

研究报告

Research Report

细基江蓠繁枝变种(*Gracilaria tenuistipitata* var. *Liui*)群体遗传多样性的 ISSR 分析

戴晓玲 杨芳 介白飞 高扬 陈柏娟 张紫皇 李文红* 程光平*

广西大学动物科学技术学院, 南宁, 530005

* 通讯作者, whli66@163.com; cgp5@163.com

摘要 运用 ISSR 标记对来自深圳、北海和防城港的三个细基江蓠繁枝变种群体进行遗传多样性检测, 筛选出的 16 条 ISSR 引物共扩增出 111 条带, 引物平均多态位点比例为 54.95%。三个群体的多态位点比例深圳群体最高为 23.42%, 北海群体最低为 4.50%, 群体平均多态位点比例为 11.12%, 平均基因多样性(Hs)为 0.051 3, 表明细基江蓠繁枝变种群体遗传多样性较低。群体遗传分化指数为 0.756 5, 说明遗传变异主要存在于群体间且群体间的遗传分化水平较高。Mantel 检验发现遗传距离与地理距离无关。适应生态环境选择无性繁殖模式可能是细基江蓠繁枝变种群体遗传多样性较低、群体间遗传分化大的重要因素。

关键词 细基江蓠繁枝变种, 群体遗传多样性, ISSR

Population Genetic Diversity of *Gracilaria tenuistipitata* var *Liui* Detected by ISSR Markers

Dai Xiaoling Yang Fang Jie Baifei Gao Yang Chen Bojuan Zhang Zihuang Li Wenhong* Cheng Guangping*

College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning, 530005

* Corresponding authors, whli66@163.com; cgp5@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.033.000121

Abstract ISSR (inter-simple sequence repeats) markers were applied to study the genetic diversity of three *Gracilaria tenuistipitata* var *Liui* populations from Shenzhen, Beihai and Fangchengang. The sixteen selected ISSR primers amplified 111 bands with a average percentage of polymorphic loci of 54.95%. The percentage of polymorphic loci of three populations ranged from 23.42% to 4.50%, highest in the Shenzhen populations and lowest in the Beihai populations. The average polymorphic loci among populations was 11.12% and Hs was 0.051 3, that infers the genetic diversity of three *G. tenuistipitata* var *Liui* populations were low. The Nei's genetic differentiation index GST was 0.756 5, indicating that genetic variation mainly existed among populations and the level of genetic differentiation between populations was higher. The Mantel test showed that genetic distance was less correlated with geographic distance. Asexual reproduction might be one importance factor which cause low genetic diversity and high genetic differentiation among *G. tenuistipitata* var *Liui* populations.

Keywords *Gracilaria tenuistipitata* var *Liui*, Population genetic diversity, ISSR

细基江蓠繁枝变种(*Gracilaria tenuistipitata* var. *Liui*)是我国南方沿海海藻栽培的重要品种,它是细基江蓠生活在池塘中的生态型,属于红藻门(Rhodophyta)、真红藻纲(Florideae)、杉藻目(Gigartinales)、江蓠科(Gracilariaceae)、江蓠属(*Gracilaria*) (夏邦美, 2002)。

近年来,细基江蓠繁枝变种的应用已由原来的用于提取琼脂和作为鲍鱼饲料,发展到对富营养化海水养殖区生物修复等(潘江球和李思东, 2010)。有关细基江蓠繁枝变种营养生理和生态学的研究报道比较多(刘静雯, 2004; 黄鹤忠等, 2006; 李娟等, 2007; 蒋雯雯

基金项目: 本研究由广西自然科学基金(2013GXNSFDA019012)资助

等, 2010) ,但对南方沿海各地无序引种养殖和鲍鱼养殖场收购异地新鲜江蓠作为饵料造成的、不同地理分布的细基江蓠繁枝变种混杂引出的种质资源保护和合理利用问题关注较少。

遗传多样性是生态系统多样性和物种的重要组成部分,更是其主要研究内容之一。研究物种的遗传多样性,可为其保护和利用提供科学依据。自从 1999 年 Vis (1999)首次采用 ISSR 技术对美国的串珠藻 *Batrachospermum boryanum* 进行了种群内的遗传多样性分析以来,ISSR 已经被广泛应用于藻类遗传多样性检测中(李文红等, 2005; Zhao et al., 2007; 陈昌生等, 2008; 韩晓磊等, 2009; 乔坤等, 2010)。

