DOI: 10.3969/j.issn.2095-9869.20241205004 http://www.yykxjz.cn/

赵昕, 车帅, 王焕, 孙侦龙, 尤颖哲, 柳淑芳, 庄志猛. 暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的荧光 PCR 鉴定技术的建立. 渔业科学进展, 2026, 47(1): 37–47

ZHAO X, CHE S, WANG H, SUN Z L, YOU Y Z, LIU S F, ZHUANG Z M. Establishment of fluorescence PCR identification techniques for *Takifugu obscurus*, *T. rubripes*, and their hybrid F_1 generation. Progress in Fishery Sciences, 2026, 47(1): 37–47

暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的荧光 PCR 鉴定技术的建立*

赵 昕[1,2] 车 帅[2] 王 焕[2] 孙侦龙[4] 尤颖哲[5] 柳淑芳[2,3①] 庄志猛[2]

(1. 浙江海洋大学水产学院 浙江 舟山 316022；2. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071；3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266237；4. 江苏中洋集团股份有限公司 江苏 南通 226600；5. 漳州市水产技术推广站 福建 漳州 363000)

摘要 暗纹东方鲀((*Takifugu obscurus* ♀)×红鳍东方鲀(*T. rubripes* ♂)的杂交 F_1 代具备双亲诸多优良性状，市场前景较好。但杂交 F_1 代的形态特征与其亲本难以区分，为河鲀种质资源保护和开发利用带来了困扰，迫切需要开发有效的分子鉴定方法对杂交 F_1 代及其亲本进行精准判别。为实现杂交 F_1 代及其亲本的快速准确鉴定，本研究根据核基因 *SH3PX3* 多态性 SNP 位点，设计荧光 PCR 扩增引物及探针，优化了荧光 PCR 参数，建立了暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的荧光 PCR 鉴定方法，并对该方法进行了验证。结果显示：杂交 F_1 代的 *COI* 序列与母本暗纹东方鲀的序列相似度为 100%，在 NJ 进化树中聚为一支，无法实现杂交 F_1 代和母本的区分；*SH3PX3* 基因荧光 PCR 体系最佳退火温度为 48 ℃；荧光 PCR 扩增后，暗纹东方鲀仅 FAM 通道有 Ct 值，ΔCt 值大于 20，红鳍东方鲀 FAM 信号通道比 HEX 通道的 Ct 值高 2~5，杂交 F_1 代的 FAM 通道与 HEX 通道的 Ct 值接近，二者之差小于 2；基于上述方法对 17 份暗纹东方鲀、21 份红鳍东方鲀和 53 份杂交 F_1 代样品进行验证，鉴定准确率为 100%。本研究建立的荧光 PCR 鉴定方法不仅具有结果准确、易判读等优点，还避免了测序等繁琐流程，可实现高通量检测，显著提高了检测效率，为河鲀种质资源鉴定与保护、杂交育种和遗传多样性研究提供了技术支持。

关键词 暗纹东方鲀；红鳍东方鲀；杂交 F_1 代；*SH3PX3* 基因；荧光 PCR；物种鉴定

中图分类号 S93 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2026)01-0037-11

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)与暗纹东方鲀(*T. obscurus*)均隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲀形目(Tetraodontiformes)、鲀科(Tetraodontidae)、东方鲀属(*Takifugu*)。红鳍东方鲀主要分布于我国黄渤海、东海及台湾海域，是东方鲀属中个体最大、生长最快的种类，体长为 35~45 cm，最长可达 80 cm (伍汉霖, 1981)；暗纹东方鲀主要分布于我国黄渤海、东海沿岸，也可进入长江和其他江河的中下游及与此相连的湖泊，是海淡水洄游性鱼类，体长仅 54~285 mm (苏锦祥, 2002)。二者均为我国河鲀养殖主要种类，具有较高的营养价

*国家重点研发计划(2019YFC1604700)、国家现代农业产业技术体系(CARS-47)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2024JC0101; 20603022024023)共同资助。赵 昕，Email: 791447582@qq.com

① 通信作者：柳淑芳，研究员，Email: liusf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-12-05, 收修改稿日期: 2025-05-07

值和经济价值。杂交育种可以将亲本的优势性状结合到一起，从而获得性状优良的杂交新品种(孙斌华等, 2024; 邹杰等, 2013)。为满足河鲀产业快速发展的需要，养殖业者利用杂交优势原理进行增产增效，其中以暗纹东方鲀为母本和红鳍东方鲀为父本进行杂交育种获得了具有养殖存活率高、生长速度快、肌肉品质好等优良性状的杂交 F_1 代(赵海涛等, 2013; 张年国等, 2016)。杂交 F_1 代的肉质继承了暗纹东方鲀的鲜美风味，比红鳍东方鲀的肌肉质地更柔软，且可以在淡水中养殖，其在苗种时期体长以及生长速度方面也优于暗纹东方鲀(Park *et al*, 2017)。然而，杂交 F_1 代的形态兼具暗纹东方鲀、红鳍东方鲀的特征，三者在稚鱼、幼鱼、成鱼时期外观体型均相似，仅依靠形态学鉴别可能会出现错误，影响优质苗种的培育(徐杰杰, 2021)。若杂交 F_1 代混入育种亲本群体中，则会导致河鲀亲本种质混杂和无序杂交，将严重影响其养殖业的健康发展。此外，自然海区也发现了东方鲀属鱼类近缘杂交现象(尹璐等, 2016)，可能对东方鲀属鱼类的遗传多样性和种质纯度构成潜在威胁。因此，开发一套杂交 F_1 代及其亲本的鉴定方法已成为当前研究的迫切需求。

