

郭睿, 张善霖, 蔡雷鸣, 等. 绿鲍 (*Haliotis fulgens*) 线粒体基因组全序列测定及分析[J]. 海洋学报, 2023, 45(5): 64–78, doi:10.12284/hyxb2023050

Guo Rui, Zhang Shanpi, Cai Leiming, et al. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of green abalone (*Haliotis fulgens*)[J]. Haiyang Xuebao, 2023, 45(5): 64–78, doi:10.12284/hyxb2023050

绿鲍 (*Haliotis fulgens*) 线粒体基因组 全序列测定及分析

郭睿^{1,2}, 张善霖^{1,2*}, 蔡雷鸣^{1,2}, 杨小强^{1,2}, 王伟^{1,2}, 江小斌^{1,2},
林钦³, 林枫³, 林哲龙³

(1. 福州海洋研究院海洋与渔业技术研究中心, 福建福州 350108; 2. 福州市海洋与渔业技术中心, 福建福州 350007; 3. 福建省连江县官坞海产开发有限公司, 福建连江 350511)

摘要: 为高效鉴别鲍属物种和更好地管理和保护鲍种质资源, 本研究通过高通量测序获得了养殖绿鲍 (*Haliotis fulgens*) 稚贝的线粒体基因组全序列, 并对其序列和结构特征进行分析。结果表明, 绿鲍线粒体基因组全长 17 041 bp, 含有 37 个编码基因, 其中蛋白质编码基因 13 个、tRNA 基因 22 个、rRNA 基因 2 个。13 个蛋白质编码基因均以 AUG 为起始密码子, 以 UAG 或 UAA 为终止密码子。除 tRNA-Ser^(AGN) 外的 21 个 tRNA 基因可折叠成典型三叶草结构。分析发现 tRNA-Glu 和 COX3 间存在富含 A+T 的非编码区, 其内含有 2 个带回文序列的发卡结构。基于已报道的 10 个鲍属线粒体基因组全序列构建系统发育树, 发现绿鲍与皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)、红鲍 (*Haliotis rufescens*)、黑鲍 (*Haliotis cracherodii*) 聚为一支。将绿鲍与皱纹盘鲍 13 个线粒体编码蛋白的结构域比较, 发现二者 ND2、ND4 的跨膜结构域数量存在差异, 这是否与二者的高温耐受性差异有关, 有待进一步研究。总之, 绿鲍线粒体基因组全序列的首次获取和分析, 丰富了鲍类细胞遗传信息, 为分类、种质鉴定与种质资源保护提供了基础数据和参考。

关键词: 绿鲍; 线粒体基因组; 基因组组成; 系统发育; 结构域

中图分类号: P735; Q959.212

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2023)05-0064-15

1 引言

中国是鲍生产与消费大国, 2021 年我国鲍养殖产量达 21.78×10^4 t^[1]。然受限于养殖品种与环境, 每年培育的大型精品鲍有限, 引进、繁育高产优质鲍种对我国鲍养殖产业的振兴与提升国际竞争力具有重要现实意义。依据世界海洋物种目录 (World Register of Marine Species, WoRMS, <https://marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1052447>), 鲍隶属软体动物门

(Mollusca)、腹足纲 (Gastropoda)、深海白笠目 (Lepetellida)、鲍总科 (Haliotoidea)、鲍科 (Haliotidae), 是鲍属 (*Haliotis*) 物种的统称。鲍广泛分布于世界热带、亚热带和温带海域。因肉质鲜美、营养丰富、符合高蛋白低脂的健康饮食需求, 被誉为海产八珍之首。目前世界上发现近百种鲍, 在已命名的 56 种^[2] 中有约 20 种是重要的海水养殖经济贝类^[3-4], 其中大型鲍多分布于温带地区, 小型鲍多分布于热带地区^[3]。绿鲍 (*Haliotis fulgens*), 原产于美国的南加利福尼亚、墨西

收稿日期: 2022-07-19; 修订日期: 2022-10-21。

基金项目: 福州海洋研究院项目 (2021F12); 福建省科技厅项目 (2021S0010)。

作者简介: 郭睿 (1986—), 男, 河北省石家庄市人, 高级农艺师, 从事水生动物遗传和疫病研究。E-mail: ariessgreen86@hotmail.com

* 通信作者: 张善霖 (1969—), 男, 高级工程师, 主要从事水产养殖技术研究。E-mail: 309468990@qq.com

哥的下加利福尼亚半岛(Baja California Sur)西海岸,为大型暖水鲍种,具有耐高温、肉质鲜、价值高等优点,一度引领当地渔业发展,然因过度捕捞、海洋气候变化等因素,其野生种群数量日益减少,2021年2月绿鲍被世界自然保护联盟(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN)濒危物种红皮书(Red List of Threatened Species)变更为极危物种(Critically Endangered, <https://www.iucnredlist.org/species/78768961/78772463>)。绿鲍自20世纪80年代引入我国^[5-6],之后20多年未见继代自繁和成功用于杂交的报道^[6]。直到2010年厦门大学柯才焕课题组对美国绿鲍再次引种,经皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)与绿鲍的种间杂交实验,成功收获杂交种(*H. discus hannai* ♀×*H. fulgens* ♂),随后对二者杂交授精关键影响因素和种间杂交制种技术开展系列研究^[7-9]。

线粒体是真核细胞中一种半自主性细胞器,其基质内含有一套自身的遗传体系,即线粒体基因组,其中富含可用于种群遗传和系统分类研究的分子标记。近年来高通量测序技术结合生物信息学注释分析的方法已广泛应用于动物线粒体基因组的测定^[10-12],所获得的线粒体基因组序列信息可用于物种鉴定、群体遗传分化及系统发育等研究领域^[13-14]。近年来在水生动物研究中,应用巨石斑鱼(*Epinephelus tauvina*)与斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的线粒体基因组序列信息对二者进行了物种有效性分析^[15],对龙虾科^[16]、梭子蟹科^[17]、帘蛤科^[18]物种的线粒体基因组全序开展了系统发育研究,陆续测定和分析了黄条鲷(*Seriola aureovittata*)^[19]、太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)^[20]、格氏束腰蟹(*Somanniathelphusa grayi*)^[21]、洞穴丽蚌(*Lamprotula caveata*)^[22]、瓜螺(*Melo melo*)^[23]等的线粒体基因组全序。此外,当前有9个鲍属物种线粒体基因组全序列或近全序列报道(表1),包括黑唇鲍(*H. rubra*)^[24]、欧洲疣鲍(*H. tuberculata*)^[25]、杂色鲍(*H. diversicolor*)^[26]、皱纹盘鲍^[12, 27]、绿唇鲍(*H. laevigata*)^[11]、黑足鲍(*H. iris*)^[28]、羊鲍(*H. ovina*)^[29]等,相关研究集中于线粒体全序列测定和系统发育分析。

近年来有关绿鲍的研究主要涉及野生种群遗传多样性与种群基因组学^[30-31]、与近源种红鲍(*H. rufescens*)的抗病差异^[32]、摄食变化及饲料优化^[33-34]、环境应激下转录组分析及应激响应^[35-36]、环境对产卵活动影响^[37]等领域,未见绿鲍线粒体基因组全序列的报道。然而绿鲍属于海洋贝类中的极危物种,是我国引进的优质鲍种,对其开展线粒体基因组全序列测定和分析研究有助于绿鲍的生物资源保护及繁育工作。

表1 已报道鲍属贝类线粒体基因组

Table 1 The complete mitochondrial genomes reported of *Haliotis* genus for analysis

物种	长度/bp	GC含量/%	GenBank登录号
皱纹盘鲍(<i>Haliotis discus hannai</i>)	16 886	39.6	KF724723.1
黑足鲍(<i>Haliotis iris</i>)	17 131	40.2	KU310895.1
黑唇鲍(<i>Haliotis rubra</i>)	16 907	40.9	AY588938.1
绿唇鲍(<i>Haliotis laevigata</i>)	16 545	42.2	KJ472483.1
欧洲疣鲍(<i>Haliotis tuberculata</i>)	15 938	39.5	FJ605488.1
杂色鲍(<i>Haliotis diversicolor</i>)	16 543	40.1	MZ465525.1
羊鲍(<i>Haliotis ovina</i>)	16 531	40.7	NC056350.1
红鲍(<i>Haliotis rufescens</i>)	16 646	39.7	NC036928.1
黑鲍(<i>Haliotis cracherodii</i>)	18 391	37.7	CM039063.1

鉴于此,福州市海洋与渔业技术研究中心的杂交鲍种质研究团队采集引自墨西哥西海岸的养殖绿鲍自繁稚贝样本,利用高通量测序技术开展其线粒体基因组全序列测定与结构特征研究,首次报道了绿鲍线粒体基因组全序列,进一步分析了鲍属贝类系统进化关系,旨在为鲍种分类、种质鉴定、良种选育提供可靠的理论基础和技术支撑。

2 材料与方法

2.1 实验材料

随机采集连江官坞养殖场2019年引种于墨西哥西海岸的绿鲍自繁子代稚贝3粒,壳长0.3~0.5 cm,将整粒去壳经无菌水冲洗后置于无水乙醇中-20℃冻存。使用北京天根海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒按照说明书提取整粒鲍的DNA,并用Nano-Drop ND2000c超微量核酸分析仪和0.8%琼脂糖核酸电泳检测DNA的浓度、纯度及完整性。

