

以化學法 6-二甲基氨基嘌呤誘導 三倍體葡萄牙牡蠣之最佳條件

郭裔培、鄭金華、陳紫媖

水產試驗所東港生技研究中心

前言

牡蠣為我國年產值最高的養殖貝類，根據 2016 年漁業統計年報，年產值達 46 億新臺幣；年進口量約 1,300 公噸，主要以生鮮或冷藏的形式進口體型大的單體牡蠣，供應生蠔市場，價格較國內傳統養殖牡蠣高。

三倍體牡蠣具有成長快、體型大、肝醣含量較高、性腺發育小而較無腥味等優點，且因生殖能力差，即使逃逸，對自然環境和野生族群之影響也相對較低。國外有多篇研究報告針對太平洋牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 和維吉尼亞牡蠣 (*Crassostrea virginica*) 進行多倍體生產研究，誘導方法分為物理和化學法抑制減數分裂時的極體釋放。物理法：溫度干擾三磷酸腺苷酶 (ATP synthase)、靜水壓抑制微絲形成；化學法：6-二甲基氨基嘌呤 (6-dimethylaminopurine, 6-DMAP) 干擾蛋白質磷酸化、細胞鬆弛素 B (cytochalasin B, CB) 抑制肌動蛋白、咖啡因提高細胞內鈣離子濃度及秋水仙素 (colchicine) 抑制微管蛋白黏合。

多種多倍體誘導法中，6-二甲基氨基嘌呤和細胞鬆弛素 B 的誘導效果較好，比較兩者，6-二甲基氨基嘌呤無毒性，可直接溶於

水，使用上較為方便且成本較低；細胞鬆弛素 B 則具有生物毒性，經由吸入、吞食、接觸皮膚有致死風險，潛在致癌和生殖系統的危害 (Sigma-Aldrich, 2017)，不溶於水，使用前必須先溶於二甲基亞礎 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 且成本較高。Gérard et al. (1994) 比較 6-二甲基氨基嘌呤和細胞鬆弛素 B 抑制第二極體，誘導生產太平洋牡蠣三倍體，誘發率分別為 85% 和 95%，兩者相近，但在孵化率和存活率方面則是 6-二甲基氨基嘌呤較高；Peachey and Allen Jr. (2016) 比較 6-二甲基氨基嘌呤和細胞鬆弛素 B 誘導生產維吉尼亞牡蠣四倍體，誘導後 1 星期在平均存活率方面，6-二甲基氨基嘌呤顯著高於細胞鬆弛素 B，而在四倍體誘發率上兩者間無顯著差異。綜上所述，6-二甲基氨基嘌呤可用於取代細胞鬆弛素 B 作為牡蠣多倍體誘發劑。但須注意 Gérard et al. (1994) 的實驗結果提及，使用抑制第一極體法誘導太平洋牡蠣三倍體時，則以細胞鬆弛素 B 優於 6-二甲基氨基嘌呤，誘發率分別為 $33.5 \pm 14.3\%$ 和 $18.3 \pm 17.2\%$ 。

過去臺灣天然海域生產的牡蠣種類被誤認為太平洋牡蠣，但 Hsiao et al. (2016) 以生命條碼分析後確認臺灣的牡蠣為葡萄牙牡蠣

(*Crassostrea angulata*)，目前誘導葡萄牙牡蠣多倍體研究報告不多，本研究以 6-二甲基氨基嘌呤作為葡萄牙牡蠣三倍體誘發物，針對牡蠣卵受精後作用時間點、使用劑量、反應時間進行試驗，建立 6-二甲基氨基嘌呤誘導葡萄牙牡蠣三倍體的最佳操作條件。

材料與方法

牡蠣經淡水稍微清洗外殼污物後，以牡蠣刀劃開閉殼肌，用玻片刮取少量生殖腺分辨公母（精子呈雲霧狀、卵子呈顆粒狀）。精子以 200 目生物網過濾組織碎屑，擠於燒杯中加入新鮮海水活化 30 分鐘；卵子以 200 目生物網過濾組織碎屑，500 目生物網蒐集並以潔淨海水沖洗後，浸泡於海水中活化 30 分鐘。精卵分別以血球計數板和浮游生物計算盤計算，以精卵比 100 : 1 授精 5 分鐘，受精卵以 500 目生物網收集並以潔淨海水洗卵，避免過多精子導致多重受精。

牡蠣受精卵密度 4 萬粒/ml，每組受精卵共 1 L 置於燒杯中，二重複，加入 6-二甲基氨基嘌呤充分攪拌，誘導結束後立即以潔淨海水沖洗，去除多餘藥物，移至 100 L 孵化桶，微弱打氣，24 小時後採樣計算孵化率和三倍體比率。試驗分為受精後作用時間點、使用劑量及反應時間，控制組不進行任何誘導處理。下述實驗條件由預備實驗結果設計，試驗期間水溫控制在 27°C、鹽度 30 psu。

試驗一：受精後作用時間點，受精後 10、15、20、25、30、35、40 分鐘，加入 450 μM 6-二甲基氨基嘌呤，反應 10 分鐘。試驗二：使用劑量，受精後 30 分鐘，加入 150、

