

6-DMAP 诱导黄河口近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)三倍体的研究*

李海昆 刘 洋 李春华 王永旺 于瑞海

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 用 6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)进行了黄河口近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)的三倍体诱导,以卵裂率、孵化率、诱导三倍体率和三倍体诱导组幼虫的生长率、存活率、三倍体率为指标,研究了诱导浓度、起始诱导时间、诱导持续时间三个因素对黄河口近江牡蛎三倍体的诱导效果。结果表明,三因素对近江牡蛎三倍体诱导效果的影响程度为起始诱导时间>诱导持续时间>诱导浓度。温度 25°C,诱导浓度为 300—450 $\mu\text{mol/L}$,起始诱导时间为受精后 14min,诱导持续时间为 15min 时,诱导三倍体率可达 51.39%—71.67%,卵裂率、孵化率、幼虫壳高日平均生长率和幼虫平均存活率分别能达到 65.16%—81.57%、61.25%—86.78%、8.76—9.88 $\mu\text{m/d}$ 、69.16%—73.29%,眼点幼虫时期三倍体率达 53.33%—62.16%。本研究为黄河口近江牡蛎的三倍体诱导提供了理论依据。

关键词 近江牡蛎; 6-DMAP; 诱导; 三倍体

中图分类号 S966.9 doi: 10.11693/hyhz20191200259

自 1981 年首次报道用细胞松弛素 B(CB)成功诱导美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的三倍体以来,牡蛎的多倍体育种就成为了牡蛎育种的重要研究方向(Stanley *et al.*, 1981)。三倍体牡蛎育性差,在繁殖季节不会因繁殖活动导致软体部消瘦,因而可以全年保持较好的品质(Allen *et al.*, 1986a; Nell, 2002);三倍体牡蛎在最适的生存条件下要比二倍体牡蛎生长快,且在繁殖季节死亡率低(Piferrer *et al.*, 2009; Dégremont *et al.*, 2012; Peachey *et al.*, 2016);此外,三倍体的不育性还可避免基因污染,具有一定的生态优势(Piferrer *et al.*, 2009; Peachey *et al.*, 2016)。这些有益的生态价值和经济价值,使三倍体牡蛎深受国内外养殖者的欢迎,其养殖产量在世界牡蛎养殖产量的占比不断提高(Peachey *et al.*, 2016)。目前获得三倍体牡蛎的方法有两种,一种是通过物理方法(Allen *et al.*, 1986b)或者化学方法(Downing *et al.*, 1987; Gérard *et al.*, 1999)诱导获得,另一种是用四倍体和二倍体杂交获得

100%的全三倍体(Guo *et al.*, 1994, 1996)。获得全三倍体牡蛎的关键是四倍体的获得,而四倍体诱导离不开三倍体牡蛎(Guo *et al.*, 1994),因此三倍体牡蛎的高效诱导是牡蛎多倍体育种的前提。目前,国内学者已经利用不同方法对我国常见的几种巨牡蛎属牡蛎开展了三倍体的研究,包括长牡蛎(*C. gigas*)(于瑞海等, 2000; 王康, 2014)、近江牡蛎(王康, 2014)、香港牡蛎(*C. hongkongensis*)(秦艳平等, 2017)、熊本牡蛎(*C. sikamea*)(武祥伟等, 2019)。

近江牡蛎主要分布于太平洋西海岸的河口区,由于其具有生长快、抗病性强的特点,曾被美国考虑作为一个新的养殖对象引进(Calvo *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2008)。近江牡蛎在我国的南北方均有分布,是我国自然分布的几种比较重要的巨牡蛎属牡蛎之一(张跃环等, 2014)。目前国内关于近江牡蛎的育种研究主要集中于杂交育种上,关于近江牡蛎的多倍体育种的研究较少。

* 山东省重点研发项目, 2017GHY15124 号; 海水养殖教育部重点实验室(中国海洋大学)开放基金资助项目, KLM2017004 号。
李海昆, 硕士研究生, E-mail: 1157474258@qq.com

通信作者: 于瑞海, 硕士生导师, 教授级高级工程师, E-mail: yuruihai@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019-12-14, 收修改稿日期: 2020-03-10

三倍体近江牡蛎具有生长快、存活率高、抗病性强的特点(Calvo *et al*, 2001), 开展近江牡蛎的三倍体的诱导研究对开展近江牡蛎的三倍体育种, 进一步提高我国养殖牡蛎的质量具有重要意义。早在 2008 年, 杨春玲等(2008)就已经进行了 6-DMAP 诱导近江牡蛎三倍体的研究, 但是当时的“近江牡蛎(*C. rivularis*)”还没有与香港牡蛎完全区分开, 实验中所用的近江牡蛎可能混有香港牡蛎(Lam *et al*, 2003; Wang *et al*, 2004; 王海艳等, 2007), 且研究评估 6-DMAP 诱导效果的指标单一, 研究内容不够完善。本实验中, 近江牡蛎取自东营市黄河三角洲地区河口区域, 具有个体较大、壳厚重的特点(Xiao *et al*, 2010), 为真正意义上的北方近江牡蛎; 使用的诱导药物为 Desrosiers 等(1993)提出的毒害作用较小的 6-DMAP。本次研究从诱导浓度、起始诱导时间、诱导持续时间三个水平探究 6-DMAP 对近江牡蛎的诱导效果, 并结合卵裂率、孵化率、三倍体率和诱导后诱导组幼虫的生长率、存活率、三倍体率变化情况 6 个评估指标, 建立了 6-DMAP 诱导近江牡蛎三倍体的方法, 为黄河口近江牡蛎的多倍体育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 亲贝暂养

