

团头鲂 EST-SSR 在厚颌鲂中的跨种扩增及 杂交 F_1 的鉴定

易少奎¹, 高泽霞^{1,2}, 罗伟¹, 段晓克¹, 李艳和¹, 王卫民^{1*}

(1. 华中农业大学水产学院, 农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室,

农业部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070;

2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为了研究团头鲂微卫星引物在厚颌鲂中跨种扩增的适用性, 并进行其杂交 F_1 的鉴定, 实验筛查了 90 个团头鲂 EST-SSR 位点在厚颌鲂中的扩增效果, 同时选取了 26 对团头鲂与厚颌鲂微卫星引物对团头鲂自交子代、厚颌鲂自交子代及其正交和反交杂交 F_1 共 4 个组合进行鉴定。结果显示, 团头鲂 90 个微卫星位点中有 76 个 (84.4%) 在厚颌鲂中能够稳定扩增, 随机选取 50 个位点在厚颌鲂 30 尾野生个体中扩增获得了 13 个多态性微卫星位点, 平均等位基因数为 3.2, 平均观测杂合度为 0.72, 平均多态信息含量为 0.42。通过 10 对团头鲂 EST-SSR 与 16 对厚颌鲂 SSR 引物在 4 个组合中扩增后发现, 4 个位点 (MP01, MP03, MP24 和 MP26) 在团头鲂自交子代中无扩增产物, 2 个位点 (MA163 和 MA189) 在厚颌鲂自交子代中无扩增产物, 其余 20 个位点均能在 4 个组合中稳定扩增, 其中 9 个位点可单独有效鉴定出团头鲂自交子代、厚颌鲂自交子代及包括正交和反交在内的杂交 F_1 , 其余位点可以通过组合鉴定出杂交 F_1 。杂交 F_1 中正交组合和反交组合无法通过本实验中的微卫星鉴别。

关键词: 团头鲂; 厚颌鲂; 杂交子代; 微卫星

中图分类号: Q 321⁺.2; S 917.4

文献标志码: A

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 与厚颌鲂 (*Megalobrama pellegrini*) 均隶属于鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae)、鲃亚科 (Culterinae)、鲂属 (*Megalobrama*)。团头鲂为我国特有的淡水经济鱼类, 由于其具有养殖成本低、生长快、成活率高、易捕捞, 肉质好等优点, 早在 20 世纪 60 年代就作为优良的草食性鱼类在全国推广, 成为池塘养殖的主要品种之一^[1]。厚颌鲂曾一度被当作三角鲂 (*Megalobrama tarminalis*) 的同种异名, 罗云林^[2]首次对厚颌鲂进行了性状差异分析, 确定为有效种。厚颌鲂分布仅限于长江上游地区,

为四川 3 种有鳞名贵鱼 (岩原鲤、厚颌鲂和中华倒刺鲃) 之一, 其肉质细嫩味道鲜美, 具有较高的营养价值^[3]。

微卫星 (microsatellite) 标记作为一种共显性标记, 具有分布广、遗传信息含量高、便于 PCR 检测、在相近种之间扩增相对保守等优点^[4], 因此是水生动物种质鉴定、亲缘关系及种质分类等研究的理想标记^[5-7]。目前, 国内外关于厚颌鲂微卫星标记的报道还较少^[8], 未见通过近缘种中跨种扩增获得厚颌鲂微卫星标记的研究报道。实验基于实验室团头鲂 EST 数据库, 探讨了团头鲂 EST-SSR 标记在厚

收稿日期: 2012-10-11 修回日期: 2013-03-28

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46-05); 国家自然科学基金项目 (31201988); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2011PY023, 2011SC27, 2011ZC011, 2012YB08)

