

CB与6-DMAP诱导香港牡蛎三倍体的效果比较

秦艳平^{1,2,3}, 张跃环^{1,3}, 周颖力^{1,2,3}, 武祥伟^{1,2,3},
彭敏⁴, 喻子牛^{1,3*}

(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重点实验室, 广东 广州 510301;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东 广州 501275;

4. 广西水产科学研究院, 广西 南宁 530021)

摘要: 以三倍体率、卵裂率、D幼率、生产成本等为指标, 比较了CB、6-DMAP两种化学试剂诱导香港牡蛎三倍体的效果, 研究了试剂浓度、诱导时机、诱导持续时间及受精卵密度等4种因素对香港牡蛎三倍体的诱导效应。结果显示, 在温度28~30 °C、盐度15~25, 受精卵密度为 2.0×10^8 个/L条件下, 采用0.5 mg/L的CB在受精后15~18 min处理, 诱导持续时间为20 min, 可产生100%三倍体; 合子的卵裂率为53.16%~63.00%, D形幼虫孵化率为47.32%~53.09%, 诱导效率指数为0.47~0.53, 生产成本为260元/L。相同条件下, 采用浓度为75~100 mg/L的6-DMAP处理, 诱导持续时间为20~25 min, 受精卵处理密度 4.5×10^7 个/L, 可产生62.52%~72.36%的三倍体; 合子的卵裂率为60.00%~66.25%, D形幼虫孵化率为74.43%~90.00%, 诱导效率指数为0.47~0.65, 生产成本为139~185元/L。综合比较两种方法, 6-DMAP诱导方法更加适合用于大规模的香港牡蛎三倍体苗种生产。本研究为香港牡蛎多倍体育种提供了研究数据与实践经验。

关键词: 香港牡蛎; 三倍体; CB; 6-DMAP

中图分类号: Q 343.2; S 968.3

文献标志码: A

香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)是我国华南沿海的一种重要牡蛎养殖品种, 俗称白蚝, 养殖历史悠久, 养殖规模很大, 具有较高的经济价值^[1]。2014年的产量为130万t左右, 占牡蛎产量的30%, 养殖贝类产量的12%, 海水养殖总产量的7%以上。香港牡蛎肉味鲜美、营养丰富, 软体部含蛋白质超过50%, 还含有大量的维生素, 是一种高蛋白水产品, 有“海洋牛奶”之称。由于二倍体牡蛎在每年的繁殖期排放配子后, 软体部变得瘦弱, 含水量增加, 糖原含量降低, 失去了鲜美的味道, 品质受到很大影响。三倍体牡蛎因生长速率更快、个体更大、肉质

鲜美、死亡率低、抵抗力更强、繁殖期后软体部并不明显消瘦, 能够明显提高牡蛎产量和质量, 满足人们的食用需求, 因而逐渐受到人们的青睐^[2]。

生产三倍体牡蛎主要是采用物理、化学等方法诱导抑制受精卵的第二极体排放, 从而使其形成三套染色体组生物体, 即三倍体; 也可以通过四倍体与二倍体杂交产生100%的三倍体, 但是四倍体生产难度大, 制作流程复杂。高温、低盐、静水压等物理方法虽然生产成本低, 但需要专门的仪器设备, 并且对受精卵的刺激太大, 往往会导致卵裂率或D幼率(D形幼虫

收稿日期: 2015-11-20 修回日期: 2016-05-09

资助项目: 广东省科技厅项目(2013B020201002, 2014B020202011); 国家贝类产业体系建设专项(CARS-48)

