

广西和云南树鼩群体遗传多样性的比较分析

唐艳萍, 曹骥*, 杨香娣, 杨春, 李瑗, 周玲丽, 罗旺, 邓玲, 王谷洋, 李科志

(广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部, 南宁 530021)

【摘要】 目的 比较分析我国广西、云南两个树鼩群体的遗传差异和分化程度, 推动树鼩优良品系的培育和优化实验动物模型。**方法** 提取广西和云南各32只树鼩的全血基因组DNA, 分别采用9对荧光标记微卫星引物进行PCR扩增, 通过毛细管电泳技术检测扩增片段, 并利用POPGENE等软件比较两个树鼩群体的遗传相关指标。**结果** 广西和云南两个树鼩群体平均期望杂合度(H_e)为0.703, 平均多态信息含量(PIC)为0.725, F_{is} 均值 >0 。CCBL1B、CCDC61、EDA1和OPA3四个位点表现为极显著偏离哈迪-温伯格平衡。两群体的遗传距离及无偏遗传距离分别为1.277和1.268, 遗传相似系数约为0.28。遗传结构变异的分布情况显示61.57%的微卫星遗传变异来自于群体内部, 38.43%存在于群体之间。STRUCTURE分析发现广西和云南树鼩为中缅树鼩群体的两个不同的亚种。**结论** 广西和云南树鼩两个群体的遗传多样性都较丰富, 两个群体间具有较大的遗传差异和分化程度, 遗传变异主要来源于群体内部。

【关键词】 树鼩; 荧光标记; 微卫星; 遗传多样性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0572-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.004

Comparison of the genetic diversity between Guangxi and Yunnan tree shrew populations (*Tupaia belangeri chinensis*)

TANG Yan-ping, CAO Ji*, YANG Xiang-di, YANG Chun, LI Yuan,
ZHOU Ling-li, LUO Wang, DENG Ling, WANG Gu-yang, LI Ke-zhi

(Department of Experimental Research, Affiliated Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 Objective To compare and analyze the genetic variation and differentiation of two tree shrew populations from Guangxi and Yunnan, to promote the breeding of fine strains of tree shrews and optimization of experimental animal models. **Methods** Sixty-four blood samples were collected and the gene DNA was extracted, 32 from the Guangxi and 32 from Yunnan populations. PCR amplification products of the nine fluorescent labeling simple sequence repeat (SSR) markers were detected by capillary electrophoresis technique and various bioinformatics software were used to analyze the genetic diversity of the two tree shrew populations (Guangxi group and Yunnan group). PCR amplification was performed using 9 fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers, the amplification products were detected by capillary electrophoresis technique, and various bioinformatics softwares such as Popgene were applied to analyze the genetic diversity of the two tree shrew populations. **Results** The average number of expected heterozygosity and polymorphism information content among the 9 microsatellite loci of Guangxi and Yunnan groups were 0.703 and 0.725, respectively. The mean value of F_{is} was >0 in both groups. The results of the tests on all the loci with Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium showed that four loci (CCBL1B, CCDC61, EDA1 and OPA3) in the two populations exhibited significant deviations ($P < 0.001$). The study also found the genetic similarity between the two populations was 0.28, while the genetic distance and unbiased genetic distance were 1.277 and 1.268, respectively. The results from AMOVA analysis

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号:81260080, 81460418); 广西自然科学基金项目(编号:2013GXNSFAA019210); 广西科技基础条件平台建设项目(编号:10-108-25, 11-31-03); 广西研究生教育创新计划资助项目(编号:YCSZ2015114)。

【作者简介】 唐艳萍(1986-), 女, 助理研究员, 研究方向: 医学实验动物学。E-mail: tangyanping1986@126.com。

【通讯作者】 曹骥(1973-), 男, 研究员, 研究方向: 树鼩肝炎模型的研究。E-mail: caojien@163.com

showed that 61.57% of genetic variation occurred within populations and 38.43% occurred among populations. Furthermore, structure analysis showed that the Guangxi and Yunnan populations studied in this study are divided into two single subspecies belonging to *Tupaia belangeri*. **Conclusions** Our results consistently indicate high genetic diversity of the two tree shrew populations, and their genetic variation is mainly of intra-populational origin.

【Key words】 Tree shrew; Fluorescent marker; Microsatellite DNA; Genetic diversity.

