

微卫星标记在刺参(*Apostichopus japonicus*) 人工繁育中亲本识别的应用*

李雪燕^{1,2} 孙国华² 杨建敏² 刘兆存³ 韦秀梅²
王卫军² 郭婷婷^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋水产研究所 山东省海洋生态修复重点实验室
烟台 264006; 3. 东营市河口华春水产技术开发有限责任公司 东营 257236)

摘要 选取 8 个高多态性的微卫星位点, 对 240 只刺参(*Apostichopus japonicus*)幼体和 14 只疑似亲本进行了亲缘关系的鉴定。通过检测, 8 个微卫星位点共得到 53 个等位基因, 平均等位基因数为 6.63; 观察杂合度在 0.730—0.902; 各位点的多态信息含量为 0.696—0.836。通过亲缘关系分析软件 CERVUS 3.0 分析, 微卫星位点累积排除概率分别为 0.9934、0.9997、0.99999。基于排除法个体基因型判定, 有 37 个子代有 1 个候选亲本, 194 个子代有 2 个及以上候选亲本; 基于似然法判定, 置信度为 80% 时, 有 198 个子代个体找到最似亲本。综合排除法和似然法的亲权鉴定, 成功为 229 个子代个体找到它们的亲本, 鉴定成功率达 95% 以上。本研究结果可为刺参育种工作中亲本识别及家系分析提供技术支持和理论依据。

关键词 刺参; 微卫星; 亲权鉴定

中图分类号 Q346

刺参(*Apostichopus japonicus*)属棘皮动物门、海参纲、刺参科、仿刺参属, 主要分布在北纬 35°—44° 的西北太平洋沿岸, 包括黄海、渤海海域, 俄罗斯东部沿岸, 日本、韩国沿岸。刺参具有较高的营养价值和药用价值, 很受人们的喜爱, 是我国海水养殖单品种产值最高的种类之一, 在沿海养殖中的经济地位举足轻重。但随着刺参人工养殖的迅猛发展, 养殖过程中出现了生长速度减慢、抗逆性减弱等种质退化的现象, 刺参良种选育的重要性日益凸显。在动物良种选育过程中, 亲权关系分析对于指导亲本选留, 分析系谱信息, 准确评估家系遗传参数, 清楚地掌握选育各代的遗传背景, 示踪关键遗传信息流向, 加快品种选育进程, 避免近交衰退现象等具有重要意义。群系混养是育种工作中避免环境差异对遗传性状影响、提高

空间利用效率、减少管理强度的常用手段, 但对于一些海水养殖动物尤其是对于刺参这种软体性动物来说, 个体标识、家系标识, 甚至种群标识, 一直是难以解决的问题, 因此需要寻找简便、可靠的方法用于亲缘关系分析。

亲权鉴定, 是通过遗传标记的检测, 根据遗传规律分析, 对个体之间血缘关系的鉴定。关于亲权鉴定的方法, 从最初的 ABO 血型鉴定、血清型鉴定, 到现在的 DNA 指纹技术, 微卫星 DNA 及线粒体 DNA 等。微卫星标记因其具有共显性、高度多态性、模板量要求低和鉴定方便等优点, 已成为亲子鉴定技术普遍采用的分子标记(Weber *et al*, 1989; Bowcok *et al*, 1994)。微卫星 DNA 遗传标记均遵循孟德尔遗传规律, 子代成对的同源染色体中一条来自父亲, 另一条来

* 山东省自然科学基金项目, ZR2011CM036 号; 山东省现代农业产业技术体系刺参创新团队刺参育种岗位, 2012—2014; 海洋经济创新发展区域示范项目, 20130125 号; 山东省优秀中青年科学家基金, Y231041011 号。李雪燕, 硕士研究生, E-mail: lixueyan2008.good@163.com

通讯作者: 杨建敏, 博士, 研究员, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2013-01-16, 收修改稿日期: 2013-03-27

