

文章编号: 1000- 0615(2005)03- 0327- 06

5 种笛鲷 mtDNA 及 *Cyt b* 基因片段的 RFLP 比较

王中铎, 刘楚吾, 郭昱嵩

(湛江海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 采用线粒体 DNA 限制性片段长度多态性分析(mtDNA-RFLP)和线粒体 DNA 的细胞色素 b 基因(*Cyt b*)的部分序列扩增限制性片段长度多态性分析(mtDNA PCR-RFLP)两种方法,对笛鲷属 5 种鱼类进行种间系统发育的比较研究,结果显示:(1)画眉笛鲷依照其形态学上体侧条带颜色差异,可分为褐带画眉笛鲷和黄带画眉笛鲷两个种;(2)千年笛鲷和星点笛鲷、褐带画眉笛鲷和黄带画眉笛鲷、金带笛鲷和金焰笛鲷之间遗传距离相对较近;(3)两种分析方法都可以为种的区分提供方便有效的分子标记;(4)两种分析方法在构建发育系统树上不完全一致。本文从 mtDNA 角度深入研究了南海海域笛鲷的系统发生,表明了 mtDNA 作为一种广泛应用的分子标记的实用性,同时也有一些潜在问题需要进一步研究。

关键词: 笛鲷属; 线粒体 DNA 限制性片段长度多态性分析; PCR-RFLP; 系统发生; 细胞色素 b; 假基因

中图分类号: S917 文献标识码: A

Comparison on RFLP of mitochondrial DNA and *Cyt b* gene segment for 5 species in *Lutjanus*

WANG Zhong-duo, LIU Chu-wu, GUO Yu-song

(Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The phylogenetic relationships of 5 species of snappers (*Lutjanus stellatus*, *L. sebae*, *L. vitta*, *L. fulvus* and *L. fulviflamma*) were studied comparatively, which were based on 2 methods: restriction fragment length polymorphism of mitochondrial DNA (mtDNA-RFLP), RFLP of cytochrome b (*Cyt b*) gene segment (> 900bp) amplified by polymerase chain reaction (PCR-RFLP). The sample numbers of *Lutjanus stellatus*, *L. sebae*, *L. vitta*, *L. fulvus* and *L. fulviflamma* were 17, 17, 35, 17 and 17, respectively, which are collected in the South China Sea from Sep. 2002 to Jun. 2003. The mtDNA being isolated and purified from fresh livers of samples range from 17.05±0.46 to 17.77±0.91 kb. Having been digested by 19 restriction endonucleases recognized 6 base pairs (*EcoR* iv, *Hind* Ⅲ, *Bgl* iv, *Bgl* Ⅱ, *Sty* iv, *Xba* iv, *Dra* iv, *Pst* iv, *Pvu* Ⅱ, *Xho* iv, *Bam*H iv, *Sca* iv, *EcoR* (Ⅷ), *Sma* iv, *Mlu* iv, *Sal* iv, *Hinf* iv, *Kpn* iv, *Hpa* iv), the mtDNA were analysed. The result of mtDNA-RFLP shows that *L. vitta* could be divided into HE and HD, based on the color of stripe on the middle of the side. The physical maps of mtDNA from *L. stellatus* and *L. sebae* have been constructed based on the endonucleases that are chosen from 19 restriction endonucleases. By comparison of the sequence of cytochrome b gene PCR-RFLP using different amplification templates (one from purified mtDNA and the other from nDNA), the possible interferences of nuclear mitochondrial pseudogenes (Numts) were excluded and the possible pseudogenes from nDNA were preliminarily discussed. Having been digested by 6 restriction endonucleases recognized 4 base pairs (*Sty* iv, *Hinf* iv, *Hpa* Ⅱ, *Msp* iv, *Sau*96 iv, *Sin* iv, *Taq* iv, *Hae* Ⅲ), the sequences were analysed. The results of mtDNA PCR-RFLP support that *L. vitta* could be divided into two species: HE and HD by the 0.0751 of divergency index. The results reveal that all of the 2 analysis methods are useful for seeking out the genetic markers among species effectively. And the results from RFLP indicate that the *L. vitta* could be divided into two species based on the color of stripe on the middle of the side. At the same time, the constructions of phylogenic trees by neighbour-joining (NJ) method show that there are some differences along different methods on the specific level when they are used for phylogenesis.

