

植物微卫星分子标记中无效等位基因检测方法的比较与应用*

侯 盟^{1,2}, 杜 芳^{1**}

(1 北京林业大学林学院, 北京 100083; 2 兰州大学生命科学学院草地农业生态系统国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 微卫星分子标记因其开发便捷、突变率高、成本较低等优势一直被广泛应用于群体遗传学、保护生物学和分子生态学研究。近年来二代测序技术、多重 PCR 方法以及毛细管电泳等新技术的发展和完善, 极大地提高了微卫星分子标记的开发和使用效率并降低了使用成本。但是在开展微卫星实验过程中普遍存在的无效等位基因 (或称为哑等位基因, null alleles) 会对研究结果造成偏差, 是微卫星分子标记应用中的最大缺陷之一。然而, 长期以来无效等位基因的检测问题并未受到研究者的足够重视。本文通过对国内外相关文献查阅, 在对无效等位基因有一个较为深入和全面认识的基础上, 对目前无效等位基因的主要检测方法进行全面的介绍和深入的比较。最后, 结合研究实例总结出植物微卫星分子标记研究中无效等位基因检测的有效办法。

关键词: 无效等位基因; 微卫星; 哈温平衡法; 亲子代基因型法

中图分类号: Q 3-3, Q 785

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2014)06-723-07

Null Allele Detection in Plant Microsatellite Studies: Comparisons and Applications

HOU Meng^{1,2}, DU Fang^{1**}

(1 College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2 School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Microsatellites remain the most popular markers in the studies of population genetics, conservation biology and molecular ecology because of its ease to development, high mutation rate and low-cost. Nowadays, the improvement of new technologies, such as Next-Generation Sequencing (NGS), multiplex-PCR and capillary electrophoresis system have greatly promoted the development and using of microsatellite markers. However, null alleles, one of the most primary defects of microsatellite markers, widely presented in the studies using microsatellite markers, may lead to biased results. Unfortunately, the detection of null alleles has not been paid enough attention. In this review, we attempted to construct an in-depth and comprehensive understanding on null alleles detection, and then, applied a detailed comparison for the different methods used to detect the occurrence of null alleles. Finally, we propose a meaningful suggestion for null allele's detection in plant.

Key words: Null alleles; Microsatellite; Hardy-Weinberg Equilibrium method; Progeny tests method

微卫星通常又被称为简单重复序列 (SSRs)、(SSLP), 是以 1~6 bp 为重复单位 (motifs) 的短串联重复 (STRs) 或简单序列长度多态性 串联重复 DNA 片段, 广泛存在于原核和真核生

* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (41201051), 中央高校基本业务经费 (TD2012-01), 111 引智计划 (B13007) 和教育部创新团队发展计划 (IRT13047)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: dufang325@gmail.com

收稿日期: 2014-03-28, 2014-07-16 接受发表

作者简介: 侯 盟 (1990-) 男, 硕士研究生, 主要从事植物群体遗传学及分子生态学研究。E-mail: houm08@lzu.edu.cn

物基因组中 (Edwards 等, 1991; Jacob 等, 1991; Tautz, 1989; Zane 等, 2002; Kalia 等, 2011)。目前, 微卫星作为遗传学研究中最受欢迎的分子标记之一 (Guichoux 等, 2011a), 具有高突变率、高等位基因多态性、近缘种之间较高的通用性、共显性遗传以及可重复性好等 (Kelkar 等, 2010; Guichoux 等, 2011a; Jarne 和 Lagoda, 1996) 优点, 因此, 自八十年代被发现以来, 微卫星被大量的用于指纹分析、亲子鉴定、基因作图和遗传结构分析中 (Ellegren, 2004; Mittal 和 Dubey, 2009; Jones 等, 2010)。近年来, 随着二代测序技术的发展, 大量转录组数据和基因组数据的公开获取, 使得直接在转录组或基因组数据上进行微卫星设计更加便捷可行 (Du 等, 2013; 程晓凤等, 2011); 而且多重 PCR 和荧光毛细管电泳技术在微卫星扩增和检测中的成熟应用 (Guichoux 等, 2011b; Xu 等, 2013), 使得微卫星的应用变得更加高效和廉价。

