

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2012.02.005

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

孙奉玉^{1,2,3}, 宋忠魁², 赵鹏², 聂振平², 苏琼², 王芳宇^{1,3}

(1. 南华大学药学与生命科学学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 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; 3. 衡阳师范学院生命科学系, 湖南 衡阳 4210081)

摘要: 采用随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术检测广西沿海及其邻近海区拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 6 个地理群体的遗传变异和遗传结构, 8 条 10 bp 寡核苷酸随机引物扩增 99 个个体, 分析其中的 44 个位点, 31 个位点表现出多态性, 在种水平的多态位点百分率为 70.45%。POPGENE 分析结果显示, 6 个群体的多态位点百分率为 29.55% ~ 54.55%, 平均为 36.97%; 群体的遗传多样性自高至低排列为钦州湾群体 > 党江群体 > 珍珠湾群体 > 闸口群体 > 清化群体 > 流沙湾群体; 群体内的遗传变异大于群体间的遗传变异, 群体间的遗传分化程度较大。AMOVA 分析显示, 群体内遗传变异占 87.03%, 群体间遗传变异占 12.97%, 群体间发生中等程度遗传分化。Mantel 检测结果表明, 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, 群体间聚类无明显的地域性分布格局。

关键词: 拟穴青蟹; RAPD; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2012)02-0030-06

RAPD analysis of genetic diversity of *Scylla paramamosain* population in Guangxi and neighboring sea areas

SUN Fengyu^{1,2,3}, SONG Zhongkui², ZHAO Peng², NIE Zhenping², SU Qiong², WANG Fangyu^{1,3}

(1. Pharmacy and Life Science, South China University, Hengyang 421001, China;

2. Guangxi Key Lab. for Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000, China;

3. Department of Life Science, Hengyang Normal University, Hengyang 421008, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technology was employed to investigate the genetic diversity and structure of 6 *Scylla paramamosain* populations in Guangxi and its neighboring sea areas. We amplified a total of 99 individuals by using 8 random primers with 10 bp in length, and analyzed 44 valid loci, among which 31 loci are disclosed as polymorphism. The percentage of polymorphic locus (PPL) at species level is 70.45%. According to POPGENE analysis, the PPL in the 6 populations ranges from 29.55% to 54.55% with an average of 36.97%. The abundance of genetic diversity is QZW > DJ > ZZW > ZK > QH > LSW. Variance within populations is higher than that among populations, and genetic differentiation among populations reaches higher level. An analysis of molecular variance (AMOVA) shows that variance within populations accounts for 87.03%, and that among populations accounts for 12.97%. However, genetic differentiation among populations only reaches medium level. Mantel test shows that no significant correlation between genetic and geographic distance is detected in the 6 *S. paramamosain* populations. Cluster analysis indicates that the distribution of these populations displays no apparent geographic pattern.

Key words: *Scylla paramamosain*; RAPD; genetic diversity; genetic differentiation

收稿日期: 2011-12-09; 修回日期: 2012-01-18

资助项目: 广西科学基金项目(0991189); 广西科学研究与技术开发计划项目(09322003, 11107012-11); 广西海洋生物技术重点实验室主任基金项目(GKLMBT-D0801)

作者简介: 孙奉玉(1982-), 男, 硕士研究生, 从事水产生物技术研究。E-mail: sfy@mail@163.com

通讯作者: 宋忠魁, E-mail: songsir2003@yahoo.com.cn

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^[1]。KEENAN 等^[2]提出青蟹属分4种的观点在当下盛行,除拟穴青蟹外,还包括锯缘青蟹(*S. serrata*)、紫螯青蟹(*S. tranquebarica*)和榄绿青蟹(*S. olivacea*)。在中国大陆东南沿海分布有4种青蟹,其中拟穴青蟹是优势种^[1]。拟穴青蟹经济价值最高,是重要增殖对象;2006年中国沿海拟穴青蟹养殖面积达 $3.45 \times 10^4 \text{ km}^2$,产量为 $10.68 \times 10^4 \text{ t}$ ^[3]。

