

DOI: 10.12264/JFSC2020-0171

熊本牡蛎三倍体与二倍体性腺发育特征比较

武祥伟^{1,2}, 张跃环¹, 肖述¹, 秦艳平¹, 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 广州 510301;

2. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南省高校高原渔业资源保护与可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650201

摘要: 为了评估三倍体熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)的繁殖潜力, 采用细胞松弛素 B 诱导了熊本牡蛎三倍体, 比较 60 日龄(2016 年 8 月)~450 日龄(2017 年 9 月)三倍体与二倍体性腺发育特点, 分析了性腺发育与繁殖周期的相关性。研究结果表明, 熊本牡蛎三倍体与二倍体性腺发育均可分为形成期、增殖期、成熟期、排放期和耗尽期 5 个时期; 在一个繁殖周期内 22% 的三倍体性腺可发育至成熟期, 但与二倍体相比, 三倍体成熟性腺的滤泡小、结缔组织丰富; 三倍体与二倍体性腺发育周期同步, 繁殖季节均位于 3—9 月, 繁殖期较长; 150 日龄(2016 年 10 月)三倍体与二倍体中发育的性腺(包括增殖期、成熟期、排放期、耗尽期)分别占 70% 与 90%, 210 日龄(2017 年 1 月)减小至 3% 与 18%, 之后性腺再次发育, 分别在 360 日龄(2017 年 6 月)和 450 日龄(2017 年 9 月)成熟期性腺比例达到最大值(40% 和 90%)。三倍体与二倍体雌雄比分别为 1.35 : 1 和 0.95 : 1, 三倍体性比显著偏离 1 : 1 ($P < 0.01$)。性腺成熟期三倍体与二倍体平均卵径分别为 (44.30 ± 6.88) μm 与 (37.76 ± 5.76) μm , 三倍体卵径比二倍体大 17.33% ($P < 0.05$)。本研究可为熊本牡蛎三倍体和二倍体繁育提供参考依据。

关键词: 熊本牡蛎; 三倍体; 二倍体; 性腺; 性比; 卵径; 贝类繁殖

中图分类号: S968; Q343

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)02-0136-08

三倍体牡蛎性腺高度不育, 具有不同于二倍体牡蛎的能量再分配与利用方式, 因而生长优势显著^[1]。此外, 由于三倍体牡蛎机体中糖原等物质含量较高^[2], 具有较好的口感, 因此具有较好的市场销量。三倍体牡蛎因其较高的经济价值, 已成为重要的牡蛎养殖品种, 被大量养殖, 其中仅长牡蛎(*Crassostrea gigas*)三倍体的养殖产量即占全球贝类养殖总产量的 30%^[3]。

牡蛎多倍化首先在美洲牡蛎(*C. virginica*)中实现, 通过细胞松弛素 B (CB)抑制极体的排放, 诱导三倍体^[4]。在长牡蛎中使用四倍体与二倍体杂交的方法生产三倍体, 避免了 CB 对牡蛎浮游幼体的毒害^[5]。无论通过哪种方法生产牡蛎三倍体, 绝大多数三倍体个体的性腺只能发育至分

化期或增殖期, 不能继续发育至成熟期, 性腺呈高度不育, 但仍有少部分三倍体个体性腺可发育至成熟期, 并可排出生殖细胞^[6-7]。因此, 与二倍体相比, 三倍体繁育能力显著降低, 在诱导产生的长牡蛎三倍体中, 三倍体雌性个体具有较低的性腺成熟比例, 通常只有二倍体的 2%~13%, 通过人工诱导产生的牡蛎三倍体具有一定的繁殖潜力^[8-9]。

熊本牡蛎(*C. sikamea*)主要分布于我国沿海及东北亚的朝鲜半岛与日本沿海, 在国外已成为主要的牡蛎养殖种类^[10-13]。我国熊本牡蛎野生资源丰富, 广泛分布于江苏以南沿海的海湾及河口区域, 具有较高的种质资源价值与经济价值^[12]。目前, 国内学者已进行了熊本牡蛎的选择育种研

收稿日期: 2020-06-08; **修订日期:** 2020-09-04.

