

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01447

## 建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)微卫星 DNA 亲权鉴定

顾颖<sup>1</sup>, 李超<sup>1</sup>, 鲁翠云<sup>1</sup>, 郑先虎<sup>1</sup>, 俞菊华<sup>2</sup>, 孙效文<sup>1</sup>

1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 农业部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150070;
2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081

**摘要:** 利用 16 个微卫星座位对建鲤 10 个全同胞家系 647 个子代进行亲权鉴定。Cervus3.0 分析表明, 16 个微卫星位点的平均多态信息含量为 0.7025, 平均等位基因数为 6.63, 期望杂合度平均为 0.7405。当双亲未知时, 累积排除概率为 0.999225, 已知单亲时的累积排除概率为 0.999996, 置信度为 95%。进一步模拟分析表明, 要达到亲权鉴定的要求在双亲未知时通常需要 8~12 个微卫星位点, 已知单亲时需要 5~8 个微卫星位点。在双亲均未知的情况下进行亲权鉴定, 94.6% 的后裔找到了其父母本, 真实鉴定率低于模拟分析预测值, 分析可能是与候选亲本间存在亲缘关系、无效等位基因的存在以及分型错误等因素有关。9 个建鲤全同胞家系的鉴定, 为今后的遗传图谱构建、QTL 定位及分子标记辅助育种研究奠定了基础。

**关键词:** 建鲤; 亲权鉴定; 微卫星

## Microsatellite markers for parentage identification in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)

GU Ying<sup>1</sup>, LI Chao<sup>1</sup>, LU Cui-Yun<sup>1</sup>, ZHENG Xian-Hu<sup>1</sup>, YU Ju-Hua<sup>2</sup>, SUN Xiao-Wen<sup>1</sup>

1. Freshwater Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding Key Lab of Ministry of Agriculture, Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin 150070, China;
2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

**Abstract:** Using 16 microsatellite loci we estimated the parentage of 647 progeny in 10 Jian Carp full-sib families. Cervus 3.0 analysis showed that mean PIC value of 16 microsatellites, mean number of allele, and mean expected heterozygosity were 0.7025, 6.63, and 0.7405, respectively. The combined probability of exclusion was 0.99922456 when both parents were unknown and the combined probability of exclusion was 0.99999557 when only one of the parental genotype was known, with the confidence level of 95%. Further simulations based on allele frequencies suggested that to achieve the requirements of paternity test usually took 8 to 12 microsatellite loci when both parents were unknown and 5 to 8 microsatellite loci when one parent was known. Out of 647 progenies, 94.6% were assigned to their parental pairs without the information of both parents in parentage analysis, which were lower than the theoretical assignment rates predicted by the

收稿日期: 2012-03-28; 修回日期: 2012-05-12

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(编号: 200903045), 国家重点基础研究发展计划项目(编号: 2010CB126305)和农业部“引进国际先进农业科学技术”重点项目(编号: 2011-G12) 资助

作者简介: 顾颖, 硕士, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。Tel: 13009854660; E-mail: xiaoyezigu@tom.com

通讯作者: 孙效文, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 水产动物基因工程育种。E-mail: sunxw2002@163.com

网络出版时间: 2012-9-10 11:01:33

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120910.1101.004.html>

Cervus simulations. This could be explained by the relationship between the candidate parents or existence of null and by typing errors. The identification of 9 families was useful for linkage analysis of Jian Carp and QTL location, also for marker assisted selection for economical traits.

**Keywords:** Jian Carp; parental identification; microsatellite

亲权鉴定(Parentage identification)又称亲子鉴定,是指利用医学、生物学以及遗传学等理论技术,分析子代与亲代之间的遗传关联,判断他们是否具有亲缘关系<sup>[1,2]</sup>。目前亲权鉴定已经广泛应用于法医检验<sup>[3,4]</sup>、畜牧业生产<sup>[2]</sup>及动物遗传育种繁殖等领域当中<sup>[5]</sup>。在当前水产动物育种中也有着普遍的应用,特别是在家系混养条件下,需要通过亲权鉴定找到各子代的父母本,保持混养群体的家系信息。

建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)是我国淡水渔业研究中心采用一系列综合育种技术经 6 代定向选育而成的优良新品种,是国家“八五”重点科技成果推广项目,具有生长快、肉质好、饲料转化率高、适应性和抗病力强、遗传性状稳定、不需杂交制种等优点。与现有鲤鱼品种相比,普遍增产 30% 以上,建鲤的推广普及,推动了我国淡水养殖业的发展<sup>[6,7]</sup>。但是作为人工育成的新品种,建鲤培育技术复杂,面临在大规模推广过程中自然和人为的负面效应,如果不注意选种育种,往往会造成质种退化、产量下降以及其他性状变差。因此加强建鲤选育工作是十分必要的。良种选育通常从两方面入手,一方面是家系选育,根据家系信息准确选留亲本,避免近交衰退现象的产生,另一方面是分子标记辅助育种,利用与目标性状紧密连锁的分子标记对性状进行直接选择,也可以有效的加快育种进程,此技术也要求明确的家系信息。因此,完整准确的家系系谱信息是建鲤良种选育的前提。但是在具体实施过程中,为了节约空间,减小管理强度,避免外界环境因素引起表型值误差,实现家系遗传参数的准确评估,多采用不同家系混养的方式,为此引入了亲子鉴定技术。

