



浙江缢蛭群体糖原含量变化与 *gys* 基因多态性的关联分析

陈燕园^{1,2}, 刘 圣³, 何 京², 姚韩韩², 林志华^{2,3*}, 董迎辉^{2*}

(1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 浙江万里学院, 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100;

3. 浙江万里学院, 宁海海洋生物种业研究院, 浙江 宁海 315604)

摘要: 为了探讨缢蛭糖原含量与糖原合酶基因 (*sc-gys*) 的特性及其用于分子标记辅助育种的可行性, 实验检测了浙江缢蛭群体糖原含量的周年变化, 克隆获得糖原合酶基因的 cDNA 全长序列, 分析其不同组织、不同月份的表达差异, 并进一步筛选出与糖原含量相关的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点。结果显示, 养殖缢蛭在 2—6 月糖原含量较高, 4 月达到最大值。*sc-gys* 基因的 cDNA 全长为 2 402 bp, 开放阅读框为 2 136 bp, 编码 711 个氨基酸。荧光定量 PCR 结果显示, *sc-gys* 基因主要在外套膜和足中表达, 其不同月份的表达水平与糖原含量周年变化规律一致, 4 月表达量显著高于其他月份, 表明该基因与糖原合成关系密切。在“甬乐 1 号”品种和台州野生群体 *sc-gys* 基因的外显子区共筛选到 2 个与糖原含量相关的 SNP 位点, 且两位点之间没有连锁不平衡, 优势基因型组合个体的糖原含量比群体均值提高 11.8%, 这些位点和优势基因型组合可为缢蛭糖原含量的遗传改良提供候选标记。

关键词: 缢蛭; 糖原; 糖原合酶; 单核苷酸多态性位点 (SNP)

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

缢蛭 (*Sinonovacula constricta*) 是我国养殖规模较大的海产经济贝类之一^[1]。近年来随着缢蛭养殖技术的不断进步和人工育苗技术的日臻成熟, 其养殖区从浙江、福建向周边的江苏、山东、广东等省份迅速拓展, 发展前景十分广阔。目前对缢蛭遗传育种的研究工作主要集中在生长和抗逆性状^[2-3], 而有关其营养品质性状的遗传变异及改良技术研究尚未见报道, 这对缢蛭养殖业的提质增效和可持续发展非常不利。

氨基酸、糖原和脂肪酸等含量是重要的营养品质指标, 其中糖原是广泛存在于动物体内的多糖, 不仅作为重要的储能物质在生长发育、

繁殖过程中扮演重要角色, 而且对许多贝类的风味品质有重要影响。在中国蛤蜊 (*Macra chinensis*) 性腺成熟期, 肌肉组织中的糖原含量明显下降, 性腺中的糖原为配子发育提供能量^[4]; 地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 糖原贮存量会影响个体生殖力^[5]; 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的糖原含量则影响群体的存活率^[6]。另据报道, 缢蛭^[7]和长牡蛎^[8-9]肉质的鲜美程度与其体内的糖原含量密切相关, 糖原含量越高, 味道就越鲜美, 在繁殖季节则会因糖原含量显著降低而导致鲜味口感变差。

糖原合酶 (glycogen synthase, GYS) 作为糖原合成的关键酶^[10], 是组织进行非氧化葡萄糖代

收稿日期: 2020-02-15 修回日期: 2020-04-07

资助项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-49); 国家海洋水产种质资源库; 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2016C02055-9); 宁波市“科技创新 2025”重大专项 (2019B10005)

第一作者: 陈燕园 (照片), 从事贝类遗传与育种研究, E-mail: 1304397861@qq.com

通信作者: 林志华, E-mail: zhihua9988@126.com; 董迎辉, E-mail: dongyinghui118@126.com



谢途径的限速酶^[11], 它催化葡萄糖分子从 UDP-葡萄糖转移至糖原分子的末端分支^[12]。GYS 的 D 型和 I 型两种形式在紫贻贝 (*M. edulis*) 和美洲牡蛎 (*C. virginica*) 中已有报道^[13-14]。在长牡蛎中发现, 糖原合酶表达水平随繁殖周期波动而影响糖原含量, 已将其作为候选基因进行高糖原牡蛎品种选育^[15-16]。

为了探讨缢蛭糖原含量的周年变化及糖原合酶基因 (*sc-gys*) 差异表达, 分析分子标记辅助育种的可行性, 本实验开展了 *sc-gys* cDNA 克隆与鉴定, 分析其不同组织、不同月份的表达水平, 并筛选与糖原含量关联的 SNP 位点, 为揭示该基因与糖原代谢的分子机制, 以及后续开展高糖原缢蛭新品种选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

