

文章编号: 1000- 0615(2000)04- 0324- 05

# 不同方法制备的三倍体长牡蛎养殖效果的比较

张国范<sup>1,2</sup>, 常亚青<sup>1</sup>, 宋 坚<sup>1</sup>, 丁 君<sup>1</sup>, 王子臣<sup>1</sup>

(1. 大连水产学院农业部海洋水产增养殖生态学重点开放实验室, 辽宁 大连 116023;

2. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 比较了细胞松弛素 B(CB) 和 6- 二甲基氨基嘌呤(6- DMAP) 通过抑制受精卵极体释放的方法批量诱导三倍体长牡蛎的养殖效果。长牡蛎卵子在 25℃ 的海水中受精, 20~ 30min 后, 开始用浓度为  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 CB 处理, 持续 18~ 22min, 受精卵处理密度为  $4.0\sim 4.5\times 10^7$  个 $\cdot\text{L}^{-1}$ , 三倍体产率为 65.2%~ 70.1%, 面盘幼虫孵化率为 12.3%~ 14.5%, 诱导效率指数为 0.09。6- DMAP 的使用浓度为  $400\sim 420\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 受精卵处理密度为  $3.0\sim 3.5\times 10^7$  个 $\cdot\text{L}^{-1}$ , 授精水温、处理起始和持续时间等与 CB 方法相同, 三倍体产率为 58.7%~ 65.4%, 面盘幼虫孵化率为 52.1%~ 55.4%, 诱导效率指数为 0.32。两种方法的采苗率基本相同, 采苗器为基质较硬的栉孔扇贝壳。海区养殖采用浮筏夹苗吊养技术, 两种方法诱导的三倍体牡蛎养殖性状没有明显差别。通过比较 CB 和 6- DMAP 两种诱导方法及三倍体的养殖效果表明, 后者具有更好的应用性。

**关键词:** 三倍体长牡蛎; 细胞松弛素 B; 6- 二甲基氨基嘌呤

## Comprehensive comparison between triploid oysters induced with CB and 6- DMAP

ZHANG Guo-fan<sup>1,2</sup>, CHANG Ya-qing<sup>1</sup>, SONG Jian<sup>1</sup>, DING Jun<sup>1</sup>, WANG Zi-chen<sup>1</sup>

(1. Key Lab of Mariculture Ecology of Ministry of Agriculture, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China;

2. Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, CAS, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** Triploid of Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg was induced by blocking  $\text{pb}_2$  with cytochalasin B (CB) and 6- dimethylaminopurine (6- DMAP) and the triploid seed had been farmed with suspended longline in the sea. The egg was fertilized at 25 °C and treated with  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  CB begun at 20- 30min post-fertilization lasted 18- 22min. Incubated density of zygote when treatment was about  $4.0\sim 4.5\times 10^7\text{ind}\cdot\text{L}^{-1}$ . Triploid yield was 65.2% - 70.1% and velar larvae gain was 12.3% - 14.5%, and the efficiency of triploid induction (ETI) was 0.09. The concentration of 6- DMAP used to the induction of triploid was  $400\sim 420\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and the zygote density for treatment was  $3.0\sim 3.5\times 10^7\text{ind}\cdot\text{L}^{-1}$ . Triploid yield was 58.7% - 65.4%, velar larvae gain was 52.1% - 55.4%, and ETI was 0.32. The surrounding temperature when fertilization, initial and lasting time for the triploid treatment were the same as those in CB. Spat harvest on the scallop shell which was as the collector was similar to both those in CB and 6- DMAP. The traits of the triploids induced by CB and 6- DMAP farmed for 14 months showed no significant difference in growth, meat harvest and condition index. Comprehensive comparison between the two methods showed that 6- DMAP was more applicable in triploid production than CB.

