

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.140490

mtDNA 和微卫星标记在放流牙鲈和非放流牙鲈鉴定中的应用

童爱萍^{1,2}, 司飞¹, 刘海金^{1,3}, 王桂兴¹, 于清海¹, 王玉芬¹, 姜秀凤¹, 侯吉伦¹

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院 北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100;

3. 中国水产科学研究院 水产生物应用基因组研究中心, 北京 100141

摘要: 用 mtDNA 控制区特异性引物对牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)亲鱼、放流牙鲈和回捕牙鲈的 DNA 进行扩增, 获得了 3 个群体的 mtDNA 控制区第一高变区部分序列。分析结果表明: 母本 55 尾具有 26 种单倍型, 作为其子代的预备放流牙鲈 129 尾具有 5 种单倍型, 与亲本的单倍型全部一致, 验证了 mtDNA 方法鉴定子代的准确性。回捕牙鲈 435 尾具有 70 种单倍型, 其中 330 尾具有 17 种单倍型, 与母本的单倍型相一致, 为疑似放流牙鲈; 另外 105 尾具有 53 种单倍型, 与母本的单倍型不一致, 为野生牙鲈或非北戴河站母本后代放流牙鲈。利用 4 个高多态性微卫星标记对 330 尾疑似放流牙鲈做进一步鉴定。结果表明, 330 尾检测个体中有 310 尾等位基因与候选亲本等位基因全部对应, 可确认其为放流牙鲈; 另外 20 尾等位基因与候选亲本不对应, 可确认其为非放流牙鲈。结合 mtDNA 和微卫星标记鉴定的结果, 可以确认 2013 年的 435 尾回捕牙鲈中有 310 尾放流牙鲈, 占 71.26%; 另外 125 尾为非放流牙鲈, 占 28.74%。本研究结果表明, 利用 mtDNA 标记可快速排除回捕鱼中的非放流牙鲈, 利用微卫星标记作进一步鉴定, 可以排除疑似放流牙鲈中的非放流牙鲈, 是区分放流牙鲈与非放流牙鲈, 准确评价放流效果的好方法。

关键词: 牙鲈; mtDNA; 单倍型; 微卫星; 增殖放流

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)04-0630-08

牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)是大型底栖经济鱼类, 主要分布在俄罗斯远东地区、日本、韩国和中国沿海等。牙鲈生长快、适应性强、个体大、肉质细嫩鲜美, 深受广大消费者的喜爱。近年来由于过渡捕捞和环境污染等原因, 牙鲈野生资源显著减少。在渤海不但不能形成渔汛, 而且在近岸产卵场捕获的繁殖群体也很少。为了增殖资源, 从 20 世纪 90 年代开始, 中国连续多年向黄渤海区大量投放牙鲈鱼苗。

大量鱼苗被放到自然海域中, 其成活率、生长速度、回捕率, 放流苗种对野生鱼群体遗传多样性影响^[1]等问题引起了人们普遍关注, 而评价放流效果的关键技术之一是准确鉴定回捕鱼中放

流鱼与非放流鱼的问题。为此, 人们开发了标志放流技术。传统的体外标志和体内标志存在对鱼体损伤较大、易遗失、识别准确率低等缺陷。随着生物技术的发展, 人们开始应用分子标记技术评价放流效果^[2-4]。

分子标记是以生物遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 是 DNA 水平遗传多态性的直接反映。与形态学标记、生物化学标记和细胞学标记相比, DNA 分子标记具有数量大、不易丢失; 可以分析生物的不同发育阶段和不同组织; 不但可以检测个体, 还可以检测群体等优越性。对于在水中生活、个体弱小、不易观察, 难以施加人工标记的水生生物来讲, 分子标记是难能可

收稿日期: 2014-12-05; 修订日期: 2015-01-18.

基金项目: 农业部财政转移支付项目(SKY-ZH-14-01).

