

doi: 10.7541/2014.127

不同壳色三角帆蚌外套膜基因的 SRAP-cDNA 差异分析

闻海波^{1,2,3} 曹哲明¹ 金武¹ 顾若波^{1,2} 华丹² 黄晓飞³ 徐跑^{1,2,3}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水鱼类遗传育种与养殖生物学重点开放实验室, 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 中美淡水贝类种质资源保护及利用国际联合实验室, 无锡, 214081;

3. 南京农业农业大学, 无锡渔业学院, 无锡 214081)

摘要: 三角帆蚌幼蚌壳表面颜色和放射条纹表型遗传分离均符合孟德尔单基因位点的一对等位基因调控规律。研究为进一步阐释其壳色遗传分子调控机制, 应用群体分离分析法(BAS)和 SRAP-cDNA 比较了两种典型外壳色表型三角帆蚌外套膜组织的基因表达差异。采用 30 个引物组合获得 5 个差异片段, 回收克隆测序获得 14 条差异序列, 大小在 195—339 bp 之间, 通过序列比对, 获得与 2 个相似蛋白序列, 包括类二氢嘧啶脱氢酶和类锌指 MYM-1 型蛋白, 而未发现与色素合成相关基因和蛋白, 但三角帆蚌外壳色表型差异是否与嘧啶代谢和类锌指蛋白参与的基因表达调控有关还有待进一步研究。

关键词: 三角帆蚌; 壳色表型; 外套膜; SRAP-cDNA; 差异基因

中图分类号: Q344⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2014)05-0848-06

贝类的壳色由外套膜表皮分泌形成, 曾被认为是一种简单的表型性状而被忽视。对许多贝类的研究表明: 壳色不仅与贝类的生态和行为有关^[1-3], 还与其生长、存活等表型性状密切相关^[4-8]。在国内外, 以壳色为选育标记, 已经成功选育出了高产白色珍珠的日本珍珠贝(*Pinctada fucata martensii* Dunker)^[9]、生长快、抗病力强的“玛瑙鲍”、金黄壳色的太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[10]、高产的“中科红”海湾扇贝(*Argopecten irradians irradians* Lamarck)、 “中国红”皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*) 及“南科珍珠红”马氏珠母(*Pinctada martensii* Dunker)等多个贝类新品种(系), 为世界海水贝类养殖发展与繁荣做出了重大贡献。壳色与生产性状协同选育已经成为海水贝类新品种选育最为有效的技术手段之一。

与海水贝类相比, 淡水贝类壳色较为单调、表型简单, 其壳色遗传研究未受到普遍关注。三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)是我国最主要的淡水经济贝类之一。闻海波等^[11]首次报道了三角帆蚌 F₁ 代幼蚌

的壳色表型遗传分离规律, 初步研究揭示: 三角帆蚌的壳色和放射条纹分别受单基因位点的一对等位基因调控。对大多数海水贝类的壳色遗传机制研究也表明: 贝类的壳色受到单个基因位点或少数基因位点的调控, 这有利于运用分子生物技术寻找与壳色相关的分子标记。筛选与壳色相关基因和分子标记, 有助于研究与贝类生长、发育及成活之间的关系, 有利于开展贝类壳色与生产性状的协同选育。国内已采用 RAPD^[12]、细胞色素酶^[13]、微卫星^[14]等多种分子生物技术开展了三角帆蚌遗传背景分析, 为其遗传改良和品种选育奠定了重要基础, 而与三角帆蚌壳色相关的基因及分子标记的研究尚未开展。

SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) 是 Li 和 Quiros 2001 年提出的一种基于 PCR 的新型分子标记, 其反应模板多数是基因组 DNA, 也可以是 cDNA^[15]。SRAP-cDNA 技术已成功运用于芸薹属、棉花、甜瓜、野牛草、桃、西葫芦、笋瓜等经济作物的遗传图谱构建、遗传多样性分析及比较基因组学研究^[16]。在水产动物上主要以 DNA

收稿日期: 2013-07-10; 修订日期: 2014-02-11

基金项目: 国家公益性行业科研专项(200903028); 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(2011JBFA18)资助

