

利用微卫星标记对四带无须鲃不同种群的遗传质量评价

陈晓虹, 张新钺, 刘春, 王芳, 李凯彬*

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

【摘要】 目的 分析四带无须鲃封闭群及近交群的遗传质量。**方法** 筛选多态性丰富的四带无须鲃微卫星序列,通过构建两个多重PCR反应体系再利用毛细管电泳技术进行分型,开展群体遗传多样性分析。**结果** 野生群、WT封闭群、BT封闭群及近交群的平均等位基因数分别为6.5833、3.1667、3.0833和3.1818,平均多态信息含量分别为0.5969、0.3748、0.4159和0.4241。群体遗传质量检测分析表明:4个群体间遗传分化结果和近交群由野生群、封闭群逐渐筛选获得的过程相符。**结论** 筛选的微卫星标记可用于四带无须鲃不同群体的遗传质量分析,为其遗传质量控制及监测提供方法基础。

【关键词】 四带无须鲃;微卫星标记;遗传质量;多重PCR

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 04-0499-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.015

Genetic quality evaluation in different populations of tiger barb, *Puntius tetrazona*, using microsatellite markers

CHEN Xiaohong, ZHANG Xincheng, LIU Chun, WANG Fang, LI Kaibin*

(Pearl River Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380, China)

Corresponding author: LI Kaibin. E-mail: likaibins@126.com

【Abstract】 Objective To analyze and evaluate the genetic quality of closed populations and inbred population of tiger barb, *Puntius tetrazona*. **Method** The microsatellite sequences with abundant polymorphism in tiger barb were screened, and two multiple PCR reaction systems were established. Then four populations were analyzed by capillary electrophoresis to identify the genotype and evaluate the genetic diversity. **Result** The average number of alleles in the wild group, WT closed group, BT closed group, and inbred group were 6.5833, 3.1667, 3.0833, and 3.1818. The average polymorphic information contents were 0.5969, 0.3748, 0.4159 and 0.4241, respectively. The analysis of population genetic quality showed that the result of genetic differentiation between the four groups were consistent with the process of the inbred population bred from the wild and closed group gradually. **Conclusion** These microsatellite markers can be used to analyze the genetic quality of different populations of tiger barb, providing a method ological basis for their genetic quality control and monitoring.

【Key words】 *Puntius tetrazona*; microsatellite marker; genetic quality; multiple PCR reaction

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

鱼类为低等脊椎动物,其内分泌、神经、皮肤、眼、血液循环等系统已具脊椎动物的基本模式,在

一定程度上可与人类的对应性状相类比;鱼类大多体外受精、体外发育,饲养简单,养殖成本相对较

[基金项目] 国家科技支撑计划 (No. 2015BAI09B05)。

Funded by National Science and Technology Support Plan of China (No. 2015BAI09B05)。

[作者简介] 陈晓虹 (1993—), 女, 科研辅助, 学士, 主要从事修饰品系筛选和感染模型建立。E-mail: iris-chan0316@qq.com

[通信作者] 李凯彬 (1973—), 男, 研究员。E-mail: likaibins@126.com

低,作为高等动物的重要替代不失为经济且有效的选择,已逐渐成为比较医学研究的重要材料。大部分鱼类在生命早期均呈透明状,但随着身体发育,体表色素细胞的生长使光线难以透过身体,部分应用优势逐渐丧失^[1],相关应用需依赖复杂仪器或连续采样解剖,故鱼类的成体透明突变有更好的应用空间。

四带无须鲃(*Puntius tetrazona*)具体型小、胚体透明、繁殖快、易于获得等优点,为病原感染模型、器官发育等相关研究的优良材料。本实验室在四带无须鲃种群中发现 1 尾自发透明突变个体,该突变全身透明,不论幼鱼或成体,其心脏、肝、肾、脊椎等器官皆清晰可见,在不处死动物的情况下可对活体动物进行连续观察,在同一动物身上能得到一系列直观的动态试验数据,是活体研究少有的优良材料。在微孢子虫和诺卡菌的感染过程中,病原在鱼体内的扩散及引起炎症反应、病理变化动态过程、时空分布可直观观察和实时获得,有普通鱼类无法比拟的应用优势,大大提高了研究效率并获得良好的应用效果,在水生动物病害以及水环境污染生物效应等相关研究中有一定的应用前景^[2-6],或可作为鱼类实验动物品系系统研究。

