

基因间隔序列 (ITS) 在水产动物种质鉴定和遗传多样性分析中的应用

徐田军, 刘楚吾, 刘丽, 董秋芬, 杨叶欣

(广东海洋大学海洋生物研究所, 广东 湛江 524025)

关键词: 基因间隔序列 (ITS); 种质鉴定; 遗传多样性

中图分类号: Q953.3

文献标识码: A

文章编号: 1007-7995(2006)01-0084-05

近年来,由于国内外市场对水产品的需求不断增长,水产业因此获得了长足的发展,许多水产种类的养殖量有了大幅度的增加,在给我国国民经济的增长作出贡献的同时,已经不可避免的带来了许多弊端,一些方面甚至在一定程度上会影响未来水产业的发展。其中最应该引起关注的是由于目前捕捞强度的增加、生态环境的恶化等,导致许多种群的数量大量减少,产量也随之降低,种质资源遭到前所未有的破坏和衰退。因此,种质鉴定、种群分析及保护和遗传多样性的研究已经成为当前水产研究的当务之急^[2-7]。

随着分子生物学技术的发展,理论与实际应用以前所未有的速度结合起来,各种分子标记技术(如 RAPD、AFLP、RFLP 等)在诞生不久很快就被应用于水产动物的种质鉴定及遗传多样性的研究上^[4-7]。这对种群遗传多样性资料的获得和种群遗传标记的建立有着非常重要的意义,因为在此之前,许多种质鉴定、种质分析的资料是建立在对表型观察、对外部特征的描述上的,这不可避免的存在一些主观性和不准确性,而分子标记技术的出现改变了这一状况,使其获得了长足的发展。

但一些分子标记技术由于操作水平、仪器、试验环境等因素的影响,它们依然存在着各自的缺点。近年来,随着 DNA 测序技术的发展,越来越多的群体遗传性研究采取了基于测序技术的 DNA 分子标记^[3],因为不管是个体还是群体,它的遗传变异和其多态性从根本上来说都是由于 DNA 序列的差异和

多态引起的,DNA 序列分析可以准确地检测出碱基替换、插入和缺失等变异信息。利用这些变异数据来研究遗传结构,不仅可以获得丰富的遗传变异资料,也更接近种群间的进化关系。从而真正做到了在分子水平上来分析个体、群体、种间的遗传变异和多态性^[1-3]。其中 ITS 序列的测定更是成为其中的热点之一。本文将对 ITS 序列的结构特征和研究方法以及近年来国内外学者利用 ITS 技术在水生生物方面的研究作一概述,并对 ITS 序列分析这一方法的优缺点进行评价,以期对水产研究者提供一定的帮助。

1 基因间隔序列 (ITS) 的概念和结构特征

目前,用于分子系统学研究的基因序列,主要有线粒体 DNA 和核糖体 DNA。真核生物的核糖体都有 3 种 rRNA,即 18srRNA,5.8s rRNA 和 28srRNA,这些 rRNA 基因都是以串联重复形式存在,编码这些 rRNA 的基因按顺序排列在一条 DNA 上,这段具有特定转录功能的 DNA 片段称为 rDNA 操纵子^[9]。

rDNA 是由转录单位和非转录单位的间隔区组成的一个重复单位。其中 18s,5.8s 和 28srRNA 基因组成一个转录单元,形成一个前体 RNA。而非转录单位包括三个部分:非转录间隔区 (non transcribed sequence NTS) 位于 rDNA 相邻重复单位之间;外转录间隔区 (extra transcribed sequence ETS) 位于 18-

收稿日期:2005-06-28

第一作者:徐田军(1982-),男,硕士研究生,从事水产动物分子生物学研究。

通讯作者:刘楚吾。E-mail:swyjs@zjou.edu.cn

sRNA 的上游 (upstream); 内转录间隔区 (internal transcribed spacers ITS) 包括 ITS1 和 ITS2, 分别位于 18sRNA 和 5.8sRNA, 5.8sRNA 和 28sRNA 之间。有时将 ITS1, 5.8sRNA 和 ITS2 统称为 ITS 区(图 1)^[3-8]。

