

## 泥蚶生长性状相关 AFLP 分子标记的筛选

董迎辉<sup>1,2</sup>, 姚韩韩<sup>2</sup>, 林志华<sup>2\*</sup>, 肖国强<sup>3</sup>, 柴雪良<sup>3</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100;

3. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005)

**摘要:** 以浙江乐清泥蚶养殖群体为育种基础群, 经过 2 代连续选育获得了泥蚶快速生长品系, 生长对比试验发现其在壳长、壳高、壳宽、总体质量等性状上都表现出了显著的生长优势。为了研究快速生长品系的遗传结构并筛查生长性状相关的分子标记, 利用 AFLP 标记技术对泥蚶快速生长品系和对照组群体的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增和电泳检测。采用 40 对多态性丰富的引物组合在 64 个个体中共扩增出 2 180 条带谱, 扩增位点总多态性比例达 85.6%。从 Nei's 基因多样性和 Shannon's 信息指数反映的遗传多样性来看, 选育品系的遗传多样性略高于对照组群体。群体遗传分化系数  $G_{ST}$ (0.022 4)和基因流  $N_m$ (22. 281 1)数据显示, 两群体间遗传变异很小, 存在明显的基因流动。通过比对 AFLP 指纹图谱的位点差异, 在 2 180 条扩增带中共筛选出了 7 个显著性差异位点, 其中 2 个位点只在选育品系中出现, 2 个位点在选育品系中出现的频率极显著高于对照组( $P < 0.01$ ), 另有 3 个位点在对照组中出现频率显著高于选育品系( $P < 0.05$ )。据此初步确定这些位点为与生长性状相关的候选标记。

**关键词:** 泥蚶; 生长性状; 扩增片段长度多态性; 遗传变异

**中图分类号:** Q 346; S 917

**文献标志码:** A

泥蚶(*Tegillarca granosa*)是江苏、浙江、福建沿海居民喜食的海鲜佳品, 也是东海区滩涂经济贝类养殖的主要对象。据统计, 2010 年蚶类(主要是泥蚶)全国养殖总面积约 7.57 万  $hm^2$ , 总产量达到 31.04 万 t, 仅浙江省泥蚶养殖面积 1.04 万  $hm^2$ , 年产量 11.08 万 t, 年产值近 20 亿元<sup>[1]</sup>。然而, 目前养殖的泥蚶仍处于野种家养的状态, 种质属于未经遗传改良的野生型, 在经过多年累代繁、养殖之后, 生产中出现了生长减慢、个体小型化、单产降低、病害易发等生产性状退化现象, 严重制约泥蚶养殖业的健康持续发展<sup>[2]</sup>。因此, 尽快培育出高产、抗逆的泥蚶良种并迅速推广到养殖生产中去, 将成为突破瓶颈、带动产业快速发展的重中之重。

当前, 常规育种与分子育种手段的有机结合,

是育种技术的发展方向。群体选育是遗传改良和新品种培育中最常用且最有效的方法, 已在动物育种中取得了广泛的成功<sup>[3]</sup>。在群体选育中, 可利用分子标记技术研究其遗传背景, 筛选与经济性状紧密连锁的特异标记, 在新品种选育前期就能实现对优良经济性状的选择, 从而大大加快良种培育进程。利用分子标记技术筛选水产动物生长、抗病、抗逆等分子标记在国内外已有一些报道, 如牙鲆(*Paralichthy solivaceus*)<sup>[4-5]</sup>、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)<sup>[6]</sup>、中国对虾(*Penaeus chinensis*)<sup>[7-9]</sup>等。本研究以乐清泥蚶养殖群体为育种基础群, 通过顶端连续选育的方法获得快速生长的泥蚶新品系, 且选育品系较对照组表现出了显著的生长优势。本研究针对泥蚶快速生长品系的性状分离现象,

收稿日期: 2011-10-29 修回日期: 2011-12-24

资助项目: 国家现代贝类产业技术体系(nycytx-47); 宁波市科技局农业择优委托项目(2010C10011); 温州市重大科技项目(S20080019)

通讯作者: 林志华, E-mail: zhilhua9988@126.com

采用 AFLP(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术对快速生长品系和对照组进行遗传差异分析, 筛选与生长性状相关的分子标记, 以期为泥蚶生长性状的数量性状位点(quantitative trait locus, QTLs)定位、分子标记辅助育种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

