

文章编号: 1000-0615(2019)12-2439-10

DOI: 10.11964/jfc.20181111527

缢蛭新品种“申浙1号”*ScHsc70* 基因SNPs筛查与 耐高温性状的关联性分析

薛宝宝, 孟德龙, 任泓妤, 申奔龙,
牛东红, 李家乐*, 沈和定*

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 水产科学国家级实验教学示范中心,
水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘要: 为获取缢蛭*ScHsc70*基因单核苷酸多态性位点与耐高温性状的相关性, 通过直接测序方法克隆了*ScHsc70*基因全长序列, 长度为4 048 bp, 包括6个内含子和7个外显子, 编码区1 950 bp, 从其外显子区域筛查到6个潜在的SNPs, 分别命名为Rs1(g. 588 C>T)、Rs2(g. 840 C>T)、Rs3(g. 885 T>A)、Rs4(g. 1233 A>G)、Rs5(g. 1467 T>G)、Rs6(g. 1482 T>C)。利用Sanger测序方法, 对缢蛭新品种“申浙1号”耐高温群体和对照组群体潜在SNPs进行基因分型, 遗传多样性分析结果显示, 两个群体的多态信息含量(PIC)值在0.111 2~0.371 8之间, 对照组群体的平均多态信息含量(0.267 0)高于耐高温群体的平均多态信息含量(0.236 5)。*ScHsc70*基因SNPs与耐热性状关联分析结果显示, Rs1、Rs3和Rs4的基因型频率和等位基因频率在对照组和耐高温群体之间存在显著性差异; 单倍型连锁不平衡分析结果显示, *ScHsc70*基因SNPs可形成2个单倍体块, 7种单倍型, 其中CCT单倍型与耐高温性状显著相关; 本实验发现, Rs2和Rs3处于连锁状态($r^2=0.86$, LOD=25.56, Dx=1.0), 可以作为缢蛭与耐高温遗传育种的SNP标签。综上所述, Rs1、Rs3、Rs4和单倍型CCT均可作为缢蛭耐高温遗传育种的候选辅助分子标记, 为后续的抗逆性相关SNPs筛选与功能验证奠定了理论基础。

关键词: 缢蛭; *HSP70*基因; 单核苷酸多态性; 耐高温; 连锁不平衡

中图分类号: Q 785; S 968.31

文献标志码: A

缢蛭(*Sinonovacula constricta*), 俗称蛭子、蜻子, 属软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、异齿亚纲(Heterodonta)、帘蛤目(Veneroida)、竹蛭科(Solenidae)、缢蛭属(*Sinonovacula*)^[1], 主要分布于西太平洋沿海的中国和日本。蛭子作为我国沿海地区的主要经济贝类, 从北部的辽宁至南部广东沿海均有分布, 是我国四大海水养殖贝类之一, 养殖历史悠久。在我国浙江、福建、山东、江苏、辽宁、广东和广西沿海均已开展养殖^[2-3]。

温度影响着海洋无脊椎动物生长和发育,

温度与疾病暴发有直接的相关性^[4]。在一定的温度范围内, 大多数海洋贝类的代谢率会随着温度的升高而升高, 当超过其承受最高温范围后, 会引起贝类生理功能的紊乱^[5], 严重时会使贝类大量死亡^[6-7], 特别在夏季持续降雨、极度高温等极端环境下, 高密度养殖的缢蛭会大面积死亡。近年来, 随着海洋环境的恶化, 野生缢蛭资源锐减; 加上连续多代的人工繁育, 造成缢蛭种质资源快速退化, 遗传多样性不断下降, 抗逆性减弱。因此, 研究贝类抗热机制, 筛选与贝类抗热相关功能基因并进行分子标记开

收稿日期: 2018-11-07 修回日期: 2019-03-15

资助项目: 国家高技术研究发展计划(2012AA10A400-3); 上海高校知识服务平台上海海洋大学水产动物遗传育种中心(ZF1206)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli@shou.edu.cn; 沈和定, E-mail: hdshen@shou.edu.cn

发, 培育耐高温贝类新品种至关重要。

热休克蛋白(HSP)是在正常生长和发育中起重要作用的一类蛋白质, 可以帮助生物体调节应激反应^[8-10]。当生物体受到温度、盐度、缺氧、重金属、病毒和细菌感染的胁迫时, HSP表达水平显著增加, 以提高生物体抗应激水平, 从而维持细胞的稳态和存活^[11-13]。关于热休克蛋白70 (HSP70) 在水产贝类抗热性和抗其他胁迫方面的重要作用, 已经在许多海洋双壳类物种中进行了相关研究, 如香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)^[14], 美洲牡蛎(*C. virginica*)^[15], 欧洲牡蛎(*Ostrea edulis*)^[16], 地中海贻贝(Mediterranean mussel)^[17], 海湾扇贝(*Argopecten irradians*)^[18-19], 文蛤(*Meretrix meretrix*)^[20-21]和缢蛏^[22]。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)被广泛应用于遗传连锁图谱构建、关联分析、分子标记辅助育种和品种鉴定等方面, 具有巨大的应用前景^[23-25]。目前, 在水产动物中大多利用生长及免疫相关基因进行生长和抗病关联性分析的研究, 如已有斑马鱼(*Denio rerio*)^[26]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[27]、文蛤^[28]、缢蛏^[29]和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[30]等相关基因的SNPs的筛选, 为水产动物分子标记辅助育种奠定了基础。