尽管微卫星具有众多其他分子标记无法匹及的优点, 但是无效等位基因的频繁存在, 使得在使用微卫星时不得不谨慎对待。无效等位基因又叫哑等位基因, 是指那些在 PCR 扩增过程中不能成功扩增的等位基因 (Oddou-Muratorio 等, 2009)。多种原因都可能导致等位基因 PCR 扩增失败。首先, 引物结合区域 (尤其是 3' 端) 发生了基因突变导致引物特异性结合受到影响, 使等位基因正常扩增受到影响, 从而显现出无效等位基因 (Primmer 等, 1995; Kwok 等, 1990); 其次, 与片段较小的等位基因相比较, 片段较长的等位基因扩增效率较低, 所以往往不容易检测到, 从而显现出无效等位基因的假象 (Wattier 等, 1998); 最后, 较低的模板 DNA 质量或浓度也会导致扩增失败, 使得将空白结果错误的解读为无效等位基因 (Garcia de Leon 等, 1998)。

无效等位基因在微生物 (Szabo, 2007; Tsui 等, 2009)、植物 (Hoban 等, 2008)、鱼类 (McCoy 等, 2001) 以及哺乳动物 (Paetkau 和 Strobeck, 1995; Ishibashi 等, 1996) 等众多物种中普遍存在。若在研究分析中不排除这些无效等位基因, 将会使结果产生巨大偏差, 甚至会导致错误的推断。例如, 在群体遗传学研究中, Paetkau 和 Strobeck (1995) 的研究指出, 无效等位

基因的存在会使得群体中纯合子个体增加, 使群体偏离哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE; 以下简称“哈温平衡”), 降低群体的表观杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e); 同时, Carlsson (2008) 研究也发现无效等位基因使得群体遗传分化系数 F_{ST} 显著增大; 此外, 在进行亲本分析时, 当无效等位基因频率较高时, 亲本的错误排除率也会显著增加 (Dakin 和 Avise, 2004)。类似的, 较高的无效等位基因频率同样也会引起亲缘关系 (Wagner 等, 2006) 分析结果产生显著偏差。

虽然无效等位基因对研究结果影响显著, 但却并未引起研究者的足够重视。在大多数使用微卫星数据进行群体遗传结构和遗传亲缘关系的研究中, 研究者并未对其使用的数据进行无效等位基因检测 (Dakin 和 Avise, 2004)。Guichoux 等 (2011a) 在其关于微卫星分子标记的文献综述中, 检查了 2009–2010 年分子生态 (Molecular Ecology) 杂志上发表的利用微卫星分子标记的 100 篇文章, 发现仅有 40% 的研究进行了无效等位基因检测。文亚峰等 (2013) 在对发表于 2009–2012 年的 1 348 项中文微卫星研究案例进行的检查中, 也发现仅有 13 项研究进行了无效等位基因检测。因此, 在进行多样性、群体遗传结构、亲缘关系等分析之前首先排除无效等位基因的干扰是获得可信结果的第一步。本文将通过综述已有文献报导并结合笔者的实际研究着重介绍 5 种常用的无效等位基因检测方法, 并对其检测能力进行比较, 从而提出较为合理的无效等位基因检测方案, 以期对植物微卫星无效等位基因检测提供指导。

1 无效等位基因的检测方法

虽然无效等位基因从数据表面上来看很难发现, 但是完全可以通过适当的方法对其存在与否进行检测。目前的检验方法很多, 根据其依据的检验理论不同, 可将其分为两类: 基于哈温平衡 (HWE) 的检测方法和亲子代基因型分析法 (progeny tests), 以下将作分别介绍。

