

doi: 10.7541/2021.2019.067

长牡蛎“海大2号”四倍体的人工诱导

李永国¹ 李琪^{1,2} 于瑞海¹

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 青岛 266237)

摘要: 为筛选适宜的四倍体诱导条件, 研究了细胞松弛素B(CB)浓度(0.3、0.5、0.7和0.9 mg/L)、起始诱导时间(5、10和15min)、诱导持续时间(10、15、20和25min)及三者的交互作用对长牡蛎“海大2号”四倍体诱导率(四倍体率)和D形幼虫率的影响, 并对诱导处理组获得的幼贝倍性进行检测分析, 进一步验证了研究诱导方法获得可存活长牡蛎“海大2号”四倍体幼贝的可行性。结果表明, CB浓度和起始诱导时间对长牡蛎“海大2号”四倍体率有显著影响($P < 0.05$), 而诱导持续时间对四倍体率影响不显著($P > 0.05$), 但是三者的交互作用对四倍体率有显著影响($P < 0.05$)。在CB浓度为0.5 mg/L、起始诱导时间为15min及诱导持续时间为20min时, 四倍体率有最大值为37.82%。CB浓度、起始诱导时间和诱导持续时间均对D形幼虫率有显著影响($P < 0.05$), 但是三者的交互作用对D形幼虫率没有显著影响($P > 0.05$)。增加CB浓度或延长诱导持续时间, D形幼虫率均呈降低的趋势; 起始诱导时间为5min时, D形幼虫率显著高于其他起始诱导时间。获得幼贝的两个诱导处理组的倍性检测结果显示, 长牡蛎“海大2号”四倍体率分别为2.22%和3.03%, 与幼虫期相比四倍体率显著下降。通过对CB浓度、起始诱导时间及诱导持续时间进行优化, 可以筛选出适宜的长牡蛎“海大2号”四倍体诱导条件。研究结果为长牡蛎“海大2号”四倍体培育提供了重要的参考资料。

关键词: 长牡蛎; “海大2号”; 细胞松弛素B; 四倍体率; D形幼虫率

中图分类号: S968.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2021)02-0360-06



长牡蛎(*Crassostrea gigas*)又称太平洋牡蛎, 是我国北方主要的牡蛎养殖品种, 由于其具有生长速度快、适应能力强以及肉质鲜美、营养丰富等特点, 已成为世界上养殖范围最广的经济贝类之一。2017年, 我国牡蛎产量 487.9×10^7 kg^[1], 占全国贝类产量34.0%, 全国海水养殖产量24.4%, 牡蛎养殖在我国海水养殖业中占有十分重要的地位。

目前, 我国北方养殖的长牡蛎大多为二倍体, 上市季节主要集中在10月至次年3月。二倍体长牡蛎4月以后开始进入性成熟期, 随配子的发育体内糖原大量消耗, 肉质变差; 夏季进入产卵期后, 软体部变得消瘦, 往往无法供应市场^[2]。而长牡蛎三倍体在夏季性腺发育程度较低, 几乎不育^[3], 可以填补二倍体长牡蛎夏季市场的短缺, 实现高品质牡蛎的全年供应, 近年来备受产业的关注。此外, 三倍体

长牡蛎具有生长速度快^[4, 5]、肉质好^[6]及部分抗病能力^[7]等优点, 因此开展长牡蛎三倍体良种的培育对于促进牡蛎产业持续、健康发展具有重要意义。

长牡蛎三倍体有2个主要的获得途径。一是由长牡蛎二倍体通过物理或化学处理诱导三倍体, 但是存在存活率低、成本较高、三倍体率不稳定以及难以自群繁育来稳定获得三倍体等问题; 二是先获得长牡蛎四倍体, 然后和长牡蛎二倍体杂交来获得100%三倍体^[8], 而且四倍体可以通过自群繁育来扩大种群, 为长牡蛎三倍体的商业化生产提供四倍体亲本保障。根据卵子的来源不同, 获得长牡蛎四倍体的方法可以分为2种, 一种是抑制长牡蛎二倍体受精卵第一极体释放诱导牡蛎四倍体^[9, 10], 另一种是先获得长牡蛎三倍体, 再利用三倍体牡蛎的卵子和二倍体牡蛎的精子授精, 并抑制其第一极体释