近江牡蛎亲贝采自东营市黄河三角洲, 4—5 龄, 挑选无损伤、左壳凹凸明显的个体作为实验亲贝。2019 年 5 月 1 日运至莱州市长渔水产有限公司育苗车间进行暂养, 暂养期间投喂新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)和亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*), 每天移池换水一次。5 月底性腺同步成熟进行实验。

1.2 解剖获取精卵、受精

解剖亲贝后, 用牙签挑破性腺, 蘸取性腺滴于载玻片的水滴上, 若呈烟雾状为雄性个体, 若呈颗粒状则为雌性个体。在显微镜下观察每个个体的卵子质量以及精子活力。选择卵子梨形或卵圆形、卵颜色较深的个体作为母本, 卵液先用 200 目的筛绢过滤较大的杂质, 然后用 500 目的筛绢洗卵 3 次, 最后将洗好的卵置于过滤海水(温度 25°C, 盐度 29)中促熟 30min; 选择精子活力较强的个体作为父本, 精液用 200 目的筛绢过滤。受精前检查卵子是否污染, 受精时保证每个卵子周围 6—10 个精子。

1.3 6-DMAP 的诱导处理

所有的诱导实验均在 3L 的塑料桶中进行, 诱导密度为 3.0×10^7 个/mL, 温度均为 25°C; 参考

Desrosiers 等(1993)、Gérard 等(1999)、秦艳平等(2017)对 6-DMAP 的使用, 设计诱导浓度、诱导时机、诱导持续时间 3 个因素, 每个因素设计 4 个水平, 每组实验均重复 3 次。

1.3.1 诱导浓度实验 受精后将受精卵平均分成 4 份, 受精后 18min 将四份受精卵分别在 150、300、450 和 600 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-DMAP 中诱导处理 15min。

1.3.2 诱导时机实验 受精后将受精卵平均分成 4 份, 分别在受精后 10、14、18 和 22min 用浓度实验中获得最佳诱导浓度进行诱导, 诱导持续 15min。

1.3.3 诱导持续时间实验 受精后将受精卵平均分成 4 份, 采用诱导浓度实验、诱导时机实验中获得最佳诱导条件进行诱导, 分别持续诱导 10、15、20 和 25min。

诱导结束后用 500 目筛绢洗受精卵 3 次, 之后将受精卵转移至 60L 的塑料桶中进行孵化, 孵化过程中连续充气, 并每间隔 2h 搅动一次小桶, 避免受精卵下沉。受精 2h 后取样测量各组的卵裂率。24h 后测量各组的孵化率, 并将孵化获得的一部分 D 形幼虫制成细胞悬液固定于 75%的酒精中, 用流式细胞仪(Beckman CoulterCytoFLEX, 美国)检测倍率。

1.4 幼虫培育

将不同诱导浓度、不同起始诱导时间、不同诱导持续时间获得的 D 形幼虫继续培养。幼虫培育期间, 投喂球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*), 每天投喂 6 次, 日投饵量 6000—8000cells/mL; 水温 25—27°C, 每天换水两次, 每次换水 50%。每隔 4 天随机取 30 个幼虫测量壳高, 同时测每组的存活率, 连续观察至第 25 天; 在 50%壳顶期幼虫和 50%眼点幼虫两个时期, 收集幼虫制成细胞悬液固定于 75%酒精中, 用于倍率检测。

1.5 数据处理

用 SPSS18.0 进行数据处理, 进行单因素方差分析比较不同处理的诱导效果, 并进行 Duncan 多重比较分析不同处理下卵裂率、孵化率、三倍体率、幼虫的壳高和存活率指标的差异, 显著水平设为 0.05。

2 结果

2.1 6-DMAP 对近江牡蛎三倍体的诱导效果

2.1.1 诱导浓度 随诱导浓度的增加受精卵的卵裂率逐渐降低; 诱导浓度 150、300 和 450 $\mu\text{mol/L}$ 组的孵化率无显著性差异($P>0.05$), 诱导浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时的孵化率显著小于诱导浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 和 300 $\mu\text{mol/L}$ 时的孵化率($P<0.05$); 诱导浓度为 300、

450 和 600 $\mu\text{mol/L}$ 时的三倍体率无显著性差异 ($P>0.05$), 但均显著高于诱导浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 时的三倍体率 ($P<0.05$); 诱导浓度为 450 $\mu\text{mol/L}$ 时诱导获得三倍体率最高达 60.67% \pm 5.63%(图 1)。

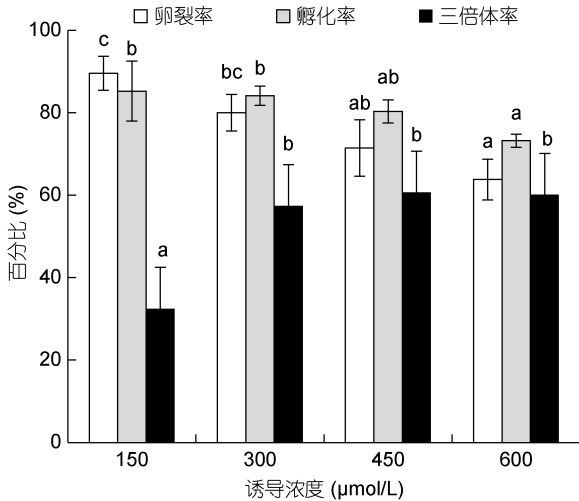


图 1 不同的诱导浓度下卵裂率、孵化率和三倍体率

Fig.2 Cleavage rate, hatching rate, and triploid rate in different induction concentrations

