

微卫星多重PCR分析食蚊鱼系统发育关系

刘世英¹, 宋春高^{1,2}, 何只翰^{1,3}, 卢育军^{1,4},
吴海生^{1,5}, 王波¹, 曾媛琴^{1*}

(1. 西南大学生命科学学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715;

2. 昆明市第十四中学, 云南昆明 650106;

3. 贵阳市第二实验中学, 贵州贵阳 550004;

4. 甘肃省秦安县第一中学, 甘肃天水 741600;

5. 江西省临川第二中学, 江西抚州 344000)

摘要: 食蚊鱼是全球入侵性物种之一。探讨和研究食蚊鱼快速入侵的原因对进一步的生态学研究有重要意义。实验选取11对多态性微卫星位点, 检测了来自欧洲境内3条河流流经的10个不同城市53个家系的755个幼鱼样本。利用微卫星多重PCR技术及Colony统计学软件, 分析食蚊鱼系谱关系。食蚊鱼的繁殖能力强, 繁殖期的雌性食蚊鱼可一胎产下大量雌雄幼鱼, 平均9尾, 最多可达72尾; 更重要的是实验中发现食蚊鱼存在多重授精现象。结果显示, 来自同一父本的幼鱼胚胎最多可达41尾; 多重授精加快了食蚊鱼的基因流; 系统发育树证实, 食蚊鱼来源于遥远的海洋, 实验采集的10个群体在系统发育树中主要聚为3支。食蚊鱼入侵性强的关键原因是多重授精, 强壮精子具有更强的竞争受精能力, 增加了物种的多样性, 但受精频率与雌鱼大小可能不成比例。在长距离的迁移中, 基因流也在快速变化。

关键词: 食蚊鱼; 多重PCR; SSR; 多重授精; 亲子关系评估

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

食蚊鱼(*Gambusia affinis*)原产于北美洲, 因擅长于捕食蚊子而受许多国家青睐。1905年, 夏威夷率先引进食蚊鱼, 此后50多个国家相继引进用于控制疟疾的传播^[1], 到目前为止, 它已经遍布全世界各热带温带海域, 成为全球入侵物种^[2-5]。食蚊鱼对欧洲的入侵始于1921年伊比利亚半岛引进的12尾食蚊鱼, 紧接着传到了意大利, 随后食蚊鱼成为地中海大多数国家的高丰度物种^[6-7]。食蚊鱼有特殊的生理结构, 幼鱼时期臀鳍生长不同于其他鱼类^[8]。食蚊鱼幼鱼为胎生, 受精卵在雌鱼体内发育, 幼鱼出生后可以自由游泳和捕食^[9-10]。食蚊鱼存在同母不同父的多次授精现象。因此, 可以通过基因分型来分析食蚊鱼入侵中的相互关系, 并得到入侵物种的遗传多样

性^[11]。美国原产地食蚊鱼遗传距离评估发现食蚊鱼有很强的种群结构^[12-13]。研究表明欧洲食蚊鱼的遗传多样性与美国相比显著降低^[7]。微卫星是在许多生物基因组中普遍存在的DNA元件^[14]。微卫星标记在基因组研究中被广泛使用^[15]。荧光标记的SSR检测和自动化DNA片段测序分析等位基因大小是基因分型最快和最精确的方法^[15-17]。这种方法可以达到与传统特异性PCR反应一样的效果^[15]。多重PCR可以在同一反应中实现多个标记的扩增, 增加每次反应的信息量, 同时也避免浪费和减少劳动量^[18], 是分子生物学和基因组学研究中的一种有效的工具^[19]。多重PCR在单一反应中同时扩增多个标记, 从而节省出更多的人力物力来管理每个单独的反应体系^[18], 提高

收稿日期: 2016-10-24 修回日期: 2017-03-14

资助项目: 西南大学博士基金(swu110064)

通信作者: 曾媛琴, E-mail: yqzeng@swu.edu.cn

了产量, 降低了基因分型的成本^[20], 有效提高了SSR分型的效率。微卫星标记的发展为研究食蚊鱼的进化和生态遗传学提供了新的思路^[21]。本实验对来自欧洲不同河流的755个样本进行多重PCR及系统发育分析, 旨在研究食蚊鱼有效入侵的原因。

