大刺鳅(*Mastacembelus armatus*)二、三、四碱基重复微卫星标记的筛选和特征分析*

房祖业[1] 陈晓东[1] 吴咏诗[1] 谭洁瑢[1] 张玮恩[1] 王正宇[1]
林婷婷[1] 查广才[2] 舒 琥[1①]

(1. 广州大学生命科学学院 广州 510006; 2. 韩山师范学院食品工程与生物科技学院 潮州 521041)

摘要 对大刺鳅(*Mastacembelus armatus*)进行简化基因组测序, 开发二、三、四碱基重复类型的微卫星引物共 105 对(重复次数≥6), 其中可稳定扩增的引物有 50 对(47.6%), 通过多态性分析, 发现有 38 个微卫星位点表现出多态性, 从中随机选取三种重复类型微卫星各 10 对对北江群体进行遗传多样性分析, 及各 6 对对澜沧江大刺鳅群体进行遗传多样性分析。结果显示, (1) 在大刺鳅中二碱基重复微卫星位点筛选效率为 50%, 而三、四碱基重复的筛选效率分别为 31.1%、35%。(2) 北江群体的平均多态信息含量为 0.649, 比澜沧江群体(0.572)高, 30 个微卫星位点在北江群体中共检到 235 个等位基因, 且 93.3%的引物表现为高度多态水平, 18 个微卫星位点在澜沧江群体中共检到 120 个等位基因, 66.7%的引物表现为高度多态水平。(3) 二碱基重复的微卫星标记在两个野生群体检出的五项多态性指标高于三、四碱基重复。结果表明, 二碱基重复的微卫星比三四碱基重复的微卫星具有更高的筛选效率和多态性, 北江群体的遗传多样性比澜沧江群体高, 本研究所筛选的引物可以应用于群体间遗传多样性分析和遗传图谱的构建, 以及亲缘关系的鉴定等方面, 为大刺鳅种质资源保护研究奠定分子基础。

关键词 大刺鳅; 微卫星; 二、三、四碱基重复; 多态性
中图分类号 Q789; S968 doi: 10.11693/hyhz20170600172

大刺鳅(*Mastacembelus armatus*)俗称辣锥、刀鳅、石锥等, 隶属于合鳃目(Synbranchiformes)、刺鳅科(Mastacembelidae)、刺鳅属(*Mastacembelus*) (Nelson, 2006)。在全球主要分布于东南亚、非洲等地区, 在我国主要分布在南部地区, 如福建、广东、广西、海南和云南等地(《福建鱼类志》编写组, 1985; 郑慈英, 1989; 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 1991; 广西壮族自治区水产研究所等, 2006)。大刺鳅肉质鲜美, 营养丰富, 属于名贵淡水鱼类(蔡雪芹, 2006), 具有很高的经济价值。但是由于近年来长期的过度捕捞和江河环境污染, 使得大刺鳅野生资源遭到严重破坏,面临着逐渐枯竭的严峻形势, 已被广东、福建、湖南等省列为重点保护野生水生动物(陈忠, 2005)。

微卫星分子标记拥有通用性好, 多态信息容量高, 突变率高, 重复性、共显性好等优点(孙效文等, 2008), 在鱼类遗传育种中得到广泛应用, 可见于鱼类种群结构(Carvalho *et al*, 1994)、亲缘关系鉴定(Brooker *et al*, 1994)、种群遗传多样性(史方等, 2009)、遗传图谱构建及 QTL 定位等(宋国华等, 2005; 刘金亮, 2011)方面。在鱼类研究中多以二碱基重复微卫星引物的应用为主, 如赵哲霞等(2014)对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)进行遗传多样性研究所采用

* 国家公益性行业(农业)重大专项, 201303048 号; 广东省海洋渔业科技攻关与研发项目, A201601A05 号; 广东省科技计划项目资助, 2016A030303064 号, 2014A020208145 号; 广州大学创业项目。房祖业, E-mail: 2287495655@qq.com
① 通讯作者: 舒 琥, 博士, 教授, E-mail: shuhu001@126.com
收稿日期: 2017-06-26, 收修改稿日期: 2017-07-30

的 20 对微卫星引物均为二碱基重复, 海萨等(2008)对鲈形目河鲈(*Perca fluviatilis*)的二碱基重复微卫星引物进行筛选, 但是近年来在有尾目动物(Sequeira *et al*, 2005; 王慧等, 2012)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)等鱼类研究中发现三、四碱基重复位点较二碱基重复具有更高的筛选效率和多态性(鲁翠云, 2009; 李文升等, 2011; 谭照君等, 2011)。林婷婷(2016)用二碱基重复微卫星引物对不同群体大刺鳅进行了遗传多样性分析, 舒琥等(2017)对华南地区 7 个大刺鳅野生群体的形态差异进行了分析, 但未见有应用三、四碱基重复微卫星引物对大刺鳅进行研究分析的报道。本文通过筛选出多态性高的二、三、四碱基重复微卫星引物对大刺鳅的遗传多样性进行研究, 并比较三种碱基重复微卫星引物的筛选效率和多态性, 为二、三、四碱基重复微卫星引物在鱼类遗传多样性研究提供理论基础, 为大刺鳅及经济鱼类的遗传多样性评估和种质资源保护提供参考。

