

江苏地区 5 个三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 种群的 ISSR 分析陈婵娟<sup>1</sup>, 窦红霞<sup>1</sup>, 许志强<sup>2</sup>, 丁淑燕<sup>2</sup>, 潘建林<sup>2</sup>, 葛家春<sup>2</sup>, 黄亚红<sup>1\*</sup>

(1. 南京大学生命科学学院, 江苏南京 210093; 2. 江苏省淡水水产研究所, 江苏南京 210017)

**摘要** [目的] 利用 ISSR 技术分析江苏地区 5 个三角帆蚌种群的遗传多样性和亲缘关系。[方法] 用 10 条 ISSR 引物对 5 个三角帆蚌种群基因组 DNA 进行扩增, 选取其中 5 条扩增条带多、信号强、背景清晰的引物对 5 个群体(无锡太湖、洪泽湖、南京江浦、兴化 1、兴化 2) 共 121 个个体进行扩增分析。[结果] 通过 ISSR 扩增共获得 70 个 DNA 片段, 大小在 200~2 000 bp, 其中 61 个位点表现多态性, 多态位点比例为 87.14%。5 个种群的基因多样性指数在 0.259 9~0.314 4, 平均值为 0.290 1, Shannon 信息指数在 0.392 2~0.466 3。南京江浦养殖种群的 2 种遗传多样性指数最高分别为 0.314 4 和 0.466 3, 而无锡太湖野生种群的最低为 0.259 9 和 0.392 2。[结论] 三角帆蚌养殖种群的遗传多样性高于野生种群; 5 个三角帆蚌种群间的亲缘关系与地理位置无显著相关性。

**关键词** 三角帆蚌; 遗传多样性; ISSR

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)35-17386-04

**ISSR Analysis on Five *Hyriopsis cumingii* Populations in Jiangsu Aera**

CHEN Chan-juan et al (College of Life Science, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093)

**Abstract** [Objective] The study aimed to analysis the genetic diversity and genetic relationship of 5 *Hyriopsis cumingii* populations in Jiangsu aera by using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) technique. [Method] The genome DNA of five *H. cumingii* populations were amplified by using 10 ISSR primers in which the five primers with more amplification bands, strong signal and clear background were selected to make the amplification analysis on 5 populations from Taihu in Wuxi City (TH), Hongzehu (HZH), Jiangpu in Nanjing (JP), Xinghua 1 (XH1), Xinghua 2 (XH2) which was 121 individuals in total. [Result] The 70 DNA fragments were obtained and their sizes were from 200 to 2 000 bp through ISSR amplification, in which, the 61 sites were polymorphism and the proportion of polymorphic site was 87.14%. The gene diversity index of 5 populations were 0.259 9 - 0.314 4 with the average of 0.290 1 and the Shannon message index was 0.392 2 - 0.466 3. The highest value for 2 kinds of the genetic diversity index in breed populations in JP were 0.314 4 and 0.466 3 resp., but the lowest value for that of wildness populations in TH were 0.259 9 and 0.392 2 resp. [Conclusion] The gene diversity of *H. cumingii* breed populations was higher than the wildness populations and the genetic relationship of 5 *H. cumingii* populations had no significant correlation with the geography position.

**Key Words** *Hyriopsis cumingii*; Genetic diversity; ISSR

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 隶属于瓣鳃纲珠蚌科帆蚌属, 为中国特有的淡水育珠蚌, 其产珠质量佳, 珠质光滑细腻, 形状较圆, 色泽好。过去, 在我国五大淡水湖泊中资源特别丰富, 近些年由于捕捞数量猛增, 开发过度, 不注意种质资源保护, 三角帆蚌资源锐减, 在一些原来自然分布的湖泊中已经绝迹, 种质退化问题已成为当前珍珠养殖业的瓶颈。在淡水育珠研究领域, 引入遗传多样性评价机制, 避免多代近亲繁殖, 加强三角帆蚌的遗传选育和品种改良, 已成为珍珠蚌养殖中迫切需要解决的问题。因此, 笔者以无锡太湖、洪泽湖、兴化 2 3 个野生群体和南京江浦、兴化 1 2 个养殖群体作为研究对象, 通过 ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) 技术分析其遗传多样性和亲缘关系, 评价三角帆蚌的遗传现状并提出利用措施, 以期对江苏地区三角帆蚌的种质资源保护、遗传改良及引种育种提供理论依据。

