

低渗透诱导合浦珠母贝的三倍体

范超¹, 张学开¹, 张兴志², 唐黎明¹, 李金龙¹, 李琼珍², 王昭萍^{1*}

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

2. 广西水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021)

摘要: 为了探究不同盐度对诱导合浦珠母贝三倍体的效果, 本研究首次利用低渗方法诱导合浦珠母贝三倍体, 通过控制变量法从不同盐度、诱导时机以及诱导时间中探究最适诱导条件。同时对合浦珠母贝卵裂率、孵化率以及存活率、壳长、三倍体率的变化进行了探究。结果显示, 在盐度 14、50% 受精卵释放第一极体 (PB I) 及诱导 15 min 时 D 形幼虫的三倍体率最高, 分别为 $64.16\% \pm 6.92\%$ 、 $65.87\% \pm 6.51\%$ 以及 $65.14\% \pm 1.93\%$ 。三倍体幼虫并未表现出明显优势; 低渗对胚胎造成的影响使幼虫存活率和三倍体率有所下降。通过对卵裂率、孵化率和 15 日龄存活率、壳长及三倍体率进行主成分分析, 在三种诱导条件中均保留了前两个主成分, 且保留的主成分的累积方差贡献率均超过了 85%。盐度 14、50% 受精卵释放 PB I 及诱导 15 min 分别在各自实验中的综合评价得分分别为第 6、第 1 和第 1。该研究表明, 合浦珠母贝三倍体幼虫在生长方面的优势不明显, 50% 受精卵释放 PB I 及诱导 15 min 两个诱导条件适合合浦珠母贝三倍体诱导。本研究可为合浦珠母贝三倍体育种提供一种新的思路, 有助于提高生产效益。

关键词: 合浦珠母贝; 低渗; 三倍体; 主成分分析

中图分类号: S 961.6

文献标志码: A

近年来, 利用先进生物技术和细胞遗传技术改善生物品质和养殖品种, 是生物育种研究和养殖的热点。其中, 多倍体育种是通过增加染色体组的方法改变生物的遗传基础, 从而培育出具有较高经济价值的优良品种, 是目前生物遗传育种中具有较高应用价值的领域之一。三倍体由于比二倍体多一套染色体组, 一般生长速率较快、个体较大、糖原含量也更高。由于三倍体育性较差, 因此在繁殖季节饱满度较高, 死亡率更低。

三倍体育种作为国内外的研究热点之一, 在水产动物遗传育种研究中也取得了较好的成绩。从 20 世纪 70 年代开始, 研究成功的海产鱼类便

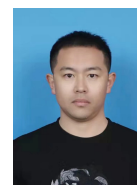
已有十余种, 如黄盖鲽 (*Pseudopleuronectes yokohamae*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、漠斑牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、真鲷 (*Pagrus major*) 及黑棘鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) 等^[1]。Stanley 等^[2]于 1981 年利用细胞松弛素 B (Cytochalasin B, CB) 首次成功诱导出美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 三倍体。自此之后, 研究人员对多种贝类进行了三倍体研究, 并成功诱导出三倍体。如利用 CB、6-DMAP 等药物通过化学方法诱导得到的三倍体贝类有长牡蛎 (*C. gigas*)^[3-5]、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)^[6]、虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)^[7]、栉孔扇贝

收稿日期: 2022-01-01 修回日期: 2022-03-03

资助项目: 国家自然科学基金 (911221680)

第一作者: 范超 (照片), 从事贝类遗传育种与繁育研究, E-mail: chaos924@outlook.com

通信作者: 王昭萍, 从事贝类遗传育种与繁育研究, E-mail: zpwang@ouc.edu.cn



(*Chlamys farreri*)^[8-9]、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*)^[10] 和缢蛏 (*Sinonova culaconstricta*)^[11] 等; 利用温度、盐度等物理方法诱导得到三倍体的贝类有栉孔扇贝^[12-13]、文蛤 (*Meretrix meretrix*)^[14]、长牡蛎^[15] 及虾夷扇贝^[16] 等; 此外, 还有利用生物方法实现规模化生产的长牡蛎、美洲牡蛎等。

合浦珠母贝是我国最主要海水珍珠贝类, 我国海水珍珠几乎全部由合浦珠母贝所产。但近年来, 由于受城市建设和长期不当养殖及近亲繁殖的影响, 合浦珠母贝野生资源遭到破坏。不注重科学育种及母贝的择优与复壮研究, 使得我国合浦珠母贝所产珍珠颗粒变小、珠层薄, 养殖规模和产量急剧滑坡。因此, 利用三倍体的不育性和生长速率快等特点来降低繁殖期的死亡率和增大珍珠规格是改善这一现状的方法之一。国内外学者对此也进行了诸多研究。其中涉及了静水压法诱导^[17]、化学药物诱导^[18-19] 等。

目前还没有利用低渗对合浦珠母贝进行三倍体诱导的相关报道。本研究通过不同盐度对合浦珠母贝进行三倍体诱导, 为合浦珠母贝三倍体育种提供新的实验依据; 同时利用主成分分析方法对卵裂率、孵化率、存活率、壳长以及三倍体率进行综合评估, 以期对合浦珠母贝三倍体育种程序的构建提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 亲本来源

实验组和对照组所用亲贝均为在北海铁山港区火禄村小宇宙合作社的二龄养殖群体。亲本于2019年4月从养殖场运至广西水产科学院国家贝类产业技术体系广西综合试验站孵化场。去除死贝和壳型不规整的个体, 清除贝壳上的附着物, 装入扇贝笼中吊养在水泥池中暂养1周。暂养期间每天投饵两次, 每次投喂足量亚心形扁藻 (*Platymonas subcordiformis*), 每天全量换水1次。暂养水温24~25℃, 盐度30。本研究获得了中国海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守中国海洋大学伦理规范, 并按照中国海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 人工授精