作者简介: 闻海波(1980—), 男, 江苏靖江人; 博士, 助理研究员; 主要从事淡水贝类种质资源保护及利用研究。E-mail: wenhb@ffrc.cn

通信作者: 顾若波(1963—), 男, 江苏无锡人; 硕士, 研究员; 主要从事水产动物遗传及养殖研究。E-mail: gurb@ffrc.cn

为模版, 对草鱼^[17]、暗纹东方鲀^[18]、马氏珠母贝“南科珍珠红”品系^[19]及青虾^[20]等品种进行 SRAP 分子标记筛选、分离及遗传图谱构建。本文采用 SRAP-cDNA 示差技术, 拟筛选与三角帆蚌壳色表型差异相关序列, 通过克隆、测序及信息比对, 获得与壳色形成相关基因或蛋白序列, 为揭示三角帆蚌壳色遗传表达机制及壳色新品系选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及来源

实验蚌为 2010 年建立的三角帆蚌 A5 家系的 F₁ 代幼蚌, 该家系中出现 2 种典型的外壳色表型: 青褐壳色具放射条纹和金黄壳色不具放射条纹(图 1)。2011 年 5 月从中随机选取 2 种壳色表型 1 龄幼蚌各 10 只, PC8000 电子称测量湿重(0.1 g)、IP6 数显卡尺测量壳长、壳高、壳宽(0.01 mm)常规生物学性状; 青褐壳色具放射条纹和金黄壳色不具放射条纹幼蚌体重分别为(8.0 ± 2.4)、(8.8 ± 2.4) g, 壳长为(48.97 ± 4.64)、(51.53 ± 4.03) mm。

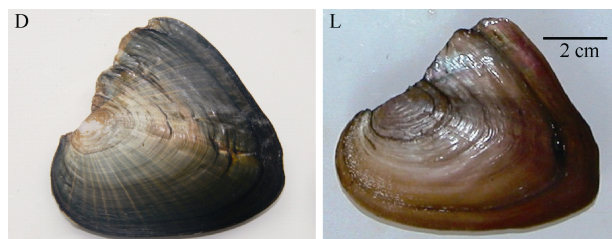


图 1 两种壳色表型的三角帆蚌幼蚌

Fig. 1 Two different shell color phenotypes in juvenile *Hyriopsis cumingii*

D-青褐壳色具放射条纹表型; L-金黄壳色不具放射条纹表型

D-Greenish-brown with rays, L- Golden without rays

1.2 组织总 RNA 提取

用解剖刀取新鲜外套膜边缘膜约 50 mg, 采用柱式动物组织总 RNA 抽提纯化试剂盒(上海生工生物工程有限公司)提取组织总 RNA, 在琼脂糖凝胶上检测 RNA 的质量和浓度。采用集群分离分析法, 取同一壳色表型的 10 份基因组 RNA 等量混合, 构建两种不同壳色表型的基因混合池。

1.3 单链 cDNA 的合成

以组织 RNA 为模版, 选取 AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (BIO BASIC INC) 合成单链 cDNA。

1.4 SRAP-cDNA 示差分析

SRAP-PCR 反应采用 25 μL 的反应体系, 体系中包括以下成分: DNA 模板 3 μL, dNTP (2.5 mmol/L)

1.5 μL, 10×Taq DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL, 正向引物和反向引物(表 1)各 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 无菌重蒸水 14.3 μL。PCR 反应所需试剂及引物均购自上海生工生物工程有限公司。

在 Eppendorf Master cycler PCR 仪上进行基因扩增。扩增程序为: 94℃变性 5min; 然后开始 5 个循环(94℃变性 45s, 38℃退火 45s, 72℃延伸 1 min); 再进行 30 个循环(94℃变性 1min, 55℃退火 1min, 72℃延伸 1 min); 最后 72℃延伸 7min。扩增产物先在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, 检测扩增产物的有无, 然后用 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶分型, 银染显色、拍照、记录数据。将初步筛选到 2 个的差异序列后, 再用同一引物对所有个体进行验证, 确认为差异表达序列再进行回收。