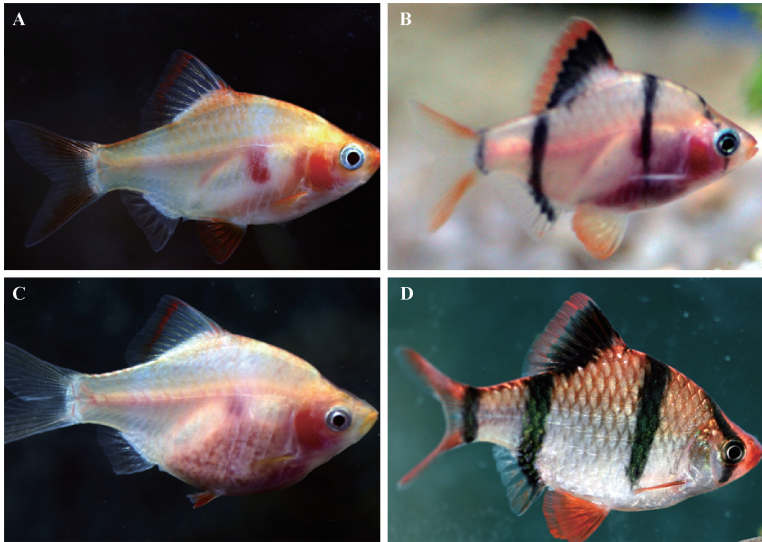
课题组分别选取黑体透明群体和白化且透明双突变群体中健壮个体作为亲本培育四带无须鲃封闭群,采用随机交配法进行繁殖,每代收集不少于 15 对鱼产下的后代,选取健壮个体繁殖下一代。黑体透明群体命名为 BT 封闭群,已繁育至第 7 代;

白化且透明群体命名为 WT 封闭群,已繁育至第 8 代。近交群最初来源于 1 雌 1 雄的 2 尾白化且透明的四带无须鲃个体,采用连续近亲交配方式培育,已繁育至第 3 代。遗传质量是实验动物化的重要内容。在封闭群或近交系培育过程中,必要的遗传检测必不可少,且成为实验动物培育和资源保存的重要手段^[7-8]。生化标记分析法是国家标准的遗传检测方法,通过检测酶类或异构蛋白的变化来推测其基因型,具简便快速、经济实惠、检测位点明确等优点,但存在检测位点少,多态性差、反映遗传变异有限等不足^[8-9]。而微卫星标记(microsatellite marker)具有高度多态性,呈共显性遗传,重复性好,易于自动化分析等优点,已广泛应用于物种遗传多样性、群体遗传结构分析、遗传漂变和亲子鉴定等方面^[9-10],是评价实验动物遗传质量的有效手段。本研究在四带无须鲃微卫星位点筛选的基础上,建立四带无须鲃的遗传检测方法,并应用于四带无须鲃封闭群和近交群体的检测,为其实验动物化研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

四带无须鲃封闭群和近交群均取自珠江水产研究所,BT 和 WT 封闭群皆为第 7 代个体,近交群为按全同胞交配繁殖的第 3 代个体;野生群来自广州地区。野生群 30 尾,其他种群各 40 尾。不同种群外观表型见图 1。



注:A. WT 封闭群;B. BT 封闭群;C. 近交群;D. 野生群。

图 1 四带无须鲃的四个实验群体

Note. A. WT population. B. BT population. C. Inbred population. D. Wild population.

Figure 1 Four populations of tiger barb

1.2 基因组 DNA 提取

剪取四带无须鲃尾鳍组织,用基因组模板一步法制备试剂盒(南京尧顺禹生物公司)提取基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。DNA 经分光光度计检测浓度后用去离子水稀释至 40 ng/ μ L, -20℃ 保存。

1.3 微卫星引物设计及筛选

从本实验室四带无须鲃转录组数据库中筛选

微卫星标记,用 Primer 5 软件设计 38 对微卫星引物,由广州艾基生物公司合成。参照文萍等^[11]的方法每对引物的正向引物 5'端添加相同的接头序列(VIC)。利用野生群的 10 个样本进行 PCR 筛选,从中选出能稳定扩增、产物条带清晰、产物多态性丰富的 12 对引物以构建多重 PCR 体系。12 对微卫星引物序列信息见表 1。

