



长牡蛎酪氨酸酶基因(*CgTyr1*)SNP多态性与壳色性状的关联

赵博文¹, 李琪^{1,2*}, 王九龙¹, 于红¹

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 黑色素是一种广泛存在于动物界的生物色素, 而酪氨酸酶被认为是一种重要的调控黑色素合成的关键酶。实验以3种壳色的长牡蛎选育品系为材料, 使用PCR-SSCP的方法对长牡蛎酪氨酸酶基因*CgTyr1*进行SNP分型筛选, 将突变位点与不同壳色性状进行关联分析。结果显示, 酪氨酸酶基因的外显子上存在23个SNP位点, 其中11个SNP位点与壳色性状极显著相关; 在这11个SNP位点中, 检测到有3个SNP位点为有义突变(c.591C/T、c.632G/A和c.1155T/C), 分别导致不同的氨基酸突变(Ala122Val、Gly136Ser和Phe310Ser); 利用极显著关联的11个SNP位点, 为每种壳色群体建立了1种单倍型, 并在验证组中得到了确认。研究表明, 长牡蛎酪氨酸酶基因的单个碱基突变和以此构建的单倍型与壳色性状存在显著的关联。本研究筛选出的SNP位点和构建的单倍型为长牡蛎壳色品系选育提供了重要的参考资料。

关键词: 长牡蛎; 壳色; 酪氨酸酶基因; SNP; 单倍型

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

在自然界中, 软体动物表现出高度的壳色多态性, 绚丽多彩的颜色和花纹深受人们的喜爱^[1]。在消费行为上, 由于不同壳色的贝类会对消费者产生不同程度的吸引, 会影响消费者做出不同的消费选择^[2-3], 从而使得人们偏爱的品种体现出较高的经济价值。长牡蛎(*Crassostrea gigas*)是一种广泛分布的双壳贝类, 同时也是世界上养殖产量最高的水生动物^[4]。经过连续的人工选育, 长牡蛎壳黑、壳白和壳金3种壳色品种(系)被成功构建^[5]。长牡蛎的壳色是一种可稳定遗传的性状, 近年来已有学者对不同壳色长牡蛎的遗传参数评估^[6-7]、壳色相关AFLP鉴定^[8]以及转录组学^[9-10]方面开展了研究, 但关于酪氨酸酶基因与长牡蛎壳色性状的关联性尚未见报道。

黑色素是一种较为常见的动物色素。尽管其合成通路尚未完全被人所知, 但是酪氨酸酶被认为是软体动物中黑色素合成调控的关键酶

之一^[11-13]。酪氨酸酶是一种含铜蛋白质, 在黑色素的合成中参与3个不同的催化反应: 将酪氨酸羟化形成L-多巴, 进而氧化L-多巴形成多巴醌, 然后从2个不同的途径分别合成真黑素和褐黑素^[14-17]。在长牡蛎基因组中至少存在26个酪氨酸酶相关基因, 其中2个酪氨酸酶基因(*CgTyr1*和*CgTyr2*)已被成功克隆^[16-17]。在分子水平上, 单核苷酸多态性(SNP)是最为常见的一种可遗传突变。由于其在基因组上大量稳定存在、共显性遗传和随机分布的特点, 已被广泛应用在遗传学研究中^[18]。目前, 在青鳞(*Oryzias latipes*)和黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)中, 已发现酪氨酸酶基因的突变与色素沉积存在关联性^[19-20]。

为探究酪氨酸酶基因与长牡蛎壳色的关联性, 本研究以壳黑、壳白和壳金3种长牡蛎壳色群体(图1)为对象, 采用单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism, SSCP)和测序

收稿日期: 2018-12-03 修回日期: 2019-02-25

资助项目: 国家自然科学基金(31772843); 山东省农业良种工程(2017LZGC009); 泰山学者种业计划

通信作者: 李琪, E-mail: qili66@ouc.edu.cn

方法对*CgTyr1*基因进行了SNP分型筛选,并以此构建单倍型,分析其与壳色变异的相关性,旨在为今后分子标记辅助长牡蛎壳色选育提供参考资料。



图1 3种壳色长牡蛎选育群体

B.壳黑; W.壳白; G.壳金

Fig. 1 *C. gigas* with three shell colors

B. black shell; W. white shell; G. golden shell

1 材料与方法

1.1 样品采集长牡蛎与DNA提取

2016年4月于山东乳山养殖海域采集2015年构建的壳黑、壳白和壳金3种壳色长牡蛎第5代选育群体。将采集到的所有壳色长牡蛎样品随机分为筛选组和验证组,最终得到筛选组:壳黑(BS)71粒、壳白(WS)54粒、壳金(GS)80粒;验证组:壳黑、壳白和壳金各10粒。采用苯酚氯仿法提取长牡蛎闭壳肌基因组DNA^[21]。提取的DNA使用Nanodrop测定浓度,将浓度稀释至100 ng/ μ L,置于4 °C保存待用。

