中国对虾微卫星家系鉴定的模拟分析与应用

董世瑞[1,2]　孔　杰[1]　张天时[1]　孟宪红[1]　王如才[2]
(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 青岛　266071;
2. 天津商业大学生物工程系, 天津　300134)

摘要: 本研究基于中国对虾群体所获的微卫星标记等位基因频率进行了计算机模拟分析, 并选择 5 个微卫星标记, 就单独养殖家系群体微卫星标记家系鉴定的准确性及混养家系群体微卫星标记家系鉴定的应用价值做了研究。模拟分析表明 4 个微卫星标记可以鉴定 95 %的后裔。而单独养殖的家系鉴定准确率达到 92.9 %, 在 30 个可能的父母对, 215 尾中国对虾组成的混养家系群体中, 90.7 %的后裔可以鉴定其父母。本研究结果表明微卫星分子标记可以应用于中国对虾的家系鉴定。模拟分析与实际应用的差异及父母与子代间的错配部分原因是由于无效等位基因的出现, 基因分型错误也是一个重要原因。基于父母 LOD 值的分析可以降低错配的几率。

关键词: 中国对虾; 微卫星; 家系鉴定; 模拟分析
中图分类号: Q344^{+}.5　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3207(2008)01-0096-06

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国重要的海水养殖品种。近年来, 单从数量上来说, 自然群体的保持多半依靠放流来维持[1], 放流中少量的有效育种亲体增加了近交几率, 也已影响了自然群体的遗传多态性[2]。为减少近交造成个体生活力降低, 保持中国对虾的遗传多态性, 必须弄清育种亲体的家系信息, 以确保育种亲体无亲缘关系。

在实施中国对虾的生长、抗性相关选育规划时, 必须估计这些性状的遗传力以确定选择方法及强度。遗传力的估计要求精确的家系信息, 要求减少对对虾生长性状有显著影响的全同胞、半同胞之间的环境差异。而中国对虾通过蜕皮完成其生长发育, 这一生理特点使得应用在鱼类、贝类的外部标记难以实现。因此, 为了保持家系信息外, 获得家系个体的生长和存活特征, 来自每个家系的后代必须分开放在不同的养殖池中。这不仅仅是空间的占用及管理强度的加大, 更重要的是不同的环境效应影响了不同家系性状。这种影响会导致所研究的性状遗传参数的估计偏差变大。而一旦获得混养环境下可靠的家系信息, 就能够最大可能地消除环境的影响, 准确地估计性状的遗传参数。

高度多态的遗传标记, 如小卫星及微卫星, 为选育中保持家系信息、确定亲缘关系、追踪家系提供了有用的工具[3,4]。微卫星标记作为调查遗传多态性和进行系谱追踪的有用工具[5—8], 已显现了强大的家系确证作用[9]。如果已知父母的基因型, 微卫星标记能在没有外部物理标记及不需分开养殖的情况下区分出混养群体所属的家系[10]。有关研究[5,8,11—17]证实了微卫星标记在确证父母、分析家系关系和确定种属关系中的应用价值。目前尚未见将微卫星应用于中国对虾家系鉴定的报道。本研究基于群体中微卫星座位的等位基因频率进行计算机软件模拟分析, 并选择 5 个微卫星座位, 研究其在中国对虾家系鉴定中的应用能力及实际应用价值, 为中国对虾的选育提供必要的分子生物学工具, 为实施中国对虾育种规划提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料　材料取自于山东即墨黄海水产研究所实验基地。材料一: 2004 年 5 月初, 通过人工精荚移植获得 5 个单独养殖的全同胞家系。2004 年 8 月底从一个家系取 38 尾, 另 4 个家系各取 40 尾。材料二: 2004 年 4 月底, 人工精荚移植方法使 5 尾雄虾与 6 尾雌虾交尾。产卵后每个家系取 200 粒卵混合

收稿日期: 2006-02-28; **修订日期**: 2006-09-18
基金项目: 863 计划(2005AA603210); 国家自然科学基金(30500378)资助
作者简介: 董世瑞(1973—), 男, 山东平度人; 博士研究生; 主要从事遗传育种研究。E-mail: dongshirui@163.com
通讯作者: 孔杰, 研究员, E-mail: kongjie@sina.com