表 1 12 个多态性微卫星标记信息

Table 1 Information of 12 polymorphic microsatellite markers

位点 Loci	引物序列(5' - 3') Primer sequence		重复单元 Repeat motif	接头种类 Joint type
P0013	F - ATCAATGTGCGCGTGTATGT	R - ATCACGACAGGACCTTGGAC	(TG)30	VIC
P1329	F - TTGTCGAGACCTGTCCTTT	R - GCACAAAATGGTGATATGAA	(AG)19	FAM
P1703	F - CGATGAGTCACAAGGACACG	R - CAGTAACCTGCTGGCACAGA	(TG)18	NED
P0439	F - TTTGCTCAGCTTTCTGTTCG	R - TTTCACCTCGACTAGCACA	(AC)23	FAM
P0668	F - CAAATAAGCACACGGCAAAG	R - TCAGCAGGCTCACAGTGAAT	(CA)24	FAM
P0672	F - TTCCATTTGCATCTGCTCAA	R - TCATGCACGTCACATGAAAA	(TC)25	FAM
P0931	F - CGTGACAAAAAGAACGTGT	R - GAGGGAAGAAGGAATGGAGG	(TC)17	FAM
P1662	F - GCAGTTGGAGAAGGCATAATTC	R - AATTCAGTTCCATTGCCCAG	(GA)18	FAM
P0834	F - TGCTGTGCTAGTGAGATGCC	R - GTGTGCGTGATGAGAGGAGA	(TG)18	FAM
P1964	F - CATCGGAAC TTGAGGAGGAA	R - GGTAAACGGCAGACCTTTTG	(AG)27	NED
P0476	F - ATTCTGGATGCAGTCGTTCC	R - CAAACAGTCCTCAACCCCAT	(GT)20	VIC
P1419	F - GTCGCTGCTTGAAC TCTTCC	R - ATGAAGCGGTGAGATTACGG	(GT)24	VIC

1.4 多重 PCR 体系构建

根据 12 对引物的退火温度及其 PCR 产物长度范围进行引物组合,构建 2 个多重 PCR 体系。根据添加同种接头的同一体系中其扩增产物不重叠原则,合成引物时在正向引物 5'端添加不同的接头序列(VIC: 5'-CAGGAACTCAGTGTGACACTC - 3'、FAM:5' - AGCTCGACCAGTGAGTCAG - 3'、NED: 5'-CGACAGACAGTAAGGTCTCTG - 3'),单独的 VIC、NED、FAM 分别以绿色、黄色、蓝色荧光进行标记,合成荧光标记接头。

PCR 总反应体积为 10 μ L,其中含 1 $\times$ ABI Multiplex PCR Master Mix 5 μ L,上下游引物按 1:40 比例混合,荧光接头按 6-FAM:VIC:NED =1:1:1 比例混合(20 μ mol/ μ L)0.1 μ L,基因组 DNA 40 ng,双蒸水 2.3 μ L。PCR 反应程序为:94℃,预变性 4 min;94℃变性 30 s,退火 40 s,72℃延伸 50 s,28 个循环,然后再进行 8 个循环(94℃变性 30 s,56℃退火 40 s,72℃延伸 30 s),72℃再延伸 10 min,4℃保存。通过优化体系内各引物混合比例、退火温度、循环次数、荧光接头混合物浓度等条件确定最佳 PCR 扩增条件。

取 PCR 扩增产物 1 μ L,加入混有去离子甲酰胺

的分子量内标 GeneScan™ - 500LIZ™ 9 μ L 混匀,95℃变性 5 min,冷却后加样到 ABI 3130 遗传分析仪(Applied Biosystems,美国)中进行毛细管电泳检测分型,原始峰图用 Peak Scanner Software v1.0 基因分型软件(Applied Biosystems,美国)分析。

1.5 遗传统计分析

采用上述建立的微卫星多重 PCR 体系对 4 个群体的 12 个位点进行微卫星标记基因型检测,利用 Peak Scanner Software V1.0 软件获取其基因型,为保证等位基因分型结果的准确性,人工校对不能确定基因型的样品,相同条件重复 2 ~ 3 次扩增和分型。利用 Popgene32 (Version 1.31) 软件统计分析 4 个群体 12 个基因座的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和 χ^2 检验 Hardy-Weinberg 平衡。采用 SPSS Statistics 17.0 软件的方差分析(ANOVA)方法对 WT 封闭群、BT 封闭群及近交群 3 个群体间的微卫星基因座等位基因数(N_a)和多态信息含量(PIC)进行差异性检验。采用 Arlequin 311 软件中的分子方差分析(ANOVA)方法估算群体间的遗传分化指数(F_{ST}),利用 UPGMA 法构建四带无须鲃 4 个

群体间的系统进化树。根据 Botstein^[12] 等的方法计算每个微卫星位点的多态信息含量(*PIC*), 计算公式如下:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

