

利用微卫星标记技术对红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 家系系谱认证的研究

孙建华^{1,2,3}, 马爱军^{2,3}, 崔文晓^{1,2,3}, 王广宁^{2,3}, 孙志宾^{2,3}, 王新安^{2,3},
孟雪松⁴, 刘圣聪⁴, 张 涛⁴

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071; 4. 大连天正实业有限公司, 辽宁 大连 116000)

摘 要:红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)是我国北方地区的一种经济型海水鱼类,但目前对其群体遗传多样性和系谱信息研究成果较少。本文研究了目前红鳍东方鲀养殖群体的遗传多样性情况和系谱信息,为其提供遗传改良的理论基础。从2015年所建的12个红鳍东方鲀家系中随机选取5个家系,采用8个微卫星标记对其遗传多样性进行分析和系谱认证。8个位点共检测得到32个等位基因,每个位点等位基因数为3~6个,平均值为4个。平均观测杂合度(A)范围为0.4533~0.9533,平均期望杂合度(H_e)范围为0.4908~0.7901,平均多态信息含量(PIC)范围为0.4555~0.7546。不同位点共发现8个特异性等位基因,7[#]家系发现3个,3[#]和11[#]家系各发现2个,12[#]家系发现1个,10[#]家系未发现特异性等位基因。根据子代基因型成功推断出5个家系的亲本基因型,据此鉴别各个家系。在fms15位点,可将3[#]和11[#]家系与其他家系相区别;TOG01位点可将7[#]家系与其他家系相区别;f1497位点可将12[#]家系相区别。因此,fms15,TOG01,f1497这3个标记可以作为鉴别5个家系的特异性标记。结果说明,所选的8个微卫星标记在这5个家系中多态信息含量较高,且在已选用的8个微卫星标记中,最少用3个标记可鉴别5个红鳍东方鲀家系。综合分析表明微卫星标记能有效地为红鳍东方鲀群体的系谱分析提供技术支持,为今后红鳍东方鲀开展分子标记辅助育种提供了可靠的理论依据。

关键词:红鳍东方鲀;微卫星;遗传多样性;系谱认证

中图分类号:Q953

文献标识码:A

文章编号:1671-6647(2017)03-0392-12

doi:10.3969/j.issn.1671-6647.2017.03.009

系谱认证作为一种有效的水产动物遗传育种技术,广泛应用于鱼类^[1-8]、甲壳类^[9-13]和贝类^[14-17]。系谱认证可在选育过程中衡量家系间的遗传参数,分析家系信息,指导亲本的筛选,避免因近亲繁殖而导致种质衰退。特别是在混养条件下,可快速有效地区分各个家系,保持各家系的遗传信息,作进一步地选育工作。为充分有效地利用选育群体,则需找到一种标记可快速准确地鉴别出不同家系。目前水产动物育种采用的标记方法大体分为外挂式标记和体内标记^[18],外挂式标记主要以剪鳍和颜色标记为主,以此方法标记鱼体,在一定程度上对鱼体有损伤,且对鱼的生长有负面影响。体内标记主要为被动整合雷达标记、荧光标记和染料标记等,这种方法对鱼体规格有一定要求,且随着鱼体增长,标记有可能出现缺失现象,影响后期观察。随着现代分子技术的发展,分子标记有分辨率高、准确度高、识别快等优点,在家系选育过程中发挥着重要的作用,微卫星标记作为分子标记的一种,被广泛应用于家系的鉴别之中。微卫星标记是一种共显性标记,其具

收稿日期:2016-06-30

资助项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项——红鳍东方鲀育种群体的遗传差异和生长性状的遗传分析(20603022012005);
大连金州新区科技计划项目资助——红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)大规模家系选育技术研究(2012-B1-012)

作者简介:孙建华(1991-),男,甘肃金昌人,硕士研究生,主要从事海水鱼类增殖养殖方面研究。E-mail: sjhxy91@outlook.com

* 通讯作者:马爱军(1971-),女,山东荣成人,研究员,博士,博士生导师,主要从事海水鱼类增殖养殖方面研究。E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

(王佳实 编辑)

有多态信息含量丰富、保守性高、通用性好、分布广等特点,作为辅助分子育种手段广泛应用于群体多样性分析,系谱认证等方面,利用微卫星标记技术对家系进行系谱分析,可有效地评估各家系的遗传参数,掌握家系信息,在种质资源保护^[19]、生态修复和提高育种效率^[20]上被广泛应用,并取得一定成效。

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*),隶属于鲀形目(Tetraodontiformes)、鲀科(Tetraodontidae)、东方鲀属(*Takifugu*),是暖温性、广盐性底栖肉食性鱼类。主要分布地区为朝鲜半岛、日本和中国沿海地区^[21]。其口感鲜美,肉质细嫩,营养丰富,有较高的经济价值,在我国北方已经形成一定的养殖规模,产品主要出口日本、韩国。选择育种作为培育优良经济性状的手段之一,在选育前要构建遗传信息丰富的群体,群体的遗传多样性决定了遗传信息含量的丰富性,刘永新等^[22]利用微卫星标记辅助构建红鳍东方鲀家系,通过 34 对微卫星引物对红鳍东方鲀两个群体进行遗传评估,从而制定育种计划。

国内的选育方式主要以群体选育为主,但经选育的后代个体之间亲缘关系模糊,遗传信息不明确,有可能在进一步的繁育过程中出现近交的现象,造成红鳍东方鲀种质资源退化,遗传多样性降低,养殖群体成活率下降等现象^[23]。为提高种质品质,保持选育群体较高的遗传多样性,作者认为有必要在选育前期对亲鱼进行系谱认证,掌握群体选育的家系背景和遗传信息,使亲鱼保持较高水平的遗传距离,避免近亲繁殖,本研究以微卫星标记作为鉴别家系的方法为目的,展开以下研究。

