

硬头鳟与溪红点鲑杂交三倍体育种技术的初步研究

徐绍刚 杨晓飞 田照辉* 李文通 马峻峰

国家淡水渔业工程技术研究中心, 北京市水产科学研究所, 渔业生物技术北京市重点实验室 北京 100068

摘要: 为了获得同时具有杂交及三倍体优势的鲑鳟鱼苗种, 开展了利用 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 诱导硬头鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、溪红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*) 正反杂交受精卵的实验。杂交结果, 溪红点鲑 (♀) × 硬头鳟 (♂) 实验组卵子在受精 10 min 后全部死亡, 而硬头鳟 (♀) × 溪红点鲑 (♂) 组的受精卵正常, 可以进行 6-DMAP 三倍体诱导实验。6-DMAP 诱导受精卵结果, 起始诱导时间在 12 ~ 15 min, 受精卵的发眼率最高, 为 75.87% ~ 76.64%, 在 5 个起始诱导时间梯度内, 受精卵的孵化率在 86.44% ~ 90.31% 之间, 苗种三倍体率在 92.45% ~ 95.55% 之间, 差异不显著 ($P > 0.05$)。诱导持续时间为 10 ~ 15 min 时, 受精卵发眼率达到最高, 为 74.28% ~ 76.81%, 在 5 个诱导持续时间梯度内, 受精卵孵化率在 87.28% ~ 90.24% 之间, 苗种三倍体率在 93.67% ~ 96.25% 之间, 变化不显著 ($P > 0.05$)。药物诱导浓度为 120 ~ 150 mg/L 时, 受精卵的发眼率达到最高, 为 73.57% ~ 76.27%, 在 5 个不同的药物浓度梯度内, 受精卵孵化率在 88.57% ~ 90.03% 之间, 苗种三倍体率在 92.56% ~ 96.38% 之间, 变化不显著 ($P > 0.05$)。结果表明, 利用 6-DMAP 诱导受精卵制备杂交三倍体苗种的方法是可行的, 实验最佳方法为硬头鳟 (♀) × 溪红点鲑 (♂) 卵子受精后 12 ~ 15 min 内, 利用浓度为 120 ~ 150 mg/L 的 6-DMAP 溶液诱导, 持续时间为 10 ~ 15 min, 然后放入孵化桶内正常孵化, 获得苗种的三倍体率可达 92.56% ~ 96.38%, 可满足正常生产的需要。

关键词: 硬头鳟; 溪红点鲑; 杂交三倍体; 6-二甲基氨基嘌呤; 诱导

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 05-887-08

Preliminary Study on Steelhead Trout (*Salmon gairdneri*) and Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) Hybrid Triploid Breeding Techniques

XU Shao-Gang YANG Xiao-Fei TIAN Zhao-Hui* LI Wen-Tong MA Jun-Feng

National Engineering Research Center for Freshwaters, Beijing Fisheries Research Institute, Fishery Biology Technology Key Laboratory of
Beijing, Beijing 100068, China

基金项目 科技支撑项目 (No. 2015BAD25B00), 北京市农业局项目 (No. SCSYZ201511-4), 北京市财政项目 (No. kjcx20140112), 冷水性鱼类科技创新团队项目 (No. JNKST201611);

* 通讯作者, E-mail: zh1973@126.com;

