

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220713001

http://www.yykxjz.cn/

宋欣霖, 杨佳雯, 韩书雅, 赖卓欣, 王庆恒, 邓岳文. 马氏珠母贝 *Rab7* 基因序列特征及其与耐低温性状的关系. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 155–165

SONG X L, YANG J W, HAN S Y, LAI Z X, WANG Q H, DENG Y W. Sequence characteristics of *Rab7* of *Pinctada fucata martensii* and its relationship with low temperature tolerance. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(6): 155–165

马氏珠母贝 *Rab7* 基因序列特征 及其与耐低温性状的关系*

宋欣霖¹ 杨佳雯¹ 韩书雅¹ 赖卓欣^{1,2,3} 王庆恒^{1,2,3,4①} 邓岳文^{1,2,3,4}

(1. 广东海洋大学水产学院 广东 湛江 524088; 2. 广东省珍珠科技创新中心 广东 湛江 524088;

3. 广东省海水养殖生物育种工程实验室 广东 湛江 524088;

4. 广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室 广东 湛江 524088)

摘要 Rab 蛋白是膜泡运输过程中的重要调节因子,在囊泡运输和水产动物的免疫应答中行使重要功能。本研究鉴定了马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)的 *Rab7* 基因(*Pm-Rab7*),分析了 *Pm-Rab7* 在 6 个组织中及在温度胁迫(低温组 17 °C、对照组 22 °C、高温组 32 °C)下的表达模式,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 *Pm-Rab7* 外显子区的 SNP 位点。结果显示, *Pm-Rab7* 序列全长为 1 153 bp, 5'端、3'端和开放阅读框(ORF)序列长度分别为 30、505 和 618 bp, 共编码 205 个氨基酸; *Pm-Rab7* 具有一个 RAB 保守结构域,并与太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)相似度最高(92.79%)。系统进化树结果显示, *Pm-Rab7* 与太平洋牡蛎等软体动物聚为一支。*Pm-Rab7* 在所检测的组织都有表达,其中在性腺和鳃中的表达显著高于外套膜和肝胰腺等组织($P < 0.05$)。*Pm-Rab7* 温度胁迫后时序表达分析发现,在 17 °C 低温组, *Pm-Rab7* 的表达量呈先上升再下降的趋势,在 6 h~3 d 内均显著高于 22 °C 对照组($P < 0.05$),在 1 d 时达到峰值;在 32 °C 高温组, *Pm-Rab7* 表达量总体稳定,仅 12 h 时显著高于对照组($P < 0.05$),其他时间点与对照组无显著差异($P > 0.05$);说明该基因的表达与马氏珠母贝对低温胁迫的响应密切相关。*Pm-Rab7* 基因的外显子区域在马氏珠母贝耐低温选育系和北部湾野生群体中共检测到 7 个 SNP 位点,其中 3 个位点的基因型频率在 2 个群体间具有显著性差异,说明这些位点可能与其耐低温性状相关。结果表明, *Pm-Rab7* 可能在马氏珠母贝耐低温适应过程中发挥重要作用,研究结果可为深入探讨马氏珠母贝对温度变化的环境适应性研究提供参考资料。

关键词 马氏珠母贝; *Pm-Rab7*; 基因克隆; 温度胁迫; SNP

中图分类号 S917.4; Q953+1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)06-0155-11

Rab (Ras-related proteins in brain)作为小分子 GTP 结合蛋白中最大的亚家族,约由 200 个氨基酸组

成,分子量为 20~25 kDa (Schwartz *et al.*, 2007),广泛分布于各种真核生物中,是膜泡运输过程中的重要调

* 广东省自然科学基金项目(2020A151501691)、广东省教育厅重点领域专项(2020ZDZX1045)和广东省现代农业产业技术体系-贝藻类产业创新团队(KJ146)共同资助。宋欣霖, E-mail: 1359005856@qq.com

① 通信作者: 王庆恒, 教授, E-mail: wangqh@gdou.edu.cn

收稿日期: 2022-07-13, 收修改稿日期: 2022-08-07

节因子,镶嵌在几乎所有与膜相关的细胞器上,调节作用主要通过 GTP 结合和 GTP 水解两种方式,在囊泡运输的各个阶段行使重要功能(Jordens *et al*, 2005; 聂宇等, 2008; 黄薇等, 2016)。目前,在水产动物中有关 Rab 蛋白功能的研究主要集中在免疫方面,例如: Rab11a 和 Rab11b 可以通过胞吞途径参与斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 感染迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 后的免疫应答(Liu *et al*, 2012; Sun *et al*, 2012); 在中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 中, Rab 基因的表达量在感染鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 的组织中会显著升高(Wang *et al*, 2013); 日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 血细胞的 Rab 基因被序列特异性 siRNA 沉默时,对副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的吞噬百分率和吞噬指数显著降低; 另一方面, Rab 基因的过表达可导致吞噬百分率和吞噬指数的增加,表明 Rab 蛋白参与了日本对虾血细胞吞噬功能的调节(Zong *et al*, 2008); 斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 可通过注射 dsRNA 来消耗 Rab7, 并抑制白斑综合征 (WSSV) 和黄头病毒 (YHV) 的复制(Ongvarrasopone *et al*, 2008)。以上研究表明, Rab 基因对水产动物的免疫应答具有重要作用。本实验室前期关于马氏珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*) 温度适应性的研究结果显示,由溶酶体介导的适度的自噬和免疫增强能提高马氏珠母贝对低温环境的适应能力(Wang *et al*, 2018), 但 Rab 基因在其中的作用尚不清楚。

SNP 是指物种基因组中由单个核苷酸突变所引起的 DNA 序列多态性,往往与生物体机能的改变和疾病的发生有关(陈昆平等, 2018)。在罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 抗病选育研究中, 高风英等(2014)和 Fu 等(2014)分别在 *MHC IIB* 和 *MCP-8* 基因中找到了与链球菌病抗性相关的 SNP 标记; 付瑞雪等(2015)对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 的抗感染鳃弧菌病群体和易感群体进行了部分 SNP 位点的分型,发现丝氨酸蛋白酶基因在牙鲆抗鳃弧菌感染中发挥了重要作用; Zhao 等(2012)报道了凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 血蓝蛋白的 C 末端的 SNP 位点可能与对不同病原菌的抗性相关; 邢贺飞等(2016)筛选了半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) *Nramp* 基因与抗鳃弧菌感染相关的 SNP 位点,发现 *Nramp* 基因不同基因型对半滑舌鳎的抗病能力有着极其重要的影响。目前, SNP 作为最理想的 DNA 分子标记,被广泛应用于水产动物免疫相关基因与抗逆关联分析的研究中,为水产动物的育种奠定了基础。