1.2 PCR-SSCP分型

根据*CgTyr1*基因cDNA序列(GenBank accession no. NM_001305297.1),使用Primer Premier 5设计引物。为尽可能多的检测SNP位点,针对其4个外显子,共设计10对引物,覆盖基因外显子的91.2%(表1)。使用LASERGENE 7软件对测序片段进行拼接和比对。

PCR反应为10 μ L体系,其中模板DNA 100 ng, 1 \times PCR buffer, dNTP混合液0.2 mmol/L,引物1 μ mol/L, MgCl₂ 2 mmol/L和*Taq* DNA聚合酶0.25 U (TaKaRa)。PCR反应条件为94 °C预变性3 min; 35个循环: 94 °C变性20 s, 退火10 s, 72 °C延伸20 s; 72 °C延伸5 min。在扩增后的PCR产物中加入等体积的变性剂(98%去离子甲酰胺、0.25%溴

<http://www.scxuebao.cn>

表1 长牡蛎*CgTyr1*基因引物信息

Tab. 1 Primer sets used for analysis of SNPs in the *CgTyr1* gene in *C. gigas*

引物 primer	序列 sequence(5'→3')	长度/bp length	退火温度/°C annealing temperature
P1-1	AGTCTTGCCGACATCTTT AAGCAGGAACCTGGAGA	284	50
P1-2	AAGCAGGAACCTGGAGA ATGAAGCCTTACATAGTCG	110	50
P2-1	TGATTCATCCAATTACTTAT CTTT GGGCGGGTGTCAATATAG	274	56
P3-1	TTATCATTTGATCCCTCCT AAGTTTAAATGGAGTGGTTT	254	50
P4-1	CTGGAATCAGAGCCTTGC TGGGTTGATGCCGTTAG	236	56
P4-2	GTCAAAGAGCTAACGGCAT AAACAAGGAACGGGCTAC	210	56
P4-3	CCAGGTCCAGCAGAAGAG GAATGTAAGCCCAAGCATC	207	56
P4-4	AAGCCCTACCAGAATACCTT GAGTCCATTAGACTGCACGA	267	56
P4-5	TACGCAGGCAAATACAAAG TGGTTCCATCTCCCTAACA	294	56

酚蓝、0.25%二甲苯菁、10 mmol/L EDTA),置于PCR仪上98 °C变性5 min后立即冰浴5 min,防止复性。

采用浓度为10%的非变性聚丙烯酰胺进行凝胶电泳。取10 μ L变性产物点样,先在300 V电压室温条件下预电泳10 min,待变性产物完全进入凝胶后,将电泳槽移入4 °C冰箱内,并将电压调至150 V继续电泳10 h。采用银染法进行染色。

1.3 测序分析

根据电泳条带的不同类型,为尽可能减少误差,在每种壳色及引物的每块胶板上,挑选典型个体进行测序,得到相应带型对应的碱基序列。

1.4 数据处理

采用卡方检验对检测到的SNP位点进行显著性分析。使用Popgene计算显著差异SNP位点的观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、有效等位基

因数(N_e)和多态性信息含量(PIC)。使用SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)^[22-23]分析哈迪温伯格平衡, 构建单倍型, 并分析相关位点的连锁不平衡(LD)。

2 结果

2.1 SNP筛查及其突变类型

通过PCR-SSCP方法, 对不同群体的*CgTyr1*基因的外显子进行扩增, 获得了相应基因片段的不同带型。挑选典型带型进行测序, 得到每个个体的相应序列(图2)。通过壳黑、壳白和壳金长牡蛎群体之间的相互比对, 共发现23个SNP位点。为进一步探究*CgTyr1*基因上SNP位点

与不同壳色性状的相关性, 筛选11个与壳色性状存在极显著关联($P < 1 \times 10^{-6}$)的SNP位点进行后续分析(附表1)。每个SNP位点均以该基因mRNA序列的第一个碱基到该突变位点的碱基数来命名。

在与壳色性状存在极显著关联的SNP位点中, 突变位点c.367A/C、c.466C/T、c.475C/G、c.591C/T和c.632A/G位于外显子1, 突变位点c.724A/G位于外显子2, 突变位点c.850C/T位于外显子3, 突变位点c.1155C/T、c.1207C/T、c.1231A/C和c.1289A/C位于外显子4。通过对SNP突变所导致氨基酸多态性的分析, 发现位点c.591C/T、c.632A/G和c.1155C/T属于非同义SNP突变位点, 分别导致Ala122Val、Gly136Ser和Phe310Ser的氨基酸突变。