**1 材料与方**

**1.1 样品采集** 2006 年 9 月~2007 年 1 月分别对江苏省内的无锡太湖梅梁湾、洪泽湖、南京江浦、兴化 4 个地区的三角帆蚌种群进行资源调查及样品采集(图 1、表 1), 三角帆蚌活体运回实验室后 -20 °C 冰箱保存。

**1.2 模板 DNA 的制备** 三角帆蚌基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》<sup>[1]</sup> 的方法进行。主要过程为: 取腹足组

织 100~200 mg 于研钵内研磨匀浆, 适量放入 1.5 ml 的离心管中, 加入 450 μl 的 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris·Cl, pH 值 8.0, 100 mmol/L 的 EDTA), 再加入终浓度分别为 0.5% 的 SDS 和 100 mg/ml 的蛋白酶 K。上述混合物于 56 °C 消化 3 h 左右至溶液澄清透明后, 加入等体积的苯酚饱和溶液, 温和混匀后经  $13.2 \times 10^3$  r/min 离心 10 min, 取上清; 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1), 剧烈混匀, 离心取上清; 加 2 倍体积无水乙醇, -20 °C 冰箱中沉淀 30 min; 离心, 倒去上清, 经 70% 的乙醇洗涤后自然风干; 加 50 μl TER(TE 内含终浓度为 20 μg/ml 的 RNase), 37 °C, 30 min。DNA 浓度通过紫外分光光度计和电泳-EB 染色的荧光强度双重测定, 稀释至 50 ng/μl, 4 °C 冰箱保存备用。

表 1 5 个三角帆蚌种群的采样情况

Table 1 The sampling situations of 5 populations of *H. cumingii* from Jiangsu

种群 Population	代号 Code	状态 State	样本数 Sample size(N)	备注 Remark
无锡太湖	TH	野生	29	太湖野生种群
洪泽湖	HZH	野生	30	洪泽湖野生种群
南京江浦	JP	养殖	30	大面积养殖种群
兴化 1	XH1	养殖	16	泗洪北大运河种群与鄱阳湖种群杂交后代
兴化 2	XH2	野生	16	购买自菜场农户

**1.3 ISSR 引物** 依据加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第 9 套 ISSR 引物序列, 并参照陈大鹏等<sup>[2]</sup> 和吕林兰等<sup>[3]</sup> 的试验结果, 选取其中 10 条引物进行预扩增, 最终选取其中 5 条扩增条带清晰、重复性好的引物, 序列见表 2。引物由南京

**基金项目** 江苏淡水珍珠蚌种质资源保护与利用(BM2006703)。**作者简介** 陈婵娟(1984-), 女, 江苏南京人, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物遗传学。\* 通讯作者, 副教授, E-mail: hyh518@263.net。**收稿日期** 2009-09-04

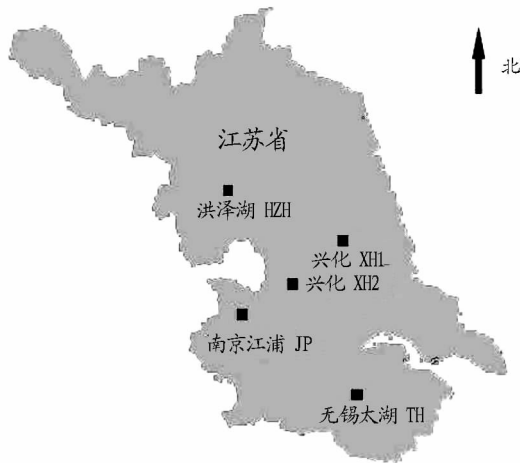


图 1 5 个三角帆蚌种群的取样分布示意

Fig. 1 The sampling distribution of 5 populations of *H. cumingii* from Jiangsu

表 2 ISSR 引物编号及其序列

Table 2 No. and sequences of ISSR primers

引物编号 No. of primers	序列(5'→3') Sequences
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
881	GGGTGGGTGGGGTG

