

基于高通量测序的达氏鲟微卫星标记筛选

李薇^① 李久煊^① 荆慧芳^① 雷毅^① 宋昭彬^{①②*}

① 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室, 四川大学生命科学学院 成都 610064;

② 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川大学生命科学学院 成都 610064

摘要: 达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*) 是我国特有的珍稀鱼类, 主要分布在长江上游干支流。由于人类活动的影响, 其种群数量急剧下降, 被列为国家 I 级重点保护动物、IUCN 红色名录极危 (CR) 物种。本研究针对当前达氏鲟群体的濒危现状, 应用微卫星标记开展达氏鲟保护遗传学研究。通过高通量测序成功筛选出 25 个微卫星位点, 采用 18 尾野生个体和 30 尾人工繁殖个体对其多样性进行了检验, 结果表明, 25 个位点共检测出 181 个等位基因, 每个位点的等位基因数 (A) 为 4 ~ 11 (平均值 7.2), 观测杂合度 (H_O) 为 0.160 ~ 1.000 (平均值 0.744), 期望杂合度 (H_E) 为 0.346 ~ 0.875 (平均值 0.727)。所有位点均不偏离 “Hardy-Weinberg” 平衡 ($P > 0.05$), 各位点间也无连锁不平衡现象。除了其中一个位点以外, 所有位点的多态信息含量 (PIC) 均大于 0.5, 其多态性较好。本次筛选的微卫星位点将有助于达氏鲟资源保护和群体遗传研究。

关键词: 达氏鲟; 微卫星; 多态性; 高通量测序

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2017) 03-449-09

Development of Microsatellite Loci for Dabry's Sturgeon (*Acipenser dabryanus*) Using High-Throughput Sequencing

LI Wei^① LI Jiu-Xuan^① JING Hui-Fang^① LEI Yi^① SONG Zhao-Bin^{①②*}

① *Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology on Endangered Wildlife, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064;*

② *Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China*

Abstract: Dabry's Sturgeon (*Acipenser dabryanus*) is an endemic freshwater fish in the mainstream of upper reaches of the Yangtze River and its tributaries in western China. Due to anthropogenic factors, the natural populations of Dabry's Sturgeon have been declining sharply in the past decades. Consequently, the species was listed as a first class protected animal by the Chinese government. And it was also listed as critical endangered in the IUCN Red List. In order to obtain the information on genetic diversity of Dabry's Sturgeon, twenty-five tetranucleotide microsatellite loci were developed from the genomic DNA using the

基金项目 中国长江三峡集团公司项目 (No. XJB/1294, 0799531);

* 通讯作者, E-mail: zbsong@scu.edu.cn;

第一作者介绍 李薇, 女, 硕士研究生; 研究方向: 鱼类生态学; E-mail: liweiscu1991@126.com。

收稿日期: 2016-10-28, 修回日期: 2017-01-18 DOI: 10.13859/j.cjz.201703011

high-throughput sequencing. The polymorphism of microsatellites was tested using 18 wild individuals and 30 artificially propagated individuals. A total of 181 alleles were found in 25 microsatellites. The number of alleles per locus (A) ranged from 4 to 11 (mean = 7.2). And the observed heterozygosities (H_O) and expected heterozygosities (H_E) ranged from 0.160 to 1.000 (mean = 0.744) and 0.346 to 0.875 (mean = 0.727), respectively. No loci significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) and there was no significant linkage disequilibrium found between pairs of loci. All of the microsatellite markers, except one, showed polymorphism information content (PIC) values above 0.5 (Table 1). These polymorphic microsatellite loci described here will facilitate further studies on the population genetic management and conservation of Dabry's sturgeon. In this article, Table 1 shows the information of polymorphic microsatellite markers isolated from Dabry's Sturgeon.