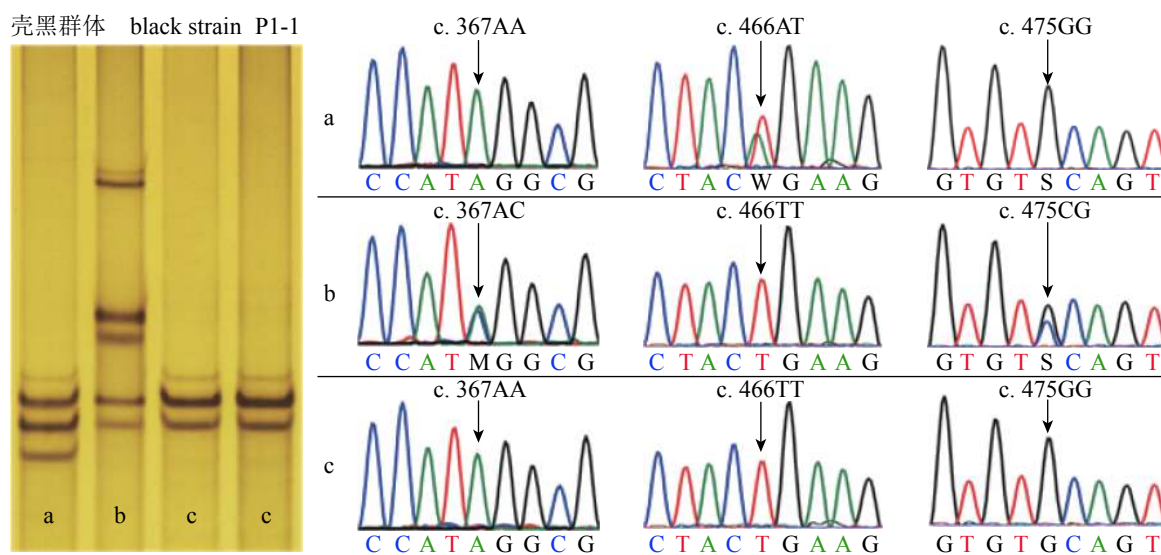


图2 部分SSCP电泳带型及测序峰图

a、b和c分别表示壳黑长牡蛎不同个体在引物P1-1扩增下产生的条带类型, 右侧展示了每种条带类型对应的测序峰图

Fig. 2 Part of SSCP band patterns and sequence

Lowercase a, b and c represent different individuals' amplified patterns using primer P1-1 in black shell color strain, and the corresponding sequences are presented on the right

2.2 SNP位点多态性信息

通过3种壳色长牡蛎群体*CgTyr1*基因序列的比较, 筛选出的11个与壳色性状存在极显著相关SNP位点($P < 1 \times 10^{-6}$)的 H_0 、 H_e 、 N_e 和 PIC 如表2。可以看出, 壳黑长牡蛎群体存在9个SNP位点、壳白长牡蛎群体存在8个SNP位点、壳金长牡蛎群体中存在5个SNP位点。

在壳黑长牡蛎群体中, 突变位点c.367A/C、c.466C/T、c.475C/G和c.591C/T属于低度多态性位点($PIC < 0.25$), 其他突变位点均为中度多态性位

点($0.5 > PIC > 0.25$)。在壳白长牡蛎群体中, 突变位点c.466C/T、c.591C/T和c.724A/G属于低度多态性位点($PIC < 0.25$), 其他突变位点均为中度多态性位点($0.5 > PIC > 0.25$)。在壳金群体中, 突变位点c.367A/C、c.475C/G和c.632A/G属于低度多态性位点($PIC < 0.25$), 其他突变位点均为中度多态性位点($0.5 > PIC > 0.25$)。

2.3 连锁不平衡分析和单倍型构建

分别选择壳黑、壳白和壳金长牡蛎群体中与壳色性状存在极显著关联的SNP位点, 分析关

表2 长牡蛎3种壳色群体SNP位点多态性信息

Tab. 2 Polymorphic parameters of 11 SNP loci of *CgTyr1* gene in three shell color strains

群体 strain	位点 locus	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	有效等位基因数 N_e	多态性信息含量 PI_C
壳黑群体 black strain	c.367A/C	0.126	0.119	1.134	0.112
	c.466C/T	0.295	0.253	1.337	0.220
	c.475C/G	0.126	0.119	1.134	0.111
	c.591C/T	0.028	0.028	1.020	0.027
	c.632A/G	0.605	0.425	1.730	0.333
	c.850C/T	0.394	0.467	1.866	0.356
	c.1207C/T	0.408	0.327	1.481	0.272
	c.1231A/C	0.408	0.343	1.518	0.283
壳白群体 white strain	c.1289A/C	0.422	0.335	1.500	0.278
	c.367A/C	0.537	0.396	1.647	0.315
	c.466C/T	0.056	0.054	1.057	0.052
	c.475C/G	0.537	0.465	1.856	0.354
	c.591C/T	0.241	0.213	1.268	0.189
	c.632A/G	0.482	0.460	1.838	0.352
	c.724A/G	0.130	0.213	1.268	0.189
	c.850C/T	0	0.327	1.480	0.271
壳金群体 gold strain	c.1155C/T	0	0.369	1.576	0.298
	c.367A/C	0	0.049	1.051	0.048
	c.475C/G	0.013	0.061	1.064	0.059
	c.632A/G	0.013	0.013	1.013	0.012
	c.724A/G	0.300	0.364	1.568	0.297
c.850C/T	0.350	0.351	1.536	0.288	