**1.4 ISSR-PCR 反应及电泳检测** PCR 扩增所用的 *Taq* 酶、10 × PCR Buffer、dNTP Mixture (Takara) 购自大连宝生物工程有限公司, PCR DNA Ladder 购自金思特科技(南京)有限公司, 随机引物由南京生兴生物技术有限公司合成。

ISSR 反应在 Biometra 公司的 T-GRADIENT 扩增仪上进行, 反应总体积为 25 μl, 其中包括 10 × PCR 反应缓冲液 2.5 μl (成分: 100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 1.3 mg/ml BSA, 0.01% Gelatin, pH 值 8.4); MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5 μl; dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μl; 引物 (10 μmol/L) 0.5 μl; *Taq* DNA 聚合酶 (Takara, 5 U/μl) 0.2 μl; 甲酰胺 1%; DNA 模板量约 50 ng; 用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 补足体积。

反应程序如下: 94 °C 变性 7 min 后进行 40 个扩增循环, 每一循环包括 94 °C 变性 30 s、52 °C 退火 1 min、72 °C 延伸 2 min, 循环结束后再 72 °C 延伸 10 min, 最后 4 °C 保存。每次反应均设不含模板 DNA 的空白对照, 用选择的引物对其进行 ISSR 扩增。

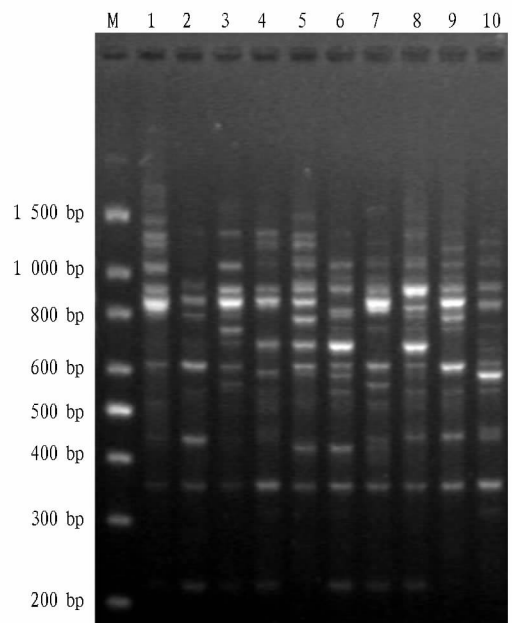
ISSR 扩增产物点样至 2% 琼脂糖凝胶 (含终浓度为 0.1 mg/ml 的溴化乙锭) 中, 选用 DNA Ladder Marker (100 ~ 2 000 bp) 作为标记估计片段大小, 在 120 V、0.5 × TBE 缓冲液中电泳分离约 1.5 h, 并用凝胶成像系统 (Bio-Rad, Gel Doc1000) 观察并拍照记录。

**1.5 数据统计及分析** 选择扩增效果好且条带清晰的电泳图作为统计对象。根据条带的有无分别记为 1 和 0, 构建原始数据表征矩阵, 并据此统计位点总数和多态位点比例。用 Popgen 软件分析和计算多态位点百分率 (PPL)、Nei's 基

因多样性指数 ( $H_e$ )、Shannon 信息指数 ( $H_o$ )、Nei's 遗传距离 ( $D$ ) 和遗传相似系数 ( $I$ )。并根据 Nei's 遗传距离 ( $D$ ) 和遗传相似系数 ( $I$ ) 进行 UPGMA 聚类分析。根据欧几里德遗传距离矩阵<sup>[4]</sup>采用 WINAMOVA1.55 软件对种群间及种群内的分子变异进行分析<sup>[5]</sup>, 计算基因分化系数 ( $G_{st}$ ), 该软件的输入文件由 AMOVA-PREP 软件制作。