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

率)较低、畸形率较高、三倍体率较低而且不稳定。其中,化学方法如细胞松弛素(CB)、6-二甲氨基嘌呤(6-DMAP)等不仅诱导出的三倍体率高,而且不会对受精卵存活产生太大影响,所以一直是研究者们较为常用的方法。国内学者从20世纪90年代开始,先后对近江牡蛎(*C. rivularis*)^[3-5]、太平洋牡蛎(*C. gigas*)^[6]等进行了三倍体诱导研究。其中,CB或6-DMAP诱导太平洋牡蛎三倍体在我国已经初步进入了产业化阶段^[7-9]。由于香港牡蛎和其他牡蛎生活环境条件有明显差异,传统方法并不完全适用于香港牡蛎三倍体生产,因此本研究探讨了CB、6-DMAP诱导三倍体的最佳条件及两种化学试剂的三倍体诱导效应,为香港牡蛎三倍体的大规模生产提供基础理论。

1 材料与方法

1.1 亲贝挑选

挑选2~3龄、壳长10~20 cm、体质量大于100 g、左壳凹凸大、无损伤、无特异病原体、性腺饱满、活性较好的个体作为亲贝。亲贝在使用前先装入网笼中,吊养在育苗池附近的海区或水泥池中备用。三倍体诱导研究在28~30 °C、盐度15~25的新鲜海水环境中进行。

1.2 解剖及人工授精

用人工解剖法获得牡蛎的配子。筛选出梨形或卵圆形、细胞质丰富的卵子,放置于海水中激活,然后用500目的筛绢网洗去组织块等杂质;同时,筛选精子活跃的雄贝挤精、用500目筛绢网过滤掉精液中的杂质,并在海水中激活精子。以受精率 $\geq 85\%$ 的受精卵诱导香港牡蛎三倍体。在解剖亲贝过程中,应严格操作,注意防止精子污染,避免意外受精。

1.3 配制药品及三倍体诱导

参照Stanley等^[10]方法配置CB(由于CB有剧毒,在配制药品及实验过程中要严格做好保护措施);6-DMAP一般先用蒸馏水配成合适浓度的储备液,置于4~8 °C下备用,在放置过程中,一般每隔0.5 h摇晃1次,使其充分混匀溶解。

CB诱导三倍体的最佳诱导条件组合 参考Scarpa等^[11]、张国范等^[12]和张跃环等^[13]相关方法,根据以下方法确定CB最佳诱导组合:①先把受精卵密度调整为 5×10^7 个/L,在受精后15 min

分别用CB浓度为0.25、0.50、0.75和1.00 mg/L 4个梯度分别持续处理20 min,再把受精卵放在正常海水中孵化,测每组的孵化率、D幼率等。在第2天收集D形幼虫,用流式细胞仪测三倍体率,最后根据三倍体率确定最佳CB处理浓度;②将受精卵密度调整为 5×10^7 个/L,然后在受精后12、15、18和21 min 4个时间点,用上述的最佳CB处理浓度持续处理20 min,测数据,收集D形幼虫测三倍体率,确定最佳开始处理时间;③将受精卵密度调整为 5×10^7 个/L,在最佳开始处理时间用最佳CB处理浓度,分别持续处理10、15、20和25 min,测数据,收集D形幼虫测三倍体率,确定最佳持续处理时间;④将受精卵密度分别调整为 2.5×10^7 、 5.0×10^7 、 7.5×10^7 、 1.0×10^8 、 2.0×10^8 和 3.0×10^8 个/L,在最佳开始处理时间用最佳CB处理浓度,处理最佳持续时间,测数据,收集D形幼虫测三倍体率,确定最佳受精卵密度。每个实验重复3次,同时设置二倍体对照组。

