

北部湾 6 个拟穴青蟹群体遗传多样性的 ISSR 分析*

宋忠魁^{1,2,*} 孙奉玉^{1,3} 李梦芸^{1,4} 赵鹏¹ 聂振平¹ 苏琼¹

(¹广西海洋研究所广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000; ²钦州学院化学与生物系, 广西钦州 535000; ³南华大学药学与生命科学院, 湖南衡阳 421001; ⁴湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128)

摘要 应用 ISSR 标记技术分析来自北部湾的拟穴青蟹 6 个地理群体(清化、党江、钦州湾、流沙湾、珍珠湾、闸口)的遗传变异和遗传结构, 8 条 ISSR 引物扩增 111 个个体, 分析其中的 66 个位点, 56 个位点表现出多态性, 表明拟穴青蟹在物种水平上的多态位点百分率是 84.85%。拟穴青蟹 6 个群体的多态位点百分率为 51.52% ~ 63.64%, 平均为 57.58%。群体的遗传多样性按自高至低顺序排列为清化群体 > 党江群体 > 钦州湾群体 > 流沙湾群体 > 珍珠湾群体 > 闸口群体。拟穴青蟹在种水平或群体水平上的多态位点百分率和 Shannon 信息指数表明, 拟穴青蟹遗传多样性在甲壳类动物中处于较高层次, 但比甲壳类以外的几类经济海产动物遗传多样性低。总的遗传分化系数 G_{ST} 值为 0.1841, 表明, 总遗传变异的绝大部分存在于群体内, 群体间的遗传分化程度较大。但是, 绝大部分两两群体间的遗传分化系数数值在 0.0689 ~ 0.1276, 为中等程度的遗传分化。AMOVA 分析表明, 群体内遗传变异占 87.97%, 群体间遗传变异占 12.03%, 群体间遗传分化程度中等但分化显著。Mantel test 结果表明, 拟穴青蟹 6 个群体间的遗传距离与地理距离之间的相关性不显著。聚类分析表明, 来自广西沿海的 4 个群体聚成一支。

关键词 北部湾; 拟穴青蟹; ISSR; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号 Q953+.5; S917.4 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2012)10-2585-06

Genetic diversity of six mud crab (*Scylla paramamosain*) populations in Beibu Gulf of South China based on ISSR analysis. SONG Zhong-kui^{1,2,*}, SUN Feng-yu^{1,3}, LI Mengyun^{1,4}, ZHAO Peng¹, NIE Zhen-ping¹, SU Qiong¹ (¹Guangxi Key Laboratory for Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000, Guangxi, China; ²Department of Chemistry and Biology, Qinzhou University, Qinzhou 535000, Guangxi, China; ³Pharmacy and Life Science, South China University, Hengyang 421001, Hunan, China; ⁴College of Biology and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(10): 2585-2590.

Abstract: ISSR-PCR technique was adopted to investigate the genetic variation and genetic structure of six *Scylla paramamosain* geographic populations (QH, DJ, QZW, LSW, ZZW, and ZK) in the Beibu Gulf of South China. A total of 111 individuals were amplified by 8 ISSR primers, and 66 valid loci were analyzed, of which, 56 loci were polymorphic. The percentage of polymorphic loci (PPL) was 84.85% at species level. The PPL of the six populations ranged from 51.52% to 63.64%, with an average of 57.58%. The genetic diversity of the six populations decreased in the order of QH > DJ > QZW > LSW > ZZW > ZK. The PPL and the Shannon's information index at species or population level showed that the genetic diversity of *S. paramamosain* arrived at a higher level within the crustacean, but was still lower than that of the other several marine animals of economic importance. The total coefficient of genetic differentiation ($G_{ST} = 0.1841$) showed that most of the total genetic variation variance (81.59%) indwelled within

* 广西自然科学基金项目(桂科自 0991275)、广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 11107012-11 和桂科能 09322003)、广西教育厅科研课题(200809MS095)和广西海洋生物技术重点实验室主任基金项目(GKLMBT-D0801)资助。

* * 通讯作者 E-mail: songsir2003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-03-30 接受日期: 2012-07-04

populations, suggesting a higher level of genetic differentiation among the populations. However, the coefficient of genetic differentiation ($G_{ST}=0.0689-0.1276$) of pairwise populations suggested the medium-degree genetic differentiation among the populations. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the genetic variation variance within and among the populations accounted for 87.03% and 12.97%, respectively, suggesting that the genetic differentiation among the populations was at a medium level, but the differentiation was significant ($P < 0.001$). The Mantel test suggested that there was no significant correlation between the genetic distance and geographic distance of the six *S. paramamosain* populations. Clustering analysis showed that the four populations from Guangxi coastal areas could be clustered into a clade.