马氏珠母贝是我国培育海水珍珠的主要贝种,具有重要经济价值,主要分布在我国广东、广西和海南

沿海,低温耐受能力较弱,严重限制了海水珍珠的养殖区域和产量(赖卓欣, 2020)。为了开展珍珠贝北移养殖,本实验室持续构建了马氏珠母贝耐低温选育系 (low temperature resistant line, R) (Wang *et al*, 2018), 并利用基因组重测序技术比较分析了耐低温选育系 F₃ 和马氏珠母贝北部湾野生群体(Beibu Gulf wild population, W)的遗传结构(赖卓欣, 2020),获得了 Rab 基因在内的一批在选育过程中受到强烈正选择的候选基因(Lai *et al*, 2021; 陈琨等, 2022)。本研究运用 RACE 技术克隆了马氏珠母贝 Rab7 基因的全长 cDNA 序列,对马氏珠母贝低温胁迫后的鳃组织进行了时序表达研究,借助前述全基因组重测序数据库,对 Rab7 基因进行外显子 SNP 位点的筛选和遗传多态性、单倍型、频率的分析及计算,以期深入了解 Rab7 基因在马氏珠母贝低温响应中的作用,为进一步研究马氏珠母贝对温度胁迫的应答机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的马氏珠母贝均来自广东省雷州市后洪村海区(20°29'N, 109°54'E)。把表面附着物清理干净的马氏珠母贝运回实验室后,暂养于 22 °C, 2 d 后从中选取规格相似、活力正常且鳞片旺盛、生理状态良好的 158 个个体用于基因克隆及基因表达分析,实验贝壳长为(69.23±3.80) mm。随机取 8 只马氏珠母贝,剪取闭壳肌、鳃、性腺、肝胰腺、足和外套膜,经液氮速冻,置于-80 °C 冰箱备用,其他个体用于温度胁迫实验。

温度胁迫下鳃组织中时序表达样品制备:以 3 个 300 L 的大白桶为容器,分别设置海水温度为 17 °C(低温组)、22 °C(对照组)和 32 °C(高温组)(赖卓欣等, 2019),在水温调到对应的温度后将 150 只马氏珠母贝随机分成 3 组,分别放进 3 个桶内养殖,在 6 h、12 h、1 d、2 d 和 3 d 从每个组随机取 8 只马氏珠母贝,剪取鳃组织,液氮急冻,-80 °C 冰箱保存,用于后续实验。养殖过程中,每天更换 50% 相同温度的海水,投喂等量的单胞藻,保持微充气。

1.2 *Pm-Rab7* 基因全长克隆

采用 Trizol 法提取总 RNA, 3' RACE 和 5' RACE 模板的制备参考 SMART™ RACE cDNA Amplification 试剂盒说明书。利用 Primer Premier 5.0 软件设计实验所需引物(表 1),利用巢式 PCR 扩增获得 5'端和 3'端序列,PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,将与

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
<i>Rab-3-outer</i>	AATAGATTTGGAAAACAGGGCG	3' RACE
<i>Rab-3-inner</i>	CGAGACCAGTGCCAAAGAGG	3' RACE
<i>Rab-5-inner</i>	CTTCTTTGGTAAGGAAATCTGCTC	5' RACE
<i>Rab-5-outer</i>	GCCTAAACTCTGAAACCTCTCCTG	5' RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG CAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE
UPm-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	菌落 PCR Colony PCR
M13-R	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA	菌落 PCR Colony PCR
<i>Pm-Rab7-F</i>	CTACTTCTGTTTCTTGTGCGAGC	qRT-PCR
<i>Pm-Rab7-R</i>	AATAGATTTGGAAAACAGGGCG	qRT-PCR

目的片段长度一致的 PCR 产物和载体 pMD18-T 连接, 连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中, 用氨苄选择培养基培养后进行菌液 PCR, 挑取阳性菌送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序获得的成功克隆序列与马氏珠母贝基因组已知的部分进行拼接, 最终获得基因全长序列。

1.3 *Pm-Rab7* 的生物信息学分析

DNAMAN 软件进行序列拼接及氨基酸序列推导; ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) 找到 *Pm-Rab7* 的开放阅读框(ORF); 利用 SMART 4 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测序列保守结构域; 对氨基酸的理化性质分析、信号肽预测和跨膜结构分析分别利用 ExPASy-ProtParam、SignalP 5.1 和 TMHMM Server 软件完成; 利用 NCBI COBALT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) 和 DNAMAN 9 进行多序列比对; 蛋白质三级结构由 Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测; 功能位点在氨基酸序列中的分布情况利用 SoftBerry-Psite(<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=psite&group=programs&subgroup=proloc>) 预测; MEGA 11 用于生物系统发育树构建。

1.4 *Pm-Rab7* 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(赖卓欣等, 2019; 陈琨等, 2022), 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *Pm-Rab7* 基因在不同组织的相对表达量以及在实验温度下各时间点的相对表达量, 以各组织的反转录 cDNA 为模板, 反应体系(10 μ L): 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 0.4 μ L, 2 \times PerfectStart Green qPCR SuperMix 5 μ L, 灭菌

ddH₂O 3.8 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 45 个循环; 溶解曲线为 95 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 1 s。每个实验组共 8 个样品, 每个样品重复 3 次。利用 SPSS 22.0 软件以进行单因素方差分析(one-way ANOVA)组织间表达量和温度胁迫后各时间点表达量的均值比较, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

1.5 *Pm-Rab7* 基因 SNP 分析

利用课题组前期完成的马氏珠母贝耐低温选育群体(R)和北部湾野生群体(W)各 30 个个体的全基因组重测序文库(赖卓欣, 2020), 对 *Pm-Rab7* 基因外显子区的 SNP 位点进行筛选。利用软件 Haploview 4.2 计算 D' 值和 R^2 值及进行连锁不平衡分析和单倍型分析; PopGen 32 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 2 个群体的 SNP 差异统计分析。

