

黄、渤海地区青蛤(*Cyclina sinensis*)种群的 ITS 序列遗传变异与遗传结构分析*

袁媛¹ 高玮玮¹ 吴琪² 潘宝平¹

(1. 天津师范大学化学与生命科学学院 天津 300387; 2. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 利用核糖体 RNA 的转录间隔区(ITS1)序列分析方法,以日本青蛤种群为外群,初步讨论了黄、渤海地区 6 个野生青蛤种群遗传变异和遗传结构。采用 AMOVA 方法对获得的 24 种单倍型序列进行了遗传变异水平和等级剖分。结果表明,ITS 序列核酸多态性参数 P_i 为 0.01973, E_{ta} 值为 0.04624。青蛤各种群内的遗传变异水平较高,约占总变异的 37.8%。但遗传变异的主要来源于不同组团(日本海与黄、渤海),其变异达到总量的 61.36%。黄、渤海地区青蛤种群间的遗传距离在 0.00311—0.14914 之间, P 检验没有出现显著差别,说明该地区青蛤种群没有出现遗传分化,并存在 7 种共享单倍型序列,种群间有一定的基因交流。日本种群与黄、渤海地区各种群的遗传距离在 0.44803—0.54122 之间,经 P 检验均出现了显著性差异,形成了明显的地理隔离及遗传分化格局。

关键词 青蛤, ITS 序列, 遗传变异, 遗传结构, AMOVA

中图分类号 Q789

青蛤(*Cyclina sinensis* Gmelin, 1791)是我国重要的经济贝类(刘相全等, 2003),也是科技部“863 计划”重点研究开发的绿色海产养殖品系之一。青蛤具有广温广盐分布、养殖产出率高和离水存活时间长等集产业化和商品化的共同优点(Liu *et al.*, 2002),目前在黄、渤海地区已作为重要的捕捞和养殖对象。近年来,随着国内青蛤养殖热潮的兴起,亲贝的盲目选择和苗种的无序交流时常出现,上述做法不仅无法达到预期的高产效果,还会导致青蛤地域性种质结构混杂,对青蛤养殖业的健康发展极为不利。因此,研究我国青蛤种群的遗传变异和种质资源分布特征,对青蛤的合理引种育苗等工作具有重要的实践指导意义。此外,鉴于青蛤属中国沿海的广布贝类(庄启谦, 2001),其分布区从辽宁到海南的各个沿海省份均有记录,在日本、朝鲜、菲律宾等也有记载。从现有的资料检索看来,目前有关青蛤的研究主要集中在生长与生境、繁殖与育苗等经典贝类学研究范畴(于业绍等, 1995; 周琳等, 2000; 莫永凯, 2007),对于青蛤

地理种群遗传多样性方面的研究报道较少(王慧等, 2005; 潘宝平等, 2005),有关青蛤种群遗传结构方面未见正式报道。因此,探索研究青蛤种群间的遗传结构不仅能够解释其种质分布格局,并且对于揭示我国海域双壳类动物的分布规律、种群变动方式和生境演替原因等问题具有一定的理论参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

样品采于 2004 年 5 月,青蛤 7 个野生种群样品分别采自辽宁庄河(ZH)、河北北戴河(BDH)、天津汉沽(HG)、山东莱州(LZ)、山东青岛(QD)、江苏启东(QID)及日本仙台(JP, Miyagi)。以上样品经形态分类鉴定后,每个种群收集 30—60 个成熟个体,将动物活体解剖后取闭壳肌组织用 70%酒精固定,带回实验室置于-20℃冰柜中保存。具体采集地记录见表 1。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用 Grewe 等(1993)的

* 天津市科委应用基础研究面上项目资助, 06YFJMJC11800 号。袁媛, 硕士研究生, E-mail: oilyuan@yahoo.com.cn

通讯作者: 潘宝平, 博士, 教授, E-mail: panbaoping@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-08-12, 收修改稿日期: 2007-11-29

