

6-DMAP诱导马氏珠母贝三倍体* Induction of Triploid Pearl Oyster (*Pinctada martensii* D.) Using 6-DMAP

王爱民 阎冰 叶力 苏琼
Wang Aimin Yan Bing Ye Li Su Qiong

(广西海洋研究所 北海 536000)

(Guangxi Institute of Oceanology, Beihai, Guangxi, 536000)

摘要 用6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP)抑制马氏珠母贝(*Pinctada martensii* Dunker)受精卵的极体释放获得三倍体。在26℃条件下,进行了不同浓度梯度的6-DMAP(40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L)和不同的处理持续时间(5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min)的诱导实验,抑制第一和第二极体的三倍体诱导率最高分别达32.4%和57.7%。随着处理强度的加大,三倍体诱导率增高,但孵化率降低。结合三倍体诱导率和幼虫孵化率,以6-DMAP浓度80 mg/L,处理持续时间10 min最好。

关键词 6-二甲基氨基嘌呤(6-DMAP) 马氏珠母贝 三倍体

中图分类号 S 968.326.9; Q 343.244

Abstract 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP) was used for inhibiting polar body of the zygotes to induce triploid pearl oyster (*Pinctada martensii* D.). At 26°C, triploid induction trails were carried out using 6-DMAP treatment at different concentration (40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L) and different treatment duration (5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min). The highest induction rate of 1 pb-triploid and 2pb-triploid were 32.4% and 57.7%. Along with the increase of the treatment intensity the induction rate of triploid increased and the hatching rate reduced. Combining to the induction rate of triploid and hatching rate, the best treatment concentration of 6-DMAP was 80 mg/L and the best treatment duration was 10 min.

Key words 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), *Pinctada martensii* (D.), triploid

自Stanley^[1]用细胞松弛素B(Cytochalasin B,简称C.B)处理美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的受精卵获得多倍体以来,已有30余种海水贝类进行了多倍体的诱导^[2]。其中有的已进入实用阶段,如美国海岸公司已把三倍体太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)用于商业生产。有关马氏珠母贝三倍体理化诱导技术的研究正在深入地展开,姜卫国^[3]、Wada^[4]、Durand^[5]、Y-P Shen^[6]等均获得了三倍体马氏珠母贝。目前,一般认为采用C.B诱导效果较好,但C.B价格昂贵且对人体有害以及其废液对环境造成污染。近年来有研究人员用6-二甲基氨基嘌呤(6-Dimethylaminopurine, 6-DMAP)替代C.B作三倍体诱导剂已在几种贝类获得良好结果^[7-9]。这种新的诱导剂对人体无害且价格便宜,据此我们使用6-DMAP对马氏珠母贝进行了三倍体诱导。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用马氏珠母贝采自广西北海市侨港镇,2龄~3龄。每次实验选用雌贝3个~4个,雄贝2个~3个。6-DMAP为美国Sigma公司产品。

1.2 方法

1.2.1 授精

用剖取法获得精卵,卵子在海水中浸泡40 min~60 min并换水洗卵2次,0.06‰氨海水中授精,放于25μm筛绢网中过滤海水孵化。每次实验前每个雌亲贝取少量卵子做预备实验,取质量好,成熟度高及发育同步性高的卵子进行实验。

1.2.2 6-DMAP处理

在过滤海水中将6-DMAP配成浓度分别为40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L和120 mg/L处理后提起筛绢网在新鲜海水中浸洗2次,并轻轻搅拌,然后将受精卵置于新鲜海水中让其继续发

1998-12-15收稿,1999-03-29修回。

* 国家“九五”重点科技项目(攻关)计划(96-C01-05-03)和广西科技攻关项目(桂科攻 9724076)资助。

育,对照组除不用6-DMAP外与实验组操作相同。抑制第1极体释放在授精后5 min进行,抑制第2极体释放在授精后18 min进行,处理持续时间分别为5 min、10 min、15 min、20 min和25 min。每次处理卵量为2万个/mL~4.3万个/mL。

