

文章编号:1000-0615(2009)04-0542-07

异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育后代的微卫星分析

吴 彪, 杨爱国, 王清印, 刘志鸿, 周丽青

(中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:采用紫外线遗传灭活的长牡蛎精子激活栉孔扇贝卵子, 6-DMAP 诱导染色体加倍的方法, 获得第二极体抑制型雌核发育二倍体早期胚胎。通过优化 PCR 反应条件, 在 11 对栉孔扇贝和 10 对长牡蛎微卫星引物中共筛选出 3 对引物, 可以同时长牡蛎和栉孔扇贝基因组中获得稳定性, 多态性较好的特异性扩增条带, 其中 2 对引物为栉孔扇贝引物。利用筛选出的 3 对通用微卫星引物对雌核发育后代进行检验及遗传分析。结果表明, 雌核发育个体基因完全来自于母本, 后代中没有父本基因的表达; 部分雌核发育后代在 3 个座位上发生了纯合, 部分个体发生了不同程度的基因重组, 3 个座位上的重组率分别为 40%、55% 和 35%。研究结果从分子水平上证实, 利用遗传失活的长牡蛎精子诱导栉孔扇贝雌核发育是可行的, 只进行一次第二极体抑制型雌核发育二倍体的诱导只能获得部分后代个体的基因纯合, 但后代与母本具有较高的遗传同质性。

关键词:栉孔扇贝; 异源精子; 雌核发育; 微卫星

中图分类号: S 917

文献标识码: A

人工诱导雌核发育二倍体是指通过物理、化学或生物学方法使精子遗传失活, 与正常卵子“授精”, 再通过抑制极体排放或者第一次卵裂使单倍性胚胎的染色体加倍从而发育成雌核二倍体。在雌核发育过程中, 没有雌雄两性原核的融合, 遗传物质理论上来源于母本, 可以快速建立纯系。有研究表明, 一次有丝分裂型雌核发育相当于 8~10 个世代同胞兄妹交配, 应用雌核发育技术只需一代最多二代就可获得纯系^[1-2]。

近年来, 栉孔扇贝在养殖过程中出现了品种退化、产量降低、品质下降等问题, 因此通过人工诱导雌核发育快速建立栉孔扇贝纯系, 并通过纯系间杂交选育是培育栉孔扇贝优良品种的良好途径。由于同源精子诱导栉孔扇贝雌核发育存在由于精子灭活不完全等原因可能造成后代中存在正常发育的个体^[3], 所以不能保证其后代全部为雌核发育个体。任建峰等^[4]证实长牡蛎精子可激活栉孔扇贝成熟卵子的发育, 但其杂交后代不能

成活, 这为利用异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育的研究提供了新思路。微卫星 DNA 因其数量分布广、多态性丰富及检测快速方便等优点而备受青睐, 已被广泛应用于群体遗传学、遗传图谱构建、基因定位、亲子鉴定、个体识别等领域^[5-7]。本研究在顺利获得 3 对长牡蛎和栉孔扇贝可通用的微卫星引物的基础上, 对遗传失活的长牡蛎精子诱导的栉孔扇贝雌核发育后代进行遗传分析, 旨在对雌核发育的诱导效果进行评价, 为异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育的可行性研究提供一定的依据。

1 材料与方 法

1.1 雌核发育后代的获得

栉孔扇贝于 2007 年 2 月取自青岛志诚水产科技公司, 壳高 6~8 cm。长牡蛎取自青岛即墨岙山卫镇附近海区, 壳高 11~12 cm。亲贝取回后雌雄分开室内暂养, 人工控温促使栉孔扇贝、长

收稿日期: 2008-05-30 修回日期: 2008-09-22

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A408); 国家科技支撑计划专题(2006BAD01A00); 国家自然科学基金资助(30600465)

通讯作者: 王清印, Tel: 0532-85822959, E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

