

利用细胞松弛素 B 抑制第一极体排放诱导 近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*) 四倍体*

阚华勇 郭希明 张国范 张福绥

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(美国新泽西州立大学海洋与海岸科学研究所 Haskin 贝类研究实验室, Port Norris, NJ 08349, USA)

摘要 采用细胞松弛素 B(CB) 处理受精卵, 抑制第一极体的排放, 对近江牡蛎四倍体的诱导和培育进行了研究。结果表明, 近江牡蛎在 25—28 °C 时受精卵发育同步性较高。在 28 °C 条件下, CB 适宜处理剂量为 0.6 mg/L。在个别受精卵出现第一极体时实施处理, 至对照组的第二极体出现率达到 50% 终止处理, 四倍体的诱导效果较好。5 个处理组 D 形幼虫的平均孵化率为 11.0%, 显著低于对照组 72.4% 的平均孵化率。在受精后 4—12d 期间处理组幼虫的存活率显著低于对照组。处理组胚胎和 D 形幼虫阶段四倍体的平均比例分别为 41.8% 和 37.9%。四倍体的比例随着幼虫的生长发育呈下降趋势, 至受精后 12d 在各处理组已检测不到四倍体。2 组幼虫完成附着变态, 从受精卵至稚贝的累计存活率平均为 0.3%。本研究结果表明, 使用 CB 处理抑制受精卵第一极体的释放可以有效诱导近江牡蛎四倍体, 但所获得的四倍体幼虫存活力差, 需要在未来的研究中解决。

关键词 近江牡蛎, 细胞松弛素 B, 第一极体, 四倍体, 三倍体, 非整倍体

中图分类号 S917.4

海水贝类多倍体研究揭示出人工三倍体贝类一系列特殊的生物学特征, 具有重要的应用价值。例如牡蛎三倍体的肉质和风味在繁殖季节优于二倍体, 且能保持周年的生长(Allen *et al.*, 1986), 因此, 三倍体对改善和丰富现有的牡蛎产品结构、实现周年供应优质的牡蛎水产品具有独特的作用。近江牡蛎是我国南方主要经济贝类, 在广东、广西大规模养殖, 以营养价值高、肉味鲜美著称, 是我国传统的出口海产品, 在两广地区、香港和东南亚地区具有广大的市场。每年夏季近江牡蛎由于性腺发育和配子排放, 肉质显著下降, 市场上近江牡蛎产品供应出现断档, 生产三倍体有望较好地解决这一问题。

三倍体贝类的人工诱导方法已得到充分的研究, 在美国等国已经利用诱导方法实现了长牡蛎

(*Crassostrea gigas*) 三倍体的商业生产(Chew, 1994)。我国在长牡蛎等经济贝类的三倍体规模诱导培育取得了突破性进展(王如才等, 2002)。但是人工诱导方法对胚胎和幼虫造成的伤害不可避免, 导致孵化率和幼虫存活率下降, 同时三倍体的不育性决定了三倍体的种苗制备需要逐年重复进行, 造成三倍体的生产成本显著高于普通二倍体, 这些缺点不利于三倍体贝类的产业化。

利用四倍体与二倍体杂交培育倍化率达 100% 的全三倍体在长牡蛎率先取得的突破为三倍体贝类的生产提供了崭新的技术(Guo *et al.*, 1996; 阚华勇等, 2003)。该项三倍体生产技术具有操作简便、可控性强等优点, 避免了复杂的人工处理过程, 适合我国海水贝类养殖业。因此, 贝类四倍体技术的研发已成为近些年我国贝类多倍体

* 国家杰出青年科学基金资助项目, 39825121 号; 国家自然科学基金项目, 30100141 号和 30471326 号; 国家 863 项目, 2001AA628060 号。阚华勇, 博士, 研究员, E-mail: hque@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2005-01-13, 收修改稿日期: 2005-06-17

研究的焦点之一。

已报道的从二倍体诱导四倍体的方法包括:抑制受精卵第一极体的释放或同时抑制第一极体和第二极体的排放(Scarpa *et al.*, 1993),抑制第一次卵裂法,细胞融合法(Guo *et al.*, 1994a),以及利用由三倍体产生的卵子与来自二倍体的精子受精,抑制第一极体释放的方法(Guo *et al.*, 1994b)。利用最后一种方法成功获得可存活的长牡蛎四倍体。采用其他方法进行的研究大多仅获得四倍体胚胎,但通过抑制第一极体排放,获得了少量四倍体稚贝(Yang *et al.*, 2000a)。

