

文章编号: 1000-0615(2019)02-0467-07

DOI: 10.11964/jfc.20171111066

## 三角帆蚌 *HcTyp-1* 基因珍珠层颜色性状相关 SNP筛选及图谱定位

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

(1. 上海海洋大学, 农业部淡水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:** 本实验室根据前期研究发现, *HcTyp-1* 基因可能参与了三角帆蚌贝壳珍珠层颜色的形成。本实验根据 *HcTyp-1* 基因 cDNA 设计引物, 比较筛选获得了 8 个 SNP 位点并分析了这些位点与内壳色的相关性, 然后对 *HcTyp-1* 基因进行了图谱定位。通过研究这些多态性位点与贝壳珍珠层颜色性状相关性发现, C+3057T 位点基因型仅在 *a* 参数上存在显著差异, G+2985T 和 T+3006C 2 个位点基因型分别在 *L*、*b* 及 *a*、*dE* 上存在显著差异, A+2834C、C+2919T 和 G+2986T 这 3 个 SNPs 位点基因型在 *L*、*a* 及 *dE* 上均存在显著差异。连锁不平衡结果显示, *HcTyp-1* 基因上除 C+2912T、C+2983A 这 2 个位点, 其他 6 个位点具有显著差异, 位点之间都存在强连锁不平衡。单倍型分析结果显示, 单倍型 T2 和 T4 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, T6 和 T8 两种单倍型在紫色群体中出现的频率极显著高于白色群体。因此 *HcTyp-1* 基因的部分 SNPs 可作为三角帆蚌不同内壳色贝壳辅助育种的候选分子标记位点。另外, 本研究还将 *HcTyp-1* 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; *HcTyp-1*; 珍珠层颜色; SNP; 相关性

中图分类号: Q 785; S 966.22<sup>+1</sup>

文献标志码: A

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 是我国特有的淡水珍珠贝, 它能够培育出品质优良的淡水珍珠, 并且珍珠产量大约占全国珍珠产量的 80%, 因此在淡水珍珠产业中具有相当重要的地位<sup>[1]</sup>。颜色是评价珍珠价值及品质的一个重要指标<sup>[2]</sup>, 不同颜色的珍珠在市场价格上有着较大的差异。目前的研究表明, 珍珠贝所产珍珠的颜色与供片蚌珍珠层的颜色之间有着紧密的联系<sup>[3-4]</sup>, 因此, 本研究通过现代分子生物学与数量遗传学并以三角帆蚌贝壳珍珠层颜色为目标性状进行选育工作<sup>[5]</sup>。

酪氨酸酶类似蛋白与酪氨酸酶相似, 都属于酪氨酸酶家族, 其结构与酪氨酸酶相似, 根据其光谱性质以及活性位点结构的差异可以将

其分为几种分型<sup>[6]</sup>。酪氨酸酶类似蛋白的具体功能尚存在争议, 经过对小鼠 (*Mus musculus*) 该蛋白的研究表明, 其具有二羟基吡啶酸氧化酶活性, 且对黑色素合成下游途径有一定影响<sup>[7]</sup>, 从而对生物的颜色性状产生影响。本实验室已经克隆得到了三角帆蚌酪氨酸酶类似蛋白基因 *HcTyp-1* 的 cDNA 全长, 通过分析发现, *HcTyp-1* 基因可能参与了三角帆蚌贝壳珍珠层颜色的形成<sup>[8]</sup>。本研究以该基因为候选基因, 采用直接测序法检测三角帆蚌的 SNP 突变点, 并与三角帆蚌内壳色相关性状进行关联分析, 以期筛选与贝壳珍珠层颜色性状相关的分子标记, 为三角帆蚌的选育工作提供基础性研究资料。

收稿日期: 2017-11-23 修回日期: 2018-03-18

资助项目: 国家自然科学基金(31472278); 现代农业产业技术体系专项(CARS-46-04)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