缢蛏*ScHsc70*基因与耐高温性状的关联分析未见相关报道, 本团队在前期研究中已成功克隆了缢蛏*ScHsc70*基因序列(登录号: JF748730)。通过构建耐高温群体和对照组群体, 以*ScHsc70*基因作为候选基因, 通过直接测序法克隆*ScHsc70*基因的DNA全长序列, 比对确定外显子和内含子区域。采用PCR产物直接测序法筛查*ScHsc70*外显子中潜在的SNPs, 然后利用Sanger法对2个群体中相应SNPs进行基因分型, 通过与耐高温性状的关联分析, 获得与耐高温性状相关的SNPs和单倍型, 为缢蛏的分子标记辅助育种提供有效的候选分子标记。

1 材料与方法

1.1 实验材料

缢蛏“申浙1号”养殖新品种是以国内6个自然群体为基础群体, 采用传统的群体选育方法, 以生长快、存活率高为主要选育指标, 经过连续5代选育获得的^[31]。用于实验的缢蛏新品

种均采自浙江宁海养殖基地。9月龄时, 随机选取600个缢蛏个体, 低温包装带回实验室暂养。

1.2 实验方法

缢蛏耐高温群体的构建 将取回后的缢蛏暂养1周后, 分成编号为1和2的两组, 分别养殖在0.6 m × 0.8 m × 0.5 m的塑料箱中, 1组260个个体于常温(32 ± 0.5) °C下养殖; 2组260个个体于(35.5 ± 0.5) °C恒温养殖, 海水比重为1.019 ± 0.001。每天分早晚2次定时投喂牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)和湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhanjiangensis*)的混合液, 72 h后对存活个体进行随机取样, 2组存活个体视为耐高温群体, 1组存活个体作为对照组。

基因组DNA的提取 采用TIANamp Marine Animals DNA Kit (TIANGEN)试剂盒, 各提取120个缢蛏耐高温群体个体和对照组群体个体外套膜基因组DNA, 实验方法参照试剂盒说明书。提取的DNA经1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 并用超微量分光光度计(D2000)检测其浓度和纯度, -20 °C保存备用。

ScHsc70 DNA基因的克隆 根据NCBI数据库中缢蛏*ScHsc70*基因序列(登录号: JF748730), 利用Primer premier 5.0设计3对特异性引物(表1), 3对引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 以上述提取的DNA为模板, 采用PCR技术分别扩增*ScHsc70*基因片段。PCR扩增反应体系为30 μL: 2×Taq PCR master Mix 15 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.9 μL, DNA模版 1.2 μL, ddH₂O 12 μL。扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测到PCR产物具有特异性条带后, 将不同片段大小的特异性条带分别进行割胶回收、纯化后与载体pMD19-T连接, 转化至大肠杆菌感受态细胞, 阳性单克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 用BioEdit软件进行序列比对与拼接。

ScHsc70 SNPs筛选 从构建的耐高温群体和对照组群体中各随机选取20个缢蛏基因组DNA, 利用引物(表1)扩增*ScHsc70*基因的部分外显子片段, PCR产物经大肠杆菌感受态细胞连接转化后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 用DNAMAN软件比对分析序列及寻找SNPs位点。

缢蛏*ScHsc70*基因SNPs分型 上海迈

表 1 缙蛭 *ScHsc70* 基因引物信息Tab. 1 The primer of *ScHsc70* gene of *S. constricta*

引物名 primer	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 usage	退火温度/°C annealing temperature
HSP70-F1	TCAGGGAAACAGGACCAC	DNA序列克隆	54.4
HSP70-R1	TACGCATACGACGCACAG	DNA序列克隆	55.2
HSP70-F2	TTCGACTTAGGAGCGGTAC	DNA序列克隆	57.1
HSP70-R2	CTGGAGCAACTTCTGGATCTTC	DNA序列克隆	58.3
HSP70-F3	TGCGTCGTCTGCGTATTGC	DNA序列克隆	59.0
HSP70-R3	ACCCTCCAGTTCCTTCTGCTT	DNA序列克隆	58.6
HSP-E04-F	TGATGTCACAGATTGTGGCG	第4外显子克隆	57.0
HSP-E04-R	GGTGAAACTGCGAAAATGTG		
HSP-E05-F	CGTCCTTCCTTGGATGCTGAACC	第5外显子克隆	57.0
HSP-E05-R	TTACATTCATTAGCTCACAAAAGT		
HSP-E06-F	GCAATGATAGATTGGCTCTGTTTG	第6外显子克隆	57.0
HSP-E06-R	GTTGTAAAACACACCACAGATGG		

