

微卫星 DNA 技术用于中国对虾家系构建中的系谱认证

孙昭宁^{1,2}, 刘 萍¹, 李 健¹, 何玉英¹, 张秀梅²

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 海洋生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003)

摘要:用6个微卫星标记对中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的5个家系进行系谱鉴别和遗传多样性研究。6个微卫星位点中有5个位点是多态的,并在所有家系中都显示了高度的遗传差异。5个家系中,5个多态微卫星位点共发现了30个等位基因,每个位点的等位基因数在5~8之间。实验中共发现了4个家系特异性等位基因:2[#]家系及4[#]家系各1个,5[#]家系2个。根据已知亲本及子代基因型,可推断出5个家系中全部亲本的基因型,据此鉴别各家系。在EN0033位点,可将5[#]家系与其他4个家系相区别;在RS0859位点,可将3[#]和4[#]家系与其他3个家系相区分。因此,EN0033和RS0859标记可用于鉴别5[#]、3[#]和4[#]家系的系谱特异性标记。研究表明,用5个微卫星标记,且最少用2个微卫星标记即可鉴别5个中国对虾家系。

关键词:中国对虾;微卫星标记;特异等位基因;亲缘鉴定

中图分类号:Q959.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)06-0694-08

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是中国水产养殖的重要种类之一,是黄、渤海的重要经济渔业资源。培育优良苗种和通过遗传改良来选育优质、高产、抗病、抗逆的新品种,是加快发展中国对虾养殖业的重要目标之一。在动物良种选育过程中,了解种群的系谱关系,有利于防止种群的近交。但是对于海水养殖动物来讲,由于个体标识、家系标识甚至群体标识一直是难以解决的问题,所以很大程度上限制了遗传育种工作的进程。微卫星 DNA 标记相对于其他分子标记而言,多态性丰富,更适合于亲缘关系较近、多态性相似的个体之间的鉴定,因此,使用微卫星标记进行系谱认证是一种较好的选择。

微卫星标记已被应用于许多生物的野生种群中个体之间的遗传关系分析^[1-3],并进行谱系和亲缘关系结构分析^[4]。微卫星标记也已应用于中国对虾不同地理群体、养殖与野生群体之间的遗传多样性及遗传关系分析^[5]。

本研究以6个微卫星 DNA 标记鉴别中国对虾的5个养殖家系,研究各家系的遗传多样性水平,以此验证微卫星 DNA 技术在中国对虾亲缘关系鉴定中应用的可行性,并寻找家系特异性标记,为特异性标记相关的选育和基因定位提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

采自日照水产研究所2003年随机交配的5个中国对虾养殖家系,分别编号为1[#]、2[#]、3[#]、4[#]、5[#],每个家系20尾,包括10尾雄虾(用A表示)和10尾雌虾(用B表示)。1[#]、2[#]家系含父母本样本,3[#]、5[#]家系仅含母本样本,4[#]家系无亲本样本。样本收集后超低温冰箱(-80℃)中保存。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 中国对虾基因组 DNA 的提取参照文献[6]的方法,用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,GENEQUANTpro (Pharmacia Biotech Ltd) RNA/DNA 定量。

1.2.2 微卫星扩增 微卫星引物序列列于表1。每个PCR反应总体积为25 μL,包括100 ng中国对虾基因组 DNA、10×PCR缓冲液2.5 μL、Mg²⁺ (2.0 mmol/L)、1 U Taq 酶、dNTP 各0.1 mmol/L、引物各0.2 μmol/L。PCR条件为:94℃变性2 min; 94℃ 40 s,退火1 min(各引物的退火温度见表1), 72℃ 1 min,25个循环;72℃延伸5 min。PCR产物在8%变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,硝酸银染色。

收稿日期:2005-04-08; 修订日期:2005-05-23.

基金项目:国家自然科学基金项目(30271038);山东省自然科学基金项目(Y2002D02);“十五”攻关项目(2004BAS26101).