微卫星作为近年来发展迅速、应用广泛的分子标记,具有多态性高、保守性好、呈共显性遗传及符合孟德尔遗传规律等优点,在群体遗传<sup>[8]</sup>、遗传连锁图谱构建<sup>[9]</sup>、亲缘关系划分<sup>[10,11]</sup>及种质结构分析<sup>[12]</sup>

等领域发挥着巨大的作用。它能弥补和克服在形态学鉴定、同工酶、RFLP 等许多缺陷和难题,极大的提高了亲权鉴定能力,成为动物个体识别和亲权鉴定的首选标记。目前微卫星标记已成功应用于许多物种的亲缘关系分析,在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[13]</sup>、真鲷(*Pagrus major*)<sup>[14]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[15]</sup>、斑节对虾(*Penaeus monodon*)<sup>[16]</sup>、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)<sup>[17]</sup>、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*, Thunberg)<sup>[18]</sup>、大西洋鲑(*Salmo salar*)<sup>[19]</sup>等水产经济动物也有相关报道。在鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)中, Vandeputte 等<sup>[20]</sup>利用 8 个微卫星标记在 10 个候选母本、24 个候选父本中为 550 个鲤鱼子代中 95.3% 的个体找到了父母本。Van deputte 等<sup>[21]</sup>利用 3 种鱼(欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)、鲤鱼和虹鳟)进行了模拟分析与实际鉴定结果的比较,结果表明,实际所得的鉴定率要远远低于模拟分析所预期的鉴定率。目前还没有关于建鲤亲权鉴定方面的报道。本研究利用筛选好的 16 对鲤鱼微卫星标记对 10 个建鲤全同胞家系进行亲权鉴定,探讨家系混养条件下,微卫星辅助建鲤家系构建的可行性,为今后建鲤的良种选育工作奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 家系构建

实验用鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,2010 年 4 月选取 10 对后备亲鱼作为建鲤亲本,经过一对一雌雄交配,产生 10 个建鲤全同胞家系,编号分别为 1#~10#,投放 2 000 尾(每个家系取约 200 尾)于 2 亩池塘混养,2010 年 12 月随机取出其中的 647 尾,其中 10#家系父母本样品丢失,其余 9 个家系亲本记录明确。

### 1.2 基因组 DNA 的提取及引物设计

抽取 20  $\mu\text{L}$  建鲤血样,加入 400  $\mu\text{L}$  的裂解液

(0.5%的十二烷基肌胺酸钠、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  蛋白酶 K、0.5 mol/L EDTA), 55 温育 1~2 h, 酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀。风干后, 加入 1 $\times$ TE 溶解。1%的琼脂糖检测 DNA 的质量及估测浓度。

从已建立的鲤鱼遗传连锁图谱上选取多态性丰富的微卫星标记, 这些标记由本实验室开发<sup>[22]</sup>, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物信息见表 1。

### 1.3 PCR 扩增及检测

建立 15  $\mu\text{L}$  反应体系, 包括 PCR 混合缓冲液 11  $\mu\text{L}$ (10 mmol/L Tris-Cl(pH8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.01%明胶, 0.1% Tween-20, 0.1% NP-40, dNTP 各 2 mmol/L), 上下游引物(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ )1  $\mu\text{L}$ , *Taq* DNA 聚合酶(Promega)1 U, 补无菌水到 15  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程度: 94 预变性 3 min; 94 30 s, 复性 30 s(各引物复性温度见表 1), 72 延伸 30 s, 25 个循环; 72 延伸 5 min, 4 保存。扩增产物在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离, 硝酸银染色。用 Gel-Pro Analyzer

4.5 软件判读基因型, 确定等位基因大小, 并进行人工校正。

### 1.4 家系鉴定

建立子代(647 个体)和亲本(9 对)的基因型数据库, 采用自编的标记数据转换软件将 0、1 矩阵转化为 Genepop 格式。运行 Cervus3.0 软件获得各微卫星座位的遗传多样性参数, 包括等位基因数、杂合度、多态信息含量、单位点排除概率及累积排除概率等, 并进行 Hardy-Weinberg 平衡检验; 根据位点等位基因频率模拟分析这 16 个微卫星位点的家系鉴定能力。然后进行亲权分析, 计算候选亲本的 *LOD* 值, *LOD* 值越大越可能是真实的父母本。本研究中双亲基因型均未知, 因此将候选亲本中 *LOD* 值最大的两个亲本确定为该子代的父母本。计算鉴定率, 即分配到各家系的个体比例。

