

DOI: 10.12264/JFSC2021-0323

马氏珠母贝 *PEPCK* 基因序列特征及其在耐低温品系的选择印记分析

陈琨¹, 赖卓欣¹, 刘雅¹, 郝瑞娟², 王庆恒^{1, 3}

1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;
2. 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广东 湛江 524025;
3. 广东省珍珠科技创新中心, 广东 湛江 524088

摘要: 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)是糖异生途径的关键酶, 当动植物处于温度胁迫等不良环境条件时, 它可通过催化草酰乙酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸, 继而生成葡萄糖以维持机体的血糖平衡, 在抗逆过程中起着重要作用。本研究鉴定了马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensi*)的 *PEPCK* 基因(*PmPEPCK*), 分析了低温胁迫下 *PmPEPCK* 表达量的变化, 筛选和比较分析了马氏珠母贝耐低温选育系(low temperature resistant line, R) F3 和北部湾野生群体(Beibu Gulf wild population, W)的 *PmPEPCK* 外显子区的 SNP 位点。序列分析表明, *PmPEPCK* 基因全长 2557 bp, 5'UTR 和 3'UTR 分别为 56 bp 和 446 bp, 开放阅读框 2055 bp, 编码 684 个氨基酸。*PmPEPCK* 在所检测组织中均有表达, 其中肝胰腺表达量最高($P<0.05$)。低温胁迫后鳃组织中的时序表达结果显示, 低温组(12 °C、17 °C) *PmPEPCK* 的表达量在 6 h 达到最高, 显著高于 22 °C 对照组($P<0.05$), 说明 *PmPEPCK* 参与贝类的低温响应过程。对 *PmPEPCK* 的外显子区 SNP 进行分析, 共得到 108 个 SNP, 其中 47 个 SNP 位点的基因型频率在 R 和 W 群体间差异显著($P<0.05$), 仅在 R 中被检测到的基因型有 11 个, 分别是位点 g.60010420、g.60007411、g.60011365 的基因型 AG, 位点 g.60006265、g.60006166 的基因型 AA, 位点 g.60007389、g.60011387 的基因型 CT 和 g.60009449、g.60006028 的基因型 TT, 位点 g.60011341 的基因型 GG 和 g.60009464 的基因型 GT。结论认为经过 3 代选育后, R 群体的 *PmPEPCK* 基因受到了强烈的正选择, *PmPEPCK* 的这些 SNPs 及其基因型可能与选育系的低温耐受能力相关, 并可能作为选择育种的候选标记。

关键词: 马氏珠母贝; *PEPCK*; 低温耐受; SNP; 基因克隆

中图分类号: S917 **文献标志码:** A

文章编号: 1005-8737-(2022)01-0058-12

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)可催化草酰乙酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸, 继而生成葡萄糖, 是糖异生过程中最先发生且最为重要的反应环节^[1-3]。PEPCK 在水产动物能量代谢的调节过程中发挥重要作用, 例如, 高糖饲料会造成金头鲷(*Sparus aurata*)及鲤(*Cyprinus carpio*)的 *PEPCK* 的 mRNA 表达量和酶活性显著降低, 而低糖饲料则会增强

PEPCK 的 mRNA 表达量及酶活性^[4]; 随着饲料糖水平的增加, 罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、军曹鱼(*Rachycentron canadum*) *PEPCK* 酶的活性与基因表达量会受到显著抑制^[5]。PEPCK 还参与水产动物环境胁迫的抗逆响应过程, 在低温胁迫下, 东北林蛙(*Rana dybowskii*)的肝和肾脏 *PEPCK* 均被激活, 0 °C 组和 -1 °C 组 *PEPCK* 活力显著高于 24 °C 对照组, 并

收稿日期: 2021-07-09; **修订日期:** 2021-09-05.

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2020A151501691); 广东省现代农业产业技术体系-贝藻类产业创新团队项目(2020KJ146); 广东省乡村振兴战略专项渔业产业发展(粤财农[2020]4 号); 广东省普通高校重点领域专项(2020ZDZX1045).

作者简介: 陈琨(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为珍珠培育与加工. E-mail: chenkun@stu.gdou.edu.cn

通信作者: 王庆恒, 教授, 研究方向为海产无脊椎动物生物学及增养殖技术. E-mail: wangqh@gdou.edu.cn

且肝脏 *PEPCK* 比活力高于肾脏 *PEPCK*, 这表明低温环境下, 东北林蛙可能通过上调 *PEPCK*, 使非糖物质向葡萄糖转化, 利用葡萄糖作为抗冻保护剂进行冬眠^[6]; 将鲈(*Lateolabrax japonicus*)从盐度 25 的海水转入盐度为 21 的海水 48 h 后, 肝脏和肾脏的 *PEPCK* 表达有所增加, 表明鲈通过加强糖异生而增加内源性葡萄糖以提供在低盐度下为保持离子平衡额外消耗的能量^[7]; 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)在低氧环境下能量代谢受到抑制, *PEPCK* 的表达量会显著升高进而产生更多的 ATP, 使机体度过不良环境^[8]。

马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)是重要的经济贝类, 主要分布在我国广东、广西与海南等地, 用于培育海水珍珠^[9]。马氏珠母贝属于暖水性贝类, 对低温的耐受能力弱, 这种对温度的敏感性限制了其养殖区域, 从而影响了珍珠产业的发展。为了扩展马氏珠母贝养殖区域, 课题组从 2014 年开始培育马氏珠母贝耐低温选育系(*low temperature resistant line, R*), 并通过转录组和群体重测序分析, 筛选出一批与马氏珠母贝低温耐受相关的功能基因^[10-12]。本研究采用 RACE 技术获得 *PmPEPCK* 的基因序列全长, 并研究了其在低温胁迫下的时序表达模式, 在耐低温选育系和北部湾野生群体(Beibu Gulf wild population, W)的全基因组重测序数据库中筛选获得了 *PmPEPCK* 外显子区的 SNP 位点, 通过遗传多态性分析、单倍型分析以及频率计算, 获得可能参与马氏珠母贝低温响应过程的 SNP 位点, 相关位点可作为分子标记应用于马氏珠母贝分子辅助育种, 可为缩短

耐低温选育系育种周期以及深入认识马氏珠母贝温度胁迫的响应机制提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究中基因克隆、表达分析所用的马氏珠母贝采自广东省雷州市后洪村海区, 将贝体表面的附着物清理干净后运回实验室, 22 ℃暂养 2 d 后, 选取活力正常、规格基本一致的马氏珠母贝用于实验, 实验贝壳长(69.23±3.80) mm。随机取 8 只马氏珠母贝的全组织, 包括闭壳肌、鳃、性腺、肝胰腺、足和外套膜, 经液氮速冻后放于-80 ℃冰箱备用。另取 300 只马氏珠母贝随机分为 3 组, 分别置于 3 个 300 L 的实验桶中微充气养殖, 水温分别设定为低温组 12 ℃、17 ℃和对照组 22 ℃, 养殖过程中每天投喂等量的单胞藻, 每 24 h 换水 50%。在养殖实验开始后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 120 h, 分别从每个实验桶中随机取 8 个个体剪取鳃组织, 组织经液氮速冻以后置于-80 ℃冰箱冷冻保存。

