

doi: 10.7541/2017.23

高原裸裂尻鱼头部轮廓形状及其变异的几何形态测量分析

王贺崑元^{1,2,3} 汤永涛^{1,2,3} 李国刚^{1,2,3} 张仁意^{1,2,3} 冯晨光^{1,2,3} 童超^{1,2,3}
刘思嘉^{1,2,3} 张存芳^{1,2,3} 田菲^{1,2,3} 赵凯^{1,2,3}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810001; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 高原鱼类进化与功能基因组学实验室, 西宁 810001; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了明确描述高原裸裂尻鱼的表型多样性, 运用现代几何形态测量法, 基于高原裸裂尻鱼头部轮廓的形态坐标数据, 对其5个地理种群的样本做了定量分析。结果主要如下: ①主成分分析(PCA)和典型变量分析(CVA)显示, 5个地理种群的样本的变异主要位于口型特征、下吻部形状、下颌骨形状、下颌锐利角质程度和头部形状等性状。②基于主成分分析、典型变量分析和聚类分析, 高原裸裂尻鱼三个亚种(班公湖亚种、玛法木湖亚种和指名亚种)相互分开, 在PC1轴上从负值到正值依次排列, 从而确定了高原裸裂尻鱼亚种划分的有效性。③通过形态差异的显著性检验, 基于马氏距离和普氏距离分析了高原裸裂尻鱼各地理种群之间的形态变异距离, 根据差异显著性将该5个地理种群的高原裸裂尻鱼分为湖泊型亚种和河流型亚种, 随后的聚类分析同样支持该结果。总之, 通过几何形态测量法, 准确描述了高原裸裂尻鱼头部轮廓的形态多样性, 按照外形的差异, 将5个地理种群分为两种生态型, 并推测该差异主要是由于所生活的水体环境和食物差异所造成。对高原裸裂尻鱼形态差异的识别和研究, 能为其生态学研究和物种多样性保护提供相应指导, 丰富进化理论。

关键词: 高原裸裂尻鱼; 几何形态测量; 亚种划分; 主成分分析; 典型变量分析; 地理变异

中图分类号: Q174 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2017)01-0182-12

高原裸裂尻鱼(*Schizopygopsis stoliczkai* Steindachner), 属于裸裂尻鱼属[*Schizopygopsis* (Steindachner)], 裂腹鱼亚科(Schizothoracinae), 广泛分布于青藏高原印度河上游及其湖泊中, 包括我国的狮泉河、象泉河、噶尔河、喀拉喀什河、班公湖、玛法木湖和兰嘎湖等^[1,2]。在各水系的高原裸裂尻鱼种群中, 根据各标本的度量比例、可数性状以及地理隔离情况, 武云飞等^[1]将高原裸裂尻鱼记载为3个亚种: 高原裸裂尻鱼指名亚种(*S. stoliczkai stoliczkai* Steindachner)、高原裸裂尻鱼玛法木湖亚种(*S. stoliczkai maphamyumensis* Wu et Zhu)和高原裸裂尻鱼班公湖亚种(*S. stoliczkai bangongensis* Wu et Zhu)(下文分别简称为指名亚种、玛法木湖亚种和班公湖亚种), 其中, 指名亚种的分布最为广泛, 包括狮泉河-噶尔河居群、象泉河居群和喀拉喀什河居群^[1,2]。

有关裸裂尻鱼属的研究, 包括遗传多样性^[3]和种群生态学^[1]等方面, 但近十年来, 有关其形态学的研究不多。生物有机体的形态是人类对其认识和建立分类系统直观且基础的依据, 同时是研究发育生物学和进化生物学的重要理论基础。在裸裂尻鱼所属的裂腹鱼亚科中, 其形态学研究主要是通过可量性状的比例、可数性状来进行统计学分析^[4-6], 该方法称之为“框架法”(The Truss method)^[7]。传统的形态测量方法虽然能够使得研究对象的几何形状数值化, 但是很多框架数据不是同源形状, 也不能保存变量间的几何关系^[8,9]。

相对于传统的形态测量法, 标点法被称为现代几何形态测量法(Modern geometric morphometrics, GMM)^[10,11], 能够精确地定量反应样本形状和大小间的差异^[12]。标志点(Landmark)是生物有机体上具有代表性、标志性的解剖位点, 在标志点不足以

收稿日期: 2016-01-27; 修订日期: 2016-05-01

基金项目: 国家自然科学基金(31572258)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31572258)]

作者简介: 王贺崑元(1992—), 男, 四川绵阳人; 硕士; 研究方向为系统地理学。E-mail: wanghekunyuan@189.cn

通信作者: 赵凯, E-mail: zhaokai@nwipb.cas.cn

反映研究对象的几何特征的情况下,还可以以标志点为基础,采用滑动技术(Sliding technique)^[11]确定半标志点(Semi-landmark)^[13]来作为标志点的补充^[14]。由标志点和半标志点构成的点的组合(后文简称为特征点),可以用来精细地描述研究对象的几何形态。几何形态学之父Rohlf创建了该方法之后,该方法在物种的分类鉴定^[15]、细胞的形态比较^[16]、生物的个体发育^[17]以及动物的系统发育与进化^[18]等方面都有着广泛的应用。

由于在青藏高原隆升和演化的过程中,生活在其中的高原鱼类主要的限制因子是食物成分、水体环境、低温和缺氧等,其中对其物种划分影响较大的是食物成分和水体环境。本文是首次将现代几何形态测量法运用于以高原裸裂尻鱼为代表的裂腹鱼亚科的鱼类上,与传统的框架法相比,发现了种群间更多更细微的形态多样性。并且本文运用主成分分析(Principal component analysis, PCA)、聚类分析(Cluster analysis)和典型变量分析(Canonical variate analysis, CVA)这些多元统计分析方法,就高原裂腹鱼类的形态进行研究,在种和亚种的水平上,讨论高原裸裂尻鱼头部轮廓形状的差异,找到了很多此前未曾讨论过的种群间的差异,从而进一步明确了其亚种划分的有效性及其分类标准,为其生物学研究和物种保护奠定形态测量基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本文实验所用的样品(表 1)于2010年、2011年和2014年采自我国高原裸裂尻鱼所有分布的区域,包括西藏阿里地区的印度河水系和新疆塔里木水

系(图 1)。使用流刺网、定制刺网和地笼,共捕获高原裸裂尻鱼样本129尾,保存于95%的酒精中,现储存于中国科学院西北高原生物研究所高原生物适应与进化重点实验室。

1.2 样本照片拍摄

所有样本使用配有NIKON AIS 55/2.8 ai微距镜头的尼康D7000数码相机,将鱼的左侧和腹部进行拍摄。拍摄时,用镊子和针线将鱼的形态还原成自然状态,并且加以固定^[19]。把相机固定在翻拍架上,微距镜头与标本的拍摄面保持完全平行。为了取得更大的景深,并减少照片的噪点,采用固定的参数(f32, S2", ISO100)拍摄。拍摄的距离固定在280 mm,不仅保证了不同样本之间具有相同的比例尺,同时也减小了被拍摄物体在投影时的由于视差所产生的形变^[20]。为了降低操作时的偶然误差,对每一个种群的所有个体,照片的拍摄和后续的数字工作,均分2—3次在不同时间完成^[17]。以上所有操作均由同一实验人员完成,从而尽量减小了人为操作引起的误差。

1.3 可量可数性状的处理

使用解剖剪和镊子取下样本的第一鳃耙,放置解剖镜下观察,记录内外鳃耙数。本文研究了下颌锐利角质长度和下咽骨至吻前端距离这两组与口型特征相关的可量性状,以各样本带有标尺的照片为基础,通过TMorphGen8(canisius.edu/~sheets/IMP%208.htm)软件测量。

1.4 标志点和半标志点的获取

标志点的选取,要求既能反映研究对象的形态变异^[21],各样本之间标志点的位置又需要具有同源性^[18]。根据以上标准,同时参考鱼类外部形态上常

表 1 高原裸裂尻鱼样本的采集地点、水系、亚种、居群及样本量

Tab. 1 Populations, numbers, river systems and sampling positions of individuals used in this study