本文运用 ISSR 分子标记技术对来源于北海、防城港和深圳海区的细基江蓠繁枝变种群体进行遗传多样性的初步检测,通过比较不同地理群体间遗传多样性的高低和遗传分化值,从 DNA 水平上揭示细基江蓠繁枝变种不同地理群体遗传变异的程度和变化模式,以达到了解广西和广东沿海细基江蓠繁枝变种群体种质资源现状的目的,为今后保护和合理利用江蓠种质资源提供参考依据。

1 结果与分析

1.1 ISSR 引物筛选和扩增结果

本实验所用的 ISSR 引物序列及其扩增结果见图 1 和表 1。从 22 个 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、多态性高、重复性好的 16 条引物用于 ISSR 分析。16 条 ISSR 引物共扩增出 111 个 DNA 片段,片段大小在 200~4 000 bp 之间,平均每条引物产生 7.0 条带,平均多态位点比例为 54.95%。

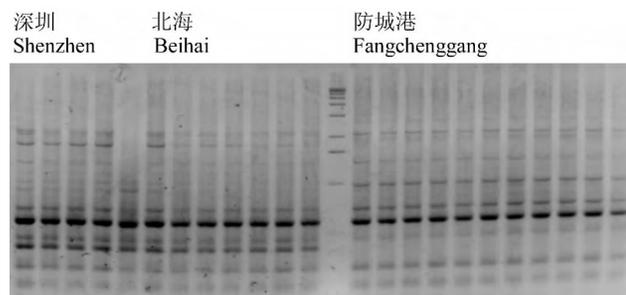


图 1 引物 S889 ISSR 扩增图谱

Figure 1 ISSR patterns of *G. tenuispititata* var *Liui* populations with primer S889

1.2 细基江蓠的遗传多样性

经过对细基江蓠繁枝变种群体 16 条 ISSR 引物进行扩增,其中 111 个扩增位点以及每条引物扩增

7.0 带,结果 ISSR 引物的平均多态位点比例为 54.95%。三个不同地方各群体遗传多样性见表 2。

从表 2 可见,深圳、北海和防城港三个细基江蓠繁枝变种群体水平的平均多态位点比例为 11.12%,平均基因多样性(H_s)为 0.0513。三个群体中深圳群体的遗传多样性最高,约是北海和防城港群体的 5 倍;北海和防城港群体间遗传多样性相近,三群体遗传多样性由高到低依次为:深圳、防城港、北海。

1.3 细基江蓠的遗传分化

实验结果表明,细基江蓠繁枝变种三个群体总的基因多样性(H_T)为 0.210 6,平均群体内基因多样性(H_s)为 0.051 3,基因分化系数 G_{ST} 是 0.756 5。ISSR 分析结果说明此物种 75.65% 遗传变异发生在群体间,25.35% 发生于群体内;不同地理群体间已发生明显遗传分化。其遗传距离和遗传相似性的 ISSR 检测结果见表 3。

表 3 中遗传距离和遗传相似性数据也表明,三个群体间遗传距离有差异,防城港和北海群体之间差异最大,北海和深圳群体间较接近。

1.4 聚类分析和 Mantel 检测结果

根据 ISSR 检测得到的遗传距离数据绘制的 UPGMA 聚类图见图 2。图 2 所示的聚类图中防城港群体自成一支,深圳和北海群体则聚集在一起。说明防城港群体和其它群体间亲缘关系较远,深圳、北海两群体之间亲缘关系较近。

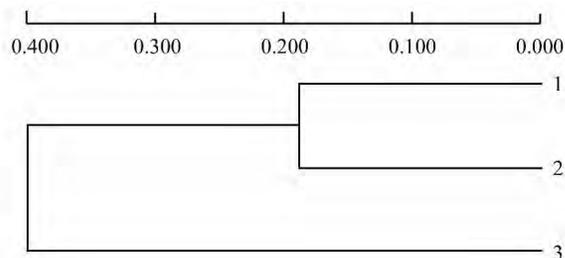


图 2 细基江蓠繁枝变种群体 UPGMA 聚类图

注: 1: 深圳群体; 2: 北海群体; 3: 防城港群体

Figure 2 The cluster of *G. tenuispititata* var *Liui* revealed by UPGMA from TFPGA 1

