

# 长江白甲鱼 ITS2 序列结构和群体遗传多样性\*

马跃岗<sup>1</sup> 朱杰<sup>1</sup> 袁万安<sup>2\*\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆市水产科学研究所, 重庆 401121; <sup>2</sup>重庆文理学院, 重庆永川 402160)

**摘要** 对长江白甲鱼 (*Onychostoma sima*) 样本核 DNA 进行 PCR 扩增, 获得白甲鱼核 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 (876 bp)。运用 DNA 分析软件对白甲鱼 2 个驯养群体 (重庆水产研究所长寿湖珍稀鱼类繁育中心及涪陵鱼种场) 进行了遗传多样性分析。结果表明: 该序列平均 T、C、A 和 G 碱基组成为 22%、32.5%、29.6% 和 15.8%, 颠换  $T_v = 40$ , 转换  $T_s = 10$ , 转换和颠换比值为  $R = T_s/T_v = 0.25$ 。40 个体都是单倍型, 单倍型多样性为  $H = 1.000$ , 平均核苷酸差异系数  $K = 5.978$ , 核苷酸多样性  $P_i = 0.0682$ 。中性检验及聚类分析表明, 两个群体没有分化成单一的群体, 两个驯养群体遗传多样性高, 种质质量良好。

**关键词** 珍稀鱼类; 白甲鱼; 转录间隔子 2; 遗传多样性; 资源保护

**中图分类号** Q959.46 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)3-0670-06

**ITS2 structure and population genetic diversity of *Onychostoma sima* (Sauvage) in Yangtze River.** MA Yue-gang<sup>1</sup>, ZHU Jie<sup>1</sup>, YUAN Wan-an<sup>2\*\*</sup> (<sup>1</sup>Chongqing Fishery Sciences Research Institute, Chongqing 401121, China; <sup>2</sup>Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan 402160, Chongqing, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(3): 670-675.

**Abstract:** Through the PCR amplification of the DNA extracted from the *Onychostoma sima* samples collected from Yangtze River, the partial sequence of 5.8S and 28S nuclear ribosomal RNA gene and the complete sequence of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) were obtained. By using the software for DNA analysis, the population genetic diversity of *O. sima* in the Changshou Lake Rare Fish Breeding Center of Chongqing Fishery Sciences Research Institute and in the Fuling Fish Breeding Center was analyzed. The ITS2 contained 876 bp nucleotides, and the T, C, A, and G were averagely accounted for 22%, 32.5%, 29.6%, and 15.8%, respectively. A total of 50 variable sites were found, including 40 transversions ( $T_v$ ) and 10 transitions ( $T_s$ ). The  $T_s/T_v$  ratio ( $R$ ) was 0.25. All the 40 *O. sima* individuals collected were of 40 haplotypes, the haplotypic diversity ( $H$ ) was 1.000, the average number of nucleotide differences ( $K$ ) was 5.978, and the nucleotide diversity ( $P_i$ ) was 0.0682. Neutrality test and cluster analysis showed the two *O. sima* populations were not differentiated into a single population. The genetic divergence of the two populations was higher, and their germplasm resources had much higher quality.

**Key words:** rare fish; *Onychostoma sima*; internal transcribed spacer 2 (ITS2); genetic diversity; resource conservation.

白甲鱼 (*Onychostoma sima*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤亚目 (Cyprinidei) 鲤科 (Cyprinidae) 白甲鱼属 (*Onychostoma*), 主要分布于长江中上游的干支流, 西江上游的融江与都柳江以及北江水系 (郑葆

珊, 1987)。其肉质细嫩, 味道鲜美, 是产地的名贵鱼类, 多年来, 由于水体污染, 过度捕捞等因素, 其种群数量日趋减少, 特别是达到性成熟的繁殖个体, 在长江中上游很难见到, 种质资源正濒临消失的危险, 现已被列为易危鱼类 (汪松和解焱, 2004; 王亚民, 2007; 吕彤等, 2009)。因此, 研究白甲鱼种群遗传特性和生物多样性状况, 对保护该鱼种种群具有非常

\* 2010 重庆市科委基本科研业务费项目 (CH001)、重庆市水产研究所项目 (20090901)、教育部博士后基金项目 (20080430853) 资助。

