

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17190

中华绒螯蟹微卫星多重 PCR 体系的建立及其亲子鉴定应用

肖起珍¹, 刘青¹, 李清清¹, 郑海地², 吴旭干¹, 成永旭^{1,3}

1. 上海海洋大学 农业部淡水种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 浙江澳凌水产种业有限公司, 浙江 长兴 313106;

3. 上海海洋大学 上海市教委水产动物遗传育种协同创新中心, 上海 201306

摘要: 利用自主开发的微卫星标记对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)进行微卫星多重 PCR 体系构建, 最终成功建立 4 组多重体系, 每组体系包含 4 个微卫星位点, 并成功应用于 3 个家系的亲子鉴定中。结果显示: (1)本研究筛选的 16 个微卫星标记, 平均观测杂合度为 0.8206, 平均期望杂合度为 0.8164, 平均多态信息含量为 0.7927, 具有丰富的多态性; (2)运用 Cervus 3.0 软件对已知系谱信息的 3 个中华绒螯蟹家系共 95 个子代个体进行亲子鉴定分析, 结果显示, 选用任意两组微卫星多重 PCR 体系时, 累积实际正确鉴定率均超过 94.74%; 使用任意三组微卫星多重 PCR 体系时, 累积实际正确鉴定率均大于 98.95%; 使用四组微卫星多重 PCR 体系时, 累积实际正确鉴定率达到 100%。并且当选用组合 1、2 和组合 3, 或者选用组合 1、3 和组合 4 时, 对 3 个家系的累积正确鉴定率达到了 100%, 因此选用这些组合不但可以获得准确的系谱信息, 还能减少工作量, 降低成本。本研究构建的微卫星多重 PCR 体系能为中华绒螯蟹的种群选育和家系管理提供便捷、高效的途径。

关键词: 中华绒螯蟹; 微卫星; 多重 PCR; 亲子鉴定

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)02-0325-11

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)又称河蟹(以下简称河蟹)、大闸蟹、毛蟹, 营养价值高, 是中国久负盛名的美食, 也是重要的淡水养殖种类, 主要养殖于长江、黄河、辽河水系, 2015 年全国中华绒螯蟹养殖总产量约 82.4 万 t, 占淡水养殖甲壳类产量的 30.60%, 具有极其重要的地位^[1]。由于多年来中华绒螯蟹养殖群体的近亲繁殖、采用小规格亲本人工育苗等原因, 导致中华绒螯蟹群体种质严重退化, 养殖性能下降^[2], 因此迫切的需要对不同水系的中华绒螯蟹进行种质资源的保护和良种选育, 而良种选育很重要的一个环节是进行家系选育。通过构建大规模家系, 能够准确地了解系谱信息, 对亲本进行有效的筛选^[3], 这

既能避免近亲繁殖, 又能不断地进行优良性状的遗传改良, 缩短育种时间, 提高中华绒螯蟹产量。

为了保证精确的家系信息, 以往的家系主要靠分池饲养, 但是大规模的家系分池饲养使得基础设施投入加大, 管理强度增加, 造成资源的大量消耗。如果进行家系同池混养不但可以解决这个问题, 而且可以避免其他环境因素干扰, 减少因环境差异而引起的遗传参数的估计偏差^[4], 但是最终需要对同池混养的家系进行亲缘关系鉴定。传统上, 水产动物同池混养家系的鉴定方法是进行电子标记区分, 但是中华绒螯蟹具有褪壳的生物学特性, 需要成熟的植入技术以及被标记的中华绒螯蟹个体规格足够大, 否则电子标记容

收稿日期: 2017-05-16; 修订日期: 2017-06-19.

基金项目: 农业部现代农业产业技术体系项目[农科(产业)函[2017]第 23 号]; 上海市科技兴农推广项目[沪农科推字(2015)第 1-7 号]; 上海市科委工程技术中心能力提升项目(16DZ2281200); 上海高校水产学高峰学科建设项目(2015-62-0908); 深圳市澳华农牧有限公司横向项目(D-8006-15-0054).

作者简介: 肖起珍(1991-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: xiaoqizhen_fjism@126.com

通信作者: 吴旭干, 副教授. E-mail: xgwu@shou.edu.cn

易脱落且死亡率高,所以电子标记技术用于中华绒螯蟹家系的应用有待开发。而 DNA 分子标记技术具有多态性高、共显性遗传、分布广、检测手段简单快速、重复性好等优点^[5],因此常被应用于水生动物的品种检测、基因定位、资源评价、物种亲缘关系分析等方面,具有广阔的应用前景,其中微卫星(microsatellites)又称简单序列重复(simple sequence repeats, SSR),是重要的分子标记之一。微卫星标记广泛分布于真核生物基因组中,因为其种类多、分布广,具有高度的变异性、多态性、共显性、遵循孟德尔遗传定律等优点,在水产动物的分子标记辅助育种和家系系谱分析等方面得到广泛的应用^[6-8]。

微卫星多重 PCR(multiplex PCR)是指在一个反应中同时扩增两个或多个位点的聚合酶链式反应^[9]。相比于微卫星单独的 PCR 扩增,多重 PCR 具有省时高效、经济节约的优点,无论是在人类医学还是在动植物研究中均有成熟的应用^[10-12],特别是对于水产动物基于大样本的亲子鉴定和遗传多样性评估时,能减少人工操作失误,减少模板的使用,提供快捷、高效、廉价的方法^[13],在三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[14-15]、美洲牡蛎(*Crassostrea virginica* Gmelin)^[16]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[17]和中国对虾(*Fenneropenaeus chinense*)^[18]等水产动物中,均有微卫星多重 PCR 的研究报道。但是,目前对于中华绒螯蟹的微卫星研究,主要集中于微卫星标记开发^[19-20]、群体遗传多样性评估^[21-22]和 QTL 图谱定位^[23]等方面,还未见有关中华绒螯蟹微卫星标记多重 PCR 体系建立和家系亲子鉴定的相关报道,这不利于大规模中华绒螯蟹育种的进程。鉴于此,本研究首次建立了中华绒螯蟹的微卫星多重 PCR 体系,并成功将其应用于中华绒螯蟹家系的亲子鉴定中,大大提高了分析效率,为中华绒螯蟹的种群选育和家系管理提供一种便捷、高效的技术方法,促进了中华绒螯蟹产业的健康发展。

