



泥蚶生长性状与SSR标记的相关性

邵艳卿¹, 方军¹, 田野^{1,2}, 滕爽爽¹, 张雷雷¹, 柴雪良^{1*}

(1. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室,
中国水产科学研究院海洋贝类工程技术研究中心, 浙江温州 325000;

2. 温州医科大学, 浙江温州 325000)

摘要: 泥蚶生长性状属于数量性状, 为了筛选与泥蚶生长性状位点连锁的分子标记, 本研究以150颗选育品系F₄泥蚶为对象, 利用12个SSR位点进行生长性状关联分析。对生长性状的相关分析表明, 各数量性状之间的相关系数均达到极显著水平, 其中壳高与活体质量的相关系数最大(0.930), 壳长与活体质量次之(0.927); 但通径分析显示, 对活体质量直接影响最大的是壳宽(0.431), 壳长次之(0.332), 决定系数与以上通径分析结果的变化趋势一致。应用SSR位点对选育品系F₄泥蚶进行遗传多样性分析, 共检测到61个等位基因, 等位基因数(N_a)为3~8个, 平均等位基因和有效等位基因(N_e)分别为5.083和3.038; 平均观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态性信息含量(PIC)分别为0.528、0.646和0.594, 表明该群体遗传多样性处于较高水平。SSR位点与生长性状相关性分析, 结果获得3个标记与生长性状具有显著相关性, 其中标记3012-2与壳长、壳宽、壳顶宽显著相关, 标记3564与壳高、放射肋宽显著相关, 标记2692与壳长显著相关, 据此初步确定为与生长性状相关的候选标记。本研究旨在为泥蚶的遗传改良和选择育种提供基础资料。

关键词: 泥蚶; SSR标记; 生长性状; 相关分析

中图分类号: Q 347; S 968.3

文献标志码: A

泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国四大传统养殖贝类之一, 已成为我国浙江、福建、广东等沿海省市重要的海水养殖经济贝类。随着养殖业快速发展, 因长期未经有效地选育和种质保护, 泥蚶养殖群体的遗传多样性已有所降低, 种质出现退化^[1]。为促进泥蚶养殖业的可持续健康发展, 迫切需要对其开展遗传育种改良工作。

选择育种是传统经典育种技术之一, 目前国内相关研究单位已开展了泥蚶选择育种研究^[2-3]。传统选育方法是依据表型而非基因型进行选择, 周期长、效率低, 而利用分子标记技术研究其遗传背景, 筛选与重要经济性状紧密

相关的分子标记, 可实现早期选种、提高选种准确性及缩短世代间隔, 从而大大加快新品种的培育进程。微卫星又称简单序列重复(simple sequence repeats, SSR), 作为分析与重要经济性状的遗传连锁关系理想的分子标记, 已经被广泛应用于文蛤(*Meretrix meretrix*)^[4]、马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)^[5]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[6]、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[7]等生长性状的相关研究中。目前国内外对泥蚶的研究还大多只是简单的微卫星标记开发和遗传多样性分析^[3,8-10], 与泥蚶生长性状相关的分子标记研究尚不多见, 仅见滕爽爽等^[11]对

收稿日期: 2019-04-17 修回日期: 2019-06-26

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901405); 国家水产种质资源共享服务平台(2018DKA30470); 浙江省科技计划项目(2017F30042)

通信作者: 柴雪良, E-mail: cxl-5888@163.com

泥蚶G₂家系的SSR相关性分析。本研究所用泥蚶群体为经过人工选育的F₄速生群体,通过群体遗传结构分析,筛选与生长性状相关的分子标记,以期为泥蚶经济性状的间接选择提供参考数据,同时也为经济性状的QTL定位和进一步分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验贝及表型性状的测量

本研究采用的泥蚶样品为浙江省海洋水产养殖研究所多年人工选育的速生品系材料,速生品系是本课题组以浙江乐清湾泥蚶为基础群,以快速生长为选育目标,采用家系与群体选育技术,经过4代优选,培育出生长快速的泥蚶。于7月底随机取同繁同池养殖的2龄泥蚶150颗用于实验。根据张永普等^[12]的测量方法进行壳长(shell length, SL)、壳宽(shell width, SW)、壳高(shell height, SH)、壳顶宽(umbo width, UW)、外韧带长(outer ligament length, OLL)、放射肋宽(radial rib width, RW)、背缘长(dorsal brim length, DBL)和体质量(body weight, BW)等表型性状的测定和计算,并活体解剖取其肌肉组织,置于-80 °C超低温冰箱中保存,用于基因组DNA提取。