CTAB方法, 每个个体取150mg组织置入600 μ l buffer 匀浆液(10mmol/L EDTA、50mmol/L Tris-HCl pH 8.0、NaCl 0.7mol/L、CTAB 1%、2-巯基乙醇 0.1% *V/V*)中研碎, 加入100 μ g/ml的蛋白酶K, 于60 $^{\circ}$ C水浴中消化2.5h。先后用等体积的酚、酚 氯仿 异戊醇(25:24:1)提取2次。加0.2体积的10mol/L 乙酸钠和2倍体积预冷的无水乙醇沉淀, 经70%乙醇洗涤两遍后干燥, 50 μ l ddH₂O 溶解, 置于-70 $^{\circ}$ C低温柜保存。DNA质量、浓度用紫外分光光度仪(Beckman DU-600, USA)和琼脂糖电泳检测。

表1 青蛤7个野生种群样品的采集地点

Tab.1 The location of sampling for seven wild *C. sinensis* populations

种群	采集地	标本数	经度($^{\circ}$ E)	纬度($^{\circ}$ N)	底质
ZH	辽宁庄河	30	122.06	39.78	泥沙
BDH	河北北戴河	45	119.57	39.28	沙岸
HG	天津汉沽	35	117.47	39.13	泥沙
LZ	山东莱州	32	119.90	37.10	泥沙
QD	山东青岛	38	120.33	36.07	泥沙
QID	江苏启东	40	121.67	31.80	泥沙
JP	日本仙台	55	141.00	38.23	泥沙

1.2.2 目的片段 PCR 扩增 每种群取8个样品DNA进行PCR扩增反应, ITS1引物采用Gaffney等(1998)序列, 即ITS1-a 5'-GGTTCTGTAGGTGAACCTGC-3', ITA1-b 5'-CTGCGTTCATCGACCC-3'。反应体系为25 μ l, 含10 \times buffer 2.5 μ l, dNTP 100 μ mol/L, MgCl₂ 2mmol/L, Taq聚合酶1U, 引物25ng, 模板DNA 20ng, 加ddH₂O至25 μ l。扩增反应在My Cycler Thermal Cycle 梯度PCR仪(BIO-RAD公司, USA)上进行, 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性3min, 94 $^{\circ}$ C 变性30s, 51 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸1min, 共35个循环, 最终72 $^{\circ}$ C 延伸7min。

1.2.3 纯化与测序 使用UNI-Q-10(上海Sangon)柱式DNA纯化试剂盒纯化PCR产物。测序反应在PRISM 3730(Applied Biosystems)测序仪上进行, 全部采用双向测序。

1.2.4 数据分析 序列拼接采用BioEdit7.0 (Hall, 2005), 多重比对采用ClustalX1.83 (Thompson *et al.*, 1997), 基本参数设定为gap open = 10; gap extension = 0.05。核酸序列变异及单倍型分析使用DNAsp4.10软件(Rozas *et al.*, 2005), 各种单倍型序列经Sequin在GenBank上注册。利用PAUP4.10 beta软件包(Swofford, 1998)建立单倍型之间的系统树, 采用

TreeView软件显示拓扑结构图。利用Arlequin3.1 (Excoffier 2006)软件中分子方差法AMOVA分析种群内、种群间和不同组别的遗传多样性及分化程度。