Key words: Beibu Gulf; *Scylla paramamosain*; ISSR (inter simple sequence repeats); genetic diversity; genetic differentiation.

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)隶属于甲壳纲、十足目、短尾亚目、梭子蟹科、青蟹属(林琪等, 2007)。拟穴青蟹的经济价值较高,所以渔业捕捞和人工养殖在当下盛行,由此而导致了拟穴青蟹野生苗种资源量下降和增加了种质资源混杂风险。应用遗传标记技术评估中国沿海拟穴青蟹种质资源现状是可持续利用这一优质水产资源的重要前提之一。已有的研究相继利用核 DNA 标记包括 RAPD、AFLP 以及微卫星等和线粒体 DNA 标记(CO I 基因片段序列)分析中国大陆东南沿海拟穴青蟹地理群体的遗传结构和群体扩散,获得了一些重要结论:譬如,拟穴青蟹地理群体间遗传分化程度中等但分化显著,广西北海群体与其他群体间的遗传分化显著,广西北部湾的几个群体在聚类分析中优先分离等(林琪, 2008; 路心平等, 2009; 舒妙安等, 2011)。

研究表明,ISSR 标记技术在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir japonica sinensis*)、拟穴青蟹等甲壳类动物的种质检测和遗传变异分析中是可行的技术手段(郑芳等, 2007; 陈淑吟等, 2008; 杨频等, 2010; 蔡小辉等, 2011; 韩晓磊等, 2011)。北部湾是一个天然渔场,拟穴青蟹资源量异常丰富,专门分析北部湾特定区段拟穴青蟹群体的遗传多样性仅有来自孙奉玉

等(2012)基于 RAPD 技术的报道。本文利用 ISSR 标记技术分析北部湾以北大陆沿岸拟穴青蟹野生群体的遗传变异,为该区段拟穴青蟹野生资源的保护和开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用拟穴青蟹的 6 个野生群体于 2009 年 5 月—2010 年 5 月搜集,当地渔民主要利用网笼在红树林捕捉。样本鉴定依据林琪等(2007)描述的拟穴青蟹形态学特征。6 个采样点分别是湛江流沙湾(LSW)、合浦闸口(ZK)、合浦党江(DJ)、钦州市钦州湾(QZW)、防城港市珍珠湾(ZZW)、越南清化(QH)。共计分析拟穴青蟹样本数 111 个个体,采样点信息见表 1。所有样本均活体运回实验室,速冻处死,螯足于 -70°C 保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取

取约 50 mg 拟穴青蟹螯足肌肉组织,以常规酚/氯仿法抽提基因组 DNA,空气晾干,灭菌超纯水溶解。采用核酸蛋白测定仪(Eppendorf, Germany)测定样品的总 DNA 浓度,以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳($0.5\times\text{TBE}$)检测其质量,于 -20°C 保存备用。

1.3 引物筛选和 PCR 扩增

基于“带型清晰、可辨”原则筛选出 8 条 ISSR

表 1 拟穴青蟹 6 个群体的采样点信息

Table 1 Sampling location information of six *Scylla paramamosain* populations

群体	采样点	纬度(N)	经度(E)	样本数
党江	新阳村附近	21°38'43.85"—21°35'07.20"	109°04'36.19"—109°03'42.38"	20
闸口	红光村附近	21°44'07.33"—21°31'10.38"	109°32'53.48"—109°32'53.50"	20
珍珠湾	交东村附近	21°35'57.21"—21°31'31.18"	108°11'50.06"—108°13'41.49"	17
钦州湾	犀牛角镇近岸海域	21°49'33.51"—21°41'07.76"	108°33'01.14"—108°40'58.59"	20
清化	静嘉近海海域	19°52'19.24"—19°40'35.28"	105°57'43.20"—105°54'35.81"	19
流沙湾	流沙镇近海海域	20°26'27.06"—20°23'51.06"	109°53'50.05"—110°00'02.41"	15

