

文章编号: 1674 - 5566(2011)01 - 0027 - 07

尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及其杂交后代微卫星标记鉴别和种质纯度分析

李建林, 唐永凯, 李红霞, 俞菊华, 徐 跑

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

摘 要: 从罗非鱼微卫星遗传图谱前 6 个连锁群上随机选取 43 个微卫星位点, 对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、尼罗罗非鱼吉富品系 (GIFT)、奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 以及尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼杂交后代的 DNA 进行 PCR 扩增, 筛选出 7 个位点 (UNH995、GM066、GM166、UNH162、GM017、GM440、UNH948) 在不同罗非鱼中扩增的条带差别明显, 具有特异性, 可作为罗非鱼鉴定的分子标记, 用其中任意一个位点都可以将尼罗罗非鱼或吉富罗非鱼、奥利亚罗非鱼、杂交罗非鱼区别开来。这 7 个标记位点在尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼和奥利亚罗非鱼中平均每个位点检测到等位基因个数分别为 3.1、2.3、1.7, 等位基因大小在 130 ~ 316 bp。这 7 个标记位点上, 尼罗罗非鱼与奥利亚罗非鱼 PCR 扩增的条带大小相差在 20 bp 以上, 对其中 2 个位点扩增的条带进行测序分析, 结果表明是由于微卫星重复次数的差异而造成的。用这 7 个位点对尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼和奥利亚罗非鱼群体的种质纯度进行检测, 结果表明, 这 3 个罗非鱼群体中分别有 8%、4%、4% 的个体在有些位点上的谱带与杂交罗非鱼的相似, 可能存在基因污染。

研究亮点: 筛选出的任意一个特异微卫星标记, 都可以同时将尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼, 以及它们的杂交后代区别开来, 具有较高的识别效率; 利用筛选出的标记能选出种质较纯或筛除可能存在种质混杂的罗非鱼个体, 也能对罗非鱼群体的种质状况进行评估。

关键词: 罗非鱼; 微卫星; 鉴别; 种质纯度

中图分类号: S 917

文献标识码: A

罗非鱼 (*Tilapia*) 原产于非洲, 自上世纪 50 年代起, 我国曾多次引入不同品种、品系的罗非鱼^[1], 现中国已是世界上最大的罗非鱼生产国和出口国^[2]。由于不同品种、品系的罗非鱼有很大的形态特征重叠^[3], 这使从形态上鉴别不同罗非鱼品种非常困难^[4]。另外, 罗非鱼品种间很容易杂交, 且杂种可育, 杂交种形态又与亲本很相似^[5], 很容易造成罗非鱼种质混杂, 从而导致优良经济性状退化^[6], 因此, 很有必要寻求一种简单、快速、准确地鉴别不同罗非鱼品种的方法。我国主要养殖的罗非鱼品种有尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*), 尼罗罗非鱼吉富品系 (Genetically Improved Farmed Tilapia, GIFT), 奥

利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 和奥尼杂交罗非鱼 (尼罗罗非鱼 ♀ × 奥利亚罗非鱼 ♂) 等。本研究采用微卫星标记技术对尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼以及它们的正、反交后代的遗传特性进行分析, 以找出可以区分它们的特异微卫星标记, 建立快速、准确鉴别不同罗非鱼品种和种质纯度检测的方法, 为罗非鱼的种质鉴定、种质保护和选择育种等提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼都采自淡水渔业研究中心宜兴养殖基地。尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼分别为 1999 年

收稿日期: 2010-07-30

修回日期: 2010-09-17

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903046 - 02); 基本科研业务费专项 (2009JBFC02, 2009JBFB05)