自母亲, 子代不可能带有双亲都没有的等位基因。通过检测遗传标记, 能将不是生父的个体否定掉的几率称为父权排除率, 又称为非父排除率。利用微卫星 DNA 多态性, 即以多个微卫星 DNA 在一个群体中等位基因频率为基础, 通过计算排除概率, 便可进行亲子鉴定。所以利用微卫星标记来进行亲权鉴定不仅被广泛应用于人类, 而且在畜牧(Emel *et al.*, 2009; Fernando *et al.*, 2011)方面的应用也普及开来, 近年来, 关于水产动物个体亲权鉴定及家系鉴定方面的研究报道也逐渐增多(Dong *et al.*, 2006; Nie *et al.*, 2012)。本研究选用已开发的 8 个微卫星位点对刺参人工繁育过程中 240 个子代和 14 个疑似亲本进行亲缘关系鉴定, 探索微卫星亲权分析在刺参方面的应用条件及适用性, 为刺参的选育、保护提供分子生物学理论依据和方法参考。

1 材料与方法

1.1 材料

样品为山东烟台崆峒岛刺参养殖基地人工繁育刺参, 亲本为 3 龄的成参, 平均体长约为 18.2cm, 共 14 只; 子代为 1 龄的幼参, 平均体长为 7.5cm, 共 240 只, 将所有个体进行无损伤取样(孙孝德等, 2010)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的获取 用 CTAB 法提取亲本 DNA, 将取得的样品约 20mg, 液氮研磨, 加入 700mL CTAB 提取缓冲液(100mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20mmol/L EDTA-Na₂, 1.4mol/L NaCl, 2% CTAB, 0.1% β-巯基乙醇)和终浓度为 100μg/mL 蛋白酶 K, 55℃消化 3h 或 37℃过夜, 等体积酚氯仿($V_{酚} : V_{氯仿} = 1 : 1$)、氯仿抽提, 2 倍体积乙醇沉淀, TE 溶解, -20℃

保存备用。

由于取得的幼参样品较少, 所以采用 Chelex-100 的方法提取幼参个体 DNA。将取得的样品放入 0.5mL 离心管中, 加纯水洗 1 次, 然后加入 200μL 5% 的 Chelex-100 和 5μL 5mg/mL 的蛋白酶 K, 置 56℃保温 2h 以上。取出振荡, 100℃保温 8min, 振荡, 13000r/min 离心 3min, 上清用于 PCR 扩增或放 4℃保存备用。

1.2.2 微卫星位点的选择和 PCR 扩增条件的优化 微卫星位点引物由上海生物工程技术服务有限公司合成, 引物序列及目的片段大小等信息见表 1。采用预实验优化后的 10μL 反应体系, 20—40ng DNA 模板、2mmol/L Mg²⁺、引物 0.2μmol/L、1×buffer、0.25U 的 *Tag* 酶, 0.2mmol/L 的 dNTP。优化后的反应程序: 94℃预变性 5min; 94℃变性 30s, 每对引物特异退火温度退火 40s, 72℃延伸 50s, 共 30 个循环; 72℃延伸 5min, 最后 4℃保存。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及基因型的判定 PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 使用 TaKaRa 公司 20bp DNA ladder Marker 为标准, 利用 Tanon GIS 凝胶图像处理系统处理电泳图片, 读取各个泳道中 PCR 扩增产物片段大小并输出数据, 直接得出个体的基因型。

1.3 统计分析

运行 CERVUS 3.0 (Marshall, 2006) 分析软件, 对 254 个不同刺参个体进行亲权鉴定。首先将每一个位点的基因型进行统计, 运行等位基因频率分析, 得到每一位点的等位基因频率、杂合度 H_o 、 H_e (Nei, 1978)、多态信息含量 PIC (Botstein *et al.*, 1980)、排除概率 PE (Jamieson, 1994; Jamieson *et al.*, 1997) 及累积排除率 CPE (Jamieson *et al.*, 1997)。

表 1 微卫星位点的相关信息
Tab.1 The information of microsatellite loci

位点	引物序列	退火温度(℃)	等位基因片段大小(bp)
<i>SJ01</i>	F: CTCAAAGTTCAGGGTTTATG R: CCTGCACTGTAAATGGTATT	53	296—316
<i>SJ04</i>	F: AGTCCCAACCTACCATAACATC R: CCCAAATGCAAAGGTGTAGAAG	58	191—213
<i>SJ09</i>	F: AGGAAGGCCACAGATAGAG R: TGCTATATTGTTTCGGTGGTC	57	263—287
<i>SJ17</i>	F: ATGACATGGGATTCGGTCTC R: CCCGATGTGAATTGCACT	58	101—111
<i>SJ33</i>	F: TCAGCAATTTATTCCAGATGTT R: TGTGTATGATCCGAAGAT	53	160—176
<i>Psj2464</i>	F: GTCTCATCAGCAATCCACCA R: TCTCTCCCTACCCAAAAACAC	56	167—177
<i>Psj2969</i>	F: TTCCTGCCCTTACAAAATAG R: GCAGCAGAATGATGAGTGTG	57	135—149
AJMS003	F: TGCAACGTTGATGTCATGAGC R: GAGACCTAGGCACTATAATTCC	62	111—127

