

基于线粒体细胞色素 *b* 基因片段序列变异 探讨 3 种鲳属鱼类系统进化

马春艳^{1,2} 赵峰^{2,3} 孟彦羽² 施兆鸿² 庄平² 赵云龙^{1*}

(¹ 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

(² 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090)

(³ 上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘要 对鲳属 3 种鱼类共 19 个个体的细胞色素 *b* (Cyt*b*) 基因进行 PCR 扩增, 经比对校正得到 1 123bp 的基因片段, 共检测到 141 个变异位点, 总变异为 12.56%, 5 个简约信息位点, 未出现插入和(或)缺失, 序列中转换(Transition)明显多于颠换(Transversion)。鲳属 3 种鱼类 19 个序列共检测到 11 种单倍型, 其 T、C、A 和 G 平均含量分别为 29.1%、30.5%、27.4% 和 13.0%。(A+T)% 为 56.5%, 大于(G+C)43.5%。结合来自 GenBank 中的鲳科的中间低鳍鲳 *Peprilus medius* 和星斑真鲳 *Stromateus stellatus* 的相应同源序列, 并以长鲳科的刺鲳 *Psenopsis anomala* 作为外群, 构建系统进化树。结果显示, 翎鲳和中国鲳亲缘关系较近, 二者与银鲳亲缘关系较远, 同为鲳科的鱼类聚类后再与作为外群的刺鲳相聚。系统进化树显示, 银鲳为 3 种鲳属鱼类中较早分化出的种, 刺鲳位于进化树的基部, 是较鲳属鱼类更为原始的类群, 与形态分析结果一致。

关键词 线粒体 DNA 细胞色素 *b* 鲳属 系统进化

中图分类号 Q959.483; Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)05-0020-07

Phylogenetic relationships of *Pampus* inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences

MA Chun-yan^{1,2} ZHAO Feng^{2,3} MENG Yan-yu²
SHI Zhao-hong² ZHUANG Ping² ZHAO Yun-long^{1*}

(¹ School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062)

(² Key Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

(³ College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT The classification and relationships of *Pampus* have been disputed for almost 200 years. The confusion and debates have brought much trouble to the study of phylogenetic relationships. Lately, some researchers partitioned *Pampus* into 5 species according to the mor-

中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院东海水产研究所 2007Z02, 2008SM04)和上海市农委重点项目(沪农科攻字 2007 第 4-1 号)共同资助

* 通讯作者。E-mail: ylzha@bio.ecnu.edu.cn, Tel: (021)62232153

收稿日期: 2008-10-27; 接受日期: 2008-12-29

作者简介: 马春艳(1978-), 女, 博士研究生, 主要从事水产种质资源研究。E-mail: mey0527@yahoo.com.cn, (021)65688139

phological specializations in China seas. In this study, to evaluate the phylogenetic relationship of 3 species (*Pampus argenteus*, *P. punctatissimus*, *P. chinensis*) from the China Seas, the mitochondrial cytochrome *b* gene of 19 individuals were amplified using PCR techniques. About 1150bp length fragments were obtained and sequenced. After being aligned, a fragment of 1 123 bp nucleotide sequence which could be used for sequence analysis was obtained. The genetic information indexes, including Kimura-2 parameter genetic distance, basal composition and phylogenetic trees were generated using MEGA3.1 software. Of the 1 123 aligned base pairs, 141 sites were variable. The mutation sites were mainly transition and transversion. Transitions were found to be more common than transversions which suggested that the sequences had not reached saturation. The average basic compositions of all sequences were as follows; 29.1% T, 30.5% C, 27.4% A, and 13.0% G. Of the 19 sequences we defined 11 haplotypes. The genetic distances between haplotypes ranged from 0.1% to 11%. The sequences were combined with homologous sequences of *Peprilus medius*, *Stromateus stellatus* and *Psenopsis anomala* downloaded from GenBank. Molecular phylogenetic trees were constructed by neighbor-joining (NJ) and minimum evolution (ME) methods based on the 1 123 bp Cytb gene sequences, with *P. anomala* as the designated outgroup. Both NJ tree and ME tree indicated a closer relationship between *P. punctatissimus* and *P. chinensis* and a farther relationship between *P. argenteus* and the above two species. *P. anomala* was basal in the NJ and ME tree and diverged before Stromateidae. The result is consistent with the conclusion of morphological analysis.

