

黄姑鱼低温耐受性的全基因组关联分析



金 鲋¹, 刘炳舰¹, 竦奇慧², 张万昌³, 李完波⁴, 王志勇⁴,
高天翔¹, 徐冬冬^{2*}

第一作者: 金钶, 从事群体遗传学方面研究, E-mail: J782289657@163.com

1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 海洋生物种质资源发掘利用国家地方联合工程实验室, 浙江舟山 316021; 2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江省海水增养殖重点实验室, 浙江舟山 316021; 3. 南昌大学生命科学学院, 江西南昌 330038;
4. 集美大学水产学院, 福建厦门 361000



摘要:

【目的】研究黄姑鱼应对低温胁迫的分子机制, 为黄姑鱼养殖过程中应对极端低温带来的挑战提供理论参考。

【方法】本研究以 200 尾养殖黄姑鱼为实验材料, 通过 5 °C 的低温胁迫, 记录每尾实验鱼低温胁迫下的存活时间及体重、体长、性别等表型参数, 然后进行全基因组重测序。获得 3 005 715 个高质量单核苷酸多态性 (SNPs) 位点, 并用于基于混合线性模型 (MLM) 的 EMMAX 软件进行全基因组关联分析 (GWAS)。

【结果】体重、体长及性别等各种表型参数均与耐低温时长不显著相关 ($P=0.834\sim0.013$), 在 24 条染色体上定位到 9 个与耐低温时长显著关联的位点 ($P=1.98\times10^{-6}\sim4.61\times10^{-8}$), 并注释到 *CBL.3*、*STOML2.2*、*SLC37A3* 等共 13 个候选基因。基因功能注释发现, 上述基因主要富集在免疫、防御修复、压力应激及线粒体能量代谢等过程, 可能与黄姑鱼对低温响应相关。

【结论】研究结果可为后续黄姑鱼耐低温性状的遗传改良提供参考。

关键词: 黄姑鱼; 低温胁迫; 单核苷酸多态性位点 (SNP); 全基因组关联分析

通信作者: 徐冬冬, 从事鱼类遗传学和遗传育种研究, E-mail : xudong0580@163.com

资助项目: 浙江省“三农九方”科技协作计划项目(2023SNJF078); 浙江省杰出青年基金(LR21C190001); 国家自然科学基金(31972785)

收稿日期: 2023-07-11
修回日期: 2023-11-02

文章编号:
1000-0615(2025)06-069604-12
中图分类号: S 961.6
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

温度是鱼类生命活动的重要环境因子之一, 贯穿鱼类各生长发育阶段^[1-2]。当温度超过鱼类的自我调节阈值时, 将导致其生理功能紊乱甚至死亡^[3-6]。低温会抑制酶活性, 影响鱼类摄食^[7]、物质转化和免疫防御等功能, 进而抑制鱼类生长^[8]。长时间的低温胁迫会导致鱼类能量代谢功能异常, 机体损伤难以修复^[9-12]。近年来, 随着全球极端天气事件频繁发生, 水产养殖鱼类的耐低温研究也受到越来越多的关注。在基因组水平上, 红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[13-14]、罗非鱼 (*Oreochromis spp.*)^[15]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[16] 和大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[17] 的研究中均开展了与低温耐受相关的分子标记筛选。如朱理光等^[13] 利用数量性状位点 (quantitative trait locus, QTL) 定位分



析, 筛选出红鳍东方鲀 6 个与耐低温相关候选基因 (*tacc2*、*fsip1*、*exoc4*、*arhgap44a*、*pde10a* 和 *unc5b*)。聂苗苗^[16]在牙鲆低温耐受研究中, 注释到耐低温相关的单核苷酸多态性 (SNP) 位点定位于关键基因 *hsp70*、*hmgb1* 以及 *yb-1* 中。在转录及代谢水平上, 已有研究表明代谢酶类如硬脂酰辅酶 1 (SCD1)^[18-20]、分子伴侣如 Hsp70 和 Hsp90^[21-23] 和抗冻 (糖) 蛋白^[24] 等参与鱼类低温响应过程。在对鱼类长期低温环境适应研究中发现, 极地鱼类^[25-26] 可以通过功能基因的获得、缺失和大规模扩增的基因组进化策略来适应持续的低温极端环境。而且其他环境因子 (如氧含量^[27-29]、盐度^[30] 和温度下降速率^[31])、鱼体生理状态^[32](饥饿^[33] 和体型大小^[34-35] 等) 及物种差异性的基因表达模式^[36], 也会影响鱼类对低温刺激的反应和耐低温能力^[4]。但是, 目前关于鱼类具体的耐低温机制尚未完全阐明。从基因组水平解析鱼类耐低温的差异性, 筛选鉴定耐低温相关的分子标记和位点的功能基因也有待进一步解析。

全基因组关联分析 (genome-wide association studies, GWAS) 是研究基因型-表型关联的强大工具, 可用于全基因组范围内筛选出与目标性状相关联的位点, 以剖析复杂的遗传问题^[37-39]。高密度 SNP 位点能有效地捕获复杂性状的加性遗传变异, 进一步促进 GWAS 分析。基于 SNP 位点的 GWAS 分析已用于鱥 (*Siniperca chuatsi*)^[40]、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[41-43] 和褐点石斑鱼 (*Epinephelus fuscoguttatus*)^[44] 等多种水生动物的复杂性状研究中, 均筛选到与目标性状相关联的候选位点。该方法有利于解析性状关联基因的遗传机制, 推动分子辅助育种的实践运用^[39, 45-46]。

黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 隶属鲈形目 (Perciformes) 石首鱼科 (Sciaenidae) 黄姑鱼属 (*Nibea*), 为近海中下层暖温性鱼类, 分布于太平洋西北沿岸海域, 在我国四大海域均有分布^[47], 因其肉质细嫩, 口感独特, 尤其是鱼鳔和耳石可做药用, 所以市场价值甚高^[48-49]。近年来, 由于全球气候变化引发的极端温度事件加剧^[50-51], 极端低温造成黄姑鱼冬季死亡率上升, 已经严重制约其养殖产业的发展。但是目前关于黄姑鱼低温耐受性研究较少, 仅发现 SOD、Na⁺/K⁺-ATP 及 Hsp70 蛋白^[52] 等可作为低温胁迫应答的标志物, 在基因组水平上的耐低温遗传机制还

