

6-二甲氨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

田传远 梁英 王如才 于瑞海 王昭萍
(青岛海洋大学水产学院, 266003)

摘要 于1996~1997年,用6-二甲氨基氨基嘌呤(6-DMAP)抑制受精卵第一极体的释放,诱导太平洋牡蛎产生三倍体。选用 $L_{16}(4^5)$ 设计,进行三因素四水平的正交试验:6-DMAP浓度,设150、300、450和600 $\mu\text{mol/L}$;诱导时机(即精卵混合后的时间),设10、15、20和25min;诱导持续时间,设10、15、20和25min。试验平行重复二次。结果为最高三倍体诱导率为(71.3 \pm 1.2)%,该实验组胚胎孵化率为(55.5 \pm 3.1)%,D形幼虫畸形率为(10.7 \pm 1.6)%。根据直观分析结果,得出诱导太平洋牡蛎三倍体各因素的最优水平组合:水温25~25.5 $^{\circ}\text{C}$,精卵混合10min时,将受精卵浸泡在含6-DMAP 600 $\mu\text{mol/L}$ 的海水中15min;决定三倍体产生的三因素的主次顺序:6-DMAP浓度 \rightarrow 诱导时机 \rightarrow 诱导持续时间。6-DMAP浓度对三倍体诱导率影响显著,但诱导时机和诱导持续时间不显著。

关键词 太平洋牡蛎,三倍体诱导,6-二甲氨基氨基嘌呤,受精卵,第一极体,抑制

用6-DMAP抑制贝类受精卵极体释放[Desrosiers等1993, Gerard等1994, Neant等1994, Scarpa等1995, Nell等1996]也能得到较高的三倍体诱导率。于1996~1997年,开始用6-二甲氨基氨基嘌呤(6-Dimethylaminopurine, 本文简称6-DMAP)抑制受精卵第一极体的释放诱导太平洋牡蛎产生三倍体。

1 材料与方法

1.1 材料

太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*) (壳长9.2 \pm 1.4cm)取自荣成市桑沟湾海区。6-DMAP购自美国SIGMA公司。分子式: $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_5$,分子量163.2,药品纯度高于98%。

1.2 获取精卵和受精

解剖法获取精卵,对获取的精卵进行离体促熟和必要的洗卵。人工授精。水温为25~25.5 $^{\circ}\text{C}$,受精卵经22h发育至D形幼虫。

1.3 三倍体诱导

用6-DMAP抑制受精卵第一极体释放的方法诱导太平洋牡蛎产生三倍体。

1.4 实验设计

选用 $L_{16}(4^5)$ 设计,进行三因素四水平的正交试验,统计三倍体诱导率。6-DMAP浓度A,

设 150、300、450 和 600 $\mu\text{mol/L}$; 诱导时机(精卵混合后的时间) B, 设 10、15、20 和 25 min; 诱导持续时间 C, 设 10、15、20 和 25 min。试验平行重复二次。影响三倍体诱导率三因素的主次顺序和最优水平组合以直观分析法获得; 对各组试验结果进行 Tukey 法两两比较。

1.5 染色体制片和倍性检查

取 8~16 细胞的胚胎, 用压片法制片和染色。染色体倍性检查采用染色体计数法; 每实验组计数 60~80 个染色体清晰可辨的胚胎, 实验设定 $2N=20\pm 2$ 、 $3N=30\pm 3$ 和 $4N=40\pm 4$ 。

2 结果

2.1 影响三倍体诱导率三因素的主次顺序

根据直观分析结果(表 1)中的极差 R 值, 影响三倍体诱导率三因素的主次顺序是: 6-DMAP 浓度 \rightarrow 诱导时机 \rightarrow 诱导持续时间。通过各因素水平极差 R 值与空列 R_e 值的比较, 由于 R_A 大于 R_e , 说明 A 因素对三倍体诱导率的影响显著; 但 $R_C < R_B < R_e$, 因此 B、C 二因素的影响不显著。