糖原含量测定、*sc-gys* 基因克隆及周年表达变化实验所用缢蛭均取自浙江省台州市浙江宏野海产品有限公司, 为浙江万里学院培育的生长快、耐低盐新品种“甬乐 1 号”。样品采集时间为 2019 年 2 月至 12 月, 每 2 个月采样 1 次, 每次采集 24 颗缢蛭, 将 12 颗缢蛭的软体部进行冷冻干燥, 剩余 12 颗取其性腺、足、外套膜、闭壳肌、肝胰腺、鳃、水管和唇瓣 8 个组织, 在液氮中速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存。

sc-gys 基因的 SNPs 与糖原含量关联性分析使用缢蛭“甬乐 1 号”品种 (YL1) 和台州市野生群体 (TZ), 各取 100 颗, 活体解剖取足组织, 经液氮速冻后放入 -80 °C 冰箱保存, 剩余组织进行冷冻干燥备用。

1.2 缢蛭糖原含量测定

取上述不同月份、不同群体的缢蛭干样, 选用肝肌糖原试剂盒 (A043, 南京建成生物研究所), 按照说明书进行检测。其原理为糖原在浓硫酸的作用下脱水生成糖醛衍生物, 后者再与蒽酮作用形成蓝色化合物, 与同法处理的标准葡萄糖溶液进行比色定量。

1.3 *sc-gys* 基因 cDNA 全长克隆

利用 Total RNA Kit 2 (OMEGA, USA) 说明书操作方法提取缢蛭足组织总 RNA, 按照 SMART RACE 5'/3' 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 说明书合成

cDNA 第一链, 作为全长序列快速扩增 (RACE) 的模板。利用缢蛭转录组文库获得 *sc-gys* 基因 EST 片段, 设计 3' 和 5' 特异性引物 R3/R5 (表 1), 并进行 3' 和 5' RACE 扩增, 用 1% 琼脂糖电泳对 PCR 产物检测并割胶回收 (OMEGA, USA), 连接转化到 T1 大肠杆菌 (TransGen, 中国) 中, 挑选阳性菌落, 经验证将阳性克隆送上海生物工程股份有限公司进行测序。

表 1 所用的引物及其信息

Tab. 1 Information of primers used in this experiment		
引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	用途 usage
R3	GAGCACTCCCGCATCTCATAGC	3'RACE
R5	GACAGTGACGAAAACGAAGAACGC	5'RACE
M13F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	菌落PCR
M13R	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	菌落PCR
18S-F	TCGGTCTATTGCGTTGGTTTT	qPCR
18S-R	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	qPCR
Q-F	ACGTTATTCTGCCAATGGTC	qPCR
Q-R	AAATATAGCGTTTTGTGCGAGGTCA	qPCR
S-F	AGTAGCAGTTCTTTTCGAGCGTTT	SNP筛选
S-R	CCTTACTCTCTCAATTACGCTGGTC	SNP筛选

1.4 *sc-gys* 基因序列及进化分析

利用 BLAST 软件工具拼接 5' 和 3'-RACE 片段序列, 获得 *sc-gys* 基因 cDNA 全长; 利用 ORF Finder 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测 cDNA 全长序列中开放阅读框 (open reading frame, ORF) 及氨基酸序列; 通过 ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/、<https://web.expasy.org/protscale/>)、Signalp (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 NCBI CDS Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 等在线软件预测蛋白质的分子量、等电点、疏水性、信号肽和结构域; 利用 NCBI 数据库中 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 工具进行序列比对, 搜索同源蛋白质序列; 用 MEGA 6.0 软件的邻接法 (Neighbor Joining method, NJ) 构建进化树; 利用 DNAMAN 6.0 软件进行同源序列的多重比较。

1.5 *sc-gys* 基因不同组织和不同月份的表达差异分析

取 4 月时的缢蛭各个组织的 cDNA 稀释 50

倍作为定量 PCR 模板, 利用 *sc-gys* 基因开放阅读框序列设计相应 PCR 引物 Q-F 和 Q-R(表 1), 18S rRNA 基因为内参, 使用荧光定量 PCR 仪 (LightCycler[®] 480 System PCR, Roche, 德国) 进行 qRT-PCR 检测。每组设 4 个生物学重复, 3 个技术重复。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量, 以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。使用 SPSS 22.0 软件进行方差分析和多重比较, 显著性水平设为 $P < 0.01$ 。

根据上述方法, 以缙蛭外套膜和足组织 cDNA 为模板, 进行荧光定量检测, 开展不同月份 *sc-gys* 基因的差异表达分析。

1.6 *sc-gys* 基因 SNPs 与糖原含量的关联性分析

取上述两个群体缙蛭各 100 颗的足, 提取 RNA 并反转合成 cDNA。以 *sc-gys* 基因 cDNA 全长为模板设计引物 S-F 和 S-R(表 1) 进行 PCR 扩增, 产物进行 Sanger 测序。测序结果用 MEGA 6.0 软件进行比对, 获得个体 SNP 位点信息, 将其中一种等位基因纯合子基因型值赋值为 0, 杂合子赋值为 1, 另一种等位基因纯合子赋值为 2, 用 SPSS 22.0 软件将基因型值与糖原含量进行线性回归分析。

