

SSR-BSA 技术对乌鳢性别差异标记的初步筛选

刘改艳^{1,2}, 陈昆慈¹, 郑光明^{1*}, 朱新平¹, 赵建¹, 徐鹏³, 孙效文⁴

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 中国水产科学研究院, 北京 100039;

4. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 采用 SSR 结合 BSA 技术对 1 个家系 96 个乌鳢个体(雌雄各 48 个)进行性别差异标记的筛选。首先构建了雌雄基因池(各 24 个个体), 然后用 140 对微卫星引物对其进行扫描, 发现 3 对引物(HLJWL17, HLJWL59, HLJWL70)在雌雄基因池间扩增出差异条带, 且都出现在雌性基因池中。用构建基因池的 48 个个体对 3 对引物进行第一轮单个体验证, HLJWL17 和 HLJWL70 在基因池中扩增出的差异条带仅在极个别个体中出现, 而 HLJWL59 的差异条带在绝大多数的雌性个体中被成功扩增出来, 雄性个体皆无。用其余的 48 个个体对 HLJWL59 进行第二轮单个体验证, 得到同样结果。对 HLJWL59 在 8 个雌性个体中扩增出来的差异基因片段进行克隆并测序。将 8 个个体的测序结果用 Vector 8.0 进行多序列比对, 证实各个个体得到的条带是同一序列, 该序列长度为 243 bp, 以 TGC 为重复单位, GC 含量为 51%。通过 BLASTn 比对, 发现在 GenBank 数据库中无同源性序列存在。经统计, 此差异标记在雌性乌鳢中出现的概率为 62.5%, 即该标记对该家系乌鳢性别的正确判别率为 81.25%。

关键词: 乌鳢; 微卫星; 性别差异; 混合分离群体法

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

乌鳢 (*Channa argus*) 和斑鳢 (*Channa maculata*), 同属鲈形目 (Perciformes), 鳢科 (Channidae), 鳢属 (*Channa*), 俗名为生鱼、黑鱼等。因其具有生肌补血等药用价值, 且肉嫩刺少, 深受消费者喜爱, 加上适应性强, 目前是我国重要的养殖品种。乌鳢比斑鳢分布广, 以食小杂鱼、冰鲜鱼为主, 较难驯食人工配合饲料, 养殖成本较高。在养殖实践中, 人们发现以乌鳢作为父本与斑鳢杂交的 F₁ 代, 综合了亲本的优点, 且其雌雄个体生长速度差异很大, 成鱼中雄性平均体重超过雌性的 2 倍。因此, 开展杂交鳢全雄育种技术研究, 对于提高杂交鳢的养殖产量和经济效益具有重要意义。进行此技术的研究开发首先需要了解亲本的性别决定机制。因此, 本研究用分子标记技术对乌鳢的性别决定机制进行了初步的探索。在开展鱼类全雄育种技术研究中, 筛选与性别相关的分子标记成为关键。目前, 在国

内外已有一些鱼类的性别特异性标记的报道, 如罗非鱼 (*tilapia*)^[1-2]、鳟 (*Salmo trutta* L.)^[3]、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[4]、圆斑星鲽 (*Verasper variegatus*)^[5]、大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*)^[6] 等。

简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR), 又称为微卫星 DNA, 是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列, 由 2~6 个核苷酸的串联重复片段构成。目前广泛应用于品种鉴定、遗传多样性分析、重要性状标记筛选和遗传图谱的构建等领域^[7-11]。分离群体分组分析法 (bulked segregant analysis, BSA), 又称分群分析法, 是 MICHELMORE 等^[12] 于 1991 年提出的分析方法, 其基本原理是从某一分离群体中筛选出一定数量具有目标基因表型差异的植株, 分别构成 2 个亚群或集团。将每群的 DNA 等量混合, 形

收稿日期: 2010-09-14 修回日期: 2010-11-05

资助项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903045)

通讯作者: 郑光明, Tel, 020-81616509, E-mail: zgmzyl@tom.com

成 2 个相对性状的“基因池”,然后用合适的分子标记对 2 个“基因池”进行分析。因其具有快速有效的特点,现在已经广泛应用于动植物抗性基因、生长相关性状的筛选、鉴定及作图方面^[13-16]。

