

# 北江大刺鳅(*Mastacembelus armatus*)的核型分析及 线粒体 Cyt *b* 基因和 D-loop 的遗传多样性\*

李 芬 陈绮萍 何佩莹 黄小琪 陈忠凯 周惠强 钟东明 舒 琥

(广州大学生命科学学院 广州 510006)

**摘要** 采用胸腔注射植物凝集素(PHA)、秋水仙素,以大刺鳅(*Mastacembelus armatus*)头肾组织为材料,低渗处理,空气干燥法进行染色体标本制备,分析其染色体核型。结果显示:大刺鳅的二倍体染色体数目为  $2n=48$ ,其核型公式为  $2n=14m+34t$ ,  $NF=62$ 。对 24 尾大刺鳅线粒体 Cyt *b* 基因和 D-loop 序列进行测序分析,结果表明:(1)大刺鳅 Cyt *b* 基因、D-loop 序列长度分别为 1438bp、895bp,两个基因的单倍型多样性分别为 0.656 和 0.541,核苷酸多样性分别为 0.00539 和 0.00817,平均核苷酸差异数分别为 5.938 和 6.805,说明该种群的遗传多样性丰富。(2)两个基因的每个个体的遗传距离分别为 0.000—0.018 和 0.000—0.026,说明该种群个体间的遗传距离小。(3)中性检验的 Tajima's *D* 检验及 Fu's *F<sub>s</sub>* 检验的结果说明该种群没有发生过扩张。结果说明北江大刺鳅的遗传多样性水平较高,可用于人工繁育。

**关键词** 大刺鳅;核型;Cyt *b* 基因;D-loop;遗传多样性

**中图分类号** Q953;S965 doi: 10.11693/hyhz20181100275

大刺鳅(*Mastacembelus armatus*)属合鳃目、刺鳅科、刺鳅属,俗称辣锥、石锥等,分布于非洲、东南亚国家及我国长江以南的各水系,栖息于砾石底的江河溪流中,常藏匿于石缝或洞穴中,以小型无脊椎动物和部分植物为食(Nelson, 2006)。大刺鳅作为重要的经济鱼类,其营养丰富(伍远安等, 2010)、味道鲜美,深受消费者喜欢。因水质污染及过度捕捞,大刺鳅野生资源遭受严重损害,为保护该物种,大刺鳅被广东、福建、贵州、湖南等地列入重点保护的野生水生动物。目前国内对大刺鳅的研究相对较少,主要集中在大刺鳅的繁殖、营养、种群遗传及亲缘地理的研究(王方等, 2012; 曾庆祥等, 2016; 樊海平等, 2018),本课题组在对大刺鳅野生群体的形态性状、遗传多样性以及大刺鳅微卫星标记开发和筛选方面进行了研究(杨华强等, 2016; 舒琥等, 2017; 房祖业等, 2018),但对大刺鳅的遗传多样性的丰富度研究还较少,对其

染色体核型分析尚未见报道。

染色体是遗传物质的主要载体,是研究物种演化、分类必不可少的重要手段。利用染色体组型分析比较,对于探讨其系统演化、杂交育种、多倍体育种以及原位杂交、基因定位等研究具有重要作用(成美玲等, 2018)。

线粒体 DNA(mtDNA)具核苷酸替代率高、进化快、核苷酸数少、母系遗传等特点,在鱼类遗传多样性和系统发育的研究中应用广泛(Lynch *et al*, 1990; 郭立等, 2011)。线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 是研究应用比较广泛的序列,可以从不同角度揭示鱼类种群遗传变异及多样性的特点,适用于群体水平的多样性分析(于旭蓉等, 2011)。

本文从细胞学和线粒体 DNA 分子水平对北江野生大刺鳅的遗传多样性进行了分析,探讨大刺鳅的种群遗传结构以及遗传多样性,旨在为开展大刺鳅的种质资源的保护与开发利用提供科学依据。