实验采用解剖法进行人工受精。用牡蛎刀将珍珠贝闭壳肌割断后肉眼观察性腺发育情况, 保

留性腺饱满的个体。用牙签蘸取少量性腺, 在显微镜下(10×)鉴定性别。将雌雄个体分开, 雄性置于阴凉处备用。将卵子挤入盛满砂滤海水的20 L桶中, 用100 μm筛绢滤去组织碎块等大块杂质后, 用25 μm筛绢洗卵3次。向卵液中滴入几滴氨水(2~3 mmol/L)^[20]对卵子进行1 h以上活化。用1 000 μL移液枪从每个雄贝性腺中吸取1 mL精液, 放出盛有砂滤海水的5 L小桶中。显微镜下观察卵子成熟后, 向精液中滴入几滴氨水激活精子。在正式受精前检查卵子以排除意外受精的发生。当观察到精子完全激活后, 向卵液中注入适量精液开始受精, 镜下观察每个卵周围约5~8个精子。受精后持续观察受精卵发育状态。

1.3 低渗透导三倍体

诱导盐度 当40%~50%合浦珠母贝受精卵释放第一极体(PB I)时, 将受精卵液置于加入后盐度分别为10、12、14、16、18、20、22的砂滤海水中诱导15 min。以此确定最佳诱导盐度。

诱导时机 当显微镜下观察合浦珠母贝受精卵排放出第一个PB I, 50%排放出PB I以及第一个第二极体(PB II)时开始诱导。诱导盐度为上述盐度中确定的最佳盐度, 诱导时间为15 min。以此确定最佳诱导时机。

诱导时间 利用上述最佳诱导盐度和诱导时机组合分别进行10、15和20 min诱导。以此确定最佳诱导时间。

低渗透诱导实验在5 L小桶中进行, 每种组合设置3个重复。同时设置一组对照组(C), 对照组未经过低渗透诱导。诱导结束后用25 μm筛绢洗去受精卵液中的多余精子, 随后将受精卵液倒入盛满砂滤海水的20 L塑料桶中进行孵化。

1.4 幼虫培育

受精卵大约20 h后发育至D形幼虫。用40 μm筛绢收集幼虫后继续在原桶中培养。幼虫生长到110~120 μm, 幼虫以球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 作为饵料, 随着幼虫的生长, 饵料中加入牟氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*) 和亚心形扁藻。饵料密度从每天3 000个/mL增加至每天8 000个/mL。三种饵料的比例为1:1:1(数量比)。幼虫培育期间每天全量换水1次, 水温24~27℃, 盐度30。

1.5 数据收集和计算

对各组的卵裂率(公式1)、孵化率(公式2)、

3、6、9、12、15日龄的存活率(公式3)和生长参数以及1、3、6、9、12、15日龄的三倍体率(公式4)进行收集和计算。收集、计算方式:

$$CR = \frac{N_{Ce}}{N_{Fe}} \times 100\% \quad (1)$$

式中, CR代表卵裂率(%), N_{Ce} 代表单位体积内发生卵裂的受精卵数(个/mL), N_{Fe} 代表单位体积受精卵数(个/mL)。

$$HR = \frac{N_D}{N_{Fe}} \times 100\% \quad (2)$$

式中, HR代表孵化率(%), N_D 代表1日龄时单位体积内的D形幼虫数(个/mL)。

$$SR = \frac{N_t}{N_D} \times 100\% \quad (3)$$

式中, SR代表存活率(%), N_t 代表测量时单位体积内存活幼虫数量(个/mL)。

$$TR = \frac{S_T}{S_T + S_D} \times 100\% \quad (4)$$

式中, TR代表三倍体率(%), S_T 代表测试群体经流式细胞仪检测后的三倍体细胞数(个), S_D 代表测试群体经流式细胞仪检测后的二倍体细胞数(个)。

生长参数 分别在显微镜下(10×)测量各组在3、6、9、12、15日龄时的壳长(μm)。

1.6 数据分析

采用单因素方差分析、Duncan氏多重比较方法分析不同组合间的孵化率、存活率、生长参数和倍化率的差异。根据李艳双等^[21]和李阳春等^[22]的方法,对卵裂率、孵化率、15日龄壳长、15日龄存活率以及15日龄三倍体率进行主成分分析。以累积方差贡献率≥85%作为主成分选取标准。综合的得分计算方式:

$$\text{综合得分} = \text{主成分1得分} \times \text{主成分2方差贡献率} + \text{主成分2得分} \times \text{主成分1方差贡献率} \quad (5)$$

所有统计分析均使用SPSS软件(版本22.0)进行,所有分析的显著水平均设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同条件下卵裂率、孵化率和三倍体率比较

不同条件下诱导合浦珠母贝三倍体时的卵裂率、孵化率及1日龄D型幼虫三倍体率如图1。结果显示,随着盐度的升高,卵裂率和孵化率逐

渐升高,D型幼虫三倍体率则先上升后降低;对照组的卵裂率和孵化率均与实验组差异显著($P < 0.05$);盐度14时,D型幼虫三倍体率最高(64.16%±6.92%),但仅与盐度22时(36.48%±4.59%)的差异显著($P < 0.05$),与其他组的差异均不显著($P > 0.05$,图1-a)。随着诱导时机的延迟,合浦珠母贝的卵裂率和孵化率逐渐升高;在出现第一个PB I和50% PB I时的卵裂率和孵化率差异均不显著($P > 0.05$);50% PB I时的D形幼虫三倍体率最高(65.87%±6.51%),与其他2个时机时的差异显著($P < 0.05$,图1-b)。随着诱导时间的延长,合浦珠母贝的卵裂率和孵化率逐渐降低,各组之间的差异显著($P < 0.05$),且均显著低于对照组($P < 0.05$);诱导15 min时,D形幼虫三倍体率最高,为65.14%±1.93%,但与诱导20 min时的差异不显著(图1-c)。