收稿日期: 2019-04-01; **修订日期:** 2020-03-17

基金项目: 山东省农业良种工程项目(2017LZGC009); 威海市科技发展计划(2018NS01); 泰山学者种业计划专家项目资助 [Supported by the Agriculture for Project Funding of Shandong Province (2017LZGC009); Science and Technology Development Project of Weihai (2018NS01); Taishan Scholar Seed Industry Experts Project]

作者简介: 李永国(1991—), 男, 博士研究生; 研究方向为贝类遗传育种学。E-mail: ygli28@163.com

通信作者: 李琪, E-mail: qili66@ouc.edu.cn

放来诱导四倍体^[11]。前者不需要三倍体亲本,且育种周期相对较短。适宜的诱导条件是获得长牡蛎四倍体的关键,在使用细胞松弛素B(CB)诱导贝类四倍体的过程中,CB浓度^[10]、起始诱导时间^[12]和诱导持续时间^[13]是3个影响诱导结果的重要因素。很多研究往往只研究了其中1个因素对诱导长牡蛎四倍体的影响,2个或者3个因素及其交互作用对诱导长牡蛎四倍体的影响鲜有报道。

长牡蛎“海大2号”是从长牡蛎野生群体中筛选左壳色为金黄色个体构建基础群体,以金黄壳色和生长速度作为选育目标性状,采用家系选育和群体选育相结合的混合选育技术选育而成。其左右壳和外套膜均为色泽亮丽的金黄色,大大提高其商品价值^[14],而且生长速率显著高于未经选育的长牡蛎,在山东和辽宁等地取得了良好的养殖效果。本研究以长牡蛎“海大2号”二倍体为研究对象,探讨了CB浓度、起始诱导时间及诱导持续时间对诱导长牡蛎“海大2号”四倍体的影响,以期筛选出长牡蛎“海大2号”四倍体适宜诱导条件,为培育长牡蛎“海大2号”四倍体提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验亲贝为2龄的长牡蛎“海大2号”二倍体,壳高(89.37±8.74) mm,湿重(61.37±12.42) g,取自山东荣成桑沟湾养殖海区,并于莱州市长渔水产有限公司进行室内人工促熟至性腺成熟。解剖获取精子和卵子,授精前检查卵子熟化程度,并确认卵子无精子污染。把精卵混合时刻作为受精的零时刻。

1.2 四倍体诱导与幼虫和稚贝的培育

为探讨CB浓度、起始诱导时间及诱导持续时间对诱导长牡蛎“海大2号”四倍体的影响及筛选适宜的四倍体诱导条件,分别设置4个CB浓度梯度(0.3、0.5、0.7和0.9 mg/L)、3个起始诱导时间梯度(10、15和20 min)及4个诱导持续时间梯度(10、15、20和25 min),共48个处理,每个处理设置3个重复。实验使用海水盐度为32,处理过程中控制水温为24℃。在实验过程中严格控制时间,在诱导处理完成后,立即用1000目筛绢收集并用砂虑海水充分冲洗,然后将其转移到含有1 mL/L DMSO(二甲基亚砷)的砂虑海水中,30 min后用筛绢过滤,并用砂虑海水充分冲洗后转移到实验桶中孵化。8 h后固定幼虫样品材料,用于染色体计数。24 h后统计D形幼虫率,并用流式细胞仪检测幼虫倍性。其中,D形幼虫率为所有D形幼虫占受精卵的百分比。

