

研究简报

# 长牡蛎壳橙品系三倍体的人工诱导\*

岳超<sup>1</sup>, 李永国<sup>1</sup>, 李琪<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 海水养殖教育部重点实验室(中国海洋大学), 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237)

**摘要:** 本研究采用了细胞松弛素 B (CB) 和 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 两种诱导方法对长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 壳橙品系进行三倍体诱导, 分析了两种诱导方法的不同条件下幼虫的三倍体率、孵化率、D 形幼虫畸形率以及幼虫生长和存活。研究表明, 虽然细胞松弛素 B (CB) 和 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 诱导的三倍体率差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但同种方法中不同处理条件下长牡蛎壳橙品系的三倍体率、孵化率和 D 形幼虫畸形率差异显著 ( $P < 0.05$ )。综合三倍体率、孵化率、D 形幼虫畸形率这三个指标; 在水温 25~27 °C、盐度 30、受精后 15 min 时, 使用浓度为 0.5 mg/L 的 CB 溶液, 持续诱导 20 min 为 CB 诱导的最适诱导条件; 在水温 25~27 °C、盐度 30、受精后 15 min 时, 使用浓度为 300  $\mu\text{mol/L}$  的 6-DMAP 溶液, 持续诱导 15 min 为 6-DMAP 诱导的最适诱导条件。幼虫生长和存活的观察结果表明, 三倍体诱导组与对照组生长差异显著 ( $P < 0.05$ ), CB 诱导组和 6-DMAP 诱导组的幼虫壳高平均日增量分别为 (15.83  $\pm$  1.44)  $\mu\text{m}$  和 (15.27  $\pm$  0.48)  $\mu\text{m}$ , 均高于对照组 (12.10  $\pm$  0.42)  $\mu\text{m}$ ; 三倍体诱导组与对照组幼虫存活率差异不显著。研究结果为长牡蛎壳橙品系的遗传改良提供了参考资料。

**关键词:** 长牡蛎; 壳橙品系; 三倍体; 人工诱导; 生长; 存活; 细胞松弛素 B; 6-二甲基氨基嘌呤

**中图分类号:** S968.31

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-5174(2021)07 II-128-08

**DOI:** 10.16441/j.cnki.hdxh.20190170

**引用格式:** 岳超, 李永国, 李琪. 长牡蛎壳橙品系三倍体的人工诱导[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(增刊 I): 128-135.

Yue Chao, Li Yongguo, Li Qi. Artificial triploid induction of orange-shell line of the pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2021, 51(Sup.I): 128-135.

三倍体是具有三套同源染色体的生物体, 其最大的特点是性腺不发育或育性差, 从而可以快速生长, 所以三倍体育种在水产动物特别是鱼类养殖过程中的应用十分广泛。在鱼类养殖过程中, 除了能够提高生长速度, 三倍体的优势还表现在降低性成熟期间疾病发生率以及防止感官性能的退化<sup>[1]</sup>。在近些年的研究中, 鱼类三倍体的人工诱导已经在鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)<sup>[2]</sup>、大西洋鲑 (*Salmo salar*)<sup>[3]</sup>、虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[4]</sup> 等品种上实现了突破且取得成功, 并在虹鳟鱼的多倍体培育中实现了产业化。

虽然贝类三倍体相比鱼类三倍体发展要晚, 但在多个种类上进行了尝试。自 1981 年 Stanley 等<sup>[5]</sup> 通过细胞松弛素 B (CB) 诱导获得了三倍体美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 以来, 贝类三倍体已经在海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)<sup>[6]</sup>、菲律宾蛤仔 (*Rudi-*

*tapes philippinarum*)<sup>[7]</sup>、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)<sup>[8]</sup>、马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*)<sup>[9]</sup> 等种类进行了研究, 并且在长牡蛎中通过四倍体与二倍体杂交得到了 100% 三倍体<sup>[10]</sup>。该方法也使长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 成为目前唯一实现三倍体产业化的贝类。研究发现, 与二倍体牡蛎相比, 三倍体牡蛎的性腺不发育或发育受阻<sup>[11]</sup>, 使其在性成熟季节, 能够将用于繁殖的能量用于生长<sup>[1,12]</sup>, 比普通二倍体有更快的生长速度。二倍体牡蛎在夏季由于产卵、排精, 会导致软体部消瘦, 无法供应市场, 而三倍体牡蛎则可以弥补该空缺, 从而保证牡蛎的全年供应。此外, 由于三倍体牡蛎的不育性, 牡蛎的三倍体技术在防止种质污染以及新品种知识产权保护上具有重要应用价值<sup>[1]</sup>。我国牡蛎三倍体的研究开始于 20 世纪 80 年代后期, 初期研究主要集中在诱导剂的筛选及诱导方法的优化等方面, 近

\* 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项目(2018NS01); 泰山学者种业计划专家项目资助  
Supposed by Shandong Province Agricultural Seed Improvement Project(2017LZGC009); Weihai Science and Technology Development Project(2018NS01); Taishan Scholars Seed Program