1.2.3 人工育苗

根据三倍体诱导率和孵化率得出6-DMAP处理的最适浓度和最适处理持续时间,分别在授精后5 min、18 min用80 mg/L的6-DMAP持续处理10 min,进行两个处理组和对照组的育苗,以培育出抑制第1极体释放而形成的三倍体(第1极体三倍体)和抑制第2极体释放而形成的三倍体(第2极体三倍体)。按照常规方法进行幼虫和幼苗的培育^[10]。授精在10 L玻璃缸中进行,当发育至D形幼虫时,对照组和抑制第1极体组移入100 L塑料桶中,抑制第2极体组移入2M³水泥池中,待贝苗壳长2 mm左右时收苗下海,6个月后检测成贝三倍体率。

1.2.4 倍性鉴定

当受精卵发育至担轮幼虫期时,用0.01%秋水仙素处理20 min,50%海淡水、0.075 mol/L KCL依次分别低渗20 min,Garneys氏液固定,50%醋酸解离,50°C温片滴片,Giemsa染色制备染色体标本。成贝剪取一小块鳃组织,于0.06%秋水仙素(70%海淡水配制)中处理90 min~120 min,0.075 mol/L KCL低渗30 min,以后操作与担轮幼虫期制备染色体标本相同。每实验组计数60~80个染色体清晰可辨的分裂相统计三倍体诱导率。本实验设定2N=28±2;3N=42±2。

1.2.5 参数统计

受精率为受精卵占受精卵总数的百分率。孵化率为孵出的D形幼虫占受精卵总数的百分率。三倍体诱导率为担轮幼虫染色体标本的三倍体分裂相占分裂相总数的百分率。

2 结果

2.1 6-DMAP处理起始时间

本实验以90%的受精卵发育到某一阶段时为到达此发育阶段。授精后第9 min出现第1极体,第22 min出现第2极体,第55 min卵裂。

2.2 6-DMAP处理最适浓度

表1为不同浓度6-DMAP抑制第1和第2极体释放诱导三倍体的实验结果。抑制第1极体在授精后5 min开始处理,抑制第2极体在授精后18 min开始处理,处理持续时间为10 min。结果表明,6-DMAP浓度为80 mg/L~120 mg/L时,随着6-DMAP浓度的增加三倍体诱导率增高,第1极体三倍体诱导率

29.7%~32.4%,第2极体三倍体诱导率55.7%。第2极体三倍体诱导率明显高于第1极体三倍体诱导率。二倍体和三倍体的染色体见图1、2。

2.3 6-DMAP最适处理持续时间

表2为6-DMAP不同处理持续时间诱导第1和第2极体三倍体的实验结果。处理起始时间分别为授精后第5 min和第18 min,6-DMAP浓度为80 mg/L。结果表明,当处理持续时间为5 min时,第1和第2极体三倍体诱导率分别为26.7%和48.6%,随着处理持续时间的延长,三倍体诱导率增高。

表1 不同6-DMAP浓度诱导结果

Table 1 The results of 6-DMAP treatments with different concentrations

组别 Group	6-DMAP 浓度 Concentra- tions of 6-DMAP (mg/L)	受精率 Zygote (%)		孵化率 D Larva (%)		三倍体率 Triploid (%)	
		I	II	I	II	I	II
		对照 Control	0	81.6	79.3	28.2	30.3
1	40	87.3	77.4	17.8	23.4	12.8	32.8
2	60	79.8	78.8	16.6	21.3	18.3	46.3
3	80	82.4	80.1	15.9	19.9	29.7	53.6
4	100	84.3	78.5	9.3	12.7	32.4	55.2
5	120	85.1	80.9	7.6	10.2	31.2	55.7

* I 代表抑制第1极体释放组,II 代表抑制第2极体释放组。

I: Inhibiting the first polar body,II: Inhibiting the second polar body.

表2 不同6-DMAP处理持续时间诱导结果

Table 2 The results of 6-DMAP treatments with different treatment duration

组别 Group	处理持 续时间 Treatment duration (min)	受精率 Zygote (%)		孵化率 D Larva (%)		三倍体率 Triploid (%)	
		I	II	I	II	I	II
		对照 Control	0	82.3	85.4	33.2	31.6
6	5	81.0	80.9	18.2	22.4	26.7	48.6
7	10	84.5	83.3	16.7	20.2	30.2	54.1
8	15	83.2	86.2	7.9	11.6	30.8	55.3
9	20	80.4	82.1	3.4	5.1	31.1	57.1
10	25	81.7	84.5	1.3	2.8	30.1	57.7

* I 代表抑制第1极体释放组,II 代表抑制第2极体释放组。I: Inhibiting the first polar body,II: Inhibiting the second polar body.

