

doi: 10.7541/2018.084

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

滕爽爽^{1, 2, 3} 方军^{1, 2, 3} 邵艳卿^{1, 2, 3} 林兴管^{1, 2, 3} 柴雪良^{1, 2, 3} 肖国强^{1, 2, 3}

(1. 浙江省海洋水产养殖研究所, 温州 325005; 2. 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 温州 325005;
3. 中国水产科学研究院海洋贝类工程技术研究中心, 温州 325005)

摘要: 利用微卫星标记对泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus) G2代家系的遗传结构和遗传多样性进行了分析, 并结合家系的表型生长数据, 关联分析筛选可用于育种的候选标记。遗传结构分析表明, 18对引物共检测出59个等位基因, 其中家系F19、F21、F22的平均等位基因数(N_a)分别是2.500、2.722和2.722; 平均观测杂合度(H_o)为0.446、0.510和0.628; 平均期望杂合度(H_e)为0.394、0.433和0.464; 多态信息含量(PIC)分别是0.346、0.379和0.403。标记与生长性状的相关性分析显示, 有3个位点与壳高、壳长、壳宽和总质量显著相关, 其中F19家系的Teg-30的BB基因型与壳高、总质量显著相关, F21家系的Teg-03的BB基因型和Teg-20的BC基因型与壳高、壳长、壳宽和总质量均显著相关, 筛选出的与生长性状相关的标记为开展泥蚶分子标记辅助育种提供了有价值的遗传信息和参考依据。

关键词: 泥蚶; 生长性状; 微卫星标记; 遗传多样性; 关联分析

中图分类号: Q173

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2018)04-0681-09

泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus)隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、列齿目(Taxodontia)、蚶科(Arcidae)、泥蚶属(*Tegillarca*), 是一种栖息于沿海滩涂的广温性双壳贝类, 主要分布于印度洋和西太平洋海域的中国、韩国、泰国、菲律宾、马来西亚等地^[1], 在我国主要分布在山东以南沿海, 是山东、浙江、福建和广东等省沿海滩涂的主要经济养殖贝类^[2, 3]。由于过度捕捞和环境恶化等问题, 自20世纪60年代以来, 我国沿海泥蚶自然苗种资源逐渐枯竭。20世纪90年代初期, 浙江省海洋水产养殖研究所等单位率先突破了泥蚶规模化人工育苗技术, 自此以后, 泥蚶养殖业获得快速发展, 泥蚶养殖所用苗种也绝大部分由人工苗种所替代。但是, 随着养殖规模的扩大和养殖年限的增长, 原先主要通过人工育苗提供的苗种, 经过多年自繁自养和亲贝的随意选留, 已不同程度地

出现了生长速度减缓、抗逆性差、性状退化、贝壳变薄等问题^[4], 因此, 采用有效的育种手段, 对泥蚶进行遗传改良, 培育出高产、抗逆性强的泥蚶新品种是当前泥蚶养殖业急需解决的难题。

选择育种是培育新品种的有效方法, 已经在动、植物的育种中取得广泛的成功。其中, 通过建立家系并进行系统选择是选择育种的重要手段^[5]。利用家系选择技术对贝类经济性状进行改良已有成功的报道。葛建龙等^[6, 7]通过构建不同壳色长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的全同胞家系, 研究了壳金性状的孟德尔遗传模式以及金黄色与黑色着色之间的关系, 比较分析了3种不同壳色家系间杂交子代生长与存活的关系, 有效的固定了牡蛎壳色性状, 成功选育出壳金家系。张国范等^[8]、郑怀平等^[9, 10]建立了海湾扇贝(*Argopecten irradians*)自交家系和杂交家系, 对其生长发育及其杂种优势进行了评价。

收稿日期: 2017-05-15; 修订日期: 2018-03-14

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-47); 温州市种子种苗科技创新专项(N20120017); 浙江省科技计划项目(2017F30042, 2018F10015)资助 [Supported by the Earmarked Fund for Modern Argo-Industry Technology Research System (CARS-47); Seed Science and Technology Innovation Project of Wenzhou City (N20120017); Science and Technology Planning Project of Zhejiang Province (2017F30042, 2018F10015)]

作者简介: 滕爽爽(1983—), 女, 浙江温州人; 硕士; 主要从事滩涂贝类分子遗传育种学研究。E-mail: 188175998@qq.com

通信作者: 肖国强(1978—), E-mail: xiaogq1978@163.com

何毛贤等^[11, 12]构建了马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)家系, 成功选育出一个红壳家系“南科珍珠红”; 彭张明等^[13]构建了马氏珠母贝红色闭壳肌F1代家系并对利用Kung育种值与综合评定值P_i对家系进行了评定, 对家系间生长与存活进行了比较。大连水产学院建立了菲律宾蛤仔家系^[14], 对其早期生长发育进行了比较; 张跃环等^[15]并对大连群体两种壳型菲律宾蛤仔的生长发育进行了研究, 发现壳扁型蛤仔具有生长快、抗逆性强的特点。通过构建家系, 对目标表型性状及基因型进行逐代选泽, 累积并逐渐增加具有经济价值的基因频率和基因型频率。

