

牙鲆家系亲权鉴定的微卫星 DNA 标记分析

刘永新^{1*}, 孙朝徽², 王玉芬², 刘 奕³, 刘英杰^{1*}

(1. 中国水产科学研究院,北京 100141;

2. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站,河北 秦皇岛 066100;

3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,广东 广州 510380)

摘要:为准确进行不同家系的亲权鉴定,筛选具有高亲本排除概率的微卫星 DNA 标记,从牙鲆选育基础群体中挑选性腺发育良好的雌雄亲本各 10 尾建立全同胞家系 10 个,从独立饲养的每个家系中随机选取 30 尾个体组成系谱结构已知的家系群体,从混合培育的子代群体中随机选取 200 尾个体组成系谱结构未知的混合群体。48 个微卫星 DNA 标记选自牙鲆第二代遗传连锁图谱,且均匀分布于 24 个连锁群上,每个连锁群 2 个标记。家系群体的遗传分析结果发现,10 个拥有丰富遗传多态性的微卫星 DNA 标记表现出高的亲本排除概率,其 Excl 1 和 Excl 2 的范围分别为 0.655~0.719 和 0.792~0.837。随鉴定所用微卫星 DNA 标记数目的增加,累计排除概率逐步升高。当使用 8 个微卫星 DNA 标记鉴定时,累计排除概率达到 100%。利用这些标记开展混合群体的亲权鉴定,显示共有 13 个雌雄个体参与繁殖过程,不同亲本配组产生的后代数量存在差异,亲本与后代群体之间的各项遗传学统计指标不存在明显差异。研究表明,筛选出具有高亲本排除概率的微卫星 DNA 标记能够有效进行牙鲆家系的亲权鉴定,可以作为今后开展家系选育与 DNA 分子标记联合育种的候选标记。

关键词:牙鲆;微卫星;家系;亲权鉴定;排除概率

中图分类号:Q 785; S 965.3

文献标志码:A

亲权鉴定是水产动物遗传育种过程中经常使用的技术方法,所涉及应用的水产动物种类非常广泛,覆盖了主要养殖的海淡水鱼类^[1-4]、虾类^[5-7]和贝类^[8-10]品种。在众多的分子标记当中,微卫星 DNA 标记以呈共显性遗传、多态性高、数量丰富、遵循孟德尔遗传法则等特点成为分析亲缘关系的首选标记^[11-14],利用其开展的实验研究主要包括家系亲权分析^[15-17]、杂交组合与家系的亲子鉴定^[18-20]、家系鉴别及系谱认证^[21-24]以及繁殖过程中不同亲本对子代的遗传贡献^[4,25-28]等。总结这些研究的特点发现,多数的研究都是以家系为分析对象,这主要源自“十二五”以来主要水产动物养殖品种大规模开展了家系选育,大量优良家系的产生为培育高产、优质、抗逆的水产动物新品种提供了必备基础材

料^[29-34]。同时,在这些分析中,所选用的微卫星 DNA 标记多为随机选取,通过遗传学统计指标确定标记是否具有足够的多态性,计算单个标记的亲本排除率和全部标记的累计排除概率,进行后续的亲本与子代之间的亲缘关系鉴定或者不同家系之间鉴别及系谱信息确定等工作。但鲜有研究从覆盖目标物种全部连锁群的角度进行大规模微卫星 DNA 标记亲本排除率高低的判断与筛选,进而利用少数高亲本排除率的微卫星 DNA 标记就能够达到多个标记才可准确完成的亲权分析工作。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)从分类学上隶属于硬骨鱼纲(Pisces),鲽形目(Pleuronectiformes),鲆科(Bothidae),有比目鱼、偏口鱼、牙片、左口等通称。因为其个体较

收稿日期:2015-03-02 修回日期:2015-07-07

资助项目:中国水产科学研究院部基本科研业务费专项(2014C009);国家科技支撑计划(2012BAD26B01)

通信作者:刘永新,E-mail:liuyx@cafs.ac.cn;刘英杰,E-mail:lyj@cafs.ac.cn

大、肉质细嫩、味道鲜美,是制作生鱼片的上等材料,拥有较高的经济和社会价值,已成为我国重要的海水增殖殖鱼类品种之一^[35]。与牙鲆家系性状相关的研究包括耐热^[36]、抗病^[37]及生长^[38-39]等。经过数年的努力,牙鲆“鲆优1号”、“北鲆1号”和“北鲆2号”等3个新品种通过了国家水产原种和良种审定委员会的审定,并在主要养殖区域进行了示范与推广。在这些新品种的培育过程中,以经典数量遗传学为基础的动物模型 BLUP 方法为主要选育手段^[40-42],而将 DNA 分子标记技术与家系选育相结合进行牙鲆经济性状遗传改良的研究还未见开展。本实验从覆盖牙鲆全部连锁群的角度选择了多个微卫星 DNA 标记,以牙鲆全同胞家系为材料进行标记亲本排除率的排序,筛选出能够准确进行牙鲆亲权鉴定的高多态性标记,利用这些标记进行牙鲆混合家系群体的遗传分析,在验证标记有效性和实用性的同时判断亲本群体与子代群体之间的遗传差异,为今后开展牙鲆家系选育与 DNA 分子标记技术的联合育种研究提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

建立家系所选用的亲本选自中国水产科学研究院北戴河中心实验站牙鲆基础群体,亲本挑选的原则是健康、体表无外伤、表型性状较好。采用雌雄 1:1 配组的方式制备全同胞家系 10 个,雌雄亲本编号分别为 $F_1 \sim F_{10}$ 和 $M_1 \sim M_{10}$,每个家系饲养于独立的玻璃钢水槽中。同时,取每个家系的受精卵约 30 mL 混合在一个大的玻璃钢水槽中进行孵化和培育。整个饲养过程按照常规方法进行,开口饵料为轮虫,之后随日龄增加,饵料逐渐转换为卤虫与人工配合饲料,每个玻璃钢水槽中的饲养条件基本保持一致。10 个全同胞家系的子代培养至 90 日龄时,每个家系随机选取 30 尾个体组成全同胞家系群体,该群体系谱结构已知;从混合孵化培育的群体随机选取 200 尾个体组成混合家系群体,该群体系谱结构未知。