培养,4 组重复。9 月初将各组存活个体样品保存于 - 20 ℃。

1.2　DNA 提取和微卫星座位分析　基因组 DNA 的提取参照刘萍等[18]的方法。根据刘萍等[19]、张天时等[20]的结果选择 5 对微卫星引物:RS0683、EN0033、RS062、RS0622、RS1101。反应程序参照张天时等[20]。8 %的聚丙烯酰氨凝胶电泳检测 PCR 产物。结果用扫描仪记录,BandScan 4.3 分析扫描结果,进行基因分型,并进行人工校正。

1.3　家系鉴定分析

1.3.1　模拟分析　根据张天时等[20]在群体中获得的微卫星等位基因频率,应用 CERVUS2.0 软件模拟估计家系鉴定能力与微卫星座位数目的关系。

1.3.2　分养家系　基于每一个体的基因型用 CERVUS2.0 进行亲权分析,计算候选父母的 LOD 值,LOD 值最大者认为是真实父母。分开养殖的 5 家系鉴定结果与实际结果相比较,计算鉴定准确率,估计微卫星基因座位在家系鉴定分析中的准确性和可靠性。

1.3.3　混养家系　CERVUS2.0 软件计算混养群体各微卫星座位等位基因频率、杂合度、期望杂合度、多态信息含量、平均排除概率、Hardy-Weinberg 平衡及无效等位基因频率,并据 LOD 值鉴定每一个体的父母。