2.4 6-DMAP处理浓度、处理持续时间与三倍体诱导率和孵化率的关系

从表1中可以看出,随着6-DMAP浓度的增加,三倍体诱导率增高,但增高的幅度逐渐降低,同时孵化率随着6-DMAP浓度的增加而降低,且降低的幅度逐渐增大。当处理浓度从40 mg/L升至120 mg/L

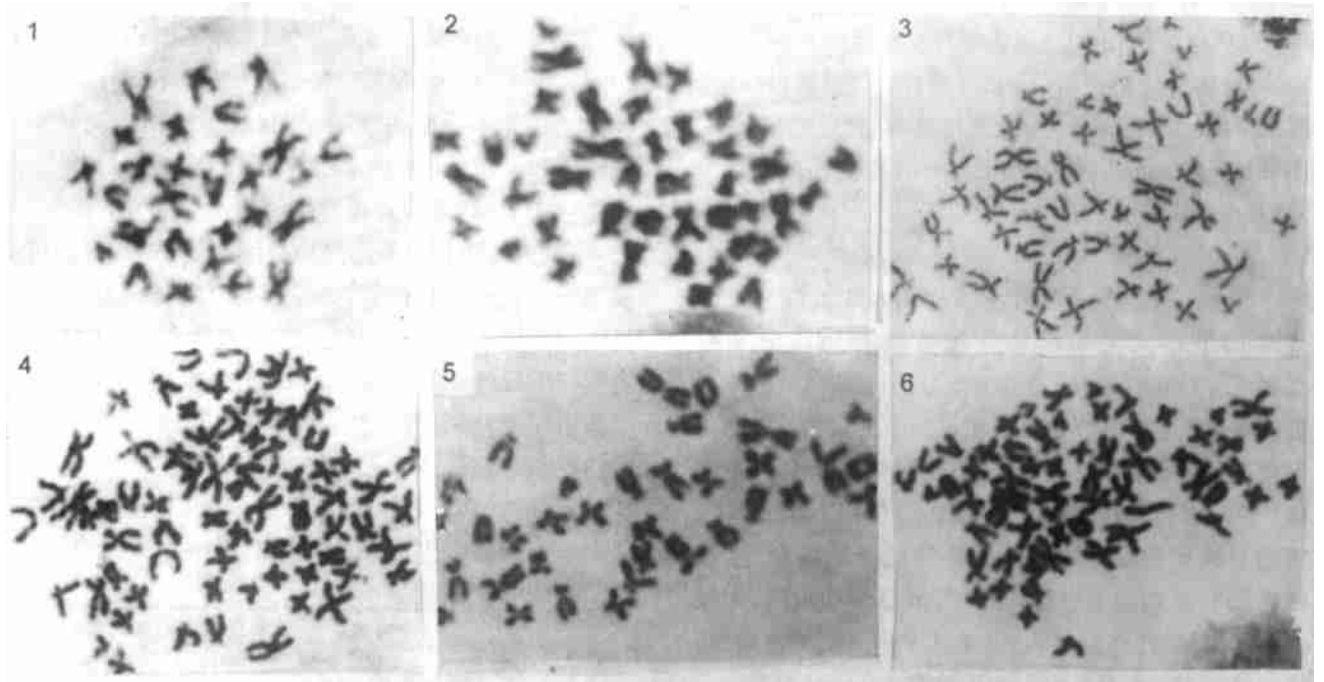


图 1~ 6 马氏珠母贝 (*Pinctada martensii* D.) 担轮幼虫期

Fig. 1~ 6 Trochophora cell's chromosomes of *Pinctada martensii* D.

1. 二倍体分裂相 $2N = 28$; 2. 6-DM AP抑制极体形成的三倍体分裂相 $3N = 42$; 3. 6-DM AP抑制极体形成的四倍体分裂相 $4N = 56$; 4. 6-DM AP抑制极体形成的五倍体分裂相 $5N = 70$; 5, 6. 6-DM AP抑制极体形成的非整倍体分裂相, 染色体条数分别为 35条和 59条. 1. Diploid ($2N = 28$); 2. Triploid ($3N = 42$); 3. Tetraploid ($4N = 56$); 4. Pentaploid ($5N = 70$); 5. Aneuploid ($A = 35$); 6. Aneuploid ($A = 59$).