1 材料与方法

1.1 样品选取

实验所用的红鳍东方鲀样品均于 2015 年取自大连天正实业有限公司,为当年 4 月所建的 12 个全同胞家系,挑选亲鱼为体格健壮、无外伤、色泽好、活力强、腹部性腺轮廓明显的 3 龄雌雄鱼 12 对,各家系编号分池饲养,编号从 1 到 12 为 1[#] 家系到 12[#] 家系,从中随机选取 5 个家系,分别为 3[#] 家系,7[#] 家系,10[#] 家系,11[#] 家系,12[#] 家系,体重范围在 80~120 g,体长范围在 13~16 cm,各家系选完整健康的鱼取样 30 尾,共计 150 尾,取其尾鳍置于-80 °C 备用。

1.2 引物与试剂

参照 Ma 等^[24]、邹杰等^[25]、Segawa^[26]、郝君等^[27]和 Kai 等^[28]使用引物序列共计 35 对,由上海生工生物科技有限公司合成。微卫星引物序列、片段长度等详情见表 1。基因组 DNA 提取试剂盒、dNTP、taq 酶、胰 RNA 酶等购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 基因组 DNA 的提取

实验所用红鳍东方鲀基因组 DNA 是用天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取,提取方法参照使用说明书,之后用琼脂糖凝胶检测目的条带完整性,再用 NANO DPO1000 分光光度计测量 DNA 纯度和浓度,最后将符合条件的个体 DNA 稀释至 40 ng/ μ L,置于-20 °C 备用。

1.4 PCR 反应及电泳

PCR 扩增总体积 15 μ L: Taq 酶 0.2 μ L(5 U/ μ L), dNTP 1.3 μ L(2.5 mmol/ μ L), buffer 1.5 μ L, 上下游引物各 0.6 μ L(10 μ mol), 模板 1 μ L(50 ng/ μ L), 补充 H₂O 9.8 μ L。PCR 扩增反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s(各引物的退火温度见表 1), 72 °C 复性 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。对 PCR 扩增产物进行 8% SDS-PAGE 电泳,用硝酸银染色检测产物条带,筛选得到目的条带。

表 1 35 对微卫星引物信息及在本实验中的退火温度

Table 1 Information and specific annealing temperatures of 35 pairs of microsatellite marker primers used in this study

位 点	引物序列(5'-3')	片段长度/bp	退火温度/°C
Tob10	F:ACCCACTCCGTCCTTCCT R:TCAACCGCCCTTCCAAC	310~380	61
Tob11	F:GCCATATTGACCACTCACC R:ACCACAGAATGTCCTGCTT	191~296	57
Tob13	F:AGTAGAACGCTCGGTCAG R:GTTTGTAAATCATCAAAAGG	309~344	59
Tob25	F:ACTCTTTCTCCAGCTCTTC R:TGCTTCCTTGATTGTAT	242~276	55
fms32	F:ACACCGCTCAATGCAAACCTC R:AATGTGGCGGCTACTTTCAG	148	61
fms75	F:GGCTTTACCGAGGTGTTGAG R:TGGAATCTGTGCCCTCATCT	123	62
fms89	F:CGTCATGATCCAACACAAGA R:CGCACACATACAGAGTTCA	319	62
fms106	F:TCTACGGCGGACATCTCTTC R:CTCCGCGCTCTAAAAGTCAG	355	63
f122	F:CCACAACAATGCAGGCAACTTTCA R:TCTCCGGGACTTTTTCAA	275~290	59
f132	F:TGCCAGCCCAAAGCGAACAGA R:GCTAGCAGGCAGGCAGTAAGG	385~395	61
f169	F:CTCCCACGCAAGCAGTCA R:CTCAGTATCAGGGTCAAAGAAAT	280~300	60
f172	F:CCACCACCTTCAGGGTTCTA R:CGCTTGGATTGCCTCAAAC	202~215	55
f184	F:CATGAGGTCAGAGACAGAAAACA R:TGGCTCTGCTGTACGTGAAC	105~130	59
f240	F:GGGGTTGCTGCCTTGTGG R:TTTGCCTTTTCGGGTTTTCTGTT	450~455	61
f268	F:TCAGCAGGCATAAAGAAAAAT R:ACGTCGTTGGAAAGAAGTGC	500~510	58
f356	F:CAAAAATGCAGCGTAGG R:CAGCGTGAATGATGAGGA	277~294	60
f360	F:TCCATCACAATCGCACCCACTT R:AATCCCCGAAAACACCTTGAACAT	352~371	60
f362	F:TTACTGTCGCAACAACCTCTG R:GGCCTATAGGACCTCTGGACT	398~405	60
f383	F:ATAGCCGGTGTCCGTCATAC R:CCTTTGATTGTCCAAACAG	145~155	58

