

马海兵<sup>1</sup> 黄天晴<sup>1</sup> 徐革锋<sup>1①</sup> 刘恩慧<sup>1</sup> 谷伟<sup>1</sup> 王高超<sup>1</sup> 郭福元<sup>2</sup> 董福霖<sup>2</sup> 郑龙华<sup>2</sup> 张黎黎<sup>2</sup> 姜再胜<sup>3</sup> 王炳谦<sup>1</sup>

1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所冷水性鱼类产业技术创新战略联盟黑龙江哈尔滨 150070;

2. 烟台经海海洋渔业有限公司山东烟台 264006;

3. 安徽省桐城市水产服务中心安徽桐城 231400

## 介绍

- 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)是我国冷水性鱼类的主要养殖品种。
- 与二倍体相比,虹鳟三倍体具有生长速度快、肉质好和不育等优点。
- 目前,鉴定虹鳟倍性主要是通过流式细胞术进行DNA含量分析,但这种方法需要采集鱼类血液或组织样本,会对其造成伤害。

## 方法与结果

• 为了实现利用微创方法收集样本鉴定虹鳟倍性,本研究利用PCR扩增以及电泳分离技术对153个微卫星标记(SSR标记)进行分析。

- 139个SSR标记能够在二倍体和三倍体中成功扩增;
- 筛选出132个SSR标记具有多态性;

• 将132个具有多态性的SSR标记在52个已知倍性水平的参考样本上进行PCR扩增,从中鉴定出在三倍体中表现出较高的变异性的SSR标记。

• 通过对7个在三倍体中表现出较高的变异性的SSR标记在48个未知倍性的样本上进行验证,进一步从中筛选出足以区分倍性水平的SSR标记组合。

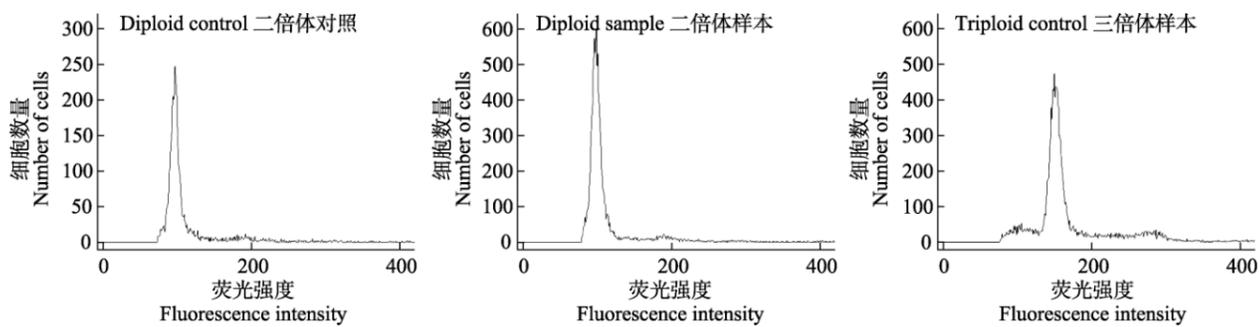


图1 二倍体和三倍体样本(细胞DNA含量)的流式细胞仪检测结果,并以2n=30的虹鳟红细胞作为二倍体对照

### 鉴定出7个标记在三倍体中表现出较高的变异性

引物名称Primer name	注册号GenBank	片段长度Segment length /bp	A		H <sub>o</sub>	
			2n	3n	2n	3n
OMM1045	AF346692.1	143~285	8	7	0.92	0.96
OMM1053	AF352738.1	237~345	8	10	0.88	0.96
SSR1054	AF352739.1	220~365	13	13	0.83	1.00
SSR1056	BV722065.1	248~463	14	12	0.83	0.96
SSR1468	BV079609.1	220~363	14	11	0.79	1.00
OMM1669	BV212161.1	206~250	4	4	0.50	0.17
OMM3142	BV718475.1	171~189	4	3	0.58	0.63
平均值Mean	0	206~323	9.29	8.57	0.76	0.81

表1 符合虹鳟倍性鉴定特征性位点筛选标准的SSR引物及遗传参数

注: A为等位基因数, H<sub>o</sub>为平均观测杂合度。

### 筛选出3个SSR标记(SSR1054、SSR1056和SSR1468)足以区分倍性水平

引物名称Primer name	序列Sequence (5'~3')	核心重复序列Repeat motif	GC含量GC content/%	扩增退火温度Annealing temperatures/°C
SSR1054F	CACGCCATACCAACTGAGC	(ATCT) <sub>20</sub>	57.89	56
SSR1054R	TCACCACACATCAGCTACCG		55.00	
SSR1056F	CCAGTCAGTGTGGCTGCAT	(AGAT) <sub>17</sub>	50.00	58
SSR1056R	ACCTGACCATGAAAGGATGG		50.00	
SSR1468F	TGTTGATGTCAAAGCGTGTG	(ATCT) <sub>21</sub>	45.00	56
SSR1468R	GGTTGGTTTCATCTCGGAGT		50.00	