1 材料与方法

1.1 样本采集

从西班牙3条河流的10个区域采集了53尾待产雌性食蚊鱼, 其中Vilanova de Muga(VM) 9尾、Castellód'Empuries(CE) 6尾、Empuria Brava(EP) 1尾、Besalú(BL) 7尾、Báscara(BA) 5尾、St. Pere Pescador(PP) 2尾、Banyoles(BY) 6尾、Onyar(OY) 11尾、Colomers(CL) 5尾、Ter Vell(TV) 1尾。VM、CE和EP属于Muga river流域; BL、BA和PP属于Fluviá river流域; BY、OY、CL和TV属于Ter river流域。EP、PP和TV靠近海岸线, BY是Ter river支流形成的一个湖泊(图1)。53尾雌鱼共产下702尾幼鱼, 组成53个家系, 每个家系的幼鱼数量不同。

1.2 DNA提取和微卫星多重PCR反应

对755尾食蚊鱼进行DNA的提取, 方法参照文献^[22]。多重PCR的反应体系为30 μ L: 3 μ L 0.2 mmol/L dNTP, 3 μ L 10 \times NH₄ Reaction Buffer (无

MgCl₂, Bioline), 0.9 μ L 50 mmol/L MgCl₂(Bioline), 6 μ L引物混合物(11对引物: G49、Mf13、Gafmu7、Gafmu6、Gafmu5、Gafmu3、Gaaf15、Gaaf7、Gaaf13、Gaaf9和Gaaf10), 0.5 μ L DNA模板, 0.15 μ L DNA聚合酶(BIOTAQ), 16.46 μ L双蒸水。PCR扩增程序: 94 $^{\circ}$ C预变性 3 min, 1个循环; 94 $^{\circ}$ C变性 30 s, 最佳退火温度 60 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C延伸 90 s, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸 10 min, 15 $^{\circ}$ C保存。1.5%琼脂糖检测结果。

1.3 基因序列分析

使用ABI 3130自动测序仪检测(HITACHI 3130 Genetic Analyzer), genemapper version 4.0 (HITACHI 3130) 软件分析确定微卫星片段长度和识别微卫星基因型。微卫星标记中, G49等位基因片段大小为149~164 bp、Mf13为157~164 bp、Gafmu7为175~204 bp、Gafmu6为197~201 bp、Gafmu3为224~278 bp、Gafmu5为257~276 bp^[23]等。755个样本被准确高效地分型成功(表1)。

1.4 多重亲子鉴定软件评估

统计学软件可以利用分子标记数据评估亲缘关系^[24-26]。最大似然法在没有亲本信息的情况下通过分析遗传标记数据可以将独立的个体分为同母同父家系和同母异父家系。Colony可以将成千上万个位点高效地实现基因分型^[27-29]。用Colony软件分析了755尾幼鱼的全同胞亲缘关系。

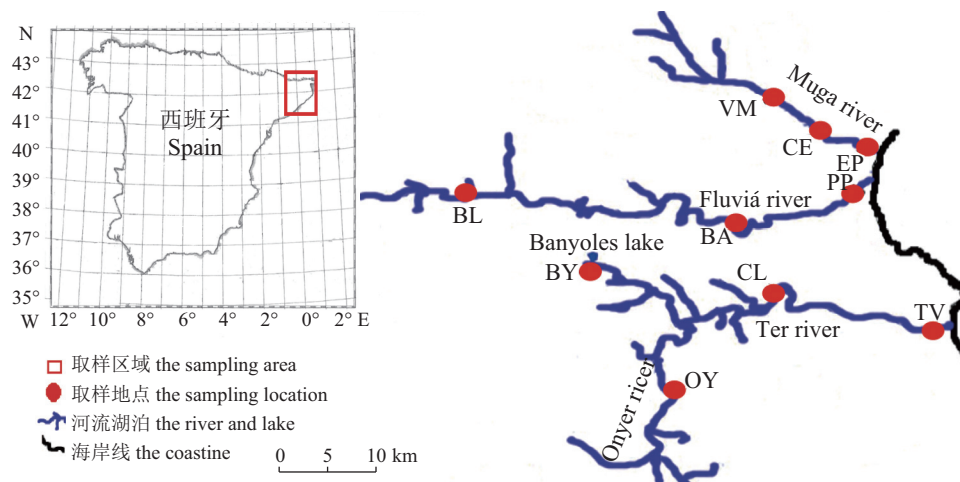


图1 食蚊鱼的采样图

10个采样点分别为西班牙的3条河流, BY为湖泊

Fig. 1 Map of the sampling locations for *G. affinis*

10 populations came from 10 locations of 3 rivers in Spain, population of BY is in a lake

