

# Technical Research on Induced Triploid of Rainbow Trout by Heat Shock

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

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

Received: May 17<sup>th</sup>, 2019; accepted: May 31<sup>st</sup>, 2019; published: Jun. 12<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

In this study, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) was used as the experimental object. The heat shock method was used to induce the triploid of rainbow trout. The ploidy of rainbow trout was identified by using flow cytometry (CytoFLEX S) and comparison of the long axis of erythrocyte. In the two orthogonal replicate experiments induced by heat shock induced rainbow trout triploid, the effects of three factors, including start time, temperature and duration, on the induction of rainbow trout triploid were studied. The results showed that the temperature had the greatest impact on the eye rate, induction rate and overall score (maximum R value) at the start time, temperature, and duration of the experiment. In the eye rate results, the highest eye rate was obtained at 25°C; in the induction rate results, induction rate of the 25°C, 27°C group was significantly higher than that of the 29°C group; in the comprehensive scoring results; the comprehensive scores of the group at 25°C and 27°C were significantly higher than those at 29°C. In the initial time of 10~20 min, the initial time had no significant effect on the induction rate, but the induction effect was optimal when the starting time was 20 min. In the two-factor experiment results of starting time and treatment intensity, there are two groups whose comprehensive score is higher than 70.00%: the first group and the second group, respectively. The starting time of heat shock is 25 min, and the action parameter is 25°C for 20 min and 27°C for 15 min respectively, which is an ideal parameter for inducing triploid treatment intensity.

## Keywords

Rainbow Trout, Heat Shock, Triploid, Induction Rate, Comprehensive Score

# 热休克法诱导虹鳟三倍体技术研究

车德钊, 温海深\*, 李吉方, 张美昭, 陈落落, 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, \*wenhaishen@ouc.edu.cn

\*通讯作者。

文章引用: 车德钊, 温海深, 李吉方, 张美昭, 陈落落, 辛苑茹. 热休克法诱导虹鳟三倍体技术研究[J]. 水产研究, 2019, 6(2): 63-72. DOI: 10.12677/ojfr.2019.62008

收稿日期：2019年5月17日；录用日期：2019年5月31日；发布日期：2019年6月12日

## 摘要

本文以虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)为实验对象,采用热休克法诱导虹鳟三倍体,利用流式细胞仪(CytoFLEX S)以及比较红细胞长径对虹鳟倍性进行鉴定;在热休克法诱导虹鳟三倍体的两个正交重复实验中,主要研究了处理的起始时间、温度、持续时间三个因素对于虹鳟三倍体诱导效果的影响,结果显示,在实验设定的起始时间、温度、以及持续时间内,温度大小对发眼率、诱导率以及综合评分影响程度都是最大(R值最大),在发眼率结果中,25℃时有最高的发眼率;在诱导率结果中,25℃、27℃明显高于29℃组的诱导率;在综合评分结果中25℃、27℃明显高于29℃组的综合评分。在起始时间为10~20 min内,起始时间对诱导率没有显著影响,但起始时间为20 min时诱导效果最优。在起始时间与处理强度双因素实验结果中,综合评分高于70.00%的共两组,分别为第一组、第二组,热休克的起始时间都是25 min,作用参数分别为25℃持续20 min、27℃持续15 min,是较为理想的诱导三倍体处理强度参数。

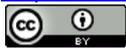
## 关键词

虹鳟,热休克法,三倍体,诱导率,综合评分

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(*Oncorhynchus mykiss*)是鲑形目中经济价值较高的类群,因其性成熟个体体侧有一条宽而鲜艳的彩虹带而得名,英文名 rainbow trout,隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、辐鳍亚纲(Actinopterygii)、鲑形目(Salmoniformes)、鲑科(Salmonidae),大麻哈鱼属(*Oncorhynchus*) [1]。虹鳟原产于美国阿拉斯加地区的山川溪流中,现已成为世界上养殖范围最广的冷水性鱼类,同时也是我国重要的名优水产品之一。虹鳟与大西洋鲑统称鲑鳟鱼,属于市场价格适中的鲑鳟鱼类,颇受广大消费者的喜爱,鱼卵则可制成高档鱼子酱,属于高附加值水产品。