联位点间的连锁不平衡(表3, 表4, 表5)。在壳黑群体中, 突变位点c.850C/T与其他突变位点均存在强连锁不平衡($D' > 0.75$)。在壳金群体中, *CgTyr1*基因上5个突变位点均表现出强连锁不平衡($D' > 0.75$)。

利用3种壳色长牡蛎群体中表现出与壳色存在极显著关联的SNP位点进行单倍型构建, 成功为每种壳色群体构建出1种单倍型, 并且每种单倍型在相应群体中的频率, 与其在其他壳色群体中的表达存在极显著差异($P < 1 \times 10^{-6}$)(表6)。

2.4 单倍型验证

为进一步验证所构建的单倍型是否具有普遍适用性, 同样使用PCR-SSCP方法在验证组中

针对*CgTyr1*基因进行扩增分型和测序, 得到每个个体的碱基序列。选取上述11个表现出极显著关联($P < 1 \times 10^{-6}$)的SNP位点(表2), 构建单倍型。验证组的单倍型构建结果表明, 单倍型haplotype black(HB)、haplotype white(HW)和haplotype gold(HG)分别为壳黑、壳白和壳金长牡蛎群体的优势单倍型($P < 0.05$)(表6)。

3 讨论

已有研究表明, 海洋软体动物的基因组中存在较高的杂合度。长牡蛎作为一种重要的水产养殖动物, 其表现出的高度多态性意味着在基因组中存在大量的SNP位点。有学者认为, 在编码区平均每60个碱基中就会出现1个SNP位点, 而在非编码区平均每40个碱基就可能存在1个SNP位点^[24]。长牡蛎全基因组测序表明其基因的多态性水平为2.3%, 而人类基因组的多态性水平仅有0.09%^[25]。在本研究所扩增的*CgTyr1*基因外显子上, 共计发现了23个SNP位点, 平均的SNP位点出现频率约为1.3%。黑色素是广泛存在于动物中的一种重要色素。酪氨酸酶作为关键酶, 参与合成真黑素和褐黑素。目前, 在长牡蛎中2个酪氨酸酶相关基因已被克隆(*CgTyr1*基因和*CgTyr2*基因), 均在色素合成中承担重要角色。*CgTyr1*基因被发现从长牡蛎的担轮幼虫时期开始表达, 位于担轮幼虫的非钙化壳上, 并且表达仅仅表现在绞合部和贝壳边缘, 而在贝壳的中心部位没有检测到其表达, 表明其可能在幼虫的贝壳形成过程中起到关键作用^[16]。同样, *CgTyr2*基因在内套膜边缘检测到高度表达, 表明其可能参与角质层的分泌和着色过程^[17]。已有研究表明, 三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)*HcTyr*基因和*HcTyr-1*基因存在多个SNP位点, 与三角帆蚌内壳色和珍珠层颜色性状存在关联^[26-27]。

在水产动物中, 已有不少学者针对TYR基因突变和颜色性状的关联性开展研究。斑马鱼(*Danio rerio*)酪氨酸酶基因的等位基因*i*导致在眼睛和表皮黑色素沉积^[27]。在该基因中, 共有4个等位基因(i^1 、 i^4 、 i^5 和 i^6)被发现^[28]。其中, 等位基因 i^6 可能由于其存在245个碱基的缺失而表现出与白化性状高度关联^[29]。研究表明, 向非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*)胚胎中注射酪氨酸酶基因的向导RNA(sgRNA)和Cas9 mRNA可导致个体出现明显的白化性状。在牡蛎中, *CgTyr1*基因上同样

表 3 长牡蛎壳黑群体 *CgTyr1* 基因 11 个 SNP 位点连锁不平衡分析Tab. 3 Linkage disequilibrium analysis of 11 SNP loci of *CgTyr1* gene in black shell color strain

壳黑群体 black strain	c.367A/C	c.466C/T	c.475C/G	c.591C/T	c.632A/G	c.850C/T	c.1207C/T	c.1231A/C	c.1289A/C
c.367A/C		0.65	1	0.431	0.477	0.987	0.554	0.014	0.041
c.466C/T	0.005		0.65	1	0.611	0.999	0.247	0.323	0.320
c.475C/G	1	0.005		0.431	0.477	0.987	0.554	0.014	0.041
c.591C/T	0.039	0.002	0.039		1	1	0.153	0.110	0.132
c.632A/G	0.035	0.149	0.035	0.006		1	0.881	0.835	0.886
c.850C/T	0.038	0.100	0.038	0.025	0.251		0.999	0.822	0.999
c.1207C/T	0.005	0.041	0.005	0.001	0.458	0.148		1	1
c.1231A/C	0	0.065	0	0.001	0.449	0.109	0.919		1
c.1289A/C	0	0.066	0	0.001	0.484	0.155	0.958	0.959	