1 材料方法

1.1 样本采集

实验所用中华绒螯蟹来源于上海海洋大学基

地构建的系谱图已知的 2014 年家系,选取其中 3 个养殖家系(辽河家系、长江家系、黄河家系)共 95 个子代体,以及 3 个家系所对应的亲本。此外,选取 20 个 2015 年中华绒螯蟹养殖群体个体,用于微卫星标记多态性的筛选以及多重 PCR 体系的构建。所有个体均取其胸肢肌肉组织,用 95%乙醇固定 24 h 后-20℃冻存。

1.2 DNA 提取

将上述肌肉固定样品参照刘皓等^[24]优化的酚-氯仿法抽提基因组 DNA,采用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的完整性,核酸蛋白检测仪检测 DNA 浓度和质量,将合格的 DNA 用 ddH₂O 稀释至 50 ng/μL, -40℃保存备用。

1.3 微卫星多重 PCR 引物的筛选以及体系优化

从本实验室自主开发的微卫星标记中选取多态性好的位点,合成引物时用荧光基团 FAM 或者 HEX 修饰上游引物的 5'端(表 1)。将每对引物的片段大小、退火温度、引物的荧光标记等信息据输入 Multiplex Manager1.0 软件^[25]进行模拟,检测组合反应体系中的引物是否会产生错配、引物二聚体和发卡结构等,模拟出几组最优的多重 PCR 引物组合。

将模拟出的几组多重 PCR 引物分别进行反应体系构建及优化,使用的 DNA 模板为 2015 年群体养殖中华绒螯蟹的 20 个个体的基因组 DNA。初始的 PCR 反应体系为:PCR 反应总体积为 12.5 μL,其中包括 DNA 模板 1 μL(约 50 ng),Premix 2×Taq(生工生物工程股份有限公司,上海) 6.25 μL,正反向引物各 0.35 μL(引物浓度为 10 pmol/μL)(引物由上海迈浦生物科技有限公司合成),ddH₂O 补充体积至 12.5 μL,避光冰浴操作。PCR 扩增采用反应程序:94℃预变性 3 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,循环 35 次;再 72℃延伸 10 min,最终 16℃保存。每次反应后,将产物送上海迈浦生物科技有限公司进行 STR 测序分析(毛细管电泳检测 ABI3730XL 全自动 DNA 测序仪)。根据测序结果的峰值图进行每个引物反应量的调整,每次调整 0.05 μL 量,直至多重 PCR 反应体系各引物的扩增效率基本一致。最终将优化好的微卫星多重 PCR 组合用于 3 个中华绒螯蟹家系的亲子鉴定。

表 1 中华绒螯蟹 4 组微卫星多重 PCR 的特性

Tab. 1 Characteristics of the four set multiplex PCR panels of microsatellites in *Eriocheir sinensis*

多重 PCR 组合 multiplex PCR	位点 loci	引物序列及荧光标记(5'-3') primer sequences (5'-3')	重复区 repeat motif	退火温度/℃ annealing temperature	扩增片段 大小/bp allele range	引物浓度/ (μmol/L)	登录号 (GenBank accession no)
组合 1 (Set 1)	CHES005	F: AGTTTCTGTGTACGGATTGA ^{FAM} R: GTAAGAAAGGATGAGGAAACGA	(CGA) ₅	57	122~137	0.24	KY798550
	CHES208	F: ACTGGAAGAGTTCGAAGAAGAG ^{FAM} R: TCATAGTCCTCAGAATCACTGC	(GAG) ₅	57	316~340	0.24	KY798565
	CHES475	F: CAGCTCCACACTAGAACCCT ^{HEX} R: TTATAAGGCGGAAAAATTAAGC	(GGT) ₇	57	416~425	0.24	KY798587
	CHES241	F: AAGTCAAGTCTTACGTCCTGGT ^{FAM} R: CTCTCCGCAGTAGGTTGAG	(AAC) ₆	56	463~562	0.24	KY798571
组合 2 (Set 2)	CHES045	F: GACTTGCCGTCCTTCTCTGT ^{HEX} R: GTGTATGGGTGTAATGAAGGTG	(TTAT) ₅	58	105~121	0.16	KY798562
	CHES034	F: ACTGACCTGAATTGACCCAA ^{FAM} R: CAACAGTAGTGTTTGTGGAGTG	(GCA) ₇	56	130~157	0.16	KY798559
	CHES203	F: CCTAAATAGCCCCATAAAACAC ^{FAM} R: CAGAGATCACATGTTTTGTGTT	(GAA) ₅	57	209~218	0.16	KY798564
	CHES322	F: TCATTACTCTTCCCTTCCAGT ^{FAM} R: ACCTTTGTGGTTGTTCTTCTT	(CTAT) ₅	57	279~306	0.36	KY798577
组合 3 (Set 3)	CHES339	F: AAGAACAGCAAACAACACAAAC ^{FAM} R: CTTTTATTACAACCAATGCCAA	(ACC) ₈	57	239~305	0.24	KY798580
	CHES320	F: TGTGTATTAAAGGGTTGCTCTG ^{FAM} R: TCTATCCTTCTGTTGACCAATG	(CCT) ₅	57	355~364	0.24	KY798576
	CHES456	F: GCAGACATTGAGTGGGTAAAC ^{FAM} R: GAACCCATTACCTATTTATCGC	(GGT) ₆	57	426~447	0.24	KY798583
	CHES465	F: TGAGATGATGGTTATGTCGTT ^{HEX} R: AGATCGAGCTGACTCATAGAGG	(AGG) ₆	58	432~453	0.24	KY798585
组合 4 (Set 4)	CHES042	F: GGAAAAACAAGAGAAGAACAGG ^{FAM} R: CGTCAAGTATACGTCACAACC	(CCA) ₆	56	98~125	0.24	KY798561
	CHES019	F: TGTCTGAATTTCACTCCACATT ^{HEX} R: CGCCTGGATGGAAGAAGA	(CTC) ₆	58	112~118	0.16	KY798554
	CHES211	F: AGACCGATATGAGCCTAGAAAG ^{FAM} R: AGAAACAGCTATAGGTCGTGGT	(CCA) ₅	57	187~208	0.24	KY798566
	CHES345	F: TAATGAAGACCAGCATTGTTTG ^{FAM} R: TGATGGTGATGTTCTGTGC	(CAC) ₁₀	57	310~349	0.36	KY798582

