

Studies on Triploid Induction of Rainbow Trout (*Onchorynchus mykiss*) by Hydrostatic Method

Luoluo Chen, Haishen Wen*, Jifang Li, Meizhao Zhang, Dezhao Che, Yuanru Xin

The Key Laboratory of Mariculture (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao Shandong
Email: 13853270722@163.com, 2474494409@qq.com, wenhaishen@ouc.edu.cn

Received: May 14th, 2019; accepted: May 28th, 2019; published: Jun. 10th, 2019

Abstract

In this study, three groups of experiments were carried out. Single factor experiment 1: starting time was 10~30 min, hydrostatic pressure was 68.9 Mpa, duration was 5 min; single factor experiment 2: starting time was 10~40 min, hydraulic pressure was 68.9 Mpa and the duration was 5 min; the three-factor orthogonal experiment 3: starting time (20, 30, 40 min), pressure (60, 65, 70 Mpa), duration (3, 5, 7 min). The results of experiment 1 showed that when the starting time was 30 min, 100% triploid rate could be obtained, and the eyed rate and the floating rate of this group were not significantly different from those of the control group. The results of experiment 2 showed that the optimal induction time of triploid was 30~35 min after fertilization based on the data of eyed rate, floatation rate and triploid rate. The results of experiment 3 showed that there was no significant difference in the triploid rate in the experimental groups with a starting time of 20~40 min, a hydrostatic pressure of 60~70 Mpa and a duration of 3~7 min; within this time range, the induction rate of triploids can reach 100%.

Keywords

Onchorynchus mykiss, Triploid, Hydrostatic Method

静水压法诱导虹鳟三倍体技术研究

陈落落, 温海深*, 李吉方, 张美昭, 车德钊, 辛苑茹

中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛
Email: 13853270722@163.com, 2474494409@qq.com, wenhaishen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2019年5月14日; 录用日期: 2019年5月28日; 发布日期: 2019年6月10日

*通讯作者。

摘要

本文共进行三组实验,分别为起始时间为10~30 min、静水压压力为68.9 Mpa、持续时间为5 min的单因素实验一;起始时间为10~40 min、静水压压力为68.9 Mpa、持续时间为5 min的单因素实验二;以及起始时间(20, 30, 40 min)、压力大小(60, 65, 70 Mpa)、持续时间(3, 5, 7 min)的三因素正交实验三。实验一结果显示,当起始时间为30 min时,可以得到100%的三倍体率,并且该组的发眼率和上浮率相对于对照组均无显著性差异。实验二结果显示,综合发眼率、上浮率、三倍体率三个数据,最优的三倍体诱导起始时间为受精后的30~35 min。实验三结果显示,起始时间为20~40 min,静水压压力为60~70 Mpa,持续时间为3~7 min对三倍体率的影响无明显差异,在此时间范围内诱导都能够获得100%的三倍体率。结果说明,在保证子代一定的存活率的基础之上可以有效地获得100%的虹鳟三倍体。

关键词

静水压, 虹鳟, 三倍体

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

虹鳟(*Onchorynchus mykiss*)隶属鲑形目(Salmoniformes)、鲑科(Salmonidae)、大马哈鱼属(*Onchorynchus*), 是全世界广泛养殖冷水鱼类之一。目前我国虹鳟养殖仍以普通的二倍体为主,而三倍体虹鳟具有个体大、生长快的特点,更能满足消费者对大规格虹鳟的要求[1],因此,三倍体虹鳟在我国具有较大的养殖前景。我国在诱导虹鳟三倍体方面的研究中大多采用的是热休克的方法,但热休克法会对受精卵造成某种程度的损伤,不利于在生产上规模化诱导三倍体虹鳟,与热休克法相比,静水压法对受精卵的刺激相对较小,处理时间较短,也更加稳定,效果优于热休克,然而,目前我国并没有形成较为成熟的虹鳟多倍体诱导技术体系,本文通过静水压法来诱导三倍体虹鳟,这对于我国三倍体虹鳟受精卵的制备具有重要的意义。

2. 材料与方法

2.1. 实验鱼类

本实验于2017年11月30日开始,实验地点为山东省潍坊市临朐鲑鳟渔业发展有限公司,以3和4龄二倍体虹鳟亲鱼为实验对象,选取个体较大、健康无伤、性腺发育良好且活力强的雌雄亲鱼进行人工授精,雌雄比例为2:1。采用湿法授精方式[2],将卵子采集到盛有单盐等渗液的塑料盆中,精液采集到干燥的塑料盆中,将精液倒入到盛有卵子的塑料盆中,用羽毛轻轻搅拌15~20 s使精卵混合均匀,并开始计时,作为受精的起点,静置3~5 min,加少许清水多次洗卵,洗卵过程中尽量去除过量的精液、未受精的死卵和血块等杂物。