迄今国内外仅见采用冷热休克和传统中药处理抑制卵裂的方法诱导近江牡蛎四倍体胚胎的报道(容寿柏等, 1992; Rong *et al.*, 1994)。本文中作者报道了利用细胞松弛素 B(CB) 抑制受精卵第一极体释放诱导近江牡蛎四倍体的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料来源

近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*), 取自广东省阳江海区, 当地称为“白肉”蚝, 3—4 龄, 壳长 10—15cm, 在室内培育促熟。解剖法获取精子和卵子, 人工授精, 加入精液的时刻作为受精零时。

1.2 四倍体的诱导处理

在受精后 7—8min, 将受精卵按 4:1 分成 2 部分, 前者为用于四倍体诱导的处理组, 后者作为二倍体对照。处理组在 10—18min 加入溶解在二甲亚砜(DMSO)的细胞松弛素 B(CB, Sigma), 母液浓度为 500mg/L, 处理终浓度为 0.4—0.8mg/L, 处理持续时间 10—30min。处理期间, 每隔 3min 取样一次, 观察对照组受精卵发育状况。用 30 μ m 网孔的筛绢过滤冲洗受精卵, 去除 CB, 将受精卵重新悬浮在 0.05% DMSO 砂滤海水中, 20min 后把受精卵倒入 90—150L 的水体中孵化, 孵化密度 30ind/ml。受精和孵化的温度为 28 $^{\circ}$ C, 盐度为 20。

1.3 幼虫的培育

至受精后 48h, 采用 40 μ m 网孔的筛绢滤出幼虫, 转移至新鲜的砂滤海水中培育, 之后每 2d 换水 1 次, 同时观察测量幼虫的生长和存活。投喂等鞭金藻 *Isochrysis galbana* Parke, 投喂量(2—6) \times 10⁴ (ml \cdot d), 后期幼虫添加适量扁藻 *Platymonas* sp.。幼虫培育的温度为 28 $^{\circ}$ C, 盐度为 20, 培育密度从早期幼虫的 10ind/ml 逐步降低至后期的 3ind/ml。

孵化率是 D 形幼虫总数与受精卵的百分比, 幼虫存活率是各期存活的幼虫数与 D 形幼虫总数的百分比。

1.4 四倍体的倍性鉴定

采用乙酸地衣红压片法观察统计 4—8 细胞胚胎的染色体, 二倍体有 20 条染色体, 三倍体和四倍体的染色体数目分别是 30 \pm 2 和 40 \pm 3 条, 偏离整倍体数目的分裂相为非整倍体。

采用流式细胞术鉴定幼虫和稚贝的倍性组成。过滤收集 10—15 万的各期幼虫样品, 采用涡旋振荡法制备成单细胞悬液, 加入 10mg/L DAPI (Sigma), 利用流式细胞仪(PARTEC CCA) 检测样品的 DNA 含量。以相同发育时期的二倍体对照样本或二倍体产生的精子标定二倍体细胞的 DNA 含量, 确定三倍体和四倍体的 DNA 理论含量。以理论值 \pm 10 的细胞群体作为多倍体, 偏离该范围的为非整倍体, 利用流式细胞仪的分析软件测算样品的倍性组成。

1.5 数据分析

利用 SYSTAT 10 统计软件对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 四倍体诱导效果的影响因子

来自不同亲贝的受精卵发育速度存在较大差异, 定时取样观察表明, 近江牡蛎在 26—28 $^{\circ}$ C 时受精卵发育同步性较高(变异系数 $CV < 15\%$), 在此范围内, 发育速度个体间的差异随着温度的升高而降低(表 1)。

表 1 不同温度下近江牡蛎受精卵第一极体出现率达到 50% 的发育时间

Tab. 1 Timing of 50% of eggs exhibiting polar body I extrusion in eggs from *C. rivularis* under different temperature

温度($^{\circ}$ C)	平均时间(min)	CV(%)
25	47	15.7
26	43	13.5
27	39	11.8
28	35	10.2
29	30	15.3

注: 利用显微镜观察随机选取的 50 粒受精卵, CV 为变异系数(coefficient of variation)

