

乌鳢和斑鳢微卫星制备及其对自交与杂交 F1 代的初步鉴定

朱树人^① 李忠全^② 冯晓宇^② 谢楠^② 朱林^① 李家乐^{①③*}

① 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306;

② 杭州市农业科学研究院 杭州 310024; ③ 上海市高校水产养殖学 E 研究院 上海 201306

摘要: 通过磁珠富集法分离了乌鳢 (*Channa argus*) 和斑鳢 (*C. maculate*) 的微卫星 DNA 序列, 根据这些微卫星 DNA 序列的两翼序列, 采用 Primer 3.0 或 Primer 5.0 软件设计出乌鳢与斑鳢的微卫星引物各 31 对。用 62 对微卫星引物对乌鳢和斑鳢自交与杂交 F1 代的 4 个组合进行扩增, 10 对引物无扩增产物, 其余 52 对引物中, 均能在 4 个组合的鱼中扩增出条带的引物有 49 对。位点 CHA16 在乌鳢中呈多态, 在斑鳢中呈单态; 位点 CHM23 在乌鳢中呈单态, 在斑鳢中呈现多态; 另外, 位点 CHM24 在乌鳢中呈单态, 在斑鳢中没有扩增出条带。检测到乌鳢和斑鳢的差异位点 22 个, 其中 18 个均可单独有效鉴定出 F1 子代的乌鳢、斑鳢及包括正交和反交在内的杂交鳢, 其余 4 个位点也可以通过组合鉴定出 F1 子代的乌鳢、斑鳢及杂交鳢。但是, 杂交鳢中正交组合和反交组合不能通过本研究开发的微卫星鉴别。

关键词: 乌鳢; 斑鳢; 杂交子代; 微卫星; 鉴定

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)04-01-07

Isolation of Microsatellite Makers for *Channa argus* and *C. maculate* and Primary Identification of *C. argus*, *C. maculate* and Their Reciprocal Hybrids

ZHU Shu-Ren^① LI Zhong-Quan^② FENG Xiao-Yu^② XIE Nan^② ZHU Lin^① LI Jia-Le^{①③*}

① Shanghai Ocean University, Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306;

② Institute of Fisheries, Hangzhou Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310024;

③ Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 201306, China

Abstract: In the present study, microsatellite DNA was isolated and enriched from the genomes of *Channa argus* and *C. maculate* by magnetic beads. Sixty-two pairs of microsatellite primers of *C. argus* and *C. maculate* were designed based on the flanking sequence of the microsatellite loci with software Primer 3.0 or Primer 5.0. Ten primer pairs failed to amplify. Among the 52 primer pairs which could effectively amplify products, 49 universal primer pairs could effectively amplify in F1 generation. Loci CHA16 showed monomorphic in *C. maculate* and polymorphic in *C. argus* and loci CHM23 was opposite. In addition, CHM24 showed monomorphic in *C. argus* and failed to show in *C. maculae*. Moreover, 22 specific loci between *C. argus* and *C. maculate* were

基金项目 杭州市科技局重大科技创新项目 (No. 20083212A04), 上海市水产养殖重点学科建设项目 (No. Y1101);

* 通讯作者, E-mail: jlli2009@126.com;

第一作者介绍 朱树人, 男, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物种质资源与种苗工程; E-mail: zhshr229@163.com。

收稿日期: 2010-11-04, 修回日期: 2011-03-03

screened out, and 18 specific loci could identify *C. argus*, *C. maculate* and the reciprocal hybrids alone effectively. Combination of the other 4 specific loci also effectively identified *C. argus*, *C. maculate* and the reciprocal hybrids. However, the reciprocal hybrids [*C. argus* (♀) × *C. maculata* (♂), *C. maculata* (♀) × *C. argus* (♂)] could not be identified in this research.