Note: 1: Shenzhen population; 2: Beihai population; 3: Fangchenggang population

运用 Mantel 检测群体间遗传距离和地理位置得出 r 为 -0.7613、 p 为 0.825 0~0.340 0、置换 824 次 $\geq z$ 339 次 $\leq z$ 。结合 UPGMA 聚类图和 Mantel 检测结果,说明细基江蓠繁枝变种群体的遗传距离和地理距离无相关。

表 1 ISSR 引物及其扩增结果

Table 1 The applied ISSR primers and amplified loci

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	ISSR 扩增片段数 The amplified band No. of ISSR			
		总位点数 The number of total locus	深圳种群 Shenzhen population	北海种群 Beihai population	防城港种群 Fangchenggang population
SP2	(GA) 7AC	4	3	3	3
SP3	(CA) 6GG	6	6	6	6
SP4	(GT) 6CC	10	8	8	10
SP5	(GAA) 6	5	5	5	3
SP6	(AAG) 7	5	3	3	4
S848	(CA) 8RG	9	6	5	2
S857	(AC) 8YG	7	6	5	4
S858	(TG) 8RT	6	4	4	5
S864	(ATG) 6	6	5	2	5
S873	(GACA) 4	7	5	4	7
S884	HBH (AG) 7	7	6	6	6
S840	(GA) 8YT	7	7	7	5
S835	(AG) 8YC	11	10	10	7
S889	BHB (GA) 7	9	9	8	7
S901	VHV (GT) 7	7	4	5	5
S902	BDB (CA) 7	5	5	4	5
合计 Total		111	92	85	84

表 2 各细基江蓠繁枝变种群体的基因多样性和多态位点比例

Table 2 The average heterozygosities and mean proportion of polymorphic loci among the populations of *G. tenuistipitata* var. *Liui*

	基因多样性 The average heterozygosities	多态位点比例(%) The mean proportion of polymorphic loci (%)
深圳群体 The group of Shenzhen	0.111	23.42
北海群体 The group of Beihai	0.020	4.50
防城港群体 The group of Fangchenggang	0.023	5.40
平均值 Average	0.051	11.12

表 3 群体间的遗传相似率和遗传距离

Table 3 The genetic identity and distance among populations of *G. tenuistipitata* var. *Liui*

项目 Project	深圳——北海 Shenzhen-Beihai	深圳——防城港 Shenzhen-Fangchenggang	北海——防城港 Beihai-Fangchenggang
遗传距离 Genetic distance	0.188 4	0.327 6	0.470 8
遗传相似性 Genetic similarity	0.828 3	0.720 7	0.624 5

2 讨论

2.1 影响细基江蓠繁枝变种遗传多样性的因素

多态位点比率和平均基因多样性是评价藻类种群遗传多样性高低的两个重要指标。陈昌生和章景

荣(1999)曾报道将 ISSR 运用于我国江蓠属海藻遗传变异检测,但其研究主要针对不同种江蓠进行遗传相似性的比较,未给出相应的群体遗传多样性数据。从表 4 列举的近年来部分大型藻类群体遗传多样性 ISSR 检测结果可知,常见大型海藻中,绿藻门的浒苔

表 4 ISSR 检测的部分藻类种群多态位点比率(P%)和基因多样性(H)

Table 4 The P% & H of alga with ISSR detection

藻类名称 The name of algae	多态位点比率(%) The ratio of polymorphic loci (%)	基因多样性(H) Genetic diversity (H)
龙须菜 <i>G. lemaneiformis</i>	8.47	0.040 0
浒苔 <i>Enteromorpha prolifera</i>	27.78	0.125 6
海黍子 <i>S. muticum</i>	61.50	0.220 3
鼠尾藻 <i>Sargassum thunbergii</i>	77.60	0.290 3
坛紫菜 <i>Porphyra haitanensis</i>	80.93	0.308 1
裙带菜 <i>Undaria pinnatifida</i>	96.59	0.332 3