很不明晰。

为了筛选并鉴定黄姑鱼耐低温性状相关的位点和候选基因, 从基因组水平解析其低温耐受分子遗传基础。本研究利用黄姑鱼的选育群体后代, 在相同养殖条件下培育至 7 月龄后进行 5 °C 低温处理, 记录低温胁迫下的存活时间 (耐低温时长) 和表型性状等数据。对 200 个样本进行 DNA 提取及重测序, 利用 GWAS 对低温耐受性状的相关位点进行定位和分析, 以期为耐低温相关性状的遗传选育以及黄姑鱼品种改良提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及表型性状测定

本实验所用的黄姑鱼来自浙江省海洋水产研究所的选育群体。幼鱼暂养在 30 m³ 水泥池中。至 7 月龄时进行实验前的驯化养殖。养殖期间, 适应于 10 °C 的自然水温中, 每日投喂两次 (8:00 和 16:00) 商业颗粒饲料 (中国宁波天邦饲料科技有限公司)。实验前, 所有实验鱼均被饥饿处理 12 h。实验开始, 以 10 °C 的自然水温作为初始温度, 按照 0.5 °C/d 的速度降温至 5 °C。自降至 6 °C 开始, 每半个小时进行观察, 以鳃盖停止运动作为标准, 记录每尾黄姑鱼的死亡时间, 并测定对应的体重、全长、体长和体高。随后进行解剖, 根据性腺类型判定性别, 并取约 1 cm³ 的背肌保存于液氮中用于 DNA 提取。本研究获得了浙江省海洋水产研究所实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守浙江省海洋水产研究所伦理规范, 并按照浙江省海洋水产研究所伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 DNA 的提取、测序及质控

采用酚-氯仿法^[53] 对样本进行 DNA 的提取, 用 Qubit 2.0 (Invitrogen, 美国)^[54] 进行 DNA 的定量, 并用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 的完整性。然后送至深圳华大基因科技有限公司进行 Illumina (HiSeq X Ten) 二代测序。

获得的原始数据通过 Fastqc v0.11.9^[55] 进行质量检查。利用 Trimmomatic v0.32^[56] 进行数据的过滤: ①过滤掉有接头的读序 (reads); ②去除由于 PCR 扩增等原因引起的重复 reads; ③当单端测序 reads 中的一端 N (未测出的碱基) 的

含量超过整条长度的百分之十, 就对此双端测序结果进行舍弃; ④当单端测序 reads 中的一端含有的低质量碱基数超过该 reads 长度的百分之五十, 也需要舍弃该双端测序 reads。最后得到高质量读序 (clean reads) 用于后续分析。

1.3 SNP 变异检测

以黄姑鱼基因组序列 (NCBI 登录号: GCA_014281875.1)^[57] 为参考基因组, 对比得到的 clean reads, 进行变异检测。用 Burrows-Wheeler Aligner (BWA, 版本: bwa-0.7.10)^[58] 进行比对; 用 Samtools (v0.1.19)^[59] 和 Picard (v1.117) 进行排序和去重复; 使用 Samtools 中的 flagstat 程序和 coverage 程序计算映射率和覆盖率; 使用 Genome Analysis Toolkit (GATK: v4.2.0.0)^[60] 的 HaplotypeCaller 进行 SNPs 变异检测, GenotypeGVCFs 进行群体变异检测; 使用 SelectVariants 进行 SNPs 位点的提取, 使用 VariantFiltration 进行 SNPs 的过滤, 获得 VCF 文件用于后续分析。

1.4 性状统计与全基因组关联分析

使用 SPSS 软件^[61] 对生长性状进行描述性统计分析, 计算各性状的平均值、标准差、偏度和峰度, 进行单样本 K-S 检验及相关性分析, 并对雌、雄黄姑鱼耐低温胁迫下的存活时间(耐低温时长)进行 Mann-Whitney U 检验, 判断性别与耐低温时长的关系。

在进行 GWAS 分析前, 为了方便判断群体内部的分层情况, 将低温胁迫下的存活时间(耐低温时长)按照从小到大排序, 将生存时间按照 0~66 h、68~74 h 以及 74 h 以上, 分为 3 个不同的群体 D、Z、G。同时采用 PLINK(v1.9)^[62] 对得到的 VCF 文件进行连锁不平衡 (LD) 过滤, 得到的文件用 GCTA(v1.93)^[63] 进行 PCA 分析。

根据低温胁迫下的存活时间统计结果, 使

用 EMMA 混合线性模型^[64] 结合 VCF 文件, 对黄姑鱼低温胁迫下的存活时间进行全基因组关联分析。混合线性模型:

$$y = \mu X + aG + e$$

式中, y 为黄姑鱼耐低温时长表型值; μ 为固定效应向量, X 为固定效应关系矩阵; a 为随机加性遗传方差的参数, G 为基于 SNP 得到的关系矩阵; e 为剩余效应的向量。

GWAS 结果、Quantile-Quantile(Q-Q) 图和曼哈顿图用 R 中的 CMplot 包绘制。

1.5 候选基因筛选及功能注释

获得显著位点后, 利用已发表的黄姑鱼基因注释信息 (NCBI 登录号: GCA_014281875.1)^[57], 在显著位点上下游 50 kb 区域内进行扫描, 筛选潜在候选基因。同时用 LDBlockShow^[65] 进行 LDblock 热图的绘制, 再利用 ShowLDSVG 将 LDblock 热图与 GWAS 曼哈顿图合并, 可视化显著位点。随后通过 Uniprot 数据库 (www.uniprot.org) 和文献检索确定注释基因的生物学功能, 筛选与耐低温相关的候选功能基因。

2 结果

2.1 表型性状的分布及相关性

黄姑鱼群体的生长表型性状分析结果显示, 200 尾实验黄姑鱼的平均体重、全长、体长和体高分别为 (124.66 ± 15.77) g、 (20.90 ± 0.96) cm、 (17.98 ± 0.83) cm 和 (5.55 ± 0.34) cm (表 1)。K-S 检验结果显示, 体重、体长和体高符合正态分布。

为进一步探究生长性状对耐低温 GWAS 分析的潜在影响, 分析了耐低温与生长性状之间的相关性。结果显示, 体重 ($R_{\text{Pearson}}=0.044$, $P=0.532$)、全长 ($R_{\text{Spearman}}=0.095$, $P=0.182$)、体长 ($R_{\text{Pearson}}=0.127$, $P=0.073$) 和体高 ($R_{\text{Pearson}}=-0.176$, $P=0.013$) 与耐低温相关性绝对值均低于 0.2, 且

