

大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科几个近缘种中的通用性研究

林能锋^{1,2}, 苏永全¹, 丁少雄¹, 王军¹

(1 厦门大学 海洋与环境学院海洋学系, 福建 厦门 361005; 2 福建省农业科学院 生物技术研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 本研究分析了 8 对大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 微卫星标记引物在石首鱼科 5 个亚科 8 属 10 个种中的通用性。结果表明, 大黄鱼微卫星标记引物在黄鱼亚科鱼类中有较高的通用性, 其中位点 *PC1C4*, *PC4H12*, *PC5E11*, *PC8F5*, *PC10F10*, *PC10G6* 的引物可在小黄鱼 (*P. polyactis*) 和棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*) 中获得清晰扩增条带, 位点 *PC7H4* 引物也可在小黄鱼中扩增, 上述可扩增位点在两个种中均得到多个等位基因, 表现出较高的多态性; 大黄鱼微卫星标记引物在白姑鱼亚科、叫姑鱼亚科、牙鲆亚科及石首鱼亚科鱼类中也有较高的通用性, 其中在银牙鲆 (*Otolithes argenteus*) 中得到 6 个可扩增位点 (*PC1C4*, *PC4H12*, *PC7A2*, *PC7H4*, *PC10F10*, *PC10G6*), 在鲢状黄姑鱼 (*Nibea miichthioides*)、丁氏鲷 (*Wak tingi*) 和眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*) 中各得到 5 个可扩增位点, 在浅色黄姑鱼 (*N. Chui*) 和尖头黄鳍牙鲆 (*Chrysoschir aureus*) 中各得到 4 个可扩增位点, 在皮氏叫姑鱼 (*Johnius belengerii*) 中得到 3 个可扩增位点 (*PC7H4*, *PC10F10*, *PC10G6*)。位点 *PC10F10* 和 *PC10G6* 引物在 10 个种中都可得到清晰的扩增产物, 可作为 10 种石首鱼的通用标记。引物 *PC5E11* 和 *PC8F5* 只在黄鱼亚科中得到扩增产物, 为黄鱼亚科特异性标记。[中国水产科学, 2008, 15 (2): 237-243]

关键词: 大黄鱼; 微卫星标记; 石首鱼科; 通用性

中图分类号: Q959.483

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0237-07

基因组中的微卫星 DNA 以孟德尔方式遗传, 呈共显性表达, 且可应用 PCR 方法来研究其核心单元重复次数的变异。因此, 微卫星标记已被广泛用于鱼类亲缘关系鉴定、遗传多样性分析、遗传连锁图构建及系统进化等方面的研究^[1-2]。研究表明, 微卫星侧翼序列在近缘种之间较为保守, 因此, 一个物种的微卫星标记引物在其近缘物种中具有一定的通用性^[3-6]。

石首鱼类是中国近海最重要的渔业资源之一, 产量大, 种类多。但由于酷捕滥渔和生态环境变化, 与一些重要海洋经济鱼类一样, 在其遗传背景仍不明的情况下, 有些种类已成为易危物种^[7]。因此, 有必要开展石首鱼类遗传资源评价, 以使石首鱼类资源得到有序开发和可持续利用。

本研究通过分析 8 对大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科 5 个亚科 8 个属 10 个种中的扩增情况, 探讨大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科近缘种中的通用性, 为应用微卫星标记分析石首鱼类的遗传多样性提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用 10 种石首鱼分别取自福建和浙江沿海 (表 1), 经形态学鉴定^[8-11]分属于 5 个亚科, 8 个属。取背部肌肉样品保存于 -20℃ 无水乙醇中备用。8 个大黄鱼微卫星位点序列引自 GenBank, Primer3.0 软件在线设计引物, 引物由上海 invitrogen 公司合成, *Taq* DNA 聚合酶为 TAKARA 公司产品。引物序列及退火温度见表 2。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 DNA 提取参照 Sambrook 等的酚 / 氯仿抽提法^[12]并略做修改: 取保存于无水乙醇中的肌肉样品约 100 mg, 用滤纸吸去残余乙醇, 置于预先加入 1 mL TE (pH 8.0) 缓冲液的 Eppendorf 管中剪碎, 离心, 吸去上清。加入 600 μ L 消化缓冲液 (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, pH=8.0) 和终浓度为 200 μ g/mL 的蛋白酶 K,

收稿日期: 2007-03-01; 修订日期: 2007-07-26.

