高体鲕(Seriola dumerili)线粒体全基因组测定 及结构特征分析^{*}

王开杰^{1,2,3} 徐永江^{1,2} 崔爱君^{1,2} 柳学周^{1,2} 姜 燕^{1,2} 王 滨^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东青岛 266237; 3. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心 浙江舟山 316022)

摘要 为快速有效鉴别鲈属鱼类物种、加强鲈鱼遗传多样性管理与种质资源保护,通过 Illumina 测序技术,获得了东海海域养殖高体鲈(Seriola dumerili)线粒体基因组全序列(16 530 bp),碱基组成 为A(26.83%)、G(17.6%)、C(30.04%)和T(25.53%),A+T含量为52.36%,且非编码控制区(D-loop) A+T富含61.64%,表现明显的AT偏好性。与其他硬骨鱼一样,高体鲈线粒体基因组包含13条蛋白编码基因,22个tRNA基因,2个tRNA基因,除*ND6、tRNA^{GIn}、tRNA^{Ala}、tRNA^{Cys}、tRNA^{Tyr}、tRNA^{Ser}、tRNA^{Glu}、tRNA^{Fro}基因外,其余均位于H链编码;蛋白编码基因中,除<i>COI、COII和ND5*的起始密码子分别为ATC、ATA和ATA外,其余10个蛋白编码基因的起始密码子均为ATG,以典型的TAA和TAG为终止密码子,在*ND*4和*Cytb*中存在不完全密码子T;除*tRNA^{Ser}-GCT外*,其余21个tRNA均为典型三叶草二级结构。比较中国和日本海域高体鲈线粒体基因组发现,*COI、COII*和*ND5*蛋白编码基因在起止位置、片段长度及起止密码子上存在显著差异。此外,与同属的黄条鲫(Seriola aureovittata)和五条蛳(Seriola quinqueradiata)的线粒体基因组13个蛋白编码基因进行两两对比分析,结果表明3种鲈属鱼类的蛋白编码基因的相似性在85%~100%之间。基于线粒体基因组全序列构建的系统发育树,成功将高体鲈与其他鲈属鱼类有效区分,高体鲈与长鳍鲈同属一支,亲缘关系最近;黄条蛳和五条蛳聚为一支,亲缘关系最近。

关键词 高体频;线粒体基因组;序列比较分析;系统发育分析 中图分类号 S917 doi: 10.11693/hyhz20210700160

线粒体 DNA (Mitochondria DNA)具有结构简单、 高拷贝数,分子量小、偏母性遗传且进化速度快等优 点(Curole *et al*, 1999)。鱼类线粒体 DNA 大小一般为 15~20 kb,多为双链闭合的环状结构,排列紧密,不 同物种间线粒体基因组存在很大差异,序列中存在 串联重复序列以及少数的散在重复序列(周传江等, 2019),与其他高等动物相似,鱼类线粒体基因组也 是由 13 个蛋白质编码基因, 2 个 rRNA, 22 个 tRNA, 以及非编码区重链复制起始相关的控制区(D-loop)和 轻链复制起始区(O_L)组成(Satoh *et al*, 2016)。随着 DNA 测序技术的逐渐成熟, 鱼类线粒体基因组已被 作为分子标记广泛应用于鱼类种质资源保护, 群体 多态性以及系统进化发育等领域(陈四海等, 2011)。黄 小林等(2018)探讨了线粒体基因组在 6 种篮子鱼 (*Siganus*)系统发育中的适用性; 程佩琳等(2021)通过 线粒体全基因组对6种鲟形目鱼类(Acipenseriformes) 进行了种群划分; Bernal-Ramírez 等(2003)利用线粒 体基因组控制区分析了新西兰金赤鲷(*Pagrus auratus*)

通信作者: 徐永江, 研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn 收稿日期: 2021-07-09, 收修改稿日期: 2021-08-27

^{*} 国家重点研发计划项目, 2019YFD0900901号, 2018YFD0901204号;山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大 科技专项, 2018SDKJ0303-1号;中国水产科学研究院基本科研业务费, TD47号, 2021GH05号;国家海洋水产种质资源库项目;财 政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助, CARS-47号。王开杰,硕士研究生, E-mail: jasions@qq.com

高体鲕(Seriola dumerili)属鲈形目(Perciformes)、 鲈亚目(Percoidei)、鲹科(Carangidae)、蛳属(Seriola)、又 名杜氏蛳、红甘鲹(陈大刚等, 2015)。高体蛳是暖水性 中上层鱼类、体侧从吻端到尾鳍有一金黄色纵带、具 有生长速度快、体型大、肉质鲜美等特点,深受广大 消费者的喜爱(廖志强, 2003)。高体狮分布于全球的亚 热带地区、在中国主要分布于东海和南海。在形态上、 師属鱼类种间体色和条纹相似、基于传统的外部形态 特征来准确鉴定物种具有一定难度、特别是受精卵和 苗种在形态上更难区分, 给渔业资源调查物种及种群 判别等带来了较大困难。Nugroho等(2000)通过微卫星 DNA 和 D-Loop 分子标记发现日本高体蛳在遗传上至 少分为两个不同的群体; Premachandra 等(2017)通过微 卫星标记、基因组测序及线粒体 DNA 等方法认为太 平洋海域黄条鲕由于地理隔离分离出的三个群体间不 存在基因流动; Iguchi 等(2012)基于线粒体基因组结构 特征、探讨了日本海域的高体鲕、黄条鲕、五条鲕和 长鳍蛳四种蛳属鱼类的种间系统进化关系。我国尚未 有髙体鲕遗传特性方面的研究报道。

本研究测定了东海海域养殖高体狮的线粒体全 基因组序列,通过与日本海域高体狮及其他两种 狮属鱼类(黄条蛳、五条蛳)线粒体基因组特征进行比 较,分析三者之间的遗传差异;通过构建分子系统发 育树,探讨了高体狮与其他狮属鱼类的亲缘关系,为 蛳属鱼类的种质鉴定和系统进化提供依据。

