

文章编号: 1000-0615(2019)04-1029-09

DOI: 10.11964/jfc.20180111123

CB诱导熊本牡蛎三倍体及其存活率与倍化率的变化关系

武祥伟^{1,2,3}, 张跃环¹, 肖述¹, 秦艳平^{1,2}, 莫日馆^{1,2}, 喻子牛^{1*}

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室,

广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东广州 510301;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南昆明 650201)

摘要: 为诱导熊本牡蛎三倍体, 研究了细胞松弛素B(CB)浓度、诱导起始时间、诱导持续时间等因素对卵裂率、D幼率、三倍体率的影响, 并分析了幼虫、稚贝及成贝的存活率和三倍体率的变化特征。结果显示, CB浓度为0.5~0.6 mg/L, 诱导起始时间为40%受精卵释放第一极体, 诱导持续时间为20 min时可获得87%的三倍体率。卵裂率、D幼率、三倍体率的最大影响因素分别为CB浓度、诱导持续时间、诱导起始时间与诱导持续时间。三倍体率与卵裂率无显著负相关性, 而与D幼率呈显著正相关。因此, 减小CB浓度或诱导持续时间, 可同时获得较高的三倍体率与幼虫产量。3~15日龄三倍体组与对照组的存活率分别由71.27%与96.09%降低至34.14%与58.80%, 成贝期450日龄(9月)三倍体组与对照组的存活率分别为53.62%与44.67%。3~9日龄三倍体率从87%降低至77%, 而90~450日龄三倍体率平均值为59.21%±4.99%, 表明幼贝与成贝期三倍体率变化较小, 三倍体率的维持与存活率无显著相关性。

关键词: 熊本牡蛎; 三倍体; 成活率; 细胞松弛素B(CB); 诱导

中图分类号: Q 343.2; S 968.3

文献标志码: A

牡蛎三倍体具有生长快、育性差、死亡率低等优势, 已成为重要的养殖品种和育种材料^[1-3]。目前, 在香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)^[4]、美洲牡蛎(*C. virginica*)^[5]、长牡蛎(*C. gigas*)^[6]、悉尼岩牡蛎(*Saccostrea commercialis*)^[7]、欧洲牡蛎(*Ostrea edulis*)^[8]、僧帽牡蛎(*O. cucullata*)^[9]、近江牡蛎(*C. rivularis*)^[10]等中已成功诱导了三倍体。牡蛎三倍体诱导方法包括使用细胞松弛素B(CB)、6-甲基氨基嘌呤(6-DMAP)、咖啡因、温度休克、高盐和低盐等化学与物理方法, 其中CB和6-DMAP方法较为常用, 可获得较好的诱导效果和较高的倍化率^[3]。目前, 采用CB和6-DMAP方法已在多种牡蛎中成功诱导了三倍体^[3]。但CB和6-DMAP毒性较大, 对幼虫的成活率和孵化率影响较

大^[7, 11]。因此, 研究诱导操作对牡蛎三倍体受精卵的卵裂、孵化、成活等的影响规律及应对措施在牡蛎三倍体生产实践中具有重要意义。

熊本牡蛎(*C. sikamea*)广泛分布于中国沿海、韩国沿海及日本有明海^[12-14], 由于其口感与体型较好, 深受市场欢迎, 在国外已成为主要的牡蛎养殖品种之一^[15]。在我国熊本牡蛎属于热带、亚热带经济贝类, 具有丰富的野生资源, 广泛分布于从江苏至广西等沿海的海湾及河口区域, 是仅次于香港牡蛎、葡萄牙牡蛎(*C. angulata*)、长牡蛎的第4种牡蛎经济品种^[12]。目前, 已有学者报道了熊本牡蛎的选择育种^[16-19], 以及与香港牡蛎^[20]、长牡蛎^[21]、葡萄牙牡蛎^[22]、近江牡蛎^[23]等的杂交, 但目前尚未有熊本牡蛎三倍体的报道。

收稿日期: 2018-01-04 修回日期: 2018-07-10

资助项目: 国家贝类产业体系建设专项(CARS-49); 广东省科技厅项目(2016TQ03N905, 2016A02020811, 2016B020233005, 2017B030314052); 广东省海洋与渔业厅项目(A201601A04)

