

# 高识别力的微卫星标记系统在鳊属(*Siniperca*) 物种鉴定中的应用\*

鲁双庆<sup>1</sup> 匡刚桥<sup>1,2</sup> 刘臻<sup>1</sup> 刘红玉<sup>3</sup> 张建社<sup>1</sup> 刘峰<sup>1,2</sup>

(1. 长沙大学生物工程与环境科学系 长沙 410003; 2. 湖南农业大学动物科技学院 长沙 410128;  
3. 湖南大学环境科学与工程学院 长沙 410082)

**提要** 根据自行分离的翘嘴鳊微卫星序列(GenBank 登录号: DQ789247—DQ789306)设计并合成 20 对微卫星引物,对鳊属鱼类 4 个物种即翘嘴鳊、大眼鳊、斑鳊和暗鳊共 80 个个体进行了物种鉴定分析。结果表明,20 对微卫星引物共检测到 293 个等位基因,大小在 80—301bp 之间。它们在 4 个物种中的多态性位点百分率分别为 90%、75%、85%和 85%,累积个体识别率和非父排除率均达到 0.9999,属于高识别力的微卫星遗传标记系统,可以用来进行鳊属鱼类物种的鉴定分析。UPGMA 聚类分析表明,翘嘴鳊与暗鳊之间亲缘关系最近,可归属于第 类;大眼鳊为第 类;斑鳊独自为第 类。本研究可为鳊属鱼类的分类及进化关系、群体遗传结构分析等提供理论支持,为野生原种鳊类遗传多样性的监测和评估以及鳊类优良的种质资源得到合理保护和开发利用奠定基础。

**关键词** 鳊属,微卫星标记,遗传多样性

**中图分类号** Q78

鳊属(*Siniperca*)鱼类是鳊亚科(*Sinipercinae*)中的淡水肉食性鱼类。我国鳊类资源丰富,有翘嘴鳊(*S. chuatsi*)、大眼鳊(*S. kneri*)、斑鳊(*S. obscura*)和暗鳊(*S. scherzeri*)等多个物种,其中翘嘴鳊和大眼鳊已成为人工养殖的主要名贵鱼类,斑鳊是进行鳊类物种遗传改良的重要优异基因来源。目前,利用分子遗传标记技术对鳊类进行物种遗传背景的研究还很少,仅见于方展强等(2005)对鳊野生群体和养殖群体的 RAPD 分析和杨受保等(2003)采用 20 个随机引物对 3 个不同水域的鳊鱼进行的 RAPD 指纹分析。但 RAPD 标记揭示的遗传信息相对较少,且试验重复性差,很难满足更进一步研究的需要。

微卫星(microsatellite)标记作为一种新型的 DNA 分子标记技术,能够显示出极高的个体特异性,且微卫星引物在种属间具有一定的通用性(周莉等, 2001)。目前,微卫星技术已被广泛应用于

水产动物的遗传多样性分析、亲缘关系鉴定和遗传连锁图谱构建等领域(Daemen, 2001; Thomas, 1998; Ferguson, 1994)。而迄今为止,尚未见有关微卫星技术在鳊属鱼类遗传学研究中的应用报道。因此,作者在本研究中根据自行分离的翘嘴鳊微卫星序列(GenBank 登录号: DQ789247—DQ789306),设计并合成 20 对微卫星引物,对湖南洞庭湖区鳊属鱼类 4 个物种即翘嘴鳊、大眼鳊、斑鳊和暗鳊共 80 个个体进行了个体识别和物种鉴定分析,以期对鳊类的遗传改良、新品种的选育及种质资源的可持续利用提供分子水平上的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验所用鳊属鱼类 4 个物种即翘嘴鳊、大眼鳊、斑鳊和暗鳊取自湖南洞庭湖区,各 20 个个体,抽取尾静脉血液,加入 ACD 抗凝剂抗凝,保存

\* 国家自然科学基金项目,30571414 号;湖南省自然科学基金项目,06JJ20056 号;湖南省教育厅资助项目,06C165 号。鲁双庆,博士,教授,博士生导师,E-mail: lsq4250440@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-04-16; 收修改稿日期: 2006-06-13

于 -20 °C 冰箱中备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 采用刘臻等(2004)提供的方法提取基因组 DNA。0.8% 琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白仪(Eppendorf 产品)检测 DNA 的浓度和纯度, -20 °C 保存备用。