泥蚶快速生长品系于 2010 年 8 月采自浙江省海洋水产养殖研究所清江基地, 是以浙江乐清泥蚶养殖群体同批中的大个体为育种基础群, 经过连续 2 代强化选择(选择强度为 10%)而获得的生长速度较快的群体。采集快速生长选育品系(selected strain, SS)与未经选育的对照组群体(control group, CG)各 50 颗, 用于形态学数据分析, 并从中各取样 32 颗, 活体解剖取闭壳肌, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存, 用于基因组 DNA 提取。

AFLP 分析所用的内切酶 *EcoR*、*Mse* 和  $T_4$ -DNA 连接酶为 Fermentas 公司产品, PCR 扩增体系中的 *Taq* 酶、dNTP、Buffer 购自大连宝生物公司, *EcoR* 接头、*Mse* 接头及扩增引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成, 序列见表 1。

### 1.2 形态学数据测量

从泥蚶选育品系和对照组中各随机取样 50 颗, 用游标卡尺测量其壳长、壳高和壳宽(精度为 0.01 mm), 用电子天平称量体质量(精度为 0.01 g), 进

行形态参数分析。

### 1.3 DNA 提取和 AFLP 分析

**基因组 DNA 的提取** 取泥蚶闭壳肌, 采用酚—氯仿法提取基因组 DNA。用 1%琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 的完整性检测, 紫外分光光度计测定浓度和纯度, 最终用无菌超纯水稀释至  $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ , 放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

**引物筛选和 AFLP 指纹图谱构建** 经过大量预实验, 从 63 对引物组合中筛选出 40 对扩增条带清晰、多态性高的引物组合。利用这 40 对引物对快速生长品系和对照组共 64 个个体进行选择性的扩增。扩增产物经  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 5 min 后, 在浓度为 4.5%聚丙烯酰胺凝胶上 60 W 恒功率电泳 2.5 h, 对电泳后的胶版进行银染, 得到清晰的 AFLP 指纹图谱, 胶版自然风干后用于位点统计分析<sup>[10]</sup>。

### 1.4 数据处理与分析

采用 SPSS 16.0 软件, 对群体间形态特征指标的差异进行单因子方差分析(ANOVA)和 Tukey 多重比较。在 AFLP 指纹图谱中, 根据每个个体在银染凝胶的不同迁移率处扩增条带的缺失或呈现进行统计, 转换成 0/1 数据矩阵; 根据统计结果, 用 Popgen 1.32 软件计算得到各群体的多态位点比例(*P*)、Nei's 基因多样性指数(*H*)、Shannon's 信息指数(*I*)、基因分化系数( $G_{ST}$ )、基因流( $N_m$ )、群体间相对遗传距离(*D*)和遗传相似性系数<sup>[11]</sup>。统计每个位

表 1 AFLP 扩增所用接头和引物的序列  
Tab. 1 Sequence of adaptors and primers used for AFLP analysis

引物 primer	序列(5'-3') sequence	引物 primer	序列(5'-3') sequence
E 接头 <i>EcoR</i> I adaptor <i>EcoR</i> I 引物 <i>EcoR</i> I primers	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'	M 接头 <i>Mse</i> I adaptor <i>Mse</i> I 引物 <i>Mse</i> I primers	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
E01	GACTGCGTACCAATTC A	M01	GATGAGTCCTGAGTAA C
E32	GACTGCGTACCAATTC AAC	M51	GATGAGTCCTGAGTAA CCA
E33	GACTGCGTACCAATTC AAG	M62	GATGAGTCCTGAGTAA CTT
E42	GACTGCGTACCAATTC AGT	M55	GATGAGTCCTGAGTAA CGA
E45	GACTGCGTACCAATTC ATG	M58	GATGAGTCCTGAGTAA CGT
E34	GACTGCGTACCAATTC AAT	M48	GATGAGTCCTGAGTAA CAC
E35	GACTGCGTACCAATTC ACA	M54	GATGAGTCCTGAGTAA CCT
E38	GACTGCGTACCAATTC ACT	M61	GATGAGTCCTGAGTAA CTG
E39	GACTGCGTACCAATTC AGA		
E44	GACTGCGTACCAATTC ATC		
E45	GACTGCGTACCAATTC ATG		