作者简介: 童爱萍(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖遗传育种与繁殖. E-mail: 417206325@qq.com

通信作者: 刘海金, 博士, 研究员. E-mail: liuhaijin2005@126.com

贵的标记^[5-7]。

mtDNA 作为一种新型的分子标记,具有严格遵守母系遗传、几乎不发生重组等特征,具有较高的种内多态性,是动物亲子鉴定和群体遗传多样性分析的理想分子标记^[8-11]。微卫星标记是共显性遗传标记,具有丰富的多态性和简单的遗传方式,近年来已广泛应用于多种水产动物的亲子鉴定和亲缘关系分析^[12]。与微卫星标记相比,mtDNA 标记只需检测母本信息,所以具有快速、简便的优点,但存在共享单倍型的缺陷^[13-14];而微卫星标记同时检测父母本信息,准确率高,与 mtDNA 标记相比,具有工作量大、成本高的缺点^[15-16]。Sekino 等^[17]分别用微卫星和 mtDNA 控制区序列对日本养殖牙鲈进行标记,成功地追踪到放流个体。陈睿毅等^[18]利用高度多态性微卫星标记,对 13 尾牙鲈亲鱼的 188 尾后代进行亲子鉴定的基础上,研究了亲本的贡献率。到目前为止,中国尚未有应用 mtDNA 标记和微卫星标记结合对放流牙鲈进行亲子鉴定的报道。本研究采用 mtDNA 和微卫星标记相结合的方法对回捕鱼中的放流牙鲈和非放流牙鲈进行鉴定,既减小了工作量又保证了较高的准确率,从而为评价放流效果提供一种快速而准确的鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用放流牙鲈亲鱼采自中国水产科学研究院北戴河中心实验站。繁殖用亲鱼共计 74 尾,其中雌性 55 尾,23 尾是从渤海捕捞的野生牙鲈,32 尾是野生亲鱼繁殖的后代;19 尾雄鱼全部为野生牙鲈。所有亲鱼置于一个 100 m³ 池内混合培养,自然产卵,从 2013 年 3 月下旬开始将每日的受精卵放在一个孵化槽内孵化,连续一个月收集受精卵,孵化后的鱼苗在河北北戴河和辽宁营口两处孵化,培育至 5 cm 后在当地进行放流。放流前,从北戴河育苗池内随机采样 66 尾,体长(5.34±0.33) cm,体重(1.19±0.92) g;在营口育苗池内随机采样 63 尾,体长(5.58±0.34) cm,体重(1.29±0.93) g。两个地点合计采集 129 尾,进行 mtDNA 分析,与已知

亲鱼的单倍型进行比对,验证 mtDNA 检测的准确性。

从 8 月至 11 月,连续 4 个月在北戴河附近 3 个渔港,收购渔船捕获的牙鲈 403 尾,在营口附近 1 个渔港收购 32 尾。标本经测量体长、体重后,剪其胸鳍,用于提取 DNA(表 1)。

表 1 牙鲈样本数量、体长与体重信息
Tab. 1 Number, length and weight of *Paralichthys olivaceus*

群体 population	数量 number	体长/cm body length	体重/g body weight
亲鱼 parent	74	79.46±11.28	3485.9±1095.1
北戴河放流前 before released	66	5.34±0.33	1.19±0.92
营口放流前 before released	63	5.58±0.34	1.29±0.93
回捕鱼 recaptured fish	435	11.54±4.46	52.83±64.13

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 亲鱼的 DNA 用鳍条提取,仔鱼的 DNA 用整鱼提取,用蛋白酶 K 消解、酚/氯仿抽提法制备模板 DNA。

1.2.2 mtDNA 引物 从中国海洋大学渔业生态学研究室获得牙鲈 mtDNA 控制区引物序列,Di-elei-d: 5'-CCCACCACTAACTCCCAAAGC-3'和 DI-s: 5'-TAGGAACCAAATGCCAGGAA-3',引物序列由上海生工生物公司合成。

1.2.3 微卫星引物 从 NCBI 上下载获得牙鲈微卫星序列,共设计 212 对微卫星引物,引物序列由上海生工生物公司合成。利用亲本 DNA 筛选多态性高且扩增效果好,波峰清晰的微卫星引物 4 对(表 2),引物序列由上海生工生物公司合成(本单位牙鲈亲本中有 30 尾野生亲鱼后代,微卫星检测其不同个体之间没有差异,因此在微卫星的工作中将这 30 尾亲本看成一个整体,与其他亲本进行比较)。

1.2.4 mtDNA PCR 扩增 PCR 反应体系为 25 μL,包括 10×buffer 2.5μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL、模板 DNA 1 μL、*rTaq*DNA 聚合酶 0.15 μL、加适量 ddH₂O。

PCR 反应程序为: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 1 min, 52℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃下避光保存 mtDNA PCR 产物。