本实验所用的三角帆蚌均来自浙江省金华市浙星珍珠商贸有限公司,是本实验室通过选育获得的白色与紫色两个家系。分别从两个家系中选取白色与紫色蚌各72只用于珍珠层颜色性状的关联性分析,取实验蚌的外套膜以及斧足并用酒精保存备用。

### 1.2 三角帆蚌基因组DNA的提取

实验用三角帆蚌的基因组DNA使用天根海洋动物DNA提取试剂盒并按照说明书进行提取,然后采用分光光度计NanoDrop 2000C(Thermo Scientific,美国)与1.5%琼脂糖凝胶电泳检测所提DNA的浓度及质量,于-20℃保存。

### 1.3 数据测量

利用Lovibond-RT200表面色度计测量三角帆蚌的内壳色,并根据国际照明委员会(CIE)的均匀色度空间系统(CIE1976)进行参数设定分别测量三角帆蚌右侧壳的边缘前、中、后3个部位,取3点数据的平均值即为内壳色。计算颜色参数色差值 $dE$ 的公式:

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

$\Delta L=L_x-L_0$ ,  $\Delta a=a_x-a_0$ ,  $\Delta b=b_x-b_0$ 。  $L_x$ 、  $a_x$ 、  $b_x$ 分别是不同贝壳的颜色参数值,  $L_0$ 、  $a_0$ 和  $b_0$ 是标准白色内壳色蚌的颜色参数,  $ML$ 、  $Ma$ 、  $Mb$ 、  $MdE$ 分别表示所测量3个点所对应的  $L$ 、  $a$ 、  $b$ 及  $dE$ 的平均值,  $L$ 为明亮度,  $L>0$ 颜色偏亮,  $L<0$ 颜色偏暗;  $a>0$ 时颜色偏红,  $a<0$ 时颜色偏绿;  $b>0$ 时颜色偏黄,  $b<0$ 时颜色偏蓝<sup>[9]</sup>。

### 1.4 *HcTyp-1*基因SNP位点筛选

将实验所获得三角帆蚌*HcTyp-1*基因(GenBank登录号:KX447817)与其基因组比对,找出外显子与内含子区域。在外显子区域设计特异性引物,(F:5'-TCTTTGACCTTACTGAAATAC TG-3'; R:5'-TCAATAAAACAAAGTCGTC CAT G-3')。随机挑选20个DNA样品进行序列扩增,获得该基因编码区上2 639~3 106碱基区段共468 bp序列长度。PCR反应体系共20  $\mu$ L: 10  $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCR Mastermix,模板DNA(50 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O为7.0  $\mu$ L。扩

增程序:94℃预变性3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35个循环; 72℃终延伸10 min。将扩增后的产物交与上海迈浦生物科技有限公司进行测序,采用Vector NIT Suite 11.0对测序的结果进行对比以获得SNP位点。

### 1.5 数据分析

使用Popgene软件分析观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )、多态信息含量( $PIC$ )和有效等位基因( $N_e$ )等遗传参数。利用JMP 8.0软件进行卡方检验,分析*HcTyp-1*基因片段的不同SNPs位点的基因型与三角帆蚌的内壳色之间的相关性。用SHEsis软件进行SNP位点连锁不平衡分析和单倍型构建<sup>[10-11]</sup>。

### 1.6 *HcTyp-1*基因在三角帆蚌图谱上的定位

使用本实验室构建三角帆蚌微卫星遗传连锁图谱时的94个F<sub>1</sub>个体和两个亲本作为实验材料。使用特异性引物进行扩增,在测序后的扩增产物中寻找家系中的SNP位点。挑选一个SNP位点,进一步统计该位点在所有F<sub>1</sub>个体和2个亲本中的基因型,运用Joinmap 4.0软件并参照之前的方法将该基因定位到三角帆蚌微卫星连锁图谱上<sup>[12-13]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 *HcTyp-1*基因SNP位点筛选

根据设计的引物对20个样品进行目的片段的扩增,扩增片段上发现存在SNP位点,最终在*HcTyp-1*基因上发现8个SNPs位点。以ATG起始密码子为起点,每个基因上SNP位点均是以该突变位点到起始密码子的碱基数来命名。

