

三种诱导长牡蛎“海大2号”四倍体途径的比较

程庚¹, 张海宁¹, 梁园鑫¹, 徐成勋^{1*}, 李琪^{1,2}

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. 青岛海洋科学与技术中心, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

摘要:

【目的】比较三种途径诱导长牡蛎“海大2号”四倍体效果, 获取最佳诱导条件组合。

【方法】以卵裂率、D幼率、幼虫及稚贝四倍体率等为指标, 综合比较途径Ⅰ($2n♀+2n♂$)、途径Ⅱ($3n♀+2n♂$)和途径Ⅲ($2n♀+4n♂$)三种途径下使用细胞松弛素B(CB)和低渗两种处理诱导长牡蛎“海大2号”四倍体的效果, 研究了试剂处理强度、诱导时机和持续诱导时间等3种因素对长牡蛎“海大2号”四倍体的诱导效果。

【结果】在途径Ⅰ($2n♀+2n♂$)下, 当受精卵第一极体刚出现时, 采用0.5 mg/L CB持续处理20 min后, 幼虫四倍体率最高, 为28.37%。该途径下使用低渗处理无法获得四倍体幼虫; 在途径Ⅱ($3n♀+2n♂$)下, 当受精卵第一极体刚出现时, 采用0.5 mg/L CB持续处理20 min后, 幼虫四倍体率最高, 为52.64%。在该途径下, 当第一极体刚出现时, 使用盐度为8的海水处理20 min后, 幼虫四倍体率最高, 为26.64%; 在途径Ⅲ($2n♀+4n♂$)下, 当第一极体出现30%时, 采用0.75 mg/L CB持续处理20 min后, 幼虫四倍体率为60.45%。在该途径下, 当第一极体出现30%时, 使用盐度为8的海水处理20 min后, 幼虫四倍体率最高, 为25.51%。在最佳诱导条件下, 途径Ⅰ下CB处理组稚贝(3~5 mm)四倍体率为4%, 与幼虫期(28.37%)相比降低24.37%; 低渗处理组未检测出四倍体稚贝; 途径Ⅱ下CB处理组和低渗处理组在稚贝阶段四倍体率分别达到80%和30%, 相比幼虫阶段(52.64%和26.64%)分别下降27.36%和3.36%; 途径Ⅲ下CB处理组和低渗处理组在稚贝阶段四倍体率分别达到10%和4%, 相比幼虫阶段(60.45%和25.51%)分别下降50.45%和21.51%。

【结论】在途径Ⅱ($3n♀+2n♂$)下使用CB进行四倍体诱导是创制长牡蛎“海大2号”四倍体的最佳选择。

关键词:长牡蛎; “海大2号”; 四倍体; 低渗; 细胞松弛素B(CB)

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)是我国北方养殖的主要牡蛎品种, 具有生长快速、肉质鲜美、营养丰富等特点。由于繁殖期配子排放, 夏季的二倍体牡蛎软体部消瘦、肉质下降, 难以上市^[1]。三倍体牡蛎因不



第一作者: 程庚, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: 320332133@qq.com



通信作者: 徐成勋, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: xcx@ouc.edu.cn

资助项目: 山东省农业良种工程项目(2022LZGCQY010); 国家贝类产业技术体系专项(CARS-49)

收稿日期: 2024-01-14

修回日期: 2024-05-26

文章编号:

1000-0615(2025)06-069613-11

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



育性高、生长速率快、抗逆性强、营养丰富并可全年上市等优点备受产业关注, 已成为牡蛎育种工作的重要部分^[2-4]。然而, 通过化学试剂抑制二倍体牡蛎极体释放获取的三倍体牡蛎幼虫死亡率高、倍性不稳定^[5-8]。目前, 通过二倍体牡蛎和四倍体牡蛎杂交可获得 100% 三倍体牡蛎^[9]。因此四倍体牡蛎的培育是三倍体牡蛎规模化生产的关键。

目前共有三种途径能够获得四倍体牡蛎: 途径 I 是使用二倍体牡蛎卵子与二倍体牡蛎精子 ($2n♀+2n♂$) 受精抑制第一极体释放来诱导四倍体^[10-11], 该途径无需三倍体牡蛎亲本, 育种周期短; 途径 II 是在三倍体牡蛎卵子与二倍体牡蛎精子 ($3n♀+2n♂$) 受精过程中抑制第一极体的释放来获取四倍体牡蛎^[12-14], 该途径四倍体牡蛎诱导率高, 为四倍体诱导的最主要途径, 而三倍体牡蛎怀卵量低限制了其应用^[2]; 途径 III 是使用二倍体牡蛎的卵子与四倍体牡蛎的精子 ($2n♀+4n♂$) 受精并抑制受精卵第二极体释放获取四倍体牡蛎^[15-16], 由于二倍体牡蛎怀卵量高, 该途径能够获得更多稚贝。目前, 细胞松弛素 B (CB) 和 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 为四倍体牡蛎主要诱导剂, 但化学药物毒性大、价格昂贵且幼虫存活率低^[12,14]。此外, 低渗可影响牡蛎受精卵减数分裂活动, 因此也常用于三倍体和四倍体牡蛎的诱导^[17-19]。与化学药物诱导相比, 盐度诱导具有价格低廉、无毒和环保的优点。

长牡蛎“海大 2 号”新品种是以野生群体中左右壳均为金黄色的个体为基础群体, 经家系选育和群体选育培育而成, 具有生长快速、双壳为金黄色等特点^[20]。本研究以长牡蛎“海大 2 号”为实验材料, 研究了不同 CB 和盐度诱导处理及三种诱导途径对长牡蛎“海大 2 号”四倍体诱导率的影响, 旨在探索长牡蛎“海大 2 号”四倍体的最佳诱导条件, 为培育遗传背景丰富

的长牡蛎“海大 2 号”四倍体群体提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为长牡蛎“海大 2 号”二倍体、三倍体及四倍体群体的 1 龄种贝, 均取自山东荣成桑沟湾养殖海区。3 种种贝均在 5 月初转移至烟台莱州育苗场进行室内人工促熟, 促熟水温 22~24 °C。促熟期间每日投喂足量新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*), 每日换水 2 次。6 月底 3 种种贝性腺基本都发育成熟。实验前对“海大 2 号”三倍体、四倍体群体亲贝进行倍性检测, 挑选性腺饱满的个体进行诱导实验。

