

大鲵 2 个驯养群体 ITS2 遗传多样性分析

马跃岗¹, 朱 杰¹, 袁万安^{2*}

(1. 重庆水产研究所, 重庆 401121; 2. 重庆文理学院, 永川 402160)

摘 要: 对大鲵 (*Andrias davidianus*) 2 个驯化种群的核 DNA 进行 PCR 扩增, 获得大鲵核 DNA 上编码核糖体 5.8S rRNA 和 28S rRNA 基因的部分序列和完整的 ITS2 序列 (606 bp)。运用 DNA 分析软件对大鲵 2 个驯养种群(重庆水产研究所长寿湖珍稀鱼类繁育中心及广汉珍稀鱼类养殖公司)进行了遗传多样性分析。结果显示, 该序列平均 T、C、A、G 含量分别为 15.6%、36.5%、12.5% 和 35.4%, 其中 G、C 的含量 C+G(平均为 71.9%)显著高于 A、T 含量 A+T(平均为 28.1%)。所测序列中有 271 个碱基发生颠换, 112 个碱基发生转换, 转换与颠换比值 (Si/Sv) 为 0.41, 颠换大于转换。10 个体均为单倍型, 单倍型多样性 (*H*) 均为 $1.000\ 0 \pm 0.126\ 0$, 平均核苷酸差异系数 (*K*) 为 $5.932\ 1 \pm 0.861\ 4$, 核苷酸多样性 (*Pi*) 为 $0.631\ 9 \pm 0.013\ 9$ 。种群遗传分化度 (*Fst*) 为 0.030 5, 中性检验及聚类分析表明 2 个群体没有分化成单一的群体, 2 个驯养种群遗传多样性好。

关键词: *Andrias davidianus*; 大鲵; ITS2; 遗传多样性; 资源保护

中图分类号: S966.63; Q959.52

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)01-0036-05

Analysis of ITS2 genetic diversity between two acclimation populations of Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*

MA Yue-gang¹, ZHU Jie¹, YUAN Wan-an²

(1. Chongqing Fisheries Research Institute, Chongqing 401121;

2. Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan 402160)

Abstract: The nuclear DNA of two populations of *Andrias davidianus* was amplified by PCR. The amplified fragments including 5.8S and 28S nuclear ribosomal RNA gene partial sequence and the nuclear ribosomal second internal transcribed spacer (ITS2) complete sequence. The length of the fragment contained 606 bp nucleotides. The genetic diversities of *Andrias davidianus* from the Changshou Lake Rare Fish Breeding Center (CSLRFBC) of the Chongqing Fisheries Research Institute and Guanghan Rare Aquaculture Company (GHRAC) were analyzed. The result indicated as follows. The T, C, A and G average contents were 15.6%, 36.5%, 12.5% and 35.4% respectively. The average contents of G+C and A+T were 71.9% and 28.1% respectively. The average values of transversional pairs were 271 and transitional pairs were 112. The ratio of transition and transversion was 0.41, and the ratio of transversion exceeded that of transition significantly. The 10 individuals belonged to 10 haplotypes according to the determined sequences. The haplotypic diversity (*H*) was $1.000\ 0 \pm 0.126\ 0$, and the average number of nucleotide differences (*K*) of them was $5.932\ 1 \pm 0.861\ 4$. The nucleotide diversity (*Pi*) of the 10 individuals was $0.631\ 9 \pm 0.013\ 9$. The correlation within populations relative to total was 0.030 5 to the two populations. Two populations have not differentiated to a single population by test of Tajima's D, Fu & Li's D, F and cluster analysis.

Key words: *Andrias davidianus*; Chinese giant salamander; ITS2; genetic diversity; conservation

中国大鲵(*Andrias davidianus*)俗称娃娃鱼, 是我国特有珍稀两栖动物, 是体型最大的两栖动物, 同时也是中国二级保护动物。主要分布于长江、黄河和珠江水系, 遍布于全国 17 个省市自治区, 大部分