### 2.2 多态性分析

对144只三角帆蚌中*HcTyp-1*基因筛选得到的SNPs位点进行扩增并测序,测序结果通过软件分析发现,*HcTyp-1*基因中的8个SNPs位点中除了C+3057T为纯合型突变外,其他7个SNPs位点均为杂合型突变。这些位点中仅A+2834C位点属于错位突变,密码子突变类型为AAA-ACA,分别编码赖氨酸和苏氨酸。采用Popgene分析该基因上SNPs位点的遗传参数,它们的 $H_o$ 为0.000~0.111,  $H_e$ 为0.142~0.451,  $N_e$ 为1.164~1.851,  $PIC$ 为0.131~0.348。依据 $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多

态,  $PIC < 0.25$  为低度多态的原则, 发现*HcTyp-1*基因上的8个SNPs位点中, 有3个SNPs位点为中度多态性位点, 5个为低度多态性位点(表1)。

表1 三角帆蚌*HcTyp-1*基因8个SNP位点的遗传参数

Tab. 1 The polymorphic parameters of eight SNP sites of *HcTyp-1* gene

位点 site	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	多态信息含量 $PIC$	有效等位基因 $N_e$
A+2834C	0.035	0.265	0.229	1.358
C+2912T	0.111	0.409	0.324	1.687
C+2919T	0.076	0.225	0.199	1.288
C+2983A	0.014	0.451	0.348	1.815
G+2985T	0.028	0.142	0.131	1.164
G+2986T	0.049	0.274	0.236	1.376
T+3006C	0.028	0.260	0.225	1.345
C+3057T	0.000	0.376	0.305	1.600

### 2.3 三角帆蚌*HcTyp-1*基因SNPs位点与内壳色性状关联分析

将*HcTyp-1*基因上发现的SNPs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。结果显示, 在*HcTyp-1*基因上的8个SNPs位点中, C+2912T、C+2983A这2个位点的不同基因型在4种内壳色性状参数方面不存在显著差异, C+3057T位点不同基因型仅在 $a$ 参数上存在显著差异( $P < 0.05$ ), 而G+2985T与T+3006C此2个位点的不同基因型分别在 $L$ 、 $b$ 以及 $a$ 、 $dE$ 等参数上存在显著差异( $P < 0.05$ ), 同时A+2834C、C+2919T和G+2986T这3个SNPs位点不同基因型在 $L$ 、 $a$ 及 $dE$ 上均存在显著差异( $P < 0.05$ )(表2)。

### 2.4 三角帆蚌*HcTyp-1*基因SNP位点连锁不平衡及单倍型分析

剔除基因上C+2912T、C+2983A这2个位点, 对剩下的6个与内壳色相关的位点, 使用SHEsis软件分析它们的连锁不平衡性。*HcTyp-1*基因上此6个与内壳色参数具有显著差异的位点之间都存在强连锁不平衡( $D' > 0.75$ )(表3)。同时对这些位点进行单倍型构建, 共获得8种单倍型, 其中单倍型T2和T4在白色群体中出现的频率极显著高于在紫色群体中的频率, 而T6和T8两种单倍型在紫色群体中出现的频率极显著高于白色群体(表4)。

### 2.5 三角帆蚌*HcTyp-1*基因在遗传连锁图谱上的定位

为了确定*HcTyp-1*基因在三角帆蚌微卫星图谱上的位置, 使用特异性引物扩增*HcTyp-1*基因上的部分片段。结果发现, 扩增的*HcTyp-1*基因部分片段在作图家系中存在C+2983A和C+3057T 2个SNPs位点, 由于3057这个位点在父母本中的基因型相同, 不能用来作图, 因此选择C+2983A这个SNP位点来定位*HcTyp-1*基因, 结果发现, *HcTyp-1*基因均被定位在LG16连锁群上。C+2983A位于LG16连锁群53.0cM位置, 临近标记分别为718CH和386CF(图1)。