- 1 材料与方法
- 1.1 实验材料及 DNA 提取

试验高体狮样品采集于福建宁德(26°62'N, 119°75'E)海上养殖网箱, 经MS-222 麻醉后, 对其进 行体质量及形态学性状测量, 用无菌解剖剪剪取一 部分胸鳍, 放入无水乙醇中保存。取胸鳍组织100 mg, 按照 DNA 提取试剂盒(OMEGA, USA)使用说明书的 操作步骤提取基因组 DNA。通过琼脂糖凝胶电泳和 核酸蛋白测定仪对其 DNA 纯度和浓度进行测定。

1.2 基因组测序

委托青岛欧易生物科技有限公司进行测序,流 程如下:将提取的 DNA 样品参照 TruSeq[™] Nano DNA Sample Prep Kit 试剂盒方法构建文库,采用 Covaris M220 超声波破碎仪分割成长度为 300~500 bp 左右的片段并在两端加接头,进行桥式 PCR 扩增,采 用 Illumina NovaSeq 6000 测序技术对样品 DNA 进行 paired-end 测序。

1.3 序列组装与分析

使用 SPAdes v3.14.1 (http://bioinf.spbau.ru/spades) 软件对 Clean Data 进行校对、排列、拼接后获得高体 鲕的线粒体基因组序列。通过 Trimmomatic v0.39 (http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmo mati)软件对其修剪后,使用 MITOS (http://mitos. bioinf.uni-leipzig.de/index.py) 软件对线粒体基因组 预测编码蛋白、tRNA 和 rRNA 基因,然后对 MITOS 预测的初始基因去冗余,并人工校正基因的起始、终 止密码子位置,获得高准确性的保守基因集。利用 tRNA scan-SE 在线软件(http://www.Genetics.Wustl. Edu./eddy/tRNAscan-SE)进行 tRNA 定位与 RNAstructure预测,利用软件CGView (http://stothard. afns.ualberta.ca/cgview_server/)对样品基因组进行圈 图展示,最后将蛋白编码基因通过 Blast 比对,进行 NR、Swiss-Prot、eggNOG、KEGG、GO 注释分析。

通过 MEGA 7.0 软件对高体蛳碱基组成、密码子 偏好性及系统进化分析。以日本花鲈(*Lateolabrax japonicus*)为外类群,从 GenBank 数据库中下载 18 种 鲹科鱼类线粒体全基因组序列见表 1,通过 Clustal W 进行序列多重比对,自举检验 1000 次,构建 Neighbor-joining 进化树,

2 结果与分析

2.1 线粒体基因组结构特征

本研究获得的高体狮线粒体全基因组序列经注 释后提交 GenBank (Accession No.: MZ398238)。高体 狮线粒体全基因组序列为典型的环状结构,全长 16 530 bp,碱基组成为 A (26.83%)、G (17.6%)、C (30.04%)和 T (25.53%); A+T 含量为 52.36%,显著大 于 G+C 含量(47.64%),表现明显的 AT 偏好性。与其 他鱼类线粒体 DNA 结构一致,共 37 个基因:包括 13 个蛋白质编码基因(*CO* I-III、*ATP*6、*ATP*8、*ND*1-6、 *ND4L*和 *Cytb*), 22 个 tRNA 基因, 2 个 rRNA 基因和一 个控制区(D-loop 区)。

高体鰤线粒体基因组 rRNA、tRNA 及 D-loop 区结构分析

高体鲕线粒体基因组含有 12S rRNA 和 16S rRNA 两个 rRNA, 12S rRNA 位于 $tRNA^{Phe}$ 和 $tRNA^{Val}$ 之间,由 950 个碱基组成; 16S rRNA 位于 $tRNA^{Val}$ 和 $tRNA^{Leu}$ 之间,由1 700 个碱基组成,且 12S rRNA 比 16S rRNA 更加保守。

Tab.1The origins of mitochondrial genomes of Carangidae fishes											
物种名	拉丁文	GenBank 登录号	总长/bp								
拉巴若鲹	Carangoides malabaricus	KJ174514	16 561								
甲若鲹	Carangoides armatus	AP004444	16 556								
游鳍叶 鲹	Atule mate	KM522838	16 565								
丽叶鲹	Alepes kleinii	KF728081	16 571								
大甲鲹	Megalaspis cordyl	KM522836	16 566								
金带细鲹	Selaroides leptolepis	KM522839	16 560								
乌鲹	Parastromateus niger	KJ192332	16 561								
高体若鲹	Carangoides equula	KM201334	16 588								
竹荚鱼	Trachurus trachurus	AB108498	16 559								
白舌尾甲鲹	Uraspis secunda	KT819204	16 554								
长身圆鲹	Decapterus macrosoma	KF841444	16 545								
脂眼凹肩鲹	Selar crumenophthalmus	KJ148633	16 610								
小甘鲹	Seriolina nigrofasciata	KT591876	16 531								
日本黄条鲕	Seriola lalandi	AB517557	16 532								
中国黄条鲕	Seriola aureovittata	MH211123	16 609								
五条鲕	Seriola quinqueradiata	AB517556	16 537								
日本高体鲕	Seriola dumerili	AB517558	16 530								
长鳍鲕	Seriola rivoliana	KP347126	16 530								
纺缍鲹	Elagatis bipinnulata	KT824759	16 542								
日本花鲈	Lateolabrax japonicus	AP006789	16 593								

