

6-DMAP 诱导栉孔扇贝异源雌核发育二倍体

吴彪^{1,2} 杨爱国¹ 王清印^{1*} 刘志鸿¹ 周丽青¹

(¹农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学 生命科学与技术学院, 201306)

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, 运用 L9(3⁴) 设计不同 6-DMAP 的处理条件来诱导染色体加倍, 获得第二极体抑制型栉孔扇贝雌核发育二倍体早期胚胎。以雌核发育担轮幼虫为材料, 滴片法制备染色体并采用计数法统计倍性, 分析不同 6-DMAP 浓度、诱导时机和诱导持续时间对雌核发育二倍体诱导率的影响, 并统计早期胚胎畸形率。结果表明, 不同 6-DMAP 浓度、诱导时机和诱导持续时间对异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的诱导率均有显著影响; 早期胚胎畸形率与二倍体的诱导率呈负相关, $y = 46.632 - 0.891x$ ($r = -0.813, P < 0.01$)。6-DMAP 诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的最佳处理条件为: 20%~25% 受精卵排放出第 1 极体时, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 6-DMAP 持续处理 25 min 可得到最高的诱导率为 $29.5 \pm 5.36\%$ 。研究结果为 6-DMAP 诱导栉孔扇贝雌核发育染色体加倍提供了一定的细胞学依据和技术参数。

关键词 6-DMAP 栉孔扇贝 雌核发育二倍体 异源精子

中图分类号 Q953 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)03-0079-06

Allogynogenetic diploidy of *Chlamys farreri* induced by 6-DMAP

WU Biao^{1,2} YANG Ai-guo¹ WANG Qing-yin^{1*}

LIU Zhi-hong¹ ZHOU Li-qing¹

(¹Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

(² College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT The eggs of *Chlamys farreri* were activated by ultraviolet-irradiated heterogeneous sperms of Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the pro-embryos were induced by inhibiting extrusion of the second polar body from fertilized eggs with 6-DMAP. Those eggs were treated with different parameters of 6-DMAP which were designed in the method of orthogonal experiment design L9(3⁴). It was found that the occasion of starting time, the length of the treatment time and the concentration of 6-DMAP were important factors to affect the derivational rate of diploids. The statistic data of the trochophores' chromosomes in the nine groups was analysed with the software SPSS11.5. Results showed that all the three factors had prominent effect on the derivational rate of diploids; the relationship between the rate of malformed embryos and the

国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA10A408)、国家科技支撑计划项目(2006BAD01A00)和国家自然科学基金项目(30600465)共同资助

* 通讯作者。E-mail: qywang@public.qd.sd.cn, Tel: (0532)85822959

收稿日期: 2008-03-25; 接受日期: 2008-05-26

作者简介: 吴彪(1982-), 男, 硕士, 主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: qmwb1028@163.com, Tel: (0532)85822959

rate of diploids was negative correlation and the equation was $y = 46.632 - 0.891x$ ($r = -0.813, P < 0.01$). Based on the relationship between derivational rate of diploids and the rate of malformed embryos, in the stated range, it was confirmed that the optimal inducing condition of 6-DMAP for gynogenesis in the *C. farreri* was that the eggs were to be treated with 6-DMAP at the concentration of $60\mu\text{g}$ per ml for 25 minutes when of the fertilized eggs expelling first polar body 20% to 25%. In this way, $29.5 \pm 5.36\%$ diploid induction could be got. In this study, the states of poly ploid yield in the treatment groups were also discussed.

KEY WORDS 6-DMAP *Chlamys farreri* Gynogenetic diploids
Heterogenous sperm

栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 是我国重要的经济养殖贝类之一,在北方海水养殖业中占有重要地位。但近年来,栉孔扇贝在养殖过程中出现了种质退化、产量降低和品质下降等问题,因此培育栉孔扇贝优良品种,保障产业的稳定和健康发展是摆在水产科技人员面前的一项重要任务。人工雌核发育作为快速建立纯合系和培育新品种的有效手段越来越多地受到国内外学者的关注。开展栉孔扇贝人工雌核发育的研究,对于快速建立纯系,并通过纯系间杂交进而选育生长快、品质优和抗逆性强的优良品种具有十分重要的意义。

迄今为止,人工诱导贝类雌核发育还没有取得完全成功。诱导出雌核发育的长牡蛎 *Crassostrea gigas*,仅成活了 10 个月 (Guo *et al.* 1993);人工诱导获得的美洲牡蛎 *Crassostrea virginica* (Stiles *et al.* 1978、1983)、地中海贻贝 *Mytilus galloprovincialis* (Scarpa *et al.* 1994)和侏儒蛤 *Mulinia lateralis* (Scarpa *et al.* 1988)等的胚胎也只存活 1~2 d。已经有不少学者进行过人工诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的研究,但也没有成活个体的报道,而且大多研究仍集中在受精行为的细胞学观察等方面(董迎辉等 2006;杨凤影等 2007)。已有研究证明,6-DMAP 能够抑制细胞分裂使染色体加倍而用于贝类雌核发育的诱导。由于 6-DMAP 具有比 CB(细胞松弛素 B)更多的优越性,目前已越来越多地被应用到雌核发育的诱导研究中。6-DMAP 的诱导条件和效果因物种而异,优化并确定其最佳的诱导条件对提高人工诱导雌核发育二倍体的诱导率及后代的成活率都有重要意义。本研究采用经遗传灭活的长牡蛎精子激活栉孔扇贝卵子,通过正交试验设计 6-DMAP 不同水平组合来诱导卵子染色体加倍,统计各实验组二倍体诱导率和胚胎畸形率,运用统计软件 SPSS 对结果进行分析,以期最终确定 6-DMAP 诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的最佳处理条件,为提高人工诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体的诱导率和成活率提供技术参数。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

栉孔扇贝亲贝于 2007 年 4 月取自青岛志诚水产科技公司,壳高 6~8 cm。长牡蛎亲贝取自青岛即墨岙山卫镇附近海区,壳高 11~12 cm。6-二甲基氨基嘌呤(6-dimethylaminopurine,简称 6-DMAP)、秋水仙素(Colchicine)和碘化丙锭(Propidium iodide,简称 PI)均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 亲贝暂养与精卵收集

亲贝取回后洗刷干净,雌、雄分开暂养于 5m^3 水泥池中,砂滤海水。长牡蛎暂养水温为 22°C ;栉孔扇贝暂养水温为 16°C ,常规管理。使用前挑选性腺饱满的雌性栉孔扇贝个体,阴干升温法催产获得卵子,解剖法获得长牡蛎精子和卵子。采集的精、卵以过滤海水稀释,并用生物计数皿和血球计数板在显微镜下分别定量至 1.0×10^7 ind/ml 和 1.0×10^5 ind/ml。

1.2.2 异源雌核发育的诱导

1.2.2.1 授精

取长牡蛎稀释精液 2.5 ml,平铺于直径为 9 cm 的亲水塑料培养皿底部。将培养皿置于紫外线照射装置内的摇床上,摇床摇动速度为 60 次/min。参照李雅娟等(2003)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 60s。照射后的精液立即分别加入盛有 50 ml 栉孔扇贝卵液或长牡蛎卵液的烧杯中,用玻璃棒搅拌均匀并稀释至 200 ml。受精卵在黑暗条件下水温 $19\ ^\circ\text{C}$ 的海水中培养。

1.2.2.2 二倍体化诱导

利用 6-DMAP 诱导实现受精卵染色体的二倍体化。选用 $L_9(3^4)$ 设计(蔡一林等 2004),进行 3 因素 3 水平的正交诱导试验。6-DMAP 终质量浓度(因素 A)设 50、60 和 $70\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 3 个水平;诱导时机(因素 B)以受精卵排放第 1 极体的百分比为指示,设 10%~15%、20%~25% 和 30%~35% 3 个水平;诱导持续时间(因素 C)设 15、20 和 25 min 3 个水平。各处理组经过 6-DMAP 处理之后用 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。实验设 3 个重复。设长牡蛎单倍体组为对照以检验精子灭活效果。

1.2.3 染色体的制备与倍性检测

以担轮幼虫为材料制备染色体。具体方法参照吕振明(2006)。染色体倍性检测采用染色体计数法,每组染色体统计至少 60 个分裂相,处理组染色体数目统计按照单倍体(19 ± 1)、二倍体(38 ± 2)、三倍体(57 ± 3)和四倍体(76 ± 4)的标准进行;对照组单倍体(10 ± 1)和二倍体(20 ± 2)为标准,其他为非整倍体。担轮幼虫期,每组统计 50 个胚胎,计算胚胎畸形率。所得数据运用统计软件 SPSS11.5 进行分析。计算公式如下:

二倍体诱导率 = (二倍体分裂相数/分裂相总数) $\times 100\%$;

非整倍体率 = (非整倍体分裂相数/分裂相总数) $\times 100\%$;

畸形胚胎率 = (畸形胚胎数/统计胚胎总数) $\times 100\%$ 。

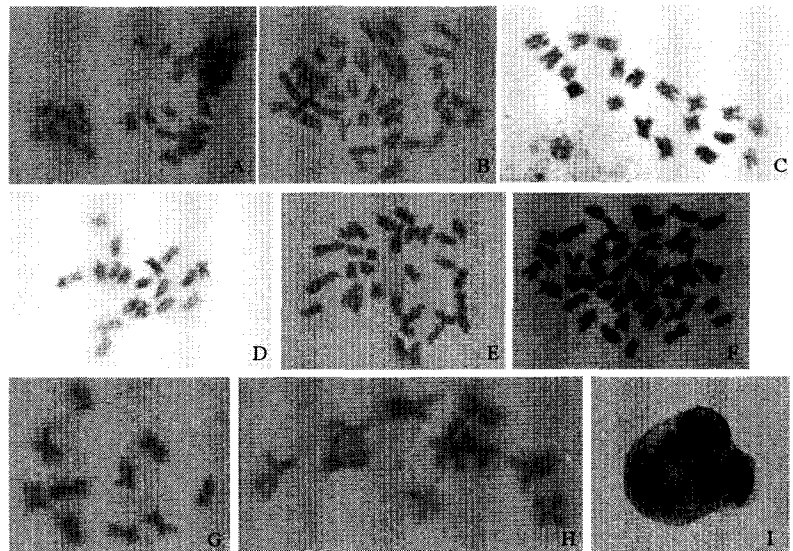
2 结果

2.1 二倍体诱导率及畸形胚胎率

滴片法获得实验组担轮幼虫及对照组胚胎的染色体,在显微镜下统计清晰可辨的分裂相的染色体条数。结果表明,对照组染色体全部为单倍体(10 ± 1) (如图 1-G、H),说明长牡蛎精子全部遗传灭活。各处理组染色体倍性组成均较复杂,幼虫染色体分裂相中除二倍体外,还有少量单倍体和大量非整倍体(图 1-A-F),处理组中出现不同比率的畸形胚胎(图 1-I)。处理组中试验设计及各组二倍体诱导率及畸形胚胎率见表 1。

2.2 实验数据方差分析

运用统计软件 SPSS 11.5 对实验结果进行方差分析,研究 6-DMAP 各不同处理水平组合对雌核发育二倍体诱导率的影响,结果见表 2 和表 3。不同 6-DMAP 质量浓度、诱导时机和诱导持续时间的处理都对栉孔扇贝雌核发育二倍



A, B 为处理组二倍体 $2n=38$; C, D 为处理组单倍体 $n=19$; E, F 为处理组非整倍体 31, 44; G, H 为对照组单倍体 $n=10$; I 为处理组畸形胚胎
A, B. Diploid of the treatment $2n=38$; C, D. Haploid of the treatment $n=19$; E, F. Aneuploid of the treatment 31, 44; G, H. Haploid of controls $n=10$; I. Malformed embryo of the treatment

图 1 试验组及对照组中幼虫的染色体倍性和畸形胚胎($\times 1\ 000$)
Fig. 1 Ploidies and malformed embryo in the treatment at trochophore stage($\times 1\ 000$)

体的诱导效果有显著影响;进一步的多重比较结果显示,A因素第二水平与第一、第三水平存在显著性差异,B因素第二水平与第一、第三水平存在显著性差异,C因素第三水平与第一、第二水平存在显著性差异。

2.3 胚胎畸形率与二倍体诱导率的相关关系

根据胚胎畸形率和二倍体诱导率的实验结果(表1),运用SPSS11.5进行胚胎畸形率(y)与二倍体诱导率(x)的相关分析。得出方程:

$$y = 46.632 - 0.891x \quad (r = -0.813)$$

$P < 0.01$, 胚胎畸形率与二倍体诱导率之间呈显著负相关,即随二倍体诱导率的升高,畸形胚胎率显著下降。

综合考虑二倍体诱导率和畸形胚胎率,确定当20%~25%受精卵排放出第1极体时,施用终质量浓度为60 $\mu\text{g/ml}$ 的6-DMAP持续处理25 min是灭活长牡蛎精子诱导栉孔扇贝雌核发育单倍染色体加倍的最佳条件,此条件下所得二倍体诱导率为29.5% \pm 5.36%。

3 讨论

6-DMAP化学式为 $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_5$,是嘌呤霉素(Puro-mycin)的一种类似物。研究表明,6-DMAP是一种蛋白质磷酸化抑制剂,能作用于特定的激酶,破坏微管的聚合中心使微管不能形成,导致纺锤体解散,从而抑制极体的形成和排放使染色体加倍(王清印 2007)。6-DMAP在诱导多倍体中较CB有更多优越性。自Desrosiers等(1993)使用6-DMAP诱导贝类三倍体成功以来,6-DMAP已经在多倍体的诱导中逐渐替代CB。由于人工诱导雌核发育和诱导多倍体在染色体加倍方面的相似性,近年来人工诱导贝类雌核发育二倍体也越来越多地使用6-DMAP处理来实现染色体的加倍。

在人工诱导贝类雌核发育二倍体中,6-DMAP的处理条件因种类而异。本试验将6-DMAP的处理浓度、

表1 正交试验雌核发育二倍体诱导率、畸形胚胎率及非整倍体率

Table 1 The ratios of diploid, malformed embryos and aneuploid by orthogonal test

实验组 Treatment	因素 Factors				二倍体诱导率及畸形胚胎率(%) Percentage of diploid, malformed embryo and aneuploid (%)
	因素 A (mg/ml)	因素 B(%)	因素 C(min)	(空白)	
1	1(50)	1(10~15)	1(15)	1	14.13 \pm 1.68/31.33 \pm 6.43/71.42 \pm 2.80
2	1	2(20~25)	2(20)	2	18.63 \pm 2.35/25.33 \pm 4.16/73.25 \pm 4.71
3	1	3(30~35)	3(25)	3	18.00 \pm 2.19/23.33 \pm 2.31/67.16 \pm 1.26
4	2(60)	1	2	3	20.27 \pm 1.96/24.00 \pm 4.00/69.78 \pm 3.98
5	2	2	3	1	29.50 \pm 5.37/18.00 \pm 2.00/61.53 \pm 8.14
6	2	3	1	2	20.87 \pm 1.20/24.00 \pm 2.00/67.81 \pm 4.86
7	3(70)	1	3	2	17.40 \pm 3.26/30.00 \pm 2.00/70.13 \pm 1.97
8	3	2	1	3	18.07 \pm 3.55/31.33 \pm 2.31/78.70 \pm 1.82
9	3	3	2	1	10.77 \pm 1.32/36.00 \pm 2.00/80.18 \pm 1.75

表2 不同处理因素对栉孔扇贝二倍体诱导率影响的方差分析

Table 2 The variance analysis of diploid ratios in the treatments

变异来源 Source of variance	平方和(SS) Sum of square	自由度(df) Degree of freedom	均方(MS) Mean square	F值	F_{α}
重复 Repeat	1.294	2	0.647	0.079	$F_{0.05}(2,18) = 3.55$
处理 Treatment	630.352	8	78.794	9.672**	$F_{0.01}(8,18) = 3.71$
因素 A factor A	336.865	2	168.433	20.675**	$F_{0.01}(2,18) = 6.01$
因素 B factor B	162.170	2	81.085	9.953**	$F_{0.01}(2,18) = 6.01$
因素 C factor C	127.881	2	63.940	7.849**	$F_{0.01}(2,18) = 6.01$
误差 D error D	3.436	2	1.718		
误差 E error E	143.186	16	8.949		
合并误差 Incorporate error	46.622	18	8.146		
总变异 Total variance	774.832	26	29.801		

表3 各因素各水平平均数差数的两两比较

Table 3 Pairwise comparisons of average difference between each level and factor

水平两两比较 Comparison between two levels	A因素 Factor A	B因素 Factor B	C因素 Factor C
1和2水平 Level one and two	-6.622*	-4.8*	1.133
1和3水平 Level one and three	1.511	0.722	-3.944*
2和3水平 Level two and three	8.133*	5.522*	-5.078*

在人工诱导贝类雌核发育二倍体中,6-DMAP的处理条件因种类而异。本试验将6-DMAP的处理浓度、

处理起始时间和处理持续时间作为影响二倍体诱导率的3个主要因素进行研究。通过对正交试验结果的分析,认为这3个因素对二倍体的诱导都有显著影响。综合考虑畸形胚胎率与二倍体诱导率的负相关关系,确定6-DMAP 诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体染色体加倍的最佳处理是:20%~25%受精卵排放出第1极体时,终质量浓度为60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的6-DMAP 持续处理25 min,诱导率为29.5% \pm 5.36%,畸形率18.0% \pm 2.0%。有关扇贝雌核发育二倍体诱导率的报道很少。董迎辉等(2006)曾用60mg/L 的6-DMAP 在20%~30%的受精卵排放第1极体时处理受精卵20min 来诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体,并通过对早期胚胎的观察证实成功诱导了二倍化的早期胚胎,但未报道诱导率。在贝类多倍体的诱导研究中,很多学者认为增加6-DMAP 的处理浓度和处理时间能够提高多倍体的诱导率,但同时胚胎的毒性程度也随之增加,具体会体现在D形幼虫的畸形甚至死亡上(Desrosiers *et al.* 1993)。据此结论,实验中提高6-DMAP 的处理浓度和处理持续时间将会有提高二倍体诱导率的空间,但同时随着处理强度的加大,药物对胚胎产生的毒性也会加大。虽然本实验得出二倍体诱导率与胚胎畸形率呈负相关的结果,但分析认为当药物浓度和处理时间超出一定的范围时,胚胎畸形率未必一直与诱导率呈负相关。所以,在一定的范围内提高6-DMAP 的处理浓度和处理持续时间能否提高二倍体的诱导率并降低胚胎畸形率还有待进一步研究。当然,6-DMAP 在人工诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体中的诱导比率还跟水温等其他因素有关,研究时应该加以考虑。

实验组中观察到较高比例的非整倍体。非整倍体是整倍体中1条或者几条染色体增加或缺失的类型。在贝类雌核发育的研究中,很多研究者对非整倍体现象已有报道(Guo *et al.* 1993;Fujino *et al.* 1990;Arai *et al.* 1984;Li *et al.* 2000)。染色体的稳定组成决定了物种的特异性,染色体数目不平衡在高等动物中通常导致严重的畸形或死亡,但在低等动物中很多非整倍体个体是可以存活的。但很多学者也认为非整倍体在胚胎阶段有高的死亡率(Xu *et al.* 1990;Li *et al.* 2000a、b;杨爱国等 2000)。关于非整倍体的形成有很多的解释。作者认为,本研究中非整倍体的出现主要有以下几个方面的原因:(1)染色体制备技术的局限性。例如在染色体制片过程中,由于染色结束后需将染色液冲洗掉,这个过程就有可能将部分分裂相中的染色体冲掉造成染色体的丢失。所以,改进染色体的制片方法是很有必要的。(2)6-DMAP 处理后引起的复杂分离方式。李永仁(2005)在进行通过抑制栉孔扇贝正常二倍体第1极体排放诱导四倍体的研究时,通过免疫荧光技术观察到受精卵在第2次减数分裂时表现出多种分离方式,并认为非同步分离方式导致非整倍体的形成。作者认为本实验在6-DMAP 诱导染色体加倍时也存在同样的情况,6-DMAP 处理破坏了正常的细胞骨架系统,导致受精卵染色体分离的紊乱,造成了非整倍体。(3)部分灭活精子DNA 的修复。由于DNA 具有光复活机制,经紫外线照射而断裂的精核DNA 氢链能被光修复,这部分精子DNA 被修复后参与了早期的胚胎发育而产生非整倍体。

迄今的研究结果表明,人工诱导贝类雌核发育的二倍体后代很难发育到成体,其原因尚未有十分明确的定论。学者普遍认为,水产动物中存在较多的隐性致死或有害基因,以及残留在卵内的精核等多种原因都会对诱导后代的发育造成障碍。本实验组诱导后代也只有少数发育到D形幼虫,之后便相继死亡。有关贝类雌核发育后代死亡的原因,在今后有必要进行深入研究。

参 考 文 献

- 王清印. 2007. 海水养殖生物的细胞工程育种. 北京:海洋出版社
- 李永仁. 2005. 栉孔扇贝四倍体诱导机理初步研究. 见:中国科学院研究生院博士学位论文
- 李雅娟,毛连菊,李霞,丁君,赵艳荣. 2003. 太平洋牡蛎人工诱导雌核发育精子遗传失活的初步研究. 大连水产学院学报,18(2):109~113
- 吕振明. 2006. 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. 见:中国海洋大学博士学位论文
- 杨凤影,杨爱国,刘志鸿,周丽青. 2007. 6-DMAP 诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体机理研究. 水产学报,31(5):583~590
- 杨爱国,王清印,刘志鸿,张岩,孟瑞萍. 2000. 栉孔扇贝三倍体率在不同生长阶段的变动趋势. 海洋水产研究,21(3):13~16
- 董迎辉,杨爱国,刘志鸿,任建峰,周丽青,李赞. 2006. 栉孔扇贝正常发育和人工雌核发育二倍体早期胚胎行为的细胞学观察. 水产学报,30(1):29~35
- 蔡一林,岳永生. 2004. 水产生物统计. 北京:中国农业出版社

- 潘英. 2003. 人工诱导扇贝雌核发育的研究. 见: 中国海洋大学博士论文
- Arai, K., Naito, F., Sasaki, H. *et al.* 1984. Gynogenesis with ultraviolet ray irradiated sperm in Pacific abalone. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52(3):417~422
- Desrosiers, R. R., Peignon, J. M., Naciri, Y. *et al.* 1993. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 170:29~43
- Fujino, K., Arai, K., Iwadare, K. *et al.* 1990. Induction of gynogenetic diploid by inhibiting 2nd meiosis in the Pacific abalone. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 56:1 755~1 763
- Guo, X., Hershberger, W. K., Cooper, K. *et al.* 1993. Artificial gynogenesis with ultraviolet light irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Induction and survival. *Aquaculture*, 113:201~214
- Li, Q., Osada, M., Kashihara, M. *et al.* 2000. Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Aquac.* 186(3-4):233~242
- Li, Q., Osada, M., Kashihara, M. *et al.* 2000. Cytological studies on artificially induced gynogenesis in the Pacific abalone. *Fisheries Science*, 66(4):701~707
- Li, Q., Osada, M., Kashihara, M. *et al.* 2000. Effects of ultra-violet irradiation on genetical inactivation and morphological features of sperm of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fisheries Science*, 66(1):91~96
- Scarpa, J., and Bolton, E T. 1988. Experimental production of gynogenetic and parthenogenetic *Mulinia laterlis* (Say). *Shellfish Res.* 7:132
- Scarpa, J., Komaru, A., and Wada, K. T. 1994. Gynogenetic induction in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquac.* 23:33~41
- Stiles, S. 1978. Conventional and experimental approaches to hybridization and inbreeding research in the oyster. *Proc 9th Ann Mtg World Mariculture Soc.* 577~586
- Stiles, S., Cromanski, J., and Longwell, A. 1983. Cytological appraisal of prospects for successful gynogenesis, parthenogenesis, and androgenesis in the oyster. *Int Council for the Exploration of the Sea, Mariculture Committee Paper.* F:10
- Xu, G. Q., Lin, Y. G., Li, G. *et al.* 1990. A preliminary study on the induction of gynogenetic diploid and "Hertwig effect" in pearl oyster *Pinctada martens*. *Tropic Oceanology*, 9(2):1~7