表1 引物及PCR条件

Tab. 1 Primers and PCR conditions

位点 locus	引物 primers	大小/bp size	退火温度/°C <i>T_a</i>	等位基因 No. allele	杂合度 <i>H_o/H_e</i>	重复序列 repeat motif
G49	CTCAGTGACTATAAGGGCAAC CATAGATTCTGCAGGCAGTG	149~164	62	4	0.3789 0.3911	(GT)6, GC, (GT)4, GC, (GT)7
Mf13	GGTCACAAATATAAAGCCACAGAC AAAGGCTGCAAACAGTAAAAGTTA	157~164	61	2	0.5312 0.4980	[GT]10
Gafmu7	TGCCGATGGATGTTCTGTAG CACAGAACAACACAGAACTGGAGG	175~204	65	7	0.5938 0.7217	[AG]22
Gafmu6	CGCCGGACAGACCAGCCTCA ACGAAGAGAGCAGCGGAGTTTTGG	197~201	65	4	0.4527 0.3864	[GA]10
Gafmu3	GCACATAACATGGAAACAGTAAAC CTCAGCCGTCATTTAGTCTCAT	224~278	65	4	0.5861 0.6567	[GT]33
Gafmu5	AAGCCGCGGATATTCATG TGGGCCTTGCTTGTCTT	257~276	52	8	0.7237 0.7726	[GA]7A2[GA]11
Gaaf 15	TGCATGTGTGTTTGTAAGG GATCCCTGTTACACTGCTGG	111~146	63	2	0.3674 0.3829	(AATG)8
Gaaf 7	TCCATCCCATTATGACCACAG GCACTTAGAAATGCCTCGC	156~160	65	4	0.4549 0.5266	(AATC)31
Gaaf 13	ACTTGGTGGCAGATTTACAGG AAGGAAACAACATGCTGGC	194~228	63	10	0.6583 0.8009	(GATT)18
Gaaf 9	GGTGCAAATCCGAGCTTG GGGAAATACTCTGGACTCG	227~239	65	3	0.1199 0.2021	(ACAG)14
Gaaf 10	GAACTGAACCACCCAAAGGC TCCATCTGGAGACAGGTGTG	254~318	67	7	0.3836 0.6568	(ATCC)12

1.5 群体遗传多态性

等位基因频率和多态性使用GENEPOP version 4.2 (Raymond & Rousset, 1995)计算; Nei氏遗传系数(Nei, 1978), F_{it} 、 F_{is} 、 F_{st} (Weir & Cockerham, 1984)计算使用FSTAT; 贝叶斯构树使用STRUCTURE version 2^[30-31]; NTSYSpc2.1软件评估Nei氏两两遗传距离, 聚集成簇分析10个群体食蚊鱼的亲缘关系。

2 结果

2.1 亲缘关系

本研究中, 通过Colony分析发现一个家系即一个母本所产多个子代有不止一个父本; 父本的

数量最多可达9个。食蚊鱼繁殖数量巨大, 全同胞只有一个父本的情况下, 子代的数量可达41尾; 多重授精, 多个父本, 子代数量可高达72尾(表2)。雌性食蚊鱼可以与多个父本交配, 一胎较高的繁殖率是食蚊鱼成为入侵物种的重要原因。

2.2 群体遗传多样性分析

将选取的11对多态性微卫星位点在食蚊鱼中扩增, 使用GENEPOP version 4.2^[32]和CONVERT version 1.31软件对其遗传多样性进行分析^[33](表3)。结果显示, VM群体中存在杂合不足现象($H_o < H_e$, $F_{is} > 0$), 推测这个群体中可能存在一定程度的近亲繁殖。剩余9个群体中都存在杂合子过剩($H_o > H_e$, $F_{is} < 0$)现象。VM、BL、OY和CL 4个群体偏离Hardy-Weinberg平衡。