Key words: Dabry's Sturgeon, *Acipenser dabryanus*; Microsatellites; Polymorphism; High-throughput sequencing

达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*) 隶属于鲟形目 (Acipenseriformes) 鲟科 (Acipenseridae) 鲟属, 是我国特有的珍稀濒危鱼类, 主要分布在长江中上游干支流, 具有重要的物种价值和科研价值 (丁瑞华 1994, Zhuang et al. 1997)。由于过度捕捞、水体污染、水利工程兴建 (Zhu et al. 2008), 以及其自身生活周期长、性成熟晚等原因, 达氏鲟天然资源已极为稀少, 1989 年被列为国家 I 级重点保护动物 (Wei et al. 1997), 同时也被列入 IUCN 红色名录极危 (CR) 物种 (IUCN 2016)。为保护达氏鲟野生资源, 国家提出了一系列保护措施, 包括禁止捕捞、设立保护区和开展人工增殖放流等。其中, 人工增殖放流是目前达氏鲟资源保护和种群恢复的主要措施之一。由于亲鱼数量极少, 在进行苗种培育时, 极易造成近亲繁殖而导致苗种遗传质量的下降。为保障达氏鲟苗种种质的纯正性, 有必要通过分子方法对其进行遗传多样性等调查。

微卫星因其具有共显性、高度遗传多态性、等位基因分型难度低等突出优点, 是遗传多样性分析最合适的分子标记。而高多态性的微卫星位点也已成为种群遗传学研究的普遍选择 (Selkoe et al. 2006, Witzemberger et al. 2011), 并在遗传分析、亲子鉴定等方面有着重要的作用 (Abbas et al. 2010, An et al. 2013)。目前,

达氏鲟的微卫星已有报道 (Zeng et al. 2013, Zhang et al. 2013, Que et al. 2014), 但部分位点仅有等位基因数 (number of alleles, A)、期望杂合度 (expected heterozygosities, H_E) 和 Shannon-Wiener 指数等计算, 并未评估多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC) 和检验 “Hardy-Weinberg” 平衡 (Zhang et al. 2013, Que et al. 2014)。同时, 已报道的位点多以二碱基重复为主 (Zhang et al. 2013, Que et al. 2014), 而遗传分析中人们往往更倾向于使用四碱基重复的微卫星以减少二碱基微卫星在 PCR 中出现滑带 (stutter) 等问题 (Ellegren et al. 2004, 张小芳等 2012)。虽然学者 Zeng 等 (2013) 筛选了 8 个四碱基重复的位点, 但其中有 6 个位点偏离 “Hardy-Weinberg” 平衡, 这将影响其在达氏鲟种群遗传学等相关分析中的使用。因此, 迫切需要筛选出更多优良微卫星位点用于达氏鲟保护遗传学和种质资源管理研究。

随着测序技术的不断发展, 应用高通量测序 (high-throughput sequencing) 进行微卫星位点筛选也越来越广泛 (岳桂东等 2012, Zhu et al. 2013, Ritchie et al. 2016)。本次研究也采用高通量测序进行微卫星位点的筛选, 为达氏鲟种质资源保护和群体遗传学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本的采集

实验所用达氏鲟组织样本分别采自于宜宾珍稀水陆生动物研究所(野生个体 18 尾),金沙江溪洛渡向家坝水电站珍稀特有鱼类增殖放流站(人工繁殖个体 30 尾),中华鲟研究所(野生个体 1 尾),长江水产研究所(野生个体 1 尾),剪取部分胸鳍或腹鳍鳍条置于无水酒精中,带回实验室 -20℃ 冰箱保存。其中,中华鲟研究所和长江水产研究所各 1 尾野生个体样本在本次实验中仅用于高通量测序,并未涉及后续实验。

1.2 基因组 DNA 的提取与高通量测序

基因组 DNA 的提取使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]。采用混合测序的方法,将样本按照一定规律混合后进行检测,可充分利用新一代测序仪的测序性能,从而大大降低成本,提高检测效率和灵敏性。本次实验根据达氏鲟性别及其数量分别建立 3 个 DNA 混合池,其中,宜宾珍稀水陆生动物研究 6 尾雌鱼和 7 尾雌鱼的 DNA 分别组成 2 个 DNA 混合池,而中华鲟研究所和长江水产研究所各 1 尾雄鱼以及宜宾珍稀水陆生动物研究 5 尾雄鱼的 DNA 共同组成另一个 DNA 混合池。然后将所有的 DNA 混合池送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司,使用 HiSeq 2500 高通量测序仪(Illumina, USA)对达氏鲟基因组 DNA 进行随机测序。