第一作者介绍 徐绍刚, 男, 高级工程师; 研究方向: 鱼类育种; E-mail: xushaogang@bjfishery.com。

收稿日期: 2015-10-29, 修回日期: 2016-05-04 DOI: 10.13859/j.cjz.201605019

Abstract: In order to obtain the salmon and trout seeds with the advantages of hybrid and triploid, Steelhead Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) reciprocal cross fertilized eggs were experimentally induced by 6-dimethyl amino purine (6-DMAP). Hybridization results showed that the eggs of Brook Trout (♀) × Steelhead Trout (♂) all died 10 min after fertilization, and the development of Steelhead Trout (♀) × Brook Trout (♂) fertilized eggs were normal, so the triploid induction could be performed with 6-DMAP. The fertilized eggs initially induced by 6-DMAP treatment for 12 - 15 min had the highest eyed rate (75.87% - 76.64%), the hatching rates of five groups with five gradient initial induction durations ranged at 86.44% - 90.31%, triploid rates ranged at 92.45% - 95.55%, and the differences were not significant ($P > 0.05$) (Table 1); When the induction duration was 10 - 15 min, eyed rate was the highest (74.28% - 76.81%), the hatching rates of the five induced gradient durations groups ranged at 87.28% - 90.24%, triploid rates ranged at 93.67% - 96.25%, and the differences were not significant ($P > 0.05$) (Table 2). The fertilized eggs had the highest eyed rate (73.57% - 76.2%) when the 6-DMAP concentration was 120 - 150 mg/L, and the hatching rates of the five induced concentration groups ranged from 88.57% to 90.03%, triploid rates ranged from 92.56% to 96.38%, and differences were not significant ($P > 0.05$) (Table 3). The results demonstrate that it is feasible to prepare hybrid triploid seeds by inducing Steelhead Trout (♀) × Brook Trout (♂) fertilized eggs with 6-DMAP, and the best condition is to induce fertilized eggs by treatment with 150 mg/L 6-DMAP solution for 12 - 15 min, and then incubate the eggs in incubator, by which the triploid rate of seed can reach 92.56% - 96.38%, meeting the needs of field production.

Key words: Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*); Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*); Hybrid triploid; 6-dimethylaminopyridine (6-DMAP); Induction

杂交育种是一种常用的鱼类品种改良方法, 通过杂交, 利用杂种优势, 可以获得生长速度、抗病力和品质等均优于亲本的新品种(张士瑾等 2001), 但杂交育种也有培育时间过长、对自然种群具有威胁、结果不稳定等缺点。三倍体育种技术获得的鱼在抗病、生长和成活等方面具有优势, 并且还有不育的特点, 可有效避免鱼肉品质下降, 对环境潜在的威胁极小, 应用前景广阔(Glamuzina et al. 1999)。在鲑科鱼类中, Chourrout (1980) 首次培育出三倍体虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*), 获得了大西洋鲑 (*Salmo salar*)、虹鳟等同源三倍体 (Solar et al. 1984, 江丽华等 2012), 通过种属间杂交培育出的虹鳟和银大麻哈鱼 (*O. keta*)、大西洋鲑和美洲红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*) 等异源三倍体。以 6-二甲氨基嘌呤 (6-DiMethylaminopurine, 6-DMAP) 为代表的化学处理方法是三倍体诱导方法之一, 具有

条件和设施简单、操作简便易行、处理量大、毒性小等优点, 比较适合规模化生产的需求, 已经在太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) (田传远等 1999) 和虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) (常亚青等 2001) 上得到验证和初步应用, 但在鲑科鱼类三倍体育种中至今未见相关的诱导鲑鱼或鲑鳟鱼成功的报道。

硬头鳟 (*O. mykiss*) 属于鲑形目鲑科大麻哈鱼属, 又名钢头鳟, 为洄游性冷水鱼类, 原来产于美国阿拉斯加的 Kuskokwin 河和加拿大不列颠哥伦比亚省的和平河等水域, 广盐性, 在水温 0 ~ 22℃ 的水域环境中均可存活, 属肉食性鱼类, 是欧美国家鲑鳟鱼主要的游钓对象之一 (Neal et al. 2007)。溪红点鲑 (*S. fontinalis*) 属于鲑形目鲑科红点鲑属, 又名美洲红点鲑、七彩鲑, 原产北美东北部, 是现有发现鲑鱼类中体形最小的一种, 也是现已发现的所有鲑鱼类中颜色最艳丽的一种。加拿大的水产科学家

弗莱迪科夫博士曾称它为“冰水女皇” (Hebert 2000)。溪红点鲑在水温 1~25℃ 的水域环境中均可存活,对酸碱度的适应能力较强,pH 值大约在 4.0~9.8 之间,人工养殖条件下,生长速度比虹鳟快 10%~20%,比北极红点鲑 (*S. leucomaenis*) 快 20%~30% (Chourrout 1980),土耳其等国家正研究利用溪红点鲑的成鱼养殖代替现有的虹鳟鱼成鱼养殖。本研究以硬头鳟与溪红点鲑的杂交卵为材料,使用 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 进行诱导,以期获得育种时间短、生长速度快、抗病力强,同时对环境的潜在威胁小的杂交三倍体苗种,为鳟鱼育种产业的发展提供帮助。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