2 结果

2.1 浙江缙蛭群体软体部糖原含量的周年变化分析

浙江缙蛭群体软体部糖原含量周年的测定结果表明, 糖原含量从 2 月开始升高, 4 月达到最高值 (88.30 mg/g, $P < 0.01$) 后逐渐下降, 到 10 月到达最低值 (8.22 mg/g) 后 12 月又略有上升(图 1)。

2.2 *sc-gys* 基因 cDNA 全长序列分析

克隆获得 *sc-gys* 基因的 cDNA 全长 2 402 bp (GenBank 登录号: MN864780), 包括 83 bp 的 5' 非编码区 (UTR), 183 bp 的 3'UTR 和 2 136 bp 的 ORF, 编码 711 个氨基酸。预测 Sc-GYS 蛋白分子质量为 82.09 ku, 理论等电点为 5.84; 在氨基酸组成上, 极性氨基酸所占比例较高, 表现为亲水性, 没有明显的信号肽。蛋白的保守域预测结果显示, Sc-GYS 蛋白含有 GT3_GSY2-like 结构域 (36~625), 属于 Glycosyltransferase GTB type 超家族。

2.3 *sc-gys* 基因同源性和系统进化分析

氨基酸序列多重比对发现, Sc-GYS 蛋白与

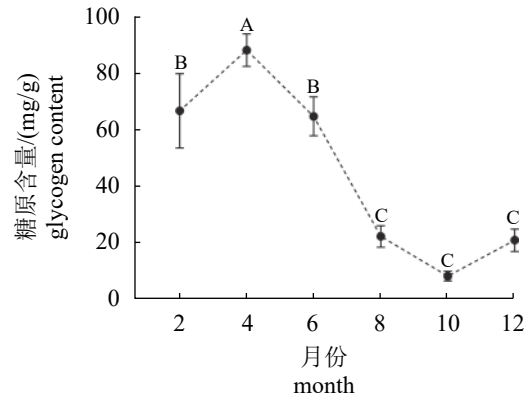


图 1 浙江缙蛭群体软体部糖原含量的周年变化
月份间不同字母的数据表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 1 Changes of glycogen content in soft part of *S. constricta* in different months from Zhejiang population

Data with different letters are extremely significantly different among months ($P < 0.01$)

皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*, BBI18978.1)、长牡蛎 (CCN27372.1) 的 GYS 蛋白同源性较高, 分别为 76.61% 与 74.96%, 与智人 (*Homo sapiens*, XP_624707.2)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*, AAB30886.1)、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*, NP.731967.2) 等物种的同源性为 54.13%~66.16% (图 2)。系统进化树结果显示, 缙蛭与长牡蛎、皱纹盘鲍等无脊椎动物的 GYS 亲缘关系较近, 而与智人、褐家鼠等脊椎动物亲缘关系较远 (图 3)。

2.4 *sc-gys* 基因在不同组织、不同月份的表达特征

采用实时荧光定量 PCR 方法, 检测了 *sc-gys* 基因在不同组织和不同月份的表达情况。组织表达结果显示, *sc-gys* 基因在缙蛭所取组织中均有表达, 而在足、外套膜中的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.01$) (图 4-a)。不同月份的 *sc-gys* 基因在足和外套膜组织中表达趋势基本一致, 呈现先升高后降低的趋势。对同一组织不同月份间比较, 从 2 月起表达量逐渐升高, 4 月达到最大值 ($P < 0.01$), 随后逐渐下降 (图 4-b)。 *sc-gys* 基因在足中表达水平普遍高于外套膜组织。

2.5 *sc-gys* 基因外显子 SNPs 与糖原含量的关联性分析

在缙蛭 YL1 群体 *sc-gys* 基因编码区 2 076 bp 中, 共检测到 40 个 SNPs 位点, 其中共有 5 个 SNPs 位点 (c.260C>G、c.569 T>C、c.620 G>A、

