

魁蚶 4 个地理群体 ITS 序列变异及系统发生分析

周丽青¹ 杨爱国^{1*} 王清印¹ 吴彪¹ 于涛²

(¹农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²中国水产科学研究院长岛增殖实验站, 265800)

摘 要 为充分了解我国魁蚶种质资源状况, 准确定位魁蚶的养殖育种模式, 本研究采用聚合酶链式反应(PCR)对采自山东蓬莱(PL)、山东黄岛(HD)、江苏前三岛(QSD)及韩国统营(KTY)4 个地理群体魁蚶样本的核糖体 RNA 两个内转录间隔区域(ITS-1 和 ITS-2)进行扩增, 经测序比对后分别获得长度为 468bp 和 541bp(包含引物、插入/缺失位点)的序列。序列比对结果表明, ITS 区序列变异相对较高, 但 4 个群体的碱基组成基本一致; 4 个群体的 ITS 区序列均表现出丰富的遗传多样性, HD 群体最为丰富, 该群体在 ITS 区序列上的变异位点数也最多, HD 和 QSD 群体共同变异位点多且集中。对不同个体间的遗传距离和分子系统树分析结果表明, ITS 序列在魁蚶不同地理群体间甚至个体间存在差异, 且 ITS-1 和 ITS-2 的变异频率是不一样的, 4 个群体合计 55 个个体基于 ITS-1 序列没有发生明显聚类现象, 这 4 个群体合计 56 个个体基于 ITS-2 序列明显聚为 PL/KTY、HD/QSD 两大类, 基于 ITS-2 序列进行系统发生分析的结果同于课题组之前基于形态度量学分析和分子标记分析的结果; HD 群体遗传多样性丰富, 而 KTY 群体遗传变异相对较少, 各群体之间存在一定的遗传差异, 综合考虑不同群体相对优良的生物学特征, 可开展选择或杂交培育良种的研究。

关键词 魁蚶 地理群体 ITS-1 ITS-2 遗传变异

中图分类号 Q953+.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)05-0078-07

ITS sequence variation and phylogenetic analysis on four geographical populations of blood clam *Scapharca broughtonii*

ZHOU Li-qing¹ YANG Ai-guo^{1*} WANG Qing-yin¹ WU Biao¹ YU Tao²

(¹ Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Changdao Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, 265800)

ABSTRACT In order to investigate the genetic structure and variability of *Scapharca broughtonii*, thus to make proposals for the species culture and breeding, four geographical populations of *S. broughtonii* were collected from Shandong Penglai (PL), Shandong Huangdao (HD), Jiangsu Qiansandao (QSD) in China, and Tongying in Korea (KTY) respectively, and the genetic variation was analyzed based on ITS nucleotide sequences of rDNA. PCR amplification

山东省科技发展计划项目(2010GHY10513)、黄海水产研究所基本科研业务费项目(2010-ts-07)、山东省自然科学基金项目(ZR2009DQ006)、青岛市重点科技成果培育计划(10-3-4-17-chg)和青岛市科技规划应用基础研究计划项目(09-1-3-12 jch)共同资助

* 通讯作者。E-mail: yangag@ysfri. ac. cn, Tel: (0532)85811982

收稿日期: 2011-08-20; 接受日期: 2012-04-01

作者简介: 周丽青(1974-), 女, 副研究员, 主要从事贝类遗传育种方面的研究。E-mail: zhoulq@ysfri. ac. cn

products were sequenced and aligned subsequently. The 486bp and 541bp nucleotide sequences of ITS-1 and ITS-2 respectively were obtained (primers and insertion/deletion sites included). The results showed that though the genetic variation of ITS-1 and ITS-2 was relatively high, the base composition of them was stable. The genetic diversity of the four populations was rich, which indicated that the germplasm resource of the species was in good condition. The genetic diversity of HD population was the richest. Also, the number of variation sites of ITS-1 and ITS-2 were the largest in HD population. There were many neighbor common variation sites in HD and QSD populations. In this study, we calculated the genetic distances between individuals and constructed the molecular phylogenetic tree by using minimum evolution method by MEGA 4.0. The results showed that the nucleotides in one species' genome had different variation frequency, and variation of nucleotides segment couldn't represent the genetic variation of the whole genome. Fifty-five blood clams did not cluster obviously based on the ITS-1 segment base sequences. However, 57 blood clams can be clustered into two categories completely, one as HD and QSD population, the other as KTY and PL populations. The information from nucleotides variation of ITS-2 is similar to the conclusion from multivariate morphometrics and molecular marker analysis carried out by our research group in the past. The genetic diversity of HD population is very rich, while the KTY population showed relatively low variation. There were certain genetic differences between each population, so that cross- and selective-breeding may be tested according to their biological characteristics.