1.2 DNA提取及引物设计

取泥蚶肌肉,用常规的酚/氯仿/异戊醇法抽提基因组DNA。用紫外分光光度计测定OD₂₆₀与OD₂₈₀,确定DNA的质量和浓度,并用无菌水统一调至100 ng/μL,于-20 °C保存备用。

本实验所用EST-SSR引物序列全部来自田野等^[3]已发表的引物。所有引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 PCR扩增及电泳检测

PCR反应体系总体积为25 μL,包括10×PCR buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各1.0 μL, 5 U/μL rTaq DNA聚合酶(TaKaRa) 0.13 μL, DNA模板1.0 μL, 加灭菌ddH₂O至25 μL。扩增反应均在AG22331型PCR仪(Eppendorf)上完成。

PCR扩增程序:94 °C预变性5 min,进入30个PCR循环[94 °C 30 s,退火温度30 s,72 °C延伸30 s],最后72 °C下延伸7 min。扩增产物利用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,用50 bp

DNA ladder标记等位基因位置,硝酸银染色,电泳胶版自然风干后用于位点统计分析。

1.4 数据分析

采用PopGene (Verion 3.2)软件统计各位点的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)以及哈迪—温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, *HWE*);根据PIC_Cale 0.6软件计算多态性信息含量(*PIC*)。

利用SPSS 19.0软件进行各生长性状的正态分布检验、Pearson相关性计算,剖析相关系数,对影响体质量的贝壳尺寸性状进行通径分析;再利用一般线性模型(general linear model, GLM)中的ANOVA方差分析各SSR位点基因型与生长性状的相关性,并采用Duncan氏法进行多重比较分析。由于一些位点中某些基因型出现太少,缺少分析价值,在实际统计分析中,每种基因型样本至少有6次观测值才被考虑。

2 结果

2.1 生长性状的描述统计

经单样本K-S检验表明,泥蚶的壳长、壳宽、壳高等8个生长性状基本符合正态分布,均表现出连续变化的特点(表1)。由变异系数可知,体质量的变异系数大于壳形态性状,体质量的选择潜力大于壳形态性状。

2.2 壳形态性状与体质量的相关性

所测各表型性状间均具有极显著的相关性($P<0.01$)(表2)。体质量(BW)与其壳形性状的相关系数从大到小依次为壳高(0.930)>壳长(0.927)>壳宽(0.920)>背缘长(0.845)>外韧带长(0.818)>放射肋宽(0.533)>壳顶宽(0.474),均表现为中高度正相关。通过逐步回归分析,剔除差异不显著的壳形态性状,计算得到壳形态性状对体质量的通径系数(直接作用)和间接作用,背缘长、外韧带长、放射肋宽对体质量的影响无显著性差异,被剔除。各形态性状对泥蚶体质量的直接作用中,壳宽(0.431)>壳长(0.332)>壳高(0.251)>壳顶宽(0.040),壳高通过壳宽对体质量的间接影响最大,为0.355(表3)。由表4可知,对泥蚶体质量起决定作用的最大的单参数为壳宽(0.185);就间接决定系数而言,对泥蚶决定系数最大的是壳宽与壳长对体质量的间接决定系数(0.229),甚至超过壳宽的决定系数。因此,以体质量为目标

表 1 泥蚶表型数据统计与正态分布检验

Tab. 1 Phenotypic data statistics of *T. granosa* and normal distribution test

| 性状 traits | 平均值 mean | 标准差 SD | 变异系数/% CV | 偏度 skewness | 峰度 kurtosis | K-S值 K-S value | P值 P value |
|--------------|-------------|-----------|--------------|----------------|----------------|-------------------|---------------|
| 壳长/mm SL | 28.66 | 2.39 | 8.34 | 0.34 | -0.05 | 0.69 | 0.73 |
| 壳宽/mm SW | 19.31 | 1.53 | 7.91 | 0.49 | 0.68 | 1.10 | 0.18 |
| 壳高/mm SH | 21.43 | 1.72 | 8.00 | 0.42 | 0.19 | 1.03 | 0.24 |
| 背缘长/mm DBL | 18.75 | 1.63 | 8.67 | 0.07 | 0.36 | 0.71 | 0.69 |
| 外韧带长/mm OLL | 13.20 | 1.27 | 9.62 | 0.30 | 0.27 | 0.71 | 0.69 |
| 壳顶宽/mm UW | 3.55 | 0.48 | 13.47 | 0.13 | -0.30 | 0.64 | 0.81 |
| 放射肋宽/mm RW | 2.05 | 0.42 | 20.43 | 0.46 | 0.15 | 0.95 | 0.33 |
| 体质量/g BW | 8.42 | 1.83 | 21.71 | 0.76 | 0.91 | 1.42 | 0.04 |