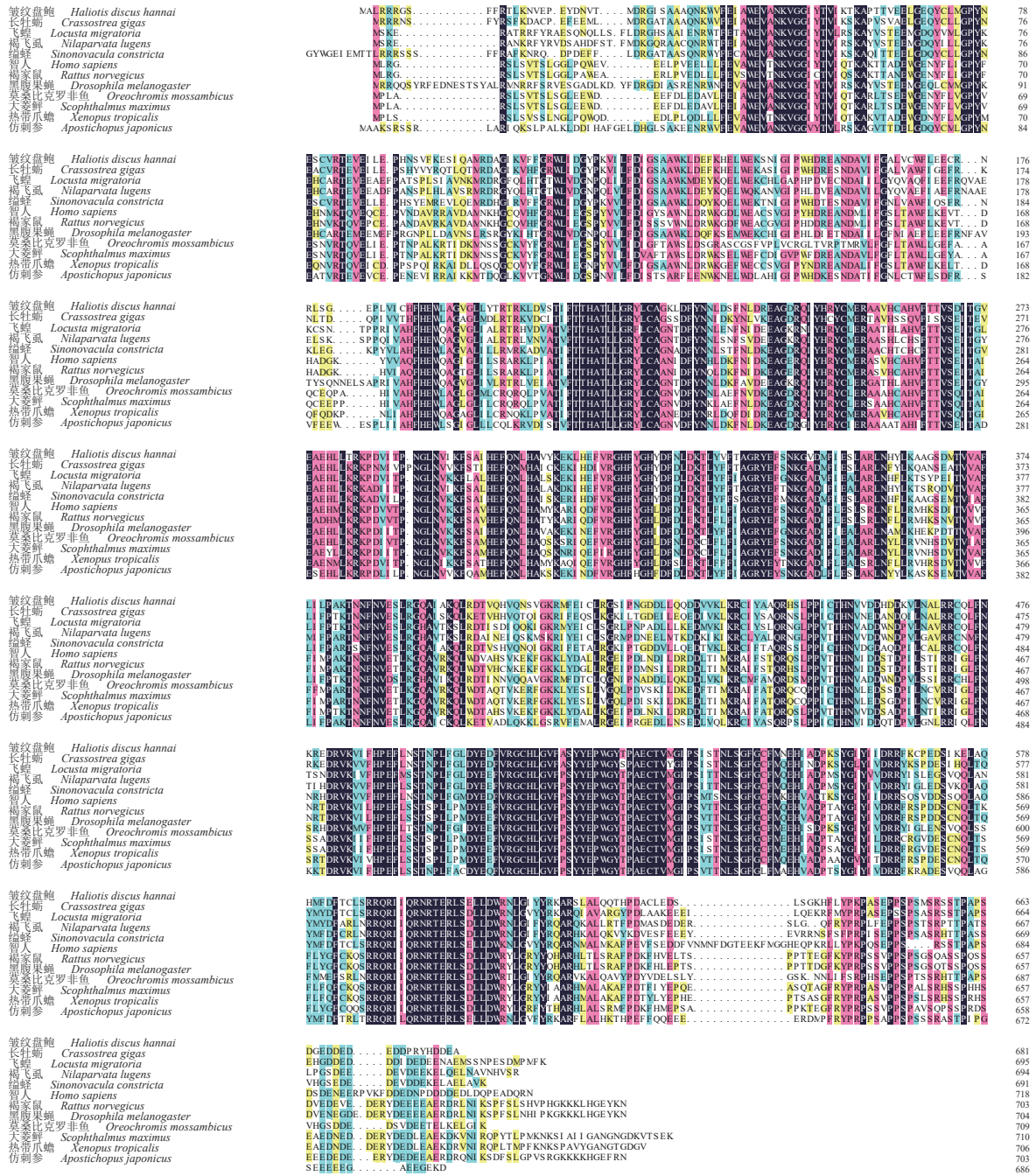


图 2 缢蛏 GYS 与其他已知物种 GYS 氨基酸序列比较

黑色阴影表示一致性序列，其他颜色阴影表示相似性序列

Fig. 2 Alignment of GYS amino acid sequences in *S. constricta* with those of other known species

Black shadow represents consistency sequence, and other color shadows represent similarity sequence

c.977 C>T 和 c.1316 A>G) 与糖原含量表现出显著的相关性, c.260C>G 位点差异极显著 ($P<0.01$)。在 TZ 群体中筛选到 c.260C>G 和 c.1316 A>G 位点, 2 个位点均为同义突变 (表 2)。关联缢蛏 2 个群体的 c.260C>G 位点发现, CG 基因型个体的糖原含量极显著高于 CC 基因型个体的糖原含

量 ($P<0.01$); 在 c.1316 A>G 位点上, GG 基因型缢蛏的糖原含量显著高于 AA 基因型的含量 ($P<0.05$), 说明这 2 个位点与缢蛏糖原含量相关。

