

# 海南岛海菖蒲种群克隆多样性和遗传结构

蒋凯<sup>1,2\*</sup> 高辉<sup>1</sup> 陈小勇<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>华东师范大学生态与环境科学学院/上海市城市化生态过程与生态恢复重点实验室,上海 200241; <sup>2</sup>上海辰山植物园/中国科学院上海辰山植物科学研究中心,上海 201602)

**摘要** 海草是生长在潮间带和潮下带的单子叶植物,由海草植物组成的海草床是生态系统服务价值最高的生态系统之一。然而,近几十年人类活动干扰、全球气候变化等因素导致海草床衰退严重。海菖蒲是分布于热带、体型最大的雌雄异株海草,我国位于该物种的分布北缘,本文对其克隆多样性和遗传结构进行研究,以期为该海草的保护提供参考。采用4对多态微卫星标记对采自海南岛4个地点的现存海菖蒲种群的样品进行基因型分型。结果表明:海菖蒲种群克隆多样性和遗传多样性较低,这与所研究种群处于分布区北缘有关;种群间遗传分化值范围较大(0.073~0.309),这可能是由于分布于不同港湾的种群间距离范围较大以及局域绝灭/再拓殖的遗传漂变效应所致;各种群未发现近期经历种群瓶颈的信号,很可能是由于种群内遗传多样性已经很低,种群减小未能导致遗传多样性明显降低。根据种群遗传特征,提出了重点保护种群的建议。鉴于目前我国海菖蒲等海草快速衰退的局面,应强化海草保护并实施海草床生态恢复。

**关键词** 海菖蒲; 微卫星; 克隆多样性; 遗传多样性; 遗传分化

**Clonal diversity and genetic structure of *Enhalus acoroides* populations along Hainan Island, China.** JIANG Kai<sup>1,2\*</sup>, GAO Hui<sup>1</sup>, CHEN Xiao-yong<sup>1</sup> (<sup>1</sup>School of Ecological and Environmental Sciences/Shanghai Key Laboratory of Urban Ecological Processes and Eco-Restoration, East China Normal University, Shanghai 200241, China; <sup>2</sup>Shanghai Chenshan Botanical Garden/Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201602, China).

**Abstract:** Seagrasses are monocotyledons that grow in intertidal and subtidal zones. Seagrass beds are among ecosystems with the highest ecosystem service value. However, seagrass beds are rapidly decline due to anthropogenic disturbances and global climate change. *Enhalus acoroides*, a monoecious perennial species, is the largest seagrass in stature. It distributes in tropical regions, with Hainan Island as its northern limits. Clonal diversity and genetic structure of *E. acoroides* populations in Hainan Island were studied to facilitate its conservation and restoration. We used four polymorphic microsatellites to genotype samples collected from four extant populations. We found low clonal and genetic diversities within populations, consistent with the expectations of genetic structure in edge populations. A large range of genetic differentiation was found between these four populations, probably due to the large range of geographic distances between them and genetic drift by local extinction and recolonization. We found no sign of recent bottlenecks in all the populations, probably due to the within-population genetic diversity being too low to show obvious reduction even after bottlenecks. We proposed suggestions on population conservation for those with high priority. Given that seagrass bed had experienced rapid decline in recent years, strengthened conservation and ecological restoration are urgently needed.

**Key words:** *Enhalus acoroides*; microsatellite; clonal diversity; genetic diversity; genetic differentiation.

本文由科技部科技基础性工作专项(2014FY130300)资助 This work was supported by the National Key Basic Research Special Foundation of China (2014FY130300).

2017-08-25 Received, 2017-12-15 Accepted.