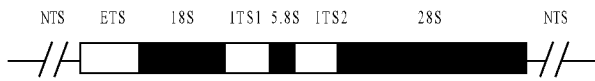


图 1 真核生物 rDNA 一个拷贝的结构

Fig. 1 The Structure of a repeating Unit of Eukaryote rDNA

rDNA 操纵子在不同个体中的个数不是恒定的, 根据种类不同, 拷贝数从一到几百不等。在大多数硬骨鱼类中有 240 - 400 个拷贝, 在两栖类中有 450 - 760 个, 而在原生生物中则仅有 1 - 9 个拷贝^[4,7]。真核生物中其个数明显多于原核生物, 可能是由于真核生物的新陈代谢以及繁殖发育过程中需要大量的蛋白质的合成, 而蛋白质的合成则需要大量核糖体的存在^[10]。

各个 RNA 亚基间的 ITS 序列, 其长度和序列上在不同的种类中有着非常大的差异, 并且在同一个体的不同操纵子上的 ITS 序列也可能是不同的, 也有着长度和序列上的差异, 说明在动物的进化过程中它是具有很高的可变性。

2 ITS 研究的原理与应用方法

DNA 序列测定可以直接从 DNA 的碱基组成上获得遗传变异的信息, 并且更接近种群间的进化关系, 因此它是区分种群与个体间的遗传差异最彻底和最准确的方法, 能够提供给我们完全的遗传信息。但是测得个体全部的 DNA 序列不仅在技术上实现有很大的困难、花费高, 而且在很多时候是完全没有必要的。我们只要选择一些在生物的进化过程中其序列变异比较大, 差异性比较明显的序列来测定和分析就可以获得所需要的遗传变异的信息, 而 ITS 就是这样值得我们去分析的一个区域。

2.1 ITS 区域的变异性

由于 ITS 属于非编码区序列最终不加入成熟核糖体, 所以受到的选择压力较小, 进化速度快, 具有可变性并且变异的速度在不同的物种间也存在着较大的差异, 因此不长的 ITS 序列能够提供比较丰富的变异位点和信息位点。在不同的物种中比较适合种间, 亚种和种群水平上的系统发生的研究^[5,6,36]。

在已经研究的动物的 ITS 序列中, 发现 ITS 序列存在着多层次水平的差异, 不仅在种间存在着差异性, 在同一个种的不同地理种群中也存在着明显的差异性, 并且由于个体的基因组中有多个 rDNA 拷贝存在, 不同的 ITS 间隔序列之间也存在着差异, 这些差异体现在长度和序列两个方面^[5]。

2.2 ITS 引物的设计

ITS 被成功应用于分子系统学的研究主要是因为: (1) ITS 序列在基因中是高度重复的, 它通过不等交换 (unequal crossing-over) 和基因转变 (gene conversion) 而经历快速的协同进化 (concerted evolution), 导致了在基因组中的一致性。^[11,12] (2) ITS1 和 ITS2 分别位于 18s - 5.8s 和 5.8s - 28s 之间, 从低等到高等的真核生物, 这些 RNA 都是高度保守的, 这样非常有利于设计 PCR 引物并成功的扩增出 ITS 序列。

表 1 总结了一些常用在贝类、鱼类以及甲壳类中扩增 ITS 区域的通用引物, 利用这些引物通过 PCR 反应可以扩增出需要的片段。

表 1 成功应用于水产动物 ITS - PCR 的引物序列

Tab. 1 ITS - PCR primer sequence successfully applied to aquatic animals

物种	引物序列	参考文献
<i>Gastropoda</i>	ITS - 1A 5 GGTTCGTGAGGTGAACCTCC	3 2,3,6,7
<i>Bivalvia</i>	ITS - 1B 5 CTCCGTTCTTCATCGACCC	3
	ITS - 2A 5 GGGTCGATGAAGAACCAG	3 2,3,7
	ITS - 2B 5 GCTCTTCCCGCTTCACTCG	3
	ITS A 5 GGTTCGTGAGGTGACCTCC	3 3,7
	ITS B 5 GCTCTTCCCGCTTCACTCG	3
<i>Osteichthyes</i>	ITS - 1A 5 AAAAACTTCCGTAAGGTGAACCTCC	3 4,23,25,26,27
	ITS - 1B 5 AGCTTGCTGCGTTCCTTCATCG A	3
	ITS - 1A 5 GGTTCGTGAGGTGAACCTCC	3 31
	ITS - 1B 5 CTCCGTTCTTCATCGACCC	3
	ITS - 2A 5 CTACGCTTGTCTGAGTGTC	3 25,27
	ITS - 2B 5 ATATGCTTAAATTCACCGGG	3
	ITS A 5 CTTGACTATCTAGAGGAAGT	3 25
	ITS B 5 ATATGCTTAAATTCACCGGG	3
<i>Crustacea</i>	ITS - 1A 5 CGAAGTAAAGTCGTAACAAG	3 37,38
	ITS - 1B 5 ATCGACCCACGACCCGAGTGAC	3
	ITS - 2A 5 GTGGGTCGATGAAGACCCAGG	3
	ITS - 2B 5 TTCAGICCCCTTACTAAGGGAATCC	3
	ITS A 5 GGAAGTAAAGTCGTAACAAG	3
	ITS B 5 TTCAGICCCCTTACTAAGGGAATCC	3