1.3 引物设计与筛选

使用微卫星查找软件 MSDB 2.4.2(Du et al. 2013)找出四碱基且重复次数 6 次以上的序列,根据微卫星 DNA 侧翼序列,利用在线引物设计软件 Primer 3.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>)进行引物设计。以 18 个野生个体(宜宾珍稀水陆生动物研究所)的基因组 DNA 和 30 个人工繁殖子代个体(金沙江溪洛渡向家坝水电站珍稀特有鱼类增殖放流站)的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增实验。保留能够产生高度特

异性扩增片段的引物,并对引物的“退火温度”进行优化。选取多态性较好的引物进行正向链 5'端的(FAM、TAMRA、HEX)荧光标记,对达氏鲟 48 个基因组 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:模板 DNA 0.5 μl (30 ng/ μl),正反向引物各 0.5 μl (10 pmol/ μl), 0.2 μl *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μl) (Takara, Japan), 2.5 μl 10 \times PCR buffer (Takara, Japan), 1.5 μl Mg^{2+} (25 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) (Takara, Japan), 1 μl dNTPs (2.5 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) (Takara, Japan), 18.3 μl ddH₂O, 共 25 μl 体系。PCR 反应程序为:94℃ 变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55 ~ 65℃ 退火 40 s (表 1), 72℃ 延伸 1 min, 重复 35 个循环; 72℃ 充分延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,选取条带清晰且单一的产物直接送样,使用 ABI PRISM 377 测序仪对扩增片段进行测定,并使用 Genotyper 2.5 软件进行微卫星等位基因分型。

1.4 数据分析

微卫星基因分型结果显示,达氏鲟每个位点的等位基因数最多达到 4 个,表明可以按照四倍体进行分析,并对分型结果进行读数与统计。以假定的同源四倍体模型为基础的 AUTOTET 软件(Thrall et al. 2000)分别计算等位基因数(A)、观测杂合度(observed heterozygosities, H_O)及期望杂合度(H_E)。使用软件 LD4X (Julier 2009)进行连锁不平衡检测,并对多态信息含量(PIC)使用 PIC_CALC 0.6 软件进行计算。

2 结果

2.1 高通量测序及微卫星分布规律统计结果

对达氏鲟进行基因组随机高通量测序,过滤掉接头、低质量序列后,共获得有效数据 35 Gbp。数据经拼接组装后,通过软件搜索获得侧翼序列超过 250 bp 的微卫星序列共 758 条,其中四碱基微卫星序列 228 条,占搜索序列的 30%;四碱基且重复超过 6 次的微卫星序列 189 条,占四碱基微卫星序列的 83%。

表 1 达氏鲟多态性卫星位点信息
Table 1 Information of polymorphic microsatellite markers isolated from Dabry's Sturgeon

