

5 个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析

李太武¹ 李成华^{1 2 3} 宋林生² 苏秀榕¹

1 (宁波大学生命科学与生物工程学院, 宁波 315211)

2 (中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室, 青岛 266071)

3 (中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术, 对 5 个泥蚶群体的遗传多样性进行了研究。在选择的 20 个随机引物中共检测到 154 个扩增片段, 长度在 300 bp ~ 2300 bp 之间, 每个个体扩增条带在 1 ~ 11 条不等。利用 Popgen 3.2 和 PHILIP 统计软件, 获得实验数据, 确立了 5 个群体间的亲缘关系。结果表明: (1) 泥蚶的 5 个地理群体分化不明显, 没有形成不同的地理种群; (2) 聚类分析显示, 韩国群体与浙江群体亲缘关系最近, 然后依次为山东群体和福建群体; (3) 5 个群体无论是在多态位点比例还是在平均遗传杂合度上都处于较高水平, 说明泥蚶当前种质资源状况良好, 遗传多样性水平较高, 泥蚶养殖有很好的发展前景; (4) 与韩国野生群体相比, 其他 4 个泥蚶群体在多态位点比例和遗传平均杂合度上都有不同程度的降低, 表明人为等因素已经开始影响到泥蚶的种质资源状况。因此, 为持续发展泥蚶养殖业, 必须加强保护泥蚶现有的种质资源并制定相应的渔业管理措施。

关键词: 泥蚶, RAPD, 遗传多样性, 亲缘关系

中图分类号: Q16, Q347

文献标识码: A

文章编号: 1005-0094(2003)02-0118-07

RAPD variation within and among five populations of *Tegillarca granosa*

LI Tai-Wu¹, LI Cheng-Hua^{1 2 3}, SONG Lin-Sheng², SU Xiu-Rong¹

1 Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211

2 Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071

3 Graduate Student Faculty, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039

Abstract: The Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to assess the genetic variation among five populations of *Tegillarca granosa*. Under predetermined optimal reaction conditions, 154 RAPD sites were detected ranging from 300 bp to 2300 bp with 20 primers. The number of amplified bands ranged from 1 to 11 in every individual. The experimental data were analyzed with the Popgen 3.2 and PHILIP software. The results showed that: (1) no evident differentiation existed among the five populations, and they all belong to one community; (2) the nearest phylogenetic relationship occurs between the Korean population and Zhejiang populations, then between the Shandong and Fujian groups in turn; (3) the high level of mean heterozygosities suggests that the resource of *Tegillarca granosa* was in good condition with high genetic variation, and (4) the heterozygosities and proportion of polymorphic loci of the hatchery populations were lower than that of the wild population, which could be attributed to artificial or other factors. We suggest that it is important to take measures soon to maintain the germ plasm resource of *Tegillarca granosa*, so as to promote sustainable development of its aquaculture.

Key words: *Tegillarca granosa*, RAPD, genetic diversity, phylogenetic relationship

1 引言

泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 俗称血蚶、宁蚶、花蚶、

粒蚶, 广泛分布于山东、浙江、福建、广东等地, 是南方主要的经济养殖贝类, 其产量占浙江省海水养殖

总产量的 5% ~ 10% ,是浙江第二大海水养殖品种。当前对泥蚶的研究工作多数集中于生态(方建光等,1999)、核型分析(郑家声,1994)、养殖(郑家声等,1996)和育苗(陈朝晖等,1995)方面,对其种质资源状况的研究相当薄弱,仅见喻子牛等(1997)利用同工酶技术的研究报道。分子水平的研究工作至今还没有开展。由于同工酶检测的是基因表达后的产物,会受到生物发育阶段及环境条件等诸多因素的影响,而且所反映的遗传信息量较少,容易造成实验数据的偏低。为得到高信息量的遗传信息数据以更加准确地了解泥蚶的资源状况,开展 DNA 分子水平的研究工作极为必要。此方面的研究工作在其他经济水产动物中早已展开,并取得了一定的成果。运用 RAPD 技术已经成功地分析了日本对虾(*Penaeus japonicus*)(宋林生等,1999)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)(宋林生等,2002)、梭鱼(*Liza haematocheila*)(权洁霞等,2000)、牡蛎(*Crassostrea virginica*)(刘必谦,戴继勋,1998; Beth *et al.*, 1999)、黑虎虾(*Penaeus monodon*)(Anchalee *et al.*, 1998)、美国龙虾(*Homarus americanus*)(Careth *et al.*, 1997)等水产经济动物的资源状况。