点在群体内的出现频率, 利用 SPSS 16.0 软件进行  $X^2$  差异显著性检验, 筛选出在群体间存在显著性差异的条带。差异性位点记录格式为“引物组合名称+扩增位点的序列号”, 序列号按照该引物扩增片段从大到小依次编排。

## 2 结果

### 2.1 形态学数据分析

对泥蚶群体间形态指标的差异进行了 ANOVA 分析和 Tukey 多重比较, 结果显示, 壳长、壳宽、壳高、总重这 4 个形态学参数 (表 2, 表 3), 选育品系均大于对照组, 并且在 2 个群体间的差异达到了极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 这说明经过两代群体选育, 选育品系生长优势明显。

### 2.2 泥蚶选育品系的遗传多样性、遗传距离及遗传变异分析

40 对引物共扩增出 2 180 条带, 平均每对引物组合扩增出 54.5 条带, 平均多态性比例 85.6%, 其中选育群体多态性条带数为 1 835, 多态性比例为

84.17%, 对照组群体共产生 1784 条多态性条带, 多态性比例为 81.16%。从 Nei's 基因多样性和 Shannon's 信息指数上来看, 选育品系遗传多样性略大于对照组 (表 4)。

泥蚶群体间遗传距离数据显示, 选育品系与对照组的遗传距离较小 (0.011 3), 这表明经过一代选育, 群体间差异较小, 亲缘关系仍然很近。遗传分化系数  $G_{ST} = 0.022 4$ , 基因流  $N_m = 22.281 1$ , 说明遗传变异较小, 群体间存在明显的基因流动 (表 5)。

### 2.3 泥蚶生长相关分子标记的筛选

在扩增得到的 2180 条带中, 经过  $X^2$  检验共发现 7 个位点在两群体间表现出显著的频率差异, 具体统计结果见表 6。其中在选育品系中发现了 2 个特异性标记 (E33M51-2、E45M51-11), 即只在选育品系中出现 (频率分别为 0.812 5 和 0.343 8), 而对对照组群体不出现 (频率为 0) (图 1, 图 2)。有 2 个位点 (E33M51-7、E45M54-25) 在选育品系中出现的频率极显著的高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 而在对照组中筛选到 3 个位点 (E33M48-4、E35M54-4、E45M54-2), 出现频率显著高于选育品系 ( $P < 0.05$ )。

表 2 泥蚶选育品系与对照组群体 4 个形态指标的多重比较 (Tukey 法)

Tab. 2 Multiple comparisons for four morphological traits of SS and CG in *T. granosa* (Tukey method)

群体 group	样本容量 sample size	壳长/mm shell length	壳宽/mm shell width	壳高/mm shell height	总体质量/g total weight
SS	50	17.50 ± 1.38	10.67 ± 0.96	13.51 ± 1.15	1.72 ± 0.41
CG	50	15.40 ± 1.76	9.46 ± 1.14	11.84 ± 1.29	1.20 ± 0.39

表 3 泥蚶选育品系和对照组群体 4 个形态指标的方差分析

Tab. 3 Analysis of variance for four morphological traits of SS and CG in *T. granosa*

	自由度 df	壳长/mm shell length		壳宽/mm shell width		壳高/mm shell height		总体质量/g total weight	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
		群体间 intergroup	1	110.21	44.10**	36.11	32.55**	69.46	46.50**
群体内 intragroup	98	2.50		1.11		1.49		15.68	
总变异 total variation	99								

Notes:  $F_{0.05(1, 98)} = 3.94$ ;  $F_{0.01(1, 98)} = 6.90$ .

表 4 泥蚶选育品系和对照组的位点多态性比例、Nei's 基因多样性和 Shannon's 信息指数比较

Tab. 4 Percentage of polymorphic loci, Nei's gene diversity and Shannon's information index of SS and CG in *T. granosa*

群体 groups	多态位点数 numbers of amplified loci	多态位点比例/% percentage of polymorphic loci (P)	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity (H)	Shannon's 信息指数/ Shannon's information index (I)
SS	183 5	84.17	0.277 8 ± 0.179 5	0.419 0 ± 0.244 7
CG	178 4	81.86	0.266 4 ± 0.180 6	0.404 2 ± 0.248 2
总计 total	183 5	84.17	0.278 5 ± 0.174 1	0.422 4 ± 0.235 1

表 5 泥蚶群体间遗传相似性系数和相对遗传距离(Nei 1978)

Tab. 5 Nei's genetic similarity and genetic distances between SS and CG of *T. granosa*

群体 groups	SS	CG
SS		0.988 7
CG	0.011 3	
$G_{ST} = 0.022 4, N_m = 22.281 1$		

注: 对角线上方为群体间遗传相似性系数, 下方为相对遗传距离。

Notes: Nei's genetic similarity (above diagonal) and genetic distances (below diagonal).

