

## 河流对黄胸鼠遗传格局的影响

赵芳<sup>1</sup>, 林恭华<sup>1</sup>, 吴爱国<sup>2\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810008;

2. 云南省地方病防治所, 云南大理 671000)

**摘要:** 河流可能会阻碍陆生动物的迁移并导致其遗传分化。很多研究证明了河流屏障假说, 但是也有少数研究不支持这个假说。本研究采集了云南省 384 只黄胸鼠 *Rattus tanezumi* 样本, 分别来自于被 5 条主要河流隔开的 6 个地理区域。通过对 mtDNA 和 IRBP 两个基因的测序分析, 检验云南省主要河流对黄胸鼠种群遗传格局的影响。共鉴定得到 81 个 mtDNA 单倍型和 135 个 IRBP 单倍型, 其中很多单倍型都被 2 个或 2 个以上区域共享。AMOVA 分析显示, 大多数的变异源于种群内部或种群之间, 只有少数变异 (< 15%) 源于 6 个区域之间。SAMOVA 分析将 mtDNA 种群分成了 3 组, 但每一组都被 2 个或 2 个以上的区域共享; 对 IRBP 的分析则没有检测到明显的谱系地理结构。结果表明, 河流屏障对黄胸鼠的遗传格局几乎无影响。

**关键词:** 河流; 黄胸鼠; mtDNA; IRBP; 遗传分化

中图分类号: Q959.8; Q3 文献标志码: A 文章编号: 1000-7083(2016)02-0167-06

## Influence of Riverine Barriers on Genetic Structure of *Rattus tanezumi*

ZHAO Fang<sup>1</sup>, LIN Gonghua<sup>1</sup>, WU Aiguo<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2. Yunnan Institute of Endemic Disease Control and Prevention, Dali, Yunnan Province 671000, China)

**Abstract:** Rivers may hinder population migration and promote genetic differentiation of terrestrial animals. Most studies testing the riverine barrier hypothesis have yielded positive results, while very few studies do not support this hypothesis. In this study, 384 Asian house rats (*Rattus tanezumi*) were collected from Yunnan, China. By combined use of the sequence markers of mitochondrial (mtDNA) and nuclear (IRBP), the influence of five local rivers on the population genetics of *R. tanezumi* was tested. A total of 81 mtDNA haplotypes and 135 IRBP haplotypes were determined, and many of which were shared by two or more of the six geographic regions. AMOVA analyses showed that most variations happened either within populations or among populations, while very few variations (< 15%) happened among the six geographic regions formed by the five rivers. SAMOVA analysis classified the mtDNA sequences into three groups, while no genetic differentiation was detected on IRBP. Our results concluded that riverine barriers in the study area had little influence on the genetic structure of *R. tanezumi*.

**Key words:** river; *Rattus tanezumi*; mtDNA; IRBP; genetic differentiation

河流屏障假说( riverine barrier hypothesis) 认为, 河流作为一种地理隔离, 可能会阻碍陆生动物的迁移以及基因流动, 从而引起种群分化, 促进种群格局的形成( Gascon *et al.* 2000; Hayes & Sewlal 2004; Li *et al.* 2009)。针对这一假说, 前人的研究得到了 2 种完全对立的结论。通过对哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物和昆虫的反复验证, 大多数的研究支持这一假说( Knopp *et al.* 2011; Díaz-Muñoz 2012; Fer-

nandes *et al.* 2012)。然而, 少数研究并不认为河流能构成影响陆生动物种群格局的屏障。例如, 对法国阿尔卑斯山脉中山溪两岸的一些鼯鼠 *Sorex araneus* 遗传结构的研究证明, 这些山溪并没有明显影响鼯鼠的基因流( Lugon-moulin *et al.* 1999)。

大家鼠属 *Rattus* 现存 66 个物种, 广泛分布于全球各地, 通常被认为是迁移扩散能力最强的哺乳动物之一( Wilson & Reeder 2005)。作为各种鼠传病

收稿日期: 2015-09-18 接受日期: 2015-11-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目( 81260416, 31101628); 中国科学院青年创新促进会项目( 2015352)