在泥蚶大规模家系选择育种过程中, 为避免近交导致的遗传变异降低, 产生近交衰退等现象, 可采用分子标记技术对育种材料的遗传结构和多样性进行分析, 有针对性的选择遗传差异大, 性状优良的家系进行杂交, 以期经过多代连续选育, 获得高产、抗逆的新品种。目前已开发了大量的泥蚶微卫星标记^[16—23], 而利用微卫星标记分析泥蚶不同家系遗传结构以及开发生长性状相关的分子标记至今还鲜有报道。本研究通过建立泥蚶不同家系, 采用微卫星标记分析泥蚶不同家系间遗传结构, 旨在筛选出遗传多样性丰富、生长快、抗逆性强的新品种, 开发生长相关的分子标记, 以期对生长等数量性状进行改良, 最终达到改良种质的目的。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选用的泥蚶为2009年7月构建的G2代全同胞家系。首先对泥蚶亲本进行性腺催熟, 再经过夜阴干和2h流水刺激后, 将各个泥蚶分别置于不同的烧杯中诱导排精产卵, 采用巢式设计和人工授精的方法, 适时将每个泥蚶雄贝与1—3个雌贝交配, 建立了18个全同胞家系和5个半同胞家系。家系日常维护和管理参考孙长森等^[24]。

培育期间管理环节一致, 跟踪测量了泥蚶各家系的壳长、壳宽、壳高和总质量等性状, 经过两周年的生长数据采集、测量、比较, 发现各家系之间生长性状存在明显差异, 从中选取了生长较快的3个家系作为实验对象, 用于分析遗传结构差异。

家系F19: (J5♂×J18♀)2♂×(J5♂×J18♀)3♀

家系F21: (Z7♂×J25♀)4♂×(J5♂×J18♀)7♀

家系F22: (S1♂×J4♀)12♂×(J5♂×J18♀)16♀

家系符号分别表示的意义: J. 江苏泥蚶; Z. 浙江泥蚶; S. 山东泥蚶。

3个G2家系分别随机抽取60、61和58个子代个体为样本。分别测量并记录每个个体的壳高、壳

长、壳宽和总质量。解剖样品, 取闭壳肌于无水乙醇中保存。

1.2 DNA提取、PCR扩增及产物检测

基因组DNA采用酚-氯仿法抽提, 提取出来的DNA用TE溶解, 用紫外分光光度计测量浓度, 再配制成100 ng/μL工作液, 4℃备用。PCR反应体系为15 μL, 包括10×PCR buffer 1.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1.2 μL, 10 μmol/L上下游引物各1.5 μL, Taq酶(5 U/μL)0.075 μL, DNA模板1.5 μL, 加ddH₂O至15 μL。PCR反应程序为: 94℃变性5min, 进入30个循环, 每一循环包括94℃变性30s, 复性(*T_m*温度见表1)30s, 72℃延伸45s, 最后一步是72℃延伸7min。最后将产物于4℃下保存。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶检测, 鉴定有扩增产物后, 以6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 硝酸银染色, 读取条带结果。本研究所采用的引物由本课题组开发^[17], 引物序列及退火温度见表1。

1.3 数据处理

应用SPSS 21.0统计分析软件对泥蚶3个家系的壳高、壳长、壳宽和总质量等4个生长相关数据进行单因子方差分析(ANOVA)及Tukey's多重比较分析, 并进行正态分布检验, 以检验3个家系是否为随机家系。

根据电泳图谱, 并参照引物设计时预期片段的大小统计条带, 应用Popgene 1.32 软件计算微卫星引物的等位基因数(*N_a*)、有效等位基因数(*N_e*)、shannon指数(*I*)、期望杂合度(*H_e*)、观察杂合度(*H_o*), Nei's遗传相似度和遗传距离, 和哈代-温伯格平衡值(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE), 用Bonferroni correction对哈温平衡结果进行校正。根据家系间遗传距离数据, 利用MEGA 4.0对3个家系进行聚类聚类分析, 构建UPGMA系统树, 以此来确定各个家系的亲缘关系远近。多态信息含量(Poly-morphic information content, PIC)的计算参照Botstein^[25]的方法, 计算公式如下:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i p_j$$

其中: *P_i*, *P_j*是某个位点第*i*、*j*个等位基因的基因频率, *n*为某个位点上的等位基因数。

采用SPSS软件中的一般线性模型(General linear model, GLM)中的多元方差分析(Multivariate)进行基因型与数量性状的相关性分析。其中, SSRs位点的不同基因型为固定因子(*F*), 壳高、壳长、壳宽和总质量等生长性状为因变量(*D*), 进行不同标记基因型之间数量性状指标差异显著性进

表1 泥蚶18对微卫星引物序列信息

Tab. 1 Primer sequences and amplification information of 18 microsatellites in *T. granosa*

