

多倍体中华鲟微卫星亲子鉴定体系的建立

辛苗苗^{1,2}, 张书环², 汪登强², 汪珂², 张磊², 霍来江², 危起伟^{2,3}
(1.西南大学生命科学学院, 重庆 400715; 2.农业部淡水生物多样性保护重点实验室, 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223; 3.中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要: 应用荧光引物和自动测序技术, 检测了 10 个自主研发的微卫星分子标记在 68 个中华鲟(*Acipenser sinensis*)个体中的遗传多态性。结果表明, 10 个微卫星标记共检测到 124 个等位基因, 等位基因数为 7~22, 期望杂合度为 0.730 26~0.873 95, Shannon-Wiener 多样性指数为 1.561 61~2.219 60。基于亲子鉴定排除率不低于 0.99 的标准, 最终确定 Asi-75067、Asi-67648、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421 和 Asi-56700 等 7 个微卫星标记为中华鲟亲子鉴定的核心体系, 其单亲、父权和双亲的累积排除率分别为 99.12%、99.95% 和 99.99%。该微卫星标记组合为中华鲟准确高效经济的亲子鉴定体系建立提供了科学依据。

关键词: 微卫星; 中华鲟(*Acipenser sinensis*); 亲子鉴定; 多倍体; 累积排除率

中图分类号:

文献标识码:

文章编号:

Parentage Identification of Polyploidy *Acipenser sinensis* Based on Microsatellite Markers

XIN Miao-miao^{1,2}, ZHANG Shu-huan², WANG Deng-qiang², WANG Ke², ZHANG Lei², HUO
Lai-jiang, WEI Qi-wei^{2,3}

(1. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture of China, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China; 3. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, Jiangsu 214081, China)

Abstract: 10 novel microsatellite markers were used for assessing genetic diversity of 68 *A. sinensis* individuals. The results demonstrated that there were 124 alleles in 10 loci and the number of alleles, mean expected heterozygosities and Shannon-Wiener Diversity Indices per locus ranged from 7 to 22, from 0.730 26 to 0.873 95 and from 1.561 61 to 2.219 60, respectively. With the criterion that cumulative exclusion probabilities were not lower than 0.99, the 7 high polymorphic microsatellite markers (Asi-75067, Asi-67648, Asi-67123, Asi-73843, Asi-72040, Asi-70421 and Asi-56700) make up the system of paternity test for *A. sinensis*. The cumulative exclusion probabilities over the 7 loci of single parent, paternity and pair parent were 0.991 232, 0.999 503 and 0.999 997, respectively. These high polymorphic microsatellite markers provide a scientific basis for validating paternity testing efficiently with a lower cost in *A. sinensis*.

Keywords: Microsatellite; *Acipenser sinensis*; Parentage identification; Polyploidy; Cumulative exclusion probabilities

收稿日期: 2015-01-12 ; 修订日期: 2015-03-03

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项: 珍稀水生动物繁育与物种保护技术研究(201203086)

第一作者简介: 辛苗苗(1989-), 女, 硕士, 专业方向为渔业资源与环境。 Email xinmiao1206@126.com

通讯作者: 危起伟。Email:weiqw@yfi.ac.cn.

中华鲟(*Acipenser sinensis*)为典型的大型溯河产卵洄游性鱼类,是我国国家一级重点保护野生动物。近年来,由于环境污染、过度捕捞、栖息地改变与破坏、葛洲坝修建等人类活动的干扰,中华鲟资源量大幅度锐减,雌雄比例失调,自然种群严重衰退,有灭绝的危险。目前,仅在葛洲坝下发现一处适宜其繁殖和栖息的自然产卵场,有效面积非常有限^[1]。因此建立中华鲟人工养殖群体,实现全人工繁殖是保存中华鲟物种和自然资源增殖的重要途径^[2]。然而,人工养殖中华鲟亲鱼数量有限,且人工繁殖时通常未进行配种设计,多年累代养殖后,将会造成不同程度的近亲繁殖,导致养殖群体遗传结构破坏,种质退化。全人工繁殖的中华鲟仔鱼受精率低,抗病能力弱,严重影响中华鲟物种保护的效果。为减少近亲繁殖导致的遗传问题以及培养出具有较好生存力的繁殖后代,迫切需要建立科学可靠的遗传系谱来有效指导中华鲟规模化的人工繁殖。

