



黄鳍棘鲷家系亲缘关系鉴定

朱克诚^{1,2}, 宋岭¹, 刘宝锁^{1,2}, 郭华阳^{1,2},
郭梁^{1,2}, 张楠^{1,2}, 张殿昌^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300;
2. 广东省海洋生物种业工程技术研究中心, 广东广州 510300)

摘要: 为了建立黄鳍棘鲷微卫星亲子鉴定技术, 利用荧光引物和自动测序技术检测了自主开发的12对微卫星分子标记在505尾黄鳍棘鲷个体中的遗传多态性, 并构建了亲子鉴定技术。结果显示, 该研究中筛选的12个微卫星标记共检测到119个等位基因, 平均等位基因数(N_a)为9.91, 平均观测杂合度(H_o)为0.651, 平均期望杂合度(H_e)为0.661, 平均多态性信息含量(PIC)为0.621, 具有丰富的多态性。此外, 运用Cervus 3.0软件对已知系谱信息的112尾黄鳍棘鲷亲本和393尾子代个体进行模拟分析, 结果显示, 当双亲未知且置信度为95%时, 12个标记的累积排除概率达99.58%; 当微卫星标记数量为8时, 累积排除概率达到99.1%。因此确定AL49、AL37、AL01、AL20、AL14、AL18、AL15和AL51共8个多态性较高的微卫星标记为黄鳍棘鲷微卫星亲子鉴定的核心体系。在双亲性别未知的情况下, 其双亲的累积排除率为99.1%。根据黄鳍棘鲷子代的实际基因分型数据, 实际鉴定率为89.31%。该研究构建的微卫星标记组合能为黄鳍棘鲷不同家系混养后的亲子鉴定、种群选育和分子辅助家系管理提供科学的技术手段。

关键词: 黄鳍棘鲷; 微卫星; 亲子鉴定; 模拟分析

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

黄鳍棘鲷(*Acanthopagrus latus*)隶属于鲈形目(Perciformes)、鲷科(Sparidae)、棘鲷属(*Acanthopagrus*), 广泛分布于红海、阿拉伯海、印度洋、西太平洋沿岸^[1-2]。黄鳍棘鲷生活于近岸海域及河口湾, 杂食性, 是一种重要的经济鱼类。黄鳍棘鲷养殖周期偏长, 需1.5~2年才能达到250 g左右的上市规格, 极大限制了渔民养殖该品种的热情。近年来, 由于环境污染、过度捕捞等导致黄鳍棘鲷自然种群严重衰退, 种质严重退化; 同时由于黄鳍棘鲷养殖群体的近亲繁殖、小规格亲本人工育苗等原因, 导致黄鳍棘鲷养殖种质严重退化, 抗病力减弱, 养殖性能下降。以上问题严重制约了黄鳍棘鲷养殖业的可持续健康发展。因此对不同地理群体的

黄鳍棘鲷进行种质资源的保护和良种选育已迫在眉睫, 而良种选育很重要的方法之一就是进行家系选育。家系选育能获得具有优良性状的品种, 同时能够准确了解系谱信息, 有效地指导亲本筛选^[3], 这既能不断地改良遗传性状, 又避免了近亲繁殖, 缩短育种时间, 提高黄鳍棘鲷的产量。

在鱼类遗传育种研究中, 苗种的来源比较杂乱, 仅采用物理和形态标记难以区分不同来源、不同品质的苗种^[4]。一般的, 水产动物同池混养家系的鉴定方法是进行电子标记区分, 但是在进行大规模群体选育或家系选育时, 电子标记的价格昂贵, 且更重要的是大量家系同池饲养可以降低养殖成本和人工消耗, 故电子标记有一定的限制性。而DNA分子标记技术具有

收稿日期: 2018-10-11 修回日期: 2018-11-29

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201403008); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-XKQ01)

