

基于转录组数据高通量发掘沙葱萤叶甲微卫星引物*

张鹏飞^{1**} 周晓榕¹ 庞保平^{1***} 谭瑶¹ 常静¹ 高利军²

(1. 内蒙古农业大学草原昆虫研究中心, 呼和浩特 010019; 2. 锡林浩特市草原工作站, 锡林浩特 026000)

摘要 【目的】沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* (Joannis) 是近年来在内蒙古草原上猖獗发生为害的一种新害虫。本研究从其高通量转录组数据中查找微卫星序列, 并进行微卫星位点的信息分析和微卫星引物的发掘, 将为进一步研究沙葱萤叶甲遗传多样性及遗传分化奠定必要的基础。【方法】应用软件 MISA 对沙葱萤叶甲转录组中 72 352 条 unigenes 的数据进行搜索。【结果】共找到 3 880 个微卫星位点, 分布于 3 277 条 unigenes 中, 其主要重复类型为单核苷酸重复 (80.85%), 其次为三核苷酸重复 (11.08%), 再次为二核苷酸重复 (7.37%)。单核苷酸重复中主要是 A/T 基序, 占总量的 77.76%。从 1 814 条 unigenes 中成功设计出 2 160 对引物, 从中随机选取 10 对引物对沙葱萤叶甲 DNA 进行扩增, 结果全部扩增出目的 DNA 片段。【结论】利用沙葱萤叶甲转录组数据开发微卫星引物是可行的, 本研究开发的微卫星引物为研究沙葱萤叶甲种群遗传学和功能基因组学奠定了必要的基础。

关键词 沙葱萤叶甲, 微卫星, 高通量测序, 转录组

High-throughput discovery of microsatellite markers in *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) from a transcriptome database

ZHANG Peng-Fei^{1**} ZHOU Xiao-Rong¹ PANG Bao-Ping^{1***} TAN Yao¹
CHANG Jing¹ GAO Li-Jun²

(1. Research Center for Grassland Entomology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China;

2. Xilinhaote Grassland Station, Xilinhaote 026000, China)

Abstract 【Objectives】*Galeruca daurica* (Joannis) is a new pest which has had a serious impact on Inner Mongolian grasslands in recent years. We investigated microsatellite sequences from its high-throughput transcriptome database, analyzed microsatellite loci information, and developed microsatellite primers in order to make an essential foundation for further study of the genetic diversity and differentiation of *G. daurica* populations. 【Methods】We used the software MISA to search for microsatellite sequences among 72 352 unigenes of the *G. daurica* transcriptome database. 【Results】3 880 microsatellite loci distributed in 3 277 unigenes were identified. The main repeat types were mono-nucleotide repeats (80.85%), followed by tri-nucleotide repeats (11.08%) and finally bi-nucleotide repeats (7.37%). The A/T motif was the most abundant (77.75%) in mono-nucleotide repeats. Based on identified microsatellite sequences, 2 160 pairs of primers were designed from 1 814 unigenes, 10 pairs of which were randomly selected and used to amplify the *G. daurica* DNA. All 10 pairs of primers could amplify the target DNA fragments. 【Conclusion】It is feasible to develop microsatellite primers from the *G. daurica* transcriptome. The primers developed here provide an essential foundation for studying the population genetics and functional genomics of *G. daurica*.

Key words *Galeruca daurica*, microsatellite, high-throughput sequencing, transcriptome

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31360441)

**第一作者 First author, E-mail: 296308147@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: pangbp@imau.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-01-11, 接受日期 Accepted: 2016-02-17

