

# 基于 mtDNA Cytb 序列分析养殖 与野生刀鲚群体的遗传多样性

魏广莲<sup>1</sup>, 徐钢春<sup>2</sup>, 顾若波<sup>2</sup>, 李建林<sup>2</sup>, 徐跑<sup>2\*</sup>

(1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心/农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

**摘要:** 为比较刀鲚(*Coilia nasus*)的人工养殖群体与野生群体的遗传结构差异,为刀鲚的种质资源保护和养殖业的可持续发展提供科学依据,应用线粒体 DNA 细胞色素 b 基因的序列分析法研究了灌江纳苗养殖刀鲚子三代(F<sub>3</sub>)、洄游刀鲚(长江野生群体)和湖鲚 3 个淡水生活环境下的群体遗传多样性。结果显示:刀鲚线粒体 DNA 细胞色素 b 基因大小为 1 141 bp;在 3 个群体 22 尾个体中,找到 12 种不同的单倍型,单倍型多态性(*h*)为 0.922,多态位点(*S*)为 18,其中单一多态位点 9 个,简约信息位点 9 个,核苷酸多样性( $\pi$ )为 0.004 1,平均核苷酸差异数(*K*)为 4.714,平均遗传距离为 0.004 2。洄游刀鲚和养殖刀鲚群体的核苷酸多样性、遗传距离都比湖鲚高,说明养殖刀鲚比湖鲚的遗传多样性要丰富,仍保持着较高的遗传多样性。

**关键词:** 刀鲚; 养殖群体; 野生群体; 细胞色素 b; 遗传多样性

中图分类号: S965.227 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)06-1216-06

## Studies on the Genetic Diversity of Farmed and Wild Populations of *Coilia nasus* by Analysing Mitochondrial DNA Cyt b genes

WEI Guang-lian<sup>1</sup>, XU Gang-chun<sup>2</sup>, GU Ruo-bo<sup>2</sup>,  
LI Jian-lin<sup>2</sup>, XU Pao<sup>2\*</sup>

(1. College of Fisheries, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China; 2. Key Open Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** To provide a system analysis of differences in genetic diversity, and scientific evidences of conservation of the germ plasm resources and industrialized artificial culture of *Coilia nasus*, the genetic diversity and genetic structure of *Coilia nasus* were assessed from three populations by using mitochondrial Cyt b sequences. The complete mitochondrial Cyt b gene sequence is 1141 bp. Twelve haplotypes were detected from the 22 individuals and the haplotype diversity (*h*) was 0.922. And 18 variation sites were defined, of which 9 were singleton polymorphic sites and the other 9 were parsimony informative polymorphic sites. The nucleotide diversity ( $\pi$ ) was 0.004 1, the average nucleotide difference (*K*) was 4.714 and the average genetic distance was 0.004 2. The result showed that genetic parameters and heredity diversities of farmed *Coilia nasus*

收稿日期: 2012-06-18 修回日期: 2012-07-12

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD26B05)、中央级公益性科研院所科研专项(2011JBFA17)、公益性行业科研专项(201203065)、江苏省水产三新工程重大项目(DZ2012-4)和江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2011411)

作者简介: 魏广莲(1987—),女,硕士生,主要从事水产遗传育种和养殖技术研究, E-mail: w593501773@163.com;

\* 通讯作者: 徐跑, 研究员, 博士生导师, E-mail: xup@ffrc.cn。

and wild *Coilia nasus* were higher than those of *Coilia nasus taihuensis*, which meant farmed *Coilia nasus* populations still had a high genetic diversity.

**Key words:** *Coilia nasus*; farmed population; wild population; Cyt b; genetic diversity

刀鲚(*Coilia nasus*) 隶属鲱形目(Clupeiformes) 鲹科(Engraulidae) 鲚属(*Coilia*) ,俗称刀鱼,在我国主要分布于黄渤海和东海一带,沿岸各通海江河如长江、钱塘江、黄河、淮河、辽河等均有分布<sup>[1-2]</sup>,以长江流域产量高而集中。刀鲚以脂肪丰满,肉质细嫩鲜美而著称,是享有“长江三鲜”美誉之一的名贵洄游性鱼类。但是,自20世纪70年代以来,由于我国水体受到污染和水文条件的改变,产卵场遭到破坏,特别是每年清明前后不断攀升的刀鲚市场需求导致其捕获季节一再提前、捕捞强度不断提高,在如此酷渔滥捕与生态环境恶化的双重重压下,刀鲚资源急剧衰退、种质退化,已不能形成渔汛<sup>[3-4]</sup>。近年来,经过刀鲚灌江纳苗<sup>[5]</sup>、幼鱼采捕<sup>[6]</sup>的成功实施后,人工繁殖试验也已取得成功,刀鲚的池塘养殖正逐步成为新兴的产业。