2 结果与分析

2.1 序列多态性与单倍型分析

青蛤56个个体的ITS序列长度在568bp(JP1)至595bp(QD19、LZ2、LZ3、LZ9、ZH1、ZH3、ZH8)之间, 序列经ClustalX 1.83多重比对后, 用DNAsp4.01软件分析核酸的基本参数如下: (Nucleotide diversity) $P_i = 0.01973$, Theta (per site) $E_{\theta} = 0.04624$; 不计插入/缺失部分, 共有51个多态性位点, 包括第7、14、26、28、36、47、50、57、59、99、109、116、118、119、126、128、129、133、135、152、161、162、173、185、190、193、194、207、210、230、233、240、242、26、266、268、274、306、309、330、359、360、363、366、378、410、415、419、577、600和622。56个个体共检出24种单倍型(Haplotype)序列, 全部序列在GenBank上注册。其中, 种群共享单倍型共7个(29%), 单倍型23在黄、渤海地区6个种群中均有共享, 单倍型8为庄河、北戴河、汉沽和莱州四个种群共享, 单倍型3、5、11、15、20分别在两个种群中共享, 其余均为某个种群所特有。作为外群的日本仙台种群与黄、渤海地区各种群均没有共享的单倍型序列, 其平均碱基长度相对较短, 最大差别达到27bp。具有各单倍型序列长度、种群分布及注册号见表2。

将24种单倍型数据输入PAUP4.10软件包, 利用最大似然法ML(Maximum-likelihood)构建24种单倍型序列的系统关系, 采用启发式搜索 heuristic search 系统树。用Bootstrap 1000个循环检验系统树的置信度, 并在分支节点上显示大于50%置信度的数值。根据最大似然显示的网络关系, 来源于日本的单倍型1、2和24与其它类型关系较远, 其它类型的聚类呈现混杂的分布格局, 见图1。

2.2 遗传变异等级剖分

根据56个青蛤样品所在的地理种群, 参考等级差标定和单倍型序列的平均位点分布差别, 将全部种群划分为黄、渤海组(ZH、BDH、HG、LZ、QD、QID)和日本海组(JP)两大组团。将全部数据输入Arlequin软件, 运用AMOVA分子方差分析法估算2个组团间、7个种群间和种群内部的遗传变异成分、种群结构和变异来源, 具体结果见表3。

表 2 青蛤 24 个单倍型序列长度、种群分布及其在 GenBank 上的注册号
Tab.2 Distribution, nucleotide length and accession numbers of 24 haplotype of *C. sinensis*

单倍型	序列长度 (bp)	种群							注册号
		ZH	BDH	HG	LZ	QD	QID	JP	
Hap1	568	—	—	—	—	—	—	4	DQ900881
Hap2	565	—	—	—	—	—	—	2	EU979388
Hap3	591	1	—	—	—	3	—	—	DQ900891
Hap4	588	1	—	—	—	—	—	—	EU979408
Hap5	582	—	1	1	—	—	—	—	EU979390
Hap6	581	—	1	—	—	—	—	—	EU979392
Hap7	580	—	—	—	—	1	—	—	EU979393
Hap8	581	2	1	2	1	—	—	—	DQ900889
Hap9	590	—	—	—	—	—	2	—	DQ900885
Hap10	583	1	—	—	—	—	—	—	EU979407
Hap11	577	—	—	—	—	1	1	—	DQ900884
Hap12	589	—	—	1	—	—	—	—	EU979402
Hap13	594	—	—	—	—	—	2	—	EU979406
Hap14	591	—	—	1	—	—	—	—	EU979394
Hap15	586	—	—	1	1	—	—	—	EU979395
Hap16	581	—	—	—	—	—	1	—	EU979396
Hap17	595	—	—	—	—	1	—	—	EU979397
Hap18	591	—	—	—	—	1	—	—	DQ900886
Hap19	595	1	—	—	—	—	—	—	DQ900887
Hap20	589	—	1	—	3	—	—	—	DQ900888
Hap21	584	—	—	—	1	—	—	—	EU979398
Hap22	589	—	—	—	—	—	1	—	EU979399
Hap23	595	2	4	2	2	1	1	—	DQ900883
Hap24	566	—	—	—	—	—	—	2	DQ900892
合计		8	8	8	8	8	8	8	56

分子方差结果显示, 青蛤的种群内和不同组间均有很高的遗传变异, 但对总变异的贡献主要来源于组间(日本海与黄、渤海的组间), 占总变异的 61.36%, 并且两组异域种群间发生了显著的遗传分化($F_{ST} = 0.62200$)。但是, 在同组内(黄、渤海地区)种群间的遗传变异较小($F_{SC} = 0.02170$), 并且仅占总变异的 0.83%, 明显小于种群内部个体间的遗传变异, 说明黄、渤海地区青蛤种群间的相互关系较近。