## 3 讨论

三角帆蚌的贝壳内壳色对于其商业价值有着极其重要的影响。根据目前的研究表明, 贝壳内壳色是一种数量遗传性状, 受到多种因素的影响, 除了自身的遗传因素外, 还与其所生存的环境有着密切的联系<sup>[14]</sup>。本实验通过分子辅助标记育种方法, 在分子水平上进行不同壳色三角帆蚌的选育工作。相较传统选育方法而言, 分子选育可以大大提高选育效率, 因此得到了广泛地应用<sup>[15]</sup>。

研究发现, 酪氨酸酶类似蛋白对生物体内黑色素的合成具有一定影响, 而多种黑色素通过在生物体累积可以产生不同的体色<sup>[16]</sup>。因此, 该蛋白对于生物的体色可能起到一定的调控作用。根据前期实验获得的酪氨酸酶类似蛋白基因*HcTyp-1*设计引物, 并通过DNA测序获得了该基因外显子上的8个SNPs位点, 这一结果显著高于以往的研究结果(1个SNP/1 000 bp)<sup>[17]</sup>, 这说明该基因中具有较丰富的单核苷酸多态性。但是这些位点均处于低度多态性或者中度多态性, 并无高度多态性位点的存在, 这是由于SNP标记是一种两等位基因标记, 不同于SSR具有的高度多态性<sup>[18]</sup>。对白色与紫色2种内壳色的三角帆蚌与*HcTyp-1*基因的SNPs相关性进行了初步分析。有研究表明, 酪氨酸酶类似蛋白基因出现变异会导致其生物功能发生变化从而阻止其黑色素的合成<sup>[19]</sup>。上述SNPs位点均存在于该基因的外显子区域, 有研究发现, 在外显子区域的基因突变会导致氨基酸类型产生变异, 从而进一步引起蛋白质性质以及功能上的改变<sup>[20]</sup>。

表2 三角帆蚌*HcTyp-1*基因8个SNP位点不同基因型的珍珠层颜色性状的关联分析Tab. 2 Association of eight SNP sites of *HcTyp-1* gene polymorphisms with nacre colour