作者简介:孙昭宁(1981-),女,硕士生,主要从事种质资源与遗传育种研究. E-mail:mingkong2002@soba.com

通讯作者:刘 萍. Tel:0532-5823291. E-mail:liuping@yfri.ac.cn

表 1 微卫星引物序列

Tab.1 Sequences of microsatellite primers

克隆编号(位点) No. clone(locus)	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	GenBank 登录号 GenBank accession	退火温度/℃ Annealing temperature
EN0033	专利(申请 02135714.5)	AY132813	64
RS0683	专利(申请 02135713.7)	AY132823	64
RS0859	F:ATCAGTAGCAGTAGTAGTTG R:TGTTAGGAATGCTTATGA	AY132791	52
RS062	F:TGCTGAAGCTACACTACCTTCG R:TGATGAAACGCAAGCAAAGGC	AY132778	66
RS0622	F:TCAGTCCGTAGTTCATACTTGG R:CACATGCCCTTTGTGTGAAAACG	AY132778	66
EN0018	F:ACAGACACTATGTCACACC R:CCGAGATACAGAAAAGATGGGC	AY132812	66

注:RS062 位点和 RS0622 位点有相同的 GenBank 登录号,属于相同的微卫星核心序列的两对引物。F:正向引物;R:反向引物。

Note: RS062 and RS0622 loci have the same GenBank accession number, which are a pair of primers with the same core sequences. F: Forward; R: Reverse.

1.2.3 统计分析 根据每个个体产生的条带位置确定其基因型,等位基因的命名按照分子量由大到小,用阿拉伯数字表示,前面加上各位点后3位数字,如0331表示EN0033位点分子量最大的等位基因1。用TFPGA软件进行数据处理、聚类分析,计算群体间遗传距离和相似指数、Hardy-Weinberg平衡检验(P 值)以及不同家系位点的杂合度。群体遗传分化指数(F_{st} 值)和遗传变异组分分析利用Arlequin软件的AMOVA分析完成。

参照Botstein等^[7]的方法计算多态性信息含量(PIC, Polymorphism Information Content):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i p_j$$

式中, P_i 、 P_j 分别为群体中第*i*和第*j*个等位基因频率, n 为等位基因数。

1.2.4 亲本基因型的推断 统计每个个体和已知亲本的基因型,根据子代中等位基因的分离对缺失亲本的基因型进行推断。在子代观察到的等位基因,在母本却没有观察到,即认为这些等位基因是由父本遗传下来的,推断各家系缺失亲本的基因型,鉴别各家系,据此对各家系进行分析。

2 结果与分析

2.1 中国对虾家系遗传多样性分析

微卫星扩增结果显示,除了EN0018位点以外,其他5个微卫星位点都是多态的,而且在所有家系中都显示了高度的遗传变异。5个位点的多态信

息含量(PIC)分别为EN0033位点0.8065,RS0683位点0.6968,RS0859位点0.7287,RS062和RS0622位点0.7414。由于EN0018位点,在所有家系都是单态的,因此,本研究未对其结果进行统计,认为不适合用于家系鉴别。

用5个多态性微卫星引物对中国对虾5个家系进行遗传多样性分析。运用TFPGA软件进行各遗传参数分析。5个位点的观测杂合度(H_o)都很高,各家系在各位点的观察杂合度在0.4500到1.0000之间。除1[#]家系以外,其他4个家系在一些微卫星位点显著偏离Hardy-Weinberg平衡。2[#]和3[#]家系在RS0859位点极显著偏离Hardy-Weinberg平衡,4[#]家系在RS0683位点显著偏离Hardy-Weinberg平衡,在EN0033位点极显著偏离。5[#]家系在RS0683位点、RS062和RS0622位点都极显著地偏离Hardy-Weinberg平衡。

根据Nei^[8]的方法对5个家系间的遗传距离和相似性指数计算(表2),构建UPGMA图(图1)。结果表明,3[#]和5[#]家系之间的遗传距离最小,相似性最高,聚合在一起。1[#]和2[#]家系之间的遗传距离次之,聚合在一起,然后与4[#]家系聚合,最后再与3[#]和5[#]家系相聚。

2.2 家系特异性标记

对于所有家系,所有的位点共发现了30个不同的等位基因。每个位点的等位基因数为5~8个。EN0033位点有8个等位基因,RS0683和RS0859位点各有6个等位基因,RS062和RS0622位点有

5个等位基因。总共发现了4个家系特异性等位基因:2[#]家系中发现1个,4[#]家系中有1个,5[#]家系中2个,1[#]和3[#]家系未发现特异性等位基因,如图2箭头所示。

