

doi: 10.7541/2023.2022.0044

细胞松弛素B和低盐诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的效果比较

周建民¹ 姜高伟¹ 徐成勋¹ 李永国¹ 李琪^{1,2}

(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, 青岛 266237)

摘要: 为探索细胞松弛素B(CB)和低盐抑制第一极体诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的最佳条件, 研究了CB浓度(0.2、0.4、0.6和0.8 mg/L)、低盐(6、8、10和12)及诱导持续时间(10、15、20和25min)对卵裂率、孵化率、四倍体率和诱导效率指数的影响, 并分析了幼虫生长和生存情况。结果表明, 在CB浓度为0.6 mg/L, 诱导持续时间为15min时, 四倍体率为(65.69±2.47)%, 诱导效率指数最大; 在盐度为8, 诱导持续时间为15min时, 四倍体率为(38.77±2.69)%, 诱导效率指数最大。CB和低盐诱导组前期壳高大于对照组, 后期小于对照组, CB诱导组壳高显著大于低盐诱导组($P<0.05$), CB和低盐诱导组幼虫平均日增长量分别为(14.2±1.08)和(10.49±0.60) $\mu\text{m}/\text{d}$, 均小于对照组(15.43±1.08) $\mu\text{m}/\text{d}$; 2个诱导组存活率始终低于对照组, 低盐诱导组前期存活率高于CB诱导组, 后期低于CB诱导组。综合来看, CB诱导法在四倍体率、诱导效率指数、12d存活率和生长速度等方面效果较好, 适用于诱导长牡蛎“海大3号”四倍体。

关键词: 四倍体率; 细胞松弛素B; 低盐; 诱导效率指数; 长牡蛎

中图分类号: Q172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2022)00-0001-08

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)又称太平洋牡蛎, 具有生长速度快、环境适应性强、营养丰富和肉质鲜美等特点, 是重要的世界性经济贝种。在我国, 长牡蛎自然分布于我国北方沿海地区, 是我国牡蛎养殖产业的主导种。2020年我国长牡蛎养殖产量为 132.33×10^7 kg, 养殖面积为8.04万公顷^[1]。

近年来, 我国牡蛎遗传改良工作日益受到重视, 新品种不断涌现。长牡蛎“海大3号”新品种以野生群体中左壳为黑色的个体为基础群体, 以壳黑色和生长速度为目标性状经连续六代家系与群体混合选育而成^[2]。与普通长牡蛎相比, 长牡蛎“海大3号”具有左右壳均为黑金色、生长速度快和微量元素含量高的特点, 深受养殖户和消费者喜爱。

二倍体长牡蛎在繁殖期营养物质(大部分是糖原)用于性腺发育和配子发生^[3], 导致口感下降, 产卵之后因软体部重量丧失60%以上而不能上市。而三倍体牡蛎由于性腺高度不育, 在繁殖季节仍可保持良好肉质和较高糖原水平^[4], 可实现全年上市。同

时, 三倍体不育性对保护当地生物多样性^[5]和二倍体新品种知识产权均有重要作用。目前, 三倍体牡蛎优良特质已被养殖业广泛认可, 养殖规模日益扩大。

在商业生产中三倍体牡蛎由四倍体雄性与二倍体雌性杂交获得^[6]。与诱导方法相比, 理论上杂交法可以产生100%三倍体^[7]。因此, 培育稳定的四倍体种群对于三倍体生产至关重要^[8]。Guo等^[9]通过将三倍体雌性与二倍体雄性杂交并抑制第一极体释放的方法, 首次培育出长牡蛎四倍体成贝。目前, 牡蛎多倍体诱导过程中抑制减数分裂通常采用静水压、渗透压、细胞松弛素B(CB)和6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)等物理或化学方法^[9-12]。其中CB是一种真菌分泌的生物碱, 可抑制肌动蛋白丝聚合^[13]和受精卵中极体排出, 但不影响由微管控制的染色体运动, 产生多倍体胚胎^[14]; 低盐是一种能引起受精卵内能量代谢紊乱, 影响微丝微管形成, 进而诱导贝类多倍体^[15]。不同诱导方法原理不同, 同一诱导方法对不同群体诱导效果也存在差异^[9, 16]。

收稿日期: 2022-01-26; **修订日期:** 2022-04-18

基金项目: 国家贝类产业技术体系(CARS-49); 山东省农业良种工程项目(2020LZGC016) 资助 [Supported by the China Agriculture Research System Project (CARS-49); the Earmarked Fund for Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2020LZGC016)]

作者简介: 周建民(1996—), 男, 硕士研究生; 主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: jianminzhou163@163.com

