

大黄鱼微卫星多重 PCR 体系的建立及其应用

李佳凯, 王志勇, 韦信键, 蔡明夷, 刘洋, 刘贤德*

(集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 利用本实验室开发的微卫星标记, 通过优化退火温度、引物浓度、循环次数等条件, 建立了 3 组大黄鱼微卫星多重 PCR 体系, 每组包含 3 个微卫星位点, 用 3 组微卫星多重 PCR 分析了一个大黄鱼选育群体 JD-01 的遗传多样性。结果显示, 该群体的平均等位基因为 12.111, 平均有效等位基因为 7.408, 平均多态信息含量为 0.846, 平均观测杂合度和期望杂合度分别为 0.825、0.868, 香农多样性指数为 2.165。运用 Cervus 3.0 软件, 对已知系谱关系的 9 个大黄鱼家系及对应亲本进行了亲子鉴定分析, 以验证 3 组微卫星多重 PCR 在亲子鉴定中的准确性。结果显示, 使用该 3 组微卫星多重 PCR 体系进行亲子鉴定准确率为 100%。大黄鱼微卫星多重 PCR 体系的建立为分析群体的遗传多样性、亲子鉴定和辅助家系管理提供了一种高效的技术手段。

关键词: 大黄鱼; 微卫星标记; 多重 PCR; 遗传多样性; 亲子鉴定

中图分类号: Q 785; S 965.3

文献标志码: A

微卫星多重 PCR (multiplex PCR) 是指在一次 PCR 反应中同时进行多个位点的分析。20 世纪 80 年代, Chamberlian^[1] 首次尝试了多重 PCR 反应模式。多重 PCR 因具有省时高效、经济节约等优点, 已广泛应用于生命科学的各个领域, 其中包括一些水生生物: 如大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[2]、美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*)^[3] 的亲子鉴定分析; 皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino)^[4] 的遗传分离模式分析; 斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[5] 的遗传多样性分析; 以及坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*)^[6] 的种质鉴定等。微卫星多重 PCR 体系的开发, 为水生生物亲权关系分析、家系管理、群体遗传等研究提供了有力的工具。

关于微卫星标记在大黄鱼群体遗传多样性分析^[7-8]、遗传分离方式分析^[9]、遗传图谱构建^[10-11]、亲子鉴定和遗传参数估计^[12-13]等方面的研究已有不少, 然而, 以上研究都是基于单个微卫星位点的分析, 效率较低, 尚未见到大黄鱼微卫星多重 PCR 体系构建及应用的相关报道。本实验开

发了 3 组微卫星多重 PCR 体系, 并将其应用于大黄鱼选育群体 JD-01 遗传多样性分析和家系亲子鉴定, 大大提高了分析效率, 以期为大黄鱼分子标记辅助选育以及家系管理提供有力的工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验共分为 3 个部分: 多重 PCR 标记开发、群体遗传多样性分析、亲子鉴定。2011 年秋季在宁德市三都澳养殖区收集养殖大黄鱼 50 尾。剪取部分胸鳍, 固定于 95% 乙醇中, 备用。从中选取 20 尾用于微卫星多重 PCR 的开发, 将开发好的微卫星多重 PCR 应用于大黄鱼选育群体 JD-01 (30 ♀, 30 ♂) 的遗传多样性分析。亲子鉴定所用大黄鱼为课题组 2011 年秋季构建的 9 个家系 (其中 2 个为半同胞家系), 每个家系随机选取 4 个子代加上 17 个亲本共 53 个个体 (样品)。为了验证亲子鉴定的准确性, 将家系后代及对应的亲本归属顺序打乱, 以确定应用多重 PCR 技术辅以相关软件可否将其鉴定出来。

收稿日期: 2014-01-16 修回日期: 2014-02-11

资助项目: 国家自然科学基金 (31172397); 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A403); 集美大学创新团队项目 (2010A02)

通信作者: 刘贤德, E-mail: xdlu@jmu.edu.cn

1.2 实验方法

大黄鱼基因组 DNA 的提取与检测 用常规的苯酚/氯仿/异戊醇法抽提 DNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性, 紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 确定 DNA 的质量, 并将 DNA 浓度调至 30 ng/ μ L, -20 °C 保存备用。