表2 中国对虾5个家系的遗传距离和相似性指数

Tab.2 Genetic identity and genetic distance in five *F. chinensis* families

家系 Family	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]
1 [#]	*****	0.6987	0.4767	0.5849	0.2590
2 [#]	0.3585	*****	0.5896	0.6492	0.5033
3 [#]	0.7409	0.5283	*****	0.5926	0.7112
4 [#]	0.5364	0.4320	0.5243	*****	0.3564
5 [#]	1.3509	0.6865	0.3408	1.0316	*****

注:对角线以上为相似性指数,对角线以下为遗传距离。

Note: Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

共检测出60种基因型,EN0033位点有15种基因型,其中只有1种纯合基因型;RS0683位点有10种基因型,只有1种纯合基因型;RS0859位点有13种基因型,有3种纯合基因型;RS062和RS0622位点有11种基因型,有2种纯合基因型。

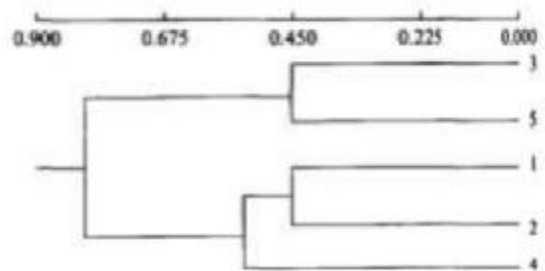


图1 中国对虾5个家系的UPGMA图

Fig.1 UPGMA dendrogram among five *F. chinensis* families

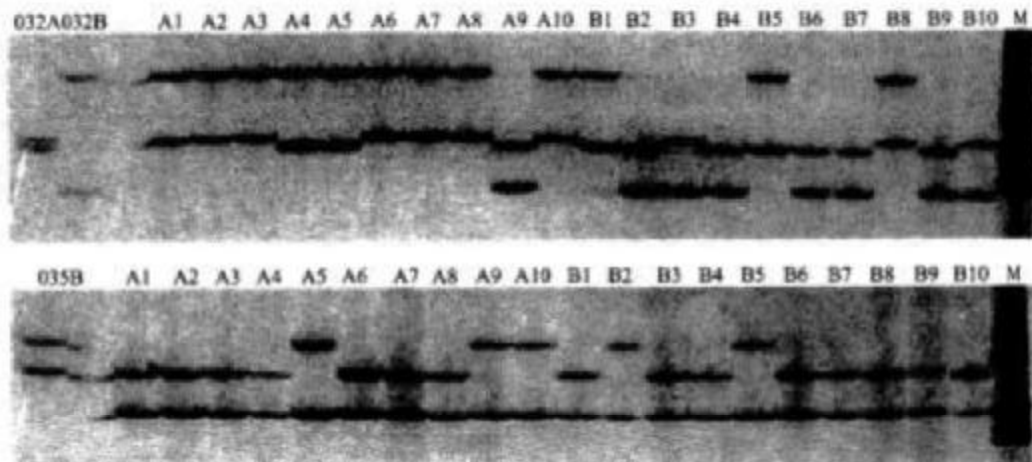


图2 2[#](上)和5[#](下)家系在RS0683位点的微卫星DNA检测图谱

注:箭头为家系特异性等位基因

Fig.2 Demonstration of microsatellite loci amplified by RS0683 primer pairs in 2[#] (upper) and 5[#] (lower) family

Note: Arrowhead showing the family unique alleles

2.3 推断缺失亲本的基因型

由于缺少3[#]和5[#]家系的父本,4[#]家系的父母本,则根据子代中等位基因的分离对缺失亲本的基因型进行推断。每个家系的等位基因信息列于表3,亲本及子一代的微卫星DNA电泳图谱见图3。

在RS0683位点(图3),有以下两种情况:(1)3[#]家系已知母本,父本缺失。母本基因型检测为6832/6834,子代有4种基因型,分别为:6831/6832;