基金项目: 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).

作者简介: 武祥伟(1984-), 男, 博士, 讲师, 主要从事水产种质资源保护与利用研究. E-mail: wxw9559@126.com

通信作者: 喻子牛, 研究员, 主要从事贝类遗传育种研究. E-mail: carlzyu@scsio.ac.cn

究^[14-18], 熊本牡蛎与香港牡蛎(*C. hongkongensis*)^[19]、葡萄牙牡蛎(*C. angulata*)^[20]、僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)^[20]、近江牡蛎(*C. rivularis*)^[21]的杂交育种研究, 以及熊本牡蛎三倍体诱导研究^[22], 但对熊本牡蛎三倍体性腺发育特征及其繁殖能力还未见研究报道。本研究通过观测 CB 诱导产生的熊本牡蛎三倍体的性腺发育特征及其繁殖潜力, 以期为熊本牡蛎三倍体的利用提供基础科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

在广西北海贝类养殖基地挑选 2~3 龄、体重大于 50 g 的无损伤熊本牡蛎 100 只作为亲贝, 按照雌:雄=4:1 配对, 人工解剖获取精、卵。使用新鲜海水促熟卵子和激活精子后备用。

采用同一批次的精子和卵子制作二倍体与三倍体。使用 CB 诱导三倍体, 当受精卵排出 40%~50%的第一极体(PBI)时, 立即加入 CB 溶液(终质量浓度为 0.5 mg/L)持续诱导 20 min, 并使用 0.1% 二甲基亚砜(DMSO)冲洗残留的 CB, 置于孵化桶中孵化; 对照组不进行处理。实验重复 3 次。在室内进行浮游幼虫的培育。采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, 进行稚贝与成贝的培育。

1.2 实验材料收集

在授精后 60、90、120、150、180、210、270、360、450 日龄随机收集处理组与对照组各 120 只个体, 解剖并取其性腺组织固定于 Bouin's 液中, 24 h 后转入 70%乙醇溶液中保存。

1.3 倍性鉴定

使用流式细胞仪(Partec II, Germany)逐个鉴定倍性, 解剖后取约 1 mm³ 鳃组织于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL DAPI 染色液(10 µg/mL; Sigma, USA), 轻微匀浆后制成细胞悬液, 使用流式细胞仪进行倍性检测与分析。以二倍体为对照, 检测峰值是二倍体峰值 1.5 倍则为三倍体。

1.4 石蜡切片制作

二倍体与三倍体性腺组织分别做石蜡切片。将保存于 70%乙醇溶液中的性腺组织取出, 依次

进行脱水、透明、包埋, 并做连续切片, 切片厚度 6~8 µm。将切片置于 45 ℃恒温箱中烘干, 之后进行苏木精-伊红(HE)染色。

1.5 二倍体与三倍体性别鉴定及性腺发育周期观察

使用光学显微镜(Olympus CX22, Tokyo, Japan)观察性腺切片进行性别鉴定, 根据生殖细胞类型及大小, 滤泡大小及结缔组织发育特征等, 并参考已报道的长牡蛎性腺发育阶段鉴别熊本牡蛎的性腺发育周期^[23-24]。

1.6 三倍体与二倍体卵径测量

根据已报道的方法测量牡蛎卵子的直径^[25]。每个采样时间点随机取性成熟期的 10 个个体的性腺组织石蜡切片, 每个个体测量 60 个卵子的直径。

1.7 数据处理

采用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)的方式记录数据, 并采用卡方检验的方法检测雌雄个体比例是否符合期望值 1:1。采用单因素方差分析(ANOVA)与 Duncan's test 的方法进行不同数据间的比较。所有数据分析使用 SPSS18.0 软件进行, 显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 三倍体性腺发育特征