基金项目: 国家 863 计划 (2002AA603021, 2006AA10A405), 福建省自然科学基金 (B0110030)。

作者简介: 林能锋 (1972-), 男, 博士研究生, 从事海洋鱼类种质资源与遗传育种研究。E-mail: lnfeng@hotmail.com

通讯作者: 王军。E-mail: junw@xmu.edu.cn

55 ℃消化至溶液清亮透明,依次用等体积的酚,酚:氯仿:异戊醇(体积比为 25:24:1),氯仿抽提。二倍体积的预冷无水乙醇沉淀 DNA。70% 乙醇洗涤,晾干,加 100 μL 无菌超纯水,4 ℃溶解过夜。紫外分光光度计测定 DNA 溶液的 A₂₆₀ 值,并计算 DNA 含量,调整 DNA 浓度至约 100 μg/mL。

表 1 实验用 10 种石首鱼的分类及采样地
Tab. 1 Details of taxonomic status and collection locations of the ten species used in this study

亚科 Subfamily	属名 Genus	种名 Species	样品数 Sample size	采样地 Collection location
黄鱼亚科 Pseudosciaeninae	黄鱼属 <i>Pseudosciaena</i>	大黄鱼 <i>Pseudosciaena crocea</i>	5	宁德 Ningde
		小黄鱼 <i>Pseudosciaena polyactis</i>	5	舟山 Zhoushan
	梅童鱼属 <i>Collichthys</i>	棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i>	5	舟山 Zhoushan
白姑鱼亚科 Argyrosominae	黄姑鱼属 <i>Nibea</i>	鲩状黄姑鱼 <i>Nibea miichthioides</i>	4	厦门 Xiamen
		浅色黄姑鱼 <i>Nibea chui</i>	6	厦门 Xiamen
叫姑鱼亚科 Johniinae	叫姑鱼属 <i>Johnius</i>	皮氏叫姑鱼 <i>Johnius belengerii</i>	5	厦门 Xiamen
	鲷属 <i>Wak</i>	丁氏鲷 <i>Wak tingi</i>	1	厦门 Xiamen
牙鲷亚科 Otolithinae	牙鲷属 <i>Otolithes</i>	银牙鲷 <i>Otolithes argenteus</i>	3	厦门 Xiamen
	黄鳍牙鲷属 <i>Chrysochir</i>	尖头黄鳍牙鲷 <i>Chrysochir aureus</i>	1	厦门 Xiamen
石首鱼亚科 Sciaeninae	拟石首鱼属 <i>Sciaenops</i>	眼斑拟石首鱼 <i>Sciaenops ocellatus</i>	6	厦门 Xiamen

1.2.2 PCR 反应及产物的检测 PCR 反应体系包括:模板 DNA 约 100 ng,1×PCR 缓冲液,上、下游引物各 0.8 μmol/L, dNTP 200 μmol/L, Mg²⁺ 1.5 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.75 U,反应总体积 20 μL。PCR 反应条件为:94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 30 s,退火(温度见表 2) 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环,72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。

PCR 产物加入等量的甲酰胺变性剂(98% 甲酰胺,10 mmol/L EDTA,0.05% 二甲苯青 FF,0.05% 溴酚兰),于 95 ℃加热变性 10 min。6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Bio-Rad 测序凝胶电泳系统,1×TBE 缓冲液,50 ℃,70 W 恒功率电泳),硝酸银染色^[13]检测扩增结果。扫描仪记录电泳图谱,根据图谱分析各微卫星位点的扩增情况,包括是否扩增,各位点在不同种中所得的等位基因数及根据 DNA 分子量标准估算等位基因片段大小。