2.2 基于细胞色素B(Cytochrome B, *cytB*)基因的鲍种验证

参考GenBank中报道的绿鲍*cytB*基因片段(GenBank登录号:MH427178.1)及同属红鲍等的线粒体基因组序列(表1),使用Primer Premier 5设计带M13接头的兼并引物(下划线标记序列为M13接头序列),用于扩增绿鲍*cytB*基因片段,上游引物序列HfcbF:CAGGAAACAGCTATGACCGCATAAGCCAATTC-GTAARGTG;下游引物序列HfcbR:TGTA AACGAC-GGCCAGTCTAATATTCAAGAATATTRTCYCAY-AAC。使用德国Biometra TRIO PCR仪扩增目的片段,PCR体系包含:2×GoTaq Master Mix(美国Promega)

20 μL , 绿鲍基因组 DNA 100 ng, HfcfB (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 HfcfR (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 加灭菌水补至 40 μL 。PCR 程序设置为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 25 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 25 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 充分延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 静置。使用 1% 琼脂糖核酸电泳检测 PCR 产物, 使用英国 Sygene G: BOX F3 凝胶成像系统成像, 将含有目的片段的 PCR 产物送生物技术公司, 使用 M13 测序引物进行一代测序。测序结果校正后进行 BLAST 比对, 以深海白笠目裂螺科 (Lepetellida: Fissurellidae) 的火山裂螺 (*Fissurella volcano*) 线粒体基因组全序列 (GenBank 登录号: NC016953.1) 中提取的 *cytB* 基因序列为外群, 从鲍属线粒体基因组全序列中提取 *cytB* 基因序列并使用 MEGA X^[38] 邻接法 (Neighbor-Joining, NJ), 设置自展检测值 (bootstrap tests) 1 000, 按照默认参数进行 *cytB* 基因片段的系统发育树构建。

2.3 线粒体基因组二代测序

混合鉴定无误的 3 个绿鲍基因组 DNA 样品建立混合池, 委托上海凌恩生物技术公司进行二代高通量测序。流程为: 通过 Covaris M220 超声破碎仪将基因组 DNA 随机打断成 300~500 bp 片段, 采用 Illumina TruSeq Nano DNA Sample Prep Kit 的方法构建文库, 应用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行双端 150 bp 测序。对下机数据原始数据使用 Trimmomatic v0.39 (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) 进行低质量读长修剪得到极正数据。

2.4 基因组组装及注释

以报道的红鲍线粒体基因组序列 (GenBank 登录号: NC036928.1) 为参考序列, 使用 SPAdes v3.14.1 (<http://bioinf.spbau.ru/spades>) 软件对极正数据进行拼接和组装, 使用 MITOS^[39] 对线粒体基因组进行蛋白质编码基因 (Protein-Coding Gene, PCG)、转运 RNA (tRNA) 基因和核糖体 RNA (rRNA) 基因的预测和结构分析。使用 Tandem Repeats Finder (TRF) 检索线粒体基因组序

列中串联重复序列^[40]。对 MITOS 预测的初始基因与参考基因组比对以校正基因的起始、终止密码子位置。使用 OGDRAW^[41] 对组装后的基因组序列进行圈图展示。将 13 条蛋白序列在 NCBI 非冗余蛋白质数据库中用 BLAST 的 blastp (E -value 小于 10^{-5}) 与已报道鲍属线粒体蛋白质基因比对以进行基因的功能注释。

2.5 鲍属贝类线粒体基因组序列分析及系统发育树构建

使用 DNAMAN 序列分析软件 8 和 MEGA X 进行绿鲍线粒体基因组各部碱基组成特征和密码子偏好性分析。使用 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 对 10 个线粒体基因组全序列的核苷酸相似性比较。以火山裂螺为外群, 将新测的绿鲍线粒体全序与表 1 中报道的鲍属线粒体全序通过 MAFFT 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) 进行多序列比对, 比对结果应用 MEGA X 使用同上方法构建 NJ 系统发育树, 产生的树图使用 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 展示。使用 DNAMAN 序列分析软件 8 对绿鲍及近缘种皱纹盘鲍 (GenBank 登录号: KF724723.1) 13 个蛋白质的氨基酸序列进行氨基酸序列相似性计算, 并使用 TBtools v1.09876 对二者 13 个蛋白质的氨基酸序列进行结构域检索和可视化分析^[42]。

3 结果

3.1 鲍种验证

稚贝 *cytB* 基因片段测序后, 经校正得 1 086 bp, 提交序列到 GenBank (登录号: ON932192.1)。该序列在线 BLAST 比对与绿鲍 *cytB* 基因片段 (GenBank 登录号: MH427178.1) 序列相似性达 100%。将该序列与同属近缘种 *cytB* 序列使用 NJ 法构建系统发育树, 稚贝 *cytB* 序列与上述绿鲍 *cytB* 基因聚为一支 (图 1, 本研究稚贝 *cytB* 序列号后标), 说明所采集稚贝样本为绿鲍。

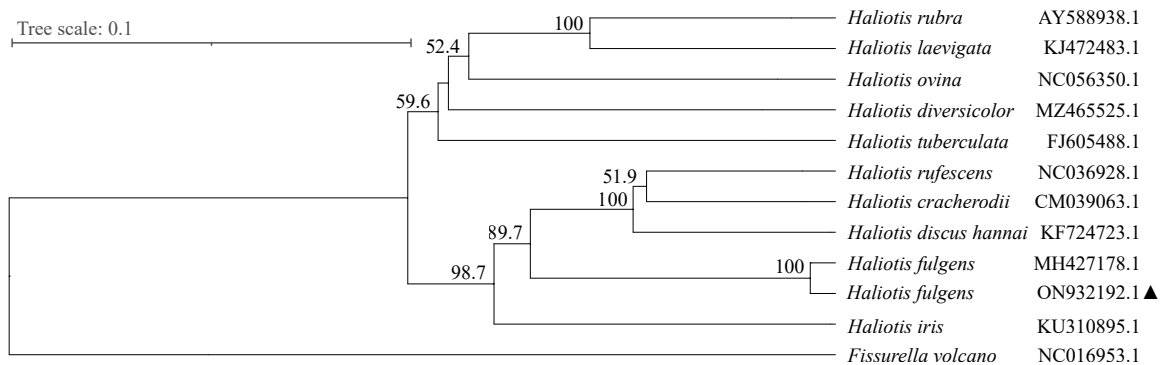


图 1 鲍属 *cytB* 基因 NJ 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the neighbor-joining (NJ) analysis of the *cytB* genes of *Haliotis* spp.

3.2 绿鲍线粒体基因组的结构组成

采用 Illumina 高通量测序技术, 测序获得原始数据 8.260 Gb, 经质量修剪后得极正数据 8.195 Gb, 极正数据 Q20 为 96.99%, Q30 为 90.08%, 说明测序质量好。所测数据经拼接组装成单一环状序列, 初步表明获得绿鲍线粒体基因组全序列。所测绿鲍线粒体全长 17 041 bp(GenBank 登录号: ON920309.1), 包含 13 个 PCGs、22 个 tRNA 基因, 2 个 rRNA 基因和 1 个推测的非编码控制区(Control Region, CR)(图 2)。PCG 长度为 11 193 nt、tRNA 基因长度为 1 517 bp、rRNA 基因长度为 2 433 bp、CR 长度为 1 010 bp, 分别占整个线粒体长度的 65.68%、8.90%、14.28% 和 5.93%。绿鲍线粒体各基因大小、位置及排列顺序等注释信息见表 2 和图 3。

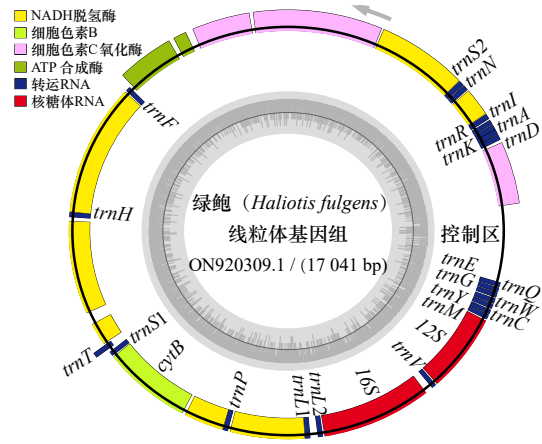


图 2 绿鲍线粒体基因组结构
Fig. 2 Mitochondrial genome structure of *Haliotis fulgens*

表 2 绿鲍线粒体基因组注释结果

Table 2 The results of the complete mitochondrial genome annotation for *Haliotis fulgens*

基因	长度/bp	定位		间隔区/bp	反密码子	密码子		编码链
		起始位点	终止位点			起始密码子	终止密码子	
<i>COX3</i>	780	1	780	0	-	AUG	UAA	H
<i>trnD</i>	73	812	884	31	GUC	-	-	H
<i>trnK</i>	72	884	955	-1	UUU	-	-	H
<i>trnA</i>	69	951	1 019	-5	UGC	-	-	H
<i>trnR</i>	66	1 021	1 086	1	UCG	-	-	H
<i>trnI</i>	70	1 099	1 168	12	GAU	-	-	H
<i>ND3</i>	354	1 171	1 524	2	-	AUG	UAA	H
<i>trnN</i>	71	1 537	1 607	12	GUU	-	-	H
<i>trnS</i>	67	1 611	1 677	3	GCU	-	-	H
<i>ND2</i>	1 095	1 681	2 775	3	-	AUG	UAA	H
<i>COX1</i>	1 542	2 795	4 336	19	-	AUG	UAA	H
<i>COX2</i>	696	4 375	5 070	38	-	AUG	UAG	H
<i>ATP8</i>	165	5 155	5 319	84	-	AUG	UAA	H
<i>ATP6</i>	696	5 374	6 069	54	-	AUG	UAA	H
<i>trnF</i>	68	6 113	6 180	43	GAA	-	-	L
<i>ND5</i>	1 740	6 195	7 934	14	-	AUG	UAA	L
<i>trnH</i>	68	7 935	8 002	0	GUG	-	-	L
<i>ND4</i>	1 233	8 050	9 282	47	-	AUG	UAA	L
<i>ND4L</i>	300	9 438	9 737	155	-	AUG	UAG	L
<i>trnT</i>	70	9 762	9 831	24	UGU	-	-	H
<i>trnS</i>	67	9 858	9 924	26	UGA	-	-	L
<i>CYTb</i>	1 140	9 937	11 076	12	-	AUG	UAG	L