1.2 精卵获取与受精

长牡蛎“海大 2 号”二倍体、三倍体和四倍体亲本群体的生物学数据如表 1 所示。通过人工解剖获取二倍体、三倍体和四倍体的配子, 光学显微镜下辨别雌雄, 挑选卵子呈卵圆形且颜色均一的个体为母本, 精子活力高的个体为父本。保留二倍体中的雌性和雄性个体, 三倍体中的雌性个体以及四倍体中的雄性个体。镜检后把雌雄个体分开放置避免意外受精并及时弃掉雌雄同体。使用 260 目筛绢网过滤卵子去除组织块及杂质, 随后置于 25 °C 砂滤海水中熟化 1 h, 弃上清液备用, 精子于受精前 10 min 挤出并经 300 目筛绢网过滤杂质后备用。人工授精前镜检卵子是否污染, 人工授精后在显微镜视野下保证每个卵子周围有 10~20 个精子。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。

1.3 CB 和低渗诱导四倍体实验设计

实验水温严格控制在 (25.0 ± 0.5) °C, 参考

表 1 长牡蛎“海大 2 号”二倍体、三倍体及四倍体亲本生物学数据

Tab. 1 Biological characteristics of diploid, triploid and tetraploid broodstock in <i>C. gigas</i> “Haida No.2”				
亲本 brookstock	壳高/mm shell height	壳长/mm shell length	壳宽/mm shell width	湿重/g wet weight
二倍体 diploid	79.71 ± 5.02	49.45 ± 4.47	25.84 ± 3.78	55.36 ± 6.62
三倍体 triploid	87.40 ± 5.39	49.66 ± 5.03	28.97 ± 4.51	66.06 ± 11.65
四倍体 tetraploid	60.45 ± 6.03	41.14 ± 3.82	23.43 ± 5.90	30.92 ± 5.64

已报道的方法配置 CB^[14]。低盐度海水用正常海水 (27) 于曝气 24 h 后的淡水按照比例混合获得, 即用即配。本实验优化三个主要影响因素: 试剂处理强度、诱导时机和持续诱导时间。诱导四倍体途径: 途径 I ($2n♀+2n♂$)、途径 II ($3n♀+2n♂$) 和途径 III ($2n♀+4n♂$)。每组 3 次重复。

途径 I ($2n♀+2n♂$) 诱导四倍体最佳条件组合 参考 Tan 等^[10] 和李永国等^[11] 相关方法, 根据以下方法确定 CB 和低渗处理诱导四倍体最佳组合: ①将二倍体卵子密度调整至 1×10^6 个/L, 受精后当第一极体刚出现时, 分别用 CB 浓度为 0.25、0.50、0.75 和 1.00 mg/L 等 4 个梯度或在盐度为 6、8、10 和 12 等 4 个盐度分别持续处理 20 min, 洗卵去除多余精子, 将受精卵转移至 100 L 塑料桶中进行孵化, 测定每组的孵化率和 D 幼率, 24 h 后通过流式细胞仪测定四倍体率, 根据四倍体率确定最佳 CB 处理浓度以及低渗处理盐度; ②把卵子密度调整至 1×10^6 个/L, 当受精卵第一极体刚出现时, 通过上述的最佳 CB 处理浓度或最佳低渗处理盐度分别持续处理 10、15、20 和 25 min, 孵化后 24 h 测定四倍体率, 确定最佳持续处理时间。每个实验重复 3 次, 同时设置二倍体对照组 ($2n♀+2n♂$, CG_{2N})。

途径 II ($3n♀+2n♂$) 诱导四倍体最佳条件组合 参考 Guo 等^[12] 和 Peachey 等^[14] 相关方法, 根据以下方法确定 CB 和低渗处理诱导四倍体最佳组合: ①将三倍体卵子密度调整至 1×10^6 个/L, 受精后当第一极体刚出现时, 用 4 个 CB 浓度 (0.25、0.50、0.75 和 1.00 mg/L) 和 4 个盐度 (6、8、10 和 12) 分别持续处理 20 min, 洗卵去除多余精子, 将受精卵转移至 100 L 塑料桶中进行孵化, 测定每组的孵化率和 D 幼率, 24 h 后通过流式细胞仪测定四倍体率, 根据四倍体率确定最佳 CB 处理浓度以及低渗处理盐度; ②把卵子密度调整至 1×10^6 个/L, 当受精卵第一极体刚出现时, 通过上述最佳 CB 处理浓度或最佳低渗处理盐度分别持续处理 10、15、20 和 25 min, 孵化后 24 h 测定四倍体率, 确定最佳持续处理时间。每个实验重复 3 次, 同时设置 CG_{2N} 和 2.5N 对照组 ($3n♀+2n♂$, CG_{2.5N})。

途径 III ($2n♀+4n♂$) 诱导四倍体最佳条件组合 参考 Benabdelmouna^[15] 和 McCombie 等^[16]

相关方法, 根据以下方法确定 CB 和低渗处理诱导四倍体最佳组合: ①将二倍体卵子密度调整至 1×10^6 个/L, 受精后当第一极体出现 30% 时, 用 4 个 CB 浓度 (0.25、0.50、0.75 和 1.00 mg/L) 及 4 个盐度 (6、8、10 和 12) 分别持续处理 20 min, 洗卵去除多余精子, 将受精卵转移至 100 L 塑料桶中进行孵化, 测定每组的孵化率和 D 幼率, 24 h 后通过流式细胞仪测定四倍体率, 根据四倍体率确定最佳 CB 处理浓度以及低渗处理盐度; ②把卵子密度调整至 1×10^6 个/L, 当受精卵第一极体出现 30%、40% 和 50% 时, 通过上述的最佳 CB 处理浓度或最佳低渗处理盐度持续处理 20 min, 孵化后 24 h 测定四倍体率, 确定最佳处理时机。③把卵子密度调整至 1×10^6 个/L, 在上述最佳处理时机, 通过最佳 CB 处理浓度或最佳低渗处理盐度分别持续处理 10、15、20 和 25 min, 孵化后 24 h 测定四倍体率, 确定最佳持续处理时间。每个实验重复 3 次, 同时设置 CG_{2N} 和三倍体对照组 ($2n♀+4n♂$, CG_{3N})。

1.4 幼虫及稚贝培养

将各组最佳诱导条件组合得到的 D 形幼虫于 100 L 塑料桶中进行培育。控制每组初始幼虫密度为 1 个/mL。培育期间每日投喂球等鞭金藻 (*Isochrysis galbans*) 3 次, 每日换水三分之一, 每隔 3 日测 1 次幼虫存活率。使用扇贝片作为附着基, 幼虫附着变态后继续培养约 1 个月至稚贝大小达到 3~5 mm, 然后各组随机取样 50 个稚贝进行倍性测定。

