

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00378

洞庭青鲫与其他六个鲫鱼品系线粒体 DNA 控制区的比较分析

刘良国¹ 杨品红^{1,2} 王文彬¹ 王晓艳² 谢春华² 李梦军²

(1. 湖南文理学院生命科学院, 常德 415000; 2. 湖南省水产工程技术研究中心, 常德 415000)

摘要: 运用 PCR 扩增、克隆、测序等技术, 在获得洞庭青鲫和彭泽鲫线粒体 DNA 控制区全序列的基础上, 对洞庭青鲫、彭泽鲫、普通鲫、红鲫、白鲫、A 系和 D 系银鲫等 7 个鲫鱼品系线粒体 DNA 控制区的碱基组成、变异情况、序列结构和系统进化进行了比较分析。结果表明, 7 个鲫鱼品系线粒体 DNA 控制区碱基的平均组成为 A: (32.7 ± 0.16)%, C: (20.4 ± 0.37)%, G: (14.1 ± 0.08)%, T: (32.8 ± 0.36)%, 序列分歧率为 0—5.7%, 其中红鲫和白鲫的分歧率最大(5.7%), 彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫之间最小(0)。洞庭青鲫与白鲫的分歧率为 5.6%, 与彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫为 2.2%, 与红鲫和普通鲫分别为 0.8%和 0.7%。对比哺乳动物线粒体 DNA 控制区结构, 并参照其他鱼类序列, 将 7 个鲫鱼品系的控制区分为终止序列区、中央保守区和保守序列区三个区域。同时识别了 7 个鲫鱼品系中一系列保守序列, 并给出了它们的一般形式。序列差异和系统进化分析表明, 在 7 个鲫鱼品系中, 洞庭青鲫与普通鲫和红鲫的亲缘关系最近, 与彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫亲缘关系次之, 与白鲫的亲缘关系最远, 而彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫三者在线粒体 DNA 控制区的相似性和分歧率上则表现为是同一个鲫鱼品系。

关键词: 洞庭青鲫; 鲫鱼品系; 线粒体 DNA; 控制区; 系统进化

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0378-10

线粒体 DNA 控制区又称 D-环区(D-loop), 位于 tRNA-Pro 和 tRNA-Phe 基因之间, 是整个线粒体 DNA 序列和长度变异最大的区域, 也是线粒体基因组上进化最快的部分^[1]。控制区为线粒体基因组中主要的非编码区, 它以其较高的突变积累对于研究物种内的遗传分化具有重要价值。近年来, 已有越来越多的研究工作将 D-loop 区作为分子标记来探讨各种鱼类的种内遗传分化^[2—4]。对控制区结构功能的研究将有助于了解 DNA 的复制、转录的机制和进化的规律^[5,6]。控制区的结构在已研究的生物中相似, 分为三个部分: 终止序列区(左区)(Extended termination associated sequence domain, ETAS)、中央保守区(Central conserved sequence blocks domain)和保守序列区(右区)(Conserved sequence blocks domain, CSB)。在对哺乳动物线粒体 DNA 控制区结构的研

究中还识别了众多的功能保守元件^[7—10], 如终止结合序列(TAS), 保守序列 CSB1、CSB2、CSB3、CSB-A、CSB-B、CSB-C、CSB-D、CSB-E、CSB-F 等。对照哺乳动物线粒体 DNA 控制区结构, 目前在鱼类中也识别了一些类群的终止相关序列和保守序列^[11—14]。

鲫鱼由于分布广泛, 各水域群体间在形态、体色、倍性和生殖方式上存在差异^[15—17], 遗传背景复杂, 因而是研究脊椎动物发育进化的好材料。洞庭青鲫(Dongtingking crucian carp, *Carassius auratus* Dongtingking variety. 暂命名)是近年来在洞庭湖区澧水北民湖水域发现的天然二倍体鲫鱼(2n=100)新品系(鉴定资料¹⁾)。在前期的工作中, 我们通过对洞庭青鲫的形态特征、染色体组型、生殖方式等进行研究^[18—20], 初步证明了洞庭青鲫是一个具有两性

收稿日期: 2008-11-03; 修订日期: 2009-07-24

基金项目: 湖南省自然科学基金(08JJ3029); 湖南省“十一五”重点建设学科(动物学)基金资助

作者简介: 刘良国(1969—), 男, 湖南常德人; 博士; 研究方向为鱼类发育生物学。E-mail: llg18@sohu.com

通讯作者: 杨品红, E-mail: ypkong@263.net

¹ 洞庭青鲫选育技术研究, 湘科鉴字[2005]第 006 号

繁殖方式、形态性状和染色体数目稳定的二倍体 ($2n=100$) 鲫鱼品系。为了进一步了解洞庭青鲫这一新型鲫鱼品系的遗传特征, 有必要从分子生物学的角度对其做进一步的研究。本实验以二倍体洞庭青鲫、普通鲫、红鲫、白鲫和三倍体彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫等 7 个鲫鱼品系为对象, 通过对其线粒体 DNA 控制区序列比较分析, 探讨了洞庭青鲫的分子遗传起源及其与其他鲫鱼品系的相互关系, 同时也为鱼类线粒体 DNA 控制区的结构与功能研究提供更多的基础性数据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用洞庭青鲫和彭泽鲫均取自湖南省水产工程研究中心实验基地。每种鱼各随机选取 3 尾, 尾鳍静脉采血, 酸性柠檬酸葡萄糖溶液(ACD)抗凝。血液总 DNA 的提取按照上海 Sangon 的 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒方法进行, 总 DNA 检测其质量和纯度后, -20°C 保存备用。采血后的 3 尾洞庭青鲫按常规肾细胞染色体直接制片法进行染色体数目的检测, 进一步确定其倍性。

1.2 引物设计与 PCR 扩增

根据 GenBank 中已知的鲫鱼品系线粒体 DNA 序列, 用 Premier 5.0 软件在控制区两侧设计引物, 扩增线粒体 DNA 控制区完整片段, 引物序列为: 上游引物 CR1: 5'-GGACAAATTGCATCCGTCCT-3', 下游引物 CR2: 5'-ATCTTAACATCTTCAGTG-3', 引物由上海 Sangon 公司合成。