通信作者: 李琪, E-mail: qili66@ouc.edu.cn

因此, 养殖新品种四倍体的人工诱导需要对诱导条件进行优化。

本研究以长牡蛎“海大3号”三倍体和二倍体为素材, 探讨了CB和低盐诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的最佳条件, 并进一步分析了两种诱导方法对幼虫生长与生存的影响, 旨在为长牡蛎“海大3号”四倍体培育提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2021年5月1龄长牡蛎“海大3号”二倍体和三倍体亲贝取自山东省乳山市海区, 其中长牡蛎“海大3号”三倍体群体为2020年6月由长牡蛎“海大3号”二倍体经CB抑制第二极体而得。亲贝转移至烟台莱州育苗场进行人工催熟, 实验前所有亲贝使用流式细胞仪确定倍性(图 1A和1B)。

1.2 实验设计

实验通过长牡蛎“海大3号”三倍体雌性与长牡

蛎“海大3号”二倍体雄性交配, 使用细胞松弛素B或低盐抑制第一极体诱导四倍体。CB诱导实验采用单因素实验方案确定最佳诱导浓度和持续时间。在最佳CB浓度诱导实验中, 将卵子密度调整为 5×10^7 egg/L, 分成4个实验组, 同时进行授精, 在首次观察到受精卵出现排出第一极体时, 采用4个CB浓度梯度(0.2、0.4、0.6和0.8 mg/L)分别处理15min, 在处理结束后, 使用1 mL/L二甲亚砜(DMSO)清洗残留的CB; 在最佳诱导持续时间实验中, 采用CB浓度为0.6 mg/L的海水分别处理10、15、20和25min。低盐诱导设置4个盐度梯度(6、8、10和12), 在首次观察到受精卵出现排出第一极体时分别处理15min; 在最佳低盐诱导持续时间实验中, 采用盐度为8的海水分别处理10、15、20和25min。实验在温度为 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 和盐度为 29 ± 1 条件下进行, 每个实验组均设置3次重复。

