

微卫星 DNA 标记在大口黑鲈亲权鉴定中的应用

何小燕^{1,2}, 白俊杰², 刘小林¹, 樊佳佳^{2,3}, 何小平², 李胜杰², 叶 星²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 热带亚热带鱼类选育
与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380; 3 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

[摘 要] **【目的】**探讨微卫星 DNA 标记在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)亲权鉴定中的可行性, 为大口黑鲈家系选育的系谱精确鉴定和选育效果评价提供依据。**【方法】**选择 12 个多态信息含量较高的微卫星 DNA 位点, 以人工选育建立的大口黑鲈 5 个全同胞家系为试验材料, 采用 Cervus 3.0 进行亲权分析, 并根据家系内个体间的遗传距离进行 UPGMA 聚类分析。**【结果】**所选的 12 个微卫星 DNA 多态位点在 102 个子代中的平均等位基因数(A)为 3, 平均观测杂合度(H_o)为 0.594 8, 平均期望杂合度(H_e)为 0.545 7, 平均多态信息含量(PIC)为 0.475 9。Cervus 3.0 亲权分析表明, 在置信度为 95% 时, 使用 12 个和 10 个位点, 模拟和实际分析的判别成功率分别为 96% 和 98%, 87% 和 91%; 而置信度为 99% 时, 分别为 78% 和 92%, 64% 和 86%; 在置信度为 99% 和 95% 时, 判别准确率皆在 90% 以上。从 12 个位点中挑选 10 个多态信息含量高的微卫星 DNA 位点, 即可将 102 个子代完全准确地聚为 5 个群体。亲权分析结果与聚类分析结果一致。**【结论】**所选用的 12 个微卫星位点可用于大口黑鲈亲权鉴定研究, 其判定成功率和准确率较高, 结果可靠。

[关键词] 微卫星; 大口黑鲈(*Micropterus salmoides*); 亲权分析; 聚类分析

[中图分类号] S965.211.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)08-0055-08

Application of microsatellite makers for parentage determination in *Micropterus salmoides*

HE Xiao-yan^{1,2}, BAI Jun-jie², LIU Xiao-lin¹, FAN Jia-jia^{2,3},
HE Xiao-ping², LI Sheng-jie², YE Xing²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China ;

2 Key Lab of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Pearl River Fisheries Research Institute,

Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510380, China; 3 College of Life Science

and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: **【Objective】**This study was initiated to assess the feasibility of parentage determination by microsatellites in order to give help for family accuracy determination and estimate the results of selective breeding in aquaculture populations for largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **【Method】**12 genotypes of the most polymorphic microsatellites loci were detected in 5 full-sib families of selected largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and the parentage determination was done by using the software package Cervus 3.0. The UPGMA dendrogram was constructed according to genetic distance among 102 individual of 5 families. **【Result】**The basic genetic parameters of the 12 microsatellite polymorphic loci in offspring population were: the average number of alleles $A=3$, Mean observed heterozygosity $H_o=0.594\ 8$, Mean expected heterozygosity $H_e=0.545\ 7$, Mean polymorphic information content $PIC=0.475\ 9$. Simulations based

* [收稿日期] 2008-11-17

[基金项目] 国家科技支撑项目(2006BAD01A1209); 国家科技基础条件平台工作项目(2005DKA21103); 广东省科技计划项目(2007B020708008)

[作者简介] 何小燕(1982—), 女, 广西全州人, 在读硕士, 主要从事水生生物学研究。E-mail: hexiaoyan0621@yahoo.com.cn

[通信作者] 白俊杰(1957—), 男, 福建福州市人, 研究员, 主要从事水产动物遗传育种与生物技术研究。E-mail: jjbai@163.com

on allele frequency data from the population demonstrated that 10 loci were required to assign 64% and 86% of offspring with 99% confidence, 87% and 91% of offspring with 95% confidence in simulation and actual simulation analysis respectively. When marker data from 12 loci were used, the assignment rate of offspring to their true parental couple (including 7 males and 7 females) increased to 78% and 92% with 99% confidence, 96% and 98% with 95% confidence in simulation and actual simulation analysis respectively. The power of microsatellite loci was not only estimated by the assignment success rate, but also judged by assignment accuracy rate. When 10 microsatellites were used, the assignment accuracy rate was more than 90%; when all loci were used, the assignment accuracy rate was close to 100%. The UPGMA tree demonstrated that when only 10 most polymorphic loci were selected, the results were consistent with parentage determination and the records of the 5 families. 【Conclusion】 The results of this study revealed that the microsatellite markers could be used in the parentage determination of largemouth bass with high assignment rate and accuracy.

