

doi: 10.7541/2023.2022.0051

基于微卫星标记的鼋亲子鉴定技术

谢敏敏 王亚坤 魏成清 陈辰 刘晓莉 李伟 洪孝友* 朱新平*

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广州 510380)

摘要: 为研究鼋(*Pelochelys cantorii*)保种群体的遗传信息, 利用鼋转录组文库, 筛选出了10对微卫星引物, 以此建立了基于2组各含5个微卫星位点多重PCR体系的鼋亲子鉴定技术, 并应用2组微卫星多重PCR体系, 通过ABI3130遗传分析仪及PopGene3.2和CERVUS软件对56只子一代鼋进行个体基因型检测和群体遗传多样性分析, 结果显示, 鼋子一代群体的平均等位基因数为2.3, 微卫星位点的平均多态信息含量为0.3829, 平均观测杂合度和期望杂合度分别为0.6305和0.4767, 处中高度水平。对子代进行亲子鉴定, 10个微卫星位点的累积排除概率分别为73.14%(NE-1P)、90.98%(NE-2P)和98%(NE-3P), 能够满足亲子鉴定的需要。且4只亲本在生殖选择中表现出差异。鼋多重PCR亲子鉴定技术的建立为群体遗传多样性分析、家系鉴定管理和选择育种提供了有效的技术手段。

关键词: 微卫星; 亲缘鉴定; 保种群体; 繁殖力; 遗传多样性; 鼋

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)12-1932-07



微卫星DNA也称为简单串联重复序列(Simple Sequence Repeats, 简称SSRs), 是由1—6个核苷酸为重复单位而多次串联的DNA序列, 它在水产动物的研究领域利用最为普遍、并且十分有效, 可以将它应用于各类经济物种、濒危物种的遗传多样性检测、遗传图谱构建、基因定位、群体遗传结构分析及种群的亲缘鉴定、种质资源保护等方面的研究^[1-9]。

鼋(*Pelochelys cantorii*)属于龟鳖目(Testudines)、鳖科(Trionychidae)、鼋属(*Pelochelys*), 是我国地区体型最大的水生龟鳖动物之一, 也是整个珠江流域, 乃至我国南部地区水系生态系统健康的重要指示物种^[10]。并且, 由于鼋的种族延续历史源远流长^[11], 因此它在对历史环境变化的研究以及生物进化方面的研究都具有十分重要的科学价值。但是, 由于不正当的贸易、人类的滥捕滥杀及水利工程等, 鼋的生存环境不断恶化, 其群数量大幅减少。如今, 鼋已成为极端濒危物种, 2020年9月, 据我国农业农村部发布的数据显示, 我国目前仅人工保圈养条件下保有13只性成熟的鼋^[12, 13]。国外鼋种群数量也

在20世纪迅速减少^[14-16], 鼋在全球范围内的物种延续都面临着严酷的挑战。因此, 为了加强对鼋的保护, 我国在早在1989年就将鼋定为国家一级重点水生野生保护动物^[17, 18]。2014年7月至2021年6月, 中国水产科学研究院珠江水产研究所人工驯养保护的4只亲鼋(2雌2雄)已产下繁育了800多只不同规格的子一代鼋^[19, 20], 但其遗传信息还未知。为了保证圈养群体的遗传多样性处于适于中高度的水平、避免近交危害鼋人工保种群体的健康, 并在未来实现对自然群体的增殖, 本论文拟探究人工驯养条件下子一代鼋的遗传信息并建立亲子鉴定技术, 意在为濒危动物鼋人工保种工作提供科学理论基础和方法。

1 材料与方法

1.1 实验对象

实验用子一代鼋包含2021年生产的56个个体。56只子一代鼋均来自高明鼋繁育保护基地人工驯养的4只亲本(2♀, 2♂)。收集同年但不同窝次的受精卵在人工控温控湿条件下孵化, 待稚鼋孵出

收稿日期: 2022-02-15; 修订日期: 2022-05-11

基金项目: 佛山市财政专项资金-2021年度共建广东农业科技示范市项目资助 [Supported by the Special Financial Fund of Foshan-Guangdong Agricultural Science and Technology Demonstration City Project in 2021]

作者简介: 谢敏敏(1997—), 女, 硕士研究生; 研究方向为种质资源与遗传育种。E-mail: 544872147@qq.com

通信作者: 洪孝友(1985—), 男, 博士研究生; 研究方向为种质资源与遗传育种。E-mail: hongxiaoyou1216@163.com

朱新平(1964—)。E-mail: zhuxinping_1964@163.com *共同通信作者

后收集其脱落的脐带, 浸泡于无水乙醇中并做好标记, -20°C 保存。其每窝包含的个体数量如表 1, 按所属窝次编号, 若为第 1 窝则编号为“1-x”, 属第 2 窝则编号为“2-x”。