表 2 两性状之间的相关性系数

Tab. 2 Correlation coefficients between two traits

| 性状 traits | 壳长 SL | 壳宽 SW | 壳高 SH | 背缘长 DBL | 外韧带长 OLL | 壳顶宽 UW | 放射肋宽 RW | 体质量 BW |
|--------------|----------|----------|----------|------------|-------------|-----------|------------|-----------|
| 壳长 SL | 1 | 0.801** | 0.922** | 0.870** | 0.833** | 0.457** | 0.539** | 0.927** |
| 壳宽 SW | | 1 | 0.824** | 0.756** | 0.745** | 0.400** | 0.474** | 0.920** |
| 壳高 SH | | | 1 | 0.817** | 0.818** | 0.438** | 0.537** | 0.930** |
| 背缘长 DBL | | | | 1 | 0.863** | 0.392** | 0.501** | 0.845** |
| 外韧带长 OLL | | | | | 1 | 0.466** | 0.463** | 0.818** |
| 壳顶宽 UW | | | | | | 1 | 0.377** | 0.474** |
| 放射肋宽 RW | | | | | | | 1 | 0.533** |
| 体质量 BW | | | | | | | | 1 |

注: **表示两两性状间相关性极显著($P < 0.01$)

Notes: ** indicates significant correlation between two traits at 0.01 level

表 3 泥蚶壳形态性状对体质量影响的通径分析

Tab. 3 Path coefficients of the morphological traits to body weight for *T. granosa*

| 性状 traits | 相关系数(r_{ij}) relative coefficient | 直接作用(P_i) direct effect | 间接作用($r_{ij}P_j$) indirect effect | | | | |
|--------------|--|--------------------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|--------|
| | | | 合计 total | 壳长 SL | 壳高 SH | 壳宽 SW | 壳顶宽 UW |
| 壳长 SL | 0.927 | 0.332 | 0.594 | | 0.231 | 0.345 | 0.018 |
| 壳高 SH | 0.930 | 0.251 | 0.679 | 0.306 | | 0.355 | 0.018 |
| 壳宽 SW | 0.911 | 0.431 | 0.489 | 0.266 | 0.207 | | 0.016 |
| 壳顶宽 UW | 0.474 | 0.040 | 0.434 | 0.152 | 0.110 | 0.172 | |

挑选育种亲贝时, 则以壳宽为优先选择, 同时加强壳长的协同选择。

2.3 SSR标记多态性分析

本研究利用的12个微卫星标记均能在泥蚶样品中稳定地扩增出对应序列, 图1给出了标记3012-2和3564在泥蚶选育群体中部分个体的聚丙

烯酰胺凝胶电泳图。12个标记在选育群体中共检测到61个等位基因, 检测到的 N_e 为1.361~4.145, 平均值为3.038; H_o 为0.427~0.696, 平均值为0.567; H_e 为0.267~0.749, 平均值为0.646; PIC 为0.232~0.718, 平均值为0.592, 除了标记3831多态性水平较低外, 其余11个标记都具有高度多态性($PIC > 0.5$)。经卡方检验, 除了标记3564、3672和

表4 泥蚶壳形态性状对体质量的决定系数

Tab. 4 Determinant coefficients of morphometric traits to the body weight of *T. granosa*

| 性状 traits | 壳长 SL | 壳宽 SW | 壳高 SH | 壳顶宽 UW |
|--------------|----------|----------|----------|-----------|
| 壳长 SL | 0.110 | 0.229 | 0.154 | 0.012 |
| 壳宽 SW | | 0.185 | 0.178 | 0.014 |
| 壳高 SH | | | 0.063 | 0.009 |
| 壳顶宽 UW | | | | 0.002 |

2692符合哈迪—温伯格平衡定律外($P>0.05$), 其他标记都显著偏离了哈迪—温伯格平衡定律($P<0.05$) (表5)。

2.4 SSR标记与生长性状的相关性及基因型分析

运用SPSS软件方差分析法对SSR标记位点与6个生长性状进行连锁显著性检验, 共检测到3个SSR标记与生长性状存在显著性的相关性(表6)。其中标记3012-2分别与壳长、壳宽和壳顶宽显著相关($P<0.05$); 标记3564分别与壳高、放射肋宽显著相关($P<0.05$); 标记2692与壳长显著相关($P<0.05$)。

将泥蚶3个微卫星标记的不同基因型分别与生长性状进行多重比较, 结果显示, 在标记3012-2上, 在所有基因型中, 个体GG基因型的各个生长性状均值都是最大的, 除了壳高外, 在其他性状上都显著高于CE基因型($P<0.05$),