通信作者: 王卫民, E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn

颌鲂中的跨种扩增适用性,开发出的厚颌鲂 SSR 标记可用于其遗传多样性分析、亲缘关系鉴定等方面的研究。

随着水产养殖业的快速发展,杂交育种是水生经济动物遗传育种中最重要的手段之一,通过杂交育种可达到促进生长、性别控制、培育不育后代、提高抗性为目的^[9]。目前,国内外学者对团头鲂与三角鲂、广东鲂等杂交育种的研究较多^[10-13],但未见团头鲂与厚颌鲂杂交研究的报道。由于团头鲂与厚颌鲂许多形态特征重叠,其杂交子代与亲本形态相似,难以区分。因此,急需一种快速、准确地鉴别不同种的方法,而选择合适的分子标记是从遗传学角度进行鉴定的前提和保证。实验采用微卫星分子标记技术,期望筛选到可以区分双亲本自交子代及其杂交 F_1 的特异微卫星标记,建立快速、准确鉴别不同品种和种质纯度检测的方法,为鲂属鱼类的种质鉴定、种质保护和选择育种等研究积累数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验中团头鲂与厚颌鲂亲本均取于湖北省鄂州市国家级团头鲂良种场,其中厚颌鲂亲本于 2011 年 11 月从四川省泸州市龙溪河采集。2012 年 6 月挑选性腺发育好的团头鲂与厚颌鲂亲本,分为 4 个组合:团头鲂(4 ♀) × 团头鲂(3 ♂)、团头鲂(4 ♀) × 厚颌鲂(3 ♂)、厚颌鲂(3 ♀) × 团头鲂(4 ♂)、厚颌鲂(3 ♀) × 厚颌鲂(3 ♂)。腹腔注射促黄体释放激素 A_2 (LHR- A_2) 和地欧酮(DOM)进行人工催产,采用干法人工受精,黄泥脱粘后置于直径 2.0 m、水深约 0.6 m 的塑料缸中充气孵化。自交与杂交子代在 2 月龄时,各取 30 尾子代的尾鳍固定于 95% 的乙醇中。

1.2 自交及杂交子代基因组 DNA 提取

实验中采用高盐法提取基因组 DNA,具体步骤参考 Li 等^[14]。

1.3 微卫星引物设计与优化

实验中采用的 90 对团头鲂 EST-SSR 引物来源于实验室通过团头鲂转录组 Roche 454 高通量测序获得的 EST 数据库^[15],利用 SSR

Hunter 软件进行微卫星位点检索获得,从获得的微卫星序列中,选取重复次数在 5 次以上的重复序列,使用引物设计软件 Primer Premier 5.0 进行微卫星引物的设计,由上海生工生物技术公司合成引物。所采用的 16 对厚颌鲂引物来源于 Wang 等^[8]通过 Roche 454 高通量测序而获得的微卫星引物,用于杂交子代的鉴定。每一对引物通过温度梯度 PCR 后经 1% 琼脂糖检测,筛选出最合适的退火温度。用所选取的 90 对团头鲂微卫星引物先分别对团头鲂和厚颌鲂的混合 DNA(每种 10 个个体)进行扩增,扩增产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳,筛选出能够扩增出清晰条带的引物。

1.4 PCR 扩增与电泳分析

团头鲂 EST-SSR 标记在厚颌鲂中的扩增

根据 90 对团头鲂 EST-SSR 引物初步筛选结果,选取 50 对在琼脂糖凝胶电泳上有清晰扩增条带的团头鲂 EST-SSR 引物,分别在 30 尾野生群体厚颌鲂的 DNA 进行扩增,PCR 反应体系为 10 μ L,包括:1 μ L 10 × PCR Buffer,0.2 μ L dNTP,0.25 μ L 上下游引物,0.1 μ L Taq 酶,0.5 μ L 模板,加 ddH₂O 补足体系。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,退火温度 50 ~ 62 °C 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测,电泳缓冲液为 0.5 × TBE,电压 160 V,电泳 1.5 h,0.1% AgNO₃ 银染后显色,凝胶成像系统拍照。

团头鲂与厚颌鲂 4 个组合子代的鉴定 选取筛选出的 10 对团头鲂 EST-SSR 引物与 16 对厚颌鲂 SSR 引物(表 1),分别对团头鲂自交子代、厚颌鲂自交子代及杂交子代的 DNA 进行扩增,扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

1.5 数据统计与分析

根据电泳结果显示的条带,以 Marker PUC18 DNA/Msp I 为参照,按照电泳条带所对应的分子量大小,统计所选微卫星引物不同等位基因的分子量大小及数目。利用 POPGENE v3.4 软件统计有效等位基因数(A)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e),使用 Little Program 软件计算多态信息含量(PI_C)^[16]。

表 1 26 对微卫星引物的基本信息
Tab.1 Primer sequences of 26 microsatellite loci selected in this study