本研究利用 SSR 结合 BSA 技术检测乌鳢雌雄基因组 DNA 间的差异,筛选出可能与乌鳢性别相连锁的微卫星标记,为开展乌鳢与斑鳢杂交全雄育种技术研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

96 尾乌鳢(雌雄各 48 尾)采自中山市三角镇裕荣水产良种养殖场 1 个乌鳢家系,体重为 100~150 g,体长为 12~17 cm,分别取肝脏和鳍条放于无水乙醇中,-20℃保存,供 DNA 提取用;同时取性腺,在显微镜下观察,鉴定其雌雄。

1.2 DNA 提取

采用天根 DP324-03 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒,按其说明书进行。提取的 DNA 用 1% 琼脂糖和紫外分光光度计进行浓度和质量的测定。用无菌水稀释至 50 ng/ μ L 左右。

1.3 BSA 基因池的建立

雌雄个体各 24 个,每个取 20 μ L DNA 溶液混合构成相应的雌雄基因池。

1.4 引物及 PCR 扩增

实验所用 140 对引物中,139 对乌鳢微卫星引物由孙效文研究员提供,另外 1 对来自 LEE 等^[1],为奥利亚罗非鱼性别特异的微卫星引物。

PCR 反应总体系为 1.5 μ L,含有 10 \times Buffer 15 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.0 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.2 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.3 μ L, Taq 酶 0.5 U,模板 DNA 50 ng 左右。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。通过上述 PCR 程序,开展引物筛选。PCR 所用试剂均购自北京绿生源公司,PCR 仪为 AB 9700(Applied Biosystems,USA)。

1.5 电泳与染色

首先取 5 μ L 在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,然后再用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,上样量为 2 μ L,电泳缓冲液为 1 \times TBE,电压 150 V 电泳时间为 2~3 h。DNA marker 上样量为 2 μ L。电泳后进行银染,染色方法参照许绍斌等^[17]的方法。

1.6 差异条带的筛选与验证

以 140 对引物对所构建的雌雄基因池进行 PCR 扩增反应,分析各对引物扩增产物的 SSR 电泳图谱,初步找出雌雄两个群体的差异性条带作为候选的性别特异 SSR 分子标记,将所对应的引物,按照上述 PCR 条件对构建雌雄基因池的 48 个乌鳢个体进行 PCR 扩增,分析有差异的等位基因片段在个体上具体的扩增情况,然后用其余的 48 个个体进行同样的操作,以进一步验证所得候选标记的正确性。

1.7 差异等位基因片段的克隆与测序

对 8 个雌性个体的差异条带进行克隆与测序。克隆参考李静^[18]和李卫东等^[19]的方法,用筛选到的普通非荧光引物重新进行 PCR 扩增、电泳、银染显示目的条带。用无外源 DNA 污染的手术刀从聚丙烯酰胺凝胶上切下目的条带,加 50 μ L 双蒸水洗涤,5 000 r/min,离心 1 min,吸取双蒸水,再加 30 μ L 的无菌水,捣碎凝胶,4℃ 过夜。12 000 r/min 离心 5 min,吸上清作为 2 次 PCR 扩增的模板。2 次 PCR 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳,用普通 DNA 凝胶回收试剂盒(TIANGEN)进行回收,按说明书提供的方法进行纯化。将目的 DNA 片段连接 pMD18-T(TaKaRa)载体后转化 DH5 α 菌株,阳性克隆送上海生工进行测序。测序结果,用 BLASTn 方法搜索该雌性特异标记在 GenBank 数据库中的同源序列。

2 结果

2.1 基因组 DNA 的提取与 DNA 样品池建立

通过试剂盒提取的基因组 DNA,经紫外分光光度计检测的结果显示,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值皆在 1.80~2.00。琼脂糖凝胶电泳分析表明,提取的基因组 DNA 样品片段比较完整,如图 1 为部分 DNA 样品电泳图。

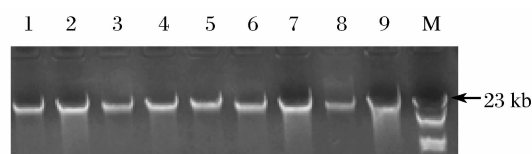


图 1 基因组 DNA 电泳图

1~9. DNA 样品, M. DNA 标记。

Fig. 1 DNA electrophoretogram of samples

1-9. DNA samples, M: DNA Marker.