熊本牡蛎三倍体与二倍体性腺发育均可分为 5 个时期: 形成期、增殖期、成熟期、排放期、耗尽期, 三倍体与二倍体性腺发育的差异主要为三倍体性腺发育程度较低, 虽然部分三倍体性腺可发育至成熟期和排放期, 但性腺中滤泡体积较小, 结缔组织丰富, 单个个体产生的配子数量少于二倍体(表 1, 图 1)。

2.2 三倍体与二倍体群体性别比例

熊本牡蛎二倍体雌雄比为 0.95:1, 未显著偏离 1:1 的期望值($\chi^2=13.64$; $P=0.09$), 而同时期三倍体的雌雄比为 1.35:1, 显著偏离 1:1 的期望值($\chi^2=35.46$; $P=0.00$)。在熊本牡蛎二倍体与三倍体中分别观测到 1 个和 7 个雌雄同体个体。处于性腺未分化期的二倍体与三倍体比例分别为 24.35% 与 48.45%, 约 50% 的三倍体个体由于性腺未分化而无法鉴定性别(图 2)。

表1 熊本牡蛎三倍体与二倍体成熟期性腺发育比较

Tab. 1 The comparison of mature gonads between triploid and diploid *Crassostrea sikamea*

类型 type	滤泡直径/ μm follicle diameter	结缔组织比例/% percentage of connective tissue	滤泡数/视野($\times 400$ /个) number of follicle per scope	每滤泡中卵细胞数/个 number of egg per follicle
二倍体 2n	143.2 \pm 22.4	5 \pm 2	36.6 \pm 1.5	10.5 \pm 2.5
三倍体 3n	129.4 \pm 38.2	40 \pm 13	31.0 \pm 1.0	4.1 \pm 2.4
三倍体(雌) female triploid	二倍体(雌) female diploid	三倍体(雄) male triploid	二倍体(雄) male diploid	
I	I	I	I	
II	II	II	II	
III	III	III	III	
IV	IV	IV	IV	
V	V	V	V	

图1 熊本牡蛎三倍体与二倍体性腺发育分期

I: 形成期; II: 增殖期; III: 成熟期; IV: 排放期; V: 耗尽期.

CT: 结缔组织; DG: 消化腺; DOg: 未成熟卵子; dSg: 双层精原细胞; Fi: 滤泡; FW: 滤泡壁;

Gd: 生殖导管; MOg: 成熟卵子; Og: 卵原细胞; PSc: 初级精母细胞; RO: 残留卵子;

RS: 残留精子; sOg: 单层卵原细胞; Sz: 精子; SSC: 次级精母细胞; 标尺: 100 μm .Fig. 1 Gonadal development for triploids and diploids of *Crassostrea sikamea*

I: early development stage; II: development stage; III: ripe stage; IV: spawning stage; V: spent stage.

CT: connective tissue; DG: digestive gland; DOg: developing oocyte; dSg: double layer spermatogonia;

Fi: follicle; FW: follicle wall; Gd: reproductive ducts; MOg: mature oocyte; Og: oogonia; PSc: primary spermatocyte; RO: residual oocyte; RS: residual sperm; sOg: single layer oogonia; Sz: sperm; SSC: secondary spermatocyte; bar: 100 μm .