微卫星候选标记位点的筛选 根据微卫星位点的多态性、序列重复单位、片段大小以及扩增效果等特性, 从本课题组已开发的微卫星标记中选取 16 个候选位点。微卫星引物由上海生工生物工程有限公司合成。通过梯度 PCR, 确定每个位点的最佳扩增条件。

PCR 及反应程序 PCR 反应体系 10 μ L: 包括模板 DNA 1 μ L (30 ng), 10 \times PCR buffer 1.0 μ L, 15 mmol/L MgCl₂ 1.0 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.2 μ L, 10 mmol/L 引物对各 0.2 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.1 μ L, 纯水 7.3 μ L。PCR 反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 退火温度 30 s, 72 °C 30 s, 循环 30 次; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。

PCR 产物检测 扩增产物于 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染显色。等位基因大小用 10 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA) 为参照标准对电泳条带进行判读。

多重 PCR 优化组合 根据单个微卫星标记的扩增结果, 确认每个位点的片段大小范围以

及最佳退火温度, 通过 DNAMAN^[14] 软件组合出引物序列间互不干扰的微卫星位点, 以扩增片段大小不重叠、退火温度相差不超过 5 °C 为原则进行多重 PCR 的组合。先进行两个位点之间的组合, 然后在条带清晰、效果良好的二重 PCR 体系中添加另一对引物筛选三重 PCR 体系。通过优化退火温度、循环次数、引物浓度等条件确定最佳的扩增条件。

1.3 统计分析

每个微卫星位点扩增的等位基因按其迁移率不同, 从小到大依次记录为 A、B、C……(无效等位基因由 0 表示)。通过软件 Cervus 3.0^[15] 计算各微卫星位点的等位基因数 (N_a)、多态信息含量 (PIC)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)。有效等位基因数 (N_e)、香农多样性指数 (I) 以及选育群体 JD-01 内个体之间的聚类图通过 Popgene 1.31^[16] 和 MEGA 4.1^[17] 计算。微卫星多重 PCR 在家系鉴定中的效率通过 Cervus 3.0 进行检测。

2 结果

2.1 微卫星多重 PCR 的建立

应用养殖群体的 20 个个体, 我们通过引物搭配、退火温度优化、PCR 反应参数调整等最终开发了 3 组微卫星多重 PCR, 每组包含 3 个微卫星位点。每组多重 PCR 的退火温度、引物浓度以及片段大小见表 1。

表 1 3 组大黄鱼微卫星多重 PCR 特征
Tab.1 Characteristics of three multiplex PCRs in large yellow croaker

多重 PCR multiplex PCR	位点 locus	退火温度/ $^{\circ}$ C annealing temperature	引物浓度/ $(\mu$ mol/L) concentration in multiplex PCR	片段大小/bp size
multiplex set1	LYC0124	55	0.15	109 ~ 188
	LYC0200		0.15	189 ~ 240
	LYC0209		0.15	260 ~ 330
multiplex set2	LYC0002	58	0.15	85 ~ 130
	LYC0405		0.15	140 ~ 190
	LYC0010		0.10	210 ~ 260
multiplex set3	LYC0009	60	0.13	70 ~ 120
	LYC0088		0.13	130 ~ 170
	LYC0451		0.19	252 ~ 315

2.2 应用微卫星多重 PCR 分析大黄鱼选育群体 JD-01 的遗传多样性

用 3 组多重 PCR 对大黄鱼选育群体 JD-01 共 60 个个体进行分析, 共检测到了 109 个等位基

因, 观察到每个位点的等位基因数 (N_a) 8 ~ 18, 平均等位基因数 12.111; 有效等位基因数 (N_e) 4.942 ~ 8.972, 平均有效等位基因数 7.408; 多态信息含量 (PIC) 0.770 ~ 0.878, 平均多态性信息

含量 0.846; 观测杂合度 (H_o) 0.576 ~ 0.900, 平均观测杂合度 0.825; 期望杂合度 (H_e) 0.804 ~ 0.896, 平均期望杂合度 0.868; 香农多样性指数 (I) 1.806 ~ 2.346, 平均香农多样性指数 2.165 (表 2)。图 1 为 LYC0124、LYC0200、LYC0209 3 个位点组合的多重 PCR 产物在选育群体 JD-01 中的电泳检测结果。采用 Nei 氏方法计算了群体内个体之间的遗传距离, 再用 UPGMA 法构建了聚类图, 直观显示出选育群体内个体之间的遗传相似性 (图 2)。总体上, 大黄鱼选育群体 JD-01 的遗传多样性较高。

