太平洋牡蛎三倍体诱导及苗种培育技术研究

隋锡林　许伟定　王志松　胡庆明

（辽宁省海洋水产研究所，大连　116023）

摘　要　本文报道了采用细胞松弛素B(CB)诱导太平洋牡蛎三倍体的研究结果。研究结果表明，CB浓度为0.25mg/L，处理时间约20分钟，诱导三倍体的倍化率可达75%，至D型幼虫的孵化率为40－50%。1992－1996年其培育出三倍体贝苗1846.4万枚。

关键词　太平洋牡蛎，三倍体，苗种培育

当前，牡蛎在世界海水双壳类养殖产量中所占比例很大，约占1/3，而太平洋牡蛎(*Crassotrea gigas*)又占其中的70%。近年，我国太平洋牡蛎养殖发展很快，现已成为我国的重要养殖贝类。由于三倍体牡蛎通常具有不育性、生长快、抗逆性强及质好味美等特点，因此，国内外对牡蛎多倍体诱导技术的研究进展很快。美国学者 Stanley 等[1981,1984]，Quillet 等[1986]，Dawning 等[1987]，Allen 等[1988]和 Quo 等[1992，1994]先后采用热休克和细胞松弛素B(Cytochalasin B，简称 CB，下同)对美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)和太平洋牡蛎的受精卵进行了诱导三倍体的研究。美国海岸牡蛎公司(Coast Oyster Company)及其在法国的子公司已大量生产太平洋牡蛎三倍体苗种，初步形成产业化生产。日本学者山本[1989]和赤繁等[1992]分别报道了用咖啡因和CB诱导太平洋牡蛎三倍体并进行海上养殖试验的研究。在我国，对贝类多倍体育种的研究起步稍晚，但进展较快。容寿柏等[1990，1992]，采用冷、热休克方法诱导近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*)三倍体和四倍体，梁　英等[1994]报道了低温诱导大连湾牡蛎(*Crassostrea talienwhanensis*)三倍体，于瑞海等[1994]报道了温度休克诱导长牡蛎(*Ostrea gigas*)三倍体，曾志南等[1994]报道了僧帽牡蛎(*Ostrea cucullata*)三倍体。采用CB诱导太平洋牡蛎(*Crassotrea gigas*)三倍体的研究在国内尚未见报道，本研究报道了用CB诱导太平洋牡蛎三倍体及其三倍体苗种培育的试验结果。

1　材料与方法

1.1　诱导方法

亲贝取自大连市金州区满家滩人工养殖群体，壳高10－15cm，平均12.5cm。亲贝经人工升温促熟后，取充分成熟的雌雄个体，用解剖法获取精、卵，取精、卵时要严格操作，绝对避免将精子带入卵中。

取一定数量的卵(去掉结缔组织等杂物)进行人工授精(需取10个以上雄性个体的混合精

1996-12-09收到。

液），卵受精后镜检，当50%左右的受精卵放出第一极体时，采用不同浓度的CB处理20分钟左右，然后用含0.02%的二甲亚砜海水浸泡20分钟，再转入正常海水中孵化。

1.2 孵化率及三倍化率统计

孵化率为孵出的D型幼虫占受精卵的百分比；三倍化率的统计以担轮期幼虫为细胞染色体倍性检查材料，染色体制片方法采用 Movinhan 等[1983]的方法并加以改进，10%Giemsa 染色，水洗，自然风干后封片。每个试验组用油镜检查100个以上中期分裂相，计算出三倍体细胞所占的百分比。

1.3 不同CB浓度处理的试验

受精卵的密度为500个/ml，经不同CB浓度处理的受精卵用容水量为17L的圆玻璃缸进行孵化，受精卵的孵化密度为60个/ml左右，每个梯度设两个平行组。三倍体D型幼虫的培育密度为8－12个/ml，孵化及培育水温均为21.5－23.0℃。

在水泥池培育三倍体D型幼虫时，幼虫密度、饵料投喂及换水管理等均与二倍体幼虫培育方法相同。

2 结果

2.1 不同CB浓度的诱导效果

经中期分裂相染色体计数结果，太平洋牡蛎的二倍体数为2n＝20，三倍体染色体数为3n＝30（图1）。不同CB浓度的诱导结果如表1和图2。

从表1和图2可见，用浓度0.25mg/L CB处理受精卵，诱导三倍体的倍化率最高为75%，至D型幼虫的孵化率为42.5%。

2.2 三倍体幼虫与对照组幼虫的生长比较

通过对幼虫壳高的测量，生长速度比如表2。

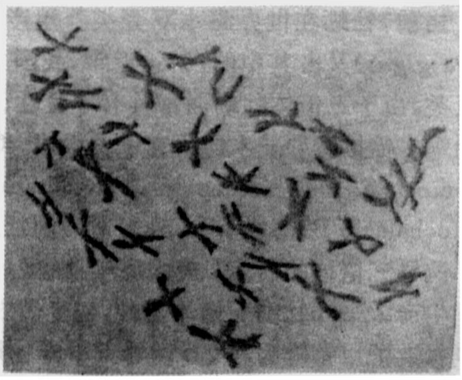

图1 太平洋牡蛎三倍体染色体（3N）显微照片（16×100）

Fig.1 The Microphotograph of triploid chromosome of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)(16×100)