## 2 结果与分析

**2.1 ISSR 扩增结果** 用 10 条 ISSR 引物对 5 个三角帆蚌种群基因组 DNA 进行扩增, 选取其中 5 条扩增条带多、信号强、背景清晰的引物对 5 个群体共 121 个个体进行扩增分析。5 条随机引物共扩增出 70 个 DNA 片断, 片段大小在 200 ~ 2 000 bp (图 2)。其中 61 个为多态性位点, 占总数的 87.14%。所采用的 5 条引物能扩增出足够数量的条带, 可以充分反映几个种群的遗传多态性。由表 3 可知, 5 个三角帆蚌种群多态位点百分率 PPL 在 77.14% ~ 85.71%, 平均值为 82.57%, 最高的为南京江浦 (JP) 种群, 最低的是无锡太湖 (TH) 种群。种群的遗传多样性指数  $H_e$  在 0.259 9 ~ 0.314 4, 平均值为 0.290 1; Shannon 信息指数  $H_o$  在 0.392 2 ~ 0.466 3, 平均值为 0.433 3, 两者大小与种群多态位点百分率的大小趋势基本一致。



注: M 为 DNA Marker; 1 ~ 10 为 10 条 ISSR 引物。

Note: M stands for DNA Marker; 1 - 10 stand for 10 ISSR primers.

图 2 引物 881 的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 2 ISSR-PCR amplification results of primer 881

表 3 三角帆蚌种群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of 5 populations of *H. cumingii*

种群 Population	观测等位基因数 $A_o$ Observed number of alleles	有效等位基因数 $A_e$ Effective number of alleles	Nei's 基因多样性 $H_e$ Nei's gene diversity	Shannon 信息指数 $H_o$ Shannon's information index	多态位点百分率 PPL/% Percentage of polymorphic loci
TH	1.785 7	1.443 0	0.259 9	0.392 2	78.57
HZH	1.857 1	1.503 7	0.292 4	0.438 2	85.71
JP	1.857 1	1.545 5	0.314 4	0.466 3	85.71
XH1	1.857 1	1.530 1	0.308 7	0.459 7	85.71
XH2	1.771 4	1.471 4	0.275 0	0.410 3	77.14

**2.2 群体间遗传分化的比较分析** 用 Popgen32 对扩增片段进行统计,得出群体间的遗传相似系数与遗传距离。由表 4 可知,洪泽湖种群(HZH)和南京江浦种群(JP)亲缘关系最近(0.027 4),2 个野生种群 TH 和 HZH 遗传距离也较小(0.034 2)。兴化养殖种群(XH1)为泗洪北大运河种群与鄱阳湖种群杂交后代,因此和洪泽湖种群(HZH)、无锡太湖种群(TH)这 2 个野生种群有较远的遗传距离。而兴化野生种群(XH2)和兴化养殖种群(XH1)均属于兴化地区,有基本相同的生存环境和遗传背景,其遗传距离也较近(0.040 4)。其中太湖种群(TH)和兴化养殖种群(XH1)距离最远。遗传相似系数最小的达 0.874 6,说明该研究所分析的 5 个种群间整体遗传相似度较高。

表 4 三角帆蚌群体间的遗传相似系数与遗传距离

Table 4 Inter-populations genetic similarity indices and genetic distances of 5 *H. cumingii* populations

种群 Population	TH	HZH	JP	XH1	XH2
TH		0.966 3	0.955 4	0.935 4	0.874 6
HZH	0.034 2		0.973 0	0.937 7	0.876 0
JP	0.045 6	0.027 4		0.957 3	0.902 1
XH1	0.066 8	0.064 3	0.043 6		0.960 4
XH2	0.134 0	0.132 4	0.103 0	0.040 4	

注:右上方矩阵数字为种群间遗传相似系数,左下方为遗传距离。

Note:The data at upper-right are the inter-population genetic similarity index and that at lower left are the genetic distance.