硬头鳟、溪红点鲑亲鱼来自北京市水产科学研究所延庆冷水鱼基地,经 3 年培育达性成熟后,挑选个体较大、体外无伤、性腺发育良好且活力强的雌性亲鱼各 30 尾,雄性亲鱼各 15 尾作为实验亲鱼群体,亲鱼群体挑选完成后放入单独亲鱼培育池,通过加大水流刺激,促使亲鱼于 12 月中旬集中成熟。实验地点在北京市水产科学研究所延庆玉渡山冷水鱼养殖基地。

1.2 亲鱼正反杂交

鱼卵采用干法受精。先将发育成熟的雌鱼采用挤压法将鱼卵挤入干净的瓷盆内,每 4 尾雌鱼为 1 组,再将相应的 2 尾雄性(硬头鳟♀×溪红点鲑♂、溪红点鲑♀×硬头鳟♂)的精液挤入水盆内,立即搅拌均匀,按精液与孵育用水体积比为 1:2 500 加入孵育用水,轻轻搅拌,1 min 后将水倒出,反复 3 次,将精液清洗干净,放置孵化桶内等待药物诱导实验,孵育方法参照硬头鳟孵育方法(徐绍刚等 2011),孵育水温为 7.5~8.0℃,流量为 1.3 L/min,水体溶解氧不低于 9 mg/L。

1.3 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 诱导杂交受精卵实验

1.3.1 不同诱导起始时间 在水桶内注入 6.7L 水,水温 9.8℃,将 1 g 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 溶入其中,使 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 药物浓度为 150 mg/L,设定受精后 10、12、15、18、20 min 五个起始诱导时间点,诱导持续时间为 15 min,之后立即分别将受精卵倒入漏水的水盆内,待水盆内的水处理干净后将受精卵倒入实验水桶正常孵育,每组受精卵数量为 1 000 粒,设 3 次重复。

1.3.2 不同诱导持续时间 实验药物配置方法同 1.3.1,受精卵诱导起始时间设定为受精后 12 min,药物浓度设定为 150 mg/L,药物诱导时间设定为 5、10、15、20、25 min 五个持续时间,到时间后按 1.3.1 方法正常孵育,每组受精卵数量为 1 000 粒,设 3 次重复。

1.3.3 药物不同浓度 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 药物配置方法同 1.3.1,分别配置 90、120、150、180、210 mg/L 五个浓度梯度,受精卵诱导起始时间设定为受精后 15 min,药物诱导持续时间设定为 15 min,到时间后按 1.3.1 方法正常孵育,每组受精卵数量为 1 000 粒,设 3 次重复。

1.4 杂交三倍体的苗种孵化与培育

将杂交三倍体发眼卵 1 万粒放入面积为 3 m²,水深 0.3 m 的孵化槽中孵化,水流量为 2 L/min,水温 7.5~8.5℃,pH 为 7.8,溶解氧不低于 9 mg/L,每天挑出死卵并计数。鱼苗上浮后移至面积为 2.5 m²水深 0.25 m 的苗种培育池中培育,密度为 4 000 尾/m²,鱼苗孵化、饲养和疾病防治参照《虹鳟鱼养殖技术》(Kjqrsvik 1984) 进行。

1.5 杂交苗种倍性检测

实验采用 Pactec CyFlow Cube8 型流式细胞仪检测鱼苗血液 DNA 相对含量的方法,鱼苗生长至 20~30 mm,随机选取硬头鳟、杂交组苗种各 100 尾进行检测。具体检测方法为:
(1) 为防血细胞凝聚,先用注射器吸取超纯水 0.05~0.10 ml,将鱼苗尾部断去,用注射器抽取鱼体血液 0.02~0.03 ml。(2) 将含有血细胞

的超纯水推到测试小管中, 加入 1 ~ 2 ml sysmex CyStain DNA 1 step Staining Solution 染液, 使用 Pactec CyFlow Cube8 型流式细胞仪进行测试, 对流式细胞仪获得的数据进行相应处理。个体倍性按如下公式判断: $DI = \text{处理组细胞峰值道数} / \text{参样细胞峰值道数}$, 细胞峰值道数即直方图上细胞数最多的通道数, 本研究中杂交苗种为处理组, 正常二倍体硬头鳊为参样, 当 DI 为 1.5 ± 0.06 时, 则受测个体为三倍体, 当 DI 为 1.0 ± 0.06 时, 则受测个体为二倍体。正常二倍体苗种的体细胞中含有 2 个染色体组, 而经过杂交处理的受精卵, 由于受精卵在第二极体排出期间使用药物诱导技术, 抑制了受精卵第二极体的排出, 从而使受精卵内部保留了 3 个染色体组, 因此杂交后代的个体的体细胞中 DNA 含量为正常二倍体鱼体细胞中 DNA 含量的 1.5 倍。