通信作者: 喻子牛, E-mail: carlzyu@scsio.ac.cn

本实验建立了CB诱导熊本牡蛎三倍体的方法,分析了不同诱导因素对卵裂率、孵化率及倍化率的影响规律,进一步分析了CB诱导后幼虫、稚贝及成贝的死亡率与倍化率的变化特点,为熊本牡蛎三倍体苗种规模化生产与养殖奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2016年5月在广西北海贝类养殖基地挑选2~3龄、体质量大于50 g的无损伤熊本牡蛎100只作为亲贝,按照雌:雄=4:1的比例配对,全部通过人工解剖获取精卵;实验前暂养于人工育苗池中,暂养水温26~30℃,盐度22~25,每日加入新鲜海水。

1.2 精卵获取与授精

采用人工解剖法获取亲贝的卵子和精子,并用解剖针挑取每个亲贝的少量性腺组织,在显微镜下鉴别雌雄,筛选出梨形或卵圆形且细胞质丰富的卵子,精子应在海水中呈剧烈运动。雌雄性腺分开放置,避免意外授精。人工挤取精卵后,使用500目筛绢网过滤掉杂质,获取的卵子使用新鲜海水浸泡促熟1 h,获取的精子则在授精前使用新鲜海水激活。精卵促熟激活后备用。

1.3 CB诱导三倍体实验设计

实验水温26~30℃,盐度20~25,并参考已报道的方法溶解配制CB^[5]。本实验优化3个主要影响因素:CB浓度、诱导持续时间、诱导起始时间;采用单因素分析方法,设置不同的因素水平,记录每个因素水平下的卵裂率、D形幼虫率(D幼率)、三倍体率,并进一步参考综合评价指数确定最佳的诱导条件。人工授精后受精卵密度调整为 5×10^7 个/L,之后迅速把受精卵等分成6份于不同授精桶中,其中1份受精卵为对照组,不进行处理,另外5份为处理组,采用不同的因素水平进行处理。实验重复3次。

CB浓度的确定 当熊本牡蛎受精卵排出40%~50%第一极体(polar body I, PB I)时,分别采用浓度为0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/L的CB溶液,持续诱导受精卵20 min,再使用0.1%二甲基亚砷(DMSO)清洗残留的CB,置于500 L孵化桶中

孵化。

诱导起始时间的确定 采用最佳的CB浓度,设定诱导起始时间分别为30%、40%、50%的受精卵排出PBI以及排出第一个第二极体(1st PB II)时开始诱导,持续诱导20 min。

诱导持续时间的确定 采用最佳的CB浓度和诱导起始时间,设定诱导持续时间分别为10、15、20和25 min。

1.4 幼虫培养与稚贝养殖

D形幼虫前期投喂球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*),后期等量混合投喂球等鞭金藻与羽纹藻(*Pinnularia brevicostata*)的混合藻液,藻细胞浓度为60 000~80 000个/mL;每3天全部换水1次,水温27.7~28.6℃,盐度20~25。使用成吊的牡蛎壳作为附着基,幼虫附着完毕后转移至自然海区吊养。

1.5 数据处理

受精孵化约8 h后随机收集受精卵计算卵裂率(卵裂数占总受精卵数的百分比),全部发育至D形幼虫后计算D幼率(D形幼虫数占总卵裂数的百分比);随机收集3与9日龄的幼虫,使用流式细胞仪(Partec II,德国)测定三倍体率^[24],则综合评价指数(I_e)为孵化率与三倍体率的乘积。幼虫第3、9、15日龄时测定成活率,使用300目筛绢网随机收集幼虫,浓缩至1.5 mL离心管中显微镜下统计空壳数与活体数,成活率为活体数占总数的百分比。

稚贝与幼贝阶段成活率测定时间为第30(2016年7月)、60、90、120、150、180、210、270、360、450日龄(2017年9月),从90日龄始测定倍化率。每个时间点随机采集5吊熊本牡蛎(约200只稚贝或成贝),现场统计空壳数与活体数,成活率为活体数占总数的百分比。取约1 mm³鳃组织,使用流式细胞仪逐个测定倍性,三倍体率为三倍体数与总活体数的百分比。

