

M、F型CO II基因在雌雄三角帆蚌不同发育时期的表达差异研究

陈亚¹, 王雅昱¹, 汪桂玲^{1,2*}, 何方殊¹, 李家乐^{1,2}

(1. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 与传统的母系遗传不同, 双壳贝类线粒体有M和F型2种mtDNA, 称为双单亲遗传(doubly uniparental inheritance, DUI)。为了探究DUI的形成机制, 实验利用RACE方法得到三角帆蚌M、F-type CO II基因的cDNA全长; 荧光定量检测各时期各组织中M、F-type CO II基因的表达。结果发现, ①M-type CO II基因的cDNA序列全长1244 bp, F-type CO II基因的cDNA序列全长808 bp, M型3'端较F型有一段546 bp的特异性延长序列; 跨膜结构预测显示M-type CO II基因3'特异性延伸区域有4个跨膜结构, 推测这段延伸序列具有一定的功能性; ②早期幼龄(胚胎期-5月龄)三角帆蚌的组织团中, M、F-type CO II基因均能检测出, 且同时期中F-type CO II基因的表达量显著高于M-type CO II; ③6月龄蚌各组织中, F-type CO II基因在各组织中表达量明显高于M型的表达量, 而M-type CO II基因在性腺中表达明显高于其他组织; ④一龄雌性各组织中, M、F-type CO II基因均有表达; 而一龄雄性各组织中, M-type CO II基因仅在性腺中表达; ⑤二龄雌性各组织中, M、F-type CO II基因均有表达; 二龄雄性各组织中, F-type CO II基因除性腺外的其他组织中均有低量表达, M-type CO II基因仅在性腺中表达, 且表达量较高。研究表明, 在三角帆蚌雌雄个体发育过程中, M-type mtDNA在组织中选择性降解或聚集。

关键词: 三角帆蚌; 双单亲遗传; CO II基因; 表达差异

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

大多数生物的线粒体基因(mtDNA)都遵循严格的母系遗传^[1](strict maternal inheritance, SMI), 但是在Donacidae, Hyriidae, Mytilidae, Solenidae, Margaritiferidae, Unionidae和Veneridae^[2-5]等双壳类生物中有两种线粒体遗传方式, 一种通过精子(M-type)传递, 另一种通过卵子(F-type)传递。F-type mtDNA通过雌性亲本传给雌或雄性后代, 而M-type mtDNA通过雄性亲本传给雌性后代^[6]。所以在性成熟的雌性个体中只有F-type mtDNA表达, 因此雌性具有同质性; 在性成熟的雄性个体中M、F-type mtDNA都有表达, 因此雄性具有异质性, 这种有别于母系遗传的mtDNA

传递方式称为双重单亲遗传^[7](doubly uniparental inheritance, DUI)。

目前已发现DUI现象广泛存在于海洋贻贝科、海洋帘蛤科和淡水珠蚌中, 其线粒体基因组中的单基因CO II在雌、雄个体中存在较大的差异。M-type CO II基因上有一段特异性的功能延伸区域^[8-9], 该特异性延长片段可作为鉴别M、F-type mtDNA的一种分子标记, 因此CO II基因被作为指示基因用于研究DUI形成的相关机制等问题^[10]。Helene等^[7, 11]研究证明, 淡水蚌类的M、F-type CO II基因核苷酸序列多态性存在显著差异, F-type CO II 5'端相似性较高, M-type CO II相似性

收稿日期: 2016-12-15 修回日期: 2017-03-29

资助项目: 国家自然科学基金(31772835); 上海市教委科研创新重点项目(13ZZ128); 上海高校知识服务平台项目(ZF1206)

通信作者: 汪桂玲, E-mail: glwang@shou.edu.cn

较低。免疫荧光染色检测结果显示,淡水蚌*V.ellipsiformis*中M-type CO II在雄性性腺、雌性性腺的滤泡壁、卵胞质以及卵母细胞的细胞核均表达^[12-13];海洋贻贝中仅在雄性性腺中检测到M-type CO II的表达^[14]。Chakrabarti^[15]利用Western-Blot检测到M-type CO II蛋白C端延长的存在,并且在精巢中M-type CO II蛋白优先表达,在雌性组织中无M-type CO II蛋白表达,证明M-type CO II基因在雄性生殖中有一定的作用。

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)在珍珠养殖产业中占有较大比重,产量占淡水珍珠总产量的80%^[16],具有和其他淡水蚌类相同的生长发育周期(胚胎、钩介幼虫、稚蚌、幼蚌和成蚌)^[17]。三角帆蚌的性别对产珠性能存在一定影响,雄蚌所产珍珠在总重、粒重和直径上都优于雌蚌,表现出良好的育珠性能^[18]。本实验室前期研究工作表明三角帆蚌具有M、F-type 2种线粒体基因组^[19],在此基础上本研究通过M、F-type CO II基因在三角帆蚌不同发育阶段的表达差异来研究DUI可能的形成机制及其与性别的关系,具有一定的理论价值和实践意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

三角帆蚌采自浙江省武义三角帆蚌养殖基地,按照发育时间分别取胚胎、钩介幼虫、稚蚌、幼蚌和成蚌若干。RNAsimple Total RNA Kit、FastQuant RT Kit (With gDNase)、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)等试剂购于天根生化(北京)有限公司。SMART RACE cDNA Amplification Kit购于Clontech公司。

1.2 实验方法

三角帆蚌RNA制备 胚胎期至5月龄个体较小,仅取性腺部位的组织团;6月龄取肝、鳃、斧足、外套膜和性腺组织;1龄和2龄分别取肝、鳃、肾、斧足、外套膜和性腺组织,按照RNAsimple Total RNA Kit试剂说明书提取RNA,所得RNA样品经电泳和分光光度计检测合格后于-80 °C保存。