Key words: *Lutjanus*; restriction fragment length polymorphism of mitochondrial DNA; polymerase chain reaction; phylogenesis; cytochrome b; Numts

收稿日期: 2004-04-05

资助项目: 广东省科技计划项目重大专项(A3050202); 湛江市科技攻关项目(200017)

作者简介: 王中铎(1980-), 男, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 主要从事经济水产动物系统发育研究。E-mail: aduofa@hotmail.com

通讯作者: 刘楚吾, E-mail: swyjs@zjyou.edu.cn

由早期对线粒体 DNA 进行限制性片段酶切分析(mtDNA-RFLP)到 PCR-RFLP 再到 DNA 序列测定技术的推广, mtDNA 以其结构简单、无重组、进化快、与核基因组无共同序列和严格母系遗传等特点在系统进化、生物地理、群体遗传、人类学及法医鉴定等领域得到了广泛应用^[1]。mtDNA 细胞色素 b 基因被认为是研究种间进化关系的最佳选择并被越来越广泛应用^[2,3], 未来有可能成为 DNA 分类(DNA taxonomy) 法的标准片段^[4]。同时, 随着研究的深入, mtDNA 应用的可靠性越来越受到关注^[1]。

笛鲷属 (*Lutjanus*) 隶属于鲈形目(Perciformes), 笛鲷科(Lutjanidae), 近海暖水性近底层鱼类, 在南海有 28 个种^[5]。国外对该属的系

统发生已有深入研究^[6-9], 但在国内才刚刚起步^[10,11]。本研究中星点笛鲷(*Lutjanus. stellatus*)、千年笛鲷(*L. sebae*)、金焰笛鲷(*L. fulviflamma*)、金带笛鲷(*L. fulvus*)和画眉笛鲷(*L. vitta*)都是南海海域重要的捕捞对象, 利用 mtDNA-RFLP 和 mtDNA PCR-RFLP 对笛鲷属系统发生研究基础上, 对两种分析方法进行一些研究探讨, 以期以后的工作提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料

参照文献[12]的形态学描述, 在湛江近海收集了 5 种笛鲷的野生种(表 1), 活体取其肝脏和血样。

表 1 样本资料

Tab. 1 The information of samples

	星点笛鲷 <i>L. stellatus</i>	千年笛鲷 <i>L. sebae</i>	金焰笛鲷 <i>L. fulviflamma</i>	金带笛鲷 <i>L. fulvus</i>	画眉笛鲷(褐带) <i>L. vitta</i> (HE)	画眉笛鲷(黄带) <i>L. vitta</i> (HD)
采样时间 time	2002-09-02- 2003-03-08	2002-09-16- 2003-02-26	2003-05-17- 2003-06-25	2003-05-19- 2003-06-26	2003-05-17- 2003-06-19	2003-05-19- 2003-06-22
样本数 samples	17	17	17	17	24	11

1.2 仪器与试剂

所用的限制性内切酶、引物和 PCR 试剂购自华美公司; 其他试剂均为国产分析纯。PCR 仪为 HEMA 8000。

1.3 DNA 的分离及纯化

按戴建华等^[13]报道的方法, 从新鲜肝脏中分离纯化 mtDNA。酚/氯仿抽提法从血样中提取基因组 DNA。

1.4 序列扩增

引物序列为 5'-GTG ATC TGA AAA ACC ACC GTT G-3'^[14] 和 5'-AAT AGG AAG TAT CAT TGC GGT TTG ATG-3'^[15]。PCR 反应体系: 总体积 50 μ L, 包含 1 \times PCR Buffer, 1.5 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 引物各 2 μ mol \cdot L⁻¹, 模板约 100 ng, 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶。循环参数: 94 $^{\circ}$ C 热变性 80 s; 94 $^{\circ}$ C 变性 42 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 55 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 150 s。

1.5 限制性内切酶的酶解

参照限制性内切酶使用说明书建议的反应体系进行酶切反应。

1.6 凝胶电泳

mtDNA 酶解片段用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离; 排除 Numts 用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物酶解片段(含 0.5 μ g \cdot mL⁻¹ 溴化乙锭)。PCR-RFLP 分析用 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离酶解片段, 银染显色。凝胶图象处理系统(Tanon GIS-2008)拍照并计算片段大小。