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 为某一基因座上等位基因数。

2 结果

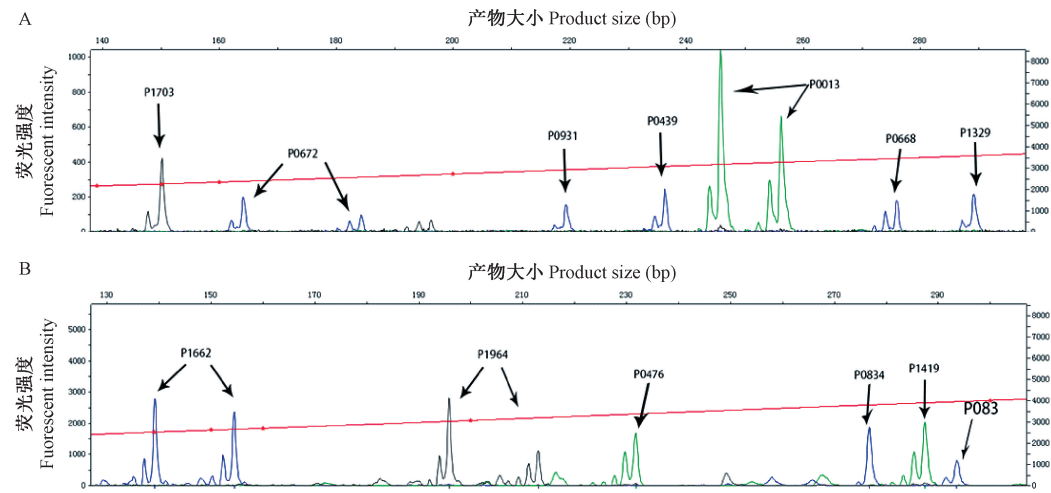
2.1 多重 PCR 体系构建

通过优化多重 PCR 反应参数, 建立了 2 组微卫星多重 PCR 体系, 每组多重 PCR 具体参数见表 2。多重 PCR 体系 1、2 在四带无须鲃中的扩增效果见图 2。

表 2 两组微卫星多重 PCR 体系特征

Table 2 Characteristics of the two multiplex PCR systems

多重 PCR Multiplex PCR	位点 Loci	引物体积比 Volume ratio	循环数 Cycle number	荧光接头浓度 Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)	产物大小 Product size (bp)
体系 1 Multiplex set 1	P0013	0.2	28	2	56.0	246 – 289
	P1329	0.3				285 – 299
	P1703	0.6				150 – 212
	P0439	0.5				231 – 247
	P0668	0.4				272 – 280
	P0672	0.3				164 – 194
	P0931	0.15				213 – 226
体系 2 Multiplex set 2	P1662	0.4	26	2	55.0	129 – 154
	P0834	0.4				258 – 297
	P1964	0.4				184 – 230
	P0476	0.4				203 – 244
	P1419	0.4				263 – 295



注: 箭头所指为不同引物扩增产物的指示峰。P083 位点统计时发现部分个体等位基因带型不一致, 在后续分析时未采用。

图 2 多重 PCR 体系 1(A)、体系 2(B) 中各微卫星位点的毛细管电泳图

Note. The arrow indicates the peak amplified by the primers. Because of the inconsistent banding pattern of the allele in some sample, the P083 locus was removed.

Figure 2 Capillary electrophoresis of microsatellite loci after multiple PCR (set 1 and 2)

2.2 四带无须鲃野生群体遗传质量检测

统计各位点的 SSR 分型结果, 转换成基因型, 计算遗传参数。12 个位点在野生群 30 个样本中共检测到 79 个等位基因, 平均每个位点检测到 6.5833 个等位基因。12 个位点检测到平均等位基因数(N_a)和平均有效等位基因数(N_e)分别为 6.5833 和 3.2483, 平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)分别为 0.5333 和 0.6486, 平均多态信息含量(PIC)为 0.5969。野生群 208F 位点呈低度多态性($PIC < 0.25$), 227F 位点呈中度多态($0.25 < PIC < 0.5$), 其

均有效等位基因数(N_e)分别为 6.5833 和 3.2483, 平均观测杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)分别为 0.5333 和 0.6486, 平均多态信息含量(PIC)为 0.5969。野生群 208F 位点呈低度多态性($PIC < 0.25$), 227F 位点呈中度多态($0.25 < PIC < 0.5$), 其

他位点都呈高度多态性($0.5 < PIC$)。对野生群 12 个 255 V、137 N、123F、272F、199 V、266 V 和 194 N 8 个位点进行 Hardy-Weinberg 平衡 χ^2 检验,结果 258F、位点偏离平衡($P < 0.05$),见表 3。

表 3 四带无须鲃野生群体 12 个微卫星位点的遗传参数

位点 Loci	野生群 Wild groups					<i>P</i>
	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	
162F	4.0000	2.3316	0.5333	0.5808	0.5191	0.0632
208F	4.0000	1.2721	0.2333	0.2175	0.2090	0.9988
227F	5.0000	1.7664	0.3333	0.4412	0.4030	0.1157
258F	5.0000	3.5928	0.3333	0.7339	0.6722	0.0000
280F	6.0000	2.9605	0.5333	0.6734	0.6219	0.1068
255V	9.0000	3.6961	0.5667	0.7418	0.6894	0.0000
137N	7.0000	4.8387	0.2000	0.8068	0.7631	0.0000
123F	6.0000	4.1958	0.7333	0.7746	0.7229	0.0000
272F	7.0000	2.5000	0.7667	0.6102	0.5241	0.0000
199V	9.0000	5.2941	0.7667	0.8249	0.7912	0.0000
266V	6.0000	2.5316	0.6333	0.6153	0.5265	0.0000
194N	11.0000	4.0000	0.7667	0.7627	0.7208	0.0281
Mean	6.5833	3.2483	0.5333	0.6486	0.5969	0.1094