近年来,国内虹鳟养殖产业由于长期的近亲繁殖以及缺乏系统的选育,导致虹鳟养殖个体出现了性早熟、个体小型化、病害频发等问题[2]。虹鳟在进入繁殖期后,能量用来性腺发育,生长停滞,部分虹鳟会出现互相撕咬导致鱼体受伤的状况,极容易导致伤口感染,最终导致鱼体死亡。性成熟的虹鳟,不论雌雄都会出现抗病能力大幅度下降的状况,容易染病导致死亡。繁殖期的虹鳟肉质品质降低,严重影响了虹鳟养殖的经济效益。

三倍体虹鳟由于性腺发育程度低或发育受阻可以有效地改善以上问题,关于虹鳟三倍体的制种方面国内外都做过大量的研究,已有很多报道[2]-[8]。但目前国内还具备大规模生产三倍体虹鳟卵的能力,养鳟者只能进口不育的、大个体的全雌三倍体虹鳟发眼卵进行养殖以满足市场要求。可见,三倍体虹鳟卵或是全雌三倍体虹鳟卵的规模化生产已成为国内虹鳟养殖业的瓶颈。

目前鱼类多倍体诱导主要分为三个重要的方法,分别为化学法(A. 细胞松弛素、B. 秋水仙素、C. 6-二甲基氨基嘌呤等)、物理法(温度休克法、静水压法、电刺激法等)以及生物法(远缘杂交、细胞融合、核

移植等)。国内外已经先后在鲤鱼[9]、黑鲟[10]、斑马鱼[11]、大黄鱼[12]、红鳍东方鲀[13]等 30 多种鱼类中成功诱导三倍体。由于温度休克法较为廉价便捷,不需要专门的大型仪器,在大规模诱导鱼类多倍体中应用较多。在诱导溪鱧三倍体时采用 28℃ 的休克温度在其受精后 10 min,持续 10 min,结果得到 98%~100% 的三倍体,相对存活率达到 42%~100% [3]。之前有研究用温度休克法诱导出黄颡鱼三倍体[14]。本文采用的是热休克法抑制受精卵第二极体的释放来诱导产生虹鱧三倍体,用来研究热休克法诱导虹鱧三倍体的适宜条件。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验用鱼、试验药品器材

虹鱧二倍体亲鱼来源于山东省潍坊市临朐县玉福虹鱧养殖合作社,挑选个体较大、体外无伤、性腺发育良好且活力强的 3~4 龄的雌鱼和雄鱼,雌雄比例为 2:1。

器材:电子恒温水浴锅、显微镜(解剖镜)、采卵盆若干、孵化网盆、塑料桶、孵化器多个、电子天平、温度计数根、秒表多个、烧杯多个、流式细胞仪、10 ml 分子管若干等。

### 2.2. 人工授精

本实验采用湿法授精,同时把精子与卵子同时挤入到盛有单盐等渗液(等渗液的配置:1%的食盐水)[15]的塑料盆中,用羽毛轻轻搅拌 15~20 s 使精卵混合均匀后,开始计时,作为受精的起点,静置 3~5 min 后,加入少许清水进行多次洗卵,洗卵过程中尽量去除过量的精液,未受精的死卵和亲鱼产生的血块等杂物。受精过程中避免强光照射,因此受精时间多在下午 4 点之后。

### 2.3. 三倍体诱导实验设计

本实验采用热休克法进行诱导,通过抑制受精卵第二极体的释放,来获得虹鱧三倍体。为找到较好的诱导条件,本试验对处理起始时间、温度大小和处理持续时间三个主要因素进行了三次试验,分别为两次三因素正交实验的重复实验(分组结果与处理方法见表 1)以及一次起始时间与处理强度的双因素全实验(处理方法见表 2)。处理起始时间为:精卵均匀混合到受精卵进入指定温度的恒温水浴锅中的时间;持续时间为:受精卵完全进入指定温度的恒温水浴锅中到离开水浴锅的时间;温度为:指定恒温水浴锅中的水温。