2.2. 实验方法

首先,采取单因素实验法,在水温10.5℃条件下,在受精后的10~30 min时间范围内,设置9个梯

度: 起始时间 10、12.5、15、17.5、20、22.5、25、27.5、30 min, 分别命名为三 1~三 9 组, 选取 68.9 Mpa 静水压力大小、持续 5 min 的诱导强度进行虹鳟三倍体的诱导, 之后进行正常的孵化、上浮、苗种培育, 分别统计各组发眼率、上浮率、三倍体率等指标。

其次, 采取单因素实验法, 在水温 10.5℃条件下, 在受精后的 10~40 min 时间范围内, 设置 13 个梯度: 起始时间 10、12.5、15、17.5、20、22.5、25、27.5、30、32.5、35、37.5、40 min, 分别命名为三 1~三 13 组, 选取 65 Mpa 静水压力大小、持续 5 min 的诱导强度进行虹鳟三倍体的诱导, 之后进行正常的孵化、上浮、苗种培育, 分别统计各组发眼率、上浮率、三倍体率等指标。

最后, 采取正交实验法, 对影响实验结果的起始时间、静水压大小、持续时间三个主要因素进行了实验, 每个因素设置三个水平, 分别为起始时间(20, 30, 40 min)、压力大小(60, 65, 70 Mpa)、持续时间(3, 5, 7 min)(表 1)。在水温 10.5℃条件下进行正常的孵化、上浮、苗种培育, 分别统计各组发眼率、上浮率、三倍体率等指标。

Table 1. Triangular rainbow trout induced orthogonal experimental scheme

表 1. 三倍体虹鳟诱导正交实验方案

组别	处理起始时间(min)	处理压力(Mpa)	持续时间(min)
1	20	60	3
2	20	65	5
3	20	70	7
4	30	60	5
5	30	65	7
6	30	70	3
7	40	60	7
8	40	65	3
9	40	70	5

2.3. 实验步骤

采用静水压法进行虹鳟三倍体的诱导, 即使用静水压机对受精卵进行一定强度的静水压处理。待到既定的起始时间, 将受精卵倒入自制的带有网眼透水的塑料小桶中, 每组用卵量约 2000 个, 提前 1 min 放入盛有清水的加压室内, 进行梯度升压, 即每加压 10 Mpa, 暂停 10 s, 以减少压力对受精卵的损伤, 待升至既定压力后, 开始计时, 持续 1 min 后, 再逐步梯度降压至常压, 然后放入到孵化桶内进行常规流水孵化, 孵化室内进行遮光处理, 保证受精卵在孵化阶段所需要的暗光条件, 并减少震动, 每周使用甲基蓝对受精卵进行杀菌处理, 定期挑除发白的死卵; 孵化积温达到 220 度日, 胚胎出现黑色的眼点后, 统计发眼率; 孵化积温达到 600 度日时, 仔鱼孵化出膜, 统计上浮率; 待仔鱼长 3~4 cm 时, 统计三倍体率。

2.4. 三倍体虹鳟鱼苗的鉴定

采用流式细胞仪(Beckman Coulter FC500M)进行三倍体虹鳟的倍性鉴定, 采用正常二倍体虹鳟作对照, 通过分析红细胞细胞核中相对 DNA 含量确定倍性, 三倍体虹鳟红细胞的 DNA 含量为二倍体的 1.5 倍左右; 具体实施步骤包括:

1) 单细胞悬液的制备: 将虹鳟鱼苗的尾柄剪断, 迅速插入到盛有 1 mL 0.01 M 的 PBS 缓冲溶液的分子管中(pH 7.2~7.4), 轻轻挤压鱼身, 使血液缓慢流出, 取血量在 10 μ L 左右, 然后摇匀, 在室温 3000 rpm

下快速离心 10 s, 洗涤血细胞, 倒掉 PBS, 再加入 1 mL 的 PBS, 混匀。

2) 单细胞悬液的固定: 使用一次性塑料吸管吸取单细胞悬液, 缓慢滴加到 3 mL 预冷的无水乙醇中, 4℃ 过夜保存(至少固定 3 h)。

3) 染色: 将收集到的细胞悬液在 4℃、2000 rpm 条件下离心 10 min, 弃上清液, PBS 洗涤 2 次, 显微镜下将细胞浓度调至 1×10^6 个/mL, 加入 20 μ L, 50 μ g/mL 的 RNA 酶, 30 min 后再加入 20~50 μ L, 1 g/L 的 PI 染液, 置于 4℃ 冰箱中染色 30 min, 使用 300 目筛绢过滤。