1.1 基于群体哈温平衡 (HWE) 的无效等位基因检测方法

当特定位点存在无效等位基因时, 其含有无

效等位基因的杂合子就会在基因分型时呈现纯合现象, 从而导致该位点的杂合度降低, 表现出该位点偏离哈温平衡。目前, 基于这一理论基础的计算无效等位基因频率的方法理论很多 (Dempster 等, 1977; Chakraborty 等, 1992; Brookfield, 1996; Summers 和 Amos, 1997; Kalinowski 和 Taper, 2006), 它们假定研究群体均为理想群体 (符合哈温平衡定律), 通过比较表观杂合度 (H_0) 和期望杂合度 (H_E) 之间的差异, 来间接确定无效等位基因的存在。根据这些算法目前也已开发出了一系列较为成熟的软件, 其中最为常用的有以下四种: C_{ERVUS} (Marshall 等, 1998), G_{ENE}P_{OP} (Rousse, 2008), MICRO-CHECKER (Van Oosterhout, 2004), 以及 ML-NullFreq (<http://www.montana.edu/kalinowski/Software/MLNullFreq.htm>)。然而, 这些软件在计算原理、输入格式及检测效率等方面均有差异, 我们将其主要特性总结为表 1 并细述如下:

(1) C_{ERVUS} 软件包中的无效等位基因检测功能

C_{ERVUS} (<http://www.fieldgenetics.com/pages/home.jsp>) 是由 Marshall 等 (1998) 开发的软件包, 可进行等位基因频率分析、亲子代分析模拟、亲子代鉴定等相关分析, 其中等位基因频率分析模块中可进行哈温平衡检测和无效等位基因频率计算。软件可识别 Excel 格式数据。该软件根据 Summers 和 Amos (1997) 提出的方法, 通过最大似然法计算无效等位基因频率。该方法假设携带有等位基因 a 的个体数为 n_a , 而该等位基因的频率为 f_a , 并给出公式: $n_a = Nf_a^2 + 2Nf_a(1-f_a)$, 其中 N 为样本个体数目 (成功扩增的)。此时如果群体中存在无效等位基因 (0 表示), 则基因型为 aa 的个体包含了真的 aa 和含有无效等位基因的杂合子 a0。重复上述步骤, 我们可以根据其一般性假设群体特定位点的任一等位基因 (x) 和一个无效等位基因 (0) 以及无效等位基因频率 f_0 , 根据公式 $n_{x0} = 2Nf_0(1-f_0)$, $n_{xx} = N(1-f_0)^2$, (其中 n_{x0} 和 n_{xx} 分别表示携带无效等位基因的杂合子个体数和不携带无效等位基因的个体数), 推导出 $n_{x0}/n_{xx} = 2f_0/(1-f_0)$, 并得到估计量 f_0 : $f_0 = n_{x0}/(2n_{xx} + n_{x0})$ 。由于无效等位基因纯合子 (00) 表现为数据缺失, 且其频率为 f_0^2 , 因此此处可修正群体数量 $N' = N/(1-f_0^2)$ 。由此

可见该软件算法将缺失数据一律视为无效等位基因纯合子对待, 因此具有一定的假阳性 (将非无效等位基因错误的检测为无效等位基因) 率。

(2) G_{ENE}P_{OP} 软件包中无效等位基因检测的功能

最早的 G_{ENE}P_{OP} 3.4 是由 Raymond 和 Rousset (1995) 编写的, 最后经 Rousset (2008) 修正 (G_{ENE}P_{OP} 4.0), 是一个经典的群体遗传学软件, 可计算哈温平衡、估算无效等位基因频率和群体遗传学参数 (如 F_{ST} , F_{IS} 等)、连锁不平衡以及地理隔离分析等。该软件以其特有 Genepop 文件为输入文件进行数据处理, Genepop 文件可通过 Convert 软件 (<http://www.agriculture.purdue.edu/fnr/html/faculty/Rhodes/Students%20and%20Staff/glaubitz/software.htm>) 由原始 Excel 数据转化获得, 也可通过 txt 编译器自行编辑获得。同时, 它以 Dempster 等 (1977) 提出的 EM (Expectation-Maximization) 算法为基础, 进行无效等位基因频率估算, 并根据公式 $P_i^* = \frac{1}{2n} [2n_{ii}^* + n_{i0}^*]$