**1.2.2 微卫星引物设计** 参照自行分离的翘嘴鲈微卫星序列(GenBank 登录号: DQ789247—DQ789306), 用引物设计软件 Primer Premier (version 5.0)进行引物设计, 共设计出 20 对引物(表 1), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.2.3 PCR 扩增及电泳分析** PCR 扩增反应总体积为 25 μl, 内含模板 DNA 50ng、10 × buffer 2.5 μl、25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.5 μl、dNTPs 1.0 mmol/L、

引物 0.4 μmol/L、Taq DNA 聚合酶 1.0U (Taq DNA 聚合酶、dNTPs 均购自 MBI 公司)。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5min, 94 °C 变性 30s, 退火 45s(退火温度依引物而异), 72 °C 延伸 1min, 经 35 个循环后, 72 °C 延伸 10min, 4 °C 保存。PCR 扩增产物先经 3.0% 琼脂糖凝胶电泳检验扩增效果后, 采用 8.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 1 × TBE 缓冲液, 5V/cm 低电压电泳分离。电泳结束后, 银染法染色, 用 GDS8000PC 凝胶成像分析系统对凝胶中 PCR 扩增产物进行拍照、记录和分析。

**1.2.4 数据统计与分析** 根据 PCR 扩增片段变异范围和特征, 直接从表型获知其基因型, 利用 GENEPOP 软件包(Version 1.2)(Raymond *et al.*, 1995)统计其等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ ); 根据 Levene(1949)计算多态座位的观察杂

表 1 20 个微卫星标记的核心序列、退火温度及其引物序列

Tab.1 Core repeats, annealing temperatures and primer sequences of the 20 microsatellite DNA loci

基因座位	核心序列	正向引物 (5'—3')	反向引物 (5'—3')	退火温 度( °C)	Mg <sup>2+</sup> 浓 度
DQ789249	(TG) <sub>10</sub>	TGCGACAACCTACTCTGCT	TCTGTTTTTGACCGAGGG	53	1.5
DQ789266	(AC) <sub>11</sub>	TCTGTTTTTGACCGAGGG	CACTTCACTGGTTCCTGCT	54	1.2
DQ789273	(ATC) <sub>6</sub> ... (GATA) <sub>21</sub>	TGCTAGAACCACCACTACAAA	TCATACCACAGCATCTCAATAG	54	1.2
DQ789274	(TCTG) <sub>6</sub>	GCTAGTCCCTGTTGGCTTT	CCAAATGTGGCAGAGTGAC	54	1.2
DQ789294	(TG)(AG) <sub>18</sub> (TG) <sub>17</sub>	TGGACCTGCTGTAATCTCTGT	ATCGGGTAACATCTCCTCAC	55	1.2
DQ789271	(AC) <sub>10</sub>	TGAGTGGTTAGAGTTAGGGACG	GCAGTTTCCTGGTTACTCCTC	57	1.5
DQ789277	(AATC) <sub>10</sub>	CCGTCCTTCTTCTCTGTGT	TTCGGTTGTTGGAAGGTG	56	1.5
DQ789295	(ATCA) <sub>6</sub>	TTACTACTCACCAGCCAATC	ATGGACTATGGGTCTGGAAA	56	1.5
DQ789296	(GACA) <sub>8</sub>	ACCTCTCTCTGCCTGTGCTT	CGCACTCAGACTGCTCACTC	56	1.5
DQ789297	(ATCA) <sub>10</sub>	ATAGCGAAACCGCAAGCA	CTGGGTGAGGAAAGTGGATT	58	2.0
DQ789303	(GATT) <sub>8</sub>	GCGTCAGCATTTCTTTGG	TTGTTCTTGCCGCTTTCA	55	1.5
DQ789265	(GT) <sub>5</sub> ...(GT) <sub>8</sub>	GGACTGAAATCACTTCCCAA	GCTGCTGACAATGGCTACTA	55	1.5
DQ789279	(GATA) <sub>17</sub>	TCCCCTCGTTTCAGCTTC	CACTCACGTTGTCAGTTTATCA	55	1.5
DQ789281	(GA) <sub>6</sub> GT(GA) <sub>6</sub>	TCTGAGTCTTGAGGCTGTTA	TTCCGGTTCAGACAAGCT	53	2.0
DQ789290	(AGAT) <sub>18</sub>	CACAAGAAATCCCCTCGTT	CACTCACGTTGTCAGTTTATCAC	55	1.5
DQ789291	(ATCT) <sub>18</sub>	CACTCACGTTGTCAGTTTATCAC	TCCCCTCGTTTCAGCTTC	55	1.5
DQ789300	(AATC) <sub>6</sub>	CCGTCCTTCTTCTCTGTGT	CGGTTGTTGGAAGGTGCT	56	1.5
DQ789306	(TAGA) <sub>12</sub>	TACCATAAACAACCTCAGACCCAC	CAAGGGAGCTTGCTCAAA	52	1.5
DQ789254	(GT) <sub>11</sub>	GAACGAGTATCGATTAGCC	GAAAGTTGTGCAATGCGC	55	1.5
DQ789256	(GT) <sub>11</sub>	GCAGTTTCTTGTTACTCCTC	GCTTTGCTGAGTGGTTAGAGT	56	1.5