随着拟穴青蟹增殖业的蓬勃发展,渔业捕捞和人工养殖对拟穴青蟹种质资源产生了巨大的干扰,表现为野生苗种资源量的下降和种质资源的混杂。因此,深入了解中国沿海不同海区拟穴青蟹的遗传特征和种质差异已成为拟穴青蟹增殖业可持续发展的当务之急。林琪^[4]利用随机扩增多态DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)和扩增片段长度多态性(amplified fragments length polymorphism, AFLP)技术开展了中国大陆沿海拟穴青蟹群体遗传多样性研究,其中在广西海区设定了2个采样点,即北海铁山港和东兴北仑河口。路心平等^[5]利用线粒体DNA标记(COI基因片段序列)分析了中国大陆东南沿海拟穴青蟹种群遗传结构,在广西海区分别设定了北海、山口和防城3个采样点。两份研究报告为认知广西海区、北部湾海域拟穴青蟹群体遗传结构提供了有价值的信息。由于广西海区比较高的岸曲比特征(约8.6:1),为了更进一步了解广西海区拟穴青蟹群体遗传结构特征,在此增加了钦州湾采样点。

RAPD 技术在经济海产动物中的应用已相当广泛,在青蟹属中的应用除林琪^[4]外,KLINBUNGE 等^[6]使用3条RAPD引物(UBC456、UBC457和YN222)鉴定了泰国东部的3种青蟹。此研究筛选有效的RAPD引物开展广西沿海及其邻近海区拟穴青蟹群体遗传多样性分析,为该区域拟穴青蟹野生资源保育和利用,以及拟穴青蟹种质改良提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

试验用拟穴青蟹的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^[1]描述的拟穴青蟹形态学特征。6个采样点分别为湛江流沙湾

(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)和越南清化(QH)。共计分析拟穴青蟹样本数99个个体。所有样本均活体运回实验室,速冻处死,螯足于-70℃保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 取约50mg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(德国Eppendorf牌)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℃保存备用。

1.2.2 引物筛选和PCR扩增 基于“带型清晰、可辨”原则筛选出8条RAPD有效引物,引物序列、退火温度等信息列于表1。

表1 RAPD 引物序列及退火温度

Tab.1 Primer sequences for RAPD and annealing temperature

引物编号 primer No.	引物序列(5→3') primer sequence	退火温度/℃ annealing temperature
S15	GGAGGCTGTT	36.0
S24	AATCGGGCTG	36.0
S31	CAATCGCCGT	36.0
S58	GAGAGCCAAC	36.0
S68	TGGACCCGTC	36.0
S83	GAGCCCTCCA	36.0
S103	AGACGTCCAC	36.0
S398	ACCACCCACC	36.0

PCR反应在BIO-RAD S1000™ Thermal Cycler上进行。12.5 μL的RAPD反应体系含10×PCR buffer 1.25 μL,模板DNA用量为10~25 ng, Taq DNA聚合酶为0.75 U,镁离子(Mg^{2+})浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,引物浓度为 $1.2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。反应条件为94℃预变性10 min;94℃变性60 s,36℃退火60 s,72℃延伸60 s,45个循环;72℃延伸10 min。选择100 bp Ladder plus(东盛生物)作为分子量标准(marker),1.5%琼脂糖凝胶(含 $0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EB)电泳检测PCR扩增产物,自动凝胶成像仪(Alpha innotech,美国产)观察拍照。

1.2.3 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 RAPD 表型数据矩阵。应用 POPGENE 1.31 软件^[7] 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(Na)、有效等位基因数(Ne)、Nei's 基因多样性指数(h)、Shannon's 信息指数(I)、群体间的遗传分化系数(Gst)、基因流(Nm)和 Nei's 遗传距离等，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 TFGPA 1.3^[8] Mantel 检测群体间遗传距离和地理距离间的相关性。利用 AMOVA-PREP^[9]生成 AMOVA155 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 RAPD 扩增结果

筛选出的 8 条 10 bp 寡核苷酸随机引物在所有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 100 ~ 1 200 bp 之间，引物 S24 对拟穴青蟹闸口群体 19 个个体的扩增结果见图 1。

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 44 个，其中多态位点 31 个，分析结果见表 2。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