1.5 测定卵裂率、D 幼率、幼虫四倍体率、幼虫成活率、稚贝四倍体率

测量各实验组的卵裂率、D 幼率、幼虫四倍体率、成活率及稚贝四倍体率等指标。卵裂率指卵裂数占总受精卵数的百分比, D 幼率指 24 h 时 D 形幼虫占总卵裂数量的百分比, 幼虫成活率为取样期幼虫数量占孵化出来的第 1 天幼虫数量的百分比。幼虫四倍体率通过流式细胞仪进行测定。稚贝四倍体率指四倍体稚贝占所检测 50 个稚贝的百分比。

1.6 数据分析

实验数据采用 SPSS 24.0 软件进行分析,

显著性水平设为 0.05, 不同实验组之间的差异用不同字母表示。同一因素下不同水平采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 处理组与对照组成活率差异通过独立样本 *t* 检验进行分析。

2 结果

2.1 三种途径诱导四倍体效果

途径 I (2n♀+2n♂) 诱导四倍体效果 长牡蛎“海大 2 号”人工授精后, 当第一极体刚出现时, 采用 0.5 mg/L CB 持续处理 20~25 min 后, 四倍体率为 23.53%~28.37%, 此条件为 CB 诱导“海大 2 号”四倍体的最佳诱导组合 (表 2, 图 1-d)。在途径 I 下, 低渗处理无法诱导得到四倍体 (表 3, 图 1-e)。

途径 II (3n♀+2n♂) 诱导四倍体效果 当第一极体刚出现时, 采用 0.50 mg/L CB (0.75~1.00 mg/L CB 处理诱导效果较好, 但孵化率和 D 幼率显著下降, *P*<0.05) 持续处理 20 min 后, 四倍体率为 52.64%, 此条件为 CB 诱导“海大 2 号”四倍体的最佳诱导组合 (表 2, 图 1-f)。当第一极体刚出现时, 采用盐度 8~10 的海水持续处理 15~25 min 后, 四倍体率为 23.72%~

26.64%, 此条件为低渗处理诱导“海大 2 号”四倍体的最佳诱导组合 (表 3, 图 1-g)。

途径 III (2n♀+4n♂) 诱导四倍体效果 当第一极体出现 30% 时, 采用 0.75 mg/L CB 持续处理 20 min 后, 四倍体率为 60.45%, 此条件为 CB 诱导“海大 2 号”四倍体的最佳诱导组合 (表 4, 图 1-h)。当第一极体出现 30%~40% 时, 采用盐度 8 的海水持续处理 15~25 min 后, 四倍体率为 20.67%~25.51%, 此条件为低渗处理诱导“海大 2 号”四倍体的最佳诱导组合 (表 4, 图 1-i)。

2.2 幼虫存活率与稚贝倍性

幼虫存活率 途径 I (2n♀+2n♂) 诱导四倍体时, 各处理组幼虫存活率显著低于 CG_{2N} 对照组 (*P*<0.05), 且随培育时间增加, 各处理组和对照组存活率逐渐下降。20 日龄时 CB 处理组幼虫存活率为 14.67%, 存活率下降 85.33%; 低渗处理组 20 日龄存活率为 20.33%, 下降 79.67%; 对应时间点对对照组存活率为 37.33%, 下降 62.67%。总体上, 对照组幼虫存活率优于处理组, 且低渗处理组幼虫存活率优于 CB 处理组 (图 2-a)。

途径 II (3n♀+2n♂) 诱导四倍体时, 处理组幼虫存活率显著低于 2N 对照组 (*P*<0.05), 但显

表 2 途径 I (2n♀+2n♂) 和途径 II (3n♀+2n♂) 诱导长牡蛎“海大 2 号”四倍体的效果 (诱导条件: CB)

Tab. 2 Tetraploid induction efficiency between the pathway I (2n♀+2n♂) and the pathway II (3n♀+2n♂) of *C. gigas* "Haida No.2" (induction condition: CB)

条件 condition	卵裂率/% cleavage rate		D 幼率/% D larvae rate		四倍体率/% tetraploid rate	
	2n♀+2n♂	3n♀+2n♂	2n♀+2n♂	3n♀+2n♂	2n♀+2n♂	3n♀+2n♂
CB/(mg/L)						
0.25	73.39±2.99 ^a	63.45±4.83 ^c	75.34±5.19 ^j	60.46±4.16 ^m	16.31±1.98 ^s	25.55±5.35 ^x
0.50	65.52±8.00 ^a	60.64±10.48 ^c	71.20±3.99 ^j	55.44±1.77 ^m	28.58±3.27 ^r	50.35±2.25 ^w
0.75	54.73±5.48 ^b	53.38±2.13 ^c	52.26±8.97 ^k	54.27±3.88 ^m	26.50±3.17 ^r	44.46±4.34 ^w
1.00	43.76±3.54 ^c	40.30±0.91 ^f	44.18±1.04 ^k	42.39±7.18 ⁿ	22.35±4.94 ^{rs}	48.3±3.22 ^w
诱导持续时间/min induction duration						
10	69.32±8.63 ^d	60.36±15.08 ^c	66.38±4.02 ^j	56.26±6.01 ^o	0 ^v	20.59±1.99 ^a
15	66.58±6.48 ^d	51.36±9.85 ^{gh}	63.24±1.09 ^j	50.23±1.01 ^{op}	20.36±1.58 ^u	43.47±0.78 ^z
20	62.74±12.41 ^d	45.27±4.03 ^{gh}	65.37±8.06 ^j	42.52±6.06 ^{pn}	28.37±5.85 ⁱ	52.64±2.12 ^y
25	56.98±7.61 ^d	42.28±3.91 ⁱ	58.26±3.11 ^j	38.25±3.29 ^q	23.53±3.21 ^{tu}	45.62±2.88 ^z
对照组 control group	85.20±4.03	83.16±4.67	88.34±3.67	80.25±4.07	0	0

注: 对照组为二倍体组, 四倍体率为 0。同一列内不同字母表示组间差异显著 (*P*<0.05), 下同。

Notes: The control group is diploid group, tetraploid rate of the diploid group is 0. Different letters in each column indicate significant difference (*P*<0.05), the same below.

