

滁州鲫(*Carassius auratus*)线粒体全基因组 序列分析及系统进化*

胡玉婷 胡王^① 江河 凌俊 段国庆 潘庭双

(安徽省农业科学院水产研究所 合肥 230031)

摘要 为探讨天然三倍体滁州鲫的系统进化地位,采用直接测序法获得滁州鲫线粒体基因组。其序列全长为16581 bp,碱基组成为31.6% A、26.2% T、16.1% G和26.1% C,包括13个蛋白质基因、22个tRNA基因、2个rRNA基因和1个非编码区,各基因的位置及组成与已公布的鲤科鱼类一致。除tRNA-Ser^(AGY)外,其他21个tRNA的二级结构均具有典型的三叶草结构;13个蛋白编码基因中,除CO I起始密码子为GTG外,其余均以ATG为起始密码子;CO II、ND3、ND4和Cytb基因的终止密码子为不完整的T,其他9个基因均具有完整的终止密码子TAA或TAG。序列分析表明,滁州鲫与其他鲫属鱼类(方正银鲫A系和D系、鲫、淇河鲫、萍乡肉红鲫、黑鲫、日本白鲫和日本银鲫)在线粒体基因组上均具有较高的序列同源性(>94%)。以鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*)为外类群,基于线粒体13个蛋白质基因的核苷酸与氨基酸序列构建上述鲫属鱼类的系统进化树,结果显示,滁州鲫与方正银鲫亲缘关系最近,与黑鲫最远。综合以上研究结果,认为滁州鲫应为银鲫亚种的一个地方种群。

关键词 滁州鲫;线粒体基因组;系统进化分析

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0063-08

动物线粒体基因组(Mitochondrial DNA, mtDNA)为闭合双链环状DNA,长度一般在15.7–19.5 kb,而鱼类mtDNA的长度大多在15–18 kb,其包括22个编码转运RNA基因(tRNA)、13个编码蛋白质基因、2个编码核糖体RNA基因(rRNA)和1个控制区(D-loop区)及散布于不同基因间的少量非编码序列。大多数脊椎动物mtDNA的组成相对较为稳定,但不同类群的基因组在结构和基因排列顺序上存在差异,这种差异性可能反映了真核细胞的不同进化路线(Saccone *et al*, 1999)。由于mtDNA具有结构简单、母系遗传、进化速度快等特点而成为分子系统学及群体遗传学研究极其有效的分子标记,被广泛用于硬骨鱼类间的亲缘关系及分类地位的研究(肖武汉等, 2000; 郭新红等, 2004; Miya *et al*, 2001; Caccone *et al*, 2004)。

滁州鲫(Chuzhou Crucian Carp)因产于安徽省滁州市而得名,是我国天然三倍体雌核发育(Gynogenesis)鲫(*Carassius auratus*)种群之一,也是滁州及安徽省特有的鲫鱼种群(张克俭等, 1995、1996; 徐广友等, 2009)。滁州鲫具有生长速度快、个体大、耐低氧、不易染病等特点,早在明朝的《滁县地方志》中,就有其“肉肥厚细嫩,味甘香醇,乌背金鳞,银光闪闪”的记载,是深受当地养殖户与居民喜爱的名贵经济鱼类,具有重要的科研与经济价值(凌武海等, 2011)。

近年来,由于环境污染、过渡捕捞等原因,滁州鲫野生资源锐减。但有关滁州鲫的研究远不够充分,且主要集中在传统的形态学(马明发等, 2009)、繁殖生物学(陈可东等, 2004; 袁兆祥等, 2010; 马明发等, 2010)等方面,对其分子生物学研究较少且方法落

* 安徽省财政专项资金项目(14D0508)、安徽省农业科学院成果推广项目(13E0504)和安徽省“115”产业创新团队(皖人才办[2009]2号)共同资助。胡玉婷, E-mail: huyuting1021@126.com

① 通讯作者: 胡王, 副研究员, E-mail: huwang101@sina.com

收稿日期: 2014-11-03, 收修改稿日期: 2014-12-03

后(姚纪花等, 1998; 凌武海等, 2009), 未能明确滁州鲫的系统地位, 限制了滁州鲫的资源保护、开发利用。胡玉婷等(2015)采用线粒体 DNA 控制区和细胞色素 b(Cytb)全序列探讨了滁州鲫与部分鲫属鱼类的遗传进化关系, 发现滁州鲫与方正银鲫(*Carassius auratus gibelio*)具有最近的亲缘关系, 而与白鲫(*Carassius cuvieri*)的亲缘关系最远。目前, 尚无滁州鲫 mtDNA 的研究报道。

