

研究简报

6-DMAP 和不同盐度诱导长牡蛎“海大 1 号” 四倍体的比较研究*

李海昆¹, 张哲^{1,2}, 于瑞海^{1**}, 王永旺^{1,2}, 李玲蔚¹, 马培振¹

(1. 中国海洋大学 水产学院海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 青岛国信蓝色硅谷发展有限责任公司, 山东 青岛 266200)

摘要: 以三倍体长牡蛎(*Crassostrea gigas*)“海大 1 号”为材料, 从诱导强度、诱导时机和诱导持续时间三个方面比较了 6-DMAP 与盐度诱导“海大 1 号”长牡蛎四倍体的效果, 并对获得的四倍体幼虫群进行培育, 探讨了“海大 1 号”长牡蛎四倍体幼虫群的生长、存活情况。研究表明, 温度 25 ℃、盐度 30、诱导密度 5×10^6 个/mL 的条件下, 用浓度 450 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-DMAP 在 30%~40% 的受精卵排放极体时诱导, 持续诱导 15 min, 四倍体诱导效果最佳; 四倍体率、孵化率和诱导效率分别达 $45.13\% \pm 1.44\%$, $20.01\% \pm 1.37\%$ 和 9.03% 。盐度诱导实验中, 温度 25 ℃、诱导密度 5×10^6 个/mL 的条件下, 用盐度 12 的低盐海水在受精卵刚排放极体时诱导, 持续诱导 15 min, 四倍体诱导效果最佳; 四倍体率、孵化率和诱导效率分别达 $35.12\% \pm 2.24\%$, $19.19\% \pm 1.12\%$ 和 6.74% 。长牡蛎“海大 1 号”四倍体幼虫群的存活率极低, 培育 23 d 后的存活率只有 1.80%, 最终成功培育出四倍体幼贝 4 200 粒。综合来看, 6-DMAP 和不同盐度诱导海大 1 号长牡蛎四倍体的最佳组合分别是: 用 450 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-DMAP 在极体排放 30%~40% 时持续诱导 15 min; 用盐度 12 的海水在极体刚排放时持续诱导 15 min。

关键词: 长牡蛎; 海大 1 号; 6-DMAP; 盐度; 诱导; 四倍体率; 孵化率

中图分类号: S966.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2021)07 II-136-10

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20190324

引用格式: 李海昆, 张哲, 于瑞海, 等. 6-DMAP 和不同盐度诱导长牡蛎“海大 1 号”四倍体的比较研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(增 I): 136-145.

Li Haikun, Zhang Zhe, Yu Ruihai, et al. A comparative study on the effectiveness of 6-DMAP and different salinities in inducing tetraploid *Crassostrea gigas* “Haida No. 1”[J]. Periodical of Ocean University of China, 2021, 51(Sup.I): 136-145.

自 1981 年 Stanley 等首次报道美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的多倍体诱导以来, 牡蛎的多倍体育种已经得到了迅速发展^[1]。三倍体牡蛎因具有生长快、育性差、肉质鲜美、死亡率低的特点受到养殖户的欢迎^[2-4], 其在美国、法国、澳大利亚等国家已经开展了规模化养殖^[5-6]。最初获得三倍体的方法是药物诱导, 但是诱导法获得的三倍体牡蛎的三倍体率不稳定, 且诱导刺激对胚胎的发育有一定的伤害^[7]。后来 Guo 等^[8]提出了用四倍体牡蛎和二倍体牡蛎杂交获得 100% 全三倍体牡蛎的方法, 这种方法也是目前规模化生产三倍体牡蛎的主要方法, 而获得可存活的四倍体牡蛎是规模化生产三倍体牡蛎的关键。

四倍体牡蛎对牡蛎的多倍体育种具有重要意义, 目前主要在美国、法国得到了广泛的应用^[4,9]。早在

1994 年报道了获得可存活的四倍体牡蛎的方法, 用三倍体牡蛎产生的卵子与二倍体牡蛎产生的精子受精, 利用 CB(Cytochalasin B)抑制该受精卵的第一极体排放获得四倍体牡蛎^[10]。Eduline 等^[11-12]对该方法进行了改进, 提高了 CB 诱导四倍体牡蛎的效率。但 CB 本身有剧毒, 可通过摄入、吸入或接触皮肤侵入人体造成不育甚至引起死亡, 因而不被提倡使用^[5], Desrosiers 等^[13]首次提出了用毒性较小的 6-DMAP(6-dimethyl-aminopurine)代替 CB 诱导四倍体牡蛎的方法, 此后 André Gérard 等^[14]对 6-DMAP 的诱导方法进一步改进。目前 CB、6-DMAP 药物诱导是最常用的药物诱导方法。除化学药物外, 研究发现盐度的变化也会对牡蛎卵子的减数分裂过程产生影响^[15], 据此国内学者已经开展了盐度诱导三倍体牡蛎的研究^[16]。与药物诱导

* 基金项目: 山东省重点研发项目(2017GHY15124); 海水养殖教育部重点实验室开放基金项目(KLM2017004)资助

Supported by the Key Research and Development Projects in Shandong Province(2017GHY15124); the Open Fund Project of Key Laboratory of Mariculture Ministry of Education(KLM2017004)

收稿日期: 2019-09-19; 修订日期: 2019-12-12

作者简介: 李海昆(1996-), 男, 硕士生, 从事贝类育种技术研究。E-mail: 1157474258@qq.com

** 通讯作者: E-mail: yuruihai@ouc.edu.cn

相比,盐度诱导贝类多倍体具有无毒害、环保的特点,但是盐度诱导四倍体牡蛎尚未报道。

本次研究以长牡蛎(*Crassostrea gigas*)“海大 1 号”新品种为实验材料,探究了盐度和 6-DMAP 对四倍体长牡蛎“海大 1 号”的诱导效果,以期获得四倍体长牡蛎“海大 1 号”最佳诱导条件,为培育出成活的长牡蛎“海大 1 号”的四倍体打下基础。

1 材料和方法

1.1 亲贝的选择和促熟

实验用长牡蛎“海大 1 号”三倍体群体、长牡蛎“海大 1 号”二倍体均为 2 龄贝。两种亲贝均在 5 月初运至莱州市长渔水产有限公司育苗车间进行暂养,暂养期间投喂新月菱形藻(*Nitzschia closterium*),每天全量换水一次,5 月底自然水温达到 25~26 °C,两种亲贝性腺基本同步成熟进行实验。诱导实验进行前,“海大 1 号”三倍体群体进行倍性检测,挑选出三倍体个体。

1.2 精卵获得与受精

解剖长牡蛎“海大 1 号”三倍体亲贝,镜检分辨雌、雄,舍弃雌雄同体与雄性个体,获得的卵液经 260 目筛绢过滤后用 500 目筛绢洗卵 3 次,之后放在过滤海水中浸泡促熟 40 min,受精前显微镜下确定卵子未被污染;待三倍体卵子促熟之后,解剖长牡蛎“海大 1 号”二倍体亲贝,镜检分辨雌雄,舍弃雌雄同体与雌性个体,精液经 500 目筛绢过滤除去较大的组织块与杂质,之后与促熟后的三倍体牡蛎的卵子受精,显微镜视野下保证每个卵子周围有 4~5 个精子。

1.3 6-DMAP 和盐度诱导处理长牡蛎“海大 1 号”四倍体

1.3.1 6-DMAP 诱导处理 诱导实验在 100 mL 的烧杯中进行,实验前配置好各浓度的 6-DMAP 储备液,储备液使用前充分搅拌确保混合均匀。诱导密度为 5×10^6 个/mL,盐度 30,参照 André Gérard 等^[16]使用 6-DMAP 的最佳诱导温度,所有实验温度均为 25 °C,每组实验重复 3 次。受精后取样显微镜下观察受精卵的极体排放情况,在受精卵刚排放第一极体时(抑制第一极体排放)分别在 300、350、400、450、500 和 550 $\mu\text{mol/L}$ 浓度条件下进行诱导,诱导过程中将每个浓度梯度下的卵液均分成 3 份,分别诱导处理 10、15 和 20 min;当有 30%~40% 的受精率排放极体时(抑制第二极体排放)对受精卵进行药物诱导处理,诱导药物浓度和诱导时间同上。诱导结束后用 500 目筛绢洗卵 3 次,之后转移至 20 L 的塑料桶中进行孵化,24 h 后测量各组的孵化率,每组随机取孵化后的 D 形幼虫 500~1 000 个,检测四倍体率。

1.3.2 低盐、高盐诱导处理 诱导实验在 100 mL 的烧杯中进行,实验前配置好 12、16 和 20 的低盐海水以

及盐度为 50、55 和 60 的高盐度海水,低盐度海水用正常海水(30)与曝气 24 h 后的淡水按照比例混合获得,高盐度的海水用自然海水加海盐溶解获得。诱导密度为 5×10^6 个/mL,温度 25 °C,每个实验重复 3 次。具体实验操作和 6-DMAP 相似,分别在第一极体刚出现时和第一极体出现 30%~40% 时进行不同盐度的诱导处理,盐度诱导时间设置为 10、15 和 20 min,受精 24 h 后测量各组的孵化率,随机取孵化后的 D 形幼虫 500~1 000 个,检测四倍体率。

1.4 幼虫的固定及倍性的检测

1.4.1 幼虫的固定 使用 200 目筛绢滤除大颗粒杂质后用 300 目筛绢收集 D 形幼虫转移至 1.5 mL 离心管中,使用 PBS 缓冲液将海水完全置换,使用 1 mL 注射器抽打幼虫 4~5 次,之后将获得的细胞悬液固定至 75% 酒精中,置于 4 °C 保存 24 h 以上。

1.4.2 幼虫的倍率检测 将固定的细胞悬液置换至 PBS 缓冲液中,使用碘化丙啶(PI)在暗处染色 20 min,染色过程中添加 RNA 酶消除 RNA 的影响,经 300 目筛绢过滤至 1.5 mL 的离心管中经流式细胞仪检测倍率,检测时以二倍体为对照。

1.5 幼虫的培育

由于各组获得 D 形幼虫较少无法分组培育,所以将两个诱导时机条件下获得的各组获得的 D 形幼虫合并进行培育。培育期间,每天投喂球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*) 4 次,全量换水 1 次,连续微充气,每隔 1 d 测量一次幼虫大小,每隔 3 d 测量一次幼虫存活率,幼虫附着变态后随机抽取 30 个体,检测倍性。

1.6 数据统计与处理

孵化率为 D 形幼虫的数量与受精卵数量的百分比,四倍体率为四倍体 D 形幼虫的数量占总 D 形幼虫数量的百分比,诱导效率为四倍体率与孵化率的乘积。使用 SPSS19.0 进行数据分析,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),并进行 Duncan 多重比较,显著性水平设为 0.05。

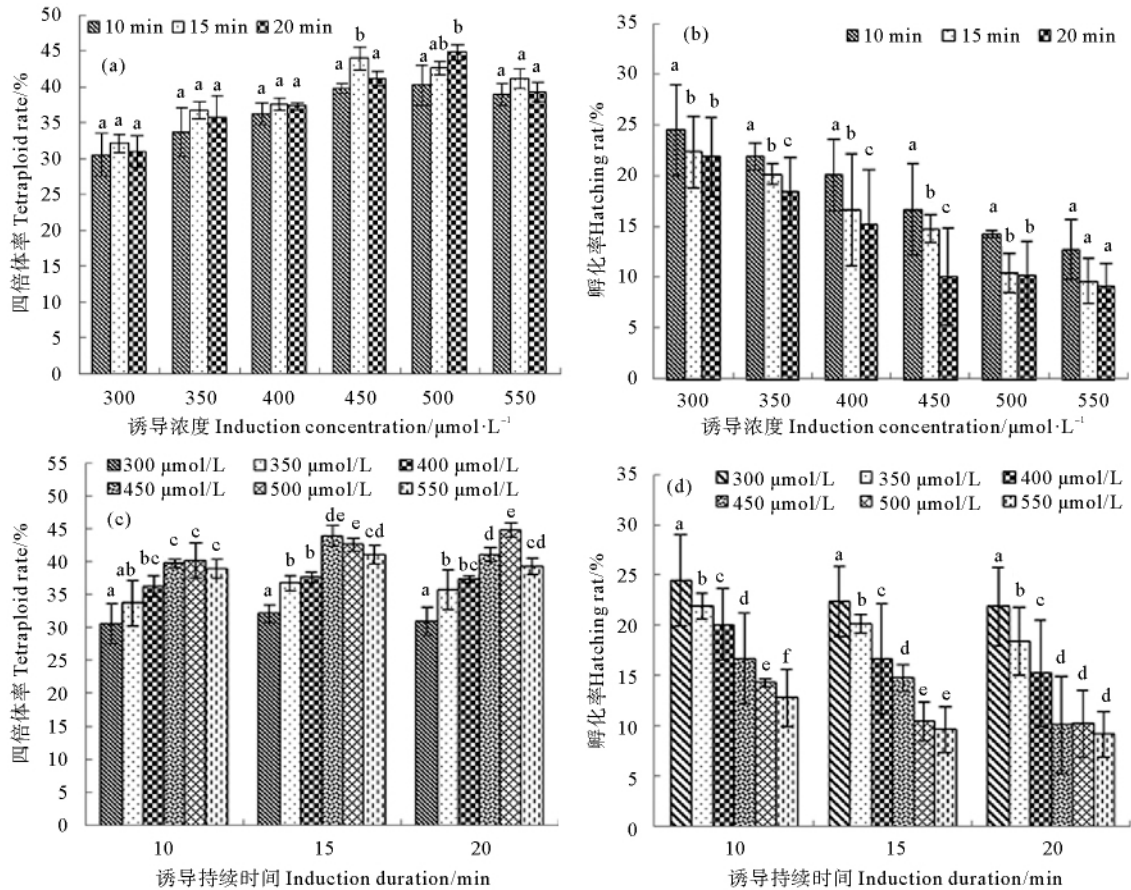
2 实验结果

2.1 6-DMAP 对长牡蛎“海大 1 号”的诱导效果

以第一极体刚出现为诱导时机时 6-DMAP 对长牡蛎“海大 1 号”四倍体的诱导效果如图 1 所示,450 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度下,诱导持续时间对四倍体率有显著性影响($P < 0.05$),其他浓度条件下诱导持续时间对四倍体率均无显著性影响($P > 0.05$);浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 时,诱导持续时间 20 min 时四倍体率最高,其余各个浓度梯度下均在诱导持续时间 15 min 时出现最高四倍体率(见图 1(a))。在各个浓度条件下,随诱导持续时间的增加幼虫的孵化率逐渐下降,在诱

导持续时间 20 min 时,幼虫孵化率最低(见图 1(b))。在各个诱导持续时间条件下,随药物浓度的增加,幼虫的四倍体率均呈现出现先增大后减小的趋势;持续诱导时间 10、15 和 20 min 三组,分别在浓度 500、450 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 时出现最大四倍体率,达 40.19% \pm

2.73%、43.94% \pm 1.56% 和 44.81% \pm 1.13% (见图 1(c))。随 6-DMAP 浓度的增加,幼虫的孵化率逐渐下降,各个浓度条件下的孵化率差异显著 ($P < 0.05$) (见图 1(d))。



(图中(a)、(b)分别为不同的诱导持续时间对四倍体率、孵化率的影响,(c)、(d)分别为不同的 6-DMAP 浓度对四倍体率、孵化率的影响。具有相同字母表示实验组之间差异不显著 ($P > 0.05$), 具有不同字母表示实验组之间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。In the figure, (a) and (b) are the effects of induction durations different on the tetraploid rate and hatching rate, (c) and (d) are the effects of different 6-DMAP concentrations on the tetraploid rate and hatching rate, respectively. The same letters mean no significant difference ($P > 0.05$), the different letters mean significant difference ($P < 0.05$), the same meaning was described as below.)

图 1 以第一极体刚出现为诱导时机时 6-DMAP 诱导长牡蛎“海大 1 号”四倍体的诱导效果比较

Fig.1 Comparison of the effect of 6-DMAP on induction of tetraploid *Crassostrea gigas* “Haida No. 1” when the first polar body appeared

以 30%~40% 的个体排放第一极体为诱导时机时 6-DMAP 对长牡蛎“海大 1 号”四倍体的诱导效果如图 2 所示。各浓度条件下,诱导持续时间对长牡蛎“海大 1 号”四倍体率无显著性影响 ($P > 0.05$);除 300 $\mu\text{mol/L}$ 外,其它各浓度条件下均在持续诱导时间 15 min 时出现最大四倍体率(见图 2(a))。各个浓度条件下,随诱导持续时间的增加,孵化率逐渐下降(见图 2(b))。各诱导持续时间条件下,随着 6-DAMP 浓度的增大,诱导四倍体率先增大后减小;持续诱导时间为 10、15 和 20 min 时,分别在浓度 500、450 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 时出现最

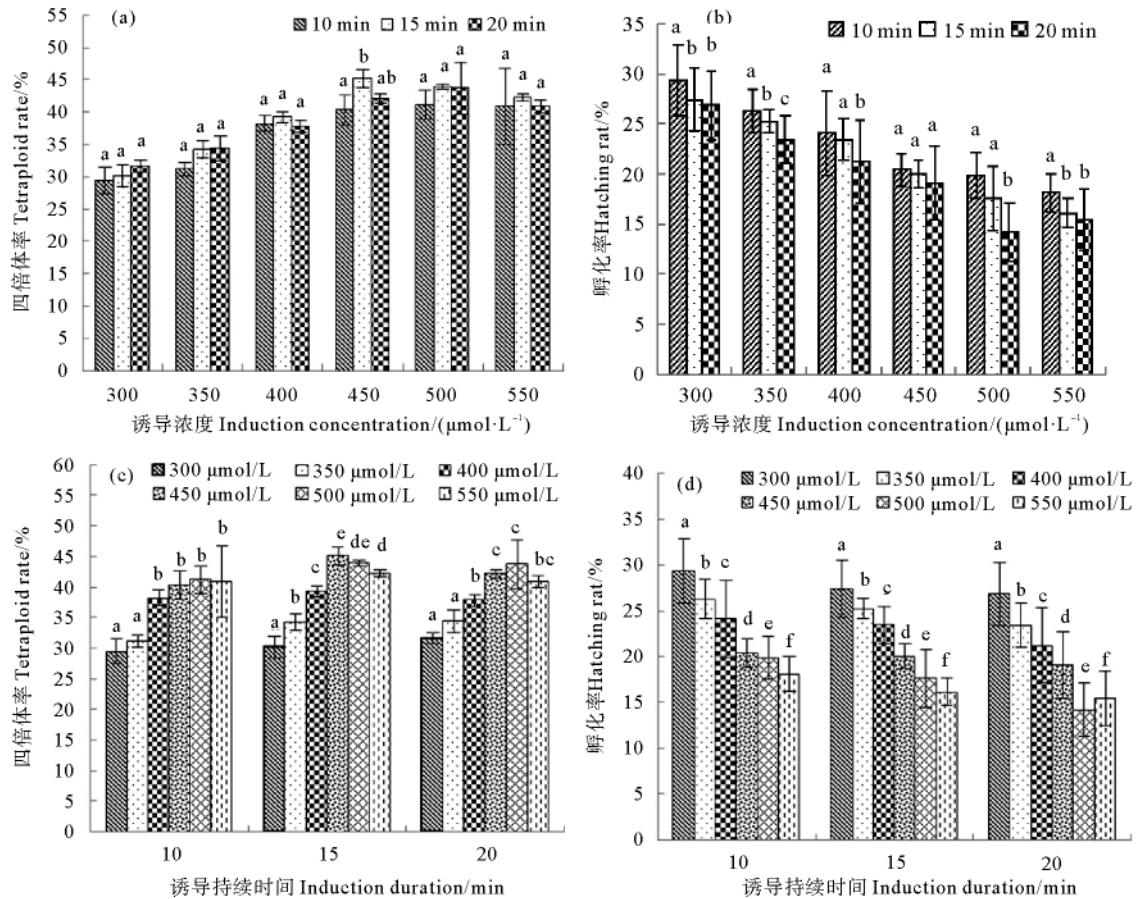
大四倍体率,为 41.19% \pm 2.26%、45.13 \pm 1.44% 和 43.71 \pm 3.98%;诱导持续时间为 15 min 时,6-DAMP 浓度对四倍体率的影响差异显著 ($P < 0.05$) (见图 2(c))。各诱导持续时间条件下,随 6-DAMP 浓度的增大,胚胎孵化率逐渐下降(见图 2(d))。

2.2 盐度对长牡蛎“海大 1 号”的诱导效果比较

以第一极体刚出现为诱导时机时,盐度对长牡蛎“海大 1 号”四倍体的诱导效果如图 3 所示。盐度为 55 时,诱导持续 20 min 的长牡蛎“海大 1 号”四倍体率最大达 16.31% \pm 1.77%,其它各盐度条件下,均在诱导

持续时间 15 min 时出现最大四倍体率(见图 3(a))。在各个诱导盐度条件下, 胚胎孵化率随诱导持续时间的增加而下降(见图 3(b))。在各个诱导持续时间条件下, 随盐度胁迫压力的增大, 四倍体率逐渐增大; 诱导持续时间 10、15 和 20 min 均在盐度 12 时出现最大四

倍体率, 分别达 25.00%±1.65%、35.12%±2.24% 和 19.34%±0.97%(见图 3(c))。各诱导持续时间条件下, 高盐诱导组内(50、55 和 60)盐度的变化对孵化率的影响不显著($P>0.05$), 低盐度诱导组内(12、16 和 20)随盐度降低, 孵化率显著降低($P<0.05$)(见图 3(d))。



(图中(a)、(b)分别为不同的诱导持续时间对四倍体率、孵化率的影响,(c)、(d)分别为不同的 6-DMAP 浓度对四倍体率、孵化率的影响。In the figure, (a) and (b) are the effects of different induction durations on the tetraploid rate and hatching rate, (c) and (d) are the effects of different 6-DMAP concentrations on the tetraploid rate and hatching rate, respectively.)

图 2 以 30%~40% 的个体排放极体为诱导时机时 6-DMAP 诱导“海大 1 号”长牡蛎四倍体的诱导效果比较
Fig.2 Comparison of the effect of 6-DMAP on induction of tetraploid *Crassostrea gigas* “Haida No. 1” when the 30%~40% individuals discharge polar body

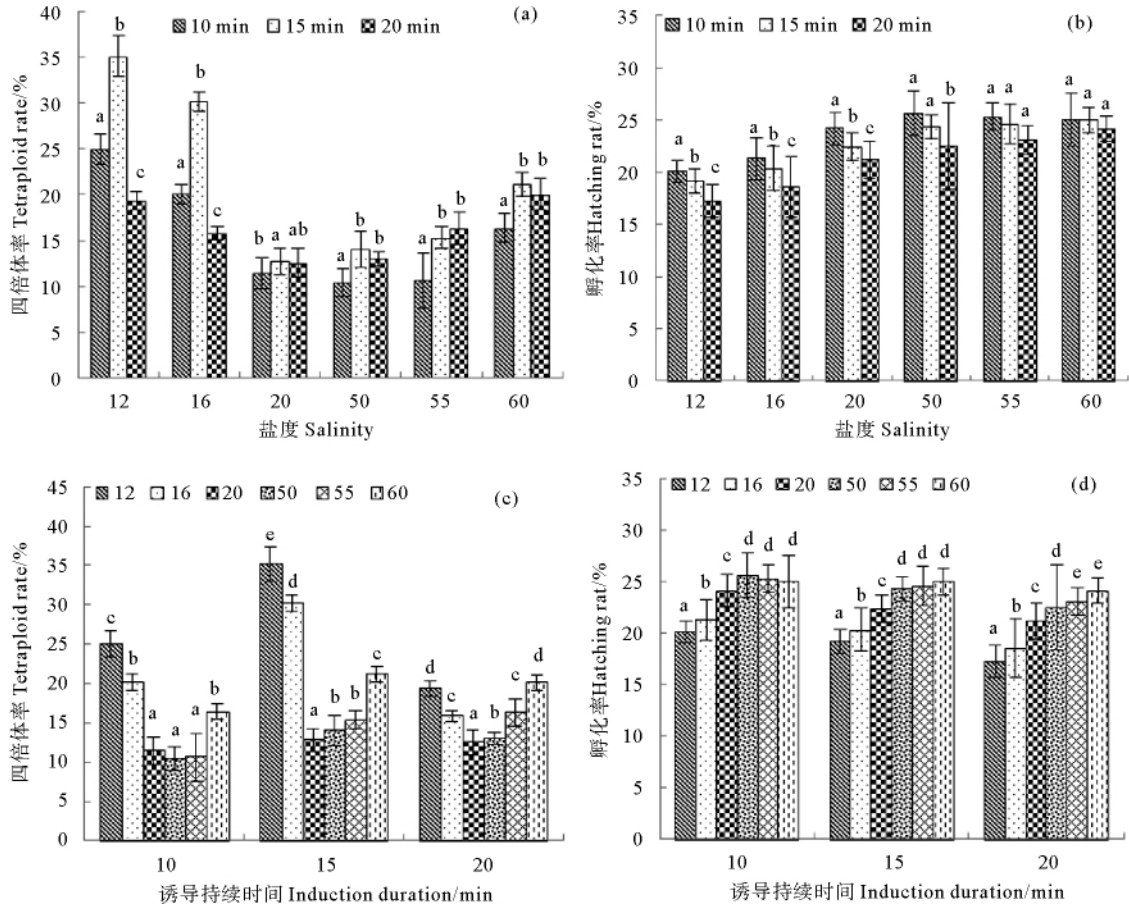
以 30%~40% 的个体排放极体为诱导时机时, 盐度对长牡蛎“海大 1 号”四倍体的诱导效果如图 4 所示, 低盐度诱导(12、16、20)实验中持续诱导时间对四倍体率影响显著($P<0.05$), 高盐度诱导(50、55、60)实验中持续诱导时间对四倍体率影响不显著($P>0.05$); 盐度 12、16 和 20 三组均在持续诱导 15 min 时出现最大四倍体率, 分别为 22.69%±1.52%、20.92%±1.51% 和 11.10%±1.28%(见图 4(a))。低盐度诱导(12、16、20)时随持续诱导时间的增加, 孵化率逐渐降低, 高盐度诱导(50、55、60)时幼虫孵化率受到持续诱导时间的影响较小(见图 4(b))。在各个诱导持续时间条件下, 随盐度胁迫的增加, 四倍体率逐渐增大; 诱导持续时间

10 和 20 min 均在诱导盐度 60 时表现出最大四倍体率, 分别为 21.93%±0.61% 和 23.26%±0.61%, 而持续诱导持续时间 15 min 时则在诱导盐度 12 时具有最大四倍体率达 22.69%±1.52%(见图 4(c))。在各持续诱导时间条件下, 盐度的变化对孵化率产生了显著的影响($P<0.05$)(见图 4(d))。

本实验获得的 6-DMAP、盐度对长牡蛎“海大 1 号”进行诱导的最佳组合如表 1 所示, 6-DMAP 的诱导实验中, 当 30%~40% 出现第一极体进行诱导, 诱导浓度 450 μmol/L, 持续诱导 15 min 时, 诱导效果最佳, 四倍体率和孵化率分别可达 45.13%±1.44% 和 20.01%±1.37%。盐度诱导实验中, 在第一极体刚出

现时进行诱导,盐度 12,持续诱导 15 min 时诱导效果最佳,四倍体率和孵化率分别达 35.12%±2.24%和

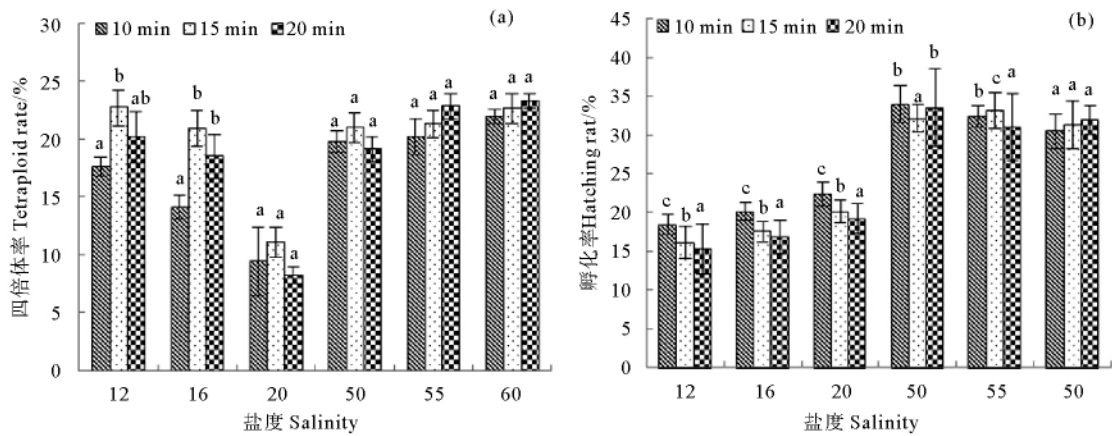
19.19%±1.12%。所有四倍体率的检测均以二倍体和三倍体作对照(见图 5)。

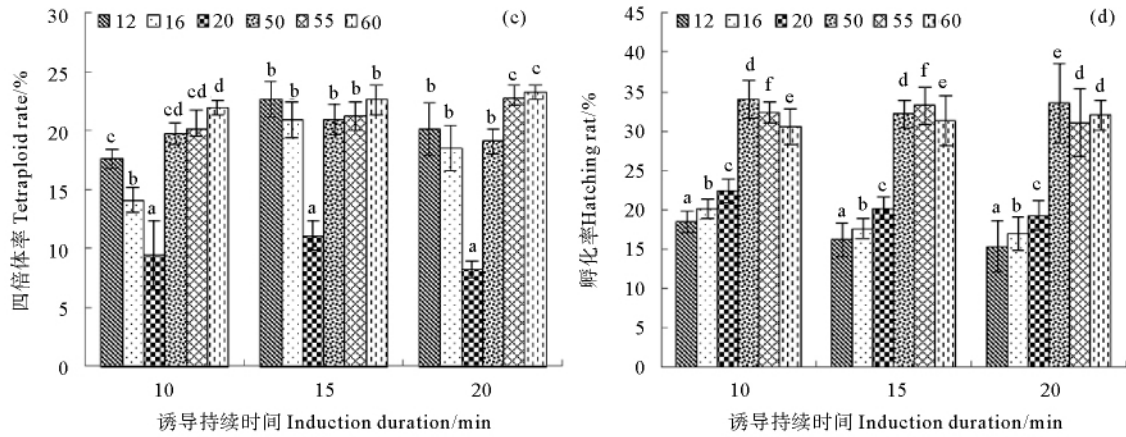


(图中(a)、(b)分别为不同的诱导持续时间对四倍体率、孵化率的影响,(c)、(d)分别为不同的盐度对四倍体率、孵化率的影响。In the figure, (a) and (b) are the effects of different induction durations on the tetraploid rate and hatching rate, (c) and (d) are the effects of different salinity on the tetraploid rate and hatching rate, respectively.)

图 3 以第一极体刚出现为诱导时机时盐度诱导“海大 1 号”长牡蛎四倍体的诱导效果比较

Fig.3 Comparison of the effect of salinity on induction of tetraploid *Crassostrea gigas* “Haida No. 1” when the first polar body appeared





(图中(a)、(b)分别为不同的持续诱导时间对四倍体率、孵化率的影响,(c)、(d)分别为不同的盐度对四倍体率、孵化率的影响。In the figure, (a) and (b) are the effects of different induction durations on the tetraploid rate and hatching rate, (c) and (d) are the effects of different 6-DMAP concentrations on the tetraploid rate and hatching rate, respectively.)

图 4 以 30%~40%的个体排放极体为诱导时机时盐度诱导长牡蛎“海大 1 号”四倍体的诱导效果比较

Fig.4 Comparison of the effect of salinity on induction of tetraploid *Crassostrea gigas* “Haida No. 1” when the 30%~40% individuals discharge polar body

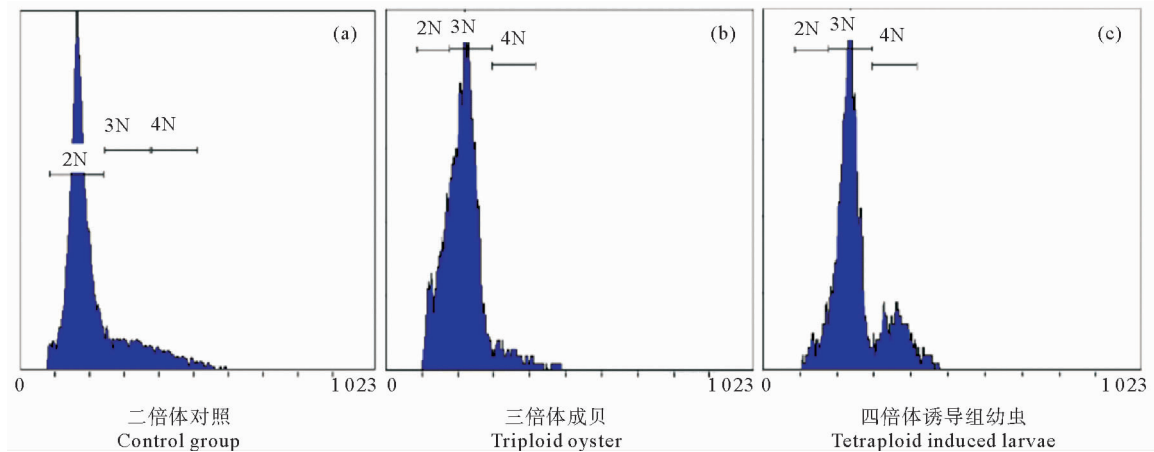


图 5 倍性检测结果

Fig.5 Ploidy test results

表 1 不同的诱导时机下的两种诱导方法的最佳诱导组合

Table1 The best induction combinations of two induction methods in different initial induction time

	诱导时机 Induction time	诱导强度 Induction intensity	诱导持续时间 Induction duration/min	四倍体率 Tetraploid rate/%	孵化率 Hatching rate/%
6-DMAP	刚出现第一极体	450 $\mu\text{mol/L}$	15	43.94 \pm 1.56	14.74 \pm 1.37
	30%~40%极体	450 $\mu\text{mol/L}$	15	45.13 \pm 1.44	20.01 \pm 1.37
不同盐度 Different salinity	刚出现第一极体	12	15	35.12 \pm 2.24	19.19 \pm 1.12
	30%~40%极体	60	20	23.26 \pm 0.61	23.26 \pm 0.61

2.3 两种诱导方法的比较

6-DMAP 诱导长牡蛎“海大 1 号”四倍体的四倍体率和孵化率均高于盐度诱导。综合四倍体率与孵化率,6-DMAP 和盐度的诱导效率分别可达 8%~10% 和 6%~8%,6-DMAP 的诱导效果优于盐度诱导。但 6-DMAP 诱导也有一定的弊端,6-DMAP 的成本较高,且具有一定的弱毒性和环境污染性(见表 2)。

2.4 四倍体幼虫群的存活情况

四倍体幼虫群在孵化后 1 周内死亡率极高,第 5 天的幼虫存活率仅为 38.02%,8 d 后降为 25.03%;在之后的培养过程中,幼虫的存活率趋于平缓下降状态,培育 23 d 后存活率降至 1.80%(见图 6),最终共获得存活的幼贝 34 970 粒,平均四倍体率达 12.01%,即存活的幼贝中约有 4 200 粒四倍体幼贝。

表 2 两种诱导方法的比较

Table 2 Comparison of two induction methods

项目 Item	6-DMAP	不同盐度 Different salinity
四倍体率 Tetraploid rate/%	44.16~46.78	33.56~37.69
孵化率 Hatching rate/%	19.23~22.34	18.34~20.13
试剂成本 Cost/(元·g ⁻¹)	2 000	0.002
毒性 Toxicity	弱毒性	无毒性
环保性 Environmental protection	有污染	无污染
诱导效率 Efficiency of triploid induction/%	8~10	6~8

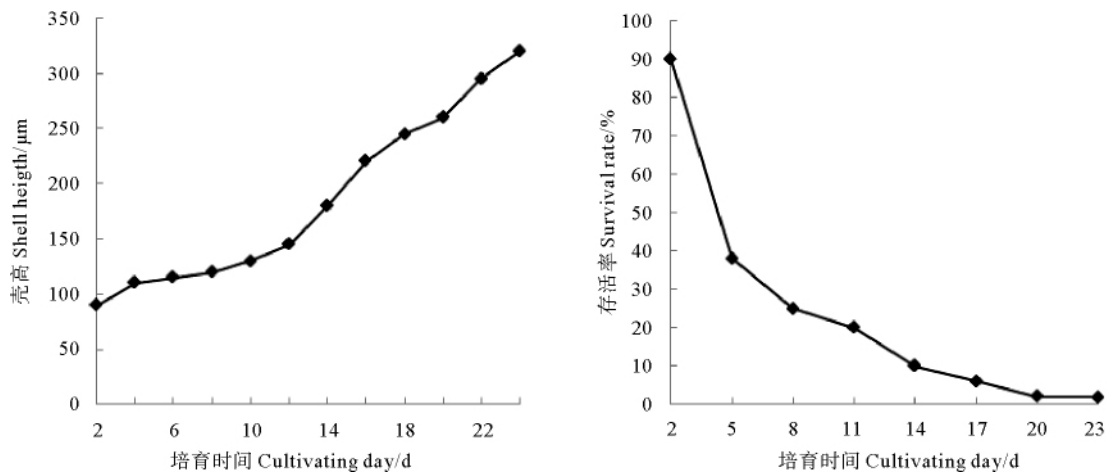


图 6 长牡蛎“海大 1 号”四倍体幼虫群的生长和存活情况

Fig.6 Growth and survival of tetraploid population of *Crassostrea gigas* "Haida No. 1"

3 讨论

3.1 二种诱导长牡蛎“海大 1 号”四倍体方法探讨

6-DMAP 以及盐度诱导长牡蛎“海大 1 号”实验中,诱导强度、诱导时机和诱导持续时间均会对四倍体率和孵化率产生影响。除上述因素外,卵子发育的同步性也是影响多倍体诱导的重要因素,为尽可能排除该因素对实验结果的影响,本次实验使用的是性腺完全成熟的亲贝,且受精时采用的是一雄对一雌的受精方式^[12,17-18]。

6-DMAP 诱导实验中,药物浓度在适宜范围内的增加会提高四倍体率,但由于药物毒性随浓度的增加而增强,胚胎的孵化率因而显著下降^[5];当药物浓度过高时四倍体率会有所下降,分析原因是当药物浓度过高时部分四倍体胚胎受毒害作用大无法发育至 D 形幼虫,导致最终获得 D 形幼虫四倍体率会有所下降。3 个

诱导持续时间对四倍体率影响不显著,但对胚胎孵化率影响较大,所以在选择合适的诱导持续时间时,要着重考虑胚胎孵化率;此外,也可能是设置的梯度太少,导致各个诱导持续时间的四倍体率差异较小^[19]。两个诱导时机中,刚出现极体时开始诱导可获得 30.52%~44.81% 的四倍体率和 9.14%~24.48% 孵化率,当有 30%~40% 个体排放极体时开始诱导可获得 29.42%~45.13% 的四倍体率和 14.19%~29.36% 的孵化率;两个诱导时机获得四倍体率差异较小,而以 30%~40% 个体排放极体作为诱导时机时的孵化率较高,主要原因是诱导时机较晚时,极体排放较早的个体受到的影响较小,因而能够正常孵化至 D 形幼虫。

盐度诱导实验中,随盐度胁迫压力的增加,四倍体率逐渐提高。这点与药物诱导有一定的相似性,即随诱导强度的增加,四倍体率增加。盐度变化引起的渗透压的变化造成能量代谢紊乱进而影响了微管或者微

丝的形成,这可能是盐度变化诱导多倍体的机制^[20];低盐诱导(12、16、20)的胚胎孵化率受到盐度的显著影响,其孵化率显著小于高盐度诱导(50、55、60)的孵化率,原因可能是渗透压过低超出了受精卵的承受范围,无法发育至 D 形幼虫。诱导持续时间对低盐诱导组(12、16、20)四倍体率影响较大,对高盐诱导组(50、55、60)四倍体率影响相对较小,说明长牡蛎“海大 1 号”对低盐较敏感,对高盐有一定的耐受力;诱导持续时间对胚胎孵化影响较小,综合四倍体率和孵化率,诱导持续时间为 15 min 时诱导效果最佳,王昭萍等^[20]、张晨晨等^[21]在做低渗透诱导扇贝三倍体时,采用的持续诱导时间也为 15 min。

本实验中 6-DMAP 的诱导效果优于盐度诱导,但是 6-DMAP 本身价格昂贵,在实验过程中会对操作人员产生危害,其废弃液也会污染环境。盐度诱导效果较差一些,但是其在使用过程中安全无毒,成本较低,也不存在环境污染的问题^[19]。综合考虑认为 6-DMAP 更适用于小范围内的科学研究,而盐度诱导在大规模的生产中具有更大的应用潜力。

3.2 长牡蛎“海大 1 号”四倍体幼虫群生长情况的探讨

本实验发现长牡蛎“海大 1 号”四倍体幼虫群增长速度较慢,出现眼点幼虫比普通长牡蛎“海大 1 号”二倍体晚 4~5 d^[22],其原因是在长牡蛎“海大 1 号”四倍体幼虫群中,可能会存在一定数量的非整倍体幼虫,而非整倍体幼虫生存能力差^[23],因此增长速度缓慢,经过 10~12 d 淘汰,剩下幼虫主要以四倍体、三倍体幼虫为主,幼虫生长逐渐恢复正常生长。

本实验研究所获得的长牡蛎“海大 1 号”四倍体幼虫群的成活率极低,特别在培养的 5~6 d 内存活率急剧下降,可能是因为产生的四倍体幼虫、非整倍体幼虫生活能力低,造成了整个四倍体幼虫群的死亡率高的现象^[23-24]。另一方面,三倍体长牡蛎本身育性低,其配子发育较差营养物质积累不足^[25],因此受精后幼虫活力差、死亡率高。李慷均^[23]在进行长牡蛎四倍体幼虫群培育时,培育 22 d 幼虫的存活率只有 2.40%,本次研究中四倍体幼虫群的存活率仅有 1.80%,均表明四倍体牡蛎群幼虫存活率低。因此,在长牡蛎“海大 1 号”四倍体幼虫群培育过程中,要科学管理,强化培育条件,提高幼虫成活率。

4 结语

本次实验从诱导强度、诱导时机和诱导持续时间三个方面探究了 6-DMAP 和不同盐度诱导长牡蛎“海大 1 号”四倍体最佳组合。综合四倍体率和孵化率两方面来看:当有 30%~40%的个体排放极体时,用 450 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-DMAP 持续诱导 15 min,四倍体诱导

效果最佳;在第一极体刚出现时,以盐度 12 的海水持续诱导 15 min 时诱导效果最佳。对诱导获得的四倍体幼虫群进行培育,最终成功培育出四倍体率为 12.01% 的四倍体幼虫群,其中四倍体约 4 200 粒。本研究为长牡蛎“海大 1 号”的多倍体育种提供了理论参考。

参考文献:

- [1] Stanley J G, Allen Jr S K, Hidu H. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B[J]. Aquaculture, 1981, 23(1-4): 1-10.
- [2] Allen Jr S K, Downing S L. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1986, 102(2-3): 197-208.
- [3] Nell J A. Farming triploid oysters[J]. Aquaculture, 2002, 210(1-4): 69-88.
- [4] 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.
- [5] Peachey B L, Allen Jr S K. Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for tetraploidy induction in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*[J]. Aquaculture, 2016, 450: 199-205.
- [6] Dégremont L, Ledu C, Maurouard E, et al. Effect of ploidy on the mortality of *Crassostrea gigas* spat caused by OsHV-1 in France using unselected and selected OsHV-1 resistant oysters[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(3): 777-786.
- [7] Stanley J G, Hidu H, Allen Jr S K. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II[J]. Aquaculture, 1984, 37(2): 147-155.
- [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] Piferrer F, Beaumont A, Falguière J C, et al. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment[J]. Aquaculture, 2009, 293(3-4): 125-156.
- [10] Guo X, Allen Jr S K. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(1): 42-50.
- [11] Eudeline B, Allen Jr S K, Guo X. Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid production[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2000, 248(2): 151-161.
- [12] 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.
- [13] Desrosiers R R, Gérard A, Peignon J M, et al. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1993, 170(1): 29-43.

- [14] Gérard A, Ledu C, Phélipot P, et al. The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB[J]. *Aquaculture*, 1999, 174(3-4): 229-242.
- [15] Lu J K. The Combined Effects of Salinity and Temperature on Meiosis and Early Mitosis of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Oocytes[D]. Seattle; University of Washington, 1986.
- [16] 于瑞海, 王昭萍, 孔静, 等. 利用不同盐度诱导长牡蛎三倍体的研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2015, 45(1): 26-29.
Yu R H, Wang Z P, Kong J, et al. A methodological study on the induction of triploidy oyster with different salinities[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(1): 26-29.
- [17] 秦艳平, 张跃环, 周颖力, 等. CB与6-DMAP诱导香港牡蛎三倍体的效果比较[J]. *水产学报*, 2017, 41(2): 250-257.
Qin Y P, Zhang Y H, Zhou Y L, et al. Comparative studies on triploidy induction using CB and 6-DMAP in *Crassostrea hongkongensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(2): 250-257.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 王昭萍, 赵婷, 于瑞海, 等. 一种新方法——低渗诱导虾夷扇贝三倍体的研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2009, 39(2): 193-196.
Wang Z P, Zhao T, Yu R H, et al. A new method for triploid induction by hypotonic treatment in scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, 39(2): 193-196.
- [21] 张晨晨, 王昭萍, 于瑞海, 等. 低渗诱导栉孔扇贝三倍体与其它方法的比较[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2010, 40(S1): 71-75.
Zhang C C, Wang Z P, Yu R H, et al. Triploid induction in *Chlamys farrrei* by hypotonic treatment and the comparison with other treatment methods[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40(S1): 71-75.
- [22] 李玲蔚, 张哲, 马培振, 等. “海大1号”长牡蛎规模化人工育苗技术的研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2017(4): 139-144.
Li L W, Zhang Z, Ma P Z, et al. Studies on the techniques of large-scale artificial reproduction of the Pacific oyster “Haida No. 1” [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2017(4): 139-144.
- [23] 李慷均. 太平洋牡蛎四倍体育种研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004
Li K J. Tetraploid breeding in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004.
- [24] 何毛贤, 沈琪. 合浦珠母贝三倍体的卵诱导四倍体[J]. *水产学报*, 2000, 24(1): 22-27.
He M X, Shen Q. Inducement of tetraploid *Pinctada martensii* in eggs from triploid[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 24(1): 22-27.
- [25] Suqvet M, Malo F, Quere C, et al. Gamete quality in triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Aquaculture*, 2016, 451(20): 11-15.

A Comparative Study on the Effectiveness of 6-DMAP and Different Salinities in Inducing Tetraploid *Crassostrea gigas* “Haida No. 1”

Li Haikun¹, Zhang Zhe^{1,2}, Yu Ruihai¹, Wang Yongwang^{1,2}, Li Lingwei¹, Ma Peizhen¹

(1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Qingdao Guoxin Blue Valley Development Co., Ltd, Qingdao 266200, China)

Abstract: The effects of the induction intensities of salinity and 6-DMAP on inducing tetraploid *Crassostrea gigas* “Haida No. 1” and their inducing occasion and inducing duration were explored. The growth and survival of tetraploid larva population of *C. gigas* “Haida No. 1” were studied. The results showed that at 25 °C, salinity 30 and induction density 5×10^6 mol/L, the best induction combination of 6-DMAP is to induce at the polar body emission rate of 30% ~ 40% at 450 μ mol/L of 6-DMAP for 15 min. In this case, the tetraploid induction rate and hatching rate were $45.13\% \pm 1.44\%$ and $20.01\% \pm 1.37\%$, respectively, and the induction efficiency was 8% ~ 10%. At 25 °C and induction density 5×10^6 mol/L, the best induction combination of salinity is to induce at the beginning of the polar body emission at salinity 12 for 15 min. In this case, tetraploid rate and hatching rate reached $35.12\% \pm 2.24\%$ and $19.19\% \pm 1.12\%$, respectively, and the induction efficiency was 6% ~ 8%. The survival rate of the tetraploid larvae population of *C. gigas* “Haida No. 1” was lower; the survival rate was only 1.80% after 23 days of cultivation, and 4 200 tetraploid spats were successfully cultivated. This study provided a theoretical basis for the tetraploid induction of *C. gigas* “Haida No. 1”. In conclusion, the optimal combination of 6-DMAP induction of tetraploid *C. gigas* “Haida No. 1” is as follows, 450 mol/L of 6-DMAP, continuous induction for 15 min when 30% ~ 40% of the polar body was discharged. The optimal combination of salinity induction of tetraploid *C. gigas* “Haida No. 1” is as follows, salinity 12, induction for 15 min at the beginning of the polar body emission.

Key words: *Crassostrea gigas*; Haida No. 1; 6-DMAP; salinity; induction; tetraploid rate; hatching rate

责任编辑 朱宝象