

文章编号:1000-0615(2009)03-0357-07

罗非鱼微卫星 DNA 指纹图谱的构建

宋红梅^{1,2}, 白俊杰¹, 叶 星¹, 全迎春¹, 李胜杰¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 中国水产科学研究院
热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要:采用微卫星 DNA 指纹图谱技术对奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼和橙色莫桑比克罗非鱼进行品种鉴定和遗传多样性分析。从 103 对罗非鱼微卫星引物中筛选出 82 对多态性高、带型清晰稳定的引物,用这 82 对引物检测 3 种罗非鱼的遗传结构,共检测到 605 个等位基因,平均等位基因数 7.37 个,数据经 Popgen32 计算和 EXCEL 工具作图,构建 3 种罗非鱼的 DNA 指纹数据库,并绘制了 DNA 指纹图谱模式图。结果显示,奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼和橙色莫桑比克罗非鱼的平均观测杂合度分别为 0.179 6、0.530 1 和 0.312 2,平均期望杂合度分别为 0.203 2、0.678 6 和 0.291 3,平均多态信息含量分别为 0.075 4、0.608 3 和 0.152 8,由此可见,尼罗罗非鱼群体的遗传多样性水平最高,奥利亚罗非鱼群体遗传多样性最低。同时筛选得到 16 对具特异性条带的核心引物组合可将 3 种罗非鱼完全区分,每个位点可在其中一种罗非鱼中扩增出独有的条带,从而将这种罗非鱼与其它两种区分开来,将 16 对特异引物的图谱数据转化成计算机可以识别的数码指纹,可以方便地应用于罗非鱼及其杂交种的鉴定研究。为解决罗非鱼品种混杂遗传渐渗问题和保护罗非鱼种质资源提供技术支撑。

关键词:罗非鱼;指纹图谱;微卫星;种质鉴定

中图分类号:Q 785; S 917

文献标识码:A

罗非鱼 (*tilapia*) 原产于非洲,是联合国粮农组织向全世界推广的优良品种。自上世纪 50 年代,我国先后从境外引进了莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) 和奥利亚罗非鱼 (*O. aureus*) 等多个品种,现罗非鱼已成为我国重要的养殖鱼类。利用种间杂交产生具有高雄性率或生长快等杂种优势的杂交子代进行养殖,成为罗非鱼重要的养殖模式。杂交种如福寿鱼^[1-2](莫桑比克罗非鱼♀×尼罗罗非鱼♂),奥尼鱼(奥利亚罗非鱼♂×尼罗罗非鱼♀),以及莫荷鱼^[3][橙色莫桑比克罗非鱼♀×荷那龙罗非鱼 (*O. hornorum*)♂] 等都具有生长快于亲本或雄性率高等杂交优势。但是,亲本的纯度和质量直接影响着罗非鱼 F₁ 代的生长速度或雄性率等性状^[4],而且罗非鱼杂交后代与纯种之间、不

同杂交种之间的杂交后代也大多可育,部分杂交种体形与亲本相似^[5-6],生产中容易出现亲本种质混杂,进行纯度鉴定也有技术上的难度。传统的罗非鱼品种鉴定主要利用形态学、同工酶等技术^[7-8],这些方法存在不同程度的不足,如受环境因素影响、不能有效检测基因的混杂程度等,难以满足实际生产需求。因此,开发科学有效的罗非鱼种质鉴定技术势在必行。

近年来,基于 DNA 水平差异的 DNA 指纹图谱鉴定技术逐渐受到人们的重视^[9-10],DNA 指纹图谱直接反映品种之间以及个体之间基因组序列的差异,具有较高的个体特异性和环境稳定性,对亲缘关系很近的品种或个体能准确辨别。其主要构建方法有 RFLP、RAPD、微卫星、小卫星等,由于微卫星是共显性标记,且随机分布于整个基