表 1 黄姑鱼的生长性状分析

Tab. 1 Analysis of growth traits in *N. albiflora*

参数 index	最小值 max	最大值 min	均值 mean	标准差 SD	偏度 skewness	峰度 kurtosis	单样本 K-S 检验 P 值 <i>P</i> -value of one-sample K-S test
体重/g overall weight	90.10	168.00	124.66	15.77	0.23	0.02	0.061
全长/cm total length	17.71	23.17	20.90	0.96	-0.59	0.43	0.002
体长/cm body length	15.55	19.85	17.98	0.83	-0.37	0.36	0.200
体高/cm body height	4.38	6.50	5.55	0.34	0.18	0.39	0.200

相关性不显著, 表明生长性状与其耐低温无显著相关性, 因此在后续的 GWAS 分析中可以忽略生长性状的影响。

进一步对不同性别黄姑鱼的耐低温时长进行检测。首先进行分布情况的检测(图 1), 发现性别的分布情况较为一致。之后进行 Mann-Whitney U 检验, 结果显示, Mann-Whitney U , $Z=-0.210$, $P=0.834$ ($P > 0.05$) (表 2)。由此可见, 耐低温时长与性别无显著相关性, 因此在后续的 GWAS 分析中可以忽略性别的影响。

2.2 测序数据统计、群体结构及全基因组关联分析

经 Trimmomatic 过滤, 共获得 1.26×10^{10} 条 clean reads; 序列的平均深度为 $15.60 \times (10.123 \times$

$\sim 21.590 \times)$; clean reads 的覆盖结果显示, 平均覆盖率达到 98.261% (97.857%~98.515%), 平均比对率为 98.30% (97.89%~98.75%), 表明测序数据具有很高的覆盖性; 在 GATK 的变异响应中, 共获 3 005 715 个高质量 SNPs 位点, 在参考基因组上的分布较均匀, 可用于后续的 GWAS 分析。

群体结构分析结果显示, 200 尾黄姑鱼的分布连续, 未出现明显的离群个体。在低(D)、中(Z)、高(G) 3 种类型分成的 3 个群体间, 个体耐低温时长的分布较为均一(图 2), 表明黄姑鱼在耐低温时长上不存在明显的群体分层现象。

通过耐低温时长的全基因组关联分析结果的 Q-Q 图, 发现检测到的 P -value 与期望的

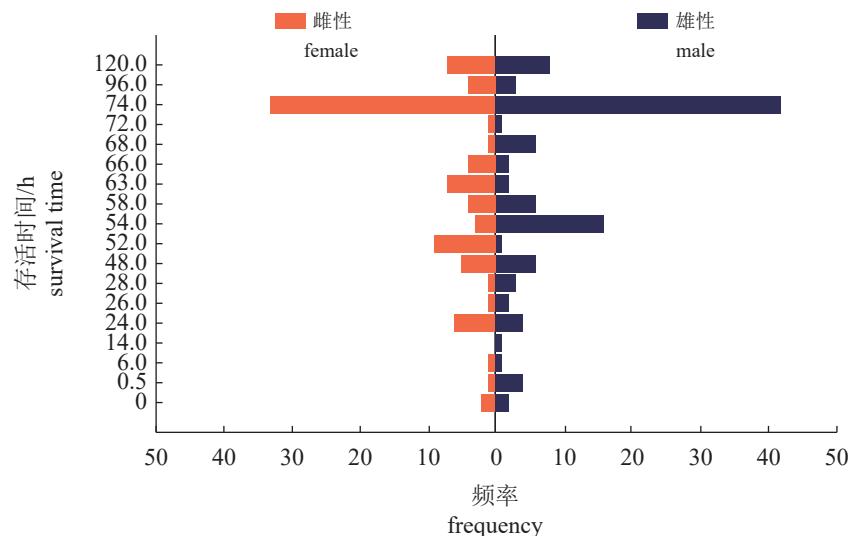


图 1 性别与存活时间相关的直方分布图

Fig. 1 Histogram of genetic sex and survival time

表 2 不同性别黄姑鱼的耐低温 Mann-Whitney U 检验

Tab. 2 Mann-Whitney U test for low temperature tolerance of *N. albiflora* of different genetic sexes

参数 index	样本数 sample size	平均值 mean	标准差 SD	最小值 min	最大值 max	百分位数 percentile		
						25%	50%	75%
存活时间/h survival time	200.00	63.59	26.50	0.00	120.00	52.50	68.00	74.00
曼-惠特尼 U Mann-Whitney U					4 867			
威尔科克森 W Wilcoxon W					10 972			
Z					0.210			
渐近显著性(双尾) asymptotic significance (two-tailed)					0.834			
存活时间中位数/h median survival time	雄性 male 雌性 female				68.00 70.00			

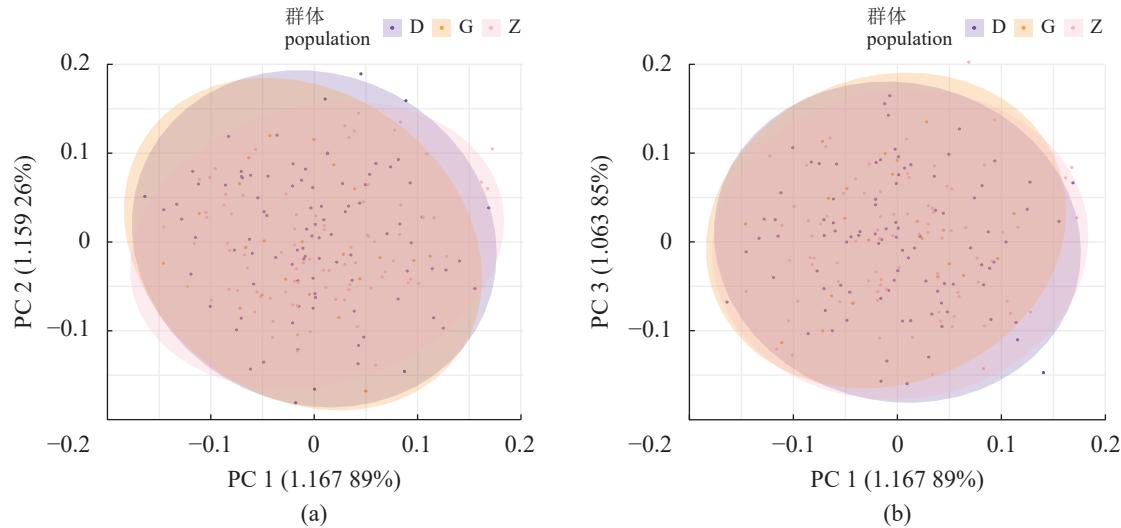


图 2 200 尾黄姑鱼关于耐低温时长的群体结构图

(a) PC1 和 PC2 的 PCA 分析, (b) PC1 和 PC3 的 PCA 分析。

Fig. 2 Population structure diagram of 200 *N. albiflora* based on low-temperature tolerance duration

(a) PCA analysis of PC1 and PC2; (b) PCA analysis of PC1 and PC3.