表 1 诱导率正交试验(二次重复)的结果及直观分析

Tab. 1 The triploidy results of orthogonal test and intuitive analysis

实验号	A ($\mu\text{mol/L}$)	B (min)	C (min)	D	三倍体诱导率(%)		$x_1 + x_2$
					x_1	x_2	
1	1(150)	1(10)	1(10)	1	45.0	42.5	87.5
2	1	2(15)	2(15)	2	37.5	37.5	75.0
3	1	3(20)	3(20)	3	40.0	37.5	77.5
4	1	4(25)	4(25)	4	45.0	42.5	87.5
5	2(300)	1	2	3	60.0	65.0	125.0
6	2	2	1	4	50.0	60.0	110.0
7	2	3	4	1	60.0	55.0	115.0
8	2	4	3	2	40.0	45.0	85.0
9*	3(450)	1	3	4	70.0	72.5	142.5
10	3	2	4	3	50.0	50.0	100.0
11	3	3	1	2	45.0	37.5	82.5
12	3	4	2	1	60.0	55.0	115.0
13	4(600)	1	4	2	55.0	55.0	110.0
14	4	2	3	1	60.0	57.5	117.5
15	4	3	2	4	57.0	60.0	117.0
16	4	4	1	3	55.0	60.0	115.0
k_1	40.94	58.13	49.33	54.33			
k_2	54.38	50.31	54.00	44.06			
k_3	55.00	49.00	52.81	52.19			
k_4	57.44	50.31	51.56	57.13			
R	16.50	9.13	4.63	13.06			

* 该实验组孵化率(55.5 ± 3.1)%, D形幼虫畸形率(10.7 ± 1.6)%。

为更直观地了解三倍体诱导率随各因素水平的变化情况, 作因素水平对三倍体诱导率的效应图(图 1)。在折线图中, A 因素的直线陡度大, 说明 A 因素对三倍体诱导率效应大, 即主要因素, B 和 C 因素为次要因素。

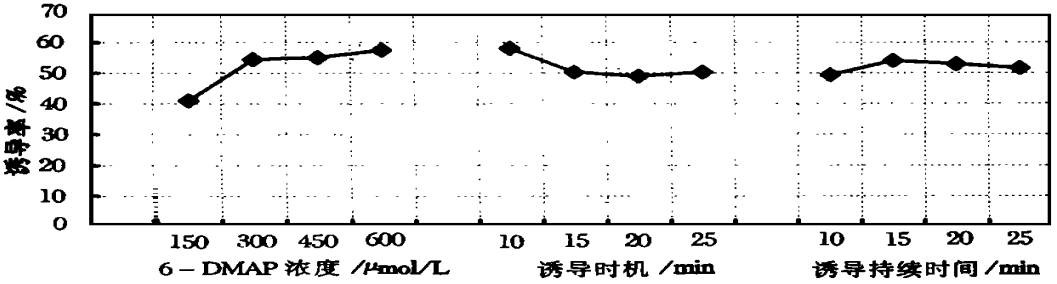


图1 三因素及其对三倍体诱导率的影响

Fig. 1 Effects of three factors and inductivity on triploid

2.2 诱导三因素四水平的最优水平组合

取显著性大的主要因素中的最好水平,次要因素取孵化率较高和D形幼虫畸形率最低的水平,得到最优水平组合为:水温 25~25.5℃时,精卵混合 10 min, 6-DMAP 浓度 600 μmol/L, 诱导持续时间 15 min. 该组合的三倍体诱导率有待实验。

2.3 三因素各水平平均数的 Tukey 法两两比较

三因素的各水平平均数标准差相等,其值为:

$$S = (\text{误差均方} / \text{水平数} \cdot \text{平行重复数})^{1/2} = (10.05 / 4 \cdot 2)^{1/2} = 1.12$$

$$\text{最小显著 D 值: } D_{0.05}(3, 16) = q_{0.05}(3, 16) \times S = 3.65 \times 1.12 = 4.09$$

$$D_{0.01}(3, 16) = q_{0.01}(3, 16) \times S = 4.78 \times 1.12 = 5.35$$

根据最小显著 D 值,通过 A、B 二因素各水平平均数两两比较的差数,进行 Tukey 法两两比较(表 2)。

经检验:A、B 二因素中,第一与其它三水平间的差异极显著, $P < 0.01$; 第二、第三和第四水平间差异不显著。C 因素中,第一与第二水平间差异显著, $P < 0.05$; 其它水平间差异不显著。