根据3个因素不同水平下的卵裂率、D幼率、三倍体率的极差大小,判断3个因素的主次影响程度,并采用曲线拟合方法分别构建三倍体率与卵裂率及D幼率的拟合方程。使用SPSS 18.0软件进行数据分析,同一因素下不同水平采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),采用独立样本的 t 检测处理组与对照组的成活率差异。显著水平均为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 CB诱导三倍体条件

CB浓度 CB浓度增加时, 卵裂率、D幼率、三倍体率、综合评价指数均表现出先增加后降低的趋势, 0.5 mg/L时处理组卵裂率(67.35%)、D幼率(66.05%)、三倍体率(87.70%)、综合评价指数(58.44%)最大, 但与0.6 mg/L因素水平无显著性差异($P>0.05$, 图1)。因此, CB浓度为0.5~0.6 mg/L时三倍体诱导效果较好。

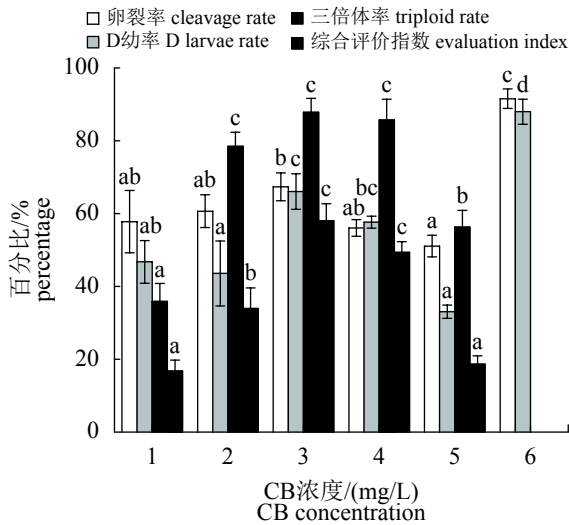


图1 不同CB浓度诱导三倍体的卵裂率、D幼率与三倍体率

1. 0.3 mg/L, 2. 0.4 mg/L, 3. 0.5 mg/L, 4. 0.6 mg/L, 5. 0.7 mg/L, 6. 对照组; 上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); 下同

Fig. 1 Cleavage rate, D larvae rate and triploidy rate by different CB concentration

1. 0.3 mg/L, 2. 0.4 mg/L, 3. 0.5 mg/L, 4. 0.6 mg/L, 5. 0.7 mg/L, 6. control. Bars with different small letter superscripts mean significant differences ($P<0.05$); the same below

诱导持续时间 当三倍体诱导持续时间为10~25 min时, 卵裂率、D幼率、三倍体率、综合评价指数均呈先增加后降低的趋势(图2)。持续诱导为20 min时三倍体诱导率(86.78%)和综合评价指数(58.45%)值最大, 且显著大于其他处理组($P<0.05$)。因此, 持续诱导20 min时诱导效果较好。

诱导起始时间 随诱导起始时间点的推后, 卵裂率、D幼率、三倍体率和综合评价指数均呈先增加后降低的趋势(图3)。当诱导时间点为40%PBI出现时, 三倍体诱导率(90.96%)与综合评价指数(56.11%)最高, 且与其他处理组呈显著性差异($P<0.05$)。40% PBI释放时是最佳的诱导起

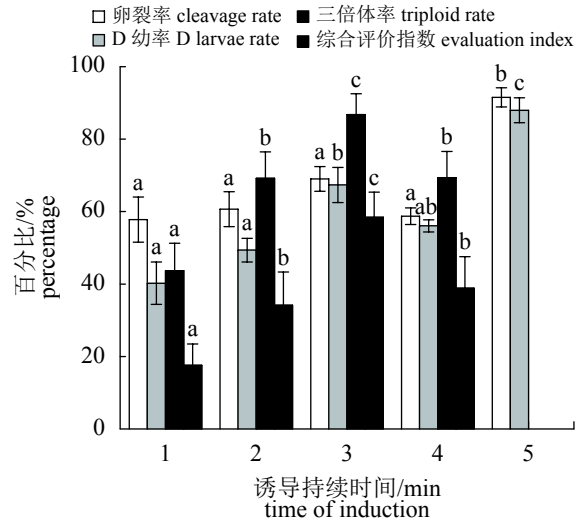


图2 不同诱导持续时间诱导三倍体的卵裂率、D幼率和三倍体率

1. 10 min, 2. 15 min, 3. 20 min, 4. 25 min, 5. 对照组

Fig. 2 Cleavage rate, D larvae rate and triploidy rate by different time of induction