时 (处理持续时间为 10 min), 第 1 和第 2 极体三倍体诱导率分别从 12. 8% 和 32. 8% 升至 31. 2% 和 55. 7%, 而孵化率则从 17. 8% 和 23. 4% 降低至 7. 6% 和 10. 2%。当 6-DM AP 浓度超过 100mg /L 时, 第 1 极体三倍体诱导率反而下降 (图 7)。从表 2 可知, 随着 6-DM AP 处理持续时间的延长, 三倍体诱导率增高, 孵化率降低, 且增高或降低的幅度逐渐降低或增加。当处理持续时间从 5 min 延长到 25 min 时 (处理浓度为 80 mg /L), 第 1 和第 2 极体三倍体诱导率分别从 26. 7% 和 48. 6% 上升至 30. 1% 和 57. 7%, 孵化率分别从 18. 2% 和 22. 4% 降低至 1. 3% 和 2. 8%。当处理持续时间超过

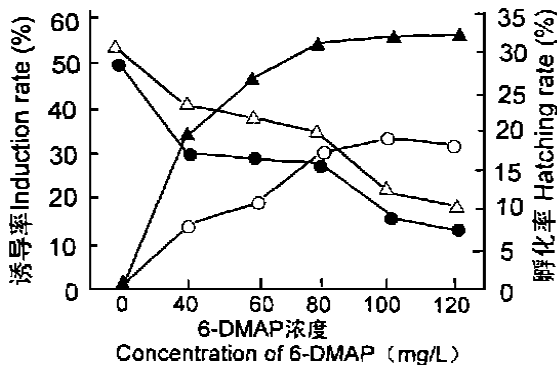


图 7 6-DM AP 浓度与三倍体诱导率及孵化率的关系

Fig. 7 Effect of 6-DMAP concentration on triploid induction and hatching rates

—▲— 诱导率 I Induction rate I ; —○— 诱导率 II Induction rate II ;
—●— 孵化率 I Hatching rate I ; —△— 孵化率 II Hatching rate II .

20 min 时, 第 1 极体三倍体诱导率反而下降 (图 8)。

通过综合考虑三倍体诱导率和孵化率, 从图 7-8 可以看出 6-DM AP 诱导马氏珠母贝三倍体的浓度 80 mg /L, 处理持续时间 10 min 为最适处理浓度和持续时间。

2. 5 育苗及养殖

抑制第 1 极体释放组培育出幼苗 1. 3 万余只, 抑制第 2 极体释放组培育出幼苗 150 万余只, 分别放养于北海市营盘镇三个珍珠养殖场。6 个月后通过鳃细胞染色体制片检测, 第 1 极体三倍体率为 17. 2%, 第 2 极体三倍体率为 37. 8%。

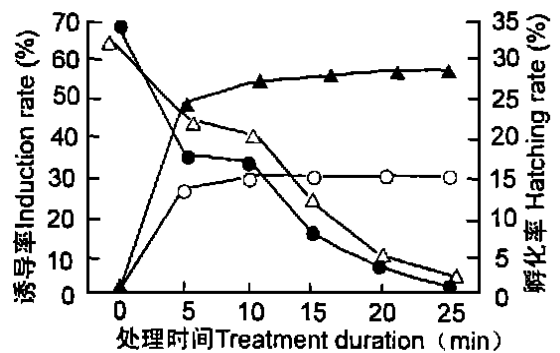


图 8 处理持续时间与三倍体诱导率及孵化率的关系

Fig. 8 Effect of treatment duration on triploid induction and hatching rates

—▲— 诱导率 I Induction rate I ; —○— 诱导率 II Induction rate II ;
—●— 孵化率 I Hatching rate I ; —△— 孵化率 II Hatching rate II .