微卫星 DNA(Microsatellite DNA)又称简单重复序列(SSRs, simple sequence repeats),是一种共显性标记,具有多态性丰富、检测简便快捷、PCR 扩增结果重复性好等特点。近年来,随着濒危物种遗传保护研究日益增强,微卫星分子标记在濒危动物保护中也得到越来越多的应用^[3]。基于微卫星标记的二倍体动物亲子鉴定体系已经建立^[4],并成功应用于系谱建立和遗传管理。然而国内外关于鲟鱼等多倍体动物亲子鉴定报道还较少。2004 年, Rodzen 等^[5]应用微卫星标记对高首鲟(*A. transmontanus*)进行了亲子鉴定分析。多倍体中华鲟^[6]因其复杂的遗传特性和未知的染色体数目使其亲子鉴定研究遇到瓶颈,1999 年,朱滨利用湖鲟(*A. fulvescens*)的 2 对微卫星标记对中华鲟进行了亲子鉴定研究^[7],但只对少量样本进行了简单的分析,并未建立中华鲟亲子鉴定的微卫星标记体系。本试验采用微卫星标记方法,在已有研究的基础上,进一步优化亲子鉴定微卫星标记组合,形成鉴定准确、检测费用低廉的微卫星亲子鉴定体系,为中华鲟成功高效的人工繁殖提供理论依据和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验材料取自中国水产科学院长江水产研究所农业部中华鲟保育与增殖放流中心,其中包括 2012 年 10 月通过人工授精获得的中华鲟家系,子代 56 尾、真实的亲本 2 尾及随机挑取与家系无关的 10 尾后备亲鱼。样品均采集鳍条,保存在无水乙醇中备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

本试验采用高盐法^[8]提取基因组 DNA,具体步骤如下:将保存的鳍条样本剪取 0.5 g 左右,放入 2 mL 离心管中,用 TE 缓冲液浸泡 12 h 以充分置换出酒精,然后取出放入 352 μ L 的无菌抽提缓冲液中,加入 40 μ L 20% SDS 和 10 μ L 20 mg/mL 蛋白酶 K 混匀,在 56 $^{\circ}$ C 消化 4 h 以上,每 30 min 摇晃离心管 1 次,直到组织完全消化后加入 300 μ L 6 mol/L NaCl 溶液,立刻剧烈震动 30 s,12 000 rpm 离心 10 min,吸上清液,加入等体积的异丙醇,-20 $^{\circ}$ C 放置 1 h,12 000 rpm 离心 15 min(4 $^{\circ}$ C),弃上清,沉淀用 70%的乙醇溶液洗涤 1 次,37 $^{\circ}$ C 烘干或自然晾干后,加入 50 μ L 双蒸水,待完全溶解后稀释成 100 ng/ μ L 保存备用。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

基于实验室已筛选出的 24 对多态微卫星标记,选取其中多态性较高的 10 对(表 1)用于亲子鉴定,由上海生工生物工程技术有限公司合成 5'端带有 FAM 和 HEX 的荧光引物。

PCR 反应体系总体积为 25 μ L: 10 \times PCR (TaKaRa) 缓冲液 3 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 离子 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1 μ L, 0.4 μ L rTaqDNA 聚合酶 (TaKaRa) 0.5 U, 正反向引物各 0.5 μ L, 100 ng 基因组 DNA 以及双蒸水。

PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火(表 1)30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，自动凝胶成像系统拍照检测，然后送至上海生工生物工程技术有限公司测序，在 ABI3730 自动测序仪上进行荧光信号收集，利用毛细管电泳方法进行基因型检测。为降低微卫星基因型测序成本，将带有不同荧光基团的 PCR 产物两两混合进行测序。本试验将 10 个微卫星标记分为 5 组，标记组合及其所携带荧光基团见表 2。

表 1 10 个微卫星标记引物序列及退火温度

Tab.1 Primer sequences and annealing temperature of 10 microsatellite markers in *A. sinensis*

| 位点 | 引物 | 片段大小/bp | 登陆号 | 退火温度/°C |
|-----------|----------------------------|---------|----------|---------|
| Asi-75067 | F:AGAGTTCTCGAAGCGGAAACAG | 293 | KM379079 | 60 |
| | R:CTGGTTCAAACCTGGGAGCGAT | | | |
| Asi-67648 | F:TCCGGTACTGGAAACCCTTG | 302 | KM379090 | 60 |
| | R:ATTCGCCTGGAAGAGCACAC | | | |
| Asi-67123 | F:AGCTAACAGCAGTGCATGGTATTT | 276 | KM379082 | 62 |
| | R:CTTGAGATAAAAAGCGCTGTAGAG | | | |
| Asi-73843 | F:GGTGTGTTGAAAGACAGCGAGAA | 292 | KM379084 | 58 |
| | R:TCCTCCAGGACAGAGTTTGC | | | |
| Asi-72040 | F:AGCAGAGTCCACATCCCCCT | 306 | KM379089 | 62 |
| | R:GAGTGTCGCTCGAAAGCCCT | | | |
| Asi-70421 | F:TGCCACAAATAAGATGCAGGAG | 309 | KM379092 | 56 |
| | R:TTTTGCTTTGGAAACTGTACTGC | | | |
| Asi-56700 | F:CAACCTCTTCACTACCGCAAAC | 295 | KM379094 | 50 |
| | R:TGCAAAAAGGAATTGGAATCG | | | |
| Asi-65194 | F:TACAAAATCGGCAGAAAGGCT | 296 | KM379077 | 58 |
| | R:GCAGGCATGATGAGAATAGGC | | | |
| Asi-77057 | F:GGGTCCCGCACAGTTTAAAG | 300 | KM379087 | 56 |
| | R:GACGGCAAGGCAAGATAGGT | | | |
| Asi-66034 | F:CCTACGCCAAGCTCAACCAG | 309 | KM379072 | 56 |
| | R:ACCGCAGAGTCACGGAGTTG | | | |

表 2 微卫星标记分组情况

Tab.2 The grouping of microsatellite markers in *A. sinensis*

| 分组 | 位点名称 | 荧光标记 | 片段大小/bp |
|----|-----------|------|---------|
| A | Asi-75067 | HEX | 293 |
| | Asi-67648 | FAM | 302 |
| B | Asi-67123 | FAM | 276 |
| | Asi-73843 | HEX | 292 |
| C | Asi-72040 | FAM | 306 |
| | Asi-65194 | HEX | 296 |
| D | Asi-70421 | FAM | 309 |
| | Asi-56700 | HEX | 295 |
| E | Asi-77057 | FAM | 300 |
| | Asi-66034 | HEX | 309 |

1.4 统计方法

应用 Excel 统计等位基因数；软件 ATetra 1.2^[9]分析计算期望杂合度、Shannon-Wiener 多样性指数；软件 GeneMarker V1.5 读取等位基因大小；软件 FaMoz^[10]进行中华鲟亲子鉴定

分析，计算排除率与累积排除率。

2 结果

2.1 微卫星标记的多态性

微卫星标记的等位基因、等位基因数和等位基因频率统计结果见表 3，10 个微卫星标记共检测到 124 个等位基因，其中等位基因数最多的位点为 Asi-77057，检测到 22 个等位基因；其次为 Asi-75067，检测到 17 个等位基因；等位基因数最少的位点是 Asi-66034，有 7 个等位基因。

