

DOI: 10.5846/stxb201305161083

牛泓博, 聂鸿涛, 朱德鹏, 杨 凤, 闫喜武. 菲律宾蛤仔 EST-SSR 标记与生长性状的相关分析. 生态学报, 2015, 35(6): 1910-1916.

Niu H B, Nie H T, Zhu D P, Yang F, Yan X W. Identification of EST-SSR markers associated with growth-related traits in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(6): 1910-1916.

菲律宾蛤仔 EST-SSR 标记与生长性状的相关分析

牛泓博, 聂鸿涛, 朱德鹏, 杨 凤, 闫喜武*

大连海洋大学, 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 大连 116023

摘要: 研究利用 20 个微卫星标记对菲律宾蛤仔斑马蛤 F2 代家系 107 个个体进行遗传多样性分析, 并对标记位点与生长相关性状进行分析。在 20 个微卫星位点共检测到 41 个等位基因, 各位点等位基因数为 2—3 个, 等位基因片段大小为 109—430 bp, 平均等位基因数为 2.05 个。平均有效等位基因数为 1.71 个, 观测杂合度平均值为 0.504, 期望杂合度的平均值为 0.431, 平均多态信息含量为 0.324。经卡方检验, 3 个位点 SSR11, SSR164 和 SSR213 的基因型分布显著偏离了孟德尔定律 ($P < 0.01$)。运用 SPSS 20.0 对 20 个微卫星位点与菲律宾蛤仔斑马蛤家系生长性状的相关性(壳长、壳宽、壳高和体重)进行连锁显著性检验。结果表明, SSR9 位点与壳高存在显著的相关关系 ($P < 0.05$), SSR135 和 SSR164 位点与壳宽呈显著相关 ($P < 0.05$), SSR142 位点与体重呈显著性相关 ($P < 0.05$)。研究结果可为菲律宾蛤仔的分子标记辅助选育提供参考。

关键词: 菲律宾蛤仔; 微卫星标记; 生长性状; 相关分析

Identification of EST-SSR markers associated with growth-related traits in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*

NIU Hongbo, NIE Hongtao, ZHU Depeng, YANG Feng, YAN Xiwu*

Engineering and Technology Research Center of Shellfish Breeding of Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: The Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, which is widely distributed along the coasts of China, is an economically important marine bivalve species in China's aquaculture industry. The world production of this species was 3.6 million metric tons in 2010. China is the first largest country in the world in terms of production of the Manila clam, producing about 3.0 million metric tons annually, which accounts for about 90% of global production. This species has several pedigrees including White, Zebra, Liangdao Red and Marine Red distributing in the coastal areas in North China. Microsatellites or simple sequence repeats (SSRs) are tandemly repeated motifs of 1—6 genetic base pairs. Microsatellite markers are powerful molecular markers due to their high polymorphism, stability, and co-dominance, and they are used widely in studies of genetic diversity, parentage assignment, genetic linkage map construction, and trait-related marker screening. In this study, 20 microsatellite DNA markers were used to analyze the genetic diversity of 107 individuals of a Zebra F2 pedigree of *R. philippinarum*. Forty-one alleles were detected, and the number of alleles (N_a) was 2—3 at each locus (average, 2.05). The effective number of alleles (N_e) was 1.71, and the DNA fragment length was 109—430 base pairs. The mean values of observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), and polymorphism information content (PIC) were 0.504, 0.431, and 0.324, respectively. The probability value of the chi-square test showed that three loci significantly deviated from Mendelian segregation ($P < 0.01$), which suggested that these loci might link with the adaptive gene, and two loci (SSR11 and SSR164) may link with recessive homozygous lethal genes. The general linear

基金项目: 国家自然科学基金(31302183); 国家高技术研究发展计划“863”项目(2012AA10A400); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48)