Key words: *Channa argus*; *C. maculate*; Hybrid; Microsatellite; Identification

乌鳢 (*Channa argus*) 和斑鳢 (*C. maculate*) 同属于鲈形目 (Perciformes) 鳢科 (Channidae) 鳢属。杂交鳢系通过斑鳢和乌鳢杂交所获得的子一代, 具有生长快、产量高、病害少、安全质量高等优势, 人工养殖过程可采用人工饲料喂养, 大大改善原乌鳢养殖中因采用冰鲜投喂而造成饲料浪费及水源污染等问题, 在珠江三角洲地区已经取代乌鳢和斑鳢而成为鳢科鱼类中最重要的养殖品种。其中, 反交 F1 代 [斑鳢 (♀) × 乌鳢 (♂)] 因为苗种孵化率高、成活率高等优势, 在中国鳢科鱼类养殖中所占的比重越来越大^[1-2]。

在杂交种鉴定方面, 国际上主要采用形态学、生物化学及遗传学方法。从形态学角度很容易区分乌鳢与其他鳢, 而斑鳢很难与杂交鳢区别开来。选择合适的分子标记是从遗传学角度进行鉴定的前提和保证^[3], 本文采用了微卫星分子标记方法。利用自行开发的微卫星引物鉴定乌鳢、斑鳢及杂交鳢, 以期为鳢科鱼类的初步鉴定及其种质资源保护和利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 实验于 2009 年在浙江杭州市农业科学研究院水产研究所进行, 催产后的乌鳢、斑鳢雌雄亲本按“一对一”的方式放入准备好的泡沫箱里进行产卵受精, 共有 4 个组合: 乌鳢 (♀) × 乌鳢 (♂)、乌鳢 (♀) × 斑鳢 (♂)、斑鳢 (♀) × 乌鳢 (♂)、斑鳢 (♀) × 斑鳢 (♂), 每个组合各 40 组, 将同一组合孵出的仔鱼全部放入一口面积为 0.2 hm² 的池塘中养殖, 待鱼苗长到 3~5 cm 时, 每个组合各取 7 尾剪取胸鳍, 并保存于 95% 乙醇中。鳍条组织基因组 DNA 的提取按照苯酚-氯仿法, TE (pH 8.0) 溶解后测定浓度和纯度, -20℃ 保存备用。

实验所用的 *Mse* I 内切酶、pGEM-T 连接试剂盒分别由 NEB 公司和 Takara 公司提供, 生物素标记探针、接头及引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 磁珠为链霉亲和素包被的磁珠 (Promega, Z548C)。Mse I 接头, Oligo-Mse I A: HO5'-TAC TCA GGA CTC AT-3' OH; Oligo-Mse I B: HO5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3' OH。Mse I-N 混合组: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A(N)-3' (N = A, T, C, G)。生物素标记探针: 5' Biotin-(CA)₁₅-3' OH。

1.2 乌鳢和斑鳢的微卫星制备

1.2.1 乌鳢、斑鳢基因组 PCR 文库的构建 基因组 DNA 的酶切: 分别取乌鳢、斑鳢基因组 DNA 1 μg, *Mse* I 酶 37℃ 酶切 2 h, 65℃ 灭活 20 min。Mse I 接头的制作: 200 μmol/L 的 Oligo-Mse I A 和 Oligo-Mse I B 各取 20 μl 混匀, 96℃ 变性 8 min, 缓慢冷却至室温, -20℃ 保存。Mse I 接头与片段的连接: 30 μl 体系配制 (Ligation Buffer 1.5 μl, Mse I 接头 2.5 μl, 酶切基因组片段 10 μl, T4 DNA 连接酶 1 μl), 在连接仪器中连接 16 h, 放置 4℃ 冰箱中 6 h。连接混合液的预扩增: 利用 Mse I-N 混合组对 1/10 倍稀释的连接混合液进行 PCR 预扩增, 建立 20 μl 的反应体系 (10 × PCR Buffer, 2.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 20 mol/L Mse I-N, 1/10 稀释的连接反应液, 2.5 U/μl *Taq* 酶)。反应程序: 95℃ 变性 3 min; 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 1 min, 23 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

1.2.2 乌鳢、斑鳢微卫星 DNA 分离 预扩增产物与生物素标记探针的杂交: 分别将乌鳢、斑鳢预扩增后的产物与生物素探针进行杂交, 建立 100 μl 杂交体系, 包括预扩增后的 PCR 产物 25 μl, 杂交缓冲液 (6 × SSC, 0.1% SDS) 70 μl