表 1 孵出子代鼋脐带采样数量

Tab. 1 Number of hatching progenitor turtles umbilical cord samples

窝次 Nest	个体数 The individual number	产卵时间 Spawning time
1	11	2021年5月16日
2	12	2021年5月19日
3	12	2021年6月5日
4	4	2021年6月14日
5	8	2021年6月30日
6	9	2021年7月3日

1.2 基因组DNA提取

剪脐带约 10 μL , 按照说明书的方法, 使用 MicroElute Genomic DNA Kit 试剂盒(OMEGA)提取基因组DNA, 使用 NanoQTM 微型分光光度计(博奥)检测所提取DNA的OD值及浓度, 并使用 1% 琼脂糖凝胶电泳测试其完整性, 随后转入 -20°C 备用。

1.3 微卫星引物设计与筛选

利用本实验室测得的鼋的转录组数据(未公布), 采用 MISA 软件挖掘鼋转录组序列中的微卫星标记(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>), 再通过引物设计软件 PrimerPremier 5.0 进行三、四核苷酸重复及核苷酸重复微卫星序列的筛选。进行 PCR 扩增前, 将所有引物稀释至 10 $\mu\text{mol/L}$, 再将每对引物按照上下游 1:40 的比例进行混合, 3 种荧光接头均稀释至 20 $\mu\text{mol/L}$ 。建立 10 μL 多重 PCR 反应体系: AB Multiplex PCR Master Mix 5 μL , 混合引物(含上下游)2 μL , 荧光接头 0.2 μL , 去离子水 1.8 μL 。30—150 ng/L 的 DNA 1 μL 。扩增程序为: 94°C 预变性 5min; 94°C 变性 30s, 60°C 退火 45s, 72°C 延伸 70s (24 个循环); 94°C 变性 30s, 53°C 退火 40s, 72°C 延伸 30s (8 个循环); 72°C 再延伸 10min。在 ABI3730 自动测序仪上进行荧光信号的收集, 利用毛细管电泳方法进行基因型检测(测序过程由广州天一辉远基因科技有限公司完成)。

1.4 数据分析

利用 Popgene 软件^[21]计算各微卫星位点的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Shannon 指数。用 CERVUS 3.0 软件^[22]计算微卫星位点的多态性信息含量(PIC)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)。

本实验以孟德尔遗传定律为判定亲子关系的理论依据。由于进行实验的所有子代个体均知晓其属于当年产出的第几窝, 因此母本均为确定母本,

父本为疑似父本, 可以采用排除法进行父权鉴定。根据 SSR 扩增产物建立 0、1 数据矩阵, 即记录每个个体在相同的迁移位置上的条带状况, 有条带的记为 1, 反之则记为 0。再利用 NTSYS 软件^[23], 基于 Nei's 遗传相似系数对遗传数据的 UPGMA(非加权类平均)进行聚类分析。

2 结果

2.1 DNA的提取与质检

本实验用 1% 琼脂糖凝胶电泳来检测 DNA 的完整性, 根据结果可知 DNA 完整性较好、条带明亮; 接着使用 NanoQTM 微型分光光度计(博奥)测定 A_{260}/A_{280} , 结果显示每个个体的 DNA 值分布于 1.82—1.92, 表明其纯度较高。即 DNA 质量可满足后续实验的要求。

2.2 微卫星引物设计及多态性筛选

搜索转录组序列中的 SSR, 并进行引物设计, 成功设计出 3 万余对三核苷酸及四核苷酸重复的微卫星引物序列, 其中三核苷酸重复微卫星引物序列 67.73%, 其中 (AAT)_n 数目最多, 占 6.00%; 四核苷酸重复微卫星引物序列 32.27%, 其中 (AAAG)_n 数目最多, 占 6.67%。随机挑选其中 230 对引物, 经第一次筛选出 153 对能扩增出稳定条带的引物, 再挑选子代个体 DNA 进行二次筛选, 发现仅有 10 对引物具多态性, 占比为 6.53%。10 对微卫星标记引物相关信息见表 2, 引物在个体中 PCR 扩增产物的毛细管电泳图谱效果如图 1 及图 2 所示。在使用 ABI3130 多功能基因遗传分析仪进行遗传分型时, 为降低基因型测序的成本, 将带有不同荧光基团的 PCR 产物分组, 进行混合测序。本试验将 10 个微卫星标记分为 2 组(表 3)。

