

## 我国五大湖三角帆蚌群体 ITS-1 序列变异分析\*

王建军<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1,2\*\*</sup>, 汪桂玲<sup>1</sup>, 白志毅<sup>1</sup>

(1: 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

(2: 上海高校水产养殖学E-研究院, 上海 200090)

**摘要:** 对我国五大淡水湖: 鄱阳湖、洞庭湖、太湖、巢湖、洪泽湖, 鄱阳湖内包括进贤、余干、珠湖、都昌、湖口、永修, 合计 10 个群体三角帆蚌 78 个个体核糖体 DNA 基因转录间隔子 ITS-1 进行 PCR 扩增、序列测定, 获得 78 条长度为 430 bp 的同源序列. 同源基因序列分析显示, 五大淡水湖 10 个群体三角帆蚌 78 条 ITS-1 序列片段, G+C 的含量都明显高于 A+T 的含量. 鄱阳湖三角帆蚌的核苷酸多态性指数最高, 而巢湖的核苷酸多样性指数最低. 基于 ITS-1 序列片段的遗传距离表明, 鄱阳湖内六个点群体间遗传距离很小, 在 0.0071 到 0.0092 之间. 五大湖间三角帆蚌群体遗传距离较远, 在 0.0752 到 0.1381 之间. ITS-1 序列片段构建系统树显示, 鄱阳湖 6 个群体聚在了一起为单独一支, 并与巢湖群体亲缘关系相近. 洞庭湖群体和洪泽湖群体亲缘关系相近, 单独为一支. 太湖群体从鄱阳湖、巢湖群体分离开来, 单独为一支.

**关键词:** 三角帆蚌; 转录间隔区; ITS-1; 遗传多样性; 亲缘关系

## Sequence variation of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer 1 of *Hyriopsis cumingii* from the Five Freshwater Lakes of China

WANG Jianjun<sup>1</sup>, LI Jiale<sup>1,2</sup>, WANG Guiling<sup>1</sup> & BAI Zhiyi<sup>1</sup>

(1: Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, P.R.China)

(2: Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 200090, P.R. China)

**Abstract:** The internal transcribed spacer 1 (ITS-1) was amplified from *Hyriopsis cumingii* in the five large lakes of China: Lake Poyang, Lake Dongting, Lake Taihu, Lake Chaohu and Lake Hongze, and 430bp lengths of homologous fragments of the ITS-1 was sequenced from 78 individuals of ten stocks. The homologous fragment analysis showed that the average contents of G+C were obviously higher than that of A+T. The nucleotide diversity of ITS of Lake Poyang was the highest, while that of Lake Chaohu was the lowest. The genetic distances among the six stocks from Lake Poyang were very near, which was from 0.0071 to 0.0092. The genetic distance among the five stocks from five large lakes were relatively far, which was from 0.0752 to 0.1381. The phylogenetic tree of ITS-1 built with MEGA 3.1 showed that the six stocks from Lake Poyang clustered together independently, and had a relative closer relationship with Lake Chaohu. The phylogenetic relationship between Lake Dongting and Lake Hongze was relatively close and clustered independently. The stocks of Lake Taihu was an independent one, which diverged from those of Lake Poyang and Chaohu.

**Keywords:** *Hyriopsis cumingii*; internal transcribed spacer; ITS-1; genetic diversity; phylogenetic relationship

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)是中国特有的优质淡水育珠母蚌. 随着珍珠养殖产业的发展, 生产中三角帆蚌种质退化现象日趋严重, 筛选或培育出品质优良的三角帆蚌成为当前亟需解决的关键问题之一.

\* 国家科技支撑计划课题(2006BAD01A13)、上海市科委基础重大项目(06DJ14003)、农业部农业结构调整重大技术研究专项项目(06-05-05B)和上海市重点学科建设项目(Y1101)联合资助. 2007-03-07 收稿; 2007-04-03 收修改稿. 王建军, 男, 硕士研究生.

\*\* 通讯作者; E-mail: jlli@shfu.edu.cn.