本研究中, 用于外显子区 SNP 位点分析的耐低温选育系 F3 和北部湾野生群体各 30 个个体的基因组重测序数据库于 2018 年 10 月由武汉华大基因完成测序^[10]。

1.2 *PmPEPCK* 基因全长克隆

总 RNA 提取、第一链 cDNA 合成及 RACE PCR 参照刘雅^[13]的方法进行。根据本课题组前期获得的转录组数据库 *PmPEPCK* 部分序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件根据引物的设计要求设计引物(表 1)。

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Primer sequences in the study

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 purpose
5' inner primer	CAGCGGTCTGAATGAAGT	5'RACE
5' outer prime	TAGCCTGACGCAACCATC	5'RACE
3' inner primer	TCCTAAAGGCAGACTACG	3'RACE
3' outer primer	ATCCAAGAGTGTTAAGCC	3'RACE
qRT-PCR-F	TTCTGCACGCCAGCTAAC	qRT-PCR 分析 qRT-PCR analysis
qRT-PCR-R	TGCGACCCCCAAAAATGAT	qRT-PCR 分析 qRT-PCR analysis
β-actin-F	CGGTACCACCATGTTCTCAG	荧光定量(内参) reference gene
β-actin-R	GACCGGATTTCATCGTATTCC	荧光定量(内参) reference gene

1.3 PmPEPCK 的生物信息学分析

DNAMAN 软件进行序列的拼接及氨基酸序列推导; ORFFinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)找到 *PmPEPCK* 的开放阅读框; 利用 Pfam (<https://pfam.xfam.org/search>)进行保守结构域预测; ExPASy-ProtParam 进行氨基酸的理化性质分析; SignalP 5.1 软件进行信号肽的预测; TMHMM Server 软件分析氨基酸的跨膜结构; 采用 NCBI COBALT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>)和 DNAMAN 9 进行多序列比对; Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测蛋白的三级结构; 利用 SoftBerry-Psite (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=psite&group=programs&subgroup=proloc>) 预测氨基酸序列中的功能位点分布; Mega X 用于构建生物系统发育树。

1.4 PmPEPCK 的组织表达及温度胁迫下的差异分析

本研究以 β -actin 为内参基因, 利用 $2^{-\Delta C_t}$ 法计算 *PmPEPCK* 基因在不同组织的相对表达量, 以及该基因在实验温度下各时间点的相对表达量, 利用 SPSS 22.0 软件分别进行各组织间和实验温度下各时间点的单因素方差分析及表达量均值比较($P<0.05$)。

1.5 PmPEPCK 基因 SNP 筛选及分析

根据本课题组前期获得的 R 和 W 的全基因组重测序数据^[10], 提取 *PmPEPCK* 的外显子 SNP 位点; 利用软件 Haplovew4.2 计算 D' 值和 R^2 值及进行连锁不平衡分析; 利用 PopGen32 软件统计分析 SNP 的基因型、基因型频率、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)以及哈迪-温伯格平衡(HWE)等遗传参数; PIC 软件计算 SNP 位点的多态信息含量; 使用 SPSS 22.0 软件的卡方检验进行 R 和 W 群体的 SNP 差异统计分析。

2 结果与分析

2.1 PmPEPCK 序列分析

利用 RACE 技术获得 *PmPEPCK* 基因的 cDNA 全长为 2557 bp(图 1)。开放阅读框 2055 bp, 编码 684 个氨基酸, 包含 56 bp 的 5'UTR 和 446 bp 的 3' UTR。*PmPEPCK* 具有 1 个 PEPCK 典型的结

构基序(GSGYGGNSLLGKK)和 2 个 GTP 三磷酸链结合的结构位点。SoftBerry-Psite 程序预测该蛋白含有 1 个糖胺聚糖附着位点, 1 个 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点, 6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 2 个酪氨酸激酶磷酸化位点, 11 个 N-豆蔻酰化位点, 2 个酰胺化的位点, 3 个 CAAX 盒, 16 个微体 C 端目标信号, 1 个磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(GTP)信号。

2.2 PmPEPCK 理化性质分析

利用 ExPASy 软件对马氏珠母贝 PEPCK 蛋白进行分析, 结果显示原子总数为 10723, 分子结构式为 $C_{3419}H_{5332}N_{934}O_{992}S_{46}$; 预测该蛋白分子量为 76.87 kD, 理论等电点为 7.80, 其中含量较高的氨基酸有 Leu (L) 7.9%, Gly (G) 7.7%, Glu (E) 7.0%; 带负电的残基总数(Asp+Glu)为 78 个, 带正电的残基总数(Arg+Lys)为 80 个; 脂溶指数是 73.99, 平均亲水性是 -0.376, 为亲水性蛋白; 不稳定系数 42.21; PEPCK 的二级结构预测结果显示, α 螺旋结构占整体的 28.51%, 延伸链为 20.61%, 无规则折叠为 44.01%。

2.3 PmPEPCK 多序列比对及三级结构预测

将长牡蛎、虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*)、海豆芽 (*Lingula anatina*)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、智人 (*Homo sapiens*)、山羊 (*Capra hircus*)、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 和小家鼠 (*Mus musculus*) 的 PEPCK 氨基酸序列与 *PmPEPCK* 氨基酸序列进行多序列对比(图 2)。结果显示, *PmPEPCK* 与其他物种 PEPCK 均具有较高的保守性, 尤其是在 PEPCK 典型的结构基序和 GTP 三磷酸链结合的结构位点; *PmPEPCK* 与长牡蛎氨基酸序列的同源性最高, 为 74.92%。

对马氏珠母贝、长牡蛎和智人的 PEPCK 进行三级结构的预测(图 3), 发现三者的相似性较高, 这说明了 PEPCK 在三维结构上的保守性较高。

2.4 PmPEPCK 系统发育和结构域分析

利用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树。结果显示, *PmPEPCK* 与长牡蛎等无脊椎动物 PEPCK 聚为一大支, 脊椎动物的 PEPCK 聚为另外一大支, 这与传统的分类基本一

图 1 *PmPEPCK* 的核苷酸序列分析

5'和3'非编码区用小写字母表示；开放阅读框及推导的氨基酸序列用大写字母表示；阴影部分为保守结构域 Pfam PEPCK_N 和 Pfam PEPCK_C；单下划线是 PEPCK 典型的结构基序；双下划线是与 GTP 和 Mg²⁺结合的结构位点。

Fig. 1 The nucleotide sequence analysis of *PmPEPCK*

5'UTR and 3'UTR are indicated with small letters; Open reading frame and the deduced amino acid sequences are indicated with capital letters; The shaded portion is conserved domains of Pfam PEPCK_N and Pfam PEPCK_C; The single underscore is a typical structural motif of PEPCK; The double underline is the structural site of the binding of GTP and Mg^{2+} .