表 2 繁殖雌鱼和父本数量

Tab. 2 The breeder size and the number of different fathers

母本 mother	子代个数/ 尾No.off- spring	父本数 量 No.father	均值 mean	标准差 SD	长度 length	最多全同 胞个数 max fullsib	母本 mother	子代个数/ 尾No.off- spring	父本数 量 No.father	均值 mean	标准差 SD	长度 length	最多全同 胞个数 max fullsib
VM82	3	2	1.500	0.500	29	2	PP141	5	4	1.250	0.433	23	2
VM83	15	8	1.875	1.269	30	5	PP164	5	1	5.000		29	5
VM123	10	2	5.000	3.000	26	8	BY142	2	1	2.000		30	2
VM124	5	2	2.500	0.500	23	3	BY144	2	2	1.000		21	1
VM125	7	4	1.750	0.829	22	3	BY145	2	1	2.000		21	2
VM126	14	4	3.500	3.279	23	9	BY155	1	1	1.000		28	1
VM127	8	3	2.667	1.700	24	5	BY156	5	5	1.000		27	1
VM128	11	5	2.200	0.748	23	3	BY157	5	3	1.667	0.943	27	3
VM129	4	2	2.000		23	2	OY81	41	5	8.200	10.496	38	28
CE82	14	5	2.800	3.124	22	9	OY82	14	3	4.667	3.091	21	9
CE83	16	5	3.200	1.166	30	5	OY83	58	4	14.500	15.660	27	41
CE90	2	2	1.000		28	1	OY84	18	2	9.000	6.000	29	15
CE91	6	4	1.500	0.866		3	OY85	23	3	7.667	4.643	29	14
CE152	6	2	3.000	2.000	26	5	OY86	23	4	5.117	28	14	
CE163	7	4	1.750	0.829	27	3	OY87	42	5	8.400	8.333	28	23
EP87	4	2	2.000	1.000	31	3	OY88	11	4	2.750	1.920	34	6
BL81	17	4	4.250	3.112	28	9	OY90	5	1	5.000		24	5
BL82	28	4	7.000	7.517	35	20	OY91	3	1	3.000		25	3
BL83	1	1	1.000		32	1	OY160	2	2	1.000		21	1
BL84	6	3	2.000	0.816	29	3	CL81	38	9	4.222	4.939	36	15
BL85	2	2	1.000		22	1	CL82	72	9	8.000	7.348	38	26
BL86	2	1	2.000		28	2	CL83	56	7	8.000	11.187	35	34
BL87	1	1	1.000		31	1	CL142	29	5	5.800	5.845	32	17
BA141	3	1	3.000		31	3	CL143	19	3	6.333	2.494	34	9
BA142	2	2	1.000		26	1	TV98	14	6	2.333	2.211	32	7
BA150	6	2	3.000	2.000	33	5	均值 average	13.25	3.25	3.510		27.8	7.604
BA151	1	1	1.000		21	1	标准差 SD	15.89	2.03	2.792		4.612	8.939
BA155	6	3	2.000	0.816	28	3							

注: 食蚊鱼的家系情况: CL81和CL82拥有最多的父本数量为9个; CL82家系一胎产下最多的仔鱼数量为72尾

Notes: the maximum number of father is 9 in one family of CL81 and CL82; the maximum offspring number of 72 can be born by one pregnant female of the CL82 in one time

3 讨论

3.1 食蚊鱼种群分子方差分析

从分子方差分析(AMOVA)结果可知, 食蚊

鱼种群内遗传变异较大, 占变异总量的77.44% (表4), 应该是一尾母本多重受精, 子代多重父子亲缘造成遗传差异巨大; 种群间的遗传变异仅占22.56%, 说明在种群间基因流动非常快, 导