表 1 SRAP 正反引物序列
Tab. 1 Sequences of SRAP F-Primer and R-Primer

编号 Marker	反向引物 R-Primer	编号 Marker	正向引物 F-Primer
R1	gactgcgtacgaattcca	F1	tgagtccaaaccggtgc
R2	gactgcgtacgaattcag	F2	tgagtccaaaccggtcc
R3	gactgcgtacgaattcga	F3	tgagtccaaaccggtga
R4	gactgcgtacgaattctg	F4	tgagtccaaaccggaag
R5	gactgcgtacgaattcaa	F5	tgagtccaaaccggacc
R6	gactgcgtacgaattgca		

1.5 特异扩增片段的回收、克隆、测序及比对

将特异片段直接从凝胶上切下, 用 100 μL 双蒸水浸泡 5min, 弃去洗涤水, 重复三次, 然后用 50 μL 双蒸水浸泡, 用枪头将胶捣烂, 70℃保温 30min 作为模版。特异片段的扩增反应总体积为 25 μL, 包括 1.5 μL 稀释连接产物, 1.5 μL 10×PCR buffer, 45 pmol Hpa II-Msp I 预扩引物, 1.5 μL dNTPs (2.5 mmol), 2 U Taq 酶, 加水至 25 μL。反应程序: 94℃变性 5min; 然后 94℃变性 20s, 56℃复性 30s, 72℃延伸 2min, 反应进行 30 个循环。扩增产物 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 用胶回收试剂盒回收, 克隆进 pMD18-T 载体, 每个差异条带挑选 4 个质粒, 送上海生物工程公司测序。获得导入的 DNA 序列在 NCBI 上进行比对, 寻找相似的 DNA 序列或蛋白序列。

2 结果

2.1 SRAP-cDNA 示差分析

用 30 个引物组合扩增得到 455 条扩增带, 初步

获得差异表达带 5 条, 对所有个体进行验证, 确认 5 条带均为差异条带。其中 4 条来自青褐壳具放射条纹群体, 1 条来自金黄壳色不具放射条纹群体。图 2 为 5 个引物组合扩增结果图谱, 其中 A 和 B 为扩增差异片段, 均出现在青褐壳色群体中。

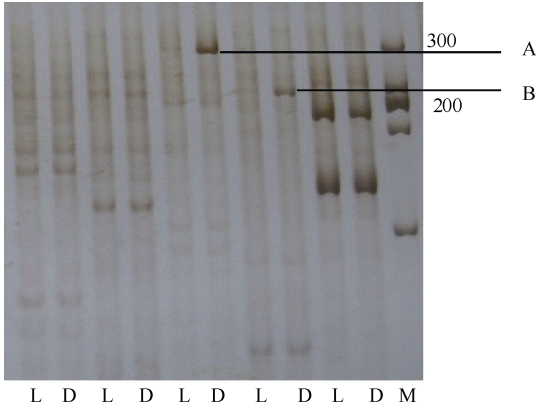


图 2 SRAP-cDNA 扩增图谱

Fig. 2 SRAP-cDNA amplification patterns

A 为 5-1 引物组合扩增差异条带; B 为 2-2 引物组合扩增差异条带; M-DL-500 DNA 标准对照
A-Differential band by primer 5-3; B-Differential band by primer 2-2; M-DL-500DNA Marker

