

文章编号: 1674-5566(2013)05-0684-06

湘西盲高原鳅线粒体 DNA 遗传多样性分析

姚雁鸿¹, 牟东¹, 汪登强¹, 孔令富², 何力¹, 何文辉³

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223; 2. 云南农业大学 动物科技学院, 云南 昆明 650201; 3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 对取自湖南湘西自治州龙山县乌龙山 3 个不同洞穴的湘西盲高原鳅 (*Triplophysa xiangxiensis*) 群体 82 尾样本的线粒体细胞色素 b (Cytb) 基因序列和控制区 (D-loop) 序列进行了研究, 分析了其遗传分化及遗传多样性。湘西盲高原鳅线粒体 Cytb 基因序列片段长 1 140 bp, D-loop 序列片段长 934 bp, 在 D-loop 中发现 6 个多态位点且均为单一变异位点, D-loop 序列中检测到 7 个单倍体, 其单倍型多样性指数 (h) 在 0.083 至 0.282 之间, 其核苷酸多样性 (π) 指数范围为 0.000 09 ~ 0.000 32。3 个采样群体的遗传多样性均较低。全部样本的 Cytb 序列均一致, 不存在变异, 4 种碱基 T、C、A、G 含量分别是 28.3%、28.6%、28.1%、15.0%, AT 含量较高。D-loop 的分子变异方差分析 (AMOVA) 结果显示湘西盲高原鳅遗传变异系数 $F_{ST} = -0.008 9$, 总遗传变异中, 各年度种群内变异为 100.89%, 年度种群间变异为 -0.89%, 变异主要来自年度种群内部。

研究亮点: 首次测定了湘西盲高原鳅的线粒体细胞色素 b 和控制区序列, 并依据序列变异情况分析了其遗传分化及遗传多样性, 结果表明湘西盲高原鳅遗传多样性水平很低。基于细胞色素 b 序列与其它鳅科鱼类构建 NJ 系统发育树表明湘西盲高原鳅以不太高的支持率位于条鳅属和高原鳅属之间。为其种质资源的保护和利用提供基础资料和科学依据。

关键词: 湘西盲高原鳅; 线粒体 DNA; 控制区; 细胞色素 b; 遗传多样性

中图分类号: S 917

文献标志码: A

洞穴鱼类的生活史一般在封闭或半封闭的洞穴环境里完成, 演化出与当地环境高度适应的形态特征, 如眼很小或没有、体表色素退化等, 因此在生物适应性进化研究中具有重要的科学价值。由于一种洞穴鱼通常只生活在一个洞穴, 分布范围十分有限, 同时由于洞穴内食物来源匮乏, 所以种内数量比较少。洞穴鱼类能够在较为极端的环境里维持一个有效种群, 长期以来较少受人类或其他鱼类的干扰, 其种群的遗传变异情况及其与地表种类是否存在差异, 受到很多学者的关注。目前国外对于洞穴生物的群体遗传多样性研究已有一些报道^[1-3], 我国是洞穴鱼类分布比较多的国家, 对洞穴鱼类的研究主要集中在洞穴生物物种多样性^[4-7]以及分子系统进化^[8]等, 还未见从群体水平上开展遗传变异研究的报

道。

湘西盲高原鳅 1986 年首次被发现, 最初定名为湘西盲条鳅 (*Noemacheilinae xiangxiensis* sp. nov.)^[9], 1992 年陈银瑞等对模式标本进一步分析后, 根据新的分类系统重新定名为湘西盲高原鳅 (*Triplophysa xiangxiensis* Yang et al)^[10]。湘西盲高原鳅眼睛完全消失, 体表色素也全部退化, 胸鳍发达, 为典型的洞穴鱼类。迄今仅在湖南龙山县乌龙山的山洞里发现其分布, 并且一般在距洞口几公里以上的洞穴深处才能被发现, 但每年夏季多雨季节, 有一部分湘西盲高原鳅会随洞内暗河水位上涨游到距洞口约 1 km 附近而被捕捉。目前已有一些关于湘西盲高原鳅生物学和微卫星等的研究报道^[11-12], 本研究采用线粒体 DNA 序列分析湘西盲高原鳅的种群遗传多样性,

收稿日期: 2013-03-25 修回日期: 2013-07-03

基金项目: 国家科技支撑计划(2004BA526B10); 国家科技部公益性行业专项(200903048)