KEY WORDS Mitochondrial DNA Cytochrome *b* *Pampus*
Phylogenetic relationships

鲷属 *Pampus* 鱼类属硬骨鱼纲 Osteichthyes, 鲈形目 Perciformes, 鲷亚目 Stromateoidei, 鲷科 Stromateidae, 为暖水性中上层鱼类, 多为重要的经济种。自从 Eupheasen1788 年发表鲷属鱼类两新种银鲷 *Pampus argenteus* 和中国鲷 *P. chinensis* 以来, 已有许多学者从外部形态、内部结构(包括骨骼系统、消化器官及感觉器官)等生物学方面对中国沿海鲷属鱼类进行了比较系统地研究, 关于中国近海鲷属鱼类的划分, 众说纷纭。以往对鲷属鱼类的划分主要是依据形态特征和同工酶谱进行的, 伍汉霖(1985)以及 Liu 等(1998)根据我国 5 种鲷属鱼类的鳃耙、幽门盲囊、耳石、侧线管、头颅和脊椎骨等形态特征进行了比较分类学研究, 确定了我国沿海鲷属鱼类 5 个种的特征。另外, 刘静等(1999、2002)利用同工酶谱和形态学特征对鲷属鱼类的系统发育和动物地理学进行了研究, 进一步证实了中国鲷属鱼类有 5 个种: 银鲷 *Pampus argenteus*、翎鲷 *P. punctatissimus*、灰鲷 *P. cinereus*、中国鲷 *P. chinensis* 和珍鲷 *P. minor*。

DNA 是物种进化的忠实记录者。研究物种 DNA 遗传信息可以再现物种的进化历程, 为物种的系统演化提供新的线索。随着 PCR 技术的广泛应用, 特别是全自动序列分析技术的推广, 许多学者开始应用 DNA 序列分析进行鱼类分子系统学研究(Meyer *et al.* 1990; 童馨等 2007)。Cytb 基因进化速度适中, 不仅容易用一些通用引物扩增和测序, 而且它还是线粒体 DNA 上唯一的结构和功能被了解的较为清楚的蛋白编码基因(Iwin *et al.* 1991)。所以, Cytb 基因是鱼类分子系统学研究中应用较多的分子标记。Meveigh 等(1991)曾利用部分 Cytb 基因序列分析了鲑类 4 属 8 个种的系统发育, 所得的系统树与传统的观点相符, 并支持将虹鳟 *Salmo gairdneri* 归入大麻哈鱼属 *Oncorhynchus* 的观点。Lockwood 等(1993)通过测定白鲑亚科 Coregoninae 8 个种 241bp 的序列, 分析了它们的系统关系, 所得出的结果与他人通过其他遗传学和形态学方法得出的结果一致。Lydeard 等(1994)通过测定 Cytb 402bp 的序列, 研究了食蚊鱼科 *Gambusia* 鱼类的系统进化。江世贵等(2003)对 4 种鲷科鱼类的 Cytb 408bp 的序列进行了分析, 从分子水平研究鲷科鱼类的分类与系统进

化关系。

本研究拟采用线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) Cytb 基因对鲳属 3 种鱼类进行分析, 根据分子数据和序列信息建立聚类图, 进而探讨中国近海鲳属鱼类各种间的分类地位和进化关系, 与形态学研究相互印证, 以期从 DNA 水平为其系统进化提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的鲳鱼样品来源信息见表 1。采集后, 立即用干冰保存运至实验室, 储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

表 1 研究动物材料(或 DNA 序列数据)来源信息
Table 1 Origins of fish samples and DNA sequence data

种名 Species	动物或序列来源 Origins of samples or sequence data	采样时间 Collection time	样本量 Sample size
领鲳 <i>Pampus punctatissimus</i>	浙江舟山	2006-07	3
中国鲳 <i>P. chinensis</i>	海南新埠岛	2007-05	9
银鲳 <i>P. argenteus</i>	浙江舟山	2007-05	7
领鲳 <i>P. punctatissimus</i>	GenBank (AB205470)	-	-
中间低鳍鲳 <i>Peprilus medius</i>	GenBank (AB205471)	-	-
星斑真鲳 <i>Stromateus stellatus</i>	GenBank (AB205472)	-	-
刺鲳 <i>Psenopsis anomala</i>	GenBank (AB205463)	-	-

1.2 DNA 提取

基因组 DNA 提取参照文献 (Sambrook *et al.*, 1989) 的方法进行。DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后稀释到合适的浓度用作 PCR 扩增的模板。