编号No.	亚种名 Subspecies	采集地点 Sampling site	水系 Basin	居群 Population	样本数量 Number of specimens
1	高原裸裂尻鱼指名亚种	西藏噶尔县	印度河	象泉河居群	20
2	高原裸裂尻鱼指名亚种	西藏噶尔县	印度河	狮泉河-噶尔河	16
3	高原裸裂尻鱼指名亚种	西藏革吉县	印度河	狮泉河-噶尔河	7
4	高原裸裂尻鱼指名亚种	新疆皮山县	塔里木河	喀拉喀什河居群	18
5	高原裸裂尻鱼班公湖亚种	西藏日土县	印度河	班公湖居群	13
6	高原裸裂尻鱼班公湖亚种	西藏日土县	印度河	班公湖居群	2
7	高原裸裂尻鱼班公湖亚种	西藏日土县	印度河	班公湖居群	8
8	高原裸裂尻鱼班公湖亚种	西藏日土县	印度河	班公湖居群	9
9	高原裸裂尻鱼班公湖亚种	西藏噶尔县	印度河	狮泉河-噶尔河	9
10	高原裸裂尻鱼玛法木湖亚种	西藏普兰县	印度河	玛法木湖居群	21
11	高原裸裂尻鱼玛法木湖亚种	西藏普兰县	印度河	玛法木湖居群	6
总计Total					129

用的解剖位点^[22], 本文从鱼的侧面轮廓上选取了10个点作为标志点(图 2b): ①腹中线上鳃盖条膜后缘, ②吻前端, ③头骨背缘末端, ④鳃盖骨后缘, ⑤鳃盖骨上端基部, ⑥口裂末端, ⑦—⑩眼的前缘、后缘、上缘、下缘。为了研究下颌骨的轮廓变异情况, 本文从鱼腹部轮廓选取了3个标志点(图 2c): ①、②下颌骨两端, ③吻前端。

虽然以上在侧面和腹面轮廓上的13个标志点能够在一定程度上反映高原裸裂尻鱼的解剖特征, 但是鱼类头部的轮廓缺乏更多的具有同源性的标志点。为了更加精细地确定研究对象的头部轮廓, 本文分别在样本的侧面和腹面轮廓上选取了17个和10个半标志点(图 2)。本文采用滑动技术的方法选取半标志点, 使一个半标志点在其邻近的半标志

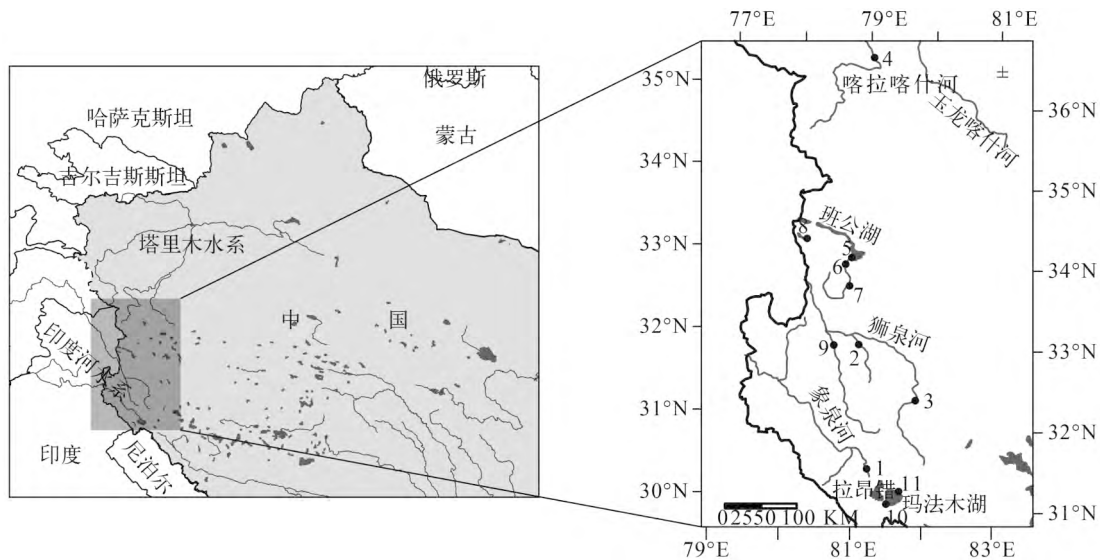


图 1 高原裸裂尻鱼采样地点示意图

Fig. 1 Map of the head-water area of the Indus River and Tarim River, showing the sampling sites

图中采样地编号1-11与表1中的编号一致

The numbers 1 to 11 are same with Tab. 1

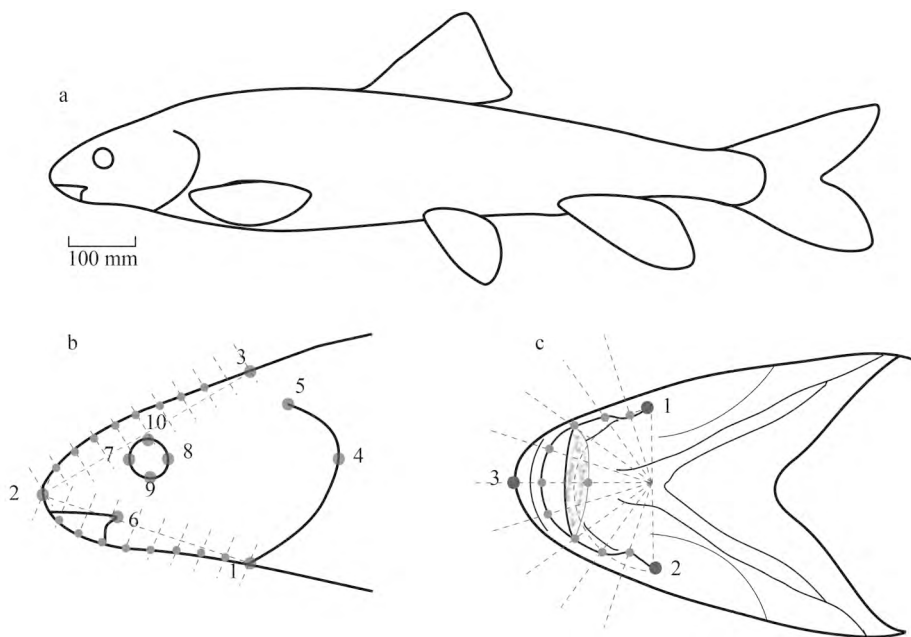


图 2 高原裸裂尻鱼标志点、半标志点的选择

Fig. 2 The landmarks and the semi-landmarks of the samples

a. 高原裸裂尻鱼; b. 头部左侧的特征点; c. 头部腹面的特征点

a. *S. stoliczkai*; b. Landmarks in the leftside of the head; c. Landmarks in the venter side of the head

点之间定义的切线上滑动,以减少单个形状与参考形状(Reference form)之间相互变化所需要的弯曲能量,即对应标志点之间的普氏距离(Procrustes distance),从而来减小由于半标志点位置的随意性而引起的误差^[13, 23]。具体的方法如图 2b、2c所示:在侧面轮廓上,第一和第二标志点之间的连线作8条间距相等的垂线,类似地,第二和第三标志点之间作9条这样的垂线,垂线与侧面轮廓的交点即得17个半标志点;在腹部轮廓上,以第一和第二标志点为直径作半圆,再用一组射线把该半圆10等分,射线与下颌骨轮廓的交点即得9个半标志点,最后一个半标志点是第5个半标志点所在的射线与下颌锐利角质末端的交点,建立这个半标志点的目的是为了描述锐利角质的长度。这样,标志点与半标志点一起,在侧面轮廓和腹面轮廓上分别建立了27个、13个特征点^[14],用来较为精确地描述高原裸裂尻鱼的头部轮廓。以上标志点和半标志点数据的确定和采集采用的是IMP软件包中的MakeFan8软件(canisius.edu/~sheets/IMP%208.htm),随后用TPS系列软件中的TpsDig(life.bio.sunysb.edu/morph)软件来统一照片的比例尺,用TpsUtil软件(life.bio.sunysb.edu/morph)来批量修改样本的ID^[10]。此步骤把样本的照片数据“矢量化”,输出了一个扩展名为“.NTS”的二维坐标矩阵文件,以便后续的数据分析。

