

缢蛭6个群体遗传结构的ISSR分析*

牛东红 李家乐** 冯冰冰 刘达博

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 200090)

摘要 采用ISSR分子标记对采自福建宁德(ND)、浙江台州(TZ)、上海崇明(CM)、山东海阳(HY)、天津汉沽(HG)和辽宁庄河(ZH)的缢蛭6个野生群体进行遗传多样性和遗传关系分析. 筛选出10条ISSR引物对6个群体共216个样品进行扩增, 共得到138个清晰的扩增位点, 其中多态性位点135个, 多态位点百分率为97.83%, 在物种水平上的遗传多样性较为丰富. 群体遗传多样性分析结果表明, 6个群体的多态位点百分率在61.59%~72.46%之间, 基因多样性指数和Shannon's信息指数分别在0.104 3~0.176 6和0.178 9~0.280 8之间, 其中ND群体的多样性指数最低. 群体间遗传分化、遗传距离和聚类结构显示, ND群体和TZ群体亲缘关系最近, 首先聚为一支, 之后依次与CM群体及HG群体和HY群体聚类, 最后与ZH群体聚在一起, 表明地理位置较远的群体, 遗传距离也较远. 图2 表5 参27

关键词 缢蛭; 群体遗传; 遗传结构; ISSR

CLC Q959.215.03

ISSR Analysis on Genetic Structure of Six *Sinonovacula constricta* Populations*

NIU Donghong, LI Jiale**, FENG Bingbing & LIU Dabo

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 200090, China)

Abstract The genetic structure of six geographic populations of the razor clam *Sinonovacula constricta* along the coast of China was investigated by the inter-simple sequence repeat (ISSR). The six populations were named as ND in Ningde City of Fujian, TZ in Taizhou City of Zhejiang, CM in Chongming Island of Shanghai, HY in Haiyang City of Shandong, HG in Hangu District of Tianjin and ZH in Zhuanghe City of Liaoning. Of the 138 ISSR loci tested, 135 (97.83%) were polymorphic with 10 ISSR primers. The number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), Shannon's information index (I), mean Nei's gene diversity (H), percentage of polymorphic bands (PPB), average values of H_t , H_s , and G_{st} for pairwise subpopulations were analyzed with POPGENE. The results showed that the values of PPB, I and H were 61.59%~72.46%, 0.104 3~0.176 6 and 0.178 9~0.280 8, respectively for the six populations with the lowest values in ND population. The UPGMA tree based on the Nei' genetic identity showed that ND was clustered with TZ into one clad, then with CM, HY and HG, and finally with ZH. Fig 2, Tab 5, Ref 27

Keywords *Sinonovacula constricta*; population genetics; genetic structure; ISSR

CLC Q959.215.03

缢蛭(*Sinonovacula constricta*, Lamarck)俗称蛭子、泥蛭或蜻, 属软体动物门(Mollusca)双壳纲(Bivalve)竹蛭科(Solenidae)缢蛭属(*Sinonovacula*), 为广温广盐性海产双壳类, 是我国四大养殖贝类之一, 具有重要的经济价值. 缢蛭养殖历史悠久, 过去主要集中在福建和浙江一带, 随着缢蛭养殖业的不断扩展, 山东沿海等地区亦开始从福建一带引进苗种进行养殖, 异地引种给缢蛭种质资源的保护和管理带来一定的困难, 这使得缢蛭群体遗传结构的研究提上日程. 而关于缢蛭的既往研究主要集中在生理、生态和养殖技术等方面, 对其群体遗传学方面的研究报道却相对较少.

