

## 应用 DNA 分子标记鉴定瓦氏黄颡鱼、长吻鮠及其杂交种

巩高瑞<sup>1</sup>, 廖倩<sup>1</sup>, 孙瑞东<sup>1</sup>, 王忠卫<sup>2</sup>, 姜俊<sup>3</sup>, 梅洁<sup>1\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北洪山实验室, 湖北武汉 430070;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北武汉 430072;

3. 四川农业大学动物科技学院, 四川成都 611130)

**摘要:** 瓦氏黄颡鱼与长吻鮠的杂交后代与其父母本形态学特征相似, 在生产中容易产生混淆, 而 DNA 分子标记可以快速准确地地区分物种, 常被用于物种鉴定。基于目前已有的瓦氏黄颡鱼、长吻鮠的基因组数据, 实验通过比较基因组学分析, 发现瓦氏黄颡鱼与长吻鮠在演化关系上较为接近, 估算出二者分化时间为 370 万年前。同时, 通过染色体序列共线性分析, 发现二者均具有 26 对染色体, 且染色体一一对应, 并未发现染色体间的融合重组现象, 仅存在染色体内部的重排。基于以上结果, 实验发现 2 种鱼在 *patj* 基因序列上存在一段 391 bp 的 INDEL。根据该差异片段, 设计出了引物 PVLL。该引物在瓦氏黄颡鱼中仅扩增出 339 bp 的条带, 在长吻鮠中仅扩增出 730 bp 的条带, 而在其杂交种中可以同时扩增出 339 与 730 bp 这 2 种大小的条带。根据扩增条带的差别可以准确区分三者, 此研究结果不受性别影响, 并且在不同群体中也验证了引物的有效性。研究表明, 比较基因组学可用于准确鉴别瓦氏黄颡鱼、长吻鮠及其杂交种, 从而提高杂交育种生产的效率。

**关键词:** 瓦氏黄颡鱼; 长吻鮠; 杂交育种; 比较基因组学; 分子标记; 物种鉴定

**中图分类号:** Q 321; S 965.1

**文献标志码:** A

鲮科 (Bagridae) 鱼类是我国江河湖泊等自然水域中广泛分布的经济鱼类, 其中常见的一些物种包括黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)、瓦氏黄颡鱼 (*P. vachelli*)、长吻鮠 (*Leiocassis longirostris*)、乌苏里拟鲮 (*Pseudobagrus ussuriensis*)、大鳍鲮 (*Mystus macropterus*)、粗唇鮠 (*Leiocassis crassilabris*) 等。近些年由于受到水域环境变化、水体污染、过度捕捞等因素影响, 野生个体数量大量减少。其中, 黄颡鱼隶属鲮形目 (Siluriformes) 鲮科黄颡鱼属 (*Pelteobagrus*), 因其肉质鲜美、肌间刺少、营养价值高而深受消费者的喜爱。20 世纪 90 年代以来, 黄颡鱼市场需求量急剧上涨, 自然水域的产

量难以满足。鱼类学家通过人工催产和授精等技术, 实现了黄颡鱼规模化人工繁育技术, 并根据黄颡鱼雄鱼生长速率显著快于雌鱼这一生长特性, 开拓出了一条分子标记辅助的全雄鱼培育技术路线, 培育出新品种全雄黄颡鱼“全雄 1 号”, 极大提高黄颡鱼产量和经济效益<sup>[1-6]</sup>。然而, 经过多代自交之后, 亲本超雄鱼繁育系会产生退化, 自交系在生长和抗病等性能方面呈现减弱的趋势。因此, 需要对全雄黄颡鱼进行品种改良或开发出其他黄颡鱼新品种。

杂交育种作为遗传育种的经典方法之一, 不仅能够结合父母本的优良性状, 丰富遗传结构,

收稿日期: 2023-06-02 修回日期: 2023-08-23

资助项目: 国家现代农业产业技术体系特色淡水鱼体系项目 (CARS-46)

第一作者: 巩高瑞 (照片), 从事鱼类基因组学研究, E-mail: [grg@webmail.hzau.edu.cn](mailto:grg@webmail.hzau.edu.cn)

通信作者: 梅洁, 从事鲮类遗传育种研究, E-mail: [jmei@mail.hzau.edu.cn](mailto:jmei@mail.hzau.edu.cn)



还可以产生新的优良性状, 获得杂种优势<sup>[7]</sup>。瓦氏黄颡鱼俗称江黄颡, 与黄颡鱼同为黄颡鱼属, 亲缘关系近, 它的生长速率优于黄颡鱼, 成年个体远大于普通黄颡鱼。研究人员选取瓦氏黄颡鱼作为父本与黄颡鱼母本杂交, 培育了新品种杂交黄颡鱼“黄优 1 号”, 其形态特征与黄颡鱼接近, 生长速率与成活率优于黄颡鱼, 杂交受精率与后代存活率均优于黄颡鱼, 因此受到养殖产业的一致青睐<sup>[8-10]</sup>。除此之外, 目前在鲿科鱼类中的不同属间杂交研究也很多。黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼与粗唇鲿三者之间的正反交实验表明, 杂交的受精率与后代存活率显著提升<sup>[11]</sup>。乌苏里拟鲿与瓦氏黄颡鱼之间的正反交实验表明, 杂交后代在苗种期具有一定的生长优势<sup>[12]</sup>。长吻鲿俗称鲮, 生长速率与个体大小远大于黄颡鱼属, 以长吻鲿作为父本与瓦氏黄颡鱼杂交, 杂交后代生长速率比鲿科的其他杂交种更快<sup>[13-14]</sup>。但传统的杂交育种工作往往基于形态学分类进行父母本的选择, 缺乏具体的遗传理论基础。因此, 对杂交个体父母本的基因组进行比较解析对于指导杂交育种工作具有重要意义。

目前, 由于人工养殖密度过大、环境变化等原因, 鱼类养殖特别容易出现开春大规模死亡的情况, 再加上黄颡鱼属体表无鳞, 在养殖过程中更易受到水体环境影响, 开春死亡率特别高, 养殖过程中一旦暴发疾病, 往往导致养殖户损失惨重。选择长吻鲿与瓦氏黄颡鱼杂交, 得到的后代通过合理的养殖模式可以在半年时间达到黄颡鱼上市规格, 这样可以在开春前上市, 避免大规模死亡, 提高了养殖经济效益。在生产过程中, 由于杂交种的形态特征与父母本非常接近, 基于形态学特征无法进行准确区分, 养殖过程会存在混杂现象, 影响生产过程。近年来, 随着分子生物学的发展, 特别是基因组测序技术的成熟应用, 鉴定方法得以改进。因此, 基于比较基因组方法设计出可以稳定、高效鉴别瓦氏黄颡鱼、长吻鲿及其杂交种的 DNA 分子标记, 对于水产养殖产业具有重要意义。DNA 分子标记是根据物种间 DNA 序列差异设计的引物, 可准确鉴定物种, 被广泛应用于物种鉴定、性别鉴定、亲子鉴定等领域, 如黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼及其杂交种的鉴定<sup>[15]</sup>。目前已公布的长吻鲿与瓦氏黄颡鱼基因组为比较基因组学研究提供了充足的资源, 本实验通过系统发育分析解析了二者的演化地位, 并结合二者