自 Williams *et al.* (1990) 创立 RAPD 技术以来,由于其灵敏、方便、多态性高等优点,被广泛用于多种动植物的系统进化、种质鉴定、群体遗传变异分析、目标性状基因的分子标记以及遗传图谱的快速构建等领域,尤其用于近缘种及种下水平的群体遗传研究。为弥补泥蚶 DNA 分子水平上研究的空白,特别是应对泥蚶养殖容量不断扩大,可能会远远超出养殖环境所承受的养殖容量,造成养殖环境日趋恶化的现状,本文采用 RAPD 技术分析了 5 个地点泥蚶的资源状况,以期对泥蚶种质资源的保护和合理开发利用提供理论上的依据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

实验所需样品分别取自韩国、中国山东荣成、福建福鼎、浙江奉化和浙江温岭各 1 个群体,活体低温保存运回实验室, -70℃ 超低温冰箱保存备用。

实验所用 PCR 反应试剂(不含随机引物)及蛋白酶 K 均购自大连 TAKARA 公司, DNA 提取所用三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)购自上海生工工程有限公司,其他试剂均为 AR 级,

购自宁波海曙化玻公司。

2.2 基因组 DNA 的提取

每个群体取 24 个个体,分别取肌肉组织 100 mg 剪碎。加入 500 μ l TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, pH8.0),混匀后加入终浓度为 1% 的 SDS 和 100 μ g/ml 的蛋白酶 K, 55℃ 消化 1 小时,然后分别用等体积的酚,酚:氯仿(1:1),氯仿:异戊醇(24:1)反复抽提,二倍体积无水乙醇沉淀过夜, TE 溶解,置 4℃ 保存备用。

2.3 随机引物

实验所用的 20 个随机引物从上海生工生物工程技术服务有限公司合成的 100 个引物中筛选出来,引物序列未列出。

2.4 PCR 反应

RAPD 反应条件参照 Williams *et al.* (1990)。基因组 DNA 在 PE9600 PCR 扩增仪上经过 94℃ 变性 5 min 后进行 40 个循环。每一个循环包括 94℃ 1 min, 37℃ 1 min, 72℃ 2 min, 最后在 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 1.3% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色(金冬雁,黎孟枫,1993),上海复日凝胶成像系统下观察、拍照。

2.5 数据处理

记录下电泳后凝胶上清晰可见的扩增条带,每一个体的扩增条带以“1”或“0”记录,出现扩增条带的记为“1”,相应位点无扩增条带的记为“0”,将此结果输入计算机 Popgen3.2 软件中,统计相应结果。

多态位点比例 $P = \text{多态扩增片段数} / \text{扩增片段总数}$ 。群体的平均杂合度 $H = \sum(1 - \sum p_i^2) / n$ 。其中 p_i 是第 i 个等位基因的频率(Nei & Roychoudhury, 1974; Nei, 1978), n 为所检测到的位点数。显性等位基因频率是根据群体中纯合隐性个体(即对应某一扩增条带,不出现该扩增带的个体)频率的平方根来计算隐性等位基因 a 的基因频率 q , 显性等位基因 A 的基因频率 $p = 1 - q$ 。群体间的近交系数(F_{st})由公式 $F_{st} = \sigma^2 q / pq$, 其中 p 和 q 为平均基因频率, $\sigma^2 q$ 为基因频率方差, $\sigma^2 q = \sum(q_i - q)^2 / n$ 。遗传相似性指数(Nei & Li, 1979) $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$, 遗传距离 $D = 1 - F$, 其中 N_{XY} 代表 X, Y 两个个体共有的扩增带, N_X, N_Y 是 X 与 Y 个体各自所有的扩增带,系统树是在遗传距离的基础上构建的。