表 6 泥蚶选育品系和对照组的 AFLP 差异性位点及出现频率

Tab. 6 The unique loci and frequency in SS and CG of *T. granosa*

差异位点 unique loci	SS	CG	$X^2_c$	P
E33M48-4	0.0313	0.2188	5.143	0.023
E33M51-2	0.8125	0.0000	43.789	0.000
E33M51-7	0.9375	0.5313	13.537	0.000
E35M54-4	0.0625	0.2813	5.984	0.014
E45M51-11	0.3438	0.0000	13.383	0.000
E45M54-2	0.0938	0.3438	5.851	0.016
E45M54-25	0.7813	0.4063	9.328	0.002

Notes:  $X^2_{0.05} = 3.84; X^2_{0.01} = 6.63$ .

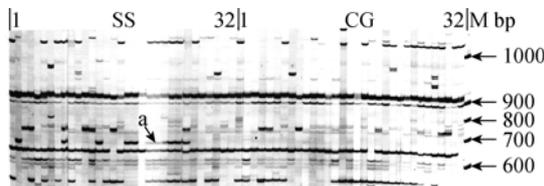


图 2 引物 E45M51 对泥蚶选育品系和对照组的 AFLP 扩增图谱

a. 选育品系特有标记。

Fig. 2 Electrophoretogram of AFLP by primer E45M51 of SS and CG in *T. granosa*

a. The unique bands in breeding groups.

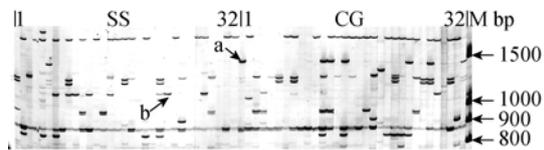


图 3 引物 E33M48 对泥蚶选育品系和对照组的 AFLP 扩增图谱

a. 对照组特有标记; b. 选育品系出现频率较高的标记。

Fig. 3 Electrophoretogram of AFLP by primer E33M48 of SS and CG in *T. granosa*

a, b. Significantly different bands of two groups.

### 3 讨论

#### 3.1 泥蚶选育群体的遗传多样性

随着分子生物学的快速发展, 分子标记技术

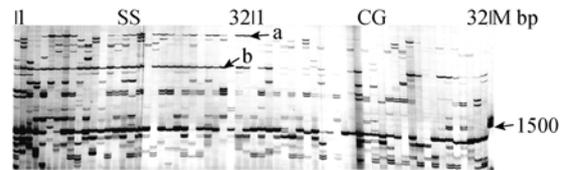


图 1 引物 E33M51 对泥蚶选育品系和对照组的 AFLP 扩增图谱

a. 选育品系特有标记; b. 选育品系出现频率较高的标记。

Fig. 1 Electrophoretogram of AFLP by primer E33M51 of SS and CG in *T. granosa*

a. The unique bands in breeding groups; b. Significantly different bands of two groups.

已广泛地应用于物种遗传多样性分析、亲缘关系鉴定、遗传连锁图谱构建、品种鉴定、分子标记辅助育种等诸多领域。关于泥蚶分子标记的研究, 国内外已有一些报道, 如李太武等<sup>[12]</sup>采用随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术对韩国、山东荣成、福建福鼎、浙江奉化和温岭 5 个泥蚶野生群体的遗传多样性进行了分析, 结果发现与韩国野生群体相比, 我国 4 个泥蚶群体在多态位点比例和遗传杂合度上都有不同程度的降低, 认为人为等因素已经开始影响到泥蚶的种质资源状况; 徐义平等<sup>[13]</sup>用 RAPD 技术研究了温州乐清湾地区养殖的 3 个泥蚶群体 (乐清湾群体、韩国群体和福建群体) 的遗传多样性, 结果显示遗传多样性大小依次为韩国群体 > 乐清湾群体 > 福建群体; 曾庆国等<sup>[14]</sup>、顾晓英等<sup>[15]</sup>利用磁珠富集法对泥蚶微卫星位点进行筛选鉴定和引物扩增条件优化; 郑文娟等<sup>[16]</sup>利用线粒体 *CO* 基因测序技术评价了我国沿海 7 个泥蚶群体的遗传分化, 将我国沿海泥蚶分成福建以南和以北两大类群, 并指出二类群之间的遗传分化已达到亚种水平; 姚韩韩等<sup>[2]</sup>利用 9 对 AFLP 引物对泥蚶 4 个快速生长