Key words: microsatellite; largemouth bass (*Micropterus salmodies*); parentage analysis; cluster analysis

养殖鱼类的选择育种是解决其种质退化、获得优质养殖品种、维持水产养殖业可持续发展的有效途径。目前,国内对鱼类进行遗传改良主要以群体选育为主,但以群体选育所获得的后代,其个体间亲缘关系不明确,选育过程中不可避免地造成近交和遗传多样性的丢失^[1],了解系谱信息则可有效减少近交^[2],且更精确的选育方法需清楚选育群体的亲缘关系。为合理高效地利用选育群体,急需找到一种能够有效鉴别出不同家系的标记。然而,鱼类不同于家畜和贝类,因其体型和生活环境的特殊性,不能用挂牌、打耳号、单独饲养等方式进行标记,目前鱼类主要的标记方法有剪鳍、注射荧光染料、植入电子芯片等。但这些标记方法存在种种缺陷,不能完全满足当前鱼类生产与研究的需求。随着现代分子生物学技术的发展,高度多态的分子标记,如小卫星(Mini-satellites)和微卫星(Microsatellites),已成为水产选育中亲缘关系鉴定的有效方法^[3-4],其中微卫星分子标记因其具有多态性丰富、共显性、遵循孟德尔分离定律、辨别能力高^[5]、检测技术相对快速方便等特点,已在水产动物亲缘关系鉴定中得到广泛应用^[1,6-11]。其可避免选育家系单独饲养所带来的环境误差,为混养后家系的准确鉴定提供了可能。

大口黑鲈因生长快、肉质鲜美,已成为我国淡水养殖业的一种重要经济鱼类^[12-13],全国养殖面积在 0.67 万 hm² 以上,年产量达 16 万 t。然而,目前大口黑鲈养殖群体却出现了不同程度的种质退化^[14],选择育种是解决其种质退化的有效途径。为了维持大口黑鲈的遗传多样性水平和避免大口黑鲈选育过程中近交的发生,有必要了解其完整的系谱信息,但目前此方面的研究尚未见报道。本研究探讨了微卫

星 DNA 应用于大口黑鲈亲权鉴定的可能性,以期为大口黑鲈家系选育提供有效的系谱信息,避免选育中近亲繁殖的发生。

1 材料与方法

1.1 大口黑鲈家系的建立与材料选择

选择健康强壮的雌、雄亲本各 5 尾进行繁殖。按雌、雄数量为 1:1 的比例得到 5 个全同胞家系,分别编号为 0802,0805,0806,0807 和 0810,样本大小依次为 15,32,29,15 和 11 尾。候选亲本样本由 10 个真正亲本和 4 个(雌、雄各 2 尾)非亲本组成。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、氢氧化钠、无水碳酸钠、过硫酸氨、TEMED、硝酸银、甲醛等,购自广州威佳生物工程公司;Taq DNA 聚合酶体系,购自上海申能博彩生物科技有限公司;分子量标准为北京天根生物技术有限公司的 PBR322 DNA/MSP I;其他试剂均为国产分析纯。

1.2.2 仪器 用 Alpha Ease FC 软件分析微卫星条带大小,琼脂电泳仪购于 Bio-Rad 公司,聚丙烯酰胺电泳槽购于北京君意有限公司,扫描仪购自上海中晶电脑有限公司,电泳仪购自北京君意有限公司和北京六一有限公司。

1.3 大口黑鲈基因组 DNA 的提取

取大口黑鲈的尾鳍或臀鳍,采用上海生工动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA。经紫外分光光度计检测其浓度,-20℃保存备用。