2.2 不同条件下存活率比较

随着培养时间的延长,各诱导盐度中的幼虫存活率逐渐降低,诱导盐度越低,下降速度越快;3日龄时,只有盐度16中的幼虫存活率与对照组差异显著($P < 0.05$),而到了15日龄,所有实验组幼虫的存活率均与对照组差异显著($P < 0.05$)(图2-a)。不同诱导时机时,各实验组幼虫的存活率在3~15日龄时的差异均不显著($P > 0.05$);6日龄时,只有出现第一个PB II时的存活率与对照组差异显著($P < 0.05$),而9~15日龄时各实验组的存活率均与对照组差异显著($P < 0.05$)(图2-b)。随着培养时间的延长,诱导时间越长,存活率下降速度越快;3~12日龄时各实验组的存活率差异不显著($P > 0.05$),而15日龄时,诱导20 min组的存活率显著低于诱导10 min组($P < 0.05$)(图2-c)。

2.3 不同条件下壳长生长比较

不同盐度处理后,各实验组幼虫的壳长差异不明显,并未表现出三倍体生长优势;15日龄时,盐度10中的幼虫壳长仅次于对照组,且与对照组没有显著差异($P > 0.05$,图3-a)。在不同诱导时机和不同诱导时长实验中,50% PB I和诱导15 min 2个实验组的壳长均大于其他实验组,甚至出现了高于对照组的情况(图3-a~b)。

2.4 不同条件下三倍体率变化比较

不同条件下,各实验组幼虫在3~15日龄的三倍体率在培养期内均有所下降。在不同盐度诱导实验中,盐度16~22实验组中的幼虫三倍体率

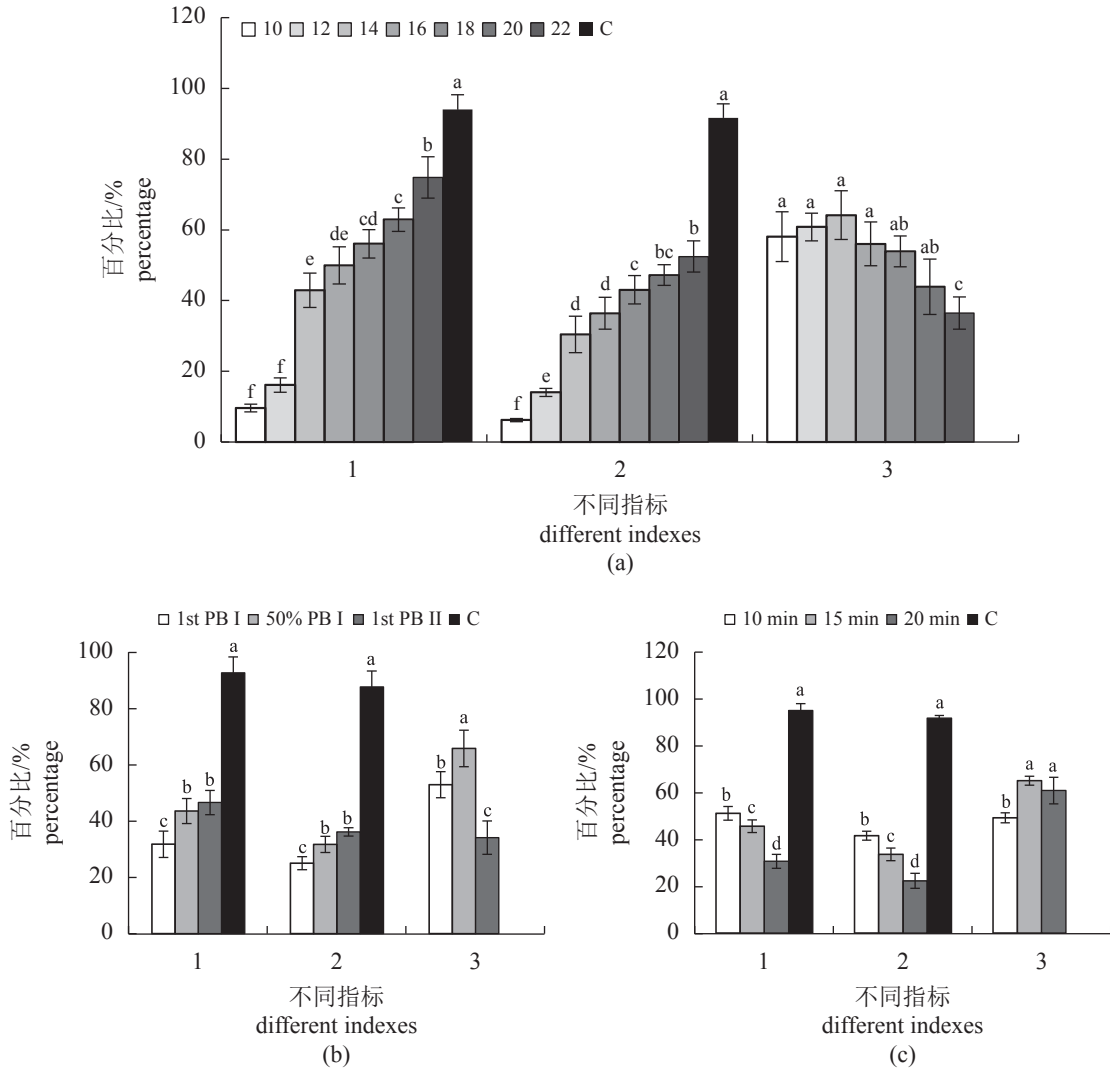


图 1 不同诱导条件下合浦珠母贝卵裂率、孵化率和 1 日龄 D 形幼虫三倍体率

(a) 50% 受精卵释放 PB I 在不同盐度中持续诱导 15 min; (b) 不同诱导时机时在盐度 14 中诱导 15 min; (c) 50% 受精卵出现 PB I 在盐度为 14 中诱导 10、15、20 min。1. 卵裂率, 2. 孵化率, 3. 1 日龄幼虫三倍体率; 相同项目中, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 1 Cleavage rate, hatching rate, and triploid rate of 1-day-old D-shaped larvae in different induction conditions.

