

栉孔扇贝雄核发育二倍体的人工诱导

袁媛, 李琪, 于瑞海

(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:研究了利用6-二甲氨基嘌呤(60 $\mu\text{g/mL}$; 6-DMAP)抑制第1卵裂诱导栉孔扇贝 [*Chlamys farreri* (Jones et Preston)] 雄核发育二倍体的条件。雄核发育单倍体是将强度为2.8 $\text{mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 的紫外线照射20 s的卵子与正常精子受精后得到的。6-DMAP不仅可以有效地抑制减数分裂, 还可以有效地抑制有丝分裂; 抑制第1卵裂的适宜起始时间为受精后80 min, 诱导率为21.0%~22.6%。细胞学观察显示, 6-DMAP抑制第1卵裂产生的雄核发育二倍体主要来源于第1卵裂中期的受精卵, 由于阻止了染色体分离和原核移动, 导致一个融合的二倍性雌性原核的形成; 经紫外线照射的卵核在第1卵裂中期没能形成染色体, 而是形成1个浓缩的染色质小体, 没有参与第1卵裂后期的核分裂。尽管孵化率和D形幼虫发生率较低, 但本研究证实了栉孔扇贝雄核发育二倍体人工诱导的可行性。[中国水产科学, 2006, 13(4): 585-590]

关键词: 栉孔扇贝; 雄核发育二倍体; 6-DMAP

中图分类号: S917.1; Q959.215 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)04-0585-06

人工诱导雄核发育是指通过用放射线照射等方法使卵子遗传失活, 与正常精子“受精”, 而后通过抑制第1次卵裂使单倍体胚胎的染色体加倍从而发育成雄核二倍体个体。与传统育种技术相比, 雄核发育二倍体的遗传物质完全来自父方, 其基因位点均处于纯合状态, 可作为快速建立纯系的有效手段^[1-4]。对于一些濒危动物, 通过将冷藏精子与遗传灭活的亲缘关系较近的卵子“受精”, 可以使这一物种得到恢复^[5-8]。因此, 雄核发育技术可以成为物种保护的重要手段之一。此外, 雄核发育还可以用于全雄生产、克隆、有害基因排除以及核质杂种的大量生产^[9]。

有学者利用不同的方法已成功地在一些鱼类诱导了雄核发育二倍体。Bongers等^[10]、Bercsenyi等^[11]、Myers等^[12]、Marengoni等^[13]以40~42.5℃的高温分别成功地抑制了鲤(*Cyprinus carpio*)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的第1次卵裂, 获得了雄核发育二倍体。Corley-Smith等^[14]、赵振山等^[15]、Nam等^[16]、Brown等^[17]和Kirankumar等^[18]也分别利用热休克法阻止了斑马鱼(*Danio rerio*)、大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)、泥鳅(*Misgurnus mizolepis*)、虹鳟(*Oncorhynchus*

mykiss)和六带鲃(*Puntius tetrazona*)的第1次卵裂, 获得了雄核发育二倍体。Parsons等^[19]和Scheerer等^[20]利用静水压抑制第1次卵裂获得了虹鳟雄核二倍体个体。

在海洋贝类, 有关雄核发育二倍体人工诱导的研究目前尚未见报道。在以前的研究中, 笔者利用紫外线照射成功地诱导了栉孔扇贝 [*Chlamys farreri* (Jones et Preston)] 雄核发育单倍体, 并采用DAPI染色对雄核发育卵子早期的核行为进行了观察^[21-22]。本实验尝试利用6-二甲氨基嘌呤(6-dimethylaminopurine, 6-DMAP)阻止栉孔扇贝雄核发育卵子的第1次卵裂, 使染色体加倍从而诱导雄核发育二倍体, 同时结合荧光显微镜观察了6-DMAP处理对雄核发育卵在卵裂过程中染色体行为变化的影响, 对形成雄核发育二倍体的作用机理进行初步探讨, 旨在研究并证实栉孔扇贝雄核发育二倍体人工诱导的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于2003年4~6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大连