2.2 序列比对分析

本研究得到 5 个差异片段, 克隆测序得到 14 条不同的序列(表 2), 序列长度在 195—339 bp 之间, 其中仅 3-2-1 序列来自金黄壳色群体, 其余 13 条均来自青褐壳色群体。用 NCBI 的 Blastn 程序比对未找到这些序列的相似序列。采用 BlastX 程序比对发现: 由 1-2、2-2 引物组合扩增获得的 6 条差异序列编码蛋白类均似于二氢嘧啶脱氢酶, 与青鳉 (*Oryzias latipes*) 类二氢嘧啶脱氢酶蛋白 318—354 区域的相似度为 43%, 该序列位于蛋白 A 亚基区域; 5-1-2 序列编码蛋白与冠轮动物海蠕虫 (*Capitella teleta*) 的一个未知蛋白 40—66 区域相似度为 48%; 由 5-2 引物组合扩增获得的 2 条序列编码均类似于锌指蛋白 MYM-1 型蛋白, 其中 5-2-2 序列编码蛋白与大乳头水螅 (*Hydra magnipapillata*) 类锌指 MYM-1 型蛋白的 46—90 区域相似度为 42%, 且位于未知功能结构域中; 5-2-4 序列编码蛋白与大乳头水螅的类锌指 MYM1 型蛋白 77—108 区域相似度为 53%, 而与大堡礁海绵 (*Amphimedon queenslandica*) 类锌指 MYM-1 型蛋白 208—246 区域相似度为 46%, 均位于该蛋白的未知功能结构域中; 由 3-2 引物组合扩增的 1 条序列编码也类似二氢嘧啶脱氢酶, 是金黄

表 2 差异序列的 BlastX 比对
Tab. 2 Different sequences alignment by BlastX

差异序列编号 Marker of different sequence	长度 Length	BlastX 比对 Sequence alignment by BlastX
1-2-1	200	类二氢嘧啶脱氢酶
1-2-3	205	类二氢嘧啶脱氢酶
1-2-4	200	类二氢嘧啶脱氢酶
2-2-1	201	类二氢嘧啶脱氢酶
2-2-3	203	类二氢嘧啶脱氢酶
2-2-4	240	类二氢嘧啶脱氢酶
3-2-1	195	类二氢嘧啶脱氢酶
5-1-1	265	/
5-1-2	339	/
5-1-3	299	/
5-2-1	312	/
5-2-2	253	类锌指 MYM-1 型蛋白
5-2-3	295	/
5-2-4	265	类锌指 MYM-1 型蛋白

注: 序列编号中前 2 位数字依次为正向引物与反向引物序号, 第 3 个数字为同一差异片段的的不同序列编号

Note: The first two numbers are successively serial number of F-Primer and R-Primer, and the third one is serial number of different sequence in one DNA band

壳色群体的唯一差异条带。其中 5-1-1 差异序列(16 个 GA 重复)和 5-2-3 差异序列(23 个 CA 重复)中各出现有一个微卫星序列。

3 讨论

与 AFLP-cDNA 技术相比, SRAP-cDNA 具有两大优点: 第一、技术流程简单, 不需要第二链的合成, 且能够检测到某些低水平表达的基因, 实验成本低; 第二、多数产生高强带, 重叠少, 得到的差异序与蛋白质相关性更高。Dinler 等^[21]利用 SRAP 技术研究翦股颖(禾本科)不同个体的序列表达标签, 通过比较这些序列发现很多个体特异的序列都是同源的, 可以用于蛋白质组的比较。Gui 等^[22]利用 SRAP 研究 *Brassica allotetraploids* 异源多倍体化发现, 异源多倍体化的可以激活大约 1.3% 的在二倍体中不表达的转录单元。卢泳全等^[23]应用 SRAP 技术对大米草的耐盐性状进行差异显示研究, 鉴定出一个与水稻葡聚糖酶基因有 30% 相似性的差异片段。马爱芬等^[24]选用培育 7 年的重组自交系群体 (RILs), 利用 SRAP-cDNA 技术进行了差异显示研究, 996 对 SRAP 引物组合扩增出 2100 条带, 2 次扩增重复率为 65.2%, 其中在黄黑籽材料之间重复稳定出现的差异片段有

12条,发现2个片段分别与拟南芥的NAD⁺ADP核糖转移酶及小肽转移蛋白3具有很高的同源性。

本文尝试将SRAP-cDNA技术应用在三角帆蚌外壳色基因差异表达分析,采用30个引物组合共扩增出455个条带,仅有5个差异序列,差异序列占总数1.1%,说明外壳色差异涉及的基因较少,也进一步证实三角帆蚌外壳色性状可能受到少数基因位点调控,与外壳色表型在F₁代幼蚌中分离符合孟德尔单基因调控的规律的结论相符^[11]。通过进一步克隆测序获得14条差异序列,由于三角帆蚌的目前序列知之甚少,未比对到相似基因序列,但找到了与2个相关蛋白序列:类二氢嘧啶脱氢酶和类锌指MYM-1型蛋白,进一步证实了SRAP-cDNA技术具有容易寻找到相关序列蛋白的特点。