1. 10 min, 2. 15 min, 3. 20 min, 4. 25 min, 5. control

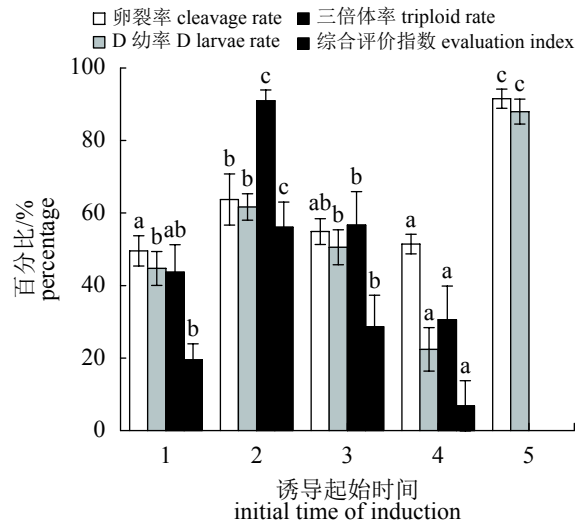


图3 不同诱导起始时间点诱导三倍体的卵裂率、D幼率和三倍体率

1. 30% PBI, 2. 40% PBI, 3. 50% PBI, 4. 1st PB II, 5. 对照组

Fig. 3 Cleavage rate, D larvae rate and triploidy rate by different initial time of induction

1. 30% PBI, 2. 40% PBI, 3. 50% PBI, 4. the first PB II, 5. control

始点。

2.2 诱导因素对卵裂率、D幼率的影响程度

在3个因素中, 不同CB浓度的卵裂率极差最大, 对应的标准差亦最大, 因此, CB浓度对卵

裂率的影响最大, 3个因素对卵裂率的影响程度为CB浓度>诱导持续时间>诱导起始时间。同理, 诱导起始时间对D幼率的影响最大, 3个因素影响程度为诱导起始时间>诱导持续时间>CB浓度, 但前2个因素的D幼率极差值相差仅0.12, 二者具有相似的影响力。持续诱导时间对三倍体率的影响最大, 3个因素影响程度为诱导持续时间>CB浓度>诱导起始时间(表1)。

2.3 卵裂率、D幼率与三倍体率的相关关系

卵裂率与三倍体率呈不显著负相关($P=0.263$), 相关方程为 $y=-0.533x+0.946(R^2=0.034)$; 而D幼率与三倍体率呈显著正相关($P=0.000$), 相关方程为 $y=1.011x+0.136(R^2=0.412)$ (图4)。因此, 提高三倍体率会降低卵裂率, 但可同步提高D幼率。

2.4 存活率与倍化率变化

幼虫存活率与倍化率 处理组幼虫的存活率显著小于对照组($P<0.05$), 且随着日龄的增加, 处理组与对照组的存活率均呈现降低趋势。处理组3日龄幼虫存活率为71.27%, 至15日龄降低至34.14%, 降幅为52.10%, 而相同时间点对照组的存活率分别为96.09%和58.80%, 降幅为38.81%(图5)。总体上, 对照组存活率优于处理组。3~9日龄处理组的三倍体率从87%下降至77%, 降幅为11.49%。

稚贝、成贝存活率与倍化率 总体上, 随日龄的增加, 处理组与对照组的存活率均呈

下降趋势(图5); 在30~270日龄时对照组的存活率高于处理组, 而在360~450日龄则相反, 在30、60、210、270、360、450日龄2组存活率均呈显著性差异($P<0.05$)。30日龄(2016年7月)至270日龄(2017年3月)时处理组与对照组的存活率分别从95.24%与91.13%缓慢降至84.77%与79.24%; 而至360日龄(2017年6月)时对照组与处理组的存活率急剧下降至49.50%与54.50%, 至450日龄(2017年10月)时对照组存活率仍快速降至44.67%, 而处理组存活率则较稳定(53.62%)。

在90~450日龄阶段, 处理组的三倍体率变化较小, 平均值为 $59.21\% \pm 4.99\%$, 90日龄与450日龄的倍化率分别为63.16%和58.37%, 并且处理组的三倍体率与存活率之间并未有显著的相关关系, 即使存活率急剧降低时三倍体率亦相对稳定(图6)。