2.3 群体遗传多样性分析

2 个 PCR 组合所包含的 10 个微卫星标记均能够在鼋的 56 个个体中扩增出稳定、清晰的 DNA 条带, 每个位点检测到的等位基因数为 2—4; PIC 为 0.306—0.684; 群体内近交系数(F_{is})为 -0.6970 — 0.1418 。有效等位基因数(N_e)为 1.2800—3.0521, 观测杂合度(H_o)为 0.250—0.929, 平均为 0.6305; 期望杂合度(H_e)为 0.221—0.678, 平均为 0.4767; 香农多样性指数(I)为 0.3768—1.0290, 平均为 0.7182。每个微卫星位点双亲基因型均未知时单个微卫星位点的非排除概率(NE-1P), 已知单亲基因型时单个微卫星位点的非排除概率(NE-2P), 两个亲本基因型已知时的非排除概率(NE-PP)如表 4 所示。并且, 排除概率会随着微卫星位点数的增多而增大。10 个微卫星位点的累积排除概率分别为 73.14%(NE-1P)、90.98%(NE-2P)和 98%(NE-3P)。

2.4 聚类分析比较

NTSYS聚类结果如图3所示, 根据每个个体实际所属的窝次推断软件分析所得亲本的亲本是否正确。经过计算, 若只考虑母本, 推演正确率为89.29%; 若同时考虑父母本, 则正确率为80.36%。

2.5 亲本后代数的比较

统计结果显示实验群体中每个雌鼋与雄鼋都

表2 鼋微卫星引物序列及扩增信息

Tab. 2 Primers and amplification information of *Pelochelys cantorii* microsatellite

微卫星 位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5'—3')	重复单元 Repeat motif	退火 温度 T_m (°C)	产物大小 Production size (bp)
Xm17	CACCACAGAGTGCA	(TTG) ₆	60	114—120
	TTGTCTTT			
	AAGCCTTCTTTTAGC			
Xm86	CATGTAGC	(AGC) ₁₂	60	174—190
	AAACTGGAAGAGTA			
	TCTTTGGGC			
Xm89	CTGCCTTAGGTGTAC	(GTTT) ₅	60	165—172
	TGGAGGAT			
	CAATTTAAACTGGCC			
Xm99	AAAGACTG	(GCT) ₇	61	117—126
	TAGGCCTTAGACTCA			
	TGCTGTTC			
Xm101	TTTCTGCTCCTGCTC	(GACA) ₅	61	163—171
	ATCACTAC			
	GTCCTCCTCCTCTGG			
Xm106	AATGG	(ACC) ₅	60	180—183
	CTAGGGCCAGGAAT			
	CATCAC			
Xm169	CTTTCCCTCTATGA	(ATA) ₆	60	129—132
	TGGTCTCT			
	TATCACTTGCAGGAC			
Xm207	CAAAATTC	(TTA) ₉	59.5	136—139
	TAGGAATCACACAT			
	GCACAACCT			
Xm209	ACTGAAAATATGGA	(CAA) ₇	60.5	137—140
	AAGGGGTGT			
	CCAAGCACAGTCAG			
Xm225	CAGATAATA	(AAC) ₅	60	124—136
	TCTGCCTTGGGTCAC			
	TTATTATC			
	TGCAAAACAACATT	(AAC) ₅	60	124—136
	TTCTGCTAA			
	GTACCACAGTGGCA			
	TTTCAGAAT	(AAC) ₅	60	124—136
	CTCCTTTCTGTGGAA			
	AATCTCG			
	GAAATCAGAGAACA	(AAC) ₅	60	124—136
	GAGAGGCAA			
	ATATAAGAATCAAC			
	CTGGACCCC	(AAC) ₅	60	124—136

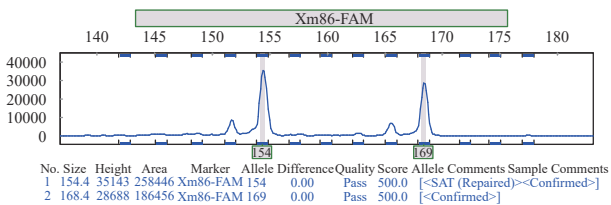


图1 引物Xm86在随机个体中的PCR扩增产物的毛细管电泳图谱

Fig. 1 Capillary electrophoresis of PCR amplification products of primer Xm86 in random individuals

育有后代, 但每个亲本的后代数都不同。结合当年繁殖季节的观察记录, 可知两只母本分别诞下共2窝(第1与第5窝)与4窝(第2、3、4及第6窝)子代(表5), 母本的后代数在群体总后代中贡献率分别为33.93%和66.07%。

3 讨论

3.1 子一代鼋的遗传信息

本研究使用10个微卫星位点进行遗传参数分析, 位点多态信息含量为0.306—0.6840, 其均值为0.3829。Schultz等^[24]认为PIC>0.5为高多态性信息含量, 0.5>PIC>0.25的信息含量为中等适度, 而