我国五大湖鄱阳湖、洞庭湖、太湖、巢湖和洪泽湖是三角帆蚌的主要自然分布区域,对五大淡水湖三角帆蚌群体遗传多样性、群体间遗传变异及亲缘关系的研究将对三角帆蚌种质资源保护和良种选育产生重要的意义. 目前为止,对我国五大淡水湖三角帆蚌群体在形态<sup>[1]</sup>、生长<sup>[2]</sup>、RAPD<sup>[3]</sup>、SSR<sup>[4]</sup>、线粒体COI基因片段等方面已经进行了一些的研究,初步确定五大湖遗传多样性由高到低的顺序为:鄱阳湖、洞庭湖、太湖、洪泽湖、巢湖,但对湖泊内部不同取样点的情况却未见报道.

运用ITS-1核苷酸序列对贝类遗传和系统发生方面的研究国内外已有较多报道<sup>[5-6]</sup>,但主要集中在海水养殖种类,运用ITS-1序列对淡水贝类方面尚不多见,对三角帆蚌的遗传多样性和亲缘关系的研究还未见报道. 本研究选用鄱阳湖、洞庭湖、太湖、巢湖和洪泽湖五个野生群体及鄱阳湖内不同群体三角帆蚌为材料,用ITS-1核苷酸片段分析五大湖间群体和鄱阳湖内群体三角帆蚌的遗传多样性及亲缘关系,以及分析五大淡水湖三角帆蚌样本是否具有代表性,为三角帆蚌天然种质资源的保护与筛选提供科学依据.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

五大湖三角帆蚌鄱阳湖群体(PY)以进贤群体(PJX)为代表,另外还有洞庭湖群体(DT)、太湖群体(TH)、洪泽湖群体(HZ)、巢湖群体(CH),都是野生群体繁育的第一代. 他们的亲本分别于2001年10月-2002年02月之间采集,采集后饲养在浙江诸暨王家井珍珠养殖场,并采取了严格的隔离措施. 每个群体随机取7-10个个体,用无水乙醇固定三角帆蚌的外套膜,放置4℃冰箱保存.

鄱阳湖另外5个野生群体于2006年8月份分别取自余干大塘湖区(PYG)、珠湖湖区(PZH)、都昌湖区(PDC)、湖口湖区(PHK)、永修昌邑湖区(PYX),采集地点均为离湖岸较远的深水处. 采集完后每个群体取6-9个个体现场取外套膜组织,无水乙醇固定,带回实验室后于4℃冰箱保存.

### 1.2 基因组DNA提取

取外套膜组织150mg左右,双蒸水冲洗,酚-氯仿提取DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测.

### 1.3 PCR扩增及序列测定

PCR扩增所用引物: ITS-1A: 5'-GGTTTCTGTAGGTGAACCTGC-3'; ITS-1B: 5'-CTGCGTTCTTCATC-GACCC-3'<sup>[7]</sup>,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

PCR反应体系为30μl: 模板DNA 50-100ng; 3.0μl的10×Buffer(含Mg<sup>2+</sup>,上海生物工程公司); dNTPs(2.5 mmol/L)2.4μl; 上、下游引物(5μmol/L)各1.2μl; Taq DNA聚合酶(5 U/μl)0.2μl,其余体积用水补足. 反应条件为: 94℃预变性2min, 94℃变性45s, 50℃退火1 min, 72℃延伸1min. 经35个循环后在72℃延伸5min. 扩增产物4℃保存. PCR产物送往上海生工生物工程技术有限公司,纯化后直接进行测序反应,测序引物为ITS-1A.

### 1.4 数据处理

用BlastN进行核酸序列同源性比较, ClustalW软件对所测得的序列进行比对,并经人工核查; DNASP4.0软件统计多态位点(S),平均核苷酸差异数(K)和核苷酸多样性指数(Pi); MEGA3.1软件进行所测序列的编辑、排序、系统发育和遗传学分析,采用Kimura双参数模型计算遗传距离,用NJ法构建系统树.

## 2 结果

### 2.1 ITS-1 核苷酸序列的 PCR 扩增结果

从提取的基因组DNA中PCR扩增到500bp左右的ITS-1序列(图1).

### 2.2 ITS-1 核苷酸序列的测定及碱基组成

三角帆蚌10个群体共78个个体的ITS-1核苷酸片段经多序列比对,删去首尾两侧部分模糊序列,共获得长度为430bp的同源序列.