M、F-type CO II基因的克隆 分别提取二龄雌、雄三角帆蚌的性腺组织总RNA,利用SMART RACE cDNA Amplification Kit反转录获得cDNA模板。根据三角帆蚌外套膜cDNA文库中已标注的EST序列,设计特异性引物F-3、F-5、M-3和M-5(表1),通过RACE方法,参照SMART RACE cDNA Amplification Kit说明书进行实验。所得PCR产物纯化连接后转化到E.coli DH5 α 中,挑选阳性克隆送生工(上海)测序。测序拼接的序列在NCBI上验证后,使用ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)^[20]确定开放阅读框(ORF),Protparam分析各物理参数,TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)预测跨膜结构。

荧光定量PCR实验 将符合标准的RNA按照FastQuant RT Kit (With gDNase)的说明书进行反转,获得cDNA。根据三角帆蚌M、F-type CO II基因的cDNA序列分别设计特异性引物FC-F、FC-R和MC-F和MC-R(表1),并以Elongation factor 1-alpha (EF1 α)做为内参基因^[21],使用SuperReal Pre-Mix Plus (SYBR Green)荧光定量试剂盒检测M、F-type CO II在各时期、各组织中的表达量。反应体系为:SYBR 10 μ L,模板1.6 μ L,引物各0.8 μ L,ddH₂O 6.8 μ L,反应条件为:95 °C预变性30 s;

表1 实验中的引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer	引物序列 sequence (5'to 3')	温度/°C annealing temperature	产物 product
F-3	AATCTCCCTACTGCCCCAAC	54	F-CO II 3' RACE
F-5	CATATGAGCTTTTGAGGTC	58	F-CO II 5' RACE
M-3	ACGGGCAGTGTAGTGAGTTATG	54	M-CO II 3' RACE
M-5	ATGAGCTTATGGGGTCAAAT	60	M-CO II 5' RACE
FC-F	TGGAGGTGGATAATCGGTGTG	58	F-type CO II 基因序列
FC-R	TAGAGGAAGAGCCCAAGCAT		F-type CO II sequence II
MC-F	CACATAACTACTACTGCCCCG	58	M-type CO II 基因序列
MC-R	GTTGTTGGAGGTGGATAATCGA		M-type CO II sequence

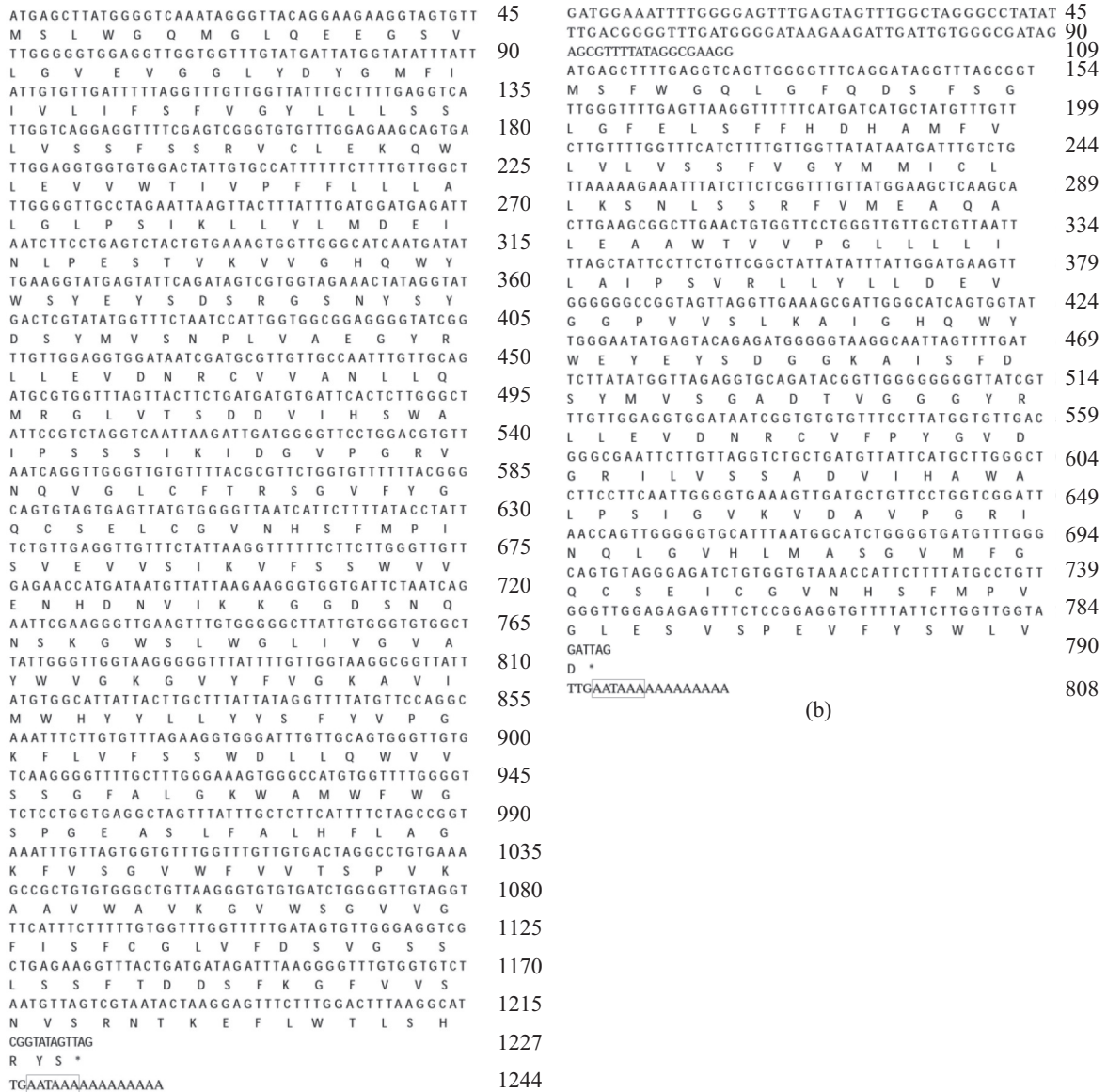
95 °C 5 s, 58 °C 30 s, 72 °C 50 s, 40 cycles, 实验得到的数据用2^{-ΔΔCt}法处理后绘制矩形图。