迄今,有关刀鲚的研究主要集中在资源调查评估<sup>[2,7-9]</sup>、洄游生理生态学<sup>[10-11]</sup>及繁殖生物学<sup>[12-13]</sup>等方面,涉及刀鲚群体遗传学方面的研究仅见长江洄游群体与湖泊定居型群体(湖鲚)的形态及遗传特性差异分析<sup>[14-16]</sup>。随着刀鲚人工养殖规模的扩大,如何合理地进行种群数量的补充、人工选育及增殖放流,还需对刀鲚养殖群体和野生群体的遗传多样性和种质资源状况进行深入研究,从而促进刀鲚的种质资源保护和人工养殖的可持续发展。

细胞色素 b(cytochrome b, Cyt b) 基因的结构和功能在 mtDNA 的 13 个蛋白质编码基因中被了解得最为清楚,且进化速度适中,因此,被广泛运用于鱼类种群遗传结构与遗传多样性研究<sup>[17-19]</sup>。本文以灌江纳苗子三代,即在池塘繁育、养殖完全没有与野生群体基因交流的养殖刀鲚群体,长江洄游刀鲚和湖泊定居的湖鲚为实验材料,对它们的细胞色素 b 基因遗传变异进行了分析,旨在从分子水平上探讨养殖群体和野生群体的遗传差异,为刀鲚种质资源的保护和可持续利用、有效地开展刀鲚遗传育种研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料及来源

供研究所用的养殖刀鲚 11 尾,于 2010 年 8 月采集于中国水产科学研究院长江鲜养殖基地,是 2004 年灌江纳苗养殖并繁育的子三代,体质量为 22.1~43.8 g,平均为 36.9 g,雌雄数量比为 1:1;长江洄游刀鲚 4 尾,于 2010 年 6 月采集于长江安庆段,体质量为 18.4~30.2 g,平均为 22.4 g,雌雄数量比为 1:1;湖鲚 7 尾,于 2010 年 9 月采集于太湖梅梁湾段,体质量为 23.2~40.1 g,平均为 36.4 g,雌雄数量比为 1:2。每尾鱼剪取少许肌肉分别放入 eppendorf 管,于 -20 °C 保存。

### 1.2 DNA 提取

将样本的背部肌肉剪碎,分别放入 1.5 mL eppendorf 管,加入 470  $\mu$ L SET 缓冲液,再依次加入 12.5  $\mu$ L 20% SDS 和 10  $\mu$ L(10 mg/mL) 蛋白酶 K,混合后在 55 °C 水浴中消化过夜,再分别用饱和酚、酚氯仿、氯仿/异戊醇抽提除蛋白,最后用预冷的无水乙醇沉淀 DNA,烘干后用 TE 溶解。所得基因组 DNA 样品用紫外分光光度计测量 DNA 样品的浓度和纯度,同时辅于琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性并估测分子量。将 DNA 原样稀释至 50 ng/ $\mu$ L,4 °C 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增及测序

使用两个通用引物 L14724 和 H15915<sup>[20]</sup> 扩增 Cyt b 基因,引物序列为: L14724,5'-GACTT-GAAAAACCACCGTTG-3'; 和 H15915,5'-CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC-3'。扩增反应混合物总体积 25  $\mu$ L,包括以下成分:DNA 模板 50~100 ng,10 $\times$  reaction buffer 2.5  $\mu$ L,200  $\mu$ mol/L dNTP,引物各 0.2  $\mu$ mol/L, *Taq* 酶 1 U,无菌重蒸水补足体积。PCR 扩增程序为:94 °C 变性 3 min;94 °C 30 s,52 °C 1 min,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 8 min。PCR 产物用 14 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,并拍照记录。目标扩增产物回收纯化后,由中部向两端进行双向测序(上海博尚生物有限公司),以保证其测序的准确性。测序引物为:正向 5'-GCGGATTCTCCGTAGACAAC-3',反向 5'-GTAAAATTGTCTGGGTCTCC-3'。