收稿日期: 2013-05-16; 网络出版日期: 2014-04-25

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yanxiwu@dlou.edu

model procedure in SPSS20.0 was used to analyze the correlation between the 20 microsatellites and growth-related traits of *R. philippinarum* (i.e., shell length, shell width, shell height, and body weight). Four loci were significantly related to the growth traits ($P < 0.05$): SSR135 and SSR164 were significantly related to shell width ($P < 0.05$), SSR9 was significantly related to shell height ($P < 0.05$), and SSR142 was significantly related to total weight ($P < 0.05$). Favorable genotypes for each growth trait were identified by a multiple comparison among the loci. Allele A for SSR9 had a significant impact on shell height ($P < 0.05$) and had the highest phenotype value; thus, it can be used as a molecular marker for selective breeding. SSR135 and SSR164 had a significant impact on shell width and total weight ($P < 0.05$), respectively, and allele B for SSR135 and allele A for SSR142 had a positive effect on growth-related traits. The following four genotypes of these loci had a favorable effect on growth-related traits: AA for SSR9, BB for SSR135, AA for SSR142, and AB for SSR164. The trait-related microsatellite loci identified in this study will be valuable for marker-assisted breeding of *R. philippinarum*.

Key Words: *Ruditapes philippinarum*; microsatellites; growth-related traits; correlation analysis

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 隶属于软体动物门 (Mollusca), 双壳纲 (Bivalvia), 异齿亚纲 (Heterodonta), 帘蛤目 (Veneroida), 帘蛤科 (Veneridae), 蛤仔属 (*Ruditapes*), 是我国传统四大养殖贝类之一, 广泛分布在我国南北沿海。据统计, 2010 年菲律宾蛤仔世界产量达到 360 多万 t^[1], 我国年产量在 300 万 t 左右, 占世界菲律宾蛤仔产量的 90% 以上^[2]。由于其营养丰富、味道鲜美, 近年来市场需求量也日益增大。然而由于人工苗种的累代养殖, 菲律宾蛤仔养殖群体的种质逐渐下降, 养殖产业迫切需要菲律宾蛤仔的优良品种。近年来, 菲律宾蛤仔的遗传改良技术取得了一定的成绩, 如选择育种和杂交育种等^[2-6]。传统育种方法对目标性状缺乏准确可靠的早期预选手段, 造成育种盲目性大、效率低。而紧密连锁的 DNA 标记为实现水产动物目标性状的早期选择提供了有效途径。因此, 研究与水产动物重要经济性状紧密连锁的分子标记, 特别是对缺乏遗传连锁图谱的水产动物 DNA 标记, 就显得十分重要。

微卫星 (microsatellites) 又称简单序列重复 (Simple Sequence Repeat, SSR), 一般由 1—6 bp 的简单序列重复排列组成。由于微卫星具有多态性丰富、共显性遗传、遵循孟德尔分离定律、易于 (Polymerase Chain Reaction) PCR 扩增等优点, 是分子遗传学研究的理想分子标记, 已广泛应用于水产动物的重要经济性状相关分子标记筛选、(Quantitative Trait Locus) QTL 定位等方面^[7-15]。在海洋贝类, 虾夷扇贝^[16]和马氏珠母贝^[17]等已报道了生长性状与微卫星标记的相关性分析。目前, 对菲律宾蛤仔的研究, 主要集中在生物学、生态学和养殖技术等方面^[2]。然而, 有关菲律宾蛤仔重要经济性状的分子基础研究还刚刚起步, 标记与生长性状的相关分析迄今还未见报道。

本实验利用 20 对微卫星标记对菲律宾蛤仔斑马蛤家系进行遗传多样性分析, 并对标记位点与生长性状相关性进行分析, 筛选出对斑马蛤生长有利的基因型, 实现分子标记和生长性状的连锁分析。为菲律宾蛤仔优良品系的进一步选育, 以及遗传图谱的构建和 QTL 定位等提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用斑马蛤材料为 2011 年大连石河菲律宾蛤仔野生群体中挑选的斑马蛤为亲本, 交配产生 F1 代群体, 上选 F1 代群体中大的个体, 采用巢式设计建立了 30 个 F1 家系, 本实验所用家系为第 8 组家系, 随机选取其中 107 个个体, 对所有个体的壳长、壳宽、壳高和体重进行测量。取部分足尖组织, 固定于 95% 乙醇中用于 DNA 的提取。