位点 locus	重复序列 repeat type	上游引物(5'-3') forward primer	下游引物(5'-3') reverse primer	退火温度/°C annealing temperature
MP01	(CT) ₁₄	GCCTCACTCTATCCCTACCT	CTCAGAAACAATCCATCCAG	56
MP03	(AC) ₂₁	ACAACACTTCACCACCCA	TAAGAACTACAAATACCCACTG	55
MP06	(TATC) ₁₀	TATGATGGTGTTCCTTGGT	GCTTTGTCCTGAGACTGTGG	58
MP08	(ATCT) ₁₂	GGGGAAAATCAGAGGGAATG	GACGACGGATGGACAGACAG	60
MP09	(TTGA) ₁₂	GTTCCGTCGTTACCAATAGAG	ACCCAAGGTCGGTCACAT	57
MP14	(AATA) ₉	CTCGTGATGAAAGAAGAGTTAG	AATAGCCAAGTGAAGTGAAGC	58
MP15	(TAA) ₁₀	CGTGAGATTCCTCGTCTCGTC	AAAGGCAGGTGTCCCAAAAC	60
MP16	(CTAT) ₁₅	CACATTTTCAGCATTTCAAGACT	TGGGTTGTTATTCTGTTTCTGA	61.5
MP17	(AAAC) ₁₁	TGGGGATACGGTGGAGAAC	GGTGCTGCTTATTATTGGAG	58
MP24	(TCAA) ₈	CAGACAATAGAGGGGTACACAC	TTGAATACAAGTAAGCAAAGGTT	58
MP26	(TCTA) ₁₆	TGGCTGAACCTCAAAATAAG	TCACCTAAACGGGAAAATAC	56.5
MP28	(AGAT) ₁₆	ATTCTTCCCCTGTCATTTTC	CTACCCAAAAGTGGCTGA	54
MP32	(TGTT) ₁₅	GAGTCATTGAGTCCGTTTAGA	TCAGTTGAGGAGACATTTGC	60
MP40	(AAT) ₁₃	TATCCGTATTGCCCAAAC	TTGCTGGCATCTTACTTTC	58
MP45	(AATA) ₈	GCGTATTTTATCATCTTTTGTGT	TGGGAGTGAAATGGAGTGAC	61.5
MP48	(GGAG) ₁₅	ATGCTGTTCCAGGATCAAC	CCGCTTTTATAGCCTTTAGT	62
MA163	(TA) ₁₀	GAAAACCCAGAGCCTGAC	TTCGGAAAAGTACAACAAC	56
MA189	(GT) ₁₂	CAAACCCTGAGCACTCTGAATC	AGCACAGTAACACGACGCCTAT	59
MA233	(ACT) ₁₃	GTAAACATTGATTGTCTGCCTC	GGCTCAACTGCCGTCCAA	58
MA356	(ATCG) ₁₁	TTGGGTCTCCTGTTTGTGTT	TGGTTCTTCCAGTCTCTCC	53
MA367	(TCTT) ₁₂	AAGAGCATTTTCATCCCAA	CCTTCTTCTCTCCCA	54
MA368	(ATCT) ₁₆	TGTCCTGGCGTCTTTTAT	AGGTGTTGTGGGCTCATC	54
MA369	(GATA) ₁₂	AGCAACCTCCTGAACAAG	CACAAGCATCTGGCACTG	60
MA374	(ACT) ₁₁	TGCTCCATGCTTAACTCTA	TTCACCTTCTACTCCAA	54
MA402	(AAGA) ₁₄	TCATACAACGGGAGGGAG	TGCGATTGAGATGCTTCA	58
MA407	(AAT) ₁₂	TACCTCCTCTACGACTTC	CCTAAACCATCAATCAA	52

注:MP01 ~ MP48 为厚颌鲂微卫星引物,来源于文献[8];MA163 ~ MA407 为实验室自主开发的团头鲂引物。

Notes:MP01 - MP48. *M. pellegrini* primers from Reference [8]; MA163 - MA407. *M. amblycephala* EST-SSR primers developed in our laboratory.

2 结果

2.1 团头鲂 EST-SSR 微卫星引物跨种扩增

实验共采用的 90 对团头鲂 EST-SSR 引物中,有 76 对引物能在厚颌鲂中获得稳定扩增条带,占总引物的 84.4%。随机选取能够获得扩增条带的 50 对微卫星引物,在 30 个厚颌鲂个体中的检测显示有 13 对引物表现出个体间的多态性,占总引物数的 26%。所检测到的微卫星位点的等位基因数为 2 ~ 6 个,平均等位基因数为 3.2 个,平均 *PI*C 为 0.42,其中有 4 个位点(MA11, MA23, MA95 和 MA389)的多态性较高(*PI*C > 0.5)(表 2)。