对糖原含量相关的 2 个 SNP 位点进行了连锁不平衡分析, 发现位点间没有连锁不平衡, R^2 为 0.006。进一步的基因型组合分析发现, CG+GG

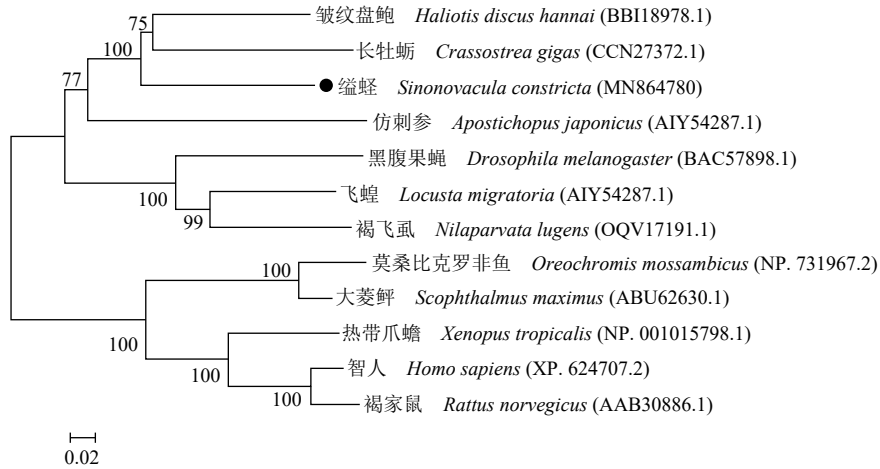


图 3 缢蛏 GYS 氨基酸序列系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of GYS from *S. constricta*

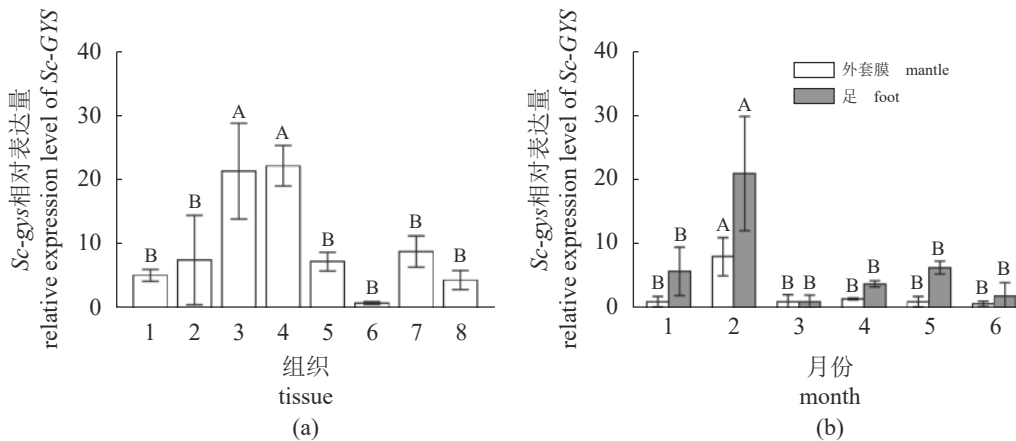


图 4 *sc-gys* 在不同组织 (a)、不同月份 (b) 的表达差异

(a) 1. 鳃, 2. 闭壳肌, 3. 足, 4. 外套膜, 5. 肝胰腺, 6. 性腺, 7. 水管, 8. 唇瓣。不同字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。 (b) 同一组织不同字母代表差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 4 Expression difference of *sc-gys* in different tissues (a) and months (b)

(a) 1. gill, 2. adductor muscle, 3. foot, 4. mantle, 5. hepatopancreas, 6. gonad, 7. siphon, 8. palp. Different lowercases indicate extremely significant difference ($P < 0.01$). (b) the capital letters marked on columns of the same tissue represent their extremely significant differences in data ($P < 0.01$)

基因型组合个体的糖原含量为 (73.5 ± 23.4) mg/g, 比群体平均含量高 11.8%, 而 CC+AA 基因型组合个体的糖原含量为 (57.3 ± 11.6) mg/g, 比群体平均含量低 12.8%, 因此 CG+GG 基因型组合的平均糖原含量最高, 为有利基因型组合。总之, 具有有利等位基因组合的个体会比单个有利等位基因含有更高的糖原含量 (表 3)。

3 讨论

3.1 糖原对贝类繁殖和风味的影响

糖原在许多贝类的能量储备物质, 对贝类

的繁殖和风味有着重要的影响。贝类的配子发育阶段一般分为休止期、增殖期、生长期、成熟期和排放期^[17-18], 不同发育时期的糖原含量变化不同。在长牡蛎和魁蚶 (*Scapharca broughtonii*) 等物种中, 观察到其休止期时整个有机体的糖原贮存量较高, 随着配子发生过程中糖原含量逐渐下降, 表明糖原对配子发生起着重要作用^[19-21]。本研究发现, 浙江缢蛏群体软体部的糖原含量在 4 月达到最大值, 此时为休止期; 随着月份的增加, 性腺的逐渐成熟需要消耗体内贮存的糖原作为能量, 糖原含量逐渐下降到 10 月的最低值, 此时为成熟期^[17], 说明缢蛏糖原含量变化与

表 2 缢蛭 YL1 和 TZ 群体 *sc-gys* 基因 SNPs 位点不同基因型与糖原含量的相关性分析

Tab. 2 Correlation analysis on SNPs of *sc-gys* with glycogen content in *S. constricta* of YL1 and TZ populations