1.4 大口黑鲈微卫星引物的选取

12 对大口黑鲈微卫星引物序列来自文献[15-17],引物和特征信息见表 1。引物由上海生工

有限公司合成。

表 1 大口黑鲈微卫星位点的引物序列及其特征

位点 Locus	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	退火温度/℃ T _m	等位基因数 A	GenBank 登录号 GenBank source
JZL60	F:AGTTAACCCGCTTTGTGCTG R:GAAGGCGAAGAAGGGAGAGT	60	3	EF056001
JZL67	F:CCGCTAATGAGAGGGAGACA R:ACAGACTAGCGTCAGCAGCA	59	3	EF056002
JZL68	F:AGGCACCGTCTTCTCTTCA R:CATTGTGGGTGCATTCTCC	59	3	EF056003
JZL72	F:AGGGTTCATGTTTCATGGTAG R:ACACAGTGGCAAATGGAGGT	59	3	EF056005
JZL83	F:TGTGGCAAAGACTGAGTGGA R:ATTTCTCAACGTGCCAGGTC	55	3	EF056006
JZL124	F:GCATTTCATACACCATCATTG R:AGCATTTTGTCTAGACCACC	55	3	本实验室 In our lab
JZL127	F:CAGAGAGATAGTGTC AACCA R:ACCACGGAGAAAGCCATT	55	3	本实验室 In our lab
MisaTPW012	F: CGGTTGCAAATTAGTCATGGCT R: (CAG)CAGGGTGCCTCGCTGTCT	55	3	EF590067
MisaTPW070	F: ACTTCGCAAAGGTATAAC R:CCTCATGCAGAAGATGTAA	48	5	EF590084
MisaTPW117	F: TGTGAAAGGCACAACACAGCCTGC R:ATCGACCTGCAGACCAACACT	55	3	EF590097
MisaTPW165	F: GTTCGCATCTGAATGCATGTGGTG R: (CAG)TGAAGGTATTAGCCTCAGCCTACA	55	3	EF590108
Lma21	F:CAGCTCAATAGTTCTGTCCAGG R:ACTACTGCTGAAGATATTGTAG	48	3	Colbourne,et al ^[16]

1.5 大口黑鲈的 PCR 扩增与检测

PCR 反应总体系为 20 μL: 50 ng 的基因组 DNA, 2 μL buffer, MgCl₂ (25 mmol/L) 0. 8 μL, dNTP (10 mmol/L) 0. 3 μL, 上、下游引物 (20 pmol/L) 各 0. 5 μL, Taq 酶 1 U。PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 30 s, 退火 (退火温度依引物而定) 30 s, 72 ℃ 30 s, 25 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物在 80 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶中分离, 硝酸银染色。

1.6 数据的统计与分析

利用 Cervus 3. 0 对各微卫星 DNA 位点等位基因频率、平均观测杂合度 (*Ho*)、平均期望杂合度 (*He*)、多态信息含量 (*PIC*)、无效等位基因频率等参数进行计算, 在此基础上进行已知亲本性别的亲权分析, 之后进行准确率分析。亲权分析时模拟子代样本为 10 000 个, 实际子代样本为 102 个, 14 个亲本 (7 个父本和 7 个母本) 100% 取样, 亲本和子代的基因分型率为 100%, 错判率默认为 1%。运用 Popgene 3. 4 对各家系后代基因型频率分布做 χ^2 检验, 为进一步验证微卫星 DNA 在亲权鉴定中的效能, 本文计算了子代个体间和家系间的遗传距离, 利用 UPGMA 进行聚类分析。

Ho 计算公式: $Ho=1-\sum_{i=1}^n P_{ii}$

He 计算公式: $He=1-\sum P_i^2$;

PIC 计算公式:

$PIC=1-\sum_{i=1}^n P_i^2-\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2(P_i P_j)^2$;

亲权排除概率 (*EP*) 计算公式^[18]:

$EP=\sum_{i=1}^n P_i(1-P_i)^2+2\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n P_i P_j(1-P_i-P_j)^2$;

对于多个引物, 累积亲权排除概率 (*CEP*) 为:

$CEP=1-(1-EP_1)(1-EP_2)(1-EP_3)\cdots$

$(1-EP_k)=1-\prod_{i=1}^k (1-EP_i)$ 。

式中: *P_{ii}* 为第 *i* 个等位基因纯合基因型的频率; *P_i*, *P_j* 分别为群体中第 *i*, *j* 个等位基因频率; *n* 为等位基因数; *EP_k* 为第 *k* 个引物的 *EP* 值。

2 结果与分析

2.1 大口黑鲈遗传参数分析

由表 2 可知, 所检测的大口黑鲈在这 12 个微卫星标记中, 分别有 6 个位点为高度多态 (*PIC* ≥ 0. 5), 6 个位点为中度多态 (0. 25 ≤ *PIC* < 0. 5); 12 个微卫星位点的观测杂合度介于 0. 353~0. 755, 期望杂合度介于 0. 386~0. 667, 大多数位点的观测杂合度超过期望杂合度, 无效等位基因频率均低于 0. 1, 每个位点都只有 3 个等位基因。由此可知, 这 12 个微卫星 DNA 位点可用于亲权分析。

表 2 12 个微卫星多态位点在 5 个大口黑鲈家系中的遗传参数分析

Table 2 Genetic analysis of 12 microsatellite markers in five largemouth bass (*Micropterus salmoides*) families