作者简介: 姚雁鸿(1972—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为水产动物种质资源。E-mail: yaoyh@yfi.ac.cn

通信作者: 何文辉, E-mail: whhe@shou.edu.cn

为其种质资源的保护和利用提供基础资料和科学依据,同时也尝试了解特殊环境下洞穴鱼类群体遗传变异的形成。

1 材料与方法

1.1 样品采集

湘西盲高原鳅样品采集于湖南省龙山县乌龙山大峡谷飞虎洞和附近 2 个无名小溶洞(2 个无名小溶洞分别位于飞虎洞东北和西南下方山脚下,2 洞与飞虎洞水平距离分别约 500 m 和 3 000 m),样品于 2008、2009、2010 年分 3 次采集,共采集 103 尾,采样地点见图 1。表 1 为样品采集信息(共 82 尾样本用于线粒体分析)。分别于每尾样本鱼尾部切取少量尾鳍组织保存于 95% 的乙醇中并编号。

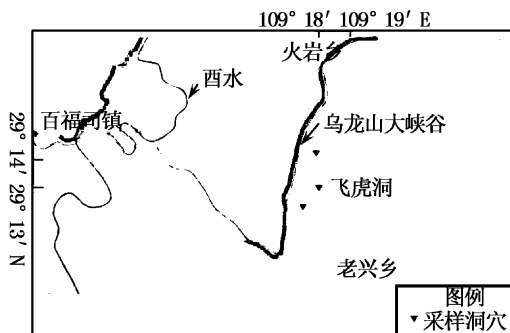


图 1 湘西盲高原鳅样本采集地点

Fig. 1 Sampling location of *T. xiangxiensis*

表 1 湘西盲高原鳅样品基本信息

Tab. 1 Sampling information of *T. xiangxiensis*

群体	采样日期	采样地点	尾数	个体规格/g
POP1	2008.5	飞虎洞洞内 200 m 暗河	24	2.0 ~ 12.5
POP2	2009.11	无名小溶洞 1 暗河	25	2.7 ~ 12.3
POP3	2010.11	无名小溶洞 2 暗河	33	2.1 ~ 14.6

注:POP1、POP2、POP3 分别代表取自 3 个不同洞穴的群体。

1.2 基因组 DNA 提取

采用高盐法提取基因组 DNA^[13]。

1.3 PCR 扩增

线粒体 Cytb 引物为 L14724(5'-GACTTGAAA AACCACCGTTG-3')和 H15915(5'-CTCCGATCTC CGGATTACAAGAC-3'),控制区(D-loop)引物为 MitD1F(5'-CACCCYTRRCTCCCAAAGCYA-3')和 MitD1R:(5'-GGTCCGGRKACTTGCATG TRTAA-3')。

PCR 体系为 50 μ L,包括 10 \times PCR Buffer 5

μ L,10 mmol/L dNTP 0.4 μ L, 10 μ mol/L 引物各 2 μ L 及模板约 100 ng,补充纯水至 50 μ L。PCR 扩增条件为,94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 8 min。

PCR 结束后,取 1 μ L PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳,检测扩增效果。选择扩增效果好的产物于 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离,产物纯化回收用 DNA 凝胶纯化试剂盒(cycle-Purekit, Omega Bio-tek),最后将回收产物送至大连 TaKaRa 公司测序。

1.4 数据分析

序列拼接和校对用软件 DNA Star v7.1 完成,采用软件 Clustal X 1.8 对序列进行多重比对。单倍型多样性指数(h)和核苷酸多样性指数(pi)用 DnaSP 软件包计算,序列的进化中性检验采用 Fu'Fs 和 Tajima'D 2 种方法,由 DnaSP 完成。群体间分子变异方差分析(AMOVA)用 ARLEQUIN v3.11 完成,单倍型间进化关系用 Network4.6 的 Median-joining 方法构建。从 GenBank 数据库上下载高原鳅属(*Triplophysa*)、条鳅属(*Barbatula*)和南鳅属(*Schistura*)的序列(表 2),3 个属都隶属条鳅亚科(Noemacheilinae),应用 MEGA 4.1 中 Kimura-2-parameter 模型构建单倍型邻接(Neighbor-joining, NJ)树,初步分析湘西盲高原鳅的系统发育地位。