3 结果

在本研究所使用的 20 个随机引物中,除 S-80

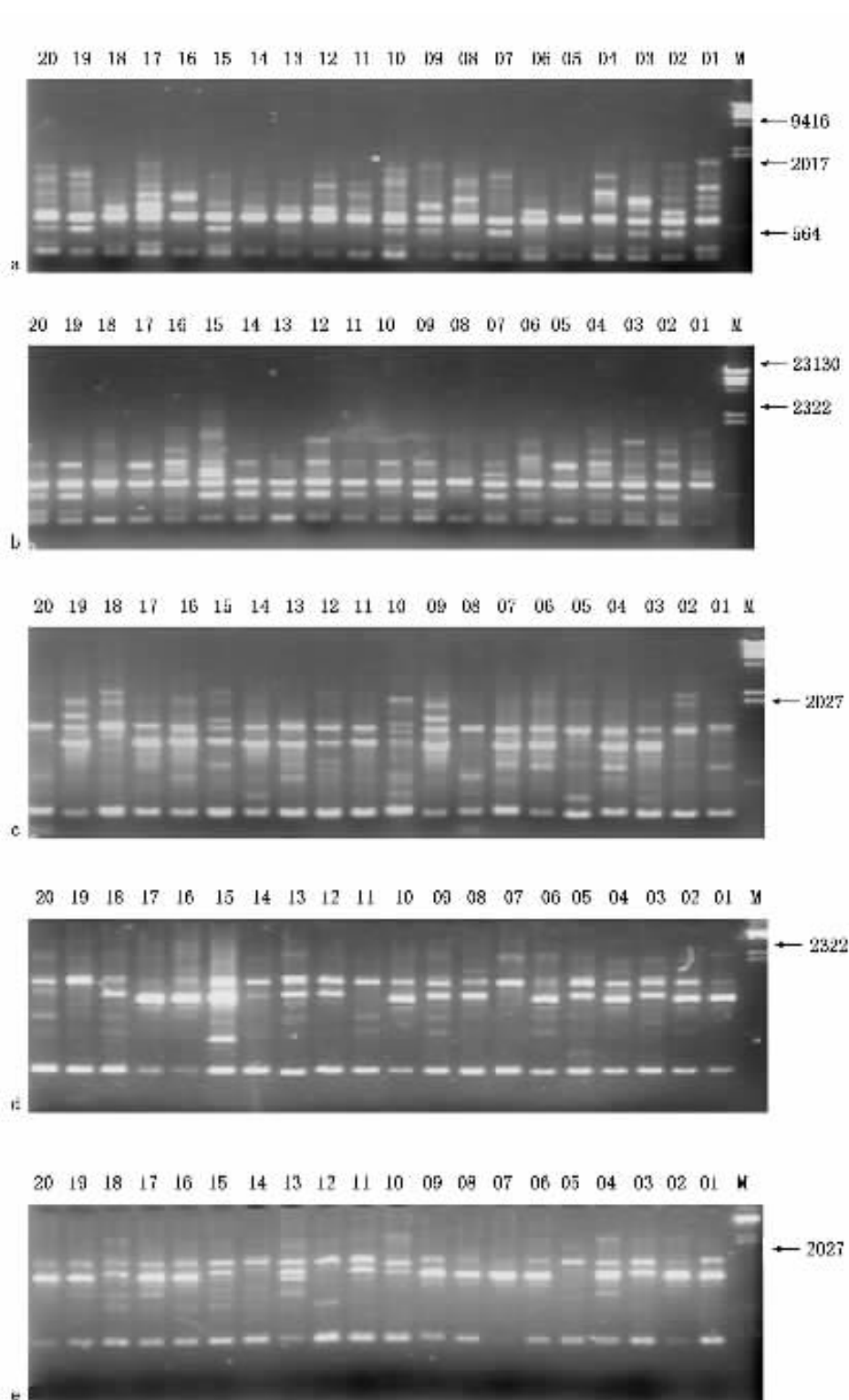


图1 5个泥蚶群体基因组DNA的随机引物S-39(a,b)和S-149(c,d,e)扩增结果电泳图

a, 福建群体; b, 山东群体; c, 韩国群体; d, 温岭群体; e, 奉化群体; M, λ -Hind III digest DNA marker

Fig. 1 The electrophoresis patterns of RAPD in five populations of *Tegillarca granosa* amplified with primers S-39 (a, b) and S-149 (c, d, e)

a, Fujian population; b, Shandong population; c, Korea population; d, Wenling population; e, Fenghua population; M, λ -Hind III digest DNA marker

表 1 5 个泥蚶群体的多态位点百分率及平均遗传杂合度

Table 1 RAPDs and mean expected heterozygosity in the five populations of *Tegillarca granosa*

	位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点比例(%) Percentage of polymorphic loci	平均遗传杂合度 Mean expected heterozygosity
福建群体 Fujian population	146	120	82.19	0.2628
韩国群体 Korea population	150	126	84.00	0.2683
山东群体 Shandong population	146	122	83.56	0.2682
温岭群体 Wenling population	143	105	73.43	0.2513
奉化群体 Fenghua population	144	115	79.86	0.2532

表 2 5 个泥蚶群体的遗传距离(下)及遗传相似性指数(上)

Table 2 The genetic distance (below) and genetic similarity index (above) among five populations of *Tegillarca granosa*

	福建群体 Fujian population	韩国群体 Korea population	山东群体 Shandong population	温岭群体 Wenling population	奉化群体 Fenghua population