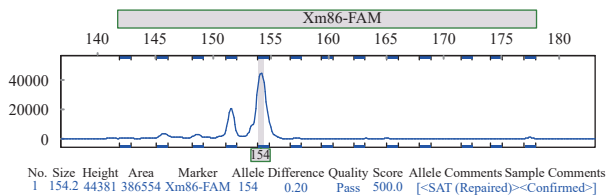


图2 引物Xm86在随机个体中的PCR扩增产物的毛细管电泳图谱

Fig. 2 Capillary electrophoresis of PCR amplification products of primer Xm86 in random individuals

在电泳图谱中, 通过 Peak Scanner Software V1.0 软件自动识别微卫星位点PCR 产物片段大小, 从而区分不同的等位基因。一个个体在一个微卫星座位上的电泳图谱至多有两个, 是单峰还是双峰, 即该位点上等位基因数, 说明了该个体在这个位点上是否杂合: 双峰代表杂合(图1), 单峰代表纯合(图2)

In electrophoretic profiling, Peak Scanner Software V1.0 automatically identifies PCR product fragment sizes at microsatellite loci to distinguish different alleles. The electrophoretic map of an individual on a microsatellite seat has at most two, single peak or double peak, i.e. the number of superior position genes at this site, which indicates whether the individual is heterozygous at this site: double peak represents heterozygous (Fig. 1), and single peak represents homozygous (Fig. 2)

表3 卫星标记分组情况

Tab. 3 The grouping of microsatellite markers

分组 Group	位点名称 Locus name	荧光标记 Fluorescent tag	片段大小 Fragment size (bp)
A	Xm17	TAMRA	114—120
	Xm86	FAM	174—190
	Xm89	TAMRA	165—172
	Xm99	HEX	117—126
	Xm209	FAM	163—171
B	Xm101	FAM	180—183
	Xm106	HEX	129—132
	Xm169	HEX	136—139
	Xm207	FAM	137—140
	Xm225	TAMRA	124—136

PIC<0.25为低信息含量, 本实验所选用的标记位点, 包含高度多态标记2个(PIC $\geq$ 0.5), 中度多态标记8个, 无低信息含量位点。由10个位点分析可得, 鼋2021年子一代群体的观测杂合度(H_o)为0.250—0.929, 平均为0.6305; 期望杂合度(H_e)为0.221—0.678, 平均为0.4767。金铃等^[25]同样利用10个微卫星位点对两个红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)群体进行遗传多样性参数分析, 其平均 H_o 为0.464, 平均 H_e 为0.557。相比之下, 可见2021年的鼋子一代群体的遗传多样性处于中度水平。同时与濒危龟鳖类比较, 荆胜利等^[26]用18对引物对黄缘盒龟(*Cuora flavomarginata*)的4个群体进行观测杂合度测定, 其 H_e 为0.032—0.936, 平均值为0.329; 人工圈养条件下黄喉拟水龟(*Mauremys mutica*)的观测杂合度(H_o)介于0.364—0.921, 平均值为0.687^[27]。相比之下, 可见鼋子一代群体遗传多样性处于较丰富的水平。

3.2 亲子鉴定

通过上述微卫星位点进行亲子鉴定, 得出累积排除概率分别为73.14%(NE-1P)、90.98%(NE-2P)和98%(NE-3P)。与同样以少数亲本进行圈养繁

殖的扬子鳄(*Alligator sinensis*)^[28]比较: 当双亲的基因型均在未知的情况下, 扬子鳄13个位点累积排除概率为0.7763; 已知单亲基因型时的累积排除概率为0.9414。这说明本实验中所选用的微卫星位点可满足鼋亲子鉴定的要求。

本实验还通过NTSYS软件对整个子代群体进行聚类, 结果基本均显示其可分为2个亚群, 符合实际圈养观察为两个母本参与生产的真实情况。并且, 结果表明其可进一步分为4个亚群, 也与实际养殖中4只亲鼋均参与生殖活动的理论子代群体构成相映照(♀1 $\times$ ♂1、♀1 $\times$ ♂2、♀2 $\times$ ♂1和♀2 $\times$ ♂2)。由此可见, 基于微卫星所建立的亲子分析技术的结果较为可靠。

3.3 亲本繁殖力分析

经统计, 母本的后代数在群体总后代中贡献率分别为33.93%和66.07%。后代数在亲本中表现差异的现象十分常见, 如文萍等^[26]利用89只雌龟进行子代统计, 经亲子鉴定可明确分配258只子代到60个母本中, 有29个母本没有被分配子代, 这表明不同母本具有不同的繁殖力。可在未来子代繁育中, 以个体繁殖力作为选择母本的重要参考条件。