1.6 数据分析

发眼率 (%) = (总卵数量 - 未发眼卵数量) / 总卵数量 $\times 100\%$; 孵化率 (%) = 出苗数量 / 发眼卵数量 $\times 100\%$; 三倍体率 (%) = 检测三倍体仔鱼数 / 检测仔鱼数 $\times 100\%$ 。

运用 SPSS13.0 软件系统并进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 利用最小显著极差法 (least significant difference, LSD) 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 杂交结果

硬头鳊 (♀) \times 溪红点鲢 (♂)、溪红点鲢 (♀) \times 硬头鳊 (♂) 的正反杂交实验, 每个实验分为 3 组, 每组实验鱼均为 4 尾雌鱼 2 尾雄鱼, 每个实验组产卵数量为 1.8 ~ 3.0 万粒。3 个溪红点鲢 (♀) \times 硬头鳊 (♂) 实验组的卵子在受精后 10 min 后全部死亡, 而硬头鳊 (♀) \times 溪红点鲢 (♂) 组的卵子正常, 可以进行 6-二甲氨基嘌呤 (6-DMAP) 诱导杂交受精卵实验, 因而药物诱导受精卵的后续实验全部采用硬头鳊 (♀) \times 溪红点鲢 (♂) 组的受精卵。

2.2 不同诱导起始时间实验结果

设定卵子受精后 10、12、15、18、20 min 五个起始诱导时间点, 6-二甲氨基嘌呤 (6-DMAP) 诱导浓度为 150 mg/L, 处理时间为 15 min, 诱导水温为 9.8°C, 其受精卵发眼率、孵化率及三倍体率见表 1。上述不同起始诱导时间, 受精卵的孵化率和苗种三倍体率变化均不显著 ($P > 0.05$); 受精卵的发眼率在起始诱导时间为 12 ~ 15 min 间达到最高, 起始诱导时间为 10、18 min 时, 受精卵发眼率急剧降低, 起始诱导时间为 20 min 时受精卵发眼率最低, 三者之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

表 1 药物诱导不同起始时间对受精卵发眼率、孵化率及苗种三倍体率变化的影响

Table 1 The effects of different initial treatment times on eyed rate, hatching rate of fertilized eggs and triploid rate of the seedlings

诱导起始时间 Initial time (min)	持续时间 Durations (min)	诱导浓度 Concentration (mg/L)	发眼率 Eyed rate (%)	孵化率 Hatching rate (%)	三倍体率 Triploid rate (%)
10	15	150	55.32 \pm 1.25 ^a	89.25 \pm 1.32	95.55 \pm 1.53
12	15	150	76.64 \pm 1.36 ^b	87.17 \pm 1.23	93.97 \pm 1.65
15	15	150	75.87 \pm 2.25 ^b	90.31 \pm 1.41	95.27 \pm 1.28
18	15	150	53.54 \pm 1.87 ^a	88.46 \pm 1.12	95.51 \pm 1.37
20	15	150	24.21 \pm 1.06 ^c	86.44 \pm 1.19	92.45 \pm 1.24

同列数据标注不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different letters mean significant difference at 0.05 level.

2.3 不同诱导持续时间的实验结果

在卵子起始诱导时间为 15 min，6-二甲基氨基嘌呤（6-DMAP）诱导浓度为 150 mg/L，诱导水温为 9.8℃的条件下，设定诱导持续时间分别为 5、10、15、20、25 min，其受精卵发眼率、孵化率及苗种三倍体率结果见表 2。不同诱导持续时间受精卵的孵化率和苗种三倍体率变化不显著（ $P > 0.05$ ）；受精卵的发眼率在诱导持续时间为 10~15 min 时达到最高，诱导持续时间为 20 min 时，受精卵发眼率急剧降低，诱导持续时间为 5、25 min 时受精卵发眼率最低，三者之间存在显著差异（ $P < 0.05$ ）。