### 1.5 聚类分析

利用 Popgene 软件计算建鲤家系间的 Nei 氏遗传距离和相似性指数, 通过 PHYLIP 程序中的

表 1 16 个鲤鱼微卫星座位的基本信息

基因座	引物序列(5'→3')	复性温度( )	核心序列	片段大小(bp)	GenBank 登录号
HLJ3473	F: CAGTGCCCAAAAAACAATGC R: TGAATGCTGAAAAACAACCAG	60	(AGAT) <sub>8</sub>	178~217	JN687019
HLJ3762	F: AGCCCAACTCTTCTCTCTTAGT R: CGGAACCTGCTGATACACAA	60	(TTTTC) <sub>6</sub>	227~280	JN687092
HLJ3697	F: CTGACGGTTCATTTCCAGT R: CGGTGTTCACCTGTTTGA	60	(AAATA) <sub>7</sub>	243~277	JN687072
HLJ3086	F: AGGCATGCATATGAGCACAG R: CAAACTTTTTGAACAGTAGTGTGTGT	60	(AAT) <sub>6</sub>	228~264	JN686956
HLJ3993	F: GCTTCTCCTAAACCTCAAGTCC R: CCCACAACGGTCAAAAAT	57	(TCTA) <sub>20</sub>	196~240	JN687148
HLJ3633	F: GACCTCAAACCTTACGAACGGTA R: CCACCTCAGATTAGTGCCAAA	60	(TATT) <sub>10</sub>	187~228	JN687061
HLJ3757	F: GCTAAAATGAACTGGAAGTGAATG R: TGTGTGATTGTTGTGGAAGGA	60	(TAAAA) <sub>7</sub>	209~247	JN687089
HLJ3516	F: TGTCTTTATTATTTCCAGTTGC R: GCCCTCAATCCAGCGTCT	60	(ATCT) <sub>10</sub>	187~233	JN687028
HLJ3734	F: GAAACCGTGAAGAATGAGCA R: CAGCACAAAATGATGGATGA	60	(AAAT) <sub>7</sub>	176~237	JN687082
HLJ3857	F: CGCTTACCTTTTCTATTTTCTG R: AGAGCACCAGGGCAACATT	60	(TCTA) <sub>11</sub>	233~297	JN687117
HLJ1140	F: TTTGCTGTATCCCAAAAATGC R: CATCAACATTGAAATCGCAATC	60	(AGAT) <sub>8</sub>	163~227	EU861322
HLJ3951	F: GCATAAAGAAAAGCAGGAAATG R: CAAGAACTCCCAAGGCTGAG	60	(TTA) <sub>11</sub>	229~285	JN687136
HLJ3291	F: TCCATCAGTCACACAAGTCCTC R: GGGTCTTGTGGCGTTAGTG	60	(ATT) <sub>19</sub> +(TG) <sub>3</sub>	180~226	JN724874
HLJ2917	F: GACATTTGATTGGTGTATTTTCATC R: GTTGGCTCCCCTTCTGTA	60	(ATT) <sub>7</sub>	228~272	JN686929
HLJ3952	F: GCAAGCATTCTCCACTTC R: CTTTTCCACCCTTTTCAGC	60	(TTTTA) <sub>6</sub>	303~360	JN687137
HLJ3586	F: TTGTGTGAAATACAGGAGACCAG R: CAACCGCCACTTTGAGTTTA	60	(ATAG) <sub>6</sub>	213~262	JN687046

UPGMA 方法进行聚类分析, 构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 家系遗传多样性分析

所用 16 个微卫星标记在建鲤群体中均能扩增出目的条带, 部分电泳结果见图 1。

运行 Allele frequency analysis 程序获得 16 个微卫星座位在 10 个家系中的遗传参数信息。结果表明这, 16 个位点均表现出较好的多态性, 各位点等位基因数在 4~9 个, 平均为 6.63 个。观测杂合度在

0.522~0.907 之间, 期望杂合度在 0.554~0.840 之间, 位点多态信息含量在 0.483~0.823 之间, 平均为 0.7025, 其中 15 个位点为高度多态位点( $PIC>0.5$ ), 只有 *HLJ3086* 为中度多态位点( $0.25<PIC<0.5$ )。Hardy-Weinberg 平衡检验显示, 只有位点 *HLJ3952* 符合 Hardy-Weinberg 平衡, 其余 15 个位点均极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P<0.01$ )(表 2)。

