

doi: 10.7541/2021.2019.255

基于微卫星标记的斑点叉尾鲷家系鉴定技术及应用

张世勇^{1,2} 刘洪岩¹ 王江^{1,3} 邵俊杰¹ 王明华^{1,2*}
钟立强^{1,2} 陈校辉^{1,2*} 边文冀^{1,2}

(1. 江苏省淡水水产研究所, 南京 210017; 2. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 南京 210014;
3. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: 研究旨在建立准确、高效且经济的斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)家系亲缘鉴定体系, 以期为斑点叉尾鲷的遗传评估及家系育种提供科学依据。选用10对具有较高多态性SSR标记, 建立两个5重PCR反应体系。应用建立的斑点叉尾鲷家系亲缘鉴定体系对来源于13个全同胞家系和8个半同胞家系的333尾个体进行亲权鉴定。结果表明: 10个位点平均等位基因数为9.8、平均观测杂合度0.8591、平均期望杂合度0.8092、平均多态信息含量0.7845; 3种情况下的累积排除概率分别为: 0.99996806、0.99833267和0.99999998; 验证群体的鉴定结果与系谱高度一致, 真实鉴定率达到99.1%, 子代与父母本三者之间配对平均LOD值介于13.30—24.70, 且置信度均达到95%。研究选择的微卫星位点等位基因数目较多, 多态性较高, 可以快速、准确地对斑点叉尾鲷混养群体进行家系鉴定。

关键词: 斑点叉尾鲷; 微卫星; 多重PCR; 家系鉴定; 遗传育种

中图分类号: S965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2021)02-0327-07



斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)亦称美洲鲶、沟鲶, 属于鲶形目, 鲶科, 原产于美国, 是北美地区重要的水产经济物种^[1]。因其具有肉质细嫩, 营养丰富, 出肉率高, 没有肌间刺等优点, 深受广大消费者欢迎。自20世纪80年代引入我国以来, 得到了快速发展, 我国斑点叉尾鲷养殖区域已遍布全国27个省(市、自治区)^[2]。我国斑点叉尾鲷产量约占世界总产量一半以上, 已成为世界上最重要的斑点叉尾鲷生产、出口和消费国家^[3]。随着我国斑点叉尾鲷养殖规模的扩大及美国对华种质供应限制力度的加大, 我国养殖斑点叉尾鲷出现了明显的生长减慢、规格不齐和病害频发等种质衰退的现象, 严重影响了斑点叉尾鲷的产品品质、产量和养殖效益^[4]。因此, 开展斑点叉尾鲷品种改良工作, 培育经济性状好和抗逆性强的斑点叉尾鲷新品种已成为当前斑点叉尾鲷产业可持续

发展亟待解决的重要问题。

在鱼类家系遗传育种研究中, 准确的系谱信息对于遗传力和育种值的计算, 及育种方案的制定具有至关重要的作用^[5]。在传统的选育过程中, 不同家系主要通过物理隔离的方式分开养殖, 等到子代个体长到较大规格时再采用注射荧光染料或电子标记等方式进行家系身份识别^[6]。对不同家系采取水泥池和网箱隔离养殖的方式, 不仅管理难度大, 更为关键的是不同家系之间在环境因子上会存在差异, 不同的环境因素会使育种相关的遗传参数估计产生偏差, 不能准确反映选育效果^[7]。

微卫星(Simple Sequence Repeats, SSR)和SNP(Single Nucleotide Polymorphism)等分子标记的出现使得混养水产动物亲子关系的鉴定成为可能^[8]。而且, 微卫星标记具有多态性高、稳定性强、特异性高和共显性遗传等优点, 相较于SNP标记仅需少

收稿日期: 2019-11-27; 修订日期: 2020-10-14

基金项目: 江苏省现代农业产业技术体系建设项目(JATS[2020]369); 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-46); 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201741); 江苏省自然科学基金(BK20191487)资助 [Supported by the Earmarked Fund for Jiangsu Agricultural Industry Technology System (JATS[2020]369); China Agriculture Research System (CARS-46); Major Project for New Cultivar Breeding of Jiangsu Province (PZCZ201741); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20191487)]

