

文章编号:1000 - 0615(2004)06 - 0616 - 07

栉孔扇贝人工雌核发育的细胞学观察

潘 英^{1,2}, 李 琪¹, 于瑞海¹, 王如才¹

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 广西大学动物科技学院, 广西 南宁 530004)

摘要:运用荧光显微镜观察了栉孔扇贝正常卵子与雌核发育卵子在受精和成熟分裂过程中的核相变化。结果表明,尽管紫外线照射没有影响受精卵的成熟分裂以及雌性、雄性原核的形成,但使雌核卵的发育速度出现明显的滞缓。在第 1 次卵裂中期,雌核发育卵子中的雄性原核没有像雌性原核那样形成染色体,而是浓缩为一染色质小体(DCB),游离在细胞质中,不参与核分裂。胞质分裂结束时,DCB 位于 2 个卵裂球之一的细胞质内或在赤道板处被分割成两部分。实验结果首次提供了栉孔扇贝雌核发育的细胞学证据。

关键词:栉孔扇贝;雌核发育;细胞学;4,6-二氨基-2-苯基吲哚

中图分类号:S917

文献标识码:A

Cytological observations on artificially induced gynogenesis in *Chlamys farreri*

PAN Ying^{1,2}, LI Qi¹, YU Rui-hai¹, WANG Ru-cai¹

(1. The Key Laboratory of Mariculture, Education Ministry, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China).

Abstract: Nuclear changes in normal and gynogenetic eggs of the *Chlamys farreri* were examined under a fluorescence microscope during meiosis and fertilization. Two milliliters of sperm suspension (1×10^7 sperm \cdot mL⁻¹) were spread on a 9.0 cm diameter plastic petri dish and placed on a reciprocal shaker 15 cm below a 15 W UV germicidal light. Haploid gynogenesis was induced by sperms, which were ultraviolet (UV)-irradiated for 30 s at an intensity of $2561 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Both the treated sperm and the untreated sperm (control) were mixed separately with a suspension of eggs (2×10^4 egg \cdot mL⁻¹), and the eggs were then allowed to develop at 22 °C. Samples of eggs from the two groups were taken at 5 min intervals up to 2 h after the addition of sperm and fixed in 2 % formalin in seawater at 4 °C. After rinsing three times with 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer containing 8 % sucrose, the samples were stained with DAPI, and observed with a fluorescence microscope. The results obtained in this study demonstrated that although UV irradiation did not affect either meiotic maturation or the formation of the male and female pronuclei, their developmental progress was delayed apparently. At metaphase of the first cleavage, the male pronucleus derived from sperm genome inactivated by UV-irradiated sperms inseminated with the normal egg formed no chromosomes, unlike the female pronucleus, but became a dense chromatin body (DCB), which did not participate in the karyokinesis at anaphase of the first cleavage as evidenced by

收稿日期:2003-07-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170735);教育部留学回国人员科研启动基金

作者简介:潘 英(1968-),女,广西南宁人,讲师,博士,主要从事贝类遗传育种研究。E-mail:panying680709@163.com

通讯作者:李 琪,E-mail:qili66@mail.ouc.edu.cn

chromosomal nondisjunction. On completion of cytokinesis of the first cleavage, the DCB was seen either in the cytoplasm of one of the two blastomeres or on the equatorial plate as two partitional parts. As did the normal eggs, the eggs inseminated with UV - irradiated sperm also developed in an asynchronous manner. On the other hand, in this study the eggs inseminated with UV - irradiated sperm developed slowly, and time difference between normal and gynogenetically developed eggs in reaching a developmental progress. Cytological evidence of the induction of gynogenesis in the scallop was first demonstrated.