位点 Locus	等位基 因数 A	样本数 <i>n</i>	平均观 测杂合度 <i>H_o</i>	平均期望 杂合度 <i>H_e</i>	多态信 息含量 <i>PIC</i>	H-W 平衡 Hardy- Weinberg	无效等位 基因频率 F (Null)	<i>PIC</i> 排名 Ranking
M12	3	102	0.755	0.643	0.564	* *	—0.083 6	3
M70	3	102	0.647	0.519	0.421	*	—0.122 8	9
M117	3	102	0.569	0.667	0.589	NS	0.079 0	1
M165	3	102	0.471	0.386	0.339	NS	—0.111 8	12
Lma21	3	102	0.539	0.463	0.396	NS	—0.073 2	10
JZL60	3	102	0.667	0.599	0.529	NS	—0.075 2	5
JZL67	3	102	0.676	0.506	0.426	* *	—0.165 8	8
JZL68	3	102	0.608	0.572	0.502	NS	—0.060 8	6
JZL72	3	102	0.706	0.628	0.553	NS	—0.053 7	4
JZL83	3	102	0.353	0.386	0.348	NS	0.025 3	11
JZL124	3	102	0.676	0.659	0.581	NS	0.020 1	2
JZL127	3	102	0.471	0.520	0.463	NS	0.065 0	7
平均 Mean	3	102	0.595	0.546	0.476			

注: NS 表示不显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡; * 表示显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡; * * 表示极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。表 3 同。

Note: NS. Not significant; *. Significant at 5% level; * *. Significant at 1% level. The table 3 is the same.

表 3 5 个大口黑鲈家系的 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 3 Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium in five largemouth bass (*Micropterus salmoides*) families

位点 Locus	项目 Item	家系 Family				
		0802	0805	0806	0807	0810
M12	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	1.16(1)	5.35(1)	28.00(1)	2.06(3)	10.00(3)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	0.281 0	0.020 7*	0.000 0**	0.560 3	0.018 6*
M70	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	14.00(1)	0.10(1)	5.49(1)	0.47(1)	10.00(3)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	0.000 2**	0.751 1	0.019 1*	0.494 5	0.018 6*
M117	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	单态	3.30(1)	0.28(1)	14.00(1)	10.00(3)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	Single genotype	0.069 4	0.598 1	0.000 2**	0.018 6*
M165	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	14.00(1)	单态	4.64(1)	1.70(1)	1.47(3)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	0.002 9**	Single genotype	0.031 2*	0.192 7	0.688 2
Lma21	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	0.26(1)	单态	28.00(1)	3.93(3)	2.42(3)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	0.611 1	Single genotype	0.000 0**	0.268 6	0.490 5
JZL60	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	1.40(1)	1.24(1)	28.00(3)	1.70(1)	2.92(3)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	0.237 4	0.266 0	0.000 0**	0.192 7	0.404 7
JZL67	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	3.32(1)	9.56(1)	28.00(3)	单态	3.08(1)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	0.068 6	0.002 0**	0.000 0**	Single genotype	0.079 4
JZL68	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	14.00(3)	0.16(1)	0.01(1)	2.40(1)	3.08(1)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	0.002 9**	0.691 7	0.906 2	0.121 3	0.079 4
JZL72	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	3.32(1)	6.47(3)	8.18(3)	0.76(1)	2.00(1)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	0.068 6	0.090 9	0.424 0	0.383 1	0.157 3
JZL83	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	单态	单态	3.90(1)	14.00(1)	0.74(1)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	Single genotype	Single genotype	0.048 2*	0.000 2**	0.391 2
JZL124	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	14.00(3)	0.64(1)	7.66(3)	0.76(1)	10.00(3)
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	0.002 9**	0.425 5	0.053 6	0.383 1	0.018 7*
JZL127	卡方(自由度) $\chi^2(df)$	单态	7.50(3)	1.42(1)	3.73(3)	单态
	<i>P</i> 值 <i>P</i> -Value	Single genotype	0.057 5	0.232 6	0.292 6	Single genotype

由表 3 可知, M117 位点在家系 0802, M165、Lma21 位点在家系 0805, JZL67 位点在家系 0807, JZL83 位点在家系 0802、0805, JZL127 位点在家系 0802、0810 均表现为单态。家系 0802 在 M70、M165、JZL68、JZL124 微卫星 DNA 位点极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P<0.01$); 家系 0805 在 M12 和 JZL67 位点分别显著($P<0.05$)和极显著

($P<0.01$)偏离 Hardy-Weinberg 平衡; 家系 0806 在 M70、M165、JZL83 位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P<0.05$), 在 M12、Lma21、JZL60、JZL67 位点极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P<0.01$); 家系 0807 在 M117、JZL83 位点极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P<0.01$); 家系 0810 在 M12、M70、M117、JZL124 位点显著偏离 Hardy-