本研究采用 PCR 扩增和 DNA 直接测序法, 测定了滁州鲫线粒体基因组 DNA 全序列, 并分析了其基因组的主要结构信息, 并与同属的一些鱼类进行比较, 以鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*)为外类群, 构建了鲫属鱼类分子系统进化树, 进一步探讨滁州鲫的系统进化地位。研究结果将为进一步利用线粒体基因组分析鲫不同地理群体的遗传多样性、亲缘关系以及鲫属鱼类系统进化提供重要的基础信息, 对滁州鲫的保护和分类地位的确定以及资源开发利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料及总 DNA 的提取

滁州鲫为安徽省滁州市水产研究所保存的滁州鲫原种。取滁州鲫背部肌肉, 采用天根生化科技(北京)有限公司的普通动物基因组提取试剂盒(Universal Genomic DNA Extraction Kit), 按照试剂盒提示的操作步骤提取基因组 DNA, 并采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2 引物设计与 PCR 扩增、测序

参照鲫(*Carassius auratus auratus*)的线粒体基因组全序列(GenBank 登录号: AB111951), 用 Primer 5 软件设计可覆盖其线粒体全基因组的引物, 部分引物参考相关文献, 详见表 1。

采用 PCR 扩增线粒体 DNA 的目的片段。PCR 反应体系: $10\times$ Taq Buffer 5.0 μ l, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 4 μ l, dNTP(10 mmol/L) 4.0 μ l, 引物 1 和 2 (10 mmol/L)

表 1 滁州鲫线粒体基因组扩增引物及扩增条件

Tab.1 Primers and PCR conditions for amplification of the mitochondrial DNA of *C. auratus* in Chuzhou

引物 Primer	上游引物序列(5'-3') Upper primer sequence	下游引物序列(5'-3') Lower primer sequence	产物长度 Product length (bp)	扩增位置 Product site (bp)
P1	CCCTACGCTCAAAGAATCC	ACCGTGTTACGACTTGCCCTC	1209	16364-991
P2	ATAGAGTGTCCCTTTGAACCC	GCTTGTCCGATTTGGCTTAC	978	867-1844
P3	TGACAGACCTACCGAACCTG	CAAACGAACCCTTAATAGCG	1130	1447-2576
P4	ACGAGAAGACCCTTTGGAGC	TTGTTCGCGCTAGTGTGAG	1227	2227-3453
P5	TGACCTTATGAGCACCAATACC	TTCGGGCATTCAGAAGTGTA	1276	3120-4395
P6	GCGCAGTAGAAGCAACAAC	TGGCAGTAGTCCAAGGGTG	863	4196-5058
P7	TCCCCAATACAACCAACTC	TTGATGAAACACCTGCTAAATG	994	4957-5950
P8	AATAGTAGGAACCGCTTTAAGC	TAGACCCAGGAAGTGTGTGG	1219	5559-6777
P9	TGACTGGCTACACTTCACGGAG	CGGATACTAAGACACGGACTGG	1209	6445-7653
P10	ATTGCTCTACCATCCCTACG	GGCTCATTATGTCCTCCTAC	911	7413-8323
P11 ^a	AAAGCGTTGGCCTTTTAAGC	GTTAGTGGTCATGGCTTGGATC	951	7902-8852
P12	TTATCGGAATACGAAATCAACC	GTGGGAGTCAGAAAGAAATGG	1276	8457-9732
P13	CCGCTGCCTGATACTGACAC	AGGTGGGTCCGGTGAAATG	644	9506-10149
P14 ^b	AAGACCTCTGATTCGGCTC	TTCGTATTATTCCGTATCC	1042	10039-11080
P15	CAAACCGAACGACTCAATG	AGACTAATCCGTGGGCAAT	553	10150-11332
P16	GCAGGGTCCATAGTACTAGC	ACTTGGATTGCACCAAGAG	889	11038-11926
P17	ACATTACGGGACTCCAACC	GTGAAGGCGGATAAACAGG	1127	11630-12756
P18	ATCTGCCCTACTCCACTCAAG	TCGTTTGTAACCTTTGCTATGG	1008	12693-13700
P19	AATCATTACCGACTCCTTCC	GTCAGCCGTAGTTTACATCTCG	1047	13560-14606
P20 ^b	GACTTGAAAAACCACCGTTG	CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC	1235	14332-15566
P21	GGACAAATCGCATCCGTCCT	ATCTTAGCATCTTCAGTG	1202	15425-45

注: 参考文献, a; 刘良国等, 2011; b; Xiao *et al.*, 2001

各 2 μl , 模板 DNA(50–100 ng/L) 2 μl , *Taq* DNA 酶(5 U/ μl) 0.3 μl , 灭菌超纯水 30.7 μl , 总体积为 50 μl 。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30–50 s、51–55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45–60 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45–60 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6–8 min。PCR 反应均设不含模板 DNA 的空白对照。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托上海生工生物工程有限公司进行纯化并直接测序, 测序引物同扩增引物。