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jiangkai@csnbgsh.cn

海草是生长在沿海潮间带和潮下带的单子叶植物,它们可以在水中或水面完成开花、授粉和种子传播<sup>[1]</sup>.由一种或多种海草植物组成的海草床与红树林、珊瑚礁是海洋中最重要的三大生态系统,海草床是单位面积生态系统服务价值最高的生态系统之一,达 19000 美元·hm<sup>-2</sup><sup>[2]</sup>.海草床在海洋环境中的营养物质和能量循环、海洋沉积物固定以及全球碳固定中具有重要作用<sup>[3-4]</sup>,此外还为许多海洋动物提供栖息场所和食物<sup>[5]</sup>.然而自 1990 年以来,随着人类活动干扰加剧、全球气候变暖、极端天气肆虐、海洋酸化等的影响,全球海草床以每年 7% 的速率减少,至 10 年前已有大约 29% 的海草床消失<sup>[6]</sup>.不仅如此,全世界约有 14% 的海草植物正处于灭绝风险的边缘<sup>[7]</sup>.越来越多的沿海国家开始意识到海草生态系统在海洋生态环境保护中的重要性,纷纷设立海草保护区,并对保护区内的海草进行监测<sup>[8]</sup>、种类调查<sup>[9]</sup>和恢复重建等<sup>[10]</sup>.

对海草的保护主要有两种方式:设立海草保护区的就地保护和移植至他处的迁地保护.海草保护区的建立能够为海草床生态系统的保护和恢复提供重要的支持与保障,而对特定海草植物的保护则需要了解其遗传变异的分布及受胁迫程度.遗传多样性不仅反映适应环境变化的潜力,也具有促进初级生产力、增强抗干扰能力和种群恢复能力等即时效应<sup>[11]</sup>.总体而言,遗传多样性高的种群保护价值往往也较高.已有研究表明,考虑种群遗传组成的生态恢复措施可以提高恢复的成功率<sup>[12-13]</sup>.因此,了解种群遗传结构可以为合适的保护和成功的生态恢复提供重要信息.

海菖蒲(*Enhalus acoroides*)是植株个体最大的海草植物,生长在热带海洋潮间带的泥质、珊瑚砂和粗糙的珊瑚碎石基质上.该物种广泛分布于印度洋-西太平洋区域,我国处于其分布区北缘,仅在海南岛东海岸港口和海湾内存在<sup>[14]</sup>.海菖蒲为雌雄异

株<sup>[15]</sup>,其传粉方式比较特别:雄花在水面下释放出花粉,花粉浮至水面,随海流和波浪传播到达在海面上开放的雌花<sup>[16]</sup>.与其他海草植物一样,海菖蒲可以通过根状茎进行克隆生长,但根状茎节间长很短,仅为 5 mm,水平扩张速率慢(0.9~5 cm·a<sup>-1</sup>)<sup>[17]</sup>.我们此前开发并报道了海菖蒲的微卫星标记<sup>[18]</sup>,本研究利用这些标记对采自中国海南岛的海菖蒲个体进行基因型分型,分析种群克隆和遗传多样性以及遗传分化,据此提出一些建议,以为海菖蒲的保护提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 研究地点和样品采集

海菖蒲样品于 2008 年 7 月采自海南岛陵水县的黎安港(LA)和新村港(XC)、琼海市的龙湾港(LW)和潭门港(TM)(图 1,表 1).每个种群不少于 10 个样品,共采集到 135 个样品.新鲜叶片经淡水冲洗、擦净后置于硅胶中快速干燥、贮存备用.采样信息见表 1.

### 1.2 样品基因组 DNA 提取和基因型分型

称取干燥样品 35 mg 左右,采用植物基因组提取试剂盒(天根)提取总 DNA.取 3 μL DNA 原液用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,根据检测结果用 TE 稀释至适当浓度以备后续 PCR 扩增.使用 4 个微卫星位点对 135 个样品进行扩增,PCR 反应体系和反应条件与 Gao 等<sup>[18]</sup>的相同,PCR 产物采用 DNA 序列分析仪(ABI3730)进行片段长度扫描.

### 1.3 数据分析

**1.3.1 克隆鉴别** 所有的海草植物都能进行克隆繁殖<sup>[11]</sup>,形成基因型(multilocus genotype, MLG)相同的分株.我们采用  $P_{sex}$  来判断具有相同基因型的个体是否属于相同的克隆.当  $P_{sex} > 0.01$  时,则认为相同的 MLG 为同一个克隆.在种群遗传统计分析时仅使用其中一个 MLG 进行分析<sup>[19]</sup>.