Corresponding author: CAO Ji. E-mail: caojien@163.com

树鼯是一种外貌形态与松鼠类似的低等灵长类动物,目前主要分布于南亚、东南亚、我国西南部和南部地区。王应祥等^[1]根据中缅树鼯的外形和头骨数据,将我国树鼯分为 6 个亚种,即滇西亚种、海南亚种、越北亚种、瑶山亚种、高黎贡山亚种和滇南亚种。刘瑞清等^[2]在树鼯染色体水平上的研究结果显示滇西亚种、越北亚种和瑶山亚种都是二倍体,并且这些亚种间的核型相似,该结果为树鼯的分类鉴定提供了细胞学依据。自 20 世纪 80 年代以来,以树鼯作为动物模型的医学生物学研究受到越来越多的关注。相比于其他灵长类动物,树鼯因其具有形体小、繁殖快、成本低等特点,已被广泛应用于病毒感染、代谢性疾病、肿瘤等方面的研究^[3]。然而目前实验中使用的树鼯遗传背景资料匮乏,尤其是亚种间的遗传差异和分化程度尚不清楚。

微卫星亦称简单重复序列,是以核苷酸为单位的 1~6 个碱基串联重复序列,具有多态性高以及保守性、共显性、重复性好等特点,被认为是目前研究种群遗传差异的理想分子标记,已被广泛应用于动植物遗传多样性、遗传结构、物种进化等方面的研究^[4]。近年来国内外学者已经开始通过筛选微卫星标记对中缅树鼯遗传多样性进行研究^[5-8],然而这些研究多数局限于单个中缅树鼯群体的遗传多样性,而比较分析树鼯亚种群体间的遗传差异和遗传结构鲜有报道。

本研究通过荧光标记微卫星技术,结合测序进行微卫星基因型判断,对来自广西的野生树鼯群体和云南昆明的人工饲养群体进行研究,比较分析两个树鼯群体的遗传多样性差异和遗传结构,为合理保护和开发利用树鼯种质资源提供科学的理论依据,同时也为培育优良的树鼯品系和建立实验动物模型积累遗传基础性数据。

1 材料与方法

1.1 动物来源

树鼯分别来源于广西融安县野生群和云南昆明动物研究所人工繁殖群,两个树鼯群体各随机选取 32 只,雌雄各半。饲养环境保持 20~25℃室温和

30%~60%湿度,每日清洁 2 次。

1.2 主要试剂及仪器

DNA 提取试剂盒(货号:DP348)、Taq 酶、微卫星上游荧光标记引物购自 Takara 公司;内标 LIZ 500、Hi-Di 甲酰胺购自美国 ABI 公司;PTC-200 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像仪购自英国 Syngene 公司;ABI 3730XL 遗传分析仪购自美国 ABI 公司;电泳仪购自北京市六一仪器厂。

1.3 全血 DNA 提取和检测

分别对树鼯进行股静脉采血 1 mL,肝素钠抗凝,-20℃保存。基因组 DNA 的提取参考试剂盒的操作说明书。将 DNA 浓度稀释到 50~100 ng/μL,于 -20℃保存备用。用浓度为 0.8%~1%的琼脂糖电泳检测所提取的 DNA 样品,并检测其浓度和纯度,A260/A280 比值应为 1.7~1.9。

1.4 选择微卫星位点和设计筛选引物

通过 NCBI 中的 *Tupaia chinensis* 基因组数据库查找 SSR 位点,并参考国内外中缅树鼯微卫星位点的侧翼序列。首先筛选出 35 对微卫星引物进行 PCR 第一轮扩增(重复两次),用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测出有目的条带后,再进行第二轮的荧光标记 PCR 扩增,并予以鉴定。最后选择扩增比较稳定且条带比较清晰的 9 对微卫星引物用于微卫星遗传多样性分析。所有引物全部由深圳华大基因科技有限公司合成并进行荧光染料标记(FAM 蓝)。各微卫星位点引物序列相关信息见表 1。

1.5 多重 PCR 扩增

PCR 反应总体积 15 μL:10×PCR buffer 1.5 μL,dNTP (2.5 mmol/L) 1 μL,上、下游引物(10 mmol/L)各为 0.5 μL,Taq DNA 聚合酶 0.25 μL,MgCl₂ (2.5 mmol/L) 2 μL,DNA 模板(60 ng/μL) 1 μL,加 ddH₂O 至反应终体积为 15 μL,再加 1~2 滴矿物油。PCR 扩增条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 20 s,54~59℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,10 个循环,95℃变性 20 s,54~59℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,25 个循环,72℃延伸 30 min。取 2 μL PCR 扩增产物,2%琼脂糖凝胶电泳。