1.3 序列拼接、注释与分析

测定的线粒体 DNA 片段结合软件 Chromas 2.13 (<http://technelysium.com.au/>)、Seaview (Galtier *et al.*, 1996)、Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) 进行序列校对和拼接。拼接好的线粒体基因组序列, 在 NCBI 数据库在线 Blast 分析序列同源性。采用在线软件 tRNA Scan-SE 1.21 (Lowe *et al.*, 1997) (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 并参照 GenBank 中已知的其他鲫属鱼类的线粒体基因组序列定位 tRNA 基因及其二级结构、蛋白质编码基因、rRNA 基因和 D-loop 区, 确定滁州鲫线粒体基因组的基因结构。采用软件 DnaSP 5.0 (Librado *et al.*, 2009) 及 MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2008) 等软件对序列信息进行分析。

1.4 系统发育分析

从 GenBank 下载一些鱼类的线粒体基因组全序列 (表 2)。以鲤为外类群, 截取 13 个蛋白质编码基因的核苷酸序列、氨基酸序列, 采用软件 MEGA 4.0 的最大似然法 (Maximum parsimony, MP) 和邻接法 (Neighbor joining, NJ) 分别构建系统进化树, 以确定滁州鲫在鲫属鱼类中的系统进化地位。系统树各分支的可靠性通过重抽样分析评价, 自展检验 (Bootstrap analysis) 设为 10000 次。

2 结果

2.1 基因组结构与组成

滁州鲫线粒体基因组全长为 16581 bp (GenBank 登录号: KM659025), 与其他鲫属鱼类线粒体基因组的长度相近 (表 2), 包括 37 个基因 (13 个蛋白编码基因、2 个 rRNA 基因和 22 个 tRNA 基因) 和 1 个控制区 (D-loop 区), 其基因序列大小以及在基因组中的排列顺序与硬骨鱼类 mtDNA 基本一致 (表 3)。基因间排列紧凑, 除控制区外, 基因间隔区有 13 处, 共计 68 bp, 其大小为 1–33 bp; 基因重叠区 10 处, 重叠碱基数在 1–7 bp 之间, 共计 28 bp。与其他脊椎动物线粒体基因结构特征一样, 除了 ND6 和 8 个 tRNA 在轻链 (L 链) 上编码, 其他的所有基因都在重链 (H 链) 上编码 (表 3)。

滁州鲫与其他鲫属鱼类的线粒体基因组均具有较高的序列同源性 (>94%), 其线粒体全基因组各碱基含量为 A (31.6%)、C (26.1%)、T (26.2%)、G (16.1%), A+T (57.8%) > C+G (42.2%); 线粒体 13 个蛋白质基因的 4 种碱基含量由高到低依次为 A (30.8%)、C (27.5%)、T (27.1%)、G (14.6%), 也显示为 A 的含量最高, 而 G 最低, A+T (57.9%) > C+G (42.1%), 表现出适度的 A+T 偏好性, 这与脊椎动物 A 或者 T 的密码子偏好性是一致的 (Broughton *et al.*, 2001; Cantatore *et al.*, 1994)。

2.2 蛋白质编码基因

滁州鲫 13 个蛋白编码基因中, 除 CO I 基因起始密码子为 GTG 外, 其余起始密码子均为 ATG, 与其他硬骨鱼类相一致。终止密码子有 9 个基因 3' 端由完全的 TAA (ND1、CO I、ATP6、CO III、ND4L、ND5)

表 2 滁州鲫与一些鱼类线粒体基因组序列的比较

Tab.2 The sequence comparison of the mitochondrial DNA of *C. auratus* in Chuzhou and other fishes

物种 Species	长度 Length (bp)	序列相似率 Similarity rate (%)	A+T 含量 A+T content (%)	登录号 Accession No.
方正银鲫 A 系 <i>C. auratus gibelio</i> A in Fangzheng	16580	99.77	57.8	JF496198
方正银鲫 D 系 <i>C. auratus gibelio</i> D in Fangzheng	16580	99.78	57.8	JF496197
鲫 <i>C. auratus auratus</i>	16580	98.55	57.8	JN105355
淇河鲫 <i>C. auratus</i> in Qihe River	16580	98.48	57.7	KJ476998
萍乡肉红鲫 <i>C. auratus</i> var. <i>pingxiangnensis</i>	16576	98.54	57.6	HQ875340
日本银鲫 <i>C. auratus langsdorfi</i>	16578	96.08	57.7	NC002079
日本白鲫 <i>C. cuvieri</i>	16581	95.22	57.4	AB045144
黑鲫 <i>C. carassius</i>	16597	94.16	58.8	JQ911695
鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	16581	89.90	56.7	NC018037