表1 受精卵经不同浓度CB处理后的孵化率及三倍化率（1992－1993）

Tab.1 The percentage of incubation triploid of the fertilization eggs treated with different CB(1992－1993)

CB浓度 (mg/L)	孵化率（%）			三倍化率（%）		
	第一组	第二组	平均	第一组	第二组	平均
0.05	59.4	51.0	55.2	33.0	28.2	30.6
0.10	50.7	56.1	53.4	60.2	53.2	56.7
0.15	42.2	54.6	48.4	51.6	58.4	55.0
0.20	41.7	45.9	43.8	59.0	63.0	61.0
0.25	46.4	38.5	42.5	78.6	71.4	75.0
0.30	24.6	20.3	22.5	68.2	71.8	70.0
对照组	75.0	75.9	75.5	0	0	0

表2　三倍体与对照组幼虫生长比较(1993)

Tab. 2　Comparative growth of the triploid and control larva(1993)

培育天数	3N幼虫壳高 (μm)	对照组幼虫壳高 (μm)
2	84.2±4.0	81.0±2.1
4	101.7±5.14	95.8±4.9
6	128.7±13.0	126.0±5.8
8	188.7±12.7	177.5±11.6
10	207.4±18.5	203.0±17.7
12	242.3±21.8	224.0±24
14	出现眼点，投附着基	254.0±16.8
16		出现眼点，投附着基

从表2可见，经CB诱导的三倍体幼虫群体的生长速度比对照组稍快，幼虫出现眼点的时间比对照组提早1－2天。

2.3　三倍体幼虫水泥池培育结果

在小型试验的基础上，我们于1992－1996年，分别用水泥池培育出三倍体稚贝1846.4万枚，各年份的水泥池育苗结果见表3、4。

表3表明，采用水泥池孵化，经CB处理后，卵的孵化率与幼虫的三倍化率与前述小型试验结果相近。

从表4可见，采用水泥池培育太平洋牡蛎三倍体幼虫也获良好效果，每片贝壳附着的稚贝(壳高1mm左右)均达40枚以上，最高为61枚/片，与正常二倍体幼虫培育及附着结果无明显差异。

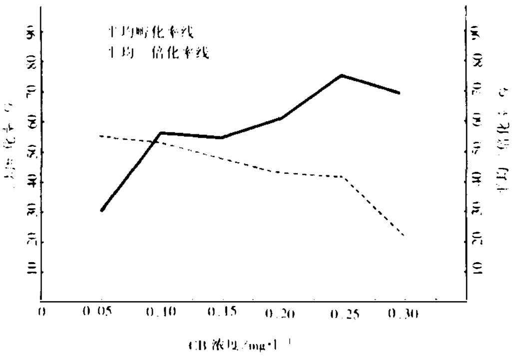

图2　不同浓度CB处理与三倍体诱导率，D型幼虫孵化率的关系

Fig. 2　The relationship between different CB concentration and the percentage of triploid and incubation of Dlarve

表3　经CB处理后，卵的孵化率及幼虫的三倍化率(1992－1996)

Tab. 3　The percentage of incubation of eggs and the percentage of triploid after CB treatment (1992－1996)

年度	水体 (m^3)	密度 (个/ml)	CB浓度 (mg/L)	孵化率 (%)	三倍化率 (%)
1992	4.8	10.2	0.25	55.0	63.0
1993	4.9	10.4	0.25	54.3	65.3
1994	30.0	9.0	0.25	45.4	64.2
1995	4.0	8.0	0.25	39.3	69.3
1996	17.0	8.5	0.25	60.7	65.3

表4　三倍体稚贝附着结果(1992－1996)

Tab. 4　The attaching result of triploid spats(1992－1996)

年度	水体 (m^3)	附着基吊数 (吊)	平均每吊片数 (片)	平均每片附着量 (枚)	总附苗量 (万枚)
1992	4.8	369	131.0	61.0	295.26
1993	4.9	267	135.0	45.7	164.70
1994	30	1520	120.0	43.0	784.30
1995	4.0	300	130.0	44.0	171.60
1996	17.0	865	110.0	45.0	430.10
总计					1846.40