2.2 团头鲂与厚颌鲂特异性微卫星位点筛选及其杂交 F₁ 的鉴定

通过 90 对团头鲂 EST-SSR 引物在厚颌鲂中跨种扩增,发现其中 76 对 EST-SSR 引物在厚颌鲂中能够稳定扩增,其余 14 对引物在团头鲂中能够扩增出清晰条带,在厚颌鲂中未能扩增出清晰条带。通过比较分析各位点分别在团头鲂与厚颌鲂个体中的扩增结果,选取了 10 个(表 1)在团头鲂与厚颌鲂中的扩增产物中有明显差异的特异性微卫星位点,分别在团头鲂自交子代与厚颌鲂自交子代中扩增,其中 MA163 与 MA189 在厚颌鲂自交子代群体中无任何扩增产物(表 3)。

表 2 厚颌鲂 13 个多态性微卫星位点及其特征
 Tab. 2 Characteristics of the 13 polymorphic microsatellite loci in *M. pellegrini*

位点 loci	重复类型 repeat type	引物序列(5'-3') primer sequence	等位基因数 no. of alleles	观测杂 合度 H_o	期望杂 合度 H_e	多态信息 含量 PI_C
MA11	(TG) ₁₁	F:ATGCCAGTCTGCCAACAA R:TTCAATGATCGTCCGTCTT	4	0.90	0.62	0.54
MA23	(AC) ₁₂	F:GCGATCATCAAGGCAACG R:AGATTCATCAGCTCTGTAGTGT	6	0.97	0.73	0.67
MA58	(GATA) ₁₂	F:TGGCAAATGAAGATGAAG R:TTACAACGCACCACTGAC	4	0.83	0.53	0.41
MA95	(AC) ₁₄	F:CACTCGCTGTGGTGAAG R:GAAGATGTGCTATCTGGGTCA	6	0.93	0.64	0.56
MA102	(TG) ₁₀	R:AACTCAAATCGCAATCAGC F:AGACGCCGTCAGGAAAC	2	0.57	0.41	0.32
MA116	(AC) ₁₃	F:CTATTACAGTTTCATGCTTTCCTC R:ATCCCGTCCGCCGCTTACT	2	1.00	0.51	0.38
MA233	(AC) ₁₀	F:GTAAACATTGATTGTCTGCCTC R:GGCTCAACTGCCGTCCAA	2	0.50	0.38	0.30
MA317	(TG) ₁₀	F:CCTGACACTGACCCATAAACC R:TTGACCCCTTCCTCCCTCT	2	0.70	0.46	0.35
MA333	(TAA) ₁₀	F:GCTAGAGTCAGATTGTGGAC R:CAAGAAAGCGGCTGGTAA	3	0.83	0.51	0.39
MA358	(TAT) ₁₀	F:TCCGTCTCTTGACTAATACTTT R:CACATTCATTTTCATTTCCCTG	2	0.40	0.33	0.27
MA371	(GATA) ₁₁	F:ACGATTCCGTCCACATTTTCC R:GCAGTGCGTCTCCTCTCACAC	2	0.87	0.50	0.37
MA387	(AAT) ₁₃	F:CAAAATGAAAAAGAGAAAGC R:GAACCTGCCTGACAAAAC	2	0.83	0.49	0.37
MA389	(AC) ₁₁	F:ATCTGCTCGTGTCTGGTCC R:GTTGGCTTGAGAAAGTCGG	5	0.07	0.62	0.53
平均 mean			3.2	0.72	0.52	0.42

注:F为正向引物;R为反向引物;MA11~MA116来源于文献[15]。

Notes:F. forward primer;R. reverse primer;MA11 - MA116 from Reference[15].

依照上述实验方法,选取 16 对厚颌鲂微卫星引物(表 1)以团头鲂自交子代 DNA 为模板进行 PCR 扩增,电泳检测发现:4 个位点(MP01, MP03, MP24 和 MP26)在团头鲂自交子代群体中未能扩增出清晰的条带,占总引物的 25%,其余 12 个位点在团头鲂自交子代与厚颌鲂自交子代中均能稳定扩增(表 3)。

将筛选出的 26 对特异性引物用于杂交子代的 PCR 扩增,电泳检测得到了双亲本自交子代中所有的等位基因(表 3)。根据表 2 的实验结果,

共有 9 个特异性位点(MP14, MP16, MP28, MP32, MP48, MA356, MA368, MA347 和 MA407)可以直接鉴定出团头鲂自交子代、厚颌鲂自交子代与杂交 F_1 。同时,可将 MP01, MP03, MP24, MP26, MA163, MA189 与其它特异性位点进行两两组合以鉴定杂交 F_1 。例如在 MP01 位点若有扩增产物,则排除团头鲂的可能性;再继续用 MP15 继续检测,若扩增出 232, 240 条带,确定为杂交 F_1 。部分特异性位点扩增结果见图 1。