位点/登录号 Locus/accession no.	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	重复序列 Repeat motif	退火温度 T_m (°C)	个体数 N	等位 基因数 A	片段大小 Size rang (bp)	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	多态信息 含量 PIC	哈迪-温伯格 平衡检验概率值 P_{HW}
AD2/KU558732	F: AAAGCCGGTGAAATAATTGCTT R: TATGTGCAGGGTTTGGGTTTC	(TTCT) ₆	65.0	48	11	181 ~ 225	0.910	0.874	0.861	0.289 4
AD4/KU558733	F: AGCTATGTCAGCAGGGAATG R: GGGACACATCGGACTTCTGT	(TATC) ₆	61.3	48	4	238 ~ 258	0.545	0.583	0.503	0.919 4
AD7/KU558734	F: TGGCAATCAAACCTCAGGGTA R: GCAGCTTCATCTTCCAGGTG	(CTTT) ₇	60.0	48	6	177 ~ 201	0.812	0.775	0.740	0.588 7
AD22/KU558736	F: CCACTATGAAAAGGCGCTACA R: GTACACAACCTTGGGGATGC	(GATT) ₁₁	65.0	48	4	183 ~ 207	0.424	0.566	0.569	0.865 9
AD23/KU558737	F: CCATCGTGTGGCCATTTAGT R: CTCCTCTGGGTATCCTGCAA	(TATC) ₁₂	63.1	48	6	160 ~ 228	0.851	0.786	0.753	0.960 2
AD24/KU976408	F: ACCCCCACTGGACTACATGA R: CACCAGGTCAAGGAGTGT	(TGAT) ₁₁	65.0	48	9	152 ~ 188	1.000	0.843	0.790	0.999 9
AD25/KU558738	F: TCCCGCTAAACCGATTCTGAT R: TTGCTCTGGGAGCTGAAAGTT	(AATT) ₁₀	60.0	48	8	175 ~ 263	0.618	0.642	0.614	0.307 4
AD27/KU558739	F: TTTGGCAAAGTCTGCAGTCAC R: ACAATGGACTGGGTTTCAGC	(CAAA) ₁₀	61.3	48	8	138 ~ 194	0.618	0.668	0.614	0.969 4
AD28/KU558740	F: ATGCAGTGTACCACAAAAT R: TAGGGCCCTCCGTTAGTTTT	(CTAT) ₁₃	60.0	48	8	159 ~ 203	0.875	0.820	0.795	0.960 2
AD29/KU558741	F: GGTGTGCAAAACCCTAAACC R: CGCACACAGACAACACACAG	(TGTC) ₁₀	63.3	48	6	236 ~ 296	0.372	0.573	0.535	0.999 8

续表 1

位点/登录号 Locus/accession no.	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	重复序列 Repeat motif	退火温度 Tm (°C)	个体数 N	等位 基因数 A	片段大小 Size rang (bp)	观测 杂合度 H _o	期望 杂合度 H _e	多态信息 含量 PIC	哈迪-温伯格 平衡检验概率值 P _{HWE}
AD32/KU558743	R: CGTTTCAACAATATCTTCATCAGG F: GGGATGGGGTATTGACATGA R: TGGTCACCTTTTGGCATTACA	(AATT) ₁₀	57.0	48	8	180 ~ 256	0.580	0.658	0.628	0.999 9
AD33/KU558744	F: GTCGGGCTGTGTTGTTTAT R: GCATGGTCTTGCTGTATTTGC	(AGAA) ₁₄	62.0	48	10	182 ~ 242	0.931	0.799	0.771	1.000 0
AD36/KU976409	F: GCGGAAACAGGGAATGTGTA R: GCAATAAAATGAAAAATCAGAAAAA	(AAAAG) ₁₀	58.3	48	5	228 ~ 244	0.917	0.704	0.626	0.999 9
AD37/KU558745	F: TGGTGTGCTGTATGAGACCAA R: GCCGACTCACAACAAACAA	(GATA) ₁₅	60.0	48	9	210 ~ 266	0.733	0.866	0.851	0.287 9
AD42/KU558746	F: AGCACCTCGCTTTTGCTTT R: CCTGTTGAACCTTTCAGTTTCC	(TATG) ₁₂	60.0	48	10	130 ~ 174	0.722	0.875	0.862	1.000 0
AD60/KU976410	F: TGAGGCCAAGCTTTCAGTTT R: GAGGGCACTAGCTTGGATTG	(TTCT) ₁₁	60.0	48	11	180 ~ 240	0.917	0.842	0.867	0.535 4
AD62/KU558747	F: TGGCTTATCCATCTTTTGAGTC R: CAAGAAAGTTCTGCTTGACTGC	(ATCT) ₁₃	55.0	48	5	198 ~ 234	0.691	0.554	0.537	0.952 2
AD66/KU558748	F: CAACTGGCAAGAAAAATTCACA R: CGGATAGGCTCTCGCTTTTT	(CTTT) ₁₂	60.0	48	8	158 ~ 190	0.917	0.812	0.788	0.003 6
AD68/KU558749	F: CAACCTTTAAACTACTGGGCAAT R: GCATGTCGCTACTTTTTCAGG	(TATG) ₁₀	65.0	48	7	172 ~ 220	0.878	0.809	0.781	0.719 3
AD69/KU976411	F: ACACCCCATATCCACAAAG R: GCCTGTGAAACATTGTCTGC	(CTTT) ₁₃	65.0	48	6	200 ~ 232	1.000	0.782	0.743	0.995 5