1　材料与方法

1.1　样本采集和基因组 DNA 提取

2015 年 8 月—2016 年 8 月, 在广东北江(平均体重 17.88g, 平均体长 19.44cm)和云南澜沧江(平均体重 24.99g, 平均体长 20.89cm)分别采集大刺鳅全鱼样本各 30 尾, 置于 90%酒精保存并带回实验室。每个样本取背部肌肉 25mg, 采用上海生工 Ezup 基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。用紫外分光光度计测定浓度和纯度, 定量至 100ng/μL。

1.2　微卫星引物的设计

选取完整性和纯度高的单个个体 DNA 送至广州基迪奥生物科技有限公司进行基因组高通量测序, 利用生物信息学方法, 根据各位点重复序列两端的侧翼序列选择性设计出 105 对引物, 重复次数在 5—27 之间, 二碱基重复次数在 15—25 之间, 三碱基重复次数在 8—11 之间, 四碱基重复次数在 5—21 之间, 引物由上海美吉生物医药科技有限公司合成。

1.3　大刺鳅微卫星引物的筛选

选用北江群体的大刺鳅 30 尾的基因组 DNA 作为模板, 对引物进行初步筛选。PCR 反应总体系为 24μL, 其中 Mix 12.5μL, 50ng/μL DNA 模板 2μL, 50μmol/L 引物各 1μL, ddH_2O 7.5μL。反应条件为 94ºC 预变性 5min, 94ºC 变性 40s, 以适宜温度退火 45s(部分见表 1), 72ºC 延伸 90s, 循环 35 次, 72ºC 继续延伸 10min。PCR 产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。从 105 个引物中筛选出能稳定扩增且产物与预期大小一致的引物共 50 对, 其片段长度均在 104—271bp。然后在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳下对 50 对引物进行多态性检测, 并通过调整扩增条件(如退火温度、Mg^{2+}浓度或循环次数)筛选出多态性较高、带型较清晰、重复性较好的引物。

1.4　多态性检测

筛选的引物用来合成 5'上游荧光引物(FAM、HEX、TEMED)。用荧光引物对北江和澜沧江大刺鳅群体各 30 尾的模板 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增体系为 10μL 反应体系: Mix 5.0μL、50μmol/L 荧光引物 F 为 0.5μL, 50μmol/L 引物 R 为 0.5μL, 50ng/μL 模板 DNA 1.0μL、ddH_2O 3.0μL, 扩增后的荧光 PCR 产物送上海生工生物工程有限公司进行 STR 测序分析。

1.5　数据处理

用 PopGene 软件统计各微卫星座位的等位基因频率(allele frequency, *P*)、观测等位基因数(observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数(effective number of alleles, N_e)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)期望杂合度(expected heterozygosity, H_e) (Yeh *et al*, 1999)。用 PIC-CALC 计算微卫星位点的多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。本实验将不同重复序列的微卫星的筛选率定义为: 最终筛选得到的稳定且多态性高的相应重复微卫星位点数目/最初设计并用于筛选的相应重复微卫星的序列数×100%。

2　结果与分析

2.1　二、三、四碱基重复微卫星引物筛选结果的比较

在本研究设计的 105 对引物(二碱基重复 20 对、三碱基重复 45 对、四碱基重复 40 对)中, 有 50 对能稳定扩增出目的条带。实验结果显示有 38 个位点表现出多态性并且扩增条带清晰, 其中二碱基重复的 10 对微卫星引物均表现出多态性, 筛选效率为 10/20×100% = 50%, 而三、四碱基重复均有 14 对, 因此三碱基重复的筛选效率为 14/45×100% = 31.1%, 四碱基重复的筛选效率为 14/40×100% = 35%。位点 ER6 在北江大刺鳅个体中的稳定性和多态性检测见图 1。

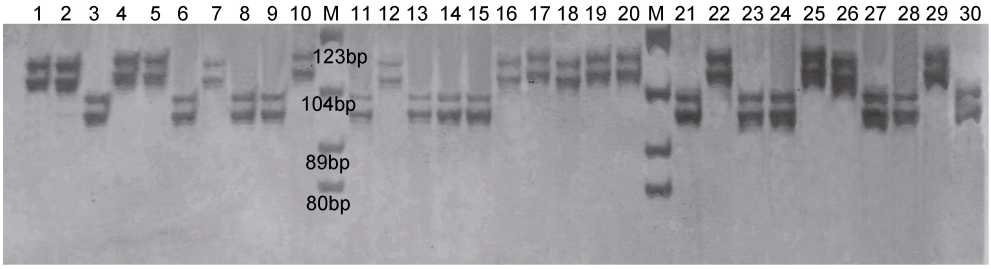

图 1 微卫星引物 ER6 在北江大刺鳅个体中的扩增结果

Fig.1 The amplification results of Beijiang *M. armatus* using microsatellite primer ER6