1.7 数据分析方法

遗传距离的计算, 用 RESTDATA 软件(<http://mep.bio.psu.edu/restdata.readme>)按 Nei 和 Li^[16]提出的片段法计算分歧指数 *D* (the average number of nucleotide substitutions), 及 Saitou 和 Nei 的方法构建系统树^[17]。

2 结果

2.1 mtDNA-RFLP

mtDNA 用 19 种 6 碱基的限制性内切酶酶解得到单酶切图谱(图 1 和图 2)。由于部分 mtDNA 在提取过程中被物理切割, 在无酶切切点时也能得到与有 1 个切点时平齐的电泳条带, 但与对照

(未加限制性内切酶酶解) 比较, 可以发现在该条带的上方还有开环状 mtDNA 区, 借此可以将无切点和单切点的酶切泳道分辨开来。各酶切片段大小见表 2。

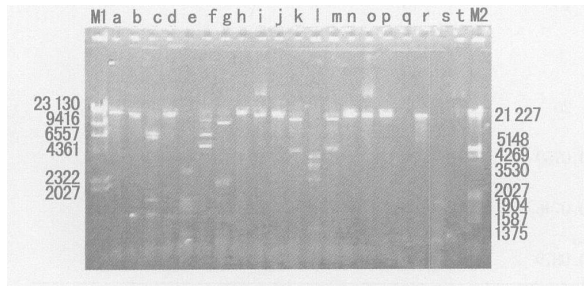


图 1 褐带画眉笛鲷单酶切

Fig. 1 HE mtDNA by single digestion

M1: Hind ④marker; a: EcoRiv; b: Hind ④; c: Bgl iv; d: Bgl ④; e: Sty iv; f: Xba iv; g: Dra iv; h: Pst iv; i: Pvu ④; j: Xho iv; k: BamH iv; l: Sca iv; m: EcoR(Ⅱ); n: Sma iv; o: Mlu iv; p: Sal iv; q: Hinf iv; r: Kpn iv; s: Hpa iv; t: mtDNA 对照; M2: EcoR I/ Hind ④marker

别简略表示为 HD 和 HE。这是因为比较图 1 和图 2 可以看出两者酶切图谱存在较大差别, 表 3 中也列出了两者的分歧距离 D 为 0.0439, 在后面的结果中也依此分别列出。根据表 2 得出共享片段数, RESTDATA 计算分歧距离(表 3)。

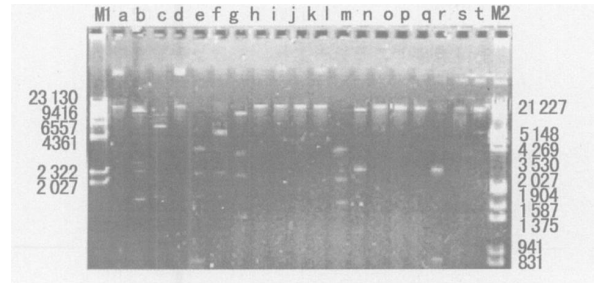


图 2 黄带画眉笛鲷单酶切

Fig. 2 HD mtDNA by single digestion

M1: Hind ④marker; a: EcoRiv; b: Hind ④; c: Bgl iv; d: Bgl ④; e: Sty iv; f: Xba iv; g: Dra iv; h: Pst iv; i: Pvu ④; j: Xho iv; k: BamH iv; l: Sca iv; m: EcoR(Ⅱ); n: Sma iv; o: Mlu iv; p: Sal iv; q: Hinf iv; r: Kpn iv; s: Hpa iv; t: mtDNA 对照; M2: EcoR I/ Hind ④marker

表中依据画眉笛鲷体侧眼后至尾柄的条纹颜色分别命名为黄带画眉笛鲷和褐带画眉笛鲷, 分

表 2 mtDNA 单酶酶切片段大小

Tab. 2 The sizes of the restriction fragments of mtDNAs by single enzyme digestion kb