简单序列重复区间扩增多态性(Inter-simple sequence repeat, 简称ISSR)是由Zietkiewicz于1994年创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记^[1]. ISSR标记技术具有操

作简单、稳定、可重复性好及多态性高等优点, 被广泛应用于动植物的群体遗传学研究领域^[2-4]. 目前国内对缢蛭群体的研究主要采用RAPD和同工酶标记^[5, 6], 本文则通过ISSR技术分析了6个缢蛭群体的遗传结构, 在分子水平上探讨了处于不同地理区域的群体遗传多样性差异和遗传分化水平, 为其种质资源管理和遗传育种工作提供科学的理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料来源

2006年和2007年在我国沿海地区采集缢蛭6个野生群体(表1), 并于当地活体解剖或者活体带回实验室, 将其外套膜组织用无水乙醇固定备用.

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA提取 每个样本取0.5 g外套膜组织剪碎后, 加入500 μ L组织匀浆缓冲液(10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH=8.0; 50 mmol L⁻¹ EDTA, pH=8.0), 混匀后加入终浓度为1%的SDS和200 μ g mL⁻¹的蛋白酶K, 55 $^{\circ}$ C消化澄清. 用等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1)提取2次, 然后加入2倍体积预冷的无水

收稿日期: 2008-06-18 接受日期: 2008-09-28

*国家高技术研究发展计划(863计划, No. 2006AA10A410)和上海市重点学科建设项目(No. Y1101)资助 Supported by the National High-tech Research and Development Program (863 Program) of China (No. 2006AA10A410) and the Leading Academic Discipline Project of Shanghai, China (No. Y1101)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: jlli@shou.edu.cn)

表1 缙蛭样品采集时间和地点
Table 1 Sampling time and sites of *S. constricta*

群体名称 Population	简称 Abbv.	采集地点(东经/北纬) Sampling site (E/N)	采集时间 Sampling time
宁德群体	ND	福建省宁德市霞浦县沙江镇 Shajiang Township of Ningde, Fujian (120.0/26.9)	2006.10
台州群体	TZ	浙江省台州市路桥区蓬街镇十塘 Pengjie Township of Taizhou, Zhejiang (121.3/28.7)	2007.10
崇明群体	CM	上海市崇明县东滩湿地 Chongming County of Chongming, Shanghai (121.3/31.6)	2007.05
海阳群体	HY	山东省海阳市行村镇丁子咀 Hancun Township of Haiyang, Shandong (121.2/36.8)	2007.05
汉沽群体	HG	天津市汉沽区蔡家堡 Caijiabao of Hangu, Tianjin (117.9/39.3)	2007.05
庄河群体	ZH	辽宁省庄河市明阳镇大张村 Mingyang Township of Zhuanghe, Liaoning (123.0/39.7)	2007.05

乙醇沉淀, 由70%乙醇洗涤两遍后干燥, 用TE溶解。紫外分光光度计测定样品DNA的 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 值, 确定其浓度和纯度, 母液置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 ISSR引物和PCR反应 ISSR引物根据加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供序列, 由上海生工生物工程生物技术公司合成。PCR反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 进行40个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性1 min, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸1.5 min, 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。PCR反应体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$, 含 $10\times\text{Buffer } 2.5\text{ }\mu\text{L}$, $\text{Mg}^{2+} 1.5\text{ mmol L}^{-1}$, dNTP 0.2 mmol L^{-1} , Taq DNA聚合酶1 U, 上、下游引物各 $0.2\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, 模板DNA $50\sim 100\text{ ng}$ 。PCR扩增产物经2.0%琼脂糖凝胶检测, 用EB染色, 于凝胶成像系统下观察并拍照记录。

1.3 数据分析

将ISSR电泳图谱记录后, 用Gelpro4.5软件进行分析, 同一引物扩增的分子量一致的条带被认为具有同源性, 属于同一位点的产物, 按有带的记为1, 无带的记为0的格式输入计算机, 构成ISSR表型数据矩阵。采用Popgene1.32软件^[7]进行遗传参数分析, 分别计算了多态位点百分率(Percentage of polymorphic bands, PPB)、观测等位基因数(Number of alleles per locus, N_a)、有效等位基因数(Effective number of alleles per locus, N_e)、Shannon's信息指数(Shannon's information index, I)、群体总基因多样性(Total gene diversity, H_t)、群体内基因多样性(Gene diversity within populations, H_s)、Nei's基因多样性(H)^[8]、各群体间的遗传分化指数(Eoefficient of population

differentiation, G_{st}) ($G_{st} = 1 - H_s / H_t$) (Slatkin and Barton, 1989)^[9]、Nei's (1978)^[10]的遗传距离(Genetic distance, D)。根据Nei's (1978)的遗传距离, 利用Mega3.0^[11]构建群体的UPGMA分子系统树。