### 2.2 微卫星位点排除率及鉴定率分析

排除率分析表明, 微卫星位点的排除概率与其位点数和多态信息含量成正比。当双亲基因型均未

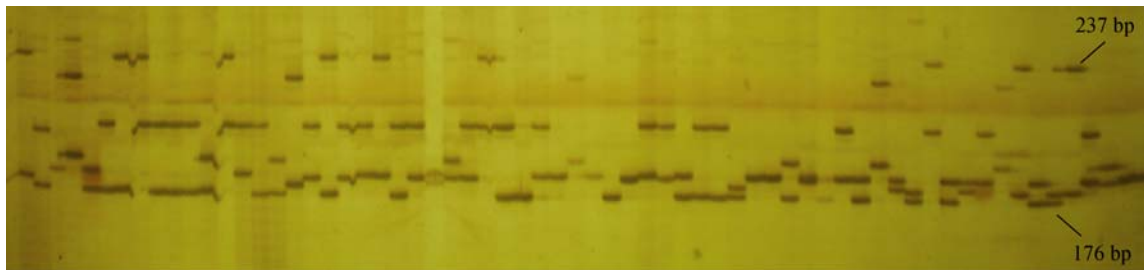


图 1 微卫星位点 *HLJ3734* 在混养家系扩增后部分结果

表 2 16 个微卫星座位在建鲤家系中的遗传参数分析

微卫星 基因座	等位 基因数	检测 个体数	杂合子	纯合子	观察杂 合度	期望杂 合度	多态信 息含量	排除概率		哈迪温伯 格平衡	无效等位 基因频率
								E-1P	E-2P		
<i>HLJ3473</i>	7	637	513	124	0.805	0.776	0.740	0.385	0.563	**	-0.0197
<i>HLJ3762</i>	7	642	526	116	0.819	0.722	0.687	0.326	0.508	**	-0.0759
<i>HLJ3697</i>	6	601	545	56	0.907	0.814	0.787	0.451	0.628	**	-0.0537
<i>HLJ3086</i>	4	630	329	301	0.522	0.554	0.483	0.158	0.291	**	+0.0410
<i>HLJ3993</i>	7	607	440	167	0.725	0.703	0.660	0.298	0.474	**	-0.0074
<i>HLJ3633</i>	7	617	510	107	0.827	0.820	0.795	0.467	0.642	**	-0.0044
<i>HLJ3757</i>	6	633	521	112	0.823	0.782	0.749	0.398	0.577	**	-0.0292
<i>HLJ3516</i>	9	604	581	23	0.962	0.840	0.823	0.522	0.690	**	-0.0719
<i>HLJ3734</i>	7	627	501	126	0.799	0.793	0.765	0.424	0.603	**	+0.0040
<i>HLJ3857</i>	7	618	483	135	0.782	0.716	0.674	0.313	0.490	**	-0.0471
<i>HLJ1140</i>	7	554	388	166	0.700	0.700	0.648	0.286	0.454	**	+0.0022
<i>HLJ3951</i>	6	601	495	106	0.824	0.762	0.728	0.373	0.553	**	-0.0473
<i>HLJ3291</i>	5	612	458	154	0.748	0.707	0.656	0.285	0.456	**	-0.0297
<i>HLJ2917</i>	9	611	551	60	0.902	0.784	0.755	0.413	0.592	**	-0.0733
<i>HLJ3952</i>	6	600	401	199	0.668	0.622	0.579	0.222	0.394	NS	-0.0425
<i>HLJ3586</i>	6	629	409	220	0.650	0.750	0.710	0.349	0.526	**	+0.0661
平均等位基因数											6.63
平均个体分型率											0.9232
平均期望杂合度											0.7405
平均多态信息含量											0.7025
累积排除概率 CE-1P											0.999225
累积排除概率 CE-2P											0.999996

注: E-1P: 双亲未知时的排除概率; E-2P: 已知一亲本基因型的排除率; NS: 符合; \*\*: 偏离极显著。

知时, 单个位点排除概率(E-1P)为 0.158 ~ 0.522, 16 个位点累积排除概率为 0.999225; 已知单亲基因型时单个位点排除概率(E-2P)为 0.291 ~ 0.690, 累积排除概率为 0.999996, 说明所选的 16 个微卫星位点可以达到很高的判定标准, 结果可靠。

根据 16 个微卫星位点多态信息含量大小, 按由高到低和由低到高顺序依次增加微卫星位点进行排除率分析, 由图 2 可见, 随着微卫星位点数目的增加, 累积排除概率也增大, 但要达到同样的排除率, 多态性低时所需位点数目要远远大于多态性高时。因此, 在双亲信息未知的情况下, 要达到亲权鉴定的要求通常需要 8 ~ 12 个微卫星位点, 而在已知单亲信息的情况下则需要 5 ~ 8 个位点。

运行 Simulation 程序, 模拟 10 000 次亲子鉴定, 亲本抽样比例 1, 置信度为 95%, 在亲本性别已知的情况下进行双亲鉴定, 16 个微卫星位点的鉴定率为 100%。

### 2.3 混养群体家系鉴定

运行 Cervus 亲权分析程序, 输入子代及亲本的基因型文件及候选亲本文件, 在亲本性别已知的情况下进行统计分析, 结果表明(表 3), 在置信水平为 95%的情况下, 612 个子代个体被分配到了 9 个家系中, 每个家系个体数分别为: 52, 49, 121, 37, 51, 11, 105, 96, 90, 鉴定率为 94.6%。另外 4.0%个体虽然找到了父母本, 但是置信度较低且其父母本并不是同一家系的亲本, 认为是发生了误判。还有 1.4%的个

体未被分配到任何家系中, 其中 4 个个体由于模板质量较差导致大部分位点未扩增出目的条带从而无法判读基因型, 还有 5 个子代未找到其亲本。由于家系 10#的亲本丢失, 所有未找到亲本的个体及误判的个体可能都是来自家系 10#。

### 2.4 聚类分析

根据等位基因频率计算出 9 个建鲤家系间的 Nei 氏遗传距离及相似性指数(表 4), 构建 UPGMA 图(图 3)。结果表明, 群体间遗传距离在 0.2886 ~ 0.8845 之间, 其中家系 2#与 8#之间遗传距离最小, 相似性最高, 聚合在一起。家系 1#与 7#之间的遗传距离次之。5#与 9#间的距离最远。

## 3 讨论

### 3.1 微卫星位点的选择

亲子鉴定是明确个体间亲缘关系, 建立正确系谱的重要辅助手段<sup>[5]</sup>。目前用于亲子鉴定的标记有很多, 但微卫星以其独特的优点, 如突变率低、能够稳定遗传、非亲排除率高及对模板质量要求低等, 成为亲子鉴定和个体识别的首选标记。理论上来说, 所选微卫星标记的遗传多样性越丰富, 其非亲排除率就越高, 就越容易通过特异条带确定亲缘关系。本研究中所选用的微卫星多为 3 ~ 5 碱基重复, 变异率较高, 扩增效果较好, 且每个位点在个体中只扩增出一条或两条带, 符合典型共显性标记的特