注: 图中 M 为 DNA Marker; 1—30 泳道为 ER6 位点对北江群体的 30 个大刺鳅个体的扩增图谱

表 1 38 对在大刺鳅中具有多态性的微卫星引物信息

Tab.1 Information of 38 pairs of primers with highly polymorphism in *M. armatus*

位点	引物序列(5′→3′)	重复序列	片段长度(bp)	退火温度(T_m)
ER2	F:TATTGAATGTAAACGGCGGC R:GCTTTGAATGAGACGCACAC	(CA)17	104	56
ER5	F:AATTCCTACGAGCCACATGC R:AGTTCATTGGCACCCTGAAA	(GT)14	114	58
ER6	F: GGGGATATTGAGAAGGACAAA R: ACCAAAAAGGCAACCCTAGA	(AC)19	109	59
ER9	F:AGTTCTGTTAACCTCTAACCTCCA R:TAGCTGAGCGTGGTGCTTTA	(TG)22	204	58
ER10	F:TCGATAGCCCAATGTTCCTC R:TCCCGATCCATTCAGAAGAC	(CA)20	174	57
ER15	F:TGTTTTAGTGTGCCACAGGG R:TGCACATTTTCCCCTCTTTC	(AC)22	229	56
ER18	F:AAATAAGCAGAGGGGGTTGG R:AGACCTGGAGCAGCTTTCAA	(GT)16	137	56
ER22	F:GTGTTCAGCCCACTCACTCA R:GGAGCACTGTGCAGACAGAA	(CA)25	141	57
ER27	F:ATTCACCATGGGAACACAGG R:GTGCTATCCGTGTGAGGGTT	(AC)21	260	58
ER29	F:CCAGGACATCTACAGGCGAT R:ATGTTTTGCTGCTGTTGCTG	(CA)21	152	58
SAN1	F:TTCACTGAAGAATGAACCAGTTG R:GCACATGCAGACATAAACTGC	(TTA)9	112	57
SAN3	F:TCTGCCAAATGGCTGTGTTA R:CCTGGCAACAGTGGGATAGT	(TTA)9	157	57
SAN7	F:GCCATAGAGGAGACTGTCAGC R:TCCGTGAAGAGTTTCAGCCT	(AAT)9	176	59
SAN8	F:TGTATCCAAAATGGGGGAAA R:GTGGGACAAAAGGAAGACCA	(ATT)11	122	55
SAN9	F:GAAGATGAAAGAACAGCGCC R:TTGCATTATACAGCTGGGGG	(AAT)9	209	57
SAN15	F:GGCTGTAGTTCCATGCACAG R:ACCACCATGTGGCCATTTAT	(TTC)10	271	57
SAN16	F:AGATGCAGAAGGATTGGAGG R:TGCCACAGGCTGTTGATAAT	(TAA)9	212	56
SAN17	F:AGCACAGCAACAGCAACAAC R:CCCATAACACAGCAAAACAAAA	(CAG)9	115	56

续表

位点	引物序列(5′→3′)	重复序列	片段长度(bp)	退火温度(T_m)
SAN19	F:CCGATTATCAGGAAATGGGA R:GGGGTCAGTGTGCTGTTTTT	(TGA)9	201	56
SAN20	F:CGCTGGTTTCACCACTTTTT R:TGACGACTGCTGCTGCTAAT	(TAT)9	236	56
SAN21	F:GCAGTGACAATGATCCACGA R:AATGATAGATTCCCACAGGGG	(GCT)9	252	58
SAN23	F:ATTTGACCCCTCCCAATACC R:AATGATAGATTCCCACAGGGG	(AGG)9	155	58
SAN26	F:TGGTGTAAATGCACAGCCAT R:TAAACGAATCAGTCCCCGAC	(TAA)8	196	56
SAN29	F:CAAACCAGCCTCCATCATTT R:AATGATAGATTCCCACAGGGG	(TTA)8	211	58
SI1	F:ACTTCGTCCACCAGGATGAG R:CGAAGCACATGAGAACCAGA	(AAGA)12	251	58
SI2	F:TAAGCTAGTGGCATGGCAAA R:TGAAGGTCGTGACTGATTGC	(ATAG)21	138	56
SI6	F:GGTGGAGGTACTCAAGCTGC R:CTTTCACCCGAGAGAAGCTG	(TCCA)7	168	60
SI7	F:GCCTTTGCAATGTTGGTTTT R:CCTGGTTAAGGAATAAGGGGG	(ATCC)7	185	56
SI8	F:AACTGCACCTTAAAAGCAATTACA R:CGACACAACACACGTCAGTG	(ATAG)6	156	57
SI9	F:GCCCACAGAAAGGTTGTGTT R:TGGTAACTGATCATTTTTGTATTTTCA	(TATT)7	155	56
SI10	F:TTAAAGCCTCCAAATCGCTG R:CCCATGAAGTTTCACATCCA	(AAAG)7	270	56
SI11	F:ACTTGTCAGATAGACGGGGC R:GGTGTGTGGAGACTACGCCT	(ATCA)5	234	60
SI12	F:TGGTTACGAAGAACATGGCA R:TGTTGTAGTGTGTGGCCCTG	(TTAT)6	185	57
SI17	F:CCTGTGACCCTGGTTAAGGA R:GAATGACCATTGTGATGAATCC	(GATG)8	248	57
SI18	F:GATGGCACACCAGCAGTAAA R:CCTGTGACCCTGGTTAAGGA	(ATCC)6	109	57
SI20	F:CCTTTCACCCAAGTGATGCT R:ATTTTTACCAGTGGCACGCT	(ATGG)6	142	56
SI24	F:TAAGGGACAGGTGGACGGTA R:CAGCGCTGTAGAACTTTGCTT	(TGAA)5	177	58
SI25	F:TCCTCCCACAGTCCAAAAAC R:TGAATCGTTGTGTGTCAGGAA	(ATGG)5	265	57