KEY WORDS *Scapharca broughtonii* Geographical populations ITS-1 ITS-2
Genetic variation

魁蚶 *Scapharca broughtonii* Schrenck 是一种大型冷水蚶类,广泛分布于太平洋西部沿岸,主要分布于中国、日本、朝鲜半岛及俄罗斯东南部沿海,在我国主要分布于辽东半岛东南部、山东半岛北部和东部等海区。魁蚶肉质鲜美,营养及药用价值高,近年来国内市场和出口的需求量明显增大,野生自然资源无法满足市场需求,人工养殖得到大力发展。我国海域辽阔,各个海域气候差异较大,多样的生态环境导致魁蚶的地理群体出现了形态和遗传差异。一个物种的遗传多样性水平与其适应能力、繁殖能力和进化潜力密切相关 (Sokal *et al.*, 1989)。而一个物种遗传多样性越丰富,对环境变化的适应能力就越强,也就越容易扩展其分布范围和开拓新的环境 (苏天凤等 2007)。魁蚶作为一个新的增养殖对象,有关其遗传学研究开展不多,周琳等 (1997) 和郑家声等 (1996) 对魁蚶的染色体组型进行了研究;吴洪喜等 (2000) 采用流式细胞仪对魁蚶血细胞 DNA 的相对含量进行了测量,验证了佩尔森纳对泥蚶、毛蚶和魁蚶分类的正确性,这些研究仅对我国魁蚶种质做了鉴定,还未进行遗传多样性评估。喻子牛等 (1998) 研究了秦皇岛、大连、青岛和韩国釜山 4 个魁蚶群体样品的等位基因酶的遗传变异,发现韩国釜山群体和我国 3 个群体之间存在一定的遗传变异;An 等 (2005) 采用新分离的 10 个多态微卫星位点对魁蚶进行了遗传多样性分析,这才开始了魁蚶资源遗传多样性调查研究。本课题组运用多变量形态度量学分析方法、RAPD 和 SSR 标记技术,对从韩国和我国沿海采集的 4 个魁蚶地理群体的遗传变异和遗传多样性进行了研究 (梁超 2009;梁超等 2010),结果均证明这 4 个群体遗传多样性丰富,育种潜力很大。

核糖体内转录间隔区 ITS-1 和 ITS-2 是核糖体 RNA 基因内部的间隔区域,它们本身不参加到成熟的核糖体当中,因此所受的选择压力较小,进化速率较快,能提供较多的遗传信息。依据其两端保守的 18S、5.8S 和 28S rDNA 序列,设计出通用的上下游引物,通过 PCR 扩增即可获得这两段间隔区序列,能简便而有效地监测到各地理群体遗传多样性的变化。为进一步调查和研究魁蚶不同地理群体的系统发生状况,以便将来更好

地利用魁蚶资源,培育新品系,制定合理的开发、保护和育种方案,本研究对实验室采集的上述4个魁蚶地理群体进行ITS的核苷酸序列变异分析及系统发生分析。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用魁蚶分别于2007年8~10月份随机采自山东蓬莱(PL)、山东黄岛(HD)、江苏前三岛(QSD)和韩国统营(KTY)4个海区,均为自然群体。各群体样本数目分别为31、51、45、28,平均壳高分别为 7.46 ± 0.04 、 3.35 ± 0.03 、 4.93 ± 0.06 、 5.74 ± 0.86 cm。