\* 中国-东盟海上合作基金项目, 2018.01—2020.12; 国家公益性行业(农业)重大专项, 201303048 号; 广东省海洋渔业科技攻关与研发项目, A201601A05 号, 2017A0007 号; 广州大学第十六届“挑战杯”立项项目。李 芬, E-mail: 3507695202@qq.com

通信作者: 舒 琥, 博士, 教授, E-mail: shuhu001@126.com

收稿日期: 2018-11-16, 收修改稿日期: 2018-12-20

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用鱼 33 尾大刺鳅(*Mastacembelus armatus*) 采自北江仁化、英德流域, 平均体质量为 39.37g, 平均体长为 18.90cm, 其中 9 尾(5 雌 4 雄)用于核型分析, 暂养于实验室鱼缸内; 余下 24 尾, 取适量的背部肌肉和尾鳍置于 2mL 离心管中, 用无水乙醇固定, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 1.2 染色体标本制备及核型分析

参照舒琰等(2010)等 PHA 注射法, 稍作改良进行大刺鳅的染色体标本制备实验。选取 100 个分散较好的来自不同个体的中期分裂相细胞, 利用(Olympus-BX51 显微镜对其进行观察统计, 选取约 10 个较好的中期分裂相, 拍摄, 放大、测量每一条染色体参数并计算其臂比值和相对长度, 按照 Levan 等(1964)提出的标准进行配对和分类排列。

### 1.3 DNA 提取、扩增及测序

采用上海生物工程公司(上海生工)提供的 DNA 提取试剂盒, 按试剂盒的操作步骤进行总 DNA 的提取。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量和纯度, 保存于  $-20^{\circ}\text{C}$ , 备用。PCR 扩增引物由上海生工合成, Cyt *b* 基因引物序列分别为 MaCyt *b*-F: 5'-CCA CCGTTGTTATTCAACTACAAGA-3'和 MaCyt *b*-R: 5'-GCTCTGGCGCTGAGCTATC-3'; D-loop 引物序列分别为 MaD-loopF: 5'-TTAACTTCC GCCCTAACTCC-3'和 MaD-loopR: 5'-GGGCCCAT TTAAACATCTTCAGTG-3'。PCR 反应体系按照刘伟等(2016)所采用的体系进行。Cyt *b* 基因扩增反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 2min 后, 再进行 35 个循环, 每一循环包括:  $94^{\circ}\text{C}$  变性 45s,  $58^{\circ}\text{C}$  退火 45s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 72s; 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10min。D-loop 基因扩增  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 2min, 其余反应条件参照吕凤义等(2008)。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳跑胶, 观察, 拍照, 送上海美吉生物医药科技有限公司进行序列检测。

### 1.4 数据处理

测序成功后使用 SeqMan II、ClustalX2.0 软件对序列进行拼接和人工比对, 应用 DNASP5.10 和 MEGA5.05 软件对两个线粒体基因(Cyt *b* 和 D-loop)序列的多肽位点、遗传多样性参数(单倍型数(Number of Haplotypes, *h*)、单倍型多样性(Haplotype (gene) diversity, Hd)、核苷酸多样性(Nucleotide diversity, Pi)、平均核苷酸差异数(Average number of nucleotide

differences, *k*)、种群大小变动、核酸组成和遗传距离等进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 大刺鳅染色体核型分析

选取 100 个分散充分的来自不同个体的中期分裂相进行观察统计, 结果见表 1。北江大刺鳅的中期分裂相染色体数目为 48 条, 占分裂相总数的 50.0%, 由此可以判断大刺鳅的染色体众数为 48。通过核型分析可知, 在大刺鳅的 24 对染色体中, 中着丝粒染色体(m)7 对; 端着丝粒染色体(t)17 对, 大刺鳅的染色体核型为  $2n=14m+34t$ , 臂数:  $NF=62$  (表 2), 无异形性染色体, 次缢痕、随体等。北江大刺鳅的中期分裂相和染色体核型见图 1。