1.2 DNA 提取及微卫星分析

DNA 的提取采用苯酚-氯仿-异戊醇法抽提 DNA, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。DNA 保存于 -20 °C 备用。PCR 反应体系: 反应总体积为 10 μ L, 其中 DNA 模板 1 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L、easytaq

MIX 5 μL 、ddH₂O 3.2 μL 。实验中所用微卫星引物的核心序列及退火温度见表 1。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 退火温度 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 银染显色。凝胶在扫描仪上成像, 拍照保存后对电泳谱带进行分析。等位基因大小用 100 bp marker 为参照标准对电泳条带进行判读。

表 1 菲律宾蛤仔 20 个微卫星引物序列和退火温度

Table 1 Characteristics of the 20 polymorphic microsatellite loci from *Ruditapes philippinarum*

位点 Locus	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	核心序列 Repeat motif sequence	引物序列(5'-3') Primer sequence
SSR4	48	(ATC) ₅	F: TTTGTAGCCTTTGGAGTT R: GCGATAACGAAAGTGAAC
SSR9	52	(TTG) ₅	F: CGATGTTTCATTGTTTG R: ATGCTTTCTTTTCGTGTA
SSR11	54	(TACA) ₅	F: GGCTCCCACATTCTCATT R: CGTCTCCTGCCCTTAACCA
SSR106	49	(AGT) ₆	F: ACCTCAGTTCAAATGTCT R: AATACTAACGCTGTGGAT
SSR107	47	(GA) ₆	F: AGCCAATGGTAGGATAAT R: GTCATAGTGGGTTCAGGT
SSR122	46	(TTC) ₈	F: CCTCTGTATCCGACTCAC R: GGAAAGCCAATTAGTATCA
SSR135	47	(TA) ₆	F: TTTACTGTATTGATGGGACT R: CTTATCTTTGCTTGCTTATT
SSR142	51	(CA) ₆	F: CAGGACATGGGTTACAAA R: AGTCACAGAATCCGCAAA
SSR164	49	(GT) ₁₇	F: AATCAAACCAGCACAATC R: AAACATTAGCAACGGATC
SSR213	49	(CA) ₆	F: ATAGTAAGTGAATGGGGATA R: TGTTCGTGTCAAAATGGT
SSR244	49	(AGTT) ₁₂	F: TCCTGGAACAAAGCAATA R: TAAACATCCGCAAGGTAC
SSR261	52	(TGA) ₆	F: GAGGTCCTGTTGCGTTTA R: CTTTCATCTCCCATTTTCATT
SSR313	50	(TC) ₆	F: ACTTGCTTAGCTGGTGGT R: GAACAGGTGTTGGGAGAA
SSR333	47	(ACA) ₅	F: TACTCAACTCACCTCCC R: ATTGTTCCAGAAAAGCATC
SSR337	47	(CAA) ₅	F: TAACCAGACAAAGCGTAT R: GGTGAAGGGATTTAGAAT
SSR341	49	(CAA) ₅	F: TAATGGAAGAAGGAGCAA R: TCACAGCACCACAGTAAA
SSR361	46	(TTTG) ₇	F: AGAGTTACGCTTATTGGT R: GGTGATTTATTCGCTCTT
SSR372	48	(ATC) ₆	F: CACGAAATGCTAACAATG R: TGAAAGTGAAGGCTATGA
SSR373	46	(ATG) ₈	F: TCTTGCTGAAAGTCCTAA R: TCAGTTGACCAAGAAAAG
SSR399	47	(3CT) ₆	F: TACTTTGGCTGATAATCTAG R: TTATAGGGAGAAAAGGGTG