将雌雄个体各 24 个样品,每个取 20 μL DNA 溶液混合构成相应的雌雄基因池,用于 BSA 分池 PCR 扩增和引物筛选。

2.2 BSA 分池 PCR 扩增结果分析

用 140 对微卫星引物对所构建的雌雄基因池进行 PCR 扩增,扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明,140 对引物中,除了包括奥利亚罗非鱼的性别特异微卫星引物在内的 17 对引物

无扩增产物外,其他引物均能稳定扩增出清晰条带,但均为 1 条谱带。同时对 PCR 产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳并银染,部分电泳结果如图 2。引物 HLJWL17,HLJWL59 和 HLJWL70 在雌雄基因池中扩增出差异片段,且 3 对引物扩增出来的差异条带均出现在雌基因池中。使用 AlphaEaseFC 4.0 软件计算差异条带的碱基数,HLJWL59 扩增出的差异条带约为 243 bp。

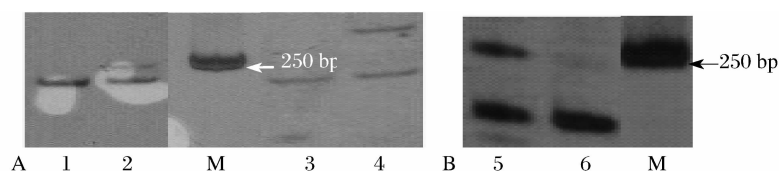


图 2 引物 HLJWL70(1,2),HLJWL17(3,4)和 HLJWL59(5,6)的 SSR 结合 BSA 扩增图

1,3,6. 雄性基因池,2,4,5. 雌性基因池,M. DL2000 分子标记。

Fig. 2 The bands amplified by primers HLJWL70(1,2),HLJWL17(3,4) and HLJWL59(5,6) in BSA

1,3,6. male; 2,4,5. female; M. DL2000 DNA marker.

2.3 差异等位基因片段在乌鳢个体中的验证

将 BSA 池中筛选到的 3 对引物首先在构建基因池的 48 个个体中分别进行 PCR 扩增,通过 PAGE 电泳分析差异等位基因片段在不同个体间的扩增情况。结果发现,引物 HLJWL70 和 HLJWL17 的差异

条带仅在极个别的个体中出现,HLJWL59 的差异条带则在绝大多数的雌性个体中扩增出来,雄性个体中未扩增出来,与 BSA 中的结果一致(图 3-A)。用其余的 48 个个体对 HLJWL59 进行第二轮的单个体验证,结果相同(图 3-B)。

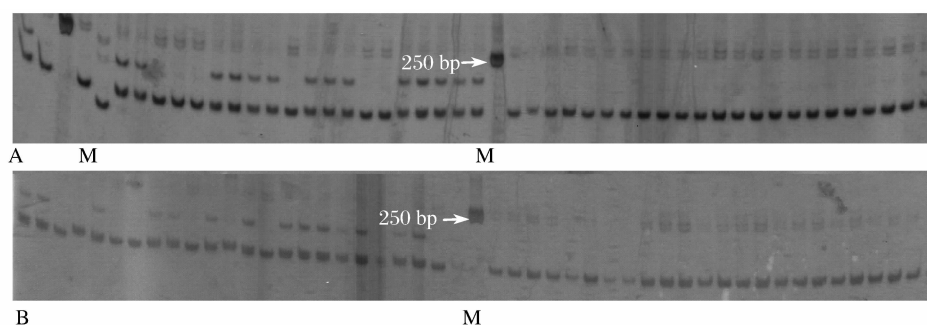


图 3 引物 HLJWL59 产生的雌性特异带在养殖群体 96 个个体中的扩增

M. DL2000 分子标记,M 左皆为雌性个体,M 右皆为雄性个体。

Fig. 3 Significantly different band amplified by primer HLJWL59 in cultured population