注: 合成引物时用荧光基团 FAM 或者 HEX 修饰上游引物的 5'端, FAM 标记的基因扫描图峰为蓝色, HEX 标记的基因扫描图峰为绿色。
Note: The 5' ends of the upstream primers were modified with the fluorescent group FAM or HEX; The color of the FAM-labeled in gene scan was blue, and the color of the HEX-labeled gene scan was green.

1.4 数据统计分析

采用 Gene Mapper4.0 软件读取等位基因数据; 用 POPGEN 3.2 软件分析等位基因数(N_a)、有

效等位基因数(N_e)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)、香农信息指数(I); 采用 PIC_CALC 0.6 软件分析多态信息含量(PIC); 利用 Cervus 3.0 软件对

基因型数据进行亲权分析。

2 结果与分析

2.1 微卫星多重 PCR 构建

以 2015 年中华绒螯蟹养殖群体的 20 个个体的 DNA 为模板, 从 150 个微卫星位点中筛选 40 个多态性最好的位点, 将这 40 个多态性位点用

Multiplex Manager 1.0 软件模拟组合, 成功模拟组合出 10 组微卫星多重 PCR 体系。再将这 10 组多重 PCR 体系分别进行实验, 根据扩增效率分别调整引物浓度, 最终确立 4 组四重 PCR 体系, 如表 1 所示。部分中华绒螯蟹个体的微卫星多重 PCR 等位基因峰值图如图 1 所示。从图 1 可看出, 4 组多重 PCR 体系的位点均有较好的扩增效率,

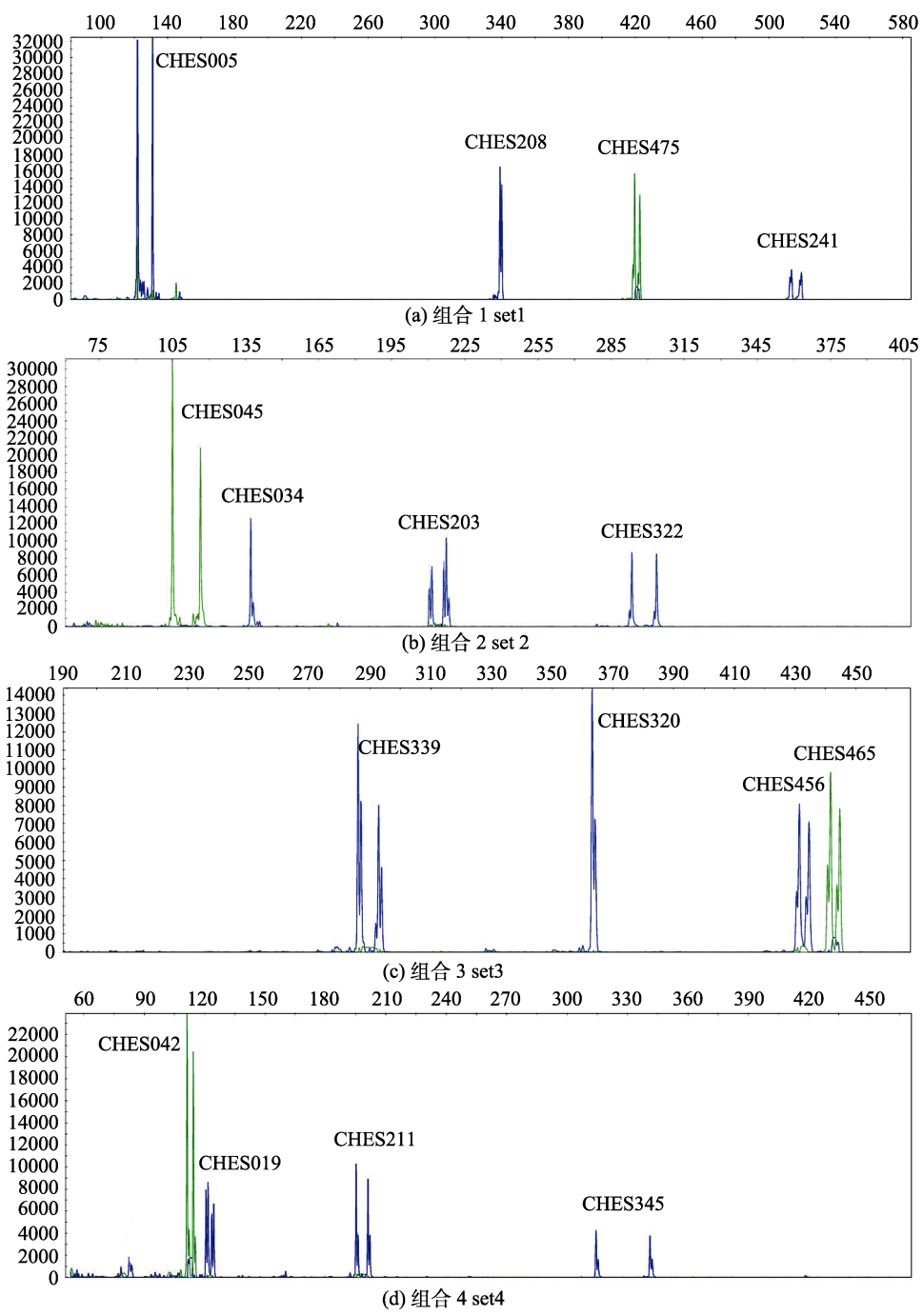


图 1 部分中华绒螯蟹个体四组多重 PCR 的基因扫描图
Fig. 1 Part of gene scan results of four sets multiplex PCR in *Eriocheir sinensis*