通信作者: 张殿昌, E-mail: zhangdch@scsfri.ac.cn

遗传信息丰富、检测手段快速简便、重复性好等特点^[5],因此在分子标记辅助育种和系谱鉴定等方面应用广泛^[6-7]。

随着测序技术的飞速发展^[8],大量的DNA分子标记如微卫星标记(simple sequence repeat, SSR)和单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNPs)等分子标记技术已经被应用到水产动物中,如二长棘鲷(*Parargyrops edita*)^[9]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[10-11]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[12]等。以上分子标记技术可以用来明确个体间亲缘关系,建立正确的系谱关系,既避免了累代养殖与近交衰退现象,也有利于优良养殖品种的筛选和推广。目前,已有一些学者开发了大量的黄鳍棘鲷SSR标记^[13-15],但是将SSR标记应用于黄鳍棘鲷家系鉴定研究的报道甚少。鉴于此,本研究采用SSR标记的方法,首次建立了黄鳍棘鲷的亲缘鉴定分子技术,并成功将其应用于黄鳍棘鲷家系的亲缘鉴定中,形成鉴定准确、价格低廉的SSR标记组合,为黄鳍棘鲷的良种选育和家系管理提供便捷、高效的技术方法,促进黄鳍棘鲷产业的健康发展。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验黄鳍棘鲷亲鱼112尾为广东阳江海捕

的野生苗种,养殖于中国水产科学研究院南海水产研究所海南热带水产研究开发中心实验基地。393尾子代来源于2017年12月份通过人工授精获得的黄鳍棘鲷混合家系。样品分别采集鳍条和全鱼,保存于无水乙醇中备用。

1.2 基因组DNA的提取

本实验采用经典的酚-氯仿方法^[16]提取亲鱼和仔鱼基因组DNA,具体步骤:将保存的亲鱼鳍条和仔鱼全鱼样本放入2 mL离心管中,用TE缓冲液浸泡12 h以充分置换出酒精。接着将裂解液[100 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl、20 mmol/L EDTA(pH 8.0), 1% SDS, 200 mg/L 蛋白酶K]加入到剪碎的尾鳍或剪碎的鱼体中,56 °C消化至澄清,然后依次用等体积的酚、酚-氯仿(1:1)、氯仿抽提,等体积的异丙醇沉淀,75%乙醇清洗沉淀,37 °C烘干或自然晾干后,加入50 μL双蒸水,待完全溶解后稀释成100 ng/μL,-20 °C保存待用。

1.3 引物设计与微卫星分析

在该实验室前期研究中,得到了黄鳍棘鲷转录组数据,设计了55对微卫星引物,并利用广东湛江36个野生黄鳍棘鲷DNA样品来筛选其多态性。选取多态性信息含量较高的12对引物用于后续的亲缘鉴定(表1),由生工生物工程(上海)

表 1 12 个微卫星标记引物特征

Tab. 1 Characteristics of 12 microsatellite loci in *A. latus*

位点 locus	引物序列 primers sequence	重复单元 repeat motif	扩增片段大小/bp allele range	退火温度/°C T_m	登录号 accession no.
AL01	F: TTCAACATGTGCGGCACG R: TATTGCCCTGCACAGTGCTCCC	(CA)14	157~200	60	MH727594
AL14	F: CAGCAACATGCTGCCATTAC R: GTGTGCCCTCATAGGCAGTT	(CA)9	177~193	60	MH727595
AL15	F: CGGCTAACTTAATGGGGGAT R: GCTATGCTATGACAGGCAACC	(TTA)5	138~147	60	MH727596
AL18	F: ACCTGAGCCCATTTCAACAT R: TGTTCACACGTCGTCCTCTC	(AC)14	305~313	60	MH727597
AL20	F: ATTTGTGGTTTTGATGGGGA R: CGTGTGTTATTGCCTCATGG	(GT)6(GA)7	228~246	60	MH727598
AL21	F: CAGGAGCTGAGCAGAAGTCC R: AAGCATCTCCTGATTGGTG	(AC)8	352~358	60	MH727599
AL26	F: GTCGATGCGCTACACAGAGA R: CAAGAGAGTTGCAGCACAGC	(AC)11	248~264	60	MH727600
AL28	F: CAGAGGTAACGCACACATGC R: TCAGCCACCTCAGTAGGGTT	(CA)10	262~272	60	MH727601
AL37	F: CCTGGGCTTTGATATGCCT R: CTGGCTCATATTTTGCCCAT	(AC)8	216~238	60	MH727602
AL46	F: AGGCTGGTGACTCACACACA R: CTTTCAGAAGCAGGCGTACC	(TATT)5	324~339	60	MH727603
AL49	F: CGGTAGCATTTTCACGGTCT R: CTGCGAGTTCACCTTTCACA	(CA)18	262~292	60	MH727604
AL51	F: CAAACGCAGACAGCGATAAG R: CCACCTCAGAAGCCATCAGT	(GT)13	341~349	60	MH727605