线粒体 *COI* 基因可实现多数硬骨鱼类的物种鉴别，在鱼类物种鉴定、系统发育研究中广泛应用(李楠等, 2018; 王熠, 2018; 刘凯莹, 2023)。由于线粒体基因为母系遗传，仅利用线粒体基因无法实现杂交种与其母本的区分(李培等, 2009; 马波等, 2018)。与之相比，核基因兼具父母本的遗传信息，结合线粒体基因，可以有效区分杂交种及亲本。Qu 等(2018)筛选出 *RYR3* 核基因标记，并集合线粒体 *COI* 基因实现了杂交石斑鱼与其父母本的鉴别。杨子豪等(2024)利用单拷贝 *fam43a* 基因和线粒体 *Cyt b* 基因能够快速准确地鉴定中华鲟(*Acipenser sinensis*)及其潜在杂交种。本团队前期研究发现，暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的核基因 *SH3PX3* 存在一个 SNP 位点，即暗纹东方鲀为 TT 型，红鳍东方鲀 CC 型，杂交 F_1 代为 TC 型，该位点位于外显子片段，为同义突变，未改变编码的氨基酸，不会影响蛋白质的功能。利用核基因 *SH3PX3* 所筛选的 SNP 位点，通过直接测序的方法，可以实现暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及杂交 F_1 代样品的准确鉴别。然而，该方法面对大量样本的检测需求时，测序成本较为高昂，测序过程中产生的庞大、复杂的数据，对于科研人员的数据分析能力提出了更高的要求。因此，亟需开发一种快速、灵敏、精确的检测方法，实现三者的快速准确鉴定。

近年来，实时荧光定量 PCR 技术因具备高灵敏度、快速性和强特异性等优势，在基因表达、突变以及多态性研究领域获得了广泛应用(高正琴等, 2011)。TaqMan-MGB 探针能够精准区分单个碱基的差异，常用于 SNP 分型，既省去了普通 PCR 检测中扩增产物的后续分析与验证，简化了检测流程，也减少了实验操作中的污染风险，提高了检测的安全性。目前，该技术已广泛应用于鱼类的病毒检测(谭翰清等, 2013; 马冬梅等, 2011)和成分检测领域(李杰等, 2022)，在鱼类杂交种及亲本鉴定领域的应用尚未见报道。本研究结合线粒体 *COI* 基因和核基因 *SH3PX3* 的 SNP 位点，优化并引入了 TaqMan-MGB 荧光探针，优化了荧光 PCR 参数，建立了用以区分暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的荧光 PCR 快速鉴定方法，以期为河鲀种质资源保护及养殖业的可持续发展提供可靠的技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

河鲀样品共计 121 份，其中暗纹东方鲀 27 份、红鳍东方鲀 31 份、杂交 F1 代 63 份，样品信息详见表 1。将样品的肌肉组织固定于 95%酒精中备用，取暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及杂交 F_1 代样品各 10 份，用于荧光 PCR 方法的建立；剩余样品用于方法的验证。

表 1 样品信息

Tab.1 Sources of sample information

样品 Sample	数量 Quantity	来源 Source
红鳍东方鲀 *T. rubripes*	27	山东青岛近海 (野生)
红鳍东方鲀 *T. rubripes*	4	辽宁大连天正实业 有限公司(养殖)
暗纹东方鲀 *T. obscurus*	4	江苏中洋集团股份 有限公司(养殖)
暗纹东方鲀 *T. obscurus*	23	中洋渔业发展(广东) 有限公司(养殖)
杂交 F_1 代 (*T. obscurus* ♀ × *T. rubripes* ♂)	63	江苏中洋集团股份 有限公司(养殖)

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 本研究利用海洋生物组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根)提取河鲀样本中的 DNA，并将提取后的 DNA 使用 Nano300 微量分光光度计进行 DNA 浓度和纯度测定，置于–20 ℃中保存。

1.2.2 引物和探针的设计合成　根据前期研究发现的 *SH3PX3* 基因多态性 SNP 位点(T/C)设计荧光 PCR 扩增引物和 MGB 分型探针，荧光探针 1 与荧光探针 2 分别选取 FAM (蓝色)、HEX(绿色)荧光素进行标记；线粒体 *COI* 基因引物序列参考 Ward 等(2009)的研究。引物特异性使用 Primer-BLAST 工具在 NCBI 数据库中进行验证。引物和探针由北京六合华大基因科技有限公司合成。序列详情见表 2。

表 2　引物和探针序列
Tab.2　Primer and probe sequences

引物/探针 Primer/Probe	序列 Sequence (5′~3′)	T_m/℃
COI-F	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	55
COI-R	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	55
SH3PX3-F	GAGCCCGCAGCCTTTCT	59
SH3PX3-R	ATGTACGTCTTGATGCCCTTGA	59
P2-TR	FAM-TGCTCCATTGAAGATGCCAC-MGB	48
P2b-TO	HEX-TGCTCCATCGAAGATGCCAC-MGB	48

1.2.3 线粒体 *COI* 基因扩增体系　PCR 扩增体系为 25 μL，其中，2×Rapid *Taq* Master Mix (南京诺唯赞) 12.5 μL，DNA 模板 2 μL，上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL，水 8.5 μL。PCR 程序：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s；55 ℃退火 30 s；72 ℃延伸 20 s，共 35 个循环；72 ℃延伸 5 min，4 ℃保存。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后送至北京六合华大基因科技有限公司进行双向测序，测序结果通过 NCBI 中的 BLAST 工具进行序列比对。

1.2.4 荧光 PCR 扩增体系及优化　为确保荧光 PCR 实验扩增结果的一致性，将所有样品 DNA 浓度稀释至 200 ng/μL。每个反应 3 个平行实验。荧光 PCR 的扩增体系为 25 μL，含荧光 PCR Mix 预混液(青岛立见) 12.5 μL，DNA 模板 5 μL，引物(20 μmol/L)各 0.5 μL，探针(10 μmol/L)各 0.5 μL，水 5.5 μL。PCR 条件：37 ℃ 2 min；95 ℃ 2 min；95 ℃ 15 s，48 ℃ 30 s (收集荧光信号)，45 个循环。

1.2.5 数据分析　使用 SeqMan 软件对 *COI* 基因测序原始序列进行校对和拼接，采用 MEGA 7.0 构建邻接法(neighbor-joining, NJ)分子系统发育树，系统发育树分支的置信度利用 Bootstrap 检验，重复次数为 1 000。