作者简介: 李建林 (1974 -), 男, 副研究员, 主要从事鱼类遗传育种方面的研究。E-mail: lij@ffrc.cn

通讯作者: 俞菊华, E-mail: yujh@ffrc.cn

从埃及引进和 1983 从美国引进并经逐年选育的后代;尼罗罗非鱼吉富品系(以下简称吉富罗非鱼)为 2006 年从马来西亚世界渔业中心引进。选取外部形态特征明显的纯种尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼和奥利亚罗非鱼各 10 尾,以及尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的正、反交后代各 10 尾,用以筛选鉴别不同罗非鱼的微卫星标记。另外,从宜兴养殖基地保存的尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼和奥利亚罗非鱼群体中随机各选 50 尾用以种质纯度检测。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

所有实验鱼从尾静脉抽血 0.2 ~ 0.5 mL, 4 °C 冰箱静置 2 h, 取血细胞 30 μ L, 用蛋白酶 K 消化, 酚-仿抽提总 DNA^[7], 再根据紫外分光光度计

和琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 样品的浓度和纯度, 稀释 DNA 至 50 ng/ μ L, 4 °C 保存备用。

1.2.2 引物合成及 PCR 反应

根据第二代罗非鱼微卫星遗传图谱^[8], 在第 1 至第 6 号连锁群上随机选取了 43 个微卫星位点, 并从 GenBank 中下载这些微卫星位点的引物序列, 表 1 列出了其中 7 个位点的引物序列、所在连锁群和退火温度。引物由上海捷瑞生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应总体积为 20 μ L, 其中含 10 \times 反应缓冲液 2.0 μ L, 2 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 0.1 μ mol/L 引物, 0.5 U *Taq*酶, 50 ~ 100 ng DNA, 用灭菌双蒸馏水补足体积。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 退火 30 s, 72 °C 30 s, 26 个循环; 72 °C 延伸 8 min; 4 °C 保存。

表 1 7 对微卫星引物的信息

Tab.1 The information of 7 pairs of microsatellite primers

位点	引物序列(5'-3')	连锁群	退火温度(°C)
UNH995	F: CCAGCCCTCTGCATAAAGAC R: GCAGCACAACCCACAGTGCTA	1	55
GM066	F: CACATGCCGCACAAATAAACAT R: CCTCTCTCCCCTTAGAAACA	2	53
GM166	F: TGTGAGGCGTGAATGCTAAA R: AAGAGCGGTGGGTGGAC	2	55
UNH162	F: CAGACACAGCAGAGGAT R: TGATAAGTAATTCATCTGTTTG	4	48
GM017	F: CCCTCTGTTTCCATCTCA R: GATACCTGTCCATACCTCCTC	5	50
GM440	F: CTGCACITTTACTGAGGG R: TGGGAGATTAACAGAATAACA	6	50
UNH948	F: GCTCGCTCCAGAAAAATCAC R: GTCAAAAAGGCATGGCAAAG	6	52

1.2.3 电泳及染色

PCR 产物经 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检验后, 再用 8.0% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶, 1 \times TBE 缓冲液, 5V/cm 低电压电泳分离。PAGE 电泳采用北京六一仪器厂生产的 DYCZ-24B 型双垂直电泳槽。电泳结束后, 硝酸银染色并拍照记录电泳结果。根据 25 bp DNA Step Ladder (Promega) 分子量标记和 PCR 扩增片段大小, 分析各位点的等位基因, 并确定基因型。

1.2.4 PCR 产物的克隆和测序

将纯化的 DNA 片段连接到 pUCm-T 载体中, 转化到感受态大肠杆菌 DH5 α , 经蓝白斑筛选重组子^[7], 筛选出的阳性克隆进行双酶切和 PCR 鉴

定后进行序列测定(由上海博尚生物技术有限公司测序)。所得序列用软件 Clustal X 进行分析。

2 结果与分析

2.1 标记位点的筛选及多态性分析

本实验所用的 43 对微卫星引物在尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼、奥利亚罗非鱼, 以及尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的正、反交后代样品中均能扩增出清晰的条带, PCR 产物电泳后可以清楚地分辨等位基因和基因型。所选位点中, 有 7 个位点 (UNH995、GM066、GM166、UNH162、GM017、GM440 和 UNH948) 在这几种罗非鱼中扩增条带差别明显, 具有品种特异性, 有望作为鉴别不同