表 2 微卫星引物序列
Tab. 2 Sequences of microsatellite primers

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	基因库登录号 GenBank accession No.
<i>Poli1345TUF</i>	F: AATGGTGAGGAGCCAGATTG R: AGTGGGCGATGGAGATGTAG	DQ888920
<i>Poli1482TUF</i>	F: GGAGGGTTTCAGGTTCTTCAC R: TGAAAGGAGGAGTGAGTGTGG	DQ889045
<i>Poli-003-HFS</i>	F: AGAGGATGGATGGATGGATG R: GCAATAATTTGCCTGGGAAT	AB049186
<i>Poli1377TUF</i>	F: CCCTCGGGGATGAATAAAG R: TGAGTGCATTTCATTTTTCAG	DQ888946

注: 退火温度为 60℃。
Note: The annealing temperature is 60℃.

1.2.5 微卫星 PCR 扩增 PCR 反应体系为 15 μL, 包括 buffer 10.5 μL, ddH₂O 2.5 μL, 引物 1 μL, 模板 DNA 1 μL, *Taq*DNA 聚合酶 1 μL。

PCR 反应程序为: 95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 25 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃下避光保存微卫星 PCR 产物。

1.2.6 电泳检测 mtDNA PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 并拍照记录。将合格目标扩增产物进行酶回收。酶回收 PCR 反应体系为 12 μL, 包括目标扩增产物 9 μL, *SAP* 酶 0.45 μL, *EXO-I* 酶 0.9 μL, 加适量 ddH₂O。反应程序为: 37℃, 30 min; 80℃, 20 min; 4℃下避光保存酶回收纯化产物。纯化后的产物送上海裕晶生物有限公司进行双向测序。微卫星 PCR 产物用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 并拍照记录。

1.2.7 数据处理 所测 mtDNA 序列用 DNASTAR 5.0 软件包的 Editseq、SeqMan 软件进行拼接, 并人工校正, 用 MegAlign 5.01 进行多重比对, 然后用 DnaSP 5.10 统计单倍型。

微卫星胶图用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件进行测量, 统计微卫星等位基因。

2 结果与分析

2.1 mtDNA 方法的比对结果

测序结果显示, 本实验扩增的牙鲈 D-loop 区的片段大小为 394 bp, 共检测到变异位点 95 个, 约占总位点数的 24.1%, 转换与颠换的比 (si/sv) 为 6.4, A、T、C、G 碱基的平均含量分别为 38.9%、

28.0%、17.7%和 15.4%, A+T 的含量 (66.9%) 明显高于 G+C 的含量 (33.1%), 表现出显著的碱基组成偏向性。

55 尾雌性亲本中共检测出 26 种单倍型。32 尾雌性野生后代亲本中的 30 尾共享同一单倍型, 另外 25 尾雌性亲本对应 25 种不同的单倍型。129 尾预备放流牙鲈中 (包括北戴河 66 尾, 营口 63 尾) 检测出 5 种单倍型, 并且与亲本的单倍型全部一致。mtDNA 检测结果证实子代的单倍型与亲本的单倍型相一致。435 尾回捕鱼中检测出 70 种单倍型, 以单倍型 1 (Hap1) 包含的个体数最多, 为 263 尾, Hap1 是 30 尾野生后代亲本的共享单倍型。其次为单倍型 16 (Hap16) 为 20 尾以上, 再次为单倍型 21 (Hap21) 和单倍型 49 (Hap49) 为 10 尾以上, 其余大部分具有的个体数为 1 尾 (表 3)。回捕鱼 435 尾中, 330 尾的 17 种单倍型与亲本单倍型相一致, 为疑似放流牙鲈, 占回捕牙鲈的 75.86%; 另外 105 尾的 53 种单倍型, 为特有单倍型, 与亲本的单倍型不一致, 为野生牙鲈或非北戴河站雌性亲本后代放流牙鲈, 占回捕牙鲈的 24.14%。结果表明, 通过 mtDNA 的单倍型对应与否, 可以快速地排除回捕牙鲈中的非放流牙鲈。

2.2 微卫星方法的亲子鉴定

利用高多态性 4 个微卫星标记对产卵亲本进行分析, 其等位基因数目在 19~43 个, 其中位点 *Poli1482TUF* 等位基因数目最少, 为 19 个, 位点 *Poli1377TUF* 等位基因数目最多, 为 43 个 (表 4)。微卫星位点等位基因数目越多, 多态性越高, 在