的基因组共线性分析定位到了 *patj* 基因上存在一个较大的 INDEL(插入/缺失), 在此基础上设计了分子标记, 可用于准确鉴定长吻鲿、瓦氏黄颡鱼及其杂交种。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**实验对象** 实验用样本群体来自 2 个不同地区, 所有样本均通过解剖确认生理性别, 采集鳍条组织用于 DNA 提取和 PCR 验证。其中用于前期开发及筛选分子标记的瓦氏黄颡鱼为 2 龄成年个体, 共 20 尾、长吻鲿为 3 龄成年个体, 共 15 尾, 均采样于长江中下游武汉流域, 其杂交种为 1 龄个体, 共 30 尾, 由湖北省武汉市农业科学院水产研究所提供; 用于进行群体验证的样本采样于长江上游区域, 为 1 龄个体, 共 30 尾, 由四川农业大学动物科技学院提供。实验过程中操作人员严格遵守实验动物福利伦理和动物实验安全规范, 并按照华中农业大学动物实验伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.2 基因家族分析

实验用斑点雀鲷 (*Lepisosteus oculatus*)、亚洲龙鱼 (*Scleropages formosus*)、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、电鳗 (*Electrophorus electricus*)、胡鲇 (*Clarias batrachus*)、低眼巨鲈 (*Pangasianodon hypophthalmus*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、南方大口鲈 (*Silurus meridionalis*)、瓦氏黄颡鱼基因组序列和注释结果均下载自 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>), 长吻鲿基因组序列和注释结果来自先前研究<sup>[16]</sup>, 下载自 NCBI 的基因组版本编号见表 1。

实验首先自行编写脚本, 提取基因组注释文件中的每个基因的最长转录本所对应的 CDS (coding sequence) 的坐标, 接着使用 SeqKit v2.1.0 在线程序 (<https://github.com/shenwei356/seqkit>), 根据最长 CDS 坐标从参考基因组序列中提取出最长 CDS, 并翻译为蛋白序列, 使用 BLAST v2.13.0 软件中的 BLASTP 对所有物种的蛋白序列进行 all-vs-all 比对, 比对参数设置为 E-value $\leq 1e-5$ , 将比对结果使用 OrthoFinder v2.5.4 (<https://github.com/>

表 1 参考基因组信息统计

Tab. 1 Statistics of reference genomes

物种名 species name	拉丁学名 Latin name	RefSeq编号 RefSeq ID
斑点雀鳢	<i>Lepisosteus oculatus</i>	GCF_000242695.1
亚洲龙鱼	<i>Scleropages formosus</i>	GCF_900964775.1
大西洋鳕	<i>Gadus morhua</i>	GCF_902167405.1
红鳍东方鲀	<i>Takifugu rubripes</i>	GCF_901000725.2
大菱鲆	<i>Scophthalmus maximus</i>	GCF_022379125.1
青鳉	<i>Oryzias latipes</i>	GCF_002234675.1
尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i>	GCF_001858045.2
电鳗	<i>Electrophorus electricus</i>	GCF_013358815.1
胡鲇	<i>Clarias batrachus</i>	GCA_003987875.1
低眼巨鲈	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	GCF_009078355.1
斑点叉尾鲷	<i>Ictalurus punctatus</i>	GCF_001660625.1
南方大口鲇	<i>Silurus meridionalis</i>	GCF_014805685.1
瓦氏黄颡鱼	<i>Pelteobagrus vachelli</i>	GCA_030014155.1

davidemms/OrthoFinder) 进行分析, 进行基因家族的鉴定和聚类, 参数为 -M msa -I 1.5, 最后对基因家族的分析结果使用 R 软件 (<https://www.r-project.org/>) 进行统计及可视化。

### 1.3 系统发育树构建

实验首先提取 OrthoFinder (<https://github.com/davidemms/OrthoFinder>) 中的 14 个物种共有的单拷贝直系同源基因 (Single-copy orthologs) 的 CDS 和蛋白序列。使用 MAFFT v7.475 (<https://mafft.cbrc.jp/>) 对每个物种的同一单拷贝直系同源基因家族的蛋白序列进行多序列比对, 结合蛋白序列比对结果, 使用 ParaAT v2.0 (<https://ngdc.cncb.ac.cn/tools/paraat>) 对 CDS 进行比对。使用 SeqKit 对单拷贝直系同源基因比对结果进行串联连接。对 CDS 比对结果使用 trimAl v1.2 (<http://trimal.cgenomics.org/trimal>) 进行修剪, 去除比对率较低的区域, 以提高后续系统发育树的准确度。使用 ModelFinder (<http://www.iqtree.org/ModelFinder/>) 评估得到最优模型为 GTR+F+R4, 使用 IQ-TREE v1.6.12 (<http://www.iqtree.org>) 通过最大似然法 (Maximum likelihood) 构建系统发育树, 其中斑点雀鳢作为外群, 参数为 -m GTR+F+R4 -bb 1000。从 Timetree (<http://www.timetree.org/>) 中获得亚洲龙鱼和大西洋鳕、斑点雀鳢和亚洲龙鱼、电鳗和胡鲇之间的具有化石证据的分化时间, 使用 PAML v4.9 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>) 中的 MCMCtree 结合最大似然树进行物种间分化时

间的估算。使用 Figtree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) 对系统发育树进行注释和可视化。

### 1.4 基因组共线性分析

为了对瓦氏黄颡鱼和长吻鲈基因组的 DNA 序列进行比较, 首先对瓦氏黄颡鱼和长吻鲈的参考基因组进行处理, 仅保留染色体序列, 之后使用 minimap2 v2.24 (<https://github.com/lh3/minimap2>) 对瓦氏黄颡鱼和长吻鲈染色体序列进行比对, 所用参数为 -ax asm10 -eqx, 使用 syri v1.4 (<https://github.com/schneebergerlab/syri>) 对比对结果进行共线性和重排的分析, 参数为 -k -F S。