续表 1

位点/登录号 Locus/accession no.	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	重复序列 Repeat motif	退火温度 Tm (°C)	个体数 N	等位 基因数 A	片段大小 Size rang (bp)	观测 杂合度 H _o	期望 杂合度 H _e	多态信息 含量 PIC	哈迪-温伯格 平衡检验概率值 P _{HWE}
AD70/KU558750	F: CCTGGGATTCCTTAGCTGCTG R: TTCCAAAAATGTACCCCTGAA	(TGAT) ₁₃	58.3	48	6	210~230	0.906	0.800	0.770	0.833 9
AD71/KU558751	F: GCAAAAGTTTCCGCTAGAAG R: GCACTGTGCTGAAAGGACAA	(TATC) ₁₁	61.3	48	7	176~228	0.878	0.798	0.768	0.218 3
AD73/KU558752	F: AGCGTCTCAAAAAGCTCTGCT R: CAATGCTTTTGTGTGTCAGTT	(TATC) ₁₂	63.1	48	7	168~240	0.628	0.632	0.581	0.083 2
AD74/KU558753	F: GCCTTCGAGGCAATTAAACAT R: TTGCTCCCTCTGTACAACC	(ATT) ₁₁	65.0	48	6	166~198	0.160	0.346	0.332	0.999 5

Tm. Annealing temperature; N. Number of samples genotyped; A. Number of alleles; H_o. Observed heterozygosities; H_e. Expected heterozygosities; PIC. Polymorphic information content; P_{HWE}. Probability value by Markov chain method for the Hardy-Weinberg equilibrium.

进一步对达氏鲟基因组微卫星分布规律进行统计分析,以单碱基重复的微卫星丰富度最高,多达 41 024 个,占微卫星总数的 49%;其次是四碱基重复的微卫星为 16 205 个,占微卫星总数的 19.4%;二碱基重复类型为 15 152 个,占微卫星总数的 18.1%;三碱基重复类型占微卫星总数的 10.5%,五碱基和六碱基重复类型占微卫星总数的 3%。由此可见,除单碱基微卫星以外四碱基微卫星丰度最高。

2.2 微卫星位点筛选与多态性评价

本次实验筛选得到的四碱基微卫星序列总数是 228 条,其中四碱基且重复次数超过 6 次的微卫星序列共 189 条,经过筛选后设计出 100 对引物,最后筛选出 25 个多态性位点。实验采用 48 个达氏鲟个体对筛选位点进行检测。在 25 个多态性位点中共检测出 181 个等位基因,每个位点产生的等位基因数 (A) 从 4 至 11 个不等,平均等位基因数为 7.2。观测杂合度 (H_O) 范围是 0.160 ~ 1.000,其平均值为 0.744。期望杂合度 (H_E) 范围是 0.346 ~ 0.875,平均值为 0.727。所有位点均不偏离“Hardy-Weinberg”平衡 ($P > 0.05$)。PIC 值均介于 0.332 ~ 0.867,平均为 0.697。除了位点 AD74 的 PIC 值仅为 0.332,其余位点的 PIC 值均大于 0.5。连锁不平衡检测结果也表明,所有标记对间均不存在连锁不平衡现象。