注:在重复单元列中,括号表示重复单元,数字表示括号内碱基重复的次数

Notes: brackets demonstrates repeat motif, number demonstrates number of base repeats in the column of repeat motif

股份有限公司合成5'端带有FAM、HEX和TET的荧光引物。

PCR反应体系(10 μ L): 双蒸水7.6 μ L, 10 \times PCR (TaKaRa) 缓冲液1 μ L (含 Mg^{2+}), 10 mmol/L dNTPs 0.15 μ L, *rTaq*DNA 聚合酶(TaKaRa) 0.15 μ L, 正反向引物各0.3 μ L, 100 ng/ μ L基因组DNA 0.5 μ L。PCR反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸40 min, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C终延伸10 min; 4 $^{\circ}$ C保存。

PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳, GelRed 染色, 自动凝胶成像系统拍照检测, 然后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行短串联重复序列(short tandem repeats, STR)测序分析(毛细管电泳检测, ABI3730XL全自动DNA测序仪), 利用毛细管电泳方法进行基因型检测, GS-500作为标记。为降低微卫星基因型测序成本, 将带有不同荧光基团的3种PCR产物混合进行测序。本实验将12个微卫星标记分为4组, 标记组合及其所携带荧光基团见表2。

表2 微卫星标记分组情况

Tab. 2 Grouping of microsatellite loci in *A. latus*

分组 groups	位点名称 locus	荧光标记 fluorescent marker	片段大小/bp size range
A	AL15	FAM	138~147
	AL20	HEX	228~246
	AL46	TET	324~339
B	AL37	FAM	216~238
	AL28	HEX	262~272
	AL51	TET	341~349
C	AL01	FAM	157~200
	AL26	HEX	248~264
	AL18	TET	305~313
D	AL14	FAM	177~193
	AL49	HEX	262~292
	AL21	TET	352~358

1.4 数据分析

采用Arlequin version 3.0 软件分析^[17]等位基因数(N_a)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、Hardy-Weinberg平衡; 采用PIC_CALC 0.6 软件分析多态性信息含量(PIC)。软件GeneMarker V1.5 读取等位基因大小。CERVUS 3.0 软件^[18]评价

505尾黄鳍棘鲷(112尾亲本和393尾子代)个体的等位基因数据(Bozeman, MT, USA), 并计算排除率与累积排除率。

2 结果

2.1 微卫星位点信息参数

通过对55个黄鳍棘鲷微卫星位点的筛选, 共得到30个多态位点, 选取其中12个等位基因数目大于5且条带清晰的微卫星标记用于亲子鉴定分型(表1)。根据扩增效率和片段长度最终确立4组PCR产物混合检测体系(表2)。

在黄鳍棘鲷112个亲本个体中, 这12个微卫星位点共检测到119个等位基因(表3), 每个位点的 N_a 为5~17个(平均9.91个), H_e 为0.323~0.936(平均0.651), H_o 为0.392~0.911(平均0.661), PIC为0.324~0.903(平均0.621), 3个微卫星标记偏离了Hardy-Weinberg平衡。

2.2 排除率和累积排除率

在双亲基因型都未知的情况下, 12个微卫星位点的多态性信息含量与其排除概率成正比, 每个位点的单独排除概率范围为7.7%~66.5%, 其中位点AL49的排除率最高, 为66.5%; 位点AL21、AL26和AL28的排除率较低, 均低于20%。12个微卫星位点的累积排除率为99.58%(表3)。微卫星位点的数量与累积排除率之间的关系如图1所示, 微卫星位点数目增多, 排除率也随之增大; 当微卫星标记数量为8时, 累积排除率达到99.1%, 趋于饱和。因此确定AL49、AL37、AL01、AL20、AL14、AL18、AL15和AL51共8个多态性较高的微卫星标记为黄鳍棘鲷微卫星亲子鉴定体系。在某些情况下, 如亲本数量过多, 使得累积排除率不能达到大于99%的标准, 可以将位点AL46、AL21、AL26和AL28作为候选标记加入分子判别组。

2.3 亲子鉴定结果

在未知亲本性别的情况下, 模拟10 000个子代和112对亲本, 置信度为95%时, 8个微卫星位点的理论鉴定率达99.1%, 只有4个子代个体未成功分配到亲本(图2)。根据黄鳍棘鲷子代的实际基因分型数据, 在置信度为95%时, 有353尾子代能找到亲本。因此实际鉴定率为89.31%。