### 2.2 大刺鳅线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 的序列信息及其遗传多样性分析

#### 2.2.1 线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 的碱基序列组成分析

Cyt *b* 基因序列长度为 1438bp, 出现 4 个单一信息位点、17 个简约信息位点。A、T、C、G 的平均含量分别为 24.97%、28.46%、32.75%、13.82%, 其中 A+T 的含量(53.43%)比 G+C 的含量高(46.57%)(表 3), 符合动物 Cyt *b* 的特征, 并与其他鱼类的碱基组成比例相似(沈朕等, 2017)。

D-loop 基因序列长度为 895bp, 出现 6 个单一信息位点、18 个简约信息位点。A、T、C、G 的平均含量分别为 31.90%、35.25%、19.64%和 13.21%, 其中 A+T 的含量(67.15%)显著高于 G+C 的含量(32.85%), 符合大多数脊椎动物线粒体 DNA 的特点。

表 1 大刺鳅的染色体数目统计  
Tab.1 The number of *M. armatus* chromosome

染色体数	细胞数	出现频率(%)
<41	24	24.0
42—43	14	14.0
44—45	10	10.0
46—47	1	1.0
48	50	50.0
>49	1	1.0

#### 2.2.2 遗传多样性分析

大刺鳅遗传多样性的参数指标由 DNASP5.10 和 MEGA5.05 软件处理得出, 遗传多样性各个方面的体现由不同的线粒体基因(如 Cyt *b* 和 D-loop)片段决定。

基于 Cyt *b* 基因, 北江大刺鳅种群平均核苷酸差异数(*k*)、单倍型多样性指数(Hd)和核苷酸多样性指数

(Pi)分别为 5.938、0.6560 和 0.0539(表 4)。

基于 D-loop, 北江大刺鳅种群平均核苷酸差异数(*k*)、单倍型多样性指数(Hd)和核苷酸多样性指数(Pi)分别为 6.805、0.541、0.00817 和(表 4)。

**2.2.3 遗传距离分析** 将线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 基因序列分别按照单倍型类型进行分组, 每个单倍型保留一个序列, 重新整理数据, 然后使用 MEGA5.05 软件进行分析, 经过数据处理后得到此两种基因序列中各单倍型间的遗传距离。

在 Cyt *b* 基因中, 实验所用 24 个个体的总平均遗传距离为 0.005, 该 8 个单倍体间的遗传距离范围在 0.000—0.018 间, 单倍体间的遗传距离结果见表 5。

在 D-loop 基因中, 实验所用 22 个个体的总平均遗传距离为 0.008, 该 7 个单倍体间的遗传距离范围在 0.000—0.026 间, 单倍体间的遗传距离结果见表 6。

表 2 大刺鳅染色体的相对长度和臂比  
Tab.2 The relative length and arm ratio of *M. armatus* chromosome

编号	相对长度	臂比	类型
1	6.47±0.20	1.27±0.09	m
2	6.11±0.25	1.14±0.05	m
3	5.91±0.15	1.13±0.08	m
4	5.78±0.18	1.32±0.07	m
5	5.63±0.03	1.17±0.03	m
6	5.43±0.13	1.28±0.14	m
7	5.27±0.08	1.41±0.08	m
8	4.36±0.33	∞	t
9	4.13±0.00	∞	t
10	4.10±0.48	∞	t
11	3.90±0.28	∞	t
12	3.80±0.08	∞	t
13	3.59±0.18	∞	t
14	3.54±0.08	∞	t
15	3.52±0.31	∞	t
16	3.41±0.25	∞	t
17	3.41±0.10	∞	t
18	3.41±0.10	∞	t
19	3.41±0.05	∞	t
20	3.21±0.41	∞	t
21	3.13±0.03	∞	t
22	2.98±0.03	∞	t
23	2.80±0.31	∞	t
24	2.68±0.03	∞	t

该群体的单倍体间的遗传距离未能达到划分亚种和种的范围(亚种范围是 0.02—0.20, 种范围是 0.05—0.30), 该划分依据由 Shaklee 等(1982)等提出。实验结果显示该群体的个体间基本没有发生遗传分化, 其遗传差异不显著。