1.2 基因组 DNA 的提取

所有家系的亲本采集腹面胸鳍作为提取 DNA 的样品,每个家系与混合家系子代均采集尾部鳍条作为提取 DNA 的样品。DNA 整个抽提流

程参照韩慧宗等^[1]方法:将裂解液 [50 mmol/L NaCl, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 200 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1% SDS, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinase K] 加入剪碎的鳍条中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 消化至澄清, 等体积的饱和酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提一遍, 2.5 倍体积预冷的异丙醇沉淀, 0.1 mL 70% 乙醇清洗沉淀, TE 溶解, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。DNA 提取完成后, DNA 样品质量利用琼脂糖凝胶电泳进行检测, OD_{260} 值利用紫外分光光度计进行测定, 确定 DNA 浓度。

1.3 微卫星标记

由牙鲆第二代遗传连锁图谱^[43]选择 48 个微卫星标记, 每个连锁群 2 个标记。引物序列或微卫星序列检索自 GenBank, 引物设计软件包括 SSRHunter 和 Primer 3.0, 引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。48 个微卫星标记的名称、连锁群、核心序列及 GenBank 登录号列于表 1 中。

1.4 PCR 反应及电泳

PCR 反应体系为 15 μL , 包括 10 \times Buffer 2.5 μL 、 Mg^{2+} (25 mmol/L) 1 μL 、dNTPs (各 2 mmol/L) 1 μL 、上下游引物 (10 mmol/L) 各 0.6 μL 、模版 1 μL (30 ~ 50 ng)、Taq DNA 聚合酶 1U, 加适量 ddH_2O 。反应程序包括: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 25 个循环, 最后延伸 10 min, 利用 PE9700 型 PCR 仪完成 PCR 扩增。PCR 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 电泳后用 1% 硝酸银染色 10 min, 显色液显色 10 min。凝胶经 HP scanjet G4010 扫描仪成像, Gel-Pro Analyzer 4.5 凝胶分析软件对电泳谱带进行数据采集和分析。

1.5 统计分析

利用 CERVUS (Version 3.0) 计算每个微卫星标记的亲本排除概率 (probabilities of exclusion, PE)^[44], 在只有子代信息已知的条件下获得的排除概率称为 Excl 1, 在双亲中有一个亲本是已知的条件下获得的排除概率称为 Excl 2。多个位点的累计排除概率 (combined probabilities of exclusion, CPE) 计算公式如下^[45]: $PE = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2)(1 - P_3) \cdots (1 - P_k)$, 式中 P_k 为第 k 个位点的亲本排除概率。亲本和家系群体遗传参数的统计指标包括等位基因数 (number of alleles, A)、观测杂合度 (observed

表 1 48 个微卫星标记的名称、连锁群、核心序列和 GenBank 登录号
 Tab.1 Locus, core sequences, linkage group and accession number in GenBank of 48 microsatellite loci

标记 locus	连锁群 linkage group	核心序列 core sequence	登录号 GenBank accession No.	标记 locus	连锁群 linkage group	核心序列 core sequence	登录号 GenBank accession No.
<i>Poli784TUF</i>	1	(TG) ₃₈	EF112749	<i>Poli1446TUF</i>	13	(TAG) ₁₆	DQ889011
<i>Poli130TUF</i>	1	(CA) ₂₄	AB037996	<i>Poli966TUF</i>	13	(CA) ₁₅	EF112892
<i>Poli23TUF</i>	2	(CA) ₂₇	AB037985	<i>Poli1260TUF</i>	14	(TG) ₁₇	EF113016
<i>Poli866TUF</i>	2	(TG) ₃₃	EF112814	<i>Poli141TUF</i>	14	(CA) ₃₂	AB086537
<i>Poli24MHFS</i>	3	(CA) ₂₁	AB459326	<i>Poli734TUF</i>	15	(CA) ₁₂	EF112723
<i>Poli18TUF</i>	3	(CA) ₂₄	AB037983	<i>Poli39MHFS</i>	15	(CA) ₃₁	AB459333
<i>Poli1393TUF</i>	4	(GCA) ₈	DQ888958	<i>Poli1503TUF</i>	16	(TGC) ₉	DQ889063
<i>Poli1359TUF</i>	4	(CA) ₁₂	DQ888932	<i>Po25A</i>	16	(GATG) ₁₀	AB046749
<i>Poli1120TUF</i>	5	(CA) ₃₃	EF112916	<i>Poli1407TUF</i>	17	(CA) ₁₀	DQ888972
<i>Poli9TUF</i>	5	(CA) ₂₀	AB037980	<i>Poli1534TUF</i>	17	(CA) ₁₆	AB458955
<i>Poli134TUF</i>	6	(CA) ₁₄	AB459410	<i>Poli1966TUF</i>	18	(CA) ₃₀	AB459226
<i>Poli107TUF</i>	6	(CA) ₂₇	AB037990	<i>Poli16-79TUF</i>	18	(CA) ₂₁	AB459369
<i>Poli18-55TUF</i>	7	(CA) ₃₂	AB459376	<i>Poli1425TUF</i>	19	(AGC) ₂₁	DQ888990
<i>Poli159TUF</i>	7	(CA) ₁₀	AB459431	<i>Poli1490TUF</i>	19	(CTT) ₇	DQ889052
<i>Poli840TUF</i>	8	(GT) ₁₀	EF112795	<i>Poli123TUF</i>	20	(CA) ₃₅	AB037994
<i>Poli1825TUF</i>	8	(GA) ₂₉	AB459110	<i>Poli139TUF</i>	20	(CA) ₁₂	AB459413
<i>Poli182TUF</i>	9	(CA) ₂₈	AB459453	<i>Poli1827TUF</i>	21	(CA) ₁₄	AB459112
<i>Poli1392TUF</i>	9	(TGC) ₆	DQ888957	<i>Poli1925TUF</i>	21	(CA) ₁₇	AB459193
<i>Poli101TUF</i>	10	(CA) ₂₅	AB086493	<i>Poli1451TF</i>	22	(AGC) ₁₁	DQ889016
<i>Poli1412TUF</i>	10	(AT) ₈	DQ888977	<i>Poli2TUF</i>	22	(CA) ₂₅	AB037978
<i>Poli1795TUF</i>	11	(CA) ₁₆	AB459082	<i>Poli1643TUF</i>	23	(CA) ₁₈	AB458986
<i>Poli174TUF</i>	11	(CA) ₁₉	AB459445	<i>Poli193TUF</i>	23	(CA) ₂₁	AB459463
<i>Poli1TUF</i>	12	(CA) ₃₉	AB037977	<i>Poli1906TUF</i>	24	(CA) ₁₆	AB459179
<i>Poli212TUF</i>	12	(CA) ₃₃	AB459478	<i>Poli1872TUF</i>	24	(CA) ₁₈	AB459147

heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) 和多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)。利用 Popgene (Version 3.2) 软件来完成各个统计指标的计算。观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量的计算公式:

$$H_o = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

$$H_e = N(1 - \sum P_i^2) / (N - 1)$$

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

式中, n 为等位基因数, i 为位点数, P_i 、 P_j 为等位基因频率。

2 结果与分析

2.1 所选择微卫星标记的亲本排除概率

48 个标记在 10 个分别孵化培育的全同胞家

系群体的各项遗传参数和亲本排除概率中,所有标记的等位基因数范围为 2 ~ 24,观测杂合度与期望杂合度分别是 0.032 ~ 1.000 和 0.079 ~ 0.922 (表 2)。46 个微卫星标记的 PIC 为 0.555 ~ 0.914,为高度多态标记;仅有 2 个标记的 PIC 低于 0.1,为低度多态标记。在 10 个标记观测到高 Excl 1 (0.655 ~ 0.719) 和 Excl 2 (0.792 ~ 0.837), 22 个标记观测到中等 Excl 1 (0.505 ~ 0.645) 和 Excl 2 (0.676 ~ 0.784), 16 个标记观测到较低的 Excl 1 (0.003 ~ 0.480) 和 Excl 2 (0.038 ~ 0.653)。累计排除概率随标记数量的增加呈现递增趋势,从 3 到 6 个标记累计排除概率明显升高,而从 6 到 10 个标记累计排除概率增加基本趋于平缓,其中,在 8 个位点处累计排除概率已经达到 100% (图 1)。

表 2 10 个全同胞家系在 48 个微卫星标记遗传学统计指标
Tab. 2 Genetic statistical data observed in ten full-sib families at forty-eight microsatellite loci

标记 locus	等位 基因数 A	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	PIC	Excl 1	Excl 2	标记 locus	等位 基因数 A	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	PIC	Excl 1	Excl 2
<i>Poli784TUF</i>	19	0.986	0.920	0.911	0.712	0.832	<i>Poli1446TUF</i>	11	0.904	0.870	0.855	0.581	0.737
<i>Poli130TUF</i>	15	0.991	0.899	0.888	0.655	0.792	<i>Poli966TUF</i>	13	0.977	0.871	0.857	0.590	0.743
<i>Poli23TUF</i>	22	1.000	0.914	0.905	0.696	0.821	<i>Poli1260TUF</i>	18	0.894	0.873	0.858	0.591	0.744
<i>Poli866TUF</i>	21	0.995	0.922	0.914	0.719	0.837	<i>Poli141TUF</i>	24	0.991	0.917	0.909	0.710	0.830
<i>Poli24MHFS</i>	17	0.858	0.869	0.855	0.585	0.739	<i>Poli734TUF</i>	11	0.867	0.775	0.741	0.396	0.574
<i>Poli18TUF</i>	14	0.986	0.871	0.855	0.584	0.739	<i>Poli39MHFS</i>	19	0.826	0.858	0.845	0.57	0.728
<i>Poli1393TUF</i>	5	0.693	0.639	0.581	0.219	0.381	<i>Poli1503TUF</i>	7	0.913	0.840	0.818	0.505	0.676
<i>Poli1359TUF</i>	10	0.853	0.804	0.777	0.444	0.620	<i>Po25A</i>	9	0.807	0.776	0.746	0.402	0.582
<i>Poli1120TUF</i>	16	0.908	0.886	0.874	0.624	0.769	<i>Poli1407TUF</i>	2	0.083	0.079	0.076	0.003	0.038
<i>Poli9TUF</i>	13	0.835	0.853	0.837	0.552	0.714	<i>Poli1534TUF</i>	5	0.514	0.684	0.629	0.267	0.433
<i>Poli134TUF</i>	8	0.844	0.774	0.741	0.393	0.573	<i>Poli1966TUF</i>	20	0.936	0.890	0.880	0.645	0.784
<i>Poli107TUF</i>	16	0.913	0.846	0.829	0.536	0.701	<i>Poli16-79TUF</i>	21	0.963	0.916	0.908	0.703	0.826
<i>Poli18-55TUF</i>	17	0.945	0.916	0.907	0.704	0.826	<i>Poli1425TUF</i>	11	0.986	0.822	0.797	0.474	0.647
<i>Poli159TUF</i>	7	0.569	0.703	0.665	0.304	0.485	<i>Poli1490TUF</i>	6	0.537	0.671	0.630	0.263	0.441
<i>Poli840TUF</i>	10	0.665	0.841	0.821	0.518	0.686	<i>Poli123TUF</i>	12	0.972	0.862	0.844	0.554	0.716
<i>Poli1825TUF</i>	10	0.917	0.826	0.802	0.48	0.653	<i>Poli139TUF</i>	17	0.995	0.909	0.900	0.684	0.813
<i>Poli182TUF</i>	17	0.959	0.893	0.881	0.637	0.780	<i>Poli1827TUF</i>	6	0.739	0.635	0.589	0.228	0.399
<i>Poli1392TUF</i>	7	0.803	0.776	0.738	0.379	0.558	<i>Poli1925TUF</i>	11	0.862	0.850	0.831	0.536	0.701
<i>Poli101TUF</i>	10	0.885	0.821	0.796	0.473	0.646	<i>Poli1451TF</i>	3	0.032	0.097	0.094	0.005	0.048
<i>Poli1412TUF</i>	6	0.546	0.611	0.555	0.206	0.364	<i>Poli2TUF</i>	18	0.917	0.871	0.858	0.595	0.747
<i>Poli1795TUF</i>	14	0.995	0.878	0.864	0.603	0.753	<i>Poli1643TUF</i>	12	0.807	0.875	0.860	0.589	0.743
<i>Poli174TUF</i>	20	0.959	0.889	0.878	0.637	0.778	<i>Poli193TUF</i>	18	0.995	0.906	0.896	0.676	0.807
<i>Poli1TUF</i>	20	0.940	0.875	0.862	0.599	0.750	<i>Poli1906TUF</i>	21	0.899	0.883	0.873	0.629	0.773
<i>Poli212TUF</i>	20	0.950	0.908	0.899	0.680	0.810	<i>Poli1872TUF</i>	14	0.849	0.844	0.826	0.529	0.695