注: 在每种壳色群体中, 对角线上方为 D' , 对角线下方为 R^2 , 下同

Notes: the figure above the diagonal represents D' , the figure below the diagonal represents R^2 , the same below

表 4 长牡蛎壳白群体 *CgTyr1* 基因 8 个 SNP 位点连锁不平衡分析Tab. 4 Linkage disequilibrium analysis of 8 SNP loci of *CgTyr1* gene in white shell color strain

壳白群体 white strain	c.367A/C	c.466C/T	c.475C/G	c.591C/T	c.632A/G	c.724A/G	c.850C/T	c.1155C/T
c.367A/C		1	0.935	0.003	0.065	0.183	0.006	0.427
c.466C/T	0.01		1	1	0.995	0.570	1	0.122
c.475C/G	0.568	0.016		1	0.644	0.045	0.075	0.278
c.591C/T	0	0.004	0.242		1	0.361	0.227	0.291
c.632A/G	0.003	0.015	0.127	0.074		1	0.225	0.169
c.724A/G	0.002	0.068	0	0.002	0.074		0.622	0.041
c.850C/T	0	0.007	0.003	0.028	0.007	0.014		0.042
c.1155C/T	0.021	0.001	0.043	0.036	0.017	0	0.001	

表 5 长牡蛎壳金群体 *CgTyr1* 基因 5 个 SNP 位点连锁不平衡分析Tab. 5 Linkage disequilibrium analysis of 5 SNP loci of *CgTyr1* gene in gold shell color strain

壳金群体 gold strain	c.367A/C	c.475C/G	c.632A/G	c.724A/G	c.850C/T
c.367A/C		1	1	1	1
c.475C/G	0.795		1	0.990	0.990
c.632A/G	0	0		1	0.998
c.724A/G	0.008	0.010	0.002		1
c.850C/T	0.007	0.009	0.022	0.090	

可能存在类似的等位基因, 控制和影响不同的壳色性状, 这需要今后利用基因编辑技术进一步验证。

本研究中, 在长牡蛎 *CgTyr1* 基因上共发现了 11 个 SNP 位点与壳色性状存在极显著相关 ($P < 1 \times 10^{-6}$), 其中有 8 个 SNP 位点是同义突变, 并不改变其编码氨基酸的类型。但是, 在基因的翻译过程中, tRNA 与简并密码子相结合的偏好并不是随机的, 同义 SNP 突变可能改变或降低基因的翻译效率^[30-31]。已有研究表明, 同义 SNP 突变可能改变 mRNA 的空间折叠和稳定性, 进而影响其功能。所以, 本研究在构建单倍型时, 将 8 个同义 SNP 位点纳入考量范围, 与 3 个非同义 SNP 一同构建单倍型, 具有较高的可信度。

连锁不平衡分析显示, 与壳色性状存在极显著相关 ($P < 1 \times 10^{-6}$) 的 11 个 SNP 位点存在不同程度的连锁遗传现象。这种在 *CgTyr1* 基因上的多重突变 (multiple mutation) 可能是导致壳色多态性的原

表6 长牡蛎3种壳色群体单倍型分析

Tab. 6 Haplotype analysis of 11 SNP loci of *CgTyr1* gene in three shell color strains

组别 group	单倍型 haplotype	单倍型序列 sequence	壳黑群体(频率) black strain (freq.)	壳白群体(频率) white strain (freq.)	壳金群体(频率) gold strain (freq.)	P值 P value
构建组 construction group	HB	ATGCAATTTCA	18.36 (0.129)	0.00 (0.000)	0.00 (0.000)	1.09E-07
	HW	ATGCGATTCCC	0.00 (0.000)	15.50 (0.144)	0.00 (0.000)	2.87E-09
	HG	ATGCGCTTCAC	0.00 (0.000)	2.50 (0.023)	37.00 (0.231)	2.65E-10
验证组 validation group	HB	ATGCAATTTCA	4.00 (0.200)	0.00 (0.000)	0.00 (0.000)	0.029
	HW	ATGCGATTCCC	0.00 (0.000)	3.50 (0.175)	0.00 (0.000)	0.043
	HG	ATGCGCTTCAC	0.00 (0.000)	0.50 (0.025)	5.00 (0.250)	0.028

因。相比于单个SNP突变位点与性状的关联分析,单倍型分析可以评估多重突变对表型所带来的细微影响。单倍型分析为二倍体生物进化研究提供了一种更为有效的手段,并在鉴定复杂遗传性状的候选基因中起到了重要作用^[23]。探究一个基因与某个性状的关系,关键是找到与这个性状存在关联性的单倍型。本研究为每一种壳色群体都建立了1种单倍型,并且每种单倍型在相应群体中的频率,与其在其他壳色群体中的表达存在极显著差异($P < 1 \times 10^{-6}$),这表明*CgTyr1*基因是导致长牡蛎个体表现出不同壳色的重要基因。