荧光 PCR 结束后，导出扩增曲线及 FAM、HEX 通道的 Ct 值，计算 Ct±SD 和 ΔCt (|FAM–HEX|)。

2　结果与分析

2.1　暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的 *COI* 基因鉴别结果

所有样品均成功扩增，有效序列长度为 603 bp。所得序列经 BLAST 比对分析表明，27 份暗纹东方鲀和 31 份红鳍东方鲀的 *COI* 基因均与 NCBI 数据库中靶标种类的 *COI* 基因片段同源性为 100%。63 份杂交 F_1 代的 *COI* 基因与暗纹东方鲀 *COI* 基因的同源性为 100%。使用本研究测定的部分序列和 6 条从 NCBI 数据库下载的线粒体 *COI* 基因序列，以绿鳍马面鲀(*Thamnaconus modestus*)为外群，构建 NJ 系统发育树。结果表明，本研究自测的杂交 F_1 代亲本序列与下载的 6 条参考序列均以较高的支持率分别聚类，且杂交 F_1 代分别与母本暗纹东方鲀聚为一支(图 1)。可见 *COI* 基因仅可对杂交 F_1 代的母本进行溯源。

2.2　荧光 PCR 结果分析

2.2.1 最佳退火温度筛选　以基因组 DNA 为模板，设置退火温度分别为 48 ℃、50 ℃、56 ℃时进行荧光 PCR 扩增。结果如图 2a 所示，退火温度为 48 ℃时扩增曲线为 S 型，线型流畅，扩增效率较好，表明荧光 PCR 正常，目标序列成功扩增，且反应体系无异常，表 3 中的扩增结果有明显差异。图 2b 和图 2c 的扩增曲线线型不流畅，表 3 中的 Ct 值大于 35，超出检测范围。因此，本研究后续荧光 PCR 参数设定为：37 ℃ 2 min；95 ℃ 2 min；95 ℃ 15 s，48 ℃ 30 s，循环 45 次。

2.2.2 荧光 PCR 方法的建立　利用优化后的荧光 PCR 程序对 10 份暗纹东方鲀(编号 TO1~TO10)、10 份红鳍东方鲀(编号 TR1~TR11)和 10 份杂交 F_1 代(编号 1~10)样品进行扩增，所有样品均成功扩增。暗纹东方鲀样品仅在 FAM 检测通道呈现特异性扩增，ΔCt 大于 20 (图 3a，附表 1)；红鳍东方鲀样品在 FAM 和 HEX 检测通道均显示扩增，FAM 通道的 Ct 值在 20~30 之间，HEX 通道的 Ct 值在 20~26 之间，ΔCt 为 2~5 (图 3b,附表 1)；杂交 F_1 代样品在 FAM 和 HEX 检测通道的均显示扩增，FAM 通道和 HEX 通道 Ct

图 1 暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的 *COI* 基因序列 NJ 系统树

Fig.1 The NJ phylogenetic tree of *COI* gene sequences for *T. obscurus*, *T. rubripes*, and their hybrid F_1 generation

TR 为自测红鳍东方鲀序列，TO 为自测暗纹东方鲀序列，ZJ 为自测杂交 F_1 代序列。

TR represents the self-determined sequences of *T. rubripes*, TO represents the self-determined sequences of *T. obscurus*, and ZJ represents the self-determined sequences of the hybrid pufferfish.

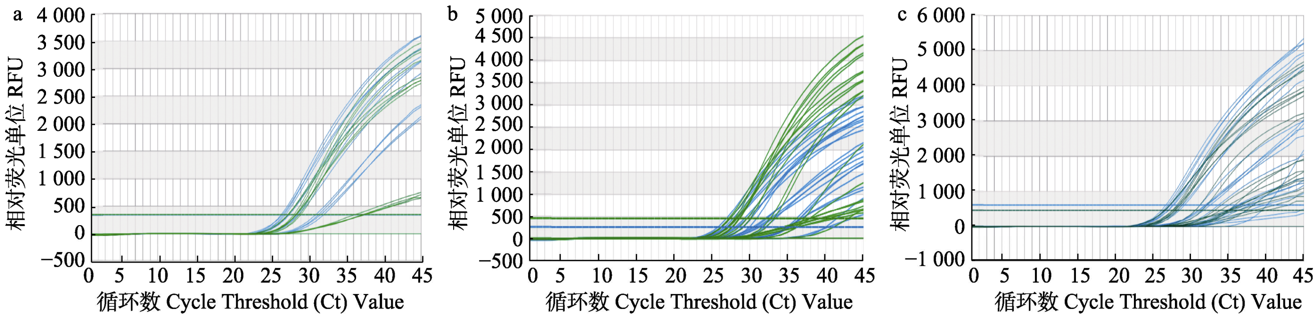

图 2 退火温度分别为 48 ℃(a)、50 ℃(b)和 56 ℃(c)的扩增曲线

Fig.2 Amplification curves at annealing temperature of 48 ℃(a), 50 ℃(b), and 56 ℃(c)

值均在 20~30 之间，ΔCt 小于 2 (图 3c，附表 1)。综上，FAM 单通道扩增，ΔCt 大于 20 的样品可判定为暗纹东方鲀；FAM、HEX 通道均有扩增且 ΔCt 为 2~5 的样品可判定为红鳍东方鲀；FAM、HEX 通道均有扩增且 ΔCt 小于 2 的样品可判定为杂交 F_1 代。

2.3 荧光 PCR 方法的验证

利用 91 份已知遗传背景的河鲀样品对上述方法进行验证，结果见图 4。所有样品均成功扩增，编号为 TO11~TO27 的 17 份样品经荧光 PCR 扩增后仅有 FAM 通道有 Ct 值，ΔCt 大于 20，鉴定为暗纹东方鲀。编号为 TR11~TR31 的 21 份样品的 ΔCt 为 2~5，鉴定为红鳍东方鲀。编号为 11~53 的 53 份样品经荧光 PCR 扩增后 ΔCt 小于 2，鉴定为杂交 F_1 代。经与样品背景信息比对后鉴定结果准确率为 100%。