表 1 鲹科鱼类线粒体基因组数据来源



图 1 高体鲕线粒体基因组图谱 Fig.1 Gene map of the mitochondrial genome of *S. dumerili*

Tab.2 Characteristics of the mitogenomes of S. dumerili												
基因名称	起止位置	长度/bp	编码链	间隔长度	起始密码子	终止密码子						
$tRNA^{Phe}$	1~68	68	Н	_	—	—						
12S rRNA	69~1 018	950	Н	0	—	—						
$tRNA^{Val}$	1 019~1 090	72	Н	0	—	—						
16S rRNA	1 109~2 808	1 700	Н	18	—	—						
$tRNA^{Leu}$	2 809~2 883	75	Н	0	—	—						
ND1	2 884~3 858	975	Н	0	ATG	TAA						
tRNA ^{IIe}	3 863~3 932	70	Н	4	—	—						
$tRNA^{Gln}$	3 932~4 002	71	L	-1	—	—						
$tRNA^{Met}$	4 002~4 070	69	Н	-1	—	—						
ND2	4 071~5 117	1 047	Н	0	ATG	TAA						
$tRNA^{Trp}$	5 117~5 187	71	Н	-1	—	—						
$tRNA^{Ala}$	5 189~5 257	69	L	1	—	—						
$tRNA^{Asn}$	5 259~5 331	73	L	1	—	—						
$tRNA^{Cys}$	5 366~5 431	66	L	34	—	—						
$tRNA^{Tyr}$	5 432~5 501	70	L	0	—	—						
CO I	5 509~7 053	1 545	Н	7	ATC	TAA						
tRNA ^{Ser}	7 054~7 124	71	L	0	—	—						
$tRNA^{Asp}$	7 129~7 199	71	Н	4	—	—						
CO II	7 205~7 912	708	Н	5	ATA	TAA						
$tRNA^{Lys}$	7 899~7 973	75	Н	-14	—	—						
ATP8	7 975~8 142	168	Н	1	ATG	TAA						
ATP6	8 133~8 816	684	Н	-10	ATG	TAA						
CO III	8 816~9 601	786	Н	-1	ATG	TAA						
$tRNA^{Gly}$	9 601~9 671	71	Н	-1	—	—						
ND3	9 672~10 022	351	Н	0	ATG	TAG						
$tRNA^{Arg}$	10 021~10 089	69	Н	-2	—	_						
ND4L	10 090~10 386	297	Н	0	ATG	TAA						
ND4	10 380~11 760	1 381	Н	-7	ATG	Т—						
$tRNA^{His}$	11 761~11 829	69	Н	0	_	—						
tRNA ^{Ser}	11 830~11 896	67	Н	0	—	_						
$tRNA^{Leu}$	11 901~11 973	73	Н	4	—	_						
ND5	11 992~13 812	1 821	Н	18	ATA	TAA						
ND6	13 809~14 330	522	L	-4	ATG	TAG						
$tRNA^{Glu}$	14 332~14 400	69	L	1	—	—						
Cytb	14 406~15 546	1 141	Н	5	ATG	T						
$tRNA^{Thr}$	15 547~15 618	72	Н	0	—	_						
$tRNA^{Pro}$	15 618~15 688	71	L	-1	—	_						
D-loop	15 689~16 530	842	Н	0								

表 2 高体鲕线粒体基因组结构特征

22个 tRNA 的序列总长度为 1 552 bp, 长度范围 为 66~75 bp, 长度最短的为 *tRNA^{Cys}*, 最长的为 *tRNA^{Leu}*和 *tRNA^{Lys}*。其中 *tRNA^{Ser}*和 *tRNA^{Leu}*基因各有 两个,除 *tRNA^{Gin}、tRNA^{Ala}、tRNA^{Asn}、tRNA^{Cys}、tRNA^{Tyr}、 tRNA^{Ser}、tRNA^{Glu}、tRNA^{Pro} 位于*L链外,其余 14 个 tRNA 皆位于 H 链上。22 个 tRNA 结构均可通过 tRNAscan-SE 在线预测,除 *tRNA^{Ser}*-GCT 基因缺失二 氢尿嘧啶臂(DHU 臂)外,其余 21 个 tRNA 均含有典 型的三叶草二级结构(图 2)。

在氨基酸臂中由于 C-T 转换造成的 tRNA^{Val}、





图 2 高体鰤线粒体 tRNA 二级结构 Fig.2 Secondary structure of *S. dumerili* mitochondrial tRNA

tRNA^{Pro}-TGG

tRNA^{lle}和 tRNA^{His}中 A-C 不配对, 还导致 tRNA^{Gln}、 *tRNA^{Ala}、tRNA^{Tyr}和tRNA^{Pro}*基因中G-T发生错配。且 在氨基酸臂中 tRNA^{Ser}-GCT 存在 1 对 A-A 不配对. tRNA^{Phe}、tRNA^{Leu}、tRNA^{Thr}存在1对C-C不配对, tRNA^{4rg}存在 2 对 T-T 不配对。在反密码子茎中也存 在由于 C-T 转换造成的 tRNA^{Trp} 中 A-C 不配对。在 T Ψ C 茎上、同样也存在 C-T 转换现象、除此之外、 tRNA^{Met}有1对U-U不配对。DHU环也存在G-T错配 现象, tRNA^{Trp}有1对 A-A 不配对, 且 tRNA^{Ser}-GCT 基 因该环缺失。

高体鲕控制区(D-loop)位于 tRNA^{Pro}和 tRNA^{Phe}基 因之间, 全长为 842 bp。利用 Tandem repeat finder 软 件搜索、未发现串联重复序列。其碱基含量为(T

RSCU

0.0

密码子

UCUIO

出现次数

22

31.24%, C 21.97%, A 30.40%, G 16.39%), 该区域 A+T 富含 61.64%: 黄条鲕和五条鲕的 A+T 含量分别 为 63.65%和 62.13%、均表现明显的 A+T 偏好性和抗 鸟嘌呤现象。

2.3 高体鲕蛋白编码基因密码子偏好性分析

本研究对高体鲕13 个蛋白编码基因密码子的使 用频率及相对同义密码子使用度(RSCU)进行了统计 分析(表 3)、共编码 3 808 个密码子、表中加粗字体为 同种氨基酸密码子使用度最多的、除 UGC、UGG 和 AGA 外, 其 RSCU 均大于 1, 均为偏好性密码子。其 中. 以 NNC 类型的密码子占总密码子数的 38.08%. 除 UGC (0.99)外, 其余 NNC 类型的密码子 RSCU 均 大于 1、表明密码子第三位点为 C 的使用频率较高。