2.2　北江群体二、三、四碱基重复微卫星引物多态性的检测分析

从扩增稳定的引物中随机选择二、三、四碱基各 10 对, 对北江群体 30 尾大刺鳅进行多态性检测和分析, 结果显示, 30 个微卫星位点共扩增出 235 个等位基因, 数量最多的是 SI2 共检测出 20 个等位基因; 等位基因数在 3—20, 二碱基微卫星平均等位基因数(9.500)比三碱基重复(6.000)和四碱基重复(8.000)的高, 这些等位基因片段大小均在 104—271bp; 有效等位基因数在 1.544—12.766; 观察杂合度(Ho)在 0.233—1.000; 期望杂合度变动范围为 0.358—0.937; 多态信息含量 PIC 在 0.311—0.916。对北江野生群体的遗传结构进行评估, 结果显示, 等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)这五项多态评估指标平均数分别为 7.833、4.008、0.873、0.702、0.649, 而且基于以上五项评估指标对二、三、

四碱基微卫星引物进行多态性比较结果：二碱基(PIC=0.735)高于四碱基(PIC=0.605)、三碱基(PIC=0.606)。30 对微卫星引物信息以及其对北江群体大刺鳅的遗传多样性评估见表 2。

表 2 30 对微卫星引物对北江群体大刺鳅的遗传多样性评估

Tab.2 The 30 pairs of the primers on the assessment of genetic diversity of Beijiang River population

位点	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)	多态信息含量(PIC)
ER2	8	2.765	1.000	0.649	0.578
ER5	8	4.813	1.000	0.806	0.768
ER6	8	4.380	0.967	0.785	0.741
ER9	8	3.750	0.967	0.746	0.696
ER10	9	5.294	1.000	0.825	0.787
ER15	5	2.965	0.667	0.674	0.622
ER18	15	10.112	1.000	0.916	0.893
ER22	14	7.807	1.000	0.884	0.859
ER27	10	6.949	0.944	0.868	0.840
ER29	10	2.760	1.000	0.647	0.570
SAN7	6	2.880	0.833	0.664	0.615
SAN8	6	3.377	0.467	0.716	0.667
SAN15	6	3.377	1.000	0.7158	0.657
SAN16	5	2.605	0.700	0.627	0.574
SAN17	7	3.285	0.967	0.707	0.643
SAN19	4	2.643	0.967	0.632	0.557
SAN20	10	3.352	0.933	0.714	0.676
SAN21	7	3.529	0.967	0.729	0.670
SAN23	5	2.280	0.967	0.572	0.467
SAN29	4	2.400	0.733	0.593	0.530
SI1	9	5.788	1.000	0.841	0.806
SI2	20	12.766	1.000	0.937	0.916
SI6	7	2.922	1.000	0.669	0.598
SI10	7	2.368	0.767	0.588	0.533
SI11	7	3.103	0.867	0.689	0.623
SI12	6	2.456	0.633	0.603	0.558
SI17	8	2.683	0.933	0.638	0.570
SI18	4	1.544	0.233	0.358	0.311
SI20	8	2.532	0.733	0.615	0.567
SI24	4	2.765	0.933	0.649	0.565