在 28 $^{\circ}$ C 条件下使用来自同一对亲贝的受精

卵进行的 CB 浓度梯度实验表明, 处理受精卵的 CB 浓度对 D 形面盘幼虫的四倍体率和孵化率影响较大。0.4—0.8mg/L CB 均可诱导比例不等的四倍体, 随着 CB 浓度的增加, D 形幼虫的四倍体率升高但孵化率明显下降(表 2), 近江牡蛎四倍体诱导的适宜剂量为 0.6mg/L。

表 2 28℃条件下 CB 处理浓度对近江牡蛎 D 形面盘幼虫四倍体率和孵化率的影响

Tab. 2 Effect of CB dosage on percentage of tetraploids and yield of D-stage larvae of *C. rivularis* at 28℃

CB 浓度(mg/L)	D 形面盘幼虫(48h PF)	
	4n%	孵化率(%)
0.4	20.3	36.7
0.5	32.2	25.5
0.6	43.8	13.7
0.7	47.0	8.2
0.8	51.4	4.4

表 3 28℃条件下采用 0.6mg/L CB 抑制近江牡蛎第一极体的四倍体诱导效果

Tab. 3 Tetraploid induction efficiency using 0.6mg/L CB to block the release of the first polar body in eggs from *C. rivularis* at 28℃

组 别	起始时间 (minPF)	持续时间 (min)	受精率(%)	孵化率(%)	胚胎倍性组成(%)			
					2n	3n	4n	An
4NCr-1	18	15	53.0	4.4	19	31	40	10
4NCr-2	11	22	91.9	2.9	11	17	48	24
4NCr-3	17	20	83.0	25.0	8	24	37	31
4NCr-4	16	25	77.6	14.7	13	15	44	28
4NCr-5	10	25	98.0	8.2	12	10	40	38
平均值			80.7	11.0	12.6	19.4	41.8	26.2

PF: 受精后; 2n: 二倍体; 3n: 三倍体; 4n: 四倍体; An: 非整倍体。下同

2.3 幼虫的存活和倍性组成

处理组幼虫存活率在受精后 8、10d 下降明显, 以受精后 2d 孵化的 D 形幼虫为基数, 幼虫的相对存活率从受精后 6d 的 62.1% 锐减至 45.0% 和 31.9%, 同期的对照组幼虫相对存活率降低幅度也较大。在受精后 4、6、8、10、12d 期间处理组的存活率显著低于对照组 ($P < 0.05$) (表 4)。

随着幼虫的生长发育, 四倍体的比例呈下降趋势, 至受精后 12d 在各处理组已检测不到四倍体。三倍体幼虫的比例在受精后 12d 内相对稳

2.2 四倍体诱导方法及其效果

在 28℃条件下, 采用 0.6mg/L CB 抑制受精卵第一极体的排放诱导四倍体, 在观察到个别受精卵出现第一极体时开始处理, 持续至对照组出现第一极体的受精卵达到 50% 终止处理。共进行了 5 组诱导实验, 处理开始的时间介于受精后 10—18min, 处理终止的时间为受精后 30—40min, 处理持续时间 12—30min。各组的受精卵取自不同的亲贝个体。

5 个处理组均获得四倍体胚胎, 比例为 37%—48%, 平均达到 41.8%。在处理组中还检测到二倍体、三倍体和非整倍体胚胎, 平均比例分别为 12.6%、19.4%、26.2% (表 3, 图 1)。处理组 D 形幼虫的平均孵化率是 11.0%, 显著低于对照组幼虫的平均孵化率 72.4% ($P < 0.01$)。

D 形幼虫期的倍性组成与胚胎期的比例相似, 二倍体、三倍体、四倍体和非整倍体的平均比例分别为 21.3%、18.2%、37.9%、22.5% (图 2)。

定。非整倍体约在受精后 1 周消失。5 个处理组幼虫的平均倍性组成的变化见表 5。

2.4 稚贝的收获及其倍性组成

处理组幼虫发育至眼点幼虫的时间为 24—26d, 比对照组晚 4—6d。5 个处理组中 2 组的幼虫存活并完成变态, 发育至稚贝, 从受精卵至稚贝的累计存活率平均为 0.3%, 相应的 2 个对照组平均为 17%, 二者差异显著 ($P < 0.01$)。从上述 2 个处理组各随机抽取 50 粒稚贝进行倍性检测, 表明稚贝仅包含二倍体和三倍体, 其平均比例分别为 91% 和 9%。