注: Mg<sup>2+</sup>浓度单位为 mmol/L

合度( $H_o$ ); 根据 Nei(1973)计算预期杂合度( $H_e$ ); 根据 Nei(1972)和 Nei(1978)计算矫正偏差前、后群体间遗传相似性系数和群体间遗传距离, 并计算了每个座位上的多态信息含量(polymorphism information content,  $PIC$ )、个体识别率(Power of discrimination,  $DP$ )、非父排除率(probability of paternity exclusion,  $PPE$ ), 用来评价所选标记在个体识别和亲缘关系鉴定上的应用价值。

## 2 结果

### 2.1 微卫星 PCR 扩增结果

采用 20 对微卫星引物对鳊属 4 个物种共 80 个个体进行了遗传多样性分析。经梯度 PCR 摸索各引物的最适退火温度, 所有引物均稳定扩增出相应的同源序列, 且重复性好(图 1)。读取全部基因型, 20 个基因位点获得了 293 个等位基因, 随引物的不同, 检测到的等位基因数分别为 5—25 个不等, 每个引物平均获得 14.65 个等位基因; 有效等位基因数在 2.2—22.8 之间, 平均每个位点检测到 10.23 个有效等位基因; 4 物种平均预期杂合度在 0.58—0.67 之间(表 2)。20 个微卫星座位在 4 个物种中的多态信息含量在 0.258—0.857 之间, 个体识别率在 0.32—0.86

之间, 非父排除率在 0.263—0.866 之间, 其累积个体识别率和非父排除率均达到 0.9999 (表 3)。

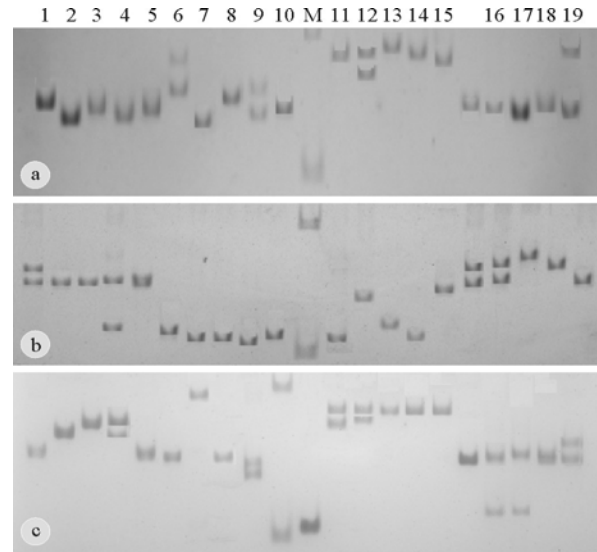


图 1 部分引物在鳊类 4 个物种中的微卫星检测带谱  
Fig. 1 Pattern of microsatellite band amplified by primer pairs in 4 *Siniperca* species  
a: DQ789296; b: DQ789291; c: DQ789279。1—5: 翘嘴鳊; 6—10: 大眼鳊; 11—15: 斑鳊; 16—20: 暗鳊; M: DNA 分子量标记

表 2 鳊属 4 个物种中 20 个微卫星座位的等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、观测杂合度( $H_o$ )、预期杂合度( $H_e$ )和产物大小