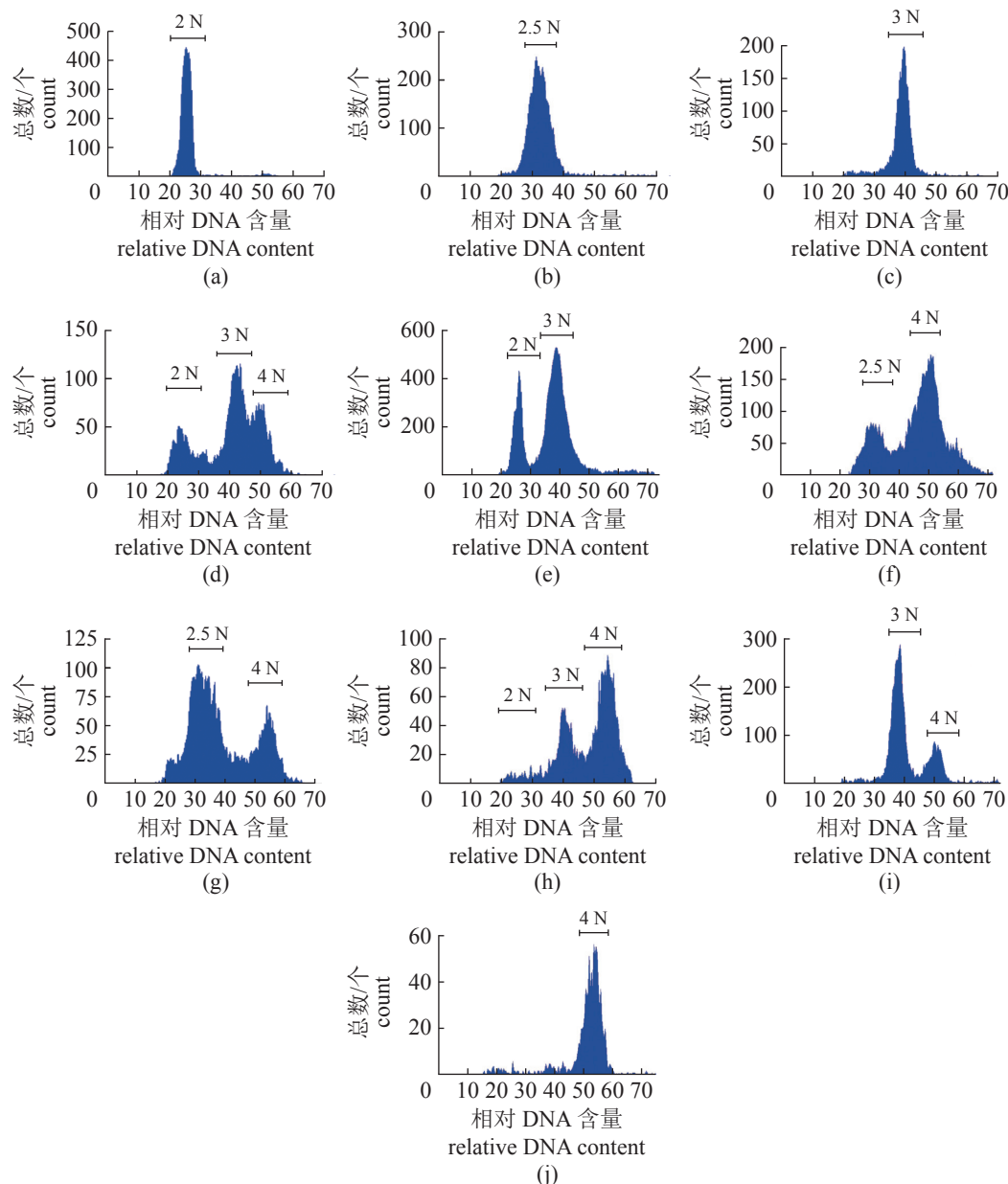


图1 倍性检测结果

(a) 二倍体对照组; (b) 2.5N 对照组; (c) 三倍体对照组; (d) 途径 I ($2n_{\text{♀}}+2n_{\text{♂}}$) CB 处理组; (e) 途径 I ($2n_{\text{♀}}+2n_{\text{♂}}$) 低渗处理组; (f) 途径 II ($3n_{\text{♀}}+2n_{\text{♂}}$) CB 处理组; (g) 途径 II ($3n_{\text{♀}}+2n_{\text{♂}}$) 低渗处理组; (h) 途径 III ($2n_{\text{♀}}+4n_{\text{♂}}$) CB 处理组; (i) 途径 III ($2n_{\text{♀}}+4n_{\text{♂}}$) 低渗处理组; (j) 四倍体稚贝。

Fig. 1 Ploidy test results

(a) diploid group; (b) control group of 2.5N; (c) triploid group; (d) ploidy result treated by CB treatment under the pathway I ($2n_{\text{♀}}+2n_{\text{♂}}$); (e) ploidy result treated by hypotonic treatment under the pathway I ($2n_{\text{♀}}+2n_{\text{♂}}$); (f) ploidy result treated by CB treatment under the pathway II ($3n_{\text{♀}}+2n_{\text{♂}}$); (g) ploidy result treated by hypotonic treatment under the pathway II ($3n_{\text{♀}}+2n_{\text{♂}}$); (h) ploidy result treated by CB treatment under the pathway III ($2n_{\text{♀}}+4n_{\text{♂}}$); (i) ploidy result treated by hypotonic treatment under the pathway III ($2n_{\text{♀}}+4n_{\text{♂}}$); (j) tetraploid spat.

