

微卫星标记快速鉴别幼鱼阶段的泥鳅与大鳞副泥鳅

陈钢铭 王卫民 曹小娟

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, 武汉 430070

摘要 从 DDBJ 数据库中选取已发表的 47 个泥鳅微卫星标记, 在采自湖北省的大鳞副泥鳅群体中进行跨种扩增, 发现有 44 个微卫星标记能在该群体获得扩增产物, 另外有 3 个微卫星标记 (即 Mac31、Mac63 和 Mac541) 完全不能获得扩增产物。以湖北省泥鳅和大鳞副泥鳅自交子代幼鱼 DNA 为模板, 采用 Mac31、Mac63 和 Mac541 这 3 个微卫星标记的引物对进行 PCR 扩增, 结果显示在以泥鳅自交子代幼鱼 DNA 为模板的体系中能扩增出目的条带, 在以大鳞副泥鳅自交子代幼鱼 DNA 为模板的体系中完全不能扩增出目的条带。因此, Mac31、Mac63 和 Mac541 这 3 个微卫星标记可用来鉴别幼鱼阶段的泥鳅与大鳞副泥鳅。

关键词 微卫星标记; 泥鳅; 大鳞副泥鳅; 幼鱼; 鉴别

中图分类号 S 917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0117-04

对于鱼类不同物种或品系的鉴别, 有效方法是建立科学的形态学指标判别函数。李思发^[1-2]曾对不同团头鲂种群和尼罗罗非鱼品系的形态学判别函数进行了分析研究。然而, 许多种鱼类 (尤其是小型鱼类) 在仔、稚、幼鱼阶段规格比较小, 因而较难建立准确的形态学判别函数来进行物种或品系的鉴别。因此, 要进行早期的物种鉴别, 一般需要开发一些有效的分子标记。现今, 多种分子标记, 如限制性片段长度多态性标记 (RFLP)、扩增片段长度多态性标记 (AFLP) 和随机扩增多态性 DNA 标记 (RAPD) 已经广泛应用于动植物的物种鉴别研究中^[3-7], 然而这些标记在实际应用中操作起来较为烦琐。微卫星标记 (SSR) 不仅具有 RFLP 的优点, 而且还操作简便、快速和经济, 这使得 SSR 成为物种和品系鉴别研究中使用最为广泛的一种分子标记^[8-10]。

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 与大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 分别隶属于鳅科泥鳅属和副泥鳅属, 广泛分布于中国、日本、朝鲜、俄罗斯及印度等地。在我国除青藏高原外, 全国各地河川、沟渠、水田、池塘、湖泊及水库等天然淡水水域中均有分布, 尤其在长江和珠江流域中下游分布极广, 群体数量大, 是我国 2 种重要的小型淡水经济鱼

类^[11-12]。泥鳅与大鳞副泥鳅近缘, 外形相似且常常同域存在^[13], 人们常利用一些形态学指标来区分它们, 例如泥鳅背鳍之前略呈圆筒形, 背鳍之后侧扁, 而大鳞副泥鳅体侧扁, 且越靠近尾鳍越侧扁; 另外还有泥鳅体被细鳞, 大鳞副泥鳅的鳞片较泥鳅大等^[14]。但是, 对于泥鳅和大鳞副泥鳅的幼鱼, 人们很难通过形态学指标对其进行区分。本研究选取已发表的 47 个泥鳅 SSR 标记, 在大鳞副泥鳅群体中进行跨种扩增, 筛选出不能获得扩增产物的 SSR 标记, 然后将这些标记放在泥鳅和大鳞副泥鳅自交子代幼鱼中进行检测, 旨在获得能够用于鉴别幼鱼阶段泥鳅和大鳞副泥鳅的 SSR 标记, 为今后这 2 种鳅类的群体遗传学和种群保护研究提供有效的分析工具。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的泥鳅与大鳞副泥鳅成鱼购买自湖北省武汉市白沙洲水产品市场。

1.2 泥鳅与大鳞副泥鳅自交子代的繁殖与养殖

挑选性成熟的雌性 (25.1~48.3 g) 和雄性 (11.3~28.4 g) 泥鳅及大鳞副泥鳅, 注射催产激素 LHRH-A₂ (20 μg/kg) 和 DOM (4 mg/kg), 约 12 h

收稿日期: 2013-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201719)

陈钢铭, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种, E-mail: 1835093916@qq.com