2.3 微卫星多重 PCR 在家系亲子鉴定中的应用

使用 3 组微卫星多重 PCR 对 9 个家系的 53 个个体 (个体随机打乱) 进行了亲子鉴定, 微卫星数据用 Cervus 3.0 软件进行分析, 所有子代的鉴定亲本与实际亲本一致, 使用这 3 组微卫星多重 PCR 的亲子鉴定准确率为 100% (表 3)。

表 2 利用 3 组多重 PCR 检测获得大黄鱼选育群体 JD-01 的遗传多样性参数值

Tab.2 Genetic diversity in a breeding group "JD-01" of large yellow croaker by using three sets of multiplex PCR

位点 locus	N_a	N_e	PIC	H_o	H_e	I
LYC0002	12	7.852	0.861	0.867	0.880	2.276
LYC0009	18	7.627	0.857	0.883	0.876	2.346
LYC0010	8	6.105	0.816	0.759	0.843	1.920
LYC0088	14	7.236	0.847	0.900	0.869	2.182
LYC0124	15	8.972	0.878	0.576	0.896	2.339
LYC0200	11	7.809	0.858	0.900	0.878	2.178
LYC0209	9	4.942	0.770	0.733	0.804	1.806
LYC0405	12	8.922	0.878	0.900	0.895	2.311
LYC0451	10	7.207	0.847	0.867	0.868	2.124
均值 mean	12.111	7.408	0.846	0.825	0.868	2.165

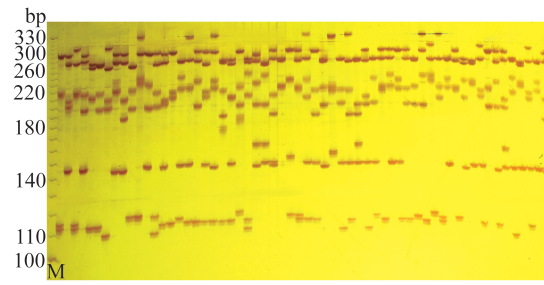


图 1 微卫星 LYC0124 (109 ~ 188 bp)、LYC0200 (189 ~ 240 bp)、LYC0209 (260 ~ 330 bp) 3 个位点在选育群体 JD-01 中的多重 PCR 扩增结果 (M 是 DNA marker)

Fig.1 The result of multiplex PCR of three microsatellites LYC0124, LYC0200, LYC0209 in breeding group "JD-01" of large yellow croaker (M. DNA marker)

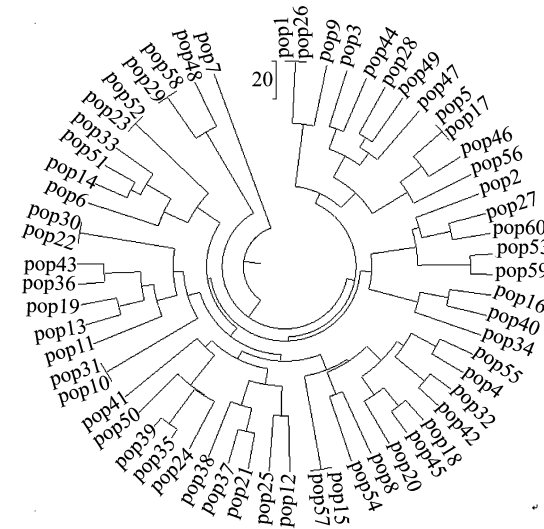


图 2 大黄鱼选育群体 JD-01 根据 Nei 氏遗传距离绘制的 UPGMA 聚类树

Fig.2 Dendrogram based on Nei's genetic distance for a breeding group "JD-01" of large yellow croaker; Method = UPGMA

表 3 3 组微卫星多重 PCR 亲子鉴定结果与实际结果比较

Tab.3 Comparison between the actual parents and identified parents of parentage assignment by using three sets of multiplex PCR

子代 offspring	实际亲本 actual parents		鉴定亲本 identified parents		子代 offspring	实际亲本 actual parents		鉴定亲本 identified parents	
	♀	♂	♀	♂		♀	♂	♀	♂
LY-69	518	501	518	501	RV-49	418	411	418	411
RY-1	4SH12	4SH1	4SH12	4SH1	RY-12	4SH12	4SH1	4SH12	4SH1
LB-26	517	501	517	501	LV-90	528	505	528	505
RB-73	419	412	419	412	RV-54	418	411	418	411
RG-15	525	503	525	503	RP-25	530	507	530	507
RB-81	419	412	419	412	LV-93	528	505	528	505
LY-49	518	501	518	501	RV-3	418	411	418	411