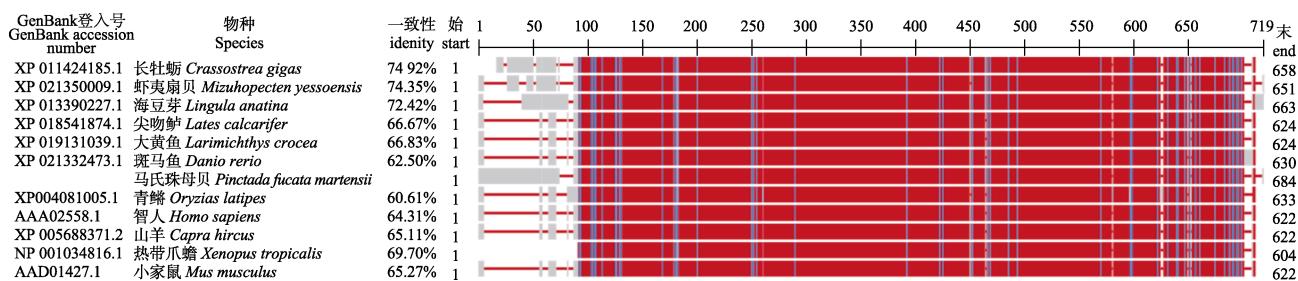


图 2 PEPCK 多序列比对

红色表示保守性高，蓝色次之；一致性数值由序列比对获得。

Fig. 2 Multiple sequence alignment of PEPCK

Red indicates high conservatism, followed by blue. Consistency values are obtained by sequence alignment.

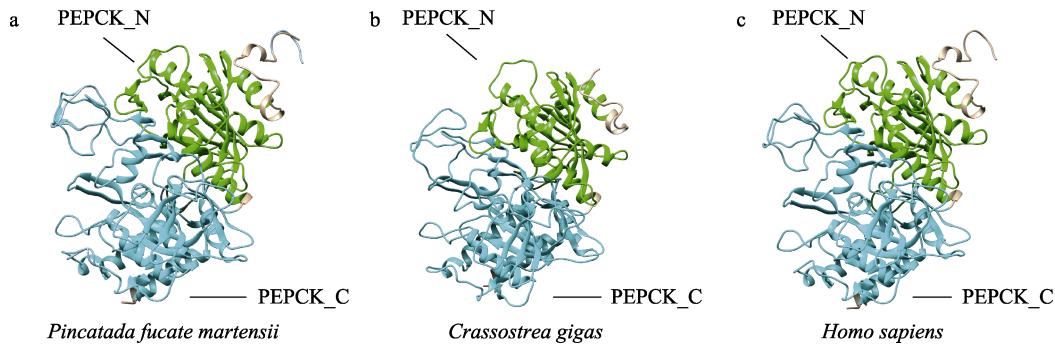


图3 马氏珠母贝(a), 长牡蛎(b), 和智人(c)的 PEPCK 蛋白三级结构

Fig. 3 The spatial structure of PEPCK protein in *Pinctada fucata martensii* (a), *Crassostrea gigas* (b), and *Homo sapiens* (c)

致。结构域分析结果显示 *PmPEPCK* 具有两个典型的 PEPCK 蛋白结构域, 分别为 Pfam PEPCK_N 结构域和 Pfam PEPCK_C 结构域(图 4)。

2.5 *PmPEPCK* 组织表达及低温胁迫下的差异分析

利用实时荧光定量 PCR 技术检测 *PmPEPCK* 在马氏珠母贝闭壳肌、鳃、性腺、足、肝胰腺和外套膜的表达模式。结果显示, *PmPEPCK* 在马氏珠母贝肝胰腺中表达量显著高于其他组织($P<0.05$); 在鳃中的表达量显著高于除肝胰腺以外的其他组织($P<0.05$, 图 5)。

为探讨 *PmPEPCK* 对低温胁迫的响应, 检测了 *PmPEPCK* 在 12 °C、17 °C 和 22 °C 马氏珠母贝鳃组织中 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 120 h

的表达模式(图 6)。结果表明, 12 °C 组和 17 °C 组 *PmPEPCK* 表达量在 6 h 即大幅上调, 均显著高于对照组($P<0.05$), 且 12 °C 组显著高于 17 °C 组($P<0.05$); 随着胁迫时间的延长, 低温组 *PmPEPCK* 的表达水平呈下降趋势, 12 h 后, 17 °C 组与对照组无显著性差异($P>0.05$), 而 12 °C 组在 48 h 之后才与 17 °C 组和对照组差异不显著($P>0.05$), 表明该基因的表达与胁迫温度和胁迫时间相关。

2.6 *PmPEPCK* 基因 SNP 位点遗传多态性分析

通过 R 和 W 的全基因组重测序数据, 在 *PmPEPCK* 基因的外显子共发现了 108 个 SNP 位点。对这些 SNP 位点的进行遗传信息分析, 结果表明 PIC 范围为 0.1038~0.3750, 平均值为 0.2716,

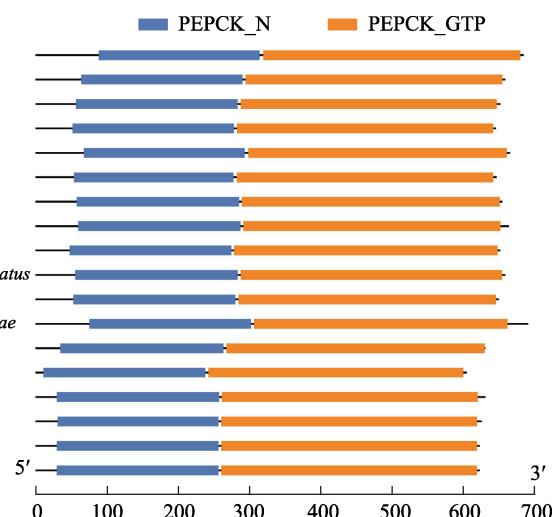
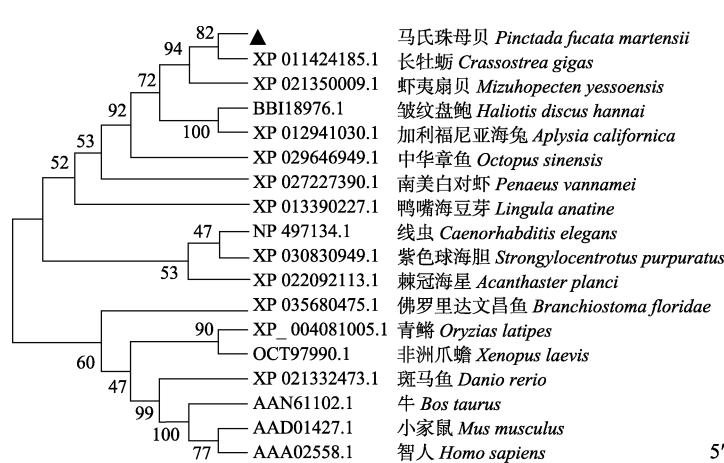


图4 PEPCK 的系统发育树及结构域

蓝色为 Pfam PEPCK_N 结构域; 橙色为 Pfam PEPCK_C 结构域。

Fig. 4 Phylogenetic trees and domains of PEPCK

The blue square is the Pfam PEPCK_N domain; the orange square is the Pfam PEPCK_C domain.