福建群体 Fujian population	* * * *	0.9753	0.9682	0.9364	0.9379
韩国群体 Korea population	0.0250	* * * *	0.9675	0.9477	0.9400
山东群体 Shandong population	0.0323	0.0330	* * * *	0.9149	0.9138
温岭群体 Wenling population	0.0657	0.0537	0.0890	* * * *	0.9552
奉化群体 Fenghua population	0.0641	0.0619	0.0901	0.0458	* * * *

表 3 5 个泥蚶群体的近交系数(F_{st})Table 3 The inbreeding coefficient (F_{st}) among the five populations of *Tegillarca granosa*

	福建群体 Fujian population	韩国群体 Korea population	山东群体 Shandong population	温岭群体 Wenling population	奉化群体 Fenghua population
福建群体 Fujian population	* * * *				
韩国群体 Korea population	0.0308	* * * *			
山东群体 Shandong population	0.0252	0.0232	* * * *		
温岭群体 Wenling population	0.0387	0.0381	0.0294	* * * *	
奉化群体 Fenghua population	0.0276	0.0251	0.0113	0.0240	* * * *

表 4 韩国野生群体与浙江温岭养殖群体的数量性状方差比较结果

Table 4 The result of variance analysis between the wild population and the Wenling population of *Tegillarca granosa*

	韩国野生群体 Korea wild population	温岭养殖群体 Wenling cultivated population
壳长** Shell length (mm)	30.80 ± 2.80	24.45 ± 1.84
壳高** Shell height (mm)	23.30 ± 2.06	19.50 ± 1.74

** $P < 0.01$

在 5 个群体中均无任何扩增结果外,其余 19 个引物共扩增出 154 条清晰可辨的片段,片段长度处于 300 bp ~ 2300 bp 不等,每个个体扩增片段数目在 1 ~ 11 之间。同一引物在不同群体扩增结果比较接近,如图 1 中 a 与 b 以及 c、d、e。