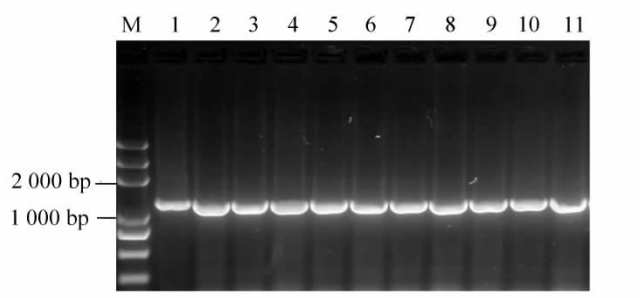
### 1.4 数据处理

序列用 Clustal W( 1.83) 软件<sup>[21]</sup> 分析比对; 利用 DnaSP( version 4.0) 软件<sup>[22]</sup> 统计单倍型及变异位点 ( S)、计算单倍型多样性( *h*)、核苷酸多样性(  $\pi$ ) 及平均核苷酸差异数( *K*)。用 MEGA( version 3.0) 软件<sup>[23]</sup> 中的 Kimura 双参数法计算各单倍型间的遗传距离; 采用 NJ( Neighbor - joining) 法 ,Bootstrap 置信值估算重复次数 1 000 次 ,对基因序列数据进行系统分析。

## 2 结 果

### 2.1 扩增结果和序列分析

洄游刀鲚、养殖刀鲚和湖鲚的 Cyt b 基因均能被清晰稳定地扩增( 图 1) ,从图可以看出 ,PCR 产物长度在 1 200 bp 左右。PCR 产物经回收后送测序 ,测出的序列根据 GenBank 中已有的刀鲚的 mtDNA Cyt b 序列( 登录号为 NC\_009579) 进行经 Clastal X 比对 ,结果表明同源性都高达 99% ,确定所得序列为 mtDNA Cyt b 区序列。测序结果经校正、除去多余序列 ,所得的 22 尾个体的 Cyt b 序列全长均为 1 141 bp。



M: DL 2 000  
图 1 Cyt b 基因 PCR 产物电泳图( 养殖刀鲚)  
Fig. 1 Electrophoresis map of Cyt b gene PCR products ( farmed *C. nasus*)

序列分析结果表明 ,3 个群体细胞色素 b 基因片段的 A、C、G、T 碱基组成分别为 30.6%、27.9%、14.4%、27.1%。其中 ,A 和 T 碱基组成 58.5% ,大于 C + G 的含量 41.5%。从碱基组成( 表 1) 可以看出 ,细胞色素 b 表现出很强的碱基组成偏向性 ,即在 A、C、G、T 4 种碱基中 ,G 的含量明显低于其它 3 种碱基的含量。

表 1 刀鲚 3 个群体 Cyt b 碱基组成比例

Tab.1 The Nucleotide Frequencies of Cyt b gene from three populations %

群体 Population	碱基 Base			
	A	G	C	T
洄游刀鲚 migratory <i>C. nasus</i>	30.73	14.50	27.00	27.78
养殖刀鲚 farmed <i>C. nasus</i>	30.63	14.30	27.05	28.04
湖鲚 <i>C. nasus taihuensis</i>	30.67	14.50	27.03	27.83

### 2.2 遗传多态性和遗传差异性的分析

通过序列比对 ,在 3 个群体 22 个个体中 ,共检测到变异位点( S) 为 18 个 ,占全部序列的 1.58% ,其中单一多态位点 9 个 ,简约信息位点 9 个( 表 2) 。共检测到 12 种不同的单倍型 ,单倍型多态性( *h*) 为 0.922。核苷酸多样性(  $\pi$ ) 为 0.004 1 ,平均核苷酸差异数( *K*) 为 4.714 ,个体间的 Kumar 遗传距离在 0.000 0 ~ 0.009 7 ,平均遗传距离为 0.004 2。洄游刀鲚、养殖刀鲚和湖鲚各群体的 Cyt b 基因的单倍型数、单倍型多态性、序列的变异位点等遗传多样性参数如表 3 所示。从表中可以看出 ,刀鲚的洄游和养殖群体的核苷酸多样性和 Kumar 遗传距都比湖鲚要高 ,其它参数则差异较小。3 个群体间的平均遗传距离如表 4 所示 ,养殖刀鲚与洄游刀鲚和湖鲚的遗传距较大 ,而洄游刀鲚与湖鲚的遗传距很小。

