

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2011.03.013

· 研究简报 ·

## 虾夷扇贝线粒体遗传模式的初步研究

徐科凤<sup>1</sup>, 李琪<sup>2</sup>, 王国栋<sup>3</sup>

(1. 青岛国家海洋科学研究中心, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;  
3. 青岛水族馆, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 动物线粒体遗传模式主要为母系遗传。近年来在一些双壳类(如贻贝科、蚌科和帘蛤科)中发现了线粒体双重单亲遗传现象。双重单亲遗传完全不同于传统的母系遗传模式,它开启了一种独特的系统来检测进化力在线粒体基因组中的作用。但双重单亲遗传是否广泛存在于双壳类尚属未知。文章研究了虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)的线粒体遗传模式,结果显示,同一个体中体细胞和性腺的线粒体片段的基因型不存在差异;家系检测中也显示子代的线粒体单倍型与母本一致;在虾夷扇贝线粒体中未发现双重单亲遗传现象。

**关键词:** 虾夷扇贝; 线粒体 DNA; 母性遗传; 双重单亲遗传

中图分类号: Q 244

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2011)03-0072-04

## Inheritance of mitochondrial DNA in Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*

XU Kefeng<sup>1</sup>, LI Qi<sup>2</sup>, WANG Guodong<sup>3</sup>

(1. National Oceanographic Center of Qingdao, Qingdao 266071, China; 2. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Qingdao Aquarium, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** For animals, the inheritance of mitochondrial DNA (mtDNA) is predominantly maternal. Recently, doubly uniparental inheritance (DUI) of mtDNA in some bivalves (the families Mytilidae, Unionidae and Veneridae) has been discovered. The discovery of DUI of mtDNA has challenged the traditional maternal inheritance and established a unique system to test for evolutionary forces acting on mitochondrial genomes. However, whether DUI of mtDNA is widely distributed among bivalves is uncertain. In this paper, the mitochondrial inheritance model of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* was investigated. The results suggest that there is no difference in the mtDNA between somatic and gametic tissues in the same individual. The family test shows that mitochondrial haplotypes of offspring (D-shaped larvae) are the same as those of mothers. No evidence for DUI of mtDNA in *P. yessoensis* is found.

**Key words:** *Patinopecten yessoensis*; mitochondrial DNA; maternal inheritance; DUI

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是动物体内唯一的核外遗传物质,拷贝数多,突变率高,编码的 37 个基因包括 13 条多肽、22 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因,全部参与线粒体内膜呼吸链复合体氧化磷酸化能量代谢过程,合成 ATP 为细胞提供能量<sup>[1]</sup>。线粒体基因组的遗传特

点,使其成为研究真核生物分子地理学、群体遗传学、发育生物学和分子系统进化的重要手段<sup>[2-4]</sup>。

长期以来普遍认为 mtDNA 基因组呈现严格的母系遗传,即后代的 mtDNA 都来自卵子。但随着对 mtDNA 研究的逐步深入,近年来发现一些双壳贝类的 mtDNA 并不完全

收稿日期: 2010-11-02; 修回日期: 2010-12-15

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31072207)

作者简介: 徐科凤 (1982-), 女, 博士, 助理研究员, 从事贝类遗传育种研究。E-mail: xkfwgd@yahoo.com.cn

通讯作者: 李琪, E-mail: qili66@ouc.edu.cn

遵循母性遗传, 而是呈双重单亲遗传 (doubly uniparental inheritance, DUI), 例如贻贝科的 *Mytilus edulis*<sup>[5-6]</sup>、*M. californianus*<sup>[7]</sup>, 菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)、凸壳肌蛤 (*Musculista senhousia*)<sup>[8]</sup> 以及珠蚌科的 *Pyganodon grandis*、*Anodonta grandis* 和 *Fusconaia flava*<sup>[9-11]</sup>。ZOUROS 等<sup>[12]</sup> 在研究中发现, 贻贝雌性和雄性个体具有不同的线粒体基因组, 雌性体内只有 1 套线粒体 DNA, 即母性线粒体 DNA, 称为 F 型 mtDNA 基因; 而雄性体内则有 2 套线粒体 DNA, 一套来自卵子, 存在于肌肉组织, 即 F 型线粒体基因; 另一套来自精子, 主要出现在雄性性腺中, 称为 M 型线粒体基因, 雄性的 M 型线粒体基因只遗传给其雄性后代。ZOUROS 等将这种遗传模式命名为双重单亲遗传 (DUI)。