收稿日期: 2005-11-28; 修订日期: 2006-02-27。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571442); 海水养殖教育部重点实验室开放课题(200401)。

作者简介: 袁媛(1978-), 女, 博士研究生, 主要从事贝类遗传育种学研究。

通讯作者: 李琪, Tel: 0532-82031622, E-mail: qili66@mail.ouc.edu.cn

长海养殖海区,样品壳长(6.56 ± 0.34) cm,壳高(7.07 ± 0.33) cm。材料取回后经洗刷干净入池于浮动网箱中暂养(水温 14℃),每天换水投饵,饵料为扁藻(*Platymonas* spp.)、叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.)。亲贝暂养按常规方法进行。

1.2 精卵的收集

采用阴干升温的方法获取成熟精、卵,镜检其质量,然后分别用海水稀释至浓度为 1.0×10^6 /mL 和 1.0×10^4 /mL。稀释及后期实验、培养用海水均为四级砂滤海水。

1.3 紫外线处理卵子

卵悬液(4 mL)置于直径 9.0 cm 的亲水性组织培养皿中,轻微振荡使卵子均匀地分散于培养皿底部。将培养皿置于 15 W 紫外杀菌灯下 15 cm 处,用紫外线强度测定仪测得此条件下紫外线强度为 $2.8 \text{ mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 。卵子在紫外线下照射 20 s。

1.4 雄核发育二倍体的诱导

8 mL 正常卵子与 1 mL 精液混合作为正常对照组。56 mL 经过紫外线照射的卵悬液与 7 mL 稀释好的精液充分混合,然后平均分为 7 组,转移至 7 个烧杯中。其中 1 个组作为雄核发育单倍体对照组,其余 6 组(A-F)用 6-DMAP 阻止第 1 卵裂以诱导雄核发育二倍体。各组受精卵于 19℃ 的温度条件下培养。6 个组用以诱导实验的雄核发育卵子分别在受精后 70 min、80 min 和 90 min 用 6-DMAP 浸泡处理 15 min、20 min,6-DMAP 的终浓度为 $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。处理结束后经 $20 \mu\text{m}$ 筛绢过滤洗卵,然后移入正常海水中孵化培育。

紫外线失活卵子的最佳条件根据以前的实验决定^[21];6-DMAP 的处理开始时间是结合本次实验雄核发育单倍体组的胚胎发育情况及以前荧光显微镜观察栉孔扇贝雄核发育卵子发育早期的核相变化而确定的^[22];6-DMAP 的使用浓度和持续时间是根据其他学者在诱导贝类多倍体及雌核发育单倍体的研究中认为的最佳参数而选择^[23-24]。受精后 4 h 计算各组的受精率,35 h 统计各组的 D 形幼虫发生率。使用不同亲本实验重复 3 次。

1.5 倍性检查

胚胎的倍性通过检查受精后 24 h 担轮幼虫的染色体标本而获得。收集每个组的 D 形幼虫样品,浓缩后加入含 0.1% 秋水仙素的海水中处理 2 h,然后加入 0.075 mol/L KCl 溶液低渗 30 min,去掉低渗液,用 Carnoy 氏液(甲醇与冰醋酸体积比 3:1)固

定,反复固定 3 次。滴片前去掉固定液,加入 50% 冰醋酸,用吸管轻轻吹打解离成单细胞。样品滴到已加热的载玻片上,空气干燥后经磷酸缓冲液(pH 6.8)稀释的 10% Giemsa 染色。观察和计数分散较好的中期分裂相以获得染色体数目。

1.6 受精细胞学观察

精卵混合后 2 h 内每隔 5 min 从 6-DMAP 处理组内取卵子样品,按 Li 等^[25]的方法用 2% 福尔马林海水溶液固定,经含 8% 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)清洗 3 次后,进行 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)染色,然后在荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 雄核发育二倍体的诱导

