

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00581

低渗诱导太平洋牡蛎三倍体以及与其他诱导方法的比较

孔静, 王昭萍, 于瑞海, 刘剑, 张跃环

中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

摘要: 通过低渗方法抑制受精卵第二极体(PB2)的释放, 诱导太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)三倍体。在水温为 23~25℃的条件下, 分别采用不同低渗海水(盐度分别为 4、6、8、10、12、14、16), 在不同处理时机, 即第 1 个第一极体(PB1)出现、30%的 PB1 出现、40%的 PB1 出现、50%的 PB1 出现以及第 1 个第二极体(PB2)出现时, 对太平洋牡蛎受精卵进行 10 min、15 min、20 min、25 min 持续处理。处理后, 于正常盐度海水中孵化, 收集 D 形幼虫, 通过流式细胞仪进行倍性测定, 确定最佳诱导条件。结果表明, 当太平洋牡蛎受精卵 PB1 出现 40%时, 在盐度为 8 的低渗海水中, 持续处理 15 min, 得到最高三倍体诱导率为(89.16±1.39)%。与对照组相比, 低渗诱导获得的三倍体幼虫表现出明显的生长优势。将低渗方法同高温(32℃)、低温(2℃)和 6-DMAP(450 μmol/L)处理等多倍体诱导方法进行比较, 结果显示, 低渗组的卵裂率和孵化率显著高于高温、低温和 6-DMAP 诱导的太平洋牡蛎三倍体($P<0.05$)。6-DMAP 诱导的三倍体率虽略高于低渗诱导, 但差异不显著($P>0.05$)。通过综合评价指数(I_e)比较, 认为低渗诱导多倍体的方法比高温、低温和 6-DMAP 诱导具有明显的优势。

关键词: 太平洋牡蛎; 三倍体; 低渗诱导

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0581-07

自 Stanley 等^[1]最早采用细胞松弛素 B(CB)处理美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)受精卵, 得到 8 个月三倍体子代以来, 贝类三倍体育种技术备受重视。三倍体贝类具生长快、个体大、育性差、品质好、繁殖季节死亡率低等优势。之后在长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[2-5]、食用牡蛎(*Ostrea edulis*)^[6]、悉尼岩牡蛎(*Saccostrea commercialis*)^[7]和僧帽牡蛎(*Ostrea cucullata*)^[8]等牡蛎中也相继成功诱导出三倍体。

太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)在中国南、北方均有分布, 是中国重要的经济贝类。牡蛎三倍体所表现出的诸多优势, 将使贝类多倍体育种技术在牡蛎养殖生产中发挥重要作用。随着对贝类三倍体研究的不断深入, 三倍体诱导方法也多种多样, 如化学方法有 6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)^[9]、

CB^[10]、咖啡因^[11]诱导等, 物理方法有低温^[12]和热休克^[11]等, 以及利用二倍体和四倍体杂交的生物方法^[13]。化学诱导剂的价格昂贵, 而且其毒副作用降低了幼虫的存活率, 影响了食用安全性; 物理方法虽操作简单、无毒, 但诱导率很低; 杂交虽然能得到 100%三倍体, 但四倍体的获得仍是育种的瓶颈。因此需要一种经济高效, 安全无毒, 易于操作的方法, 以促进贝类多倍体育种技术的进一步广泛应用。

低渗诱导贝类多倍体已在虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)^[14]中得到验证。此方法的诱导率高, 而且方法简单, 取材方便, 具有较高的应用价值。本研究采用低渗诱导方法培育太平洋牡蛎三倍体, 旨在验证低渗在贝类三倍体诱导中的可行性及应用前景。

收稿日期: 2010-09-15; 修订日期: 2010-11-16.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771622); 国家高技术研究发展规划项目(2006AA10A401).