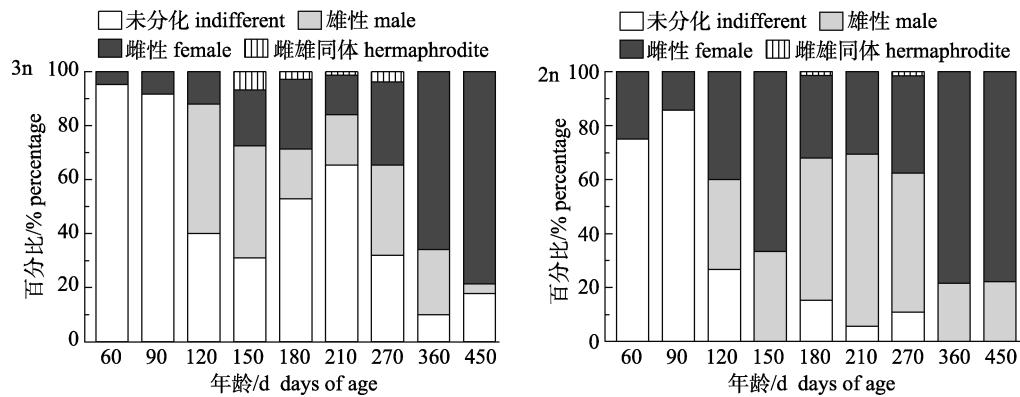


图 2 60~450 日龄三倍体与二倍体熊本牡蛎性别比例的变化

Fig. 2 Percentage of male, female and indifferent individuals from the age of 60 d to 450 d in triploid and diploid *Crassostrea sikamea*

2.3 三倍体与二倍体性腺发育的周期性变化

熊本牡蛎三倍体与二倍体雌雄个体性腺发育呈周期性变化, 且在 60 日龄时即开始发育(图 3)。60~450 日龄(2016 年 8 月至 2017 年 10 月)22% 的三倍体具有成熟期性腺, 78% 的三倍体性腺虽可

发育, 但无法发育至成熟期。三倍体雌雄个体均在 210 日龄(2017 年 1 月)具有最多的未发育期性腺, 分别为 81.8% 和 80%, 之后逐渐减少, 450 日龄(2017 年 10 月)未发育期性腺的比例又再次升高至较高水平(分别为 54.5% 与 75%)。

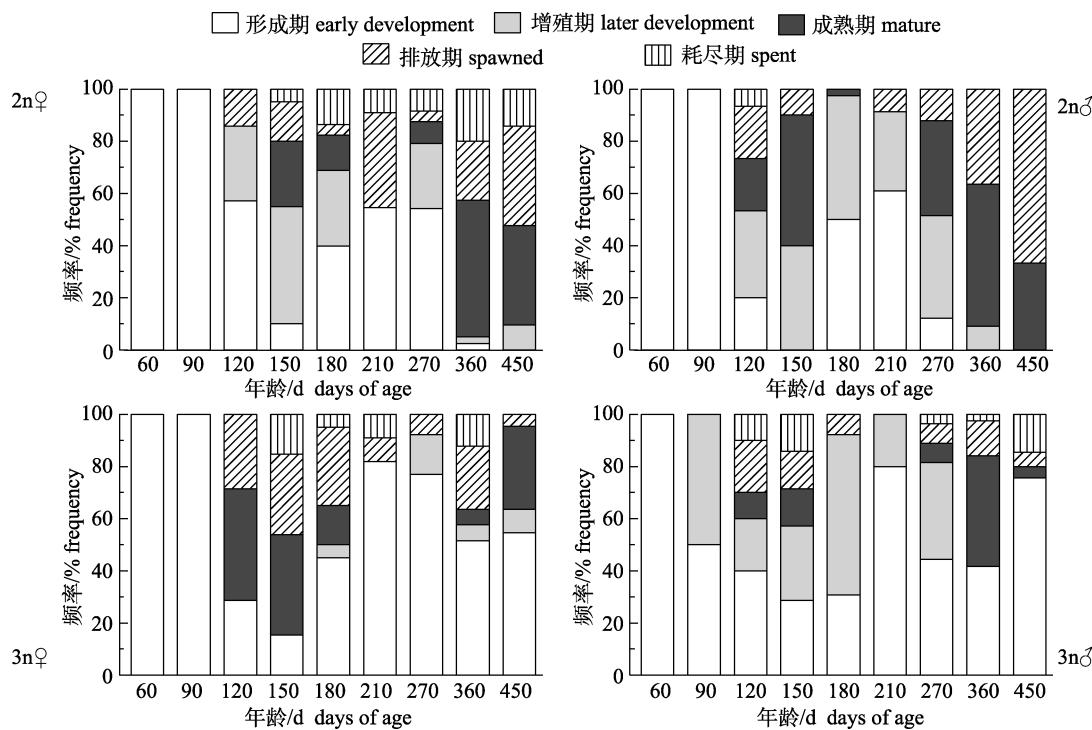


图 3 60 日龄至 450 日龄熊本牡蛎三倍体和二倍体雌雄个体性腺发育比例

Fig. 3 Percentage of individuals observed at different stages from the age of 60 d to 450 d in female and male diploid and triploid *Crassostrea sikamea*