作者简介: 赵芳( 1987—), 女, 博士研究生, 研究方向: 动物生态学, E-mail: zf\_lgh@ 163.com

\* 通信作者 Corresponding author, E-mail: wuaiguo698@ 163.com

菌(如鼠疫杆菌 *Yersinia pestis*) 和体外寄生虫(如跳蚤) 最重要的宿主, 它们是各种重大动物疾病的元凶 (Pagès *et al.* 2010), 而且还会严重破坏生活环境内的建筑物, 并且污染和毁坏人类的粮食储存 (Hinds *et al.* 2003)。因此, 了解大家鼠属生物多样性形成的机制对疾病的预防和鼠害的防控至关重要。

黄胸鼠 *Rattus tanezum* 是主要分布在东南亚的大家鼠, 其生境广泛, 包括城区、农村、农田以及森林边缘 (Wilson & Reeder 2005), 因携带很多鼠传病菌和对人类设施巨大的破坏力而臭名昭著 (郑智民等, 2008), 其中最为人们所熟悉的是, 它们是东南亚鼠疫的主要宿主 (贺雄, 王虎, 2010)。黄胸鼠主要分布在热带和亚热带地区, 这些地区的大江大河常年不结冰。然而, 这些河流是否能影响黄胸鼠的种群遗传分化, 目前还没有系统的调查和分析资料。本研究中, 我们从云南省捕获了一定数量的黄胸鼠, 以线粒体基因和核基因共同作为分子标记来验证云南省内 5 条大江 (怒江、澜沧江、李仙江、元江和南盘江) 对黄胸鼠种群遗传格局的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集、DNA 提取、基因扩增和测序

用活捕笼 (20 cm × 12 cm × 9 cm) 捕获黄胸鼠, 乙醚麻醉, 断颈法处死并收集大腿内侧肌肉样品, 保存在 95% 乙醇中, 带回实验室用于分子实验。

采用动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (Qiagen, Germany) 提取基因组 DNA。根据黄胸鼠线粒体基因组序列 (GenBank 登录号: KF011916) 设计扩增线粒体部分序列的引物: mtDNA-F: 5'-AC-CCTACTTACTGGCTTCA-3'; mtDNA-R: 5'-TAATG-GCGAATACTGCTC-3'。mtDNA 包含完整的 tRNA-Tyr 基因和细胞色素 C 氧化酶 I 基因 (cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 的部分序列。类视黄醇结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid binding protein, IRBP) 部分序列的引物根据已发表的黄胸鼠 IRBP 序列 (GenBank 登录号: HM217693) 设计: IRBP-F: 5'-CTATGAGCCCAGTACCCTCG-3'; IRBP-R: 5'-AG-CACGGACACCTGAAACA-3'。

PCR 扩增使用 40 μL 反应体系, 包括: 40 ~ 60 ng 的基因组 DNA, 0.6 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs, 0.2 μmol · L<sup>-1</sup> 的正/反向引物, 1 U Taq 酶, 以及 DNA buffer 和去离子水的混合反应缓冲液。PCR 反应程序是: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C

退火 45 s, 72 °C 延伸 75 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物用 CASpure PCR Purification Kit (Casarray, Shanghai, China) 纯化, 用 PCR 扩增引物进行 Sanger 法测序 [由生工生物工程 (上海) 有限公司完成]。

### 1.2 谱系地理学分析

用 MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) 中内嵌的 Clustal W (Tompson *et al.*, 1997) 程序比对测序得到的序列, 辅以人工校对。用 DnaSP 5 (Librado & Rozas, 2009) 分析 mtDNA 的变异位点和单倍型的分布。由于 IRBP 基因为二倍体序列, 其中有很多单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点, 我们首先使用 DnaSP 5 中的 PHASE 2.1 (Stephens *et al.* 2001) 程序构建单倍型, 然后基于这些单倍型进行变异位点和遗传结构分析。

为了推断河流对黄胸鼠谱系地理学特征的影响, 按照 5 条河流的分隔, 将采样地点划分为 6 个地理区域分组 (G1 ~ G6, 图 1)。用 Arlequin 3.11 (Excoffier & Lischer 2005) 进行分子方差分析 (analyses of molecular variance, AMOVA), 分别计算区域之间、区域内种群之间和种群内部的方差百分比。