牡蛎同时性成熟。挑选性腺发育饱满的雌性栉孔扇贝,阴干处理 30 min 后分别放入盛有过滤海水的烧杯内,亲贝产卵后定量至 1.0×10^5 ind/mL。解剖法获得长牡蛎的精子,定量至 1.0×10^7 ind/mL。参照李雅娟等^[8]方法,将精液在辐射强度为 $1\ 500\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的紫外线下照射 60 s,照射后的精液立即加入盛有 50 mL 栉孔扇贝卵液的烧杯中,用玻璃棒搅拌均匀并稀释至 200 mL(单对单授精)。显微镜下观察到处理组约 20% 受精卵排出第一极体时,施加 6-DMAP 母液(10 mg/mL)1.2 mL,使其终质量浓度达到 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$,持续处理 25 min。之后用 500 目筛绢过滤,洗卵 2~3 次,移入装有 200 mL 过滤海水的烧杯中继续培养。后代幼虫发育至担轮幼虫时,无水乙醇固定于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存。亲贝闭壳肌保存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 超低温冰箱内。

1.2 基因组 DNA 的提取

亲贝基因组 DNA 的提取按第三版《分子克隆实验指南》上的方法略改动。取约 100 mg 闭壳肌置于 Eppendorf 管中,加入 475 μL 的组织缓冲液(TE 缓冲液, pH 8.0),室温下剪碎,加入 25 μL 10% SDS 及 5 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K, $55\ ^\circ\text{C}$ 水浴消化 3 h 至溶液清亮透明;取出冷却,加入等体积饱和酚 500 μL ,轻摇 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液;再分别用等体积饱和酚:氯仿(1:1)、氯仿抽提;1/25 体积的 5 mol/L NaCl 和二倍体积的冷无水乙醇沉淀;70% 乙醇洗涤两次后风干,TE(pH 8.0)溶解,置 $-20\ ^\circ\text{C}$ 下保存。单个幼虫 DNA 的提取参照刘广绪等^[9]的方法进行:在含有一个担轮幼虫的 PCR 管内各加入 15 μL 的裂解液于 $55\ ^\circ\text{C}$ 恒温裂解 3 h 左右,再置于 $95\ ^\circ\text{C}$ 下 10 min 以灭活蛋白酶 K。提取后的 DNA 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,紫外凝胶成像检测 DNA 的完整性,核酸定量仪测定浓度,最后用 TE 稀释成 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的模板 DNA。

1.3 引物筛选及后代检验方法

利用栉孔扇贝 DNA 模板优化 11 对栉孔扇贝微卫星引物的 PCR 反应条件,长牡蛎 DNA 模板优化 10 对长牡蛎微卫星引物的 PCR 反应条件。在此基础上,筛选对栉孔扇贝模板和长牡蛎

模板能同时扩增的引物。利用筛选出的通用引物对基因组 DNA 质量好的雌核发育后代进行检验和分析。

1.4 引物来源

在已发表的文献中查找扩增效果好、多态性高的微卫星引物序列。本研究共选用 21 对微卫星引物序列进行筛选,其中栉孔扇贝引物 11 对^[10],牡蛎引物 10 对^[11]。引物均由英俊生物技术有限公司合成。

1.5 PCR 反应

PCR 反应体系参照谭杰等^[12]的方法,进行适当的调整。每个 PCR 反应体系总体积为 10 μL ,含 100 ng 模板 DNA, 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物, 0.25 mmol/L dNTPs, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 1 \times PCR 反应 Buffer, 0.25 U *Taq* DNA 聚合酶。

PCR 反应条件: $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 3 min; $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 1 min, 各引物退火温度 30 s, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 7 个循环; $90\ ^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 各引物退火温度 30 s, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 33 个循环; $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,硝酸银染色。

1.6 雌核发育后代的检验及分析

在雌核发育后代的检验及分析中,将电泳谱带中的每一条 DNA 片段作为该座位的一个等位基因来处理,个体中出现一条带为纯合子,出现两条带为杂合子,计算雌核发育后代的基因-着丝点之间的重组率(recombination rate, R)^[13]: $R = \text{杂合个体数} / \text{总个体数} \times 100\%$, 如果亲本中存在无效等位基因时: $R = 1 - 2m$ (m 为无效等位基因纯合子的比率)。