2 结果

2.1 缙蛭群体内的遗传变异分析

从100条引物中筛选出10条扩增产物条带清晰、稳定性和重复性好的引物用于6个群体共216份样品的PCR扩增(表2)。图1为引物835对ZH群体的电泳图谱。每条引物分别产生11~16条扩增条带, 共检测到138个位点, 其中多态位点135个, 多态位点百分率(PPB)达97.83% (表3)。6个群体的多态位点百分率分别在61.59%~72.46%之间, 基因多样性指数和Shannon's信息指数分别在0.104 3~0.176 6和0.178 9~0.280 8之间, 其中ND群体各个多样性指数最低。

2.2 缙蛭群体间的遗传变异分析

根据总的基因多样性(H_t)和群体内基因多样性(H_s)计算各个群体间的分化水平(G_{st})。所分析的6个缙蛭群体间 $G_{st} = 0.122 8$, 即表明总的遗传变异中有12.28%的变异存在于群体间, 群体内的遗传变异为87.72%。

两两群体间遗传距离在0.016 5~0.035 7间, 遗传分化在0.052 7~0.090 4间, 其中ZH群体与其他群体遗传距离在0.03以上, 遗传分化值在0.08以上。而遗传分化和遗传距离均较近的群体是HG群体和HY群体(0.016 5, 0.052 7)以及TZ群体和ND群体(0.018 6, 0.068 3) (表4)。

表2 ISSR引物序列

Table 2 Nucleotide sequences of 10 ISSR random primers

引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence	引物编号 Primer No.	引物序列 Primer sequence
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	UBC836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	UBC841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	UBC850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC

B=C, G, T; D=A, G, T; H=A, C, T; Y=C, T; V=A, C, G

表3 缙蛭群体遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity of *S. constricta* populations

群体 Population	个体数 Individual No.	等位基因数 N_a	有效等位基因 N_e	Nei's基因多样性 H	Shannon's信息指数 I	多态位点百分率 PPB/%
ND	36	1.6159	1.1492	0.1043	0.1789	61.59
TZ	36	1.6522	1.2108	0.1423	0.2339	65.22
CM	36	1.7029	1.2115	0.1453	0.2416	70.29
HY	36	1.7246	1.2700	0.1734	0.2780	72.46
HG	36	1.6594	1.1713	0.1219	0.2079	65.94
ZH	36	1.6884	1.2726	0.1766	0.2808	68.84
Total	216	1.9783	1.2241	0.1641	0.2845	97.83

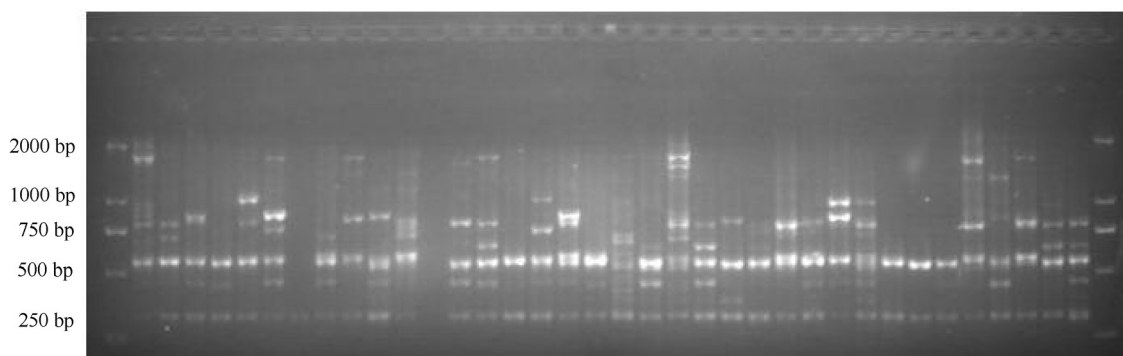


图1 引物835号对ZH群体36个个体的ISSR电泳图
Fig. 1 ISSR profile of ZH population of *S. constricta* with primer 835