### 1.5 引物设计

结合基因和基因组序列比对结果, 提取瓦氏黄颡鱼和长吻鲈对应的单拷贝直系同源基因的基因组序列使用 minimap2 进行比对, 筛选二者存在较多长度为 300~1 000 bp 的基因, 其中 patj 基因存在较多长度小于 1 000 bp 的 INDEL, 因此, 本实验选取 patj 的基因组序列用于瓦氏黄颡鱼和长吻鲈物种差异标记的设计。使用 DNAMAN v6.0 (<https://www.lynnon.com/dnaman.html>) 的多序列比对功能对瓦氏黄颡鱼和长吻鲈的 patj 基因组序列进行比对; 基于 DNAMAN 的序列比对结果, 选取包含大小适中的 INDEL 的区域使用 Primer Premier 5 (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html>) 在该区域两侧设计引物; 使用 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 对设计好的引物进行筛选, 排除存在非特异性扩增的引物对, 仅保留特异性良好的引物用于后续实验。

### 1.6 引物筛选验证

取待鉴定样本的鳍条组织, 使用 TIANGEN (磁珠法) 动物组织 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 中国), 按照说明书要求提取样本基因组 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测提取的 DNA 质量和浓度, 保存于 -20 °C 备用。使用合成的引物分别在 3 个物种组织 DNA 中进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 10 μL, 包括 5 μL 2 × Taq Master Mix (诺唯赞, 中国)、0.5 μL 正反向引物 (10 μmol/L)、1 μL DNA template、3 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 程序: 在 95 °C 预变性 3~5 min, 进入循环扩增阶段: 95 °C 预变性 40 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 30~35 次。扩增结束后进行琼脂糖凝胶电泳检测; 根据产物大小选择制备 1% 的琼脂糖

凝胶, 将 PCR 产物混合 GelRed 染液后点样, 200 V、200 A 运行 20 min 左右, 取出凝胶放置在紫外照射仪上观察条带情况, 根据 3 个物种电泳条带差异性选择可用的引物。引物筛选出来后, 再在不同群体的多个样本中验证鉴定效果。

## 2 结果

### 2.1 基因家族分析

为了比较长吻鲈和瓦氏黄颡鱼的基因组差异, 研究二者的分化时间, 本实验首先进行了基因家族的分析, 共选取了 14 个物种用于基因家族的鉴

定, 其中包括斑点雀鲷、亚洲龙鱼、大西洋鲑、红鳍东方鲀、大菱鲆、青鲈、尼罗罗非鱼、电鳗、胡鲈、低眼巨鲈、斑点叉尾鲷、南方大口鲈、长吻鲈和瓦氏黄颡鱼。14 个物种中共鉴定到了 20 664 个基因家族, 1 202 个为物种特有家族。其中瓦氏黄颡鱼中鉴定到 8 380 个多拷贝直系同源基因和 133 个特有的物种基因, 长吻鲈中鉴定到 8 889 个多拷贝直系同源基因, 10 260 个多拷贝直系同源基因, 以及 240 个物种特有基因。最终, 本实验共鉴定到 14 种鱼类共有的 3 616 个直系单拷贝同源基因家族用于系统发育分析 (图 1-a)。

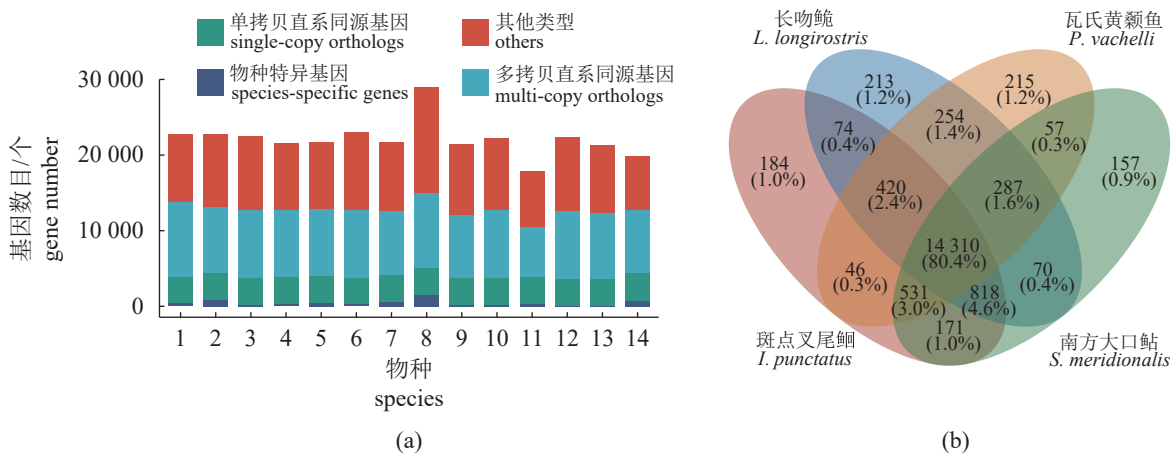


图 1 基因家族分析

(a) 14 种鱼类基因家族的分类, 横坐标 1~14 分别代表亚洲龙鱼、大西洋鲑、斑点叉尾鲷、电鳗、红鳍东方鲀、长吻鲈、青鲈、尼罗罗非鱼、瓦氏黄颡鱼、南方大口鲈、斑点雀鲷、低眼巨鲈、大菱鲆和胡鲈。(b) 长吻鲈、瓦氏黄颡鱼、南方大口鲈与斑点叉尾鲷基因家族韦恩图。

Fig. 1 Analysis of gene families

(a) clusters of gene families in 14 fish genomes. The x-axis numbers 1-14 represented the *S. Formosus*, *G. morhua*, *I. punctatus*, *E. electricus*, *T. rubripes*, *L. longirostris*, *O. latipes*, *O. niloticus*, *P. vachelli*, *S. meridionalis*, *L. oculatus*, *P. hypophthalmus*, *S. maximus*, and *C. batrachus* respectively. (b) Venn diagram of gene families among *L. longirostris*, *P. vachelli*, *S. meridionalis*, and *I. punctatus*.