表 3 中华鲟微卫星标记等位基因及其等位基因频率

Tab.3 Number of alleles and allele frequencies of microsatellite markers in *A. sinensis*

| 位点 | 等位基因 | 等位基因频 | 位点 | 等位基因大小/bp | 等位基因频 |
|-----------|------|-------|-----------|-----------|-------|
| | 274 | 0.182 | | 300 | 0.011 |
| | 276 | 0.050 | | 302 | 0.123 |
| | 280 | 0.004 | | 305 | 0.062 |
| | 284 | 0.070 | | 308 | 0.004 |
| | 286 | 0.008 | | 312 | 0.202 |
| | 288 | 0.150 | | 317 | 0.063 |
| | 290 | 0.128 | | 320 | 0.140 |
| | 292 | 0.124 | Asi-67648 | 324 | 0.148 |
| Asi-75067 | 296 | 0.178 | | 327 | 0.109 |
| | 300 | 0.004 | | 330 | 0.060 |
| | 302 | 0.004 | | 333 | 0.014 |
| | 304 | 0.008 | | 336 | 0.011 |
| | 308 | 0.066 | | 339 | 0.004 |
| | 314 | 0.004 | | 342 | 0.049 |
| | 316 | 0.004 | | 281 | 0.077 |
| | 320 | 0.008 | | 286 | 0.005 |
| | 322 | 0.008 | | 298 | 0.005 |
| | 238 | 0.004 | | 301 | 0.145 |
| | 248 | 0.008 | Asi-72040 | 304 | 0.010 |
| | 250 | 0.012 | | 307 | 0.343 |
| | 252 | 0.142 | | 311 | 0.222 |
| | 256 | 0.012 | | 314 | 0.087 |
| | 258 | 0.008 | | 317 | 0.005 |
| | 260 | 0.004 | | 321 | 0.010 |
| Asi-77057 | 262 | 0.244 | | 280 | 0.004 |
| | 264 | 0.020 | | 284 | 0.004 |
| | 272 | 0.004 | | 286 | 0.004 |
| | 276 | 0.008 | | 289 | 0.209 |
| | 278 | 0.021 | Asi-70421 | 300 | 0.044 |
| | 280 | 0.004 | | 304 | 0.161 |
| | 282 | 0.012 | | 307 | 0.229 |
| | 284 | 0.200 | | 310 | 0.225 |
| | 286 | 0.004 | | 313 | 0.116 |

| | | | | | |
|-----------|-----|-------|-----------|-----|-------|
| | 294 | 0.004 | | 316 | 0.004 |
| | 296 | 0.008 | | 260 | 0.007 |
| | 298 | 0.008 | | 287 | 0.007 |
| | 300 | 0.228 | | 296 | 0.270 |
| | 304 | 0.041 | | 298 | 0.292 |
| | 306 | 0.004 | Asi-56700 | 300 | 0.109 |
| | 281 | 0.016 | | 302 | 0.044 |
| | 283 | 0.208 | | 304 | 0.044 |
| | 288 | 0.074 | | 310 | 0.161 |
| | 292 | 0.372 | | 312 | 0.066 |
| Asi-65194 | 294 | 0.005 | | 262 | 0.147 |
| | 300 | 0.09 | | 274 | 0.004 |
| | 302 | 0.085 | | 278 | 0.004 |
| | 304 | 0.085 | | 282 | 0.013 |
| | 314 | 0.065 | | 284 | 0.017 |
| | 263 | 0.098 | | 287 | 0.176 |
| | 269 | 0.053 | Asi-73843 | 290 | 0.164 |
| | 273 | 0.214 | | 293 | 0.118 |
| | 274 | 0.004 | | 295 | 0.218 |
| | 278 | 0.053 | | 298 | 0.046 |
| | 282 | 0.019 | | 300 | 0.060 |
| Asi-67123 | 284 | 0.049 | | 302 | 0.004 |
| | 287 | 0.192 | | 305 | 0.029 |
| | 291 | 0.011 | | 256 | 0.290 |
| | 294 | 0.144 | | 291 | 0.283 |
| | 297 | 0.147 | | 298 | 0.020 |
| | 303 | 0.008 | Asi-66034 | 300 | 0.195 |
| | 306 | 0.008 | | 303 | 0.058 |
| | | | | 306 | 0.150 |
| | | | | 312 | 0.004 |