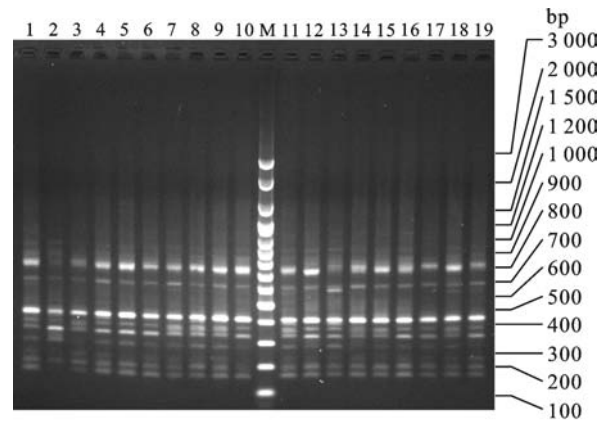


图 1 引物 S24 对拟穴青蟹部分个体的扩增结果

M. 分子量标准(100 bp ladder plus);

1 ~ 19. 闸口群体的 19 个个体

Fig. 1 RAPD amplification in some individuals of *S. paramamosain* using primer S24

M. marker (100 bp ladder plus); 1 ~ 19. 19 individuals representing ZK population

个群体中，钦州湾群体的遗传多样性最高，流沙湾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分别为党江群体、珍珠湾群体、闸口群体和清化群体。

2.3 群体间遗传分化

群体基因多样性的 Nei's 分析结果见表 3。Gst 显示，18.43% 的遗传变异存在于群体间，81.57% 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分化。

表 2 拟穴青蟹群体的遗传多样性

Tab. 2 Genetic diversity parameters of *S. paramamosain* populations

项目 item	样本数/个 number of specimen (NS)	多态位点数/个 number of polymorphic locus (NPL)	多态位点百分率/% percentage of polymorphic locus (PPL)	观察等位基因数 observed number of alleles (Na)	有效等位基因数 effective number of alleles (Ne)	Nei's 基因多样性 gene diversity (h)	Shannon's 信息指数 Shannon's information index(I)
党江 DJ	19	17	38.64	1.386 4 ± 0.492 5	1.276 1 ± 0.382 7	0.155 8 ± 0.208 1	0.227 1 ± 0.298 6
闸口 ZK	19	16	36.36	1.363 6 ± 0.486 6	1.258 2 ± 0.363 1	0.148 5 ± 0.202 5	0.216 9 ± 0.293 4
珍珠湾 ZZW	14	17	38.64	1.386 4 ± 0.492 5	1.274 1 ± 0.387 5	0.154 0 ± 0.207 6	0.224 8 ± 0.297 0
钦州湾 QZW	13	24	54.55	1.545 5 ± 0.503 7	1.375 8 ± 0.397 5	0.213 2 ± 0.214 2	0.312 1 ± 0.305 5
清化 QH	19	15	34.09	1.340 9 ± 0.479 5	1.251 3 ± 0.391 6	0.138 1 ± 0.206 6	0.200 1 ± 0.293 5
流沙湾 LSW	15	13	29.55	1.295 5 ± 0.461 5	1.177 8 ± 0.308 0	0.106 6 ± 0.175 3	0.159 9 ± 0.257 7
平均 average	16.5	17	36.97	1.369 7	1.268 8	0.152 7	0.223 5
物种水平 at species level	99	31	70.45	1.704 5 ± 0.461 5	1.296 3 ± 0.335 9	0.184 3 ± 0.177 7	0.290 9 ± 0.250 2

AMOVA 分析结果显示, 拟穴青蟹遗传变异主要发生在群体内, 占总的遗传变异的 87.03%, 群体间遗传变异占 12.97% (表 4)。PHI 统计结果是 $PHI_{st} = 0.130$ 。变异组分显著性检验 (1 000 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

Mantel 检测结果显示, 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 ($R = -0.1188$, $P = 0.4260 \sim 0.5770$) (表 5)。