1.3 幼虫培育

授精24h后, 使用300目筛绢进行幼虫选优, 转

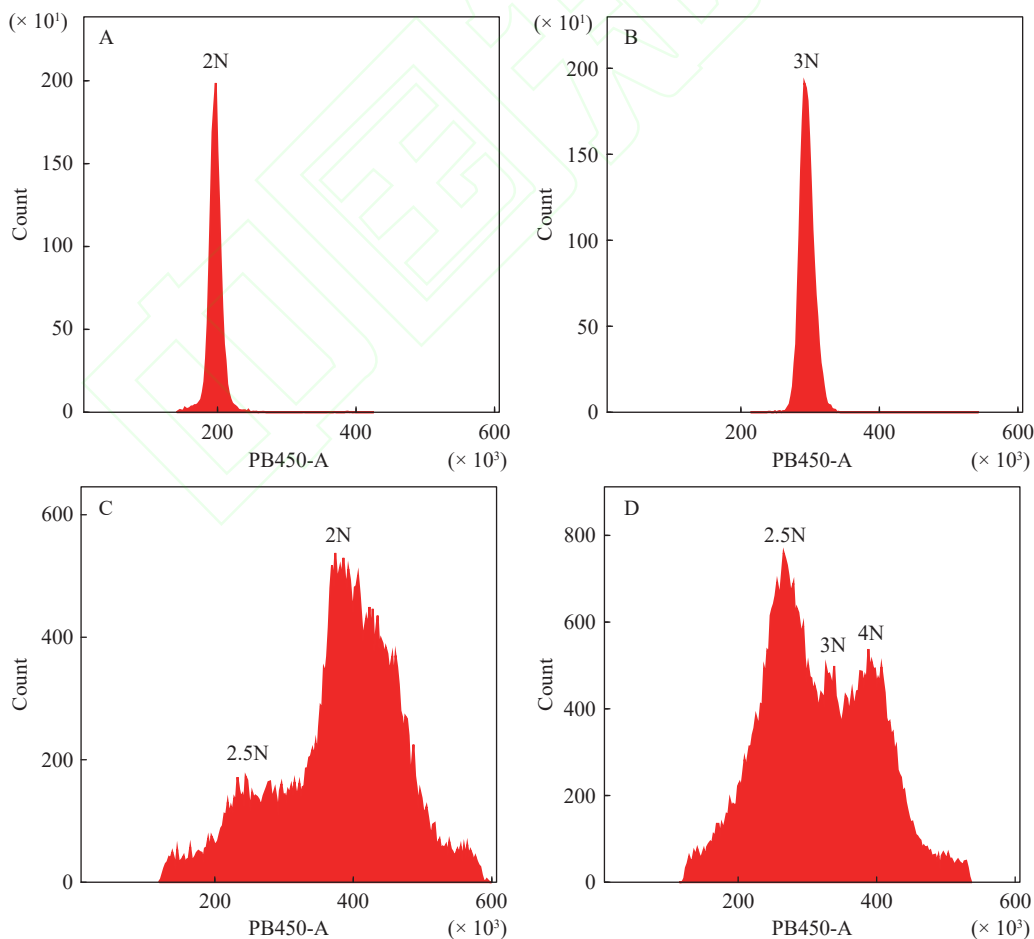


图1 流式细胞仪检测亲贝及各组幼虫DNA相对含量和倍性

Fig. 1 Relative DNA content and ploidy level of parents and each experimental group by the flow cytometry

A. 二倍体亲贝; B. 三倍体亲贝; C. CB诱导组; D. 低盐诱导组

A. Diploid oyster; B. Triploid oyster; C. CB group; D. Low salinity group

移至70 L聚乙烯塑料桶中进一步培育, 控制幼虫密度为 1×10^4 ind./L。壳顶幼虫前期每日投喂3次球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*), 后期适量添加扁藻(*Platymonas subcordigoramis*), 日换水量为总体积的三分之一, 水温保持在 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

1.4 数据测量及统计分析

对授精后4h、2d、4d、6d、8d、10d和12d的幼虫进行取样, 使用光学显微镜测定幼虫壳高。卵裂率为授精后4h卵裂数与总卵数的百分比, 孵化率为D形幼虫数与受精卵的百分比, 存活率为单位体积内幼虫数与选优后初始幼虫数的百分比, 诱导效率指数是指幼虫四倍体率与孵化率的乘积^[17]。

使用流式细胞仪分析幼虫倍性。收集各组D形幼虫到1.5 mL离心管中, 用1.5 mL注射器抽打3—6次制成细胞悬液, 经过500目筛绢过滤至75%酒精固定。使用1 mL DAPI ($2 \mu\text{g/mL}$)溶液置换75%酒精, 随后用流式细胞仪测定本各组诱导率, 以对照组幼虫在流式细胞仪上所测出的峰值作为2n峰所在位置。

实验数据均用平均值 \pm 标准差所表示, 采用SPSS 25.0软件对生长和存活数据进行单因素方差分析(ANOVA)及邓肯(Duncan)多重比较分析, 显著性水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同CB浓度和盐度对长牡蛎“海大3号”四倍体率的影响

在CB诱导组中, 随着CB浓度增加, 长牡蛎“海大3号”幼虫的卵裂率、孵化率逐渐减小, 四倍体率

和诱导效率指数先增大后减小。在CB浓度为 0.6 mg/L 时, 诱导组四倍体率为 $(69.02 \pm 2.94)\%$ (图 1C), 诱导效率指数(0.351)最大, 且与 0.4 和 0.8 mg/L 诱导组在这两个指标上均有显著性差异($P < 0.05$; 图 2A)。由此可以确定CB诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的最佳诱导浓度为 0.6 mg/L 。

在低盐诱导组中, 随着盐度增大, 长牡蛎“海大3号”卵裂率、孵化率逐渐增大, 四倍体率和诱导效率指数先增大后减小。在盐度为8时, 诱导组四倍体率为 $(39.10 \pm 2.03)\%$ (图 1D), 诱导效率指数(0.227)最大, 与盐度为6的诱导组在四倍体率无显著性差异($P > 0.05$), 但诱导效率指数有显著性差异($P < 0.05$; 图 2B), 与诱导盐度为10的诱导组在这两个指标上均有显著性差异($P < 0.05$)。由此可以确定低盐诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的最佳诱导盐度为8。

2.2 不同处理时间对长牡蛎“海大3号”四倍体率的影响

在CB诱导组中, 随诱导持续时间延长, 长牡蛎“海大3号”卵裂率、孵化率逐渐减小, 四倍体率和诱导效率指数先增大后减小。在诱导持续时间为15min时, 其四倍体率为 $(65.69 \pm 2.47)\%$, 诱导效率指数(0.363)最大, 与诱导持续时间为10min的诱导组在四倍体率有显著性差异($P < 0.05$), 在诱导效率指数无显著性差异($P > 0.05$), 与诱导持续时间为20min的诱导组在这两个指标上均有显著性差异($P < 0.05$; 图 3A)。由此可以确定CB诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的最佳持续时间为15min。