和生物素标记的探针 5 μl 。混匀后在 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅变性 15 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min, 缓慢冷却至室温, 加入 300 μl 的 TEN 100, 混匀。

磁珠富集: 使用 400 μl TEN₁₀₀₀ Buffer 于室温下洗涤磁珠 3 次, 然后使用 400 μl 0.2 \times SSC、0.1% SDS 于室温下洗涤磁珠 3 次, 同样使用 400 μl 0.2 \times SSC、0.1% SDS 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下洗涤磁珠 10 min, 最后使用 400 μl 0.2 \times SSC 于室温下洗涤磁珠 10 min。加入 100 μl TE (pH 9.0) 混匀, 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 用磁架固定磁珠后, 迅速吸出上清液, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

目的片段精制 DNA 与扩增: 分别将磁珠富集后的上清液加入两倍体积的冰冻乙醇, 移去乙醇后, 加入 700 μl 70% 的乙醇浸泡 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 20 min, 移去乙醇, 室温挥发乙醇后, 加入 50 μl 的灭菌双蒸水。用 Mse I-N 引物组 (20 mol/L) 对精制的 DNA 片段进行 PCR 扩增。反应体系和反应条件与预扩增相同, 30 个循环, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

T 载体连接、阳性克隆的培养与筛选: 用天根生物公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收片段大小为 150 ~ 800 bp 产物, 连接到 pGEM-T 载体中, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞, 铺平板于含有 Amp 的 LB 固体培养基中。经过蓝白斑筛选, 挑选白色的克隆转到含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。直接以菌液为模板, 用 Mse I-N 混合组进行 PCR 扩增, 挑选 150 ~ 800 bp 的阳

性克隆。

1.3 乌鳢、斑鳢微卫星 DNA 测序及引物设计

获得的阳性克隆在上海生工生物工程技术有限公司进行测序, 利用 Primer 3.0 和 Primer 5.0 软件设计引物。

1.4 乌鳢、斑鳢及杂交子代的微卫星鉴定

用制备的 31 对乌鳢微卫星引物和 31 对斑鳢微卫星引物对乌鳢、斑鳢及杂交子代进行检测, PCR 反应体系为 10 μl , 包括: 1 \times PCR Buffer, 1.5 mmol Mg²⁺, 200 μmol dNTP, 200 μmol 上下游引物, 0.1 U *Taq* 酶, 100 ng 模板, 灭菌去离子水补齐。

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳初检合格后, 用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 用 Puc18DNA/Msp I 作为分子量标准, 快速银染法染色, 拍照后观察分析。

2 结果

2.1 乌鳢、斑鳢的阳性克隆筛选及微卫星序列特征分析

实验获得了乌鳢、斑鳢微卫星基因文库, 经蓝白斑初步筛选, 每个 LB 平板中均匀分布约 500 个白色菌落, 在每个文库中随机挑选 20 个白色菌落进行 LB 液体培养基培养。以菌液为模板, 用 PCR 法快速鉴定微卫星序列的阳性克隆 (图 1), 挑选乌鳢菌落 190 个和斑鳢菌落 82 个信号较强的菌液进行测序, 分别获得了 165 个乌鳢微卫星 DNA 序列和 74 个斑鳢微卫星 DNA 序列。

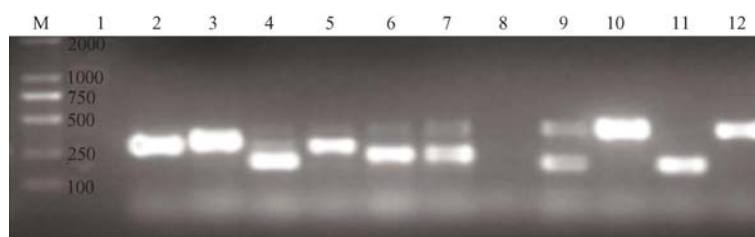


图 1 菌落 PCR 检测阳性克隆

Fig. 1 The positive clones obtained in the first round screening

M: D2000 DNA 分子量标准; 1 ~ 12: 阳性克隆。M: D2000 DNA marker; 1 ~ 12: Positive clones.