为进一步比较长吻鲈和瓦氏黄颡鱼的差异, 实验选取瓦氏黄颡鱼、长吻鲈、南方大口鲈与斑点叉尾鲷 4 种鲇形目鱼类进行了比较。4 种鲇形目鱼类共鉴定到 17 807 个基因家族, 4 种鲇形目共有的基因家族为 14 310 个, 占总数目的 80.4%。其中瓦氏黄颡鱼和长吻鲈相比另外 2 种鱼类, 享有最多的共有基因家族, 达到 15 271, 占总数目的 85.8% (图 1-b)。

### 2.2 系统发育分析

实验共选取 14 种鱼类, 通过构建系统发育树以分析长吻鲈和瓦氏黄颡鱼的演化位置。基于鉴定到的 14 种鱼类共有的 3 616 个单拷贝直系同源基因的蛋白质序列进行比对, 得到的结果转化为

CDS 比对结果后, 使用串联法构建出最大似然树, 包含 13 个可以支持演化分析的分支。之后结合系统发育树和化石证据使用 PAML 中的 MCMCtree 对物种的分歧时间进行最大似然法估算。从图 2 中系统进化树结果来看, 长吻鲈与瓦氏黄颡鱼大约在 3.7 百万年前从共同的祖先中分化出来, 同为鲇科的二者与鲇科的南方大口鲈的分歧时间为 52.4 百万年前, 其他物种的系统发育关系与之前已发表结果一致。长吻鲈与瓦氏黄颡鱼具有较近的亲缘关系。

### 2.3 基因组共线性分析

长吻鲈与瓦氏黄颡鱼均属于鲇形目鲇科, 二者的核型一致, 均为  $2n=52$ , 两种鱼基因组大小

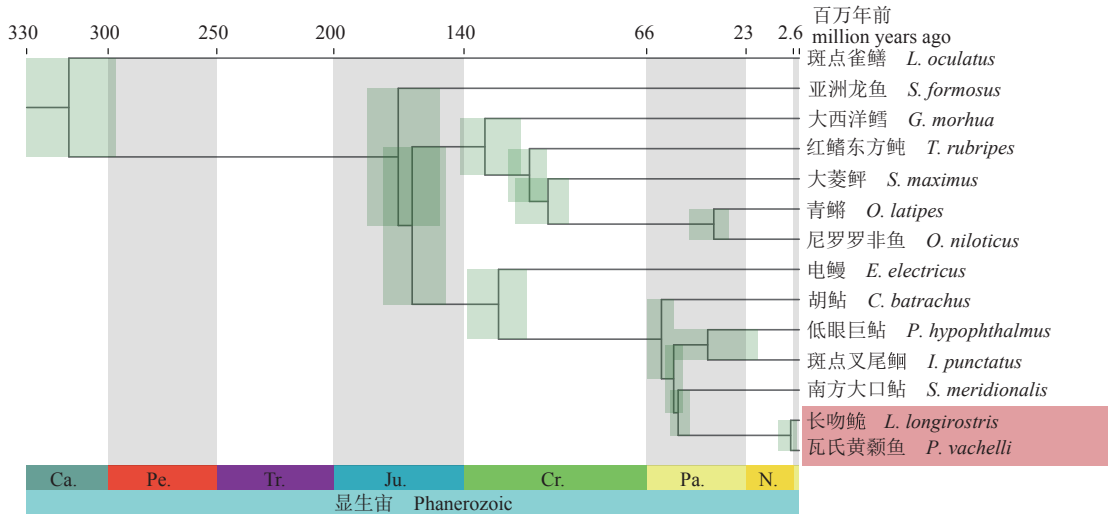


图 2 14 种鱼类的系统发育树

每个分支点上绿色阴影表示估算的分歧时间的 95% 置信区间, 长吻鲢和瓦氏黄颡鱼使用红色阴影标出。Ca. 寒武纪, Pe. 二叠纪, Tr. 三叠纪, Ju. 侏罗纪, Cr. 白垩纪, Pa. 古近纪, N. 新第三纪。

Fig. 2 Phylogenetic tree of 14 fish species

The estimated divergence time with a 95% confidence interval is highlighted in green shading. The split between *L. longirostris* and *P. vachelli* was highlighted in red shading. Ca. Cambrian, Pe. Permian, Tr. Triassic, Ju. Jurassic, Cr. Cretaceous, Pa. Paleogene, N. Neogene.

均在 700 Mb 左右, 且包含相近的基因数目(表 2)。为观察二者基因组间差异化较大的区域, 用于分子标记的开发, 本研究对二者染色体间共线性进行了分析。分析比对结果, 二者的染色体间共线性较好, 呈现出——对应的关系, 并未观察到染色体的融合重组现象; 仅在染色体内部有观察到一些重排、倒位现象(图 3)。其中长吻鲢的 1、3、5、6、7、8、9、10、18、20、25、26 号染色体与对应的瓦氏黄颡鱼染色体仅存在少数重排现象, 而长吻鲢的 2、4、11、12、14、16、19、21、22、23 号染色体与对应的瓦氏黄颡鱼则存在明显的倒位和易位等染色体重排现象(图 3)。结合系统发育树与基因组共线性分析结果, 实验锁定到一个二者差异较大的基因 *patj*。该基因是黄颡鱼 *pfpdz1* 的同源基因, 此前用于鉴定黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼及其杂交种的标记也位于该基因的内含子区域<sup>[15]</sup>, 本实验选择在该基因上寻找设计引物的位点。

表 2 瓦氏黄颡鱼与长吻鲢基因组比较

Tab. 2 Comparison of the genomes of *P. vachelli* and *L. longirostris*

基因组特征 genome features	瓦氏黄颡鱼 <i>P. vachelli</i>	长吻鲢 <i>L. longirostris</i>
基因组大小/Mb genome size	692.10	703.39
染色体数目/个 chromosome number	26	26
基因数目/个 gene number	22 203	23 707

## 2.4 瓦氏黄颡鱼、长吻鲢及其杂交种的分子鉴定

为准确区分瓦氏黄颡鱼、长吻鲢及其杂交种 3 个物种, 实验比对了瓦氏黄颡鱼、长吻鲢基因组上 *patj* 基因序列, 发现一个长度为 391 bp 的 INDEL, 根据这段 DNA 序列差异, 设计了引物 PVLL-F: TTATCTGACAGAAGCACCAG, PVLL-R: CAGTTACCACTTTGGACTAT(图 4), 引物序列见表 3。使用该引物在长吻鲢、瓦氏黄颡鱼及其杂交种中进行 PCR 验证, 在长吻鲢中仅能扩增出 730 bp 的条带, 在瓦氏黄颡鱼中仅能扩增出 339 bp 的条带, 而在其杂交种中可以同时扩增出 730 和 339 bp 两种大小的条带, 并且扩增的产物大小在以上物种中没有观察到雌雄差异(图 5-a)。为确定引物是否适用于其他群体, 实验采取相同的实验条件在长江上游区域群体中进行了验证(图 5-b), 与预期扩增效果一致, 据此引物 PVLL 可以准确区分长吻鲢、瓦氏黄颡鱼及其杂交种, 且不受性别影响。