Tab.2 Numbers of alleles ( $N_a$ ), effective alleles ( $N_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ) and fragment size at the 20 microsatellite loci of the 4 *Siniperca* species

基因座	等位基因数	有效等位基因数	产物大小 (bp)	翘嘴鳊		大眼鳊		斑鳊		暗鳊	
				$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$
DQ789249	7	2.2	80—105	0.00	0.00	0.00	0.71	0.20	0.82	0.00	0.00
DQ789266	6	3.4	95—140	1.00	0.56	0.00	0.71	0.40	0.80	1.00	0.56
DQ789273	13	8.1	180—301	0.00	0.80	0.00	0.00	0.20	0.82	0.00	0.62
DQ789274	15	12.5	150—157	0.00	0.80	0.40	0.80	0.00	0.80	0.00	0.80
DQ789294	5	4.3	114—168	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DQ789271	19	12.1	148—186	1.00	0.56	0.40	0.64	1.00	0.93	0.40	0.84
DQ789277	16	11.3	169—209	0.20	0.51	0.40	0.64	0.60	0.91	0.00	0.80
DQ789295	18	14.0	212—240	0.60	0.91	0.00	0.80	0.00	0.71	0.40	0.76
DQ789296	25	22.8	112—168	0.20	0.91	0.20	0.91	0.40	0.93	0.20	0.91
DQ789297	12	8.2	120—152	0.00	0.80	0.00	0.00	0.20	0.78	0.00	0.71
DQ789303	14	9.1	215—245	0.00	0.80	0.00	0.80	0.00	0.00	0.00	0.89
DQ789265	20	13.1	94—150	1.00	0.71	1.00	0.87	0.60	0.96	1.00	0.56
DQ789279	21	14.5	120—200	0.20	0.82	0.20	0.82	0.40	0.64	0.60	0.99
DQ789281	14	8.2	140—170	0.00	0.00	0.40	0.84	0.00	0.53	0.00	0.89
DQ789290	19	13.8	120—180	0.20	0.91	0.20	0.82	0.00	0.53	0.60	0.89
DQ789291	20	17.4	124—186	0.40	0.89	0.00	0.89	0.00	0.86	0.40	0.84
DQ789300	25	21.1	160—196	1.00	0.91	0.60	0.87	0.40	0.89	1.00	0.93
DQ789306	9	6.4	220—250	0.60	0.47	0.00	0.00	1.00	0.73	0.60	0.47
DQ789254	5	4.6	136—154	1.00	0.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DQ789256	10	8.7	156—190	1.00	0.56	1.00	0.56	1.00	0.73	1.00	0.56
平均值	14.6	10.2		0.42	0.64	0.24	0.58	0.32	0.67	0.36	0.65

## 2.2 遗传多样性鉴定分析

根据 Nei(1972)和 Nei(1978)计算校正偏差前、后物种间遗传相似性系数和遗传距离如表 4 所示。不同物种间的遗传相似性系数为 0.0367—0.1786,遗传距离为 1.7117—3.3037;校正偏差后的遗传相似性系数为 0.0395—0.1926,遗传距离

为 1.6473—3.2325。两种计算方法所得到的物种间遗传相似性系数及遗传距离略有不同,但都表明 4 个物种间有一定的遗传差异。其中,物种间的校正偏差后遗传相似性系数最小的为斑鳊和大眼鳊(0.0395),其遗传距离最大(3.2325),说明这 2 个物种间遗传变异程度最高,亲缘关系最远;

表 3 鳊属 4 个物种中 20 个微卫星座位上的多态信息含量(PIC)、个体识别率(DP)和非父排除率(PPE)  
Tab.3 The value of polymorphism information content (PIC), power of discrimination (DP) and probability of paternity exclusion (PPE) at 20 microsatellite loci in the 4 *Siniperca* species