表 3 12 个微卫星位点在黄鳍棘鲷混合家系中的参数值

Tab. 3 Parameter values of the 12 microsatellite loci in *A. latus* parent family

位点 locus	等位基因数 N_a	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_c	多态性信息含量 PIC	双亲未知时 排除率/% Excl-1	已知一亲本基因 型的排除率/% Excl-2	Hardy-Weinberg 平衡	无效等位基因频率 $F(\text{null})$
AL49	17	0.955	0.905	0.892	66.5	79.9	NS	-0.029 7
AL37	17	0.875	0.889	0.875	62.5	77.0	NS	0.005 1
AL01	12	0.679	0.850	0.827	52.5	69.2	***	0.114 2
AL20	9	0.848	0.807	0.778	44.4	62.2	NS	-0.028 5
AL14	8	0.804	0.764	0.720	35.4	53.1	NS	-0.028 6
AL18	10	0.688	0.700	0.669	30.9	49.6	NS	-0.002 1
AL15	5	0.518	0.702	0.651	28.1	45.4	*	0.150 9
AL51	7	0.455	0.631	0.598	23.8	42.0	*	0.169 3
AL46	16	0.607	0.642	0.580	23.5	39.0	NS	0.028 1
AL21	5	0.518	0.522	0.486	14.7	31.0	NS	-0.003 7
AL26	8	0.482	0.525	0.459	14.4	27.6	NS	0.051 2
AL28	5	0.321	0.394	0.315	7.7	15.8	NS	0.099 2
平均值 mean	9.91	0.646	0.694	0.654	33.7	49.3		
累积排除率/% accumulate exclusion probability					99.58	99.99		

注: NS. 符合, * 偏离显著($P<0.05$), ***. 偏离极显著($P<0.01$)

Notes: NS. conformance, *. significant departure ($P<0.05$), ***. extremely significant departure ($P<0.01$)

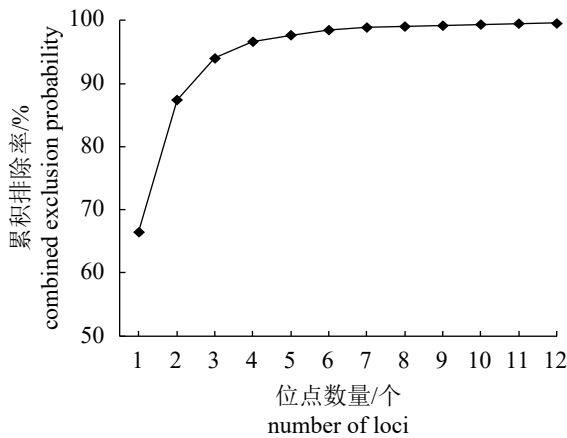


图 1 12 个多态性位点计算双亲未知时的排除率(Excl-1)
Fig. 1 Combined probabilities of exclusion calculated over twelve polymorphic loci when both parents are unknown (Excl-1)

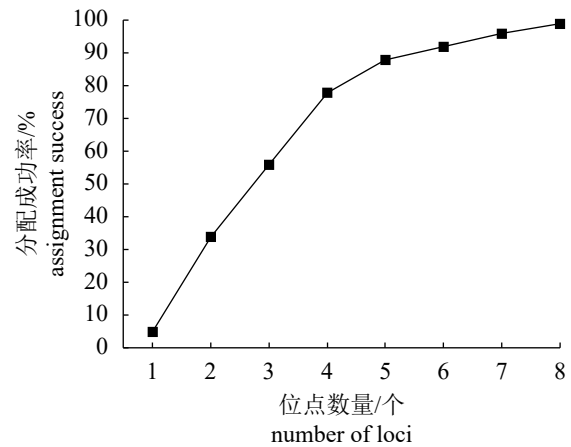


图 2 基于亲本和子代的基因型推测的双亲正确分配率
Fig. 2 Assignment success of progeny to correct parent pair, based on parent and offspring genotypes

3 讨论

生物群体的遗传多样性是评估生物种质资源的重要指标之一^[19]。PIC值的高低代表了群体遗传基础的丰富多样性。在本实验中, 12个微卫星标记的PIC平均值为0.621, 表明这些标记能够提供丰富的遗传信息。杂合度能准确反映微卫