2 结果

2.1 M、F-type COII 基因序列对比分析

M-type COII 基因的cDNA序列全长1244 bp, 包含17 bp的3'UTR和1227 bp的ORF, 无5'UTR,

编码408个氨基酸, 3'UTR含有典型的多聚腺苷酸加尾信号序列AATAAA和PolyA (图1-a); Prot-param程序推导的蛋白质分子量为45.59 ku, 蛋白质分子式为C₂₁₃₇H₃₁₇₀N₅₀₈O₅₇₁S₁₅, 理论等电点为6.17, 不稳定指数为29.17, 蛋白质性质稳定, 表现为疏水性。F-type COII 基因的cDNA序列全长808 bp, 包含109 bp的5'UTR, 18 bp的3'UTR和681 bp的



(a)

(b)

图 1 三角帆蚌M、F-type COII 基因cDNA序列全长及氨基酸序列预测

(a) M-type COII 基因cDNA序列全长及氨基酸序列预测; (b) F-type COII 基因cDNA序列全长及氨基酸序列预测; 加框的密码子表示加尾信号, *表示终止密码子

Fig. 1 M and F-type COII gene cDNA sequences and predicted amino acid sequences in *H.cumingii*

(a) M-type COII gene cDNA sequences and predicted amino acid sequences; (b) F-type COII gene cDNA sequences and predicted amino acid sequences; Letters in boxes are used to indicate the polyadenylation signal sequence, stop codons are marked with asterisk (*)

ORF, 编码226个氨基酸, 3'端包含典型的含有典型的多聚腺苷酸加尾信号序列AATAAA和PolyA (图1-b); 蛋白质分子量为24.70 ku, 蛋白分子式为 $C_{1138}H_{1720}N_{276}O_{314}S_{13}$, 理论等电点为4.74, 不稳定指数30.86, 蛋白性质稳定, 表现为疏水性。

2.2 M、F-type CO II 基因跨膜结构分析

M、F-type CO II 蛋白结构的跨膜区域预测

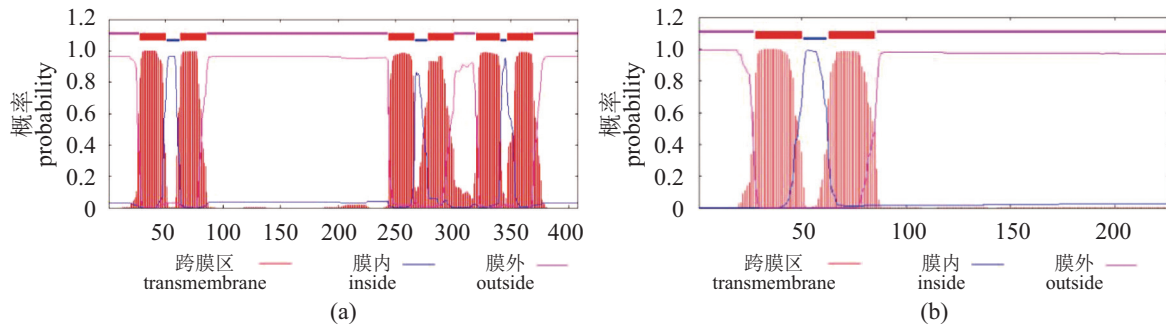


图2 三角帆蚌M、F-type CO II 基因跨膜结构图

(a) M-type CO II 跨膜结构图; (b) F-type CO II 跨膜结构图

Fig. 2 Transmembrane areas predicted in F and M-types CO II from *H.cumingii*

(a) Transmembrane areas predicted in M-type CO II; (b) Transmembrane areas predicted in F-type CO II

2.3 各时期三角帆蚌M、F-type CO II 基因表达分析

胚胎期-5月龄组织团中M、F-type CO II 基因的表达 三角帆蚌早期性腺组织团中的荧光定量检测结果显示: M-type CO II 在各时期中均能检测到表达, 且相对表达量较为稳定, 5月份时最高(图3-a), F-type CO II 在各时期中均有表达, 相对表达量差异较大, 5月份时最高(图3-b), 在相同的时期中, F-type CO II 相对表达量远高于M-type CO II 基因。

6月龄三角帆蚌各组织M、F-type CO II 基因表达 6月龄三角帆蚌还无法准确辨别雌雄, 随机取10只混样, 荧光定量检测其各组织中M、F-type CO II 的表达。结果显示: M、F-type CO II 基因在各组织中均有表达。M-type CO II 基因在性腺中的相对表达丰度最高, 在其他组织中较低(图4-a), F-type CO II 在斧足、鳃和肝脏中的相对表达丰度较高(图4-b), 在相同组织中, F-type CO II 在各组织中的相对表达量均高于M-type CO II。