2 结果与分析

2.1 大黄鱼微卫星引物在几种石首鱼类中的扩增结果

在所有的 8 个微卫星位点中,位点 *PC10F10* 与

PC10G6 的通用性最高,在所有 10 个石首鱼种类中都得到特异性扩增片段。位点 *PC1C4* 在除皮氏叫姑鱼外的其他种鱼中都得到特异扩增产物。位点 *PC7H4* 在石首鱼类中也有较高的通用性,除在棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*)和浅色黄姑鱼(*Nibea chui*)中没有得到扩增产物外,在其他的几个近缘种中都得到清晰的特异性扩增条带。*PC5E11* 和 *PC8F5* 则只在黄鱼亚科中扩增。*PC4H12* 可在除叫姑鱼亚科及浅色黄姑鱼、尖头黄鳍牙鲷(*Chrysochir aureus*)外的其他 6 种鱼中得到目的扩增条带。*PC7A2* 则只在大黄鱼、浅色黄姑鱼、丁氏鲷(*Wak tingi*)和银牙鲷(*Otolithes argenteus*)中得到特异性扩增。

在黄鱼亚科中,除 *PC7A2*、*PC7H4* 外,其余 6 个标记位点都可得到特异性扩增,*PC7A2* 仅在大黄鱼样品中得到较好的扩增,在小黄鱼(*P.polyactis*)及棘头梅童鱼中扩增条带模糊。*PC7H4* 在黄鱼属的大黄鱼和小黄鱼中扩增条带清晰,但在梅童鱼属的棘头梅童鱼中则无扩增产物(表 3)。

表 2 大黄鱼微卫星标记的特征

Tab. 2 The characteristics of the microsatellite markers developed for *Pseudosciaena crocea*

位点 Locus	核心序列 Motif	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	期望产物大小 /bp Expected product size	退火温度 /℃ Annealing temperature	GenBank 登录号 GenBank Access. no.
PC1C4	(AC) ₄ C(CA) ₁₅	F: CATTGAGACCAACGACTGCT R: AGGGCTGATCTCCTTGTTCA	299	50	EF635863
PC4H12	(CA) ₂₃	F: GCATCACCTAAGCCTCAGA R: TCAGTGGGCACAAATGTGAT	229	50	EF635864
PC5E11	(TG) ₈ (GA) ₇	F: ACACAGCGTGGAAGTTCA R: TGCCTGTTTTGAAATTGACG	249	49	EF635865
PC7A2	(GT) ₁₂	F: AGTGAGGAGTGAAGGCAGGA R: TTGACCGTTGTGTTGTGTT	233	51	EF635867
PC7H4	(TC) ₉ ... (CTT) ₆	F: CATCTCCCCACTCATATCG R: TTCAGACTGCTGCCCTGTC	299	52	EF635869
PC8F5	(TG) ₉ G(GT) ₄	F: CCCTCCTCCCAGTATTCCAT R: ACACTTGAGCCTTTCGGCTA	171	54	EF635872
PC10F10	(CT) ₂₂	F: CCTGTGTCATTTTGGTTTC R: AGACTGGAGCTGTCTCTG	212	53	EF635875
PC10G6	(CT) ₈ ... (CT) ₄	F: CTTTGCTGTGAGGCTTTTCC R: TCGCAGACAGAATCTCCAAG	254	50	EF635876