在低盐诱导组中, 随诱导持续时间延长, 其卵裂率、孵化率逐渐减小, 四倍体率和诱导效率指数

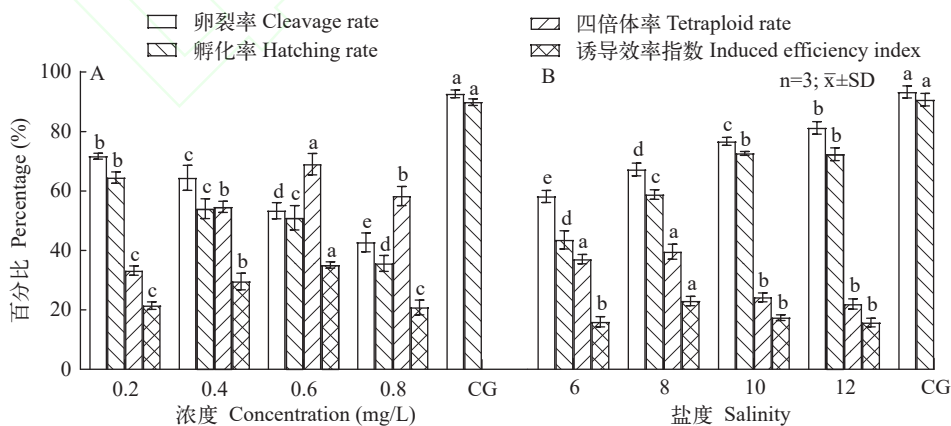


图 2 不同CB浓度和盐度对长牡蛎“海大3号”四倍体的诱导效果

Fig. 2 Effects of different CB concentrations and salinities on tetraploid induction of the Pacific oyster “Haida No. 3”

A. CB诱导组; B. 低盐诱导组; CG. 对照组; 同一指标具有相同字母表示组间差异不显著($P > 0.05$), 具有不同字母表示组间存在显著差异($P < 0.05$), 下同

A. CB group; B. Low salinity group; CG. control group. The same indicator with the same letter means that the difference between groups is not significant ($P > 0.05$), and with different letters means that there is a significant difference between groups ($P < 0.05$). The same applies below

先增大后减小。在持续时间为15min时,诱导组四倍体率为(38.77±2.69)%,诱导效率指数(0.233)最大,且与诱导持续时间为10min的诱导组在四倍体率有显著性差异($P<0.05$),在诱导效率指数无显著性差异($P>0.05$),与诱导持续时间为20min的诱导组在四倍体率无显著性差异($P>0.05$),在诱导效率指数有显著性差异($P<0.05$;图3B)。由此可以确定低盐诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的最佳持续时间为15min。

2.3 不同诱导方法对长牡蛎“海大3号”幼虫生长和存活的影响

在幼虫生长方面, CB和低盐诱导组前期壳高大于对照组,后期小于对照组, CB诱导组壳高显著大于低盐诱导组($P<0.05$)。培育至12日龄, CB诱导组幼虫壳高为(170.39±12.99) μm , 低盐诱导组为(125.86±7.2) μm , 对照组为(185.20±12.9) μm 。2日龄CB与低盐诱导组幼虫壳高显著大于对照组($P<0.05$); 4日龄CB诱导组幼虫壳高显著大于低盐诱导组和对照组($P<0.05$), 低盐诱导组大于对照组但无显著性差异($P>0.05$); 6日龄对照组幼虫壳高大于CB和低盐诱导组, 与CB诱导组无显著性差异($P>0.05$), 与低盐诱导组有显著性差异($P<0.05$), CB诱导组显著大于低盐诱导组($P<0.05$); 8日龄和10日龄幼虫壳高为对照组>CB诱导组>低盐诱导组, 各组间差异明显($P<0.05$); 12日龄CB诱导组和对照组壳高均显著大于低盐诱导组($P<0.05$), 对照组大于CB诱导组但无显著性差异($P>0.05$;图4)。

在幼虫存活方面, 2个诱导组存活率始终低于对照组, 低盐诱导组前期存活率高于CB诱导组, 后期低于CB诱导组。培育至12日龄, CB诱导组幼虫

存活率为(12.35±5.02)%, 低盐诱导组为(3.74±1.62)%, 对照组为(29.00±6.48)%。2日龄幼虫存活率为对照组>低盐诱导组>CB诱导组, 各组间差异明显($P<0.05$); 4—6日龄低盐诱导组发生了大规模死亡, 6日龄存活率低于CB诱导组, 但无显著性差异($P>0.05$), 低盐和CB诱导组存活率显著低于对照组($P<0.05$); 8—12日龄, 幼虫存活率为对照组>CB诱导组>低盐诱导组, 各组间差异显著($P<0.05$;图5)。