表 3 自交和杂交 F₁ 在 26 个微卫星特异位点上的扩增产物信息
 Tab. 3 Amplified products information of 26 specific microsatellite loci in the inbred and reciprocal hybrid offspring

特异性位点 specific loci	扩增产物大小/bp amplified product size		
	团头鲂自交子代 <i>M. amblycephala</i>	厚颌鲂自交子代 <i>M. pellegrini</i>	杂交 F ₁ reciprocal hybrids
MP01		215, 242	215, 242
MP03		155, 166, 145	155, 166, 145
MP06	200, 250	185, 200	185, 200, 250
MP08	246, 268, 298	226, 246, 260, 268	226, 246, 260, 268, 298
MP09	154	136, 154	136, 154
MP14	192	180, 204	180, 192, 204
MP15	200, 232, 240	200, 218	200, 218, 232, 240
MP16	204, 220, 228, 255	186, 213	186, 204, 213, 220, 228, 255
MP17	180, 194	194, 223, 238	184, 194, 223, 238
MP24		240	240
MP26		196, 223	196, 223
MP28	247, 280, 295	185, 196, 205, 210, 218	185, 196, 205, 210, 218, 247, 280, 295
MP32	240	225, 246, 260	225, 240, 246, 260
MP40	200, 218	190, 218	190, 200, 218
MP45	300, 310, 327, 340, 356	300, 310, 340	300, 310, 327, 340, 356
MP48	177, 201	218	177, 201, 218
MA163	255, 276		255, 276
MA189	373, 382		373, 382
MA233	218	218, 245	218, 245
MA356	216	210, 222	210, 216, 222
MA367	320	320, 340	320, 340
MA368	160, 174, 188	154	154, 160, 174, 188
MA369	348	251, 348	251, 348
MA374	190, 230, 254	212, 220	190, 212, 220, 230, 254
MA402	332, 392	332	332, 392
MA407	224, 244	232, 252, 273	224, 232, 244, 252, 273

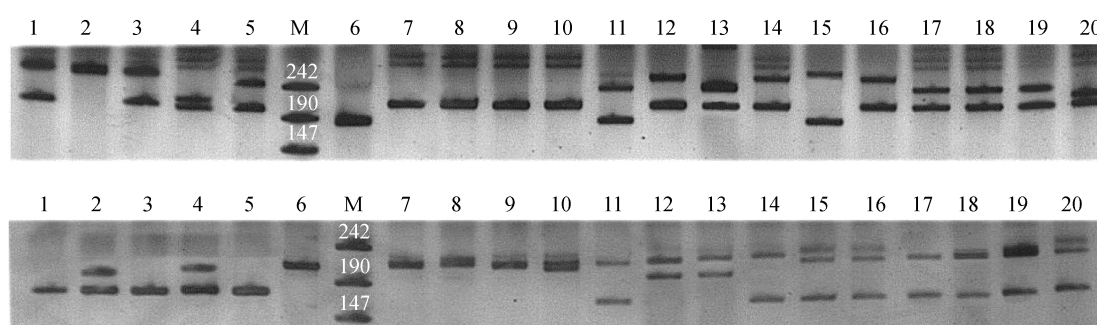


图 1 MP16 与 MP48 引物电泳图谱

M. PUC18 标准分子量; 1~5. 团头鲂(♀) × 团头鲂(♂) 子代; 6~10. 厚颌鲂(♀) × 厚颌鲂(♂) 子代; 11~15. 正交子代[团头鲂(♀) × 厚颌鲂(♂)]; 16~20. 反交子代[厚颌鲂(♀) × 团头鲂(♂)].

Fig. 1 PAGE electrophoretic patterns of primers MP16 and MP48

M. PUC18 DNA marker; 1-5. *M. amblycephala*(♀) × *M. amblycephala*(♂) offspring; 6-10. *M. pellegrini*(♀) × *M. pellegrini*(♂) offspring; 11-15. *M. amblycephala*(♀) × *M. pellegrini*(♂) offspring; 16-20. *M. pellegrini*(♀) × *M. amblycephala*(♂) offspring.