2 结果与分析

2.1 *Pm-Rab7* 基因克隆及序列分析

本研究利用 RACE 技术克隆获得马氏珠母贝 *Pm-Rab7* 基因 cDNA 序列, *Pm-Rab7* 总长为 1 153 bp, 5' UTR 为 30 bp, 3' UTR 为 505 bp, ORF 为 618 bp, 编码 205 个氨基酸(图 1), 理论分子量为 23.04 kDa, 等电点为 5.40。带负电的残基总数(Asp+Glu)为 27 个, 带正电的残基总数(Arg+Lys)为 25 个; 脂溶指数为 77.02, 平均亲水性(grand average of hydropathicity,

```

1 gaggaataagaaaatctgtttacgaagagATGGCTTCGAGGAAGAAGGTTTGTGAAAGTAATAATATTAGGTGACAGTGGTGTAGGT
1 M A S R K K V L L K V I I L G D S G V G
91 AAGACATCACTTATGAACAGTATGTGAACAAAAAGTTCAGTAATCAATATAAGGCCACCATGGAGCAGATTTCCCTTACCAAAGAAGTC
21 K T S L M N Q Y V N K K F S N Q Y K A T I G A D F L T K E V
181 ATGGTAGAAGATAGGCTAGTCACTATGCAGATATGGGACACAGCAGGCCAGGAGAGGTTTCAGAGTTTAGGCGTGGCTTTCTACAGGGGT
51 M V E D R L V T M Q I W D T A G Q E R F Q S L G V A F Y R G
271 GCAGACTGTTGTATTGGTGTGGTGTATGTTACCATGCCAAATACATTCAAATCACTAGACAGCTGGAGAGATGAGTTTCTTATACAAGCA
81 A D C C V L V F D V T M P N T F K S L D S W R D E F L I Q A
361 AGTCCAAGGGATCCAGAAAATTCCTTTTGTGTTATAGGAAATAAAATAGATTGGAAAACAGGGCGGTAACGGCAAAAAGAGCCCAA
111 S P R D P E N F P F V V I G N K I D L E N R A V T A K R A Q
451 GGCTGGTGAATAGTAAAGGAGAAATTCCTTATTCGAGACCCAGTGCCAAAGAGGCCATTAATGTTGAACAAGCTTCCAGACCGTCGCA
141 G W C N S K G E I P Y F E T S A K E A I N V E Q A F Q T V A
541 AAGAATGCGCTCGCACAGAAACAGAAGTAGAACATTTACAATGAATCCCCGATCCAGTAAAACCTCAGGACAACCAAAACAAACAAAA
171 K N A L A Q E T E V E L Y N E F P D P V K L T D N Q N K P K
631 GAAGGGTGGATGCTTtagttacaagttatcatggattttattatgtgatcatctttaagttcttcaaaatatggaagatttccat
201 E G C G C *
721 ggacttgaattagaattttatttaaaatagtgctagtttggatggacaaaattggaccacttgtgcattttgggtaaccattttgca
811 agtgaatataactctatctcaaaagcctacattacaagggtttatgtctataagaagtagaggtcctaagctgaaaataaagaatata
901 aggagaatacaatgattcagatgtttaatttttaacaaagttaaagaattatgtataaattatcagaaggaagtacatgtaacaatctt
991 tgtgtaccatggttaccagttcatttatttgaagtaaaatttaaaattttattgaagtcatttgaagtaataatcatttgaccaagt
1081 ctttagtatatttgatccatggcattatcaacccttcaatataatccaaaaaAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 *Pm-Rab7* 的核苷酸序列分析
 Fig.1 Nucleotide sequence analysis of *Pm-Rab7*

小写字母表示 5'和 3'非编码区；大写字母表示编码区以及推导的氨基酸序列；
 方框内为起始密码子与终止密码子；阴影部分为结构域。

5' and 3' non-coding regions are indicated by lowercase letters; coding regions and deduced amino acid sequences are indicated by uppercase letters; within the box are the start codon and stop codon; and the shaded region is the domain.

GRAVY)为-0.343，为亲水性蛋白。结构域分析结果显示，*Pm-Rab7* 具有 Rab 典型的结构域 RAB，其中第 15~22 号氨基酸(GDSGVGKT)，第 37~45 号氨基酸(YKATIGADF)，第 62~67 号氨基酸(WDTAGQ)，第 124~128 号氨基酸(GNKID)，第 153~157 号氨基酸(ETSAK)是 Rab 家族的保守序列。

2.2 *Pm-Rab7* 同源性分析

为了确定 *Pm-Rab7* 与其他物种的同源性，将 *Pm-Rab7* 与普氏野马(*Equus przewalskii*)、牛(*Bos taurus*)、野生火鸡(*Meleagris gallopavo*)、斑尾咬鹃(*Apaloderma vittatum*)、锦龟(*Chrysemys picta bellii*)、中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)、大蟾蜍(*Bufo bufo*)、高山

倭蛙(*Nanorana parkeri*)、新西兰背唇隆头鱼(*Notolabrus celidotus*)、象鼻鱼(*Paramormyrops kingsleyae*)、台湾家白蚁(*Coptotermes formosanus*)、多胚跳小蜂(*Copidosoma floridanum*)、笠贝(*Lottia gigantea*)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、棘冠海星(*Acanthaster planci*)和紫色球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)的 *Rab* 基因序列进行多序列比对。结果显示，*Pm-Rab7* 与笠贝、太平洋牡蛎等其他软体动物的 RAB 序列相似，程度最高的是太平洋牡蛎，达 92.79% (图 2)。

2.3 *Pm-Rab7* 三级结构预测

对马氏珠母贝、太平洋牡蛎、新西兰背唇隆头鱼

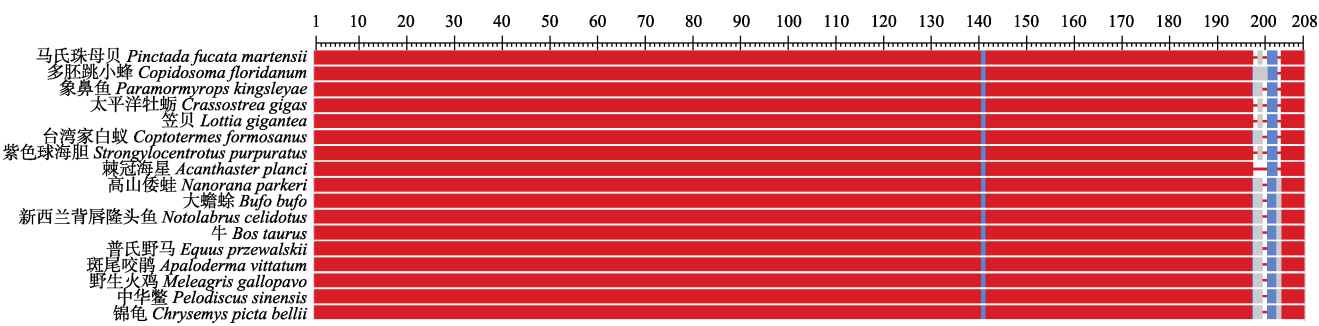


图 2 Rab7 氨基酸序列多序列对比
 Fig.2 Multiple alignment of Rab7 amino acid sequences

红色到灰色代表保守性从高到低。
 Red to gray represents conservatism from high to low.

和普氏野马的 *Rab7* 基因利用在线软件进行蛋白三维结构的构建, 预测的具体结果见图 3, 从图 3 可以看出, 不同物种的三维结构十分相似, 说明 *Rab7* 基因在生物进化过程中相对比较保守。

2.4 Pm-Rab7 进化树构建

将 *Pm-Rab7* 与其他物种的 RAB 序列建立系统进化树, 结果显示, 进化树呈现出 3 大支, 其中, 哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类与鱼类同为脊椎动物, 聚为一大支; 节肢动物与软体动物同为原口动物, 聚为一大支; 棘皮动物另聚为一大支(图 4), 这与传统的分类基本保持一致。

2.5 Pm-Rab7 组织表达及温度胁迫下的差异分析

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测 *Rab7* 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, *Pm-Rab7* 基因在所有马氏珠母贝检测组织中均有不同程度的表达, 在性腺和鳃中表达量显著高于其他组织($P < 0.05$)(图 5)。