2.2 遗传多样性分析

微卫星标记的遗传多样性检测结果显示(表 4), 10 个微卫星位点期望杂合度变化范围为 0.730 26~0.873 95, Shannon-Wiener 多样性指数变化范围为 1.561 61~2.219 60, 说明这 10 个微卫星标记具有较高的多态性, 可用于中华鲟亲子鉴定及系谱建立等遗传学分析。

表 4 中华鲟微卫星各位点的遗传信息

Tab.4 Genetic information of the microsatellite loci in *A. sinensis*

| 位点 | 等位基因数 | 期望杂合度 | Shannon-Wiener 多样性指数 |
|-----------|-------|----------|----------------------|
| Asi-75067 | 17 | 0.864 46 | 2.143 82 |
| Asi-67648 | 14 | 0.873 95 | 2.219 60 |
| Asi-67123 | 13 | 0.850 79 | 2.059 02 |
| Asi-73843 | 13 | 0.851 50 | 2.076 00 |
| Asi-72040 | 10 | 0.766 69 | 1.618 31 |
| Asi-70421 | 10 | 0.813 51 | 1.789 14 |
| Asi-56700 | 9 | 0.778 06 | 1.719 69 |

| | | | |
|-----------|----|----------|----------|
| Asi-65194 | 9 | 0.730 26 | 1.612 01 |
| Asi-77057 | 22 | 0.811 23 | 1.987 92 |
| Asi-66034 | 7 | 0.765 45 | 1.561 61 |

2.3 微卫星标记对已知亲本中华鲟家系的检测分析

通过对中华鲟繁殖亲本与子代基因型(表 5 和 6)比较发现, 位点 Asi-75067、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421 和 Asi-65194 对该家系成员扩增结果中, 子代与亲本基因型保持一致, 且 56 个子代基因型在该 6 个微卫星位点均呈杂合态。其余 4 个位点子代基因型与亲本基因型都存在不同程度的差异: 位点 Asi-67648 有 13 个子代个体的部分等位基因 330、333 和 336 不是来自亲本, 位点 Asi-56700 有 13 个子代个体的其中一个等位基因 310 不是来自亲本, 位点 Asi-77057 有 4 个个体的 7 个等位基因不是来自亲本, 位点 Asi-66034 有 2 个个体的一个等位基因 298 不是来自亲本, 其余个体全部等位基因均来源于亲本(表 6)。

表 5 中华鲟 10 个微卫星标记的基因型

Tab.5 Genotype of 10 microsatellite markers in *A. sinensis*

| 位点 | 父本基因型 | | | | 母本基因型 | | | | 子代 1 基因型 | | | |
|-----------|-------|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|
| Asi-75067 | 274 | 276 | 290 | 296 | 274 | 290 | 292 | 308 | 276 | 292 | 296 | 308 |
| Asi-67648 | 302 | 312 | 317 | 327 | 312 | 320 | 327 | 342 | 302 | 312 | 327 | 342 |
| Asi-67123 | 269 | 287 | 297 | | 263 | 273 | 284 | 297 | 269 | 273 | 287 | 297 |
| Asi-73843 | 287 | 293 | | | 262 | 290 | 295 | 298 | 262 | 287 | 293 | 298 |
| Asi-72040 | 301 | 307 | 311 | | 301 | 307 | 311 | | 301 | 307 | 311 | |
| Asi-70421 | 289 | 307 | 310 | 313 | 289 | 304 | 307 | | 289 | 304 | 307 | 310 |
| Asi-56700 | 298 | 300 | 312 | | 296 | 298 | | | 296 | 298 | 312 | |
| Asi-65194 | 292 | 304 | | | 283 | 288 | 292 | | 283 | 292 | 304 | |
| Asi-77057 | 262 | 284 | 300 | | 252 | 262 | 284 | 300 | 262 | 284 | 300 | |
| Asi-66034 | 256 | 291 | 300 | 306 | 256 | 291 | 300 | 303 | 256 | 291 | 300 | |