为进一步分析种群间的相互遗传差别, 使用 Arlequin 软件中的 Kimura 2-Parameters 方法构建 7 个种群间的相对遗传变异距离矩阵, 同时采用 Hardy-Weinberg 平衡对种群间的 F_{ST} 差异显著性 P 检验, 具体结果如表 4 所示。

从表 4 可以看出, 日本种群(JP)与黄、渤海地区的其它种群间的遗传距离在 0.44803—0.54122 之间,

F_{ST} 值的 P 检验均出现显著差异($P < 0.05$), 说明两组青蛤种群团之间的分化程度较高。其中, 遗传距离最大值源于日本种群(JP)与江苏启东(QID)之间, 其 P 值接近极显著检验水平(0.00102)。位于渤海地区的北戴河(BDH)、汉沽(HG)和莱州(LZ)种群与黄海地区的庄河(ZH)、青岛(QD)和启东(QID)种群间的遗传距离在 0.00311 到 0.14914 之间, 并且 P 值检验均没有出现显著差别。

3 讨论

3.1 ITS 序列与分析方法

核糖体 RNA 转录间隔区序列(ITS)位于核基因组中的 18S rRNA 与 5.8S rRNA 基因之间, 属非编码区域, 在没有选择压力情况下进化速度较快, 鉴于其较大的变异性而常被作为种群研究的目的片段(张国范,

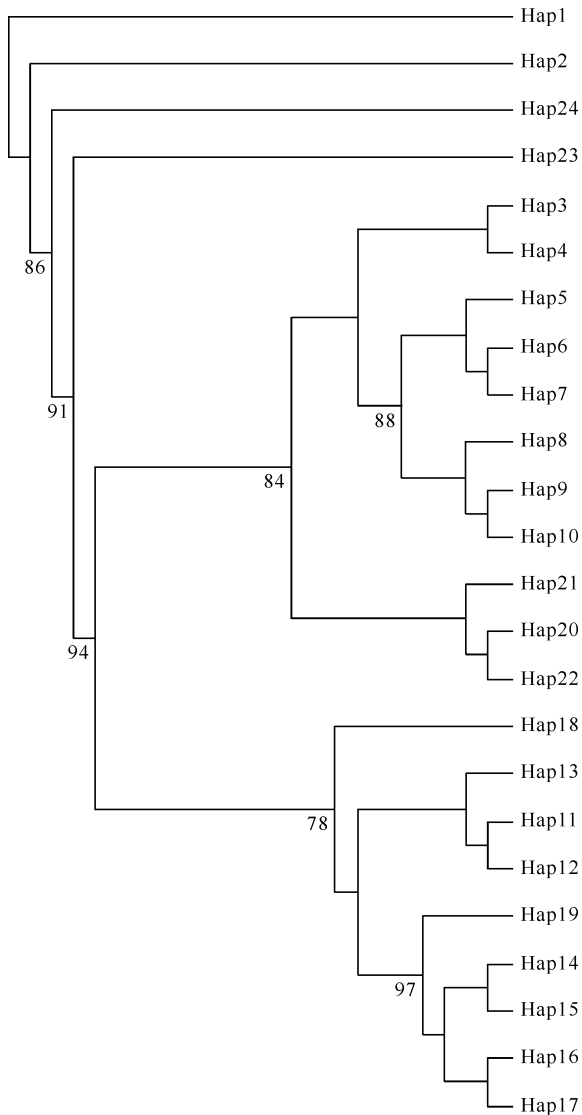


图1 利用最大拟然法建立的 24 种青蛤单倍型序列系统树
Fig.1 The ML (Maximum likelihood) phylogenetic tree based on the sequences of 24 haplotypes of *C. sinensis*
节点上显示 Bootstrap 1000 个循环的置信度(只显示>50%以上)