表 1 树鼩群体 9 个微卫星位点的相关信息及退火温度

Tab. 1 Information and annealing temperature on 9 microsatellite loci from the tree shrews

位点名称 Locus	片段大小 Size range	登录号 GenBank accession number	核心序列 Repeat motif	荧光标记 Fluorescent label	引物序列(5' - 3') Primer sequences (5' - 3')	退火温度 /℃ Annealing temperature
CCBL1A	324 - 338	>gi1558064534;879582 - 925420	(AG) ₁₂	FAM	F:TCGCCCCTCACAACTATACC R:CCTCTCAGGTGGGCAAAGAA	58
CCBL1B	342 - 354	>gi1558064534;879582 - 925420	(AG) ₁₂	FAM	F:CTGCTGCACCAGGAATAGG R:TGTGTCTGATGGCCCGTGAA	57
CCDC61	167 - 179	>gi1558068208;3985812 - 4010079	(AAT) ₇	FAM	F:GTGGCTTTGTTTTTGAAGCAGC R:CATTACGCTAACTACTGG	59
EDA1	489 - 529	>gi1557962798;c351759 - 266704	(ATTT) ₇	FAM	F:TCTCATGCCACGCTCTTTCCT R:CTCACTCTGTCCCTCT	55
OPA3	433 - 449	>gi1558068208;c3466190 - 3404814	(TTTG) ₆	FAM	F:GAAGGCAGTTACTTTCCCGC R:GGGTGGAACCTGATCCTCAAG	57
RALGPS1A	423 - 435	>gi1558064534;c2754549 - 2470366	(TTA) ₆	FAM	F:CCCCAAGTGAGGGCATTACA R:GCTGGTAGGCACTGCTACTG	54
SLC45A4	427 - 483	>gi1558065195;2077523 - 2150050	(TCTT) ₁₆	FAM	F:ATCCACACGTGCGACTTTGTGA R:CCCTGGGAGGTGTGAAAACCT	58
TP53	177 - 203	>gi1558065239;842295 - 867393	(AG) ₉	FAM	F:AACATCCTGTCTGCTCCC R:GGTGAACAATGGAGC	56
TRIM23	171 - 183	>gi1557961907;c430891 - 390111	(ATTT) ₅	FAM	F:TCCAGCAACTTCTGAGTCCC R:AAGTGTACCCTCCCTAT	59

1.6 毛细管电泳检测扩增片段

取 PCR 产物 1 μL, Liz 500 内标 0.8 μL, Hi-Di 甲酰胺 8.0 μL 充分混匀后, 95℃ 变性 5 min, 然后在 ABI3730XL 自动测序仪上进行毛细管电泳检测(本部分由深圳华大基因公司进完成)。由 Genemarker V2. 2. 0 (SoftGenetics LLC, State College, PA) 软件自动生成各位点在每个样品上的图谱文件, 根据峰值图获取产物片段大小。

1.7 数据统计与分析方法

使用 CONVERT(version 1. 31) 软件转化数据格式, 利用 Microsatellite Toolkit (version 3. 1)、POP-GENE(version 1. 32) 软件计算各基因座等位基因数(Na)、有效等位基因数(Ne)、观测杂合度(Ho)、期望杂合度(He)、Shannon 信息指数(I)等指标, 并计算 F-统计量(Fis, Fit, Fst)。利用 FSTAT 2. 9. 3 软件计算各位点的等位基因丰富度(allele richness, AR)。多态信息含量(PIC)使用 PIC-CALC 软件计算。运用 GENEPOP4. 0 软件检验各种群等位基因频率是否偏离哈温平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)。种群的瓶颈效应利用 BottlenecK 软件提供的 IAM、TPM、SMM 三个模型来检测, 设置 1000 个重复, 并通过 Wilcoxon 符号秩次检验(Wilcoxon signed-rank test)和符合检验(Sign test)分析杂合过度是否显著。利用 Arlequin 3. 5. 1 软件包中的分子变异分析软件(AMOVA)计算种群间和种群内的分

子遗传变异分布情况, 以及各种群间的遗传分化系数(F_{ST})和基因流(Nm)。使用 Structrue 2. 2 软件对所有个体的基因型进行贝叶斯聚类分析, 检测树鼩群体潜在的遗传结构。本研究 K 值设为 1~5, 使用混合模型(admixture model), 对每个 K 值重复运行 6 次, 预热 100, 000 次并舍弃(burn-in 为 100, 000), 随后进行 1, 000, 000 次重复正式计算(run-length 为 1, 000, 000)。根据每次运行不同的 K 值对应得 LnP(D)值计算 ΔK 值分析可能的遗传结构。