+ $\sum_{j \neq i}^K n_{ij}$] 和 $r = \frac{1}{2n} [2n_0 + \sum_{i=1}^K n_{i0}^*]$ 分别计算任意等位基因 i 的频率 P_i^* , 和无效等位基因 '0' 的频率 r。以此为基础, 根据迭代方程 $p''_i = \frac{1}{2n} [\frac{2(p'_i + r')}{p'_i + 2r'} \times n_{ii} + \sum_{j \neq i}^K n_{ij}]$ 和 $r'' = \frac{1}{2n} [2n_0 + \sum_{i=1}^K (\frac{2r'}{p'_i + 2r'}) \times n_{i0}]$ 进行迭代, 直至 $(p''_i - p'_i)$ 和 $(r'' - r')$ 都小于 10^{-5} , 并确定该频率为最终频率。同样的, 该方法依然将缺失数据以无效等位基因纯合子处理。

(3) MICRO-CHECKER 软件

MICRO-CHECKER (Van Oosterhout 等, 2004) 是专门用于大量微卫星数据分析的软件, 可用于检测大片段等位基因遗失 (未产生和小片段等位基因同等扩增效率的扩增)、影子带 (Stuttering) 和无效等位基因的存在。该软件以 Excel 格式文件为输入文件。在等位基因检测方面, 其根据 Chakraborty 等 (1992) 和 Brookfield (1996) 的方法分别进行无效等位基因频率估算。Chakraborty 等 (1992) 的方法将缺失数据视为扩增失败,

并给出公式 $H_0 = \frac{2 \sum_{i \neq j}^K P_i^* P_j^*}{(1 - r^2)}$ 和 $H_E = \frac{2 \sum_{i \neq j}^K P_i^* P_j^*}{(1 - r)^2}$

分别计算表观杂合度和期望杂合度,并且给出无效等位基因频率计算公式 $r' = (H_E - H_0) / (H_E + H_0)$; 而 Brookfield (1996) 的方法则将缺失数据视为无效等位基因纯合子对待 (n_0), 并得到 $r' = \frac{A + \sqrt{A^2 + B}}{2(1 + H_E)}$, 其中 $A = H_E(1 + n_0) - H_0$, $B = 4n_0(1 - H_E^2)$ 并利用最大似然法进行估算。利用 MICRO-CHECKER 估算无效等位基因时结果的假阳性率和假阴性率都比较适中。

(4) ML-NullFreq

ML-NullFreq (<http://www.montana.edu/kalinowski/Software/MLNullFreq.htm>) 也以 Genepop 格式文件为输入文件进行分析, 并根据 Kalinowski 和 Taper (2006) 的方法, 给出了等位基因频率的估计量: $L = \left\{ \prod_{i=1}^k [(p_i^2 + 2p_i p_n)(1 - \beta)]^{n_{ii}} \right\} \times \left\{ \prod_{i \neq j} [(2p_i p_j)(1 - \beta)]^{n_{ij}} \right\} \times \{ [\beta + p_n^2(1 - \beta)]^{n_{nn}} \}$ 。其中, β 为由于实验原因而扩增失败的概率, n_{mm} 为全部未扩增成功个体, i, j 为特定位点等位基因 i, j 。然后再根据 Chakraborty 等 (1992) 和 Brookfield (1996) 的方法, 进行迭代计算。不同的是, 该方法认为缺失数据包含了无效等位基因纯合子和因实验原因而导致的扩增失败。

1.2 亲子代基因型法的无效等位基因检测

不同于哈温平衡法, 亲子代基因型法并不要求群体必须处于理想状态, 即群体可以偏离哈温平衡。事实上, 自然群体中广泛存在的干扰因素例如瓶颈效应, 非随机交配等都会引起群体偏离哈温平衡。因此, 利用亲子代基因分型法进行无效等位基因检测就显得尤为重要。

亲子代基因分型法是基于孟德尔遗传规律的直接分析无效等位基因的方法。在孟德尔遗传规律下, 若为全同胞家系 (即父本、母本及子代), 两亲本基因型分别为 01 (0, 为无效等位基因) 和 23, 那么如果此时子代中观测到了 22, 33 基因型 (实际应为 02, 03), 那么就出现和亲本 01 (仅能观测到等位基因 1) 基因型不一致的现象 (即基因型为 22, 33 的子代没有获得亲本 01 的任一等位基因, 表现出违反孟德尔遗传规律的现象), 据此, 我们就可检测出无效等位基因的存在。若为半同胞家系 (仅父本、母本一方及子