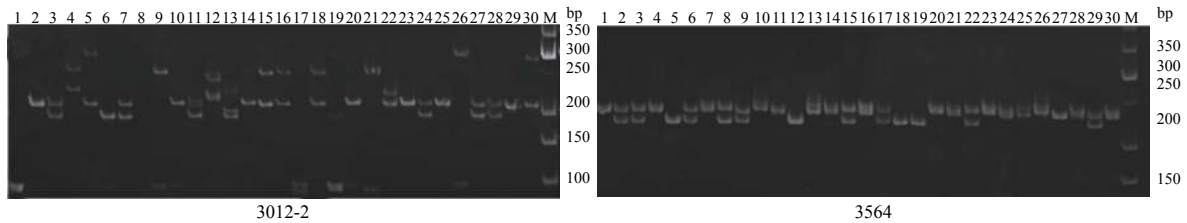


图1 引物3012-2和3564在泥蚶部分个体中的PCR扩增产物电泳图

M. 标准物质50 bp; 1~30泳道为引物对30个泥蚶个体的扩增图谱

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of 3012-2 and 3564 primers in some individuals of *T. granosa*

M. 50 bp DNA ladder Marker; 1-30 lanes form amplification map of 30 individuals of *T. granosa* by primer

表5 12个微卫星位点在泥蚶选育群体中的统计信息

Tab. 5 Statistic information for 12 microsatellite loci in selected population of *T. granosa*

| 标记 markers | N_a | N_e | H_o | H_e | PIC | P_{HWE} |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| 3873 | 5 | 2.566 | 0.493 | 0.612 | 0.545 | 0.008* |
| 3146 | 7 | 3.945 | 0.520 | 0.749 | 0.717 | 0.000* |
| 3039 | 4 | 2.789 | 0.440 | 0.644 | 0.582 | 0.000* |
| 3012-2 | 8 | 3.814 | 0.565 | 0.740 | 0.714 | 0.000* |
| 2712 | 4 | 3.017 | 0.520 | 0.671 | 0.604 | 0.002* |
| 2679-2 | 4 | 3.208 | 0.593 | 0.691 | 0.631 | 0.009* |
| 3048-1 | 3 | 2.504 | 0.427 | 0.603 | 0.524 | 0.000* |
| 3564 | 5 | 3.000 | 0.647 | 0.669 | 0.597 | 0.726 |
| 3791 | 5 | 4.145 | 0.696 | 0.761 | 0.718 | 0.031* |
| 3672 | 6 | 3.134 | 0.687 | 0.683 | 0.648 | 0.152 |
| 3831 | 3 | 1.361 | 0.522 | 0.267 | 0.232 | 0.000* |
| 2692 | 7 | 2.975 | 0.693 | 0.666 | 0.619 | 0.667 |
| 平均值 mean | 5.08 | 3.038 | 0.567 | 0.646 | 0.594 | |

注: *代表群体在此位点偏离哈迪—温伯格平衡($P<0.05$)

Notes: * indicates significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$)

表 6 3个微卫星位点不同基因型壳长、壳宽、壳高、放射肋、壳顶宽与体质量的均值和多重比较

Tab. 6 Means and multiple comparison of major growth traits with different genotypes at 3 microsatellite locis