(韩晓磊等, 2009)、褐藻门的鼠尾藻和海黍子(Zhao et al., 2007)以及红藻门的坛紫菜(陈昌生等, 2008)的多态位点比例介于 27.78%~80.93%之间, 基因多样性介于 0.125 6~0.308 1 之间, 江蓠属海藻龙须菜(李文红等, 2005)的多态位点比例和基因多样性分别为 8.47% 和 0.040, 本实验的结果细基江蓠繁枝变种的多态位点比例和基因多样性分别为 11.12% 和 0.051, 其群体遗传多样性与同属的龙须菜相近但明显低于浒苔、坛紫菜、鼠尾藻、海黍子和裙带菜。除了物种差别因素外, 可能和细基江蓠繁枝变种的繁育系统和对环境的适应有关。

2.1.1 繁育系统的影响

繁育系统是指代表所有影响后代遗传特性组成的有性特征的总和, 是群体遗传结构差异和物种水平上的遗传变异的最重要的营养因素之一。植物种群遗传多样性中, 异交为主的往往高于自交或近交为主的植物。坛紫菜、海黍子和浒苔的 ISSR 标记研究结果也证明了繁殖模式对群体遗传多样性的重要影响。如坛紫菜大部分为雌雄异体, 少数为雌雄同体, 且不具无性生殖, 长期异交的结果, 使得坛紫菜个体之间逐步分化, 遗传变异加大, 群体多态位点比例高达 80.93% (陈昌生和章景荣, 2008)。雌雄同体的褐藻海黍子其自交和近交概率较高, 群体多态位点比例是 61.50% (Zhao et al., 2007)。大部分江蓠属海藻为雌雄异株, 种内自交为主, 几乎没有种间杂交报道, 因此群体遗传多样性较低。

一般认为无性繁殖使一个种群内的多个个体保持遗传的同一性, 使生物体的基因型趋于纯合, 因此无性繁殖方式降低藻类种群的遗传多样性。细基江蓠

繁枝变型分枝繁杂、无固着器, 很难找到成熟的植株, 千百棵中偶尔发现 1~2 棵带有囊果的藻体, 繁殖方式主要是营养体繁殖, 藻体长到 10 cm 以上时, 藻枝容易断掉, 具有顶端细胞的断枝在水中不断分裂生长, 萌发成新枝长成新的藻体(陈昌生和章景荣, 1999)。这是因为海藻属于低等孢子植物, 具有多样繁殖方式, 为了适应环境条件的变化, 其会选择较合适的繁殖方式来维持其种群的存在和延续。Sosa 等(1998)对江蓠(*Gracilaria cervicornis*)三个种群遗传变异的研究结果支持无性繁殖导致遗传变异水平低的论点, 他在遗传多样性非常低的两个江蓠种群内没有采集到具有繁殖能力的四分孢子体。Peason 和 Murray (1997)发现红藻 *Lithothrix aspergillum* 南部种群进行有性繁殖, 表现为较高的种群内部遗传多样性, 而北部种群为无性繁殖, 种群内遗传多样性较低。和江蓠一样可以依靠孢子和配子进行繁殖, 营养繁殖的能力也很强的绿藻浒苔, 其 6 个地区群体的遗传多样性处于较低水平, 群体多态位点比例只有 27.78% (韩晓磊等, 2009)。

2.1.2 生态环境的影响

生态环境是物种的遗传多样性水平及分布的主要影响因素之一。在不同的生境条件下物种会面临不同的选择压力, 地理距离导致居群之间的分化和隔离差异, 因此较适应当地的生境条件的广布种通形成在遗传上有区别的不同生态型。江蓠为暖水性藻类, 在热带、亚热带及温带都可生长, 细基江蓠属于亚热带性类型, 一般生长在风浪较小, 潮流畅通、地势平坦的海区, 生活史中无性和有性世代交替。生长在干露的、平静的水塘中的细基江蓠, 由于水