同时用 SAMOVA v1.0 (Dupanloup *et al.* 2002) 对黄胸鼠种群进行谱系地理结构聚类。组数 *K* 值的设定从 2 到 6, 置换 500 次。判定标准为: 在避免某一组只有单个种群的前提下, *F<sub>CT</sub>* 值最大且 *P* 值有统计学意义的分组为最好的种群分组 (Magri *et al.*, 2006; Shi *et al.* 2012)。

## 2 结果

从云南省 38 个县 50 个地点共捕获 384 只黄胸鼠, 地点信息详见表 1 和图 1。测序结果显示, 比对的 mtDNA 序列总长 1 182 bp (File S1), 有 93 个多态位点, 81 个单倍型 (mH1 ~ mH81; File S2); IRBP 基因总长 932 bp (File S3), 包括 45 个变异位点和 135 个通过 PHASE 软件分离的 SNP 单倍型 (iH1 ~ iH135; File S4)。mtDNA 和 IRBP 基因的单倍型分布情况详见 Table S1。以上所有附属文件可在 Dryad 数据库中下载 (<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.584kb>), 或联系作者邮件索取。

AMOVA 分析显示, 对于 mtDNA 而言, 超过 50% 的变异源于种群内部, 只有 13.33% 源于区域之间 (即 G1 ~ G6 之间)。对于 IRBP, 大多数变异 (88.12%) 源于种群内部, 仅有 4.62% 源于区域之间 (表 2)。

表 1 黄胸鼠样本的大小和地理信息  
Table 1 Geographic information and sample size of *Rattus tanezumi* in this study

县 County	地点编号 Locality ID	纬度 Latitude/°	经度 Longitude/°	样本大小 Sample size	地理区域编号 Geographic group ID
澄江 Chengjiang	CJ	24.689 70	102.982 80	4	G5
昌宁 Changning	CN	24.874 91	99.644 67	10	G2
大理 Dali	DL	25.783 17	100.126 44	7	G5
福贡 Fugong	FG1	26.860 44	98.871 80	5	G2
福贡 Fugong	FG2	26.890 81	98.871 51	8	G1
福贡 Fugong	FG3	26.495 52	98.897 28	9	G1
福贡 Fugong	FG4	26.540 11	98.897 18	3	G2
福贡 Fugong	FG5	26.981 15	98.864 27	2	G2
富民 Fumin	FM	25.388 48	102.612 07	6	G5
凤庆 Fengqing	FQ	24.590 11	99.914 53	10	G2
耿马 Gengma	GM	23.571 26	99.317 34	10	G2
江城 Jiangcheng	JC	22.561 00	101.872 82	9	G3
景东 Jingdong	JD	24.455 62	100.834 78	9	G3
景洪 Jinghong	JH1	21.914 90	100.780 87	10	G2
景洪 Jinghong	JH2	21.869 97	100.990 59	9	G3
景洪 Jinghong	JH3	21.841 72	100.979 61	8	G2
景洪 Jinghong	JH4	22.015 90	100.811 07	9	G3
金平 Jinping	JP	22.723 40	103.238 00	2	G4
澜沧 Lancang	LAC	22.556 07	99.932 30	9	G2
陇川 Longchuan	LC	24.247 65	97.879 64	10	G1
梁河 Lianghe	LH	24.846 86	98.324 51	10	G1
龙陵 Longling	LL	24.662 60	98.867 06	9	G1
罗平 Luoping	LP	24.806 35	104.222 61	8	G6
泸水 Lushui	LS1	25.908 14	98.841 87	8	G1
泸水 Lushui	LS2	25.914 49	98.831 43	9	G2
泸水 Lushui	LS3	25.649 92	98.883 50	9	G1
泸西 Luxi	LX	24.534 33	103.759 77	1	G6
勐腊 Mengla	MEL	21.360 60	101.636 36	11	G3
马关 Maguan	MG	23.012 47	104.398 36	8	G5
勐海 Menghai	MH	21.994 88	100.490 34	8	G2
墨江 Mojiang	MJ	23.415 14	101.653 69	5	G4
弥勒 Mile	ML	24.065 58	103.505 03	9	G6
芒市 Mangshi	MS	24.406 63	98.531 48	8	G1
蒙自 Mengzi	MZ	23.360 49	103.479 32	3	G5
南华 Nanhua	NH	25.192 03	101.287 60	8	G5
丘北 Qiubei	QB	24.030 23	103.778 90	10	G5
双江 Shuangjiang	SJ	23.491 36	99.838 19	8	G2
石屏 Shiping	SP	23.700 24	102.545 17	13	G5
腾冲 Tengchong	TC	25.031 59	98.496 57	10	G1
通海 Tonghai	TH	24.117 88	102.749 56	7	G5
西盟 Ximeng	XM	22.647 26	99.607 52	10	G2
永德 Yongde	YD	24.074 44	99.383 33	8	G2
盈江 Yingjiang	YIJ	24.708 05	97.932 54	10	G1
元江 Yuanjiang	YJ1	23.569 01	102.014 46	2	G4
元江 Yuanjiang	YJ2	23.669 99	101.868 41	2	G4
元江 Yuanjiang	YJ3	23.410 32	102.040 20	4	G4
元江 Yuanjiang	YJ4	23.711 86	102.006 17	7	G5
砚山 Yanshan	YS	23.738 36	103.806 61	10	G5
镇康 Zhenkang	ZK	23.775 77	98.825 87	10	G2
镇沅 Zhenyuan	ZY	24.005 38	101.107 06	10	G4