表 4 四带无须鲃封闭群体 12 个微卫星位点的遗传参数

Table 4 Genetic parameters of 12 microsatellite loci in the closed populations of tiger barb						
位点 Loci	WT 封闭群 WT closed group					<i>P</i>
	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	
162F	2.0000	1.5355	0.4500	0.3532	0.2879	0.0757
208F	3.0000	2.0526	0.8750	0.5193	0.4045	0.0000
227F	2.0000	1.0950	0.0000	0.0888	0.0830	0.0000
258F	3.0000	2.3636	0.3846	0.5844	0.5011	0.0002
280F	3.0000	1.8681	0.4750	0.4706	0.4193	0.6465
255 V	7.0000	3.9900	0.7250	0.7589	0.7152	0.0990
137 N	2.0000	1.1050	0.0000	0.0962	0.0905	0.0000
123F	4.0000	2.9277	1.0000	0.6668	0.5958	0.0000
272F	4.0000	3.0160	0.5750	0.6769	0.5979	0.0000
199 V	2.0000	1.1050	0.1000	0.0962	0.0905	0.7745
266 V	3.0000	2.0430	0.4872	0.5171	0.3926	0.7909
194 N	3.0000	1.5944	0.4750	0.3775	0.3195	0.3025
Mean	3.1667	2.0580	0.4622	0.4338	0.3748	0.2241

BT 封闭群 WT closed group						
位点 Loci						<i>P</i>
	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	
162F	2.0000	1.7241	0.5500	0.4253	0.3318	0.0592
208F	2.0000	1.9692	0.8750	0.4984	0.3711	0.0000
227F	3.0000	1.8278	0.2632	0.4651	0.4094	0.0019
258F	2.0000	1.9231	0.8000	0.4861	0.3648	0.0000
280F	2.0000	1.5031	0.4250	0.3389	0.2787	0.0994
255 V	5.0000	4.6512	1.0000	0.7949	0.7499	0.0000
137 N	2.0000	1.0253	0.0250	0.0250	0.0244	1.0000
123F	2.0000	1.9036	0.7750	0.4807	0.3620	0.0001
272F	6.0000	3.7559	0.8250	0.7430	0.6895	0.0001
199 V	2.0000	1.9888	0.9250	0.5035	0.3736	0.0000
266 V	6.0000	2.5682	0.9000	0.6184	0.5337	0.0000
194 N	3.0000	2.3512	0.8250	0.5820	0.5024	0.0005
Mean	3.0833	2.2660	0.6823	0.4968	0.4159	0.0968

2.3 四带无须鲃封闭群遗传质量检测

12 个位点在封闭群 80 个样本中共检测到 41 个等位基因,平均每个位点检测到 3.42 个等位基

因。WT 和 BT 封闭群的平均 *Na* 值分别为 3.1667 和 3.0833,平均 *Ne* 值分别为 2.0580 和 2.2660,平均 *Ho* 值分别为 0.4622 和 0.6823,平均 *He* 值分别

为 0.4338 和 0.4968,平均 *PIC* 值分别为 0.3748 和 0.4159。WT 封闭群中,除去 227F、137 N、199 V 3 个低态性位点,其余位点均为中度或高度多态,高度多态位点 4 个;BT 封闭群中,低度多态位点 1 个,高度多态位点 4 个,中度多态位点 7 个。对封闭群 12 个位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结果 WT 封闭群中 208F、227F、258F、137 N、123F 和 272F 6 个位点偏离平衡。BT 封闭群中 208F、227F、258F、255 V、123F、272F、199 V、266 V、194 N 9 个位点偏离平衡,见表 4。

2.4 四带无须鲃近交群体遗传质量检测

12 个位点在近交群 40 个样本中共检测到 35 个等位基因,平均每个位点检测到 3.17 个等位基因,位点 227F 在近交群中缺失。近交群平均 *Na* 和 *Ne* 值分别为 3.1818 和 2.2806,平均 *Ho* 和 *He* 值分别为 0.6455 和 0.5448,平均 *PIC* 值为 0.4241。除 227F 位点,其余位点均为中度或高度多态。对近交群 12 个位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,208F、