收稿日期: 2019-04-29; 修订日期: 2019-09-22

作者简介: 岳超(1993-), 男, 硕士生。E-mail: 824584526@qq.com

\*\* 通讯作者: E-mail: qili66@ouc.edu.cn

年来随着诱导技术的日益完善,对不同品种牡蛎的三倍体研究也进行了相应的报道。

在长牡蛎育种实践过程中,我们发现了左右壳均为橙色的突变个体,通过家系和群体选育得到了遗传稳定的长牡蛎壳橙品系(见图1)。作为表观性状的直接表达,美观、靓丽的橙色壳色对培育牡蛎高端品种十分重要<sup>[13]</sup>。然而,与野生群体相比,有限的亲本数量使长牡蛎壳橙品系遗传多样性显著降低,在生长、存活等性状上出现近交衰退现象<sup>[14]</sup>。为培育具有靓丽壳橙性状的长牡蛎优良品种,需要对长牡蛎壳橙品系二倍体的生产性状进行遗传改良。

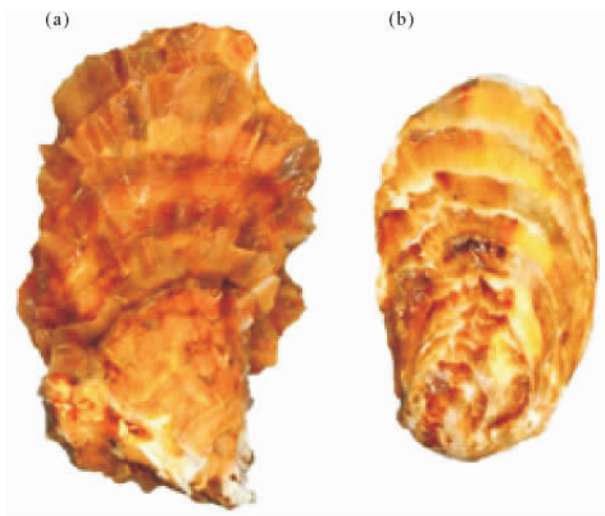


图1 长牡蛎壳橙品系的左壳(a)和右壳(b)

Fig.1 The left shell (a) and right shell (b) of orange-shell line of *Crassostrea gigas*

本研究以人工选育第六代长牡蛎壳橙品系为素材,研究了细胞松弛素 B、6-二甲基氨基嘌呤诱导长牡蛎壳橙品系三倍体的适宜条件和幼虫的生长发育,旨在为长牡蛎壳橙品系的遗传改良提供参考资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验亲贝为2018年5月在山东省荣成市海区采集的人工选育第六代2龄长牡蛎壳橙品系。实验前在室内进行人工促熟,促熟期间每日投喂球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)或扁藻(*Platymonas subcordiformis*)4次。人工促熟约2周后挑选个体外表无损伤,性腺发育成熟的个体作为亲贝。

### 1.2 人工授精与三倍体诱导

人工解剖获取牡蛎配子,取少量精卵于载玻片上,分别在显微镜下观察卵子和精子发育情况。取出的卵子用500目筛绢进行洗卵,去除组织块,将洗好的卵子滤入500 mL烧杯中,每组实验使用一对亲本。

使用细胞松弛素 B (Cytochalasin B, 以下简称 CB; Solarbio 公司) 和 6-二甲基氨基嘌呤(6-Dimethylaminopurine, 以下简称 6-DMAP; SIGMA 公司) 进行长牡蛎壳橙品系三倍体的人工诱导。CB 诱导实验中,每一家系设计 3 个诱导处理组和 1 个对照组,受精 15 min 后,以诱导浓度为不变因素,分别持续诱导 15、20 和 25 min,诱导结束后卵子充分水洗, CB 诱导实验中水洗后,再用二甲基亚砜(DMSO)进行洗卵,实验设置 3 个重复。再以诱导持续时间为不变因素,受精 15 min 后分别加入 3 种浓度 CB (0.3、0.5 和 0.7 mg/L) 诱导剂,设置 3 组重复实验;6-DMAP 诱导实验中,每一家系设计 3 个诱导处理组和 1 个对照组,受精 15 min 后,以诱导浓度为不变因素,分别持续诱导 15、20 和 25 min,诱导结束后卵子充分水洗,实验设置 3 个重复。再以诱导持续时间为不变因素,受精 15 min 后分别加入 3 种浓度 6-DMAP (300、400 和 500  $\mu\text{mol/L}$ ) 诱导剂,同样设置 3 组重复实验。所有实验均在盐度 30,水温(26 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下完成。

受精 24 h 后进行选优,并开始投喂饵料,每日 3 次,开口饵料选择球等鞭金藻,约一周后投喂扁藻,并根据幼虫数量控制饵料浓度,每天换水,持续充氧。统计各个实验组的孵化率和 D 形幼虫畸形率,通过流式细胞仪检测幼虫倍性,具体过程参考 Eudeline<sup>[15]</sup>的方法。每隔 3 d 取一次样品,计算幼虫成活率和幼虫生长情况。

### 1.3 数据分析

实验数据采用 SPSS21.0 软件进行单因子方差分析,结合 LSD 多重比较分析 CB 和 6-DMAP 诱导实验中三倍体率、孵化率、D 形幼虫畸形率的组间差异以及生长和存活差异,显著性水平设为  $P < 0.05$ 。