密码子

UCUCO

表 3 高体鲕13 个蛋白编码基因密码子偏好性统计 Tab.3 Codon preference statistics of 13 protein-coding genes of S. dumerili

RSCU

~ -

密码子

TIATICE

出现次数

RSCU

0.55

UUU(F)	88	0.8	UCU(S)	32	0.7	UAU(Y)	29	0.55	UGU(C)	7
UUC(F)	154	1.2	UCC(S)	73	2.21	UAC(Y)	81	1.3	UGC(C)	17
UUA(L)	79	0.77	UCA(S)	50	1.11	UAA(*)	9	0.47	UGA(*)	100
UUG(L)	25	0.28	UCG(S)	25	0.62	UAG(*)	2	0.08	UGG(W)	20
CUU(L)	148	1.41	CCU(P)	59	1.3	CAU(H)	25	0.72	CGU(R)	8
CUC(L)	174	1.51	CCC(P)	103	1.62	CAC(H)	82	1.28	CGC(R)	13
CUA(L)	169	1.32	CCA(P)	43	0.78	CAA(Q)	77	1.55	CGA(R)	46
CUG(L)	65	0.72	CCG(P)	19	0.3	CAG(Q)	17	0.3	CGG(R)	12
AUU(I)	127	1.11	ACU(T)	53	0.91	AAU(N)	28	0.59	AGU(S)	9
AUC(I)	124	1.1	ACC(T)	105	1.27	AAC(N)	90	1.41	AGC(S)	43
AUA(I)	77	0.79	ACA(T)	115	1.39	AAA(K)	61	1.28	AGA(R)	1
AUG(M)	75	1	ACG(T)	23	0.43	AAG(K)	15	0.41	AGG(R)	0
GUU(V)	69	1.18	GCU(A)	62	0.71	GAU(D)	17	0.59	GGU(G)	34
GUC(V)	83	1.45	GCC(A)	166	1.79	GAC(D)	62	1.26	GGC(G)	80

1.3

0.21

GAA(E)

GAG(E)

71

29

1.46

0.54

17 注:*表示终止密码子;括号内的字母表示各氨基酸名称的缩写;表中加粗字体为氨基酸偏好密码子

115

2.4 中国海域高体鲕与日本海域高体鲕蛋白编码基

GCA(A)

GCG(A)

0.94

0.44

因差异

56

25

GUA(V)

GUG(V)

本研究发现东海海域与日本海域高体鲕在线粒 体基因组序列中长度一致,均为16530bp,比较分析 了两者在蛋白编码基因上的差异(表 4)。除 CO I、 CO II 和 ND5 蛋白基因在起止位置、片段长度以及起 止密码子选择上存在差异外, 两者在其他 11 个蛋白 编码基因中表现出很高的相似性。中国海域高体

師COI蛋白基因长度比日本海域高体師COI蛋白基 因短 6 bp, 起始密码子分别为 ATG 和 GTG; CO II 蛋 白编码基因长度比日本高体鲕长 17 bp、起始密码子 分别为 ATA 和 ATG; ND5 蛋白编码基因长度比日本 海域高体鲕ND5 蛋白基因短 18 bp、起始密码子分别 为 ATA 和 ATG。中国海域高体鲕CO II 蛋白终止密码 子为完全的"TAA",而日本海域高体狮COII蛋白的 终止密码子为不完全的"T"。

GGA(G)

GGG(G)

73

52

RSCU

0.4

0.99

2.44

0.85

0.55

1 1 3

3.01

0.79

0.22

1.15

0.07

0

0 5

1.16

1.09

1.05

出现次数

密码子

出现次数

Tab.4 Protein coding gene comparisons between S. dumerili populations from China and Japan												
其田		中国海域副	⑤体 鲕		日本海域高体鲕							
至凶	起止位置(bp)	长度(bp)	起始密码	终止密码	起止位置(bp)	长度(bp)	起始密码	终止密码				
ND1	2 884~3 858	975	ATG	TAA	2 884~3 858	975	ATG	TAA				
ND2	4 071~5 117	1 047	ATG	TAA	4 071~5 117	1 047	ATG	TAA				
CO I	5 509~7 053	1 545	ATC	TAA	5 503~7 053	1 551	GTG	TAA				
CO II	7 205~7 912	708	ATA	TAA	7 208~7 898	691	ATG	Т				
ATP8	7 975~8 142	168	ATG	TAA	7 975~8 142	168	ATG	TAA				
ATP6	8 133~8 816	684	ATG	TAA	8 133~8 816	684	ATG	TAA				
CO III	8 816~9 601	786	ATG	TAA	8 816~9 601	786	ATG	TAA				
ND3	9 672~10 022	351	ATG	TAG	9 672~10 022	351	ATG	TAG				
ND4L	10 090~10 386	297	ATG	TAA	10 090~10 386	297	ATG	TAA				
ND4	10 380~11 760	1 381	ATG	T	10 380~11 760	1 381	ATG	Т				
ND5	11 992~13 812	1 821	ATA	TAA	11 974~13 812	1 839	ATG	TAA				
ND6	13 809~14 330	522	ATG	TAG	13 809~14 330	522	ATG	TAG				
Cytb	14 406~15 546	1 141	ATG	T	14 406~15 546	1 141	ATG	T				