线粒体遗传模式对于物种的群体遗传学以及系统发生学都有非常重要的意义。但迄今为止对其他贝类线粒体遗传模式的研究报道仍比较少, 该研究利用变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术检测了虾夷扇贝雄性个体的体细胞和性腺的线粒体基因片段是否为同一基因型, 并通过建立虾夷扇贝单对交配家系, 进一步论证了虾夷扇贝的线粒体遗传模式。

## 1 材料与方法

### 1.1 家系的创建及取样

11 个虾夷扇贝成熟个体 (雌性 4 个和雄性 7 个) 来自山东威海的北海、寻山等地的不同养殖场, 取每个个体的性腺和闭壳肌, 分别保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 用于检测体细胞和性腺的线粒体基因片段的单倍型是否一致。共构建虾夷扇贝单对交配家系 20 组, 用于检测线粒体遗传模式。受精卵经 48 h 发育为 D 型幼虫, 将各家系 D 型幼虫收集于 1.5 mL 灭菌离心管中,  $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min 后去上清, 加入 100% 乙醇后于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存。将各家系亲本的闭壳肌放于 1.5 mL 灭菌离心管中, 加入 90% 乙醇保存。

### 1.2 DNA 的提取

亲本的 DNA 采用 LI 等<sup>[13]</sup> 描述的酚/氯仿法从闭壳肌组织中提取。幼虫 DNA 的提取基本采用 Chelex 法<sup>[14]</sup>, 个别地方稍作修整。将幼虫从 1.5 mL 离心管转移到培养皿中, 加入 100% 无水乙醇冲洗 3 次。在解剖镜下将单个浮游幼虫

分开, 分别放置于 0.2 mL PCR 管中, 每个管中加入  $2\ \mu\text{L}$  无水乙醇,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 30 min 后, 室温下完全晾干。每个 PCR 管中加入  $20\ \mu\text{L}$  5% solution of Chelex<sup>R</sup>-100 resin (BioRad) 以及  $2\ \mu\text{L}$  TE 和  $0.5\ \mu\text{L}$  PK ( $20\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。置于 PCR 仪中,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  温浴 2 h,  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  下 10 min, 最后  $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清放入新的 PCR 管中, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存。

### 1.3 PCR 扩增

PCR 扩增片段为 SATO 和 NAGASHIMA<sup>[15]</sup> 所开发的线粒体非编码基因  $\text{NcR}_2$ , 扩增引物为 PysoMetF 和 Pyso12SAR。在 PysoMetF 引物 5' 端增加 DGGE 电泳通用发卡结构。

PCR 反应体系为  $50\ \mu\text{L}$ :  $1\times$  PCR buffer,  $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP 混合液,  $1.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1.25\ \text{U}$  *Taq* DNA (Takara),  $0.25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  引物, 50 ng DNA 模板。  $5\ \mu\text{L}$   $10\times$  PCR 缓冲液,  $5\ \mu\text{L}$  dNTP 混合液 ( $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $3\ \mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  ( $25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $1.25\ \mu\text{L}$  引物 ( $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $0.25\ \mu\text{L}$  *Taq* 酶 (Takara, 5 U), 50 ng DNA 模板。PCR 反应条件为  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min、 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min、 $51\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 35 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。PCR 产物于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存。