续表 2

基因	长度/bp	定位		间隔区/bp	反密码子	密码子		编码链
		起始位点	终止位点			起始密码子	终止密码子	
<i>ND6</i>	507	11 114	11 620	37	-	AUG	UAG	L
<i>trnP</i>	67	11 621	11 687	0	UGG	-	-	L
<i>ND1</i>	945	11 710	12 654	22	-	AUG	UAG	L
<i>trnL</i>	68	12 656	12 723	1	UAA	-	-	L
<i>trnL</i>	68	12 814	12 881	90	UAG	-	-	L
<i>16S</i>	1 400	12 898	14 297	16	-	-	-	L
<i>trnV</i>	66	14 390	14 455	92	AAC	-	-	L
<i>12S</i>	1 033	14 469	15 501	13	-	-	-	L
<i>trnM</i>	70	15 516	15 585	14	CAU	-	-	L
<i>trnY</i>	68	15 588	15 655	2	GUA	-	-	L
<i>trnC</i>	70	15 664	15 733	8	GCA	-	-	L
<i>trnW</i>	73	15 737	15 809	3	UCA	-	-	L
<i>trnQ</i>	70	15 820	15 889	10	UUG	-	-	L
<i>trnG</i>	68	15 892	15 959	2	UCC	-	-	L
<i>trnE</i>	68	15 964	16 031	4	UUC	-	-	L

注: *trn*表示rRNA, 后面的大写字母表示该tRNA转运的氨基酸; *16S*和*12S*为rRNA基因; -代表无密码子。

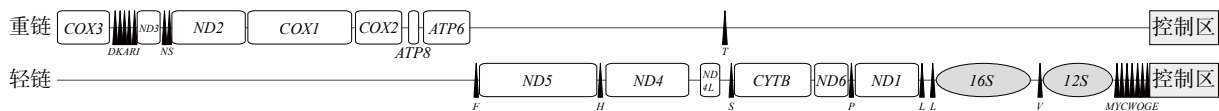


图 3 绿鲍线粒体编码基因及非编码基因排列图

Fig. 3 The mitochondrial coding and non-coding genes arrangement diagram of *Haliotis fulgens*

3.3 鲍属贝类线粒体基因组碱基组成

比较报道的鲍属贝类线粒体基因组碱基组成(表 3), 发现各鲍种线粒体基因组 A+T 含量(57.8%~62.3%)均高于 G+C 含量(37.7%~42.2%), 核苷酸组成具有明显的 AT 偏好性, 其中本研究绿鲍的 A+T 含量在全基因组的占比为 60.6%, 在 PCG 组为 59.7%, 在 tRNA 基因组为 59.1%, 在 rRNA 基因组为 61.2%, 在 CR 更是高达 67.0%, 表现出同样的 AT 偏好性。本研究中绿鲍线粒体全基因组碱基含量由高到低依次为: A(36.2%)、C(26.5%)、T(24.4%)、G(12.9%), AT 偏移碱基组成和 GC 偏移碱基组成分别为 0.195 和 -0.345, 其他鲍属贝类线粒体基因组中鸟嘌呤(G)含量较本研究的更高(13.4%~27.3%), 腺嘌呤(A)含量较本研究的更低(23.9%~35.9%), 与绿唇鲍和黑鲍不同, 绿鲍 GC 偏移碱基中鸟嘌呤(G)含量远低于胞嘧啶(C)含量, 而且 GC 偏移达到最小(-0.345)。通过以上分析发现, 鲍属贝类 37 个编码基因的碱基组成在

PCGs、tRNA 和 rRNA 基因中表现出相对较高的胸腺嘧啶(T)含量和相对较少的胞嘧啶(C)含量, 且本研究中绿鲍 tRNA 基因的胞嘧啶(C)含量较其他鲍略低, 绿鲍控制区含有相对较高的腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶或尿嘧啶(T/U)。

3.4 绿鲍线粒体蛋白质编码基因和相对同义密码子使用率

本研究使用无脊椎动物线粒体密码子表(The Invertebrate Mitochondrial Code), 发现绿鲍 13 个 PCGs 均使用 AUG 作为起始密码子, 使用 UAA 或 UAG 作为终止密码子, 可使用 UGA 编码色氨酸(Tryptophan, Trp, W), 可使用 AGA、AGG 编码丝氨酸(Serine, Ser, S)。其中, UAA 为 *ATP8*、*ATP6*、*COX1*、*COX3*、*ND2*、*ND3*、*ND4* 和 *ND5* 这 8 个基因的终止密码子, UAG 为 *cytB*、*COX2*、*ND1*、*ND4L*、*ND6* 这 5 个基因的终止密码子。13 个 PCGs 编码序列中除终止密码子外共有 3 718 个密码子。对其分析碱基使用频率, 密码子第

表3 鲍属线粒体基因组碱基组成

Table 3 Composition and skewness in the mitochondrial genomes of *Haliotis* genus species

物种	碱基组成/%					AT偏移	GC偏移
	A	T	C	G	A+T		
线粒体全基因组							
绿鲍 <i>Haliotis fulgens</i>	36.2	24.4	26.5	12.9	60.6	0.195	-0.345
皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	35.4	25.0	26.1	13.5	60.4	0.172	-0.318
黑足鲍 <i>Haliotis iris</i>	35.9	23.9	26.8	13.4	59.8	0.201	-0.333
黑唇鲍 <i>Haliotis rubra</i>	34.6	24.5	26.7	14.2	59.1	0.171	-0.306
绿唇鲍 <i>Haliotis laevigata</i>	23.9	33.9	14.9	27.3	57.8	-0.173	0.294
欧洲疣鲍 <i>Haliotis tuberculata</i>	34.8	25.7	25.8	13.6	60.5	0.150	-0.310
杂色鲍 <i>Haliotis diversicolor</i>	35.2	24.7	26.4	13.7	59.9	0.175	-0.317
羊鲍 <i>Haliotis ovina</i>	34.8	24.5	27.4	13.4	59.3	0.174	-0.343
红鲍 <i>Haliotis rufescens</i>	35.4	24.9	25.9	13.7	60.3	0.174	-0.308
黑鲍 <i>Haliotis cracherodii</i>	26.6	35.7	13.5	24.2	62.3	-0.146	0.284
蛋白质编码基因							
绿鲍 <i>Haliotis fulgens</i>	23.4	36.3	19.1	21.2	59.7	-0.216	0.052
皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	23.4	36.3	19.2	21.1	59.7	-0.216	0.047
黑足鲍 <i>Haliotis iris</i>	22.5	36.0	19.6	21.9	58.5	-0.231	0.055
黑唇鲍 <i>Haliotis rubra</i>	22.3	35.1	19.9	22.6	57.4	-0.223	0.064
绿唇鲍 <i>Haliotis laevigata</i>	22.2	34.5	20.4	22.8	56.7	-0.217	0.056
欧洲疣鲍 <i>Haliotis tuberculata</i>	23.7	36.1	18.9	21.3	59.8	-0.207	0.060
杂色鲍 <i>Haliotis diversicolor</i>	23.2	35.9	19.1	21.8	59.1	-0.215	0.066
羊鲍 <i>Haliotis ovina</i>	22.6	35.8	19.3	22.2	58.4	-0.226	0.070
红鲍 <i>Haliotis rufescens</i>	23.5	36.0	19.3	21.2	59.5	-0.210	0.047
黑鲍 <i>Haliotis cracherodii</i>	23.2	35.9	19.4	21.6	59.1	-0.215	0.054
tRNA基因							
绿鲍 <i>Haliotis fulgens</i>	28.1	31.0	16.9	24.0	59.1	-0.050	0.174
皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	28.2	30.5	17.3	24.0	58.7	-0.039	0.162
黑足鲍 <i>Haliotis iris</i>	27.6	30.6	17.5	24.3	58.2	-0.052	0.163
黑唇鲍 <i>Haliotis rubra</i>	27.5	30.4	17.4	24.8	57.9	-0.050	0.175
绿唇鲍 <i>Haliotis laevigata</i>	27.3	30.7	17.1	24.9	58.0	-0.059	0.186
欧洲疣鲍 <i>Haliotis tuberculata</i>	28.7	31.0	17.0	23.3	59.7	-0.039	0.156
杂色鲍 <i>Haliotis diversicolor</i>	27.2	30.8	17.2	24.9	58.0	-0.062	0.183
羊鲍 <i>Haliotis ovina</i>	27.5	31.2	17.0	24.4	58.7	-0.063	0.179
红鲍 <i>Haliotis rufescens</i>	28.3	30.5	17.4	23.8	58.8	-0.037	0.155
黑鲍 <i>Haliotis cracherodii</i>	28.0	30.8	17.1	24.1	58.8	-0.048	0.170
rRNA基因							