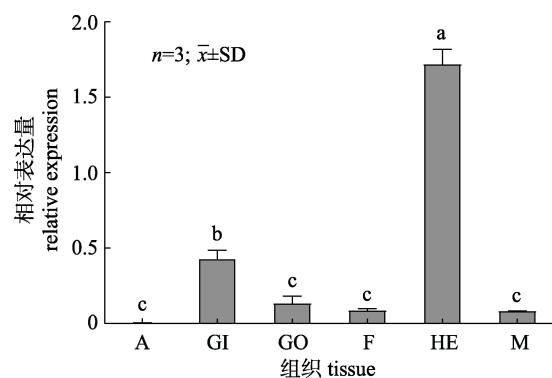


图 5 *PmPEPCK* 在马氏珠母贝不同组织中的表达分布

A: 闭壳肌; GI: 鳃; GO: 性腺; HE: 肝胰腺; F: 足;

M: 外套膜. 相同字母代表无显著性差异($P>0.05$).

Fig. 5 *PmPEPCK* gene expression profiles in different tissues of *Pinctada fucata martensi*

A: adductor muscle; GI: gill; GO: gonads; HE: hepatopancreas; F: foot; M: mantle. The same letters represent no significant difference ($P>0.05$).

47 个位点为低度多态性($PIC<0.25$), 61 个为中度多态性($0.25<PIC<0.5$), H_o 范围为 0.0833~0.6833, 平均值为 0.3577; H_e 的范围为 0.1108~0.5042, 平均值为 0.3376 (表 2)。连锁不平衡分析结果表明, 位点完全连锁不平衡($D'=1, r^2=1$)有 70 对, 强连锁不平衡($0.8\leq D' < 1, 0.3 \leq r^2 < 1$)有 368 对, 弱连锁不平衡($D' < 0.8, r^2 < 0.3$)有 3378 对(图 7)。

2.7 *PmPEPCK* 基因 SNP 位点与耐低温关联分析

在 *PmPEPCK* 基因外显子区域共检测到 108

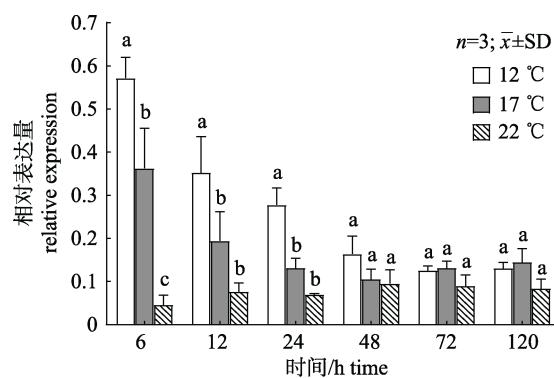


图 6 12 °C、17 °C 和 22 °C 下马氏珠母贝鳃中 *PmPEPCK* 基因的时序表达

不同字母表示同一时间点不同实验组间的

PmPEPCK 表达量具有显著差异($P<0.05$).

Fig. 6 Temporal expression of the *PmPEPCK* gene in the gills of *Pinctada fucata martensi* at 12 °C, 17 °C and 22 °C

Different letters indicate significant differences in the expression of *PmPEPCK* between different experimental groups at the same time point ($P<0.05$).

个 SNP 位点, 其中 47 个 SNP 位点在 W 和 R 之间差异显著($P<0.05$)(表 3)。其中, 频率差异最大的 5 个位点及其基因型是: *g.60006225* 的 CC 基因型在 R 和 W 群体中的频率分别为 96.7% 和 26.7%, 位点 *g.60006289* 的基因型 CC 在 R 和 W 群体中的频率分别为 73.3% 和 20%; 位点 *g.60007000* 的 AA 基因型在 R 和 W 群体中的频率分别为 56.7% 和 10%; 位点 *g.60009425* 的基因型 AA 在 R 和 W 群体中的频率分别为 80% 和 6.7%; 位点 *g.60009467*

表 2 *PmPEPCK* 的 SNP 多态性分析
Tab. 2 Haplotype of SNPs in *PmPEPCK*

编号 ID	位置 position	H_o	H_e	PIC	HWE	编号 ID	位置 position	H_o	H_e	PIC	HWE
1	60,006,028	0.3500	0.4536	0.3487	0.0738	13	60,006,173	0.5000	0.3782	0.3047	0.0114
2	60,006,040	0.5000	0.3782	0.3047	0.0114	14	60,006,225	0.3833	0.3125	0.2619	0.0734
3	60,006,116	0.3000	0.2571	0.2225	0.1856	15	60,006,265	0.3833	0.4536	0.3487	0.2251
4	60,006,117	0.3000	0.2571	0.2225	0.1856	16	60,006,289	0.5167	0.4021	0.3192	0.0254
5	60,006,118	0.1667	0.1541	0.1411	0.5057	17	60,006,316	0.1833	0.1679	0.1527	0.4578
6	60,006,124	0.5167	0.3864	0.3098	0.0081	18	60,006,343	0.6000	0.4840	0.3648	0.0611
7	60,006,127	0.5167	0.3864	0.3098	0.0081	19	60,006,784	0.3000	0.2571	0.2225	0.1856
8	60,006,133	0.2500	0.2688	0.2310	0.5797	20	60,006,829	0.4500	0.3517	0.2879	0.0278
9	60,006,148	0.3833	0.4167	0.3278	0.5306	21	60,006,835	0.2500	0.2452	0.2137	0.8772
10	60,006,154	0.5500	0.4929	0.3693	0.3649	22	60,007,000	0.5667	0.4768	0.3610	0.1403
11	60,006,166	0.3667	0.4482	0.3457	0.1545	23	60,007,009	0.2333	0.2571	0.2225	0.4621
12	60,006,169	0.1667	0.1815	0.1638	0.5097	24	60,007,081	0.3333	0.4588	0.3515	0.0324