2 结果与分析

2.1 毛细管电泳检测结果

图 1、2 分别为广西、云南两个群体中的某个体在 EDA1 位点上的检测结果, 可看出 EDA1 位点在广西树鼩和云南树鼩 2 个样品中检测到的微卫星 DNA 产物片段大小(基因型)分别为 489/493 bp 和 493/502 bp。该位点都表现为双峰, 即为杂合子; 无其它非特异性扩增产物污染, 说明引物扩增特异性良好。

2.2 两个树鼩群体的遗传多样性

由表 2 可知广西树鼩群体的 Ne、He、PIC 和 I 分别为 2. 7422、0. 5856、0. 5201、1. 0676, 都略高于云南树鼩群体(2. 2939、0. 4840、0. 4195、0. 8606); 对这两个群体进行配对 t 检验, 结果提示差异均无显著性

($P_{Ne} = 0.232$ 、 $P_{He} = 0.193$ 、 $P_{PIC} = 0.197$ 、 $P_I = 0.232$)。

对两个树鼯群体 9 个微卫星位点进行 HWE 平衡检测,结果显示 CCBL1B、CCDC61、EDA1 和 OPA3 这 4 个位点在两个树鼯群体都表现为极显著偏离

HWE 平衡 ($P < 0.01$) ; CCBL1A、RALGPS1A 和 SLC45A4 这 3 个位点在两个群体都处于平衡状态 ($P > 0.05$) ; TP53 和 TRIM23 两位点在云南树鼯表现为显著偏离平衡状态,而在广西树鼯中处于平衡状态。

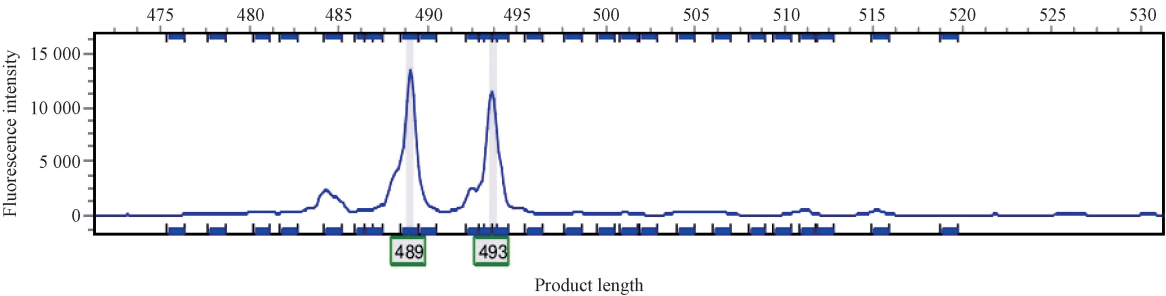


图 1 广西树鼯 EDA1 位点分型结果:489/493 bp

Fig.1 Results of EDA1 in Guangxi tree shrew individual genotypic alleles analyzed by the Genemarker:489/493 bp

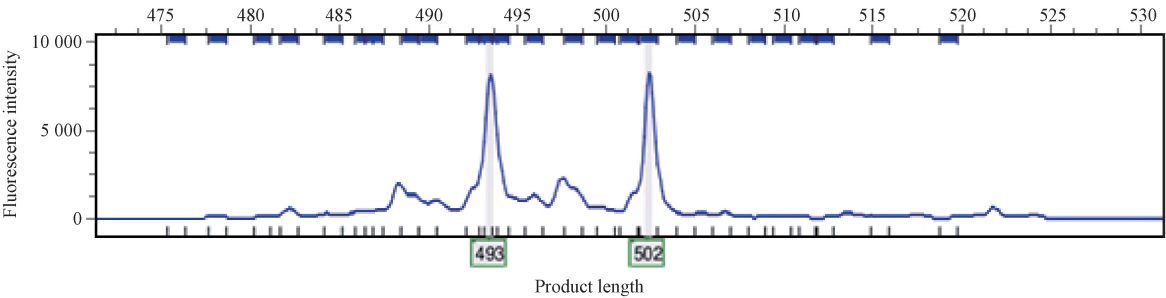


图 2 云南树鼯 EDA1 (FAM) 位点分型结果:493/502 bp

Fig.2 Result of EDA1 genotypic alleles analyzed by the Genemarker is 493/502 bp in the Yunnan tree shrew individuals