作者简介: 张世勇, 男, 博士, 助理研究员; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: shiyongzhang@hotmail.com

通信作者: 王明华, E-mail: wangminghua18@sina.com; 陈校辉, E-mail: cxiaohui416@hotmail.com *共同通信作者

量多态性位点即可达到家系亲缘关系鉴定的目的^[9],以微卫星分型为基础的亲子鉴定技术是目前水产动物系谱确认中应用最广泛、结果最可靠的手段之一。众多研究表明微卫星标记在确认水产动物父母本和分析家系关系方面具有重要的应用价值^[10-15]。因此,开发出一套基于微卫星分子标记的快速、准确且经济的斑点叉尾鲷家系亲缘鉴定体系对其育种工作的开展具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2008年使用1997—2004年从美国引进德克萨斯(1997)群体、阿肯色(1999)群体、密西西比(2001)群体、阿肯色(2003)群体和阿肯色(2004)群体共405尾斑点叉尾鲷建立育种基础群体,利用基础群体进行G₀代家系构建。2011年6月选用G₀代亲本构建50个G₁代家系。2015年6月选用G₁代选育群体作为亲本构建100个G₂代家系。剪取用于繁殖亲本的尾鳍鳍条,储存在95%的酒精内,-20℃保存。斑点叉尾鲷交配产卵后,每个家系卵块独立孵化,待鱼苗孵出15d后,从21个家系(其中全同胞家系13个,半同胞家系8个)随机选取500尾鱼苗于面积为0.1 hm²的池塘中混合养殖。在养殖12个月后,随机选取333尾G₂代斑点叉尾鲷个体,剪取小块尾鳍组织,95%酒精保存,-20℃保存。

1.2 基因组DNA提取

剪取每个待测斑点叉尾鲷亲本和子代尾鳍样品约25 mg,用液氮研磨成粉末,转移到1.5 mL 离心管中。先后加入450 μL STE DNA抽提缓冲液

(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)、35 μL SDS (10%),最后加入15 μL蛋白酶K (0.2%)颠倒混匀。加入RnaseA 1 μL,置于水浴锅55℃温浴1h。加入等体积(约700 μL) Tris饱和酚,在DNA混合仪上振荡混匀,4℃下12000 r/min离心10min,结束后使用移液枪将上清液转移入另一个干净的离心管中。在上清液中加入等体积酚仿醇混合物(酚:氯仿:异戊醇比例为25:24:1),置于DNA混合仪上振荡混匀15min。在上清液中加入等体积氯仿约500 μL,置于DNA混合仪上振荡混匀15min。在上清液中加入-20℃预冷的无水乙醇1 mL沉淀DNA,离心机12000 r/min离心5min后弃上清液。先加入70%乙醇洗涤两次,再加入无水乙醇洗涤一次,干燥后加入200 μL TE,溶解充分。使用NanoDrop ND-1000分光光度仪(美国Nanodrop公司)检测基因组DNA浓度和质量,并将各DNA样品稀释成100 ng/μL的工作液。

1.3 多态性微卫星标记筛选和反应体系优化

从已发表的斑点叉尾鲷文献中选取10个具有较高多态性微卫星位点^[16],根据微卫星标记两端序列设计适于多重PCR扩增引物,正向引物5'端作相应的荧光标记(表1)。建立2个多重PCR进行扩增,每个多重PCR包含5组微卫星引物,引物如表1所示。经优化的PCR反应体系为20 μL: 2×Taq Master Mix (Vazyme), 10 μL; 基因组DNA, 1 μL; 10P上下游引物, 0.25 μL; ddH₂O, 6.5 μL。多重PCR扩增反应在Eppendorf Mastercycler nexus PCR仪上进行,扩增条件为: 94℃预变性5min; 94℃变性30s, 58—51℃(每个循环减1℃)退火30s, 72℃延伸60s,