表 3 牙鲈亲鱼与回捕鱼单倍型分布表
Tab. 3 Haplotype distribution of female parents and recaptured *Paralichthys olivaceus*

项目 item	单倍型与分布 haplotype and distribution							
单倍型/haplotype	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8
亲本个体数 parents number	30	1	1	1	1	1	1	1
回捕鱼个体数 recaptured number	263	1		1	1		5	2
单倍型 haplotype	Hap9	Hap10	Hap11	Hap12	Hap13	Hap14	Hap15	Hap16
亲本个体数 parents number	1	1	1	1	1	1	1	1
回捕鱼个体数 recaptured number	4	2		1		3		21
单倍型 haplotype	Hap17	Hap18	Hap19	Hap20	Hap21	Hap22	Hap23	Hap24
亲本个体数 parents number	1	1	1	1	1	1	1	1
回捕鱼个体数 recaptured number	8	1	1		11	3		
单倍型 haplotype	Hap25	Hap26						合计 total
亲本个体数 parents number	1	1						55
回捕鱼个体数 recaptured number		2						330
特有单倍型 unique haplotype	Hap27	Hap28	Hap29	Hap30	Hap31	Hap32	Hap33	Hap34
回捕鱼个体数 recaptured number	2	2	7	3	3	1	1	2
特有单倍型 unique haplotype	Hap35	Hap36	Hap37	Hap38	Hap39	Hap40	Hap41	Hap42
回捕鱼个体数 recaptured number	3	2	2	3	1	1	3	1
特有单倍型 unique haplotype	Hap43	Hap44	Hap45	Hap46	Hap47	Hap48	Hap49	Hap50
回捕鱼个体数 recaptured number	1	1	1	1	1	7	11	1
特有单倍型 unique haplotype	Hap51	Hap52	Hap53	Hap54	Hap55	Hap56	Hap57	Hap58
回捕鱼个体数 recaptured number	2	1	1	1	8	2	2	1
特有单倍型 unique haplotype	Hap59	Hap60	Hap61	Hap62	Hap63	Hap64	Hap65	Hap66
回捕鱼个体数 recaptured number	1	1	1	1	1	1	4	1
特有单倍型 unique haplotype	Hap67	Hap68	Hap69	Hap70	Hap71	Hap72	Hap73	Hap74
回捕鱼个体数 recaptured number	1	1	2	1	1	1	1	2
特有单倍型 unique haplotype	Hap75	Hap76	Hap77	Hap78	Hap79			合计 total
回捕鱼个体数 recaptured number	1	1	1	1	1			105

表 4 基于 4 对微卫星标记的亲本信息
Tab. 4 Four microsatellite DNA loci information of parents

位点 locus	基因型总数 genotype number	等位基因总数 alleles number	特有等位基因总数 unique alleles number
<i>Poli1345TUF</i>	32	29	13
<i>Poli1482TUF</i>	29	28	13
<i>Poli-003-HFS</i>	33	43	26
<i>Poli1377TUF</i>	25	19	10

亲权分析中越有效, 亲子鉴定准确率也就越高。利用 4 个高多态性微卫星位点对 330 尾疑似放流牙鲈进行检测。结果显示, 330 尾疑似放流牙鲈中有 310 尾等位基因与候选亲本等位基因全部对应, 鉴定其为放流牙鲈; 另外 20 尾等位基因与产卵亲本不对应, 可确定其为非北戴河站的放流牙鲈, 可能是与本场产卵亲本具有一定亲缘关系的野生鱼或其他单位放流牙鲈(表 5)。

综合 mtDNA 和微卫星的结果, 435 尾回捕牙鲈中有 310 尾为北戴河站亲本后代放流牙鲈, 占 71.26%; 另外 125 尾为野生牙鲈或非北戴河站亲

本放流牙鲈, 占 28.74%。403 尾北戴河回捕牙鲈中, 鉴定有 287 尾为北戴河亲本后代放流牙鲈, 占北戴河回捕牙鲈的 71.22%; 另外 116 尾为非北戴河亲本后代放流牙鲈, 占北戴河回捕牙鲈的 28.78%; 32 尾营口回捕牙鲈中, 鉴定有 23 尾为北戴河亲本后代放流牙鲈, 占营口回捕牙鲈的 71.88%; 另外 9 尾为非北戴河亲本后代放流牙鲈, 占营口回捕牙鲈的 28.12%(表 6)。北戴河站的放流牙鲈所占比例与营口站相似。结果表明, 利用微卫星做进一步的遗传分析, 有效地弥补了 mtDNA 存在共享单倍型的局限性。