3 讨论

较短重复单位的微卫星序列(如单碱基、二碱基)扩增时易出现滑带等问题,产生干扰带;而较长重复单位的微卫星序列(如五碱基及以上)扩增时效率相对较低(黄如欣等 2002)。四碱基微卫星在基因分型时效果较好(黄杰等 2012)。此外,本次高通量测序统计结果显示,四碱基重复的微卫星位点所占比例较高。可见,四碱基微卫星在达氏鲟位点筛选中具有优势。

核心部分碱基重复数目的不同是微卫星多态性的基础,微卫星的多态性水平可用多态信

息含量值(PIC)衡量(闵金金等 2013)。PIC 值是等位基因频率和数目变化的函数,能较好地衡量片段的多态性,并反映出某个遗传标记所含的遗传信息容量。根据 Botstein 等(1980)提出的衡量基因变异程度高低的多态信息含量指标可见,本研究中的 25 个微卫星位点的 PIC 值均介于 0.332 ~ 0.867,平均为 0.697,除了位点 AD74 的 PIC 值仅为 0.332,其余位点的 PIC 值均大于 0.5。表明这 25 个微卫星位点均具有多态性,而其中 24 个位点具有高度多态性,能确切地提供遗传信息。然而,目前已报到的位点并未对其 PIC 值进行评估(Zeng et al. 2013, Zhang et al. 2013, Que et al. 2014),这也使达氏鲟在群体遗传研究中受到较大的限制,而本次筛选出的 25 个微卫星位点可弥补这些缺陷。

杂合度是度量群体变异的一个最适参数。平均杂合度的大小可近似反映出群体遗传结构变异程度的高低(罗明等 2012)。本研究得出的期望杂合度 (H_E) 为 0.346 ~ 0.867,平均为 0.696。Que 等(2014)报道的位点中,其平均期望杂合度为 0.609; Zhang 等(2013)报道的位点中,其平均期望杂合度为 0.676,本研究获得的微卫星位点的期望杂合度略高于已报道位点的平均期望杂合度。

目前,达氏鲟野生资源已极为稀少,较少的亲本也容易遭受年龄老化、疾病和意外死亡等威胁。有文献曾对比不同时间段(1958 ~ 1959, 1980 ~ 1981, 1998 ~ 1999)的达氏鲟 DNA 指纹图谱(DNA fingerprinting),发现其群体遗传多样性水平呈下降趋势(Wan et al. 2003)。那么现阶段达氏鲟群体遗传多样性如何?还在继续下降吗?亲代与子代的遗传结构又如何?目前有关达氏鲟亲代与子代微卫星位点的报道甚少,本次实验筛选的位点在达氏鲟 18 个野生个体(宜宾珍稀水陆生动物研究所)和 30 个人工繁殖子代个体(金沙江溪洛渡向家坝水电站珍稀特有鱼类增殖放流站)中扩增效果均较好,是适用于达氏鲟亲代与子代遗传多样性评价的高多态性位点。学者 Zeng 等(2013)共扩增

30 尾个体, Zhang 等 (2013) 共扩增 24 尾个体, Que 等 (2014) 仅扩增 22 尾个体, 均为宜宾珍稀水陆生动物研究所提供的达氏鲟个体。

现如今, 除宜宾珍稀水陆生动物研究所、中华鲟研究所、长江水产研究所储备有少量的野生达氏鲟亲本外, 其余均为人工繁殖饲养的子一代和子二代。为有效保护达氏鲟, 应进一步加强其产卵场等重要栖息地的调查和保护, 并选择部分人工繁殖饲养的性成熟个体放流到天然水域, 以增加其野生资源量及重建野外繁殖种群。此次筛选出的微卫星位点将适用于达氏鲟保护工作中必要的种群遗传多样性分析, 以及放流个体的跟踪监测等工作。