注: 上标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同

2.1.2 起始诱导时间 起始诱导时间对卵裂率影响较小, 起始诱导时间 14、18 和 22min 时的卵裂率无显著性差异 ($P>0.05$), 但均显著低于起始诱导时间 10min 时的卵裂率; 不同的起始诱导时间下的三倍体率差异较大, 起始诱导时间为受精后 14min 时, 诱导获得的三倍体率最高为 69.34% \pm 2.11%(图 2)。

2.1.3 诱导持续时间 随诱导持续时间的增加, 卵裂率和孵化率均降低; 诱导持续时间 25min 时, 卵裂率和孵化率均不到 60%。持续诱导时间 15min 和 20min 两组的三倍体率显著高于另外两组的三倍体率 ($P<0.05$), 但两组内的三倍体率无显著性差异 ($P>0.05$), 持续诱导时间为 20min 时, 诱导获得三倍体率最高为 60.32% \pm 2.01%(图 3)。

2.2 不同的 6-DMAP 诱导条件下诱导组幼虫的生长情况

幼虫培育的前 5 天, 不同诱导浓度下的诱导组幼虫壳高均无显著性差异 ($P>0.05$); 培育的第 10—20 天, 诱导浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时的诱导组幼虫壳高最小, 显著小于诱导浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 时幼虫的壳高 ($P<0.05$), 诱导浓度为 150、300 和 450 $\mu\text{mol/L}$ 时的诱导组幼虫的壳高无显著性差异 ($P>0.05$); 培育的第 20—25 天, 诱导浓度 150、300 和 450 $\mu\text{mol/L}$ 时诱导组幼虫的壳

高无显著性差异 ($P>0.05$), 但均高于浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ 时幼虫的壳高(图 4)。

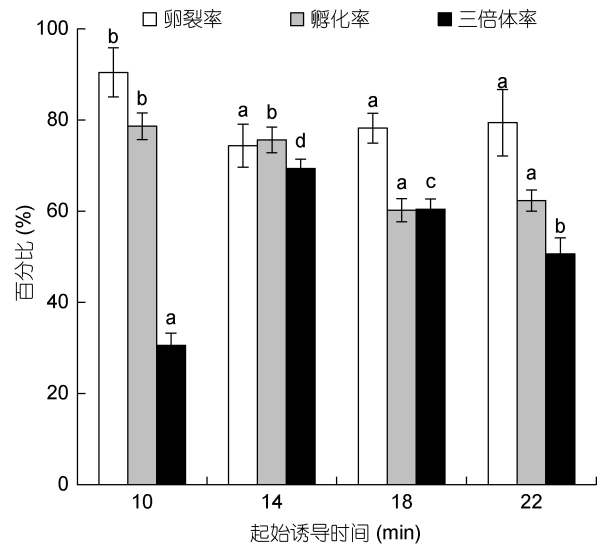


图 2 不同的起始诱导时间下卵裂率、孵化率和三倍体率

Fig.2 Cleavage rate, hatching rate, and triploid rate in different initial induction times

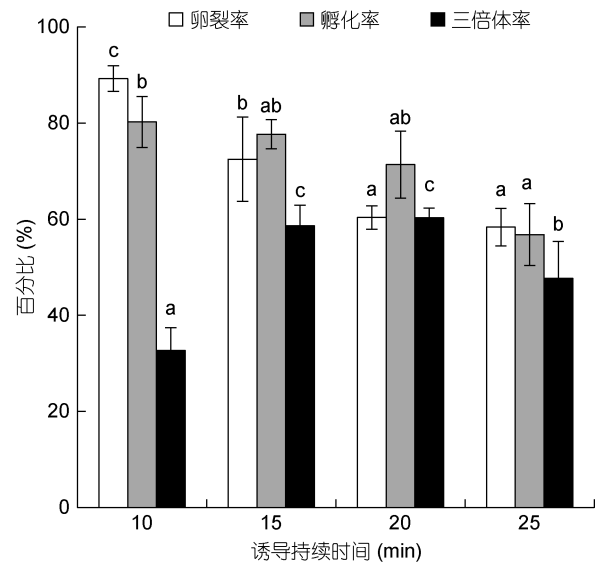


图 3 不同的诱导持续时间下卵裂率、孵化率和三倍体率

Fig.3 Cleavage rate, hatching rate, and triploid rate in different induction durations

在培育的 25 天内, 起始诱导时间为受精后 14、18 和 22min 时诱导组幼虫的壳高始终无显著性差异 ($P>0.05$); 幼虫培育的前 10 天, 不同的诱导起始时间下诱导组幼虫的壳高均无显著性的差异 ($P>0.05$); 培育的第 15—20 天, 起始诱导时间 10min 时诱导组幼虫的壳高均显著高于起始诱导时间 18min 时诱导组幼虫的壳高 ($P<0.05$)(图 5)。