4) 上机检测, 每个样本检测的细胞数目 $> 10^4$ 个, 测量所得的数据和结果由计算机进行处理。

3. 结果

3.1. 第一批实验各组发眼率、上浮率、三倍体率

结果显示, 普通二倍体虹鳟荧光值为 310 ± 5 (图 1), 三倍体虹鳟为 437 ± 13 (图 2), 二者比值为 1.4, 与理论值 1.5 相近。每组随机选取至少 24 尾鱼苗进行倍性鉴定, 统计各组三倍体率。图 3 为第一批实验各组发眼率与上浮率, 图 4 为第一批实验各组的三倍体率。结果发现, 在起始时间 20~30 min 时间范围内, 都能获得近似 100% 的三倍体率。虹鳟三倍体批量化生产的技术要求在诱导率达到 100% 的同时又要保证胚胎具有一定的存活率, 从各组发眼率和上浮率的数据可知, 随着起始时间的延长, 各组发眼率、上浮率呈上升趋势, 在 30 min 组达到最高。因此综合实验结果中的发眼率、上浮率、三倍体率三个数据, 可以确定三倍体虹鳟诱导的最佳起始时间为受精后的 30 min, 在该时间进行诱导可以得到 100% 的三倍体率, 并且该组的发眼率和上浮率相对于对照组均无显著性差异。