基因组,包括基因的间隔区和内含子,以及外显子和调控区,多态性丰富,相比其它标记更能揭示整个基因组的总体特征。目前我国许多物种,如鸡^[11]、水稻^[12]、玉米^[13]等均已构建微卫星 DNA 指纹图谱,在种质鉴定方面起到了重要作用。罗非鱼已发展有 500 多个微卫星位点,为 DNA 指纹图谱的构建提供了良好基础。本研究拟通过筛选出的微卫星位点,以不同遗传基础的奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼和橙色莫桑比克罗非鱼为试验材料,初步构建 3 种罗非鱼的微卫星 DNA 指纹图谱数据库,确定用于品种鉴定的位点,为罗非鱼的种质资源保护和品种鉴定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

奥利亚罗非鱼 120 尾(以下简称奥利亚),分别取自珠江水产研究所高要水产科技园区(高要)60 尾、广东省番禺国家级罗非鱼良种场(番禺)30 尾和厦门鹭业国家级罗非鱼良种场(鹭业)30 尾。尼罗罗非鱼 90 尾(以下简称尼罗),也分别来自以上 3 个罗非鱼良种场,其中高要 30 尾、番禺 30 尾、鹭业 30 尾。橙色莫桑比克罗非鱼 30 尾(以下简称莫桑),取自高要。

1.2 罗非鱼基因组 DNA 的制备

注射器尾静脉取血,血液和 ACD 抗凝剂比例为 1:6,具体参考文献[14]的方法操作。按照天为试剂盒全血基因组 DNA 的提取方法,从新鲜血液中提取基因组 DNA,用 ddH₂O 溶解,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性和纯度,并用分光光度计测量浓度,4 ℃ 冷藏保存备用。

1.3 微卫星引物的合成

在尼罗罗非鱼 22 个连锁群上均匀选取 103 对微卫星位点,引物序列来自于美国汉普郡大学 Hubbard 基因研究中心网站数据(<http://hcg.unh.edu>)和文献[15],由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 PCR 反应体系和扩增程序

PCR 反应总体积为 20 μL,含有 10 × Buffer 2.0 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 0.8 ~ 1.0 μL, dNTPs(10 mmol/L) 0.3 μL,上、下游引物(20 pmol/L)各 0.5 μL, Taq 酶 1 U,模板 DNA 60 ng 左右。PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 4 min 后进

入循环体系 94 ℃ 变性 30 s,各引物退火温度 45 ~ 60 ℃,退火时间 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,25 个循环,最后 72 ℃ 延伸 7 min。

1.5 电泳检测

PCR 扩增产物在 80 mg/mL(8%)的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测,产物上样量均为 4 μL(样品与 Buffer 按 3:1 混合),DNA Marker 上样量为 0.5 μL。电泳后硝酸银染色,染色方法根据霍金龙等^[16]的方法进行了部分修改。最后采用扫描仪获取图像进行分析。

1.6 微卫星 DNA 指纹图谱构建

根据电泳结果,以同一品种罗非鱼全部个体在筛选出的所有位点上出现的等位基因片段组合,构建 3 种罗非鱼的微卫星指纹模式图。构建工具为 EXCEL。

1.7 数据统计与分析

根据每个个体产生的条带位置确定基因型,用 Alpha Ease FC 数字图像分析系统分析微卫星条带大小,用 Popgen32 软件分析,计算微卫星座位的等位基因数(E)、等位基因频率(P)、基因杂合度(heterozygosity, H)等指标。参照 Botstein 等^[17]的方法计算每个微卫星位点的多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j$$