1.2 ITS序列的测定

基因组DNA提取方法参照《分子克隆》(Sambrook *et al.* 1989),取样部位为魁蚶肉柱,基因组DNA母液用核酸定量仪结合1%的琼脂糖凝胶电泳进行DNA浓度和质量检测。ITS-1扩增的正向引物ITS-1F:5'-GGTTCTGTAGGTGAACCTGC-3',反向引物ITS-1R:5'-CTGCGTTCTTCATCGACCC-3';ITS-2扩增的正向引物ITS-2F:5'-GGGTCGATGAAGAACGCAG-3',反向引物ITS-2R:5'-GCTCTTCCCGCTTCACTCG-3'。PCR扩增在PTC-200型PCR仪(BIO-RAD, USA)上进行,反应体系为60 μ l。PCR反应程序:94℃预变性5min,94℃变性45s,50℃(ITS-1)/52℃(ITS-2)退火1min,72℃延伸1min,共运行35个循环;最后72℃延伸5min。PCR产物上样至1.0%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,EC3型凝胶成像系统(UVP, USA)观察、照相,挑选扩增效果好的个体PCR扩增产物,送生工生物工程(上海)有限公司进行正反向测序。

1.3 数据统计与分析

ITS-1和ITS-2测序结果运用Chromas检查、ClustalX 1.8软件进行序列比对,运用DnaSP v 5.10.00-基因多态性分析软件进行多态性分析,运用MEGA 4软件计算碱基含量和遗传距离,并构建NJ、MP、ME、UPG-MA分子系统树。

2 结果与分析

2.1 核糖体RNA两个内转录间隔区域序列的扩增和测定

PCR扩增ITS-1和ITS-2产物的琼脂糖凝胶电泳条带单一清晰,依据DNA Marker,扩增序列浓度在200~600 ng/ μ l,片段大小在500 bp左右。ITS-1序列测定的有:HD群体19个、KTY群体10个、PL群体13个、QSD群体13个,合计55个个体。ITS-2序列测定的有:HD群体15个、KTY群体19个、PL群体15个、QSD群体7个,合计56个个体。

2.2 核糖体RNA两个内转录间隔区域的碱基组成及变异分析

ITS-1和ITS-2序列长度分别为468bp和541bp(均包含插入/缺失位点)。图1显示4个群体ITS-2碱基变异位点比对,引物标出。在距离引物ITS-1F结合区域20~79bp处、距离引物ITS-1R结合区域21~61bp处、距离引物ITS-2F结合区域10~44bp处、距离引物ITS-2R结合区域11~36bp处插入/缺失位点密集。HD35的ITS-1序列在311bp处发生一个碱基T的插入;PL31、HD44、HD28和QSD38的ITS-2序列在194bp处发生一个碱基C的缺失位点,KTY25在341bp处发生一个碱基A的插入位点,PL31、HD44和QSD38在415bp处也发生一个碱基A的插入位点。KTY群体的ITS-1序列变异位点最少,仅3个个体有单个位点的变异,而QSD群体的变异位点最多,13个个体均有变异位点,HD群体的变异位点也很多,达24个。4群体的ITS-2序列变异位点具有明显的群体特征,KTY群体变异位点多集中在序列前端,而HD和QSD群体集中在序列的后端,PL群体则分散在序列的前中部。HD群体ITS-1序列变异位点数最多,达24个;KTY