一龄三角帆蚌中M、F-type CO II 基因的表达 一龄雌雄三角帆蚌各组织中M、F-type CO II 基因

结果显示(图2-a, b), M、F-type CO II 基因的5'端均包含两个跨膜结构, 跨膜结构位置相同, 分别位于28~50 aa和63~85 aa, 与线粒体传递的功能有关。M-type CO II 3'端相对F-type CO II 有一段546 bp的特异性延伸, 这段延伸序列编码182个氨基酸, 在延长结构中跨膜结构预测显示存在4个跨膜结构域, 推测其可能参与雄性性腺的发育, 与性别分化有一定的关系。

的荧光定量结果显示: 雌性各组织中, M-type CO II 在各组织中均有表达, 在性腺中相对表达量最高, 其余各组织中的表达量无明显差异(图5-a), F-type CO II 在各组织中均有表达, 在肝中相对表达量最高, 在斧足中相对表达量最低(图5-b); 雄性各组织中, 仅在性腺中检测到M-type CO II 基因的表达, 在其他组织中没有检测到表达(图5-c), F-type CO II 基因在各组织中均有表达, 肝脏中的相对表达量最高, 性腺中相对表达量最低(图5-d)。

二龄三角帆蚌中M、F-type CO II 基因的表达 二龄雌雄三角帆蚌各组织中M、F-type CO II 基因荧光定量检测结果显示: 雌性三角帆蚌中, M-type CO II 基因在各组织中存在微量表达, 在性腺中最低(图6-a), F-type CO II 在各组织中均有表达, 相对表达量无明显差异性, 仅在性腺中相对表达量略高(图6-b), 同时发现M-type CO II 基因在雌性三角帆蚌的各组织中的表达丰度远低于F-type CO II。雄性三角帆蚌中, F-type CO II 基因在除性腺外的各组织中均能检测到表达, 在肾中的相对表达量最高(图6-d); 而M-type CO II 基因仅在性腺中检测到表达(图6-c)。

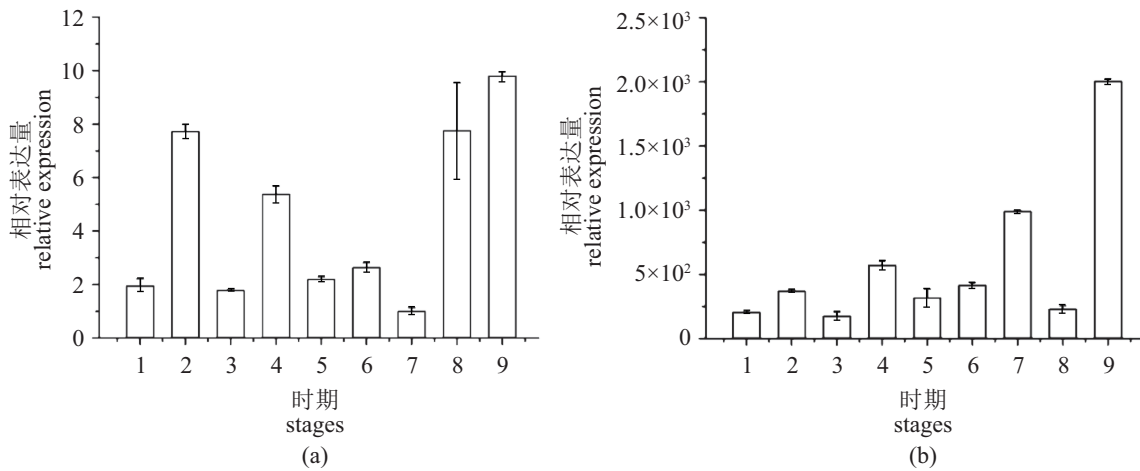


图 3 M、F-type CO II 在三角帆蚌各时期中的表达

(a) M-type CO II 基因在各时期中的表达; (b) F-type CO II 基因在各时期中的表达; 1. 胚胎期; 2. 钩介幼虫; 3. 15天; 4. 1月; 5. 1.5月; 6. 2月; 7. 3月; 8. 4月; 9. 5月

Fig. 3 The expression level of M, F-type CO II in different developmental stages of *H.cumingii*

(a) The expression level of M-type CO II in different developmental stages; (b) The expression level of F-type CO II in different developmental stages. 1. embryos; 2. glochidia; 3. 15 days; 4. 1 Month; 5. 1.5 Months; 6. 2 Months; 7. 3 Months; 8. 4 Months; 9. 5 Months

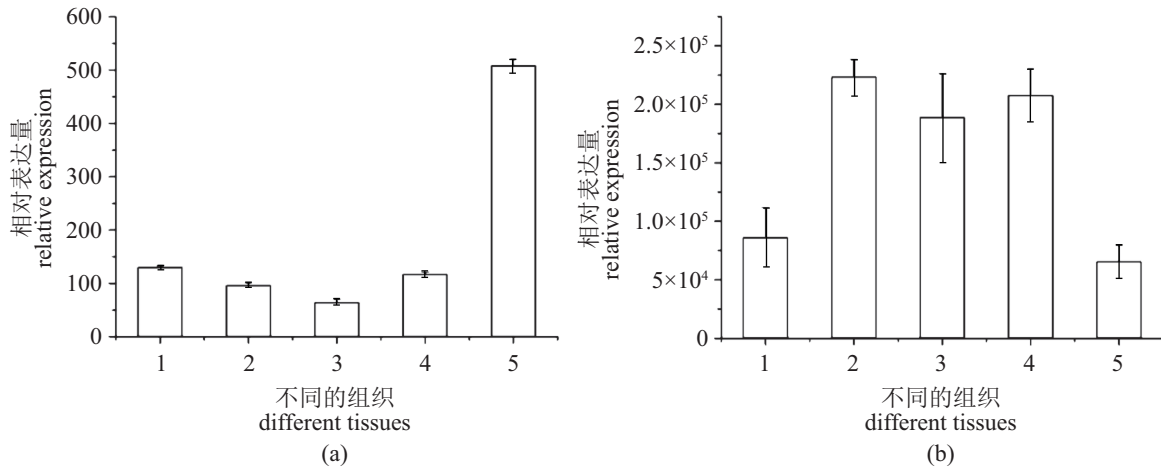


图 4 6月龄三角帆蚌各组织中M、F-type CO II 基因的表达

(a) M-type CO II 基因在各组织中的表达; (b) F-type CO II 基因在各组织中的表达; 1. 外套膜; 2. 斧足; 3. 鳃; 4. 肝; 5. 性腺