作者简介: 孔静(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事贝类遗传育种研究. Kjlinda1515@163.com

通信作者: 王昭萍, 教授, 主要从事贝类遗传育种研究. E-mail: zpwang@ouc.edu.cn

1 材料与方法

1.1 亲贝来源

于 2010 年 5 月,在山东乳山海区选取贝壳无损伤的 2 龄太平洋牡蛎 100 枚作为亲贝,并于蓬莱海益水产有限公司人工促熟培养至性腺成熟。

1.2 精卵的获得及授精

剖开牡蛎,用解剖针取出少量性腺组织,显微镜下辨别雌雄,检查卵细胞发育情况和精子的活力。分别放置雌雄贝,严格防止精卵污染。将卵细胞用 250 目筛绢过滤后,于标记好的小桶中浸泡促熟 1 h,弃去上层清液。成熟卵子由梨形变为圆形,显微镜下观察颜色较深,卵黄含量丰富。加入精液后迅速搅匀,进行人工授精。授精前检查卵细胞是否被污染。

1.3 低渗诱导实验设计

受精、处理及孵化水温均保持在 23~25℃。

1.3.1 最佳诱导盐度的确定 当太平洋牡蛎受精卵第一极体(PB1)出现 40%~50%,在盐度分别为 4、6、8、10、12、14、16 的低渗海水中,持续处理 15 min 后,于正常海水中孵化。孵化后收集 D 形幼虫,经倍性分析,确定最佳诱导盐度。实验重复 3 次以上。

1.3.2 最佳持续处理时间的确定 当太平洋牡蛎受精卵第一极体(PB1)出现 40%~50%,在最佳诱导盐度的处理液中,设置不同的处理时间,分别为 10 min、15 min、20 min、25 min。处理后,于正常海水中孵化,收集 D 形幼虫,经倍性分析,确定最佳处理持续时间。实验重复 3 次以上。

1.3.3 最佳处理时机的确定 结合显微镜观察,分别当太平洋牡蛎受精卵出现第 1 个 PB1、30%的 PB1、40%的 PB1、50%的 PB1 以及第 1 个第二极体(PB2)时,采用最佳诱导盐度及最佳持续处理时间进行诱导,于正常海水中孵化。孵化后收集 D 形幼虫,经倍性分析,确定三倍体最佳诱导时机。实验重复 3 次以上。

1.3.4 各种诱导方法诱导效果的比较 将同一批受精卵分成 4 份,分别采用高温(32℃)^[11]、低温(2℃)^[12]、6-DMAP(450 μmol/L)^[15]和低渗(最佳诱

导盐度)诱导方法抑制太平洋牡蛎 PB2,比较各种方法的诱导效果。实验重复 3 次以上。

1.4 胚胎孵化及幼虫培养

选取最佳诱导条件,进行太平洋牡蛎三倍体诱导、孵化和培养。幼虫孵化后每日投饵 3 次,前期为金藻,后期为扁藻与金藻混合投喂。每天全量换水,水温保持在 23~25℃。

1.5 指标测量及数据处理

镜检测定诱导处理后的卵径、卵裂率以及孵化率。卵裂率为已分裂卵数与总卵数的百分比,孵化率为 D 形幼虫与受精卵数的百分比。孵化后的幼虫经 300 目筛绢收集到 1.5 mL 离心管中,加入 DAPI 荧光染色,经振荡器震荡后,通过 Partec PA II 流式细胞仪(FCM)进行倍性分析。采用 Excel 作图,SPSS13.0 统计软件进行分析处理,不同实验组间数据的比较采用单因素方差分析方法,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

综合评价指数(I_e)为三倍体率与孵化率乘积的百分数^[16]。本实验采用综合评价指数对低渗诱导三倍体结果进行综合评价,以此来确定最佳诱导条件。

2 结果与分析

2.1 不同盐度条件下受精卵卵径的比较

不同低渗环境下的受精卵卵径如图 1 所示,低渗环境下受精卵的卵径显著大于正常海水(盐度为 30)中的卵径($P < 0.05$)。随着盐度不断升高接

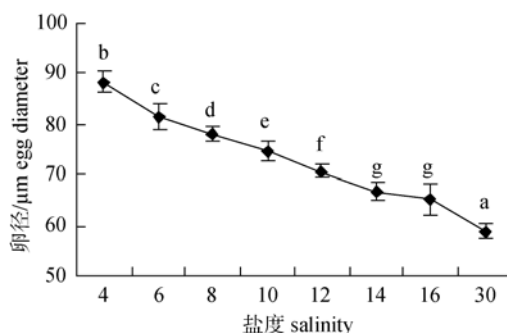


图 1 不同盐度条件下受精卵的卵径
具有相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),具有不同字母者差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 1 Egg diameters at different salinity
The same letters mean no significant difference ($P > 0.05$). Different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