6831/6834;6832/6834;6834/6834(表3)。其中等位基因6832、6834来自母本,因此可以确定等位基因6831来自父本,又因为子代中出现了6834/6834纯合基因型,所以可以推断父本还含有等位基因6834。由此可以得出在RS0683位点,3[#]家系父本的基因型为6831/6834。同样的方法,可以推断出3[#]家系在其他位点缺失的父本基因型,和5[#]家系在各位点上缺失的父本基因型。(2)在4[#]家系中,

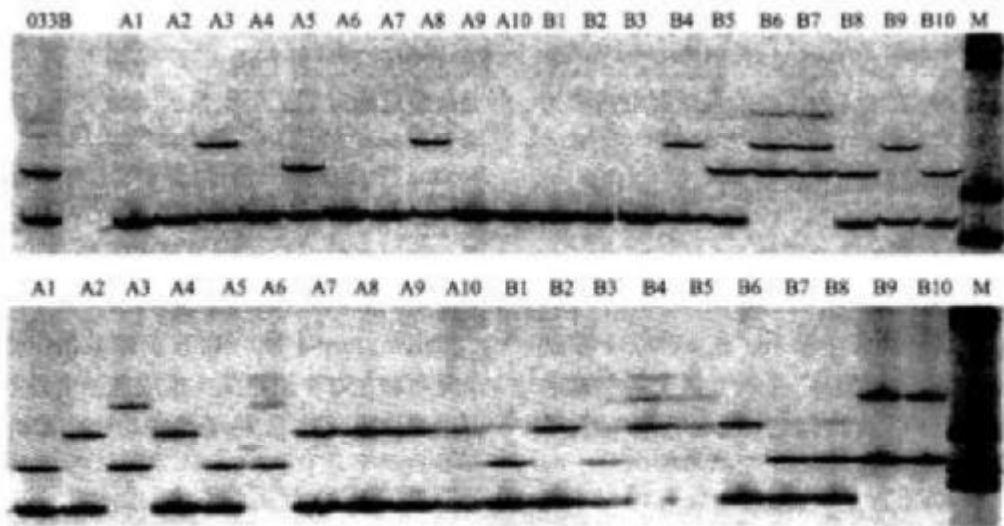
图 3 3rd家系(上)和 4th家系(下)RS0683 位点的微卫星 DNA 检测图谱

Fig.3 Demonstration of microsatellite loci amplified by RS0683 primer pairs in 3rd (upper) and 4th (lower) family

表 3 每个家系观察到的和推断出的基因型

Tab.3 Observed and conferred genotypes of each family

家系 Family	位点 Locus	已知母本 Known dam	已知父本 Known sire	基因型(观察到的个数) Genotype (observed number)				推断亲本 Expected parent 推断父本 Expected sire
				1	2	3	4	
1 st	EN0033	0334/0338	0335/0336	0334/0335(4)	0334/0336(4)	0335/0338(7)	0336/0338(4)	
	RS0683	6831/6834	6831/6834	6831/6831(5)	6831/6834(11)	6834/6834(3)		
	RS0859	8591/8592	8592/8594	8591/8592(8)	8591/8594(3)	8592/8592(2)	8592/8594(6)	
	RS062	0624/0625	0624/0625	0624/0624(9)	0624/0625(11)			
	RS0622	6224/6225	6224/6225	6224/6224(9)	6224/6225(11)			
2 nd	EN0033	0334/0335	0336/0338	0334/0336(2)	0334/0338(5)	0335/0336(6)	0335/0338(7)	
	RS0683	6831/6836	6834/6835	6831/6834(8)	6831/6835(4)	6834/6836(2)	6835/6836(6)	
	RS0859 **	8591/8591	8592/8594	8591/8592(10)	8591/8594(10)			
	RS062	0621/0624	0621/0623	0621/0621(4)	0621/0623(4)	0621/0624(6)	0623/0624(6)	
	RS0622	6221/6224	6221/6223	6221/6221(4)	6221/6223(4)	6221/6224(6)	6223/6224(6)	
3 rd	EN0033	0332/0338		0332/0334(9)	0332/0338(4)	0334/0338(3)	0338/0338(4)	0334/0338
	RS0683	6832/6834		6831/6832(2)	6831/6834(4)	6832/6834(4)	6834/6834(10)	6831/6834
	RS0859 **	8593/8595		8591/8593(8)	8591/8595(12)			8591/8591
	RS062	0622/0623		0622/0623(7)	0622/0624(4)	0623/0623(5)	0623/0624(4)	0623/0624
	RS0622	6222/6223		6222/6223(7)	6222/6224(4)	6223/6223(5)	6223/6224(5)	6223/6224
4 th	EN0033 **			0332/0334(7)	0332/0338(2)	0333/0334(5)	0333/0338(6)	0332/0333 × 0334/0338
	RS0683 *			6831/6832(2)	6831/6834(4)	6832/6836(8)	6834/6836(6)	6832/6834 × 6831/6836
	RS0859			8591/8591(9)	8591/8596(9)	8596/8596(2)		8591/8596 × 8591/8596
	RS062			0621/0622(5)	0621/0624(4)	0622/0625(3)	0624/0625(8)	0621/0625 × 0622/0624
	RS0622			6221/6222(5)	6221/6234(5)	6222/6225(2)	6224/6225(8)	6221/6225 × 6222/6224
5 th	EN0033	0333/0334		0331/0333(6)	0331/0334(6)	0333/0337(3)	0334/0337(5)	0331/0337
	RS0683 **	6832/6833		6832/6834(6)	6833/6834(14)			6834/6834
	RS0859	8592/8594		8592/8593(7)	8592/8595(6)	8593/8594(5)	8594/8595(2)	8593/8595
	RS062 **	0621/0622		0621/0623(10)	0622/0623(10)			0623/0623
	RS0622 **	6221/6222		6221/6223(10)	6222/6223(10)			6223/6223