2.3 ITS 在分子系统学中的应用

目前, ITS 已经成为微生物和分子系统学中的

一种重要分子标记技术。在微生物、植物、细菌病毒等物种得到广泛的应用。在分析这些物种的进化发生,鉴定亲缘关系方面作出了贡献。研究表明 ITS 区一般适合于相近的种和同种的不同地理种群及不同品系的研究^[36]。目前,ITS 区域在分子系统学中的应用主要有:

2.3.1 系统树的构建 分子系统学研究的一个目的就是通过 DNA 的碱基差异来构建系统树,以阐明不同物种、不同种群之间的关系。商慧敏对 8 种盾纤亚纲纤毛虫共 9 个种群的 ITS - 1 序列进行了测序,并构建了距离树和最大似然树,在这两个树中,盾纤亚纲、旋唇纲和侧口纲的种类均很好的聚合在一起,彼此明确分开^[13]。Vidigal et al. 在软体动物双脐螺的系统进化研究中,把分布于巴西的双脐螺 (*Biomphalaria*) 的 10 个种的 ITS2 序列,分别用最大简约法 (maximum parsimony) 和最大似然法 (maximum likelihood) 构建了分子系统树,其结果同用形态学特征得到的结论相一致^[14]。

2.3.2 进化方式的研究 Verneau 等对绦虫多节亚目的 *Bothriocelalus* 属的 7 个种的 ITS - 1 进行了研究,发现通过此序列得到的系统发生树与其宿主真口鱼类 (Teleostean) 的系统进化之间没有明显的协同进化关系^[15]。Odorica 和 Miller 对鹿角珊瑚的 ITS 区研究发现它们具有网状进化 (reticulate evolution) 的特征^[16]。

2.3.3 对新种的分类鉴定 一些种类的鉴定传统上主要依据形态特征,如寄生虫。但研究表明,由于环境温度,以及年龄和标本的处理方法都可能导致形态变异,给虫体的鉴定造成困难,用 ITS 序列作为分子标记进行研究,有时会取得满意的结果。丁雪娟等对四种新本尼登虫 ITS 序列进行研究,结果表明未定种 1 和 2 与玫氏新本尼登虫非常相似,差异率为 0.17%,应为同一个种;而本尼登虫与新本尼登虫的差异在 33% 以上,在遗传距离上相隔比较远^[17]。

2.3.4 作为一些种和亚种的鉴别标记 Zahler 等研究孢子虫 *Balesiacanicans*, *B. c. vogeli* 和 *B. c. rossi* 后指出,ITS 区的 PCR 产物可作为 3 个亚种的鉴别标记。董世娟在对片形吸虫的 ITS - 1 序列研究后初步认为它可以作为遗传标记来区分大片吸虫 (*Fasciola gigantica*) 和肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*),同时也证实了在我国除了这两种片形吸虫外,还可能存在着“中间型”的片形吸虫^[19]。

3 ITS 在水产动物研究中的应用

在水产研究中,利用 RAPD、RFLP、AFLP 以及同工酶电泳等分子标记方法来研究水产动物的遗传多样性的技术已经比较成熟,但就 ITS 研究来说,目前大部分都集中在细菌、微生物、植物、昆虫等,在水产动物的研究中尽管有所应用,但比较少,主要集中在贝类的系统学研究中,在鱼类的研究可以说是刚刚起步。目前对 ITS 的研究主要集中在遗传多样性分析、序列比较分析和区系的划分等方面。