浦生物科技有限公司采用Sanger测序法, 成功检测107个对照组个体和111个耐高温个体的SNPs基因分型, 使用测序仪(3730 xl)进行测序, 用DNA Sequencing analysis软件分析测序结果, 用Sequencing analysis 5.2.0软件进行解读, 并用Sequencher 5.1软件包进行比对分析。

数据统计分析 采用POPGENE version 1.32软件计算有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)等遗传多样性参数; Chi-square检验估计群体Hardy-Weinberg平衡偏离; 用SPSS 20.0软件进行卡方(χ^2)检验, 分析各SNP位点与缙蛭耐高温性状的相关性, 连锁不平衡分析采用Haploview 4.2软件进行, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 *ScHsc70* DNA基因序列克隆

序列总长度为4 048 bp, 编码区1 950 bp, 6个内含子, 7个外显子, 第4外显子最长554 bp, 第3外显子最短为153 bp, 内含子长度在237~494 bp之间, 内含子符合GT-AG剪接规则(登录号: MK 140678)。经序列比对发现6个候选SNPs位点, 且都在第4~5外显子中, 以起始密码子TAA第1个的碱基开始编号, 以突变位置和碱基突变类型进行命名: Rs1(g. 588 C>T)、Rs2(g. 840 C>T)、Rs3

(g. 885 T>A)、Rs4(g. 1233 A>G)、Rs5(g. 1467 T>G)、Rs6(g. 1482 T>C) (表2)。其中4个转换, 2个颠换, 6个SNPs位点中氨基酸没有发生改变。

表 2 缙蛭 *ScHsc70* 基因6个SNPs位点的突变信息Tab. 2 The 6 SNPs loci mutation information of *ScHsc70* gene in *S. constricta*

名称 name	外显子区域 exon region	碱基突变类型 base mutation type	氨基酸突变类型 amino acid mutation type
Rs1	4	转换	亮氨酸(L)-亮氨酸(L)
Rs2	4	转换	丙氨酸(A)-丙氨酸(A)
Rs3	4	颠换	苏氨酸(T)-苏氨酸(T)
Rs4	5	转换	苏氨酸(T)-苏氨酸(T)
Rs5	5	颠换	丝氨酸(S)-丝氨酸(S)
Rs6	5	转换	丝氨酸(S)-丝氨酸(S)

2.2 遗传多样性分析

利用重测序方法对“申浙1号”缙蛭对照群体和耐高温群体SNPs位点基因进行分型。共获得218个有效个体, 对照组107个, 耐高温群体111个。在对照组群体中, 多态性信息含量(PIC)的范围为0.196 2~0.371 8, 其中Rs1和Rs4属于中度多态($0.25 < PIC < 0.50$), 其余为低度多态($PIC < 0.25$); 在耐高温群体中, 多态性信息含量(PIC)的范围0.111 2~0.351 9, 其中Rs1、Rs4和Rs6属于中度多态($0.25 < PIC < 0.50$), 其余为低度多态

($PIC < 0.25$)。 χ^2 检验表明, 在对照组群体中, 除 Rs3 和 Rs5 不符合 Hardy-Weinberg 平衡外 ($P < 0.05$), 其余都符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$); 在耐高温

群体中, 除 Rs5 不符合 Hardy-Weinberg 平衡外 ($P < 0.05$), 其余都符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 3 6 个 SNPs 位点在缙蛭对照组群体和耐高温群体中的遗传多样性信息

Tab. 3 The genetic polymorphism information of 6 SNPs loci in control groups and resistant groups from *S. constricta*

位点 locus	对照组群体 (107 个) control group					耐高温群体 (111 个) resistant groups				
	N_e	H_e	H_o	PIC	H-W (P)	N_e	H_e	H_o	PIC	H-W (P)
Rs1	1.950 8	0.487 4	0.467 3	0.368 6	0.634 7	1.809 6	0.449 4	0.531 5	0.347 3	0.052 9
Rs2	1.306 0	0.234 3	0.196 3	0.206 8	0.080 7	1.113 4	0.118 7	0.108 1	0.111 2	0.330 0
Rs3	1.352 9	0.260 9	0.196 3	0.226 8	0.008 5	1.164 7	0.142 1	0.135 1	0.131 5	0.623 1
Rs4	1.975 2	0.493 7	0.476 6	0.371 8	0.684 5	1.837 6	0.457 9	0.540 5	0.351 9	0.055 8
Rs5	1.282 9	0.220 5	0.177 6	0.196 2	0.036 8	1.338 9	0.254 2	0.207 2	0.221 0	0.048 2
Rs6	1.364 8	0.267 3	0.299 1	0.231 6	0.233 3	1.430 9	0.302 5	0.315 3	0.255 8	0.652 3
mean	1.538 8	0.327 4	0.302 2	0.267 0	0.279 7	1.449 2	0.287 5	0.306 3	0.236 5	0.293 7