位点 locus	基因型 genotype	样本量 sample quantity	ML	Ma	Mb	MdE
A+2834C	AA	119	53.45±0.51 <sup>A</sup>	3.06±0.25 <sup>A</sup>	-8.87±4.52 <sup>A</sup>	48.19±0.50 <sup>A</sup>
	AC	5	55.98±2.51 <sup>AB</sup>	3.19±1.21 <sup>AB</sup>	-12.19±5.52 <sup>A</sup>	46.62±2.44 <sup>AB</sup>
	CC	20	56.78±1.26 <sup>B</sup>	0.97±0.60 <sup>B</sup>	-7.47±4.34 <sup>A</sup>	44.50±1.22 <sup>B</sup>
C+2912T	CC	33	54.07±1.00 <sup>A</sup>	2.32±0.48 <sup>A</sup>	-8.17±0.80 <sup>A</sup>	47.35±0.98 <sup>A</sup>
	CT	16	54.00±1.43 <sup>A</sup>	4.28±0.69 <sup>B</sup>	-9.57±1.15 <sup>A</sup>	48.15±1.40 <sup>A</sup>
	TT	95	53.98±0.58 <sup>A</sup>	2.68±0.28 <sup>A</sup>	-8.87±0.47 <sup>A</sup>	47.63±0.58 <sup>A</sup>
C+2919T	CC	120	54.53±0.51 <sup>A</sup>	2.42±2.59 <sup>A</sup>	-8.77±0.42 <sup>A</sup>	47.06±0.50 <sup>A</sup>
	CT	11	53.10±1.68 <sup>AB</sup>	4.78±3.37 <sup>B</sup>	-8.39±1.39 <sup>A</sup>	48.85±1.64 <sup>AB</sup>
	TT	13	49.88±1.55 <sup>B</sup>	4.40±2.96 <sup>B</sup>	-9.26±1.27 <sup>A</sup>	51.74±1.51 <sup>B</sup>
C+2983A	CA	48	54.14±0.83 <sup>A</sup>	2.63±0.40 <sup>A</sup>	-7.88±0.65 <sup>A</sup>	47.50±0.81 <sup>A</sup>
	AA	2	56.23±4.06 <sup>A</sup>	5.26±1.97 <sup>A</sup>	-13.93±3.20 <sup>A</sup>	46.78±3.96 <sup>A</sup>
	CC	94	53.88±0.59 <sup>A</sup>	2.80±0.29 <sup>A</sup>	-9.14±0.47 <sup>A</sup>	47.70±0.58 <sup>A</sup>
G+2985T	GG	9	49.02±1.87 <sup>A</sup>	2.96±0.93 <sup>A</sup>	-4.288±1.47 <sup>A</sup>	51.87±1.83 <sup>A</sup>
	TG	4	54.94±2.80 <sup>AB</sup>	3.79±1.40 <sup>A</sup>	-12.21±2.21 <sup>B</sup>	47.84±2.75 <sup>A</sup>
	TT	131	54.31±0.49 <sup>B</sup>	2.73±0.24 <sup>A</sup>	-8.99±0.39 <sup>B</sup>	47.32±0.48 <sup>A</sup>
G+2986T	GG	20	56.78±1.25 <sup>A</sup>	0.97±0.60 <sup>A</sup>	-7.47±1.01 <sup>A</sup>	44.50±1.22 <sup>A</sup>
	GT	7	55.93±2.12 <sup>AB</sup>	2.38±1.02 <sup>AB</sup>	-11.57±1.71 <sup>A</sup>	46.26±2.06 <sup>AB</sup>
	TT	117	53.41±0.52 <sup>B</sup>	3.11±0.25 <sup>B</sup>	-8.85±0.42 <sup>AB</sup>	48.24±0.50 <sup>B</sup>
T+3006C	TT	120	53.50±0.51 <sup>A</sup>	3.04±0.25 <sup>A</sup>	-8.89±0.41 <sup>A</sup>	48.14±0.50 <sup>A</sup>
	CT	4	54.94±2.81 <sup>AB</sup>	3.79±1.35 <sup>AB</sup>	-12.21±2.27 <sup>A</sup>	47.83±2.73 <sup>AB</sup>
	CC	20	56.78±1.26 <sup>B</sup>	0.97±0.60 <sup>B</sup>	-7.47±1.01 <sup>A</sup>	44.50±1.22 <sup>B</sup>
C+3057T	CC	108	53.79±0.55 <sup>A</sup>	3.07±0.26 <sup>A</sup>	-9.22±0.44 <sup>A</sup>	47.90±0.54 <sup>A</sup>
	TT	36	54.64±0.95 <sup>A</sup>	1.89±0.46 <sup>B</sup>	-7.50±0.75 <sup>A</sup>	46.78±0.93 <sup>A</sup>

注：同一位点中同列中不同大写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

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

表3 三角帆蚌*HcTyp-1*基因6个SNP位点连锁不平衡分析Tab. 3 Linkage disequilibrium analysis of six SNP sites of *HcTyp-1* gene

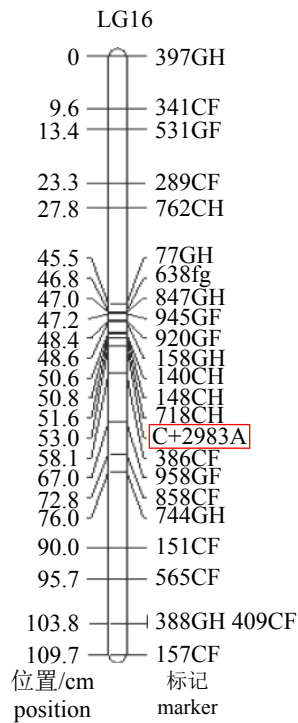
	A+2834C	C+2919T	G+2985T	G+2986T	T+3006C	C+3057T
A+2834C		1.000	0.972	0.973	1.000	0.970
C+2919T	0.027		1.000	1.000	1.000	1.000
G+2985T	0.014	0.012		0.996	0.965	1.000
G+2986T	0.900	0.029	0.016		0.973	0.887
T+3006C	0.974	0.027	0.014	0.875		1.000
C+3057T	0.523	0.049	0.248	0.460	0.541	