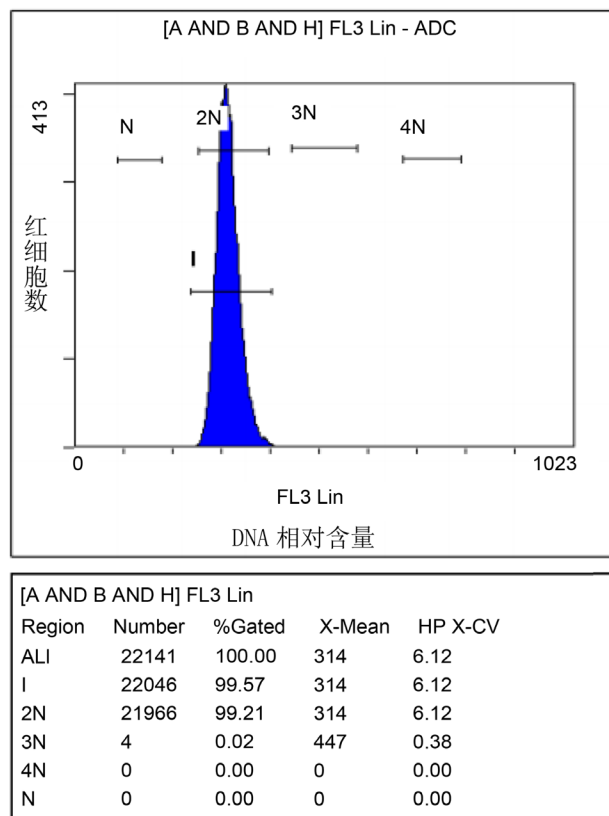


Figure 1. Diploid rainbow trout flow cytometry test results

图 1. 二倍体虹鳟流式细胞仪检测结果

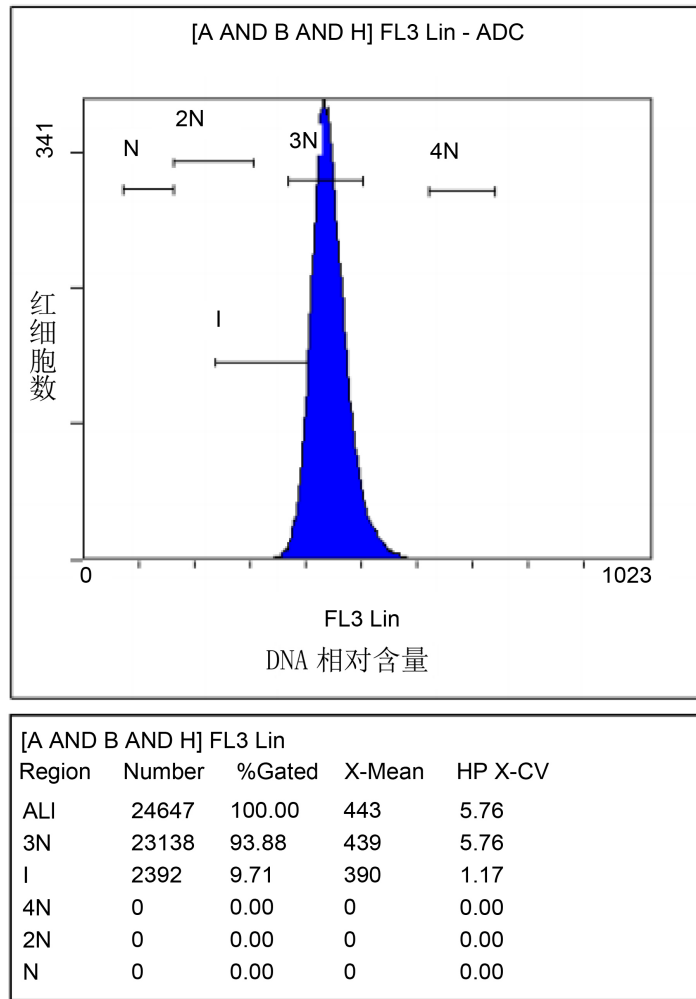


Figure 2. Triploid rainbow trout flow cytometry test results

图 2. 三倍体虹鳟流式细胞仪检测结果

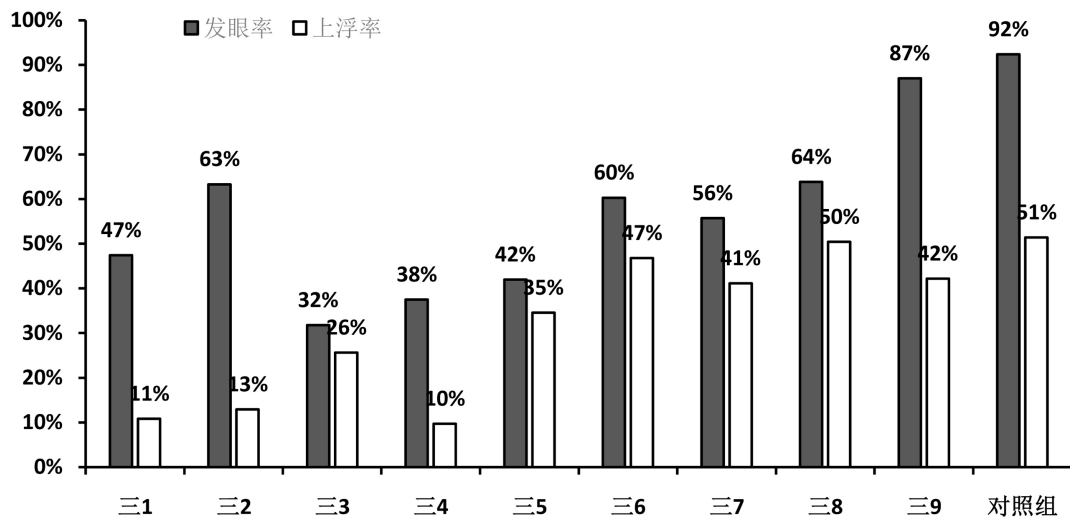


Figure 3. Eye rate and floating rate of each group of triploid rainbow trout

图 3. 各组三倍体虹鳟发眼率和上浮率

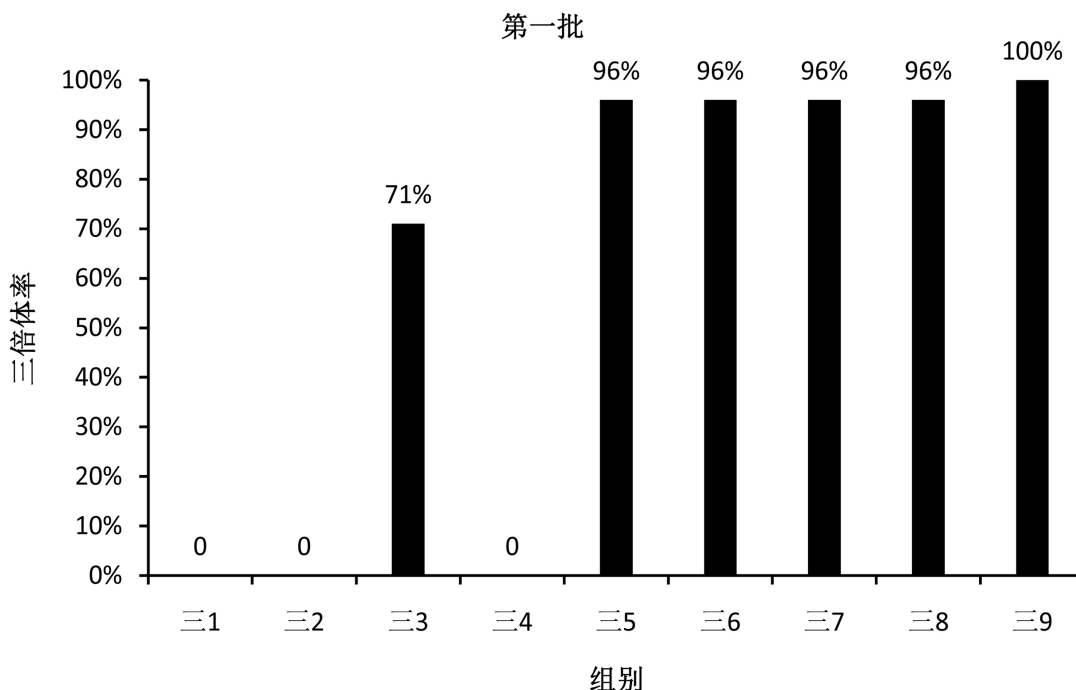


Figure 4. Triploid rate of each experimental group of rainbow trout
图 4. 各实验组虹鳟三倍体率