1.3 线粒体 Cytb 基因片段 PCR 扩增、产物纯化及测序

鲳鱼 mtDNA Cytb 基因, 通过使用通用引物 L14724 和 H15915 扩增而获得。引物序列为: L14724, 5'-GAC TTG AAA AAC CAC CGT TG-3'; 和 H15915, 5'-CTC CGA TCT CCG GAT TAC AAG AC-3' (Xiao *et al.*, 2001)。PCR 反应总体积为 50 μl , 包括 2.0 mmol/L MgCl_2 , 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 每种引物, 2 U *Taq* plus DNA 聚合酶 (上海生工), 1 \times *Taq* 聚合酶缓冲液以及 100 ng 基因组 DNA。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后经过 36 个循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 55 s, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物用含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶 (1 \times TAE 配制) 电泳检测, 凝胶成像系统拍照记录; 所用的分子量标准为 DL2000 (Takara)。PCR 产物用 UNIQ-10 (上海生工) 柱式纯化试剂盒纯化, 纯化产物在 ABI3130 型自动测序仪上进行测序。

1.4 数据分析

利用 Clustal X (1.83) (Jeanmougin *et al.*, 1998) 对序列进行对位排列, 并结合人工校正, 确定单倍型。

通过 Mega3.0 软件(Kumar 2004)分析序列的碱基组成和变异位点,同时基于 Kimura 双参数法计算单倍型间的遗传距离。分别以 Neighbor-joining(NJ)和 Minimum evolution(ME)法构建系统发生树,系统树各分支的置信度用“Bootstrap”(Felsenstein 1985)1 000 循环检验,以长鲷科的刺鲷 *Penopsis anomala* 作为外群。

2 结果

2.1 Cytb 基因片段序列特征

3 种鲷鱼的 Cytb 基因均能被清晰稳定的扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳显示 1 条清晰明亮的条带,大小约 1 250bp,PCR 产物经回收、测序等步骤得到 Cytb 基因序列。测序结果经比对、校正后,获得 3 种鲷鱼的 Cytb 基因一致序列(Consensus sequence)片段长 1 123bp,编码 374 个氨基酸,已提交至 GenBank 数据库。将本研究得到的翎鲷序列与 GenBank 中翎鲷序列比较,同源性达 99.5%。在所测定并排序的 1 123bp 碱基序列中,序列有 141 个变异位点,总变异为 12.56%,5 个简约信息位点,未出现插入和缺失,序列中转换(Transition)明显多于颠换(Transversion)(表 2)。另外,在替换的碱基中,主要发生在第 3 密码子位置上,密码子第 3 位的变异明显高于第 1 位和第 2 位。鲷鱼 3 个种的 T、C、A、G 平均含量分别为 29.1%、30.5%、27.4% 和 13.0%。(A+T)% 为 56.5%,大于(G+C)43.5%。采用 Mega3.1 中统计软件计算的各种鲷鱼的平均碱基组成见表 3。

在所测定的 3 种鲷鱼的 19 个样本中,共定义了 11 种单倍型(Haplotype),各单倍型的变异位点见图 1。其中,翎鲷有 3 种单倍型(Hap1-Hap3),中国鲷有 3 种单倍型(Hap4-Hap6),在银鲷中共检测到 5 种单倍型(Hap7-Hap11)。根据 Kimura 遗传距离的计算结果,各单倍型之间的遗传距离见表 2,种内及种间遗传距离见表 3。种内遗传距离为 0.1%~0.3%,种间遗传距离在 0.1%~10.8%之间。其中,银鲷与翎鲷的遗传距离最大(10.8%),而翎鲷与中国鲷间的遗传距离最小(0.1%)。

表 2 各单倍型间的遗传距离和转换/颠换

Table 2 Genetic distance between haplotypes (below diagonal) and number of transitions/transversions (above diagonal) for cytochrome *b* sequences in *Pampus*

Hap	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8	Hap9	Hap10	Hap11
Hap1		3/1	3/1	51/10	52/10	52/10	88/22	87/22	87/22	87/22	89/22
Hap2	0.004		2/0	52/9	53/9	53/9	91/21	90/21	90/21	90/21	92/21
Hap3	0.004	0.002		52/9	53/9	53/9	91/21	90/21	90/21	90/21	92/21
Hap4	0.057	0.057	0.057		1/0	1/0	89/16	90/16	88/16	90/16	88/16
Hap5	0.058	0.058	0.058	0.001		2/0	90/16	91/16	89/16	91/16	89/16
Hap6	0.058	0.058	0.058	0.001	0.002		90/16	91/16	89/16	91/16	89/16
Hap7	0.107	0.109	0.109	0.102	0.103	0.103		1/0	1/0	2/0	1/0
Hap8	0.106	0.108	0.108	0.103	0.104	0.104	0.001		2/0	1/0	2/0
Hap9	0.106	0.108	0.108	0.101	0.102	0.102	0.001	0.002		3/0	2/0
Hap10	0.106	0.108	0.108	0.103	0.104	0.104	0.002	0.001	0.003		3/0
Hap11	0.108	0.11	0.11	0.101	0.102	0.102	0.001	0.002	0.002	0.003	