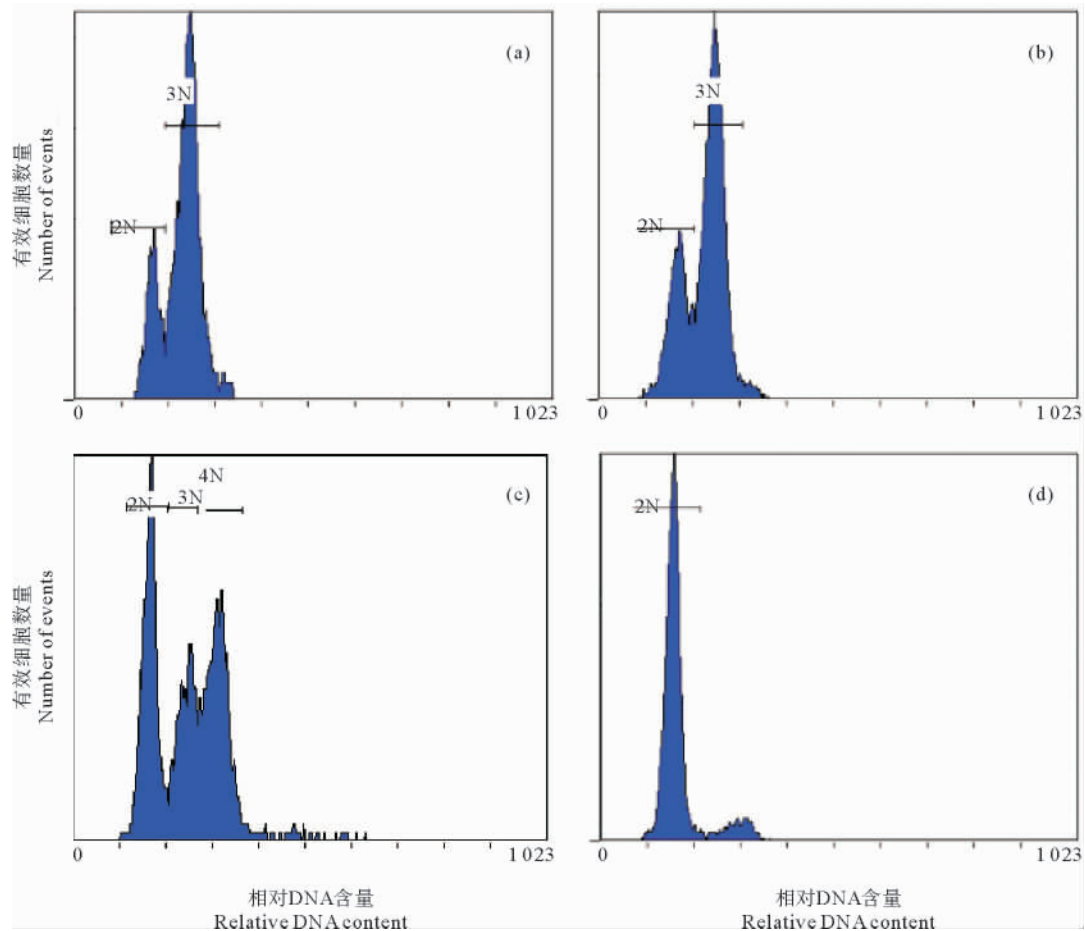
## 2 结果

### 2.1 幼虫倍性分析

通过对担轮幼虫进行倍性分析,对照组幼虫仅在二倍体处表现峰值(见图 2(d)),不同诱导方法虽然诱导率不同,但都在三倍体处表现出峰值(见图 2(a)~(c))。CB 诱导组的三倍体率为(60.90 $\pm$ 4.85)%,6-DMAP 诱导组的三倍体率为(53.56 $\pm$ 6.84)%(见图 3)。

### 2.2 CB 诱导条件对长牡蛎壳橙品系孵化率和 D 形幼虫畸形率的影响

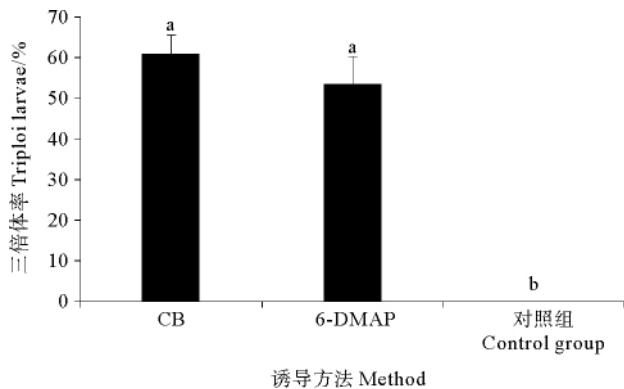
受精后 15 min, CB 诱导浓度为 0.5 mg/L,分别持续诱导 15、20 和 25 min,孵化率分别为 43.25%、36.31%和 32.27%。诱导时间 15 min 的孵化率显著高于其他 2 个诱导时间的孵化率( $P < 0.05$ )。3 个诱导时间下的 D 形幼虫畸形率分别为 7.11%、11.07%和 14.33%,存在显著性差异( $P < 0.05$ )。受精后 15 min,



((a)CB 诱导;(b) 6-DMAP 诱导;(c) 多倍体情况;(d) 二倍体对照组。(a)CB induction;(b) 6-DMAP induction;(c)polyploidy;(d) diploid control.)