3 讨论

6-DMAP是一种蛋白激酶抑制剂。我们用6-DMAP诱导马氏珠母贝的受精卵获得了三倍体,在6-DMAP浓度为80 mg/L,处理持续时间为10 min的条件下,第1和第2极体三倍体诱导率分别可达到29.7%和55.7%,孵化率分别为16.7%和20.2%。虽然上属结果与姜卫国^[3]和Wada^[4]等用C.B诱导的结果三倍体诱导率有一定的差距,但孵化率明显高于C.B诱导法,在相应条件下姜卫国等用C.B诱导孵化率分别为7.6%和16.9%。而且6-DMAP不致癌,对人体无毒害并减轻废液对环境的污染,若能进一步提高三倍体的诱导率,6-DMAP有可能替代C.B用于马氏珠母贝三倍体育种生产。

用6-DMAP诱导马氏珠母贝三倍体,在处理持续时间为5 min时(处理浓度为80 mg/L),第1和第2极体三倍体率即可分别达到26.7%和48.6%。随着处理时间的延长,三倍体诱导率增加,但增长幅度递减。此外,每次实验结果都存在着较大的差距,我们发现这与卵子的成熟度和受精卵发育的同步性有密切关系。成熟度好、受精卵发育同步性高的卵子随着处理时间的延长三倍体诱导率增加值低,反之亦然。故我们认为,6-DMAP诱导马氏珠母贝三倍体可能是在短时间内起作用的,处理时间延长三倍体诱导率提高可能是由于受精卵发育不同步引起的。这与田传远^[11]用6-DMAP诱导太平洋牡蛎的结果相一致。较短的处理时间大大有利于提高孵化率。因此用6-DMAP诱导马氏珠母贝三倍体提高卵子的质量和受精卵发育的同步性是至关重要的。我们采用海水浸泡卵子和洗卵等措施对提高卵子的成熟度和受精卵发育的同步性起到了一定的作用,如何进一步提高有待深入的研究。

用6-DMAP诱导马氏珠母贝第1极体三倍体时,当处理浓度超过100 mg/L,持续时间超过20 min时,随着处理强度的加大,三倍体诱导率反而下降,通过担轮幼虫期染色体制片观察发现,诱导产生三倍体的同时亦产生四倍体、五倍体和非整倍体(图3~6)。Guo X^[12]认为,阻止第1极体释放的遗传学结果可能导致染色体的多极分离,所以既可能形成三倍体,又可能形成四倍体;完全阻止两个极体的释放则产生五倍体,在染色体发生多极分离时,如果排出的极体恰

好含有一套染色单体(N),则形成四倍体,如果排出的极体含有其他倍性的染色体,则可能产生任意倍性的非整倍体。在本实验中,处理持续时间达到20 min时即同时抑制了第1和第2极体的释放(受精后22 min释放第2极体),随着处理强度的加大,染色体的行为更复杂,所产生的子代类型更多,这可能是导致三倍体诱导率降低的原因。

参考文献

- 1 Stanley J G, et al. Polyploid induced by the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 1981, 23: 1~10.
- 2 王昭萍,王如才. 海产贝类多倍体育种研究进展. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(3): 399~404.
- 3 姜卫国,李刚. 人工诱导合浦珠母贝多倍体的发生. 热带海洋, 1987, 6(4): 37~45.
- 4 Wada K T, Komaru A, Uchimura A. Triploid Production in the Japanese Pearl Oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture*, 1989, 76: 11~19.
- 5 Durand P, Wada K T, Komaru A. Triploidy induction by caffeine-heat shock in the Japanese pearl oyster. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990, 56(9): 1423~1425.
- 6 Y-P Shen et al. Triploidy induction by hydrostatic pressure shock in *Pinctada martensii* Dunker. *Aquaculture*, 1993, 110: 221~227.
- 7 Desrosiers R R, Gerard A, et al. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-DMAP. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1993, 170(1): 29~43.
- 8 Scarap J, Vaughan D E, Longley R. Induction of triploidy in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, using 6-DMAP. Triennial meeting of fish culture section of American fisheries society world aquaculture society, nation shellfisheries association, 1995, 14(1): 227.
- 9 蔡国雄, A R 鲍蒙特等. 用6-甲氨基嘌呤诱导贻贝四倍体的研究. 热带海洋, 1996, 15(4): 26~30.
- 10 金启增,魏贻尧等. 合浦珠母贝人工育苗的研究. 南海海洋科学集刊. 第3集. 北京: 科学出版社, 1982. 99~109.
- 11 田传远,梁英. 6-DMAP诱导太平洋牡蛎三倍体. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(3): 422~425.
- 12 Guo X, et al. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biol Bull*, 1992, 183: 378~393.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)