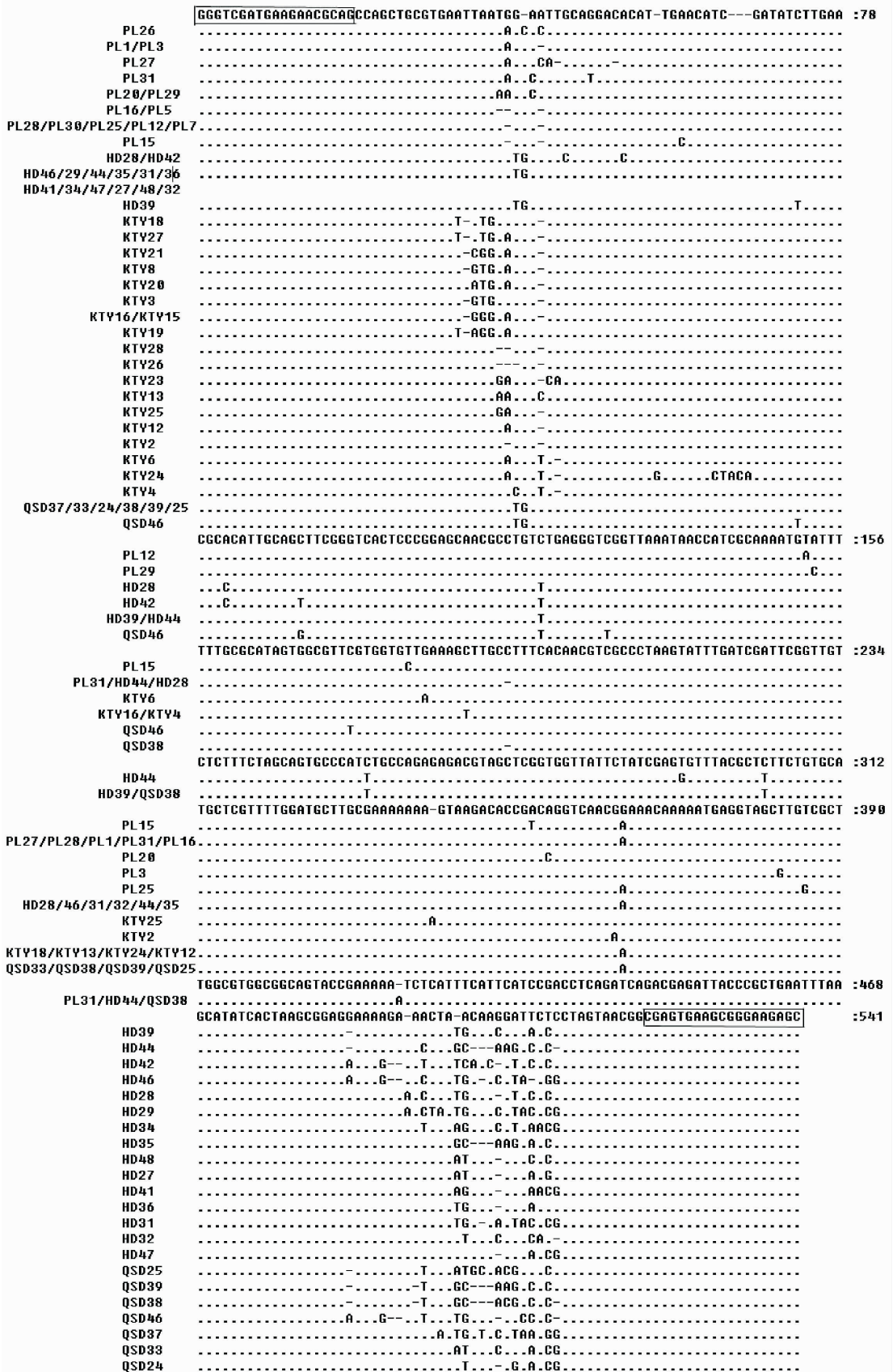


图 1 4 个群体魁蚶 ITS-2 核苷酸变异位点对比

Fig. 1 The variation sites alignment of ITS-2 nucleotide obtained from four populations of *S. broughtonii*

群体变异位点数最少,只有5个;4个群体的简约信息位点数9个,其中151和158是4个群体的共同变异位点;59和72是HD和QSD群体的共同变异位点;406是KTY和PL群体的共同变异位点。HD群体ITS-2序列变异位点数也最高,为27个;PL群体变异位点数最少,为14个;4个群体的简约信息位点数20个,其中364是4个群体的共同变异位点;HD群体和QSD群体共同变异位点很多,且非常集中(图1)。KTY群体和PL群体的共同变异位点为37、42和43。由此可见,HD群体和QSD群体的系统分化较近,而KTY群体和PL群体的系统分化更近。

4群体的ITS-1和ITS-2的碱基组成见表1。虽然各群体的ITS-1和ITS-2序列变异相对较高,但4个群体的碱基组成稳定,ITS-1的G+C含量明显高于ITS-2。碱基序列与组成基本与陈琳琳等(2005)报道的研究结果一致,其在GenBank上注册的ITS-1和ITS-2的序列号分别为AY380534和AY594286。

表1 4个魁蚶群体ITS-1和ITS-2序列的碱基组成

Table 1 Base composition of ITS-1 gene and ITS-2 gene fragments of four *S. broughtonii* populations

群体 Population	ITS-1					ITS-2				
	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	G+C(%)	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	G+C(%)
山东黄岛 HD	22.6	27.5	23.8	26.0	53.5	25.5	22.1	27.0	25.4	47.5
韩国统营 KTY	22.8	27.5	23.8	25.9	53.4	25.3	22.1	27.0	25.6	47.7
山东蓬莱 PL	22.7	27.5	23.8	26.0	53.5	25.3	22.2	27.1	25.4	47.6
江苏前三岛 QSD	22.6	27.6	23.9	25.9	53.5	25.6	22.0	26.9	25.5	47.5
平均值 Mean	22.7	27.6	23.8	25.9	53.5	25.4	22.1	27.0	25.5	47.6