**2.2.4 种群的中性检验** 两个线粒体基因(Cyt *b* 和 D-loop)的 Tajima's D 检验和 Fu's F<sub>s</sub> 检验结果由 DNASP5.05 软件处理数据后分析, 结果表明, 大刺鳅细胞色素 *b* 序列的 Tajima's D 值和 Fu's F<sub>s</sub> 值都为正值, *P* 值均不显著(*P*<0.05 表示显著), 由此说明该种群大小并未经历过明显种群扩张; D-Loop 序列的 Tajima's D 值和 Fu's F<sub>s</sub> 值也都为正值, 而且 *P* 值都不显著(*P*<0.05 表示显著), 由此说明该种群没有发生明显的扩张(表 7)。

### 3 讨论

#### 3.1 北江大刺鳅核型分析

染色体作为遗传物质的主要载体, 对其进行核型分析研究, 能够了解生物的遗传组成、变异规律以及生物的发育机理, 推测和鉴别种间杂交和多倍体育种, 为了解性别遗传的基本原理和基因组数、物种的进化起源以及种族关系的鉴别提供了重要的参考依据(吴仲庆, 1998)。

由本实验结果可知, 大刺鳅的二倍体染色体数目为  $2n=48$ , 核型为  $2n=14m+34t$ , 与武汉大学生物系细胞遗传实验室所做的研究结果  $2n=48t$  (生物系细胞遗传学实验室, 1985)一致, 但在染色体形态方面存在差异, 本文结果得出大刺鳅核型多数是端部着丝粒染色体, 少数是中部着丝粒染色体, 但均未出现异形性染色体及有特殊标志性特征的染色体。两者的差异可能是由于不同地理种群所表现出的染色体多态性, 前者样本来自 33 年前的广西, 本文样本来自广东北江流域的仁化、英德; 也可能是不同研究者的实验方法不同以及测量误差所致。在特定分类阶元中, 染色体数目多的(多倍体除外)具有较多端部着丝粒染色体的鱼类应是较原始的类型, 而染色体数目少的为较特化类型。例如核型公式为:  $2n=48t$ , 可认为其是相对较原始的类型, 而本研究大刺鳅有 7 对中部着丝粒染色体, 臂数较多, 相对进化, 属于较为进化的类群。关于大刺鳅的分类地位, 国内学者(除本研究团队外)均沿用成庆泰等(1987)主编的中国鱼类系统检索中的分类结果, 将其归为鲈形目, 而 Nelson(2006)根据线粒体 DNA 及分子标记等结果将大刺鳅归为合鳃目。

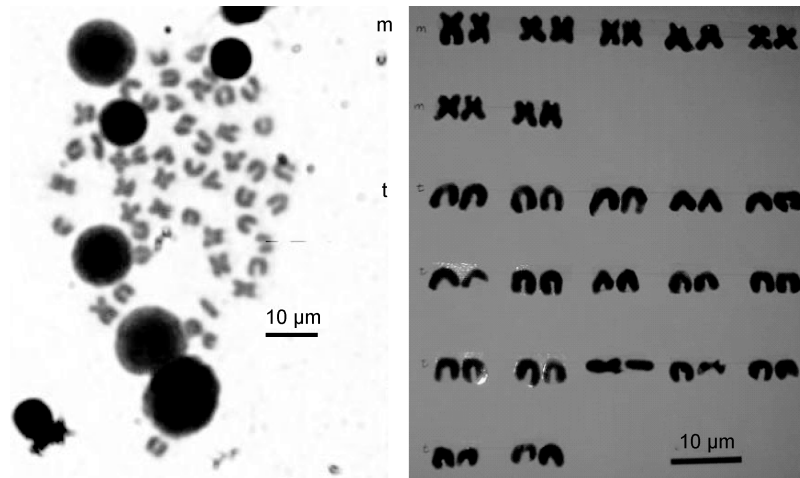


图 1 大刺鲃核型分析

Fig.1 The karyotype of *M. armatus*

表 3 大刺鲃线粒体 Cyt b 和 D-loop 碱基构成

Tab.3 The base constitutions of Cyt b gene and mtDNA D-loop sequences of *M. armatus*