著高于 2.5N 对照组 ($P<0.05$)。2.5N 对照组幼虫存活率最低, 2 日龄时幼虫存活率下降 75.33%。20 日龄时 CB 处理组、低渗处理组、2N 对照组及 2.5N 对照组分别下降 87.00%、90.67%、62.67% 和 98.67%。总体上, CB 处理组幼虫存活率优

于低渗处理组 (图 2-b)。

途径 III ($2n_{\text{♀}}+4n_{\text{♂}}$) 诱导四倍体时, CB 处理组幼虫存活低于低渗处理组幼虫, 20 日龄时降幅分别为 94.67% 和 84.00%。低渗处理组幼虫存活率优于 CB 处理组, 但均低于 2N 对照组

表 3 途径 I ($2n♀+2n♂$) 和途径 II ($3n♀+2n♂$) 诱导长牡蛎“海大 2 号”四倍体的效果 (诱导条件: 低渗处理)

Tab. 3 Tetraploid induction efficiency between the pathway I ($2n♀+2n♂$) and the pathway II ($3n♀+2n♂$) of *C. gigas* "Haida No.2" (induction condition: hypotonic treatment)

条件 condition	卵裂率/% cleavage rate		D 幼率/% D larvae rate		四倍体率/% tetraploid rate	
	$2n♀+2n♂$	$3n♀+2n♂$	$2n♀+2n♂$	$3n♀+2n♂$	$2n♀+2n♂$	$3n♀+2n♂$
盐度 salinity						
6	40.67±5.95 ^c	42.67±3.3 ^e	48.50±4.13 ^j	45.51±3.69 ^m	0	20.43±0.82 ^p
8	48.27±5.73 ^{bc}	44.49±0.83 ^g	55.39±4.86 ^{ij}	48.61±4.13 ^m	0	25.62±1.76 ^o
10	52.69±2.96 ^{ab}	50.51±2.18 ^f	57.47±5.13 ⁱ	52.42±6.47 ^{lm}	0	23.48±2.76 ^{op}
12	60.46±5.38 ^a	58.67±2.94 ^e	61.49±4.29 ⁱ	59.45±3.81 ^l	0	20.77±2.02 ^p
诱导持续时间/min induction duration						
10	56.66±3.94 ^d	52.76±4.20 ^h	47.61±6.04 ^k	45.31±4.83 ⁿ	0	20.66±2.92 ^r
15	53.16±1.26 ^d	52.67±1.16 ^h	45.53±1.67 ^k	46.35±1.28 ⁿ	0	23.72±1.76 ^{qr}
20	54.17±5.02 ^d	54.79±1.09 ^h	46.36±0.71 ^k	42.69±2.08 ⁿ	0	26.64±2.88 ^q
25	50.90±0.92 ^d	48.67±4.85 ^h	40.61±6.09 ^k	39.37±5.82 ⁿ	0	23.74±3.77 ^{qr}
对照组 control group	88.05±2.15	85.65±5.08	86.47±2.13	83.50±2.21	0	0

表 4 途径 III ($2n♀+4n♂$) 诱导长牡蛎“海大 2 号”四倍体的效果 (诱导条件: CB 和低渗处理)

Tab. 4 Tetraploid induction efficiency of the pathway III ($2n♀+4n♂$) of *C. gigas* "Haida No.2" (induction condition: CB and hypotonic treatment)

条件 condition	卵裂率/% cleavage rate		D 幼率/% D larvae rate		四倍体率/% tetraploid rate	
	CB	HT	CB	HT	CB	HT
CB/(mg/L)						
0.25	71.60±3.88 ^a	—	70.29±5.14 ^o	—	23.32±2.16 ^b	—
0.50	62.30±5.92 ^b	—	67.38±2.97 ^o	—	45.57±3.37 [^]	—
0.75	50.35±4.03 ^c	—	55.22±1.23 ^p	—	56.36±4.18 ^z	—
1.00	42.30±1.13 ^d	—	46.07±6.01 ^q	—	55.61±5.22 ^z	—
盐度 salinity						
6	—	41.39±3.99 ^k	—	49.25±4.21 ^w	—	20.42±0.97 ^j
8	—	50.44±4.01 ^j	—	60.21±7.95 ^v	—	25.33±1.96 ^h
10	—	58.06±3.73 ⁱ	—	65.31±5.28 ^v	—	21.45±0.69 ⁱ
12	—	61.55±4.99 ⁱ	—	68.48±0.82 ^v	—	18.41±1.06 ^j
诱导时机/min induction time						
30% PB1	63.32±6.15 ^c	58.21±0.98 ^l	66.28±9.15 ^r	53.22±6.04 ^x	56.42±2.04 ^c	24.59±2.01 ^k
40% PB1	55.39±5.07 ^f	54.54±2.28 ^l	60.25±6.96 ^r	50.24±9.77 ^x	55.49±0.83 ^c	24.54±0.71 ^k
50% PB1	52.31±0.78 ^f	47.93±5.11 ^m	43.24±2.27 ^s	42.29±12.46 ^s	40.67±3.92 ^d	20.39±5.35 ^k
诱导持续时间/min induction duration						
10	67.42±3.79 ^g	52.68±1.05 ⁿ	63.44±2.89 ^t	51.43±1.86 ^y	32.41±3.93 ^g	0 ^m
15	65.50±4.32 ^g	54.23±8.54 ⁿ	64.29±4.21 ^t	51.53±3.27 ^y	44.34±2.11 ^f	20.67±5.84 ^l
20	60.48±6.08 ^{gh}	49.65±4.07 ⁿ	62.34±6.10 ^u	50.37±6.15 ^y	60.45±3.19 ^c	25.51±3.93 ^l
25	56.27±2.21 ^h	45.47±4.30 ⁿ	53.2±8.24 ^u	44.68±10.81 ^y	50.71±7.09 ^f	21.63±2.94 ^l
对照组 control group	83.48±2.90	83.93±3.90	84.48±2.98	82.23±6.22	0	0

注: “HT”表示低渗处理; “—”表示无数据; 下同。

Notes: "HT" means hypotonic treatment; "—" means that no data are available; the same below.