式中, P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, n 为等位基因数。

2 结果与分析

2.1 扩增结果

以奥利亚 4 个群体、尼罗 3 个群体和莫桑 1 个群体,每个群体 10 尾鱼,共 80 尾鱼,从 103 对 SSR 引物中筛选出扩增带型清晰、稳定的 90 对;进而对 8 个群体共 240 尾鱼进行扩增分析,得到多态性信息量 $PIC > 0.500$ 的引物 82 对。82 对引物在 3 种罗非鱼中共检测出 605 个等位基因,其中,等位基因数最多的为 UNH880 和 UNH908,达到 14 个;最少的为 UNH148, UNH911 和 UNH855,仅 3 个,获得的平均等位基因数为 7.37 个。奥利亚、尼罗和莫桑 3 种罗非鱼的平均观测杂合度分别为 0.179 6、0.530 1 和 0.312 2,平均期望杂合度分别为 0.203 2、0.678 6 和 0.291 3,平均多态信息量分别为 0.075 4、0.608 3 和 0.152 8。部分扩增结果见图 1,具体信息见表 1。

2.2 DNA 指纹模式图的绘制

利用 EXCEL 作图,根据每种罗非鱼在 82 个微卫星位点上的扩增结果,按照表 1 中位点顺序构建了 3 种罗非鱼的 DNA 指纹模式图(图 2),依次为奥利亚、尼罗、莫桑的 DNA 指纹模式图。

2.3 DNA 数字化指纹图谱数据库的构建

82 个微卫星位点,在相同迁移率位置上,以 1、0 标记扩增片段有无,形成每个罗非鱼个体对应的指纹数码。采用数据库软件管理这些数码,形成 3 种罗非鱼 DNA 指纹图谱数据库。结合扩增结果考虑带型统计的难易、带型清晰度、重复性、PIC、片段大小(86 ~ 338 bp)等指标,通过对

240 个样品进行 PCR 扩增,从 82 个位点中筛选出在奥利亚、尼罗和莫桑中具有独有带型的 16 对微卫星核心引物组合,用于 3 种罗非鱼及其杂交种的鉴定研究。其中有奥利亚的特异位点 GM636、UNH117、UNH172、UNH878、UNH738、UNH896,尼罗的特异位点 UNH913、UNH907、UNH222、UNH980、UNH880 和莫桑的特异位点 UNH876、UNH899、UNH853、UNH932、UNH933(表 2),每个位点可在其中一种罗非鱼中扩增出独有的条带,从而将这种罗非鱼与其它两种区分开来。表 3 列出了 3 种罗非鱼按照表 2 引物次序形成的 DNA 数字化指纹。

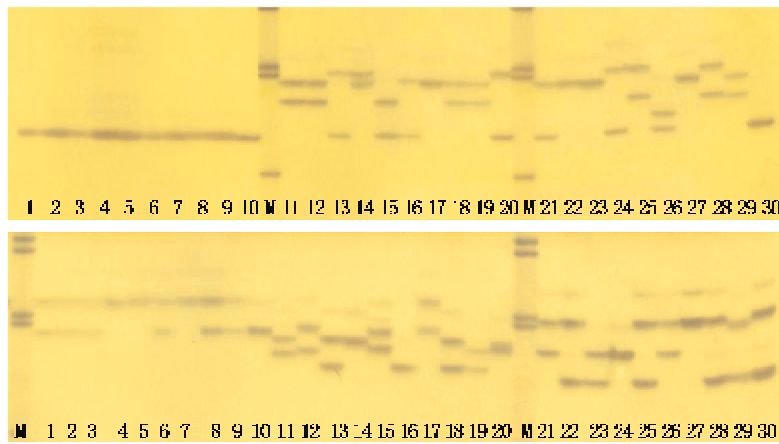


图 1 3 种罗非鱼在 UNH932 和 UNH954 微卫星基因座的部分扩增结果
1~10 为奥利亚高要群体;11~20 为莫桑群体;21~30 为尼罗高要群体

Fig.1 A portion of PCR result of UNH932 and UNH954 in three tilapia
1-10 are Aureus tilapia; 11-20 are Mozambique tilapia; 21-30 are Nile tilapia in Gaoyao

表 1 82 对微卫星引物在 3 种罗非鱼中检测到的等位基因数及 PIC 值
Tab.1 The number of alleles, size range and PIC value of 82 SSR primers detected in three tilapia