2.2 微卫星扩增图谱的分析

对 8 个微卫星位点在 10 种石首鱼中的扩增图谱进行分析,结果表明,在扩增与否、等位基因长度分布范围及各位点扩增的等位基因数量方面,不同种间存在区别。

从微卫星位点的扩增情况来看,在小黄鱼中,除位点 PC7A2 外,其他 7 个位点均可扩增,棘头梅童鱼除 PC7A2、PC7H4 位点外其他位点均可扩增;在其他种类中,可扩增的微卫星位点数各不相同,银牙鲷得到最多的 6 个可扩增位点 (PC1C4, PC4H12, PC7A2, PC7H4, PC10F10, PC10G6), 鮟状黄姑鱼 (*Nibea miichthioides*)、丁氏鲷和眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*) 各得到 5 个可扩增位点,浅色黄姑鱼和尖头黄鳍牙鲷各得到 4 个可扩增位点,叫姑鱼亚科的皮氏叫姑鱼 (*Johnius belengeni*) 的可扩增位点最少,只得到 3 个可扩增位点 (PC7H4, PC10F10, PC10G6), 见表 3。

在等位基因长度分布范围方面,大黄鱼、小黄鱼和棘头梅童鱼在 PC10F10 位点上的等位基因大

小范围有明显的区别 (图 1A)。PC5E11 位点上,棘头梅童鱼的等位基因大小范围介于 210~220 bp 间,明显小于该位点上大黄鱼与小黄鱼的扩增片段 (图 1D)。此外,如皮氏叫姑鱼与丁氏鲷在 PC10G6 位点上扩增片段的大小不同 (图 1B),银牙鲷与尖头黄鳍牙鲷在 PC10G6、PC7H4 位点上扩增片段的大小也不相同 (图 1B、C)。

从各微卫星位点所得到的等位基因数来看,各种类所得到的等位基因的数目存在差异 (表 3)。黄鱼亚科的小黄鱼和棘头梅童鱼在各可扩增位点上得到的等位基因数较多,得到等位基因数目最多的位点是 PC10F10,其在小黄鱼的 5 尾被测个体中共得到 9 个等位基因,在棘头梅童鱼上得到 8 个等位基因。白姑鱼亚科中的鮟状黄姑鱼和浅色黄姑鱼在 PC10F10 位点所得的等位基因数差异明显,鮟状黄姑鱼中得到 4 个等位基因,所检测的 5 尾浅色黄姑鱼在该位点上表现为单态。而引进的养殖种眼斑拟石首鱼除位点 PC1C4, PC4H12 分别得到 2 个和 5 个等位基因外,在其余各可扩增位点均表现为单态。