表 3 遗传多样性

Tab. 3 Genetic diversity

群体 populations	A	AR	H_o	H_e	PIC	F_{is}	偏离哈迪温伯格的位点 HW disequilibrium
VM	3.545	2.470	0.394	0.474	0.3807	0.170	G49/Gafmu5
CE	3.727	2.587	0.466	0.448	0.3975	-0.041	
EP	2.000	2.000	0.657	0.559	0.2677	-0.203	
BL	2.909	2.153	0.541	0.487	0.3561	-0.112	G49/Gaaf15/Gaaf10
BA	2.364	1.911	0.480	0.418	0.2058	-0.152	
PP	2.545	2.305	0.658	0.519	0.3567	-0.283	
BY	2.909	2.512	0.564	0.490	0.4075	-0.156	
OY	3.273	2.438	0.533	0.488	0.3877	-0.091	Gafmu7/Gamfu6/Gaaf7/Gaaf13
CL	4.364	2.637	0.513	0.457	0.4084	-0.121	Mf13/Gamfu7/Gamfu6/Gamfu3/Gamfu5/Gaaf13
TV	2.909	2.500	0.589	0.521	0.3944	-0.138	
均值 mean	4.727	3.021	0.540	0.486	0.3563	-0.113	

注: A. 每个位点的平均等位基因数, AR. 平均等位基因丰度, H_o . 平均观测杂合度, H_e . 平均期望杂合度, PIC. 多态信息含量, F_{is} . 近交系数
Notes: A. average allele numbers per locus, AR. average allelic richness, H_o . average observed heterozygosity, H_e . average expected heterozygosity, PIC. polymorphic information content, F_{is} . inbreeding coefficients

表 4 食蚊鱼种群分子方差分析

Tab. 4 Analysis of molecular variance(AMOVA) for *G. affinis*

变异来源 source of variation	自由度 df	平方和 sum of squares	方差分量 variance components	变异百分比/% percentage of variation
群体间 among populations	9	806.881	0.670 13 Va	22.56
群体内 within populations	1500	3451.428	2.300 95 Vb	77.44

注: Va. 群体内变异; Vb. 群体间变异
Notes: Va. variation within populations; Vb. variation among populations

致变异不大; 因此可以看出该地区食蚊鱼的遗传变异主要来自种群内。

3.2 群体间遗传距离与地理种群非严格相关

使用POPGENE version 1.32^[34]软件评估Nei氏遗传系数和遗传距离(表5)。OY与BL群体之间遗传距离最大(0.6095), 最小为VM与CE群体, 为0.0197。遗传距离是指不同的种群或种之间的基因差异程度, 是研究种群遗传多样性和遗传分化的重要指标。通常群体间遗传距离越小, 表示其分化时间越短、遗传关系越近, 反之相反。BL和VM群体间遗传一致度最小(0.5439)。最大的两两遗传距离是OY与BL群体之间, 为0.6095, 其次是VM和BL之间, 为0.6089, 它们都不在同一条河流; 最大的遗传多样性是VM和CE之间, 为0.9805, 其次是PP和CL之间, 为0.8995, 还有BY和CL之间, 为0.8993, 前者两个

群体位于同一条河流, 后者不在同一条河流。遗传距离、遗传一致度与水系分布均不相关。群体遗传分析结果显示遗传多样性较低, 各种群间基因交流较为频繁。

3.3 群体间的遗传分化模式

STRUCTURE软件贝叶斯聚类法可用于群体遗传分化研究^[35]。目前研究食蚊鱼群体遗传模式就常常使用STRUCTURE version 2 贝叶斯聚类法^[30-31], 根据所得的 $LnP(D)$ 平均数进行分配测试和 ΔK 检验, 绘制散点曲线图。实验结果进行了50 000次重复的马尔可夫链蒙特卡罗方法(MCMC)搜索, 并舍弃最初的20 000次重复的聚类数据, 以求得到系统树的最大可能簇数(K)。共测试了从1~10的10个可能簇数。为保证数据的一致性, 对每个簇数都进行了100次运算(图2)。K值设定为1~10, 运行结果显示当K=3时, ΔK 达到最大

表 5 基于Nei氏无偏估计法的群体间遗传一致度(对角线以上)和遗传距离(对角线以下)