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

编号 ID	位置 position	H_o	H_e	PIC	HWE	编号 ID	位置 position	H_o	H_e	PIC	HWE
25	60,007,087	0.2500	0.2452	0.2137	0.8772	67	60,008,997	0.2667	0.2801	0.2392	0.7108
26	60,007,338	0.1667	0.1815	0.1638	0.5097	68	60,009,000	0.5500	0.4873	0.3664	0.3142
27	60,007,359	0.2500	0.2206	0.1948	0.2868	69	60,009,003	0.6333	0.4840	0.3648	0.0159
28	60,007,363	0.4167	0.5029	0.3744	0.1802	70	60,009,425	0.4667	0.4482	0.3457	0.7468
29	60,007,365	0.3500	0.4929	0.3693	0.0235	71	60,009,449	0.3500	0.4424	0.3425	0.1019
30	60,007,374	0.3000	0.2571	0.2225	0.1856	72	60,009,461	0.1833	0.1948	0.1745	0.6358
31	60,007,389	0.1333	0.1255	0.1168	0.6062	73	60,009,464	0.1833	0.1948	0.1745	0.6358
32	60,007,403	0.4000	0.3608	0.2938	0.3926	74	60,009,467	0.4833	0.4301	0.3356	0.3323
33	60,007,407	0.4000	0.3608	0.2938	0.3926	75	60,009,468	0.1833	0.1948	0.1745	0.6358
34	60,007,409	0.4000	0.3608	0.2938	0.3926	76	60,009,476	0.2333	0.2331	0.2044	0.9924
35	60,007,411	0.1833	0.1679	0.1527	0.4578	77	60,009,482	0.1667	0.1815	0.1638	0.5097
36	60,007,413	0.4000	0.3608	0.2938	0.3926	78	60,009,494	0.3833	0.4021	0.3192	0.7142
37	60,007,416	0.4167	0.3696	0.2994	0.3169	79	60,009,515	0.6333	0.5020	0.3739	0.0409
38	60,007,449	0.5000	0.5020	0.3739	0.9757	80	60,009,524	0.5833	0.4805	0.3630	0.0944
39	60,007,452	0.4333	0.3944	0.3146	0.4384	81	60,009,527	0.4167	0.4021	0.3192	0.7763
40	60,007,455	0.3833	0.3696	0.2994	0.7704	82	60,009,533	0.3667	0.3782	0.3047	0.8114
41	60,007,461	0.5333	0.5042	0.3750	0.6518	83	60,009,539	0.3833	0.4424	0.3425	0.2956
42	60,007,494	0.2000	0.2331	0.2044	0.2582	84	60,009,545	0.2000	0.2078	0.1849	0.7625
43	60,007,509	0.2000	0.2331	0.2044	0.2582	85	60,009,548	0.3333	0.3608	0.2938	0.5496
44	60,007,515	0.1833	0.1948	0.1745	0.6358	86	60,009,550	0.3167	0.3696	0.2994	0.2602
45	60,007,527	0.5167	0.5007	0.3733	0.8033	87	60,009,560	0.6000	0.4902	0.3680	0.0800
46	60,007,791	0.2000	0.2078	0.1849	0.7625	88	60,009,584	0.3333	0.3423	0.2819	0.8366
47	60,007,803	0.1667	0.1815	0.1638	0.5097	89	60,009,599	0.1667	0.1815	0.1638	0.5097
48	60,007,818	0.2500	0.2688	0.2310	0.5797	90	60,009,605	0.3000	0.2801	0.2392	0.5739
49	60,007,833	0.1500	0.1679	0.1527	0.3876	91	60,009,608	0.3500	0.3125	0.2619	0.3430
50	60,007,851	0.5333	0.5020	0.3739	0.6254	92	60,009,619	0.2000	0.2078	0.1849	0.7625
51	60,007,863	0.1667	0.1815	0.1638	0.5097	93	60,009,620	0.2000	0.2078	0.1849	0.7625
52	60,007,878	0.5167	0.5029	0.3744	0.8312	94	60,010,272	0.2500	0.2452	0.2137	0.8772
53	60,007,884	0.5500	0.5029	0.3744	0.4648	95	60,010,293	0.6000	0.4992	0.3725	0.1145
54	60,007,890	0.4333	0.3608	0.2938	0.1138	96	60,010,296	0.4833	0.4873	0.3664	0.9498
55	60,007,899	0.2333	0.2331	0.2044	0.9924	97	60,010,311	0.3000	0.2801	0.2392	0.5739
56	60,007,917	0.6000	0.5036	0.3747	0.1350	98	60,010,341	0.4833	0.4021	0.3192	0.1130
57	60,008,822	0.3833	0.3696	0.2994	0.7704	99	60,010,365	0.5500	0.4536	0.3487	0.0964
58	60,008,844	0.6833	0.4805	0.3630	0.0010	100	60,010,377	0.5333	0.4588	0.3515	0.2039
59	60,008,853	0.2833	0.2688	0.2310	0.6673	101	60,010,416	0.5000	0.4235	0.3318	0.1571
60	60,008,880	0.3000	0.2571	0.2225	0.1856	102	60,010,420	0.0833	0.1108	0.1038	0.0389
61	60,008,901	0.1500	0.1399	0.1291	0.5553	103	60,011,266	0.5167	0.4805	0.3630	0.5566
62	60,008,913	0.5167	0.4973	0.3716	0.7614	104	60,011,290	0.4500	0.4929	0.3693	0.4968
63	60,008,928	0.1833	0.1948	0.1745	0.6358	105	60,011,320	0.3167	0.2912	0.2471	0.4886
64	60,008,940	0.2000	0.2078	0.1849	0.7625	106	60,011,341	0.4000	0.4095	0.3236	0.8553
65	60,008,949	0.5500	0.4637	0.3541	0.1455	107	60,011,365	0.1833	0.1679	0.1527	0.4578
66	60,008,976	0.2667	0.2571	0.2225	0.7622	108	60,011,387	0.1167	0.1108	0.1038	0.6581

注: H_o 为观测杂合度, H_e 为期望杂合度, PIC 多态信息含量, HWE 为哈迪-温伯格平衡。Note: H_o is observed heterozygosity, H_e is expected heterozygosity; PIC is polymorphic information content, and HWE is Hardy-Weinberg equilibrium.

图 7 *PmPEPCK* 外显子区 SNP 位点的连锁不平衡分析

方框中颜色从白色到红色, 代表连锁程度从低到高。

Fig. 7 Linkage disequilibrium analysis for the SNPs in the exon region of *PmPEPCK*
The color in the box ranges from white to red, representing the degree of linkage from low to high.