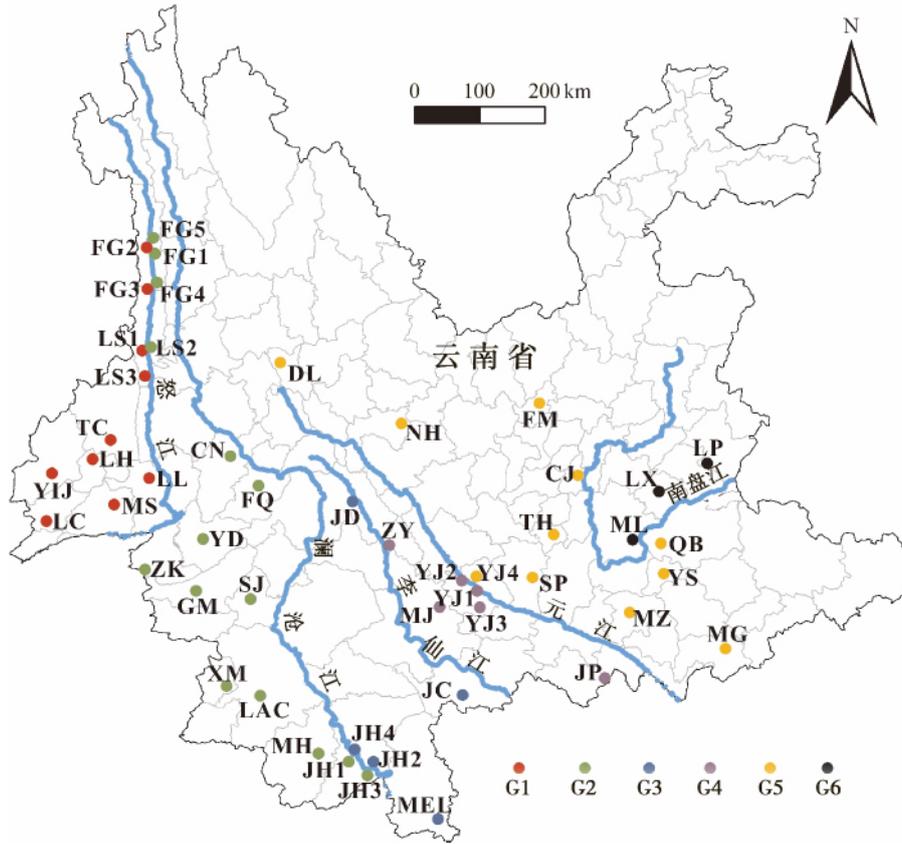


图 1 黄胸鼠样本及地理分布

Fig. 1 Geographic distribution and grouping of *Rattus tanezumi*

缩写见表 1 中地点编号; 下图同。

Abbreviations are the same as the locality ID in table 1; the same below.