通讯作者: 曹小娟, 博士, 讲师, 研究方向: 水产养殖与遗传育种, E-mail: caoxiaojuan@mail.hzau.edu.cn

后进行人工授精,获得泥鳅和大鳞副泥鳅自交子代。将泥鳅与大鳞副泥鳅的子代分别置于 1.0 m×0.5 m 的长方形塑料水箱中饲养。

1.3 基因组 DNA 的提取

剪取 40 尾泥鳅成鱼和 40 尾大鳞副泥鳅成鱼的鳍条,另外随机剪取 8 尾泥鳅幼鱼(0.21±0.013 g)和 8 尾大鳞副泥鳅幼鱼(0.23±0.011 g)的鳍条,所有鳍条存放于装满 95%乙醇的 1.5 mL 的离心管中。参照改进后的醋酸铵/异戊醇法^[15]提取基因组 DNA,然后用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度,并将各样品的质量浓度稀释至 100 ng/μL,−20℃保存备用。

1.4 SSR 分析

47 个泥鳅微卫星标记(表 1)筛选自 DDBJ 数据

库和 Morishima 等^[16]的研究报道。47 个微卫星标记的引物对由上海生物工程服务有限公司合成。PCR 反应的总体积为 10 μL,其中含 100 ng/μL 的模板 DNA 0.5 μL,1.0 μL 的 10×Buffer(含 Mg²⁺),0.2 μL 的 10 mmol/L dNTPs,0.1 μL 的 0.5 U/μL 的 Taq DNA 聚合酶,10 μmol/L 正向及反向 SSR 引物各 0.25 μL。PCR 循环参数为:94℃ 5 min;94℃ 1 min,梯度退火温度下 30 s,72℃ 45 s,30 个循环;72℃ 5 min,然后 4℃ 保存。其中退火温度设置温度梯度,从 55~62℃ 设置 8 个温度梯度。扩增产物在 3.0% 的 MetaPhor 琼脂糖凝胶上电泳。分子质量标准为 1 kb DNA Ladder Plus(MBI)。利用凝胶图象分析系统 GDS-7600(UVP)记录扩增结果。

表 1 47 个泥鳅微卫星标记

Table 1 Names of 47 microsatellites loci of *Misgurnus anguillicaudatus* and their DDBJ accession numbers

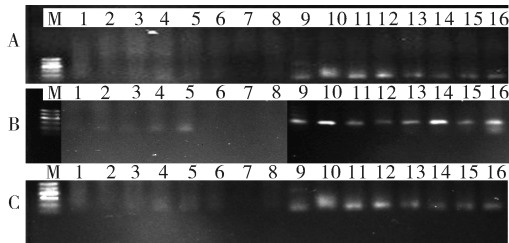
位点 Locus	DDBJ accession No.	位点 Locus	DDBJ accession No.	位点 Locus	DDBJ accession No.	位点 Locus	DDBJ accession No.	位点 Locus	DDBJ accession No.
Mac2 ^a	AB060172	Mac60	AB081631	Mac262	AB303468	Mac404	AB303512	Mac541	AB303588
Mac21	AB081619	Mac63	AB081633	Mac264	AB303470	Mac425	AB303516	Mac559	AB303592
Mac24 ^a	AB060178	Mac103	AB303436	Mac276	AB303473	Mac429	AB303518	Mac574	AB303594
Mac31	AB081622	Mac105	AB303437	Mac277	AB303474	Mac449	AB303519	Mac576	AB303595
Mac36 ^a	AB060180	Mac133	AB303444	Mac291	AB303477	Mac456	AB303522	Mac605	AB303605
Mac37 ^a	AB060181	Mac140	AB303445	Mac293	AB303478	Mac477	AB303575	Mac612	AB303607
Mac45 ^a	AB060185	Mac167	AB303453	Mac320	AB303483	Mac497	AB303578	Mac627	AB303610
Mac47	AB081625	Mac190	AB303455	Mac331	AB303487	Mac519	AB303584		
Mac49 ^a	AB060186	Mac229	AB303459	Mac361	AB303496	Mac523	AB303585		
Mac51	AB081627	Mac242	AB303463	Mac387	AB303506	Mac532	AB303586		

2 结果与分析

2.1 SSR 引物在湖北泥鳅成鱼和大鳞副泥鳅成鱼中的扩增

用 47 对引物在以湖北泥鳅成鱼基因组 DNA 为模板的体系中进行扩增,每个引物对都能扩增出较好的目的条带。这表明筛选出的这 47 个泥鳅 SSR 标记有着较好的稳定性。采用这 47 对引物在以湖北大鳞副泥鳅成鱼基因组 DNA 为模板的体系中进行扩增,有 44 对能扩增得到目的条带,但条带明暗均有,质量不一。另外 3 个 SSR 标记 Mac31(图 1-A)、Mac63(图 1-B)和 Mac541(图 1-C)的引物对完全不能扩增出条带,说明这 3 对来自泥鳅的 SSR 引物在大鳞副泥鳅中不具有通用性。引物 Mac31 在以大鳞副泥鳅 DNA 为模板的体系中的 8 个退火温度下均不能扩增出条带,而在泥鳅模板中 57℃ 和 58℃ 退火温度条件下能扩增出较亮且无杂