收稿日期: 2011-06-27

基金项目: 2010 重庆市科委基本科研业务费资助项目 (CH001) 和重庆市水产研究所资助项目共同资助。

作者简介: 马跃岗, 男, 副研究员。E-mail: myg0016@163.com

* 通讯作者: 袁万安, 男, 博士。E-mail: ywal10@163.com

栖息地位于长江中上游流域, 包括湖南、河南、四川、重庆和陕西等地。大鲵是水生到陆生的过渡物种, 因其在生物进化方面的独特地位而备受关注。近几十年来, 随着人口的膨胀及人类开发自然资源强度的增强, 人为的捕杀, 大鲵赖以生存的环境受到严重破坏, 种群数量减少, 种群内年龄结构趋向小型化, 许多分布区的大鲵种群数量锐减乃至濒危或灭绝^[1-2]。随着大鲵人工繁殖及规模化繁育技术的成功, 我国大鲵人工繁殖种群的数量在逐年增长。如何保护现存的野生种群, 采取科学的繁殖管理措施, 避免大鲵种质衰退和遗传多样性丢失, 目前有的养殖场已经怀疑有繁殖场繁育出的大鲵苗种有退化现象, 主要表现为抗病力低, 苗种成活率低, 这一猜测已经被几个养殖场证实。所以, 大鲵亲本的种质鉴定, 成为目前大鲵保护和养殖中关键而且迫切需要解决的问题。如果要解决这些问题, 首先必须搞清楚现有大鲵种群的遗传结构, 特别是遗传多样性情况。这方面的研究目前主要集中在在线粒体 DNA 基因组序列^[3-7], 得到的结果是大鲵的遗传多样性水平较低。由于大鲵线粒体 DNA 变异小, 提供的变异信息量有限, Murphy 等^[3]对来自 6 个地方大鲵的 mtDNA Cytb 和同工酶进行分析后, 指出应该用更多的 DNA 指纹技术如微卫星方法对大鲵进行更深入的分析。

通过对鲤形目^[8]、鲈形目^[9]、鲇形目鱼类^[10]的研究发现, 编码 5.8SrRNA 和 28SrRNA 的基因比编码 18SrRNA 基因更保守。已经证实, 真核生物 DNA 链上编码核糖体 18SrRNA、5.8SrRNA 和 28SrRNA 基因之间含有转录间隔子 1 (internal transcribed spacer 1, ITS1) 和转录间隔子 2 (internal transcribed spacer 2, ITS2), 在物种进化过程中相对保守。基因查找发现, 同一目 (order) 鱼类的编码 5.8SrRNA 基因碱基序列完全一致, 而编码 28SrRNA 序列也比较稳定。编码 ITS1 和 ITS2 基因座的种内变异较小, 而种间变异大, 可以区分不同种, 已应用于各种生物种属鉴别及种内遗传结构和遗传进化研究^[11-16]。关于大鲵 ITS2 遗传结构的研究却未见报道。本研究通过对大鲵 ITS2 全序列的测定, 研究这两个人工驯化种群的遗传多样性, 分析它们的遗传进化关系, 了解它们是否出现遗传分化, 分析它们的种质质量, 以便为其种质资源的保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用大鲵 10 尾, 分别取自重庆水产研究所所长

寿湖珍稀鱼类繁育中心 (以下简称“长寿”, CS) 及广汉珍稀鱼类养殖公司 (以下简称“广汉”, GH) 各 5 尾。其中繁育中心大鲵收集于重庆地区, 而广汉大鲵购于陕西汉中, 收集于汉水流域。大鲵鱼用 MS-222 (烷基磺酸盐间位氨基苯甲酸乙酯, Tricaine Methanesulphonate) 麻醉, 取大鲵尾部肌肉 3~4 mg, 样本用无水乙醇保存于干净消毒的 1.5 mL 的离心管, 储藏在 -40℃ 冰箱备用。

1.2 基因组 DNA 提取

用生理盐水或 STE 缓冲液浸泡组织以去除乙醇, 然后剪碎组织, 放入 1.5 mL 离心管, 采用蛋白酶 K 酚氯仿法^[17]提取总 DNA, 并用琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA。

1.3 大鲵 ITS2 序列的 PCR 扩增

PCR 扩增引物采用本实验室自己设计的引物, 上游引物序列为

ADL: 5'-GTTCGATGAAGAA CGCAGCTA-3',

下游引物序列为

ADR: 5'-CGGGTTGTCTCGTCTGATCT-3'

对 5.8SrRNA 和 28SrRNA 基因的部分片段和完整的 ITS2 片段进行扩增, 扩增片段大小约 606 bp。PCR 扩增体系为 20 μ L: 2 μ L DNA, 每种引物 (6 pmol·L⁻¹) 2 μ L, 4 μ L 10 \times buffer, 1 mmol·L⁻¹ dNTP 6 μ L, 1 U *Taq LA* 酶 (Takara 公司), 其余为超纯水。PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 40 s, 56℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 32 个循环; 最后一次循环结束后, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测片段大小, 扩增产物浓度和纯度后, 送宝生物 (Takara) 大连有限公司纯化双向测序。序列提交 GenBank, 序列号为: CS: HQ634335-634337, HQ634341, HQ654343; GH: HQ634338-634340, HQ634342, HQ634344。