表4 缢蛭群体间遗传距离和遗传分化
Table 4 Genetic distance and genetic differentiation of *S. constricta* populations

群体 Population	ZH	HG	HY	CM	TZ	ND
ND	0.0298	0.0178	0.0258	0.0224	0.0186	
TZ	0.0342	0.0184	0.0334	0.0241		0.0683
CM	0.0331	0.0178	0.0324		0.0722	0.0788
HY	0.0357	0.0165		0.0837	0.0866	0.0813
HG	0.0319		0.0527	0.0604	0.0629	0.0708
ZH		0.0891	0.0821	0.0843	0.0876	0.0904

对角线以上为遗传距离, 对角线以下为遗传分化 Nei's genetic distance (above diagonal) and genetic differentiation (below diagonal)

2.3 缢蛭群体的聚类分析

根据ISSR分子标记得到的遗传距离指数, 用非加权的组平均法(UPGMA)分别进行聚类分析(图2). TZ群体与ND群体首先聚为一支, 之后与CM群体、HG群体和HY群体聚类, 最后与ZH群体聚在一起.

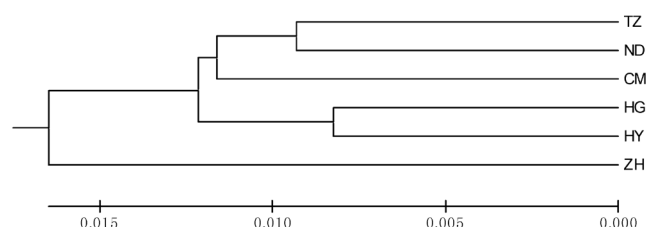


图2 缢蛭6个群体的UPGMA分子系统树

Fig. 2 UPGMA phylogenetic tree of the six populations of *S. constricta*

3 讨论

3.1 缢蛭群体的遗传多样性分析

物种的遗传多样性水平在一定程度上体现着这个物种适应环境的能力, 制约着物种适应性进化的水平, 同时为其现状和保护价值的评估提供非常重要的信息^[12, 13].

缢蛭群体遗传多样性参数如Nei's基因多样性、Shannon's信息指数和多态位点百分率显示, 福建宁德群体的多样性指标分别为0.104 3、0.178 9和61.59%, 为6个群体的最低水平. 福建是我国缢蛭养殖最早的地方, 据考证, 始于公元1180年的宋代, 距今已有800多年历史, 而且目前仍然是我国缢蛭的主要养殖区和苗种产地. 由于福建的缢蛭受人类干预较多, 形成了一定的遗传瓶颈, 因此福建缢蛭的遗传多样性较低. 另

一方面, 在上海崇明岛刚刚开始缢蛭的人工养殖, 在山东一带则是近几年开始兴起养殖缢蛭, 其野生资源的遗传多样性处于较高水平. 上述情况在泥蚶中也有存在, 在比较研究中国和韩国泥蚶(*Tegillarca granosa*)群体遗传差异后发现, 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, 表明人为因素对群体的遗传多样性水平产生了影响^[14]. 由于群体遗传变异的丧失, 有可能导致该群体对未来环境适应性降低^[15], 因此要加强现有资源的保护和管理, 以适应人类的需求和物种的进化.