代), 一方亲本基因型为 01 (仅能观测到等位基因 1), 子代的基因型为 02 (仅能观测到等位基因 2) 则可确定此位点能够监测到无效等位基因。一般来说, 对于全同胞家系中只需要有六个子代的基因型数据、半同胞家系中 12 或 24 个等位基因型的数据就可确定该位点是否为无效等位基因 (与 Rémy J. Petit 沟通)。

2 无效等位基因检测方法比较以及检测结果可信度评价

在上述总结提到的 5 种方法中, 毫无疑问, 亲子代基因分型的方法是最为准确的方法。但在大多数时候, 尤其是进行自然群体的研究时, 我们无法获得有效的亲本遗传信息, 因此只能通过间接的杂合度方法来估算无效等位基因频率。四种间接估计的方法, 无论是在其计算理论还是对缺失数据的处理等方面上都存在差异 (表 1), 那么, 对其估计效力在实际应用中应当谨慎对待。

Oddou-Muratorio 等 (2009) 使用 C_{ERVUS} , G_{ENE} P_{OP} 和 ML-NullFreq 对欧洲山毛榉的研究结果显示, 虽然这三种软件检测无效等位基因得到的结果 (分别为 0.0783, 0.0719 和 0.0731) 略高于亲子代法检测的结果 (0.053), 但结果之间并无显著差异, 这似乎显示了这些间接方法的有效性。但是文亚峰等 (2013) 则认为, 该结果的产生是由于欧洲山毛榉本身较低的无效等位基因频率以及其广泛连续分布, 可使其群体处于哈温平衡状态, 所以该结果并不能有效的证明在群体含有较高频率无效等位基因或可能偏离哈温平衡 (可能自交, 经历瓶颈效应等) 时检测结果的可靠性。

Dałbrowski 等 (2014) 通过比较根田鼠 (*Microtus oeconomus*) 自然居群连续监测八年的数据和模拟数据的结果, 对 4 种以哈温平衡为基础无效等位基因检测方法 (C_{ERVUS} , G_{ENE} P_{OP} , MICRO-CHECKER, 以及 ML-NullFreq) 的检测效力进行了评估。通过对根田鼠自然群体的研究结果显示, 不仅这 4 种方法之间的结果差异显著 (相似率仅为 15%), 并且同种方法不同年份之间的结果也存在显著差异。由于根田鼠的群体数量每年都会经历季节性的剧烈波动并且存在群体迁移, 因而, 该结果显示了这 4 种方法在对非平衡

群体进行检测时存在显著的误差。另一方面，该文作者还分别模拟了平衡群体下，不存在无效等位基因和存在无效等位基因时的 4 种方法的检测效率。不含有无效等位基因的模拟数据检测的结果发现 4 种方法都存在假阳性（表 1）且结果之间还存在显著差异（相似率仅为 1%）；而在含有已知无效等位基因的模拟数据中除了 $G_{ENE}P_{OP}$ 得到了 55% 的假阳性外，其他 3 种方法均很低（1.6%~1.9%），但是 4 种方法却显示出了高达 22%~42% 不等的假阴性（本为无效等位基因，但却未被检测到）。这些结果都暗示即使是平衡群体，也应当慎重对待检测结果。值得注意的是，该研究还发现随着瓶颈效应的增强，检测结果的误差也显著增高，尤以 $G_{ENE}P_{OP}$ 的检测结果误差最为突出。

3 植物微卫星无效等位基因检测的建议

亲子代基因分型法具有准确的鉴定结果，并且无需考虑群体是否符合哈温平衡，因而我们建议优先使用亲子代基因分型法对植物群体无效等位基因进行检测。然而对于开放授粉的植物来说，确定父本非常困难，而种子却相对易于获得，我们能够较为方便的构建以母本和其子代信息为基础的半同胞家系来检验无效等位基因。作者所在的实验室成功利用了半同胞家系（一个母本和 12 个子代）检验了胡杨中的无效等位基因（在 64 对核基因 SSR 引物中检测到 3 对无效等位基因）（Du 等，2013；Xu 等，2013）。利用该方法分析无效等位基因时需要谨慎对待基因分型，以防人为原因造成的分型误差而产生无效等位基因。