1.3.1 基于排除法的亲权鉴定 排除法的基本原理是孟德尔遗传定律, 子代全部染色体上的遗传因子, 一半来自父亲, 一半来自母亲。通过比较个体的基因型, 来排除子代的可能亲本, 排除法是比较简单也是常用的方法, 适用于候选亲本少、多态性高的时候, 但是当读取基因型错误时, 容易造成排除错误。

1.3.2 基于似然法的亲权鉴定 根据各个体的基因型文件, 运用 CERVUS 3.0 进行等位基因频率分析, 再运行亲缘关系的仿真模拟。当在亲本都未知的情况下, 将 254 个个体同时作为后代和候选亲本运行模拟 10000 次, 置信度为 95%。然后运行亲权分析, 计算出每个候选父母的 LOD 值, 以及 LOD>0 时的 t 值, 找出最似亲本、第二似亲本, 最后找出候选亲本中最可能是子代亲本的个体。

2 结果

2.1 DNA 的提取检测及位点扩增结果

两种方法提取的亲本和子代的 DNA, 经过琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统检测, 浓度和纯度均达到实验要求, 质量良好, 可以用于 PCR 反应。扩增产

物经过 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 8 个微卫星位点均得到清晰地条带, 且大小与目的条带一致。图 1 为 *SJ04* 在 30 个子代个体的扩增结果。

2.2 微卫星位点扩增结果分析

通过检测 254 只刺参 8 个微卫星位点的基因型, 共检测到 53 个等位基因(表 2), 各标记均显示出多态性, 各位点的等位基因数 5—8 个不等, 平均等位基因数为 6.63; 观察杂合度在 0.730—0.902 之间; 各位点的多态信息含量为 0.696—0.836, 平均值为 0.7869。

2.3 排除概率和累积排除概率

根据各微卫星位点的等位基因频率, 计算各位点的排除概率, 见表 3。一个候选亲本和子代的基因型已知, 排除候选亲本的概率记为概率 1, 其值为 0.329—0.540; 一个已知亲本、性别不同的另一个候选亲本和子代的基因型已知, 排除候选亲本的概率记为排除概率 2, 其值为 0.505—0.704; 候选父母双方和子代基因型已知, 排除父母双方的概率记为排除概率 3, 其值为 0.686—0.870; 累积排除概率分别为 0.9934、0.9997、0.99999。

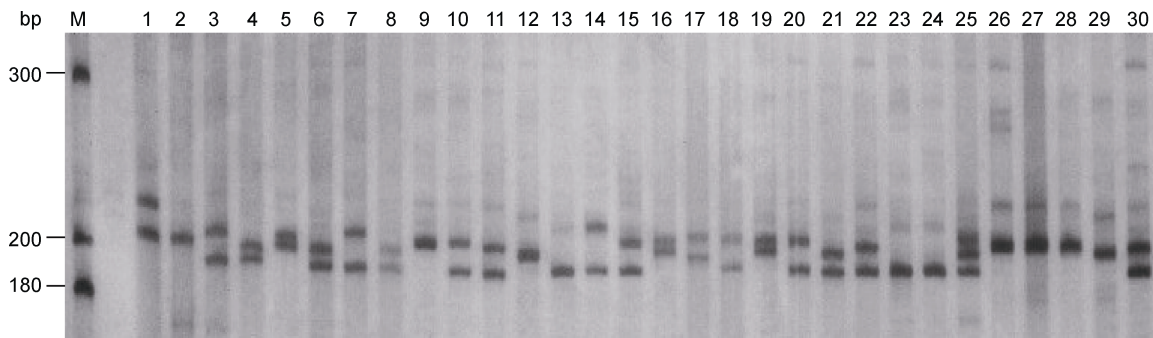


图 1 位点 *SJ04* 在 30 个子代个体的电泳扩增图

Fig.1 Electrophoretogram of 30 offsprings at microsatellite loci *SJ04*
M: 20bp 分子量标准; 1—30: 30 个子代个体

