

## 三角帆蚌*HcTyr*基因内壳色性状相关SNP筛选及图谱定位

韩学凯<sup>1</sup>, 陈夏君<sup>1</sup>, 白志毅<sup>1,2</sup>, 刘晓军<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 为研究三角帆蚌*HcTyr*基因与内壳色性状的相关性, 本实验根据已分离的三角帆蚌*HcTyr*基因进行引物设计和片段扩增, 并用144只三角帆蚌对其多态性进行筛选和验证, 卡方检验分析了SNP位点和三角帆蚌内壳色相关性, 并对*HcTyr*基因进行了图谱定位。结果显示, 在*HcTyr*基因上筛选出8个SNP位点, 其中有7个SNP位点与三角帆蚌内壳色*L*、*a*及*dE*呈显著相关性, 用这7个SNP位点做单倍型构建和分析, 发现Ⅱ、Ⅲ及Ⅳ这3种单倍型在白色群体中出现的频率极显著高于在紫色群体中出现的频率, 而Ⅴ和Ⅶ这2种单倍型在紫色群体中出现的频率极显著高于白色群体。进一步在商业养殖群体中验证发现, Ⅳ和Ⅶ这2种单倍型可分别作为白色和紫色群体的优势单倍型。研究表明, 三角帆蚌*HcTyr*基因可作为内壳色相关的候选基因, 其部分SNP位点可用于三角帆蚌分子辅助育种。另外本实验还将*HcTyr*基因定位在三角帆蚌LG16连锁群上, 这为进一步解析该基因调控珍珠颜色形成的分子机制奠定了基础。

**关键词:** 三角帆蚌; *HcTyr*; 内壳色; 相关性; 基因定位

**中图分类号:** Q 785; S 968.3

**文献标志码:** A

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)隶属于软体动物门(Mollusca), 双壳纲(Bivalvia), 蚌目(Unionida), 蚌科(Unionidae), 是我国最具经济价值的特有淡水珍珠贝。据报道, 世界上约95%的淡水珍珠产自中国, 而其中70%是由三角帆蚌生产的<sup>[1]</sup>。然而, 如今我国淡水珍珠面临着产量高而产值却很低的问题, 造成这种问题主要原因是质量低的淡水珍珠比较多, 其中颜色是影响珍珠质量和价格的一个重要因素。研究表明贝壳内壳色具有可遗传性<sup>[2-3]</sup>, 海水和淡水贝类育珠中 were 发现, 以不同内壳色外套膜小片插片时, 对形成珍珠颜色会有显著影响<sup>[4-6]</sup>, 因此可以用内壳色为目标性状对珍珠贝进行选育。虽然国内已开展对三角帆蚌内壳色进行传统选育的相关工作<sup>[3]</sup>, 但由于贝类许多性状是数量性状, 其表型可能受多基因控制且易受环境影响, 传统选育有效性受到限制。而借助现代分

子生物学和数量遗传学手段<sup>[7]</sup>, 筛选与内壳色相关的分子标记开展三角帆蚌辅助选育工作, 将有可能大大提高育种效率。

酪氨酸酶(TYR)是广泛分布于动植物和微生物中含铜离子的金属酶<sup>[8]</sup>。研究发现, TYR在色素沉积、创伤修复及先天性免疫过程中都起着重要作用<sup>[9-11]</sup>。目前, 酪氨酸酶在软体动物中也多有发现, 但研究内容主要涉及基因克隆和酶活性分析等方面<sup>[12-14]</sup>。在合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)中, 研究发现TYR不但能在外套膜中特异性表达, 而且还参与贝壳基质形成和黑色素的沉积过程<sup>[15]</sup>, 也有研究表明TYR在蓝色珍珠形成过程中起到关键作用<sup>[16]</sup>。本实验室已克隆三角帆蚌TYR的cDNA全长, 并发现该基因参与了贝壳角质层和珍珠质层的形成, 并与珍珠层颜色形成有关<sup>[17]</sup>。本研究将三角帆蚌酪氨酸酶基因*HcTyr*作为候选基因, 采用直接测序法检测三角帆蚌

收稿日期: 2017-02-21 修回日期: 2017-03-27

资助项目: 国家自然科学基金(31272657); 国家科技支撑计划(2012BAD26B04)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

的SNP突变位点,并与三角帆蚌内壳色相关性状进行关联分析,以期筛选与贝壳或珍珠颜色性状相关的分子标记,加快三角帆蚌紫色等彩色珍珠新品种选育进程。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验对象

于2015年3月,在浙江金华伟民水产养殖基地进行三角帆蚌紫色和白色群体苗种的人工繁育工作,6月份将出池的小蚌运送至上海海洋大学崇明养殖基地进行培养。于12月份从同池培养的紫色和白色群体中分别随机选取72只三角帆蚌,共144只用于内壳色性状的关联分析。取144只三角帆蚌的斧足和外套膜于酒精中保存。

### 1.2 三角帆蚌基因组DNA的提取及数据测量

三角帆蚌基因组DNA的提取使用天根海洋动物DNA提取试剂盒,分别用1.5%的琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测基因组DNA的质量和浓度,然后将样品置于-20℃冰箱中备用。

三角帆蚌内壳色的测量中使用Lovibond-RT200表面色度计,参照之前的方法<sup>[18]</sup>,采用国际照明委员会1976推荐的*L*、*a*及*b*,对每只蚌右壳边缘的3个点进行测量,并取这3个位置颜色数据的平均值作为该蚌内壳色数据。其中*L*代表明度,*L*>0表示颜色偏白,*L*<0表示颜色偏黑;*a*>0表示颜色偏红,*a*<0表示颜色偏绿;*b*>0表示颜色偏黄,*b*<0表示颜色偏蓝,颜色参数色差值*dE*计算方法:

$$dE = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

式中, $\Delta L=L_n-L_0$ , $\Delta a=a_n-a_0$ , $\Delta b=b_n-b_0$ 。 $L_n$ 、 $a_n$ 、 $b_n$ 分别为所测贝壳的颜色参数值, $L_0$ 、 $a_0$ 和