注: * 为显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, $0.01 < P < 0.05$; ** 为极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, $P < 0.01$ 。

Note: * Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, $0.01 < P < 0.05$; ** Highly significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, $P < 0.01$.

父母本均缺失,未知其基因型。在子代中观察到4种基因型:6831/6832、6831/6834、6832/6836、6834/6836,均为杂合型。因此,可知其亲本基因型只能为6832/6834 $\times$ 6831/6836。同样的方法可以推断出4[#]家系在其他位点的亲本的基因型。

2.4 家系鉴别

根据已知亲本及子代基因型,可以推断出5个家系中缺失亲本的基因型。根据不同家系亲本间的基因型差异,可以鉴别各个家系。在EN0033位点的0337等位基因,可以将5[#]家系与其他4个家系相区别,在RS0859位点的8595、8596等位基因,可以将3[#]家系、4[#]家系与其他3个家系相区分。因此,EN0033和RS0859标记可作为鉴别5[#]、3[#]和4[#]家系的特异性标记。

EN0033位点的0336等位基因将1[#]家系与3[#]和4[#]家系相区别开来,0335、0336等位基因可以区别2[#]和4[#]家系;RS0683位点的6833等位基因将5[#]家系与1[#]、2[#]和4[#]家系相区别,但不能与3[#]家系区别开。在RS0859位点的8593、8595等位基因,可以将5[#]家系与1[#]和2[#]家系相区别。在RS062的0625等位基因和RS0622位点的6225等位基因可以将1[#]位点与2[#]、3[#]和5[#]家系相区别,但不能与4[#]家系相区别。

由于RS0859和EN0033两个微卫星标记可以鉴别3[#]、4[#]和5[#]家系,而RS062和RS0622标记可以区分1[#]和2[#]家系,因此可以用5对微卫星标记对5个家系进行鉴别。

3 讨论

微卫星DNA具有丰富的多态性和简单的遗传方式,近年来已成为分子生态学的研究热点之一,在遗传多样性的维持、濒危物种的保护、良种选育和基因作图等领域得到了广泛的应用^[9-13],并应用微卫星标记进行亲缘关系鉴定的研究,为改善繁育计划提供了指导。张亚平等^[9]就曾利用10个微卫星位点引物分析了13只大熊猫的系谱关系,澄清了两组未知的父系关系,从而为建立各地大熊猫系谱和制订有效的繁殖计划提供了有利的帮助。Norris等^[14]在大西洋鲑中使用8个微卫星标记,在超过12000种可能的亲子关系中为200个子代中95.6%的个体找到它们的亲代。他们还指出,4个高度多态性的微卫星标记就可以鉴别出200个子代