1.4 分析方法

试验所得序列通过 DNASTar 软件包的 Edit-Seq, SeqMan 和 Megalign 软件排序, 并进行人工校正。每一碱基均经过正、反向测序验证。利用 MEGA4.1Beta3 软件包分析序列特征、统计碱基组成和转换与颠换值、计算遗传差异和遗传距离; PHYLIP3.69 构建 ML 系统进化树; 通过 DnaSP5.0 软件统计各种群的单倍型多样性 (H)、样本中所有单倍型对两两的平均核苷酸差异系数 (K)、核苷酸多态性 (Pi); 同时计算白甲鱼各种群的基因多样性 (H_s)、平均核苷酸差异度 (K_{xy})、基因分化系数 (Gst)、地理单元遗传分化系数 ($GammaST$)、遗传分化指数 (Fst)、核苷酸净遗传距离 (Da)、核苷

酸的分歧度 (D_{xy})。核苷酸多样性以及中性检验统计值 Tajima's D 和 Fu & Li's D 和 F。

2 结果与分析

2.1 大鲵 ITS2 序列结构及变异情况

大鲵核 DNA 上编码核糖体 5.8S rRNA 和 28S rRNA 基因的部分序列和完整的 ITS2 序列长度约 606 bp, 除去编码 5.8 S rRNA 和 28 S rRNA 基因的 150 bp 碱基, 大鲵 ITS2 序列长度约为 456 bp。序列碱基组成(见表 1), 广汉群体 T 含量低于繁育中心, A 含量高于繁育中心, G、C 含量两个种群没有明显差异。其中 G、C 的含量 C+G(平均为 71.9%)显

著高于 A、T 含量 A+T (平均为 28.1%)。所测序列中有 271 个碱基发生颠换, 112 个碱基发生转换, 转换与颠换比值 (Si/Sv) 为 0.41, 颠换大于转换。

表 1 大鲵 ITS2 扩增片段碱基组成

Table 1 Nucleotide compositions of the fragments of 5.8 S rRNA, 28 S rRNA partial sequences and ITS2 complete sequence from *Andrias davidianus* %

种群 Population	T	C	A	G
繁育中心 EFBC	16.7	36.9	11.7	34.8
广汉 GH	14.6	36.2	13.4	35.9
平均 Average	15.6	36.5	12.5	35.4

表 2 白甲鱼 2 个种群统计参数

Table 2 Demographic parameters estimated from two *Andrias davidianus* populations

种群 Population	H	K	Pi
繁育中心 EFBC	1.000 0±0.126 0	5.932 9±0.219 8	0.612 7±0.018 6
广汉 FL	1.000 0±0.126 0	5.931 2±0.217 0	0.641 9±0.018 5
平均 Average	1.000 0±0.045 0	5.932 1±0.861 4	0.631 9±0.013 9

注: H:单倍型多样性 Haplotype diversity; K:样本中所有单倍型对两两的平均核苷酸差异系数 Mean number of differences between all pairs of haplotypes in the sample; Pi:核苷酸多样性 Nucleotide diversity.

表 3 两个大鲵群体 Kimura 双参数法计算的遗传距离(对角线下方)和相应的表现准误差(对角线上方)

Table 3 The genetic distance of two populations by Kimura two parameters (below the diagonal) and the error performance (above the diagonal)

	CS1	CS2	CS3	CS4	CS4	GH1	GH2	GH3	GH4	GH5
CS1		0.000	0.023	0.025	0.024	0.024	0.024	0.024	0.026	0.026
CS2	0.000		0.023	0.025	0.024	0.024	0.024	0.024	0.026	0.026
CS3	0.238	0.238		0.022	0.022	0.023	0.023	0.023	0.022	0.022
CS4	0.270	0.270	0.226		0.015	0.016	0.016	0.018	0.014	0.014
CS5	0.243	0.243	0.228	0.112		0.016	0.015	0.019	0.015	0.015
GH1	0.236	0.236	0.241	0.123	0.118		0.000	0.018	0.014	0.014
GH2	0.236	0.236	0.241	0.123	0.118	0.000		0.018	0.014	0.014
GH3	0.248	0.248	0.228	0.161	0.168	0.157	0.157		0.015	0.016
GH4	0.259	0.259	0.226	0.108	0.116	0.099	0.099	0.112		0.003
GH5	0.265	0.265	0.231	0.112	0.121	0.103	0.103	0.112	0.004	