\*\* 通讯作者 E-mail: vwa110@163.com

收稿日期: 2011-08-12 接受日期: 2011-10-26

重要的意义。目前,关于白甲鱼的研究仅见于国内对于其生物学特性的描述(李勇等,2006;谭娟等,2006;周剑等,2007;陈先均等,2008;胡世然等,2009;李强等,2009;王永爽等,2010)、微卫星遗传多样性(熊美华等,2009)、营养需求(周兴华等,2007)及人工养殖(万松彤,2010)和鱼病防治(胡世然等,2009;李强,2009)等研究。

通过对鲢形目(袁万安,2008)、鲈形目(袁万安,2009)、鲤形目(袁万安,2010)鱼类研究发现,编码 5.8S rRNA 和 28S rRNA 的基因比较保守。已经证实,真核生物 DNA 链上编码核糖体 18S rRNA、5.8S rRNA 和 28S rRNA 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 5.8S rRNA 基因碱基序列完全一致,而编码 28S rRNA 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,已应用于各种生物的种属鉴别及种内遗传结构和遗传进化研究(Oliverio *et al.*, 2002; Coleman, 2003; Young & Coleman, 2004; Gomulskil *et al.*, 2006; Umehara *et al.*, 2006; Craig *et al.*, 2007)。核糖体内部转录间隔区(ITS)是一个非编码区域,它包括转录间隔区 1(ITS1)和转录间隔区 2(ITS2)。ITS2 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(Herskovitz & Zimmer, 1996)。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(Jobst *et al.*, 1998; Goertzen *et al.*, 2003; Schultz *et al.*, 2005; Coleman, 2007; Miao *et al.*, 2008)。

关于白甲鱼 ITS2 遗传结构的研究尚未见报道。本研究通过对白甲鱼 ITS2 全序列的测定,研究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,同时为今后鱼苗种群的鉴定,鱼苗鱼种来源,保护养殖户合法的经济利益,打击假冒伪劣苗种打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与 DNA 提取

实验用白甲鱼 40 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“繁育中心”)及涪陵鱼种场(以下简称“涪陵”)各 20 尾。其中繁育中心为预备亲鱼体长 35~40 cm,涪陵为 10 cm 白甲鱼第一代鱼种。两个场的亲鱼收集都在三峡大坝蓄水之前。亲鱼取尾鳍上叶,约 1~2 g,受伤鱼尾涂抹四环素软膏防止感染;鱼种麻醉(MS-222),取鱼的尾柄肌肉 1~2 g,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 °C 冰箱备用。采用蛋白酶 K 酚氯仿法(Sambrook *et al.*, 1989)提取总 DNA。

### 1.2 白甲鱼 ITS2 序列的 PCR 扩增

PCR 扩增引物采用鲤形目鱼类通用引物(袁万安, 2010),通用序列为 C5.8SF: 5'-CGGTGGAT-CACTCGGCTCGT-3', C28SR: 5'-CGGGTTGTCTCGC-CTGACCT-3',对 5.8S rRNA 和 28S rRNA 基因的部分片段和完整的 ITS2 片段进行扩增。由于片段太长,约 876 bp,中间加入测序引物,把此片段分成两端扩增。PCR 扩增体系为 20  $\mu$ L: 2  $\mu$ L DNA,每种引物(6 pmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 2  $\mu$ L, 4  $\mu$ L 10 $\times$ buffer, 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP 6  $\mu$ L, 1 U *Taq* LA 酶(Takara 公司),其余为超纯水。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 40 s, 62 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 32 个循环;最后一次循环结束后, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 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 Takara 大连公司双向测序。

### 1.3 分析方法

实验所得序列通过 DNASTar 软件包的 EditSeq、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 MEGA 4.1 Beta3 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;PHYLIP 3.69 构建 ML 系统进化树;通过 DnaSP 5.0 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之间的平均核苷酸差异系数  $K$ 、核苷酸多样性  $P_i$  及中性检验统计值 Tajima  $D$  和 Fu & Li  $D$  和  $F$ ;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  $G_{st}$ 、地理单元遗传分化系数  $\gamma_{st}$ 、遗传分化指数  $F_{st}$ 、核苷酸净遗传距离  $D_a$ 、核苷酸的