2.4 两种四倍体诱导方法应用效果的综合比较

通过对两种诱导方法产生长牡蛎“海大3号”四倍体的效果比较可见, 低盐诱导方法具有更高的卵裂率和孵化率, 其对环境 and 操作人员无毒害作用, 诱导成本极低, 操作简单, 具有诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的潜力。但CB诱导法在四倍体率、诱导效率指数、12d存活率和生长速度等方面展现出了更好效果, 这些优点都使CB比低盐更加适用于诱导长牡蛎“海大3号”四倍体(表1)。

3 讨论

3.1 两种诱导方法抑制第一极体排放诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的影响因子

自1981年Stanley等^[18]用CB成功诱导美洲牡蛎三倍体以来, 牡蛎多倍体育种技术已成为广泛认可的育种手段。目前已经开发了多种牡蛎四倍体诱导方法, 其中CB仍为一种有效的诱导剂^[9, 16, 19]。在本研究中, 诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的最佳CB浓度为0.6 mg/L, 此时诱导组幼虫四倍体率和诱导效率指数最大, 具有较好诱导效果。研究表明, CB浓度偏低, 药物浓度不能有效抑制第一极体(PB1)释放, 导致诱导效率指数较低; 而CB浓度偏

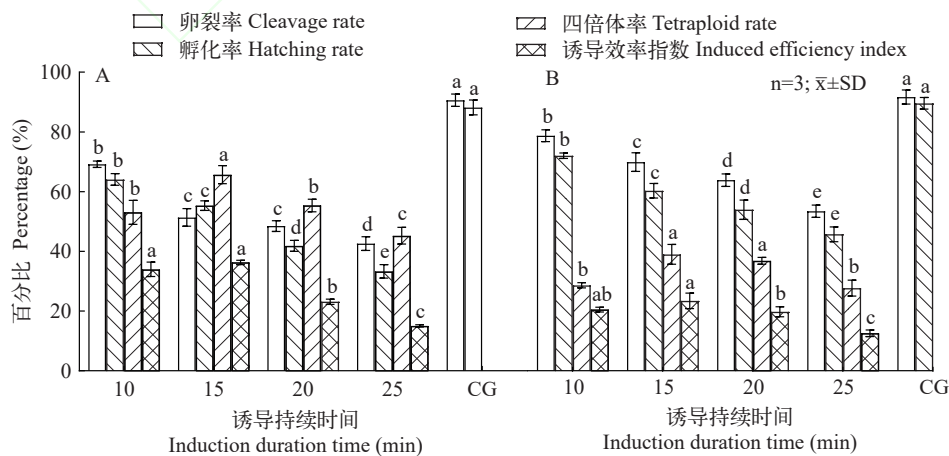


图3 不同持续时间下2种诱导方法对长牡蛎“海大3号”四倍体的诱导效果

Fig. 3 Effects of two induction methods on tetraploid induction of the Pacific oyster “Haida No. 3” at different durations

CG. 对照组; A. CB诱导组; B. 低盐诱导组

CG. control group; A. CB group; B. Low salinity group

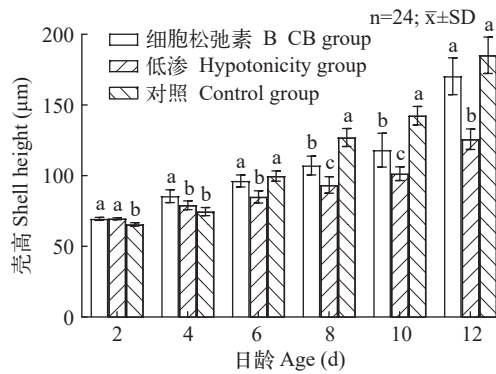


图4 两种四倍体诱导方法对长牡蛎“海大3号”幼虫生长的影响
Fig. 4 Effects of two tetraploid induction methods on the larvae growth of the Pacific oyster “Haida No. 3”

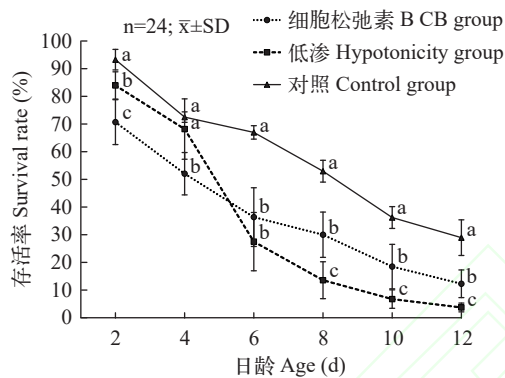


图5 两种四倍体诱导方法对长牡蛎“海大3号”幼虫存活率的影响
Fig. 5 Effects of two tetraploid induction methods on the larvae survival rate of the Pacific oyster “Haida No. 3”