$b_0$ 为标准白样品的颜色参数。 $\Delta L$ 、 $\Delta a$ 、 $\Delta b$ 、 $\Delta dE$ 分别代表所测量3个点*L*、*a*、*b*及*dE*的平均值。

### 1.3 *HcTyr*基因SNP位点筛选

利用本实验室已分离的三角帆蚌*HcTyr*基因(GenBank登录号:KX447816),通过与本实验已有的部分三角帆蚌基因组序列进行对比,以区分基因的内含子和外显子区域。然后利用Primer Premier 5软件在基因的外显子区域设计引物,最终在*HcTyr*基因上设计得到3对引物(表1)。其中P1引物扩增*HcTyr*基因编码区上60~480区段共421 bp序列长度,而P2和P3引物共扩增出*HcTyr*基因编码区上611~1848区段共1238 bp序列长度,3对引物扩增出的编码区序列长度为1659 bp,共覆盖*HcTyr*基因编码区的83.41%,覆盖整个基因cDNA全长的71.66%。

利用设计的*HcTyr*基因上3对引物,分别用20个样品进行PCR扩增。PCR反应体系共20 μL:10 μL 2×Taq PCR Mastermix,模板DNA(50 ng/μL)2 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL,ddH<sub>2</sub>O为7.0 μL。扩增程序:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸45 s,共35个循环;72℃延伸7 min。扩增产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,将检测合格的样品送至上海迈浦生物科技有限公司进行测序,用Vector NIT Suite 11.0对测序结果进行比对寻找SNP位点。然后对存在SNP位点的引物用144只三角帆蚌个体进行扩增验证。本研究所有试剂均购自天根生化科技有限公司,引物合成由上海迈浦生物科技有限公司完成。

### 1.4 数据分析

采用Popgene软件分析观测杂合度、期望杂合度和多态性含量等遗传参数。利用JMP 8.0软

表1 三角帆蚌*HcTyr*基因SNP分型引物信息

Tab. 1 The primers of SNP in *HcTyr* gene of *H. cumingii*

| 引物 primers | 序列(5'-3') sequence of primers                    | 产物长度/bp products length | 退火温度/℃ annealing temperature |
|------------|--|-------------------------|------------------------------|
| P1         | TATAGAACGAATACACTTCTCTCC<br>CAGTCATCGTGGGATTATCT | 670                     | 55                           |
| P2         | ACAACCTCCCTGTCTTTGCCCT<br>TCCCGCTTATAGTCCCTGTGC  | 750                     | 55                           |
| P3         | CCGACTGCGGATCTCTTTACC<br>CAGACGAATGACACCAGAACA   | 653                     | 55                           |

件的卡方检验来分析*HcTyr*基因片段的不同SNP位点的基因型与三角帆蚌的内壳色性状之间的相关性。用SHEsis软件进行连锁不平衡分析和单倍型构建。

### 1.5 *HcTyr*基因SNP位点和单倍型在商业养殖群体中的验证

为了对筛选出的SNP位点和所构建的优势单倍型进行验证,从商业养殖群体中随机选取紫色和白色三角帆蚌各48只,统计每个个体内壳色性状并用上述引物进行SNP位点扩增,再进行内壳色性状和SNP位点的相关性分析及单倍型构建,通过分析验证所筛选出SNP位点和优势单倍型在其他群体中的可用性。

### 1.6 *HcTyr*基因在三角帆蚌图谱上的定位

为了将*HcTyr*基因定位到三角帆蚌图谱上,采用之前本实验室构建三角帆蚌微卫星图谱时所用的94个F<sub>1</sub>代个体和2个亲本作为实验材料。在*HcTyr*基因上选取一对引物对2个亲本及子代共96只三角帆蚌个体进行扩增,扩增产物进行测序后寻找在该家系中存在的SNP位点。然后在扩增片段上选取1个SNP位点,统计该位点在94只F<sub>1</sub>个体和2个亲本中的基因型,运用Joinmap 4.0软件并参照Bai等<sup>[18]</sup>的方法将*HcTyr*基因定位到三角帆蚌微卫星遗传连锁图谱上。

## 2 结果与分析

### 2.1 *HcTyr*基因的序列扩增

根据在*HcTyr*基因上设计的3对引物,分别用20个样品扩增相应的基因片段。对扩增片段进行测序和比对后,在P1和P2两对引物扩增的基因片段上分别发现3个和5个SNP位点。而在P3引物扩增片段上没有发现SNP位点。由于所扩增的基因片段均位于*HcTyr*基因的cDNA序列上,所以SNP位点均以cDNA序列上该突变位点到起始密码子ATG的碱基数来命名。

### 2.2 *HcTyr*基因多态性分析

使用144只三角帆蚌对*HcTyr*基因上筛选得到的SNP位点进行扩增测序,测序结果用软件分析,发现*HcTyr*基因上的8个SNP位点均为杂合型突变,其中有2个发生错义突变,C+700T位点密码子改变类型为CTT-TTT,分别编码亮氨酸和苯丙氨酸。G+994A位点密码子改变类型为GTA-

ATA,分别编码缬氨酸和异亮氨酸。

对*HcTyr*基因上SNP位点分型结果用Popgene处理后,*HcTyr*基因上的SNP位点的多态性遗传参数见表2。根据 $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态的原则,发现*HcTyr*上的8个SNP位点中,除了A+771T为低度多态位点外,其他7个SNP位点均为中度多态位点。