Key words: *Chlamys farreri*; gynogenesis; cytology; 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)

人工诱导雌核发育是指通过用物理或化学方法使遗传失活的精子激活卵,精子不参与合子核的形成,卵仅靠雌核发育形成胚胎的一种发育方式。由于雌核发育后代的遗传物质完全来源于母体,因而可作为快速建立纯合系、克隆的有效手段。通过该方法,已成功地培育出虹鳟 (*Salmo gairdneri*)^[1]、斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)^[2]、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[3]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[4]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[5]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[6] 等经济鱼类的克隆品系,为养殖新品种的开发以及性别决定机制、单性生殖等基础生物学研究提供了极为宝贵的素材。在贝类方面,在太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[7-9]、贻贝 (*Mytilus edulis*)^[10]、地中海贻贝 (*M. galloprovincialis*)^[11]、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)^[12-15]、华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*)^[16]、虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)^[17]、合浦珠母贝 (*Pinctada martensii*)^[18] 和侏儒蛤 (*Mulinia lateralis*)^[19,20] 等近 10 种海洋经济贝类中相继进行了人工诱导雌核发育的研究^[21]。然而,关于雌核发育卵子发育早期的细胞学方面的研究报道很少,目前仅见于太平洋牡蛎 (*C. gigas*)^[22] 和皱纹盘鲍 (*H. discus hannai*)^[23] 雌核发育的细胞学观察方面的报道。有关贝类雌核发育诱导的细胞学机制并不清楚,贝类雌核发育的有效诱导程序还没有像鱼类那样建立起来。因此,对遗传失活精子在卵内的染色体动态变化进一步研究,有助于弄清贝类雌核发育的细胞学机制,改善雌核发育诱导技术,提高诱导效率。

关于栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 人工诱导雌核发育方面的细胞学研究国内外尚未见报道。我们以栉孔扇贝为对象,首次研究了紫外线照射对栉孔扇贝精子遗传失活的影响,成功地诱导出栉孔扇贝雌核发育单倍体^[24],在此基础上利用 DAPI 染色,通过荧光显微镜详细观察了栉孔扇贝正常

卵和雌核发育卵在受精和成熟分裂过程中精核的动态变化,旨在为研究贝类雌核发育的细胞学机制提供证据。

1 材料与方法

实验于 2002 年 3 - 5 月在山东省文登市水产综合育苗试验基地进行。所用栉孔扇贝亲贝取自威海北海养殖海区,为成熟期的 2 龄贝(壳长 6.27 ± 0.5 cm,壳高 6.75 ± 0.5 cm)。采用阴干升温 (20 ℃) 的方法获得精卵。采集的精卵经 25 μm 网目的筛绢过滤、分别收集,用血球计数板在显微镜下定量精子密度,并在解剖镜下定量卵子密度,使精子、卵子密度分别为 1×10^7 ind · mL⁻¹ 和 2×10^4 ind · mL⁻¹。

取 2 mL 精液均匀铺于直径为 9.0 cm 的亲水性组织培养皿 (Nunc dish; 丹麦 Nalge Nunc 公司) 中,然后将培养皿放在紫外线照射装置内的振荡器上,振荡器的振荡频率为每分钟 50 次。紫外线灭菌灯 (15W, Toshiba GL15, 254 nm; 日本东芝公司) 至培养皿底部的垂直距离为 15 cm,用紫外线强度计 (美国 Cole-Parmer 公司) 测得此处的紫外线强度为 $2561 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。紫外线照射栉孔扇贝精子 30 s。经紫外线照射后的精子和未经处理的精子 (对照组) 分别立即与 10 mL 正常卵液充分混合授精,然后在 20 ℃ 的水温条件下培养。

在精卵充分混合后 0 ~ 2 h 内,每隔 5 min 分别从对照组 (0 s) 和照射组 (30 s) 中用吸管吸取受精卵样品 (每次 200 ~ 300 个),按 Li 等^[22] 的方法用 2% 福尔马林海水溶液固定,于 4 ℃ 保存。样品经含 8% 蔗糖的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液洗卵 3 次后,DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) 染色 1 h 以上,然后在 Olympus BH2 荧光显微镜 (120 ×) 下观察、拍照。

2 结果

2.1 正常卵子中的精核行为

为了阐明受精后各发育时间与核相间的关系,我们对栉孔扇贝精子入卵至第2次卵裂过程中染色体的行为进行观察,并将受精和成熟分裂过程中卵内核的形态变化分为11个阶段:图版-0表明栉孔扇贝成熟卵子受精前处于第1次减数分裂中期,此时同源染色体配对,排列在中期赤道板上。