用MEGA3.1软件对五大湖三角帆蚌群体的碱基(T、C、A、G)组成作了计算(表1),发现其碱基组成差异不大,鄱阳湖三角帆蚌6个群体的T、C、A和G的平均含量分别为21.2%、29.4%、23.2%和26.1%. 除

鄱阳湖外其他四个湖三角帆蚌群体 T、C、A 和 G 的平均含量分别是 21.3%、29.3%、23.2% 和 26.2%。G+C 的含量都明显高于 A+T 的含量。

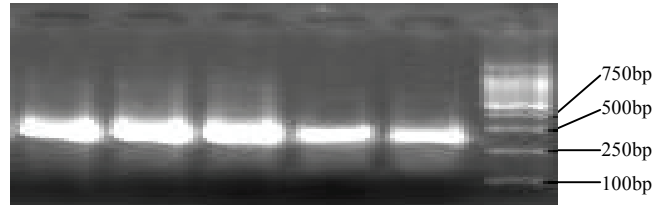


图1 三角帆蚌 10 群体 ITS-1 序列部分序列的 PCR 产物  
Fig.1 PCR products for ITS-1 of ten stocks of *Hyriopsis cumingii*

表1 三角帆蚌各群体ITS-1核苷酸序列的碱基组成  
Tab.1 Base compositions of ITS-1 fragments of different *Hyriopsis cumingii* stocks

群体	个体数	T%	C%	A%	G%	G+C%
PY	10	21.2	29.5	23.2	26.2	55.7
CH	8	21.1	29.6	23.1	26.2	55.8
DT	8	21.2	29.3	23.4	26.1	55.4
HZ	7	21.3	29.2	23.2	26.3	55.5
TH	10	21.2	29.4	23.2	26.2	55.5
Avg	8	21.3	29.4	23.2	26.2	55.5
PJX	10	21.2	29.5	23.2	26.2	55.7
PDC	7	21.2	29.5	23.1	26.1	55.6
PHK	9	21.3	29.4	23.2	26.1	55.5
PYG	6	21.2	29.5	23.1	26.2	55.7
PYX	7	21.1	29.3	23.3	26.1	55.4
PZH	6	21.3	29.3	23.1	26.2	55.5
Avg	7	21.2	29.4	23.2	26.1	55.6

### 2.3 ITS-1 核苷酸序列变异及其遗传多样性参数

使用 DNASP4.0 软件对中国五大湖三角帆蚌群体的遗传多样性参数进行计算。鄱阳湖内 6 个群体的核苷酸多态位点在 54 到 60 之间, 居五个湖首位。其次是洞庭湖和太湖群体, 分别是 51 个和 48 个, 而洪泽湖群体和巢湖群体的多态核苷酸位点数分别为 35 个和 33 个(表 2)。

在五个湖三角帆蚌群体中, 鄱阳湖 6 个群体的平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数值分别在 14.054 到 16.267 和  $0.11841 \pm 0.14651$  到  $0.16186 \pm 0.12651$  之间, 明显高于其它四个湖三角帆蚌群体, 其次是洞庭湖群体和太湖群体, 巢湖群体最低, 其平均核苷酸差异数和核苷酸多样性指数值分别为 7.333 和  $0.03346 \pm 0.05754$ 。

### 2.4 ITS-1 核苷酸序列的遗传距离

基于所测得的核苷酸序列, 利用 MEGA3.1 软件中的 Kumara 双参数模型(转换加颠换, 转换比颠换)计算鄱阳湖内六个点群体间相对遗传距离和遗传分化指数  $F_{st}$ (表 3)。以进贤群体(PJX)为鄱阳湖群体代表, 计算五大湖间群体的相对遗传距离和遗传分化指数  $F_{st}$ (表 4)。

鄱阳湖内六个点群体间遗传距离相对很小, 遗传距离在 0.0071 到 0.0092 之间, 遗传分化指数  $F_{st}$  在 -0.11963 到 0.08998 之间(表 3)。五大湖间群体遗传距离相对较远, 遗传距离在 0.0752 到 0.1381 之间, 是鄱阳湖内群体间遗传距离的 7 倍以上。遗传分化指数  $F_{st}$  在 0.08832 到 0.53913 之间(表 4)。