P-value 的一致性较高 (图 3), 表明 GWAS 使用的统计模型能够恰当地对表型数据进行拟合。

在耐低温全基因组关联分析的曼哈顿图中筛查出 9 个显著 SNP 位点, 其中最显著的位点在 18 号染色体上 ($P=4.61\times10^{-8}$)。另外, 在 5、6、15、22、23 号染色体上 ($P=1.59\times10^{-7}\sim1.98\times10^{-6}$) 均筛查到 1 个显著位点, 而 14 号染色体上筛查到 3 个位点 ($P=9.51\times10^{-8}\sim1.73\times10^{-6}$) (图 3, 表 3)。

2.3 候选位点的注释及功能预测

对获得的显著位点上下游 50 kb 区域进行

扫描, 寻找候选基因并对其进行功能注释, 结果共扫描到 13 个潜在相关的基因, 通过功能注释发现主要与免疫、防御修复、压力应激和线粒体能量代谢等过程相关 (图 4, 表 4)。

3 讨论

研究黄姑鱼应对低温胁迫的分子机制, 可为黄姑鱼养殖过程中应对极端低温带来的挑战提供理论参考。在本研究中, 通过对 200 尾养殖黄姑鱼进行 5 °C 的低温胁迫, 基于相关性分

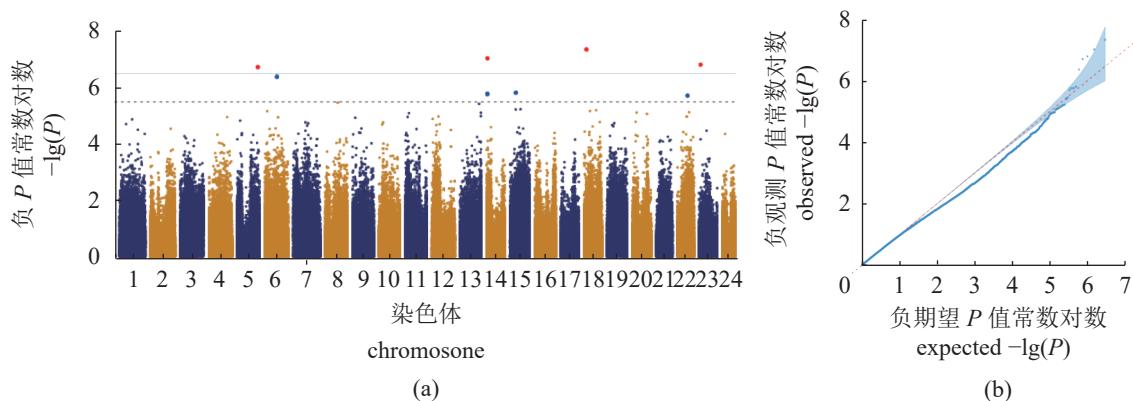


图 3 黄姑鱼耐低温时长的全基因组关联分析结果

(a) 曼哈顿图, 黑色的实线和虚线分别表示 $-\lg(1/n)=6.48$ 和 $-\lg(10/n)=5.48$ 时的阈值线, 蓝色和橘色的点代表 SNP 位点; (b) Q-Q 图。**Fig. 3 Results of genome-wide association analysis of low temperature tolerance time of *N. albiflora***(a) Manhattan plot, where the solid and dashed black lines represent threshold lines at $-\lg(1/n) = 6.48$ and $-\lg(10/n) = 5.48$, respectively, and the blue and orange dots represent SNP sites; (b) Q-Q plot.

表 3 耐低温 GWAS 显著相关的 SNP 位点
Tab. 3 SNPs significantly associated with low temperature tolerance related in GWAS

性状 traits	染色体编号 chromosome number	位置/bp position	P 值 P-value
耐低温 cold tolerance	chr5	24 742 779	1.95×10^{-7}
	chr6	14 709 088	4.30×10^{-7}
	chr14	1 198 510	1.73×10^{-6}
	chr14	1 198 526	9.51×10^{-8}
	chr14	1 198 531	1.73×10^{-6}
	chr15	7 057 732	1.56×10^{-6}
	chr18	2 856 391	4.61×10^{-8}
	chr22	11 990 810	1.98×10^{-6}
	chr23	1 750 336	1.59×10^{-7}

析, 排除了生长和性别对黄姑鱼耐低温性状的影响。基于重测序获得的 SNPs 数据, 对耐低

温时长进行了全基因组关联分析, 鉴定出多个候选 SNPs 位点和候选基因, 表明黄姑鱼的低温耐受性可能受多基因控制。通过对上述候选基因进行注释分析发现, 候选主要与免疫、防御修复、压力应激及线粒体相关的能量代谢等过程相关。

其中候选基因 *CBL3* 编码的 E3 泛素-蛋白连接酶已被多次报道在生物抵御外界逆境环境中发挥正调控作用^[66], 能通过钙信号系统抑制促分裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 信号途径的调控表达^[67-68], 增强对逆境信号的感知, 有利于抵御低温胁迫环境。候选基因 *STOML2.2* 的编码蛋白被报道能促进线粒体 DNA 复制, 增进质子动力驱动型 ATP 合成^[69-70]。Meng 等^[71]研究表明, *SLC37A3* 编码的蛋白具有跨膜转运蛋