表1 白甲鱼部分 5.8S rRNA、28S rRNA 和完整的 ITS2 序列碱基组成

Table 1 Nucleotide compositions of the fragment of 5.8S rRNA, 28S rRNA partial sequence and ITS2 complete sequence from *Onychostoma sima*

种群	T	C	A	G
繁育中心	21.9	32.8	29.7	15.7
涪陵	22.2	32.3	29.5	16.0
平均	22.0	32.5	29.6	15.8

表3 群体的基因交流及遗传分化

Table 3 Genetic differentiation and  $N_m$  values between two populations

种群1	种群2	基因多样性 $H_s$	平均核苷酸 差异系数 $K_{xy}$	群体分化 系数 $G_{st}$	遗传分化 系数 $\gamma_{st}$	遗传分化 指数 $F_{st}$	核苷酸分 歧度 $D_{xy}$	地理群体 分化系数 $N_{st}$	核苷酸净 遗传距离 $D_a$	基因流 $N_m$
繁育中心	涪陵	1.0000	604.1050	0.0000	0.0308	0.0103	0.6896	0.0279	0.0071	24.07

$H_s$ : 单倍型平均多样性值;  $K_{xy}$ : 平均核苷酸差异数;  $G_{st}$ : 群体分化系数;  $\gamma_{st}$ : 地理单元遗传分化系数;  $F_{st}$ : 遗传分化系数;  $D_{xy}$ : 核苷酸分歧度;  $D_a$ : 核苷酸净遗传距离;  $N_{st}$ : 地理群体分化系数;  $N_m$ : 群体间基因流。

分歧度  $D_{xy}$ , 并根据  $N_m \approx (1 - F_{st}) / (2F_{st})$  得到群体间的基因交流值  $N_m$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 白甲鱼 ITS2 序列碱基组成及变异情况

白甲鱼核 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 876 bp, 包括编码 5.8S rRNA 和 28S rRNA 基因的 200 bp, 及 ITS2 序列约 676 bp。序列提交 GenBank, 序列号为: 繁育中心白甲鱼: HQ634295-634314; 涪陵白甲鱼: HQ634315-63433。序列碱基组成见表 1, 两个群体组成基本一致, 没有显著变化。其中 G 的含量显著低于其他碱基的含量, A+T (平均为 51.6%) 高于 C+G (平均为 48.3%)。所测序列中有 40 个碱基发生颠换, 10 个碱基发生转换, 转换与颠换比值 ( $T_s/T_v$ ) 为 0.25, 颠换大于转换。

### 2.2 白甲鱼种群遗传多样性

**2.2.1 种群多态性位点分析** 40 个个体共检测到总共有 50 个变异位点, 其中 45 个为单变异位点, 5 个 3 变异位点。40 个个体都为单倍型。

**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(表 2), 2 个种群的  $H$  值均为 1.00, 非常高。衡量种群遗传水平的  $K$  值和  $P_i$  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(表 3)及中性检验统计值 Tajima  $D$  和 Fu & Li  $D$  和  $F$ 。Tajima  $D$  检验值为 -0.08078, 无显著差异 ( $P > 0.1$ )。Fu & Li  $D$  检验值为 -2.0250, Fu & Li  $F$

表2 白甲鱼 2 个种群统计参数

Table 2 Demographic parameters estimated from two *Onychostoma sima* populations

种群	$H$	$K$	$P_i$
繁育中心	1.000	5.990	0.0683
涪陵	1.000	5.967	0.0681
平均	1.000	5.978	0.0682