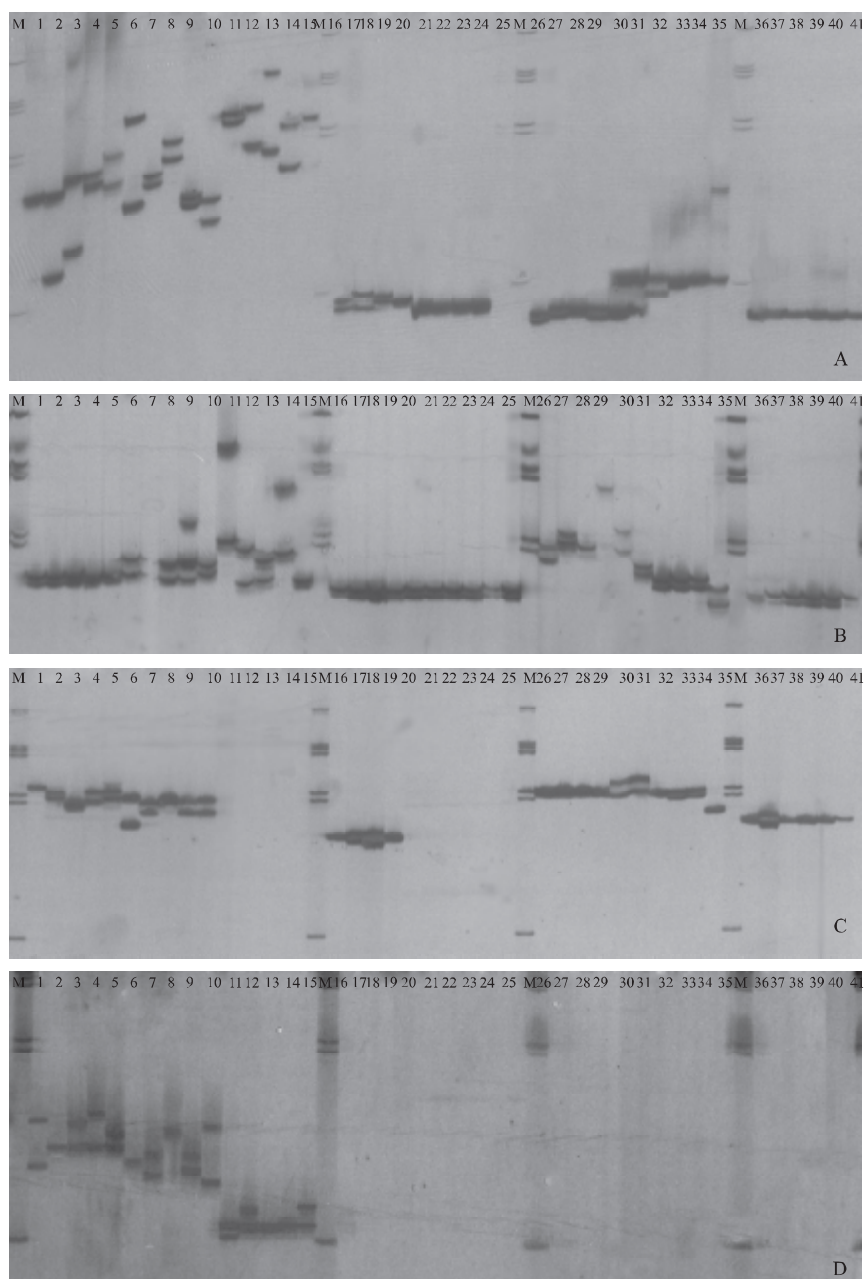


图1 4个大黄鱼微卫星位点在10种石首鱼科鱼类中的PCR扩增结果

A. *PC10F10* B. *PC10G6* C. *PC7H4* D. *PC5E11*

M: Φ 174/*Hinc* II; 1~5: 大黄鱼; 6~10: 小黄鱼; 11~15: 棘头梅童鱼; 16~19: 鲢状黄姑鱼; 20~25: 浅色黄姑鱼; 26~30: 皮氏叫姑鱼; 31: 丁氏鲷; 32~34: 银牙鲷; 35: 尖头黄鳍牙鲷; 36~41: 眼斑拟石首鱼。

Fig. 1 The results of PCR amplification of four SSR loci from *Pseudosciaena crocea* in ten species of Sciaenidae.

A. *PC10F10* B. *PC10G6* C. *PC7H4* D. *PC5E11*

M: Φ 174/*Hinc* II; 1~5: *Pseudosciaena crocea*; 6~10: *Pseudosciaena polyactis*; 11~15: *Collichthys lucidus*; 16~19: *Nibea miichthioides*; 20~25: *Nibea chui*; 26~30: *Johnius belangerii*; 31: *Wak tingi*; 32~34: *Otolithes argenteus*; 35: *Chrysochir aureus*; 36~41: *Sciaenops ocellatus*.

表 3 8 个大黄鱼微卫星位点在 10 种石首鱼科鱼类中的扩增结果

Tab. 3 Cross-species amplification in ten Sciaenidae fishes with 8 microsatellite loci from *Pseudosciaena crocea*