## 3 讨论

### 3.1 杂交育种在鱼类中的应用

杂交在自然界中普遍存在, 杂交育种对于鱼类的品质改良与新品种培育至关重要。截至

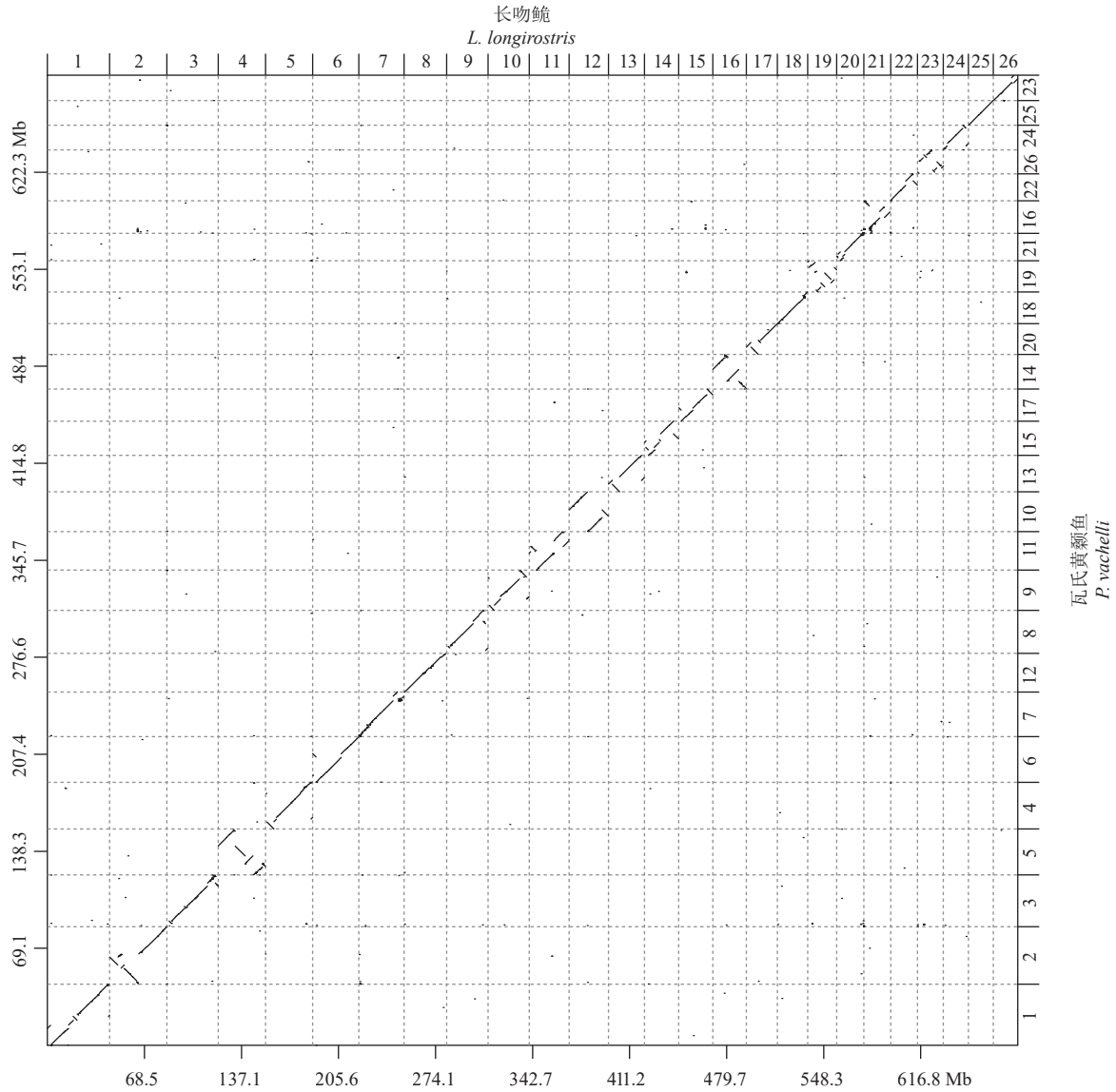


图3 长吻鲢与瓦氏黄颡鱼基因组共线性分析结果

横坐标为长吻鲢基因组, 纵坐标为瓦氏黄颡鱼基因组, 线条代表两个物种基因组之间的共线性。

Fig. 3 Genome synteny between *P. vachelli* and *L. longirostris*

The x-axis represented the genome of the *L. longirostris*, and the y-axis represented the genome of *P. vachelli*. The lines indicated the collinearity between the genomes of the two species.

2021年, 经全国水产原种和良种审定委员会审定通过并由农业农村部公告的210个国审新品种中有近一半为杂交种。通过杂交, 子代可以结合父母本的优良性状, 获得杂种优势, 包括生长、抗病、抗逆等。杂交还可以用于性控育种, 如尼罗罗非鱼 [*O. niloticus* (♀)]×奥利亚罗非鱼 [*O. aureus* (♂)]的杂交后代奥尼鱼, 具有“全雄”和“杂交”双重优势<sup>[17]</sup>; 研究发现黄颡鱼(♀)与瓦氏黄颡鱼(♂)的杂交后代“黄优1号”是不育的, 它的生长性能优于父母本主要是源于摄取的能量更多地用于鱼体的生长, 而非性腺的发育<sup>[8]</sup>。当然, 在鱼类

杂交的生产过程中, 也会出现子代发育异常, 畸形死亡的现象, 这主要是由于染色体数目差异、核-核与核-质的协调性等因素导致<sup>[18]</sup>。瓦氏黄颡鱼与长吻鲢的杂交属于属间杂交, 后代存活率高, 且生长速率快。随着水产动物基因组资源的丰富, 通过组学分析可以更好地指导水产动物杂交育种工作。本研究通过比较基因组学分析表明, 瓦氏黄颡鱼与长吻鲢具有较近的亲缘关系, 在约370万年前发生分化, 并且二者的染色体数目相同, 核型均为 $2n=52$ , 呈现出染色体一一对应的共线性关系, 可保证二者属间杂交过程中双亲核质的

