

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2011.05.009

泥鳅线粒体 DNA 控制区结构分析及遗传多样性研究

荣朝振¹, 祖国掌¹, 胡建华¹, 孙守旗², 孙棠丽³

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 安徽省怀远县水产技术推广中心, 安徽 怀远 233400;
3. 安徽省怀远县渔业科技发展有限责任公司, 安徽 怀远 233400)

摘要: 采用 PCR 和 DNA 测序技术对 4 个泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 群体的线粒体 DNA 控制区序列进行比较, 研究其遗传多样性和控制区的结构。结果显示, 用于分析的线粒体 DNA 控制区片段序列为 918 ~ 920 bp。32 个序列中共发现了 56 个多态位点, 其中 32 个转换位点, 19 个颠换位点, 5 个转换与颠换同时存在的位点, 定义了 32 种单倍型。同时对控制区结构进行分析, 识别了其终止序列区 (ETAS)、中央保守区 (CD) 和保守序列区 (CSB) 的关键序列。4 个地理群体的单倍型多样性 (Hd)、核苷酸多样性 (Pi) 和平均核苷酸差异数 (K) 分别为 0.992、0.012 和 10.698。群体间的平均 Kimura 双参数遗传距离 (Kimura 2-parameter distance, K2-P)、遗传分化指数 (F_{st})、基因交流值 (N_m) 和分子方差分析 (AMOVA) 均表明 4 个泥鳅群体具有较高的遗传分化, 基因交流贫乏。利用核苷酸序列构建的 NJ 分子系统树揭示 4 个群体分为 2 个谱系, 除范县群体外, 其余各群体间相互交叉聚集。

关键词: 泥鳅; 线粒体 DNA 控制区; 遗传多样性

中图分类号: Q 523+.8; S 917.4 文献标志码: A 文章编号: 2095-0780-(2011)05-0055-08

Structure of mitochondrial DNA control region and genetic diversity of *Misgurnus anguillicaudatus*

RONG Chaozhen¹, ZU Guozhang¹, HU Jianhua¹, SUN Shouqi², SUN Tangli³

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;
2. Huaiyuan County Aquaculture Technology Extension Center of Anhui Province, Huaiyuan 233400, China;
3. Huaiyuan Fishery Science Technology Development Co., Ltd. of Anhui Province, Huaiyuan 233400, China)

Abstract: We compare and study the genetic diversity and structure of DNA control region of 4 *Misgurnus anguillicaudatus* populations by using PCR and DNA sequencing. The results show that the sequence of mitochondrial DNA control region is 918 ~ 920 bp. Among 32 sequences, a total of 56 polymorphic loci were detected, including 32 transitions, 19 transversions, 5 transitions-transversions and 36 haplotypes. The key sequences of extended terminal associated sequences (ETAS), central domains (CSB-A, B, C, D, E and F) and conserved sequence blocks (CSB-1, CSB-2 and CSB-3) were discovered. The haplotypic diversity (Hd), average genetic distance (Pi) and average number of pairwise differences (K) is 0.992, 0.012 and 10.698, respectively. The average Kimura 2-parameter distance, F_{st} value, N_m value and AMOVA reveal great genetic differentiation among the 4 *M. anguillicaudatus* populations. The NJ phylogenetic tree constructed on nucleotide sequence indicates that the 4 populations form into 2 monophyletic lineages, and cross and cluster among one another except Fanxian population.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; mitochondrial DNA control region; genetic diversity

收稿日期: 2011-03-25; 修回日期: 2011-05-03

资助项目: 安徽省科技攻关计划项目 (07010302147)

作者简介: 荣朝振 (1986 -), 男, 硕士研究生, 从事经济动物与水产动物繁殖控制技术研究。E-mail: rongcz9@yahoo.com.cn

通讯作者: 祖国掌, E-mail: zgzh@ahau.edu.cn

鱼类线粒体 DNA (mtDNA) 具有结构简单、进化速率快、群体内变异大、严格母系遗传等特点, 已成为种内、种间近缘群体间遗传分化关系研究的理想材料^[1]。线粒体 DNA 中 D-loop 区(或称控制区)是线粒体上一段非编码区, 受进化压力小、进化速率快、遗传变异程度高, 是探讨近缘种间和种内或个体间遗传变异的良好指标^[2-3]。目前, 基于对线粒体 DNA D-loop 区序列多态性的研究和 D-loop 区结构的研究报道较多^[4-8]。