表 3　退火温度为 48 ℃、50 ℃和 56 ℃时的 Ct 值

Tab.3　Ct values at annealing temperature of 48 ℃, 50 ℃, and 56 ℃

退火温度 Annealing temperature	样品编号 Sample No.	Ct					
		FAM	HEX	FAM	HEX	FAM	HEX
48 ℃	TO1	20.98	–	21.24	–	20.52	–
	TO2	20.59	–	20.58	–	20.46	–
	TR1	25.42	22.86	25.36	22.66	25.34	22.58
	TR2	26.38	22.87	26.85	23.06	26.37	23.07
	1	20.65	20.48	20.90	20.52	20.43	20.15
	1	21.01	20.68	21.29	20.88	20.98	20.65
50 ℃	TO1	26.32	39.41	25.81	37.91	26.01	38.79
	TO2	26.68	40.56	26.32	37.90	26.45	39.67
	TR1	31.15	28.70	30.79	28.70	31.42	28.74
	TR2	31.32	28.61	30.48	28.08	31.01	28.50
	1	28.36	28.39	28.18	28.23	28.13	28.20
	1	27.12	27.44	27.03	27.06	27.10	27.13
56 ℃	TO1	27.68	34.88	27.01	38.22	27.24	38.30
	TO2	26.73	36.12	27.30	39.65	27.02	39.42
	TR1	31.92	28.00	32.62	28.27	31.98	28.02
	TR2	32.07	27.60	32.23	27.80	32.46	27.94
	1	28.90	27.59	28.22	27.55	28.91	27.64
	2	27.39	26.50	27.76	26.57	26.89	26.32

注：“–”代表无 Ct 值。样品编号 TO1、TO2 为暗纹东方鲀，TR1、TR2 为红鳍东方鲀，1、2 为杂交 F_1 代。

Note: “–” represents no Ct value. Samples TO1 and TO2 were *T. obscurus*, TR1 and TR2 were *T. obscurus*, and 1 and 2 were hybrid F_1 generation.

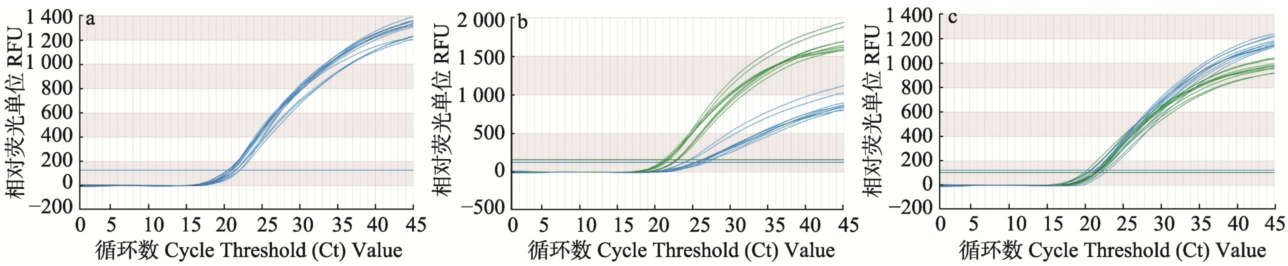

图 3　暗纹东方鲀(a)、红鳍东方鲀(b)及其杂交 F_1 代(c)样品的荧光 PCR 扩增曲线

Fig.3　Fluorescence PCR amplification curves of *T. obscurus* (a), *T. rubripes* (b), and their hybrid F_1 generation (c)

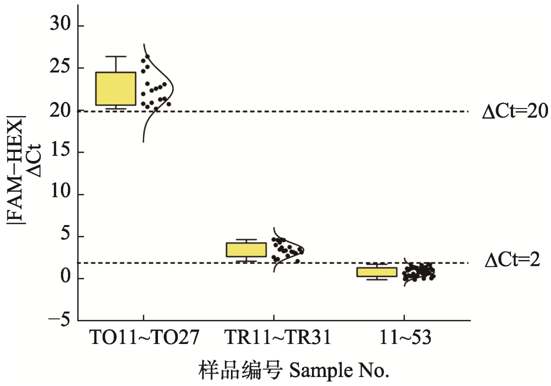

图 4　91 份样品的 ΔCt 值分布

Fig.4　Distribution of ΔCt values in 91 samples

3　讨论

3.1　杂交 F_1 代及其亲本鉴定方法

虽然暗纹东方鲀与红鳍东方鲀在体色与斑纹、体型与比例及鳍条数量等形态特征上存在差异，但其杂交 F_1 代通常表现为亲本特征的混合或中间型，尤其在幼体或未成熟阶段，三者的外部形态极为相似，仅通过形态学特征很难区分，需要结合分子标记手段对其鉴定。本研究通过线粒体 *COI* 基因对暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的序列同源性、系统进化

树分析，结果显示，线粒体 *COI* 可有效鉴别暗纹东方鲀和红鳍东方鲀，但由于线粒体基因的母系遗传特性，无法实现杂交 F_1 代与其母本的有效鉴定(图 1)。郑乐云(2014)研究表明，赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)和云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)正反交子一代的线粒体 *COI*、*16S rDNA*、*Cyt b* 基因序列类型分别与母本的序列类型一致。吴文化(2010)研究发现，线粒体 DNA 条形码技术能够有效鉴别纯种鲟，并准确鉴定鲟杂交子代的母系来源，但对母系来源相同的杂交鲟鱼品种则无法实现有效区分。

有研究表明，基于所筛选的 SNP 位点建立荧光 PCR 方法可以实现物种的快速鉴定。吴锐琼等(2024)筛选了福建省内野生棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*)两个不同种群间的 *12S rRNA* 基因的 SNP 位点，并利用 KASP 技术开发了一种针对这两个群体的特异性 SNP 快速分型方法。冯俊彦等(2022)利用简化基因组测序技术对甘薯(*Dioscorea esculenta*)种质材料进行 SNP 位点筛选，并利用 HRM 技术实现了对不同基因型的准确区分。核基因具有双亲遗传特性，利用单核苷酸多样性(SNP)分子标记技术，结合线粒体基因，能够精准鉴别杂交种及其亲本。本团队前期通过核基因 *SH3PX3* 筛选到一个 SNP 位点(T/C)，该位点可有效鉴别暗纹东方鲀(TT 型)、红鳍东方鲀(CC 型)及其杂交 F1 代(TC 型)。本研究利用该位点，设计荧光 PCR 扩增引物及探针，优化了荧光 PCR 参数，建立了暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的荧光 PCR 鉴定方法，相较于传统形态学鉴定和线粒体基因鉴定方法，该方法在操作简便性、检测时效性和通量方面均实现了显著提升，为暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的准确鉴定提供了有力的技术支撑。