表 2 三角帆蚌各群体 ITS-1 遗传多样性参数比较  
Tab.2 Summary of genetic diversity of different *Hyriopsis cumingii* stocks

群体	个体数(n)	多态位点(S)	平均核苷酸差异数(K)	核苷酸多样性指数(Pi)
PY	10	55	14.067	0.12868 ± 0.13750
CH	8	33	7.333	0.03346 ± 0.05754
DT	8	51	12.133	0.10636 ± 0.14435
HZ	7	35	7.467	0.04271 ± 0.03361
TH	10	48	11.689	0.08085 ± 0.07537
PJX	10	55	14.067	0.12868 ± 0.13750
PDC	7	60	16.267	0.16186 ± 0.12651
PHK	9	57	15.089	0.14953 ± 0.14341
PYG	6	54	14.054	0.11841 ± 0.14651
PYX	7	59	16.112	0.15736 ± 0.16047
PZH	6	55	14.223	0.12085 ± 0.14047

表 3 鄱阳湖内 6 群体间的相对遗传距离和遗传分化指数 *Fst*\*  
Tab.3 Comparative genetic distance and fixation indices among six stocks of *Hyriopsis cumingii* from Lake Poyang

	PJX	PDC	PYX	PYG	PZH	PHK
PJX	***	0.06362	0.05772	0.07665	0.05583	0.08998
PDC	0.0082	***	0.05296	-0.07952	0.02989	-0.08073
PYX	0.0072	0.0091	***	-0.0008	-0.11963	0.05596
PYG	0.0081	0.0083	0.0091	***	-0.02913	-0.09252
PZH	0.0071	0.0081	0.0072	0.0083	***	0.02971
PHK	0.0090	0.0081	0.0072	0.0082	0.0092	***

\* 对角线下为遗传距离; 对角线上为遗传分化指数 *Fst*.

表 4 五大湖间 5 群体的相对遗传距离和遗传分化指数 *Fst*\*  
Tab.4 Comparative genetic distance and fixation indices among five stocks of *Hyriopsis cumingii* from the five freshwater lakes of China

	PY	CH	DT	HZ	TH
PY	***	0.10850	0.40660	0.21374	0.13980
CH	0.0752	***	0.53913	0.34195	0.20698
DT	0.1352	0.1202	***	0.08832	0.50906
HZ	0.1271	0.1273	0.1021	***	0.31292
TH	0.1121	0.1201	0.1263	0.1381	***

\* 对角线下为遗传距离; 对角线上为遗传分化指数 *Fst*.

### 2.5 基于 ITS-1 核苷酸序列的分子系统树

用 MEGA3.1 软件中的 NJ 法, 构建 10 个群体之间的系统聚类图(图 2). 以太平洋牡蛎(OUT)为外群, 对 78 个样本进行系统树的构建, 系统树各分支的置信度由 1000 次自检法(Bootstrap)检验(图 3).

鄱阳湖内 6 个群体聚在一起单独为一支, 并与巢湖群体亲缘关系相近. 洞庭湖群体和洪泽湖群体亲

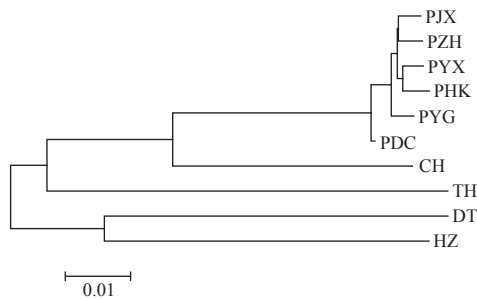


图2 三角帆蚌 10 群体 ITS-1 序列的 NJ 系统树  
Fig.2 ITS-1 Neighbor-joining phylogenetic tree of ten *Hyriopsis cumingii* stocks

缘关系相近, 单独为一支. 太湖群体从鄱阳湖和巢湖群体分离开来, 单独为一支(图 2). 鄱阳湖、巢湖和太湖个体分别聚在一起, 并且和图 1 群体间聚类关系基本相吻合. 洞庭湖和洪泽湖两群体的个体间有较多的交叉, 未能单独成群(图 3).