3.1 在遗传多样性分析及系统分类领域

在对贝类的研究中,国内外学者均付出了较多的努力。Insua 等用 ITS 区对扇贝科 4 个种进行了系统发生关系研究,发现单独使用 ITS - 1 或 ITS - 2 或同时使用两个片段进行系统学分析结果相似^[20]。Coleman 分析了采自世界各地的 17 种鲍的 ITS 序列,作出聚类分析^[21]。Ernandez, Atcia et al. 对 3 种贻贝 ITS 区域进行了种间遗传多样性研究^[22]。Philips, Susan et al. 对不同地理种群的 *Salvelinus* 的 rDNA - ITS1 进行了测序,结果表明几个种群(种内不同群体)之间的序列相似性较大,对它们进行系统发育分析,可以区分不同的地理种群^[23]。Fernandez 等利用 ITS 区的 PCR - RFLP 分析技术区分了 3 种帘蛤科贝类^[24],魏晓华将测得的四种扇贝的 ITS - 1 序列与其他四种扇贝构建了系统发育树,与用其他方式构建的有很强的一致性^[6]。

在鱼类的研究中,目前主要集中在鲑科。Dornico 等通过对 rDNA 的 ITS1 和 ITS2 区基因的测序结果,综合分析了大西洋鲑的系统发育关系,分析认为 pink 和 chum salmon 以及 coho 和 chinool salmon 之间有最近的亲缘关系^[25]。Sajdak 等通过对白鲑种类 rDNA - ITS1 的序列分析,构建了较大范围的系统发育树,并与通过蛋白质分析和 mtDNA 分析所构建的系统发育树进行了比较,得到了较为一致的结果^[26]。

3.2 序列比较与分子标记

Harris, Crandall 测得克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的 ITS1 和 ITS2 序列,他们分别为 760 bp 和 1300 bp,是目前在无脊椎动物中已测得的最长的 ITS 序列^[28]。Chu 等在对甲壳类的研究中发现,在同一个体内的基因组内的 ITS 序列存在差异^[29]。Heath 等利用 ITS 区序列测得加拿大西部的沿海贻贝 (*Mytilus* spp.) 存在不同的基因型^[30]。

姜艳艳测得日本三个不同地理群体的 ITS - 1 序列为 393bp, 认为在分析遗传多样性方面 ITS 序列分析不如 CoI 基因更有力^[31]。喻子牛等对栉孔扇贝的 ITS 序列进行了研究, 分别获得了 ITS - 1 和 ITS - 2 部分序列^[32]。陈琳林等对魁蚶的 ITS 序列进行了研究, 测得 ITS - 1 和 ITS - 2 序列长度分别为 461bp 和 533bp, 通过与其他四种贝类的比较, 发现魁蚶与几种贝类的同源性差别不大, 同时对五种蚶科贝类的 ITS - 2 相应片段进行比较, 发现中间有 75bp 的保守区域, 她认为 ITS 区可以应用于贝类的分子系统学或种群遗传结构方面的研究^[2]。邓筑虹对南海四种常见笛鲷的 ITS 序列进行测序比较, 认为在南海领域笛鲷的遗传多样性比较丰富, 测得的 ITS 序列可以作为一个分子标记应用于分子鉴别和系统学领域, 并认为有必要对南海其他常见笛鲷的 ITS 区域作一分析, 以确定是否每一笛鲷种都有其特殊的 ITS 序列^[4]。

3.3 生物区系结构的划分

King 等对淡水贝类 *Lasmigona subviridis* 的 ITS 进行研究, 分析结果表明 ITS 序列是适用于地理系统学的一个有效片段^[33]。Coleman 等对鲍科 ITS 序列的聚类分析结果表明鲍科生物的进化树从基部就开始分成界限明显的 3 个种群, 即北太平洋种、欧洲种、澳大利亚种^[21]。Toro 应用 ITS 序列限制片段图谱区分了智利南部沿海四种贻贝^[34]。

4 ITS 方法在研究中存在的问题和缺陷

ITS 区域的可变性提供了非常多的变异位点, 可以从中获得较多的变异和位点信息, 在分析动物的遗传多样性、分类研究方面得到了应用。但它仍然存在着一些缺点和不足之处, 它的缺点正是来自于它的可变性引起的复杂性, 这一复杂性给目前研究带来了相当大的困难。它的复杂性是来自多个方面的。

首先, 有差别的 ITS 片段不仅可能来自种间或亚种间, 也可能来自同一个种中不同的个体, 甚至来自于同一个体的不同的操纵子, 动物个体的基因组中含有许多个 rDNA 拷贝, 其中的 ITS 长度可能不同, 即使 ITS 片段长度一致, 其序列也有一定的差异。这样就更加增加了复杂性。如硬骨鱼类中就有 240 - 400 个拷贝, 仅对一种鱼的操纵子个数的确定以及 ITS 片段的测序, 工作量就已经是非常巨大。