表 2 微卫星位点遗传信息
Tab.2 Genetic information of microsatellite loci

位点	等位基因数	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量
<i>SJ01</i>	8	0.886	0.855	0.836
<i>SJ04</i>	5	0.730	0.741	0.696
<i>SJ09</i>	7	0.902	0.845	0.823
<i>SJ17</i>	5	0.835	0.750	0.706
<i>SJ33</i>	7	0.886	0.845	0.823
<i>Psj2464</i>	6	0.859	0.792	0.760
<i>Psj2969</i>	8	0.879	0.851	0.832
AJMS003	7	0.898	0.842	0.820

2.4 基于排除法的亲子鉴定结果

如表 4 所示, 子代编号为 013 的个体与编号为 1003 的候选父本 1 在 8 个位点处的基因型都一致, 根据孟德尔遗传定律, 不能排除子代与候选亲本之间的亲子关系, 又知该标记的累积排除概率大于 0.9, 可得候选亲本 1 为子代的亲生父亲。而子代 013 与编号为 1011 的候选父本 2 在位点 *SJ33*、*Psj2462*、*Psj2969* 处的基因型不符合孟德尔遗传定律, 所以可以排除子代与候选父本 2 之间具有亲子关系。根据基于排除法对所有亲本和子代的基因型进行判定, 有 37 个子代有 1 个候选亲本, 有 194 个子代有 2 个及以上候

表 3 微卫星位点的排除概率

Tab.3 Exclusion probability of microsatellite loci

位点	排除概率 1[PE(1)]	排除概率 2[PE(2)]	排除概率 3[PE(3)]
<i>SJ01</i>	0.460	0.296	0.130
<i>SJ04</i>	0.671	0.495	0.314
<i>SJ09</i>	0.488	0.318	0.149
<i>SJ17</i>	0.659	0.483	0.301
<i>SJ33</i>	0.487	0.317	0.148
<i>Psj2464</i>	0.588	0.409	0.227
<i>Psj2969</i>	0.469	0.303	0.145
AJMS003	0.493	0.322	0.152
累积排除概率 (CPE)	0.9934	0.9997	0.9999

表 4 子代 013 与候选亲本在 8 个微卫星位点的基因型

Tab.4 The genotypes of 013 and candidate parents at 8 microsatellite loci

位点	子代(013)	候选亲本 1(1003)	候选亲本 2(1011)
<i>SJ01</i>	312/315	312/310	312/315
<i>SJ04</i>	195/191	195/199	191/195
<i>SJ09</i>	283/286	283/280	286/283
<i>SJ17</i>	109/110	109/111	110/110
<i>SJ33</i>	172/176	172/170	165/163
<i>Psj2464</i>	169/167	169/171	171/175
<i>Psj2969</i>	140/135	140/143	145/147
AJMS003	116/116	116/114	116/119

表中黑体下划线数据表示不符合孟德尔遗传定律的位点基因型

选亲本, 其中, 具有 2 个候选亲本的个体较多, 有 186 个。

2.5 基于似然法的亲子鉴定结果

利用 CERVUS 3.0 得到的基因型频率, 通过模拟抽样 10000 次, 候选亲本检测率为 59%, 位点检测率为 84%, 基因型判错率为 0.01, 在 95% 置信度时 Δ 阈值为 4.56, 在 80% 置信度时 Δ 阈值为 2.68。根据 Kalinowski 等(2007)修正的似然函数公式, 计算各候选亲本为真实亲本的可能性。当计算所得的候选亲本的 Δ 值大于 4.56 时, 鉴定的可信度为 95%, 当 $2.68 < \Delta < 4.56$ 时, 鉴定的可信度为 80%, 当 Δ 值小于 2.68 时, 则鉴定的可信度小于 80%。通过子代与候选亲本的基因型比对, 计算候选亲本的 LOD 值或 Δ 值就可以找出子代的最相似亲本、第二似亲本。如表 5 所示, 当置信度为 95% 时, 有 57 个子代个体找到了它们的最似亲本; 而置信度为 80% 时, 有 198 个子代个体找到了它们的最似亲本。

表 5 亲子鉴定结果(95% 置信度)

Tab.5 Results of parentage (95% confidence)