### 3 讨论

五大淡水湖三角帆蚌样本是否具有代表性是本文重点研究内容之一. 为此, 笔者采集了鄱阳湖内 6 个点的三角帆蚌群体, 并对它们的 ITS-1 核苷酸序列分别进行了分析, 结果发现鄱阳湖内部各采样点之间碱基组成、核苷酸多态位点数、平均核苷酸差异数、核苷酸多样性

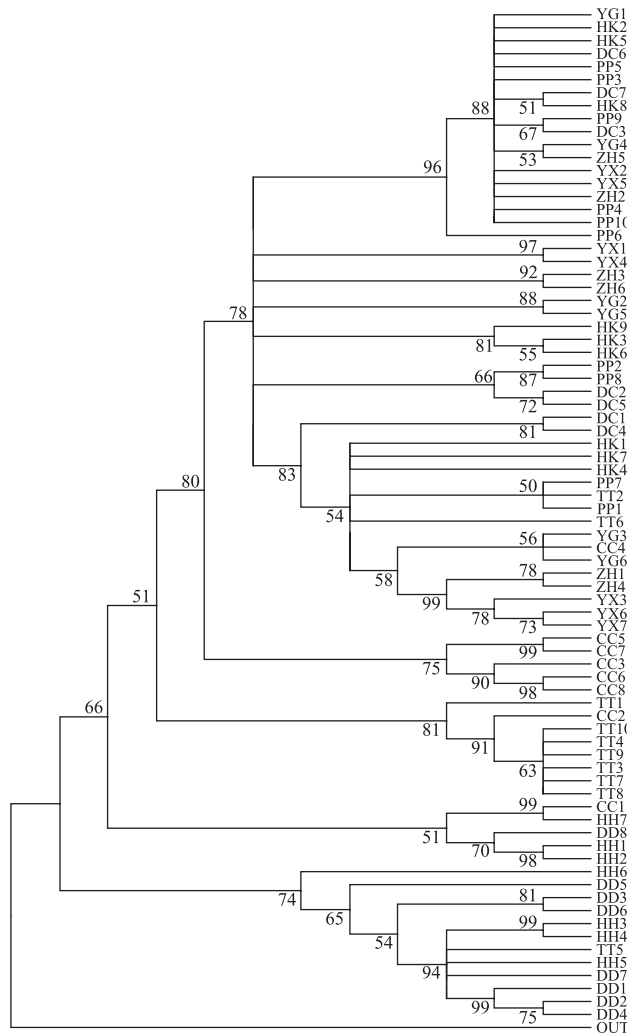


图 3 五大湖三角帆蚌 ITS-1 的 NJ 聚类图

Fig.3 NJ tree based on the internal transcribed spacer 1 of *Hyriopsis cumingii* from the Five Freshwater Lakes of China

指数等指标差异很小. 五大湖三角帆蚌群体间的遗传距离是鄱阳湖内群体间的遗传距离的 7 倍以上. 五大湖群体间的遗传距离在 0.0752 到 0.1381 之间, 最大差异不到 1 倍. 鄱阳湖内群体间的遗传距离在 0.0071 到 0.0092 之间, 最大差异不到 30%, 与湖泊间和湖泊内至少 7 倍的差异相比, 非常小. NJ 法构建的分子系统树结果显示鄱阳湖 6 个群体紧密的聚在了一起, 明显为单独的一支. 上述结果均表明, 湖泊内部的一个取样点基本可以代表整个湖泊的情况. 另外, 从鄱阳湖内 6 个点的分析结果来看, 1 个子一代群体与 5 个野生群体差异很小, 因此繁育子一代能代表野生群体的情况. 这与笔者用 mtDNA COI 基因片段分析的结果一致.

核糖体 DNA 转录间隔区(ITS)为核基因组序列, 由于该序列属于非编码的间隔区, 没有自然选择的压力而具有较大的变异性, 使得该片段成为较好的分子系统学分析片段<sup>[8-10]</sup>. ITS 序列的进化速率要比线粒体 COI 基因的速率要快<sup>[11]</sup>. 对番红砗磲的研究和分析发现 ITS 序列具有非常高的多态性<sup>[12]</sup>, ITS-1 序列可用作贝类群体间的遗传分析. 而对于本实验中五大湖三角帆蚌群体, ITS-1 序列的多态性也很高, ITS-1 序列的进化速率也比线粒体 COI 基因的进化速率快, 在群体间的变异程度也较大, 这表明 ITS-1 序列适用于三角帆蚌群体间遗传分析.