2.4 不同药物浓度的诱导实验结果

在卵子起始诱导时间为 15 min，诱导水温

为 9.8℃，诱导持续时间为 15 min 的条件下，设定药物诱导浓度分别为 90、120、150、180、210 mg/L，其受精卵发眼率、孵化率及苗种三倍体率的实验结果见表 3。不同药物诱导浓度，受精卵孵化率和苗种三倍体率均变化不显著（ $P > 0.05$ ）；受精卵的发眼率在药物诱导浓度为 120~150 mg/L 时达到最高，药物诱导浓度为 180 mg/L 时，受精卵发眼率降低，药物诱导浓度为 90、210 mg/L 时，受精卵发眼率最低，三者之间存在显著差异（ $P < 0.05$ ）。

通过各组实验发现，不同的起始时间、不同的持续时间和不同的药物浓度诱导受精卵，对受精卵的孵化率、三倍体率均无较大的影响，但对受精卵的发眼率具有决定性的作用。

表 2 药物诱导持续时间对受精卵发眼率、孵化率及苗种三倍体率变化的影响

Table 2 The effects of drug treatment durations on eyed rate, hatching rate of fertilized eggs and triploid rates of the seedlings

持续时间 Durations (min)	诱导起始时间 Initial time (min)	浓度 Concentration (mg/L)	发眼率 Eyed rate (%)	孵化率 Hatching rate (%)	三倍体率 Triploid rate (%)
5	15	150	34.59 ± 0.86 ^c	90.24 ± 2.01	95.38 ± 1.76
10	15	150	76.81 ± 1.67 ^a	88.38 ± 1.66	94.64 ± 1.83
15	15	150	74.28 ± 1.73 ^a	89.25 ± 1.35	95.29 ± 1.94
20	15	150	61.35 ± 1.75 ^b	87.28 ± 1.58	93.67 ± 1.83
25	15	150	42.92 ± 1.06 ^c	89.75 ± 1.79	96.25 ± 1.92

同列数据标注不同字母表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

Different letters mean significant difference at 0.05 level.

表 3 药物不同浓度梯度对受精卵发眼率、孵化率及苗种三倍体率变化的影响

Table 3 The effects of drug concentration on eyed rate, hatching rate of fertilized eggs and triploid rates of the seedlings

持续时间 Durations (min)	诱导起始时间 Initial time (min)	浓度 Concentration (mg/L)	发眼率 Eyed rate (%)	孵化率 Hatching rate (%)	三倍体率 Triploid rate (%)
15	15	90	45.54 ± 1.12 ^a	90.03 ± 2.13	94.12 ± 1.86
15	15	120	73.57 ± 1.67 ^b	88.57 ± 1.76	92.56 ± 1.65
15	15	150	76.27 ± 1.77 ^b	89.39 ± 1.67	95.74 ± 1.83
15	15	180	60.29 ± 1.43 ^c	88.63 ± 2.03	95.27 ± 1.95
15	15	210	43.96 ± 1.03 ^a	89.20 ± 1.85	96.38 ± 1.87

2.5 杂交苗种倍性检测结果

正常二倍体硬头鳟苗种和杂交苗种血液中 DNA 相对含量经流式细胞仪检测。正常二倍体硬头鳟苗种细胞峰值道数均值为 6 502 (图 1), 杂交苗种细胞峰值道数均值为 10 133 (图 2), 对流式细胞仪获得的数据进行相应处理, 根据个体倍性公式, $DI = 10\ 133 / 6\ 502 = 1.56$, 即处理组受测个体为三倍体, 即证明制备获得的杂交苗种为三倍体。

3 讨论

杂交是鱼类育种广泛采用的一种手段, 杂交苗种可以丰富遗传结构, 提高杂交后代的生活力, 同时产生亲本从未出现过的优良性状, 获得杂种优势(楼允东 2001, 楼允东等 2006)。褐鳟 (*Salmo trutta*) 与溪鳟 (*Salvelinus fontinalis*)、大西洋鲑与褐鳟、湖鳟 (*S. namaycush*) 与溪鳟以及太平洋鲑鱼间的杂交均获得了明显的杂交优势 (Bartly et al. 2001)。我国近年相继报道了虹鳟与银鲑 (*O. kisutch*) 间