图2 不同三倍体诱导方法下长牡蛎壳橙品系倍性分析

Fig.2 The ploidy analysis of orange-shell line of *C. gigas* treated with different triploid induction methods



(图中字母完全不同表示差异显著,  $P < 0.05$ , 下同。The letters in the Fig.3 are completely different, indicating significant difference,  $P < 0.05$ , the following notes are the same as Fig.3)

图3 不同诱导方法对长牡蛎壳橙品系三倍体率的影响

Fig.3 Effects of different induction methods on triploid rate of orange-shell line of *C. gigas* and control group

持续诱导时间控制 15 min, CB 诱导浓度分别为 0.3、0.5 和 0.7 mg/L 时, 孵化率分别为 48.65%、41.83% 和 37.91%, D形幼虫畸形率分别为 7.47%、8.80% 和

10.61%。0.7 mg/L 诱导组的 D形幼虫畸形率与其他 2 组 D形幼虫畸形率差异显著 ( $P < 0.05$ ), 0.3 mg/L 诱导组和 0.5 mg/L 诱导组 D形幼虫畸形率差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (见表 1)。

### 2.3 6-DMAP 诱导条件对长牡蛎壳橙品系孵化率和 D形幼虫畸形率的影响

受精后 15 min, 6-DMAP 诱导浓度为 300  $\mu\text{mol/L}$ , 分别持续诱导 15、20 和 25 min 时, 孵化率分别为 43.86%、29.06% 和 20.25%, 各组之间存在差异性显著 ( $P < 0.05$ )。3 个诱导时间下的 D形幼虫畸形率为 5.91%、6.42% 和 7.31%, 15 min 诱导组 D形幼虫畸形率与 20 min 诱导组差异不显著, 与 25 min 诱导组差异显著 ( $P < 0.05$ )。受精后 15 min, 持续诱导时间控制为 15 min, 6-DMAP 诱导浓度分别为 300、400 和 500  $\mu\text{mol/L}$  时, 孵化率分别为 35.50%、33.38% 和 20.88%, D形幼虫畸形率分别为 9.88%、9.08% 和 7.97%。500  $\mu\text{mol/L}$  诱导浓度组的孵化率和 D形幼虫畸形率与其他 2 组差异性显著 ( $P < 0.05$ ), 其他 2 组之间差异不显著 (见表 2)。

表 1 不同 CB 浓度和诱导持续时间对长牡蛎壳橙品系三倍体率、孵化率和 D 形幼虫畸形率的影响

Table 1 Effect of different CB concentrations and induction duration on triploid rate, hatching rate and abnormal rate of D larvae of orange-shell line of *C. gigas*

CB 浓度 <sup>①</sup> /mg/L	诱导时间 <sup>②</sup> /min	持续诱导时间 <sup>③</sup> /min	三倍体率 <sup>④</sup> /%	孵化率 <sup>⑤</sup> /%	D 形幼虫畸形率 <sup>⑥</sup> /%
0.5	15	15	54.51±3.03 <sup>a</sup>	43.25±0.52 <sup>a</sup>	7.11±1.21 <sup>a</sup>
0.5	15	20	62.88±1.48 <sup>ab</sup>	36.31±0.23 <sup>b</sup>	11.07±0.59 <sup>ab</sup>
0.5	15	25	71.07±1.42 <sup>b</sup>	32.27±2.44 <sup>b</sup>	14.33±1.60 <sup>b</sup>
0	—	—	0	75.33±14.90	5.20±1.87
0.3	15	20	43.63±3.05 <sup>a</sup>	48.65±3.13 <sup>a</sup>	7.47±0.25 <sup>a</sup>
0.5	15	20	63.95±0.99 <sup>b</sup>	41.83±1.51 <sup>ab</sup>	8.80±0.49 <sup>a</sup>
0.7	15	20	68.62±0.68 <sup>b</sup>	37.91±0.13 <sup>b</sup>	10.61±0.33 <sup>b</sup>
0	—	—	0	77.50±4.40	4.86±0.51

注:对照组为二倍体组,同一列内不同上标表示差异显著( $P<0.05$ ),下同。

Notes: the control group is diploid group, the different letter in each line indicates significant difference ( $P<0.05$ ), the same below.

①CB concentration; ②Induction time; ③Induction duration; ④Triploid rate; ⑤Hatching rate; ⑥Abnormal rate of D larvae.

表 2 不同 6-DMAP 浓度和诱导持续时间对长牡蛎壳橙品系三倍体率、孵化率和 D 形幼虫畸形率的影响

Table 2 Effect of different CB concentrations and induction duration on triploid rate, hatching rate and abnormal rate of D larvae of orange-shell line of *C. gigas*

6-DMAP <sup>①</sup> /μmol·L <sup>-1</sup>	诱导时间 <sup>②</sup> /min	持续诱导时间 <sup>③</sup> /min	三倍体率 <sup>④</sup> /%	孵化率 <sup>⑤</sup> /%	D 形幼虫畸形率 <sup>⑥</sup> /%
300	15	15	64.05±1.63 <sup>a</sup>	43.86±1.30 <sup>a</sup>	5.91±0.28 <sup>a</sup>
300	15	20	41.05±5.70 <sup>b</sup>	29.06±2.31 <sup>b</sup>	6.42±0.33 <sup>a</sup>
300	15	25	20.63±2.93 <sup>c</sup>	20.25±0.86 <sup>c</sup>	7.31±0.10 <sup>b</sup>
0	—	—	0	84.81±0.15	3.31±0.17
300	15	15	63.41±2.63 <sup>a</sup>	35.50±0.90 <sup>a</sup>	9.88±0.25 <sup>a</sup>
400	15	15	56.72±0.71 <sup>ab</sup>	33.38±0.25 <sup>a</sup>	9.08±0.23 <sup>a</sup>
500	15	15	52.25±0.77 <sup>b</sup>	20.88±0.29 <sup>b</sup>	7.97±0.23 <sup>b</sup>
0	—	—	0	82.56±2.04	6.31±0.70

Notes: ①CB concentration; ②Induction time; ③Induction duration; ④Triploid rate; ⑤Hatching rate; ⑥Abnormal rate of D larvae.