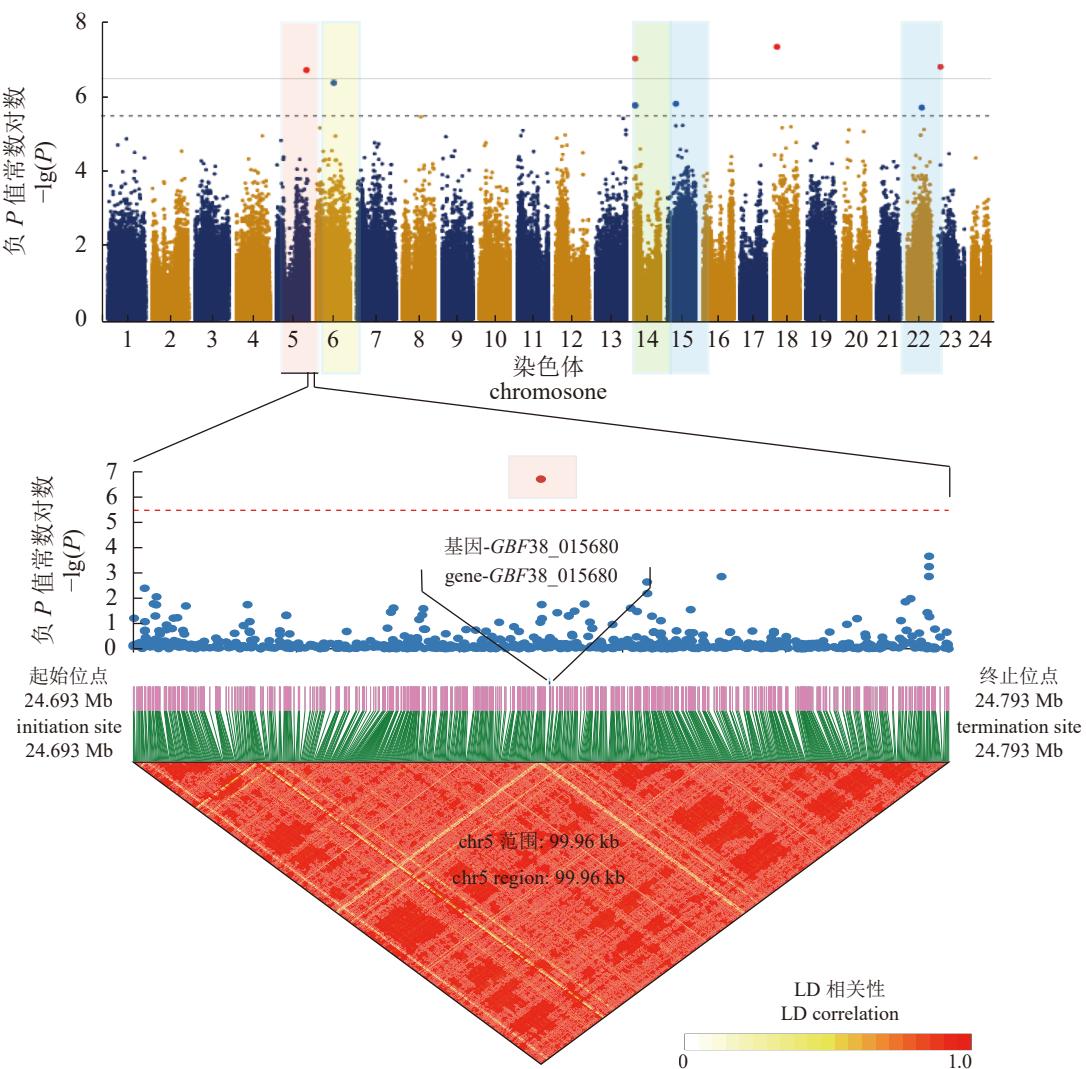


图 4 5 号染色体 GWAS 分析的候选基因 LDblock 注释图

Fig. 4 LDblock annotation of candidate genes from GWAS analysis on chromosome 5 (chr5)

表 4 GWAS 分析的候选基因及功能注释

Tab. 4 Candidate genes and function annotation of GWAS

SNP	染色体 chromosome no.	起始位点/bp gene initiation site	终止位点/bp gene termination site	候选基因 candidate gene	编码蛋白 coding protein	功能注释 fuction annotation
24 742 779	chr5	24 743 748	24 743 927	<i>GBF38_015680</i>	hypothetical protein	
14 709 088	chr6	14 684 492	14 692 800	<i>MCAM.2</i>	cell surface glycoprotein MUC18	促进血管生成
		14 698 727	14 710 497	<i>CBL.3</i>	E3 ubiquitin-protein ligase CBL	EGFR介导的信号转导的调节因子 MAP激酶活性的负调控
		14 730 015	14 733 699	<i>GBF38_012354</i>	hypothetical protein	
		14 711 118	14 729 571	<i>CBL.2</i>	E3 ubiquitin-protein ligase CBL	细胞黏附的过程调控 加工蛋白质泛素化 泛素蛋白连接酶活性
1 198 510 ~ 1 198 531	chr14	1 208 705	1 209 769	<i>PAQR8</i>	membrane progestin receptor beta	核类固醇受体活性 信号受体活性 类固醇结合蛋白
		1 223 151	1 224 355	<i>IL17F</i>	interleukin-17F	适应性免疫反应 对革兰氏阴/阳性细菌的防御反应 炎症应答 转化生长因子受体信号通路的调控
		1 187 046	1 204 357	<i>GBF38_005762</i>	hypothetical protein	
		1 228 416	1 230 699	<i>STMN4</i>	stathmin-4	微管聚合或解聚的调控
		1 177 523	1 183 369	<i>PENK</i>	proenkephalin-A	疼痛感知和对压力的反应 细胞对cAMP的反应(蛋白激酶A) 细胞对氧化应激的反应
7 057 732	chr15	7 050 490	7 053 563	<i>STOML2.2</i>	stomatin-like protein 2	线粒体钙离子跨膜转运 线粒体DNA复制的正向调控 质子动力驱动的线粒体ATP合成 T细胞受体信号通路
11 990 810	chr22	11 945 434	11 949 757	<i>SLC37A3</i>	sugar phosphate exchanger 3	跨膜转运蛋白活性 碳水化合物运输
		12 039 243	12 040 259	<i>CDKN1B.2</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	周期蛋白依赖性丝氨酸/ 苏氨酸激酶抑制剂活性 蛋白磷酸酶结合 细胞对缺氧的反应

白活性, 能提升碳水化合物运输速率, 故推测, *STOML2.2* 和 *SLC37A3* 极有可能在黄姑鱼低温胁迫的能量响应中发挥着重要作用。根据注释结果, *MCAM.2*^[72-73] 编码的蛋白能促进血管生成, *IL17F*^[74-75] 编码的蛋白能对革兰氏阴/阳性细菌做出防御反应, 而 *CBL.2* 编码蛋白具有泛素化功能, 能调动损伤蛋白降解^[76]、催化酶活性功能^[77]、传递信号^[78] 和介导损伤修复^[79], 推测它们在低温胁迫下的防御修复中发挥着重要作用。

虽然基于 GWAS 分析定位到了多个候选基因, 但 GWAS 分析的效果受多种因素影响^[80], 故黄姑鱼具体低温胁迫响应通路还需要更多的证据链去诠释。同时由于本研究所用的黄姑鱼属于同一批次繁育, 因此导致能够获得的候选位点数目较少, 且定位到的候选位点和基因有待进行进一步的筛查和验证。未来期望通过扩大实验群体规模、筛选地方与野生群体、增加

选择标记密度覆盖、提高表型测量准确度和优化实验等方法, 进一步提高候选定位的精准性。通过转录组差异性表达、基因编辑技术或表观遗传学等手段对定位到的候选位点和基因进行功能性验证, 从而更好地解析黄姑鱼耐低温遗传调控机制。