表4 子一代鼋在10对微卫星位点的多样性指数

Tab. 4 Diversity index of subgeneration Soft-shelled turtles at 10 pairs of microsatellite loci

位点名称Locus name	N_a	N_e	I	H_o	H_e	PIC	HW	NE-1p	NE-2P	NE-3P
Xm86	4	3.0521	1.2268	0.929	0.678	0.684	NS	0.751	0.588	0.416
Xm207	2	1.7738	0.6279	0.536	0.440	0.353	**	0.905	0.829	0.739
Xm106	2	1.6000	0.5623	0.500	0.378	0.306	**	0.93	0.848	0.761
Xm169	2	1.9382	0.6771	0.821	0.488	0.344	ND	0.883	0.817	0.724
Xm17	2	1.9975	0.6925	0.411	0.504	0.375	***	0.875	0.813	0.719
Xm101	2	1.9122	0.6700	0.786	0.481	0.364	ND	0.886	1.919	0.726
Xm209	2	1.7935	0.6344	0.554	0.446	0.359	***	0.902	0.828	0.737
Xm99	2	1.2800	0.3768	0.250	0.221	0.328	NS	0.976	0.903	0.833
Xm89	2	1.9692	0.6853	0.732	0.497	0.330	NS	0.879	0.814	0.721
Xm225	3	2.6520	1.0290	0.786	0.634	0.607	NS	0.803	0.66	0.511
平均值Mean value	2.5	1.9969	0.71821	0.6305	0.4767	0.405				

Combined non-exclusion probability (first parent): 0.26856356

Combined non-exclusion probability (second parent): 0.09018910

Combined non-exclusion probability (parent pair): 0.01999258

Combined non-exclusion probability (identity): 0.00003673

Combined non-exclusion probability (sib identity): 0.00631004

注: 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; PIC. 多态信息含量; HW. Hardy-Weinberg平衡检验, 且HW中NS代表未偏离; ND. 无检测结果; *. 显著偏离; 当 ≥ 2 时代表极显著偏离; NE-1P. 双亲基因型均未未知时单个微卫星位点的非排除概率; NE-2P. 已知单亲基因型时单个微卫星位点的非排除概率; NE-PP. 两个亲本基因型已知时的非排除概率

Note: N_a . the number of alleles; N_e . the number of effective alleles; H_o . observed heterozygosity; H_e . expected heterozygosity; PIC. polymorphic information content; HW. Hardy-Weinberg equilibrium test, and NS in HW stands for no deviation. ND. no test results; *. significant deviation; When ≥ 2 , it represents extremely significant deviation; Ne-1p. the non-exclusion probability of a single microsatellite locus when both parental genotypes are unknown; NE-2P. the non-exclusion probability of a single microsatellite locus when both parental genotypes are known; NE-PP. the non-exclusion probability of a single microsatellite locus when both parental genotypes are known

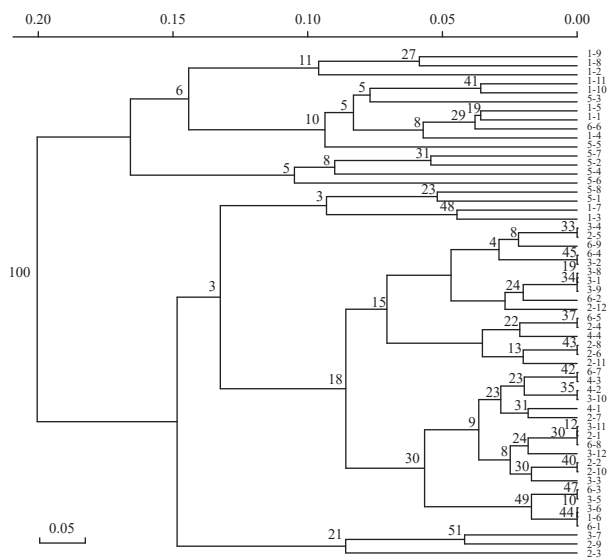


图 3 NTSYS 软件聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis of NTSYS software

