

文章编号:1005-8737(2000)01-0110-03

·研究简报·

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

Triploid *Crassostrea gigas* induced with 6-DMAP: the influences of
3 factors on hatching rate and D-shaped larvae abnormality rate

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

TIAN Chuan-yuan, LIANG Ying, WANG Ru-cai, WANG Zhao-ping, YU Rui-hai
(Fisheries College Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

关键词: 太平洋牡蛎; 三倍体; 诱导; 孵化率; D 形幼虫; 畸形率; 6-DMAP; 诱导因素

Key words: *Crassostrea gigas*; triploid; induce; hatching rate; D-shaped larvae; abnormality rate; 6-DMAP; induction factors

中图分类号: Q959.223

文献标识码: A

太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)三倍体 D 形幼虫及其后阶段的生长和存活方面的研究已有较多报道^[1~4], 但有关牡蛎三倍体各诱导因素对孵化率和 D 形幼虫畸形率的研究尚少见报道。我们于 1996~1997 年度, 在进行 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体的同时, 开展了这方面的研究, 旨在为三倍体诱导的技术储备提供必要补充。

1 材料与方法

1.1 实验材料

太平洋牡蛎取自荣城市桑沟湾海区; 壳长 (9.6 ± 1.3) cm; 肉眼观察, 性腺发育良好。

6-二甲基氨基嘌呤(6-Dimethylaminopurine, 本文简称 6-DMAP) 的分子式为 $C_7H_9N_5$, 相对分子质量 163.2, 药品纯度高于 98%。

1.2 获取精卵和受精的方法

解剖法获取精卵, 人工授精。

1.3 实验设计

取 3 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 的正交设计: 6-DMAP 浓度 A, 设 300、450 和 600 $\mu\text{mol/L}$; 诱导时机(静止状态出现 PBI 的受精卵的百分率)B, 设 10%、30% 和 50%; 诱导持续时间 C,

设 10、15 和 20 min。平行重复 3 次, 共 27 个实验组。对实验组结果进行直观分析。

1.4 孵化率与 D 形幼虫畸形率统计

每组随机镜检 60~80 个 D 形幼虫(含畸形个体)或胚胎, 统计孵化率和 D 形幼虫畸形率。

2 结果与讨论

2.1 3 因素对孵化率和 D 形幼虫畸形率的影响程度

由直观分析结果(表 1)中的极差 R 值可以看出, 3 因素对孵化率影响的顺序依次为: 诱导持续时间→诱导时机→6-DMAP 浓度。各因素的 R 值皆小于空列 R_e 值, 说明 3 因素对孵化率的影响不显著。但诱导持续时间对孵化率的影响最大, 这一点与 Desrosiers^[5] 的结论一致。可见, 缩短诱导持续时间可以提高孵化率。

3 因素对 D 幼畸形率的影响顺序为: 6-DMAP 浓度→诱导持续时间→诱导时机。3 因素中只有 6-DMAP 浓度对 D 幼畸形率影响显著, 其它因素的影响不显著。可见, 6-DMAP 诱导三倍体的同时, 对胚胎也造成了一定的毒害。6-DMAP 是一种蛋白激酶抑制剂^[6,7], 是影响磷酸激酶作用的嘌呤毒素类似物^[8]; 当 6-DMAP 与微管蛋白二聚体结合以后, 对微管的正常结构和功能起到了抗有丝分裂的作用; 因此, 可以产生三倍体, 但同时又对受精卵产生毒性。可以说, 这种毒性发生在受精卵, 潜伏在胚胎期, 但在 D 形幼虫的初期开始表现出来。有关 6-DMAP 作用于受精卵产生三倍体及其对受精卵的毒性机理尚待研究。

收稿日期: 1998-06-05

基金项目: 国家高新技术研究发展计划资助项目(863-819-01-01)

作者简介: 田传远(1966-), 男, 山东枣庄人, 青岛海洋大学讲师, 硕士, 从事贝类遗传育种研究。

6-DMAP 的诱导效果包括诱导率、孵化率和 D 形幼虫畸形率等方面的综合指标。实践证明,离体促熟和洗卵的措施可提高精卵成熟的同步性和质量^[9],使 6-DMAP 在较短

的时间里对批量受精卵产生的有效作用大;因此,这种措施既可较大程度地提高三倍体诱导率,又可提高孵化率和降低 D 形幼虫畸形率。

表 1 孵化率和 D 幼畸形率结果和直观分析*

Table 1 Hatching rates, D-shaped larvae abnormality rates and intuitive analysis results