| 标记 markers | 基因型 genotype | 数目 number | 壳长/mm shell length | 壳宽/mm shell width | 壳高/mm shell height | 放射肋宽/mm radial rib width | 壳顶宽/mm umbo width | 体质量/g body weight |
|---------------|-----------------|--------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| 3012-2 | CE | 10 | 27.06±1.64 ^a | 17.94±0.66 ^a | 20.33±1.39 | 1.89±0.33 | 3.03±0.39 ^a | 6.98±0.88 |
| | EG | 9 | 28.04±2.37 ^{ab} | 18.25±1.45 ^{ab} | 20.95±1.73 | 1.89±0.45 | 3.51±0.52 ^b | 7.53±1.62 |
| | AE | 7 | 28.04±1.97 ^{ab} | 19.32±1.26 ^{abc} | 21.65±1.13 | 2.05±0.24 | 3.49±0.39 ^b | 8.23±1.41 |
| | EF | 23 | 28.12±2.57 ^{ab} | 19.09±1.62 ^{abc} | 20.78±1.95 | 2.03±0.38 | 3.57±0.47 ^b | 7.97±1.99 |
| | BE | 12 | 28.25±3.00 ^{ab} | 19.35±2.20 ^{abc} | 21.23±2.27 | 2.04±0.43 | 3.62±0.40 ^b | 8.42±2.79 |
| | CC | 10 | 28.91±1.86 ^{ab} | 19.56±1.44 ^{bc} | 21.54±1.34 | 2.14±0.29 | 3.77±0.54 ^b | 8.77±1.45 |
| | EE | 34 | 29.12±2.50 ^{ab} | 19.35±1.38 ^{abc} | 21.76±1.85 | 2.05±0.49 | 3.49±0.41 ^b | 8.61±1.79 |
| | GG | 6 | 29.56±2.45 ^b | 19.93±1.02 ^c | 21.95±1.54 | 2.42±0.77 | 3.64±0.58 ^b | 9.15±1.69 |
| 3564 | AA | 26 | 29.11±2.64 | 19.50±1.72 | 21.81±1.79 ^{ab} | 2.23±0.37 ^b | 3.62±0.50 | 8.70±1.99 |
| | AB | 38 | 28.40±3.60 | 19.39±1.56 | 21.72±1.76 ^{ab} | 2.04±0.52 ^{ab} | 3.57±0.48 | 8.69±1.98 |
| | AD | 21 | 27.83±2.02 | 19.07±1.19 | 20.92±1.47 ^a | 2.02±0.32 ^{ab} | 3.44±0.31 | 7.83±1.42 |
| | BB | 18 | 29.76±2.35 | 19.81±1.76 | 22.17±1.55 ^b | 2.19±0.38 ^b | 3.73±0.46 | 9.20±2.00 |
| | BD | 33 | 28.19±1.86 | 19.19±1.86 | 20.98±1.56 ^a | 1.88±0.33 ^a | 3.44±0.53 | 8.15±1.48 |
| | DD | 9 | 27.69±3.46 | 18.66±1.71 | 20.63±2.35 ^a | 1.98±0.40 ^{ab} | 3.33±0.56 | 7.51±2.19 ^a |
| | CE | 22 | 29.49±2.84 ^{abc} | 19.52±2.04 | 21.96±2.07 | 2.20±0.47 | 3.74±0.50 | 8.98±2.45 |
| 2692 | CF | 11 | 29.87±2.25 ^{bc} | 20.11±1.51 | 22.18±1.79 | 2.12±0.56 | 3.46±0.52 | 9.30±2.18 |
| | DE | 19 | 28.25±2.26 ^{ab} | 19.04±1.42 | 21.00±1.52 | 1.94±0.39 | 3.59±0.38 | 8.13±1.69 |
| | EE | 35 | 28.05±2.43 ^a | 19.02±1.66 | 21.20±1.77 | 1.93±0.42 | 3.45±0.50 | 8.01±1.75 |
| | EF | 37 | 28.35±1.79 ^{bc} | 19.40±1.21 | 21.21±1.43 | 2.12±0.33 | 3.50±0.42 | 8.34±1.39 |
| | FF | 8 | 30.07±2.03 ^c | 19.60±1.06 | 22.15±1.81 | 2.04±0.38 | 3.65±0.44 | 9.13±1.32 |

注: 数值右肩不同字母表示同一标记不同基因型间差异显著($P<0.05$)

Notes: different superscript letters within the same column mean significant difference between different genotypes of the same marker at 0.05 level

而与其他基因型(EG基因型的壳宽和放射肋宽除外)间在生长性状上存在差异, 但不显著($P>0.05$)。因此, 推测GG型是生长性状的优势基因型, 而CE是生长性状的劣势基因型。在标记3564上, 个体BB基因型的壳高显著高于DD、AD、BD基因型($P<0.05$), 高于AA、AB基因型但无显著差异($P>0.05$); 个体BB基因型的放射肋宽显著高于BD基因型($P<0.05$), 与其他基因型无显著差异, 说明BB基因型是壳高、放射肋宽的优势基因型, DD基因型为壳高的劣势基因型, 等位基因D可能起负面影响。在标记2692上, 个体FF、CF基因型的壳长显著高于EE基因型($P<0.05$), 与其他CE、DE、EF基因型不存在显著差异($P>0.05$), 但高于它们, 推测FF基因型是壳长的优势基因型, 而EE基因型是壳长的劣势基因型。

3 讨论

3.1 泥蚶的壳形态性状与体质量的关系

壳形态性状和体质量是贝类选择育种的主要指标, 研究清楚壳形态性状与体质量间的相关程度, 能为良种选育提供有价值的参考。一般认为, 各形态性状对体质量的单独决定系数及两两共同决定系数的总和(总决定系数) $\sum d \geq 0.85$ 时, 表明各形态性状是影响体质量的主要因素^[13]。本研究中, 泥蚶壳形态性状对活体质量的决定系数总和为0.956, 大于0.85, 说明所列壳形态性状是影响活体质量的重点性状, 其中壳宽为主要决定因子, 其次为壳长。这与蒋涛涛等^[14]研究得出, 影响泥蚶活体质量的主要因子是壳宽, 其次为壳高略有不同。与其他贝类相比, 本研究结果与其他贝类之间存在相同之处, 也