注: N_e 代表有效等位基因数, H_e 代表期望杂合度, H_o 代表观测杂合度, PIC 代表多态信息含量, H-W 代表 Hardy-Weinberg 平衡; $P < 0.05$ 表示差异性显著; 下同

Notes: N_e represents effective number of alleles, H_e represents expected heterozygosity, H_o represents observed heterozygosity, PIC represents polymorphism information content, H-W represents Hardy-Weinberg equilibrium; $P < 0.05$ is considered to be statistically significant; the same below

2.3 缙蛭 SNPs 与耐高温性状的关联性分析

采用 SPSS20.0 软件分析 *ScHsc70* 基因的 6 个 SNPs 在对照群体和耐热性群体中的基因型分布频率、等位基因频率、卡方检验及其与高温抗性的相关性。结果显示, 仅 Rs1、Rs3 和 Rs4 的基因型频率和等位基因频率在对照组和耐高温群体之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 表明这 3 个位点与耐高温性状显著相关 ($P < 0.05$) (表 4); 利用 Haploview 4.2 软件中的 Four Gamete Rule 计算方法对 *ScHsc70* 基因的 SNPs 进行连锁不平衡分析 (图 1), 6 个 SNPs 可形成 2 个连锁不平衡单倍块和 7 种单倍型, 其中仅有 CCT 单倍型与耐高温性状显著相关 ($P < 0.05$) (表 5)。此外, 本实验发现 Rs2 和 Rs3 处于连锁状态 ($r^2 = 0.86$, $LOD = 25.56$, $Dx = 1.0$), 可以作为缙蛭耐高温遗传育种的 SNP 标签 (图 1)。

3 讨论

3.1 HSP70 的功能

在植物信号传导途径中, 环境改变如高温、高盐和细菌侵染会导致胞质内蛋白质变性, 变性的蛋白质聚集, 进而引起热休克蛋白 70/90 和热激转录因子 HsfA/B 的积累, 热激蛋白使变性的蛋白质复性, 具有分子伴侣的功能, 有助于高温下保持和恢复蛋白质的活性结构^[32]。

HSP70 作为应激保护蛋白, 高温刺激下可诱导机体的 HSP 合成增加, 使生物体抵抗应激物的侵害, 从而维持细胞的稳态和存活^[11]。菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)^[33] 在高温胁迫 12 h 后体内 HSP70 达到最高峰, 可能促进异常蛋白的恢复。Nakano 等^[34] 对潮间杜父鱼 (*Cottus spp.*) 研究表明, 当机体内 HSP70 储存较多时机体具有更大的热耐受能力, 能够适应更大的温差变化。淡水海绵 (*Ephydatia fluviatilis*)^[35] 受亚致死热刺激后, 表现出较强的抵抗力。冯冰冰等^[22] 在缙蛭弧菌感染实验发现, 其肝脏中 *ScHsc70* mRNA 水平在一段时间后会大量表达。贝类的高温耐受性是一个非常复杂的过程, 高温性状是由多个基因控制, 贝类耐热性分子机制尚未可知, 本实验中以 *ScHsc70* 作为缙蛭耐高温选育的候选基因进行两个群体间 SNPs 与耐高温性状的关联性分析, 为后续的抗逆性相关 SNPs 筛选提供理论基础。

3.2 遗传多样性分析

SNP 标记是鉴定数量性状基因座位、发现致病基因^[24] 的一种有效方法, 通过不同表现型与 SNPs 间的相关性进行分子标记辅助选择, 可以提高筛选效率。徐田军等^[36] 在牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 野生群体 MHC-DAA 基因中筛选出与抗病相关的等位基因。大多数 SNPs 位于基因组的

表 4 缙蛭*ScHsc70*基因在对照组群体和耐高温群体的SNPs统计分析

Tab. 4 The SNPs statistical analysis of *S. constricta ScHsc70* gene in control group and resistant group

位点 locus	基因型 genotype	基因型频率 genotype frequency		χ^2	P	等位基因 allele	等位基因频率 allele frequency		χ^2	P
		对照组群体 control group	耐高温群体 resistant group				对照组群体 control group	耐高温群体 resistant group		
Rs1	CC (81)	37/0.346	44/0.396	6.420	0.040	C	179/0.579	147(0.662)	3.170	0.006
	TT (28)	20/0.187	8/0.072				149/0.421	75(0.338)		
	TC (109)	50/0.467	59/0.532							
Rs2	TT (17)	4/0.037	1/0.009	5.764	0.056	T	29(0.136)	14(0.937)	6.434	0.011
	CC (173)	82/0.766	98/0.883				185(0.864)	208(0.063)		
	TC (25)	21/0.196	12/0.108 1							
Rs3	TT (167)	80/0.748	95/0.856	6.181	0.045	A	33(0.154)	17(0.077)	6.468	0.011
	AA (11)	6/0.056	1/0.009				181(0.846)	205(0.923)		
	TA (37)	21/0.196	15/0.135							
Rs4	AA (32)	22/0.206	9/0.081	7.150	0.028	A	95(0.444)	78(0.351)	4.235	0.040
	GG (72)	33/0.308	42/0.378				117(0.556)	144(0.649)		
	GA (110)	51/0.477	60/0.541							
Rs5	TT (166)	84/0.785	83/0.748	0.778	0.678	G	25(0.126)	25(0.149)	0.000	0.986
	GG (6)	3/0.028	5/0.045				187(0.874)	186(0.851)		
	TG (42)	19/0.178	23/0.207							
Rs6	TT (4)	1/0.009	3/0.027	1.114	0.573	T	34(0.159)	41(0.815)	0.509	0.475
	CC (147)	74/0.692	73/0.658				180(0.841)	181(0.185)		
	TC (64)	32/0.299	35/0.315							