3 讨论

经CB处理后，受精卵发育至D型幼虫的孵化率及三倍化率主要取决于CB的浓度。本试验的结果表明，当CB的浓度由0.05mg/L增至0.30mg/L时，随着CB浓度的增大，孵化率下降，三倍化率增高。当CB的浓度为0.25mg/L时，倍化率可达75.0%，而孵化率可达40－50%，取得了最佳结果。此结果与美国Barber等[1992]所报道的牡蛎三倍体诱导结果相一致。此外，孵化率及倍化率与CB的处理时机及处理的持续时间也有一定的关系。试验结果表明，当受精卵第一极体的出现率达50%左右时为CB处理的最佳时机，而处理的持续时间以20分钟为最佳。这与Stanley等[1984]的试验结果基本一致。

用相同浓度的CB处理受精卵，至D型幼虫的孵化率也有一定的差异，其原因可能与亲贝的促熟培育水平及亲贝成熟度有一定的关系。

经CB处理的三倍体幼虫浮游阶段的生长比同期二倍体幼虫稍快，这与于瑞海等[1994]用温度休克诱导三倍体的试验结果相一致。

1992－1996年，我们用水泥池进行中试，培育出三倍体苗种1846.4万枚，稚贝附着效果同二倍体无明显差异，附苗效果良好，已完全可以应用于产业化生产。抑制第二极体放出与抑制第一极体放出所诱导的三倍体苗种经养成后，其生长速度及产品质量是否明显差异还有待于进一步探讨。

在本试验中"嵌合体"极少见，诱导率中三倍体占绝对优势，即占95%以上。

采用CB诱导太平洋牡蛎三倍体方法简便，倍化率较高且较稳定，适用于产业化育苗生产。笔者也曾采用冷、热休克法及热休克结合咖啡因等方法进行诱导三倍体试验，但倍化率和孵化率均较低且诱导结果不稳定，较难应用于产业化育苗生产。

参考文献

[1] 于瑞海，1994.温度休克诱导长牡蛎三倍体的研究.黄渤海海洋，12(3)：31－35.

[2] 容寿柏等，1990.用冷热休克诱导三倍体近江牡蛎.湛江水产学院学报，10(2)：18－21.

[3] ———，1992.用冷热休克诱导四倍体近江牡蛎.湛江水产学院学报，12(3)：32－36.

[4] 曾志南，1994.僧帽牡蛎三倍体的研究.海洋通报，13(6)：34－41.

[5] 梁 英等，1994.三倍体大连湾牡蛎的初步研究.水产学报，18(3)：237－240.

[6] 山本敏，1989.マガキ三倍體作法の改良と養殖への應用.養殖，26(6)：134－137.

[7] 赤繁悟ら，1992.広島県海域における三倍體マガキの成長，生殖とグリコーゲン含量. *Nippon Suisan Gakksishi*, **58**(6)：1063－1071.

[8] Allen, S. K. Jr, 1988. Cytology of gametogensis in triploid Pacific oyster (*Crassosfrea gigas*) (Abstract) *J. Shellfish Res.*, **7**(1)：107.

[9] Barber, B. J. *et al.*, 1992. Oplimization of triploid induction for the oyster (*Crassostrea virginica*) (Gmelin). *Aquaculture* **106**：21－26.

[10] Dowing, S. L. *at al.*, 1987. Induced triploid in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*), optimal treatment with cychalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, **61**：1－15.

[11] Guo, X. *at al.*, 1994. Viable tetraploiols in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) (Thunborg) produced by inhibition polar body I in eggs from triploids. *Md. Mar. Bio. Biotech.*, **3**(1)：42－51.

[12] Movnihan, E. P. and G. A. T. Mahon, 1983. Quantitative karyotgpe analysis in the mussel *Mytilus edulis L*. *Aquaculture*, **33**:301—309.

[13] Quillet, E. *et al*., 1986. Triploid incubation by thermal shoks in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* **57**:271—279.

[14] Stanly, J. G. *et al*., 1981. Polyploid induced in the American oyster (*Crassostreas virginica*) with cytochalasin B. *Aquacultnre*, **23**:1—100.

[15] Stanly, J. G. *et al*., 1984. Growth of American oyster increased by polyploid induced by blocking meiosis I but not meiosis I. *Aquaculture*, **37**:147—155.

STUDIES ON INDUCTION OF TRIPLOID AND TECHNOLOGY OF SPAT CULTURE IN THE PACIFIC OYSTER (*CRASSOSTREA GIGAS*)

Sui Xi-lin, Xu Wei-ding, Wang Zhi-song and Hu Qing-ming

(*Liaoning Marine Fisheries Research Institute*, *Dalian* 116023)

ABSTRACT This paper is reported that triploids were induced in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using cytochalasin B. The result shows that the percentage of triploids was 75.0%, treated with CB concentration of 0.25mg/L duration 20min The percentage of incubation of D-form larvae was 40—50%. 18,464 thousand triploid spats were cultured during 1992—1996.

KEYWORDS Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, triploid, spat culture