群体 population	SNP位点 SNPs	基因型 genotype	样本量/F number/F	糖原含量/ (mg/g) glycogen content	P值 P-value
YL1	c.260C>G	CC	58/0.58	49.4±17.9	0.008**
		CG	34/0.34	67.2±25.8	
		GG	8/0.8	53.8±32.6	
	c.569 T>C	TT	37/0.7	61.7±25.6	0.044*
		TC	49/0.49	53.5±22.2	
		CC	14/0.14	48.5±19.2	
	c.620 G>A	GG	39/0.39	63.2±25.1	0.032*
		GA	44/0.44	50.8±21.9	
		AA	17/0.17	51.8±19.1	
	c.977 C>T	CC	58/0.58	62.2±21.1	0.020*
		CT	29/0.29	63.3±24.9	
		TT	13/0.13	50.6±22.1	
c.1316 A>G	AA	26/0.26	50.5±23.3	0.047*	
	AG	45/0.45	55.7±19.1		
	GG	29/0.29	61.9±29.3		
TZ	c.260C>G	CC	45/0.45	65.9±18.5	0.002**
		CG	43/0.43	85.9±18.9	
		GG	12/0.12	75.2±17.6	
	c.1316 A>G	AA	51/0.51	72.3±21.0	0.041*
		AG	35/0.35	76.6±20.6	
		GG	14/0.14	85.2±17.6	

注: *代表差异显著, $P<0.05$; **代表差异极显著, $P<0.01$

Notes: * represents significant difference, $P<0.05$; ** represents extremely significant difference, $P<0.01$

繁殖周期紧密相关。另外, 春季缢蛭的糖原含量在整个周年变化中处于较高水平, 此时正是缢蛭上市季节; 9—11月缢蛭性腺饱满, 该时段糖原等营养物质含量的降低会导致其口感变差, 说明糖原对缢蛭的风味有一定影响, 并且随着繁殖周期的变化而变化^[22]。

3.2 糖原合酶表达水平对糖原含量的影响

根据已有报道, *gys* 基因在长牡蛎中呈现广泛表达, 具有明显的组织特异性, 在性腺和唇瓣组织中的表达量较高, 此时性腺和唇瓣组织

表 3 缢蛭 YL1 和 TZ 群体中糖原含量关联的 2 个位点优势基因型组合分析

Tab. 3 Favorable genotypes combination of two associated SNPs in *S. constricta* of YL1 and TZ populations

组合 combination	糖原含量/ (mg/g) glycogen content	提高程度/% improvement	样本数 number	比例/% percentage
CG+GG	73.5±23.4	11.0	14	7
CC+AA	57.3±11.6	-12.8	40	20
群体平均值 population mean	65.7±19.8		200	

注: 提高程度表示基因型组合的糖原含量高于/低于总平均值的程度。样本数表示具有组合的个体数量, 比例表示个体在两个群体中的比例
Notes: the improvement means extent of glycogen content of genotype combination is higher/lower than the total average. Number means number of individuals with different genotype combinations, and percentage means the proportion of the individuals in the two populations

中的糖原含量高于其他组织^[23]。本实验发现, *sc-gys* 基因在不同组织中均有表达, 足和外套膜中的表达量最高, 2 个组织中糖原含量也较高, 说明糖原合酶基因在不同组织中的表达量与其组织的糖原储存能力密切相关。

sc-gys 基因在不同月份的表达差异结果显示, 糖原合酶的表达量受到季节性调节并与糖原含量相关, 与长牡蛎研究结果一致^[23]。2—4月呈现高表达, 此时缢蛭体内糖原贮存量较高, 随着配子的发生, 糖原含量逐渐减少, *sc-gys* 基因表达量逐渐降低, 由于糖原储存和动员与繁殖周期密切相关, 故推测缢蛭糖原合酶表达水平受到繁殖周期的影响^[24]。海洋贝类的繁殖不仅受内部因素调控, 还受外部因素如水温 and 食物等影响^[24-25]。这些因素可能通过影响缢蛭的繁殖周期, 从而影响糖原合酶的表达水平。

3.3 糖原合酶编码区与糖原含量相关的 SNP 位点的关联分析

研究结果表明, 糖原含量与糖原合酶基因表达之间具有相关性, 糖原合酶基因的表达水平影响糖原代谢的长期调控^[26], 又如在长牡蛎的糖原合酶基因编码区发现与糖原含量相关的 SNP 位点, 认为糖原合酶基因在选择育种中具有潜在的价值^[16]。本研究 SNP 筛选实验中, 从缢蛭 YL1 和 TZ 群体的糖原合酶编码区筛选到 2 个 SNP 位点与糖原含量显著相关 ($P<0.05$), 虽然是同义突变位点, 但在文蛤 (*Meretrix meretrix*) 中发现血清淀粉样蛋白 A 基因中 2 个同义 SNP 与其