**Key words:** triploid Pacific oyster; cytochalasin B; 6- DMAP

收稿日期: 1999- 12- 12

基金项目: 国家“八六三”重大资助项目(863- 819- 01)

作者简介: 张国范(1954- ), 男, 理学博士, 教授, Tel: 0532- 2879062- 5407, E-mail: gzfzhang@ms.qdio.ac.cn

长牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg)是世界上最重要的海水养殖贝类之一。自80年代初在我国开展浮筏养殖以来,已成为我国海水养殖业的重要生产对象,年产已达百万吨以上。贝类三倍体具有生长速度快<sup>[1]</sup>、经济性状好<sup>[2,3]</sup>、周年肥满度较高、在某些条件下(如繁殖期)具有一定的抗逆性等特点,对于增加产量、改善产品品质、缓解当前贝类的异常死亡有重要的意义。牡蛎的三倍体研究始于本世纪80年代初<sup>[11]</sup>,是最早开展多倍体研究和积累文献最多的贝类。经过近20年各国科学家的努力,牡蛎三倍体诱导的方法学研究日趋丰富<sup>[4-10]</sup>。早期三倍体牡蛎的直接诱导大多采用细胞松弛素B方法<sup>[1,5]</sup>,在美国也是采用CB方法进行三倍体牡蛎的生产<sup>[11]</sup>。但由于CB的价格昂贵及对环境和人体健康的潜在影响等,学者们近几年一直在寻找新的替代方法,如温度休克等<sup>[12]</sup>,但这些方法大都存在孵化率低<sup>[13]</sup>或倍化率不稳定等缺陷,使其大规模应用比较困难。因此,在研究四倍体<sup>[14]</sup>的同时,也应进一步研究清洁、高效、适于大规模操作的三倍体直接诱导方法。

6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)作为一种蛋白激酶抑制药物,它可以破坏中期纺锤体并有促使染色体凝集的作用<sup>[15]</sup>,目前已经用于贝类多倍体的研究<sup>[16-22]</sup>。

Scarpa等<sup>[23]</sup>比较了不同方法诱导三倍体的效果,但到目前为止,国内外还未见到有关细胞松弛素B和6-二甲氨基嘌呤两种药物诱导方法规模生产三倍体牡蛎效果的比较研究报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 亲贝的选择

所用长牡蛎亲贝为2龄或2龄以上人工养殖、室内人工促熟积温达400~450℃·d以上的个体。亲贝腹缘棘色浅黄、亮泽、锋利,壳形规则无破损、呈长三角型,内腔大,壳长8~14cm,采自非发病区。

### 1.2 意外受精的防控

长牡蛎配子的获得采用解剖法<sup>[24]</sup>。用开壳器从牡蛎壳顶处将双壳开启并移去一侧的贝壳。用一硬物将生殖腺轻轻划破,取内容物涂于载玻片上,目辨或用显微镜辨其性别。每解剖一个亲贝,操作者的双手和解剖器具都应用次氯酸钠溶液严格消毒。用器具先将雌性配子剥于容器内,加海水稀释,轻搅使卵子分散,用筛网除去组织块。再用同样的方法获得雄性配子。雌雄个体应严格隔离,雌雄配子的剥离也应在异处进行。在正式人工授精前应对卵子进行检查,以确定是否意外受精。

### 1.3 人工授精

用于三倍体生产的亲贝每5~8枚雌性个体为一组,分别剥卵受精。每次授精所用雄性个体数至少应与雌性个体数相等。配子剥离后应在半小时内进行人工授精。生产前一般需进行预受精实验。随机解剖5~10枚亲贝,检查配子是否正常。精子活跃,卵子入水后20~30min之内变圆、卵径50~52μm、卵黄匀密,受精率达80%以上的配子,可用于三倍体的诱导生产。