表3 滁州鲫鱼线粒体基因组组成

Tab.3 The gene content, organization and features of the mitochondrial genome of *C. auratus* in Chuzhou

序号 No.	基因 Genes	位置 Location(bp)	长度 Length(bp)	间隔 Intergenic nucleotides	编码链 Strand	起始密码 Initiation condon	终止密码 Termination condon
1	tRNA-Phe	1-69	69	0	H		
2	12S rRNA	70-1023	954	0	H		
3	tRNA-Val	1024-1095	72	0	H		
4	16S rRNA	1096-2777	1682	0	H		
5	tRNA-Leu ^(UUR)	2778-2853	76	1	H		
6	ND1	2855-3829	975	4	H	ATG	TAA
7	tRNA-Ile	3834-3905	72	-2	H		
8	tRNA-Gln	3904-3974	71	1	L		
9	tRNA-Met	3976-4044	69	0	H		
10	ND2	4045-5091	1047	-2	H	ATG	TAG
11	tRNA-Trp	5090-5160	71	2	H		
12	tRNA-Ala	5163-5231	69	1	L		
13	tRNA-Asn	5233-5305	73	33	L		
14	tRNA-Cys	5339-5407	69	-1	L		
15	tRNA-Tyr	5407-5477	71	1	L		
16	CO I	5479-7029	1551	0	H	GTG	TAA
17	TRNA-Ser ^(UCN)	7030-7100	71	3	L		
18	TRNA-Asp	7104-7175	72	12	H		
19	CO II	7188-7878	691	0	H	ATG	T--
20	TRNA-Lys	7879-7954	76	1	H		
21	ATP8	7956-8120	165	-7	H	ATG	TAG
22	ATP6	8114-8797	684	-1	H	ATG	TAA
23	CO III	8797-9582	786	-1	H	ATG	TAA
24	tRNA-Gly	9582-9653	72	0	H		
25	ND3	9654-10004	349	-2	H	ATG	TAG
26	tRNA-Arg	10003-10072	70	0	H		
27	ND4L	10073-10369	297	-7	H	ATG	TAA
28	ND4	10363-11743	1381	0	H	ATG	T--
29	tRNA-His	11744-11812	69	0	H		
30	tRNA-Ser ^(AGY)	11813-11881	69	1	H		
31	tRNA-Leu ^(CUN)	11883-11955	73	3	H		
32	ND5	11959-13782	1824	-4	H	ATG	TAA
33	ND6	13779-14300	522	0	L	ATG	TAG
34	tRNA-Glu	14301-14369	69	5	L		
35	Cytochrome b	14375-15515	1141	0	H	ATG	T--
36	tRNA-Thr	15516-15587	72	-1	H		
37	tRNA-Pro	15587-15657	71	0	L		
38	D-loop	15658-16581	924	0	H		

或 TAG (ND2、ND3、ATP8、ND6)为终止密码子,其余3个基因终止密码子为不完整的 T (ND4、CO II、Cytb) (表3)。这种不完全终止密码子在脊椎动物线粒体 DNA 中比较常见,一般认为,在转录加工过程中,mRNA 会利用其 PolyA 尾形成完整的终止密码子

UAA 从而终止翻译(Anderson *et al*, 1981)。

ND6 基因是唯一位于 L 链上的蛋白质编码基因。滁州鲫的蛋白质编码基因中共有 4 个重叠结构,ATP8 和 ATP6 之间有 7 bp 的共用碱基,ATP6 和 CO III 之间有 1 bp 的共用碱基,ND4L 和 ND4 之间有 7 bp 的共

用碱基, ND5 和 ND6 有 4 bp 的共用碱基。

2.3 rRNA 基因和 tRNA 基因

滁州鲫的 12S rRNA 位于 tRNA-Phe 和 tRNA-Val 之间, 长度为 954 bp, 其碱基组成为 A (31.7%)、T (19.9%)、C (26.3%) 和 G (22.1%); 16S rRNA 基因位于 tRNA-Val 和 tRNA-Leu^(UUR) 之间, 长度为 1682 bp, 其碱基组成为 A (36.3%)、T (20.5%)、C (22.8%) 和 G (20.4%), 它们与其他硬骨鱼类的碱基组成相似, 且均具有较高的保守性, 与鲤科其他已知物种在 mtDNA 中的位置相同, 长度基本一致。

滁州鲫的线粒体基因组包含 22 个 tRNA 基因(表 3), 它们在线粒体基因组中分散存在, 长度范围为 69–73 bp, tRNA-Gln、tRNA-Ala、tRNA-Asn、tRNA-Cys、tRNA-Tyr、tRNA-Ser^(UCN)、tRNA-Glu 和 tRNA-Pro 的编码基因位于 L 链上, 其余则位于 H 链上, 共转运 20 种氨基酸。除 tRNA-Ser^(AGY) 外, 所有的 tRNA 基因都能折叠成典型的三叶草型结构。