利用 qRT-PCR 技术检测了 *Pm-Rab7* 在温度胁迫下马氏珠母贝鳃组织中的时序表达。结果显示, 在 17 °C 低温组, *Pm-Rab7* 的表达量呈现先上升再下降的趋势, 在 6 h~3 d 内均显著高于 22 °C 对照组($P < 0.05$), 在 1 d 时达到峰值; 在 32 °C 高温组, *Pm-Rab7* 的表达量总体稳定, 仅 12 h 时显著高于对照组($P < 0.05$), 其他时间点与对照组无显著性差异($P > 0.05$), 说明该基因的表达与马氏珠母贝对低温胁迫的响应密切相关(图 6)。

2.6 Pm-Rab7 基因 SNP 位点遗传多态性分析

通过 R 和 W 群体的全基因组重测序数据, 在 *Pm-Rab7* 基因的外显子共发现了 7 个 SNP 位点。对这些 SNP 位点进行遗传信息分析, 结果显示, 在 R 群体 PIC 范围为 0.091~0.352, 平均值为 0.251, 3 个位点为低度多态性($PIC < 0.25$), 4 个为中度多态性($0.25 < PIC < 0.5$), H_o 范围为 0.033~0.533, 平均值为 0.310; H_e 范围为 0.097~0.463, 平均值为 0.311 (表 2)。

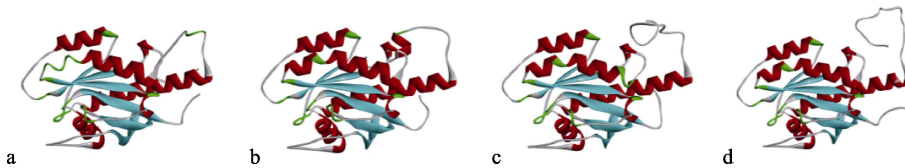


图 3 马氏珠母贝(a)、太平洋牡蛎(b)、新西兰背唇隆头鱼(c)和普氏野马(d) Rab7 蛋白分子结构

Fig.3 Molecular structure of Rab7 protein structure in *P. f. martensii* (a), *C. gigas* (b), *N. celidotus* (c), and *E. przewalskii* (d)

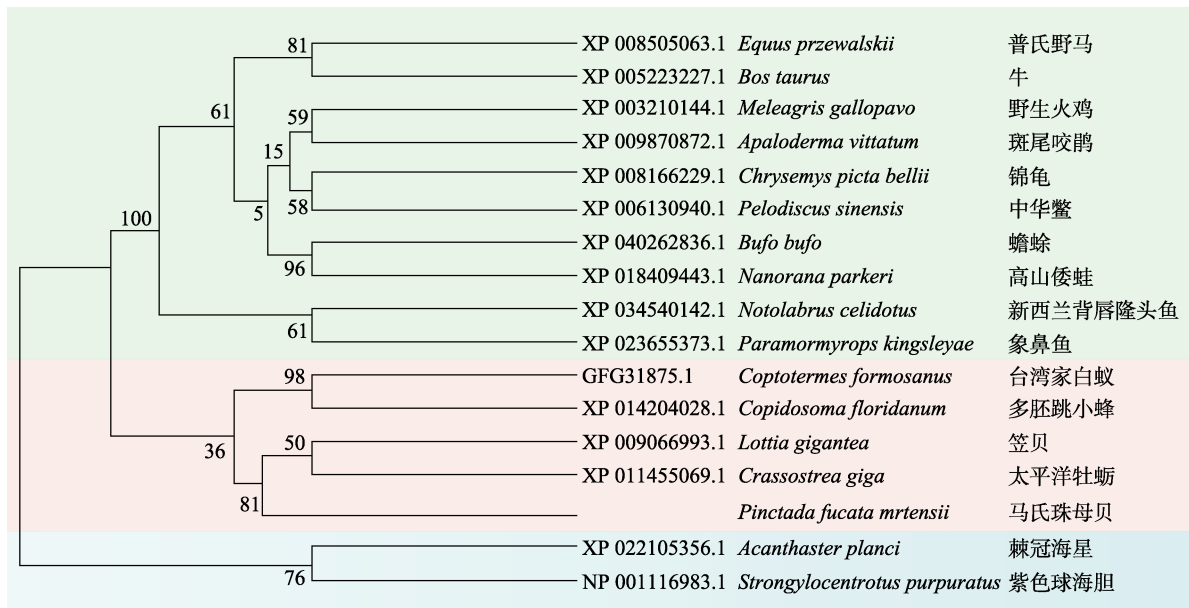


图 4 Rab7 的系统进化树

Fig.4 The phylogenetic tree of Rab7

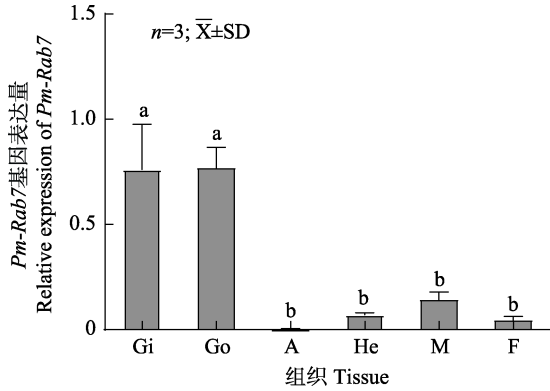


图5 *Pm-Rab7* 在马氏珠母贝不同组织中的表达分布
Fig.5 *Pm-Rab7* gene expression profiles in different tissues of *P. f. martensii*

Gi: 鳃; Go: 性腺; A: 闭壳肌; He: 肝胰腺;
M: 外套膜; F: 足。不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。
Gi: Gill; Go: Gonad; A: Adductor muscle;
He: Hepatopancreas; M: Mantle; F: Foot.
Different letters represent significant difference ($P < 0.05$).

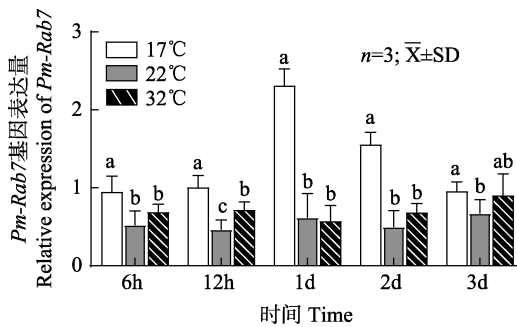


图6 17 °C、22 °C和32 °C下马氏珠母贝鳃中
Pm-Rab7 基因的时序表达

Fig.6 Temporal expression of the *Pm-Rab7* gene in the gills of *P. f. martensii* at 17 °C, 22 °C, and 32 °C
同一时间点相同字母代表无显著性差异($P > 0.05$)。
The same letters at the same time point represent no significant difference ($P > 0.05$).

Pm-Rab7 的 7 个 SNP 位点连锁不平衡分析结果显示: 位点完全连锁不平衡($D'=1, R^2=1$)有 0 对, 强连锁不平衡($0.8 \leq D' < 1, 0.3 \leq R^2 < 1$)有 1 对, 弱连锁不平衡($D' < 0.8, R^2 < 0.3$)有 8 对(图 7A)。在 W 群体中 PIC 范围为 0.062~0.357, 平均值为 0.211, 4 个位点为低度多态性($PIC < 0.25$), 3 个为中度多态性($0.25 < PIC < 0.5$), H_o 范围为 0.067~0.533, 平均值为 0.291; H_e 的范围为 0.066~0.472, 平均值为 0.260 (表 2)。*Pm-Rab7* 的 7 个 SNP 位点连锁不平衡分析结果显示: 位点完全连锁不平衡($D'=1, R^2=1$)有 0 对, 强连锁不平衡($0.8 \leq D' < 1, 0.3 \leq R^2 < 1$)有 0 对, 弱连锁不平衡($D' < 0.8, R^2 < 0.3$)有 13 对(图 7B)。

2.7 *Pm-Rab7* 基因 SNP 位点与耐低温关联分析

在 *Pm-Rab7* 基因外显子区域共检测到 7 个 SNP 位点, 其中, g.112712470、g.112712503、g.112714774 这 3 个 SNP 位点的基因型频率和等位基因频率在两个群体间差异显著($P < 0.05$) (表 3), g.112712470 的 AG 基因型在 R 和 W 中的频率分别为 53.3%和 26.7%, g.112712503 的 AG 基因型在 R 和 W 中的频率分别为 40.0%和 13.3%, g.112714774 的 GG 基因型在 R 和 W 中的频率分别为 83.3%和 36.7%, 表明这 3 个位点与耐低温性状相关($P < 0.05$)。值得注意的是, 位点 g.112712895 的基因型 CC 只在 R 群体中被检测到, 说明这个位点在低温选育群体中受到了强烈的正选择。

3 讨论

具有 Mg^{2+} 作用位点、共有的 5 个保守序列、GTP/GDP 开关 I 和开关 II 是 Rab 家族成员共同具有的特征, C 端最后几个氨基酸通常以固定模式存在, 半胱氨酸会进行异戊二烯化修饰, 在细胞膜的可逆

表 2 *Pm-Rab7* 的 SNP 多态性分析
Tab.2 Analysis of the SNP polymorphisms of *Pm-Rab7*

ID	位置 Position/bp	观测杂合度 H_o		期望杂合度 H_e		有效等位基因数 N_e		多态信息含量 PIC		哈迪-温伯格平衡 HWE	
		R	W	R	W	R	W	R	W	R	W
1	112712141	0.300	0.100	0.259	0.097	1.342	1.105	0.223	0.091	0.366	0.815
2	112712470	0.533	0.267	0.398	0.235	1.642	1.301	0.315	0.204	0.055	0.434
3	112712503	0.400	0.133	0.325	0.127	1.471	1.142	0.269	0.117	0.193	0.737
4	112712820	0.400	0.467	0.452	0.427	1.800	1.724	0.346	0.332	0.520	0.604
5	112712895	0.033	0.067	0.097	0.066	1.105	1.069	0.091	0.062	0.000	0.895
6	112714774	0.133	0.533	0.183	0.472	1.220	1.867	0.164	0.357	0.106	0.471
7	112714849	0.367	0.467	0.463	0.398	1.835	1.642	0.352	0.315	0.246	0.330

注: R: 耐低温选育系; W: 北部湾野生群体。
Note: R: Low temperature resistant line; W: Beibu Gulf wild population.

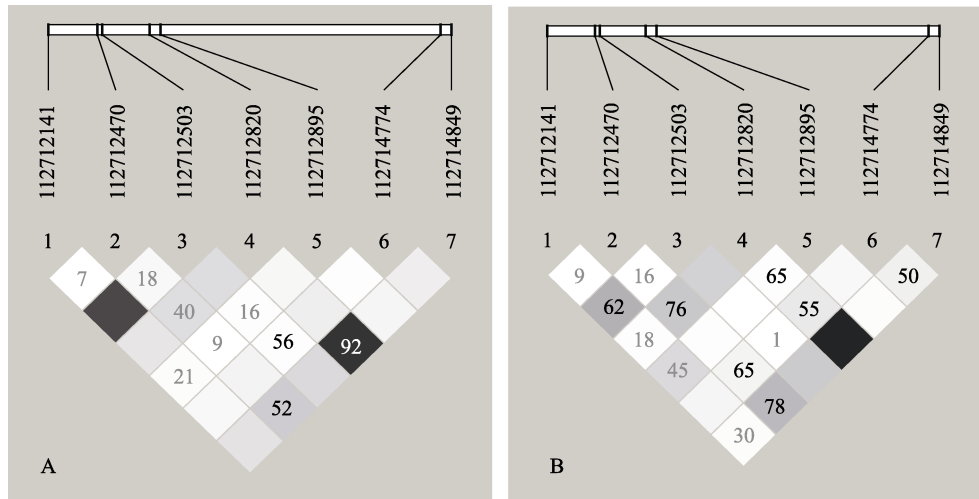


图 7 *Pm-Rab7* SNP 位点的连锁不平衡分析
Fig.7 Linkage disequilibrium analysis for the SNPs in *Pm-Rab7*

A: 耐低温选育系; B: 北部湾野生群体
A: Low temperature resistant line; B: Beibu Gulf wild population

表 3 *Pm-Rab7* 在耐低温选育系(R)和北部湾野生群体(W)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 *Pm-Rab7* SNP sites in low temperature resistant line (R) and Beibu Gulf wild population (W)

ID	位置 Position/bp	基因型 Genotype	R 个体数 Ind.of R	W 个体数 Ind.of W	频率 <i>P</i>	等位基因 Allele	R 个体数 Ind.of R	W 个体数 Ind.of W	频率 <i>P</i>
1	112712141	AA:AT	21:9	27:3	0.053	A:T	51:9	57:3	0.067