续表 3

物种	碱基组成/%					AT偏移	GC偏移
	A	T	C	G	A+T		
绿鲍 <i>Haliotis fulgens</i>	26.1	35.1	13.4	25.4	61.2	-0.147	0.309
皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	27.2	35.2	13.1	24.5	62.4	-0.128	0.303
黑足鲍 <i>Haliotis iris</i>	25.8	35.7	12.9	25.6	61.5	-0.161	0.330
黑唇鲍 <i>Haliotis rubra</i>	26.2	34.9	13.6	25.3	61.1	-0.142	0.301
绿唇鲍 <i>Haliotis laevigata</i>	26.3	33.9	14.3	25.6	60.2	-0.126	0.283
欧洲疣鲍 <i>Haliotis tuberculata</i>	28.0	34.4	13.2	24.4	62.4	-0.103	0.298
杂色鲍 <i>Haliotis diversicolor</i>	27.1	35.1	13.2	24.5	62.2	-0.129	0.300
羊鲍 <i>Haliotis ovina</i>	25.8	34.6	13.5	26.1	60.4	-0.146	0.318
红鲍 <i>Haliotis rufescens</i>	27.3	34.9	13.3	24.5	62.2	-0.122	0.296
黑鲍 <i>Haliotis cracherodii</i>	27.1	35.0	13.3	24.6	62.1	-0.127	0.298
假定控制区							
绿鲍 <i>Haliotis fulgens</i>	37.6	29.4	24.6	8.4	67.0	0.122	-0.491

一位点以 U 为主 (30.7%), G 次之 (26.9%); 第二位点以 U 为主 (43.5%), C 次之 (21.3%); 第三位点以 U 为主 (34.7%), A 次之 (27.4%), 3 个位点均存在明显尿嘧啶碱基偏好性。

对密码子进行相对同义密码子使用率 (Relative Synonymous Codon Usage, RSCU) 分析的结果表明, 绿鲍 13 个 PCGs 中存在 31 个偏好密码子 (RSCU>1), 所编码的 20 种氨基酸均由至少 2 种密码子编码, 除密码子 AUG (编码 Methionine, Met, M) 和 GAC (编码 Aspartic acid, Asp, D) 外, 其余 18 种氨基酸的不同偏好密码子中第 3 位为 U、A 碱基的密码子占比达 80.6% (25/31), 而且 18 种氨基酸中每一种氨基酸对应 RSCU 值最高的密码子第三位点均为 U 或 A (表 4)。

3.5 绿鲍线粒体基因组 rRNA 基因和 tRNA 基因

绿鲍 16S rRNA 基因和 12S rRNA 的序列长度分别为 1 400 bp 和 1 033 bp, 均位于 L 链。两个 rRNA 基因位于 tRNA-Leu^(CUN) 和 tRNA-Met 之间并以 tRNA-Val 间隔开, 与其他鲍属贝类一致。通过对绿鲍的 22 个 tRNA 基因进行定位及二级结构预测分析, 发现 22 个 tRNA 基因分布于 13 个 PCGs 之间, 大小从 66 bp 到 73 bp 不等。其中, 包括 2 个 tRNA-Ser, 在重链(H)和轻链(L)各 1 个; 2 个 tRNA-Leu, 均位于 L 链上且连续分布 (图 3)。此外, 发现绿鲍两对相邻的 tRNA (tRNA-Asp 与 tRNA-Lys、tRNA-Lys 与 tRNA-Ala) 间存在 1 个或 5 个核苷酸的基因重叠的现象。22 个 tRNA 基因中的 8 个由 H 链编码, 14 个由 L 链编码 (表 2, 图 3), 除 tRNA-

Ser^(AGN) 外均可折叠成典型三叶草结构, 但其中 tRNA-Asp、tRNA-Lys、tRNA-Ala、tRNA-Gln、tRNA-Cys、tRNA-Trp 的氨基酸臂、反密码子茎或 T ψ C 茎上分别存在 1 对由非互补碱基形成的错配或凸环, 而 tRNA-Ser^(AGN) 因缺失二氢尿嘧啶茎不能形成三叶草结构 (图 4)。

3.6 绿鲍线粒体基因组非编码区

在绿鲍线粒体非编码区共识别出 5 处基因序列重复区, 均位于 tRNA-Glu 和 COX3 之间, 重复序列总长为 256 bp, 最大碱基重叠数为 49 bp, 最小碱基重叠数为 2 bp。有 33 个间隔序列分布在各编码基因间, 长度大小在 1~1 010 bp 之间。在最长的 1 010 bp 间隔序列中 A+T 含量达 67.0%, 从中检测到串联重复序列, 比如 (AT)₁₅, (ATAC)₃ 等, 以及一段多聚胞嘧啶 (C)₁₇ 序列。使用 MITOS 从中发现 2 段存在回文序列的发卡结构, 一段位于基因组 16 385~16 579 之间, 从上述第 3 个 ATAC 开始, 包含 (AT)₁₅, 长度为 195 nt, 最小自由能 (Minimum Free Energy, MFE) 为 -70.3; 一段位于基因组 17 003~17 041 之间, 长度为 39 nt, MFE 为 -1.5 (图 5)。推测该 1 010 bp 长链非编码序列为控制区, 与线粒体基因组 H 链复制起始有关。

3.7 鲍属系统发育分析及绿鲍和皱纹盘鲍线粒体编码蛋白结构域比较

将绿鲍线粒体基因组全序列与已报道鲍属的线粒体全序列进行基因组水平的核苷酸序列相似性分析, 发现绿鲍与皱纹盘鲍、红鲍、黑鲍具有较高的核苷酸序列相似性 (87.90%~89.15%, 表 5)。依据线粒体

表4 绿鲍13个蛋白质编码基因密码子平均使用频率

Table 4 Total codon average usage in the thirteen protein coding genes for *Haliotis fulgens*

密码子	数量	使用率	密码子	数量	使用率	密码子	数量	使用率	密码子	数量	使用率
UCU(S)	95	2.11	GUU(V)	127	1.60	ACU(T)	67	1.48	CAA(Q)	44	1.19
UCC(S)	58	1.29	GUA(V)	75	0.94	ACA(T)	66	1.46	CAG(Q)	30	0.81
UCA(S)	52	1.15	GUG(V)	74	0.93	ACC(T)	36	0.80	CAU(H)	46	1.15
AGU(S)	50	1.11	GUC(V)	42	0.53	ACG(T)	12	0.27	CAC(H)	34	0.85
AGG(S)	38	0.84	UUA(L)	151	1.56	UUU(T)	216	1.38	AAA(K)	46	1.12
AGA(S)	34	0.75	UUG(L)	148	1.53	UUC(T)	98	0.62	AAG(K)	36	0.88
AGC(S)	18	0.40	CUA(L)	115	1.19	UAU(Y)	86	1.33	UGA(W)	60	1.10
UCG(S)	16	0.35	CUU(L)	74	0.77	UAC(Y)	43	0.67	UGG(W)	49	0.90
CGA(R)	29	1.81	CUC(L)	59	0.61	GGA(G)	92	1.31	GAA(E)	50	1.10
CGU(R)	19	1.19	CUG(L)	33	0.34	GGG(G)	92	1.31	GAG(E)	41	0.90
CGG(R)	9	0.56	GCU(A)	94	1.55	GGU(G)	69	0.99	GAC(D)	40	1.08
CGC(R)	7	0.44	GCC(A)	63	1.04	GGC(G)	27	0.39	GAU(D)	34	0.92
CCA(P)	61	1.64	GCA(A)	58	0.96	AAU(N)	77	1.29	AUG(M)	88	1.05
CCU(P)	52	1.40	GCG(A)	27	0.45	AAC(N)	42	0.71	AUA(M)	80	0.95
CCG(P)	20	0.54	UGU(C)	45	1.50	AUU(I)	145	1.19	UAA	8	1.23
CCC(P)	16	0.43	UGC(C)	15	0.50	AUC(I)	98	0.81	UAG	5	0.77