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 隶属于鲤形目、鳅科、花鳅亚科、泥鳅属, 已成为具有一定经济价值的养殖对象, 养殖规模越来越大, 泥鳅种质的选择成为一项工作内容。目前已有应用同工酶、RAPD 及 SSR 等技术分析泥鳅的种群遗传结构的报道^[9-12], 而基于 mtDNA D-loop 序列多态性的研究未见报道。该研究测定了怀远、范县、舒城和池州 4 个泥鳅地理群体的 mtDNA 控制区基因片段的核苷酸序列, 分析了控制区结构及群体遗传多样性, 探讨了泥鳅种群的遗传结构、遗传多样性, 以期为今后泥鳅遗传选育工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本采集

研究所用泥鳅样本于 2010 年 4 月采自安徽怀远(简称为 HY, 下同)、安徽舒城(SC)、河南范县(FX)和安徽池州(CZ)4 个地方, 均为野生群体。分别随机采集活体解剖, 取肌肉 1~2 g 于 95% 酒精中浸泡, 在 -20 °C 保存备用。分析所用样本信息见表 1。

表 1 泥鳅样本数量、体长与体质量

Tab. 1 Number, length and weight of *M. anguillicaudatus*

群体 population	数量/尾 number	体长/cm length	体质量/g weight
怀远 Huaiyuan (HY)	9	12.56 ± 2.14	15.43 ± 5.43
范县 Fanxian (FX)	9	11.78 ± 1.34	13.98 ± 5.31
舒城 Shucheng (SC)	9	11.63 ± 1.52	14.45 ± 4.36
池州 Chizhou (CZ)	9	12.63 ± 3.26	16.86 ± 6.29

1.2 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 的提取采用常规酚-氯仿^[13] 抽提法提取。

1.3 PCR 扩增和测序

拟扩增 D-loop 基因全序列, PCR 扩增所用引物序列为 DL₁ (5'-ACCCCTGGCTCCCAAAGC-3') 和 DL₂ (5'-ATCTTAGCATCTTCAGTG-3')^[14] 分别位于脯氨酸和苯丙氨酸的 tRNA 上。PCR 采用 100 ng 的 DNA 为模板, 反应体系为 50 μL, 其中预混料 (premix) 25 μL, 灭菌双蒸水 18 μL, 上、下游引物各 2 μL (10 μm · L⁻¹), DNA 模板 3 μL。扩增条件为 94 °C, 预变性 5 min, 接着 35 个循环 (94 °C 45 s, 51 °C 45 s, 72 °C 60 s), 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。扩增产物经 1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 凝胶成像系统拍照。PCR 产物直接由上海生工生物技术公司回收、纯化、双向测序, 测序引物与 PCR 扩增引物相同。

1.4 数据处理与分析

测得的 DNA 序列用 ClustalX 1.81 对序列进行比对, 并通过 Seaview 4 软件进行编辑并辅以人工核查; 对比 GenBank 中登录号为 EU 697122 的泥鳅线粒体 DNA 全序列, 找到控制区的起点和终点。并以 CSB-F 和 CSB1 的起点分别作为终止序列区、中央保守区和保守序列区的分界线。在识别的保守序列中, 兼并密码子的代号分别为 W = A 或 T, R = A 或 G, M = A 或 C, Y = C 或 T 和 K = G 或 T。

用 DnaSP 5.1 软件计算多肽位点数 (s)、单倍型数 (n)、单倍型多样性指数 (h)、核苷酸多样性指数 (π) 等; 用 Mega 4.1 软件统计 DNA 序列的碱基组成, 用 Kimura 双参数遗传距离 (Kimura 2-parameter distance, K2-P) 模型计算 4 个群体内和群体间的平均遗传距离, 采用 K2-P 距离矩阵, 用邻接法 (NJ) 构建分子系统树, 系统树中节点的自举置信水平应用自引导法 (bootstrap analysis, BP) 重复检测, 设置为 1 000 次重复; 用 DnaSP 软件计算遗传分化指数 (F -statistics, F_{st}) 和基因交流值 (N_m), 利用 Arlequin 3.1 软件根据群体间的 F_{st} 进行方差分析 (AMOVA)。

2 结果与分析

2.1 线粒体 DNA 控制区序列与变异情况

对 36 尾泥鳅线粒体控制区进行双向测序, 通过人工拼接和序列比对分析, 获得的序列与泥鳅 (Genbank 登录号 EU 697122) 的线粒体 D-loop 区序

