

## 研究报告

## Research Report

# 鲤和鲫线粒体(mtDNA)全基因组分析

葛倩芸 蔡原 王建福 赵生国\*

甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州, 730070

\* 通信作者, zhaosg@gsau.edu.cn

**摘要** 为研究鲤(*Cyprinus carpio*)和鲫(*Carassius auratus*) mtDNA 上的基因分布特征,丰富鱼类 mtDNA 数据库。本研究通过 PCR 扩增和测序,获得了鲤和鲫 mtDNA 基因组序列,经比对分析表明,鲤和鲫的 mtDNA 序列全长均为 16 596 bp,共有 13 个蛋白质编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和 1 个 D-Loop 区。鲤和鲫的 mtDNA 序列中(A+T)百分含量分别为 57.2%和 57.1%,其碱基组成均具有一定的 A/T 碱基偏向性。N-J 系统发育树分析表明,鲤和鲫与琵琶湖鲌亲缘关系最近,与达氏深水尾鲢亲缘关系最远。本研究揭示了鲤和鲫 mtDNA 遗传变异特征及基因分布规律,为鱼类遗传资源保护及开发利用提供了参考依据。

**关键词** 鲤, 鲫, mtDNA, 基因分布, 系统进化

## Complete Genome Analysis of mtDNA in Carp and Crucian

Ge Qianyun Cai Yuan Wang Jianfu Zhao Shengguo\*

College of Animal Science and Technology of Gansu Agricultural University, Lanzhou, 730070

\* Corresponding author, zhaosg@gsau.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.039.000037

**Abstract** In order to investigate the distribution of genes in the mtDNA of Carp (*Cyprinus carpio*) and Crucian (*Carassius auratus*), and improve the database of the fish mtDNA, in this study, the mtDNA genome sequences of Carp and Crucian were obtained by PCR amplification and sequencing. The result showed that there were 16 596 bp, which included 13 protein coding factors, 2 rRNA genes, 22 tRNA genes, and 1 D-Loop region, in the whole genomes both of Carp and Crucian based on the comparison analysis. The contents of A+T% in the mtDNA sequences of Carp and Crucian were 57.2% and 57.1%, respectively, and their base compositions all had a certain A/T bias. The NJ phylogenetic tree analysis showed that the phylogenetic relationship between Carp and Crucian was the closest, and the relationship with Deepwater stingray was farthest. This study revealed the genetic variation and distribution of mtDNA in carp and crucian, providing a reference for the conservation, development and utilization of fish genetic resources.

**Keywords** Carp, Crucian, mtDNA, The distribution of gene, Phylogenetic evolution

鲤(*Cyprinus carpio*)和鲫(*Carassius auratus*)是鲤属鱼类的两个不同种,鲤身体侧扁,口呈马蹄形,须2对,鳞大。常分布于江河、湖泊水草丛生的底部水层,主要以底栖动物为食。原产亚洲,后引入欧洲、北美及其他地区。鲤经人工培育的品种很多,如红鲤、团鲤、草鲤、锦鲤、火鲤、芙蓉鲤、荷包鲤等。鲫体侧扁

而高,头短小,无须。全国各地水域常年均有生产,多产于黄河流域、长江流域一带,是主要以植物为食的杂食性鱼。中国经过选育的地方优良品种有高背鲫、方正银鲫、彭泽鲫、淇河鲫等。这两种鱼分布广泛、适应性强、养殖历史悠久,是中国重要的食用鱼。然而其遗传资源研究及新品系培育相对滞后。环境污染

基金项目:本研究由甘肃农业大学本科生科研训练项目(SRTP)资助

引用格式:Ge Q.Y., Cai Y., Wang J.F., and Zhao S.G., 2020, Complete genome analysis of mtDNA in Carp and Crucian, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 39(1): 37-43 (葛倩芸, 蔡原, 王建福, 赵生国, 2020, 鲤和鲫线粒体(mtDNA)全基因组分析, *基因组学与应用生物学*, 39(1): 37-43)



表 1 鲤和鲫线粒体基因组各编码蛋白质基因和结构 RNAs 概述

Table 1 Characteristics of the protein coding genes and structural RNAs in the Carp and Crucian mitochondrial genome

| 产物名称         | 编码链    | 位点            | 长度(bp)      | 间隔(+)/重叠(-)            | 起始密码子       | 终止密码子  |
|--------------|--------|---------------|-------------|------------------------|-------------|--|
| Product name | Strand | Position      | Length (bp) | Spacer (+)/Overlap (-) | Start codon | Stop codon   |
| Phe tRNA     | H      | 1~69          | 69          |                        |             |  |
| 12S RNA      | H      | 70~1 026      | 957         |                        |             |  |
| Val tRNA     | H      | 1 027~1 098   | 72          |                        |             |  |
| 16S RNA      | H      | 1 099~2 786   | 1 687       | 1                      |             |  |
| Leu tRNA     | H      | 2 788~2 863   | 76          | 1                      |             |  |
| ND1          | H      | 2 865~3 839   | 975         | 4                      | ATG         | ATT (鲤)/ACT (鲫)<br>ATT ( <i>Cyprinus carpio</i> )/ACT ( <i>Carassius auratus</i> ) |
| Ile tRNA     | H      | 3 844~3 915   | 72          | -2                     |             |  |
| Gln tRNA     | L      | 3 914~3 984   | 71          | 1                      |             |  |
| Met tRNA     | H      | 3 986~4 053   | 68          |                        |             |  |
| ND2          | H      | 4 054~5 099   | 1 046       |                        | ATG         | AAG  |
| Trp tRNA     | H      | 5 100~5 170   | 71          | 2                      |             |  |
| Ala tRNA     | L      | 5 173~5 241   | 69          | 1                      |             |  |
| Asn tRNA     | L      | 5 243~5 315   | 73          | 31                     |             |  |
| Cys tRNA     | L      | 5 347~5 414   | 68          | 1                      |             |  |
| Tyr tRNA     | L      | 5 416~5 485   | 70          | 1                      |             |  |
| COX1         | H      | 5 487~7 037   | 1 551       |                        | GTG         | ACG  |
| Ser tRNA     | L      | 7 038~7 108   | 71          | 3                      |             |  |
| Asp tRNA     | H      | 7 112~7 183   | 72          | 13                     |             |  |
| COX2         | H      | 7 197~7 887   | 691         |                        | ATG         | TCA  |
| Lys tRNA     | H      | 7 888~7 963   | 76          | 1                      |             |  |
| ATP8         | H      | 7 965~8 129   | 165         | -7                     | ATG         | ACA  |
| ATP6         | H      | 8 123~8 806   | 684         | -1                     | ATG         | ATG  |
| COX3         | H      | 8 806~9 589   | 784         |                        | ATG         | TAA  |
| Gly tRNA     | H      | 9 590~9 662   | 73          |                        |             |  |
| ND3          | H      | 9 663~10 012  | 350         |                        | ATG         | AGG  |
| Arg tRNA     | H      | 10 013~10 080 | 68          |                        |             |  |
| ND4L         | H      | 10 081~10 377 | 297         | -7                     | ATG         | AAA  |
| ND4          | H      | 10 371~11 752 | 1 382       |                        | ATG         | AGT  |
| His tRNA     | H      | 11 753~11 821 | 69          |                        |             |  |
| Ser tRNA     | H      | 11 822~11 890 | 69          | 1                      |             |  |
| Leu tRNA     | H      | 11 892~11 964 | 73          |                        |             |  |
| ND5          | H      | 11 965~13 800 | 1 836       | -4                     | ATG         | AAC  |
| ND6          | L      | 13 797~14 318 | 522         |                        | CTA         | TAA (鲤)/TAT (鲫)<br>TAA ( <i>Cyprinus carpio</i> )/TAT ( <i>Carassius auratus</i> ) |
| Glu tRNA     | L      | 14 319~14 387 | 69          | 4                      |             |  |
| CYTb         | H      | 14 392~15 532 | 1 141       |                        | ATG         | TGC  |
| Thr tRNA     | H      | 15 533~15 604 | 72          |                        |             |  |
| Pro tRNA     | L      | 15 605~15 673 | 69          |                        |             |  |
| D-loop       | H      | 15 674~16 596 | 923         |                        |             |  |

NA-3")排列顺序与人、小鼠、果蝇、鸟类、大鼠和牛(郭新红等, 2004)中等一致,表现出一定的保守性。通过

序列极为相似,全序列长均为 16 596 bp,包括长 923 bp 的线粒体调控区(D-loop 区)和长 15 673 bp 的编码区,可编码 13 种蛋白质、2 种 rRNA 和 22 种 tRNA。

表 2 13 种鱼类线粒体基因组 4 种碱基百分含量比较

Table 2 Base compositions of the 13 fish mitochondrial genomes

| 物种<br>Species                       | 分类<br>Classification | GenBank 登录号<br>No. of GenBank | 长度(bp)<br>Length (bp) | 碱基组成(%)<br>Base composition (%) |      |      |      |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------|------|------|------|
|                                     |                      |                               |                       | T                               | C    | A    | G    |
| 鲤<br>Carp                           | 鲤科<br>Cyprinidae     |                               | 16 595                | 26.5                            | 26.3 | 30.7 | 16.6 |
| 鲫<br>Crucian                        | 鲤科<br>Cyprinidae     |                               | 16 596                | 26.6                            | 26.2 | 30.5 | 16.6 |
| 草鱼<br>Grass carp                    | 鲤科<br>Cyprinidae     | HQ891005                      | 16 611                | 26.2                            | 26.3 | 31.9 | 15.6 |
| 琵琶湖鲌<br>Biwia zezera                | 鲤科<br>Cyprinidae     | NC008324                      | 16 599                | 26.9                            | 26.2 | 30.1 | 16.8 |
| 澳洲马鲛<br>Australian spotted mackerel | 鲭科<br>Scombridae     | JX559739                      | 16 796                | 25.4                            | 30.3 | 28.2 | 16.1 |
| 达氏深水尾鲛<br>Deepwater stingray        | 近鲛科<br>Dasyatidae    | NC007230                      | 17 514                | 27.7                            | 28.9 | 30.3 | 13.1 |
| 杂斑狗母鱼<br>Variegated lizardfish      | 狗母鱼科<br>Synodontidae | NC007228                      | 16 448                | 27.0                            | 27.7 | 26.4 | 19.0 |
| 中华花鳅<br>Siberian spiny loach        | 鳅科<br>Cobitidae      | NC007229                      | 16 553                | 27.8                            | 25.9 | 29.9 | 16.3 |
| 比克吴郭鱼<br>Mozambique tilapia         | 慈鲷科<br>Cichidae      | NC007231                      | 16 641                | 26.3                            | 30.0 | 28.0 | 15.6 |
| 长江胭脂鱼<br>Chinese sucker             | 鲤科<br>Cyprinidae     | NC006401                      | 16 636                | 24.8                            | 27.9 | 28.6 | 18.7 |
| 北极红点鲑<br>Arctic char                | 鲑科<br>Salmonidae     | NC000861                      | 16 659                | 26.5                            | 28.5 | 28.1 | 16.9 |
| 美洲红点鲑<br>Brook trout                | 鲑科<br>Salmonidae     | AF154850                      | 16 624                | 26.6                            | 28.3 | 28.2 | 16.9 |
| 半线马鲛<br>Broadbarred king mackerel   | 鲭科<br>Scombridae     | JX559745                      | 16 548                | 26.4                            | 29.0 | 28.5 | 16.0 |

此外,除蛋白质编码基因 *ND6* 和 *tRNA* 基因 *tRNA-Pro*、*tRNA-Glu*、*tRNA-Ser*、*tRNA-Tyr*、*tRNA-Cys*、*tRNA-Asn*、*tRNA-Ala*、*tRNA-Gln* 位于 L 链上外,其余的基因均位于 H 链上。

## 2.2 碱基组成及密码子使用

分析线粒体基因组 4 种碱基百分含量,发现鲤和鲫 mtDNA 核苷酸碱基组成与大多数脊椎动物相同,具有 A+T 碱基的偏向性(Broughton et al., 2001)。鲤的线粒体基因组全序列中 A+T 百分含量为 57.2%,鲫的线粒体基因组全序列中 A+T 百分含量为 57.1%。

以琵琶湖鲌 mtDNA 核苷酸序列和基因排列为参照,经比对分析,获得鲤和鲫基因及其起始密码子、终止密码子位置。*COX1* 和 *ND6* 基因起始密码子分别为 GTG 和 CTA,其他基因均为 ATG。与鲶形目

中的黄颡鱼属和鲶属不同,黄颡鱼属和鲶属只有 *COX1* 基因的起始密码子为 GTG,其余均为 ATG(梁宏伟, 2012)。且鲤和鲫终止密码子相似,只有 *ND1* 和 *ND6* 蛋白质编码基因的终止密码子不同,鲤 *ND1* 的终止密码子为 ATT,而鲫 *ND1* 的终止密码子为 ACT;鲤 *ND6* 的终止密码子为 TAA,而鲫 *ND6* 的终止密码子为 TAT,这些进化中的 mtDNA 变异,有助于研究阐明物种特征、理解种间差异、分析进化关系等。

## 2.3 基因重叠区和基因间隔区

两种鱼类整个编码区的 37 个基因之间,基因间隔总共有 65 bp,占基因总长度的 0.39%。其中 10 个基因(*tRNA-Ile* 与 *tRNA-Gln*, *ATP8* 与 *ATP6*, *ATP6* 与 *COX3*, *ND4L* 与 *ND4*, *ND5* 与 *ND6*)具有重叠现象,13 个蛋白基因中重叠 4 处,分别为 7 bp、1 bp、7 bp、

表 3 遗传距离  
Table 3 Genetic distance

| 品种<br>Species | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1             |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 2             | 0.361 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 3             | 0.306 | 0.365 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 4             | 0.358 | 0.424 | 0.348 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 5             | 0.205 | 0.391 | 0.321 | 0.36  |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 6             | 0.214 | 0.378 | 0.313 | 0.368 | 0.229 |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 7             | 0.279 | 0.367 | 0.278 | 0.343 | 0.289 | 0.281 |       |       |       |       |       |       |    |
| 8             | 0.281 | 0.365 | 0.283 | 0.34  | 0.289 | 0.283 | 0.046 |       |       |       |       |       |    |
| 9             | 0.300 | 0.372 | 0.252 | 0.354 | 0.313 | 0.318 | 0.281 | 0.282 |       |       |       |       |    |
| 10            | 0.297 | 0.367 | 0.242 | 0.342 | 0.315 | 0.308 | 0.280 | 0.282 | 0.143 |       |       |       |    |
| 11            | 0.146 | 0.383 | 0.316 | 0.356 | 0.22  | 0.232 | 0.290 | 0.288 | 0.319 | 0.310 |       |       |    |
| 12            | 0.137 | 0.38  | 0.310 | 0.356 | 0.213 | 0.229 | 0.283 | 0.283 | 0.311 | 0.305 | 0.046 |       |    |
| 13            | 0.149 | 0.382 | 0.311 | 0.353 | 0.214 | 0.230 | 0.286 | 0.284 | 0.314 | 0.307 | 0.046 | 0.039 |    |

注: 1: 草鱼; 2: 达氏深水尾鲴; 3: 比克吴郭鱼; 4: 杂斑狗母鱼; 5: 长江胭脂鱼; 6: 中华花鳅; 7: 北极红点鲑; 8: 美洲红点鲑; 9: 澳洲马鲛; 10: 半线马鲛; 11: 琵琶湖鲟; 12: 鲤鱼; 13: 鲫鱼

Note: 1: Grass carp; 2: Deepwater stingray; 3: Mozambique tilapia; 4: Variegated lizardfish; 5: Chinese sucker; 6: Siberian spiny loach; 7: Arctic char; 8: Brook trout; 9: Australian spotted mackerel; 10: Broadbarred king mackerel; 11: Biwia zezera; 12: Carp; 13: Crucian

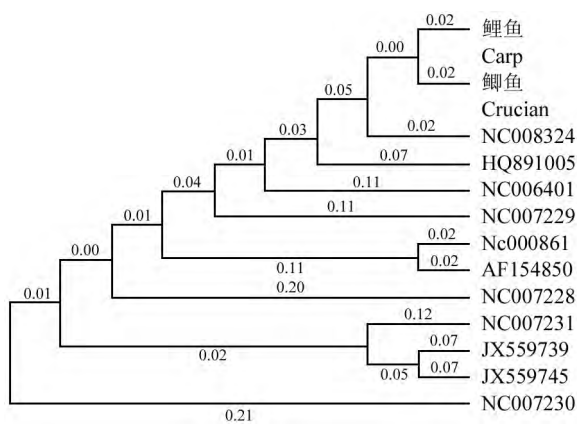


图 2 基于线粒体基因组全序列采用 NJ 算法构建系统进化树  
Figure 2 Phylogenetic trees based on the complete mitochondrial genome by Neighbor-joining analysis

4 bp, 重叠碱基数在 1~7 bp 之间, 共计 21 bp。虽然与大多数脊椎动物具有相同的基因重叠区, 然而重叠碱基数存在差异。如爪蛙和鸡在 *ATP8* 和 *ATP6* 之间以及 *ND4L* 和 *ND4* 之间有 10 bp 重叠(Desjardins and Morais, 1990), 而哺乳动物这两组基因重叠达 40~46 bp (Anderson et al., 1981), 依次可进行物质进化上关系上的分析和种间鉴别。

### 2.4 系统发育特点

Liu 等(2002)利用 mtDNA 控制区序列变异探讨

了鲤科鱼的系统发育关系。本研究通过构建鲤和鲫与 GenBank 中其他 11 种鱼类 mtDNA 基因组进化树并分析, 发现鲤和鲫之间的遗传距离仅为 0.039, 且二者与琵琶湖鲟的亲缘关系最近(0.046), 与达氏深水尾鲴表现出最远的亲缘关系(0.38)。通过对 13 种鱼类的比较还发现, 其中杂斑狗母鱼与达氏深水尾鲴之间的遗传距离最远(0.424)。美洲红点鲑与北极红点鲑之间的遗传距离近(0.046), 且与鲤和鲫与琵琶湖鲟之间的遗传距离相同(0.046)。就已知鲤科线粒体基因组来看, 鲤和鲫 mtDNA 的相似性表明两者有较近的亲缘关系。

## 3 材料与方法

### 3.1 实验动物

鲤和鲫均采自于甘肃省临夏回族自治州刘家峡镇。肌肉组织取样后 -80℃ 低温保存在保存备用。

### 3.2 总 DNA 的提取及检测

采用常规的酚氯仿抽提法(Sambrook and Russell, 2002)对肌肉组织进行基因组 DNA 提取。取两种鱼类的肌肉组织各 10 mg 打碎, 加入 600 μL 的裂解液, 再加入 10 μL 的 Prok 和 15 μL 的 SDS 水浴过夜, 使组织消化完全。加入等体积约 600 μL 的 Tris 饱和

酚,然后以 1 200 r/min 的转速离心 10 min。取出上清液再加入等体积 Tris 饱和酚,再以 1 200 r/min 的转速离心 10 min。取上清液,加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),以 1 200 r/min 的速度离心 10 min。取上清液加入等体积氯仿:异戊醇(24:1) 600  $\mu$ L,混匀,以 1 200 r/min 的速度离心 10 min。取上清液加入 2 倍体积约 1 mL 的冰乙醇,再加入 1/10 体积约 60  $\mu$ L 的 NaAc 摇动,可见白色絮状 DNA 出现。将样品置于 -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min,挑出 DNA,以 1 200 r/min 的转速离心 10 min。用 75%乙醇洗涤 DNA,以 1 200 r/min 的转速离心 10 min。弃去 75%的乙醇,自然干燥,加入适量 TE 溶液,-20 $^{\circ}$ C 保存。用 0.8%琼脂糖凝胶电泳对基因组 DNA 进行检测。

### 3.3 引物设计

根据 GenBank 已经公布的琵琶湖鲟(NC008324)的线粒体全基因组序列,设计了 13 对引物对 mtDNA 全序进行 PCR 扩增(表 4)。

### 3.4 PCR 扩增及测序

采用 30  $\mu$ L 体系进行 PCR 扩增,其中基因组 DNA 1  $\mu$ L,3.0  $\mu$ L PCR Buffer,2.0  $\mu$ L 10 mmol/L dNTP,上下游引物(10 pmol/ $\mu$ L)各 1  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L,加水 21.75  $\mu$ L。

PCR 扩增的反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,然后于 4 $^{\circ}$ C 保存。获得的目的片段经检测后测序。

### 3.5 数据处理

通过 Chromas Version 2.33 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)编辑测序结果,采用 MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>)建立数据库并构建系统发育树,用 Clustal X 软件(<http://www.igbmc.ustrasbg.fr/pub/ClustalX>)进行同源序列比对。根据已经公布的琵琶湖鲟 mtDNA 全基因组序列,确定各蛋白质编码基因、16S RNA 基因、12S RNA 基因和 tRNA 的相对位置。与 GenBank 中公布的 11 种鱼类的 mtDNA 全基因组序列进行多重比对(表 2),以近鲴科达氏深水尾鲴(Deepwater stingray, NC007230)为外群,使用距离法(Distance methods)中的 Neighbor-joining 算法构建系统进化树。

### 作者贡献

葛倩芸是本研究的实验设计和实验研究的执行

人,完成数据分析、论文初稿的写作;蔡原参与试验结果分析;王建福参与论文修改;赵生国是项目的构思者及负责人,指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由甘肃农业大学本科生科研训练项目(SRTP)资助。

### 参考文献

- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., Bruijn M.H.L., Coulson A.R., and Drouin J., 1981, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290(5806): 457-465
- Broughton R.E., Milam J.E., and Roe B.A., 2001, The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA, *Genome Res.*, 11(11): 1958-1967
- Chen T., Shi Y.R., and You P., 2012, Sequence and analysis of complete mitochondrial genome of *Pseudorasbora parva*, *Dongwu Fenlei Xuebao (Acta Zootaxonomica Sinica)*, 37(1): 10-19 (陈涛, 史妍茹, 尤平, 2012, 麦穗鱼线粒体基因组序列测定及分析, *动物分类学报*, 37(1): 10-19)
- Desjardins P., and Morais R., 1990, Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates, *Molecular Biol.*, 212(4): 599-634
- Gong W.H., 2004, Studies the genetic diversity of Taishan chilinfish and *Cyprinus carpio* L., *Carassius aruatus* L., *Culter erythropterus* B., *Hemiculter leucisculus* B. of Weishan lake, Thesis for M.S., Shandong Agricultural University, Supervisor: Yue Y.S., and Du L.X., pp.26-33 (公维华, 2004, 泰山螭霖鱼和微山湖鲤鱼、鲫鱼、红鳍鲌、(鱼参)条遗传多样性研究, 硕士学位论文, 山东农业大学, 导师: 岳永生, 杜立新, pp.26-33)
- Guo X.H., Liu S.J., Liu Q., and Liu Y., 2004, New progresses on mitochondrial DNA in fish, *Yichuan Xuebao (Journal of Genetic and Genomics)*, 31(9): 983-1000 (郭新红, 刘少军, 刘巧, 刘筠, 2004, 鱼类线粒体 DNA 研究新进展, *遗传学报*, 31(9): 983-1000)
- Liu H., Tzeng C., and Teng H., 2002, Sequence variations in the mitochondrial DNA control region and their implications for the phylogeny of the Cypriniformes, *Can. J. Zool.*, 80(3): 569-581
- Liang H.W., 2012, The complete mitochondrial genomes of six Catfishes (Siluriformes) and the phylogenetic relationships analysis, Dissertation for Ph.D., Northwest A&F University, Supervisor: Liu X.L., pp.110-125 (梁宏伟, 2012, 六种鲶形目鱼类线粒体基因组克隆及其系统发育研究, 博士学位论文, 西北农林科技大学, 导师: 刘小林, pp.110-125)

表 4 鲤和鲫线粒体基因组 PCR 扩增引物列表

Table 4 Primers for amplifying the complete mitochondrial genome of Carp and Crucian

| 编号<br>No. | 引物(5'-3')<br>Primer (5'-3')                            | 长度(bp)<br>Length (bp) | 退火温度(°C)<br>Annealing temperature (°C) |
|-----------|--|-----------------------|--|
| F-mt01    | F: GCATCGGTCTTGTAATCCG<br>R: ATAGTGGGGTATCTAATCCCAG    | 1 247                 | 58                                     |
| F-mt02    | F: CTCGTGCCAGCCACCGCGGT<br>R: TGGCTGCTTTTAGGCCAC       | 1 435                 | 56                                     |
| F-mt03    | F: GTCTCTGTGGCAAAAGAGTG<br>R: AGATAGAAACTGACCTGGATT    | 1 304                 | 56                                     |
| F-mt04    | F: CCTCGATGTTGGATCAGGAC<br>R: AACCGTCATGTTCCGGGGTATGG  | 1 525                 | 54                                     |
| F-mt05    | F: GAGATCAAACTCTTAGTGCT<br>R: TACCTGTGGCAATTACGCGCTG   | 1 594                 | 58                                     |
| F-mt06    | F: AACTCTTAGTTAACAGCTAAG<br>R: GCCACGACGATACTCCGACTA   | 1 561                 | 52                                     |
| F-mt07    | F: ACAGGTGTAAAAGTATTTAG<br>R: CAGGAATGTAATACATCTTC     | 1 314                 | 55                                     |
| F-mt08    | F: TAGGACATCAATGATACTG<br>R: CCTTGAAAGGTTCCCTTCTCGG    | 1 551                 | 52                                     |
| F-mt09    | F: TTGATCCTAGCCCATGACC<br>R: CAGGTGGGTGCGGTGAAATGC     | 1 328                 | 56                                     |
| F-mt10    | F: AAGACCTCTGATTTTCGGCT<br>R: AGTGAGTAGCCCGCTGTAAT     | 1 585                 | 55                                     |
| F-mt11    | F: AACTTAATAGGAGAATAAT<br>R: AGGCCGATTGTGACTATTATTAG   | 1 451                 | 54                                     |
| F-mt12    | F: TCTGCCCTACTCCATTCTAGC<br>R: AACCCGACTCCTTATTTTGCTGC | 1 567                 | 56                                     |
| F-mt13    | F: AAGGCTCAGCAGCTAAAGC<br>R: TCCGATCTTCGGATTACAAGAC    | 1 510                 | 52                                     |

Sambrook J., and Russell D., eds., 2002, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, pp.484-485

Wang Z.W., 2005, *Applications of genetic markers in fish breeding and ecology*, Dissertation for Ph.D., Chinese Academy of Science, Supervisors: Gui J.F., and Wu Q.J., pp.70-95 (王忠卫, 2005, *遗传标记在鱼类育种和生态研究中的应用*,

博士学位论文, 中国科学院研究生院, 导师: 桂建芳, 吴清江, pp.70-95)

Yuan Z.X., 2017, *Evaluation of genetic resources and diversity of 4 economic species in cyprinidae from the Duliu river*, Thesis for M.S., Guizhou University, Supervisor: Dai Y.G., pp. 3-4 (袁振兴, 2017, *都柳江 4 种鲤科经济鱼类种质资源现状及评价*, 硕士学位论文, 贵州大学, 导师: 代应贵, pp.3-4)