(a) 50% of the zygotes released PB I and were continuously induced at different salinity for 15 min; (b) at different initial induction times, induced at a salinity of 14 for 15 min; (c) 50% of the fertilized eggs released PB I and were treated at a salinity of 14 for 10, 15, 20 min. 1. cleavage rate, 2. hatching rate, 3. triploid rate of 1-day-old D-shaped larvae; in the same index, different letters indicate multiple comparisons significant differences between groups ($P < 0.05$), the same below.

降低幅度均超过了 10%(图 4-a); 不同诱导时间实验中, 诱导时间为 10 min 时的幼虫三倍体率降低幅度超过了 10%(图 4-c); 其他实验组均较为稳定; 幼虫的三倍体率变化多集中在壳顶期。

2.5 主成分分析

本研究以累计方差贡献率 $\geq 85\%$ 为标准, 3 种实验方法均选择了前两个主成分用于进行主成分分析综合评价得分计算。不同盐度实验中, 前两个主成分的累积方差贡献率为 94.78%; 主成分

1 主要反映了卵裂率、孵化率和存活率这三个原始变量; 主成分 2 则主要反映的原始变量为生长。在不同诱导时机实验中, 前两个主成分的累积方差贡献率为 100%; 主成分 1 在卵裂率、孵化率、存活率和生长的特征向量分别为 99.75%、98.93%、99.45% 和 87.03%; 主成分 2 在三倍体率上的特征向量为 96.45%。与不同诱导时机实验类似, 在不同诱导时间实验中, 前两个主成分同样很好的反映了所有原始变量; 主成分 1 主要反映了卵裂率、孵化率、存活率和生长这 4 个原始变量, 而主成

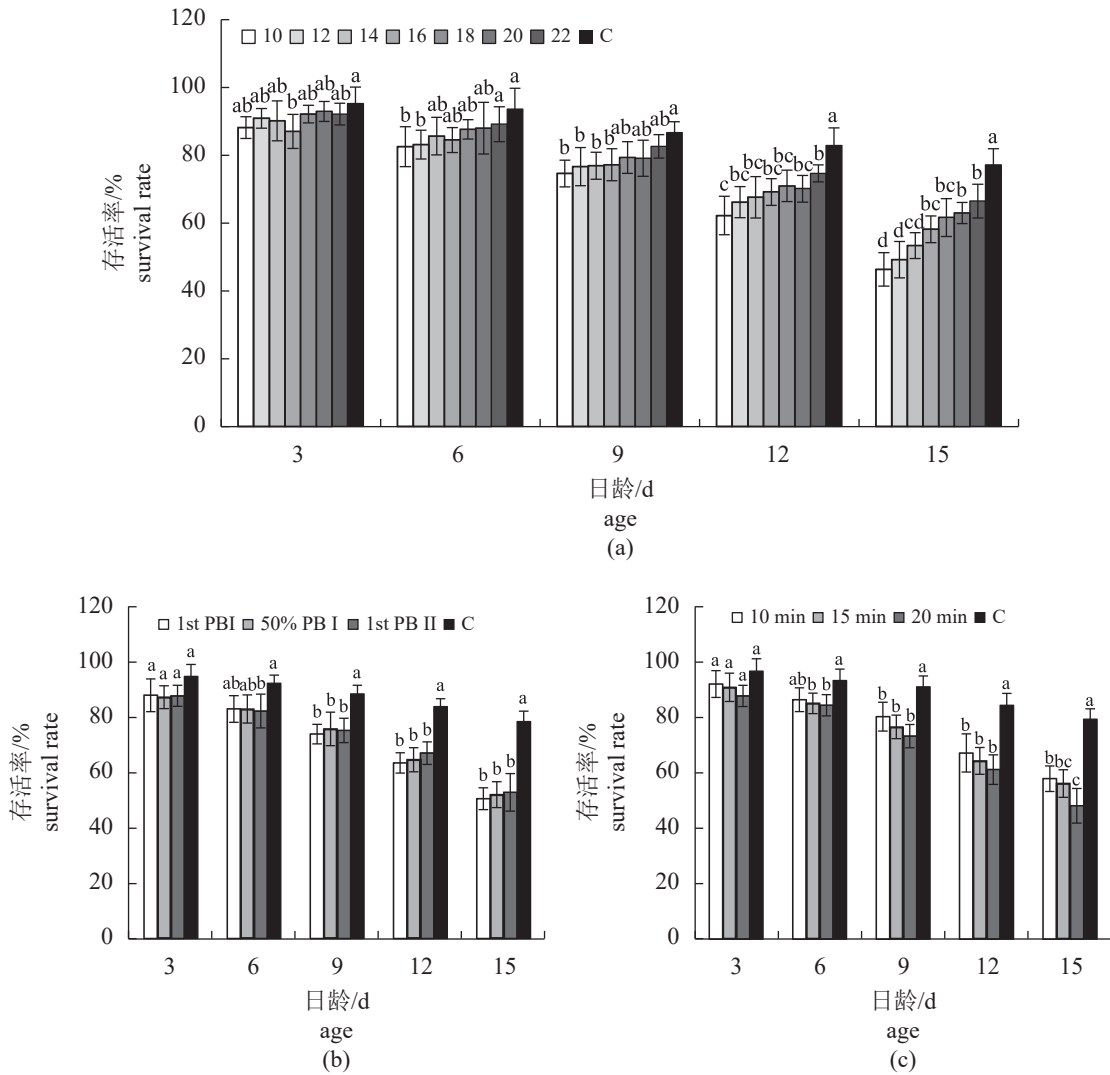


图 2 不同诱导条件下合浦珠母贝在不同日龄的存活率

Fig. 2 Survival rate at different age in different induction conditions

分 2 则主要反映原始变量为三倍体率 (表 1)。在不同盐度实验中, 当诱导盐度为 20 时, 其综合评价得分最高 (89.08); 诱导三倍体率最高的盐度 14 仅排名第 6, 其综合评价得分为 -44.04。不同诱导时机和诱导时间实验中, 三倍体率最高的两个条件 (50% PB I 和 15 min) 的综合评价得分排名均为第 1, 二者的得分分别为 75.75 和 74.47 (表 2)。