表2 符合虹鳟倍性鉴定特征性位点筛选标准的SSR引物及遗传参数

### 使用3个特异SSR标记鉴定虹鳟倍性的方法

- 使用SSR1054、SSR1056和SSR1468这三个标记对未知倍性虹鳟样本进行PCR扩增,其中,扩增出现特异标记条带或3条条带的样本均为三倍体,其余个体判定为虹鳟二倍体。
- 例如:SSR1054样本扩增图谱中含有三倍体特异等位基因305 bp或3条条带基因型的个体判定为虹鳟三倍体个体。

### 发现的3个SSR标记(SSR1054、SSR1056和SSR1468)的特异标记条带可用于区分倍性水平

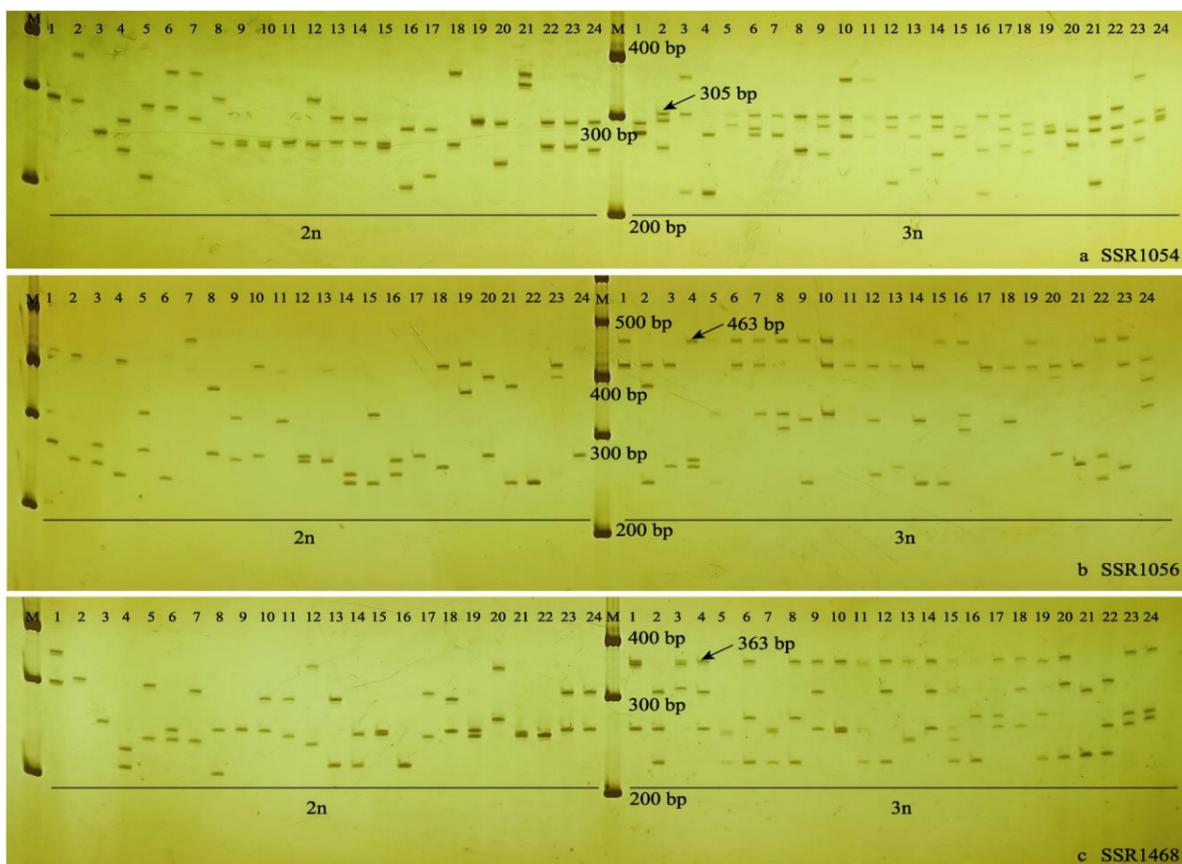


图2 引物SSR1054(a)、SSR1056(b)和SSR1468(c)扩增虹鳟基因组DNA的电泳图

M: 分子量标准DL1000; 2n: 虹鳟二倍体个体; 3n: 虹鳟三倍体个体

### 特异SSR标记在虹鳟三倍体鉴定中的应用

特异标记Locus	SSR1054	SSR1056	SSR1468	三倍体Triplets
1	√	√	√	√
2	√	√	√	√
3	√	√	√	√
4	√	√	√	√
5	√	√	√	√
6	√	√	√	√
7	√	√	√	√
8	√	√	√	√
9	√	√	√	√
10	√	√	√	√
11	√	√	√	√
12	√	√	√	√
13	√	√	√	√
14	√	√	√	√
15	√	√	√	√
16	√	√	√	√
17	√	√	√	√
18	√	√	√	√
19	√	√	√	√
20	√	√	√	√
21	√	√	√	√
22	√	√	√	√
23	√	√	√	√
24	√	√	√	√

表3 3个SSR特异标记在倍性鉴定中的有效性验证结果(部分)

## 总结

- 本研究所筛选的3个特异SSR标记解决了现有虹鳟倍性鉴定中存在的技术流程复杂、耗材昂贵的问题,并有助于不同倍性虹鳟的遗传多样性研究。