表 2 两个树鼯群体 9 个微卫星位点的遗传多态性及 Hardy-Weinberg 平衡检验

Tab.2 Genetic diversities and Hardy-Weinberg equilibrium test of 9 microsatellite loci in the two tree shrews populations

位点 Locus	广西 (GX) Guangxi (GX)						云南 (YN) Yunnan (YN)					
	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	香浓指数 I	PHW	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	香浓指数 I	PHW
CCBL1A	3.220	0.813	0.700	0.633	1.319	0.210	1.534	0.406	0.354	0.297	0.582	0.123
CCBL1B	2.149	0.219	0.543	0.474	0.910	0.000 *	2.547	0.938	0.617	0.527	1.075	0.000 *
CCDC61	2.779	0.125	0.650	0.576	1.204	0.000 *	1.438	0.123	0.310	0.258	0.483	0.000 *
EDA1	3.710	0.281	0.742	0.690	1.504	0.000 *	1.932	0.147	0.490	0.366	0.676	0.000 *
OPA3	2.359	1.000	0.585	0.486	0.934	0.000 *	2.186	1.000	0.551	0.438	0.849	0.000 *
RALGPS1A	2.092	0.531	0.530	0.465	0.894	0.064	1.255	0.188	0.206	0.197	0.485	0.228
SLC45A4	5.069	0.813	0.815	0.775	1.705	0.982	4.935	0.719	0.810	0.769	1.747	0.286
TP53	2.096	0.438	0.531	0.427	0.828	0.605	3.396	0.969	0.717	0.651	1.291	0.000 *
TRIM23	1.205	0.125	0.173	0.155	0.311	0.228	1.421	0.156	0.301	0.272	0.560	0.004 *
Mean	2.742	0.483	0.586	0.520	1.068		2.294	0.516	0.484	0.420	0.861	
St. Dev	1.134	0.327	0.185	0.179	0.415		1.202	0.423	0.206	0.194	0.434	

注:PHW, Hardy-Weinberg 平衡检验 P 值;*, 显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.01$)。
Note. PHW, * P value from exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), showing significant departure from HWE ($P < 0.01$).

2.3 各微卫星位点遗传变异

在 64 个广西和云南的树鼯血样品中 9 个微卫

星位点共检测到 62 个等位基因,其中位点 TRIM23 的等位基因数最少(为 3 个);位点 SLC45A4 的等位

基因数最多(为 14 个)(见表 3)。每个基因座上的平均等位基因为 6.889 个。所有位点的 PIC 均大于 0.5,平均 PIC 为 0.725。各位点 H_o 和 H_e 分别在 0.141 ~ 1.000 和 0.241 ~ 0.907 之间,平均观测杂

合度和平均期望杂合度分别为 0.484 和 0.703。

F-stastic 统计结果(见表 3)显示 F_{is} 、 F_{it} 、 F_{st} 的变化范围分别为 -0.788 ~ 0.868、-0.302 ~ 0.913 和 0.025 ~ 0.373,平均为 0.080、0.306 和 0.235。

表 3 9 个微卫星位点的遗传特征

Tab. 3 Genetic characteristics of 9 microsatellite loci used in this study

位点 Loci	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	等位 基因 丰度 AR	香浓 指数 I	亚群 内近 交指数 F_{is}	总群 体内 近交 指数 F_{it}	种群 间分 化指 数 F_{st}
CCBL1A	7	3.170	0.609	0.690	0.731	5.878	1.377	-0.175	0.110	0.242
CCBL1B	7	4.559	0.578	0.787	0.755	6.485	1.649	-0.012	0.259	0.269
CCDC61	5	3.542	0.063	0.723	0.674	4.971	1.399	0.868	0.913	0.342
EDA1	9	5.082	0.141	0.810	0.776	7.849	1.783	0.768	0.825	0.245
OPA3	5	4.309	1.000	0.774	0.743	4.986	1.505	-0.788	-0.302	0.272
RALGPS1A	5	2.368	0.359	0.582	0.630	4.629	1.045	0.009	0.378	0.373
SLC45A4	14	10.002	0.766	0.907	0.895	12.824	2.419	0.043	0.149	0.111
TP53	7	5.185	0.703	0.814	0.780	6.871	1.753	-0.145	0.129	0.239
TRIM23	3	1.314	0.141	0.241	0.541	2.995	0.484	0.397	0.412	0.025
Mean	6.889	4.392	0.484	0.703	0.725	6.388	1.490	0.080	0.306	0.235