近于正常海水盐度, 受精卵的卵径逐渐减小, 达到 $(58.9 \pm 1.37) \mu\text{m}$, 接近于正常的卵径。

2.2 最佳低渗盐度

当受精卵第一极体出现 40%~50%, 在不同盐度下(正常海水盐度为 30)持续处理 15 min, 受精卵的卵裂率、孵化率及三倍体诱导率如图 2 所示。随着低渗液盐度升高逐渐接近于正常海水盐度, 卵裂率和孵化率均逐渐升高。在正常海水盐度下, 卵裂率和孵化率分别为 $(97.83 \pm 0.61)\%$ 和 $(99.67 \pm 0.58)\%$ 。通过比较各低渗盐度综合评价指数, 在盐度为 8 的条件下, 综合评价指数值最大, 为 69.82%;

三倍体诱导率最高, 为 $(89.13 \pm 2.04)\%$, 且显著大于其他各盐度下的三倍体诱导率($P < 0.05$); 孵化率为 $(78.33 \pm 2.08)\%$, 低于正常海水盐度下的孵化率($P < 0.05$)。

2.3 最佳持续处理时间

当受精卵第一极体出现 40%~50%, 在盐度为 8 的低渗处理液中, 持续处理 10 min、15 min、20 min、25 min, 各实验组受精卵卵裂率、孵化率及三倍体诱导率如图 3 所示。随着持续处理时间的增加, 卵裂率和孵化率逐渐减小, 均显著小于对照组[卵裂率和孵化率分别为 $(90.80 \pm 2.88)\%$ 和

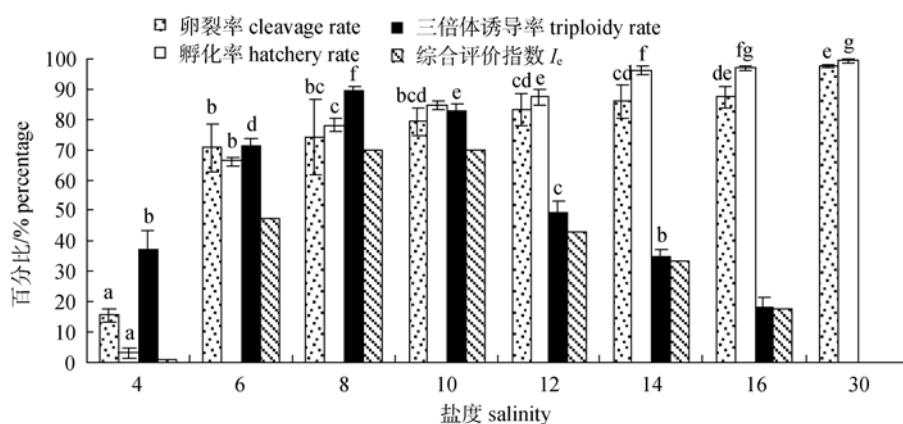


图 2 不同低渗盐度下的受精卵卵裂率、孵化率及三倍体诱导率

同一指标中具有相同字母的各项间差异不显著($P > 0.05$), 具有不同字母者差异显著($P < 0.05$).