续表

位 点	引物序列(5'-3')	片段长度/bp	退火温度/°C
f1160	F:AGACACTGATGGTGCCTGTG R:CGTAGCAACGAGACGAACAA	165~175	60
f1169	F:GAACCCTGGGAGCCCTATTA R:TTGCTACACGTTTCACACGA	122~132	59
f1365	F:GGCCACAGTGCTGAAAAG R:CAGAAAACCCAGCTGCTGAC	400~460	59
f1497	F:CACCTGCCCCGAAAGTTTAAG R:TGAAAGCCCAAGAGAGGAAA	170~182	58
f1637	F:CCTGAAGCACACACTGCAAG R:CCTGATGACACCTGCTCTGA	200~208	60
TOG01	F:AACACCTCCACCTGCTTGCT R:ATTGCCAGTTGACTTTCC	280~290	54
TOG02	F:CACAAGGTGAGGACAAAGAC R:TTGGCAACAGTTAGGTAGGT	155~165	54
TOG03	F:TCGGTGATGATCGGTGAC R:TAAGCTCTGAGCCAAAAGG	280~290	57
TOP01	F:AAAAGAATGCTTATCCTG R:TACTTGTGACCTGCGT	200~225	52
TOP02	F:TCTTCTTGCTATTTTGCT R:ATGAGTCTGGTCCTGCT	260~300	54
TOP03	F:TCCGCTATCACATCTATCT R:CATGATGCTCCTGGAAAAT	155~175	53
fms15	F:CTGGCATAACTGATTAGGCTGT R:ATAGCTGACAGCACGGGAAC	165~175	60
fms43	F:GTGCCACAAAAGATGAAAAT R:TCCTTGGCAGAGTCAGTCCT	120	60
fms54	F:CAAATGTGTGAGGGCAGTTC R:CATTTCCAAGCGTGCTCTCT	370	55

1.5 数据分析

根据每个个体的条带位置确定基因型,按照从大到小的顺序对等位基因分子量大小进行排序,把各位点后两位的数字放在最前面,例如 011 表示 TOG01 位点分子量最大的等位基因 1。用 Popgene32 软件处理数据,计算各微卫星位点的等位基因数(A)、有效等位基因数(N_e)、平均观察杂合度(H_o)、平均期望杂合度(H_e),并计算 5 个家系 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(d)、平衡检验概率值(P)、遗传相似性系数(I)和遗传距离(D)。根据 Botstein 等^[29]的方法,计算多态信息含量(PIC)。采用 MEGA4.1 软件根据遗传距离进行聚类分析。

2 结 果

2.1 遗传多样性分析

随机抽取 30 个个体,对 35 个微卫星标记进行多态性筛选(图略),得到 8 个多态性好的微卫星标记,分别为 f362, f1497, f1637, fms15, fms89, f169, f1372 和 TOG01。将 8 个微卫星标记的数据用 Popgene32 软件分析,数据内容见表 2。分析结果表明,8 个微卫星位点的多态信息含量在 0.455 5~0.754 6,平均多态信息含量为 0.597 3,具有较为丰富的多态性。150 个样本数(N)经 8 个微卫星位点检验共得到 32 个等位基因,各位点的等位基因数在 3~6 个,等位基因出现的最高频率(S)在 0.266 7~0.690 0,每个微卫星座位平均含 4 个等位基因;观测杂合度在 0.453 3~0.953 3,平均观测杂合度为 0.709 2;期望杂合度在 0.490 8~0.790 1,平均期望杂合度为 0.655 6。对 8 个微卫星位点进行哈迪温伯格平衡(HWE)检测,结果显示, f1497 位点符合哈迪温伯格平衡,其余 7 个微卫星位点都极显著偏离哈迪温伯格平衡($P < 0.001$)。8 个微卫星位点在 5 个红鳍东方鲀家系中的遗传分化指数(F_{st})均大于 0。

表 2 8 个微卫星位点在红鳍东方鲀群体中的遗传多样性指数

Table 2 Genetic diversity parameters of 8 microsatellite loci among cultured *Takifugu rubripes* populations

位 点	N	A	S	H_o	H_e	PIC	F_{st}	HWE
TOG01	150	4	0.266 7	0.773 3	0.750 3	0.701 0	0.175 7	* * * *
f1497	150	3	0.560 0	0.473 3	0.580 8	0.507 7	0.106 6	NS
f169	150	3	0.456 7	0.453 3	0.599 8	0.511 9	0.205 9	* * * *
fms89	150	6	0.276 7	0.946 7	0.790 1	0.754 6	0.109 4	* * * *
fms15	150	5	0.690 0	0.486 7	0.490 8	0.455 5	0.096 7	* * * *
f362	150	4	0.383 3	0.826 7	0.691 2	0.631 2	0.183 1	* * * *
f1637	150	3	0.516 7	0.760 0	0.618 3	0.547 0	0.023 1	* * * *
f1372	150	4	0.350 0	0.953 3	0.723 1	0.669 2	0.099 7	* * * *

注: NS 表示符合哈迪温伯格平衡; * * * * 表示显著偏离哈迪温伯格平衡

根据所得遗传距离,经 MEGA4.1 软件聚类分析,得到 5 个红鳍东方鲀家系之间的遗传距离和相似性指数(表 3),并构建 UPGMA(图 1)。从结果可知,3[#] 家系和 12[#] 家系之间的遗传距离最小,相似性最高,聚合在一起,然后与 7[#] 家系聚合在一起,最后再与 10[#] 家系和 11[#] 家系聚合在一起。

表 3 红鳍东方鲀 5 个家系的遗传距离和相似指数

Table 3 Genetic similarity index and distance in 5 *Takifugu rubripes* families

家 系	3 [#]	7 [#]	10 [#]	11 [#]	12 [#]
3 [#]	* * * *	0.837 1	0.790 2	0.797 3	0.963 7
7 [#]	0.177 8	* * * *	0.626 9	0.607 9	0.808 8
10 [#]	0.235 5	0.467 0	* * * *	0.752 5	0.740 4
11 [#]	0.226 6	0.497 7	0.284 4	* * * *	0.803 7
12 [#]	0.037 0	0.212 2	0.300 5	0.218 5	* * * *