家系的遗传结构和遗传差异进行了分析, 在指纹图谱中找到了 40 个可用作家系鉴别的特征性标记, 并依据家系的遗传多样性和遗传差异预测了家系培育的最佳亲本配组, 为分子标记辅助泥蚶家系选育提供了科学依据。本实验利用 AFLP 技术分析了泥蚶选育品系和对照组的遗传差异, 从获得的各项遗传参数来看, 选育群体的遗传多样性略高于对照组, 这说明经过两代群体选育以后, 选育品系的遗传多样性没有降低, 种质仍处于稳定状态, 这可能与制种过程中采用的亲本数量较多、尽量减少了近亲繁殖带来的衰退有关。

Wright<sup>[17]</sup>认为, 遗传分化系数  $G_{ST}$  在 0~0.05 之间且  $N_m > 1$ , 说明群体之间没有遗传分化, 存在显著的基因流动。本研究中, 根据基因频率计算出泥蚶快速生长家系和对照组的  $G_{ST}=0.022\ 4$ ,  $N_m=22.281\ 1$ , 遗传距离  $D=0.011\ 3$ , 这说明泥蚶经过群体选育之后, 虽然子代在形态学参数方面表现出了生长性能的显著差异, 但在分子水平上尚未出现明显的遗传分化。李素红等<sup>[7]</sup>对中国对虾抗病群体和感病群体进行 RAPD 分析, 发现两群体在抗病能力上有很大的差异, 但也没有明显的遗传分化。其原因都在于, AFLP、RAPD 等分子标记技术是对整个基因组的变异情况进行评价的手段, 而生长、抗病等性状的改变可能仅是个别基因的 SNPs 位点发生变异引起的, 因此来自同一基础群的泥蚶或中国对虾出现明显的遗传分化。

### 3.2 泥蚶生长性状相关分子标记的筛选

分子标记技术的飞速发展, 使得与重要经济性状相关分子标记的研究成为可能, 并克服了传统育种手段的缺陷, 加快了具有优良经济性状的品种选育。目前, RAPD、AFLP、简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 等第二代分子标记技术, 是海洋生物分子遗传学研究中最常用的手段, 已被广泛用于与生长、繁殖、抗病、壳色等性状相关标记的筛选及经济性状与基因间的相关关系分析中去。生物的性状按其性质可分为质量性状和数量性状。质量性状相对于数量性状而言, 遗传基础相对简单, 表现为不连续变异, 各变异类型间存在明显区别, 能够直接加以描述, 其遗传规律符合孟德尔经典遗传学理论。海洋贝类的壳色一般被认为是质量性状, 受单个或少数几个基因控制, 若能在群体找到壳色相关分子标记, 一般会出现全无或全有的情况, 如 Qin 等<sup>[18]</sup>在海湾扇贝 (*Argopecten*

*irradians*) 中找到了 6 个与壳色相关的 AFLP 标记, 其中 Orange 1 标记只在桔色壳扇贝的父母本和所有子代中存在; 何毛贤等<sup>[19]</sup>从华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) 橙黄壳色群体中分离出 1 个高特异性的 AFLP 标记, 鉴定准确率可高达 100%。