第1阶段(图版-1,授精):母本染色体处于浓缩状态并排列于赤道板上。精子穿过卵膜,其锥形头部进入细胞质膜后,精核略微膨大扩散形成球形。

第2阶段(图版-2,第1次成熟分裂后期):卵细胞的同源染色体分开,位于卵子皮层。

第3阶段(图版-3,第1极体形成):第1极体(first polar body, PB1)以致密染色质团的形式排出卵子,剩余的母本染色体排列在中期赤道板上形成第2次成熟分裂中期。此时精核没有明显变化。

第4阶段(图版-4,第2次成熟分裂后期):排列在中期赤道板上的母本染色单体再次分离为两组,每组染色体的荧光强度比PB1低,反映了DNA量的减少。精核再次膨胀。

第5阶段(图版-5a, b,第2极体以及雌性、雄性原核的形成):靠近PB1的一组染色体形成第2极体(second polar body, PB2)排出并位于PB1的下方。精核迅速膨大扩散形成雄性原核,随后卵内剩余的母本染色体扩散形成大小、形状与雄性原核相似的雌性原核。两原核沿一定路线移动,逐渐靠拢。

第6阶段(图版-6,第1次卵裂中期):雌、雄原核内的染色质各自浓缩形成染色体并相互融合,共同排列在中期赤道板上,形成第1次卵裂的中期相。

第7阶段(图版-7,第1次卵裂后期):染色体在纺锤丝的牵引下向卵的两极移动,此时还观察不到卵裂沟。

第8阶段(图版-8,2细胞期):随着胞质分裂结束,形成两个大小不均等的分裂球。

第9阶段(图版-9,第2次卵裂后期):在两个分裂球中均出现染色体的分离。

第10阶段(图版-10,4细胞期):胞质分裂结束,形成4个分裂球。

表1显示了受精后正常卵子各发育阶段与时间间隔之间的关系。在减数分裂和卵裂过程中表现出了发育的不同步性。处于第1次成熟分裂后期(第2阶段)的卵子出现在受精后10~30 min,而处于第2次成熟分裂后期(第4阶段)的卵子出现在受精后25~60 min。

表1 正常卵子授精后各发育阶段发生时间表

Tab. 1 Developmental timetable in normal eggs after insemination

| 授精后时间 (min) time after insemination | 发育阶段* developmental stages | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | | | | |
| 5 | 58 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 63 | 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 17 | 33 | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 22 | 4 | 27 | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | 7 | 3 | 43 | 4 | | | | | | | | | | | | |
| 30 | 5 | 9 | 58 | 10 | 1 | | | | | | | | | | | |
| 35 | | | 17 | 20 | 9 | | | | | | | | | | | |
| 40 | | | 7 | 23 | 42 | 2 | | | | | | | | | | |
| 45 | | | 6 | 11 | 47 | 8 | | | | | | | | | | |
| 50 | | | | 1 | 61 | 22 | | | | | | | | | | |
| 55 | | | | 4 | 66 | 35 | | | | | | | | | | |
| 60 | | | | | 5 | 67 | 22 | | | | | | | | | |
| 65 | | | | | | 16 | 45 | 3 | | | | | | | | |
| 70 | | | | | | 6 | 27 | 51 | | | | | | | | |
| 75 | | | | | | 3 | 10 | 39 | 2 | | | | | | | |
| 80 | | | | | | | 11 | 54 | 20 | 4 | | | | | | |
| 85 | | | | | | | | 15 | 5 | 63 | 3 | 2 | | | | |
| 90 | | | | | | | | | 3 | 16 | 45 | 2 | | | | |
| 95 | | | | | | | | | | 1 | 13 | 35 | 4 | | | |
| 100 | | | | | | | | | | | 38 | 20 | 11 | | | |
| 105 | | | | | | | | | | | | 11 | 28 | 37 | | |
| 110 | | | | | | | | | | | | | 7 | 21 | 42 | |
| 115 | | | | | | | | | | | | | | 3 | 10 | 71 |
| 120 | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 98 |