存在不同之处。如李莉等^[15]在对2龄毛蚶(*Scapharca subcrenata*)的研究中发现,影响活体质量的主要因子为壳长和壳宽,且二者的共同决定系数最大。而杜美荣等^[16-17]研究得出,1龄栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)对活体质量的主要决定因子为壳长,其次为壳高,而2龄时主要为壳高,其次为壳宽,并且具有相同遗传背景但在不同海域养殖下对扇贝体质量起决定作用的壳尺寸性状亦会变化。方军等^[18]研究文蛤得出,壳高和壳宽是决定黑斑文蛤活体质量的主要因素,而壳长是决定红色文蛤活体质量的主要因素。针对华贵栉孔扇贝(*C. nobilis*)的研究发现,5种规格大小的扇贝,影响体质量的主要指标都是壳高^[19]。说明不同双壳贝类因其形态特征不同,影响其体质量的贝壳性状也不同,而且即使同一种贝类,由于不同的年龄、生长环境、遗传背景等均会影响贝壳形态性状对体质量的效果,也不能一概而论。

通过相关分析和通径分析,分析影响选育F₄泥蚶活体质量的主要壳形态性状,2龄是泥蚶育苗生产上通用的种贝规格,选择亲贝繁育时可以壳宽为优先选择,同时加强壳长的协同选择。

3.2 泥蚶选育群体的遗传多样性

杂合度作为衡量群体遗传结构和遗传变异程度的最适指标之一,可以反映一个群体内所包含的所有等位基因的分布情况和丰富程度,揭示群体的生存和适应能力以及进化程度,杂合度的高低与其生命力和适应能力成正相关^[20]。泥蚶选育群体遗传多样性分析表明,群体的平均观测杂合度和期望杂合度分别为0.567和0.646,都略高于田野等^[3]采用相同微卫星标记对泥蚶基础群体和选育群体的研究结果,其中观测杂合度的增幅大于期望杂合度。导致上述结果的原因,可能是由于本研究所用选育群体样本量较大,所以实验结果间存在一定差异。一般而言, $PIC < 0.25$ 为低度多态性,而 $PIC > 0.5$ 为高度多态性。本研究结果显示,选育F₄群体的平均PIC值为0.594,表明泥蚶选育F₄群体仍保持较高的遗传多样性水平,具备进一步辅助选育优良种质的价值,这与田野等^[3]的分析结果一致。

3.3 泥蚶生长性状与SSR标记的关联

性状—标记关联分析是进行性状与位点的基因型统计检验,如基因型数量性状差异显著

<http://www.sxuebao.cn>

则说明性状与标记存在关联。根据关联分析,找到一个或多个标记与某一性状存在显著的遗传相关性,则可认为存在一个数量性状分子标记,达到从表型到基因型选择育种的转变^[19]。滕爽爽等^[11]通过对18个SSR标记与泥蚶家系生长性状的相关性分析,发现3个与壳高、壳长、壳宽和总质量显著相关的SSR标记。董迎辉等^[21]进行了泥蚶生长性状相关AFLP标记的筛选,找到2条仅在快速生长群体内出现的DNA片段,推测此位点与生长性状正相关。在本研究中,共找到了3个与选育群体泥蚶生长性状显著相关的微卫星分子标记,其中标记3012-2和2692均与壳长性状显著相关,标记3012-2与壳长、壳宽和壳顶宽3个生长性状均具有显著相关性,标记3564与壳高和放射肋宽存在显著相关,说明SSR标记与生长性状具有较高的关联度(3/12),同时也说明这些性状受多个QTL控制,也进一步验证了泥蚶各生长性状间存在显著的遗传相关。这与其他水产动物的研究结果相类似^[5-7,19]。

对性状相关标记不同基因型的多重比较表明,标记3012-2的基因型GG在壳长、壳宽和壳顶宽性状的均值上显著高于基因型CE,也高于群体平均值,表现出正相关;标记3564的基因型BB在壳高和放射肋宽的均值上显著高于基因型DD,也高于群体平均值,表现出正相关,而含有等位基因D的个体在壳高上均低于群体平均值,显著低于基因型BB,说明等位基因D可能起负面影响;标记2692的基因型FF在壳长性状的均值为30.07 cm,比群体壳长平均值高出5.1%,显著高于基因型EE的壳长均值28.05 cm。因此,筛选出的3012-2、3564和2692标记可初步用于增进优势性状,避免劣势性状的泥蚶分子育种中,使传统育种与分子育种相结合,加快育种的进程。在后续的研究中,应对这些候选标记进一步分析与验证,以提高选择的准确性,才能将其真正应用到泥蚶分子标记辅助育种实践中。