数量性状与质量性状有显著区别, 各变异类型间无明显差别, 性状受多基因控制, 遗传基础相对复杂, 易受环境的影响, 表型呈连续性分布, 表型与基因型之间缺乏明确的对应关系<sup>[20]</sup>。亟需改良的生产性状, 如生长、肉质、品质、产仔数、大小、抗逆性等, 均属于数量性状, 遗传力较低, 研究起来比较困难。分子标记技术的出现, 为深入研究数量性状的遗传基础提供了便捷手段。在海洋水产动物方面, 李素红等<sup>[7]</sup>利用 400 对引物对中国对虾抗病群体和感病群体进行 RAPD 分析, 得到了 5 个与抗病相关的特异性标记, 2 个与抗病负相关的特异性标记; 刘云国等<sup>[4]</sup>利用 61 对引物对牙鲆感病群体和抗病群体进行 AFLP 分析, 发现了 2 条抗病群体出现频率较高的标记, 6 条感病群体出现频率较高的标记; 张天时等<sup>[9]</sup>利用分群分离分析法, 对中国对虾人工选育快速生长第 6 代群体的 7 个多态性 SSR 位点进行了遗传分析, 在大个体组和小个体组间找到 7 个片段表现差异; 王桂兴等<sup>[5]</sup>利用 30 对 SSR 标记对牙鲆雌核发育家系 91 个个体基因组 DNA 进行检测, 并与生长性状进行连锁显著性检验, 发现有 8 个座位分别与体质量、体长、体高等生长性状显著相关。在本实验中, 共发现 7 条差异性显著的条带, 其中 2 条带仅在快速生长群体内出现, 另有 2 条在两群体间表现出极显著差异, 推测这些位点与生长性状正相关, 初步确定为与生长相关的候选标记。后续的工作将对这些候选标记进行进一步实验验证, 并把其转化为稳定的 SCAR 标记, 研究它们在各世代中的遗传变化规律, 为分子标记辅助育种的开展奠定理论基础。

本研究利用 AFLP 技术筛选到的与生长性状相关的遗传标记, 其结果需进一步分析与验证, 才能应用到分子标记辅助育种实践中去。要实现分子标记辅助泥蚶快速生长品种的成功培育, 其基础和前提是遗传连锁图谱的构建及生长性状的 QTLs 精确定位。但迄今为止, 真正可直接用于贝类经济性状相关的标记辅助选择的 DNA 分子标记仍然缺乏。目前, 国内外学者已对一些重要的海水经济贝

类如太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)<sup>[21-23]</sup>、栉孔扇贝<sup>[24-25]</sup>、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)<sup>[26]</sup>、海湾扇贝<sup>[27]</sup>、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)<sup>[28]</sup>等进行了遗传连锁图谱的构建,并进行了重要经济性状的主效 QTLs 定位,这为分子标记辅助选育做出了重要的前瞻性研究。然而,截至目前尚未见到用任何分子标记技术构建泥蚶遗传连锁图谱的研究报道,而有关生长性状的 QTLs 定位研究更少,若要对生长性状进行精准定位,并真正实现分子标记辅助育种,还需要高效分子标记技术的研发应用、高密度遗传连锁图谱的构建以及分子标记辅助育种理论的成熟完善。