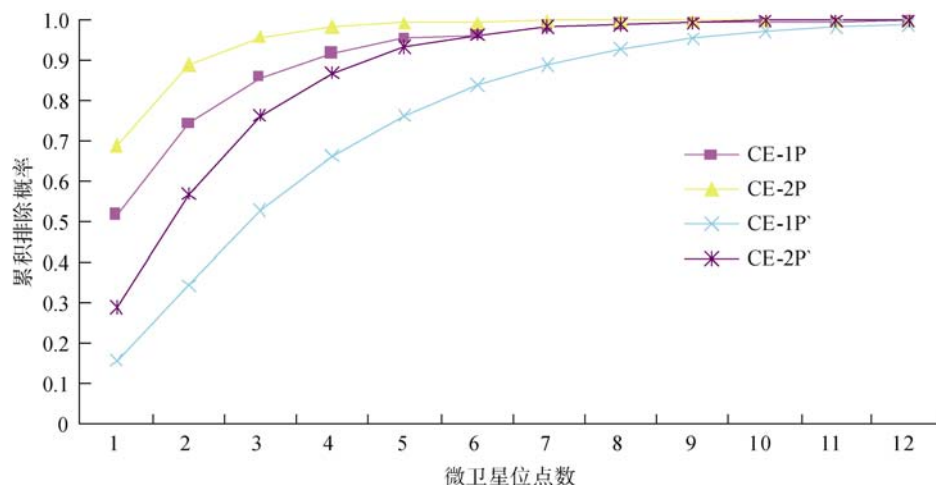


图 2 Cervus 模拟分析微卫星位点数与累积排除概率之间的关系

CE-1P, CE-2P: PIC 由高到低排列的累积排除概率; CE-1P', CE-2P': PIC 由低到高排列的累积排除概率。

表 3 建鲤 647 个子代的亲权鉴定结果

项目	个体数	比例 (%)
亲本来自同一家系的(共 9 个家系)	612	94.6
亲本来自不同家系的	26	4.0
大部分位点未扩增出目的条带的	4	0.6
未找到候选亲本的	5	0.8
所有未分配个体	9	1.4
所有检测个体	647	100

点。16 个微卫星位点共检测到 106 个等位基因, 平均每个位点 6.63 个, 多态信息含量在 0.483 ~ 0.823, 平均值为 0.7025, 表现出较丰富的信息含量。多态性丰富不仅能扩大位点的通用性及使用年限, 同时具有很好的实验重复性及稳定性, 因此, 在做鉴定前, 要选择多态性好的微卫星标记以实现利用少量标记得到较高的鉴定率。

在利用微卫星进行亲子鉴定时, 需要选择适当的微卫星标记数目。于飞等<sup>[23]</sup>研究表明, 使用 8 个微卫星标记对 7 个大菱鲃家系进行系谱鉴别, 仅知单亲基因型记录时, 要达到 95% 以上的累积排除概率至少需要 8 个中的 4 个多态位点, 而双亲均未知时, 则至少需要 8 个中的 7 个多态位点。王鸿霞等<sup>[24]</sup>选取 10 个微卫星座位中多态信息含量高的 6 个进行组合在凡纳滨对虾家系中的累积排除概率与原组合均达 0.99。纪志宾等<sup>[25]</sup>用 12 个微卫星位点在 212 只崂山奶山羊中的累积排除率为 0.9998, 在已知双亲和仅知单亲信息的情况下, 需要 5 个和 7 个微卫星位点(平均 PIC 为 0.687 左右)就能达到 0.99 的累积排除率。由此可见所用微卫星标记数目越多, 多态性越丰富, 其排除非亲本的能力就越高。但是当

达到一定标记数目时再增加标记累积排除率的变化则不明显, 因此在实际应用中还要考虑到鉴定成本和工作量的因素, 故建议选择适当的标记数。本研究通过 16 个微卫星位点对来自 10 个全同胞家系的 647 个个体进行模拟分析, 在双亲未知和已知单亲情况下的累计排除率高达 0.999225 和 0.999996。进一步模拟分析表明, 在双亲信息未知的情况下要达到亲权鉴定的要求通常需要 8 ~ 12 个微卫星位点, 已知单亲信息的情况下, 通常需要 5 ~ 8 个位点。

### 3.2 模拟分析与家系鉴定

Cervus 模拟分析是根据微卫星位点在群体中的等位基因频率进行亲缘关系的重建模拟, 预测这些微卫星位点在家系鉴定中的可行性<sup>[26]</sup>。但在研究中发现, 实际鉴定结果与模拟分析的结果有差异。Vandeputte<sup>[21]</sup>等利用 3 种鱼(欧洲鲈鱼、鲤鱼和虹鳟)进行了模拟分析与实际鉴定结果的比较, 结果表明, 实际所得的鉴定率要远远低于模拟分析所预期的鉴定率, 要达到 99% 的真实鉴定率至少要求模拟分析达到 99.999996%, 而真实值为 95% 时对应的理论值为 99.9989%。董世瑞等<sup>[26]</sup>模拟分析表明, 5 个微卫星标记能够对 95% 以上的个体进行家系鉴定, 而实际应用中, 5 个微卫星标记在单独养殖的家系中的鉴定准确率可达 92.9%, 在混养的家系中的鉴定率为 90.7%。本研究利用 16 个微卫星标记对来自 10 个家系的 647 个个体进行亲权鉴定, 94.6% 的个体被成功分配到了九个家系中, 还有 4.0% 的个体没有分配到同一家系亲本, 认为是发生了误判, 真实鉴定率低于模拟分析的结果。