表 4 中国海域高体鲕与日本海域高体鲕蛋白编码基因对比

2.5 三种鲫鱼线粒体基因组比较分析

比较分析了三种鰤属鱼类的线粒体基因组全序列 (表 5),长度分别为:黄条蛳(16 609 bp)、高体 蛳(16 530 bp)、五条蛳(16 537 bp)。其基因排列顺序与 其他大多数鱼类线粒体基因组一致,均包括 13 个蛋白 质编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因及非编 码区的轻链复制起始区(O_L)以及控制区(D-loop)。其中 *tRNA^{GIn}、tRNA^{Pro}、tRNA^{Ala}、tRNA^{Glu}、tRNA^{Cys}、tRNA^{Asn}、 tRNA^{Tyr}和 tRNA^{Ser(UCN)}*八个 tRNA 基因与 *ND*6 共 9 个基 因由 L 链编码,其余 28 个基因则是由 H 链编码。黄条 蛳、高体蛳和五条蛳线粒体基因组序列的 A+T 含量分 别为 52.05%、52.36%、51.8%, 平均 A+T 含量 52.07%, 明显高于 G+C 含量, 表现出明显的 A+T 偏好性。13 个 蛋白编码基因中,同一编码基因的起止位点上有差异, 基于 CO I 基因多以 GTG 为起始密码子,而黄条蛳和高 体蛳分别以 ATG 和 ATC 为起始密码子;基于 CO II 基 因,高体蛳以 ATA 为起始密码子,而黄条蛳和五条 蛳以 ATG;基于 ND5 基因,黄条蛳和高体蛳以 ATA 为 起始密码子,而五条蛳以 ATG,其余 10 个编码基因均 以 ATG 为起始密码子。其中高体蛳CO II 基因的终止 密码子为完全的"TAA",黄条蛳和五条蛳CO II 基因的 终止密码子为不完全的"T"。

表 5 三种鲫鱼线粒体基因组结构特点 Tab 5 Characteristics of the mitogenemes of three *Seriola* species

基因 -		黄条蛳			高体鲕			五条	师	密码子	
	起始	终止	长度/bp	起始	终止	长度/bp	起始	终止	长度/bp	起始	终止
tRNA ^{Phe}	1	68	68	1	68	68	1	68	68		
12S rRNA	69	1 019	951	69	1 018	950	69	1 023	955		
tRNA ^{Val}	1 020	1 092	72	1 019	1 090	72	1 024	1 095	72		
16S rRNA	1 110	2 808	1 699	1 109	2 808	1 700	1 096	2 813	1 718		
$tRNA^{Leu(UUR)}$	2 809	2 883	75	2 809	2 883	75	2 814	2 888	75		
ND1	2 884	3 858	975	2 884	3 858	975	2 889	3 863	975	ATG	TAA
tRNA ^{Ile}	3 863	3 932	70	3 863	3 932	70	3 868	3 937	70		
$tRNA^{Gln}(L)$	3 932	4 002	71	3 932	4 002	71	3 937	4 007	71		
$tRNA^{Met}$	4 002	4 070	69	4 002	4 070	69	4 007	4 075	69		
ND2	4 071	5 117	1 047	4 071	5 117	1 047	4 076	5 122	1 047	ATG	TAA
$tRNA^{Trp}$	5 117	5 187	71	5 117	5 187	71	5 122	5 192	71		
$tRNA^{Ala}(L)$	5 189	5 257	69	5 189	5 257	69	5 194	5 262	69		

∧+ →

其因		黄条鲕			高体狮			五条飾	帀	密码子		
소디	起始	终止	长度/bp	起始	终止	长度/bp	起始	终止	长度/bp	起始	终止	
$tRNA^{Asn}(L)$	5 259	5 331	73	5 259	5 331	73	5 264	5 336	73			
O L	5 332	5 365	33	5 332	5 365	33	5 337	5 370	34			
$tRNA^{Cys}(L)$	5 366	5 431	66	5 366	5 431	66	5 371	5 4 3 6	66			
$tRNA^{Tyr}(L)$	5 432	5 501	70	5 432	5 501	70	5 437	5 506	70			
CO I	5 584	7 053	1 470	5 509	7 053	1 545	5 508	7 058	1 551	ATG/ATC/GTG	TAA	
$tRNA^{Ser (UCN)}(L)$	7 054	7 124	71	7 054	7 124	71	7 059	7 129	71			
$tRNA^{Asp}$	7 129	7 199	71	7 129	7 199	71	7 134	7 204	71			
CO II	7 208	7 898	691	7 205	7 912	708	7 213	7 903	691	ATG/ATA/ATG	T/TAA/T	
$tRNA^{Lys}$	7 899	7 973	75	7 899	7 973	75	7 904	7 978	75			
ATP8	7 975	8 142	168	7 975	8 142	168	7 980	8 147	168	ATG	TAA	
ATP6	8 133	8 816	684	8 1 3 3	8 816	684	8 1 3 8	8 821	684	TAA		
CO III	8 816	9 601	786	8 816	9 601	786	8 821	9 606	786	ATG	TAA	
$tRNA^{Gly}$	9 601	9 671	71	9 601	9 671	71	9 606	9 676	71			
ND3	9 672	10 022	351	9 672	10 022	351	9 677	10 027	351	ATG	TAG	
$tRNA^{Arg}$	10 021	10 089	69	10 021	10 089	69	10 026	10 094	69			
ND4L	10 090	10 386	297	10 090	10 386	297	10 095	10 391	297	ATG	TAA	
ND4	10 380	11 760	1 381	10 380	11 760	1 381	10 385	11 765	1 381	ATG	Т	
$tRNA^{His}$	11 761	11 829	69	11 761	11 829	69	11 766	11 834	69			
$tRNA^{Ser(AGY)}$	11 830	11 896	67	11 830	11 896	67	11 835	11 901	67			
$tRNA^{Leu(CUN)}$	11 901	11 973	73	11 901	11 973	73	11 906	11 978	73			
ND5	11 992	13 812	1 821	11 992	13 812	1 821	11 979	13 817	1 839	ATA/ATA/ATG	TAA	
ND6 (L)	13 809	14 330	522	13 809	14 330	522	13 814	14 335	522	ATG	TAG	
$tRNA^{Glu}(L)$	14 332	14 400	69	14 332	14 400	69	14 337	14 405	69			
Cytb	14 405	15 545	1 141	14 406	15 546	1 141	14 410	15 550	1 141	ATG	Т	
$tRNA^{Thr}$	15 546	15 617	72	15 547	15 618	72	15 551	15 622	72			
$tRNA^{Pro}(L)$	15 617	15 687	71	15 618	15 688	71	15 622	15 692	71			
Control region	15 689	16 609	921	15 689	16 530	842	15 693	16 537	845			