选取若干装有适量水的容器及恒温水浴锅,分别将水温调到 20℃ 和相应的诱导温度。将洗净的受精卵放在自制的可透水的塑料筛盒中,浸没在盛有常温水的塑料盆中,每组卵在 2000 粒左右,诱导前 5 min 将装有受精卵的塑料筛盒置于 20℃ 的水浴中预处理,并适量的充气搅动,目的是使受精卵在塑料筛盒中受热均匀,诱导时将每组卵快速转移至对应温度的恒温水浴锅中,同样进行充气使其受热均匀,诱导处理完毕后,再放回 20℃ 的水浴中降温 5 min,所有处理完毕后,分别将各组卵放入到指定的流水孵化桶

**Table 1.** The table of orthogonal test on triploid salmon  
**表 1.** 虹鱧三倍体诱导正交试验因素水平表

水平	因素		
	起始时间(min)	温度(℃)	持续时间(min)
1	10	25	10
2	15	27	15
3	20	29	20

**Table 2.** Two-factor experimental scheme for the initiation time and treatment intensity of rainbow trout triploid  
**表 2.** 虹鳟三倍体诱导起始时间与处理强度的双因素实验方案表

组别	处理起始时间(min)	温度大小(°C)	持续时间(min)
1	25	25	20
2	25	27	15
3	25	29	10
4	30	25	20
5	30	27	15
6	30	29	10
7	35	25	20
8	35	27	15
9	35	29	10

内进行流水孵化。

#### 2.4. 苗种培育

各组虹鳟卵在自制的孵化桶内进行常规流水孵化，流水温度为 10.5℃，溶氧为 8 mg/L，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；孵化积温达到 220 度日，胚胎出现黑色的眼点后，挑除发白的死卵，统计各组的发眼率。

然后将发眼卵转移到自制的上浮筐中进行破膜上浮，当孵化积温达到约 600 度日时，仔鱼孵化出膜、吸收卵黄，待卵黄完全吸收，仔鱼开始自由游动时，统计各组的上浮率；开口投喂人工配合饲料，待到仔鱼长到 3~5 cm 时，统计各组的诱导率。

#### 2.5. 样品采集与处理

在仔鱼体长 3~5 cm 时，每组随机取 50 尾进行断尾取血，将采集的尾静脉血用流式细胞仪和红细胞大小比较进行倍性鉴定。

流式细胞仪鉴定具体方法如下：

1) 单细胞悬液的制备：将虹鳟鱼苗用丁香酚麻醉后将其尾柄剪断，迅速插入到盛有 1 mL 0.01 M 的 PBS 缓冲溶液(pH 7.2~7.4)的分子管中，轻轻挤压鱼身，使血液缓慢流出，取血量在 10 μL 左右，然后摇匀，在常温下 3000 rpm 离心 10 s，洗涤血细胞，倒掉上清液，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 2000 rpm 离心 10 min，弃上清液，PBS 洗涤 2 次，显微镜下将细胞浓度调至  $1 \times 10^6$  个/mL，加入 50 μg/mL 的 RNA 酶 20 μL，30 min 后再加入 1 g/L 的 PI 染液 20~50 μL，置于 4℃冰箱中染色 30 min，使用 300 目筛绢过滤。

4) 上机检测，以正常二倍体虹鳟血液样本作为对照组，检测实验组各样本的 DNA 含量，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。三倍体虹鳟血液样本的 DNA 含量理论值应为正常二倍体的 1.5 倍左右。

红细胞大小比较具体方法如下：

将虹鳟鱼苗用丁香酚麻醉后将其尾柄剪断，迅速插入到盛有 1 mL 0.01 M 的 PBS 缓冲溶液(pH 7.2~7.4)

的分子管中,轻轻挤压鱼身,使血液缓慢流出,取血量在 10  $\mu\text{L}$  左右,然后摇匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存带回实验室,当天制作血细胞涂片,用 PBS 缓冲溶液对血细胞浓度进行适当稀释,用在显微镜下测量红细胞大小,重点是测量红细胞长径。