种94.3%的亲子关系(12个可能的家系)。Takuma等^[15]用日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)5个微卫星位点确定了7个家系的亲缘关系,证明这5个微卫星标记可以用于确定日本对虾的亲缘关系。Wolfus等^[16]将微卫星标记应用于对虾的养殖选育计划,对高健康虾品系中的6个地理种群共16个家系312尾对虾进行了微卫星M1的分析,阐明了每一家系的亲代与其后代之间的遗传关系。

但是,Jerrya等^[17]在6个微卫星位点,对由30个母本和150个假定父本组成的一个日本对虾捕获野生群体进行分析,将子代成功地分配给其“真实”母本的概率只有47%。认为无效等位基因和由于低质量的DNA造成的等位基因缺失是产生这种情况的原因。因此,应用DNA作为在对虾选择孵化过程中获得谱系信息的方法还有待进一步证实。

在本实验中,除1[#]家系外,其他4个家系在一些微卫星位点显著或极显著偏离Hardy-Weinberg平衡($P < 0.05$),5个家系杂合度观测值都比期望值要高。5个家系在所有位点都表现了杂合过剩($F < 0$)。这种现象可能有以下4种原因:(1)具有无效等位基因的个体,事实上是纯合的;(2)这些杂合过剩位点具有很高的突变率,导致许多不同的等位基因;(3)这些家系不是随机交配的,导致杂合过剩,因此,不符合Hardy-Weinberg平衡;(4)取样误差造成,Nei和Roychoudhury^[18]认为杂合度的理论值或期望值比观测值更适于在小样本中用来评价种群的杂合度水平。

RS062位点和RS0622位点有相同的GenBank登录号,属于相同的位点,只是片段大小(bp)不同。因此,在两位点分析的结果完全一致,只是在4[#]家系中的一个个体在这一位点有所区别,我们认为可能是发生了突变。

在2[#]家系中有1个家系特异性的等位基因6835(表4)。由于2[#]家系的亲本是杂合的,其子代20个个体中有10个表现出特异性带;特异性等位基因8596在4[#]家系中特有,其子代20个个体中有11个出现了该家系特异性等位基因;5[#]家系中有两个特异性等位基因0337和6833,其子代20个个体中分别有8个子代和14个子代中存在。其他家系中未发现家系特异性等位基因。但这些家系特异性等位基因在家系鉴别中的应用还需要进一步的研究。本研究中发现,在EN0033位点,可以将5[#]家

表4 在中国对虾的5个微卫星位点的等位基因多样性
Tab.4 Alleles diversity at 5 microsatellite loci of *F. chinensis*

家系 Family	项目 Item	位点 Locus					平均 Average
		EN0033	RS0683	RS0859	RS062	RS0622	
1 [#]	A	4	2	3	2	2	2.6
	F	0.2895	0.5526	0.4737	0.7105	0.7105	0.5473
	U	0	0	0	0	0	
	G	4	3	4	2	2	3
	H _e	0.7639	0.5078	0.6529	0.4225	0.4225	0.5539
	H _o	1.0000	0.5789	0.8947	0.5789	0.5789	0.7263
	P	0.2532	0.6549	0.0749	0.2532	0.2532	0.2978
	N	19	19	19	19	19	19
2 [#]	A	4	4	3	3	3	3.4
	F	0.3250	0.3000	0.5000	0.4500	0.4500	0.4050
	U	0	1(6835)	0	0	0	
	G	4	4	2	4	4	3.6
	H _e	0.7526	0.7641	0.641	0.6615	0.6615	0.6961
	H _o	1.0000	1.0000	1.0000	0.8000	0.8000	0.9200
	P	0.0567	0.1188	0.000	1.000	1.000	0.4351
	N	20	20	20	20	20	20
3 [#]	A	3	3	3	3	3	3
	F	0.3750	0.7000	0.5000	0.5500	0.5500	0.5350
	U	0	0	0	0	0	
	G	4	4	2	4	4	3.6
	H _e	0.6808	0.4769	0.6359	0.6103	0.6103	0.6028
	H _o	0.8000	0.5000	1.0000	0.7000	0.7000	0.7400
	P	0.3394	1.000	0.000	1.000	1.000	0.6678
	N	20	20	20	20	20	20
4 [#]	A	4	4	2	4	4	3.6
	F	0.4000	0.3500	0.6750	0.3000	0.3000	0.4050
	U	0	0	1(8596)	0	0	
	G	4	4	3	4	4	3.8
	H _e	0.7218	0.7487	0.4500	0.7628	0.7628	0.6892
	H _o	1.0000	1.0000	0.4500	1.0000	1.0000	0.8900
	P	0.0054	0.0426	1.000	0.1188	0.1188	0.2571
	N	20	20	20	20	20	20
5 [#]	A	4	3	4	3	3	3.4
	F	0.3250	0.5000	0.3250	0.5000	0.5000	0.4300
	U	1(0337)	1(6833)	0	0	0	
	G	4	2	4	2	2	2.8
	H _e	0.7526	0.6205	0.7564	0.641	0.641	0.6823
	H _o	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	P	0.0576	0.000	0.0576	0.000	0.000	0.0230
	N	20	20	20	20	20	20
所有家系 The whole family	A	6	8	5	5	5	5.8
	F	0.2828	0.4293	0.3939	0.2980	0.2980	0.3404
	U	1	2	1	0	0	0.8
	G	15	10	13	11	11	12
	H _e	0.8315	0.7355	0.7638	0.7789	0.7789	0.7777
	H _o	0.9596	0.8182	0.8687	0.8182	0.8182	0.8565
	P	0.0000	0.0414	0.0112	0.8130	0.8130	0.3357
	N	99	99	99	99	99	99