分别统计 5 个地理群体扩增电泳结果,并输入计算机 Popgen 3.2 软件中,计算它们各自的多态位点比例以及平均遗传杂合度(表 1)、相对遗传距离

及遗传相似性指数(表 2)。将表 2 的遗传距离各数据输入计算机利用 PHILIP 3.5 统计软件中的 Neighbor 与 Drawgram 程序处理,得到基于 NJ 的 5 个群体系统发生树(图 2)。5 个群体间近交系数(F_{st})的计算结果见表 3。韩国野生群体与浙江温岭养殖群体数量性状测定结果见表 4。

4 讨论

4.1 种内遗传多样性是保护种质资源的基础

生物多样性是物种适应多变的生存环境而得以维持生存、发展和进化的基础。保护生物多样性的核心是保护种质资源,其实质是保存群体的基因组体系。因此,最大限度地维持种内遗传多样性水平,是持续利用种质资源的前提和基础。

本文对 5 个泥蚶群体的研究得到的多态位点比例都在 70% 以上(表 1)、平均遗传杂合度和遗传相似性指数也均处于较高水平,各群体与野生群体间

的近交系数均小于 0.05,符合 Wright 的群体间无遗传分化的标准(F_{st} 在 0~0.05),一方面表明当前条件下泥蚶各地理群体的种质资源良好,养殖环境对其本身的胁迫作用在当前阶段表现不甚明显,泥蚶养殖业具有较好的发展前景;另一方面,与无泥蚶养殖业的韩国野生群体相比较,中国各地理群体泥蚶的多态位点比例、平均遗传杂合度都有不同程度的降低,表明人为因素等原因已经开始对泥蚶群体的遗传多样性水平产生了影响。此结论也可从我们对韩国野生泥蚶与温岭养殖泥蚶群体数量性状的测定结果中得到进一步的证明。在壳龄相近的前提下,韩国野生群体无论是在壳长(平均为 30.80 mm),还是在壳高(平均为 23.30 mm)方面都高于温岭养殖群体(壳长 24.45 mm,壳高 19.50 mm)(表 4), F 检验结果证实两者差异极其显著($P < 0.01$)。当然野生群体与养殖群体不同的生活环境条件也会影响到上述差异,要排除此因素造成的影响,需要采集到同一地区的养殖和野生个体,然而在我国由于泥蚶养殖业的发展及养殖个体逃逸等原因,使得野生泥蚶样品的采集存在着较大困难,即使采集到也无从鉴别,而在韩国至今还没有泥蚶养殖业,因而无法采集到养殖个体,这就使得我们研究同一地区的野生群体和养殖群体极其困难,这也是我们不得已采用上述实验材料进行对比和分析的原因。但考虑到两地环境条件的差异不是太大,且环境对遗传物质的改变是一个漫长的过程,因此我们认为从上述数据中可以推导出泥蚶种质资源退化的结论。当前,浙江温州一带已从韩国引进泥蚶,并进行育苗、养殖生产,这为我们以后继续研究养殖群体与野生群体在遗传上的分化情况提供了条件,也为进一步证实我们的结论打下了基础。

4.2 5 个群体的亲缘关系比较

PHILIP 聚类分析的结果(图 2)表明,韩国群体与浙江奉化和温岭 2 个群体间的亲缘关系最近,然后依次为山东群体和福建群体。这与实际的群体地理分布有所差别,究其原因作者认为可能是引种造成的。浙江地区的泥蚶养殖品种开始时从山东引种,后来由于韩国泥蚶苗种价格便宜,部分养殖厂家开始从韩国引种,这样两地泥蚶杂交不可避免,再加上韩国至今仍未有泥蚶养殖业,其种系基本可以认为是野生种质,使得浙江地区泥蚶在聚类分析上处于其韩国群体和山东群体之间。这也在一定程度上