和 3N 对照组 (图 2-c)。

稚贝倍性组成 各处理组稚贝倍性组成情况显示, 除途径 I ($2n♀+2n♂$) 下低渗处理组

无法获得四倍体稚贝外, 其他途径和处理方式均可成功获得四倍体稚贝 (图 1-j), 并且与幼虫阶段相比, 四倍体率均有一定改变。途径

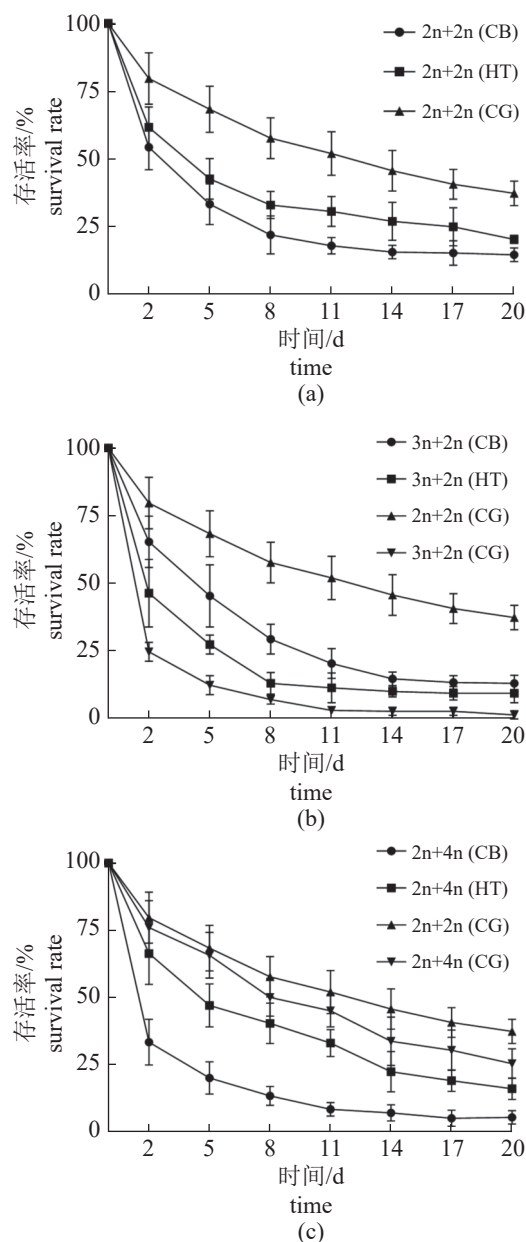


图2 最佳诱导条件下, 三种途径诱导长牡蛎“海大2号”四倍体幼虫存活率的变化

(a) 途径 I ($2n\text{♀}+2n\text{♂}$), (b) 途径 II ($3n\text{♀}+2n\text{♂}$), (c) 途径 III ($2n\text{♀}+4n\text{♂}$).

Fig. 2 Changes in the survival rate of tetraploid larvae of *C. gigas* "Haida No. 2" induced by three pathways under the optimal induction conditions

(a) pathway I ($2n\text{♀}+2n\text{♂}$), (b) pathway II ($3n\text{♀}+2n\text{♂}$), (c) pathway III ($2n\text{♀}+4n\text{♂}$).

I ($2n\text{♀}+2n\text{♂}$) 下通过 CB 处理获得稚贝的四倍体率为 4%, 与幼虫期 (28.37%) 相比四倍体率呈下降趋势。通过途径 II ($3n\text{♀}+2n\text{♂}$) 诱导四倍体时, CB 处理组和低渗处理组在稚贝阶段四

倍体率分别达到 80% 和 30%, 相比幼虫阶段 (52.64%、26.64%) 均呈现上升趋势。而途径 III ($2n\text{♀}+4n\text{♂}$) 诱导四倍体在稚贝阶段仅获得少量四倍体, CB 处理组和低渗处理组四倍体率分别为 10% 和 4%, (幼虫阶段四倍体率分别为 60.45% 和 25.51%) 四倍体率呈下降趋势, 而诱导群体的稚贝中大部分个体为三倍体, 分别达到 86% 和 90% (表 5)。

2.3 三种途径及两种诱导方法比较

采用三种途径及两种方法对同批次长牡蛎“海大 2 号”诱导四倍体, 结果显示, 除途径 I ($2n\text{♀}+2n\text{♂}$) 下通过低渗处理无法获得四倍体稚贝外, 其他方式均能诱导获得四倍体 (表 5)。在三种途径下, 使用 CB 处理获得的幼虫四倍体率和稚贝四倍体率均高于低渗处理组, 但 CB 诱导也存在一定弊端, CB 试剂成本昂贵, 具有一定毒性, 且对环境有污染。通过途径 II ($3n\text{♀}+2n\text{♂}$) 和途径 III ($2n\text{♀}+4n\text{♂}$) 使用 CB 诱导四倍体在幼虫阶段均能取得良好效果, 但是途径 III ($2n\text{♀}+4n\text{♂}$) 获得的幼虫四倍体率在稚贝阶段大幅度降低, 不适合长牡蛎“海大 2 号”四倍体的大规模生产。因此, 通过途径 II ($3n\text{♀}+2n\text{♂}$) 使用 CB 诱导四倍体是生产长牡蛎“海大 2 号”四倍体的最佳方法。

3 讨论

3.1 四倍体诱导的影响因素

有关三倍体和四倍体牡蛎最佳诱导条件的研究已大量报道, 优化条件主要包括诱导剂种类、诱导剂使用强度、诱导时机以及诱导持续时间 [5-6, 21-23]。综合考虑幼虫孵化率、存活率、四倍体率以及试剂成本、试剂毒害性等才能获得最佳诱导条件。CB 通过抑制细胞内微丝的形成, 阻止极体排除 [24]; 而低渗处理诱导多倍体机制并不明确, 相关研究认为低渗处理影响细胞内渗透压变化导致细胞内能量代谢紊乱, 从而影响受精卵减数分裂活动 [25]。诱导剂使用强度同时影响幼虫孵化率和四倍体率。研究发现, CB、6-DMAP 浓度过高, 盐度处理过低或者过高, 幼虫受精卵、孵化率显著降低, 三倍体率和四倍体率呈现下降趋势 [5-6, 12, 17, 22, 26], 与本研究结果类似。这可能与处理强度过高, 诱导剂对

表 5 三种途径诱导长牡蛎“海大 2 号”四倍体稚贝 (60 日龄) 倍性结果

Tab. 5 Ploidy results of three pathways on tetraploid induction of *C. gigas* "Haida No.2" (60 d)

倍性 ploidy	诱导条件 induction condition					
	CB			低渗 hypotonic treatment		
	2n♀+2n♂	3n♀+2n♂	2n♀+4n♂	2n♀+2n♂	3n♀+2n♂	2n♀+4n♂
2n	13(26%)	4(8%)	2(4%)	17(34%)	25(50%)	3(6%)
3n	35(70%)	6(12%)	43(86%)	33(66%)	10(20%)	45(90%)
4n	2(4%)	40(80%)	5(10%)	0	15(30%)	2(4%)

注: 括号外的数字表示测定各种倍性个体数量, 括号内的数字表示该种倍性个体数量占总测定数量的比例。
Notes: Numbers outside brackets indicate the number of individuals of each ploidy detected, and numbers inside brackets indicate the proportion of individuals of that ploidy to the total number detected.