3 讨论

通过低渗抑制第二极体被认为是诱导贝类三倍体的一种有效方式。此外, 配子的成熟度也是提高诱导效率的关键因素之一, 配子的成熟度决定了受精卵发育的同步性。获得高质量配子的方法主要包括种贝促熟、诱导产卵排精和解剖获得精卵等^[23]。其中, 解剖获得精卵的方式更容易控

制, 但对于合浦珠母贝来说, 解剖获得的精卵往往不具有受精能力, 需要进行激活。本实验所用的亲本性腺发育良好, 因此, 向卵液中滴入几滴氨水后浸泡约 1 h 可有效提高合子发育的同步性。

本研究中, 各实验组中的卵子经过促熟后, 发育水平较为一致, 因此, 受精卵的发育同步性也较高。利用不同盐度在相同的诱导时机和诱导时间下诱导三倍体, 各盐度中受精卵的卵裂率和孵化率均随着盐度的升高而升高, 而 D 形幼虫三倍体率则随着盐度的升高先上升后降低。盐度的改变会迫使受精卵渗透压发生改变, 严重者可能会使胚胎受损, 造成畸形或者使三倍体胚胎无法发育至 D 形幼虫^[24]。这可能是盐度 10 和 12 中的幼虫三倍体率低于盐度 14 的原因。类似的结果在长牡蛎、近江牡蛎 (*C. ariakensis*) 及熊本牡蛎 (*C.*

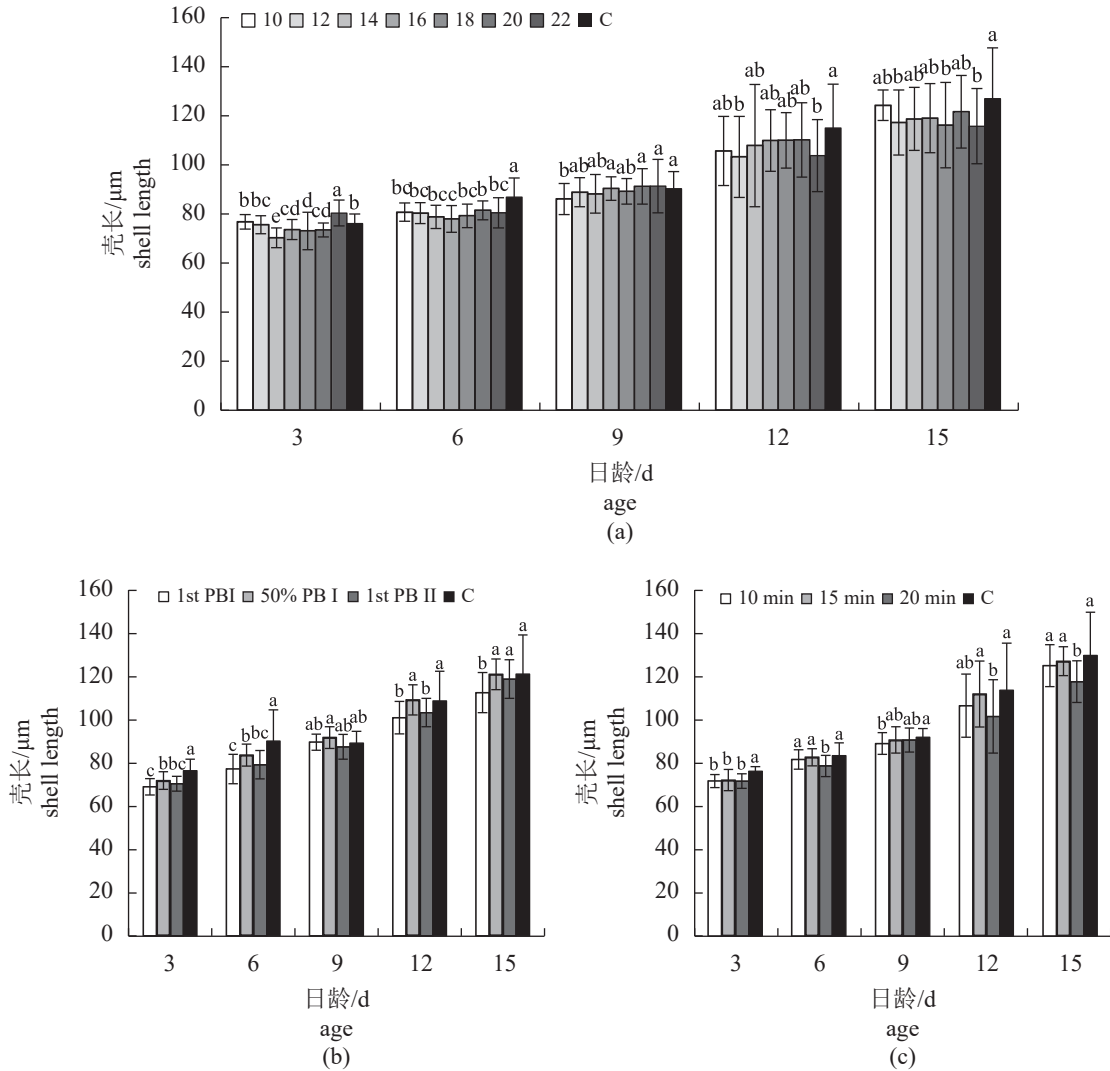


图3 不同诱导条件下合浦珠母贝在不同日龄的壳长

Fig. 3 Shell length at different age in different induction conditions

sikamea) 中均有报道^[15, 25-26]。在不同诱导时机实验中, 当 50% 受精卵排出 PB I 时开始诱导, D 形幼虫的三倍体率最高。本实验采用抑制 PB II 的方式诱导三倍体, 三倍体率的高低与受精卵发育的同步性有直接关系。当显微镜下观察到 50% 受精卵已经释放 PB I 时, 实际上绝大多数受精卵的 PB I 已经释放完毕, 准备释放 PB II。因此, 在此时开始诱导可能具有较好的效果。目前已有的研究中, 诱导时机的选择主要有两种方式, 一种是如本研究中所采用的以某一发育阶段为起点开始诱导^[16, 27], 此方法的其实标志清晰, 容易观察, 但有时需等待较长时间; 另外一种以时间为标志^[28-30], 即受精后的一定时间点时开始诱导, 此方法虽然等待时间较短, 但可能出现在此期间未达到目标发育阶段的情况。在不同诱导时间实验