2.4 三倍体诱导对长牡蛎壳橙品系生长和存活的影响  
利用 CB 和 6-DMAP 两种方法进行三倍体诱导的

幼虫生长情况如图 4 所示。第一天诱导组 D 形幼虫壳高高于对照组,但不存在显著性差异。从第 3 天开始,

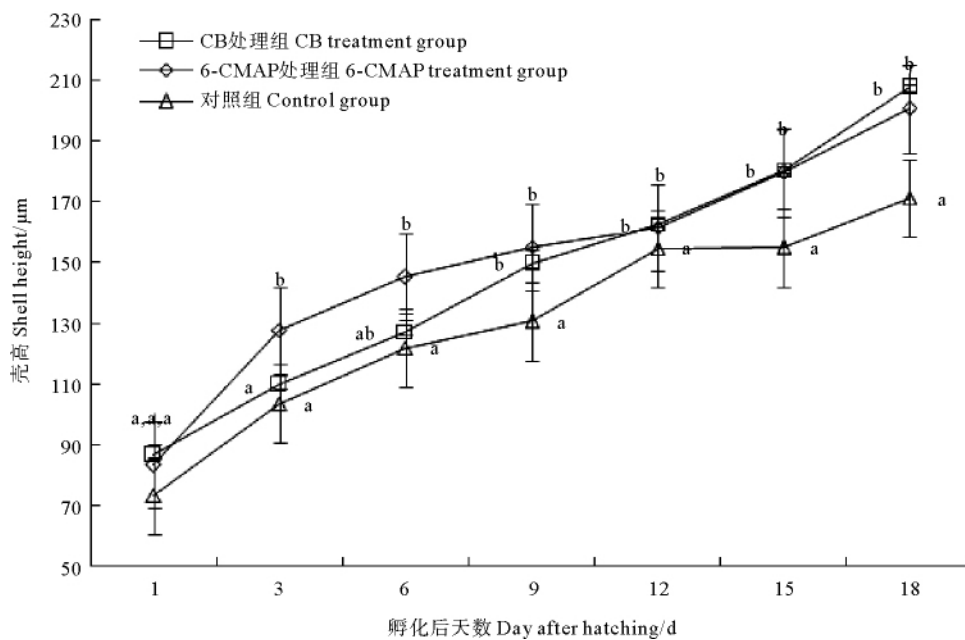


图 4 不同三倍体诱导方法对长牡蛎壳橙品系幼虫生长的影响

Fig.4 Effects of different triploid induction methods on the larvae growth of orange-shell line of *C. gigas*

6-DMAP 诱导组的幼虫壳高显著高于对照组 ( $P < 0.05$ );从第 9 天开始, CB 诱导组的幼虫壳高显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。6-DMAP 诱导组的幼虫壳高在第 12 天以前大于 CB 诱导组幼虫壳高, 且在第 3 天有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 但从第 12 天以后, CB 诱导下的幼虫壳高大于 6-DMAP 诱导组壳高, 但没有显著性差异。在第 18 天 CB 组诱导组幼虫壳高达到最大值  $207.7 \mu\text{m}$ 。CB 诱导组与 6-DMAP 诱导组之间平均日增长量差异不大, 分别为  $(15.83 \pm 1.44) \mu\text{m}$  和  $(15.30 \pm 0.48) \mu\text{m}$ ; 对照组平均日增长量为  $(12.10 \pm 0.42) \mu\text{m}$ , 与诱导组之间差异性显著 ( $P < 0.05$ ) (见图 5)。

对照组幼虫存活率在第 3、6、15 和 18 天分别为 87.2%、61.8%、7.5% 和 6.5%, 显著高于 2 个诱导组 ( $P < 0.05$ ), 在第 9 和 12 天分别为 38.2% 和 13.0%, 高于 2 个诱导组但不显著 ( $P > 0.05$ )。CB 诱导组在第 3、6 和 9 天的存活率分别 54.0%、35.7% 和 22.9%, 高于 6-DMAP 诱导组存活率 (32.8%、25.6% 和 22.9%), 但没有显著性差异。6-DMAP 诱导组在第

12、15 和 18 天的存活率分别为 8.8%、3.2% 和 1.7%, 高于 CB 诱导组存活率 (5.8%、2.9% 和 1.4%), 但没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (见图 6)。

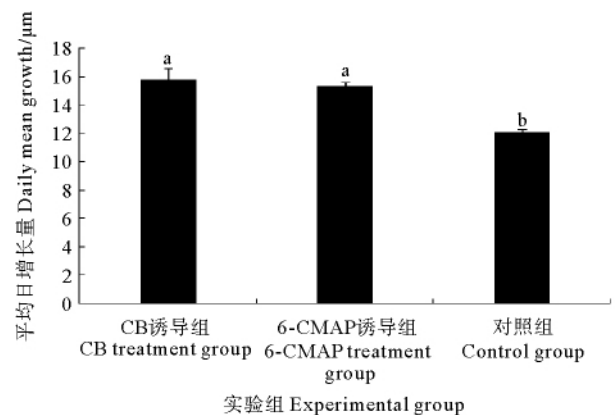


图5 不同方法诱导组和对照组长牡蛎壳橙品系幼虫壳高的平均日增长量  
Fig.5 The daily mean shell height growth of orange-shell line of *C. gigas* larvae at different induction and the control groups