为检测诱导方法的有效性,将3个诱导处理组

的幼虫转移到水泥池进行养成,日常管理过程同普通二倍体牡蛎幼虫的培育过程。附着后,将稚贝转移到山东荣成桑沟湾养成。

1.3 四倍体的倍性鉴定

流式细胞仪分析:流式细胞仪可以快速判断早期幼虫群体的倍性组成以及确定个体的倍性。取受精24 h后的幼虫于离心管中,加入1 mL 1×PBS(Phosphate buffered saline)缓冲液,用1.5 mL注射器吸打后,300目筛绢过滤,75%乙醇固定,4℃保存过夜。离心(300×g)后倒掉上清液,加入1 mL 1×PBS,再加入20 ng/mL RNA酶A反应30 min后,最后再加入35 μL的PI(1 mg/mL)染色30 min,经300目筛绢过滤后,利用流式细胞仪检测细胞DNA含量。180日龄时,取幼贝鳃丝再次进行倍性检测。

染色体计数:取受精10 h后的胚胎,0.1%秋水仙素溶液处理2 h,0.075 mol/L氯化钾低渗处理30 min,重复2次。然后使用新配置的卡诺固定液固定3次,-20℃保存。热滴片后显微镜下观察拍照,进行染色体计数。

1.4 数据分析

采用OriginPro 9.1作图,利用SPSS 23.0软件进行方差分析,差异显著度为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 不同时期的倍性检测

受精10 h时,对照组中,只有20条染色体的长牡蛎“海大2号”的二倍体细胞。在诱导处理组中,可以观察到二倍体(2n=20)、三倍体(3n=30)及四倍体(4n=40)的细胞(图1),而且同一个诱导处理组中有三者同时存在的情况,同时也存在一些非整倍体细胞。染色体计数结果表明诱导处理中存在长牡蛎“海大2号”四倍体胚胎。

受精24 h时,对D形幼虫群体进行倍性检测,与对照组只有二倍体幼虫相比,诱导处理组幼虫群体通常由2—3个不同倍性的幼虫群体组成(图2),而且幼虫群体中不同倍性幼虫所占比例会随诱导条件的变化而改变。

受精180 d时,对表1中自上而下3个处理组的幼贝进行倍性检测,其检测数量分别为73、45和66个。幼贝倍性检测结果显示,2个诱导处理组中检测到长牡蛎“海大2号”四倍体幼贝(图2),并且与受精24 h相比,四倍体率有显著的降低(表1)。

2.2 CB浓度、起始诱导时间及诱导持续时间对长牡蛎“海大2号”D形幼虫四倍体率的影响

在不同诱导条件下,长牡蛎“海大2号”四倍体率范围为4.30%—37.82%(图3)。受精24 h时,CB浓度对长牡蛎“海大2号”四倍体率有显著的影响

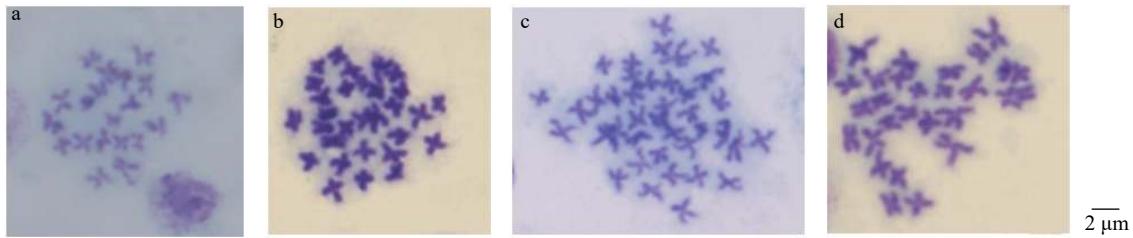


图1 长牡蛎“海大2号”二倍体(a)、三倍体(b)、四倍体(c)和非整倍体(d)胚胎中期分裂相

Fig. 1 Example metaphase of diploid (a), triploid (b), tetraploid (c) and aneuploidy (d) embryos of *C. gigas* “Haida No. 2”