序号 no.	引物 primer	等位基因数 allele no.			片段大小 (bp) size	信息量 PIC	序号 no.	引物 primer	等位基因数 allele no.			片段大小 (bp) size	信息量 PIC
		A	N	M					A	N	M		
1	UNH968	1	5	2	167 ~ 232	0.6298	42	UNH973	3	4	2	135 ~ 160	0.5975
2	UNH971	2	8	2	198 ~ 240	0.7805	43	UNH148	2	2	1	150 ~ 158	0.6083
3	UNH211	3	9	3	112 ~ 162	0.7588	44	GM223	1	3	4	173 ~ 205	0.5983
4	UNH932	2	5	3	122 ~ 164	0.7398	45	GM117	1	3	2	275 ~ 338	0.6794
5	UNH178	3	5	2	127 ~ 147	0.5361	46	GM354	2	5	2	97 ~ 126	0.6826
6	UNH980	1	3	3	183 ~ 215	0.5939	47	UNH231	1	4	2	163 ~ 190	0.5067
7	UNH214	1	8	2	170 ~ 218	0.6833	48	UNH879	1	3	1	183 ~ 199	0.6733
8	UNH899	1	6	2	148 ~ 201	0.7078	49	UNH974	1	6	2	125 ~ 158	0.5086
9	UNH933	1	3	1	238 ~ 271	0.6240	50	UNH958	2	4	2	144 ~ 172	0.7196
10	UNH988	1	6	1	155 ~ 220	0.6080	51	GM633	1	3	2	174 ~ 205	0.6287
11	UNH876	1	8	1	159 ~ 245	0.6185	52	UNH901	1	11	3	127 ~ 171	0.7122
12	UNH874	3	11	2	188 ~ 240	0.7817	53	GM677	3	5	3	172 ~ 264	0.8532
13	UNH855	1	3	4	151 ~ 158	0.5534	54	GM509	1	10	3	169 ~ 202	0.6788
14	UNH878	1	12	1	157 ~ 192	0.9660	55	UNH908	2	13	3	109 ~ 203	0.7972
15	UNH106	2	2	2	113 ~ 188	0.8077	56	UNH213	1	6	2	183 ~ 214	0.6550