2.4 遗传距离和遗传分化

通过 Popgene 1.32 软件计算出广西和云南树鼩 Nei(1972) 遗传距离和遗传同一性分别为 1.2770 和 0.2789,Nei(1978) 无偏遗传距离和遗传同一性分别为 1.2680 和 0.2814。

利用 Arlequin 软件包中的 AMOVA 分析检测两个树鼩群体遗传结构变异分布情况,结果显示 61.57% 的微卫星遗传变异来自于群体内部,38.43% 存在于群体之间,群体间已经产生了极显著的遗传分化($F_{st}=0.3843$, $P=0.0000$)。

2.5 遗传结构

通过 Structure 软件对两个树鼩群体的 64 个样本进行聚类分析,结果显示,当 $K=2$ 时, ΔK 出现

明显拐点且取得最大值,提示本研究的两个树鼩群体的 64 个样品可划分为 2 个理论群,而且两个树鼩群体的个体遗传结构都相对独立的。

2.6 瓶颈效应分析结果

瓶颈效应分析结果(见表 4)显示,广西树鼩在 IAM 和 TPM 这两种模型下均偏离了突变-漂移平衡,表现出极其显著的杂合度过剩($P<0.01$),但在 SMM 模型下未偏离突变-漂移平衡($P>0.05$);而云南树鼩群体在 3 种突变模型下,虽然表现出杂合度过剩,但均未达到显著性的水平($P>0.05$)。这些结果表明广西树鼩群体突变-漂变未达到平衡状态,该群体近期可能经历了瓶颈效应。

表 4 两个群体瓶颈效应检测

Tab. 4 Bottleneck analysis in the two populations

种群 Populations	个体大小 Sample size	Sign test						Wilcoxon test (one tail for H excess)		
		IAM		TPM		SMM		IAM	TPM	SMM
		H_e/H_d	Prob.	H_e/H_d	Prob.	H_e/H_d	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.
广西(GX)	32	8/1	0.0320 *	8/1	0.0470 *	5/4	0.5622	0.0020 *	0.0068 *	0.3262
云南(YN)	32	6/3	0.3037	5/4	0.6317	4/5	0.3368	0.1250	0.2852	0.6738

注: H_e/H_d :杂合过剩位点数与杂合不足位点数之比;* 显著偏离平衡水平($P<0.05$)。

Note. H_e/H_d : represents the ratio of the number of loci with a heterozygosity excess to the number with a heterozygosity deficiency. * Significant deviation at $P<0.05$ from equilibrium (bottleneck) expectations.

3 讨论

在微卫星位点检测方法中,利用荧光标记微卫星-全自动分析技术较传统的银染法检测效率和灵敏度更高,不仅可得到清晰的图谱文件,而且可提高

分析结果的精确性。传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳易受凝胶电压、时间、质量,尤其个人肉眼分辨能力等多方面的影响,使实验结果的准确度受到极大的限制。而采用荧光标记微卫星-毛细管电泳法,利用测序仪自动收集和分析数据,具有简便快捷、实用、高

通量等优点,可明显提高工作效率并降低系统误差。

杂合度和 PIC 是反映群体内个体遗传变异程度的重要参数,其值越大说明遗传变异越高,反之越低。本研究两个群体平均 H_e 为 0.703,高于 Liu 等^[5]利用微卫星 DNA 对中缅树鼩遗传多态性的研究(0.616),而低于 Munshi-South 等^[6]对平原树鼩群体的研究(0.74),推测出现这种差异的原因可能与各自所采用的树鼩亚种、选择的微卫星标记以及检测手段不同有关。Botstein 等^[9]认为:当 $PIC > 0.5$ 时,为高度多态性位点;当 PIC 为 $0.25 \sim 0.5$ 时,为中度多态性位点;当 $PIC < 0.25$ 时,则为低度多态性位点。本研究结果显示广西和云南树鼩群体平均 PIC 分别为 0.52 和 0.42,提示这两个树鼩群体的遗传多态性均较高。