表 3 拟穴青蟹 6 个群体基因多样性的 Nei's 分析

Tab. 3 Nei's analysis of gene diversity in 6 *S. paramamosain* populations

项目 item	总基因多样性 total gene diversity (Ht)	群体内基因多样性 gene diversity within population (Hs)	基因分化系数 coefficient of gene differentiation (Gst)	基因流 gene flow (Nm)
平均 average	0.187 2	0.152 7	0.184 3	2.212 9
标准差 standard deviation	0.031 6	0.023 9	—	—

表 4 拟穴青蟹 6 个群体的 AMOVA 分析

Tab. 4 AMOVA analysis of 6 *S. paramamosain* populations

谱系结构 source of variation	自由度 degree of freedom (df)	方差总和 sum of squared deviation (SSD)	平均方差 mean of squared deviation (MSD)	变异组分 variance component	变异百分率/percentage of total variance
群体间 among populations	5	43.407	8.681	0.375	12.97
群体内 within populations	93	234.290	2.519	2.519	87.03

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

Tab. 5 Geographic (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among 6 *S. paramamosain* populations km

项目 item	党江 DJ	闸口 ZK	珍珠湾 ZZW	钦州湾 QZW	清化 QH	流沙湾 LSW
党江 DJ	—	53.53	88.63	53.28	383.77	165.20
闸口 ZK	0.023 4	—	140.79	101.60	434.87	156.80
珍珠湾 ZZW	0.037 3	0.065 1	—	38.83	306.54	220.77
钦州湾 QZW	0.060 2	0.093 8	0.023 6	—	344.13	204.32
清化 QH	0.038 3	0.042 1	0.040 0	0.062 1	—	422.49
流沙湾 LSW	0.023 7	0.033 1	0.030 7	0.068 8	0.021 2	—

2.5 聚类分析

基于 Nei's 无偏遗传距离的 UPGMA 聚类分析结果显示, 拟穴青蟹的 6 个群体聚成 3 支, 钦州湾群体与珍珠湾群体聚在一起且最先从群体中分离, 清化群体与流沙湾群体聚在一起, 闸口群体与党江群体聚在一起 (图 2)。聚类分析表明, 拟穴青蟹群体聚类与地理距离无相关性。

3 讨论

3.1 遗传多样性

PPL 是衡量物种遗传多样性的重要指标之一。

对应用 RAPD 技术报道的海产虾蟹类动物群体的 PPL 概括有斑节对虾 (*Penaeus monodon*, 66.19% 和 67.14%)^[10]、短沟对虾 (*P. semisulcatus*, 87.69% 和 89.23%)^[11]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*, 39.00% ~ 77.00%, 平均为 58.75%)^[12]、中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*, 25.00% ~ 34.38%)^[13]、口虾蛄 (*Oratosquilla oratoria*, 67.80%)^[14]、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*, 61.29% 和 62.44%)^[15] 和拟穴青蟹 (26.79% ~ 38.39%)^[4]。根据上述研究结果, 拟穴青蟹的遗传多样性在海产虾蟹类动物中相对较低。

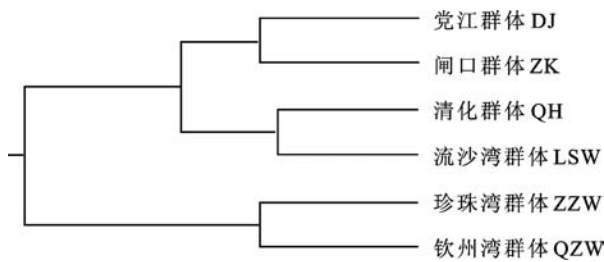


图2 拟穴青蟹6个群体基于Nei's无偏遗传距离的UPGMA系统树图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 6 *S. paramamosain* populations based on Nei's unbiased genetic distance

与林琪^[4]的研究结果比较,此研究的广西海区(不含钦州湾)拟穴青蟹群体 PPL (36.36% ~ 38.64%) 略高于前者 (35.27% 和 34.82%), 但流沙湾群体 PPL (29.55%) 要低于湛江徐闻群体 (35.71%); 基于 I 的比较表明, 除流沙湾群体 (0.159 9) 低于湛江徐闻群体 (0.176 8) 外, 对应广西海区的拟穴青蟹群体 I (0.216 9 ~ 0.227 1) 均高于前者 (0.161 7 和 0.136 9)。此研究揭示拟穴青蟹在物种水平上的 PPL 为 70.45%, 高于林琪^[4]的 42.88%。拟穴青蟹钦州湾群体和清化群体在以往的研究均未见报道, 其中钦州湾群体的 PPL (54.55%) 在所有已报道的群体中为最高。