3 讨论

3.1 团头鲂 EST-SSR 在厚颌鲂中的跨种扩增

微卫星广泛分布于真核生物基因组中,随着微卫星侧翼保守序列在哺乳动物基因组中的发现,微卫星引物在同一属、科、目不同种之间具有保守性的特点也被发现,同属、科、目的不同物种通过一种引物扩增微卫星均可获得扩增产物^[17-18]。目前,跨种扩增的方法已经被广泛应用到动、植物的研究中^[19-21]。因此,根据微卫星引物通用性的特点,利用实验室团头鲂 EST-SSR 引物来获得厚颌鲂微卫星引物是可靠的。

实验共设计 90 对团头鲂 EST-SSR 引物,经过优化后 76 对(84.4%)引物可以获得稳定的特异性条带,其中有 13 对引物具有多态性。夏军红等^[22]利用 23 对鲸类微卫星引物对长江江豚群体进行了微卫星扩增,结果表明其中有 7 对(30.4%)引物扩增产物是稳定且多态的。全迎春等^[23]筛选了 6 072 对斑马鱼(*Danio rerio*)微卫星引物,在鲤(*Cyprinus carpio*)种间扩增出特异条带的引物共计 646 对(10.64%),表现出较明显多态性的 563 对(9.27%)引物。Wang 等^[8]利用 454 高通量测序开发了 33 对厚颌鲂微卫星引物,其中 28 对(84.9%)引物在团头鲂种间扩增出特异性条带。实验利用团头鲂 EST-SSR 引物对厚颌鲂 DNA 进行种间扩增,两者跨种扩增成功率与 Wang 等^[8]的研究结果基本吻合,远高于夏军红等^[22]和全迎春等^[23]的研究结果,说明团头鲂与厚颌鲂亲缘关系十分相近,同源性较高。蔡鸣俊等^[24]从形态学角度阐述了鲂属鱼类的进化关系十分相近,这也为本实验结果提供了一个理论依据。同时,同属种间扩增的通用性要高于同科种间扩增的通用性^[25]。

实验共获得厚颌鲂 13 个多态位点,等位基因数为 2~6 个,平均期望杂合度(H_e)为 0.72,平均多态信息含量(PIC)为 0.42,按照 Botstein 等^[26]提出的分类方法,有 4 个位点($PIC > 0.5$)为高度多态性位点,其余 9 个位点($0.5 > PIC > 0.25$)为中度多态性位点,说明龙溪河野生厚颌鲂群体遗传多样性较高。因此,实验初步认为筛选出的这 13 个多态性微卫星位点是适用于厚颌鲂种群遗传学研究的良好分子标记。

3.2 团头鲂自交子代、厚颌鲂自交子代及其杂交 F₁ 微卫星鉴定

杂交育种是水生经济动物遗传育种中最重要的手段之一。但是,杂交也可能造成诸多负面影响,如降低物种多样性、种质退化、进入天然水域产生其他未知的生态风险等^[27-28]。因此,开展鱼类杂种鉴别的研究对于遗传育种与物种多样性保护具有重要的理论意义和实践价值。作为我国重要淡水增养殖经济鱼类,团头鲂资源保护和开发利用等方面的研究较鲂属其它鱼类要更加深入,实验基于实验室团头鲂转录组高通量测序获得的大量 EST 序列^[15]与已发表的厚颌鲂微卫星引物^[8],通过微卫星分子标记技术有效鉴定出了团头鲂与厚颌鲂杂交子代。

目前,微卫星分子标记技术鉴定杂交种是鱼类遗传育种研究的热点。Mia 等^[29]研究表明鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)和鳙(*Aristichthys nobilis*)在 Hmo01、Hmo03 和 Hmo11 三个微卫星位点上的等位基因大小均存在明显差异,且其杂交后代恰好同时含有鲢鳙的各一个等位基因。朱树人等^[30]通过磁珠富集法制备了乌鳢(*Channa argus*)与斑鳢(*Channa maculate*)的微卫星引物各 31 对,检测到 18 个均可单独有效鉴定出 F₁ 的乌鳢、斑鳢及杂交鳢,其余 4 个位点也可以通过组合鉴定出乌鳢、斑鳢及杂交鳢。实验共检测了 10 对团头鲂微卫星引物与 16 对厚颌鲂微卫星引物,其中 9 个微卫星位点可直接鉴定出团头鲂自交子代、厚颌鲂自交子代及其杂交子代,其余 17 对引物可以通过组合鉴定出团头鲂自交子代、厚颌鲂自交子代及杂交 F₁。同时,4 对厚颌鲂特异性引物(MP01, MP03, MP24 和 MP26)与 2 对团头鲂特异性引物(MA163 和 MA189)可直接用于团头鲂与厚颌鲂自交子代的鉴定。