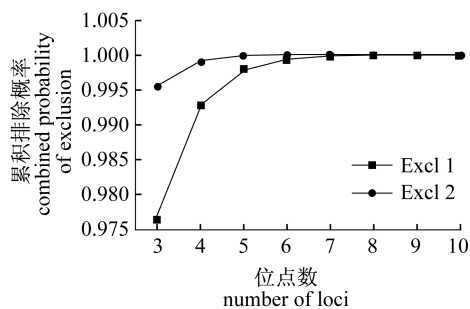


图 1 不同位点数的累积排除概率

Fig. 1 Combined probabilities of exclusion for different number of loci

2.2 混合孵化培育家系群体的亲缘关系分析

根据单个微卫星标记亲本排除概率的结果,选择排序在前的 8 个标记进行混合孵化培育家系群体的亲缘关系鉴定。采样群体中有 6 个母本和

7 个父本产生的子代,其中 F_6 与 M_4 、 F_8 与 M_7 的子代最多,所占比例为 17.5%;依次, F_8 与 M_6 子代占 14.5%, F_3 与 M_8 子代占 11%, F_9 与 M_2 子代占 10%,剩余父母本组合的子代所占比例均在 6% 以下(表 3)。亲本群体和子代群体的各项遗传学参数显示,两个群体之间的遗传差异并不明显(表 4)。在平均等位基因数、期望杂合度和多态信息含量方面,亲本群体略高于子代群体;而在平均观测杂合度方面,亲本群体则略低于子代群体。

3 讨论

水产动物的亲权鉴定是分子标记技术辅助育种的常规手段,就应用的物种范围来讲鱼类是研究最多的种类。各种海淡水鱼类品种,如建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*)^[17]、哲罗鱼 (*Hucho*

表 3 每对亲本繁殖后代所占的比例
Tab. 3 Percentage of offspring related to each parent contributing to reproduction

母本 female	父本 male	子代个体数 number of offspring	百分比/% percentage
F ₃	M ₂	5	2.5
	M ₄	5	2.5
	M ₇	7	3.5
	M ₈	22	11
F ₄	M ₂	10	5
	M ₄	6	3
	M ₈	5	2.5
F ₅	M ₃	12	6
F ₆	M ₄	35	17.5
F ₈	M ₆	29	14.5
	M ₇	35	17.5
F ₉	M ₂	20	10
	M ₈	4	2
	M ₉	5	2.5
合计 Total		200	100

表 4 亲本和子代群体的遗传学统计指标
Tab. 4 Genetic statistical data of parental and offspring population

群体 population	统计指标 statistical index	位点 Locus								均值 Mean
		Poli866- TUF	Poli784- TUF	Poli141- TUF	Poli18-55- TUF	Poli16-79- TUF	Poli23- TUF	Poli139- TUF	Poli212- TUF	
亲本 parent	等位基因数 A	18	18	21	16	20	20	16	20	18.625 0
	观测杂合度 H _o	0.944 4	0.833 3	1	0.944 4	0.888 9	1	0.944 4	0.888 9	0.930 5
	期望杂合度 H _e	0.939 7	0.938 1	0.947 6	0.942 9	0.963 5	0.950 8	0.942 9	0.960 3	0.948 2
	PIC	0.907	0.904	0.917	0.911	0.933	0.92	0.913	0.93	0.916 9
子代 offspring	等位基因数 A	17	16	19	15	15	19	15	16	16.500 0
	观测杂合度 H _o	1	1	0.99	0.945	0.97	1	1	0.955	0.982 5
	期望杂合度 H _e	0.920 4	0.918 7	0.915 2	0.913 4	0.911 9	0.91	0.906 8	0.904 6	0.912 6
	PIC	0.912	0.910	0.907	0.905	0.902	0.9	0.897	0.894	0.903 4

taimen)^[20]、尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*)^[46]、金头鲷 (*Sparus aurata*)^[47]、大菱鲈 (*Scophthalmus maximus*)^[48] 和大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[4,27,49] 等,所涉及的内容主要为亲子鉴定与家系系谱认证、亲本繁殖贡献率分析以及利用混合繁育群体经过亲权鉴定后,研究生长性状的遗传参数。检索已有文献中对牙鲈亲权关系的实验分析,与其他鱼类品种研究基本相同,集中在放流群体的系谱追踪^[3]、人工繁殖群体亲本对子代贡献率判别^[50]、有丝分裂雌核发育家系的亲子鉴定^[51]以及养殖群体子代的亲缘关系分析^[52]。在上述的这些报道中,所利用的微卫星 DNA 标记全部都是随机选取,经过标记多态性判断和亲本