2.4 非编码区

类似于其他硬骨鱼类, 滁州鲫线粒体的非编码区除基因间少数几个碱基的间隔外还包括 D-loop 区和复制起始区(Origin of light strand replication, OL)

(Kumazawa *et al.*, 1999)两个区域。D-Loop 区域位于 tRNA-Pro 和 tRNA-Phe 之间, 长度为 924 bp, 作为 DNA 复制和转录的相关序列, 它的结构与已报道的其他鲫属鱼类相似。该区域受进化选择压力较小, 进化速率快; 分析其碱基组成, 发现具有明显的 A+T 偏好性(65.8%), 并大于线粒体基因组其他区域的 A+T 含量; 其结构特征也包含 3 个区: 终止结合序列区(TAS-1、TAS-2、TAS-3)、中央保守区(D-box)和保守序列区(CBS-1、CBS-2、CBS-3) (Boore, 1999)。滁州鲫线粒体轻链(L链)上 tRNA-Asn 和 tRNA-Cys 之间的复制起始区(OL)长 33 bp, 这与已报道的硬骨鱼类长度相似(Oh *et al.*, 2008)。

2.5 系统分析

滁州鲫相关分子系统进化树见图 1。核苷酸序列和氨基酸序列的分析结果表明, 鲫属鱼类中, 滁州鲫与黑鲫的亲缘关系最远, 与方正银鲫的亲缘关系最近。

3 讨论

3.1 鲫属鱼类分类

鲫属(*Carassius*)鱼类广泛分布于欧亚大陆及其东部岛屿, 不仅表型变异大, 而且具有很高的遗传多

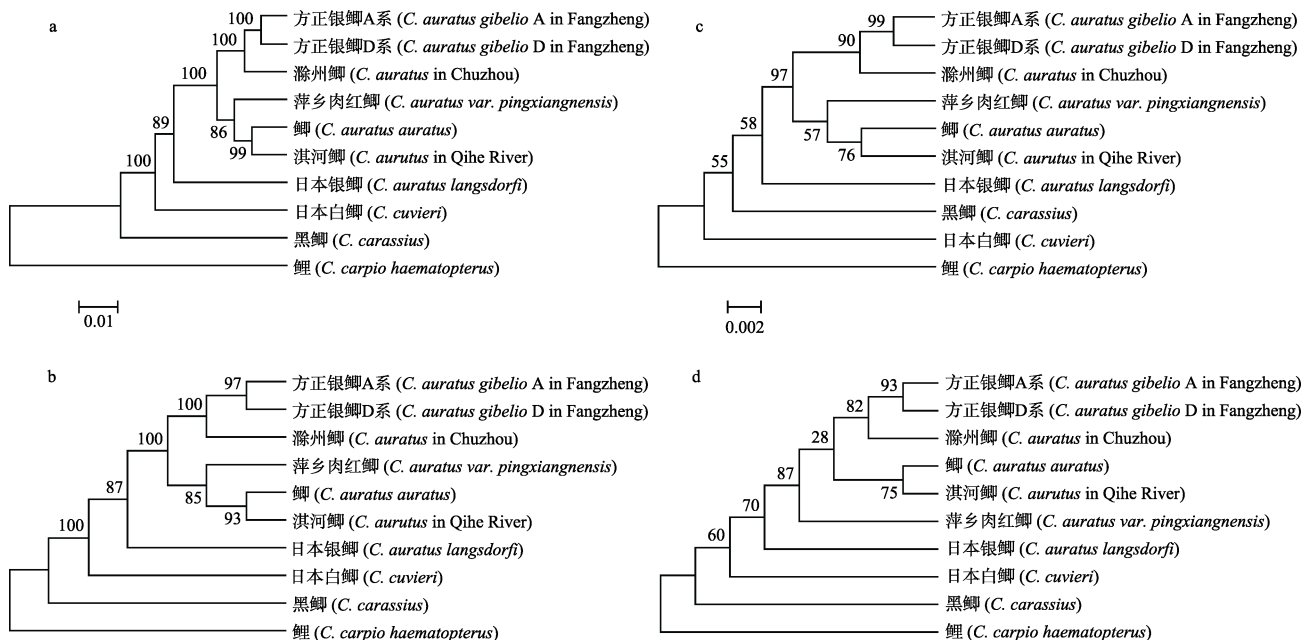


图 1 基于线粒体基因组 13 个蛋白质基因的核苷酸序列(a 和 b)和氨基酸序列(c 和 d)的系统进化树

Fig.1 The phylogenetic tree based on the nucleotide sequences (a and b) or amino acid sequences (c and d) of 13 protein-coding genes in *Carassius* fishes and *C. carpio haematopterus*

a 和 c: NJ 树; b 和 d: MP 树; 节点数字表示支持率
 a, c: NJ-trees; b, d: MP-trees; Numbers in nodes means bootstrap value