2.3 澜沧江群体二、三、四碱基重复微卫星引物多态性的检测分析

从对北江群体分析的微卫星引物中随机选择二、三、四碱基各 6 对，对澜沧江群体 30 尾大刺鳅进行多态性检测。用 PopGene 软件对这 18 对引物扩增的产物进行多态性评价分析，结果显示，18 个微卫星位点等位基因数变动范围为 2—20，平均等位基因数为 6.722，其中 SAN21 位点仅获得的 2 个等位基因数，位点 SI1 获得 20 个等位基因数，有效等位基因数在 1.455—7.258，平均值为 3.224，观测杂合度(Ho)在 0.367—1.000，平均值为 0.822；而期望杂合度(He)在 0.318—0.862，平均值为 0.509。用 PIC—CALC 软件来分析多态信息含量，多态信息含量 PIC 在 0.283—0.847，平均值为 0.572，位点 SAN16 的 PIC 最低，仅为 0.283，而 SI2 的 PIC 值最高，为 0.847。与北江一致的是基于五项评估指标，二碱基重复微卫星的多态性均比三四碱基重复的高，其中二碱基(PIC=0.627)>四碱基(PIC=0.584)>三碱基(PIC=0.506)。18 对微卫星引物对澜沧江群体大刺鳅的遗传多样性评估见表 3，以及两个群体的遗传多样性比较见表 4。

表 3　18 对微卫星引物对澜沧江群体大刺鳅的遗传多样性评估

Tab.3　The 18 pairs of primers on the assessment of genetic diversity of Lancang River population

位点	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)	多态信息含量(PIC)
ER2	4	3.509	0.867	0.727	0.663
ER5	6	2.980	0.933	0.676	0.605
ER15	7	3.543	0.933	0.730	0.673
ER18	10	5.522	0.767	0.833	0.796
ER22	5	2.715	0.800	0.642	0.582
ER27	5	2.195	0.967	0.554	0.445
SAN7	9	3.056	0.933	0.684	0.617
SAN8	10	4.511	0.967	0.722	0.750
SAN15	5	1.822	0.567	0.459	0.414
SAN16	3	1.484	0.400	0.332	0.283
SAN17	6	2.885	0.967	0.664	0.598
SAN21	2	2.000	1.000	0.509	0.375
SI1	20	5.769	0.900	0.841	0.819
SI2	11	7.258	1.000	0.862	0.847
SI6	5	2.941	0.900	0.671	0.618
SI10	6	2.490	0.867	0.609	0.531
SI11	4	1.901	0.667	0.482	0.401
SI18	3	1.455	0.367	0.318	0.285

表 4　不同类型核心序列的微卫星对两个群体的评估效果比较

Tab.4　Comparison in the result of assessment on genetic structure of the two populations in different repeat motif microsatellites

群体	重复序列类型	座位数目	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)	多态信息含量 (PIC)
北江	二碱基重复	10	9.500	5.160	0.954	0.780	0.735
	三碱基重复	10	6.000	2.973	0.853	0.667	0.606
	四碱基重复	10	8.000	3.893	0.810	0.659	0.605
	平均值	10	7.833	4.008	0.873	0.702	0.649
澜沧江	二碱基重复	6	6.167	3.411	0.878	0.694	0.627
	三碱基重复	6	5.833	2.626	0.806	0.562	0.506
	四碱基重复	6	8.167	3.636	0.783	0.630	0.584
	平均值	6	6.722	3.224	0.822	0.629	0.572

3　讨论

3.1　大刺鳅二、三、四碱基重复微卫星引物的筛选

微卫星引物是指以微卫星核心序列两侧的侧翼序列设计的具有有效扩增 DNA 模板的一对碱基序列。本研究通过简化基因组测序, 筛选了 105 对微卫星引物, 通过不断优化 PCR 条件, 如退火温度, 循环次数等, 最终获得 50 对能在大刺鳅群体中稳定扩增的微卫星引物, 并测出其中有 38 对标记在大刺鳅群体中表现出多态性, 总筛选效率为 36.2%, 筛选效率较高, 证明了该方法适用于大刺鳅微卫星位点的规模化筛选, 与韩承慧(2016)的看法一致。而刘瑞成等(2013)在宽口光唇鱼(*Acrossocheilus monticola*)的微卫星开发中, 163 个合成的微卫星引物中仅得到 18 个多态性高的微卫星引物, 筛选效率仅为 11.04%。本研究筛选出的二、三、四碱基微卫星引物重复次数都在 30 以内, 这与 Ellegren(2002)提出的真核生物微卫星大部分都在 30 次重复以下一致。其中二碱基重复引物以 15—19 次重复为主, 三碱基重复引物以 8—9 次重复为主, 四碱基重复引物以 5—7 次重复为主。龚小玲等(2009)在对澳洲鳗鲡(*Anguilla japonica*)进行微卫星标记开发时发现, 微卫星重复序列的重复次数

过高会影响 PCR 扩增效果。另有 55 对引物条件优化后进行聚丙烯酰胺电泳检测，仍不能扩增产生稳定的特异性条带。可能是因为微卫星位点扩增 DNA 时容易形成发夹结构，使得引物扩增不稳定或形成不了扩增产物，导致引物质量不高。