续表 3

子代 offspring	实际亲本 actual parents		鉴定亲本 identified parents		子代 offspring	实际亲本 actual parents		鉴定亲本 identified parents	
	♀	♂	♀	♂		♀	♂	♀	♂
RV-80	418	411	418	411	LG-15	4SH16	4SH2	4SH16	4SH2
RG-28	525	503	525	503	LB-40	517	501	517	501
RP-27	530	507	530	507	LV-59	528	505	528	505
LY-44	518	501	518	501	RY-58	4SH12	4SH1	4SH12	4SH1
LG-47	4SH16	4SH2	4SH16	4SH2	RB-56	419	412	419	412
RY-17	4SH12	4SH1	4SH12	4SH1	RG-9	525	503	525	503
LB-44	517	501	517	501	RP-22	530	507	530	507
RG-27	525	503	525	503	RB-82	419	412	419	412
LB-29	517	501	517	501	LG-37	4SH16	4SH2	4SH16	4SH2
LV-103	528	505	528	505	LG-53	4SH16	4SH2	4SH16	4SH2
LY-50	518	501	518	501	RP-63	530	507	530	507

3 讨论

多重 PCR 要求不同引物能在同一反应体系中进行特异性扩增,因而技术难度较大,理想的多重 PCR 反应体系,并非单一 PCR 的简单组合,需要针对目标产物,进行全面的分析和反复试验^[18]。为了保证多个目的片段在 1 个 PCR 反应中同时特异性扩增,微卫星引物的组合和反应条件的优化至关重要。本研究首先从大黄鱼 24 个连锁群上每个连锁群选择 1~2 个微卫星,保证微卫星的分布在大黄鱼基因组中的均衡性,然后对这些位点的多态性进行分析,确定 16 个多态性较好的位点进行多重 PCR 实验。在影响多重 PCR 反应的众多因素中,张毅等^[19]认为引物间的兼容性和引物浓度比例是其中 2 个核心因素;任宪云等^[20]认为退火温度、 Mg^{2+} 的浓度、引物的相对浓度是 3 个重要的因素。本研究中,主要对引物组合、引物浓度、循环次数、退火温度等 4 个因素进行了优化,结果发现,引物组合是最重要的影响因素,选择的引物间不能形成二聚体、发卡结构等,各引物在同一 PCR 反应体系中的扩增效率要相近,多重 PCR 组合中各引物对扩增产物之间的大小要有一定间隔。平衡每对引物的浓度和循环次数的优化,是优化多重 PCR 反应条件的 2 个关键因素,引物浓度过大以及循环次数过多,会导致杂带的产生,引物浓度过小以及循环次数较少,会减少 PCR 产物量或影响 PCR 产物的形成,这两个因素的优化,需要反复地试验,根据电泳检测结果,调整多重组合中各引物的量以及循环次数,在实验中,可以先控制一个因素,调整另一个因素来满足最终需要。退火温度的优化是其中

另一个比较重要的因素,首先要确定各个引物在单个 PCR 中的最佳退火温度,然后进行退火温度相差不超过 5 °C 的引物间的组合,本研究中开发的多重 PCR 只有一个退火温度,在优化退火温度的过程中,实验采取梯度 PCR 的方法,确定最佳的退火温度。

采用荧光标记微卫星引物开发的微卫星多重 PCR^[3,5]可以在一个反应体系中加入较多的微卫星位点,但是需要专用的设备(如 ABI 的 3730 遗传分析仪),检测仪器本身造价就高,加上相关耗材成本价格也不菲,致使荧光标记多重 PCR 技术的应用受到很大限制。考虑到本实验室的实验条件,我们没有采用此种方法,而是使用普通的银染方法来检测多重 PCR 产物。非荧光标记的微卫星多重 PCR 中,增加一个或者两个位点,都会相应地增加实验难度以及影响扩增效果,同时对选取的微卫星引物片段提出更高的要求,鉴于此,我们在开发微卫星多重 PCR 时,选取了高度多态的微卫星位点,进行了 3 个位点的组合而没有进行更多位点的组合。与单个位点 PCR 相比,多重 PCR 无疑增加了很多前期工作,但技术一旦开发成熟,其效率也可提高不少。与人类相比,鱼类的亲子鉴定远远不需要达到人类亲子鉴定的置信度 (>99.999 999%),因此允许多重 PCR 技术有少许误差。