罗非鱼的标记位点,其余大部分位点等位基因大小在这几种罗非鱼中差别不大或有重合,不能有效区别不同品种的罗非鱼。表 2 可见,7 个位点在 10 尾尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼和奥利亚罗非

鱼中检测到的等位基因个数在 1~4 之间,共检测到等位基因数分别为 22、16、12,等位基因大小在 130~316 bp 之间。

表 2 7 个微卫星位点扩增结果
Tab. 2 The results amplified by 7 microsatellite loci

位点	尼罗罗非鱼		吉富罗非鱼		奥利亚罗非鱼	
	等位基因数	等位基因范围 (bp)	等位基因数	等位基因范围 (bp)	等位基因数	等位基因范围 (bp)
UNH995	3	176~188	3	184~200	3	225~248
GM066	4	208~228	3	208~216	2	248,260
GM166	4	202~228	2	202,204	2	218,226
UNH162	3	308~316	3	308~316	1	174
GM017	2	144~148	1	144	1	160
GM440	2	262,266	1	266	1	290
UNH948	4	168~184	3	178~184	2	196,202
平均	3.1		2.3		1.7	

2.2 标记片段的克隆和测序

我们分别对 7 个标记位点中的 GM066 和 GM166 位点在部分尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼个体中扩增的片段进行了克隆和序列测定。结果表明,2 种鱼在这 2 个位点上扩增片段的序列除有少数核苷酸存在差异外,微卫星重复次数上的差别尤为突出:在位点 GM066,尼罗罗非鱼的微卫星序列为 (CA)₁₈,奥利亚罗非鱼的为 (CA)₃₇,序列大小相差 38 bp (图 1);在位点 GM166,尼罗罗非鱼微卫星序列为 (AC)₁₅,奥利亚罗非鱼的为 (AC)₃₀,序列大小相差 30 bp (图 2)。因此,可确定这 2 种鱼在这 2 个位点上的谱带差别是由于等位基因中微卫星重复次数差别而造成的,而其他 5 个标记位点电泳谱带的差别是否也由微卫星重复次数差别而造成的还有待进一步验证。

```
0. niloticus  CAATCCACAAATAAATTT-----
0. aureus    CAATCCACACATAAATTTTCACACACACACACACACACACACACACACA
*****

0. niloticus  ---CACACACACACACACACACACACACACACACACACACCATTAAAGTTAATTAATAATA
0. aureus    CACACACACACACACACACACACACACACACACACACCATTAAAGTTAATTAATAATA
*****

0. niloticus  CGTCTTTTTCAGAGTCGGTGTATATATCACAGTGGATATAAAGTTACTCACAGGAGACA
0. aureus    CATCTTTTCAGAGTCGGTGTATATATCACAGTGGATATAAAGTTACTCACAGGAGACA
*****

0. niloticus  AAAGACAGTGGCCGCAAAACAAGACTTTTCAACAACCTTAICTTTTCTAAGCCGAG
0. aureus    AAAGACAGTGGCCGCAAAACAAGACTTTTCAACAACCTTAICTTTTCTAAGCCGAG
*****

0. niloticus  GAGAG
0. aureus    GAGAG
*****
```

图 1 尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼在位点 GM066 的等位基因序列
Fig. 1 The allele sequences in *O. niloticus* and *O. aureus* of locus GM066 阴影部分为微卫星引物。

```
0. niloticus  TGTGAGCGTCTAAATGATTAATTTGATCACGAACTAGAATGTATGGTATGTTG
0. aureus    TGTGAGCGTCTAAATGATTAATTTGATCACGAACTAGAATGTATGTTGTTG
*****

0. niloticus  AACATGCTTATCCOCACAAGGGTGCACACACACACACACACACACACACACACACAC
0. aureus    TAGATACATTATACACACAAGAGTGGCACACACACACACACACACACACACACACACAC
*****

0. niloticus  -----GGTAACCATAACTCCACATTACAGATTCA
0. aureus    ACACACACACACACATACACACACGGTAACCATAACTCCACATTACAGATTCA
*****

0. niloticus  TTGTGCTATTGAGCAATCTGGTTTTGGTCAACACACAGCTG
0. aureus    TTGTGCTATTGAGCAATCTGGTTTTGGTCAACACACAGCTG
*****
```

