

核 rDNA ITS 区序列在无脊椎动物分子系统学研究中的应用*

唐伯平^{①②} 周开亚^{①**} 宋大祥^①

(^①南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所 南京 210097;

^②华东师范大学生物学博士后流动站 上海 200062)

摘要: 在无脊椎动物的分子系统学研究中,作为对线粒体 DNA 信息的重要补充,人们越来越多地采用核 DNA 的核糖体内转录间隔区(ITS)作为分子标记。本文介绍了 ITS 的组成和性质,并对近年来 ITS 在无脊椎动物分子系统学研究中的应用进行了总结,同时提出并讨论了目前在该领域存在的一些问题。

关键词: 核糖体 DNA 内转录间隔区; 分子系统学; 无脊椎动物

中图分类号: Q951 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)04-67-07

Application of Sequences of nrDNA ITS to Molecular Systematics of Invertebrates

TANG Bo-Ping^{①②} ZHOU Kai-Ya^① SONG Da-Xiang^①

(^① College of Life Sciences, Nanjing Normal University Nanjing 210097;

^② College of Life Sciences, East China Normal University Shanghai 200062, China)

Abstract: The internal transcribed spacer (ITS) of the nuclear ribosomal DNA, as an important complement of information obtained from mtDNA, is being used increasingly to construct or reconstruct phylogenetic relationships among species and to distinguish morphologically similar species in invertebrates. The composition and characteristics of nrDNA ITS were reviewed in this paper. Recent progress in invertebrates phylogenetic studies based on of ITS sequences invertebrates was summarized. Some problems in this field were brought up and discussed.

Key words: nrDNA ITS; Molecular systematics; Invertebrates

近十几年来,在无脊椎动物的分子系统学研究中,随着 mtDNA(mitochondrial DNA)序列的大量积累,人们越来越迫切地想得到核 DNA 的信息,来对 mtDNA 的资料进行补充,以便在系统学研究中对所研究的对象有一个更加全面准确的认识。在核 DNA 中,受到人们普遍关注的是核 rDNA 的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)。目前,它已被应用到很多无脊椎动物类群的分子系统学研究中。

1 ITS 的组成

核糖体是一个致密的核糖核蛋白颗粒,执行着蛋白质合成的功能。1953 年,首先在植物细胞中发现了

这种颗粒。第二年在动物细胞中也观察到了这一结构。1958 年人们才将它命名为核糖核蛋白体(ribosome),简称核糖体。它由几十种蛋白质和 rRNA 组成。真核生物的核糖体中, RNA 占 3/5,蛋白质占 2/5。nrRNA 包括两个亚基:大亚基和小亚基。大亚基的 RNA

* 国家自然科学基金重点资助项目,国家自然科学基金资助项目(No. 30130040, No. 30170116);

** 通讯作者;

第一作者介绍 唐伯平,男,37岁,博士,副教授;研究方向:动物分子系统学,动物分类学。

收稿日期:2001-08-04,修回日期:2002-05-14

主要为 28S、5.8S 和 5S rRNA。小亚基的为 18S rRNA。真核生物的 rRNA 基因以串联重复方式存在,其中 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因组成一个转录元,产生一个前体 RNA。在形成 rRNA 时,有 2 段 RNA 被剪切。第一段是位于 5.8S 和 18S rRNA 之间的片段,称之为 ITS1(internal transcribed spacer 1)即核糖体 RNA 第一内转录间隔区。第二段位于 5.8S 和 28S rRNA 之间,被称为核糖体 RNA 第二内转录间隔区,即 ITS2(internal transcribed spacer 2)。ITS 区包括 ITS1 和 ITS2,有时将 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 统称为 ITS 区,其结构如图 1 所示

18S rDNA	ITS1	5.8S rDNA	ITS2	28S rDNA
----------	------	-----------	------	----------

图 1 ITS 区的组成

2 ITS 的变异性

虽然 ITS 区最终不参加核糖体的形成,但是 ITS 区对 rRNA 的成熟也是有一定作用的,如酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)核 rDNA ITS1 和 ITS2 的部分序列缺失会对大亚基和小亚基的 rRNAs 的产生和加工有抑制作用^[1,2]。由于 ITS 区不加入成熟核糖体,所以受到的选择压力较小,进化速率较快,人们可以从不太长的序列中获得较多的信息。更为重要的一点是这一基因家族通过不等交换(unequal crossing-over)和基因转变(gene conversion)而经历快速的协同进化(concerted evolution),导致了重复单位在基因组中的一致性^[3,4]。其次,由于 18S、5.8S 和 28S rDNA 的高度保守性,据此能较方便地设计出上下游引物,而使 PCR 扩增得以可能,这便促成了可用这一序列来探讨不同动物之间的系统发生关系。在已研究的无脊椎动物的 ITS 区序列中,ITS 存在着下面几种变异。