注:1)期望杂合度(H_e)按公式 $H_e = 1 - \sum P_i^2$ 计算。2)A—等位基因数;F—频率最高等位基因的频率;G—基因型数;H_e—观察杂合度;N—样本数;P—HWE 偏离显著性;U—特异性等位基因数。3)括号内为家系特异性等位基因。

Note:1) Expected heterozygosity $H_e = 1 - \sum P_i^2$. 2) A—Nos. of alleles; F—F frequency of the allele with the highest frequency; G—Nos. of genotypes; H_e—Observed heterozygosity; N—Nos. of the samples; P—Probability of deviation from HWE; U—Nos. of unique alleles. 3) Family unique alleles are shown in parentheses.

系与其他4个家系相区别,在RS0859位点,可以将3[#]和4[#]家系与其他3个家系相区分。因此,EN0033可以作为5[#]家系的特异性标记用于鉴别5[#]家系,RS0859标记可以作为3[#]和4[#]家系的特异性标记用于鉴别3[#]和4[#]家系。此外,在本研究中,用5对微卫星标记可以完全将5个家系两两区别开来,并且最少用2对微卫星标记:RS062或RS0622与RS0859组合即可将这5个家系鉴别开。这对于养殖上不同家系的混养及鉴别具有十分重要的应用意义。同时也表明微卫星标记可以作为对虾选择孵化过程中获得谱系信息的一种有效方法。

参考文献:

- [1] Blouin M S, Parsons M, Lacaille V, et al. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness [J]. Mol Ecol, 1996, 5:393-401.
- [2] Finch M O, Lambert D M. Kinship and genetic divergence among populations of tuatara *Sphenodon punctatus* as revealed by minisatellite DNA profiling [J]. Mol Ecol, 1996, 5:651-658.
- [3] Cronin M, Shideler R, Hechtel J, et al. Genetic relationships of grizzly bears (*Ursus arctos*) in the Prudhoe bay region of Alaska: Inference from microsatellite DNA, mitochondrial DNA, and field observations [J]. Hered, 1999, 90:622-628.
- [4] Barrois F, Gaudet J, Perrin N. Breeding system and genetic variance in the monogamous, semi-social shrew, *Crocidura russula* [J]. Evolution, 1998, 52:1230-1235.
- [5] 刘 萍, 孟宪红, 何玉英, 等. 中国对虾黄、渤海3个野生地理种群遗传多样性的微卫星DNA分析[J]. 海洋与湖泊, 2004, 35(5):252-257.
- [6] Liu Ping, Kong Jie, Shi Tiao, et al. RAPD analysis of wild stock of Penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in Chinese coastal waters of the Huanghai Sea and coastal waters of the Bohai Sea [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2000, 19(1):119-126.
- [7] Botstein D, White R L, Skolnick M. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Anim Gen, 1980, 32:314.
- [8] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am Nat, 1972, 106:283-292.
- [9] 崔亚平, 王 文, 邵 兵, 等. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用[J]. 动物学研究, 1995, 16(4):301-306.
- [10] Xu Zhenkang, Primavera J H, de la Pena. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites [J]. Aquaculture, 2000, 199:13-40.
- [11] Wright J M, Bentzen P. Microsatellites: genetic markers for the future [J]. Rev Fish Biol Fish, 1994, 4:384-388.
- [12] Moore, S S, Wham V, Davis G P, et al. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) [J]. Aquaculture 1999, 173:19-32.
- [13] Lee W-J, Kocher T D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus* [J]. Fish Biol, 1996, 49:169-171.
- [14] 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, 182:73-83.
- [15] Takuma Sugeya, Minoru Ikeda, Hideshi Mori, et al. Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use for kinship estimation in kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) [J]. Fish Sci, 2002, 68:299-305.
- [16] Wolfus G M, Garcia D K, Alcivar-Warren A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs [J]. Aquaculture, 1997, 152:35-47.
- [17] Jerrya D R, Preston N P, Croxson P J, et al. Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus japonicus)* using microsatellite markers (Date) [J]. Aquaculture, 2004, 235:237-247.
- [18] Nei M, Roychoudhury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance [J]. Genetics, 1974, 76:379-390.