根据获得的乌鳢及斑鳢微卫星 DNA 序列, 应用 Primer 3.0 在线设计软件和 Primer 5.0 设

计并分别合成 31 对引物, 这 62 对引物的详细信息已上传 GenBank, 数据库序列号为

HQ404168 ~ HQ404198 和 HQ404200 ~ HQ404230,退火温度 41 ~ 63℃。

2.2 微卫星位点的 PCR 扩增结果 本实验所用 62 对微卫星引物中,有 10 对引物(CHA24、CHA28、CHA30、CHA35、CHM5、CHM6、CHM11、CHM20、CHM22、CHM33)在 4 种鱼中均无扩增产物。在余下的 52 对引物中,均能在 4 个组合的鱼中扩增出条带的引物有 49 对,而引物 CHM12 (除乌鳢)及引物 CHA22 和 CHM24(除斑鳢)仅在 3 个组合的鱼中有扩增条带。在 52 个微卫星位点中,位点 CHA19 在乌鳢和斑鳢中均呈单态;位点 CHA16 在乌鳢中

呈多态,在斑鳢中呈单态;位点 CHM23 在乌鳢中呈单态,在斑鳢中呈现多态;另外,位点 CHM24 在乌鳢中呈单态,在斑鳢中没有扩增出条带;其余位点在 4 种鱼中均呈现多态。在乌鳢中多态位点 48 个,单态位点 3 个,共得到 110 个等位基因,每个位点平均等位基因数为 2.24,大小范围 96 ~ 267 bp。在斑鳢中多态位点 48 个,单态位点 2 个,共得到 88 个等位基因,每个位点平均等位基因数为 1.80,大小范围 82 ~ 298 bp。杂交子代的条带类型基本上包含了乌鳢和斑鳢的条带类型,部分扩增结果见图 2。

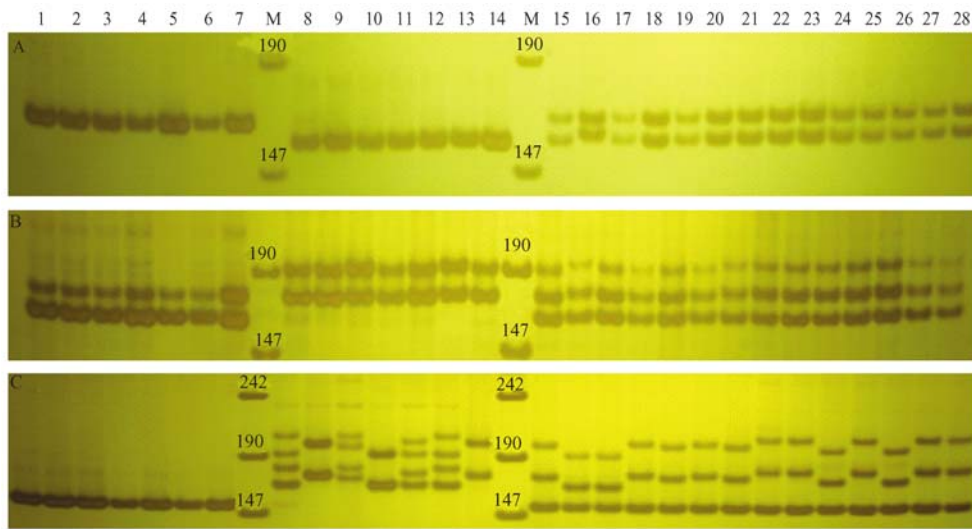


图 2 引物 CHA19(A)、CHM19(B)和 CHM23(C)的电泳图谱

Fig.2 SDS-PAGE electrophoretic patterns of primer CHA19(A), CHM19(B) and CHM23(C)

M:pUC18 标准分子量; 1~7:乌鳢; 8~14:斑鳢; 15~21:正交(乌鳢♀×斑鳢♂)子代; 22~28:反交(斑鳢♀×乌鳢♂)子代。
M: pUC18 DNA marker; 1-7: *C. argus*; 8-14: *C. maculata*; 15-21: Cross *Channa* [*C. argus* (♀) × *C. maculata* (♂)]; 22-28: Cross *Channa* [*C. maculata* (♀) × *C. argus* (♂)].