2.1 种间变异性 如通过对北半球 12 个国家 18 个不

同地点的叶螨科的 *Tetranychus urticae* 及其相近种的 ITS2 序列的分析,证明了其种内序列的一致性,而在种间存在着明显的变异^[5];Gotoh 等^[6]在红叶螨(*Tetranychus pueraricola*)及其相近种中也得到了同样的结论。人们依据扁形动物卷棘口吸虫(*Echinostoma revolutum*)以及它的近缘种的 ITS 序列的种间变异^[7],日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)及其近缘种的 ITS2 序列的种间变异^[8]分别构建了各自的系统进化树。Gomez-Zurita 等^[9]利用鞘翅目叶甲科的 *Timarcha* 属的 34 个种的 ITS2 的序列差异,探讨了它们之间的系统发生关系。

2.2 种内变异性 如膜壳绦虫(*Hymenlepis diminuta*)、棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)的不同地理种群,其 ITS 区序列都有变化^[10,11]。蚋蝇(*Simulium damnosum* 和 *S. sanctipauli*)的 ITS1 序列因为插入或缺失一个 52 bp 的片段,而导致了其序列长度在种内发生变化^[14]。卫氏并殖吸虫(*Paragonimus westermani*)的不同个体间的 ITS1 片段中,内含两个可重复片段,一个为 82 bp,另一个为 38 bp,这样不同个体内 ITS1 所包含的可重复片段的数目不等,导致了其序列长度可以在 508 bp 到 748 bp 之间发生变化^[15]。

2.3 个体内的变异性 如疟蚊(*Anopheles quadriannulatus*)的同一个体的 ITS1 和 ITS2 的不同克隆之间存在着序列变异^[12];在蚜虫(*Myzus persicae*)的 ITS1 序列研究中也发现了个体内变异^[13]。

3 ITS 区在无脊椎动物系统发育研究中的作用

经初步统计,到 2000 年底人们已对无脊椎动物中的 6 个门,62 个属的动物的 ITS1 和 ITS2 做过研究,详见表 1。

表 1 无脊椎动物 ITS1 和 ITS2 及 5.8S rDNA 研究情况

分类阶元		ITS1	5.8S rDNA	ITS2	资料来源
门	属				
原生动物 Protozoa	<i>Perkinsus</i>	+	+	+	Robledo <i>et al.</i> , 1999
	<i>Giardia</i>	+	+	+	Edlind <i>et al.</i> , 1990
	<i>Encephalitozoon</i>		+	+	Peyretailade <i>et al.</i> , 1998
	<i>Bbbesia</i>	+		+	Zahler <i>et al.</i> , 1998
	<i>Toxoplasma</i>	+			Homan <i>et al.</i> , 1997
	<i>Sarcocystis</i>	+			Jeffries <i>et al.</i> , 1996
	<i>Plasmodium</i>	+			Rogers <i>et al.</i> , 1995
		+	+	+	Waters <i>et al.</i> , 1995
	<i>Neospora</i>	+			Holmdahl <i>et al.</i> , 1996
		+			Davison <i>et al.</i> , 1999
	<i>Entamoeba</i>	+	+	+	Katiyar <i>et al.</i> , 1995