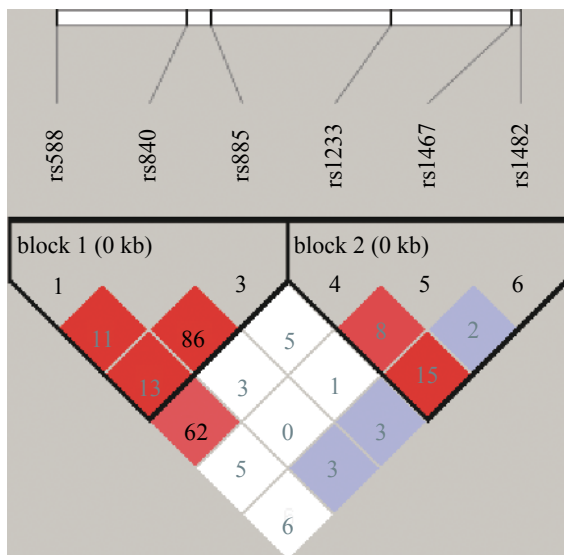


图 1 缙蛭*ScHsc70*基因SNPs连锁不平衡分析
标记之间显示配对LD值(r^2); 阴影代表标记之间所处的连锁状态

Fig. 1 Linkage disequilibrium map showing the pairwise LD between the SNPs of *ScHsc70* gene in *S. constricta*

The values inside the squares indicate the LD values (r^2) of the two SNPs; the chain states between the marks were indicated by shadow

非编码区, 对蛋白质无直接影响, 这一类SNPs作为遗传标记在群体遗传和生物进化研究中有着很重要的作用^[37-38]。Halushka等^[39]根据对75个基因的检测推测, 人类基因组中大约存在100万个SNPs位点, 其中50万个在非编码区, 20~40万个在编码区, 而分布在编码区的非同义突变只有2.4~4万个。Weber等^[40]认为编码区的SNPs位点具有更高的遗传稳定性。

本实验中克隆得到*ScHsc70*基因的全长4 048 bp, 包含7个外显子和6个内含子, 在7个外显子中初步筛选出6个潜在SNP位点(表2), 分布密度为1/494 bp。长牡蛎(*C. gigas*)外显子编码区SNPs的分布密度为1/60 bp^[41], 缙蛭生长因子受体结合蛋白2基因外显子上SNPs的分布密度为1/65 bp^[42], 说明不同物种、同一物种不同基因外显子上SNPs的分布密度不同。另外, 6个SNPs中4个变异位点为转换, 2个变异位点为颠换, 4个转换, 变异类型中C→T变异最多, 可能是因为CpG二核苷酸上的胞嘧啶残基是人类基因组中最易发生突变的位点, 其中大多数是甲基化的, 可自发地脱去氨基而形成胸腺嘧啶^[43]。

表5 缙蛭*ScHsc70*基因单倍型与耐高温性状的关联分析Tab. 5 Association analysis of *ScHsc70* haplotypes with resistance to high temperature for *S. constricta*

单倍块 haploblock	单倍型 haplotype	分布频率 distribution frequency	耐高温群体频率 resistant group frequency	对照组群体频率 control group frequency	χ^2	<i>P</i>
1	CCT	0.134	63/0.572	45/0.425	4.710	0.030
	TCT	0.148	38/0.338	45/0.421	1.414	0.234
	CTA	0.199	9/0.077	15/0.136	1.943	0.163
2	GTC	0.097	35/0.315	30/0.277	0.318	0.573
	ATC	0.105	39/0.351	47/0.438	1.762	0.184
	GGC	0.090	21/0.185	13/0.120	1.897	0.168
	GTT	0.067	17/0.149	17/0.159	0.014	0.907

3.3 缙蛭*ScHsc70*基因SNPs多态性与耐高温的相关性

本实验以新品种“申浙1号”为基础群体, 通过高温胁迫构建耐高温群体, 与对照组间的存活率存在显著性差异, 说明温度胁迫对受试个体可产生区分度, 群体遗传结构可能会发生变化。耐高温群体和对照组群体6个SNPs基因分型中, 所有位点多态性信息含量位于0.111 2~0.371 8之间, 对照群体的平均多态信息含量高于耐高温群体的多态信息含量, 很大原因是经过耐高温实验导致的。经过连续多代的人工选择, 多态信息含量出现多个低度多态位点($PIC < 0.25$)^[44]有一定程度的下降。本实验中获得的3个SNPs与耐高温性状显著相关, 可以作为耐高温遗传育种的候选分子标记辅助育种。