1.3 统计分析

用 PopGene3.2 软件进行数据处理、遗传多样性分析, 计算等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)及期望杂合度(H_e)。根据 Botstein 等^[18]的方法可计算多态信息含量(PIC)。利用 PIC-CALC 计算软件, 根据等位基因频率来计算每个位点的多态信息含量, 其计算公式如下:

$$PIC = 1 - \sum_{i=2}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

式中, n 为某一位点上的等位基因数; p_i 、 p_j 分别为群体中第 i 和第 j 个位点的等位基因频率, $j = i + 1$ 。

用 SPSS 20.0 软件中的一般线性模型 (GLM) 对菲律宾蛤仔斑马蛤家系的生长相关性状与 20 个微卫星标记相关性进行分析。其线性模型如下:

$$y_{ij} = \mu + g_i + \varepsilon_{ij}$$

式中, y_{ij} 为斑马蛤某性状第 i 个标记第 j 个个体表型值, μ 为群体平均值, g_i 为第 i 个标记的效应值, ε_{ij} 为随机误差。

2 结果

2.1 性状的表型值分布

经测量得到的壳长、壳宽、壳高和体重 4 个生长性状, 均符合正态分布, 可直接进行相关性分析。正态分

布信息见表 2。

表 2 壳长、壳宽、壳高和体重的表型数据及正态分布统计检验

Table 2 The phenotypic data of shell length, width, height, body weight and normal distribution test

项目 Item	最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值 Mean±SD	K-S 值 Kolmogorov-Smirnov Z	P 值 P value
壳长 Shell length/mm	6.15	13.81	10.53 ± 1.39	0.805	0.536
壳宽 Shell width/mm	2.04	5.16	3.60 ± 0.61	0.784	0.570
壳高 Shell height/mm	4.87	10.60	7.49 ± 1.05	0.806	0.534
体质量 Total weight/g	0.04	0.42	0.19 ± 0.07	1.325	0.060

2.2 微卫星位点基因型

利用父母本和 8 个子代进行引物筛选,经 PCR 扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳,从 32 对微卫星引物中筛选得到 20 对扩增条带清晰、稳定,具有多态性的位点。检测了父母本和 107 个 F₂ 子代个体在 20 个微卫星位点的基因型(表 3)。SSR372 和 SSR373 位点在菲律宾蛤仔斑马蛤家系部分个体中的扩增结果见图 1。

20 个微卫星位点共检测到 41 个等位基因,片段大小为 109—430 bp,各位点的等位基因数 2—3 个,平均等位基因数 2.05 个,平均有效等位基因数为 1.71 个。各位点的期望杂合度、观测杂合度、基因型分布和多态信息含量等值见表 3。20 个位点的期望杂合度平均值为 0.431,观测杂合度平均值为 0.504,多态信息含量平

均值为 0.324。在 20 个位点中,有 2 个位点 SSR213 和 SSR261 的观测杂合度低于期望杂合度,表现出纯合子过剩、杂合子不足现象。另外 18 个位点的观测杂合度则高于期望杂合度,其中 SSR11 和 SSR164 的观测杂合度与期望杂合度的差异较大。经卡方检验,有 17 个位点的基因型比例符合孟德尔分离定律,另外 3 个位点 SSR11,SSR164 和 SSR213 的基因型分布显著偏离了孟德尔定律($P<0.01$)(表 3)。

表 3 菲律宾蛤仔 20 个微卫星位点在斑马蛤 F₂ 家系中的统计信息

Table 3 Statistic information for 20 microsatellite loci in an F₂ family of *Ruditapes philippinarum*