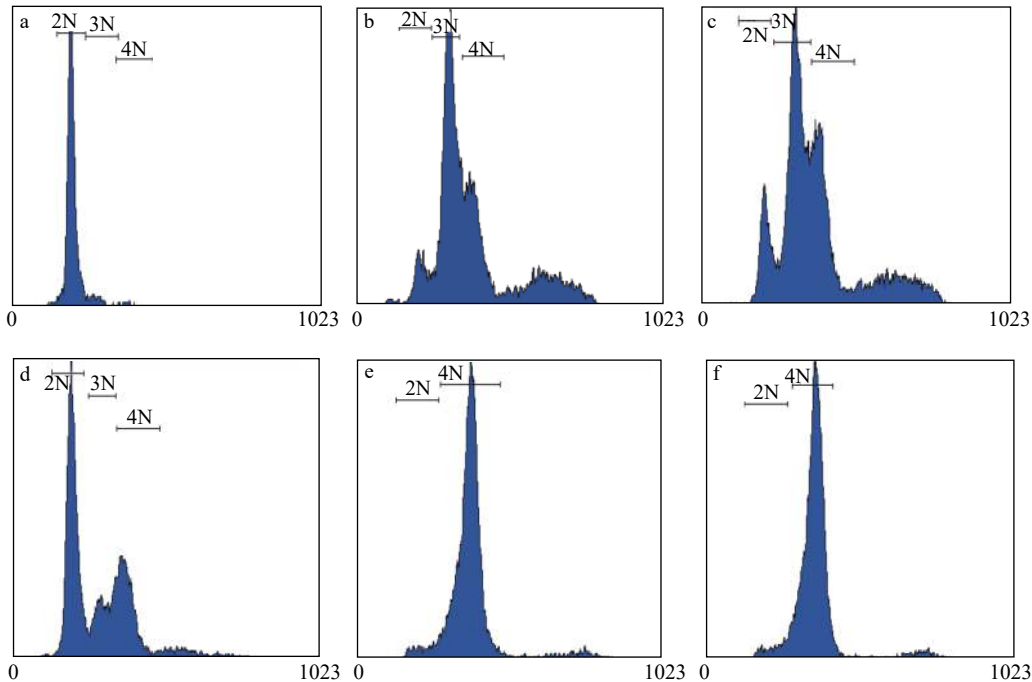


图2 流式细胞仪检测长牡蛎“海大2号”D形幼虫及幼贝倍性

Fig. 2 Ploidy composition of *C. gigas* “Haida No. 2” larvae and spat samples determined by flow cytometry

a. 对照组幼虫; b—d. 24h处理组幼虫; e, f. 180d四倍体幼贝
a. control; b—d. treatment larvae; e, f. *C. gigas* “Haida 2” tetraploid spat

表1 流式细胞仪检测长牡蛎“海大2号”180日龄幼贝倍性

Tab. 1 Flow cytometry analysis of *C. gigas* “Haida No. 2” spats at 180 day

CB (mg/L)	起始诱导时间 Initial induction time (min)	诱导持续时间 Induction duration (min)	四倍体率 Tetraploid rate (%)	
			24h	180d
0.3	5	25	21.15±1.97	—
0.5	10	15	12.19±2.25	2.22
0.5	15	20	37.82±4.75	3.03

($P < 0.05$), 在CB浓度为0.7 mg/L时四倍体率显著低于其他CB浓度, 四倍体率和CB浓度没有表现出正相关的关系。起始诱导时间能显著影响长牡蛎“海大2号”四倍体率($P < 0.05$), 起始诱导时间为15min时, 可以显著提高四倍体率。在实验设置的诱导持续时间的范围内, 诱导持续时间没有对长牡蛎“海大2号”四倍体率产生显著影响($P > 0.05$)。CB浓

度、起始诱导时间和诱导持续时间三者的交互作用对长牡蛎“海大2号”四倍体率有显著影响($P < 0.05$)。长牡蛎“海大2号”在CB浓度为0.5 mg/L、起始诱导时间为15min及诱导持续时间为20min时, 长牡蛎“海大2号”四倍体率出现最大值, 为37.82%。

2.3 CB浓度、起始诱导时间及诱导持续时间对诱导长牡蛎“海大2号”四倍体的D形幼虫率的影响

在不同诱导条件下, D形幼虫率为0.73%—47.22%(图4)。受精24h时, CB浓度对D形幼虫率有显著的影响($P < 0.05$), CB浓度为0.3 mg/L时, D形幼虫率显著高于其他CB浓度, 随CB浓度增加, D形幼虫率呈逐渐下降的趋势, 且在CB浓度为0.9 mg/L时, D形幼虫率最低。诱导持续时间显著影响D形幼虫率($P < 0.05$), 且诱导持续时间与D形幼虫率存在负相关的关系, D形幼虫率随诱导持续时间的增加而

降低。起始诱导时间对D形幼虫率影响显著 ($P<0.05$), 起始诱导时间为5min时, D形幼虫率显著高于起始诱导时间为10min和15min。但是三者的交互作用对诱导长牡蛎“海大2号”四倍体率影响不

显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

除了一些可控的因素外, 卵子发育同步性对四

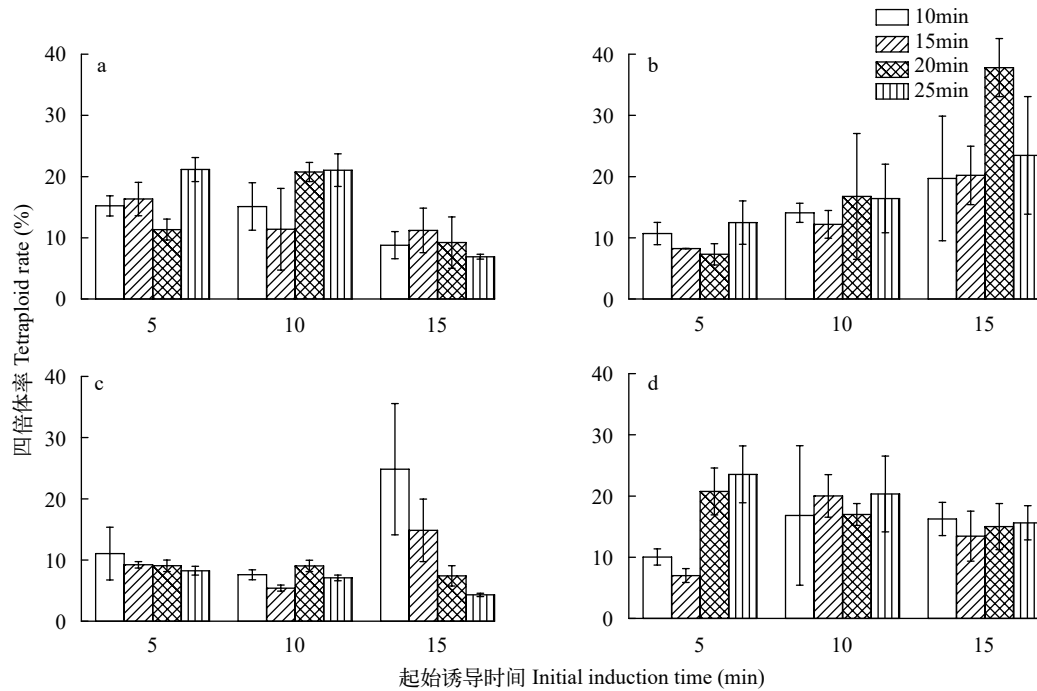


图3 不同CB浓度、起始诱导时间及诱导持续时间对长牡蛎“海大2号”四倍体率的影响

Fig. 3 Effects of different CB concentrations, initial induction times and induction durations on tetraploid rate of *C. gigas* “Haida 2”

a—d分别表示CB浓度为0.3, 0.5, 0.7和0.9 mg/L; $n=3, \bar{x}\pm SD$

a—d represent CB concentrations of 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 mg/L, respectively; $n=3, \bar{x}\pm SD$

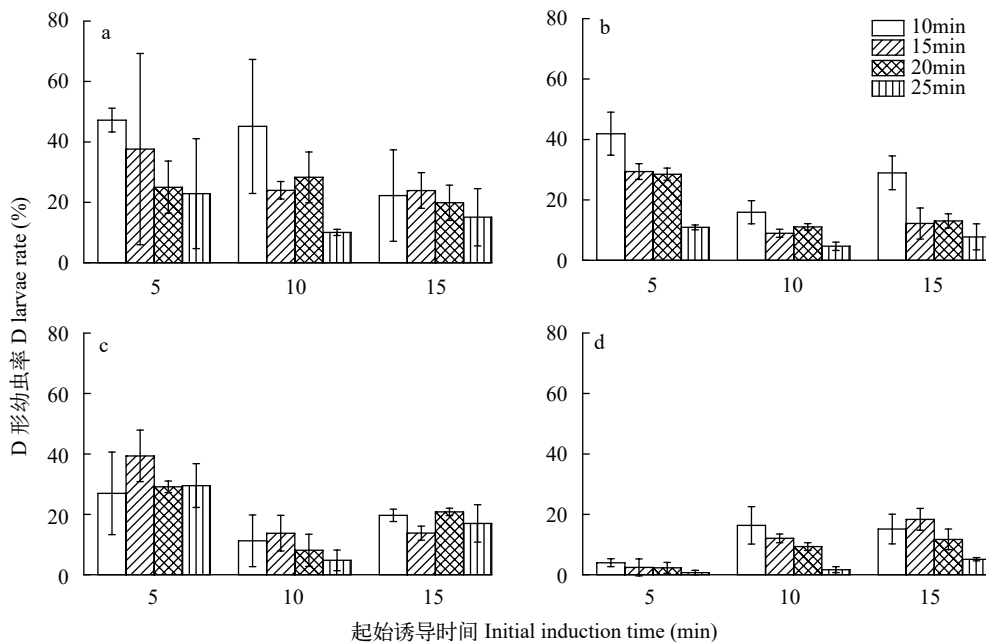


图4 不同CB浓度、起始诱导时间及诱导持续时间对诱导长牡蛎“海大2号”四倍体D形幼虫率的影响

Fig. 4 Effects of different CB concentrations, initial induction times and induction durations on D larvae rate of *C. gigas* “Haida No. 2”

a—d分别表示CB浓度为0.3、0.5、0.7和0.9 mg/L; $n=3, \bar{x}\pm SD$

a—d represent CB concentrations of 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 mg/L, respectively; $n=3, \bar{x}\pm SD$

倍体率的影响不容忽视^[13]。本研究为了降低卵子同步性对四倍体诱导结果的影响,实验亲贝采用同一批人工繁育且同步促熟的长牡蛎“海大2号”二倍体,以尽可能保证亲贝性腺发育成熟程度的同步性。受精24h幼虫群体的倍性检测结果表明,直接诱导长牡蛎“海大2号”二倍体的受精卵可以获得其四倍体幼虫,而且CB浓度、起始诱导时间及诱导持续时间对长牡蛎“海大2号”四倍体率有显著影响。对CB浓度、起始诱导时间及诱导持续时间进行优化,在一定程度上可以提高幼虫四倍体率。CB浓度对长牡蛎“海大2号”四倍体率和D形幼虫率均有显著影响,随着CB浓度增加,D形幼虫率逐渐降低,说明随着CB浓度的增加,其诱导作用逐渐增强,但是四倍体率并没有随之增加,而是CB浓度为0.7 mg/L时的四倍体率低于CB浓度为0.5 mg/L的四倍体率。其原因可能是随着CB浓度增加,CB毒性作用增强,导致幼虫的死亡率上升,而存活幼虫中四倍体幼虫的相对比例并没有提高,而且倍性检测对象是存活幼虫群体,最终导致CB浓度增加而四倍体率没有相应增加的现象。这说明并不是CB浓度越高,诱导效果越好。起始诱导时间可以显著影响长牡蛎“海大2号”四倍体率和D形幼虫率,四倍体率在起始诱导时间为15min高于其他起始诱导时间,说明同一批受精卵有一个相对集中释放第一极体的时期,在该时期对受精卵进行诱导处理,可以高效的抑制受精卵第一极体释放,从而获得较高的四倍体率。起始诱导时间为15min时的D形幼虫率显著低于起始诱导时间为5min的D形幼虫率,表明CB对不同发育时期的受精卵的作用程度不同,CB对受精15min后的受精卵的作用效果较为显著。同时,在起始诱导时间为15min时,四倍体率较高而D形幼虫率较低,说明有效抑制受精卵第一极体释放会导致D形幼虫率的降低。诱导持续时间对长牡蛎“海大2号”四倍体率没有显著影响,而对D形幼虫率有显著影响,一方面说明诱导持续时间对四倍体率和D形幼虫率的影响有明显的差异,另一方面也说明不能通过降低D形幼虫率来提高四倍体率。另外,诱导持续时间对长牡蛎“海大2号”四倍体率没有显著影响,也可能是诱导持续时间梯度小导致的^[15]。

染色体计数结果显示在同一个处理中存在不同倍性的长牡蛎“海大2号”胚胎细胞,这在很大程度上是由卵子发育不同步导致的。在单个牡蛎卵子数量可以满足实验需求的情况下,可以采用对单个牡蛎的卵子进行诱导,避免不同牡蛎之间卵子发育不同步对诱导的影响,提高目标倍性的诱导效果^[12]。

染色体计数发现的一些非整倍体,可能是染色体的不同分离方式导致的^[16]。幼贝检测结果表明,由长牡蛎“海大2号”二倍体的受精卵直接诱导其四倍体是可行的,但是存在四倍体率低的问题。造成这种情况的原因,一方面可能是CB诱导导致幼虫染色体异常增加,很多无法适应染色体异常增加的四倍体幼虫在生长过程中逐渐死亡;另一方面,与正常二倍体相比,四倍体幼虫生长速度较慢^[9],当诱导处理组的大多数幼虫变态附着后,仍有大部分四倍体幼虫未能变态附着,并且由于后期附着环境变差,导致一定比例的四倍体幼虫不能完成变态附着。在已有的关于贝类四倍体的诱导研究中,不仅出现幼虫培养过程中四倍体幼虫比例逐渐下降的问题^[10],而且变态附着后的养成过程中也存在幼贝四倍体率降低的现象^[17]。即使采用物理方法诱导牡蛎四倍体,也同样出现高死亡率^[18]。由贝类二倍体直接诱导其四倍体,高死亡率是一个较为普遍的现象。

综上所述,本研究分析了CB浓度、起始诱导时间及诱导持续时间对诱导长牡蛎“海大2号”四倍体的影响,筛选出较为适宜的长牡蛎“海大2号”四倍体的诱导条件为CB浓度0.5 mg/L,起始诱导时间15min和诱导持续时间20min,而且在该条件下获得了长牡蛎“海大2号”四倍体幼贝。研究结果为培育长牡蛎“海大2号”四倍体提供了重要的基础资料。

参考文献:

- [1] Ministry of Agriculture Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 43. [农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 43.]
- [2] Li Q, Liu W G, Shirasu K, *et al.* Reproductive cycle and biochemical composition of the Zhe oyster *Crassostrea plicatula* Gmelin in an eastern coastal bay of China [J]. *Aquaculture*, 2006, **261**(2): 752-759.
- [3] Guo X, Allen Jr S K. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. *The Biological Bulletin*, 1994, **187**(3): 309-318.
- [4] Walton W C, Rikard F S, Chaplin G I, *et al.* Effects of ploidy and gear on the performance of cultured oysters, *Crassostrea virginica*: survival, growth, shape, condition index and *Vibrio* abundances [J]. *Aquaculture*, 2013(414): 260-266.
- [5] Dégremont L, Garcia C, Frank-Lawale A, *et al.* Triploid oysters in the Chesapeake Bay: comparison of diploid and triploid *Crassostrea virginica* [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2012, **31**(1): 21-32.
- [6] Allen S K, Downing S L, Chew K K. Hatchery Manual for Producing Triploid Oysters [M]. Washington Sea

- Grant Program, 1989.
- [7] Gagnaire B, Soletchnik P, Madec P, *et al.* Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters [J]. *Aquaculture*, 2006, **254**(1-4): 606-616.
- [8] Guo X, DeBrosse G A, Allen Jr S K. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids [J]. *Aquaculture*, 1996, **142**(3-4): 149-161.
- [9] Benabdelmouna A, Ledu C. Autotetraploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) obtained using normal diploid eggs: induction and impact on cytogenetic stability [J]. *Genome*, 2015, **58**(7): 333-348.
- [10] Que H Y, Guo X M, Zhang G F, *et al.* Tetraploids induced by inhibiting polar body I with cytochalasin B in jinjiang oyster, *Crassostrea rivularis* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, **36**(5): 437-444. [阙华勇, 郭希明, 张国范, 等. 利用细胞松弛素B抑制第一极体排放诱导近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*)四倍体 [J]. *海洋与湖泊*, 2005, **36**(5): 437-444.]
- [11] Guo X, Allen Jr S K. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, **3**(1): 42-50.
- [12] Diter A, Dufy C. Polyploidy in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. II. Chemical induction of tetraploid embryos [J]. *Aquatic Living Resources*, 1990, **3**(2): 107-112.
- [13] Eudeline B, Allen Jr S K, Guo X. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator [J]. *Aquaculture*, 2000, **187**(1-2): 73-84.
- [14] Mizuta D D, Wikfors G H. Seeking the perfect oyster shell: a brief review of current knowledge [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, **3**(11): 586-602.
- [15] Yang H, Guo X. Tetraploid induction by meiosis inhibition in the dwarf surfclam *Mulinia lateralis* (Say 1822): effects of cytochalasin B duration [J]. *Aquaculture Research*, 2004, **35**(13): 1187-1194.
- [16] Guo X, Hershberger W K, Cooper K, *et al.* Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: II. Segregation of chromosomes [J]. *The Biological Bulletin*, 1992, **183**(3): 387-393.
- [17] Yang H, Zhang F, Guo X. Triploid and tetraploid Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, produced by inhibiting polar body I [J]. *Marine Biotechnology*, 2000, **2**(5): 466-475.
- [18] Tan S H A, Teh C P, Chang G O, *et al.* Tetraploid induction in tropical oysters, *Crassostrea belcheri* (Sowerby) and *Crassostrea iredalei* (Faustino) [J]. *Aquaculture Research*, 2017, **48**(4): 1406-1412.

ARTIFICIAL INTRODUCTION OF TETRAPLOID OF THE NEW VARIETY OF “HAIDA No. 2”, *CRASSOSTREA GIGAS*

LI Yong-Guo¹, LI Qi^{1,2} and YU Rui-Hai¹

(1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

Abstract: In order to obtain suitable conditions for tetraploid induction of *Crassostrea gigas* “Haida No. 2”, the effects of cytochalasin B (CB) concentration, initial induction time and induction duration on tetraploid rate and D larvae rate were estimated. The ploidy of induced spat was tested to verify the effectiveness of the induction method. The result showed that the linear effects of CB concentration and initial induction time on tetraploid rate were significantly ($P < 0.05$), but induction duration had no significant effect on tetraploid rate ($P > 0.05$). The interactive effect of CB concentration, initial induction time and induction duration influenced tetraploid rate significantly ($P < 0.05$). The linear effects of CB concentration, initial induction time and induction duration on D larvae rate were significant ($P < 0.05$), but the interactive effect of CB concentration, initial induction time and induction duration had no significant effect on D larvae rate ($P > 0.05$). The maximum point of tetraploid rate was found at CB concentration of 0.5 mg/L, initial induction time of 15min and induction duration of 20min. Under these conditions, the tetraploid rate reached to $(37.82 \pm 4.75)\%$. On day 180, tetraploid spat of *C. gigas* “Haida No. 2” existed in two of the treatment groups, and the tetraploid rates were 2.22% and 3.03%, respectively.

Key words: *Crassostrea gigas*; “Haida No. 2”; Cytochalasin B; Tetraploid rate; D larvae rate