其次, 由于在进化过程中承受的选择压力小, 因

此发生突变的概率大大增加, 其片段的插入、缺失和替换是非常常见的, 这些有利于获得变异信息来分析物种的遗传多样性, 但同时也不可避免地增大了分析的误差。

另外就是有些种类的 ITS 片段差异不大, 在生物的进化中非常保守, 同源性很高, 不适合作为一些种类鉴定的依据。还有有时一些 rDNA 的 ITS 序列比较容易扩增, 但有些却得不到扩增, 据郑雪松认为这和 PCR 反应的偏倚性有关, 在任何以混合 DNA 为模板的 PCR 反应都存在这个问题^[8]。

最后就是由于并不是所有的物种的 18s 和 28s 的 rRNA 数据库都已经建立, 许多数据还很缺乏, 这样就导致不能很好的设计所需要的特异性引物, 而有时候通用引物并不能很好地扩增出需要的 ITS 片段, 这样就必然影响 ITS 方法的应用, 因此可见无论哪种分子生物学方法的建立和完善都和其他数据的建立和其他技术的发展分不开的。

5 结论

在水生生物资源日益退化和衰竭的今天, 进行生物多样性的保护, 获得种群遗传多样性的资料和建立种群的遗传标记是非常有必要的^[35], 而 ITS 方法的出现正是满足了这方面的要求。作为一段位于核糖体 DNA 中 18s 和 28srRNA 之间的高度可变的序列, 它弥补了 16srRNA 片段保守性强, 分化程度不够的缺点, 迅速成为在种和亚种水平上进行分子系统学研究的一种重要的分子标记技术^[36]。已经在微生物、单细胞动物、线形动物、节肢动物, 两栖和爬行动物的种质鉴定, 进化关系, 种类进化, 亲缘关系鉴定等方面得到成功的应用, 并取得了许多研究成果。在水生生物的研究上, 虽然刚刚起步, 但也取得了一些卓有成效的成果。许多以 ITS 区域序列测定为基础的分子标记技术, 也正在迅速的发展着。

虽然由于 ITS 序列的复杂性和高度的可变性, 使它的应用受到一定的限制。但相信随着分子生物学的发展和技术的进步, 以及人们对其研究规律性认识的深入, 数据库的不断充实和完善, 相信这以技术的发展一定会为水生生物的种质鉴定、遗传多样性和种群进化的分析作出更为巨大的贡献。

参 考 文 献

- [1] 邱芳, 伏建民. 遗传多样性的分子检测[J]. 生物多样性, 1998, 6: 143 - 150.