二氢嘧啶脱氢酶(Dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)是嘧啶分解途径的限速酶,它催化尿嘧啶和胸腺嘧啶分别还原为二氢尿嘧啶和二氢胸腺嘧啶,体内80%的5-氟尿嘧啶由DPD降解^[25],其编码基因(DPYD)的突变是二氢嘧啶脱氢酶活性降低和引起氟化嘧啶类化疗药物毒性的重要原因之一。在青褐色群体中出现了6条差异条带的编码蛋白均类似二氢尿嘧啶脱氢酶,推测三角帆蚌壳色形成可能与嘧啶代谢途径中的某些蛋白相关。锌指结构于1983年首先发现于爪蟾5S RNA基因的转录因子IIIA(TFIIIA),其三维结构由一个含有大约30个氨基酸的环和一个与环上的4个Cys或2个Cys和2个His配位的Zn²⁺构成,形成的结构类似手指状,该蛋白广泛存在于生物体基因组中,占据大于人类基因组1%的基因,能与特定DNA序列、RNA及蛋白结合,与细胞分化、胚胎发育及人类多种疾病相关^[26]。本研究获得两种不同外壳色三角帆蚌的外套膜的2种相似蛋白,而未发现与相关色素合成的基因和蛋白,但三角帆蚌外壳色表型是否与这两种基因或蛋白的表达差异有直接关系,仍有待进一步的研究。

在海洋贝类中已找到一些与壳色相关的分子标记。Qin, *et al.*^[27]对海湾扇贝的研究中,将壳色基因分别作为母本标记和父本标记,并同时进行雌性及雄性连锁图谱的构建,壳色标记定位在了雌性图谱第九连锁群上;利用 AFLP 技术在海湾扇贝中找到了6个与壳色相关的分子标记,其中两个标记 F1f335 和 D8f420 与壳色基因之间遗传图距为 0 cM,经过在家系和群体中初步验证,证明这两个标记与

橘黄壳色位点紧密或完全连锁。相比之下,在扩增出的10个微卫星中却未找到与壳色相关的分子标记。孙秀俊等^[28]用 RAPD 技术对比了虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)白色贝和褐色贝群体的遗传差异,发现位点 S285-1 在褐色贝 75% 的个体中都能获得扩增片段,但在白色贝所有个体中都没有这个位点的扩增片段,由此推断该位点的缺失与壳色存在一定的关系。朱东丽等^[29]利用 AFLP 筛选到一个细纹文蛤品系的特有分子标记,出现频率为 1.00;利用微卫星标记技术,对4个壳色花纹品系的文蛤(*Meretrix meretrix*)进行了遗传分析,从中筛选出与壳色花纹相关的微卫星标记^[30]。进一步以本文的差异序列为基础设计特异 TRAP 引物,筛选出稳定壳色 SCRA 标记,从而更加全面揭示三角帆蚌外壳色形成的分子遗传机制,为壳色定向选育提供有力的工具。

参考文献:

- [1] Mitton J B. Shell color and pattern variation in *Mytilus edulis* and its adaptive significance [J]. *Chesapeake Science*, 1977, **18**(4): 387—390
- [2] Odile L, Luc M, Jacques D. Temperature and phenotypic plasticity in the shell color and banding of the land snail *Helix aspersa* [J]. *Animal Biology*, 1998, **321**: 649—654
- [3] Sokolova I M, Berger V J. Physiological variation related to shell color polymorphism in white sea *Littotina saxatilis* [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, **245**: 1—2
- [4] Newkirk G F. Genetics of shell color in *Mytilus edulis* L. and the association of growth rate with shell color [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1980, **47**(1): 89—94
- [5] Figueroa E, Brand E, Winkler F. Shell color polymorphism and growth in the Chilean oyster *Tiostrea chilensis* [J]. *Journal of Shellfish Research*, 1992, **1**(1): 194
- [6] Brand E, Kijima A, Fujio Y. Shell color polymorphism and growth in the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* [J]. *Tohoku Journal of Agricultural Research Sendm*, 1994, **44**: 67—76
- [7] 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 irradians*)家系的建立及生长发育的研究. 海洋与湖沼, 2003, **34**(6): 632—639]
- [8] Cheng P, Yang A G, Wu B, *et al.* The applicability analysis