2 结果

2.1 通用微卫星引物的筛选

经过条件优化的 21 对引物中,有 3 对引物可以同时从栉孔扇贝和长牡蛎中获得重复性好多态性高的 PCR 产物,其中 CFMSP002、CFMSP003 为栉孔扇贝微卫星引物^[10], *ucdCgi24* 为长牡蛎微卫星引物^[11],其序列、连锁群、退火温度如表 1。图 1 为部分共用微卫星引物在通用物种中扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱。

表 1 通用引物序列、连锁群及特异退火温度

位点 locus	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	核心区序列 core sequence	退火温度(°C) annealing temperature	GenBank 索引号 GenBank accession
CFMSP002	F: CAACTTCGTCAGACAAATG	A ₉ (CA) ₇ A ₆ (CAAA) ₇	49	AY682108
	R: GTAAAAGAACCCAAACACC			
CFMSP003	F: CGACTCTGCCCTAGTGCTTC	(AGC) ₉	52	AY682109
	R: AACCAAGGGTACTTCACGGTCGG			
ucdCgi24	F: CAGAGAGCCGGACTATTTTC	45		
	R: GCTCTTTGACACTATGCCGA			

注: F. 正向引物; R. 反向引物

Notes: F. Forward primer; R. Reverse primer

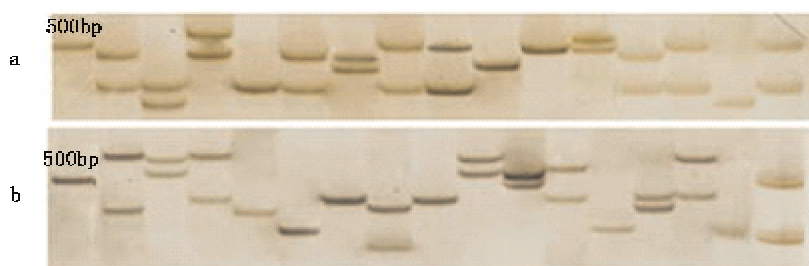


图 1 部分通用微卫星引物扩增的电泳图谱

a. 栉孔扇贝群体在位点 *ucdCgi24* 的扩增图谱; b. 长牡蛎群体在位点 *CFMSP003* 的扩增图谱

Fig.1 Electrophoresis patterns of cross-species amplification of microsatellite loci amplified by primers *ucdCgi24* and *CFMSP003*

a. Electrophoresis patterns of microsatellite locus amplified by primers *ucdCgi24* in the *Chlamys farreri*; b. Electrophoresis patterns of microsatellite locus amplified by primers *CFMSP003* in the *Crassostrea gigas*

2.2 雌核发育后代的检验

利用筛选的 3 对微卫星引物对雌核发育组幼虫及其亲本基因组 DNA 进行 PCR 扩增,产物在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,硝酸银染色。结果表明,所选用的 3 对微卫星引物可以在长牡蛎、栉孔扇贝以及雌核发育后代得到扩增产物,雌核发育后代基因全部来自母本,没有父本基因的

表达。雌核发育后代在 3 个座位上均有一定比例的杂合个体,重组率分别为 35%、40%、55%。每对引物在雌核发育组中所扩增出的个体数、亲本以及后代的基因型和重组率如表 2。每个基因座位上基因型的定义,按照其迁移率从大到小依次定义为 a、b、c、d。图 2 为部分通用引物在雌核发育后代中的扩增图谱。

表 2 通用微卫星引物在雌核发育后代中扩增出产物的个体数,父母本、雌核发育后代的基因型和重组率

位点 locus	个体数 individual number	父本基因型 genotype of father	母本基因型 genotype of mother	雌核发育组基因型 genotype of offspring	重组率(%) combination rate
<i>ucdCgi24</i>	20	a/b	c/d	c/c(5) c/d(8) d/d(7)	40
<i>CFMSP003</i>	20	a	b/c	b/b(6) b/c(11) c/c(3)	55
<i>CFMSP002</i>	20	c/d	a/b	a/a(5) a/b(7) b/b(8)	35

注:括号内为个基因型的数目

Notes: the number in the parentheses are the genotype's number

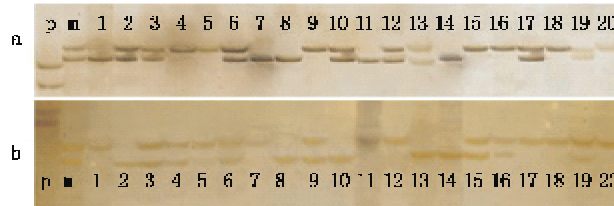


图2 雌核发育后代及其亲本在部分通用微卫星引物中的扩增图谱

a:位点 *ucdCgt24* 的扩增图谱;b:位点 *CFMSP003* 的扩增图谱 p 为父本,m 为母本,1~20 泳道为雌核发育个体

Fig.2 Demonstration of microsatellite loci amplified by two pairs of cross-species primers in gynogenetic offspring and their parents

a. Electrophoresis pattern amplified by primer *ucdCgt24*; Electrophoresis patterns amplified by primer *CFMSP003*; p: father, m: mother, 1-20: gynogenetic offspring

3 讨论

较好的精子遗传灭活效果是诱导雌核发育成功的重要前提保证,对雌核发育后代的遗传物质来源进行检验十分重要。所以遗传失活的长牡蛎精子诱导栉孔扇贝雌核发育的后代需要进行进一步遗传检验,以确定人工诱导雌核发育的效果。在人工诱导贝类雌核发育的过程中,利用对照单倍体染色体计数、荧光显微技术观察雌核发育早期胚胎的核相变化^[14]、准确灵敏地检测出外源染色体的渗入 GISH 等^[15]技术,可以在染色体水平上说明后代的遗传物质来源,但不能更好地揭示深层次的现象。微卫星分子标记技术具有分布均匀、多态性高、共显性等优点,是进行遗传分析比较优秀的分子标记技术手段之一。运用微卫星分子标记技术对本研究所诱导的雌核发育后代进行检验,可以在更深层上证实后代基因的来源情况,能检验后代基因有无父本基因的干扰、计算其基因杂合率等,例如刘静霞等^[16]利用微卫星标记在分子水平上证实了所获得的红白锦鲤人工雌核发育 F_2 代是一个纯系;王伟等^[17]对人工诱导牙鲆 (*Paralichthys olivace*) 异质雌核发育群体进行了微卫星分析,证实其群体的多态性和杂合度明显低于自然和养殖群体,在具多态性基因座位上均发生了基因一着丝点之间的重组。

用微卫星分子标记技术对异源雌核发育后代进行检测,需要解决父本及母本基因在微卫星分子标记上的通用引物问题。很多的研究结果表明,由于微卫星侧翼序列在物种进化过程中具有保守性,从某物种来的微卫星引物可以用于其近缘物种的扩增,在植物研究中,已有许多的学者对

不同种、属植物间微卫星引物的共用性进行了研究^[18]。水产动物中也有相关方面的报道,如 Wang 等^[19]在 32 对太平洋牡蛎的微卫星引物中筛选出 13 对引物可以在三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 的基因组中扩增出特异性条带, Kim 等^[20]利用红大麻哈鱼 (*Oncorhynchus nerka*) 的微卫星引物在 4 属 10 种鲑科鱼中得到扩增产物。本研究利用 11 对栉孔扇贝和 10 对长牡蛎的微卫星引物进行长牡蛎和栉孔扇贝通用微卫星引物的筛选,结果有 3 对引物可以通用并且表现出比较高的多态性,适用于本研究中雌核发育后代的遗传检验。本研究中,通用引物占所选用引物的 14.29%,通用率较低。王丽等^[18]通过对许多研究者的结果分析,总结出微卫星共用引物的一般规律是,微卫星共用引物的困难度是依赖于亲缘关系远近的。长牡蛎和栉孔扇贝在分类地位上属于不同科,其亲缘关系较远可能是造成引物共用困难的主要原因。

3 对微卫星引物对栉孔扇贝雌核发育后代进行遗传检测结果表明,后代的基因全都来自于母本,没有父本基因的渗入,证实了本研究在栉孔扇贝雌核发育的诱导中对长牡蛎精子的遗传失活是非常成功的。在异源精子诱导鱼类雌核发育的研究中,有些学者认为有些雌核发育后代在形态学等方面出现了父性的遗传性状,并通过实验证实了这种“异精生物学效应”^[21-23]。但这种效应的存在与否则目前尚有争议,如滕春波等^[24]、张英培等^[25]不认为存在这种生物学效应,异源精子只是激活了卵子的发育。本研究中,作者在诱导后代发育至担轮幼虫阶段取材分析,发现后代基因是没有父本基因影响的。

人工诱导雌核发育单倍体的二倍化主要是通过抑制单倍体受精卵的第二极体的排放或卵裂而完成的。通过抑制单倍体受精卵的第二极体的排放而获得的称为异质(减数)雌核发育,抑制第一次有丝分裂而获得的称为同质(卵裂)雌核发育。理论上,同质雌核发育二倍体所有的基因座位都是纯合的,而异质雌核发育由于同源染色体在第一次减数分裂时发生了交换重组而得到杂合个体。本研究对雌核发育后代的检验结果发现,在母本基因型均呈杂合状态下,3个座位上幼虫基因型呈纯合状态的个数仍分别为12、9、13。朱晓琛等^[26]用8个微卫星座位对牙鲆雌核发育二倍体纯合性进行检验时,卵裂雌核发育二倍体在所有检测座位全部纯合,而减数雌核发育二倍体没有得到所有座位全部纯合的个体。但是减数雌核发育二倍体的杂合比例可以用来反映该座位与着丝粒的重组率^[27]。雌核发育后代重组率范围变化比较大,Francescon等^[27]报道欧鲈(*Dicentrarchus labrax*)6个微卫星座位的重组率为40%~94%,Li等^[6]报道了实验组皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)在9个微卫星座位上的重组率为10%~60%。本研究中的雌核发育后代在3个微卫星座位上的重组率分别为40%、55%和35%。王伟等^[17]认为造成雌核发育个体高的基因重组率原因很多,作者也认为染色体较小导致基因座位与着丝点之间比较容易发生重组、隐性致死基因导致纯合个体死亡、基因座位与着丝点的距离近容易发生重组等这些因素都可能是造成本研究中雌核发育后代高的基因重组率的原因。高的重组率体现了与母本具有比较高的遗传同质性,这表明异质雌核发育可以有效加速栉孔扇贝基因的纯合,可以获得好的遗传材料,是改良栉孔扇贝种质的有效手段之一。

参考文献:

- [1] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Nature, 1981, 291: 293 - 296.
- [2] Wu Q J, Ye Y Z, Cheng D R. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line [J]. Acta Genetica Sinica, 1981, 8(1): 50 - 55.
- [3] 杨凤影. 栉孔扇贝雌核发育二倍体的细胞与分子遗传学分析 [D]. 大连: 大连水产学院, 2007.
- [4] 任建峰. 栉孔扇贝(♀) × 长牡蛎(♂) 远缘杂交的细胞学研究 [D]. 上海: 上海水产大学, 2005.
- [5] Peruzzi S, Chatain B. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability [J]. Aquaculture, 2000, 189: 23 - 37.
- [6] Li Q, Kijima A. Segregation of microsatellite alleles in gynogenetic diploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. Mar Biotechnology, 2005, 7: 669 - 676.
- [7] O'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes [J]. Rev Fish Boil Fish, 1997, 7: 331 - 363.
- [8] 李雅娟, 毛连菊, 李霞, 等. 太平洋牡蛎人工诱导雌核发育精子遗传失活的初步研究 [J]. 大连水产学院学报, 2003, 18(2): 109 - 113.
- [9] 刘广绪, 包振民, 胡景杰, 等. 栉孔扇贝、华贵栉孔扇贝及其种间杂交子代、种内交配子代的 ISSR 分析 [J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(1): 71 - 75.
- [10] Zhan A B, Bao Z M, Yao B, et al. Polymorphic microsatellite markers in the Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6: 127 - 129.
- [11] Launey S, Hedgecock D. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Genetics, 2001, 159(1): 255 - 265.
- [12] 谭杰, 孙惠玲, 刘萍, 等. 3个仿刺参地理种群遗传变异的微卫星 DNA 分析 [J]. 水产学报, 2007, 31(4): 437 - 442.
- [13] Morishima K, Nakayama I, Arai K, et al. Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Genetica, 2001, 111: 59 - 69.
- [14] 王卫军, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育早期胚胎发育及其倍性分析 [J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(5): 414 - 420.
- [15] 吕振明. 栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交过程中的细胞与分子遗传学分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [16] 刘静霞, 周莉, 魏丽华, 等. 红白锦鲤人工雌核发育纯系的微卫星标记分析 [J]. 水生生物学报, 2003, 27(6): 557 - 562.
- [17] 王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 人工诱导牙鲆异质雌核发育群体的微卫星标记分析 [J]. 高技术通讯, 2005, 15(7): 107 - 110.
- [18] 王丽, 赵桂仿. 植物不同种属间共用微卫星引物的研究 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(8): 1540 -

- 1546.
- [19] Wang G L, Wang J J, Li J L, *et al.* Preliminary study on applicability of microsatellite primers developed from *Crassostrea gigas* to genomic analysis of *Hyriopsis cumingii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(1): 15 - 20.
- [20] Kim T S, Judy R G, Raymond L F. Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1996, 53: 833 - 841.
- [21] 蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德, 等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应 [J]. *水生生物学集刊*, 1983, 8(1): 1 - 12.
- [22] 丁 军, 谢岳峰, 蒋一珪, 等. 异育银鲫及其人工杂合种外源遗传物质的检测分析 [J]. *水生生物学报*, 1993, 17(1): 22 - 26.
- [23] 赵 俊, 崔 森, 陈湘麟, 等. 异精效应在雌核发育彭泽鲫胚胎发育中的同工酶证据 [J]. *水生生物学报*, 2004, 28(1): 33 - 39.
- [24] 滕春波, 孙效文, 沈俊宝, 等. 利用异源精子激发雌核发育的银鲫及亲本的 RAPD 分析 [J]. *水产学报*, 1999, 23(4): 421 - 423.
- [25] 张英培, 刘 红, 楼允东, 等. 异育淇鲫及其双亲同工酶的比较研究 [J]. *遗传学报*, 1990, 17(1): 34 - 37.
- [26] 朱晓琛, 刘海金, 孙效文, 等. 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性 [J]. *动物学研究*, 2006, 27(1): 63 - 69.
- [27] Francescon A, Barbaro A, Bertotto D, *et al.* Assessment of homozygosity and fertility in meiotic gynogens of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Aquaculture*, 2005, 243: 93 - 102.

Microsatellite analysis of gynogenetic diploids induced by heterologous sperm in *Chlamys farreri*

WU Biao, YANG Ai-guo, WANG Qing-yin, LIU Zhi-hong, ZHOU Li-qing

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract: The Zhikong scallop *Chlamys farreri* plays an important role in the shellfish breeding in the north of China and the gynogenesis in this scallop has developed rapidly in recent years. In this study, the meiotic division of the eggs of *C. farreri* was activated by ultraviolet (UV)-irradiated heterogenous sperms of Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the gynogenetic diploids were induced by blocking extrusion of the second polar body from fertilized eggs with 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). To assess homogeneity and isogeneity between the progeny and their parents, microsatellite technique were used. Then 3 pairs of common microsatellite primers to be used for genetic analysis of offspring were screened from 21 pairs of microsatellite primers among which 11 pairs were indentified in *C. farreri* and 10 pairs in *C. gigas* by optimizing the condition of polymerase chain reaction (PCR). Under the optimal condition, PCR was performed for analyzing the genetic character of the gynogenetic offspring. It was found that the 3 loci could amplify clear fragments in these offspring. The results of genetic analysis showed that the gene of offspring without gene contamination of male parent *C. gigas* was completely inherited from female parent *C. farreri*. Microsatellite locus and centromere recombined at the 3 polymorphic loci and the recombination rates were 40%, 55%, and 35%, respectively. This study confirmed that it was feasible to achieve diploid gynogenetic progeny of *C. farreri* by heterologous sperm's inducement while it was difficult to get an absolute homozygotic population once in manner of suppression of the meiosis-II, because there was high heterozygosity in the first meiyngogenetic generation owing to crossover between the homologous chromosome during the meiosis-I.

Key words: *Chlamys farreri*; heterologous sperm; gynogenesis; microsatellite