表1 用微卫星位点及引物信息

Tab. 1 The information of microsatellite markers and their primers

位点 Loci	引物序列 Primer sequence (5'-3')	重复单元 Repeat unit	退火温度 <i>T_m</i> (°C)	片段大小 Size (bp)	荧光标记 Fluorescence label
IP1	TGCTTAGGGTAAGTCAGTTATAG AAATCCATATTACCCGGGTGTG	(ATT) <i>n</i>	51	107—146	FAM
IP14	GTACCACTGGTCAGTATCTCC GTCACACCATCACCAGAGTCC	(TTA) <i>n</i>	56	146—203	HEX
IP11	GCAGGTCTGTCGTCATCTAC AACTGTCATTTACACACATTC	(TAA) <i>n</i>	54	228—249	FAM
IP16	CCTCTGCAGAACCATCTCTAAAC GCATAAACGTCTGTAGCTCTATAG	(ACAA) <i>n</i> (AATT) <i>n</i>	57	298—342	HEX
IP4	GGGTGTCCACTACCTTGTGCCCC CACGTTTCAGGCCAATACAACAC	(ATT) <i>n</i>	60	369—408	FAM
IP13	GAAACCATTTCATGGACCCATC GTGCCTGTAAGTACATCTGC	(CCAT) <i>n</i> (CTAT) <i>n</i>	55	105—133	FAM
IP18	GGTTTTACTTCCTCATACAGCAC CAAGAGACCTGTGACATCGCAGT	(TTC) <i>n</i>	57	141—189	HEX
IP19	TGAGTACAGCGCTTTGAGAATC CCACAGGGTTTAGGGCATCA	(TTA) <i>n</i>	57	215—245	FAM
IP20	AACCACTAAGCCTAGCACGTTT AGTATGGGTACTGCAACAAAAC	(ATAG) <i>n</i>	57	293—325	HEX
IP12	ATTTGGTGGAGAATACAGGTAGC TGCTTTTACCACATCAGAAGACC	(ATT) <i>n</i>	58	340—361	FAM

9个循环; 94℃变性30s, 55℃退火30s, 72℃延伸60s, 15个循环; 94℃变性30s, 50℃退火30s, 72℃延伸60s, 15个循环; 72℃延伸10min。

1.4 微卫星位点基因分型

在PCR反应结束后, 取3 μL 扩增产物样品加入到ABI 3730 XL遗传分析系统(美国ABI公司)配置的96孔板内, 每个孔内加入0.5 μL 的GeneScan™ 350ROXTM标准片段(美国ABI公司), 另外在每个孔内加入6.5 μL 的Hi-Di™ 甲酰胺(美国ABI公司), 将96孔板放入PCR仪器内于95℃变性10min, 变性后立即置于冰上, 并上样到ABI 3730XL遗传分析系统, 或者用铝箔纸包好后放入-20℃保存待后续上机分析。待ABI 3730 XL遗传分析系统毛细管电泳结束后, 导出电泳图谱文件, 使用GeneMarker v2.2.0软件读取每个斑点叉尾鲷亲本和子代在各微卫星位点的基因型。

1.5 数据分析

采用Popgene 3.2软件对基因分型数据进行等位基因频率(Alele frequency)、观测杂合度(Observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(Expected heterozygosity, H_e)、多态信息含量(Polymorphic information content, PIC)及无效等位基因频率(Null allele frequency)等参数分析。使用Genepop 4.2.1软件进行Hardy-Weinberg平衡检验。GenAlEx 6.51软件计算每个微卫星位点双亲基因型已知时的估计排除概率(PE-1)、已知一个亲本基因型时的估计排除概率(PE-2)以及候选父母双方和子代基因型已知, 排除父母双方的概率(PE-3)及其相应的累积排除率。最后, 使用CERVUS 3.0软件进行模拟分析以及亲子鉴定分析。通过似然率(Likelihood, LOD)检验待测个体与亲本基因型之间的关联性, 并在