2	112712470	AA:AG	14:16	22:8	0.035	A:G	44:16	52:8	0.067
3	112712503	AA:AG	18:12	26:4	0.020	A:G	48:12	56:4	0.032
4	112712820	AA:AG:GG	14:12:4	14:14:2	0.660	A:G	40:20	42:18	0.690
5	112712895	CC:CT:TT	1:1:28	0:2:28	0.510	C:T	3:57	2:58	0.650
6	112714774	AA:AG:GG	1:4:25	3:16:11	0.001	A:G	6:54	22:38	0.000
7	112714849	AA:AT:TT	5:11:14	1:14:15	0.220	A:T	21:39	16:44	0.320

注: 阴影区域表示 SNP 位点的基因型频率和等位基因频率在 2 个群体间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Shaded areas indicate that the genotype and allele frequencies of SNP loci differ significantly between the two populations ($P < 0.05$).

定位中有很重要的作用(Stroupe *et al*, 2000; Pereira-Leal *et al*, 2001; Takai *et al*, 2001; 吴文林等, 2006)。RAB 结构域是 *Rab* 基因家族所具有的保守区域, 已有研究表明, 利用 5 个保守的氨基酸序列来鉴定 *Rab* 蛋白是一种已确定的验证方法(Pereira-Leal *et al*, 2000), 本研究利用 RACE 技术成功克隆获得的马氏珠母贝 *Rab7* 基因中包含 5 个保守的氨基酸序列, 预测蛋白结果显示, *Pm-Rab7* 具有 *Rab* 蛋白的保守结构域 RAB, 这些都印证了同源 *Rab* 基因结构上高度保守(Kelly *et al*, 2012)。此外, *Rab7* 有 2 个区域, 分别称为开关 I 和开关 II, 这 2 个区域是 *Rab7* 构象在与 GDP 和 GTP 结合的 2 种状态之间变化的位置。当 *Rab* 和 GTP 相结合时, *Rab* 处于激活状态, 可以自动识

别其中的效应影响因子并执行各种效应功能。GTP 在被水解后, *Rab7* 变得不活跃, 这在抑制 *Rab* 与其他能调节免疫蛋白之间的相互作用、免疫病毒防御等领域发挥着重要作用(Pasqualato *et al*, 2004)。多序列比对结果表明, *Pm-Rab7* 与其他物种的 *Rab7* 的氨基酸序列相似性高, 与太平洋牡蛎 *Rab* 相似度最高, 为 92.79%。由此可推测, 本研究克隆获得的序列为 *Rab7* 基因。各物种的 *Rab7* 基因进化树构建结果显示, 原口动物、棘皮动物和脊椎动物分别聚为三大支。在原口动物中, *Pm-Rab7* 首先与其他软体动物聚类, 软体动物再与节肢动物聚为一大支, 这说明 *Pm-Rab7* 在进化过程中相对保守。

除少数物种的 *Rab* 结合蛋白仅在特定的组织中

可以表达,大多数的 Rab 结合蛋白不具有组织特异性(Stenmark *et al*, 2001; Uno *et al*, 2010)。本研究结果显示, *Rab7* 在马氏珠母贝鳃和性腺的表达量相对较高,在外套膜、闭壳肌、肝胰腺等组织均有表达,没有明显的组织特异性,这与 *Rab* 基因在日本对虾的各个组织中均有表达的研究结果相似(Wu *et al*, 2007)。鳃组织是马氏珠母贝与外界环境接触的主要器官,也是双壳贝类抵御外界刺激的第一道防线(Tiscar *et al*, 2004), *Pm-Rab7* 基因在鳃组织中的高表达暗示 *Rab7* 在抵抗外界各种环境刺激时发挥重要作用。温度胁迫后的 *Pm-Rab7* 时序表达结果显示:在 32 °C 高温组, *Pm-Rab7* 的表达总体稳定;而在 17 °C 低温组, *Pm-Rab7* 在所有时间点的表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$),这说明 *Rab* 基因主要参与了马氏珠母贝的低温适应过程的响应。在多种水产动物中的研究中已表明, *Rab* 基因参与了生物的免疫应答,而低温会引起马氏珠母贝的免疫反应(赖卓欣, 2020),推测 *Pm-Rab7* 可能是通过参与马氏珠母贝的免疫过程而对温度胁迫作出响应。

遗传多样性是生命进化和适应的基础,广义上指物种群体内及群体间的遗传变异度,其种内变异程度决定物种的进化潜力(马静等, 2010),通常可利用 PIC、杂合度以及有效等位基因数等指标来衡量物种的遗传多样性,其丰富程度能反映物种对环境变化的适应能力(李浩等, 2019)。本研究中, R 群体 *Pm-Rab7* 多个 SNP 位点的多态位点信息低于 W 群体,说明经过连续多代的高强度人工选择,降低了 R 群体的遗传多态性。其中, g.112712895 位点在 R 群体中偏离哈迪-温伯格平衡($P > 0.05$)(表 2),而偏离哈迪-温伯格平衡现象的出现可作为在抗性群体的构建过程中与性状相关的初步判断(曹建萌等, 2017)。根据生物遗传性状影响,可将基因编码区 SNP 分为同义 SNP 和非同义 SNP,而同义 SNP 可能通过影响少数密码子共翻译折叠时间,从而影响蛋白质的结构和功能(Komar *et al*, 2007)。本研究发现, *Pm-Rab7* 基因 3 个 SNP 位点的基因型频率在 W 群体和 R 群体间差异显著 ($P < 0.05$),这 3 个位点的变异类型中 A→G 变异最多,均属于同义突变,但这些 SNP 位点与表型性状间的关联还需要进一步的实验验证。以上研究结果可为进一步深入研究马氏珠母贝对环境温度变化的适应机制提供重要参考资料。

参 考 文 献

CAO J M, HU X X, LU M X, *et al*. SNPs of C9 gene and their

association with resistance to the infection of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(3): 354–365 [曹建萌, 胡欣欣, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼补体 C9 基因单核苷酸多态性及其与抗无乳链球菌感染的关联分析. *农业生物技术学报*, 2017, 25(3): 354–365]

CHEN K P, LU M X, LIU Z G, *et al*. Molecular cloning analysis of the 5' regulatory region of *Ikaros* gene from *Oreochromis niloticus* and screening of its SNP markers for *Streptococcus agalactiae* resistance. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(2): 237–250 [陈昆平, 卢迈新, 刘志刚, 等. 吉富尼罗罗非鱼 *Ikaros* 基因 5'调控区的克隆序列分析及抗无乳链球菌相关 SNP 位点筛选. *中国水产科学*, 2018, 25(2): 237–250]

CHEN K, LAI Z X, LIU Y, *et al*. Sequence characteristics of *PEPCK* gene of *Pinctada fucata martensii* and its selection in low temperature-resistant line. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(1): 58–69 [陈琨, 赖卓欣, 刘雅, 等. 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. *中国水产科学*, 2022, 29(1): 58–69]

FU G H, WAN Z Y, XIA J H, *et al*. The *MCP-8* gene and its possible association with resistance to *Streptococcus agalactiae* in tilapia. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 331–336

FU R X, ZHOU N Y, LIU J X, *et al*. The polymorphism of serine protease I-1 in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 55–62 [付瑞雪, 周纳宇, 刘金相, 等. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 丝氨酸蛋白酶 I-1 基因多态性. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 55–62]