· 续表 1 ·

序号 no.	引物 primer	等位基因数 allele no.			片段大小 (bp) size	信息量 PIC	序号 no.	引物 primer	等位基因数 allele no.			片段大小 (bp) size	信息量 PIC
		A	N	M					A	N	M		
16	UNH911	1	2	2	144 ~ 152	0.5014	57	GM041	1	4	2	231 ~ 262	0.6226
17	UNH880	1	12	2	138 ~ 248	0.9751	58	UNH909	1	3	2	221 ~ 283	0.5230
18	UNH999	2	9	1	85 ~ 137	0.7180	59	UNH957	2	9	2	145 ~ 197	0.7697
19	UNH208	1	7	2	86 ~ 140	0.6770	60	GM024	4	11	2	101 ~ 158	0.8508
20	UNH954	3	8	3	129 ~ 180	0.8182	61	UNH183	1	3	2	185 ~ 200	0.5076
21	UNH989	1	4	3	143 ~ 162	0.5610	62	UNH132	1	2	1	113 ~ 122	0.5873
22	UNH1004	1	10	1	164 ~ 220	0.7282	63	UNH159	1	6	1	224 ~ 256	0.5539
23	UNH773	1	5	0	209 ~ 257	0.6932	64	UNH995	2	5	2	171 ~ 241	0.7144
24	UNH927	2	7	2	200 ~ 226	0.7067	65	UNH907	3	3	1	122 ~ 149	0.6970
25	UNH998	2	8	1	111 ~ 147	0.7053	66	UNH898	3	7	2	217 ~ 289	0.7973
26	UNH172	1	10	1	183 ~ 245	0.6823	67	UNH860	2	6	7	200 ~ 264	0.6173
27	UNH896	1	11	1	132 ~ 226	0.7911	68	UNH848	2	7	1	183 ~ 207	0.5882
28	UNH1009	1	6	3	150 ~ 176	0.5784	69	GM201	1	8	3	125 ~ 173	0.6934
29	UNH104	2	5	1	133 ~ 198	0.8088	70	UNH176	2	6	3	132 ~ 167	0.6616
30	UNH846	2	7	1	170 ~ 223	0.6616	71	UNH197	3	7	1	158 ~ 203	0.6081
31	GM558	1	4	1	165 ~ 202	0.6336	72	UNH914	1	4	2	160 ~ 179	0.5405
32	GM566	2	8	2	130 ~ 190	0.7559	73	UNH902	1	7	1	110 ~ 142	0.5956
33	UNH719	3	5	1	105 ~ 136	0.7487	74	UNH890	2	7	2	227 ~ 275	0.5996
34	GM636	1	3	2	175 ~ 192	0.5996	75	UNH985	1	2	8	125 ~ 158	0.6202
35	UNH913	1	5	1	93 ~ 121	0.6855	76	UNH886	1	6	1	173 ~ 198	0.5631
36	GM119	2	9	2	101 ~ 175	0.6394	77	UNH927	2	7	2	200 ~ 226	0.7067
37	UNH738	2	8	3	144 ~ 200	0.7918	78	UNH997	1	7	4	123 ~ 156	0.6639
38	UNH190	2	6	2	145 ~ 177	0.5438	79	UNH132	1	2	1	113 ~ 122	0.5873
39	UNH853	1	3	1	150 ~ 207	0.6302	80	UNH222	1	5	1	170 ~ 218	0.6833
40	UNH906	1	5	1	147 ~ 166	0.6639	81	UNH166	1	3	2	138 ~ 183	0.5479
41	GM150	1	8	3	130 ~ 197	0.6724	82	UNH940	2	2	2	148 ~ 190	0.6896

注：“N”表示尼罗罗非鱼；“A”表示奥利亚罗非鱼；“M”表示橙色莫桑比克罗非鱼
Notes: “N” means *O. niloticus*; “A” means *O. aureus*; “M” means *O. mossambicus*

表 2 3 种罗非鱼的 16 个特异微卫星位点及其独有扩增带大小

Tab.2 Sixteen unique SSR loci used for identification

序号 no.	名称 name	位点 loci	独有扩增片段大小 (bp) unique amplified bands	序号 no.	位点 loci	名称 name	独有扩增片段大小 (bp) unique amplified bands
1	<i>O. aureus</i>	UNH896	218	9	UNH222	<i>O. niloticus</i>	218/210/206/193
2	<i>O. aureus</i>	UNH117	275	10	UNH980	<i>O. niloticus</i>	210/200/196/183
3	<i>O. aureus</i>	UNH172	227	11	UNH880	<i>O. niloticus</i>	248/224/221/218/212/190\ 185/182/178/172/164/154
4	<i>O. aureus</i>	UNH738	200/190	12	UNH876	<i>O. mossambicus</i>	159
5	<i>O. aureus</i>	UNH878	157	13	UNH899	<i>O. mossambicus</i>	201
6	<i>O. aureus</i>	GM636	175	14	UNH853	<i>O. mossambicus</i>	207
7	<i>O. niloticus</i>	UNH913	121/117/114/111/102	15	UNH932	<i>O. mossambicus</i>	137/134/127
8	<i>O. niloticus</i>	UNH907	128/124/122	16	UNH933	<i>O. mossambicus</i>	238