$H$ : 单倍型多样性;  $K$ : 样本中所有单倍型对两两的平均核苷酸差异系数;  $P_i$ : 核苷酸多样性。

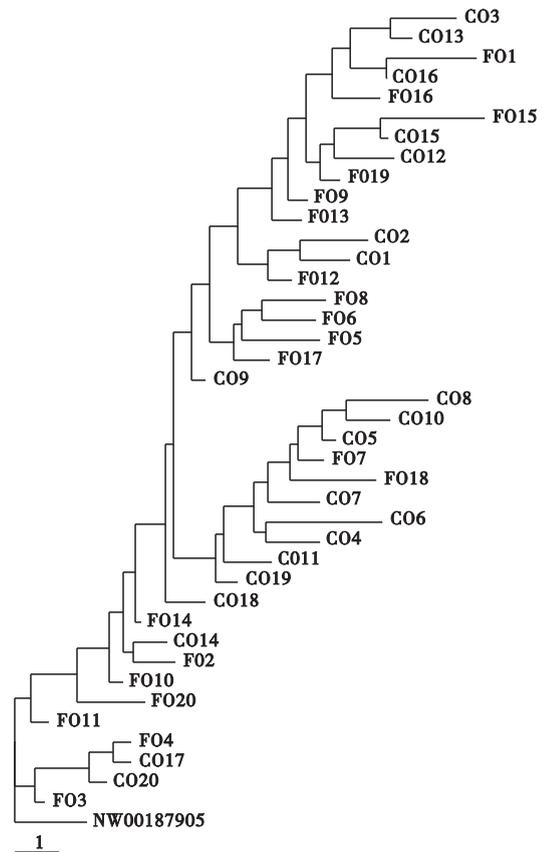


图1 5.8S rRNA、28SrRNA 基因的部分序列和完整 ITS2 序列构建的系统发生树

Fig. 1 Phylogenetic trees based on 5.8S, 28S nuclear ribosomal RNA gene partial sequence and nuclear ribosomal second internal transcribed spacer complete sequence

Kimura 双参数模型以白甲鱼 5.8S rRNA、28S rRNA 基因部分序列和完整的 ITS2 序列以斑马鱼相同序列作外群, 用 ML 法构建, Bootstrap 值 1000. FO-涪陵渔场样本; CO-繁育中心样本; NW00187905-斑马鱼。

检验值为 $-1.573$ ,无显著差异( $P>0.1$ ),说明序列为选择性中性。

**2.2.4 种群的遗传距离和系统进化** 用 MEGA 4.0 软件,用 Kimura 2-parameter 模型计算的种群内和种群间的遗传距离,两个种群间平均遗传距离为 $0.076$ ,种群间的遗传距离为 $0.006$ 。通过 PHYLIP 3.69 软件包分析,以亲缘关系最近的鲤形目的斑马鱼(*Danio rerio*) GenBank 号 NW001879059.1 为外群构建 ML(maximum likelihood)系统进化树(图 1), Bootstrap 值 1000,繁殖中心和涪陵渔场的样本混合聚类,最后与斑马鱼聚类构成有根树。

### 3 讨论

#### 3.1 白甲鱼两个群体的遗传分化

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。Shakelee(1982)综合已经发表的资料,提出鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离  $D$  值分别为 $0.9$ 、 $0.30$ 及 $0.05$ 的分类依据。白甲鱼两个驯化群体间的遗传距离为 $0.006$ ,表明两个驯化群体间的遗传分化没达到种群的分化标准,中性检验统计 Tajima  $D$  和 Fu & Li  $D$  和  $F$  值更证明两个种群没有分化。聚类分析也得到相同结果,繁育中心样本和涪陵渔场样本,单倍型之间混合聚类,每个群体都没形成单一的聚类枝。原因是繁育中心样本收集于长江中游,而涪陵渔场的亲鱼也是收集于长江中游,所以完全有机会进行基因交流。从  $N_m$  值来看,基因流是一个群体迁移至另一个群体时将某基因带到新的群体所产生的基因流动。通常  $N_m > 1$ ,表明群体间的基因交流的水平较高,群体间遗传分化较小;当  $N_m > 4$  时,种群间基因交流充分,遗传分化较小(Millar & Libby, 1991)。本研究两个驯化群体间,  $N_m$  值是 $24.07$ ,表明涪陵渔场苗种的亲鱼与繁育中心的种群在长江未被收集驯化前,有较强烈的基因交流。

#### 3.2 白甲鱼的遗传多样性

采用 ITS2 序列变异来研究种群的遗传变异时,主要考虑两个指标:一是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(Lan & Shi, 1993)。本研究的白甲鱼单倍型间的平均遗传距离为 $0.076$ ,说明这两个群体白甲鱼 ITS2