95%置信水平下, 确定待测个体与候选亲本之间的亲子关系。

2 结果

2.1 微卫星标记的分型研究

本研究根据10个微卫星标记扩增产物范围将其分为两组进行多重PCR扩增, 具体分组情况为: 第一组(IP1、IP14、IP11、IP16、IP14)、第二组(IP13、IP18、IP19、IP20、IP12)。多重PCR扩增产物经ABI 3730XL遗传分析系统进行毛细管电泳后, 使用GeneMarker v2.2.0软件读取每个斑点叉尾鲷亲本和子代个体在10个微卫星位点的基因型。图1为第一组多重PCR体系, 每个微卫星标记正向扩增引物的5'端间隔采用FAM和HEX荧光基团进行标记, 采用此标记方法可以清晰地辨别每个位点的扩增片段及大小。

2.2 微卫星标记的多态性分析

从表2中可以看出, 通过检测微卫星标记在待测21个家系中的遗传多样性, 发现10个位点均具有较高多态性: 等位基因数(N_a)在6—16个, 观察杂合度(H_o)在0.748—0.952, 期望杂合度(H_e)在0.678—0.880, 各位点的多态信息含量(PIC)在0.647—0.868, 无效等位基因频率在-0.0735—0.0316, 说明这10个微卫星标记在斑点叉尾鲷亲子鉴定中具有较高的使用价值。在待测21个家系中平均等位基因数均为9.8, 平均观测杂合度、平均期望杂合度、平均多态信息含量依次分别为0.8591、0.8092和0.7845。除位点IP1外, 均显著偏离Hardy-Weinberg平衡。

2.3 排除率和累积排除率

使用GenAlEx 6.51软件计算排除率与累积排

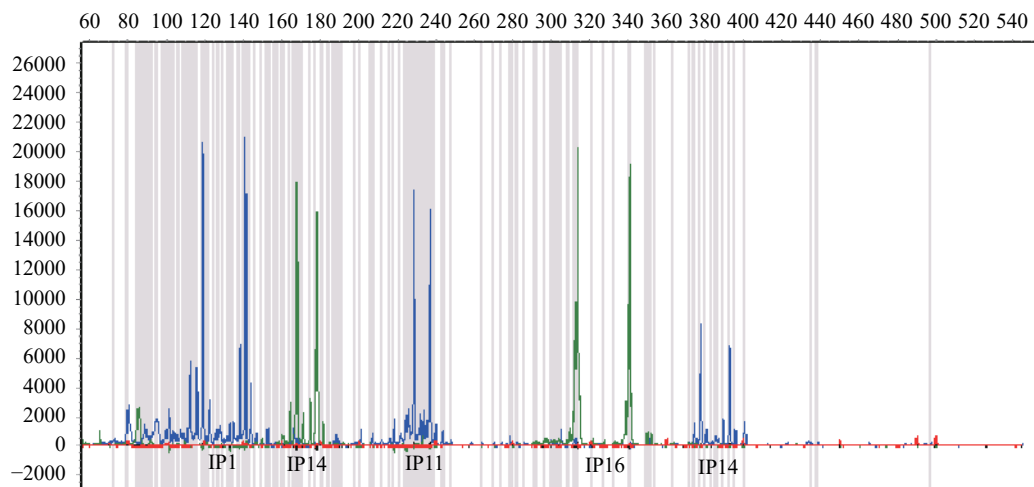


图1 微卫星标记分型图

Fig. 1 Genotyping of microsatellite markers

除率, 结果如表 3 所示。每个微卫星位点双亲基因型已知时的估计排除概率(PE-1)、已知一个亲本基因型时的估计排除概率(PE-2)及候选父母双方和子代基因型已知, 排除父母双方的概率(PE-3)均与多态性信息含量成正比, 其中位点IP1各排除率均最高, 分别为0.76、0.61和0.91, 而位点IP13各排除率均最低, 分别为0.47、0.28和0.67。10个微卫星位点的累积排除概率CPE-1、CPE-2和CPE-3分别为0.99996806、0.99833267和0.99999998。随着微卫星位点数目的增多, 排除率也随之增大, 且每种排