此外, 本文研究发现, 在黄渤海区域的3个缢蛭群体中, 天津汉沽群体的多样性指数较低, 这可能与当地的地理位置和环境条件有一定关系. 渤海是我国唯一的内海, 自身水力条件较差决定了它自净能力有限, 而且渤海污染主要来自陆源, 污染较为严重, 造成该区域群体在长期的环境胁迫下遗传多样性有所下降. 这表明环境在物种的进化过程中具有较强的选择压力, 尤其在污染环境下, 种群的敏感性个体消失, 或者污染引起种群数量减小, 以致于达到了种群的遗传学瓶颈^[16], 从而降低整个种群的遗传多样性水平, 引起长期的生物学效应, 有效利用资源减少^[17].

3.2 与相关贝类群体遗传多样性的比较分析

缢蛭群体的多态位点百分率在61.59%~72.46%之间, Nei's多样性指数平均为0.164 1, 高于海洋贝类的平均水平(45.0%, 0.147)^[18]. 进一步将相关海洋贝类ISSR和RAPD标记的分析结果比较(表5)发现, 在研究过的海洋贝类群体多态位点百分率和Nei's多样性指数结果中, 缢蛭处于中等水平, 这些遗传变异是今后良种选育的物质基础.

由于不同物种生活习性不同, 其群体间多样性水平的

表5 缢蛭与其他贝类的遗传多样性比较
Table 5 Comparis of genetic diversities of *S. constricta* and other clams

种类 Species	地理位置 Location	方法 Method	Nei's多样性指数 (<i>H</i>)	多态位点百分率 (PPB/%)	参考文献 References
缢蛭 <i>S. constricta</i>	辽宁, 天津, 山东, 上海, 浙江, 福建 Liaoning, Tianjin, Shandong, Shanghai, Zhejiang, Fujian	ISSR	0.1043~0.1766	61.59~72.46	本研究 This study
四角蛤蜊 <i>Macra veneriformis</i>	辽宁, 山东, 江苏, 浙江 Liaoning, Shandong, Jiangsu, Zhejiang	ISSR	0.2120~0.3420	72.50~96.67	[3]
马氏珠母贝 <i>Pinctada martensii</i>	北海, 大亚湾, 三亚 Beihai, Dayawan, Sanya	ISSR	0.1257~0.1260	93.62~97.87	[21]
文蛤 <i>Meretrix meretrix</i>	江苏和辽宁 Jiangsu, Liaoning	ISSR		68.40~80.70	[24]
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	山东养殖群体 The cultured populations from Shandong	ISSR		56.21~78.70	[26]
翡翠贻贝 <i>Penera viridis</i>	广西北海, 广东湛江和汕尾 Beihai, Zhanjiang, Shanwei	ISSR RAPD	0.2457~0.2534 0.1748~0.1901	72.48~75.22 57.14~60.78	[19]
大珠母贝 <i>Pinctada maxima</i>	印度尼西亚养殖群体 The cultured populations from Indonesia	RAPD	0.2891~0.2904	72.22~80.00	[20]
菲律宾蛤 <i>Ruditapes philippinarum</i>	大连沿海地区 The coast of Dalian	RAPD	0.1599~0.1973	58.65~71.15	[22]
泥蚶 <i>Tegillarca granosa</i>	福建, 奉化, 山东, 温岭和韩国 Fujian, Fenghua, Shandong, Wenling, Korea	RAPD	0.2513~0.2628	73.43~84.00	[14]
青蛤 <i>Cyclina sinensis</i>	江苏, 浙江, 天津, 辽宁, 福建 Jiangsu, Zhejiang, Tianjin, Liaoning, Fujian	RAPD	0.2490~0.3070	68.90~73.30	[25]
文蛤 <i>M. meretrix</i>	广东和广西 Guangdong, Guangxi	RAPD	0.2088~0.2594	85.71~94.74	[23]