序列	碱基平均比率					
	A	T(U)	C	G	A + T	G + C
Cyt b	24.97%	28.46%	32.75%	13.82%	53.43%	46.57%
D-loop	31.90%	35.25%	19.64%	13.21%	67.15%	32.85%

表 4 大刺鲃遗传多样性参数指标

Tab.4 The genetic diversity parameters of *M. armatus*

序列	单倍型数	单倍型多样性(Hd)	核苷酸多样性(Pi)	平均核苷酸差异数(k)
Cyt b	8	0.656	0.00539	5.938
D-loop	7	0.541	0.00817	6.805

表 5 大刺鲃 Cyt b 序列单倍型间的遗传距离

Tab.5 The genetic distances of the Cyt b's haplotypes

单倍型	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8
Hap1								
Hap2	0.001							
Hap3	0.001	0.002						
Hap4	0.001	0.002	0.002					
Hap5	0.013	0.012	0.014	0.014				
Hap6	0.017	0.016	0.018	0.018	0.004			
Hap7	0.015	0.014	0.016	0.016	0.002	0.002		
Hap8	0.001	0.002	0.002	0.002	0.014	0.018	0.016	

表 6 大刺鲃 D-loop 序列单倍型间的遗传距离

Tab.6 The genetic distances of the D-loop's haplotypes

单倍型	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7
Hap1							
Hap2	0.021						
Hap3	0.004	0.025					
Hap4	0.020	0.006	0.023				
Hap5	0.001	0.022	0.002	0.021			
Hap6	0.022	0.001	0.026	0.007	0.023		
Hap7	0.022	0.001	0.026	0.007	0.023	0.002	

虽然核型研究对鱼类分类问题的探讨至关重要, 但也存在其自身的局限, 本文的核型研究结果就不能为大刺鳅的分类归属提供直接证据。但从本课题组对大刺鳅的研究结果综合考虑认同 Nelson(2006)的分类结果。

表 7 大刺鳅的 Tajima's D 和 Fu's Fs 检测结果  
Tab.7 The results of Tajima's D and Fu's Fs

序列名称	Tajima's D 值	P 值	Fu's Fs 值	P 值
Cyt <i>b</i>	0.20510	$P>0.10$	0.49034	$P>0.10$
D-Loop	0.12704	$P>0.10$	0.21762	$P>0.10$

### 3.2 北江大刺鳅遗传多样性分析

北江大刺鳅种群 D-loop 序列中 A+T 的含量高于 Cyt *b* 基因中 A+T 的含量, 这表明 D-loop 进化速度更快, 因为 D-loop 为非编码基因, 故 D-loop 所受自然选择压力小, 突变之后被保留下来的几率更大, 更适用于做种内遗传变异分析(Yang *et al.*, 2002)。在北江大刺鳅种群 Cyt *b* 基因和 D-loop 序列中, G 含量最低, 碱基 A+T 的含量高于 G+C 的含量。这在其他鱼类线粒体 DNA 碱基组成中也发现相似的特点(刘朋朋等, 2013; 钟立强等, 2013)。