表2 *HcTyr*基因8个SNP位点遗传参数

Tab. 2 The polymorphic parameters of 8 SNP sites in *HcTyr* gene of *H. cumingii*

| 位点<br>site | 观测杂合度<br>$H_o$ | 期望杂合度<br>$H_e$ | 多态信息含量<br>$PIC$ | 有效等位基因数<br>$N_e$ |
|------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|
| A+168G     | 0.903          | 0.903          | 0.321           | 1.670            |
| C+255T     | 0.632          | 0.507          | 0.371           | 1.966            |
| C+456T     | 0.750          | 0.750          | 0.218           | 1.332            |
| C+700T     | 0.813          | 0.642          | 0.293           | 1.555            |
| A+771T     | 0.813          | 0.818          | 0.165           | 1.221            |
| C+826T     | 0.813          | 0.642          | 0.293           | 1.555            |
| C+831G     | 0.813          | 0.642          | 0.293           | 1.555            |
| G+994A     | 0.819          | 0.638          | 0.296           | 1.564            |

### 2.3 *HcTyr*基因SNP位点与内壳色性状关联分析

将*HcTyr*基因上检测得到的SNP位点基因型与144只三角帆蚌的内壳色性状(*L*、*a*、*b*及*dE*)进行相关性分析。分析结果表明,在*HcTyr*基因上的8个SNP位点中,除C+255T位点不同基因型仅在内壳色性状*L*和*dE*参数上存在显著差异外( $P < 0.05$ ),其余7个位点不同基因型均在*L*、*a*及*dE*上存在显著差异( $P < 0.05$ ),而在*b*参数上,8个SNP位点不同基因型都没有显示出明显差异(表3)。

### 2.4 *HcTyr*基因SNP位点连锁不平衡及单倍型分析

选择*HcTyr*基因上7个在*L*、*a*及*dE*性状上存在显著差异的SNP位点,用SHEsis软件分析差异位点的连锁不平衡性。结果显示*HcTyr*基因上的7个差异显著位点中,A+168G、C+700T、C+826T、C+831G、G+994A这5个位点之间存在强连锁不平衡( $D' > 0.75$ ,  $R^2 > 0.33$ )。另外,A+771T位点与C+700T、C+826T、C+831G、G+994A位点之间也存在强连锁不平衡( $D' > 0.75$ ,  $R^2 > 0.33$ )(表4)。用这7个位点单倍型构建后共获得7种单倍型,其中II、III、IV这三种单倍型在白色

表3 *HcTyr*基因8个SNP位点与内壳色性状关联分析Tab. 3 Association analysis of 8 SNP sites with shell nacre colour in *HcTyr* gene of *H. cumingii*

| 位点 locus | 基因型 genotype | 样本量 no. | <i>AL</i>                | <i>Aa</i>               | <i>Ab</i>               | <i>AdE</i>               |
|----------|--------------|---------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| A+168G   | AA           | 33      | 55.91±0.97 <sup>A</sup>  | 1.36±0.45 <sup>A</sup>  | -9.13±0.80 <sup>A</sup> | 45.49±0.93 <sup>A</sup>  |
|          | AG           | 14      | 56.62±1.48 <sup>A</sup>  | 0.88±0.69 <sup>A</sup>  | -8.31±1.23 <sup>A</sup> | 44.61±1.43 <sup>A</sup>  |
|          | GG           | 97      | 52.97±0.56 <sup>B</sup>  | 3.53±0.26 <sup>B</sup>  | -8.74±0.47 <sup>A</sup> | 48.78±0.54 <sup>B</sup>  |
| C+255T   | CC           | 36      | 55.87±0.94 <sup>A</sup>  | 1.67±0.45 <sup>A</sup>  | -9.37±0.76 <sup>A</sup> | 45.63±0.91 <sup>A</sup>  |
|          | CT           | 53      | 52.89±0.77 <sup>AB</sup> | 3.51±0.37 <sup>AB</sup> | -8.64±0.63 <sup>A</sup> | 48.80±0.75 <sup>B</sup>  |
|          | TT           | 55      | 53.84±0.76 <sup>B</sup>  | 2.80±0.37 <sup>B</sup>  | -8.54±0.62 <sup>A</sup> | 47.79±0.74 <sup>AB</sup> |
| C+456T   | CC           | 105     | 55.07±0.53 <sup>A</sup>  | 2.03±0.25 <sup>A</sup>  | -8.78±0.45 <sup>A</sup> | 46.44±5.32 <sup>A</sup>  |
|          | CT           | 36      | 50.94±0.91 <sup>B</sup>  | 4.74±0.42 <sup>B</sup>  | -8.80±0.77 <sup>A</sup> | 50.94±5.07 <sup>B</sup>  |
|          | TT           | 3       | 53.15±3.15 <sup>AB</sup> | 5.47±1.45 <sup>AB</sup> | -8.75±2.66 <sup>A</sup> | 49.28±4.37 <sup>AB</sup> |
| C+700T   | CC           | 97      | 52.97±0.56 <sup>A</sup>  | 3.53±0.26 <sup>A</sup>  | -8.74±0.47 <sup>A</sup> | 48.78±0.54 <sup>A</sup>  |
|          | CT           | 27      | 56.52±1.07 <sup>B</sup>  | 1.14±0.50 <sup>B</sup>  | -8.31±0.88 <sup>A</sup> | 44.80±1.03 <sup>B</sup>  |
|          | TT           | 20      | 55.58±1.24 <sup>AB</sup> | 1.33±0.58 <sup>B</sup>  | -9.66±1.02 <sup>A</sup> | 45.81±1.19 <sup>B</sup>  |
| A+771T   | AA           | 116     | 53.42±0.52 <sup>A</sup>  | 3.16±0.25 <sup>A</sup>  | -8.95±0.42 <sup>A</sup> | 48.28±0.50 <sup>A</sup>  |
|          | AT           | 27      | 56.53±1.08 <sup>B</sup>  | 1.14±0.52 <sup>B</sup>  | -8.31±0.88 <sup>A</sup> | 44.80±1.05 <sup>B</sup>  |
|          | TT           | 1       | 52.96±5.61 <sup>AB</sup> | 2.47±2.69 <sup>AB</sup> | -2.72±4.56 <sup>A</sup> | 47.26±5.44 <sup>AB</sup> |
| C+826T   | TT           | 97      | 52.97±0.56 <sup>B</sup>  | 3.53±0.26 <sup>A</sup>  | -8.74±0.47 <sup>A</sup> | 48.78±0.54 <sup>A</sup>  |
|          | CT           | 27      | 56.53±1.07 <sup>A</sup>  | 1.14±0.50 <sup>B</sup>  | -8.31±0.88 <sup>A</sup> | 44.80±1.03 <sup>B</sup>  |
|          | CC           | 20      | 55.58±1.24 <sup>AB</sup> | 1.33±0.58 <sup>B</sup>  | -9.66±1.02 <sup>A</sup> | 45.81±1.19 <sup>B</sup>  |
| C+831G   | CC           | 97      | 52.97±0.56 <sup>A</sup>  | 3.53±0.26 <sup>A</sup>  | -8.74±0.47 <sup>A</sup> | 48.78±0.54 <sup>A</sup>  |
|          | CG           | 27      | 56.52±1.07 <sup>B</sup>  | 1.14±0.50 <sup>B</sup>  | -8.31±0.88 <sup>A</sup> | 44.80±1.03 <sup>B</sup>  |
|          | GG           | 20      | 55.58±1.24 <sup>AB</sup> | 1.33±0.58 <sup>B</sup>  | -9.66±1.02 <sup>A</sup> | 45.81±1.19 <sup>B</sup>  |
| G+994A   | AA           | 21      | 55.60±1.21 <sup>AB</sup> | 1.34±0.56 <sup>A</sup>  | -9.20±1.00 <sup>A</sup> | 45.75±1.17 <sup>A</sup>  |
|          | AG           | 26      | 56.54±1.09 <sup>A</sup>  | 1.12±0.51 <sup>A</sup>  | -8.62±0.90 <sup>A</sup> | 44.81±1.05 <sup>A</sup>  |
|          | GG           | 97      | 52.97±0.56 <sup>B</sup>  | 3.53±0.26 <sup>B</sup>  | -8.74±0.47 <sup>A</sup> | 48.78±0.54 <sup>B</sup>  |