带的目的条带。



M. DNA Ladder; 1-8. 大鳞副泥鳅成鱼 Adult *Paramisgurnus dabryanus*; 9-16. 泥鳅成鱼 Adult *Misgurnus anguillicaudatus*.

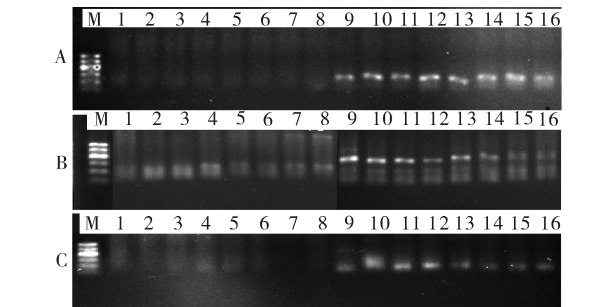
图 1 Mac31(A)、Mac63(B)和 Mac541(C)在泥鳅成鱼和大鳞副泥鳅成鱼中的扩增结果

Fig.1 PCR results of microsatellite Mac31(A), Mac63(B) and Mac541(C) in adult *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus*

2.2 SSR 引物在湖北泥鳅幼鱼和大鳞副泥鳅幼鱼中的扩增

利用 Mac63、Mac31 和 Mac541 三个引物对在

以湖北泥鳅自交子代幼鱼和大鳞副泥鳅自交子代幼鱼 DNA 为模板的体系中进行 PCR 扩增。结果显示,Mac31、Mac63 和 Mac541 在以泥鳅 DNA 为模板的体系中扩增出了目的条带,而在以大鳞副泥鳅 DNA 为模板的体系中没有扩增出目的条带(图 2)。这表明,在利用子代形态还不能明显区分泥鳅与大鳞副泥鳅个体的情况下,利用 SSR 标记能较好地区分出泥鳅与大鳞副泥鳅幼鱼。引物 Mac31 在大鳞副泥鳅幼鱼模板中的 8 个温度下均不能扩增出条带,而在泥鳅幼鱼模板中的 55、56、57 和 58 ℃ 退火温度条件下均能扩增出较亮且无杂带的目的条带。



M. DNA Ladder; 1-8. 大鳞副泥鳅幼鱼 Juvenile *Paramisgurnus dabryanus*; 9-16. 泥鳅幼鱼 Juvenile *Misgurnus anguillicaudatus*.

图 2 Mac31(A)、Mac63(B) 和 Mac541(C) 在泥鳅幼鱼和大鳞副泥鳅幼鱼中的扩增结果
Fig. 2 PCR results of microsatellite Mac31(A), Mac63(B) and Mac541(C) in juvenile *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus*

3 讨论

众所周知,作为一种分子标记,微卫星广泛分布于动植物的基因组中,呈现出共显性和高度多态性的特点^[17]。另外,微卫星片段小且在低质量的 DNA 样本中还能够稳定存在也是该标记能够非常广泛应用于物种或品系鉴别研究的一个很重要的原因。这里列举一个很有趣的微卫星鉴别品系的案例(芬兰钓鱼比赛欺诈案)^[18]。在这个案例中,微卫星分型数据显示一位竞赛者所获得的大西洋鲑并不是来自于垂钓竞赛区——芬兰东南部的赛马湖,最终这位竞赛者承认他的大西洋鲑其实是购自一个非垂钓竞赛区的渔场。

王元军^[19]在对泥鳅和大鳞副泥鳅形态特征进行研究的基础上,经逐步判别分析筛选了 3 项形态指标,建立了识别泥鳅与大鳞副泥鳅的判别函数,需要量取体长、头长、尾柄长、吻背长、吻腹长、吻臀长、

体高、吻长、颌须、尾柄高、尾柄皮褶长和纵列鳞等 12 个形态学指标,并计算体高/体长、吻腹长/体长、头长/体长、吻长/头长、尾柄高/尾柄长、颌须/头长、吻背长/体长、吻臀长/体长和皮褶长/体长等 9 个性状比值。这个方法在区分泥鳅成鱼与大鳞副泥鳅成鱼的研究中可以有效地实施,因为成鱼的各个形态学性状都可以较准确地测量。但是当需要辨别在形态上还难以区分是泥鳅还是大鳞副泥鳅的一些特殊生长阶段,如仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期,利用相关测量仪器难以精确测量鱼体的多项形态学指标,如吻长、颌须和纵列鳞等性状测量难度大,且测量误差非常大。因此,本研究筛选出 3 个用于鉴别泥鳅幼鱼和大鳞副泥鳅幼鱼的 SSR 标记,这些标记还可以推广到处于仔稚鱼期的泥鳅和大鳞副泥鳅的鉴别,这就解决了早期泥鳅与大鳞副泥鳅鉴别难的问题,为今后这 2 种鳅类的群体遗传学和种群保护研究提供了有效的分析工具。