并且能清晰地辨别出各位点的等位基因峰值。

2.2 微卫星多重 PCR 在家系亲子鉴定中的应用

16 个微卫星位点在 3 个家系中的遗传参数如表 2 所示。等位基因数(N_a)从 5 至 14, 平均等位基因数为 9.875; 有效等位基因数(N_e)从 4.0886 到 8.3095, 平均有效等位基因数为 5.6542; 观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)范围分别为 0.297~0.9697 和 0.7592~0.8841, 平均观测杂合度为 0.8206, 平均期望杂合度为 0.8164; 香农信息指数(I)为

1.5217~2.2378, 平均香农信息指数为 1.8650; 多态信息含量(PIC)范围为 0.7198~0.8686, 平均多态信息含量为 0.7927, 各位点均为高度多态性($PIC>0.5$)。

中华绒螯蟹 3 个家系的遗传多样性参数见表 3, 长江家系的平均等位基因数(N_a)最高, 但平均期望杂合度(H_e)和观测杂合度(H_o)稍低于其他两个家系; 香农信息指数(I)体现的群体遗传多样性为辽河家系>黄河家系>长江家系, 但是差异均不显著($P>0.05$)。

表 2 微卫星位点在中华绒螯蟹 3 个家系中的遗传参数
Tab. 2 Genetic parameters of the microsatellite loci in three families of *Eriocheir sinensis*

locus	N_a	N_e	H_o	H_e	I	PIC
CHES005	10	5.3172	0.802	0.816	1.9150	0.7912
CHES028	5	4.2798	0.297	0.7702	1.5217	0.7279
CHES475	6	4.3697	0.4554	0.775	1.5738	0.7330
CHES241	12	4.8507	0.4059	0.7978	1.7948	0.7637
CHES045	15	6.1619	0.8416	0.8419	2.0278	0.8182
CHES034	11	6.0165	0.703	0.8379	1.9649	0.8179
CHES203	9	4.0886	0.8218	0.7592	1.5968	0.7198
CHES322	11	7.1384	0.7576	0.8643	2.0908	0.8472
CHES339	9	6.2891	0.7624	0.8452	1.9146	0.8204
CHES320	8	5.4372	0.701	0.8203	1.8293	0.7924
CHES456	12	5.9709	0.9368	0.8369	2.0055	0.8132
CHES465	8	5.7062	0.4574	0.8292	1.8303	0.8012
CHES042	12	6.8879	0.7525	0.8591	2.1014	0.8394
CHES019	7	4.5744	0.5644	0.7853	1.6317	0.7477
CHES211	9	5.0701	0.8812	0.8068	1.8039	0.7814
CHES345	14	8.3095	0.9697	0.8841	2.2378	0.8686
平均 mean	9.875	5.6542	0.8206	0.8164	1.8650	0.7927

注: locus – 位点; N_a – 等位基因数; N_e – 有效等位基因数; H_o – 观测杂合度; H_e – 期望杂合度; I – 香农信息指数; PIC – 多态信息含量。
Note: N_a – number of alleles; N_e – number of effective allele; H_o – observed heterozygosity; H_e – expected heterozygosity; I – Shannon Wiener index; PIC – polymorphism information content.

表 3 中华绒螯蟹 3 个家系的遗传多样性
Tab. 3 Genetic diversity statistics of *Eriocheir sinensis* for the three families

家系 family	N_a	N_e	H_o	H_e	I
LF	4.5625	2.6556	0.7385	0.6146	1.097
YF	4.875	2.4863	0.6042	0.5236	0.9675
HF	3.875	2.6412	0.7416	0.6024	1.0400

注: LF – 辽河家系; YF – 长江家系; HF – 黄河家系. N_a – 等位基因数; N_e – 有效等位基因数; H_o – 观测杂合度; H_e – 期望杂合度; I – 香农信息指数。

Note: LF – The families of Liaohe; YF – The families of Yangtze Rive; HF – The families of Yellow Rive. N_a – number of alleles; N_e – number of effective allele; H_o – observed heterozygosity; H_e – expected heterozygosity; I – Shannon Wiener index.

通过 Cervus 3.0 软件进行中华绒螯蟹 3 个家系亲子鉴定, 置信区间均设置为 95%。四组微卫星多重 PCR 体系分别用于家系亲子鉴定, 结果如表 4 所示。仅已知母本基因型时, 四组体系的亲子鉴定正确率分别从 73.68%至 96.84%; 仅已知父本基因型时, 四组体系的亲子鉴定正确率从 74.74%至 86.32%; 当双亲基因型均已知时, 四组体系的鉴定正确率从 69.47%至 85.26%。如图 2 所示, 若双亲基因型均已知, 模拟的亲子鉴定正确率均高于实际的正确鉴定率, 并且可以看出四

组微卫星多重 PCR 体系中组合 1 和组合 4 的鉴定效果最好。同时从表 4 也可以看出, 将四组多重 PCR 体系累积进行家系亲子鉴定, 使用两组多重 PCR 体系时, 亲子鉴定正确率超过 94.74%; 使用三组微卫星多重 PCR 体系时, 亲子鉴定正确率超过 98.95%, 同时使用四组微卫星多重 PCR 鉴定时, 正确鉴定率达 100%。图 3 所示, 根据单组多重 PCR 的鉴定成功率由高到低组合进行累积鉴定时, 可以看出使用 3 组多重 PCR 累积鉴定率可以达到 100%。