	星点笛鲷 <i>L. stellatus</i>	千年笛鲷 <i>L. sebæ</i>	金焰笛鲷 <i>L. fulviflamma</i>	金带笛鲷 <i>L. fulvus</i>	画眉笛鲷(褐带) <i>L. vitta</i> (HE)	画眉笛鲷(黄带) <i>L. vitta</i> (HD)
EcoR iv	0	0	17.32	17.29	17.13	0
Hind ④	11.40, 5.33	8.88, 5.91, 2.00	6.77, 4.41, 3.80, 3.04	9.14, 5.11, 3.16, 1.77	17.13	14.11, 2.70
Bgl iv	9.16, 6.62, 1.63	0	10.70, 5.35, 1.33	6.76, 5.60, 1.56, 1.45	7.27, 6.43, 1.68, 1.30	10.78, 6.13, 1.71
Bgl ④	9.33, 5.08, 2.97	12.36, 2.86, 2.31	0	0	17.13	0
Sty iv	2.97, 1.54, 1.42, 0.86, 0.80	3.95, 1.78, 1.29, 1.04	3.38, 2.36, 0.62, 0.43	1.95, 1.68, 1.36, 0.94, 0.83, 0.74	2.85, 1.70, 1.56, 1.43	3.61, 2.30, 1.72, 1.52, 0.73
Xba iv	7.37, 3.78, 3.43, 1.49, 1.46	15.69, 1.56	7.40, 6.30, 4.01	17.29	13.19, 9.83, 6.73, 5.00	5.47, 4.88, 2.32
Dra iv	6.72, 3.06, 2.58, 2.12, 1.74	6.76, 3.57, 2.95, 2.70, 1.39	10.93, 2.93, 2.17, .21	9.42, 3.20, 2.71, 2.23	10.71, 2.26, 2.16	12.33, 3.30, 2.26
Pst iv	17.25	16.80	0	0	0	0
Pvu ④	15.38, 1.26	12.46, 3.98, 1.04	0	0	0	0
Xho iv	17.25	16.80	0	0	0	0
BamH iv	0	0	0	0	13.84, 4.17	0
Sca iv	6.62, 5.08, 2.31, 1.54, 1.26	14.30, 2.43	7.70, 6.56, 2.05, 1.35	6.27, 3.30, 3.20, 2.78, 2.44	3.66, 3.02, 2.77, 2.26, 1.00	2.12, 1.60, 1.50, 0.94
EcoR(Ⅱ)	12.61, 4.59	13.28, 3.33	15.95, 0.86, 0.19	9.14, 4.46, 3.60	12.71, 4.36	16.89, 2.63, 1.08
Sma iv	8.76, 8.76	14.36, 2.49	0	17.29	17.13	17.84
Mlu iv	17.25	0	0	17.29	0	17.84
Sal iv	0	11.99, 4.62	0	17.29	17.13	17.84
Hinf iv	2.29, 1.79, 1.33, 0.99, 0.92	1.57, 1.26	1.54, 1.28, 0.65, 0.17	1.40, 1.02, 0.78	1.56, 1.04, 0.82	2.41,
Kpn iv	0	15.05, 2.20	0	0	17.13	0
Hpa iv	17.25	6.56, 5.65, 3.52, 65	14.99, 2.26	8.35, 4.88, 3.46	1.50, 1.33, 1.09, 0.70	0
平均碱基数 mean base pair	17.05±0.46	17.04±0.32	17.47±0.34	17.36±0.55	17.08±0.66	17.77±0.91
有效片段数 fragments	33	32	26	30	22	16

表3 mtDNA的共享片段数 N_j 和分歧指数 D
Tab. 3 N_j and D of mtDNA by single enzyme digestion

	星点笛鲷 <i>L. stellatus</i>	千年笛鲷 <i>L. sebae</i>	金焰笛鲷 <i>L. fulviflamma</i>	金带笛鲷 <i>L. fulvus</i>	画眉笛鲷(褐带) <i>L. vitta</i> (HE)	画眉笛鲷(黄带) <i>L. vitta</i> (HD)
星点笛鲷 <i>L. stellatus</i>	33	9	10	10	7	10
千年笛鲷 <i>L. sebae</i>	0.0780	32	3	6	7	5
金焰笛鲷 <i>L. fulviflamma</i>	0.0649	0.1446	26	8	7	5
金带笛鲷 <i>L. fulvus</i>	0.0691	0.1016	0.0759	30	10	7
画眉笛鲷(褐带) <i>L. vitta</i> (HE)	0.0835	0.0823	0.0746	0.0569	22	9
画眉笛鲷(黄带) <i>L. vitta</i> (HD)	0.0531	0.0967	0.0879	0.0718	0.0439	16