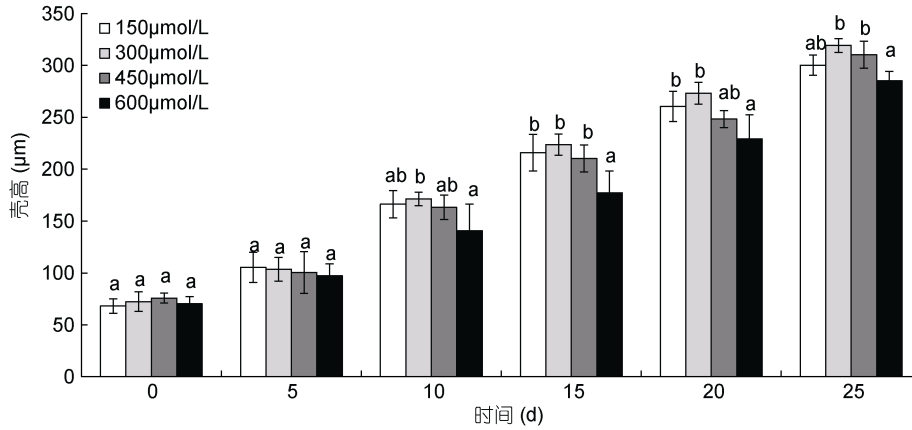


图 4 不同的诱导浓度下三倍体诱导组幼虫的生长情况

Fig.4 The growth of triploid induced larvae under different induction concentrations

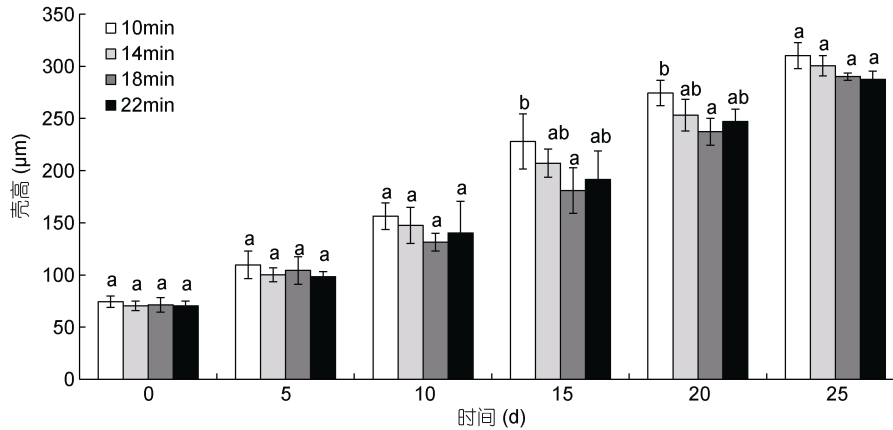


图 5 不同的起始诱导时间下三倍体诱导组幼虫的生长情况

Fig.5 The growth of triploid induced larvae under different initial induction times

在培育的 25 天内, 诱导持续时间为 10、15 和 20min 时诱导组幼虫的壳高无显著性差异($P>0.05$); 在培育的前 10 天, 不同的诱导持续时间下的诱导组幼虫的壳高无显著性差异($P>0.05$); 在培育的第 15—20 天, 诱导持续时间为 10、15 和 20min 的诱导组幼虫壳高均显著高于持续诱导时间为 25min 时幼虫的壳高($P<0.05$); 培育的 25 天内, 持续诱导时间为 25min 时的诱导组幼虫壳高均最小(图 6)。

2.3 不同的诱导条件下幼虫的存活情况

在培育的 25 天内, 诱导浓度 150、300 和 450 μmol/L 时的诱导组幼虫存活率均无显著性差异($P>0.05$); 在培育的 15—25 天, 诱导浓度 150、300 和 450 μmol/L 时的诱导组幼虫的存活率均显著高于诱导浓度 600 μmol/L 时的诱导组幼虫存活率($P<0.05$)。起始诱导时间对幼虫存活影响较小, 在培育第 15 天之后各起始诱导时间之间的诱导组幼虫的存活率均无显著性差异($P>0.05$); 在培育的第 10 天,

起始诱导时间 10min 时的诱导组幼虫的存活率显著低于其他各诱导组幼虫存活率($P<0.05$)。在培育的前 20 天内, 持续诱导时间 10、15 和 20min 时的诱导组幼虫的存活率无显著性差异($P>0.05$), 但均显著高于持续诱导时间 25min 时诱导组幼虫的存活率($P<0.05$)(表 1)。

不同的 6-DMAP 诱导组合下的三倍体诱导组幼虫的日平均生长率无显著性差异($P>0.05$)。培育 25 天内, 诱导浓度为 150、300 和 450 μmol/L 的三倍体诱导组幼虫平均存活率无显著性差异($P>0.05$), 但均显著高于诱导浓度为 600 μmol/L 时的三倍体诱导组幼虫的平均存活率($P<0.05$)。起始诱导时间为 10min 时的三倍体诱导组幼虫的平均存活率显著小于起始诱导时间为 14min 时的三倍体诱导组幼虫的平均存活率($P<0.05$)。不同的持续诱导时间下, 三倍体诱导组幼虫的平均存活率差异较小, 诱导持续 10、15 和 20min 时的三倍体诱导组幼虫的平均存活率无显著性差异