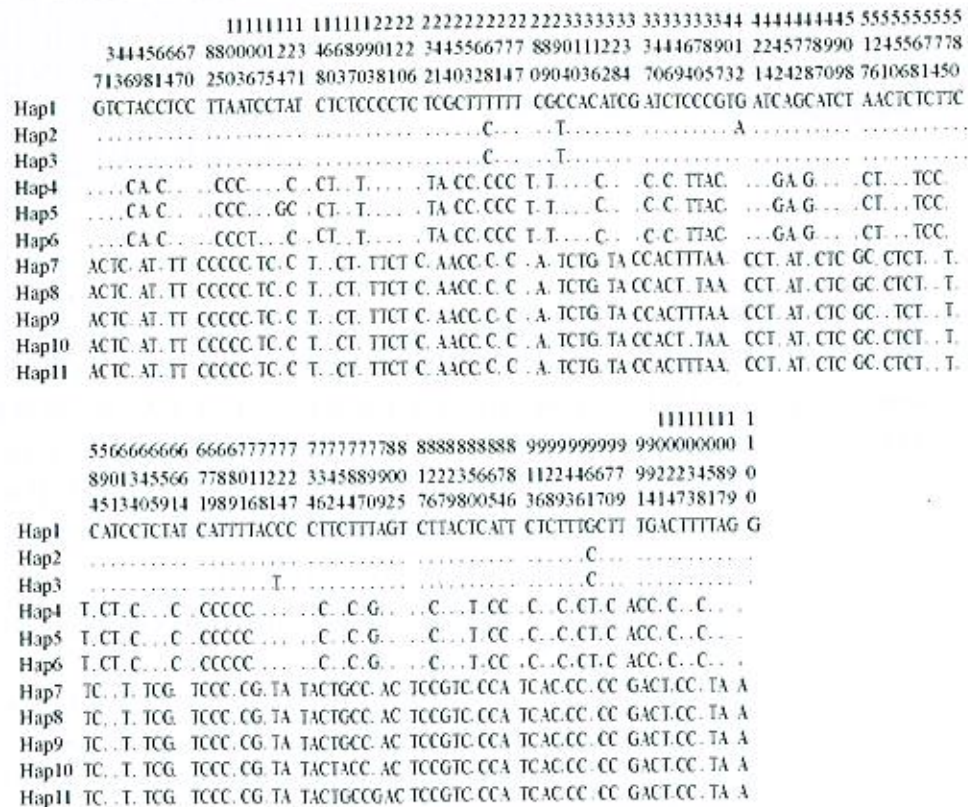


图1 3种鲷鱼线粒体Cytb基因序列变异位点

Fig. 1 Variable sites of mitochondrial Cytb gene in 3 *Pampus*

表3 3种鲷鱼线粒体Cytb片段碱基组成及种间遗传距离

Table 3 Base composition of mitochondrial Cytb gene and genetic distance of 3 *Pampus* species

物种 Species	碱基含量(%) Nucleotide composition				遗传距离 Genetic distance		
	T	C	A	G			
翎鲷 <i>P. punctatissimus</i>	30.5	28.8	27.5	13.2	0.003		
中国鲷 <i>P. chinensis</i>	28.7	31.1	27.1	13.1	0.057	0.001	
银鲷 <i>P. argenteus</i>	29.5	29.9	29.7	12.9	0.108	0.103 0.001	
平均 Average	29.1	30.5	27.4	13.0			