位点 Primer	引物序列 Primer sequences (5'-3')	核心序列 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature (°C)	序列号 GenBank Accession No.
Teg-01	F: ATATAGCAGTGTGCATTGGT R: CATTGTAAAGATACTGGGCTTT	(TA) ₆	55	JN700020
Teg-03	F: ATTTGCTCATCAATCAGTTG R: AGGAGCAAAAGATGAAGATT	(TA) ₆	55	JN700022
Teg-05	F: TAGCACTTAAATCGCAGGTAG R: ATATCAACTTGCTCCGGAAAT	(AGT) ₅	56	JN700024
Teg-06	F: GGTACACTATTGGACATGC R: GAACACTCCAAAATTGTCTGA	(ACA) ₆	56	JN700025
Teg-07	F: GGTGGATGTTCATTAATCACT R: ACACAAACCATGATGTCTTAGAG	(TTA) ₆	53	JN700026
Teg-12	F: TGTGTGTGTGAGAGAGAGA R: ACTTTTGCTTTAGAGGGACT	(GA) ₈	55	JN700031
Teg-14	F: CTATCAAGGACCTGATGACAG R: ATGACACAGTCATTCTATA	(AAT) ₇	53	JN700033
Teg-15	F: TTGCACTTAACGTTATGAAT R: ACACAAACATTCAAATGATCC	(AT) ₇	55	JN700034
Teg-16	F: AAAGTATTCCAGTCTGGTTCTG R: TGTTAATTCTGTGATGGGTA	(TA) ₈	54	JN700035
Teg-17	F: CAAGTTATCAATTAGGCCTTC R: TGGAATGTGTGTTTCACTATG	(GA) ₁₃	54	JN700036
Teg-18	F: GTGACAAGTATCTGCTTTATT R: ATCAGAAGTCCCCTGTTACT	(ATAAT) ₃	52	JN700037
Teg-19	F: ATTCGTAATTCCACAATCA R: CTTAAGACTTGAGCAAACATGA	(AT) ₇	54	JN700038
Teg-20	F: ACACACCAACACTAAACCATC R: TTTGAGATTGGAAGAACACA	(TA) ₆	55	JN700039
Teg-26	F: TTACCACTGTGAAAGTTTATCT R: AGGAGACGAGGTTTACAT	(AATC) ₅	55	JN700045
Teg-30	F: TCACTGCAAATTAAACATTACG R: TTGTTCTCTGTGGATCACTT	(TG) ₇	52	JN700049
Teg-32	F: TGTGTTGCACATTAGAACAA R: AACACAACCTGACAGCAGAAT	(TTAT) ₅	54	JN700051
Teg-34	F: AGCACATTAGGGAAATTAGT R: AACCACTCATAAATGTCATGC	(AT) ₈	54	JN700053
Teg-35	F: TGTGCACCTAATATTGACCT R: AAGTTGAATCTGCTCGTA	(TA) ₆	53	JN700054

行检验，并进行最小显著性差异法(Least-significant different, LSD)的多重比较，进而分析等位基因的效应。应用卡方检验计算各位点在家系子代中的分离比是否符合的孟德尔遗传定律。

2 结果

2.1 泥蚶不同家系生长性状统计分析

应用SPSS 21.0软件对泥蚶3个G2家系在24月

龄的4个生长性状参数进行统计。结果如表2，家系F19的壳高(16.15 ± 0.17) mm, 壳长(21.41 ± 0.22) mm, 壳宽(14.22 ± 0.16) mm, 总质量(3.20 ± 0.10) g, 与F21、F22家系相比，具有明显生长优势。通过频数分析和K-S单样本正态分布检验对家系进行正态分布检验，结果显示3个家系壳高、壳长、壳宽和总质量的偏度均小于1, P 值均大于0.05，基本符合正态分布，适合作为标记与性状相关分析的材料(表2)。

表2 泥蚶3个家系表型性状参数统计及正态分布检验

Tab. 2 Descriptive statistics of the phenotypic traits and normal distribution test in three families of *T. granosa*

家系 Family	性状 Character	平均值±SD Mean±SD	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis	K-S值 Kolmogorov-Smirnov Z	渐进显著性 P值
F19	壳高Shell height	(16.15±0.17 ^a) mm	0.51	0.51	0.91	0.37
	壳长Shell length	(21.41±0.22 ^a) mm	0.57	0.29	0.72	0.68
	壳宽Shell width	(14.22±0.16 ^a) mm	0.43	0.25	0.98	0.29
	总质量Total weight	(3.20±0.10 ^a) g	0.93	0.64	1.03	0.24
F21	壳高Shell height	(15.04±0.20 ^b) mm	0.21	0.62	0.55	0.92
	壳长Shell length	(19.72±0.25 ^b) mm	0.16	-0.28	0.58	0.89
	壳宽Shell width	(13.13±0.18 ^b) mm	0.01	-0.13	0.62	0.84
	总质量Total weight	(2.59±0.10 ^b) g	0.83	1.68	0.48	0.98
F22	壳高Shell height	(13.71±0.16 ^c) mm	0.14	-0.41	0.58	0.89
	壳长Shell length	(18.07±0.20 ^c) mm	0.00	-0.47	0.51	0.96
	壳宽Shell width	(11.50±0.14 ^c) mm	0.26	-0.51	0.47	0.98
	总质量Total weight	(1.92±0.06 ^c) g	0.75	0.45	0.71	0.69

注: 在相同性状比较中不同字母标记表示差异显著, $P<0.05$ Note: Values with different letters within the same character in the three families indicates significant difference at $P<0.05$

2.2 三个泥蚶家系的微卫星遗传结构分析

18对引物共检测出59个等位基因, 其中家系F19, F21, F22的平均等位基因数(N_a)分别是2.500、2.722和2.722; 平均有效等位基因数(N_e)分别是1.993、2.020和2.196; 平均观测杂合度(H_o)为0.446、0.510和0.628; 平均期望杂合度(H_e)为0.394、0.433和0.464; 平均香农指数(I)为0.669、0.733和0.780; 多态信息含量(PIC)分别是0.346、0.379和0.403(表3)。其中Teg-14、Teg-16、Teg-20和Teg-32基因座位在不同家系中具有不同的多态性类型。例如Teg-14在F19家系的子代个体中表现为单态性, 而在其余2个家系中为多态性。Teg-16在F22家系为单态性位点, 在另外2个家系中表现为多态性。Teg-20在F21家系中为多态性, 而在其他2个家系中表现为单态性位点, 同样Teg-32在F22家系中表现为多态性, 在另外2个家系中为单态性位点。以上标记具有家系独有基因型特征, 可以作为家系鉴别的潜在分子标记。图1显示了引物Teg-30在3个家系部分个体中扩增结果, 在F19和F21家系中有2个等位基因, 在F22中有4个等位基因。

泥蚶家系间的Nei's遗传距离中等(表4), F19和F22的遗传距离最小, 为0.362, 即相似度最高; F21和F22遗传距离最远, 为0.486。利用MEGA4分析软件, 对3个家系进行聚类分析, 获得聚类树图(图2), F19与F22聚为一支。2种方法所得聚类结果一致。