对 10 个群体三角帆蚌的 ITS-1 核苷酸序列碱基组成分析发现, G+C 的含量大约在 55%, 明显大于 A+T 的含量. 双壳贝类 ITS-1 的 G+C 含量一般在 45%–66% 之间<sup>[13]</sup>, 几种欧洲扇贝的 ITS-1 序列中 G+C 含量都低于 50%<sup>[9]</sup>, 文蛤属 4 种贝类 ITS-1 序列中 G+C 含量都大约在 60%<sup>[14]</sup>, 太平洋牡蛎 ITS-1 序列中 G+C 的含量是 56.36%<sup>[15]</sup>. 而本研究 10 个群体三角帆蚌 ITS-1 序列的 G+C 含量处于中间水平, 与太平洋牡蛎基本相当.

鄱阳湖内 6 个群体三角帆蚌的平均核苷酸差异数在 14.054 到 16.267 之间, 核苷酸多样性指数值在 0.11841±0.14651 到 0.16186±0.12651 之间, 明显高于其它四个湖泊三角帆蚌群体. 五大湖遗传多样性由高到低的顺序为: 鄱阳湖、洞庭湖、太湖、洪泽湖、巢湖. 洪泽湖群体和巢湖群体的多态核苷酸位点数和核苷酸多样性指数最低, 遗传多样性也最低. 过去利用 RAPD 和 SSR 技术, 对我国五大湖三角帆蚌的遗传多样性进行了分析, 结果也认为鄱阳湖群体三角帆蚌遗传多样性最高, 洞庭湖群体和太湖群体其次, 洪泽湖和巢湖群体最低<sup>[3-4]</sup>. 本研究结果和过去的研究结果相同. 群体遗传多样较高的群体, 其种质资源较好. 通过对中国五大湖三角帆蚌群体和诸暨养殖群体生长性能比较研究显示, 鄱阳湖三角帆蚌群体生长性能和成活率最高<sup>[2]</sup>.

基于 ITS-1 核苷酸序列的 10 个群体的遗传距离和 NJ 法构建的系统树表明, 鄱阳湖与巢湖三角帆蚌群体间亲缘关系较近, 可能是因为鄱阳湖与巢湖地理位置相隔较近的缘故. 洪泽湖群体与除洞庭湖群体以外的其它群体亲缘关系相对较远, 可能因为洪泽湖属于淮河水系, 其它群体均属于长江水系, 其地理位置相隔较远有关, 这与五大湖三角帆蚌形态学、RAPD、SSR、mtDNA COI 基因片段等的研究结果相似<sup>[1,3-4]</sup>, 五大湖三角帆蚌群体之间的亲缘关系可能与地理分布有一定的关系.

从五大湖的形成和地质演变历史来看, 鄱阳湖、洞庭湖、太湖、洪泽湖、巢湖的形成都有上千年的历史. 经过漫长的演变, 鄱阳湖和太湖的湖口直接和长江相通, 水文状况复杂, 生物多样性丰富, 使得三角帆蚌的遗传多样性很高. 太湖大约在 5000 年前, 由一个大海湾逐渐转变成了内陆湖泊<sup>[16]</sup>. 伴随着地质演变过程, 太湖与长江有大量的水体交换, 同时黄浦江逐渐成为太湖的主要排水通道, 使得太湖也具有非常高的生物多样性, 三角帆蚌的遗传多样性保持很高. 而洪泽湖历史以来, 就是一个浅水湖, 湖泊水也主要来源于一些河道, 而且历史上也曾出现过干涸, 可能导致了三角帆蚌的遗传多样性不高. 巢湖主要位于安徽省腹地, 经过漫长的演变, 沿岸主要为一些城市所包围, 缺乏与外界大量的水体交换, 可能也使得三角帆蚌的遗传多样性不高.