280F、255 V、137 N、123F、272F、199 V、194 N 8 个位点偏离平衡。运用方差分析(ANOVA) 分别对 WT、BT 封闭群及近交群三个群体间的各微卫星基因座 *Na* 值和 *PIC* 值的差异性检验进行两两比较,LSD 及 Duncan 多重比较分析表明,WT 封闭群、BT 封闭群与近交群两两间的 *Na* 值和 *PIC* 值均无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 5。

2.5 四带无须鲃 4 个群体遗传结构分析

4 个群体的遗传分化系数 *FST* 表明,2 个封闭群间遗传分化较小(*FST* 为 0.0508),WT、BT 封闭群和近交群的遗传分化为中等程度(*FST* 分别为 0.1078、0.1381),野生群和 WT、BT 封闭群及近交群间遗传分化较大(*FST* 分别为 0.1777、0.1565、0.1599)。

4 个群体的遗传相似率和遗传距离显示 2 个封闭群的遗传相似率较高(见表 6)。采用 UPGMA 法构建 4 个群体的系统进化树(见图 3),由图可见,2 个封闭群首先聚为一支,然后再与近交群聚为一支。

表 5 四带无须鲃近交群体 12 个微卫星位点的遗传参数

位点 Loci	近交群 Inbred population					<i>P</i>
	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	
162F	2.0000	1.5679	0.4750	0.3668	0.2966	0.0563
208F	2.0000	2.0000	1.0000	0.5063	0.3750	0.0000
227F	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
258F	2.0000	1.5031	0.4250	0.3389	0.2787	0.0994
280F	3.0000	2.6208	0.7250	0.6263	0.5489	0.0162
255V	3.0000	2.8986	0.5000	0.6633	0.5805	0.0000
137N	3.0000	1.9465	0.0000	0.4924	0.3899	0.0000
123F	4.0000	2.9170	0.9750	0.6655	0.5942	0.0000
272F	4.0000	1.9453	0.6000	0.4921	0.4083	0.0000
199V	4.0000	2.7850	0.9250	0.6491	0.5717	0.0000
266V	3.0000	2.2207	0.6250	0.5566	0.4905	0.1070
194N	5.0000	2.6823	0.8500	0.6351	0.5549	0.0053
Mean	3.1818	2.2806	0.6455	0.5448	0.4241	0.1070

表 6 四带无须鲃野生群、封闭群、近交群的遗传相似率和遗传距离

Genetic similarity rate and genetic distance of wild, closed and inbred populations in tiger barb				
群体 populations	WT 封闭群 WT closed group	BT 封闭群 BT closed group	WT 群 Wild group	近交系 Inbred population
WT 封闭群 WT closed group		0.9105	0.5215	0.7370
BT 封闭群 BT closed group	0.0937		0.5233	0.7422
WT 群 Wild group	0.6510	0.6477		0.5431
近交系 Inbred population	0.3052	0.2982	0.6105	

注:对角线上的数字表示群体间的相似性率,对角线以下的数字表示群体间的相对遗传距离
Note. The number on the diagonal represents the similarity rate between groups, and the number below the diagonal represents the relative genetic distance between groups.

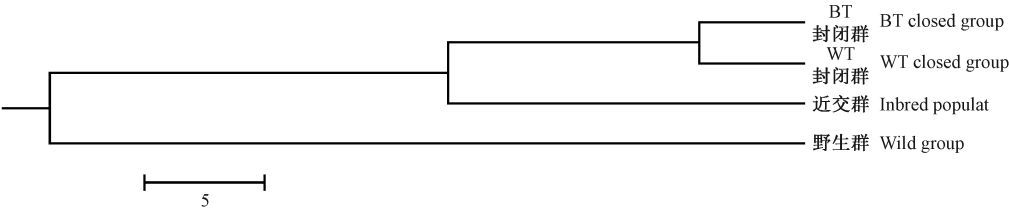


图3 四带无须鲃野生群、封闭群、近交群聚类图

Figure 3 Clustering diagram of the wild, closed and inbred populations of tiger barb

3 讨论

四带无须鲃于野生群体中发现透明突变,引入白化基因后形成 WT 封闭群,该群 1 对个体经全同胞交配繁殖,形成近交群体,这过程可能导致某些基因和位点的纯合或丢失。本研究发现野生群中存在 227F 位点,2 个封闭群部分个体该位点缺失,而近交群个体该点均缺失,这结果与封闭群和近交群的筛选过程一致。

