牡蛎的染色体及操作技术研究进展

RESEARCH DEVELOPMENT OF OYSTER'S CHROMSOME AND MANIPULATION

王 宁 姜国良 李立德

(中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

中图分类号 Q343 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)10-0022-06

牡蛎是一种营养价值很高的珍贵海产品,为世界性的贝类,目前已发现有100多种,全世界濒海各国几乎都有生产。我国沿海所产的牡蛎约有20多种,作为主要的养殖种类有近江牡蛎(*Crassostrea rivularis* could)、褶牡蛎(*Crassostrea plicatula* Gmelin)、长牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg)、大连湾牡蛎(*Crassostrea talienwhanensis*)和密鳞牡蛎(*Ostrea denselamellosa* Lischke)等。日本的牡蛎大部分与我国相同,欧美各国的牡蛎主要有食用牡蛎(*Ostrea edulis* L)、美国牡蛎[*Ostrea* (*Crassostrea*) *virginica* Gmelin]、欧洲牡蛎[*Ostrea* (*Crypheu*) *angulata*],其总产量在贝类中居首位。

近年来随人们对于牡蛎综合利用价值重视程度的不断提高以及牡蛎产品社会需求量持续增长,传统的海水养殖牡蛎品种和养殖技术已经不能满足产量和质量方面的要求。因此,国内外研究者将大量精力倾注于利用现代生物技术改良牡蛎的品质方面,尤其是牡蛎的染色体研究及染色体操作更是取得了大量成果,从染色体水平为牡蛎的综合利用提供了理论依据和实践指导,本文将对此予以简要综述。

1 牡蛎的染色体研究

研究染色体的行为、数目及组型,不仅对了解生物的遗传组成、遗传变异规律和发育机制具有重要的意义,而且对于预测并鉴定种间杂交和多倍体育种的结果,了解性别遗传机制,确定生物的基因组数目,研究物种起源、进化地位、分类和种族关系等也具有重要的参考价值。其生产意义旨在通过染色体操作,培育出生长快、品质好和抗病力强等优良性状的新品种,以提高牡蛎的生产和质量。

1.1 染色体核型分析

由于海产无脊椎动物的组织培养或细胞培养目前还存在一定困难,落后于脊椎动物和其他陆生无脊椎动物,所以有关海产无脊椎动物的核型分析和带型等的报道相对较少,近年来也开展了一些工作,取得了部分成绩。

1.1.1 染色体分裂相 制备并获得清晰的染色体分裂相,是确定该物种染色体数目,进行核型与带型分析的重要环节,要从一个个体一次得到大量分裂旺盛的细胞是很难的。因此多选用细胞分裂旺盛的材料,如胚胎、幼虫、幼贝和成贝的鳃、外套膜等制备染色体片子。胚胎和鳃组织是较为普遍采用的实验材料[1]: 如郑小东利用太平洋牡蛎4~8细胞胚胎为材料,采用压片法获得清晰的细胞分裂相。曾志南等[2]以僧帽牡蛎为材料采用胚胎压片、担轮幼虫制片和鳃组织制片等3种方法获得了较理想的染色体玻片标本; 贾志良等[3]以太平洋牡蛎鳃为材料,使用PHA、ConA和低温同步法分别处理之后用王梅林的方法制片,均获得了较多的中期分裂相,其中尤以低温同步法处理效果为最佳。

1.1.2 染色体数目 已知世界上牡蛎种类约在100种左右,迄今已进行染色体观察的有二十几种,除*Dendrostrea folium*具有2N=18的染色体数外[4],其他种类均为2N=20,详见表1[5]。