M. DL2000 DNA Marker, left of M is female, right of M is male.

从图 3 可以看出,微卫星引物 HLJWL59 在雌雄个体中的带型差异显著。经统计 243 bp 的差异等位基因片段在雌性个体的扩增图谱中出现的频率较高,48 个个体中有 30 个个体扩增出该片段(62.5%),雌性个体性别正确鉴定 30 个,雄性 48 个,其性别正确鉴定率为 81.25%。此结果与 BSA 分析的结果相吻合。可见该位点的这个差异片段对乌鳢的性别有明显的偏好性,该微卫星位点可能与乌鳢的性别决定区域存在一定的相

关关系,为雌性乌鳢特异性标记。

2.4 差异等位基因片段的克隆与测序结果

对 HLJWL59 在 8 个雌性个体中扩增出来的差异等位基因片段进行克隆并测序。将 8 个个体的测序结果用 Vector 8.0 进行多序列比对,证实各个个体得到的条带是同一序列,该序列长度为 243 bp。序列如下:

CAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATT-
GCTGTGTTTGGACTGATGATGGTGTGCTG-

CTGCTGCTGCTGCTGATGATGATGATGCTGC-
TGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT-
GATGCTGCTGCTGCTGCTGATGCAACTGTTG-
TTGTTATTGTTATTGATGATGATGGTGCATT-
CTCTGTTGCTGCTGTGTCTGCATTTGTTGTG-
ACTGTTTCGACAGTTGTTGACGAGGCTGA

通过 BLASTn 比对,发现其在 GenBank 数据库中无同源性序列存在。此片段以 TGC 为重复单位,GC 含量为 51%。

3 讨论

近年来, RAPD、RFLP、AFLP、SRAP 和 SSR 等分子标记可广泛应用于鱼类性别相关标记研究。KOVACS 等^[20]及 ITURRA 等^[21-22]用 RAPD 的方法分别在非洲鲶 (*Clarias gariepinus*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中找到了性别相关的分子标记, CHEN 等^[23]在黄河鲤 (*Cyprinus carpio*) 中找到雄性特异的分子标记。GRIFFITHS 等^[24]采用 AFLP 的方法在三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 中鉴定出了两个 Y 染色体特异的片段, CHEN 等^[4]和 MA 等^[5]在半滑舌鳎和圆斑星鲽中找到了雌性特异的 AFLP 片段。

微卫星进行性别差异筛选也有报道,如在罗非鱼^[1-2],湖红点鲑 (*Salvelinus namaycush*)^[25]和孔雀鱼 (*Poecilia reticulata*)^[26-27]。NANDA 等^[26]在孔雀鱼近交群体中发现, (GATA)₄ 探针在经过酶切的雄性孔雀鱼的基因组 DNA 中标记出一条大于 23 kb 的特异片段,他们推断重复序列可能与孔雀鱼性染色体的早期分化相联系。而 HORNADAY 等^[27]用同种方法在孔雀鱼自然群体中寻找却失败了。HORNADAY 等^[27]分析,雄性特异片段在自然群体中可能是多态的。另外他们认为 NANDA 等^[26]找到的雄性特异片段是近交的结果。NANDA 等^[26]的研究中,用的材料鱼都是在实验室环境下高度自交的,或者是来自经过多次群体大小限制的养殖个体,在这些个体中,雄性特异的片段被固定下来,这就使被检测出来成为可能。

本研究中,在乌鳢养殖群体中找到了一条与性别相关的位点,得到此结果可能有以下几个原因:(1) 所用材料来自同一家系,亲缘关系很近,遗传背景相同;(2) 此家系系同池养殖,群体面对的是相同的环境条件,即人为影响相同的,面对来自各方面的压力也是相同。这在理论上使个体只

表现出遗传物质上极个别方面的差异,性别便是其一。幸运的是,我们采用的 140 对引物中的一对引物正好在雌雄差异的范围内。鉴于鱼类性别决定机制的复杂性,要想完全清楚乌鳢的性别决定机制,需要更多的研究与分析。