表3 青蛤种群遗传变异等级的分子方差分析(AMOVA)
Tab.3 AMOVA analysis of genetic variation in populations of *C. sinensis*

遗传变异来源	方差和	遗传变异元素	占总变异的百分比(%)
组间	241.086	16.74465	61.36133
组内种群间	60.535	0.22885	0.83861
种群内	495.125	10.31510	37.80006
合计	796.746	27.28860	100

注:组间和种群间的近交系数 $F_{ST} = 0.62200$; 组内种群间的近交系数 $F_{SC} = 0.02170$; 种群在组间的近交系数 $F_{CT} = 0.61361$

1999; 唐伯平等, 2002; Coleman, 2002)。此外, 由于 18S 和 5.8S rRNA 基因具有高度保守性, 在 PCR 聚合酶链式反应中便于设计上下游引物, 使它更加得到分子系统学研究者的青睐。本实验结果表明, 该序列不仅具有遗传变异信息量大、扩增的片段变异位点丰富的特征, 而且具有有效信息位点多、保守区间相对稳定的特点。

Harmrick 等(1989)指出, 群体遗传结构是指遗传变异在物种或群体中的一种非随机分布, 它是遗传变异在群体内、群体间的分布样式以及在时间上的变化。在早期的群体遗传结构研究时, Wright(1951, 1965)提出的 F-statistics 是广泛被采用的分析模型(Weir, 1990; Roussert, 1996)。但是, 该方法在应用中常有一些争议(Weir *et al*, 1984; Long, 1986), 主要原因是该模型是基于共显性双等位基因位点推导出来的, 并且等级结构较少。因此, 一些学者在该模型的基础上又建立或完善了各种分析模型(Cockerham, 1969, 1973; Nei, 1977; Weir *et al*, 1984; Long, 1986; Hartl *et al*, 1997)。近年来, 随着使用 DNA 分子数据在群体遗传研究中日益增多, 许多学者认为 F-statistics 方法运用在各种 DNA 标记中需要一定的前提或假设(张富

表4 青蛤 7 个种群间的相对遗传距离和 F_{ST} 显著性检验
Tab.4 Pairwise distance matrix of ITS1 Sequences among 7 populations

种群	HG	LZ	BDH	QID	QD	ZH	JP
HG	—	0.15315	0.66667	0.05405	0.11712	0.43243	0.00172*
LZ	0.00311	—	0.41441	0.12613	0.10811	0.41441	0.00254*
BDH	0.03448	0.01180	—	0.06306	0.10811	0.73874	0.00214*
QID	0.13015	0.14493	0.14914	—	0.09009	0.15315	0.00102*
QD	0.04597	0.03423	0.06790	0.14668	—	0.58559	0.00387*
ZH	0.08185	0.00374	0.02403	0.02937	0.00363	—	0.00417*
JP	0.50504	0.54046	0.53371	0.54122	0.44803	0.46267	—

注: 对角线以下为相对遗传距离, 对角线以上为 F_{ST} 显著性检验(显著水平 $P = 0.05$)。* 表示差异显著($P < 0.05$)

民等, 2002)。Excoffer 等(1992)提出了分子方差分析方法(Analysis of Molecular Variation, AMOVA), 该方法在考虑单倍型(含等位基因)之间的差异程度基础上, 通过估计单倍型(含等位基因)或基因型之间的进化距离, 修订了 F-statistics 模型来有效度量亚群体的分化程度, 细化了遗传变异的等级剖分。该方法能够适合于所有类型的序列变异(共显性、显性、单倍型等数据), 并在人类遗传结构的研究中取得了显著成果。目前, AMOVA 在水生动物系统学研究中的应用已有一些报道(杨金权等, 2008; 赫崇波等, 2008)。本研究中的数据处理上采用了 AMOVA 进行等级剖分, 以解释不同地理种群间的遗传差别, 提高了分析结果的说服力和置信度。