表2 A 和 B 二因素各水平平均数两两比较的差数

Tab. 2 The margins compared between averages of every two levels of factor A and B

比较的水平	A 因素	B 因素	C 因素
1.2 水平	13.44 **	7.82 **	4.62 *
1.3 水平	14.06 **	9.13 **	3.43
1.4 水平	16.50 **	7.82 **	2.18
2.3 水平	0.56	1.31	1.19
2.4 水平	3.06	0.00	2.44
3.4 水平	2.44	1.31	1.25

3 讨论

牡蛎三倍体的诱导方法很多,如细胞松弛素 B [Allen Jr 等 1986, Downing 1989]、高温休克 [Yamamoto 和 Sugawara 1983]、低温休克 [梁英等 1994]、热休克+咖啡因 [山本敏 1989]、水静压 [Chaiton 和 Allen 1985, Allen Jr 等 1986]、细胞融合 [Guo 等 1988, 1989] 和电脉冲 [Cadoret 1992] 等方法。其中,细胞松弛素 B 的三倍体诱导率最高,最高达 100% [Allen Jr 等 1986, Downing 1989]; 但该药物毒性大、致癌、价格昂贵和难水溶,从而应用和发展受到一定的限制。

6-DMAP 是一种嘌呤毒素类似物 [Rime 等 1989], 由于它诱导蛋白质进行去磷酸化作用, 所以可抑制极体的形成 [Neant 和 Guerrier 1988]。用 6-DMAP 抑制太平洋牡蛎受精卵第二极

体的释放, 最高得到 93.8% 的三倍体诱导率(田传远 1998); 在产业化生产中, 最高达到 90.46%(王如才 1998)。由于 6-DMAP 无毒、较细胞松弛素 B 便宜、易水溶, 也有较高的三倍体诱导率, 因此, 在诱导三倍体方面表现出较大的优越性。

由表 1 可以看出, 150~600 μ mol/L 的 6-DMAP 都可抑制受精卵第一极体的释放, 并产生三倍体。但最优水平组合选取 6-DMAP 的浓度为 600 μ mol/L。这个结果与诱导时的水温、诱导时机、诱导持续时间和精卵成熟度及其同步性有关。

对于一批精卵, 其受精的速度和受精卵释放第一极体的时间, 与精卵成熟度、受精同步性、受精环境(如温度、pH 等)和受精方式都有较大的关系。在多倍体生产实际中, 精卵取自成熟度不可能相同的亲贝群, 需要处理的受精卵的数量很大, 精卵的成熟度存在一定程度的差异, 受精的速度也不同。这是本实验三倍体诱导率较低的重要原因之一。

由此可见, 三倍体诱导结果除受实验所选因素的影响外, 还受它们间的交互效应、水温、精卵成熟度和受精同步性等的影响。在三倍体诱导工作中, 所有这些影响因素都需综合考虑。

诱导持续时间对三倍体诱导率的影响不显著, 但对 D 形幼虫畸形率的影响则极显著(田传远等 1998)。所以, 在把握有效的诱导时机的前提下, 需考虑诱导持续时间对 D 形幼虫畸形率的影响, 这是提高三倍体总体产量的重要保证。