注: 黑体表示偏好密码子。

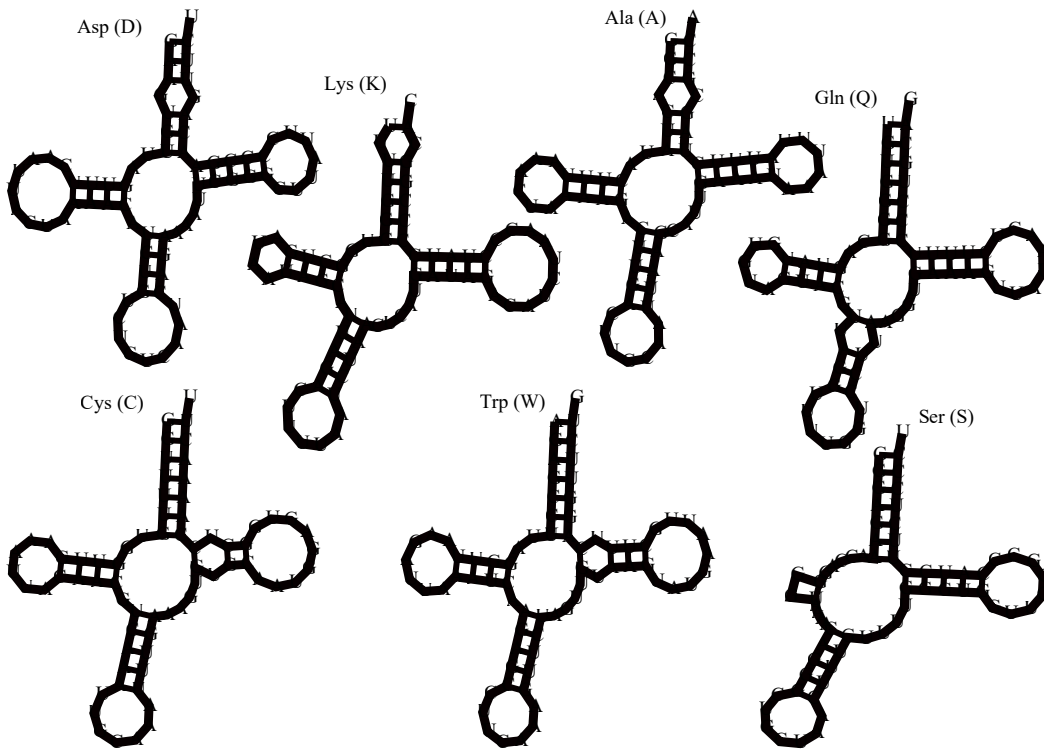


图4 绿鲍特殊 tRNA 基因二级结构

Fig. 4 The unusual secondary structures of the tRNA genes in *Haliotis fulgens*

1 AAACATTTACATCAACTTAACTGTT TAACACACCAACAAACGAAACCACA GCTGCCGTAAGTGCCTCTGTACAA
 76 TTACATACCTATTTCCCAATAATCA CTTACCTCCATTTCAACAAAAATTC ATTAGGTATTAATATCTACACAAT
 151 CATAGCAICTACTAGCACATATATC AGATCCTAGCATACCAATAACATTA TACACACACCCCTAGGTACCCACCA
 226 AGGTACCTCAACCAAGGTACCTCAA GCACATTACTATCCATATTACTCAT GCTAGACACCCGGCCTATATAAAT
 301 GTATACATCTTGGGCACGGAACACG TACATACACCAGGTACCGAAATACA TACATACATATATATATATATGAT
 376 ATATATATATATATATACTGGGTAC CGAAATATATACATATATATATATA TATATATATATACTGGGTACCGAAA
 451 TATATACATACATATATATATATAT ATATATATATACTGGGTACCGAAAT ATATACATACATATATATATATA
 526 TATATATATATATATATATATATAT CCTAATTATTCCACACCTTTTCTA ACTCCTCACTGTTAACACTTTATA
 601 TTTAACGCCAAATGCCCTAAAACCC CCGTTTTTACGCCCTGTTTACCACG GAATCCCCTTCCGACCCCTCCCTCC
 676 CCCCCCTTCCGGAGCAATTTAATCA TTCAAGGAAGCTGACCATAATAAAC CTCAACACCTACACTCCCCAGGTC
 751 TGCCCCAATTTACTACACCAAAATTT AACTTAAAAATCTACATTTAAATCA AATTACAAGAAATTCATAAAATTA
 826 AITTACCCCTTTTACCTATTTTTT ACCTAATTTTTAAGGACACTAAAAAT AAAGGGCATTCTTTACCTATTCCC
 901 ACCAAACCTAACACTAAAACACAAA GAAATTTAAAAATCTGTTAGACA ACATTATCAAATCTTACGGGGCTAA
 976 TTAAACAGTTTTTTACCATAAAAGT GACTACAGAA 1 010



图 5 绿鲍线粒体控制区序列及结构特征示意图

Fig. 5 Schematic map of the control region sequences and characteristics of *Haliotis fulgens*

下划线表示存在回文序列的两个发卡结构序列, 下方为对应的发卡结构

Underline shows the sequences of two hairpin structures containing palindromes and bottom is the corresponding hairpin structures

全基因组构建的系统发育树如图 6 所示, 10 种鲍分属两个类群, 其中绿鲍与皱纹盘鲍、红鲍、黑鲍及黑足鲍聚为一个分支, 表明以上鲍种亲缘关系较近。

将绿鲍及其近缘种皱纹盘鲍 (GenBank 登录号: KF724723.1) 的 13 个线粒体编码蛋白进行序列相似性计算和结构域对比, 发现二者所编码蛋白质均小于 600 个氨基酸。细胞色素相关蛋白均含有各自的

特征 pfam 结构域且相对保守, 氨基酸序列相似性为 98.42%~100%; ATP 相关蛋白 ATP8 氨基酸序列相似性最低, 为 90.74%, ATP6 氨基酸序列相似性较高, 为 99.13%; 两种鲍各 NADH 脱氢酶亚基氨基酸序列相似性为 93.02%~98.99%, 除了含有各自特征的氧化、还原结构域外, ND2、ND4、ND5、ND6 含有跨膜结构域, ND6 含有信号肽序列, 其中绿鲍 ND2 蛋白氨基端

表 5 基于线粒体全序列的 10 种鲍种间核酸相似性

Table 5 Nucleotide sequence identity among 10 species of abalone based on whole mitochondrial genome

物种	核酸相似性/%									
绿鲍 <i>Haliotis fulgens</i>	100									
皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	89.15	100								
黑足鲍 <i>Haliotis iris</i>	82.86	83.41	100							
黑唇鲍 <i>Haliotis rubra</i>	80.94	80.97	80.73	100						
绿唇鲍 <i>Haliotis laevigata</i>	80.80	80.66	80.23	91.89	100					
欧洲疣鲍 <i>Haliotis tuberculata</i>	81.51	81.39	81.32	83.84	83.37	100				
杂色鲍 <i>Haliotis diversicolor</i>	81.03	80.77	80.16	83.09	82.80	82.59	100			
羊鲍 <i>Haliotis ovina</i>	80.10	79.95	79.06	82.14	81.92	81.36	81.54	100		
红鲍 <i>Haliotis rufescens</i>	88.16	90.94	83.41	81.51	81.12	81.61	81.59	80.75	100	
黑鲍 <i>Haliotis cracherodii</i>	87.90	90.03	83.46	81.25	80.98	81.19	80.64	80.55	91.62	100



图6 鲍属线粒体基因组 NJ 系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on the neighbor-joining (NJ) analysis of *Haliotis* genus whole mitochondrial genomes

较皱纹盘鲍少 1 个跨膜结构域, 绿鲍 ND4 蛋白羧基 端较皱纹盘鲍多 1 个跨膜结构域(图 7)。

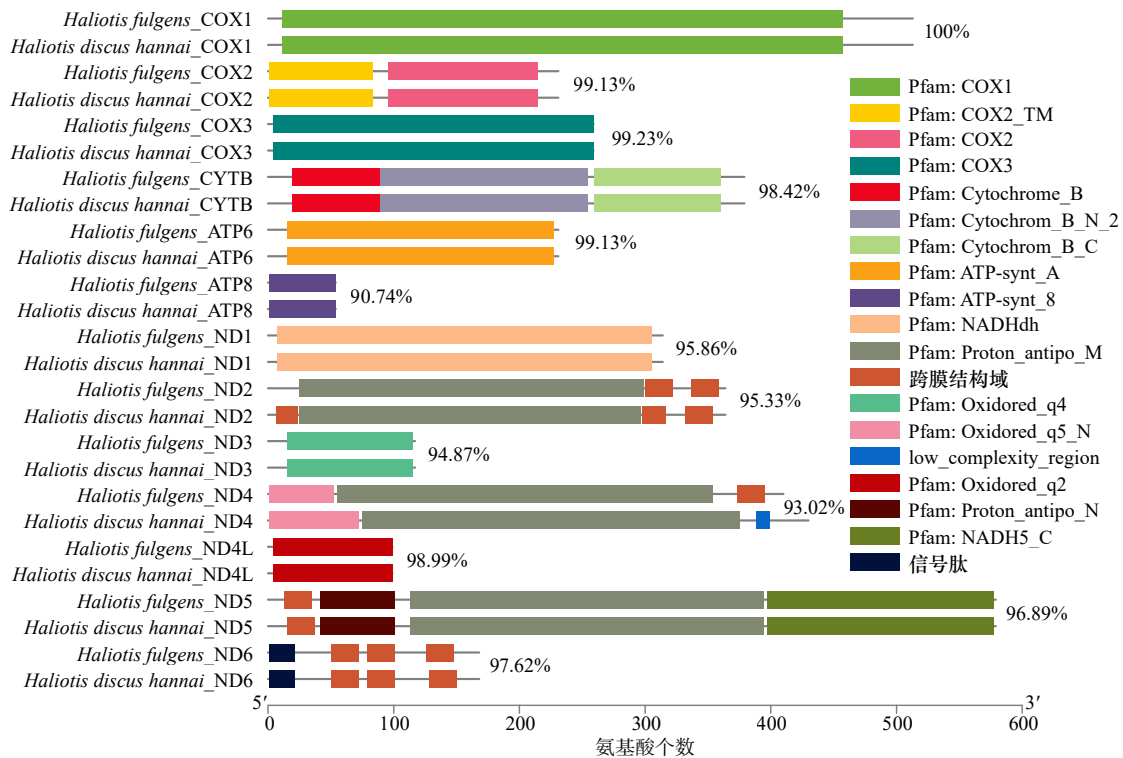


图7 绿鲍与皱纹盘鲍线粒体蛋白质氨基酸序列相似性及二级结构比较

Fig. 7 Comparison of amino acid sequence identity and secondary structure of mitochondrial proteins between *Haliotis fulgens* and *Haliotis discus hannai*