在对照组群体中, Rs3和Rs5不符合Hardy-Weinberg平衡($P < 0.05$), 在耐高温群体中, Rs5不符合Hardy-Weinberg平衡($P < 0.05$)(表3), 两个群体遗传多样性发生轻微的变化, 且部分SNPs基因型频率和等位基因频率发生差异(表4), 这可能是由于经过第一代耐高温选育, 与抗热性相关的SNPs的基因型和等位基因在选育过程中被定向选择导致的。在抗性群体的构建过程中, SNPs偏离Hardy-Weinberg平衡现象的出现, 可以作为与抗性相关的初步推断^[45]。

连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)是一条染色体上2个等位基因间的非随机相关。理论上, LD的强度与2个SNP间的距离有关, 距离越小, 发生重组的机会越小, LD越强, 反之亦然。 r^2 和 D_x 来度量LD的强弱^[46], 当 $D_x > 0.33$, $r^2 > 0.1$ 认为是有意义的连锁不平衡^[47]。在研究SNPs

与疾病的相关性时, 运用单倍型连锁不平衡分析与抗病性的关联分析更能说明问题^[48]。本实验通过连锁不平衡分析获得一个单倍型(CCT)与耐高温性状显著相关($P < 0.05$), 同时发现一个SNP标签, 可以作为耐高温新品种培育的候选分子标记。

SNP已经广泛应用于水产养殖育种进程中, 目前多以鱼类研究为主, 且主要集中在与生长^[49]、抗性^[26-27]相关等领域; 海洋贝类中多集中在生长^[29]相关领域, 未见与抗逆性相关的报道。从高产到高品质、抗逆性是水产种业发展的趋势, 分子标记辅助育种是培育高品质、抗逆性新品种的有效手段。关于贝类抗逆性相关的候选基因比较少, 后期应构建精密的遗传连锁图谱, 加强全基因组学、基因组选择育种和功能基因组学的研究, 寻找与抗性相关的候选基因, 借助分子标记辅助育种技术快速高效的培育优良抗逆性新品种。

孟德龙为同等贡献第一作者。

参考文献:

- [1] 徐凤山, 张素萍. 中国海产双壳类图志[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
Xu F S, Zhang S P. An illustrated bivalvia mollusca fauna of China Seas[M]. Beijing: Science Press, 2008(in Chinese).
- [2] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴2017[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 27, 54.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. China Fishery Statistical Yearbook

- 2017[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 27, 54(in Chinese).
- [3] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴2017[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 23, 50.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. China Fishery Statistical Yearbook 2017[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 23, 50(in Chinese).
- [4] 杨红生, 张涛, 王萍, 等. 温度对墨西哥湾扇贝耗氧率及排泄率的影响[J]. 海洋学报, 1998, 20(4): 91-96.
- Yang H S, Zhang T, Wang P, *et al.* Effects of temperature on oxygen consumption and ammonia-N excretion of the southern bay scallop *Argopecten irradians concentricus*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 1998, 20(4): 91-96(in Chinese).
- [5] 王俊, 姜祖辉, 唐启升. 栉孔扇贝耗氧率和排氨率的研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(9): 1157-1160.
- Wang J, Jiang Z H, Tang Q S. Oxygen consumption and ammonia-N excretion rates of *Chlamys farreri*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(9): 1157-1160(in Chinese).
- [6] 林君卓, 许振祖. 温度和盐度对文蛤幼体生长发育的影响[J]. 福建水产, 1997, 19(1): 27-33.
- Lin J Z, Xu Z Z. The effects of temperature and salinity on the development of *Meretrix meretrix* larvae[J]. Journal of Fujian Fisheries, 1997, 19(1): 27-33(in Chinese).
- [7] 刘贤德, 闫玉华, 王志勇, 等. 杂色鲍对高温和低盐耐受力的初步研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2008, 13(4): 301-303.
- Liu X D, Yan Y H, Wang Z Y, *et al.* A preliminary study on tolerance to high temperature and low salinity of *Haliotis diversicolor reeve*[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2008, 13(4): 301-303(in Chinese).
- [8] Lindquist S. The heat-shock response[J]. Annual Review of Biochemistry, 1986, 55: 1151-1191.
- [9] Lindquist S, Craig E A. The heat-shock proteins[J]. Annual Review of Genetics, 1988, 22: 631-677.
- [10] Martin J, Hartl F U. Molecular chaperones in cellular protein folding[J]. BioEssays, 1994, 16(9): 689-692.
- [11] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology[J]. Pharmacology & Therapeutics, 1998, 80(2): 183-201.
- [12] Sørensen J G, Kristensen T N, Loeschke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins[J]. Ecology Letters, 2003, 6(11): 1025-1037.
- [13] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. Nature, 2012, 490(7418): 49-54.
- [14] Zhang Z H, Zhang Q Z. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu²⁺ and malachite green[J]. Gene, 2012, 497(2): 172-180.
- [15] Rathinam A V, Chen T T, Grossfeld R M. Cloning and sequence analysis of a cDNA for an inducible 70 kDa heat shock protein (Hsp70) of the American oyster (*Crassostrea virginica*)[J]. DNA Sequence, 2000, 11(3-4): 261-264.
- [16] Piano A, Valbonesi P, Fabbri E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals[J]. Cell Stress & Chaperones, 2004, 9(2): 134-142.
- [17] Franzellitti S, Fabbri E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 336(4): 1157-1163.
- [18] 吴龙涛, 宋林生, 胥炜, 等. 栉孔扇贝热休克蛋白70基因cDNA的克隆与分析[J]. 高技术通讯, 2003, 13(11): 75-79.
- Wu L T, Song L S, Xu W, *et al.* Identification and cloning of heat shock protein 70 gene from scallop *Chlamys farreri*[J]. High Technology Letters, 2003, 13(11): 75-79(in Chinese).
- [19] Song L S, Wu L T, Ni D J, *et al.* The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21(4): 335-345.
- [20] Yue X, Liu B Z, Sun L, *et al.* Cloning and characterization of a hsp70 gene from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* which is involved in the immune response against bacterial infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(3): 791-799.
- [21] Liu T, Pan L Q, Cai Y F, *et al.* Molecular cloning and