中, 三个诱导时间中 D 形幼虫的三倍体率先上升后下降。在多次实践过程中我们发现, 合浦珠母贝受精卵从 PB I 释放完成到 PB II 释放完成, 一般在 15min 内完成。这可能也是为什么在之前的报道中多选择 15 min 或 15 min 诱导效果最好的原因^[18, 31]。而诱导时间低于或高于 15 min 时 D 形幼虫三倍体率低的原因可能是未完全达到抑制 PB II 释放的效果或对胚胎产生了不可逆的影响。

在本实验中, 在盐度 10 和诱导 20 min 时的两组幼虫的存活率均最低, 存活率持续而快速降低。诱导盐度的降低以及诱导时间的延长使胚胎处于不适环境中, 使其受到潜在伤害, 这种潜在伤害在 D 形幼虫中的表现为高死亡率^[32]。同时, 由于发育同步性的原因, 高强度的诱导可能使一部分受精卵的 PB I 排放受到抑制, 进而导致染

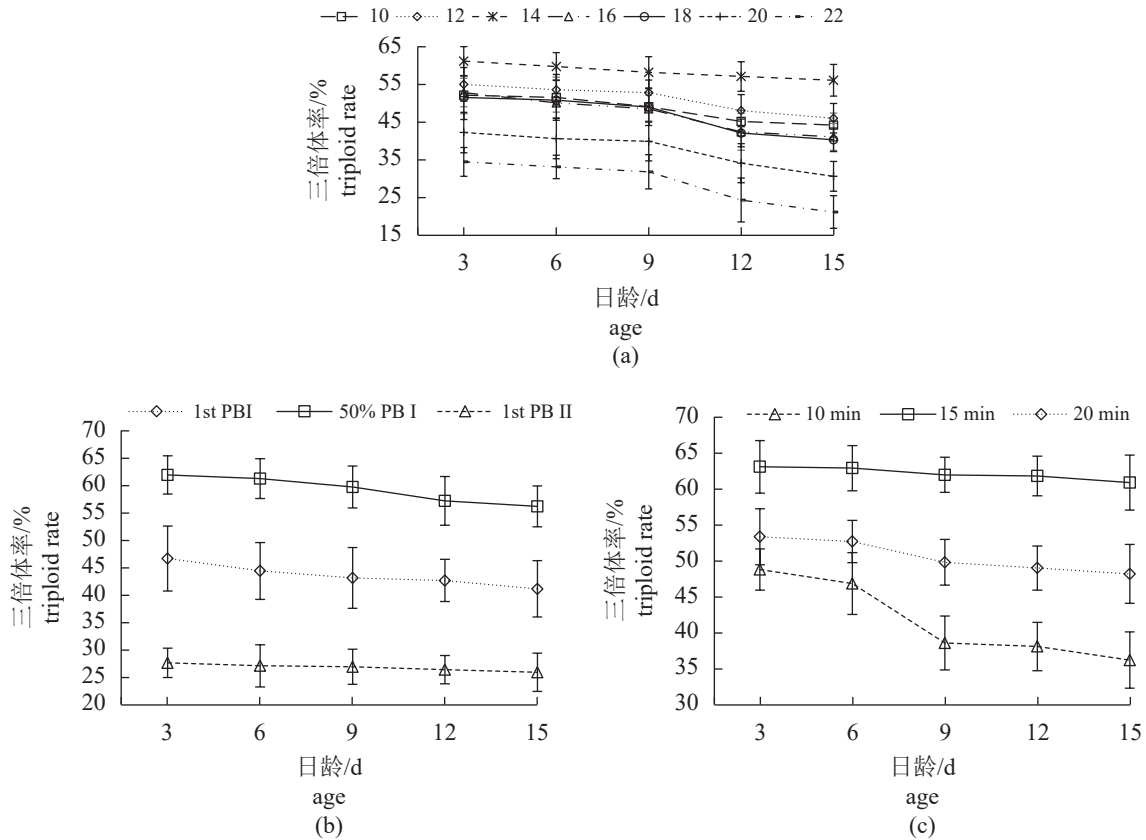


图 4 不同诱导条件下合浦珠母贝在不同日龄的三倍体率

Fig. 4 Triploid rate at different age in different induction conditions

表 1 提取主成分的负荷及方差贡献率

Tab. 1 Factor loading and variance contribution rate of the extracted principal components %

项目 items	不同盐度 salinity		诱导时机 initial induce time		诱导时间 induce time	
	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2
卵裂率 cleavage rate	97.60	1.41	99.75	6.64	99.89	-3.89
孵化率 hatching rate	98.22	8.63	98.93	-14.67	98.02	-19.78
存活率 survival rate	99.48	3.14	99.45	-9.78	99.78	5.56
壳长 shell length	-54.64	82.17	87.03	49.33	91.04	41.45
三倍体率 triploid rate	-83.78	-38.21	-26.12	96.45	-20.45	97.89
方差贡献率 contribution rate	78.16	16.62	75.79	24.21	76.52	23.48

染色体多级分离产生非整倍体^[33], 非整倍体的低存活能力也是存活率下降的原因。相比于对照组, 各实验组从受精卵发育至 D 形幼虫的时间明显延长。且在整个实验期内, 三倍体并未表现出明显的生长优势。盐度 10 中诱导的幼虫在 15 日龄时的壳长仅次于对照组, 但这可能并非三倍体体现出的生长优势。这可能是由于低渗对胚胎造成持续性的损伤及染色体多级分离, 孵化后体型较小的个体和非整倍体不断死亡, 仅留下体型较大的个体。这也是为什么在 15 日龄时, 盐度 10 中