排除概率 (PE) 估计之后应用于实际分析过程中,而未大范围进行具有高亲本排除概率 (PE) 的标记筛选,造成鉴定所用的标记数目往往较多。与其不同,本实验从 48 个覆盖牙鲈全部连锁群的微卫星标记中首先进行亲本排除概率 (PE) 的计算,共找到 10 个标记拥有高 Excl 1 和 Excl 2 标记,其最低估计值分别在 0.655 和 0.792 之上。这 10 个标记均匀分布在牙鲈 8 个连锁群上面,其中 1 号和 2 号连锁群各包含 2 个标记。标记累计排除概率 (CPE) 结果表明:6 个标记已达到 99%,8 个标记则达到了 100%,而后标记数目再增加结果无变化。利用 8 个标记进行全同胞家系群体亲本与子代的亲权分析,鉴定结果与已知的系谱结构

完全一致。由此证实,采用这种方法能够有效消除随机选取标记的盲目性,降低亲权关系鉴定所使用的标记数量,同时提高鉴定结果的准确性。

当然,标记仅拥有高的亲本排除概率(PE)并不能够满足鉴定的实际需求,是否具有足够的遗传多态性也决定了其在今后的应用价值。在已知系谱结构的全同胞家系群体遗传参数中,48 个候选微卫星 DNA 标记的绝大多数都拥有较高的遗传统计指标。针对亲本排除概率(PE)前 10 位的标记,其最低的等位基因数(A)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)更是达到了 15、0.991、0.899、0.888。以衡量标记遗传信息含量高低的主要参数 PIC 为例,借鉴已有文献的界定, $PIC < 0.5$ 时判定该标记为低或中度多态标记; $PIC > 0.5$ 时判定该标记为高度多态标记^[53]。由此,可表明这些标记的多态性足够丰富,完全可以满足后续的群体遗传分析需求。未知系谱结构的混合孵化培育家系群体亲缘关系分析结果中,共计发现 13 个父本与母本个体,有 14 对父母本组合产生了后代,不同组合的后代数量存在一定的差异性,这主要与该群体为随机采样群体有关。亲本群体与子代群体的遗传参数统计比较表明,两者之间不存在明显的差异,表明亲本群体经过一代繁殖产生的子代拥有较为丰富的遗传多样性。该亲本群体可以作为牙鲆优良品种选育的基础群体或核心群体,而所产生的子代同样可以作为培育具有特定目标经济性状优良家系的备选群体。同时,混合家系群体的实验分析也验证了所筛选高亲本排除概率(PE)的微卫星 DNA 标记的有效性和实用性。通过本实验筛选出的具有高亲本排除概率标记在实验中 10 个家系制备的混合群体进行了验证。在后续开展家系选育的过程中,10 个家系之外亲本混合繁育后代利用这些标记也进行了亲子鉴定,应用结果表明部分标记同样具备较高的鉴别效率,由此表明筛选出的标记在实际育种过程中具备一定的应用价值。此外,筛选出的该批标记也是今后开展牙鲆增殖放流与回捕群体的亲缘关系鉴定、不同混养家系的遗传甄别、亲本与家系群体的遗传结构与特征分析等工作的候选遗传标记。

对于水产动物的新品种培育,首先,利用亲缘关系分析可以判断育种核心群体内个体之间的遗传距离,选择遗传距离相对较远的个体之间进行

配组,从而有效避免因为近亲交配带来的种质性状衰退,在团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[54]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[55]和镜鲤 (*Cyprinus carpio*)^[56]等多个水产物种上都已经取得了较为成功的应用。其次,开展分子标记辅助育种与大规模家系选育相结合的联合选育能够促进遗传改良效果的提高,利用亲权鉴定技术准确无误地区分出不同家系,这样在家系培育过程中可以将大量的家系分布在少数几个池内进行饲养,避免了每个家系都需要一个独立养殖单元的空间浪费,大大降低了人工管理与操作的强度;同时,因为同池饲养各个家系的生存条件完全保持一致,显著降低了外界环境条件对于性状表型值造成的差异,家系之间出现的差异性多是由遗传差异造成,十分有利于后续家系和个体经济性状的遗传分析与准确评定。日本对虾 (*Penaeus japonicus*)^[57]、三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*)^[58]、许氏平鲈 (*Sebastes schlegelii*)^[59]、马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*)^[60]、虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)^[61]、大口黑鲈 (*Micropoterus salmoides*)^[62]和三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[63]等品种都已经应用此种方法进行选育,在降低物力与人力消耗的同时加速了选育进程,收获了较快的遗传进展和较好的成效。通过本研究筛选出有效进行亲权关系分析的高亲本排除概率微卫星 DNA 标记,也验证了分子标记在鉴定牙鲆亲子关系和区分不同家系方面的实用性,为今后采用家系选育与分子标记技术开展同步育种,培育优质、高产、抗逆(病)的牙鲆新品种提供了一定的理论数据支持与特异性标记储备。

参考文献:

- [1] 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(1-4): 413-423.
- [2] 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.
- [3] Sekino M, Saitoh K, Yamada T, et al. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications

- for hatchery management related to stock enhancement program [J]. Aquaculture, 2003, 221(1-4):255-263.
- [4] 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.
- [5] Dong S, Kong J, Zhang T, *et al.* Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers [J]. Aquaculture, 2006, 258(1-4):283-288.
- [6] Jerry D R, Evans B S, Kenway M, *et al.* Development of a microsatellite DNA parentage marker suite for black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 2006, 255(1-4):542-547.
- [7] 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.
- [8] Selvamani M J, Degnan S M, Degnan B M. Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture [J]. Marine Biotechnology, 2001, 3(5):478-485.
- [9] Slabbert R, Bester A E, D'Amato M E. Analyses of genetic diversity and parentage within a south African hatchery of the Abalone *Haliotis midae* Linnaeus using microsatellite markers [J]. Journal of Shellfish Research, 2009, 28(1):369-375.
- [10] Lafarga-de la Cruz F, Aguilar-Espinoza A, Gallardo-Escarate C. Parentage assignment in hybrid abalones (*Haliotis rufescens* × *Haliotis discus hannai*) based on microsatellite DNA markers [J]. Aquaculture research, 2013, 3(1):1-10.
- [11] Hara M, Sekino M. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker [J]. Aquaculture, 2003, 217(1-4):107-114.
- [12] Hatanaka A, Yamada S. Isolation and application of microsatellite DNA markers for pedigree tracing of seedlings of red sea bream [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2006, 37(1):139-143.
- [13] Kim S G, Morishima K, Satoh N, *et al.* Parentage assignment in hatchery population of brown sole *Pleuronectes herzensteini* by microsatellite DNA markers [J]. Fisheries Science, 2007, 73(5):1087-1093.
- [14] Wang H, Iwai T, Zhao B, *et al.* Identification of microsatellite DNA markers for Pacific Threadfin parentage assignment [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2010, 41(1):640-647.
- [15] Luo M K, Guo J T, Zhao J L, *et al.* Analysis of paternity and relatedness in *Oreochromis niloticus* (♀) × *Sarotherodon melanotheron* (♂) hybrid F₁ families by microsatellite markers [J]. South China Fisheries Science, 2014, 10(1):9-15. [罗明坤, 郭金涛, 赵金良, 等. 尼罗罗非鱼 (♀) × 萨罗罗非鱼 (♂) F₁ 家系亲权关系微卫星分析. 南方水产科学, 2014, 10(1):9-15.].
- [16] Peng M, Chen X L, Zhao Y Z, *et al.* Application of fluorescent labeled microsatellite technology in parentage analysis of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Hydroecology, 2014, 35(4):60-67. [彭敏, 陈秀荔, 赵永贞, 等. 荧光标记微卫星技术用于凡纳滨对虾不同家系亲权关系鉴定. 水生态学杂志, 2014, 35(4):60-67.].
- [17] Gu Y, Li C, Lu C Y, *et al.* Microsatellite markers for parentage identification in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. jian) [J]. Hereditas, 2012, 34(11):1447-1455. [顾颖, 李超, 鲁翠云, 等. 建鲤 (*Cyprinus carpio* var. jian) 微卫星 DNA 亲权鉴定. 遗传, 2012, 34(11):1447-1455.].
- [18] Ge H Z, Jia Z Y, Li C T, *et al.* Parentage identification of Heilongjiang wild carp and German mirror carp cross combinations on microsatellite DNA markers [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(4):489-494. [葛会争, 贾智英, 李池陶, 等. 黑龙江野鲤与德国镜鲤杂交组合的亲缘鉴定分析. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4):489-494.].
- [19] Liu L, Li J, Liu P, *et al.* Applicability of microsatellite DNA markers in parentage determination of *Portunus trituberculatus* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(5):76-82. [刘磊, 李健, 刘萍, 等. 微卫星 DNA 标记用于三疣梭子蟹家系亲缘关系的鉴定. 渔业科学进展, 2010, 31(5):76-82.].
- [20] 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. [张春雷, 佟广香, 匡友谊, 等. 哲罗鱼微卫星亲缘鉴定的应用. 动物学研究, 2010, 31(4):395-400.].
- [21] Sun Z N, Liu P, Li J, *et al.* Parentage determination of *Fenneropenaeus chinensis* family establishment

- using microsatellite DNA markers [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(6): 694 - 701. [孙昭宁, 刘萍, 李健, 等. 微卫星 DNA 技术用于中国对虾家系构建中的系谱认证. 中国水产科学, 2005, 12(6): 694 - 701.]
- [22] Wang H X, Wu C G, Zhang L S, *et al.* The application of microsatellite markers for parentage determination in selective breeding of Pacific white Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Hereditas, 2006, 28(2): 179 - 183. [王鸿霞, 吴长功, 张留所, 等. 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.]
- [23] Dong S R, Kong J, Zhang Q W, *et al.* Pedigree tracing of *Fenneropenaeus chinensis* by microsatellite DNA markers genotyping [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 28(5): 157 - 161. [董世瑞, 孔杰, 张庆文, 等. 微卫星分型方法进行中国明对虾家系系谱鉴定. 海洋学报, 2006, 28(5): 157 - 161.]
- [24] Yu F, Wang W J, Kong J, *et al.* The application of microsatellite markers for genealogical identification in selective breeding program of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2009, 31(3): 127 - 136. [于飞, 王伟继, 孔杰, 等. 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.]
- [25] Wang H X, Wu C G, Xiang J H. Difference of parental contributions in the reproduction of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Acta Zoologica Sinica, 2006, 52(1): 175 - 181. [王鸿霞, 吴长功, 相建海. 凡纳滨对虾繁殖中不同亲本对子代遗传贡献率的差异. 动物学报, 2006, 52(1): 175 - 181.]
- [26] Li X Y, Sun G H, Yang J M, *et al.* Parentage identification using microsatellite DNA in artificial breeding of *Apostichopus japonicus* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(5): 1263 - 1269. [李雪燕, 孙国华, 杨建敏, 等. 微卫星标记在刺参 (*Apostichopus japonicus*) 人工繁育中亲本识别的应用. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1263 - 1269.]
- [27] Liu X D, Sui B L, Wang Z Y, *et al.* Estimated reproductive success of brooders and heritability of growth traits in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using microsatellite [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011, 29(5): 990 - 995.
- [28] Liu X D, Zhao G T, Cai M Y, *et al.* Estimated genetic parameters for growth-related traits in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using microsatellites to assign parentage [J]. Journal of Fish Biology, 2013, 82(1): 34 - 41.
- [29] Kong J, Luo K, Luo S, *et al.* The new variety of *Fenneropenaeus chinensis* "Huanghai No. 2" [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(12): 1855 - 1862. [孔杰, 罗坤, 栾生, 等. 中国对虾新品种“黄海 2 号”的培育. 水产学报, 2012, 36(12): 1855 - 1862.]
- [30] Gao B Q, Liu P, Li J, *et al.* Analysis of the growth and breeding value of *Portunus trituberculatus* 'Huangxuan No. 1' [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(1): 44 - 50. [高保全, 刘萍, 李健. 三疣梭子蟹“黄选 1 号”生长和育种性能分析. 中国水产科学, 2015, 22(1): 44 - 50.]
- [31] Liu F, Chen S L, Wang L, *et al.* Analysis of growth performance and breeding value of "Ping You No. 1" Japanese flounder and selection of parents [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(3): 521 - 527. [刘峰, 陈松林, 王磊, 等. “鲆优 1 号”牙鲆生长和育种性能分析及亲本选留. 中国水产科学, 2013, 20(3): 521 - 527.]
- [32] Chen S L, Li Y Z, Zhang J, *et al.* Selection of the families with high growth rate and high female proportion in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(4): 481 - 488. [陈松林, 李仰真, 张静, 等. 半滑舌鲷快速生长及高雌性家系的筛选. 水产学报, 2013, 37(4): 481 - 488.]
- [33] Ma A J, Guo J L, Wang X A, *et al.* Family selection and estimation of disease resistance in turbot, *Scophthalmus maximus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 484 - 493. [马爱军, 郭建丽, 王新安, 等. 大菱鲆选育家系抗鳃弧菌性能. 中国水产科学, 2014, 21(3): 484 - 493.]
- [34] Huang Y C, Ai H S, Pan Z C, *et al.* Establishment and WSSV resistant characteristics of selective breeding families for resistance to the white spot syndrome virus of *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 359 - 366. [黄永春, 艾华水, 潘忠诚, 等. 凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的建立及其抗病特性. 水产学报, 2013, 37(3): 359 - 366.]
- [35] Lei J L. Marine fish culture theory and techniques [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 482 - 483. [雷霖. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 2011: 482 - 483.]
- [36] Wang Z G, Liu X D, Liu S T, *et al.* A preliminary