列在 NCBI 中比对后, 结果表明主体部分相似度高达 98%, 证实所获得的序列即为泥鳅线粒体 D-loop 区段序列。

去除引物和部分端序列得到的 36 尾泥鳅线粒体 DNA 控制区序列(918 ~ 920 bp), 共检测到 32 种单倍型, 每个群体都有各自的单倍型, 变异位点 63 个(包括 7 个插入/缺失位点和 56 个多态性位点), 多肽位点中包含 30 个简约信息位点和 26 个单碱基突变位点。2 碱基单一信息位点 22 个, 占有位点的 2.40%; 2 碱基简约信息位点 28 个, 占有位点的 3.05%; 3 碱基单一信息位点 3 个, 占有位点的 0.33%; 3 碱基简约信息位点 3 个, 占有位点的 0.33%。所有多肽信息位点中转换 32 个, 颠换 19 个, 转换与颠换同时存在的位点 5 个。平均转颠换比(T_s/T_v)为 1.68, 转换大于颠换, 这个结果与其他一些脊椎动物的数值相类似^[15]。控制区序列中碱基 A、T、G 和 C 平均含量分别为 34.1%、31.7%、14.3% 和 19.9%。A + T 含量(65.8%)明显高于 G + C 含量(34.2%), 碱基组成具有明显的偏倚性, 这与其他鱼类的线粒体控制区碱基组成情况类似^[16]。4 个群体内平均 K2-P 为 0.004 ~ 0.012, 群体间的遗传距离为 0.011 ~ 0.016(表 2)。此结果表明, 4 个群体间的平均遗传距离略高于群体内。

表 2 4 个泥鳅群体内(对角线)与群体间的平均 K2-P 遗传距离

Tab. 2 Average genetic distance within (diagonal) and among 4 *M. anguillicaudatus* populations based on Kimura 2-parameter model

群体 population	HY	FX	SC	CZ
怀远 Huaiyuan(HY)	0.008			
范县 Fanxian(FX)	0.011	0.006		
舒城 Shucheng(SC)	0.011	0.014	0.004	
池州 Chizhou(CZ)	0.016	0.014	0.015	0.012

2.2 D-loop 结构分析

参考刘焕章^[17]在鳊鲃亚科识别出的各功能单位和给出的保守序列的普遍形式和不同区域的划分标志, 笔者识别了泥鳅 D-loop 区的 3 个区域和其中的一些保守序列。

2.2.1 终止序列区(extended termination associated sequences, ETAS) 终止序列区是控制区中变异最大的区域, 包含了与 DNA 复制终止相关的序列(termination associated sequences, TAS)。不同的物种中 TAS 的变异较大, 但其主体的核心序列是 TACAT 和其反向互补序列 ATGTA。该研究成功识别了泥鳅的终止序列区, 全长 236 bp(nt: 1 ~ 236), 序列为 TACATATTATGCATAATWWTACATT。

2.2.2 中央保守区(central domain, CD) 中央保守区被认为是控制区中最为保守的区域。该研究在泥鳅中识别出了几个序列, 近 5' 端识别了被认为是区分终止区和中央保守区标志的 CSB-F, 全长 325 bp(nt: 237 ~ 561), 其序列是 ATGTAGTAGAAACCACCACCAACCAGT。紧接其后的是 CSB-E 和 CSB-D, 序列分别为 TCAGGGACAATAATTGTGGGGGT 和 TATTACTGGCATYTGTTCTATTTCAGG。

2.2.3 保守序列区(conserved sequence block, CSB) 保守区包含有重链的复制起始点、重链和轻链的启动子及 3 个保守序列 CSB1、CSB2 和 CSB3。保守序列区全长 358 bp(nt: 562 ~ 918), 其中 CSB1 是区分保守序列区和中央保守区的标志, 变异最大且不易被识别, 该研究通过一保守片段 GACATA 帮助识别了泥鳅的 CSB1, 其序列为 GAWTGAATGWTGGAAAGACATAAT。CSB2 和 CSB3 序列较为保守, 容易被识别, 其序列分别为 CAAACCCCCCTACCCCC 和 CCTTGTC AAACCCCCGAAACCAA。

2.3 群体遗传多样性和遗传分化

4 个群体间遗传多样性差异不显著, 所有 36 个序列的单倍型多样性(H_d)和核苷酸多样性(P_i)分别为 0.992 和 0.012, 平均核苷酸差异数(K)为 10.698(表 3)。从核苷酸多样性看, 池州群体最高(0.012), 说明 4 个群体中, 池州群体的遗传多样性最丰富。