基因座	翘嘴鳊			大眼鳊			斑鳊			暗鳊		
	PIC	DP	PPE	PIC	DP	PPE	PIC	DP	PPE	PIC	DP	PPE
DQ789249	0.000	0.00	1.000	0.576	0.64	0.639	0.736	0.74	0.443	0.000	0.00	1.000
DQ789266	0.375	0.50	0.813	0.627	0.64	0.598	0.258	0.36	0.506	0.375	0.50	0.813
DQ789273	0.701	0.72	0.495	0.000	0.00	1.000	0.725	0.74	0.455	0.528	0.56	0.676
DQ789274	0.701	0.72	0.495	0.714	0.72	0.481	0.701	0.72	0.495	0.701	0.72	0.495
DQ789294	0.269	0.32	0.866	0.000	0.00	1.000	0.000	0.00	1.000	0.000	0.00	1.000
DQ789271	0.375	0.50	0.813	0.550	0.58	0.639	0.835	0.84	0.299	0.743	0.76	0.424
DQ789277	0.420	0.46	0.755	0.568	0.62	0.645	0.814	0.82	0.335	0.701	0.72	0.495
DQ789295	0.809	0.82	0.341	0.691	0.72	0.505	0.576	0.64	0.639	0.673	0.68	0.512
DQ789296	0.809	0.82	0.341	0.812	0.82	0.338	0.834	0.84	0.301	0.843	0.85	0.384
DQ789297	0.701	0.72	0.495	0.000	0.00	1.000	0.661	0.70	0.540	0.614	0.64	0.613
DQ789303	0.701	0.72	0.495	0.691	0.72	0.505	0.000	0.00	1.000	0.70	0.72	0.495
DQ789265	0.633	0.64	0.574	0.761	0.78	0.403	0.857	0.86	0.263	0.375	0.50	0.813
DQ789279	0.723	0.74	0.458	0.725	0.74	0.455	0.572	0.58	0.622	0.834	0.84	0.301
DQ789281	0.000	0.00	1.000	0.755	0.76	0.410	0.365	0.48	0.818	0.787	0.80	0.378
DQ789290	0.812	0.82	0.338	0.723	0.74	0.458	0.365	0.48	0.818	0.790	0.80	0.367
DQ789291	0.787	0.80	0.378	0.787	0.80	0.378	0.691	0.72	0.505	0.752	0.76	0.414
DQ789300	0.812	0.82	0.338	0.857	0.86	0.263	0.787	0.80	0.378	0.834	0.84	0.301
DQ789306	0.332	0.42	0.834	0.000	0.00	1.000	0.605	0.66	0.595	0.332	0.42	0.834
DQ789254	0.375	0.50	0.813	0.000	0.00	1.000	0.000	0.00	1.000	0.000	0.00	1.000
DQ789256	0.375	0.50	0.813	0.375	0.50	0.813	0.638	0.66	0.559	0.375	0.50	0.813
合计		0.9999	0.9999		0.9999	0.9999		0.9999	0.9999		0.9999	0.9999

表 4 鳊属 4 个物种的 Nei 相似性系数及遗传距离

Tab.4 Nei's genetic identity and genetic distance of the 4 *Siniperca* species

物种	Nei(1972)				Nei(1978)			
	Q	D	B	A	Q	D	B	A
Q	—	0.0759	0.0486	0.1786	—	0.0812	0.0526	0.1926
D	2.5779	—	0.0367	0.0675	2.5106	—	0.0395	0.0722
B	3.0237	3.3037	—	0.0490	2.9453	3.2325	—	0.0530
A	1.7117	2.6959	3.0165	—	1.6473	2.6276	2.9372	—

注: 对角线以下为遗传距离, 对角线以上为遗传相似系数。Q: 翘嘴鳊; D: 大眼鳊; B: 斑鳊; A: 暗鳊

翘嘴鳊与暗鳊的遗传相似性指数最大(0.1926), 其遗传距离最小(1.6473), 这可推断翘嘴鳊与暗鳊亲缘关系较近。

根据物种间的遗传距离值用 PHYLIP 3.5 软件的 UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA)法对 4 个物种进行聚类分析(图 2)。从图中可以看出, 4 个野生鳊类物种可聚为 3 类。翘嘴鳊和暗鳊遗传距离最小, 亲缘关系最近, 可归为第 1 类; 之后与大眼鳊进行聚合为第 2 类; 斑鳊独自为第 3 类。