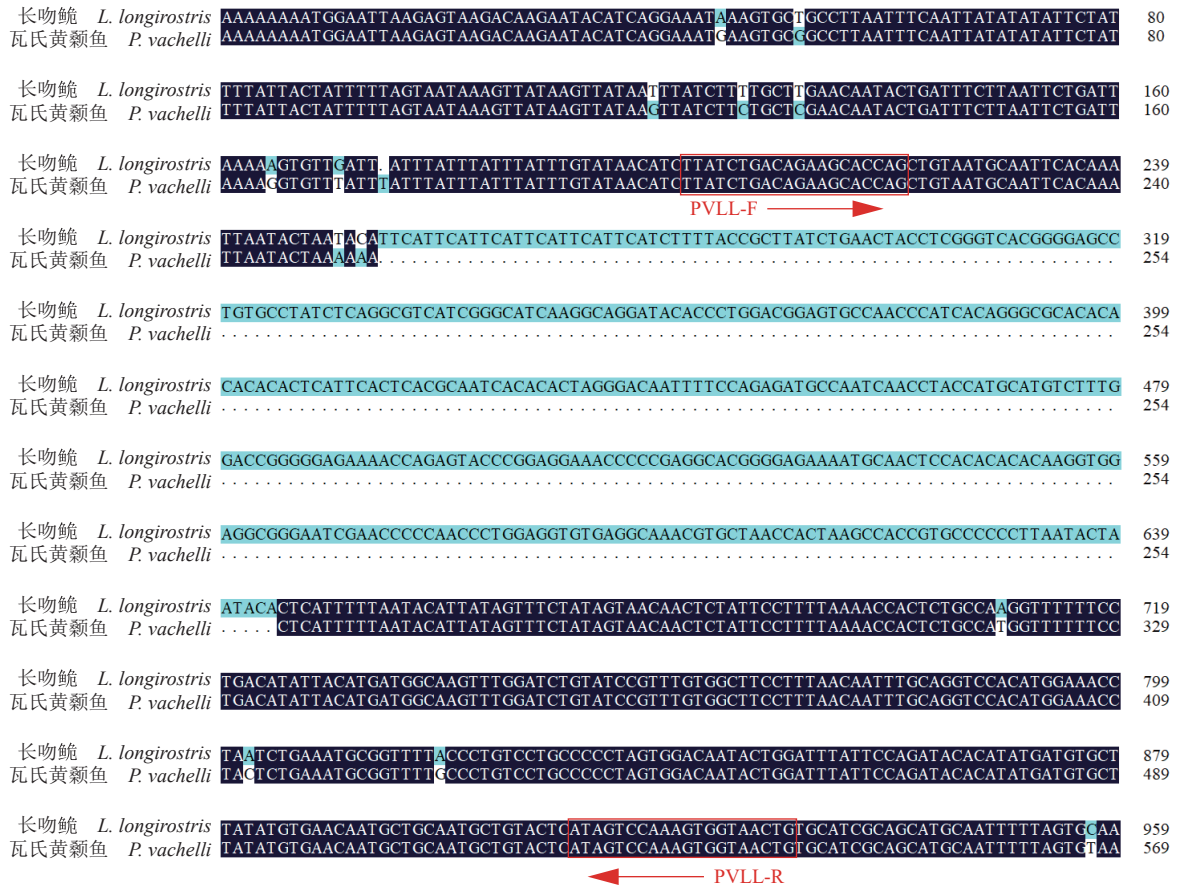


图 4 引物设计示意图

黑色代表两个物种一致的序列, 浅蓝色代表各自特异或差异的序列, 红色方框为本研究所设计的引物位置。

Fig. 4 Primer design schematic

Black represented sequences consistent between the two species, light blue represented unique or divergent sequences for each species, and the red box indicated the primer positions designed in this study.

表 3 鉴定瓦氏黄颡鱼、长吻鲢及其杂交种的分子标记信息

Tab. 3 Molecular markers for *P. vachelli*, *L. longirostris*, and their hybrid

引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature
PVLL-F	TTATCTGACAGAAGCACCAG	54
PVLL-R	CAGTTACCACTTTGGACTAT	

顺利融合。同时, 比较基因组学结果也为二者杂交育种工作提供了遗传理论基础。

### 3.2 鱼类杂交种的鉴定技术研究

培育杂交种的生产过程离不开物种鉴定, 早期一般是根据形态学方法来区分物种, 可以简单地快速地完成鉴定, 如等鳍鲈 (*Isopsetta isolepis*) 和副眉鲈 (*Parophrys vetulus*) 杂交后代的形态处于中间态, 据此可对其进行鉴定<sup>[19]</sup>。但是这种鉴定方法仅适用于形态特征差别明显的物种, 对于一些

外形相似的近缘物种则不适用, 如实验中瓦氏黄颡鱼与长吻鲢, 它们的杂交后代与父母本外形相似, 生产中容易混杂。通常一个物种的染色体核型在不同发育阶段会保持恒定, 因此还可以根据染色体核型与倍性进行区分, 泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 和大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 的正反交子代的染色体数目均等于双亲染色体数目总和的一半, 染色体核型均为  $3n=74$ <sup>[20]</sup>。同样, 此方法仅适用于核型有差异性的物种, 并且操作较为繁琐, 在实际生产中具有局限性。在分子标记技术出现之前, 生化标记被广泛应用, 根据同工酶和蛋白质的电泳技术可以鉴别杂交种<sup>[21]</sup>, 但是此方法受个体差异、发育时期、组织表达差异等因素的影响, 因此也具有一定的局限性。随着测序技术的发展, 基因组资源日益丰富, 出现了多种分子标记技术, 如 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等, 在许多鱼类中均有成功