表 5 基于微卫星标记的回捕牙鲆亲缘关系表

Tab. 5 Parentage of recaptured *Paralichthys olivaceus* based on microsatellite markers

亲本 parents	M1	M2	M4	M5	M6	M9	M12	M15	M19	合计 total	其他 others
FM-1	191	49	2	1	1	2	4	1	1	252	11
FM-2	1									1	
FM-3	1									1	
FM-4										0	1
FM-5	3	2								5	
FM-6	1	1								2	
FM-7		4								4	
FM-8	2									2	
FM-9	1									1	
FM-10										0	3
FM-11	5	13								18	3
FM-12	6	2								8	
FM-13		1								1	
FM-14	1									1	
FM-15	8	1								9	2
FM-16	2	1								3	
FM-17	1	1								2	
合计 total	223	75	2	1	1	2	4	1	1	310	20

注: M 为父本, FM 为母本。 “ 其他 ” 中的数字, 为与母本具有相同单倍型, 但微卫星检测没有相同等位基因的个体数量。
Note: M-male, FM-female. The values in “others ” mean the numbers of the individuals with same FM haplotype but without same alleles checked by microsatellites.

表 6 回捕牙鲆中放流牙鲆和非放流牙鲆比例表

Tab. 6 Released and wild fish proportion of *Paralichthys olivaceus*

回捕鱼 recaptured fish	放流牙鲆/尾 released fish	比例/% percentage	非放流牙鲆/尾 non-released fish	比例/% percentage	合计 total
北戴河 Beidaihe	287	71.22	116	28.78	403
营口 Yingkou	23	71.88	9	28.12	32
合计 total	310	71.26	125	28.74	435

3 讨论

关于利用 mtDNA 标记进行亲子鉴定的研究, 宋娜^[19]利用 mtDNA 研究了分子标记在褐牙鲆增殖放流中的应用, 在 10 个群体的 216 个个体中成功地威海野生群体的两尾放流个体鉴别出来。本研究中, 首先对放流前的鱼苗进行检测, 结果其单倍型与母本全部相一致, 证明依据单倍型鉴定亲子关系是准确的^[20]。本研究利用 mtDNA 方法对回捕牙鲆进行检测, 快速地排除了回捕牙鲆中的 105 尾为非北戴河站放流牙鲆。由此可以看出, 基于 mtDNA 单倍型对应性的鉴定方法, 是排除非放流个体的有效手段。但是, mtDNA 也存在

一定的局限性。Sekino 等^[17]的研究中用 mtDNA 追踪到 41 尾某放流场的牙鲆个体, 而用微卫星标记排除了 6 尾, 实际追踪到 35 尾, 说明微卫星标记比 mtDNA 更加准确。本研究中, 利用 mtDNA 单倍型鉴定出 330 尾疑似放流个体, 而用微卫星则确认了 310 尾为放流个体。说明用 mtDNA 标记评价时, 由于存在共享单倍型, 因此只能识别与母本单倍型相一致的为疑似放流牙鲆, 还需要利用微卫星标记进一步鉴定, 检测其等位基因与亲本是否对应, 从而确认其中的放流牙鲆^[21-22]。这样可以有效地弥补 mtDNA 具有共享单倍型而不能准确判断亲子关系的局限性。

本研究中, 55 尾亲鱼中共检测出 26 种单倍型,

随机抽取预备放流的 129 尾个体中只检测出 5 种单倍型, 435 尾回捕鱼个体中有 263 尾为同一单倍型, 这说明放流亲本对子代贡献率的差异很大, 子代的单倍型集中在几个贡献率大的亲本中。陈睿毅等^[18]用 8 雄 5 雌亲鱼配组, 结果发现不同亲本的贡献率不同, 最高为 47.34%, 最低为 0.53%。在对日本牙鲈亲本对后代的贡献率研究中, Sekino 等^[23]用 6 雄 12 雌亲鱼配组, 结果发现 99% 的子代是 1 尾雄性与 6 尾雌性牙鲈亲鱼的后代, 其他的雌雄亲本形成的后代很少, 亲本对后代的贡献率十分不平衡。对于不同亲本产生贡献率差异的原因还有待进一步研究。