2.6 三种鰤属鱼类蛋白编码基因碱基组成及相似性 分析

三种狮属鱼类的蛋白编码基因的长度分别为: 黄条狮(11 838 bp)、高体狮(11 426 bp)、五条 狮(11 433 bp),分别占全序列总长度的 71.3%、 69.12%、69.14%。且相邻蛋白编码基因中存在 1~10 bp 的碱基重叠区域。在 CO I、CO II、CO III、ATP6、 ATP8和 ND5基因中,三种狮属鱼类A+T含量均高于 50%(表 6),CO II 基因中 A+T 平均含量最高 (56.74%)。13个蛋白编码基因的 A+T 总含量分别为 黄条蛳(51.09%)、高体蛳(51.72%)、五条蛳(52.04),可 见其在蛋白编码基因组中也具有 AT 偏好性。除了 ND6 基因外,三种狮属鱼类其他蛋白编码基因的 G 含量都在 20%以下,表现明显的反 G 现象。 对三种狮属鱼类的线粒体全基因组 13 个蛋白编 码基因序列进行两两比对,结果表明三种狮属鱼类 的蛋白编码基因的相似性在 85%~100%之间(图 3)。 三者之间在 ATP6 基因中相似性最低,但也在 85%以 上。中国和日本高体狮在 ND2 和 ATP8、ATP6、ND3、 ND6和 Cytb六个基因上的相似性高达 100%;中国和 日本黄条蛳在 ND1、CO II、ATP8 和 ND4L 基因上的 相似性也是 100%。黄条蛳种群中除了日本黄条蛳的 Cytb 基因与五条蛳相似性低于 90%,其他所有蛋白 编码基因相似性均在 90%以上,说明黄条蛳和五条 蛳的亲缘关系最近。由于差异性不显著,这些相似性 100%的蛋白编码基因不适用于不同地理区域同种物 种的鉴别,但所有蛋白编码基因对于三种狮属鱼类 都能有效区分。

	Tab.6 Nucleotide composition of protein-coding genes in three Seriola species													
种类	碱基	ND1	ND2	CO I	CO II	ATP8	ATP6	CO III	ND3	ND4L	ND4	ND5	ND6	Cytb
	A+T	48.10	48.62	52.24	57.16	52.98	52.63	50.89	50.14	48.82	50.62	52.39	49.43	49.78
黄条蛳	Т	26.36	24.83	28.30	28.08	23.81	27.63	26.97	29.63	30.64	24.55	26.03	36.02	26.73
S. aureovittata	С	33.44	36.77	28.84	26.63	32.74	32.46	31.04	32.48	35.02	32.95	32.24	16.86	34.36
	А	21.74	23.78	23.95	29.09	29.17	25.00	23.92	20.51	18.18	26.07	26.36	13.41	23.05
	G	18.46	14.61	18.91	16.21	14.29	14.91	18.07	17.38	16.16	16.44	15.38	33.72	15.86
	A+T	49.95	50.15	52.16	56.77	51.78	51.61	51.40	49.29	49.50	51.48	52.83	51.72	51.00
高体鲕	Т	27.18	25.60	28.41	27.82	22.02	27.78	27.23	27.35	30.64	25.63	26.03	36.97	26.99
S. dumerili	С	32.92	35.05	29.19	26.84	34.52	32.75	30.92	34.47	35.35	32.37	31.96	15.33	33.39
	А	22.77	24.55	23.75	28.95	29.76	23.83	24.17	21.94	18.86	25.85	26.80	14.75	24.01
	G	17.13	14.80	18.64	16.38	13.69	15.64	17.68	16.24	15.15	16.15	15.21	32.95	15.60
	A+T	48.51	47.27	52.22	56.29	51.19	50.81	51.53	50.99	48.82	49.46	53.12	50.19	49.96
五条蛳	Т	26.77	24.16	28.69	27.35	23.21	27.01	27.10	29.34	30.64	24.48	26.26	13.41	26.73
S. quinqueradiata	С	32.72	37.15	28.24	27.35	33.33	33.43	30.92	32.76	34.68	33.02	31.65	33.91	33.83
	А	21.74	23.11	23.53	28.94	27.98	23.80	24.43	21.65	18.18	24.98	26.86	36.78	23.23
	G	18.77	15.57	19.54	16.35	15.48	15.77	17.56	16.24	16.50	17.52	15.23	15.90	16.21

表 6 三种鲫鱼蛋白编码基因碱基组成



图 3 三种狮属鱼类的 13 个蛋白编码基因之间的相似性比较 Fig.3 Similarity of 13 protein-coding genes of the three *Seriola* species 注: CSD: 中国高体狮; JSD: 日本高体狮; SA: 中国黄条狮; SL: 日本黄条狮; SQ: 五条狮

2.7 系统进化分析

以日本花鲈为外类群,构建了高体鲕与其他鲹 科鱼类的系统发育树,由图 4 可知,每个鱼种都独立 分支,纺缍鰺属、小条蛳属和蛳属鱼类聚为单细分支, 且中国与日本髙体蛳聚为一个独立小分支,表明其 具有最近的亲缘关系。在蛳属鱼类中,分化时间上高 体蛳略早于黄条蛳和五条蛳,且高体蛳与长鳍蛳聚 为一支,亲缘关系最近;黄条蛳和五条蛳同属一支。