然而当我们无法获取构建完整的亲缘谱系关系时，就不得不使用间接的估计方法。由于上述 4 种方法均假定研究群体为哈温平衡群体，因此我们首先必须清楚群体的遗传结构和历史动态，以确定群体是否经历了瓶颈效应、迁移或者非随机交配而可能偏离哈温平衡，若为非哈温平衡群体，则必须使用亲子代基因分型法进行检测。

在明确群体为平衡群体时，我们也必须慎重对待检测结果。由于 $G_{ENE}P_{OP}$ 在对含有已知无效等位基因的模拟数据检测中的较差表现（Dąbrowski 等，2014），因此建议不使用 $G_{ENE}P_{OP}$

表 1 无效等位基因计算方法比较
Table 1 Compare of the methods used for null alleles detection

方法	输入文件	算法	缺失数据处理	假阳性率* / %	评价	参考文献
CERVUS	Excel	Summers 和 Amos, 1997 最大似然法	无效等位基因 纯合子	1.4	无效等位基因频率较低时，具有高估其频率的趋势；估算结果具有最低的假阳性率，但同时具有最高的假阴性结果；瓶颈效应对检测结果影响显著，但是低于 $G_{ENE}P_{OP}$	Marshall 等 (1998)
$G_{ENE}P_{OP}$	Genepop	Dempster 等, 1977 EM 算法	无效等位基因 纯合子	4.7	无效等位基因频率较低时，具有较好的估计结果，且具有高估其频率的趋势；估算结果假阳性率较高，且是唯一一种在其他方法检测结果显示都不存在假阳性时，其仍然可获得极高的假阳性结果；瓶颈效应对结果误差影响显著，高于其他任意一种方法；因此，不建议优先使用	Rousset (2008)
MICRO-CHECK-ER	Excel	Chakraborty 等, 1992; Brookfield, 1996 最大似然	无效等位基因 纯合子或 PCR 反应失败	2.1	无效等位基因频率较低时，估计结果准确，但具有高估其频率的趋势；估算结果的假阳性率和假阴性率都比较居中；瓶颈效应对结果影响较小	Van Oosterhout 等 (2004)
ML-NullFreq	Genepop	Kalinowski 和 Taper, 2006 最大似然和 EM 相结合	无效等位基因 纯合子和 PCR 反应失败	5.2	无效等位基因频率较低时，估计结果准确，但具有高估其频率的趋势；估算结果的假阳性率稍高，但是假阴性率最低；瓶颈效应对结果影响较小	http://www.montana.edu/kalinowski/Software/MLNullFreq.htm
progeny tests	Excel	直接比较	PCR 反应失败	—	具有准确的估计结果，但是需要构建亲缘谱系，且估计结果容易受到人为和 PCR 过程因素的影响；1) 基因分型错误；2) 影子带 (Stuttering) 影响片段大小的正确读取；3) 分裂峰 (Split peaks) 影响片段大小的正确读取	—

注：Cervus、GenePop、Micro-Checker、ML-NullFreq 等软件的原理是无效等位基因会引起杂合度不足，使得群体偏离哈温平衡，因此这些方法要求检测群体符合哈温平衡而子代分型法符合孟德尔遗传规律，对检测群体无要求；*：数据摘自 Dąbrowski 等，2014

进行检测。在使用 C_{ERVUS}, MICRO-CHECKER 以及 ML-NullFreq 检测时, 结果依然存在较高假阳性概率 (Dałbrowski 等, 2014) 和高估无效等位基因频率的趋势 (Oddou-Muratorio 等, 2009)。因此, 建议使用多种方法同时进行检测, 并且仅选取共同检测到的结果, 这将有效的降低假阳性的出现。但同时, 这又必将增大假阴性结果出现的概率, 综合这一因素, 建议最好选取任意两种方法组合, 且选取共同检测到的结果。此外, 如果群体数量足够大的话, 建议不妨随机获取几个子样本进行检验并将结果综合后与总体数据的检测结果进行对照, 以确定检测结果的可信度。