Chen 等^[10]通过分析昆明周边野生树鼩 mtDNA 控制区序列片段之间的核苷酸差异,发现树鼩群体内存在个体遗传差异,表明中缅树鼩具有较高的遗传多样性。本研究的遗传多态性比较发现广西树鼩群体的平均 N_e 、 H_e 、 PIC 、 I 值都略高于云南树鼩群体,但差异不显著,表明两个树鼩群体都呈现出较丰富的遗传多样性,表现出比较好的资源种质状况,具有进一步选育的价值和潜力。而其差异的原因有可能是动物本源不一致:广西树鼩是野生的,云南树鼩是实验驯化的;导致差异的原因应当还与地理隔离有关。

总群体的遗传变异可以看成是群体内和群体间遗传变异的总和。一般用 F_{is} 、 F_{st} 来衡量群体内近交和群体间的遗传分化程度。 F_{is} ,即亚群内的近交系数,可用作衡量亚群体内偏离哈迪-温伯格平衡的程度。本研究发现 F_{is} 均值大于 0,说明树鼩群体总体上存在近亲交配,但群体内部分个体 F_{is} 小于 0,说明处于轻微的杂交状态。 F_{st} 反映的是亚群体间遗传分化程度。本研究发现两个种群的 F_{st} 均值为 0.2352,说明总体上群体间存在高度分化,而部分位点处于极度分化。

在没有突变、迁移、和人工选择的理想情况下,各群体应该处于一种遗传平衡状态,但由于干扰 HWE 平衡的因素太多,如非随机化交配、人工选择、基因突变、迁移和遗传漂变等,导致在自然界中符合 HWE 平衡定律的群体甚少。本实验两个树鼩群体的 HWE 平衡检测结果发现所筛选的大部分位点处于非平衡状态,说明两个树鼩群体遗传结构欠稳定,容易受到随机漂变、选择、突变等因素的影响。推测

本研究树鼩群体处于不平衡状态的主要原因是:第一,目前本课题组养殖树鼩规模较小,饲养繁育的雌雄树鼩数量不等,繁殖期间可能存在一雌多雄或一雄多雌交配;第二,群体内存在近亲交配,从而使部分稀有基因丢失;第三,在某种程度上存在人工选择的可能,而且本实验所选样品数量少,可能造成群体结构不完整,导致统计误差的可能。

遗传距离是衡量群体间、系统间遗传分化程度和遗传差异大小的主要指标。群体遗传距离与分化时间成正比,如果群体间的分化时间越长,遗传距离也就越大,反之亦然。黎家敏等^[11]报道采用随机扩增多态性 DNA 标记法研究云南滇西亚种树鼩的个体间遗传多样性,对 48 只树鼩进行 RAPD 扩增得到的遗传相似系数介于 $0.73 \sim 0.91$ 之间,平均为 0.8307,个体间遗传距离在 $0.09 \sim 0.27$ 之间,平均遗传距离为 0.1693,表明滇西亚种树鼩的个体之间差异很大。本研究发现广西和云南树鼩群体的 Nei (1972) 遗传距离及 Nei (1978) 无偏遗传距离分别为 1.277 和 1.268,而两个群体的遗传相似系数约为 0.28,表明了这两个群体间具有较大的遗传差异和分化程度。

本研究进一步分析两个树鼩群体遗传结构变异的分布情况发现 61.57% 的微卫星遗传变异来自于群体内部,38.43% 存在于群体之间,说明树鼩群体大部分遗传变异是由群体内的遗传变异引起的,但不可忽略群体间的遗传变异。

STRUCTURE 软件是基于个体遗传组成而进行的群体模拟分析,它不受各群体的样本大小的影响,常被认为是一种群体遗传结构分析的理想工具^[12, 13]。STRUCTURE 分析结果发现本研究观察的树鼩可划分为 2 个理论群,并且两群体之间不存在明显的杂交。说明广西和云南树鼩可能为中缅树鼩群体的两个不同的亚种,这可能与地理隔离使自然条件下的基因交流减少密切相关。此研究结果与分布于我国云南地区的树鼩亚种分类基本上是一致的^[1]。

瓶颈效应的发生可能主要与生态环境的破坏、种群繁衍缓慢、数量有限等有关^[14]。IAM 模型与 SMM 模型是基于不同突变-漂移假设条件下的两种极端模型,而 TPM 模型则是对前两者的综合模型。本研究结果显示在 IAM 和 TPM 假设模型下广西树鼩群体微卫星位点杂合度过剩显著,而云南树鼩群体在 3 种突变模型下均未达到显著性水平,表明广