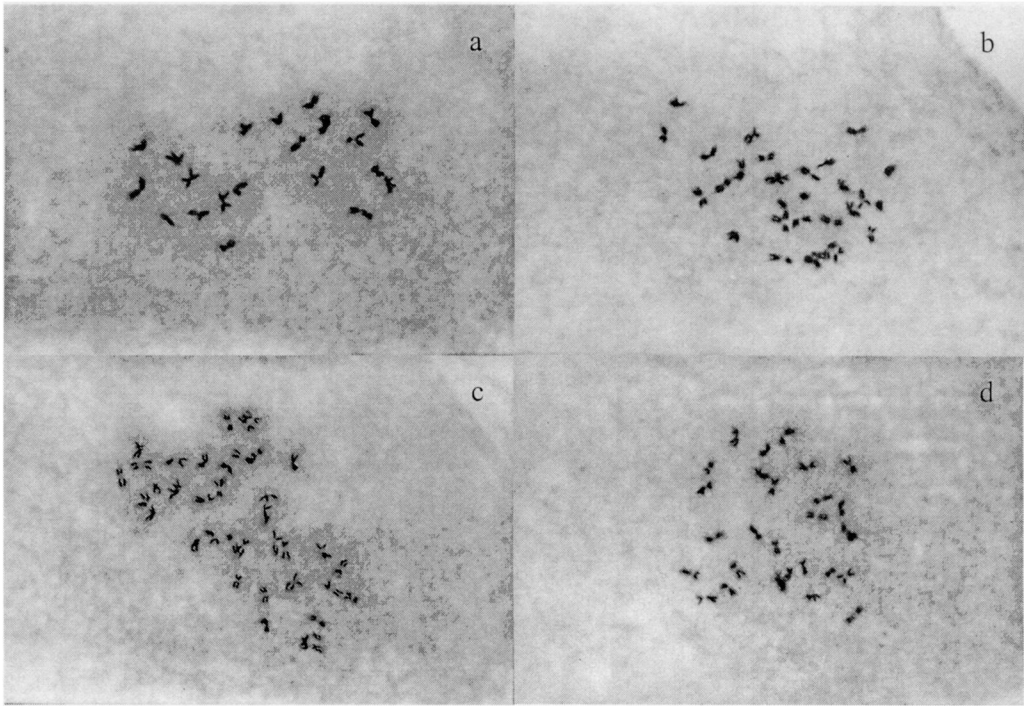


图1 近江牡蛎二倍体(a)、三倍体(b)、四倍体(c)和非整倍体(d)胚胎中期分裂相

Fig. 1 Example metaphase of diploid (a), triploid (b), tetraploid (c) and aneuploid (d) embryos of *C. rivularis*