1.1.3 核型 通过近年来国外有关牡蛎染色体

第一作者:王宁,出生于1978年,硕士研究生,从事海洋生物分子生物学研究。E-mail: aaa-wang@sina.com

收稿日期:2003-02-28;修回日期:2003-07-01

表 1　已知的牡蛎科的种类染色体数目

种 名	染色体数目	核 型
Crassostrea amasa (Iredale)	20	
C. angulata (Lamarck)	20	
	20	10m
	20	9m-1sm
C. belcheria (Sowerby)	20	10m-sm
C. cortexiensis (Hertlein)	20	7m-3sm
C. gigas (Thunberg)	20	8m-2sm
	20	10m
C. glomerata (Gould)	20	
C. gryphides (Scholtein)	20	
C. iredalei (Fauatino)	20	
C. rhizaphorae (Guilding)	20	5m-5sm
		8m-2sm
C. sikamea	20	9m-1sm
C. rivularis (Gould)	20	
同名于 *C. ariakensis* (Fujital)	20	10m-sm
	20	8m-2sm
C. virginica (Gmelin)	20	6m-4sm
	20	6m-2sm
	20	6m-4sm
	20	8m-2sm
C. gasar	20	5m-5sm
C. talienwhanensis	20	
Ostrea puelchane	20	4m-5sm-1st
O. circupicta	20	
O. denselamellosa (Lischke)	20	
	20	7m-3sm
O. edulis (L.)	20	6m-2sm-2st
	20	6m-2sm-2st
O. equestris	20	
O. folium	20	
O. glomerata	20	
Saccostrea commerician	20	
	20	8m-2sm
S. cucullata	20	10m
S. echinata	20	10m-sm
S. mordax	20	10m-sm
Dendostrea	18	5m-2sm-2st
Hyotissa imbricata	20	7m-3sm
Tiostrea chilensis (Philippi)	20	7m-3sm

核型的研究，尤其是我国几种主要水产种类：太平洋牡蛎[6]、僧帽牡蛎[7,8]和近江牡蛎[9,10]的核型研究表明牡蛎的染色体组型通常只由中部（M）和亚中部（SM）着丝粒染色体组成，而 *Dendrostrea folium* 具亚端部（ST）和端部（T）染色体，具有较多 M/SM着丝粒染色体核型的种比具较多 ST/T着丝粒核型的种更为高级或特化。根据双壳类的核型比较，牡蛎科的种类可能比贻贝、扇贝科的种类更进化[1]，这与 Hinegardner[11]根据核 DNA 含量的比较研究得出的结论一致。沈亦平等 1994 年在近江牡蛎中观察到了一些核型多态现象，一是个别分裂相中出现一条亚端部着丝粒染色体，二是个别分裂相的一对染色体上出现随体，这些现象在牡蛎其他种类的研究中，也偶有发现。Thirist-Quieurex 发现食用牡蛎的某些染色体变成端部着丝粒。Ahmed 和 Spark 发现奥林匹亚牡蛎（*Ostrea lurida*）的晚前期分裂相中有一对带随体的染色体。另外 Longwell 等和 Rodrignez-Romero 等在美洲牡蛎的最长一对染色体上发现有次缢痕。这些多态现象可能是牡蛎类型分化的迹象，有待于深入研究。

除对二倍体牡蛎核型研究外，郑小东等[12]对太平洋牡蛎二倍体和三倍体核型进行了分析比较，为多倍体育种在理论和实践应用方面提供了依据。

1.1.4　非整倍体　目前对牡蛎非整倍体研究较少，但已有的数据表明贝类能耐受某些非整倍体的存在。在太平洋牡蛎的二倍体自然群体中，在生长较慢的个体中发现有较高比例的非整倍体细胞[13]。在太平洋牡蛎中至少发现 7 种类型的非整倍体是可以存活的，这些非整倍体未表现出明显的生长滞缓或缺陷[14]。Wang 等[15]在经诱导的三倍体太平洋牡蛎及其四倍体（♂）与二倍体（♀）杂交后代中都发现有一定数量的非整倍体存在。

1.2　高分辨率显带技术在牡蛎染色体中的应用

高分辨率显带技术能显示染色体内部结构，提供更多的具鉴定性特征的信息，使用特殊的染色方法，在染色体中产生明显着色的色带（暗带）和未着色的明带相间的带型，形成鲜明的染色体个性。

