

6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体 ——抑制受精卵第二极体释放*

田传远 王如才 梁 英 王昭萍 于瑞海

(青岛海洋大学水产学院, 青岛 266003)

摘 要 于1996~1997年,用6-DMAP抑制太平洋牡蛎受精卵第二极体的释放,诱导产生三倍体,最高诱导率为93.8%。该实验组胚胎孵化率为81.0%,D形幼虫畸形率为17.6%。实验选用 $L_9(3^4)$ 设计,进行三因素三水平的正交试验:6-DMAP浓度,设300、450和600 $\mu\text{mol/L}$ 等三水平;诱导时机(观察静止状态的受精卵,以受精卵出现第一极体的百分率指示),设10%、30%和50%等三水平;诱导持续时间,设10、15和20 min等三水平,试验设三次重复。解剖法获取精卵,人工授精。染色体倍性检查采用染色体计数法。根据正交试验直观分析结果,得出诱导太平洋牡蛎三倍体各因素的最优水平组合:当30%受精卵出现第一极体时,将受精卵浸泡在含6-DMAP 450 $\mu\text{mol/L}$ 的海水中10 min;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的浓度和诱导时机对三倍体诱导率的影响显著;但诱导持续时间影响不显著。部分试验组得到4.2%~13.6%的四倍体和10%左右的非整倍体,这种情况可能与受精不同步抑制第一极体释放而导致的染色体多极分离有关。

关键词 太平洋牡蛎,三倍体诱导,6-DMAP,受精卵,第二极体,抑制

关于牡蛎三倍体理化诱导技术的研究开始得较早^[1],迄今已研究出许多诱导方法^[2~5],在世界范围和我国一些地区都已取得了卓越的成绩。本研究在过去同类研究^[6,7]的基础上,于1996~1997年采用抑制受精卵第二极体释放的方法,诱导太平洋牡蛎产生三倍体。对实验的方法和结果,分别进行三倍体研究、各诱导因素及其水平对胚胎孵化率和D形幼虫畸形率与三倍体诱导率关系的研究和四倍体研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*) 取自荣成市桑沟湾镇海区,壳长 (9.6 ± 1.3) cm。

1.1.2 6-二甲基氨基嘌呤(6-Dimethyl-

laminopurine,简称6-DMAP) 购自美国SIGMA公司。分子式: $C_7H_9N_5$,分子量163.2,药品纯度高于98%。

1.2 方法

1.2.1 受精 解剖法获取精卵,人工授精。对解剖出的精卵进行离体促熟和洗卵处理。

1.2.2 三倍体诱导 用6-DMAP抑制受精卵第二极体释放的方法诱导太平洋牡蛎产生三倍体。

1.2.3 正交试验 选用 $L_9(3^4)$ 设计^[8],进行三因素三水平的正交试验。6-DMAP浓度A,设300、450和600 $\mu\text{mol/L}$;诱导时机B(以受精卵静止状态下出现第一极体的百分率指示),设10%、30%和50%;诱导持续时间C,设10、15和20 min等三水平。试验平行重复3次。决定三倍体诱导率的三因素主次顺序和最优水平组合以直观分析法得出,并进行两两比较的Tukey法分析。

1.2.4 染色体制片和倍性检查 在胚胎阶段用常

收稿日期:1997-08-25

* 国家高技术研究发展计划项目,863-819-01-01

规方法制片和染色。染色体倍性检查用染色体计数法;每实验组计数 60~80 个染色体清晰可辨的胚胎,实验设 $2N=20\pm 2$, $3N=30\pm 3$ 和 $4N=40\pm 4$ 。

2 结果

2.1 影响三倍体诱导率的三因素主次顺序和最优水平组合

根据直观分析(表 1)中的极差 R 值,可看出影响因素的主次顺序是: $A\rightarrow B\rightarrow C$ 。

表 1 太平洋牡蛎三倍体($3N$)诱导率的正交试验(3 次重复)结果及直观分析*

Table 1 Results of orthogonal test and intuitive analysis of triploidy

试验号	A/ No($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	B/ %	C/ min	D	三倍体诱导率/%			$X = X_1 + X_2 + X_3$
					X_1	X_2	X_3	
1	1(300)	1(10)	1(10)	1	20.4	30.1	34.5	85.0
2	1	2(30)	2(15)	2	74.7	75.2	85.1	235.0
3	1	3(50)	3(20)	3	28.6	36.4	28.6	93.6
4	2(450)	1	2	3	81.0	59.1	76.0	216.1
5	2	2	3	1	84.0	84.6	90.9	259.5
6	2	3	1	2	74.1	76.9	68.6	219.6
7	3(600)	1	3	2	70.8	85.7	81.8	238.3
8	3	2	1	3	89.7	87.9	93.8**	271.4
9	3	3	2	1	54.5	55.6	66.7	176.8
k_1	45.96	59.93	64.00	57.92				
k_2	77.24	85.10	69.77	76.99				
k_3	76.28	54.44	65.71	64.57				
R	31.29	30.66	5.77	19.07				

注: * 各实验组出现 10% 左右的非整倍体。About 10% aneuploidy was found averagely in every experimental group.