- sequence analysis of heat shock proteins 70 (HSP70) and 90 (HSP90) and their expression analysis when exposed to benzo(a)pyrene in the clam *Ruditapes philippinarum*[J]. *Gene*, 2015, 555(2): 108-118.
- [22] 冯冰冰, 牛东红, 钟玉民, 等. 缢蛏*ScHsc70* cDNA的分子特性和表达分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 33-44.
Feng B B, Niu D H, Zhong Y M, *et al.* Molecular characteristics and expression analysis of *ScHsc70* cDNA in agamaki clam (*Sinonovacula constricta*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(1): 33-44(in Chinese).
- [23] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4): 1-37.
- [24] Xu T J, Chen S L, Ji X S, *et al.* MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 213-221.
- [25] Rasal K D, Chakrapani V, Pandey A K, *et al.* Status and future perspectives of single nucleotide polymorphisms (SNPs) markers in farmed fishes: way ahead using next generation sequencing[J]. *Gene Reports*, 2017, 6: 81-86.
- [26] 王倩, 尤锋, 辛梦娇, 等. 斑马鱼*GSTM*单核苷酸多态性与低温耐受性的相关分析[J]. 海洋科学, 2015, 39(1): 1-7.
Wang Q, You F, Xin M J, *et al.* Correlation analysis between polymorphisms of *GSTM* gene and cold—tolerance trait in zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Marine Sciences*, 2015, 39(1): 1-7(in Chinese).
- [27] Kongchum P, Palti Y, Hallerman E M, *et al.* SNP discovery and development of genetic markers for mapping innate immune response genes in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(2): 356-361.
- [28] Nie Q, Yue X, Liu B Z. Development of *Vibrio* spp. infection resistance related SNP markers using multiplex SNaPshot genotyping method in the clam *Meretrix meretrix*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(2): 469-476.
- [29] 谢淑媚, 牛东红, 阮海灯, 等. 缢蛏*IGFBP*基因结构及生长性状相关SNP筛选[J]. 水产学报, 2015, 39(6): 799-809.
Xie S M, Niu D H, Ruan H D, *et al.* Molecular characterization of *IGFBP* and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 799-809(in Chinese).
- [30] Zhao X L, Guo L L, Zhang Y L, *et al.* SNPs of hemocyanin C-terminal fragment in shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(4): 403-410.
- [31] 李练星, 李浩, 杜文俊, 等. 缢蛏选育系F₃的生长优势比较及育种效应分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(1): 50-56.
Li L X, Li H, Du W J, *et al.* Growth comparison and selective breeding of a fifth-generation selected line of *Sinonovacula constricta*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(1): 50-56(in Chinese).
- [32] Yokotani N, Ichikawa T, Kondou Y, *et al.* Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2008, 227(5): 957-967.
- [33] Nie H T, Liu L H, Huo Z M, *et al.* The *HSP70* gene expression responses to thermal and salinity stress in wild and cultivated Manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. *Aquaculture*, 2017, 470: 149-156.
- [34] Nakano K, Iwama G K. The 70 kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133(1): 79-94.
- [35] Müller W E G, Koziol C, Dapper J, *et al.* Combinatory effects of temperature stress and nonionic organic pollutants on stress protein (hsp70) gene expression in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1995, 14(7): 1203-1208.
- [36] 徐田军, 陈松林. 牙鲆*MHC-DAA*结构及其等位基因多态性[J]. 遗传, 2009, 31(10): 1020-1028.
Xu T J, Chen S L. Genomic structure of *DAA* gene and polymorphism within *MHC-DAA* alleles in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2009, 31(10): 1020-1028(in Chinese).
- [37] 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.