### 1.4 DGGE 电泳

根据被检测目标片段大小, 使用的变性聚丙烯酰胺凝胶浓度梯度为 35% ~ 45%, DGGE 电泳分析于 DCode<sup>TM</sup> system (BioRad Inc.) 上进行。对闭壳肌和性腺的 PCR 产物进行 DGGE 电泳检测, PCR 产物变形后, 点样  $15\ \mu\text{L}$ ,  $30\ \text{V}$  电压下电泳 16 h, 电泳结束后硝酸银染色。家系分析时首先对家系的亲本进行检测, 观察其单倍型是否存在差异, 然后选择单倍型存在差异的父母本及 20 个子代 (D 型幼虫) 进行 DGGE 检测。步骤同上。

## 2 结果与讨论

在该研究试验条件下, 通过 DGGE 电泳分析, 11 个虾夷扇贝个体中每个个体均只含有 1 种单倍型, 且同一个体的体细胞和性腺含有同一单倍型 (图 1, 第 1~4 个体为雌性, 第 5~11 个体为雄性)。20 对亲本组合中共产生 9 对单倍型存在差异的组合。将该 9 对组合的父母本及 20 个子代

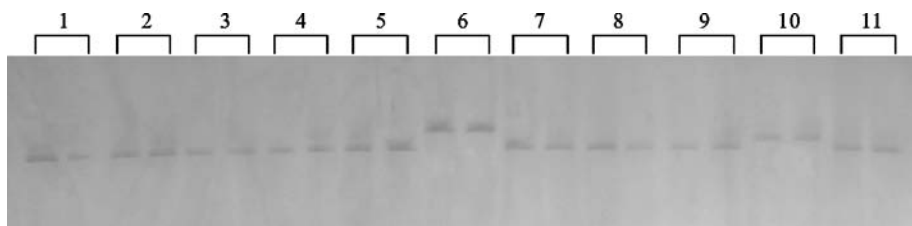


图 1 同一个体的体细胞与性腺 PCR 产物的 DGGE 电泳对照图

Fig. 1 DGGE analysis of PCR products from somatic and gametic tissues in the same individual