2.3 泥蚶SSR位点与生长性状的相关性分析及多重比较

分别对3个家系的18个SSR位点与壳高、壳长、

壳宽和总质量进行相关性分析, 结果显示, 在F19家系中, 位点Teg-30与壳高显著相关; 在F21家系中, 位点Teg-03和Teg-20与壳高、壳长、壳宽和总质量均显著相关。

对家系中与生长性状显著相关的3个标记不同基因型间的表型值进行了多重比较(表5)。在基因型统计分析过程中, 由于一些位点中某些基因型出现频率太少, 缺乏分析价值, 因此在实际统计分析中, 每种基因型至少有3次观察值才被考虑。

在F19家系中, 位点Teg-30的BB基因型在壳高、壳长、壳宽和总质量等4个性状的均值都高于AA和AB基因型, 在壳高上, BB型与AA型和AB型差异显著, 在总质量上, BB型与AB型差异显著($P<0.05$), 说明BB基因型对生长起到正面作用, 推测BB基因型是壳高的优势基因。

在F21家系中, 位点Teg-03和Teg-20的不同基因型与生长性状有显著相关: 位点Teg-03的BB基因型在壳高、壳长、壳宽和总质量性状的均值上都显著大于AA; 在壳高、壳长、壳宽和总质量性状的均值上都大于AB型, 但仅在壳宽和总质量性状上有显著差异; 这说明BB基因型对生长起到正面作用, 推测BB基因型是壳宽和总质量的优势基因。位点Teg-20中, BC基因型在壳高、壳长、壳宽和总质量性状均值都显著大于AB型; 在壳高、壳长和总质量性状均值上都显著大于BB型, 壳宽大于BB型, 但差异不显著; 说明BC型对生长起到正面作用, 推测BC基因型是壳高、壳长、总质量的优势基因。

以上3个位点在F19、F21家系中基因型分离比

表3 18对微卫星位点在泥蚶3个家系中的遗传多样性统计

Tab. 3 Genetic diversity summary in three families of *T. granosa* for 18 microsatellite loci

家系 Family	位点 Loci	参数Parameter						
		等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	Shannon指数 I	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	多态信息含量PIC	
F19	Teg-01	2	1.483	0.507	0.279	0.329	0.273	0.228
	Teg-03	4	3.790	1.358	1.000	0.742	0.687	0.000*
	Teg-05	3	1.974	0.856	0.590	0.497	0.442	0.208
	Teg-06	2	1.260	0.360	0.000	0.208	0.185	0.000*
	Teg-07	3	1.910	0.817	0.443	0.480	0.419	0.468
	Teg-12	2	1.818	0.642	0.383	0.454	0.349	0.225
	Teg-14	1	1.000	0.000	0.000	0.000	单态	纯合体
	Teg-15	2	1.085	0.171	0.082	0.079	0.076	0.766
	Teg-16	2	1.336	0.418	0.262	0.254	0.220	0.784
	Teg-17	2	1.336	0.418	0.197	0.254	0.220	0.072
	Teg-18	3	2.571	1.011	1.000	0.618	0.536	0.000*
	Teg-19	4	3.136	1.241	1.000	0.687	0.622	0.000*
	Teg-20	1	1.000	0.000	0.000	0.000	单态	纯合体
	Teg-26	4	2.964	1.221	0.328	0.668	0.611	0.000*
	Teg-30	2	1.800	0.637	0.467	0.448	0.346	0.747
	Teg-32	1	1.000	0.000	0.000	0.000	单态	纯合体
	Teg-34	3	2.667	1.040	1.000	0.631	0.555	0.000*
	Teg-35	4	3.742	1.350	1.000	0.745	0.683	0.000*
F21	Teg-01	3	2.584	1.018	0.982	0.619	0.540	0.000*
	Teg-03	4	2.518	1.135	0.321	0.608	0.560	0.000*
	Teg-05	3	1.278	0.407	0.225	0.219	0.198	0.039
	Teg-06	2	1.600	0.562	0.259	0.378	0.305	0.015
	Teg-07	3	2.359	0.936	0.544	0.581	0.488	0.342
	Teg-12	3	1.557	0.665	0.333	0.361	0.329	0.002*
	Teg-14	4	3.447	1.304	1.000	0.716	0.657	0.000*
	Teg-15	3	2.115	0.820	0.789	0.532	0.423	0.000*
	Teg-16	2	1.362	0.436	0.281	0.268	0.231	0.720
	Teg-17	2	1.399	0.460	0.241	0.288	0.245	0.209
	Teg-18	2	1.194	0.301	0.179	0.164	0.149	0.488
	Teg-19	2	1.338	0.420	0.296	0.255	0.220	0.218
	Teg-20	3	1.757	0.741	0.544	0.435	0.377	0.140
	Teg-26	3	2.399	0.976	0.793	0.588	0.514	0.001*
	Teg-30	2	1.552	0.541	0.389	0.359	0.293	0.535
	Teg-32	1	1.000	0.000	0.000	0.000	单态	纯合体
	Teg-34	4	3.904	1.374	1.000	0.752	0.696	0.000*
	Teg-35	3	2.991	1.097	1.000	0.672	0.592	0.000*
F22	Teg-01	3	2.611	1.027	0.979	0.624	0.546	0.000*
	Teg-03	4	3.720	1.348	1.000	0.739	0.682	0.000*
	Teg-05	3	2.026	0.876	0.680	0.512	0.454	0.005
	Teg-06	4	2.869	1.171	1.000	0.658	0.585	0.000*
	Teg-07	3	1.878	0.806	0.620	0.472	0.413	0.021
	Teg-12	3	2.232	0.937	0.588	0.557	0.491	0.433
	Teg-14	2	1.083	0.168	0.080	0.078	0.074	0.800
	Teg-15	2	1.913	0.670	0.404	0.483	0.363	0.261
	Teg-16	1	1.000	0.000	0.000	0.000	单态	纯合体
	Teg-17	2	1.843	0.650	0.708	0.462	0.353	0.000*
	Teg-18	2	1.313	0.402	0.106	0.241	0.210	0.000*
	Teg-19	2	1.435	0.481	0.255	0.306	0.257	0.221
	Teg-20	1	1.000	0.000	0.000	0.000	单态	纯合体
	Teg-26	4	2.795	1.159	1.000	0.649	0.583	0.000*
	Teg-30	4	3.853	1.367	1.000	0.748	0.693	0.000*
	Teg-32	2	2.000	0.693	1.000	0.505	0.375	0.000*
	Teg-34	4	3.562	1.316	0.938	0.731	0.666	0.000*
	Teg-35	3	2.399	0.961	0.939	0.589	0.503	0.000*