3.2. 第二批实验各组发眼率、上浮率、三倍体率

第二批实验各组发眼率和上浮率见图 5。结果显示，普通二倍体虹鳟荧光值为 310 ± 5 ，三倍体虹鳟为 437 ± 13 ，二者比值为 1.4，与理论值 1.5 相近。每组随机选取至少 24 尾鱼苗进行倍性鉴定，统计各组三倍体率。第二批实验各组的三倍体率见图 6，结果表明，在起始时间 30~35 min 范围内，各组发眼率与上浮率达到最高，去除起始时间 27.5 min 处理组，起始时间 20~40 min 内都能够获得近似 100%三倍体诱导率。综合发眼率、上浮率、三倍体率三个数据，最优的三倍体诱导起始时间为受精后的 30~35 min。

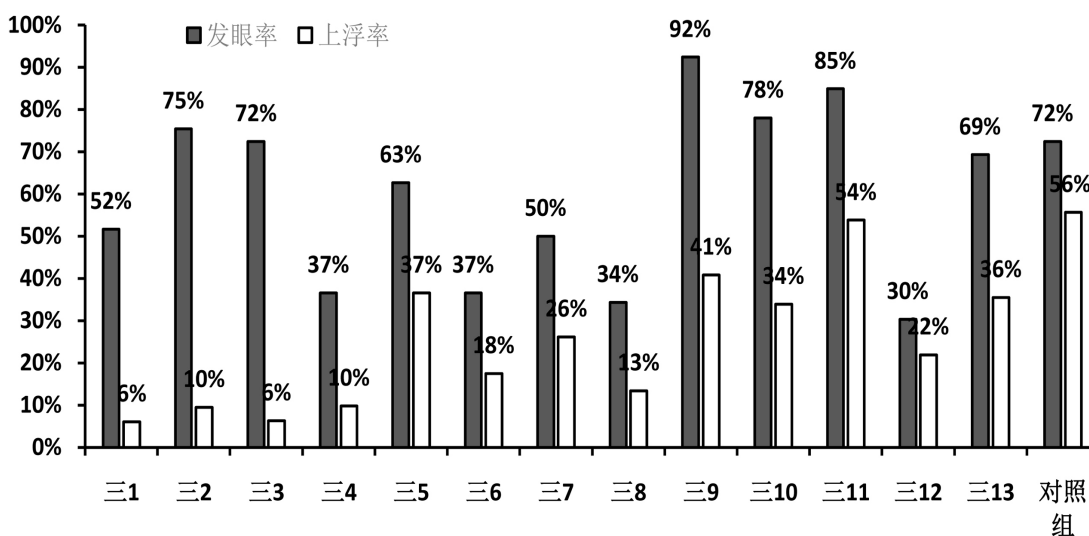


Figure 5. Eye rate and floating rate of each group of triploid rainbow trout
图 5. 各组三倍体虹鳟发眼率和上浮率

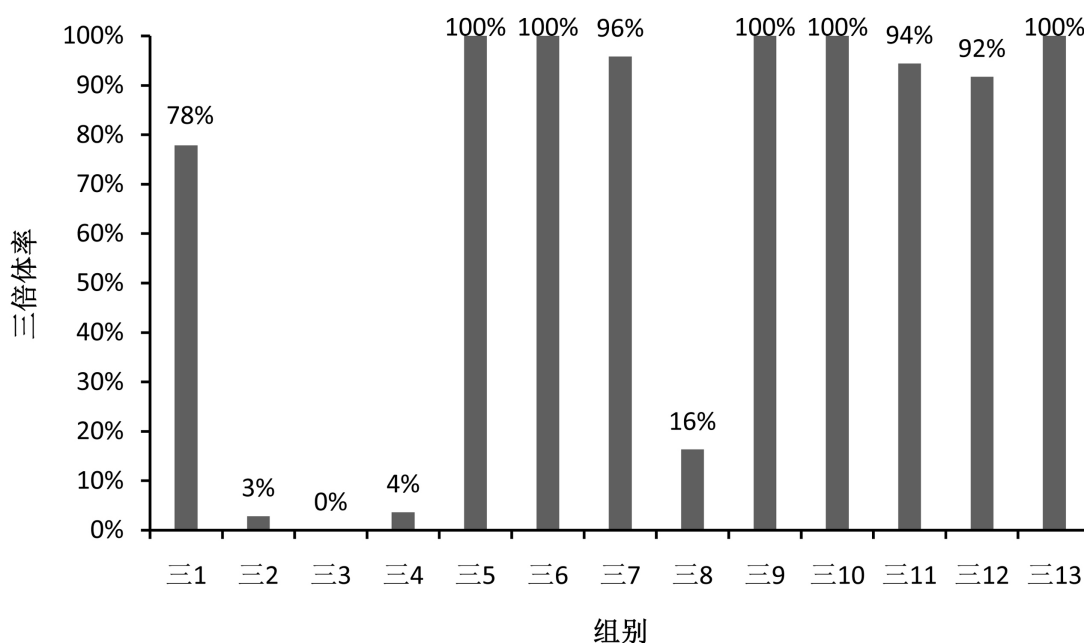


Figure 6. Triploid rate of each experimental group of rainbow trout
图 6. 各实验组虹鳟三倍体率