PCR 扩增反应体系为 50 μL , 其中 10 $\times$ PCR buffer 5.0 μL , 25 mmol/L MgCl_2 5.0 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 5.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 2 μL , Taq 酶 3.0 μL (1 U/ μL), 100 ng/ μL DNA 模板 2 μL , ddH₂O 26 μL 。PCR 扩增程序为: 95°C 预变性 5min, 然后 94°C 变性 30s, 50°C 退火 35s, 72°C 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后在 72°C 延伸 6min。

1.3 PCR 产物的克隆与测序

扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和胶回收试剂盒(Sangon)纯化后, 克隆到 pMD18-T 载体(TaKaRa), 转化大肠杆菌 DH5 α , 经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定, 每个片段选取 3 个阳性克隆送上海 Sangon 测序。

1.4 序列分析与系统进化树构建

鲫(*C. auratus auratus*)、红鲫(*C. carassius red var.*)、白鲫(*C. auratus cuvieri*)、银鲫 A 系(*C. auratus*

gibelio clone A)、银鲫 D 系(*C. auratus gibelio clone D*)、斑马鱼(*Danio rerio*)的线粒体 DNA 控制区序列从 GenBank 数据库获得, 登录号分别为: AB111951、AY714387、AB045144、AY786068、AY786069、NC_002333。洞庭青鲫和彭泽鲫线粒体 DNA 控制区序列为本实验数据。以 tRNA-Pro 的终点作为控制区的起点, 以 tRNA-Phe 的起点作为控制区的终点, 以扩展的保守序列 CSB-F、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; 序列的多重排列由 ClustalW 在线软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)完成; 用 MEGA(4.0)软件统计序列的碱基组成, 基于 Kimura 二参数模型计算同源序列间的分歧率。以斑马鱼的同源序列为外群, 用 MEGA(4.0)软件的 Neighbor Joining (NJ)程序构建系统进化树, 置信度(Bootstrap)经 1000 次重复抽样检验^[21]。

2 结 果

2.1 线粒体 DNA 控制区的序列扩增及碱基组成

3 尾洞庭青鲫的肾细胞染色体检测结果均为 $2n=100$ (图略), 证实了所选材料洞庭青鲫的二倍性。用 CR1/CR2 引物对 3 尾洞庭青鲫和 3 尾彭泽鲫 DNA 样品进行 PCR 扩增, 所有样品均扩增出约 1200 bp 左右条带(图 1)。对所有扩增条带回收克隆测序, 序列长度约为 1200 bp, 包括部分 Cytb 基因序列、侧翼 tRNA-Thr 和 tRNA-Pro 基因全序列及部分 tRNA-Phe 基因序列。对照鲫、红鲫、白鲫和银鲫线粒体 DNA 序列, 找到洞庭青鲫和彭泽鲫线粒体 DNA 控制区的全序列, 其长度分别是 923 bp 和 924 bp (除去两侧基因序列)。3 尾洞庭青鲫和 3 尾彭泽鲫分别共享 1 种单元型。洞庭青鲫和彭泽鲫线粒体 DNA 控制区全序列已递交 GenBank, 序列登录号分别为 FJ472986 和 FJ472985。在 7 个不同的鲫鱼品系中, 彭泽鲫与 A 系、D 系银鲫三者线粒体 DNA 控制区的长度和碱基组成完全一样。7 个鲫鱼品系线粒体 DNA 控制区核苷酸的平均组成为: A=(32.7 ± 0.16)%, C=(20.4 ± 0.37)%, G=(14.1 ± 0.08)%, T=(32.8 ± 0.36)%, 这与其他鱼类 A、T 含量高, G 含量低的特点相似^[11](表 1)。

在终止序列区, 7 个鲫鱼品系核苷酸的组成情况为: A>T>C>G; 在中央保守区, 洞庭青鲫的核苷酸组成情况为: T>A>G=C, 其他 6 个鲫鱼品系的核苷酸组成情况为: T>A>G>C; 在保守序列区, 7 个鲫

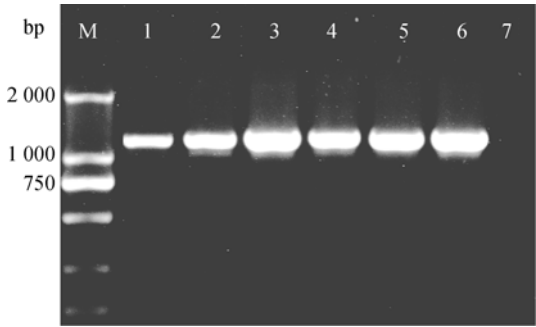


图 1 洞庭青鲫和彭泽鲫线粒体控制区及其侧翼基因 PCR 扩增结果

Fig.1 The PCR amplification products of the mitochondrial DNA control and its flanking genes in Dongtingking crucian carps and Pengze crucian carps

M. 200 bp 分子梯度标记; 1—3. 洞庭青鲫; 4—6. 彭泽鲫; 7. 空白对照

M. 200 bp marker; 1—3. Dongtingking crucian carps; 4—6. Pengze crucian carps; 7. negative control

鱼品系核苷酸的组成情况为: A>T>C>G。但是, 在终止序列区、中央保守区和保守序列区核苷酸的组

成都具有共同的特点, 即(A+T)>(C+G)。

2.2 线粒体 DNA 控制区的序列变异分析

7 个鲫鱼品系线粒体 DNA 控制区序列的相似率和分歧率(表 2)。在 7 个鲫鱼品系中, 核苷酸序列的相似率在 93%—100%之间, 其中彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫三者间的核苷酸序列相似率为 100%, 洞庭青鲫与红鲫和普通鲫的相似率均为 99%, 与彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫的相似率均为 97%, 与白鲫的相似率为 93%。7 个鲫鱼品系线粒体 DNA 控制区核苷酸序列分歧率的变化范围为 0—5.7%, 其中最大发生在红鲫和白鲫之间(5.7%), 最小发生在彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫之间(0)。洞庭青鲫与白鲫的分歧率为 5.6%, 与彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫的分歧率均为 2.2%, 与红鲫的分歧率为 0.8%, 与普通鲫的分歧率为 0.7%。而所有鲫鱼品系线粒体 DNA 控制区序列与斑马鱼相比, 分歧率都高达 75%以上(表 2)。