表2 ISSR引物序列及退火温度

Table 2 ISSR primer sequence and annealing temperature

引物编号	引物序列(5'-3')	退火温度(°C)
U825	(AC) ₈ T	60.4
U835	(AG) ₈ YC	47.9
U843	(CT) ₈ RA	56.4
U846	(CA) ₈ RT	58.6
U847	(CA) ₈ RC	50.2
U854	(TC) ₈ RG	52.5
U876	(GATA) ₂	50.2
U881	(GGTG) ₃	58.6

有效引物,引物序列、退火温度等信息列于表2。

PCR反应在BIO-RAD S1000™ Thermal Cycler上进行。12.5 μL的ISSR反应体系含10×PCR buffer 1.25 μL,模板DNA用量在10~25 ng, Taq DNA聚合酶为0.75 U, Mg²⁺浓度为1.5~3.0 mmol·L⁻¹, dNTP浓度为0.10~0.25 mmol·L⁻¹,引物浓度为0.2~0.8 μmol·L⁻¹;反应条件:94 °C预变性6 min;94 °C变性45 s, 50.2~60.4 °C退火45 s, 72 °C延伸90 s, 35个循环;72 °C延伸10 min。

选择100 bp Ladder plus(东盛生物)作为Marker, 1.5%琼脂糖凝胶(含0.5 mg·L⁻¹ EB)电泳检测PCR扩增产物,自动凝胶成像仪(Alpha Innotech, USA)观察拍照。

1.4 条带记录与数据统计分析

按凝胶同一位置上DNA条带的有无进行统计,有带的记为“1”,无带的记为“0”,记录清晰稳定的DNA条带,构成ISSR表型数据矩阵。应用POP-GENE 1.31软件(Yeh *et al.*, 1997)在假定种群处于Hardy-Weinberg平衡状态下,计算群体间和群体内的遗传参数,包括多态位点百分率(PPL)、观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei基因多样性指数(h)、Shannon信息指数(I)、群体间的遗传分化系数(G_{ST})、基因流(N_m)、Nei遗传距离(D)等,并用UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages)方法对各个群体进行了聚类分析。用Google-earth估测地理距离,用TFPGA 1.3(Miller, 1997)中的Mantel检测群体间遗传距离和地理距离间的相关性。

利用AMOVA-PREP(Excoffier, 1993)生成AMOVA 155可分析的输入文件,开展群体间和群体内的分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)。

2 结果与分析

2.1 ISSR扩增结果

筛选出8条ISSR引物在供试群体中均能得到带型清晰的扩增谱带,扩增片段的分子量大小主要集中在200~2000 bp,引物U876对拟穴青蟹闸口群体20个个体的扩增结果如图1所示。

2.2 物种和群体水平的遗传多样性

拟穴青蟹6个群体累计分析的位点是66个,其中多态位点56个,分析结果见表3。在物种水平上,多态位点百分率PPL=84.85%、平均每个位点的观察等位基因数 $N_a=1.8485\pm0.3613$ 、有效等位基因数 $N_e=1.4940\pm0.3751$ 、Nei基因多样性指数 $h=0.2857\pm0.1845$ 、Shannon信息指数 $I=0.4288\pm0.2482$ 。群体水平上对应遗传参数的平均分别为PPL=57.58%、 $N_a=1.5758$ 、 $N_e=1.4133$ 、 $h=0.2329$ 、 $I=0.3393$ 。这说明了物种水平的遗传多样性高于群体水平。在分析的拟穴青蟹6个群体中,清化群体的遗传多样性最高,闸口群体的遗传多样性最低。其余4个群体按遗传多样性自高至低的顺序排列是党江群体>钦州湾群体>流沙湾群体>珍珠湾群体。

2.3 群体间遗传分化

群体基因多样性的Nei分析揭示,拟穴青蟹6个群体总的基因多样性 $H_t=0.2855$,其中群体内基因多样性 $H_s=0.2330$,群体间的基因多样性($D_{st}=H_t-H_s$)为0.0525,说明拟穴青蟹6个群体间存在一定程度的遗传分化。群体间总的遗传分化系数 $G_{ST}=0.1841$,群体间总的基因流($N_m=0.5(1-G_{ST})/G_{ST}$)为2.2164。总的 G_{ST} 值表明,18.41%的遗传变