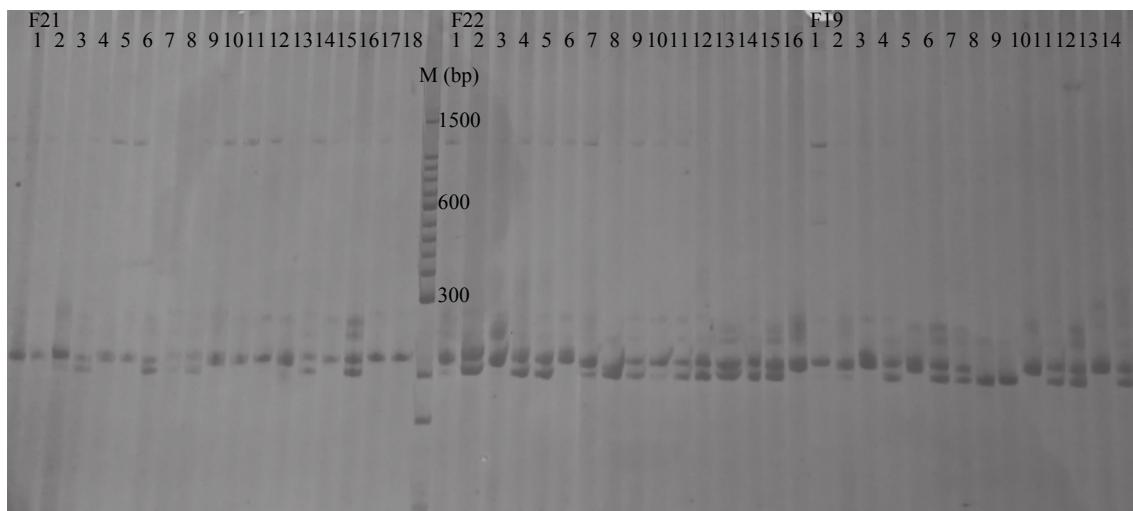


图1 引物Teg-30在3个泥蚶家系部分个体中的扩增电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of some individuals of 3 families in *T. granosa* using primer Teg-30

表4 Nei遗传相似度和遗传距离

Tab. 4 Nei genetic similarity and genetic distance

家系Family	F19	F21	F22
F19	****	0.624	0.696
F21	0.472	****	0.615
F22	0.362	0.486	****

注: 对角线以下为遗传距离, 对角线上为遗传相似度

Note: Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

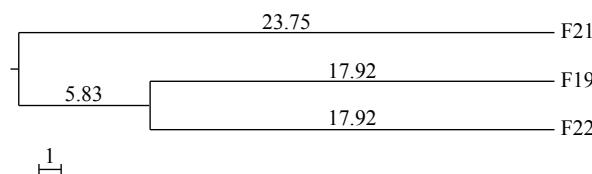


图2 根据家系间遗传距离用UPGMA法构建了3个泥蚶家系的遗传聚类图

Fig. 2 Phylogenetic tree on the basis of genetic distance of 3 families of *T. granosa* by Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) assay

例均显著偏离孟德尔遗传定律(通过Bonferroni法校正, $P<0.0027$)。Teg-30位点在F19家系中, AA基因型比例偏高43.3%(理论上应25%), 该基因型生长性状统计值介于AB和BB基因型之间, 有利于该家系个体的生长。在F21家系中Teg-03位点AA基因型比例为57.4%显著高于理论值25%; Teg-20位点BB和BC基因型比例偏高, 分别为48.2%和42.8%(理论上均应33.3%)。

3 讨论

3.1 泥蚶家系遗传多样性分析

基因杂合度(H)反映了群体在各个基因座位上

的遗传变异, 是度量群体遗传多样性水平的指标。 H 值越高, 表明群体的遗传多样性越高, 反之, 则越低^[26]。在本研究中平均观测杂合度(H_o)为0.446—0.628, 平均期望杂合度(H_e)为0.394—0.464, 说明3个家系的遗传杂合度属中等多样性。多态信息含量用来描述微卫星位点的变异程度, 根据PIC判断标准: $PIC<0.25$ 为低度多态, $0.25\leqslant PIC<0.5$ 为中度多态, $PIC\geqslant 0.5$ 为高度多态^[25]。本实验所选18对微卫星的PIC在0.074—0.696, 表示微卫星位点低度、中度和高度多态都有, 3个泥蚶家系的平均多态信息含量在0.401—0.453, 其中F22家系的多态信息含量最高, 为0.453, 3个家系的多态信息含量均处于中度水平。低于已报道的泥蚶人工选育不同世代群体^[27]和不同地理群体^[28]的遗传多样性水平, 可能跟本研究对象是家系样品有关。