3.2 荧光 PCR 快速鉴别方法的有效性

SNP 位点的检测方法主要包括直接测序法和 TaqMan 探针法等。本研究前期利用河鲀核基因 *SH3PX3* 的 SNP 位点对暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及杂交 F_1 代进行鉴定，通过直接测序方法获得鉴定结果，但该方法难以满足大批量样本的同步鉴定需求，操作流程较为繁琐复杂。TaqMan-MGB 探针法在操作步骤、定量能力、检测时间等方面均表现出显著优势，能够快速、准确区分杂合子(杂交种)和纯合子(亲本)，因此，本研究采用了 TaqMan-MGB 探针，建立了鉴定暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的荧光 PCR 方法。与普通 TaqMan 探针相比，本研究采用的 MGB 探针的 3'端存在一个能插入 DNA 的小沟结合物(Minor Groove Binder, MGB)，提高了检测的灵敏性和特异性，克服了普通 TaqMan 探针假阳性率较高的缺点(吕燕等, 2022; 郭立新等, 2020)。TaqMan-MGB 探针技术已成功应用于植物、作物等物种鉴定领域(郭立新等, 2020; Endo *et al*, 2020; 李忠华等, 2021; 张田等, 2021; 吴明生等, 2015)，在鱼类杂交种及其亲本鉴定领域尚未见到报道。本研究首次将该技术应用于杂交种及亲本鉴定领域，且探针所选取的 FAM 通道和 HEX 通道与多数荧光检测设备兼容，能够实时监测结果，省去电泳及核酸测序等步骤，操作更加便捷，整个鉴定流程控制在 2 h 以内。结果判读也较为简单，仅通过两个荧光通道的 Ct 值差异，就可轻松实现暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的准确鉴别，方法建立与验证阶段的样品扩增结果一致，证实了该方法的准确性、稳定性、特异性，开拓了新方法。

4 结论

本研究利用线粒体 *COI* 基因对暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代进行了序列相似性比对、NJ 进化树分析，准确鉴别了杂交 F_1 代的母系遗传信息；针对核基因 *SH3PX3* 的 SNP 位点，设计荧光 PCR 扩增引物及探针，优化了荧光 PCR 参数，建立了快速鉴别暗纹东方鲀、红鳍东方鲀及其杂交 F_1 代的荧光 PCR 方法，实现了杂交 F_1 代及其亲本的快速、准确和高通量鉴别。本研究结果后续可用于杂交河鲀的亲本溯源，避免杂交子代逃逸或误入亲本群体导致种质混乱的情况发生，为河鲀种质资源鉴定与保护、杂交育种和遗传多样性研究提供了技术支持。

参 考 文 献

冯俊彦, 郎涛, 张聪, 等. 基于简化基因组测序技术的甘薯 HRM 分子标记开发及其应用. 核农学报, 2022, 36(7): 1350–1361 [FENG J Y, LANG T, ZHANG C, *et al*. Development and application of HRM molecular markers in sweet potato based on reduced-representation sequencing. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(7): 1350–1361]

高正琴, 邢进, 冯育芳, 等. TaqMan MGB 探针实时荧光定量 PCR 快速检测布鲁氏菌. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(11): 995–1000 [GAO Z Q, XING J, FENG Y F, *et al*. Development of a TaqMan MGB-probe based real-time fluorescence quantitative PCR assay for rapid detection of *Brucella*. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27(11): 995–1000]

郭立新, 段丽君, 王英超, 等. 基于 TaqMan MGB 探针的葡萄茎枯病菌实时荧光 PCR 检测方法. 植物病理学报, 2020, 50(1): 97–106 [GUO L X, DUAN L J, WANG Y C, *et* *al*. TaqMan MGB-based real-time PCR method for the detection of *Didymella glomerata*. Acta Phytopathologica Sinica, 2020, 50(1): 97–106]

李杰, 钱云开, 王建昌. 鱼肉制品中龙利鱼和巴沙鱼的鱼源性成分的双重实时荧光 PCR 快速检测法. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(3): 539–545 [LI J, QIAN Y K, WANG J C. Dual real-time PCR method for rapid detection of sole fish and *Pangasius bocourti*-derived components in fish products. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(3): 539–545]

李楠, 王佳慧, 韩春卉, 等. *COI* 及 *cytb* 基因对河鲀鱼鱼种鉴定的适用性研究. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 6–11 [LI N, WANG J H, HAN C H, *et al*. Application of *COI* and *cytb* gene in species identification of pufferfish. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(1): 6–11]

李培, 刘丽, 谭围, 等. 奥尼罗非鱼杂交子代及亲本 mtDNA D-loop 基因序列的多态性. 广东海洋大学学报, 2009, 29(6): 12–15 [LI P, LIU L, TAN W, *et al*. Polymorphism of the mitochondrial DNA D-loop gene sequences of *Oreochromis niloticus*, *O. aureus* and their hybrids. Journal of Guangdong Ocean University, 2009, 29(6): 12–15]

李忠华, 杨宝, 马宁, 等. 人参实时荧光定量PCR快速鉴别方法. 山西大学学报(自然科学版), 2021, 44(3): 609–616 [LI Z H, YANG B, MA N, *et al*. Method for rapid identification of *Panax ginseng* based on real-time fluorescence quantitative PCR. Journal of Shanxi University (Natural Science), 2021, 44(3): 609–616]

刘凯莹. 鲀形目鱼类 DNA 条形码及物种快速鉴定技术研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2023 [LIU K Y. The research of DNA barcoding of Tetraodontiformes and their identification. Master’s Thesis of Shanghai Ocean University, 2023]

吕燕, 段维军. 基于 TaqMan MGB 探针的山茶叶杯菌实时荧光 PCR 快速检测方法. 园艺学报, 2022, 49(3): 663–670 [LÜ Y, DUAN W J. TaqMan MGB-based real-time fluorescence PCR method for the rapid detection of *Ciborinia camelliae*. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(3): 663–670]