2 结果

2.1 序列变异和多样性

经比对,湘西盲高原鳅线粒体 Cytb 基因序列片段长 1 140 bp,碱基组成 A = 27.97%、G = 15.14%、T = 28.40%、C = 28.49%,A + T (56.37%)大于 C + G (43.63%)。线粒体 Cytb 基因序列十分保守,未发现变异,控制区序列片段长 934 bp,碱基组成 A = 32.97%、G = 13.21%、T = 34.06%、C = 19.76%,A + T (67.03%)大于 C + G (32.97%),控制区 A + T 含量比 Cytb 基因的更高。控制区中存在 6 个多态位点,均为单一变异位点,见表 3。82 条序列中检测到 7 个单倍型(表 4),其中 2008 年、2009 年和 2010 年分别有 2 个、4 个、6 个单倍型。单倍型多样性指数(h)介于 0.083 到 0.282,核苷酸多样性指数(pi)介于 0.000 09 到 0.000 32。

表 2 系统发育分析所用种类
Tab. 2 Specimens used for phylogenetic analysis

属	种名	GenBank 登录号
高原鳅属 <i>Triplophysa</i>	贝氏高原鳅 <i>Triplophysa bleekeri</i>	FJ406605.1
	细尾高原鳅 <i>Triplophysa stenura</i>	DQ105247.1
	汉水高原鳅 <i>Triplophysa</i> sp	DQ105250.1
	斯氏高原鳅 <i>Triplophysa stoliczkae</i>	DQ105249.1
	异尾高原鳅 <i>Triplophysa stewarti</i>	DQ105248.1
	东方高原鳅 <i>Triplophysa orientalis</i>	DQ105251.1
	似鲶高原鳅 <i>Triplophysa siluroides</i>	EF212443.1
	湘西盲高原鳅 <i>Triplophysa xiangxiensis</i>	JN696407
条鳅属 <i>Barbatula</i>	北方条鳅 <i>Barbatula nuda</i>	DQ105252.1
	须条鳅 <i>Barbatula Barbatula</i>	DQ105254.1
南鳅属 <i>Schistura</i>	横纹南鳅 <i>Schistura fasciolata</i>	DQ105201.1
	泰国南鳅 <i>Schistura thai</i>	DQ105202.1
	湄公南鳅 <i>Schistura kloetzliae</i>	DQ105228.1

表 3 湘西盲高原鳅线粒体控制区变异位点
Tab. 3 variable sites in control region
sequence of *T. xiangxiensis*

单倍型	变异位点					
	1	1	1	2	4	5
	6	9	9	2	4	0
	8	3	9	2	4	9
H1	T	C	T	C	A	T
H2	T	A	T	C	A	T
H3	T	C	T	C	C	T
H4	T	C	T	C	A	G
H5	T	C	G	C	A	T
H6	T	C	T	A	A	T
H7	C	C	T	C	A	T

注: H 指单倍型, 变异位点区数字(从上往下)示变异位点在线粒体控制区的位置。

表 4 湘西盲高原鳅控制区单倍体数量
及在年度样本中的分布

Tab. 4 Number of individuals per haplotype in control region and sampling annual of *T. xiangxiensis*

单倍型	POP1	POP2	POP3	总计	GenBank 登录号
1	23	22	28	73	JN696408.1
2		1	2	3	JN696409.1
3		1	1	2	JN696410.1
4			1	1	JN696411.1
5		1		1	JN696412.1
6			1	1	JN696413.1
7	1			1	JN696414.1
h	0.083	0.230	0.282	0.207	
pi	0.000 09	0.000 26	0.000 32	0.000 23	

注: h 是单倍型多样性指数; pi 是核苷酸多样性指数。

2.2 种群遗传结构

3 个不同采样点种群的分子变异分析见表 5。结果显示, 遗传变异系数 $F_{ST} = -0.008 9$, 为负值, 表明种群内的变异比种群间的变异大, 种

群间不存在遗传分化^[14]。

表 5 湘西盲高原鳅种群的分子变异分析 (AMOVA)

Tab. 5 Analysis of molecular variance
(AMOVA) for *T. xiangxiensis*

变异来源	自由度	平方和	变异组成	变异百分比/%
群体间	2	0.166	-0.000 96	-0.89
群体内	79	8.626	0.109 19	100.89
总计	81	8.793	0.108 23	
变异系数 F_{ST}			-0.008 9	

通过 Network 的 Median-joining 方法构建的单倍型网络结构见图 2。位于网络图中心为单倍型 H1 (82 个个体), 其余 6 个单倍型都经过一步突变连于 H1 单倍型, 据此可推测 H1 为原始单倍型。