** 该实验组孵化率 81.0%, D 形幼虫畸形率 17.6%。The embryo hatch rate and D-shaped larval abnormality rate of this experimental group are 81.0% and 17.6%, respectively.

根据三倍体诱导率随各因素水平变化的图示(图 1), A 和 B 因素折线图上的直线陡度大,说明二者对 $3N$ 诱导率影响大,即主要因素, C 因素为次要因素。

取可靠性大的主要因素中的最好水平,次要因素取 D 形幼虫畸形率最低的水平,得到最优水平组合为: 6-DMAP 的浓度 $450\mu\text{mol/L}$, 诱导时机界定在出现第一极体的受精卵达到 30% 时刻, 诱导持续时间为 10 min。

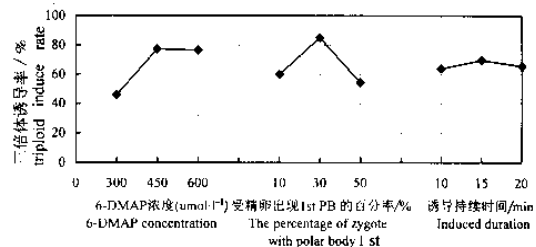


图 1 三因素及其水平对三倍体诱导率的效应

Fig. 1 Effects of the 3 factors and 3 levels on the inductivity of triploidy

2.2 显著因素 A 和 B 的各水平平均数的两两比较

本文采用 Tukey 法。

A 因素与 B 因素的三水平平均数标准差相等, 其值为:

$$S = (\text{误差均方} / \text{各水平重复数} \cdot \text{平行重复数})^{1/2} = (42.81/3 \cdot 3)^{1/2} = 2.18$$

最小显著 D 值:

$$D_{0.05}(3, 18) = q_{0.05}(3, 18) \times S = 3.61 \times 2.18 = 7.87$$

$$D_{0.01}(3, 18) = q_{0.01}(3, 18) \times S = 4.70 \times 2.18 = 10.25$$

经过对 A 和 B 二因素每两两水平平均数 k 的比较, 得到它们的差数, 见表 2。

表 2 A 和 B 二因素各水平平均数两两比较的差数

Table 2 Margins between averages of every levels of factor A and B

水平两两比较 comparison between 2 levels	A 因素 factor A	B 因素 factor B
1, 2 水平 level 1 and 2	31.29**	25.17**
1, 3 水平 level 1 and 3	30.32**	5.38
2, 3 水平 level 2 and 3	0.97	30.66**

经检验, A 因素中第二、第三与第一水平间的差异极显著, $P < 0.01$; 第二与第三水平间差异不显著。B 因素中第一与第三水平间差异不显著; 第二与第一、第三水平间的差异极显著, $P < 0.01$, 与直观分析法得到的结论一致。

3 讨论

3.1 6-DMAP 的优点

三倍体太平洋牡蛎诱导方法很多, 如水静

压^[9]、温度休克^[10]、电脉冲^[11]、热休克结合咖啡因^[12]和细胞松弛素 B^[2]等方法。其中,细胞松弛素 B 诱导产生三倍体的诱导率最高,高者达 100%^[2,3];但该药毒性大、致癌、价格昂贵和难水溶,使其应用和发展受到一定的限制。

近年报道的用 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎能得到 85% 的三倍体诱导率^[5];本试验用 6-DMAP 抑制受精卵第二极体释放的方法得到三倍体诱导率最高为 93.8%,胚胎孵化率为 81.0%。由于 6-DMAP 无毒、较细胞松弛素 B 便宜、易水溶,同样有较高的三倍体诱导率,表现出较大的优越性。

3.2 最优组合

在特定诱导温度下,对达到一定成熟度的牡蛎,其三倍体的诱导率主要由 6-DMAP 的浓度和施加诱导的时机决定,诱导持续时间是次要因素,或者说,选择最佳的诱导时机,一定浓度的 6-DMAP 可敏感地诱导受精卵产生三倍体,这是本试验的重要结论之一。

诱导持续时间对胚胎孵化率的影响不显著,但对 D 形幼虫畸形率的影响则极显著(作者,另文报道)。

为此,三倍体诱导率各影响因素最优水平组合的选择标准,本文取可靠性大的主要因素中的最好水平。但选取次要因素的水平时,首先考虑其对胚胎孵化率、尤其对 D 形幼虫畸形率的影响;这样,为节约材料,最优水平组合不取次要因素的最好水平,而取其中 D 形幼虫畸形率最低的水平。