参 考 文 献

[1] 李思发. 团头鲂种群间的形态学差异和生化遗传差异[J]. 水产学报,1991,15(3):204-211.
[2] 李思发. 尼罗罗非鱼品系间形态差异分析[J]. 动物学报,1998,44(4):450-457.
[3] ZHANG Q F, SAGHAI-MAROOF M A, LU T Y, et al. Genetic diversity and differentiation of *indica* and *japonica* rice detected by RFLP analysis[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 83(4):495-499.
[4] QIAN H R, ZHUANG J Y, LIN H X, et al. Identification of a set of RFLP probes for subspecies differentiation in *Oryza sativa* L. [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 90(6):878-884.
[5] PARSONS B J, NEWBURY H J, JACKSON M T, et al. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types[J]. Molecular Breeding, 1997, 3(2):115-125.
[6] WELSH J, MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18:7213-7218.
[7] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21):4407-4414.
[8] HERBINGER C M, DOYLE R W, PITMAN E R, et al. DNA fingerprintbased analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout[J]. Aquaculture, 1995, 137:245-256.

[9] LIU Z J, CORDES J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. Aquaculture, 2004, 238:1-37.

[10] 游翠红, 童金苟, 俞小牧. 大鳞副泥鳅 7 个群体遗传变异的微卫星分析[J]. 水生生态学杂志, 2012, 33(1):84-91.

[11] 方礼豹, 周小云, 崔蕾, 等. 二倍体、四倍体泥鳅与大鳞副泥鳅杂交子代 DNA 相对含量与染色体组型的比较[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4):500-505.

[12] 游翠红, 童金苟, 俞小牧. 大鳞副泥鳅 *Sox* 基因保守区的克隆与特征分析[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(4):490-498.

[13] 周玲玲, 张桂蓉, 魏开建, 等. 同域分布二倍体和四倍体泥鳅群体的遗传结构[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(5):624-630.

[14] 郭伟荣, 邱伟强, 王武, 等. 不同地域泥鳅和大鳞副泥鳅的染色体倍性比较与分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17):8030-8032.

[15] NICHOLLS J A, DOUBLE M C, ROWELL D M, et al. The evolution of cooperative and pair breeding in thornbills *Acanthiza* (Pardalotidae)[J]. Journal of Avian Biology, 2000, 31:165-176.

[16] MORISHIMA K, NAKAYAMA I, ARAI K. Genetic linkage map of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae)[J]. Genetica, 2008, 132:227-241.

[17] ZANE L, BARGELLONI L, PATARNELLO T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. Molecular Ecology, 2002, 11:1-16.

[18] PRIMMER C R, KOSKINEN M T, PIIRONEN J. The one that did not get away: individual assignment using microsatellite data detects a case of fishing competition fraud[J]. Proceedings of the Royal Society-Biological Sciences, 2000, 267(1453):1699-1704.

[19] 王元军. 基于判别分析的泥鳅和大鳞副泥鳅识别[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(2):564-568.

Development of microsatellite markers for identifying *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus* in juvenile stage

CHEN Gang-ming WANG Wei-min CAO Xiao-juan

College of Fisheries/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Forty-seven *Misgurnus anguillicaudatus* microsatellite markers were randomly selected from DDBJ database and used for cross-species amplification in a population of *Paramisgurnus dabryanus* from Hubei Province. Forty-four pairs of primers amplified *P. dabryanus* DNA, while 3 primers including Mac31, Mac63 and Mac541 failed. Using genomic DNA of selfing offsprings juveniles of *M. anguillicaudatus* and *P. dabryanus* as templates, PCR amplifications were performed using three primers of Mac31, Mac63 and Mac541. The results showed that target bands were detected only in selfing offsprings of *M. anguillicaudatus*, suggesting that markers of Mac31, Mac63 and Mac541 are useful for identifying *M. anguillicaudatus* and *P. dabryanus* at the juvenile stage.

Key words microsatellite markers; *Misgurnus anguillicaudatus*; *Paramisgurnus dabryanus*; juvenile; identify

(责任编辑:边书京)