2　结果与分析

2.1　微卫星基因座位的扩增

所用 5 对微卫星引物均能扩增出目的条带。部分电泳结果(图 1、图 2)。

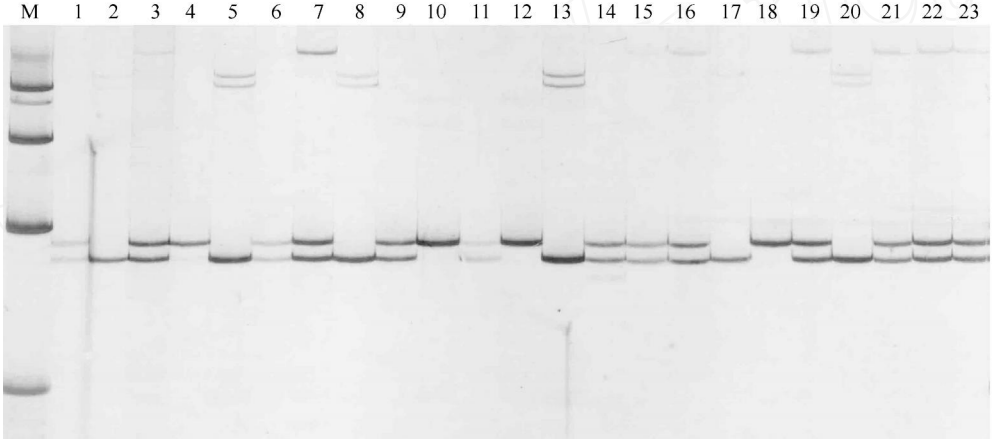

图 1　RS1101 引物在单独养殖家系的扩增图谱

Fig. 1　Demonstration of primer RS1101 in single families

M 为 marker, 1 —23 为家系个体

M denotes marker, 1 —23 denotes individuals of the family

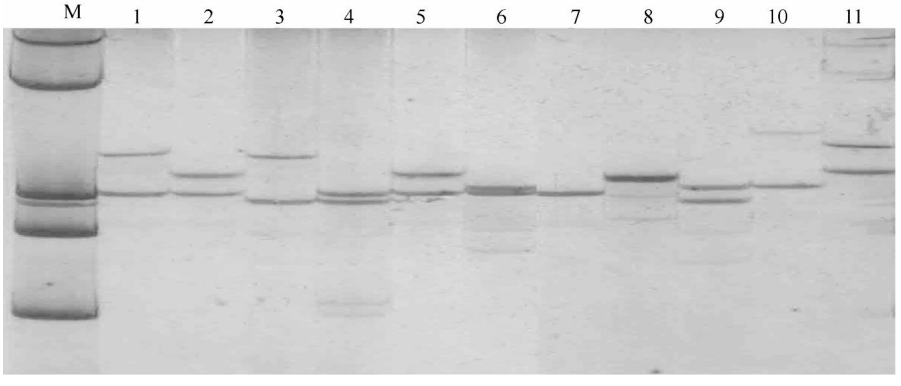

图 2　RS0683 引物在混养家系群体的扩增图谱

Fig. 2　Demonstration of primer RS0683 in mixed families

M 为 marker,1 —11 为家系亲本

M denotes marker, 1 —11 denotes parents of the families

2.2 模拟分析

CERVUS2.0 模拟结果(图 3)表明,在个体父母双方基因型都未知情况下,8 个微卫星座位的排除概率从 37.4 %到 73 %之间,只有一个单亲基因型记录时的排除概率在 55.1 % 到 84.4 %之间。两种情况下,8 个座位的综合排除概率都超过了 99 %。模拟分析结果显示在中国对虾中要达到 95 %以上的排除率,最少需要 4 个多态性的微卫星座位。

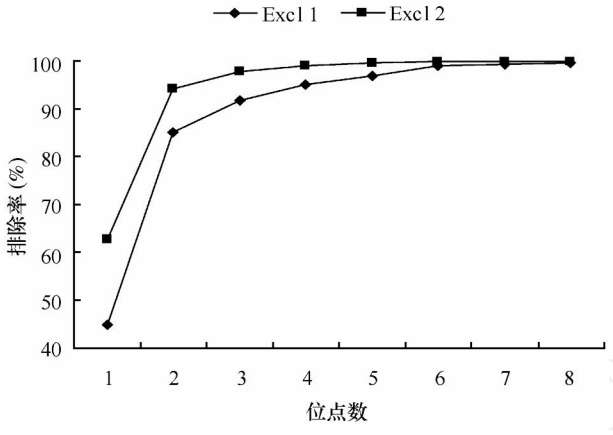

图 3 8 个微卫星座位的累积排除率

Fig. 3 Combined probabilities of exclusion calculated over the eight polymorphic loci

双亲未知时排除率(Excl 1),已知单亲时排除率(Excl 2)

Probabilities of exclusion genotype of no parent known (Excl 1) or one parent known (Excl 2)

2.3 微卫星鉴定准确率

5 个微卫星座位在分养中国对虾家系获得的等位基因数目从 5 到 8 条不等。共对 208 尾对虾进行了基因分型,包括 10 尾亲虾及其 198 尾后代(部分电泳结果见图1)。家系鉴定结果与养殖记录比对结果表明,198 尾后代个体中,有 14 尾没有找到正确的父母。单一座位的鉴定准确率分别为 37 %、54 %、38 %、40 %、40 %。5 个微卫星座位的累积鉴定准确率达到 92.9 %。5 个微卫星座位联合鉴定单一父本或母本的准确率分别为 95 %和 96 %(图 4)。

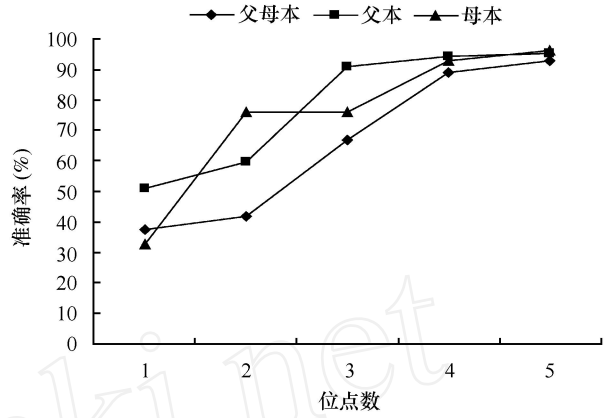

图 4 五个微卫星座位对母本、父本、父母本的累积鉴定准确率

Fig. 4 Cumulative assignment success of progeny to correct dam, sire and parent-pair based on parent and offspring genotypes