6-DMAP诱导三倍体的最佳诱导条件组合 根据于瑞海等^[14]、田传远等^[15]和Gerard等^[16]相关方法,用以下方法确定6-DMAP的最佳诱导组合:①先把受精卵密度调整为 3.0×10^7 个/L,平均分为4组,然后在受精后15 min分别用6-DMAP浓度为50、75、100和125 mg/L 4个梯度分别持续处理20 min,再把受精卵放在正常海水中孵化,测每组的孵化率、D幼率等。在第2天收集D形幼虫,用流式细胞仪测三倍体率,最后根据三倍体率确定最佳6-DMAP处理浓度;②先将受精卵密度调整为 3.0×10^7 个/L,平均分为4组,然后分别在受精后12、15、18和21 min,用最佳6-DMAP处理浓度持续处理20 min,测数据,收集D形幼虫测三倍体率,确定最佳开始处理时间;③先将受精卵密度调整为 3.0×10^7 个/L,平均分为4组,然后在最佳开始处理时间用最佳6-DMAP处理浓度,分别持续处理10、15、20和25 min,测数据,收集D形幼虫测三倍体率,确定最佳处理持续时间;④分别将受精卵密度调整为 1.5×10^7 、 3.0×10^7 、 4.5×10^7 和 6.0×10^7 个/L 4个梯度;然后在最佳开始处理时间,用最佳6-DMAP处理浓度处理最佳持续时间,最后测数据,收集D形幼虫测三倍体率,确定最佳受精卵密度。每个实验重复3次,同时设置二倍体对照组。

1.4 受精率、卵裂率、D幼率、三倍体率

测量各实验组的受精率、卵裂率、D形幼虫率等指标, 受精率为受精的卵子数占总卵子数的百分比; 卵裂率为卵裂的受精卵数量占总受精卵数量的百分比; D幼率为D形幼虫数量占总卵裂数量的百分比; 三倍体率为三倍体分裂相占总分裂相的百分比; 诱导效率指数为三倍体率均值与D幼率均值的乘积。三倍体率利用德国Partec II流式细胞仪进行检测。

1.5 数据处理

利用SPSS19.0统计软件进行数据分析, 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 显著性水平

设为0.05, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著, 不同实验组间的差异用不同字母表示。

2 结果

2.1 CB诱导效果

香港牡蛎在受精后15~18 min, 受精卵密度为 2.0×10^8 个/L(密度太低, 生产成本增加; 密度太高, D幼率变低), 用浓度为0.50 mg/L的CB(浓度为0.75~1.00 mg/L时三倍体率虽高, 但D幼率很低)进行处理, 持续处理20 min后, 三倍体率为100%, 此条件为CB诱导香港牡蛎三倍体的最佳诱导组合(表1, 图1)。

表1 CB诱导香港牡蛎三倍体的效果
Tab. 1 The effect of CB on triploid induction of *C. hongkongensis*

条件 condition	卵裂率 cleavage rate	D幼率 D larvae rate	三倍体率 triploidy rate
CB(mg/L)			
0.25	76.92±7.70 ⁱ	79.87±4.81 ⁱ	78.33±2.19 ^b
0.50	65.86±18.74 ^{uu}	71.62±3.29 ^j	98.53±5.95 ^a
0.75	56.67±1.94 ^{uu}	48.90±5.58 ^j	100±0 ^a
1.00	41.55±0.86 ^u	42.47±4.79 ^j	100±0 ^a
诱导时机/min induction time			
12	65.28±16.84 ^v	77.77±3.72 ^m	93.54±4.07 ^d
15	56.35±1.12 ^v	57.86±2.58 ⁿ	100±0 ^c
18	57.94±19.08 ^v	56.07±3.52 ^{no}	100±0 ^c
21	61.27±4.89 ^v	48.87±3.56 ^o	62.20±0.65 ^e
诱导持续时间/min induction duration			
10	61.31±10.76 ^w	58.73±6.35 ^p	74.73±2.99 ^e
15	60.09±14.60 ^w	59.83±2.25 ^p	89.11±1.97 ^b
20	50.36±1.43 ^w	60.25±8.24 ^p	100±0 ^f
25	51.51±2.62 ^w	50.23±7.15 ^p	85.17±2.08 ^b
受精卵密度/($\times 10^7$ 个/L) fertilized eggs density			
2.5	63.20±8.45 ^x	65.52±7.12 ^q	51.45±2.86 ⁱ
5.0	59.45±6.38 ^x	68.34±2.35 ^q	100±0 ^k
7.5	54.23±3.75 ^x	78.33±2.89 ^q	100±0 ^k
10	60.00±9.14 ^x	69.52±4.95 ^q	99.46±0.94 ^k
20	59.69±5.66 ^x	50.58±2.96 ^r	100±0 ^k
30	56.76±8.14 ^x	24.23±4.76 ^s	100±0 ^k
对照组 control group	88.78±5.26	89.34±3.59	