物种 Species	微卫星卫点 Microsatellite locus															
	PC1C4		PC4H12		PC5E11		PC7A2		PC7H4		PC8F5		PC10F10		PC10G6	
大黄鱼 <i>P. crocea</i>	+	4	+	7	+	6	+	4	+	5	+	2	+	6	+	2
小黄鱼 <i>P. polyactis</i>	+	2	+	6	+	6	?		+	4	+	2	+	9	+	4
棘头梅童鱼 <i>C. lucidus</i>	+	2	+	8	+	3	?		—		+	2	+	8	+	6
鮟状黄姑鱼 <i>N.miichthioides</i>	+	2	+	2	—		—		+	4	?		+	4	+	2
浅色黄姑鱼 <i>N. chui</i>	+	2	—		—		+	2	—		?		+	1	+	1
皮氏叫姑鱼 <i>J. belengerii</i>	?		—		—		?		+	2	?		+	3	+	6
丁氏鲷 <i>W. tingi</i>	+	2	—		—		+	1	+	2	—		+	2	+	2
银牙鲷 <i>O. argenteus</i>	+	1	+	2	—		+	1	+	2	—		+	3	+	2
尖头黄鳍牙鲷 <i>C. aureus</i>	+	2	—		—		?		+	1	?		+	2	+	2
眼斑拟石首鱼 <i>S. ocellatus</i>	+	2	+	5	—		—		+	1	—		+	1	+	1

注：“+”表示有特异性扩增；“?”表示非特异扩增或等位基因条带很弱难以判断；“—”表示无扩增条带；表中数字表示各位点所得到的等位基因数。

Note: “+” indicates successful amplification ; “?” indicates non-specific amplification or weak amplification bands; “—” means no amplified product; numbers in the table indicate number of alleles on the locus.

3 讨论

3.1 大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科鱼类中的通用性

研究表明,微卫星侧翼序列在属内种间和有较近亲缘关系的属间相当保守,而且在基因组中有部分微卫星位点在亲缘关系较远的分类群间也有一定保守性^[3-6]。微卫星侧翼序列的保守性使得在某一物种中开发出的微卫星引物应用于相关的近缘物种成为可能。

关于微卫星共用引物的研究在水生动物中有很多报道。例如,用红大马哈鱼 (*Oncorhynchus nerka*) 的微卫星引物对 4 属 10 种鲑科鱼类进行扩增分析,结果表明几乎所有微卫星引物在被检测的鲑鱼中都能产生扩增产物^[14]。朱滨等^[15]用湖鲟 (*Acipenser fulvescens*) 微卫星引物对中华鲟 (*A. sinensis*) 个体进行鉴定。林凯东等^[16]在 28 对鲤 (*Cyprinus carpio*) 的微卫星引物中筛选出 7 对可在草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 中特异扩增的引物。对斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 微卫星引物的通用性研

究表明,有 3 对引物可在中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和日本对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 中得到特异的扩增产物^[17]。本实验中,8 对大黄鱼微卫星引物在同属的小黄鱼中有 7 对可扩增并得到多个等位基因,表现出很高的通用性;在同亚科不同属的棘头梅童鱼中也有 6 对引物可扩增,该结果显示,这些微卫星位点的侧翼序列在黄鱼亚科中有较高的保守性,而且微卫星位点表现出较高的多态性,可充分利用这些位点研究该亚科鱼类的遗传多样性。在其他 4 个亚科的鱼类中,部分引物也得到较好的扩增。因此,可充分利用已有的大黄鱼微卫星引物对石首鱼类遗传多样性进行研究,尤其是位点 *PC10F10* 和 *PC10G6*,二者在 10 个种中都得到扩增,可做为 10 种石首鱼类遗传分析的共同标记,在石首鱼类遗传相似性分析及系统进化研究中具有一定的价值。

3.2 大黄鱼微卫星标记在不同种中扩增状况的差异

Primmer 等^[18]发现微卫星的通用性及扩增出的多态性位点比例随着物种间遗传距离的增加而

呈下降的趋势。在本研究中,大黄鱼微卫星标记在与其分类地位较近的小黄鱼和棘头梅童鱼中可扩增的位点数最多而且位点的多态性较为丰富,在其他几种鱼类中,可扩增的微卫星位点及等位基因数相对较少,其结果与 Primmer 等的研究相同。