### 2.3 分子系统树

以鲢科鲢属的 *Engraulis japonicus* 和 *Engraulis encrasicolus* 为外群 ,并以凤鲚和刀鲚的 mtDNA Cytb 区序列( 登录号分别为 HM\_219220 和 NC\_009579) 为参考 ,采用 MEGA 3.1 软件进行分析 ,系统树分支的置信度采用自引导法( bootstrap analysis ,BP) 重复检测( 图 2) ,设置为 1 000 次重复。结果显示 ,凤鲚和洄游刀鲚、养殖刀鲚、湖鲚明显分为 2 支 ,养殖刀鲚、洄游刀鲚和湖鲚一起组成的单系群体中的 2 个小分支。

表 2 刀鲚 3 个群体线粒体 DNA Cyt b 基因变异位点分布

Tab. 2 Variation sites of Cyt b gene of mitochondrial DNA from three populations

变异位点	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Variationsite	0	0	0	0	1	1	2	4	4	4	5	8	9	0	0	1	1	1
	1	4	4	7	6	8	0	1	3	6	2	5	8	4	6	1	2	3
	4	5	9	1	1	8	3	3	6	4	1	7	9	3	7	2	3	2
009579 - 1	C	C	G	G	A	T	C	G	G	A	G	A	G	A	T	T	T	G
cy29	T	.	.	.	G	.	T	A	.	.	A	.	T	G	.	.	.	.
cy6	T	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
cy7	T	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
cy16	T	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
cy17	T	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
cy21	T	.	.	A	G	.	T	A	.	.	A	.	.	G	.	.	.	.
cy31	T	.	.	A	G	C	T	A	.	.	A	.	.	G	.	.	.	.
cy36	T	T	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	T
cy40	T	.	.	.	G	.	T	.	T	.	.	.	.	G	.	.	.	.
cy44	T	.	.	A	G	.	T	A	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
cy45	T	.	.	A	G	.	T	A	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
hj20	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
hj23	.	.	.	.	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
hj24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
hj25	.	.	.	.	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
hj27	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
hj28	.	.	.	.	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
hj29	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ys17	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ys18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
ys20	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ys22	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	A	.

cy: 养殖刀鲚; hj: 湖鲚; ys: 洄游刀鲚。

cy: farmed *C. nasus*; hj: *C. nasus taihuensis*; ys: migratory *C. nasus*.

表 3 刀鲚 3 个群体遗传多样性参数

Tab. 3 Populational genetic diversity in three populations

参数 Parameter	洄游刀鲚 Migratory <i>C. nasus</i>	养殖群体 Farmed <i>C. nasus</i>	湖鲚 <i>C. nasus taihuensis</i>
样本数 Number of samples ( n )	4	11	7
单倍型数 Number of haplotype ( h )	3	6	4
多态位点数( 单一多态位点 / 简约信息位点 ) Number of variable sites ( S ) ( singleton polymorphic sites / parsimony informative polymorphic sites. )	5 ( 5 / 0 )	8 ( 5 / 3 )	3 ( 1 / 2 )
单倍型多态性指数 Haplotype diversity ( Hd )	0. 833	0. 836	0. 813
核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity ( $\pi$ )	0. 002 2	0. 002 2	0. 001 2
平均核苷酸差异数 Average nucleotide difference ( K )	2. 500	2. 509	2. 509
Kumar 遗传距离 Kumar genetic distance	0. 000 0 ~ 0. 004 4	0. 000 0 ~ 0. 004 4	0. 000 0 ~ 0. 002 6

### 3 讨 论

线粒体 DNA 是核外 DNA ,由于它具有分子结构简单、母系遗传、进化速率快、缺少重组等特点 ,已成为群体遗传结构、地理变异、系统发育及物种分化研究等领域的有效分子标记。Cyt b 基因是线粒体 DNA 上结构、功能、进化动力学以及蛋白质产物的生物化学特性较为清楚的基因<sup>[24]</sup>。通过 Cyt b 基因分子标记可以检测到近缘种或种群更多的遗传变异信息 ,可以更真实的反应两者的差异。从本实验测定的 3 个刀鲚群体的细胞色素 b 长 1 141 bp 的序列中共检测出 18 个变异位点( S ) ,占全部序列的 1.58% ,共定义了 12 个单倍型 ,显示出很高的遗传多样性。