注: 同一位点同列中不同大写字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同

Notes: different superscript letters in a column of the same two loci indicate significant difference at  $P<0.05$ , the same below

群体中出现的频率极显著高于在紫色群体中出现的频率( $P<0.01$ )。而V和VII 2种单倍型在紫色群体中出现的频率极显著高于在白色群体中出现的频率( $P<0.01$ )(表5)。

### 2.5 *HcTyr*基因7个显著SNP位点及优势单倍型的验证

选取96只商业养殖三角帆蚌进行内壳色测量, 并用该群体扩增上述7个显著SNP位点后, 分析内壳色性状和SNP位点基因型的相关性。结果表明, 在7个SNP位点中, A+168G、C+700T和

G+994A 3个位点不同基因型在内壳色性状*L*、*a*和*dE*参数上存在显著差异( $P<0.05$ ), 另外4个位点不同基因型在*L*、*a*、*b*及*dE*上均存在显著差异( $P<0.05$ )(表6)。

对这7个SNP位点进行连锁不平衡分析, 发现C+700T、A+771T、C+826T、C+831G、G+994A这5个位点之间存在强连锁不平衡( $D'>0.75$ ,  $R^2>0.33$ )。另外, A+168G与C+700T、G+994A位点之间也存在强连锁不平衡( $D'>0.75$ ,  $R^2>0.33$ )(表7)。用这7个位点重新构建单倍型, 发现在商业养殖群体中出现4个显著差异的单倍

表4 *HcTyr*基因7个SNP位点连锁不平衡分析Tab. 4 Linkage disequilibrium analysis of 7 SNP sites in *HcTyr* gene of *H. cumingii*

|        | A+168G | C+456T | C+700T | A+771T | C+826T | C+831G | G+994A |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A+168G |        | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 1.000  |
| C+456T | 0.066  |        | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 1.000  |
| C+700T | 0.788  | 0.052  |        | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 1.000  |
| A+771T | 0.291  | 0.019  | 0.369  |        | 1.000  | 1.000  | 1.000  |
| C+826T | 0.788  | 0.052  | 1.000  | 0.369  |        | 1.000  | 1.000  |
| C+831G | 0.788  | 0.052  | 1.000  | 0.369  | 1.000  |        | 1.000  |
| G+994A | 0.804  | 0.052  | 0.981  | 0.362  | 0.981  | 0.981  |        |

注: 对角线上方为 $D'$ , 对角线下方为 $R^2$ , 下同

Notes: the figures above diagonal represent  $D'$ , the figures below the diagonal represent  $R^2$ , the same below

表5 *HcTyr*基因7个SNP位点单倍型分析Tab. 5 Haplotype analysis of 7 SNP sites in *HcTyr* gene of *H. cumingii*

| 单倍型<br>haplotype | 单倍型序列<br>sequence | 紫色群体(频率)<br>purple strain (frequency) | 白色群体(频率)<br>white strain (frequency) | $\chi^2$ (P值)<br>$\chi^2$ (P value) |
|------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| I                | ACCTTCA           | 0.00(0.000)                           | 1.00(0.007)                          |                                     |
| II               | ACCTTCG           | 0.00(0.000)                           | 12.00(0.083)                         | 12.612(0.000**)                     |
| III              | ACTACGA           | 0.00(0.000)                           | 51.01(0.354)                         | 62.479(0.000**)                     |
| IV               | ACTTCGA           | 0.00(0.000)                           | 15.99(0.111)                         | 17.051(0.000**)                     |
| V                | GCCATCG           | 102.00(0.708)                         | 63.99(0.444)                         | 20.016(0.000**)                     |
| VI               | GCCTTCG           | 0.00(0.000)                           | 0.01(0.000)                          |                                     |
| VII              | GTCATCG           | 42.00(0.292)                          | 0.00(0.000)                          | 48.855(0.000**)                     |