注: * * * * 以上数据为相似指数; * * * * 以下数据为遗传距离

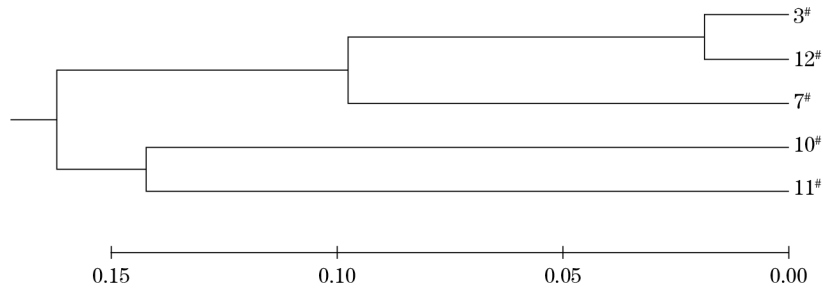


图1 红鳍东方鲀 5 个家系的 UPGMA 图

Fig.1 UPGMA dendrogram among 5 *Takifugu rubripes* families

2.2 家系特异性鉴别

用 8 个微卫星位点在 5 个红鳍东方鲀家系中检测,共计得到 32 个等位基因。每个位点的等位基因数为 3~6 个。fms89 位点有 6 个等位基因;fms15 位点有 5 个等位基因;TOG01,f362 和 f1372 位点有 4 个等位基因;f1497,f169 和 f1637 位点有 3 个等位基因。5 个家系中检测到 8 个家系特异性等位基因,在 3# 家系和 11# 家系中各检测到 2 个,在 12# 家系中检测到 1 个,在 7# 家系中检测到 3 个,在 10# 家系中没有未发现家系特异性等位基因。fms15 位点的特异性基因 a(图 2)可用于鉴别 3# 家系与其他 4 个家系;TOG01 位点的特异性基因 b(图 3)可用于鉴别 7# 家系与其他 4 个家系;fms15 位点的特异性基因 c(图 4)可用于鉴别 11# 家系与其他 4 个家系;f1497 位点的特异性基因 d(图 5)可用于鉴别 12# 家系与其他 4 个家系。因此,fms15, TOG01 和 f1497 位点可作为区分 5 个家系的特异性标记。

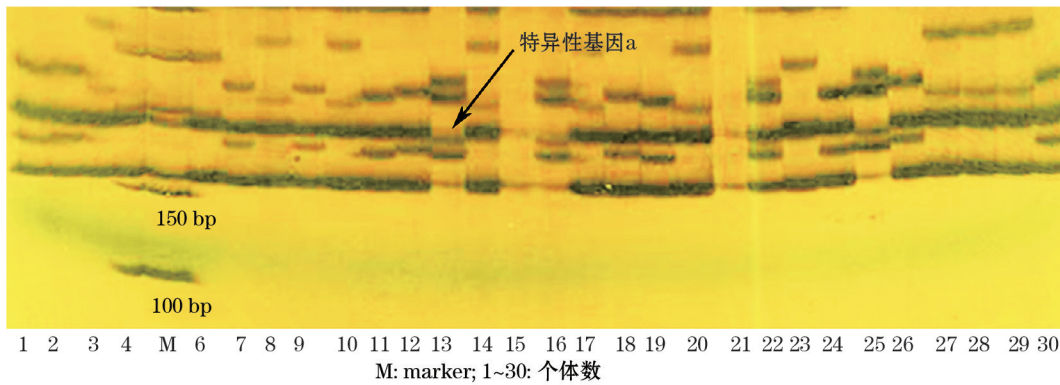


图 2 3# 家系在 fms15 位点的微卫星 DNA 扩增图谱

Fig.2 Demonstration of microsatellite loci amplified by fms15 primer pairs in 3# family

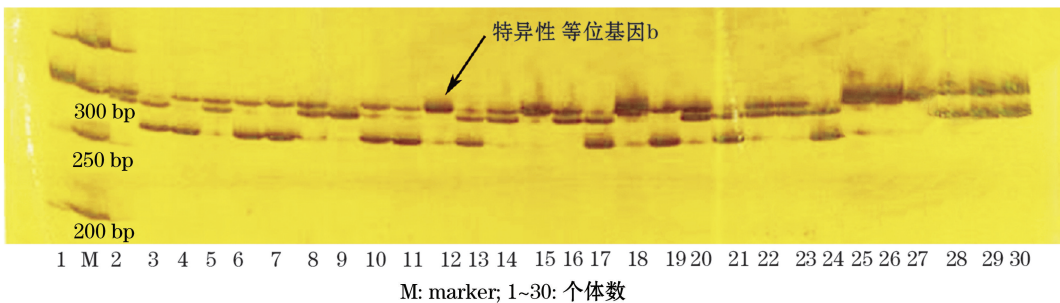


图 3 7# 家系在 TOG01 位点的微卫星 DNA 扩增图谱

Fig.3 Demonstration of microsatellite loci amplified by TOG01 primer pairs in 7# family

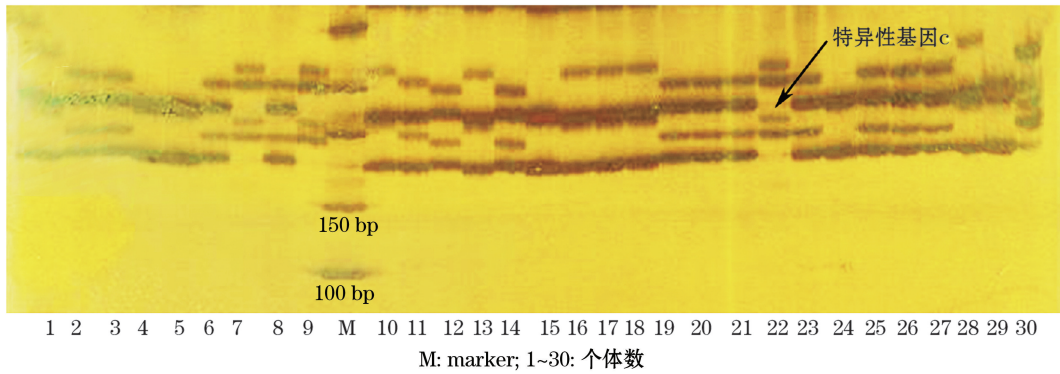


图 4 11[#]家系在 fms15 位点的微卫星 DNA 扩增图谱

Fig.4 Demonstration of microsatellite loci amplified by fms15 primer pairs in 11[#] family