### 1.4 三倍体诱导

细胞松弛素B(CB)的配制见Stanley<sup>[11]</sup>。6-DMAP可用灭菌的蒸馏水配制成合适浓度的储备液,置4℃条件下备用。一般在使用前1~2h配制即可。CB的使用浓度为0.5mg·L<sup>-1</sup>,6-DMAP为400~420μmol·L<sup>-1</sup>。受精卵的处理密度,在CB方法为4.0~4.5×10<sup>7</sup>个·L<sup>-1</sup>,在6-DMAP为3.0~3.5×10<sup>7</sup>个·L<sup>-1</sup>。

本研究选择抑制受精卵第二极体排出的方法诱导三倍体长牡蛎。经预实验在25℃条件下授精后20min约有40%~50%的受精卵出现第一极体,并以此时间为三倍体处理的起始时间。而处理持续时间则根据处理的起始时间和对照组40%~50%受精卵出现第二极体的时间来确定。在25.0℃条件下,授精后30min有40%~50%的受精卵出现第二极体,处理的持续时间选择为18~22min。每次处理的持续时间都必须根据对照组第二极体出现的比率来确定。

## 1.5 幼虫培育及采苗

受精卵的孵化和面盘幼虫培育与正常的二倍体相同。三倍体处理幼虫在发育至壳顶幼虫时应进行一次分选,即用80目的筛网将较大的个体选移它池另养,剩余幼体在原池继续培养,如有需要亦可多次分选。当发育到后期面盘幼虫,眼点出现率达10%~20%时,开始采苗。

采苗器为壳质较为坚硬的栉孔扇贝壳。采苗器需用1:10的盐酸溶液浸泡以除去表面污物,并用清水冲洗浸泡备用。在入池采苗前采苗器还需用 $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗生素浸泡15~20min。125~150片扇贝壳串成一吊,垂悬于培育池中供牡蛎幼虫附着。每片扇贝壳附着15~20个牡蛎苗后取出,移另池培养3~5d后出池。采苗器在附着有一定数量的稚贝并移另池后,再投放新的采苗器,如此并多次采苗。出池苗在海上暂养一周后再行夹苗浮筏养殖。

## 1.6 三倍体牡蛎的养成

养成海区选择在大连湾的红星海区和董家沟海区。养成浮筏筏身长80m,夹苗绳垂系于浮筏上,苗绳间距55~60cm。有效养殖水层为-0.5~-6.5m。采用直径0.6cm的聚氯乙烯绳或直径1.2~1.5cm聚丙烯绳(三股)做夹苗绳(长4.0~5.0m),将附有10~12个稚贝的扇贝壳夹在苗绳中间,用铁丝稍加缚固,间距15~17cm,每吊夹20~22片。苗绳下端拴挂一个重约0.5~1.0kg石块作坠物,以保持苗绳的垂直和避免其相互缠绕。

## 1.7 倍性检测及有关参数的计算方法

倍性检验采用热滴片染色体计数法<sup>[10]</sup>和DNA定量法<sup>[25]</sup>。其中眼点幼虫的染色体制备在常规方法的基础上加入0.05%的二甲基亚砜(DMSO)。

养殖生产性状的取样遵循随机取样的原则,被测群体的繁殖亲贝来源相同。出肉率(%) (湿)=软体部湿全重/带壳鲜全重( $\times 100$ ),条件指数=软组织干重(g)/贝壳的内腔体积(mL),诱导效率指数为倍化率均值与面盘幼虫孵化率均值的乘积,其它参数的计算见Zhang等<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 CB和6-DMAP的诱导效果比较

在所采用的浓度条件下,CB方法的三倍体产率要高于6-DMAP方法,而在受精率和采苗率方面两种方法也基本相同,但6-DMAP方法在面盘幼虫孵化率方面明显高于CB方法。6-DMAP诱导效率指数比CB方法高3~4倍(表1)。