塘生态因子的变化幅度相对较小,生长环境基质相对稳定,环境的异质性较小,所以形成了分支繁多、主要行营养繁殖的细基江蓠繁枝变种。细基江蓠繁枝变种作为细基江蓠的池塘生态型,其遗传多样性较细基江蓠小,RAPD 检测结果支持此观点(李文红等,2004)。Engelen 等(2005)对马尾藻的研究结果发现影响种群分布的一些环境因子(波浪,温度,盐分等)是影响藻类生长和遗传变异的重要因素。本研究江蓠样本的三个采样地点距离较远,如庄军莲等(2010)、黄小平等(2004)和黄强(2003)报道所示,各地温度和盐度年均变化幅度有一定差异,盐度年均值最高值为深圳大鹏湾 29.0,最低为北海 25.26,盐度相差 3.74;温度最高为北海 28.2℃,最低为防城港 16.5℃,相差 11.7℃。三个采样点存在明显的环境差异,我们推测生长环境因子的差别是造成深圳、北海和防城港三个细基江蓠繁枝变种群体遗传多样性差异的原因。

2.2 影响细基江蓠群体间的遗传分化的因素

虽然自交植物的总体遗传变异小,但群体间的分化大;以无性繁殖为主的物种的遗传变异也呈现相同趋势,因为无性繁殖的扩散距离有限,若有性繁殖弱,可导致群体间遗传分化增加。ISSR 分析结果揭示 75.65% 遗传变异发生在细基江蓠繁枝变种群体间也证实了这点。一般认为,群体遗传分化程度用群体间的遗传距离来衡量,地理距离与遗传距离呈正相关,遗传距离随着地理距离越远而变大,地理距离相隔越远,群体之间的遗传分化水平越高。但本实验的 Mantel 检验结果和近年来 ISSR 检测藻类遗传多样性的一些研究结果发现遗传距离与地理间隔没有相关性。如 Hall 和 Vis (2002)采用 ISSR 标记对美国红藻(*B. helminthosum*)的分析也发现种群的遗传变异与地理间隔没有相关性。韩晓磊等(2009)研究结果显示 6 个地区浒苔的 ISSR 亲缘关系与其地理距离的远近没有相关性。陈昌生等(2008)等也发现基于 ISSR 遗传距离的 UPGMA 聚类结果表明坛紫菜个

体并不按照其地理分布进行分群,而是随机分群的。

2.3 细基江蓠繁枝变种群体的采样策略问题

于洋和刘文胜(2010)在讨论无性系植物的空间遗传结构时认为:由于自交和无性繁殖的物种个体间的基因交流受到限制,而导致遗传变异的分布呈斑块状;同时群体内遗传变异因生境异质性而存在一定的空间分布格局。采样时,若选择的采样尺度太小,导致重复采样会低估植物的遗传多样性,若采样尺度太大,则不能了解植物的相关特征。在进行无性繁殖为主的植物遗传多样性研究中,选择适当的空间尺度进行合理取样是获取准确的遗传多样性数据的重要前提。

金燕和卢宝荣(2003)建议:自交为主的植物,由于变异多发生在群体间,采样时要尽量多取群体,每一群体内可以少取样。而异交植物,变异主要发生在群体内,因此群体内多取样,少取群体,例如采用间隔很大距离取样。在不知道某物种生物学特性和遗传背景的情况下,推荐对一个群体随机抽取 30 个左右样本。目前我们对细基江蓠繁枝变种群体中无性繁殖和有性繁殖的分配以及无性系结构的尺寸还不清楚,因此为了更精确地揭示无性系结构在群体遗传多样性评估中的影响程度,可以用多态性更高的分子标记(如 AFLP 和 SSR)揭示其无性系结构,取样需采用空间自相关分析的策略出发。

3 材料与方法

3.1 实验材料

本研究样品来自广东省深圳大鹏湾、北部湾海区北海竹林盐场和防城港江平海区,其样品来源详见表 5。以同一附着点为单位进行采样,游离藻体采用分隔距离法随机采样,实验用藻体均为无囊果的新鲜营养体。样品空运过程中一直保持新鲜,回实验室后放入灭菌的新鲜海水中进行室内暂养。实验前

表 5 细基江蓠繁枝变种采样地点
Table 5 Sampling sites of *G. tenuistipitata* var *Liui*

代号 Mark	采样地点 Location	经纬度 Longitude and latitude	DNA 样本数 The number of DNA sample
SZ	深圳大鹏湾 Shenzhen Dapeng Bay	22°33'N /114°30'E	6
BH	北海竹林海区 Beihai Zulinhai District	21°24' N /109°09' E	6
FCG	防城港江平海区 Fangchenggang Jiangpinghai District	21°34' N /108°11' E	12