利用本实验开发的 3 组大黄鱼微卫星多重 PCR,分别进行了群体遗传多样性分析和亲子鉴定研究,都分别达到了预期效果,比之前使用单个微卫星进行分析,效率提高了 2 倍。

本实验中,利用 3 组大黄鱼微卫星多重 PCR

对选育群体 JD-01 的遗传多样性分析, 研究结果与赵广泰等^[7]利用 13 个多态性微卫星位点对大黄鱼“官井洋优快 01”品系的遗传多样性分析相比, 该选育群体的遗传多样性较高, 可能是“官井洋优快 01”品系经过多年选育, 遗传多样性有所下降有关。通过构建的聚类图, 可以直观地显示出选育群体 60 个样品之间的遗传相似性, 这对于下一代亲本的选择、近交控制以及保持选育群体的遗传多样性具有一定的指导作用。

本研究中, 当使用 3 组微卫星多重 PCR 进行亲子鉴定时, 准确性达到了 100%, 只使用 1 组多态信息含量最高的 multiplex set 2 进行亲子鉴定时, 准确性达到了 83.3%, 再增加其中任意一组时, 准确性也达到了 100%, 这个结果比以往研究的大黄鱼亲子鉴定效率都要高^[13], 可能与本实验所选用的微卫星位点的多态性较高有关, 如对于复杂群体进行鉴定, 还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier P N, *et al.* Deletion screening of the *Duchenne muscular dystrophy* locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16 (23): 11141 - 11156.
- [2] Miao G D, Fan T J, Chen S L, *et al.* Development of two microsatellite multiplex PCR systems for turbot (*Scophthalmus maximus*) and its application for family management [J]. *Periodical of Ocean University of China: Natural Science*, 2011, 41 (1 - 2): 97 - 106. [苗贵东, 樊廷俊, 陈松林, 等. 大菱鲆亲子鉴定的微卫星多重 PCR 技术建立及应用. 中国海洋大学学报, 2011, 41 (1 - 2): 97 - 106.]
- [3] Wang Y, Wang X X, Wang A, *et al.* A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) [J]. *Aquaculture*, 2010, 308 (S1): 28 - 33.
- [4] Nie H T, Kong L F, Li Q. Development of four multiplex PCR panels of microsatellites and application to kinship analysis in the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37 (2): 207 - 215. [聂鸿涛, 孔令锋, 李琪. 皱纹盘鲍微卫星多重 PCR 体系构建及其在家系鉴定中的应用. 水产学报, 2013, 37 (2): 207 - 215.]
- [5] Li Y T, Wong K P, Shekhar M, *et al.* Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations [J]. *Aquaculture*, 2010, 266 (1 - 4): 279 - 288.
- [6] Wang T, Xu Y, Chen C S, *et al.* Construction of multiplex PCR in variety identification of *Porphyra haitanensis* “Z-26” based on SCAR markers [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37 (5): 688 - 695. [王婷, 徐燕, 陈昌生, 等. 基于 SCAR 标记的坛紫菜“闽丰 1 号”多重 PCR 鉴定技术的建立. 水产学报, 2013, 37 (5): 688 - 695.]
- [7] Zhao G T, Liu X D, Wang Z Y, *et al.* Genetic structure and genetic diversity analysis of four consecutive breeding generations of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using microsatellite markers [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34 (4): 500 - 508. [赵广泰, 刘贤德, 王志勇, 等. 大黄鱼连续 4 代选育群体遗传多样性与遗传结构的微卫星分析. 水产学报, 2010, 34 (4): 500 - 508.]
- [8] Lin N F, Su Y Q, Ding S X, *et al.* Genetic analysis of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) stocks using polymorphic microsatellite DNA [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (7): 661 - 666. [林能锋, 苏永全, 丁少雄, 等. 大黄鱼群体遗传多样性的微卫星 DNA 分析. 福建农业学报, 2012, 27 (7): 661 - 666.]
- [9] Ye H, Ren P, Liu Y, *et al.* Isolation and genetic analysis of microsatellite markers for markers for *Larimichthys crocea* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012 (6): 1156 - 1163. [叶华, 任鹏, 王志勇, 等. 大黄鱼微卫星标记的开发及其遗传方式分析. 水生生物学报, 2012, 36 (6): 1156 - 1163.]
- [10] Ning Y, Liu X D, Wang Z Y, *et al.* A genetic map of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Aquaculture*, 2007, 264 (1 - 4): 16 - 26.
- [11] Li Y, Cai M, Wang Z, *et al.* Microsatellite-centromere mapping in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) using gynogenetic diploid families [J]. *Marine Biotechnology*, 2008, 10 (1): 83 - 90.
- [12] Wu X W, Liu X D, Wang Z Y, *et al.* Condition exploration and optimization for fSSR system and its application in large yellow croaker *Larimichthys crocea* for parentage assignment [J]. *Marine Science Bulletin*, 2011, 30 (4): 419 - 214. [武祥伟, 刘贤德, 王志勇. fSSR 分析技术的建立及在大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 亲子鉴定中应用. 海洋通报, 2011, 30 (4): 419 - 214.]