本研究中, 北戴河回捕牙鲈中放流牙鲈占 71.22%, 非放流牙鲈占 28.78%; 而营口回捕牙鲈中, 放流牙鲈占 71.88%, 非放流牙鲈占 28.12%。两者比例十分接近, 即放流牙鲈与非放流牙鲈的比例大致为 3 : 1, 说明回捕时两海域放流牙鲈所占比例大体相同。分析其原因可能是, 首先, 两个地点放流牙鲈属于同一放流亲鱼群体的后代, 其生存力、索饵能力和逃避敌害能力等均相似, 两个放流地点生态条件均比较适合牙鲈生长, 且放流苗种的大小、回捕时间和回捕方法均相似, 从而导致两个地点比例相似。但是, 对于不同年份, 北戴河回捕牙鲈中放流牙鲈与非放流牙鲈的比例却大不相同, 根据陈睿毅^[24]的研究结果, 2012 年放流牙鲈占回捕鱼的 28.35%, 非放流牙鲈占 71.65%, 两者比例约为 1 : 3。说明在放流量基本稳定的情况下(未发表资料), 牙鲈的资源变动依年份而不同, 每年加入量的差异是很大的。

本研究结果一方面证实了 mtDNA 标记在排除非放流牙鲈的有效性, 另一方面, 也反映出 mtDNA 标记的局限性, 通过微卫星的补充, 可以进一步完善。使用两种标记相结合, 既可以减少工作量又可以保证准确率, 形成一种快速而准确的亲子鉴定方法, 对评价鱼类放流效果和分析遗传多样性具有重要的应用价值。

参考文献:

[1] Wu X, Yan M J, Li Z J. Genetic structure of stocking domes-

ticated and wild mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) in Xiaosihai lake[J]. Journal of Aquatic Organisms, 2010, 34(3): 562–568. [吴旭, 严美姣, 李钟杰. 肖四海湖野生和人工放流鳊群体遗传结构分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(3): 562–568.]

- [2] Le Nguyen D D, Ngoc H H, Dijoux D, et al. Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on Pangasius fish from Viet Nam (ed)[M]. 2008: 454–460.
- [3] Xuan Z X, Zhang S C. The research progress of DNA molecular markers on paternity verification of animals[J]. Livestock and Poultry Industry, 2009(6): 16–18. [宣之兴, 张守纯. DNA 分子标记在动物亲子鉴定中的研究进展[J]. 畜禽业, 2009(6): 16–18.]
- [4] Brennan N P, Leber K M, Blackburn B R. Use of coded-wire and visible implant elastomer tags for marine stock enhancement with juvenile red snapper *Lutjanus campechanus*[J]. Fish Res, 2007, 83(1): 90–97.
- [5] Bentzen P, Taylor E B, Wright J M. A novel synthetic probe for DNA fingerprinting salmonid fishes[J]. J Fish Biol, 1993, 43(2): 313–316.
- [6] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. Aquaculture, 2004, 238(1–4): 1–37.
- [7] Catalano M J, Chipps S R, Bouchard M A, et al. Evaluation of injectable fluorescent tags for marking centrarchid fishes: retention rate and effects on vulnerability to predation[J]. North Am J Fish Manage, 2001, 21(4): 911–917.
- [8] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(16): 6196–6200.
- [9] Glenn T C, Staton J L, Vu A T, et al. Low mitochondrial DNA variation among American alligators and a novel non-coding region in crocodilians[J]. J Exp Zool, 2002, 294(4): 312–324.
- [10] Grunwald C, Stabile J, Waldman J R, et al. Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences[J]. Mol Ecol, 2002, 11(10): 1885–1898.
- [11] Ovenden J R, Lloyd J, Newman S J, et al. Spatial genetic subdivision between northern Australian and southeast Asian populations of *Pristipomoides multidens*: a tropical marine reef fish species[J]. Fish Res, 2002, 59(1): 57–69.
- [12] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. Aquaculture, 2004, 238(1–4): 1–37.