Fig. 4 The expression level of M, F-type CO II in different tissues of six-month-old *H.cumingii*

(a) The expression level of M-type CO II in different tissues; (b) The expression level of F-type CO II in different tissues. 1. mantle; 2. foot; 3. gill; 4. liver; 5. gonad

3 讨论

目前存在两个关于DUI的机制假说, 其一为X-W-Z系统假说^[22], 共有X、W、Z三个因素参与受精卵中M-type mtDNA的降解或聚集。W因子被假定标记在M-type mtDNA的外表面, 能被卵子细胞质中的X因子识别, 结合导致M-type mtDNA的降解, 使受精卵发育成雌性。而一些卵母细

胞质中存在Z因子与X因子相结合, 从而保护了M-type mtDNA不被降解, 发育成雄性。另一个机制假说则提出在存在DUI现象的物种中, 其M-type mtDNA的降解存在着三个时期^[23], 胚胎初期时雌雄个体中都具备F-type和M-type mtDNA, 在第一个时期, 胚胎中的M-type mtDNA聚集在一起; F-type mtDNA随机的分布^[24]。到第二个期

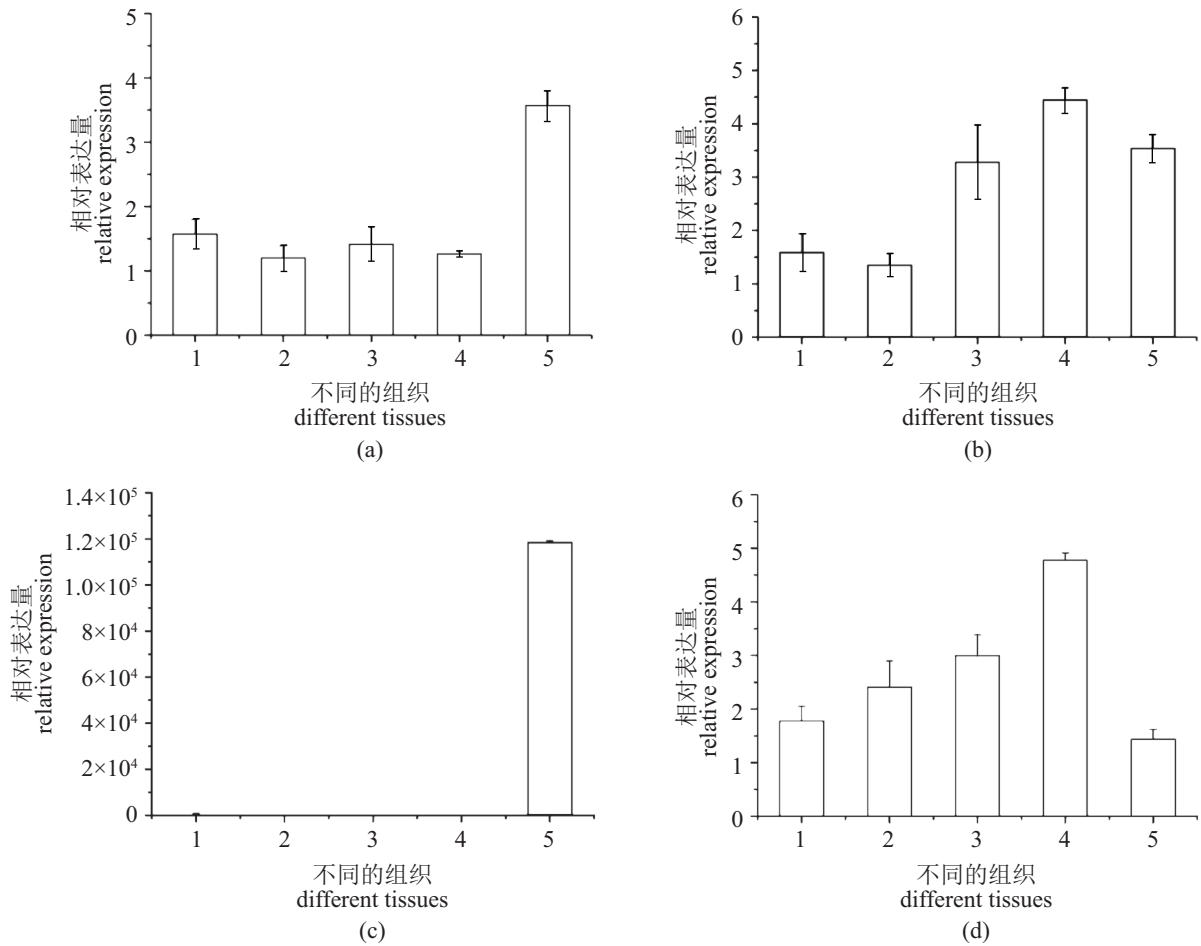


图5 一龄雌雄三角帆蚌各组织中M、F-type COII 基因的表达

(a) M-type COII 基因在雌性各组织中的表达; (b) F-type COII 基因在雌性各组织中的表达; (c) M-type COII 基因在雄性各组织中的表达; (d) F-type COII 基因在雄性各组织中的表达; 1. 外套膜; 2. 斧足; 3. 鳃; 4. 肝; 5. 性腺