2.3 乌鳢、斑鳢特异微卫星位点筛选 在 52 个能够有效扩增的微卫星位点中,检测到 22 个位点能在乌鳢和斑鳢中扩增出稳定的特异条带,对 22 个位点的详细统计结果见表 2。其中,位点 CHM12 在乌鳢中无任何扩增产物,位点 CHA22 和 CHM24 在斑鳢中无任何扩增产物。杂交子代的群体水平上基本上继承了乌鳢和斑鳢的全部扩增条带。

根据表 2 的实验结果,可用特异位点区分 F1 子代的乌鳢、斑鳢及杂交鳢(包括正交和反交)。例如,在 CHA19 位点只扩增出 168 bp 条带,可确定是乌鳢,只扩增出 160 bp 条带,可确定是斑鳢,同时扩增出 160 bp 和 168 bp 的条带,可确定是杂交鳢。按照这种鉴别思路,用一个位点便可鉴别 F1 子代的乌鳢、斑鳢及杂交鳢的引物有 18 个: CHA14、CHA19、CHA20、

CHA23、CHA34、CHA36、CHA37、CHA38、CHA39、CHA41、CHA42、CHM3、CHM7、CHM15、CHM19、CHM23、CHM28、CHM29。同

时,用这 22 个位点在其他采样的群体中验证,也取得了相同的结果,证明本实验开发的这 22 个位点具有种间特异性。

表 1 F1 代在 22 个微卫星特异位点上的扩增产物信息

Table 1 Amplified product information of 22 specific microsatellite loci in F1 generation

特异位点 Specific loci	扩增产物大小 Amplified product size (bp)		
	乌鳢 <i>Channa argus</i>	斑鳢 <i>Channa maculata</i>	正反杂交子代 Reciprocal hybrid
CHA14	183,213	173,197,229	173,183,197,213,229
CHA16	220,254	225	220,254
CHA19	168	160	160,168
CHA20	188,216	179,203	179,188,203,216
CHA22	175,181,195,201,207,223	无	175,181,195,201,207,223
CHA23	131,151	138,158	131,138,151,158
CHA34	237,247	205,215	205,215,237,247
CHA36	229,239	270,298	229,239,270,298
CHA37	251,267	267,285	251,267,285
CHA38	198,202,204,228,230,234	186,214	186,198,202,204,214,228,230,234
CHA39	208,236	188,216	188,208,216,236
CHA41	159,175,183,199	142,162	142,162,175,199
CHA42	195,223	209,235	195,209,223,235
CHM3	180,206	171,193	171,180,193,206
CHM7	151,165	175,193	151,165,175,193
CHM12	无	244,260	244,260
CHM15	181,211	189,221	181,189,211,221
CHM19	165,177	177,191	165,177,191
CHM23	154	169,175,177,193,199,205	154,169,175,177,193,199,205
CHM24	147	无	147
CHM28	153,177	161,183	153,161,177,183
CHM29	91,101	116,132	91,101,116,132

3 讨论

微卫星标记目前已广泛用于鲤 (*Cyprinus carpio*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鳊鱼 (*Aristichthys nobilis*) 等^[4-7] 淡水鱼类的种群遗传多样性分析、遗传图谱构建、种质鉴定及辅助育种等方面。本实验采用了磁珠富集法快速制备乌鳢和斑鳢的微卫星,斑鳢的微卫星尚属首次开发。关于克隆的微卫星标记的类别,Weber^[8] 划分为 3 种类型,即完美型、非完美型和混合型。采用 Weber 的划分方式:165 个乌鳢微卫星序列中,完美型 125 个 (76%)、非完美型 34 个 (20%) 和混合型 6 个 (4%);74 个斑鳢微卫星 DNA 序列中,完美型 48 个 (65%)、非完美型 16

个 (21%) 和混合型 10 个 (14%)。本实验分析发现,乌鳢及斑鳢微卫星核心序列重复次数跨度较大,最少的只有 5 次,最多的可达 59 次。由于实验使用的探针是 (CA)₁₅, 因此得到的微卫星 DNA 核心序列中 CA、AC、TG 和 GT 重复占 89%, 同时也出现了少量的 GA 序列重复。