表 1 海南岛海菖蒲种群的采样信息

Table 1 Sampling information of the *Enhalus acoroides* populations along Hainan Island

| 地点<br>Site | 地理位置<br>Coordinate        | 采样间隔<br>Interval of<br>samples (m) | 样品数<br>Number of<br>samples | 种群面积<br>Population area<br>(hm <sup>2</sup> ) | 其他混生海草<br>Other<br>seagrasses |
|------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------|
| LW         | 19°17'5" N, 110°38'14" E  | >2                                 | 11                          | <1  | Cr, Th, Ho                    |
| TM         | 19°14'31" N, 110°37'31" E | >20                                | 29                          | <1  | Th                            |
| LA         | 18°24'48" N, 110°3'28" E  | >20                                | 41                          | 38  | Cr, Th                        |
| XC         | 18°24'7" N, 109°59'4" E   | >20                                | 53                          | 120   | Cr, Th, Ho, Hp                |

LW: 龙湾港 Longwan Harbor; TM: 潭门港 Tanmen Harbor; LA: 黎安港 Li'an Harbor; XC: 新村港 Xincun Harbor; Cr: 圆叶丝粉草 *Cymodocea rotundata*; Th: 泰来草 *Thalassia hemperichii*; Ho: 卵叶喜盐草 *Halophila ovalis*; Hp: 羽叶二药草 *Halodule pinifolia*. 下同 The same below.

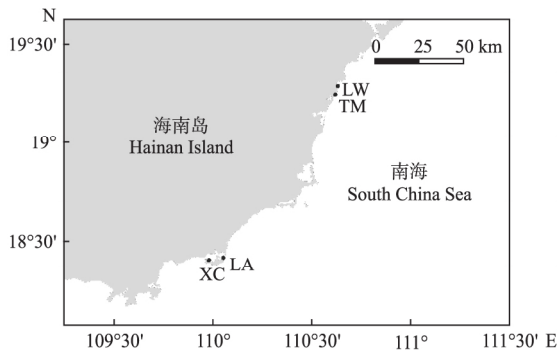


图 1 4 个海菖蒲种群分布

Fig.1 Distribution of the four *Enhalus acoroides* populations.

LW: 龙湾港 Longwan Harbor; TM: 潭门港 Tanmen Harbor; LA: 黎安港 Li'an Harbor; XC: 新村港 Xincun Harbor. 下同 The same below.

**1.3.2 连锁不平衡和哈迪-温伯格 (Hardy-Weinberg) 平衡检验** 采用 FSTAT v2.9.3.2<sup>[20]</sup> 检验位点间连锁不平衡, 利用 TFGPA v1.3<sup>[21]</sup> 中的精确检验法 (Fisher's exact test) 检验各位点是否符合哈迪-温伯格平衡。

**1.3.3 克隆多样性和遗传多样性分析** 用 GenClone v2.0 计算多位点基因型数 (number of multilocus genotypes,  $G$ )、克隆丰富度 (clonal richness,  $P_d$ )<sup>[22]</sup>、辛普森多样性互补指数 (complement of Simpson index,  $D^*$ ) 和辛普森均匀度互补指数 (complement of Simpson evenness index,  $ED^*$ )<sup>[19]</sup>。

采用种群总等位基因数 (total number of alleles,  $A$ )、等位基因丰富度 (allele richness,  $A_R$ )、期望杂合度 (expected heterozygosity,  $H_E$ ) 和观察杂合度 (observed heterozygosity,  $H_O$ ) 等指标衡量种群遗传多样性。排除属于相同克隆的分株后, 利用 TFGPA v1.3<sup>[21]</sup> 计算相关指标。在 FSTAT v2.9.3.2<sup>[20]</sup> 中经过 1000 次模拟来检验近交系数 (inbreeding coefficient,  $F_{IS}$ ) 是否显著偏离 0。

**1.3.4 种群瓶颈的检验** 使用 BOTTLENECK v1.2.02<sup>[23]</sup> 检验各种群是否经历近期瓶颈。计算中采用 TPM (two-phase model of mutation) 模型, 该模型介于无限等位基因模型 (infinite allele model) 和逐步突变模型之间, 比较适合微卫星数据<sup>[24]</sup>。使用 Wilcoxon 符号秩检验 (Wilcoxon sign rank test) 进行分析, 这一方法对于采样面积较小的种群具有很强的统计能力<sup>[25]</sup>。