表 3 *PmPEPCK* 在 R 和 W 群体间分布频率差异显著的 SNP 位点及其基因型
Tab. 3 The characterization and significance of *PmPEPCK* SNP sites in R and W population

ID	位点 locus	基因组参考碱基 REF	基因型 genotype	R 个体数 ind. of R	W 个体数 ind. of W	P	等位基因 allele	R 个体数 ind. of R	W 个体数 ind. of W	P
1	g.60006028	A	TT:AA:AT	10:6:14	0:23:7	0.000	T:A	34:26	7:53	0.250
2	g.60006040	A	AA:AG	23:7	7:23	0.000	A:G	53:7	37:23	0.001
3	g.60006116	G	GG:CG	27:3	15:15	0.002	G:C	57:3	45:15	0.004
4	g.60006117	C	CC:CT	27:3	15:15	0.002	C:T	57:3	45:15	0.004
6	g.60006124	C	CC:CT	22:8	7:23	0.000	C:T	52:8	37:23	0.003
7	g.60006127	C	AC:CC	7:23	24:6	0.000	A:C	7:53	24:36	0.001
10	g.60006154	T	TT:AA:AT	5:14:11	4:4:22	0.009	T:A	21:39	30:30	0.139
11	g.60006166	C	AA:AC:CC	9:15:6	0:7:23	0.000	A:C	33:27	7:53	0.000
13	g.60006173	G	GG:AG	23:7	7:23	0.000	G:A	53:7	37:23	0.001
14	g.60006225	C	CC:CT	29:1	8:22	0.000	C:T	59:1	38:22	0.000
15	g.60006265	G	GG:AA:AG	7:9:14	21:0:9	0.000	G:A	28:32	51:9	0.000
16	g.60006289	C	TT:CC:CT	1:22:7	0:6:24	0.000	T:C	9:51	24:36	0.004
18	g.60006343	T	GG:GT:TT	14:13:3	4:23:3	0.016	G:T	41:19	31:29	0.093
19	g.60006784	C	CC:CT	27:3	15:15	0.002	C:T	57:3	45:15	0.004
20	g.60006829	T	TT:CT	25:5	8:22	0.000	T:C	55:5	38:22	0.000
22	g.60007000	C	AA:AC:CC	17:10:3	3:24:3	0.000	A:C	44:16	30:30	0.014
23	g.60007009	A	TT:AA:AT	2:16:12	0:28:2	0.002	T:A	16:44	2:58	0.001
24	g.60007081	T	TT:CC:CT	9:11:10	2:18:10	0.046	T:C	28:32	14:46	0.012
25	g.60007087	G	GG:AA:AG	16:1:13	28:0:2	0.002	G:A	45:15	58:2	0.001
27	g.60007359	A	AA:AG	28:2	17:13	0.002	A:G	58:2	47:13	0.004
30	g.60007374	C	CC:CT	28:2	14:16	0.000	C:T	58:2	44:16	0.001
31	g.60007389	T	TT:CT	22:8	30:0	0.005	T:C	52:8	60:0	0.006
35	g.60007411	G	GG:AG	19:11	30:0	0.000	G:A	49:11	60:0	0.001

(待续 to be continued)

(续表 3 Tab. 3 continued)

ID	位点 locus	基因组参考 碱基 REF	基因型 genotype	R 个体数 ind. of R	W 个体数 ind. of W	P	等位基因 allele	R 个体数 ind. of R	W 个体数 ind. of W	P
38	g.60007449	C	AA:AC:CC	9:10:11	4:20:6	0.035	A:C	28:32	28:32	1.000
44	g.60007515	G	GG:GT:TT	20:9:1	28:2:0	0.000	G:T	49:11	58:2	0.016
50	g.60007851	A	GG:AA:AG	12:7:11	4:5:21	0.024	G:A	35:25	29:31	0.360
52	g.60007878	A	TT:AA:AT	12:7:11	4:6:20	0.035	T:A	35:25	28:32	0.273
53	g.60007884	C	TT:CC:CT	12:7:11	3:5:22	0.009	T:C	35:25	28:32	0.273
55	g.60007899	C	TT:CC:CT	1:17:12	0:28:2	0.004	T:C	14:46	2:58	0.002
56	g.60007917	A	GG:AA:AG	8:9:13	3:4:23	0.031	G:A	29:31	29:31	1.000
60	g.60008880	G	GG:AG	27:3	15:15	0.002	G:A	57:3	45:15	0.004
61	g.60008901	T	TT:CT	22:8	29:1	0.026	T:C	52:8	59:1	0.032
65	g.60008949	C	AA:AC:CC	2:12:16	3:21:6	0.027	A:C	16:44	27:33	0.056
68	g.60009000	C	TT:CC:CT	14:3:13	5:5:20	0.044	T:C	41:19	30:30	0.063
70	g.60009425	A	TT:AA:AT	0:24:6	6:2:22	0.000	T:A	6:54	34:26	0.000
71	g.60009449	T	TT:AA:AT	9:10:11	0:20:10	0.002	T:A	29:31	10:50	0.001
73	g.60009464	T	GG:GT:TT	1:8:21	3:0:27	0.008	G:T	10:50	6:54	0.421
74	g.60009467	A	GG:AA:AG	2:22:6	2:5:23	0.000	G:A	10:50	27:33	0.001
79	g.60009515	G	GG:AA:AG	4:11:15	5:2:23	0.018	G:A	23:37	33:27	0.099
94	g.60010272	G	GG:GT:TT	20:9:1	24:6:0	0.000	G:T	49:11	54:6	0.295
96	g.60010296	T	TT:CC:CT	9:6:15	1:15:14	0.006	T:C	33:27	16:44	0.003
102	g.60010420	G	GG:AA:AG	24:1:5	30:0:0	0.036	G:A	53:7	60:0	0.013
103	g.60011266	G	GG:AA:AG	7:4:19	1:17:12	0.001	G:A	33:27	14:46	0.001
104	g.60011290	G	GG:AA:AG	11:2:17	1:19:10	0.000	G:A	39:21	12:48	0.000
106	g.60011341	G	GG:AA:AG	5:8:17	0:23:7	0.000	G:A	27:33	7:53	0.000
107	g.60011365	G	GG:AG	19:11	30:0	0.000	G:A	49:11	60:0	0.001
108	g.60011387	C	CC:CT	23:7	30:0	0.011	C:T	53:7	60:0	0.013

注: P 值为 R 和 W 频率的 χ^2 检验($P<0.05$)。阴影表示基因型只在 R 群体中被检测到的位点。

Note: P-values are from chi-square test of frequencies in the R and W ($P<0.05$). Shadows represent sites where genotypes appear only in the R group.