子代个体号	候选亲本号	值	子代个体号	候选亲本号	值
003	1005	5.35	128	1010	5.19
005	1012	5.88	129	1012	6.46
006	1013	5.77	133	1005	6.78
013	1008	6.88	135	1013	7.13
017	1003	7.07	139	1012	6.46
019	1008	7.66	142	1008	4.57
020	1013	5.33	145	1003	7.05
028	1010	5.16	151	1008	5.96
032	1008	4.61	156	1005	6.08
035	1005	4.85	158	1012	6.88
041	1012	4.56	160	1010	8.27
046	1003	5.20	167	1010	7.88
049	1013	5.50	171	1008	7.05
055	1010	5.33	172	1005	5.76
062	1005	4.61	183	1010	5.63
064	1005	4.85	185	1003	6.36
077	1010	6.04	188	1012	8.30
080	1008	5.26	193	1013	6.42
083	1012	5.76	195	1005	5.26
088	1013	5.63	202	1010	8.30
094	1008	6.36	206	1012	4.76
096	1010	4.76	212	1008	6.87
099	1003	7.78	218	1003	4.96
103	1012	5.96	220	1010	5.20
105	1005	5.13	223	1005	7.94
107	1008	6.04	227	1013	4.61
111	1013	5.03	235	1013	4.76
120	1012	6.29	237	1005	5.50
126	1008	6.78			

3 讨论

在应用微卫星进行亲权鉴定过程中既要体现检测系统的有效性又要根据累积排除概率值的参考标准选择最佳微卫星位点检测数目, 防止位点检测数目盲目性的增加, 以降低鉴定成本。基于排除法的亲权鉴定是按孟德尔定律逐个检查可疑父亲和可疑母亲, 只要有一个基因型不合就可排除。然而在实验中常找出多个可疑父母, 由于亲缘关系很近, 已有的标记难以排除, 就需增加微卫星标记, 排除到剩下唯一父亲、母亲。在顾颖等(2012)的研究中提到, 微卫星标记数目越多, 多态性越丰富, 其排除非亲本的能力越高, 但当标记数目达到一定数量时再增加标记, 累

积排除率变化不明显, 考虑到应用中成本和工作量的因素, 应选择适当的标记数。其模拟分析表明, 在双亲信息未知的情况下要达到亲权鉴定的要求通常需 8—12 个微卫星位点, 已知单亲信息的情况下, 通常需要 5—8 个位点。葛会争等(2012)的研究中提到了微卫星标记数与鉴定率的关系, 一般检测的遗传座位越多, 得到正确鉴定结果的概率越大; 每个座位在群体中含有的等位基因数越多, 得到正确鉴定结果的概率也会更高。其研究结果表明在候选亲本数目较少时, 6—8 个多态性良好的标记就能达到较高的鉴定准确率。本研究由于候选亲本数目较少, 选取了 8 个多态信息含量高的微卫星位点, 8 个位点的 PIC 均大于 0.5, 根据 Botstein 等(1980)将多态性信息含量分为高、中、低三个层次, 表明本实验所选择的微卫星位点具有高度多态性。多态信息含量的高低表明了品种遗传基础的丰富多样性, 等位基因数越多, 多态性也越丰富, 杂合度高, 在个体识别中的应用价值也就越大。由于当累积排除概率大于 0.9973 时, 可以认定有亲子关系(Vogt *et al.*, 1991; Cerit, 2003), 本研究的排除概率数据表明可以使用本实验所选的基因位点对本群体进行亲权鉴定, 并且具有足够的精确性, 鉴定结果可靠。

亲权鉴定所采用的方法则主要有三种(Jones *et al.*, 2003): 排除法、似然法和基因型重建法, 其中基因型重建较多用于存在多父本现象的物种种群结构分析中(Amavet *et al.*, 2008), 不适用于本研究。排除法是亲子鉴定一个非常有效的方法, 因为可以单独解释亲子对之间的关系, 而不需要其它假设(Milligan, 2003)。本研究中, 微卫星位点的累积排除概率为 0.9934、0.9997、0.99999, 根据 Weller 等(2004)对排除概率和亲缘关系确认的划分, 排除概率大于 0.9, 后代与亲本之间的标记没有一个有差异, 就可确定它们之间的亲缘关系; 若有一个标记有差异, 则不能排除它们之间的亲缘关系, 如果两个或更多个标记之间存在差异则可排除它们之间的亲缘关系, 基于此, 利用排除法为 37 个个体找到了它们的亲本。虽然排除法在进行亲子鉴定确定或否定亲子关系时简单有效, 但由于普通的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行个体识别时可能会产生一些不精确的偏差问题、无效等位基因或基因型错判等问题, 导致一个子代存在两个或更多个候选亲本, 也可能真实亲本被排除导致