## 2.6. 数据分析

对实验组出现的二倍体、三倍体个数进行统计,计算发眼率、诱导率。三倍体诱导率=三倍体个数/总检测个数。所得到的实验数据发眼率、诱导率以及综合评分[11] (诱导率与发眼率的和为 100,诱导率占 40%,发眼率占 60%)均采用 Excel 软件进行整理。

## 3. 结果

### 3.1. 倍性鉴定结果

三倍体倍性鉴定结果:在流式细胞仪鉴定结果中,二倍体虹鳟红细胞的相对 DNA 含量约为 310,三倍体虹鳟红细胞的相对 DNA 含量约为 450 (图 1),二者比值为 1.45,接近于理论值 1:1.5。在红细胞大小鉴定结果中,二倍体虹鳟的红细胞长径平均值为 16  $\mu\text{m}$ ,与理论值结果一致[16],三倍体虹鳟的长径平均值为 20  $\mu\text{m}$  (图 2),三倍体虹鳟红细胞长轴为二倍体的 1.25 倍。

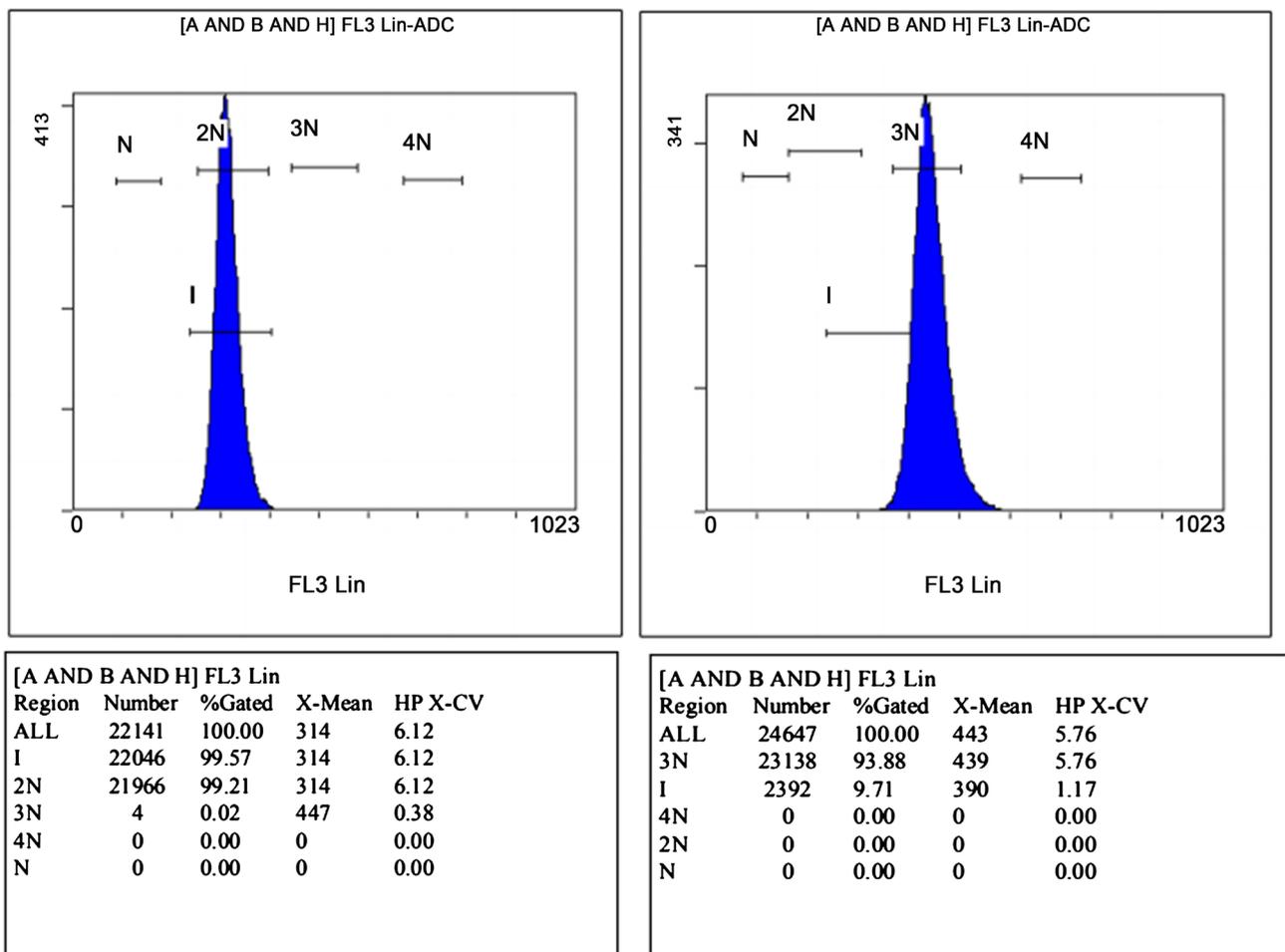
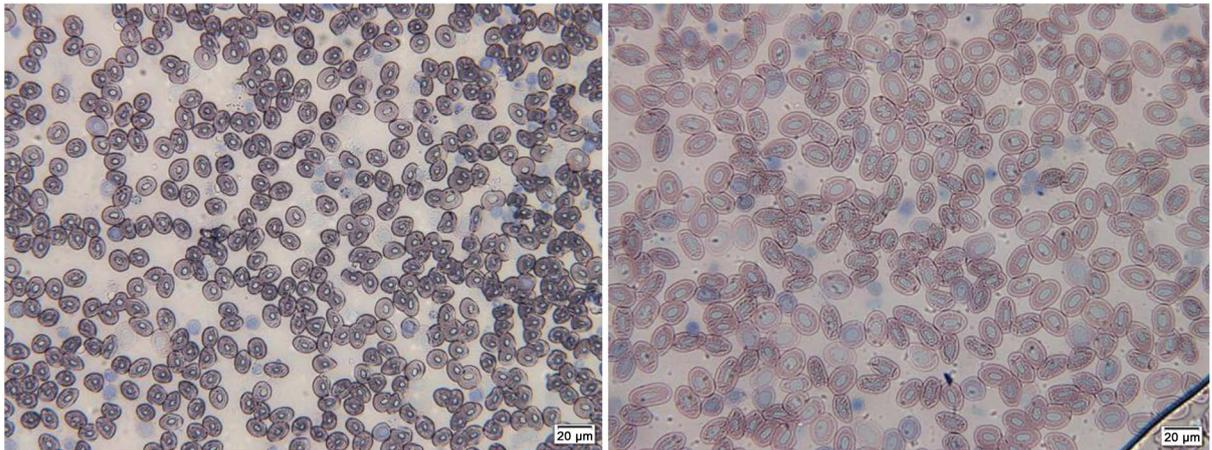