Weinberg 平衡($P<0.05$)。

2.2 大口黑鲈的亲权分析

2.2.1 亲权排除概率分析 由表 4 可知,当双亲基因型均不清楚时,单个位点的排除概率(EP1)介于 0.186 6~0.367 8,平均值为 0.282 8;7 个位点和 12 个位点组合时,排除概率(CEP1)分别为 0.940 4 和

0.982 8。当有一个亲本基因型已知时,单个位点的排除概率(EP2)介于 0.303 9~0.516 2,平均值为 0.421 4;7 个位点和 12 个位点组合时,排除概率(CEP2)分别为 0.989 9 和 0.998 7。亲权排除概率越高,说明该位点的鉴定能力越强。

表 4 大口黑鲈 12 个微卫星 DNA 多态位点的排除概率 1 和排除概率 2
Table 4 Probabilities of exclusion 1 and 2 calculated over the 12 microsatellite polymorphic loci in largemouth bass (*Micropterus Salmoides*)

位点 Locus	样本数 <i>n</i>	排除概率 1 EP1	排除概率 2 EP2	组合位点数目 No.	累积排除概率 1 CEP1	累积排除概率 2 CEP2
M117	102	0.367 8	0.516 2	—	—	—
JZL124	102	0.361 0	0.509 7	—	—	—
M12	102	0.347 2	0.495 4	—	—	—
JZL72	102	0.340 3	0.490 6	4	0.826 0	0.939 0
JZL60	102	0.323 0	0.474 4	5	0.882 2	0.967 9
JZL68	102	0.301 9	0.450 5	6	0.917 8	0.982 4
JZL127	102	0.275 3	0.423 7	7	0.940 4	0.989 9
JZL67	102	0.240 4	0.368 9	8	0.954 7	0.993 6
M70	102	0.232 0	0.351 8	9	0.965 2	0.995 8
Lma21	102	0.221 6	0.347 4	10	0.972 9	0.997 3
JZL83	102	0.196 9	0.324 2	11	0.978 3	0.998 2
M165	102	0.186 6	0.303 9	12	0.982 8	0.998 7
平均 Mean	102	0.282 8	0.421 4			

注:EP1 和 CEP1 分别为双亲基因型均未知情况下单个位点和多个位点组合时的排除概率;EP2 和 CEP2 为已知一个亲本基因型情况下单个位点和多个位点组合时的排除概率。

Note:EP1 and CEP1 represent the probabilities of exclusion and combined probabilities of exclusion when no parent known respectively; EP2 and CEP2 represent the probabilities of exclusion and combined probabilities of exclusion when one parent known respectively.

2.2.2 判别成功率分析 根据 12 个微卫星 DNA 位点多态信息含量的高低,逐步删除多态信息含量最低的位点,由多到少依次减少亲权分析中微卫星 DNA 位点所使用的数目,得到的判别成功率见图 1。由图 1 可知,当使用 12 个位点进行分析时,除模拟分析在 $P=0.01$ 水平上的判别成功率仅为 78% 外,其余判别成功率均在 90% ($P=0.05$ 或 0.01) 以上。当微卫星位点数目为 9 个时,模拟分析判别成功率为 55% ($P=0.01$) 与 80% ($P=0.05$);而实际分析的判别成功率为 81% ($P=0.01$) 与 88% ($P=0.05$)。随着所使用引物数目的减少,判别成功率越来越低。置信度为 95% 时,即使微卫星 DNA 位点减少到 7 个,仍可以判别 80% 的子代;而位点减少为 5 个,判别率仅为 55%。当位点减少为 4 个,置信度为 99% 时,无论模拟分析还是实际分析,判别率均为 0;而置信度为 95% 时,模拟分析与实际分析的判别成功率则分别为 9% 和 17%。由以上结果可知,模拟分析结果始终低于实际分析,随着样本数量的增加和置信度的提高,所需微卫星位点增加。相同位点,置信度越高,样本越大,判别成功率越低。

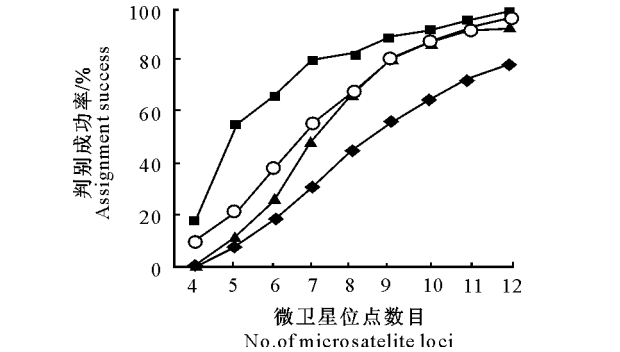


图 1 12 个微卫星 DNA 多态位点对大口黑鲈子代模拟和实际判别的成功率
—◆—, 模拟分析($P=0.01$); —○—, 模拟分析($P=0.05$);
—▲—, 实际分析($P=0.01$); —■—, 实际分析($P=0.05$)
Fig. 1 Assignment success of simulated and real largemouth bass (*Micropterus salmoides*) offspring to their correct parent pair using up to 12 microsatellite markers.
—◆—, Simulation($P=0.01$); —○—, Simulation($P=0.05$);
—▲—, Actual simulation($P=0.01$); —■—, Actual simulation($P=0.05$)