采用 6-DMAP 处理抑制受精卵的第 1 卵裂以诱导产生雄核发育二倍体,诱导处理对受精率、D 形幼虫发生率的影响见表 1。正常对照组(2N)的受精率为 76.8%,雄核发育单倍体组(AN)和 6-DMAP 各处理组(A-F)的受精率与正常对照组的受精率差别不大,说明适宜剂量的紫外线失活卵子遗传物质并没有给受精率带来太大影响。D 形幼虫发生率在 2N 和 AN 组分别为 97.9% 和 0。经过 6-DMAP 处理抑制雄核发育卵子的第 1 次有丝分裂,由于处理的起始时间和持续时间不同,各处理组的 D 形幼虫发生率各不相同,但是均低于 1%。相比较而言,在受精后 80 min 用浓度为 $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 6-DMAP 持续处理 15 min 得到的 D 形幼虫较多(0.008%)。

为了确定在各个 6-DMAP 处理的雄核发育二倍体组中胚胎的染色体是否加倍,对染色体数目进行了分析。栉孔扇贝二倍体的染色体数目是 38(图 1)。由于在各组中均观察到很多非整倍体,所以在这个实验中,将染色体数 $17 \sim 21(N \pm 2)$ 计为单倍体, $36 \sim 40(2N \pm 2)$ 计为二倍体。表 2 表示了各处理组幼虫细胞的单倍体、二倍体和非整倍体的比率。在正常二倍体和雄核发育单倍体对照组中,分别有 100% 和 74.5% 的担轮幼虫为二倍体和单倍体。6-DMAP 处理能够阻止第 1 次有丝分裂,其使染色体加倍的效果与处理开始时间、处理持续时间有关,实验结果表明,在受精后 80 min 用浓度为 $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 6-DMAP 持续处理 15 min 或 20 min 能得到相对较高的倍化率(21.0% 和 22.6%)。

表 1 各处理组的受精率和 D 形幼虫发生率
Tab.1 Rates of fertilization and development of D-shaped larvae in various experimental groups ($\bar{X} \pm SD$)

实验组	卵子紫外线照射	处理时间/min	受精率/%	D 形幼虫发生率/%
Experimental groups	UV irradiation of eggs	Treatment time	Fertilization rate	Developmental rate of D-larvae
对照组 Control	-	未处理 Untreated	76.8±3.6	97.9±0.9
单倍体组 Haploid	+	未处理 Untreated	69.5±4.1	0.0±0.0
A	+	70~85	69.8±6.5	0.003±0.001
B	+	70~90	71.4±4.3	0.002±0.001
C	+	80~95	69.6±6.1	0.008±0.002
D	+	80~100	70.3±6.2	0.006±0.003
E	+	90~105	69.1±2.2	0.0003±0.0005
F	+	90~110	72.3±3.8	0.0±0.0

注:数值表示平均值±标准偏差(n=3);“+”,卵子经紫外线照射;“-”,卵子未经紫外线照射。
Note: Each value represents the mean ±SD (n=3); “+”, eggs were UV-irradiated; “-”, eggs were not UV-irradiated.

表 2 2N,AN 和 6-DMAP 各处理组的倍化率
Tab.2 Levels of haploids and diploids in various experimental groups ($\bar{X} \pm SD$)

实验组	卵子紫外线照射	处理时间/min	单倍性/%	二倍性/%	非整倍性/%
Experimental groups	UV irradiation of eggs	Treatment time	Haploids	Diploids	Aneuploids
对照组 Control	-	未处理 Untreated	0.0±0.0	100.0±0.0	-
单倍体组 Haploid	+	未处理 Untreated	74.5±6.4	1.9±7.2	23.6±8.6
A	+	70~85	37.2±12.9	11.7±14.6	51.1±7.9
B	+	70~90	28.8±8.8	13.3±9.3	57.9±7.9
C	+	80~95	15.6±6.9	21.0±6.5	63.4±12.3
D	+	80~100	12.7±6.2	22.6±5.7	64.7±6.0
E	+	90~105	47.1±7.3	6.8±7.9	46.1±6.8
F	+	90~110	45.2±3.7	7.2±4.5	47.6±4.1

注:数值表示平均值±标准偏差(n=3);“+”,卵子经紫外线照射;“-”,卵子未经紫外线照射。
Note: Each value represents the mean ±SD (n=3); “+”, eggs were UV-irradiated; “-”, eggs were not UV-irradiated.