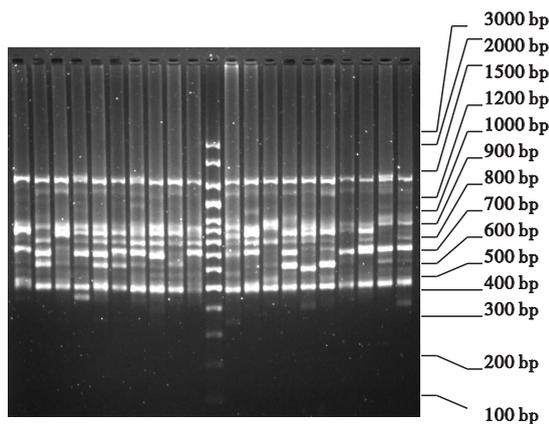


图1 引物U876对拟穴青蟹部分个体的扩增结果

Fig. 1 ISSR amplification of some *Scylla paramamosain* individuals using primer U876.

M: marker (100 bp ladder plus); 1~20: 闸口群体的20个个体。

表3 拟穴青蟹群体的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of *Scylla paramamosain* populations

群体	NPL	PPL(%)	N_a	N_e	h	I
党江	41	62.12	1.6212±0.4888	1.4365±0.3898	0.2486±0.2091	0.3636±0.2983
闸口	34	51.52	1.5152±0.5036	1.4252±0.4406	0.2285±0.2305	0.3259±0.3251
珍珠湾	36	54.55	1.5455±0.5017	1.3821±0.3963	0.2167±0.2135	0.3168±0.3052
钦州湾	39	59.09	1.5909±0.4954	1.4262±0.4061	0.2389±0.2159	0.3473±0.3070
清化	42	63.64	1.6364±0.4847	1.4229±0.3718	0.2459±0.2020	0.3627±0.2903
流沙湾	36	54.55	1.5455±0.5017	1.3868±0.3975	0.2190±0.2142	0.3196±0.3063
平均	38	57.58	1.5758	1.4133	0.2329	0.3393
物种水平	56	84.85	1.8485±0.3613	1.4940±0.3751	0.2857±0.1845	0.4288±0.2482

NPL, 多态为点数; PPL, 多态位点百分率; N_a , 观察等位基因数; N_e , 有效等位基因数; h , Nei 基因多样性; I , Shannon 信息指数。

异存在于群体间, 81.59% 的遗传变异存在于群体内, 群体内的遗传分化大于群体间的遗传分化。

两两群体之间的遗传分化系数和基因流值见表4, 其中党江群体与闸口群体间的遗传分化系数值最低、基因流值最大, 珍珠湾群体与流沙湾群体间的遗传分化系数值最高、基因流值最小。

AMOVA 等级剖分法分析结果再次证实, 拟穴青蟹遗传变异主要发生在群体内, 占总遗传变异的 87.97%, 群体间遗传变异占 12.03%。PHI 统计结果 PHI_{st} 值为 0.120。变异组分显著性检验 (1000 次重复) 表明, 拟穴青蟹 6 个群体的群体间已发生极显著遗传分化 ($P < 0.001$)。

2.4 遗传距离和地理距离的相关性分析

表5 对角线下方示群体间的无偏遗传距离, 对角线上方示群体间的地理距离。Mantel test 结果显示, 所分析的 6 个群体间的遗传距离与地理距离之间的相关性不显著 ($r = 0.422, P = 0.055$)。

2.5 聚类分析

由图2可知, 拟穴青蟹的 6 个群体聚成 2 支, 一支包括了清化群体 (QH) 和流沙湾群体 (LSW), 另一支包括了来自广西海区的钦州湾群体 (QZW)、珍珠湾群体 (ZZW)、闸口群体 (ZK) 和党江群体 (DJ)。

表4 拟穴青蟹 6 个群体间的遗传分化系数 (对角线上方) 和基因流 (对角线下方)