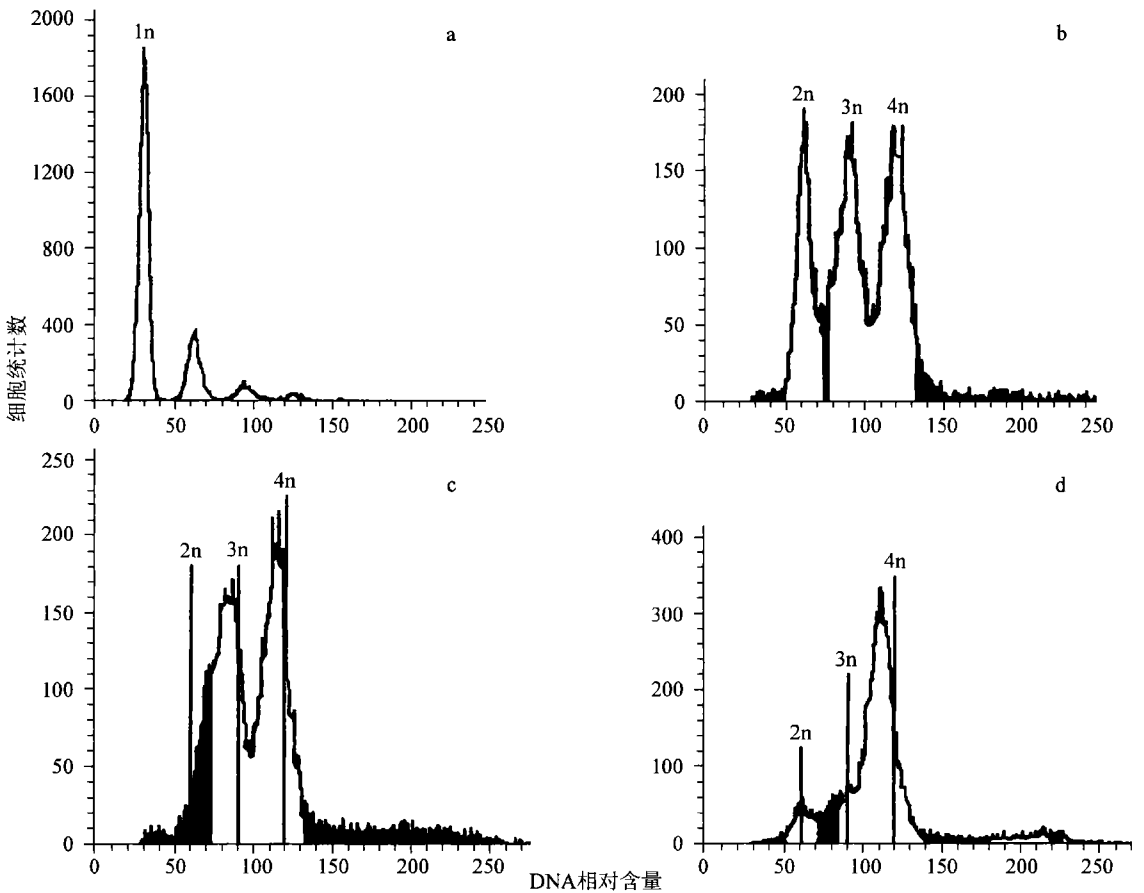


图2 利用流式细胞术获得的D形面盘幼虫倍性检测结果

Fig. 2 Ploidy composition of *C. rivularis* larval samples determined by flow cytometry

表 4 受精后近江牡蛎幼虫的相对存活率(以 D 形幼虫数为基数)

Tab. 4 Survival of larvae relative to the amount of D-stage larvae in *C. rivularis* during the period of post-fertilization

组别	相对存活率(%)				
	4d	6d	8d	10d	12d
4nCr-1	68.4	59.2	41.7	37.6	33.5
2nCr-1	79.8	74.6	64.7	57.6	55.4
4nCr-2	57.6	50.0	37.5	21.3	16.8
2nCr-2	80.2	69.7	63.8	54.6	50.7
4nCr-3	87.5	76.7	46.6	35.4	27.6
2nCr-3	96.4	88.9	70.2	62.8	53.3
4nCr-4	69.3	58.4	48.3	36.1	32.2
2nCr-4	87.4	82.4	73.7	63.5	55.1
4nCr-5	70.3	66.1	51.1	29.2	21.9
2nCr-5	94.7	89.2	71.8	64.7	59.4
4nCr 平均值	70.6	62.1	45.0	31.9	26.4
2nCr 平均值	87.7	81.0	68.8	60.6	54.8

表 5 近江牡蛎 5 个处理组幼虫的平均倍性组成随发育天数的变化

Tab. 5 Variation of ploidy composition of induced larvae over the time during larval development from 5 replicates

发育天数(d)	幼虫倍性组成(平均值±SD, %)			
	2n	3n	4n	An
4	30.7±3.2	21.3±2.4	32.0±2.8	16.0±8.5
6	46.1±6.3	23.3±2.7	21.5±4.5	9.2±4.5
8	65.9±4.2	20.8±1.8	13.4±2.3	0
10	77.6±7.9	17.3±5.7	5.1±2.3	0
12	84.4±1.4	15.6±1.4	0	0

3 讨论

3.1 CB 抑制第一极体排放诱导四倍体的影响因素

近江牡蛎受精卵的成熟分裂速度个体间的差异较大(变异系数高于 10%), 温度偏低或偏高均导致卵子发育速度的差距加大, 而在适宜的温度范围内, 温度升高可以提高卵子发育的同步性。为了进一步降低卵子发育不同步性对四倍体诱导效果造成的负面影响, 本研究药物处理的时机在参照发育时间的基础上, 主要根据对照组受精卵的实际发育速度来确定处理时机, 在对照组第一极体出现比例达到 50% 时终止处理, 抑制第一极