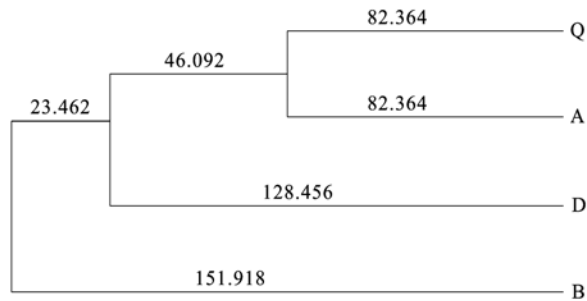


图 2 鳊属 4 个物种的聚类分析图

Fig.2 Cluster dendrogram of the 4 breed varieties of *Siniperca*

### 3 讨论

微卫星标记因其特异的引物序列及高度的多态性, 与其他的标记系统相比能更多的揭示群体的遗传变异水平而广泛应用于群体遗传研究(鲁双庆等, 2005)。本研究采用从翘嘴鳊中筛选的 20 个微卫星标记, 对鳊属鱼类的翘嘴鳊、大眼鳊、斑鳊和暗鳊共 4 个物种的基因组进行 PCR 扩增, 经检测确定, 扩增产物条带清晰、稳定性好。20 对引物扩增共获得 293 个等位基因, 等位基因数在 5—25 个之间, 平均 14.6 个; 有效等位基因数在 2.2—22.8 之间, 平均每个位点检测到 10.2 个有效等位基因。因此, 作者认为从翘嘴鳊中分离的微卫星标记可以较好地用于其他鳊属鱼类的物种遗传多样性研究。

遗传杂合度( $H$ )是度量群体遗传变异的参数之一(Nei *et al.*, 1975), 其大小可以反映群体的适应能力、生存能力和进化潜力。本研究中各物种内的平均遗传杂合度都较大, 在 0.58—0.67 之间, 其中翘嘴鳊为 0.64, 大眼鳊为 0.58, 斑鳊为 0.67, 暗鳊为 0.65。这表明来自湖南洞庭湖水域的这些野生鳊类物种在自然环境中近交及瓶颈效应发生的可能性不大, 所受自然选择压力较小, 群体的遗传变异较大, 遗传多样性丰富, 种质资源良好,

蕴藏着较大的进化潜力以及丰富的育种和遗传改良潜力。

多态信息含量( $PIC$ )是衡量一个遗传标记所包含的或所能够提供的遗传信息容量的较好指标(Botstein *et al.*, 1980)。个体识别率( $DP$ )和非父排除率( $PPE$ )是评价遗传标记在个体识别和亲缘关系鉴定中应用价值的重要参数(王伟等, 2004)。本研究中, 20 个微卫星位点在翘嘴鳊、大眼鳊、斑鳊和暗鳊 4 个物种中多态位点百分数分别为 90%、75%、85%和 85%, 平均多态信息含量  $PIC > 0.5$ , 个体识别率在 0.32—0.86 之间, 非父排除率在 0.263—0.866 之间, 其累积个体识别率和非父排除率均达到 0.9999, 表明这 20 个微卫星标记属于高识别力的微卫星遗传标记系统, 可以利用它们来进行鳊属鱼类物种的鉴定分析。

目前, 国内利用微卫星技术对鱼类进行群体亲缘鉴定的研究已有报道(鲁双庆等, 2005)。由于我国鳊类资源在系统分类上尚存争议(孔晓瑜等, 1992; 杨受保, 2003), 作者通过采用 Nei(1972)与 Nei(1978)两种计算方法对湖南洞庭湖水域鳊属鱼类的 4 个物种进行遗传相似性系数、遗传距离及聚类分析, 结果表明, 翘嘴鳊与暗鳊之间遗传距离最小, 亲缘关系最近, 可能是由于物种遗传分化的时间相当, 首先聚在一起为第 1 类; 之后与大眼鳊进行聚合为第 2 类; 斑鳊群体遗传分化的年代最早, 独自为第 3 类。根据 Meldgaard 等(2003)采用的由 Shaklee 提出的鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离( $D$ 值)分别为 0.90、0.30 和 0.05, 翘嘴鳊、大眼鳊、斑鳊和暗鳊的遗传距离  $D$ 值均大于 0.90, 表明 4 个物种间遗传分化极大, 它们为同一个属下面的不同物种。

本研究结果表明, 湖南洞庭湖流域的野生鳊类资源具有较为丰富的遗传多样性及遗传变异, 这与其长期生活在沅江流域适应不同的环境密切相关, 长期的自然选择使之适应环境的能力增强。从鳊类资源开发和可持续利用的角度出发, 利用微卫星遗传标记技术确定鳊类的分类及进化关系, 分析群体的遗传结构, 从而制定科学的保护措施, 加强野生原种遗传多样性的监测和评估, 避免过度捕捞, 建立鳊属鱼类基因库, 使鳊类优良的种质资源得到合理的保护和开发利用, 具有重要的实际意义和理论价值。