参 考 文 献

- Abbas K, Zhou X, Li Y, et al. 2010. Microsatellite diversity and population genetic structure of yellowcheek, *Elopichthys bambusa* (Cyprinidae) in the Yangtze River. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4): 806–812.
- An H S, Lee J W, Hong S W. 2013. Population genetic structure of the Korean Pacific abalone *Haliotis diversicolor supertexta* inferred from microsatellite marker analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 48(2): 76–84.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3): 314–331.
- Du L M, Li Y Z, Zhang X Y, et al. 2013. MSDB: a user-friendly program for reporting distribution and building databases of microsatellites from genome sequences. *Journal of Heredity*, 104(1): 154–157.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6): 435–445.
- IUCN. 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016.1: *Acipenser dabryanus*. [DB/OL]. [2016-10-20]. <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/231/0>.
- Julier B. 2009. A program to test linkage disequilibrium between loci in autotetraploid species. *Molecular Ecology Resources*, 9(3): 746–768.
- Que Y F, Xu D M, Shao K, et al. 2014. Identification and characterization of seventeen novel microsatellite markers for the tetraploid fish Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*). *Journal of Genetics*, 93(2): 1–4.
- Ritchie H, Jamieson A J, Piernney S B. 2016. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the deep-sea amphipod *Paralicella tenuipes* by Illumina MiSeq sequencing. *Journal of Heredity*, 107:367–371.
- Selkoe K A, Toonen R J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5): 615–629.
- Thrall P H, Young A. 2000. AUTOTET: a program for analysis of autotetraploid genotypic data. *Journal of Heredity*, 91(4): 348–349.
- Wan Q H, Fang S G, Li Y N. 2003. The loss of genetic diversity in Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*, Duméril) as revealed by DNA fingerprinting. *Aquatic Conservation Marine & Freshwater Ecosystems*, 13(3): 225–231.
- Wei Q W, Ke F E, Zhang J M, et al. 1997. Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China. *Environmental Biology of Fishes*, 48(1): 241–255.
- Witzenberger K A, Hochkirch A. 2011. Ex situ conservation genetics: A review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity and Conservation*, 20(9): 1843–1861.
- Zeng Q, Ye H, Ludwig A, et al. 2013. Microsatellite development for the endangered Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus* Duméril, 1896) using 454 sequencing. *Journal of Applied Ichthyology*, 29(6): 427–514.
- Zhang S H, Luo H, Du H, et al. 2013. Isolation and characterization of twenty-six microsatellite loci for the tetraploid fish Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*). *Conservation Genetics Resources*, 5(2): 409–412.
- Zhuang P, Ke F, Wei Q, et al. 1997. Biology and life history of Dabry's sturgeon, *Acipenser dabryanus*, in the Yangtze River. *Environmental Biology of Fishes*, 48(1): 257–264.
- Zhu D, Chang J. 2008. Annual variations of biotic integrity in the upper Yangtze River using an adapted index of biotic integrity (IBI). *Ecological Indicators*, 8(5): 564–572.

- Zhu Y, Stephens R M, Meltzer P S, et al. 2013. SRADB: query and use public next-generation sequencing data from within R. *BMC Bioinformatics*, 14(2): 1-4.
- 丁瑞华. 1994. 四川鱼类志. 成都: 四川科技出版社.
- 黄杰, 杜联明, 李玉芝, 等. 2012. 红原鸡全基因组中微卫星分布规律研究. *四川动物*, 31(3): 358-363.
- 黄如欣, 游攀, 周娟娟. 2002. 福建汉族群体 15 个 STR 基因座频率分布. *中国法医学杂志*, 17(4): 235-236.
- 罗明, 白志毅, 李应森, 等. 2011. 三角帆蚌微卫星位点筛选及多态性分析. *淡水渔业*, 42(1): 80-84.
- 闵学金, 张加勇, 郑荣泉, 等. 2013. 跨种扩增筛选大鳄龟微卫星标记及遗传多样性分析. *动物学杂志*, 48(6): 926-932.
- 岳桂东, 高强, 罗龙海, 等. 2012. 高通量测序技术在动植物研究领域中的应用. *中国科学: 生命科学*, 42(2): 107-124.
- 张小芳, 杨淑慧, 马跃, 等. 2012. 微卫星复杂结构对分型的影响: 以熊 UamD116 和 UamB1 为例. *现代生物医学进展*, 12(20): 3812-3816.