2.2.3 判别准确率分析 由图 2 可知,当所使用的微卫星位点数为 9 个以上时,判别准确率均在 90% 以上。当微卫星位点减少为 5 个时,判别准确率也

能达到 80%。而当微卫星位点数为 4 个时,判别准确率均为 0。置信度为 95%和 99%时,使用相同数目位点的判别准确率相同。

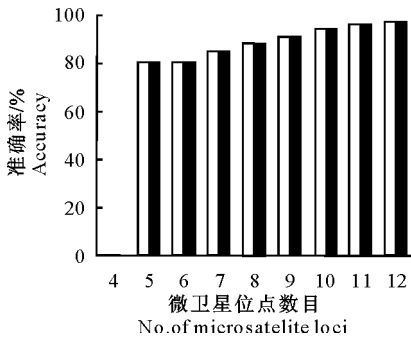


图 2 12 个微卫星多态位点对 5 个大口黑鲈家系的判别准确率

□. 准确率($P=0.01$); ■. 准确率($P=0.05$)

Fig.1 Assignment accuracy of five largemouth bass (*Micropterus salmoides*) families to their correct parent pair using 12 microsatellite markers

□. Accuracy($P=0.01$); ■. Accuracy($P=0.05$)

2.3 大口黑鲈的聚类分析

为了进一步验证此 12 个微卫星位点的鉴定效能,计算了大口黑鲈 5 家系间和家系内 102 个个体间的

遗传距离,家系间的遗传距离见表 5。由表 5 可知,家系 0805 与 0810 的遗传距离最大,为 0.398 8;家系 0802 与 0806 的遗传距离最小,为 0.177 8。

表 5 大口黑鲈 5 个家系间的遗传距离

Table 5 Genetic distance among five largemouth bass (*Micropterus salmoides*) families

群体	家系编号 Family names				
Population	0802	0805	0806	0807	0810
0802					
0805	0.287 2				
0806	0.177 8	0.337 3			
0807	0.336 3	0.363 6	0.311 8		
0810	0.318 7	0.398 8	0.224 9	0.259 2	

根据家系内个体间的遗传距离,对 102 个个体进行 UPGMA 聚类分析,结果见图 3。由图 3 可知,聚类图第 1 分支处,家系 0805 所有个体单独聚为一类,其他 4 个家系聚为一大类;第 2 分支处,家系 0807 又与其他 3 个家系(0802、0806、0810)分开;第 3 分支处,家系 0810 与 0802、0806 分开;第 4 分支处,家系 0802 与 0806 内所有个体分别聚为一类。聚类结果表明,利用 12 个微卫星 DNA 多态位点,可完全将大口黑鲈 5 个家系准确地区分开来。家系间的遗传距离与家系内个体间的聚类结果完全一致。

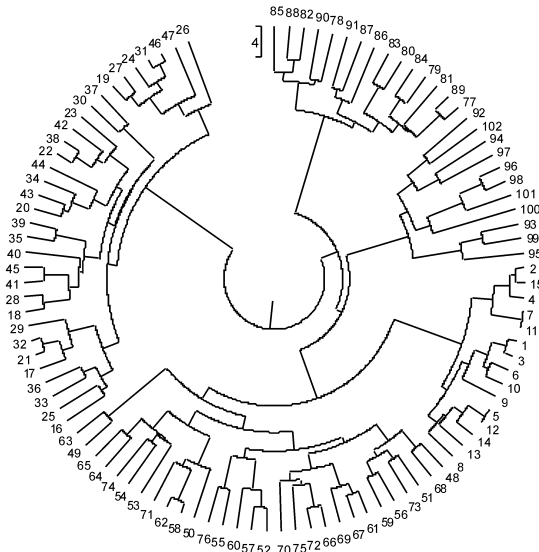


图 3 大口黑鲈 5 个家系内 102 个个体的遗传距离 UPGMA 聚类结果

1~15 属于 0802 家系;16~47 属于 0805 家系;48~76 属于 0806 家系;77~91 属于 0807 家系;92~102 属于 0810 家系

Fig.3 UPGMA dendrogram created from genetic relation among 102 individuals of 5 largemouth bass (*Micropterus salmoides*) families