注:由于标准差均小于0.01%,因此表中未列出标准差

Note: The standard deviations are less than 0.01%, and they are not listed in the table

2.3 核糖体RNA两个内转录间隔区域序列的多态性参数

4个群体间ITS-1和ITS-2的核苷酸遗传多态性参数见表2。从4个群体55个个体ITS-1序列中共检测到24个多态位点,22种单倍型,单倍型多样性为0.826,说明这4个群体的ITS-1区域单倍型比较丰富,但核苷酸多样性仅为0.0048,并不丰富。从4个群体的56个个体ITS-2序列中共检测到42个多态位点,45种单倍型,单倍型多样性为0.979,说明这4个群体的ITS-2区域单倍型非常丰富,其核苷酸多样性为0.0104,比较丰富。HD群体的ITS-1序列和ITS-2序列的多态性最高,其次是QSD群体,KTY群体ITS-1序列的多态性最低,PL群体ITS-2序列的多态性最低。

表2 4个魁蚶群体核糖体RNA两个内转录间隔区域序列的多态性参数

Table 2 Nucleotide polymorphism of two internal transcribed sequences of ribosomal RNA in four *S. broughtonii* populations

基因片段 Gene fragment	群体 Population	多态位点数 Number of polymorphic sites	单倍型数 Number of haplotype mutation	单倍型多样性 Haloptyme diversity(Hd)	核苷酸多态度 Nucleotide diversity(Pi)	平均核苷酸差异 Average number of nucleotide difference
ITS-1	HD	19	11	0.883	0.00696	3.175
	KTY	5	5	0.667	0.00252	1.156
	PL	7	9	0.910	0.00461	2.103
	QSD	8	6	0.795	0.00453	2.077
ITS-2	HD	20	15	1.000	0.01222	6.390
	KTY	11	15	0.971	0.00589	3.099
	PL	12	10	0.914	0.00420	2.210
	QSD	17	7	1.000	0.01402	7.333

2.4 4 个魁蚶群体分子系统树的构建和聚类分析

用 MEGA 4.0 软件计算 4 个群体间和群体内的遗传距离(表 3),置信度设置为 99.5%,分别构建 4 个群体个体间的 NJ、MP、ME 和 UPGMA 分子系统树。基于 ITS-1 序列,4 个群体间的遗传距离均很小,群体内遗传距离甚至高于群体间遗传距离。PL 群体和 HD 群体间的遗传距离最远,KTY 群体和 QSD 群体间的遗传距离最近,与 PL 群体之间的遗传距离也很近。基于 ITS-2 序列,群体间的遗传距离均比较大,KTY 群体和 QSD 群体间的遗传距离最远,而与 PL 群体间的遗传距离最近。4 种分子系统树树形基本一致,ITS-2 的 ME 分子系统树见图 2。魁蚶 ITS-1 的 4 种分子系统树数据显示 54 个个体没有明显的聚类发生,但 ITS-2 的 ME 分子系统树数据显示 57 个个体中,PL 群体和 KTY 群体明显聚类,HD 群体和 QSD 群体明显聚为一类,而 ITS-2 的 NJ 分子系统树中除 HD36 和 HD47 外、MP 分子系统树中除 HD36、HD27 和 HD32 外,UPGMA 分子系统树中除 HD36 和 HD47 外,其他个体仍象 ME 分子系统树一样明显聚为 PL/KTY、HD/QSD 两大类。

表 3 基于 ITS-1 和 ITS-2 序列的 4 个魁蚶群体间和群体内的遗传距离

Table 3 Genetic distance based on ITS-1 and ITS-2 sequence within or between *S. broughtonii* populations

群体 Population	ITS-1				ITS-2			
	HD	KTY	PL	QSD	HD	KTY	PL	QSD
黄岛 HD	0.006 4				0.012 6			
韩国统营 KTY	0.004 7	0.002 6			0.013 7	0.006 1		
蓬莱 PL	0.005 4	0.003 9	0.004 7		0.011 8	0.006 2	0.004 3	
前三岛 QSD	0.005 2	0.003 5	0.004 4	0.004 3	0.012 8	0.015 1	0.013 1	0.013 0