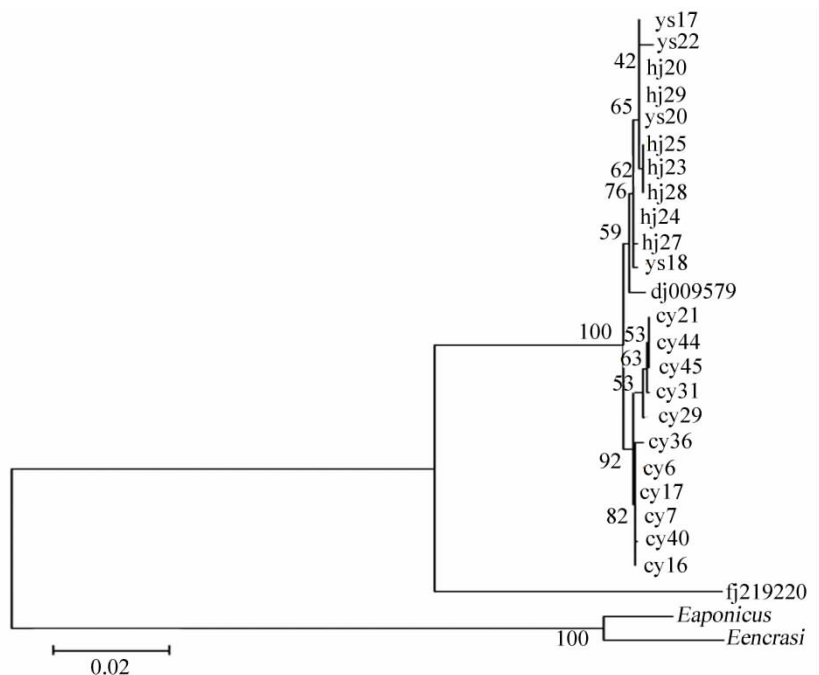
核苷酸多样性(  $\pi$  ) 是表示每个群体内各个单倍型的两两配对差异的平均值 ,是一个群体的遗传多样性指标。程起群<sup>[16]</sup>、葛家春<sup>[25]</sup> 和 马春艳等<sup>[26]</sup> 通过扩增片段长度多态性发现 ,刀鲚群体的遗传多样性比较丰富。本实验中 ,洄游刀鲚、养殖刀鲚( 灌江纳苗子三代 )、湖鲚的核苷酸多样性(  $\pi$  ) 分别是 0.002 2、0.002 2 和 0.001 2。湖鲚是长时期陆封型刀鲚群体<sup>[16]</sup> ,由奠基者效应( Founder effect ) 等因素的影响 ,其遗传多样性水平应低于刀鲚 ,结果正好与此相符合。一般来说 ,养殖群体的核苷酸多样性应该小于或等于洄游群体的核苷酸多样性。但是 ,养殖刀鲚( F<sub>3</sub> 代 ) 的核苷酸多样性却与洄游刀鲚相等 ,原因可能是养殖群体育苗过程中有效亲本数量较多 ,减少了群体奠基者效应的影响 ,从而使养殖群体的遗传多样性与洄游的相当 ,这也与形态学聚类分析结果相吻合。一般认为由于人工繁殖过程中影响群体遗传多样性的瓶颈效应、遗传漂变和近亲杂交等因素 ,养殖群体的遗传多样性可能会下降 ,本研究结果表明养殖群体( F<sub>3</sub> 代 ) 的遗传多样性并没有下降。

分子系统树显示 ,几种鲚鱼聚类成 2 大分枝 : 洄游刀鲚、养殖刀鲚和湖鲚一起聚在 1 大分支上 和它们同属的另一物种凤鲚聚在另 1 大支 ,说明洄游刀鲚、养殖刀鲚和湖鲚 3 个种群不能独立构成单系群 ,没有达到亚种的分化 ,这与唐文乔等<sup>[29]</sup> 的研究结果相似。说明湖鲚为刀鲚的淡水生态型种群 ,非有效物种。邻接法构建的系统发育树还揭示 ,刀鲚具有较强的环境适应能力<sup>[2,7,12,27]</sup> ,而环境易造成某些形态性状的变异。Billington 等<sup>[28]</sup> 报道鱼类种内遗传距离一般在 10% 以内 ,对其他一些动物的 Cyt b 基因系列分析表明 ,种内个体间的系列差异一般在 0~4.06% ,差异超过 6% 的个体间已有明显的亚种或者种的分化<sup>[25,29]</sup> ,而本实验中洄游刀鲚与养殖刀鲚的平均遗传距离为 0.65%、与湖鲚的平均遗传距离是 0.17% ,养殖刀鲚与湖鲚的平均遗传距离是 0.61%。由此可见 3 个种群远未达到亚种的分化。同时也