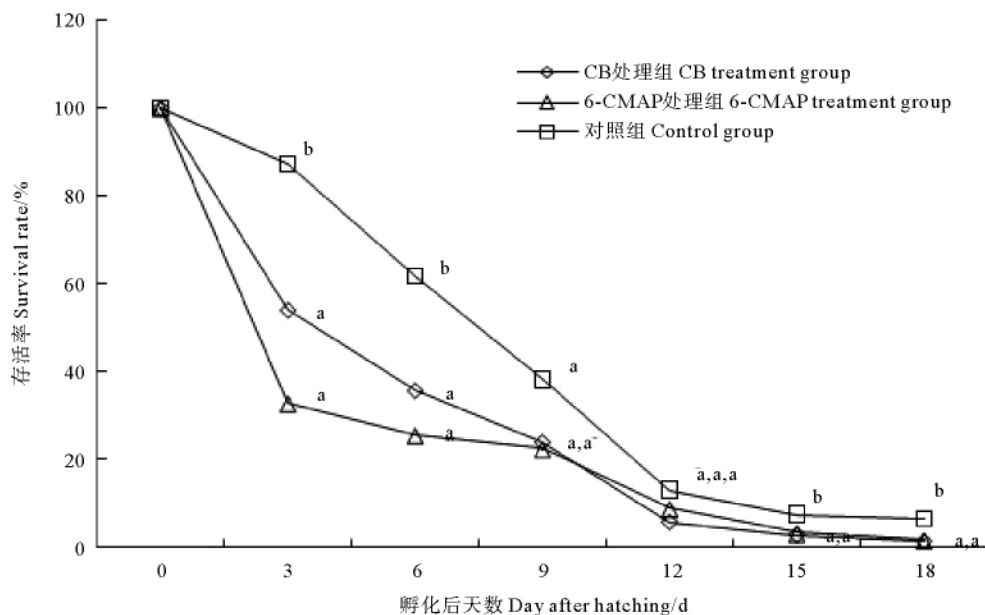


图6 不同三倍体诱导方法对长牡蛎壳橙品系幼虫存活率影响

Fig.6 Effects of different triploid induction methods on the larvae survival rate of orange-shell line of *C. gigas*

### 3 讨论

#### 3.1 不同诱导方法诱导长牡蛎壳橙品系三倍体率

三倍体率是检验三倍体诱导是否成功的首要因素。现阶段除了采用生物方法利用四倍体与二倍体杂交获得 100% 的三倍体牡蛎外<sup>[10]</sup>, 其他方法很难直接诱导获得 100% 的三倍体牡蛎。本研究采用的 CB、6-DMAP 诱导方法, 均属于化学诱导方法, 得到了较高且稳定的三倍体率, 达到了其他诱导试验中三倍体率的水平<sup>[16-18]</sup>。不同诱导品种和不同人为操作都会对诱

导率产生影响, 在本研究诱导长牡蛎壳橙品系三倍体的过程中, CB 作为诱导剂时, 最佳条件为受精后 15 min, CB 浓度 0.5 mg/L, 并持续诱导 25 min, 获得了 70% 以上的三倍体率; 6-DMAP 作为诱导剂时, 最佳条件为受精后 15 min, 6-DMAP 浓度 300  $\mu\text{mol/L}$ , 持续诱导 15 min, 获得 60% 以上的三倍体率。在物理方法研究过程中, 孔静等<sup>[19]</sup>通过低渗方法诱导长牡蛎三倍体取得了较好效果, 本实验过程中也曾尝试过高低盐度诱导长牡蛎壳橙品系三倍体的实验, 但由于得到的倍性不高, 未将该实验结果放入文中。分析原因可

能是高盐和低盐处理虽然能够诱导长牡蛎三倍体,但是在较低和较高盐度下,长牡蛎会有少数的受精卵发育不正常,出现细胞分裂畸形、卵膜皱缩、卵膜破裂等情况,从而导致发育畸形而死亡,得不到较高三倍体率<sup>[20]</sup>。因此,结合研究结果,选择最优方法,控制诱导剂浓度,严格把控开始诱导时间是获得高三倍体率的关键。此外,精卵发育好坏、精卵数量多少等方面的配子质量问题也会影响胚胎发育,进而降低三倍体率<sup>[21]</sup>。在本研究过程中出现过由于配子质量问题导致的倍性低、幼虫发育畸形死亡的现象,所以在今后诱导过程中,应挑选性腺饱满且发育良好的个体作为亲贝来解决精卵质量问题。卵子发育同步性作为获得较高诱导三倍体率的基本要求,一直受到研究人员的关注<sup>[22]</sup>。本研究中采用来自同一家系的亲贝进行诱导处理,提高了配子发育同步性,减少了配子发育不同步引起的倍性混乱,同时有利于诱导起始时间的控制,有效提高诱导效率。