- on microsatellite markers for parentage determination of different shell color lines of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(5): 768—775 [程鹏, 杨爱国, 吴彪, 等. 微卫星标记在不同壳色虾夷扇贝家系亲权鉴定的适用性. 水生生物学报, 2011, **35**(5): 768—775]
- [9] Wada K T, Komaru A. Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker) [J]. *Aquaculture*, 1996, **142**: 25—32
- [10] Nell J A. The history of oyster farming in Australia [J]. *Marine Fisheries Review*, 2001, **63**: 14—25
- [11] Wen H B, Gu R B, Cao Z M, *et al.* Variation of color and ray pattern in juvenile shells in hatchery-produced freshwater triangle pearl mussels, *Hyriopsis cumingii*, in China [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2013, **44**(1): 154—160
- [12] Li J L, Dong Z G, Zheng H F. RAPD analysis on genetic variance of F_1 of *Hyriopsis cumingii* from three populations [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, **31**(6): 848—852 [李家乐, 董志国, 郑汉丰. 三角帆蚌三种群 F_1 遗传差异的 RAPD 分析. 水产学报, 2007, **31**(6): 848—852]
- [13] Xiao T Y, Liu Q L, Guo X Z, *et al.* Cloning and expression analysis of cytochrome P450 homolog from *Hyriopsis cumingii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(5): 987—992 [肖调义, 刘巧林, 郭小泽, 等. 三角帆蚌细胞色素 P450 基因的克隆与表达分析. 水生生物学报, 2012, **36**(5): 987—992]
- [14] Li J L, Wang G L, Bai Z Y. Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) estimated by microsatellite DNA markers [J]. *Aquaculture*, 2009, **287**: 286—291
- [15] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, **103**: 455—461
- [16] Gui Q, Wang J L, Wu X M, *et al.* Application of SRAP-cDNA method in analysis of differential gene expression in plants [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2007, **29**(4): 497—502 [桂琴, 王嘉璐, 伍晓明, 等. SRAP-cDNA 方法在植物基因差异表达分析中的应用. 中国油料作物学报, 2007, **29**(4): 497—502]
- [17] Ding W D, Cao L P, Cao Z M. The SRAP and SCAR molecular markers for detecting germ degeneration in *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, **54**(3): 475—481 [丁炜东, 曹丽萍, 曹哲明. 草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记. 动物学报, 2008, **54**(3): 475—481]
- [18] Cheng C H, Zhang M Y, Liu K, *et al.* Analysis of genetic diversity of four *Takifugu obscurus* populations using SRAP markers [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(5): 858—865 [程长洪, 张敏莹, 刘凯, 等. 利用 SRAP 标记研究四个暗纹东方鲀群体的遗传多样性. 水生生物学报, 2012, **36**(5): 858—865]
- [19] Zhang H Y, He M X, Guan Y Y. SRAP analysis on genetic variation of the different generations of a red shell family in pearl oyster, *Pinctada martensi* Dunker [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **33**(5): 727—733 [张红玉, 何毛贤, 管云雁. 马氏珠母贝红色壳家系不同世代遗传变异的 SRAP 分析. 水产学报, 2009, **33**(5): 727—733]
- [20] Qiao H, Wu Y, Fu H T, *et al.* Construction of a genetic linkage map for oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) using SSR and SRAP markers [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, **19**(2): 202—210 [乔慧, 吴滢, 傅洪拓, 等. 应用 SSR 和 SRAP 标记构建青虾遗传连锁图谱. 中国水产科学, 2012, **19**(2): 202—210]
- [21] Dinler G, Budak H. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from *Agrostis* species obtained using sequence related amplified polymorphism [J]. *Biochemical Genetics*, 2008, **46**: 663—676
- [22] Gui Q, Wang J L, Xu Y H, *et al.* Expression changes of duplicated genes in allotetraploids of *Brassica* detected by SRAP-cDNA technique [J]. *Molekulyarnaya Biologiya*, 2009, **43**(1): 3—9
- [23] Lu Y Q, Wu W R. Identification of salt-responsive genes in English cordgrass (*Spartina anglica*) roots using SRAP technique [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Science)*, 2006, **32**(5): 511—514
- [24] Ma A F, Li J N, Chen L, *et al.* Differential display of related genes to seed-coat color by cDNA-SRAP in *Brassica napus* L. [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, **34**(3): 526—529 [马爱芬, 李加纳, 谌利, 等. 甘蓝型油菜种皮色泽相关基因的 cDNA-SRAP 差异显示. 作物学报, 2008, **34**(3): 526—529]
- [25] Van Kuilenburg A B, Haasjes J, Richel D J, *et al.* Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene [J]. *Clinical Cancer Research*, 2000, **6**: 4705—4712
- [26] Ganss B, Jheon A. Zinc finger transcription factors in skeletal development [J]. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 2004, **15**(5): 282—297
- [27] 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
- [28] Sun X J, Yang A G, Liu Z H, *et al.* RAPD analysis of genetic diversity of *Patinopecten yessoensis* with different shell colors [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, **30**(6): 110—117 [孙秀俊, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 两种壳色虾夷扇贝的 RAPD 分析. 渔业科学进展, 2009, **30**(6): 110—117]
- [29] Zhu D L, Lin Z H, Dong Y H, *et al.* Genetic variation analysis of four strains of *Meretrix meretrix* that have different shell colors and decorative patterns [J].

- Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, **42**(3): 374—379
[朱东丽, 林志华, 董迎辉, 等. 文蛤 4 个壳色花纹品系的遗传差异分析. 海洋与湖沼, 2011, **42**(3): 374—379]
- [30] Zhu D L, Dong Y H, Lin Z H, *et al.* Genetic analysis among four strains of different shell colors and decorative patterns of *Meretrix meretrix* using microsatellite markers [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, **36**(2): 202—208
[朱东丽, 董迎辉, 林志华, 等. 利用微卫星标记对文蛤 4 个壳色花纹品系的遗传分析. 水产学报, 2012, **36**(2): 202—208]

ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION BY SRAP-cDNA IN MANTLE TISSUE OF *HYRIOPSIS CUMINGII* WITH DIFFERENT EXTERNAL SHELL COLOR

WEN Hai-Bo^{1,2,3}, CAO Zhe-Ming¹, JIN Wu¹, GU Ruo-Bo^{1,2}, HUA Dan², HUANG Xiao-Fei³ and XU Pao^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. Sino-US Cooperative Laboratory for Germplasm Conservation and Utilization of Freshwater Mollusks, Freshwater Fisheries Research Center, Wuxi, Jiangsu 214081, China; 3. Wuxi Fishery college, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China)

Abstract: The segregation of shell coloration and presence of radial rays in the juvenile freshwater mussel, *Hyriopsis cumingii*, follows Mendelian inheritance modes of a single gene locus with one pair of dominant/recessive alleles. To elucidate the mechanisms of external shell color formation, gene expression of two typical shell colors was analyzed by bulked segregant analysis (BSA) and SRAP-cDNA. Five differential gene segments were obtained by SRAP-cDNA using 30 primers' combinations, and 14 fragments with the size ranging from 195 bp to 339 bp were obtained after re-claim and clone. Using BlastX, these fragments could encode two similar proteins, dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) and MYM-1 Zn Finger protein, and no protein related to pigment could be encoded. Further directions should focus on the relationship between shell color phenotype and pyrimidine metabolism by similar Zn finger proteins in the triangle pearl mussels.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; Shell color phenotype; Mantle tissue; SRAP-cDNA; Differential genes