表 3 3 种罗非鱼的数字化 DNA 指纹

Tab.3 The numbered SSR DNA fingerprinting of three tilapia

名称 name	DNA 指纹 DNA fingerprinting
奥利亚 <i>O. aureus</i>	110000000 - 0010 - 01000000 - 1100000000 - 000000000001 - 0001 - 00001 - 111000 - 00001 - 100000 - 000000000010 - 100000000 - 0000000001 - 00010000 - 00000010 - 000010
尼罗 <i>O. niloticus</i>	001111111 - 1101 - 10111111 - 0011111110 - 111111011111 - 1110 - 11110 - 000111 - 11100 - 011111 - 111111111100 - 111111110 - 0111111111 - 01111111 - 11110011 - 111110
橙色莫桑 <i>O. mossambicus</i>	001000000 - 1001 - 10000000 - 0000010011 - 000000100000 - 0110 - 00001 - 001000 - 00010 - 100000 - 000000000011 - 000000001 - 1000000000 - 10000000 - 00011100 - 000001

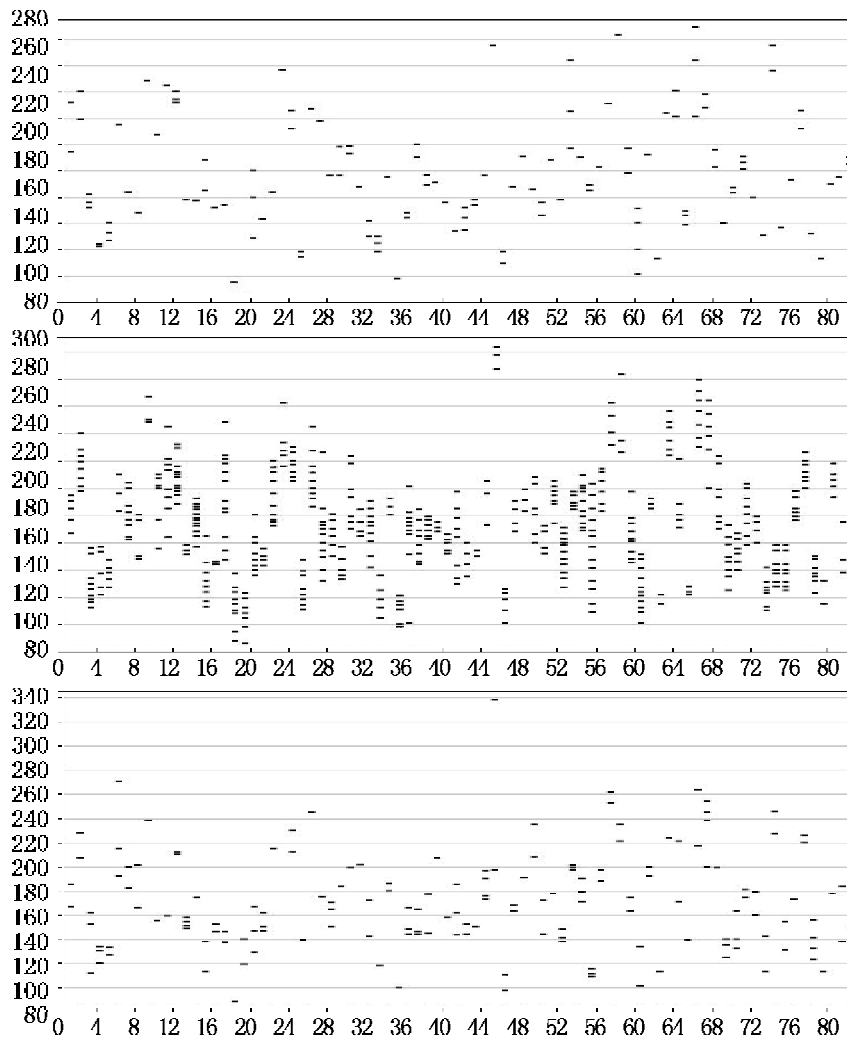


图2 奥利亚、尼罗和莫桑3种罗非鱼的微卫星DNA指纹模式图
Fig.2 DNA fingerprintings of *O. aureus*, *O. niloticus* and *O. mossambicus*