取约 2 cm 长的幼嫩尖部,先用无菌海水进行冲洗,再在显微镜下用毛笔充分刷洗体表附生的杂藻,最后用无菌水清洗材料,吸干其体表水份后再称量,立即进行 DNA 的提取。

3.2 基因组DNA 的提取和检测

采用 CTAB 法进行细基江蓠繁枝变种基因组 DNA 提取。取新鲜幼嫩藻体 0.2 g 于液氮中充分研磨至粉末状,加 700 μ L CTAB (65 $^{\circ}$ C 预热)混匀后水浴 40~60 min。水浴后加 700 μ L 氯仿-异戊醇(24:1)混匀 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清加入 0.8 倍异丙醇(冷)缓慢混匀后 -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min,然后 12 000 r/min 离心 10 min,去上清得沉淀,沉淀用 70%乙醇(冷)洗涤 2 次,12 000 r/min 离心 3 min,去上清,室温下晾干沉淀。最后加 50 μ L RNase 溶解并于 -20 $^{\circ}$ C 保存使用。采用紫外分光光度计定量,含有溴化乙锭的 0.7%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA,紫外灯下观察拍照,用 λ Hind DNA 作为分子量标记。

3.3 ISSR 反应及其产物检测

使用 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪进行 ISSR 扩增。PCR 反应体系 25 μ L 包括:1 \times PCR Buffer, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μ mol/L 引物, 40 ng 模板 DNA, 1.0 U Taq 酶。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,按照不同引物的 Tm 值退火温度 48 $^{\circ}$ C/50 $^{\circ}$ C/53 $^{\circ}$ C/55 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 总共 32 个循环。最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应产物在含有溴化乙锭的 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳检测,用 100 bp 的 DNA Ladder 作为分子量标记,紫外灯下观察拍照。

3.4 数据分析

以 ISSR 扩增产生的电泳图谱中每一条带的迁移位置记为一个位点,用来估计基因型的信息。仅选择清晰重复性好且易于辨认的条带,而排出模糊不清或者无法准确标记的电泳条带,进行条带统计分析。所选位点的 DNA 多态性片段被标记为二进制的 1 (出现)和 0 (缺失)。得到的 0,1 数据矩阵用于群体遗传多样性的分析。

假定 Hardy-Weinberg 平衡,选用群体遗传分析软件 TPGA 1.3 (Miller, 1997)完成了如下的计算,用于种群遗传多样性的评估:(1)多态位点比率(P%),采用 99%的标准;(2)Nei 的平均基因多样性,即平均预期杂合度(H);(3)Nei's 非偏差遗传距离(D)和遗传相似性(I) (Nei, 1978);(4)依据遗传距离矩阵数据,通过

非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析得到相应的系统表征图。

基因分化系数 G_{ST} (Nei(1973))将总群体的基因多样性(H_T)分解为群体内基因多样性(H_S)和群体间基因多样性(D_{ST}):

$$H_T = H_S + D_{ST}, G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

其中 $H_S = 1 - (\sum J_i) / S$, J_i 是第 i 个群体内的基因一致性, S 为群体的数目。

作者贡献

通讯作者李文红和程光平负责实验指导及论文修改,戴晓玲第一作者,负责整个实验的具体实施及论文撰写;杨芳和介白飞负责辅助第一作者进行样品遗传多样性检测以及部分数据分析,高扬、陈柏娟和张紫皇负责不同地去江蓠样品的采集与培养,各作者均参与了本实验的具体实施工作。