续表 1

分类阶元		ITS1	5.8S rDNA	ITS2	资料来源	
门	属					
	<i>Eimeria</i>	+			Hnida <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Tetrahymena</i>			+	Muller <i>et al.</i> , 1989	
	<i>Euglena</i>	+	+	+	Greenwood <i>et al.</i> , 1998	
	<i>Tritrichomonas</i>	+	+	+	Felleisen, 1997	
	<i>Trichomonadid</i>	+	+	+	Felleisen, 1997	
	<i>Cryptosporidium</i>	+	+	+	Morgan <i>et al.</i> , 1999	
		+			Lindsay <i>et al.</i> , 2000	
	<i>Theileria</i>	+		+	Collins <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Trypanosoma</i>	+			Hartshorne <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Scuticociliates</i>	+	+	+	Goggin <i>et al.</i> , 2000	
腔肠动物	<i>Paracanthus</i>	+			Beauchamp <i>et al.</i> , 1996	
Coelenterata	<i>Balanophyllia</i>	+			Beauchamp <i>et al.</i> , 1996	
	<i>Acropora</i>	+	+	+	Odorico <i>et al.</i> , 1997	
				+	Oppen <i>et al.</i> , 2000	
扁形动物	<i>Schistosoma</i>	+			van Herwerden <i>et al.</i> , 1998	
Platyhelminthes				+	Despres <i>et al.</i> , 1995	
				+	Barber <i>et al.</i> , 2000	
		<i>Spirometra</i>	+			Lee <i>et al.</i> , 1997
		<i>Echinostoma</i>	+	+	+	Morgan <i>et al.</i> , 1995
		<i>Cyrodactylus</i>			+	Morgan <i>et al.</i> , 1998
			+	+	+	Cunningham 1997
					+	Morgan <i>et al.</i> , 1998
		<i>Strigea</i>	+		+	Morgan <i>et al.</i> , 1998
		<i>Didymozoon</i>	+	+	+	Anderson <i>et al.</i> , 1993
		<i>Paragonimus</i>	+			van Herwerden <i>et al.</i> , 1999
					+	Ryu <i>et al.</i> , 2000
					+	Iwagami <i>et al.</i> , 2000
		<i>Paramphistomum</i>	+			Yu <i>et al.</i> , 1997
		<i>Metagonimus</i>	+			Verneau <i>et al.</i> , 1997
			+			Bowles <i>et al.</i> , 1995
	<i>Bothriocephalus</i>	+	+		Scott <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Echinococcus</i>			+	Rinder <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Hymenolepis</i>			+	Okamoto <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Plagiorchis</i>	+		+	Tkach <i>et al.</i> , 2000	
线形动物	<i>Ancylostoma</i>	+	+	+	Gasser <i>et al.</i> , 1996	
Nemathelminthes	<i>Trichinella</i>	+	+	+	Zarlenga <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Trichuris</i>			+	Oliveros <i>et al.</i> , 2000	
	<i>Globodera</i>			+	Clapp <i>et al.</i> , 2000	
	<i>Heterodera</i>			+	Clapp <i>et al.</i> , 2000	
	<i>Meloidogyne</i>			+	Clapp <i>et al.</i> , 2000	
软体动物	<i>Isabellaria</i>	+			Schilthuizen <i>et al.</i> , 1995	
Mollusca	<i>Bulinus</i>	+	+	+	Stothard <i>et al.</i> , 1996	
	<i>Biomphalaria</i>	+		+	Caldeira <i>et al.</i> , 1998, 2000	
				+	Vidigal <i>et al.</i> , 2000	

续表 1

分类阶元		ITS1	5.8S rDNA	ITS2	资料来源
门	属				
节肢动物	<i>Oroconectes</i>	+	+	+	Harris <i>et al.</i> , 2000
Arthropoda	<i>Procambarus</i>	+	+	+	Harris <i>et al.</i> , 2000
	<i>Rhipicephalus</i>			+	Zahler <i>et al.</i> , 1997
	<i>Tetranychus</i>			+	Navajas <i>et al.</i> , 1998, 2000 Gotoh <i>et al.</i> , 1998
	<i>Ixodes</i>	+		+	Wesson <i>et al.</i> , 1993
	<i>Anopheles</i>	+		+	Paskewitz <i>et al.</i> , 1993 Lounibos <i>et al.</i> , 1998 Strickman <i>et al.</i> , 2000 Romi <i>et al.</i> , 2000 Hackett <i>et al.</i> , 2000 Van Bortel <i>et al.</i> , 2000 Beebe <i>et al.</i> , 2000 Onyabe <i>et al.</i> , 2000 Torres <i>et al.</i> , 2000 Cooper <i>et al.</i> , 2000
	<i>Culex</i>	+		+	Crabtree <i>et al.</i> , 1995
	<i>Aedes</i>	+		+	Wesson <i>et al.</i> , 1992
	<i>Nasonia</i>			+	Campbell <i>et al.</i> , 1993
	<i>Simulium</i>	+	+	+	Tang <i>et al.</i> , 1996
	<i>Trichogramma</i>	+	+	+	Sappal <i>et al.</i> , 1995
	<i>Myzus</i>	+	+	+	Fenton <i>et al.</i> , 1998
	<i>Drosophila</i>	+	+	+	Schlotterer, 1994 俞海菁等, 2000
	<i>Bactrocera</i>			+	Morrow <i>et al.</i> , 2000
	<i>Paraphlebotomus</i>			+	Depaquit <i>et al.</i> , 2000
	<i>Phlebotomus</i>			+	Muccio <i>et al.</i> , 2000
	<i>Androctonus</i>			+	Ben <i>et al.</i> , 2000
	<i>Timarcha</i>			+	Gomez-Zurita <i>et al.</i> , 2000
	<i>Bemisia</i>		+		De Barro <i>et al.</i> , 2000