注: \*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ), 下同

Notes: \*\* indicates extremely significant difference at  $P<0.01$ , the same below

型, 其中IV、V和VII这3种单倍型也出现在之前构建的单倍型中, 而VIII单倍型是新出现的单倍型(表8)。分析表明, 无论在商业养殖群体还是非商业养殖群中, IV单倍型在白色群体中出现的频率都极显著高于在紫色群体中出现的频率( $P<0.01$ ), VII单倍型在紫色群体中出现的频率都极显著高于在白色群体中出现的频率( $P<0.01$ ), IV和VII在2次单倍型分析中结果一致。而对于V单倍型, 在用非商业养殖群体单倍型构建时, 它在紫色群体中出现的频率极显著高于在白色群体中出现的频率( $P<0.01$ ), 在用商业养殖群体构建的单倍型时, V单倍型在白色群体中出现的频率却极显著高于在紫色群体中出现的频率( $P<0.01$ )。

## 2.6 *HcTyr*基因在三角帆蚌微卫星遗传图谱上定位

为了研究*HcTyr*基因在三角帆蚌遗传图谱上

的位置, 选取2个亲本及94个 $F_1$ 子代作为作图群体, 用P1引物来扩增*HcTyr*基因上的部分片段。经序列比对后发现P1引物扩增的*HcTyr*部分片段在作图家系中存在C+255T和C+456T 2个SNP位点, 选择C+456T位点来进行*HcTyr*基因的定位, 最后*HcTyr*基因被定位在之前构建三角帆蚌微卫星图谱的LG16连锁群上。C+456T位于LG16连锁群的77.7 cM位置, 其两侧的临近标记分别为151CF和958CF(图1)。

## 3 讨论

壳色作为贝类一个重要的可遗传性状, 属于多基因控制的数量性状, 虽然近年来针对贝类壳色选育工作已得到开展, 但由于传统选育的局限性, 选育进程往往较慢。而分子标记辅助育种作为新兴的选育方法, 可以在分子水平上进行选育并大幅度提高育种效率, 已受到越

表 6 商业养殖群体中*HcTyr*基因7个SNP位点与内壳色性状关联分析Tab. 6 Association analysis of 7 SNP sites with shell nacre colour in *HcTyr* gene for commercial cultured populations

| 位点 locus | 基因型 genotype | 样本量 no. | <i>AL</i>                | <i>Aa</i>               | <i>Ab</i>                 | <i>AdE</i>               |
|----------|--------------|---------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| A+168G   | AA           | 9       | 55.10±2.06 <sup>AB</sup> | 1.99±0.92 <sup>A</sup>  | -9.54±2.30 <sup>AB</sup>  | 47.38±1.86 <sup>AB</sup> |
|          | AG           | 15      | 58.78±1.59 <sup>A</sup>  | 0.71±0.72 <sup>A</sup>  | -13.78±1.78 <sup>A</sup>  | 44.14±1.44 <sup>A</sup>  |
|          | GG           | 72      | 52.66±0.73 <sup>B</sup>  | 4.14±0.33 <sup>B</sup>  | -9.58±0.81 <sup>B</sup>   | 50.19±0.66 <sup>B</sup>  |
| C+456T   | CC           | 62      | 51.92±0.76 <sup>A</sup>  | 4.41±0.35 <sup>A</sup>  | -8.62±0.85 <sup>B</sup>   | 50.70±0.70 <sup>A</sup>  |
|          | CT           | 21      | 56.42±1.31 <sup>B</sup>  | 1.83±0.60 <sup>B</sup>  | -13.66±1.47 <sup>B</sup>  | 46.83±1.20 <sup>B</sup>  |
|          | TT           | 13      | 58.84±1.66 <sup>B</sup>  | 1.16±0.76 <sup>B</sup>  | -12.36±1.86 <sup>AB</sup> | 44.29±1.52 <sup>B</sup>  |
| C+700T   | CC           | 77      | 52.97±0.72 <sup>A</sup>  | 3.94±0.33 <sup>A</sup>  | -9.77±0.80 <sup>A</sup>   | 49.85±0.66 <sup>A</sup>  |
|          | CT           | 18      | 57.34±1.49 <sup>B</sup>  | 1.19±0.68 <sup>B</sup>  | -11.72±1.65 <sup>A</sup>  | 45.38±1.36 <sup>B</sup>  |
|          | TT           | 1       | 57.72±6.33 <sup>AB</sup> | 2.14±2.87 <sup>AB</sup> | -18.89±6.98 <sup>A</sup>  | 46.87±5.75 <sup>AB</sup> |
| A+771T   | AA           | 74      | 52.63±0.72 <sup>A</sup>  | 4.12±0.32 <sup>A</sup>  | -9.65±0.79 <sup>A</sup>   | 50.20±0.65 <sup>A</sup>  |
|          | AT           | 19      | 57.51±1.41 <sup>B</sup>  | 0.91±0.64 <sup>B</sup>  | -10.94±0.57 <sup>A</sup>  | 44.95±1.28 <sup>B</sup>  |
|          | TT           | 3       | 60.50±3.56 <sup>B</sup>  | 1.55±1.60 <sup>AB</sup> | -20.04±3.94 <sup>B</sup>  | 44.67±3.22 <sup>AB</sup> |
| C+826T   | TT           | 76      | 52.65±0.71 <sup>A</sup>  | 4.04±0.32 <sup>A</sup>  | -9.38±0.77 <sup>A</sup>   | 50.14±0.64 <sup>A</sup>  |
|          | CT           | 17      | 55.78±1.50 <sup>B</sup>  | 0.83±0.68 <sup>B</sup>  | -12.35±1.62 <sup>AB</sup> | 46.74±1.35 <sup>B</sup>  |
|          | CC           | 3       | 60.50±3.57 <sup>B</sup>  | 1.55±1.62 <sup>AB</sup> | -20.04±3.86 <sup>B</sup>  | 44.67±3.21 <sup>AB</sup> |
| C+831G   | CC           | 76      | 52.65±0.71 <sup>A</sup>  | 4.04±0.32 <sup>A</sup>  | -9.38±0.77 <sup>A</sup>   | 50.14±0.64 <sup>A</sup>  |
|          | CG           | 17      | 55.78±1.50 <sup>B</sup>  | 0.83±0.68 <sup>B</sup>  | -12.35±1.62 <sup>AB</sup> | 46.74±1.35 <sup>B</sup>  |
|          | GG           | 3       | 60.50±3.57 <sup>B</sup>  | 1.55±1.62 <sup>AB</sup> | -20.04±3.86 <sup>B</sup>  | 44.67±3.21 <sup>AB</sup> |
| G+994A   | GG           | 75      | 52.92±0.73 <sup>A</sup>  | 3.97±0.33 <sup>A</sup>  | -9.74±0.81 <sup>A</sup>   | 49.93±0.66 <sup>A</sup>  |
|          | AG           | 20      | 57.12±1.42 <sup>B</sup>  | 1.34±0.64 <sup>B</sup>  | -11.63±1.56 <sup>A</sup>  | 45.53±1.28 <sup>B</sup>  |
|          | AA           | 1       | 57.72±0.73 <sup>AB</sup> | 2.14±2.88 <sup>AB</sup> | -18.89±6.98 <sup>A</sup>  | 46.87±5.74 <sup>AB</sup> |