图 2 尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼在位点 GM166 的等位基因序列
Fig. 2 The allele sequences in *O. niloticus* and *O. aureus* of locus GM166 阴影部分为微卫星引物。

2.3 罗非鱼的品种鉴别

通过对这 7 个位点的电泳图谱分析发现 (图 3),尼罗罗非鱼与吉富罗非鱼间的等位基因大小相差较小或相同,不能有效区分吉富罗非鱼和尼罗罗非鱼,说明这些位点不能将不同品系的尼罗罗非鱼区别开来。但在这 7 个位点上,尼罗罗非鱼或吉富罗非鱼与奥利亚罗非鱼的等位基因大小相差在 20 bp 以上,可清楚地将尼罗罗非鱼或吉富罗非鱼与奥利亚罗非鱼区分开。尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼正、反交后代的谱带相似,且都为杂合子,每个个体的 2 个等位基因分别能在其亲本尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼中找到,因微卫星 DNA 呈共显性的孟德尔式遗传,可认为杂交罗非鱼的等位基因 1 条来自母本,1 条来自父本,由此可将杂交后代与尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼、奥利亚罗非鱼区分开。

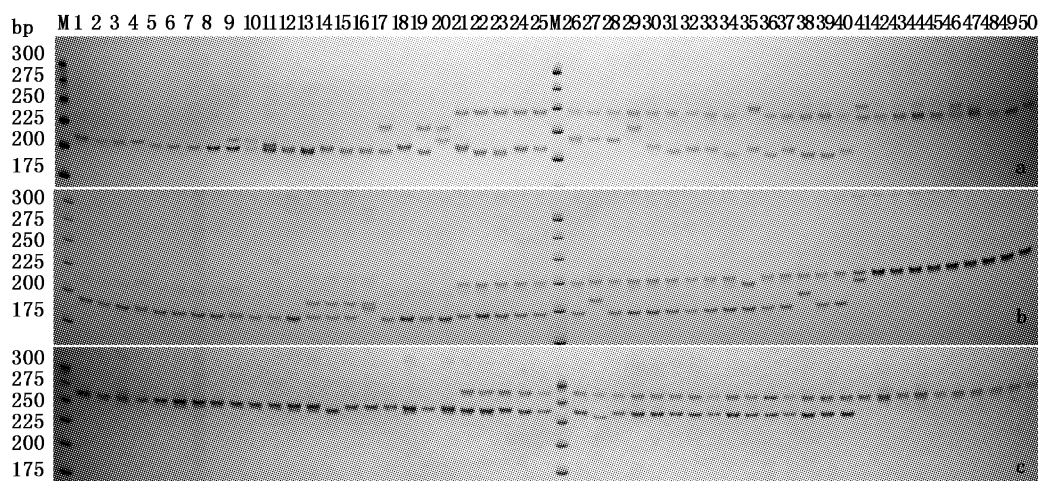


图3 位点 *GM066* (a), *GM166* (b) 和 *GM440* (c) 扩增的结果。

Fig. 3 Results amplified by *GM066* (a), *GM166* (b) and *GM440* (c)

M. 25 bp DNA 每阶; 1 - 10. 吉富罗非鱼; 11 - 20. 尼罗罗非鱼; 21 - 30. 奥尼罗非鱼; 31 - 40. 尼罗罗非鱼; 41 - 50. 奥利亚罗非鱼。

2.4 种质纯度检测

用本实验所筛选到的 7 个微卫星标记对宜兴养殖基地的尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼和奥利亚罗非鱼群体进行检测。结果表明,大多数尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼、奥利亚罗非鱼个体在这 7 个位点中的图谱具有纯种的特征,但仍有少数个体在这 7 个位点中有些位点上的图谱与杂交罗非鱼的相同或相似,如图 4,图 5 中,尼罗罗非鱼的第 1、23 号样品在位点 *GM166*、*UNH995* 上的谱