西树鼯群体在近期很可能经历过瓶颈效应,从而推断其有效群体数量近几十年可能存在不同程度的下降。此结果表明十分有必要对广西树鼯群体进行合理管理和保护。

综上所述,本研究运用 9 个荧光标记微卫星对来源于广西和云南的树鼯群体进行遗传多样性检测,结果表明这两个群体的遗传多样性都较丰富,两个群体间具有较大的遗传差异和分化程度。这些数据为推动树鼯优良品系的培育和实验动物模型的创建奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 王应祥. 中国树鼯的分类研究 [J]. 动物学研究, 1987, 8 (3): 213 - 230.
 - [2] 刘瑞清, 陈玉泽. 树鼯(*Tupaia belangeri* Wagner)三个亚种的染色体比较研究 [J]. 动物学研究, 1989, 10 (3): 195 - 200, +273 - 274.
 - [3] Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research [J]. J Med Primatol, 2003, 32(3): 123 - 130.
 - [4] Grover A, Sharma PC. Development and use of molecular markers: past and present [J]. Crit Rev Biotechnol, 2016, 36(2): 290 - 302.
 - [5] Liu XH, Yao YG. Characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Zoolog Res, 2013, 34(E2): E62 - 68.
 - [6] Munshi-South J, Wilkinson GS. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci Bornean treeshrews (*Tupaia* spp.) [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6(3): 698 - 699.
 - [7] 张媛, 李晓飞, 李振宇, 等. 滇西亚种树鼯微卫星分子标记的筛选 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6): 36 - 41.
 - [8] 李婧潇, 王新兴, 王文广, 等. 中缅树鼯微卫星分子标记的筛选 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(4): 312 - 315.
 - [9] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314 - 331.
 - [10] Chen SY, Xu L, Lu LB, et al. Genetic diversity and matrilineal structure in Chinese tree shrews inhabiting Kunming, China [J]. Zoolog Res, 2011, 32(1): 17 - 23.
 - [11] 黎家敏, 李海燕, 李婧潇, 等. 应用 RAPD 标记技术对树鼯遗传多样性的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(2): 34 - 40.
 - [12] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. Mol Ecol, 2005, 14(8): 2611 - 2620.
 - [13] Perez - Alvarez MJ, Olavarria C, Moraga R, et al. Microsatellite markers reveal strong genetic structure in the endemic Chilean dolphin [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123956.
 - [14] Gupta AK, Chauhan M, Bhardwaj A, et al. Microsatellite markers based genetic diversity and bottleneck studies in Zanskari pony [J]. Gene, 2012, 499(2): 357 - 361.
- [收稿日期] 2016 - 06 - 06
-
- (上接第 571 页)
- [7] 张彩勤, 张海, 赵勇, 等. 近红外荧光染料 IR-783 介导的肿瘤成像 [J]. 中国实验动物学报. 2014, 22(2): 17 - 19.
 - [8] Shao C, Liao CP, Hu P, et al. Detection of live circulating tumor cells by a class of near-infrared heptamethine carbocyanine dyes in patients with localized and metastatic prostate cancer [J]. PLoS One. 2014, 9(2): e88967.
 - [9] 张彩勤, 赵勇, 张海, 等. 近红外荧光染料 MHI - 148 应用于肿瘤活体成像的初步研究 [J]. 科学技术与工程. 2014, 28: 179 - 182
 - [10] 郑玲, 卢光明. 近红外荧光染料在肿瘤特异性成像中的研究 [J]. 临床放射学杂志. 2012, 31(6): 897 - 899
 - [11] Close DM, Xu T, Sayler GS, et al. In vivo bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals [J]. Sensors (Basel). 2011, 11(1): 180 - 206.
 - [12] Popovic M, Zaja R, Smital T. Organic anion transporting polypeptides (OATP) in zebrafish (*Danio rerio*): Phylogenetic analysis and tissue distribution [J]. Comp Biochem Physiol Part A, Mol Integr Physiol. 2010, 155(3): 327 - 335.
 - [13] Martinez-Becerra P, Briz O, Romero MR, et al. Further characterization of the electrogenic and pH sensitivity of the human organic anion-transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3 [J]. Mol Pharmacol. 2011, 79(3): 596 - 607.
 - [14] Acharya MR, Karp JE, et al. Factors affecting the pharmacokinetic profile of MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor, in patients with cancer [J]. Invest New Drugs. 2006, 24(5): 367 - 375.
 - [15] Shi C, Wu JB, Pan D. Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting, and photodynamic therapy [J]. J Biomed Opt. 2016, 21(5): 50901.
- [收稿日期] 2016 - 05 - 10