表 4 9 个建鲤家系间的遗传距离和相似性指数

家系	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#
1#	/	0.6616	0.5593	0.5010	0.4918	0.5736	0.7036	0.6777	0.6134
2#	0.4130	/	0.5286	0.4994	0.5610	0.4566	0.6540	0.7493	0.4712
3#	0.5811	0.6375	/	0.6762	0.5647	0.6207	0.6055	0.5949	0.6378
4#	0.6911	0.6944	0.3912	/	0.5638	0.6683	0.6553	0.6414	0.6587
5#	0.7096	0.5780	0.5715	0.5731	/	0.5655	0.6107	0.6533	0.4129
6#	0.5558	0.7840	0.4770	0.4030	0.5700	/	0.6027	0.5548	0.5635
7#	0.3516	0.4247	0.5017	0.4226	0.4931	0.5064	/	0.7432	0.6979
8#	0.3890	0.2886	0.5194	0.4441	0.4258	0.5892	0.2968	/	0.5340
9#	0.4887	0.7525	0.4497	0.4175	0.8845	0.5737	0.3596	0.6274	/

注: 对角线上方为相似性指数, 对角线下方为遗传距离。

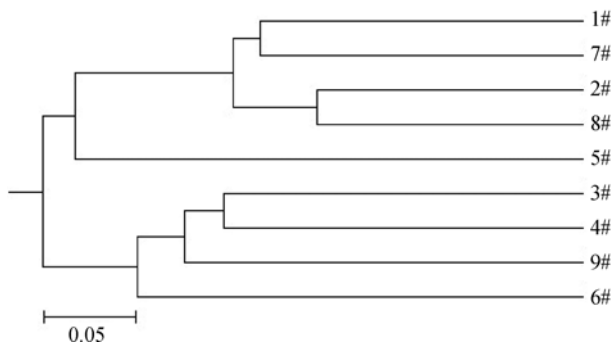


图 3 9 个建鲤家系的 UPGMA 聚类分析

影响真实鉴定率的原因可能有如下几点：(1)候选亲本间具有一定程度的亲缘关系，比如同胞或半同胞关系，导致亲本间遗传相似度较高，共有等位基因较多，特别是在一些小群体中更为普遍。而模拟分析中没有考虑到这一点。本研究中 4.0% 的个体发生了误判，没有被分配到同一家系中。聚类分析表明，家系 2# 与 8# 及 1# 与 7# 之间遗传距离较近，被聚为一类，推测这些家系亲本间可能具有同胞或半同胞关系使得排除率降低，最终导致亲缘关系的误判。(2)无效等位基因，通常是由引物结合部位的点突变、插入或缺失引起的特异等位基因不被扩增的现象<sup>[27]</sup>，由于微卫星序列点突变频率( $10^{-2} \sim 10^{-5}$ )和复制滑脱频率( $10^{-3} \sim 10^{-4}$ )很高<sup>[28]</sup>，无效等位基因在多个物种中存在已被证实<sup>[29-31]</sup>。某些情况下无效等位基因的存在可以通过是否偏离哈迪温伯格平衡或者偏离孟德尔遗传模式来验证<sup>[17]</sup>。在种群分析中无效等位基因的存在常常会导致杂合子的缺失<sup>[32]</sup>，在家系鉴定中则会导致可能亲本或个体间亲缘关系的错误推断从而降低亲权鉴定的成功率<sup>[33]</sup>。考虑到这一点，一方面可以在家系研究之前验证所用微卫星位点是否符合孟德尔遗传，剔除不符合的位点。另一方面可以通过增加微卫星位点数目计算候选亲本 LOD 值大小来寻找真实父母本，这样可以降低个别位点出现无效等位基因而引起的错配几率。(3)基因分型错误也会导致子代与亲本的错配。研究表明微卫星分型错误率通常在 2% 左右<sup>[17,34-36]</sup>，一方面是实验操作包括 PCR 扩增、电泳等诸多因素影响，使得条带扩增不清导致分型错误，另一方面是数据处理过程人为的分型错误，比如等位基因之间差异较小(只差 1 bp)，聚丙烯凝胶很难将其区分。前者在实

验中是可控制的，我们可以通过提取高质量模板或者调整复性温度及电泳条件等得到清晰的条带，减少分型错误的几率。而后者是很难控制的，本研究中有部分位点两个等位基因间只差 1~2 bp，因此人为的分型误差也将导致真实鉴定准确率低于模拟分析的结果。(4)缺带严重或样本污染等。本研究中有 4 个子代个体可能由于 DNA 模板质量较差，在大部分位点未扩增出目的条带，因此无法获得基因型而未被分配到可能的家系中。