各位点等位基因数及全部位点等位基因平均数是表示遗传多态性的重要参数^[8]。有效等位基因数(N_e)是基因纯合度的倒数,反映等位基因的相互影响, N_e 值和检测到的等位基因数越接近说明等位基因在群体中分布越均匀^[13],可作为群体遗传变异的一个指标。本研究四带无须鲃 4 个群体的平均 N_a 和 N_e 值范围分别为:3.0833 ~ 6.5833 和 2.058 ~ 3.2483,各群体内的等位基因分布较均匀,品系内遗传较稳定。

Botstein 等^[12]提出的多态信息含量(PIC)是衡量微卫星基因座位变异程度高低的重要指标。本研究 4 个群体平均 PIC 值范围为 0.3748 ~ 0.5969,野生群的平均 PIC 大于 0.5,表明野生群的遗传多样性较其余三个群体丰富。2 个封闭群和近交群的平均 PIC 含量均小于 0.5,12 个位点平均呈中度多态水平,可能是群体长期封闭繁殖导致 PIC 值降低,使遗传多样性偏低。有研究者认为群体 PIC 值偏低可能与采样群体部分等位基因发生缺失或选用微卫星位点检测到的等位基因数偏少有关^[14]。

H_o 和 H_e 反映群体遗传多样性。前者反映群体中实际杂合比例,而后者是假定各基因座位符合 Hardy-Weinberg 平衡而得到的杂合度,常被用来度量群体遗传多样性,其高低可反映群体遗传一致性程度, H_e 值越高,所在群体遗传多样性越丰富。野生群平均 H_o 和 H_e 值分别为 0.5333 和 0.6486,低

于一些野生鱼类 H_o 和 H_e 平均值^[15-16]。这可能是实验野生群来自人工养殖群体,一直养殖在封闭环境,和其他群体无基因交流所致。 H_o 和 H_e 值体现群体间相对的遗传纯合度,由于本研究利用野生群筛选多态性好的微卫星标记,多态性差的标记大多被剔除,使得实验获得的杂合度比实际情况低。在某种程度上, H_o 和 H_e 值是群体间相互比较的量的体现,本研究选择的野生群遗传均一性较好,故封闭群和近交群或有更好的遗传纯度。WT 封闭群的平均 H_o 值为 0.4622, H_o 值偏低,可能是杂合子缺失导致 227F 和 137 N 的 H_o 值为 0,而杂合子缺失与近亲繁殖、样本量大小、无效等位基因及人为因素等有关^[17]。4 个群体的 Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示大部分位点均显著和极显著偏离平衡状态,导致这一现象的原因除无效等位基因外,大部分的偏离可能是群体内近交所致。这种 Hardy-Weinberg 偏离平衡现象在实验动物封闭群的繁育研究中多有报道^[18-19]。以上结果表明本研究使用的微卫星位点可提供充足的遗传多样性信息,可满足群动物遗传背景检测的要求。

遗传分化系数 F_{ST} 表示种群间遗传分化程度。4 个群体的 F_{ST} 分析表明,2 个封闭群间遗传差异最小,遗传变异主要存在于群体内。封闭群和近交群遗传差异为中等程度,野生群和其他群体间均出现较大遗传差异。遗传相似率和进化树都表明两封闭群间的遗传相似度最高和遗传距离最小,亲缘关系最近,其次是封闭群和近交群亲缘关系较近,野生群和其他群体的相似度最小、遗传距离最远,亲缘关系较远,这些结果和近交群由野生群、封闭群逐渐筛选的过程相符。WT、BT 封闭群与近交群间的 N_a 和 PIC 值的差异性检验均为 $P > 0.05$,说明封闭群和近交群无显著差异,可能是选择的微卫星位点显著偏离平衡,影响了群体间的比较;也可能是近交群为第三代繁殖群体,遗传分化程度较小,与种群间 F_{ST} 的结论一致。

参 考 文 献 (References)