2.2 PCR-RFLP

分别以 mtDNA 和总 DNA 为模板平行扩增, 5 个种都得到 900 bp 左右的特异扩增产物(图 3)。用 8 种 4 碱基限制性内切酶(*Sty* iv、*Hinf* iv、*Hpa* ①、*Msp* iv、*Sau*96 iv、*Sin* iv、*Taq* iv、*Hae* ②)对各个种的扩增产物酶切。2% 琼脂糖凝胶电泳后比较酶切图谱(图 4), 不同模板的同种鱼无明显差异。由此推断本实验中当应用总 DNA 作为扩增模板时, 不存在 Numts 影响 PCR-RFLP 分析的情况。

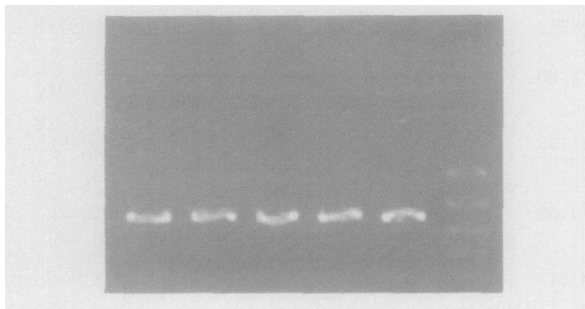


图3 mtDNA *Cyt b* 基因部分序列扩增产物
Fig. 3 The PCR product of mtDNA *Cyt b* gene segment

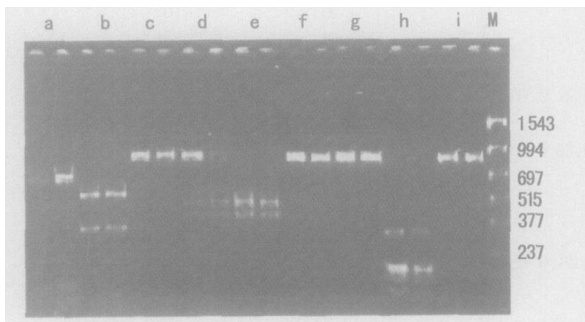


图4 千年笛鲷 *Cyt b* 基因部分序列单酶切
Fig. 4 *L. sebae* mtDNAs *Cyt b* gene segment
by single digestion

a: *Sy* iv; b: *Hinf* iv; c: *Hpa* ①; d: *Msp* iv; e: *Sau*96 iv; f: *Sin* iv;
g: *Taq* iv; h: *Hae* ②; i: 对照; M: PCR marker

Hpa ①对所有样品无切点, *Msp* iv多星点效应不利于 RFLP 分析, 所以只用另外 6 种限制性内切酶。5 个种的扩增产物酶切后 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 5。从图 5 直接得共享片段数, 计算分歧指数 D , 方法同上(表 4)。

2.3 构建系统树

根据 mtDNA-RFLP 与 PCR-RFLP 分析所得分歧指数 D , 用 RESTDATA 分别作系统树(图 6 和图 7)。

3 讨论

画眉笛鲷按照体侧纵带的褐色或黄色分成的两个群体间, mtDNA-RFLP 和 PCR-RFLP 分析得到分歧距离分别为 0.0439 和 0.0751, 前者在本文种间比较中为最小, 但后者却非最小。这提示它们之间已经存在相当程度的分化。而从所得的系统树可以看出, mtDNA-RFLP 与 PCR-RFLP 分析结果大体一致, 都表明千年笛鲷和星点笛鲷、HE 和 HD、金带笛鲷和金焰笛鲷遗传距离相对较近。这与形态学上的描述较为符合, 但同时也存在一些差异。由 PCR-RFLP 分析得到 NJ-TREE 中金带笛鲷先与 HD 和 HE 聚为一支, 再和金焰笛鲷聚为一支, 而 mtDNA-RFLP 分析得到的 NJ-TREE 是金带笛鲷和金焰笛鲷、HD 和 HE 先分别聚为一支后再聚到一起。这个结果在一定程度上反映出 mtDNA 部分片段与总 mtDNA 进化速率的不一致。尽管可以通过增加扩增片段长度、选取更多的片段进行 RFLP 比较, 甚至是测序后的序列比较来提高系统树的精确度, 应用形态、考古、生物地理等方面的资料仍将十分重要^[1]。