4 结论

基于黄姑鱼重测序获得的 SNPs 数据, 定位到 9 个与耐低温时长显著相关的位点, 共注释到了 13 个候选基因。通过功能注释发现, *CBL.3*、*PAQR8*、*STMN4*、*PENK* 和 *CDKN1B.2* 与应激反应相关, *STOML2.2* 和 *SLC37A3* 与线粒体能量代谢有关, *MCAM.2*、*CBL.2* 和 *IL17F* 与免疫及防御修复相关。综合分析发现, *CBL.3*、*STOML2.2* 和 *SLC37A3* 等基因可能在调控黄姑

鱼耐低温性状中发挥重要作用, 具有潜在的应用价值。

参考文献 (References):

- [1] Jobling M. Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature change[M]//Wood C M, McDonald D G. Global Warming: implications for freshwater and marine fish. Cambridge: Cambridge University Press, 1997: 225-254.
- [2] Viadero R C. Factors affecting fish growth and production [M]//Lehr J H, Keeley J W, Lehr J K, et al. Water encyclopedia. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005: 129-133.
- [3] 宋红彬. 黄姑鱼对低温与饥饿胁迫的生理响应及差异表达谱的初步研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
- Song H B. Preliminary study on physiological response and differential expression profiles of yellow drum (*Nibea albiflora*) to low temperature and starvation[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [4] 龙勇, 葛国栋, 李西西, 等. 鱼类低温应激反应的调控机制 [J]. 水生生物学报, 2021, 45(6): 1405-1414.
- Long Y, Ge G D, Li X X, et al. Regulation mechanisms for cold stress responses of fish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(6): 1405-1414 (in Chinese).
- [5] 章雪丹, 叶超霞, 洪健安, 等. 鱼类低温应激研究进展 [J]. 饲料工业, 2013, 34(6): 17-22.
- Zhang X D, Ye C X, Xian J A, et al. Research progress of low temperature stress in fish[J]. Feed Industry, 2013, 34(6): 17-22 (in Chinese).
- [6] Cheng C H, Ye C X, Guo Z X, et al. Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 64: 137-145.
- Liu C, Ding J, Gao X M, et al. Effects of acute low temperature stress on the hormones and gene expression of glucocorticoid receptor of large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Journal of Thermal Biology, 2021, 99: 103018.
- Gabillard J C, Weil C, Rescan P Y, et al. Does the GH/IGF system mediate the effect of water temperature on fish growth? A review[J]. Cybium, 2005, 29(2): 107-117.
- Aidos L, Cafiso A, Bertotto D, et al. How different rearing temperatures affect growth and stress status of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* larvae[J]. Journal of Fish Biology, 2020, 96(4): 913-924.
- 徐伟, 耿龙武, 姜海峰, 等. 水温和养殖密度对大鳞鲃幼鱼的生长影响 [J]. 淡水渔业, 2016, 46(5): 96-99.
- Xu W, Geng L W, Jiang H F, et al. The effects of water temperature and stocking density on growth of juvenile *Barbus capito*[J]. Freshwater Fisheries, 2016, 46(5): 96-99 (in Chinese).
- [11] 郭红会, 胡振, 张金刚, 等. 鱼类环境耐受性与抗逆性育种研究进展 [J]. 水产学报, 2023, 47(1): 019606.
- Guo H H, Hu Z, Zhang J G, et al. Advances in environmental tolerance and resistance breeding in fish[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(1): 019606 (in Chinese).
- [12] Volkoff H, Rønnestad I. Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish[J]. Temperature, 2020, 7(4): 307-320.
- [13] 朱理光, 刘志峰, 马爱军, 等. 红鳍东方鲀低温胁迫应答主效 QTL 候选基因的表达特征分析 [J]. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 74-82.
- Zhu L G, Liu Z F, Ma A J, et al. Evaluating the transcriptional regulation of six major QTL candidate genes during low temperature stress in *Takifugu rubripes*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(6): 74-82 (in Chinese).
- [14] 袁晨浩. 红鳍东方鲀耐低温标记筛选及转录组分析 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2021.
- Yuan C H. Screening of low temperature tolerance markers and transcriptome analysis of *Takifugu rubripes*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2021 (in Chinese).
- [15] 徐鸿飞, 陈沼, 黄彩林, 等. 基于简化基因组测序的红罗非鱼低温体色变异全基因组关联分析 [J]. 西南农业学报, 2021, 34(3): 667-672.
- Xu H F, Chen Z, Huang C L, et al. Genome-wide association analysis of low temperature body color variation in red tilapia based on RAD sequence[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(3): 667-672 (in Chinese).
- [16] 聂苗苗. 大菱鲆与牙鲆耐低温机制初探及连锁 SNP 标记筛选 [D]. 青岛: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2019.
- Nie M M. Study on the mechanism of cold tolerance and screening of cold related SNP markers in flatfish[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2019 (in Chinese).
- [17] Ji L Q, Jiang K Y, Liu M, et al. Low temperature stress on the hematological parameters and HSP gene expression in the turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2016, 34(3): 430-440.
- Tseng Y C, Chen R D, Lucassen M, et al. Exploring uncoupling proteins and antioxidant mechanisms under acute cold exposure in brains of fish[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18180.
- [19] 谢妙. 低温胁迫对斜带石斑鱼生理、生化、脂肪酸的影响 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.
- Xie M. Effects of low temperature stress on physiology, biochemical and fatty acid of *Epinephelus coioides*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [20] Hsieh S L, Kuo C M. Stearyl-CoA desaturase expression and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during cold acclimation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 141(1): 95-101.