Fig. 2 Results of cleavage rate, hatchery rate and triploidy rate of hypotonic treatment at different salinity
The same letters in each indicator mean no significant difference ($P > 0.05$), and different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

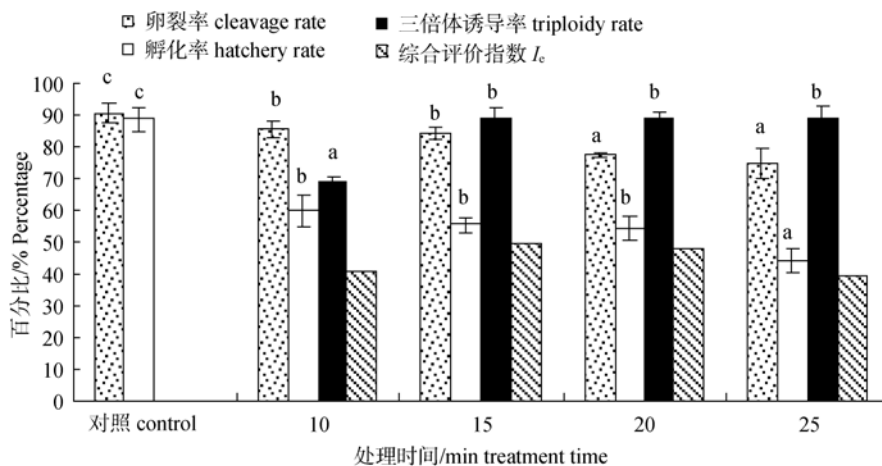


图 3 不同持续处理时间下的受精卵卵裂率、孵化率及三倍体诱导率

同一指标中具有相同字母的各项间差异不显著($P > 0.05$), 具有不同字母者差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 Results of cleavage rate, hatchery rate and triploidy rate of hypotonic treatment at different salinity
The same letters in each indicator mean no significant difference ($P > 0.05$), and different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

($88.63 \pm 3.59\%$)($P < 0.05$)。在持续处理 15 min 时,三倍体诱导率最高($89.16 \pm 1.39\%$),显著大于持续处理 10 min 组($P < 0.05$),但与持续处理 20 min 组和 25 min 组差异不显著($P > 0.05$);持续处理 15 min 时综合评价指数最高,为 49.33%,显示处理 15 min 三倍体诱导效果最好。

2.4 最佳诱导时机

当受精卵分别出现第 1 个 PB1、30%的 PB1、40%的 PB1、50%的 PB1 以及第 1 个 PB2 时,在盐度为 8 的处理液中,持续处理 15 min,受精卵卵裂率、孵化率及三倍体诱导率如图 4。不同处

理时机下,受精卵的卵裂率和孵化率变化不明显,有随着处理时机推迟而增长的趋势,但均显著小于对照组[卵裂率和孵化率分别为($86.50 \pm 1.81\%$)和($97.52 \pm 0.51\%$)]($P < 0.05$)。在处理时机为 40% PB1 出现时,三倍体的诱导率最高,为($60.33 \pm 3.03\%$),显著大于诱导时机为第 1 个 PB1 和第 1 个 PB2 出现的处理组($P < 0.05$),但与诱导时机为 30%PB1 和 50%PB1 出现的处理组差异不显著($P > 0.05$);综合评价指数为 57.32%,大于其他各组的综合评价指数值,显示此诱导时机为太平洋牡蛎三倍体的最佳诱导时机。