注: + 表示该片段已被研究过

在所有报道的 ITS 区序列中,最短的是鹿角珊瑚 (*Acropora longicyathus*), 其 ITS1 只有 70 bp, ITS2 只有 100 bp^[16]。当然也有缺失的, 如微孢子虫 (*Encephalitozoon cuniculi*) 就没有 ITS2^[17]。最长的是克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的 ITS1 和 ITS2, 他们分别为 760 bp 和 1 300 bp^[18]。ITS 区的进化速度, 在 *Tetranychus* 属中是线粒体 CO I 基因进化速度的 2.5 倍^[5], 在 *Nasonia* 属中比 28S rDNA 快 2 倍^[19]。在亲缘关系的建立和鉴定上, 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。目前无脊椎动物的 ITS 区主要用于下列几个方面的研究。

3.1 系统树的构建 分子系统学的一个重要目的就是通过对 DNA 分子的碱基差异来构建分子系统树, 以期阐

明不同类群的物种、物种的不同种群之间的关系。如 Bowles 等^[8]测得不同种的血吸虫 (*Schistosoma*) (又称裂体吸虫) 的 ITS2 序列, 并用它们构建血吸虫的分子系统树, 他们发现所有的埃及血吸虫 (*Schistosoma haematobium*) 形成独立的一支; 孟氏血吸虫 (*S. mansoni*) 形成独立的一支; 日本血吸虫 (*S. japonicum*) 和 *S. mekongi* 形成一支后再与埃及血吸虫、孟氏血吸虫组成一大支, 并且非洲的种不与亚洲的种聚在一起。这同传统的分类学基于血吸虫卵的形状、中间宿主的性质和地理分布的特征来分类是完全吻合的, 这样他们得到的分子系统树就比较接近物种树。在软体动物双脐螺的系统进化研究中, ITS2 的应用也取得了较为满意的结果。把分布于巴西的双脐螺 (*Biomphalaria*) 的 10 个种 (*B. glabrata*,

B. tenagophila, *B. occidentalis*, *B. straminea*, *B. peregrina*, *B. kuhniiana*, *B. schrammi*, *B. amazonica*, *B. oligoza*, *B. intermedia*) 的 ITS2 序列, 分别用最大简约法(maximum parsimony)和最大似然法(maximum likelihood)构建分子系统树, 其结果同用形态学特征得到的结论相一致^[20]。Schlotterer 等^[21]用 ITS 序列构建了果蝇 *melanogaster* 亚群的分子系统发生树, 并认为 ITS 较好地反映了这些种的系统发生关系, 但俞海菁等^[22]用 ITS 区序列对果蝇 *nasuta* 亚群的研究, 却没有得到较为满意的结论。

3.2 进化方式的研究 通过对金小蜂科的 *Nasonia* 属的 ITS2 和 28S rDNA 的研究, 发现 *Nasonia* 的进化和它的寄生菌之间存在着协同进化关系^[19]。Verneau 等^[23]对绦虫多节亚目的 *Bothriocephalus* 属的 7 个种的 ITS1 进行了研究, 发现由此得到的系统发生树同它的宿主真口鱼类(Teleostean)的系统进化之间没有明显的协同进化关系。对鹿角珊瑚的 ITS 区研究发现它们具有网状进化(reticulate evolution)特征^[16]。