3 讨论

3.1 关于魁蚶 4 个地理群体系统发育情况及我国魁蚶育种规划

我国魁蚶群体有着丰富的遗传多样性,并存在较广泛的地理变异。这种变异在 ITS 基因序列和遗传变异参数上均有所体现,而且主要为个体之间的遗传差异,尽管个体间碱基发生变异的频率并不高,而碱基插入/缺失的情况较为普遍。姚红伟等(2010)提出,魁蚶种质资源已呈现衰退趋势,而魁蚶本身是一种颇受欢迎的经济价值较高的贝类,相对牡蛎、鲍鱼和扇贝而言,有关蚶类研究较少,应该从现有种质资源提纯、复壮出

发,注意在保护野生资源的前提下,合理开发和利用魁蚶种质资源。从本研究中的遗传距离和遗传变异可以看出,KTY 群体与 PL 群体在系统发生上亲缘关系比较密切,可能是地理位置上二者更接近的缘故,这与魁蚶的埋栖型、少移动的生物习性也有关;HD 群体遗传变异很高,对环境变化的适应能力强,KTY 群体遗传多样性相对较低,但它的各种性状相对稳定。本研究 4 个群体系统发生聚类结果与课题组之前采用多变量形态测量学方法和分子标记分析的结果是一致的,为今后制定魁蚶的育种计划指明了方向。

我国水产养殖企业比较认可韩国的魁蚶苗种,每年从韩国引进魁蚶种贝进行苗种生产,利用不同群体相对优良的生物学特征,开展选择或杂交培育良种的研究,或许能培育出优良品种,因为从韩国引种理论上可增加

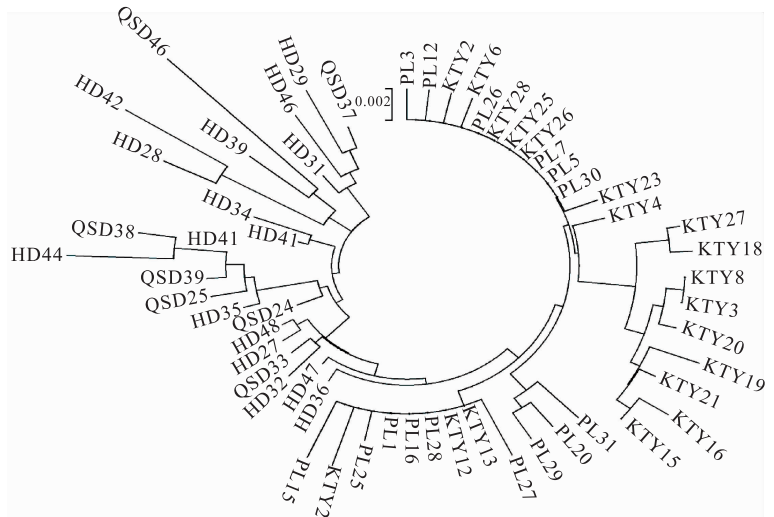


图 2 基于魁蚶 ITS-2 序列数据构建的 ME 分子系统树
Fig. 2 Molecular phylogenetic tree based on ITS-2 fragment sequences by ME method

我国魁蚶资源的遗传多样性,但应该考虑引种后的养殖区域和引种数量,特别要注意有效繁育群体的大小,以免出现遗传瓶颈效应。前三岛的地理位置比较特殊,介于山东日照和江苏连云港海域中间,是渔民赖以生存的传统作业渔场和重要的养殖基地,魁蚶是其增殖放流的主要对象之一,这里的魁蚶资源得到了较好的开发和利用。在开展优质魁蚶人工育苗和养殖研究的基础上,要防止过度捕捞引起自然种群数量锐减,在保护魁蚶生存环境保持优良种质繁衍生息的同时防止盲目人工引种导致的种质混杂。