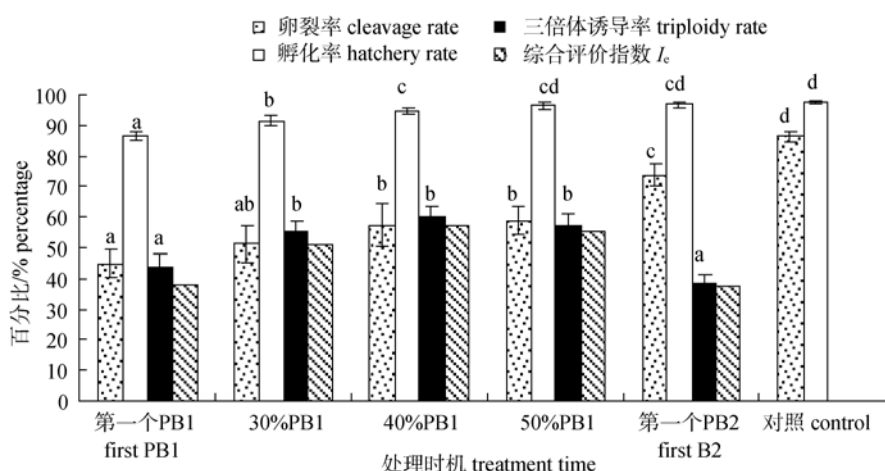


图 4 不同诱导时机下低渗处理的受精卵卵裂率、孵化率及三倍体诱导率

同一指标中具有相同字母的各项间差异不显著($P > 0.05$),具有不同字母者差异显著($P < 0.05$). PB1: 第一极体; PB2: 第二极体.

Fig. 4 Results of cleavage rate, hatchery rate and triploidy rate of hypotonic treatment at different initial treating time

The same letters in each indicator mean no significant difference ($P > 0.05$). Different letters in each indicator mean significant difference ($P < 0.05$). PB1: polar body I; PB2: polar body II.

2.5 低渗透诱导组幼虫与对照组幼虫生长比较

当受精卵出现 40%PB1 时,在盐度为 8 的处理液中,持续处理 15 min,进行太平洋牡蛎三倍体的诱导。该三倍体组与二倍体对照组幼虫生长曲线如图 5 所示。诱导组卵裂率为($83.41 \pm 6.81\%$),孵化率为($77.70 \pm 8.25\%$)。孵化后,收集 D 形幼虫测得三倍体诱导率为 82.74%。低渗透诱导组幼虫与同期对照组幼虫相比个体较大,除 6、15 日龄外,其他日龄幼虫壳高差异显著($P < 0.05$)。诱导组的生长速度为(13.84 ± 0.80) $\mu\text{m}/\text{d}$,明显大于对照组的生长速度[(12.41 ± 1.12) $\mu\text{m}/\text{d}$]。

2.6 低渗透诱导与其他诱导方法的比较

采用同一批牡蛎的受精卵,分别通过高温

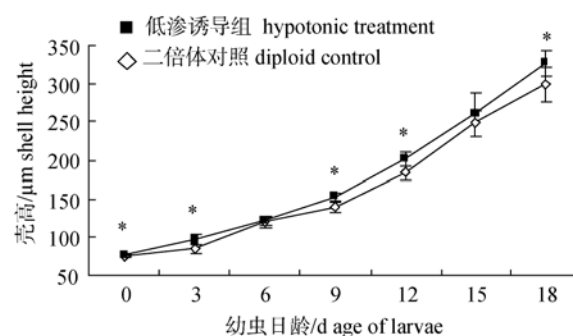


图 5 低渗透诱导组与二倍体对照组幼虫壳高生长比较

*表示低渗透诱导组与对照组间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 5 Shell height comparison between hypotonic treatment group and control

* donates significant difference between hypotonic treatment group and control ($P < 0.05$).

(32℃)、低温(2℃)、6-DMAP(450 μmol/L)、低渗(盐度 8)等方法诱导三倍体, 卵裂率、孵化率和三倍体诱导率如图 6。低渗处理组的卵裂率与对照组及高温组相比差异显著($P<0.05$), 但与其他 2 种诱导方法结果差异不显著($P>0.05$)。低渗诱导的孵化率显著高于其他 3 种诱导方法($P<0.05$)。

6-DMAP 的诱导率为(60.12 ± 1.58)%, 略高于低渗处理组的诱导率(59.04 ± 3.15)%, 但差异不显著($P>0.05$)。而低渗和 6-DMAP 2 种方法的诱导率显著高于高温、低温诱导方法($P<0.05$)。低渗诱导方法的综合评价指数最高, 为 36.01%, 显示低渗诱导三倍体太平洋牡蛎的效果最佳。