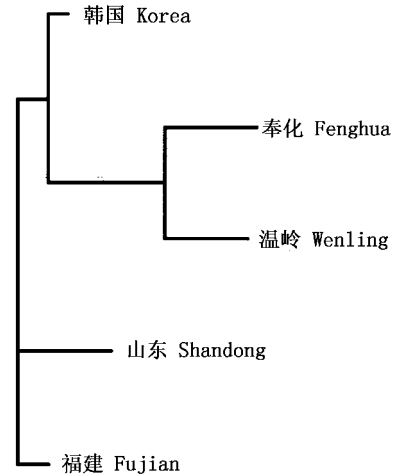


图 2 根据遗传距离应用 NJ 法得到的系统发生树
Fig. 2 The NJ tree constructed from RAPD analysis of the five populations of *Tegillarca granosa*

体现了杂种优势的原则。

4.3 遗传相似性指数、遗传距离及近交系数作为种内区分标准

Thorp(1982)通过分析研究认为:遗传相似度 $I < 0.85$ (遗传距离 $D > 0.15$)的两个群体,不可能是同一物种;同科属间 I 是 0.1~0.5(D 为 0.5~0.9);不同物种间 I 为 0.2~0.8($D = 0.2 \sim 0.8$);而同种群体 $I = 0.8 \sim 0.97$ ($D = 0.03 \sim 0.2$)。根据上述区分标准,本次所选取的 5 个地理群体的泥蚶,最大遗传距离仅为 0.0901(表 2),说明地理环境的差异并没有造成物种遗传物质上较大的变化,它们仍然隶属于同一地理群体,这一点从遗传相似性系数高达 90% 以上也可得到更清楚的证实。Wright(1978)认为近交系数 F_{st} 在 0~0.05 之间的群体没有遗传分化,本文所得到的近交系数均小于 0.05(表 3),也说明本次实验所选择的 5 个地理群体的泥蚶尚未出现明显的遗传分化。造成此种现象的原因,作者认为可能与当前泥蚶养殖中无明显的累代养殖有关:当前我国养殖的泥蚶多依赖于每代引进苗种或引进亲本,养殖一代后,重新引进新种,养殖环境短期内对种质的影响无法有效地富集,有害的等位基因在短时间内无法纯合,造成多态位点比例较高,5 个地区的泥蚶分化并不明显。

4.4 RAPD 与同工酶研究结果差异明显

喻子牛(1997)利用同工酶电泳技术对泥蚶种质资源的遗传变异进行了研究,在 12 种同工酶中,

共检测到 27 个位点, 3 个群体的多态位点比例在 P. 95 分别为 33.33% (温州)、25.93% (青岛) 和 22.22% (荣成); 平均遗传杂合度分别为 0.097 (温州)、0.068 (青岛) 和 0.062 (荣成), 远远低于本实验结果。推测其原因可能有 3 个: (1) 技术本身的差异。同工酶技术考察的是不同基因位点或等位基因编码的蛋白质或多肽的表达特征, 而且其所能检测到的仅为可溶性且能够被淀粉凝胶分辨的酶, 因而在很大程度上低估了整个基因组的遗传变异水平; 而 RAPD 技术检测的是基因组本身, 不会受到上述原因的影响; (2) 实验材料的差异。喻子牛选用的是 3 个野生群体, 而我们的实验材料除韩国外, 其余全为养殖群体, 而且取材时间和地点不同, 也会对实验结果造成一定的影响; (3) 实验得到的位点和检测的同工酶数量不足。据国外报道: 只有检测 20 种以上同工酶, 获得 30 个以上位点, 才能较准确地反映物种的种质资源状况。喻子牛 (1997) 仅检测了 12 种同工酶, 检测到的位点也不足 30 个, 因此可能造成实验带有很大的局限性和片面性, 不能较准确地反映泥蚶的种质资源状况。而本次实验所用的 20 个随机引物中, 除 S-80 无任何扩增结果外, 其余引物扩增条带清晰, 共检测到 154 个位点, 远远大于同工酶的 27 个位点, 因此, RAPD 技术能检测到同工酶所无法涉及到的更多的遗传信息, 更能反映当前条件下的泥蚶的种质状况。