带,奥利亚罗非鱼的第 4 号样品在位点 *UNH995* 和 *GM017* 上的谱带。表 3 列出了尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼、奥利亚罗非鱼在这 7 个位点上与杂交罗非鱼谱带相似的个体数。经统计分析,在这 7 个标记位点上,尼罗罗非鱼有 4 尾(占样本总数 8%) 在 6 个位点上、吉富罗非鱼有 2 尾(占样本总数 4%) 在 2 个位点上、奥利亚罗非鱼有 2 尾(占样本总数 4%) 在 3 个位点上的谱带与杂交罗非鱼的相同或相似,可能存在基因污染。

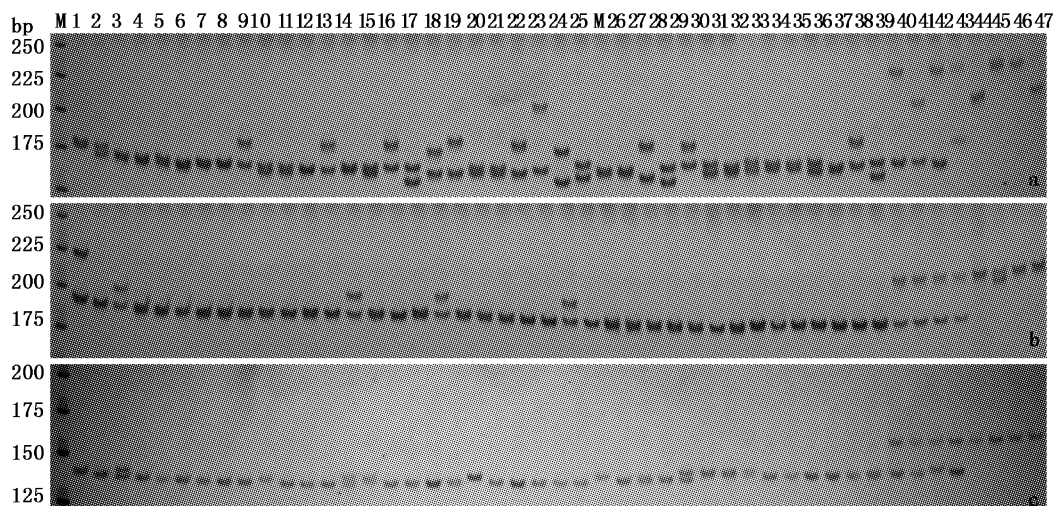


图4 位点 *UNH995* (a), *GM166* (b) 和 *GM017* (c) 在尼罗罗非鱼中扩增的部分结果

Fig. 4 Partial results amplified by *UNH995* (a), *GM166* (b) and *GM017* (c) in *O. niloticus*