2.2 大鲵种群遗传结构分析

2.2.1 种群多态性位点分析 10 个个体共检测到总共有 16 个多态性变异位点, 其中 2 个为 2 变异位点, 9 个 3 变异位点, 5 个 4 变异位点。10 个个体均为不同的单倍型。

2.2.2 种群统计参数的估计 种群遗传多样性参数统计结果(见表 2), 2 个种群的 H 值繁育中性为 1.000 0±0.126 0, 广汉为 1.000 0±0.126 0, 均较高。衡量种群遗传水平的 K 值和 Pi 值均较高。

2.2.3 各种群间的基因交流及遗传分化 由 DnaSP 软件包统计得到衡量各种群间的遗传分化指标: 种群 1(长寿)和种群 2(广汉)基因多样性为 1.000 0, 平均核苷酸差异系数为 388.24, 群体分化系数

0.000 0, 遗传分化系数为 0.126 3, 遗传分化指数为 0.030 5, 核苷酸分歧度为 0.640 6, 地理群体分化系数为 0.089 8, 核苷酸净遗传距离为 0.019 5。中性检验统计值 Tajima's D 和 Fu&Li's D 和 F。Tajima's D 检验值为 -1.044 15, $P>0.1$, 无显著差异; Fu & Li's D 检验值为 0.176 41, $P>0.10$, 没有显著差异; Fu & Li's F 检验值为 0.147 03, $P>0.10$, 仍然没有显著差异。

2.2.4 种群的遗传距离和系统进化 用 MEGA4.0 软件, 用 Kimura 2-parameter 模型计算的种群内和种群间的遗传距离(见表 3), 两个种群单倍型之间的平均遗传距离为 0.176±0.015, 两个种群内平均遗传距离繁育中心为 0.207, 广汉为 0.095, 种群间的遗

传距离为 0.197, 种群间净遗传距离为 0.046。通过 PHYLIP3.69 软件包分析, 以亲缘关系较近的有尾目的代氏无肺螈爱达荷亚种 (*Plethodon v. idahoensis Burns*) GenBank 号 GQ337954.1 为外群构建 ML (maximum likelihood) 系统进化树(图 1), Bootstrap 值 1000, 首先广汉 GH4、GH5 聚类, 再和 GH3 聚类, 最后 GH2 与 GH1 聚类后聚在一起; 繁育中心 CS1、CS2 聚类后与 CS3 聚类, 聚类枝再与 CS5 聚类, 广汉聚类枝和繁育中心 4 个样本的聚类枝, CS5 一起与代氏无肺螈爱达荷亚种聚类构成有根树。



Kimura 双参数模型以大鲵 5.8 S rRNA、28 S rRNA 基因部分序列和完整的 ITS2 序列以代氏无肺螈爱达荷亚种相同序列作外群, 用 ML 法构建, Bootstrap 值 1000. GH-广汉样本; CS-繁育中心样本; PL-代氏无肺螈爱达荷亚种。

图 1 5.8 S rRNA、28 S rRNA 基因的部分序列和完整 ITS2 序列构建的系统发生树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 5.8S, 28S nuclear ribosomal RNA gene partial sequences and nuclear ribosomal second internal transcribed spacer complete sequence

3 讨论

3.1 大鲵 ITS2 结构

核糖体内部转录间隔区是一个非编码区域, 它包括转录间隔区 1(ITS-1)和转录间隔区 2(ITS-2)。ITS-2 介于 2 个保守区(5.8S/2S 和 28S/25S)之间, 能较方便地设计出上下游引物, 其具有多串联重复特征, 从而易于进行 PCR 扩增。由于 ITS 区受外界环境的影响较小, 且其不加入成熟核糖体, 因而受到的选择压力较小, 进化速度快^[18]。所以, ITS 的序列信息可以提供比较丰富的变异位点和信息位点, 常作为探讨科内属间及属下种间遗传关系的有效手段^[19-23]。大鲵 ITS2 片段长度约 450 bp, GC 含量非常高, 所以扩增时要加高 GC 缓冲液才能准确的扩增该片段, 试验用宝生物的长链 DNA 扩增酶 (Takara LA 酶, 能够准确扩增长片段的酶) 和高 GC 扩增缓冲液进行扩增。测序时对测序产物进行