2.4 三倍体与二倍体卵径大小比较

性腺成熟期三倍体与二倍体卵子直径均值分

别为 (44.30 ± 6.88) μm 与 (37.76 ± 5.76) μm , 三倍体的卵径比二倍体增大 17.33%, 差异显著($P < 0.05$)。

180~450 日龄, 性腺成熟期的二倍体卵径逐渐增大, 且卵径大小呈显著差异($P<0.05$)。性腺成熟期的三倍体在 180 日龄具有最大的卵径(45.7 μm), 270 日龄降低至最小(41.5 μm), 之后逐渐增大, 450 日龄时恢复至最大值(45.7 μm , 图 4)。

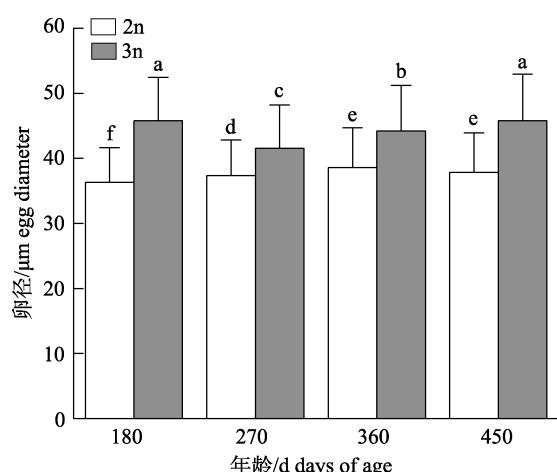


图 4 180~450 日龄熊本牡蛎性腺成熟期的三倍体与二倍体卵径

立柱上标不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Diameter of the eggs of diploid and triploid *Crassostrea sikamea* at gonadal mature stage
Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 熊本牡蛎三倍体与二倍体的性腺发育比较

可育的三倍体牡蛎具有较高的种质利用价值, 但三倍体牡蛎的可育性呈现多样性。在香港牡蛎^[26]、美洲牡蛎^[27]、长牡蛎^[28]的三倍体中观察到可育个体, 并且长牡蛎三倍体成熟性腺中滤泡面积占比达 50%, 呈现较高的可育性^[7], 而在悉尼岩牡蛎(*C. commereialis*)三倍体中未观察到性腺可育现象^[24]。本研究中 22% 的熊本牡蛎三倍体性腺可发育至成熟期, 因而熊本牡蛎三倍体具有较高的种质利用潜力。牡蛎三倍体的性腺发育程度及可育性与它们的生存环境相关, 例如在长牡蛎中, 有的学者不能观察到三倍体个体的生殖细胞排出体外的现象^[23], 而其他学者发现丰富的食物(浮游植物密度)与较高的水温可促进长牡蛎三倍体个体的未成熟性腺发育至成熟状态^[6,29]。Séguin 等^[30]观察到 42% 的长牡蛎三倍体在水温

20~22 $^{\circ}\text{C}$ 时可达到性成熟。本研究中熊本牡蛎三倍体养殖于热带海区, 在繁殖季节平均水温均高于 30 $^{\circ}\text{C}$ 。因此, 本研究中熊本牡蛎三倍体较高的可育性可能与较高的生活水温有关, 高的生活水温促进了它们的性腺发育与成熟。此外, 三倍体的诱导方法亦可影响三倍体可育性, 有研究报道在长牡蛎中, 通过四倍体与二倍体杂交生产三倍体, 比使用化学药物诱导产生三倍体具有更高的可育性, 可能是因为杂交三倍体从可育的四倍体中遗传得到了促进性腺发育的基因^[9]。

