

以細胞鬆弛素 B 誘發多倍體牡蠣之研究

孫于璇¹、黃致憲¹、李忠憲²

¹ 財團法人農業科技研究院、² 水產試驗所海水養殖研究中心

三倍體牡蠣在歐美國家相關技術已發展多年，並已進入商業化量產階段，由於全球不同產區分布的牡蠣種類不同，各國多以各自主要生產之牡蠣種類進相關行技術開發，以歐美地區為例，太平洋牡蠣 (*Magallana gigas*) 為其主要生產及技術開發對象。由於歐美國家對多倍體技術開發時間較早，因此在太平洋牡蠣多倍體備製的相關研究也較完整及多元。近年臺灣藉由 DNA 定序技術，重新確認了臺灣所養殖及野生分布的牡蠣並非早年以為的太平洋牡蠣，而是外型與其非常相似的葡萄牙牡蠣 (*Magallana angulata*) (Hsiao et al., 2016)。過去臺灣也嘗試過使用本島牡蠣參照歐美做法進行多倍體牡蠣的生產，但結果仍有改進之空間 (郭等，2018)，而這項發現可能也解釋在不同種間對於多倍體的生產技術及方法仍有所差異，無法依葫蘆畫瓢。

經由人為操作產出三倍體貝類的方法，大致分為環境條件調控的物理方法及以化學藥物進行刺激兩種，其中又以化學刺激較為快速精準，因此成為主流生產做法。化學刺激法主要以細胞鬆弛素 B (cytochalasin B, CB) 及 6-二甲基氨基嘌呤 (6-dimethylaminopurine, 6-DMAP) 兩種藥物處理的效果較好，目前在全球被廣泛被使用，郭等 (2018) 已發表利用 6-二甲基氨基嘌呤誘導葡萄牙牡蠣產生三倍體的研究，因此，本研究將報告使用細胞

鬆弛素 B 誘導葡萄牙牡蠣產生多倍體之初步研究測試。

細胞鬆弛素是一種真菌類分泌的生物鹼，會影響細胞骨架 (cytoskeleton) 網路形成，使得極體的排放受到影響，進而產生不同倍數的個體。細胞鬆弛素 B 抑制極體排放的方法分為兩種，分別為抑制第一極體 (polar body, PB1) 釋放及抑制第二極體 (PB2) 釋放，根據 Eudeline 等 (2000) 指出，抑制 PB1 釋放的最佳下藥時機為第一個 PB1 釋放時，Gerard 等 (1999) 則指出抑制 PB2 的時機為 50% 的 PB1 釋出時間時最佳。本研究觀察葡萄牙牡蠣在 27°C 溫度下的第 1 個 PB1 釋出時間約為受精後 6–8 分鐘 (PF6-8)，而 50% 的 PB1 釋出時間則約在 PF24-28，因此以此做為依據，進行 PB1 及 PB2 抑制方法測試，再分別測試不同的浸泡作用時間下對於三倍體產出效果的差異。

本研究參考陳等 (1996) 牡蠣受精及早期胚胎發育觀察的結果，在水溫 27°C 下極體釋放最集中，故以此作為本試驗之設定溫度。以 PF8、10 及 12 三個下藥時間對受精卵進行 PB1 抑制測試，使用 0.5 mg CB 溶於 1 ml 的 DMSO (二甲基亞砜，dimethylsulfoxide，因 CB 不溶於水，需先溶於 DMSO) 後加入 1 L 海水進行配製，各下藥時間處理組分別浸泡 16、18 及 20 分鐘進行測試。PB2 之抑制方法則以 PF21、26、31 三個時間點設定為

下藥時間，使用 1 mg CB 溶於 1 ml 的 DMSO 後加入 1 L 海水進行配製，分別進行 20 及 25 分鐘使其作用，下藥後 18–24 小時，再經細胞染色處理，以流式細胞儀判定其 3N 誘發的比例，其中 3N 訊號判定的範圍係利用精子 1N 及正常牡蠣細胞 2N 兩者之間的訊號相對位置做判定。

抑制受精卵 PB1 釋出產生 3N 胚胎的結果顯示，PF8 處理組分別作用 16、18 及 20 分鐘誘發率為 15.94–35.81%，PF10 處理組誘發率為 7.47–47.78%，PF12 處理組誘發率則為 8.83–46.30%（圖 1）。