3 讨论

3.1 三倍体诱导的影响因素

CB可抑制细胞膜内微丝形成, 阻止细胞分裂, 被最早应用于牡蛎三倍体培育研究中^[15, 25]。本实验中CB诱导的三倍体率为87%, 与僧帽牡蛎(87.5%)三倍体率相近, 高于长牡蛎(70.59%)、美洲牡蛎(73.91%)、悉尼岩牡蛎(79.2%)的三倍体率。在长牡蛎等贝类三倍体诱导研究中, 诱导持续时间对D幼率的影响最大, 其次是诱导起始时间和药物浓度^[26-27]。本研究的结论与之相似,

表1 不同诱导条件下卵裂率、D幼率与三倍体率统计数据

Tab. 1 Summary information of cleavage rate, D larvae rate, and triploidy rate by different induction factors in *C. sikamea*

指标 parameter	因素 factor	数量 number	极差 rang	最小值 minimum	最大值 maximum	均值 mean	标准差 standard deviation
卵裂率 cleavage rate	CB浓度 CB concentration	15	25.63	47.17	72.80	58.60	7.42
	诱导持续时间 time of induction	12	24.35	52.47	76.82	62.30	6.99
	诱导起始时间 initial time of induction	12	23.03	43.64	66.67	54.95	7.03
D幼率 D larvae rate	CB浓度 CB concentration	15	37.75	31.25	69.00	49.41	12.66
	诱导持续时间 time of induction	12	41.86	20.93	62.79	47.89	15.97
	诱导起始时间 initial time of induction	12	41.98	34.27	76.25	53.24	11.72
三倍体率 triploidy rate	CB浓度 CB concentration	15	59.68	31.57	91.25	68.82	20.98
	诱导持续时间 time of induction	12	65.70	26.08	91.78	55.58	23.89
	诱导起始时间 initial time of induction	12	48.44	41.11	89.55	67.23	16.41

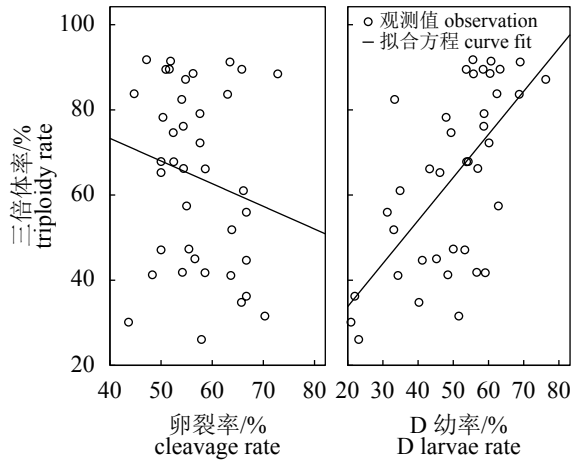


图4 三倍体率与卵裂率及D幼率的相关关系

Fig. 4 The correlativity between triploidy rate and cleavage rate or D larvae rate in triploid induction

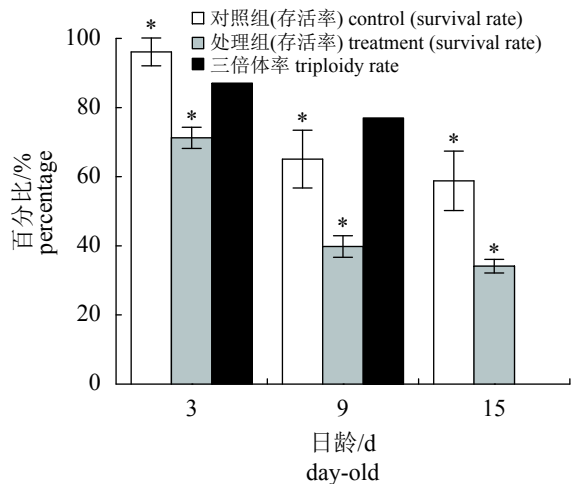


图5 3~15日龄处理组与对照组的存活率与三倍体率
*表示组间差异显著($P < 0.05$); 下同

Fig. 5 Survival rate and triploidy rate of treatment and control groups from 3 to 15 days