微卫星 (Microsatellite) 是由 1~6 个核苷酸碱基串联重复而形成的序列, 又称简单重复序列 (Simple sequence repeats, SSR), 广泛存在于真核生物的核基因组中 (Jarne and Lagoda, 1996), 它们最早被发现在植物叶绿体和线粒体的基因组中 (Powell *et al.*, 1995; Provan *et al.*, 1996; Whitton *et al.*, 1997; Procaccini and Mazzella, 1998)。SSR 作为分子标记具有多态性高、呈共显性、数量多、实验操作容易等优点, 是资源保护、遗传育种、系统发生和群体遗传学研究的有力工具, 在人类医学、动物、植物及微生物等领域得到了广泛的应用。虽然微卫星作为分子标记具有很多优点, 但是传统的微卫星引物开发方法费时费力, 成功几率较小 (Roder *et al.*, 1998; Ujino *et al.*, 1998; Uzunova and Ecke, 1999), 而利用富集技术筛选 SSR 引物, 需要构建筛选基因文库, 操作过程繁琐, 因此一直制约着微卫星在研究中的应用 (李齐发等, 2004)。随着新一代高通量测序技术的发展, 基于高通量转录组数据发掘微卫星引物应运而生, 极大地提高了微卫星开发的效率, 目前通过此方法已开发出多种重要害虫的微卫星引物 (朱家颖等, 2013; 罗梅等, 2014; 魏丹丹等, 2014)。

沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica* (Joannis) 是近年来严重危害内蒙古草原百合科葱属植物的一种草原害虫。该虫于 2009 年在内蒙古锡林郭勒盟草原上突然大面积暴发成灾 (杨星科等, 2010), 到 2014 年已迅速扩大到呼伦贝尔市、锡林郭勒盟、乌兰察布市、巴彦淖尔市、阿拉善盟及鄂尔多斯市等 6 个盟市的 16 个旗县 (内蒙古草原工作站内部资料)。目前有关沙葱萤叶甲的研究较少, 主要集中于发生为害情况 (马崇勇等, 2012)、寄主植物选择性 (吴翔等, 2014)、抗寒性 (李浩等, 2014, 2015; 高靖淳等, 2015) 以及药剂筛选 (常静等, 2015)。本研究基于高通量测序技术获得的沙葱萤叶甲转录组数据, 应用生物信息学相关软件进行大规模的 SSR 位点发掘, 并设计对应的引物, 以期对沙葱萤叶甲的群体遗传学分析提供必要的基础。

1 材料与方法

1.1 试虫来源及 DNA 提取

本试验用于验证 SSR 引物的沙葱萤叶甲 2014 年 5 月 19 日采自锡林浩特市阿尔善苏木, 活虫带回实验室后, 冲洗晾干后, 用无水乙醇浸泡, -80°C 保存备用。取单头沙葱萤叶甲用液氮研磨后, 移入 1.5 mL 离心管中, 使用天根 dp304 动物基因组 DNA 提取试剂盒, 对单头沙葱萤叶甲样本提取基因组 DNA, 提取的 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, -20°C 保存备用。

1.2 转录组数据

沙葱萤叶甲转录组数据为委托北京百迈客生物科技有限公司对沙葱萤叶甲个体采用第 2 代高通量测序技术获得的 72 352 条 unigenes。

1.3 SSR 鉴定

运用软件 MISA (Micro satellite identification tool, www.pgrc.ipk-gatersleben.de/misa) 从沙葱萤叶甲的 72 352 条 unigenes 中查找 SSR 位点。查找标准: 重复单元长度设为 1, 2, 3, 4, 5 和 6 bp, 最小重复次数分别为 12, 6, 5, 5, 4 和 4, 且 SSR 位点侧翼序列长度 ≥ 100 bp。

1.4 SSR 引物设计与验证

基于筛选的 SSRs, 运用 Primer 3 软件 (Untergrasser *et al.*, 2012) 进行引物的批量设计。目标扩增片段设置为必须包含 SSR 起始 - 3 bp, 终止 +6 bp, 扩增片段大小为 80~300 bp。引物的长度设置为 18~25 bp, 最适长度为 22 bp, 引物最大允许有一个不能识别的碱基; 引物的退火温度 (T_m) 设置为 $55\sim 65^{\circ}\text{C}$, 最适 T_m 为 60°C , 上下游引物间的 T_m 差异最大允许 3°C , 引物末端稳定性最大为 250。