了说明, 注明是高 GC 产物, 每个序列都是双向测序, 所以所得序列应该是准确的。通过对鲤形目、鲇形目和鲟形目鱼类的研究发现, 每种鱼类的 ITS2 序列都有一段种属特异序列, 利用这段特异序列可以设计种属引物, 扩增种属特异的片段, 用于鉴定种属。今后对 ITS2 的研究, 主要集中在各种生物的 ITS2 序列的差异上。通过全世界生物科学家的共同努力, 如果能够对各个物种的 ITS2 序列组成全部了解清楚, 设计出针对每种生物的探针, 做成基因芯片, 作为种属微量检材种属鉴别的工具, 这对生物资源调查, 生物资源的保护, 涉及保护动物的刑事案件 的 侦 察 取 证, 动 物 产 品 的 商 业 欺 诈 判 定 非 常 有 用。

3.2 大鲵两个种群的遗传分化和遗传多样性

不同群体间的遗传距离反映了其遗传组成分化程度, 而一个群体内的遗传距离反映了该群体的遗传多样性。2 个大鲵驯化群体间的遗传距离为 0.197, 中性检验统计 Tajima's D、Fu & Li's D 和 Fu & Li's F 值显示 2 个种群分化不明显, 作者猜测可能是由于样本太少 (5 个样本)。但是, 从另外一个种群分化指标, 种群分化指数 (F_{st}) 常用来表示 2 个种群间的遗传分化程度, 在 0 到 1 的范围内, F_{st} 值越大, 两种群的分化程度越高^[24]。两个群体 F_{st} 为 0.030 5, 种群内部存在 96.95% 变异, 种群之间存在 3.05% 变异, 说明群体分化程度低, 没有分化成独立的种群。

单倍型间的遗传距离 (P), 大多数动物的 P 值在 0.01 之上, 就认为变异较大^[25], 2 个种群单倍型的平均遗传距离为 0.176 ± 0.015 , 说明这 2 个群体遗传多样性高, 而 2 个群体核苷酸多样性 P_i 值分别为 $0.612 7 \pm 0.018 6$ 、 $0.641 9 \pm 0.018 5$, 说明核苷酸多样性高, 这与孟彦等^[26]用微卫星研究的结果相同。

这次只取了 2 个驯养种群, 种群数量较少, 每个种群的样本量也较少。今后的研究应该扩大调查种群数量, 增加样本量, 提高分析的可信度。

3.3 大鲵种质资源的保护

动物的人工驯养, 将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, 驯养种群会不可避免地丧失某些特定的等位基因, 遗传位点, 造成驯养种群的遗传变异度及遗传多样性水平均低于野生种群的情况, 这在很多人工驯养大鲵的检测中已得到证实^[27-29]。研究的 2 个大鲵种群 ITS2 具有丰富的遗传多样性, 为这 2 个种群提供了高适应能力、生存能力和进化潜力的遗传物质基础和储备。长江流域生态环境的改变, 很多支流小生态环境的消失, 过度捕捞、水质污染等已导致大鲵种群数量

急剧减少,从而将降低其遗传多样性和对环境的适应能力。因此,必须开展大鲵种群及其遗传多样性的保护。

遗传多样性是生命进化和适应的物质基础,丰富的遗传多样性可以维持种群的多样性,而遗传多样性的丧失会威胁到种群的生存。现在,大鲵的人工养殖范围越来越广,并且规模越来越大,遗传多样性水平的降低对生物的抗病力、生长速度、个体大小、繁育性能等生物学特性都有直接的影响,对于大鲵的遗传多样性保护和合理开发利用产生严重阻碍。由于大鲵经济价值极高,非法捕捉、过度捕捞、生存环境破坏等原因,大鲵资源急剧减少,所以在今后的人工繁殖过程中一定要注意亲本间亲缘关系的选择,尽可能扩大亲本的数量,加强繁殖场之间的协作,必要时进行亲本交换,人为避免近交衰退和群体遗传多样性水平下降。

致谢:本研究在样本采集过程中得到重庆水产研究所所长长寿湖珍稀鱼类繁育中心和广汉珍稀鱼类养殖公司全体工作人员的大力支持,实验过程得到本实验室胡凯老师、冉烈老师的大力支持,在此一并致谢。