* means significant difference ($P < 0.05$); the same below

诱导持续时间和诱导起始时间对D幼率影响最大, 同时诱导持续时间亦是三倍体率最大的影响因素。

卵裂率与D幼率(孵化率)是影响苗种产量的主要指标, 而它们与三倍体率的相关关系既影响着三倍体率又影响着苗种产量, 探讨它们之间的关系对生产实践具有重要意义。浮游幼虫期存活率的变化幅度较大, 因此, CB的毒害作用可能主要集中于卵裂与胚胎发育阶段, 同时CB浓度是卵裂率的最大影响因素, 亦说明卵裂率对CB浓度变化(即毒性大小变化)的敏感性。而

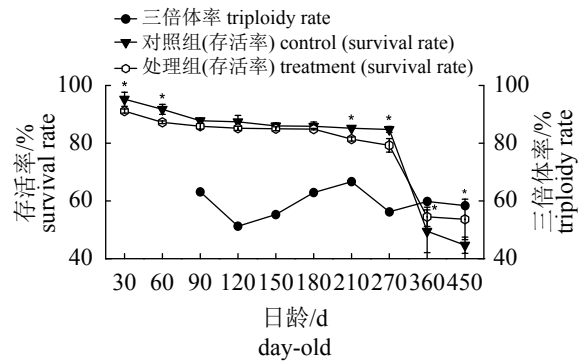


图6 30~450日龄处理组和对照组存活率与三倍体率的变化

Fig. 6 Variation of survival rate and triploidy rate in treatment and control groups from 30 to 450 days

使用6-DMAP诱导长牡蛎三倍体时, 其三倍体率与D幼率呈不显著负相关($P > 0.05$)^[28], 与本研究的结论相反, 可能是因CB毒性大于6-DMAP所致。本研究中卵裂率的第二大影响因素为诱导持续时间, 在熊本牡蛎三倍体诱导中尽可能缩短受精卵与CB溶液的接触时间, 平衡卵裂率与三倍体率间的关系, 可同时获得较高的苗种产量和三倍体率。

3.2 存活率与三倍体率

熊本牡蛎幼虫阶段, CB处理组的存活率显著低于对照组($P < 0.05$), 并且在3~9日龄存活率急剧下降, 表明前期淘汰了生存力较弱的D形幼虫。CB的毒害作用可能是幼虫死亡的原因之一; CB阻止微丝形成的同时也破坏了细胞正常的生理生化功能, 导致幼虫发育受阻而死亡。非整倍体现象可能是另一个原因; CB处理后的幼虫中常存在一定比例的非整倍体^[3], 在刚孵化的悉尼岩牡蛎三倍体中存在1%~11%的非整倍体^[2], 在长牡蛎三倍体幼虫中亦观察到非整倍体^[29]; 非整倍体生存力较弱, 死亡率较高。本研究中270日龄(2016年3月)之后处理组的存活率显著大于对照组($P < 0.05$), 这种现象可能与性腺发育繁殖导致个体生存力下降死亡相关, 而牡蛎三倍体性腺不育或发育滞后, 因而较少个体死亡^[6, 30]; 本研究熊本牡蛎养殖区域, 每年3月份处于熊本牡蛎繁殖起始时期, 其性腺开始快速发育, 导致在繁殖季节三倍体存活率显著大于二倍体($P < 0.05$)。

非整倍体现象也可降低贝类的三倍体率^[31]; 本研究中熊本牡蛎在3~9日龄、9~90日龄、90~450

日龄三倍体率分别下降了10.00%、13.84%、4.97%。但这与已报道的长牡蛎、悉尼岩牡蛎三倍体稚贝与幼贝的存活率随时间的变化趋势相反^[6, 32]；与长牡蛎和悉尼岩牡蛎相比，熊本牡蛎个体较小、生长较慢，而个体生长又与繁殖相关，较快的生长意味性腺发育较快，增加了个体的生理胁迫，使牡蛎对死亡较敏感，特别是夏季高温、性腺发育较快阶段，牡蛎死亡率较高^[33]。熊本牡蛎全年均具有成熟的性腺，特殊的繁殖特征可能是导致其存活率差异的主因。已有的研究认为个体选择性死亡与三倍体恢复为二倍体，是三倍体率降低的原因^[34]；在本研究中熊本牡蛎稚贝与成贝期，处理组与对照组的存活率急剧降低，且具有一致的变化趋势，但三倍体率保持稳定；因此，本研究认为熊本牡蛎中个体选择性死亡不影响三倍体率，且三倍体恢复为二倍体现象也未发生，进一步说明熊本牡蛎处理组中三倍体与二倍体的死亡是随机的、无选择性的，对成贝期三倍体率的维持无显著影响。