致谢

感谢广西自然科学基金(2013GXNSFDA019012)对本研究工作的资助。

参考文献

- Chen C.S., Xie C.T., Ji D.H., Xu Y., and Guo L.C., 2008, Genetic diversity of wild population of *Porphyra haitanensis* based on ISSR analysis, *Shuichan Xuebao* (Journal of Fisheries of China), 32(5): 416-427 (陈昌生, 谢潮添, 纪德华, 徐燕, 郭留超, 2008, 野生坛紫菜种群遗传多样性的 ISSR 分析, 水产学报, 32(5): 416-427)
- Chen C.S., and Zhang J.R., 1999, A discussion on the techniques of artificial cultivation of *Gracilaria tenuistipitata* var *liui* in Fujian, *Jimei Daxue Xuebao* (Ziran Kexueban) (Journal of Jimei University (Natural Science)), 4(2): 65-71 (陈昌生, 章景荣, 1999, 福建省细基江蓠繁枝变型人工栽培的探讨, 集美大学学报(自然科学版), 4(2): 65-71)
- Engelen A.H., Aberg P., Olsen J.L., Breeman A.M., and Stam W. T., 2005, Effects of wave exposure and depth on biomass, density and fertility of the furoid seaweed *Sargassum polyceratum* (Phaeophyta, Sargassaceae), *Eur. J. Phycol.*, 40(2): 149-158
- Hall M.M., and Vis M.L., 2002, Genetic variation in *Batrachospermum helminthosum* (Batrachospermales, Rhodophyta) among and within stream reaches using intersimple sequence repeat molecular markers, *Phycol. Res.*, 50: 155-162
- Han X.L., Xu J.R., Wang J.H., Zhang T., Yang L.E., Mu X.W., Yao C.Y., and Xu P., 2009, Different regions of *Enteromorpha prolifera* analysis of genetic diversity of ISSR, *Changshu Ligong Xueyuan Xuebao* (Ziran Kexueban) (Journal of Changshu Institute of Technology (Natural Science)), 23(10):