样性,常表现出二倍体与三倍体共存、雌核发育与有性生殖两种生殖方式的情况(Gui *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011; Podlesnykh *et al.*, 2012)。又由于鲫属鱼类的分布受人为影响较大以及从鲫中选育的金鱼在许多地方的扩散,使鲫属鱼类尤其是鲫的遗传背景更为复杂(牟希东等, 2007; Wang *et al.*, 2013),其分类仍存在着一些争论(任慕莲等, 2002; Takada *et al.*, 2010)。鲫属鱼类可以划分为鲫(*C. auratus*)、黑鲫和分布于日本列岛及其周边的白鲫(*C. cuvieri*) 3个物种或者鲫与黑鲫两个物种(Murakami *et al.*, 2001; Hosoya, 2002; 程磊等, 2012)。该研究基于鲫属鱼类线粒体基因组 13 个蛋白质基因的核苷酸序列和氨基酸序列的系统进化树显示,黑鲫为高支持率的单系群,最先与其他鲫属类群分开;而白鲫(*C. cuvieri*)也是一个具有较高支持率的单系群,与其他鲫属类群的遗传距离均较远。因此,白鲫应为 *C. cuvieri* 而非 *C. auratus cuvieri*,是鲫属的一个有效种,本研究结果支持将鲫属鱼类分为 3 个物种。程磊等(2012)采用线粒体 CO I 部分序列(DNA 条形码)、王姝妍(2013)¹⁾采用线粒体 Cytb 和 D-loop 的鲫属鱼类相关研究也得到了相似的结果。

鲫可分为多个亚种(包括金鱼 *Carassius auratus* var.), 中国大陆鲫(*C. auratus*)可分为鲫(*C. auratus auratus*)指名亚种和银鲫(*C. auratus gibelio*)亚种(罗云林等, 2000; 桂建芳, 2007)。关于银鲫的含义,由于中国的雌核发育多倍体鲫鱼最初是在银鲫中发现的,后来一些学者将中国的雌核发育多倍体鲫鱼均称为银鲫(桂建芳, 2007; 沈俊宝等, 1997),但这种说法是不合适的,因为多倍体在遗传上更接近同域的二倍体而不是异域的多倍体(Apalikova *et al.*, 2011; Takada *et al.*, 2010);而且从本研究结果可以看出(图 1),不同地区多倍体间的亲缘关系较为复杂,可能包含多个遗传距离差异较大的群体。如,同属于天然雌核发育三倍体的方正银鲫、滁州鲫、淇河鲫、萍乡肉红鲫与二倍体普通鲫的亲缘关系差异较大,即:三倍体的淇河鲫与二倍体的普通鲫亲缘关系较近,而与相同倍性的方正银鲫、滁州鲫亲缘关系则较远。王姝妍(2013)¹⁾的研究结果显示,尽管一些群体受人为影响,鲫(*C. auratus auratus*)中大部分群体间的亲缘关系与其地理分布相关,而与倍性关系无关。这进一步说明了倍性在鲫属鱼类中不代表系统进化地位。所以,银鲫应仅指方正银鲫及其近缘群体,不包括中国大陆所有的多倍体鲫。

3.2 滁州鲫系统地位

鱼类线粒体的不同区域进化速率不同,线粒体各个基因的系统发育信息表现也有所不同(郭新红等, 2004; Zardoya *et al.*, 1996; Miya *et al.*, 2000)。在进行系统进化分析时,因为单个基因所包含的系统发育信息过少,不能全面反映整个生物的分子进化水平,现在研究者普遍认可利用更长的线粒体 DNA 序列可以获得更精确、更可靠的系统发生分析结果。将基因组中 13 个蛋白编码基因或轻链上的 12 个蛋白编码基因的氨基酸序列按照顺序连接起来构建系统进化树更为可靠(Miya *et al.*, 2001; Elmerot *et al.*, 2002)。