参考文献:

- [1] Guo X M, 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.
- [2] Nell J A, Perkins B. Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, in Port Stephens, New South Wales, Australia[J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(6): 530-536.
- [3] 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.
- [4] Zhang Y H, Li J, Qin Y P, *et al.* A comparative study of the survival, growth and gonad development of the diploid and triploid Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis* (Lam & Morton 2003)[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(5): 2453-2462.
- [5] Stanley J G, Allen S K Jr, Hidu H. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B[J]. *Aquaculture*, 1981, 23(1-4): 1-10.
- [6] Allen S K Jr, Downing S L. Performance of triploid Pacific oyster, *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.
- [7] Nell J A, Hand R E, Goard L J, *et al.* Studies on triploid oysters in Australia: evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for triploidy induction in Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley)[J]. *Aquaculture Research*, 1996, 27(9): 689-698.
- [8] Gendreau S, Grizel H. Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L[J]. *Aquaculture*, 1990, 90(3-4): 229-238.
- [9] 曾志南, 陈木, 林琪, 等. 僧帽牡蛎三倍体的研究[J]. 海洋通报, 1994, 13(6): 34-40.
- Zeng Z N, Chen M, Lin Q, *et al.* Triploidization of oyster *Ostrea cucullata* with cytochalasin B and temperature shock[J]. *Marine Science Bulletin*, 1994, 13(6): 34-40(in Chinese).
- [10] 杨春玲, 陈晓汉, 李咏梅, 等. 应用6-DMAP人工诱导近江牡蛎三倍体的初步研究[J]. *西南农业学报*, 2008, 21(3): 825-828.
- Yang C L, Chen X H, Li Y M, *et al.* Artificial induction of triploidy in *Crassostrea rivularis* with 6-DMAP[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2008, 21(3): 825-828(in Chinese).
- [11] 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(in Chinese).
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.

- [15] 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.
- [16] 张跃环, 秦艳平, 张扬, 等. 熊本牡蛎多嵴和无嵴品系 F₁ 生长性状的群体选育[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 882-889.
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(in Chinese).
- [17] 张跃环, 秦艳平, 张扬, 等. 熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)多嵴和无嵴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.
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(in Chinese).
- [18] 张跃环, 武祥伟, 秦艳平, 等. 熊本牡蛎多嵴和无嵴品系 F₃ 生长性状的连续选择效应[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1161-1167.
Zhang Y H, Wu X W, Qin Y P, *et al.* Sustained response to selection of growth traits to the third generation for two strains of Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1161-1167(in Chinese).
- [19] 张跃环, 秦艳平, 武祥伟, 等. 熊本牡蛎无嵴和多嵴品系生产性状比较[J]. *水产学报*, 2016, 40(12): 1883-1888.
Zhang Y H, Qin Y P, Wu X W, *et al.* Evaluation of phenotypic traits of two strains of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 40(12): 1883-1888(in Chinese).
- [20] 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.
- [21] 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.
Su J Q. Hybridization between *Crassostrea Angulata* and *C. Sikamea*, *Saccostrea Cucullata*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015(in Chinese).
- [22] Xu F, Li L, Wang J F, *et al.* Use of high-resolution melting analysis for detecting hybrids between the oysters *Crassostrea sikamea* and *C. angulata* reveals bidirectional gametic compatibility[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2014, 80(4): 435-443.
- [23] Yan L L, Su J Q, Wang Z P, *et al.* Growth performance and biochemical composition of the oysters *Crassostrea sikamea*, *Crassostrea angulata* and their hybrids in southern China[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(2): 1020-1028.
- [24] Eudeline B, Allen S K Jr, Guo X M. 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.
- [25] Schatten G, Schatten H. Effects of motility inhibitors during sea urchin fertilization: microfilament inhibitors prevent sperm incorporation and restructuring of fertilized egg cortex, whereas microtubule inhibitors prevent pronuclear migrations[J]. *Experimental Cell Research*, 1981, 135(2): 311-330.
- [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 C Y, Liang Y, Wang R C, *et al.* Triploid *Crassostrea gigas* induced with 6-DMAP: the influences of 3 factors on hatching rate and D-shaped larvae abnormality rate[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7(1): 110-112(in Chinese).
- [27] 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.
- [28] 田传远, 梁英, 王如才, 等. 6-DMAP诱导太平洋牡蛎三倍体-5. 孵化率和D幼畸形率与三倍体诱导率的关系[J]. *青岛海洋大学学报*, 1998, 28(3): 421-425.
Tian C Y, Liang Y, Wang R C, *et al.* Triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) induced by 6-DMAP: 5. The relationship between embryo hatching rate and D-shaped larval deformity rate and triploidy[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1998, 28(3): 421-425(in Chinese).
- [29] 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): 1-4.