Fig. 5 The expression level of M, F-type COII in different tissues of one-year-old *H. cumingii*

(a) The expression of M-type COII in female tissues; (b) The expression of F-type COII in female tissues; (c) The expression of M-type COII in male tissues; (d) The expression of F-type COII in male tissues. 1. mantle; 2. foot; 3. gill; 4. liver; 5. gonad

时, 雌性中的M-type mtDNA开始出现降解, F-type mtDNA开始增多; 雄性中的M、F-type mtDNA均开始增多。到达第三个时期, 雌性中的M-type mtDNA已经完全降解, 雄性中的M-type mtDNA占据主导位置。F-type和M-type mtDNA各自的数量将明显多于其在时期1和时期2的数量。该假说中时期3被认为是存在DUI物种中的一个关键时期。

本研究得到M、F-type COII 基因的cDNA全序列, 其序列中不存在内含子序列, 具有高效的碱基利用率。结果显示, M-type COII 基因比F-type COII 基因在3'端多了一段长达546 bp的序列, 这段特异性延伸序列形成的多肽片段可能以某种构象插入到M型细胞色素氧化酶亚基中,

从而达到增加精子活力的目的。在预测的氨基酸结构中, 这段特异性延长的碱基被翻译成182个氨基酸, 包含了4个跨膜结构, 这4个M-type COII 独有的跨膜结构可能参与到雄性性腺的发育中, 在性别分化中具有一定的作用。与其他淡水贝类的序列比对显示, M-type具有明显的差异, 特别是3'延伸区, 具有较高的进化速率。这也证明M-type mtDNA比F-type mtDNA具有更快的进化速率, 这些结论在之前也有过报道^[7]。

QRT-PCR检测M、F-type COII 在各时期、各组织中的表达的结果显示, 从胚胎期到5月龄的三角帆蚌组织团中, M、F-type COII 基因在各时期均有表达。由于早期三角帆蚌较小, 组织尚未分化完全, 结合M、F-type COII 基因在

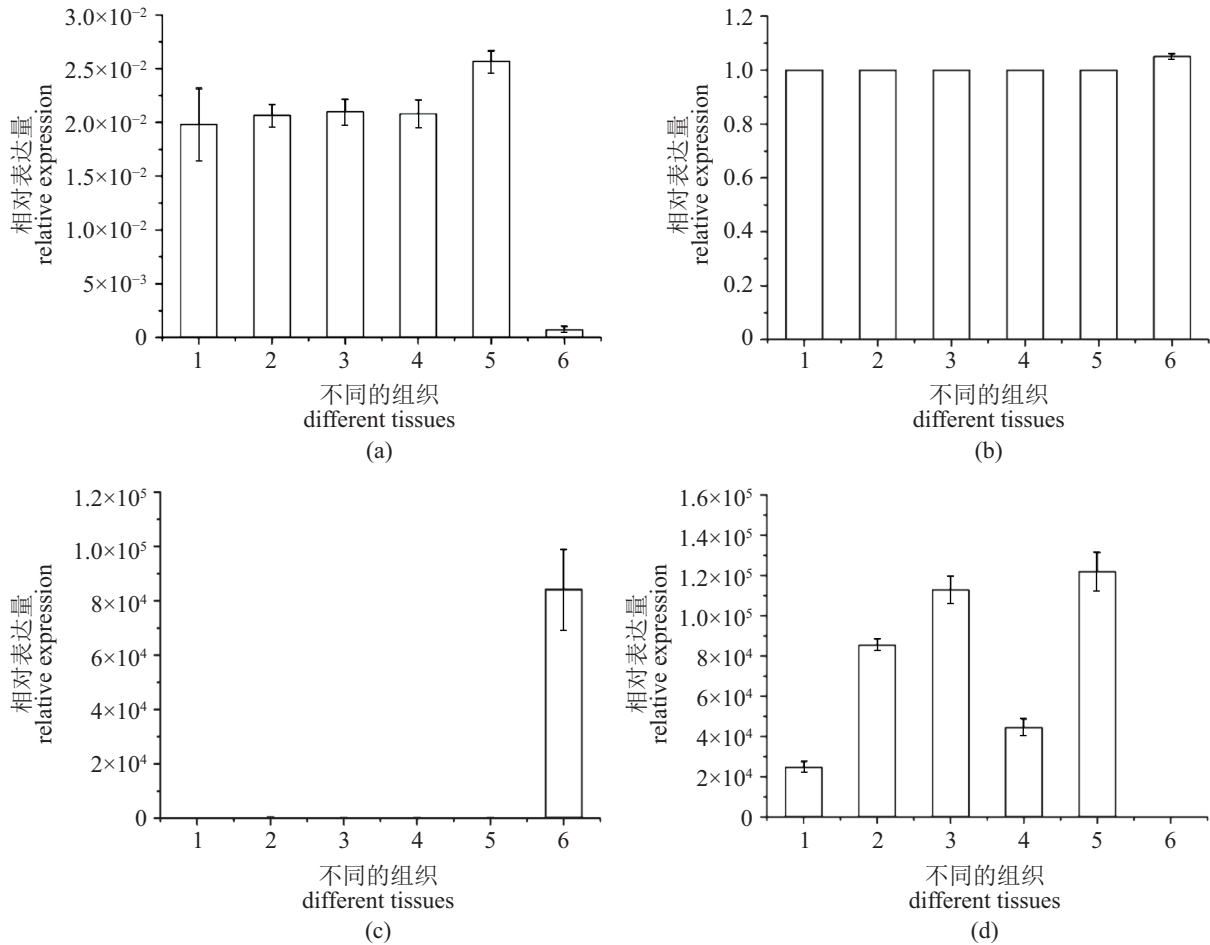


图 6 二龄雌雄三角帆蚌各组织中M、F-type CO II 基因的表达

(a) M-type CO II 基因在雌性各组织中的表达; (b) F-type CO II 基因在雌性各组织中的表达; (c) M-type CO II 基因在雄性各组织中的表达; (d) F-type CO II 基因在雄性各组织中的表达; 1. 外套膜; 2. 斧足; 3. 鳃; 4. 肝; 5. 肾; 6. 性腺