国内外在鱼类杂交育种方面进行了大量的研究^[9-16], 并取得显著的成就, 其中某些杂交种经过多年的生产应用与实践, 获得了大面积的推广。在鳢科鱼类中, 随着乌鳢和斑鳢的杂交在生产上广泛开展, 杂交鳢在繁殖习性、人工繁殖、养殖密度等各方面的研究逐渐增多^[17-25]。在利用微卫星分子标记进行种质鉴定方面, 微卫星分子标记技术鉴定杂交种已经成熟, 如张玉勇等^[26] 用微卫星特异性位点鉴定

虹鳟、山女鳟 (*O. masou masou*) 及其杂交子代。本实验中检测了 62 对微卫星引物在乌鳢、斑鳢及杂交子代中的扩增情况, 筛选出 22 个微卫星特异位点, 其中 18 个位点中任意一个位点可鉴定出乌鳢、斑鳢及杂交鳢, 并且其他 4 个位点 (CHA16、CHA22、CHM12、CHM24) 进行有效组合也可鉴定乌鳢、斑鳢及杂交鳢。研究中发现, 杂交鳢与 F1 代的斑鳢和乌鳢相比较, 没有产生特异性条带。本研究中, 出现了影子带 (stutter bands) 现象, 如 CHM23 位点在部分斑鳢个体中扩增出 4 个条带, 这与微卫星呈共显性遗传的原理不相符。Murra 等^[27]认为影子带的产生机理可能是扩增中 DNA 链在复制时滑动误配所致, 王吉振等^[28]发现影子带是由特异性扩增带和非特异性扩增带不完全配对形成的异质链, 结构上形成不配对的、突出的环。正是这一突出的环状结构减慢了影子带的泳动速度。本实验通过严格的 PCR 反应条件、控制银染、显色时间和洗胶时间, 最大程度减少了影子带的出现。在本实验中, 像 CHM23 位点在部分个体中出现的影子带并不影响对乌鳢、斑鳢及杂交鳢的初步鉴定。

正反杂交鳢无法通过本实验开发的微卫星标记鉴定, 因为本实验开发的微卫星标记没有与性别标记有关的位点, 而微卫星分子标记是一种共显性的分子标记, 它遵循孟德尔的分离规律, 正常杂交子代从双亲获得相同数量的核遗传物质, 即正交组合的杂交鳢与反交组合的杂交鳢的遗传物质一半来自父本, 一半来自母本, 除非找到与性别标记相关的位点, 不然很难利用微卫星标记鉴定出正交组合的杂交鳢与反交组合的杂交鳢, 这与很多研究者对于杂交子代的研究结果一致^[29-31], 如果要鉴定出正反交组合的杂交鳢, 需要批量开发微卫星标记。从种质资源保护和利用的角度看, 本研究开发的微卫星标记可对乌鳢、斑鳢及杂交子代初步鉴定分离。

参 考 文 献

[1] 杨小强. 闽香鳢[乌鳢(♂) × 斑鳢(♀)]遗传生物学

研究 I 子代和亲本形态比较. 福建水产, 2004, (3): 41-44.