3 讨论

3.1 DNA 指纹图谱数据库的应用

在构建奥利亚、尼罗和莫桑3种罗非鱼的DNA指纹图谱数据库中,82对微卫星引物共检测出605个等位基因,检测出的个体平均条带数为7.37个,可见微卫星DNA指纹图谱的多态性水平很高。根据82个微卫星位点扩增出的等位基因大小,利用EXCEL绘制了DNA指纹模式图,用尽可能多的位点呈现出3种罗非鱼整体的遗传概貌,从图谱可明显看出尼罗的多态性水平最高,奥利亚和莫桑的多态性水平都较低,这与我们由于罗非鱼引种的批次和数量决定的奠基群大

小相一致^[18-19]。将罗非鱼各品种的微卫星DNA指纹图谱与各种罗非鱼的种质形状等联系起来,使罗非鱼种间的多态性差异与其表型形状相结合,可将控制某些形状的QTL定位在染色体的一定区域,从而使图谱中各个位点能够更直接地反映各种罗非鱼的指纹特征,这为罗非鱼的品种选育和保护等种质资源研究的实施提供新的途径。此外,DNA指纹图谱表现的个体特异性,使种群内个体之间的DNA指纹图谱各不相同,借此可作为个体标签用于鱼类遗传育种中对个体的标记。

3.2 数字化指纹对3种罗非鱼的纯度鉴定

本着实用方便的原则,最终选定16个可作鉴

定的微卫星位点,每种罗非鱼都有其特异的位点,可产生该品种独有的谱带,将各个位点的谱带用数字代码表示,即数字化指纹,利用鉴定引物的数字化指纹可将他们逐一区分。这些数字化指纹也同样适用于以3种罗非鱼作为亲本的杂交种的鉴定。因为对于共显性的微卫星标记,每一个子代从父本和母本中分别获得一个等位基因,如果2个亲本存在相同的等位基因,则无法准确判断后代的等位基因是否分别来自于2个亲本。但只要找到亲本的特异性微卫星标记,即寻找双亲中没有相同等位基因的微卫星位点,则可将群体中亲本之间,杂交种之间以及亲本与杂交种之间准确地加以鉴定。根据本研究中16个在3种罗非鱼中各具特异的位点,以及微卫星标记的共显性,杂交子代应为父母本条带的组合,因此可以直接通过亲本与杂交种的指纹代码比对应来区分杂交后代和亲本,这为下一步3种罗非鱼种质纯度的鉴定工作奠定了基础。由于将大量罗非鱼的数字化指纹图谱放在一起,完全用人工鉴别,其难度相当大,费工费时,且容易出现错误。因此,本研究正试图开发出基于Windows XP操作平台的罗非鱼微卫星DNA指纹计算机鉴定软件,通过计算机来自动识别数字化的DNA指纹,这对于利用SSR技术进行罗非鱼纯度鉴定的具体实施有着重要意义。此外,随着实验的进一步深入,会有更好的微卫星引物补充到DNA指纹图谱数据库中,从而使数据库更加完善。

参考文献:

- [1] 梁幼嫦,戴佛生. 福寿鱼、尼罗罗非鱼、莫桑比克罗非鱼的生长对比试验[C]. 珠江水产研究所论文报道选辑, 1979-1983:16-23.
- [2] 唐国盘,曾春芳,齐子鑫,等. 福寿鱼的生物学特性及养殖前景[J]. 水利渔业, 2006, 26(6):70-71, 81.
- [3] 杨 淞,叶 星,卢迈新,等. 橙色莫桑比克罗非鱼和荷那龙罗非鱼 AFLP 分析[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(6): 937-940.
- [4] 李思发,蔡完其. 我国尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼养殖群体的遗传渐渗[J]. 水产学报, 1995, 19(2):106-112.
- [5] 朱华平,黄樟翰,卢迈新,等. 罗非鱼遗传背景的研究进展[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(1): 79-84.
- [6] Artalion R R. Genetic markers in *Sarotherodon* and their use for sex and species identification [C]// Pullin R S V, McConnell R H L, eds. ICLARM Conference Proceedings 7, Manila: Internacional Center for Living Resources Management, 1982: 432-442.
- [7] 李家乐,李思发,李 勇,等. 尼罗罗非鱼(♀)×奥利亚罗非鱼(♂)同其亲本的形态和判别[J]. 水产学报, 1999, 23(3):261-265.
- [8] 曹 莹,夏德全. 尼罗非鲫和奥利亚非鲫线粒体DNA遗传差异的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(4): 360-365.
- [9] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA [J]. Nature, 1985, 316: 76-79.
- [10] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L, et al. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA [J]. Nature, 1985, 314: 67-73.
- [11] 高玉时,李慧芳,陈国宏,等. 地方鸡种微卫星DNA指纹图谱建立与遗传多样性研究[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(3): 313-318.
- [12] 李进波,方宣钧,杨国才,等. 两系杂交稻亲本SSR指纹图谱的建立及其在种子纯度鉴定中的应用[J]. 杂交水稻, 2005, 20(2): 50-53.
- [13] 李晓辉,李新海,高文伟,等. 玉米杂交种DNA指纹图谱及其在亲本鉴定中的应用[J]. 作物学报, 2005, 31(3):386-391.
- [14] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002:101.
- [15] Carleton K I, Strelman J T, Lee B Y, et al. Rapid isolation of C A microsatellites from the tilapia genome [J]. International Society for Animal Genetics, 2002, 33:40-44.
- [16] 霍金龙,曾 嵘,潘伟荣,等. 微卫星PCR聚丙烯酰胺凝胶银染法影响因素的分析研究[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(1): 67-71.
- [17] Botstein D, White R L, Skolnick M. Construction of genetic linkage map in mail using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Anim Gen, 1980, 32: 314-341.
- [18] 李家乐,李思发. 中国大陆尼罗罗非鱼引进及其研究进展[J]. 水产学报, 2001, 25(1):90-95.
- [19] 李家乐. 中国大陆奥利亚罗非鱼的引进和研究[J]. 浙江海洋学院学报, 2000, 19(3):261-265.

Establishment of DNA fingerprinting of tilapia with microsatellite

SONG Hong-mei^{1, 2}, BAI Jun-jie¹, YE Xing¹, QUAN Ying-chun¹, LI Sheng-jie¹

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation of CAFS, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

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

Abstract: Microsatellite DNA fingerprinting technology was used to investigating the genetic variation and germplasm identification within three tilapias of *Oreochromis aureus*, *O. niloticus* and red *O. mossambicus*. 82 pairs of primers which could give stable and polymorphic amplification profiles were screened out from 103 microsatellite loci and used to analyze the genetic structure of three varieties. Totally, 605 alleles of microsatellite loci were obtained and the average number of alleles was 7.37. Additionally, microsatellite DNA fingerprinting database of three tilapias was established based on the results of alleles of microsatellite loci by Popgen32 software package and illustrative patterns were constructed by EXCEL. The results showed that, the mean value of observed heterozygosity of *O. aureus*, *O. niloticus* and *O. mossambicus* was 0.179 6, 0.530 1, 0.312 2, the mean value of expected heterozygosity was 0.203 2, 0.678 6, 0.291 3, and the polymorphism information content (PIC) was 0.075 4, 0.608 3, 0.152 8, respectively. It indicated that, the genetic diversity of *O. niloticus* was the highest and *O. aureus* was the lowest. Then 16 pairs of primers that can distinguish one variety tilapia from the others were screened out as the core primers for tilapia germ plasm identification. The amplified data from 16 pairs of special primers were transformed to the application platform of digital microsatellite DNA fingerprinting, which could be used to identify tilapia species. This result could provide a technique for solving the problem of germplasm farrago for tilapia.

Key words: tilapia; DNA fingerprinting; microsatellite; germplasm identification