4 讨论

本研究采用二代高通量测序技术首次获得了绿鲍线粒体基因组全序, 与近年来二代测序获得的绿唇鲍^[11]、皱纹盘鲍^[12]和羊鲍^[29]以及早期一代测序拼接获得的杂色鲍^[26]、黑足鲍^[28]等的线粒体基因组相比, 绿鲍线粒体基因组全长 17 041 bp, 长度在已测序鲍属物种线粒体基因组长度范围内(表 1), 可编码 37 个基因, 这些编码基因及其排列顺序与其他鲍相同^[11-12, 24-29]。比较鲍属不同物种 37 个编码基因的碱基组成发现, AT 偏移均为负而 GC 偏移均为正(表 3), 表明碱基 T 和 G 出现的频率分别大于 A 和 C, 这种现

象广泛存在于牡蛎(*Crassostrea virginica*)、扇贝(*Chlamy farreri*)等软体动物线粒体基因组中^[43], 但在大多数脊椎动物中 A 和 C 出现的频率分别大于 T 和 G^[44]。有报道称这种碱基偏移通常是由复制中的非对称定向突变和选择压力造成^[45]。

线粒体基因组 AT 含量大于 GC 含量是后生动物线粒体基因组的普遍特征^[46], 典型的无脊椎动物的密码子偏好以 A 或 U 结尾^[47]。软体动物绿鲍同其他鲍属物种的线粒体基因组也不例外, 这种趋势也体现在蛋白质编码基因的碱基组成中。绿鲍 13 种蛋白质编码基因密码子第三位的 AT 含量高达 62.1%, 除了编码蛋氨酸和天冬氨酸外的 18 种氨基酸的偏好密码子

中 RSCU 值最高的密码子都是 U 或 A。密码子第三位 AT 含量较高的现象在多种异齿亚纲贝类中存在^[48], 在腹足类贝类线粒体 PCGs 中也较为常见^[26,49-50]。该现象可能与密码子第三位的摆动性有关, 参考克里克摆动假说 (the wobble hypothesis), 反密码子第一位可以与密码子第三位允许非标准碱基配对, 如 G 与 U/C、U 与 A/G 配对^[51]。在绿鲍中除了起始密码子 AUG 对应的反密码子第一位为 C, 其余反密码子第一位均不为 C, 当 PCGs 中偏好密码子以 U 或 A 结尾时, 可较快速与 tRNA 上的反密码子配对, 或有利于核糖体快速扫描高效翻译。

在线粒体基因组中可供选择的起始密码子包括 AUG、AUC、AUU、CUA、CUU、UUA、GUG、UUG 等^[48,52]。某些情况下, 准确鉴定起始密码子是比较困难的, 特别是在这个区域出现多个可选择的起始密码子时^[53]。AUN 作为后生动物传统起始密码子^[54], 在鲍属物种线粒体 PCG 中使用较多的为 AUG 和 AUA, 后者较多作为 NADH 氧化还原酶亚基相关基因的起始密码子, 如黑唇鲍 *ND1* 和 *ND5*^[24]、欧洲疣鲍的 *ND4L*^[25]、皱纹盘鲍 *ND4* 和 *ND5*^[12,27]。绿鲍的 13 个 PCG 均以 AUG 为起始密码子, 可能与注释线粒体时所用软件的算法或版本有关。不同鲍种 (包括绿鲍) 的终止密码子均为 UAA 或 UAG, 没有发现其他经济贝类如西施舌中出现的不完全终止密码子 TA 或 T^[55]。绿鲍所使用的起始密码子和终止密码子均为鲍属贝类常见密码子, 是自然选择和适应性进化的结果。

动物线粒体基因组基因排列紧凑, 基因间隔较小, 普遍存在基因重叠现象。在哺乳动物中的基因重叠被认为具有防止基因顺序重排和基因在进化中丢失的作用, 以免对生物体造成有害影响^[56]。在无脊椎动物蜈蚣 (*Seculamonas ecuadoriensis*)^[57]、冠蚌 (*Cristaria plicata*)^[58]、仿刺参 (*Apostichopus japonicus*)^[59] 等各类群物种中也存在基因重叠现象, 或具有与哺乳动物中的相似作用。在鲍属物种线粒体编码基因中, 同样存在不同 tRNA 间或 tRNA 与 PCG 间的基因重叠, 如皱纹盘鲍 tRNA-Lys 与 tRNA-Ala 存在 4 nt 重叠、tRNA-His 与 *ND5* 存在 3 nt 重叠^[12], 杂色鲍 tRNA-His 与 *ND5* 存在 3 nt 重叠^[26]。在绿鲍中同样存在这一现象, 如 tRNA-Asp 与 tRNA-Lys 存在 1 nt 重叠、tRNA-Lys 与 tRNA-Ala 存在 5 nt 重叠。在软体动物线粒体 tRNA 的二级结构中存在缺失二氢尿嘧啶茎环或 T ψ C 茎环的特殊现象^[60], 其中 tRNA-Ser^(AGN) 因通常缺失二氢尿嘧啶茎环, 而不具有经典三叶草结构^[61], 不同鲍种的 tRNA-Ser^(AGN) 常存在该现象, 比如黑唇鲍和杂色鲍的

tRNA-Ser^(AGN), 而这一现象在绿鲍 tRNA-Ser^(AGN) 中同样存在。有报道称后生动物中, 线粒体 tRNA 可通过转录后编译修复缺失的臂, 从而形成典型三叶草结构^[62]。此外, 在 tRNA 中除了常见的沃森—克里克碱基配对和 RNA 中的 GU 配对外, 还存在诸如 UC、GC、AC、GG、UU 等配对或错配凸环现象, 如黑唇鲍 tRNA-Arg 和 tRNA-Lys 中存在 UC、GC、AC 等^[24], 皱纹盘鲍和黑足鲍 tRNA-Asp、tRNA-Ala 中存在 GG、AC 等^[28]。本研究发现绿鲍中有 6 个 tRNA 存在该现象 (图 4), 而且 tRNA-Asp、tRNA-Ala、tRNA-Cys、tRNA-Trp 与房孝宁^[28] 报道的皱纹盘鲍和黑足鲍中对应 tRNA 碱基错配或凸环位置完全一致, 推测这 4 个 tRNA 序列比较保守。

脊椎动物线粒体非编码区或控制区中存在较保守的控制区特征, 而无脊椎动物中对应区域的序列并不保守, 存在很多变化^[63], 在非编码区仅包含一些类似脊椎动物控制区中存在的特征, 如串联重复序列、发卡结构等, 其具体位置和调控功能尚不明确^[64]。在软体动物牡蛎^[65]、扇贝^[66]、鸟尾蛤 (*Acanthocardia tuberculata*)^[67] 等的线粒体最长非编码区中都有存在串联重复序列的报道。有关鲍属线粒体非编码区或控制区的研究较少, 有报道评估了黑唇鲍线粒体基因组假定控制区的大小, 在其中发现一段可能由 GC 富集区隔开的 (AT)_n 串联重复序列^[24]。本研究在绿鲍假定控制区中, 发现部分 (AT)_n 串联重复序列, 部分可形成带有回文序列的发卡结构, 其后为含有多聚胞嘧啶的 GC 富集区, 末尾再次出现发卡结构 (图 5), 与上述黑唇鲍控制区的序列特征存在一定的相似性, 推测在线粒体复制中可起到调控作用, 有待进一步研究。

随着鲍属贝类线粒体基因研究的深入和基因组全序列的丰富, 其系统发育研究日趋完善。早期仅可用部分线粒体基因片段, 如 Wormhoudt 等^[25] 对 17 种鲍及亚种联合使用线粒体基因 *COXI*、16S rRNA 和核基因 *ITS1* 构建 PHYML 树进行系统发育分析。随着近年来公布的线粒体基因组序列增多, Xin 等^[26] 对包括 4 种鲍属贝类 (杂色鲍、皱纹盘鲍、黑唇鲍和欧洲疣鲍) 的腹足类物种进行了系统发育分析; 房孝宁^[28] 对腹足纲 51 个种 (包括鲍属 6 个种) 的 13 个 PCG 进行 NJ 法系统发育分析, 并在鲍属中发现皱纹盘鲍与黑足鲍具有较近的亲缘关系并聚为一支; Guo 等^[27] 将其所测的皱纹盘鲍线粒体全序列, 与采自韩国巨济的皱纹盘鲍样本^[12] 进行全序列比较, 并与之前报道的 7 种鲍线粒体基因组 (新增红鲍) 提取 13 个 PCGs 核酸序列进行最大似然法建树分析, 在其构建的系统发育树中皱纹盘鲍、红鲍和黑足鲍聚为一支。使用本研究所获得的绿鲍线粒体基因组序列与数据库中的

其他9种鲍的线粒体基因组序列进行线粒体基因组水平的序列相似性分析,发现绿鲍与皱纹盘鲍、红鲍、黑鲍间的序列相似性在87.90%~89.15%。进行10种鲍基因组全序列的系统发育树构建与之前报道的分析结果类似^[25,27],也与上文仅用*cytB*构建的系统发育树基本一致,即绿鲍与皱纹盘鲍、红鲍、黑鲍和黑足鲍聚为一支,黑唇鲍、绿唇鲍、欧洲疣鲍、杂色鲍和羊鲍聚为一支。其中绿鲍所在分支均为北太平洋沿岸类群,推测鲍种亲缘关系的远近与其地理分布远近具有较大关系,有待获得更多鲍属线粒体基因组序列后加以确定。

比较绿鲍和皱纹盘鲍的13个PCGs氨基酸序列及对应的结构域,发现二者*ND2*、*ND4*的跨膜结构域数量不同。*ND2*、*ND4*都是NADH氧化还原酶亚基之一,作为线粒体内膜呼吸链的重要组成部分,参与机体的能量代谢^[61]。绿鲍分布于中低纬度海域,较适应高温环境,其自身能量代谢水平较高,而皱纹盘鲍