从3个家系构建的系谱关系看, F19家系的亲本来自同一家系的个体间的交配(姊妹交), 另外2个家系亲本间无亲缘关系, 而3个家系的母本又来自于同一个家系(J5♂×J18♀)的不同个体, 即3个家系互为表兄弟姐妹。微卫星标记分析的3个家系的遗传距离, 结果显示, F21和F22遗传距离最远, 也支持这一系谱关系。从一个侧面反应了微卫星的灵敏性和可靠性。在遗传多样性分析中, 家系F19相比家系F21和F22, 出现平均观测杂合度(H_o)、平均期望杂合度(H_e)、平均香农指数(I)、多态信息含量(PIC)的数据值偏小的; 而生长经济性状测量的结果显示, F19生长速度较快。推测可能是由于家系F19的父母本来自于同一个家系, 为姊妹交, 有利于生长相关基因以及其他基因的纯化, 从而导致生长快速, 而遗传多样性降低。在我们前期对泥蚶不同

表5 泥蚶SSR位点不同基因型在生长性状上的平均值及多重比较

Tab. 5 Means and multiple comparison of growth traits of different genotype of *T. granosa*

家系 Family	位点 Locus	父本 Sire	母本 Dam	子代基因型 Genotypes of progeny	壳高 (mm) Shell height (mm)	壳长 (mm) Shell length (mm)	壳宽 (mm) Shell width (mm)	总质量 (g) Total weight (g)	期望孟德 尔分离比 Expected ratio	观察孟德 尔分离比 Observed ratio	P值 P-value
F19	Teg-30	AB	AB	AA	16.01±1.25 ^a	21.46±1.70	14.22±1.17	3.20±0.80 ^{ab}	1	26	0.001
				AB	16.00±1.12 ^a	21.14±1.65	14.06±1.34	3.06±0.65 ^a	2	28	
				BB	17.44±1.84 ^b	22.51±2.02	15.06±1.49	3.87±1.03 ^b	1	6	
F21	Teg-03	AB	AB	AA	14.97±1.27 ^a	19.74±1.62 ^a	13.13±1.13 ^a	2.54±0.57 ^a	1	35	0.000
				AB	15.31±1.66 ^{ab}	20.07±2.08 ^{ab}	12.87±1.52 ^a	2.51±0.77 ^a	2	16	
				BB	16.31±1.69 ^b	21.55±1.86 ^b	14.47±1.26 ^b	3.39±0.92 ^b	1	10	
	Teg-20	AB	BC	AB	13.66±0.73 ^a	17.66±0.56 ^a	11.79±0.69 ^a	1.84±0.23 ^a	1	5	0.002
				BB	14.79±1.38 ^a	19.42±1.87 ^a	12.89±1.31 ^{ab}	2.42±0.68 ^a	1	27	
				BC	15.68±1.62 ^b	20.57±1.92 ^b	13.58±1.45 ^b	2.89±0.84 ^b	1	24	

注: 在相同性状比较中不同字母标记表示差异显著, $P<0.05$ Note: Significant differences are indicated with different letters in the same character comparison, $P<0.05$

世代选育群体的SSR分析结果中, 也得到类似结果^[27]: 人工选育G5世代, 在生长上明显优于G4、G3和对照组, 但在遗传多样性上略有下降。

3.2 泥蚶微卫星位点与生长性状的关系

近年来, 利用微卫星座位遗传多态信息进行水生动物经济性状相关分析的研究报道越来越多^[29–32]。微卫星标记具有遵循连锁互换定律的特点, 因此在代代遗传时经常发生遗传连锁, 这也是分析其与表型性状关联性的基础。Qiu等^[29]通过对29个多态性EST-SSR标记与马氏珠母贝生长及珍珠层性状的关联分析, 发现3个与马氏珠母贝壳宽、总质量和珍珠层厚度呈正相关的EST-SSR标记。本研究在3个全同胞家系子代中进行相关性分析得到3个与生长性状显著相关的EST-SSR标记, 其中在F19家系中, 位点Teg-30与壳高显著相关; 在F21家系中, 位点Teg-03和Teg-20与壳高、壳长、壳宽和总质量均显著相关。上述结果显示一个标记可能与多个性状相关联, 推测原因可能是壳高、壳长、壳宽和总质量之间本身具有一定的相关性。Teg-30只在F19家系中与壳高显著相关, 在F21和F22家系中未与任何性状显著相关; 同样的, Teg-03和Teg-20只在F21家系中与生长性状显著相关, 在F19和F22家系中未与任何性状相关。这可能与用于相关性分析的家系样品不同有关。在马氏珠母贝EST-SSR位点与全同胞家系进行相关性分析中, 同样观察到此现象^[29], 得到3个与生长及珍珠层性状显著相关的标记, 将这3个标记在养殖群体中进一步验证后发现只有1个标记与性状显著相关。在本研究中, EST-SSR标记数目18个, 家系F19、F21和F22样品数分别为60、61和58个, 标记和样品数较少, 因此最终得到的与生长性状显著相关标记较少, 在接下

来的研究中可以通过增加标记的不同类型和数量, 加大样品数量, 增加样品表型差异来进一步分析。

通过多重比较, 同一标记的不同基因型在某些性状上的差异十分显著, 在F19家系中, 位点Teg-30的BB基因型在壳高和总质量性状的均值上显著高于AA和AB基因型。在F21家系中, 位点Teg-03的BB基因型在壳高、壳长、壳宽和总质量性状的均值上都显著大于AA; 在壳宽和总质量性状的均值上显著大于AB型; 在位点Teg-20中, BC基因型在壳高、壳长、壳宽和总质量性状均值都显著大于AB型; 在壳高、壳长和总质量性状均值上都显著大于BB型。因此推断Teg-30的BB基因型、Teg-03的BB基因型和Teg-20的BC基因型可能为优势基因型, 是对生长有利的基因型, 为泥蚶重要生长性状的QTL定位及分子标记辅助育种提供了一定的依据。