1.5 几何形态测量分析

以上对高原裸裂尻鱼的侧面和腹面进行数字摄影,标志点和半标志点的定位和选取之后,本文使用Morphoj^[24]、TpsRegr(life.bio.sunysb.edu/morph)和PAST软件,对所得的高原裸裂尻鱼侧面轮廓的几何形态数据作以下分析。

普氏印叠(Generalized Procrustes Analysis, GPA) 所有样本特征点的坐标数据组成了一个三维数据矩阵,基于该数据矩阵,对各样本特征点的位置、尺寸、方向等非形状因素通过一系列函数进行平移、旋转、缩放和校正,从而让各样本的各特征点的相对位置趋于一致,从而消除了非形状因素对数据的影响,然后将所有样本的特征点进行叠合,该过程称为特征点的印叠(Superimposition),能够将研究对象的原始几何形态进行客观的复原,从而对其进行描述和比较,可以理解为数据标准化的一个过程。印叠的方法包括GRF、GLS和GPA等,其中,如今应用最广泛的方法要数GPA,因为该方法采用了普氏距离最小的原则来缩小研究对象形状上的差异,与其他印叠方法相比,能对不

同生物结构的几何形状差别更为精确地复原。GPA的算法具体步骤如下:①质心点(研究对象轮廓的重心点,由于研究对象的密度趋于均匀,该质心点的位置可以估算为各特征点的几何中心)的重叠,将样本各特征点的坐标减去质心点的坐标;②根据各样本的质心值(Centroid size, CS, $CS(X)=\sqrt{\sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^M (X_{ij} - C_j)^2}$,即每个特征点到质心点距离的平方和再开方),对每个样本缩放(每个特征点坐标除以质心值),从而消除了样本大小不一致对后续分析的影响;③旋转,选择一个样本的特征点轮廓形状作为参考,根据普氏距离最小的原则,将另一个样本特征点旋转,从而拍照时由于摆放角度的差异而造成的形状差异得以消除^[11, 19, 25, 26]。总之,GPA分析排除了非形态差异对研究结果的影响,将此前的原始数据转化成了可以多元统计分析的普氏形状坐标(Procrustes shape coordination)。

误差估计 在几何形态测量法的研究中,测量误差的大小是决定研究结果可靠程度的重要因素,所以本文将使用普氏方差分析(Procrustes ANOVA)的方法来对测量误差进行检测。在高原裸裂尻鱼同一采样点的样本中随机选取10张照片,每张照片按照1.4中的方法重复地取标志点和半标志点10次,从而得到了一个样本量为100的笛卡尔坐标数据矩阵nts文件。此后,对该矩阵进行GAP印叠处理,对得到的普氏形状坐标方差分析(analysis of variance, ANOVA),若组间方差在总方差中的比重(即测量误差)符合一定的范围,则说明测量误差在总方差中没有影响^[27]。

多元统计分析 本研究将GPA印叠之后得到的普氏形状坐标数据进行主成分分析和典型变量分析,前者是为了分析每个样本几何形态上的变异,后者是用来讨论不同居群之间高原裸裂尻鱼的差异。同时计算了两两居群之间的马氏距离(Mahalanobis distance)和普氏距离,并对其结果进行了基于10000次重复的P值检验。马氏距离和普氏距离都能用来定量分析两居群之间的变异大小,前者计算的是协方差矩阵数据的距离,用于检测样本中的某个个体与其他个体间的差异,即组间形态变异的重叠程度;而普氏距离用来检测的是居群间平均形态的差异程度,即各组间的形态差异^[28]。之后,计算各居群的平均形态,将平均形态数据导入到PSAT软件中,使用Euclidean算法聚类分析(10000次重复),用来展示全部主成分之间的差异。

2 结果

2.1 测量误差

对指名亚种象泉河居群的10张头部左侧轮廓照片10次重复测量的测量误差结果如下:对质心值和头部左侧轮廓的数据 P 检验,其 P 值均小于0.0001,说明该误差检测的结果极具有统计学意义,质心值的平均误差为0.0460%,头部左侧轮廓的平均误差是0.0004%。该结果表明,10次重复测量的误差检测数据不存在明显差异,样本中个体间的差异占总方差的99%以上,特征点选择时的人为误差不会对总方差造成影响。

2.2 高原裸裂尻鱼的头部轮廓形状

高原裸裂尻鱼亚种间侧面轮廓比较 图3展示了由10个标志点、17个半标志点组成的高原裸裂尻鱼各亚种、各居群的侧面平均轮廓形状。其中每一个点代表一个特征点,是由所研究样本普氏形状坐标系的平均位置而得到的,两点之间的连线则大致反映高原裸裂尻鱼侧面轮廓的平均形态。由图3可以看出,高原裸裂尻鱼头部侧面轮廓的差异主要集中在头部的形状、下吻部的形状和口裂特征这3个性状。

鱼类头部的长宽比能一定程度地描述头部形状。第25和26号特征点反映了高原裸裂尻鱼的头长,第15—18号特征点集表现出其头宽。如图3a,班公湖亚种的25、26号特征点向左突出33.98%,

15、16、17和18号特征点集在平均轮廓的下方的34.31%,因此该亚种头部的长宽比大于平均值,头部的形状较扁;而在图3b玛法木湖亚种中,头部也呈现出扁的形态,但是这种扁的趋势没有高原裸裂尻鱼班公湖亚种明显,头长和头宽的形变量分别是20.93%和15.59%;高原裸裂尻鱼指名亚种(图3c、3d和3e)的25和26号特征点在平均轮廓的右侧,15—18号特征点集趋近于平均轮廓,各居群的形变量均不超过20%,所以指名亚种的3个居群头部长宽比较小,头部的形状更圆。

第27、9号特征点的连线反映的是样本的口裂特征,图3显示:班公湖亚种的口裂位置位于平均口裂位置的上方,形变量达38.45%,口裂特征为端位;玛法木湖亚种的口裂位置也在平均口裂位置的上方,但形变量较小,为11.20%,口裂特征是亚下位;指名亚种的口裂位置位于平均值的下方,口型成明显的下位。

下吻部形状的变异,可用7、8、9号3个特征点来表示。班公湖亚种下吻部特征点的位置在平均位置的外部,变异量为42.04%,说明该亚种的下吻部明显向外凸起。玛法木湖亚种的下吻部的几何形态与平均形态最为接近,变异量不足10%。相反,指名亚种3个居群的个体,它们的下吻的特征点在平均轮廓的内部,呈向内凹陷的形态。