### 2.2 三倍体牡蛎的海区浮筏养成

#### 2.2.1 不同诱导方法三倍体生产性状的比较

CB方法处理三倍体群体的生产性状,如壳长、个体重、出肉率和条件指数等都要稍高于6-DMAP处理群体,但差异不明显(表2)。

#### 2.2.3 CB和6-DMAP两种药物诱导方法应用效果的比较

通过对两种牡蛎三倍体生产方法的比较可见,CB方法除了三倍体的产率比6-DMAP方

表1 CB和6-DMAP诱导方法的孵化率、采苗率和三倍体产率等的比较

Tab. 1 A comparison of triploid induction in *Crassostrea gigas* with CB and 6-DMAP

| 项目         | CB        | 6-DMAP    |
|------------|-----------|-----------|
| 受精率(%)     | 80.0~90.0 | 80.0~90.0 |
| 面盘幼虫孵化率(%) | 12.3~14.5 | 52.1~55.4 |
| 采苗率(%)     | 19.1~22.0 | 19.1~22.0 |
| 三倍体产率(%)   | 65.2~70.1 | 55.1~65.4 |
| 诱导效率指数     | 0.09      | 0.32      |

表2 CB和6-DMAP诱导的三倍体生长的比较(养殖14个月)

Tab. 2 Growth comparison between the triploid oysters induced with CB and 6-DMAP farming for 14 months on the suspended longline

| 检测项目      | CB三倍体群体          | 6-DMAP三倍体群体      | 增减率(%) |
|-----------|------------------|------------------|--------|
| 壳长(cm)    | 11.0 $\pm$ 4.5   | 10.8 $\pm$ 4.8   | 1.9    |
| 壳宽(cm)    | 6.3 $\pm$ 3.2    | 6.3 $\pm$ 2.9    | 0.0    |
| 个体重(g)    | 104.8 $\pm$ 26.7 | 102.9 $\pm$ 29.0 | 1.8    |
| 出肉率(湿重,g) | 19.4 $\pm$ 4.7   | 19.1 $\pm$ 5.1   | 1.6    |
| 软体部干重(g)  | 2.5 $\pm$ 0.9    | 2.4 $\pm$ 1.1    | 4.2    |
| 腔体积(mL)   | 38.1 $\pm$ 4.5   | 38.0 $\pm$ 3.8   | 0.3    |
| 条件指数      | 6.6 $\pm$ 1.4    | 6.3 $\pm$ 1.6    | 4.7    |

法稍高外,其余各项技术、经济和环境指标等都明显差于6-DMAP方法,而成活率的差别尤为明显(表3)。

### 3 讨论

国内外不同作者采用同样的方法对同一种类贝类进行三倍体诱导的结果经常差别很大<sup>[26,27]</sup>,其中的一个重要原因是各作者所使用的配子质量可能有异,特别是在长牡蛎的多倍体研究中,所用配子大多采用解剖法获得,而且其中还有很多亲贝是通过人工促熟达到性腺发育成熟的,致所用配子成熟状况的差别较大。只有当减数分裂期间染色体处于向两极移动的时候,对其进行化学或物理学方法的处理,三倍体的诱导才有效<sup>[28]</sup>。如果受精卵成熟度不好,发育参差不齐,受精卵内的染色体就不可能在同一时间处于相同状态,因而对其处理也就难以获得高比率的三倍体。

解剖的牡蛎雌性生殖细胞大多还不具备受精能力,但一经剥离入水,在海水的刺激下可在较短的时间内使染色体达中期状态,成为具受精能力的成熟卵,而入水后的持续时间与卵子的成熟状态有关。由于在生产操作时每批处理解剖剥离的个体数越多,拖延时间越长,对同批次配子成熟的同步性影响越大。因此,在具体操作时,每批解剖的雌性亲贝个体数应控制在5~8枚。

在一定的诱导强度下,预计的诱导起始和持续时间只能作为参考。每处理一批受精卵的同时都必须要有相应的对照样,同步观察对照样受精卵极体的排出情况。在对照样受精卵第一极体排出40%~50%时,开始对处理组进行诱导,当对照样40%~50%的受精卵出现第二极体时,终止处理。同时应密切跟踪观察处理组极体发生的数量变化,如果处理组在加入药物后极体的数量仍然在增加,说明处理无效,反之则有效。根据极体发生的情况,对处理的持续时间作适当的调整,可提高诱导效率。