表 5 每个子代个体的亲缘关系
Tab. 5 Genetic relationship of each progeny

编号 Serial number	聚类 Clustering	实际 The actual	编号 Serial number	聚类 Clustering	实际 The actual
1-1	♀ ₁	♀ ₁	3-6	♀ ₂	♀ ₂
1-2	♀ ₁	♀ ₁	3-7	♀ ₂	♀ ₂
1-3	♀ ₂	♀ ₁	3-8	♀ ₂	♀ ₂
1-4	♀ ₁	♀ ₁	3-9	♀ ₂	♀ ₂
1-5	♀ ₁	♀ ₁	3-10	♀ ₂	♀ ₂
1-6	♀ ₂	♀ ₁	3-11	♀ ₂	♀ ₂
1-7	♀ ₂	♀ ₁	3-12	♀ ₂	♀ ₂
1-8	♀ ₁	♀ ₁	4-1	♀ ₂	♀ ₂
1-9	♀ ₁	♀ ₁	4-2	♀ ₂	♀ ₂
1-10	♀ ₁	♀ ₁	4-3	♀ ₂	♀ ₂
1-11	♀ ₁	♀ ₁	4-4	♀ ₂	♀ ₂
2-1	♀ ₂	♀ ₂	5-1	♀ ₂	♀ ₁
2-2	♀ ₂	♀ ₂	5-2	♀ ₁	♀ ₁
2-3	♀ ₂	♀ ₂	5-3	♀ ₁	♀ ₁
2-4	♀ ₂	♀ ₂	5-4	♀ ₁	♀ ₁
2-5	♀ ₂	♀ ₂	5-5	♀ ₁	♀ ₁
2-6	♀ ₂	♀ ₂	5-6	♀ ₁	♀ ₁
2-7	♀ ₂	♀ ₂	5-7	♀ ₁	♀ ₁
2-8	♀ ₂	♀ ₂	5-8	♀ ₂	♀ ₁
2-9	♀ ₂	♀ ₂	6-1	♀ ₂	♀ ₂
2-10	♀ ₂	♀ ₂	6-2	♀ ₂	♀ ₂
2-11	♀ ₂	♀ ₂	6-3	♀ ₂	♀ ₂
2-12	♀ ₂	♀ ₂	6-4	♀ ₂	♀ ₂
3-1	♀ ₂	♀ ₂	6-5	♀ ₂	♀ ₂
3-2	♀ ₂	♀ ₂	6-6	♀ ₁	♀ ₂
3-3	♀ ₂	♀ ₂	6-7	♀ ₂	♀ ₂
3-4	♀ ₂	♀ ₂	6-8	♀ ₂	♀ ₂
3-5	♀ ₂	♀ ₂	6-9	♀ ₂	♀ ₂

经过遗传聚类分析, 还可发现每对亲本组合对子代的贡献率存在显著差异。对于雌性爬行动物来说, 一妻多夫制可减小近交衰退和遗传不相容性^[29], 还可以为同一种群中的所有成熟雄性提供交配的机会, 以此增加种群的遗传多样性^[30, 31]。例如, 多父性在胎生岩鱼(*Sebastes* spp.)^[32]的多重父权的繁殖策略, 可以作为一种基因上的缓冲方式来扩大该种的适应幅度, 以应对自然选择的压力, 更利于种群的延续和散布。

而鳇子一代的4个子代亚群所拥有子代个体数不同, 其原因可能是雄性在交配活动中竞争力的优劣, 诸如雌性选择偏好, 即能够提供更多更好物质利益的雄性会被雌性优先选择, 以便将这些优势直接转化为产卵的适宜效应; 精子浓度与活力差异对受精结果的影响; 雌性个体与雄性个体之间的固定搭配; 时间上最后进行交配的个体由于在雌性生殖器官中贡献的精子损失量少、能够去除前任雄性的精子占比、精子在雌性生殖器官中的存放位置等使其更占优势。诸如此类因素, 都可能造成父权分配不均的结果。

然而, 优势个体的出现可能会造成子代群体内遗传多样性的偏移和减少。在将来F₂的育种中, 可利用分子遗传手段挑选种鳇, 保护稀有等位基因, 通过两两个体之间的亲缘分析, 隔离或迁出亲缘关系对较多的繁殖雌雄个体, 进而提高鳇种群遗传多样性的维持能力, 进一步改进濒危物种的人工饲养繁殖管理和保护策略。

参考文献:

[1] Wei D W, Lou Y D, Sun X W, *et al.* Isolation of microsatellite markers in the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Zoological Research*, 2001, **22**(3): 238-241. [魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选 [J]. *动物学研究*, 2001, **22**(3): 238-241.]

[2] Taylor E B, Chudnow R, Pillipow R, *et al.* Microsatellite DNA analysis of overwintering bull trout (*Salvelinus confluentus*) and its implications for harvest regulation and habitat management [J]. *Fisheries Management and Ecology*, 2021, **28**(3): 219-229.

[3] Guo X Z, Chen H M, Wang A B, *et al.* Population genetic structure of the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) in China inferred from microsatellite analyses: implications for fisheries management and breeding [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2021, **53**(1): 174-191.

[4] Liu Z J, Cordes J. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. *Aquaculture*, 2004(238): 1-37.