高原裸裂尻鱼各亚种下颌骨形状比较 在高原裸裂尻鱼头部的腹面,本文用13个特征点及连

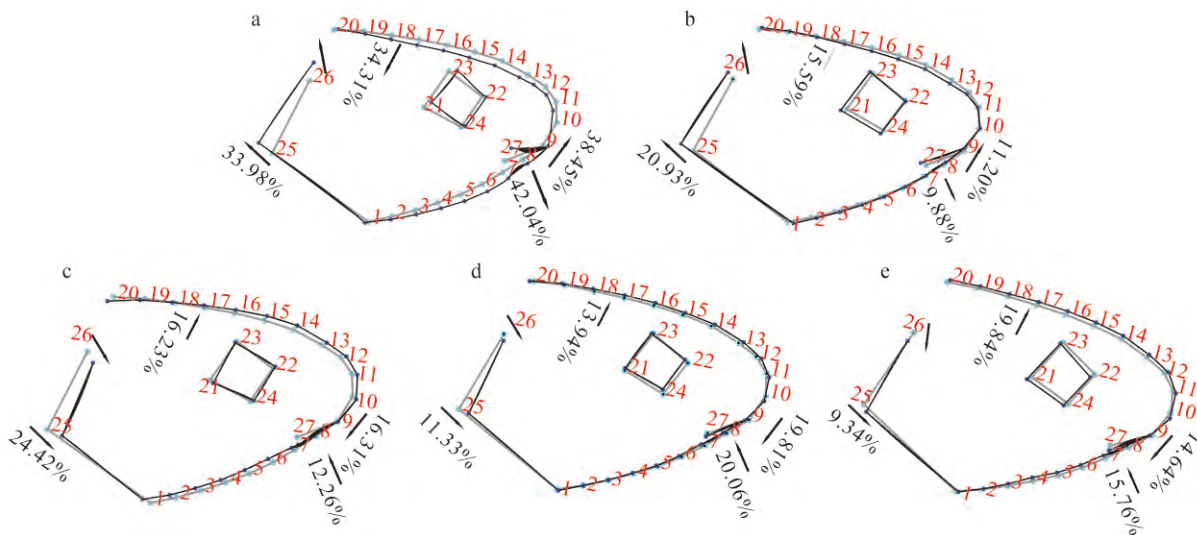


图3 由10个标志点、17个半标志点组成的高原裸裂尻鱼侧面轮廓

Fig. 3 The cephalic side contour constituting of 10 landmarks and 17 semi-landmarks of *Schizopygopsis stoliczkai*

a. 班公湖亚种; b. 玛法木湖亚种; c. 指名亚种象泉河居群; d. 指名亚种狮泉河居群; e. 指名亚种喀拉喀什河居群。灰色线条表示所有样本的平均轮廓,箭头和百分比数值代表变形的方向和大小

a. *S. stoliczkai* bangonggensis; b. *S. stoliczkai* maphamyumensis; c. Xiangquan River population of *S. stoliczkai* stoliczkai; d. Shiquan River population of *S. stoliczkai* stoliczkai; e. Karakash River population of *S. stoliczkai* stoliczkai. Gray lines represent the average for all samples, and the arrow means the direction of the deformation. The percentage is the size of the deformation

线描绘其以下颌骨为主的几何形状。高原裸裂尻鱼不同亚种的个体下颌骨的形态差异主要在以下3点。①下颌骨前端的轮廓形状差异: 班公湖亚种和玛法木湖亚种(图 4a、4b, 可称为湖泊型亚种), 其5、6、7号特征点的位置明显向外凸起, 说明湖泊型亚种的下颌骨向吻前端凸起, 下颌骨前端成圆弧形; 而在图 4c、4d、4e 河流型亚种中, 5、6、7号特征点的连线向身体一侧凹陷, 这三个特征点大致在一条直线上, 下颌骨前端形状平截。②下颌锐利角质的宽度差异: 图 4中12号特征点可反映锐利角质末端了位置, 班公湖亚种和玛法木湖亚种的12号点相对靠近6号点, 说明了湖泊型亚种的锐利角质出现了不同程度的退化, 班公湖亚种的平均锐利角质仅有0.21 mm(图 5a), 玛法木湖亚种的平均锐利角质长度为1.17 mm, 而指名亚种的三个居群锐利角质宽度均在2 mm以上。③口型特征的差异: 下颌骨前端到吻前端距离(即图 4中6号点和13号点的间距)可用来反映口型的特征, 班公湖亚种的这两点间距离很近, 通过实际测量, 该亚种的此项平均距离为0.48 mm(图 5a), 表明该亚种的口型特征为明显的端位; 在图 4b中, 玛法木湖的高原裸裂尻鱼下颌骨前端到吻前端的距离稍长, 平均距离为

1.43 mm, 玛法木湖亚种的口型为亚下位; 同样的, 如图 4c、4d、4e, 指名亚种的6号和13号特征点的间距相对较大, 下颌骨至吻前端的平均距离均在2.20 mm以上, 口型是明显的下位。图 5b展示了高原裸裂尻鱼内外鳃耙数量的差异, 玛法木湖的高原裸裂尻鱼鳃耙数多于其他居群, 对其进行置信区间为95%的独立样本 T 检验, 其 P 值均小于0.0001, 差异极显著。

2.3 高原裸裂尻鱼侧面轮廓主成分分析

高原裸裂尻鱼侧面轮廓主成分分析 图 6展示了基于由10个标志点、17个半标志点的数据对高原裸裂尻鱼侧面轮廓进行主成分分析, 以贡献值最大的两个主成分为坐标轴作出的二维分布散点图。主成分分析的结果能够进一步对高原裸裂尻鱼头部轮廓的变异进行解释, 结果如下。前3个主成分的累积贡献率达到了60.7%, 其中主成分1和主成分2的贡献率分别是25.6%和22.7%。主成分1的主要变异的位点位于6、7、8、25、26和27号特征点, 即高原裸裂尻鱼亚种间发生变异的形状是头长、口型特征和下吻部的形状, 横轴左侧的样本下吻部轮廓向下凸起, 口裂到下吻的距离较远, 鳃盖骨后缘后延, 符合于班公湖亚种的特征, 当主成分

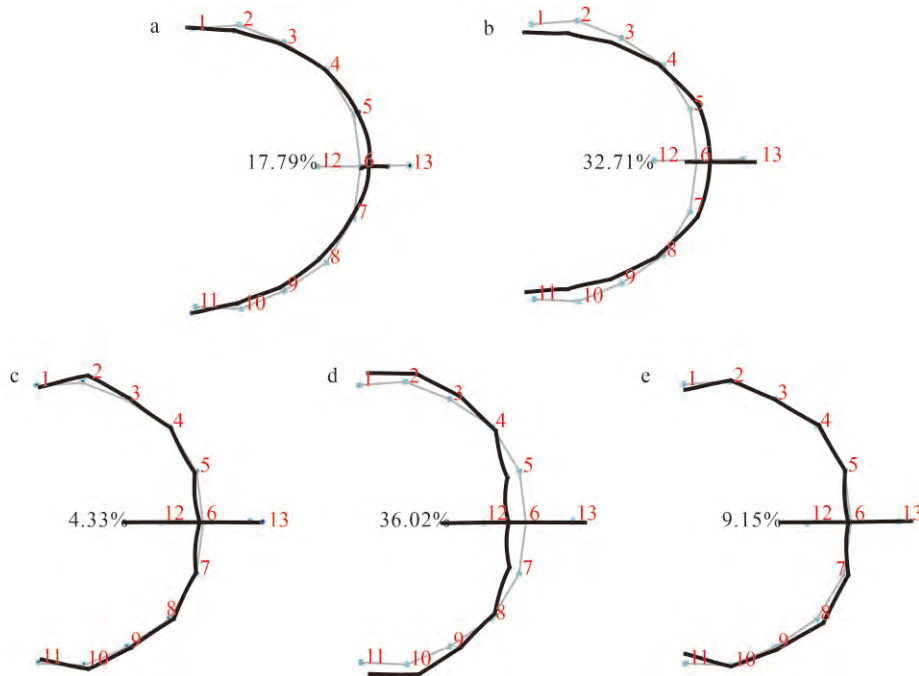


图 4 由13个特征点组成的高原裸裂尻鱼下颌骨轮廓

Fig. 4 The contour of the mandibles comprised of 13 characteristic marks of the specimens

a. 班公湖亚种; b. 玛法木湖亚种; c. 指名亚种象泉河居群; d. 指名亚种狮泉河居群; e. 指名亚种喀拉喀什河居群。灰色线条表示所有样本的平均轮廓, 百分比数值代表5、6、7号特征点变异大小

a. *S. stoliczkae* bangonggensis; b. *S. stoliczkae* maphamyumensis; c. Xiangquan River population of *S. stoliczkae* stoliczkae; d. Shiquan River population of *S. stoliczkae* stoliczkae; e. Karakash River population of *S. stoliczkae* stoliczkae. Gray lines represent the average for all samples, and the arrow means the direction of the deformation. The percentage is the size of the deformation