试验号 No.	6-DMAP 浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Concentration	诱导时机/% Inducing moment	持续时间/min Inducing time	D	孵化率/% Hatching rate D 幼畸形率/% D-shaped larvae abnormality rate			$X = X_1 + X_2 + X_3$
					X_1	X_2	X_3	
1	1(300)	1(10)	1(10)	1	74.7	50.0	70.0	194.7
					20.0	17.6	14.3	51.9
2	1	2(30)	2(15)	2	55.7	51.4	77.5	184.6
					23.5	47.4	25.5	96.4
3	1	3(50)	3(20)	3	90.6	59.3	73.5	223.4
					20.7	15.6	16.0	52.3
4	2(450)	1	2	3	61.8	63.2	74.3	199.3
					14.1	20.8	23.1	58.2
5	2	2	3	1	46.5	47.5	48.6	132.6
					17.5	32.1	40.6	90.2
6	2	3	1	2	52.6	56.4	66.1	175.1
					32.9	25.0	18.9	76.8
7	3(600)	1	3	2	83.3	68.4	65.7	217.4
					62.3	69.2	65.2	196.7
8	3	2	1	3	71.4	81.5	81.0	233.9
					43.3	21.6	17.6	82.5
9	3	3	2	1	28.9	36.7	26.7	92.3
					38.5	38.9	33.3	110.7
K_1	66.97	67.93	67.08	46.62				
	22.29	34.09	23.47	28.09				
K_2	56.33	61.23	52.91	64.12				
	25.02	29.90	29.48	41.10				
K_3	60.4	54.53	63.71	72.96				
	43.32	26.64	37.69	21.44				
R	10.63	13.40	14.17	26.33				
	21.03	7.44	14.22	19.66				

* 对照组孵化率为(90.8±1.4)%, D 幼畸形率(15.5±1.7)%, 水温 22.5℃。The embryo hatching rate and D-shaped larval abnormality rate of the control group is (90.8±1.4)% and (15.5±1.7)%, respectively. Water temperature 22.5℃

2.2 D 形幼虫畸形率与孵化率的关系

对每个实验组合得到的孵化率(X)和 D 幼畸形率(Y)作相关分析,得出相关方程(图 1)。所以,D 形幼虫畸形率与孵化率间呈不显著的负相关。这一点与“三倍体诱导率和孵化率呈不显著的负相关和 D 幼畸形率呈显著的正相关”^[10]的结论一致。

可见,在一定的有效的范围里,较高浓度的 6-DMAP 产生较高三倍体诱导率的同时,对受精卵造成的毒性也随之加强,这种现象表现为孵化率低和 D 幼畸形率上升。

由于本实验的交互效应, e_1 极显著地大于实验误差 e_2 ;说明孵化率和 D 形幼虫畸形率除受诱导 3 因素的影响外,还受交互效应及诱导时的水温、pH、精卵成熟度和受精同步性等因素的影响。进一步研究这些因素对孵化率和 D 形幼虫畸形率影响的方式和大小,对完善多倍体育种工作、提高多

倍体总体产量和经济效益有实际意义。

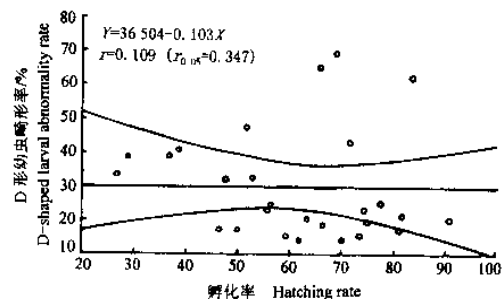


图 1 D 形幼虫畸形率与孵化率的相关关系

Fig. 1 The correlativity between D-shaped larval abnormality rate and hatching rate

参考文献:

- [1] Cooper K, ET AL. Polyploid Pacific oysters produced by inhibiting polar I and II with cytochalasin B[J]. J Shellfish Res, 1989, 8(2):412.
- [2] Downing S L, et al. Induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature[J]. Aquaculture 1987, 61:1-15.
- [3] Downing S L. Hybridization triploidy and salinity effects on crosses with *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* [J]. J Shellfish Res, 1989, 8(2):447.
- [4] Quillet E, et al. Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Aquaculture, 1986, 57:272-279.
- [5] Desrosiers R R, 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] Neant I, et al. DNA replication initiation by 6 - DMAP treatment in maturing oocytes and dividing embryos from marine invertebrates [J]. Molecular Reproduction and Development, 1996, 44(4):443-451.
- [7] Todorovic V, et al. Novel DNA - binding protein from *Drosophila* embryos identified by binding site selection [J]. FEBS Letters, 1996, 396(1):99-102.
- [8] Rime H, et al. 6 - Dimethylaminopurine (6 - DMAP): A reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte [J]. Developmental Biology, 1989, 133(1):169-179.
- [9] 王昭萍, 等. 维生素及海水浸泡对牡蛎卵子的体外促熟作用 [J]. 海洋湖沼通报, 1997, 2:70-75.
- [10] 田传远, 等. 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 [J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(3):421-425.