为了验证所设计的引物能否稳定扩增, 从批量设计出的引物中随机挑选 10 对引物进行验证, 引物由北京六合华大基因科技有限公司进行合成。PCR 反应体系为 20 μL : 沙葱萤叶甲 DNA 模板 1 μL , $10\times\text{PCR Buffer (Mg}^{2+}\text{Free)}$ 2.0 μL ,

MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μL, dNTPs Mixture (各 2.5 mmol/L) 1.6 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.8 μL, TaKaRa *Taq* 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL (大连宝生物工程有限公司), 超纯水补足至 20 μL。反应程序 (BIO-RAD PCR 仪): 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 沙葱萤叶甲转录组中 SSR 位点的分布特点

利用软件 MISA 对沙葱萤叶甲转录组中 72 352 条 unigenes 的数据进行搜索, 共找到 3 880 个 SSR 位点, 分布在 3 277 条 unigenes 中, 发生频率(含有 SSR 的 unigene 数量与总 unigene 数量之比)为 4.53%。其中 2 790 条 unigenes 序列只含有 1 个 SSR 位点, 含 2 个及以上 SSR 位点的 unigene 序列有 487 条, 以复合型形式存在的 SSR 序列数目为 128 条, SSR 的分布频率(SSR 个数与总 unigene 数量比)为 5.36%。这些 SSR 基序包含 1~5 bp 的串联重复序列。

在沙葱萤叶甲转录组数据中, SSR 基序的重复类型占 SSR 总数最多的是单核苷酸重复, 占 80.85%; 其次是三核苷酸重复, 占 SSR 总数的

11.08%; 再次是二核苷酸重复, 占 SSR 总数的 7.37%; 四核苷酸和五核苷酸重复的含量很少, 分别占 SSR 总数的 0.67% 和 0.03% (表 1)。沙葱萤叶甲转录组 SSR 重复单元的重复次数分布在 5~24 次之间。单核苷酸重复次数分布在 10~24 次之间, 二核苷酸重复次数分布在 6~12 次之间, 三核苷酸重复次数分布在 5~10 次之间, 四核苷酸重复次数分布在 5~7 次之间, 五核苷酸重复只有 1 个(重复 5 次), 其中重复次数最多的为 10 次, 占 39.05%。

从不同 SSR 基序出现频率来看(表 2), 单核苷酸重复中主要是 A/T 基序, 占总量的 77.76%; C/G 基序占 3.09%; 其它基序百分比超过 1% 的只有 AC/GT, AG/CT, AT/AT, AAG/CTT, AAT/ATT 和 ATC/ATG, 其比例分别为 2.06%, 1.93%, 3.30%, 2.35%, 4.20% 和 1.91%。二核苷酸中 CG/CG 基序最少, 占二核苷酸 SSR 总数的 1.05%。SSR 基序长度因核苷酸类型的不同而互异, 最长的为 30 bp 的三核苷酸 AAT/ATT, 最短的为 10 bp 的单核苷酸。

2.2 沙葱萤叶甲 SSR 引物设计

基于筛选的 SSRs, 运用 Primer 3 软件进行引物的批量设计, 按照已设置好的参数, 共有

表 1 基于重复单元数目中 SSRs 在沙葱萤叶甲转录组中的出现频率
Table 1 Frequency of SSRs based on the number of repeat units in *Galeruca daurica* transcriptome

重复类型 Repeat type	重复数 Number of repeats												合计 Total	百分比 Percentage
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	>15		
单核苷酸 Mononucleotide	—	—	—	—	—	1 489	300	141	76	74	102	955	3 137	80.85
二核苷酸 Dinucleotide	—	136	56	22	12	25	32	3	—	—	—	—	286	7.37
三核苷酸 Trinucleotide	306	84	31	6	2	1	—	—	—	—	—	—	430	11.08
四核苷酸 Tetranucleotide	22	3	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26	0.67
五核苷酸 Pentanucleotide	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0.03
总计 Total	329	223	88	28	14	1 515	332	144	76	74	102	955	3 880	—
百分比 Percentage	8.48	5.75	2.27	0.72	0.36	39.05	8.56	3.71	1.96	1.91	2.63	24.61	—	—