[5] Sun X W, Zhang X F, Zhao Y Y, *et al.* Development and application of microsatellite markers in aquatic species

- [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, **15**(4): 689-703. [孙效文, 张晓峰, 赵莹莹, 等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用 [J]. *中国水产科学*, 2008, **15**(4): 689-703.]
- [6] Huang L, Wang Y Q. The application of microsatellite DNA markers in conservation genetics of endangered animals [J]. *Biodiversity Science*, 2004(5): 528-533. [黄磊, 王义权. 微卫星分子标记在濒危动物保护遗传学研究中的应用 [J]. *生物多样性*, 2004(5): 528-533.]
- [7] Banks M A, Blouin M S, Baldwin B A, *et al.* Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. *The Journal of Heredity*, 1999, **90**(2): 281-288.
- [8] Li L L, Xing L M, Yu Z X, *et al.* Parentage assignment of *Silurus lanzhouensis* using multiplex RCR of microsatellites [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(3): 530-540. [李兰兰, 邢露梅, 俞兆曦, 等. 基于微卫星多重PCR技术的兰州鲇亲子鉴定 [J]. *水生生物学报*, 2021, **45**(3): 530-540.]
- [9] 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.]
- [10] Ruan D M, Su X H, Chen X Z, *et al.* Investigation of present situation of large soft-shelled turtle (*Pelochelys bibroni*) at Youxi River in Fujian Province [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2001(6): 42-45. [阮德明, 苏雪红, 陈秀珠, 等. 福建尤溪河鼋的现状调查 [J]. *动物学杂志*, 2001(6): 42-45.]
- [11] Gu H Q, Ma X M. The soft-shelled turtle, *Pelochelys bibroni* in China: its historical distribution and current situation—Comment on the protective methods of *Pelochelys bibroni* of Oujiang River basin [J]. *Journal of Hangzhou Normal University (Humanities and Social Sciences)*, 2000(3): 45-48. [顾辉清, 马小梅. 鼋在我国的历史地理分布和现状——评述瓯江流域鼋的保护对策 [J]. *杭州师范学院学报(社会科学版)*, 2000(3): 45-48.]
- [12] Hong X Y, Cai X D, Chen C, *et al.* Conservation status of the Asian giant softshell turtle (*Pelochelys cantorii*) in China [J]. *Chelonian Conservation and Biology*, 2019, **18**(1): 68.
- [13] Ministry of Agriculture and Rural Affairs, PRC. Adaptive protection of Turtles rewilding was held in Foshan, Guangdong Province. http://www.cjyzbgs.moa.gov.cn/gzdt/202009/t20200928_6353394.htm. [中华人民共和国农业农村部. 鼋野化适应性保护活动在广东佛山举行. http://www.cjyzbgs.moa.gov.cn/gzdt/202009/t20200928_6353394.htm]
- [14] Moll E E, Vijaya J. Distributional records for some Indian turtles [J]. *Journal of the Bombay Natural History Society*, 1986(83): 57-62.
- [15] Anders G J R, Russell A M, Philip M H. Distribution, osteology, and natural history of the Asian giant softshell turtle, *Pelochelys bibroni*, in Papua New Guinea [J]. *Chelonian Conservation and Biology*, 1993, **1**(1): 19-30.
- [16] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, *et al.* Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. *Bio-Techniques*, 1997, **23**(3): 504-511.
- [17] Lau M, Shi H T. Conversation and Trade of Terrestrial and Freshwater Turtles and Tortoises in the People's Republic of China [M]/van Dijk P P, Stuart B L, Rhodin A G J (Eds.), *Asian Turtle Trade: Proceedings of a Workshop on Conversation and Trade of Freshwater Turtles and Tortoises in Asia*. Chelonian Research Monographs, 2000: 30-38.
- [18] Shi H T. Identification Manual for Traded Turtles in China [M]. Beijing: Encyclopedia of China Publishing House, 2011. [史海涛. 中国贸易龟类检索图鉴 [M]. 2版. 北京: 中国大百科全书出版社, 2011.]
- [19] Hong X Y. Conservation biology research of the Asian giant softshell turtle, *Pelochelys cantorii* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020: 18-19. [洪孝友. 濒危动物鼋保护生物学研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020: 18-19.]
- [20] Hong X Y, Zhu X P, Chen C, *et al.* Reproduction traits of captive Asian giant softshell turtles, *Pelochelys cantorii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(4): 794-799. [洪孝友, 朱新平, 陈辰, 等. 人工驯养鼋繁殖习性研究 [J]. *水生生物学报*, 2018, **42**(4): 794-799.]
- [21] Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, **8**(1): 103-106.
- [22] Holland M M, Parson W. GeneMarker® HID: a reliable software tool for the analysis of forensic STR data [J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2011, **56**(1): 29-35.
- [23] Rohlf F J. NTSYS-pc: microcomputer programs for numerical taxonomy and multivariate analysis [J]. *The American Statistician*, 1987, **41**(4): 330.
- [24] Schultz J K, Baker J D, Toonen R J, *et al.* Extremely low genetic diversity in the endangered Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*) [J]. *Journal of Heredity*, 2008, **100**(1): 25-33.
- [25] Jin L, Chen Y B, Li S D, *et al.* SSR analysis of genetic diversity in cultured populations of *Cherax quadricarinatus* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2021, **51**(4): 75-80. [金玲, 陈奕彬, 李色东, 等. 红螯螯虾养殖群体遗传多样性的SSR分析[J]. *淡水渔业*, 2021, **51**(4): 75-80.]
- [26] Jin S L, Zhang K, Huang X Y, *et al.* Isolation and genetic diversity of microsatellite molecular markers in the yellow-margined box turtle (*Cuora flavomarginata*) [J]. *Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2018, **31**(4): 555-561. [荆胜利, 张坤, 黄小燕, 等. 黄缘闭壳龟微卫星分子标记的开发及遗传多样性分析 [J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2018, **31**(4): 555-561.]
- [27] 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.]
- [28] Han Q H. Breeding ecology and molecular mechanism of mate choice in the Chinese Alligator [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019: 65-72. [韩群花. 扬子鳄繁殖生态及配偶选择策略的分子机制研究. 杭州: 浙江大学, 2019: 65-72.]
- [29] Uller T, Olsson M. Multiple paternity in reptiles: patterns and processes [J]. *Molecular Ecology*, 2008, **17**(11): 2566-2580.
- [30] Pearse D E, Anderson E C. Multiple paternity increases effective population size [J]. *Molecular Ecology*, 2009, **18**(15): 3124-3127.
- [31] Karl S A. The effect of multiple paternity on the genetically effective size of a population [J]. *Molecular Ecology*, 2008, **17**(18): 3973-3977.
- [32] Hyde J R, Kimbrell C, Robertson L, *et al.* Multiple paternity and maintenance of genetic diversity in the live-bearing rockfishes *Sebastes* spp. [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2008(357): 245-253.