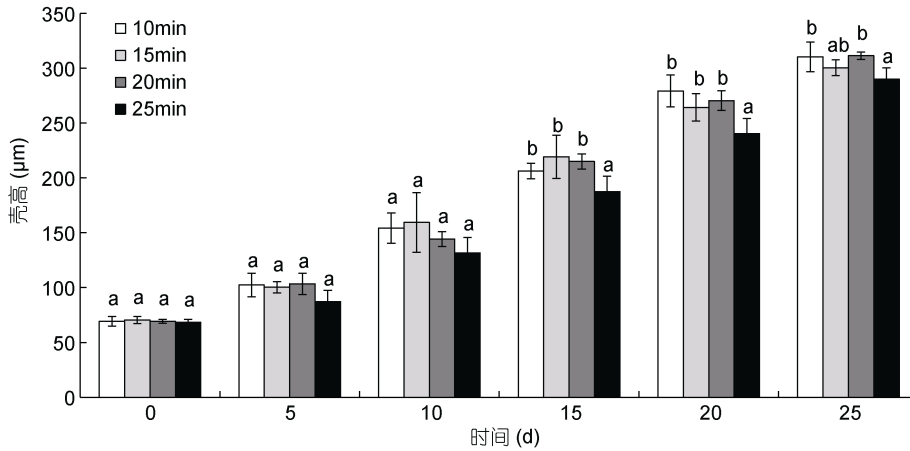


图6 不同的持续诱导时间下三倍体诱导组幼虫的生长情况

Fig.6 The growth of triploid induced larvae under different induction durations

表1 不同的6-DMAP诱导条件下三倍体诱导组幼虫的存活率

Tab.1 Survival rate of triploid induced larvae under different 6-DMAP induction conditions

项目	条件	5d	10d	15d	20d	25d
诱导浓度(μmol/L)	150	86.34±5.68 ^a	79.33±3.75 ^b	79.15±6.81 ^b	75.7±13.77 ^b	70.27±5.05 ^b
	300	82.33±3.61 ^a	74.20±8.69 ^{ab}	73.32±5.40 ^b	69.23±5.33 ^b	67.45±3.35 ^b
	450	83.29±5.52 ^a	76.17±9.60 ^{ab}	70.13±9.19 ^b	67.46±2.76 ^b	66.34±4.24 ^b
	600	74.30±8.69 ^a	65.35±6.05 ^a	55.78±2.54 ^a	54.45±4.13 ^a	52.12±5.19 ^a
起始诱导时间(min)	10	71.78±5.76 ^a	61.23±4.37 ^a	57.46±1.69 ^a	55.35±3.18 ^a	54.57±5.02 ^a
	14	82.45±5.65 ^b	74.33±3.35 ^b	67.34±7.50 ^a	64.23±5.68 ^a	62.79±3.33 ^a
	18	83.33±6.21 ^b	70.34±4.67 ^b	65.34±2.77 ^a	63.47±2.76 ^a	63.33±4.41 ^a
	22	80.2±2.38 ^{ab}	69.23±2.99 ^b	60.12±2.79 ^a	60.01±6.24 ^a	58.89±4.77 ^a
诱导持续时间(min)	10	83.19±6.09 ^b	73.15±6.80 ^b	70.19±5.17 ^b	68.13±3.53 ^b	68.12±5.28 ^b
	15	85.27±3.57 ^b	77.49±6.23 ^b	72.11±5.14 ^b	64.21±4.64 ^b	60.26±4.06 ^{ab}
	20	80.14±3.57 ^b	70.12±4.27 ^b	70.07±4.76 ^b	66.33±3.19 ^b	65.10±4.43 ^{ab}
	25	63.12±5.28 ^a	56.13±3.53 ^a	55.12±3.50 ^a	55.01±2.58 ^a	54.23±3.59 ^a

注: 数据上标字母不同表示组间存在显著差异($P<0.05$)。下同

($P>0.05$), 但均显著高于诱导持续时间为 25min 时的三倍体诱导组幼虫的平均存活率($P<0.05$)(表 2)。

2.4 不同的诱导条件对三倍体近江牡蛎诱导的影响程度比较

不同的诱导持续时间对卵裂率产生极显著差异影响($P<0.01$), 且对应的极差最大, 因此诱导持续时间对卵裂率的影响程度最大, 三个诱导条件对卵裂率的影响程度为诱导持续时间>诱导浓度>起始诱导时间; 三个诱导条件对孵化率的影响程度为起始诱导时间>诱导浓度>诱导持续时间; 三个诱导条件对三倍体率的影响程度为起始诱导时间>诱导浓度>诱导持续时间。诱导浓度和诱导持续时间是影响幼虫平均存活率的主要因素(表 3)。

2.5 不同幼虫期各三倍体诱导组幼虫三倍体率变化情况

幼虫培育期间, 各三倍体诱导组幼虫的三倍体率均有所下降, 诱导浓度 600μmol/L 和诱导持续时间 25min 两组的三倍体率下降超过 10%, 其他各组三倍体率下降均为超过 10%, 变化不显著($P>0.05$)。多数情况下, 三倍体率的下降主要集中于壳顶期幼虫之前, 壳顶期幼虫之后三倍体率变化较小(图 7)。