表 2 黄胸鼠 mtDNA 和 IRBP 的 AMOVA 分析结果  
Table 2 AMOVA results of mtDNA and IRBP markers of *Rattus tanezumi*

基因 Gene	自由度 df	变异来源 Source of variation	变异百分比 Percentage of variation/%
mtDNA	5	区域间	13.33
	44	种群间	33.04
	334	种群内	53.63
IRBP	5	区域间	4.62
	44	种群间	7.26
	718	种群内	88.12

表 3 黄胸鼠 mtDNA 和 IRBP 的 SAMOVA 分析结果  
Table 3 SAMOVA results of mtDNA and IRBP of *Rattus tanezumi*

基因 Gene	K 值 K-value	分组预测 Structure tested	变异来源 Source of variation			固定指数 $F_{CT}$
			AG	AP	WP	
mtDNA	2	42 + 18	46.11	11.73	42.16	0.461 1
	3	32 + 16 + 2	47.62	10.05	42.32	0.476 3
	4	32 + 15 + 2 + 1	49.26	8.52	42.22	0.492 6
	5	32 + 14 + 2 + 1 + 1	49.78	7.73	42.49	0.497 8
	6	32 + 13 + 2 + 1 + 1 + 1	50.13	7.09	42.78	0.501 3
	IRBP	2	49 + 1	34.50	7.08	58.42
3		48 + 1 + 1	19.00	8.68	72.32	0.190 0
4		47 + 1 + 1 + 1	14.32	8.74	76.94	0.143 2
5		46 + 1 + 1 + 1 + 1	13.57	8.74	77.70	0.135 7
6		43 + 3 + 1 + 1 + 1 + 1	13.14	7.51	79.35	0.131 4

注: AG. 组间, AP. 种群间, WP. 种群内。

Notes: AG. among groups, AP. among populations within group, WP. within population.

SAMOVA 分析显示,对 mtDNA 而言,  $K$  值越大,  $F_{CT}$  值越大。但是,当  $K > 3$  时,会存在某些分组内只有一个种群的情况。因此  $K = 3$  时的模型属于最佳模型,此模型的 3 个分组 (S1 ~ S3) 分别包含 32 个、16 个和 2 个种群(图 2)。对 IRBP 而言,  $F_{CT}$  值随着  $K$  值的增大而减小,同时也存在某些分组只有一个种群的情况,因此,基于 IRBP 数据无法得到明显的种群结构(表 3)。

### 3 讨论

本研究检验了河流屏障对黄胸鼠种群遗传的影

响。单倍型分布分析显示,河流对地理区域 (G1 ~ G6) 组间的单倍型分布没有明显的影响。总的来说,81 个 mtDNA 单倍型中有 15 个是 2 个或 2 个以上区域共享的。例如, G2 ~ G6 共享 mH3 单倍型。同时,在 135 个 IRBP 单倍型中,有 49 个被 2 个或 2 个以