表 4 中华绒螯蟹不同组合位点实际的正确鉴定率
Tab. 4 The real success assignment rate of different multiplex PCR in *Eriocheir sinensis*

组合 set	已知母本基因 known mother genotype		已知父本基因型 known father genotype		已知双亲基因型 known parents genotype	
	正确数 correct number	鉴定率/% assignment rate	正确数 correct number	鉴定率/% assignment rate	正确数 correct number	鉴定率/% assignment rate
1	92	96.84	75	78.95	81	85.26
2	70	73.68	71	74.74	66	69.47
3	76	80.00	71	74.74	79	83.16
4	77	81.05	82	86.32	81	85.26
1+2	94	98.95	95	100.00	94	98.95
1+3	90	94.74	85	89.47	92	96.84
1+4	88	92.63	85	89.47	93	97.89
2+3	95	100.00	95	100.00	94	98.95
2+4	88	92.63	86	90.53	90	94.74
3+4	87	91.58	84	88.42	90	94.74
1+2+3	95	100.00	95	100.00	94	98.95
1+2+4	95	100.00	95	100.00	95	100.00
2+3+4	95	100.00	95	100.00	94	98.95
1+3+4	95	100.00	95	100.00	95	100.00
1+2+3+4	95	100.00	95	100.00	95	1.00

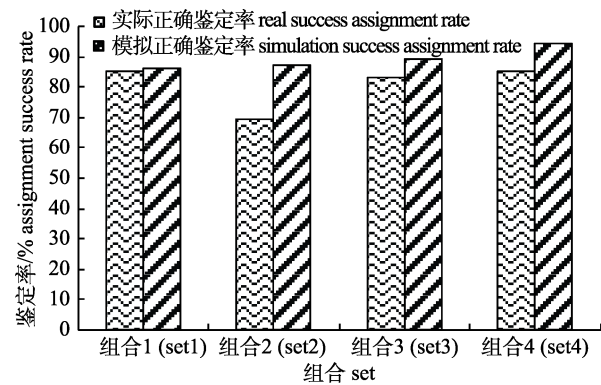


图 2 中华绒螯蟹四组微卫星多重 PCR 体系实际和模拟正确鉴定率
Fig. 2 The real success assignment rate and simulation success assignment rate of four set multiplex PCR

3 讨论

3.1 微卫星多重 PCR 体系的构建

在大量样本分析时, 构建微卫星多重 PCR 体系能够极大地减少基因分型的费用和实验操作的工作量, 虽然前期工作量比较大, 但多重体系技术一旦建立, 后期的工作效率可以提高数倍。但是微卫星多重 PCR 体系的构建并非简单的 PCR 组合累加, 而是需要保证在同一反应体系中不同的引物均能高效地特异性扩增, 需要根据目标产物, 进行全面的分析和反复实验, 因此关键技术在于反应引物的组合和条件优化, 技术难度较大^[26]。

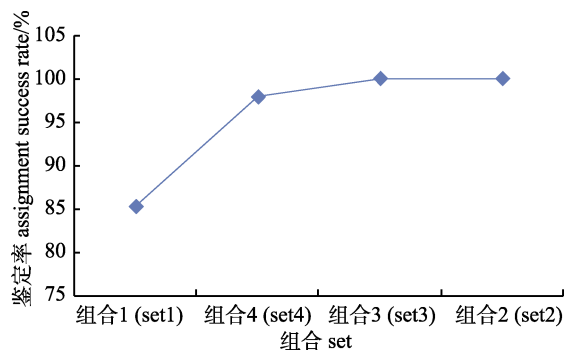


图3 已知中华绒螯蟹双亲基因型时的实际累积鉴定正确率
根据单组微卫星多重 PCR 的成功鉴定率
由高到低添加多重组合。

Fig. 3 The real cumulative success assignment rate of parents genotypes of known *Eriocheir sinensis* According to the success assignment rate of a single set of microsatellite multiple PCR, adding multiple combination from high to low.

研究表明, 多重 PCR 体系能否成功构建与引物的退火温度、片段大小、引物的相对浓度等相关^[27]。本研究中, 所用微卫星位点均为实验室自主开发的中华绒螯蟹微卫星位点, 并且挑选其中退火温度接近 55 °C 的位点, 减少退火温度对扩增的影响, 最终将扩增效率好、多态性高的位点用于多重组合。微卫星多重 PCR 体系要求同种荧光标记引物之间的片段大小不能重叠, 以免相互干扰, 造成等位基因位点读取误差。本研究中同一体系的相近引物片段间隔均大于 50 bp, 并且采用两种不同的荧光标记(FAM 和 HEX 基团)加以区分, 结合毛细管电泳检分型, 相比传统的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 能够获得更加丰富和准确的等位基因数据^[28]。对于实验中引物相对浓度的控制, 为了避免形成引物二聚体, 并且使各引物均有较好的扩增效率, 我们先用 Multiplex Manager 1.0 软件进行模拟, 挑选干扰较小的引物组合, 反复进行 PCR 扩增, 再根据 PCR 产物分型的结果分别进行引物浓度的调整, 最终获得 4 组四重 PCR, 类似的方法在先前三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)^[29]和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[30]的微卫星多重 PCR 研究中均有报道, 具有可行性。