利用 DNASP 软件估算 4 个群体间的 F_{st} 和 N_m (表 4)。结果显示, 4 个群体间的 F_{st} 大, N_m 较小, 群体分化明显。舒城和范县群体间有最高的 F_{st} (0.663) 和最低的 N_m (0.130), 怀远和范县群体间有最低的 F_{st} (0.338) 和最高的 N_m (0.490)。分子变异分析(AMOVA)的结果见表 5。群体内个

表3 4个泥鳅群体内遗传多样性参数

Tab. 3 Parameters of genetic diversity within 4 *M. anguillicaudatus* populations

群体 population	样本数 number of samples	单倍型数 number of haplotypes	单倍型多样性 haplotype diversity (<i>Hd</i>)	多态位点数 polymorphic loci (<i>s</i>)	平均核苷酸差异数 average number of pairwise difference (<i>K</i>)	核苷酸多样性 nucleotide diversity (<i>Pi</i>)
怀远 Huaiyuan (HY)	9	8	0.972	23	8.028	0.009
范县 Fanxian (FX)	9	8	0.972	22	6.611	0.007
舒城 Shucheng (SC)	9	7	0.917	14	3.278	0.004
池州 Chizhou (CZ)	9	9	1.000	37	11.306	0.012
合计 total	36	32	0.992	56	10.698	0.012

表4 4个泥鳅群体间的遗传分化指数 F_{st} (对角线下方) 和基因交流值 N_m (对角线上方)Tab. 4 Genetic differentiation F_{st} value (below diagonal) and gene flow N_m value (above diagonal) among 4 *M. anguillicaudatus* populations

群体 population	HY	FX	SC	CZ
怀远 Huaiyuan (HY)		0.490	0.274	0.468
范县 Fanxian (FX)	0.338		0.127	0.470
舒城 Shucheng (SC)	0.477	0.663		0.238
池州 Chizhou (CZ)	0.348	0.347	0.512	

表5 4个泥鳅群体的 AMOVA 分析

Tab. 5 AMOVA analysis of 4 *M. anguillicaudatus* populations

变异来源 source of variation	自由度 <i>df</i>	方差总和 sum of squares	变异组分 variance components	变异百分比/% percentage of variation
群体间 among populations	3	97.809	3.137	38.980
群体内个体间 within populations	32	157.110	4.910	61.020
总计 total	35	254.917	8.046	-

体间的变异是变异的主要来源 (61.02%), 38.98% 的变异发生在群体间 ($F_{st} = 0.3898$), 群体间具有较高的遗传分化, 遗传变异主要来自群体内部。

2.4 个体间亲缘关系聚类分析

以 32 尾泥鳅个体的 D-loop 序列构建 NJ 分子进化树见图 1。系统发育树显示 4 个群体可以分为 2 个谱系 (lineage) 和多个支系。这 2 个谱系的单系支持率均未超过 50%, 表明泥鳅线粒体控制区的变异水平不大, 群体之间并未发生显著的遗传分化。范县群体独自为一个谱系, 其余 3 个群体为一谱系且相互交叉。

3 讨论

3.1 泥鳅线粒体控制区结构组成特点

线粒体 DNA 控制区为非编码区, 因此会有缺失、插入、串联重复等变化。研究得到泥鳅线粒体 DNA 控制区长度为 918 ~ 920 bp, 同其他鱼类基本相似, 并没有大的缺失、插入、串联重复等现象。

线粒体 DNA 控制区其主要功能与线粒体 DNA 的复制、终止、转录相关。通过比对其他鱼类笔者成功识别了泥鳅线粒体 DNA 控制区上的主要的功能单元, 如终止序列区和保守相关序列, 其中变异最大的终止序列区富含 A 和 T, A + T 的含量高达