3.3. 第三批实验各组发眼率、上浮率、三倍体率

第三批实验各组的发眼率和上浮率见图 7，从图中可以看出，发眼率和上浮率在各组中的变化趋势并不一致，为了排除仔鱼在上浮以后由于养殖环境条件以及疾病等其它因素的干扰，我们对各组的发眼率进行了正交实验结果分析。首先，起始时间为 20 min 各组发眼率的平均 K 值为 46%，起始时间 30 min 各组发眼率的平均 K 值为 62%，起始时间为 40 min 各组发眼率的平均 K 值为 62%，比较得出在起始时间这一实验因素中 30 min 和 40 min 为优水平，且随着起始时间的延长，各组发眼率有升高的趋势；压力大小为 60 Mpa 各组发眼率的平均 K 值为 66%，压力大小为 65 Mpa 各组发眼率的平均 K 值为 51%，压力大小为 70 Mpa 各组发眼率的平均 K 值为 53%，比较得出在压力大小这一实验因素中 60 Mpa 为优水平，且随着压力大小的增加各组发眼率逐渐降低；持续时间 3 min 各组发眼率的平均 K 值为 57%，持续时间 5 min 各组发眼率的平均 K 值为 56%，持续时间 7 min 各组发眼率的平均 K 值为 57%，持续时间这一实验因素中 3 min、5 min、7 min 三个水平之间无显著性差异。此外，起始时间、压力大小、持续时间三种实验因素的极差分别为 16.2%、14.5%、1.1%，根据极差大小，判断因素的主次影响顺序为起始时间 > 压力大小 > 持续时间，起始时间影响最大，为主要因素，持续时间为不重要因素。根据各因素的最优水平确定最优组合为起始时间为 30 和 40 min，压力大小为 60 Mpa，持续时间为 3~7 min。第三批实验各组的三倍体率见图 8，结果显示，除去意外死亡的第一组，各组三倍体率皆为 100%，表明 20~40 min，60~70 Mpa，3~7 min 对三倍体率无显著性影响，在此时间范围内诱导都能够获得 100% 的三倍体率。

4. 讨论

静水压法诱导虹鳟产生三倍体的原理为抑制受精卵第二极体的释放，使得卵内具有三套染色体组。诱导鱼类产生三倍体的方法有物理法(温度休克法，静水压法)、化学法(细胞分裂素、6-DMAP)、生物法。国内在虹鳟三倍体诱导方面使用较多的是热休克法，张艳萍等[3]在 26.5℃水温下，授精 15 min 后处理 10 min 得到了 79.32%发眼率和 83.18%诱导率结果。沈希顺等[4]在 9℃~10℃的水温下静置 10 min 后将虹