位点 Locus	亲本基 因型 Parental genotypes	等位基因 片段大 小/bp Size range	等位基因 N_a	有效等位 基因数 N_e	期望 杂合度 H_o	观测 杂合度 H_e	子代 基因型 Genotypes of progeny	多态信 息含量 PIC	P
SSR4	AB×BB	163—175	2	1.545	0.354	0.457	AB:BB=47:56	0.290	0.375
SSR9	AB×AB	109—118	2	1.926	0.483	0.523	AA:AB:BB=36:53:16	0.365	0.014
SSR11	AA×AB	359—383	2	1.966	0.494	0.868	AA:AB=16:91	0.371	0.000
SSR106	AA×AB	409—421	2	1.594	0.374	0.495	AA:AB=54:53	0.303	0.923
SSR107	AB×BB	255—263	2	1.618	0.384	0.514	AB:BB=54:51	0.309	0.770
SSR122	AB×AA	404—422	2	1.523	0.345	0.440	AA:AB=59:48	0.284	0.288
SSR135	BB×AB	237—253	2	1.487	0.329	0.413	AB:BB=43:64	0.274	0.042
SSR142	AA×AB	298—322	2	1.618	0.384	0.514	AA:AB=52:55	0.309	0.772
SSR164	AB×AB	418—430	2	1.892	0.474	0.762	AA:AB:BB=0:83:24	0.360	0.000
SSR213	AB×AB	379—391	2	1.989	0.500	0.241	AA:AB:BB=37:27:43	0.374	0.000
SSR244	AB×BB	309—325	2	1.552	0.358	0.463	AB:BB=49:58	0.293	0.384
SSR261	AB×AB	163—172	2	1.963	0.493	0.440	AA:AB:BB=23:46:38	0.370	0.043

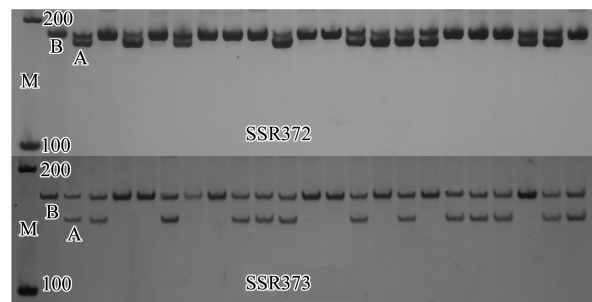


图 1 引物 SSR372 和 SSR373 在斑马蛤 F₂ 家系部分个体的聚丙烯酰胺电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern of PCR product of partial individuals in the F₂ family of *Ruditapes philippinarum* amplified with microsatellite marker SSR372 and SSR373

图中 M 为 100 bp DNA Marker, A、B 为不同等位基因

续表

位点 Locus	亲本基 因型 Parental genotypes	等位基因 片段大 小/bp Size range	等位基因 <i>Na</i>	有效等位 基因数 <i>Ne</i>	期望 杂合度 <i>Ho</i>	观测 杂合度 <i>He</i>	子代 基因型 Genotypes of progeny	多态信 息含量 <i>PIC</i>	<i>P</i>
SSR313	AB×BB	215—227	2	1.547	0.355	0.459	AB:BB=49:58	0.291	0.384
SSR333	AA×AB	248—254	2	1.523	0.345	0.440	AA:AB=60:47	0.284	0.209
SSR337	AB×AA	288—312	2	1.452	0.313	0.385	AA:AB=66:41	0.263	0.016
SSR341	AA×AB	169—193	2	1.733	0.450	0.608	AA:AB=41:64	0.333	0.025
SSR361	BC×AC	302—318	3	2.698	0.632	0.750	AB:AC:BC:CC=27:29:24:26	0.558	0.921
SSR372	BB×AB	173—191	2	1.485	0.328	0.411	AB:BB=45:62	0.273	0.100
SSR373	BB×AB	154—166	2	1.588	0.372	0.490	AB:BB=50:52	0.302	0.843
SSR399	BB×AB	125—131	2	1.490	0.331	0.415	AB:BB=43:61	0.275	0.078
平均值 Mean			2.05	1.709	0.431	0.504		0.324	

Na: The number of alleles; *Ne*: Number of effective alleles; *Ho*: Observed heterozygosity; *He*: Expected heterozygosity; *PIC*: Polymorphism information content; *P* 为基因型分离比的卡方检验; 加粗 *P* 值代表偏分离的基因型分离比 ($P < 0.01$)