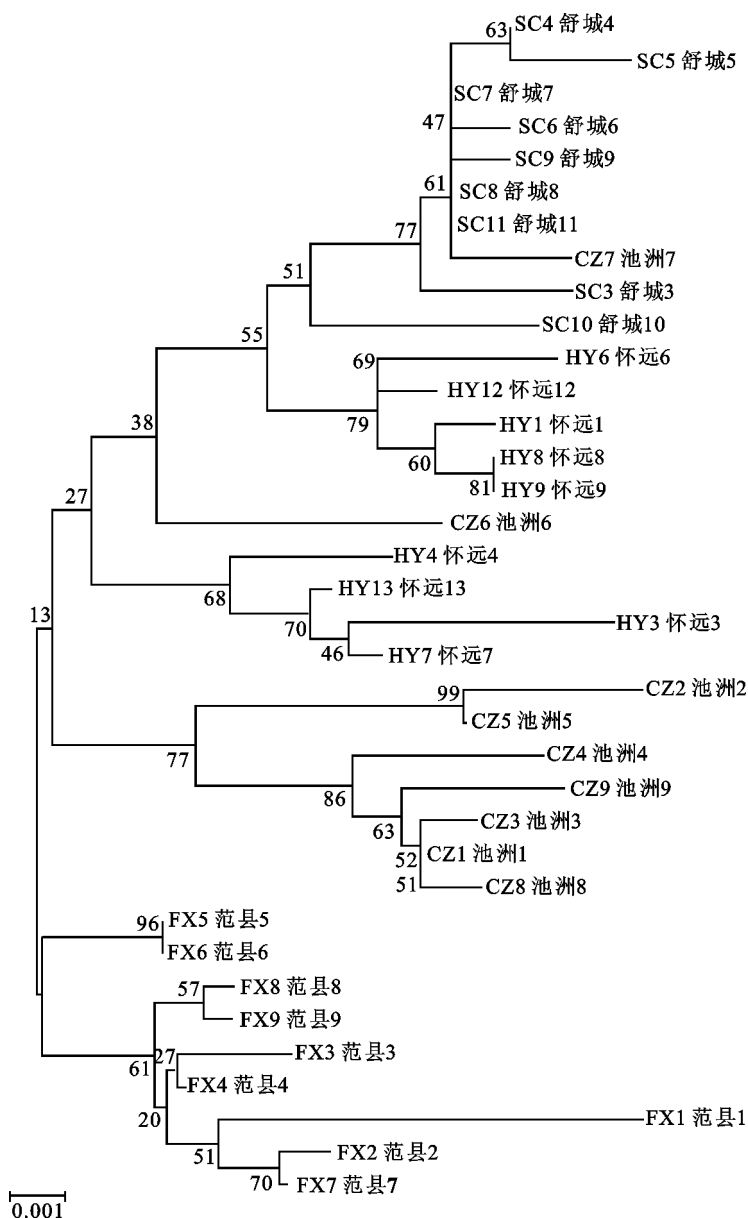


图 1 基于线粒体控制区序列变异构建的 4 个泥鳅群体邻接树
节点处数值为 1 000 次 bootstrap 检验的支持率

Fig. 1 Neighbor-joining tree based on sequence variation of mtDNA control region of 4 *M. anguillicaudatus* populations
Numbers at the nodes indicate bootstrap values with 1 000 replicate

73.6%。而中央保守区富含 GC，含量(39.5%)较终止区(26.5%)高，这种现象可能是中央保守区最为保守的原因之一。

D-loop 区又称控制区，是 mtDNA 的复制起点，也是变化最复杂、最快的区域，近年来成为 mtDNA 研究的热点。控制区分为终止序列区、中央保守区和保守序列区 3 个部分^[18-19]。哺乳动物的 D-loop 区 B、C、D、E 和 F 保守序列已被识别，从 LEE 等^[20]在鱼类中识别了 CSB-D 后，LIU 等^[14]、

张燕等^[21]和唐琼英等^[22]又分别在鲤形目、鲮科鱼类和沙鳅亚科鱼类中识别了 CSB-D、CSB-E 和 CSB-F 3 个保守序列。在泥鳅的控制区中含有 ETAS、CSB-D、CSB-E、CSB-F、CSB-1、CSB-2 和 CSB-3，其中 CSB-F 和 CSB-1 的起点分别是区分终止序列区和中央保守区、中央保守区和保守序列区的标志。在容易发生变异的终止序列区，发现泥鳅的终止序列区长度为 236 bp，包含了 6 个保守的 TAS(TACAT) 和 4 个与 TAS 互补序列(ATGTA)，

推测两者可形成发卡结构^[18]。CSB-1 是与线粒体 DNA 复制相关的重要保守序列, 在哺乳动物中高度保守^[23-25], 其一般形式为 ATT-AATTAATG-TGCAGGACATA。但在鱼类中变异很大, 其中 GACATA 序列框最为保守, 可以帮助识别。如鳊鱼 (*Rhodeus sinensis*)^[17]、大口胭脂鱼 (*Ictiobus cyprinellus*)^[26]、沙鳅亚科鱼类 (*Botiinae*)^[22] 的 CSB-1 序列分别为 TT-ATTATTGAA-GACATA、AATCGC CCAGGACATT 和 AGRTKAATGMTWRAAWGACATA-MCC-AYAAGA。同样在泥鳅中也发现此保守序列框。另外, 泥鳅的 CSB-2 和 CSB-3 序列非常保守, 同其他鱼类基本一致。