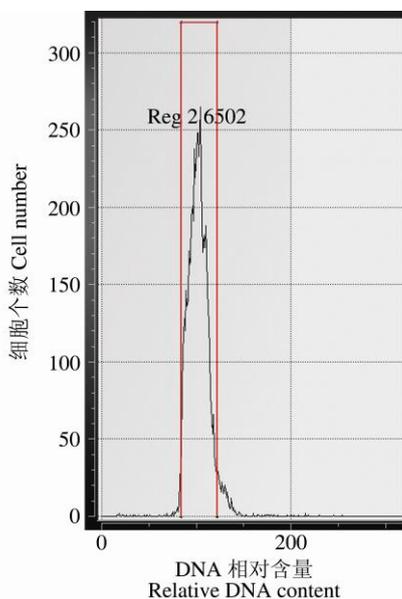


图 1 硬头鳟苗种 DNA 含量检测结果

Fig. 1 Steelhead trout fingerlings detection map

红线: 参样细胞峰值道数区间。Red line: Interval peak values of reference cell.

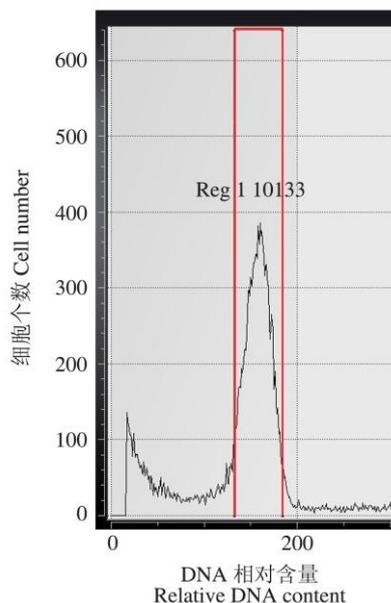


图 2 杂交苗种 DNA 含量检测结果

Fig. 2 Hybrid seed detection map

红线: 参样细胞峰值道数区间。Red line: Interval peak values of reference cell.

的杂交 (徐革锋等 2006)、哲罗鱼 (*Hucho bleekeri*) 与细鳞鱼 (*Brachymystax lenok*) 的杂交 (徐革锋等 2010) 以及日本金鳟与道氏虹鳟间的杂交 (王炳乾等 2005) 等。通过化学方法制备三倍体目前主要集中在贝类上, 包括太平洋牡蛎、虾夷扇贝等 (常亚青等 2001, 于瑞海等 2003), 并可以获得栉孔扇贝 [*Chlamys (Azumapecten) farreri*] (♀) × 虾夷扇贝 (♂)、栉孔扇贝 (♀) × 海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) (♂) 等异源三倍体 (杜方勇等 2003, 孟庆磊 2009), 鱼类研究较少, 而有关利用 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 制备硬头鳟与溪红点鳟的杂交三倍体及其生长与的研究尚未见报道。

3.1 溪红点鳟 (♀) × 硬头鳟 (♂) 杂交后受精卵死亡的分析

本实验以溪红点鳟 (♀) × 硬头鳟 (♂) 为亲本进行杂交, 实验所得的受精卵在受精后 10 min 后全部死亡, 不能发育至发眼阶段, 这种现象与美洲红点鳟 (♀) × 虹鳟 (♂) 的杂

交结果相同（于波 2008），推测可能胚胎阶段的发育方式为雄核发育，导致这种现象的原因可能与养殖环境、群体自身遗传结构以及卵的质量等因素有关。

3.2 药物诱导起始时间对受精卵发眼率、孵化率及苗种三倍体率的影响

鱼类第二极体释放时间约为受精后 8 ~ 15 min（甘光明 2003），随着水温的降低，第二极体释放时间将延后，实验在 9.8℃ 的水温条件下设定了 10、12、15、18、20 min 五个起始时间段，在五个实验起始时间段内受精卵的孵化率保持在 86.44% ~ 90.31% 之间，杂交苗种三倍体率均保持在 92.45% ~ 95.55% 之间，两者变化不显著，但获得受精卵的发眼率在诱导起始时间为 12 min 和 15 min 达到最高，为 75.87% ~ 76.64%，显著高于诱导起始时间 10、18、20 min 的受精卵发眼率。推测诱导起始时间的不同对受精卵正常发育产生了影响，起始诱导时间提前，没有到达第二极体的最佳排出时间，药物起不到抑制作用，而起始诱导时间拖后，受精卵第二极体已经排出，药物处理同样起不到抑制作用，均可导致受精卵的发眼率过低现象。硬头鲮（♀）与溪红点鲑（♂）的杂交三倍体药物诱导在 9.8℃ 的水温条件下，最佳诱导起始时间应为 12 ~ 15 min，在不同水温条件下的最佳诱导时间有待于进一步的研究。