3.2 微卫星多重 PCR 在虾蟹遗传育种中的应用

微卫星标记常被用于中华绒螯蟹遗传多样性评估, 如对不同的地理种群、野生和养殖群体间、

奇偶年中华绒螯蟹的评估等^[21, 31-32]。从表 2 可以看出, 本研究选用的 16 个微卫星标记在 3 个养殖家系中的平均观测杂合度(H_o)为 0.8206, 平均期望杂合度(H_e)为 0.8164, 高于许志强等^[33]对 4 个天然群体中华绒螯蟹遗传特征分析的平均期望杂合度(H_e) 0.7411, 同样也高于唐刘秀等^[34]对 3 个中华绒螯蟹育种基础群体遗传特征微卫星分析报道中的平均期望杂合度和平均观测杂合度。同时本研究结果显示, 平均多态信息含量为 0.7927, 各位点的 PIC 值均大于 0.5, 因此选用的微卫星标记具有高度多态性、丰富性, 显示出了较高的遗传多样性水平, 符合中华绒螯蟹的亲子鉴定要求。研究表明经过连续多代选育的家系容易出现杂合度降低, 遗传多样性下降的现象^[35]。从表 3 可以看出, 经过多代的繁殖后, 3 个家系的期望杂合度和观测杂合度略低于本课题组先前对中华绒螯蟹 2015 年养殖群体的 60 个个体遗传多样性评估的平均观测杂合度 0.7500, 平均期望杂合度 0.8925^[36], 虽然 3 个家系的遗传多样性有所下降, 但依然保持一个较高值, 这可能与这些家系没有经过高强度的人工选育有关, 也说明课题组合选育的中华绒螯蟹群体遗传多样性处于合理水平。

亲权关系分析在品种选育过程中的亲本选留、系谱信息追踪、家系遗传参数评估以及避免近交衰退等方面扮演着重要的角色^[37]。本研究采用遗传多样性丰富的 4 组共 16 个微卫星位点对 3 个家系进行亲子鉴定。由图 2 可知, 4 组微卫星多重 PCR 组合模拟的正确鉴定率均高于实际的鉴定正确率, 这可能与无效等位基因的存在、基因型统计误差等原因有关^[38], 这种现象也出现于黄喉拟水龟(*Mauremys mutica*)^[39]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[40]等水产动物的亲子鉴定研究中。由表 3 可以看出, 当使用两组的多重 PCR 组合时(8 个微卫星位点), 正确鉴定率超过 94.74%; 使用 4 组组合时(16 个微卫星位点), 能达到 100% 的正确鉴定率。在其他虾蟹研究中, 李东宇等^[30]通过构建 4 组凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 组合, 对 11 个家系进行亲子鉴定, 模拟和亲权鉴定准确率达到 100%。孔杰等^[41]利用 3 对微卫星引物构建了中国对虾的三重 PCR 体系, 并结合荧光标记引物的

基因扫描技术(genescan)对中国对虾 7 个半同胞家系和 16 个全同胞家系进行识别,结果能准确定位到各个家系。于洋^[42]开发了凡纳滨对虾 SSR 标记,并构建了 2 组微卫星多重 PCR 体系用于 8 个家系亲子鉴定,结果显示 194 个子代中的 189 个能够准确鉴定出对应的亲本,平均鉴定准确率达到 98%。研究表明,微卫星位点的多态性对于亲子鉴定亲本排除概率的效率有很大的影响,当达到同样的鉴定效果时,所需多态性高的微卫星位点数量远少于多态性低位点的数量^[43],所以微卫星位点的筛选至关重要。本研究所选用的微卫星位点,多态信息含量(PIC)范围从 0.7198 至 0.8686,平均多态信息含量为 0.7927,均为高度多态性的位点,能达到亲子鉴定的要求。由图 3 和表 3 可以看出,使用组合 1(CHES005、CHES208、CHES475、CHES241)和组合 2(CHES045、CHES034、CHES203、CHES322),或者组合 2 和组合 3(CHES339、CHES320、CHES456、CHES465)时,正确鉴定率达到 98.95%;选用组合 1、2 和组合 3 时,或者选用组合 1、3 和组合 4 时,累积正确鉴定率达到了 100%,因此表明在一定程度上,增加微卫星标记的数量可以提高家系鉴定的准确率,但当微卫星标记达到一定数量后,鉴定率处于平稳趋势,即使再增加微卫星标记的数量也不一定能提高鉴定率,反而增加成本和工作量。Lafarga-de la Cruz 等^[44]在对杂交鲍的微卫星亲子鉴定研究中也发现,最少使用 5~6 个高多态性微卫星位点时依然可以达到 9 个微卫星标记的亲子鉴定效果。所以,在中华绒螯蟹亲子鉴定中,可以选用多重组合 1、2 和组合 3,或者选用组合 1、3 和组合 4 累积进行鉴定,不但可以获得准确的系谱信息,还能减少工作量,降低成本。综上所述,本研究的 4 组微卫星多重 PCR 对于中华绒螯蟹家系的亲子鉴定具有很高的可靠性、识别性。

4 结论

本研究构建的 4 组微卫星多重 PCR 在中华绒螯蟹家系的亲子鉴定上有较高识别力,能大大提高分析效率,为中华绒螯蟹的遗传多样性评估和选择育种,尤其是家系选育提供便捷、高效的方法。

参考文献:

- [1] Department of Agriculture Fisheries Fishery Administration. Chinese Fishery Statistical Yearbook: 2016[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016: 29-30. [农业部渔业渔政管理局. 2016 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 29-30.]
- [2] He J, Wu X, Li J, et al. Comparison of the culture performance and profitability of wild-caught and captive pond-reared Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles reared in grow-out ponds: Implications for seed selection and genetic selection programs[J]. Aquaculture, 2014, 434: 48-56.
- [3] Liu Y X, Sun Z H, Wang Y F, et al. Parentage determination in Japanese flounder (*paralichthys olivaceus*) families by microsatellite DNA marker analysis[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(11): 1593-1603. [刘永新, 孙朝徽, 王玉芬, 等. 牙鲆家系亲权鉴定的微卫星 DNA 标记分析[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1593-1603.]
- [4] 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[J]. 遗传, 2006, 28(2): 179-183.]
- [5] Waaijenborg S, Verselewele de Wiff Hamer P C, Zwinderman A H. Quantifying the association between gene expressions and DNA-markers by penalized canonical correlation analysis[J]. Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology, 2008, 7(1): Article 3.
- [6] Lu X, Wang H, Liu B, et al. Three EST-SSR markers associated with QTL for the growth of the clam *Meretrix meretrix*, revealed by selective genotyping[J]. Marine Biotechnology, 2013, 15(1): 16-25.
- [7] Castro J, Pino A, Hermida M, et al. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. Aquaculture, 2007, 272: S210-S216.
- [8] 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.
- [9] Neff B D, Fu P, Gross M R. Microsatellite multiplexing in fish[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2000, 129(2): 584-593.
- [10] Yang Y Q. Rapid diagnosis of systematic fungal infections based on multiplex PCR and microsatellite PCR[D]. Changchun: Jilin University, 2007: 39-70. [杨艳秋. 多重 PCR 及微卫星标记技术用于深部病原真菌感染的快速诊断[D]. 长春:

- 吉林大学, 2007: 39-70.]
- [11] Huang L G, Wang X L, Ou J T, et al. Genetic analysis of 32 microsatellite loci in 13 families of Wuzhishan pig by multiplex PCR and gene scanning technique[J]. *Hereditas*, 2005, 27(1): 70-74. [黄礼光, 王希龙, 欧江涛, 等. 应用多重 PCR 和基因扫描技术对五指山猪 13 个家系 32 个微卫星基因座的遗传分析[J]. *遗传*, 2005, 27(1): 70-74.]
- [12] Leonarduzzi C, Spanu I, Labriola M, et al. Development and characterization of three highly informative EST-SSR multiplexes for *Pinus halepensis* mill. and their transferability to other Mediterranean pines[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, 34(5): 993-1002.
- [13] Porta J, Porta J M, Martb́inez-Rodŕguez G, et al. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management[J]. *Aquaculture*, 2006, 256(1-4): 159-166.
- [14] Ren X Y, Liu P, Li J, et al. Establishment and optimization of a microsatellite-labeling multiplex PCR system in *Portunus trituberculatus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(3): 76-83. [任宪云, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹微卫星多重 PCR 技术建立及条件的优化[J]. *渔业科学进展*, 2011, 32(3): 76-83.]
- [15] Lee H J, Lee D H, Yoon S J, et al. Characterization of 20 microsatellite loci by multiplex PCR in swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. *Genes & Genomics*, 2013, 35(1): 77-85.
- [16] Wang Y, Wang X Y, Wang A M, et al. A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin)[J]. *Aquaculture*, 2010, 308(S1): S28-S33.
- [17] Li Y T, 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(1-4): 279-288.
- [18] Li W Y, Wang W J, Kong J, et al. Establishment of the microsatellite quadruple PCR technology for *Fenneropenaeus chinense* and its application in the evaluation on the effect of releasing simulation[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2012, 34(5): 213-220. [李伟亚, 王伟继, 孔杰, 等. 中国对虾微卫星四重 PCR 技术的建立及其在模拟放流效果评估方面的应用[J]. *海洋学报(中文版)*, 2012, 34(5): 213-220.]
- [19] Xiong L W, Wang Q, Qiu G F. Large-scale isolation of microsatellites from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* via a solexa genomic survey[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(12): 16333-16345.
- [20] Hānfling B, Weetman D. Characterization of microsatellite loci for the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3(1): 15-17.
- [21] Liu Q, Liu H, Wu X G, et al. Genetic variation of wild and cultured populations of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* from the Yangtze, Huanghe, and Liaohe River basins using microsatellite marker[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 958-968. [刘青, 刘皓, 吴旭干, 等. 长江、黄河和辽河水系中华绒螯蟹野生和养殖群体遗传变异的微卫星分析[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 958-968.]
- [22] Xiong L W, Li Z, Ma K Y, et al. Analysis of genetic diversity in cultured populations of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by microsatellite markers[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(12): 1441-1448. [熊良伟, 李真, 马克异, 等. 利用微卫星 DNA 分子标记分析中华绒螯蟹养殖群体遗传分化[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(12): 1441-1448.]
- [23] Qiu G F, Xiong L W, Liu Z Q, et al. A first generation microsatellite-based linkage map of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*, and its application in quantitative trait loci (QTL) detection[J]. *Aquaculture*, 2016, 451: 223-231.
- [24] Liu H, Liu Q, Wu X G, et al. Comparative study on extraction of genome DNA from different tissues of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by dissimilar methods[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(24): 147-150. [刘皓, 刘青, 吴旭干, 等. 不同提取方法和不同组织对中华绒螯蟹 DNA 提取效果的比较研究[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(24): 147-150.]
- [25] Holleley C E, Geerts P G. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR[J]. *BioTechniques*, 2009, 46(7): 511-517.
- [26] 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[J]. *武汉理工大学学报*, 2005, 27(10): 33-36.]
- [27] Rithidech K N, Dunn J J, Gordon C R. Combining multiplex and touchdown PCR to screen murine microsatellite polymorphisms[J]. *BioTechniques*, 1997, 23(1): 40-44.
- [28] Liu H, Liu Q, Wu X G, et al. Comparison of two detection systems of microsatellite markers in the research of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Journal of Biology*, 2015, 32(1): 90-94. [刘皓, 刘青, 吴旭干, 等. 中华绒螯蟹两种微卫星 DNA 分型方法的应用比较[J]. *生物学杂志*, 2015,