**1.3.5 聚类分析** 采用 Structure v2.3<sup>[26]</sup> 对 4 个种群进行聚类分析, 推断种群遗传结构及每个个体在种群中分布的概率。首先, 在软件中设置  $K=1$  到  $K=7$ , 然后基于以上设置的  $K$  值对微卫星数据分别进行

迭代长度为  $1 \times 10^5$ 、MCMC (Markov chain Monte Carlo approach) 为  $1 \times 10^6$  次运算, 计算时选择混合模型。使用 Evanno 等<sup>[27]</sup> 的方法得出最优类群数  $K$ , 然后采用最优  $K$  值对海南岛 4 个种群进行划分。

**1.3.6 种群遗传分化** 使用 Weir 和 Cockerham 提出的参数  $\theta$ <sup>[28]</sup> 计算种群间遗传分化程度 ( $F_{ST}$ )。微卫星标记多态性高  $F_{ST}$  往往低估种群间遗传分化, 因此, 我们使用 RecordData 软件<sup>[29]</sup> 将数据转换之后计算出种群间遗传分化最大值  $F_{STmax}$ , 使用  $F_{ST}/F_{STmax}$  得到标准  $F_{ST}'$ 。此外, 我们采用 GenAlEx v6.51<sup>[30]</sup> 计算种群间的  $D_{EST}$  值。使用软件 GenAlEx v6.51 中的 AMOVA 方法分析海南岛海菖蒲种群遗传分化的等级结构; 运用其中的主坐标分析法分别基于个体和种群等位基因频率数据进行分析, PCoA 能够很直观地说明种群间遗传变异分化格局。

## 2 结果与分析

采用 4 个微卫星位点对 135 个个体进行 PCR 扩增, 其中有 116 个个体获得了清晰的扩增产物和可信的片段扫描峰图。在 4 个种群中共有 11 个等位基因、29 种不同的基因型, 其中 13 种基因型只存在于黎安港, 6 种基因型只存在于新村港, 3 种基因型只存在于潭门港, 龙湾港没有私有基因型, 另外 7 种基因型为不同种群间共享。在成功测得基因型的 116 个个体中有 2 个相同的基因型源于不同的有性繁殖事件 ( $P_{sex} < 0.01$ )。

连锁不平衡检验显示位点间均不存在显著的连锁关系, 哈迪-温伯格平衡检验结果表明, 位点 EA970 在黎安港种群显著偏离哈迪-温伯格平衡, 而在其余 3 个种群为单态。

从表 2 可以看出, 新村港 (XC) 种群克隆丰富度最小 (0.224), 最大的为龙湾港 (LW) 种群 (0.571)。辛普森多样性互补指数 ( $D^*$ ) 最小为 0.842 (TM), 最大的为 0.938 (LA)。黎安港 (LA) 种群有 1 个私有等位基因, 其他种群不存在私有等位基因。这 4 个种群等位基因丰富度差异不大, 最大为 2.202 (LA)。观察和期望杂合度都较低, 观察杂合度最大的为 0.272 (LA), 最小的为 0.225 (LW)。种群间的期望和观察杂合度的差异较小, 最大的期望杂合度为 0.326 (LA), 最小的期望杂合度为 0.211 (LW)。所有种群的近交系数均未显著偏离 0。

种群间遗传分化系数 ( $F_{ST}$ ) 为 0.177, 标准化遗传分化系数 ( $F_{ST}'$ ) 为 0.243,  $D_{EST}$  值为 0.059。两种群间的遗传分化系数为 0.073~0.309, 其中龙湾港

表 2 海南岛海菖蒲种群的克隆结构和遗传组成

Table 2 Clonal structure and genetic composition of *Enhalus acoroides* populations along Hainan Island