除概率均趋于饱和。

2.4 亲子鉴定结果分析

从G₂世代育种群体中随机选择13个全同胞家系和8个半同胞家系子代幼鱼混合养殖后, 从群体中随机选取333尾子代, 通过对333尾子代、38尾目标亲本和9尾干扰亲本在10个微卫星位点分型结果(表 4), 应用似然法鉴定它们之间的亲子关系。每个家系子代与父本平均配对LOD值在4.22—11.70, 子代与母本平均配对LOD值在5.59—10.20, 子代与父母本三者之间配对LOD值在13.30—24.70。最

表 2 10对微卫星标记在21个家系中的遗传参数

Tab. 2 Genetic parameters of 10 microsatellite loci in 21 families0

位点 Loci	等位基因数 N_a	检测个体数 K	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	哈迪温伯格 平衡HWE	无效等位 基因频 F (Null)
IP1	12	333	0.904	0.880	0.868	NS	-0.0136
IP14	14	331	0.906	0.837	0.817	**	-0.0398
IP11	8	332	0.771	0.814	0.791	**	0.0316
IP16	8	333	0.901	0.843	0.821	**	-0.0340
IP4	16	332	0.952	0.868	0.854	**	-0.0495
IP13	6	329	0.748	0.678	0.647	**	-0.0735
IP18	10	330	0.797	0.832	0.809	**	0.0238
IP19	10	328	0.863	0.778	0.744	**	-0.0559
IP20	7	333	0.820	0.798	0.767	**	-0.0177
IP12	7	333	0.841	0.763	0.726	*	-0.0516
Mean	9.8	331.4	0.860	0.8092	0.7845	—	-0.0280

注: 哈迪温伯格平衡检验, *代表显著偏离, **代表极显著偏离, NS代表不显著

Note: N_a . Number of alleles at the locus; K : Number of individuals typed at the locus; H_o . Observed heterozygosity; H_e . Expected heterozygosity; PIC . Polymorphic information content; F (Null). Estimated null allele frequency; NS indicates not significant, * indicates significant at the 0.1 level, ** indicates significant at the 0.001 level

表 3 10对微卫星标记的排除率统计表

Tab. 3 Combined exclusion probability and exclusion probability of 10 loci

位点 Loci	排除概率 P1PE-1	排除概率 P2PE-2	排除概率 P3PE-3	累积排除概率1 CPE-1	累积排除概率2 CPE-2	累积排除概率3 CPE-3
IP1	0.76	0.61	0.91	0.75996908	0.61138479	0.91316733
IP14	0.68	0.51	0.86	0.92346786	0.81069284	0.98763801
IP11	0.64	0.47	0.83	0.97255036	0.89876528	0.99784154
IP16	0.68	0.51	0.85	0.99120523	0.95037470	0.99967548
IP4	0.74	0.58	0.90	0.99770319	0.97937292	0.99996751
IP13	0.47	0.28	0.67	0.99877954	0.98520305	0.99998937
IP18	0.66	0.49	0.84	0.99958920	0.99248011	0.99999828
IP19	0.57	0.39	0.76	0.99982360	0.99543088	0.99999958
IP20	0.60	0.42	0.78	0.99992939	0.99735519	0.99999991
IP12	0.55	0.37	0.73	0.99996806	0.99833267	0.99999998

注: PE-1. 双亲基因型已知时的估计排除概率; PE-2. 已知一个亲本基因型时的估计排除概率; PE-3. 候选父母双方和子代基因型已知, 排除父母双方的概率; CPE-1. 双亲基因型已知时的累积排除概率; CPE-2. 已知一个亲本基因型时的累积排除概率; CPE-3. 候选父母双方和子代基因型已知, 排除父母双方的累积概率

Note: PE-1. Estimates the probability of exclusion when the genotypes of both parents are known; PE-2. Estimates the probability of exclusion when the genotypes of only one parent is known; PE-3. Estimates the probability of excluding two putative parents. CPE-1. Combined probability of exclusion when the genotypes of both parents are known; CPE-2. Combined probability of exclusion when the genotypes of only one parent is known; CPE-3. Combined probability of exclusion two putative parents

终, 根据LOD值大小将子代与候选父母进行匹配, 最终331尾子代在21个家系中找到了对应的候选父母本, 对应结果符合家系交配原则, 仅2尾个体与候选亲本配对LOD值小于0, 此外存在1尾子代与2个候选母本配对的情况。结果表明该斑点叉尾鲷家系鉴定方案鉴定准确率达到99.10%。