马波, 李雷, 王继隆, 等. 雅鲁藏布江拉萨裂腹鱼、异齿裂腹鱼及其自然杂交种的形态与 COI 基因条形码分析. 中国水产科学, 2018, 25(4): 753–761 [MA B, LI L, WANG J L, *et al*. Morphological and COI gene barcode analyses of *Schizothorax waltoni*, *S. o’connori* and their natural hybrids in the Yarlung Zangbo River. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(4): 753–761]

马冬梅, 白俊杰, 邓国成, 等. 大口黑鲈溃疡综合征病毒 TaqMan-MGB 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立. 华南农业大学学报, 2011, 32(2): 99–102 [MA D M, BAI J J, DENG G C, *et al*. Development of a TaqMan-MGB real time PCR assay for largemouth bass ulcerative syndrome virus detection. Journal of South China Agricultural University, 2011, 32(2): 99–102]

苏锦祥, 李春生. 中国动物志: 硬骨鱼纲. 鲀形目, 海蛾鱼目, 喉盘鱼目, 鮟鱇目. 北京: 科学出版社, 2002, 1–297 [SU J X, LI C S. Fauna of China Osteichthyes: Osteichthyes, Tetraodontiformes, Pegasiformes, Gobiesociformes, Lophiiformes. Beijing: Science Press, 2002, 1–297]

孙斌华, 俞雅文, 陈校辉, 等. 浅谈鱼类育种技术. 水产养殖, 2024, 45(12): 45–49 [SUN B H, YU Y W, CHEN X H, *et al*. Discussion on fish breeding technology. Journal of Aquaculture, 2024, 45(12): 45–49]

谭翰清, 谭海芳, 林凤, 等. 香港海鸥形菌 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 的建立与应用. 热带医学杂志, 2013, 13(1): 39–42 [TAN H Q, TAN H F, LIN F, *et al*. Development and application of real-time PCR for *Laribacter hongkongensis*. Journal of Tropical Medicine, 2013, 13(1): 39–42]

王熠. 常见河鲀 DNA 条形码的构建及快速鉴定. 中国计量大学硕士研究生学位论文, 2018 [WANG Y. The construction of DNA barcoding of common pufferfish and rapid identification. Master’s Thesis of China University of Metrology, 2018]

吴明生, 赵海艳, 宋歌, 等. 利用 TaqMan-SNP 基因分型技术快速鉴别玉米杂交种与其亲本. 种子, 2015, 34(1): 117–119 [WU M S, ZHAO H Y, SONG G, *et al*. Rapid discrimination of maize hybrids variety and theirs parents through TaqMan SNP genotyping technology. Seed, 2015, 34(1): 117–119]

吴锐琼, 张雪萍, 杨理程, 等. 基于线粒体 *12S* 基因分析福建省棘胸蛙不同地理种群遗传多样性. 福建农业科技, 2024, 55(7): 10−16 [WU R Q, ZHANG X P, YANG L C, *et al*. Analysis on genetic diversity of different geographical populations of *Quasipaa spinosa* in Fujian Province based on the mitochondrial *12S* gene. Fujian Agricultural Science and Technology, 2024, 55(7): 10−16]

吴文化. 几种鲟鱼及杂交种 DNA 条形码研究及分子鉴别. 内蒙古农业大学硕士研究生学位论文, 2010 [WU W H. DNA barcoding studying and molecular identification of sturgeons and their hybrids. Master’s Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2010]

伍汉霖, 陈永豪. 我国的河鲀鱼及其毒素. 动物学杂志, 1981, 16(1): 75–79 [WU H L, CHEN Y H. Fish and their toxins in China. Chinese Journal of Zoology, 1981, 16(1): 75–79]

徐杰杰. 暗纹东方鲀全基因组微卫星标记的开发及应用. 南京师范大学硕士研究生学位论文, 2021 [XU J J. Development of genome-wide microsatellite markers in *Takifugu obscurus* and applications. Master’s Thesis of Nanjing Normal University, 2021]

杨子豪, 夏若成, 蒋志伟, 等. 基于线粒体 DNA 和核 DNA 遗传标记的中华鲟种属鉴定. 中国司法鉴定, 2024(1): 61–65 [YANG Z H, XIA R C, JIANG Z W, *et al*. Species identification of *Acipenser sinensis* based on mitochondrial DNA and nuclear DNA genetic markers. Chinese Journal of Forensic Sciences, 2024(1): 61–65]

尹璐, 龚小玲, 鲍宝龙. 东海海区东方鲀属鱼类的杂交现象.

上海海洋大学学报, 2016, 25(3): 359–366 [YIN L, GONG X L, BAO B L. Occurrence of hybrid among *Takifugu* in East China Sea. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(3): 359–366]

张年国, 潘桂平, 周文玉, 等. 菊黄东方鲀、暗纹东方鲀及其杂交 F_1 代肌肉营养成分的比较分析. 动物学杂志, 2016, 51(4): 633–641 [ZHANG N G, PAN G P, ZHOU W Y, *et al*. Comparative analysis on the muscle nutrient composition of tawny puffer (*Takifugu flavidus*), obscura puffer (*T. obscures*) and their hybrid F_1 generation. Chinese Journal of Zoology, 2016, 51(4): 633–641]

张田, 陈娇, 蒋瑞平, 等. TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 法检测太白贝母及其近缘种的研究. 药学学报, 2021, 56(9): 2577–2583 [ZHANG T, CHEN J, JIANG R P, *et al*. Identification of *Fritillaria taibaiensis* and its relatives by real-time PCR with a TaqMan-MGB probe. Acta Pharmaceutica Sinica, 2021, 56(9): 2577–2583]

赵海涛, 万玉美, 张福崇, 等. 菊黄东方鲀(♀)×红鳍东方鲀(♂) F_1 代及其亲本肌肉营养成分的比较分析. 大连海洋大学学报, 2013, 28(1): 77–82 [ZHAO H T, WAN Y M, ZHANG F C, *et al*. Comparison of muscular components of crossbreed F_1 between puffer *Takifugu flavidus* (♀) and *T. rubripes* (♂) and its parents. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(1): 77–82]