综上所述,本研究筛查了壳白、壳黑和壳金3种长牡蛎群体*CgTyr1*基因的SNP位点,共发现23个SNP突变,其中11个SNP位点与壳色性状存在极显著关联($P < 1 \times 10^{-6}$)。在这11个SNP位点中,突变位点c.591C/T、c.632A/G、c.1155C/T属于非同义SNP位点,分别导致Ala122Val、Gly136Ser和Phe310Ser的氨基酸突变,其余突变位点均为同义SNP位点。基于与壳色性状存在极显著关联($P < 1 \times 10^{-6}$)的11个SNP位点,实验为每一种壳色群体都构建了1种单倍型,并在验证组中得到了确认。研究结果为长牡蛎壳色品系的标记辅助育种提供了重要基础资料。

参考文献:

- [1] Williams S T. Molluscan shell colour[J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2017, 92(2): 1039-1058.
- [2] Clydesdale F M. Color as a factor in food choice[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1993, 33(1): 83-101.
- [3] Brake J, Evans F, Langdon C. Evidence for genetic <http://www.sexuebao.cn>

control of pigmentation of shell and mantle edge in selected families of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*[J]. *Aquaculture*, 2004, 229(1-4): 89-98.

- [4] FAO. The state of world fisheries and aquaculture[M]. Rome, Italy: FAO, 2018.
- [5] 丛日浩,李琪,葛建龙,等.长牡蛎4种壳色家系子代的表型性状比较[J].中国水产科学,2014,21(3):494-502. Cong R H, Li Q, Ge J L, et al. Comparison of phenotypic traits of four shell color families of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 494-502(in Chinese).
- [6] Wan S, Li Q, Liu T, et al. Heritability estimates for shell color-related traits in the golden shell strain of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using a molecular pedigree[J]. *Aquaculture*, 2017, 476: 65-71.
- [7] Xing D, Li Q, Kong L F, et al. Heritability estimate for mantle edge pigmentation and correlation with shell pigmentation in the white-shell strain of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Aquaculture*, 2018, 482: 73-77.
- [8] Song J L, Li Q, Kong L F, et al. Identification of candidate AFLP markers for shell color of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) under artificial selection[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016, 66: 209-215.
- [9] Feng D D, Li Q, Yu H, et al. Comparative transcriptome analysis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* characterized by shell colors: identification of genetic bases potentially involved in pigmentation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145257.
- [10] Feng D D, Li Q, Yu H, et al. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs in mantle of *Crassostrea gigas* and their association with shell pigmentation[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1436.

- [11] Palumbo A, Poli A, Di Cosmo A, *et al.* N-Methyl-D-aspartate receptor stimulation activates tyrosinase and promotes melanin synthesis in the ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis* through the nitric Oxide/cGMP signal transduction pathway. A novel possible role for glutamate as physiologic activator of melanogenesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(22): 16885-16890.
- [12] Naraoka T, Uchisawa H, Mori H, *et al.* Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(19): 4026-4038.
- [13] Ando H, Kondoh H, Ichihashi M, *et al.* Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007, 127(4): 751-761.
- [14] Chung S Y, Seo Y K, Park J M, *et al.* Fermented rice bran downregulates MITF expression and leads to inhibition of α -MSH-induced melanogenesis in B16F1 melanoma[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(8): 1704-1710.
- [15] Lee Y S, Kim H K, Lee K J, *et al.* Inhibitory effect of glyceollin isolated from soybean against melanogenesis in B16 melanoma cells[J]. *BMB Reports*, 2010, 43(7): 461-467.
- [16] Huan P, Liu G, Wang H X, *et al.* Identification of a tyrosinase gene potentially involved in early larval shell biogenesis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Development Genes and Evolution*, 2013, 223(6): 389-394.
- [17] Yu X, Yu H, Kong L F, *et al.* Molecular cloning and differential expression in tissues of a tyrosinase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(8): 5403-5411.
- [18] Lapègue S, Harrang E, Heurtebise S, *et al.* Development of SNP-genotyping arrays in two shellfish species[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(4): 820-830.
- [19] Tsutsumi M, Imai S, Kyono-Hamaguchi Y, *et al.* Color reversion of the albino medaka fish associated with spontaneous somatic excision of the *Tol-1* transposable element from the tyrosinase gene[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2006, 19(3): 243-247.
- [20] Zhang X T, Wei K J, Chen Y Y, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *tyr* and *tyrp1* genes in normal and albino yellow catfish *Tachysurus fulvidraco*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2018, 92(4): 979-998.
- [21] Li Q, Park C, Kijima A. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2002, 21(2): 811-815.
- [22] 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.
- [23] Li Z Q, Zhang Z, He Z D, *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.
- [24] Sauvage C, Boudry P, De Koning D J, *et al.* QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Animal Genetics*, 2010, 41(4): 390-399.
- [25] Venter J C, Adams M D, Myers E W, *et al.* The sequence of the human genome [J]. *Science*, 2001, 291(5507): 1304-1351.
- [26] 韩学凯, 陈夏君, 白志毅, 等. 三角帆蚌 *HcTyr* 基因内壳色性状相关SNP筛选及图谱定位[J]. *水产学报*, 2017, 41(7): 1044-1053.
- [26] Han X K, Chen X J, Bai Z Y, *et al.* Detection of shell nacre colour-related SNP and gene mapping of *HcTyr* gene in *Hyriopsis cumingii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(7): 1044-1053(in Chinese).
- [27] 陈夏君, 韩学凯, 白志毅, 等. 三角帆蚌 *HcTyr-1* 基因珍珠层颜色性状相关SNP筛选及图谱定位[J]. *水产学报*, 2019, 43(2): 467-473.
- [27] Chen X J, Han X K, Bai Z Y, *et al.* Detection of nacre colour-related SNPs and genetic mapping of *HcTyr-1* gene in *Hyriopsis cumingii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(2): 467-473(in Chinese).
- [28] Inagaki H, Koga A, Bessho Y, *et al.* The tyrosinase gene from medaka fish: transgenic expression rescues albino mutation [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 1998, 11(5): 283-290.
- [29] Koga A, Hori H. Albinism due to transposable element insertion in fish [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 1997, 10(6): 377-381.
- [30] Koga A, Wakamatsu Y, Kurosawa J, *et al.*