表1 两种四倍体诱导方法应用效果的综合比较

Tab. 1 A comprehensive comparison of the effects of the application for two tetraploid induction methods

诱导方法 Induction method	CB	低盐 Low salinity
毒性 Toxicity	强	无
可操作性 Operability	复杂	简单
卵裂率 Cleavage rate (%)	40.60~71.69	53.16~80.31
孵化率 Hatching rate (%)	33.30~64.51	43.06~71.83
四倍体率 Tetraploid rate (%)	33.23~69.02	27.54~39.10
诱导效率指数 The efficiency of tetraploid induction	0.150~0.363	0.125~0.233
12d存活率 12-day survival rate (%)	12.35±5.02	3.74±1.62
生长速度 Growth rate (μm/d)	14.2±1.08	10.49±0.60
试剂成本 Cost (元/mg)	800	无

高, 受精卵不能正常发育, 畸形率和死亡率上升, 幼虫卵裂率和孵化率降低, 导致四倍体率下降^[9, 16, 20]。例如, Barreto等^[21]使用高浓度CB(1 mg/L)诱导扇贝(*Argopecten nucleus*)三倍体时发现, 胚胎畸形严重, 幼虫三倍率仅为21%, 且在第9天全部死亡。而

Bruce等^[22]在使用低浓度CB(0.25 mg/L)诱导美洲牡蛎三倍体时, 三倍体率和存活率均表现最好。这表明不同物种受精卵的生理特征可能会影响诱导结果, 同时也应注意依据卵量多少适当添加或减少试剂量。

低盐诱导是最近提出的一种贝类多倍体诱导方法, 其诱导原理可能与受精卵能量代谢紊乱, 进而影响微丝微管的形成有关^[15]。在本实验中, 诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的最佳盐度为8, 此时诱导组幼虫四倍体率和诱导效率指数最大, 诱导效果较好。盐度为6和8的两个诱导组中, 四倍体率无显著性差异($P>0.05$), 但盐度为6时, 卵裂率和孵化率较低, 可能是由于低盐对部分受精卵产生不可逆的伤害。孔静等^[23]研究结果表明在盐度为8时所诱导的长牡蛎三倍体率最高, 随着低盐诱导强度下降, 卵裂率和孵化率逐渐上升, 但三倍体诱导率表现出下降趋势。

目前, 大多数研究都是抑制第一极体来诱导四倍体^[12, 16]。第一极体经药物处理抑制后, 染色体分离行为发生诸多改变, 出现“三极分离”、“联合二极分离”、“独立极分离”和“非同步分离”等一系列复杂染色体分离的行为, 其中产生四倍体主要模式为“联合二极分离”^[24]。不同三倍体雌性之间减数分裂时机具有差异, 开发一种诱导四倍体的统一模式是困难的^[25], 因此需要对诱导时机进行精准把控。在本研究中, 随诱导持续时间的延长, 两种诱导方法的卵裂率和孵化率逐渐减小, 而四倍体率和诱导效率指数先增大后减小, 均表明15min时诱导效果最好, 与之前报道类似^[23, 26]。此外, 因雌雄配子质量、配子熟化时间、父母本数量、水温、盐度、对照组极体出现比例等情况复杂多变^[27, 28], 诱导四倍体时需根据实际及时调整, 以期获得最佳诱导效果。

3.2 两种诱导方法对长牡蛎“海大3号”生长和存活的影响

结果表明, CB和低盐诱导组幼虫前期壳高大于对照组, 后期小于对照组, 而CB诱导组壳高显著大于低盐诱导组($P<0.05$)。这一结果与Richard等^[29]使用CB和6-DMAP诱导长牡蛎三倍体结果相似, 其对照组幼虫生长速度快于诱导组。Yang等^[30]使用CB诱导栉孔扇贝时也发现经过处理的幼虫发育明显迟缓和畸形明显增多。这可能是由于诱导结束后较低的细胞膜渗透性阻碍了CB排出体外, 残留CB继续干扰细胞正常分裂所致^[21]。研究发现, CB所控制的肌动蛋白丝在受精卵中负责mRNA的分布并控制其极性, 胚胎正常发育主要取决于形态发生因素(mRNA)在卵细胞中的位置, 而CB诱导肌动