带型、核型以及染色体形态特征都代表种的特征，即在一般情况下，在一个种群的所有个体或在同一个体的所有体细胞中，它们基本上是一致和稳定的，这就为不同动物种群的分类研究和在进化过程中所处位置的确定提供了重要的标准[1]。目前，高分辨率显带技术在牡蛎中应用与哺乳类、鱼类相比差距甚大，国内外文献记载的种类很少，如美洲牡蛎 G 带[16]，太平洋牡蛎 G 带和银带（Ag-NOR 带）[17]。G 带研究主要采用的是胰酶法和尿素法显带，从而在美洲牡蛎和太平洋牡蛎中得到了稳定、清晰的 G 带。银带法主要参照 Howell 和 Black 的快速银染法。原位分子杂交实验证明，Ag-NORs 可以准确地显示 rDNA 的位置，银染是具有活性的或潜在活性的 NORs 的酸性蛋

白成分，以显示具转录活性或潜在转录活性的染色体。失活的 NORs 不能被银染。牡蛎的 NORs 在其数目和分布上具多态性，不同胚胎之间及同一胚胎的不同细胞之间都存在差异[17]。

1.3 染色体 DNA 含量

每一细胞核中，染色体组乃至每一染色体的 DNA 含量，是染色体核型特征中的主要的分子特征之一。目前，牡蛎科仅有 *Ostrea lurida*，*O. virginica*，*O. permullis* 有 DNA 绝对含量的报道，其含量分别为 1.3，1.1，0.69pg[1]。李赟等[18]利用流式细胞术对太平洋牡蛎鳃、闭壳肌和性腺组织的细胞核 DNA 相对含量进行比较，指出核 DNA 含量在不同组织间变化较大，差异明显。其中，鳃及闭壳肌组织细胞核 DNA 相对含量在个体间及组织之间比较恒定。而性腺组织细胞核 DNA 含量受温度影响比较大，个体差异显著。结果说明，鳃及闭壳肌组织是测定牡蛎细胞核 DNA 含量用于倍性鉴定的理想材料，它为进一步研究牡蛎 DNA 含量与其生长发育的关系奠定了基础。

1.4 新技术在牡蛎染色体研究中的应用

牡蛎的染色体形态相似，用传统的带型技术鉴定识别染色体很难且不稳定，若结合荧光原位杂交(FISH)技术和各种特异性探针，则可很容易地分析和鉴定染色体，还可同时对一些基因进行定位。FISH 的成功很大程度上取决于高质量的染色体制片，而早期胚胎制备的染色体质量较好，适合 FISH 分析。FISH 产生的染色体带型相对于传统的带型技术来说是稳定的，简单的，富含信息的。虽然目前还没见 FISH 技术用于牡蛎种间杂交研究的相关报道，但是，考虑到杂交育种和多倍体育种在牡蛎养殖中举足轻重的位置，FISH 技术和种特异性探针进行杂交育种的快速检测很有发展前景。即使在亲缘关系很近的种类存在相似的重复序列，序列差异性也足够区分这两个种类的染色体。应用 FISH 技术，用小量的组织快速鉴定杂交育种是可行的，这对于牡蛎养殖业杂交育种的生产及自然种群杂交种的鉴定是非常有用的。其作为染色体高分辨显带技术的补充和发展，在牡蛎的细胞遗传学研究中必将发挥重要的作用[5]。

2 牡蛎的染色体操作技术

染色体操作技术，又称染色体组工程，即用生物、物理或化学方法，改变有性生殖生物原有染色体组的方法，是细胞工程的重要组成部分。牡蛎的染色体操作研究是从人工诱导三倍体开始的，Stanley 1981 年把美洲牡蛎的受精卵用细胞松弛素 B 处理，使极体排出受阻，受精卵内遗传物质由二倍体变三倍体，接下来洗去细胞松弛素 B，让卵子发育，从而育成人工三倍体贝。这是首次在海洋无脊椎动物上成功获得三倍体。自此，海产贝类的人工诱导多倍体的研究工作迅速在国内外开展起来。