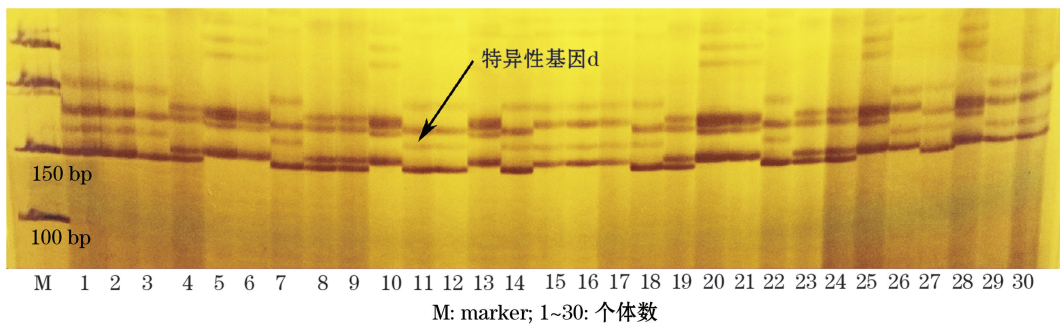


图 5 12[#]家系在 f1497 位点的微卫星 DNA 扩增图谱

Fig.5 Demonstration of microsatellite loci amplified by f1497 primer pairs in 12[#] family

2.3 推断缺失亲本基因型

微卫星标记属于共显性分子标记,严格遵循孟德尔遗传定律,子代的等位基因一半来自母本,一半来自父本,因此可根据子代的等位基因来推测缺失亲本的基因型。每个家系的等位基因信息列于表 4。在 TOG01 位点,7[#]家系有 4 种基因型(图 3),分别为 014/014,013/014,011/013 和 011/014,基因型中存在 014/014,由此推测其父母本的基因型中各包含有等位基因 014,又因为基因型中存在 013/014 和 011/014,推测得知其亲本基因型为(011/014)×(013/014)。运用同样的方法可推断出 5 个家系在其他位点的亲本基因型,具体信息见表 4。

表 4 各家系观察到和推断出的基因型

Table 4 Observed and conferred genotypes of each family

家系	位点	基因型(观测到的个数)				推测亲本
		1	2	3	4	
3 [#]	TOG01	013/014(9)	012/014(14)	011/012(7)		(011/014)×(012/013)
	f1497	972/973(7)	971/972(9)	972/972(10)	973/973(2)	(971/972)×(972/973)
	f169	692/692(10)	691/691(13)	691/692(7)		(691/692)×(691/692)
	fms89	892/894(7)	891/894(5)	892/893(6)	891/893(12)	(891/892)×(893/894)
	fms15	151/153(6)	151/154(6)	151/151(15)	153/155(3)	(151/153)×(151/154)
	f362	621/623(9)	621/624(14)	623/624(7)		(621/623)×(621/624)
	f1637	371/373(8)	371/372(7)	372/373(10)	371/371(5)	(371/372)×(371/373)
	f1372	722/723(12)	722/724(4)	721/722(8)	721/724(6)	(721/723)×(722/724)

续表

家系	位点	基因型(观测到的个数)				推测亲本
		1	2	3	4	
7 [#]	TOG01	014/014(7)	013/014(9)	011/013(8)	011/014(6)	(011/014)×(013/014)
	f1497	972/972(18)	972/973(6)	973/973(5)	971/972(1)	(972/973)×(972/973)
	f169	691/693(11)	693/693(9)	692/693(7)	691/692(3)	(691/693)×(692/693)
	fms89	893/896(10)	891/892(6)	891/893(6)	892/896(8)	(891/896)×(892/893)
	fms15	151/154(18)	151/151(11)	151/153(1)		(151/153)×(151/154)
	f362	621/624(17)	624/624(13)			(621/624)×(624/624)
	f1637	371/372(15)	371/373(6)	371/371(4)	372/373(5)	(371/372)×(371/373)
	f1372	721/722(17)	722/723(12)	721/724(1)		(721/723)×(722/722)
10 [#]	TOG01	011/013(6)	013/014(6)	013/013(10)	011/014(8)	(011/013)×(013/014)
	f1497	971/972(17)	971/971(7)	972/972(6)		(971/972)×(971/972)
	f169	691/692(22)	692/692(8)			(691/692)×(692/692)
	fms89	893/894(15)	894/894(3)	895/895(5)	894/895(7)	(893/895)×(894/895)
	fms15	151/151(21)	151/153(9)			(151/151)×(151/153)
	f362	621/622(17)	622/622(7)	621/621(6)		(621/622)×(621/622)
	f1637	371/373(14)	371/372(6)	372/373(5)	371/371(5)	(371/372)×(371/373)
	f1372	721/723(18)	721/724(12)			(723/724)×(721/721)
11 [#]	TOG01	011/012(15)	011/011(7)	012/012(8)		(011/012)×(011/012)
	f1497	971/972(9)	971/971(11)	972/972(10)		(011/012)×(011/012)
	f169	691/692(3)	692/692(6)	691/691(21)		(691/692)×(691/692)
	fms89	892/893(16)	892/894(14)			(892/892)×(893/894)
	fms15	151/151(12)	152/153(14)	153/154(3)	151/154(1)	(151/151)×(151/154)
	f362	621/624(14)	621/622(16)			(621/621)×(622/624)
	f1637	371/373(10)	371/372(7)	372/373(2)	371/371(11)	(371/372)×(371/373)
	f1372	721/724(20)	722/723(3)	721/722(7)		(721/723)×(722/724)
12 [#]	TOG01	012/014(15)	011/012(15)			(012/012)×(011/014)
	f1497	971/973(10)	971/972(6)	972/972(8)	972/973(6)	(971/972)×(972/973)
	f169	691/691(4)	692/692(10)	691/692(16)		(691/692)×(691/692)
	fms89	892/893(9)	891/893(9)	892/894(6)	891/894(6)	(891/892)×(893/894)
	fms15	151/154(13)	151/151(17)			(151/151)×(151/154)
	f362	621/624(16)	623/624(14)			(621/623)×(624/624)
	f1637	371/371(10)	371/373(6)	372/373(8)	371/372(6)	(371/372)×(371/373)
	f1372	721/722(10)	721/723(6)	722/723(8)	722/722(6)	(721/722)×(722/723)