鲫属鱼类 13 个蛋白质编码基因的核苷酸和氨基酸的分子系统进化树显示,中国大陆鲫可分为两大类群,一类为鲫、萍乡肉红鲫和淇河鲫,另一类为方正银鲫(A 系和 D 系)和滁州鲫,这表明滁州鲫与方正银鲫具有最近的亲缘关系,两者可能具有相似的起源。这从彭泽鲫(*Carassius auratus*)与方正银鲫的系统关系也可知,蒋一珪等(1983)、张辉等(1998)、李名友等(2002)研究表明,彭泽鲫与方正银鲫 A 系具有基本相似的遗传背景,属于方正银鲫的一个地方品系,而方正银鲫 A 系和 D 系是直接由其种群内的遗传分化产生。胡玉婷等(2015)采用线粒体 Cytb 和控制区的研究结果显示,滁州鲫与方正银鲫(A 系)具有最近的亲缘关系,大于彭泽鲫与方正银鲫(A 系)的亲缘关系。马明发等(2009)比较研究了滁州鲫、方正银鲫和彭泽鲫 3 种群银鲫的形态特征,发现滁州鲫与方正银鲫在形态上也较滁州鲫与彭泽鲫间更相近,姚纪花等(1998)、凌武海等(2009)的研究也得到了相似的结果。这些研究结果均说明,不管是在形态上还是遗传上,滁州鲫比彭泽鲫更接近方正银鲫。综合相关研究结果,认为滁州鲫应为银鲫亚种的一个地方种群。

参 考 文 献

- 马明发, 张克俭, 凌武海, 等. 三种群银鲫形态特征的比较研究. 河北渔业, 2009(4): 17-19
- 马明发, 袁兆祥, 凌武海, 等. 滁州鲫生长特性的初步研究. 水产养殖, 2010, 31(5): 16-20
- 任慕莲, 郭焱, 张人铭, 等. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 2002, 145-162
- 刘良国, 杨品红, 杨春英, 等. 洞庭青鲫等 5 个鲫品系线粒体 ATPase 基因序列的比较分析. 淡水渔业, 2011, 41(1): 36-42

1) 王姝妍. 古环境的变化和人工选择对鲫属鱼类遗传结构的影响. 中国科学技术大学博士研究生学位论文, 2013, 1-118

- 牟希东, 白俊杰, 叶星, 等. 金鱼线粒体 DNA Cytb 基因序列分析及与鲫鱼亲缘关系探讨. 南方水产, 2007, 3(1): 26–30
- 李名友, 周莉, 杨林, 等. 彭泽鲫的分子遗传分析及其与方正银鲫 A 系的比较. 水产学报, 2002, 26(5): 472–476
- 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384–391
- 沈俊宝, 刘明华, 范兆廷. 黑龙江银鲫. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1997, 1–225
- 胡玉婷, 胡王, 江河, 等. 滁州鲫线粒体细胞色素 b 基因和控制区序列比较及其系统进化分析. 南方水产科学, 2015, 11(2): 101–108
- 张克俭, 万全, 李公行, 等. 滁州鲫的形态学和血清蛋白电泳谱型. 水产学报, 1996, 20(4): 352–356
- 张克俭, 万全, 李公行, 等. 滁州鲫染色体组型的研究. 中国水产科学, 1995, 2(4): 8–15
- 张辉, 董新红, 叶玉珍, 等. 三个三倍体鲫鱼品系及野鲫 mtDNA 的比较研究. 遗传学报, 1998, 25(4): 330–336
- 陈可东, 万全, 蔡玉龙. 滁州鲫夏花鱼种适宜蛋白质需求量的研究. 水利渔业, 2004, 24(2): 23–24
- 罗云林, 乐佩琦. 中国动物志(硬骨鱼纲·鲤形目·下卷). 北京: 科学技术出版社, 2000, 427–434
- 姚纪花, 楼允东, 江涌. 我国六个地区银鲫种群线粒体 DNA 多态性的研究. 水产学报, 1998, 22(4): 289–295
- 袁兆祥, 凌武海, 汪永忠, 等. 滁州鲫鱼人工繁育与苗种培育技术研究. 水产养殖, 2010, 31(3): 2–4
- 桂建芳. 鱼类性别和生殖的遗传基础及其人工控制. 北京: 科学出版社, 2007, 107–124
- 徐广友, 万全, 袁兆祥, 等. 滁州鲫雌核发育的细胞学研究. 安徽农业大学学报, 2009, 36(4): 533–537
- 凌武海, 马明发, 袁兆祥, 等. 滁州鲫、方正银鲫和彭泽鲫分子遗传差异的分析. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13482–13483, 13485
- 凌武海, 任信林. 天然滁州鲫氨基酸成分分析与营养价值评价. 水产养殖, 2011, 32(1): 50–52
- 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展. 遗传学报, 2004, 31(9): 983–1000
- 蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德, 等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学报, 1983, 8(1): 1–13
- 程磊, 常玉梅, 鲁翠云, 等. 鲫属鱼类 DNA 条码及种与亚种划分. 动物学研究, 2012, 33(5): 463–472
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290(5806): 457–465
- Apalikova OV, Podlesnykh AV, Kukhlevsky AD, *et al.* Phylogenetic relationships of silver crucian carp *Carassius auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri*, crucian carp, *Carassius carassius*, and common carp *Cyprinus carpio* as inferred from mitochondrial DNA variation. *Russ J Genet*, 2011, 47(3): 322–331
- Boore JL. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(8): 1767–1780
- Broughton RE, Milam JE, Roe BA. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res*, 2001, 11(11): 1958–1967
- Caccone A, Gentile G, Burns CE, *et al.* Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galápagos tortoises. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 31(2): 794–798
- Cantatore P, Roberti M, Pesole G, *et al.* Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J Mol Evol*, 1994, 39(6): 589–597
- Elmerot C, Arnason U, Gojobori T, *et al.* The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. *Gene*, 2002, 295(2): 163–172
- Galtier N, Gouy M, Gautier C. Seaview and Phylo_win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci*, 1996, 12(6): 543–548
- Gui JF, Zhou L. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio*. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(4): 409–415
- Hosoya K. Cyprinidae. Tokyo: Tokai University Press, 2002, 253–254
- Kumar S, Nei M, Dudley J, *et al.* MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 2008, 9(4): 299–306
- Kumazawa Y, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(6): 784–792
- Librado P, Rozas J. DnaSP V5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452
- Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(5): 955–964
- Miya M, Kawaguchi A, Nishida M. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(11): 1993–2009
- Miya M, Nishida M. Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol Phylogenet Evol*, 2000, 17(3): 437–455
- Murakami M, Matsuba C, Fujitani H. The maternal origins of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing. *Genes Genet Syst*, 2001, 76(1): 25–32
- Oh DJ, Kim SJ, Jung YH. Comparison of the mitochondrial genomes of East Asian *Pseudolabrus* fishes. *Mitochondr DNA*, 2008, 19(5): 453–460
- Podlesnykh AV, Apalikova OV, Brykov VA. Phylogenetic relationships of silver crucian carp in *Carassius auratus* complex based on mtDNA analysis. *Russ J Genet*, 2012, 48(12): 1207–1217
- Saccone C, Giorgi CD, Gissi C, *et al.* Evolutionary genomics in

- Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 1999, 238(1): 195–209
- Takada M, Tachihara K, Kon T, *et al.* Biogeography and evolution of the *Carassius auratus* complex in East Asia. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 7
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876–4882
- Wang SY, Luo J, Murphy RW, *et al.* Origin of Chinese goldfish and sequential loss of genetic diversity accompanies new breeds. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e59571
- Xiao J, Zou TM, Chen YB, *et al.* Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters. *BMC Genetics*, 2011, 12(1): 20
- Xiao WH, Zhang YP, Liu HZ. Molecular systematics of Xenocyprinae (teleostei: cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 18(2): 163–173
- Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(7): 933–942

(编辑 冯小花)

Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of Chuzhou Crucian Carp (*Carassius auratus*)

HU Yuting, HU Wang^①, JIANG He, LING Jun, DUAN Guoqing, PAN Tingshuang

(Fishery Research Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

Abstract Chuzhou Crucian Carp (*Carassius auratus* in Chuzhou) is one of the natural gynogenetic crucian carp originated from Anhui Province in China. It belongs to the genus of *Carassius* within the family of Cyprinidae. To investigate the species status of this fish, we performed the direct DNA sequencing on the PCR products of the complete mitochondrial DNA (mtDNA). The total length of the mtDNA was 16581 bp, including 13 protein-coding genes, 22 transfer RNA genes, 2 ribosomal RNA genes and a non-coding control region. The composition and location of genes in the mitochondrial genome of Chuzhou Crucian Carp were consistent with those of Cyprinidae fishes published in GenBank. The tRNA genes formed typical secondary structures except for tRNA-Ser (AGY). The CO I gene had GTG as its initiation codon, and the other 12 protein-coding genes had ATG as the initiation codon. Among the 13 protein-coding genes, 9 had complete stop codons but CO II, ND3, ND4 and Cyt *b* had an incomplete T as the stop codon. Sequence analysis showed that there was high similarity between the mtDNA sequences of Chuzhou Crucian Carp and other species in genus *Carassius* recorded in GenBank (>94%). The nucleotide composition of Chuzhou Crucian Carp was 31.6% (A), 26.2% (T), 16.1% (G) and 26.2% (C). We conducted the phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes of 9 *Carassius* fishes and 1 *Cyprinus carpio*, based on their nucleotide and amino acid sequences of all protein-coding genes. The results indicated that the phylogenetic relationship between *C. auratus gibelio* in Chuzhou and in Fangzheng was the closest while *C. auratus gibelio* in Chuzhou and *Carassius carassius* was the farthest. Our study may provide basic data and contribute to the classification of *Carassius* and Cyprinidae fishes.

Key words Chuzhou Crucian Carp (*Carassius auratus*); Mitochondrial genome; Phylogenetic analysis

① Corresponding author: HU Wang, E-mail: huwang101@sina.com