引起多态位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡的原因是多方面的，除了受遗传学规律控制外，还和外界环境及人为等其他因素有关<sup>[37]</sup>。本研究中 10 个建鲤家系在 15 个位点均极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P < 0.01$ )，这种现象主要是因为这 10 个家系繁殖方式并不是随机交配的，而是根据亲本间遗传距离及表型性状等方面特定选育的家系，对于这种非野生小群体在部分位点偏离平衡是正常的；其次无效等位基因的存在也会导致杂合子缺失<sup>[38]</sup>，从而偏离 Hardy-Weinberg 平衡；另外数据统计出现误差，如两个等位基因之间差异较小，造成基因分型错误或将其作为一个等位基因处理都会导致基因频率的变化。

通过聚类分析可以看出各家系间的亲缘关系，亲缘关系越近则亲本相似程度越高，非亲排除概率越小，可为家系鉴定提供参考。此外，聚类分析也可为家系配组繁殖避免近交衰退提供依据。本研究从 10 个建鲤全同胞家系的混养群体中分辨出 9 个家系，其中 4 个家系个体数在 100 左右，可以用于进行下一步的图谱构建及 QTL 定位分析，为建鲤的遗传育种工作打下基础。同时表明应用较少的微卫星标记就可以对大的混养群体进行家系鉴定，显示微卫星技术作为一种快捷有效的亲子关系分析工具具有实用价值，在群体遗传结构、亲缘关系鉴定、系谱认证及分子标记辅助选择等方面也具有广阔的应用前景。

#### 参考文献(References):

- [1] 孙业良, 谢庄, 刘国庆, 任航行, 王刚, 代蓉. 利用微卫星 DNA 技术进行绵羊亲子鉴定. 安徽农业大学学报, 2005, 32(3): 301-305. DOI
- [2] 钱林东, 张自芳, 田应华, 袁峰, 钱坤, 苗永旺. 利用微卫星 DNA 标记进行黄牛的亲子鉴定. 云南农业大学学报, 2010, 25(1): 69-74. DOI

- [3] 刘秋玲, 吕德坚, 孙宏钰, 陆惠玲, 伍祥林, 伍新尧. 5 个 X-STR 基因座荧光复合扩增体系的建立及法医学应用. *遗传*, 2007, 29(12): 1459–1462. [DOI](#)
- [4] 李生斌, 阎春霞, 赖江华, 汪建, 杨焕明. DNA 鉴定技术在法科学中的应用. *遗传*, 2001, 23(2): 157–160. [DOI](#)
- [5] 高爱保, 吴登俊. 利用微卫星标记进行凉山半细毛羊亲权鉴定的研究. *遗传*, 2005, 27(1): 85–90. [DOI](#)
- [6] 张建森, 孙小异. 建鲤新品系的选育. *水产学报*, 2007, 31(3): 287–292. [DOI](#)
- [7] 董在杰, 朱健, 袁新华, 王建新. 建鲤基因组 DNA 的 RAPD 分析. *湛江海洋大学学报*, 2002, 22(1): 3–6. [DOI](#)
- [8] Zhao JL, Cao Y, Li SF, Li JL, Deng YF, Lu GQ. Population genetic structure and evolutionary history of grass carp *Ctenopharyngodon idella* in the Yangtze River, China. *Environ Biol Fish*, 2011, 90(1): 85–93. [DOI](#)
- [9] Xu KF, Li Q, Kong LF, Yu RH. A first-generation genetic map of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*-based AFLP and microsatellite markers. *Aquacult Res*, 2008, 40(1): 35–43. [DOI](#)
- [10] 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*. *Fisheries Sci*, 2002, 68(2): 299–305. [DOI](#)
- [11] Barrous F, Gaudet J, Perrin N. Breeding system and genetic variance in the monogamous, semi-social shrew, *Crociodura russula*. *Evolution*, 1998, 52(4): 1230–1235. [DOI](#)
- [12] 鲁双庆, 刘臻, 刘红玉, 肖调义, 苏建明. 鲫鱼 4 群体基因组 DNA 遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析. *中国水产科学*, 2005, 12(4): 371–376. [DOI](#)
- [13] Sekino M, Sugaya T, Hara M, Taniguchi N. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2004, 233(1): 163–172. [DOI](#)
- [14] 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. *Aquaculture*, 1999, 173(1–4): 413–423. [DOI](#)
- [15] McDonald GJ, Danzmann RG, Ferguson MM. Relatedness determination in the absence of pedigree information in three cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 2004, 233(1–4): 65–78. [DOI](#)
- [16] Jerry DR, Evans BS, MattKenway M, Wilson K. Development of a microsatellite DNA parentage marker suite for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 2006, 255(1–4): 542–547. [DOI](#)
- [17] Castro J, Bouza C, Presa P, Pino QA, Riaza A, Ferreiro I, Sánchez L, Martínez P. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture*, 2004, 242(1–4): 119–135. [DOI](#)
- [18] Boudry P, Collet B, Cornette F, Hervouet V, Bonhomme F. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*, 2002, 204(3–4): 283–296. [DOI](#)
- [19] Norris AT, Bradley DG, Cunningham EP. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, 2000, 182(1–2): 73–83. [DOI](#)
- [20] Vandeputte M, Kocour M, Mauger S, Dupont-Nivet M, De Guerry D, Rodina M, Gela D, Vallod D, Chevassus B, Linhart O. Heritability estimates for growth-Related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 2004, 235(1–4): 223–236. [DOI](#)
- [21] Vandeputte M, Rossignol MN, Pincet C. From theory to practice: Empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding. *Aquaculture*, 2011, 314(1–4): 80–86. [DOI](#)
- [22] Zheng XH, Kuang YY, Zhang XF, Lu CY, Cao DC, Li C, Sun XW. A genetic linkage map and comparative genome analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using microsatellites and SNPs. *Mol Genet Genomics*, 2011, 286(3–4): 261–277. [DOI](#)
- [23] 于飞, 王伟继, 孔杰, 阮晓红. 微卫星标记在大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 家系系谱印证中的应用研究. *海洋学报*, 2009, 31(3): 127–136. [DOI](#)
- [24] 王鸿霞, 吴长功, 张留所, 相建海. 微卫星标记应用于凡纳滨对虾家系鉴别的研究. *遗传*, 2006, 28(2): 179–183. [DOI](#)
- [25] 纪志宾, 王桂芝, 王金凤, 陈珊珊, 王勇, 赵金山, 程明, 王建民. 崂山奶山羊分子系谱的构建及家系遗传特征分析. *中国农业科学*, 2011, 44(13): 2796–2807. [DOI](#)
- [26] 董世瑞, 孔杰, 张天时, 孟宪红, 王如才. 中国对虾微卫星家系鉴定的模拟分析与应用. *水生生物学报*, 2008, 32(1): 96–101. [DOI](#)
- [27] Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol Ecol*, 1995, 4(2): 249–252. [DOI](#)
- [28] Vigouroux Y, Jaqueth JS, Matsuoka Y, Smith OS, Beavis WD, Smith JS, Doebley J. Rate and pattern of mutation at