抑制受精卵 PB2 釋出繼而產生 3N 胚胎的結果顯示，PF21 處理組分別作用 20 及 25 分鐘誘發率為 23.09–33.22%；PF26 處理組誘發率為 4.49–25.54%；PF31 處理組誘發率

為 6.55–26.77%（圖 2）。不過很可惜，本試驗雖可達到 10,000 顆以上 3N 幼苗，但於計畫執行期間，幼苗未達附板階段，絕大部分即死亡，僅極少部分可附板（比例極低）。

綜結本試驗結果，在 PB1 及 PB2 以 CB 誘發 3N 牡蠣胚胎的備製方法中，若以適當的條件進行刺激，都有機會產出 30–50% 不等之比例的 3N 幼苗，但各處理組內每次試驗結果均存在著極大的差異，其中原因可能也包含了每次試驗的牡蠣狀態差異。本試驗提供葡萄牙牡蠣進行 3N 誘發的基礎資訊，未來仍可持續大量進行條件測試，在更多的數據佐證下，能確立最佳生產條件，建立國內多倍體牡蠣的生產方式，以提升國內牡蠣產業之商品多樣性及國際競爭力，使得臺灣的牡蠣產業也能迎頭趕上全球趨勢及需求。

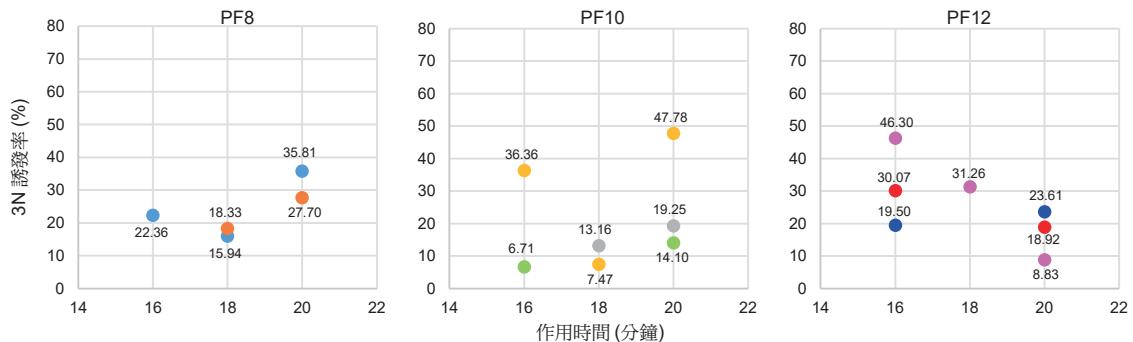


圖 1 以 CB 抑制 PB1 誘發 3N 幼苗產出各處理組（作用 16、18、20 分鐘）之誘發率（相同顏色為同一批處理組）

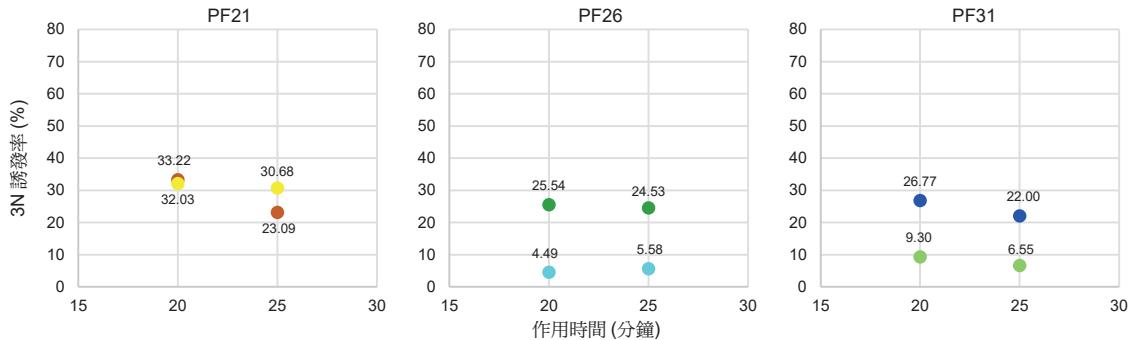


圖 2 以 CB 抑制 PB2 誘發 3N 幼苗產出各處理組（作用 20、25 分鐘）之誘發率（相同顏色為同一批處理組）