|    | 克隆多样性 Clonal diversity |          |                      |                      |                       | 遗传组成 Genetic composition |                      |                       |          |                      |                      |
|----|------------------------|----------|----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|-----------------------|----------|----------------------|----------------------|
|    | <i>N</i>               | <i>G</i> | <i>P<sub>d</sub></i> | <i>D<sup>*</sup></i> | <i>ED<sup>*</sup></i> | <i>H<sub>E</sub></i>     | <i>H<sub>O</sub></i> | <i>F<sub>IS</sub></i> | <i>A</i> | <i>A<sub>R</sub></i> | <i>P<sub>A</sub></i> |
| LW | 8                      | 5        | 0.571                | 0.893                | 0.833                 | 0.211                    | 0.225                | -0.010                | 7        | 1.743                | 0                    |
| TM | 23                     | 6        | 0.318                | 0.842                | 0.813                 | 0.233                    | 0.226                | 0.049                 | 8        | 1.723                | 0                    |
| LA | 36                     | 19       | 0.514                | 0.938                | 0.833                 | 0.326                    | 0.272                | 0.179                 | 11       | 2.202                | 1                    |
| XC | 50                     | 12       | 0.224                | 0.847                | 0.836                 | 0.251                    | 0.256                | -0.008                | 8        | 1.713                | 0                    |

*N*: 样本数 Number of samples; *G*: 多位点基因型数 Number of multilocus genotypes; *P<sub>d</sub>*: 克隆丰富度 Clonal richness; *D<sup>\*</sup>*: 辛普森多样性互补指数 Complement of Simpson index; *ED<sup>\*</sup>*: 辛普森多样性均匀度指数 Simpson evenness index; *H<sub>E</sub>*: 期望杂合度 Expected heterozygosity; *H<sub>O</sub>*: 观察杂合度 Observed heterozygosity; *F<sub>IS</sub>*: 近交系数 Inbreeding coefficient; *A*: 种群总的等位基因数 Total number of alleles; *A<sub>R</sub>*: 等位基因丰富度 Allelic richness; *P<sub>A</sub>*: 私有等位基因 Private allele.

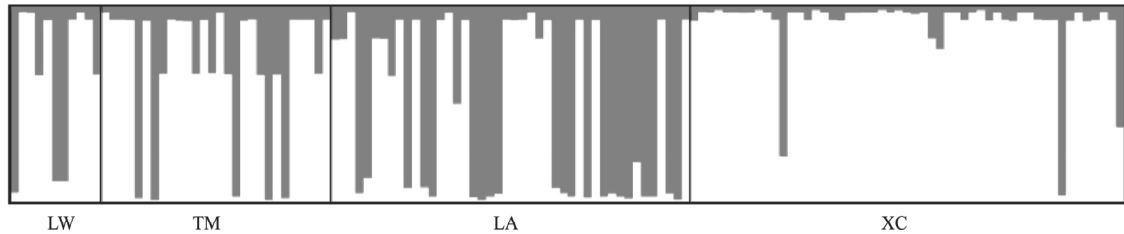


图 2 海南岛 4 个海菖蒲种群个体基因聚类分析结果

Fig. 2 Genetic cluster results of the four *Enhalus acoroides* populations along Hainan Island.

(LW) 和潭门港 (TM) 种群之间的遗传分化系数最小 (0.073), 潭门港 (TM) 和新村港 (XC) 之间的遗传分化系数最大 (0.309). AMOVA 分析表明, 种群间的差异能够解释约 15% 的分子变异 (表 3).

表 3 海南岛海菖蒲种群的 AMOVA 分析

Table 3 AMOVA analysis of *Enhalus acoroides* populations along Hainan Island

| 变异来源<br>Source of variance | 自由度<br><i>df</i> | 变异<br>Variance | 总变异百分比<br>Percentage of total variance |
|----------------------------|------------------|----------------|--|
| 种群间<br>Among populations   | 3                | 0.116          | 15                                     |
| 种群内<br>Within populations  | 268              | 0.674          | 85                                     |
| 总体<br>Total                | 271              | 0.790          | 100                                    |

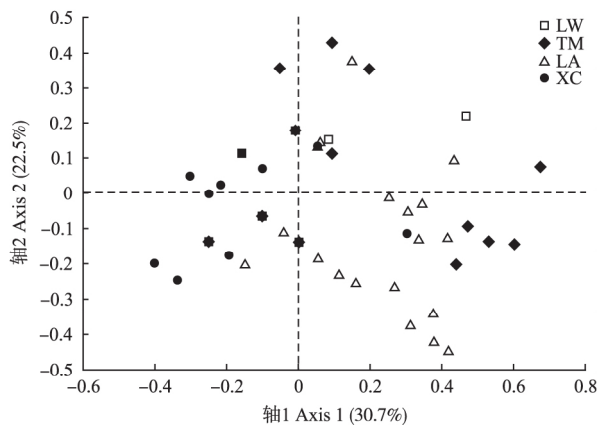


图 3 海南岛 4 个海菖蒲种群基于遗传距离的主坐标分析 (PCoA)

Fig. 3 Analysis of PCoA based on genetic distance of the four *Enhalus acoroides* populations along Hainan Island.