由于鱼类的特殊进化地位,其遗传差异很大,一种鱼类上筛选出的性别特异标记,在其他鱼类上可能没有效果^[21,28-29]。本研究用奥利亚罗非鱼性别相关的微卫星引物在乌鳢中未扩增出产物,也证明了这一点。利用分池法对乌鳢进行性别相关分子标记筛选是一种有效的方法,可以使工作量大大减少。以本实验为例,先构建雌雄基因池,进行初步筛选,这样既可以淘汰掉绝大多数没有扩增多态性的引物组合,又可以初步筛选出目标组合。如果直接用单个个体进行鉴定,工作量会异常繁重。

本研究采用 SSR 分子标记技术,初步获得 1 个与乌鳢性别相关的分子标记。据我们了解,这是第一次对与乌鳢性别相关的 DNA 标记的报道。这对探索乌鳢性别决定机制以及克隆其性别决定基因,进而开展分子标记辅助育种工作具有重要的意义。

参考文献:

- [1] LEE B Y, HULATA G, KOCHER T D. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. Heredity, 2004, 92 (6): 543-549.
- [2] LEE B Y, PENMAN D J, KOCHER T D. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis [J]. Anim Genet, 2003, 34 (5): 379-383.
- [3] PRODOHL P A, TAGGART J B, FERGUSON A. Single locus inheritance and joint segregation analysis of minisatellite (VNTR) DNA loci in brown trout (*Salmo trutta* L.) [J]. Heredity, 1994, 73: 556-566.
- [4] CHEN S L, LI J, DENG S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Mar Biotechnol, 2007, 9 (2): 273-280.
- [5] MA H Y, CHEN S L, YANG J F, et al. Isolation of sex-specific AFLP markers in Spotted halibut (*Verasper variegatus*) [J]. Environ Biol Fish, 2010, 88 (1): 9-14.

- [6] XIA X H, ZHAO J, DU Q Y, *et al.* Cloning and identification of a female-specific DNA marker in *Paramisgurnus dabryanus* [J/OL]. *Fish Physiol Biochem*, 2010, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20607392>.
- [7] ALDBIESER G C, WOLTERS W R. Definition of the USDA103 strain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Animal Genetics*, 2007, 38 (2): 180 - 183.
- [8] LEE W J, KOCHER T D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Fish Biology*, 1996, 49 (1): 169 - 17
- [9] 周莉, 刘静霞. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探 [J]. *动物学研究*, 2001, 22 (4): 257 - 264.
- [10] 葛学亮, 尹洪滨, 毕冰, 等. 黄颡鱼遗传图谱构建及生长相关性状的 QTL 定位 [J]. *水产学报*, 2010, 34 (2): 185 - 193.
- [11] 许可, 马爱军, 王新安, 等. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 生长性状相关的微卫星标记筛选 [J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40 (5): 577 - 583.
- [12] MICHELMORE R W, PARAN I, KESSELI R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88 (21): 9828 - 9832.
- [13] SUN X, BAI B, CARVER B F, *et al.* Molecular mapping of wheat leaf rust resistance gene Lr42 [J]. *Crop Sci*, 2009, 50 (1): 59 - 66.
- [14] TRIPATHI N, HOFFMANN M, WEIGEL D, *et al.* Linkage analysis reveals the independent origin of poeciliid sex chromosomes and a case of atypical sex inheritance in the guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. *Genetics*, 2009, 182 (1): 365 - 374.
- [15] 严长杰, 梁国华, 朱立煌, 等. 秋稻品种 Dular 广亲和基因的 RFLP 分析 [J]. *遗传学报*, 2000, 27 (5): 409 - 417.
- [16] 白素兰, 刘永胜, 孙敬三, 等. 水稻颖花开裂基因 srs-1 定位及其同源异型功能分析 [J]. *中国科学 (C 辑)*, 2000, 30 (4): 337 - 341.
- [17] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法 [J]. *遗传*, 2002, 24 (30): 335 - 336.
- [18] 李静. 半滑舌鳎养殖群体遗传结构分析及性别特异 AFLP 分子标记的筛选 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [19] 李卫东, 孟祥文, 李伟. 一种从银染后聚丙烯酰胺凝胶中回收、克隆 DNA 的方法 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 1997, 14 (6): 380 - 381.
- [20] KOVACS B, EGEDI S, BARTFAI R, *et al.* Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Genetica*, 110 (3): 267 - 276.
- [21] ITURRA P, MEDRANO J F, BAGLEY M, *et al.* Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent *in situ* hybridization in rainbow trout [J]. *Genetica*, 1997, 101 (3): 209 - 213.
- [22] ITURRA P, LAM N, DE LA FUENTE M, *et al.* Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) [J]. *Genetica*, 2001, 111 (1 - 3): 125 - 131.
- [23] CHEN J J, WANG Y L, YUE Y Y, *et al.* A novel male-specific DNA sequence in the common carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2009, 23 (5): 235 - 239.
- [24] GRIFFITHS R, ORR K J, ADAM A, *et al.* DNA sex identification in the three-spined stickleback [J]. *Fish Biol*, 2000, 57 (5): 1331 - 1334.
- [25] STEIN J, REED K M, WILSON C C, *et al.* A sex-linked microsatellite locus isolated from the Y chromosome of lake chart, *Salvelinus namaycush* [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2002, 64 (21): 1 - 216.
- [26] NANDA I, FEICHTINGER W, SCHMID M, *et al.* Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish [J]. *Mol Evol*, 1990, 30 (5): 456 - 462.
- [27] HORNADAY, ALEXANDER S, BREDE N F. Absence of repetitive DNA sequences associated with sex chromosomes in natural populations of the Trinidad guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. *Mol Evol*, 1994, 39 (4): 431 - 433.
- [28] ITURRA P, BAGLEY M, VERGARA N, *et al.* Development and characterization of DNA sequence OmyP9 associated with the sex chromosomes in rainbow trout [J]. *Heredity*, 2001, 86: 412 - 419.
- [29] VOLF J N, KONDO M, SCHARTL M. Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish [J]. *Trends Genet*, 2003, 19 (4): 196 - 199.