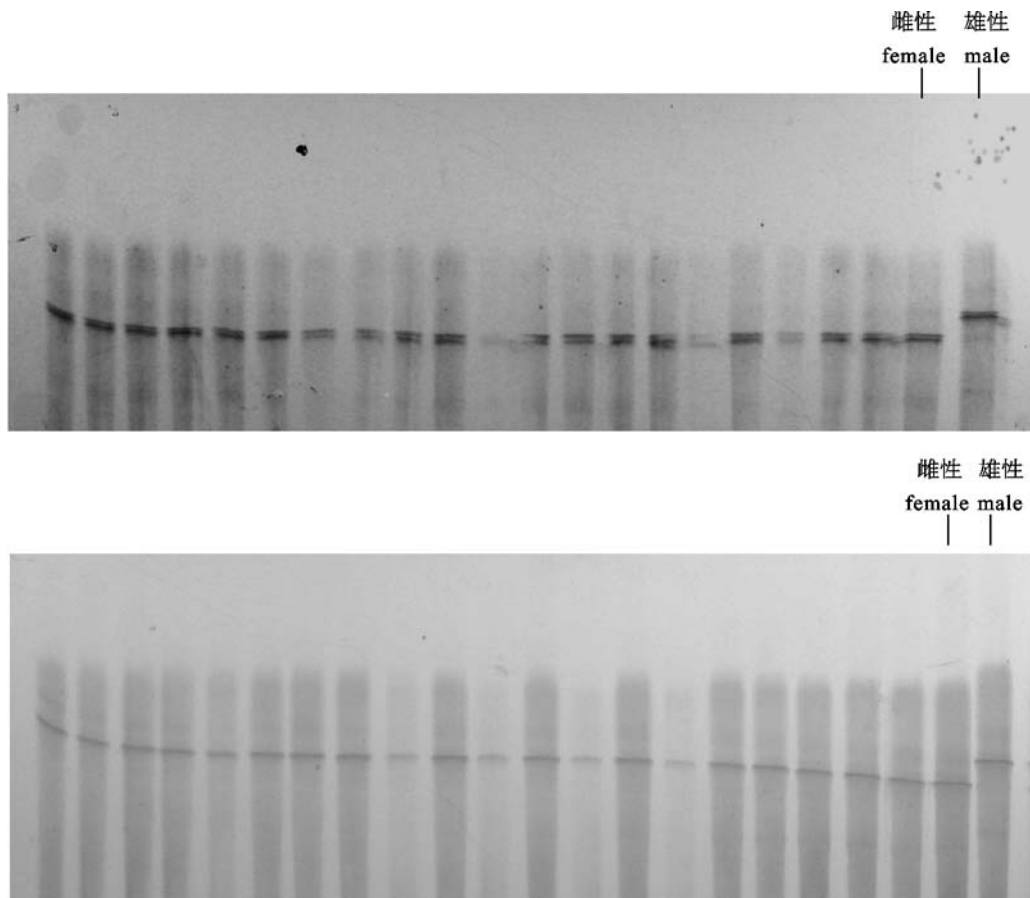


图2 虾夷扇贝家系亲本和子代 NcR2 片段扩增 DGGE 电泳图

Fig. 2 DGGE electrophoresis of NcR2 from parent and generation of *P. yessoensis*

(D型幼虫)进行DGGE检测,结果表明,9个家系中的子代(D型幼虫),其单倍型均与母本一致,表现出典型的母系遗传。图2是2个家系的DGGE电泳图。

线粒体的双亲遗传于1990年因贻贝线粒体异质性存在偏性比而被首次发现<sup>[16]</sup>。继而其他双壳贝类也被证实同一个体的线粒体基因存在2种单倍型<sup>[11,17-18]</sup>。随着研究的深入,人们发现线粒体的异质性与性别有关<sup>[12,19-20]</sup>。物种的线粒体是否是双亲遗传,很容易被鉴定。如果存在双亲遗传,雄性个体的线粒体基因则存在异质性,且子代的基因型并不都是母系遗传,部分存在父系遗传。

该研究首次为虾夷扇贝线粒体遗传模式提供了证据。DGGE是一种快速有效的检测方法,最初应用于检测疾病的单碱基突变<sup>[21]</sup>,后来被广泛应用于微生物群落研究<sup>[22-23]</sup>。该研究应用DGGE技术分析一段线粒体非编码基因NcR<sub>2</sub>,研究中未发现任何双亲遗传模式的证据。1)根据有关DUI的研究<sup>[11,19,24]</sup>,雄性个体的线粒体基因型应呈现异质性,但该研究中雄性个体的线粒体基因只含有1种单倍型;2)通过对5组虾夷扇贝家系的线粒体遗传模式的检测,也表明子代基因型均与母本一致,属于母系遗传。

检测线粒体遗传模式是将线粒体作为分子标记使用的一个重要前提。该研究的2个证据表明,虾夷扇贝的线粒体应该属于母系遗传,而非双重单亲遗传。这是关于虾夷扇贝线粒体遗传模式的首次报道。

#### 参考文献:

- [1] CASTRO J A, PICORNELL A, RAMON M. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies [J]. *Int Microbiol*, 1998, 1 (4): 327-332.
- [2] ARNASON U, GULLBERG A, GRETARSDOTTIR S, et al. The mitochondrial genome of the sperm whale and a new molecular reference for estimating eutherian divergence dates [J]. *Mol Evol*, 2000, 50 (6): 569-578.
- [3] HUVET A, LAPÈGUE S, MAGOULAS A, et al. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe [J]. *Conserv Genet*, 2000, 1 (3): 251-262.
- [4] MAHIDOL C, NA-NAKORN U, SUKMANOMON S, et al. Mitochondrial DNA diversity of the Asian moon scallop, *Amusium pleuronectes* (Pectinidae), in Thailand [J]. *Mar Biotechnol*, 2007, 9 (3): 352-359.