幼虫受精卵产生不可逆转的毒害作用, 严重影响了受精卵正常生理活动有关。诱导时机和诱导持续时间则直接影响极体的排放。诱导试剂过早或诱导持续时间过长会导致同时抑制第一极体和部分第二极体, 会导致非整倍体的产生^[27], 而诱导试剂过晚或诱导持续时间过短则难以有效抑制住极体的排放, 导致诱导失败。除以上可控因素之外, 卵子发育同步性也会对幼虫四倍体率产生很大影响^[13]。因此, 有必要使用同批次人工繁育且同步促熟的长牡蛎“海大 2 号”二倍体、三倍体及四倍体群体, 同时通过显微镜检查精卵成熟度并进行预实验, 及时移除卵子受精率低、极体排除时间点异常的个体, 最大限度降低由于卵子发育不同步对幼虫四倍体率的影响。

此外, 即使使用相同诱导途径或诱导剂, 不同牡蛎种间的最佳诱导途径也存在一定差异。Liang 等^[28]使用 CB 通过途径 II (3n♀+2n♂) 诱导福建牡蛎 (*C. angulata*) 四倍体时, 最佳处理浓度要高于本实验研究结果; 使用低渗通过途径 I (2n♀+2n♂) 诱导时, 处理的最佳盐度则高于本实验研究结果; 使用途径 I (2n♀+2n♂) 时, 通过低渗处理四倍体率较低, 而在本研究中则并未诱导出四倍体幼虫。Qin 等^[29]使用 CB 通过途径 I (2n♀+2n♂) 诱导香港牡蛎 (*C. hongkongensis*) 和熊本牡蛎 (*C. sikamea*) 四倍体时, 诱导的最佳处理时机和处理时长也与本研究实验结果存在一定差异。这可能是由于物种本身生理特性的影响。同时, 即使使用一样的处理方法, 在具体操作过程中也需要根据实际情况进行适当调整。因此, 在进行大规模诱导操作时, 最好先做预实验, 确保诱导路线的正确性, 然后进行大规模诱导, 以此保证较高的四倍体率。

3.2 幼虫存活率和幼虫与稚贝倍性

在幼虫阶段, 处理组幼虫存活率均低于二倍体对照组, 且在 8 日龄之前处理组幼虫存活率均明显降低, 这可能与诱导剂对幼虫的毒害作用以及诱导过程中产生的大量非整倍体死亡有关^[30]。然而, 在三种途径下, CB 和低渗处理组幼虫存活率也存在一定差异。这可能与幼虫群体中不同倍性幼虫存活率不同相关。通过途径 I (2n♀+2n♂) 诱导四倍体时, CB 处理组幼虫由二倍体、三倍体及四倍体组成, 而低渗处理组仅由二倍体和三倍体幼虫组成。而在稚贝阶段, CB 处理组四倍体率仅为 4%, 表明诱导产生的四倍体幼虫在幼虫大量死亡, 这可能是 CB 处理组幼虫存活率低于低渗处理组的部分原因。Qin 等^[29]使用 CB 通过途径 I (2n♀+2n♂) 诱导香港牡蛎和熊本牡蛎四倍体时发现, 在处理组培育过程中, 幼虫四倍体率呈现不断降低的趋势, 与本研究结果一致。同样, 通过途径 III (2n♀+4n♂) 诱导四倍体时, 在稚贝阶段, CB 和低渗处理组从幼虫到稚贝四倍体率降幅分别为 50.45% 和 21.51%, 说明在幼虫阶段四倍体幼虫大量死亡, 且 CB 处理组幼虫死亡比例远大于低渗处理组, 因此也能解释 CB 处理组幼虫存活率低于低渗处理组。途径 I (2n♀+2n♂) 和途径 III (2n♀+4n♂) 诱导四倍体的共同点是这两种途径均通过二倍体卵子直接诱导四倍体牡蛎。大量研究人员将四倍体牡蛎幼虫大量死亡归因于“细胞数量不足”假说, 即四倍体牡蛎细胞具有正常二倍体牡蛎细胞 2 倍的遗传物质, 而诱导获得的四倍体牡蛎细胞质含量与正常二倍体牡蛎相当, 导致核质比异常, 因而造成有丝分裂异常和细胞数量的下降, 认为卵细胞大

小是限制四倍体能否诱导成功的一个重要因素^[14,31-32]。然而, 有研究认为卵细胞大小并不是诱导四倍体成功率的限制因素^[15-16]。直接使用二倍体牡蛎卵子也可成功诱导出四倍体牡蛎, 合适的培养条件为四倍体牡蛎成功获得的关键^[31]。通过途径Ⅱ($3n_{\text{♀}}+2n_{\text{♂}}$)诱导四倍体时, CB 和低渗处理诱导四倍体得到的幼虫群体主要由 2.5N 幼虫和 4N 幼虫组成。而 20 日龄时 2.5N 幼虫存活率仅 1.33%, Guo 等^[2]也发现 2.5N 幼虫 7 日龄幼虫存活率为 7.93%, 到 3 月龄稚贝时存活率仅 0.0463%, 说明 2.5N 幼虫在幼虫及稚贝期存活率都极低。而低渗处理组幼虫中 2.5N 比例远大于 CB 处理组, 这可能是两组幼虫存活率产生差异的主要原因。

本研究综合比较了在 3 种途径下使用 CB 和低渗处理两种方法诱导长牡蛎“海大 2 号”四倍体的生产效果, 得到了 3 种途径获得四倍体的最佳诱导条件, 认为使用 CB 通过途径Ⅱ($3n_{\text{♀}}+2n_{\text{♂}}$)诱导四倍体是生产长牡蛎“海大 2 号”四倍体的最佳方法, 为长牡蛎“海大 2 号”四倍体群体的培育提供了参考资料。

参考文献 (References):

- [1] Li Q, Liu W G, 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.
- [2] Guo X, Allen Jr S K. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg)[J]. *The Biological Bulletin*, 1994, 187(3): 309-318.
- [3] Dégremont L, Garcia C, Frank-Lawale A, *et al.* Triploid oysters in the Chesapeake Bay: comparison of diploid and triploid *Crassostrea virginica*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2012, 31(1): 21-31.
- [4] Allen Jr S K, 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] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 秦艳平, 张跃环, 莫日馆, 等. 三种香港牡蛎三倍体幼虫诱导方法的效果比较 [J]. 中国水产科学, 2019, 26(4): 677-685.
- [9] Qin Y P, Zhang Y H, Mo R G, *et al.* Three comparison methods of triploid induction in *Crassostrea hongkongensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(4): 677-685 (in Chinese).
- [10] Guo X M, DeBrosse G A, Allen Jr S K. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids[J]. *Aquaculture*, 1996, 142(3-4): 149-161.
- [11] Tan S H A, Teh C P, Chang G O, *et al.* Tetraploid induction in tropical oysters, *Crassostrea belcheri* (Sowerby) and *Crassostrea iredalei* (Faustino)[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(4): 1406-1412.
- [12] 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.
- [13] 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 (in Chinese).
- [14] Guo X M, Allen Jr S K. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs of triploids[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(1): 42-50.
- [15] Eudeline B, Allen Jr S K, 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.
- [16] Peachey B L, Allen Jr S K. Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for tetraploidy induction in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*[J]. *Aquaculture*, 2016, 450: 199-205.
- [17] Benabdelmouna A, Ledu C. Autotetraploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) obtained using normal diploid eggs: induction and impact on cytogenetic stability[J]. *Genome*, 2015, 58(7): 333-348.