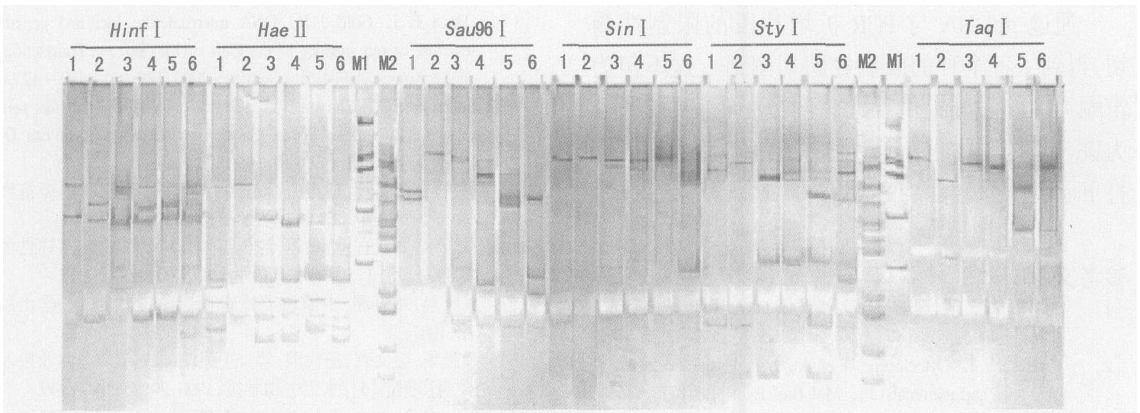


图 5 *Cyt b* 基因部分序列单酶切片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳比较

Fig. 5 PAGE comparison of *cyt b* gene segment by single enzyme digestion

1: 星点笛鲷; 2: 千年笛鲷; 3: 金焰笛鲷; 4: 金带笛鲷; 5: 画眉笛鲷(褐带); 6: 画眉笛鲷(黄带); M1: PCR marker; M2: pBR322 DNA/ *Msp* I markers

1: *L. stellatus*; 2: *L. sebae*; 3: *L. fulviflamma*; 4: *L. fulvus*; 5: *L. vitta* (HE); 6: *L. vitta* (HD); M1: PCR marker; M2: pBR322 DNA/ *Msp* I markers

表 4 *Cyt b* 的共享片段数 *N_j* 和分歧指数 *D*

Tab. 4 *N_j* and *D* of *Cyt b* segment by single enzyme digestion

	星点笛鲷 <i>L. stellatus</i>	千年笛鲷 <i>L. sebae</i>	金焰笛鲷 <i>L. fulviflamma</i>	金带笛鲷 <i>L. fulvus</i>	画眉笛鲷(褐带) <i>L. vitta</i> (HE)	画眉笛鲷(黄带) <i>L. vitta</i> (HD)
星点笛鲷 <i>L. stellatus</i>	12	4	8	6	7	6
千年笛鲷 <i>L. sebae</i>	0.0862	9	4	5	4	3
金焰笛鲷 <i>L. fulviflamma</i>	0.0519	0.1067	17	9	8	9
金带笛鲷 <i>L. fulvus</i>	0.0718	0.0778	0.0501	15	7	10
画眉笛鲷(褐带) <i>L. vitta</i> (HE)	0.0703	0.1139	0.0718	0.0789	19	9
画眉笛鲷(黄带) <i>L. vitta</i> (HD)	0.0963	0.1557	0.0706	0.0562	0.0751	23