2.3 系统进化分析

以长鲷科的刺鲷 *Pseneopsis anomala* 作为外群,用 GenBank 中查找到的翎鲷 *P. punctatissimus*-*P. p* 和中间低鳍鲷 *Peprilus medius*、星斑真鲷 *Stromateus stellatus* 的 Cytb 序列与本研究中的 3 种鲷属鱼类的 Cytb 序列构建各单倍型间的 NJ 树和 ME 树(图 2)。从系统进化树可以看出,本研究中的 3 个翎鲷单倍型与 GenBank 中下载的翎鲷序列聚为 1 支,中国鲷单独聚为 1 支,5 个银鲷单倍型单独聚为 1 支,然后 3 支相聚。同为鲷科的中间低鳍鲷和星斑真鲷聚在一起后,与本研究中的 3 种鲷属鱼类聚在一起,最后与长鲷科的刺鲷聚在一起。

3 讨论

3.1 3种鲳属鱼类的系统进化关系

邓思明等(1981)通过比较中国沿海8种鲳亚目鱼类的侧线管系统、骨骼系统和耳石等形态特征后认为,刺鲳属是较鲳属更为原始的类群。刘静等(2002)通过对中国鲳属鱼类形态的研究,认为中国鲳属鱼类构成一个单系群,珍鲳具有个体小、脊椎骨数目少、眼眶窝大、后颞窝明显和耳石厚等近祖特征,是最早分化出来的一种。银鲳虽具有个体大、脊椎骨数目多和耳石薄等离征,但它们仍然具有鳃耙数目多、下颌牙齿少等近祖特征,也是分化较早的种。中国鲳具有个体大、背鳍和臀鳍不具鳍棘、鳍条数目较多、鳃耙数少且短、翼蝶骨较发达等特征,是较特化的种。翎鲳和灰鲳特征较为相似,是一对姐妹种。同时通过8个离征(如腹鳍的有无,鳍条及脊椎骨数量等)将中国鲳属鱼类和鲳亚目其他属区分开。

由于材料的限制,本研究仅对鲳属的3个种的系统进化关系进行了研究。分子树(NJ和ME)是采用不同的方法构建的,其建树的方法原理和假设条件不同,对数据的考察角度也不一样。因此,根据同一序列数据采用不同的构建方法,可能得到不一致的系统树(张亚平 1997)。本研究根据1123bp的DNA序列构建了NJ和ME两种分子树,树形基本一致,但各节点的支持率以及单倍型间的聚类关系不同。进化树显示,3种鲳鱼分别聚为单独的分支,然后再相聚,翎鲳和中国鲳的亲缘关系较近,而与同为鲳属的银鲳的亲缘关系较远。银鲳处于进化树较基部的位,是鲳属鱼类中分化较早的类群。3种鲳属鱼类聚在一起,然后再与同为鲳科的中间低鳍鲳和星斑真鲳相聚,最后再与刺鲳相聚。刺鲳位于进化树的基部,是较鲳属鱼类更为原始的类群。由此可见,本研究关于鲳属鱼类系统进化分析结果与形态学研究结果一致。

3.2 Cytb 基因在鲳鱼鱼类系统进化研究方面的适用性

形态的变异、物种的分化其本质在于遗传物质DNA的变异,分子系统树通过揭示DNA分子中核苷酸的变异来研究物种的系统发生,目前已日益引起动物系统学和进化生物学研究者的注重。在重新构建物种的系统进化树时,合适的基因片段有助于构建正确的系统进化关系(张亚平 1996)。对亲缘关系较远物种的系统学研究可以选择相对比较保守的区域,对亲缘关系较近的物种或种下水平研究可以选择变异相对较快的区域。线粒体细胞色素 *b* 基因是目前线粒体中结构和功能了解得最为透彻的基因之一,在鱼类线粒体中,Cytb 进化速度适中,是鱼类分子系统学研究中十分有用的研究对象,已在鱼类种间或更高级阶段的系统进化关系研究中取得了成功(肖武汉等 1997;Near *et al.* 2000),可见线粒体 Cytb 基因是探讨种间和种内遗传分化程度的良好标记,其中的一个基因片段就包含了从种内到种间乃至科间的进化遗传信息(Kochet *et al.* 1989; Meyer *et al.* 1990),在系统进化和分类研究上有很强的适用性。

通过几种鲳鱼 Cytb 序列比较发现,同一物种的 Cytb 序列基本相同或非常相似,有时几个个体共享一种单倍型,Cytb 基因在种内不同单倍型的碱基替换数很小,而在不同种的单倍型间碱基替换数较大。序列变异位点主要是转换(Transition)和颠换(Transversion),且转换多于颠换,这种差异在亲缘关系接近的类群中更显著。另外,序列间的大部分变异都主要集中在第3密码子位置,因此大部分的变异都属于无义突变,密码子的第2位非常保守,第3位变异较大,符合密码子具有摇摆性的特点,由此可见,Cytb 基因非常适合于鲳属鱼类系统演化研究。