- [2] 陈琳林,孔晓瑜,周立石,等. 魁蚶核糖体 DNA 基因转录间隔区的序列特征[J]. 中国水产科学,2005,12(1):104-107.
- [3] 孙博. 海湾扇贝分子标记的研究与应用[D]. 北京:中国科学院研究生院,2003.
- [4] 邓筑虹. 四种笛鲷 rDNA - ITS1 测序和 Cytb - PCR - SSCP 初步分析[D]. 湛江:湛江海洋大学,2004.
- [5] 丁小雷. 双壳纲贝类 rDNA 分子系统学及马氏珠母贝遗传多样性的研究[D]. 武汉:武汉大学,2003.
- [6] 魏晓华. 栉孔扇贝和海湾扇贝的遗传多样性研究及扇贝科几种贝类的分子系统学研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2004.6
- [7] 孔晓瑜. 栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 和牡蛎 *Crassostrea* 的遗传多样性研究[D]. 青岛中国海洋大学,2004.
- [8] 郑雪松,杨虹,李道棠,等. 基因间隔序列(ITS)在细菌分类鉴定和种群分析中的应用[J]. 应用与环境生态学报,2003,9(6):678-684.
- [9] Garcia - Martinez J, Acinas S G, Anton AI, Rodriguez - Valera F. Use of the 16S - 23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity[J]. Microbial Meth,1999,36:55-64.
- [10] Aakra A, Utaker JB, Nes I F. RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S - 23S rDNA intergenic spacer region of ammonia - oxidizing bacteria: a phylogenetic approach [J]. Int J Syst Bacteriol,1999,49:123-130.
- [11] Dover G A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution [J]. Nature,1982,299:111-117.
- [12] Hillis M D M, Davis S K. Ribosomal DNA: Intraspecific polymorphism, concerted evolution and phylogeny reconstruction [J]. Syst Zool,1988,37:63-66.
- [13] 商慧敏. 盾纤亚纲(纤毛门,寡膜纲)纤毛虫的分子系统学研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2004.
- [14] Vidigal T H, Kissinger J C, Caldeira R L et al. Phylogenetic relationships among Brazilian Biomphalaria species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences[J]. Parasitology,2000,121:611-620.
- [15] Verneau O, Renaud F, Catzeflis F. Evolutionary relationships of sibling tapeworm species (Cestoda) parasitizing teleost fishes[J]. Mol Biol Evol,1997,14:630-636.
- [16] Odorica D M, Miller D J. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8S rDNA among five species of Acropora (Cnidaria; Scleractinia): patterns of variation consistent with reticulate evolution[J]. Mol Biol Evol,1997,14(5):465-473.
- [17] 丁雪娟,李安兴,张剑英,等. 海水鱼类寄生本尼登虫的 ITS1 序列[J]. 华南师范大学学报,2003(2):85-80.
- [18] Zahler M, Schein E, Rinder H et al. Characteristic genotypes discriminate between Babesia isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs[J]. Parasitol Res,1998,84:544-548.
- [19] 林瑞庆,董世娟,青楚雄,等. 片形吸虫第一内转录间隔区 DNA 多态性的研究[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology,2004,34(7):8-13.
- [20] Ana Insua, Maria J Lopez - Piron, Ruth Freire, et al. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae) [J]. Genome,2003,46:595-604
- [21] Coleman A W, Vacquier V D. Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for abalone (Haliotis) [J]. Mol. Evol,2002,54:246-257.
- [22] Hernandez A F, Atcia T G, Sensio L A, et al. PCR - RFLP Analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species[J]. Journal of Food Science,2001,66(5):657-661.
- [23] Phillips R B, Sajdak S L, Michael J, Domanico. Relationships among charrs bases on DNA Sequences[J]. Nordic J. Frdshw. Res.,1995,71:378-391.
- [24] Ferndndez A, Garcia T Asensio, et al. PCR - RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species[J]. Food. Sci.,2000,66:657-661
- [25] Domanico M J, Phillips R B, Oakley T H. Phylogenetic analysis of Pacific salmon (genus Oncorhynchus) using nuclear and mitochondrial DNA sequences[J]. Can. J. Fish. Aquat. Sci.,1997,54:1865-1872.
- [26] Sajdak L S, Ruth B Phillips. Phylogenetic relationships among Coregonus species inferred from the DNA swquence of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA [J]. Can. J. Fish. Aquat. Sci.,1997,54:1494-1503.
- [27] Presa P, Pardo B G, et al. Phylogeographic Congruence Between mtDNA and rDNA ITS Markers in Brown Trout [J]. Mbl. Biol. Evol. 2002,19(12):2161-2175.
- [28] Harris D J, Crandall K A. Intragenomic variation within ITS 1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies[J]. Mbl Biol Evol,2000,17(2):284-291.
- [29] Chu K H, Li C P, Ho H Y. The first internal transcribed spacer (ITS - 1) of Ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in Crustacea [J]. Marine Biotechnology,2001,3(4):355-361
- [30] Heath D D, Rawson P D, Hilbish T J. PCR - based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada[J]. Can. J. Fish. Aquat. Sci.,1995,52:2621-2627.
- [31] 姜艳艳. 蓝点马鲛和日本鳕的遗传多样性研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2003.
- [32] 喻子牛,姜艳艳,孔小瑜,等. 栉孔扇贝核糖体 DNA 转录间隔子序列研究及其前在应用[J]. 中国水产科学,2001,8(1):6-9.
- [33] King T L, Eachles M S, Gjetvaj B, Hoeh W R. Intraspecific phylogeography of *Lasuigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity[J]. Mbl. Ecol.,1999,8:S65-S78.
- [34] Toro J E. Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR - based nuclear markers: the potential use in studies involving planktonic surveys[J]. Shellfish Res.,1998,17:1203-1205.
- [35] 王献溥. 生物多样性保护与利用的主要研究方向[J]. 自然资源,1994(4):1-6.
- [36] 唐伯平,周开亚,宋大祥. 核 rDNA - ITS 区在无脊椎动物分子系统学研究中的应用[J]. 动物学杂志,2002,37(4):67-73
- [37] Tang B P, Zhou K Y, Xiang D X, et al. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2003,29:309-316.
- [38] Tang B P, Zhou K Y, Xiang D X, et al. Study on Size Variation of rDNA Internal Transcribed Spacer 1 in *Eriocheir japonica sinensis* (Decapoda, Grapsidae) [J]. Journal of East China Normal University (Natural Science),2003,3:61-68.