注: 对照组是二倍体组, 三倍体率为0。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 triploidy of the diploid group is 0. The different letter in each line indicates significant difference($P<0.05$), the same below

2.2 6-DMAP诱导效果

香港牡蛎在受精后的15~18 min, 受精卵密度为 4.5×10^7 个/L, 用浓度为75~100 mg/L的6-DMAP处理20~25 min时, 三倍体率为62.52%~72.36%, 此条件为6-DMAP诱导香港牡蛎三倍体的最佳诱导组合(表2, 图1-a, 1-c)。

2.3 两种诱导方法比较

采用CB、6-DMAP对同一批香港牡蛎受精卵进行诱导, 结果显示, CB诱导方法三倍体率很高但卵裂率较低、D幼率较低, 由于CB价格昂贵, 因此生产成本较高, CB的生产成本是6-DMAP的1.40~1.87倍。此外, CB有一定的毒性, 在操作过程中对人员的身体健康构成一定的威胁、其废液对环境有污染, 故CB诱导香港牡蛎三倍

体的方法可能更加适用于小规模的科学实验。虽然6-DMAP诱导方法的三倍体率较CB低, 但是其卵裂率更高、D幼率更高、诱导效率更高, 而且试剂成本较低、对人畜毒性较小、对环境污染较轻, 这些优点都使6-DMAP比CB更加适用于大规模的香港牡蛎三倍体苗种生产(表3)。

3 讨论

试剂浓度、受精卵密度、诱导时机(受精后开始处理时间)、诱导持续时间等4种因素都会对三倍体率结果产生影响, 最佳诱导组合需要结合三倍体率、卵裂率、D幼率、试剂成本等多方面因素考虑。由于CB具有毒性, 所以卵裂率、D幼率随着试剂浓度的增加而降低, CB在浓度为0.75和1.00 mg/L时, 三倍体率为100%, 与0.50 mg/L

表 2 6-DMAP诱导香港牡蛎三倍体的效果
Tab. 2 The effect of 6-DMAP on triploid induction of *C. hongkongensis*

条件 condition	卵裂率 cleavage rate	D幼率 D larvae rate	三倍体率 triploidy rate
%			
6-DMAP/(mg/L)			
50	84.85±0.78 ^s	87.50±2.50 ^o	27.78±0.52 ^a
75	77.27±6.36 ^{s†}	86.31±1.03 ^o	58.52±1.81 ^b
100	71.41±9.86 ^{s†}	85.89±3.65 ^o	51.67±1.45 ^b
125	64.68±4.63 [†]	79.79±7.27 ^o	36.37±10.64 ^a
诱导时机/min induction time			
12	60.88±24.46 ^u	90.67±4.04 ^p	27.35±7.31 ^e
15	64.19±6.59 ^u	84.44±5.09 ^p	58.75±4.84 ^e
18	53.72±8.19 ^u	88.36±2.43 ^p	57.37±3.54 ^e
21	52.93±13.26 ^u	80.07±6.77 ^p	42.71±5.84 ^d
诱导持续时间/min induction duration			
10	50.83±11.27 ^v	88.75±6.96 ^q	10.85±2.20 ^h
15	45.37±4.24 ^v	90.67±2.08 ^q	37.16±3.52 ^e
20	69.55±17.86 ^v	91.22±1.07 ^q	58.82±2.80 ^f
25	51.03±9.97 ^v	88.78±4.74 ^q	50.64±5.43 ^f
受精卵密度/($\times 10^7$ 个/L) fertilized eggs density			
1.5	52.06±2.86 ^w	77.33±13.31 ^r	30.84±3.00 ⁱ
3.0	65.56±5.56 ^s	89.00±3.61 ^r	53.84±4.29 ^k
4.5	63.37±3.15 ^{s,w}	81.08±8.03 ^r	68.71±4.62 ^l
6.0	62.05±7.15 ^{s,w}	75.64±1.11 ^r	32.11±0.77 ⁱ
对照组 control group	89.32±4.37	94.12±5.44	