3.2 泥鳅的遗传多样性

遗传多样性是物种长期生存和进化的前提, 也是物种进化潜能的保证。研究测定 36 尾泥鳅 D-loop 区的 918 ~ 920 bp 序列, 共检测出变异位点数 63 个, 单倍型 32 种, 单倍型多样性和核苷酸多样性分别为 0.992 和 0.012。高于青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) ($\pi = 0.0067 + 0.00156$)^[27]、长薄鳅 (*Leptobotia elongata*) (0.00450)^[28]、鱧浪白鱼 (*Anabarilius grahami*) (0.00434)^[29]、小口白甲鱼 (*Onychostoma lini*) (0.00575)^[30]、长江铜鱼 (*Coreius heterodon*) (0.00218)^[7] 等种群, 稍低于齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) (0.019)^[31], 说明目前这 4 个泥鳅种群 D-loop 序列存在丰富的多样性。4 个群体中池州群体隶属于长江支流, 其 π 最高 (0.012), 种群遗传多样性较其他几个种群丰富。种群遗传距离的大小, 能够间接反映种群遗传相似性大小, 池州群体 K2-P 遗传距离最大 (0.012), 池州群体个体间存在较大的遗传差异, 表明池州群体具有较丰富的遗传多样性, 进一步说明长江池州江段的泥鳅多样性较丰富。由此可以考虑把此江段的泥鳅引到怀远地区, 作为后备良种。从控制区的变异看, 4 个群体间的 K2-P 遗传距离为 0.011 ~ 0.016, 高于群体内 (平均为 0.007)。分子变异分析 (AMOVA) 结果也显示, 大部分变异分布在种群内 (61.02%), 存在于种群间变异较少 (38.98%)。说明群体间遗传分化大, 基因交流较为匮乏。彼此都有各自的独立基因库, 可能是长期地理隔离的结果。

3.3 泥鳅的遗传分化分析

F_{st} 表示 2 个种群间的遗传分化程度。数值在 0

到 1 的范围内, F_{st} 越大, 表明 2 个种群的分化程度越高。而 N_m 则表示种群间的基因交流程度。 $N_m > 1$ 表明 2 个种群间有基因交流。 $N_m < 1$ 则可能预示着隔离的产生。4 个群体具有较小的 N_m (0.127 ~ 0.490), 几乎没有基因交流, 有明显的遗传分化 (表 4)。

以 NJ 构建的系统发育树显示, 4 个群体泥鳅相互交叉聚为 2 个谱系和多个支系, 其中范县群体独自构成一谱系, 其余 3 个群体构成另一谱系且群体间相互交叉。怀远和舒城个体在同一谱系, 遗传距离相对较近, 原因可能是淮河 (怀远群体) 和淮河之流的淠河 (舒城群体) 存在着微弱的基因交流。范县群体独成 1 支, 与其他 3 个群体距离较远, 可能是黄河 (范县群体) 与长江、淮河地理位置原因, 导致地理隔离, 形成独立的基因库。CZ6、CZ7 与怀远群体和舒城群体存在交叉, 可能因为长江池州江段部分支系与淮河支系水体是流通的。

参考文献:

- [1] CANN R L, BROWN W M, WILSON A C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA [J]. *Genetics*, 1984, 106(2): 479-499.
- [2] ROSEL P E, DIZON A E, HAYGOOD M G. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, on interoceanic and regional scales [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1995, 52(3): 1421-1429.
- [3] ROSEL P E, HAYGOOD M G, PERRIN W F. Phylogenetic relationship among the true porpoise (Cetacean: Phocoenidae) [J]. *Mol Phyl Evol*, 1995, 4(4): 463-474.
- [4] 孙玉华, 王伟, 刘思阳, 等. 中国胭脂鱼线粒体控制区遗传多样性分析 [J]. *遗传学报*, 2002, 29(9): 787-790. SUN Yuhua, WANG Wei, LIU Siyang, et al. Genetic diversity research of mtDNA D-loop area from Chinese *Myxocyprinus asiaticus* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(9): 787-790. (in Chinese)
- [5] 杨金权, 胡雪莲, 唐文乔, 等. 长江口邻近水域刀鲚的线粒体控制区序列变异与遗传多样性 [J]. *动物学杂志*, 2008, 43(1): 8-15. YANG Jinquan, HU Xuelian, TANG Wenqiao, et al. mtDNA control region sequence variation and genetic diversity of *Coilia nasus* in Yangtze River estuary and its adjacent waters [J]. *Chin J Zool*, 2008, 43(1): 8-15. (in Chinese)
- [6] 彭珊, 代应贵. 濒危鱼类稀有白甲鱼清水江种群 mtDNA D-loop 序列多态性 [J]. *水产学报*, 2009, 33(2): 196-200. PENG Shan, DAI Yingui. Sequence polymorphism of mtDNA D-loop in the population of the endangered species *Onychostoma arara*