参考文献:

- [1] Wang X M, Zhang K J, Wang Z H, et al. The decline of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* and implications for its conservation [J]. *Oryx*, 2004, 38(2): 197-202.
- [2] Yoshinao K, Satomi K, Tomohiro O, et al. Molecular cloning of estrogen receptor alpha(Era ; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006: 257-258: 25884-25894.
- [3] Murphy R W, Fu J Z, Upton D E, et al. Genetic variability among endangered Chinese giant salamanders, *Andrias davidianus*[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9(10): 1539-1547.
- [4] 陶峰勇, 王小明, 郑合勋, 等. 中国大鲵四种群的遗传结构和地理分化[J]. *动物学研究*, 2005, 26(2): 162-167.
- [5] 方耀林, 张燕, 杨焱清, 等. 大鲵遗传多样性分析[J]. *淡水渔业*, 2006, 36(6): 8-11.
- [6] Lin M, Huang J, Li Z, et al. RAPD analysis on the wild parents and second filial generation of artificial breeding of *Andria davidianus*[J]. *上海水产大学学报*, 2003, 12(增刊): 20-23.
- [7] 陶峰勇, 王小明, 郑合勋. 中国大鲵五地理种群 Cyt b 基因全序列及其遗传关系分析[J]. *水生生物学报*, 2006, 30(5): 625-628.
- [8] 袁万安. 核糖体转录间隔子 2 应用于鱼类种属的鉴别[J]. *遗传*, 2010, 32(4): 269-374.
- [9] 袁万安. ITS2 在法医鱼类学的应用研究[R]. 汕头大学医学院, 博士后出站报告: 1-53.
- [10] 袁万安. 通过核基因 ITS2 片段研究四种鲑形目鱼类进化[J]. *淡水渔业*, 2008, 35(5): 15-21.
- [11] Young I, Coleman A W. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 30: 236-242.
- [12] Craig J H, Nathan J B, Naoki I, et al. Three species of parasites emerging on the gills of mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Temminck and Schlegel, 1843), cultured in Australia [J]. *Aquaculture*, 2007, 265: 27-40.
- [13] Azusa U, Yasushi K, Toshihiro M, et al. Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters[J]. *Parasitology International*, 2006, 55: 267-271.
- [14] Gomulskil M, Meiswinkel R, Delecolle J C, et al. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences [J]. *Med Vet Ent*, 2006, 20: 229-238.
- [15] Oliverio M. ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoidea)[J]. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2000, 25: 63-69.
- [16] Coleman A W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons [J]. *Trends in Genetics*. 2003, 19(7): 370-375.
- [17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [18] Hershkovitz M A, Zimmer E A. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences [J]. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 2857-2867.
- [19] Jobst J, King K, Hemleben V. Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae [J]. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1998, 9(2): 204-219.
- [20] Goertzen L R, Cannone J J, Gutell R R, et al. ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29: 216-234.
- [21] Schultz J, Maisel S, Gerlach D, et al. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer2 (ITS2) throughout the Eukaryota [J]. *RNA*, 2005, 11: 361-364.
- [22] Miao M, Warren A, Song W, et al. Analysis of the internal transcribed spacer2 (ITS2) region of Scuticociliates and related taxa (Ciliophora, Oligohymenophorea) to infer their evolution and phylogeny [J]. *Protist*, 2008, 159: 519-533.
- [23] Coleman A W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure [J]. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35: 3322-3329.
- [24] Lan H, Shi L M. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in south west China: An approach from mitochondrial DNA polymorphism [J]. *Biochemical Genetics*, 1993, 31: 51-60.
- [25] Wright S. *Evolution and the genetics of population, variability with and among natural population* [M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- [26] 孟彦, 杨焱清, 张燕, 等. 野生和养殖大鲵群体遗传多样性的微卫星分析[J]. *生物多样性*, 2008, 16(6): 533-538.
- [27] 张德春. 鲮鱼人工繁殖群体遗传多样性的研究[J]. *三峡大学学报: 自然科学版*, 2000, 24(4): 379-381.
- [28] 孟宪红, 孔杰, 庄志猛, 等. 真鲷自然群体和人工繁殖群体的遗传多样性[J]. *生物多样性*, 2000, 8(3): 248-252.
- [29] 张德春, 余来宁, 方耀林. 草鱼自然群体和人工繁殖群体遗传多样性的研究[J]. *淡水渔业*, 2004, 34(4): 5-7.