而以 78 个个体构建的分子亲缘关系树和遗传分化指数的计算中发现洞庭湖和洪泽湖个体间遗传分化指数较小, 个体间有较大的基因交流. 从珍珠产业发展的现状来看, 五大湖周边地区是我国淡水珍珠的主要产区, 洞庭湖的三角帆蚌资源较好, 由于洪泽湖历史上曾出现过多次干涸造成三角帆蚌资源匮乏, 可能将采集的洞庭湖三角帆蚌亲本移至洪泽湖来培育珍珠. 从三角帆蚌繁殖习性来看, 它是体内受精, 受精卵成熟排出体外为钩介幼虫, 钩介幼虫主要寄生在鱼鳃和体表部分, 变态后从鱼体脱落沉入湖底. 由于鱼的活动把钩介幼虫带到湖内各个水域, 洞庭湖与洪泽湖内的三角帆蚌进行了基因交流. 洪泽群体

与洞庭群体的亲缘关系较近,可能与洪泽湖干枯后湖边的洞庭湖养殖群体进入后造成的遗传污染有关。

三角帆蚌是我国现有最主要的淡水育珠蚌,是我国特有种。研究表明,鄱阳湖、洞庭湖和太湖具有相对较高的遗传多样性,生长性能也较好,表明它们具有作为育种材料的基本条件。因此建议加强对现有鄱阳湖、洞庭湖和太湖三角帆蚌种质资源的保护,以维持我国特有的具有重要经济价值的三角帆蚌优良种质的遗传多样性,为三角帆蚌良种选育提供必要的基础条件。

#### 4 参考文献

- [1] 钱荣华,李家乐,董志国等.中国五大湖三角帆蚌形态差异分析.海洋与湖沼,2003,34(4):112-119.
- [2] 李家乐,钱荣华,鲍宝龙等.中国五大湖三角帆蚌遗传多样性的RAPD分析.上海水产大学学报,2005,14(1):1-5.
- [3] 汪桂玲,袁一鸣,李家乐.中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性及亲缘关系的SSR分析.水产学报,2007,31(2):152-158.
- [4] 李家乐,白志毅,钱荣华.中国五大湖三角帆蚌群体和诸暨养殖群体生长性能比较研究.水产科技情报,2006,33(6):243-246.
- [5] 喻达辉,朱嘉濠.珠母贝属的系统发育:核rDNA ITS序列证据.生物多样性,2005,13(4):315-323.
- [6] Yu ZN, Kong XY, Zhuang ZM *et al.* Sequence study and potential uses of ribosomal DNA internal transcribed spacers in scallop *Chlamys farreri*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(1): 6-9.
- [7] 陈林林,孔晓喻,周立石等.魁蚶核糖体DNA基因转录间隔区的序列特征.中国水产科学,2005,12(1):104-108.
- [8] Kenchington E, Bird CJ, Osborn J *et al.* Novel repeat elements in the nuclear ribosomal RNA operon of the flat oysters *Ostrea edulis* C Linnaeus and *O. angasi* Sowerby. *Shell Research*, 2002, 21: 697-705.
- [9] Insua A, López-Piñón MJ, Freire R *et al.* Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae). *Genome*, 2003, 46(4): 595-604.
- [10] King TL, Eackles MS, Gjetvaj B *et al.* Intraspecific phylogeography of *Lasmigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity. *Molecular Ecology*, 1999, 8(12): S65-S78.
- [11] Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J *et al.* Species-wide homogeneity nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity*, 1998, 80(6): 742-752.
- [12] Eizadora YT, Ma Antomette Juinio-menez, Monie VD. Sequence variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Tridacna crocea*. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(6): 511-516.
- [13] Freire R. Analisis de secuencias de ADX ribosómico en berberechos y mejillones de la costa europea. Coruna: Universidade da coruna, coruna, spain, 2002.
- [14] 潘宝平,吴琪,张素萍等.文蛤属(*Meretrix*)16SrRNA基因及ITS1序列的系统学分析.海洋与湖沼,2006,37(4):342-347.
- [15] Kong XY, Zhang LS, Yu ZN *et al.* Sequencing of ribosomal internal transcribed spacer regions and mitochondrial gene fragments in *Crassostrea giga*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(4): 304-308.
- [16] Chang WYB, 刘金陵. 11000年以来太湖的形成和演变. 古生物学报, 1996, 35(2): 129-135.