注:空白表示无数据

3 讨 论

明确家系系谱之间的关系是家系选育的前提,通过家系选育可提高有利基因在某一群体内出现的频率,降低育种不需要的基因频率,建立正确的系谱,掌握育种群体的系谱信息。传统的外部物理标记如颜色、电

子标记等有明显的不足之处^[10],与其相比,微卫星标记的优点有多态性高、遵循孟德尔分离定律、共显性遗传等特点,已成为多种水产动物系谱分析的重要工具^[30]。

目前已有微卫星标记应用于海洋生物家系谱认证的报道,董世瑞等^[31]根据子代基因型成功地推断出 4 个中国明对虾(*Penaeus orientalis*)家系的父本基因型,通过基因型找到父母本,鉴别出 4 个家系;刘磊等^[32]根据已知的亲本基因型和子代基因型,推断出 6 个三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)家系全部亲本基因型,鉴别了各个家系;杜晓东等^[33]根据子代基因型,推断出 4 个马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)家系的亲本基因型,以此鉴别不同家系;于飞等^[2]根据已知亲本基因型和子代基因型,推断出 7 个大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)家系中缺失的其他亲本基因型,以此鉴别各个家系;马群群^[34]根据已知子代基因型和母本基因型,推断出 4 个拟穴青蟹(*Scylla Paramamosain*)家系中缺失的其他亲本基因型,以此鉴别各个家系。红鳍东方鲀的家系鉴别尚未报道,本研究应用 8 个微卫星标记,推断出 5 个红鳍东方鲀家系缺失的亲本基因型,其中仅用 3 个微卫星标记 fms15, TOG01 和 f1497 便可鉴别出 5 个家系。

种群进化和遗传改良离不开物种的遗传多样性,遗传多样性丰富的物种,具有更大的遗传进展的空间^[35]。目前,已有相关报道通过利用微卫星标记手段对红鳍东方鲀亲本进行选配,万玉美等^[36]利用 21 个微卫星标记对从日本引进的红鳍东方鲀群体和在秦皇岛经过群体选育的岛红鳍东方鲀群体进行遗传参数的评估。其中从日本引进的红鳍东方鲀群体的平均观测杂合度(H_o)为 0.657 2,平均期望杂合度(H_e)为 0.651 6,选育的秦皇岛红鳍东方鲀群体的平均观测杂合度(H_o)为 0.523 9,平均期望杂合度(H_e)为 0.607 3。本实验的 5 个红鳍东方鲀家系的平均观测杂合度(H_o)为 0.709 2,平均期望杂合度(H_e)为 0.655 6。杂合度是评估群体遗传多样性的重要指标,杂合度越高,群体的遗传多样性就越高^[37],与上述实验结果相比较,本实验的红鳍东方鲀家系的遗传多样性较高,这表明家系内含有丰富的遗传信息,适应环境变化能力强,是进行选育的良好群体。

本研究结果表明,多态信息含量(PIC)在 8 个微卫星位点上分别为 TOG01 位点 0.701 0, f1497 位点 0.507 7, f169 位点 0.511 9, fms89 位点 0.754 6, fms15 位点 0.455 5, f362 位点 0.631 2, f1637 位点 0.547 0, f1372 位点 0.669 2。根据相应的评价标准:当 $PIC < 0.25$ 时,此位点为低度多态性位点;当 $0.25 < PIC < 0.50$ 时,此位点为中度多态性位点;当 $PIC > 0.50$ 时,此位点为高度多态性位点^[32]。本研究仅 fms15 位点多态信息含量为 0.455 5,为中度多态位点,其余 7 个位点的多态信息含量都比 0.5 大,为高度多态位点。由此可知,本研究所用的 8 个微卫星标记在 5 个红鳍东方鲀家系中具有较高的多态信息含量,说明这 5 个群体内的遗传变异大,有着相对较高的遗传多样水平。除 f1497 位点外,其他 7 个位点在 5 个红鳍东方鲀家系中的数据表明,7 个位点都显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.01$)。这种现象出现的主要原因:1)由于样本数较多,取样时有少数混养造成误差;2)人为读取基因型时判断错误,导致出现无效等位基因;3)某些杂合过剩的位点突变,导致产生不同的等位基因。以上原因需要进一步研究解决,以免对实验结果带来影响。

通过对 5 个红鳍东方鲀家系进行系谱分析,发现了 8 个家系特异性等位基因,但这 8 个家系特异性等位基因是否单独属于某个家系,还需要用大量的样本进行研究。本文用 8 个微卫星位点中的 fms15, TOG01, f1497 三个微卫星位点即可区分出 5 个红鳍东方鲀家系。这充分证明了微卫星标记可作为追踪系谱的有效工具,通过特异性标记来区分不同家系,为家系选育提供科学的理论参考依据。