- [21] 强俊, 杨弘, 王辉, 等. 急性温度应激对吉富品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生化指标和肝脏HSP70 mRNA表达的影响[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(5): 943-953.
- Qiang J, Yang H, Wang H, et al. The effect of acute temperature stress on biochemical indices and expression of liver HSP70 mRNA in GIFT Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(5): 943-953 (in Chinese).
- [22] 刘波, 王美垚, 谢骏, 等. 低温应激对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏HSP70基因表达的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(17): 4866-4873.
- Liu B, Wang M Y, Xie J, et al. Effects of acute cold stress on serum biochemical and immune parameters and liver HSP70 gene expression in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(17): 4866-4873 (in Chinese).
- [23] Wen X, Zhang X Y, Hu Y D, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Takifugu fasciatus* liver in response to low-temperature stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2019, 201: 27-36.
- [24] Soyano K, Mushirobira Y. The mechanism of low-temperature tolerance in fish[M]//Iwaya-Inoue M, Sakurai M, Uemura M. Survival strategies in extreme cold and desiccation: adaptation mechanisms and their applications. Singapore: Springer, 2018: 149-164.
- [25] 刘丽丽, 朱华, 闫艳春, 等. 鱼类低温耐受机制与功能基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(8): 50-57.
- Liu L L, Zhu H, Yan Y C, et al. Research progress of cold tolerance mechanism and functional genes in fish[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(8): 50-57 (in Chinese).
- [26] Somero G N, DeVries A L. Temperature tolerance of some Antarctic fishes[J]. *Science*, 1967, 156(3772): 257-258.
- [27] Elshout P M F, Dionisio Pires L M, Leuven R S E W, et al. Low oxygen tolerance of different life stages of temperate freshwater fish species[J]. *Journal of Fish Biology*, 2013, 83(1): 190-206.
- [28] Verberk W C E P, Sandker J F, van de Pol I L E, et al. Body mass and cell size shape the tolerance of fishes to low oxygen in a temperature - dependent manner[J]. *Global Change Biology*, 2022, 28(19): 5695-5707.
- [29] Morgenroth D, McArley T, Gräns A, et al. Coronary blood flow influences tolerance to environmental extremes in fish[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2021, 224(8): jeb239970.
- [30] Jian C Y, Cheng S Y, Chen J C. Temperature and salinity tolerances of yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*, at different salinity and temperature levels[J]. *Aquaculture Research*, 2003, 34(2): 175-185.
- [31] Bennett W A, Judd F W. Factors affecting the low-temperature tolerance of Texas pinfish[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1992, 121(5): 659-666.
- [32] Atwood H L, Tomasso J R, Webb K, et al. Low - temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of environmental and dietary factors[J]. *Aquaculture Research*, 2003, 34(3): 241-251.
- [33] Sullivan K M. Physiology of feeding and starvation tolerance in overwintering freshwater fishes[M]//Simenstad C A, Cailliet G M. Contemporary studies on fish feeding. Dordrecht: Springer, 1986: 259-268.
- [34] 陈柏湘, 尹建雄, 陈昆慈, 等. 三种杂交鳢品种耐寒能力的比较[J]. 水产养殖, 2020, 41(2): 21-24.
- Chen B X, Yin J X, Chen K C, et al. Comparison of cold tolerance ability of three hybrid snakeheads[J]. *Journal of Aquaculture*, 2020, 41(2): 21-24 (in Chinese).
- [35] Chen S, Tian Y S, Li Z T, et al. Heterosis in growth and low temperature tolerance in Jinhu grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*Epinephelus tukula* ♂)[J]. *Aquaculture*, 2023, 562: 738751.
- [36] 刘美丽, 杨文意, 王金凤, 等. 低温胁迫下鱼类鳃中RPL11/MDM2/P53信号通路相关基因及蛋白表达差异分析[J]. 大连海洋大学学报, 2021, 36(1): 51-56.
- Liu M L, Yang W Y, Wang J F, et al. Expression analysis of RPL11/MDM2/P53 pathway related gene and protein in gills of fish exposed to cold stress[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(1): 51-56 (in Chinese).
- [37] Ke Q Z, Wang J Y, Bai Y L, et al. GWAS and genomic prediction revealed potential for genetic improvement of large yellow croaker adapting to high plant protein diet[J]. *Aquaculture*, 2022, 553: 738090.
- [38] Jørsboe E, Albrechtsen A. Efficient approaches for large-scale GWAS with genotype uncertainty[J]. *G3 Genes| Genomes| Genetics*, 2022, 12(1): jkab385.
- [39] Visscher P M, Wray N R, Zhang Q, et al. 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2017, 101(1): 5-22.
- [40] Zhou Y, Fu H C, Wang Y Y, et al. Genome-wide association study reveals growth-related SNPs and candidate genes in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 550: 737879.
- [41] 何骞, 吴怡怡, 周志雄, 等. 大黄鱼肌纤维性状的全基因组关联分析[J]. 水产学报, 2022, 46(8): 1313-1323.
- He Q, Wu Y D, Zhou Z X, et al. Genome-wide association study of muscle fiber related traits in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(8): 1313-1323 (in Chinese).
- [42] Wu Y D, Zhou Z X, Pan Y, et al. GWAS identified candidate variants and genes associated with acute heat tolerance of large yellow croaker[J]. *Aquaculture*, 2021, 540: 736696.

- [43] Zhang W J, Li W B, Liu G J, et al. Evaluation for the effect of low-coverage sequencing on genomic selection in large yellow croaker[J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736323.
- [44] Yang Y, Wu L N, Wu X, et al. Identification of candidate growth-related SNPs and genes using GWAS in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(2): 153-166.
- [45] Xu Z L, Taylor J A. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S2): W600-W605.
- [46] Welter D, MacArthur J, Morales J, et al. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D1001-D1006.
- [47] Han Z Q, Gao T X, Yanagimoto T, et al. Genetic population structure of *Nibea albiflora* in Yellow Sea and East China Sea[J]. *Fisheries Science*, 2008, 74(3): 544-552.
- [48] Liu G J, Dong L S, Gu L L, et al. Evaluation of genomic selection for seven economic traits in yellow drum (*Nibea albiflora*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(6): 806-812.
- [49] Xu D D, Lou B, Zhou W, et al. Genetic diversity and population differentiation in the yellow drum *Nibea albiflora* along the coast of the China Sea[J]. *Marine Biology Research*, 2017, 13(4): 456-462.
- [50] Sui C J, Zhang Z H, Cai Y, et al. Using the physical decomposition method to study the effects of Arctic factors on wintertime temperatures in the Northern Hemisphere and China[J]. *Advances in Polar Science*, 2014, 25(4): 213-221.
- [51] Cascarano M C, Stavrakidis-Zachou O, Mladineo I, et al. Mediterranean aquaculture in a changing climate: temperature effects on pathogens and diseases of three farmed fish species[J]. *Pathogens*, 2021, 10(9): 1205.
- [52] 罗胜玉, 徐冬冬, 楼宝, 等. 低温胁迫对黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 抗氧化酶、 Na^+/K^+ -ATP 酶及 Hsp70 蛋白含量的影响 [J]. *海洋通报*, 2017, 36(2): 189-194.
- Luo S Y, Xu D D, Lou B, et al. Effects of low temperature stress on activities of antioxidant enzymes, Na^+/K^+ -ATP enzyme and Hsp70 content of *Nibea albiflora*[J]. *Marine Science Bulletin*, 2017, 36(2): 189-194 (in Chinese).
- [53] Sambrook J, Russell D W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006, 2006(1): pdb. prot4455.
- [54] Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, et al. The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2018, 479: 14-19.
- [55] Brown J, Pirrung M, McCue L A. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(19): 3137-3139.
- [56] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [57] Xu D D, Zhang W C, Chen R Y, et al. Chromosome-scale assembly and high-density genetic map of the yellow drum, *Nibea albiflora*[J]. *Scientific Data*, 2021, 8(1): 268.
- [58] Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(5): 589-595.
- [59] Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [60] McKenna N, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. *Genome Research*, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [61] Green S B, Salkind N J. Using SPSS for windows and macintosh: analyzing and understanding data[M]. 5th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall Press, 2008.
- [62] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2007, 81(3): 559-575.
- [63] Yang J, Lee S H, Goddard M E, et al. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2011, 88(1): 76-82.
- [64] Kang H M, Sul J H, Service S K, et al. Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(4): 348-354.
- [65] Dong S S, He W M, Ji J J, et al. LDBlockShow: a fast and convenient tool for visualizing linkage disequilibrium and haplotype blocks based on variant call format files[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2021, 22(4): bbaa227.
- [66] 刘春, 曹丽敏, 李玉中, 等. 利用转基因途径提高植物非生物胁迫耐受性的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2013, 29(1): 16-24.
- Liu C, Cao L M, Li Y Z, et al. Progress in the improvement of abiotic stress tolerance in plants using transgenic approaches[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013, 29(1): 16-24 (in Chinese).
- [67] Keane M M, Ettenberg S A, Nau M M, et al. cbl-3: a new mammalian cbl family protein[J]. *Oncogene*, 1999, 18(22): 3365-3375.
- [68] 肖育华, 詹纯列, 李新春, 等. 寒冷刺激对大鼠胃黏膜的影响及血清一氧化氮含量和胃黏膜表皮生长因子受体表达水平变化研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(9): 549-552.