表 7 *HcTyr*基因7个SNP位点在商业养殖群体中连锁不平衡分析Tab. 7 Linkage disequilibrium analysis of 7 SNP sites in *HcTyr* gene for commercial cultured populations

|        | A+168G | C+456T | C+700T | A+771T | C+826T | C+831G | G+994A |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A+168G |        | 0.603  | 1.000  | 0.749  | 0.728  | 0.724  | 1.000  |
| C+456T | 0.022  |        | 0.999  | 1.000  | 1.000  | 1.000  | 0.999  |
| C+700T | 0.560  | 0.035  |        | 0.881  | 0.752  | 0.765  | 0.885  |
| A+771T | 0.405  | 0.044  | 0.603  |        | 0.846  | 0.847  | 0.784  |
| C+826T | 0.343  | 0.039  | 0.489  | 0.629  |        | 1.000  | 0.785  |
| C+831G | 0.344  | 0.040  | 0.500  | 0.652  | 0.971  |        | 0.788  |
| G+994A | 0.624  | 0.038  | 0.703  | 0.531  | 0.584  | 0.591  |        |

表 8 *HcTyr*基因7个SNP位点在商业养殖群体中单倍型分析

Tab. 8 Haplotype analysis of 7 SNP sites in *HcTyr* gene for commercial cultured population

| 单倍型<br>haplotype | 单倍型序列<br>sequence | 紫色群体(频率)<br>purple strain (frequency) | 白色群体(频率)<br>white strain (frequency) | $\chi^2$ (P值)<br>$\chi^2$ (P value) |
|------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| IV               | ACTTCGA           | 0.06(0.083)                           | 11.46(0.119)                         | 11.956(0.000**)                     |
| V                | GCCATCG           | 49.00(0.510)                          | 63.94(0.666)                         | 8.571(0.003**)                      |
| VII              | GTCATCG           | 41.00(0.427)                          | 0.00(0.000)                          | 50.227(0.000**)                     |
| VIII             | ACCATCG           | 0.31(0.003)                           | 5.90(0.061)                          | 4.892(0.027*)                       |

注: \*表示差异显著( $P < 0.05$ )

Notes: \* indicates significant difference at  $P < 0.05$

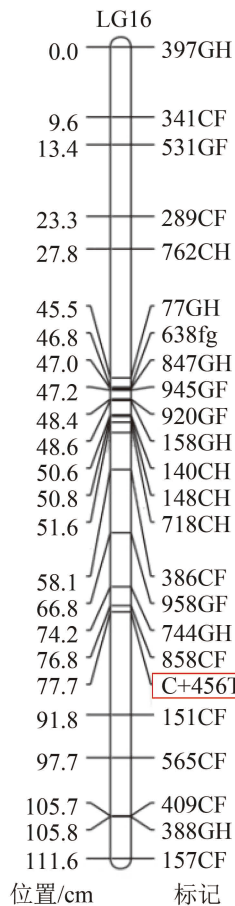


图 1 *HcTyr*基因在LG16连锁群上定位情况

Fig. 1 Location of *HcTyr* gene on LG16 of *H. cumingii*

来越广泛的关注<sup>[19]</sup>。

酪氨酸酶作为生物体内黑色素重要的限速酶, 在黑色素的形成和沉积过程中起重要作用<sup>[20]</sup>。由于黑色素分类不同, 不同种类的黑色素的沉积可参与生物体不同体色的形成<sup>[21]</sup>。本实验根据已知的三角帆蚌*HcTyr*基因的cDNA序列设计引物, 经引物扩增、序列对比后, 在*HcTyr*基因cDNA序列上发现8个SNP位点。这显著高于之前研究的1SNP/1000水平<sup>[22]</sup>, 说明在*HcTyr*基因中单

核苷酸多态性较高。另外多态性分析发现在*HcTyr*基因中, 有7个位点表现出中度多态性, A+771T位点表现出低度多态性。在该基因上没有发现高度多态位点, 这是由于SNP标记是典型的两等位基因标记, 因此很难像SSR标记一样表现出较高多态性<sup>[23]</sup>。