3.2 大刺鳅二、三、四碱基重复微卫星的多态性比较及两个群体评估效果

对北江和澜沧江群体进行遗传多样性分析的微卫星引物中，二碱基重复引物的多态信息含量最高，分别为 0.735 与 0.627；其次是四碱基重复引物，为 0.605 与 0.584；最低是三碱基重复引物，为 0.606 与 0.506。从以上数据可看出，二碱基引物在大刺鳅种群中应用效率最高，验证了 Brenner 等(1993)提出的在鱼类基因组中，二碱基微卫星引物在其基因组中数量最为丰富并且应用所占比重最大的说法(Crooijmans *et al*, 1997; Maguire *et al*, 2000; Tóth *et al*, 2000; Serapion *et al*, 2004)。另一方面，Weber(1990)表示，当二碱基重复序列重复次数大于 12 次时，微卫星标记或许能够表现出较高的 PIC；二碱基重复次数在 16 次或以上时，可提供的 PIC 在 0.5 以上，相应的多态性分析才可进行。本次研究在北江群体中使用的二碱基微卫星引物重复序列的重复次数均为 19 以上，PIC 均超过 0.5，均可应用于种群间遗传多样性分析。

多态信息含量是评价种群遗传变异程度高低的重要指标，当 PIC>0.5 时，该基因位点表现为高度多态性；0.25<PIC<0.5 时，该位点表现为中度多态性；PIC<0.25 时，该位点表现为低度多态性(Botstein *et al*, 1980)，Feresu-Shonhiwa 等(1998)认为 PIC>0.70 时该微卫星标记是最理想的标记，本研究筛选出来的 30 个微卫星位点中有 28 个位点表现出高度多态性，占 93.3%，有 8 个位点(ER5、ER6、ER10、ER22、ER27、SI1、SI2) PIC>0.7，其中 SI2 具有最高的 PIC 为 0.916；另有 2 个位点 SAN23、SI18 的 PIC 在 0.311—0.467，PIC>0.25，表现为中度多态性，占 6.67%。因而本研究中所制备的微卫星将在大刺鳅的群体遗传多样性分析、遗传连锁分析等方面都会起到一定的作用。

遗传多样性丰富的生物能够更好地适应各种环境，进行遗传多样性的分析，是对物种进行种质资源保护的基础。本研究应用 30 对引物对北江群体扩增的平均等位基因数为 7.833，而 18 对引物扩增澜沧江群体的平均等位基因为 6.722，且二、三、四碱基重复微卫星引物对五项评估指标(N_a、N_e、H_e、H_o、PIC)比较均为北江群体的遗传多样性比澜沧江的高，这与王方(2012)认为澜沧江种群的遗传多样性较低的结果一致。其可能原因是北江群体有二次接触，可显著提高群体的遗传多样性，而澜沧江群体遗传多样性较低可能与长时间的地理隔离而不能进行必要的基因交流有关。此外还可能与生活环境遭到严重破坏和人为过度捕捞有关。两个群体的观测杂合度 H_o 均比期望杂合度 H_e 高，表明大刺鳅遗传多样性高，变异率高且存在杂合子过剩的可能。杨华强等(2016)提到，与刀鲚(*Coilia macrognathos* Bleeker)、草鱼(*C. idellus*)、赤眼鳟(*Squaliobarbus ourriculus*)、翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)、黄鳝(*Monopterus albus*)和河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)比较，大刺鳅的遗传多样性水平较高。尽管如此，仍存在野生资源少的问题，主要还是人为因素造成的种群结构失调所致，这也为今后对大刺鳅进行种质资源保护提供了方向。

3.3 筛选意义及展望前景

本实验主要从 N_a、N_e、H_e、H_o、PIC 这五项评估指标来分析种群的遗传多样性，其中前三项为检测遗传变异的重要指标，后两项是反映微卫星位点中杂合子基因型所占的比例大小，从位点的遗传变异水平衡量群体的遗传变异水平。经这五项评估指标鉴定，本实验筛选的二、三、四碱基重复微卫星引物均适用于大刺鳅的遗传多样性研究。结果表明大刺鳅二碱基重复微卫星引物较三、四碱基重复具有更高的筛选效率和遗传稳定性，这与其他鱼类研究中三、四碱基微卫星标记具有更高的多态性，基因分型效果较二碱基微卫星好(Hearne *et al*, 1992; Diwan *et al*, 1997; 鲁翠云等, 2009)的结果不同，高焕等(2005)认为四碱基重复类型处于非编码区，进化压力小可“自由突变”，笔者认为虽然如此，但四碱基存在着重复次数少、序列丰富度低和突变率低等劣势，刘瑞成等(2013)认为二、四碱基重复微卫星引物是宽口光唇鱼(*A. monticola*)的主要微卫星重复类型，三碱基重复则较少出现。离体复制中，二碱基重复类型微卫星突变序列的突变率显著高于三碱基重复类型(Schlötterer *et al*, 1992; Hite *et al*, 1996)。鲁翠云(2009)在鲤鱼研究中得出四碱基重复多态性较好，认为与其长期进化过程中基因组加倍有关。不同结果可能与物种的特异性有关，也可能与实验选取引物数量及类型的随机性和样本的量有关。