分布于较高纬度海域,环境水温相对较低,其能量代谢水平也较低。而上述*ND2*、*ND4*结构域数量差异产生的蛋白功能差异或与两个物种长期适应性进化中产生的高温耐受性差异有关,这与不同水温环境下的海洋或淡水双壳贝类因线粒体部分基因的序列差异产生的能量代谢水平差异类似^[68]。这种种间线粒体基因序列差异产生的蛋白结构和功能差异有待进一步研究。

5 结论

本研究首次获得了养殖绿鲍自繁殖贝的线粒体基因组全序列,提供了有关绿鲍线粒体基因结构特点和碱基组成、密码子使用情况、tRNA二级结构、假定控制区的串联重复序列及二级结构等的详实数据,为鲍种分类和种质鉴定、良种选育和杂交育种提供理论支撑,也为后续研究绿鲍遗传进化模式和种质资源保护提供参考。

参考文献:

- [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. 2022中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022. Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2022 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022.
- [2] Franchini P, Slabbert R, Merwe M V D, et al. Karyotype and genome size estimation of *Haliotis midae*: estimators to assist future studies on the evolutionary history of Haliotidae[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2010, 29(4): 945–950.
- [3] Geiger D L. Distribution and biogeography of the recent Haliotidae (Gastropoda: Vetigastropoda) world-wide[J]. *Bollettino Malacologico*, 1999, 35: 57–118.
- [4] 赖龙玉, 严正凇. 鲍遗传育种研究进展[J]. *福建农业学报*, 2013, 28(12): 1303–1309. Lai Longyu, Yan Zhenglin. Advances in genetics and breeding of abalone[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28(12): 1303–1309.
- [5] 王子臣. 红鲍、绿鲍引种初步成功[J]. *大连水产学院学报*, 1986(6): 93–94. Wang Zichen. Transplantations of American abalones, *Haliotis rufescens* and *H. fulgens* from U. S. A. to China[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 1986(6): 93–94.
- [6] 许国领, 劳赞, 杨小立. 美国绿鲍驯育和人工育苗[J]. *热带海洋*, 1989, 8(3): 75–81. Xu Guoling, Lao Zan, Yang Xiaoli. A preliminary summary on the climatization and seed culture of green abalone[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 1989, 8(3): 75–81.
- [7] 范飞龙. 绿鲍的引种及与皱纹盘鲍的种间杂交研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2012. Fan Feilong. The introduction of *Haliotis fulgens* and the research of hybridization between *Haliotis fulgens* and *Haliotis discus hannai*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2012.
- [8] 郭勃. 皱纹盘鲍与绿鲍杂交、回交后代的分子鉴定及性腺发育的初步研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2015. Guo Qing. Molecular identification of *Haliotis discus hannai*, *Haliotis fulgens* and their hybrids and backcross and the preliminary research of gonadal development of them[D]. Xiamen: Xiamen University, 2015.
- [9] You Weiwei, Guo Qing, Fan Feilong, et al. Experimental hybridization and genetic identification of Pacific abalone *Haliotis discus hannai* and green abalone *H. fulgens*[J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 243–249.
- [10] Jex A R, Hall R S, Littlewood D T J, et al. An integrated pipeline for next-generation sequencing and annotation of mitochondrial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(2): 522–533.
- [11] Robinson N A, Hall N E, Ross E M, et al. The complete mitochondrial genome of *Haliotis laevigata* (Gastropoda: Haliotidae) using MiSeq and HiSeq sequencing[J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2016, 27(1): 437–438.
- [12] Yang E C, Nam B H, Noh S J, et al. Complete mitochondrial genome of Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) from Korea[J]. *Mitochondrial DNA*, 2015, 26(6): 917–918.
- [13] 张国范, 常亚青, 赵艳. 海洋动物线粒体DNA研究进展[J]. *海洋科学*, 1997(1): 25–28. Zhang Guofan, Chang Yaqing, Zhao Yan. A perspective of mitochondrial DNA research in marine animals[J]. *Marine Sciences*, 1997(1):

- 25–28.
- [14] 周传江, 马爱喆, 汪曦, 等. 鱼类线粒体基因组研究进展[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2019, 47(2): 74–82.
Zhou Chuanjiang, Ma Aizhe, Wang Xi, et al. Progress on fish mitochondrial genome[J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 47(2): 74–82.
- [15] 梁日深, 杨杰鑫, 谢瑞琳, 等. 巨石斑鱼与斜带石斑鱼线粒体基因组测序及物种有效性分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2022, 52(6): 50–61.
Liang Rishen, Yang Jieluan, Xie Ruilin, et al. Complete mitochondrial genomes of *Epinephelus tauvina* and *E. coioides* and their species validity[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2022, 52(6): 50–61.
- [16] 朱雷宇, 朱志煌, 朱陇强, 等. 龙虾科物种线粒体基因组特征和系统发育分析[J]. 中国水产科学, 2022, 29(4): 525–534.
Zhu Leiyu, Zhu Zhihuang, Zhu Longqiang, et al. Characteristics and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome in Palinuridae[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(4): 525–534.
- [17] 李加爱, 陈丽彬, 柳斌彬, 等. 钝齿螯线粒体基因组全序列测定及系统发育分析[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2021, 40(3): 198–208.
Li Jiaai, Chen Libin, Liu Binbin, et al. The complete mitochondrial genome of *Charybdis hellerii* (Brachyura: Portunidae) and phylogenetic analysis[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2021, 40(3): 198–208.
- [18] 颜成瑞, 苗菁, 叶莹莹. 14种帘蛤科贝类线粒体基因组特征与系统进化分析[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2021, 40(4): 285–292.
Yan Chengrui, Miao Jing, Ye Yingying. Mitochondrial genomic characteristics and phylogenetic analysis of 14 species of Veneridae[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2021, 40(4): 285–292.
- [19] 史宝, 柳学周, 刘永山, 等. 黄条鲷线粒体全基因组测序及结构特征分析[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 405–415.
Shi Bao, Liu Xuezhou, Liu Yongshan, et al. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of *Seriola aureovittata*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 405–415.
- [20] 毛明光, 顾杰, 刘瑞婷, 等. 太平洋鳕线粒体全基因组测序及结构特征分析[J]. 水生生物学报, 2019, 43(1): 17–26.
Mao Mingguang, Gu Jie, Liu Ruiting, et al. Analysis of complete mitochondrial genome sequences of *Gadus macrocephalus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(1): 17–26.
- [21] 杜诗雨, 张康琴, 潘达, 等. 格氏束腰蟹(*Somanniathelphusa grayi*)的线粒体基因组序列测定和基因顺序进化研究[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2022, 45(1): 86–95.
Du Shiyu, Zhang Kangqin, Pan Da, et al. The mitochondrial genome of *Somanniathelphusa grayi* and the evolution of gene order[J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2022, 45(1): 86–95.
- [22] 韩振勇. 丽蚌属线粒体基因组双单亲遗传研究与淡水蚌系统进化分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
Han Zhenyong. Research of DUI in lamprotula mtDNA and phylogenomics analysis of unionoida[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [23] Zhong Shengping, Huang Guoqiang, Liu Yonghong, et al. The complete mitochondrial genome of marine gastropod *Melo melo* (Neogastropoda: Volutoidea)[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2019, 4(2): 4161–4162.
- [24] Maynard B T, Kerr L J, Mckiernan J M, et al. Mitochondrial DNA sequence and gene organization in the Australian blacklip abalone *Haliotis rubra* (Leach)[J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(6): 645–658.
- [25] Van Wormhoudt A, Le Bras Y, Huchette S. *Haliotis marmorata* from Senegal; a sister species of *Haliotis tuberculata*: morphological and molecular evidence[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, 37(6): 747–755.
- [26] Xin Yi, Ren Jianfeng, Liu Xiao. Mitogenome of the small abalone *Haliotis diversicolor* Reeve and phylogenetic analysis within Gastropoda[J]. *Marine Genomics*, 2011, 4(4): 253–262.
- [27] Guo Zhansheng, Ding Yi, Han Leng, et al. Characterization of the complete mitochondrial genome of Pacific abalone *Haliotis discus hannai*[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2019, 4(1): 717–718.
- [28] 房孝宁. 皱纹盘鲍、黑足鲍及杂交F₁代线粒体基因组测序及系统发育价值的研究[D]. 威海: 山东大学, 2016.
Fang Xiaoning. Research on sequencing of mitogenome and phylogenetic analysis within *Haliotis discus hannai* Ino, *Haliotis iris* martyn and hybrid F₁[D]. Weihai: Shandong University, 2016.
- [29] 逯峰. 羊鲍线粒体全基因组序列测定及幼体附着影响因素的分析[D]. 海口: 海南大学, 2020.
Lu Feng. Sequencing and analysis of complete mitochondrial genome of *Haliotis ovina*[D]. Haikou: Hainan University, 2020.
- [30] Gutiérrez-Gonzalez J L, Cruz P, Rio-Portilla M A D, et al. Genetic structure of green abalone *Haliotis fulgens* population off Baja California, Mexico[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2007, 26(3): 839–846.
- [31] Mejía-Ruiz P, Perez-Enriquez R, Mares-Mayagoitia J A, et al. Population genomics reveals a mismatch between management and biological units in green abalone (*Haliotis fulgens*)[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9722.
- [32] Moore J D, Juhász C I, Robbins T T, et al. Green abalone, *Haliotis fulgens* infected with the agent of withering syndrome do not express disease signs under a temperature regime permissive for red abalone, *Haliotis rufescens*[J]. *Marine Biology*, 2009, 156(11): 2325–2330.
- [33] Mazariegos-Villarreal A, Casas-Valdez M, Siqueiros-Beltrones D A, et al. Changes in the natural diet of green abalone *Haliotis fulgens* during the 1997 to 1998 El Niño event in Baja California Sur, Mexico[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2012, 31(3): 795–800.
- [34] Serviere-Zaragoza E, Pérez-Estrada C J, Aranda D A. Status of the digestive gland and feed index in juvenile green abalone *Haliotis ful-*