3.3 对传统分类方法进行遴选和鉴别 有些用传统的分类方法, 一时难以解决的分系统学问题, 用 ITS 区的序列作为分子标记对其进行研究, 有时会取得较为满意的结果。如通过对烟管螺科 5 个种的 ITS1 序列差异和二级结构分析, 指出以壳形和条纹以及分布地为分类指标的分类系统更加接近自然真实^[24]。Lounibos 等^[25]通过对南美洲的疟蚊的 ITS2 研究后发现, 它们的亲缘关系同雄性的附性腺特征间的关系相吻合。

3.4 种的分类鉴定 在分类实践中, 有一些种的分类地位争议很大, 用传统分类方法一时很难统一, 而将 ITS 区序列作为一项分类性状, 可很好地解决这一问题。Despres 等^[26]通过 ITS2 的研究发现, 在南非河马体内采到的河马血吸虫(*Schistosoma hippopotami*)是一个十分明确的新种, 而不是 *S. mansoni* 的同物异名。Bowles 等^[27]通过对棘球绦虫属的 *Echinococcus granulosus* 和其它相近种的 ITS1 和其它基因的研究, 指出 *E. granulosus* 作为一个种是不能成立的。Lindsay 等^[28]通过 ITS1 和 18S rDNA 序列以及形态性状的分析, 发现了隐孢子虫的一个新种(*Cryptosporidium andersoni*)。

3.5 作为一些种和亚种的鉴别标记 1998 年 Zahler 等^[29]研究孢子虫 *Balesia canis canis*, *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。同样通过对弓形虫 ITS1 的仔细研究后发现, ITS1 可用来鉴别弓形虫(*Toxoplasma gondii*)和其相近种

Neospora caninum^[30]。ITS 作为物种的鉴别标记, 在较高等的无脊椎动物中, 还未见到很好的应用。

综上所述, 在无脊椎动物的分子系统学研究中, ITS 区序列已得到了广泛的应用, 为解决一些长期存在的分类学问题提供了一个新的重要标记。但在实际运用中, 还存在一些需要进一步深入探讨的问题。如在不同动物中, ITS1 和 ITS2 的序列, 在种间、种内或个体内的变异是很不相同的, 所以在对一个类群的动物的 ITS 性质未知的情况下, 用它来作为解决某一问题的分子标记是要冒一定风险的。即使是相近的种群有时也会出现不同的结果。作者在绒螯蟹研究中也遇到过类似情况(待发表)。其次, ITS 的进化方式的研究目前还不很深入, 它们的不同重复序列究竟是如何保持一致, 为什么相近的物种间这种一致程度会有很大的不同? 而同样是 ITS 序列在植物中却几乎很少有个体内变异。相信这些问题的解决, 会使人们对 ITS 有一个更加深入的认识, 它的意义可以肯定地说, 决不会仅仅局限在分子系统学的范围。第三, 如果所研究的 ITS 区存在个体内变异, 那么必须要对它进行克隆测序, 如果研究的样本再多些, 这将是一个不小的费用, 这也是研究中不得不考虑的。最后就是 ITS 适用范围, 究竟有没有一个规律可循? 根据作者自己的工作, 可以认为: 如果 ITS 不存在个体内变异, 那么它可用于种群间和种间, 甚至属间的分子系统学研究; 如果它有个体内变异, 那么在不同的研究类群中, 可能会有不同的结果, 在研究时要区别对待, 最好能结合形态学证据或其它分子生物学证据等综合考虑。

随着分子生物学的迅猛发展, 人们必将对 ITS 本身和它在无脊椎动物分子系统学研究中的地位有一个更加广泛的和全面的认识。

参 考 文 献

- [1] Muster W, Boon K, van der Sande C A F M *et al.* Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *EMBO*, 1990, 9: 3 989 ~ 3 996.
- [2] van der Sande C A F M, Kwa M, van Nues R W *et al.* Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *J Mol Bio*, 1996, 223: 899 ~ 910.
- [3] Dover G A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*, 1982, 299: 111 ~ 117.
- [4] Hillis M D M, Davis S K. Ribosomal DNA: Intraspecific polymorphism, concerted evolution and phylogeny reconstruction.