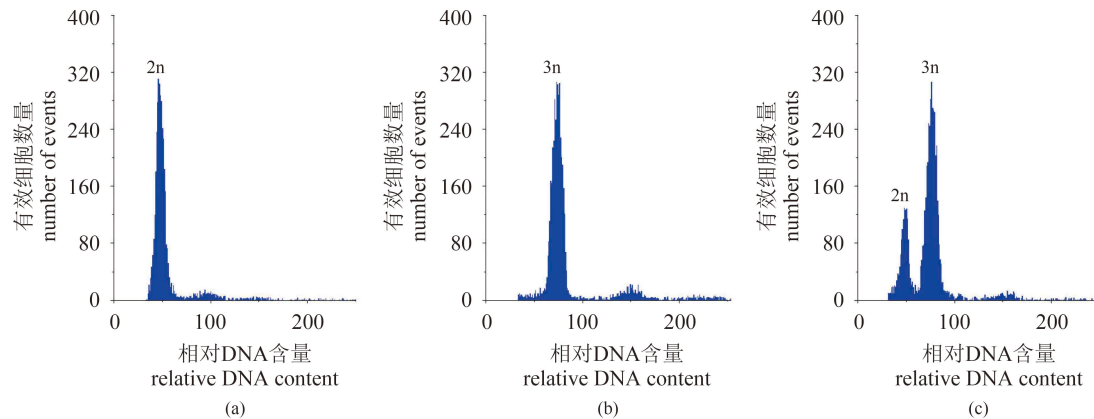


图1 CB和6-DMAP最佳条件下诱导三倍体的比较

(a) 二倍体对照组; (b) CB诱导100%比率三倍体; (c) 6-DMAP诱导72.36%比率三倍体

Fig. 1 Induced triploid by CB and 6-DMAP during the optimum condition

(a) diploid group; (b) 100% triploid rate by CB treatment; (c) 72.36% triploid rate by 6-DMAP treatment

表3 CB与6-DMAP诱导香港牡蛎三倍体的比较

Tab. 3 A comparison of triploidy induction in *C. hongkongensis* using CB and 6-DMAP

项目 item	CB	6-DMAP
毒性 toxicity	有一定毒性, 对人体有潜在的健康影响	毒性较小, 对人体健康影响较小
受精率 fertilization rate	89.35%	90.12%
卵裂率 cleavage rate	53.16%~63.00%	60.00%~66.25%
D幼率 D larvae rate	47.32%~53.09%	74.43%~90.00%
试剂成本 cost	260 元/L	139~185 元/L
三倍体率 triploid rate	100%	62.52%~72.36%
三倍体率稳定性 stability of triploid rate	稳定	稳定
诱导效率指数 the efficiency of triploid induction	0.47~0.53	0.47~0.65

时三倍体率没有显著差异, 但分析发现, 在此两浓度时卵裂率、D幼率比0.50 mg/L时低, 并且浓度的增大必然导致试剂成本增加, 所以选择使用CB浓度为0.50 mg/L。6-DMAP对受精卵没有显著的直接影响, 所以随着6-DMAP浓度的增加, 卵裂率、D幼率没有特别大的变化。6-DMAP在浓度为75和100 mg/L时的三倍体率没有显著性差异, 所以选用浓度为75~100 mg/L。处理受精卵的密度不仅与卵裂率、D幼率、三倍体率有关, 也与试剂成本有关。受精卵处理密度是影响生产成本的重要指标之一, CB、6-DMAP诱导方法分别以 2.0×10^8 和 4.5×10^7 个/L为宜^[17]。对于起始处理时间及处理持续时间而言, 两种不同诱导方法的最佳开始处理时间均为15~18 min, 最佳处理持续时间都为20 min, 这说明同一批亲贝