4 微卫星位点的选择

无效等位基因不仅对群体遗传分析结果产生巨大影响, 并且其检验方法亦不够稳定, 因此在选择引物时我们应当舍弃具有较高无效等位基因频率的位点, 并尽可能选择不含有无效等位基因的位点。Xu 等 (2013) 的研究显示, 相对于核基因 SSR (gSSR), 表达序列标签, EST-SSR (eSSR) 虽然杂合度稍低, 但是其无效等位基因的出现频率也有效降低, 这可能由于外显子序列的高度保守性使其不易于在引物区段发生突变, 而产生无效等位基因。此外, 随着二代测序技术的发展, 获得越来越多非模式物种的基因组、转录组数据已经成为可能, 基于这些基因组、转录组数据直接开发的引物也可避免由于不同种间的转移扩增时产生的无效等位基因 (Du 等, 2013)。

5 结语

无效等位基因在微卫星中普遍存在并会对分析结果会造成强烈偏差, 因此在利用微卫星分子标记进行研究时必须去除无效等位基因, 以获得可信的结果。一方面, 在初始微卫星选择时, 我们应尽量选择无效等位基因较少出现的微卫星 (如 EST-SSR); 另一方面, 我们需要对微卫星进行严格的无效等位基因检测, 以去除无效等位基因。鉴于不同方法无效等位基因检测结果的显著差异, 我们建议最好选取任意两种方法 (不建议使用 G_{ENE}P_{OP}) 组合, 并且选取其共同检测到的结果, 确保结果可信。但就目前的检验方法而言, 不管是亲子代基因型法亲缘谱系的难以构

建, 还是哈温平衡方法假设群体是处于哈温平衡下的要求, 都使这些方法的应用具有很大的局限性, 因此期望新的更加稳健的无效等位基因检测方法的出现, 克服以上方法的局限性, 使检测更方便、检测结果更稳定。

致谢 感谢中国林科院曾艳飞老师和云南大学生态学与环境学院贾东瑞老师对文章初稿的修改以及提出的宝贵意见。

〔参 考 文 献〕

- Brookfield JFY, 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency [J]. *Molecular Ecology*, **5**: 453—455
- Carlsson J, 2008. Effect of microsatellite null alleles on assignment testing [J]. *Journal of Heredity*, **99**: 616—623
- Chakraborty R, De Andrade M, Daiger SP *et al.*, 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications [J]. *Annals of Human Genetics*, **56**: 45—57
- Chen XF (程晓凤), Huang FJ (黄福江), Liu MD (刘明典) *et al.*, 2011. Development of microsatellite markers use 454 pyrosequencing [J]. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), **8**: 82—90
- Dałbrowski MJ, Pilot M, Kruczyk M *et al.*, 2014. Reliability assessment of null allele detection: inconsistencies between and within different methods [J]. *Molecular Ecology Resources*, **14**: 361—373
- Dakin EE, Avise JC, 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis [J]. *Heredity*, **93**: 504—509
- Dempster AP, Laird NM, Rubin DB, 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm [J]. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*, **39**: 1—38
- Du FK, Xu F, Qu H *et al.*, 2013. Exploiting the transcriptome of *Euphrates Poplar*, *Populus euphratica* (Salicaceae) to develop and characterize new EST-SSR markers and construct an EST-SSR database [J]. *PloS One*, **8**: e61337
- Edwards AL, Civitello A, Hammond HA *et al.*, 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats [J]. *American Journal of Human Genetics*, **49**: 746—756
- Ellegren H, 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution [J]. *Nature Reviews Genetics*, **5**: 435—445
- Garcia de Leon FJ, Canonne M, Quillet E *et al.*, 1998. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* [J]. *Aquaculture*, **159**: 303—316
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S *et al.*, 2011a. Current trends in microsatellite genotyping [J]. *Molecular Ecology Resources*, **11**: 591—611