参考文献:

- [1] 李太武,李成华,宋林生,等. 5个泥蚶群体遗传多样性的RAPD分析[J]. *生物多样性*, 2003, 11(2): 118-124.
Li T W, Li C H, Song L S, et al. RAPD variation within and among five populations of *Tegillarca granosa*[J]. *Biodiversity Science*, 2003, 11(2): 118-124(in Chinese).
- [2] 姚韩韩,董迎辉,林志华,等. 泥蚶4个快速生长家系的中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 遗传变异分析[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 340-347.
- Yao H H, Dong Y H, Lin Z H, *et al.* Analysis of genetic variation in the fast growth families of *Tegillarca granosa*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(3): 340-347(in Chinese).
- [3] 田野, 邵艳卿, 肖国强, 等. 泥蚶人工选育群体的微卫星分析[J]. 海洋科学, 2015, 39(4): 1-7.
- Tian Y, Shao Y Q, Xiao G Q, *et al.* Analysis of genetic variability in selective bred populations of *Tegillarca granosa* by microsatellites[J]. Marine Sciences, 2015, 39(4): 1-7(in Chinese).
- [4] Lu X, Wang H X, Liu B Z, *et al.* Three EST-SSR markers associated with QTL for the growth of the clam *Meretrix meretrix* revealed by selective genotyping[J]. Marine Biotechnology, 2013, 15(1): 16-25.
- [5] Qiu Y, Lu H, Zhu J T, *et al.* Characterization of novel EST-SSR markers and their correlations with growth and nacreous secretion traits in the pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker)[J]. Aquaculture, 2014, 420-421(S1): 92-97.
- [6] 安泉泉, 刘海金, 王桂兴, 等. 牙鲆骨骼生长性状与微卫星标记的相关性分析[J]. 水产学报, 2012, 36(5): 641-646.
- An Q Q, Liu H J, Wang G X, *et al.* Correlation analysis of microsatellite DNA markers with skeletal growth traits of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(5): 641-646(in Chinese).
- [7] 张天时, 刘萍, 李健, 等. 中国对虾与生长性状相关微卫星DNA分子标记的初步研究[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(5): 34-38.
- Zhang T S, Liu P, Li J, *et al.* Preliminary study on specific microsatellites markers related to growth trait in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(5): 34-38(in Chinese).
- [8] Dong Y H, Yao H H, Shi S F, *et al.* Development of novel polymorphic microsatellite markers for the blood clam *Tegillarca granosa* by pyrosequencing[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(3): 8977-8987.
- [9] Teng S S, Fang J, Cai Y L, *et al.* Development and validation of 89 novel expressed sequence tag-derived microsatellite markers in blood clam, *Tegillarca granosa*[J]. Journal of Ocean University of China, 2017, 16(3): 509-516.
- [10] 程雪艳, 滕爽爽, 肖国强, 等. 基于微卫星的泥蚶5个地理群体遗传多样性分析[J]. 海洋科学, 2015, 39(11): 116-125.
- Cheng X Y, Teng S S, Xiao G Q, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity in five geographic populations of *Tegillarca granosa*[J]. Marine Sciences, 2015, 39(11): 116-125(in Chinese).
- [11] 滕爽爽, 方军, 邵艳卿, 等. 泥蚶G2代快速生长家系遗传结构的微卫星分析及其与生长性状的关联[J]. 水生生物学报, 2018, 42(4): 681-689.
- Teng S S, Fang J, Shao Y Q, *et al.* Microsatellite analysis of genetic variation in the fast growth families of the 2nd generation of *Tegillarca granosa* and correlation with growth traits[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(4): 681-689(in Chinese).
- [12] 张永普, 林志华, 应雪萍. 不同地理种群泥蚶的形态差异与判别分析[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 339-342.
- Zhang Y P, Lin Z H, Ying X P. Morphological variations and discriminant analysis of different geographical populations of *Tegillarca granosa*[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(3): 339-342(in Chinese).
- [13] 袁志发, 周静芋. 多元统计分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 145-180.
- Yuan Z F, Zhou J Y. Multivariate statistical analysis[M]. Beijing: Science Press, 2002: 145-180 (in Chinese).
- [14] 蒋涛涛, 施育彦, 姚韩韩, 等. 泥蚶壳形态性状对活体重和软体部重的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 200-202.
- Jiang T T, Shi Y Y, Yao H H, *et al.* Effect of shell morphology traits on living body weight and soft-tissue weight of *Tegillarca granosa*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(5): 200-202(in Chinese).
- [15] 李莉, 郑永允, 徐科凤, 等. 不同贝龄毛蚶壳形态性状对体质量的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(6): 54-58.
- Li L, Zheng Y Y, Xu K F, *et al.* The relationship between morphometric traits and body weight of *Scapharca subcrenata* at different ages[J]. Marine Sciences, 2015, 39(6): 54-58(in Chinese).
- [16] 杜美荣, 方建光, 高亚平, 等. 不同贝龄栉孔扇贝数量性状的相关性和通径分析[J]. 水产学报, 2017, 41(4): 580-587.
- Du M R, Fang J G, Gao Y P, *et al.* Correlation and path analysis of quantitative traits of different-age *Chlamys farreri*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(4):