本文初稿承蒙刘长安教授审阅, 在此谨表感谢。

参 考 文 献

- 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
- 梁 英, 王如才, 田传远等. 1994. 三倍体大连湾牡蛎的初步研究. 水产学报, 18(3): 237~240
- 山本敏. 1989. マガキ三倍体作出法の改良と养殖への应用. 养殖, 6: 134~137
- Allen S K Jr, H Hidu, J G Stanley. 1986. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). Biol Bull, 170: 198~210
- Cadoret J P. 1992. Electric field-induced polyploidy in mollusc embryos. Aquaculture, 106: 127~139
- Chaiton J A, S K Allen. 1985. Early detection of triploidy in the larvae of pacific oysters *Crassostrea gigas* by flow cytometry. Aquaculture, 48: 35~43
- Desrosiers R R, Gerard A, Peignon J M, et al. 1993. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. J Exp Mar Biol Ecol, 170(1): 29~43
- Downing S L. 1989. Hybridization triploidy and salinity effects on crosses with *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. J Shellfish Res, 8(2): 447
- Gerard A, Naciri Y, Peignon J M, et al. 1994. Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquac Fish Manage, 25(7): 709~719
- Guo X, Hershberger W K, Chew K K, et al. 1988. Cell fusion in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Tetraploids produced by blastomere fusion. J Shellfish Res, 7(3): 549~550
- Guo X, Hershberger W K, Chew K K, et al. 1989. Cell fusion in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I. Formation of polyploid cells via oocyte fusion. J Shellfish Res, 8(1): 321

(1) 王如才. 1998. 863 海洋生物技术主题重大项目检测会: 三倍体太平洋牡蛎加温育苗情况汇报.

(2) 田传远. 1998. 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体. 4. 三倍体诱导率与孵化率和 D 形幼虫畸形率的关系.

- Neant I, Dufresne L, Morasse J, et al. 1994. The release from metaphase arrest in blue mussel oocytes. *Int J Dev Biol*, 38(3): 513~523
- Neant I, Guerrier P. 1988. Meiosis reinitiation in the mollusc *Patella vulgata*; Regulation of MPF, CSF and chromosome condensation activity by intracellular pH, protein synthesis and phosphorylation. *Development*, 102(3):505~516
- Nell J A, Hand R E, GOARD L J, et al. 1996. Studies on triploid oysters in Australia; Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for triploidy induction in sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Aquac Res*, 27(9): 689~698
- Rime H, Neant I, Guerrier P, et al. 1989. 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP); A reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Developmental Biology*, 133(1): 169~179
- Scarpa J, Vaughan D E, Longley R. 1995. Induction of triploidy in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, using 6-DMAP. Triennial Meeting of Fish Culture Section of American World Aquaculture Society, Nation Shellfisheries Association, 14(1): 277
- Yamamoto S, Sugawara Y. 1988. Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture*, 72: 21~29

TRIPLOID OF *CRASSOSTREA GIGAS* INDUCED WITH 6-DIMETHYLAMINOPURINE; BLOCKING POLAR BODY I

TIAN Chuan-Yuan, LIANG Ying, WANG Ru-Cai, YU Rui-Hai, WANG Zhao-Ping
(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT From 1996 to 1997, experiments were carried out to induce triploid in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by inhibiting release of polar body I of the zygotes with 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). $L_{16}(4^5)$ design was selected to engage in orthogonal experiment of three factors and four levels; the four levels of 6-DMAP concentration were 150, 300, 450 and 600 $\mu\text{mol/L}$, respectively; the induced occasion (the time after sperms and eggs confused) was 10, 15, 20 and 25 min, respectively; and the induced duration was 10, 15, 20 and 25 min, respectively. Experiments were repeated twice. The highest induced ratio was $(71.3 \pm 1.2)\%$, the embryonic hatching ratio of this experiment group was $(55.5 \pm 3.1)\%$, and the abnormality of D-shape larvae was $(10.7 \pm 1.6)\%$. The results calculated by direct analysis indicated that the best level combination of inducing factors for triploid in Pacific oyster was 25—25.5 $^{\circ}\text{C}$ water temperature, at 10 min after sperms and eggs confused and the fertilized eggs were rinsed continuously in sea water with 600 $\mu\text{mol/L}$ 6-DMAP, the treatment duration is 15 min. The sequence of three factors for deciding triploid was: 6-DMAP concentration \rightarrow induced occasion \rightarrow induced duration. The influence of the factor 6-DMAP concentration on the triploid was very obvious, but the influences of the factors induced occasion and induced duration were not obvious.

KEYWORDS *Crassostrea gigas*, Triploid induce, 6-DMAP, Zygotes, Polar body I, Blocking