- Syst Zool*, 1988, 37: 63 ~ 66.
- [5] Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J *et al.* Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial CO I polymorphism. *Heredity*, 1998, 80(Pt 6): 742 ~ 752.
- [6] Gotoh T, Gutienze J, Navajas M. Molecular comparison of the sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehora *et* Gotoh and *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Entomological Science*, 1998, 1: 55 ~ 57.
- [7] Morgan J A T, Blair D. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. *Parasitology*, 1995, 111(Pt 5): 609 ~ 615.
- [8] Bowles J, Blair D, McManus D P. A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Mol Phylogenet Evol*, 1995a, 4(2): 103 ~ 109.
- [9] Gomez-Zurita J, Juan C, Petitpierre E. Sequence, secondary structure and phylogenetic analyses of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in the *Timarcha* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Mol Biol*, 2000, 9(6): 591 ~ 604.
- [10] Okamoto M, Agatsuma T, Kurosawa T *et al.* Phylogenetic relationships of three hymenolepidid species inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Parasitology*, 1997, 115(Pt 6): 661 ~ 666.
- [11] van Herwerden L, Blair D, Agatsuma T. Intra- and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex. *Parasitology*, 1998, 116(Pt 4): 311 ~ 317.
- [12] Paskewitz S M, Wesson D M, Collins F H. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Insect Mol Biol*, 1993, 2(4): 247 ~ 257.
- [13] Fenton B, Malloch G, Germa F. A study of variation in rDNA ITS regions shows that two haplotypes coexist within a single aphid genome. *Genome*, 1998, 41(3): 337 ~ 344.
- [14] Tang J, Toe L, Back C *et al.* Intra-specific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) complex. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(1): 244 ~ 252.
- [15] van Herwerden L, Blair D, Agatsuma T. Intra- and inter-individual variation in ITS1 of *Paragonimus westermani* (Trematoda: Digenea) and related species: implications for phylogenetic studies. *Mol Phylogenet Evol*, 1999, 12(1): 67 ~ 73.
- [16] Odorico 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. *Mol Biol Evol*, 1997, 14(5): 465 ~ 473.
- [17] Peyretailade E, Biderre C, Peyret P *et al.* Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Ucleic Acids Res*, 1998, 26(15): 3 513 ~ 3 520
- [18] Harris D J, Crandall K A. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(2): 284 ~ 291.
- [19] Campbell B C, Steffen-Campbell J D, Werren H J. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect Mol Biol*, 1993, 2(4): 225 ~ 237.
- [20] 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. *Parasitology*, 2000, 121(Pt 6): 611 ~ 620.
- [21] Schlotterer C, Hauser M T, Haeseler A *et al.* Comparative evolutionary analysis of rDNA its regions in *Drosophila*. *Mol Biol Evol*, 1994, 11(3): 513 ~ 522.
- [22] 俞海菁, 张亚平, 林飞棧等. 探讨 rDNA ITS 区作为果蝇 *Drosophila nasuta* 分子系统发育研究的价值. 遗传学报, 2000, 27(1): 18 ~ 25.
- [23] Verneau O, Renaud F, Catzefflis F. Evolutionary relationships of sibling tapeworm species (Cestoda) parasitizing teleost fishes. *Mol Biol Evol*, 1997, 14(6): 630 ~ 636.
- [24] Schilthuizen M, Gittenberger E, Gulyaev A P. Phylogenetic relationships inferred from the sequence and secondary structure of ITS1 rRNA in *Albinaria* and putative *Isabellaria* species (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae). *Mol Phylogenet Evol*, 1995, 4(4): 457 ~ 462.
- [25] Lounibos L P, Wilkerson R C, Conn J E *et al.* Morphological, molecular, and chromosomal discrimination of cryptic *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae) from South America. *J Med Entomol*, 1998, 35(5): 830 ~ 838.
- [26] Despres L, Kruger F J, Imbert-Establet D *et al.* ITS2 ribosomal RNA indicates *Schistosoma hippopotami* is a distinct species. *Int J Parasitol*, 1995, 25(12): 1 509 ~ 1 514.
- [27] Bowles J, Blair D, McManus D P. A molecular phylogeny of

- the genus *Echinococcus*. *Parasitology*, 1995b, **110** (Pt 3): 317 ~ 328.
- [28] Lindsay D S, Upton S J, Owens D S *et al*. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol*, 2000, **47**(1): 91 ~ 95.
- [29] Zahler M, Schein E, Rinder H *et al*. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol Res*, 1998, **84** (7): 544 ~ 548.
- [30] Homan W L, Limper L, Verlaan M *et al*. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. *Parasitol Res*, 1997, **83**(3): 285 ~ 289.