- [38] Syvänen A C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(12): 930-942.
- [39] Halushka M K, Fan J B, Bentley K, *et al.* Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis[J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(3): 239-247.
- [40] Weber J L, Wong C. Mutation of human short tandem repeats[J]. *Human Molecular Genetics*, 1993, 2(8): 1123-1128.
- [41] Sauvage C, Bierne N, Lapègue S, *et al.* Single nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Gene*, 2007, 406(1-2): 13-22.
- [42] 赵家熙, 崔宝月, 董迎辉, 等. 缙蛭生长因子受体结合蛋白2基因克隆、时空表达及SNP筛查[J]. *海洋学报*, 2018, 40(2): 87-94.
- Zhao J X, Cui B Y, Dong Y H, *et al.* Cloning, spatiotemporal expression and SNPs identification of *GRB2* gene in *Sinonovacula constricta*[J]. *Haiyang Xuebao*, 2018, 40(2): 87-94(in Chinese).
- [43] Brookes A J. The essence of SNPs[J]. *Gene*, 1999, 234(2): 177-186.
- [44] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [45] 曹建萌, 胡欣欣, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼补体C9基因单核苷酸多态性及其与抗无乳链球菌感染的关联分析[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(3): 354-365.
- Cao J M, Hu X X, Lu M X, *et al.* SNPs of *C9* gene and their association with resistance to the infection of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(3): 354-365(in Chinese).
- [46] 周靖晶. 中国人群年龄相关性黄斑变性与其基因及环境因素的关联研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- Zhou J J. Association of genetic and environmental factors with age-related macular degeneration in a Chinese population[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013(in Chinese).
- [47] Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes[J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(2): 139-144.
- [48] Drysdale C M, McGraw D W, Stack C B, *et al.* Complex promoter and coding region β_2 -adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict *in vivo* responsiveness[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(19): 10483-10488.
- [49] 王沈同, 张猛, 沈玉帮, 等. 草鱼GH基因3'部分序列多态性与生长性状及肌肉成分的相关性分析[J]. *水产学报*, 2017, 41(9): 1329-1337.
- Wang S T, Zhang M, Shen Y B, *et al.* Polymorphisms of the *GH* gene 3' partial sequence and their associations with growth traits and muscle composition in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(9): 1329-1337(in Chinese).

***ScHsc70* gene SNP markers screening and correlation analysis for high temperature resistance of *Sinonovacula constricta* new variety “Shenzhe NO. 1”**

XUE Baobao, MENG Delong, REN Hongyu, SHEN Benlong,
NIU Donghong, LI Jiale*, SHEN Heding*

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To obtain single nucleotide polymorphism (SNP) markers of heat shock protein 70 (*ScHsc70*) gene related to heat tolerance traits in *Sinonovacula constricta*, the full-length sequence of *ScHsc70* gene was cloned by direct sequencing. The results showed that the *ScHsc70* gene was 4 048 bp, including 6 introns and 7 exons, and the coding region was 1 950 bp. The high temperature resistance group and control group from a new variety of razor clam were established, and six potential SNPs Rs1 (g.588 C > T), Rs2 (g.840 C > T), Rs3 (g.885 T > A), Rs4 (g.1233 A > G), Rs5 (g.1467 T > G), Rs6 (g.1482 T > C) were screened from the exon region of *ScHsc70* gene by PCR product direct sequencing. SNPs genotyping was performed on the high temperature tolerant population and the control population of the new variety “Shenzhe No.1” by Sanger sequencing. The results of genetic diversity analysis showed that the polymorphism information content (PIC) of the two populations was between 0.111 2 and 0.371 8, and the average polymorphism information content of the control population was 0.267 0, which is higher than that of the high temperature resistant populations (0.236 5). Association analysis results showed that the genotype frequency and allele frequency of Rs1, Rs3 and Rs4 were significantly different between control group and high temperature tolerant group. Haploid linkage disequilibrium analysis showed that SNPs markers of *ScHsc70* gene could form 2 haploid blocks and 7 haplotypes, among which CCT haplotypes were significantly correlated with high temperature tolerance traits. It was found that Rs2 and Rs3 were in a linkage state ($r^2 = 0.86$, LOD = 25.56, Dx = 1.0), and could be used as SNP markers for the Genetic breeding of *S. constricta* for high temperature tolerance. In summary, Rs1, Rs3, Rs4 and haplotype CCT can be used as candidate auxiliary molecular markers for high temperature tolerance breeding of razor clam, which lays a theoretical foundation for the subsequent functional verification of resistance-related SNPs.

Key words: *Sinonovacula constricta*; HSP70 gene; single nucleotide polymorphism; high temperature resistance; linkage disequilibrium

Corresponding author: LI Jiale. E-mail: jlli@shou.edu.cn; SHEN Heding. E-mail: hdshen@shou.edu.cn

Funding projects: National High-tech Research and Development Program (2012AA10A400-3); Shanghai University Knowledge Service Platform Shanghai Ocean University Aquatic Animal Genetic Breeding Center (ZF1206)