弧菌抗性相关^[27]。同义突变可能会影响基因转录效率及蛋白质的空间结构^[28-29]。另外, 糖原含量关联 SNP 位点的基因型组合结果揭示, 有 2 个有利基因型具有作为高糖原品系选育标记的潜力, 可以利用这些标记在育苗期进行基因分型, 为亲本的选择提供参考依据。在长牡蛎中的研究也表明, 使用这种有利的基因型组合进行分子育种以改良糖原含量是可行的^[30]。

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 2019[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 23.
- Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Station, China Society of Fisheries. China Fishery statistical yearbook-2019[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2019: 23 (in Chinese).
- [2] 李浩, 孟德龙, 薛宝宝, 等. 缢蛭 α -淀粉酶基因外显子区域 SNPs 筛选及其与生长性状关联性[J]. 海洋渔业, 2019, 41(2): 214-223.
- Li H, Meng D L, Xue B B, *et al.* SNPs detection of α -amylase exon region and its association with growth traits in *Sinonovacula constricta*[J]. Marine Fisheries, 2019, 41(2): 214-223(in Chinese).
- [3] 林德海, 刘晨珊, 董迎辉, 等. 缢蛭天然抗性相关巨噬蛋白 2(*Sc-Nramp2*) 基因克隆及其在副溶血弧菌刺激下的表达分析[J]. 海洋学报, 2017, 39(8): 70-77.
- Lin D H, Liu C S, Dong Y H, *et al.* Cloning of natural resistance associated macrophage protein 2 (*Sc-Nramp 2*) gene from *Sinonovacula constricta* and the expression analysis under *Vibrio parahaemolyticus* stimulation[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2017, 39(8): 70-77(in Chinese).
- [4] Li Q, Yang L, Ke Q Z, *et al.* Gametogenic cycle and biochemical composition of the clam *Macrta chinensis* (Mollusca: Bivalvia): implications for aquaculture and wild stock management[J]. Marine Biology Research, 2011, 7(4): 407-415.
- [5] Fearman J, Moltshaniwskyj N A. Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*[J]. Aquaculture, 2010, 305(1-4): 20-25.
- [6] Samain J F. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality[J]. Aquatic Living Resources, 2011, 24(3): 227-236.
- [7] 张智翠, 薛长湖, 李兆杰. 山东沿海牡蛎糖原、游离氨基酸及重金属含量的季节变化[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(5): 6-8.
- Zhang Z C, Xue C H, Li Z J. Seasonal various of glycogen, free amino acid and heavy mental residue of oyster along the East Coast of Shandong[J]. Food Research and Development, 2006, 27(5): 6-8(in Chinese).
- [8] 杨文鸽, 徐大伦, 孙翠玲, 等. 缢蛭冰藏保活期间呈味物质的变化[J]. 中国食品学报, 2009, 9(3): 181-186.
- Yang W G, Xu D L, Sun C L, *et al.* Changes of taste components in *Sinonovacula constricta* during iced storage-keeping alive[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(3): 181-186(in Chinese).
- [9] 高捷, 刘红英, 齐凤生, 等. 缢蛭保活过程中糖原变化的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 361-362, 421.
- Gao J, Liu H Y, Qi F S, *et al.* Research on changes of glycogen of *Sinonovacula constricta* during its life-keeping process[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(5): 361-362, 421(in Chinese).
- [10] Roach P J. Glycogen and its metabolism[J]. Current Molecular Medicine, 2002, 2(2): 101-120.
- [11] Palsamy P, Subramanian S. Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats[J]. Chemico-Biological Interactions, 2009, 179(2-3): 356-362.
- [12] Zhao N, Hou M, Wang T, *et al.* Cloning and expression patterns of the brine shrimp (*Artemia sinica*) glycogen phosphorylase (*GPase*) gene during development and in response to temperature stress[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(1): 9-18.
- [13] Gabbott P A, Whittle M A. Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L. —II. Seasonal changes in glycogen content and glycogen synthetase activity in the mantle tissue[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry, 1986, 83(1): 197-207.
- [14] Swift M L, Thomas T P, Humphrey C L. Characteristics of glycogen synthase activity in the oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry, 1988, 90(2): 361-365.