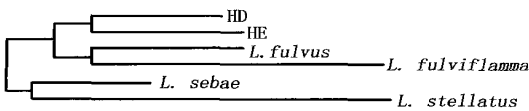


图 6 依据 mtDNA-RFLP 构建的系统树

Fig. 6 NJ-TREE according to mtDNA-RFLP

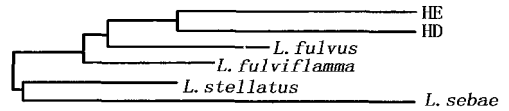


图 7 依据 PCR-RFLP 构建的系统树

Fig. 7 NJ-TREE according to PCR-RFLP

随着对线粒体基因组研究的深入, Numts 存在不断被证实^[18]。这些假基因在不同物种中丰富度不尽相同, 有些可以用通用引物扩增出来, 有时甚至比 mtDNA 更易与通用引物结合, 从而干扰扩增, 产生非特异性带, 增加研究工作难度, 甚至会得出错误结论^[1]。在哺乳类(如人类、小鼠)、两栖类(如非洲爪蟾)、昆虫(如蝗虫)都有相关研究

报道, 并对其遗传机理进行了深入研究^[1, 19]。但硬骨鱼类还未见此类研究报道。本文以相同个体 mtDNA 和总 DNA 为模板, 通过 PCR 方法进行比较, 对此问题进行了初步探讨。在肯定无明显非特异条带存在后, 又通过 RFLP 酶切比较进一步排除了假基因影响的可能。但要确认是否存在 Numts, 尚需进一步的研究。

通过 mtDNA 与 PCR 扩增片段的限制性酶切,得到了各个种的限制性酶切图谱。这不但为笛鲷类种的区分提供了大量的分子标记,同时也为进一步构建物理图谱、进化遗传学和育种研究打下了良好基础。

参考文献:

- [1] 牛屹东,李明,魏辅文,等. 线粒体 DNA 用作分子标记的可靠性和研究前景[J]. 遗传, 2001, 23(6): 593-598.
- [2] Castresana J. Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals[J]. Mol Biol Evol, 2001, 18, 465-471.
- [3] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes[J]. Pro Bio Sci, 2003, 270: 313-321.
- [4] Diethard T, Peter A, Minelli A, *et al.* A plea for DNA taxonomy[J]. Trends in Ecology and Evolution, 2003, 18(2): 70-74.
- [5] 祝茜. 中国海海洋鱼类种类名录[M]. 北京: 学苑出版社, 1998.
- [6] Chow S, Clarke M E, Walsh P J. PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification[J]. Fishery Bulletin US, 1993, 91: 619-627.
- [7] Gold J R, Sun F, Richardson L R. Population structure of red snapper from the Gulf of Mexico as inferred from analysis of mitochondrial DNA[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1997, 126: 386-396.
- [8] Heist E J, Gold J R. DNA microsatellite loci and genetic structure of red snapper in the Gulf of Mexico[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2000, 129(2): 469-475.
- [9] Santamaría A, Chavez E A. Fishery evaluation: *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) from Guerrero, Mexico[J]. Revista De Biología Tropical, 1999, 47(3): 571-580.
- [10] 曹伏君,李长玲,刘楚吾. 红鳍笛鲷、紫红笛鲷和白斑笛鲷的核型研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(11): 43-46.
- [11] 易乐飞,刘楚吾,吕立强. 约氏笛鲷自然群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国水产科学, 2002(9): 379-381.
- [12] 成庆泰,郑葆珊. 中国鱼类检索系统[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [13] 戴建华,殷文莉,杨代淑,等. 胡子鲶 mtDNA 多态性及限制性酶切图谱[J]. 水生生物学报, 1996, 20(2): 144-149.
- [14] Song C B, Near T J, Page J M. Phylogenetic relations among Percid fishes as inferred from mitochondrial cytochrome b DNA sequence data[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1998, 10: 343-353.
- [15] Taberlet P, Meyer A, Bouvet J. Unusually large mitochondrial variation in populations of the blue tit, *Parus caeruleus*[J]. Molecular Ecology, 1992, 1: 27-36.
- [16] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406-425.
- [18] Bensasson D, Zhang D X, Daniel L, *et al.* Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses[J]. Trends in Ecology and Evolution, 2001, 16(6): 314-321.
- [19] 任竹梅,马恩波,郭亚平. 蝗总科部分种类 *Cyt b* 基因序列及系统进化研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(4): 314-321.