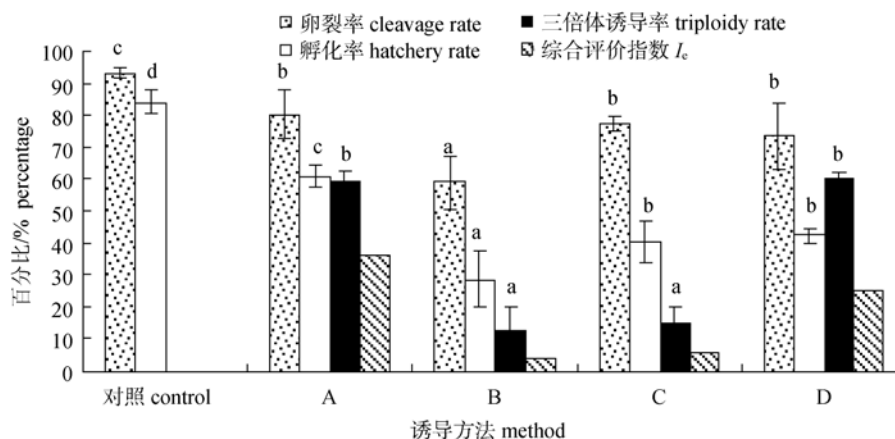


图 6 不同诱导方法的受精卵卵裂率、孵化率及三倍体诱导率

同一指标中具有相同字母的各项间差异不显著($P>0.05$), 具有不同字母者差异显著($P<0.05$)。A: 低渗诱导; B: 高温诱导; C: 低温诱导; D: 6-DMAP 诱导。

Fig. 6 Results of cleavage rate, hatchery rate and triploidy rate with different methods of triploid induction

The same letters in each indicator method mean no significant difference ($P>0.05$). Different letters in each indicator mean significant difference ($P<0.05$). A: hypotonic treatment; B: heat shock; C: cold shock; D: 6-DMAP.

3 讨论

3.1 低渗诱导条件的确定

通过测定不同低渗条件下卵径的大小, 发现受精卵并没有因为低渗处理而破裂, 推测受精卵对低渗处理具有一定的耐受能力, 且实验中不同的低渗盐度是在太平洋牡蛎耐受范围之内的。随着低渗处理强度的增强, 对受精卵的影响也逐渐增强: 卵裂率、孵化率随之下降, 而三倍体诱导率则表现出了峰值。

本实验结果显示出诱导时机对孵化率影响不显著, 这与于瑞海等^[11]采用咖啡因和热休克诱导太平洋牡蛎三倍体研究结果一致。在受精卵第一极体出现 40%~50%时诱导效果最好, 这个结果与田传远等^[17]采用 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体实验结果一致。要提高三倍体的诱导率, 保持受精卵发育的同步性及合适的受精卵处理密度也

是至关重要的^[15, 18]。本实验采用同一批牡蛎促熟解剖, 尽量保证受精卵的同步性, 以及保持同一密度、同等卵量, 消除卵密度等对各条件下诱导率的影响, 保证实验结果的可靠性。

从推广的角度来考虑, 评价三倍体的诱导效果不能仅考虑三倍体诱导率这 1 个指标, 还要结合卵裂率、孵化率和实验条件等综合评判。本研究选取综合评价指数, 即三倍体诱导率与孵化率乘积的百分比来判定低渗诱导太平洋牡蛎三倍体的最佳条件。田传远等^[17]认为, 在确定三倍体诱导率各影响因素最优水平组合时, 不仅要选取主要因素中的最好水平, 也要选取次要因素的最好水平。本实验没有将卵裂率和实验条件列入综合评价指数, 是基于两点考虑: (1)在受精卵发育至 D 形幼虫时, 通过选幼, 可以将未受精的卵筛除, 所以没有将卵裂率列入; (2)实验条件随着环境、水质、水温等因素的变化而不同, 可重复性较差,

也没有将其列入综合评价指数。

3.2 低渗方法的优势

诱导贝类三倍体的理化方法很多,其中物理方法主要采用温度休克^[12],化学方法有 6-DMAP^[17]、CB^[10]和咖啡因^[11]等。于瑞海等^[19]采用低温(2~3℃)对太平洋牡蛎进行三倍体诱导,诱导率较低(58%)且不稳定;Quillet 等^[20]用 38℃ 高温诱导日本太平洋牡蛎,获得 60%的三倍体胚胎。化学方法中以 6-DMAP 的诱导率较高,Desrosiers 等^[5]用 300 μm 的 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体幼虫率高达 93%。