注：对角线上方为 $D'$ ，对角线下方为 $r^2$

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

表 4 三角帆蚌 *HcTyp-1* 基因单倍型分析Tab. 4 Haplotype analysis of six SNP sites of *HcTyp-1* gene

单倍型 haplotype	单倍型序列 sequence	紫色群体(频率) purple strain (frequency)	白色群体(频率) white strain (frequency)	$\chi^2$ (P值) $\chi^2$ (P value)
T1	CCTGCC	0(0)	1.00(0.007)	
T2	CCTGTT	3.00(0.021)	40.00(0.278)	38.478(0 <sup>**</sup> )
T3	TCTGCC	0(0)	3.00(0.021)	
T4	TCTTCC	75.00(0.521)	100.00(0.694)	10.800(0.001 <sup>**</sup> )
T5	CCTTTT	1.00(0.007)	0(0)	
T6	TCGTCT	22.00(0.153)	0(0)	23.353(0 <sup>**</sup> )
T7	TCTTCT	6.00(0.042)	0(0)	6.002(0.014)
T8	TTTTCC	37.00(0.257)	0(0)	41.672(0 <sup>**</sup> )

注: \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )Notes: \*\* indicates extremely significant difference at  $P < 0.01$ 图 1 *HcTyp-1* 基因在三角帆蚌 LG16 连锁群上的定位情况Fig. 1 Locations of *HcTyp-1* gene on LG16 of *H. cumingii*

本实验使用统计学的方法分析了 *HcTyp-1* 基因上的 SNPs 位点与两种内壳色之间的关联性。上述位点中有 3 个在  $L$ 、 $a$  和  $dE$  参数方面同时存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 还有 3 个分别在  $L$ 、 $a$  以及  $dE$  上存在显著差异。这些参数中  $L$  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。同时本实验室前期研究发现, 内壳色  $dE$  值越大紫色珍珠产出率越高,  $dE$  值越小则白色珍珠产出率越高<sup>[21]</sup>, 因此该基因可能对三角帆蚌内壳色的形成起到一定作用。

针对单个 SNP 位点进行分析是一种传统的分析手段, 但是这一方法存在一些缺陷, 例如信息位点不完整或者模糊等<sup>[22-24]</sup>。因此, 为了进一步研究 *HcTyp-1* 基因的多态性是否与内壳色的颜色性状相关, 本实验进行了连锁不平衡以及单倍型分析。研究表明, *HcTyp-1* 基因构建的单倍型中, T2 是白色群体的主要优势单倍型, 而 T8 是紫色群体的主要优势单倍型。因此, 可以根据需求选择优势型, 从而实现加快育种的目的<sup>[25]</sup>。

Bai 等<sup>[26]</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 *HcTyp-1* 基因是否存在于之前报道的壳色相关 LG17 连锁群上, 选取 *HcTyp-1* 基因上 SNP 位点并将其进行定位, 最终将其定位在 LG16 连锁群上 53.0 cm 位置, 虽然此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被发现, 并且生物颜色性状属于一种数量遗传性状, 它是由多个基因以及环境因素共同作用的结果。目前, 壳色形成的机理并不十分清楚, 因此 *HcTyp-1* 基因对三角帆蚌珍珠层颜色影响的大小, 还需要进一步研究。