子代没有亲本(Chevalet *et al.*, 1997; Marshall *et al.*, 1998)。在作者的研究中, 排除法确定的 37 个个体有唯一亲本, 其它个体暂无法判定, 此时就需要结合似然法来进行分析。基于似然法的亲子鉴定可以避免应用排除法时出现的问题(Thompson, 1975), 当一个子代有多个候选亲本无法排除时, 似然法可以找到其最似亲本(Meagher, 1986)。Marshall 等(1998)定义 Δ 用于亲子鉴定, Δ 为最似亲本与第二似亲本的 LOD 值的差, Δ 值越大, 其鉴定可信度越高。在研究中通过运行 CERVUS 3.0 得到各子代个体与候选亲本的 Δ 值, 当子代对应的有两个及以上候选亲本时, 选择 Δ 值最高的为最似亲本, 如个体 019, 其候选亲本 1(1008)的 Δ 值为 7.66, 大于 Δ 值为 4.53 的候选亲本 2(1006), 所以最终确定亲本 1008 为个体 019 的最似亲本。将排除法和似然法结合应用, 是目前进行亲子鉴定研究常用手段。贺建宁(2010)¹⁾应用 12 个微卫星基因座, 结合排除法和似然法, 最终为 406 只子代找到了它们的亲生父母, 386 只找到了它们的亲生母亲。余建秋等(2010)利用 7 对微卫星标记对 27 只豚鹿进行了基因分型, 最终成功鉴定了 13 对父子关系, 其中排除法鉴定 8 对, 似然法鉴定 5 对且置信度达 95%。本研究应用 8 个微卫星位点, 综合排除法和似然法最终成功为 95.4%(229)的子代个体找到了它们的亲本, 置信度大于 80%。

亲权鉴定最早应用于司法鉴定领域, 随着其技术发展成熟, 现在已经广泛地应用到动物学、植物学及生态学等相关领域。在水产动物遗传育种中, 随着现代生物科技的不断发展, 亲权鉴定也广泛地为良种选育、系谱追踪提供技术支持, 应用亲权鉴定技术对鉴别个体身份、清晰系谱信息有着极为重要的现实意义。程鹏等(2011)对不同壳色虾夷扇贝进行了家系鉴定, 探讨了微卫星标记在其家系鉴定中的可行性, 为追踪不同壳色亲本来源、进行虾夷扇贝壳色群体选育和家系选育工作提供分子辅助工具。Dong 等(2006)研究了微卫星标记在中国对虾亲缘关系鉴定中的应用, 仅用 5 个微卫星位点就成功鉴定出可能来源于 30 对亲本的后代, 表明亲权鉴定可以加快中国对虾在混养家系中的选育进程。利用微卫星进行人工繁育过程中刺参亲本识别, 是现代亲子鉴定技术在刺参养殖实践活动的具体应用, 可为刺参良种选育中混养群体优势性状溯源、系谱明晰提供便捷可靠的工作

1) 贺建宁, 2010. 利用微卫星确定中国西门塔尔牛亲缘关系. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 23—29