第一、二极体出现时间大致相同。

在香港牡蛎三倍体生产过程中, 需要注意: ①操作熟练程度。使用同样的条件(即重复实验)处理受精卵, 其三倍体率、卵裂率、D幼率等会有一些的差异, 不同科研人员采用同一种方法对同种牡蛎进行三倍体诱导, 结果也有不同。②配子成熟度。因为所用配子大多采用人工解剖法获得, 配子成熟度差异较大; 选用较成熟的配子, 受精卵出现第一、二极体的时间相对一致, 可产生较高比例的三倍体^[18]。在本研究中, 为了保证良好的同步性, 在诱导前进行了显微镜检查配子成熟度并做预实验, 弃用成熟度差、同步性差的亲贝。③幼虫倍性测定。即使使用同一批D型幼虫测定倍化率, 流式细胞仪检测也会有一定的差异, 这可能是流式细胞仪

自身检测稳定性的问题;所以对同一批样品检测三倍体率时,至少要重复检测3次,取其平均值。④不同幼虫阶段倍性略有变化。同一批诱导的三倍体在不同时期检测,其三倍体率也会有差异;这可能是一些三倍体/二倍体在生长过程中由于环境变化而死亡,或某些三倍体个体发生倍性变化导致的,这也会影响到倍化率的变化。所以为了保证结果的可靠性和可重复性,实验尽量使用同批亲贝,在间隔较短时间内,设置相同的环境条件(温度、盐度),重复进行3次实验,数据取平均值,尽量减少误差。

本实验团队系统地研究了CB和6-DMAP两种化学试剂对香港牡蛎三倍体的生产效果,得出了两种试剂生产三倍体的最佳条件,评估了使用两种试剂生产三倍体的效果差异,认为6-DMAP更适合于三倍体大规模生产,为香港牡蛎多倍体育种奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 常亚青. 贝类增殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 207-213.
Chang Y Q. Shellfish Breeding Science[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007: 207-213 (in Chinese).
- [2] 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).
- [3] 容寿柏, 李一民, 刘绍琼, 等. 用冷热休克诱导四倍体近江牡蛎[J]. 湛江水产学院学报, 1992, 12(2): 18-21.
Rong S B, Li Y M, Liu S Q, *et al.* Tetraploidy induction by cold and heat shock in *Crassostrea rivularis*[J]. Journal of Zhanjiang Fisheries College, 1992, 12(2): 18-21 (in Chinese).
- [4] 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, 18(3): 237-240.
Liang Y, Wang R C, Tian C Y, *et al.* A preliminary study on the triploid oyster *Crassostrea talienwhanensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 1994, 18(3): 237-240 (in Chinese).
- [5] 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* Born with Cytochalasin B and temperature shock[J]. Marine Science Bulletin, 1994, 13(6): 34-40 (in Chinese).
- [6] 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-DMAP: By blocking the second polar body of the zygotes[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1999, 6(2): 1-4 (in Chinese).
- [7] 王如才, 王昭萍, 田传远, 等. 我国太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)三倍体育苗与养殖技术研究进展[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(2): 193-200.
Wang R C, Wang Z P, Tian C Y, *et al.* Advances in triploid breeding and culturing techniques in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2002, 32(2): 193-200 (in Chinese).
- [8] 王昭萍, 李贇, 王如才, 等. 三倍体太平洋牡蛎生产性育苗与养成初报[J]. 海洋湖沼通报, 2000(3): 34-39.
Wang Z P, Li Y, Wang R C, *et al.* Productive seed breeding and culturing of triploid pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2000(3): 34-39 (in Chinese).
- [9] 于瑞海, 王昭萍, 王如才, 等. 两种方法诱导太平洋牡蛎三倍体在生产上的应用效果[J]. 海洋湖沼通报, 2003(1): 57-61.
Yu R H, Wang Z P, Wang R C, *et al.* Comparison of economic efficiency of triploidy induction in Pacific oysters *Crassostrea gigas* by two methods[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2003(1): 57-61 (in Chinese).
- [10] 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.
- [11] Scarpa J, Toro J E, Wada K T. Direct comparison of six methods to induce triploidy in bivalves[J]. Aquaculture, 1994, 119(2-3): 119-133.
- [12] 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 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 (in Chinese).
- [13] 张跃环, 喻子牛, 苏家齐, 等. 一种生产香港牡蛎全三倍体的时间点定量处理方法: 中国, CN104255586A [P]. 2015-01-07.
- Zhang Y H, Yu Z N, Su J Q, *et al.* Time point quantification treatment method for producing *Crassostrea hongkongensis* all-triploid: China, CN104255586A [P]. 2015-01-07 (in Chinese).
- [14] 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): 589-592.
- 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): 589-592 (in Chinese).
- [15] 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).
- [16] Gérard A, Ledu C, Phélipot P, *et al.* The induction of M I and M II triploids in the pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB[J]. *Aquaculture*, 1999, 174(3-4): 229-242.
- [17] 于瑞海, 王如才, 王昭萍, 等. 不同卵密度对太平洋牡蛎三倍体诱导效果影响的研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2002(2): 57-61.
- Yu R H, Wang R C, Wang Z P, *et al.* A study on the effect of spawn density on triploid induction of Pacific oyster[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2002(2): 57-61 (in Chinese).
- [18] 曾志南, 林琪, 吴建绍, 等. 太平洋牡蛎二倍体和三倍体的生长比较[J]. *上海水产大学学报*, 1999, 8(2): 119-123.
- Zeng Z N, Lin Q, Wu J S, *et al.* Comparison of growth between diploids and triploids oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1999, 8(2): 119-123 (in Chinese).