Screening and identification of female-specific DNA fragments in *Channa argus* using SSR-BSA

LIU Gai-yan^{1,2}, CHEN Kun-ci¹, ZHENG Guang-ming^{1*}, ZHU Xin-ping¹,
ZHAO Jian¹, XU Peng³, SUN Xiao-wen⁴

(1. Pearl River Fisheries Research Institute (PRFRI), Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China;

4. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Microsatellites combined with bulked segregation analysis (BSA) were used to screen the gender differences of 96 individuals (48 for male and female each) from a family of *Channa argus*. Two gene pools were constructed using 24 individuals for male and female each separately, gene pools were used to scan using totally 140 pairs of microsatellite primers and specific DNA fragments of female gene pool were amplified by 3 pairs of primers (HLJWL17, HLJWL59, HLJWL70). Then, the specific DNA fragments amplified by the three pairs of primers were verified for the first round in the 48 individuals constructing the gene pools, showing that the specific bands of HLJWL17 and HLJWL70 in gene pools only appeared in few individuals, while HLJWL59 was successfully amplified in females. And in the second round verification, the same results were obtained in the remaining 48 individuals with the HLJWL59. The amplified fragments by primer HLJWL59 of eight different alleles in females were cloned and sequenced. Sequence alignment of the eight individuals using Vector 8.0 multiple confirmed that the bands of each individual are the same sequence, with the sequence length of 243 bp. The repeat units were TGC, and 51% of GC. Compared by the BLASTn, homologous sequences were not found in the GenBank database. According to the statistics, the probability of different bands that appeared in the female *C. argus* was 62.5%, that is, the correct classification rate of the marker for female *C. argus* was 81.25%. We believe that this microsatellite loci may be associated with *C. argus* female gender under certain conditions. This study may serve as a basis for culturing pure male hybrid using female-specific DNA fragments in *C. argus*.

Key words: *Channa argus*; simple sequence repeats; gender-differences; bulked segregation analysis

Corresponding author: ZHENG Guang-ming. E-mail: zgmzyl@tom.com