在评估种群遗传多样性时, 核苷酸多样性指数和平均遗传距离是两个非常重要的指标, 而核苷酸多样性指数是包含了各单倍型在群体中所占的比例, 因此核苷酸多样性指数较平均遗传距离在反映种群的遗传多样性情况时更为可靠和准确(姬南京等, 2014)。核苷酸多样性指数越高, 则遗传多态性越高, 反之亦然。北江大刺鳅的种群 Cyt *b* 基因的核苷酸多样性指数为 0.00539, 故根据 Grant 等(1998)中遗传多样性高低的评价标准, 该种群的遗传多样性处于一般水平。大刺鳅 Cyt *b* 基因的单倍型数为 8; 单倍型多样性(Hd)是 0.656, 处于中等水平; 核苷酸多样性(Pi)是 0.00539, 处于较高水平; 平均核苷酸差异数(*k*)为 5.938, 平均核苷酸差异数越大, 说明遗传多样性越丰富; 大刺鳅 D-loop 基因的单倍型数为 7; 单倍型多样性(Hd)是 0.541, 处于中等水平; 核苷酸多样性(Pi)是 0.00817, 处于较高水平; 平均核苷酸差异数(*k*)为 6.805, 说明遗传多样性丰富。上述 DNA 多肽位点分析及多肽分析检验说明北江流域的大刺鳅遗传多样性拥有较高的丰富度。

根据中性检验分析的结果可知, 所检验的群体的种群数目较为稳定, 在总体上并未经历大规模的扩张。综上所述, 本实验的北江大刺鳅遗传多样性较丰富, 且彼此间差异不大, 每个个体间的亲缘关系较近。

## 4 结论

影响大刺鳅遗传多样性水平的原因有很多种, 如水质环境变化、人为干预、过度捕捞、自身进化程度等等, 但是从目前来看, 主要是由于人为干预导致生态环境恶化所造成的。现在大刺鳅野生资源相对匮乏, 且其规模化全人工繁殖技术尚未成功, 故本实验得出的数据对进一步研究北江流域经济鱼类的遗传多样性具有重要参考价值, 并为大刺鳅的种群遗传多样性保护和种质资源的开发和利用提供了理论依据。

## 参 考 文 献

- 于旭容, 仇雪梅, 柳晓瑜等, 2011. 线粒体 DNA 多态性在海洋动物群体遗传结构研究中的应用. 生物技术通报, (10): 49—54
- 王 方, 黄小林, 拉 达等, 2012. 中国南部地区大刺鳅种群遗传和亲缘地理研究. 见: 中国鱼类学会. 中国海洋湖沼学会鱼类学分会, 中国动物学会鱼类学分会 2012 年学术研讨会论文集. 兰州: 中国海洋湖沼学会, 中国鱼类学会, 23
- 生物系细胞遗传学实验室, 1985. 四川广西两省 59 种鱼的染色体研究初报. 武汉大学学报(自然科学版), (1): 124—126
- 成庆泰, 郑葆珊, 1987. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社, 459
- 成美玲, 田永胜, 吴玉萍等, 2018. 云纹石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交后代染色体核型分析. 渔业科学进展, 39(2): 67—75
- 吕凤义, 左艳玲, 范月明等, 2008. 4 种鲮科鱼类基于线粒体 DNA 控制区序列的比较研究. 华南师范大学学报(自然科学版), (2): 105—110
- 伍远安, 梁志强, 李传武等, 2010. 两种刺鳅肌肉营养成分分析及评价. 营养学报, 32(5): 499—502
- 刘 伟, 代应贵, 袁振兴等, 2016. 都柳江粗唇种群线粒体 DNA Cyt *b* 基因和 D-loop 序列组成及遗传多样性. 淡水渔业, 46(3): 10—15, 51
- 刘朋朋, 钟立强, 潘建林等, 2013. 基于线粒体 D-loop 区分析黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)五个淡水湖泊群体的遗传多样性. 海洋与湖沼, 44(3): 728—733
- 杨华强, 李 强, 舒 琥等, 2016. 华南及邻近地区大刺鳅遗传多样性的 ISSR 分析. 水生生物学报, 40(1): 63—70
- 吴仲庆, 1998. 水产生物遗传育种学. 厦门: 厦门大学出版社, 7—2
- 沈 朕, 关洪斌, 郑风荣等, 2017. 基于 *cytb* 和 D-loop 的 4 个大泷六线鱼群体遗传多样性分析. 海洋科学进展, 35(4): 524—534
- 房祖业, 陈晓东, 吴咏诗等, 2018. 大刺鳅(*Mastacembelus armatus*)二、三、四碱基重复微卫星标记的筛选和特征分析. 海洋与湖沼, 49(1): 174—182
- 钟立强, 刘朋朋, 潘建林等, 2013. 长江中下游 5 个湖泊黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)种群线粒体细胞色素 *b* 基因的遗传变异分析. 湖泊科学, 25(2): 302—308
- 郭 立, 李 隽, 王忠锁等, 2011. 基于四个线粒体基因片段的银鱼科鱼类系统发育. 水生生物学报, 35(3): 449—459