Oculocutaneous albinism in the i^6 mutant of the medaka fish is associated with a deletion in the tyrosinase gene[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 1999, 12(4): 252-258.

[31] Kimchi-Sarfaty C, Oh J M, Kim I W, *et al.* A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity[J]. *Science*, 2007, 315(5811): 525-528.

Polymorphism in *CgTyr1* gene and its association with shell color traits in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)

ZHAO Bowen¹, LI Qi^{1,2*}, WANG Jiulong¹, YU Hong¹

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

Abstract: The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is cultured worldwide due to the advantages of rapid growth and good adaptability, and has become one of the most commercially important bivalve species. In our successively selective breeding, three strains of *C. gigas* with black, white and gold shell color traits have been developed. Tyrosinase (Tyr) is known as one of the most important enzymes in the regulation and production of melanin in animals. In this study, exons in the *C. gigas* *TYR* gene (*CgTyr1*) were sequenced. Mutations of the *CgTyr1* gene and its association with shell color were analyzed in the three shell color strains of *C. gigas*. A total of 23 single nucleotide polymorphisms (SNP) were detected using single-strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing analysis, of which 11 SNP loci had highly significant differences between the three shell-color strains. In the SNP loci with significant difference, mutation c.591C/T, c.632G/A and c.1155T/C are non-synonymous which lead to amino acid changes Ala122Val, Gly136Ser and Phe310Ser. For further analysis, 11 SNP loci with a highly significant difference were selected for haplotype construction. One specific haplotype for every shell color strain was constructed and confirmed in the validating group. The mutations and haplotypes that are strongly associated with the shell color phenotypes in this study could be useful in understanding the molecular mechanism of pigmentation, and could also be potentially applied to marker-assisted selection breeding programs for *C. gigas*.

Key words: *Crassostrea gigas*; shell color; tyrosinase gene; SNP; haplotype

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31772843); Agricultural Fine Seed Project of Shandong Province (2017LZGC009); Taishan Scholars Seed Project of Shandong

附表 1 长牡蛎 *CgTyr1* 基因与壳色 SNP 位点信息Attached Tab. 1 Genetic polymorphisms in *CgTyr1* gene in *C. gigas*