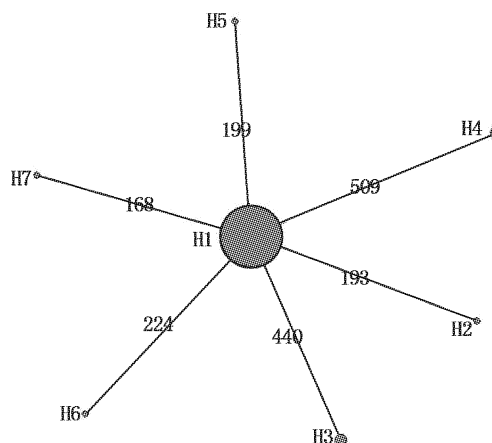


图 2 基于湘西盲高原鳅控制区构建的 Network 网络结构

Fig. 2 Network topology constructed by D-loop sequences of *T. xiangxiensis*

依据 Cytb 序列使用 NJ 法 (Kimura 2-parameter) 构建的单倍型系统树 (南鳅属的 *S. kloetzliae*, *S. thai*, *S. fasciolata* 为外群), 见图 3。由图可见, 湘西盲高原鳅位于高原鳅属基部, 但支持率并非很高。

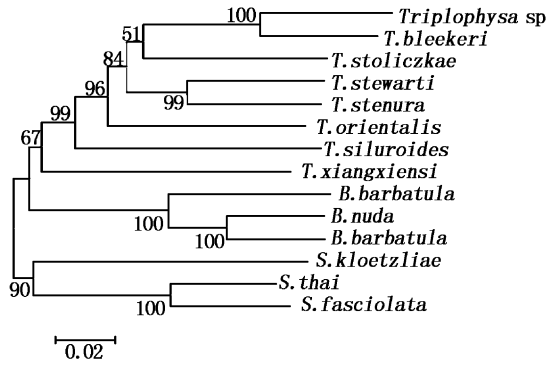


图 3 基于若干鳅科鱼类 Cytb 序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 3 NJ tree of 11 species of genus *Triplophysa*, based on the Cytb sequences

各分支数值表示 1 000 次重复抽样所得的大于 50% 的支持率 (只采用了颠换数), 以 *S. kloetzliae*, *S. thai*, *S. fasciolata* 为外群。

2.3 中性检验

2 种中性检验方法的检验结果都得出显著负值, 其中 $Fu'Fs = -7.93 (P=0)$, $Tajima'D = -1.90 (P<0.01)$ 。这说明, 湘西盲高原鳅线粒体 DNA 显著偏离中性进化, 种群发生了扩张。

3 讨论

3.1 湘西盲高原鳅的遗传多样性与分化

线粒体 DNA 序列分析表明了湘西盲高原鳅的遗传多样性水平很低, 相比于同属的贝氏高原鳅 Cytb 251 个变异位点和控制区 155 个变异位点^[15], 湘西盲高原鳅线粒体 DNA 高度保守性极为明显。在已有研究报道的近缘种类中, 如美丽小条鳅、长薄鳅等线粒体 DNA 变异都明显高于湘西盲高原鳅^[16-17]。一般濒危物种的遗传多样性比较低, 但是如中华鲟等这样高危鱼类, 其线粒体 DNA 变异^[18]也高于湘西盲高原鳅。由于本研究样本来自 3 个不同年度不同采样地点, 每一批样本的个体大小也是参差不齐, 可以排除了取样误差, 说明低水平的线粒体变异是湘西盲高原鳅的基本情况。遗传多样性低的原因可能是群体小造成的遗传瓶颈, 或者近亲交配等。湘西盲