- [2] 冯晓宇, 王宇希, 李行先, 等. 池塘养殖杂交鳢高效试验. 科学养鱼, 2008, (3): 31-32.
- [3] Ludwig A. Identification of acipenseriformes species in trade. *J Appl Ichthyol*, 2008, 24(S1): 2-19.
- [4] Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance. *Aquaculture*, 2004, 238(1/4): 165-172.
- [5] Nichols K M, Young W P, Danzmann R G, et al. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim Genet*, 2003, 34(2): 102-115.
- [6] Liu F, Xia J H, Bai Z Y, et al. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. *Aquaculture*, 2009, 297(1/4): 51-56.
- [7] 鲁翠云, 孙效文, 梁利群. 鳙鱼微卫星分子标记的筛选. 中国水产科学, 2005, 12(2): 192-196.
- [8] Weber J L. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Curr Opin Biotechnol*, 1990, 1(2): 166-171.
- [9] 楼允东, 李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用. 中国水产科学, 2006, 13(1): 151-158.
- [10] 王晓清, 王志勇, 谢中国, 等. 大黄鱼(♀)与(♂)杂交的遗传分析. 水产学报, 2008, 32(1): 51-57.
- [11] 李莉好, 喻达辉, 黄桂菊, 等. 尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼及其正、反杂交群体的遗传多样性. 中国水产科学, 2008, 15(4): 585-592.
- [12] 赵金良, 李家乐, 曹阳. 草鱼杂交育种及杂交后代生物学研究进展. 安徽农学通报, 2008, 14(11): 162-164.
- [13] 顾志敏, 贾永义, 叶金云, 等. 翘嘴红鲌(♀) × 团头鲂(♂)杂种 F1 的形态特征及遗传分析. 水产学报, 2008, 32(4): 533-544.
- [14] Hara M, Kikuchi S. Increasing the growth rate of abalone, *Haliotis discus hannai*, using selection techniques. NOAA Technical Report NMFS, 1992, 106: 21-26.
- [15] Avaul J W. Stock improvement. *Aquaculture Magazine*, 2002, 28(2): 54-61.
- [16] Nakadate M, Shikano T, Taniguchi N. Inbreeding depression and heterosis in various quantitative traits of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Aquaculture*, 2003, 220(1/4): 219-226.
- [17] 刘文奎, 樊启学, 朱邦科, 等. 乌鳢养殖技术之一: 雄性乌鳢与雌性斑鳢杂交试验. 中国水产, 2007, (3): 37-39.

- [18] 游曦. 闽香鳢人工繁育及苗种培育技术研究. 福建水产, 2006, (1): 48-49.
- [19] 邓水妹. 池塘微流水养殖闽香鳢技术. 内陆水产, 2008, (3): 15-16.
- [20] 杨菁. 惠农 1 号杂交鳢与斑鳢养殖效益的比较. 海洋与渔业, 2009, (5): 42-42.
- [21] 刘文奎, 樊启学, 杜海明, 等. 养殖密度对杂交鳢仔鱼生长与存活的影响. 淡水渔业, 2007, 37(4): 45-48.
- [22] 杨凯, 樊启学, 刘文奎, 等. 规格差异和饵料密度对杂交鳢 (*Channa maculate* ♀ × *C. argus* ♂) 仔稚鱼残食的影响. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 279-283.
- [23] 刘新轶, 王宇希, 谢楠, 等. 杂交鳢及其亲本肌肉营养成分分析. 齐鲁渔业, 2010, 27(5): 24-26.
- [24] 卓孝磊, 梁日深, 陈言峰, 等. 杂交鳢(乌鳢 ♂ × 斑鳢 ♀) 及其亲本血液指标的比较分析. 淡水渔业, 2010, 40(3): 72-75.
- [25] 林启存, 陈武, 周立伟, 等. 6 种常见药物对杂交鳢的急性毒性试验. 安徽农业科学, 2010, 38(9): 4639-4641.
- [26] 张玉勇, 白庆利, 贾智英, 等. 虹鳟、山女鳟及其杂交子代(虹鳟 ♀ × 山女鳟 ♂) 的微卫星分析. 水产学报, 2009, 33(2): 188-195.
- [27] Murray V, Monchawin C, England P R. The determinations of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. Nuc Aci Res, 21(10): 2395-2398.
- [28] 王吉振, 王爱国, 储明星, 等. 二核苷酸微卫星 PCR 扩增的影子带及其来源. 畜牧兽医学报, 2007, 38(3): 241-246.
- [29] 胡佳, 汪登强, 危起伟, 等. 施氏鲟、达氏鳇及其杂交子代的分子鉴定. 中国水产科学, 2010, 17(1): 21-30.
- [30] 彭涛, 王念民, 佟广香, 等. 湖鲟微卫星引物在三种鲟鱼及杂交子代的通用性研究. 水产学杂志, 2009, 22(2): 12-16.
- [31] 颜标, 李思发, 蔡完其. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼及其正反杂交后代的微卫星分析. 水产学报, 2007, 31(3): 411-415.