GAO F Y, PANG J C, LU M X, *et al*. Major histocompatibility complex *MHCHB* gene polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(2): 76–83 [高风英, 庞纪彩, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼 *MHCHB* 基因多态性及其与链球菌病抗性的关系. *中国农学通报*, 2014, 30(2): 76–83]

HUANG W, KANG Y J. The role of Rabs in glucose transport. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 32(3): 274–280 [黄薇, 康雁君. Rab 蛋白在葡萄糖转运中的作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(3): 274–280]

JORDENS I, MARSMAN M, KUIJL C, *et al*. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic*, 2005, 6(12): 1070–1077

KELLY E E, HORGAN C P, GOUD B, *et al*. The Rab family of proteins: 25 years on. *Biochemical Society Transactions*, 2012, 40(6): 1337–1347

KOMAR A A. SNPs, silent but not invisible. *Science*, 2007, 315(5811): 466–467

LAI Z X, LIU Y, WANG Q H, *et al*. cDNA cloning of *FBP* gene in *Pinctada fucata martensii* and its response to temperature

- stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 106–114 [赖卓欣, 刘雅, 王庆恒, 等. 马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) *FBP* 基因的克隆及其对温度胁迫的响应. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 106–114]
- LAI Z X. Genome selection sweep of low temperature resistant line from *Pinctada fucata martensii*. Master's Thesis of 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. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2020]
- LAI Z, ADZIGBLI L, CHEN Q, *et al.* Identification and allelic variants associated with cold tolerance of *PmPIAS* in *Pinctada fucata martensii*. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 634838
- LI H, MENG D L, XUE B B, *et al.* SNPs detection of α -amylase exon region and its association with growth traits in *Simonovacula constricta*. *Marine Fisheries*, 2019, 41(2): 214–223 [李浩, 孟德龙, 薛宝宝. 缢蛏 α 淀粉酶基因外显子区域 SNPs 筛选及其与生长性状关联性. *海洋渔业*, 2019, 41(2): 214–223]
- LIU S, ZHANG Y, ZHOU Z, *et al.* Efficient assembly and annotation of the transcriptome of catfish by RNA-Seq analysis of a doubled haploid homozygote. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 1–18
- MA J, AN Y P, WANG C F, *et al.* Research progress of genetic diversity. *Shannxi Journal of Agricultural Sciences*, 2010(1): 126–130 [马静, 安永平, 王彩芬, 等. 遗传多样性研究进展. *陕西农业科学*, 2010(1): 126–130]
- NIE Y, LI J J, LIANG A H, *et al.* *EoRab43* is an atypical *Rab* gene in *Euplotes octocarinatus*. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(1): 128–135 [聂宇, 李江姣, 梁爱华, 等. *EoRab43* 为八肋游仆虫中编码非典型 *Rab* 的基因. *动物学报*, 2008, 54(1): 128–135]
- ONGVARRASOPONE C, CHANASAKULNIYOM M, SRITUNYALUCKSANA K, *et al.* Suppression of *PmRab7* by dsRNA inhibits WSSV or YHV infection in shrimp. *Marine Biotechnology*, 2008, 10(4): 374–381
- PASQUALATO S, SENIC-MATUGLIA F, RENAULT L, *et al.* The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(12): 11480–11488
- PEREIRA-LEAL J B, SEABRA M C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 313(4): 889–901
- PEREIRA-LEAL J B, SEABRA M C. The mammalian Rab family of small GTPases: Definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the *Ras* superfamily. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 301(4): 1077–1087
- SCHWARTZ S L, CAO C, PYLYPENKO O, *et al.* Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 2007, 120(Pt 22): 3905–3910
- STENMARK H, OLKKONEN V M. The Rab GTPase family. *Genome Biology*, 2001, 2(5): 1–7
- STROUPE C, BRUNGER A T. Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 304(4): 585–598
- SUN F, PEATMAN E, LI C, *et al.* Transcriptomic signatures of attachment, *NF- κ B* suppression and IFN stimulation in the catfish gill following columnaris bacterial infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 38(1): 169–180
- TAKAI Y, SASAKI T, MATOZAKI T. Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews*, 2001, 81(1): 153–208