3 讨论

在鱼类家系育种中掌握准确的系谱信息对于遗传参数估计和育种方案制定具有关键性的作用, 因此必须选择合适的标记以正确掌握系谱信息。本研究选择的10个微卫星标记在21个斑点叉尾鲷家系群体中均具有较高的多态性, *PIC*值介于0.647—0.868, 而说明这10个微卫星位点能提供较为丰富的遗传变异信息。研究将10个微卫星标记根据其扩增产物大小分成2组建立2个5重PCR扩增体系, 大大减少了PCR反应和毛细管电泳上样过程中的工作量, 显著提高了工作效率。随着多重PCR反应中引物的增加, 对PCR反应的灵敏性和特异性均会带来不小的挑战, 以往大多数亲缘关系鉴定类研究通常采用低重PCR反应或者单独PCR后再混合上样的策略^[17]。本文对筛选的微卫星位点

分别进行了引物和反应体系优化。引物优化主要通过对各微卫星位点在基因组上定位再设计适合开展多重PCR反应的引物; 反应体系优化则是通过选用适合多重PCR反应的商品试剂, 再结合Touch-down PCR反应得以实现。

基于似然法的亲子鉴定主要是通过建立似然函数, 应用假设检验的方法在所有候选亲本中找到最似父/母本。其计算过程是将每个微卫星位点的似然比累加后求自然对数值得到配对LOD值。当LOD值等于0认为候选父/母本与群体中随机父/母本成为子代真实父亲的可能性相同; 当LOD值小于0认为候选父/母本不可能为子代的真实父/母亲; LOD大于0认为候选父/母本是子代的真实父/母亲, LOD值越大, 可靠性越高^[15]。根据CERVUS软件计算的LOD值, 当所有的微卫星座位全部匹配, 并符合亲本交配原则时, 330尾斑点叉尾鲷子代个体确认所属家系, 真实鉴定率达99.1%, 且置信度均达到95%。3尾没有被准确鉴定到家系的个体很可能是因为在基因分型时没有准确读取其基因型数据, 或是混养家系中渗入其他家系子代。准确的基因分型是亲缘关系鉴定成功的关键, O'Reilly等^[18]发现平均每个基因座位往往存在2%—3%的基因分型错

表 4 10个微卫星标记亲子鉴定结果
Tab. 4 Paternity test results of ten microsatellite markers

家系 Family	子代个数 Offspring number	父本 Sire	平均两点配对LOD值 Average pair LOD	母本 Dam	平均两点配对LOD值 Average pair LOD	平均三点配对LOD值 Average trio LOD
27-2	9	P7	8.97	P6	9.88	22.68
11-2	28	P10	4.22	P9	9.08	16.97
20-1	19	P13	10.20	P12	9.34	23.62
15-1	11	P18	8.89	P16	8.66	18.94
14-2	10	P20	10.70	P19	8.17	24.40
K10-2	11	P28	6.42	P27	7.36	19.00
K10-1	31	P29	7.13	P27	7.80	20.80
K7-2	10	P31	6.06	P30	5.00	13.30
K6-1	8	P40	11.70	P39	7.56	24.70
25-1	22	P43	8.08	P42	10.20	22.40
10-2	15	P50	6.71	P49	7.04	18.40
2-2	7	P61	6.70	P60	6.23	18.17
2-1	23	P62	6.10	P60	6.64	16.86
K3-1	25	P64	5.85	P63	5.61	15.90
K3-2	13	P65	6.28	P63	5.68	16.60
8-2	8	P72	11.10	P71	7.87	24.05
9-1	19	P75	6.52	P74	6.01	16.64
1-2	22	P77	7.24	P76	7.17	17.68
K1-2	16	P83	7.94	P81	6.74	17.87
3-1	15	P85	5.07	P84	5.50	14.62
3-2	8	P86	7.42	P84	5.57	17.13