本研究中熊本牡蛎三倍体性腺组织滤泡数少于二倍体(表 1), 但性腺中结缔组织占比远高于二倍体, 并且在三倍体未成熟性腺组织中(形成期), 滤泡的空隙明显多于二倍体, 原始生殖细胞较少, 即使在成熟的三倍体性腺组织中(成熟期和排放期), 滤泡中仍存在较多的空隙, 而二倍体滤泡中则被成熟的卵子充满(图 1)。目前, 较多研究已报道了牡蛎三倍体的可育性, 但仍未有统一的评价牡蛎三倍体可育程度的标准。Cox 等^[24]把牡蛎的可育程度分为两种类型, 一种类型是性腺产生极少的配子, 或者仅产生一些成熟的配子, 或者滤泡中具有较多的空隙, 仅释放一些配子; 另一种类型是滤泡中可产生成熟的配子。本研究中熊本牡蛎三倍体的未成熟与成熟性腺发育特点均与上述性腺发育分类吻合, 但依据该评价方法, 有研究报道水温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 时 87% 的长牡蛎三倍体具有成熟的性腺^[31], 而另外的研究却未观测到长牡蛎三倍体可产生配子^[6], 并且基于该评价方法, Cox 等^[24]与 Jouaux 等^[7]也未观测到性腺成熟的长牡蛎三倍体产卵现象, 因而该评价方法可能并不能全面反映牡蛎三倍体的可育程度。Jouaux 等^[7]又把长牡蛎三倍体中配子生成方式分为 alpha 与 beta 两种类型, alpha 类型为性腺中具有大量增殖的原始生殖细胞, 而 beta 类型则为性腺中未有配子形成。在本研究中, 22% 的熊本牡蛎三倍体性腺可发育至成熟期, 并可排出成熟配子, 属于 alpha 类型, 它们具有可产生成熟生殖配子的能力; 而性腺仅能发育至形成期或增殖期的熊本牡蛎三倍体属于 beta 类型。

3.2 熊本牡蛎三倍体与二倍体性别比例和卵径

熊本牡蛎三倍体性腺处于分化期时雄性个体

的比例较高,之后雌性个体比例增加并达到最大值,可能表明随着日龄的增加熊本牡蛎性反转方式为雄性转为雌性,这种性比变化方式与长牡蛎相似^[31]。另外,熊本牡蛎三倍体与二倍体具有不同的性比。Guo等^[32]与Normand等^[6]认为环境与生物因子通过影响生理状态而影响机体生理活动,可能是决定牡蛎性别的首要因素。牡蛎三倍体与二倍体具有不同的能量再分配模式与生理状态^[33],这种差异可能导致两者的性比变化模式不同。环境因子亦可改变贝类群体的性比,如水体中锌离子浓度升高可使等边浅蛤(*Gomphina aequilatera*)群体中雄性个体增加^[34]。此外,熊本牡蛎二倍体的性比具有季节性变化。熊本牡蛎二倍体雌性个体在冬季(120~150 日龄)增加,而在翌年的春季(180~270 日龄)减少,秋季(360~450 日龄)时再次升高。相比而言,熊本牡蛎三倍体性比的季节性变化不明显,可能是由于熊本牡蛎三倍体性腺滞育,未分化性腺的比例较大。在悉尼岩牡蛎三倍体中也发现了相似的现象,它们的性腺发育节奏比二倍体滞后^[24]。

180~450 日龄性腺成熟期的熊本牡蛎三倍体与二倍体卵径变化与生殖季节相关,繁殖季节性腺成熟期三倍体卵径显著小于非繁殖季节;而二倍体卵径随着成熟期性腺比例的增加而逐渐增大,相似的结果亦在二倍体长牡蛎壳金色群体中观察到^[35]。因此,与其他影响因素如食物丰度、杂合度、能量代谢能力等相比,繁殖季节牡蛎性腺发育占用了大量的能量与营养物质,个体生长受到限制,因而在繁殖季节,三倍体与二倍体牡蛎的性腺发育对它们的个体生长影响较大^[33, 36-37]。