本研究对比了低渗、高温、低温等物理方法和 6-DMAP 诱导三倍体的效果。在相同的外部条件下,用已报道的各种处理方法的最佳处理方案对同一批牡蛎受精卵进行操作,结果显示温度休克方法(高温、低温)诱导率较低,低渗处理与 6-DMAP 诱导三倍体率明显高于温度休克($P<0.05$),但低渗处理和 6-DMAP 的诱导效果差异性不显著($P>0.05$)。

杨爱国等^[21]认为化学诱导剂 6-DMAP 能有效抑制受精卵的染色体分离和原核移动而产生三倍体,未发现对胚胎发育造成明显的不良影响。但这种化学试剂的残留对三倍体贝类食用安全是否具有潜在隐患还有待于进一步的探讨。就成本与食用安全而言,低渗方法比较经济,操作更简单,也更适合大规模生产。同时通过综合评价指数比较,也能看出采用低渗诱导方法诱导太平洋牡蛎三倍体具有明显的优势。

目前低渗诱导三倍体的作用机理还不明确,王昭萍等^[14]认为可能与低渗引起的能量代谢紊乱影响微管和微丝的形成有关。

3.3 低渗诱导三倍体的应用前景

低渗诱导是最新提出的一种多倍体诱导方法,迄今只在虾夷扇贝中进行过三倍体的诱导^[14],在牡蛎或其他养殖贝类中尚未见报道。虾夷扇贝受精卵在出现第 1 个 PB2 时,以盐度为 12 的低渗海水处理 20 min,三倍体诱导率最高,为(84.74±3.82)%。在本研究中,当 40%受精卵出现 PB1 时,用盐度为 8 的低渗海水处理 15 min,太平洋牡蛎

的三倍体诱导率高达(89.16±1.39)%。本研究中太平洋牡蛎的诱导条件与已报道的虾夷扇贝的诱导条件不同,可能与物种不同有关,但两者获得的三倍体组幼虫在均表现出明显的生长优势。

低渗诱导组与对照组同期相比个体较大,生长率明显较快。这些三倍体幼虫的生长优势可能与多倍体的巨态发育有关,即发育进程中细胞体积增大而细胞数目并不减少,结果导致整个三倍体个体的增大^[22]。低渗诱导贝类三倍体幼虫的生长优势,在虾夷扇贝^[14]中已得到验证。低渗方法在太平洋牡蛎三倍体诱导及其大规模推广方面应具有可行性。

多倍体育种的诱导技术与实验种类、发育状况及生长环境密切相关,因而对多倍体幼虫的诱导条件、处理强度等方面的研究也较为复杂。低渗诱导与其他诱导方法相比,安全无毒、经济高效、易于操作。通过低渗方法诱导太平洋牡蛎三倍体,虽然诱导率不能像通过四倍体与二倍体杂交那样达到 100%,但是相对成本低廉,工序简单,适合于大规模推广。从三倍体诱导率、D 幼孵化率和药品价格及来源等进行综合考虑,低渗诱导多倍体的方法将会在养殖贝类多倍体的大规模养殖中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Stanley J G, Allen S K, Hidu H. Ployploidy induced in the American oyster *Crassostrea virginica* with cytochalasin B [J]. Aquaculture, 1981, 23: 1–10.
- [2] Allen S K, Downing S L, Chaiton J C, et al. Chemically and pressure induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 1986, 57: 359–360.
- [3] Yamamoto S, Sugawara Y, Nomura T, et al. Induced triploidy in Pacific oyster, *Crassosyrea gigas*, and performance of triploid larvae [J]. Tohoku J Agric Res, 1988, 39(1): 47–59.
- [4] Yamamoto S, Sugawara Y, Nomura T. Chemical and thermal control of triploid production in Pacific oysters and mussels, with regard to controlling meiotic maturation [J]. Adv Invertebr Reprod, 1990, 5: 455–460.
- [5] Desrosiers R R, Gerard A, Peignon J M, et al. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1993, 170(1): 29–43.
- [6] Gendreau S, Grizel H. Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L [J]. Aquaculture,