Tab. 5 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

群体 population	VM	CE	EP	BL	BA	PP	BY	OY	CL	TV
VM		0.9805	0.8643	0.5439	0.665	0.7366	0.8039	0.7613	0.7765	0.818
CE	0.0197		0.8519	0.5789	0.6758	0.7264	0.8122	0.7682	0.7617	0.7942
EP	0.1458	0.1603		0.6143	0.5601	0.7093	0.7798	0.772	0.7291	0.7446
BL	0.6089	0.5466	0.4872		0.6994	0.5759	0.6516	0.5436	0.6794	0.6188
BA	0.408	0.3918	0.5797	0.3575		0.7886	0.7373	0.6441	0.8033	0.7591
PP	0.3056	0.3197	0.3434	0.5518	0.2375		0.837	0.8554	0.8995	0.8832
BY	0.2182	0.208	0.2487	0.4284	0.3048	0.178		0.872	0.8993	0.8684
OY	0.2727	0.2637	0.2588	0.6095	0.4399	0.1561	0.1369		0.8255	0.8568
CL	0.253	0.2721	0.3159	0.3865	0.219	0.1059	0.1061	0.1917		0.8765
TV	0.2009	0.2304	0.295	0.48	0.2756	0.1242	0.1411	0.1545	0.1319	

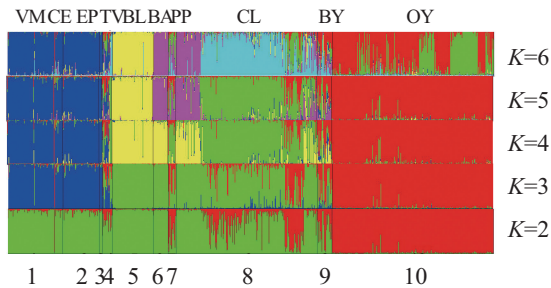


图 2 使用STRUCTURE分析基于取样点K=2-6的食蚊鱼群体

每种颜色代表一聚集簇。每一位点不同取样点的家系

Fig. 2 Assignment of individuals of *G. affinis* using STRUCTURE based on sample locations and K=2-6

Colors correspond to each cluster. Each bar represents a single individual sample and present in groups based on sampling location

值, 预测最佳分群模式是K=3(图3)。

3.4 系统发育分析

使用邻接法构建系统发育树, BL和EP是遗传距离最大的2个点(图4, 图5)。这种拓扑结构在一定程度上表现出聚类与地理位置的一致性。NJ树显示, BA和BL这两个来自Fluviá river的群体间关系较为密切, 而与VM、CE、EP等这些来自Muga river的较远, OY和BY这两个群体关系较近。但邻接海岸线的群体并没有聚在一起。这可能是由于邻近海岸的食蚊鱼会到大海深处繁殖幼鱼造成的。相反, 尽管它们相隔距离较远, 远离海岸的食蚊鱼由于它们的生活环境相

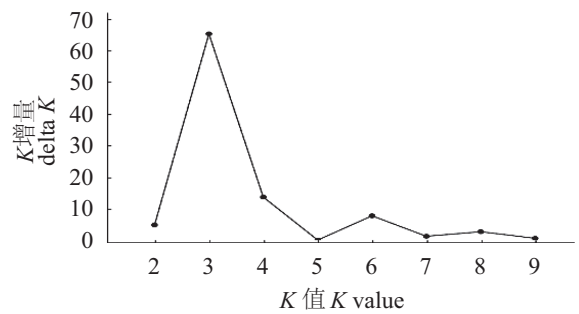


图 3 STRUCTURE分析的ΔK方法绘制的K值变动图

Fig. 3 The graph of the number of the inferred clusters (K) using STRUCTURE

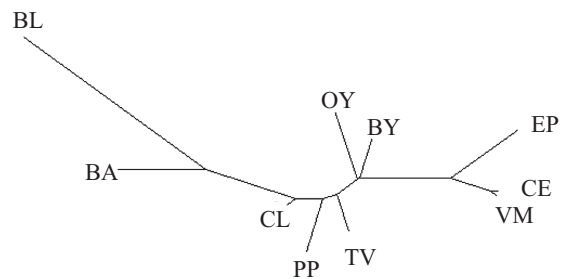


图 4 食蚊鱼10个家系的Nei氏遗传距离系统进化树(邻接法)