- [13] Liu X D, Zhao G T, Wang Z Y, *et al.* Estimated genetic parameters for growth-related traits in large yellow croaker *Larimichthys crocea* using microsatellites to assign parentage [J]. *Journal of Fish Biology*, 2013, 82(1):34-41.
- [14] Woffelman C. DNAMAN for windows [M]. The Netherlands: Leiden University, 1994.
- [15] 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.
- [16] Yeh F, Yang R C, Boyle T. POPGENE: A User friendly share are for population genetic analysis [M]. Edmonton: Molecular and Biotechnology Center, University of Alberta, 1997.
- [17] Tamura K, Dudley J, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolution Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8):1569-1599.
- [18] Chen M J, Fang T, Ke T, *et al.* Multiplex PCR-A molecular biotechnique of high efficiency and speed [J]. *Journal of Wuhan University of Technology*, 2005, 27(10):33-36. [陈明洁, 方倜, 柯涛, 等. 多重 PCR——一种高效快速的分子生物学技术. 武汉理工大学学报, 2005, 27(10):33-36.]
- [19] Zhang Y, Sun D X, Yu Y, *et al.* Optimized multiplex PCR sets and genetic polymorphism of 30 microsatellite loci in domestic buffalo [J]. *Hereditas*, 2008, 30(1):59-64. [张毅, 孙东晓, 张沅, 等. 家养水牛 30 个微卫星标记的多重 PCR 体系建立及其多态性检测. 遗传, 2008, 30(1):59-64.]
- [20] Ren X Y, Liu P, Li J, *et al.* Establishment and optimization of a microsatellite-labeling multiplex PCR system in *Portunus trituberculatus* [J]. *Marine Fisheries Research*, 2011, 32(3):76-83. [任宪云, 李建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹微卫星多重 PCR 技术建立及条件的优化. 渔业科学进展, 2011, 32(3):76-83.]

Development and application of three multiplex PCR panels of microsatellites in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

LI Jiakai, WANG Zhiyong, WEI Xinjian, CAI Mingyi, LIU Yang, LIU Xiande*

(Key Laboratory of Mariculture in the East China Sea, Ministry of Agriculture of China, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, three multiplex PCR panels were established using microsatellite markers developed from our laboratory by optimizing annealing temperature, concentration of primers and times of cycle. A breeding group “JD-01” was analyzed using the three multiplex PCR panels. The results showed: the average number of alleles and effective number of alleles were 12.111 and 7.408 respectively. The average of polymorphism information content (PI_C) were 0.846. The average of observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) was 0.825 and 0.868, respectively. The Shannon's diversity index was 2.165. By using Cervus 3.0 software, we verified parentage assignment that the pedigree relationship was known in 9 families of large yellow croaker. As a result, the accuracy rate of parentage assignment was 100% by using three multiple PCR panels. The development of microsatellite multiple PCR system provides a high efficiency technical method for genetic diversity analysis, parentage assignment and marker-assisted family management in large yellow croaker.

Key words: *Larimichthys crocea*; microsatellite markers; multiplex PCR; genetic diversity analysis; parentage assignment

Corresponding author: LIU Xiande. E-mail: xdlu@jmu.edu.cn