表 1 七个鲫品系线粒体 DNA 控制区的序列长度和碱基组成

Tab. 1 The mitochondrial DNA control region length variation and base composition in seven strains of *Carassius auratus*

物种 Species	长度 Length (bp)	碱基组成 Base composition (%)					
		A	C	G	T	A+T	C+G
CC	923	32.6	20.8	14.1	32.5	65.1	34.9
DCC	923	32.8	21.0	13.9	32.3	65.1	34.9
RCC	923	32.5	20.8	14.2	32.5	65.0	35.0
JCC	924	33.0	20.2	14.1	32.7	65.7	34.3
PCC	924	32.6	20.1	14.1	33.2	65.8	34.2
SCC-A	924	32.6	20.1	14.1	33.2	65.8	34.2
SCC-D	924	32.6	20.1	14.1	33.2	65.8	34.2
平均 Averages	—	32.7±0.16	20.4±0.37	14.1±0.08	32.8±0.36	65.5±0.35	34.5±0.35

注: CC. 鲫; DCC. 洞庭青鲫; RCC. 红鲫; JCC. 日本白鲫; PCC. 彭泽鲫; SCC-A. A 系银鲫; SCC-D. D 系银鲫; 下同

Note: CC. crucian carp; DCC. Dongtingking crucian carp; RCC. red crucian carp; JCC. Japanese crucian carp; PCC. Pengze crucian carp; SCC-A. silver crucian carp clone A; SCC-D. silver crucian carp clone D; The same as follows

表 2 七个鲫品系线粒体 DNA 控制区的序列相似性(上三角)和分歧率(下三角)

Tab. 2 The percent similarity of nucleotide sequences (above triangle) and the percent divergence calculated by Kimura two-parameter (below triangle) of the mitochondrial DNA control region sequences for the seven strains of *Carassius auratus* and zebrafish (%)

物种 Species	CC	DCC	RCC	JCC	PCC	SCC-A	SCC-D	ZF
CC		99	99	93	97	97	97	52
DCC	0.7		99	93	97	97	97	52
RCC	0.1	0.8		93	97	97	97	52
JCC	5.6	5.6	5.7		94	94	94	54
PCC	2.1	2.2	2.1	5.0		100	100	52
SCC-A	2.1	2.2	2.1	5.0	0.0		100	52
SCC-D	2.1	2.2	2.1	5.0	0.0	0.0		52
ZF	76.0	77.4	76.2	75.6	76.2	76.2	76.2	

注: 百分分歧率=转换比率+颠换比率; ZF. 斑马鱼

Note: the percent divergence = rate of transition + rate of transversion, ZF. Zebrafish

2.3 线粒体 DNA 控制区的终止序列区

终止序列区位于线粒体 DNA 控制区的 5' 端, 包含与 DNA 复制终止相关的序列元件 (Terminal associated sequence TAS), 线粒体控制区的变异一

般出现在该区域, 故将这部分序列分别分析。

7 个鲫鱼品系终止序列区的长度均为 252 bp, 没有明显的重复、长片段的缺失和插入 (图 2, 因彭泽鲫、银鲫 A 系和银鲫 D 系三者序列相同, 故只显

CC	GGATAACCATCCC-TGTATGGTTTAATACATAATATGCATAATATTACATTAGTGTATTA 59
RCC	GGATAACCATCCC-TGTATGGTTTAATACATAATATGCATAATATTACATTAGTGTATTA 59
DCC	GGATAACCATCCC-TGTATGGTTTAATGCATAATATGCATAATATTACATTAGTGTATTA 59
SCC	GGATAACCATCCC-TATATGGTTTAATACATAATATGCATAATATTACATTAAATGCATTA 59
JCC	GGGTAACCATCCCCTATATGGTTTAGTACATAATATGCATAATATTACATT-AATGTATTA 59
** ***** * ***** * ***** ***** ** *	
CC	GTACATATATGTATTATCACCATATCATTATATTAACCCCAAAGCAAGTACATATAAACT 119
RCC	GTACATATATGTATTATCACCATATCATTATATTAACCCCAAAGCAAGTACATATAAACT 119
DCC	GTACATATATGTATTATCACCATATCATTATATTAACCCCAAAGCAAGTACATATAAACT 119
SCC	GTACATATATGTATTATCACCATATCATTATTTAACCCCAAAGCAAGTACATGTAAAT 119
JCC	GTACATATATGTATTATCACCATATCATTATTTAACCATAAAGCAGGGACATATATGTG 119
***** ***** ***** *	
CC	AAGGTATGCATAAAGCATAATCTTAAGACTCACAAGTTAAATTATTTTAACCCGGGTAAT 179
RCC	AAGGTATGCATAAAGCATAATCTTAAGACTCACAAGTTAAATTATTTTAACCCGGGTAAT 179
DCC	AAGGTATGCATAAAGCATAATCTTAAGACTCACAAGTTAAATTATTTTAACCCGGGTAAT 179
SCC	AAGGTATACATAAAGCATAATCTTAAGACTCACAAGTTAAATTATTTTGACCCGGGTAAT 179
JCC	AAGGTATACATAAAGCATAACATTAAGACTCACAATTAATTTATTCGACCCGGGTAAT 179
***** ***** ***** ***** *****	
CC	ATATTATCCCCAAGAAATTGTCCCCACATTTTCCTTGAATGACTCAACTAAGGTTTTA 239
RCC	ATATTATCCCCAAGAAATTGTCCCCACATTTTCCTTGAATGACTCAACTAAGGTTTTA 239
DCC	ATATTATCCCCAAGAAATTGTCCCCACATTTTCCTTGAATGACTCAACTAAGGTTTTA 239
SCC	ATATTATCCCCAAGAAATTGTCTCACATCTTTTCCTTGAATGACTCAACTAAGGTTTTA 239
JCC	ATATTATCCCCAAAAAATTGTCTCACATTTTCCTTGAATGGATCAACTAAGATTTTA 239
***** ***** ***** ***** *****	
CSB-F	
CC	TTCAAACATATTAATGTAGTAAGAGACCACCAACCA-TTTATATAAAGGAATATCATGCA 298
RCC	TTCAAACATATTAATGTAGTAAGAGACCACCAACCA-TTTATATAAAGGAATATCATGCA 298
DCC	TTCAAACATATTAATGTAGTAAGAAACCACCAACCA-CTTATATAAAGGAATATCATGCA 298
SCC	TTCAAACATATTAATGTAGTAAGAAACCACCAACTAATTTATATAAAGGAATATCATGCA 299
JCC	TTCGAACATATTAATGTAGTAAGAAACCACCAACTAATTTACATAAAGGAATATCATGCA 299
** ***** ***** * ** *****	
CSB-E	
CC	TGATAGAATCAGGGACATCAATTGTGGGGTTCGCACAATATGAACTATTACTGGCATCTG 358
RCC	TGATAGAATCAGGGACATCAATTGTGGGGTTCGCACAATATGAACTATTACTGGCATCTG 358
DCC	TGATAGAATCAGGGACATCAATCGTGGGGTTCGCACAATATGAACTATTACTGGCATCTG 358
SCC	TGATAGAATCAGGGACATCAATTGTGGGGTTCGCACAATGTGAACTATTACTGGCATCTG 359
JCC	TGATGGAATCAAGGACACTAATCGTGGGGTTCGCACAATATGAACTATTACTGGCATCTG 359
**** ***** ** ***** ***** *****	
CSB-D	
CC	GTTCTATTTTCAGGTACATAACTGTAATACTCCACCCTCGGATAATTATACTGGCATCTG 418
RCC	GTTCTATTTTCAGGTACATAACTGTAATACTCCACCCTCGGATAATTATACTGGCATCTG 418
DCC	GTTCTATTTTCAGGTACATAACTGTAATACTCCACCCTCGGATAATTATACTGGCATCTG 418
SCC	GTTCTATTTTCAGGTACATAATTGTAATATCCACCCTCGGATAATTATACTGGCATCTG 419
JCC	GTTCTATTTTCAGGGACATAACTGTAATATCCACCCTCGGATAATTATACTGGCATCTG 419
***** ***** ***** ***** *****	
CC	ATTAATGGGTAGTAGACATATGGTTCATTTACCCACATGCCGAGCGTTCTTTTATATGCAT 478
RCC	ATTAATGGGTAGTAGACATATGGTTCATTTACCCACATGCCGAGCGTTCTTTTATATGCAT 478
DCC	ATTAATGGGTAGTAGACATATGGTTCATTTACCCACATGCCGAGCATTTCTTTTATATACAT 478
SCC	ATTAATGGGTAGTAGACATATGGTTCATTTACCCACATGCCGAGCATTTCTTTTATATGCAT 479
JCC	ATTAATGGGTAGTAGACATATGGTTCATTTACCCACATGCCGAGCATTTCTTTTATATGCAT 479
***** ***** ***** ***** *****	