表 6 中华鲟子代与亲本等位基因比较结果

Tab.6 Comparison of the alleles between parents and offspring of *A. sinensis*

| 位点 | A | B | C | D | | | | | | |
|-----------|---|----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asi-75067 | √ | | | | | | | | | |
| Asi-67648 | | 13 | 3 | 330 | 333 | 336 | | | | |
| Asi-67123 | √ | | | | | | | | | |
| Asi-73843 | √ | | | | | | | | | |
| Asi-72040 | √ | | | | | | | | | |
| Asi-70421 | √ | | | | | | | | | |
| Asi-56700 | | 13 | 1 | 310 | | | | | | |
| Asi-65194 | √ | | | | | | | | | |
| Asi-77057 | | 4 | 7 | 248 | 250 | 260 | 264 | 280 | 282 | 298 |
| Asi-66034 | | 2 | 1 | 298 | | | | | | |

注: A: 子代全部等位基因来自亲本的位点; B: 非全部等位基因来自亲本的子代个体数; C: 来自非父母的等位基因个数; D: 非父母的等位基因。

2.4 排除率和累积排除率

由表 7 可知, 位点 Asi-75067 的排除率最高, 为 0.555 491; Asi-65194、Asi-77057 和 Asi-66034 三个位点的排除率较低, 均低于 0.4。依据中华鲟微卫星标记排除率由高到低的顺序(表 7), 当微卫星位点数目不小于 7 时, 累积排除率均大于 0.99, 分别为 0.992 799、0.999 681 和 0.999 998。因此, 确定 Asi-75067、Asi-67648、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、

Asi-70421 和 Asi-56700 等 7 个多态性较高的微卫星标记为中华鲟微卫星亲子鉴定体系。在某些标记不能顺利提供信息时,为达到排除率大于 0.99 的标准,把位点 Asi-65194、Asi-77057 和 Asi-66034 作为候选标记。

表 7 中华鲟微卫星标记的排除率及累积排除率

Tab.7 Exclusion probability and cumulative exclusion probability of different microsatellite markers for parentage testing in *A. sinensis*

| | PE1 | PE2 | PE3: | CPE1 | CPE2 | CPE3 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Asi-75067 | 0.555 491 | 0.717 114 | 0.880 012 | 0.555 491 | 0.717 114 | 0.880 012 |
| Asi-67648 | 0.534 586 | 0.699 645 | 0.867 453 | 0.793 119 | 0.915 034 | 0.984 096 |
| Asi-67123 | 0.526 405 | 0.692 778 | 0.862 250 | 0.902 022 | 0.973 896 | 0.997 809 |
| Asi-73843 | 0.523 063 | 0.690 126 | 0.859 557 | 0.953 271 | 0.991 911 | 0.999 692 |
| Asi-72040 | 0.442 998 | 0.620 577 | 0.806 304 | 0.973 972 | 0.996 931 | 0.999 940 |
| Asi-70421 | 0.431 458 | 0.609 188 | 0.788 036 | 0.985 202 | 0.998 801 | 0.999 987 |
| Asi-56700 | 0.407 490 | 0.585 600 | 0.771 956 | 0.991 232 | 0.999 503 | 0.999 997 |
| Asi-65194 | 0.396 250 | 0.575 876 | 0.762 169 | 0.994 706 | 0.999 789 | 0.999 999 |
| Asi-77057 | 0.399 454 | 0.577 398 | 0.758 192 | 0.996 821 | 0.999 911 | 1.000 000 |
| Asi-66034 | 0.366 892 | 0.555 952 | 0.725 063 | 0.997 987 | 0.999 959 | 1.000 000 |