星标记多态性的变化。在本研究中, 12个微卫星标记的平均观测杂合度为0.651, 平均期望杂合度为0.661。Hardy-Weinberg检验结果显示, 3个位点存在不同程度的偏离, 其中有1个位点极显著偏离($P<0.01$)。造成群体偏离Hardy-Weinberg平衡的原因之一是杂合子的缺失, 3个显著偏离Hardy-Weinberg平衡的位点其期望杂合

度都远大于其观测杂合度, 说明该实验群体可能存在无效等位基因或一定程度的近交, 存在纯合子个体。本研究中, 12 个微卫星标记无效等位基因频率为 $-0.029\ 7\sim 0.169\ 3$, 3 个显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡标记的无效等位基因的频率均大于 10%, 表明无效等位基因也是造成其偏离 Hardy-Weinberg 平衡的原因之一。此外, 12 个微卫星标记的等位基因数都大于等于 5, 且该标记组合的平均等位基因数为 9.91。综上所述, 12 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, 并适合作为筛选具有高非亲排除率标记的候选标记, 进行黄鳍棘鲷混合家系群体亲缘关系的鉴定分析。

准确的系谱关系对良种选育有着重要的作用, 因此必须选择合适的标记来掌握正确的系谱信息^[20]。以往, 由于物理标记(如颜色标记、电子标记、弹力球等)具有简单和直观的优点, 已经应用于水生动物区分中, 如欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*)^[21]和欧洲螯龙虾 (*Homarus gammarus*)^[22]。但是物理标签不仅价格昂贵, 而且标签容易丢失和退化^[4]。在系谱关系鉴定中, 使用分子标记可以克服物理标记的局限性, 如分子标记在处理物理标记难以识别的鱼类家系中具有一定的作用, 但对于大量后代群体的识别成本也较为昂贵。由于具有高度杂合性和丰富的遗传信息, 微卫星标记也已经被广泛应用于水生动物亲缘关系鉴定研究中。在该研究中, 运用 8 个微卫星标记能使黄鳍棘鲷子代的成功分配率达到 89.31%。在鉴定能力超过 80% 的情况下, 微卫星标记在亲子鉴定中具有较高的应用价值^[23]。本研究表明, 这 8 个微卫星标记是能够用于黄鳍棘鲷选择育种的一种可行且有效的工具。

本研究所选择的 8 个用于亲子鉴定的标记, 只有 3 个标记的 Excl-1(probabilities of exclusion based either on the genotype of no parent known)超过了 0.5。此结果与对黄河鲤(*C. carpio haematopterus*)和哲罗鱼(*Hucho taimen*)的微卫星亲子鉴定结果类似^[10, 24], 在筛选的黄河鲤 11 对微卫星位点组合中, 只有 2 个标记的 Excl-1 超过了 0.5, 但是其实际鉴定率为 93.82%。在筛选的哲罗鱼 7 对微卫星标记组合中, 也只有 3 个标记的 Excl-1 超过了 0.5。但是在哲罗鱼 9 组父母对下, 混合养殖家系鉴定率为 92.2%。可见在黄河鲤和哲罗鱼中, 实际鉴定率均高于本研究的鉴定率。因此, 为

进一步提升亲子鉴定准确率, 后续实验将在已有研究的基础上, 采用似然法和排除法相结合的模式, 在多个黄鳍棘鲷家系中开展更为稳定的亲子鉴定应用。

在亲子鉴定中, 微卫星标记排除率可以用于说明亲本和子代之间的系谱关系^[25-26]。在本研究中, 8 个微卫星位点的理论鉴定率达 99.1%, 然而, 实际鉴定率只有 89.31%。理论鉴定率高于实际鉴定率的可能原因: ①无效等位基因, 本研究采用 Cervus 3.0 软件分析微卫星位点基因型数据, 得出 12 个微卫星标记无效等位基因频率为 $-0.029\ 7\sim 0.169\ 3$, 其中位点 AL01、AL15 和 AL51 的无效等位基因频率均大于 10%。无效等位基因会影响样本杂合子缺失, 从而降低鉴定准确率^[27]; ②等位基因的缺失导致低质量的 DNA 序列, 进一步影响扩增结果^[28]。