Table 4 Coefficient of gene differentiation (above diagonal) and gene flow (below diagonal) among six *Scylla paramamosain* populations

群体	党江	闸口	珍珠湾	钦州湾	清化	流沙湾
党江	-	0.0689	0.1170	0.1027	0.1175	0.1511
闸口	6.7574	-	0.1166	0.1276	0.1243	0.0984
珍珠湾	3.7721	3.7865	-	0.0886	0.1220	0.1546
钦州湾	4.3677	3.4181	5.1408	-	0.1203	0.1518
清化	3.7551	3.5229	3.5998	3.6575	-	0.1214
流沙湾	2.8084	4.5818	2.7348	2.7944	3.6195	-

表5 拟穴青蟹 6 个群体间的地理距离 (km, 对角线上方) 和遗传距离 (对角线下方)

Table 5 Geographic (km, above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among six *Scylla paramamosain* populations

群体	党江	闸口	珍珠湾	钦州湾	清化	流沙湾
党江	-	53.53	88.63	53.28	383.77	165.20
闸口	0.0393	-	140.79	101.60	434.87	156.80
珍珠湾	0.0751	0.0706	-	38.83	306.54	220.77
钦州湾	0.0683	0.0856	0.0507	-	344.13	204.32
清化	0.0829	0.0841	0.0785	0.0831	-	422.49
流沙湾	0.1057	0.0563	0.0984	0.1034	0.0780	-

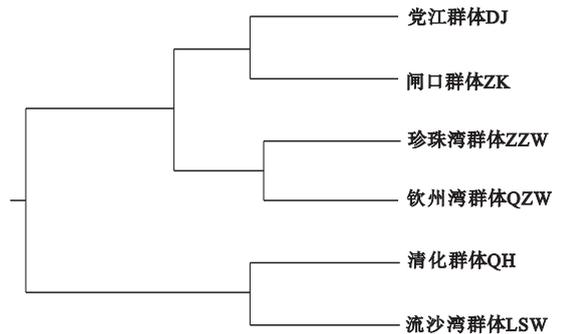


图2 拟穴青蟹 6 个群体基于 Nei 无偏遗传距离的 UPGMA 系统树

Fig. 2 UPGMA dendrogram of six *Scylla paramamosain* populations based on Nei unbiased genetic distance.

钦州湾群体 (QZW) 与珍珠湾群体 (ZZW) 的亲缘关系较近, 闸口群体 (ZK) 和党江群体 (DJ) 的亲缘关系较近。

3 讨论

3.1 遗传多样性

基于多态位点百分率和 Shannon 信息指数评价拟穴青蟹供试群体的遗传多样性高低。利用 ISSR 标记技术在不同甲壳类动物的研究表明, 克氏原螯虾在种水平上的多态位点百分率是 35.71%, 日本

沼虾在种水平上的多态位点百分率和 Shannon 信息指数分别是 97.18% 和 0.323, 三疣梭子蟹在种水平上的多态位点百分率是 82.22%, 中华绒螯蟹在种水平上的多态位点百分率是 66.25% (郑芳等, 2007; 陈淑吟等, 2008; 杨频等, 2010; 韩晓磊等, 2011)。文章报道的拟穴青蟹群体在种水平上的多态位点百分率和 Shannon 信息指数分别是 84.85% 和 0.4288, 在群体水平上的多态位点百分率介于 51.52% ~ 63.64%。与已报道的甲壳类动物比较, 拟穴青蟹群体遗传多样性的水平较高。

与基于 ISSR 技术的其他经济水产动物的遗传多样性相比, 拟穴青蟹群体遗传多样性水平并不高。裸体方格星虫在群体水平上的多态位点百分率在 59.77% ~ 71.26%, 虾夷扇贝在 73.88% ~ 89.55% (王婷等, 2009; 宋忠魁等, 2011)。马氏珠母贝在种水平上的多态位点百分率高达 98.61% (姜因萍等, 2007)。

Nelson 和 Hedgecock (1980) 认为, 海洋甲壳类低水平遗传变异与随机遗传漂变、营养结构、环境稳定性等因素相关。拟穴青蟹群体遗传多样性水平受其环境稳定性的影响, 近岸海域拟穴青蟹绝大部分时间栖息于红树林的一定区域, 不会大范围活动。此外, 拟穴青蟹群体遗传多样性水平也可能与拟穴青蟹在最近经历了一个快速的种群爆发及扩张事件相关 (路心平等, 2009)。