总之,熊本牡蛎三倍体性腺发育周期与二倍体相似,均可分为形成期、增殖期、成熟期、排放期和耗尽期 5 个时期,三倍体部分个体可育,60~450 日龄平均 22% 个体的性腺可发育至成熟期;三倍体与二倍体性腺发育同步,繁殖期位于 3—9 月,但三倍体性别比例显著偏离 1:1 ($P<0.01$),雌性个体数量较多,并且三倍体与二倍体的卵径变化与繁殖周期相关,三倍体卵径比二倍体大 17.33%。本研究为熊本牡蛎三倍体和二倍体繁育提供了重要参考依据。

参考文献:

- [1] Piferrer F, Beaumont A, de 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.
- [2] Jeung H D, Keshavmurthy S, Lim H J, et al. Quantification of reproductive effort of the triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* raised in intertidal rack and bag oyster culture system off the west coast of Korea during spawning season[J]. Aquaculture, 2016, 464: 374-380.
- [3] Dunham R A. Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches[M]. Cabi: Dunham, RA Stylus Cabi Publishing, 2011.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Normand J, Le Pennec M, Boudry P. Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave[J]. Aquaculture, 2008, 282(1-4): 124-129.
- [7] Jouaux A, Heude-Berthelin C, Sourdaine P, et al. Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2010, 395(1-2): 162-170.
- [8] Guo X, Allen S K Jr. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg)[J]. The Biological Bulletin, 1994, 187(3): 309-318.
- [9] Gong N, Yang H, Zhang G, et al. Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg[J]. Heredity, 2004, 93(5): 408-415.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [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] Wu X W, Zhang Y H, Xiao S, et al. Comparative studies of

- the growth, survival, and reproduction of diploid and triploid Kumamoto oyster, *Crassostrea sikamea*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2019, 50(4): 866-877.
- [14] 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. [张跃环, 秦艳平, 张扬, 等. 熊本牡蛎多峰和无峰品系 F₁ 生长性状的群体选育[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 882-889.]
- [15] 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. [张跃环, 秦艳平, 张扬, 等. 熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)多峰和无峰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.]
- [16] 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. [张跃环, 武祥伟, 秦艳平, 等. 熊本牡蛎多峰和无峰品系 F₃ 生长性状的连续选择效应[J]. 中国水产科学, 2017, 24(6): 1161-1167.]
- [17] Zhang Y H, Wu X W, Qin Y P, et al. Construction of basic population and performance evaluation for American Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1020-1026. [张跃环, 武祥伟, 秦艳平, 等. 美国熊本牡蛎基础群体构建及生产性能评估[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1020-1026.]
- [18] Wu X W, Zhang Y H, Xiao S, et al. Heterosis and triploid advantage between Chinese and American populations of Kumamoto oysters (*Crassostrea sikamea*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(3): 465-472. [武祥伟, 张跃环, 肖述, 等. 熊本牡蛎中国群体与美国群体杂交效应及杂交三倍体优势分析[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 465-472.]
- [19] 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.
- [20] Su J Q. Hybridization between *Crassostrea angulata* and *C. sikamea*, *Saccostrea Cucullata*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015. [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.]
- [21] 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.
- [22] 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. [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.]
- [23] Allen S K Jr, Downing S L. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Gametogenesis[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1990, 47(6): 1213-1222.
- [24] 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.
- [25] Lango-Reynoso F, Chávez-Villalba J, de Cochard J C, et al. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)[J]. Aquaculture, 2000, 190(1-2): 183-199.
- [26] 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.
- [27] Allen S K Jr, Bushek D. Large-scale production of triploid oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using "stripped" gametes[J]. Aquaculture, 1992, 103(3-4): 241-251.
- [28] Allen S K Jr, 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.
- [29] Chávez-Villalba J, Barret J, Mingant C, et al. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: A new approach[J]. Aquaculture, 2002, 210(1-4): 171-186.
- [30] Séguin A, Mottier A, Perron C, et al. Sub-lethal effects of a glyphosate-based commercial formulation and adjuvants on juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) exposed for 35 days[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 117(1-2): 348-358.
- [31] Shpigel M, Barber B J, Mann R. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1992, 161(1): 15-25.
- [32] Guo X M, Hedgecock D, Hershberger W K, et al. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* thunberg[J]. Evolution, 1998, 52(2): 394-402.
- [33] Kesarcodi-Watson A, Lucas J S, Klumpp D W. Comparative feeding and physiological energetics of diploid and triploid Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis*: I. Effects of oyster size[J]. Aquaculture, 2001, 203(1-2): 177-193.
- [34] Ju S M, Park J J, Lee J S. Induction of intersex and masculu-