Fig. 4 A phylogenetic tree (Neighbor-Joining) based on Nei's genetic distance of 10 populations of *G. affinis*

近, 因此它们在进化上也没有很大的改变。VM和CE 2个群体可能在迁移中有较为频繁的基因交流, 因此聚为一支。

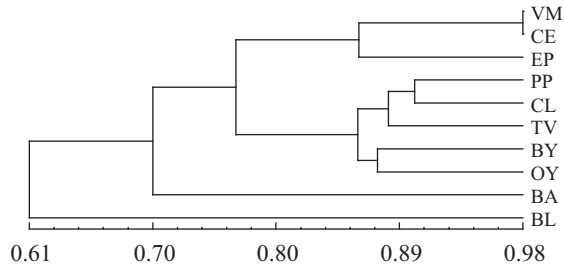


图5 NTSYSpc 2.1分析与POPGENE version 1.32计算的食蚊鱼10个家系的进化树

Fig. 5 The clusters of a phylogenetic tree based on NTSYSpc 2.1 and POPGENE version 1.32 of 10 populations of *G. affinis*

参考文献:

- [1] Pyke G H. A review of the biology of *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*[J]. Review in Fish Biology and Fisheries, 2005, 15(4): 339-365.
- [2] Geiser S W. Notes relative to the species of *Gambusia* in the United States[J]. The American Midland Naturalist, 1923, 8(8-9): 175-188.
- [3] Rosen D, Bennett F D, Capinera J L. Pest Management in the Subtropics [M]. UK: Intercept, Andover, 1994: 395-407.
- [4] Krumholz L A. Reproduction in the Western Mosquitofish, *Gambusia affinis* (Baird & Girard), and its use in mosquito control[J]. Ecological Monographs, 1948, 18(1): 1-43.
- [5] Lowe S, Browne M, Boudjelas S, et al. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database [Z]. Gland: Invasive Species Specialist Group, 2004.
- [6] García B E, Alcaraz C, Pou-Rovira Q, et al. Introduction pathways and establishment rates of invasive aquatic species in Europe[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2005, 62(2): 453-463.
- [7] Vidal O, Sanz N, Araguas R M, et al. SNP diversity in introduced populations of the invasive *Gambusia holbrooki*[J]. Ecology of Freshwater Fish, 2012, 21(1): 100-108.
- [8] Shakuntala K, Reddy S R. Influence of body weight/age on the food intake, growth and conversion efficiency of *Gambusia affinis*[J]. Hydrobiologia, 1977, 55(1): 65-69.
- [9] Turner C L. Morphogenesis of the gonopodium in *Gambusia affinis*[J]. Journal of Morphology, 1941, 69(1): 161-185.
- [10] Kuntz A. Notes on the habits, morphology of the reproductive organs, and embryology of the viviparous fish (*Gambusia affinis*)[J]. Bulletin of the United States Bureau of Fisheries, 1913, 33: 177-190.
- [11] Allendorf F W, Lundquist L L. Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species[J]. Conservation Biology, 2003, 17(4): 24-30.
- [12] Wooten M C, Scribner K T, Smith M H. Genetic variability and systematics of *Gambusia* in the southeastern United States[J]. Copeia, 1988, 2: 283-289.
- [13] Hernandez-Martich J D, Smith M H. Patterns of genetic variation in eastern mosquito fish (*Gambusia holbrooki* Girard) from the piedmont and coastal plain of three drainages[J]. Copeia, 1990, 1990(3): 619-630.
- [14] Stolle E, Kidner J H, Moritz R F A. Patterns of evolutionary conservation of microsatellites (SSRs) suggest a faster rate of genome evolution in Hymenoptera than in Diptera[J]. Genome Biology and Evolution, 2013, 5(1): 151-162.
- [15] Hayden M J, Nguyen T M, Waterman A, et al. Multiplex-Ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 80.
- [16] Ziegler J S, Su Y, Corcoran K P, et al. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci[J]. Genomics, 1992, 14(4): 1026-1031.
- [17] Mansfield D C, Brown A F, Green D K, et al. Automation of genetic linkage analysis using fluorescent microsatellite markers[J]. Genomics, 1994, 24(2): 225-233.
- [18] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol[J]. Biotechniques, 1997, 23(3): 504-511.
- [19] Nguyen T T, Kwon H J, Kim I H, et al. Multiplex nested RT-PCR for detecting avian influenza virus, infectious bronchitis virus and Newcastle disease virus[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 188(1-2): 41-46.
- [20] Xu F, Feng S S, Wu R L, et al. Two highly validated SSR multiplexes (8-plex) for Euphrates' poplar, *Populus euphratica* (Salicaceae)[J]. Molecular Ecology Resources, 2013, 13(1): 144-153.
- [21] Zane L, Nelson W S, Jones A G, et al. Microsatellite