2.1 三倍体牡蛎

2.1.1 二倍体与三倍体牡蛎的比较 由于传统二倍体长牡蛎在成熟期为形成生殖腺消耗体内贮存的糖元，且排放精卵后肉质变劣，大大降低了商品价值；在繁殖季节，牡蛎由于产卵导致生理活性降低，经常出现死亡，造成经济效益降低，称“夏季效应”。而与之相对照，三倍体牡蛎具生殖腺不发育、生长快、抗病力强以及成活率高的特点，并可以缩短养殖周期，提高单位面积产量。关于二者在形态、生理、生化等各方面的具体差异，国内外研究者作了较多工作，曾志南等[19,20]分别对太平洋牡蛎及僧帽牡蛎的二倍体和三倍体的生长进行比较，结果表明三倍体较二倍体具有明显的生长优势；周一兵等[21]从生理能量学角度研究指出三倍体和二倍体太平洋牡蛎的能量收支特征比较表明，两者的生长系力存在明显的差异，牡蛎三倍体比二倍体能够更加有效地抵御“夏季死亡”造成的危害，取决于能量利用对策上的优势。另外，三倍体牡蛎具有较高的能量转化效率可减少种群所产生的生物沉降对养殖环境的影响，在一定程度上可缓解目前养殖海区的自身污染问题；林琪[22]研究僧帽牡蛎二倍体和三倍体卵母细胞的超微结构表明三倍体卵母细胞大都呈不规则形状、核仁小、致密、细胞器少且不发达、卵黄粒少、细胞膜无微绒毛、卵母细胞生物合成及代谢弱；曾志南等[23]对太平洋牡蛎二倍体和三倍体生殖腺涂片检查结果表明，三倍体生殖腺发育较二倍体差，组织切片检查结果，二倍体生殖腺发育正常，三倍体生殖腺发育受阻；孔令锋等[24]通过二倍体太平洋牡蛎与三倍体的氨基酸组成和含量的分析比较也表明，二倍体牡蛎的氨基酸组分在繁殖前后变化较大，而三倍体的氨基酸组分相对稳定；牡蛎肉的鲜味取决于软体部分组织的糖元含量，糖元含量高，则牡蛎的味道便更为鲜美。林琪[25]研究表明在养殖的一周年里，太平洋牡蛎三倍体的平均糖元含量是二倍体的 2.1 倍，脂类含量也比二倍体高，这些指标均显示出三倍体牡蛎比二倍体具更好的肉质。国外方面，Allen 和 Downing 1986 年、Akashiage 和 Fushimi 1992 年比较研究了太平洋牡蛎二倍体和三倍体软体组织糖元含量的季节变化。Shipigel 和 Barber 1992 年比较研究了太平洋牡蛎二倍体和三倍体生化成分(组蛋白、总糖、粗脂肪、灰分)在不同温度时的含量变化[21]。

由此可见，三倍体的生物学优势已经显现出来

并为人们所认识，目前，国内外研究者已在此方面倾注了大量精力，其中我国主要对大连湾牡蛎，僧帽牡蛎，太平洋牡蛎的三倍体诱导及生长进行了试验，并取得了大量成果。

2.1.2 三倍体的诱导 三倍体的获得途径一般为抑制精卵 PB Ⅰ或 PB Ⅱ，四倍体与二倍体杂交，事实上，具体操作的材料是一批受精卵或胚胎，其发育程度存在一定的差异，所以某些诱导方法的实际诱导结果一般是二倍体、三倍体、四倍体和非整倍体共存的多倍体群。牡蛎三倍体的诱导方法主要有物理方法：静水压、电脉冲和温度休克等；化学方法：CB、6-DMAP、咖啡因和秋水仙素等；生物方法：四倍体与二倍体杂交产生 100×10^{-2} 三倍体；联合方法：田传远等[26]于 1998～2001 年间通过大量研究，采用不同诱导方法对太平洋牡蛎多倍体诱导结果比较后发现，不同的诱导方法，结果存在较大差异，见表 2。一般 CB 诱导产生的结果较高，也较稳定；但由于 CB 毒性大，致癌，需 DMSO助水溶，操作不方便，其应用受到一定

表 2 国内外太平洋牡蛎多倍体诱导技术[27]

诱导方法	多倍体率($\times10^{-3}$) 2N	4N	说明	文献
CB→PB Ⅰ	0 15.5	91 19.4	第 8～9 天，4N 数量降至 51×10^{-3}，第 10～21 天，几乎全部消失，非整倍体 57.6×10^{-2}	Soephena 等，1988 Guo 等，1992
CB→PB Ⅱ	88±9 75	17	低温操作环境下，CB 产生的 3N 诱导率较高温时低	Downing，1988 Soephena 等，1988
CB 诱导 2N 卵与 2N 精子杂交产生合子	3	67 7/30	非整倍体出现 23×10^{-2} 非整倍体 7/30	Guo 等，1991 Guo 等，1994
6-DMAP→PB Ⅰ	90		延长时间处理，可提高 3N 诱导率，但畸形率上升	Dearosiers，1993
6-DMAP→PB Ⅱ	93.8	0		田传远等，1998
高温＋咖啡因	71	4		山本，1989
高温：35℃ 38℃	25 45～60		受精后 10～15min 或 35～40 min 时开始处理，3N 诱导率最高	Quillet，1986
静水压	60			Allen，1986
电脉冲	55	20	600V/cm	Cadiret，1992
合子融合		40		Guo 等，1994
分裂球融合		8～44 30	这些方法只可得到非常有限的可存活的 4N	Guo 等，1991 Guo 等，1994
雌核发育：CB→PB Ⅰ&PB Ⅱ		80～100		Guo 等，1991
杂交：4N 和 2N	100		10 月龄的 3N 个体比 2N 大$(13\sim51)\times10^{-1}$；4N 间杂交产生的 3N 成活率低	Guo 等，1996
杂交：2N♀×3N♂ 3N♀×2N♂ 3N♀×3N♂	0 57 30	10	对 9 月龄个体倍性鉴定的结果。 6×10^{-2}为嵌合体	Guo 等，1994

的限制。相反,6-DMAP和咖啡因毒副作用小,操作简便,有更大的应用前景[27],这与张国范研究的结果[28]一致。

诱导机制:细胞松弛素B(Cytochalasim B,分子式:$C_{29}H_{37}NO_5$,简称:CB)对微丝有特异和可逆的作用,可抑制动物细胞的运动和胞质分裂,使之极体的形成受到抑制,从而多个单倍的雌性原核与一个雄性原核结合,形成多倍体。

6-二甲基氨基嘌呤(6-Dimethylaminopurine,分子式:$C_7H_9N_5$简称6-DMAP)是一种嘌呤毒素类似物,是蛋白质磷酸化的抑制剂,通过抑制特定激酶,来破坏微管聚合中心的聚合,使极体形成遭破坏,从而形成多倍体。

秋水仙素是一种抗有丝分裂的药物,可阻止二聚体的聚合,破坏微管的结构与功能,抑制极体的形成,当其作用于受精卵时,可形成多倍体。

咖啡因与温度休克法诱导机制相似,二者皆以物理的行为改变胞内Ca^{2+}浓度,破坏微管或微丝的组织或聚合,影响染色体的运动和行为,抑制极体形成,从而形成多倍体。

静水压和电脉冲诱导多倍体的机制属机械作用,主要为抑制受精卵的核分裂和第二极体的形成,产生多倍体[27]。

2.1.3 三倍体牡蛎倍性鉴别方法 倍性鉴定方法据田传远等介绍主要有:流式细胞计法、染色体记数法、显微荧光测定法、极体记数法、核生物学测定法、电泳法和影象分析法。传统的倍性鉴别方法虽然准确可靠,但操作大多繁琐且价格较贵,不便于应用大规模生产。因此,本文在此介绍两种快速简便的三倍体鉴别方法。贾志良[29]用银染-Ⅱ法对二倍体和三倍体太平洋牡蛎的血细胞和鳃细胞分别染色,发现太平洋牡蛎二倍体的鳃细胞和血细胞核仁为2个,而三倍体对应组织细胞的核仁数目则以2,3个核仁的为主,这一方法简便易行,结果可信,不失为三倍体太平洋牡蛎鉴定的好方法。曾志南等[30]研究结果表明,从外套膜和生殖腺外观特征上的差异可鉴别出牡蛎二倍体和三倍体,其鉴别准确率达96.99%。

2.1.4 三倍体牡蛎的产业化进展 有关三倍体牡蛎育苗与养殖技术方面的研究,一直是国内外研究的重点,并取得了一定的结果。其中,美国海岸牡蛎公司(Coast Oyster Company)及其在法国的子公司已大量生产太平洋牡蛎三倍体苗种,初步形成产业化生产;而我国也在产业化研究方面取得了进展。隋锡林[31]采用细胞松弛素B诱导太平洋牡蛎三倍体,于1992~1996年培养出三倍体贝苗1 846.6万枚。胡庆明等[32]进行的太平洋牡蛎三倍体养成实验结果表明实验组台筏产量增加30.6%,台筏产值增加69.9%,台筏收入19 814.40元。王如才等[33]于1996~2000年间进行牡蛎三倍体育苗的中试与产业化生产,采用6-DMAP诱导方法产生多倍体。平均诱导率71.5%;总育苗水体9 780m^3,共培育出三倍体牡蛎苗30.20亿粒,单位水体平均出苗量为31万粒/m^3。

2.2 四倍体牡蛎

人工诱导贝类四倍体研究是近几年来贝类多倍体育种的主攻方向之一。由于用物理、化学方法直接诱导三倍体的诱导率不稳定且很难达到100%;同时,理化手段对受精卵的处理也影响到孵化率和早期幼虫的存活率。因此,如果通过人工诱导培育出四倍体,再与正常二倍体交配来生产三倍体,就能克服以上问题,同时从理论上讲也可获得100%的纯三倍体,这为三倍体贝类的大规模生产诱导的研究已有部分报道,但迄今仅见Guo和Allen 1994年及林琪等2001年用CB处理抑制第一极体排放的方法成功地诱导培育出可存活的太平洋牡蛎[34]。其他诱导方法尽管在胚胎和幼虫都能检查到一定比例的四倍体,但都未能培育出有生活力的四倍体成贝。

3 小结

牡蛎染色体方面的研究,不仅可以探讨其在分类系统中的地位和系统演化过程,从细胞遗传学以及分子遗传学角度,解释物种所具有的生物学特征和遗传多样性,而且对于一些重要养殖种类的遗传、变异、杂交和育种等多方面工作还具有理论依据和实践指导意义[1]。但是牡蛎的核型研究方面相对脊椎动物和陆生无脊椎动物仍显薄弱,且其带型及核DNA含量方面的研究报道较少。而细胞培养技术正是解决这一问题的技术瓶颈,相信随着未来牡蛎的细胞培养技术的成熟与发展,以及各种生化遗传和分子遗传手段的结合应用,必将促进牡蛎染色体研究的进一步大发展。

目前,有关牡蛎染色体操作方面的研究主要集中于三倍体牡蛎的诱导、倍性鉴别及育苗等基础研究方面,国内研究者在三倍体牡蛎的养殖产业化方面也进行了许多工作,取得了大量成果,但距其大规模产业化还有较大距离。这主要因为普通老百姓对于这一高技术产业的正确认识还有待提高。因此,对于如何进一步搞活三倍体牡蛎的养殖,如何开发整个牡蛎养殖业的国内外市场和如何普遍提高全国水产工作者的科技意识和掌握水产高科技等问题尚须进一步研究[33]。但我们应当有信心,随着我们工作的深入,三

倍体牡蛎的经济效益、生态效益和社会效益必将为大众所认同，其必将实现更大范围的产业化，产生重大的经济效益。

参考文献

1 郑小东，王昭萍，王如才，等．双壳类动物染色体研究现状及进展．黄渤海海洋，2000，18(3)：101-108

2 曾志南，陈木．僧帽牡蛎和华贵栉孔扇贝染色体的制作．福建水产，1995，3：1-4

3 贾志良，李智盈，包振民，等．增加贝类染色体分裂相的方法初探．青岛海洋大学学报，2001，31(2)：232-235

4 Ieyame H. Chromosomes of the oyster, Hyotissa imbricata and Denchristrea folium Bivalvia pteriomorphia. Jap J Malacol(Venus), 1990, 49: 63-68

5 王永平，郭希明．FISH技术在贝类分子生物学研究中的应用．生命科学研究，2001，6(4)：283-293

6 许伟定，胡庆明，隋锡林，等．太平洋牡蛎染色体核型的研究．水产科学，1992，11(2)：14-15

7 陈木，林琪，曾志南．僧帽牡蛎(*Ostrea cucullata* Born)染色体核型．福建水产，1995，1(1)：1-4

8 林加涵．僧帽牡蛎染色体组型研究．福建水产，1986，1：16-19

9 沈亦平，刘汀，姜海波，等．近江牡蛎染色体核型的研究．武汉大学学报，1994，4：102-105

10 余建贤，熊志尧，童旺东，等．近江牡蛎的染色体组型．湛江水产学院学报，1993，13(1)：27-29

11 Hinegardner R. Cellular DNA content of the Mollusion. Comp Biochem Physiol, 1974, 47A: 447-460

12 郑小东，王如才，王昭萍，等．太平洋牡蛎二倍体与三倍体的核型研究．中国水产科学，2000，7(2)：96-97

13 Fujine K, Arai K, Iwadare K T, et al. Induction of gynogenetic diploid by inhibiting second meiosis in the Pacific abalone. Nippon Suism Gakkaish, 1990, 56(11): 1755-1763

14 Guo X, Allen Jr S k. Viable terraploid in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploid. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3(1): 42-50

15 Wang Z P. Aneuploid pacific oyster(*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid productin. Aquaculture, 173, 1999: 347-357

16 Rodrigues-Romero F. Distribution of "G" bands in the Karyotype of *Crassostrea virginica*. Venus, 1979, 38(3): 180-184

17 郑小东，王昭萍，王如才，等．太平洋牡蛎染色体G带和Ag-NORs研究．中国水产科学，1999，6(4)：180-184

18 李赟，郑小东，王昭萍，等．牡蛎不同组织细胞核DNA含量比较．青岛海洋大学学报，1999，29(3)：453-456

19 曾志南，林琪，吴建绍，等．太平洋牡蛎二倍体和三倍体的生长比较．海洋科学，1999，8(2)：120-123

20 曾志南，林琪，吴建绍，等．僧帽牡蛎三倍体和二倍体的生长比较．中国水产科学，1999，6(4)：2-3

21 周一兵，宋坚，李晓艳，等．不同温度下太平洋牡蛎三倍体和二倍体生物能量学的比较．水产学报，2000，24(6)：504-509

22 林琪，曾志南，吴建绍，等．僧帽牡蛎三倍体和二倍体卵母细胞发育的超微结构比较．台湾海峡，2000，19(3)：350-353

23 曾志南，林琪，吴建绍，等．长牡蛎二倍体和三倍体生殖腺发育的组织学观察．台湾海峡，1999，18(3)：332-336

24 孔令锋，王昭萍，于瑞海，等．二倍体与三倍体太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)繁殖前后生化成分及氨基酸组成的比较研究．海洋湖沼通报，2001，4：44-49

25 林琪，吴建绍，曾志南．长牡蛎诱导三倍体与二倍体的养殖生物学比较研究．水产科学情报，2001，28(6)：265-267

26 田传远，梁英，王如才，等．6-DMAP诱导太平洋牡蛎三倍体．青岛海洋大学学报，1998，28(3)：423-424

27 田传远，王如才，梁英，等．太平洋牡蛎多倍体研究．黄渤海海洋，1999，17(2)：75-83

28 张国范，常亚青，宋坚，等．不同方法制备的三倍体长牡蛎养殖效果的比较．水产学报，2000，24(4)：324-328

29 贾志良，包振民，潘洁，等．三倍体太平洋牡蛎的快速活体鉴定．海洋学报，2001，23(2)：142-149

30 曾志南，林琪，吴建绍，等．二倍体和三倍体牡蛎的外观鉴别．海洋科学，1999，1：51-53

31 隋锡林，许伟定，王志松，等．太平洋牡蛎三倍体诱导及苗种培育技术研究．上海水产大学学报，1997，6(2)：85-88

32 胡庆明，王志松，隋锡林，等．太平洋牡蛎三倍体的养成及经济效益分析．上海水产大学学报，1997，8(3)：129-132

33 王如才，王昭萍，田传远，等．我国太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)三倍体育苗与养殖技术研究．青岛海洋大学学报，2002，32(2)：193-200

34 林琪，吴建绍，曾志南，等．长牡蛎四倍体诱导的研究．台湾海峡，2001，20(4)：528-532

(本文编辑：张培新)