3 讨论

3.1 6-DMAP 诱导黄河口近江牡蛎三倍体方法的探讨

从三倍体诱导原理上看, 起始诱导时间的控制是把握极体排放时机的关键, 诱导浓度是作用强度

表 2 培育 25 天内不同的 6-DMAP 诱导条件下三倍体诱导组幼虫的生长存活比较

Tab.2 Comparison on growth and survival of triploid induced larvae under different 6-DMAP induction conditions on the 25th day

项目	条件	日平均生长率($\mu\text{m}/\text{d}$)	平均存活率(%)
诱导浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)	150	9.28 \pm 1.89 ^a	78.18 \pm 5.86 ^b
	300	9.88 \pm 2.63 ^a	73.29 \pm 5.73 ^b
	450	9.38 \pm 3.25 ^a	72.68 \pm 7.65 ^b
	600	8.59 \pm 2.32 ^a	60.40 \pm 9.27 ^a
起始诱导时间(min)	10	9.44 \pm 2.94 ^a	60.08 \pm 7.03 ^a
	14	9.20 \pm 2.12 ^a	70.23 \pm 8.15 ^b
	18	8.76 \pm 2.58 ^a	69.16 \pm 8.41 ^{ab}
	22	8.68 \pm 2.15 ^a	65.70 \pm 9.14 ^{ab}
诱导持续时间(min)	10	9.64 \pm 3.40 ^a	72.56 \pm 6.29 ^b
	15	9.20 \pm 2.69 ^a	71.87 \pm 10.06 ^b
	20	9.68 \pm 2.94 ^a	70.35 \pm 5.91 ^b
	25	8.87 \pm 2.96 ^a	56.72 \pm 3.64 ^a

表 3 不同的诱导条件对三倍体近江牡蛎诱导的影响程度比较

Tab.3 Comparison on effects of different induction conditions on triploid *C. ariakensis* induction

项目	条件	方差分析(P 值)	最大值	最小值	极差
卵裂率(%)	诱导浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)	0.002**	93.34	58.20	35.14
	起始诱导时间(min)	0.031*	96.67	69.86	26.81
	诱导持续时间(min)	0.000**	91.56	54.39	37.17
孵化率(%)	诱导浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)	0.028*	93.59	71.56	21.03
	起始诱导时间(min)	0.000**	80.94	57.33	23.61
	诱导持续时间(min)	0.07	85.81	59.35	26.46
三倍体率(%)	诱导浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)	0.001**	66.77	28.23	38.54
	起始诱导时间(min)	0.000**	68.78	28.66	40.12
	诱导持续时间(min)	0.001**	62.43	29.45	32.98
日平均生长率($\mu\text{m}/\text{d}$)	诱导浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)	0.877	13.56	4.92	8.64
	起始诱导时间(min)	0.955	14.31	5.60	8.71
	诱导持续时间(min)	0.969	14.57	3.79	10.78
平均存活率(%)	诱导浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)	0.008*	86.34	52.12	34.22
	起始诱导时间(min)	0.241	74.33	54.57	19.76
	诱导持续时间(min)	0.006*	85.27	54.23	31.04

注: *表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)

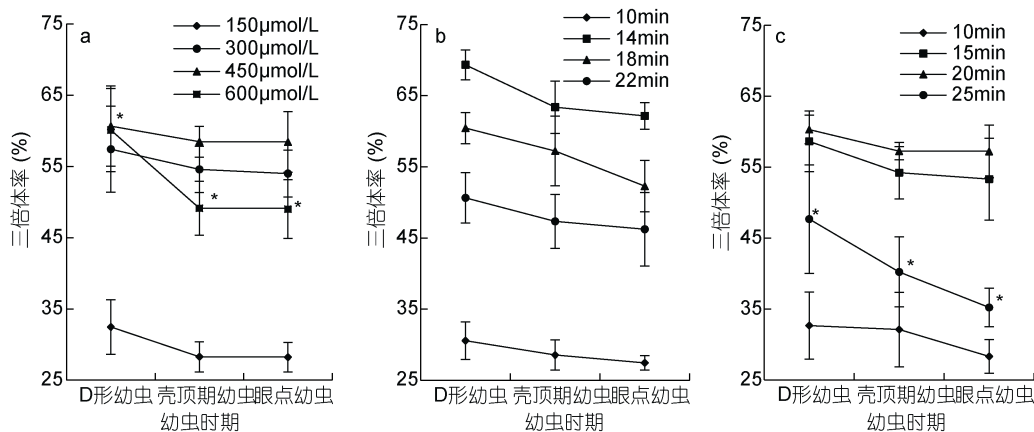


图 7 不同的诱导条件下三倍体诱导组幼虫的三倍体率的变化

Fig.7 Variation of triploid rate of triploid induced larvae in different induced conditions

注: a、b、c 分别表示不同的诱导浓度、不同的起始诱导时间、不同的诱导持续时间时幼虫的三倍体率变化, *表示该条件下不同的幼虫时期的三倍体率差异显著($P < 0.05$)