本实验筛选的部分三、四碱基重复微卫星位点具有很高的多态性，如 ER5、ER6、ER10、ER22、ER27、

SI1、SI2 等是三、四碱基重复微卫星标记的最理想标记。本研究首次筛选并将三、四碱基重复微卫星应用于大刺鳅的种群分析中, 发现虽然三、四碱基微卫星相对于二碱基多态性较弱, 但依然适用于大刺鳅群体的遗传多样性分析、近交衰退和性状退化等方面的分析。运用所筛选的引物建立分子遗传选育技术的方法, 能够为遗传育种、种质资源保护研究、种苗放流等提供理论依据(李文升等, 2011), 实现大刺鳅的种质资源科学评价及保护利用。

参 考 文 献

广西壮族自治区水产研究所, 中国科学院动物研究所, 2006. 广西淡水鱼类志. 2 版. 南宁: 广西人民出版社, 498—499

王　方, 2012. 中国南部地区大刺鳅种群遗传和亲缘地理研究. 广州: 华南师范大学硕士学位论文

王　慧, 张保卫, 史文博等, 2012. 商城肥鲵二碱基重复和四碱基重复微卫星 DNA 的结构特征及对筛选效率的影响. 生物多样性, 20(1): 51—58

中国水产科学研究院珠江水产研究所, 1991. 广东淡水鱼类志. 广州: 广东科技出版社, 519—520

史　方, 徐　念, 熊美华等, 2009. 利用微卫星标记评估乌江彭水水电站对泉水鱼的遗传多样性影响. 水生态学杂志, 2(2): 117—121

刘金亮, 2011. 东北雅罗鱼微卫星分子标记的筛选及雅罗鱼 5 个野生群体遗传多样性分析. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文

刘瑞成, 张富铁, 但胜国等, 2013. 宽口光唇鱼微卫星位点的筛选与特征分析. 四川动物, 32(2): 161—166

孙效文, 张晓锋, 赵莹莹等, 2008. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用. 中国水产科学, 15(4): 689—703

李文升, 刘　翠, 鲁翠云等, 2011. 草鱼三、四核苷酸重复微卫星标记的分离与特征分析. 中国水产科学, 18(4): 742—750

杨华强, 李　强, 舒　琥等, 2016. 华南及邻近地区大刺鳅遗传多样性的 ISSR 分析. 水生生物学报, 40(1): 63—70

宋国华, 刘田福, 2005. 微卫星标记及其在实验动物中的应用. 中国比较医学杂志, 15(4): 244—248

陈　忠, 2005. 大刺鳅的生物学及其养殖技术概要. 中国水产, (10): 22—25

林婷婷, 2016. 大刺鳅微卫星标记开发及野生群体遗传多样性分析. 见: 2016 年中国水产学会学术年会论文摘要集, 101

郑慈英, 1989. 珠江鱼类志. 北京: 科学出版社, 518—520

赵哲霞, 蒋　珊, 王滨花等, 2014. 黄颡鱼属 SSR 分子鉴定及其遗传多样性. 南昌大学学报(理科版), 38(5): 498—501

高　焕, 孔　杰, 2005. 串联重复序列的物种差异及其生物功能. 动物学研究, 26(5): 555—564

海　萨, 李家乐, 郭　焱等, 2008. 河鲈微卫星引物筛选. 水生态学杂志, 1(6): 90—94

龚小玲, 李思发, 蔡完其等, 2009. 澳洲鳗鲡微卫星分子标记的筛选与检测. 中国水产科学, 16(1): 133—138

韩承慧, 马海涛, 姜海滨等, 2016. 许氏平鲉(*Sebastes schlegeli*)微卫星标记开发及野生、养殖群体遗传多样性分析. 海洋与湖沼, 47(1): 213—220

舒　琥, 江小璐, 杨华强等, 2017. 华南地区 7 个大刺鳅野生群体的形态差异分析. 广州大学学报(自然科学版), 16(3): 8—14

鲁翠云, 毛瑞鑫, 李　鸥等, 2009. 鲤鱼三、四核苷酸重复微卫星座位的筛选及特征分析. 农业生物技术学报, 17(6): 979—987

《福建鱼类志》编写组, 1985. 福建鱼类志下卷. 福州: 福建科学技术出版社, 447—448

蔡雪芹, 2006. 名优品种——大刺鳅. 海洋与渔业, (10): 17

谭照君, 张天奇, 鲁翠云等, 2011. 鲢三、四核苷酸重复微卫星标记的筛选及其特征分析. 上海海洋大学学报, 20(3): 328—335

Botstein D, White R L, Skolnick M *et al*, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Society of Human Genetics, 32(3): 314—331

Brenner S, Elgar G, Sanford R *et al*, 1993. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. Nature, 366(6452): 265—268