2.3 微卫星标记与生长性状的相关性分析

用 SPSS 20.0 软件中的一般线性模型 (General Linear Model, GLM), 对微卫星位点基因型与斑马蛤主要生长性状 (壳长、壳宽、壳高和体重) 之间的相关性进行分析, 经方差分析检验呈显著性差异的位点。在 20 对微卫星位点中, 共找出 4 个与斑马蛤生长相关的位点 (表 4)。SSR9 位点与壳高呈显著关联, SSR135 和 SSR164 与壳宽显著相关, SSR142 位点与体重呈显著性相关。由于相关分析得到的微卫星位点除 SSR9 号引物外其他 3 个位点基因型个数都小于 3, 故使用 SPSS 中 compare means 过程进行不同位点表型值的比较。在 SSR9 位点上, AA 基因型的壳长、壳宽、壳高和体重 4 项生长指标平均值均高于其他基因型个体, 说明 AA 基因型对斑马蛤生长起正效应。另外, SSR135 位点上的 BB 基因型、SSR142 位点上的 AA 基因型和 SSR164 位点上的 AB 基因型, 在 4 项生长指标中的平均值均高于各自位点中的其他基因型, 说明 4 个基因型在各自位点上对斑马蛤的生长具有正效应。

表 4 20 个微卫星位点不同基因型主要生长性状的平均值及多重比较

Table 4 Means and multiple comparisons of major growth traits with different genotypes at 20 microsatellites

位点 Locus	基因型 Genotype	个体数 No.	壳长/mm Shell length	壳宽/mm Shell width	壳高/mm Shell height	体重/g Body weight
SSR9	AA	36	10.97±1.13a	3.95±0.48a	7.91±0.91a *	0.21±0.07a
	AB	53	10.26±1.39b	3.66±0.60b	7.25±0.97b *	0.18±0.07b
	BB	15	10.34±1.48b	3.65±0.68b	7.33±1.22b *	0.18±0.09b
SSR135	AB	43	10.30±1.63a	3.61±0.71a *	7.28±1.22a	0.17±0.08a
	BB	64	10.69±1.18b	3.86±0.50b *	7.64±0.90b	0.20±0.07b
SSR142	AA	52	10.80±1.23a	3.88±0.56a	7.70±0.96a	0.21±0.07a *
	AB	55	10.28±1.48b	3.65±0.63b	7.30±1.11b	0.18±0.07b *
SSR164	AB	83	10.66±1.36a	3.83±0.61a *	7.59±1.07a	0.19±0.08a
	BB	24	10.11±1.41b	3.56±0.57b *	7.19±0.96b	0.17±0.06b

上标字母表示在同一位点中不同基因型之间差异显著 ($P < 0.05$), 无字母表示基因型间差异不显著, * 表示与生长相关的位点

3 讨论

群体的遗传多样性主要表现在杂合度、等位基因数和多态信息含量三个方面。杂合度大小可以反映出遗传结构变异程度的高低, 杂合度期望越高, 群体的遗传结构越复杂^[19]。本实验中, 观测杂合度和期望杂合度的平均值分别为 0.504 和 0.431, 说明实验家系的遗传变异和遗传多样性较丰富。从等位基因来看, 有效等位

基因越接近所检测到的等位基因的绝对值,说明等位基因在群体中的分布越均匀^[20]。本研究在 20 个微卫星位点共检测到 41 个等位基因,其中有效等位基因数为 34 个,接近于实际等位基因数,表明所检测的微卫星位点的等位基因在群体中分布较均匀。多态信息含量可作为一个衡量遗传标记所包含的或能提供的遗传信息容量的指标。一般认为,在某一群体中,当 $PIC > 0.5$ 时该位点表现为高度多态, $0.25 < PIC < 0.5$ 时该位点表现为中度多态,当 $PIC < 0.25$ 时该位点表现为低度多态^[21]。本实验中,19 个位点均表现为中度多态位点,1 个位点表现为高度多态位点,表明所选微卫星标记多态性相对丰富,可作为有效的遗传标记进行遗传多样性分析。