Fig. 6 The expression level of M, F-type CO II in different tissues of two-year-old *H.cumingii*

(a) The expression of M-type CO II in female tissues; (b) The expression of F-type CO II in female tissues; (c) The expression of M-type CO II in male tissues; (d) The expression of F-type CO II in male tissues. 1. mantle; 2. foot; 3. gill; 4. liver; 5. gonad

6月龄中各组织的表达情况, 可以推测其在早期未完全分化的组织中也是存在的。同时发现6月龄中, 相同组织的F-type CO II 表达量明显高于M-type CO II, 这可能与mtDNA在发育初期, 由母本传递的F-type mtDNA起主导作用这一DUI遗传规律有关。而在一龄三角帆蚌中, 性腺尚未成熟, 在雌蚌各组织中均能检测到M、F-type CO II 的表达; 雄蚌各组织中F-type CO II 基因也均能检测到, 但在性腺中较低; 而M-type CO II 基因只在性腺中检测到表达。二龄三角帆蚌中, 性腺已基本发育成熟, F-type CO II 基因在雌雄三角帆蚌除性腺外的各组织中均能检测到表达, M-type CO II 基因只在雄蚌性腺中检测到明显表达(在雌蚌各组织中的表达量十分低), 这种表达方

式与经典的DUI现象基本一致。

Ghiselli^[23]研究发现, 菲律宾花蛤(*Venerupis philippinarum*)从受精卵发育到钩介幼虫时期, 雌蚌和雄蚌的性腺发生组织中同时存在M、F-type mtDNA基因。从钩介幼虫到性腺成熟的过程中, 将来发育成雌蚌的个体的性腺中M-type基因组逐渐降解, F-type基因组逐渐增多, 而将来发育成雄蚌的个体的性腺中F-type基因组逐渐降解, M-type基因组逐渐增多。推测在三角帆蚌发育过程中, 幼龄时期, M、F-type mtDNA是同时存在于雌雄各组织中的; 随着性腺的发育, 一部分个体中M-type mtDNA在体组织中逐渐发生降解, 只在性腺中聚集, 而F-type mtDNA在性腺组织中发生降解, 因此这一部分个体未来将发

育成雄性，而在其余个体中，M-type mtDNA在所有组织中均发生降解，这一部分未来将发育成雌性；最终，在发育成熟的雄性中，M-type mtDNA只保存在性腺组织中，F-type mtDNA保存在体组织中；而在雌性中，各组织中只存在F-type mtDNA。由于这个过程的发生需要很长的时间，所以我们在不同年龄阶段不同组织中能检测到M、F-type mtDNA差异较大的存在情况；由于降解机制的不完全，有时在雌性或雄性成熟性腺中仍能检测到M、F-type mtDNA的存在，但是这并不与DUI现象相违背。本实验只是选取了几个大范围的时间点对M、F-type mtDNA进行检测，在未来的研究中，需要对三角帆蚌个体中M、F-type mtDNA进行实时监测，了解其在三角帆蚌发育过程中各组织的表达情况，以及与发育性别的联系，以此进一步探明DUI现象的形成机制和DUI现象同三角帆蚌性别决定的关系。

参考文献:

- [1] Chat J, Chalak L, Petit R J. Strict paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in intraspecific crosses of kiwifruit[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99(1-2): 314-322.
- [2] Skibinski D O, Gallagher C, Beynon C M. Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*[J]. *Genetics*, 1994, 138(3): 801-809.
- [3] Zouros E, Ball A O, Saavedra C, *et al.* An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(16): 7463-7467.
- [4] Theologidis I, Fodelianakis S, Gaspar M B, *et al.* Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia[J]. *Evolution*, 2008, 62(4): 959-970.
- [5] Passamonti M, Scali V. Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia)[J]. *Current Genetics*, 2001, 39(2): 117-124.
- [6] Zouros E. Biparental inheritance through uniparental transmission: The doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA[J]. *Evolutionary Biology*, 2013, 40(1): 1-31.
- [7] Breton S, Beaupré H D, Stewart D T, *et al.* Comparative mitochondrial genomics of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida) with doubly uniparental inheritance of mtDNA: Gender-specific open reading frames and putative origins of replication[J]. *Genetics*, 2009, 183(4): 1575-1589.
- [8] Curole J P, Kocher T D. Evolution of a unique mitotype-specific protein-coding extension of the cytochrome *c* oxidase II gene in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida)[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 61(3): 381-389.
- [9] Chapman E G, Piontkivska H, Walker J M, *et al.* Extreme primary and secondary protein structure variability in the chimeric male-transmitted cytochrome *c* oxidase subunit II protein in freshwater mussels: Evidence for an elevated amino acid substitution rate in the face of domain-specific purifying selection[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8: 165.
- [10] Kuroiwa T. Review of cytological studies on cellular and molecular mechanisms of uniparental (maternal or paternal) inheritance of plastid and mitochondrial genomes induced by active digestion of organelle nuclei (nucleoids)[J]. *Journal of Plant Research*, 2010, 123(2): 207-230.
- [11] Doucet-Beaupré H, Breton S, Chapman E G, *et al.* Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca): Searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10: 50.
- [12] Chakrabarti R, Shepardson S, Karmakar M, *et al.* Extra-mitochondrial localization and likely reproductive function of a female-transmitted cytochrome *c* oxidase subunit II protein[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2009, 51(5): 511-519.
- [13] Breton S, Stewart D T, Shepardson S, *et al.* Novel protein genes in animal mtDNA: A new sex determination system in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida)?[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(5): 1645-1659.
- [14] Obata M, Sano N, Komaru A. Different transcriptional ratios of male and female transmitted mitochondrial DNA and tissue-specific expression patterns in the blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Development, Growth & Regeneration*, 2011, 53(7): 878-886.