表 4 刀鲚 3 个群体的平均遗传距离

Tab.4 The average genetic distance among three populations

群体 Population	养殖刀鲚 Farmed <i>C. nasus</i>	湖鲚 <i>C. nasus taihuensis</i>
湖鲚 <i>C. nasus taihuensis</i>	0.006 1	
洄游刀鲚 Migratory <i>C. nasus</i>	0.006 5	0.001 7



cy: 养殖刀鲚 hj: 湖鲚 ys: 洄游刀鲚 fj: 凤鲚。

cy: farmed *C. nasus*; hj: *C. nasus taihuensis*; ys: migratory *C. nasus*; fj: *Coilia mystus*。

图 2 基于 Cyt b 序列构建的几种鲚属鱼类的邻接树

Fig.2 Molecular phylogenetic tree based on the Cyt b sequences constructed by NJ method

表明,湖鲚与洄游刀鲚之间仍然存在基因的交流,与程起群<sup>[16]</sup>的研究结果一致。

由于野生刀鲚资源量大幅度下降,群体遗传多样性严重破坏,所以,人工养殖成为一种新的保护刀鲚资源的有效方法,刀鲚灌江纳苗、人工繁殖及池塘养殖关键技术的突破<sup>[30-31]</sup>改变了以往刀鲚研究大都停留在基础性、理论性层面的现状,而直接转变为现实生产力,将根本扭转长江刀鲚资源锐减局面,并发展成为一个崭新的养殖产业。本研究只是在分子水平上初步探索养殖刀鲚的遗传变化情况,刀鲚不同群体的遗传分化程度,应进一步综合运用多种分子标记,包括线粒体上的其他标记,以及细胞核上的分子标记,同时把线粒体 DNA 和核 DNA,如 RAPD、RFLP、SSR 等结合起来进行研究,以得出更全面、客观的结论,从而为刀鲚资源管理和合理开发利用提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] Whitehead P J P. FAO species catalogue[M]. Rome: United Nations Development Programmer, 1985: 470-471.
- [2] 张莹莹, 徐东坡, 刘凯, 等. 长江下游刀鲚生物学及最大持续产量研究[J]. 长江流域资源与环境, 2005, 14(6): 694-698.
- [3] Shi D, Gong D. Strategies of resource conservation for *Coilia ectenes* in the Yangtze Estuary[J]. Marine Science, 2003, 25: 96-97.
- [4] Li Y X, Xie S G, Li Z J, et al. Gonad development of an anadromous fish *Coilia ectenes* (Engraulidae) in lower reach of Yangtze River, China[J]. Fisheries Science, 2007, 73(6): 1224-1230.
- [5] 张呈祥, 郑金良. 长江刀鲚灌江纳苗与养殖[J]. 科学养鱼, 2006, 7: 26.
- [6] 沈林宏, 戴玉红, 顾树信, 等. 长江刀鲚幼鱼的采集与运输技术研究[J]. 水产养殖, 2011(5): 4-6.
- [7] 袁传忠. 长江中下游刀鲚资源和种群组成变动状况及其原因[J]. 动物学杂志, 1988(3): 12-15.
- [8] Haacke C, Hess M, Melzer R R, et al. Fine structure and development of the retina of the grenadier anchovy *Coilia nasus* (Engraulidae, Clupeiformes) [J]. Journal of Morphology, 2001, 248: 41-55.
- [9] 黄仁术. 刀鲚的生物学特性及资源现状与保护对策[J]. 水利渔业, 2005, 25(2): 33-34.
- [10] 长江水产研究所资源捕捞研究室, 南京大学生物系鱼类研究组. 刀鲚的生殖洄游[J]. 淡水渔业, 1977, 6: 19-24.
- [11] Yang J, Arai T, Liu H, et al. Reconstructing habitat use of *Coilia mystus* and *Coilia ectenes* of the Yangtze River estuary, and of *Coilia ectenes* of Taihu Lake, based on otolith strontium and calcium[J]. Journal of Fish Biology, 2006, 69: 1120-1135.
- [12] 朱栋良. 长江刀鲚的天然繁殖与胚胎发育观察[J]. 水产科技情报, 1992, 19(2): 49-51.
- [13] 何为, 李家乐. 长江刀鲚性腺发育规律的研究[J]. 水产学报, 2006, 30(6): 773-777.
- [14] Cheng Q Q, Lu D R, Ma L. Morphological differences between close populations discernible by multivariate analysis: a case study of genus *Coilia* (Teleostei: Clupeiformes) [J]. Aquatic Living Resources, 2005, 18: 187-192.
- [15] Cheng Q Q, Lu D R. PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene does not support *Coilia ectenes* taihuensis being a subspecies of *Coilia ectenes* [J]. Journal of Genetics, 2005, 84(3): 307-310.
- [16] 程起群, 温俊娥, 王云龙. 刀鲚与湖鲚线粒体细胞色素 b 基因片段多态性及遗传关系[J]. 湖泊科学, 2006, 18(4): 425-430.
- [17] Bennetts R Q, Grady J M, Rohde F C, et al. Discordant patterns of morphological and molecular change in broadtail mad-toms (genus *Noturus*) [J]. Mol Ecol, 1999, 8: 1563-1569.
- [18] Mcveigh H P, Davidson W S. A salmonid phylogeny inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences [J]. Fish Biol, 1991, 39(suppl): 277-282.
- [19] Cantatore P, Roberti M, Pesole G. Evolutionary analysis of cytochrome b sequence in some perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals [J]. Mol Evol, 1994, 39: 589-597.
- [20] Xiao W H, Zhang Y P, Liu H Z. Molecular systematics of xenocyprinidae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomic, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 18: 163-173.
- [21] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [22] Rozas J, Smeznik - DelBarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymerism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2006, 19(18): 2496-2497.
- [23] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA<sub>3</sub>: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Brief Bioinform, 2004, 5(2): 150-163.