#### 参考文献:

- [1] 黄建光. 2011 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 29-60.
- [2] 姚韩韩, 董迎辉, 林志华, 等. 泥蚶 4 个快速生长家系的遗传变异分析[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 340-347.
- [3] 李婉涛, 张京和. 动物遗传育种[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2011: 232-274.
- [4] 刘云国, 陈松林, 刘占江. 牙鲆抗鳃弧菌病 AFLP 分子标记筛选[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 155-159.
- [5] 王桂兴, 刘永新, 孙效文, 等. 牙鲆微卫星分子标记与生长性状的相关分析[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(7): 77-84.
- [6] 孙秀俊, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 两种壳色虾夷扇贝的同工酶分析[J]. 渔业科技进展, 2009, 30(1): 54-60.
- [7] 李素红, 张天时, 孔杰, 等. 中国对虾抗病性状遗传标记筛选及遗传多样性分析[J]. 渔业科技进展, 2009, 30(2): 54-59.
- [8] 刘萍, 何玉英, 孙昭宁, 等. 中国对虾生长性状相关遗传标记的筛选与克隆[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(2): 1-6.
- [9] 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.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatic T. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1979, 76: 5273-5296.
- [12] 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.
- [13] 徐义平, 孙开练, 杨桂梅, 等. 温州乐清湾三个泥蚶群体遗传多样性的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 234-238.
- [14] 曾庆国, 林志华, 尤仲杰. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)GT 微卫星位点的筛选和性质鉴定[J]. 海洋与湖泊, 2008, 39(2): 174-177.
- [15] 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[J]. 海洋与湖泊, 2008, 39(6): 661-664.
- [16] 郑文娟, 朱世华, 沈锡权, 等. 基于线粒体 COI 基因序列探讨泥蚶的遗传分化[J]. 动物学研究, 2009, 30(1): 17-23.
- [17] Wright S. Evolution and the genetics of populations [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- [18] Qin Y J, Liu X, Zhang H B, et al. Identification and mapping of amplified fragment length polymorphism markers linked to shell color in Bay Scallop, *Argopecten irradians irradians* (Lamarck, 1819) [J]. Marine Biotechnology, 2007(9): 66-73.
- [19] 何毛贤, 袁涛, 黄良民. 一种华贵栉孔扇贝橙黄壳色分子标记及其鉴定方法和试剂盒: 中国, CN10-1712992A[P]. 2009.
- [20] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 35-40.
- [21] Hedgecock D, Hubert S, Li G, et al. A genetic linkage map of 100 microsatellite markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Journal of Shellfish Research, 2002, 21(1): 381.
- [22] Li L, Guo X. AFLP-based genetic linkage maps of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg [J]. Marine Biotechnology, 2004, 6(10): 26-36.
- [23] Hubert S, Hedgecock D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Genetics, 2004, 168(10): 351-362.
- [24] Wang S, Bao Z M, Pan J, et al. AFLP linkage map of an intraspecific cross in *Chlamys farreri* [J]. Journal of Shellfish Research, 2004, 23(2): 491-499.
- [25] Li L, Xiang J H, Liu X, et al. Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers [J]. Aquaculture, 2005, 245(10): 63-73.
- [26] Liu X D, Liu X, Gao Q K, et al. A preliminary genetic linkage map of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino [J]. Marine Biotechnology, 2006, 8 (4): 386-397.
- [27] 秦艳杰. 海湾扇贝遗传图谱构建及壳色基因、生长相关 QTL 的定位研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所.
- [28] 喻达辉, 王小玉, 黄桂菊, 等. 合浦珠母贝遗传连锁图谱的构建[J]. 中国水产科学, 2007, 14 (3): 361-368.

## Screening of AFLP markers related to growth traits in *Tegillarca granosa*

DONG Ying-hui<sup>1,2</sup>, YAO Han-han<sup>2</sup>, LIN Zhi-hua<sup>2\*</sup>, XIAO Guo-qiang<sup>3</sup>, CHAI Xue-liang<sup>3</sup>

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

3. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China)

**Abstract:** The bloody clam, *Tegillarca granosa*, is an important commercial bivalve which is extensively cultured from South Korea to Malaysia. Due to its economic value, it is important to cultivate rapid growth strains for the sustainable development of aquaculture industry of *T. granosa*. The emergence of molecular markers provides a rich theoretical basis for the rapid cultivation varieties. By the method of group selection, the rapid growth strains of *T. granosa* were bred through two generations. According to the comparison test, the rapid growth strains showed significant advantages in shell length, shell height, shell width and total weight than control group under the same environmental conditions. AFLP marker was applied in this study to evaluate the genetic variation of the rapid growth strains, and to screen the molecular markers associated with the traits of growth. A total of 2180 bands were amplified from 64 individuals of the rapid growth strain and control group by 40 primer combinations. The analysis of Nei's genetic diversity index and Shannon's genetic information index of two groups indicated that the genetic diversity of breeding group was slightly higher than the control group. The genetic distance between two groups was about 0.011 3, the value of  $G_{ST}$  was 0.022 4 and  $N_m$  was 22.281 1, from which we concluded that there is a little genetic differentiation after selection. Of all amplified bands, 7 bands showed significant differences in frequency between two groups. 2 bands of all were only found in rapid growth strains, with the frequency of 0.812 5 and 0.343 8, respectively. And 2 bands showed significantly higher frequencies in rapid growth strains, while 3 bands showed significantly higher frequencies in control group. The bands with higher frequencies in rapid growth strains may be associated with the traits of growth. The unique AFLP markers associated with growth traits would be useful for growth-related gene cloning, quantitative trait locus (QTL) mapping, and molecular-assisted selection (MAS) of *T. granosa*.

**Key words:** *Tegillarca granosa*; growth traits; amplified fragment length polymorphism(AFLP); genetic variation

**Corresponding author:** LIN Zhi-hua. E-mail: zhihua9988@126.com