2.4 混养群体家系鉴定

在 5 个微卫星座位对 226 尾混养对虾个体进行了扩增和基因分型,包括 6 尾候选母本和 5 尾候选父本及其 215 尾子代(部分电泳结果见图 2)。基因型应用 CERVUS2.0 软件分析结果(表 1)。为保证鉴定结果准确,据 LOD 值鉴定候选父母时,只有所有微卫星座位全部匹配,并符合亲本交配体制的才确认亲子关系。最终确认了 195 尾混养后裔的父母,混养家系群体的鉴定率为 90.7 %。

表 1 5 个微卫星座位在混养家系检测值

Tab. 1 Detective values of five microsatellite loci

基因座位 Loci	k	n	Hets	Homs	H(O)	H(E)	PIC	Excl 1	Excl 2	HW	无效等位基因频率 Null frequency
RS0683	12	226	197	29	0.872	0.884	0.871	0.620	0.766	NS	+ 0.0041
RS062	10	226	188	38	0.832	0.831	0.808	0.493	0.664	**	+ 0.0019
RS0613	10	226	224	2	0.991	0.847	0.826	0.522	0.689	**	- 0.0816
RS1101	12	226	220	6	0.973	0.891	0.879	0.635	0.777	**	- 0.0475
EN0033	16	226	221	5	0.978	0.923	0.916	0.726	0.841	NS	- 0.0306

注:等位基因数目(k),检测个体数目(n),杂合子(Hets),纯合子(Homs),观察杂合度 H(O),期望杂合度 H(E),多态信息含量(PIC),双亲未知时排除率(Excl 1),已知单亲时排除率(Excl 2),哈迪温伯格平衡检验(HW),NS 表示符合,** 表示偏离极显著

Note: Number of alleles (k), number of individuals (n) genotyped, number of heterozygotes, number of homozygotes, observed heterozygosities H(O), expected heterozygosities H(E), polymorphic information content (PIC), probabilities of exclusion based either on the genotype of no parent known (Excl 1) or one parent known (Excl 2), test of Hardy-Weinberg expectations (HW), NS demonstrates conformance, ** demonstrates significant departure

3　讨　论

3.1　模拟分析

计算机模拟分析可以根据微卫星座位的等位基因数据提供进行家系鉴定的可行性等的信息[21]。但在应用微卫星分子标记进行日本对虾的亲缘关系鉴定中发现,实际所得的鉴定率远远低于模拟分析所预期的鉴定率[10]。本研究基于几个微卫星标记在群体中检测的基因频率进行了模拟分析。分析结果表明5个微卫星标记能够对95%以上的个体进行家系鉴定。实际应用中,5个微卫星标记在单独养殖的家系中可以达到92.9%的准确率。在混养的家系群体中可以进行90.7%后裔的鉴定。实际的应用与模拟分析的结果有差异。因此,应用微卫星分子标记进行中国对虾的亲缘关系鉴定时,虽然可以预先就群体研究中所得的等位基因频率进行模拟分析,以减少研究规划与决策的盲目性,降低成本,但其在确定家系鉴定所需的微卫星标记数目及多态性要求等方面的应用价值有限。

3.2　中国对虾的家系鉴定

实施选育规划中保持家系内和家系间的信息必须选择合适的标记。通常采用的颜色等外部的物理标记方法有明显不足之处[10]。微卫星分子标记以其数量多、分布广、多态性丰富等诸多优点而广泛应用于构建连锁图谱、个体鉴定、亲子鉴定、遗传多样性分析、疾病诊断、基因定位等诸多领域。近年来的研究证实,微卫星分子标记可以有效地保持混养群体的家系信息。Perez-Enriquez 等[8]在真鲷(*Pagrus major*)中,用4至5个微卫星标记在7800个可能的父母对中为73%的后裔找到亲本。用4个微卫星标记,94.3%的大西洋鲑(*Salmo salar*)可以正确地鉴定其亲本[22]。8个微卫星标记理论上可以在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)140×140的或虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)34×34的交配体制中对95%甚至更多的后裔进行家系鉴定[23]。在日本对虾(*Penaeus japonicus*)中,Sugaya 等[24]用5个微卫星位点鉴定了个体间的亲缘关系,而 Jerry 等[10]由于低质量的DNA,用6个微卫星位点仅鉴定了47%的个体。