采用化学诱导方法是目前诱导牡蛎多倍体技术中较为常见的途径,曾志南<sup>[23]</sup>采用 CB 诱导僧帽牡蛎,后代三倍体率达到了 87.5%。Scarpa 等<sup>[24]</sup>采用 6-DMAP 诱导美洲牡蛎得到 15% 的三倍体后代。在本研究采用的 CB 和 6-DMAP 两种诱导方法中,分别将诱导剂浓度和持续诱导时间作为单一变量,对各个诱导条件下的三倍体率、孵化率、D 形幼虫畸形率进行了测定与分析。在 CB 诱导过程中,随着 CB 诱导浓度和持续诱导时间的增加,三倍体率提高,孵化率降低,D 形幼虫畸形率也增加,这与秦艳平等研究结论相似<sup>[25]</sup>,说明 CB 诱导剂在获得高三倍体率方面存在优势,但同时其毒性也会对幼虫孵化及发育产生影响,尽管在诱导过程中多次洗卵,CB 诱导剂的毒性仍会影响牡蛎胚胎发育造成死亡。在 6-DMAP 诱导过程中,随着诱导浓度和持续诱导时间的增加,三倍体率和孵化率降低,D 形幼虫畸形率增加,与田传远等<sup>[26]</sup>研究结果不同。田传远等<sup>[26]</sup>认为在一定有效范围内,较高浓度 6-DMAP 虽然会让幼虫孵化率降低,D 形幼虫畸形率提高,但也会相应提高三倍体率。分析原因可能是虽然实验材料同为长牡蛎,但本研究使用的长牡蛎壳橙品系遗传多样性较低,存在适应能力上的劣势,导致诱导剂浓度和诱导时间的增加并不会提高其三倍体率。

本研究在对长牡蛎壳橙品系进行三倍体诱导,并进行为期 18 天的幼虫培育中发现,诱导处理能显著提高长牡蛎壳橙品系幼虫的生长,诱导组幼虫的生长速度明显高于对照组,这与杨爱国在栉孔扇贝研究中的结果相似<sup>[27]</sup>,说明通过三倍体诱导牡蛎在幼虫期就表现出了生长优势。在幼虫存活方面,三倍体诱导后的长牡蛎壳橙品系幼虫存活率低于对照组,其原因可能

是因为 CB 和 6-DMAP 均属于化学诱导剂,有一定毒性,对胚胎发育的毒害作用很强。研究证明经过 CB 处理过的受精卵,其胚胎孵化率和以后幼虫成活率都明显低于二倍体对照组<sup>[28]</sup>,即使在诱导过程中对其进行反复洗卵,也难免会有药物残留而从对幼虫发育产生影响。而 6-DMAP 虽然毒性较弱,但在诱导过程中未对 6-DMAP 诱导组的幼虫进行洗卵,导致在培育初期 6-DMAP 诱导组的幼虫死亡率明显高于 CB 诱导组和对照组。另外,虽然诱导三倍体主要是抑制第二极体的释放,但由于受精卵发育的不同步性,会有一部分发育迟缓的受精卵管在第一极体产生的时候就被抑制,而抑制第一极体会导致减数分裂紊乱产生大量异倍体,异倍体在幼虫培育期间的死亡也是造成诱导组死亡率提高的原因之一<sup>[29-31]</sup>。

#### 4 结语

本研究探讨了 CB、6-DMAP 两种不同诱导方法对长牡蛎壳橙品系三倍体率的影响,查明了长牡蛎壳橙品系三倍体的适宜诱导条件,诱导后的三倍体长牡蛎壳橙品系生长速度得到了改善,研究结果将为长牡蛎壳橙品系的遗传改良提供参考资料。

#### 参考文献:

- [1] Piferrer F, Beaumont A, Falguiere 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.
- [2] Gervai J, Pater S, Nagy A, et al. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. Journal of Fish Biology, 1980, 17(6): 667-671.
- [3] Allen S K, Stanley J G. Polyploid mosaics induced by cytochalasin B in landlocked atlantic salmon *Salmo salar* [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1979, 108(5): 462-466.
- [4] Chourrout D. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics[J]. Aquaculture, 1984, 36(1-2): 111-126.
- [5] Stanley J G, Allen S K, Hidu H. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B[J]. Aquaculture, 1981, 23(1-4): 1-10.
- [6] Tabarini C L. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effects on growth and gametogenesis[J]. Aquaculture, 1984, 42(2): 151-160.
- [7] Dufy C, Diter A. Polyploidy in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. I-Chemical induction and larval performances of triploids[J]. Aquatic Living Resources, 1990, 3(1): 55-60.
- [8] Arai K, Wilkins N P. Chromosomes of *Haliotis tuberculata* L.[J]. Aquaculture, 1986, 58(3-4): 305-308.
- [9] Shen Y, Zhang X, He H, et al. Triploidy induction by hydrostatic pressure in the pearl oyster, *Pinctada martensii* Dunker[J]. Aquaculture, 1993, 110(3-4): 221-227.
- [10] Guo X, Debrosse G A, Allen S K. All-triploid Pacific oysters