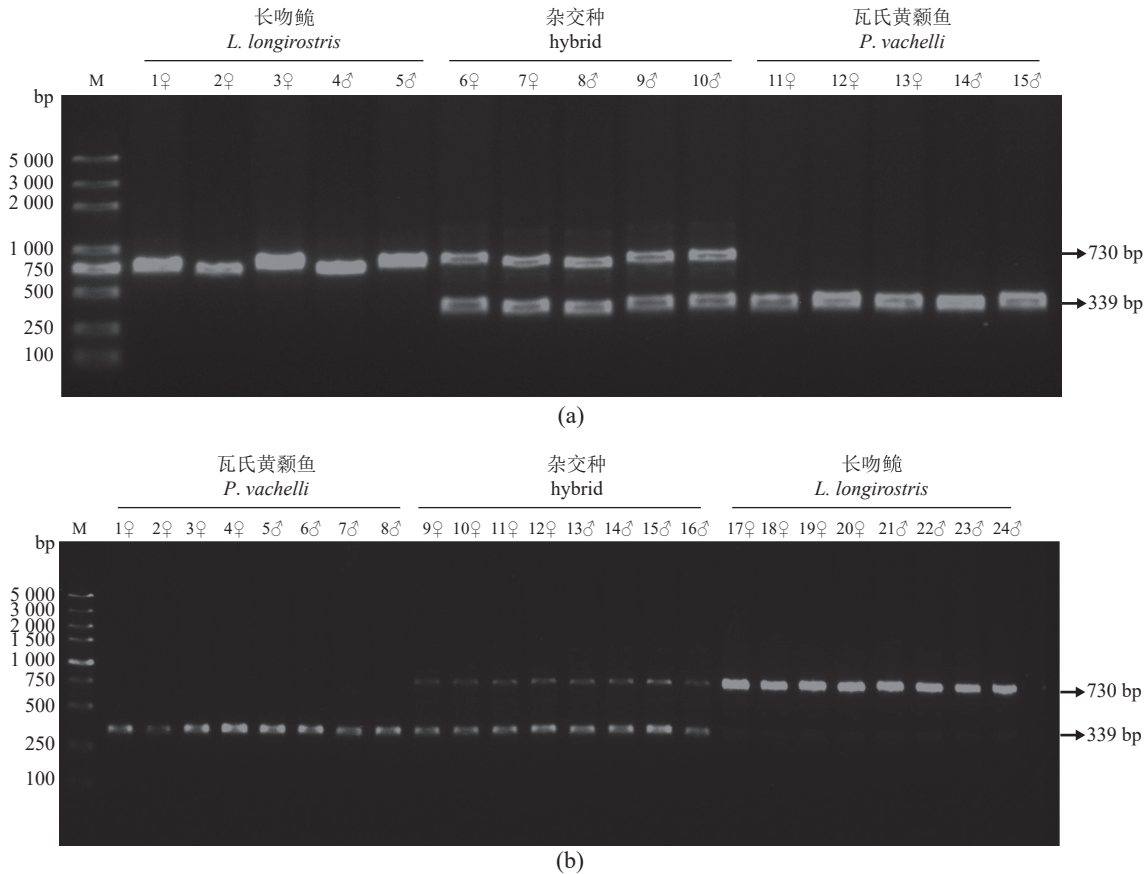


图 5 分子标记在不同群体中的验证结果

(a) 长江中下游群体电泳图, 泳道 1~3、6~7、11~13 为雌鱼, 其余为雄鱼。M. DL2000 plus。(b) 长江上游群体电泳图, 泳道 1~4、9~12、17~20 为雌鱼, 其余为雄鱼。M. DL5000。

Fig. 5 Validation results of the molecular marker in different populations

(a) gel electrophoresis result in the middle and lower reaches of the Yangtze River. Lanes 1-3, 6-7, and 11-13 are females and the rest are males. M. DL2000 plus. (b) gel electrophoresis result in Yangtze River upstream population. Lanes 1-4, 9-12, and 17-20 are females and the rest are males. M. DL5000.

的应用,但是也存在各自的局限性<sup>[22-25]</sup>。当前应用最广泛的是基于 SNP 和 INDEL 的第三代分子标记技术,由于 SNP 和 INDEL 在基因组中位点丰富,具有多态性,并且可以稳定遗传,因此十分适合作为物种鉴定的标记,也在大量的杂交物种中成功应用,如黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼的杂交种鉴定就是根据基因组序列上的较大缺失片段的插入来设计分子标记,目前已经成功应用数年,极大地推动了杂交黄颡鱼产业发展<sup>[15]</sup>。本研究基于比较基因组学分析,成功定位到了瓦氏黄颡鱼与长吻鲢基因组上的一段 391 bp 的 INDEL,基于此,设计出了一对可以高效区分亲本与子代的分子标记,这将有效提高瓦氏黄颡鱼与长吻鲢杂交产业的效率。比较基因组学方法被广泛用于食品和微生物领域,以鉴定病原微生物的标记开发<sup>[26-27]</sup>。相较于传统的微卫星分子标记开发等手段,本研究

<https://www.china-fishery.cn>

所使用的比较基因组学方法可以更加高效地在全基因组范围搜寻物种的特异片段,并且可以保证引物扩增的特异性,较为适用于水产动物。分子标记在应用过程中,常常会遇到不同地区群体差异导致标记鉴定失效的情况,本研究在长江上游区域群体中进一步验证了标记鉴定结果的可靠性,也进一步证实了该遗传位点的稳定性。不过,未来在实际生产过程中是否还会存在其他地区群体不适用的情况,有待进一步验证。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Wang D, Mao H L, Chen H X, *et al.* Isolation of Y- and X-linked SCAR markers in yellow catfish and application in the production of all-male populations[J]. *Animal*

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



- Genetics*, 2009, 40(6): 978-981.
- [ 2 ] Dan C, Mei J, Wang D, *et al.* Genetic differentiation and efficient sex-specific marker development of a pair of Y- and X-linked markers in yellow catfish[J]. *International journal of Biological Sciences*, 2013, 9(10): 1043-1049.
- [ 3 ] Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(15): 1751-1760.
- [ 4 ] Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 124-136.
- [ 5 ] 刘汉勤, 崔书勤, 侯昌春, 等. 从 XY 雌鱼雌核发育产生 YY 超雄黄颡鱼 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31(5): 718-725.
- Liu H Q, Cui S Q, Hou C C, *et al.* YY supermale generated gynogenetically from XY female in *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(5): 718-725 (in Chinese).
- [ 6 ] Liu H Q, Guan B, Xu J, *et al.* Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale breeding of YY super-male and XY all-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson))[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(3): 321-328.
- [ 7 ] 楼允东. 鱼类育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- Lou Y D. Fish Breeding[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1999 (in Chinese).
- [ 8 ] 胡伟华, 丹成, 郭稳杰, 等. 黄颡鱼和杂交黄颡鱼“黄优 1 号”形态及性腺发育的比较 [J]. *水生生物学报*, 2019, 43(6): 1231-1238.
- Hu W H, Dan C, Guo W J, *et al.* The morphology and gonad development of *Pelteobagrus fulvidraco* and its interspecific hybrid “Huangyou No. 1” with *Pelteobagrus vachelli*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(6): 1231-1238 (in Chinese).
- [ 9 ] 张佳佳, 张国松, 张宏叶, 等. 黄颡鱼 (♀)×瓦氏黄颡鱼 (♂) 双亲及其杂交子代核型和营养成分分析 [J]. *海洋渔业*, 2017, 39(2): 149-161.
- Zhang J J, Zhang G S, Zhang H Y, *et al.* Comparative analysis of the karyotype and nutritional ingredient for the hybrids of *Pelteobagrus fulvidraco* (♀) × *P. vachelli* (♂) and their parental fish[J]. *Marine Fisheries*, 2017, 39(2): 149-161 (in Chinese).
- [10] 刘炜, 周国勤, 陈树桥, 等. “黄优 1 号”杂交黄颡鱼规模化繁殖技术及提高繁殖效率的方法 [J]. *科学养鱼*, 2019, 35(10): 6-8.
- Liu W, Zhou G Q, Chen S Q, *et al.* Mass breeding technology and methods for improving breeding efficiency of the hybrids of *Pelteobagrus fulvidraco* (♀)×*P. vachelli* (♂) “Huangyou No. 1”[J]. *Scientific Fish Farming*, 2019, 35(10): 6-8 (in Chinese).
- [11] 王峰, 王武. 江黄颡鱼、黄颡鱼、粗唇鲩杂交繁育初报 [J]. *水产科技情报*, 2004, 31(1): 10-11.
- Wang F, Wang W. Preliminary report on hybrid breeding of *Pelteobagrus vachelli*, *P. fulvidraco* and *Leiocassis crassilabris*[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2004, 31(1): 10-11 (in Chinese).
- [12] 王明华, 蔡永祥, 陈校辉, 等. 乌苏里拟鲮、瓦氏黄颡鱼杂交与自交子代生长性能比较 [J]. *水产科学*, 2013, 32(1): 50-54.
- Wang M H, Cai Y X, Chen J H, *et al.* Growth comparison of offsprings in ussuri bullhead *Pseudobagrus ussuriensis* and darkbarble catfish *Pelteobagrus vachelli* and their reciprocal hybrids[J]. *Fisheries Science*, 2013, 32(1): 50-54 (in Chinese).
- [13] 何尧平, 曾洁, 冯军, 等. 瓦氏黄颡鱼与长吻鲩杂交养殖试验 [J]. *水产养殖*, 2008, 29(5): 33-34.
- He Y P, Zeng J, Feng J, *et al.* Hybrid breeding experiment of *Pelteobagrus vachelli* and *Leiocassis longirostris*[J]. *Journal of Aquaculture*, 2008, 29(5): 33-34 (in Chinese).
- [14] 魏刚. 瓦氏黄颡鱼与长吻鲩杂交的初步研究 [J]. *淡水渔业*, 1987(6): 14-17.
- Wei G. Preliminary study on hybridization of *Pelteobagrus vachelli* and *Leiocassis longirostris*[J]. *Freshwater Fisheries*, 1987(6): 14-17 (in Chinese).
- [15] 巩高瑞, 张晋, 丹成, 等. 应用 DNA 分子标记鉴定黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼及其杂交种的研究 [J]. *水生生物学报*, 2017, 41(2): 321-325.
- Gong G R, Zhang J, Dan C, *et al.* Identification of *Pelteobagrus fulvidraco*, *Pelteobagrus vachelli* and their interspecific hybrid by dna markers[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(2): 321-325 (in Chinese).
- [16] He W P, Zhou J, Li Z, *et al.* Chromosome-level genome assembly of the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris*[J]. *Zoological Research*, 2021, 42(4): 417-