- 姬南京, 常亚青, 赵冲等, 2014. 3 个地理群体仿刺参 D-loop 序列的变异及系统发生分析. 水产学报, 38(4): 477—482
- 舒琥, 江小璐, 杨华强等, 2017. 华南地区 7 个大刺魮野生群体的形态差异分析. 广州大学学报(自然科学版), 16(3): 8—14
- 舒琥, 蔡晓阅, 刘锋等, 2010. 鲃形目 3 种鱼的染色体组型分析. 动物学杂志, 45(2): 101—106
- 曾庆祥, 方园, 曾学平等, 2016. 大刺魮的生物学特性与人工繁殖技术. 中国水产, (3): 70—73
- 樊海平, 邱曼丽, 钟全福等, 2018. 不同生长阶段野生和养殖大刺魮营养成分的比较. 安徽农业科学, 46(8): 92—96
- Grant W A S, Bowen B W, 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. Journal of Heredity, 89(5): 415—426
- Levan A, Fredga K, Sandberg A A, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52(2): 201—220
- Lynch M, Crease T J, 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. Molecular Biology and Evolution, 7(4): 377—394
- Nelson J S, 2006. Fishes of the World. 4th ed. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Shaklee J B, Tamaru C S, Waples R S, 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins. Pacific Science, 36(2): 141—157
- Yang Y H, Kim K I, Cothran E G *et al*, 2002. Genetic diversity of Cheju Horses (*Equus caballus*) determined by using mitochondrial DNA D-loop polymorphism. Biochemical Genetics, 40(5—6): 175—186

## THE KARYOTYPE PATTERN AND GENETIC DIVERSITY OF MITOCHONDRIAL DNA Cyt *b* GENE AND D-LOOP SEQUENCE IN *MASTACEMBELUS ARMTUS* BEIJIANG RIVER, SOUTH CHINA

LI Fen, CHEN Qi-Ping, HE Pei-Ying, HUANG Xiao-Qi, CHEN Zhong-Kai, ZHOU Hui-Qiang, ZHONG Dong-Ming, SHU Hu

(College of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract** To study and protect the resource of fish *Mastacembelus armatus* in the Beijiang River, Guangdong, South China, 24 individuals were sampled in the river reaches and their chromosomes karyotypes were analyzed. PHA (phytohemagglutinin) and colchicines were injected *in vivo*, and the kidney cells were collected and hypotonically air-dried. The results show that, the diploid chromosome number of *M. armatus* is 48 and the karyotype formula is  $2n=14m+34t$ ,  $NF=62$ . In addition, the sequences of Cyt *b* gene and D-loop were analyzed using PCR and DNA sequencing, from which a 1438-bp Cyt *b* gene and a 895-bp D-loop were obtained. The haplotype diversity of the two genes is 0.656 and 0.541, the nucleotide diversity 0.00539 and 0.00817, and the average number of nucleotide differences 5.938 and 6.805, respectively, indicating an obvious population genetic diversity. The genetic distance of each individual of the two genes are 0.000—0.018 and 0.000—0.026, respectively, showing a close genetic distance. Moreover, the population size has not changed as shown in Tajima's *D* and Fu's *F<sub>s</sub>* tests. Therefore, the genetic diversity of the *M. armatus* population in Beijiang River regions is intermediate, and the species can be used for artificial breeding.

**Key words** *Mastacembelus armatus*; chromosomes karyotype; Cyt *b* gene; D-loop; genetic diversity