注: *数字1~10与图版中的发育阶段相对应。授精后4 h的卵裂率为77.6%。表1中的数字表示观察的受精卵数目

Notes: * Numbers 1 - 10 correspond to the developmental stages of plate. The cleavage rate at 4h post-fertilization was 77.9%. The numbers in Table 1 indicate number of zygotes observed

2.2 雌核发育卵子内的精核行为

雌核发育卵子的减数分裂和雌性原核的形成过程与正常卵子相同,能够排出PB1和PB2,形成大小、形状与正常卵子中相似的雌性原核(图版-11~15)。紫外线照射精子入卵后,精核同样经历

2 次明显的膨胀扩散并最终形成与正常卵子内大小、形状相似的雄性原核,在第一次卵裂前期其行为与正常精核行为相似(图版-15)。但在第 1 次卵裂中期,随着雌性原核的染色质浓缩形成一组染色体,最终排列在中期赤道板上,雌核发育卵子内的雄性原核并没有浓缩形成染色体,而是形成一个致密的染色质小体(dense chromatin body, DCB, 图版-16),位于母本染色体近旁,没有与母本染色体融合。在第 1 次卵裂后、末期,随着来自母本的染色体移向两个纺锤极,DCB 滞留在 2 组染色体之间(图版-17,18)。胞质分裂结束后,可以观察到 DCB 存在于 2 个分裂球其中之一的细胞质中(图版-19a)或被第 1 次卵裂沟分割为 2 个部分而同时存在于 2 个分裂球的细胞质之中(图版-19b)。

表 2 为雌核发育卵子的发育时间表。雌核发育卵子也存在与正常卵子一样发育不同步的现象,然而雌核发育卵的发育速度出现明显的滞缓。与正常卵子的发育相比,大多数雌核发育卵达到第 3,5 和 8 阶段所需要的时间分别延迟 10,10 和 20 min。

3 讨论

已有的研究表明,贝类排出的成熟卵在受精前处于第 1 次成熟分裂的前期或中期^[25]。观察结果显示,栉孔扇贝的成熟卵在受精前处于第 1 次成熟分裂中期,其正常卵子成熟分裂与受精过程与杨爱国等^[26]的观察基本一致。在栉孔扇贝的受精过程中,雌、雄原核的出现是不同步的,雄性原核稍早于雌性原核,且发生在第 2 次成熟分裂完成之后。这与任素莲等^[27]的研究结果相同,而与杨爱国等^[26]的观察不同。不同的种类,雌雄原核出现的时间存在差异,栉孔扇贝雌雄原核的形成与太平洋牡蛎(*C. gigas*)^[28]、近江牡蛎(*Ostrea rivularis* Gould)^[29]有所差别。在栉孔扇贝的成熟分裂过程中,雌、雄原核分别沿一定路线向卵中央移动、相互靠拢,然后雌、雄原核内的染色质经浓缩后各自形成染色体并相互融合,共同排列在中期赤道板上,形成第 1 次卵裂中期相,没有形成合子核。这在太平洋牡蛎^[22]、日本珍珠贝(*Pinctada fucata martensii*)^[30]、大扇贝(*Placopecten magellanicus*)^[31]的受精过程中也观察到相似的结果。而任素莲等^[27]认为在栉孔扇贝的受精过程

中,雌雄原核中的染色质是弥散的,原核融合后形成致密的染色质,因此两性原核结合成为合子核。这可能与染色方法和观察方式的不同有关。

表 2 雌核发育卵子受精后各发育阶段发生时间表
Tab. 2 Developmental timetable in eggs inseminated with UV-irradiated sperm after insemination

| 授精后时间 (min) time after insemination | 发育阶段* developmental stages | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|---|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 5 | 71 | | | | | | | | | |
| 10 | 60 | 4 | | | | | | | | |
| 15 | 40 | 49 | 1 | | | | | | | |
| 20 | 17 | 37 | 3 | | | | | | | |
| 25 | 4 | 35 | 7 | | | | | | | |
| 30 | 3 | 16 | 25 | 12 | | | | | | |
| 35 | | 2 | 24 | 39 | 1 | | | | | |
| 40 | | | 3 | 11 | 4 | | | | | |
| 45 | | | 6 | 27 | 16 | | | | | |
| 50 | | | 11 | 13 | 30 | | | | | |
| 55 | | | 3 | 20 | 38 | | | | | |
| 60 | | | | 2 | 47 | | | | | |
| 65 | | | | 1 | 45 | 8 | | | | |
| 70 | | | | | 12 | 36 | | | | |
| 75 | | | | | 39 | 18 | | | | |
| 80 | | | | | 35 | 25 | 3 | | | |
| 85 | | | | | 43 | 32 | 4 | | | |
| 90 | | | | | 5 | 26 | 19 | 1 | | |
| 95 | | | | | | 32 | 19 | 2 | | |
| 100 | | | | | | 17 | 33 | 23 | | |
| 105 | | | | | | 7 | 14 | 29 | | |
| 110 | | | | | | 2 | 23 | 42 | | |
| 115 | | | | | | | 11 | 67 | | |
| 120 | | | | | | | 2 | 78 | 4 | |

注: * 数字 1~10 与图版 11~19b 中的发育阶段相对应。受精后 4 h 的卵裂率为 62.4%。表 2 中的数字表示观察的受精卵数目

Notes: * Numbers 1 - 10 correspond to the developmental stages 11 - 19b of plate. The cleavage rate at 4h post-fertilization was 62.4%. The numbers in Table 2 indicate number of zygotes observed

研究表明,紫外线照射不仅可以破坏精子遗传物质还可使精子入卵后行为发生变化。紫外线照射并没有影响卵子成熟分裂以及雌、雄性原核的形成,但使卵的发生速度出现滞缓,这一现象在太平洋牡蛎^[22]、皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)^[23]中也有相似的报道。第 1 次卵裂前期,与雌性原核不同的是,经紫外线照射的精核形成的雄性原核并没有像雌性原核那样形成染色体,而是浓缩为一个致密的染色质小体(DCB),没有参加核分裂。

胞质分裂结束时,DCB 游离于卵裂球中或滞留在卵裂沟上。在第 1 次卵裂后期,由于没有观察到 DCB 的分离,表明经紫外线照射的精子染色体并没有参与第 1 次卵裂过程中的核分裂。由于荧光取样时间的限制,我们无法继续跟踪研究 DCB 对 4 细胞期及其以后胚胎发育的影响,以及 DCB 的最终去向仍未弄清楚。该研究首次提供了栉孔扇贝雌核发育卵仅靠自身染色体发育成胚胎的细胞学证据,从细胞学角度进一步证实精子经 $2561 \mu\text{W cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 的紫外线照射 30 s 可有效地诱导出栉孔扇贝雌核发育单倍体。

从表 1,2 中可以发现栉孔扇贝正常卵子和雌核发育卵同样具有发育不同步的特点。在太平洋牡蛎^[22]、皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)^[23]的雌核发育诱导的研究中也存在发育不同步的现象,这可能是贝类受精过程中的一个共同特点。这一现象也解释了在雌核发育单倍体诱导过程中雌核单倍体率在理论上不可能达到 100% 的原因。此外,由于紫外线照射使雌核卵的发育速度出现明显的滞后,表明抑制极体形成或卵裂产生三倍体的最佳时机并非适用于雌核发育二倍体的诱导。

参考文献:

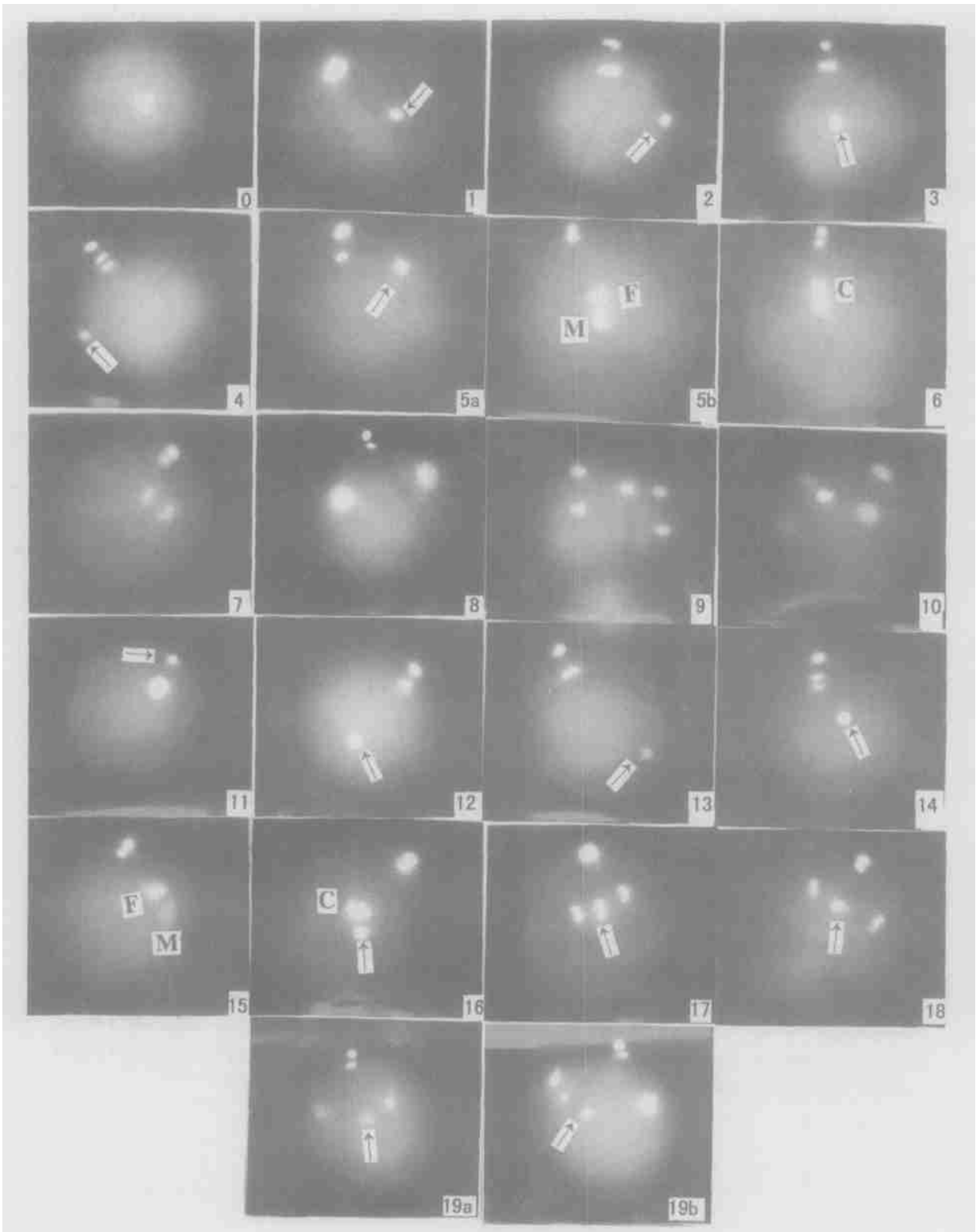
- [1] Lou Y D, Purdom C E. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson[J]. J Fish Biol, 1984, 24: 665 - 670.
- [2] Streiesinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Nature, 1981, 291: 293 - 296.
- [3] Hussain M G. Suppression of first cleavage in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L[J]. Genetics in Aquac IV, 1993, 262 - 270.
- [4] Komen J, Bongers A B J, Richter C J J, et al. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) II. The production of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids [J]. Aquac, 1991, 92: 127 - 142.
- [5] Naruse K, Ijiri K, Shima A, et al. The production of cloned fish in the medaka (*Orgzias latipes*) [J]. J Exp Zool, 1985, 236: 335 - 341.
- [6] Tabata K, Gorie S. Induction of gynogenesis diploids in *Paralichthys olivaceus* by suppression of the 1st cleavage with special reference to their survival and growth[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1988, 54: 1867 - 1872.
- [7] Guo X, Hershberger W K, Cooper K, et al. Artificial gynogenesis with ultraviolet light-irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* I. Induction and survival [J]. Aquac, 1993, 113: 201 - 214.
- [8] Goswami U. Induction of gynogenetic haploidy in oyster *Crassostrea gigas*, using ultraviolet irradiated sperm[J]. Indian J Mar Sci, 1993, 22: 146 - 148.
- [9] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Induction of gynogenetic diploids and cytological studies in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Suisanzoshoku, 2000, 48: 185 - 191.
- [10] Fairbrother J E. Viable gynogenetic diploid *Mytilus edulis* (L.) larvae produced by ultraviolet light irradiation and cytochalasin B shock[J]. Aquac, 1994, 126: 25 - 34.
- [11] Scarpa J, Komaru A, Wada K T. Gynogenetic induction in the mussel, *Mytilus galloprovincialis* [J]. Bull Natl Res Inst Aquac, 1994, 23: 33 - 41.
- [12] Arai K, Naito F, Sasaki H, et al. Gynogenesis with ultraviolet ray irradiated sperm in Pacific abalone [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1984, 52: 417 - 422.
- [13] Fujino K, Arai K, Iwadare K, et al. Induction of gynogenetic diploid by inhibiting 2nd meiosis in the Pacific abalone [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1990, 56: 1755 - 1763.
- [14] Kijima A. Effect of UV irradiation on genetic inactivation of sperm using marketing tissue culture petri dish in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* [J]. Tohoku J Agric Res, 1992, 42: 73 - 81.
- [15] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* [J]. Tohoku J Agric Res, 1999, 50: 1 - 10.
- [16] Goswami U. Sperm density required for inducing gynogenetic haploidy in scallop *Chlamys nobilis* [J]. Indian J Mar Sci, 1991, 20: 255 - 258.
- [17] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* [J]. Aquac, 2000, 186: 233 - 242.
- [18] Xu G Q, Lin Y G, Li G, et al. A preliminary study on the induction of gynogenetic diploid and "Hertwig effect" in pearl oyster *Pinctada martens* II [J]. Tropic Oceanology, 1990, 9: 1 - 7. [许国强,林岳光,李刚,等.人工诱导合浦珠母贝雌核二倍体发生及"Hertwig"效应的初步研究[J].热带海洋, 1990, 9(2): 1 - 7.]
- [19] Scarpa J, Bolton E T. Experimental production of gynogenetic and parthenogenetic *Mulinia lateralis* (Say) [J]. Shellfish Res, 1988, 7: 132 (Abstract).
- [20] Guo X, Allen S K Jr. Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say) [J]. Genetics, 1994, 138: 1199 - 1206.
- [21] Pan Y, Li Q, Wang R C, et al. Progress and perspectives of gynogenesis research in marine molluscs [J]. J Fish China, 2002, 26(5): 465 - 471. [潘英,李琪,王如才,等.海洋贝类雌核发育研究进展和展望[J].水产学报, 2002, 26(5): 465 - 471.]
- [22] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Cytological observations

- on nuclear behavior in normal and gynogenetic eggs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Suisanzoshoku*, 2000, 48: 193 - 198.
- [23] Li Q, Osada M, Kashihara M, *et al.* Cytological studies on artificially induced gynogenesis in the Pacific abalone [J]. *Fisheries Science*, 2000, 66: 701 - 707.
- [24] Pan Y, Li Q, Yu R H, *et al.* Induction of gynogenesis and effects of ultraviolet irradiation on ultrastructure of sperm of the Zhikong scallop, *Chlamys farrieri* [J]. *Fisheries Science*, 2004, 70: 487 - 496.
- [25] Ahmed M. Cytogenetics of oysters [J]. *Cytologia*, 1973, 38: 337 - 347.
- [26] Yang A G, Wang Q Y, Kong J, *et al.* Cytological study on meiosis of fertilized eggs from *Chlamys farrieri* [J]. *J Fish Sci China*, 1999, 6(3): 96 - 98. [杨爱国,王清印,孔杰,等. 栉孔扇贝受精卵减数分裂的细胞学研究[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(3): 96 - 98.]
- [27] Ren S L, Wang D X, Shen X Z, *et al.* Cytological observation on fertilization of *Chlamys farrieri* [J]. *Trans Oceanol Limnol*, 2000, 1: 24 - 29. [任素莲,王德秀,绳秀珍,等. 栉孔扇贝受精过程的细胞学观察[J]. *海洋湖沼通报*, 2000, 1: 24 - 29.]
- [28] Ren S L, Wang D X, Wang R C, *et al.* Sperm nuclear dispersion and meiotic maturation in fertilized eggs of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Trans Oceanol Limnol*, 1999, 1: 34 - 39. [任素莲,王德秀,王如才,等. 太平洋牡蛎受精过程中的精核扩散与原核形成[J]. *海洋湖沼通报*, 1999, 1: 34 - 39.]
- [29] Shen Y P, Liu T, Jiang H P, *et al.* A cytological study on fertilization of eggs in *Ostrea rivularis* Gould [J]. *J Wuhan Univ*, 1995, 41(4): 482 - 486. [沈亦平,刘汀,姜河波,等. 近江牡蛎受精的细胞学研究[J]. *武汉大学学报*, 1995, 41(4): 482 - 486.]
- [30] Komaru A, Matsuda H, Yamakawa T, *et al.* Meiosis and fertilization of the Japanese pearl oyster eggs at different temperatures observed with a fluorescence microscope [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1990, 56: 425 - 430.
- [31] Desilets J, Gicquaud C, Dude F. An ultrastructural analysis of early fertilization events in the giant scallop, *Placopecten magellanicus* (Mollusca, Pelecypoda) [J]. *Invert Reprod Develop*, 1995, 27: 115 - 129.

图版说明 Explanation of Plate

0. 第1次成熟分裂中期(未受精成熟卵子); 1. 授精; 2. 第1次成熟分裂后期; 3. 第1极体的形成; 4. 第2次成熟分裂后期; 5a. 第2极体的形成; 5b. 雌性原核(F)和雄性原核(M)的形成; 6. 第1次卵裂中期; 7. 第1次卵裂后期; 8. 2细胞期; 9. 第2次卵裂后期; 10. 4细胞期 箭头表示精核. C. 染色体. 放大倍数: $\times 120$; 11. 第1次成熟分裂中期(授精); 12. 第1次成熟分裂后期; 13. 第1极体的形成; 14. 第2次成熟分裂后期; 15. 第2极体以及雌性原核(F)和雄性原核(M)的形成; 16. 第1次卵裂中期; 17. 第1次卵裂后期; 18. 第1次卵裂末期; 19a, b. 2细胞期 箭头表示经紫外线照射的精核. C. 染色体. 放大倍数: $\times 120$.

0. metaphase of the first meiosis (unfertilized egg); 1. insemination; 2. anaphase of the first meiosis; 3. formation of the first polar body; 4. anaphase of the second meiosis; 5 a. formation of the second polar body; 5 b. formation of the female (F) and male (M) pronuclei; 6. metaphase of the first cleavage; 7. anaphase of the first cleavage; 8. 2-cell; 9. anaphase of the second cleavage; 10. 4-cell. arrows indicate the sperm nucleus; C represents chromosomes. $\times 120$; 11. metaphase of the first meiosis; 12. anaphase of the first meiosis; 13. formation of the first polar body; 14. anaphase of the second meiosis; 15. formation of the second polar body, the female (F) and male (M) pronuclei; 16. metaphase of the first cleavage; 17. anaphase of the first cleavage; 18. telophase of the first cleavage; 19a, b. 2-cell. arrows indicate the UV-irradiated sperm nucleus; C represents chromosomes, $\times 120$.



图版 Plate