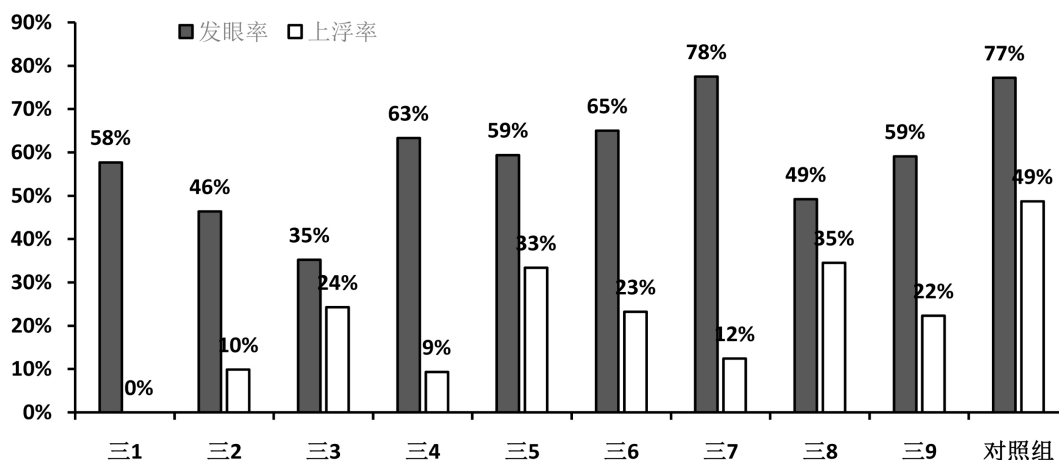


Figure 7. Eye rate and floating rate of each group of triploid rainbow trout

图 7. 各组三倍体虹鳟发眼率和上浮率

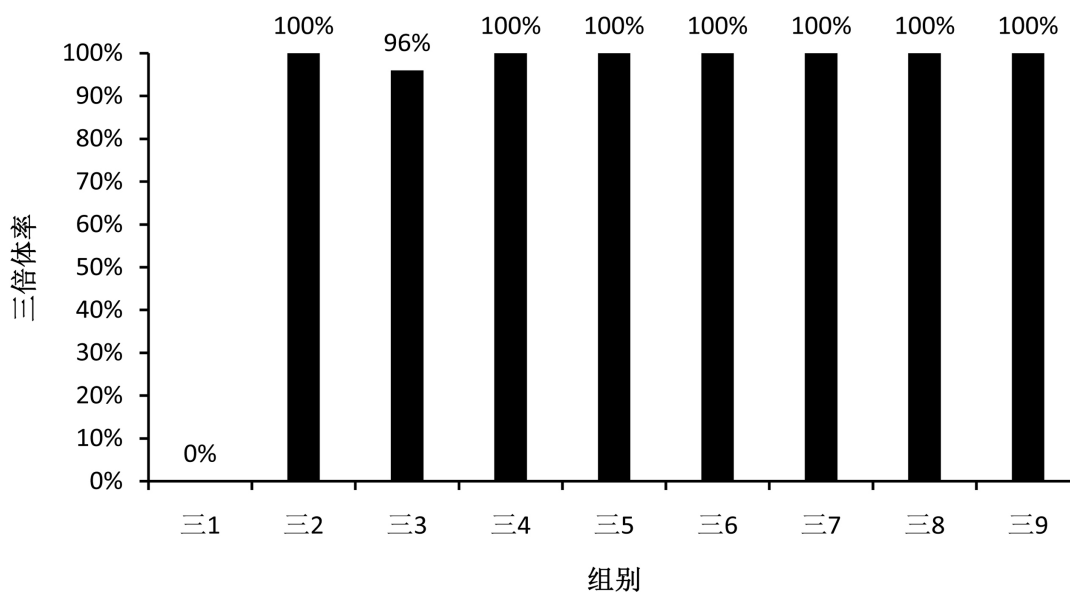


Figure 8. Triploid rate of each experimental group of rainbow trout

图 8. 各实验组虹鳟三倍体率

鳟受精卵移入 28℃~29℃ 水中热休克处理 10~13 min, 三倍体诱导率为 71.4%。尽管使用热休克法进行虹鳟三倍体诱导可以获得较高的子代存活率和诱导率以及所需要的设备简单、成本低, 但是仍未发现诱导率达到 100% 的有关报道。静水压法也是一种诱导鱼类多倍体有效的方法, 尤颖哲等[5]在双斑东方鲀(*Fugu bimaculatus*)的研究中发现, 水温 18℃~20℃ 时, 授精后 5 min, 采用 10~15 Mpa 的压强、5~7 min 的处理时间的静水压诱导条件下获得了 96.67% 以上的三倍体诱导率, 以及 77% 以上孵化率; 在静水压休克法诱导三倍体鲶鱼(*Clarias gariepinus*)中发现, 鲶鱼卵受精 4~5 min, 用 600~640 kg/cm² 静水压力处理 3 min, 可以获得 100% 的三倍体鲶鱼, 而且胚胎存活率也较高, 孵化率达对照组的 90% 以上, 是静水压休克法诱导三倍体鲶鱼的最佳条件[6]。此外, 有关静水压法对鲑科鱼类三倍体诱导的研究在国外报道较多, Preston 等[7]在褐鳟(*Salmo trutta*)中的研究表明使用静水压法诱导褐鳟三倍体能够获得较高的存活率以及 100% 的三倍体诱导率。本实验中, 选择了一定的实验参数下使用静水压法对虹鳟进行三倍体诱导, 结果说明,

在保证子代一定的存活率的基础之上可以有效地获得 100%的虹鳟三倍体。

影响静水压法诱导虹鳟三倍体的因素主要涉及三个关键实验参数,即起始时间、静水压力大小、压力持续时间。起始时间是指从精卵接触开始计时,至受精卵所处水环境水压完全到达既定的压力大小所需要的时间。不同物种鱼类由于其自身胚胎结构、生理特性、发育速度、所处水环境理化条件等方面存在一定差异,因此抑制其第二极体排放的时间有所不同。虹鳟卵子在受完精以后需要经历一个吸水膨胀期,受精卵在未吸水之前较软具有黏性,如果此时对受精卵进行加压处理会降低胚胎的存活率。本实验一的研究中,起始时间处于 10~30 min 的时间范围内,可以明显地看到虹鳟受精卵的发眼率与上浮率皆随着起始时间的延长而显著升高,在 30 min 中时达到最高,这与虹鳟胚胎发育的吸水特性相吻合,表明随着胚胎的逐渐吸水膨胀,其对外界的如高温、静水压等理化因子的抵抗力会随之上升,更加有利于虹鳟三倍体的诱导。为了进一步探究起始时间处于 30 min 以后的起始时间对实验结果的影响状况,本实验二将起始时间延长至 40 min,结果表明起始时间为 30 min 以后的实验各组子代存活率有了下降的趋势,且三倍体率也没能继续维持在 100%的水平。尽管实验三 40 min 各组都出现了 100%的三倍体率,但不能排除起始时间过度延长对诱导虹鳟三倍体所存在的不稳定性。综合三次实验结果,可以初步确定诱导虹鳟三倍体最优的起始时间为 30~35 min,但这也并不是绝对的,在受孵化水温对胚胎发育速度的影响中,真正影响第二极体释放的生物学条件应当是有效积温的大小,如果孵化水温低于 10.5℃时,则最优的诱导虹鳟三倍体的起始时间可能会相应地延长,反之亦然。按照有效积温的定义可以推算,最优的静水压诱导虹鳟三倍体的有效积温可能为 315~368 CTM (指受精后孵化水温(℃)与时间(min)的乘积)。这与 Preston 等[7]在褐鳟三倍体诱导中所得到的最优诱导积温为 300 CTM 结果存在着一定的差异,这种差异进一步表明不同种鱼类在三倍体诱导参数之间存在的差异,以及其它外界环境条件诸如气候、水温、亲鱼培育、亲鱼年龄等因素对实验结果潜在的影响。