- 32(1): 90-94.]
- [29] Yin H, Bai Z Y, Han X K, et al. The development and application of multiplex PCR panels of microsatellites in *Hyriopsis cumingii*[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(1): 156-162. [殷浩, 白志毅, 韩学凯, 等. 三角帆蚌微卫星多重 PCR 体系的建立及其应用[J]. 生物技术通报, 2016, 32(1): 156-162.]
- [30] Li D Y, Kong J, Meng X H, et al. Development of multiplex PCR systems of microsatellite markers for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its application for parentage identification[J]. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(3): 58-67. [李东宇, 孔杰, 孟宪红, 等. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 微卫星多重 PCR 体系的建立及其在家系亲权鉴定中的应用[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(3): 58-67.]
- [31] Pan J L, Mu D K, Hao S, et al. Microsatellite DNA polymorphism analysis of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* from two geographic populations[J]. Journal of Nanjing University: Natural Science, 2006, 42(5): 457-462. [潘建林, 牟大凯, 郝莎, 等. 中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* 两个地理种群的微卫星 DNA 多态性分析[J]. 南京大学学报: 自然科学, 2006, 42(5): 457-462.]
- [32] Wang Z Q, Huang S, Mao H C, et al. Genetic differentiation analysis of the even and odd year populations of Chinese mitten crab[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(5): 657-664. [王中清, 黄姝, 茅海成, 等. 中华绒螯蟹奇、偶年天然群体的遗传差异分析[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(5): 657-664.]
- [33] Xu Z Q, Ge J C, Li Y H, et al. The population genetic structure analysis on four stocks of *Eriocheir sinensis* from different water systems using microsatellite markers[J]. Journal of Nanjing University: Natural Science, 2011, 47 (1): 82-90. [许志强, 葛家春, 李跃华, 等. 四水系中华绒螯蟹天然群体遗传特征的微卫星标记分析[J]. 南京大学学报: 自然科学, 2011, 47(1): 82-90.]
- [34] Tang L X, Xu Z Q, Ge J C, et al. Microsatellite analysis on the genetic structure of three breeding stocks of *Eriocheir Sinensis*[J]. Journal of Nanjing Normal University: Natural Science Edition, 2013, 36(2): 84-90. [唐刘秀, 许志强, 葛家春, 等. 中华绒螯蟹 3 个育种基础群体遗传特征的微卫星分析[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2013, 36(2): 84-90.]
- [35] Lind C E, Evans B S, Knaure J, et al. Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*)[J]. Aquaculture, 2009, 286(1-2): 12-19.
- [36] Xiao Q Z, Liu Q, Wu X G, et al. Genetic diversity analysis of wild and culture megalopa population of *Eriocheir sinensis* from Yangtze River[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(5): 1935-1945. [肖起珍, 刘青, 吴旭干, 等. 长江水系中华绒螯蟹野生和人工繁殖大眼幼体的遗传多样性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(5): 1935-1945.]
- [37] Zhang B, Song W P. Recent progress 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 在水生动物亲权分析中的研究进展[J]. 海洋渔业, 2012, 34(3): 350-356.]
- [38] Dakin E E, Avise J C. Microsatellite null alleles in parentage analysis[J]. Heredity, 2004, 93(5): 504-509.
- [39] Wen P, Zhao J, Li W, et al. The parentage assignment of *Mauremys mutica* using multiplex PCR of microsatellites[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(6): 1134-1141. [文萍, 赵建, 李伟, 等. 基于微卫星多重 PCR 技术的黄喉拟水龟亲子鉴定[J]. 水生生物学报, 2015, 39(6): 1134-1141.]
- [40] Li R H, Li Q, Cornette F, et al. Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment[J]. Aquaculture, 2010, 310(1-2): 234-239.
- [41] Kong J, Gao H, Yu F, et al. Parentage identification of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) using microsatellite-based triplex PCR genescan technology[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1): 59-66. [孔杰, 高焕, 于飞, 等. 微卫星三重 PCR 基因扫描技术在中国明对虾家系标识中的应用[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 59-66.]
- [42] Yu Y. Development of molecular markers and their applications in selective breeding of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2014: 45-56. [于洋. 凡纳滨对虾分子标记的开发及其在遗传育种中的应用[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2014: 45-56.]
- [43] Zhou L, Chu Q, Liu L, et al. Simulation study on paternity identification in dairy cattle with microsatellite and SNP markers[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2011, 42(2): 169-176. [周磊, 初芹, 刘林, 等. 利用微卫星和 SNP 标记信息进行奶牛亲子鉴定的模拟研究[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(2): 169-176.]
- [44] Lafarge-de la Cruz F, Aguilar-Espinoza A, Gallardo-Escárate C. Parentage assignment in hybrid abalones (*Haliotis rufescens* × *Haliotis discus hannai*) based on microsatellite DNA markers[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(1): 216-225.

Development and application of multiplex PCR panels of microsatellites in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

XIAO Qizhen¹, LIU Qing¹, LI Qingqing¹, ZHENG Haidi², WU Xugan¹, CHENG Yongxu^{1,3}

1. Key Laboratory of Freshwater Aquaculture Genetic Resources, Ministry of Agriculture; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Zhejiang Aoling Aquatic Seed Industry Technology Co., Changxing 313106, China;
3. Collaborative Innovation Center of Aquatic Animal Breeding Center Certified by the Shanghai Municipal Education Commission; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In order to increase the analysis efficiency of microsatellites in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), we report four highly informative, multiplex PCR panels developed from 16 microsatellite markers. The multiplex PCR panels were used to evaluate the genetic diversities and parentage assignment for 95 individuals in 3 families. The results showed that the 16 microsatellite markers screened in this study were rich in polymorphism, for example the average of observed heterozygosity (H_o) was 0.8206, the average of expected heterozygosity (H_e) was 0.8164, and the average of polymorphism information content (PIC) was 0.7927. Cervus 3.0 software was used to determine parentage assignment for 95 individuals in 3 families, and the results revealed that the accuracy of parentage assignment using any 2 groups of multiplex PCR panels was more than 94.74%. When using any 3 groups of multiplex PCR panels, the accuracy of parentage assignment was greater than 98.95%. The accuracy of parentage assignment was greater than 100% using all four multiplex assays. Using the combination of set 1, set 2, and set 3, or the combination of set 1, set 3, and set 4, the accuracy of parentage assignment also reached 100%, so the selection of these combinations of multiplex PCR panels can not only get accurate genealogy information, but also reduce workload and costs. Therefore, these multiplex PCR panels can provide a convenient and efficient way for breeding and family management of *E. sinensis*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; microsatellites; multiplex PCR; parentage assignment

Corresponding author: WU Xugan. E-mail: xgwu@shou.edu.cn