4.5 野生与养殖群体遗传多样性

由于国外泥蚶养殖较少, 对泥蚶的种质资源研究几近空白, RAPD 方面的研究也未见报道, 无法与本实验结果进行横向比较。但有关其他经济海产动物中的研究数据却有不少报道。Beth *et al.* (1999) 应用 RAPD 技术对 1 个养殖群体和 4 个野生群体的牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 遗传多样性进行了研究, 结果表明: 野生群体多态位点比例为 74%, 明显高于养殖群体的 54%, 在 4 个野生群体中, East Wareham 群体的多态位点比例最低 (62%), 推测是受人为因素和河口沉积物增加的影响; Wilkins (1976) 的研究结果与之接近; English (1997) 则报道养殖牡蛎群体与野生群体的多态位点比例接近 (平均为 70%), 与 Beth 和 Wilkins 的研究结果不同, 表明即使研究方法相同, 取样时间和地点的差异也会对最终的实验结果产生影响, 从而从另一方面证实了本研究结果的可靠性。对上述同一物种研究结果差异

较大的原因, 作者的解释是因为用于繁殖的亲本数量不同, 亲本数量足够多可以保持相对较高的遗传多样性, 反之将会加速遗传多样性丢失。因此 Beth 认为: 在育苗中使用较多的亲本个体是提高牡蛎的遗传多样性水平的重要举措。Careth *et al.* (1997) 对美国龙虾 (*Homarus americanus*) 的研究也证实三地龙虾差异极小, 它们之间几乎没有地理分化, 其中两地间的遗传距离仅为 0.002, 说明龙虾分布的连续性。此结论也与本研究得出的关于 5 个地区泥蚶没有明显分化的结论相符。Bohlmeyer & Gold (1991) 认为: 每一代个体中一个个体的迁移在理论上可以确保该代个体的主位点在迁入群体中得到体现, 但不能足以保证同一位点的基因频率在各亚种间相同。Wright (1978) 发现: 当 F_{st} 值较小时, 利用 F_{st} 准确地定量基因交流就会变的非常困难, 每一代中少于 5 个个体的迁入不会造成遗传分化。由此可以推断: 造成各地理区间泥蚶没有明显分化的可能原因是繁殖亲本的数量足够大, 没有造成遗传多样性的丧失。

4.6 展望

泥蚶群体丰富的遗传多样性是泥蚶具有较高的适应能力、生存能力和进化潜能的内在表现, 为泥蚶养殖业的大发展提供了前提和基础。但我们更应注意到泥蚶种质资源日益衰退的现状和趋势, 应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, 合理开发利用, 并且尽可能保证人工育苗过程各环节的科学性和合理性。在条件允许的情况下, 应采取每年人工放苗等措施, 丰富泥蚶野生资源。同时尽快将分子遗传标记技术应用于泥蚶苗种培育, 建立标记辅助选育技术, 必将会极大地促进泥蚶人工养殖业的发展。

参考文献

- Anchalee T. K., Siriporn P. M. and Padermsak J. H. 1998. Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Marine Biotechnology*, **6**: 249 - 254.
- Beth M. H., Arun K., Dhar K. R. and Acacia A. W. 1999. Genetic diversity in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Massachusetts using the RAPD technique. *Journal of Shellfish Research*, **18**(1): 121 - 125.
- Bohlmeyer D. A. and Gold J. R. 1991. II. A protein electrophoretic analysis of population structure in the red drum *Sciaenops ocellatus*. *Marine Biology*, **108**: 197 - 206.