表 2 基于基序类型中 SSRs 在沙葱萤叶甲转录组中的出现频率
Table 2 Frequency distribution of SSRs based on motif types in *Galeruca daurica* transcriptome

SSR 基序 SSR motif	重复数 Number of repeats													合计 Total	百分比 Percentage
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	> 15			
A/T	—	—	—	—	—	1 438	271	124	72	69	98	945	3 017	77.76	
C/G	—	—	—	—	—	51	29	17	4	5	4	10	120	3.09	
AC/GT	—	30	16	8	6	7	12	1	—	—	—	—	80	2.06	
AG/CT	—	27	18	6	2	8	12	2	—	—	—	—	75	1.93	
AT/AT	—	76	22	8	4	10	8	—	—	—	—	—	128	3.30	
CG/CG	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	0.08	
AAC/GTT	27	5	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	36	0.93	
AAG/CTT	72	15	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	91	2.35	
AAT/ATT	112	32	16	2	—	1	—	—	—	—	—	—	163	4.20	
ACC/GGT	11	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13	0.34	
ACT/AGT	16	7	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24	0.62	
AGC/CTG	10	3	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	14	0.36	
AGG/CCT	7	—	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	10	0.26	
ATC/ATG	46	21	4	3	—	—	—	—	—	—	—	—	74	1.91	
CCG/CGG	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	0.13	
AAAG/CTTT	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0.03	
AAAT/ATTT	14	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17	0.44	
AGAT/ATCT	5	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6	0.15	
AACC/TTGG	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0.03	
GCTG/CGAC	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0.03	
ATGGT/TACCA	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0.03	

1 814 个 unigenes 成功设计引物,共设计出 2 160 对引物。随机挑选 10 对引物对沙葱萤叶甲 DNA 进行扩增(表 3),结果显示,10 对引物全部扩增成功,并且与预期目的片段大小基本一致(图 1)。本研究成功扩增了随机挑选的 10 对沙葱萤叶甲 SSR 引物,是对基于转录组数据高通量发掘微卫星的肯定,其多态性的高低有待于进一步的试验评估。

3 讨论

本研究通过生物信息学的方法,从沙葱萤叶甲转录组数据库中发现大量的微卫星,且种类较为丰富,以单核苷酸重复类型为主,其次为三核苷酸重复。这与许多昆虫从转录组中发掘的 SSR

研究结果一致,如黄粉虫 *Tenebrio molitor*(朱家颖等,2013)和扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis*(罗梅等,2014)。在 ESTs 里,大多数情况下,除了单核苷酸重复以外,最多的是三核苷酸重复(Xu *et al.*, 2012)。从本研究 and 以往的研究可以看出,在昆虫里,三核苷酸重复是 EST-SSR 中优势的核心重复类型。这是因为在编码区,三核苷酸核心基元较其它重复基元类型更加稳定,极少产生编码框滑动突变现象(Wang *et al.*, 2012)。本研究中 GC/CG 核心基元含量仅为 3 个,这与褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(刘玉娣和侯茂林,2010)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*(张琳琳等,2008)及桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*(魏丹丹等,2014)的研究结果相似。对以往的文献分析发现,