差异也有所不同(表5)。翡翠贻贝(*Penera viridis*)^[19]、大珠母贝(*Pinctada maxima*)^[20]和马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)^[21]属于暖水性种类, 分布范围较小, 在我国仅限于南方地区, 其各个群体间遗传多样性差异相差甚微。而广布种贝类如四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)^[3]、菲律宾蛤(*Ruditapes philippinarum*)^[22]、文蛤(*Meretrix meretrix*)^[23, 24]和青蛤(*Cyclina sinensis*)^[25]群体间遗传差异就相对较大。由此可见, 广布种比狭域分布的物种具有更多的遗传差异^[12]。缢蛭属于广温、广盐性滩涂贝类, 广泛分布于我国沿海, 其群体间遗传多样性水平存在一定差异, 为物种水平上的遗传变异提供了遗传基础。

3.3 缢蛭群体间的遗传分化和亲缘关系分析

本研究中, 6个缢蛭群体间 $G_{st}=0.1228$, 表明总的遗传变异中群体内的遗传变异为87.72%, 12.28%的变异来自于群体间, 不同群体间存在着一定的遗传分化。Thorp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 $I=0.1\sim0.5$ ($D=0.5\sim0.9$); 不同物种间 $I=0.2\sim0.8$ ($D=0.2\sim0.8$); 而同种不同群体 $I=0.8\sim0.97$ ($D=0.03\sim0.2$)^[27]。6个缢蛭群体的遗传距离大致在0.02~0.03范围之内, 属于同种不同地理群体。缢蛭的浮游幼虫期只有一两个星期, 自然水流的作用只能在较近范围内形成基因交流, 而且不同地理群体具有不同的生活温度和繁殖季节, 因此容易形成不同的遗传结构。

聚类关系反映了群体间亲缘关系的远近。利用ISSR标记分析了广泛分布于我国沿海的四角蛤蜊(*M. veneriformis*)地理群体的遗传分化情况, 同样表明了遗传距离和地理距离呈正相关关系^[3]。本研究的聚类结果显示, 位于东海沿海的福建宁德群体(ND)和浙江台州群体(TZ)首先聚为一支, 之后依次与上海崇明群体(CM)、汉沽群体(HG)和海阳群体(HY)聚类,

最后与庄河群体(ZH)聚在一起, 这一亲缘关系同样大致反应了各个群体的地理位置关系。

References

- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176~183
- Ma CZ (马朝芝), Fu TD (傅廷栋), Stine T, Bo G. Genetic diversity of Chinese and Swedish rapeseed (*Brassica napus* L.) analyzed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Agric Sci China* (中国农业科学), 2003, 2 (2): 137~143
- Hou L, Lü HL, Zou XY, Bi XD, Yan DQ, He CB. Genetic characterizations of *Macra veneriformis* (Bivalve) along the Chinese coast using ISSR-PCR markers. *Aquaculture*, 2006, 261: 865~871
- He W (何玮), Guo L (郭亮), Wang L (王岚), Yang W (杨威), Tang L (唐琳), Chen F (陈放). ISSR analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* L. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, 13 (4): 466~470
- Li CH (李成华), Li TW (李太武), Song LS (宋林生), Su XR (苏秀榕). Genetic variations among four populations of *Sinonovacula constricta* by using random amplified polymorphic DNA. *Fish Sci* (水产科学), 2004, 23 (12): 26~28
- Wang DQ (王冬群), Li TW (李太武), Su XR (苏秀榕). Study on biochemical genetic marker of six populations of *Sinonovacula constricta* Lamarck. *Fish Sci* (水产科学), 2004, 23 (4): 8~11
- Yeh FC, Yang RC, Boyle ET. Popgene, the User Friendly Shareware or Population Genetic Analysis. Edmonton, Canada: MolecularBiology and Biotechnology Center, University of Alberta, 1997
- Shannon CE, Weaver W. The Mathematical Theory of Communication.

