传多样性[J]. 西南农业学报, 2011, 24(3): 1136-1139
- Xu L X, Lin R Y, Li A P, Yang H B, Yang S L. Gene diversity of Yunnan pony based on micro-satellite markers[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 24(3): 1136-1139 (in Chinese)
- [13] Hochachka P W, Rupert J L, Monge C. Adaptation and conservation of physiological systems in the evolution of human hypoxia tolerance[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 1999; 124(1): 1-17
- [14] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism[J]. *Journal of Heredity*, 1995, 86(3): 248-249
- [15] Pritchard J K, Seielstad M T, Perez-Lezaun A, Feldman M W. Population growth of human Y chromosomes: A study of Y chromosome microsatellites[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16(12): 1791-1798
- [16] Callen D F, Thompson A D, Shen Y, Phillips H A, Sutherland G R. Incidence and origin of "null" alleles in the (ac)n microsatellite markers[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 1993, 52(5): 922-927.
- [17] 文亚峰, Kentaro Uchiyama, 韩文军, Saneyoshi Ueno, 谢伟东, 徐刚标, Yoshihiko Tsumura. 微卫星标记中的无效等位基因[J]. 生物多样性, 2013, 21(1): 117-126
- Wen Y F, Kentaro U, Han W J, Saneyoshi U, Xie W D, Xu G B, Yoshihiko T. Null alleles in microsatellite markers[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(1): 117-126 (in Chinese)
- [18] Lindgren G, Sandberg K, Persson H, Marklund S, Breen M, Sandgren B, Carlstén J, Ellegren H. A primary male autosomal linkage map of the horse genome[J]. *Genome Research*, 1998, 8(9): 951-966
- [19] Mostafa V, Kwon K K, Akira K, Toshiaki K. Analysis of genetic distance among nine medicago species by using DNA polymorphisms[J]. *Breeding Science*, 1996, 46(1): 7-10

责任编辑: 杨爱东