- Guichoux E, Lagache L, Wagner S *et al.*, 2011b. Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks (*Quercus* spp.) [J]. *Molecular Ecology Resources*, **11**: 578—585
- Hoban S, Anderson R, McCleary T *et al.*, 2008. Thirteen nuclear microsatellite loci for butternut (*Juglans cinerea* L.) [J]. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 643—646
- Ishibashi Y, Saitoh T, Abe S *et al.*, 1996. Null microsatellite alleles due to nucleotide sequence variation in the grey-sided vole *Clethrionomys rufocanus* [J]. *Molecular Ecology*, **5**: 589—590
- Jacob HJ, Lindpaintner K, Kusumir EL *et al.*, 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat [J]. *Cell*, **67**: 213—224
- Jarne P, Lagoda PJ, 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**: 424—429
- Jones AG, Small CM, Paczolt KA *et al.*, 2010. A practical guide to methods of parentage analysis [J]. *Molecular Ecology Resources*, **10**: 6—30
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S *et al.*, 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants [J]. *Euphytica*, **177**: 309—334
- Kalinowski ST, Taper ML, 2006. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci [J]. *Conservation Genetics*, **7**: 991—995
- Kelkar YD, Strubczewski N, Hile SE *et al.*, 2010. What is a microsatellite: A computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats [J]. *Genome Biology and Evolution*, **2**: 620—635
- Kwok S, Kellogg DE, McKinney N *et al.*, 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies [J]. *Nucleic Acids Research*, **18**: 999—1005
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB *et al.*, 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations [J]. *Molecular Ecology*, **7**: 639—655
- McCoy EE, Jones AG, Avise JC, 2001. The genetic mating system and tests for cuckoldry in a pipefish species in which males fertilize eggs and brood offspring externally [J]. *Molecular Ecology*, **10**: 1793—1800
- Mittal N, Dubey A, 2009. Microsatellite markers—A new practice of DNA based markers in molecular genetics [J]. *Pharmacognosy Reviews*, **3**: 235—246
- Oddou-Muratorio S, Vendramin GG, Buitenveld J *et al.*, 2009. Population estimators or progeny tests: what is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci? [J]. *Conservation Genetics*, **10**: 1343—1347
- Paetkau D, Strobeck C, 1995. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears [J]. *Molecular Ecology*, **4**: 519—520
- Primmer CR, Møller AP, Ellegren H, 1995. Resolving genetic relationship with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica* [J]. *Molecular Ecology*, **4**: 493—498
- Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism [J]. *Journal of Heredity*, **86**: 248—249
- Rousset F, 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the genepop software for Windows and Linux [J]. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 103—106
- Summers K, Amos W, 1997. Behavioral, ecological, and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates venenatus* [J]. *Behavioral Ecology*, **8**: 260—267
- Szabo LJ, 2007. Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus, *Puccinia graminis* [J]. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 92—94
- Tautz D, 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. *Nucleic Acids Research*, **17**: 6463—6471
- Tsui CKM, Feau N, Ritland CE *et al.*, 2009. Characterization of microsatellite loci in the fungus, *Grosmannia clavigera*, a pine pathogen associated with the mountain pine beetle [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 1500—1503
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DMP *et al.*, 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data [J]. *Molecular Ecology Notes*, **4**: 535—538
- Wagner AP, Creel S, Kalinowski ST, 2006. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles [J]. *Heredity*, **97**: 336—345
- Wattier R, Engel CR, Saumitou-Laprade P *et al.*, 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta) [J]. *Molecular Ecology*, **7**: 1569—1573
- Wen YF (文亚峰), Kentaro Uchiyama, Han WJ (韩文军) *et al.*, 2013. Null alleles in microsatellite markers [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **21**: 117—126
- Xu F, Feng S, Wu R *et al.*, 2013. Two highly validated SSR multiplexes (8-plex) for Euphrates' poplar, *Populus euphratica* (Salicaceae) [J]. *Molecular Ecology Resources*, **13**: 144—153
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T, 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Molecular Ecology*, **11**: 1—16