- [15] Zeng Z, Ni J B, Ke C H. Expression of glycogen synthase (*GYS*) and glycogen synthase kinase 3β (*GSK3\beta*) of the Fujian oyster, *Crassostrea angulata*, in relation to glycogen content in gonad development[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 166(3-4): 203-214.
- [16] Liu S W, Li Q, Yu H, *et al.* Relationship between single nucleotide polymorphism of glycogen synthase gene of Pacific oyster *Crassostrea gigas* and its glycogen content[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2017, 16(1): 168-174.
- [17] 王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008: 310-312.
Wang R C, Wang Z P. Science of marine shellfish culture[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008: 310-312 (in Chinese).
- [18] Racotta I S, Ramirez J L, Ibarra A M, *et al.* Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*[J]. *Aquaculture*, 2003, 217(1-4): 335-349.
- [19] 刘文广, 李琪, 高凤祥, 等. 长牡蛎繁殖周期、生化成分的季节变化与环境因子的关系[J]. *热带海洋学报*, 2011, 30(3): 88-93.
Liu W G, Li Q, Gao F X, *et al.* Seasonal variation in reproductive cycle and biochemical composition in relation to environmental factors in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2011, 30(3): 88-93(in Chinese).
- [20] Park M S, Kang C K, Lee P Y. Reproductive cycle and biochemical composition of the ark shell *Scapharca broughtonii* (Schrenck) in a southern coastal bay of Korea[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2001, 20(1): 177-184.
- [21] Lomovasky B J, Malanga G, Calvo J. Seasonal changes in biochemical composition of the clam, *Eurhemalea exalbida* (Bivalvia: Veneridae), from the Beagle Channel, Argentina[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 23(1): 81-87.
- [22] 孙莎, 钟婵, 章骞, 等. 4种海产贝类中主要呈味物质含量与季节变化的关系[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2016, 21(6): 420-427.
Sun S, Zhong C, Zhang Q, *et al.* Seasonal variation of taste-active component contents in four species of marine shellfish[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science Edition)*, 2016, 21(6): 420-427(in Chinese).
- [23] Bacca H, Huvet A, Fabioux C, *et al.* Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140(4): 635-646.
- [24] 阮飞腾, 高森, 李莉, 等. 山东沿海魁蚶繁殖周期与生化成分的季节变化[J]. *水产学报*, 2014, 38(1): 47-55.
Ruan F T, Gao S, Li L, *et al.* Gonad development and biochemical composition in the ark shell *Scapharca broughtonii* from coast of Shandong Peninsula[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(1): 47-55(in Chinese).
- [25] Yan H W, Li Q, Liu W G, *et al.* Seasonal changes in reproductive activity and biochemical composition of the razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck 1818)[J]. *Marine Biology Research*, 2010, 6(1): 78-88.
- [26] Nordlie R C, Foster J D, Lange A J. Regulation of glucose production by the liver[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1999, 19: 379-406.
- [27] Zou L H, Liu B Z. Identification of a serum amyloid A gene and the association of SNPs with *Vibrio*-resistance and growth traits in the clam *Meretrix meretrix*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(2): 301-309.
- [28] Greenwood T A, Kelsoe J R. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene[J]. *Genomics*, 2003, 82(5): 511-520.
- [29] Hunt R, Sauna Z E, Ambudkar S V, *et al.* Silent (synonymous) SNPs: should we care about them?[M]//Komar A A. Single nucleotide polymorphisms: methods and protocols. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2009: 23-39.
- [30] Liu S, Li L, Meng J, *et al.* Association and functional analyses revealed that PPP1R3B plays an important role in the regulation of glycogen content in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 106.

Glycogen content fluctuation and association analysis with polymorphism of *gys* gene of *Sinonovacula constricta* in the Zhejiang population

CHEN Yanyuan^{1,2}, LIU Sheng³, HE Jing², YAO Hanhan², LIN Zhihua^{2,3*}, DONG Yinghui^{2*}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources of Zhejiang, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

3. Institute of Marine Biological Seed Industry, Zhejiang Wanli University, Ninghai 315604, China)

Abstract: In order to explore the characteristics of glycogen content in *Sinonovacula constricta*, the glycogen synthase (*sc-gys*) gene and its feasibility in molecular marker-assisted breeding, the annual changes of glycogen content were detected in this study. The glycogen content in *S. constricta* was high between February to June and reached the maximum level in April during the annual cycle. The *sc-gys* gene has a full-length cDNA of 2 402 bp and an ORF of 2 136 bp, encoding 711 amino acids, with high similarity to orthologs of other animals showing conserved domain of Glycosyltransferase. The results of real-time quantitative PCR showed that *sc-gys* was mainly expressed in mantle and foot tissues. The expression level of *sc-gys* in April was significantly higher than that of other months, indicating its close relation to glycogen synthesis. Two SNP loci was tightly associated with glycogen content in the *sc-gys* exon region from “Yongle NO.1” new strain and wild population of Taizhou, and there was no linkage disequilibrium between the two SNP loci. Glycogen content of individuals with these two genotypes combinations was 11.8% higher than that of the population average. These two SNP loci and proper combination would provide candidate genetic markers for glycogen content genetic improvement of *S. constricta*.

Key words: *Sinonovacula constricta*; glycogen; glycogen synthase; SNP

Corresponding authors: LIN Zhihua. E-mail: zhihua9988@126.com ;

DONG Yinghui. E-mail: dongyinghui118@126.com

Funding projects: China Agriculture Research System(CARS-49); National Marine Genetic Resource Center Program; Zhejiang Major Program of Science and Technology (2016C02055-9); Ningbo Major Project of Science and Technology (2019B10005)