Comparative studies on triploidy induction using CB and 6-DMAP in *Crassostrea hongkongensis*

QIN Yanping^{1,2,3}, ZHANG Yuehuan^{1,3}, ZHOU Yingli^{1,2,3}, WU Xiangwei^{1,2,3},
PENG Min⁴, YU Ziniu^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Biological Resources and Ecology,
South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences,

Guangdong Key Laboratory of Applied Marine Biology, Guangzhou 510301, China;

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

3. South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou 501275, China;

4. Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China)

Abstract: Triploid of *Crassostrea hongkongensis* was induced by blocking the second polar body release by cytochalasin B(CB) and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), and we compared the two methods in the aspects of triploid rate, cleavage rate, velar larvae gain, cost and so on. The effects of the concentration of CB or 6-DMAP, induced occasion, induced duration and zygote density on inducing triploid *C. hongkongensis* were also discussed. The results showed that: when oyster zygotes were fertilized at 28–30 °C and salinity at 15–25, and dealt with 0.50 mg/L CB began at 15–18 min, post fertilization lasted 20 min, and incubated density of zygote when treatment was about 2.0×10^8 ind/L. These were optimum conditions under which triploid of *C. hongkongensis* was induced by CB. In this case, triploid yield was 100%, cleavage rate was 53.16%–63.00%, velar larvae gain was 47.32%–53.09%, the efficiency of triploid induction was 0.47–0.53, and the cost was 260 RMB/L. The surrounding when fertilization, and induced occasion was the same as those in CB, but oyster zygotes were dealt with 75–100 mg/L 6-DMAP last 20–25 min, and incubated density of zygote when treatment was about 4.5×10^7 ind/L. These were optimum conditions of triploid of *C. hongkongensis* was induced by 6-DMAP. In this case, triploid yield was 62.52%–72.36%, cleavage rate was 60.00%–66.25%, velar larvae gain was 74.43%–90.00%, the efficiency of triploid induction was 0.47–0.65, and the cost was 139–185 RMB/L. Through comprehensive comparison between CB and 6-DMAP, we could draw the conclusion that 6-DMAP was more applicable in triploid production of *C. hongkongensis* than CB. This study provided the basic theory and practical experience for polyploidy breeding in oyster.

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; triploid; CB; 6-DMAP

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

Funding projects: Guangdong Provincial Department of Science and Technology (2013B020201002, 2014B020202011); National Shellfish Industry Technology System (CARS-48)