3.2 基于 ITS 序列特征进行群体鉴定和遗传多样性分析的可行性

DNA 碱基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个体或者群体的遗传结构,不仅可以获得丰富的遗传变异资料,而且还可以准确地揭秘种群间进化关系,甚至更准确地鉴别不同的个体。ITS 属于非编码区序列,所受到的选择压力较小,进化速度快,有丰富的变异位点和信息位点,从低等到高等的真核生物,18S、5.8S 和 28S RNA 基因都是高度保守的,这样非常有利于设计 PCR 引物并成功扩增出 ITS 序列。因此,ITS 基因序列分析已被广泛用于水产动物种间、亚种和种群水平上遗传差异的研究(徐田军等 2006)。King 等(1999)认为 ITS 序列和 CO I 序列适用于淡水贝类 *Lasmigona subviridis* 地理系统学的研究;吕振明等(2010)利用栉孔扇贝和虾夷扇贝 ITS-1 的差异构建了虾夷扇贝的种特异性探针,采用 FISH 技术成功识别和鉴定这两种扇贝杂交子代染色体组成;陈琳琳等(2005)研究了魁蚶 ITS-1 和 ITS-2 序列特征,认为二者的引物在贝类中具有良好的通用性;郭永军等(2010)则对毛蚶、魁蚶和泥蚶核糖体 DNA 内转录间隔区进行 RFLP 分析。Insua 等(2003)采用 ITS 序列对扇贝科 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 和同时使用这两个序列进行系统学分析结果相似,而本研究结果表明魁蚶 ITS-1 和 ITS-2 序列的遗传变异信息并不完全一致,因为各序列变异频率是不一样的,不能完整代表某种生物全部遗传物质的特征,所以仅选用某个核苷酸序列来研究群体遗传多样性不够准确,可考虑选择生物在进化过程遗传变异比较大的几组序列来测定和分析就可以获得所需的遗传变异信息,如将核基因序列的分析和线粒体基因序列分析相结合,才有助于全面、深入地了解物种的进化及种群遗传结构。

参 考 文 献

- 吕振明,杨爱国,王清印,刘志鸿,周丽青,樊甄姣. 2010. FISH 技术在栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交子代染色体识别中的应用初探. 水生生物学报, 34(4): 709~715
- 陈琳琳,孔晓瑜,周立石,陈丽梅,喻子牛. 2005. 魁蚶核糖体 DNA 基因转录间隔区的序列特征. 中国水产科学, 12(1): 104~108
- 苏天凤,黄建华,吴进锋,江世贵. 2007. 2 种东风螺线粒体基因序列多态性研究. 中国水产科学, 14(3): 369~376
- 吴洪喜,柴雪良,吴建波,沈志坚. 2000. 3 种蚶 DNA 含量和种间亲缘关系的探讨. 水产科技情报, 27(2): 51~53
- 郑家声,王梅林,郭丹红,徐希明,高清兰. 1996. 3 种蚶染色体组型的比较研究. 海洋学报, 18(3): 78~85
- 周琳,王子臣. 1997. 魁蚶核型的研究. 水产学报, 21(4): 455~457
- 郭永军,戴伟,王晓梅,周晓狹. 2010. 毛蚶、魁蚶和泥蚶核糖体 DNA 转录间隔区的 RFLP 分析. 华北农学报, 25(4): 88~91
- 姚红伟,郭晋,景娜娜. 2010. 魁蚶增殖养殖状况及遗传多样性研究进展. 河北渔业, 197(5): 45~47
- 徐田军,刘楚吾,刘丽,董秋芬,杨叶欣. 2006. 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. 湛江海洋大学学报, 26(1): 84~88
- 梁超. 2009. 魁蚶不同地理区域种群的遗传多样性研究. 见: 上海海洋大学硕士学位论文
- 梁超,杨爱国,刘志鸿,周丽青,吴彪. 2010. 魁蚶 4 个地理群体遗传结构的 RAPD 分析. 渔业科学进展, 31(1): 59~64
- 喻子牛,孔晓瑜,杨锐,陈再忠,刘必谦,王如才. 1998. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*) 等位基因酶遗传变异研究. 青岛海洋大学学报, 28(1): 51~58
- An, H. S., and Park, J. Y. 2005. Ten new highly polymorphic microsatellite loci in the blood clam *Scapharca broughtonii*. Molecular Ecology Notes, 5(4): 896~898
- Insua, A., López-Pñón M. J., Freire R., and Méndez, J. 2003. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species(Mollusca: Bivalvia: Pectinidae). Genome, 46(4): 595~604
- King, T. L., Eackles, M. S., Gjetvaj, B., and Hoeh, W. R. 1999. Intraspecific phylogeography of *Lasmigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity. Mol. Ecol. 8(12 Suppl 1): S65~S78
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sokal, R. R., Jacquez, G. M., and Wooten, M. C. 1989. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection. Genetics, 121(4): 845~855