- Careth C., Harding E. L. and Kenchington C. J. 1997. Genetic relationship among subpopulations of the American lobster (*Homarus americanus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA. *Aquatic Science*, **54**: 1762 – 1771.
- Chen Z-H(陈朝晖) and Zhou Z-M(周志明). 1995. Study on the techniques for industrialized fry production of bloody clam larvae *Tegillarca granosa*. *Marine Science(海洋科学)*, **6**: 10 – 12. (in Chinese)
- English L. J., Maguire G. B. and Ward R. D. 1997. Genetic variation in Australian wild and hatchery populations of the Pacific oyster (*Crassostrea virginica*) using allozyme, mitochondrial, and microsatellite technique. In: *Sixth International Symposium on Genetics in Aquaculture*, Stirling, UK.
- Fang J-G(方建光), Sun H-L(孙慧玲), Kuang S-H(匡世焕), Liang X-M(梁兴明), Niu X-D(牛锡端), Liu Z-H(刘志鸿) and Li F(李锋). 1999. Study on the filtration and ingestion rate of bloody clam larvae *Tegillarca granosa*. *Oceanologia et Limnologia Sinica(海洋与湖沼)*, **30**(2): 169 – 171. (in Chinese)
- Jin D-Y(金冬雁) and Li M-F(黎孟枫). 1993. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual* (2nd edn.) (分子克隆实验指导). Science Press, Beijing, 304 – 316. (in Chinese)
- Liu B-Q(刘必谦) and Dai J-X(戴继勋). 1998. Study on genetic diversity in oyster, *Crassostrea*. *Journal of Fisheries of China(水产学报)*, **22b**(3): 193 – 197. (in Chinese)
- Nei M. 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races. *Journal of Human Genetics*, **23**(4): 341 – 369.
- Nei M. and Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. *Process of Natural Academic Science*, **76**(10): 5269 – 5273.
- Nei M. and Roychoudhury A. K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, **76**(2): 379 – 390.
- Quan J-X(权洁霞), Dai J-X(戴继勋), Shen S-D(沈颂东), Deng J-Y(邓景耀) and Zhuang Z-M(庄志猛). 2000. Genetic variation analysis of two mullet populations through randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Acta Oceanologica Sinica(海洋学报)*, **22**(5): 82 – 87. (in Chinese)
- Song L-S(宋林生), Li J-Q(李俊强), Li H-L(李红蕾), Cui Z-X(崔朝霞), Li C-H(李成华), Xu W.(胥炜) and Chang Y-Q(常亚青). 2002. The genetic structure and genetic differentiation of the natural population and the hatchery stock of *Chlamys farreri* revealed by RAPD analysis. *High Technology Letters(高技术通讯)*, **7**: 83 – 86. (in Chinese)
- Song L-S(宋林生), Xiang J-H(相建海), Li C-X(李晨曦), Zhou L-H(周岭华), Liu B-Z(刘保忠) and Liu R-Y(刘瑞玉). 1999. Study of population genetic structure in *Penaeus japonicus* with RAPD markers. *Oceanologia et Limnologia Sinica(海洋与湖沼)*, **30**(3): 261 – 265. (in Chinese)
- Thorp J. P. 1982. The molecular dock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics. *Annual Review of Ecology Systematics*, **13**(1): 139 – 168.
- Wilkins N. P. 1976. Genetic variability in marine bivalvia: implications and applications in molluscan. *Mariculture*, 549 – 563.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R. and Livark K. J. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**(22): 6531 – 6535.
- Wright S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability within and among Natural Population*. University of Chicago Press, Chicago
- Yu Z-N(喻子牛), Kong X-Y(孔晓瑜), Yang R.(杨锐), Wang R-C(王如才) and Liu B-Q(刘必谦). 1997. Allozyme variation within populations of *Tegillarca granosa*. *Journal of Fishery Sciences of China(中国水产科学)*, **4**(5): 15 – 21. (in Chinese)
- Zheng J-S(郑家声) and Wang M-L(王梅林). 1994. A study on the proliferation of spats of bloody clam *Tegillarcagranosa* (Linnaeus). *Journal of Oceanography of Huanghai and Bohai Seas(黄渤海海洋)*, **12**(3): 25 – 30. (in Chinese)
- Zheng J-S(郑家声), Wang M-L(王梅林), Guo D-H(郭丹红), Xu X-M(徐希明) and Gao Q-L(高清兰). 1996. The comparative study of three Arcidae chromosome. *Acta Oceanologica Sinica(海洋学报)*, **18**(3): 78 – 85. (in Chinese)

(责任编辑:时意专)