3 讨论

本研究测定了高体鲕的线粒体基因组全序列,

全长为 16 530 bp, 其碱基组成为(T: 25.53%, C: 30.04%, A: 26.83%, G: 17.60%), GC 含量约 47.64%, 呈现出明显的 AT 偏好性, 这与脊椎动物碱基组成相 似(张方等, 1998)。其中, 高体蛳G 碱基含量与其他硬 骨鱼类如黄条蛳(17.84%) (史宝等, 2019)、斑鱚 (*Sillago aeolus*)(18.75%)(肖家光, 2015)、西里伯斯青 鳉(*Oryzias celebensis*)(17.60%)(马江茹, 2020)等含量 相似, 表现出显著的抗鸟嘌呤现象。本研究基于高体 蛳线粒体基因组的基础上, 对其基因组结构特征、碱 基组成、密码子偏好性及蛋白编码基因等做了系统分 析。结果表明, 在高体蛳线粒体基因组中, 13 个蛋白



0.020

图 4 基于线粒体基因组全序列构建的 NJ 系统进化树

Fig.4 Molecular phylogenetic tree constructed by NJ method based on mitochondrial genome

编码基因除了 ND6 外, 其余均在 H 链上。基因组中重 叠的片段在鱼类中一般只有 7~10 bp, 而在哺乳动物 中一般可达 40~46 bp (Broughton *et al*, 2001; Zhu *et al*, 2013)。本研究发现高体蛳重叠片段长度为 1~14 bp, 其 中,蛋白编码基因 CO II 与 *tRNA^{Lys}*之间的重叠片段最 大(14 bp),在 *tRNA^{Ile}-tRNA^{Gln}、tRNA^{Gln}-tRNA^{Met}、* ND2-*tRNA^{Trp}、CO* III-*tRNA^{Gly}*和 *tRNA^{Thr}-tRNA^{Pro}*之间 重叠片段最小(1 bp)。对于高体蛳密码子偏好性分析 显示,以 NNC 类型的密码子使用频率最高,与其蛋 白编码基因组成中碱基 C 偏好性一致,与条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*)(孟乾等, 2020)结果类似;但 在鲂属(*Megalobrama*)(赖瑞芳等, 2014)、鳑鲏亚科 (Acheilognathinae)(王尚洪, 2015)等鱼类中以 NNA 类 型密码子使用频率较高。可见,不同鱼种在密码子偏 好性选择中存在差异。

本研究通过对中国海域高体狮线粒体基因组的 37 个基因的起止位置、长度及蛋白编码基因等特征 分析显示与 Iguchi等(2012)报道的日本海域高体狮线 粒体基因组特征高度相似。但两者在 rRNA 与蛋白编 码基因上存在差异。在 rRNA 中,中国海域高体狮*16S rRNA* 较日本海域高体狮*16S rRNA* 基因长 18 bp; 蛋 白编码基因中,中国海域高体狮的 *CO I* 蛋白基因与 *ND5* 蛋白基因皆略短于日本海域高体狮,而中国海 域高体狮的 *CO* II 蛋白基因略长于日本海域高体狮, 可能由于中国和日本高体狮存在一定的地理种群隔 离而表现出的位点多态性。

此外,本研究对三种狮属鱼类线粒体基因组特 征、蛋白编码基因及其相似性进行比较发现,高体

鰤在 COⅡ基因中以完全的"TAA"为终止密码子、黄 条手和五条手在 COII 基因中的终止密码子为不完全 的"T",而其余的蛋白质编码基因则是以常见的 TAA 和 TAG 作为终止密码子。tRNA^{Asn}和 tRNA^{Cys}之间的 轻链复制起始区(OL)在 3 种狮属鱼类中是一个 34 bp 的 DNA 片段、控制区是一个变异累积多、进化速度 最快的基因之一,本研究中的三种狮属鱼类,其 D-loop 区 A+T 含量都相对比较高, 该区域调控线粒 体的复制和转录(郭新红等, 2004)。在 tRNA 结构中, tRNA^{Ser}-GCT 基因缺失二氢尿嘧啶臂(DHU 臂)不能形 成三叶草结构,这在斑石鲷(Oplegnathus punctatus) (孟乾等, 2020)等鱼类中也有类似报道。每个蛋白编 码基因在进化速率上是不同的、Zardova 等(1996)把 13 个蛋白质的编码基因依次划分为好、中、差 3 个 组,其中,COI、ND2、ND4、Cytb和ND5这5个基 因作为好, CO II、CO III、ND1 和 ND6 作为中等. 而 ATP6、ATP8、ND3 和 ND4L 则作为差的一组。本研 究通过对三种狮属鱼类蛋白编码基因进行比较分析、 Cvtb 和 ND 基因均可用于蛳属鱼类分子标记,还可筛 选合适蛋白编码基因用作不同地理种群划分、为 **鰤属鱼类的物种鉴定和系统进化分析提供依据。**

本研究基于线粒体基因组全序列通过邻接法构 建了部分鲹科鱼类系统发育树, 蛳属鱼类与小条 蛳属先聚为一类, 再与其他鲹科鱼类聚为一大支, 这 与郑文娟等(2008)采用单个基因 *16S rRNA* 分类结果 一致, 在分化时间上高体蛳要晚于黄条蛳, 且黄条 蛳与五条蛳亲缘关系最近, 同属于一个细支。高体 蛳和长鳍蛳同属一个分支, 亲缘关系最近。

4 结论

本研究基于线粒体基因组结构特征比较,推测 中国海域高体鲕与日本海域高体鲕可能属于同一种 群,但可能存在一定的地理隔离。结合形态学与生物 信息学成功将髙体鲕与其他鲕属鱼类属准确区分, 为鲕属鱼类物种鉴别、种群划分和种质资源保护及 可持续利用提供技术支撑,助力我国鲕鱼养殖产业 的持续健康发展。

参考文献

- 马江茹,2020. 西里伯斯青鳉线粒体基因组全序列和中华青鳉 群体遗传结构的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学:29-30.
- 王尚洪, 2015. 鳑鲏亚科三种鱼类线粒体全基因组测定及其比较基因组学分析[D]. 南昌: 南昌大学: 54-76.
- 史宝,柳学周,刘永山,等,2019. 黄条蛳线粒体全基因组测

序及结构特征分析[J]. 中国水产科学, 26(3): 405-415.