300、450、600 μM 6-二甲基氨基嘌呤，反應 10 分鐘。試驗三：反應時間，受精後 30 分鐘，加入 450 μM 6-二甲基氨基嘌呤，反應 5、10、15、20、25、30 分鐘。

孵化率計算：均勻攪拌孵化桶，以 2 L 燒杯採樣，500 目浮游生物網收集後定量至 9 ml，加入 1 ml 福馬林固定，適當稀釋後以浮游生物計算盤計算正常發育、外觀無畸形的 D 型幼生。

牡蠣苗倍性檢測：使用流式細胞儀 (sysmex) 的 cystain UV precise p 檢測套組，以燒杯撈取浮游於水表，較為健壯的牡蠣幼生約 1 萬粒，500 目浮游生物網收集置於 1.5 ml 微量離心管，10,000 rpm 離心 10 分鐘，移除多餘海水，加入 0.4 ml 核酸萃取液反應 1 分鐘，研磨棒磨碎後，以 50 μm 細胞篩網過濾萃取液至樣本管，加入 1.6 ml 的染色劑 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色 1 分鐘，以流式細胞儀分析，紫外激發光波長 355 – 375 nm，螢光放射光波長 435 – 500 nm，分析前先以控制組的正常二倍體校正波峰在 X 軸 200，實驗組的三倍體波峰會出現在 X 軸 300 (圖 1)。三倍體誘發率：三倍體數/(二倍體數 + 三倍體數)

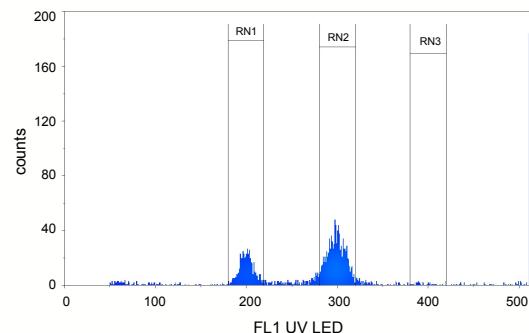


圖 1 流式細胞儀波峰圖 (二倍體波峰位於 X 軸 200；三倍體波峰位於 X 軸 300)

結果與討論

一、試驗一：受精後作用時間點

受精後 10、15、20、25、30、35、40 分鐘進行三倍體誘導的結果如圖 2 所示，三倍體誘發率隨受精後作用時間點呈現先升後降的趨勢，以受精後 10 分鐘最低，誘發率 9.72%；受精後 30 分鐘最高，誘發率 75.96%。孵化率則以受精後 30 分鐘最低，為 23%，控制組孵化率為 64%。

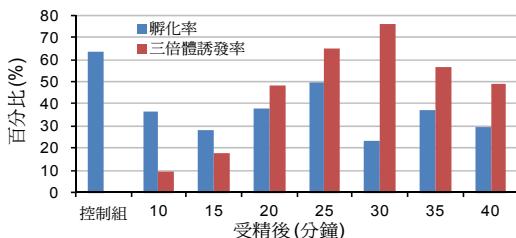


圖 2 以 6-二甲基氨基嘌呤在不同受精後作用時間點處理對牡蠣卵孵化率和三倍體誘發率之影響

三倍體誘導可分為抑制第一或第二極體的排放，Gérard et al. (1999) 以 6-二甲基氨基嘌呤和細胞鬆弛素 B 抑制太平洋牡蠣的第一和第二極體，兩種誘導藥物均以抑制第二極體排放的三倍體誘發率較高，誘發率約 84% (兩種藥物間無顯著差異)，抑制第一極體的三倍體誘發率為 18.3–36.1%，作者對此有兩種推論：(1)精卵品質影響受精卵發育的同步率；(2)抑制第一極體排放的受精卵，在第二次減數分裂時較容易產生非整倍體。

本次實驗結果抑制第二極體的誘發率高於抑制第一極體 (受精後第 20 分鐘第二極體開始排放)，且抑制第一極體的孵化率也較抑制第二極體低，符合 Gérard et al. (1999) 的第二點推論。在受精後第 30 分鐘有最高誘發

率 75.96%，雖然孵化率較低僅有 23%，但考量後續三倍體種貝檢測篩選所需耗費的人力和時間，仍以受精後第 30 分鐘進行誘導為較佳時間點。

二、試驗二：使用劑量

以 150、300、450、600 μM 6-二甲基氨基嘌呤進行三倍體誘導的結果如圖 3 所示，以 450 μM 組最高，誘發率達 74.13%。孵化率和藥物劑量呈負相關，實驗組孵化率依序為 47、41、24、23%，控制組孵化率為 62%。