参考文献(References):

- [1] FROST L A, EVANS B S, JERRY D R. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*)[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(3): 1056-1064.
- [2] YU F, WANG W J, KONG J, et al. The application of microsatellite markers for genealogical identification in selective breeding program of turbot(*Scophthal musmaximus* L.)[J]. *Haiyang Xuebao*, 2009, 31(3): 127-136. 于飞, 王伟继, 孔杰, 等. 微卫星标记在大菱鲂(*Scophthal musmaximus* L.)家系系谱印证中的应用研究[J]. *海洋学报*, 2009, 31(3): 127-136.
- [3] MCDONALD G J, DANZMANN R G, FERGUSON M M. Relatedness determination in the absence of pedigree information in three cul-

- tured strains of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 2004, 233(1): 65-78.
- [4] MIAO G D. Development of SSR Markers and construction of genetic linkage maps of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010. 苗贵东. 半滑舌鲷微卫星标记开发、应用及遗传连锁图谱的构建[D]. 青岛:中国海洋大学, 2010.
- [5] JEONG D S, GONZALEZ E B, MORISHIMA K, et al. Parentage assignment of stocked black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* in Hiroshima Bay using microsatellite DNA markers[J]. *Fisheries Science*, 2007, 73(4): 823-830.
- [6] NAVARRO A, BADILLA R, ZAMORANO M J, et al. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies[J]. *Aquaculture*, 2008, 285(1): 30-37.
- [7] LOU J F, LEI S Y, ZHU J L, et al. AFLP analysis of genetic diversity in two cultured communities of *Pseudosciaena crocea* [J]. *Advances in Marine Science*, 2015, 33(3): 361-366. 娄剑锋, 雷世勇, 竺俊全, 等. 岱衢洋与官井洋大黄鱼养殖群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *海洋科学进展*, 2015, 33(3): 361-366.
- [8] 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(1): 163-172.
- [9] LI Y, WONGPRASERT K, 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*, 2007, 266(1): 279-288.
- [10] 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): 237-247.
- [11] CUI H Y, MA H Y, MA C Y, et al. Genetic diversity among different families of mud crab *Scylla paramamosain* by microsatellite markers [J]. *Marine Fisheries*, 2011, 33(3): 274-281. 崔海玉, 马洪雨, 马春艳, 等. 利用微卫星标记比较分析拟穴青蟹不同家系的遗传多样性[J]. *海洋渔业*, 2011, 33(3): 274-281.
- [12] MA C Y, MA H Y, MA L B, et al. Microsatellite analysis on genetic variation of imported *Litopenaeus vannamei* population and cultured stocks [J]. *Marine Fisheries*, 2011, 33(1): 1-8. 马春艳, 马洪雨, 马凌波, 等. 凡纳滨对虾引进群体和 2 个养殖群体遗传变异的微卫星分析[J]. *海洋渔业*, 2011, 33(1): 1-8.
- [13] 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[J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(5): 76-82.
- [14] ZHANG H B, LIU X, ZHANG G F, et al. Effects of effective population size on the F1 growth and survival of bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Haiyang Xuebao*, 2005, 27(2): 177-180. 张海滨, 刘晓, 张国范, 等. 不同有效繁殖群体数对海湾扇贝 F1 生长和存活的影响[J]. *海洋学报*, 2005, 27(2): 177-180.
- [15] LI Z B. Multiplex PCR application in microsatellite of *Haliotis rubra* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(4): 319-325. 黎中宝. 多元 PCR 在黑鲍 (*Haliotis rubra*) 微卫星遗传研究中的应用[J]. *海洋与湖沼*, 2005, 36(4): 319-325.
- [16] PORTA J, PORTA J M, MARTINEZ-RODRIGUEZ G, et al. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management [J]. *Aquaculture*, 2006, 256(1): 159-166.
- [17] 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缘鉴定的适用性[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(5): 768-775.
- [18] LI X J, HU C, WANG L. Current research progress of fish family selective breeding [J]. *Fisheries Science*, 2016, 35(1): 81-86. 李学军, 胡灿灿, 王磊, 等. 鱼类家系选育的研究进展[J]. *水产科学*, 2016, 35(1): 81-86.
- [19] HU J, HOU X Y, YIN S W, et al. Genetic diversity of different geographical populations of *Cheilinus undulatus* revealed by microsatellite analysis [J]. *Advances in Marine Science*, 2013, 31(4): 538-545. 胡静, 侯新远, 尹绍武, 等. 波纹唇鱼 (*Cheilinus undulatus*) 不同地理种群遗传多样性的微卫星分析[J]. *海洋科学进展*, 2013, 31(4): 538-545.
- [20] ZHANG B, SONG W P. Recent progresses on microsatellite multiplex PCRs for parentage analysis of aquatic animals [J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(3): 350-356. 张博, 宋文平. 微卫星多重 PCR 在水生动物亲缘分析中的研究进展[J]. *海洋渔业*, 2012, 34(3): 350-356.
- [21] WANG K Q, CHEN M, GAO T X. Study on taxonomy and fauna of *Takifugu* [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao (Natural Science)*, 2001, 31(6): 855-860. 王奎旗, 陈梅, 高天翔. 东方鲀属鱼类的分类与区系分布研究[J]. *青岛海洋大学学报 (自然科学版)*, 2001, 31(6): 855-860.
- [22] LIU Y X, LIU Y, ZHOU Q, et al. Application of microsatellite markers in parental apogamy of redfin puffer *Takifugu rubripes* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(2): 113-119. 刘永新, 刘奕, 周勤, 等. 利用微卫星标记指导红鳍东方鲀亲本选配[J]. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(2): 113-119.