参考文献:

- [1] Funge-Smith S, Briggs M, Miao W M. Regional Overview of Fisheries and Aquaculture in Asia and the Pacific 2012 [M]. Bangkok: RAP Publication. 2012, 114
- [2] Wu H X, Chai X L. The reproductive habit and growth character of bloody clam *Tegillarca granosa* in Yueqing bay [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2004, 39(3): 47—50 [吴洪喜, 柴雪良. 浙江乐清湾泥蚶的繁殖习性和生长特性. 动物学杂志, 2004, 39(3): 47—50]
- [3] Wang R X, Li T W, Lü Z M, et al. Study on genetic variation by isozyme in different populations of bloody clam *Tegillarca granosa* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(3): 227—234 [王日昕, 李太武, 吕振明, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)不同地理居群同工酶变异及遗传分化的研究. 海洋与湖沼, 2005, 36(3): 227—234]

- [4] Jin S, Zhao Q S, Wang D G, et al. Cause analysis and prevention of mass mortality of *Tegillarca granosa* cultured in shrimp pond [J]. *Fisheries Science*, 2002, **21**(6): 31—32 [金珊, 赵青松. 虾塘养殖泥蚶大规模死亡原因及防治对策. 水产科学, 2002, **21**(6): 31—32]
- [5] Lou Y D. Fish Breeding [M]. Beijing: Chinese Agriculture Press. 1999, 10—39 [楼允东. 鱼类育种学. 北京: 中国农业出版社. 1999, 10—39]
- [6] Ge J L, Li Q, Yu H, et al. Mendelian inheritance of golden shell color in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Aquaculture*, 2014, **441**: 21—24
- [7] Ge J L, Li Q, Yu H, et al. Comparison of growth and survival among the hybrid offspring of three different shell color families of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(3): 42—49 [葛建龙, 李琪, 于红, 等. 长牡蛎三种壳色家系间杂交子代生长与存活比较. 水产学报, 2015, **39**(3): 42—49]
- [8] Zhang G F, Liu S X, Liu X, et al. Self-fertilization family establishment and its depression in bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, **10**(6): 441—445 [张国范, 刘述锡, 刘晓, 等. 海湾扇贝自交家系的建立和自交效应. 中国水产科学, 2003, **10**(6): 441—445]
- [9] Zheng H P, Zhang G F, Liu X, et al. Establishment of different shell color lines of bay scallop *Argopecten irradians irradians* Lamarck (1819) and their development [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2003, **34**(6): 632—639 [郑怀平, 张国范, 刘晓, 等. 不同贝壳颜色海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)家系的建立及生长发育的研究. 海洋与湖沼, 2003, **34**(6): 632—639]
- [10] Zheng H P, Zhang G F, Liu X, et al. Comparison of growth and survival between the self-fertilized and hybridized families in *Argopecten irradians irradians* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, **28**(3): 267—271 [郑怀平, 张国范, 刘晓, 等. 海湾扇贝杂交家系与自交家系生长和存活的比较. 水产学报, 2004, **28**(3): 267—271]
- [11] He M X. Breeding of red shell strain of pearl oyster *Pinctada martensii* [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2006, **25**(2): 58 [何毛贤. 马氏珠母贝红壳品系“南科珍珠红”的培育. 热带海洋, 2006, **25**(2): 58]
- [12] He M X, Guan Y Y, Lin Y G, et al. Growth comparison between families of pearl oyster *Pinctada martensii* Dunker [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2007, **26**(1): 39—43 [何毛贤, 管云雁, 林岳光, 等. 马氏珠母贝家系的生长比较. 热带海洋学报, 2007, **26**(1): 39—43]
- [13] Peng Z M, Tao H Q, Liu G, et al. Research of family selection and evaluation of *Pinctada martensi* with red adductor muscle [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2015, **35**(4): 37—45 [彭张明, 陶后全, 刘锦上, 等. 马氏珠母贝红色闭壳肌F1代的家系选育及家系评定. 广东海洋大学学报, 2015, **35**(4): 37—45]
- [14] Yan X W, Zhang G F, Yang F, et al. A comparison of growth and development of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) from two pedigrees [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, **20**(4): 266—269 [闫喜武, 张国范, 杨风, 等. 菲律宾蛤仔莆田群体两个壳色品系生长发育的比较. 大连水产学院学报, 2005, **20**(4): 266—269]
- [15] Zhang Y H, Yan X W, Yang F, et al. Comparison of growth and development of two shell-shape lines of Dalian-population Manila clam [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, **28**(9): 4246—4252 [张跃环, 闫喜武, 杨风, 等. 菲律宾蛤仔大连群体两种壳型家系生长发育比较. 生态学报, 2008, **28**(9): 4246—4252]
- [16] Gu X Y, Zeng Q G, You Z J, et al. Isolation and characteristics of six microsatellite primers of *Tegillarca granosa* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, **39**(6): 661—664 [顾晓英, 曾庆国, 尤仲杰, 等. 泥蚶 (*Tegillarca granosa*)6个微卫星引物的分离和鉴定. 海洋与湖沼, 2008, **39**(6): 661—664]
- [17] Liu B, Teng S S, Shao Y Q, et al. Isolation and characterization of 39 novel polymorphic EST-SSR loci for the blood clam, *Tegillarca granosa* [J]. *Conservation Genetic Resource*, 2012, **4**: 375—378
- [18] Shi S F, Yao H H, Lin Z H, et al. Characterization and analysis of 24 polymorphic EST-SSR loci in *Tegillarca granosa* [J]. *Marine Sciences*, 2013, **37**(8): 42—46 [史松富, 姚韩韩, 林志华, 等. 24个泥蚶EST-SSR标记的开发与分析. 海洋科学, 2013, **37**(8): 42—46]
- [19] Dong Y H, Wu G X, Yao H H, et al. Characterization of 34 polymorphic EST-SSR markers in *Tegillarca granosa* and their transferability in *Anadara craticulata* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, **37**(1): 70—77 [董迎辉, 吴国星, 姚韩韩, 等. 泥蚶34个EST-SSR标记的开发及在格粗饰蚶中的通用性检测. 水产学报, 2013, **37**(1): 70—77]
- [20] Zhou X L, Zhu J H, Dong Y H, et al. Development and comparative study of genomic-SSR and EST-SSR in *Tegillarca granosa* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, **44**(2): 467—475 [周小龙, 朱靖华, 董迎辉, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)基因组SSR和EST-SSR的开发及比较研究. 海洋与湖沼, 2013, **44**(2): 467—475]
- [21] Dong Y H, Yao H H, Lin Z H, et al. Characterization of 62 polymorphic EST-SSR markers in the blood clam (*Tegillarca granosa*) and their cross-amplification in *Scapharca subcrenata* [J]. *Conservation Genetic Resource*, 2012, **4**: 991—997
- [22] 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
- [23] 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—5016