在测量的内壳色参数中, *L*代表亮度, *a*>0代表颜色偏红, 而色差值 *dE*大小可以反映色彩丰富度。本研究在用144只三角帆蚌个体检测*HcTyr*基因上的8个SNP位点发现, 有7个位点不同基因型均在*L*、*a*及*dE*上存在显著差异( $P < 0.05$ )。这说明*HcTyr*基因对三角帆蚌内壳色形成有重要影响, 尤其是影响内壳色的亮度、红色度及色彩丰富度。由于贝壳与珍珠在形成机制上具有相似性, 长期以来珍珠颜色与珍珠贝的内壳色之间也一直被认为存在密切联系。李清清等<sup>[6]</sup>在研究供片蚌与珍珠颜色相关性时, 发现供片蚌内壳色*dE*越大紫色珍珠产出率越高, *dE*越小则白色珍珠产出率越高。通过对*HcTyr*基因上不同位点基因型进行个体选育, 不但可以改良三角帆蚌内壳色性状, 而且将有可能推进三角帆蚌不同颜色珍珠品种的选育。在*HcTyr*基因上的8个SNP位点中, C+700T和G+994A 2个位点发生了错义突变, 而且这2个位点均位于该基因的编码区内并与*L*、*a*及*dE*显著相关, 这有可能是错义突变导致编码氨基酸的改变, 从而影响酪氨酸酶功能活性的变化, 进而对壳色的形成产生影响<sup>[24]</sup>。

Bai等<sup>[25]</sup>曾构建了三角帆蚌高密度图谱并对内壳色性状进行QTL定位, 发现控制三角帆蚌内壳色形成的主效基因可能位于LG17连锁群上。为了进一步确定*HcTyr*基因是否存在于之前报道的壳色相关LG17连锁群上, 实验在*HcTyr*基因上选取SNP位点来将其进行图谱定位, 并最终将其定位在三角帆蚌微卫星遗传图谱的LG16连锁群

77.7 cM位置。虽然*HcTyr*基因没有定位在之前报道的LG17连锁群上,但是由于目前关于控制三角帆蚌内壳色形成的主效基因仍未发现,而且壳色形成的机理也不清楚,因此要确定*HcTyr*基因是否为控制内壳色关键基因,还需要进行后续的功能性实验才能验证。

在用传统方法分析单个SNP位点与性状关系时,往往会出现位点信息模糊和不完整等问题<sup>[26-28]</sup>,而单倍型的构建和分析则可以有效解决这些问题。李西雷等<sup>[29]</sup>从三角帆蚌*GPX*基因中筛选得到16个SNP位点,并通过构建单倍型分析显示,*GPX*基因特定的单倍型在抗性群体和易感群体中存在显著差异。本研究在*HcTyr*基因上挑选与*L*、*a*及*dE*均存在显著差异的SNP位点,并进一步做了单倍型的构建和分析。在*HcTyr*基因构建的7种单倍型中,白色群体中出现了Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ3个主要优势单倍型,紫色群体中出现了Ⅴ和Ⅶ2种主要优势单倍型。进一步用商业养殖群体对筛选出的SNP位点和所构建的优势单倍型进行验证,发现在商业养殖群体中,这7个SNP位点不同基因型同样与内壳色性状不同参数之间存在显著性差异。单倍型验证发现,在商业养殖群体中也存在Ⅳ、Ⅴ和Ⅶ3种单倍型,并且Ⅳ单倍型在白色群体中出现的频率极显著高于在紫色群体中出现的频率,Ⅶ单倍型在紫色群体中出现的频率极显著高于在白色群体中出现的频率,这与之前结果一致。而在商业养殖群体中的Ⅴ单倍型,其在紫色群体中出现的频率极显著高于在白色群体中出现的频率,这与之前在非商业养殖群体中观察到的结果不一致。考虑到Ⅴ单倍型在紫色和白色群体中都有较高频率出现,因此Ⅴ单倍型并不适用于对紫色和白色群体进行区分和选育。而在2次不同群体的单倍型构建中,Ⅳ单倍型几乎只在白色群体中出现,Ⅶ单倍型也只在紫色群体中出现,尤其是Ⅶ单倍型在紫色群体中出现概率极大,因此Ⅳ和Ⅶ单倍型可分别作为白色群体和紫色群体的优势单倍型。在今后三角帆蚌内壳色选育过程中,可以针对目标性状来选择具有优势基因型的个体,从而达到加快育种的目的<sup>[30]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Li J L, Li Y S. Aquaculture in China-Freshwater pearl culture[J]. World Aquaculture, 2009, 40(1): 60.
- [2] Jerry D R, Kvingsedal R, Lind C E, *et al.* Donor-oyster derived heritability estimates and the effect of genotype × environment interaction on the production of pearl quality traits in the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima*[J]. Aquaculture, 2012, 338-341: 66-71.
- [3] 王照旗, 韩学凯, 白志毅, 等. 三角帆蚌紫色选育系1龄阶段内壳色及生长性状的遗传参数估计[J]. 水产学报, 2014, 38(5): 644-650.
- Wang Z Q, Han X K, Bai Z Y, *et al.* Estimates of genetic parameters for inner shell color and growth traits during one year old stage in the purple strain of *Hyriopsis cumingii* using microsatellite based parentage assignment[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(5): 644-650(in Chinese).
- [4] Wada K T, Komaru A. Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker)[J]. Aquaculture, 1996, 142(1-2): 25-32.
- [5] Gu Z F, Huang F S, Wang H, *et al.* Contribution of donor and host oysters to the cultured pearl colour in *Pinctada martensii*[J]. Aquaculture Research, 2014, 45(7): 1126-1132.
- [6] 李清清, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌生长性状和内壳色与所产无核珍珠质量的相关性分析[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1631-1639.
- Li Q Q, Bai Z Y, Liu X J, *et al.* Correlation analysis of non-nucleated pearl quality parameters with growth traits and inner shell color of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(11): 1631-1639(in Chinese).
- [7] 桂建芳, 朱作言. 水产动物重要经济性状的分子基础及其遗传改良[J]. 科学通报, 2012, 57(19): 1719-1729.
- Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals[J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(19): 1719-1729(in Chinese).
- [8] Sánchez-Ferrer Á, Rodríguez-López J N, García-Cánovas F, *et al.* Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1995, 1247(1): 1-11.
- [9] Cerenius L, Lee B L, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity[J]. Trends in Immunology, 2008, 29(6): 263-271.
- [10] Andersen S O. Insect cuticular sclerotization: a