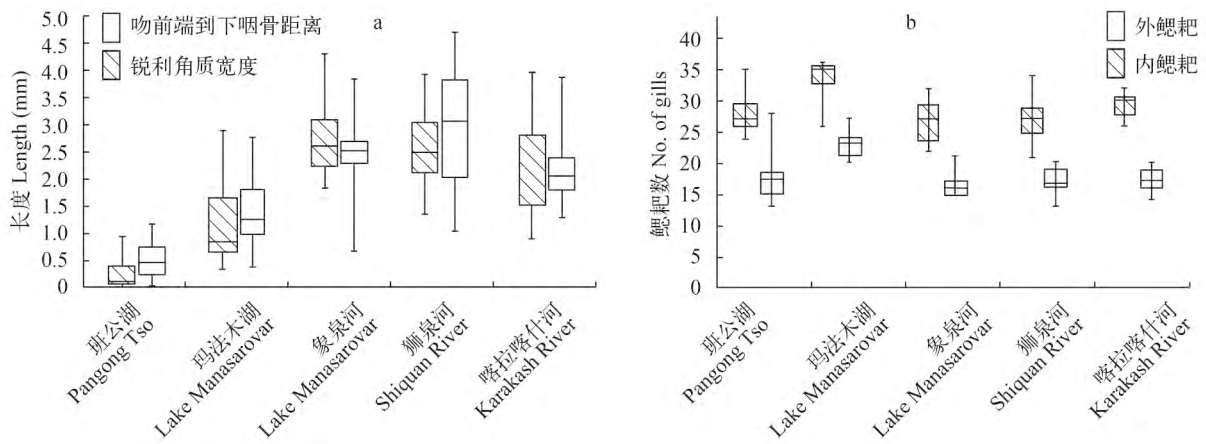


图5 食性相关的可量可数性状比较

Fig. 5 The boxplots show the measurable and numerable characters of the samples

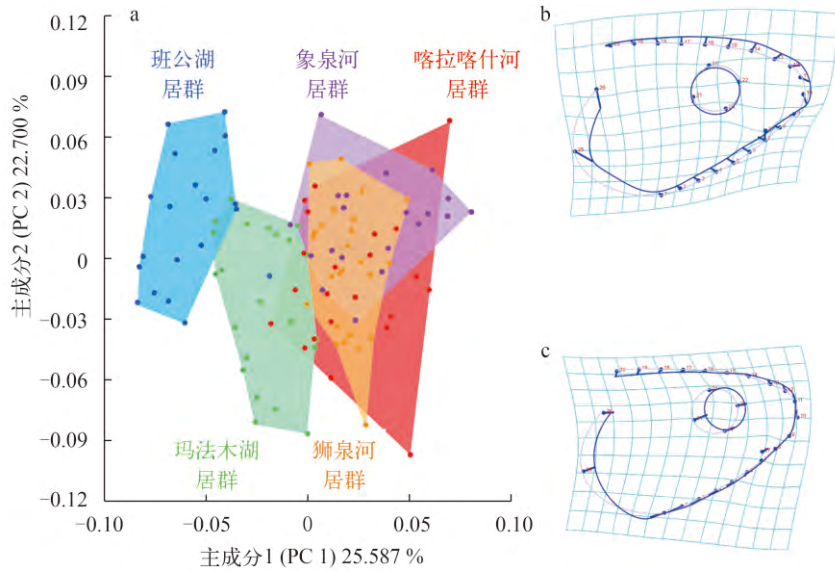


图6 高原裸裂尻鱼头部侧面轮廓主成分分析

Fig. 6 The scatter diagram based on the PCA for the cephalic side contour of all the schizothoracine fishes

a. 主成分分析散点图; b. 主成分1; c. 主成分2
a. The scatter diagram of PCA; b. PC1; c. PC2

1逐渐增大时, 样本的形态特征逐渐向玛法木湖亚种和指名亚种过度。

高原裸裂尻鱼下颌骨形状主成分分析 对描述高原裸裂尻鱼下颌骨形状的13个特征点的数据主成分分析, 提取前两个主成分作出的散点图如图7所示。主成分1和主成分2共能够解释下颌骨轮廓形状变异的87.3%。横轴主成分1正值方向分布的样本呈锐利角质退化、下颌骨前端靠近吻前端的趋势, 相反, 横轴负值方向的样本锐利角质趋于明显, 下颌骨前端距离吻前端的距离更大。主成分2除了能描述主成分1的变异之外, 下颌骨起点处的1、11号特征点也产生了向内凹陷的形状的变异, 该特征在玛法木湖亚种上表现得最明显: 该亚种的

散点图范围主要位于纵轴正值方向, 说明这些点的主成分2的值较大, 与其他样本相比, 玛法木湖的高原裸裂尻鱼下颌骨的宽度较小。

2.4 高原裸裂尻鱼不同居群间的典型变量分析

上文的主成分分析计算了所研究的每个样本在几个形态上的差异, 为了研究高原裸裂尻鱼不同居群之间的差异, 本文对所有样本按照居群进行分组并作了典型标量分析(图8), 其组间差异用马氏距离和普氏距离表示(表2—5)。

基于马氏距离和普氏距离得出的结论相似, 班公湖居群、玛法木湖居群与指名亚种3个居群之间的形态差异较大, 班公湖居群与玛法木湖居群、指名亚种3个居群之间发生的变异较小, 因此高原裸

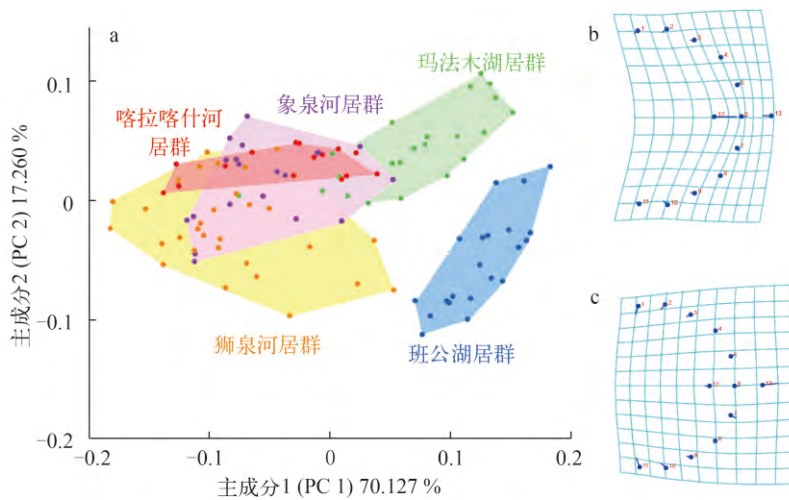


图7 高原裸裂尻鱼下颌骨形状主成分分析

Fig. 7 The mandible morphological variations of the fishes based on PCA

a. 主成分分析散点图; b. 主成分1; c. 主成分2
a. The scatter diagram of PCA; b. PC1; c. PC2

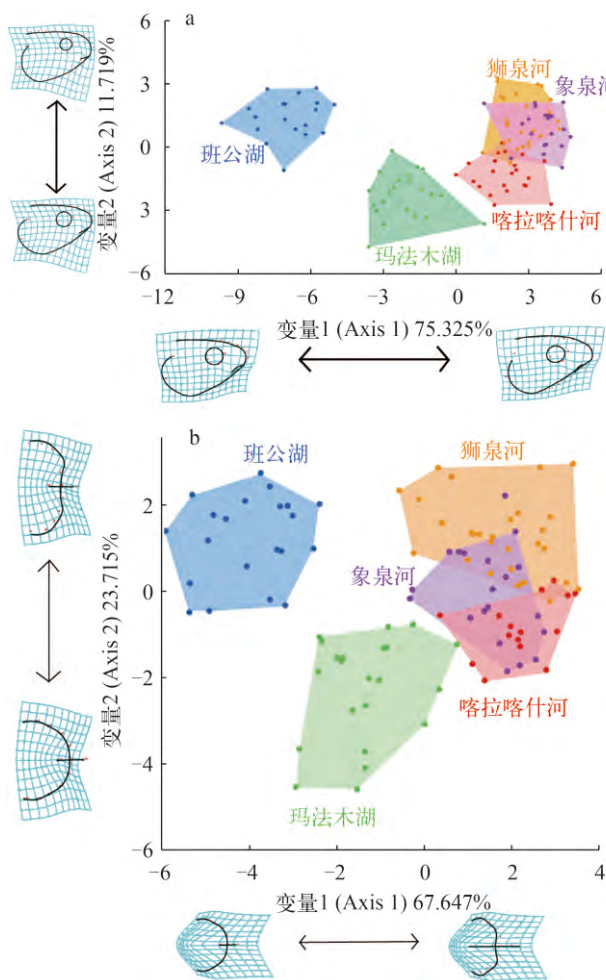


图8 高原裸裂尻鱼典型变量分析散点图

Fig. 8 CVA of all the 5 geographical populations

a. 侧面轮廓; b. 下颌骨轮廓
a. Profile contour; b. Mandible contour

表2 高原裸裂尻鱼各居群头部侧面轮廓马氏距离比较

Tab. 2 Shape difference of the cephalic side contour from different geographical populations according to Mahalanobis distance