M. 25 bp DNA 每阶; 1 - 39. 尼罗罗非鱼; 40 - 43. 奥尼罗非鱼; 44 - 47. 奥利亚罗非鱼。

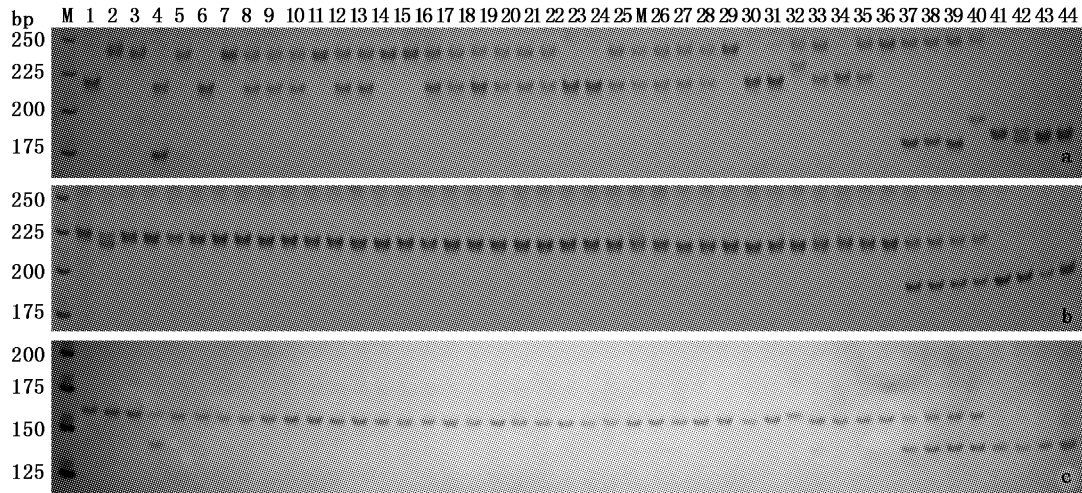


图5 位点 *UNH995* (a), *GM166* (b) 和 *GM017* (c) 在奥利亚罗非鱼中扩增的部分结果

Fig. 5 Partial results amplified by *UNH995* (a), *GM166* (b) and *GM017* (c) in *O. aureus*

M. 25 bp DNA 每阶; 1-36. 奥利亚罗非鱼; 37-40. 奥尼罗非鱼; 41-44. 尼罗罗非鱼。

表3 3种罗非鱼在7个位点上与杂交罗非鱼谱带相似的个体数

Tab. 3 The number of three tilapia species with bands similar with the hybrid tilapia in 7 microsatellite loci

位点	与杂交罗非鱼谱带相似的个体数		
	尼罗罗非鱼	吉富罗非鱼	奥利亚罗非鱼
<i>UNH995</i>	1	1	1
<i>GM066</i>	0	0	0
<i>GM166</i>	1	0	0
<i>UNH162</i>	1	1	1
<i>GM017</i>	0	0	1
<i>GM440</i>	2	0	0
<i>UNH948</i>	1	0	0

3 讨论

3.1 标记位点的多态性

本研究从43个微卫星位点中筛选出7个位点在尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼、奥利亚罗非鱼,以及尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的正、反交后代中扩增的谱带品种特征比较明显。这7个位点在尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼和奥利亚罗非鱼中平均检测到的等位基因个数分别为3.1、2.3、1.7,最多的也只有4个等位基因。这7个位点多态性偏低,可能与本实验的引物选择有关:在筛选鉴别不同罗非鱼的微卫星标记过程中,舍弃了较多的多态性较高的位点。根据微卫星选择标准,等位基因数大于4个才能较好地用于群体遗传多样性的评估^[9],因此,该7个位点不大适合用于对

尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼和奥利亚罗非鱼进行群体遗传多样性分析。然而,从本实验筛选标记位点的过程来看,当不同种罗非鱼等位基因大小有差别时,多态性较低的位点比多态性较高的位点图谱简单明确,更易于区分不同的种群,这与毛永江等^[10]研究结果相同。BJORNSTAD和ROED^[11]和BOLTT等^[12]认为在个体识别时,拥有较多等位基因数的微卫星位点有较高的识别效率,结合本研究结果,可认为在不同品种鉴别时,选用等位基因大小有差别且等位基因数较少的微卫星位点识别准确性更高,而在种群内个体识别时,采用拥有较多等位基因数的微卫星位点效果较好。

3.2 罗非鱼的品种鉴别

本实验结果表明,所筛选出来的7个标记位点在尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼、奥利亚罗非鱼,以及尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的正、反交后代中PCR反应稳定、特异性强、图谱品种特性明显,可作为鉴别它们的标记位点。这7个位点上,尼罗罗非鱼或吉富罗非鱼与奥利亚罗非鱼PCR扩增的条带大小相差在20 bp以上,而尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的正、反交后代的基因型都为杂合子,其等位基因分别能在它们的双亲中找到,用这7个位点中任意一个位点都可以同时将尼罗罗非鱼或吉富罗非鱼、奥利亚罗非鱼、杂交罗非鱼区别开来,具有较高的识别效率。用这7个位点在对宜兴养殖基地保存的尼罗罗非鱼、吉富罗