PATERNITY TEST TECHNOLOGY BASED ON MICROSATELLITE MARKER ISLET

XIE Min-Min, WANG Ya-Kun, WEI Cheng-Qing, CHEN Chen, LIU Xiao-Li, LI Wei,
HONG Xiao-You and ZHU Xin-Ping

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation of Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The Asian giant soft-shelled turtles (*Pelochelys cantorii*) belong to Testudines, Trionychidae, and *Pelochelys*. As one of the largest aquatic turtles in China, it is also an important indicator species for the health of the river ecosystem in the Pearl River Basin and even the southern part of China. Because of the long history of *P. cantorii*, it is of great scientific value of environmental changes and biological evolution. *P. cantorii* was widely distributed in Southeast Asia of China in history. However, due to unfair trade, excessive harvesting and killing of turtles and water conservancy projects, the population of *P. cantorii* has been greatly reduced. Currently, *P. cantorii* have become an extremely endangered species. There are only 13 *P. cantorii* in captivity in China, which have been listed as national first-class protected animals and taken seriously by scientific researchers. With the success of artificial domestication and breeding in recent 3 years, the genetic information of the preserved population is still unknown. In this paper, we use transcriptome data design trinucleotide repeat and repeat four nucleotides microsatellite primers 30000 on, the choice of 230 pairs of primer synthesis, received 10 after two screening amplification with high efficiency and high specificity of microsatellite marker, and build 2 multiple PCR system. Genotypes and genetic diversity of 56 soft-shelled islet were detected by ABI3130 genetic analyzer and PopGene3.2 and CERVUS Software. The results showed that the average number of alleles was 2.3 and the average content of polymorphic information was 0.3829. The average observed and expected heterozygosity were 0.6305 and 0.4767, respectively. Paternity analysis of 56 progenies showed that the cumulative exclusion probabilities of 10 microsatellite loci were 73.14% (NE-1P), 90.98% (NE-2P) and 98% (NE-3p), which can meet the needs of paternity testing, respectively, and the four parents showed differences in reproductive selection. The analysis of the technology can help identify the captive population of genetic information, assist researchers to family management of groups. And more importantly, in the process of F₃ generations of breeding in the future, the technology can be regarded as parental choice of technical means, to get healthier, higher genetic diversity, and their offspring, for the entire group of proliferation and endangered wild work to lay a solid foundation.

Key words: Microsatellite; Genetic identification; Conservation population; Fertility; Genetic diversity; *Pelochelys cantorii*