Liu 等^[12]用 6 个多态性微卫星标记成功将大黄鱼的 959 个子代分配到正确的亲本中。也有学者运用大西洋鲑(*Salmo salar*)的 4 个微卫星标记(等位基因为 10~17)从 110 对潜在父母中正确地鉴定出其亲本^[29]。此外, 在对日本鳗鲡(*A. japonica*)的研究中, 使用 8 个微卫星标记将 297 个子代成功分配到对应的父母对中^[30]。在曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)中, 8 个微卫星位点能将 159 个子代中的 146 个子代成功分配到对应的父母对中^[31]。本研究中, 89.31% 的子代能被成功分配到对应的亲本中, 此结果比大黄鱼的 99.6%、大西洋鲑的 94.3%、日本鳗鲡的 98.7% 略低, 与曼氏无针乌贼的 91.8% 类似^[12, 29-31]。说明以上分子标记能有效地应用于黄鳍棘鲷谱系关系的鉴定。此外, 以上位点能为黄鳍棘鲷及鲷科鱼类遗传结构的评价和设计可行的保护方案提供途径。

参考文献:

- [1] 樊冀蓉, 吴仁协, 赵元著, 等. 中国鲷科鱼类分类和系统发育研究进展[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 472-480.
Fan J R, Wu R X, Zhao Y J, et al. Progresses on taxonomy and phylogeny of family Sparidae from China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 472-480(in Chinese).
- [2] Hong W S, Zhang Q Y. Review of captive bred species and fry production of marine fish in China[J]. Aquaculture, 2003, 227(1-4): 305-318.
- [3] 刘永新, 孙朝徽, 王玉芬, 等. 牙鲆家系亲缘鉴定的微卫星 DNA 标记分析[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1593-

- 1603.
- Liu Y X, Sun Z H, Wang Y F, *et al.* Parentage determination in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families by microsatellite DNA marker analysis[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1593-1603(in Chinese).
- [4] Herbinger C M, O'Reilly P T, Doyle R W, *et al.* Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks[J]. *Aquaculture*, 1999, 173(1-4): 105-116.
- [5] 韩春梅, 张嘉保, 高庆华. DNA多态在动物亲子鉴定中的应用[J]. *草食家畜*, 2004(1): 11-13.
- Han C M, Zhang J B, Gao Q H. Studies and application of DNA polymorphism on animal parentage testing[J]. *Grass-Feeding Livestock*, 2004(1): 11-13(in Chinese).
- [6] Jewell E, Robinson A, Savage D, *et al.* SSR primer and SSR taxonomy tree: biome SSR discovery[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(S2): 656-659.
- [7] O'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1997, 7(3): 331-363.
- [8] Schuster S C. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(1): 16-18.
- [9] 杨兵, 林琳, 李纯厚, 等. 基于高通量测序的二长棘鲷微卫星标记开发与评价[J]. *南方水产科学*, 2015, 11(4): 116-120.
- Yang B, Lin L, Li C H, *et al.* Development and evaluation of microsatellite markers in *Parargyrops edata*[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(4): 116-120(in Chinese).
- [10] 王新华, 俞小牧, 冯建新, 等. 黄河鲤全同胞家系的微卫星标记亲子鉴定[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 1023-1031.
- Wang X H, Yu X M, Feng J X, *et al.* Parentage assignment for full-sib families of the Yellow River carp *Cyprinus carpio haematoperus* based on microsatellites[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1023-1031(in Chinese).
- [11] Xu J, Feng J Y, Peng W Z, *et al.* Development and evaluation of a high-throughput single nucleotide polymorphism multiplex assay for assigning pedigrees in common carp[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 48(4): 1866-1876.
- [12] Liu X D, Zhao G T, Wang Z Y, *et al.* Parentage assignment and parental contribution analysis in large yellow croaker *Larimichthys crocea* using microsatellite markers[J]. *Current Zoology*, 2012, 58(2): 244-249.
- [13] 夏军红, 朱彩艳, 苏天凤, 等. 黄鳍鲷基因组微卫星的分离[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(2): 321-325.
- Xia J H, Zhu C Y, Su T F, *et al.* Isolation of microsatellites from yellowfin seabream *Acanthopagrus latus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(2): 321-325(in Chinese).
- [14] Ghasemi A, Shadi A. Population structure of *Acanthopagrus latus* from the Northern Persian Gulf and Gulf of Oman based on Microsatellite markers[J]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2018, 18(8): 983-990.
- [15] Ahmad-Syazni K, Watanabe M, Oka T, *et al.* Ten novel polymorphic microsatellite loci for yellowfin black seabream (*Acanthopagrus latus*)[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2012, 4(4): 909-911.
- [16] Sambrook J D, Russell D W. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [17] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1(1): 47-50.
- [18] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [19] 季维智, 宿兵. 遗传多样性的研究原理与方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.
- Ji W Z, Su B. Principles and methodologies of genetic diversity studies[M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1999 (in Chinese).
- [20] 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): 96-101.
- Dong S R, Kong J, Zhang T S, *et al.* Microsatellite markers simulation and application for parentage determination on *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(1): 96-101(in Chinese).
- [21] Imbert H, Beaulaton L, Rigaud C, *et al.* Evaluation of visible implant elastomer as a method for tagging small European eels[J]. *Journal of Fish Biology*, 2007, 71(5): 1546-1554.
- [22] Linnane A, Mercer J P. A comparison of methods for tagging juvenile lobsters (*Homarus gammarus* L.) reared for stock enhancement[J]. *Aquaculture*, 1998, 163(3-4): 195-202.
- [23] Chen X, Cho Y G, McCouch S R. Sequence divergence of rice microsatellites in *Oryza* and other plant species[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268(3): 331-343.
- [24] 张春雷, 佟广香, 匡友谊, 等. 哲罗鱼微卫星亲子鉴定的应用[J]. *动物学研究*, 2010, 31(4): 395-400.
- Zhang C L, Tong G X, Kuang Y Y, *et al.* Applicability of microsatellite DNA markers to the parental