的体现,这两个因素是决定三倍体率的主要因素,本次实验的结果也证明了这一点。杨春玲等(2008)诱导“近江牡蛎(*C. rivularis*)”三倍体时,也认为起始诱导时间和诱导浓度是决定诱导三倍体率的主要因素。田传远等(1999)认为诱导持续时间对长牡蛎三倍体诱导率无显著性影响,而本实验中诱导持续时间是三因素中对三倍体率影响最小的因素,这说明诱导持续时间是三个因素中对诱导三倍体率影响最小的一个因素。持续诱导时间和诱导浓度是影响卵裂率的主要因素,推测原因是较高的诱导浓度和较长的诱导时间使受精卵受到一定的毒害作用,受精卵不能正常分裂(田传远等,1998)。持续诱导时间对胚胎的孵化率没有显著性的影响,这与CB诱导熊本牡蛎的结论相反,推测原因是6-DMAP毒性比CB的毒性小,其毒害作用是瞬间的,因此其毒害作用主要集中于受精卵时期,而对胚胎的影响较小,因此卵裂率受该因素的影响较大,而孵化率几乎不受该因素的影响(田传远等,1998;武祥伟等,2019)。综合来看,三个诱导条件对三倍体诱导效果的影响程度为起始诱导时间>诱导持续时间>诱导浓度。

较高的诱导浓度(600 $\mu\text{mol/L}$)和较长的持续诱导时间(25min)下三倍体诱导组幼虫生长慢且存活率显著低,若以三倍体诱导组幼虫的生长、存活和三倍体率变化作为考量诱导效果的指标,只能说明诱导浓度600 $\mu\text{mol/L}$ 、诱导持续时间25min两个条件下诱导效果较差,而其他的条件下均无显著性差异。综合三倍体D形幼虫的产量和诱导组幼虫的情况来看,6-DMAP诱导黄河口近江牡蛎三倍体的最佳组合是:诱导浓度为300—450 $\mu\text{mol/L}$,起始诱导时间为受精后14min,持续诱导时间为15min。

3.2 三倍体诱导组幼虫的生长存活探讨

从幼虫壳高变化看,诱导浓度600 $\mu\text{mol/L}$ 和持续诱导时间25min时的幼虫在培育的第5—15天内,生长速度明显减慢,幼虫壳高显著小于组内其他条件下幼虫的壳高。武祥伟等(2019)用CB诱导获得的熊本牡蛎三倍体群幼虫在培育前期出现大量死亡现象,作者认为死亡率高的原因之一是CB的毒性大,对胚胎产生了毒害作用。虽然本实验中用到的6-DMAP的毒性小,但当诱导浓度过大和诱导时间过长时,胚胎处于极度不适应的环境中,会受到潜在的伤害,而这种潜在的伤害会在D形幼虫初期表现出来—生长迟滞和高死亡率(田传远等,2000)。在培育的前期,幼虫的死亡率急剧下降,尤其是诱导强度较强时(高诱

导浓度和长的诱导持续时间),这种现象尤为明显。由于极体排放不同步,高强度的诱导使得第一极体被抑制的几率大大增加,导致染色体多级分离产生非整倍体(Guo *et al.*, 1992; 田传远等, 1999), 这些非整倍体幼虫虽然不存在生长迟滞现象(Guo *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999), 但是其存活能力低(武祥伟等, 2019), 造成整组在培育初期存活率急剧下降。

3.3 三倍体诱导组幼虫的三倍体率变化情况分析

培育至眼点幼虫时期,多数情况下幼虫三倍体率下降幅度较小,均未超过10%,只有诱导强度过大时三倍体率下降显著。诱导浓度600 $\mu\text{mol/L}$ 和持续诱导时间25min两组幼虫时幼虫死亡率均较高,同时三倍体率急剧下降,较高的诱导强度获得了较多的非整倍体,非整倍体存在会降低三倍体率(He *et al.*, 2000)。因此在用6-DMAP诱导近江牡蛎三倍体时,诱导浓度不能太大且诱导持续时间不能太长,否则三倍体产量会大大下降。此外,三倍体染色体的丢失也是造成三倍体率下降的重要原因,多倍体牡蛎由于体内多了一套染色体而具备了许多二倍体牡蛎不具有的特点,但其额外的染色体组使其细胞分裂紊乱的几率增加,容易产生非整倍体嵌合体,甚至逆转回二倍体(de Sousa *et al.*, 2016)。

4 结论

本研究认为,温度25 $^{\circ}\text{C}$,盐度29的条件下,诱导浓度为300—450 $\mu\text{mol/L}$,起始诱导时间为受精后14min,诱导持续时间为15min时,6-DMAP诱导黄河口近江牡蛎三倍体的效果较好。

参 考 文 献

- 于瑞海,王昭萍,王如才等,2000.三种化学诱导剂诱导太平洋牡蛎三倍体的比较研究.青岛海洋大学学报,30(4): 589—592
- 王康,2014.盐度诱导太平洋牡蛎和近江牡蛎三倍体的研究.青岛:中国海洋大学硕士学位论文,38—67
- 王海燕,郭希明,刘晓等,2007.中国近海“近江牡蛎”的分类和订名.海洋科学,31(9): 85—86
- 田传远,王如才,梁英等,1999.6-DMAP诱导太平洋牡蛎三倍体——抑制受精卵第二极体释放.中国水产科学,6(2): 1—4
- 田传远,梁英,王如才等,1998.6-DMAP诱导太平洋牡蛎三倍体5.孵化率和D幼畸形率与三倍体诱导率的关系.青岛海洋大学学报,28(3): 421—425
- 田传远,梁英,王如才等,2000.6-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.中国水产科学,7(1): 110—112
- 杨春玲,陈晓汉,李咏梅等,2008.应用6-DMAP人工诱导近