体排放取得较好效果, 并保证第二极体的正常释放。长牡蛎的四倍体技术优化研究表明, 采用在对照组第一极体出现比例达到 50% 时终止 CB 处理, 四倍体诱导比例高且稳定 (Eudeline *et al.*, 2000), 与本研究的结果一致。但在通过抑制第一极体排放诱导栉孔扇贝四倍体的研究中, 采用的标准是对照组排出第一极体的受精卵的比例达到 60%—70% 时终止 CB 处理 (阙华勇等, 2004)。这种差异主要是扇贝和牡蛎受精卵发育上的不同特点导致的。

CB 的处理剂量是影响四倍体诱导率和幼虫孵化率的主要因素。本研究结果表明, 四倍体诱

导率和幼虫孵化率存在负相关性,在栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 等贝类多倍体研究中也发现类似的现象(杨爱国等, 1999; 阙华勇等, 2004)。本研究中作者采用的四倍体诱导方案是在平衡诱导率和孵化率指标的基础上, 确定 CB 的最佳处理剂量为 0.6mg/L。

3.2 四倍体诱导方法及其诱导效果

已报道的从二倍体诱导四倍体的方法包括: 抑制受精卵第一极体的释放或同时抑制第一极体和第二极体的排放(Scarpa *et al.*, 1993); 抑制第一次卵裂以及细胞融合法等(Guo *et al.*, 1994a)。本研究结果表明, 通过施加 CB 处理抑制受精卵第一极体的排放, 可以有效诱导近江牡蛎四倍体胚胎和幼虫。有报道采用冷热休克以及药物(氯丙嗪)处理抑制第一次卵裂诱导出近江牡蛎四倍体的胚胎, 四倍体比例为 28%—30% (Rong *et al.*, 1994), 该报道未提供四倍体幼虫的孵化、存活和生长资料。通过抑制卵裂获得的长牡蛎四倍体胚胎, 幼虫孵化率很低, 不易获得幼虫(Guo *et al.*, 1994a)。

利用由三倍体产生的卵子与来自二倍体的精子受精, 抑制第一极体释放的方法成功诱导获得可存活的长牡蛎四倍体并已获得四倍体群体(Guo *et al.*, 1994b), 但利用该方法诱导马氏珠母贝 (*Pinctada fucata martensii*) 四倍体却未能取得理想效果(何毛贤等, 2000; 王爱民等, 2003)。未来的研究应尝试利用三倍体诱导四倍体近江牡蛎。

近江牡蛎受精卵第一极体排放受到抑制形成的胚胎包括二倍体、三倍体、四倍体和非整倍体, 在长牡蛎、栉孔扇贝类似的研究中也发现这种现象。研究表明, CB 处理抑制长牡蛎、栉孔扇贝受精卵第一极体的排放导致受精卵染色体分离行为发生显著改变, 出现三极分离、联合二极分离、独立二极分离(四极分离)、非同步分离等一系列复杂的染色体行为, 显著改变了胚胎的倍性组成(Guo *et al.*, 1992; Que *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000b)。从本研究结果可以推测, 近江牡蛎受精卵第一极体受抑制后, 可能发生类似的染色体分离行为, 但有待于研究证实。

利用流式细胞术检测幼虫和稚贝的倍性具有快速、简便、准确等显著特点, 但倍性组成的复杂化对所采用的流式细胞仪的检测灵敏度提出了较高的要求。本研究使用的 Partec CCA 流式细胞仪对分析不同倍性幼虫的比例显现一定的局限性,