- [15] Chakrabarti R, Walker J M, Stewart D T, *et al.* Presence of a unique male-specific extension of C-terminus to the cytochrome *c* oxidase subunit II protein coded by the male-transmitted mitochondrial genome of *Venustaconcha ellipsiformis* (Bivalvia: Unionoidea)[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(3): 862-866.
- [16] 韩学凯, 陈夏君, 白志毅, 等. 三角帆蚌HcTyr基因内壳色性状相关SNP筛选及图谱定位[J]. *水产学报*, 2017, 41(7): 1044-1053.
- Han X K, Chen X J, Bai Z Y, *et al.* Detection of shell nacre colour-related SNP and gene mapping of HcTyr gene in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(7): 1044-1053(in Chinese).
- [17] 陈修报, 杨健. 淡水蚌类发生与发育研究进展[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(4): 944-952.
- Chen X B, Yang J. Gametogenesis and development of freshwater bivalve molluscs: A review[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(4): 944-952(in Chinese).
- [18] Zhao Y C, Bai Z Y, Fu L L, *et al.* Comparison of growth and pearl production in males and females of the freshwater mussel, *Hyriopsis cumingii*, in China[J]. *Aquaculture International*, 2013, 21(6): 1301-1310.
- [19] 蒋文枰. 褶纹冠蚌和三角帆蚌线粒体基因组全序列分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- Jiang W P. Analysis of complete mitochondrial genomes of *Cristaria plicata* and *Hyriopsis cumingii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2010 (in Chinese).
- [20] Xu X Y, Shen Y B, Yang X M, *et al.* Cloning and characterization of TIMP-2 b gene in grass carp[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 159(2): 115-121.
- [21] Bai Z Y, Lin J Y, Ma K Y, *et al.* Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the pearl mussel, *Hyriopsis cumingii*, during biomineralization[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289(4): 717-725.
- [22] Batista F M, Lallias D, Taris N, *et al.* Relative quantification of the M and F mitochondrial DNA types in the blue mussel *Mytilus edulis* by real-time PCR[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2011, 77(1): 24-29.
- [23] Ghiselli F, Milani L, Passamonti M. Strict sex-specific mtDNA segregation in the germ line of the DUI species *Venerupis philippinarum* (Bivalvia: Veneridae)[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(2): 949-961.
- [24] Cao L Q, Kenchington E, Zouros E. Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*)[J]. *Genetics*, 2004, 166(2): 883-894.

Full-length cDNA cloning of M and F-type *CO II* genes and expression in different age freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*

CHEN Ya¹, WANG Yayu¹, WANG Guiling^{1,2*}, HE Fangshu¹, LI Jiale^{1,2}

(1. Key Laboratory of Genetic Resources for Freshwater Aquaculture and Fisheries,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306, China)

Abstract: The mitochondrial genetic patterns of bivalve mollusc are different from the traditional maternal inheritance. The mitochondria of bivalve molluscs have two kinds of mtDNA of M type and F type, which are called doubly uniparental inheritance (DUI). In order to explore the mechanism of DUI, the full-length cDNA of M and F-type *CO II* genes in *Hyriopsis cumingii* was obtained by RACE. qRT-PCR was used to detect the expression of M and F-type *CO II* genes in different tissues and stages. The results are as follows: 1. The full-length cDNA sequences of M-type *CO II* gene and F-type *CO II* gene were 1244 bp and 808 bp respectively, and the 3' end of M-type *CO II* gene had a prolonged sequence of 546 bp. The transmembrane structure prediction showed that there were four transmembrane structures in the C-terminus extension region of the M-type *CO II* gene, suggesting that this extension sequence has certain function. 2. M-type *CO II* gene and F-type *CO II* gene were all expressed in the early juvenile (embryonic to 5-month-old) of *H. cumingii*, and the expression level of F-type *CO II* gene was significantly higher than that of M-type *CO II* gene. 3. In the tissues of six-month-old mussels, the expression of M-type *CO II* gene was the highest in gonads, and the expression of F-type *CO II* gene was still at a high level in the same tissues. 4. In the one-year-old female tissues, M and F-type *CO II* genes can be detected in all tissues. In male tissues, the F-type *CO II* gene was detected in each tissues, but M-type *CO II* gene was only expressed in gonads. 5. In the two-year-old female tissues, F and M type both expressed in each tissue, but the expression of M-type *CO II* gene is very low. In the two-year-old male tissues, the F-type *CO II* gene was detectable in addition to the gonad, and the M-type *CO II* gene was detected only in the gonad. In the two-year-old male tissues, the F-type *CO II* gene was detectable except for the gonad, and the M-type *CO II* gene was detected only in the gonad. These results suggested that M-type mtDNA is selectively degraded or aggregated in tissues during male and female development of *H. cumingii*.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; doubly uniparental inheritance (DUI); *CO II* gene; expression differences

Corresponding author: WANG Guiling. E-mail: glwang@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31101939); Key Fundamental Shanghai Universities Knowledge Service Platform (ZF1206); Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (13ZZ128)