受精卵的处理密度既与三倍体产率有关,也与生产成本和该项技术的可应用性有关。因此,在考虑到各种因素的情况下,受精卵密度一般以 $3.0 \sim 5.0 \times 10^7$ 个 $\cdot L^{-1}$ 为宜,受精卵密度再大就将影响到三倍体的产率,如再低将使生产成本明显增加。

虽然CB的三倍体产率较高,但价格昂贵,并具致癌性,在使用过程中对操作人员的身体及废液对环境都有一定的危害,在生产单位推广使用时危险性更大。6-DMAP虽然三倍体的产率稍低,但其诱导效率指数高于CB方法,而且6-DMAP对人畜毒害较小、对环境污染较轻,生产成本相对较低,操作方法也比较简单。

通过1996~1998年三年的三倍体长牡蛎苗种和养成规模生产的比较分析表明,6-DMAP诱导方法可操作性更强,适于长牡蛎和其它贝类三倍体大规模生产<sup>[29]</sup>,是当前贝类三倍体产业化的首选诱导方法之一。

表3 CB和6-DMAP诱导三倍体长牡蛎效果的综合比较(1996~1998)

Tab.3 A comprehensive comparison for the induction of triploid oyster with CB and 6-DMAP (1996-1998)

| 诱导药物          | CB                                    | 6-DMAP                                      |
|---------------|---------------------------------------|---|
| 毒性            | 强,致癌                                  | 无或弱   |
| 溶解性           | 溶于DMSO                                | 溶于水   |
| 三倍体产率(%)      | 60~70                                 | 50~60                                       |
| 使用剂量          | $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  | 400~420 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ |
| 三倍体产率的稳定性     | 稳定                                    | 稳定  |
| 受精卵的处理密度      | 4.0~                                  | 3.0~  |
| 面盘幼虫孵化率(%)    | $4.5 \times 10^7 \cdot \text{L}^{-1}$ | $3.5 \times 10^7 \cdot \text{L}^{-1}$       |
| 性状优势          | $\leq 15$                             | $\geq 50$                                   |
| 可操作性          | 明显                                    | 明显  |
| 潜在危险性(人、畜、环境) | 较复杂                                   | 简单  |
| 成本(元/片采苗器)    | 大                                     | 小(或尚未发现)                                    |
| 对大规模生产应用可行性   | 0.009                                 | 0.004                                       |
|               | 不强                                    | 较强  |