尽管采用相关分析软件进行了校正, 估计仍无法将非整倍体与整倍体彻底区分开。结合采用染色体计数的方法可以较好弥补上述缺点。

3.3 四倍体的存活力

本研究中作者发现, 处理组面盘幼虫的死亡率较高, 伴随着四倍体比例的大幅下降, 表明通过抑制第一极体诱导获得的四倍体幼虫存活力低下, 导致在后期幼虫和稚贝中无法检测到四倍体。采用抑制二倍体受精卵第一极体的方法在其他贝类中有报道获得了少量四倍体稚贝, 包括 2% 的栉孔扇贝四倍体稚贝(Yang *et al.*, 2000a)、马氏珠母贝培育至 7 个月时检测到 0.0625% 的四倍体稚贝(王爱民等, 2003)、以及少量大西洋浪蛤 (*Mulinia lateralis*) 的四倍体稚贝(Peruzzi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004)。由于四倍体稚贝数量少, 上述研究均未能获得四倍体成贝。上述几项研究结果表明采用抑制二倍体受精卵第一极体的方法可以获得四倍体, 但该方法获得的四倍体幼虫存活力低, 估计与核质比失调等内在的发育生长机制有关。利用分子生物学和现代发育生物学技术, 研究四倍体幼虫发育机制, 建立提高四倍体幼虫存活力的有效方法, 具有重要的意义。

利用长牡蛎三倍体的卵子诱导四倍体的研究发现, 在早期幼虫阶段非整倍体发生大量死亡, 至受精后 8d 的幼虫基本上由二倍体和四倍体组成, 并成功获得了可存活的四倍体, 表明来自三倍体的卵子对倍性的增加具有更好的适应性。未来研究应该尝试利用三倍体近江牡蛎的卵子进行四倍体诱导, 探索可存活四倍体诱导的新方法。

参 考 文 献

- 王如才, 王昭萍, 田传远等, 2002. 我国太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 三倍体育苗与养殖技术研究进展. 青岛海洋大学学报, 32(2): 193—200 [Wang R, Wang Z, Tian C, 2002. Progress on triploid seed production and cultivation technology of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. Journal of Ocean University of Qingdao, 32(2): 193—200]
- 王爱民, 阎冰, 兰国宝等, 2003. 三种诱导马氏珠母贝四倍体方法的比较. 农业生物技术学报, 11(1): 64—69 [Wang A, Yan B, Lan B *et al.*, 2003. Comparative of three methods for the induction of tetraploidy pearl oyster (*Pinctada martensii* D.). J Agri Biotech, 11(1): 64—69]
- 何毛贤, 沈琪, 林岳光等, 2000. 合浦珠母贝三倍体的

- 卵诱导四倍体. 水产学报, 24(1): 22—27 [He M, Shen Q, Lin Y *et al*, 2000. Inducement of tetraploid *Pinctada martensi* in eggs from triploid. Journal of Fisheries of China, 24(1): 22—27]
- 杨爱国, 王清印, 孔杰等, 1999. 6-二甲氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体. 水产学报, 23(3): 241—247 [Yang A, Wang Q, Kong J *et al*, 1999. Triploid induction in *Chlamys farrei* by application of 6-dimethylaminopurine. Journal of Fisheries of China, 23(3): 241—247]
- 容寿柏, 李一民, 刘绍琼等, 1992. 用冷热休克诱导四倍体近江牡蛎. 湛江水产学院学报, 12(2): 18—21 [Rong S, Li Y, Liu S *et al*, 1992. Tetraploidy induced by cold and heat shock in *Ostrea rivularis*. Journal of Zhanjiang Fisheries College, 12(2): 18—21]
- 阙华勇, 张国范, 刘晓等, 2003. 雄性四倍体与雌性二倍体杂交培育全三倍体长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的研究. 海洋与湖沼, 34(6): 656—662 [Que H, Zhang G, Liu X *et al*, 2003. All-triploid production by crossing tetraploids with diploids in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. Oceanologia et Limnologia Sinica, 34(6): 656—662]
- 阙华勇, 张国范, 张丽瑛等, 2004. 栉孔扇贝四倍体幼虫的诱导研究. 高技术通讯, 14(12): 103—105 [Que H, Zhang G, Zhang L *et al*, 2004. Production of tetraploid larvae of zhikong scallop, *Chlamys farrei* (Jones & Preston). High Technology Letters, 14(12): 103—105]
- Allen S K Jr, Downing S L, 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. J Exp Mar Biol Ecol, 102(2/3): 197—208
- Chew K K, 1994. Tetraploid Pacific oysters offer promise to future production of triploids. Aquaculture Magazine, 20(6): 69—74
- Eudeline B, Allen S K Jr, Guo X, 2000. Optimization of tetraploid induction in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. Aquaculture, 187: 73—84
- Guo X, Hershberger W K, Cooper K *et al*, 1992. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: II. Segregation of chromosomes. Biol Bull, 183: 387—393
- Guo X, Hershberger W K, Cooper K *et al*, 1994a. Tetraploid induction with mitosis I inhibition and cell fusion in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). J Shellfish Res, 13(1): 193—198
- Guo X, Allen S K Jr, 1994b. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. Mol Mar Biol Biotechnol, 3(1): 42—50
- Guo X, DeBrosse G A, Allen S K Jr, 1996. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. Aquaculture, 142: 149—161
- Peruzzi S, Guo X, 2002. Tetraploid induction by meiosis inhibition with cytochalasin B in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis* Say: effects of temperature. J Shellfish Res, 21(2): 677—684
- Que H, Guo X, Zhang F *et al*, 1997. Chromosome segregation in fertilized eggs from triploid oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), following inhibition of polar body I. Biol Bull, 193: 14—19
- Rong S, Shi S, Mo Q *et al*, 1994. Tetraploid induced by physical and chemical methods in Jinjiang oyster (*Crassostrea rivularis*). Acta Oceanologica Sinica, 12(2): 275—283
- Scarpa J, Wada K T, Komaru A, 1993. Induction of tetraploidy in mussels by suppression of polar body formation. Nippon Suisan Gakkaishi, 59(12): 2017—2023
- Yang H, Zhang F, Guo X, 2000a. Triploid and tetraploid zhikong scallop, *Chlamys farrei* Jones et Preston, produced by inhibiting polar body I. Mar Biotechnol, 2: 466—475
- Yang H, Que H, He Y *et al*, 2000b. Chromosome segregation in fertilized eggs from zhikong scallop (*Chlamys farrei*) following polar body I inhibiting with cytochalasin B. J Shellfish Res, 19(1): 101—105
- Yang H, Guo X, 2004. Tetraploid induction by meiosis inhibition in the dwarf surfclam *Mulinia lateralis*: effects of cytochalasin B duration. Aquaculture Res, 35: 1187—1194