刘萍等^[16]认为中国对虾低水平的遗传多样性与大强度的渔业捕捞、人工养殖个体逃逸以及大规模不安全的人工放流等有关。NELSON 和 HEDGE-COCK^[17]认为海洋甲壳类低水平遗传变异与随机遗传漂变、营养结构和环境稳定性等因素相关。拟穴青蟹相对较低的遗传多样性是否与上述因素相关值得探讨。笔者认为, 拟穴青蟹低的遗传多样性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^[5]有关。

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^[18]。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^[19]。利用 POPGENE 计算出的群体间遗传分化系数表明, 拟穴青蟹遗传变异主要存在于群体内, 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^[20]提出的评价遗传分化程度的方法,

Gst(介于 0.15 ~ 0.25) 表明群体间遗传分化程度较大, 而 Phist (Φ_{st}) (介于 0.05 ~ 0.15) 表明群体间遗传分化程度中等。

基于群体间的遗传距离评价遗传分化, 钦州湾群体和闸口群体之间的遗传距离最大 (0.093 8), 在同一物种居群间的遗传距离范围内 (< 0.16)^[21], 说明拟穴青蟹群体间遗传分化未超过种的范畴。拟穴青蟹群体间 $Nm = 2.2129 > 1$ 表明群体间存在有效基因流, 群体间遗传分化不是因为遗传漂变事件导致^[22]。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。此结果说明了地理距离并不影响拟穴青蟹群体间遗传分化, 与路心平等^[5]的研究结论吻合, 但与林琪^[4]的研究结果矛盾。拟穴青蟹群体间遗传分化具体与哪些因素相关还有待进一步研究。

综上所述, 拟穴青蟹群体的遗传多样性水平低, 但群体间遗传分化显著, 佐证了路心平等^[5]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所获得的结论。

参考文献:

- [1] 林琪, 李少菁, 黎中宝, 等. 中国东南沿海青蟹属 (*Scylla*) 的种类组成[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 211-219.
LIN Qi, LI Shaojing, LI Zhongbao, et al. Species composition in genus *Scylla* from the coast of southeast China[J]. J Fish China, 2007, 31(2): 211-219. (in Chinese)
- [2] KEENAN C P, DAVIES P J F, MANN D L. A revision of the genus *Scylla* de Hann, 1833 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae) [J]. Raffles Bull Zool, 1998, 46(1): 217-245.
- [3] 乔振国, 马凌波, 于忠利, 等. 我国海水蟹类养殖现状与发展目标[J]. 渔业现代化, 2009, 36(3): 45-48.
QIAO Zhenguo, MA Lingbo, YU Zhongli, et al. Status and development goal of sea crabs farming in China [J]. Fish Modern, 2009, 36(3): 45-48. (in Chinese)
- [4] 林琪. 中国青蟹属种类组成和拟穴青蟹群体遗传多样性的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2008.
LIN Qi. Species composition of genus *Scylla* and genetic diversity of *Scylla paramamosain* (Estampador, 1949) populations in China [D]. Xiamen: Xiamen University, 2008. (in Chinese)
- [5] 路心平, 马凌波, 乔振国, 等. 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[J]. 水产学报, 2009, 33(1): 15-23.
LU Xinping, MA Lingbo, QIAO Zhenguo, et al. Population genetic structure of *Scylla paramamosain* from the coast of the southeastern China based on mtDNA COI sequences[J]. J Fish China, 2009, 33(1): 15-23. (in Chinese)
- [6] KINBUNGA S, BOONYAPAKDEE A, PRATOOMCHAT B. Ge-