外显子 region	SNP位点 mutation	壳黑群体 black strain (n=71)			壳白群体 white strain (n=54)			壳金群体 gold strain (n=80)			P值 P value
		基因型 genotype	数量(频率) no. (Freq.)	数量(频率) no. (Freq.)	数量(频率) no. (Freq.)	数量(频率) no. (Freq.)	数量(频率) no. (Freq.)	数量(频率) no. (Freq.)	数量(频率) no. (Freq.)		
exon 1	c.367A/C	AA	62(0.873)	25(0.463)	78(0.975)	1.29E-13					
		AC	9(0.127)	29(0.537)	0(0.000)						
		CC	0(0.000)	0(0.000)	2(0.025)						
		HW	0.325(0.569)	7.276(0.007)	80.00(0.000)						
		等位基因 allele	频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid					
		A	0.937	0.731	0.975	Ile					
		C	0.063	0.269	0.025	Ile					
	c.466C/T	基因型 genotype	CT	21(0.296)	3(0.056)	0(0.000)	3.19E-08				
			TT	50(0.704)	51(0.944)	80(1.000)					
			HW	2.138(0.544)	0.044(0.997)	0.000(1.000)					
		等位基因 allele	频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid					
		C	0.148	0.028	0	Thr					
		T	0.852	0.972	1	Thr					
c.475C/G	基因型 genotype	CC	0(0.000)	5(0.093)	2(0.025)	5.66E-15					
		CG	9(0.127)	29(0.537)	1(0.013)						
		GG	62(0.873)	20(0.370)	77(0.963)						
		HW	0.325(0.569)	1.450(0.229)	50.38(0.000)						
		等位基因 allele	频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid					
		C	0.063	0.361	0.031	Val					
		G	0.937	0.639	0.969	Val					
c.591C/T*	基因型 genotype	CC	69(0.972)	41(0.759)	80(1.000)	2.06E-07					
		CT	2(0.028)	13(0.241)	0(0.000)						
		HW	0.014(0.904)	1.011(0.315)	0.000(1.000)						
		等位基因 allele	频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid					
		C	0.986	0.880	1	Ala					
		T	0.014	0.120	0	Val					
c.632A/G*	基因型 genotype	AA	0(0.000)	6(0.111)	0(0.000)	7.26E-18					
		AG	43(0.606)	26(0.481)	1(0.013)						
		GG	28(0.394)	22(0.407)	79(0.988)						
		等位基因 allele	频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid					

· 续附表1 ·

外显子 region	SNP位点 mutation		壳黑群体 black strain (n=71)	壳白群体 white strain (n=54)	壳金群体 gold strain (n=80)	P值 P value
		HW	13.39(0.000)	0.167(0.683)	0.003(0.955)	
		等位基因 allele	频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid
		A	0.303	0.352	0.006	Gly
		G	0.697	0.648	0.994	Ser
exon 2	c.724A/G	基因型 genotype	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	
		AA	71(1.000)	44(0.815)	49(0.613)	3.39E-07
		AC	0(0.000)	7(0.130)	24(0.300)	
		CC	0(0.000)	3(0.056)	7(0.087)	
		HW	0.000(1.000)	8.123(0.004)	2.358(0.125)	
		等位基因 allele	频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid
		A	1	0.880	0.762	Pro
C	0	0.120	0.237	Pro		
exon 3	c.850C/T	基因型 genotype	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	
		CC	12(0.169)	11(0.204)	4(0.050)	7.81E-07
		CT	28(0.394)	0(0.000)	28(0.350)	
		TT	31(0.437)	43(0.796)	48(0.600)	
		HW	1.607(0.205)	54.00(0.000)	0.001(0.974)	
		等位基因 allele	频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid
		C	0.366	0.204	0.225	Ser
T	0.634	0.796	0.775	Ser		
exon 4	c.1155C/T*	基因型 genotype	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	
		CC	0(0.000)	13(0.241)	0(0.000)	3.73E-09
		TT	71(1.000)	41(0.759)	80(1.000)	
		HW	0.000(1.000)	54.00(0.000)	0.000(1.000)	
		等位基因 allele	频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid
	C	0	0.241	0	Phe	
	T	1	0.759	1	Ser	
	c.1207C/T	基因型 genotype	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	
		CC	42(0.592)	54(1.000)	80(1.000)	1.43E-14
		CT	29(0.408)	0(0.000)	0(0.000)	
HW		4.676(0.031)	0.000(1.000)	0.000(1.000)		
等位基因 allele		频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid	
C	0.796	1	1	Asn		
T	0.204	0	0	Asn		

· 续附表1 ·

外显子 region	SNP位点 mutation	壳黑群体 black strain (n=71)	壳白群体 white strain (n=54)	壳金群体 gold strain (n=80)	P值 P value	
c.1231A/C	基因型 genotype	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	1.87E-28	
	AA	41(0.577)	0(0.000)	80(1.000)		
	AC	29(0.408)	54(1.000)	0(0.000)		
	CC	1(0.014)	0(0.000)	0(0.000)		
	HW	2.748(0.097)	54.00(0.000)	0.000(1.000)		
	等位基因 allele	频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid	
	A	0.782	0.500	1	Gly	
	C	0.218	0.500	0	Gly	
	c.1289A/C	基因型 genotype	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	数量(频率) no. (freq.)	3.96E-15
		AC	30(0.423)	0(0.000)	0(0.000)	
CC		41(0.577)	54(1.000)	160(1.000)		
HW		5.094(0.024)	0.000(1.000)	0.000(1.000)		
等位基因 allele		频率 freq.	频率 freq.	频率 freq.	氨基酸类型 amino acid	
A		0.211	0	0	Arg	
C		0.789	1	1	Arg	

注: HW表示哈迪温伯格平衡检验; *表示该位点为非同义SNP突变位点

Notes: HW represents Hardy-Weinberg test; * represents nsSNP locus