- [23] 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 Edition), 2009(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[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009(8): 55-62.
- [24] MA H Y, CHEN S L, LIAO X L, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from a dinucleotide-enriched genomic library of obscure puffer(*Takifugu obscurus*) and cross-species amplification[J]. Conserv Genet, 2009, 10(4): 955-957.
- [25] ZOU J, MA A J, ZHAO Y F, et al. Study on the genetic structure of three cultured populations of *Takifugu obscurus* with microsatellite markers[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 55-62. 邹杰, 马爱军, 赵艳飞, 等. 利用微卫星标记分析 3 个暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)养殖群体的遗传多样性[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 55-62.
- [26] SEGAWA S. *Takifugu obscurus*' studies in high growth genetic and molecular biology[D]. Tokyo: Tokyo University, 2009.
- [27] HAO J, SUN X W, MENG X S. Analyzing the polymorphisms of *Takifugu rubripes* with microsatellite[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(1): 21-24. 郝君, 孙效文, 孟雪松. 红鳍东方鲀微卫星 DNA 多态性初步分析[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 21-24.
- [28] KAI W, KIKUCHI K, TOHARI S, et al. Integration of the genetic map and genome assembly of fugu facilitates insights into distinct features of genome evolution in teleosts and mammals[J]. Genome Biology & Evolution, 2011, 3(3): 424-442.
- [29] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [30] SUN N, LI Q, YU H, et al. Parentage determination of *Scapharca broughtonii* based on microsatellite analysis[J]. Periodical of Ocean University of China, 2015(9): 42-48. 孙楠, 李琪, 于红, 等. 利用微卫星标记的魁蚶混交家系鉴定[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2015(9): 42-48.
- [31] DONG S R, KONG J, ZHANG Q W, et al. Pedigree tracing of *Fenneropenaeus chinensis* by microsatellite DNA markers genotyping [J]. Haiyang Xuebao, 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[J]. 海洋学报, 2006, 28(5): 157-161.
- [32] LIU L, LI J, LIU P. 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[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(7-8): 38-44.
- [33] 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[J]. 水产学报, 2011, 35(12): 1795-1804.
- [34] MA Q Q. Development of SNP and SSR markers and establishment of parentage analysis technique in *Scylla paramamosain*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. 马群群. 拟穴青蟹 SNP 和 SSR 标记开发及系谱认证技术的建立研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- [35] CHEN L Z, WANG X F, WANG S. China's biodiversity and its protection countermeasures[M]. Beijing: Science Press, 1993. 陈灵芝, 王献涛, 汪松. 中国的生物多样性: 现状及其保护对策[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- [36] WAN Y M, WANG L, TAN Z J, et al. Genetic analysis of two *Takifugu rubripes* populations and correlation of microsatellite markers and economic traits[J]. Freshwater Fisheries, 2011, 41(5): 9-16. 万玉美, 王蕾, 谭照君, 等. 红鳍东方鲀两个群体的遗传结构及与经济性状的相关性分析[J]. 淡水渔业, 2011, 41(5): 9-16.
- [37] XU X, WANG J Y, JIANG J Z, et al. Studies on the genetic structure of *Haliotis diversicolor* reeve in coastal area of Guangdong Province by microsatellite markers[J]. Advances in Marine Science, 2012, 30(2): 284-294. 许新, 王江勇, 姜敬哲, 等. 广东沿海杂色鲍养殖群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 海洋科学进展, 2012, 30(2): 284-294.

Parentage Determination of the *Takifugu rubripes* Families by Microsatellite Markers

SUN Jian-hua^{1,2,3}, MA Ai-jun^{2,3}, CUI Wen-xiao^{1,2,3}, WANG Guang-ning^{2,3}, SUN Zhi-bin^{2,3},
WANG Xin-an^{2,3}, MENG Xue-song⁴, LIU Sheng-cong⁴, ZHANG Tao⁴

(1. Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries
Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for
Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;

4. Dalian Tianzheng Industrial Co. Ltd., Dalian 116000, China)

Abstract: *Takifugu rubripes* is one of the economic sea fish in northern coast of China. In recent years, there are few studies on genetic diversity and genealogical information of *Takifugu rubripes*. In this study the genetic diversity and genealogical information of *Takifugu rubripes* were investigated, providing the basis of theory for genetic improvement. Five families were randomly sampled from twelve families which have been established in 2015. Eight pairs of microsatellite primers were used to identify the genealogy and analyze the genetic diversity among five cultured populations of *Takifugu rubripes*. Thirty-two alleles were detected at eight microsatellite loci. The number of alleles (A) at each locus ranged from three to six with an average of four. The value of average observed heterozygosity was $0.453 \sim 0.953$. The expected heterozygosity (H_e) was $0.490 \sim 0.790$ and the mean polymorphic information content (PIC) ranged from 0.455 to 0.754 . Eight family unique alleles were found out: three in 7[#] family, two in 3[#] family, two in 11[#] family, one in 12[#] family. Family unique allele was not found in family 10[#]. Based on the genotypes of offspring, all parental genotypes of the five families were successfully deduced. 3[#] family and 11[#] family were identified from the other families at locus fms15. 7[#] family was separated from the other families at locus TOG01. 12[#] family was distinguished from the other families at locus f1497. The three microsatellite markers (fms15, TOG01, f1497) could be used to identify five families. Results show that there exists high genetic diversity among the five families. The five families could be identified using at least three microsatellite markers selected from Eight microsatellite markers. Microsatellite marker is an useful tool for genealogical identification of *Takifugu rubripes*. And it is a reliable basis for molecular marker-assisted breeding in the future.

Key words: *Takifugu rubripes*; microsatellite; genetic diversity; genealogical identification

Received: June 30, 2016