实验得到大连市开发区水产技术推广站郭海先生、红星养殖场王洪基先生等的大力支持,在此一并表示感谢。

## 参考文献:

- [ 1 ] Stanley J G, Allen S K Jr, Hidu H. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica* with cytochalasin B[J]. Aquac, 1981, 23: 1- 10.
- [ 2 ] 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]. J Exp Mar Bio Ecol, 1986, 102: 197- 208.
- [ 3 ] 张国范, 王子臣, 常亚青, 等. 三倍体长牡蛎浮筏养殖技术的研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 68- 72.
- [ 4 ] Stanley J G, Allen S K Jr, Hidu H. Growth of American oyster increased by polyploidy induced by blocking Meiosis I but not meiosis II[J]. Aquac, 1984, 37: 147- 155.
- [ 5 ] Downing S L, Allen S K Jr. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature[J]. Aquac, 1987, 61: 1- 15.
- [ 6 ] 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]. Biol Bull, 1992, 183: 381- 386.
- [ 7 ] Guo X, Allen S K Jr. Viable tetraploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(1): 42- 50.
- [ 8 ] 容寿柏, 李一民, 刘绍琼, 等. 用冷热处理诱导三倍体近江牡蛎[J]. 湛江水产学院学报, 1990, 10(2): 32- 36.
- [ 9 ] 梁 英, 王如才, 田传远, 等. 三倍体大连湾牡蛎的初步研究[J]. 水产学报, 1994, 8(3): 22- 24.
- [ 10 ] Zhang G F, Chang Y Q. Triploid induction in Pacific oyster *Crassostrea gigas* by caffeine with thermal shock[J]. Chin J Oceanol Limnol, 1998, 16(3): 249- 255.
- [ 11 ] Allen S K Jr, Downing S L, Chew K K. Hatchery manual for Producing triploid oyster[M]. University of Washington Press, Seattle, WA, 1989.
- [ 12 ] Quillet E, Panelay P J. Triploidy induction by thermal shocks in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Aquac, 1986, 57: 271- 279.
- [ 13 ] Beaumont A R, Fairbrother J E. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: A review[J]. J Shell Res, 1991, 10(1): 1- 18.
- [ 14 ] Guo X, DeBrosse G A, Allen S K Jr. All-triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids[J]. Aquac, 1996, 142: 149- 161.
- [ 15 ] Rubhun L I, White K, Sander G. Cleavage inhibition in marine eggs by puromycin and 6- dimethylaminopurine[J]. Exp Cell Res, 1973, 77: 312- 318.
- [ 16 ] Desrosiers R R, Gerard A, Peignon J M, et al. A novel method to produce triploids in bivalve mollusca by the use of 6- dimethylaminopurine [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1993, 170: 29- 43.
- [ 17 ] Gerard A, Naciri J M, Peignon J M. Optimization of triploid induction by the use of 6- DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. Aquac Fish Manag, 1994, 25: 709- 719.
- [ 18 ] 田传远, 王如才, 梁 英, 等. 6- DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体- 4. 四倍体现象的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(4): 560 - 566.
- [ 19 ] 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 幼畸型率与三倍体诱导率的关系[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(3): 422- 425.
- [ 20 ] 田传远, 梁 英, 王如才, 等. 6- 二甲基氨基嘌呤诱导太平洋牡蛎三倍体- 抑制受精卵第一极体的释放[J]. 水产学报, 1999, 23(3): 128- 132.
- [ 21 ] 田传远, 王如才, 梁 英, 等. 6- 二甲基氨基嘌呤诱导太平洋牡蛎三倍体- 抑制受精卵第二极体的释放[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 1- 4.
- [ 22 ] 曾呈奎, 相建海(编). 海洋生物技术[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1998. 45- 66.
- [ 23 ] Scapa J, Toro J E, Wada K T. Direct comparison of six methods to induce triploidy in bivalves[J]. Aquac, 1994, 119: 119- 133.
- [ 24 ] Allen S K, Bushek D. Large- scale production of triploid oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using "stripped" gametes[J]. Aquac, 1992, 103: 241- 251.
- [ 25 ] Allen S K Jr. Flow Cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish[J]. Aquac, 1983, 33: 317- 328.
- [ 26 ] Zhang G F, Chang Y Q, Song J. Triploid induction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, by caffeine with thermal shock[J]. Chin J Oceanol Limnol, 1998, 16(3): 249- 255.
- [ 27 ] Yamamoto S, Sugawara Y, Normura T. Chemical and thermal controls of triploid production in Pacific oyster and mussels, with regard to controlling meiosis maturation[J]. Adv Invert Reprod, 1990, 5: 455- 460.
- [ 28 ] Nicklas R B. Odd chromosome movement and inaccurate chromosome distribution in mitosis and meiosis after treatment with protein kinase inhibitors[J]. J Cell Sci, 1993, 104: 961- 973.
- [ 29 ] Zhang G F, Wang Z C, Chang Y Q, et al. The Induction of triploid in Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, with 6- DMAP and its performance of triploid juvenile[J]. J Shell Res, 1998, 17(3): 473- 478.