	喀拉喀什河 Karakash River	狮泉河 Shiquan River	玛法木湖 Lake Manasarovar	班公湖 Pangong Tso
狮泉河 Shiquan River	3.5401*			
玛法木湖 Lake Manasarovar	5.4794*	6.2699*		
班公湖 Pangong Tso	9.5196*	9.7817*	6.3585*	
象泉河 Xiangquan River	4.6709*	3.387*	6.7531*	10.7854*

注: * 当 $P < 0.05$ 时, 差异显著, 表3、4和5同

Note: If $P < 0.05$, then significant different, same as Tab. 3, 4 and 5

表3 高原裸裂尻鱼各居群头部侧面轮廓普氏距离比较

Tab. 3 Comparisons of the cephalic side contour from different geographical populations on the basis of Procrustes distance

	喀拉喀什河 Karakash River	狮泉河 Shiquan River	玛法木湖 Lake Manasarovar	班公湖 Pangong Tso
狮泉河 Shiquan River	0.0248			
玛法木湖 Lake Manasarovar	0.0481*	0.0526*		
班公湖 Pangong Tso	0.0871*	0.0845*	0.0586*	
象泉河 Xiangquan River	0.0391*	0.0300	0.0701*	0.0939*

表 4 高原裸裂尻鱼各居群下颌骨轮廓马氏距离比较

Tab. 4 Geometric morphometrics variations of the mandible contour from different geographical populations based on Mahalanobis distance

	喀拉喀什河 Karakash River	狮泉河 Shiquan River	玛法木湖 Lake Manasarovar	班公湖 Pangong Tso
狮泉河 Shiquan River	2.8146*			
玛法木湖 Lake Manasarovar	4.2137*	4.6811*		
班公湖 Pangong Tso	6.6254*	5.8645*	4.5011*	
象泉河 Xiangquan River	1.8313	2.3408*	3.9961*	5.7756*

表 5 高原裸裂尻鱼各居群下颌骨轮廓普氏距离比较

Tab. 5 Comparisons of the mandible contour from different geographical populations on the basis of Procrustes distance

	喀拉喀什河 Karakash River	狮泉河 Shiquan River	玛法木湖 Lake Manasarovar	班公湖 Pangong Tso
狮泉河 Shiquan River	0.0760*			
玛法木湖 Lake Manasarovar	0.1128*	0.1678*		
班公湖 Pangong Tso	0.1827*	0.2120*	0.1117*	
象泉河 Xiangquan River	0.0261	0.0536*	0.1313*	0.1926*

裂尻鱼亚种间的差异主要产生在湖泊型亚种和河流型亚种之间。

本文分别对高原裸裂尻鱼的侧面轮廓和下颌骨轮廓进行了典型变量分析(图 8a和8b), 结果如下: 通过典型变量1和典型变量2, 高原裸裂尻鱼的三个亚种均能够独立地分开; 就居群而言, 指名亚种的三居群在散点图上的相对位置均有所重叠, 而班公湖居群和玛法木湖居群的几何形态具有完全独立的距离选择。在图 8a中, CV axis 1和CV axis 2分别能代表总体变异的73.3%和11.7%, 能对各亚种进行区分的形态变异主要体现在CV axis 1上的口型、下吻部形状和头长上, 而纵轴的差异主要体现在头部的长宽比和口型特征上, 负值处的特征在玛法木湖居群中尤其明显。在图 8b上, CV axis 1和CV axis 2的本征值(Eigenvalues)本别占总体的67.6%和23.2%, 其余CV axis的本征值比例均小于10.0%, 其中CV axis 1的变化表明高原裸裂尻鱼亚种间的形态差异主要体现在下颌骨前端弧度、锐利角质化程度和口型特征上, CV axis 2展示出的形态差异仅

在下颌骨的形状上, 其负值处的形态特征在玛法木湖的高原裸裂尻鱼居群上表现明显。

2.5 高原裸裂尻鱼头部平均轮廓的聚类分析

将高原裸裂尻鱼以居群分组, 对其平均轮廓数据聚类分析(图 9)。指名亚种的3个居群聚在了第一分支上, 该支分为两个侧枝, 狮泉河居群和喀拉喀什河居群聚在一起, 象泉河居群与其分开。此外玛法木湖居群和班公湖居群分别形成第二和第三分支。与班公湖居群相比, 玛法木湖居群距离第一分支的距离较近。

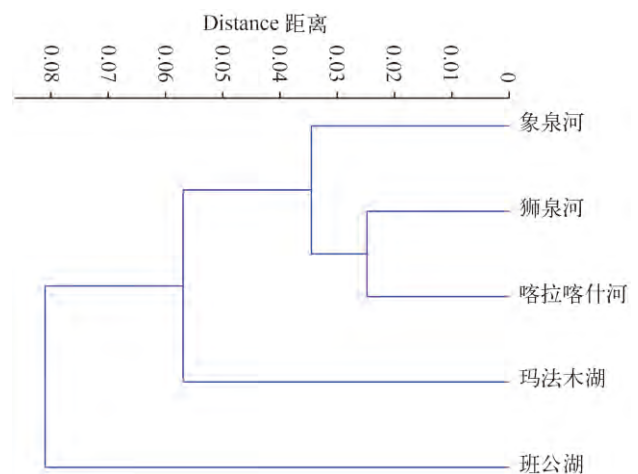


图 9 高原裸裂尻鱼头部形态聚类分析

Fig. 9 Phenetic tree of the geographical populations of these schizothoracine fishes based on the average Procrustes shape coordination

3 讨论

3.1 高原裸裂尻鱼的形态变异

武云飞^[1, 29]、陈毅峰、曹文宣^[2]、张春霖等^[30]早期对高原裸裂尻鱼研究时, 以可量可数性状和地理隔离为依据, 划分出高原裸裂尻鱼的3个亚种。本文使用现代几何形态测量法, 与此前的研究相比, 发现了以下更丰富的形态差异。

口型及吻部特征 武云飞、陈毅峰、曹文宣等^[1, 2]的记载, 班公湖亚种的口裂向上倾斜, 多为亚下位, 玛法木湖亚种和指名亚种的口裂下位。本文通过侧面轮廓的9号、27号特征点(图 3)和腹面轮廓的6号、13号特征点(图 4、图 5a)定量分析了高原裸裂尻鱼的口裂特征, PCA分析显示(图 6、图 7), 玛法木湖亚种和指名亚种的口裂特征已经出现分化, 分别为亚下位和下位, 班公湖亚种的口裂特征为端位。在高原裸裂尻鱼的口部, 除了口裂特征, 本文同时发现了之前未曾描述的下吻部特征的区别(图 6、图 8a), 以班公湖亚种为代表的湖泊型亚

种,下吻部向外凸起,相对而言,生活在河流里的指名亚种,下吻部向头内凹陷。

头部形状 1979年的《西藏阿里地区动植物考察报告》中^[31],对高原裸裂尻鱼形态特征描述时,对其三个亚种头部的形状均形容为圆锥形。本文研究(图3、图6、图8a)发现了这3个亚种头部形状更具体的差异:班公湖亚种的头部形状,相对于指名亚种而言,其长宽比更大,呈纺锤形;若把头部的形状近似为椭圆,班公湖亚种头部椭圆的离心率更大,该椭圆较扁,而指名亚种的头部椭圆形状更圆。