- Tian C Y, Wang R C, Liang Y, *et al.* Triploidy of *Crassostrea gigas* induced with 6-DMA P: by blocking the second polar body of the zygotes[J]. *Journal of Fisheries Sciences of China*, 1999, 6(2): 1-4(in Chinese).
- [30] Cox E S, Smith M S R, Nell J A, *et al.* Studies on triploid oysters in Australia. VI. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1996, 197(1): 101-120.
- [31] He M X, Lin Y G, Shen Q, *et al.* Production of tetraploid pearl oyster (*Pinctada martensii* Dunker) by inhibiting the first polar body in eggs from triploids[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2000, 19(1): 147-151.
- [32] Hand R E, Nell J A, Maguire G B. Studies on triploid oysters in Australia. X. Growth and mortality of diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 1998, 17(4): 1115-1127.
- [33] Cotter E, Malham S K, O'Keeffe S, *et al.* Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of growth, biochemistry and gametogenesis[J]. *Aquaculture*, 2010, 303(1-4): 8-21.
- [34] Allen S K. Triploids for field study? The good, the bad, and the ugly[J]. *Journal of Shellfish Research*, 1993, 12(1): 125.

Triploidy induction by CB and their survival rate and triploidy rate in Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*)

WU Xiangwei^{1,2,3}, ZHANG Yuehuan¹, XIAO Shu¹, QIN Yanping^{1,2}, MO Riguan^{1,2}, YU Ziniu^{1*}

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: In order to induce triploid using cytochalasin B (CB) in *Crassostrea sikamea*, three effecting factors, including CB concentration, initial time of induction, and duration time of induction, were optimized by the cleavage rate, D larvae rate, and triploidy rate. In addition, the variations of survival rate and triploidy rate were also compared for larvae and adults. The results suggested that the optimal method of triploid induction were 0.5 mg/L CB, 40% first polar body releasing for initial time of induction, and 20 min for duration time of induction. The triploidy rate of 87% was obtained by the optimal method. The first effecting factor for cleavage rate, D larvae rate, and triploidy rate was CB concentration, duration time of induction and initial time of induction, and duration time of induction, respectively. Furthermore, there was insignificant negative relationship between triploidy rate and cleavage rate. Whereas, the positive relationship was significant between triploidy rate and D larvae rate. As a result, high triploidy rate and high larvae production could be obtained by decreasing both CB concentration and duration time of induction. The survival rates were 71.27% and 96.09% at 3 days, and 34.14% and 58.80% at 15 days for triploid and control groups, respectively. Comparatively, the survival rate were 53.62% and 44.67% for adults at 450 days (September) in triploid and control groups, respectively. The triploidy rate declined from 87% to 77% during the period of 3 to 9 days. Whereas, the triploidy rate was 59.21%±4.99% on average from 90 to 450 days, suggesting that there was no correlativity between triploidy rate and survival rate, with a small variation of triploidy rate for adults. This study provides valuable data for further exploration into triploidy of *C. sikamea*.

Key words: *Crassostrea sikamea*; triploid; survival rate; CB; induction

Corresponding author: YU Ziniu. E-mail: carlzyu@scsio.ac.cn

Funding projects: National Shellfish Industry Technology System (CARS-49); Guangdong Provincial Department of Science and Technology (2016TQ03N905, 2016A02020811, 2016B020233005, 2017B030314052); Guangdong Provincial Department of Marine and Fishery (A201601A04)