3.3 非整倍体现象

实验过程中,所有实验组皆出现不同比例的非整倍体,其原因可能与因受精不同步必然出现的抑制第一极体释放而导致的染色体多极分离有关^[13]。在鲍多倍体诱导方面,非整倍体的现象与成熟度有关^[1];但牡蛎非整倍体的产生与成熟度的关系尚未见报道。

非整倍体现象在整个无脊椎动物亚界中比较常见,研究其形成的机制将对无脊椎动物的多倍体育种具有实际意义。

3.4 诱导时机的把握

根据受精卵出现第一极体的数量来把握施加诱导的时机,得到的三倍体诱导率具较好的稳定性。

由于试验的交互效应 e_1 极显著地大于试验误

差 e_2 ,说明本试验的结果除受试验所选因素的影响外,还受它们之间的交互效应或其它因素(如诱导水温、精卵成熟度和受精的同步性等)的影响。为此,这些影响因素在三倍体诱导中,都需综合考虑。

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(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,精卵的成熟度存在一定程度的差异,需要处理的受精卵数量很大。此时,在三倍体诱导操作过程中,如以精卵混合后的时间作为施加诱导的时机,得到的三倍体诱导率往往具有较大的随机性,很不稳定。本文通过观察受精卵出现第一极体的数量来把握施加诱导的时机,能够得到较稳定的三倍体诱导率,可以此指导生产。

致谢:初稿承蒙刘长安教授审阅,在此谨表感谢。

参 考 文 献

- 1 Stanley J G, Allen S K Jr, H Hidu. Polyploidy induced in the American oyster *Crassostrea virginica* with cytochalasin B. *Aquaculture*, 1981, 23: 1-10
- 2 Allen S K Jr, H Hidu, Stanley J G. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Biol Bull*, 1986, 170: 198-210
- 3 Downing S L. Hybridization triploidy and salinity effects on crosses with *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. *J Shellfish Res*, 1989, 8(2): 447, Abstract only
- 4 Downing S L, Allen S K Jr. Induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 1987, 61: 1-15
- 5 Gerard A, et al. Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquacult Fish Manage*, 1994, 25(7): 709-719
- 6 吕隋芬,王如才.细胞松弛素 B 诱导栉孔扇贝产生三倍体的研究. *海洋湖沼通报*, 1992, 2: 40-45
- 7 梁 英,王如才,田传远等.三倍体大连湾牡蛎的初步研究. *水产学报*, 1994, 18(3): 237-240
- 8 徐继初.生物统计及试验设计(第二次印刷).北京:农业出版社, 1994. 176-185
- 9 Chaiton J A, Allen S K. Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters *Crassostrea gigas* by flow cytometry. *Aquaculture*, 1985, 48: 35-43
- 10 Yamamoto S, Y Sugawara. Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture*, 1988, 72: 21-29
- 11 Cadoret J P. Electric field-induced polyploidy in mollusc embryos. *Aquaculture*, 1992, 106: 127-139
- 12 山本 敏.マガキ三倍体作出法の改良と繁殖への応用. *养殖*, 1989, 6: 134-137

1) 孙振兴.皱纹盘鲍多倍体的生物学基础研究.[博士论文].青岛:青岛海洋大学, 1997

Triploidy of *Crassostrea gigas* induced with 6-DMAP: by blocking the second polar body of the zygotes

Tian Chuanyuan Wang Rucai Liang Ying Wang Zhaoping Yu Ruihai
(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

Abstract From 1996 to 1997, a number of experiments were undertaken to induce triploid of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* by blocking the second polar body of the zygotes with 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP). $L_9(3^4)$ design was selected to engage in orthogonal experiment of 3 factors and 3 levels: the 3 concentrations of 6-DMAP were 300, 450 and 600 $\mu\text{mol/L}$; the 3 levels of induced occasion (the percentage of zygotes with polar body I when observing the zygotes in still) were 10%, 30% and 50%; and the 3 levels of induced duration were 10, 15 and 20 min, respectively. Each experiment was repeated 3 times. Sperms and ovums were obtained with anatomy method, ripen in vitro. Ovums were washed and inseminated artificially. Ploidy was identified by chromosome counts. The results indicated that the highest inductivity of triploid is 93.8%; the hatch rate is 81.0% and the percentage of abnormal D-shaped larvae is 17.6%. The sequence of the 3 decisive factors is as follows: induced occasion, the concentration of 6-DMAP, and the duration of treatment. The induced occasion and the concentration of 6-DMAP are main factors; and the duration is secondary factor. The optimal conditions of treatment is the 6-DMAP concentration of 450 $\mu\text{mol/L}$, the induced occasion when 30% of zygotes presenting polar body I, and the duration of 10 min. We also obtained 4.2% ~ 13.6% tetraploids and 10% aneuploid in the experiment. The reasons maybe relate to the multipolarity of chromosomal aberration.

Key words *Crassostrea gigas*, triploid induce, 6-DMAP, zygotes, polar body II, blocking