非鱼和奥利亚罗非鱼群体进行检测发现,少数尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼、奥利亚罗非鱼个体在有些位点上的谱带与杂交罗非鱼的相同或相似,可能存在基因污染或种质混杂。这些可能存在基因污染或混杂的个体在这7个位点中的一些位点上表现为纯种特性,而在另一些位点上表现为杂交种特性。因此,仅从单个位点还无法将它们与纯种罗非鱼准确区别开来,需用多个标记位点组合进行分析,才能有效区别纯种和可能存在种质污染的罗非鱼,标记位点检测得越多,识别就会越准确。罗非鱼第二代遗传连锁图谱报道了525个微卫星位点^[8],本研究只从其中43个位点筛选到7个标记位点,很有必要继续进行筛选,以找出更多的标记位点用于罗非鱼品种鉴别或种质纯度检测。

3.3 种质纯度分析

用本研究所筛选到的微卫星标记对淡水渔业研究中心宜兴养殖基地保存的尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼和奥利亚罗非鱼群体进行检测,发现这3种罗非鱼中有少数个体可能存在基因污染。这可能是在保种或选育过程中由于遗传渐渗或种质混杂而造成的,但也不能排除在引种时就已经存在。由于罗非鱼品种间很容易发生种间杂交,且杂种可育,在自然条件或生产中难以避免,因此纯种保存相对较难。李思发和蔡完其^[6]利用同工酶分析我国“78”品系尼罗罗非鱼养殖群体中存在的遗传渐渗问题;PULLIN^[13]也发现菲律宾莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼之间遗传渐渗相当普遍;MCANDREW等^[14]曾发现1个罗非鱼商业品系中含有多达4种不同罗非鱼的基因。即使野生品种,通过遗传渐渗也会造成基因污染^[15]。由于罗非鱼种质混杂会造成生长性能下降,如生长速度减慢、养成规格偏小等,奥尼罗非鱼的雄性率也与亲本的种质纯度密切相关,目前对罗非鱼种质状况的评价多以群体遗传多样性来衡量^[16-18],当群体的遗传多样性丰富,则认为群体种质遗传变异度高,遗传差异大;当群体的遗传多样性低,则认为群体亲缘关系近,种质遗传相似性大。然而罗非鱼遗传多样性的高低有可能是因为种内基因差异造成的,也有可能是基因污染或混杂的结果。本研究用所筛选的7个微卫星标记位点进行组合,对宜兴养殖基地保存的尼罗罗非鱼、吉富罗非鱼和奥利亚罗非鱼群体

进行种质纯度检测,发现这3个罗非鱼群体分别有8%、4%和4%的个体可能存在基因污染或种质混杂,说明这3个群体还有待进一步选育来提高它们的种质纯度。然而,由于微卫星位点一般都有较高的多态性,本实验用微卫星标记检测出的存在种质污染的个体也有可能是因为群体内基因变异造成的,还需要用其他的研究方法加以验证。在罗非鱼的选育中,利用这些微卫星标记对罗非鱼群体种质纯度进行分析,筛选存在基因污染或杂交个体,将有助于罗非鱼的纯种选育,或加快提纯复壮的进程。另外,应用这些标记筛选种质纯度较高的尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼用于生产奥尼罗非鱼,则有希望提高奥尼罗非鱼的雄性率和养殖性能,但这些标记具体应用效果如何,还需要在生产实践中得以验证。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 吴湘生. 2006年中国罗非鱼市场形势分析[J]. 北京水产,2006(2):20-22.
- [3] 李家乐,李思发,李勇. 尼奥鱼[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.
- [4] AVTALION R R. Genetic markers in Sarotherodon and their use for sex and species identification[C]//PULLIN R S V, LOWE-MCCONNELL R H. Biology and Culture of Tilapias ICLARM Conference Proceedings 7, 1982: 269-277.
- [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] 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):105-111.
- [7] 萨姆布鲁克J,拉塞尔D W. 分子克隆试验指南[M]. 3版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002:463-471.
- [8] LEE B Y, LEE W J, STREELMAN T, et al. A Second-Generation Genetic Linkage Map of Tilapia (*Oreochromis spp.*) [J]. Genetics, 2005,170(1): 237-244.
- [9] BARKER J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds [C]//Proceeding of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Canada: Guelph, Ontario, 1994: 501-508.
- [10] 毛永江,常洪,杨章平,等. 3种不同利用微卫星标记与进行个体识别方法的比较研究[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(9):1171-1175.
- [11] BJORNSTAD G, ROED K H. Evaluation of factors affecting individual assignment precision using microsatellite data from horse breeds and simulated breed crosses [J]. Animal Genetics,2002,33(4):262-270.