- 1990, 90: 229–238.
- [7] Nell J A, Cox E, Smith I R, et al. Studies on triploid oysters in Australia. I. The farming potential of triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) [J]. *Aquaculture*, 1995, 137: 355–358.
- [8] 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.
- [9] 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释放[J]. *水产学报*, 1999, 23(2): 128–132.
- [10] 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.
- [11] 于瑞海, 王昭萍, 田传远, 等. 利用咖啡因和热休克诱导太平洋牡蛎三倍体[J]. *青岛海洋大学学报*, 2001, 31(4): 518–522.
- [12] 田传远, 王如才, 梁英, 等. 低温诱导太平洋牡蛎产生三倍体[J]. *海洋科学*, 1999 (1): 53–55.
- [13] 王昭萍, 姜波, 孔令峰, 等. 利用四倍体与二倍体杂交规模化培育全三倍体太平洋牡蛎苗种[J]. *中国海洋大学学报*, 2004, 34(5): 742–746.
- [14] 王昭萍, 赵婷, 于瑞海, 等. 一种新方法 - 低渗诱导蛎夷扇贝三倍体的研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(2): 193–196.
- [15] 林琪, 吴建绍, 曾志南, 等. 长牡蛎三倍体的诱导和培育[J]. *台湾海峡*, 2000, 19(4): 478–483.
- [16] 孟庆磊, 黄晓婷, 赵海波, 等. 扇贝异源三倍体诱导[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(5): 718–727.
- [17] 田传远, 梁英, 王如才, 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.
- [18] 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, 1(2): 57–61.
- [19] 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(1): 57–61.
- [20] Quillet E, Panelay P J. Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Aquaculture*, 1986, 57: 271–279.
- [21] 杨爱国, 王清印, 孔杰, 等. 6-二甲基氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体的细胞学机理[J]. *海洋水产研究*, 2000, 21(1): 22–26.
- [22] Guo X, Allen S K. Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf-surf clam, *Mulinia lateralis* Say [J]. *Genetics*, 1994, 138: 1199–1206.

Triploid induction in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by hypotonic treatment and comparison with other induction methods

KONG Jing, WANG Zhaoping, YU Ruihai, LIU Jian, ZHANG Yuehuan

The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: Triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) were induced by inhibiting polar body II (PB2) releasing with hypotonic treatment. Different hypotonic treatments, including salinity (4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16), initial treatment time (at the time when the first PB1, 30 percents of PB1, 40 percents of PB1, 50 percents of PB1 and the first PB2 were observed) and duration time (10, 15, 20 and 25 min) were tested at 23–25°C water temperature. Flow cytometry analysis showed that the highest triploidy rate was (89.16±1.39)% when the fertilized eggs were treated for 15 min with hypotonic solution with salinity of 8 at the time when 40 percents of PB1 appeared. The results also showed that shell height of triploids were larger than that of diploids. And triploid larvae appeared much superiority in growth. Then four different triploid induction methods were compared including hypotonic treatment, cold shock (2 °C), heat shock (32 °C) and 6-DMAP (450 µmol/L) treatment. The triploids induced by hypotonic treatment were superior over those by cold shock, heat shock and 6-DMAP, and the difference in hatching success and D-larval size was significant ($P<0.05$). The induction ratio of 6-DMAP treatment was higher than that by hypotonic treatment, but the difference was not significant ($P>0.05$). General evaluation index (I_c) of hypotonic treatment is superior over those of other three triploid induction treatments. Because of the low price, the high induction ratio of triploids and security, it is feasible and worthwhile to induce triploid by hypotonic treatment.

Key words: *Crassostrea gigas*; triploidy; hypotonic treatment

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