

文章编号: 1004 - 7271(2008)02 - 0152 - 06

长江口鲚属鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析

诸廷俊^{1,2}, 杨金权¹, 唐文乔¹

(1. 上海水产大学鱼类研究室, 上海 200090;
2. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025)

摘要:测定了 21 尾长江口鲚属鱼类 mtDNA D-loop 区全序列, 长度在 1 233 ~ 1 372 bp 之间, 其中凤鲚长达 1 372 bp, 短颌鲚为 1 233 bp, 刀鲚和湖鲚出现长度的异质性现象, 各具有 1 271 bp 和 1 233 bp 两种类型。识别了终止序列区、中央保守区和保守区。终止序列区长 650 ~ 790 bp, 包含了多个重复的 ETAS, 结构为: TACATAT - - ATGTATTATAT。全序列 21 次转换中的 17 次和 9 次颠换中的 7 次都发生于该区。终止区还包含 140 个多态位点和 97 个系统发育信息位点, 分别占整个 D-loop 区相应位点的 80.9% 和 78.9%。中央保守区中的 CSB-F、CSB-E、CSB-D 等保守序列分别为 CSB-F: ATGTAGTAAGAGACCACC, CSB-E: AGGGACAACACTAT GTGGGGG, CSB-D: TATTCCTGGCATCTGGT, 有 24 个多态位点和 18 个系统发育信息位点来自该区。在保守区识别了 CSB1、CSB2 和 CSB3, 序列为 CSB1: TT-ATAGAAGA-T-ACATAA, CSB2: AAACCCCTTACCC, CSB3: TGTCAAACCCGAAA, 仅有 9 个多态位点和 8 个信息位点。研究表明 D-loop 区的序列变异主要来自终止序列区。

关键词: 鲚属鱼类; 线粒体控制区; 序列长度异质性; 长江口

中图分类号: S 917 文献标识码: A

MtDNA control region sequence structure of the genus *Coilia* in Yangtze River estuary

ZHU Ting-jun^{1,2}, YANG Jin-quan¹, TANG Wen-qiao¹

(1. Laboratory of Ichthyology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China)

Abstract: We determined 21 mtDNA control region (D-loop) sequences of three *Coilia* species in Yangtze River estuary, to analyze their sequence structure. Sequence lengths of the D-loop region ranged from 1233 bp (*C. brachygnathus*) to 1372 bp (*C. mystus*), and two types of sequence lengths (1233 bp and 1271 bp) were found both in *C. nasus nasus* and *C. nasus taihuensis*. However, there were only 33% individuals with sequence length as 1271 bp in *C. nasus nasus*, while in *C. nasus taihuensis* its proportion was higher than 67%. The three domains of the D-loop region were recognized, and they were ETAS (Extended Termination Associated Sequence) domain, Central Conserved domain and Conserved Sequence Block domain. The ETAS domain ranged from 650 bp to 790 bp including several repeated core sequence of TAS. The consensus

收稿日期: 2007-04-30

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(30490235); 上海市科学技术委员会重大计划(04DZ19306); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 诸廷俊(1979-), 男, 上海市人, 硕士研究生, 专业方向为鱼类学与保护生物学。

通讯作者: 唐文乔, E-mail: wqtang@shfu.edu.cn

sequence of ETAS in *Coillia* fishes was derived as TACATAT - - - ATGTATTATAT. In the ETAS region, transition occurred 17 times (21 in total) and transversion happened 7 times (9 in total), besides 140 variable sites (80.9% of the total) and 97 parsimony-informative sites (78.9% of the total) were found in this region. In Central Conserved region, several conservative sequences were recognized: CSB-F: ATGTAGTAAGAGACCACC, CSB-E: AGGGACAA CTATTGTGGGGG, CSB-D: TATTCCTGGCATCTCGGT. There were 24 variable sites (13.9% of the total) and 18 parsimony-informative sites (14.6% of the total) in Central Conserved region. In the conserved region three conservative sequences were found, they were CSB1: TT-AT AGAAGA-T-ACATAA, CSB2: AAACCCCTTACCCCC, CSB3: TGTCAAACCCCGAAA. There were only 9 variable sites (5.2% of the total) and 8 parsimony-informative sites (6.5% of the total) in this region. Considering the results listed above, we can draw a conclusion that in the D-loop region of the genus *Coilia*, sequence mutation occurred mainly in the ETAS domain.

Key words: *Coilia* fishes; mitochondrial DNA control region; sequence length heteroplasmy; Yangtze River estuary

长江口分布有凤鲚 (*Coilia mystus*)、刀鲚 (*C. coilia coilia*) 和短颌鲚 (*C. brachygnathus*) 等 3 种鲚属鱼类^[1-3]。凤鲚俗称烤子鱼,是在河口产卵的短距离洄游鱼类,也是目前长江口捕捞产量最高的经济鱼类之一^[4]。刀鲚也称刀鱼,是一种过河口性溯河产卵的洄游鱼类,每年的 2-5 月在长江口形成渔汛。生殖洄游中的刀鲚,肉质细嫩腴美,是长江口最负盛名的名贵水产品之一^[3,5]。同时,在太湖等长江下游湖泊,还分布有一种定名为湖鲚 (*C. coilia taihuensis*) 的非洄游型刀鲚亚种^[6]。短颌鲚为定居性鱼类,与刀鲚的主要形态区别是上颌骨后延较短。线粒体 DNA (mtDNA) 是存在于线粒体内的核外遗传物质,进化速度快,能反映较短时间内的进化事件。控制区 (D-loop 区) 是 mtDNA 中进化速度最快的部分,被较多地应用于群体遗传学和种下系统学研究^[7-13]。本研究通过对 D-loop 区序列的分析,试图从分子水平上揭示长江口鲚属鱼类、特别是刀鲚与湖鲚在遗传结构上的异同,为丰富鱼类 D-loop 区结构与功能的研究积累资料,也为进行中的刀鲚人工繁殖提供种质选择依据。

1 材料与方法

1.1 材料

刀鲚采自长江靖江段和九段沙水域,湖鲚采自太湖长兴水域和淀山湖水域,短颌鲚与凤鲚均采自长江靖江段(表 1)。标本用 95% 的乙醇固定,随机选取 21 尾个体用于测序。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取、PCR 扩增、纯化及测序

总 DNA 提取采用传统的“酚-氯仿”法。PCR 反应使用大约 50 ng 基因组 DNA 作模板,扩增体系为 50 μ L,其中 10 \times Buffer 5 μ L, dNTPs 2 μ L (各 2.5 mmol/L),引物各 1 μ L, *Taq* 酶 2.0 U。扩增 mtDNA 控制区序列的引物序列为: DL1: 5'-ACC CCT GGC TCC ACC AGC-3' 和 DH2: 5'-ATC TTA GCA TCT TCA GTG-3', 分别位于 D-loop 区两端的脯氨酸和苯丙氨酸的 tRNA 上^[11]。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 30 个循环包括: 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物用上海生工的 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行回收, 然后送上海生工生物技术公司测序。

1.2.2 序列分析

控制区序列的对位排列 (alignment) 使用 Clustal X 软件^[14], 并在 SEAVIEW 程序^[15] 中辅以手工校正。以两个 tRNA 的结束分别作为控制区的起点和终点, 以 ECSB-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。用 MEGA3.0^[16] 软件对序列的碱基组成和变异进行统计。

表1 研究所用样本的物种名、编号、采集地、采集时间及体长
 Tab.1 Species, numbers, collection localities and time, body length in the present study

物种名及编号	采集地	采集时间	体长 (cm)
* <i>Coilia nasus</i> 1	九段沙	2003年1月初	13.5
<i>C. nasus</i> 2	同上	同上	15.0
<i>C. nasus</i> 3	同上	同上	16.5
<i>C. nasus</i> 4	同上	同上	14.0
<i>C. nasus</i> 5	长江靖江段	同上	29.5
<i>C. nasus</i> 6	同上	2003年4月初	25.0
<i>C. nasus</i> 7	同上	同上	22.0
<i>C. nasus</i> 8	长江靖江段	2003年5月初	24.0
<i>C. nasus</i> 9	同上	同上	28.5
<i>C. nasus taihuensis</i> 1	太湖长兴水域	2002年1月初	21.5
<i>C. nasus taihuensis</i> 2	同上	同上	14.0
<i>C. nasus taihuensis</i> 3	长江靖江段	2003年1月初	12.0
<i>C. nasus taihuensis</i> 4	太湖长兴水域	同上	12.5
<i>C. nasus taihuensis</i> 5	长江靖江段	同上	15.5
<i>C. nasus taihuensis</i> 6	青浦淀山湖	2003年4月中旬	18.0
<i>C. nasus taihuensis</i> 7	同上	同上	16.0
<i>C. nasus taihuensis</i> 8	太湖长兴水域	2003年10月初	14.5
<i>C. nasus taihuensis</i> 9	同上	同上	18.0
<i>C. brachygnathus</i>	长江靖江段	2003年1月初	19.0
<i>C. mystus</i> 1	同上	2003年5月初	13.5
<i>C. mystus</i> 2	同上	同上	14.0

注: *表示刀鲚的指名亚种

2 结果与讨论

2.1 D-loop 区序列长度和碱基组成

获得的21尾长江口鲚属鱼类 mtDNA D-loop 区全序列长度在 1 233 ~ 1 372 bp(表2)。其中以凤鲚 D-Loop 的序列为最长,全长达到了 1 372 bp;短颌鲚的 D-Loop 区长度最短,为 1 233 bp。刀鲚和湖鲚的群体内均出现了长度的异质性现象,具有 1 271 bp 和 1 233 bp 两种长度类型,分别有 33% 的刀鲚个体和 67% 的湖鲚个体全长为 1 271 bp,而 67% 的刀鲚和 33% 的湖鲚个体全长为 1 233 bp。

表2 三种鲚属鱼类 D-loop 区序列长度和碱基频率
 Tab.2 Sequence lengths and base frequencies of three *Coilia* species

	T%	C%	A%	G%	长度
<i>Coilia nasus</i> 1	33.6	18.7	33.3	14.4	1 271
<i>C. nasus</i> 2	33.5	18.8	33.3	14.4	1 271
<i>C. nasus</i> 3	33.6	18.7	33.3	14.4	1 271
<i>C. nasus</i> 4	33.0	19.2	33.2	14.5	1 232
<i>C. nasus</i> 5	33.1	19.2	33.3	14.4	1 233
<i>C. nasus</i> 6	32.9	19.3	33.3	14.4	1 233
<i>C. nasus</i> 7	32.7	19.6	33.6	14.1	1 233
<i>C. nasus</i> 8	33.0	19.2	33.5	14.3	1 233
<i>C. nasus</i> 9	32.6	19.3	33.8	14.3	1 233
<i>C. nasus taihuensis</i> 1	33.3	19.1	33.2	14.5	1 233
<i>C. nasus taihuensis</i> 2	33.2	19.1	33.2	14.5	1 233
<i>C. nasus taihuensis</i> 3	33.3	19.1	33.4	14.2	1 271
<i>C. nasus taihuensis</i> 4	33.1	19.2	33.3	14.4	1 233
<i>C. nasus taihuensis</i> 5	33.1	19.0	33.8	14.1	1 272
<i>C. nasus taihuensis</i> 6	33.1	19.0	33.6	14.2	1 271
<i>C. nasus taihuensis</i> 7	33.2	18.9	33.6	14.3	1 270
<i>C. nasus taihuensis</i> 8	33.3	19.0	33.3	14.4	1 271
<i>C. nasus taihuensis</i> 9	33.4	18.9	33.3	14.4	1 269
<i>C. brachygnathus</i>	33.3	19.1	33.5	14.0	1 233
<i>C. mystus</i> 1	33.0	19.4	34.2	13.4	1 370
<i>C. mystus</i> 2	32.9	19.5	34.3	13.3	1 372
Avg.	33.2	19.1	33.5	14.2	1 262

目前,从无脊椎动物的果蝇(*Drosophila mauritiana*)到脊椎动物的日本猕猴(*Macaca fuscata*)都发现有 mtDNA 的长度异质性现象,鱼类的白鲈(*Morone Americana*)、溪刺鱼(*Culaea inconstans*)、大西洋鳕(*Gadus morhua*)、美洲西鲱(*Alosa sapidissima*)、小鲤(*Cyprinella spiloptera*)以及鲟形目的一些种类中也发现有长度异质性现象^[17]。王伟等^[10]报道 8 种鳅亚科鱼类的 D-Loop 序列长约为 1 kb,张燕等^[12]测得 20 种鲚形目鱼类 D-Loop 全序列在 866 ~ 942 bp 之间,刘焕章^[11]报道 3 种鲚属鱼类 D-Loop 全序列长度在 915 ~ 1 125 bp 之间。因此,与国内其他研究相比,长江口鲚属鱼类的 D-Loop 区序列明显较长,但仍未超过 Lee 等^[18]研究的 1 500 bp 的上限。

21 条 D-loop 区全序列共检测到多态位点(variable sites)173 个,占有位点的 13.6%;信息位点(parsimony-informative sites)123 个,占总位点数的 9.7%。平均碱基含量为 T = 33.2%, C = 19.1%, A = 33.5%, G = 14.2%; A + T = 66.7% 恰好为 G + C = 33.3% 的两倍(表 2)。转换(transition)共发生了 21 次,包括 12 次 T 和 C 间转换和 9 次 A 和 G 间转换。颠换(transversion)共发生了 9 次,包括 4 次 T 和 A 颠换、2 次 T 和 G 颠换和 3 次 C 和 A 颠换。转换与颠换的比值为 2.2。

2.2 D-loop 结构分析

D-loop 区又称控制区,是 mtDNA 的复制起始点,也是其中变化最快、最复杂的区域,因此成为 mtDNA 研究中的热点^[11]。在哺乳动物的 D-loop 区中,已识别出了众多的功能保守序列,并将控制区分为终止序列区(extended termination associated sequences, ETAS)、中央保守区(central conserved region)和保守区(conserved region)^[19-20]。刘焕章^[11]对照哺乳动物 D-loop 区的结构,在鲚亚科中识别出了各功能单位,并给出了保守序列的普遍形式和不同区域的划分标志。参考已有的研究,本文在鲚属鱼类中识别了 D-loop 区的三个区域和其中的一些保守序列。

2.2.1 终止区序列结构分析

终止区是 D-loop 区中变异最大的部分,又称高变区(hypervariable domain),它包含了与 DNA 复制终止相关的序列(termination associated sequences, TAS)。在不同的物种中 TAS 的变异较大,其主体的核心序列是 TACAT 和它的反向互补序列 ATGTA,两者可形成发夹结构^[20]。

长江口几种鲚属鱼类的终止区中包含有大段序列的插入和缺失,长度范围在 650 ~ 790 bp,在其中识别出多个重复的终止相关序列 ETAS,刀鲚和湖鲚有 5 到 6 个这样的重复,而凤鲚多达 8 个,变异多由这些重复序列产生。如图 1 中方框间的序列所示,其结构为: TACATAT - - - - - ATGTATTATAT,这与刘焕章^[11]在鲚鱼类识别的序列有部分出入。值得注意的是,在凤鲚的重复序列中,ATGTAT 均突变为 ATGCAT,这些片段正好可形成自身互补(图 1 阴影部分),这与其他类群有较大差异。

2.2.2 中央保守区结构分析

在整个控制区序列中,中央保守区被认为是最为保守的区域。如图 2 中的方框和阴影所示。在鲚属的该区域中,我们识别了如下保守序列(conserved sequence blocks, CSB): CSB-F: ATGTAGTAAGAGACCACC,(该序列被认为是区分终止区和中央保守区的标志); CSB-E: AGGGACAACCTATTGTGGGGG(下划线部分为识别标志); CSB-D: TATTCCCTGCCATCTGGT,这与刘焕



图 1 鲚属三种鱼类 D-Loop 终止区序列比较

Fig. 1 Comparison of mtDNA D-loop ETAS of three *Coilia* species

TACAT 表示 ETAS 的起始序列,下划线表示 ETAS 内的核心序列 ATGCAT 表示最后一个 ETAS 的特征序列,斜体表示凤鲚 ETAS 的突变序列

章^[11]描述的鱼类普遍序列有部分出入。

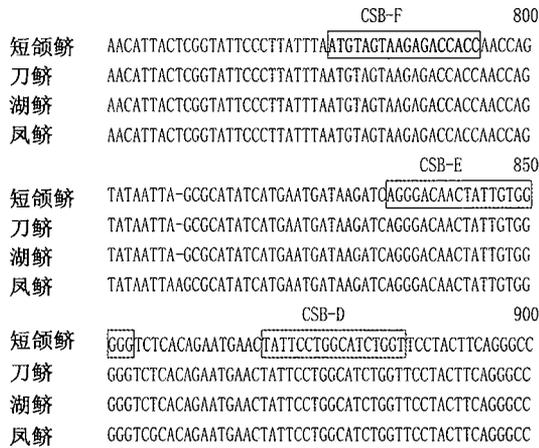


图2 鲛属三种鱼类 D-Loop 中央保守区序列比较
Fig.2 Comparison of central conserved region (CCR) of mtDNA control region
示中央保守区的起始序列, □示中央保守区核心序列

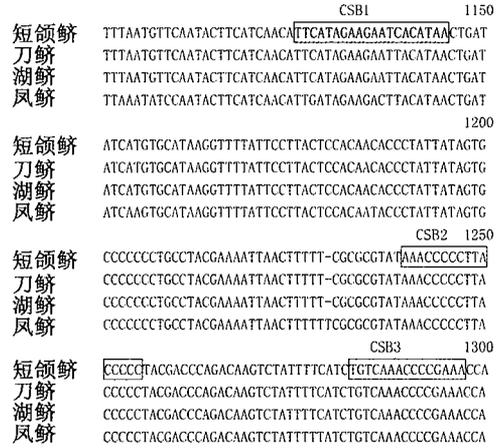


图3 鲛属三种鱼类 D-Loop 保守区序列比较
Fig.3 Comparison of conserved region (CR) of mtDNA control region.
示保守区的起始序列, □示保守区核心序列

2.2.3 保守区结构分析

保守区包含有重链的复制起始点、重链和轻链的启动子、以及三个保守序列 CSB1、CSB2 和 CSB3。其中 CSB1 是区分保守区和中央保守区的标志,但变异较大,不易识别,在鱼类中仅有雅罗鱼和鳊鲂类被成功识别的报道^[11]。对照鳊鲂类的 CSB1,我们在位置相当处识别了一段类似序列 TT-ATAGAAGA-T-ACATAA(下划线处为与鳊鲂类 CSB1 相似部分)(图3)。CSB2 与 CSB3 都比较保守,容易识别,其序列分别为:AAACCCCTTACCCCTT 和 TGTCAAACCCCGAAA。

2.3 D-loop 各区域碱基组成分析

2.3.1 终止区碱基频率

由表3可见,21尾鲛属鱼类终止区 A+T 的平均含量高达 74.3%,其长度占了全序列的一半以上,且不同种类间序列变化幅度超过 100 bp,约占该区长度的 20%。另外,全序列 21 次转换中的 17 次和 9 次颠换中的 7 次都产生于这一区域。该区还包含了 140 个多态位点和 97 个信息位点,分别占整个 D-loop 区多态位点和信息位点的 80.9% 和 78.9%。表明终止区是 D-loop 区序列变异的主要区域。

表3 D-loop 序列三个区域的平均碱基频率和序列长度

Tab.3 Average base frequency and sequence length of three domains of mtDNA D-loop region

种类	区域	T%	C%	A%	G%	长度
<i>C. naus</i>	ETAS	34.9	14.2	39.4	11.5	657/695
<i>C. naus taihuensis</i>		35.0	14.2	39.3	11.5	657/695
<i>C. brachygnathus</i>		35.6	13.9	39.9	10.6	657
<i>C. mystus</i>		34.4	15.5	39.9	10.2	793/794
<i>C. naus</i>	CCR	31.6	23.8	25.2	19.4	340/341
<i>C. naus taihuensis</i>		31.7	23.8	25.2	19.3	341/342
<i>C. brachygnathus</i>		31.4	24.0	24.9	19.7	341
<i>C. mystus</i>		30.7	24.9	25.4	19.0	342
<i>C. naus</i>	CR	29.1	26.7	28.7	15.4	247
<i>C. naus taihuensis</i>		29.1	26.7	28.7	15.4	247
<i>C. brachygnathus</i>		28.7	27.1	28.7	15.4	247
<i>C. mystus</i>		30.1	25.5	28.7	15.8	247/248

2.3.2 中央保守区和保守区碱基频率

由表 3 可以看出,与终止区相比,A + T 的含量在这 2 个区中明显下降,而 A 的下降幅度最大,由终止区的 39.9% 降到中央保守区的 25.2%。在中央保守区中,产生了 24 个多态位点和 18 个信息位点,分别占整个 D-loop 区多态位点和信息位点的 13.9% 和 14.6%。而在保守区中,多态位点和信息位点分别只有 9 个和 8 个,仅占整个 D-loop 区相应位点的 5.2% 和 6.5%。由此可见,在长江口的鲚属鱼类中,保守区的碱基序列似乎比中央保守区更为保守。

2.3.3 碱基组成与序列变异

根据 DNA 碱基配对原则,A 与 T 配对形成两个氢键,G 与 C 相配形成三个氢键,所以 GC 之间的连接较为稳定。在测得的 21 尾 D-Loop 序列中,A + T 的平均含量为 66.7%。在产生大部分变异的终止区,A + T 的含量高达 74%;而在相对保守的中央保守区和保守区,这一比值降到了 56.7% 和 57.9%。所以,A + T 的含量可以反映出序列的变异性,具有高比例的 A + T 可能是 D-Loop 序列变异较快的原因之一。刀鲚与湖鲚个体间的碱基含量几乎一致,没有差别。在 18 尾刀鲚和湖鲚个体中共产生了 8 次转换,2 次颠换。而将短颌鲚统计在内,转换共有 9 次,颠换仍为 2 次。若将凤鲚也统计在内,则转换共为 21 次,颠换为 9 次。可见,凤鲚与刀鲚间的遗传距离要大于短颌鲚与刀鲚间的遗传距离,而湖鲚与刀鲚间的遗传距离比另两者间更小。

本文承中国科学院水生生物研究所刘焕章研究员审阅,特此致谢。

参考文献:

- [1] 湖北省水生生物研究所鱼类研究室. 长江鱼类[M]. 北京:科学出版社,1976:21-26.
- [2] 中国水产科学研究院东海水产研究所等. 上海鱼类志[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990:103-115.
- [3] 唐文乔,诸廷俊,陈家宽,等. 长江口九段沙湿地的鱼类资源及其保护价值[J]. 上海水产大学学报,2003,12(3):193-200.
- [4] 倪 勇. 长江口凤鲚的渔业及其资源保护[J]. 中国水产科学,1999,6(5):75-77.
- [5] 长江刀鲚资源调查协作组. 长江刀鲚资源及其利用[J]. 淡水渔业,1976,(8):24-26.
- [6] 袁传宓,秦安龄,刘仁华,等. 关于长江中下游及东南沿海各省的鲚属鱼种下分类的探讨[J]. 南京大学学报,1980,16(3):67-82.
- [7] Birt T P, Green J M, Davidson W S. Mitochondrial DNA variation reveals genetically distinct sympatric populations of anadromous and nonanadromous Atlantic salmon, *Salmo salar*[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1991, 48:577-582.
- [8] 夏德全,王文君. 动物线粒体 DNA 研究及在鱼类种群遗传结构研究中的应用[J]. 水产学报,1998,22(4):364-370.
- [9] 肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报,2000,24(4):384-391.
- [10] 王 伟,何舜平,陈宜瑜. 线粒体 DNA D-loop 序列变异与鳅鲈亚科鱼类系统发育[J]. 自然科学进展,2002,12(1):33-36.
- [11] 刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构和进化:以鳊鲚鱼类为例[J]. 自然科学进展,2002,12(3):266-270.
- [12] 张 燕,张 鹤,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.
- [13] 谢震宇,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[J]. 遗传,2006,28(3):362-368.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucl Acids Res, 1997, 25:4876-4882.
- [15] Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny[J]. Comp Appl Biosci, 1996, 12:543-548.
- [16] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Brief Bioinf, 2004, 5:150-163.
- [17] 张四明,邓 怀,汪登强,等. 中华鲟 mtDNA 个体间的长度变异与个体内的长度异质性[J]. 遗传学报,1999,26(5):489-496.
- [18] Lee W J, Conroy J, Howell W H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions[J]. J Mol Evol, 1995, 41:54-66.
- [19] Brown G C. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA[J]. J Mol Biol, 1986, 192:503-511.
- [20] Broughton R E, Dowling T E. Length variation in mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spiloptera*[J]. Genetics, 1994, 138:179-190.