3.3 药物诱导持续时间对受精卵发眼率、孵化率及苗种三倍体率的影响

在孵化水温为 9.8℃，药物诱导起始时间为 15 min，药物诱导浓度为 150 mg/L 条件下，本实验设置了 5、10、15、20、25 min 五个药物诱导持续时间段，实验发现，在五个实验诱导持续时间段内，受精卵的孵化率保持在 87.28% ~ 90.24% 之间，杂交苗种三倍体率保持在 93.67% ~ 96.25% 之间，变化不显著，但获得受精卵的发眼率在诱导 10 ~ 15 min 间达到最高，为 74.28% ~ 76.81% 之间，显著高于处理 5、20、25 min 时的受精卵发眼率，并且在 20 min 后随着药物诱导时间的延长受精卵发眼率有持续下

降的趋势，最佳的药物诱导持续时间段应为 10 ~ 15 min。推测药物处理持续时间的长短对受精卵的发眼率产生了影响，长时间浸泡可能对受精卵的发育产生了抑制作用，最终导致受精卵发眼率下降，而受精卵诱导时间过短，则起不到对第二极体排出的抑制作用，从而产生单倍体受精卵或产生了一套硬头鲮染色体、一套溪红点鲑染色体的二倍体受精卵，但异种二倍体受精卵不能发育，从而导致受精卵发眼率下降，该问题产生的原因有待进一步的研究。

3.4 药物诱导浓度对受精卵发眼率、孵化率及苗种三倍体率的影响

本实验共设置了 90、120、150、180 和 210 mg/L 五个 6-二甲基氨基嘌呤（6-DMAP）诱导浓度梯度，在这五个浓度梯度处理范围内，受精卵的孵化率保持在 88.57% ~ 90.03% 之间，苗种的三倍体率保持在 92.56% ~ 96.38% 之间，变化不显著，但获得受精卵的发眼率在 120 ~ 150 mg/L 间达到最高，显著高于 90 mg/L 的受精卵发眼率，并且在 180 mg/L 后随着药物处理浓度的升高，受精卵发眼率有持续下降的趋势。6-二甲基氨基嘌呤（6-DMAP）主要作用是通过抑制磷酸化激酶的抑制，抑制一系列有磷酸激酶参与的生化反应和细胞功能，从而抑制卵母细胞第二极体排出的作用。推测药物浓度低于 90 mg/L，达不到对卵母细胞第二极体排出的抑制作用；药物浓度高于 150 mg/L，对受精卵的正常发育产生了影响，从而导致受精卵发眼率降低，最佳的药物处理浓度应为 120 ~ 150 mg/L 之间。在贝类处理中，浓度一般较低，如栉孔扇贝（♀）× 虾夷扇贝（♂）使用 6-二甲基氨基嘌呤（6-DMAP）制备三倍体的浓度均为 60 mg/L（杜方勇等 2003，董迎辉等 2007），考虑到贝类和鲑科鱼类卵径差距较大，双壳贝类的卵径一般为 60 ~ 100 μm（施坤涛 2006），而鲑科鱼类的卵径为 3 000 ~ 6 000 μm（齐志宏 2010），所以鲑科鱼类制备三倍体的药物浓度高于贝类的药物处理浓度应为正常现象。

3.5 药物诱导三倍体制备苗种三倍体率的分析

本实验药物诱导三倍体苗种的三倍体率在 92.45% ~ 96.38% 之间, 该结果与虹鳟 (♀) × 美洲红点鲑 (♂) 杂交组合利用热休克技术开展三倍体苗种制备的三倍体率为 93.3% (于波 2008) 的结果相近, Ueda 等 (1984) 曾以虹鳟为母本, 美洲红点鲑为父本开展杂交实验, 在得到杂交子代的同时, 还得到部分三倍体, 这种三倍体是由于“双雌受精”所致, 含有两套母本的染色体组和一套父本的染色体组, 因此推测部分鲑鳟鱼杂交经处理后应更容易形成三倍体, 这也解释了本实验杂交三倍体苗种制备三倍体率比较高的原因。