微卫星分子标记为共显性的分子标记,它遵循孟德尔的分离规律,正常杂交子代从双亲获得相同数量的核遗传物质,即子代遗传物质一半来自于父本,一半来自于母本,因而能清楚反映杂交物种的遗传特性。实验开发获得的团头鲂和厚颌鲂特异性微卫星标记,可以准确鉴定出其自交子代及杂交 F₁。然而,由于所开发的微卫星没有包括与性别相关的位点,因此难以通过实验开发的微卫星标记区分其正交和反交子代,这与很多研究者对于杂交子代的研究结果是一致的^[31-33]。

另外,如果水体中有鲂属其它种(三角鲂、广东鲂)或者种群存在时,杂交子代的亲本信息未知,若要准确鉴别未知的杂交子代,则有必要确定更多的鲂属鱼类微卫星特异性位点,进而建立完整的鲂属鱼类微卫星标记数据库,为鲂属鱼类及其杂交子代的鉴定提供数据资料。

参考文献:

- [1] 王卫民. 团头鲂养殖产业现状[J]. 科学养鱼, 2009(4):44-45.
- [2] 罗云林. 鲂属鱼类的分类整理[J]. 水生生物学报, 1990,14(2):160-165.
- [3] 谭德清,王剑伟,但胜国,等. 厚颌鲂含肉率及生化成分的分析[J]. 水生生物学报, 2004, 28(1):17-22.
- [4] 高泽霞,王卫民,周小云. DNA分子标记技术及其在水产动物遗传上的应用研究[J]. 生物技术通报, 2007, (2):109-112.
- [5] 马洪雨,岳永生,于艳,等. 鲤微卫星引物对麦穗鱼的适用性初步研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(2):278-281.
- [6] 吴旭东,连总强,侯玉霞,等. 大口鲈微卫星标记在三个鲂形目鱼类种群间适用性研究[J]. 水生生物学报, 2011, 35(4):638-645.
- [7] Dubut V, Martin J F, Costedoat C, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the freshwater fishes *Telestes souffia* and *Telestes muticellus* (Teleostei: Cyprinidae) [J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(3):1001-1005.
- [8] Wang J J, Yu X M, Zhao K, et al. Microsatellite development for an endangered bream *Megalobrama pellegrini* (Teleostei, Cyprinidae) using 454 sequencing [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(3):3009-3021.
- [9] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京:中国农业出版社, 2009.
- [10] 叶星,谢刚,许淑英,等. 广东鲂♀×团头鲂♂杂交子一代及其双亲同工酶的比较[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(2):118-122.
- [11] 谢刚,叶星,庞世勋,等. 杂交鲂(广东鲂♀×团头鲂♂)及其亲本主要遗传性状的比较研究[J]. 湖北农学院学报, 2002, 22(4):330-332.
- [12] 叶星,谢刚,祁宝伦,等. 广东鲂♀×团头鲂♂杂交子一代及其双亲染色体组型分析[J]. 大连水产学院学报, 2002, 17(2):102-106.
- [13] 杨怀宇,李恩发,邹曙明. 三角鲂与团头鲂正反杂交 F₁ 的遗传性状[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(4):305-311.
- [14] Li Y, Wang W, Liu X, et al. DNA extraction from crayfish exoskeleton [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2011, 49(12):953-957.
- [15] Gao Z X, Luo W, Liu H, et al. Transcriptome analysis and SSR/SNP markers information of the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. PLoS ONE, 2012, 7(8):e42637.
- [16] Li Y H, Guo X W, Cao X J, et al. Population genetic structure and post-establishment dispersal patterns of the red swamp crayfish *Procambarus Clarkii* in China [J]. PLoS ONE, 2012, 7(7):e40652.
- [17] 朱晓宇. 脊尾白虾微卫星分离及其遗传多样性分析[D]. 杭州:浙江大学, 2010:12-27.
- [18] Moore S S, Sergeant L L, King T J, et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species [J]. Genomics, 1991, 10(3):654-660.
- [19] Singh R K, LalKuldeep K, Vindhya M, et al. Cross-species amplification of microsatellite loci in the cyprinid fish, *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822) (In English) [J]. Acta Zoologica Sinica, 2008, 54(5):937-940.
- [20] Das P, Barat A, Meher P K, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Labeo rohita* and their cross-species amplification in related species [J]. Molecular Ecology Notes, 2005, 5(2):231-233.
- [21] Primer C R, Moller A P, Ellegren H. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds [J]. Molecular Ecology, 1996, 5(3):365-378.
- [22] 夏军红,郑劲松,王丁. 鲸类微卫星引物对长江江豚的适用性研究[J]. 水生生物学报, 2004, 28(6):640-646.
- [23] 全迎春,梁利群,孙效文,等. 斑马鱼微卫星分子标记检测鲤鱼种间多态性[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2):300-304.
- [24] 蔡鸣俊,张敏莹,曾青兰,等. 鲂属鱼类形态度量学研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(6):631-635.
- [25] 孙波,鲍毅新,张龙龙,等. 大鼠及小鼠微卫星引物在社鼠中的跨种扩增[J]. 动物学杂志, 2009, 44(6):145-150.
- [26] 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(3):