- 422.
- [17] Hulata G, Wohlfarth G W, Karplus I, *et al.* Evaluation of *Oreochromis niloticus*×*O. aureus* hybrid progeny of different geographical isolates, reared under varying management regimes[J]. *Aquaculture*, 1993, 115(3-4): 253-271.
- [18] Wang S, Tang C C, Tao M, *et al.* Establishment and application of distant hybridization technology in fish[J]. *Science China Life Sciences*, 2019, 62(1): 22-45.
- [19] Garrett D L. A new intergeneric hybrid flatfish (Pleuronectiformes: Pleuronectidae) from puget sound and adjacent waters[J]. *Copeia*, 2005, 2005(3): 673-677.
- [20] You C H, Yu X M, Tong J G. Detection of hybridization between two loach species (*Paramisgurnus dabryanus* and *Misgurnus anguillicaudatus*) in wild populations[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2009, 86(1): 65-71.
- [21] Janko K, Flajšhans M, Choleva L, *et al.* Diversity of European spined loaches (genus *Cobitis* L.): an update of the geographic distribution of the *Cobitis taenia* hybrid complex with a description of new molecular tools for species and hybrid determination[J]. *Journal of Fish Biology*, 2007, 71: 387-408.
- [22] 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 F<sub>1</sub> 代的初步鉴定 [J]. *动物学杂志*, 2011, 46(4): 1-7.
- Zhu S R, Li Z Q, Feng X Y, *et al.* Isolation of microsatellite makers for *Channa argus* and *C. maculate* and primary identification of *C. argus*, *C. maculate* and their reciprocal hybrids[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2011, 46(4): 1-7 (in Chinese).
- [23] Liu Z J, Karsi A, Li P, *et al.* An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family[J]. *Genetics*, 2003, 165(2): 687-694.
- [24] Liu Z J, Li P, Argue B J, *et al.* Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and backcross hybrids[J]. *Animal Genetics*, 1998, 29(1): 58-62.
- [25] Elo K, Ivanoff S, Vuorinen J A, *et al.* Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon[J]. *Aquaculture*, 1997, 152(1-4): 55-65.
- [26] Park J, Jin G D, Pak J I, *et al.* Development of a rapid identification method for the differentiation of *Enterococcus* species using a species-specific multiplex PCR based on comparative genomics[J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(4): 476-483.
- [27] Kim H J, Ryu J O, Song J Y, *et al.* Multiplex polymerase chain reaction for identification of Shigellae and four *Shigella* species using novel genetic markers screened by comparative genomics[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2017, 14(7): 400-406.

## Identification of *Pelteobagrus vachelli*, *Leiocassis longirostris* and their interspecific hybrid by DNA markers

GONG Gaorui<sup>1</sup>, LIAO Qian<sup>1</sup>, SUN Ruidong<sup>1</sup>, WANG Zhongwei<sup>2</sup>, JIANG Jun<sup>3</sup>, MEI Jie<sup>1\*</sup>

(1. Hubei Hongshan Laboratory, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,

Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

3. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** The *Pelteobagrus vachelli* and *Leiocassis longirostris*, belong to the order Siluriformes and family Bagridae, respectively fall under the genus *Pelteobagrus* and *Leiocassis*. Their interspecific hybrid offspring exhibit superior growth performance, suggesting significant production potential. As the hybrid offspring of *P. vachelli* and *L. longirostris* share similar morphological features with their parents, confusion may arise in production. DNA molecular markers can be used to accurately and rapidly distinguish species, and are commonly used for species identification. In this study, based on the published genomic data of *P. vachelli* and *L. longirostris*, comparative genomic analysis revealed a close evolutionary relationship between the two species. The estimated divergence time was about 3.7 million years ago. Moreover, through chromosome sequence synteny analysis, it was found that both species had 26 pairs of chromosomes. These chromosomes corresponded one-to-one, with no observed chromosomal fusions, only intra-chromosomal rearrangements. Based on these results, a 391 bp INDEL was identified in the *patj* gene sequence in the two fish species. Using this differential fragment, we designed the primer PVLL. This primer only amplified a 339 bp band in *P. vachelli* and a 730 bp band in *L. longirostris*, while in the hybrid species, it amplified both 339 bp and 730 bp bands. The difference in the amplified bands could be used to distinguish the three species, regardless of gender accurately. We further verified the validity of the primers in different populations. Accordingly, our study provides a theoretical basis for hybrid breeding between *P. vachelli* and *L. longirostris* through comparative genomic analysis. Furthermore, we developed a molecular marker that could efficiently and accurately identify *P. vachelli*, *L. longirostris*, and their interspecific hybrids, which will greatly improve the efficiency of hybrid breeding production.

**Key words:** *Pelteobagrus vachelli*; *Leiocassis longirostris*; hybrid breeding; comparative genomics; molecular marker; species identification

**Corresponding author:** MEI Jie. E-mail: [jmei@mail.hzau.edu.cn](mailto:jmei@mail.hzau.edu.cn)

**Funding projects:** China Agriculture Research System (CARS-46)