由表 5 可知,群体间的基因分化系数  $G_{st} = 0.135 4$ ,即总的变异中有 13.54% 的变异存在于群体间,而绝大部分的遗传变异存在于群体内部,群体内的遗传变异占总遗传变异的 86.46%。群体间和群体内变异均极显著( $P < 0.001$ )。基于群体间的遗传分化系数( $G_{st}$ )计算群体间的基因流  $Nm = (1 - G_{st})/4G_{st} = 1.60$ 。

表 5 三角帆蚌 5 个群体的分子变异分析结果

Table 5 Molecular variation analytic results of 5 *H. cumingii* populations

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	总方差 Total variance	比率//% Ratio	$P$
群体间	4	198.85	13.54	0.000 *
群体内	109	1 216.45	86.46	0.000 *

注: \* \* 表示在 0.01 水平有差异。

Note: \* \* mean difference at 0.01 level.

根据 Nei's (1978) 遗传距离( $D$ )和遗传相似系数( $I$ ),采用 UPGMA 进行聚类分析。由图 3 可知,洪泽湖种群(HZH)和南京江浦种群(JP)亲缘关系较近,兴化野生种群(XH2)和兴化养殖种群(XH1)之间遗传距离比较近。而无锡太湖种群(TH)与洪泽湖种群(HZH)和南京江浦种群(JP)较近。

### 3 讨论

**3.1 遗传多样性分析** ISSR 是继 SSR 后发展出来的新型分子标记,是由 Zietkiewicz 等于 1994 年创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记<sup>[6]</sup>。ISSR 标记技术和 RAPD 原理比较相似,不同之处在于 ISSR 所用引物序列来源于简单重复序列区域,比 RAPD 引物序列长,退火温度高,反应系统更为稳定。ISSR 技术以其操作简单、成本低、快速、灵敏、

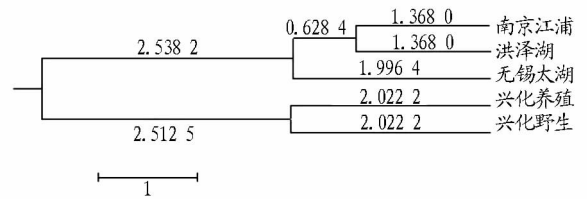


图 3 三角帆蚌 5 个种群的 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 UPGMA cluster analysis of 5 populations of *H. cumingii*

检测多态性能力强、所需 DNA 模板的量少而倍受青睐,已成功地运用于遗传多样性分析、种质鉴定、物种的分类系统学比较等研究。

该研究用 ISSR 技术对江苏地区 5 个三角帆蚌种群进行了遗传分析,共扩增获得 70 个 DNA 片段,其中 61 个位点表现为多态位点,多态位点比例在 77.14% ~ 85.71%。研究所分析的 5 个种群在地理条件、生态环境和生长方式上均存在一定的差异,其遗传多样性指数也明显不同,分别为南京江浦种群(JP) > 兴化养殖种群(XH1) > 洪泽湖种群(HZH) > 兴化野生种群(XH2) > 太湖种群(TH),表现为养殖种群的遗传多样性指数整体上高于野生种群,与以往报道的贝类遗传多样性研究结果有所不同<sup>[7-8]</sup>,而与该研究前期用 RAPD 技术分析的试验结果一致。分析可能是由于三角帆蚌的移动性较差,近交频繁,导致天然水域中三角帆蚌种群间的基因交流较弱,从而使得野生种群的遗传多样性指数相对较低<sup>[9]</sup>,而育珠蚌的养殖种群多为不同来源亲本杂交后产生的后代<sup>[10]</sup>,引入的外源亲本增加了种群的有效繁殖个体数,缓解了群体内的近交问题,从而在一定程度上提高了养殖种群的遗传多样性指数。南京江浦地区和兴化地区是江苏重要的珍珠蚌养殖地区,该研究中南京江浦种群(JP)和兴化养殖种群(XH1)均来源于大面积的珍珠蚌养殖场。兴化养殖种群(XH1)为泗洪北大运河种群与湖南鄱阳湖种群的杂交后代,亲本间的地理位置较远,因而该种群的遗传多样性指数较高,达 0.308 7。南京江浦种群(JP)的三角帆蚌苗种没有固定的来源,苗种交流比较频繁。苗种交流在一定程度上提高了三角帆蚌种群的遗传多样性指数。但由于生产企业未能建立完整的引种和苗种繁育档案,不利于以后的蚌源追溯和良种繁育。由该研究遗传多样性分析结果提示,在三角帆蚌养殖过程中一定要注重远源苗种的引种杂交,以增加养殖群体的遗传多样性,并须建立完善的引种和苗种繁育档案,以利于以后的蚌源追溯和良种繁育。

**3.2 种群之间遗传相似度与遗传距离分析** 遗传相似度与遗传距离反映种群间的亲缘关系。李家乐等<sup>[11]</sup>和华丹等<sup>[8]</sup>利用 RAPD 技术分别对我国五大湖三角帆蚌种群和江苏无锡野生与养殖三角帆蚌种群进行了研究,发现我国五大湖三角帆蚌种群间的遗传相似度介于 0.683 0 ~ 0.873 8,无锡野生与养殖三角帆蚌种群间的遗传相似度为 0.946。该研究利用多态性好、重复性高的 ISSR 技术对江苏地区三角帆蚌种群进行分析发现,采自江苏地区的 5 个种群间的遗传相似度为 0.860 9 ~ 0.965 5,表明江苏地区三角帆蚌种群具有一定的遗传进化潜力。由结果可以看出,群体间的相似度与群体来源的地域差异有关,地域差异大则相似度低,而相近地域的遗传相似度高。对于江苏地区来说相似度较高,应该进行

跨地域间的引种,以增加群体间基因交流,提高遗传多样性,增强遗传分化能力。

UPGMA 聚类分析结果表明,洪泽湖种群(HZH)和南京江浦种群(JP)亲缘关系最近,聚为 1 支,再与无锡太湖种群(TH)聚合;而兴化野生种群(XH2)和兴化养殖场种群(XH1)之间遗传距离较近单独聚为 1 支。由聚类图可见,江苏地区 5 个三角帆蚌的亲缘关系和地理位置有一定关系,但却没有明显的地区差异,这可能与江苏地区三角帆蚌苗种交流有关,使三角帆蚌种群间发生基因交流,打破原先地域分布带来的限制,使各种群间的遗传距离与地理位置之间的关系不是很明显。

**3.3 群体分子变异结果分析** 对群体间和群体内的遗传多样性进行分析,不仅能揭示出该群体潜在的遗传多样性(因为子代个体的遗传变异是群体内以及群体间遗传变异的持续来源),还能对该物种的交配系统进行粗略估计,对那些目前交配系统模式仍不清楚的物种,通过对其群体内遗传多样性的研究,将有助于进一步了解该种的繁育系统。AMOVA 结果显示,三角帆蚌绝大部分的遗传变异存在于群体内部,因此要维持该物种的遗传多样性,就要从维持其群体内的遗传多样性着手,选择优良的远交亲本,增加有效繁殖个体数。

**3.4 三角帆蚌的遗传改良与种质资源保护** 三角帆蚌是我国特有的淡水育珠蚌,在我国淡水珍珠养殖业中占有重要的地位,但目前我国对野生三角帆蚌种质资源的保护力度还不够,由于环境污染等因素的影响,有些水域的三角帆蚌资源量大幅下降。而养殖场多代近亲繁殖现象普遍,三角帆蚌种质退化,抗逆性减弱,育珠质量不断下降。从日本引进的池蝶蚌对育珠品种是有益的补充<sup>[12]</sup>,但也对我国同属的三角帆蚌构成了潜在威胁,再加上近年来由于人工养殖规模的日益壮大,育珠过程中三角帆蚌种群病害频发,筛选或选育出优良品质的三角帆蚌种质并加以保护是当前亟需解决的关键问题之一<sup>[13]</sup>。贝类杂交后代存在一定的杂交优势,在抗病性能、生产性能等方面均较亲本有一定的优势<sup>[14-15]</sup>。因此利用不同种群间的三角帆蚌杂交,在一定程度上可以达到遗传改良的目的。而杂交子代在人工累代繁殖中容易使后代基因库产生不良变化,造成种质污染,给生产带来损失<sup>[16]</sup>。因此,利用野生群体进行杂交育种时须纯化亲本才能获得杂种优势,人工育苗或选择性育种需要保持足够数量的繁殖亲本以

避免遗传多样性降低<sup>[17]</sup>。我国在海水贝类中开展的多倍体育种和现代生物技术辅助育种工作,对提高贝类的生长速度、抗病力和育珠质量发挥了重要作用<sup>[18]</sup>。因此,在今后的三角帆蚌育种工作中,如果在保护好野生资源的基础上,利用分子标记技术辅助选择稳定的家系,合理利用杂交优势,建立完善的遗传改良体系,也许能实现精确、稳定、高效的育种目标。

#### 参考文献

- [1] J·萨姆布鲁克, D·W·拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] 陈大鹏, 沈怀舜, 丁亚平, 等. 文蛤 (*Meretrix meretrix*) 地理种群 ISSR 分子标记的初步研究[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 2004, 27(3): 74-77.
- [3] 吕林兰, 杜晓东, 王嫣, 等. 马氏珠母贝 ISSR-PCR 反应条件优化[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(22): 5806-5807, 5855.
- [4] EXCOFFIER L, SMOUSE P E, QUATTRO J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes; application to human mitochondrial DNA restriction Data[J]. Genetics, 1992, 131: 479-491.
- [5] 张富民, 葛颂. 群体遗传学研究中的数据处理方法 I. RAPD 数据的 AMOVA 分析[J]. 生物多样性, 2002, 10(4): 438-444.
- [6] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKE A, LABUDA D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genome, 1994, 20: 178-183.
- [7] 王爱民, 邓凤姣, 张锡元, 等. 马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 2000, 46(4): 467-470.
- [8] 华丹, 顾若波, 白云飞, 等. RAPD 分析野生和养殖三角帆蚌的遗传多样性[J]. 水产学报, 2003, 27(6): 540-544.
- [9] 张国范, 刘晓, 阙华勇, 等. 贝类杂交及杂种优势理论和技术研究进展[J]. 海洋科学, 2004, 28(7): 54-60.
- [10] 张玉勇, 常亚青, 宋坚. 杂交育种技术在海水养殖贝类中的应用及研究进展[J]. 水产科学, 2005, 24(4): 39-41.
- [11] 李家乐, 钱荣华, 鲍宝龙. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(1): 1-5.
- [12] 徐毛喜, 颜冬. 池蝶蚌育珠技术[J]. 江西水产科技, 2005(1): 39-41.
- [13] 汪桂玲, 袁一鸣, 李家乐. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性及亲缘关系的 SSR 分析[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 152-157.
- [14] MACKIE L A, ANSELL A D. Differences in reproductive ecology in natural and transplanted populations of *Pecten maximus*: evidence for the existence of separate stocks [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1993, 169: 57-75.
- [15] 董志国, 李家乐, 郑汉丰. 三角帆蚌三个优异群体杂交后代生长性能比较研究[J]. 淡水渔业, 2007, 37(3): 17-21.
- [16] 庄志猛, 孔杰, 石拓, 等. 日本对虾野生和养殖群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 自然科学进展, 2001(11): 250-255.
- [17] 吕林兰, 杜晓东, 王嫣, 等. 马氏珠母贝 3 个野生种群及种群间杂交后代遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 水生生物学报, 2008, 32(1): 26-32.
- [18] 姜波, 王昭萍, 于瑞海, 等. 多倍体贝类的繁殖生物学研究进展[J]. 海洋湖沼通报, 2004(2): 73-79.

(上接第 17366 页)

操作。研究成果对于生产富钙、铁的灵芝具有指导意义。所以可以考虑直接生产富钙、铁的灵芝口服液或饮料,从而更好地为人类服务。

#### 参考文献

- [1] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 2 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2001.

- [2] 韩春华, 李明, 田景花. 食用菌富集微量元素的特性及在栽培中应用[J]. 食用菌, 2003(3): 2-3.
- [3] 陆利霞, 沈爱光. 食用菌富集微量元素的研究与展望[J]. 中国食用菌, 1999(4): 10-12.
- [4] 蔡震峰, 李卫东, 刘咏, 等. 微量锌的分离与富集[J]. 理化检验: 化学分册, 2006(2): 141-145.