- review[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40(3): 166-178.
- [11] Cieslak M, Reissmann M, Hofreiter M, *et al.* Colours of domestication[J]. *Biological Reviews*, 2011, 86(4): 885-899.
- [12] Nagai K, Yano M, Morimoto K, *et al.* Tyrosinase localization in mollusc shells[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 146(2): 207-214.
- [13] Jiang J W, Xing J, Sheng X Z, *et al.* Characterization of phenoloxidase from the bay scallop *Argopecten irradians*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2011, 30(2): 273-277.
- [14] Zhang C, Xie L P, Huang J, *et al.* A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342(2): 632-639.
- [15] Takagi R, Miyashita T. A cDNA cloning of a novel alpha-class tyrosinase of *Pinctada fucata*: its expression analysis and characterization of the expressed protein[J]. *Enzyme Research*, 2014, 2014: 780549.
- [16] Miyashita T, Takagi R. Tyrosinase causes the blue shade of an abnormal pearl[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2011, 77(3): 312-314.
- [17] Chen X J, Liu X J, Bai Z Y, *et al.* *HcTyr* and *HcTyp-1* of *Hyriopsis cumingii*, novel tyrosinase and tyrosinase-related protein genes involved in nacre color formation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 204: 1-8.
- [18] Bai Z Y, Han X K, Luo M, *et al.* Constructing a microsatellite-based linkage map and identifying QTL for pearl quality traits in triangle pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*)[J]. *Aquaculture*, 2015, 437: 102-110.
- [19] 孙效文, 鲁翠云, 贾智英, 等. 水产动物分子育种研究进展[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 981-990.
- Sun X W, Lu C Y, Jia Z Y, *et al.* The progress of molecular marker-based breeding for aquatic species[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(6): 981-990(in Chinese).
- [20] Sugumaran M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects[J]. *Pigment Cell Research*, 2002, 15(1): 2-9.
- [21] Hearing V J, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals[J]. *The FASEB Journal*, 1991, 5(14): 2902-2909.
- [22] Vignal A, Milan D, SanCristobal M, *et al.* A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2002, 34(3): 275-305.
- [23] Hubert S, Bussey J T, Higgins B, *et al.* Development of single nucleotide polymorphism markers for Atlantic cod (*Gadus morhua*) using expressed sequences[J]. *Aquaculture*, 2009, 296(1-2): 7-14.
- [24] Parichy D M. Evolution of danio pigment pattern development[J]. *Heredity*, 2006, 97(3): 200-210.
- [25] Bai Z Y, Han X K, Liu X J, *et al.* Construction of a high-density genetic map and QTL mapping for pearl quality-related traits in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32608.
- [26] Daly M J, Rioux J D, Schaffner S F, *et al.* High-resolution haplotype structure in the human genome[J]. *Nature Genetics*, 2001, 29(2): 229-232.
- [27] Bader J S. The relative power of SNP and haplotype as genetic markers for association tests[J]. *Pharmacogenomics*, 2001, 2(1): 11-24.
- [28] Clark A G. The role of haplotypes in candidate gene studies[J]. *Genetic Epidemiology*, 2004, 27(4): 321-333.
- [29] 李西雷, 汪桂玲, 李家乐. 三角帆蚌*GPX*基因结构特征及抗性相关SNP的筛选[J]. *遗传*, 2012, 34(11): 1456-1464.
- Li X L, Wang G L, Li J L. Identification of genomic structure and resistance trait associated SNP loci in glutathione peroxidase gene of *Hyriopsis cumingii*[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(11): 1456-1464(in Chinese).
- [30] 刘福平, 白俊杰. 单核苷酸多态性及其在水产动物遗传育种中的应用[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(4): 704-712.
- Liu F P, Bai J J. Single nucleotide polymorphisms and its application in genetic breeding of aquatic animals[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(4): 704-712(in Chinese).

## Detection of shell nacre colour-related SNP and gene mapping of *HcTyr* gene in *Hyriopsis cumingii*

HAN Xuekai<sup>1</sup>, CHEN Xiajun<sup>1</sup>, BAI Zhiyi<sup>1,2</sup>, LIU Xiaojun<sup>1</sup>, LI Jiale<sup>1,2\*</sup>

(1. Key laboratory of Freshwater Fisheries Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to study the correlation between *HcTyr* gene and shell nacre colour, genomic sequence fragments were amplified according to cDNA fragments of *HcTyr* gene. Regarding the detected SNP, the genotype and the polymorphic information (*PIC*) of 144 *Hyriopsis cumingii* were analyzed, and the correlation between SNP and shell nacre colour-related traits were further analyzed using Chi-square test. Moreover, the location of *HcTyr* gene on gene map was also studied. The results showed that 7 of the 8 detected SNP in *HcTyr* gene were significantly associated with shell nacre colour (*L*, *a* and *dE*). Haplotype analysis revealed that the frequency of three major predominant haplotypes (II, III, IV) in the white strain was significantly higher than that in the purple strain. And the other two major predominant haplotypes (V and VII) showed significantly higher frequency in the purple strain. The haplotypes were further validated in commercial cultured populations and the results showed that IV and VII can be considered as predominant haplotypes for white strain and purple strain respectively. The results suggest that *HcTyr* could be candidate shell nacre colour related genes for *H. cumingii*, and some polymorphic loci in this gene could be potential genetic markers for molecular breeding. Furthermore, we mapped *HcTyr* gene on LG16 of the previous linkage map, which will lay the foundation for the further study of the molecular mechanisms about this gene.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii*; *HcTyr*; shell nacre colour; correlation; gene mapping

**Corresponding author:** LI Jiale. E-mail: jlli2009@126.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31272657); National Science and Technology Support Program (2012BAD26B04)