图 1 栉孔扇贝幼虫细胞染色体有丝分裂中期相
A: 正常二倍体(2N=38); B: 雄核发育单倍体(N=19); C: 雄核发育二倍体(2N=38)。×330。
Fig.1 Mitotic metaphase plates from the larval cells of *C. farreri*.
A: A diploid cell with 38 chromosomes from the control group; B: A haploid cell with 19 chromosomes from the haploid group;
C: A diploid cell showing 38 chromosomes from the androgenetic diploid group treated with 6-DMAP. ×330.

2.2 6-DMAP 处理后雄核发育卵子的核相变化

当 6-DMAP 的处理开始时间掌握在雄核发育卵子进行第 1 次有丝分裂的中期时,受精卵中就会

形成一个体积较大、荧光度略强的二倍性雄性原核;由于紫外线使母本染色体失活,雄核发育卵子内的雌性原核并不浓缩形成染色体,而是形成致密的染

色质小体(Dense chromatin body, DCB),位于父本染色体近旁,没有与父本染色体融合(图2-A)。在第1次卵裂后期,二倍性的雄性原核没有发生分离,DCB仍然位于其近旁,没有卵裂沟的形成(图2-B);6-DMAP处理结束后,受精卵继续有丝分裂,父

本染色质存在于2个分裂球中,DCB或存在于2个分裂球其中之一的细胞质中(图2-C),或被卵裂沟分割为2个部分而同时存在于2个分裂球的细胞质之中(图2-D)。

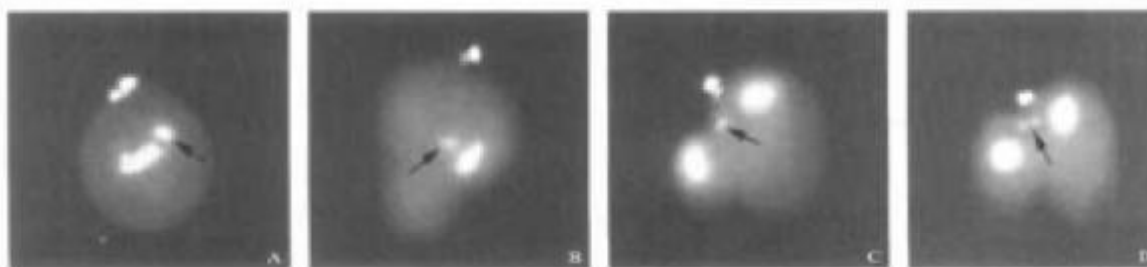


图2 栉孔扇贝 6-DMAP 处理组雄核发育卵子的核相变化

A: 一个大的二倍性雄性原核和DCB; B: 第1卵裂后期; C、D: 2细胞期。×30。箭头表示DCB。

Fig.2 Nuclear behavior of *C. farreri* eggs in the 6-DMAP-treated androgenetic diploid groups

A: One large male pronucleus and DCB; B: Anaphase of the first cleavage; C and D: 2-cell. ×30. Arrows show DCB.

3 讨论

实验结果表明,利用 6-DMAP 处理诱导雄核发育二倍体,不同的处理开始时间及处理持续时间对二倍体诱导率及 D 形幼虫发生率均有影响。本实验中,在培养温度 19℃ 的条件下,受精后 80 min 开始处理,胚胎的二倍体率要高于受精后 70 min 和 90 min 开始处理的实验组。对本次实验雄核发育单倍体组胚胎发育情况的观察以及以前利用荧光显微镜观察栉孔扇贝雄核发育卵子发育早期的核相变化的结果发现^[25],受精后 80 min,大部分受精卵将要进入第1次有丝分裂中期,此时父本染色体已经复制,以 6-DMAP 处理破坏纺锤体的形成,从而阻止染色体向两极移动,可以使胚胎二倍化。对 6-DMAP 诱导栉孔扇贝三倍体的细胞学机理的研究表明,抑制第2极体产生的三倍体主要来源于发育至第2次减数分裂中期的受精卵,是1个双倍性的雌性原核与1个雄性原核结合形成三倍体^[26]。潘英等^[27]利用 6-DMAP 处理诱导第1卵裂抑制型雌核发育二倍体的研究也表明,二倍体胚胎来源于第1次卵裂中期的受精卵。李冰霞等^[28]在第1次卵裂进入中期时对草鱼卵进行热休克处理得到比例较高的基因纯合型二倍体仔鱼。这些研究结果说明,在染色体复制完毕但还未开始分离的中期对受精卵进行处理,可以获得较高的倍化率。

相同的处理开始时间,6-DMAP 浸泡 20 min 比 15 min 所得的二倍体要多,但是 D 形幼虫发生率却有所下降。在田传远等^[24]、杨爱国等^[23]利用 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎和栉孔扇贝三倍体、杨惠萍等^[29]以 CB 诱导栉孔扇贝四倍体的研究中均观察到类似的现象。有学者认为这是由于处理时间的增长使部分受精卵的染色质发生了分散,从而造成死亡率明显增加^[23]。另外,长时间的药物处理对胚胎的毒害作用可能也会增加,从而使幼虫成活率下降。结合胚胎二倍化率和 D 形幼虫发生率可以看出,在受精后 80 min 以浓度为 60 μg/mL 的 6-DMAP 持续处理 15 min 的效果较好。由于在雄核发育单倍体组中 D 形幼虫发生率为 0,表明 6-DMAP 处理组出现的 D 形幼虫可能是雄核发育二倍体。

DAPI 荧光染色是观察早期胚胎发育染色体变化的有效技术。荧光显微镜观察显示,6-DMAP 加倍处理后,受精卵内只有1个体积较大、荧光度略强的雌性原核和失活的母本染色体;6-DMAP 处理结束后,父本染色体又开始分离,有丝分裂继续进行。6-DMAP 是一种蛋白质磷酸化抑制剂,其作用机理为破坏中期有丝分裂器的微管和中间纤维,损伤有丝分裂期纺锤体微管的功能,使纺锤体不能形成,导致染色体的分离运动受阻,从而使染色体加倍,并能促进染色质去凝集^[30-33]。本次实验的结果证实了 6-DMAP 的这一作用机理。同时也说明,以 6-

DMAP 处理诱导雄核发育二倍化,处理时机应该选择在受精卵将要进入第 1 卵裂中期时进行。

本次实验使部分胚胎的染色体加倍,但是倍化率和 D 形幼虫发生率都很低。已有的报道表明,在马苏大麻哈 (*Oncorhynchus masou ishikawae*)^[2]、虹鳟^[4,19-20]、鲤^[10,34]、溪红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*)^[35]、尼罗罗非鱼^[12]和泥鳅^[36]等鱼类中,阻止第 1 卵裂以诱导雄核发育二倍体,二倍化率大多在 10% 以下,只有一例为 32.5%~38.9%^[19]。潘英等^[27]利用 CB 和 6-DMAP 抑制第 1 卵裂诱导栉孔扇贝雌核发育二倍体,二倍化率和 D 形幼虫发生率也远比抑制第 2 极体获得的二倍化率和 D 形幼虫发生率低。这可能是因为抑制第 1 卵裂染色体加倍后导致部分携带隐性纯合致死基因的二倍体胚胎死亡。在鱼类中,大多采用物理方法如温度休克和静水压力来抑制第 1 卵裂,本实验以 6-DMAP 这种化学药物作为诱导剂,药物处理恰好在卵裂这一对药物耐受力较弱的敏感期,这可能对胚胎产生较大的副作用,使激活卵无法正常发育。紫外线照射对卵子细胞质的损伤也可能会对胚胎发育造成一定影响,从而降低胚胎的存活率。

本实验中没有采用 DNA 标记提供第 1 卵裂抑制型雄核发育二倍体的纯合证据,但是细胞学观察数据表明 6-DMAP 处理中得到的二倍体幼虫源于第 1 卵裂的抑制,而不是第 2 极体的抑制。尽管倍化率和 D 形幼虫发生率较低,但该研究首次报道了贝类雄核发育二倍体人工诱导的可行性。

参考文献:

- [1] Bongers A B J, Bos Abrens J, Zandieh Douabi B, et al. Maternal influence on development of androgenetic clones of common carp, *Cyprinus carpio* L. [J]. *Aquaculture*, 1995, 137:139-147.
- [2] Nagoya H, Okamoto H, Nakayama I, et al. Production of androgenetic diploids in amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* [J]. *Fish Sci*, 1996, 62:380-383.
- [3] Schoerer P D, Thorpe G H, Allendorf F W. Genetic analysis of androgenetic rainbow trout [J]. *J Exp Zool*, 1991, 260:382-390.
- [4] Young W H, Wheeler P A, Fields R D, et al. DNA fingerprinting confirms isogenicity of androgenetically derived rainbow trout lines [J]. *J Hered*, 1996, 87:77-81.
- [5] Gwo J C, Ohta H, Okuzawa K, et al. Cryopreservation of sperm from the endangered formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosensis*) [J]. *Theriogenol*, 1999, 51:569-582.
- [6] Thorpe G H, Schoerer P D, Hershberger W K, et al. Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival [J]. *Aquaculture*, 1990, 85:215-221.
- [7] Bahiok I, Dobson S, Goryczko K, et al. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors [J]. *Theriogenol*, 2002, 57:1229-1249.
- [8] Corley-Smith G E, Lim C J, Brandhorst B P. Production of androgenetic Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Genetics*, 1996, 142:1265-1276.
- [9] 范亮廷. 水产动物育种学[M]. 北京:中国农业出版社, 2005. 130-132.
- [10] Bongers A B J, in't Veld E P C, Abo-Hashema K, et al. Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks [J]. *Aquaculture*, 1994, 122:119-132.
- [11] Bercsenyi M, Magyary I, Urbanyi B, et al. Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species [J]. *Genome*, 1998, 41:573-579.
- [12] Myers J M, Penman D J, Basavaraju Y, et al. Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 2:205-210.
- [13] Marenzeller N G, Onoue Y. Ultraviolet-induced androgenesis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and hybrid Nile x blue tilapia, *O. aureus* (Steindachner) [J]. *Aquacult Res*, 1998, 29:359-366.
- [14] Corley-Smith G E, Lim C J, Brandhorst B P. Production of androgenetic Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Genetics*, 1996, 142:1265-1276.
- [15] 赵国山, 吴清江. 人工诱导大鳞副泥鳅雄核发育二倍体克隆鱼的产生[J]. 遗传学报, 1998, 25:416-421.
- [16] Nam Y K, Cho Y S, Cho H J, et al. Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus misgurnus* [J]. *Aquaculture*, 2002, 209:257-270.
- [17] Brown K H, Thorpe G H. Mitochondrial and nuclear inheritance in an androgenetic line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 2002, 204:323-335.
- [18] Kimukumar S, Pandian T J. Production of androgenetic tiger bel, *Puntius tetrastemus* [J]. *Aquaculture*, 2003, 228:37-51.
- [19] Parsons J E, Thorpe G E. Production of androgenetic diploid rainbow trout [J]. *J Hered*, 1985, 76:177-181.
- [20] Schoerer P D, Thorpe G H, Allendorf F W, et al. Androgenetic rainbow trout produced from inbred and outbred sperm sources show similar survival [J]. *Aquaculture*, 1986, 57:289-298.
- [21] 袁媛, 李琪, 于瑞海, 等. 紫外线诱导栉孔扇贝雄核发育的研究[J]. 水产学报, 2004, 28(2):133-138.
- [22] 袁媛, 李琪, 于瑞海. 人工诱导栉孔扇贝雌核发育早期的荧光显微观察[J]. 中国水产科学, 2003, 10(5):419-424.

- [23] 杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 6-二甲氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体[J]. 水产学报, 1999, 23(3): 241-247.
- [24] 田传远, 王如才, 董英, 等. 6-DMAP诱导太平洋牡蛎三倍体—抑制受精卵第二极体释放[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 1-4.
- [25] Li Q, Otsu M, Koshihara M, et al. Cytological observations on nuclear behavior in normal and gynogenetic eggs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Scienceochoku*, 2000, 48: 193-198.
- [26] 杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 6-甲基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体的细胞学机理[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(1): 22-26.
- [27] 董英, 李琪, 于瑞海. 栉孔扇贝第一卵裂抑制型雌核发育二倍体的研究[J]. 海洋学报, 2005, 27(6): 1-8.
- [28] 李冰霞, 罗琛. 热休克法抑制第一次卵裂实现草鱼雌核发育的细胞学观察[J]. 水生生物学报, 2003, 27(2): 155-160.
- [29] 杨惠萍, 王如才, 郭希明, 等. 栉孔扇贝四倍体的研究 I: 细胞松弛素 B 诱导[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(2): 166-172.
- [30] Dubé F, Dufrense L, Coust L, et al. Protein phosphorylation during activation of surf clam oocytes [J]. *Dev Biol*, 1991, 146: 473-482.
- [31] Niant I, Guerrier P. 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity [J]. *Exp Cell Res*, 1988, 176: 68-79.
- [32] Dufrense L, Niant I, St-Pierre J, et al. Effects of 6-dimethylaminopurine on microtubules and putative intermediate filaments in sea urchin embryos [J]. *J Cell Sci*, 1991, 99: 721-730.
- [33] Simili M, Pellenzo P, Pigullo S, et al. 6-DMAP inhibition of early cell cycle events and induction of mitotic abnormality [J]. *Mutagenesis*, 1997, 12: 313-319.
- [34] Granina A S, Gomelsky B I, Neyfakh A A. Diploid androgenesis in pond carp [J]. *Genetika*, 1990, 26: 2 037-2 043.
- [35] May B, Henley K J, Krueger C C, et al. Androgenesis as a mechanism for chromosome set manipulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) [J]. *Aquaculture*, 1988, 75: 57-70.
- [36] Masuoka T, Arai K, Suzuki R. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* from UV irradiation eggs of the first cleavage [J]. *Fish Sci*, 1995, 61: 716-717.

Artificial induction of androgenetic diploid in scallop, *Chlamys farreri* (Jones et Preston)

YUAN Yuan, LI Qi, YU Rui-hai

(The Key Lab of Mariculture of the Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Androgenesis, development from paternal but not maternal chromosomes, can be used in numerous genetic studies and breeding programs, including rapid establishment of isogenic, clonal lines, sex control, generation of nucleo-cytoplasmic hybrids between two different species, and recovery of valuable strains from cryopreserved sperm. In numerous fish species, efficient procedures for genetic inactivation of eggs and restoring diploidy have been studied and successful diploid androgenesis have been produced. However, in mollusks artificial induction of androgenetic diploids has been not documented. In this study, conditions required for the induction of androgenetic diploids by suppression of first cleavage in the Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones et Preston) were examined using treatments of 6-dimethylaminopurine (60 $\mu\text{g/mL}$; 6-DMAP). Haploid androgenesis was induced by eggs which were ultraviolet (UV)-irradiated for 20 s at an intensity of 2.8 $\text{mW}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$. Treatment with 6-DMAP was effective in inhibiting not only meiosis but also mitosis, and the optimum time for the suppression of first cleavage began 80 min after insemination, resulting in 21.0% - 22.6% androgenetic diploids. Cytological observations indicated that 6-DMAP disrupted the spindle at mitosis and inhibited chromosome movement, resulting in the formation of one diploid female nucleus. At metaphase of the first cleavage, the UV-irradiated female nucleus did not form chromosome, but became a dense chromatin body (DCB), which did not participate in the karyokinesis at anaphase of the first cleavage. Although attempts to produce androgenetic diploids demonstrated that ploidy levels and the developmental rate of D-shaped larvae are low, the results of this study suggest the possibility of producing androgenetic diploids in *C. farreri* (Jones et Preston). [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 585-590]

Key words: *Chlamys farreri* (Jones et Preston); androgenetic diploid; 6-DMAP

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qil66@mail.ouc.edu.cn