下颌骨及其锐利角质形状 有关高原裸裂尻鱼下颌锐利角质的情况,本文的数据(图4、图5a、图7)支持曾经的研究结果^[1,2,31],相对于指名亚种,班公湖亚种和玛法木湖亚种的下颌锐利角质出现了不同程度的退化。50.0%的班公湖亚种个体下颌锐利角质长度不足0.1 mm,此时人体肉眼已难以分辨^[32],并且出现了5个个体的下颌锐利角质完全消失。因此《青藏高原鱼类》^[1]和《中国动物志》^[2]上检索表以“下颌有无锐利角质”这一特征为依据来区别裸鲤属和裸裂尻鱼属鱼类将显得不合理,因为裸裂尻鱼属鱼类中的高原裸裂尻鱼班公湖亚种出现了“下颌锐利角质几乎完全退化”这一特殊情况。其次,本文所讨论的下颌骨的形状,这是曾经的研究没有涉及的。班公湖亚种的下颌骨前端圆弧形,而指名亚种的下颌骨前端明显平截。

亚种间形状的变化趋势 综上所述,除了内外鳃耙数量差异之外,3个亚种的形态差异主要集中在口型特征、下吻部形态、头部形状和下颌骨形状这些性状上,且与指名亚种相比,班公湖亚种在以上性状上变化最大,玛法木湖亚种的形态特征趋于班公湖亚种和指名亚种之间。

3.2 高原裸裂尻鱼形态变异的生态机制

不同地理种群的几何形态差异,可以间接反映该生物的种群结构,虽然不能作为描述种群遗传距离的直接证据,但是也能证明各地理种群的形态分化是长期处于不同生境下的地理隔离的结果这一现象^[33]。相反,由于取食、越冬或者繁殖等原因,某些个体在不同地理种群中频繁地迁移,那么最终可能会使得各地理种群间的形态差异越来越小^[34]。对本文而言,与高原裸裂尻鱼在同一个亚科不同属的物种花斑裸鲤(*Gymnocypris eckloni*),包含两个亚种——指名亚种(*G. eckloni*)和斜口亚种(*G. e sco-liostomus*)^[29],其形态上的变异特征也主要集中于口型上,由于逊木措湖的特殊的环境,导致其食性和生活环境的差异,这可能是该物种产生分化的生态学机理^[35]。同样,裂腹鱼亚科的青海湖裸鲤(*G.*

przewalskii),由于甘子河的地理隔离使其不同地理种群的生活环境产生差异,使得该物种分化为指名亚种(*G. p. przewalskii*)和甘子河亚种(*G. p. gan-zihonensis*)。类似地,就高原裸裂尻鱼班公湖亚种、玛法木湖亚种和指名亚种之间产生变异的原因讨论,本文认为主要是由于在不同的生境中,由于印度河水系和塔里木水系长期的地理隔离,引起水体理化因素和食物成分的改变所造成。由于河流型亚种所生活的水域,位于流域的上游,流速快,食物相对贫乏,从而其主要以刮食藻类的方式取食;在班公湖、兰嘎湖和玛法木湖等湖泊型亚种所栖息的地区,由于湖泊的水位高,水流速慢,水流冲击力较弱,可以取得到更多的浮游和底栖动植物作为食料^[1],因此进化出以上适应该栖息环境的形态特征。

总之,在具有不同采样时间且保存良好的大量样本的基础上,用几何形态测量学来描述高原裸裂尻鱼不同地理种群之间的差异,该方法是非常实用的。然而,如果将几何形态测量法与分子数据、生活史、耳石研究、生理生化、标志放流技术等研究手段结合,那么会得到更全面且深刻的结果。尽管如此,鱼类的身体形状与其适合度和自然选择压力等因素息息相关,在长时间中性突变的累积下,这些因素转而也会加快该鱼类地理种群的遗传变异^[36],从而现代几何形态测量法在裂腹鱼类系统发育、分类鉴定等方面的运用具有十分重要的价值。同时,该方法是几何形态测量法的革命^[9],从1996年发展至今,在生物学不同领域上都有着广泛的应用^[10,11,13],但在近期最新有关裂腹鱼类形态学的研究^[4-6],均用的是传统的形态学测量法——框架法。本文所用的研究方法是在高原裸裂尻鱼为代表的裂腹鱼亚科鱼类上的首次尝试,以具有同源性的解剖位点为基础,与传统的框架法相比,能对研究对象的形态更加精确的描述和分析^[34],可作为一种模式,用于其他裂腹鱼类的研究,在大量研究所积累的大数据的基础上,建立鱼类形态特征数据库。同时,本研究也从形态学的角度,丰富了高原裸裂尻鱼的微进化理论,为其分类地位、种群生态和保护生物学的研究提供更深刻的理论支持。

参考文献:

- [1] Wu Y F, Wu C Z. The Fishes of the Qinghai-Xizang Plateau [M]. Chengdu: Sichuan Publishing House of Science & Technology. 1992 [武云飞, 吴翠珍. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社. 1992]
- [2] Chen Y F, Cao W X. Schinzotheoracinae [A]. In: Yue P Q, et al. (Eds.), Fauna Sinaica Osteichthyes Cypriniformes III [C]. Beijing: Science Press. 2000, 273 [陈毅峰, 曹文