- gens* fed rehydrated macroalgae[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(4): 767–775.
- [35] Tripp-Valdez M A, Harms L, Pörtner H O, et al. *De novo* transcriptome assembly and gene expression profile of thermally challenged green abalone (*Haliotis fulgens*: Gastropoda) under acute hypoxia and hypercapnia[J]. *Marine Genomics*, 2019, 45: 48–56.
- [36] Calderón-Liévanos S, Lluch-Cota S E, Hernández-Saavedra N Y, et al. Responses of the green abalone *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845) to sudden and recurring extreme environmental variations[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2021, 40(1): 127–136.
- [37] Vélez-Arellano N, Valenzuela-Quiñonez F, García-Domínguez F A, et al. Long-term analysis on the spawning activity of green (*Haliotis fulgens*) and pink (*Haliotis corrugata*) abalone along the central west coast of Baja California[J]. *Fisheries Research*, 2020, 228: 105588.
- [38] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [39] Donath A, Jühling F, Al-Arab M, et al. Improved annotation of protein-coding genes boundaries in metazoan mitochondrial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(20): 10543–10552.
- [40] Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(2): 573–580.
- [41] Greiner S, Lehwark P, Bock R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3. 1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W59–W64.
- [42] Chen Chengjie, Chen Hao, Zhang Yi, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202.
- [43] Xu Kefeng, Kanno M, Yu Hong, et al. Complete mitochondrial DNA sequence and phylogenetic analysis of Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Bivalvia: Pectinidae)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(5): 3067–3074.
- [44] Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, et al. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system[J]. *Gene*, 1999, 238(1): 195–209.
- [45] Perna N T, Kocher T D. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1995, 41(3): 353–358.
- [46] Yu Hong, Li Qi. Complete mitochondrial DNA sequence of *Crassostrea nippona*: comparative and phylogenomic studies on seven commercial *Crassostrea* species[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(2): 999–1009.
- [47] Brown W M. The mitochondrial genome of animals[M]//MacIntyre R J. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Plenum, 1985: 95–130.
- [48] 远洋. 九种异齿亚纲贝类线粒体基因组研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Yuan Yang. Studies on complete mitochondrial genomes of nine subclass Heterodonta species[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
- [49] Terrett J A, Miles S, Thomas R H. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Pulmonata)[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 42(2): 160–168.
- [50] Jannotti-Passos L K, Ruiz J C, Caldeira R L, et al. Phylogenetic analysis of *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda)[J]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010, 105(4): 504–511.
- [51] Crick F H C. Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1966, 19(2): 548–555.
- [52] Ren Jianfeng, Liu Xiao, Jiang Feng, et al. Unusual conservation of mitochondrial gene order in *Crassostrea* oysters: evidence for recent speciation in Asia[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10: 394.
- [53] Ren Jianfeng, Shen Xin, Jiang Feng, et al. The mitochondrial genomes of two scallops, *Argopecten irradians* and *Chlamys farreri* (Mollusca: Bivalvia): the most highly rearranged gene order in the family Pectinidae[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2010, 70(1): 57–68.
- [54] Wolstenholme D R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution[J]. *International Review of Cytology*, 1992, 141: 173–216.
- [55] 孟学平, 申欣, 赵娜娜, 等. 漳州西施舌线粒体基因组全序列: 腔蛤蛎属(*Coelomaetra*)存在新种的证据[J]. *海洋学报*, 2013, 35(3): 204–214.
Meng Xueping, Shen Xin, Zhao Nana, et al. The complete mitochondrial genome of Zhangzhou *Coelomaetra antiquata*: the evidence of a new species in genus *Coelomaetra* (Mollusca: Mactridae)[J]. *Haiyang Xuebao*, 2013, 35(3): 204–214.
- [56] Uda K, Komeda Y, Koyama H, et al. Complete mitochondrial genomes of two Japanese precious corals, *Paracorallium japonicum* and *Corallium konojoi* (Cnidaria, Octocorallia, Coralliidae): notable differences in gene arrangement[J]. *Gene*, 2011, 476(1/2): 27–37.
- [57] Leigh J, Lang B F. Mitochondrial 3' tRNA editing in the jakobid *Seculamonas ecuadoriensis*: a novel mechanism and implications for tRNA processing[J]. *RNA*, 2004, 10(4): 615–621.
- [58] 蒋文彬, 李家乐, 郑润玲, 等. 褶皱冠蚌线粒体基因组全序列分析[J]. *遗传*, 2010, 32(2): 153–162.
Jiang Wenping, Li Jiale, Zheng Runling, et al. Analysis of complete mitochondrial genome of *Cristaria plicata*[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2010, 32(2): 153–162.
- [59] 李云峰, 李梦遥, 王健, 等. 仿刺参线粒体全基因组序列结构及比较研究[J]. *水产科学*, 2012, 31(8): 454–462.
Li Yunfeng, Li Mengyao, Wang Jian, et al. Comparative structure of complete mitochondrial genome in sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(8): 454–462.
- [60] Yamazaki N, Ueshima R, Terrett J A, et al. Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of gene organizations of Euhadra, Cepaea and Albinaria and implications of unusual tRNA secondary structures[J]. *Genetics*, 1997, 145(3): 749–758.
- [61] Boore J L. Animal mitochondrial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(8): 1767–1780.

- [62] Segovia R, Pett W, Trewick S, et al. Extensive and evolutionarily persistent mitochondrial tRNA editing in velvet worms (phylum onychophora)[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2873–2881.
- [63] Hoffmann R J, Boore J L, Brown W M. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*[J]. *Genetics*, 1992, 131(2): 397–412.
- [64] Yuan Yang, Li Qi, Kong Lingfeng, et al. The complete mitochondrial genome of the grand jackknife clam, *Solen grandis* (Bivalvia: Solenidae): a novel gene order and unusual non-coding region[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(2): 1287–1292.
- [65] Milbury C A, Gaffney P M. Complete mitochondrial DNA sequence of the eastern oyster *Crassostrea virginica*[J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(6): 697–712.
- [66] La Roche J, Snyder M, Cook D I, et al. Molecular characterization of a repeat element causing large-scale size variation in the mitochondrial DNA of the sea scallop *Placopecten magellanicus*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1990, 7(1): 45–64.
- [67] Dreyer H, Steiner G. The complete sequences and gene organisation of the mitochondrial genomes of the heterodont bivalves *Acanthocardia tuberculata* and *Hiatella arctica*—and the first record for a putative atpase subunit 8 gene in marine bivalves[J]. *Frontiers in Zoology*, 2006, 3: 13.
- [68] 宋文涛, 高祥刚, 李云峰, 等. 双壳贝类线粒体基因组结构的比较[J]. *遗传*, 2009, 31(11): 1127–1134.
Song Wentao, Gao Xianggang, Li Yunfeng, et al. Comparison of mitochondrial genomes of bivalves[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2009, 31(11): 1127–1134.

Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of green abalone (*Haliotis fulgens*)

Guo Rui^{1,2}, Zhang Shanpi^{1,2}, Cai Leiming^{1,2}, Yang Xiaoqiang^{1,2}, Wang Wei^{1,2}, Jiang Xiaobin^{1,2},
Lin Qin³, Lin Feng³, Lin Zhelong³

(1. Marine and Fisheries Technology Research Center, Institute of Oceanography of Fuzhou, Fuzhou 350108, China; 2. Fuzhou Ocean and Fisheries Technology Center, Fuzhou 350007, China; 3. Fujian Lianjiang Guanwu Marine Products and Development Co., Ltd., Lianjiang 350511, China)

Abstract: To identify abalone species effectively for better management and protection of abalone germplasm resources, we have obtained the complete mitochondrial genome of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens*) through high-throughput sequencing, and its sequences and structural characteristics are analyzed accordingly. The results show that the mitogenome of *H. fulgens* is 17 041 bp in total length and encoded 37 genes, including 13 protein coding genes, 22 transfer RNA (tRNA) genes and 2 ribosomal RNA (rRNA) genes. The 13 protein coding genes used AUG as the starting codon and UAA or UAG as the termination codon. Twenty-one tRNA genes other than tRNA-Ser^(AGN) could be folded into a typical cloverleaf structure. There is a rich A+T non-coding region between tRNA-Glu and *COX3*, with two hairpin structures containing palindromes in it. A phylogenetic tree was constructed based on the reported complete mitochondrial genome sequences of *Haliotis* genus species, and phylogenetic analysis shows that *H. fulgens* is clustered with *H. discus hannai*, *H. rufescens* and *H. cracherodii*. Comparing the domains of 13 proteins of mitogenome of *H. fulgens* and *H. discus hannai*, we found the number of transmembrane domains of *ND2* or *ND4* dehydrogenase subunits were different in them. Whether this is related to the difference of high temperature tolerance between them needs further study. In brief, the first acquisition and analysis of the complete mitochondrial genome of *H. fulgens* has enriched the abalone cellular genetic information, and provided basic data and references for abalone species classification, germplasm identification, and protection of germplasm resources of *H. fulgens* as well.

Key words: *Haliotis fulgens*; mitochondrial genome; genome composition; phylogeny; domain