- Urbana, USA: University of Illinois Press, 1949
- 9 Slatkin M, Barton NH. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 1989, **43**: 1349~1368
 - 10 Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, **89**: 583~590
 - 11 Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3.0: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings Bioinform*, 2004, **5**: 150~163
 - 12 Hamrick JL, Godt MJW. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise JC, Hamrick JL eds. *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. New York, USA: Chapman and Hall, 1996. 281~304
 - 13 Hogbin PM, Peakall R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrate*. *Conserv Biol*, 1999, **13**: 514~522
 - 14 Li TW (李太武), Li CH (李成华), Song LS (宋林生), Su XR (苏秀榕). RAPD variation within and among five populations of *Tegillarca granosa*. *Biodiv Sci* (生物多样性), 2003, **11** (2): 118~124
 - 15 段昌群, 王焕校, 姜汉侨. 污染条件下生物多样性丧失的生态遗传学机制. *生态科学进展*, 2004, **1**: 267~290
 - 16 Nadig SG, Lee KL, Adams SM. Evaluating alterations of genetic diversity in sunfish populations exposed to contaminants using RAPD assay. *Aquat Toxicol*, 1998, **43**: 163~178
 - 17 Krane DE, Sternberg DC, Burton GA. Randomly amplified polymorphic DNA profile-based measures of genetic diversity in crayfish correlated with environmental impacts. *Environ Toxicol & Chem*, 1999, **18**: 504~508
 - 18 相建海. 海洋生物细胞和种群水平遗传研究. 济南: 山东科技出版社, 1999. 112~123
 - 19 Du XD (杜晓东), Li K (李康), Huang RL (黄荣莲), Wang QH (王庆恒), Deng YW (邓岳文). Genetic diversity of three populations of *Penaeus viridis* as revealed by phenotypic traits, RAPD and ISSR analyses. *J Trop Oceanogr* (热带海洋学报), 2007, **26** (4): 51~55
 - 20 Shi YH (石耀华), Gui JF (桂建芳), Wang Y (王嫣), Wang AM (王爱民), Qu YB (曲艳波). Studies on the genetic diversity of three cultured populations of *Pinctada maxima*. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2007, **31** (1): 133~136
 - 21 Lü LL (吕林兰), Du XD (杜晓东), Wang Y (王嫣), Shi YH (石耀华), Wang AM (王爱民). Genetic diversity of three populations and the first generations of hybridization between different populations of pearl oyster *Pinctada martensii*(Dunker). *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2008, **32** (1): 26~32
 - 22 Pei Y (裴赢), Wang XH (王晓红), Zhang HQ (张恒庆). RAPD analysis for *Ruditapes philippinarum* along Dalian coast of Bohai Sea. *Fish Sci* (水产科学), 2006, **25** (5): 250~252
 - 23 Du XD (杜晓东), Deng YW (邓岳文), Ye FL (叶富良), Wang H (王辉). Genetic diversity of seven wild populations of *Meretrix meretrix*. *J Fish Sci China* (中国水产科学), 2004, **11** (1): 41~47
 - 24 Chen DP (陈大鹏), Shen HS (沈怀舜), Ding YP (丁亚平), Yang JX (杨家新), Shen SD (沈颂东), Xu P (许璞). Using inter-simple sequence repeats (ISSR) technique in two populations of *Meretrix meretrix*. *J Nanjing Norm Univ Nat Sci* (南京师大学报自然科学版), 2004, **27** (3): 75~78
 - 25 Yao ZL (么宗利), Zhou K (周凯), Lai QF (来琦芳), Wang H (王慧), Xia LJ (夏连军). Analysis of genetic variations of five geographical populations in *Cyclina sinensis* (Gmelin) of China by RAPD. *Mar Fish* (海洋渔业), 2005, **27** (2): 102~107
 - 26 Liu GX (刘广绪), Bao ZM (包振民), Hu JJ (胡景杰), Wang S (王师), Yao B (姚冰), Zhan AB (战爱斌). ISSR analysis of two species of scallop (*Chlamys farreri*, *C. nobilis*) and their intra and inter-species mating. *Periodical Ocean Univ China* (中国海洋大学学报), 2006, **36** (1): 71~75
 - 27 Thorp JP. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Annu Rev Ecol Syst*, 1982, **13** (1): 139~168