- 江牡蛎三倍体的初步研究. 西南农业学报, 21(3): 825—828
- 张跃环, 王昭萍, 喻子牛等, 2014. 养殖牡蛎种间杂交的研究概况与最新进展. 水产学报, 38(4): 613—624
- 武祥伟, 张跃环, 肖述等, 2019. CB 诱导熊本牡蛎三倍体及其存活率与倍化率的变化关系. 水产学报, 43(4): 1029—1037
- 秦艳平, 张跃环, 周颖力等, 2017. CB 与 6-DMAP 诱导香港牡蛎三倍体的效果比较. 水产学报, 41(2): 250—257
- Allen Jr S K, Downing S L, 1986a. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 102(2—3): 197—208
- Allen Jr S K, Downing S L, Chaiton J *et al*, 1986b. Chemically and pressure-induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 57(1—4): 359—360
- Calvo G W, Luckenbach M W, Allen S K Jr *et al*, 2001. A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. Journal of Shellfish Research, 20(1): 221—229
- de Sousa J T, Allen Jr S K, Baker H *et al*, 2016. Aneuploid progeny of the American oyster, *Crassostrea virginica*, produced by tetraploid \times diploid crosses: another example of chromosome instability in polyploid oysters. Genome, 59(5): 327—338
- Dégremont L, Garcia C, Frank-Lawale A *et al*, 2012. Triploid oysters in the Chesapeake Bay: comparison of diploid and triploid *Crassostrea virginica*. Journal of Shellfish Research, 31(1): 21—32
- Downing S L, Allen Jr S K, 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. Aquaculture, 61(1): 1—15
- Desrosiers R R, Gérard A, Peignon J M *et al*, 1993. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 170(1): 29—43
- Gérard A, Ledu C, Phélipot P *et al*, 1999. The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. Aquaculture, 174(3—4): 229—242
- Guo X M, Allen Jr S K, 1994. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploids. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(1): 42—50
- Guo X M, Cooper K, Hershberger W K *et al*, 1992. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I. Ploidy of resultant embryos. The Biological Bulletin, 183(3): 381—386
- Guo X M, DeBrosse G A, Allen Jr S K, 1996. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. Aquaculture, 142(3—4): 149—161
- He M X, Lin Y G, Shen Q *et al*, 2000. Production of tetraploid pearl oyster (*Pinctada martensii* Dunker) by inhibiting the first polar body in eggs from triploids. Journal of Shellfish Research, 19(1): 147—151
- Lam K, Morton B, 2003. Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Peral River Delta, Hong Kong, China. Aquaculture, 228(1—4): 1—13
- Nell J A, 2002. Farming triploid oysters. Aquaculture, 210(1—4): 69—88
- Peachey B L, Allen Jr S K, 2016. Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for tetraploidy induction in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Aquaculture, 450: 199—205
- Piferrer F, Beaumont A, Falguière J C *et al*, 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture, 293(3—4): 125—156
- Stanley J G, Allen Jr S K, Hidu H, 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. Aquaculture, 23(1—4): 1—10
- Wang H Y, Guo X M, Zhang G F *et al*, 2004. Classification of Jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis. Aquaculture, 242(1—4): 137—155
- Wang Z P, Guo X M, Allen Jr S K *et al*, 1999. Aneuploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid production. Aquaculture, 173(1—4): 347—357
- Xiao J, Cordes J F, Wang H Y *et al*, 2010. Population genetics of *Crassostrea ariakensis* in Asia inferred from microsatellite markers. Marine Biology, 157(8): 1767—1781
- Yoon H S, Jung H T, Choi S D, 2008. Suminoe Oyster (*Crassostrea ariakensis*) Culture in Korea. Journal of Shellfish Research, 27(3): 505—508

STUDY ON 6-DMAP INDUCED TRIPLOID OF *CRASSOSTREA ARIAKENSIS* FROM HUANGHE RIVER ESTUARY

LI Hai-Kun, LIU Yang, LI Chun-Hua, WANG Yong-Wang, YU Rui-Hai

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

Abstract To obtain efficient induction method of *Crassostrea ariakensis* by 6-DMAP, we conducted triploid induction of *C. ariakensis* under the factors of induction concentration, initial induction time, and induction duration. Samples of *C. ariakensis* in age of 4—5 years were collected from Dongying City, Shandong, near the Huanghe (Yellow) River mouth. The cleavage rate, hatching rate, triploid rate, and condition of triploid larval population in different induction combinations were studied. Results show that the degree of influence of the three factors on triploid induction was in the order of initial induction time > induction duration > induction concentration. At 25°C, the best induction effect was obtained under the induction concentration of 300—450 μmol/L, the induction of 14min after fertilization, and the duration of 15min. The induction rate of triploid was 51.39%—71.67%, the cleavage rate, hatching rate, shell height mean daily growth and mean survival rate of induced triploid larvae were 65.16%—81.57%, 61.25%—86.78%, 8.76—9.88 μm/d, 69.16%—73.29%, respectively, and the triploid rate of eye-spot larvae reached 53.33%—62.16%. This study provides a theoretical basis for triploid induction of *C. ariakensis* in Huanghe (Yellow) River mouth region.

Key words *Crassostrea ariakensis*; 6-DMAP; induction; triploid