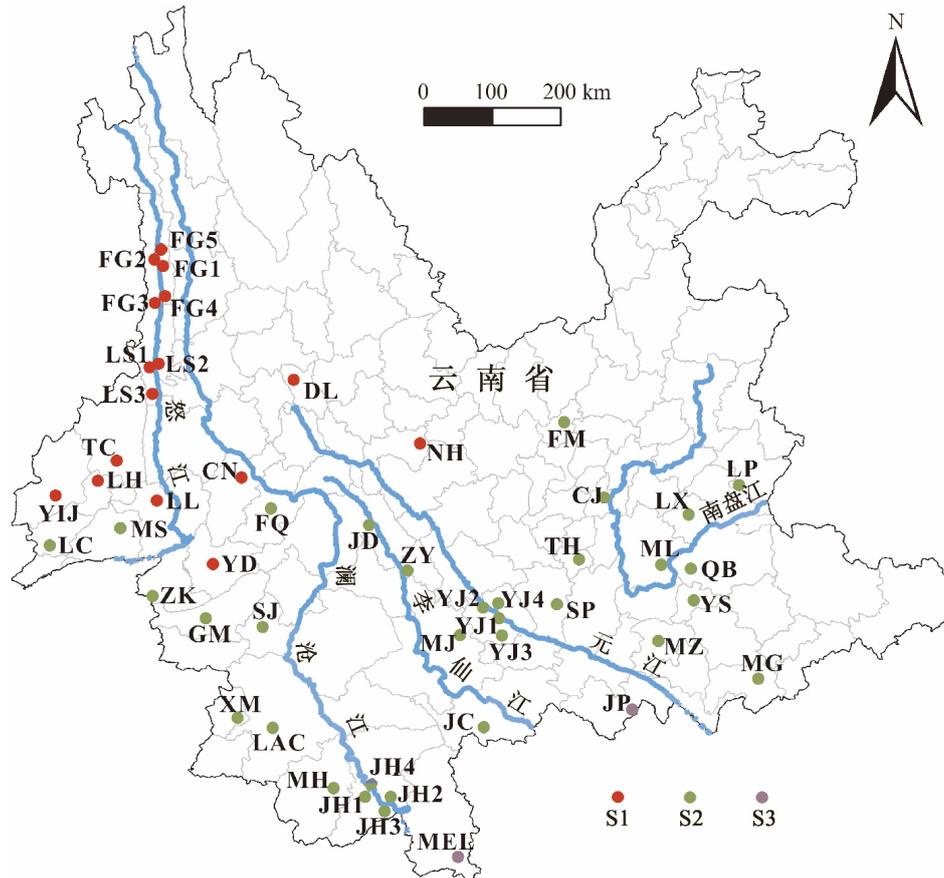


图2 基于 mtDNA 的 50 个黄胸鼠种群的 SAMOVA 分组  
Fig. 2 SAMOVA grouping of the 50 *Rattus tanezumi* populations based on mtDNA sequences

上区域共享,其中,iH47和iH65为所有区域共享(详见Table S1)。

AMOVA分析显示,无论是mtDNA还是IRBP,都只有少数变异源于6个区域之间(分别为13.33%和4.67%),表明5条河流对黄胸鼠种群遗传变异的屏障作用不明显。同时,基于mtDNA的SAMOVA分析也显示所有种群被分成了3组(S1~S3),且每一个SAMOVA分组都被2条或以上河流分隔开,换句话说,每个SAMOVA分组都不是单独位于某一区域内。此外,基于IRBP的SAMOVA分析证明没有明显的种群结构存在。综合来看,所有结果都表明云南省5条主要河流对黄胸鼠种群遗传格局的形成影响很小。

由于对各种生境的适应能力很强,以及高效的迁移和繁殖能力,大鼠一直被认为是最具有侵略性扩张能力的哺乳动物之一。本属的很多动物在有需要时都会游泳,褐家鼠*R. norvegicus*的游泳能力(能在水中呆3d或游0.75km)在很多文献中被反复证明(Russell *et al.*, 2008)。也有文献(Innes, 2005; Shiels *et al.*, 2014)证明屋顶鼠*R. rattus*能游

300~750m到邻近的岛屿上。作为与屋顶鼠亲缘关系最近的黄胸鼠,我们有理由相信它们也是游泳能手。事实上,在福贡县采样时,当地居民告诉我们黄胸鼠有时候甚至能横游过怒江(个人交流)。云南省5条主要河流的宽度一般都不超过200m,我们假设黄胸鼠能够轻易游过这几条河流的话,也就证明了对黄胸鼠而言,河流不存在屏障效应。

除了游泳外,黄胸鼠还可能通过船只往来进行迁移(Russell *et al.*, 2008)。由于交通业的发展,目前世界上大部分地区都有褐家鼠和屋顶鼠的分布(Krinke 2000; Aplin *et al.*, 2011)。在中国,火车运输对黄胸鼠在各个省份之间的迁移扮演了重要的角色(张美文等, 2000)。同时,桥梁也为黄胸鼠横跨河流两岸提供了路径,然而这些跨河交通及设施究竟如何影响黄胸鼠的种群遗传结构,则需要进一步研究。

#### 参考文献:

- 贺雄,王虎. 2010. 现代鼠疫概论[M]. 北京: 科学出版社.  
张美文,郭聪,王勇,等. 2000. 我国黄胸鼠的研究现状[J]. 动物学

- 研究, 21(6): 487-497.
- 郑智民, 姜志宽, 陈安国. 2008. 啮齿动物学[M]. 上海: 上海交通大学出版社.
- Aplin KP, Suzuki H, Chinen AA, *et al.* 2011. Multiple geographic origins of commensalism and complex dispersal history of black rats [J]. PLoS ONE, 6(11): e26357.
- Díaz-Muñoz SL. 2012. Role of recent and old riverine barriers in fine-scale population genetic structure of Geoffroy's tamarin (*Saguinus geoffroyi*) in the Panama Canal watershed [J]. Ecology and Evolution, 2(2): 298-309.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations [J]. Molecular Ecology, 11: 2571-2581.
- Excoffier L, Lischer HL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. Molecular Ecology Resources, 10: 564-567.
- Fernandes AM, Wink M, Aleixo A. 2012. Phylogeography of the chestnut-tailed antbird (*Myrmeciza hemimelaena*) clarifies the role of rivers in Amazonian biogeography [J]. Journal of Biogeography, 39(8): 1524-1535.
- Gascon C, Malcolm JR, Patton JL, *et al.* 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(25): 13672-13677.
- Hayes FE, Sewlal JAN. 2004. The Amazon River as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy [J]. Journal of Biogeography, 31(11): 1809-1818.
- Hinds LA, Krebs CJ, Spratt DM. 2003. Rats, mice and people: rodent biology and management [M]. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Innes JG. 2005. Ship rat [M] // King CA. The handbook of New Zealand mammals 2nd edition. Oxford, UK: Oxford University Press: 187-203.
- Knopp T, Rahagalala P, Miinala M, *et al.* 2011. Current geographical ranges of Malagasy dung beetles are not delimited by large rivers [J]. Journal of Biogeography, 38(6): 1098-1108.
- Krinke GJ. 2000. The laboratory rat [M]. San Diego, USA: Academic Press.
- Li R, Chen W, Tu L, *et al.* 2009. Rivers as barriers for high elevation amphibians: a phylogeographic analysis of the alpine stream frog of the Hengduan Mountains [J]. Journal of Zoology, 277(4): 309-316.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 25: 1451-1452.
- Lugon-moulin N, Bruenner H, Balloux F, *et al.* 1999. Do riverine barriers, history or introgression shape the genetic structuring of a common shrew (*Sorex araneus*) population? [J]. Heredity, 83: 155-161.
- Magri D, Vendramin GG, Comps B, *et al.* 2006. A new scenario for the quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences [J]. New Phytologist, 171: 199-221.
- Pagès M, Chaval Y, Herbreteau V, *et al.* 2010. Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries [J]. BMC Evolutionary Biology, 10(1): 184.
- Russell JC, Towns DR, Clout MN. 2008. Review of rat invasion biology: implications for island biosecurity (Science for Conservation 286) [M]. Wellington, NZ: Science & Technical Publishing.
- Shi W, Kerdelhué C, Ye H. 2012. Genetic structure and inferences on potential source areas for *Bactrocera dorsalis* (Hendel) based on mitochondrial and microsatellite markers [J]. PLoS ONE, 7(5): e37083.
- Shiels AB, William CP, Robert TS, *et al.* 2014. Biology and impacts of Pacific island invasive species. 11. *Rattus rattus*, the black rat (Rodentia: Muridae) [J]. Pacific Science, 68(2): 145-184.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data [J]. The American Journal of Human Genetics, 68: 978-989.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 28(10): 2731-2739.
- Tompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 25(24): 4876-4882.
- Wilson DE, Reeder DA. 2005. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference [M]. Baltimore, USA: John Hopkins University Press.