- (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids[J]. *Aquaculture*, 1996, 142(3-4): 149-161.
- [11] 宁岳, 郭香, 曾志南, 等. 牡蛎育种研究进展[J]. 厦门大学学报, 2016, 55(5): 624-636.  
Ning Yue, Guo Xiang, Zeng Zhinan, et al. Progress on oyster breeding[J]. *Journal of Xiamen University*, 2016, 55(5): 624-636.
- [12] Guo X, Allen S K. Sex determination and polyploid gigantism in the Dwarf Surfclam (*Mulinia Lateralis* Say)[J]. *Genetics*, 1994, 138(4): 1199-1206.
- [13] 韩自强, 李琪. 长牡蛎壳橙品系形态性状与体质量的相关及通径分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2017, 47(12): 46-52.  
Han Ziqiang, Li Qi. Multiple regression and path analysis of morphological and weight traits of Pacific oyster(*Crassostrea gigas*) orange-shell strain[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2017, 47(12): 46-52.
- [14] Han Z, Li Q. Different responses between orange variant and cultured population of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* at early life stage to temperature-salinity combinations[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(6): 2233-2239.
- [15] Eudeline B, Allen 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.
- [16] Gerard A, Ledu C, Phelipot 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.
- [17] Yamamoto S, Sugawara Y, Nomura T, et al. Induced triploidy in Pacific oyster *Crassostrea gigas*, and performance of triploid larvae[J]. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 1988, 39(1): 47-59.
- [18] Guo X, Cooper K, Hershberger W K, et al. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I. Ploidy of resultant embryos[J]. *The Biological Bulletin*, 1992, 183(3): 381-386.
- [19] 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.  
Kong Jing, Wang Zhaoping, Yu Ruihai, 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.
- [20] 刘海涛, 董占武, 徐志明. 盐度对大连湾牡蛎胚胎发育及幼虫生长的影响[J]. 水产学报, 1992, 16(1): 32-39.  
Liu Haitao, Dong Zhanwu, Xu Zhiming. The effects of salinity on embryonic development and growth of veliger of oyster *ostrea talienwhanensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(1): 32-39.
- [21] 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[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 324-328.  
Zhang Guofan, Chang Yaqing, Song Jian, et al. Comprehensive comparison between triploid oysters induced with CB and 6-DMAP[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(4): 324-328.
- [22] 李赞, 王昭萍, 王如才. 诱导三倍体太平洋牡蛎群体发育过程中三倍体率的变化[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(5): 666-672.  
Li Yun, Wang Zhaoping, Wang Rucai. Variance of triploid rate of induced Pacific oyster *Crassostrea gigas* during development[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2001, 31(5): 666-672.
- [23] 曾志南, 陈木, 林琪, 等. 僧帽牡蛎三倍体的研究[J]. 海洋通报, 1994(6): 34-40.  
Zeng Zhinan, Chen Mu, Lin Qi, et al. Triploidization of oyster *Ostrea cucullata* with cytochalasin B and temperature shock[J]. *Marine Science Bulletin*, 1994(6): 34-40.
- [24] Scarpa J, Wada K, Komaru A. Induction of tetraploidy in mussels by suppression of polar body formation[J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1993, 59(12): 2017-2023.
- [25] 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 Yanping, Zhang Yuehuan, Zhou Yingli, et al. Comparative studies on triploidy induction using CB and 6-DMAP in *Crassostrea hongkongensis* [J]. *Journal of Fisheries China*, 2017, 41(2): 250-257.
- [26] 田传远, 梁英, 王如才, 等. 6-DMAP诱导太平洋牡蛎三倍体诱导因素对孵化率和D幼畸形率的影响[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 110-112.  
Tian Chuanyuan, Liang Ying, Wang Rucai, et al. Triploid *Crassostrea gigas* induced with 6-DMAP: the influence of 3 factors on hatching rate and D-shaped larvae abnormality rate[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7(1): 110-112.
- [27] 杨爱国, 王清印, 张岩, 等. 栉孔扇贝三倍体与二倍体的生长比较[J]. 海洋科学, 2000, 24(8): 21-23.  
Yang Aiguo, Wang Qingyin, Zhang Yan, et al. Comparison of the growth characters between the triploid and diploid *Chlamys (Azumapecten) farreri* [J]. *Marine Sciences*, 2000, 24(8): 21-23.
- [28] 王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.  
Wang Rucai, Wang Zhaoping. *Science of Marine Shellfish Culture* [M]. Qingdao: Press of Ocean University of China, 2008.
- [29] de Sousa J T, Allen S K, Baker H, et al. Aneuploid progeny of the American oyster, *Crassostrea virginica*, produced by tetraploid  $\times$  diploid crosses: another example of chromosome instability in polyploid oysters[J]. *Genome*, 2016, 59(5): 327-338.
- [30] Zhang Z, Wang X, Zhang 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.
- [31] 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.

## Artificial Triploid Induction of Orange-Shell Line of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*

Yue Chao<sup>1</sup>, Li Yongguo<sup>1</sup>, Li Qi<sup>1,2</sup>

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

**Abstract:** The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is one of the most widely farmed species worldwide. A rare orange-shell variant of *C. gigas* was obtained through family and mass selections. In order to produce the triploid of orange-shell line of *C. gigas*, cytochalasin B (CB) and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) were used to inhibit polar body II of the fertilized eggs. The triploid rate, hatching rate, abnormal rate of D larvae, the growth and survival between induction groups and control groups were compared and discussed. Triploid rate between CB and 6-DMAP treatments had no significant difference, but significantly higher than salinity treatment. On the other hand, triploid, hatching and abnormal rates of D larvae were found to be significantly different among different induction conditions. The optimum condition induced by CB was 0.5 mg/L CB for 20 min 15 min post fertilization at the temperature of 25~27 °C and salinity 30. Meanwhile the optimum condition induced by 6-DMAP was 300 μmol/L treatment for 15 min 15 min post fertilization at the same temperature and salinity as those of CB treatment. Moreover, the mean daily growth of CB induction group ( $15.83 \pm 1.44$ ) μm and 6-DMAP induction group ( $15.27 \pm 0.48$ ) μm had no significant difference, but significantly higher than the control group ( $12.10 \pm 0.42$ ) μm. However, the survival rate had no significant difference between induction and control groups. The results will provide a reference for the genetic improvement of orange-shell line of *C. gigas*.

**Key words:** *Crassostrea gigas*; orange-shell line; triploid; artificial induction; grow; survival; cytochalasin B; 6-dimethylaminopurine

责任编辑 朱宝象