

泥蚶(♀)×毛蚶(♂)受精及胚胎发育过程的初步研究

朱东丽^{1,2} 林志华¹ 董迎辉^{1*} 姚韩韩³ 柴雪良⁴

(¹浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100)

(²中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

(³上海海洋大学生命和水产学院, 201306)

(⁴浙江省海洋水产养殖研究所, 温州 325005)

摘要 以泥蚶为母本、毛蚶为父本, 运用同步催产法, 同时收集泥蚶的卵和毛蚶的精子进行人工杂交, 采用普通光镜和荧光显微镜, 对泥蚶(♀)×毛蚶(♂)受精及胚胎发育的细胞学过程进行了连续观察。结果显示, 毛蚶的精子可以附着并穿过泥蚶的卵膜进行受精, 并激活卵子减数分裂使其释放第一极体(PB1)和第二极体(PB2), 能够形成雌、雄原核并发生原核联合, 接着受精卵开始进行卵裂; 杂交受精率统计为60.2%, 发育速度较自交组慢; 杂交胚胎发育前两次卵裂发育基本正常, 后期才出现明显畸形; 囊胚期持续时间很长, 只能发育到担轮幼虫期, 且纤毛越来越长, 最后全部死亡。另外, 在实验中发现有多精入卵和多极分离现象。

关键词 泥蚶 毛蚶 杂交 受精 胚胎发育

中图分类号 S968.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)05-0069-07

Preliminary study on fertilization and embryonic development of *Tegillarca granosa* (♀)×*Scapharca subcrenata* (♂)

ZHU Dong-li^{1,2} LIN Zhi-hua¹ DONG Ying-hui^{1*}

YAO Han-han³ CHAI Xue-liang⁴

(¹College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100)

(²College of Aquaculture, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(³College of Fishery and Life Sciences, Shanghai Ocean University, 201306)

(⁴Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005)

ABSTRACT The fertilization experiment of *Tegillarca granosa* (♀)×*Scapharca subcrenata* (♂) was carried out three times at Qingjiang Field Research Station of Zhejiang Mariculture Institute in July, 2009. Consecutive cytological observation of fertilization and embryonic development of *Tegillarca granosa* (♀)×*Scapharca subcrenata* (♂) were conducted using both optical microscopy and fluorescence microscopy (Hoechst 33258 staining). The results show

国家“863”计划项目(2006AA10A410)、国家现代贝类产业技术体系(nycytx-47)和温州市重大科技项目(S20080019)共同资助

* 通讯作者。E-mail: dongyinghui118@126.com, Tel: 15067427669

收稿日期: 2009-11-28; 接受日期: 2010-03-09

作者简介: 朱东丽(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: dongli1000@163.com, Tel: (0574)88223018

that sperm of *S. subcrenata* can attach to the surface of *T. granosa* eggs rapidly and the acrosomal reaction can be achieved successfully. Subsequently, the interspecific sperm activated the meiosis of *T. granosa* egg and induced the releasing of PB1 and PB2. Then, the male and female pronuclei fused into zygotonucleus and the cleavage began subsequently. The rate of crossing fertilization was approximately 60.2%, and the early embryogenetic development of *T. granosa* (♀) × *S. subcrenata* (♂) was slower compared to those of intraspecific control groups, respectively. During the whole development process, the blastula stage was relatively long compared to that of control groups and the embryo was obviously abnormal, which may only reach trochophore stage and died before D-shaped larva stage. Trochophore larva of *T. granosa* (♀) × *S. subcrenata* (♂) were found to keep excessive cilia growth. In addition, polyspermy and multiple separations were observed in this experiment.

KEY WORDS *Tegillarca granosa* *Scapharca subcrenata* Fertilization
Cross breeding Embryogenesis

杂交育种是一种传统的育种手段,操作简单易行,最早应用于陆地农牧业中,现在已被广泛应用于水产生物。杂交选育已在水产生物的品种改良和生产中发挥了巨大的作用(吴仲庆 2000),尤其鱼类杂交育种开展得比较多,培育出了一些优良品种,已经获得了巨大的经济效益和社会效益。在贝类上,人工杂交育种起步比较晚,但是发展迅速。目前国内外已有较多报道,国内学者主要报道了如紫扇贝 *Argopecten purpuratus* 与海湾扇贝 *Argopecten irradians irradians*(王春德等 2009),华贵栉孔扇贝 *Chlamys nobilis* 与栉孔扇贝 *Chlamys farreri*(王珏等 2006;毕克等 2005),栉孔扇贝与虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis*(于瑞海等 2006;吕振明等 2006),岩牡蛎 *C. nippona* 与长牡蛎 *C. gigas*(腾爽爽等 2009),日本盘鲍与皱纹盘鲍(燕敬平等 1999;万俊芬等 2001)等的杂交试验。国外学者主要开展了美洲牡蛎 *Crassostrea virginica*、长牡蛎与近江牡蛎 *C. rivularis*(Standish et al. 1993),长牡蛎与葡萄牙牡蛎 *C. angulata*(Patrick et al. 2002),长牡蛎与熊本牡蛎 *C. sikamea*(Banks et al. 1994)等的杂交研究。

泥蚶和毛蚶是两种重要的海水养殖贝类,其中泥蚶为我国海水养殖四大贝类之一,在我国沿海广为分布,是浙、闽一带主导养殖品种,经济价值较高。泥蚶和毛蚶分属于软体动物门 Mollusca、瓣鳃纲 Lamellibranchia、蚶目 Arcoida、蚶科 Arcidae 的泥蚶属 *Tegillarca* 和毛蚶属 *Scapharca*,二者在分类上为同科不同属,亲缘关系相对较远,无论在形态或生态上都有明显的差别。目前有关两种蚶杂交的受精细胞学过程尚未见报道,有可能通过杂交途径,集两种蚶的优良性状于一体,获得新的优良品种。本实验采用同步催产法,对泥蚶(♀) × 毛蚶(♂)进行了人工授精,并对其杂交受精过程及杂交子代早期发育直至担轮幼虫发育过程进行了光镜和荧光显微镜的细胞生物学观察,为进一步了解异源精子入卵、远缘杂交过程中雌、雄原核的相互关系、杂交的亲合性等问题提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验于 2009 年 7 月下旬在浙江省海洋水产养殖研究所清江科研基地进行。所用泥蚶亲贝取自清江基地养殖塘,毛蚶取自台州黄岩金清镇养殖塘,置于 2 t 的玻璃缸水槽里暂养 10 d 左右强化促熟,用于繁殖。Hoechst 33258 荧光染色试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所。

1.2 实验方法

取性腺饱满的泥蚶、毛蚶亲贝,阴干结合流水刺激催产,分别挑出刚产的泥蚶雌性和毛蚶雄性个体,用淡水

冲洗干净,以免污染,单个放入盛有过滤海水的烧杯中产卵、排精。对获取的卵子用300目和500目的筛绢网过滤,冲洗,除去其组织液。在泥蚶排卵40 min后镜检,挑选质量好、无污染的精、卵在盛1 L海水的烧杯中以适当的比例混合,每个卵子周围有5~10个精子左右,水温在27~29℃。设泥蚶和毛蚶自交组为对照组。

在受精过程开始的1 h之内,每隔5 min取样1次;60~120 min,每隔10 min取样1次;120~240 min,每隔30 min取样1次,每次取卵不少于1 000粒,所取样品用4%多聚甲醛液固定,保存于4℃冰箱中。普通光学镜观察的样品直接滴于载玻片上,加盖玻片,在光镜下观察拍照。荧光显微镜观察的样品要先用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.2)冲洗2~3次,然后滴于载玻片上,用Hoechst 33258荧光染料在黑暗环境下染色5 min,经轻微压片后在Nikon 80i荧光显微镜的紫外光(365 nm)下观察,CCD拍照(董迎辉等 2007)。

以上实验均重复3次。

2 结果与分析

2.1 泥蚶(♀)×毛蚶(♂)杂交受精及胚胎发育的观察

泥蚶的未受精卵(0 min)呈圆球形(图版 I-1),在荧光显微镜下被染成亮蓝色,卵质为浅蓝色(图版 II-1),核相处于第1次成熟分裂中期,此时同源染色体配对,整齐地排列在赤道板上,粗短鲜明,清晰可见。毛蚶的精子(SP)在荧光显微镜下仅能观察到头部浓缩的染色质发出亮蓝色荧光(图版 II-2)。

杂交过程受精卵及胚胎发育进程归纳如下:

2~5 min:精子附卵,在光镜下清晰可见(图版 I-2)。荧光显微镜下观察发现此时卵子处于第1次减数分裂中期(图版 II-3)。

10~15 min:大部分精子入卵,异源精卵相互识别后,可诱发精子发生顶体反应,精子头部逐渐进入胞质,精子入卵的位置是随机的(图版 II-4)。精子入卵后,由于卵子胞质作用而致使精核染色质去致密,体积明显膨大,呈球形,卵子的第1次成熟分裂被重新启动,染色体在纺锤丝的牵引下逐渐向卵膜移动(图版 II-5)。

20~25 min:大部分受精卵处于第1次减数分裂后期,有的已经完成分裂,开始排放出第一极体。(图版 I-3,图版 II-7)。

25~30 min:大多第一极体排出,有的第二极体还未形成,处在第2次减数分裂后期,极个别排出第二极体(图版 I-4、图版 I-5、图版 II-8)。

30~35 min:大部分排出第二极体,出现多精入卵现象。

35~40 min:雌、雄原核形成(图版 II-9),精子入卵后膨大为精核,精核再次膨胀,形成雄原核。卵内剩余的染色体解聚形成雌原核,雌、雄原核大小、形状有所差别,一般从所处位置以及面积大小可以辨认,靠近极体且体积大的为雌原核。雄原核膨胀比雌原核要早。

45~50 min:大部分排出两个极体,雌、雄原核染色体发生联合(图版 II-10、图版 II-11),已迁移到卵的中央,有的没有排出极体也发生了联合(图版 II-17),有的只排出1个极体就发生了联合(图版 II-20)。

55~60 min:大部分处于第1次卵裂中期(图版 II-12),有明显的三级、四级或多级分离现象。

60~70 min:大部分胚胎完成第1次卵裂,呈两细胞状态,并且进入第2次卵裂前、中期,发现有的极叶已经缩回,两细胞大小近等(图版 I-6、图版 I-7、图版 II-13、图版 II-14)。

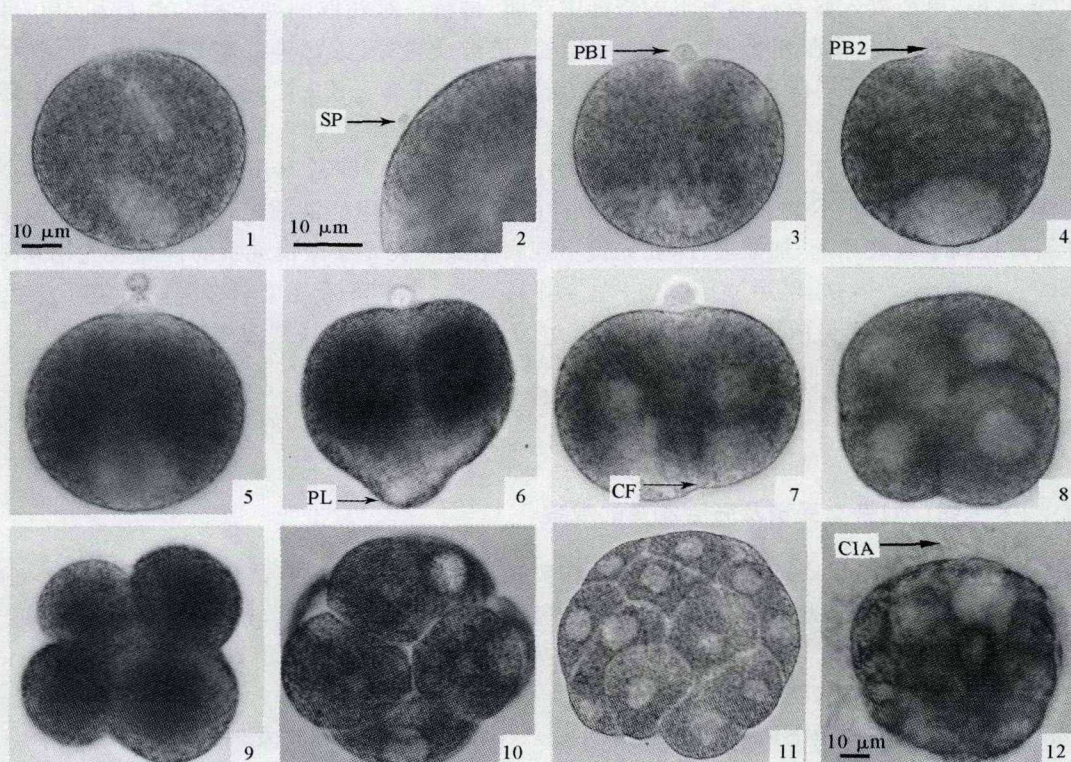
70~80 min:大部分处在第2次卵裂后期,有些已到了4细胞,有的不排或排1个极体的也可以卵裂(图版 II-19)。

90~100 min:大部分胚胎完成第2次卵裂,呈4细胞状态(图版 I-8、图版 I-9、图版 II-15、图版 II-16)。

100~120 min:大部分胚胎完成第3次卵裂,呈8细胞状态(图版 I-10),有的分裂发生紊乱。

150~180 min:16细胞期,有的已经达到多细胞(图版 I-11)。

7 h后发育为早期担轮幼虫(图版 I-12),经过48 h观察,始终不能变到D形,且纤毛越来越长,最后全部死亡。



1. 泥蚶的成熟卵子;2. 精子附卵;3. 排出第一极体;4,5. 排出第二极体;6,7. 第1次卵裂;8,9. 第2次卵裂;10. 第3次卵裂;11. 多细胞时期;12. 担轮幼虫期($\times 400$) SP: 精子;PB1: 第一极体;PB2: 第二极体;PL: 极叶;CF: 卵裂沟;CIA: 纤毛

1. Unfertilized mature egg; 2. Sperm attaching to the egg; 3,4. Release of the first polar body; 5,6. Release of the second polar body; 7,8. The first cleavage; 9,10. The second cleavage; 11. The third cleavage; 12. Multi-cell stage; 13. Trochophore stage (400)

SP: Sperm; PB1: The first polar body; PB2: The second polar body; PL: Polar lobe; CF: The cleavage furrow; CIA: Ciliary

图版 I 泥蚶(♀) \times 毛蚶(♂)受精及早期胚胎发育过程的光镜观察

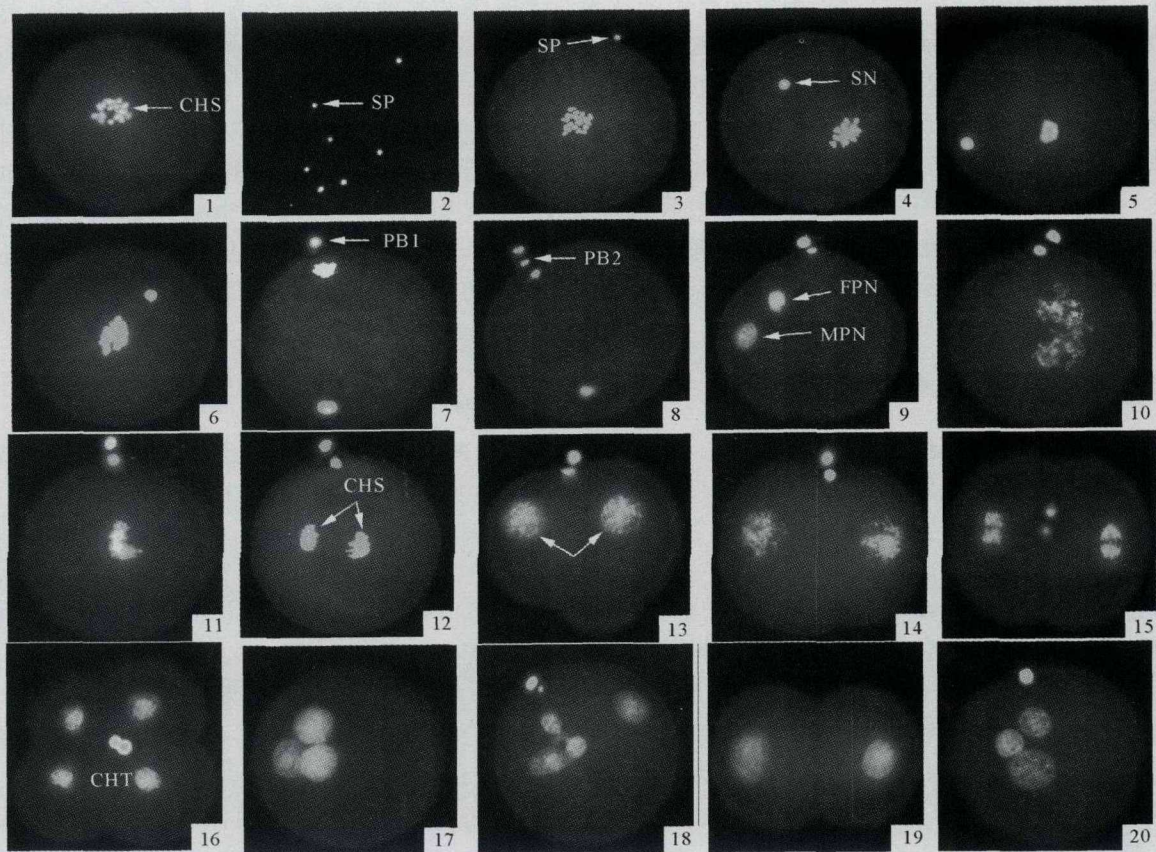
Plate I Cytology of the fertilization process and early embryonic development in *T. granosa* (♀) \times
S. subcrenata (♂) under optical microscope

2.2 杂交受精率及胚胎发育进程

泥蚶、毛蚶杂交受精率统计为 60.2%，泥蚶、毛蚶自交组受精率都达到了 95% 以上。通过对亲本的自交组与杂交组之间的受精卵及早期胚胎发育进程进行比较，结果表明，杂交受精卵及杂种早期胚胎发育进程较亲本对照组在时间上有着明显的延迟。杂种受精卵普遍出现第一极体的时间较其自交组推迟了 10 min，出现第二极体的时间平均推迟了 20 min，而出现第 1 次卵裂的时间则平均推迟了近 30 min。当胚胎发育到囊胚期，胚胎畸形率和死亡率明显提高，而且囊胚期很长。能发育到原肠期的胚胎，只有少数可以变态发育到担轮幼虫，纤毛越来越长，始终不能变态到 D 形，最终全部死亡。

2.3 杂交后受精卵排放极体的不同类型

杂交的受精过程中发现，受精卵发育出现了排放两个极体、排放 1 个极体、不排放极体 3 种类型，所占受精比例约为 58%、15% 和 27%。大多数排放两个极体，正常卵裂；也有相当一部分不排放极体，其卵子受精后在未见极体排放的情况下也完成了卵裂过程。第 1 次卵裂后，卵裂沟贯通两极，受精卵分裂为两个大小不等的子细胞(图版 II-19)；有少数多个原核只排放 1 个极体(图版 II-20)，第 1 极体排放之前核相变化与排放两个极体类型相似。



1. 泥蚶的成熟卵子;2. 毛蚶精子;3. 精子附卵;4. 精子入卵;5,6. 第1次成熟分裂中期;7. 第一极体排出;8. 第二极体排出;9. 雌、雄原核形成;10,11. 雌、雄原核靠近,雌、雄原核的染色体联合;12,13. 第1次卵裂中期、后期;14. 2细胞期;15. 第2次卵裂后期;16. 4细胞期;17. 多精入卵;18. 多极分离;19. 不排极体的受精卵;20. 只排1个极体的受精卵(×400)

CHS:染色体;SP:精子;SN:精核;PB1:第一极体;PB2:第二极体;FPN:雌性原核;MPN:雄性原核;CHT:染色质

1. Mature egg of *T. granosa*; 2. Sperm of *S. subcrenata*; 3. Sperm attaching to the egg; 4. Sperm penetrated in egg; 5,6. Metaphase and anaphase of the first meiosis; 7. Release of the first polar body; 8. Release of the second polar body; 9. Formation of the female and male pronuclei; 10,11. Approach and association of the female and male pronuclei; 12,13. Metaphase and anaphase of the first cleavage; 14. 2-cell stage; 15. Anaphase of the second cleavage; 16. 4-cell stage; 17. Multi-sperm penetrated in egg; 18. Chromosomes separated into four groups; 19. One-polar-body; 20. None-polar-body(×400)

CHS: Chromosome; SP: Sperm; SN: Sperm nucleus; PB: Polar body; FPN: Female pronucleus; MPN: Male pronucleus; CHT: Chromatin

图版 II 泥蚶(♀)×毛蚶(♂)受精及早期胚胎发育过程的荧光观察

Plate II Cytology of the fertilization process and early embryonic development in *T. granosa* (♀) × *S. subcrenata* (♂) under fluorescent microscope

2.4 杂交后多精受精现象的荧光显微观察

在荧光观察过程中发现了相当一部分受精卵具有多精受精现象,其中双精受精的现象占绝大多数(图版 II-17、图版 II-18),即两个精子可以进入同一卵子并且都可去致密。精子入卵的精核多能发生膨胀解凝,有些卵子还能像正常的受精卵一样排出极体,并观察到多个精核的原核化和联合。

3 讨论

3.1 泥蚶与毛蚶杂交的可行性

双壳贝类的杂交一直是贝类遗传育种的重要手段之一。杂交成功与否,首先需要考察杂交受精是否可行。

国内外学者采用光镜或电镜结合细胞学和组织学技术对双壳类杂交的受精生物学进行了研究,如:姜卫国等(1983)对合浦珠母贝 *Pinctada martensii*、长耳珠母贝 *Pinctada chemnitzii* 和大耳珠母贝 *Pinctada maxina* 种间人工杂交受精过程进行了观察,结果证实了杂交组合实现了异种受精;Que 等(2002)对长牡蛎和近江牡蛎杂交受精表明,这两个近缘种的杂交是可行的,但受精率极低且完成受精的时间长;毕克等(2005)对栉孔扇贝×华贵栉孔扇贝,杨爱国等(2002)对虾夷扇贝×栉孔扇贝进行了杂交实验,这些研究都初步证明了其杂交是可行的。本实验中毛蚶和泥蚶杂交,较以上几种杂交组合来看,这两种蚶杂交受精率低且胚胎发育缓慢,第一次卵裂之前已受精的胚胎发育基本正常,但第2次卵裂后期,畸形现象严重,胚胎发育不同步。本试验虽然没有通过远缘杂交获得成活的杂交个体,但是证明了杂交受精的可能性,为下一步开展雌核发育、雄核发育、转基因等研究提供参考。

3.2 泥蚶与毛蚶杂交的亲合性

远缘杂交成功的关键在于杂交亲本的亲和性。王祖熊等(1986)曾提出染色体组型相似者亲和性较大,可能是染色体组型相似,亲本之间基因组以及母本细胞质与父本核基因组之间有较小的差异;桂建芳等(1993)也提出远缘杂交的亲合性与亲本的基因组大小、胚胎发育速度的同步与否密切相关。本实验中,泥蚶和毛蚶染色体数目、染色体总臂数是相同的, $2n=38$, $NF=76$ 。郑家声等(1996)对3种蚶的染色体组型进行了比较研究,结果显示,泥蚶染色体组型 $28m+10sm$,而毛蚶的染色体组型 $14m+22sm+2st$,虽然有所不同,但染色体的数目、大小、臂数等有更多的相似性,结果推测两种贝类杂交是有可能的。吴洪喜等(2000)对泥蚶、毛蚶、魁蚶 *Scapha rcabroughtonii* Schrenck 血细胞的 DNA 相对含量进行了比较,结果发现,泥蚶与毛蚶、魁蚶的 DNA 含量相差不大,说明了它们之间的亲缘关系比较相近,由此说明二者之间有一定的亲和性。一般来说,只有同种精子的结合素和卵膜对应的结合素受体相互的特异性识别,而不同种类精子的结合素不能亲和到卵膜对应的结合素受体上。受精时,精卵结合首先需要精子和卵子相互间的信号识别,即精子表面的配体和卵子质膜上的精子受体结合(Strittmatter *et al.* 1985),进而通过融合蛋白的介导,最终完成细胞内含物的混合,精卵结合为一体,精卵融合有一定种的特异性(Yanagimachi *et al.* 1988;Dunbar *et al.* 1991),即不同种类的精子表面的受体具有鲜明的种属特异性。本实验中虽然毛蚶精子可以进入泥蚶卵中,精核在卵内物质调节下能够膨大形成雄性原核并与雌性原核结合,但可能由于杂种胚胎雌、雄核染色体复制和分裂速度不同,造成细胞分裂节奏不协调和染色体不均等的分配。

3.3 染色体分离紊乱、多精入卵现象与胚胎死亡

染色体分离紊乱在贝类多倍体育种中是经常出现的现象,李永仁等(2006)在诱导栉孔扇贝四倍体的过程中发现了3个纺锤体的紊乱分离现象。近年来 Wakayama 等(1998)对 PB1 发育潜力进行研究,发现 PB1 内的中心粒处于合适的条件下可以像胞质内中心粒一样进行正常分裂。任建峰等(2005)在荧光观察时发现胚胎发育过程中有排放一个和不排放极体的现象。本实验中也有相当一部分不排放极体或只排放1个极体,因此,当排放1个极体或不排放极体时,滞留在受精卵内的中心粒复制、分离,从而会在胞质内出现多个纺锤体。

在泥蚶和毛蚶杂交的过程中发现有多精入卵现象。此种现象在贝类中普遍存在。任建峰等(2004)在栉孔扇贝(♀)×长牡蛎(♂)杂交中也发现了严重的多精入卵现象。在贝类杂交中,受精卵可能缺乏一个健全的机制抑制多精受精,这与贝类正常受精不同,可能是由于精卵异质性矛盾导致阻断多精入卵机制的失控。Schmell 等(1983)认为,受精时膜电位变化和皮质反应共同阻止多精入卵。本实验结果分析,单个毛蚶精子可以进入并激活泥蚶卵子,但是单精入卵并不能阻止其他精子的进入,从而出现多精入卵现象。精子进入卵子也会带入自身的中心粒,多精入卵时会把多个中心粒带入到卵子中,从而形成多个的分裂极和纺锤体,导致细胞异常分裂而使胚胎发育终止。任素莲等(1999)认为,在有多个精原核存在的情况下,尽管形成多套染色体,但不能正常卵裂,说明多精入卵现象也是出现胚胎畸形,影响受精卵成熟分裂及胚胎正常发育的重要因素。对于毛蚶和泥蚶杂交胚胎在发育到D形幼虫期之前就死亡,作者认为染色体紊乱分离不能平均分配到两个子细胞中,是产生大量的非整倍体、导致胚胎死亡的主要原因,但是目前对于紊乱分离的机理仍不是很清楚,其形成机

理还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 万俊芬,汪小龙,潘洁,李冰,李楨,包振民,燕敬平,方建光. 2001. 日本盘鲍×皱纹盘鲍子代杂种优势的 RAPD 分析. 青岛海洋大学学报, 31(4): 506~512
- 于瑞海,包振民,王昭萍,孔令峰,董伟,李吉清. 2006. 栉孔扇贝×虾夷扇贝的杂交技术. 中国海洋大学学报:(自然科学版), 36(1): 85~88
- 王春德,刘保忠,李继强,刘升平. 2009. 紫扇贝与海湾扇贝种间杂交的研究. 海洋科学, 33(10): 84~91
- 王珏,毕克,黄晓婷,张玲玲,胡景杰,包振民. 2006. 华贵栉孔扇贝♀×栉孔扇贝♂远缘杂交的受精细胞学观察. 生物技术通报, 6: 122~126
- 王祖熊,张锦霞,靳光琴. 1986. 鱼类杂交不亲和性的研究. 水生生物学报, 10(2): 171~179
- 吕振明,杨爱国,王清印. 2006. 栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交子代的细胞遗传学研究. 高技术通讯, 16(8): 853~858
- 任建峰,杨爱国,董迎辉,刘志鸿,周丽青. 2005. 栉孔扇贝(♀)和长牡蛎(♂)受精过程的荧光显微观察. 中国水产科学, 12(5): 643~647
- 任建峰,杨爱国,周丽青,刘志鸿,董迎辉. 2004. 栉孔扇贝(♀)和长牡蛎(♂)精子入卵过程的扫描电镜观察. 高技术通讯, 14: 349~353
- 任素莲,王德秀,王如才. 1999. 太平洋牡蛎受精过程的精核扩散与成熟分裂. 海洋湖沼通报, 1: 34~39
- 孙振兴,王如才,姜明,刘晓云,谢嘉林. 1997. 皱纹盘鲍受精过程的电镜观察. 动物学研究, 18(3): 253~257
- 毕克,包振民,黄晓婷,王珏,赵洋,胡景杰. 2005. 栉孔扇贝 *Chlamys farreri*(♀)×华贵栉孔扇贝 *Chlamys nobilis*(♂)受精及早期胚胎发育过程的细胞学荧光显微观察. 中国海洋大学学报, 35(2): 283~286
- 毕克,包振民,黄晓婷,王珏,方建光,刘慧. 2004. 菲律宾蛤仔受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察. 水产学报, 28(6): 623~627
- 李永仁. 2006. 栉孔扇贝二倍体以及 CB 诱导的三倍体组与四倍体组 D 型幼虫生长的比较. 天津农业学报, 13(3): 1~4
- 沈亦平,刘汀,姜海波,张锡元,陈晓汉,叶力,吴斌. 1995. 近江牡蛎受精的细胞学研究. 武汉大学学报(自然科学版), 8: 482~486
- 吴仲庆. 2000. 水产生物遗传育种学. 厦门:厦门大学出版社, 312~320
- 吴洪喜,柴雪良,吴建波,沈志坚. 2000. 3 种蚶 DNA 含量和种间亲缘关系的探讨. 水产科技情报, 27(2): 51~53
- 杨爱国,王清印,刘志鸿,张岩. 2002. 虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis*×栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 人工受精过程的荧光显微观察. 海洋水产研究, 23(3): 1~4
- 杨爱国,王清印,孔杰,刘志鸿,刘萍,李锋,王如才,姜明. 1999. 栉孔扇贝受精卵减数分裂的细胞学研究. 中国水产科学, 6(3): 96~98
- 郑家声,王梅林,郭丹红,徐希明,高清兰. 1996. 3 种蚶染色体组型的比较研究. 海洋学报, 18(3): 78~81
- 姜卫国,魏尧尧,李刚. 1983. 合浦珠母贝、长耳珠母贝和大耳珠母贝种间杂交的研究. II. 受精过程和杂交后代的染色体观察. 热带海洋, 2(4): 316~320
- 桂建芳,梁绍昌,朱蓝菲,孙建民,蒋一珪. 1993. 鱼类远缘杂交正反交杂种胚胎发育差异的细胞遗传学分析. 动物学研究, 14(2): 171~177
- 燕敬平,孙慧玲,方建光,张榭令,陈家彦,张春利. 1999. 日本盘鲍与皱纹盘鲍杂交育种技术研究. 海洋水产研究, 20(1): 35~39
- 董迎辉,林志华,柴雪良,陆荣茂,肖国强. 2007. 文蛤受精及早期胚胎发育过程的细胞学观察. 动物学报, 53(4): 700~709
- 滕爽爽,李琪,孔令峰. 2009. 岩牡蛎和长牡蛎杂交的受精细胞学观察. 中国海洋大学学报, 39(9): 338~342
- Banks, M. A., McGoldrick, D. J., Borgeson, W., and Hedgecock, D. 1994. Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. Mar. Biol. 121: 127~135
- Dunbar, B. S., and O'Rand, M. G. 1991. Comparative Overview of Mammalian Fertilization. New York: Plenum Press 120~150
- Patrick, S., Arnaud, H., Olivier, L. M., Daniel razet, Geairon, P., Faury, N., Goulletquer, P., and Boudry, P. 2002. A comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids. Aquat. Living Resour. 15: 243~250
- Que, H., and Allen, S. K. Jr. 2002. Hybridization of tetraploid and diploid *Crassostrea gigas* (Thunberg) with diploid *C. ariakensis* (Fujita). J. Shellfish Res. 21(1): 137~143
- Schmell, E. D., Gulyas, B. J., and Hedrick, T. L. 1983. Egg surface changes during fertilization and the molecular mechanism of the block to polyspermy. New York; Mechanism and Control of Animal Fertilization, J. F. Hartman(eds.) Academic Press, 365~413
- Standish, K., Allen, J., Patrick, M. G., Scarpa, J., and Bushek, D. 1993. Genetic confirmation of hybridization between *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea rivularis* (Gould). Aquaculture, 113: 291~300
- Standish, K., Allen, J., Patrick, M. G., Scarpa, J., and Bushek, D. 1993. Inviabile hybrids of *Crassostrea virginica* (Gmelin) with *C. rivularis* (Gould) and *C. gigas* (Thunberg). Aquaculture, 113: 269~289
- Strittmatter, W. J., Couch, C. B., and Mundy, D. I. 1985. Role of proteins in the fusion of biological membranes. Mem. Fluid Biol. 4: 259~291
- Wakayama, T., and Yanagimachi, R. 1998. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice. Biol. Reprod. 59(1): 100~104
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization. In Knobil, E., Neill, I. D., Eds: The Physiology of Reproduction. New York; Raven Press, 135~136