误而无法达到100%的准确率。因此,为了提高鉴定的准确性,除了选择多态性高的微卫星标记外,尽量选择三、四碱基重复型标记。此外,还需要严把基因分型关口,必要时可以采用人工辅助计算机对分型数据进行判读。

有效鉴定亲本数目是衡量微卫星标记鉴别能力的重要指标。通常,随着微卫星位点数目的增加,累积排除概率逐渐增大;相同数量的微卫星标记数目,多态信息含量大的微卫星组合具有更高的累积排除概率。吕洋^[19]使用不同微卫星位点数量模拟鉴别青虾亲本数量的研究表明,5个微卫星标记(平均等位基因5个)可以对10个已知性别的候选亲本和5个未知性别候选亲本进行有效鉴定,当微卫星位点数目增加到10个时(平均等位基因5.6个;平均PIC 0.7245),对已知性别候选亲本和未知性别候选亲本鉴定数则分别达到434和238尾。任昆等^[20]使用8个高多态性微卫星(平均等位基因8.75个,平均PIC 0.8135)模拟最多可鉴定草鱼亲本数量,已知性别亲本598尾,未知性别亲本431尾。本文所选择的10个微卫星位点平均等位基因(9.8个)高于以上两项研究;平均多态性信息含量PIC (0.7845)介于以上两项研究结果之间。因此,本研究所建立的斑点叉尾鲷家系亲缘关系鉴定体系能够提供准确完整的系谱信息,从而满足育种需求,若具有更多候选亲本时则可通过增加多态性微卫星位点数目来实现准确鉴定的目的。

参考文献:

- [1] Waldrop J E, Wilson R P. Present status and perspectives of the culture of catfishes (Siluroidei) in North America [J]. *Aquatic Living Resources*, 1996(9): 183-188.
- [2] Bureau of Fisheries of the Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook 2019 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019: 31. [农业农村部渔业渔政管理局. 年中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 31.]
- [3] Zhang S Y, Zhang X H, Chen X H, *et al.* Construction of a high-density linkage map and QTL fine mapping for growth- and sex-related traits in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Frontiers in Genetics*, 2019(10): 251.
- [4] Zhang S Y, Zhong L Q, Qin Q, *et al.* Three SNPs polymorphism of growth hormone-releasing hormone gene (GHRH) and association analysis with growth traits in channel catfish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(5): 886-893. [张世勇, 钟立强, 秦钦, 等. 斑点叉尾鲷因3个SNPs位点及其单倍型组合与生长性状的关联分析 [J]. *水生生物学报*, 2016, 40(5): 886-893.]
- [5] Luan S, Kong J, Wang Q Y, *et al.* Methods and application of aquatic animal breeding value estimation: A review [J]. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(3): 103-109. [栾生, 孔杰, 王清印. 水产动物育种值估计方法及其应用的研究进展 [J]. *海洋水产研究*, 2008, 29(3): 103-109.]
- [6] Zhang L, Dong Z J, Ming J C, *et al.* Individual tagging technique in fish breeding practice [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2010, 23(1): 55-59. [张磊, 董在杰, 明俊超, 等. 鱼类育种实践中的个体标记技术 [J]. *水产学杂志*, 2010, 23(1): 55-59.]
- [7] Luan S, Bian W J, Deng W, *et al.* Genetic parameters for the growth and survival of the base population in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(9): 1313-1321. [栾生, 边文冀, 邓伟, 等. 斑点叉尾鲷基础群体生长和存活性状遗传参数估计 [J]. *水产学报*, 2012, 36(9): 1313-1321.]
- [8] Gao Z X, Wang W M, Zhou X Y, *et al.* DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2007(2): 111-116. [高泽霞, 王卫民, 周小云, 等. DNA分子标记技术及其在水产动物遗传上的应用研究 [J]. *生物技术通报*, 2007(2): 111-116.]
- [9] 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.]
- [10] Zhu B, Chang J B, Tan X C, *et al.* Applicability of microsatellite dna primers of lake sturgeon for the parentage analyzing of Chinese sturgeon [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(6): 3-9. [朱滨, 常剑波, 谭细畅, 等. 湖鲟微卫星DNA引物应用于中华鲟亲子关系分析的初步研究 [J]. *水生生物学报*, 1999, 23(6): 3-9.]
- [11] Dong S R, Kong J, Zhang T S, *et al.* Microsatellite markers simulation and application for parentage determination on *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(1): 96-101. [董世瑞, 孔杰, 张天时, 等. 中国对虾微卫星家系鉴定的模拟分析与应用 [J]. *水生生物学报*, 2008, 32(1): 96-101.]
- [12] 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): 66-71. [张春雷, 佟广香, 匡友谊, 等. 哲罗鱼微卫星亲子鉴定的应用 [J]. *动物学研究*, 2010, 31(4): 66-71.]
- [13] Li K J, 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): 471-476. [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 [J]. *水产学报*, 2014, 38(4): 471-476.]
- [14] 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.]
- [15] He Y F, Zhu Y J, Wu X B, *et al.* Parentage analysis of *Coreius guichenoti* using microsatellites [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(6): 1216-1223. [何勇凤, 朱永久, 吴兴兵, 等. 基于微卫星标记的圆口铜鱼亲子鉴定技术 [J]. *水生生物学报*, 2019, **43**(6): 1216-1223.]
- [16] Waldbieser G C, Bosworth B G, Nonneman D J, *et al.* A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Genetics*, 2001, **158**(2): 727-734.
- [17] Zhang D, Fu J J, Zhang L D, *et al.* The parentage analysis of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) based on ten microsatellite markers [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019(7): 2949-2957. [张丹, 傅建军, 张利德, 等. 鳊基于10个微卫星标记的亲缘鉴定分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2019(7): 2949-2957.]
- [18] O'Reilly P T, Herbinger C, Wright J M. Analysis of parentage determination in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites [J]. *Animal Genetics*, 1998(29): 363-370.
- [19] Lü Y. The establishment of parentage identification technique and screening of growth-related loci based on microsatellite in *Macrobrachium nipponense* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015: 26. [吕洋. 基于微卫星标记的青虾亲子鉴定技术建立及生长相关位点的筛选 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015: 26.]
- [20] Ren K, Bai J J, Fan J J, *et al.* Parentage identification of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using microsatellites [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2013, **44**(8): 1367-1371. [任昆, 白俊杰, 樊佳佳, 等. 草鱼的微卫星亲缘鉴定 [J]. *南方农业学报*, 2013, **44**(8): 1367-1371.]