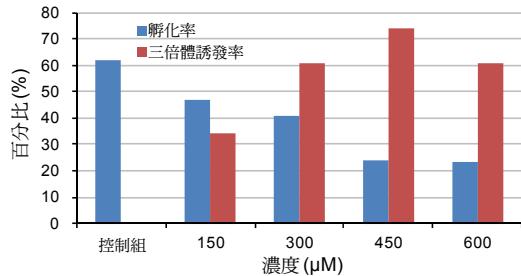


圖 3 不同濃度 6-二甲基氨基嘌呤對牡蠣卵孵化率和三倍體誘發率之影響

Gérard et al. (1994) 以 150、300、450、600 μM 6-二甲基氨基嘌呤進行太平洋牡蠣的三倍體誘導，條件為受精後 20 分鐘，反應 15 分鐘，藥物濃度和三倍體誘發率呈正相關，誘發率 40–83%，藥物濃度和相對孵化率 (僅計算發育正常的 D 型幼生，除以控制組孵化率) 呈負相關，相對孵化率 60.3%，同時考量誘發率和孵化率，以 300 和 450 μM 為較適當的誘導濃度。

本次實驗以 450 μM 的誘發率 74.13% 為最高，孵化率 24% 和 Gérard et al. (1994) 的研究結果相似，但以更高劑量 600 μM 誘導反而誘發率較低 (60.87%)，孵化率和 450 μM 組相近 (23%)。與 Gérard et al. (1994) 的實驗條件相比，差異在於本次實驗的誘導時

間點較晚、反應時間較短以及牡蠣品種不同，根據試驗三反應時間的實驗結果，可確認反應 10 分鐘和 20 分鐘的孵化率有明顯差異，推論高濃度下延長反應時間，是影響孵化率的主要因素；至於高濃度組的三倍體誘發率反而較低的原因則有待後續實驗驗證。

三、試驗三：反應時間

誘導反應 5、10、15、20、25、30 分鐘的結果如圖 4 所示，三倍體誘發率以反應 10 分鐘為最高，誘發率 67.12%。孵化率和誘導反應時間呈負相關，實驗組孵化率依序為 71、67、49、14、12、13%，控制組孵化率為 75%。

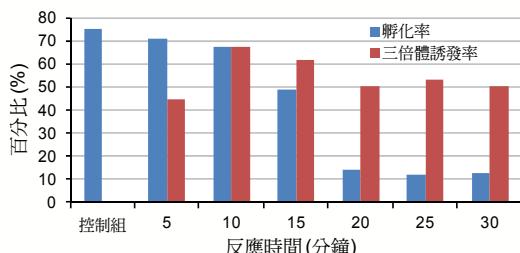


圖 4 以 6-二甲基氨基嘌呤處理不同反應時間對牡蠣卵孵化率和三倍體誘發率之影響

Gérard et al. (1994) 於受精後 15 分鐘，以 $450 \mu\text{M}$ 的 6-二甲基氨基嘌呤進行太平洋牡蠣的三倍體誘導，反應時間分別為 10、15、20、25，三倍體誘發率和相對孵化率均和反應時間呈負相關，以誘導 10 分鐘的效果最好，三倍體誘發率為 72%，相對孵化率為 58%。和本實驗的結果相同，原因推測為過長的反應時間，會干擾受精卵後續的分裂發育，染色體套數異常導致大量死亡。

另外，比較試驗一、二、三，同樣受精後 30 分鐘， $450 \mu\text{M}$ ，誘導反應 10 分鐘，試驗三的孵化率高於試驗一、二，原因推測為

試驗三的精卵品質較佳，試驗一、二、三控制組的孵化率分別為 64、62、75%。

結論

國外進行牡蠣多倍體商業性繁殖已有三十餘年，三倍體牡蠣苗主要生產國包括澳洲、美國和法國，由於生殖腺發育不全，生產不受繁殖季影響，全年可穩定採收，並有成長快、個體大等優點，價格較高。我國的牡蠣養殖大多仍依賴天然資源供應種苗和餌料，容易受天候和環境污染等影響，因此為發展魚塭牡蠣養殖模式，有必要開發多倍體種苗生產和單體牡蠣養殖技術，提高人工種苗的養殖收益。

臺灣周邊海域所生產的牡蠣為葡萄牙牡蠣，欠缺相關多倍體誘導研究，本實驗所使用的受精卵密度依據于等 (2002a) 針對不同卵密度下，6-二甲基氨基嘌呤對太平洋牡蠣三倍體誘導效果影響，選用最佳密度 4 萬粒/ml；精卵活化時間參考于等 (2002b) 建議之 30 分鐘，提高發育同步性。由於上述條件是針對太平洋牡蠣進行研究，應用於葡萄牙牡蠣是否有改進空間有待後續實驗測試。

本實驗針對受精後作用時間點、使用劑量、反應時間建立 6-二甲基氨基嘌呤誘導葡萄牙牡蠣三倍體的最佳條件，以受精後 30 分鐘，濃度 $450 \mu\text{M}$ ，誘導反應 10 分鐘的條件為最佳，三次試驗的平均誘發率為 $72.40 \pm 4.67\%$ ，可作為研究人員誘導生產牡蠣三倍體參考，未來若成功於三倍體牡蠣的基礎上應用相同原理建立四倍體種貝，即可以雜交法間接生產三倍體牡蠣苗免除藥物殘留疑慮。