微卫星核心单元的重复次数的变异及在其侧翼序列中插入或缺失 DNA 片段,都可导致物种间等位基因长度分布范围的差异^[19-21]。这种差异可用于物种,特别是近缘种的 DNA 鉴定。May 等^[22]用 11 个湖鲟的 tri- 和 tetra- 核苷酸微卫星位点对 8 种鲟进行了研究,并成功用 DNA 指纹图谱区别出不同的鲟种类。Fitzsimmons 等^[23]利用微卫星结合 mtDNA 标记,成功地从 103 只鳄鱼 (*Rocodylus siamensis*) 中鉴别出 4 只杂种个体。Primmer 等^[18]在用微卫星标记对燕科鸟类的研究中发现,科内不同的种在一些位点的等位基因长度分布范围上有着严格的区分。本研究也发现黄鱼亚科、叫姑鱼亚科和牙鲆亚科中的近缘种在一些微卫星位点上的等位基因长度分布范围存在较大差异,可以作为 DNA 分子鉴定的候选标记。目前已有在不同石首鱼种间进行杂交研究的报道^[24],也可利用这些微卫星标记进行亲本与杂种子代的鉴别。

此外,等位基因数目的不同也可以做为鉴定近缘种的一个参考指标^[25]。本研究发现,一些在黄鱼亚科中具有较多等位基因的位点,在其他亚科的近缘种中等位基因数较少甚至只表现为单态,但各个物种等位基因的多态性状况尚有待于进一步深入研究确认。

参考文献:

- [1] O'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in Fishes[J]. Rev Fish Biol Fish, 1997, 7: 331-363.
- [2] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. Aquaculture, 2004, 238: 1-37.
- [3] McConnell S K, Hamilton L, Morris D, et al. Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon[J]. Aquaculture, 1995, 137: 19-30.
- [4] Morris D B, Richard K R, Wright J M. Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic studies of salmonids[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1996, 53: 120-126.
- [5] Rico C, Rico I, Hewitt G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species[J]. Proc R Soc Lond, 1996, 263: 549-557.
- [6] Presa P, Guyomard R. Conservation of microsatellites in three species of salmonids[J]. J Fish Biol, 1996, 49: 1326-1329.
- [7] 汪松, 解炎. 中国物种红色名录 (第一卷) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004, 179-181.
- [8] 朱元鼎, 罗云林, 伍汉霖. 中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1963.
- [9] 福建鱼类志编写组. 福建鱼类志 (下卷) [M]. 福州: 福建科技出版社, 1985, 101-136.
- [10] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索 [M]. 北京: 科学出版社, 1987, 317-324.
- [11] 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995, 713-725.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbour Press, 1989: 463-468.
- [13] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1991, 196: 80.
- [14] Kim T S, Judy R G, Raymond L F. Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1996, 53: 833-841.
- [15] 朱滨, 常剑波, 谭细畅, 等. 湖鲟微卫星 DNA 引物应用于中华鲟亲子关系分析初步研究 [J]. 水生生物学报, 1999, 23(6): 547-554.
- [16] 林凯东, 罗琛. 鲤的微卫星引物对草鱼基因组分析适用性的初步研究 [J]. 激光生物学报, 2003, 12(2): 121-127.
- [17] 张天时, 刘萍, 孟宪红, 等. 不同对虾种间共用微卫星 DNA 引物的研究 [J]. 高技术通讯, 2003, (11): 80-85.
- [18] Primmer C R, Møller A P, Ellegren H. A widerange survey of cross-species microsatellite amplification in birds[J]. Mol Ecol, 1996, 5: 365-378.
- [19] Estoup A, Tailliez C, Cornuet J M, et al. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae) [J]. Mol Biol Evol, 1995, 12: 1074-1084.
- [20] Chistiakov D A, Hellemans B, Volckaert F A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics [J]. Aquaculture, 2006, 255: 1-29.