3.2 种群遗传多样性与遗传结构

本研究所涉及的黄、渤海地区 6 个青蛤种群 48 个个体间的单倍型序列显示, 黄、渤海地区青蛤的 ITS 单倍型序列种类丰富, 总数达到 21 种, 占全部序列的 43.7%。除北戴河(BDH)种群仅 1 种独特的单倍型外, 其它种群均有 2—3 种特有的单倍型序列。根据 AMOVA 对遗传变异的剖分看来, 全部遗传变异的 37.8%来自种群内部, 远远大于该组各种群间的遗传变异, 说明黄、渤海地区青蛤各种群内个体间的遗传多样性较高。另外, 由于该地区种群间还有 7 种共享的单倍型序列, 其中的单倍型 23 在 6 个种群中均有共享, 暗示该地区的青蛤种群间存在一定的基因交流现象。

群体遗传学认为, *F_{ST}* 值可以表示群体间的分化程度, 一般在 0—0.05 之间表示分化较弱, 0.05—0.15 之间表示遗传分化中等, 如达到 0.15—0.25 之间表示群体遗传分化较大; 当超过 0.25 时表示遗传分化极大。本实验结果显示, 位于黄、渤海组内种群间单倍型的 *F_{ST}* 值仅为 0.02170, 并且种群间的遗传变异仅占总变异的 0.83%, 没有出现明显的遗传分化现象。总体看来, 该地区青蛤种群间的遗传距离随者地理距离的增加而逐步增大, 该结果与王慧等(2005)利用 RAPD 方法对分布于我国辽宁、天津、江苏、福建 5 个青蛤地理群体的遗传变异分析的研究结论基本接近。

作为研究对照组(外群)的日本种群(JP)遗传结构问题比较复杂, 其 ITS 序列与黄、渤海区域的 6 个种群遗传距离在 0.44803—0.54122 之间, *F_{ST}* 值的 *P* 检验均出现显著性差异($P < 0.05$), 两组动物之间也没有共享的单倍型序列存在。从 ITS 序列上分析, 日本种群的片段明显短于黄、渤海地区的片段长度, 最大差

别达到 27bp, 经多重比对发现日本青蛤单倍型在第 70—90、200—210 碱基区间有明显的缺失现象, 说明两组青蛤之间的分化程度较高。但是, 鉴于日本种群的纬度(38.23°N)与黄、渤海地区接近, 不同域青蛤种群间的隔离机制问题尚有待于今后进一步研究。

参 考 文 献

- 于业绍, 王 慧, 陆 平等, 1995. 青蛤生境及生长. 水产学报, 19(3): 276—279
- 王 慧, 么宗利, 2005. 我国五个青蛤地理群体遗传变异的 RAPD 分析. 海洋渔业, (2): 102—108
- 庄启谦, 2001. 中国动物志 软体动物门 双壳纲 帘蛤科. 北京: 科学出版社, 236—241
- 刘相全, 方建光, 包振民等, 2003. 中国沿海帘蛤科贝类主要经济种苗与养殖技术研究进展. 动物学杂志, 38(4): 114—119
- 杨金权, 胡雪莲, 唐文乔等, 2008. 长江邻近水域刀鲚的线粒体控制区序列变异与遗传多样性. 动物学杂志, 43(1): 8—15
- 张国范, 李 霞, 1999. 病害与二十一世纪中国的贝类养殖业: 面向二十一世纪科技进步与社会经济发展. 北京: 中国科技出版社, 506
- 张富民, 葛 颂, 2002. 群体遗传学研究中的数据处理方法 I. RAPD 数据的 AMOVA 分析. 生物多样性, 10(4): 438—444
- 周 琳, 于业绍, 顾润润, 2000. 青蛤人工育苗及增养殖的研究. 中国水产科学, 7(1): 74—77
- 莫永凯, 2007. 青蛤大规模种苗培育技术. 水产养殖, 28(4): 26
- 唐伯平, 周开亚, 宋大祥, 2002. 核 rDNA ITS 区序列在无脊椎动物分子系统学研究中的应用. 动物学杂志, 37(4): 67—73
- 赫崇波, 丛林林, 葛陇利等, 2008. 文蛤养殖群体和野生群体遗传多样性的 AFLP 分析. 中国水产科学, 15(2): 215—220
- 潘宝平, 宋林生, 卜文俊等, 2005. 青蛤两个异域种群的遗传多样性与分化研究. 水生生物学报, 29(4): 372—378
- Cockerham C C, 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution*, 23: 72—84
- Cockerham C C, 1973. Analysis of gene frequencies. *Genetics*, 84: 679—700
- Coleman A W, Vacquier V D, 2002. Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for Abalone (*Haliotis*). *Mol Evol*, 54(2): 246—257
- Excoffer L, Smouse P E, Quattro J M, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479—491
- Gaffney P M, Orbach E A, Yu Z, 1998. Using the D code system to identify DNA sequence variation for studies of population structure in marine organism. *Mutation Analysis*, 2: 329
- Grewe P M, Krueger C C, Aquadro C F *et al*, 1993. Mitochondrial