- Xiao Y H, Zhan C L, Li X C, *et al.* Effects of cold stimulation on content of nitric oxide in serum and expression of epidermal growth factor receptor in gastric mucosa of rats[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2006, 16(9): 549-552 (in Chinese).
- [69] Suen D F, Norris K L, Youle R J. Mitochondrial dynamics and apoptosis[J]. *Genes & Development*, 2008, 22(12): 1577-1590.
- [70] Hájek P, Chomyn A, Attardi G. Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(8): 5670-5681.
- [71] Meng Z Y, Geng X, Lin X Y, *et al.* A prospective diagnostic and prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma that functions in glucose metabolism regulation: solute carrier family 37 member 3[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2023, 1869(4): 166661.
- [72] Wang P, Luo Y T, Duan H X, *et al.* MicroRNA 329 suppresses angiogenesis by targeting CD146[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2013, 33(18): 3689-3699.
- [73] Kwon O, Miller S, Li N, *et al.* Bone marrow-derived endothelial progenitor cells and endothelial cells may contribute to endothelial repair in the kidney immediately after ischemia-reperfusion[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2010, 58(8): 687-694.
- [74] Duan Y L, Li Q, Zhou J, *et al.* Studies on the molecular level changes and potential resistance mechanism of *Coreius guichenoti* under temperature stimulation[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 1015505.
- [75] Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, *et al.* Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses[J]. *Immunity*, 2009, 30(1): 108-119.
- [76] Qi M L, Tagawa K, Enokido Y, *et al.* Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases[J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9(4): 402-414.
- [77] Ajaz M, Elahi A, Rehman A. Degradation of azo dye by bacterium, *Alishewanella* sp. CBL-2 isolated from industrial effluent and its potential use in decontamination of wastewater[J]. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 2018, 8(4): 507-515.
- [78] Smit L, Borst J. The Cbl family of signal transduction molecules [J]. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, 1997, 8(4): 359-380.
- [79] Miyake S, Mullane-Robinson K P, Lill N L, *et al.* Cbl-mediated negative regulation of platelet-derived growth factor receptor-dependent cell proliferation: a critical role for Cbl tyrosine kinase-binding domain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(23): 16619-16628.
- [80] Gallagher M D, Chen-Plotkin A S. The post-GWAS era: from association to function[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2018, 102(5): 717-730.

Genome-wide association analysis of low temperature tolerance in *Nibea albiflora*

JIN Xun¹, LIU Bingjian¹, ZHU Qihui², ZHANG Wanchang³, LI Wanbo⁴,
WANG Zhiyong⁴, GAO Tianxiang¹, XU Dongdong^{2*}

1. National and Provincial joint Laboratory of Exploration and Utilizaion of Marine Aguatic Genetic Resources,
Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China;

2. Key Lab of Mariculture and Enhancement of Zhejiang Provincial,
Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhoushan 316021, China;

3. School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330038, China;

4. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361000, China

Abstract: Increasing temperature extremes are caused by global climate change. Extreme low temperature has caused the increase of death rate for *Nibea albiflora* in winter, which has seriously restricted the development of aquaculture industry. *N. albiflora* is one of the important mariculture fish in China. Studying the molecular mechanism of response to low temperature stress can provide theoretical basis for *N. albiflora* culture to cope with the challenges of extreme low temperature. In this study, 200 *N. albiflora* individuals were selected to low-temperature stress at 5 °C, and the survival time, weight, body length, sex and other phenotypic parameters of every individual were recorded. Then, whole genome was resequenced. A total of 3 005 715 high-quality single nucleotide polymorphism (SNPs) sites were obtained by comparing to the reference genome (NCBI GenBank number: GCA_014281875.1), and the obtained SNP sites were used for genome-wide association analysis (GWAS) using the Mixed linear model (MLM) based on EMMA software. The results showed that the phenotypic parameters such as body weight, body length and sex were not significantly correlated with the low temperature tolerance time ($P=0.834-0.013$). However, 9 sites were identified on 24 chromosomes that were significantly correlated ($P=1.98\times10^{-6}$ - 4.61×10^{-8}) with the low temperature tolerance time, and a total of 13 candidate genes, such as *CBL3*, *STOML2.2* and *SLC37A3* were annotated. Gene ontology (GO) analysis showed that the above genes were mainly enriched in the processes of immunity, defense and repair, stress and mitochondrial energy metabolism, which may be related to low temperature response of the *N. albiflora*. The results of this study can provide reference for the genetic improvement of low temperature tolerance.

Key words: *Nibea albiflora*; low-temperature stress; single nucleotide polymorphism (SNP); genome-wide association analysis

Corresponding author: XU Dongdong. E-mail: xudong0580@163.com

Funding projects: Zhejiang Province “Three Agriculture Nine Side” Science and Technology Cooperation Program Project (2023SNJF078); Outstanding Youth Foundation of Zhejiang Province (LR21C190001); National Natural Science Foundation of China (31972785)