表 3 SSR 引物的特征
Table 3 Characterization of selected SSR primers

编号 No.	unigene ID	引物序列 Primer sequence	产物大小 (bp) Product size	基序和重复数 Motif and repeat number	PCR 扩增 PCR amplification
1	13895	F:TTATCCCTTTTGAGAGGGGC R:AATGGCAACAAAAAGGATCG	186	(TCA)5	S
2	34555	F:AAGTCAAGCACAATGGCTCC R:CCTTCCTTCAACCATAAACCA	191	(TAT)6	S
3	17915	F:TGGCAATACAGCGAAAAATG R:TGGTGCTTTATGGGTAAAGCC	109	(A)10	S
4	44579	F:AATCCTCAAGAGTGCCAAGG R:TAGGCTGGTAGTTCTGGCGT	227	(T)12	S
5	45381	F:ACCGTTACAGGCGTAGGTTG R:AGTCCAGAGGCAGACCAAGA	171	(CT)8	S
6	47935	F:AAAACCTCCAGGAAGTGGCCT R:CGGCAATGCAGAGTCAACTA	263	(TGC)5	S
7	48192	F:GCCCTAATTGTGATCGTGCT R:TTGTTCAGCTGTTCCCAAT	185	(TGA)5	S
8	51033	F:GGGCCGATTTATTGTCTGATT R:GGCTGCAAAAGCTACTCCTG	200	(TATT)5	S
9	53170	F:TCGGTTAGCTTTTCCACAC R:CGGTAACGCGTTTGAAGATA	165	(TCA)5	S
10	73889	F:TGGCTCCTTAAAGAATAGTGCAG R:TTCTGATAGGGACGGGTTTG	135	(AC)7	S

S: 成功扩增 Successful amplification.

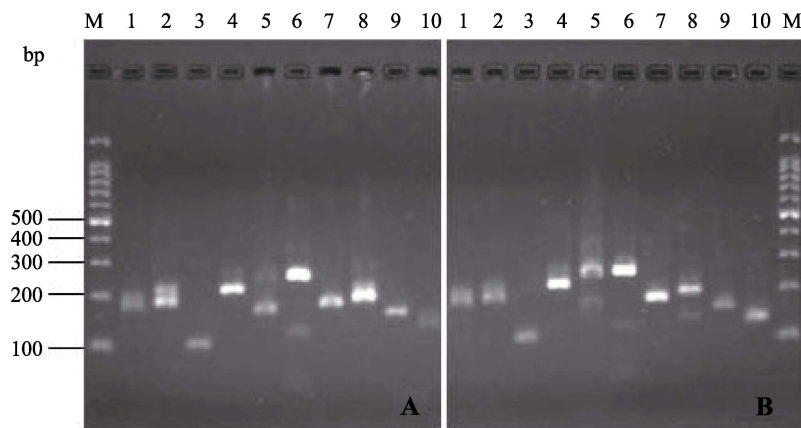


图 1 沙葱萤叶甲转录组 10 个微卫星位点扩增电泳图

Fig. 1 Agarose gel showing the amplification of 10 SSR loci in *Galeruca daurica* transcriptome

A 和 B 为两个沙葱萤叶甲个体重复。M: DNA 分子量标准物; 1~10: 引物 1-10.

The individual repeat of two *Galeruca daurica* are showed in figure A and B.

M: DNA molecular weight marker; 1-10: Primer 1-10.

在动物和植物的转录组或基因组中,二碱基重复的 SSR 中 GC/CG 是非常稀有的重复单元,数量几乎接近于零。

为验证 SSR 的可利用性,本研究从筛选并设计出的 2 160 对引物中随机挑选 10 对,结果全部都稳定扩增。目前虽然无法确定它们的多态性高低,但说明可用于多态性检测和分析的 SSR 位点数量相当可观。本研究随机挑选的 10 对引

物均稳定扩增出了与预期片段长度一致的产物,而在扶桑绵粉蚧(罗梅等,2014)和桔小实蝇(魏丹丹等,2014)的研究中,出现了与预期产物片段长度大小不符的情况。这是因为 SSR 的 PCR 扩增成功率会受到 SSR 在基因中位置的影响(Saha *et al.*, 2004)。由于发掘微卫星的 cDNA 序列缺少内含子,当内含子插入扩增片段中间时,扩增产物就会大于预期片段长度;当内含子

插入引物中间时,就不能扩增出预期片段。本研究中的 2 160 对引物也可能存在扩增出与预期产物长度大小不符的引物。

在阐明种群遗传结构以及研究种群扩散和迁移方面,微卫星发挥着巨大的作用。但是对于非模式生物,微卫星应用的前提是引物的开发,传统的方法开发成本高,费时又费力。基于转录组数据高通量发掘微卫星引物的应用,极大的推动了微卫星的开发。该方法直接从转录组数据中发掘微卫星并设计引物,高通量测序技术的出现,大大降低了开发成本,并在多种非模式生物中成功应用。