- linization of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae) by zinc[J]. Animal Cells and Systems, 2009, 13(3): 339-344.
- [35] Deng C M, Kong L F, Yu R H, et al. Seasonal variation in gonadal development and nutritive components in the golden shell colored strain of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(1): 40-49. [邓传敏, 孔令锋, 于瑞海, 等. 长牡蛎壳金选育群体性腺发育与营养成分的周年变化[J]. 中国水产科学, 2017, 24(1): 40-49.]
- [36] Kesarcodi-Watson A, Klumpp D W, Lucas J S. Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*): II. Influences of food concentration and tissue energy distribution[J]. Aquaculture, 2001, 203(1-2): 195-216.
- [37] Hand R E, Nell J A, Thompson P A. Studies on triploid oysters in Australia: XIII. Performance of diploid and triploid Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850), progeny from a third generation breeding line[J]. Aquaculture, 2004, 233(1-4): 93-107.

Comparative study of gonadal development in triploid and diploid *Crassostrea sikamea*

WU Xiangwei^{1,2}, ZHANG Yuehuan¹, XIAO Shu¹, QIN Yanping¹, YU Ziniu¹

1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;
2. Animal Science and Technology College, Key Laboratory of Plateau Fishery Resources Protection and Sustainable Utilization of Yunnan Province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650301, China

Abstract: To evaluate the reproductive potential of triploids of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*, triploids were made using cytochalasin B. The characteristics of the periodical variation of gonadal development were investigated for the triploids and diploids. The relationship between the gonadal development and reproduction period was also analyzed in the triploids and diploids. The results showed that gonadal development could be classified into five stages: early development, later development, mature, spawning, and spent. Triploids had partial reproduction, with 22% mature individuals. The mature triploids had smaller sized follicles and amounts of connective tissue compared with mature diploids. The gonadal development was synchronous in triploids and diploids. Diploids had a long reproduction period from March to September. The percentages of the gonad development of females and males (including the development stage, mature stage, spawning stage, and spent stage) were 70% and 90% in October (150 d) for triploids and diploids, respectively, and decreased until December (210 d), with a minimum of 3% and 18% for triploids and diploids, respectively. Subsequently, the gonads developed once more, with the highest maturation rate of 40% and 90% in June (360 d) and September (450 d), respectively. The sex ratios (female: male) were 1.35 : 1 and 0.95 : 1 for triploids and diploids, respectively, with the triploid sex ratio significantly deviating from the expected sex ratio (1 : 1) ($P < 0.01$). The average (\pm standard deviation) egg diameters were (4.30 ± 6.88) μm and (37.76 ± 5.76) μm in the gonads of mature triploids and diploids, respectively. Moreover, the egg diameters of the triploids were 17.33% larger than that of the diploids, which was significant ($P < 0.05$). The present study provides a useful basis for the reproduction of triploids and diploids of *C. sikamea*.

Key words: *Crassostrea sikamea*; triploid; diploid; gonad; sex ratio; egg diameter; mollusk breeding

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