郑乐云. 云纹石斑鱼和赤点石斑鱼杂交子一代线粒体相关基因的母性遗传特征分析. 上海海洋大学学报, 2014, 23(3): 351–358 [ZHENG L Y. Analysis of maternal inheritance of mitochondrial genes between two crossing grouper hybrids and their parents. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(3): 351–358]

邹杰, 马爱军, 王新安, 等. 鱼类育种技术研究进展. 渔业信息与战略, 2013, 28(3): 199–207 [ZOU J, MA A J, WANG X A, *et al*. Progress on techniques of fish breeding. Fishery Information & Strategy, 2013, 28(3): 199–207]

ENDO T, FUJII H, YOSHIOKA T, *et al*. TaqMan-MGB SNP genotyping assay to identify 48 *Citrus cultivars* distributed in the Japanese market. Breeding Science, 2020, 70(3): 363–372

PARK I S, LIM S Y, LEE T H, *et al*. Various characteristics of hybrid between river puffer, *Takifugu obscurus* and tiger puffer, *T. rubripes*, and their hybrid triploid. Development & Reproduction, 2017, 21(2): 181–191

QU M, TANG W, LIU Q H, *et al*. Genetic diversity within grouper species and a method for interspecific hybrid identification using DNA barcoding and RYR3 marker. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2018, 121: 46–51

WARD R D, HANNER R, HEBERT P D N, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species: The campaign to DNA barcode all fishes. Journal of Fish Biology, 2009, 74(2): 329–356

(编辑 冯小花)

附表 1 荧光 PCR 扩增 Ct 值

Appendix 1 The Ct value results of fluorescence PCR amplification

样本编号 Sample No.	通道 Channel	Ct				
		重复一 rep1	重复二 rep2	重复三 rep3	Ct±SD	ΔCt (|FAM−HEX|)
TO1	FAM	20.98	21.24	20.52	20.91±0.36	20.91
	HEX	–	–	–	–	
TO2	FAM	20.59	20.58	20.46	20.54±0.07	20.54
	HEX	–	–	–	–	
TO3	FAM	21.40	20.63	21.06	21.03±0.39	21.03
	HEX	–	–	–	–	
TO4	FAM	20.01	20.18	20.05	20.08±0.09	20.08
	HEX	–	–	–	–	
TO5	FAM	21.68	20.70	21.32	21.23±0.49	21.23
	HEX	–	–	–	–	
TO6	FAM	22.14	21.62	21.30	21.69±0.43	21.69
	HEX	–	–	–	–	
TO7	FAM	25.59	25.55	25.69	25.61±0.07	25.61
	HEX	–	–	–	–	
TO8	FAM	23.46	23.32	23.40	23.39±0.07	23.39
	HEX	–	–	–	–	

续表

样本编号 Sample No.	通道 Channel	Ct				
		重复一 rep1	重复二 rep2	重复三 rep3	Ct±SD	ΔCt (|FAM−HEX|)
TO9	FAM	20.33	20.31	21.06	20.57±0.43	20.57
	HEX	–	–	–	–	
TO10	FAM	22.64	23.11	22.54	22.76±0.29	22.76
	HEX	–	–	–	–	
TR1	FAM	25.42	25.36	25.34	25.37±0.04	2.71
	HEX	22.86	22.66	22.58	22.70±0.14	
TR2	FAM	26.38	26.85	26.37	26.53±0.26	3.53
	HEX	22.87	23.06	23.07	23.00±0.11	
TR3	FAM	25.39	25.34	25.14	25.29±0.13	3.87
	HEX	21.40	21.57	21.30	21.42±0.14	
TR4	FAM	28.57	28.68	28.52	28.59±0.08	3.89
	HEX	24.72	24.79	24.60	24.70±0.10	
TR5	FAM	27.26	27.49	27.56	27.44±0.15	2.55
	HEX	25.04	24.67	24.92	24.88±0.19	
TR6	FAM	24.05	24.37	24.35	24.26±0.17	2.89
	HEX	21.60	21.16	21.36	21.37±0.22	
TR7	FAM	25.67	25.35	25.02	25.35±0.33	3.26
	HEX	22.10	22.04	22.13	22.09±0.05	
TR8	FAM	27.13	27.34	27.03	27.17±0.16	2.44
	HEX	24.36	24.86	24.05	24.42±0.41	
TR9	FAM	25.43	25.49	25.53	25.48±0.05	2.36
	HEX	23.01	23.20	23.14	23.12±0.10	
TR10	FAM	29.23	28.65	28.79	28.89±0.31	2.45
	HEX	26.89	26.32	26.12	26.44±0.41	
1	FAM	20.65	20.90	20.43	20.66±0.24	0.28
	HEX	20.48	20.52	20.15	20.38±0.19	
2	FAM	21.01	21.29	20.98	21.09±0.16	0.26
	HEX	20.68	20.88	20.65	20.74±0.12	
3	FAM	23.75	23.96	23.57	23.76±0.20	0.05
	HEX	23.40	24.04	23.98	23.81±0.35	
4	FAM	21.64	21.70	21.60	21.65±0.05	0.01
	HEX	21.65	21.84	21.42	21.64±0.21	
5	FAM	21.11	21.43	21.33	21.29±0.16	0.26
	HEX	21.29	21.95	21.41	21.55±0.35	
6	FAM	24.07	23.58	23.79	23.81±0.25	0.49
	HEX	23.26	23.23	23.46	23.32±0.12	
7	FAM	22.52	22.52	22.55	22.53±0.02	0.55
	HEX	1.96	22.00	21.99	21.98±0.02	
8	FAM	24.68	24.18	24.57	24.48±0.26	1.75
	HEX	23.22	22.33	22.64	22.73±0.45	
9	FAM	25.09	24.97	24.43	24.83±0.33	1.29
	HEX	23.98	23.43	23.20	23.54±0.39	
10	FAM	21.02	21.12	20.95	21.03±0.09	0.61
	HEX	20.44	20.46	20.36	20.42±0.05	

Establishment of Fluorescence PCR Identification Techniques for *Takifugu obscurus*, *T. rubripes*, and Their Hybrid F_1 Generation