本研究利用沙葱萤叶甲转录组数据库,共筛选出 3 880 个 SSR 位点,并对其数量分布、相关特性及可用性进行了阐述。这些微卫星的获得,为今后开发高多态性的微卫星引物来研究沙葱萤叶甲种群遗传多样性、种群遗传结构、功能基因组学等奠定了必要的基础。沙葱萤叶甲是一种非模式生物,本研究进一步说明从高通量转录组数据中筛选 SSR 是发掘非模式生物 SSR 的一种快速、经济、有效的方法。

参考文献 (References)

- Chang J, Zhou XR, Li HP, Pang BP, 2015. Synergistic effects of *Metarhizium anisopliae* mixed with three pesticides against *Galeruca daurica*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 17(1): 54–59. [常静, 周晓榕, 李海平, 庞保平, 2015. 绿降菌与 3 种杀虫剂混用对沙葱萤叶甲的协同作用. 农药学报, 17(1): 54–59.]
- Gao JC, Zhou XR, Pang BP, Bao X, Luo JP, Erdengqimuge, 2015. Effects of low temperature on the survivorship and development of overwintering eggs of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(8): 881–886. [高靖淳, 周晓榕, 庞保平, 包祥, 罗建平, 额尔登其木格, 2015. 低温对沙葱萤叶甲越冬卵存活和发育的影响. 昆虫学报, 58(8): 881–886.]
- Hao X, Zhou XR, Pang BP, Zhang ZR, Ma CY, 2014. Effects of host plants on feeding amount, growth and development of *Galeruca daurica* (Joannis) larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Agrestia Sinica*, 22(4): 854–858. [昊翔, 周晓榕, 庞保平, 张卓然, 马崇勇, 2014. 寄主植物对沙葱萤叶甲幼虫生长发育及取食的影响. 草地学报, 22(4): 854–858.]
- Jarne P, Lagoda PJL, 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11(10): 424–429.
- Li H, Zhou XR, Pang BP, Chang J, 2014. Supercooling capacity and cold hardiness of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(2): 212–217. [李浩, 周晓榕, 庞保平, 常静, 2014. 沙葱萤叶甲的过冷却能力与抗寒性. 昆虫学报, 57(2): 212–217.]
- Li H, Zhou XR, Pang BP, Zhang ZR, Chang J, Shan YM, 2015. Effects of low temperature stress on the supercooling capacity and development of *Galeruca daurica* (Joannis) larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(2): 434–439. [李浩, 周晓榕, 庞保平, 张卓然, 常静, 单艳敏, 2015. 低温胁迫对沙葱萤叶甲幼虫过冷却能力及生长发育的影响. 应用昆虫学报, 52(2): 434–439.]
- Li QF, Zhao XB, Luo XL, Yao P, Li N, Tian ZH, Wu CX, Xie Z, 2004. Construction and identification on enriched microsatellite library from yak genome. *Acta Genetica Sinica*, 31(5): 489–494. [李齐发, 赵兴波, 罗晓林, 姚平, 李宁, 田志华, 吴常信, 谢庄, 2004. 牦牛基因组微卫星富集文库的构建与分析. 遗传学报, 31(5): 489–494.]
- Liu YD, Hou ML, 2010. Analysis of microsatellite information in EST resource of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(3): 239–247. [刘玉娣, 侯茂林, 2010. 褐飞虱 EST 资源的微卫星信息分析. 昆虫学报, 53(3): 239–247.]
- Luo M, Zhang H, Bin SY, Lin JT, 2014. High-throughput discovery of SSR genetic markers in the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae), from its transcriptome database. *Acta Entomologica Sinica*, 57(4): 395–400. [罗梅, 张鹤, 宾淑英, 林进添, 2014. 基于转录组数据高通量发掘扶桑绵粉蚧微卫星引物. 昆虫学报, 57(4): 395–400.]
- Ma CY, Wei J, Li HS, Cao Y, 2012. Preliminary studies on leaf beetle, *Galeruca daurica* on grassland. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(3): 766–769. [马崇勇, 伟军, 李海山, 草原, 2012. 草原新害虫沙葱萤叶甲的初步研究. 应用昆虫学报, 49(3): 766–769.]
- Powell W, Morgante M, Andre C, Mcnicol JW, Machray GC, Doyle JJ, Tingey SV, Rafalski JA, 1995. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology*, 5(9): 1023–1029.
- Procaccini G, Mazzella L, 1998. Population genetic structure and gene flow in the seagrass *Posidonia oceanica* assessed using microsatellite analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 169(1): 133–141.
- Provan J, Corbett G, Waugh R, Mcnicol JW, Morgante M, Powell