静水压法利用静压机产生一定的静水压抑制第二极体的排放而产生多倍体,其作用机制是抑制纺锤体的微丝和微管的形成,阻止染色体的移动,从而抑制细胞的分裂,因此静水压力大小与持续时间也是影响三倍体诱导率和存活率的重要因素,且不同物种鱼类所需要的压力强度存在一定的差异。林琪等[8]采用静水压法对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)进行三倍体诱导,设置 400~600 kg/cm²一系列压力梯度,得到 450 kg/cm²的压力大小最适合大黄鱼三倍体的诱导。压力过低或持续时间过短达不到抑制受精卵第二极体排放的目的,可能会导致子代存活率的增加和三倍体率的降低,反之亦然。桂建芳等[9]在诱导三倍体水晶彩鲫(*Carassius auratus transparent colored var.*)时发现用 700 kg/cm²的压力大小处理时,胚胎畸形率明显上升且孵化率相对于对照组显著降低,子代出现部分嵌合体。本实验的研究结果同样也说明了在保证达到 100%三倍体率的前提下,相比于 65 Mpa 和 70 Mpa 的压力大小,60 Mpa 的诱导压力更有利于子代的存活。除了以上三个主要实验参数影响虹鳟三倍体的存活率和三倍体率外,Weber 等[10]的研究表明不同虹鳟种群、不同产卵年份、以及同一产卵年份中的不同时期、卵子成熟度等因素对胚胎发育快慢同样具有较大影响。此外,不同的静水压仪器设备以及不同的操作手段都会对子代存活率和三倍体率产生一定的影响,为降低静水压处理对受精卵的刺激程度,可采取梯度升压法和降压法等方法措施[11]。总之,虽然静水压法诱导虹鳟三倍体需要专门的静压机,但是相比于温度休克法的不稳定性,静水压法因其最佳条件易于掌握,处理程序易于标准化,且对胚胎的损伤比温度休克小,可以作为一种于生产上规模化制备虹鳟三倍体的有效方法。

基金项目

山东省农业良种工程项目(2016LZGC003)和山东省重点研发计划(产业关键技术)项目(2016CYJS04A01)资助。

参考文献

- [1] Tiwary, B.K., Kirubakaran, R. and Ray, A.K. (2004) The Biology of Triploid Fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **14**, 391-402. <https://doi.org/10.1007/s11160-004-8361-8>
- [2] 张荣吉, 贾钟贺, 王炳谦. 虹鳟亲鱼培育与人工繁殖技术[J]. 黑龙江水产, 2009(3): 7-9.
- [3] 张艳萍, 王太, 俞小牧, 等. 热休克诱导虹鳟三倍体的最佳条件[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2011, 47(6): 69-74.
- [4] 沈希顺, 李立海, 王昭明. 虹鳟鱼三倍体生产规模制种技术研究[J]. 北京水产, 2005(1): 37-41.
- [5] 尤颖哲. 静水压法诱导双斑东方鲀三倍体的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(3): 348-352.
- [6] 尹洪滨, 潘伟志, 孙中武, 等. 静水压休克法诱导三倍体鲶鱼(*Silurus asotus* L.)的研究[J]. 水产学杂志, 1997(1): 10-13.
- [7] Preston, A.C., Taylor, J.F., Craig, B., et al. (2013) Optimisation of Triploidy Induction in Brown Trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture*, **414-415**, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.034>
- [8] 林琪, 吴建绍, 曾志南. 静水压休克诱导大黄鱼三倍体[J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 6-9.
- [9] 桂建芳, 梁绍昌, 孙建民, 等. 鱼类染色体组操作的研究 I. 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫[J]. 水生生物学报, 1990(4): 336-344.
- [10] Weber, G.M. and Hostuttler, M.A. (2012) Factors Affecting the First Cleavage Interval and Effects of Parental Generation on Tetraploid Production in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **344-349**, 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.017>
- [11] 刘东, 白宝海, 邱黎明. 虹鳟四倍体的诱导试验[J]. 中国水产, 2006(7): 76-77.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2373-1443, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: ojfr@hanspub.org