- study on heat-tolerance traits of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) family [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2014, 1: 101 - 108. [王志刚, 刘旭东, 刘寿堂, 等. 牙鲆家系耐热性状的初步研究. 海洋湖沼通报, 2014, 1: 101 - 108.]
- [37] Zhang Y P, Chen S L, Sun H J, *et al.* Establishment and analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families with enhanced disease resistance to *Edwardsiella tarda* [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1917 - 1925. [张英平, 陈松林, 孙何军, 等. 牙鲆抗迟缓爱德华菌病家系建立与抗病性能评价. 水产学报, 2014, 38(9): 1917 - 1925.]
- [38] Liu Y X, Jiang L, Wang G X, *et al.* Factor analysis for growth traits of selective breeding family in Japanese flounder [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2013, 26(5): 11 - 15. [刘永新, 蒋丽, 王桂兴, 等. 牙鲆选育家系生长性状的因子分析. 水产学杂志, 2013, 26(5): 11 - 15.]
- [39] Liu Y X, Liu H J. Comparison and analysis of genetic parameters of growth traits estimated by different models for Japanese flounder families [J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(1): 40 - 47. [刘永新, 刘海金. 不同模型估计牙鲆家系间生长性状遗传参数的比较分析. 渔业科学进展, 2010, 31(1): 40 - 47.]
- [40] Tian Y S, Chen S L, Xu T J, *et al.* The comparison of growth performances of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families and selection of parents with good trait [J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(6): 901 - 911. [田永胜, 陈松林, 徐田军, 等. 牙鲆不同家系生长性能比较及优良亲本选择. 水产学报, 2009, 33(6): 901 - 911.]
- [41] Chen S L, Tian Y S, Xu T J, *et al.* Development and characterization for growth rate and disease resistance of disease-resistance population and family in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(5): 665 - 673. [陈松林, 田永胜, 徐田军, 等. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定. 水产学报, 2008, 32(5): 665 - 673.]
- [42] Liu Y X. Genetic analysis for growth traits in Japanese flounder selection and breeding family [D]. Harbin: North-east Agriculture University, 2009. [刘永新. 牙鲆选育家系生长性状的遗传分析. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.]
- [43] Castaño-Sánchez C, Fujii K, Ozaki A, *et al.* A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 554.
- [44] Gundel H, Reetz I. Exclusion probabilities obtainable by biochemical polymorphisms in dogs [J]. Animal Blood Groups and Biochemical Genetics, 1981, 12(2): 123 - 132.
- [45] Jamieson A, Taylor S C. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion [J]. Animal Genetics, 1997, 28(6): 397 - 400.
- [46] Dang G C, Ji X S, Wang H, *et al.* Nile Tilapia paternity testing based on DNA fingerprinting technology [J]. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science, 2014, 45(1): 30 - 35. [党广成, 季相山, 王慧, 等. DNA 指纹技术鉴定尼罗罗非鱼各家系父本. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2014, 45(1): 30 - 35.]
- [47] Jaime C, Ania P, Miguel H, *et al.* A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. Aquaculture, 2007, 272(S1): S210 - S216.
- [48] Miao G D, Du M, Yang J F, *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, 2011, 41(1-2): 97 - 106. [苗贵东, 杜民, 杨景峰, 等. 大菱鲆亲子鉴定的微卫星多重 PCR 技术建立及应用 [J]. 中国海洋大学学报, 2011, 41(1-2): 97 - 106.]
- [49] Li J K, Wang Z Y, Wei X J, *et al.* Development and application of three multiplex PCR panels of microsatellites in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(4): 470 - 475. [李佳凯, 王志勇, 韦信键, 等. 大黄鱼微卫星多重 PCR 体系的建立及其应用. 水产学报, 2014, 38(4): 470 - 475.]
- [50] Chen R Y, Wang G X, Liu H J, *et al.* Difference in parental contribution to reproduction in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(4): 698 - 705. [陈睿毅, 王桂兴, 刘海金, 等. 牙鲆亲本对子代贡献率的实验研究. 中国水产科学, 2013, 20(4): 698 - 705.]
- [51] Ji X, Sun X W, Yang L G, *et al.* Paternity testing of mitogynogenetic Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using microsatellite loci [J]. Zoological Research, 2008, 29(1): 25 - 30. [季旭, 孙效文, 杨立更, 等. 微卫星标记对牙鲆有丝分裂雌核发育家系的亲子鉴定. 动物学研究, 2008, 29(1): 25 -