- TISCAR P G, MOSCA F. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Veterinary Research Communications*, 2004, 28: 57–62
- UNO T, HATA K, HIRAGAKI S, *et al.* Small GTPases of the Rab family in the brain of *Bombyx mori*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2010, 134(6): 615–622
- WANG L, LI L, WANG L, *et al.* Two Rab GTPases, EsRab-1 and EsRab-3, involved in anti-bacterial response of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 1007–1015
- WANG Q, LIU Y, ZHENG Z, *et al.* Adaptive response of pearl oyster *Pinctada fucata martensii* to low water temperature stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 78: 310–315
- WU W L, WU S J. Rab GTPase family: Structure, function and its research prospects. *Journal of Applied Oceanography*, 2015, 25(4): 599–605 [吴文林, 吴穗洁. Rab 蛋白的结构、功能与研究展望. *应用海洋学学报*, 2006, 25(4): 599–605]
- WU W, ZHANG X. Characterization of a Rab GTPase up-regulated in the shrimp *Peneaus japonicus* by virus infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23(2): 438–445
- XING H F, GAO F T, ZHANG Y Z, *et al.* Molecular cloning, expression and SNP screening of natural resistance-associated macrophage protein (*Nramp*) gene cDNA from half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 116–127 [邢贺飞, 高峰涛, 张永珍, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Nramp* 基因克隆与表达分析及 SNP 筛选. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 116–127]
- ZHAO X, GUO L, ZHANG Y, *et al.* SNPs of hemocyanin C-terminal fragment in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *FEBS Letters*, 2012, 586(4): 403–410
- ZONG R, WU W, XU J, *et al.* Regulation of phagocytosis against bacterium by Rab GTPase in shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(3): 258–263

Sequence Characteristics of *Rab7* of *Pinctada fucata martensii* and Its Relationship with Low Temperature Tolerance

SONG Xinlin¹, YANG Jiawen¹, HAN Shuya¹, LAI Zhuoxin^{1,2,3},
WANG Qingheng^{1,2,3,4}①, DENG Yuewen^{1,2,3,4}

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

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

3. Guangdong Provincial Engineering Laboratory for Mariculture Organism Breeding, Zhanjiang 524088, China;

4. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Control and Healthy Culture, Zhanjiang 524088, China)

Abstract The Ras-related proteins in brain (Rab) subfamily is the largest group of small molecule guanine nucleotide-binding regulatory proteins (GTP-binding proteins). These proteins are widely distributed across various eukaryotes and consist of approximately 200 amino acids, producing a molecular weight of approximately 20~25 kDa. Rab is known to be an important regulator in the transport of membrane vesicles and is embedded in almost all membrane-related proteins. Rab is primarily regulated through GTP binding and hydrolysis within the organelles and is known to perform several important functions across various stages of vesicle transport. Current research on Rab proteins produced by aquatic animals has revealed that the *Rab* gene plays an important role in immune response. The Pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, is the most common species used in the cultivation of seawater pearls, making them economically important. These oysters are primarily distributed along the coastal areas of Guangdong, Guangxi, and Hainan provinces in China. However, they display weak tolerance to low temperatures, which severely limits their cultivation area and the overall production of seawater pearls. Given the desire to expand their cultivation northward, we designed this study to help create low-temperature resistant *P. f. martensii* breeding lines F3 (R). We used genome resequencing technology to compare and analyze the R and Beibu Gulf wildtype populations (W), and identified a group of candidate genes, including the *Rab* gene, that were strongly positively selected during the breeding process. In addition, the full-length sequence of *Rab7* of *P. f. martensii* (*Pm-Rab7*) was