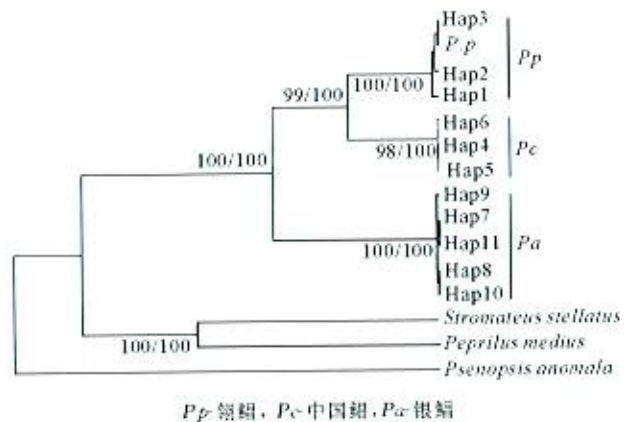


图2 基于线粒体 Cytb 序列构建的鲳属鱼类的系统进化树
(枝上数字分别表示置信度)

Fig. 2 Construction of phylogenetic tree in the genus *Pampus* based on Cytb gene sequences (the values of bootstrap confidence level are indicated above the branch)

参 考 文 献

- 邓思明,熊国强,詹鸿禧. 1981. 中国鲷亚目鱼类分类系统的初步研究. 见: 鱼类学论文集(第2辑). 北京: 科学出版社, 25~38
- 江世贵,刘红艳,苏天凤,龚世园. 2003. 4种鲷科鱼类的线粒体细胞色素**b**基因序列及分子系统学分析. 中国水产科学, 10(3): 184~188
- 刘静,尤锋,李春生. 1999. 中国鲷属鱼类同工酶谱分析. 海洋科学, 5: 31~34
- 刘静,李春生,李显森. 2002. 中国鲷属鱼类系统发育和动物地理学研究. 海洋科学集刊, 44: 235~239
- 伍汉霖. 1985. 鲷科. 福建鱼类志. 福州: 福建科学技术出版社, 430~436
- 张亚平. 1996. 从DNA序列到物种树. 动物学研究, 17(3): 247~252
- 张亚平. 1997. DNA序列、物种树和保护单元-ESU. 中国动植物的遗传多样性. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1~6
- 肖武汉,吴春花,宿兵,张亚平,崔桂华. 1997. 福尔马林固定云南鲷的DNA提取及其细胞色素**b**基因序列分析. 动物学研究, 18(3): 242, 252, 258, 284
- 童馨,杜博,喻达辉,龚世园,郭奕惠,黄桂菊,李莉好. 2007. 浅色黄姑鱼线粒体16SrRNA基因片段序列特征分析. 海洋水产研究, 28(3): 85~91
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783~791
- Iwin, D. W., Kocher, T. D., and Wilson, A. C. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128~144
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* 23: 403~405
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., and Wilson, A. C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(16): 6196~6200
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150~163
- Liu, J., and Li, C. S. 1998. Redescription of a stromateid fish, *Pampus punctatissimus* (T. et S., 1845) and comparison with *Pampus argenteus* (Euphrasen, 1788). *Chin. Oceanol. Limnol.* 16(2): 161~166
- Lockwood, S., Dillinger, Jr., Birt, P., Green, M., and Thomas, S. P. 1993. Phylogenetic relationships among members of the *Coregoninae* inferred from direct sequencing of PCR-amplified mitochondrial DNA. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 50: 2112~2118
- Lydeard, C., Wooten, M. C., and Meyer, A. 1994. Cytochrome *b* sequence variation and a molecular phylogeny of the live-bearing fish genus *Gambusia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Can. J. Zool.* 73: 213~227
- Meveigh, H. P., and Davidson, W. S. 1991. A salmonid phylogeny inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *J. Fish Biol.* 39 (Supplement A): 277~282
- Meyer, A., and Wilson, A. C. 1990. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *J. Mol. Evol.* 31(5): 359~364
- Near, T. J., Jean, C. P., and Lawrence, M. P. 2000. Evolution of cytochrome *b* and the molecular systematics of *Ammocrypta* (Percidae: Etheostomatinae). *Copeia*, (3): 701~711
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Xiao, W. H., Zhang, Y. P., and Liu, H. Z. 2001. Molecular systematics of xenocyprininae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18: 163~173