遗传多样性较高,这与彭珊等(2009)用 mtDNA D-loop 环对稀有白甲鱼的研究结果相吻合。另外一个指标就是核苷酸多样性( $P_i$ ),由于  $P_i$  值考虑了各个单倍型在群体中所占比例,在反映群体 ITS2 多样性程度时就比单纯的平均遗传距离精确。白甲鱼 40 个个体,有 40 个单倍型,说明群体的 ITS2 多态性高,而繁育中心和涪陵渔场的核苷酸多样性  $P_i$  值分别为 $0.0683$ 和 $0.0681$ ,平均  $P_i$  值为 $0.0682$ ,说明种群核苷酸多样性较高,与代应贵等(2010)关于小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D-loop 环遗传多样性的研究一致。

#### 3.3 白甲鱼种质资源的保护

物种进化潜力高低、抵制自然界各种生存压力的能力强弱的重要指标是遗传多样性,而这指标也是针对濒危物种制定有效保护策略和管理措施的科学依据(Frankham & Ralls, 1998; Frankham *et al.*, 2002)。遗传多样性的丧失会对物种生存带来不利影响,使生物适应能力降低,物种更加容易灭绝(Frankham, 1995)。研究的两个白甲鱼种群 ITS2 具有丰富的遗传多样性,为这两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。近年来,由于三峡大坝的修建,蓄水水位的不断提高,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、水质污染等已导致白甲鱼种群数量急剧减少,从而将降低其遗传多样性和对环境的适应能力。因此,必须开展白甲鱼种群及其遗传多样性的保护。

鱼类人工驯养,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,这在很多人工驯养鱼类的检测中已得到证实(孟宪红等, 2000; 张德春, 2000; 张德春等, 2004; Kolar *et al.*, 2005)。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生物种群的生存。白甲鱼是长江的特有珍稀鱼类,对其进行遗传多样性的研究可以充分了解群体的遗传结构,从而为物种的资源管理,种质资源的评估提供科学依据,特别是现在三峡电站水位正在不断提高的特殊时期,对长江现有珍稀鱼类种群的保护和恢复

具有重要意义。

**致谢** 本研究在样本采集过程中得到重庆水产研究所所长寿湖珍稀鱼类繁育中心和涪陵渔场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,审稿人对文章提出宝贵的修改意见,在此一并致谢。

#### 参考文献

陈先均,周 剑,李孟均. 2008. 白甲鱼生物学特征与繁殖技术初探. 江苏农业科学, (6): 222-223.

代应贵,韩 雪,张晓杰. 2010. 小口白甲鱼都柳江种群 mtDNA D 环的序列变异及遗传多样性. 动物学杂志, **45**(2): 115-120.

胡世然,方世贞,郑贵海. 2009. 白甲鱼暴发性流行病的诊治方法. 科学养鱼, (11): 48-49.

胡世然,张竹青,周承辉,等. 2009. 白甲鱼生物学特性及人工驯养技术. 贵州农业科学, **37**(10): 152-154.

李 强,李孟均,周传江,等. 2009. 饥饿对白甲鱼(*Onychostoma sima*)仔鱼摄食、生长的影响. 淡水渔业, **39**(5): 32-37.

李 强. 2009. 白甲鱼车轮虫病的防治. 渔业致富指南, (15): 62.

李 勇,张耀光,谢碧文,等. 2006. 白甲鱼胚胎和胚后发育的初步观察. 西南师范大学学报(自然科学版), **31**(5): 142-147.

吕 彤,郭乔羽,王 丁. 2009. 为长江上游的珍稀和特有鱼类保持生态流. 世界环境, (1): 88-89.

孟宪红,孔 杰,庄志猛,等. 2000. 真鲷自然群体和人工繁殖群体的遗传多样性. 生物多样性, **8**(3): 248-252.

彭 珊,代应贵. 2009. 濒危鱼类稀有白甲鱼清水江种群 mtDNA D-loop 序列多态性. 水产学报, **33**(2): 196-200.

谭 娟,张耀光,刘本祥,等. 2006. 中华倒刺鲃、白甲鱼和岩原鲤精子的生理特性比较. 淡水渔业, **36**(6): 3-7.

万松彤. 2010. 四川白甲鱼的网箱养殖试验. 渔业致富指南, (13): 58-59.

汪 松,解 焱. 2004. 中国物种红色名录(第1卷): 红色名录. 北京: 高等教育出版社.

王亚民. 2007. 亟待保护的长江濒危鱼类. 大自然, (3): 24-26.