- assessment of multiple paternity in natural populations of a live-bearing fish, *Gambusia holbrooki*[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 1999, 12(1): 61-69.
- [22] Sambrook J, Russell D C. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- [23] Spence C C, Chilan C A, Neigel J E, *et al.* Polymorphic microsatellite markers in the western mosquitofish, *Gambusia affinis*[J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 157-168.
- [24] Blouin M S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2003, 18(10): 503-511.
- [25] Jones A G, Ardren W R. Methods of parentage analysis in natural populations[J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12(10): 2511-2523.
- [26] Jones A, Small C M, Paczolt A K, *et al.* A practical guide to methods of parentage analysis[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(1): 6-30.
- [27] Wang J J. Computationally efficient sibship and parentage assignment from multilocus marker data[J]. *Genetics*, 2012, 191(1): 183-194.
- [28] Wang J, Santure A W. Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy[J]. *Genetics*, 2009, 181(4): 1579-1594.
- [29] Wang J J. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors[J]. *Genetics*, 2004, 166(4): 1963-1979.
- [30] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945-959.
- [31] Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies[J]. *Genetics*, 2003, 164(4): 1567-1587.
- [32] 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.
- [33] Glaubitz J C. Convert: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2004, 4(2): 309-310.
- [34] Yeh F C, Hu X S. Genetic structure and migration from mainland to island populations in *Abies procera* Rehd[J]. *Genome*, 2005, 48(3): 461-473.
- [35] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611-2620.

Microsatellite SSR multiplexed amplification to analyze the phylogenetic relationship among invasive mosquitofish (*Gambusia affinis*)

LIU Shiyang¹, SONG Chungao^{1,2}, HE Zhihan^{1,3}, LU Yujun^{1,4},
WU Haisheng^{1,5}, WANG Bo¹, ZENG Yuanqin^{1*}

- (1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, School of Life Science in Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. The No.14 Middle School of Kunming, Kunming 650106, China;
3. Guiyang No.2 Experimental Middle School, Guiyang 550004, China;
4. Qin'an No.1 Middle School of Gansu Province, Tianshui 741600, China;
5. Linchuan No.2 Middle School of Jiangxi Province, Fuzhou 344000, China)

Abstract: Mosquitofish(*Gambusia affinis*) is a globe invasive species. In order to analyze why they can invade so quickly all over the world, 11 polymorphic microsatellite loci were isolated and employed to examine paternity patterns in 755 samples of 53 families from 10 locations in 3 rivers basins. After sequence genetic analysis of the multiplex SSR PCRs, we got the best fullsib family and analyzed the phylogenetic relationship. We found that there are multiple inseminations in *G. affinis*. The female in the same womb can reproduce a number of the juveniles, up to 72, with different males, even up to 9. The max fullsib is 41, but the breeder's size isn't the max even not bigger than others. At the same time the max size of the breeder isn't the female which reproduce the largest number of the juveniles. The phylogenetic tree shows that the evolution was far away the sea. The 10 populations can be obviously divided into 3 clusters. The conclusion can be drawn that the key reason of the invasion is *G. affinis* multiple inseminations. It is suspected that the fertilized frequency isn't proportional to the size of female. Their gene flows rapidly specifically when they were in the migratory distance.

Key words: *Gambusia affinis*; multiplex PCR; SSR; multiple insemination; parentage assessment

Corresponding author: ZENG Yuanqin. E-mail: yqzeng@swu.edu.cn

Funding projects: Doctoral Foundation of Southwest University(swu110064)