蛋白丝的扰动可能改变了形态发生因子的正常分布、胚胎位置和正常分裂^[31]。Meng等^[32]用低盐诱导虾夷扇贝三倍体时发现低盐处理的虾夷扇贝三倍体表现出生长“劣势”，这与本研究低盐诱导组幼虫生长速度缓慢有相似之处，但是否因低盐处理对受精卵产生损伤从而抑制幼虫和稚贝生长，还需进一步研究。

在幼虫存活方面，CB和低盐诱导组的存活率均低于对照组，低盐诱导组前期存活率高于CB诱导组，4—6日龄低盐诱导组幼虫发生大规模死亡，存活率低于CB诱导组。可能原因有以下三点：(1)在授精后48h内诱导产生了大量的非整倍体，在第一周内发生大规模死亡^[27, 33]。(2)诱导剂处理对幼虫生理和发育的负面作用^[34]。(3)诱导的四倍体幼虫自身生存能力有限^[28]和紊乱的染色体复制影响正常基因表达^[30, 35]。

3.3 两种诱导方法中最佳诱导长牡蛎“海大3号”四倍体的方法比较

目前诱导牡蛎多倍体的方法有静水压和渗透压等物理方法^[10, 11]和CB和6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)等化学方法^[9, 12]，本研究综合比较了低盐和CB诱导法诱导“海大3号”四倍体的效果，结果显示，低盐诱导法卵裂率和孵化率较高，且成本低廉，操作简单，可大批量生产，对环境无污染；CB诱导法在四倍体率、诱导效率指数、存活率和生长速度方面有更好表现。在实际三倍体生产中，以四倍体与二倍体杂交为例，四倍体需求量不大，考虑到CB诱导法表现出存活率高、四倍体率高等优势，可能更适合于诱导长牡蛎“海大3号”四倍体。

参考文献:

- [1] Bureau of Fisheries of Ministry of Agriculture and Rural Affairs. China Fishery Statistical Yearbook 2021 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 27-53. [农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴(2021) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 27-53.]
- [2] Xu L, Li Q, Xu C, *et al.* Genetic diversity and effective population size in successive mass selected generations of black shell strain Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) based on microsatellites and mtDNA data [J]. *Aquaculture*, 2019, **500**: 338-346.
- [3] Li Q, Liu W, 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.
- [4] Allen S K Jr, 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.
- [5] 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.
- [6] Guo X, DeBrosse G A, Allen S K Jr. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids [J]. *Aquaculture*, 1996, **142**(3/4): 149-161.
- [7] Yang H, Simon N, Sturmer L N. Production and performance of triploid oysters for aquaculture [J]. *EDIS*, 2018, **2018**(4).
- [8] Miller P A, Elliott N G, Vaillancourt R E, *et al.* Genetic diversity and pedigree assignment in tetraploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) [J]. *Aquaculture*, 2014, **433**: 318-324.
- [9] Guo Ximing, Allen S K. Viable tetraploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs of triploids [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, **3**(1): 42-50.
- [10] Shen Y P, Zhang X Y, He H P, *et al.* Triploidy induction by hydrostatic pressure in the pearl oyster, *Pinctada martensii* Dunker [J]. *Aquaculture*, 1993, **110**(3/4): 221-227.
- [11] Li L W, Li H K, Yu R H, *et al.* Comparisons of three triploid induction methods in *Crassostrea sikamea* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(2): 352-359. [李玲蔚, 李海昆, 于瑞海, 等. 三种方法诱导熊本牡蛎三倍体的比较研究 [J]. *水生生物学报*, 2021, **45**(2): 352-359.]
- [12] Peachey B L, Allen S K Jr. Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for tetraploidy induction in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* [J]. *Aquaculture*, 2016, **450**: 199-205.
- [13] MacLean-Fletcher S, Pollard T D. Mechanism of action of cytochalasin B on actin [J]. *Cell*, 1980, **20**(2): 329-341.
- [14] 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.
- [15] 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**(02): 193-196. [王昭萍, 赵婷, 于瑞海, 等. 一种新方法——低渗透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**(02): 193-196.]
- [16] Eudeline B, Allen S K Jr, 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.
- [17] Zhang G F, Chang Y Q, Song J, *et al.* Comprehensive