使用 4 个微卫星位点对海南岛 4 个海菖蒲种群进行聚类分析, 得到的最佳 *K* 值为 2 ( $\Delta K$  值最大时的 *K* 值). 使用最佳 *K* 值模拟后得到的结果表明, 除新村港 (XC) 外, 其他 3 个种群混杂较严重 (图 2). 主坐标分析得到类似结果 (图 3).

### 3 讨论

#### 3.1 种群遗传多样性

本研究中的 4 个海菖蒲种群的克隆多样性和遗传多样性均较低, 也低于目前已研究的其他海草植物<sup>[31-33]</sup>. 很低的遗传多样性与本文所研究的种群位于该物种分布区边缘有关. 海菖蒲是典型的热带分布种类, 我国海南位于其分布区北缘. 一般而言, 处于分布区边缘的种群较小, 常经历局域灭绝/再拓殖, 与其他种群的隔离程度较高, 因而具有较低的遗传多样性. 这一结论也与 Nakajima 等<sup>[34]</sup> 的结果一致. 他们采用微卫星标记研究了东南亚海菖蒲种群遗传多样性, 发现处于北缘种群的遗传多样性显著较低.

尽管本文所研究的海菖蒲种群遗传多样性很低, 却未检测到显著的近期种群瓶颈信号. 通常情况下, 说明这些种群近期未经历过较大的波动, 或种群波动发生在较远时期, 等位基因数目的下降与杂合度的降低达到了新的平衡<sup>[35]</sup>. 然而, 在本研究中, 则很可能是由于种群内遗传多样性很低, 并且私有等位基因很少, 即使种群大小经历较大的波动, 那些个

体共有的等位基因并不会随着某些个体的丢失而丢失,因此遗传多样性也不会有大的变化。

4 个种群间的遗传分化值范围较大(0.073 ~ 0.309) 处于不同港湾的种群间遗传分化很大。海菖蒲花和种子扩散距离较远,最远可达 63.5 ~ 400 km<sup>[36]</sup>。不同港湾间最短海面距离约 120 km,理论上应能在港湾间扩散。然而海菖蒲分布在港湾内,港湾独特的地理环境和区域的海流可能不利于这两个港湾间直接的花粉和种子扩散。此外,处于分布区边缘的种群间隔离较大,基因流较小,加上伴随局域绝灭/再拓殖的遗传漂变效应,因而边缘种群间的遗传分化较大。

值得注意的是,相距较远的新村港(XC)/黎安港(LA)与潭门港(TM)/龙湾港(LW)之间有 7 个共享基因型,这可解释为它们之间存在通过克隆片段的长距离扩散。考虑到海南海菖蒲分布港湾独特的地理环境和复杂的海流方向,克隆片段很难在海流作用下漂流很长的距离且仍具有活力;但不同港口间运输货船的压舱水可能携带海菖蒲克隆片段,进而导致这些克隆片段在港湾间扩散。如果这种情况成立,那么这些种群间的遗传分化应该很小;然而较高的遗传分化系数显示种群间的基因流较低,这表明另一种情形的可能性很大,即通过有性繁殖使得不同种群形成具有相同基因型的个体。由于 4 个位点在海南海菖蒲种群中的多态性低,等位基因数目少,通过有性繁殖(减数分裂、基因重组)产生的不同个体也可以具有相同的基因型。

### 3.2 对海菖蒲保护的建议

海菖蒲是生长缓慢的大型海草,生态系统服务价值高,对于生态环境保护具有很好的标志性意义。我国海南现存海菖蒲种群遗传多样性很低,应对变化环境的能力较差;此外,海南又处于海菖蒲分布区的北缘,缺少可供选择的迁地保护地点,因此需要加强现存种群的就地保护。