## 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] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 18781-2008 珍珠分级[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. GB/T 18781-2008 Cultured pearl grading[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009(in Chinese).
- [3] 刘越. 三角帆蚌供片蚌对珍珠质量的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013. Liu Y. The effect of donor *Hyriopsis cumingii* on the quality of pearls[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013(in Chinese).
- [4] 毛媛媛, 郑荣泉, 张启鹏, 等. 转录组测序研究三角帆蚌珍珠颜色相关基因[J]. *水产学报*, 2018, 42(3): 322-333. Mao Y Y, Zheng R Q, Zhang Q P, *et al.* Transcriptome sequencing analysis on pearl color related genes in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 322-333(in Chinese).
- [5] 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(in Chinese). 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)(in Chinese).
- [6] Aguilera F, McDougall C, Degnan B M. Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2013, 13: 96.
- [7] 高莉, 赵英虎, 刘朝亮, 等. 酪氨酸酶相关蛋白1调控黑色素形成的研究进展[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(10): 114-116, 119(in Chinese). Gao L, Zhao Y H, Liu Z L, *et al.* Research progress in synthesis of melanin regulated by tyrosinase related protein 1[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 31(10): 114-116, 119(in Chinese)(in Chinese).
- [8] 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*, 2016, 204: 1-8.
- [9] Hunt R W G. The specification of colour appearance. I. Concepts and terms[J]. *Color Research and Application*, 2010, 2(2): 55-68.
- [10] Yong Y, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci[J]. *Cell Research*, 2005, 15(2): 97-98.
- [11] Li Z, Zhang Z, He Z, *et al.* A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>) [J]. *Cell Research*, 2009, 19(4): 519-523.
- [12] Ooijen J W V, Jansen J. Genetic mapping in experimental populations[J]. *Applied Optics*, 2013, 49(4): 701-707.
- [13] 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.
- [14] Jerry D R, Kvingedal 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.
- [15] 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(in Chinese). 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)(in Chinese).
- [16] Hofreiter M, Schöneberg T. The genetic and evolutionary basis of colour variation in vertebrates[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(15): 2591-2603.
- [17] 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.
- [18] 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.

- [19] Parichy D M. Evolution of danio pigment pattern development[J]. *Heredity*, 2006, 97(3): 200-210.
- [20] Cargill M, Altshuler D, Ireland J, *et al.* Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes[J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(3): 231-238.
- [21] 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(in Chinese).  
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)(in Chinese).
- [22] 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.
- [23] Bader J S. The relative power of SNPs and haplotype as genetic markers for association tests[J]. *Pharmacogenomics*, 2001, 2(1): 11-24.
- [24] Clark A G. The role of haplotypes in candidate gene studies[J]. *Genetic Epidemiology*, 2004, 27(4): 321-333.
- [25] 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(in Chinese).  
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)(in Chinese).
- [26] 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.

## Detection of nacre colour-related SNPs and genetic mapping of *HcTyp-1* gene in *Hyriopsis cumingii*

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

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

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

**Abstract:** According to previous studies, we found that *HcTyp-1* gene may be involved in the formation of nacre color in shell of *Hyriopsis cumingii*. Primers were designed based on the cDNA sequence of *HcTyp-1* gene in *H. cumingii*, and 8 SNPs were obtained by comparative screening and the correlation between SNPs and nacre colour-related traits was analyzed. Moreover, the location of *HcTyp-1* gene on genetic map was studied. The study of the relationship between these polymorphic sites and shell nacre color traits found that, C+3057T showed a significant difference in the “a”; G+2985T and T+3006C had significant difference of *L*, *b* and *a*, *dE* respectively. Moreover, A+2834C, C+2919T and G+2986T all had significant difference in *L*, *a* and *dE*. Linkage disequilibrium analysis showed that there were 6 SNPs in high linkage disequilibrium except C+2912T and C+2983A. The result of haplotype analysis indicated that the frequency of T2 and T4 in the white mussels was significantly higher than that of purple group, but T6 and T8 were higher in purple group. The results suggested that the polymorphic loci in *HcTyp-1* could be potential genetic markers for future molecular selection of different nacre color in *H. cumingii*. Furthermore, we mapped *HcTyp-1* 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*; *HcTyp-1*; shell nacre colour; SNP; correlation

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

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31472278); China Agriculture Research System (CARS-46-04)