ZHAO Xin[1,2], CHE Shuai[2], WANG Huan[2], SUN Zhenlong[4],
YOU Yingzhe[5], LIU Shufang[2,3①], ZHUANG Zhimeng[2]

(1. *Marine Fishery College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan* 316022, *China*; 2. *State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071, *China*; 3. *Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao* 266237, *China*; 4. *Jiangsu Zhongyang Group Co., Ltd., Nantong* 226600, *China*; 5. *Zhangzhou Fisheries Technical Extension Station, Zhangzhou* 363000, *China*)

Abstract Pufferfish, commonly known as "fugu," belong to the family Tetraodontidae within the class Actinopterygii. With a wide variety of species, the genus *Takifugu* has the highest number of members and the greatest economic value. Notable representatives include *Takifugu obscurus* and *T. rubripes*. These two pufferfish species are characterized by their tender and delicious flesh as well as their high nutritional value. They are widely used in aquaculture, pufferfish toxin pharmaceutical development, and vertebrate genome research, thus holding significant economic, scientific, and medicinal value. *T. obscurus* is primarily distributed along the coasts of the Yellow, Bohai, and East China Seas in China. It can also enter the middle and lower reaches of rivers such as the Yangtze River and other connected lakes. It is one of China's important freshwater economic aquaculture species. Due to its high fat content and strong edibility, it is highly favored by domestic consumers, especially those who enjoy cooking. However, issues associated with aquaculture, such as small body size, slow growth, and sensitivity to low temperatures, have led to weaker market competitiveness. *T. rubripes* is mainly found in the Yellow Sea, East China Sea, and Taiwan waters of China. It is widely cultured in northern China, Japan, and South Korea and is suitable only for marine aquaculture. Compared to *T. obscurus*, *T. rubripes* has a faster growth rate and larger body size. However, when facing nutritional deficiency, its larvae may engage in cannibalism. After multiple generations of self-crossing, the germplasm of *T. rubripes* has degraded, with issues such as deformities and diseases severely impacting breeders.

Hybrid breeding combines superior traits of parents to produce new hybrid varieties with improved characteristics. To obtain varieties with better traits and meet the rapidly developing needs of the pufferfish industry, aquaculture farmers have utilized the principle of hybrid vigor to increase production and efficiency. They have crossed *T. obscurus* (♀) with *T. rubripes* (♂) to produce hybrid F_1 offspring with good market prospects. The hybrid F_1 generation inherits the fast growth rate and large body size of the paternal parent (*T. rubripes*) and the freshwater culture capability of the maternal parent (*T. obscurus*). Therefore, the hybrid pufferfish not only retains the freshwater culture capability but also achieved improved growth rates and yields. However, the hybrid F_1 generation has morphological features that blended with those of the parents. *T. obscurus*, *T. rubripes*, and their hybrid F_1 generations are similar in appearance and body size at the larval, juvenile, and adult stages, making it impossible to distinguish them by naked eye observation. Additionally, certain tissues or processed meat products of pufferfish cannot be differentiated based on appearance alone. In recent years, the hybrid offspring, which share similar morphological features with their parents, have been easily mixed into the parental

① Corresponding author: LIU Shufang, Email: liusf@ysfri.ac.cn

groups used for hybrid breeding. This has led to prominent issues in pufferfish aquaculture, such as mixed germplasm, serious quality degradation, and uncontrolled hybridization. The escape of hybrid individuals can also affect the gene pool of wild populations, which is not conducive for protecting germplasm resources. Accurate species identification is not only essential for distinguishing pufferfish species but also promotes the rational development of fishery resources, ecological surveys, and biodiversity conservation. Therefore, there is an urgent need for a method to distinguish between *T. obscurus*, *T. rubripes*, and their hybrid F_1 generation.

In our previous research, we identified a single nucleotide polymorphism (SNP) site in the *SH3PX3* nuclear gene, which combined with mitochondrial genes, can be used to identify *T. obscurus*, *T. rubripes*, and their hybrid F_1 generation. Direct sequencing of SNP sites can differentiate between the three. However, when faced with a large number of samples, the sequencing cost is relatively high, and the vast and complex data generated during sequencing impose higher demands on researchers' data analysis capabilities. In recent years, the TaqMan probe method based on fluorescence PCR has been widely used for gene expression, mutation, and polymorphism research because of its high sensitivity, speed, and specificity. Compared to ordinary TaqMan probes, TaqMan-MGB probes can accurately distinguish single-base differences and are commonly used for SNP genotyping.

In the present study, we designed fluorescence PCR amplification primers and probes based on the polymorphic SNP site of the *SH3PX3* nuclear gene, optimized the fluorescence PCR parameters, and established a fluorescence PCR identification method for *T. obscurus*, *T. rubripes*, and their hybrid F_1 generation. This method was validated, with the results showing that: (1) The *COI* sequence of the hybrid F_1 generation was 100% identical to that of the maternal parent *T. obscurus*, and they clustered together in the NJ phylogenetic tree, making it impossible to distinguish between the hybrid F_1 and the maternal parent; (2) The optimal annealing temperature for the *SH3PX3* gene fluorescence PCR system was 48℃; (3) After fluorescence PCR amplification, only the FAM channel of *T. obscurus* has a Ct value, and the ΔCt is greater than 20, *T. rubripes* had a Ct value in the FAM channel that was 2 to 5 higher than that in the HEX channel, and the Ct values of the FAM and HEX channels in the hybrid F_1 were close, with a difference of less than 2; (4) Based on the above method, 17 samples of *T. obscurus*, 21 samples of *T. rubripes*, and 53 samples of hybrid F_1 were verified, with an identification accuracy rate of 100%. The fluorescence PCR identification method established in this study not only provides accurate results and easy interpretation, but also avoids cumbersome processes such as sequencing. It can achieve high-throughput detection and significantly improve detection efficiency. This method offers technical support for the identification and protection of pufferfish germplasm resources, hybrid breeding, and genetic diversity research.

Key words　*Takifugu obscurus*; *Takifugu rubripes*; Hybrid F_1; *SH3PX3* gene; Fluorescence PCR; Species identification