30.]].
- [52] Hara M, Sekino M. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker [J]. Aquaculture, 2003, 217(1-4): 107-114.
- [53] McDonald, John Wiley. Space, Time and Life [M]. Seattle: University of Washington Press, 2003. 109-120.
- [54] Zeng C, Zhang Y, Zeng X J, et al. Prediction of hybrid vigor among three geographical populations of *Megalobrama amblycephala* by combination ability and SSR markers [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(6): 809-814. [曾聪, 张耀, 曹小娟, 等. 团头鲂 3 个地理种群杂交效果的配合力和微卫星标记预测. 水产学报, 2012, 36(6): 809-814.].
- [55] Wang B Q, Gu W, Gao H J, et al. Prediction of hybridization advantage among five strains of rainbow trout by combination ability and SSR markers [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(2): 206-213. [王炳谦, 谷伟, 高会江, 等. 利用配合力和微卫星标记预测虹鳟品系间的杂交优势. 中国水产科学, 2009, 16(2): 206-213.].
- [56] Lu C Y, Cao D C, Sun X W, et al. Families construction assisted by microsatellite markers in mirror carp *Cyprinus carpio* L. [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(6): 893-901. [鲁翠云, 曹顶臣, 孙效文, 等. 微卫星分子标记辅助镜鲤家系构建. 中国水产科学, 2008, 15(6): 893-901.].
- [57] Dean R J, Nigel P P, Peter J C, et al. Application of DNA parentage analyses for determining relative growth rates of *Penaeus japonicus* families reared in commercial ponds [J]. Aquaculture, 2006, 254(1-4): 171-181.
- [58] Wang Z Q, Han X K, Bai Z Y, et al. Estimates of genetic parameters for inner shell color and growth traits during one year old stage in the purple strain of *Hyriopsis cumingii* using microsatellite based parentage assignment [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(5): 644-650. [王照旗, 韩学凯, 白志毅, 等. 三角帆蚌紫色选育系 1 龄阶段内壳色及生长性状的遗传参数估计. 水产学报, 2014, 38(5): 644-650.].
- [59] Chu G N, Jiang L M, Yu H Y, et al. Family assessment with microsatellite markers in the ovoviviparous black rock fish *Sebastes schlegelii* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(3): 670-676. [初冠囡, 姜黎明, 于海洋, 等. 卵胎生鱼许氏平鲈 (*Sebastes schlegelii*) 雌亲家系的微卫星鉴定. 海洋与湖沼, 2013, 44(3): 670-676.].
- [60] Du X D, Gao Y Z, Deng Y W, et al. Genetic structure and genealogical identification of four families of pearl oyster *Pinctada martensii*, as inferred by microsatellite markers [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(12): 1795-1804. [杜晓东, 高远镇, 邓岳文, 等. 利用微卫星标记进行马氏珠母贝家系遗传结构分析与系谱认证. 水产学报, 2011, 35(12): 1795-1804.].
- [61] Cheng P, Yang A G, Wu B, et al. The applicability analysis on microsatellite markers for parentage determination of different shell color lines of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(5): 768-775. [程鹏, 杨爱国, 吴彪, 等. 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.].
- [62] He X Y, Bai J J, Liu X L, et al. Application of microsatellite makers for parentage determination in *Micropterus salmoides* [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science, 2009, 37(8): 55-62. [何小燕, 白俊杰, 刘小林, 等. 微卫星 DNA 标记在大口黑鲈亲权鉴定中的应用. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(8): 55-62.].
- [63] Liu L, Li J, Liu P, et al. Parentage determination of *Portunus trituberculatus* in family establishment based on microsatellite DNA markers [J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(7-8): 38-44. [刘磊, 李健, 刘萍. 基于微卫星标记的三疣梭子蟹家系系谱认证. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2012, 42(7-8): 38-44.].

Parentage determination in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families by microsatellite DNA marker analysis

LIU Yongxin^{1*}, SUN Zhaohui², WANG Yufen², LIU Yi³, LIU Yingjie^{1*}

(1. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

2. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;

3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: To carry out accurately the parentage determination on different families in Japanese flounder and select the microsatellite DNA markers with higher parental probabilities of exclusion, in this study, 10 mature females and 10 mature males chosen from the selection and breeding founder were used to produce 10 full-sib families of Japanese flounder. 30 individuals from each family separately raised were random selected to construct the family population whose pedigree structure was known. 200 individuals from the families raised together were random selected to construct the mixed population whose pedigree structure was unknown. A set of 48 microsatellite DNA markers distributed evenly on 24 linkage groups were selected from the second genetic linkage maps of Japanese flounder, furthermore, 2 markers were located on each linkage group. The results showed that 10 microsatellite DNA markers took on the higher parental probabilities of exclusion and richer genetic polymorphism based on the genetic analysis of family population, and their range for Excl 1 and Excl 2 was from 0.655 to 0.719 and from 0.792 to 0.837, respectively. The combined probabilities of exclusion gradually increased as the number of markers identified increased. It reached 100% when 8 microsatellite DNA markers were jointly used. The results of parentage determination of mixed population by using these markers demonstrated that 13 females and males contributed to the reproduction in total. To some extent, there were differences in the number of offspring from the combination of different parents. Moreover, significant differences did not exist in each genetic statistical data between the parental and progeny populations. The research demonstrated that these microsatellite DNA markers selected with higher parental probabilities of exclusion can effectively perform the parentage determination on family in Japanese flounder, therefore, they are designated as candidate markers to develop joint breeding by combining the family selection with DNA molecular marker in future.

Key words: *paralichthys olivaceus*; microsatellite; family; parentage determination; probabilities of exclusion

Corresponding author: LIU Yongxin. E-mail: liuyx@cafs.ac.cn; LIU Yingjie. E-mail: lyj@cafs.ac.cn

Funding projects: Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes Chinese Academy of Fishery Sciences (2014C009); National Science and Technology Support Program (2012BAD26B01)