ESTABLISHMENT AND APPLICATION OF PEDIGREE IDENTIFICATION TECHNIQUE FOR CHANNEL CATFISH BASED ON MICROSATELLITE MARKERS

ZHANG Shi-Yong^{1,2}, LIU Hong-Yan¹, WANG Jiang^{1,3}, SHAO Jun-Jie¹, WANG Ming-Hua^{1,2}, ZHONG Li-Qiang^{1,2}, CHEN Xiao-Hui^{1,2} and BIAN Wen-Ji^{1,2}

(1. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China; 2. The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China; 3. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: To establish an accurate, efficient and economical pedigree identification technique for the channel catfish and provide a scientific basis for the genetic evaluation of the channel catfish and family breeding, two 5-plex PCR reactions were established using 10 pairs of SSR markers with high polymorphism. 333 individuals from 13 full-sib families and 8 half-sib families were identified by the channel catfish pedigree identification system. The results showed that the average number of alleles at 10 loci was 9.8, the average observed heterozygosity was 0.9952, the average expected heterozygosity was 0.8092, and the average polymorphism information content was 0.7845. The cumulative exclusion probabilities of these three cases were 0.99996806, 0.99833267, and 0.99999998, respectively. The identification of the verified population was highly consistent with the pedigree with a true identification rate of 99.1%. The average LOD value between the offspring and the parents was between 13.30 and 24.70, with a confidence level of 95%. The number of alleles in the microsatellite locus selected in this study is abundant, and the polymorphism is high. Our pedigree identification system can quickly and accurately identify the family from the channel catfish breeding population.

Key words: Channel catfish; Microsatellite; Multiplex PCR; Pedigree identification; Genetic breeding