- identification of *Hucho taimen* (Pallas)[J]. *Zoological Research*, 2010, 31(4): 395-400(in Chinese).
- [25] Wan S, Li Q, Liu T, *et al.* Heritability estimates for shell color-related traits in the golden shell strain of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using a molecular pedigree[J]. *Aquaculture*, 2017, 476: 65-71.
- [26] Xing D, Li Q, Kong LF, *et al.* Heritability estimate for mantle edge pigmentation and correlation with shell pigmentation in the white-shell strain of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Aquaculture*, 2018, 482: 73-77.
- [27] Jerry D R, Preston N P, Crocos P J, *et al.* Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate)[J]. *Aquaculture*, 2004, 235(1-4): 237-247.
- [28] Dong S R, Kong J, Zhang T S, *et al.* Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers[J]. *Aquaculture*, 2006, 258(1-4): 283-288.
- [29] 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(1-2): 73-83.
- [30] Sudo R, Miyao M, Uchino T, *et al.* Parentage assignment of a hormonally induced mass spawning in Japanese eel (*Anguilla japonica*)[J]. *Aquaculture*, 2018, 484: 317-321.
- [31] Guo B Y, Guan A, Qi P Z, *et al.* Parentage determination of cuttlefish (*Sepiella japonica*) based on microsatellite DNA markers[J]. *Animal Biology*, 2018, 68(1): 1-14.

Establishment of parentage determination in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*)

ZHU Kecheng^{1,2}, SONG Ling¹, LIU Baosuo^{1,2}, GUO Huayang^{1,2},
GUO Liang^{1,2}, ZHANG Nan^{1,2}, ZHANG Dianchang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation and Utilization,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. Engineer Technology Research Center of Marine Biological Seed of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China)

Abstract: In this study, using twelve novel microsatellite markers, we established a paternity test technology for *Acanthopagrus latus* based on a mixed family of *A. latus* including 112 parent individuals and 393 offspring individuals. Genetic diversity data demonstrated that there were 119 alleles observed and the mean number of alleles (N_a), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) were 9.91, 0.651, 0.661, 0.621, respectively. Paternity analysis showed that the combined probability of exclusion reached 99.58 % when both parents were unknown (confidence level, 95%) by 12 loci. And, the combined probability of exclusion reached 99.1 % when both parents were unknown (confidence level, 95%) by 8 loci. Consequently, the 8 high polymorphic microsatellite markers (AL49, AL37, AL01, AL20, AL14, AL18, AL15 and AL51) made up the system of paternity test for *A. latus*. The cumulative exclusion rate of their parents was 99.1% without parents' gender by 8 loci. The rate of assignment success for the real data set was only 89.31 %. In conclusion, the combination of this novel 12 microsatellite markers in our study provided highly effective testing tools for the paternity identification, population breeding and molecular-assisted family management in *A. Latus*.

Key words: *Acanthopagrus latus*; microsatellites; parentage determination; simulation analysis

Corresponding author: ZHANG Dianchang. E-mail: zhangdch@scsfri.ac.cn

Funding projects: Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201403008); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-XKQ01)