(下转第 1244 页)

## 参考文献:

- [1]秦玉青,应杰,吴昊,等. 乳酸和柠檬酸在酸型含乳饮品中的应用[J]. 乳品科学与技术, 2004, 107(2): 65-67.
- [2]陈奇. 防止酸性蛋白沉淀的方法[J]. 食品工业科技, 2001, 22(1): 47-50.
- [3]姚晶,孟祥晨. 羧甲基纤维素钠及酸性乳饮品加工工艺对其稳定性及粒径分布的影响[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(7): 40-43.
- [4]杜伯桥. 羧甲基纤维素钠溶液的流变性质及其对酸性乳体系的稳定作用[D]. 上海: 上海交通大学, 2008: 120.
- [5]徐伟,马力. 高甲氧基果胶对酸奶饮品的稳定作用[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(8): 38-40.
- [6]张学兵. 水溶性大豆多糖的提取及其在酸性乳饮品中的应用研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009: 4.
- [7]崔岩,马鹏,王联结. 酪蛋白在酸性条件下稳定性的研究[J]. 食品科技, 2007, 9: 170-172.
- [8]吕长鑫,赵大军,宋立. 活菌型山楂乳酸菌功能饮品生产工艺及稳定性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 484-487.
- [9]Lucey J A. Formation and physical properties of milk protein gels[J]. Journal of Dairy Science, 2002(85): 281-294.

## (上接第 1221 页)

- [24]Iwin D W, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals[J]. Mol Evol, 1991, 32: 128-144.
- [25]葛家春,曹延,陈婵娟,等. 利用扩增片段长度多态性技术分析长江刀鲚的遗传多样性[J]. 南京大学学报, 2008, 44(3): 333-337.
- [26]马春艳,刘敏,马凌波. 长江口刀鲚遗传多样性扩增多态 DNA(RAPD)分析[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(5): 20-24.
- [27]唐文乔,胡雪莲,杨金权. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲚和湖鲚的物种有效性[J]. 生物多样性, 2007, 15(3): 224-231.
- [28]Billing ton N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1991, 48: 80-94.
- [29]Stephen J, O'Brien, Ernst Mayr. Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies[J]. Science, 1991, 251: 187-188.
- [30]徐钢春,徐跑,顾若波,等. 池养刀鲚(*Coilia nasus*)鱼种的摄食与生长[J]. 生态学杂志, 2011, 30(9): 2014-2018.
- [31]徐钢春,万金娟,顾若波,等. 池塘养殖刀鲚卵巢发育的形态及组织学研究[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 537-546.