的基因型 AA 在 W 和 R 群体的频率分别为 73.3% 和 16.7%; 仅在 R 群体被检测到的位点共 11 个, 分别是位点 g.60010420、g.60007411、g.60011365 的基因型 AG, 位点 g.60006265、g.60006166 的基因型 AA, 位点 g.60007389、g.60011387 的基因型 CT, 位点 g.60009449、g.60006028 的基因型 TT, 位点 g.60011341 的基因型 GG 和 g.60009464 的基因型 GT, 说明这些位点在 R 群体中受到了强烈的正选择, 还有可能是这些基因型在野生群体的基因频率较低且重测序个体数相对较少的原因。

3 讨论

PEPCK 蛋白具有和草酰乙酸结合的结构基序(GSGYGGNSLLGKK), 以及与 GTP 和

Mg^{2+} 结合的激酶-1 基序(FPSACGK)和激酶-2 基序(CVGDD)^[7,14-15], 说明 PEPCK 特有结构域以及与 GTP 三磷酸链结合的激酶 1 和激酶 2 基序在进化中相当保守。本研究利用 RACE 技术获得了 PmPEPCK 的全长序列, 其同时具有 Pfam PEPCK_N、Pfam PEPCK_C 两个完整的结构域, 这证实本研究克隆所得 PmPEPCK 为 PEPCK 基因。序列比对结果表明 PmPEPCK 与长牡蛎氨基酸序列的同源性最高, 为 75.53%; 进化树分析显示 PmPEPCK 与长牡蛎、虾夷扇贝的 PEPCK 聚为一支, 均说明 PEPCK 在双壳类动物进化过程中的保守性。

PEPCK 作为糖异生过程中的关键限速酶, 广泛存在于生物的各个组织中, 包括肝、鳃、心、

脾、种子、果实等^[7,16],但是主要在肝脏、肾脏和脂肪组织中表达^[17]。本研究对马氏珠母贝 *PmPEPCK* 基因的组织表达分析发现,它在肝胰腺的表达量最高,与上述研究结果一致。此外,温度能够直接影响贝体的新陈代谢活动,进而影响贝体的能量收支和生长过程。有研究表明,当海水温度急剧变化时,对贝类的摄食、呼吸和排泄均有很大的负面影响^[18-20]。本研究显示 *PmPEPCK* 在低温组中 mRNA 表达量在 6 h 时就已大幅上调,且显著高于对照组,说明低温胁迫下,马氏珠母贝快速开启了糖异生作用,增加机体糖原以应对温度骤降对能量的消耗。随后低温组 *PmPEPCK* 的表达量逐渐回落,且 17 ℃组和 12 ℃组的分别在 12 h 和 48 h 与对照组无显著性差异,说明 *PEPCK* 基因可能在低温响应过程的前期起着更为重要的作用。这些结果表明 *PEPCK* 基因的表达与环境温度和胁迫时间存在明显的相关性。

外显子 SNPs 可能会导致基因编码的蛋白发生结构功能的变化,进而影响表型性状^[21]。目前,SNP 分子标记技术已被广泛应用于水产动物遗传育种研究中,如 Kjøglum 等^[22]对大西洋鲑(*Salmo salar*)的不同家系大量个体 MHC I 类和 II A 类等位基因及其组合在抗 ISA 方面进行评估,结果表明这些等位基因的组合对 ISA 的抗病性具有显著影响。柴欣等^[23]利用高分辨率熔解曲线法和限制性内切酶酶切法对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) MHC IIa 基因的多态性与抗细菌性败血症性状进行关联分析,获得 3 个与抗细菌性败血症相关联的 SNP 标记。陈晓敏等^[24]对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *CAT* 基因进行 SNP 位点筛查,发现 1 个与耐低溶氧性状显著相关的多态位点 *g.155A>G*,该 SNP 位点 AG 基因型的个体低溶氧耐受性较 GG 基因型高,表明 *CAT* 基因可作为凡纳滨对虾耐低溶氧性状的候选基因。Nie 等^[25]发现牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的 *Hsp70* 基因单倍型 TTG 和 *hmgb1* 基因单倍型 ATG、TCT 与牙鲆的抗寒性有关。Du 等^[26]对海湾扇贝(*Argopecten irradians*)两个不同亚种的 SNP 进行分析,得出 *A153308-760T/C* 可能与海湾扇贝的耐热性有关。Lai 等^[12]通过对马氏珠母贝 *PmPIAS* 外显子区域

进行 SNP 分析,共获得 18 个 SNP 位点,其中 11 个 SNP 位点可能与低温耐受能力存在密切联系。本研究分析了马氏珠母贝 R 和 W 的 *PmPEPCK* 的外显子区域,共检测到 108 个 SNP 位点,其中 47 个位点的基因型频率在 W 群体和 R 群体间差异显著,说明高强度的人工选育过程形成强烈的选择效应,但这些位点基因型频率的改变与选育系低温耐受能力之间的关系还有待深入分析,以从中筛选出可应用于后续耐低温品系分子辅助育种的分子标记。本研究中,有 11 个基因型仅在 R 群体中被检测到,说明这些位点在 R 群体中受到了强烈的正选择,还有可能是因为这些基因型在野生群体的基因频率较低且重测序个体数相对较少。

参考文献:

- [1] Matte A, Tari L W, Goldie H, et al. Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(13): 8105-8108.
- [2] Hanson R W, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression[J]. Annual Review of Biochemistry, 1997, 66: 581-611.
- [3] Yang J Q, Kalhan S C, Hanson R W. What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(40): 27025-27029.
- [4] Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 2002, 1579(1): 35-42.
- [5] Li S Y, Liu H Y, Tan B P, et al. Effects of dietary carbohydrate levels on the gene expression and the activity of pepck in marine fishes with different food habits[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 80-89. [李淑云, 刘泓宇, 谭北平, 等. 饲料中糖水平对不同食性海水鱼类 PEPCK 基因表达和酶活性的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 80-89.]
- [6] Li X F, Xiao X H, Chai L H, et al. Effect of low temperature stress on enzyme specific activity of GP and PEPCK in male *Rana dybowskii*[J]. Journal of Economic Animal, 2012, 16(2): 67-70, 75. [李秀峰, 肖向红, 柴龙会, 等. 低温胁迫对东北林蛙雄性成体 GP、PEPCK 比活性的影响[J]. 经济动物学报, 2012, 16(2): 67-70, 75.]
- [7] Qian Y X, Yang S X, Tong L J, et al. Low salinity induces cytosolic PEPCK expression in sea perch (*Lateolabrax japonicus*)[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular

- Biology, 2010, 26(7): 651-658. [钱云霞, 杨孙孝, 童丽娟, 等. 低盐度可诱导鲈鱼胞浆型 PEPCK 基因表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(7): 651-658.]
- [8] Wang T. The molecular mechanism of hypoxia signal pathway in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2017. [王婷. 长牡蛎低氧信号通路分子作用机制研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2017.]
- [9] Tian R R, Tian Q L, Du X D, et al. Molecular characterization and tissue specific expression of SRF gene from *Pinctada martensi*[J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(2): 272-278. [田荣荣, 田群莉, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝 SRF 基因的分子特征及组织特异性表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(2): 272-278.]
- [10] Lai Z X. Genome selection sweep of low temperature resistant line from *Pinctada fucata martensi*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2020. [赖卓欣. 马氏珠母贝耐低温选育系的选择印记分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2020.]
- [11] Wang Q H, Liu Y, Zheng Z, et al. Adaptive response of pearl oyster *Pinctada fucata martensi* to low water temperature stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 78: 310-315.
- [12] Lai Z X, Adzibli L, Chen Q Y, et al. Identification and allelic variants associated with cold tolerance of *PmpIAs* in *Pinctada fucata martensi*[J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 634838.
- [13] Liu Y. Preliminary study on the molecular mechanism of low temperature adaptability of *Pinctada fucata martensi*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2018. [刘雅. 马氏珠母贝低温适应性分子机制的初步研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2018.]
- [14] Choi C Y, Min B H, Jo P G, et al. Molecular cloning of PEPCK and stress response of black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*) to increased temperature in freshwater and seawater[J]. General and Comparative Endocrinology, 2007, 152(1): 47-53.
- [15] Ge X P, Yu J H, Wu T T. Molecular cloning and character analysis of cDNA of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in *Erythroculter ilishaeformis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 389-396. [戈贤平, 俞菊华, 吴婷婷. 翘嘴红鲌 PEPCK 基因的克隆和序列分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 389-396.]
- [16] Wang M Y. Study on the response and regulatory mechanisms of juvenile *Coilia nasus* to variations in environmental factors based on transcriptome analysis[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017. [王美垚. 基于转录组分析探讨刀鲚幼鱼对环境因子变化的响应及调控机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.]
- [17] Wang G Y, Liu B, Xie J, et al. Research progress of several carbohydrate metabolic key enzymes in fish[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(3): 377-383. [王广宇, 刘波, 谢骏, 等. 鱼类糖代谢几种关键酶的研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(3): 377-383.]
- [18] Wu B, Yang A G, Sun X J, et al. Effects of acute temperature stress on genome-wide DNA methylation profiles in *Patinopecten yessoensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2016, 37(5): 140-146. [吴彪, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 急性温度胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)基因组 DNA 甲基化的影响[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 140-146.]
- [19] Gao Z K, Zhang J H, Li M, et al. Effects of temperature fluctuation on physiological and immune parameters of scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(3): 148-154. [高振锟, 张继红, 李敏, 等. 温度波动对不同规格虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)生理和免疫指标的影响[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(3): 148-154.]
- [20] Jiang W W, Jiang Z J, Du M R, et al. Physiological and biochemical responses of Zhikong scallop, *Chlamys farreri*, to different thermal stressors[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(9): 4783-4797.
- [21] Chen L Y, Yuan C, Guo J, et al. Polymorphism and bioinformatics analysis of INHA gene and its association with litter size in alpine merino sheep[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(3): 1035-1041. [陈来运, 袁超, 郭健, 等. 高山美利奴羊 INHA 基因多态性生物信息学分析及与产羔数关联分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(3): 1035-1041.]
- [22] Kjøglum S, Larsen S, Bakke H G, et al. How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21(4): 431-441.
- [23] Chai X, Hu X K, Ma X F, et al. SNP screening, identification and association with disease resistance of MHC II α gene in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2017, 36(4): 76-82. [柴欣, 胡晓坤, 马徐发, 等. 团头鲂 MHC II α 基因的 SNP 位点开发、鉴定及与抗病性状关联分析[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 76-82.]
- [24] Chen X M, Liu J Y, Zhang J C, et al. Single nucleotide polymorphisms in catalase gene and their association with resistant hypoxia traits in *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2016, 36(6): 16-20. [陈晓敏, 刘建勇, 张嘉晨, 等. 凡纳滨对虾过氧化氢酶基因单

- 核苷酸多态性及其与耐低溶氧性状的相关性[J]. 广东海洋大学学报, 2016, 36(6): 16-20.]
- [25] Nie M M, Hu J W, Lu Y L, et al. Cold effect analysis and screening of SNPs associated with cold-tolerance in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2019, 35(4): 924-932.
- [26] Du X D, Li L, Zhang S D, et al. SNP identification by transcriptome sequencing and candidate gene-based association analysis for heat tolerance in the bay scallop *Argopecten irradians*[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104960.

Sequence characteristics of *PEPCK* gene of *Pinctada fucata martensi* and its selection in low temperature-resistant line

CHEN Kun¹, LAI Zhuoxin¹, LIU Ya¹, HAO Ruijuan², WANG Qingheng^{1,3}

1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524025, China;

3. Guangdong Science and Innovation Center for Pearl Culture, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Phosphoenolpyruvate carboxylase is a key enzyme in the gluconeogenesis pathway. When animals and plants are under adverse environmental conditions such as temperature stress, they can convert oxaloacetic acid into phosphoenolpyruvate, generating glucose to maintain the blood glucose balance. This process plays an important role in stress resistance. In this study, *PEPCK* gene of *Pinctada fucata martensi* was identified, the changes of *PmPEPCK* expression under low temperature stress were analyzed, and single-nucleotide polymorphism (SNP) sites in the exon region of *PmPEPCK* in low temperature tolerant breeding line F3 (R) and Beibu Gulf wild populations (W) of *Pinctada fucata martensi* were screened and compared. Sequence analysis showed that the *PmPEPCK* gene had a full length of 2557 bp; the 5'UTR and 3'UTR were 56 bp and 446 bp long, respectively, and the open reading frame was 2055 bp long and encoded 684 amino acids. *PmPEPCK* was expressed in the tested tissues, among which the hepatopancreas had the highest expression ($P<0.05$). The time-series expression results in gill tissues after low temperature stress showed that the expression of *PmPEPCK* in the low temperature group reached the highest at 12 °C and 17 °C at 6 h, which was significantly higher than that at 22 °C noted in the control group ($P<0.05$), indicating that *PmPEPCK* participates in the low temperature response process of shellfish. A total of 108 SNPs were identified in the exon region of *PmPEPCK*, of which 47 SNPs showed significant differences between the R and W population ($P<0.05$). Among the 47 SNP loci, 11 genotypes only appeared in R, which were the AG genotype of loci g.60010420, g.60007411, and g.60011365; genotype AA of loci g.60006265 and g.60006166; genotype CT of loci g.60007389 and g.60011387; genotype TT of loci g.60009449 and g.60006028; genotype GG of locus g.60011341; and genotype GT of locus g.60009464. Thus, after 3 generations of selection, the *PmPEPCK* gene of the R population was strongly positively selected. These SNPs and their genotypes of *PmPEPCK* may be related to the low temperature tolerance of the breeding line and used as candidate markers for selective breeding.

Key words: *Pinctada fucata martensi*; *PEPCK*; low temperature tolerance; SNPs; gene cloning

Corresponding author: WANG Qingheng. E-mail: wangqh@gdou.edu.cn