- W, 1996. DNA fingerprints of rice (*Oryza sativa*) obtained from hypervariable chloroplast simple sequence repeats. *Biological Sciences*, 263(1375): 1275–1281.
- Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW, 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149(4): 2007–2023.
- Saha MC, Mian MAR, Eujay I, Zwonitzer JC, Wang L, May GD, 2004. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(4): 783–791.
- Ujino T, Kawahara T, Tsumura Y, Nagamitsu T, Yoshimaru H, Ratnam W, 1998. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity*, 81(4): 422–428.
- Untergrasser A, Couteutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG, 2012. Primer 3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15): e115.
- Uzunova MI, Ecker W, 1999. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding*, 118: 323–326.
- Wang B, Ekblom R, Castoe TA, Jones EP, Kozma R, Rudloff EB, Pollock DD, Hoglund J, 2012. Transcriptome sequencing of black grouse (*Tetrao tetrix*) for immune gene discovery and microsatellite development. *Open Biology*, 2(4): 120054.
- Wei DD, Shi JX, Zhang XX, Chen SC, Wei D, Wang JJ, 2014. Analysis of microsatellite loci from *Bactrocera dorsalis* based on transcriptome dataset. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 25(6): 1799–1805. [魏丹丹, 石俊霞, 张夏瑄, 陈世春, 魏冬, 王进军, 2014. 基于转录组数据的桔小实蝇微卫星位点信息分析. 应用生态学报, 25(6): 1799–1805.]
- Whitton J, Rieseberg LH, Ungerer MC, 1997. Microsatellite loci are not conserved across the asteraceae. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 204–209.
- Xu Y, Zhou W, Zhou Y, Wu J, Zhou X, 2012. Transcriptome and comparative gene expression analysis of *sogatella furcraea* (Horvath) in response to southern rive black-streaked dwarf virus. *PLoS ONE*, 7(4): e36238.
- Yang XK, Huang DC, Ge SQ, Bai M, Zhang RZ, 2010. One million mu of meadow in Inner Mongolia suffer from the harm of breaking out of *Galeruca daurica* (Joannis). *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(4): 812. [杨星科, 黄顶成, 葛斯琴, 白明, 张润志, 2010. 内蒙古百万亩草场遭受沙葱萤叶甲暴发危害. 昆虫知识, 47(4): 812.]
- Zhang LL, Wei ZM, Lian ZM, Kong GY, 2008. Abundance of microsatellites in the entire genome and EST of *Tribolium castaneum*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(1): 38–42. [张琳琳, 魏朝明, 廉振民, 孔光耀, 2008. 赤拟谷盗全基因组和 EST 中微卫星的丰度. 昆虫知识, 45(1): 38–42.]
- Zhu JY, Wu GX, Yang B, 2013. High-throughput discovery of SSR genetic markers in the yellow mealworm beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), from its transcriptome database. *Acta Entomologica Sinica*, 56(7): 724–728. [朱家颖, 吴国星, 杨斌, 2013. 基于转录组数据高通量发掘黄粉甲微卫星引物. 昆虫学报, 56(7): 724–728.]