具,从而提高选育效率,有效缩短人工繁育周期,加快良种选育进程,促进刺参养殖产业的健康持续发展。

参 考 文 献

- 孙孝德,孙国华,杨建敏等,2010.刺参基因组 DNA 提取的探讨. 生物技术通报, 3: 149—153
- 余建秋,王强,刘选珍等,2010.基于微卫星位点的人工圈养豚鹿亲子关系鉴定. 兽类学报, 30(2): 200—204
- 顾颖,李超,鲁翠云等,2012.建鲤微卫星 DNA 亲权鉴定. 遗传, 11: 1447—1455
- 葛会争,贾志英,李池陶等,2012.黑龙江野鲤与德国镜鲤杂交组合的亲权鉴定分析. 上海海洋大学学报, 21(4): 489—494
- 程鹏,杨爱国,吴彪等,2011.微卫星标记在不同壳色虾夷扇贝家系亲权鉴定的适用性. 水生生物学报, 35(5): 768—775
- Amavet P, Rosso E, Markarian R *et al*, 2008. Microsatellite DNA markers applied to detection of multiple paternity in *Caiman latirostris* in Santa Fe, Argentina. *J Exp Zool*, 309A: 1—6
- Botstein D, White R L, Skolnick H *et al*, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Animal Genetics*, 32: 314—331
- Bowcock A M, Weber J S, Ford O R, 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368: 455—457
- Cerit H, 2003. Determination of the allele frequency of some genomic loci in a Holstein cattle population and its importance in individual identification. *Animal Science*, 27: 81—91
- Chevalet Sancristobal, Magali Claude, 1997. Error tolerant parent identification from a finite set of individuals. *Genetical Research*, 70: 53—62
- Dong Shirui, Kong Jie, Zhang Tianshi *et al*, 2006. Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 258: 283—288
- Emel Ozkan M, Ihsan Soysal, Muhittin Ozder, 2009. Evaluation of parentage testing in the Turkish Holstein population based on 12 microsatellite loci. *Livestock Science*, 124: 101—106
- Fernando Rendo, Mikel Iriondo, 2011. Microsatellite based ovine parentage testing to identify the source responsible for the killing of an endangered species. *Forensic Science International: Genetics*, 5: 333—335
- Jamieson A, 1994. The effectiveness of using co/dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full/sib pair members. In: *Festschrift in Honour of Dr Clyde J Stormont*. *Animal Genetics*, 25: 37—44
- Jamieson A, Taylor S C S, 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, 28: 397—400
- Jones A G, Ardren W R, 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol Ecol*, 12: 2511—2523
- Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T, 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*, 16(5): 1099—1106
- Marshall T, 2006. Cervus 3.0, Cervus is a computer program for assignment of parents to their offspring using genetic markers. *Mol Ecol*, 7: 639—655
- Marshall T, Slate J, Kruuk L E *et al*, 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*, 7(5): 639—655
- Meagher T R, 1986. Analysis of Paternity within a Natural Population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of the most-likely male parents. *American Naturalist*, 128: 199—215
- Milligan B G, 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics*, 163(3): 1153—1167
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583—590
- Nie Hongtao, Li Qi, Kong Lingfeng, 2012. Development of four multiplex PCRs in the Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and their validation in parentage assignment. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44: 96—101
- Thompson E A, 1975. The estimation of pairwise relationships. *Hum Genet*, 39(2): 173—188
- Vogt U, Weise W, Cleve H, 1991. The examination of the ITI system in disputed paternities. *Int J Legal Med*, 104(4): 201—204
- Weber J L, May P E, 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Hum Genet*, 44: 388—396
- Weller J I, Feldmesser E, Golik M *et al*, 2004. Factors affecting incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein population. *Dairy Science*, 87(8): 2627—2640

PARENTAGE IDENTIFICATION USING MICROSATELLITE DNA IN ARTIFICIAL BREEDING OF *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

LI Xue-Yan^{1,2}, SUN Guo-Hua², YANG Jian-Min², LIU Zhao-Cun³,
WEI Xiu-Mei², WANG Wei-Jun², GUO Ting-Ting^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2. Shandong Marine Fisheries Research Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Yantai, 264006; 3. Huachun Aquaculture and Technology Development Limited Liability Company of Dongying Estuary, Dongying, 257236)

Abstract In the present study, 8 microsatellite loci were adopted for parentage identification of 240 offspring and total 14 parents in artificial breeding group of *Apostichopus japonicus*. The results showed that all the 8 microsatellite loci had genetic polymorphisms, the total number of alleles was 53, and the mean number of alleles was 6.63. The observed heterozygosity ranged from 0.730 to 0.902, and PIC values were 0.696—0.836. Analyzing by CERVUS 3.0, the calculate exclusion probabilities of microsatellite loci were 0.9934, 0.9997 and 0.99999. Based on Elimination method and judged by the genotypes of parents and offspring, 37 individuals had one parents and 194 individuals had two or more candidate parents. Based on Likelihood method, there were 198 individuals found the most like parents at 80 percent confidence level. Parental Identification on the results of the complementary methods, 229 individuals found their parents with 95% success rate. The results can provide technical support and theoretical basis for parentage identification in the breeding practice of *A. japonicus*.

Key words *Apostichopus japonicus*, microsatellite, parentage testing