- 57-60 (韩晓磊, 徐建荣, 汪洁华, 张涛, 杨立恩, 穆新武, 姚春燕, 许璞, 2009, 不同地区浒苔(*Enteromorpha prolifera*)群体遗传多样性的 ISSR 分析, 常熟理工学院学报(自然科学), 23(10): 57-60)
- Huang H.Z., Sun J.Y., He L.H., and Shen H., 2006, Physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under different levels of NO₃-N, Haiyang Kexue (Ocean Sciences), 30(11): 32-36 (黄鹤忠, 孙菊燕, 贺丽虹, 申华, 2006, 细基江蓠繁枝变型对水体硝态氮变化的生理响应, 海洋科学, 30(11): 32-36)
- Huang Q., ed., 2003, Monitoring and prediction of the marine environment, Beihai Yearbook, pp.218 (黄强, 编著, 2003, 海洋环境监测与预报, 北海年鉴, pp.218)
- Huang X.P., Yue W.Z., Li Y.H., Yi J.Q., Huang L.M., and Shen P.P., 2004, Environmental characteristics and evolvement in sea area around Pingzhou island of Dapeng bay, south China sea, Redai Haiyang Xuebao (Journal of Tropical Oceanography), 23(5): 72-80 (黄小平, 岳维忠, 李颖虹, 尹健强, 黄良民, 沈萍萍, 2004, 大鹏湾平洲岛附近海域生态环境特征及其演变过程, 热带海洋学报, 23(5): 72-80)
- Jiang W.W., Tian X.L., Dong S.L., Wang Q.L., and Li Y., 2010, Effects of nutrient concentration changes on growth, biochemical compositions and physiology of *Gracilaria lichenoides* and *G. tenuistipitata* var. *Liui*, Zhongguo Haiyang Daxue Xuebao (Periodical of Ocean University of China), 40 (S): 83-90 (蒋雯雯, 田相利, 董双林, 王青林, 李英, 2010, 营养盐浓度变动对菊花江蓠和细基江蓠繁枝变型生长, 生化组成及生理的影响研究, 中国海洋大学学报, 40(S): 83-90)
- Jin Y., and Lu B.R., 2003, Sampling strategy for genetic diversity, Shengwu Duoyangxing (Biodiversity Science), 11(2): 155-161 (金燕, 卢宝荣, 2003, 遗传多样性的取样策略, 生物多样性, 11(2): 155-161)
- Li J., Huang L.F., Guo F., Cai A.Y., and Zheng L., 2007, Absorption of N, P Nutrients by *Gracilaria tenuistipitata* and its resistant effect on the outbreak of red tide, Xiamen Daxue Xuebao (Journal of Xiamen University (Natural Science)), 46(2): 221-225 (李娟, 黄凌风, 郭丰, 蔡阿员, 郑颖, 2007, 细基江蓠对氮, 磷营养盐的吸收及其对赤潮发生的抑制作用, 厦门大学学报(自然科学版), 46 (2): 221-225)
- Li W.H., Hu Z.M., Qin Z.B., Guo Y.F., Wang R.C., and Duan D.L., 2004, RAPD detection and ITS sequences analysis of *Gracilaria tenuistipitata* and *G. tenuistipitata* var. *liui*, Haiyang Xuebao (Acta Oceanologica Sinica), 6: 89-95 (李文红, 胡自民, 覃志彪, 郭亚芬, 王如才, 段德麟, 2004, 细基江蓠(*Gracilaria tenuistipitata*)和细基江蓠繁枝变种(*Gracilaria tenuistipitata* var. *Liui*)的 RAPD 和 ITS 分析, 海洋学报, 6: 89-95)
- Li W.H., Yao J.T., Wang J.C., Wang R.C., and Duan D.L., 2005, ISSR analysis of wild and selected strains of *Gracilaria lemaneiformis* (rhodophyta), Haiyang Yu Huzhao (Oceanologia Etlimnologia Sinica), 36(3): 241-247 (李文红, 姚建亭, 王继成, 王如才, 段德麟, 2005, 龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*)选育品系及其野生型的 ISSR 指纹分析, 海洋与湖沼, 36(3): 241-247)
- Liu J.W., Dong S.L., and Feng L.J., 2004, Physiological and ecological response of stress *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* to ipon stress, Haiyang Yu Huzhao (Oceanologia Etlimnologia Sinica), 35(2): 167-175 (刘静雯, 董双林, 冯丽洁, 2004, 细基江蓠繁枝变型(*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*)铁限制的生理生态学反应, 海洋与湖沼, 35(2): 167-175)
- Pan J.Q., and Li S.D., 2010, New progress in the development and utilization of resources of *Gracilaria*, Redai Nongye Kexue (Tropical Agricultural Science), 30(10): 47-50 (潘江球, 李思东, 2010, 江蓠的资源开发利用新进展, 热带农业科学, 30(10): 47-50)
- Peason E.A., and Murray S.N., 1997, Patterns of reproduction, genetic diversity and genetic differentiation in California populations of the *Geniculate coralline* alga *Lithothrix aspergillum* (Rhodophyta), J. Phycol., 33(5): 753-763
- Qiao K., Li S.G., Li H.Y., and Hou H.S., 2010, Genetic diversity analysis on cultivated *Undaria pinnatifidain* dalian coastal areas by ISSR marker, Haiyang Yuye (Marine Fisheries), 32 (2): 113-117 (乔坤, 李世国, 李洪艳, 侯和胜, 2010, 大连海域养殖裙带菜遗传多样性的 ISSR 分析, 海洋渔业, 32(2): 113-117)
- Sosa P.A., Valero M., Batista F., and Gonzalez-Pérez M.A., 1998, Genetic structure of natural populations of *Gelidium* species: A re-evaluation of results, J. Appl. Phycol., 10(3): 279-284
- Vis M.L., 1999, Inter-simple sequence repeats (ISSR) molecular markers to distinguish gametophytes of *Batrachospermum boryanum* (Batrachospermales, Rhodophyta), Phycologia, 38 (1): 70-73
- Xia B.M., ed., 2002, Chinese algae flora, Science Press, Beijing, China, pp.5-145 (夏邦美, 主编, 2002, 中国藻类志, 科学出版社, 中国, 北京, pp.5-145)
- Yu Y., and Liu W.S., 2010, Spatial genetic structure of clonal plant, Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agriculture Science), 38(5): 2226-2228, 2238 (于洋, 刘文胜, 2010, 克隆植物的空间遗传结构, 安徽农业科学, 38(5): 2226-2228, 2238)
- Zhao F.J., Wang X.L., Liu J.D., Duan D.L., 2007, Population genetic structure of *Sargassum thunbergii* (Fucales, Phaeophyta) detected by RAPD and ISSR markers, J. Appl. Phycol., 19(5): 409-416
- Zhuang J.L., Xu M.B., Zhang R.C., Jiang F.J., Wang Y.B., and He B.J., 2010, Anniversary variation of phytoplankton abundance in Fangchenggang bay of Guangxi, Guangxi Kexue (Guangxi Sciences), 17(4): 387-390, 395 (庄军莲, 许铭本, 张荣灿, 姜发军, 王一兵, 何碧娟, 2010, 广西防城港湾浮游植物数量周年变化特征, 广西科学, 17(4): 387-390, 395)