本研究在单独养殖的家系中,用5个微卫星标记对198个后裔进行家系鉴定,其准确率达到92.9%。在混养家系群体中,这5个微卫星标记能在30个可能的父母对中对90.7%的后裔进行鉴定。结果证实在中国对虾中应用较少几个微卫星标记能够对混养群体进行家系鉴定,鉴定个体间的亲缘关系,从而为微卫星分子标记在中国对虾遗传选育、生产中的大规模应用提供了依据。

3.3　中国对虾家系鉴定影响因素

影响家系鉴定准确性的一个重要原因是无效等位基因的存在。对于微卫星标记座位,无效等位基因常由于引物结合位点的突变、插入或缺失导致引物无法结合而产生。在多个物种的群体分析中已证实无效等位基因的存在[25—27]。本研究的5个微卫星标记在混养家系群体中有3个偏离哈迪-温伯格平衡,显示无效等位基因的存在。无效等位基因频率高于5%的位点不能应用于家系鉴定中[28]。除了无效等位基因的影响外,基因分型错误也是父母与后裔间的错配的原因。实际上基因分型数据不可能达到100%的准确。O'Reilly 等[29]在研究中发现平均每个基因座位2%—3%的分型错误。本研究中,候选父母的选择以LOD为依据,如果个体在多个位点都出现错误的分型结果,则会得到较小的LOD值,此时会出现错配的现象。但如果微卫星标记的鉴别能力较高,即使在1—2个座位出现错误的分型结果,仍然会得到正确结果。

参考文献:

[1] Deng J Y, Zhuang Z M. The cause of recruitment variation of *Penaeus chinensis* in the Bohai Sea [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, **7**(4): 125—128 [邓景耀, 庄志猛. 渤海对虾补充量变动的分析及对策研究. 中国水产科学, 2001, **7**(4): 125—128]

[2] Zhuang Z M, Shi T, Kong J, *et al*. Genetic diversity in *Penaeus chinensis* shrimp as revealed by RAPD technique [J]. *Progress in Natural Science*, 2001, **11**(6): 432—438

[3] O'Reilly P T, 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]? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1998, **55**: 1553—1563

[5] Herbinger C M, Doyle R W, Pitman E R, *et al*. DNA fingerprint based analysis of parental and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout [J]. *Aquaculture*, 1995, **137**: 245—256

[6] Blouin M S, Parsons M, Lacaille V L S. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness [J]. *Mol. Ecol.*, 1996, **3**: 393—401

[7] 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

[8] Perez-Enriquez R, Takagi M, Taniguchi N. 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

[9] Stephen S M, Vicki W, Gerard P D, *et al*. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 1999, **173**: 19—32

[10] Dena R J, Nigel P P, Peter J, *et al*. Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus* (*Marsupenaeus*) *japonicus* using microsatellite markers (Bate) [J]. *Aquaculture*, 2004, **235**: 237—247

[11] Takuma S, Minoru I, Hideshi M, *et al*. Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use for kinship estimation in Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Fisheries Science*, 2002, **68**: 299—305

[12] Jackson T R, Martin-Robichaud D J, Reith M E. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock [J]. *Aquaculture*, 2003, **220**:245—259

[13] 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

[14] Sekino M, Sugaya T, Hara M, *et al*. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2004, **233**: 163—172

[15] Marc V, Martin K, Stephane M, *et al*. Heritability estimates for growth-Related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Aquaculture*, 2004, **235**: 223—236

[16] McDonald G J, Danzmann R G, Ferguson M M. Relatedness determination in the absence of pedigree information in three cultured stains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 2004, **233**: 65—78