- [24] Sun C S, Lin Z H, Dong Y H, et al. Estimation of genetic parameters of major economic traits in blood clam *Tegillarca granosa* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, **41**(6): 907—913 [孙长森, 林志华, 董迎辉, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)主要经济性状遗传参数的估算. 海洋与湖沼, 2010, **41**(6): 907—913]
- [25] 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
- [26] Wright S. Evolution and the Genetics of Populations [M]. Chicago: University of Chicago Press. 1978, 203—210
- [27] 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 Science*, 2015, **39**(4): 1—7 [田野, 邵艳卿, 肖国强, 等. 泥蚶人工选育群体的微卫星分析. 海洋科学, 2015, **39**(4): 1—7]
- [28] Chen X Y, Teng S S, Xiao G Q, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity in five geographic populations of *Tegillarca granosa* [J]. *Marine Science*, 2015, **39**(11): 116—125 [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. 海洋科学, 2015, **39**(11): 116—125]
- [29] 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**: 92—97
- [30] Shao Y Q, Fang J, Bai Y, et al. Correlation of EST-SSR markers with growth traits in razor clam (*Sinonovacula constricta*) [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, **46**(5): 1146—1152 [邵艳卿, 方军, 柏艳, 等. 缘蛤(*Sinonovacula constricta*)EST-SSR标记与生长性状的相关性分析. 海洋与湖沼, 2015, **46**(5): 1146—1152]
- [31] Dong Y, Li Q. Correlation analysis between snps and growth traits of *Apostichopus japonicas* [J]. *Transacrions of Oceanology and Limnology*, 2016, **2**: 49—58 [董玉, 李琪. 刺参SNP标记与生长性状的关联分析. 海洋湖沼通报, 2016, **2**: 49—58]
- [32] Quan Y C, Ma D M, Bai J J, et al. SNPs identification in RNA-Seq data of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed on formulated feed and association analysis with growth trait [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(6): 1128—1134 [全迎春, 马冬梅, 白俊杰, 等. 大口黑鲈转录组SNPs筛选及其与生长的关联分析. 水生生物学报, 2016, **40**(6): 1128—1134]

MICROSATELLITE ANALYSIS OF GENETIC VARIATION IN THE FAST GROWTH FAMILIES OF THE 2nd GENERATION OF *TEGILLARCA GRANOSA* AND CORRELATION WITH GROWTH TRAITS

TENG Shuang-Shuang^{1, 2, 3}, FANG Jun^{1, 2, 3}, SHAO Yan-Qing^{1, 2, 3}, LIN Xing-Guan^{1, 2, 3}, CHAI Xue-Liang^{1, 2, 3} and XIAO Guo-Qiang^{1, 2, 3}

(1. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-Resource, Wenzhou 325005, China; 3. Engineering Research Center for Marine Bivalves, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wenzhou 325005, China)

Abstract: In this study, microsatellite markers were used to assess the genetic structure and genetic diversity of the second generation of *Tegillarca granosa*. In addition, the correlation of these markers with growth-related traits was assessed to explore their potential use for marker-assisted breeding. Genome-wide identification and structural analysis herein led to detect 59 alleles through 18 pairs of primers. Among these, the average values of alleles (N_a) in the families of F19, F21, and F22 were 2.500, 2.722, and 2.722, respectively. The average observed heterozygosity (H_o) was 0.446, 0.510, and 0.628; the average expected heterozygosity (H_e) was 0.394, 0.433, and 0.464, respectively. In addition, the corresponding values of polymorphism information content (PIC) were 0.346, 0.379, and 0.403, respectively. Correlation analyses of these polymorphic markers and growth traits revealed significant association of three loci with shell height, shell length, shell width, and total weight. Specifically, genotype BB of Teg-30 in F19 was remarkably associated with shell height and total weight, while genotype BB of Teg-03 and genotype BC of Teg-20 in F21 showed a significant correlation with the shell height, shell length, shell width, and total weight. As a result, the growth-related markers, identified in the present study, may provide precious genetic information and novel insights for molecular marker-assisted breeding of *T. granosa*.

Key words: *Tegillarca granosa*; Growth traits; Microsatellite markers; Genetic diversity; Correlation analysis