- [1] 张黎. 用于成年斑马鱼中活体细胞追踪的光学影像与流式检测技术的研究 [D]. 复旦大学, 2013.
Zhang L. Study on optical imaging and flow detection techniques for the tracking of living cells in adult zebrafish [D]. Fudan University, 2013.
- [2] Li KB, Chang OQ, Wang F, et al. Identification of a transparent mutant tiger barb *Puntius tetrazona* and its use for in vivo observation of a *Pleistophora* sp. (Microsporidia) infection [J]. J Fish Biol, 2012, 80(7) : 2393 – 2404.
- [3] Li KB, Chang OQ, Wang F, et al. Ultrastructure, development, and molecular phylogeny of *Pleistophora hyp-hessobryconis*, a broad host microsporidian parasite of *Puntius tetrazona* [J]. Parasitol Res, 2012, 111(4) : 1715 – 1724.
- [4] Wang F, Wng XG, Liu C, et al. Transparent Tiger barb *Puntius tetrazona*, a fish model for in vivo analysis of nocardial infection [J]. Vet Microbiol, 2017, 211 : 67 – 73.
- [5] 王芳, 刘春, 李凯彬, 等. 四带无须鲷透明品系的海分枝杆菌感染模型 [J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(6) : 20 – 26.
Wang F, Liu C, Li KB, et al. A *Mycobacterium marinum* infection model for transparent tiger barb *Puntius tetrazona* [J]. J South China Agr Univ, 2017, 38(6) : 20 – 26.
- [6] 刘春, 王庆, 石存斌, 等. 斑马鱼迟缓爱德华氏菌的鉴定、致病性及药物敏感性 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(3) : 105 – 111.
Liu C, Wang Q, Shi CB, et al. Identification, pathogenicity and drug susceptibility of zebrafish strains of *Edwardsia* strains [J]. J Huazhong Agr Univ, 2013, 32(3) : 105 – 111.
- [7] 蔡武卫. 实验动物的遗传质量控制及其意义 [J]. 海峡预防医学杂志, 1997, 3(3) : 68 – 70.
Cai WW. Genetic quality control of experimental animals and its significance [J]. Strait J Prev Med, 1997, 3(3) : 68 – 70.
- [8] 朱亮, 蔡月琴, 屠珏, 等. 应用微卫星标记研究 Dunkin Hartley 豚鼠封闭群的遗传背景 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(1) : 51 – 55.
Zhu L, Cai YQ, Tu Y, et al. Assessment of the genetic background in Dunkin Hartley guinea pig outbred stock using microsatellite DNA markers [J]. Chin J Exp Animals, 2011, 19(1) : 51 – 55.
- [9] 陈振文, 赵太云, 孙贺娟, 等. 微卫星 DNA 与生化标记分析对长爪沙鼠群体遗传分析的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4) : 276 – 279.
Chen ZE, Zhao TY, Sun HJ, et al. Comparison of population genetic analysis with microsatellite DNA and biochemical markers in Mongolia gerbils [J]. Acta Lab Animal Sci Sin, 2006, 14(4) : 276 – 279.
- [10] 公维华, 张宁波, 李奎, 等. 小型猪微卫星标记多重 PCR 体系的建立与应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2) : 21 – 25.
- Gong WH, Zhang NB, Li K, et al. Establishment of a microsatellite-labeling multiplex PCR system and its application in minipig [J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(2) : 21 – 25.
- [11] 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.
Wen P, Zhao J, Li W, et al. The parentage assignment of *Mauremys mutica* using multiplex PCR of microsatellites [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2015, 39(6) : 1134 – 1141.
- [12] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Human Genet, 1980, (32) : 314 – 331.
- [13] 徐龙鑫, 林瑞意, 李爱萍, 等. 利用微卫星标记分析云南矮马的遗传多样性 [J]. 西南农业学报. 2011, 24(3) : 1136 – 1139.
Xu LX, Lin RY, Li AP, et al. Genetic diversity of Yunnan pony based on microsatellite markers [J]. Southwest China J Agr Sci, 2011, 24(3) : 1136 – 1139.
- [14] 蔡磊, 陈小曲, 郑伟强, 等. 诸氏鲮虎鱼多态性微卫星标记的开发及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1) : 57 – 62.
Cai L, Chen XQ, Zheng WQ, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Mugilogobius chulae* [J]. Acta Lab Animal Sci Sin, 2015, 23(1) : 57 – 62.
- [15] 赵程, 梁旭方, 田昌绪, 等. 鳊属 5 种鱼类微卫星遗传多样性分析 [J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(5) : 76 – 80.
Zhao C, Liang XF, Tian CX, et al. Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships of five *Siniperca* species based on microsatellite markers [J]. J Huazhong Agr Univ, 2015, 34(5) : 76 – 80.
- [16] 傅建军, 李家乐, 沈玉帮, 等. 草鱼野生群体遗传变异的微卫星分析 [J]. 遗传, 2013, 35(2) : 192 – 201.
Fu JJ, Li JL, Shen YB, et al. Genetic variation analysis of wild populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using microsatellite markers [J]. Hereditas, 2013, 35(2) : 192 – 201.
- [17] Suci A, Uthairat NN, Worawut K. Study of genetic diversity of orange spotted grouper, *Epinephelus coioides* from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. Mar Biotechnol, 2005, 8 : 17 – 26.
- [18] Degorge J. Genetic evaluation of outbred rats [C]. In: Microbial Status and Genetic Evaluation of Mice and Rats. Proceedings of the 1999 US / Japan Conference, 2000, 47 – 50.
- [19] Kloting I, Nitschke C, Van den Brandt J. Impact of genetic profiles on experimental studies: outbred versus wild rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 189(1) : 68 – 71.

[收稿日期] 2018 – 06 – 04