- 宣. 裂腹鱼亚科. 见: 乐佩琦, 等. 中国动物志硬骨鱼纲鲤形目(下卷). 北京: 科学出版社. 2000, 273]
- [3] Zhao K, Yang G S, Li J B, *et al.* Phylogenetic structure of *Schizopygopsis pylzovi* populations from mitochondrial cytochrome *b* gene sequence variations [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(2): 129—133 [赵凯, 杨公社, 李俊兵, 等. 黄河裸裂尻鱼群体遗传结构和Cyt *b*序列变异. 水生生物学报, 2006, **30**(2): 129—133]
- [4] Nie Z L, Wei J, Ma Z H, *et al.* Morphological variations of Schizothoracinae species in the Muzhati River [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, **30**(2): 359—365
- [5] Mir J I, Mir F A, Patiyal R S. Phenotypic variations among three populations of Chirruh snowtrout, *schizothorax esocinus* (Heckel, 1838) in Kashmir Himalaya with insights from truss network system [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 2014, **84**(1): 105—111
- [6] Xie J Y. Genetic and morphological variation of three freshwater lake populations of *Coilia ectenes* (Engraulidae) [J]. *Russian Journal of Genetics*, 2012, **48**(10): 1029—1034
- [7] Strauss R E, Bookstein F L. The truss: body form reconstructions in morphometrics [J]. *Systematic Biology*, 1982, **31**(2): 113—135
- [8] Bai M, Yang X K. Application of geometric morphometrics in biological researches [J]. *Entomological Knowledge*, 2007, **44**(1): 143—147 [白明, 杨星科. 几何形态测量法在生物形态学研究中的应用. 昆虫知识, 2007, **44**(1): 143—147]
- [9] Ge D Y, Lin X, Lü X F, *et al.* Methods in geometric morphometrics and their applications in ontogenetic and evolutionary biology of animal [J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2012, **37**(2): 296—304 [葛德燕, 夏霖, 吕雪霏, 等. 几何形态学方法及其在动物发育与系统进化研究中的应用. 动物分类学报, 2012, **37**(2): 296—304]
- [10] Viscosi V, Cardini A. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners [J]. *PloS One*, 2011, **6**(10): e25630
- [11] Bookstein F L. Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape [J]. *Medical Image Analysis*, 1997, **1**(3): 225—243
- [12] Mitteroecker P, Gunz P. Advances in geometric morphometrics [J]. *Evolutionary Biology*, 2009, **36**(2): 235—247
- [13] Bookstein F L. Applying landmark methods to biological outline data [A]. In: Mardia K V, Gill C A, Dryden I L (Eds.), *Image Fusion and Shape Variability Techniques* [C]. Leeds: Leeds University Press. 1996, 59—70
- [14] Li H J, Xu X N. Morphometric analysis of the Chinese facial profile: Contour of the side face and its variations in Tu and Zang ethnic minorities [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2014, **16**: 1516—1524 [李海军, 徐晓娜. 青海土族和藏族侧面轮廓形状及其变异: 基于标志点的几何形态测量分析. 科学通报, 2014, **16**: 1516—1524]
- [15] Mitteroecker P, Gunz P, Bernhard M, *et al.* Comparison of cranial ontogenetic trajectories among great apes and humans [J]. *Journal of Human Evolution*, 2004, **46**(6): 679—698
- [16] Lan Y H, Niu H Y, Lin S Z, *et al.* Effect of microscopic photography conditions on test results of cell morphology [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, **12**(5): 872—875 [蓝永洪, 牛海艳, 林世珍, 等. 显微摄像条件对细胞形态测试结果的影响. 现代生物医学进展, 2012, **12**(5): 872—875]
- [17] Fruciano C, Tigano C, Ferrito V. Body shape variation and colour change during growth in a protogynous fish [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2012, **94**(4): 615—622
- [18] Muschick M, Indermaur A, Salzburger W. Convergent evolution within an adaptive radiation of cichlid fishes [J]. *Current Biology*, 2012, **22**(24): 2362—2368
- [19] Zelditch M L, Swiderski D L, Sheets H D. *Geometric Morphometrics for Biologists: a Primer* [M]. San Diego: Elsevier Academic Press. 2004, 36—40
- [20] Mullin S K, Taylor P J. The effects of parallax on geometric morphometric data [J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2002, **32**(6): 455—464
- [21] Xing S, Zhou M, Liu W. Crown morphology and variation of the lower premolars of Zhoukoudian *Homo erectus* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2009, **54**(19): 2902—2911 [邢松, 周蜜, 刘武. 周口店直立人下颌前臼齿冠形态结构及其变异. 科学通报, 2009, **54**(19): 2902—2911]
- [22] Su J X. *Ichthyology and Mariculture* [M]. Beijing: China Agriculture Press. 1995, 1116 [苏锦祥. 鱼类学与海水鱼类养殖. 北京: 中国农业出版社. 1995. 11—16]
- [23] Liu W, Clarke R, Xing S. Geometric morphometric analysis of the early *Pleistocene hominin* teeth from Jianshi, Hubei Province, China [J]. *Science China Earth Sciences*, 2010, **40**(6): 724—736 [刘武, Clarke R, 邢松. 湖北建始更新世早期人类牙齿几何形态测量分析. 中国科学: 地球科学, 2010, **40**(6): 724—736]
- [24] Klingenberg C P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2011, **11**(2): 353—357
- [25] Rohlf F J, Slice D. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks [J]. *Systematic Biology*, 1990, **39**(1): 40—59
- [26] Slice D E. *Modern Morphometrics in Physical Anthropology* [M]. Springer Science & Business Media. 2005, 1—383
- [27] Firmat C, Schliewen U K, Losseau M, *et al.* Body shape differentiation at global and local geographic scales in the invasive cichlid *Oreochromis mossambicus* [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2012, **105**(2): 369—381

- [28] Suo Z Y, Bai M, Li S, *et al.* A geometric morphometric analysis of the morphological variations among Chinese populations of *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera: Scarabaeidae) with an inference of the invading source of its Xinjiang populations [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2015, 4: 408—418 [索中毅, 白明, 李莎, 等. 中国白星花金龟地理变异的几何形态学分析及其新疆种群的入侵来源推断. 昆虫学报, 2015, 4: 408—418]
- [29] Wu Y F, Chen Y. The fishes in Guoluo and Yushu region of Qinghai province [J]. *Acta Zootaxonomic Sinica*, 1979: 4(3): 287—296 [武云飞, 陈瑗. 青海省果洛和玉树地区的鱼类. 动物分类学报, 1979, 4(3): 287—296]
- [30] Zhang C L, Yue Z H, Huang H J. The *Schizopygopsis* in southern Tibet [J]. *Acta Zootaxonomic Sinica*, 1964, 4: 661—673 [张春霖, 岳佐和, 黄宏金. 西藏南部的裸裂尻鱼属(*Schizopygopsis*)鱼类. 动物分类报, 1964, 4: 661—673]
- [31] Qinghai Biology Institute. The investigation report of animals and plants in Ngari Prefecture, Tibet [M]. Beijing: Science Press. 1979, 21—24 [青海省生物研究所编著. 西藏阿里地区动植物考察报告. 北京: 科学出版社. 1979, 21—24]
- [32] Zhao L K, Ren Y L. The invisible friends [J]. *China Nature*, 1983, 1: 32 [赵立魁, 任玉岭. 看不见的朋友. 大自然, 1983, 1: 32]
- [33] Campana S E, Gagné J A, McLaren J W. Elemental fingerprinting of fish otoliths using ID-ICPMS [J]. *Marine Ecology Progress Serie*, 1995, 122(1): 115—120
- [34] Sequeira V, Rodriguez-Mendoza R, Neves A, *et al.* Using body geometric morphometrics to identify bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) populations in the Northeastern Atlantic [J]. *Hydrobiologia*, 2011, 669(1): 133—141
- [35] Zhao K A I, Duan Z Y, Peng Z G, *et al.* The youngest split in sympatric schizothoracine fish (Cyprinidae) is shaped by ecological adaptations in a Tibetan Plateau glacier lake [J]. *Molecular Ecology*, 2009, 18(17): 3616—3628
- [36] Swain D P, Foote C J. Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification [J]. *Fisheries Research*, 1999, 43(1): 113—128

GEOMETRIC MORPHOMETRICS OF THE CEPHALIC CONTOUR AND ITS MORPHOLOGICAL VARIATIONS AMONG *SCHIZOPYGOPSIS STOLICZKAI* (TELEOSTEI: CYPRINIDAE)

WANGHE Kun-Yuan^{1,2,3}, TANG Yong-Tao^{1,2,3}, LI Guo-Gang^{1,2,3}, ZHANG Ren-Yi^{1,2,3}, FENG Chen-Guang^{1,2,3}, TONG Chao^{1,2,3}, LIU Si-Jia^{1,2,3}, ZHANG Cun-Fang^{1,2,3}, TIAN Fei^{1,2,3} and ZHAO Kai^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Laboratory of Plateau Fish Evolutionary and Functional Genomics, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Schizopygopsis stoliczkai*, belongs to family Cyprinidae, distributes in the lakes and rivers in Qinghai-Tibetan Plateau, China. The morphological differences in the species are attributed to the local environments, hence identifying the variations helps to improve our understanding of micro-evolution theory and provide the guidance for the ecological and biodiversity protection. To explore the morphological diversity, we quantitatively measured the cephalic contour in *Schizopygopsis stoliczkai* from five different geographical populations using modern geometric morphometrics. The principal component analysis (PCA) and canonical variate analysis (CVA) revealed that the variations among five geographical populations were mostly in the shapes of the lower part rhynchodaenm, orifice of mouth, mandible and sharp clogs. Furthermore, PCA, CVA and cluster analysis showed that the three subspecies of *S. stoliczkai stoliczkai*, *S. stoliczkai maphamyumensis* and the *S. stoliczkai bangongensis* were separated. The samples from each subspecies were clearly grouped together based on PC1, which strongly supported the reliability of three subspecies in *S. stoliczkai*. The Procrustes distance and the Mahalanobis distance suggested that five geographical populations could divide into two categories: the lacustrine type and the riverine type, which supported by cluster analysis. Taken together, we profiled the morphological variations in the head of *S. stoliczkai*, and classified the fish into two types, which might regulate by natural resources and environment of lake and river.

Key words: *Schizopygopsis stoliczkai*; Geometric morphometrics; Subspecies division; Rincipal component analysis (PCA); Canonical variate analysis (CVA); Geographic variation