王永爽,权 恒,丁诗华,等. 2010. 白甲鱼耗氧率与窒息点的测定. 西南师范大学学报(自然科学版), **32**(6): 6-10.

熊美华,史 方,徐 念,等. 2009. 微卫星标记分析乌江流域白甲鱼群体的遗传多样性. 水生态学杂志, **2**(2): 122-125.

袁万安. 2008. 通过核基因 ITS2 片段研究四种鲂形目鱼类进化. 淡水渔业, **35**(5): 15-21.

袁万安. 2009. ITS2 在法医鱼类学的应用研究(博士后出站报告). 汕头: 汕头大学医学院.

袁万安. 2010. 核糖体转录间隔子 2 应用于鱼类种属的鉴别. 遗传, **32**(4): 369-374.

张德春,余来宁,方耀林. 2004. 草鱼自然群体和人工繁殖群体遗传多样性的研究. 淡水渔业, **34**(4): 5-7.

张德春. 2000. 鲮鱼人工繁殖群体遗传多样性的研究. 三峡大学学报(自然科学版), **24**(4): 379-381.

郑葆珊. 1987. 中国动物图谱(鱼类). 北京: 科学出版社.

周 剑,陈先均,李孟均. 2007. 白甲鱼食性的初步研究. 水利渔业, **27**(5): 83-107.

周兴华,郑曙明,吴 青,等. 2007. 白甲鱼肌肉营养成分与品质的评价. 西南大学学报(自然科学版), **29**(8): 123-128.

Coleman AW. 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, **19**: 370-375.

Coleman AW. 2007. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, **35**: 3322-3329.

Craig JH, Nathan JB, Naoki I, et al. 2007. Three species of parasites emerging on the gills of mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Temminck and Schlegel, 1843), cultured in Australia. *Aquaculture*, **265**: 27-40.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge: Cambridge University Press.

Frankham R, Ralls K. 1998. Conservation biology: Inbreeding leads to extinction. *Nature*, **392**: 441-442.

Frankham R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, **29**: 305-327.

Goertzen LR, Cannone JJ, Gutell RR, et al. 2003. ITS secondary structure derived from comparative analysis: Implications for sequence alignment and phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**: 216-234.

Gomulskil LM, Meiswinkel R, Delecolle JC, et al. 2006. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, **20**: 229-238.

Hershkovitz MA, Zimmer EA. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. *Nucleic Acids Research*, **24**: 2857-2867.

Jobst J, King K, Hemleben V. 1998. Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9**: 204-219.

Kolar CS, Chapman DC, Courtenay WR, et al. 2005. Asian Carps of the Genus *Hypophthalmichthys* (Pisces, Cyprin-

- dae): A Biological Synopsis and Environmental Risk Assessment [2011-10-02]. <http://www.fws.gov/contaminants/OtherDocuments/ACBSRAFinalReport2005.pdf>.
- Lan H, Shi LM. 1993. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in south west China: An approach from mitochondrial DNA polymorphism. *Biochemical Genetics*, **31**: 51–60.
- Miao M, Warren A, Song W, *et al.* 2008. Analysis of the internal transcribed spacer2 (ITS2) region of Scuticociliates and related taxa (Ciliophora, Oligohymenophorea) to infer their evolution and phylogeny. *Protist*, **159**: 519–533.
- Millar CL, Libby WJ, 1991. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in wide spread species// Fald DA, Holsinger KE. Genetics and Conservation of Rare Plants. New York: Oxford University Press: 149–170.
- Oliverio M, Cervelli M, Mariottini P. 2002. ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **25**: 63–69.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Schultz J, Maisel S, Gerlach D, *et al.* 2005. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA*, **11**: 361–364.
- Shakelee JB. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoresis analysis of proteins. *Pacific Science*, **36**: 141–157.
- Umehara A, Kawakami Y, Matsui T, *et al.* 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitology International*, **55**: 267–271.
- Young I, Coleman AW. 2004. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: A Drosophila example. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**: 236–242.
- 
- 作者简介** 马跃岗,男,1962年生,硕士,副研究员,主要从事鱼类资源保护、水产资源开发与应用研究。E-mail: myg0016@163.com
- 责任编辑** 李凤芹
-