参 考 文 献

- Bartly D M, Rana K, Immink J. 2001. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(3): 325–327.
- Chourrout D. 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmon gairdneri* Richardson). *Reproduction Nutrition Development*, 20(3A): 727–733.
- Glamuzina B, Kozaul V, Tutman P, et al. 1999. Hybridization of mediterranean groupers: *Epinephelus marginatus* ♀ × *E. aeneus* ♂ and early development. *Aquaculture Research*, 30(8): 625–628.
- Hebert C. 2000. Hydrography and population genetic structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill) from eastern Canada. *Molecular Ecology*, 9(7): 971–982.
- Kjqrsvik E. 1984. Morphological, phylogenetic and genetical studies of egg quality in cod (*Gadus morhua* L.). The propagation of Cod *Gadus morhua* L. *Flodevien*, 1(6): 67–86.
- Neal A G J, Edward S R, Doran M M. 2007. Diet feeding rate growth mortality and production of juvenile Steelhead in a Lake Michigan Tributary. *North American Journal of Fisheries Management*, 27(2): 578–592.
- Solar I I, Donaldson E M, Hunter G A. 1984. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmon gairdneri* Richardson) by heat shock and investigation of early growth. *Aquaculture*, 42(1): 57–67.
- Ueda T, Ojima Y, Sato R, et al. 1984. Triploid hybrids between female rainbow trout and male brook trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50(8): 1331–1336.
- 常亚青, 相建海, 张国范, 等. 2001. 虾夷扇贝三倍体诱导与培育技术的研究. *中国水产科学*, 8(1): 18–22.
- 董迎辉, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 2007. 6-DMAP 诱导栉孔扇贝三倍体的细胞学观察. *海洋水产研究*, 28(2): 71–75.
- 杜方勇, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 2003. 6-DMAP 诱导扇贝异源三倍体的细胞学观察. *水产学报*, 27(6): 528–532.
- 甘光明. 2003. 唇鲮受精生物学研究. 重庆: 西南师范大学硕士学位论文, 14–20.
- 江丽华, 金媛, 毛勇. 2012. 鱼类育种研究进展. *福建水产*, 34(5): 420–427.
- 楼允东. 2001. 鱼类育种学. 北京: 中国农业出版社, 40.
- 楼允东, 李小勤. 2006. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用. *中国水产科学*, 13(1): 151–158.
- 孟庆磊. 2009. 扇贝异源多倍体与四倍体培育技术研究. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 44–50.
- 齐志宏. 2010. 美洲红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*) 的养殖及繁殖技术研究. *现代渔业信息*, 25(6): 24–26.
- 施坤涛. 2006. 四倍体太平洋牡蛎繁殖生物学初探. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 11–25.
- 田传远, 王如才. 1999. 6-DMAP 诱导太平洋牡蛎三倍体——抑制受精卵第二极体释放. *中国水产科学*, 6(2): 1–4.
- 王炳乾, 贾钟贺, 徐连伟, 等. 2005. 日本金鳞 (*Oncorhynchus mykiss*) 和道氏虹鳟及其杂交后代生产性能的比较研究. *水产学杂志*, 18(1): 38–42.
- 徐革锋, 杜佳, 张永泉, 等. 2010. 哲罗鱼 (♀) 与细鳞鱼 (♂) 杂交种胚胎及仔稚鱼发育. *中国水产科学*, 17(4): 630–636.
- 徐革锋, 李永发, 贾钟贺, 等. 2006. 虹鳟、银鲑及其杂交种血液指标的比较研究. *大连水产学院学报*, 21(3): 212–218.
- 徐绍刚, 田照辉, 王跃智, 等. 2011. 硬头鳟受精卵、发眼卵、卵黄囊仔鱼和开口仔鱼氨基酸及脂肪酸的变化. *水生生物学报*, 35(6): 1032–1037.
- 于波. 2008. 虹鳟杂交及多倍体诱导的研究. 天津: 天津师范大学硕士学位论文, 19–31.
- 于瑞海, 王昭萍, 王如才, 等. 2003. 两种方法诱导太平洋牡蛎三倍体在生产上的应用效果. *海洋湖沼通报*, 5(1): 57–61.
- 张士瑾, 李荔, 郭华荣, 等. 2001. 鱼类品种培育新技术. *遗传*, 21(3): 76–78.