cloned using RACE technology, and the expression levels of *Pm-Rab7* in adductor muscle, gill, gonad, hepatopancreas, foot, and mantle, and their expression patterns under temperature stress (17 °C in the low temperature group, 22 °C in the control group, and 32 °C in the high temperature group) were detected using bioinformatics analysis. Furthermore, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the exon regions of *Pm-Rab7* in the R and W were screened, and this information was used to determine the genetic polymorphism, haplotype, and frequency rates for each mutation. Sequence analysis also revealed that the *Pm-Rab7* gene displayed a full length of 1 153 bp, with the 5' and 3' UTR adding 30 bp and 505 bp, respectively. This gene was also shown to encode a single open reading frame (ORF) of 618 bp and 205 amino acids, producing a theoretical protein of 23.04 kDa with the isoelectric point at 5.40. This was later confirmed using the cloned *Pm-Rab7* gene, which produced 5 conserved amino acid sequences, including a RAB conserved domain. Similarity evaluations revealed a high degree of overlap with *C. gigas* (92.79%), whereas phylogenetic tree construction revealed that the *Rab7* gene produced a tree with three branches, one each for protostomes, echinoderms, and vertebrates. Closer inspection of the protostomes branch revealed that *Pm-Rab7* first clusters with other mollusks, and then with arthropods to produce a

① Corresponding author: WANG Qingheng, E-mail: wangqh@gdou.edu.cn

large clade, suggesting that this protein is relatively well conserved during the evolutionary process. *Pm-Rab7* was also shown to be expressed in all the tested tissues, with the most *Pm-Rab7* expression recorded in the gonad and gill ($P < 0.05$). Time-course results from the gill tissues of temperature stressed samples revealed that *Pm-Rab7* expression first increased and then decreased in response to low temperature ($17\text{ }^{\circ}\text{C}$) exposure, with all time points showing a significant increase in *Pm-Rab7* expression when compared to that in the $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ control from 6 h to 3 d ($P < 0.05$). In addition, we noted an expression peak at 1 d. The expression of *Pm-Rab7* was generally stable in response to growth at $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ (high temperature group), but was also significantly increased when compared to that in the control group following 12 h of exposure ($P < 0.05$). This suggests that *Pm-Rab7* is most likely linked to the low temperature response process in these shellfish. We also identified a total of seven SNPs in the exon region of *Pm-Rab7*, three (*g.112712470*, *g.112712503*, and *g.11271477*) of which demonstrated significant differences in occurrence rate between the R and W populations ($P < 0.05$). Genetic evaluations of all seven SNPs revealed that three could be classified as low polymorphism loci ($\text{PIC} < 0.25$) and four could be classified as moderate polymorphism loci ($0.25 < \text{PIC} < 0.5$) in the R population. There were also no pairs of sites with complete linkage disequilibrium ($D' = 1$, $R^2 = 1$), one pair with strong linkage disequilibrium ($0.8 \leq D' < 1$, $0.3 \leq R^2 < 1$), and eight pairs with weak linkage disequilibrium ($D' < 0.8$, $R^2 < 0.3$). In addition, evaluations of the W population revealed four low polymorphism loci ($\text{PIC} < 0.25$) and three moderate polymorphism loci ($0.25 < \text{PIC} < 0.5$). Taken together, these results suggest that these loci are likely to be associated with improved low temperature resistance in *P. f. martensii*. Thus we conclude that *Pm-Rab7* may play an important role in the adaptation of *P. f. martensii* to low temperatures, and that these findings may support further explorations into the adaptation of *P. f. martensii* to low temperatures.

Key words *Pinctada fucata martensii*; Pm-Rab7; Gene cloning; Temperature stress; SNP