- [13] Sloss B L, Billington N, Burr B M. A molecular phylogeny of the Percidae (Teleostei, Perciformes) based on mitochondrial DNA sequence[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 32(2): 545–562.
- [14] Guo X H, Liu S J, Liu Q, et al. New progresses on Mitochondrial DNA in fish[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(9): 983–1000.
- [15] Han C M, Zhang J B, Gao Q H. Studies and application of DNA polymorphism on animal parentage testing[J]. *Grass-Feeding Livestock*, 2004(1): 11–13. [韩春梅, 张嘉保, 高庆华. DNA 多态在动物亲子鉴定中的应用[J]. *草食家畜*, 2004(1): 11–13.]
- [16] Marshall T C, Slate J, Kruuk L E, et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations[J]. *Mol Ecol*, 1998, 7(5): 639–655.
- [17] Sekino M, Saitoh K, Yamada T, et al. Genetic tagging of released Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on polymorphic DNA markers[J]. *Aquaculture*, 2005, 244(1–4): 49–61.
- [18] Chen R Y, Wang G X, Liu H J, et al. Difference in parental contribution to reproduction in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of Chian*, 2013, 20(4): 698–705. [陈睿毅, 王桂兴, 刘海金, 等. 牙鲆亲本对子代贡献率的实验研究[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(4): 698–705.]
- [19] Song N. Molecular phylogeography of two marine fishes in northwestern pacific and application of molecular marker in fishery stock enhancement of *Paralichthys olivaceus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011: 159. [宋娜. 西北太平洋两种海洋鱼类的分子系统地理学研究及分子标记在褐牙鲆增殖放流中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011: 159.]
- [20] Brown G G, Gadaleta G, Pepe G, et al. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA[J]. *J Mol Biol*, 1986, 192(3): 503–511.
- [21] Hara M, Sekino M. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker[J]. *Aquaculture*, 2003, 217(1–4): 107–114.
- [22] Zhang C L, Tong G X, Kuang Y Y, et al. Applicability of Microsatellite DNA Markers to the Parental Identification of *Hucho taimen* (Pallas)[J]. *Zoolog Res*, 2010, 31(4): 395–400. [张春雷, 佟广香, 匡友谊, 等. 哲罗鱼微卫星亲子鉴定应用[J]. *动物学研究*, 2010, 31(4): 395–400.]
- [23] Sekino M, Saitoh K, Yamada T, et al. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program[J]. *Aquaculture*, 2003, 221(1–4): 255–263.
- [24] Chen R Y. Application of microsatellite markers to evaluate the effect of *Paralichthys olivaceus* stock enhancement[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013: 61. [陈睿毅. 微卫星标记在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)增殖放流中的应用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 61.]

Application of mtDNA and microsatellite markers to distinguish the released or non-released Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

TONG Aiping^{1,2}, SI Fei¹, LIU Haijin^{1,3}, WANG Guixing¹, YU Qinghai¹, WANG Yufen¹, JIANG Xiufeng¹, HOU Jilun¹

1. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;

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

3. Center for Applied Aquatic Genomics, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China

Abstract: We used the specific mtDNA primer to amplify *Paralichthys olivaceus* parents, released fish and recaptured fish DNA, and obtained the mtDNA control areas sequences of these groups. The results showed that 55 parents had 26 kinds of haplotypes; and the 129 released fish had 5 kinds of haplotypes, all corresponding to the parents' haplotypes database, verified the accuracy of mtDNA markers in the analysis of parental allocation for the released *Paralichthys olivaceus*. Four hundred and thirty-five recaptured *P. olivaceus* with 70 kinds of haplotypes were identified, among which 330 fish with 17 kinds of haplotypes were corresponded to the parents' haplotypes database. These fish had the possibility to be the released fish. Another 105 fishes with 53 kinds of haplotypes could not be corresponded to the parents' haplotypes database, and we categorized them into non-released fish of Beidaihe. We performed further paternity tests by using 4 high polymorphic microsatellite markers for the 330 might be released *P. olivaceus*. The results indicated that 310 fish's alleles were all corresponded to candidate parents' alleles, and we determined these fish as released; another 10 fish's alleles were not corresponded to candidate parents' alleles, and were determined as non-released. By the combination using of mtDNA and microsatellite markers, we can categorized 310 fish (among 435 recaptured *P. olivaceus*) into the released *P. olivaceus* (71.26% of recaptured *P. olivaceus*) and categorized 125 fish into non-released *P. olivaceus* (28.74% of recaptured *P. olivaceus*). In conclusion, we could effectively determine the released *P. olivaceus* from the recaptured ones, and provide basic information for the analyzing of genetic diversity and artificial stock enhancement effect.

Key words: Japanese flounder; *Paralichthys olivaceus*; mtDNA; haplotype; microsatellite; artificial stock enhancement

Corresponding author: LIU Haijin. E-mail: liuhaijin2005@126.com