CC	AAGGTATTTTTTTTGGTTTCCTTTCATCTTGCATCTCAGAGTGCAGGCACAAATGTTG	538
RCC	AAGGTATTTTTTTTGGTTTCCTTTCATCTTGCATCTCAGAGTGCAGGCACAAATGTTG	538
DCC	AAGGTATTTTTTTTGGTTTCCTTTCATCTTGCATCTCAGAGTGCAGGCACAAATGTTG	538
SCC	AGGGTATCTTTTTTTGGTTTCCTTTCATCTTGCATCTCAGAGTGCAGGCACAAATGTTG	539
JCC	AAGGTATTTTTTTTGGTTTCCTTTCATCTTGCATCTCAGAGTGCAGGCACAAATGTTG	539
* * * * *		
CSB-1		
CC	GTTTAAGGTTGAACATTTCCTTGAATGTGATTATATAAATGAATTATCGTAAGACATAA	598
RCC	GTTTAAGGTTGAACATTTCCTTGAATGTGATTATATAAATGAATTATCGTAAGACATAA	598
DCC	GTTTAAGGTTGAACATTTCCTTGAATGTGATTATATAAATGAATTATCGTAAGACATAA	598
SCC	GTTTAAGGTTGAACATTTCCTTGAATGTGATTATATAAATGAATTATCGTAAGACATAA	599
JCC	ATTTAAGGTTGAACATTTCCTTGAATGTGATAATATAAATGAATTATCGTAAGACATAA	599
* * * * *		
CC	TTTAAGAACTGCATACTTCTAACTCAAGTGCATAACATATTCATCTCTTATTCAACTTAT	658
RCC	TTTAAGAACTGCATACTTCTAACTCAAGTGCATAACATATTCATCTCTTATTCAACTTAT	658
DCC	TTTAAGAACTGCATACTTCTAACTCAAGTGCATAACATATTCATCTCTTATTCAACTTAT	658
SCC	TTTAAGAACTGCATACTTCTAACTCAAGTGCATATCATATTCATCTCTTATTCAACTTAT	659
JCC	TTTAAGAATTACATACTTCTAACTCAAGTGCATAACATATTCATCTCTTATTCAACTTAT	659
* * * * *		
CSB-2		
CC	CCTTATATAGTCCCCCTTTGGTTTTTGC GCGACAAACCCCTACCCCTACGCTCAA	718
RCC	CCTTATATAGTCCCCCTTTGGTTTTTGC GCGACAAACCCCTACCCCTACGCTCAA	718
DCC	CCTTATATAGTCCCCCTTTGGTTTTTGC GCGACAAACCCCTACCCCTACGCTCAA	718
SCC	CCTTATATAGTCCCCCTTTGGTTTTTGC GCGACAAACCCCTACCCCTACGCTCAA	719
JCC	CCTTACATAGTCCCCCTTTGGTTTTTGC GCGACAAACCCCTACCCCTACGCCAGA	719
* * * * *		
CSB-3		
CC	GAATCCTGTTATCCTTGTCAAACCCGAAACCAAGGAGGACCAAGAACGTGTAAGCCAA	778
RCC	GAATCCTGTTATCCTTGTCAAACCCGAAACCAAGGAGGACCAAGAACGTGTAAGCCAA	778
DCC	GAATCCTGTTATCCTTGTCAAACCCGAAACCAAGGAGGACCAAGAACGTGTAAGCCAA	778
SCC	GAATCCTGTTATCCTTGTCAAACCCGAAACCAAGGAGGACCAAGAACGTGTAAGCCAA	779
JCC	GAATCCTGTTATCCTTGTCAAACCCGAAACCAAGGAGGACCAAGAACGTGTAAGCCAA	779
* * * * *		
Putative promoter		
CC	CGAGTTGAGGTACGAATTGGCATCCCATTATATATATATATATATGTGCATCGGTTTT	838
RCC	CGAGTTGAGGTACGAATTGGCATCCCATTATATATATATATATATATGTGCATCGGTTTT	838
DCC	CGAGTTGAGGTACGAATTGGCATCCCATTATATATATATATATATATGTGCATCGGTTTT	838
SCC	CGAGTTGAGGTACGAATTGGCATCCCATTATATATATATATATATATGTGCATCGGTTTT	839
JCC	CGAGTTGCGGTATGAATTGGCATCCCATTATATATATATATATATATGTGCATCGGTTTT	839
* * * * *		
CC	TTTATCCCAATTTCAGTAATCACCAAAAAATCTCTGCCAAAAACCCAAAAAATCACCTCC	898
RCC	TTTATCCCAATTTCAGTAATCACCAAAAAATCTCTGCCAAAAACCCAAAAAATCACCTCC	898
DCC	TTTATCCCAATTTCAGTAATCACCAAAAAATCTCTGCCAAAAACCCAAAAAATCACCTCC	898
SCC	TTTATCACAATTTCAGTGATCACCTAAAAATCTCTGCCAAAAACCCAAAAAATCACCTCC	899
JCC	TTTATCACAATTTCAGTGATCACCTAAAAACCTCTGCCAAAAACCCAAAAAATCACCTCC	899
* * * * *		
CC	ACACTAAATTTTCTAACATTATTTA	923
RCC	ACACTAAATTTTCTGACATTATTTA	923
DCC	ACACTAAATTTTCTAACATTATTTA	923
SCC	ACACTAAATTTTCTAACATTATTTA	924
JCC	ACACTAAATTTTCTAATATTATTTA	924
* * * * *		

图2 不同鲫鱼品系线粒体 DNA 控制区序列比对

Fig. 2 Aligned sequences of the mitochondrial DNA control region in different strains of *Carassius auratus*

SCC 代表彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫; “*”表示相同的核苷酸位点; “-”表示缺失位点; 中央保守序列(CSB-F, CSB-E, CSB-D)、保守序列(CSB-1, CSB-2, CSB-3)和启动子用下划线表示; 终止相关序列(TAS)用阴影表示, 它的反向互补序列(ATGTA)用双下划线表示; 短小重复序列用方框表示

SCC indicates Pengze crucian carp, silver crucian carp clone A and D; “*” indicates the same base site, and dashes are gaps required for alignment. The central conserved sequence blocks (CSB-F, CSB-E and CSB-D), conserved sequence blocks (CSB1, CSB2 and CSB3), and putative promoters are underlined. The TAS motifs (TACAT) are indicated by shadows, and the palindromic motifs (ATGTA) are doubly underlined. The short repeated sequences are framed

示 1 个序列, 用 SCC 表示), 该区共有 30 个核苷酸替换位点, 2 个核苷酸插入/缺失位点。7 个鲫鱼品系中除白鲫只发现 2 个 TAS 外, 其他 6 个均发现 3 个 TAS, TAS 中含有核心序列 TACAT, 同时还发现 7 个鲫鱼品系均含 TAS 的反向互补序列 ATGTA。Doda, *et al.*^[6]最初给出的 TAS 为 ACATTAAAYYAAT, 但其他研究者发现这一序列在不同群体有较大差异。Sbisa, *et al.*^[8]对比 27 个哺乳动物的序列后, 将 TAS 变为扩展的 TAS (即 ETAS: Extended terminal associated sequence), 在哺乳动物中有两个, 其中比较稳定的是 ACAT 序列。Saccone, *et al.*^[9]发现在哺乳动物中, TACAT 和它的反向序列 ATGTA 常常一起出现, 形成发夹结构。事实上, 这一现象存在于许多类群中, 本实验 7 个鲫鱼品系序列也存在这一发夹结构, 因此我们认为它可能是 ETAS 的主体, 从而确定 7 个鲫鱼品系的 ETAS 序列为: TACATAT-ATGTA TTATCACCAT-TATATTAACC(“-”表示发生变异的碱基, 即转换、颠换或缺失)。

2.4 线粒体 DNA 控制区的中央保守区

对比哺乳动物线粒体控制区结构, 并参照其他鱼类序列, 确定了 7 个鲫鱼品系中央保守区的序列, 其中洞庭青鲫、普通鲫和红鲫为 319 bp, 白鲫、彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫为 320 bp。该区共有核苷酸替换位点 23 个, 插入/缺失位点 1 个。在 7 个鲫鱼品系中, 该区域首先被识别的关键序列为: ATGTAG-TAAGA-ACCACC, 命名为 CSB-F, 它是分开终止序列区和中央保守区的标志(图 2), 紧接其后的是 CSB-E, 其识别的关键序列是: ATGAT-GAATCA-

GGACA-, CSB-F 之后是 CSB-D, 7 个鲫鱼品系 CSB-D 序列非常保守, 一般形式为: TTATACTG-GCATCTGATTAA。此外, 我们还找到一些保守重复序列, 如 TCAT、GCAT 和 TTCC。7 个鲫品系和斑马鱼线粒体 DNA 控制区中央保守区的比较(表 3)。

2.5 线粒体 DNA 控制区的保守序列区

哺乳动物的保守区一般存在保守序列 CSB-1、CSB-2 和 CSB-3, 研究表明 CSB-1 与线粒体的复制起始点相关^[22], 在哺乳动物中特别保守, 其一般形式为: ATT-AATTAATG-T-GCAGGACATA。本实验 7 个鲫鱼品系保守序列区的长度均为 352 bp, 共有核苷酸替换位点 19 个, 无插入/缺失位点。对比哺乳动物和鱼类序列, CSB-1 中 GACATA 最为保守, 有助于识别 CSB-1 的存在。本实验 7 个鲫鱼品系 CSB-1 高度保守序列形式为: ATATAAATGAATTATCG-TAAGACATA; CSB-2 和 CSB-3 也非常保守, 容易识别, CSB-2 的一般形式为: CAAACCCCC-TACCC, CSB-3 的一般形式为: TGTCAAACCCCGA-AACCA。7 个鲫品系和斑马鱼线粒体 DNA 控制区保守序列区的比较(表 4)。

2.6 线粒体 DNA 控制区的系统进化树

根据 Kimura 二参数模型估计每个核苷酸位点的碱基替换数, 以斑马鱼的同源序列为外群, 用 MEGA(4.0)软件的 Neighbor Joining(NJ)程序构建 7 个鲫鱼品系的系统进化树(图 3)。从图 3 可见, 系统进化树首先明显地分为内群与外群两支; 在内群中, 普通鲫和红鲫聚合后再与洞庭青鲫聚合构成一个分支, 然后它们与彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫构成的分

表 3 七个鲫品系和斑马鱼线粒体 DNA 控制区中央保守区元件的比较
Tab. 3 The comparison of the central conserved sequence blocks of the mitochondrial DNA control region in seven strains of *Carassius auratus*

物种 Species	中央保守区元件 Central conserved sequence blocks		
	CSB-F	CSB-E	CSB-D
CC	ATGTAGTAAGAGACCACC	ATGATAGAATCAGGGACAT	TTATAC-TGGCATCTGATTAA
DCC	*****A*****	*****	*****
RCC	*****	*****	*****
JCC	*****A*****	*****G*****A*****C	*****
PCC	*****A*****	*****	*****
SCC-A	*****A*****	*****	*****
SCC-D	*****A*****	*****	*****
ZF	-*CA**G*****	*****	*GG**AAC*****A*****G

注: “*”表示相同的核苷酸位点; “-”表示缺失位点; 下同
Note: “*”indicated the identical base sites; “-”indicated the gaps required for alignment; The same as follow

表 4 七个鲫鱼品系和斑马鱼线粒体 DNA 控制区保守序列区的比较
Tab. 4 The comparison of the conserved blocks of the mitochondrial DNA control region in seven strains of *Carassius auratus*

物种 Species	保守序列区 Conserved blocks		
	CSB-1	CSB-2	CSB-3
CC	ATATAAATGAATTATCGTAAGACATA	CAAACCCCTACCC	TGTCAAACCCGAAACCA
DCC	*****	*****	*****
RCC	*****	*****	*****
JCC	*****	*****T*****	*****
PCC	*****	*****	*****
SCC-A	*****	*****	*****
SCC-D	*****	*****	*****
ZF	*****T*****TA*****	*****T*****	*****T*****

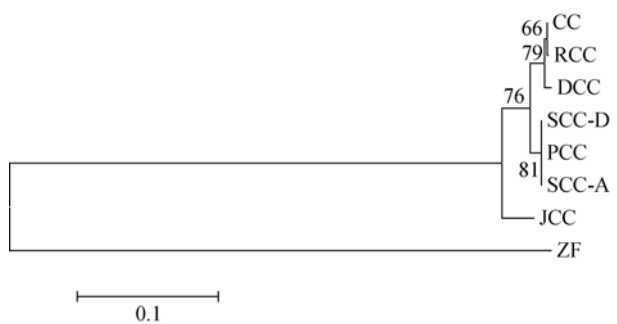


图 3 NJ 法构建的 7 个鲫鱼品系和斑马鱼线粒体 DNA 控制区系统进化树
Fig. 3 The NJ phylogenetic tree based on the complete nucleotide sequences of control regions in seven strains of *Carassius auratus* and zebrafish
接点处数值表示 1000 次重复抽样检验值
The values in nodes represented local bootstrap values from 1000 replicates

支聚合,最后与白鲫聚合成一个大的分支。线粒体控制区序列聚类关系显示,在 7 个鲫鱼品系中,洞庭青鲫与普通鲫和红鲫的亲缘关系最近,与彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫亲缘关系次之,与白鲫的亲缘关系最远。而彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫三者则表现为是一个相同的鲫鱼品系。

3 讨 论

3.1 7 个鲫鱼品系线粒体 DNA 控制区结构特征分析
本实验对比哺乳动物线粒体 DNA 控制区结构,并参照其他鱼类序列,首次识别了 7 个鲫鱼品系的中央保守区序列 CSB-D、CSB-E、CSB-F 和保守区序列 CSB-1、CSB-2、CSB-3,并且给出了识别 7 个鲫鱼品系中央保守区序列 CSB-D、CSB-E、CSB-F 和保守序列 CSB-1、CSB-2、CSB-3 的一般形式。表 3 和表 4 的数据表明,7 个鲫鱼品系的中央保守区和

保守区序列元件都具有极高的保守性。近年来,大量的研究表明,至少在脊椎动物中,线粒体的结构是相似的,一些序列非常保守,在鱼类、鸟类和哺乳动物中都有存在,经受了强烈的自然选择压力,被认为是功能单位。因此,在进行鱼类线粒体 DNA 控制区的研究时,我们识别的这些功能单位是有着重要参考价值的。

线粒体 DNA 控制区的终止序列区是最容易发生变异的区域,在这一区域我们找到了与终止相关的序列 TAS (TACAT),而且还发现多个 TAS 拷贝,这与 Yang, et al.^[23]发现的在同一物种内部 TAS 的拷贝数存在个体差异的结论相一致。本实验我们在同为一个物种的 7 个鲫鱼品系中发现白鲫为 2 个 TAS 拷贝,而其他 6 个鲫鱼品系有 3 个 TAS 拷贝,多个 TAS 拷贝的出现可能是终止序列复制的结果。一般认为,在终止序列区,只有一个 TAS 与它的反向互补序列 ATGTA 一起构成 ETAS 的主体行使功能,而其他复制的 TAS 不行使功能^[11]。

3.2 7 个鲫鱼品系的起源与遗传关系分析

线粒体控制区序列由于其进化速度快,遗传变异大,因此非常适合于物种内的遗传分化和遗传关系研究^[3]。本实验利用 7 个鲫鱼品系的线粒体控制区序列,探讨了它们的起源和相互间遗传关系。从表 2 数据看到,在 7 个鲫鱼品系中,红鲫、洞庭青鲫二者与白鲫的分歧率均较大,分别为 5.7%和 5.6%,而与普通鲫的分歧率很小,分别为 0.1%和 0.7%,系统进化树也显示红鲫、洞庭青鲫和普通鲫三者间具有极近的亲缘关系,推测红鲫和洞庭青鲫均直接起源于普通鲫,而它们与白鲫的亲缘关系较远,可能有着不同的遗传起源。

彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫都是行雌核发育的三倍体鲫鱼。关于雌核发育三倍体鲫鱼的遗传起源, 有报道认为它们是由二倍体鲫鱼在一定的条件下(如环境急变, 天然杂交或产生未减数的二倍体配子)演变而来^[17, 24, 25], 因此它们与二倍体普通鲫仍然保持着比较亲近的遗传关系。本实验利用线粒体 DNA 控制区对彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫三个三倍体鲫鱼品系与二倍体普通鲫进行序列相似性比较, 相似率高达 97%, 这一结果与上述三倍体鲫鱼起源于二倍体普通鲫的报道是相符合的。洞庭青鲫是新近发现的一个优良鲫鱼品系, 本实验及先前的研究结果均证实了其为一个染色体数目稳定($2n=100$)的二倍体鱼, 至于在今后的养殖生产中洞庭青鲫是否会发生类似银鲫的遗传分化, 我们将密切加以关注。

对于彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫的相互关系, 有报道表明彭泽鲫与 A 系银鲫具有基本相似的遗传背景, 是属于银鲫的一个地方品系^[26, 27], 而 A 系和 D 系银鲫则是直接由银鲫种群内的遗传分化产生^[28]。如果彭泽鲫和 A 系、D 系银鲫都起源于银鲫的结论正确, 根据银鲫的雌核发育生殖方式和线粒体的母性遗传特性, 则它们在线粒体 DNA 遗传上具有完全的一致性。本实验彭泽鲫、A 系和 D 系银鲫线粒体 DNA 控制区序列比较完全相同的结果恰好证实了上述推论。当然也不排除由于异源基因的影响银鲫雌核发育子代线粒体出现序列变异的情况。

此外, 从图 2 线粒体 DNA 控制区序列比对数据可见, 尽管不同的鲫鱼品系同属一个相同的物种 *C. auratus*, 而且在线粒体 DNA 控制区有着相似的保守序列元件, 但是这些鲫鱼品系在线粒体 DNA 控制区上仍然存在着碱基位点差异, 这些差异可以作为区分不同鲫鱼品系的分子遗传标记。

参考文献:

- [1] Guo X H, Liu S J, Liu Q, et al. New progresses on mitochondrial DNA in fish [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, **31**(9): 983—1000 [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]
- [2] Xiao W H, Zhang Y P. Mitochondrial DNA's genetic differentiation of natural *Xenocypris argentea* populations [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(1): 1—9 [肖武汉, 张亚平. 银鲫自然群体线粒体 DNA 的遗传分化. 水生生物学报, 2000, **24**(1): 1—9]
- [3] Xie Z Y, Du J Z, Chen X Q, et al. The significance of mitochondrial control region in intraspecific genetic differentiation of fish [J]. *Hereditas*, 2006, **28**(3): 362—368 [谢振宇, 杜继曾, 陈学群, 等. 线粒体控制区在鱼类种内遗传分化中的意义. 遗传, 2006, **28**(3): 362—368]
- [4] Beheregaray L B, Sunnucks P. Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis* [J]. *Molecular Ecology*, 2001, **10**(12): 2849—2866
- [5] Foran D R, Hixson J E, Brown W M. Similarities of ape and human sequences that regulate mitochondrial DNA transcription and the DNA synthesis [J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**: 5841—5861
- [6] Shaffer H B, McKnight M L. The polytypic species revisited: genetic differentiation and molecular phylogenetic of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum* (Amphibia: Caudata) complex [J]. *Evolution*, 1996, **50**: 417—433
- [7] Doda J N, Wright C T, Clayton D A. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, **78**(10): 6116—6120
- [8] Sbisa E, Tanzariello F, Reyes F, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and the functional and evolutionary implications [J]. *Gene*, 1997, **205**: 125—140
- [9] Saccone C, Attimonelli M, Sbisa E. Structural elements highly preserved during the evolution of the d-loop region in vertebrate mitochondrial DNA [J]. *Journal of molecular evolution*, 1987, **26**(3): 205—211
- [10] Southern S O, Southern P J, Dizon A E. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome [J]. *Journal of molecular evolution*, 1988, **28**: 32—40
- [11] Guo X H, Liu S J, Liu Y. Comparative analysis of the mitochondrial DNA control region in cyprinids with different ploidy level [J]. *Aquaculture*, 2003, **24**: 25—35
- [12] Liu H Z. The structure and evolution of the mtDNA control region in fish: taking example for Acheilognathinae [J]. *Progress in Natural Sciences*, 2002, **12**(3): 266—270 [刘焕章. 鱼类 DNA 控制区的结构和进化: 以鲮鲷为例. 自然科学进展, 2002, **12**(3): 266—270]
- [13] Zhang Y, Zhang E, He S P. 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 [张燕, 张鹤, 何舜平. 中国鲮科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析. 水生生物学报, 2003, **27**(5): 463—467]
- [14] Tang Q Y, Liu H Z, Yang X P. Studies on the structure of the mitochondrial DNA control region and phylogenetic relationships of the subfamily botiinae [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(6): 645—653 [唐琼英, 刘焕章, 杨秀平. 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. 水生生物学报, 2005, **29**(6): 645—653]
- [15] Chen M R, Yang X Q, Yu X M, et al. Karyotype studies on

- the bisexual gynogenetic crucian carp (*Carassius auratus*) of Pengze [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, **20**(1): 25—31 [陈敏容, 杨兴棋, 俞小牧, 等. 两性型天然雌核发育彭泽鲫染色体组型的研究. 水生生物学报, 1996, **20**(1): 25—31]
- [16] Ye Y Z, Zhou J F, Wang Z W, *et al.* Comparative studies on the DNA content from three strains of crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(1): 13—16 [叶玉珍, 周建峰, 王忠卫, 等. 三个鲫鱼品系 DNA 含量的比较研究. 水生生物学报, 2004, **28**(1): 13—16]
- [17] Shen J B, Wang G R, Fan Z T. The ploidy of crucian carp and its geographical distribution in Heilongjiang main river [J]. *Journal of Fisheries China*, 1983, **7**(2): 87—94 [沈俊宝, 王国瑞, 范兆廷. 黑龙江主要水域鲫鱼倍性及其地理分布. 水产学报, 1983, **7**(2): 87—94]
- [18] Wu S, Wu W X. The genetics analysis of morphological trait on *Carassius auratus* Tungting [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2006, **15**(1): 90—93 [吴珊, 吴维新. 洞庭青鲫形态性状遗传分析. 激光生物学报, 2006, **15**(1): 90—93]
- [19] Yang P H, Wang X Y, Wu W X, *et al.* Chromosome karyotype analysis of *Carassius auratus* Dongtingking var. and cultivar identification [J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, **37**(3): 3—7 [杨品红, 王晓艳, 吴维新, 等. 洞庭青鲫的染色体核型分析及品种鉴定. 淡水渔业, 2007, **37**(3): 3—7]
- [20] Yang P H, Wu W X, Xie C H, *et al.* Biological characterization of the Dongtingking crucian carp [J]. *Inland Fisheries*, 2005, **30**(3): 44—45 [杨品红, 吴维新, 谢春华, 等. 洞庭青鲫的生物学特性. 内陆水产, 2005, **30**(3): 44—45]
- [21] Koichiro T, Joel D, Masatoshi N, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1596—1599
- [22] Foran D R, Hixson J E, Brown W M. Comparison of ape and human sequences that regulate mitochondrial DNA transcription and D-loop DNA synthesis [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, **16**: 5841—5861
- [23] Yang Y J, Lin Y S, Wu J L, *et al.* Variation in mitochondrial DNA and population structure of the Taipei treefrog *Rhacophorus taipeianus* in Taiwan [J]. *Molecular Ecology*, 1994, **3**: 219—228
- [24] Wang R F, Shi L M, He W S. A comparative study of the AG-NORS of *Carassius auratus* from different geographic districts [J]. *Zoological Research*, 1988, **9**(2): 165—170 [王蕊芳, 施立明, 贺维顺. 不同地理区域鲫鱼染色体银染核仁组织者的比较研究. 动物学研究, 1988, **9**(2): 165—170]
- [25] Zan R G. Fish polyploidy and its role in the evolution of fishes [J]. *Journal of Yunnan University*, 1985, **7**(2): 235—243 [曾瑞光. 鱼类中的多倍性及其在鱼类演化中的作用. 云南大学学报(自然科学版), 1985, **7**(2): 235—243]
- [26] Zhang H, Dong X H, Ye Y Z, *et al.* Comparative studies of the mtDNA from three strains of triploid *Carassius auratus* and *C. auratus auratus* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1998, **25**(4): 330—336 [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]
- [27] Li M Y, Zhou L, Yang L, *et al.* Molecular genetic analysis on Pengze crucian carp and comparison with strain A of gynogenetic silver crucian carp [J]. *Journal of Fisheries China*, 2002, **26**(5): 472—476 [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]
- [28] Jiang Y G, Liang S C, Chen B D, *et al.* Biological effect of heterologous sperm on gynogenetic offspring in *Carassius auratus gibelio* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1983, **8**(1): 1—13 [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]

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION IN DONGTINGKING CRUCIAN CARP AND OTHER SIX STRAINS OF *CARASSIUS AURATUS*

LIU Liang-Guo¹, YANG Pin-Hong^{1,2}, WANG Wen-Bin¹, WANG Xiao-Yan², XIE Chun-Hua² and LI Meng-Jun²

(1. College of Life Science, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000;

2. Hunan Province Fisheries Engineering Technological Centre, Changde 415000)

Abstract: In this study, the complete fragment of the mitochondrial DNA control region were amplified using the genomic DNA of Dongtingking crucian carp (*Carassius auratus* Dongtingking variety) and Pengze crucian carp (*Carassius auratus* of Pengze). The PCR products were ligated and sequenced to the plasmid of pMD18-T Vector by the method of direct cloning, and then, the base composition, variation, sequence structure and phylogeny of the mitochondrial DNA control region were compared and analyzed among seven strains of *Carassius auratus* (Dongtingking crucian carp, Pengze crucian carp, crucian carp, Red crucian carp, Japanese crucian carp, Silver crucian carp clone A and D). In the seven strains of *Carassius auratus*, the percentages of average base compositions of the mitochondrial DNA control region were A (32.7±0.16)%, C (20.4±0.37)%, G (14.1±0.08)% and T (32.8±0.36)%, respectively, the sequences percent divergences were between 0—5.7%, the highest percent divergence (5.7%) was between Red crucian carp and Japanese crucian carp, and the lowest percent divergence (0) was among Pengze crucian carp, Silver crucian carp clone A and D. The percent divergence between Dongtingking crucian carp and Japanese crucian carp was 5.6%, which was 2.2% among Dongtingking crucian carp and Pengze crucian carp, Silver crucian carp clone A and D, 0.8% between Dongtingking crucian carp and Red crucian carp, and 0.7% between Dongtingking crucian carp and crucian carp. Compared with the mitochondrial DNA control region in mammalian and other fishes, the extended terminal associated sequences (ETAS), central conserved sequence blocks (CSB-F, CSB-E, CSB-D), conserved sequence blocks (CSB-1, CSB-2, CSB-3) and putative promoters of the mitochondrial DNA control region in the seven strains of *Carassius auratus* were observed. Analysis of the sequences percent divergences and phylogeny indicated that the Dongtingking crucian carp had a extremely close relationship with crucian carp and Red crucian carp, taking the second place with Pengze crucian carp, Silver crucian carp clone A and D, and had a farthest relationship with Japanese crucian carp. Moreover, the consistent similarity and percent divergence of the mitochondrial DNA control region among Pengze crucian carp, Silver crucian carp clone A and D demonstrated that they were the same strain of *Carassius auratus*.

Key words: *Carassius auratus* Dongtingking variety; Strains of *Carassius auratus*; Mitochondrial DNA; Control region; Phylogeny