- microsatellite loci in maize. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(8): 1251–1260. [DOI](#)
- [29] 程鹏, 杨爱国, 吴彪, 周丽青, 李霞. 微卫星标记在不同壳色虾夷扇贝家系亲权鉴定的适用性. *水生生物学报*, 2011, 35(5): 768–775. [DOI](#)
- [30] Kline MC, Hill CR, Decker AE, Butler JM. STR sequence analysis for characterizing normal, variant, and null alleles. *Genetics*, 2011, 5(4): 329–332. [DOI](#)
- [31] Alderson GW, Gibbs HL, Sealy SG. Parentage and kinship studies in an obligate brood parasitic bird, the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*), using microsatellite DNA markers. *J Hered*, 1999, 90(1): 182–190. [DOI](#)
- [32] Jones AG, Walker D, Avise JC, Stockwell CA. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish. *J Hered*, 1998, 89(4): 339–342. [DOI](#)
- [33] 李琪. 皱纹盘鲍微卫星研究进展. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2004, 34(3): 365–370. [DOI](#)
- [34] Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol Ecol*, 2004, 13(11): 3261–3273. [DOI](#)
- [35] Hoffman JI, Amos W. Does kin selection influence fostering behaviour in Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*)? *Proc R Soc Lond Ser B: Biol Sci*, 2005, 272(1576): 2017–2022. [DOI](#)
- [36] Castro J, Pino A, Hermida M, Bouza C, Rianza A, Ferreiro I, Sánchez L, Martínez P. A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions. *Aquaculture*, 2006, 261(4): 1194–1203. [DOI](#)
- [37] 黎中宝, 李少菁, 王桂忠. 锯缘青蟹(*Scylla serrata*)不同种群的杂合性研究. *海洋与湖沼*, 2004, 35(4): 358–362. [DOI](#)
- [38] Ball AO, Leonard S, Chapman RW. Characterization of (GT) sub(n) microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Mol Ecol*, 1998, 7(9): 1251–1253. [DOI](#)

## •综合信息•

### 分子系统发生学

书号: 978-7-03-033026-0/Q · 2820

作者: 黄原 定价: 120

内容简介: 分子系统发生学是应用分子数据重建系统发生关系的学科。本书全面系统地论述了分子系统发生学的基础、原理、方法及应用。全书由 18 章组成, 可以归纳为五大部分: 第一部分包括第 1~3 章, 分别介绍了系统发生和系统树的基本知识; 第二部分包括第 4~7 章, 是分子系统发生分析的基础, 其中第 4 章和第 5 章是分子系统发生学的信息学基础, 第 6 章是数据集系统发生信号评估, 第 7 章讨论了分子进化模型及模型选择原理与方法; 第三部分中的第 8~12 章是各种系统发生分析方法, 分别就目前主要的系统发生分析方法(距离矩阵法、简约法、最大似然法、贝叶斯推论法和系统发生网络法等)从原理、软件操作、应用及局限性等方面进行了详细的介绍, 第 13 章讨论了系统发生假设检验的原理和方法, 第 14 章讨论了系统发生分析可靠性与影响因素; 第四部分主要涉及各类数据集分析策略, 其中第 15 章总结了不同类型数据的分析策略, 第 16 章对复杂数据集系统发生的分析策略与方法进行了详细地介绍, 第 17 章是多基因数据分析策略和方法; 最后一部分即第 18 章是系统树的可视化、注释与应用方面的内容。

推荐语: 分子系统发生学是当前生命科学的一个热点领域, 本书是作者 20 余年来在系统发生学领域研究和教学的总结, 在写作过程中注意兼顾基本概念的解释和最新进展的评述, 使读者能够快速掌握本学科各个方面的基础知识。

科学出版社 科学销售中心 联系人: 周文宇

电话: 010-64022646, 010-64017321 E-mail: zhouwenyu@mail.sciencep.com