幼虫壳长方差在所有实验组中最小的原因。同时, 体型较小的个体和非整倍体不断死亡可能也是幼虫培养过程中三倍体率降低的原因。除此之外, 三倍体率降低的另外一个原因可能是由于染色体丢失造成的^[28]。

主成分分析是通过将多个变量进行降维, 尽可能多地保留原始变量信息, 利用少数几个主成分来解释原始变量的分析方法^[21]。本研究中的三个实验均保留了前两个主成分, 且保留的主成分累积方差贡献率均超过了 85%。说明所保留的主

表 2 不同诱导条件下的综合评价得分

Tab. 2 Comprehensive evaluation scores under different inducing conditions

项目 items	不同盐度 salinity						诱导时机 initial induce time			诱导时间 induce time			
	10	12	14	16	18	20	22	PB I	50% PB I	PB II	10 min	15 min	20 min
主成分1得分 PC1 scores	-2.66	-1.32	-0.64	0.10	0.80	0.99	2.02	-2.24	0.41	1.12	-2.24	0.44	1.10
主成分2解析 PC2 scores	0.12	-0.70	-0.43	-0.05	-0.54	0.93	-0.04	-0.93	0.87	-0.64	-0.87	0.84	-0.66
综合评价得分 evaluation scores	-34.87	-76.38	-44.04	-2.08	-28.67	89.08	30.61	-124.73	75.75	-21.03	-119.56	74.47	-24.92
排名 ranks	5	7	6	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2

成分能够很好的反应所有原始变量，达到了减少变量的目的。从综合评价得分的结果来看，我们选择的三个最佳三倍体诱导条件并非都得到了最高的综合评价得分。诱导时机和诱导时间中，50% PB I 和诱导 15 min 时在各自所属的实验中均排名第 1，而盐度 14 在不同盐度实验组中仅排名第 6。此结果与李阳春等^[22]关于长牡蛎的研究结果不同，其原因可能与原始变量的数量有关。本研究中的原始变量不仅有卵裂率、孵化率和三倍体率，还增加了 15 日龄时的存活率和壳长，低渗造成的生长减慢和存活率下降可能导致了此结果的产生。由此可见，利用低渗诱导合浦珠母贝三倍体虽然可诱导出一定比例的三倍体且成本较药物诱导更低，但如何提高胚胎卵裂率、孵化率以及幼虫存活率是日后需要解决的问题。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] 尤锋. 海产鱼类多倍体育种的研究[J]. 海洋科学, 1997, 2(1): 33-37.
You F. Research of polyploidy breeding in marine fishes[J]. Marine Sciences, 1997, 2(1): 33-37 (in Chinese).

[2] Stanley J G, Allen Jr S K, Hidu H. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B[J]. *Aquaculture*, 1981, 23(1-4): 1-10.

[3] Gérard A, Ledu C, Phélipot 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.

[4] Wang Z P, Guo X M, Allen S K, et al. Heterozygosity and body size in triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, produced from meiosis II inhibition and tetraploids[J]. *Aquaculture*, 2002, 204(3-4): 337-348.

[5] Eudeline B, Allen S K, Guo X M. 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.

[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] 常亚青, 相建海, 张国范, 等. 虾夷扇贝三倍体诱导与培育技术的研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 18-22.
Chang Y Q, Xiang J H, Zhang G F, et al. Induced triploidy in scallop *Patinopecten yessoensis* and the larval cultivation[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(1): 18-22 (in Chinese).

[8] Yang H P, Zhang F S, Guo X M. Triploid and tetraploid zhikong scallop, *Chlamys farreri* jones et preston, produced by inhibiting polar body I[J]. *Marine Biotechnology*, 2000, 2(5): 466-475.

[9] Yang H P, Guo X M, Chen Z Z, et al. Tetraploid induction by inhibiting mitosis I in scallop *Chlamys farreri*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 1999, 17(4): 350-358.

[10] Okumura S I, Senbokuya H, Arai K, et al. The characterization of survival, growth, and male gamete in the triploid Pacific abalone *Haliotis discus hannai*[J]. *Aquaculture*, 2007, 272 Suppl 1: S297.

[11] 李德祥, 李太武, 苏秀榕, 等. 6-DMAP诱导缢蛭三倍体的研究[J]. 台湾海峡, 2006, 25(3): 396-401.
Li D X, Li T W, Su X R, et al. Study on triploid induction of *Simonova culaconstricta* using 6-DMAP[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2006, 25(3): 396-401 (in Chinese).

[12] 张晨晨, 王昭萍, 于瑞海, 等. 低渗诱导栉孔扇贝三倍体及与其它方法的比较 [J] 中国海洋大学学报, 2010, 40(S1): 71-75.