TETRAPLOIDS INDUCED BY INHIBITING POLAR BODY I WITH CYTOCHALASIN B IN JINJIANG OYSTER, *CRASSOSTREA RIVULARIS*

QUE Hua-Yong, GUO Xi-Ming^{*}, ZHANG Guo-Fan, ZHANG Fu-Sui

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

(*Haskin Shellfish Research Laboratory, Institute of Marine and Coastal Sciences, Rutgers University, Port Norris,
NJ 08349, USA*)

Abstract Tetraploids in Jinjiang oyster, *Crassostrea rivularis*, were induced by inhibiting the first polar body (PB1) with cytochalasin B (CB). Increasing temperature from 25 °C to 28 °C led to an increase in the synchrony of zygote development. The optimal dosage of CB for tetraploid induction was 0.6 mg/L at 28 °C. The following timing of CB treatment was effective for tetraploid production: starting when the first signs of PB1 extrusion were observed and ending as 50% of fertilized eggs in control group expelled PB1. On average, the yield of D-stage larvae in treatment groups was 11.0%, which was significantly lower than that of controls (72.4%) ($P < 0.01$). Most mortality occurred to the induced larvae during the first 8—10 days post fertilization (PF). Compared to controls, average larval survival of treatment groups was significantly lowered during the period of 4—12 days PF in all five replicates ($P < 0.05$). Tetraploids were obtained in both embryos and D-stage larvae from five replicates. The proportion of tetraploids varied from 37% to 48%, averaging 41.8% in embryos, as confirmed by chromosome counting. Diploids, triploids and aneuploids were observed in CB-treatment groups. Flow cytometric analysis of D-stage larvae of treatment groups revealed ploidy compositions similar to that of embryos. The average percentage of diploids, triploids, tetraploids and aneuploids was 21.3%, 18.2%, 37.9% and 22.5%, respectively, in D-stage larvae. The percentage of tetraploids decreased over the time of larval development. Tetraploids were undetectable at Day 12 PF. Two of five replicates of CB-treatment groups survived beyond settlement and metamorphosis. The average cumulative survival from fertilized eggs to spat was 0.3% for CB-treated groups. Tetraploids were not found in spat, indicating the weak survival of tetraploid larvae. Overall, tetraploids can be effectively induced by blocking PB1 with CB treatment. However, how to enhance the survival of tetraploid larvae remains a challenge for future research.

Key words *Crassostrea rivularis*, Cytochalasin B, Polar body I, Tetraploids, Triploids, Aneuploids