Brooker A L, Cook D, Bentzen P *et al*, 1994. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 51(9): 1959—1966

Carvalho G R, Hauser L, 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 4(3): 326—350

Crooijmans R P M A, Van der Poel J J, Groenen M A M *et al*, 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Animal Genetics, 28(2): 129—134

Diwan N, Cregan P B, 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. Theoretical and Applied Genetics, 95(5—6): 723—733

Ellegren H, 2002. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation. Trends in Genetics, 18(2): 70

Feresu-Shonhiwa F, Howard J H, 1998. Electrophoretic identification and phylogenetic relationships of indigenous tilapiine species of Zimbabwe. Journal of Fish Biology, 53(6): 1178—1206

Hearne C M, Ghosh S, Todd J A, 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. Trends in Genetics, 8(8): 288—294

Hite J M, Eckert K A, Cheng K C, 1996. Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of $d(C\text{-}A)_n{\cdot}d(C\text{-}T)_n$ microsatellite repeats. Nucleic Acids Research, 24(12): 2429—2434

Maguire T L, Edwards K J, Saenger P *et al*, 2000. Characterisation and analysis of microsatellite loci in a mangrove species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). Theoretical and Applied Genetics, 101(1—2): 279—285

Nelson J S, 2006. Fishes of the World. 4th ed. Hoboken: Wiley and Sons, 316—317

Schlötterer C, Tautz D, 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research, 20(2): 211—215

Serapion J, Kucuktas H, Feng J N *et al*, 2004. Bioinformatic mining of type Ⅰ microsatellites from expressed sequence tags of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Marine Biotechnology, 6(4): 364—377

Sequeira F, Rocha S, Ferrand N *et al*, 2005. Isolation and characterization of seven microsatellite loci in *Chioglossa lusitanica* (Urodela: Salamandridae). Molecular Ecology Notes, 5(2): 212—214

Tóth G, Gáspári Z, Jurka J, 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. Genome Research, 10(7): 967—981

Weber J L, 1990. Informativeness of human $(dC\text{-}dA)_n\cdot(dG\text{-}dT)_n$ polymorphisms. Genomics, 7(4): 524—530

Yeh F C, Yang R C, Boyle T, 1999. POPGENE version 1.31: Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Alberta: University of Alberta

SCREENING AND CHARACTERISTIC ANALYSIS ON DI-/TRI-/TETRA-NUCLEOTIDE-REPEATED MICROSATELLITES IN *MASTACEMBELUS ARMATUS*

FANG Zu-Ye[1], CHEN Xiao-Dong[1], WU Yong-Shi[1], TAN Jie-Rong[1], ZHANG Wei-En[1], WANG Zheng-Yu[1], LIN Ting-Ting[1], ZHA Guang-Cai[2], SHU Hu[1]

(1. *College of Life Science*, *Guangzhou University*, *Guangzhou* 510006, *China*; 2. *School of Food Engineering and Biotechnology*, *Hanshan Normal University*, *Chaozhou* 521041, *China*)

Abstract Thirty individuals of two wild fish *Mastacembelus armatus* populations from Beijiang River (BJP), Guangdong (average body weight 17.88g, and average body length 19.44cm) and from Lancang River (LCP), Yunnan (24.99g, and 20.89cm) were sampled to study the reduced-representation genome sequencing, from which 105 pairs of microsatellite primers were developed and were of di-/tri-/tetra-nucleotide-repeated microsatellite (the number of repeat was six or more, and 50 pairs (47.6%) of them yielded steady amplifiable primers. In addition, we found 38 microsatellite loci who had high polymorphism, from which we randomly selected 10 and 6 pairs each from the three types of repeat from BJP and LCP, respectively, to study the genetic diversity. Result presents that: (1) the efficiency of screening the di-nucleotide-repeated microsatellite primer was 50%, while that of the tri- and tetra-nucleotide-repeated ones was only 31.1% and 35%, respectively. (2) The average polymorphism information content (PIC) was higher in BJP (0.649) than LCP (0.572). We detected 235 alleles from 30 microsatellite loci in BJP and 93.3% of them were in high polymorphism level, while 120 alleles in 18 microsatellite loci in LCP and 66.7% of them were in high polymorphism level. (3) The di-nucleotide-repeated microsatellite markers in the two wild populations presented greater values of five polymorphic indexes than tri- or tetra-nucleotide-repeated ones. The above-mentioned findings indicate that di- and tri-nucleotide-repeated microsatellites are more effective in screening and more polymorphic than those of the tri- and tetra-repeated. BJP showed higher genetic diversity than LCP. The primers screened in this study could provide a reference to analyze genetic diversity among different populations, to establish their genetic linkage, to determine genetic relationships etc., and lay a solid ground for the protection of germplasm resources of *M. armatus*.

Key words *Mastacembelus armatus*; microsatellite; di-/tri-/tetra-nucleotide repeat; polymorphism