Parentage determination of *Fenneropenaeus chinensis* in family establishment using microsatellite DNA markers

SUN Zhao-ning^{1,2}, LIU Ping¹, LI Jian¹, HE Yu-ying¹, ZHANG Xiu-mei²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Division of Life Sciences and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: One of the difficulties in selecting a breeding program is to maintain the parentage information. In order to obtain the survival and growth traits of each family, the progeny from family groups are often isolated and raised in separate tanks until they are large enough for physical tagging. Due to their highly polymorphic, microsatellites have provided an essential tool for identifying parentage relationships among individuals and for obtaining pedigree information in aquaculture selective programs.

Six microsatellite markers were used to estimate the kinship and examine the genetic diversity of five *Fenneropenaeus chinensis* families. Investigating the potential application of microsatellite markers in the parentage determination of *Fenneropenaeus chinensis*, as well as exploring family unique markers, which could be used in marker-assisting selective breeding and gene localization, was also performed in this study.

All the microsatellite loci were polymorphic except locus *EN0018*. The five polymorphic loci displayed high genetic difference among the five families. The polymorphic information content (PIC) of the five loci was 0.806 5 at locus *EN0033*, 0.696 8 at *RS0683*, 0.728 7 at *RS0859*, 0.741 4 at *RS062* and 0.741 4 at *RS0622*, respectively. Thirty alleles were detected in five families tested at five microsatellite loci. The number of the alleles at each locus was between five and eight. There were six alleles at locus *RS0683*, six at locus *RS0859*, five at locus *RS062* and five at locus *RS0622*. Four family unique alleles were found out: one in 2[#] family, one in 4[#] family and two in 5[#] family. Family unique allele was not found in families 1[#] and 3[#]. Sixty kinds of genotypes were acquired. Thirteen genotypes were acquired at locus *EN0033*, 10 at locus *RS0683*, 13 at locus *RS0859*, 11 at locus *RS062* and 11 at *RS0622*, respectively. All the parental genotypes of the five families were inferred based on the genotypes of the parents and the progeny known. Based on the unique alleles among the families, each family could be distinguished from the others. The results showed that 5[#] family was identified from the other four families at locus *EN0033*, and 3[#] and 4[#] families were identified from other families at locus *RS0859*. It was considered that unique alleles at loci *EN0033* and *RS0859* could be used as family markers of 5[#], 3[#] and 4[#], and they could be used to identify these families. On all accounts, the five families could be distinguished by these five microsatellite markers, and the five families could be identified using at least two microsatellite markers: *RS062* or *RS0622* and *RS0859*.

These results demonstrate that the use of microsatellite DNA markers can contribute significantly to the parentage determination of the family groups of *Fenneropenaeus chinensis* reared communally. It also shows that microsatellite DNA markers can be used as a powerful tool for gaining pedigree information in selective breeding programs.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; microsatellite DNA marker; unique allele; parentage determination

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn