

doi: 10.7541/2021.2019.263

## 三种方法诱导熊本牡蛎三倍体的比较研究

李玲蔚 李海昆 于瑞海 马培振 张哲 王永旺

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

**摘要:** 为获得高效的熊本牡蛎的三倍体诱导方法, 分别比较了6-DMAP、高盐和低盐3种诱导方法在不同的诱导浓度(盐度)、起始诱导时间和持续诱导时间下的卵裂率、孵化率和三倍体率, 同时比较了3种方法获得的幼虫的生长、存活和三倍体率变化情况。结果表明, 在6-DMAP诱导组中, 三倍体率和诱导效率分别可达37.97%—58.01%和34.30%—42.50%, 培育期间幼虫的平均存活率27.19%, 生长率13.03  $\mu\text{m}/\text{d}$ , 三倍体率降低了24.94%; 在低盐诱导组中, 三倍体率和诱导效率分别可达7.32%—42.25%和2.17%—31.41%, 培育期间幼虫的平均存活率33.92%, 生长率12.71  $\mu\text{m}/\text{d}$ , 三倍体率降低了20.64%; 在高盐诱导组中, 三倍体率和诱导效率分别可达7.47%—63.03%和6.58%—49.41%, 培育期间幼虫的平均存活率31.66%, 生长率13.08  $\mu\text{m}/\text{d}$ , 三倍体率降低了17.64%。综合来看, 高盐诱导是诱导三倍体熊本牡蛎的最优方法, 其诱导条件的最佳组合为盐度55, 起始诱导时间受精后15min, 持续诱导时间20min。研究为熊本牡蛎的三倍体诱导提供了技术支持, 对熊本牡蛎的多倍体育种具有重要的理论指导意义。

**关键词:** 熊本牡蛎; 6-DMAP; 高盐; 低盐; 三倍体率

**中图分类号:** S966.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2021)02-0352-08



熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)属于巨牡蛎属(*Crassostrea*), 在中国、日本和韩国的沿海均有分布<sup>[1-3]</sup>, 其独特的口味深受消费者的喜爱, 被美国引进并成功地开展了生产养殖<sup>[4-6]</sup>。我国熊本牡蛎的野生群体主要分布于江苏以南的海区, 是我国自然分布的几种巨牡蛎属牡蛎之一, 但因个体小、产量低, 未被开发利用<sup>[5, 7, 8]</sup>。美国的熊本牡蛎大小适中, 出肉率较高, 肉质细腻具甜味, 在美国颇受消费者的青睐, 价格是长牡蛎的1倍以上, 也是我国酒店进口高档牡蛎的主要品种之一。目前国内养殖户迫切需要大量熊本牡蛎满足日益增长的客户需求, 因此, 熊本牡蛎在我国具有较大的开发潜力。同时, 开发熊本牡蛎作为我国一个新的养殖品种对解决我国牡蛎养殖业面临的养殖品种单一, 种质退化等问题具有重要意义<sup>[8]</sup>。目前, 熊本牡蛎已经在国内已经开展了人工繁育<sup>[5-9]</sup>、单体培育<sup>[8]</sup>、多倍体育种<sup>[10]</sup>、性状选择育种<sup>[11, 12]</sup>和杂交育种<sup>[13, 14]</sup>等方面的研究, 取得了一定的成效。

熊本牡蛎虽然品质好、壳形规则, 但壳厚、生长缓慢、产量低<sup>[5]</sup>。贝类的三倍体因不育性往往比二倍体生长快<sup>[15, 16]</sup>, 熊本牡蛎的三倍体育种有望改善其生长慢的劣势, 提高生长速度。武祥伟等<sup>[10]</sup>报道了用CB诱导熊本牡蛎三倍体的研究, CB诱导的效率较高, 但是其成本较高且毒性大。6-DMAP及盐度诱导也是常见的牡蛎三倍体的诱导方法, 与CB相比这2种方法在经济性、安全性上具有一定的优势, 但诱导效率稍低。本次研究探讨了6-DMAP、低盐和高盐3种方式对熊本牡蛎的诱导效果, 以期获得更加环保、经济、无毒害的诱导方案, 为获得四倍体熊本牡蛎进而开展三倍体熊本牡蛎的规模化育种提供理论支持。

### 1 材料与方法

#### 1.1 亲贝暂养

本次实验所用的熊本牡蛎来自美国俄勒冈州, 挑选贝壳完整、活力良好亲贝, 将其表面附着物洗

收稿日期: 2019-12-03; 修订日期: 2020-05-11

基金项目: 山东省重点研发项目(2017GHY15124); 开放基金项目(KLM2017004)资助 [Supported by Key Research and Development Projects in Shandong Province (2017GHY15124); Open Fund Project (KLM2017004)]

作者简介: 李玲蔚(1991—), 女, 硕士研究生; 研究方向为贝类遗传育种学。E-mail: yu1598@163.com

通信作者: 于瑞海(1964—), 男, 教授, 主要从事贝类育种研究。E-mail: yuruihai@ouc.edu.cn

刷干净后, 运至山东省烟台莱州市长渔水产有限公司室内育苗车间暂养。暂养期间水温26—27℃, 盐度28—30。每天换水2次, 采用吸底的方式换水。混合投喂球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)和新月菱形藻(*Nitzschia closterium*), 根据具体的摄食和水体中残饵情况调整投饵量。

### 1.2 解剖受精

采用解剖的方式获得精卵, 获得的卵液先经60 μm的尼龙筛绢过滤除去大组织块, 之后用25 μm的尼龙筛绢洗卵3次, 最后将卵液浓缩至一定的体积, 便于确定诱导浓度(盐度)。置于过滤海水中浸泡促熟, 促熟时间30—60min。精液经25 μm的筛绢过滤, 稀释后直接使用。下列每个实验均重复3次。

### 1.3 6-DMAP诱导

**诱导浓度实验** 参考秦艳平等<sup>[17]</sup>报道的香港牡蛎三倍体诱导的最佳诱导时机, 诱导时机设为受精后15min, 分别将受精卵置于55、60、65、70、75和80 mg/L的6-DMAP中持续诱导20min。

**诱导时机实验** 分别在受精后12min、15min、18min和21min四个时刻, 用浓度实验中最适宜浓度, 持续处理受精卵20min。

**诱导持续时间实验** 采用浓度试验和诱导时机试验的最佳组合, 将受精卵分别持续诱导10min、15min、20min和25min。

### 1.4 盐度诱导

高盐海水用海盐加海水母液配置获得, 低盐海水用经24h曝气后的淡水与海水母液混合获得, 配置不同盐度海水时将浓缩后卵液的体积计算在内, 确保最终的诱导盐度。

**诱导盐度实验** 参考秦艳平等<sup>[17]</sup>报道的香港牡蛎三倍体诱导的最佳诱导时机, 诱导时机设为受精后15min, 将受精卵分别在盐度为35、40、45、50、55和60的高盐海水及3、6、9、12、15和18的低盐海水中持续诱导20min。

**诱导时机实验** 分别在受精后的12min、15min、18min和21min四个时刻内分别用高盐和低盐实验中的最适诱导盐度持续诱导20min。

**诱导持续时机实验** 用诱导时机实验中最适诱导时机, 将受精卵分别在高盐和低盐实验中的最适诱导盐度中持续诱导10min、15min、20min和25min。

### 1.5 幼虫的培养

分别用1.3中获得的6-DMAP、低盐和高盐最佳诱导组合诱导熊本牡蛎三倍体, 将不同三倍体诱导组的幼虫继续培育。培育期间, 水温26—28℃, 盐度30; 每天投喂球等鞭金藻4次, 日投饵量6000—

8000 cells/mL, 具体投饵量根据摄食和残饵情况进行调整; 每天换水两次, 每次换水1/2。

### 1.6 倍性检测

将收集获得的幼虫置于PBS缓冲液(pH=7.4)中, 用1 mL注射器抽打3—5次制成细胞悬液, 将细胞悬液用25 μm的筛绢过滤至75%的酒精中固定24h以上。上机检测前用DAPI(2 μg/mL)将获得的幼虫细胞从酒精中置换出, 避光染色30min, 随后用流式细胞仪(CytoFLEX, 美国)检测三倍体率。

### 1.7 数据测量与处理

受精后24h收集D形幼虫检测三倍体率。幼虫培育期间每隔3d测量幼虫壳高和存活率; 各组分别在幼虫培育的第5、第9、第13和第17天随机取500—1000个幼虫检测三倍体率。卵裂率为受精4h后发生卵裂的受精卵占总受精卵的百分比, 孵化率为受精后24h后D形幼虫占卵裂的受精卵的百分比; 三倍体率为组内所有幼虫中三倍体幼虫占的百分比; 诱导效率为孵化率与三倍体率乘积的百分数; 幼虫的平均存活率为所有的幼虫在培育24d内的平均存活率; 幼虫的生长率为所有幼虫在培育24d内的平均生长速度。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 结果

### 2.1 三种诱导方式在不同的诱导组合下卵裂率、孵化率、三倍体率比较

在6-DMAP诱导组中, 随诱导浓度的增加, 卵裂率和孵化率持续下降, 而三倍体率先增大后减小; 浓度为75 mg/L时诱导三倍体率最高为(58.0±3.67)%, 对应的卵裂率和孵化率分别为(75.42±5.33)%和(73.26±3.15)%(图1A)。在低盐诱导组中随盐度的增加, 卵裂率和孵化率逐渐升高, 三倍体率先升高后降低; 在盐度为6时, 三倍体率最高可达(42.25±2.63)%, 显著高于其他各组( $P<0.05$ ), 此时对应的卵裂率和孵化率分别为(76.51±7.22)%和(74.33±3.71)%(图2B)。在高盐诱导组中, 对照组与实验组各组的卵裂率和孵化率差异较小, 实验组内的三倍体率随盐度的增加先增大后减小; 在盐度为55时, 三倍体率最高可达(60.03±3.03)%, 卵裂率和孵化率分别可达(80.26±3.78)%和(78.39±4.32)%(图1C)。

在6-DMAP诱导组中, 随着起始诱导时间的增大, 卵裂率和三倍体率先增大后减小; 起始诱导时间为受精后15min时, 诱导获得三倍体率最高为(53.92±7.07)%, 显著高于起始诱导时间为受精后12min和21min时的三倍体率( $P<0.05$ ), 此时的卵裂

率和孵化率分别可达(86.08±2.94)%和(76.13±5.12)% (图 2A)。在低盐诱导组中, 随起始诱导时间的增加, 三倍体率先增大后减小; 在起始诱导时间为15min时, 三倍体率最高达(40.89±3.13)%, 卵裂率和孵化率也相对较高, 分别可达(76.51±3.11)%和(75.17±4.01)% (图 2B)。在高盐诱导组中, 随起始诱导时间的增加, 三倍体率先增大后减小; 起始诱导时间为受精后15min时, 三倍体率最大可达(59.52±4.32)%, 卵裂率和孵化率分别可达(81.4±3.76)%和(78.1±3.59)%

(图 2C)。

在6-DMAP诱导组中, 随诱导持续时间的增大, 三倍体率先增大后减小, 卵裂率和孵化率逐渐降低。在诱导持续时间20min时, 三倍体率最高可达(51.77±5.42)%, 此时对应的卵裂率和孵化率分别为(79.04±4.77)%和(81.76±6.72)% (图 3A)。在低盐诱导组中, 各组的三倍体率普遍较低, 三倍体率只有16.74%—37.98%; 随诱导持续时间增加, 各组的卵裂率逐渐降低, 三倍体率先增加后减小, 但孵化率

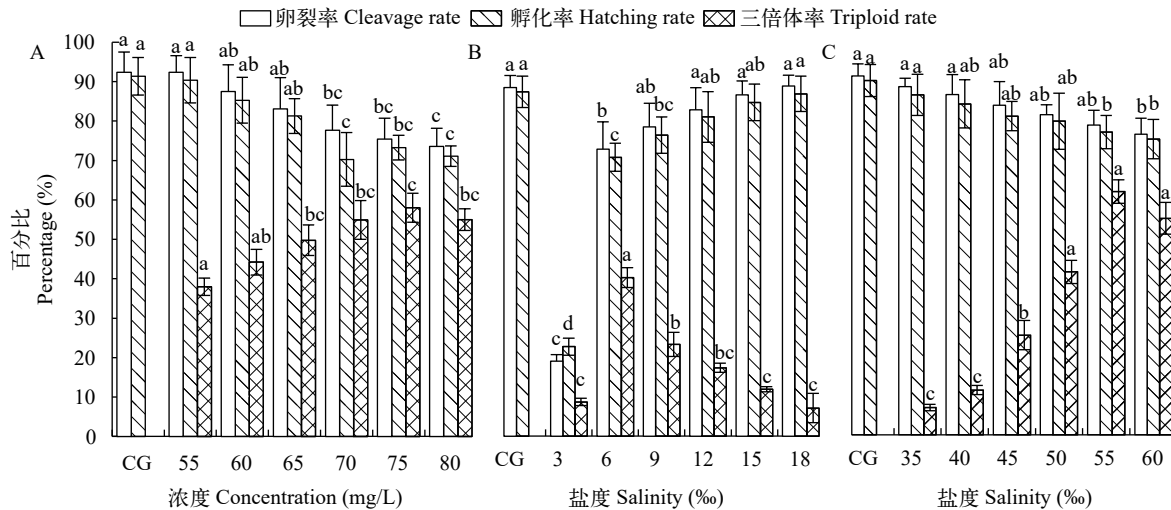


图 1 不同的诱导浓度(盐度)下3种诱导方法对熊本牡蛎三倍体诱导效果

Fig. 1 Effects of three induction methods on triploid induction of *C. sikamea* at different induction concentrations (salinity)

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; CG. 对照组; A. 6-DMAP诱导组; B. 低盐诱导组; C. 高盐诱导组

The same letters mean no significant difference ( $P>0.05$ ); the different letters mean significant differences ( $P<0.05$ ); the same applies below; CG. control group; (A). 6-DMAP induction group; (B). low salt induction group; (C). high salt induction group

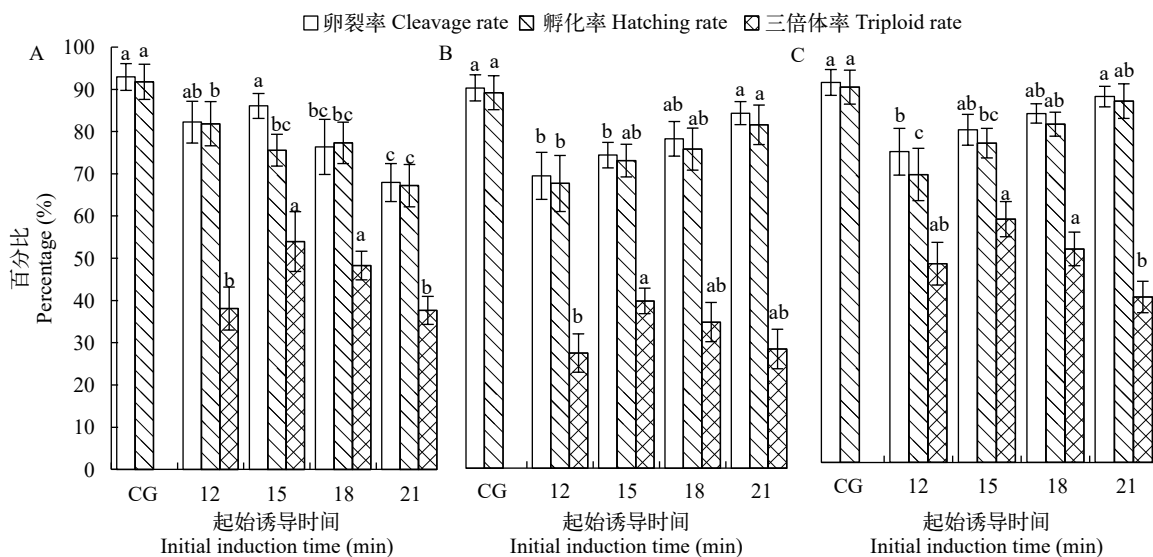


图 2 不同的起始诱导时间下3种诱导方法对熊本牡蛎三倍体诱导效果

Fig. 2 Effects of three induction methods on triploid induction of *C. sikamea* at different initial induction times

CG. 对照组; A. 6-DMAP诱导组; B. 低盐诱导组; C. 高盐诱导组

CG. control group; A. 6-DMAP induction group; B. low salt induction group; C. high salt induction group



无明显的变化;在诱导持续时间为20min时,三倍体率最高达(37.98±5.05)%,此时卵裂率和孵化率分别为(77.40±5.52)%和(84.51±7.61)%(图3B)。在高盐诱导组中,各组间三倍体率可达35.26%—56.48%;随诱导持续时间的增大,三倍体率先增大后减小,卵裂率和孵化率逐渐降低;在诱导持续时间20min时,三倍体率最高可达(56.48±4.83)%,卵裂率和孵化率分别可达(82.16±3.29)%和(83.46±3.78)%(图3C)。

## 2.2 不同诱导条件下3种诱导方法三倍体诱导的诱导效率比较

在不同的盐度条件下,低盐组和高盐组的诱导效率变化范围均较大,其最大诱导效率出现在盐度为6和55时,分别可达31.41%和49.41%;在不同的6-DMAP浓度条件下,诱导效率变化相对较小,浓度为75 mg/L时,诱导效率最大可达42.50%(图4A)。随起始诱导时间的增大,3种诱导方式的诱导效率均呈现先增大后减小的趋势,6-DMAP、低盐和高盐3种诱导方式的最大诱导效率均出现在起始诱导时间15min时,分别可达40.75%、30.47%和46.48%(图4B)。随诱导持续时间的增大,3种诱导方式的诱导效率均呈现先增大后减小的趋势;6-DMAP、低盐和高盐3种诱导方式的最大诱导效率均出现在诱导持续时间20min时,分别可达42.33%、32.10%和47.14%(图4C)。

## 2.3 三种诱导方式获得的幼虫的生长、存活、三倍体率比较

在幼虫培育的前6天,对照组以及各三倍体诱导组的幼虫壳高无显著性差异( $P>0.05$ )。自培育的

第9天开始,处理组幼虫生长逐渐加快。培育的第9至第24天处理组的幼虫壳高始终大于对照组。在3个三倍体诱导组中,高盐诱导组的幼虫生长速度最快,其次是6-DMAP诱导组和低盐诱导组的幼虫,但在培育期间各组之间的幼虫壳高均无显著性差异( $P>0.05$ ,图5)。

对照组幼虫的存活率始终显著高于3个诱导组的幼虫存活率,培育至24d,对照组的存活率达(15.58±2.17)%,而三个实验组的幼虫存活率均不到5%。在3个实验组中,6-DMAP三倍体诱导组幼虫的存活率始终最低,第24天时幼虫存活率只有(2.78±0.23)%,不到对照的30%。低盐和高盐诱导组获得的幼虫群的存活率差异较小,培育至24d幼虫存活率分别达(3.51±0.77)%和(4.37±2.57)%(图6)。

在3种诱导方式中,高盐诱导组获得的三倍体率最高,其次是6-DMAP和低盐组。培育至17d,3种诱导方式获得的幼虫的倍率均有所下降。低盐诱导组和6-DMAP诱导组三倍体率降低幅度较大,第13天之后,其三倍体幼虫的比例显著低于高盐组( $P<0.05$ )。6-DMAP、高盐和低盐3种诱导方式获得的幼虫的三倍体率分别由最初的(73.41±3.98)%、(75.69±4.33)%和(66.53±6.72)%降低至(48.47±3.17)%、(58.05±6.455)%和(47.45±4.82)%(图7)。

## 2.4 三种诱导方式的综合比较

3种诱导方式的综合比较如表1所示,在3种诱导方式中,低盐的诱导效率显著地低于另外2种诱导方式,6-DMAP诱导组和高盐诱导组相比,6-DMAP诱导的最大三倍体率稍低于高盐诱导的最

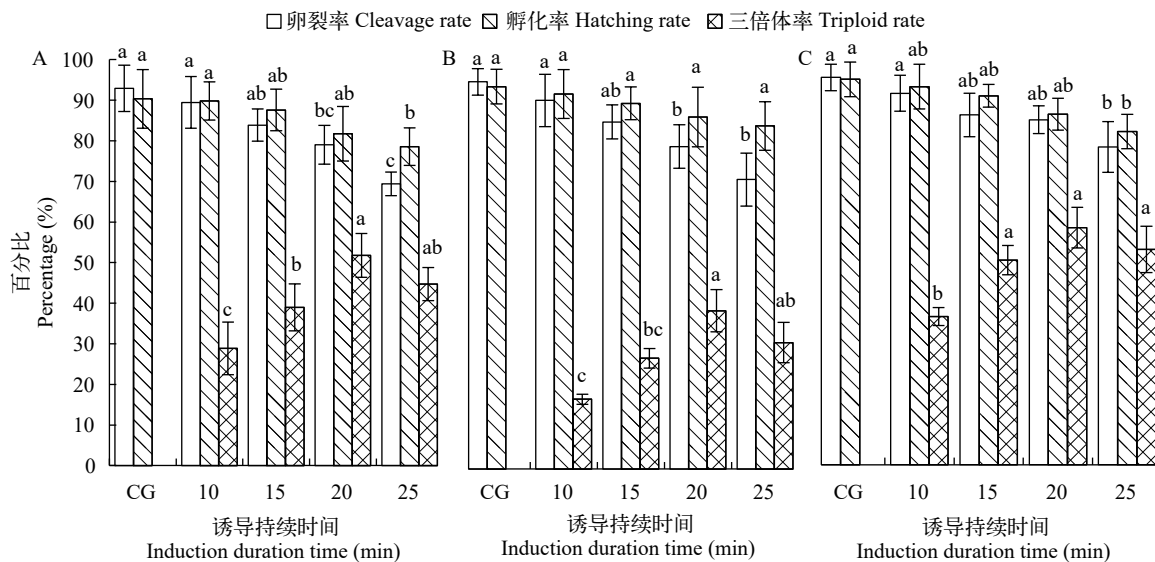


图3 不同的诱导持续时间下3种诱导方法对熊本牡蛎三倍体诱导效果

Fig. 3 Effects of three induction methods on triploid induction of *C. sikamea* at different induction duration times

CG. 对照组; A. 6-DMAP诱导组; B. 低盐诱导组; C. 高盐诱导组

CG. control group; A. 6-DMAP induction group; B. low salt induction group; C. high salt induction group

大三倍体率。盐度诱导实验成本低且无毒,而6-DMAP诱导组成本较高且有一定毒性。6-DMAP诱导组幼虫的三倍体率衰退最大,且幼虫平均存活率低于2个盐度组。

### 3 讨论

#### 3.1 最佳诱导组合的探讨

本次实验的药物浓度梯度较大,发现随诱导浓度的增加,三倍体率先增加后有所下降,这在6-DMAP诱导三倍体香港牡蛎和长牡蛎中均出现了类似的现象<sup>[17,18]</sup>。而Gérard等<sup>[19]</sup>的研究结果表明随6-DMAP浓度的增加和诱导持续时间的增长,诱导获得的三倍体率先显著升高,后逐渐趋于平缓,这与本次实验结果有所不同。主要原因可能是当诱导浓度过大时,幼虫胚胎受损严重,胚胎畸形率增加,很多三倍体胚胎无法正常发育至D形幼虫,导致D形幼虫的三倍体率有所下降<sup>[20]</sup>。其次诱导强度过大时,很多胚胎无法完成细胞分裂过程,这些无法分裂的胚胎往往中往往包含较多的多倍体胚胎。实际上这也可以解释盐度实验中随盐度胁迫的增加,诱导三倍体率先增加后减小的现象,此外近江牡蛎、长牡蛎的盐度诱导中均出现了随盐度胁迫的增加,三倍体率先增加后减小的现象<sup>[21,22]</sup>。

三组均在起始诱导时间为15min时出现了最高的诱导效率,说明受精后15min时是熊本牡蛎受精卵第二极体集中排放的时间点,是3种方式的最佳

诱导时机;3种诱导方法中在持续诱导时间20min时均表现出了最高的诱导效率;综合卵裂率、孵化率和三倍体诱导率,在6-DMAP实验中,当6-DMAP浓度为75 mg/L,起始诱导时间受精后15min,持续诱导20min时,诱导效果最好;在低盐诱导组中,当盐度为6,起始诱导时间为,受精后15min,持续诱导20min时,诱导效果最好;在高盐实验中,盐度55,起始诱导时间受精后15min,持续诱导时间15min时,诱导效果最好。

#### 3.2 最佳诱导方法的探讨

综合来看,低盐诱导组的效率较低,其获得幼虫的平均存活率低,且三倍体率不稳定,为3种方法中诱导效果最差的一种。6-DMAP诱导最高三倍体率通常能达到80%以上<sup>[17-20]</sup>,但本次研究的三倍体率远低于此,这可能与卵子的成熟度、操作熟练程度和不同种对不同药物的耐受性等因素有关<sup>[17]</sup>。因此在贝类的三倍体诱导过程中每个环节都要严谨,否则诱导的不稳定性会大大地增加。在本次实验中,与6-DMAP诱导组相比,高盐诱导组表现出了一定的优越性,其最高诱导效率高于6-DMAP诱导,且诱导获得幼虫的三倍体率较稳定、平均存活率高、无毒环保和成本低。因此高盐诱导熊本牡蛎是3种方法中最优的一种。

#### 3.3 三种诱导方式获得幼虫的生长、存活和三倍体率探讨

3种诱导方式获得的浮游幼虫在生长上无显著

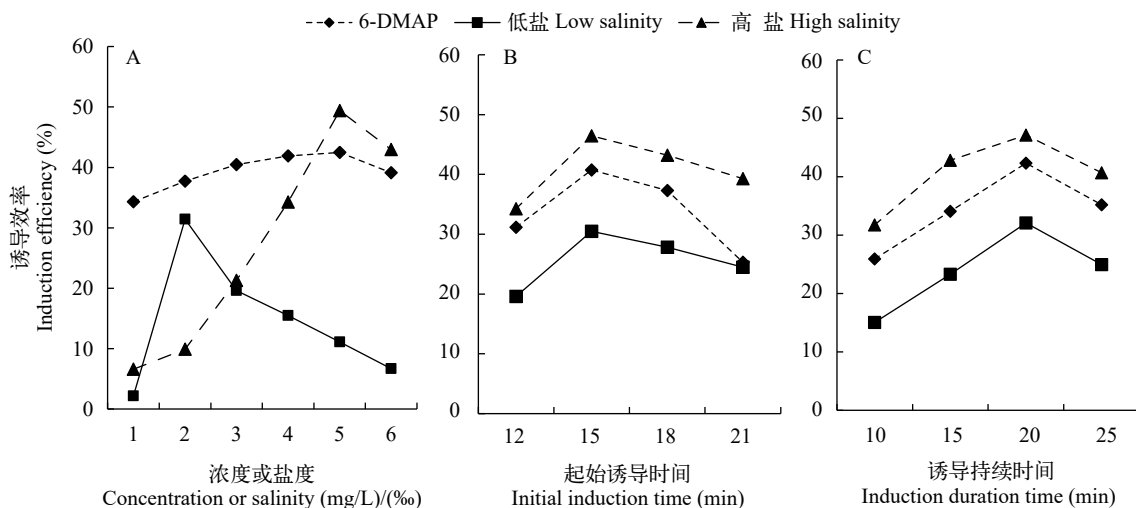


图4 不同的诱导条件下3种诱导方法诱导熊本牡蛎三倍体的诱导效率

Fig. 4 Induction efficiency of three induction methods on triploid induction of *C. sikamea* at different induction conditions

A. 不同的诱导浓度(盐度)“1—6”. 6-DMAP浓度(55、60、65、70、75和80 mg/L),或低盐盐度(3‰、6‰、9‰、12‰、15‰和18‰),或高盐盐度(35‰、40‰、45‰、50‰、55‰和60‰); B. 不同的起始诱导时间; C. 不同的诱导持续时间

A. different induction concentrations, “1—6”. the concentration of 6-DMAP (55, 60, 65, 70, 75 and 80 mg/L), or the low salinity (3‰, 6‰, 9‰, 12‰, 15‰ and 18‰), or the high salinity (35‰, 40‰, 45‰, 50‰, 55‰ and 60‰); B. different initial induction times; C. different induction duration times

性差异( $P>0.05$ ),但在培育的第9至第24天,其幼虫的壳高均显著高于对照组( $P<0.05$ )。三倍体诱导组幼虫在壳顶期幼虫之后表现出了一定的生长诱导优势,在壳顶期之前未表现出任何的生长优势,分析原因是壳顶前期存在一定比例的非整倍体幼虫,这些非整倍体幼虫与正常的二倍体个体相比存在一定的生长劣势<sup>[23]</sup>,导致其没有表现出生长优势,而壳顶期之后这些幼虫被淘汰<sup>[10]</sup>,幼虫逐渐表现出生长优势。三倍体诱导组的幼虫的存活率显著低于对照组,主要是与非整倍体的死亡以及存活力弱的D形幼虫的淘汰有关<sup>[10]</sup>。

自Stanley等<sup>[24]</sup>1981年首次报道三倍体美洲牡蛎以来,双壳贝类的多倍体育种发展迅速,三倍体牡蛎的规模化养殖是双壳贝类进行多倍体育种的一个成功的典范<sup>[25,26]</sup>,但是在贝类的多倍体育种中也存在一些问题。多倍体群体的倍率衰退是贝类

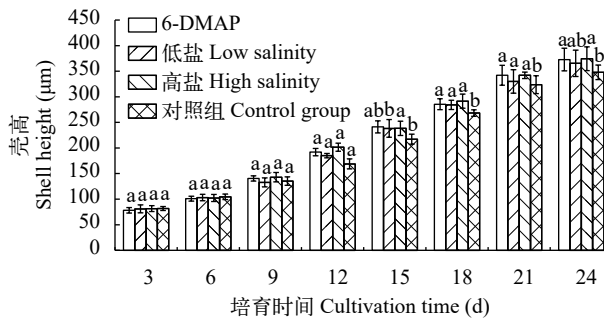


图5 三种诱导方式获得的幼虫的壳高比较

Fig. 5 Comparison in shell height of larvae induced by three methods

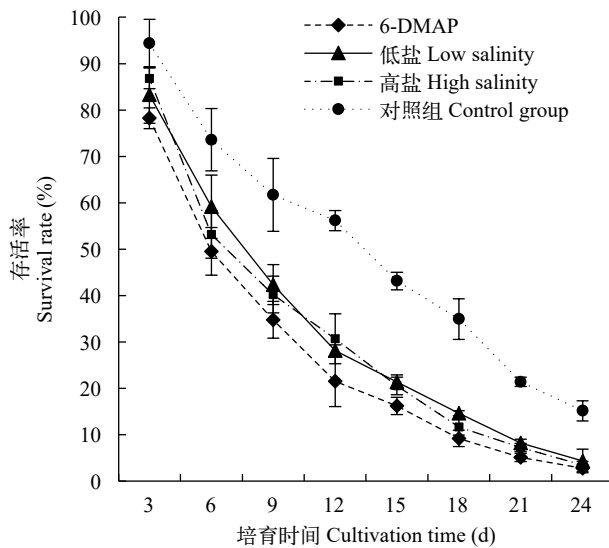


图6 三种诱导方式获得的幼虫的存活率比较

Fig. 6 Comparison on survival rate of triploid larva population induced by three methods

多倍体育种的一个重要的问题,限制了稳定的三倍体和四倍体牡蛎群体的形成<sup>[27-29]</sup>。在本研究中3种诱导方式获得的幼虫均出现了不同程度的倍率衰退,分析原因有三:首先是个体的选择性死亡,被抑制第二极体排放而获得三倍体属于非正常的个体,一部分个体由于不能适应这种现象在培育前期大量死亡,造成整体的三倍体率下降<sup>[10]</sup>;其次是非整倍体个体存在,其染色体不稳定性也可能造成三倍体率的下降;此外研究中检测倍率的方法是流式细胞仪检测,流式细胞仪并不能检测出DNA含量的微小差别,检测的三倍体中可能包含一定比例的非整倍体个体<sup>[30]</sup>,随着非整倍体的死亡三倍体率逐渐下

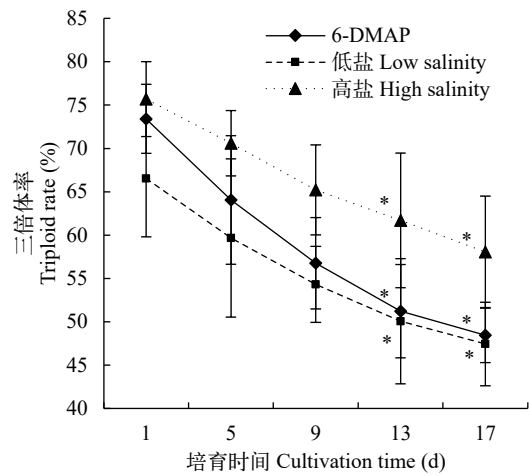


图7 三种诱导方式获得的幼虫的三倍体率比较

Fig. 7 Comparison on triploidy rate of larva induced by three methods

\*表示组间差异显著( $P<0.05$ )

\* means significant difference ( $P<0.05$ )

表1 三种三倍体诱导方法的综合比较

Tab. 1 Comprehensive comparison on three triploid induction methods

指标Index	6-DMAP	低盐Low salinity	高盐High salinity
卵裂率Cleavage rate (%)	67.92—92.37	19.99—93.30	75.69—90.19
孵化率Hatching rate (%)	70.27—90.34	23.87—90.01	70.44—90.02
三倍体率Induction rate (%)	37.97—58.01	7.32—42.25	7.47—63.03
生长率Growth rate (µm/d)	13.03	12.71	13.08
平均存活率Mean survival rate (%)	27.19	33.92	31.66
三倍体率衰退 Recession of triploid rate (%)	24.94	20.64	17.64
试剂成本Cost of reagent (元/g)	3000	无	0.2
毒性Toxicity	有毒性	无毒	无毒
诱导效率Induction efficiency (%)	34.30—42.50	2.17—31.41	6.58—49.41



降;最后一个原因就是染色体的丢失,三倍体个体的染色体丢失逆转成为二倍体或者非整倍体会造成三倍体群体的三倍体率的下降。目前认为这种染色体丢失现象主要是由于细胞分裂过程中形成染色体从造成的<sup>[29,31]</sup>,并且这种现象广泛地存在于三倍体<sup>[29]</sup>和四倍体牡蛎<sup>[31]</sup>中。

#### 4 结论

在6-DMAP、高盐和低盐3种诱导方式中,低盐的诱导效果最差,不适合三倍体熊本牡蛎的诱导。高盐诱导的三倍体率最高,幼虫的三倍体率稳定、存活率高,且成本低、环保、无毒害,是诱导三倍体熊本牡蛎的理想方法。在实际的熊本牡蛎三倍体诱导生产中,建议以高盐的诱导方式进行诱导,最佳诱导条件为盐度55,起始诱导时间为受精后15min,持续诱导时间为20min。

#### 参考文献:

- [1] Wang H Y, Qian L M, Wang A M, *et al.* Occurrence and distribution of *Crassostrea sikamea* (Amemiya 1928) in China [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2013, **32**(2): 439-446.
- [2] Camara M D, Davis J P, Sekino M, *et al.* The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* is neither rare nor threatened by hybridization in the northern Ariake sea, Japan [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2008, **27**(2): 313-322.
- [3] Hong J S, Sekino M, Sato S. Molecular species diagnosis confirmed the occurrence of Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in Korean waters [J]. *Fisheries Science*, 2012, **78**(2): 259-267.
- [4] Hedgecock D, Banks M A, Mcgoldrick D K. The status of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* (Amemiya 1928) in US commercial brood stocks [J]. *Journal of Shellfish Research*, 1993, **12**(2): 215-221.
- [5] Lü X Y. Studies on the techniques of artificial reproduction of the *Crassostrea sikamea* and cultivation of the culthess spat of *Crassostrea gigas* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013: 22-29. [吕晓燕. 熊本牡蛎人工繁育与长牡蛎单体苗种培育技术研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 22-29.]
- [6] Robinson A. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture [J]. *Aquaculture*, 1992, **106**(1): 89-97.
- [7] Zhang Y H, Wang Z P, Yu Z N, *et al.* A recent review of interspecific hybridization among cultivated oysters [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, **38**(4): 613-624. [张跃环, 王昭萍, 喻子牛, 等. 养殖牡蛎种间杂交的研究概况与最新进展 [J]. 水产学报, 2014, **38**(4): 613-624.]
- [8] Wang C B. Studies on single-seed oyster spat production and culture techniques of *Crassostrea sikamea* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013: 5-9. [王昌勃. 熊本牡蛎单体苗种生产和养殖技术的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 5-9.]
- [9] Wang T, Li Q. Effects of salinity and temperature on growth and survival of juvenile of Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*) [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, **48**(2): 297-302. [王涛, 李琪. 不同盐度和温度对熊本牡蛎 (*Crassostrea sikamea*) 稚贝生长与存活的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2017, **48**(2): 297-302.]
- [10] Wu X W, Zhang Y H, Xiao S, *et al.* Triploidy induction by CB and their survival rate and triploidy rate in Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, **43**(4): 1029-1037. [武祥伟, 张跃环, 肖述, 等. CB诱导熊本牡蛎三倍体及其存活率与倍化率的变化关系 [J]. 水产学报, 2019, **43**(4): 1029-1037.]
- [11] Zhang Y H, Qin Y P, Zhang Y, *et al.* Population selection for growth in two strains of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, **23**(4): 882-889. [张跃环, 秦艳平, 张扬, 等. 熊本牡蛎多峰和无峰品系F1生长性状的群体选育 [J]. 中国水产科学, 2016, **23**(4): 882-889.]
- [12] Zhang Y H, Qin Y P, Zhang Y, *et al.* Selective effect of the second generation for fast growth in two strains of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, **47**(3): 581-586. [张跃环, 秦艳平, 张扬, 等. 熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)多峰和无峰品系子二代生长性状的选择效应 [J]. 海洋与湖沼, 2016, **47**(3): 581-586.]
- [13] Zhang Y H, Li J, Zhang Y, *et al.* Performance evaluation of reciprocal hybrids derived from the two brackish oysters, *Crassostrea hongkongensis* and *Crassostrea sikamea* in southern China [J]. *Aquaculture*, 2017(473): 310-316.
- [14] Su J Q. Hybridization between *Crassostrea angulata* and *C. sikamea*, *Saccostrea Cucullata* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015: 16-56. [苏家齐. 葡萄牙牡蛎与熊本牡蛎、僧帽牡蛎的种间杂交研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015: 16-56.]
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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. [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.]
- [18] Tian C Y, Wang R C, Liang Y, *et al.* Triploidy of *Crassostrea gigas* induced with 6-DMAP: by blocking the second polar body of the zygotes [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, **6**(2): 2-5. [田传远, 王如才, 梁英, 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): 2-5.]
- [19] Gérard A, Naciri Y, Peignon J M, *et al.* Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. *Aquaculture Research*, 1994, 25(7): 709-719.
- [20] Yu R H, Wang Z P, Wang R C, *et al.* Comparative studies on triploidy induction using three chemicals in Pacific oyster [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2000, 30(4): 590-592. [于瑞海, 王昭萍, 王如才, 等. 三种化学诱导剂诱导太平洋牡蛎三倍体的比较研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(4): 590-592.]
- [21] Wang K. The study of salinity induce triploid of *Crassostrea gigas* and *C. ariakensis* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014: 16-51. [王康. 盐度诱导太平洋牡蛎和近江牡蛎三倍体的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 16-51.]
- [22] Kong J, Wang Z P, Yu R H, *et al.* Triploid induction in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by hypotonic treatment and comparison with other induction methods [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 581-587. [孔静, 王昭萍, 于瑞海, 等. 低渗诱导太平洋牡蛎三倍体以及与其他诱导方法的比较 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 581-587.]
- [23] Leitao A, Boudry P, Thiriou-Quievreux C. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: ten years of evidence [J]. *Aquaculture*, 2001, 193(1-2): 39-48.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Nell J A. Farming triploid oysters [J]. *Aquaculture*, 2002, 210(1-4): 69-88.
- [27] Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploid [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(11): 836.
- [28] McCombie H, Lapègue S, Cornette F, *et al.* Chromosome loss in bi-parental progenies of tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Aquaculture*, 2005, 247(1-4): 97-105.
- [29] Zhang Q Q, Yu H Y, Howe A, *et al.* Cytogenetic mechanism for reversion of triploids to heteroploid mosaics in *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea ariakensis* [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(11): 1658-1667.
- [30] de Sousa J T, Allen Jr S K, Wolfe B M, *et al.* Mitotic instability in triploid and tetraploid one-year-old eastern oyster, *Crassostrea virginica*, assessed by cytogenetic and flow cytometry techniques [J]. *Genome*, 2017, 61(2): 79-89.
- [31] Zhang Z R, Wang X L, Zhang Q Q, *et al.* Cytogenetic mechanism for the aneuploidy and mosaicism found in tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2014, 13(1): 125-131.

## COMPARISONS OF THREE TRIPLOID INDUCTION METHODS IN *CRASSOSTREA SIKAMEA*

LI Ling-Wei, LI Hai-Kun, YU Rui-Hai, MA Pei-Zhen, ZHANG Zhe and WANG Yong-Wang

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** To obtain an efficient *C. sikamea* triploid induction scheme, we compared 6-DMAP, low salinity and high salinity on *C. sikamea* triploid induction in terms of cleavage rate, hatching rate and triploid rate. The effects of different concentrations (salinity), initial induction times and induction duration were also studied. At the same time, the growth, survival rate and triploid rate of larvae obtained by the three methods were compared. In the 6-DMAP induction group, the triploid rate and induction efficiency reached 37.97%—58.01% and 34.30%—42.50%, respectively; during the cultivation period, the average survival rate of larvae was 27.19%, the growth rate was 13.03  $\mu\text{m}/\text{d}$ , and the triploid rate reduced by 24.94%. In the low-salt induction group, the triploid rate and induction efficiency reached 7.32%—42.25% and 2.17%—31.41%, respectively; during the cultivation period, the average survival rate of larvae was 33.92%, the growth rate was 12.71  $\mu\text{m}/\text{d}$ , and the triploid rate reduced 20.64%. In the high-salt induction group, the triploid rate and induction efficiency reached 7.47%—63.03% and 6.58%—49.41%, respectively; during the cultivation period, the average survival rate of larvae was 31.66%, the growth rate was 13.08  $\mu\text{m}/\text{d}$ , and the triploid rate was reduced by 17.64%. In general, high salinity induction is the best triploid induction method for *C. sikamea*, and the optimal induction condition was induced for 20min start at 15min post fertilization using 55 salinity water. This study provides technical support for *C. sikamea* triploid induction and has important theoretical guiding significance for polyploid breeding of *C. sikamea*.

**Key words:** *Crassostrea sikamea*; 6-DMAP; High salinity; Low salinity; Triploid rate