1—15 belong to family 0802;16—47 belong to family 0805;48—76 belong to family 0806;
77—91 belong to family 0807;92—102 belong to family 0810

3 讨 论

3.1 用于亲权鉴定的微卫星 DNA 位点的选择

有研究认为,利用微卫星 DNA 位点进行家系亲权鉴定时,其排除非亲本的能力依赖于等位基因的多样性^[2,19-21],等位基因多样性越高,微卫星 DNA 位点数目越多^[22],则更容易通过特异基因找到候选亲本。本研究选用的 12 个大口黑鲈微卫星 DNA 位点,易于扩增和分型,多态信息含量较高,适用于大口黑鲈亲权鉴定。由于国内养殖大口黑鲈本身的遗传多样性较低^[15],本试验用于鉴定的微卫星 DNA 位点只有 50% 达到高度多态,每个位点等位基因数目仅为 3 个。本研究使用的微卫星 DNA 位点的遗传特征,与相关研究^[2,11,23]所使用位点的遗传特性有一定差异,为提高鉴定的准确性,将 12 个位点全部用于亲权鉴定分析,因使用的微卫星 DNA 位点较多,依然可以达到相同的目的。

3.2 影响微卫星 DNA 用于亲权鉴定的因素

无效等位基因是影响微卫星 DNA 在亲权鉴定中准确性的主要因素^[23]。据报道,无效等位基因频率超过 0.05,将会影响亲缘关系鉴定^[20];另有研究认为,无效等位基因频率小于 0.2,会轻微地低估平均排除概率,但不会产生很大影响^[24]。为消除无效等位基因对亲权鉴定的影响,有学者建议去除含有无效等位基因的位点^[25],也可以通过重新设计引物来避免无效等位基因的出现,但这并不是有效的解决方法,也不能确保重新设计的引物在其他个体上不会出现无效等位基因^[22]。本研究所使用的微卫星 DNA 位点中,只有 M117 和 JZL127 的无效等位基因频率大于 0.05,但无效等位基因频率的数值均接近 0.05。建议在亲权分析中尽量避免使用含有高频率无效等位基因的位点。

基因型分型错误亦是影响亲权分析准确性的重要因素,研究中并不能确保所选微卫星位点基因型的判定 100% 正确。本研究在进行大口黑鲈判定成功率分析时,实际分析结果要高于模拟分析,这可能与实际基因型错判率低于 1% 和模拟分析时未考虑亲本的基因型有关。研究发现,随着微卫星 DNA 位点数目的增加,模拟分析与实际分析间判别成功率的差距越来越小。判定准确率结果显示,即使使用 5 个微卫星位点,判别准确率也大于 80%;当微卫星位点达到 9 个时,判别准确率大于 90%。从判定成功率和准确率来看,使用 9 个微卫星位点就足以满足亲权鉴定所需。本研究还对 5 个家系内 102

个个体进行了 UPGMA 聚类分析,结果与亲权分析结果一致。为了降低试验成本,可以考虑多个位点同时进行扩增和电泳分离。如果鉴定样本数量大,或者使用微卫星位点等位基因的遗传多样性较低,则应尽可能增加微卫星 DNA 位点的使用数目。

4 结 论

通过亲权鉴定分析中的模拟和实际分析结果,及根据家系内个体间的遗传距离所得的聚类分析结果可知,选用的 12 个微卫星 DNA 多态位点的判别成功率和准确率较高,结果可靠,可用于大口黑鲈的亲权鉴定。

【参考文献】

- [1] Herbing C M, Doyle R W, Pitman E R, et al. DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout [J]. Aquaculture, 1995, 137: 245-256.
- [2] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2000, 182: 73-83.
- [3] O'Reilly P, Wright J M. The evolving technology of DNA Fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture [J]. Journal of Fish Biology, 1995, 47: 29-55.
- [4] Ferguson M M, Danzmann R G. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1998, 55: 1553-1563.
- [5] 徐晋麟, 徐 沁, 陈 淳. 现代遗传学原理 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 224-225.
- [6] Xu J L, Xu Q, Chen C. Modern genetics principles [M]. Beijing: Science Press, 2003: 224-225. (in Chinese)
- [7] Ricardo P-E, Motohiro T, Nobu H T. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers [J]. Aquaculture, 1999, 173: 413-423.
- [8] Boudry P, Collet B, Cornette F, et al. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses [J]. Aquaculture, 2002, 204: 283-296.
- [9] Timothy R J, Martin-Robichaud D J, Michael E R. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock [J]. Aquaculture, 2003, 220: 245-259.
- [10] Motoyuki H, Masashi S. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker [J]. Aquaculture, 2003, 217: 107-114.
- [10] Dong S R, Kong J, Zhang T S. Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on micro-