分布于黎安港(LA)、新村港(XC)的海菖蒲种群具有相对较高的克隆多样性和遗传多样性,其中黎安港含有 1 个私有等位基因。因此,从种群遗传来看,黎安港(LA)和新村港(XC)的海菖蒲种群更具保护价值,应优先保护。海南省人民政府于 2009 年批准建立了新村港与黎安港海草特别保护区,保护区的建立有助于对包括海菖蒲在内的海草的保护。然而遗憾的是,近年来海南经济发展加剧了海草床的衰减,即使是位于保护区内也难以幸免。以新村港为例,本研究 2008 年采样期间,海水养殖面积尚不

大,海草床面积大、种类多,除海菖蒲外,还有圆叶丝粉草(*Cymodocea rotundata*)、泰来草(*Thalassia hemperichii*)、卵叶喜盐草(*Halophila ovalis*)和羽叶二药草(*Halodule pinifolia*)等,海草密度高、生长状况良好。2015 年 10 月再次调查时,海水养殖覆盖面积大幅增大,水体富营养化严重,海草床严重衰退,几乎没有连续分布的海草,耐污能力较强的海菖蒲密度也很低,羽叶二药草已很少,其他海草植物甚至已经难觅踪迹。因此,加强对海草的保护力度刻不容缓<sup>[37]</sup>。

龙湾港(LW)和潭门港(TM)海菖蒲分布面积较小,克隆多样性和遗传多样性相对较低,局域绝灭风险较高,因而亟需保护,建议尽快设立海草保护区,加强对海菖蒲和其他海草的保护。此外,也需通过生态恢复措施,扩大海菖蒲等海草床的面积。比如,可以从黎安港(LA)适当迁入一些海菖蒲个体到龙湾港(LW)和潭门港(TM),增加这两个海菖蒲种群的克隆多样性和遗传多样性水平,通过两个主要分布区域间的联动,降低我国海菖蒲种群局域绝灭风险。

### 参考文献

- [1] Huang X-P (黄小平), Huang L-M (黄良民), Li Y-H (李颖虹), et al. The Study on the Seagrass in South China Sea. Guangzhou: Economic Press, 2007 (in Chinese)
- [2] Costanza R, d'Arge R, De Groot R, et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 1997, **387**: 253-260
- [3] Qiu G-L (邱广龙), Lin X-Z (林幸助), Li Z-S (李宗善), et al. Seagrass ecosystems: Contributions to and mechanisms of carbon sequestration. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2014, **25**(6): 1825-1832 (in Chinese)
- [4] Duffy JE. Biodiversity and the functioning of seagrass ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*, 2006, **311**: 233-250
- [5] Heck KL Jr, Hays G, Orth RJ. Critical evaluation of the nursery role hypothesis for seagrass meadows. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, **253**: 123-136
- [6] Waycott M, Duarte CM, Carruthers TJ, et al. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, **106**: 12377-12381
- [7] Short FT, Polidoro B, Livingstone SR, et al. Extinction risk assessment of the world's seagrass species. *Biological Conservation*, 2011, **144**: 1961-1971
- [8] Coles R, McKenzie L, De'ath G, et al. Spatial distribution of deepwater seagrass in the inter-reef lagoon of the Great Barrier Reef World Heritage Area. *Marine Ecology Progress Series*, 2009, **392**: 57-68
- [9] Short F, Carruthers T, Dennison W, et al. Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*,