在许多海洋贝类中,经常会出现偏分离的等位基因,这似乎是海洋贝类中普遍存在的现象。在本实验中,发现 3 个微卫星位点的基因型分离比显著偏离孟德尔遗传定律($P < 0.01$),部分位点偏分离的原因可能与生活环境和人工选择有关,再有可能是由隐性致死基因、取样或基因型判读错误等因素引起^[22]。大部分微卫星位点的期望杂合度与观测杂合度基本接近,说明群体内的基因型频率未发生大的改变。但有 2 个位点 SSR11 和 SSR164 的观测杂合度明显大于期望杂合度,在 SSR164 发现了一种纯合子完全缺失的现象(基因型 AA 为 0),说明该位点附近可能存在着与之紧密连锁的隐性致死基因^[23]。

菲律宾蛤仔的壳长、壳宽、壳高、体重等性状属于数量性状,数量性状受多个基因的控制,其遗传基础比较复杂且容易受环境的影响。标记与性状之间的连锁分析,是根据标记位点的基因型以及数量性状的表型对个体进行显著性检验,差异显著则说明标记与数量性状存在关联^[24]。因此,如果一个群体的性状差异显著,或两个群体的差异很大,就可以通过标记与性状的相关分析,找出性状与一个或多个标记的遗传相关,一旦发现显著相关,即可认为存在一个数量性状位点,从而实现从表型到基因型选择育种的转变^[25]。借助微卫星标记进行性状连锁分析或 QTL 定位,在水产动物育种中已也有较多报道^[10-17]。

目前,菲律宾蛤仔遗传标记的开发较少,不足以满足遗传作图和 QTL 定位的需要。所以,有必要应用有限的微卫星标记对菲律宾蛤仔生长相关性状进行连锁分析。在本研究中,共找到了 4 个与生长性状相关的位点,SSR9 位点与壳高存在显著的相关关系($P < 0.05$),SSR135 和 SSR164 与壳宽显著相关($P < 0.05$),SSR142 与体重显著相关($P < 0.05$)。在这些关联中,出现了几个标记同一个性状相关,说明这些位点存在多因一效的现象,并符合数量性状的相关理论。对上述位点不同基因型的多重比较表明,SSR9 位点的 AA 基因型、SSR135 位点的 BB 基因型、SSR142 位点的 AA 基因型和 SSR164 位点的 AB 基因型都与壳长、壳宽、壳高和体重性状呈正相关。目前,分子标记在菲律宾蛤仔中的应用主要集中于遗传多样性研究^[26-27],有关菲律宾蛤仔性状相关分子标记的筛选迄今未见报道。本文筛选出菲律宾蛤仔生长性状相关的微卫星标记,为菲律宾蛤仔分子标记辅助选育提供参考。

参考文献(References):

- [1] FAO. Yearbook of fishery statistics summary tables. 2011, Available from <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/default.htm#aqua>.
- [2] 张国范, 闫喜武. 蛤仔养殖学. 北京: 科学出版社, 2010.
- [3] 闫喜武, 张跃环, 霍忠明, 孙焕强, 杨凤, 张国范. 不同壳色菲律宾蛤仔品系 F2 的表型性状. 水产学报, 2010, 34(6): 701-709.
- [4] 闫喜武, 张跃环, 孙焕强, 霍忠明, 孙欣, 杨凤, 张国范. 菲律宾蛤仔两道红与白斑马品系的三元杂交. 水产学报, 2010, 34(8): 1190-1197.
- [5] Yan X W, Huo Z M, Yang F, Zhang G F. Heritability of larval and juvenile growth for two stocks of Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Aquaculture Research, 2013, doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03250.x.
- [6] Zhao L Q, Yan X W, Huo Z M, Yang F, Zhang G F. Divergent selection for shell length in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Journal of the World Aquaculture Society, 2012, 43(6): 878-884.
- [7] Cnaani A, Hallerman E M, Ron M, Weller J I, Indelman M, Kashi Y, Graham A E G, Hulata G. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F₂ tilapia hybrid. Aquaculture, 2003, 223(1/4): 117-128.
- [8] Rodriguez M F, LaPatra S, Williams S, Famula T, May B. Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. Aquaculture, 2004, 241(1/4): 93-115.
- [9] 高国强, 常玉梅, 韩启霞, 池炳杰, 李明云, 薛良义, 梁利群. 大黄鱼耐低温性状相关微卫星标记的筛选. 遗传, 2010, 32(3): 248-253.