注: PE1: 单亲排除率; PE2: 父权排除率; PE3: 双亲排除率; CPE1:单亲累积排除率; CPE2: 父权累积排除率; CPE3: 双亲累积排除率

3 讨论

3.1 微卫星标记的多态性

微卫星标记分析中检测到遗传座位越多,得到正确鉴定结果的概率越大;同时每个座位在群体中含有的等位基因数越多,得到正确鉴定结果的概率也会越高^[11]。本研究初步选择 10 个微卫星标记,对 68 个中华鲟个体进行遗传多态性检测,该标记组合的平均等位基因数为 12.4,且每个座位上等位基因数均不低于 6。杂合度反应微卫星标记多态性的变化^[12],本研究中 10 个微卫星标记平均期望杂合度为 0.810 59,平均 Shannon-Wiener 多样性指数为 1.878 712。综上所述,10 个微卫星标记均表现为高度多态性且能够提供丰富准确的遗传信息,可作为有效的遗传标记用于中华鲟亲子鉴定分析。

3.2 微卫星标记等位基因的分型

判定亲子关系的理论依据是孟德尔遗传定律,子代的基因组分别来自双亲。但微卫星标记在遗传过程中存在着突变的可能,且基因分型时,并非所有基因座都能获得正确的分型结果^[13]。由表 6 可知位点 Asi-75067、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421 和 Asi-65194 在中华鲟个体的扩增结果中,子代基因型均来源于亲本,符合孟德尔遗传规律。位点 Asi-67648、Asi-56700、Asi-77057 和 Asi-66034 在中华鲟个体的扩增结果中,子代部分基因型不存在于亲本基因型中,因此推测在遗传过程中,子代等位基因可能发生了基因突变或者错误分型。O'Reilly 等^[14]发现平均每个基因座位存在 2%~3%的基因分型错误而无法达到 100%的准确。如果个体在多个基因座位都出现错误的分型结果,就会产生错配现象,但如果在 1~2 个基因座位出现错误的分型结果,仍会得到正确结果^[15],因此位点 Asi-67648 和 Asi-56700 作为亲子鉴定核心体系不会影响亲子鉴定结果的准确性。此外,位点 Asi-65194、Asi-77057 和 Asi-66034 的排除率较低,故将其作为候选标记。

3.3 亲子鉴定分析

亲子鉴定中,常用的方法有二种:一种是基于排除概率的排除法;另一种是基于似然比的似然法。排除法是进行亲子鉴定最早使用且最为简单有效的方法^[16]。本研究主要应用排

除法分析多倍体中华鲟^[6]的亲亲子鉴定体系。Ellegren 等^[17]研究表明,组合 5 个微卫星座位(每个有 6 个以上的等位基因)可使排除率达 98%以上,使用 10 个这样的座位排除率可达 99.99%。张志和等^[18]和高建伟^[19]分别应用 18 对和 15 对微卫星座位对大熊猫和黑熊进行亲子鉴定研究,结果显示排除率均大于 99.99%。本研究中,标记数达到 5 个时,其单亲、父权、双亲累积排除率分别为 97.40%、99.69%、99.99%;标记数达到 7 个时,其单亲、父权、双亲累积排除率分别为 99.12%、99.95%、99.99%;标记数为 10 时,其单亲、父权、双亲累积排除率分别为 99.80%、99.99%、100%(表 7),其结果与 Ellegren 等的研究基本一致。基于亲子鉴定累积排除率不低于 99%的标准^[20]和尽量降低检测成本和减少工作量的原则,本研究确定微卫星标记 Asi-75067、Asi-67648、Asi-67123、Asi-73843、Asi-72040、Asi-70421 和 Asi-56700 为中华鲟亲子鉴定的核心体系。为进一步考虑亲子鉴定的准确性,下一步我们将在已有研究的基础上采用排除法和似然法相结合的方式,更为稳健的在多个中华鲟家系中开展亲子鉴定应用。