- [5] SKIBINSKI D O F, GALLAGHER C, BAYNON C M. Mitochondrial DNA inheritance [J]. *Nature*, 1994, 368 (6474): 817–818.
- [6] SKIBINSKI D O F, GALLAGHER C, BAYNON C M. Sexlimited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis* [J]. *Genetics*, 1994, 138 (3): 801–809.
- [7] BEAGLEY C T, TAYLOR K A, WOLSTENHOLME D R. Gender associated diverse mitochondrial DNA molecules of the mussel *Mytilus californianus* [J]. *Curr Genet*, 1997, 31 (4): 318–324.
- [8] PASSAMONTI M. An unusual case of gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy: the mytilid *Musculista senhousia* (Mollusca Bivalvia) [J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7 (Suppl 2): S7.
- [9] HOEH W R, STEWART D T, SUTHERLAND B W, et al. Cytochrome c oxidase sequence comparisons suggest an unusually high rate of mitochondrial DNA evolution in *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia) [J]. *Mol Biol Evol*, 1996, 13 (2): 418–421.
- [10] LIU H P, MITTON J B, WU S K. Paternal mitochondrial DNA differentiation far exceeds maternal DNA and allozyme differentiation in the freshwater mussel, *Anodonta grandis* [J]. *Evolution*, 1996, 50 (2): 952–957.
- [11] PASSAMONTI M, SCALI V. Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia) [J]. *Curr Genet*, 2001, 39 (2): 117–124.
- [12] ZOUROS E, BALL A O, SAAVEDRA C, et al. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 (16): 7463–7467.
- [13] LI Q, PARK C, KOBAYASHI T, et al. Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* [J]. *Mar Biotechnol*, 2003, 5 (4): 331–338.
- [14] LAUNEY S, HEDGECOCK D. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Genetics*, 2001, 159 (1): 255–265.
- [15] SATO M, NAGASHIMA K. Molecular characterization of a mitochondrial DNA segment from the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*): demonstration of a region showing sequence polymorphism in the population [J]. *Mar Biotechnol*, 2001, 3 (4): 370–379.
- [16] FISHER C, SKIBINSKI D O F. Sex-biased mitochondrial-DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus* [J]. *Proc R Entomol Soc A*, 1990, 242 (1305): 149–156.
- [17] HOEH W R, BLAKLEY K H, BROWN W M. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial-DNA [J]. *Science*, 1991, 251 (5000): 1488–1490.
- [18] ZOUROS E, FREEMAN K R, BALL A O, et al. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial-DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus* [J]. *Nature*, 1992, 359 (6394): 412–414.
- [19] STEWART D T, SAAVEDRA C, STANWOOD R R, et al. Male and female mitochondrial-DNA linkages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group [J]. *Mol Biol Evol*, 1995, 12 (5): 735–747.
- [20] SAAVEDRA C, REYERO M I, ZOUROS E. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Genetics*, 1997, 145 (4): 1073–1082.
- [21] VALERO M C, VELASCO E, MORENO F, et al. Characterization of four mutations in the neurofibromatosis type 1 gene by denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)[J]. *Hum Mol Genet*, 1994, 3 (4): 639–641.
- [22] MUYZER G, SMALLA K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. *Anton Van Leeuw*, 1998, 73 (1): 127–141.
- [23] 谷海晶, 凌均. 变性梯度凝胶电泳分析口腔微生物多样性的研究进展 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2009, 36 (1): 114–116.  
GU Haijing, LING Jun. Evaluation of oral microbial diversity with denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Int J Stomatol*, 2009, 36 (1): 114–116. (in Chinese)
- [24] SUTHERLAND B, STEWART D, KENCHINGTON E R, et al. The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA [J]. *Genetics*, 1998, 148 (1): 341–347.