- satellite DNA markers [J]. *Aquaculture*, 2006, 258: 283-288.
- [11] Herlin M, Delghandi M, Wesmajervi M, et al. Analysis of the parental contribution to a group of fry from a single day of spawning from a commercial Atlantic cod (*Gadus morhua*) breeding tank [J]. *Aquaculture*, 2008, 274: 218-224.
- [12] 刘家照, 沈彬彬, 叶 星, 等. 大口黑鲈人工繁殖和胚胎发育 [J]. *淡水渔业*, 1990(1): 15-16.
Liu J Z, Xian Z B, Ye X, et al. The artificial breeding and fetal-tion in largemouth bass [J]. *Freshwater fisheries*, 1990(1): 15-16. (in Chinese)
- [13] 谭肖英, 刘永坚, 田丽霞. 饲料中碳水化合物水平对大口黑鲈 *Micropterus salmoides* 生长、鱼体营养成分组成的影响 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2005, 44(增刊): 258-263.
Tan X Y, Liu Y J, Tian L X, et al. The effects of dietary carbohydrate levels on the growth, nutrient composition of juvenile Largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni: Nature Science Edition*, 2005, 44(suppl.): 258-263. (in Chinese)
- [14] 梁素娟, 白俊杰, 叶 星, 等. 养殖大口黑鲈的遗传多样性分析 [J]. *大连水产学报*, 2007, 22(4): 260-263.
Liang S X, Bai J J, Ye X, et al. RAPD analysis of genetic diversity for cultured Largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2007, 22(4): 260-263. (in Chinese)
- [15] 梁素娟, 孙效文, 白俊杰, 等. 微卫星标记对中国引进加州鲈养殖群体遗传多样性的分析 [J]. *水生生物学报*, 2008, 32(5): 80-86.
Liang S X, Sun X W, Bai J J, et al. Genetic analysis for cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China with microsatellites [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(5): 80-86. (in Chinese)
- [16] Colbourne J K, Neff B D, Wright J M, et al. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT) microsatellites and its potential for assessment of mating success [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1996, 53: 342-349.
- [17] Lutz-Carrillo D J, Nice C C, Bonner T H, et al. Admixture analysis of florida largemouth bass and northern largemouth bass using microsatellite loci [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2006, 135: 779-791.
- [18] Ohno Y, Sebetan I M, Akaishi S. A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles [J]. *Forensic Sci Int*, 1982, 19(1): 93-98.
- [19] Estoup A, Gharbi K, SanCristobal M, et al. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1998, 55: 715-725.
- [20] Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B, et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations [J]. *Molecular Ecology Notes*, 1998, 7: 639-655.
- [21] Bernatchez L, Duchesne P. Individual based genotype analysis in studies of parentage and population assignment; how many loci, how many alleles? [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2000, 57: 1-12.
- [22] MacAvoy E S, Wood A R, Gardner J P A. Development and evaluation of microsatellite markers for identification of individual Greenshell? mussels (*Perna canaliculus*) in a selective breeding programme [J]. *Aquaculture*, 2008, 274: 41-48.
- [23] Castro J, Bouza C, Presa P, et al. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci [J]. *Aquaculture*, 2004, 242: 119-135.
- [24] Dakin E E, Avise J C. Microsatellite null alleles in parentage analysis [J]. *Heredity*, 2004, 93: 504-509.
- [25] Pemberton J M, Slate J, Bancroft D R, et al. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies [J]. *Molecular Ecology*, 1995, 4: 249-252.

(上接第 54 页)

- [11] Thompson G M, Cano V S P, Valentini S R. Mapping eIF-5A binding sites for Dys1 and Lial; *in vivo* evidence for regulation of eIF-5A hypusination [J]. *FEBS Lett*, 2003, 555(3): 464-468.
- [12] Clement P M J, Johansson H E, Wolff E C, et al. Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells [J]. *FEBS J*, 2006, 273(6): 1102-1114.
- [13] Jenkins Z A, Haag P G, Johansson H E. Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression [J]. *Genomics*, 2001, 71(1): 101-109.
- [14] 靳宝锋, 何 昆, 张学敏. eIF-5A 与 hypusine [J]. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27(6): 463-466.
Jin B F, He K, Zhang X M. eIF-5A and hypusine [J]. *Bulletin of the Academy of Military (Medical Sciences)*, 2003, 27(6): 463-466. (in Chinese)
- [15] Bevec D, Klier H, Holter W, et al. Induced gene expression of the hypusine-containing protein eukaryotic initiation factor 5A in activated human T lymphocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(23): 10829-10833.