- 2007, **350**: 3–20
- [10] Shafer D, Bergstrom P. An introduction to a special issue on large-scale submerged aquatic vegetation restoration research in the Chesapeake Bay: 2003–2008. *Restoration Ecology*, 2010, **18**: 481–489
- [11] Miao Y (苗苑), Xu N-N (徐娜娜), Yu S (于硕), et al. Clonality and its population genetic consequences in seagrasses. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2009, **29**(7): 3846–3853 (in Chinese)
- [12] Sinclair EA, Verduin J, Krauss SL, et al. A genetic assessment of a successful seagrass meadow (*Posidonia australis*) restoration trial. *Ecological Management & Restoration*, 2013, **14**: 68–71
- [13] Procaccini G, Piazzini L. Genetic polymorphism and transplantation success in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Restoration Ecology*, 2001, **9**: 332–338
- [14] Zheng F-Y (郑凤英), Qiu G-L (邱广龙), Fan H-Q (范航清), et al. Diversity, distribution and conservation of Chinese seagrass species. *Biodiversity Science* (生物多样性), 2013, **21**(5): 517–526 (in Chinese)
- [15] Brouns JJ, Heijs FM. Production and biomass of the seagrass *Enhalus acoroides* (Lf) Royle and its epiphytes. *Aquatic Botany*, 1986, **25**: 21–45
- [16] Rollón RN, de Ruyter van Steveninck ED, van Vierssen W. Spatio-temporal variation in sexual reproduction of the tropical seagrass *Enhalus acoroides* (Lf) Royle in Cape Bolinao, NW Philippines. *Aquatic Botany*, 2003, **76**: 339–354
- [17] Marba N, Duarte CM. Rhizome elongation and seagrass clonal growth. *Marine Ecology Progress Series*, 1998, **174**: 269–280
- [18] Gao H, Jiang K, Geng Y, et al. Development of microsatellite primers of the largest seagrass, *Enhalus acoroides* (Hydrocharitaceae). *American Journal of Botany*, 2012, **99**: 99–101
- [19] Arnaud-Haond S, Duarte CM, Alberto F, et al. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, 2007, **16**: 5115–5139
- [20] Goudet J. FSTAT (Version 2.9.3.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 2002, **86**: 485–486
- [21] Miller MP. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data [EB/OL]. (1997-05-16) [2016-02-08]. <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>
- [22] Dorken ME, Eckert CG. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology*, 2001, **89**: 339–350
- [23] Cristescu R, Sherwin WB, Handasyde K, et al. Detecting bottlenecks using BOTTLENECK 1.2.02 in wild populations: The importance of the microsatellite structure. *Conservation Genetics*, 2010, **11**: 1043–1049
- [24] Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, et al. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, **91**: 3166–3170
- [25] Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 1996, **144**: 2001–2014
- [26] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, **155**: 945–959
- [27] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 2005, **14**: 2611–2620
- [28] Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1984, **38**: 1358–1370
- [29] Meirmans PG. Using the amova framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 2006, **60**: 2399–2402
- [30] Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: An update. *Bioinformatics*, 2012, **28**: 2537–2539
- [31] Xu NN, Yu S, Zhang JG, et al. Microsatellite primers for *Halophila ovalis* and cross-amplification in *H. minor* (Hydrocharitaceae). *American Journal of Botany*, 2010, **97**: 56–57
- [32] Jiang K, Gao H, Xu NN, et al. A set of microsatellite primers for *Zostera japonica* (Zosteraceae). *American Journal of Botany*, 2011, **98**: 236–238
- [33] Sinclair EA, Anthony J, Coupland GT, et al. Characterisation of polymorphic microsatellite markers in the widespread Australian seagrass, *Posidonia australis* Hook. f. (Posidoniaceae), with cross-amplification in the sympatric *P. sinuosa*. *Conservation Genetics Resources*, 2009, **1**: 273–276
- [34] Nakajima Y, Matsuki Y, Lian C, et al. The Kuroshio Current influences genetic diversity and population genetic structure of a tropical seagrass, *Enhalus acoroides*. *Molecular Ecology*, 2014, **23**: 6029–6044
- [35] Luikart G, Cornuet JM. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 1998, **12**: 228–237
- [36] Lacap CDA, Vermaat JE, Rollon RN, et al. Propagule dispersal of the SE Asian seagrasses *Enhalus acoroides* and *Thalassia hemprichii*. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, **235**: 75–80
- [37] Lan Z-H (兰竹虹), Chen G-Z (陈桂珠). Degradation of main ecosystems in South China Sea and corresponding conservation countermeasures. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2006, **17**(10): 1978–1982 (in Chinese)

作者简介 蒋凯,男,1987年生,硕士研究生.主要从事海草保育遗传学研究. E-mail: jiangkai@csnbgsh.cn

责任编辑 肖红

蒋凯,高辉,陈小勇.海南岛海菖蒲种群克隆多样性和遗传结构.应用生态学报,2018,29(2):397–402

Jiang K, Gao H, Chen X-Y. Clonal diversity and genetic structure of *Enhalus acoroides* populations along Hainan Island, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, **29**(2): 397–402 (in Chinese)