高原鳅生存在洞穴深处暗河内, 人迹罕至, 群体几乎不受外界干扰, 因此可以排除人类活动对其遗传多样性造成的直接影响, 遗传多样性主要是受自然因素的作用。中性检验显示湘西盲高原鳅群体发生了历史扩张, 并且由于检测到的序列变异均为单一变异 (表 3), 其他单倍型与主单倍型都是以单一突变连接 (图 3), 因此其种群扩张应是近期的。当前, 我们还没有得到湖南乌龙山地区地下水变迁历史, 但是乌龙山属典型的岩溶地貌, 这种地貌的特点是地下河流向和水量在不同历史阶段变化比较大。因此, 我们推测, 乌龙山地区地下暗河可能近期发生过较大水文特征的改变, 如径流量、水位等, 引起生境和食物来源的条件十分恶劣, 致使湘西盲高原鳅种群下降到十分严重、近乎灭绝的程度, 这与中国当前很多洞穴鱼类种群很小, 并且不少种类, 如金线鲃等处于濒危状态^[19]的情况相似; 随后乌龙山地区地下暗河环境逐渐好转、食物增多, 湘西盲高原鳅种群迅速扩张到目前的状况。迄今还没有见到更多洞穴鱼类, 特别是喀斯特地区洞穴鱼类群体遗传变异的研究报道, 有关湘西盲高原鳅低水平遗传变异及其成因还有待进一步的分析和验证。

对来自不同年份和采样地点的样本比较发现, 乌龙山地区的湘西盲高原鳅没有发生显著的群体遗传分化。考虑到总体低水平遗传变异, 我们推测这些样本均是一个奠基群体扩张的后代, 乌龙山地区地下河是相互连通的, 湘西盲高原鳅有充分发生基因交流的机会。

3.2 湘西盲高原鳅的分类地位

前面已经提及, 湘西盲高原鳅最初发现时被认为是条鳅属, 随后归为高原鳅属。我们基于线粒体 Cytb 基因构建的系统树显示, 条鳅属和高原鳅属鱼类为两个不同单系群, 湘西盲高原鳅以不太高的支持率位于条鳅属和高原鳅属之间。我们也采用其他模型构建系统发育树, 有一些模型将湘西盲高原鳅聚到条鳅属的系群中, 另外一些模型将湘西盲高原鳅聚到高原鳅属的系群中, 但支持率都不高。这说明, 线粒体 Cytb 基因并不能作为目前定名湘西盲高原鳅为高原鳅属鱼类的依据。在形态分类学上, 条鳅属和高原鳅属之间的区别在于雄性吻部有无一密集的小刺突区^[20]。小刺突区在繁殖季节较为明显, 非繁殖季节较难辨认。本研究仅用一个线粒体基因序列, 可提供

的信息有限,还不能从分子水平上明确湘西盲高原鳅系统发育地位。未来有必要进一步采用更多分子标记,以及更详细的形态学数据来确定湘西盲高原鳅的分类问题。

3.3 湘西盲高原鳅的保护建议

洞穴鱼类在学术上具有很高的科研意义,又因其特化的表型特征也具有很好的观赏价值^[6]。湖南乌龙山地区已被批准成立国家地质公园,并开发为旅游风景区,湘西盲高原鳅成为其旅游推广的一张重要名片。从近几年的观察来看,湘西盲高原鳅的群体数量还比较大,相对其他洞穴鱼类,如鸭嘴金线鲃、个旧盲高原鳅等已被列为易危物种^[19],这是很大的优势,可以尝试进行人工驯养和繁殖,加以开发利用。同时应注意,湘西盲高原鳅作为洞穴鱼,生存环境极其脆弱,环境的较小改变都可能威胁种群的生存,正如前面分析所示,湘西盲高原鳅经历了近期极严重的遗传瓶颈。因此,在旅游开发利用的同时应减少人为干扰,加强保护洞穴环境不受破坏,维持生境稳定。从本研究的遗传结构分析结果看,湘西盲高原鳅为同一个遗传群体,因此在设立保护措施时,主要加强就地保护,无需对某一地点开展特别保护。

参考文献:

- [1] STEPIEN C A, MORTON B, DABROWS K A, et al. Genetic diversity and evolutionary relationships of the troglodytic 'living fossil' *Congerina kusceri* (Bivalvia: Dreissenidae) [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(8): 1873 - 1879.
- [2] BUHAY J E. Subterranean phylogeography of freshwater crayfishes shows extensive gene flow and surprisingly large population sizes [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(14): 4259 - 4273.
- [3] ORLANDO L, BONJEAN D, BOCHERENS H, et al. Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, 19(11): 1920 - 1933.
- [4] 黎道洪, 陈德牛, 罗泰昌, 等. 贵州洞穴螺类的物种多样性及分布初步研究 [J]. *中国岩溶*, 2003, 22(3): 212 - 218.
- [5] 黎道洪, 罗泰昌. 云南石林地区岩溶洞穴动物种多样性初步研究 [J]. *贵州师范大学学报: 自然科学版*, 2002, 20(1): 1 - 5.
- [6] 张晓杰, 代应贵. 我国喀斯特洞穴鱼类研究进展 [J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(3): 364 - 371.
- [7] 陆霞, 李竹, 安建梅. 中国洞穴甲壳动物多样性及其对洞穴环境的适应性 [J]. *动物分类学报*, 2010(1): 108 - 116.
- [8] XIAO H, CHEN S Y, LIU Z M, et al. Molecular phylogeny of *Sinocyclocheilus* (Cypriniformes: Cyprinidae) inferred from mitochondrial DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 36(1): 67 - 77.
- [9] 杨干荣, 袁凤霞, 廖荣谋. 中国鳅科鱼类一新种——湘西盲条鳅 [J]. *华中农业大学学报*, 1986, 5(3): 219 - 223.
- [10] 陈银瑞, 徐国才. 云南石林盲高原鳅的发现及其分类地位的讨论 [J]. *动物学研究*, 1992, 13(1): 17 - 23.
- [11] 何力, 王雪光, 陈清纯, 等. 湘西盲高原鳅的形态特征描述 [J]. *淡水渔业*, 2006, 36(4): 56 - 58.
- [12] 姚雁鸿, 孔令富, 汪登强, 等. 湘西盲高原鳅遗传多样性的微卫星分析 [J]. *水产学报*, 2013, 37(1): 26 - 33.
- [13] ALJANABI S M, MARTINEZ I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22): 4692 - 4693.
- [14] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596 - 1599.
- [15] 陶聪. 贝氏高原鳅线粒体 Cytochrome b 和 Control region 序列的遗传分化研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2009.
- [16] 丘城锋, 林岳光, 庆宁, 等. 华南西部及海南岛美丽小条鳅种群遗传变异与亲缘地理 [J]. *动物学报*, 2008, 54(5): 805 - 813.
- [17] 赵刚, 周剑, 杜军, 等. 长薄鳅线粒体 DNA 控制区遗传多样性研究 [J]. *西南农业学报*, 2010, 23(3): 930 - 937.
- [18] 王巍, 朱华, 胡红霞, 等. 五种鲟鱼线粒体控制区异质性和系统发育分析 [J]. *动物学研究*, 2009, 30(5): 487 - 496.
- [19] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录第一卷: 红色名录 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [20] 何春林, 宋昭彬, 张鄂. 中国高原鳅属鱼类及其分类研究现状 [J]. *四川动物*, 2011, 30(1): 150 - 155.

Genetic diversity analysis of mitochondrial DNA in *Triplophysa xiangxiensis*

YAO Yan-hong¹, MU Dong¹, WANG Deng-qiang¹, KONG Ling-fu², HE Li¹, HE Wen-hui³

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Wuhan 430223, Hubei, China;

2. College of Animal Science and technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, the genetic diversity and genetic differentiation of a total of 82 individuals from three *Triplophysa xiangxiensis* populations which were sampled from three caves in Wulongshan mountain were evaluated using mitochondrial DNA (mtDNA), cytochrome b (Cytb) gene and control region (D-loop) sequences. 1 140 bp of the mitochondrial Cytb partial sequences and 934 bp of D-loop partial sequences were obtained. No genetic variation was found in cyt b, and all sequences were identical, the contents of T, C, A, and G nucleotides accounted for 28.3%, 28.6%, 28.1%, 15.0%. In the control region, the sequence analysis of the 73 samples revealed 7 haplotypes with haplotype diversity ranging from 0.083 to 0.282. 6 polymorphic sites were found from all samples, and all were singleton variables. Seven haplotypes were detected among the sequences, with one of them (haplotype 1) being popular which was represented by 73 individuals. As for annual samples, sequences of all individuals from year 2008 were completely identical except one, and four and five haplotypes were determined from specimens of year 2009 and 2010, respectively. The nucleotide diversity ranged from 0.000 09 to 0.000 32, respectively. All of which revealed that the genetic diversity in these three *T. xiangxiensis* populations was low. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that 100.89% of the genetic variability occurred within annual temporary samples, and negative value of 0.89% came from among temporary samples. The network constructed by sequences of control region displayed a star-like topology, with the haplotype 1 in center and the other haplotypes connecting with it by one step of mutation.

Key words: *Triplophysa xiangxiensis*; mtDNA; D-loop; cytochrome b; genetic diversity