- 肖家光, 2015. 基于线粒体基因组全序列的鱚属鱼类系统发育 研究[D]. 青岛: 中国海洋大学: 24-25.
- 张方, 米志勇, 1998. 动物线粒体 DNA 的分子生物学研究进展[J]. 生物工程进展, 18(3): 25-31.
- 陈大刚,张美昭,2015. 中国海洋鱼类[M]. 青岛:中国海洋大 学出版社: 1096-1097.
- 陈四海, 区又君, 李加儿, 2011. 鱼类线粒体 DNA 及其研究进 展[J]. 生物技术通报(3): 13-20.
- 周传江,马爱喆,汪曦,等,2019. 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),47(2):74-82.
- 郑文娟,朱世华,邹记兴,等,2008. 基于 16S rRNA 部分序列 探讨 12 种鲹科鱼类的分子系统进化关系[J]. 水产学报, 32(6): 847-854.
- 孟乾,张志勇,张志伟,等,2020. 斑石鲷和条石鲷线粒体基因组密码子使用分析[J].水产科学,39(5):702-709.
- 郭新红,刘少军,刘巧,等,2004. 鱼类线粒体 DNA 研究新进 展[J]. 遗传学报,31(9):983-1000.
- 黄小林,杨育凯,林黑着,等,2018. 篮子鱼属线粒体基因组 序列系统发育信息分析[J]. 生物学杂志,35(5):33-36.
- 程佩琳, 俞丹, 刘焕章, 等, 2021. 基于线粒体基因组全序列 的鲟形目鱼类(Pisces: Acipenseriformes)的分子系统发育 重建[J]. 水生生物学报, 45(3): 487-494.
- 赖瑞芳, 张秀杰, 李艳和, 等, 2014. 鲂属鱼类线粒体基因组的比较及其系统发育分析[J]. 水产学报, 38(1): 1-14.
- 廖志强, 2003. 高体蛳网箱养殖技术[J]. 中国水产(12): 60-61.
- BERNAL-RAMÍREZ J H, ADCOCK G J, HAUSER L, et al, 2003. Temporal stability of genetic population structure in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus*, and relationship to coastal currents [J]. Marine Biology, 142(3): 567-574.
- BROUGHTON R E, MILAM J E, ROE B A, 2001. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA [J]. Genome Research, 11(11): 1958-1967.
- CUROLE J P, KOCHER T D, 1999. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes [J]. Trends in Ecology & Evolution, 14(10): 394-398.
- IGUCHI J, TAKASHIMA Y, NAMIKOSHI A, *et al*, 2012. Species identification method for marine products of *Seriola* and related species [J]. Fisheries Science, 78(1): 197-206.
- NUGROHO E, TANIGUCHI N, KATO K, et al, 2000. Genetic difference among seed populations of greater amberjack used in aquaculture farm of Japan [J]. Aquaculture Science, 48(4): 665-674.
- PREMACHANDRA H K A, LAFARGA-DE LA CRUZ F, TAKEUCHI Y, et al, 2017. Genomic DNA variation confirmed Seriola lalandi comprises three different populations in the Pacific, but with recent divergence [J]. Scientific Reports, 7(1): 9386.
- SATOH T P, MIYA M, MABUCHI K, *et al*, 2016. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes [J]. BMC Genomics, 17(1): 719.
- ZARDOYA R, MEYER A, 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving

relationships among vertebrates [J]. Molecular Biology and Evolution, 13(7): 933-942.

ZHU Y X, CHEN Y, CHENG Q Q, et al, 2013. The complete

mitochondrial genome sequence of *Schizothorax macropogon* (Cypriniformes: Cyprinidae) [J]. Mitochondrial DNA, 24(3): 237-239.

COMPLETE SEQUENCE AND GENE ORGANIZATION OF THE MITOCHONDRIAL GENOME OF SERIOLA DUMERILI

WANG Kai-Jie^{1, 2, 3}, XU Yong-Jiang^{1, 2}, CUI Ai-Jun^{1, 2}, LIU Xue-Zhou^{1, 2}, JIANG Yan^{1, 2}, WANG Bin^{1, 2} (1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 3. National Engineering Research Center For Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022,

China)

To identify the species of Seriola and strengthen the management of genetic diversity and protection of Abstract germplasm resources of the Seriola, the complete mitochondrial genome sequence of Seriola dumerili cultured in the East China Sea was successfully obtained by second-generation sequencing and bioinformatic analysis. The total length of the mitochondrial genome sequence was 16 530 bp with typical mtDNA components including 13 proteins and 22 tRNAs, 2 rRNAs and a D-Loop region, in which the A content was 26.83%, G was17.6%, C was 30.04% and T was 25.53%. Except for ND6, tRNA^{Gln}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Glu}, and tRNA^{Pro}, all the other genes were encoded on the H-strand. The A+T content of the complete mitochondrial genome sequence and the protein coding gene were 52.36% and 51.72%, respectively. Among the 22 tRNA genes, except for tRNAser-GCT, the other 21 tRNA genes contained typical secondary structure of clover. The results show that the similarity of 13 protein coding genes in the whole mitochondrial genome of the three species was over 85% to 100%. The genes encoding CO I, CO II, and ND5 showed difference at the start point, length, and starting codon between Chinese and Japanese S. dumerili. Furthermore, the phylogenetic tree was constructed with the complete mitochondrial genome sequences of four species from Seriola genus. The phylogenetic tree showed that S. aureovittata and S. quinqueradiata were clustered in one branch, and the phylogenetic tree of S. dumerili and S. rivoliana belonged to the same proximal branch. The phylogenetic relationship between S. aureovittata and S. quinqueradiata, and between S. dumerili and S. rivoliana are the closest.

Key words Seriola dumerili; mitochondrial genome; sequence analysis; phylogenetic tree