- netic diversity and species-diagnostic markers of mud crabs (Genus *Scylla*) in eastern Thailand determined by RAPD analysis [J]. *Mar Biotechnol*, 2000, 2(2): 180-187.
- [7] YEH F C, YANG R C, BOYLE T B J, et al. POPGENE: the user-friendly shareware for population genetic analysis [CP]. Edmonton: Molecular and Biotechnology Center, University of Alberta, 1997.
- [8] MILLER M P. Tools for population genetic analysis (TFPGA): version 1.3 [CP]. Flagstaff: Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, 1997.
- [9] EXCOFFIER L. Analysis of molecular variance (AMOVA): version 1.55 [CP]. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1993.
- [10] 李康, 杜晓东, 叶富良. 斑节对虾两个野生种群 RAPD 分析 [J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 25(3): 79-82.
LI Kang, DU Xiaodong, YE Fuliang. Genetic diversity of two wild populations of *Penaeus monodon* revealed by RAPD technique [J]. *J Zhanjiang Ocean Univ*, 2005, 25(3): 79-82. (in Chinese)
- [11] 谭树华, 王桂忠, 林琼武, 等. 短沟对虾两个野生群体遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生态学报, 2006, 26(11): 3907-3911.
TAN Shuhua, WANG Guizhong, LIN Qiongwu, et al. Genetic diversity of two wild populations of *Penaeus semisulcatus* revealed by RAPD technique [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(11): 3907-3911. (in Chinese)
- [12] GARCIA D K, FAGGART M A, RHOADES L, et al. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3(5): 270-280.
- [13] 孟宪红, 马春燕, 刘萍, 等. 黄渤海中国对虾 6 个地理群的遗传结构及其遗传分化 [J]. 高技术通讯, 2004, 14(4): 97-102.
MENG Xianhong, MA Chunyan, LIU Ping, et al. The genetic structure and differentiation of geographic stock of *Fenneropenaeus chinensis* along the Yellow Sea and the Bohai Sea [J]. *Chin High Technol Lett*, 2004, 14(4): 97-102. (in Chinese)
- [14] 刘海映, 王桂娥, 王秀丽. 大连海域口虾蛄资源遗传多样性的分析 [J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(4): 350-353.
LIU Haiying, WANG Gui'e, WANG Xiuli. Genetic diversity analysis of mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* from Dalian coast [J]. *J Dalian Fish Univ*, 2009, 24(4): 350-353. (in Chinese)
- [15] CHI Dali, YAN Binlun, SHEN Songdong, et al. RAPD analysis between color-different crab individuals of *Portunus trituberculatus* [J]. *Mar Sci Bull: English Edition*, 2010, 12(2): 47-54.
- [16] 刘萍, 孔杰, 石拓, 等. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析 [J]. 海洋学报, 2000, 22(5): 89-93.
LIU Ping, KONG Jie, SHI Tuo, et al. RAPD analysis of wild stock of Penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in the China's coastal waters of Huanghai and Bohai Seas [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2000, 22(5): 89-93. (in Chinese)
- [17] NELSON K, HEDGECOCK D. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the decapod crustacean [J]. *Am Nat*, 1980, 116(2): 238-279.
- [18] HAMRICK J L, LOVELESS M D. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology [G] // BOCK J H, LINHART Y B. *Plant evolutionary ecology*. Boulder: Westview Press, 1989: 131-146.
- [19] 李婧, 夏念和. 广东省五节芒遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2011, 19(6): 506-512.
LI Jing, XIA Nianhe. Genetic diversity of *Miscanthus floridulus* (Poaceae) from Guangdong by inter simple sequence repeat (ISSR) [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2011, 19(6): 506-512. (in Chinese)
- [20] BUSO G S C, RANGEL P H, FERREIRA M E. Analysis of genetic variability in South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers [J]. *Mol Ecol*, 2002, 7(1): 107-117.
- [21] SITES J W, MARSHALL J C. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology [J]. *Trends Ecol Evol*, 2003, 18(9): 462-470.
- [22] WALKER C W, VILA C, LANDA A, et al. Genetic variation and population structure in Scandinavian wolverine (*Gulo gulo*) populations [J]. *Mol Ecol*, 2001, 10(1): 53-63.