- 314 - 331.
- [27] Bartley D M, Rana K, Immink A J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2001, 10(3) : 325 - 337.
- [28] 杨世勇, 郭睿, 刘匆, 等. 鱼类杂种鉴别研究进展 [J]. *四川动物*, 2012, 31(4) : 668 - 674.
- [29] Mia M Y, Taggart J B, Gilmour A E, *et al.* Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci [J]. *Aquaculture*, 2005, 247 (1 - 4) : 267 - 273.
- [30] 朱树人, 李忠全, 冯晓宇, 等. 乌鳢和斑鳢微卫星制备及其对自交与杂交 F₁ 代的初步鉴定 [J]. *动物学杂志*, 2011, 46(4) : 1 - 7.
- [31] 张玉勇, 白庆利, 贾智英, 等. 虹鳟、山女鳟及其杂交子代(虹鳟♀ × 山女鳟♂)的微卫星分析 [J]. *水产学报*, 2009, 33(2) : 188 - 195.
- [32] 颜标, 李思发, 蔡完其. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼及其正反杂交后代的微卫星分析 [J]. *水产学报*, 2007, 31(3) : 411 - 415.
- [33] Hamilton P B, Tyler C R. Identification of microsatellite loci for parentage analysis in roach *Rutilus rutilus* and eight other cyprinid fish by cross-species amplification, and a novel test for detecting hybrids between roach and other cyprinids [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8 (2) : 462 - 465.

Cross-species amplification of *Megalobrama amblycephala* EST-SSR in *M. pellegrini* and identification of their reciprocal hybrids

YI Shaokui¹, GAO Zexia^{1,2}, LUO Wei¹, DUAN Xiaoke¹, LI Yanhe¹, WANG Weimin^{1*}

(1. Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education/Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Collaborative Innovation Center for Freshwater Aquaculture, Wuhan 430070, China)

Abstract: To investigate the applicability of microsatellite markers developed from *Megalobrama amblycephala* in *M. pellegrini* and find the molecular markers to identify the *M. amblycephala*, *M. pellegrini* and their reciprocal hybrids, 90 pairs of *M. amblycephala* EST-SSR primers were synthesized for cross-species amplification on the genome DNA of *M. pellegrini*, and 26 pairs of microsatellite primers of *M. amblycephala* and *M. pellegrini* were screened for PCR amplification on the genome DNA of *M. amblycephala*, *M. pellegrini* and their reciprocal hybrids. The results revealed that 76 pairs (84.4%) of the primers were amplified successfully. Fifty pairs were screened from these 76 primers to test the polymorphism in *M. pellegrini* population and 13 markers were polymorphic with an average of 3.2 alleles per locus, the mean observed heterozygosity being 0.72 and the mean PIC being 0.42. The results of PCR amplification on the genome DNA of *M. amblycephala*, *M. pellegrini* and their reciprocal hybrids indicated that 4 primer pairs had no amplified products on *M. amblycephala*, and 2 primer pairs had no amplified products on *M. pellegrini*. Among the 20 loci which had effective amplified products, 9 specific loci could identify *M. amblycephala*, *M. pellegrini* and the reciprocal hybrids, respectively. Combination of the other 17 specific loci also distinguished *M. amblycephala*, *M. pellegrini* and the reciprocal hybrids effectively. However, the reciprocal hybrids [*M. amblycephala* (♀) × *M. pellegrini* (♂), *M. pellegrini* (♀) × *M. amblycephala* (♂)] could not be identified through these markers used in this study.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; *M. pellegrini*; reciprocal hybrids; microsatellite

Corresponding author: WANG Weimin. E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn