

3 个地理居群泥鳅的同工酶生化遗传分析

吴艳丽¹, 常重杰²

(1 商丘师范学院 生命科学系, 河南 商丘 476000; 2 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

【摘要】 【目的】探讨 3 个不同地理居群(黄河、长江、珠江流域)泥鳅群体的遗传变异特性及其亲缘关系。【方法】采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术和同工酶谱分析方法,检测并分析黄河、长江、珠江流域各 30 尾泥鳅的 10 种同工酶(乳酸脱氢酶(LDH)、过氧化物酶(POD)、酯酶(EST)、 α -淀粉酶(α -AMY)、苹果酸脱氢酶(MDH)、葡萄糖 6 磷酸脱氢酶(G6PDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、碱性磷酸酯酶(ALP)、ATP 酶(ATPase))基因的多态性,并采用 Nei's 数据处理方法分析泥鳅群体间的遗传变异特性和亲缘关系。【结果】在所分析的 10 种同工酶中,记录到 30 个基因座位,以其主要的等位基因频率低于 0.99 为标准,从泥鳅 3 个群体中各检测到 7~9 个多态基因位点,其多态位点比例为 0.233 3~0.300 0,平均预期杂和度为 0.058 65~0.076 29;3 个地理居群泥鳅群体的遗传偏离指数均为负值;泥鳅种内遗传相似性很高,为 0.983 8~0.996 5。【结论】泥鳅群体的遗传多样性在淡水鱼中处于较高水平,但其群体遗传结构不够合理,会对以后泥鳅种质资源的保护产生较大影响;3 个地理居群泥鳅群体从分类上还处于同一个种群。

【关键词】 泥鳅;同工酶分析;遗传多样性

【中图分类号】 S917

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)11-0037-06

Biochemical genetic analysis of isozymes in three populations of *Misgurnus anguillicaudatus*

WU Yan-Li¹, CHANG Zhong-Jie²

(1 Department of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu, Henan, 476000, China;

2 Department of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan, 453007, China)

Abstract: 【Objective】 This study was to investigate the genetic variation and relationship in 3 population of *M. anguillicaudatus* collected from the Yellow River, Yangtze River and Pearl River. 【Method】 30 loach (*M. anguillicaudatus*) samples were collected from Huanghe, Changjiang, Zhujiang. Discontinuous vertical plate polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was used to investigate the genomic polymorphism of 10 isozymes. Xiong QM's method was made to analyse the patterns of Isozyme and Nei's was used for statistical analysis. 【Result】 The results showed that 10 isozymes (EST, SOD, POD, CAT, G6PDH, α -AMY, MDH, LDH, ALP and ATPase) were coded by 30 loci, 7-9 of each 3 population were found polymorphic according to the polymorphic standard 0.99, and the mean proportion of polymorphic loci of three populations was 0.233 3-0.300 0. The average predicted heterozygosity was 0.058 65-0.076 29, and the genetic similarity among 3 populations was very high, 0.983 8-0.996 5. 【Conclusion】 It revealed higher genetic diversity in populations of the three rivers compared with other freshwater fish. However, taking negative genetic deviation index of hardy-weinberg of all three populations into account, the present status of *M. anguillicaudatus* was not so good. The unconscionable genetic structure of populations of the three rivers may bring some effect in genetic diversity protection. What's more, it indicated all three

* 【收稿日期】 2009-03-09

【基金项目】 河南省高校杰出科研人才创新工程项目(2001KYCX010); 河南省杰出青年科学基金项目(0512001800)

【作者简介】 吴艳丽(1972-), 女, 河南商丘人, 讲师, 硕士, 主要从事鱼类生化遗传学研究。E-mail: sqswyy@sohu.com

populations belonged to one species in taxonomy.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; isozyme analysis; genetic variation of population

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)属鲤形目, 鳅科, 花鳅亚科, 泥鳅属, 是我国常见的经济鱼类之一。由于材料易得, 泥鳅容易饲养, 常常作为试验材料。近年来有关泥鳅生理生化^[1]、发育及繁殖生物学^[2]、毒理病理学^[3]、细胞学^[4]、组织解剖学^[5]等方面的研究较多, 但有关群体遗传学的研究很少, 仅见常重杰等^[6]、龙良启等^[7]运用 RAPD 遗传标记对泥鳅进行分析的报道。本研究采用同工酶电泳技术, 对采自黄河、长江、珠江流域 3 个地理居群泥鳅群体的生化遗传结构及变异进行分析, 探讨种群间的遗传变异特性及其亲缘关系, 以期为泥鳅的人工养殖及种质资源的保护提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试泥鳅为野生成体泥鳅, 分别采自典型的四倍体泥鳅产地: 湖北武昌(长江流域, 出自梁子湖)、广东韶山(珠江流域, 派专人采集)及河南新乡(黄河流域)。每个群体取雌、雄泥鳅各 15 尾, 体长 10~15 cm, 查看性腺确定性别。

1.2 方法

1.2.1 泥鳅组织样品的制备 活体泥鳅剪断鳃动脉放血后, 取肝脏或性腺组织, 以预冷蒸馏水洗涤后, 按质量(g)体积(mL)比 1:1 的比例加入 PBS 缓冲液, 在预冷的玻璃匀浆器中冰浴匀浆, 匀浆液置 4℃冰箱中抽提 1 h, 4℃条件下 12 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液, 按 1:1 的体积比加入甘油, 置 -20℃冰箱中冷藏备用。

1.2.2 选取的同工酶种类 选取泥鳅生长发育过程中重要的 10 种同工酶进行酶谱分析, 即乳酸脱氢酶(LDH)、过氧化物酶(POD)、酯酶(EST)、α-淀粉酶(α-AMY)、苹果酸脱氢酶(MDH)、葡萄糖 6 磷酸脱氢酶(G6PDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、碱性磷酸酯酶(ALP)和 ATP 酶(AT-Pase)。

1.2.3 同工酶的电泳方法 采用不连续的 Tris-HCl 缓冲系统进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶制备及电泳方法参照文献^[8], 同工酶染色方法参照文献^[9-10]。电泳结果用生物凝胶成像系统观察, 扫描成像并储存于电脑中, 供拍照和分析用。

1.2.4 同工酶酶谱分析与数据处理方法 同工酶

酶谱分析参照文献^[11]进行。数据处理采用文献^[12]的方法, 各指标计算公式如下。

(1) 等位基因频率(q_i)。

$$q_i = (2n_{ii} + \sum n_{ij}) / (2N), (i \neq j).$$

式中: i 为指定的等位基因, j 为不同于 i 的等位基因, n_{ii} 为具有纯合基因型的个体数, n_{ij} 为具有杂合基因型的个体数, N 为个体总数。

(2) 多态位点比例(P)。

$$P = \text{多态位点数} / \text{所测位点总数}.$$

(3) 种群平均观测杂合度(H_o)。

$$H_o = \sum_{i=1}^n (1 - \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}^2) / n.$$

种群平均预期杂合度(H_e)。

$$H_e = \sum_{i=1}^n (1 - \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}^2) / n.$$

式中: q_{ij} 为第 i 位点、第 j 个等位基因纯合基因型的频率, n 为所测位点总数, m_i 为第 i 位点测定纯合基因型的种类数。

(4) Hardy-Weinberg 遗传偏离指数(d)。

$$d = (H_o - H_e) / H_e.$$

(5) 遗传相似度(I)。

$$I = \sum_{i=1}^n X_i Y_i / \sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}.$$

式中: n 为座位数, X_i 为种群 X 第 i 个等位基因的频率, Y_i 为种群 Y 第 i 个等位基因的频率。

(6) 遗传距离(D)。

$$D = -\ln I$$

2 结果与分析

2.1 3 个地理居群泥鳅群体的等位基因频率

在所检测的 10 种同工酶中, 乳酸脱氢酶、α-淀粉酶、苹果酸脱氢酶、碱性磷酸酯酶和 ATP 酶基因座位均为单态, 其余 5 种同工酶存在多态位点。从图 1 可以看出, 3 个地理居群泥鳅群体的同工酶具有相同的迁移位置, 但多态位点及等位基因频率存在显著差异。由表 1 可知, 在所有同工酶中, 酯酶同工酶(EST)的多态位点最多, 在 3 个群体中的差异也最明显, 其中在 EST-1 位点只有长江流域泥鳅群体表现为多态, 在 EST-3 位点只有黄河流域泥鳅群体表现为多态, 与此相对的是在 EST-2 位点只有黄河流域泥鳅群体表现为单态, 而在 EST-4 位点只有珠江流域泥鳅群体表现为哑基因表达。此外, 过氧

化物酶 POD-2 基因位点在 3 个泥鳅群体中的差异也较大,其中除黄河流域泥鳅群体外,长江流域和珠江流域泥鳅群体在此基因座位均表现为多态。

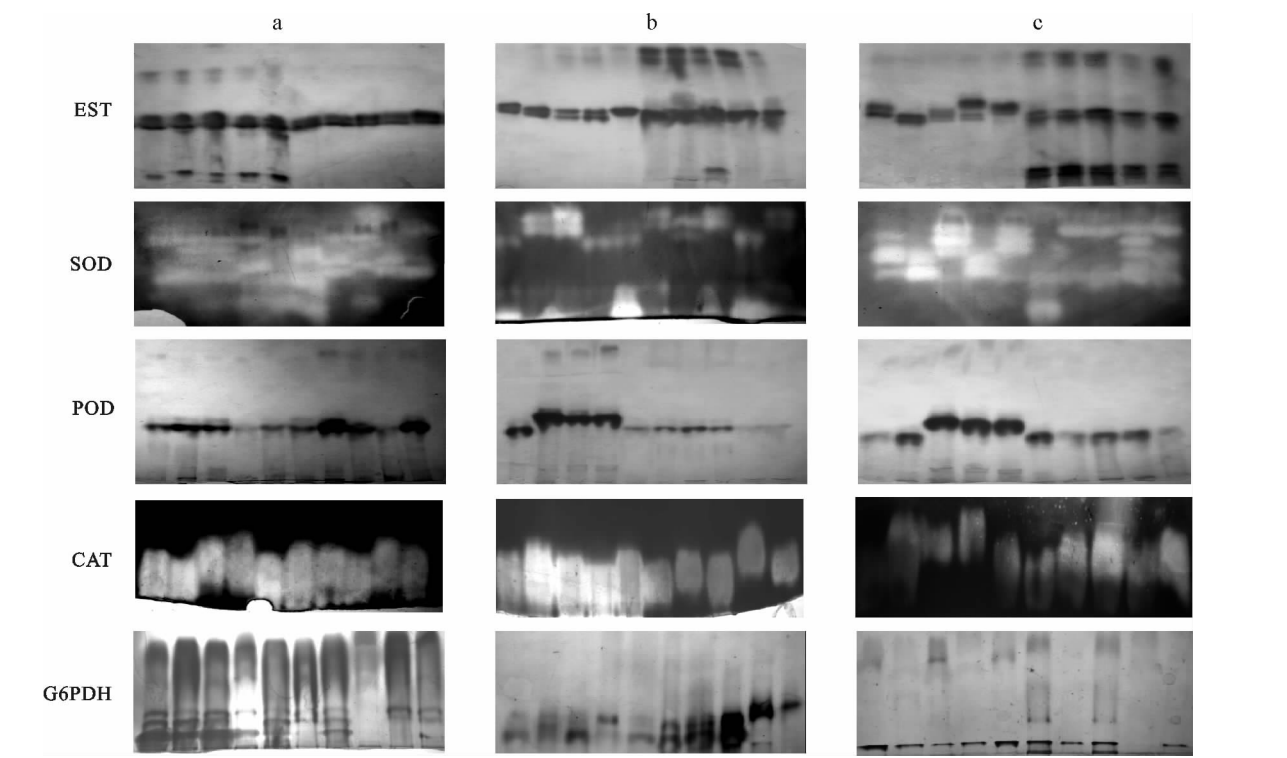


图 1 3 个地理居群泥鳅群体的多态位点同工酶电泳图谱
a. 黄河流域泥鳅群体;b. 长江流域泥鳅群体;c. 珠江流域泥鳅群体

Fig. 1 Electrophoresis patterns of polymorphic loci in 3 populations of *M. anguillicaudatus*
a. Population of *M. anguillicaudatus* in the Yellow River;b. Population of *M. anguillicaudatus* in the Yangtze River;c. Population of of *M. anguillicaudatus* in the Pearl River

表 1 3 个地理居群泥鳅群体同工酶多态位点的等位基因频率

Table 1 Allele frequencies of polymorphic loci in 3 populations of *M. anguillicaudatus*

同工酶 座位 Locus	等位 基因 Allele	泥鳅居群 Population			同工酶 座位 Locus	等位 基因 Allele	泥鳅居群 Populations		
		黄河流域 Yellow River	长江流域 Yangtze River	珠江流域 Pearl River			黄河流域 Yellow River	长江流域 Yangtze River	珠江流域 Pearl River
EST-1	a	0.000 0	0.016 7	0.000 0	s-SOD	a	0.666 6	0.266 7	0.250 0
	b	1.000 0	0.983 3	1.000 0		b	0.216 7	0.216 7	0.400 0
EST-2	a	1.000 0	0.983 3	0.983 3	m-SOD	c	0.116 7	0.516 6	0.350 0
	b	0.000 0	0.016 7	0.016 7		a	0.983 3	0.966 7	0.916 7
EST-3	a	0.016 7	0.000 0	0.000 0	G6PDH-2	b	0.016 7	0.033 3	0.083 3
	b	0.983 3	1.000 0	1.000 0		o	0.016 7	0.033 3	0.033 3
EST-4	a	0.900 0	0.966 7	0.916 7	POD-2	a	0.000 0	0.100 0	0.133 3
	b	0.100 0	0.033 3	0.016 7		b	1.000 0	0.900 0	0.866 7
EST-5	o	0.000 0	0.000 0	0.066 7	CAT	a	0.583 3	0.516 7	0.533 3
	a	0.500 0	0.500 0	0.500 0		b	0.416 7	0.483 3	0.466 7
	o	0.500 0	0.500 0	0.500 0					

2.2 3 个地理居群泥鳅群体的遗传多样性

3 个地理居群泥鳅群体遗传多样性的主要度量指标见表 2。对 3 个泥鳅群体的 10 种同工酶进行分析后得到 30 个基因位点,以其主要等位基因频率低于 0.99 为判读标准,黄河、长江、珠江流域 3 个泥

鳅群体的多态基因座位数分别为 7,9 和 8,其多态位点比例为 0.233 3~0.300 0;以其主要等位基因频率低于 0.95 为判读标准,3 个群体的多态基因座位数则依次为 6,7 和 8,其多态位点比例为 0.166 7~0.233 3。泥鳅 3 个群体每个位点平均预

期杂合度为 0.058 65~0.076 29,而平均观测杂合度为0.042 22~0.048 33。泥鳅各群体的 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数均为负值,说明群体的纯合子过剩(表 2)。

表 2 3 个地理居群泥鳅群体遗传多样性的主要度量指标

Table 2 Genetic variability in 3 populations of *M. anguillicaudatus*

泥鳅居群 Population	多态基因座位数 Polymorphic loci	多态位点比例(<i>P</i>) proportion of polymorphic loci	平均预期杂合度(<i>H_e</i>) Average heterozygosity	平均观测杂合度(<i>H_o</i>) Average heterozygosity	遗传偏离指数(<i>d</i>) Index of hardy-weinberg
黄河流域 Yellow River	7	0.233 3	0.058 65	0.042 22	−0.280 1
长江流域 Yangtze River	9	0.300 0	0.068 44	0.045 56	−0.334 3
珠江流域 Pearl River	8	0.266 7	0.076 29	0.048 33	−0.366 5

2.3 3 个地理居群泥鳅群体间的遗传关系

根据 Nei^[12] 的公式,得出泥鳅 3 个地理居群的遗传相似度 *I* 和 Nei's 遗传距离 *D*(表 3)以及 UP-GMA 聚类分析结果(图 2)。由表 3 和图 2 可以看出,泥鳅不同地理居群的亲缘关系很近,其中长江流

域与珠江流域泥鳅群体的遗传相似度最大,达到 0.996 5,而遗传距离最小,达到 0.003 5;黄河流域与长江流域泥鳅群体的遗传相似度最小,为 0.983 8,遗传距离最大,为 0.016 3。

表 3 3 个地理居群泥鳅群体的遗传相似度和 Nei's 遗传距离

Table 3 Genetic similarity and distance among 3 populations of *M. anguillicaudatus*

泥鳅居群 Population	黄河流域 Yellow River	长江流域 Yangtze River	珠江流域 Pearl River
黄河流域 Yellow River		0.016 3	0.014 6
长江流域 Yangtze River	0.983 8		0.003 5
珠江流域 Pearl River	0.985 5	0.996 5	

注:右上角为遗传距离,左下角为遗传相似度。

Note:Genetic distance (Top right corner),Genetic identity (Lower left quarter).

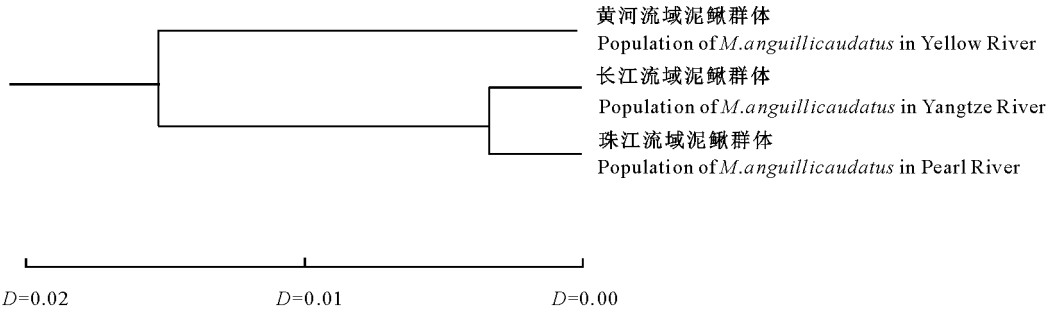


图 2 3 个地理居群泥鳅群体的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Phylogenetic tree of 3 populations of *M. anguillicaudatus* constructed by UPGMA method

3 讨 论

3.1 3 个地理居群泥鳅群体的遗传多样性

多态位点比例 *P* 和平均预期杂合度 *H_e* 是评价鱼类种群生化遗传变异及其种质资源状况的 2 个主要参数。本研究中,泥鳅 3 个居群的多态位点比例为 0.233 3~0.300 0,平均预期杂合度为 0.058 65~0.076 29,对照相关文献资料^[13-14],泥鳅群体的变异在淡水鱼类中处于较高水平。3 个泥鳅群体的 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数均为负值,说明居群内遗传结构不合理,杂合子处于缺失状态,提示在未来的泥鳅种质资源保护工作中,应加强不同居群之间的基因交流,实施科学的遗传管理措施。

3.2 3 个地理居群泥鳅群体的遗传变异特性和遗传关系

一般认为,物种的遗传变异特性与物种对环境的适应能力密切相关。有文献^[15]报道,在克氏亚口鱼(*Catostomus clarki*)的 Est-1 位点上,2 个等位基因的分布与环境温度相关;三块鱼和珠星三块鱼多个基因位点的研究显示,环境温度、盐度对等位基因的分布有影响^[16]。本研究中,3 个地理居群中的黄河流域属于温带干冷气候,长江、珠江流域属于亚热带湿热气候,而 EST-3a 等位基因仅在黄河流域泥鳅群体中表达,EST-2 和 POD-2a 等位基因仅在长江、珠江流域泥鳅群体中表达,这 3 个等位基因的表达是否与环境气候条件直接相关,或是多种因素综

合影响的结果,还有待于进一步研究。但环境气候的影响显然具有一定作用,这表现在长江与珠江流域泥鳅群体的遗传相似度明显高于其与黄河流域泥鳅群体,而遗传距离则与之相反。此结果与常重杰等^[6]运用 RAPD 技术研究的这 3 个泥鳅群体的遗传关系略有差异,这可能与所用的方法不同有关。RAPD 技术是直接 DNA 水平上研究物种的遗传多样性,而同工酶分析则是从蛋白质水平上研究基因,二者的差异可能与核酸和蛋白质遗传替换率不同有关。

黄河流域泥鳅群体与长江、珠江流域泥鳅群体的遗传距离非常接近,因此可以认为,3 个地理居群泥鳅群体虽然由于地域隔离、生殖隔离以及环境影响已经有了部分分化,但分化的时间不是很长,在遗传特性上尚未产生显著分化,3 个群体从分类上应该还属于同一个种群。

3.3 哑基因、重复基因与泥鳅的倍性问题

哑基因又称零等位基因或不活动基因、寂静基因,指不编码蛋白或所编码蛋白活性大大降低的基因。熊全沫^[11]研究中国胭脂鱼时发现,重复基因在表达过程中会出现关闭现象,认为重复基因的表达为祖征,重复基因的关闭即哑基因为离征,是进化的表现,称为功能二倍体;还认为四倍体鱼的特征是重复基因的表达,中国胭脂鱼中 EST、MDH、LDH 同工酶都出现了重复基因的表达和关闭现象。同样的现象在 Ferris 等^[17]、Buth^[18]和 Chen 等^[19]的研究中也有发现。

泥鳅是鳅科鱼类中分布最广泛的一种鱼类,根据一些学者的研究,泥鳅存在多倍体现象。采自四川、广西、黑龙江、河北、神农架、太湖等地的泥鳅为二倍体($2n=50$),而采自于广东韶关、湖北武昌和沙市的泥鳅为四倍体($4n=100$),分布于日本的泥鳅则分别为 $2n=50, 75, 100$ 等 3 种核型^[20]。本研究中,长江、珠江流域泥鳅群体为典型的四倍体($4n=100$),黄河流域泥鳅经鉴定也为四倍体^[21-22],分析泥鳅中出现哑基因的 EST-4、EST-5、G6PDH-2 位点可以看出,在 G6PDH-2 位点所有泥鳅都表现为祖征,即重复位点表达;在 EST-4 位点除了珠江流域泥鳅群体外,其他 2 种群体都表现为离征;EST-5 位点则均表现为祖征。这些特征与泥鳅的细胞遗传学成果相适应,泥鳅的四倍体核型决定其在多个位点上表现为祖征。陈景星等^[23]在鳅科的亚科划分及亚科之间宗系发生的相互关系研究中指出,花鳅亚科可能在晚第三纪喜马拉雅山脉隆起之前或同时出

现,仅分布于东南亚和中国南方,并已分出沙鳅亚科和花鳅亚科;后来喜马拉雅山脉隆起,引起周围地文变迁,花鳅亚科鱼类才逐渐北移分化为各个属种,这可能是 EST-4 基因位点只在珠江流域泥鳅群体中表现为祖征的内在原因。

[参考文献]

- [1] 游丽君,崔 春,赵谋明,等.不同酶水解泥鳅蛋白的特性研究[J].四川大学学报:工程科学版,2008,40(1):74-80.
You L J, Cui C, Zhao M M, et al. Characteristics of loach protein hydrolysates using different proteases [J]. Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition, 2008, 40(1): 74-80. (in Chinese)
- [2] 万 全,王云龙,牛风利.泥鳅的繁殖力测定及几种激素人工催产比较[J].水利渔业,2005,25(5):26-28.
Wan Q, Wang Y L, Niu F L. Fecundity of *Misgurnus anguillicaudatus* and comparison of several hormones for induced spawning [J]. Reservoir Fisheries, 2005, 25(5): 26-28. (in Chinese)
- [3] 陈细香,卢昌义,蔡金聪.漂染废水对泥鳅红细胞核异常的诱导[J].厦门大学学报:自然科学版,2007,46(4):555-558.
Chen X X, Lu C Y, Cai J C. Induction of nuclear anomalies in erythrocytes of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) by bleached waste [J]. Journal of Xiamen University: Natural Science Edition, 2007, 46(4): 555-558. (in Chinese)
- [4] 吴 萍,吴小松,魏育红,等.三倍体与二倍体泥鳅的组织细胞学比较[J].水产学报,2007,31(增刊):1-4.
Wu P, Wu X S, Wei Y H, et al. Comparison of histology and cytology between triploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and diploid loach [J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31 (Suppl): 1-4. (in Chinese)
- [5] 刘文生,王凤麟,胡子鲇,月鳢、泥鳅具气呼吸作用器官呼吸上皮的电镜观察[J].水生生物学报,2004,28(5):519-525.
Liu W S, Wang F L. An electron microscopic study of the respiratory epithelium in the air respiration organs of *Clarias fuscus*, *Channa asiatica* and *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28(5): 519-525. (in Chinese)
- [6] 常重杰,周荣家,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 Z J, Zhou R J, Yu Q X. Genetic variation of two loach species revealed by RAPD analysis [J]. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(1): 89-93. (in Chinese)
- [7] 龙良启,汤宝贵,赵振山,等.泥鳅与大鳞副泥鳅群体 RAPD 分析[J].华中农业大学学报,1998,17(6):566-569.
Long L Q, Tang B G, Zhao Z S, et al. RAPD analysis on nature population of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1998, 17(6): 566-569. (in Chinese)
- [8] Harris H D. Handbook of electrophoresis in human genetics [M]. New York: America Elsevier, 1976.
- [9] 胡能书,万国贤.同工酶技术及其应用 [M]. 长沙:湖南科技

术出版社,1985;94-107.

Hu N S,Wan G X. Isozyme analysis technology and its application [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1985;94-107. (in Chinese)

[10] Shaw C R,Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes-a compilation of recipes [J]. Biochem Genet,1970,4:297-320.

[11] 熊全沫. 鱼类同工酶谱分析:上 [J]. 遗传,1992,14(2):41-44. Xiong Q M. The analysis of isozyme patterns in fishes (1) [J]. Hereditas,1992,14(2):41-44. (in Chinese)

[12] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Amer Natur,1972,106:283-292.

[13] Kirpichnikov V S. Genetic bases of fish selection [M]. Berlin, Herdelbarg, New York:Spinger Verlag,1981:143-200.

[14] 李思发,吴力钊,王 强. 中国淡水主要养殖鱼类种质研究 [M]. 上海:上海科学出版社,1998:71-90. Li S F,Wu L Z,Wang Q. Genetical characterization of major freshwater culture fishes in China [M]. Shanghai: Shanghai Science Press,1998:71-90. (in Chinese)

[15] Koehn R K. Functional and evolutionary dynamics of polymorphic esterases in catostomid fishes [J]. Tran Amer Fisher Soc,1970,99(1):219-228.

[16] 马 波,陈金平,董崇智. 绥芬河三块鱼和珠星三块鱼种群的生化遗传变异及亲缘关系 [J]. 中国水产科学,2005,12(6): 688-693. Ma B,Chen J P,Dong C Z. Biochemical genetic variations and relationships for populations of *Tribolodon brandti* and *Tribolodon hakonensis* in the Suifen River,China [J]. Journal of Fishery Sciences of China,2005,12(6):688-693. (in Chinese)

[17] Ferris S D,Whitt G S. Loss of duplicate gene expression after polyploidisation [J]. Nature,1977,265:258-260.

[18] Buth D G. Duplicate gene expression in tetraploid fishes of the tribemox ostomatini (*Cyprini forme*, *Catostomidae*) [J]. Comp Biochem Physiol,1979,63B:7-12.

[19] Chen Y F,He D K,Chen Y Y. Electrophoretic analysis of isozymes and discussion about species differentiation in three species of *Genus Gymnocypris* [J]. Zoological Research,2001, 22(1):9-19.

[20] 余先觉,周 墩,李渝成,等. 中国淡水鱼类染色体 [M]. 北京:科学出版社,1989:22-23. Yu X J,Zhou D,Li Y C,et al. The chromosome of freshwater fish in china [M]. Beijing:Science Press,1989:22-23. (in Chinese)

[21] 常重杰,杜启艳,余其兴. 泥鳅的 Ag-NORs 带和 c 带研究 [J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2000,28(2):71-73. Chang Z J,Du Q Y,Yu Q X. Studies on the Ag-NORs and C-banding of *Misgurnus Auguillicaudatus* [J]. Journal of Henan Normal University: Natural Science Edition,2000,28 (2):71-73. (in Chinese)

[22] 印 杰,赵振山,陈小奇,等. 二倍体和四倍体泥鳅染色体组型比较 [J]. 水生生物学报,2005,29(4):469-472. Yin J,Zhao Z S,Chen X Q. Karyotype comparison of diploid and tetraploid loach(*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica,2005,29(4):469-472. (in Chinese)

[23] 陈景星,朱松泉. 鳅科鱼类亚科的划分及其宗系发生的相互关系 [J]. 动物分类学报,1984,9(2):201-207. Chen J X,Zhu S Q. Phylogenetic relationships of the subfamily in the loach family *Cobitidae Pisces* [J]. Acta Zootaxonomica Sinica,1984,9(2):201-207. (in Chinese)