- comparison between triploid oysters induced with CB and 6-DMAP [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, **24**(4): 324-328. [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.]
- [18] Stanley J G, Allen S K Jr, Hidu H. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B [J]. *Aquaculture*, 1981, **23**(1/2/3/4): 1-10.
- [19] McCombie H, Ledu C, Phelipot P, *et al.* A complementary method for production of tetraploid *Crassostrea gigas* using crosses between diploids and tetraploids with cytochalasin B treatments [J]. *Marine Biotechnology*, 2005, **7**(4): 318-330.
- [20] Qin Y, Noor Z, Li X, *et al.* Tetraploid induction of *Crassostrea hongkongensis* and *C. sikamea* by inhibiting the polar body 1 release in diploid fertilized eggs [J]. *Marine Life Science & Technology*, 2021, **3**(4): 463-473.
- [21] Barreto-Hernández A, Velasco L A, Winkler F M. Effect of three triploidy induction methods on the growth and survival of larvae and post-larvae of the Caribbean scallop *Argopecten nucleus* [J]. *Aquaculture Research*, 2018, **49**(4): 1578-1587.
- [22] Barber B J, Mann R, Allen S K Jr. Optimization of triploid induction for the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) [J]. *Aquaculture*, 1992, **106**(1): 21-26.
- [23] 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.]
- [24] Que H, Guo X, Zhang F, *et al.* Chromosome segregation in fertilized eggs from triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), following inhibition of polar body I [J]. *The Biological Bulletin*, 1997, **193**(1): 14-19.
- [25] Eudeline B, Allen S K Jr, 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.
- [26] Guo X, Allen S K Jr. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. *The Biological Bulletin*, 1994, **187**(3): 309-318.
- [27] 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.
- [28] Downing S L, Allen S K Jr. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature [J]. *Aquaculture*, 1987, **61**(1): 1-15.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Sun Q Y, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization [J]. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2006, **131**(2): 193-205.
- [32] Meng Q, Bao Z, Wang Z, *et al.* Growth and reproductive performance of triploid Yesso scallops (*Patinopecten yessoensis*) induced by hypotonic shock [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2012, **31**(4): 1113-1122.
- [33] Li Y G, Li Q, Yu R H. Artificial introduction of tetraploid of the new variety of “Haida No. 2”, *Crassostrea gigas* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(2): 360-365. [李永国, 李琪, 于瑞海. 长牡蛎“海大2号”四倍体的人工诱导 [J]. 水生生物学报, 2021, **45**(2): 360-365.]
- [34] Stanley J G, Hidu H, Allen S K Jr. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II [J]. *Aquaculture*, 1984, **37**(2): 147-155.
- [35] Malison J A, Procarione L S, Held J A, *et al.* The influence of triploidy and heat and hydrostatic pressure shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) [J]. *Aquaculture*, 1993, **116**(2/3): 121-133.

TETRAPLOID INDUCTION OF THE PACIFIC OYSTER “HAIDA NO. 3” USING CYTOCHALASIN B AND LOW SALINITY

ZHOU Jian-Min¹, JIANG Gao-Wei¹, XU Cheng-Xun¹, LI Yong-Guo¹ and LI Qi^{1,2}

(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: To investigate the optimal conditions for the tetraploid induction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

“Haida No. 3” by cytochalasin B (CB) and low salinity, the effects of CB concentration (0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 mg/L), low salinity (6, 8, 10 and 12) and induction duration (10, 15, 20 and 25min) on the cleavage rate, hatching rate, tetraploid rate and the efficiency of tetraploid induction were estimated by inhibiting the first polar body of fertilized eggs. At the same time, the growth and survival of the larvae were analyzed. The results showed that the maximum point of tetraploid rate ($65.69\pm 2.47\%$) and the efficiency of tetraploid induction was found at CB concentration of 0.6 mg/L and induction duration of 15min. In low-salt induction, the maximum point of tetraploid rate ($38.77\pm 2.69\%$) and the efficiency of tetraploid induction was found at salinity of 8 and induction duration of 15min. The shell height of CB and low-salt treatment groups were larger at the early stage and smaller at the later stage compared with the control group. The shell height of the CB treatment group was significantly greater than the low-salt treatment group ($P<0.05$), and the mean daily growth of larvae in the CB and the low-salt treatment groups was ($14.2\pm 1.08\ \mu\text{m}/\text{d}$) and ($10.49\pm 0.60\ \mu\text{m}/\text{d}$), respectively, which were smaller than the control group ($15.43\pm 1.08\ \mu\text{m}/\text{d}$). The survival rate of the two induction treatment groups was consistently lower than the control group, and the survival rate of the low-salt treatment group was higher at the early stage and lower at the late stage compared with the CB treatment group. In general, the CB induction method showed better results in terms of tetraploid rate, the efficiency of tetraploid induction, 12-day survival rate and growth rate, and has better applicability for the tetraploid induction of the Pacific oyster “Haida No.3”.

Key words: Tetraploid rate; Cytochalasin B; Low salinity; The efficiency of tetraploid induction; *Crassostrea gigas*