## 参 考 文 献

- 王伟, 尤 锋, 高天翔等, 2004. 山东近海牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 自然和养殖群体 10 个微卫星基因座位的遗传多态性分析. 海洋与湖沼, 35(6): 530—537
- 方展强, 陈 军, 郑文彪等, 2005. 鳊野生群体与养殖群体的 RAPD 分析. 大连水产学院学报, 20(1): 16—19
- 孔晓瑜, 周才武, 1992. 鳊亚科 *Siniperca* 鱼类的 LDH 同工酶的比较研究. 青岛海洋大学学报, 22(1): 103—109
- 刘 臻, 鲁双庆, 肖调义, 2004. 鲫鱼基因组 DNA 提取方法的探讨. 水利渔业, 24(6): 20—22
- 杨受保, 2003. 鳊类的资源利用及遗传多样性研究. 水产科技情报, 30(3): 121—125
- 杨受保, 祖国掌, 程久发, 2003. 鳊鱼遗传多样性的 RAPD 指纹分析. 水产养殖, 24(4): 33—35
- 周 莉, 刘静霞, 桂建芳, 2001. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探. 动物学研究, 22(4): 257—264
- Botstein D, white R L, Skolnick M, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum genet*, 32: 314—331
- Daemen E, 2001. Analysis of the genetics structure of European eel using microsatellite DNA and mtDNA markers. *Marine Biology*, 139: 755—764
- Ferguson A, 1994. Molecular genetics in fisheries: current and future perspective. *Rev Fish Biol Fish*, 4: 379—383
- Levene H, 1949. On a matching problem arising in genetics. *Ann Math Stat*, 20: 91—94
- Meldgaard T, Nielsen E E, Loeschcke V, 2003. Fragmentation by weirs in a riverine system: a study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. *Conservation Genetics*, 4: 735—747
- Nei M, 1972. Genetic distance between populations. *Amer Naturalist*, 106: 283—293
- Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70: 3321—3323
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583—590
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R, 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29: 1—10
- Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP version 1.2, a population genetics software for exact tests and ecume-nicism. *J Hered*, 86: 248—249
- Thomas D K, 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish: the tilapia or *cochromis miloticus*. *Genetics*, 1948: 1225—1232

APPLICATION OF HIGH RESOLUTION MICROSATELLITE MARKERS TO SPECIES IDENTIFICATION OF *SINIPERCA*

LU Shuang-Qing<sup>1</sup>, KUANG Gang-Qiao<sup>1,2</sup>, LIU Zhen<sup>1</sup>, LIU Hong-Yu<sup>3</sup>,  
ZHANG Jian-She<sup>1</sup>, LIU Feng<sup>1,2</sup>

(1. Department of Biotechnology & Environment Science, Changsha University, Changsha, 410003; 2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128; 3. College of Environmental Science & Engineering, Hunan University, Changsha, 410082)

**Abstract** The genetic diversity and genetic differentiation of *Siniperca* was conducted. The fresh water fish is also known as Mandarin fish. Four species including *S. chuatsi*, *S. kneri*, *S. obscura* and *S. scherzeri* were studied with microsatellite DNA technique. Twenty microsatellite primers were designed using Primer Premier 5.0 according to the microsatellite DNA sequence (GenBank accession Number: DQ789247—DQ789306) of *S. chuatsi* isolated in our library. The results showed that: 293 alleles were found from the 20 pairs of microsatellite primers in sizes of ranging from 80 to 301 bp. The percentages of polymorphic bands were 90%, 75%, 85%, and 85% for each species respectively; and the accumulative power of discrimination (*DP*) and probability of paternity exclusion (*PPE*) were 0.9999, which indicated that the 20 pairs of microsatellite primers could be used in parentage and determine the kinship of *Siniperca* in future genetic breeding studies. Clustering analysis indicated that *S. chuatsi* and *S. scherzeri* joined the first group sharing close kinship and appeared relatively later. *S. kneri* and *S. obscura* joined up in another group. The UPGMA tree demarcates the 4 species into different species with different evolutionary and breeding history.

**Key words** *Siniperca*, Microsatellite markers, Genetic diversity