- [12] BOLTT S C, WILLIAMS J L, HALEY C S. Discriminating among cattle breeds using genetic markers [J]. *Heredity*, 1999, 82(6):613-619.
- [13] PULLIN R S V. Tilapia genetic resources for aquaculture [C]// ICLARM, Conference Proceedings 16, 1988:108.
- [14] MCANDREW B J, ROUBAL F R, ROBERTS R J, *et al.* The genetics and histology of red, blond and associated colour variants in *Oreochromis niloticus* [J]. *Genetica*, 1988, 76(2):127-137.
- [15] MACARANAS J M, TANIGUCHI N, PANTE M J R, *et al.* Electro-phoretic evidence for extensive hybrid gene introgression into commercial *O. niloticus* stocks in the Philippines [J]. *Aquaculture and Fisheries Management*, 1986, 17(4):248-258.
- [16] 李建林,唐永凯,陈文华,等. 吉富罗非鱼微卫星标记与体质量、体形相关性分析[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(6):824-832.
- [17] 张庭,卢迈新,叶星,等. 四个奥利亚罗非鱼群体的微卫星分析[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(3):498-508.
- [18] 王进科,夏德全,吴婷婷. 中国莫基群奥利亚罗非鱼遗传多态性的DNA指纹图谱[J]. *南京农业大学学报*, 2000, 23(3):61-63.

Identification and pureness of germplasm analysis of *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*, and their hybrids by microsatellite markers

LI Jian-lin, TANG Yong-kai, LI Hong-xia, YU Ju-hua, XU Pao

(Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: 43 microsatellite loci were chosen randomly in the first six linkage groups on the microsatellite genetic map of tilapia, and relevant primers were used to perform PCR amplification from genomic DNA of *Oreochromis niloticus*, GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia) strain, *Oreochromis aureus* and hybrids of *O. niloticus* and *O. aureus*. And seven microsatellite loci (*UNH995*, *GM066*, *GM166*, *UNH162*, *GM017*, *GM440*, *UNH948*) were screened in this study. The seven loci could amplify unique bands of variety characters respectively and any loci could be used as a molecular marker to distinguish *O. niloticus* or GIFT strain, *O. aureus*, and hybrid tilapia. The average alleles number detected by these 7 loci in *O. niloticus*, GIFT strain, and *O. aureus* was 3.1, 2.3 and 1.7 respectively, and the lengths ranged from 124 to 310 bp. The amplification by PCR had an over 20 bp difference between *O. niloticus* and *O. aureus* on these 7 loci. The bands amplified by 2 loci were sequenced and then analyzed, and the results showed that the differences were caused by different microsatellite repeats. Germplasm pureness analysis of *O. niloticus*, GIFT strain and *O. aureus* populations by these 7 loci indicated that there were 8%, 4% and 4% individuals of each population could obtain similar bands to the hybrid tilapia in some loci, which might have some genetic pollution.

Key words: tilapia; microsatellite; identification; pureness of germplasm