3.2 遗传结构

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, 即遗传变异在群体内、群体间的分布样式以及在时间上的变化 (Hamrick & Loveless, 1989)。群体遗传结构是通过物种群体间和群体内的遗传分化来体现 (李婧和夏念和, 2011)。利用 POPGENE 计算出的群体间总的遗传分化系数表明, 拟穴青蟹遗传变异主要来源于群体内, 佐证了异交物种的遗传变异主要存在于居群内的推论。AMOVA 分析结果支持了 POPGENE 的分析结果。

依据 Buso 等 (2002) 提出的评价遗传分化程度的方法, 群体间总的 G_{ST} 值 (0.1841, 介于 0.15 ~ 0.25) 表明, 群体间遗传分化程度较大, 而 $Phist$ (Φ_{st}) 值 (0.120, 介于 0.05 ~ 0.15) 表明, 群体间遗传分化程度中等。从两两群体间的遗传分化系数值来看, 除流沙湾群体与党江群体、与珍珠湾群体、与钦州湾群体间遗传分化程度较大外, 其余 2 组群体间的遗传分化程度中等偏弱。但目前的两两群体间

的遗传分化系数值要远超过来自 RAPD 与 AFLP (林琪, 2008)、线粒体 DNA 标记 (路心平等, 2009) 以及微卫星标记 (舒妙安等, 2011) 分析拟穴青蟹群体的结果。

基于群体间的遗传距离评价遗传分化, 流沙湾群体和党江群体之间的遗传距离最大是 0.1057, 在同一物种居群间的遗传距离范围内 (<0.16) (Sites & Marshall, 2003), 说明拟穴青蟹群体间遗传分化仍处于种的范畴。拟穴青蟹群体间总的基因流 $N_m = 2.2164 > 1$ 表明, 群体间存在有效基因流, 6 个群体间的遗传分化不是因为遗传漂变事件导致的 (Walker *et al.*, 2001)。Mantel 检测结果表明, 拟穴青蟹 6 个地理群体间的遗传距离与地理距离不相关, 与路心平等 (2009) 的研究结论吻合, 但与林琪 (2008) 研究结果矛盾。变异组分显著性检验表明拟穴青蟹群体间的遗传分化显著 ($P < 0.001$), 与路心平等 (2009) 利用线粒体 DNA 标记研究中国东南沿海拟穴青蟹群体遗传结构获得的结论一致。

3.3 ISSR 标记在经济水产动物应用的可行性

ISSR 标记技术在经济水产动物的应用逐渐得到认可, 但是与 RAPD、AFLP、SSR 等标记的应用比起来表现出所覆盖的动物种类少和应用范围窄。主要是与 ISSR-PCR 反应对 DNA 质量要求比较高、诸多影响因子如 T_m 值等需要优化有关。从目前研究结果来看, ISSR 标记技术在经济水产动物的应用是值得肯定的。首先, 对应比较孙奉玉等 (2012) 报道的遗传参数, 发现 ISSR 标记比 RAPD 标记能揭示更加丰富的遗传变异。与 AFLP、SSR 等标记比较可以获得类似的结果, 以下是拟穴青蟹基于不同标记群体间的遗传分化系数范围: ISSR (0.0689 ~ 0.1546), AFLP (0.0029 ~ 0.0669), SSR (0.0355 ~ 0.0817) (林琪, 2008; 舒妙安等, 2011)。其次, ISSR 标记揭示的群体遗传多样性和遗传结构与其他标记的结果保持一致。譬如, 拟穴青蟹与大多数经济水产动物比较遗传多样性偏低; 拟穴青蟹群体间遗传分化显著 (林琪, 2008; 路心平等, 2009; 舒妙安等, 2011)。此外, ISSR 标记技术表现出操作上的简单性和可重复性。