- [10] 张天时, 刘萍, 李健, 孔杰, 王清印. 中国对虾与生长性状相关微卫星 DNA 分子标记的初步研究. 海洋水产研究, 2006, 27(5): 34-38.
- [11] 樊佳佳, 白俊杰, 李小慧, 何小平, 何小燕, 李胜杰, 叶星, 吴立新. 大口黑鲈生长性状的微卫星 DNA 标记筛选. 遗传, 2009, 31(5): 515-522.
- [12] 张研, 梁利群, 常玉梅, 侯宁, 鲁翠云, 孙效文. 鲤鱼体长性状的 QTL 定位及其遗传效应分析. 遗传, 2007, 29(10): 1243-1248.
- [13] 王桂兴, 刘永新, 孙效文, 刘海金. 牙鲆微卫星分子标记与生长性状的相关性分析. 东北农业大学学报, 2009, 40(7): 77-84.
- [14] 刘贤德, 韦信键, 蔡明夷, 刘洋, 王志勇. 大黄鱼 22 个微卫星标记在 F1 家系中的分离方式及与生长性状的相关分析. 水产学报, 2012, 36(9): 1322-1330.
- [15] 刘磊, 李健, 刘萍, 赵法箴, 高保全, 杜盈, 马春艳. 三疣梭子蟹微卫星标记与生长相关性状的相关性分析. 水产学报, 2012, 36(7): 1034-1041.
- [16] 张曼, 陈蒙, 姬南京. 虾夷扇贝家系群体遗传结构及其微卫星标记与经济性状相关性的分析研究. 中国农学通报, 2012, 28(20): 125-130.
- [17] 邓岳文, 高远镇, 王学颖, 杜晓东. 马氏珠母贝生长性状与 EST-SSR 标记的关联分析. 农业生物技术学报, 2013, 21(1): 77-88.
- [18] Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [19] Yang M S, Hertel H, Schneck V. Genetic diversity and population structure of *Robinia pseudoacacia* provenances from middle Europe. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(12): 2700-2706.
- [20] Hines H C, Zikakis J P, Haenlein G F, Kiddy C G, Trowbridge C L. Linkage relationships among loci of polymorphism in blood and milk of cattle. Journal of Dairy Science, 1981, 64(1): 71-76.
- [21] Wright S. Evolution and the Genetics of Populations: Variability Within and Among Natural Population. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- [22] Launey S, Hedgecock D. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Genetics, 2001, 159(1): 255-265.
- [23] Nie H T, Li Q, Kong L. Centromere mapping in the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) through half-tetrad analysis in gynogenetic diploid families. Animal Genetics, 2012, 43(3): 290-297.
- [24] Óvilo C, Pérez-Enciso M, Barragán C, Clop A, Rodríguez C, Oliver M A, Toro M A, Noguera J L. A QTL for intramuscular fat and backfat thickness is located on porcine chromosome 6. Mammalian Genome, 2000, 11(4): 344-346.
- [25] 钟金城, 陈智华. 分子遗传学与动物育种. 成都: 四川大学出版社, 2001.
- [26] 虞志飞, 闫喜武, 杨霏, 王金海, 张跃环, 杨凤, 张国范. 菲律宾蛤仔大连群体不同世代的遗传多样性. 生态学报, 2011, 31(15): 4199-4206.
- [27] 闫喜武, 虞志飞, 秦艳杰, 杨霏, 王金海, 张跃环, 杨凤, 张国范. 菲律宾蛤仔 EST-SSR 标记开发及不同地理群体遗传多样性. 生态学报, 2011, 31(15): 4190-4198.