- drial DNA variation among lake trout (*Salvelinus namaycush*) strains stocked into Lake Ontario. *Can J Fish Aqua Sci*, 5: 2397—2403
- Harmrick J L, Loveless M D, 1989. Associations between the breeding system and the genetic structure of troical tree population. In: Bock J, Linhart Y B ed. *Evolutionary Ecology of Plants*, Westview Press, Boulder, 129—146
- Hartl D L, Clark A G, 1997. *Principal of Population Genetics*. Sunderland, Sinauer Associates, 186—245
- Liu W S, Ma Y H, Hu S Y *et al*, 2002. Rearing Venus clam seed, *Cyclina sinensis* (Gmelin), on a commercial scale. *Aquaculture*, 211: 109—114
- Long J C, 1986. The allelic correlation structure of Gainj and Kalam-speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-statistics. *Genetics*, 112: 629—647
- Nei M, 1977. F-statistics and the analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human. Genetics*, 41: 225—133
- Rousset R, 1996. Equilibrium of measure of population subdivision for stepwise mutation process. *Genetic*, 142: 1357—1362
- Weir B S, 1990. *Genetics Data Analysis*. Sunderland, Sinauer, 140—197
- Weir B S, Cockerham C C, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358—1370
- Wright S, 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395—420
- Wright S, 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323—334

GENETIC VARIATION AND STRUCTURE OF *CYCLINA SINENSIS* POPULATIONS IN THE YELLOW AND BOHAI SEA OF CHINA

YUAN Yuan¹, GAO Wei-Wei¹, WU Qi², PAN Bao-Ping¹

(1. *College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin, 300387;*

2. *Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract This paper discusses the genetic variation/structure of 6 populations of natural *Cyclina sinensis* with a Japan outgroup. The populations distribute in the Yellow Sea and Bohai Sea of China. The ribosome DNA gene internal transcribed spacer (ITS) of them was studied. 24 haplotypes were identified from 56 individuals among populations. The nucleotide diversity (P_i) and E_{ta} (per site) were 0.0312 and 0.0294 respectively. AMOVA analysis showed that the genetic variation was notably high within populations, reaching 37.8%. However, 61.36% of the variations were in level of group between Japan Sea and Chinese seas. The genetic distances of among-population were 0.00311 and 0.14914 for the Yellow Sea and Bohai Sea respectively, indicating no genetic differentiations has occurred among the populations, and had 7 haplotypes shared. On the other hand, the genetic distance of Japan population to other Chinese ones were from 0.44803 to 0.54122 with significant $F_{ST} P$ values ($P < 0.05$). Therefore, the geographical isolation and phylogenetic differentiation were significant between Japanese and Chinese groups.

Key words *Cyclina sinensis*, ITS sequences, Genetic variation, Genetic structure, AMOVA