- [16] 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.
- [17] 于瑞海, 王昭萍, 孔静, 等. 利用不同盐度诱导长牡蛎三倍体的研究 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2015, 45(1): 26-29,82.
Yu R H, Wang Z P, Kong J, *et al.* A methodological study on the induction of triploidy oyster with different salinities[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(1): 26-29,82 (in Chinese).
- [18] 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).
- [19] 李海昆, 张哲, 于瑞海, 等. 6-DMAP 和不同盐度诱导长牡蛎“海大 1 号”四倍体的比较研究 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2021, 51(S1): 136-145.
Li H K, Zhang Z, Yu R H, *et al.* A comparative study on the effectiveness of 6-DMAP and different salinities in inducing tetraploid *Crassostrea gigas* "Haida No. 1"[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2021, 51(S1): 136-145 (in Chinese).
- [20] 李琪, 于瑞海. 长牡蛎“海大 2 号”[J]. 中国水产, 2018(6): 84-92.
Li Q, Yu R H. "Ocean University of China No. 2" of *Crassostrea gigas*[J]. *China Fisheries*, 2018(6): 84-92 (in Chinese).
- [21] Yang H P, Guo X M. Tetraploid induction by inhibiting mitosis I with heat shock, cold shock, and nocodazole in the hard clam *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)[J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(5): 501-510.
- [22] Gerard A, Naciri Y, Peignon J M, *et al.* Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg)[J]. *Aquaculture Research*, 1994, 25(7): 709-719.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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, 2009, 39(2): 193-196.
Wang Z P, Zhao T, Yu R H, *et al.* A new method for triploid induction by hypotonic treatment in scallop *Patinopecten yes-soensis*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, 39(2): 193-196 (in Chinese).
- [26] 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.
- [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] Liang Y X, Cheng G, Bai X C, *et al.* Comparative study on tetraploid induction of the Fujian oyster *Crassostrea angulata* utilizing three typical methods[J]. *Aquaculture International*, 2024, 32(1): 593-612.
- [29] Qin Y P, Noor Z, Li X Y, *et al.* Tetraploid induction of *Crassostrea hongkongensis* and *C. sikamea* by inhibiting the polar body I release in diploid fertilized eggs[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2021, 3(4): 463-473.
- [30] Storchova Z, Kuffer C. The consequences of tetraploidy and aneuploidy[J]. *Journal of Cell Science*, 2008, 121(Pt 23): 3859-3866.
- [31] 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.
- [32] 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.

Comparison of three tetraploid induction pathways in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) "Haida No.2"

CHENG Geng¹, ZHANG Haining¹, LIANG Yuanxin¹, XU Chengxun^{1*}, LI Qi^{1,2}

1. 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 Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China

Abstract: Tetraploid of *Crassostrea gigas* "Haida No.2" was induced by cytochalasin B (CB) and hypotonic treatment under pathway I ($2n♀+2n♂$), pathway II ($3n♀+2n♂$) and pathway III ($2n♀+4n♂$), and this study compared the three pathways in the aspects of cleavage rate, D larvae rate, tetraploid rate of larvae and spat. The effects of three factors including reagent treatment intensity, induced occasion and induced duration were also discussed. The results showed that under pathway I ($2n♀+2n♂$), the highest tetraploid rate of 28.37% was obtained in larval stage treated with 0.5 mg/L CB, and 20 min for duration time of induction when the first polar body of fertilized eggs appeared. Under this pathway, tetraploid larvae could not be detected using hypotonic treatment. Under pathway II ($3n♀+2n♂$), the highest larval tetraploid rate of 52.64% was obtained in larval stage treated with 0.5 mg/L CB, and 20 min for duration time of induction when the first polar body of fertilized eggs appeared. Under this pathway, when the first polar body of fertilized eggs appeared, the highest larval tetraploid rate of 26.64% was obtained after 20 min of treatment using seawater with a salinity of 8. Under pathway III ($2n♀+4n♂$), the highest larval tetraploid rate of 60.45% was obtained in larval stage after 20 min of duration time with 0.75 mg/L CB when 30% PB1 appeared. Under this pathway, the highest larval tetraploid rate of 25.51% was obtained after 20 min of treatment using seawater with a salinity of 8 when 30% PB1 appeared. Under the optimal induction conditions, the ploidy of the spats (60 days) was analyzed by flow cytometry to determine their composite ploidy under optimal induction conditions. The tetraploid rate of the spats in the CB-treated group under pathway I ($2n♀+2n♂$) was 4%, which was a decrease of 24.37% compared with that of the larval stage (28.37%); no tetraploid juvenile shells were detected in the hypotonic treatment group. The tetraploid rate of the spats in the CB-treated group and the hypotonic treatment group reached 80% and 30% under pathway II ($3n♀+2n♂$), which decreased by 27.36% and 3.36%, respectively, compared to the larval stage (52.64% and 26.64%, respectively). The tetraploid rate of the spats of CB-treated and hypotonic treatment groups under pathway III ($2n♀+4n♂$) reached 10% and 4%, which was a decrease of 50.45% and 21.51%, respectively, compared with that of the larval stage (60.45% and 25.51%, respectively). Comparing the three pathways and two induction methods, the best choice for the production of tetraploid of *C. gigas* "Haida No.2" is to use CB to induce tetraploid through pathway II ($3n♀+2n♂$).

Key words: *Crassostrea gigas*; "Haida No.2"; tetraploid; hypotonic treatment; cytochalasin B (CB)

Corresponding author: XU Chengxun. E-mail: xcx@ouc.edu.cn

Funding projects: Agricultural Seed Improvement Project of Shandong Province (2022LZGCQY010); China Agriculture Research System (CARS-49)