[17] Jaime C, Carmen B, Pablo P, *et al*. Potential sources of error in parentage assessment of terbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci [J]. *Aquaculture*, 2004, **242**: 119—135

[18] Liu P, Kong J, Shi T, *et al*. RAPD analysis of wild stock of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in the China's coastal waters of Huanghai and Bohai Seas [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2000, **22**(5): 89—93 [刘 萍, 孔杰, 石拓, 等. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析. 海洋学报, 2000, **22**(5): 89—93]

[19] Liu P, Meng X H, Kong J, *et al*. Polymorphism of microsatellite DNA in penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) [J]. *Progress in Natural Science*, 2004, **14**(3): 333—338 [刘 萍, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国对虾微卫星 DNA 多态性分析. 自然科学进展, 2004, **14**(3): 333—338]

[20] Zhang T S, Wang Q Y, Liu P, *et al*. Genetic diversity analysis on selected populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by microsatellites [J]. *Oceanoligia et Limnologia Sinica*, 2005, **36**(1): 72—80 [张天时, 王清印, 刘萍, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 人工选育群体不同世代的微卫星分析. 海洋与湖沼, 2005, **36**(1): 72—80]

[21] Wilson A J, Ferguson M M. Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications, and practical considerations [J]. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 2002, **59**: 1696—1707

[22] Ashie T N, Daniel G B, Edward P C. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers [J]. *Aquaculture*, 2000, **182**: 73—83

[23] Estoup A, Gharbi K, San C M, *et al*. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations [J]. *Can. J. Fish. Aqut. Sci.*, 1998, **55**: 715—725

[24] Sugaya T, Ikeda M, Mori H, Taniguchi N. Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use for kinship estimation in Kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Fish. Sci.*, 2002, **68**: 299—305

[25] Jones A G, Stockwell C A, Walker D, *et al*. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish [J]. *J. Hered.*, 1998, **89**: 339—342

[26] Banks M A, Blouin M S, Baldwin B A, *et al*. Isolation and inheritance of novel microsatellites in Chinook salmon (*Oncorhynchus tachawytscha*) [J]. *J. Hered.*, 1999, **90**: 281—288

[27] Alderson G W, Gibbs H L, Sealy S G. Parentage and kinship studies in an obligate brood parasitic bide, the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*), using microsatellite DNA markers [J]. *J. Hered.*, 1999, **90**: 182—190

[28] Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B, *et al*. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations [J]. *Mol. Ecol.*, 1998, **7**: 639—655

[29] 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

MICROSATELLITE MARKERS SIMULATION AND APPLICATION FOR PARENTAGE DETERMINATION ON FENNEROPENAEUS CHINENSIS

DONG Shi-Rui[1,2], KONG Jie[1], ZHANG Tian-Shi[1], MENG Xian-Hong[1] and WANG Ru-Cai[2]

(1. *Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071; 2. *Department of Bioengineering, Tianjin University of Commerce, Tianjin* 300134)

Abstract: This study was initiated to assess the feasibility of parentage determination in aquaculture populations for Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Under different scenarios both simulation and reality, microsatellite markers were used to assign parentage to offspring. Simulations based on allele frequency data from the population of Chinese shrimp demonstrated that at least 4 loci were required to assign over 95 % of progeny. When marker data from five loci were combined, the assignment success of progeny to their true parental couple increased to 92.9 % in parentage identification with known parental and filial information. Out of 215 offspring, 90.7 % was assigned to their parental pairs exclusively in mixed families groups. This study showed that the pedigree of progeny in mixed families could be satisfactorily determined using as few as five microsatellite markers even though the shrimp could have originated from 30 possible pairs. Discrepancies between the simulations and real data sets were considered to be largely due to the mismatches caused by scoring errors at microsatellite loci. Analysis for the value of LOD would reduce the error occurred in parentage determination on Chinese shrimp. Based on these results, it was concluded that the use of a number of microsatellite markers represented a realistic and effective alternative to physical tagging in a selection program and it allowed the identification of parental effects on offspring performances from the early life stages.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; Microsatellite marker; Parentage determination; Simulation