- 580-587(in Chinese).
- [17] 杜美荣, 方建光, 包振民, 等. 不同养殖海域栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)混合家系的通径分析[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(5): 963-970.
- Du M R, Fang J G, Bao Z M, *et al.* Correlation and path coefficient analysis for *Chlamys farreri* cultured in different sea areas[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(5): 963-970(in Chinese).
- [18] 方军, 肖国强, 张炯明, 等. 两种壳色文蛤壳形态性状对活体质量的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(3): 310-315.
- Fang J, Xiao G Q, Zhang J M, *et al.* Effect of morphological traits on live body weight in clam *Meretrix meretrix* with two kind color shells[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(3): 310-315(in Chinese).
- [19] 刘文广, 林坚士, 何毛贤. 不同贝龄华贵栉孔扇贝数量性状的通径分析[J]. 南方水产科学, 2012, 8(1): 43-48.
- Liu W G, Lin J S, He M X. Path analysis of quantitative traits of scallop *Chlamys nobilis* at different ages[J]. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(1): 43-48(in Chinese).
- [20] 袁文成, 叶金明, 黄鹤忠, 等. 翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)EST-SSR标记与生长性状相关性及其4个选育群体遗传结构研究[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(1): 224-231.
- Yuan W C, Ye J M, Huang H Z, *et al.* Study on correlation of EST-SSR markers with growth traits and genetic structure of 4 breeding populations in mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(1): 224-231(in Chinese).
- [21] 董迎辉, 姚韩韩, 林志华, 等. 泥蚶生长性状相关 AFLP分子标记的筛选[J]. 水产学报, 2012, 36(6): 825-831.
- Dong Y H, Yao H H, Lin Z H, *et al.* Screening of AFLP markers related to growth traits in *Tegillarca granosa*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(6): 825-831(in Chinese).

Correlation analysis of SSR markers with growth-related traits of mud clam (*Tegillarca granosa*)

SHAO Yanqing¹, FANG Jun¹, TIAN Ye^{1,2}, TENG Shuangshuang¹,
ZHANG Leilei¹, CHAI Xueliang^{1*}

(1. Zhejiang Mariculture Research Institute, Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Reservation of Coastal Bio-resource, Engineering Research Center for Marine Bivalves, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wenzhou 325000, China;

2. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract: Growth traits of mud clam (*Tegillarca granosa*) are quantitative traits. In order to acquire some reliable molecular genetic markers for growth-related traits, the correlation analysis of 12 SSR markers and growth-related traits in *T. granosa* were analyzed using 150 samples with the fourth-generation selected line of *T. granosa*. And the correlation and path analysis method were used to analyze the effect of phenotypic character on body weight. Then results showed that the correlations among the quantitative characters reached extremely significant levels. The shell height showed the greatest correlation coefficients to the body weight (0.930). However, the result of the path coefficient analysis showed that the highest path coefficients were the shell width (0.432). The results of the determinant coefficients were consistent with the results of the path analysis. In addition, a total of 61 alleles for the 12 loci were detected (3-8 alleles for each locus), and the average number of alleles and effective number of alleles were 5.083 and 3.038, respectively. The average observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) was 0.528, 0.646, and 0.594, respectively, both of which indicated that the population genetic diversity was high. Correlation analysis between genotypes of SSR and growth traits indicated that 3012-2 had a significant impact on shell length, shell width and shell umbo width. Locus 3564 showed a significant influence on shell height and radial rib width. Locus 2692 showed a significant correlation with shell length. Our results could provide theoretical basis for the study of genetic improvement and selective breeding of *T. granosa*.

Key words: *Tegillarca granosa*; EST-SSR marker; growth trait; correlation analysis

Corresponding author: CHAI Xueliang. E-mail: cxl-5888@163.com

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0901405); National Infrastructure of Fishery Germplasm Resource of China (2018DK30470); Zhejiang Province Science and Technology Program (2017F30042)