4 结论

拟穴青蟹群体遗传多样性水平在甲壳类动物范围较高, 拟穴青蟹野生群体保留了相当程度的育种潜力; 拟穴青蟹群体总的遗传变异的绝大部分存在

于群体间,大部分两两群体间遗传分化程度中等偏弱,总体上群体间遗传分化显著;拓宽了 ISSR 标记对经济水产动物适用物种种类。

参考文献

- 蔡小辉,宋忠魁,彭银辉,等. 2011. 二种体色拟穴青蟹群体 ISSR 分析. 台湾海峡, **30**(3): 363-368.
- 陈淑吟,吉红九,丁亚平,等. 2008. 吕泗渔场三疣梭子蟹自然群体同工酶与 ISSR 遗传多样性分析. 上海水产大学学报, **17**(4): 406-410.
- 韩晓磊,徐松维,李小蕊,等. 2011. 克氏原螯虾群体遗传多样性的 ISSR 分析. 江苏农业科学, **39**(4): 26-29.
- 姜因萍,何毛贤,林岳光. 2007. 马氏珠母贝群体内遗传多样性的 ISSR 分析. 海洋通报, **26**(5): 62-66.
- 李婧,夏念和. 2011. 广东省五节芒遗传多样性的 ISSR 分析. 热带亚热带植物学报, **19**(6): 506-512.
- 林琪,李少菁,黎中宝,等. 2007. 中国东南沿海青蟹属 (*Scylla*) 的种类组成. 水产学报, **31**(2): 211-219.
- 林琪. 2008. 中国青蟹属种类组成和拟穴青蟹群体遗传多样性的研究(博士学位论文). 福州: 厦门大学.
- 路心平,马凌波,乔振国,等. 2009. 利用线粒体 DNA 标记分析中国东南沿海拟穴青蟹种群遗传结构. 水产学报, **33**(1): 15-23.
- 舒妙安,周宇芳,朱晓宇,等. 2011. 中国沿海拟穴青蟹群体遗传多样性的微卫星分析. 水产学报, **35**(7): 977-984.
- 宋忠魁,刘婷,杨家林,等. 2011. 广西沿海裸体方格星虫群体遗传多样性及遗传分化. 水产科学, **30**(12): 749-753.
- 孙奉玉,宋忠魁,赵鹏,等. 2012. 广西沿海及其邻近海区拟穴青蟹群体遗传多样性的 RAPD 分析. 南方水产科学, **8**(2): 31-36.
- 王婷,丁君,于佳平,等. 2009. 利用 ISSR 技术研究虾夷扇贝不同地理种群的遗传多样性及其分化. 烟台大学学报(自然科学与工程版), **22**(1): 35-41.
- 杨频,陈立侨,王伟,等. 2010. 日本沼虾遗传多样性的 ISSR 分析. 中国水产科学, **17**(5): 913-921.
- 郑芳,吕秀玲,孙红英,等. 2007. ISSR 标记在河蟹种质检测中的应用. 中国水产科学, **14**(1): 46-51.
- Buso GSC, Rangel PH, Ferreira ME. 2002. Analysis of genetic variability in South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology*, **7**: 107-117.
- Excoffier L. 1993. Analysis of Molecular Variance (AMOVA): Version 1.55. Switzerland, University of Geneva, Genetics and Biometry Laboratory.
- Hamrick JL, Loveless MD. 1989. The genetic structure of tropical tree populations: Associations with reproductive biology// Bock JH, Linhart YB, eds. *Plant Evolutionary Ecology*. Boulder Colo: Westview Press; 131-146.
- Miller MP. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA): Version 1.3. Arizona, Flagstaff, Northern Arizona University, Department of Biological Sciences.
- Nelson K, Hedgecock D. 1980. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the Decapod Crustacean. *American Naturalist*, **116**: 238-279.
- Sites JW, Marshall JC. 2003. Delimiting species: A renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**: 462-470.
- Walker CW, Vila C, Landa A, et al. 2001. Genetic variation and population structure in Scandinavian wolverine (*Gulo gulo*) populations. *Molecular Ecology*, **10**: 53-63.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TB, et al. 1997. POPGENE: The user-friendly shareware for population genetic analysis. Release 1.31, Canada, Edmonton, University of Alberta, Molecular Biology and Biotechnology Centre.

作者简介 宋忠魁,男,1973年生,博士,副教授。主要从事水产生物技术和海洋动物分子生态学研究,发表论文23篇。
E-mail: songsir2003@yahoo.com.cn

责任编辑 魏中青