- from the Qingshui River[J]. J Fish China, 2009, 33(2): 196 - 200. (in Chinese)
- [7] 袁娟, 张其中, 李飞, 等. 铜鱼线粒体控制区的序列变异和遗传多样性[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 9 - 19.
YUAN Juan, ZHANG Qizhong, LI Fei, et al. mtDNA control region sequence variation and genetic diversity of *Coreius heterodon* (Bleeker) in the upper and middle sections of the Yangtze River[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 9 - 19. (in Chinese)
- [8] 刘海林, 章群, 唐优良, 等. 黄渤海松江鲈鱼线粒体控制区结构与序列多态性分析[J]. 海洋通报, 2010, 29(3): 283 - 288.
LIU Hailin, ZHANG Qun, TANG Youliang, et al. Structure and genetic diversity of mtDNA D-Loop sequences among *Trachidermus fasciatus* stocks in Yellow Sea and Bohai Sea of China[J]. Mar Sci Bull, 2010, 29(3): 283 - 288. (in Chinese)
- [9] 朱翠兰, 余为一, 陆依群, 等. 分布稻田的三种不同体色泥鳅组织 LDH 同工酶的研究[J]. 安徽农业大学报, 1996, 23(2): 155 - 159.
ZHU Cuilan, YU Weiyi, LU Yiqun, et al. Study on characterization of the electrophoretic patterns of LDH isoenzymes of *Misgurnus anguillicaudatus* distributed over bog [J]. J Anhui Agric Univ, 1996, 23(2): 155 - 159. (in Chinese)
- [10] 常重杰, 周家荣, 余其兴. 两种泥鳅不同群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. 动物学报, 2001, 47(1): 89 - 93.
CHANG Chongjie, ZHOU Jiarong, YU Qixing. Genetic variation of two loach species revealed by RAPD analysis[J]. J Anim, 2001, 47(1): 89 - 93. (in Chinese)
- [11] 曾柳根, 甘云飞, 王军花, 等. 鄱阳湖区泥鳅的微卫星 DNA 多态性分析[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2008, 32(1): 84 - 88.
ZENG Liugen, GAN Yunfei, WANG Junhua, et al. Genetic diversity of loaches (*Misgurnus anguillicaudatus*) from Poyang Lake determined by microsatellites DNA[J]. J Nanchang Univ: Science Edition, 2008, 32(1): 84 - 88. (in Chinese)
- [12] 单磊. 长江流域二倍体泥鳅野生群体遗传多样性的微卫星分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
SHAN Lei. Population genetic diversity of natural diploid loach in the Yangtze River basin as revealed by microsatellite DNA analyses [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009. (in Chinese)
- [13] PEREZ-ENRIQUZE R, TANIGUCHI N. Genetic structure of red sea bream (*Pagrus major*) population of Japan and the southwest Pacific using microsatellite DNA marks[J]. Fish Sci, 1999, 65(1): 23 - 30.
- [14] LIU Huanzhang, TZENG C S, TENG Huiyu. Sequence variations in the mitochondrial DNA control region and their implications for the phylogeny of the Cypriniformes[J]. Can J Zool, 2002, 80(6): 569 - 581
- [15] SACCONI C, PESOLE G, SBISA E. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop containing region in vertebrate mitochondrial DNA[J]. Mol Evol, 1987, 26(4): 205 - 211.
- [16] 郑冰蓉, 张亚平, 肖衢. 鲤属鱼类 mtDNA 控制区(D-环区)序列的变异性分析[J]. 水产学报, 2002, 26(4): 289 - 294.
ZHENG Bingrong, ZHANG Yaping, XIAO Heng. mtDNA control region of *Cyprinus* (D-loop region) sequence analysis of the variability[J]. J Fish China, 2002, 26(4): 289 - 294. (in Chinese)
- [17] 刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构与进化: 以鳊鲃鱼类为例[J]. 自然科学进展, 2002, 12(3): 266 - 270.
LIU Huanzhang. The structure and evolution of mitochondrial DNA control region of fish: a case study to bitterlings[J]. Prog Natural Sci, 2002, 12(3): 266 - 270. (in Chinese)
- [18] BROWN G G. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA[J]. J Mol Biol, 1986, 192(2): 503 - 511.
- [19] BROUGHTON R E, DOWLING T E. Length variation in mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spiloptera*[J]. Genetics, 1994, 138(1): 179 - 190.
- [20] LEE W J, CONROY J, HOWELL W H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions[J]. J Mol Evol, 1995, 41(1): 54 - 66.
- [21] 张燕, 张鹏, 何舜平. 中国鳊科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析[J]. 水生生物学报, 2003, 27(5): 463 - 467.
ZHANG Yan, ZHANG E, HE Shunping. Studies on the Structure of the control region of the Bagridae in China and its phylogenetic significance[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(5): 463 - 467. (in Chinese)
- [22] 唐琼英, 刘焕章, 杨秀平, 等. 沙鳅亚科鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析及系统发育关系的研究[J]. 水生生物学报, 2009, 26(6): 645 - 653.
TANG Qiongying, LIU Huanzhang, YANG Xiuping, et al. Studies on the structure of the mitochondrial DNA control region and phylogenetic relationship of the subfamily Botiinae[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 26(6): 645 - 653. (in Chinese)
- [23] SOUTHERN S O, SOUTHERN P J, DIZON A E. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome[J]. J Mol Evol, 1988/1989, 28(1/2): 32 - 42.
- [24] SBISA E, TANZARIELLO F, REYES A, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications[J]. Gene, 1997, 205(1/2): 125 - 140.
- [25] SACCONI C, PESOLE G, SBISA E. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern[J]. J Mol Evol, 1991, 33(1): 83 - 91.
- [26] 曾青兰, 刘焕章. 大口胭脂鱼线粒体 DNA 控制区序列的研究[J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2001, 23(3): 261 - 264.