- [21] Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E, et al. Conservation of (CA)_n microsatellite loci between *Quercus* species[J]. Mol Ecol, 1997, 6: 1 189–1 194.
- [22] May B, Krueger C C, Kincaid H L. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus* [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1997, 54: 1 542–1 547.
- [23] Fitzsimmons N N, Buchan J, Lam P V, et al. Identification of purebred *Crocodylus siamensis* for reintroduction in Vietnam[J]. J Exp Zool, 2002, 294: 373–381.
- [24] 马梁, 王军, 陈武各, 等. 鲈状黄姑鱼与大黄鱼人工杂交子代的胚胎发育[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(3): 378–381.
- [25] Turner T F, Dowling T E, Broughton R E, et al. Variable microsatellite markers amplify across divergent lineages of cyprinid fishes (subfamily Leuciscinae) [J]. Conserv Genet, 2004, 5(2): 279–281.

Cross-species amplification of microsatellite markers from *Pseudosciaena crocea* in Sciaenidae

LIN Neng-feng^{1,2}, SU Yong-quan¹, DING Shao-xiong¹, WANG Jun¹

(1. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2 Institute of Biotechnology, Fujian Academic of Agriculture Sciences, Fuzhou, 350003, China)

Abstract: The objectives of this study were to assess the ability of 8 pairs of microsatellite primers developed from *Pseudosciaena crocea* to amplify microsatellites in ten species of Sciaenidae fishes which were collected from coast of Zhejiang Province and Fujian Province. It was found that the rate of successful amplification in species belonging to the same genus or the same subfamily as the target species was high. In the subfamily of Pseudosciaeninae, 7 loci (*PC1C4*, *PC4H12*, *PC5E11*, *PC7H4*, *PC8F5*, *PC10F10*, *PC10G6*) were amplified successfully in *P. polyactis*, and 6 loci were amplified successfully in *Collichthys lucidus* except *PC4H12* and *PC7A2*. These loci which could be amplified revealed polymorphism in Pseudosciaeninae. Primers of these loci were also useful in species of Argyrosominae, Johniinae, Otolithinae and Sciaeninae. 6 loci (*PC1C4*, *PC4H12*, *PC7A2*, *PC7H4*, *PC10F10*, *PC10G6*) of 8 loci were amplified successfully in *Otolithes argenteus*. Loci *PC1C4*, *PC4H12*, *PC7H4*, *PC10F10*, *PC10G6* could be amplified successfully in *Nibea miichthioides* and *Sciaenops ocellatus*, while *PC1C4*, *PC7A2*, *PC7H4*, *PC10F10*, *PC10G6* in *Wak tingi*. Loci *PC1C4*, *PC7A2*, *PC10F10*, *PC10G6* and loci *PC1C4*, *PC7H4*, *PC10F10*, *PC10G6* have been amplified in *N. chui* and *Chrysochir aureus*, respectively. Meanwhile, only 3 loci (*PC7H4*, *PC10F10*, *PC10G6*) were amplified successfully in *Johnias belengerii*. Our cross-species amplification data indicated that allelic diversity was very low in other species compared with *P. crocea*. For example, locus *PC10F10* has high allelic diversity in *P. crocea* but it has only one allele in *S. ocellatus*. Loci *PC10F10* and *PC10G6* were extremely conservative, they could be amplified in all species used in the test. The result suggested that these two loci had potential value in inter-specific molecular comparisons and phylogeny reconstruction among different Sciaenidae fishes. Loci *PC5E11* and *PC8F5* were only amplified in subfamily Pseudosciaeninae. Maybe they were specific loci in Pseudosciaeninae, which indicated we could use these loci to identify species of Pseudosciaeninae from other Sciaenidae fishes. In addition, we found that there were differences between closely related Sciaenidae fishes in average allelic length and the number of alleles which had been scored, thus the microsatellite's footprints of each taxonomic species might be used to discriminate closely related species, but it need more data to confirm the inferrer. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(2): 237–243]

Key word: *Pseudosciaena crocea*; microsatellite; Sciaenidae; cross-species amplification

Corresponding author: WANG Jun. E-mail: junw@xmu.edu.cn