参考文献:

- [1] Wang C, Kynard B, Wei Q W, et al. Spatial distribution and habitat suitability indices for non-spawning and spawning adult Chinese sturgeons below Gezhouba Dam, Yangtze River: Effects of river alterations[J]. J Appl Ichthyol, 2013, 28: in press doi: 10.1111/jai.12094.
- [2]危起伟,李罗新,杜浩,等.中华鲟全人工繁殖技术研究[J].中国水产科学,2013,1:1-11.
- [3]王绍先,王飞,刘成柏.DNA 分子标记技术在濒危物种保护中的应用[J].生态学杂志,2008,27(2):250-256.
- [4]成为为,汪登强,危起伟,等.基于微卫星标记对长江中上游胭脂鱼增殖放流效果的评估[J].中国水产科学,2014,03:574-580.
- [5] Rodzen J F, Famula T R, Bernie May. Estimation of parentage and relatedness in the polyploid white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using a dominant marker approach for duplicated microsatellite loci[J]. Aquaculture, 2004, 232: 165-182.
- [6] Ludwig A, Belfiore N M, Pitra C, et al. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*)[J]. Genetics. 2001, 158: 1203-1215.
- [7]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的初步研究[J].水生生物学报,1999,6:547-553.
- [8] Salah M A, Iciar M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 4692-4693.
- [9] Van Puyvelde K, Van Geert A, Triest L. ATETRA, a new software program to analyze tetraploid microsatellite data: comparison with TETRA and TETRASAT[J]. Mol Ecol Resour, 2010, 10: 331-334.
- [10] Gerber S, Chabrier P, Kremer A. FAMOZ: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers[J]. Mol Ecol Notes, 2003, 3: 479-481.
- [11]钱林东,张自芳,田应华,等.利用微卫星DNA标记进行黄牛的亲子鉴定[J].云南农业大学学报,2010,25(1):69-74.
- [12]周磊,初芹,刘林,等.利用微卫星和SNP标记信息进行奶牛亲子鉴定的模拟研究[J].畜牧兽医学报,2011,42(2):169-176.
- [13] Lathrop G M, Hooper A B, Huntsman J W, et al. Evaluating pedigree data. 1. The estimation of pedigree error in the presence of marker mistyping[J]. Am J Hum Genet, 1983, 35: 241-262.
- [14] O'Reilly P T, Herbinger C, Wright J M. Analysis of parentage determination in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites[J]. Anim Genet, 1998, 29: 363-370.
- [15]董世瑞,孔杰,张天时,等.中国对虾微卫星家系鉴定的模拟分析与应用[J].水生生物学

报,2008,32(1):96-100.

[16] Jones A G, Ardren W R. Methods of parentage analysis in natural populations[J]. *Mol Ecol*, 2003, 12: 2511-2523.

[17] Ellegren H, Johansson M S, berk K, et al. Cloning of highly polymorphic microsatellite in the horse[J]. *Anim Genet*, 1992, 23: 133-142.

[18] 张志和,沈富军,孙 珊,等.应用微卫星分型方法进行大熊猫父亲鉴定[J].*遗传*,2003,25(5):504-510.

[19] 高建伟.应用微卫 DNA 标记对延边圈养黑熊进行亲子鉴定和遗传多样性研究[D].延边大学,2012.1-97.

[20] 郭立平,徐 丽,朱 淼,等.西门塔尔牛微卫星亲子鉴定体系的优化[J].*畜牧兽医学报*,2013,44(6):871-879.

(责任编辑:张潇嵒)