- Zhang C C, Wang Z P, Yu R H, *et al.* Triploid Induction in *Chlamys farreri* by hypotonic treatment and the comparison with other treatment methods[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(S1): 71-75 (in Chinese).
- [13] 王子臣, 毛连菊, 陈来钊, 等. 温度休克诱导栉孔扇贝和虾夷扇贝三倍体的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 1990, 5(3-4): 1-6,79.
- Wang Z C, Mao L J, Chen L Z, *et al.* A preliminary study on induced triploidy in the *Chlamys farreri* and *Patinopeten yessoensis* by temperature shock[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 1990, 5(3-4): 1-6,79 (in Chinese).
- [14] 常建波, 魏利平, 杨建敏, 等. 文蛤染色体核型及三倍体诱导的初步研究[J]. 水产学报, 1996, 20(3): 269-274.
- Chang J B, Wei L P, Yang J M, *et al.* A preliminary study on the karyotype and triploid induction in *Meretrix meretrix*[J]. Journal of fisheries of China, 1996, 20(3): 269-274 (in Chinese).
- [15] 孔静, 王昭萍, 于瑞海, 等. 低渗透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 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 (in Chinese).
- [16] Ma P Z, Wang Z P, Yu R H. Triploid induction by hyperosmotic shock in the Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2019, 50(5): 922-933.
- [17] 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.
- [18] Uchimura Y, Komaru A, Wada K T, *et al.* Detection of induced triploidy at different ages for larvae of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, by microfluorometry with DAPI staining[J]. *Aquaculture*, 1989, 76(1-2): 1-9.
- [19] Guan Y Y, He M X, Wu H B. Differential mantle transcriptomics and characterization of growth-related genes in the diploid and triploid pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Marine Genomics*, 2017, 33: 31-38.
- [20] Ohta H, Kawamoto T, Isowa K, *et al.* Motility of spermatozoa obtained from testes of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Fisheries Science*, 2007, 73(1): 107-111.
- [21] 李艳双, 曾珍香, 张闽, 等. 主成分分析法在多指标综合评价方法中的应用[J]. 河北工业大学学报, 1999, 28(1): 94-97.
- Li Y S, Zeng Z X, Zhang M, *et al.* Application of primary component analysis in the methods of comprehensive evaluation for many indexes[J]. Journal of Hebei University of Technology, 1999, 28(1): 94-97 (in Chinese).
- [22] 李阳春, 王昭萍, 刘剑, 等. 利用概率加权回归和主成分分析评估低盐诱导太平洋牡蛎三倍体幼虫的效果[J]. 中国海洋大学学报, 2020, 50(4): 21-28.
- Li Y C, Wang Z P, Liu J, *et al.* Hypertonic induction of triploidy pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larva and prediction of inducing efficiency through Weighted probit regression and principal component analyses[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(4): 21-28 (in Chinese).
- [23] 刘晓赫. 氨海水和 5-羟色胺对海湾扇贝 (*Argopecten irradians* Lamarck) 解剖卵的体外促熟研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- Liu X H. Improving maturation of oocyte stripped from sallop, *Argopecten irradians* Lamarck by ammonia seawater and serotonin creatinine sulfate complex (5-HT)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [24] 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).
- [25] 王康. 盐度诱导太平洋牡蛎和近江牡蛎三倍体的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Wang K. The study of salinity methods induce triploid of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea ariakensis* gould[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [26] 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.

- 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 (in Chinese).
- [27] 武祥伟, 张跃环, 肖述, 等. CB诱导熊本牡蛎三倍体及其存活率与倍化率的变化关系[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 1029-1037.
- Wu X W, Zhang Y H, Xiao S, *et al.* Triploidy induction by CB and their survival rate and triploidy rate in Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 1029-1037 (in Chinese).
- [28] 李海昆, 刘洋, 李春华, 等. 6-DMAP诱导黄河口近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)三倍体的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2020, 51(5): 1194-1202.
- Li H K, Liu Y, Li C H, *et al.* Study on 6-DMAP induced triploid of *Crassostrea ariakensis* from huanghe river estuary[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(5): 1194-1202 (in Chinese).
- [29] 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*, 2021, 51(SI): 128-135.
- Yue C, Li Y G, Li Q. Artificial triploid induction of orange-shell line of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2021, 51(SI): 128-135 (in Chinese).
- [30] 王爱民, 阎冰, 叶力, 等. 6-DMAP诱导马氏珠母贝三倍体[J]. *广西科学*, 1999, 6(2): 148-151.
- Wang A M, Yan B, Ye L, *et al.* Induction of triploid pearl oyster (*Pinctada martensii* D.) Using 6-DMAP[J]. *Guangxi Sciences*, 1999, 6(2): 148-151 (in Chinese).
- [31] Wada K T, Komaru A, Uchimura Y. Triploid production in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*[J]. *Aquaculture*, 1989, 76(1-2): 11-19.
- [32] 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).
- [33] 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).

Triploid induction by hyponotic shock in the Chinese pearl oyster (*Pinctada martensii*)

FAN Chao¹, ZHANG Xuekai¹, ZHANG Xingzhi², TANG Liming¹,
LI Jinlong¹, LI Qiongzhen², WANG Zhaoping^{1*}

(1. Key Laboratory of Mariculture of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture,
Guangxi Academy of Fisheries Sciences, Nanning 530021, China)

Abstract: Triploid technology is widely used in aquatic animal breeding and has produced huge economic benefits. It is possible to increase the size of pearl by using the fast growth of triploid. In this study, the hypotonic shock was used to induce triploid of *Pinctada martensii* for the first time to explore the comprehensive effect of hatching rate, growth rate, survival rate and triploid rate. We used the controlled variable method to find the optimal conditions for inducing triploid *P. martensii* from 7 different salinity, 3 different initial induction times and 3 different induction time. Meanwhile, the cleavage rate, hatching rate, the changes in survival rate, shell length and triploid rate of *P. martensii* were explored. Results showed that the highest triploid rates of D-shaped larvae were $64.16\% \pm 6.92\%$, $65.87\% \pm 6.51\%$, and $65.14\% \pm 1.93\%$. The optimal conditions for highest triploid rates were at a salinity of 14, when 50% of first polar body (PB I) was released from fertilized eggs, and 15 min after induction, respectively. The results showed that triploid larvae did not show obvious advantages. The effect of hypotonicity shock on embryos caused a decrease in larval survival rate and triploid rate. Through principal component analysis of cleavage rate, hatching rate, 15-day-old survival rate, shell length and triploid rate, the first two principal components were retained in the three induction conditions. The cumulative variance contribution rate of the retained principal components exceeds 85%. The comprehensive evaluation scores of 50% PB I released from fertilized eggs, salinity of 14, and 15 minutes of induction were 6th, 1st, and 1st respectively in their respective experiments. The study showed that there was no obvious advantage in the growth of the triploid of *P. martensii* larvae, and the two conditions of 50% PB I released from fertilized eggs and 15 minutes of induction were suitable for the triploid induction of *P. martensii*. This study can provide a new idea for the *P. martensii* triploid breeding, which may improve production efficiency.

Key words: *Pinctada martensii*; hyponotic shock; triploid; principal component analysis

Corresponding author: WANG Zhaoping. E-mail: zpwang@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (911221680)