- ZENG Qinglan, LIU Huanzhang. Study on mitochondrial DNA control region of the *Ictiobus cyprinellus*[J]. J Hubei Univ: Natural Science, 2001, 23(3): 261 - 264. (in Chinese)
- [27] 赵凯, 李军祥, 张亚平, 等. 青海湖裸鲤 mtDNA 遗传多样性的初步研究[J]. 遗传, 2001, 23(5): 445 - 448.
- ZHAO Kai, LI Junxiang, ZHANG Yaping, et al. Mitochondrial DNA diversity in naked carps in Qinghai-lake (*Gymnocypris przewalskii przewalskii*) [J]. Hereditas, 2001, 23(5): 445 - 448. (in Chinese)
- [28] 赵刚, 周剑, 杜军, 等. 长薄鳅 (*Leptobotia elongata*) 线粒体 DNA 控制区遗传多样性研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(3): 930 - 937.
- ZHAO Gang, ZHOU Jian, DU Jun, et al. Genetic diversity of elongate loach (*Leptobotia elongata*) inferred from mitochondrial DNA control region[J]. Southwest China J Agric Sci, 2010, 23(3): 930 - 937. (in Chinese)
- [29] 杨博, 陈小勇, 杨君兴. 鱈浪白鱼线粒体 DNA 控制区结构和种群遗传多样性分析[J]. 动物学研究, 2008, 29(4): 379 - 385.
- YANG Bo, CHEN Xiaoyong, YANG Junxing. Structure of the mitochondrial DNA control region and population genetic diversity analysis of *Anabarilius grahami* (Regan) [J]. Zool Res, 2008, 29(4): 379 - 385. (in Chinese)
- [30] 代应贵, 韩雪, 张晓杰. 小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环的序列变异及遗传多样性[J]. 动物学杂志, 2010, 45(2): 115 - 120.
- DAI Yinggui, HAN Xue, ZHANG Xiaojie. Genetic diversity and sequence variation of mtDNA D-loop in the population of vulnerable species *Onychostoma lini* from the Dulu River[J]. China J Zool, 2010, 45(2): 115 - 120. (in Chinese)
- [31] SONG Zhaobin, SONG Jun, YUE Bisong. Population genetic diversity of Pregnant's schizothoracin, *Schizothorax prenanti*, inferred from the mitochondrial DNA control region [J]. Environ Biol Fish. 2008, 81(3): 247 - 252.