Figure 1. The DNA relative content of diploid and triploid rainbow trout  
图 1. 二倍体、三倍体虹鳟 DNA 相对含量



**Figure 2.** The red blood cells of diploid and triploid rainbow trout (40×10)

**图 2.** 二倍体、三倍体虹鳟红细胞(40×10)

### 3.2. 热休克法诱导三倍体正交实验结果

发眼率结果分析中,影响发眼率最主要的因素(R 值最大)为温度,其次是起始时间与持续时间,温度越高发眼率越低,在 25℃时有最高的发眼率(表 4)。在诱导率结果分析中,影响诱导率最主要的因素(R 值最大)为温度,其次是持续时间与起始时间,在 27℃存在最高的诱导率(表 5)。在综合评分结果分析中,影响诱导效果的最主要因素为温度,其次是起始时间与处理时间,温度为 25℃、27℃明显高于 29℃,起始时间为 15、20 min 高于 10 min,持续时间差异不明显,三个因素的最高值分别是起始时间为 20 min,处理温度为 25℃,持续时间为 20 min (表 6)。综合评分最高的为第七组(表 3),处理参数为起始时间 20 min、25℃处理 20 min。

### 3.3. 热休克法诱导三倍体双因素全实验结果

在本次实验结果中显示,综合评分最高的一组为第一组,参数为起始 25 min, 25℃处理 20 min,发眼率为 70.00%,诱导率为 88.89%,综合评分为 77.56%。综合评分高于 70.00%的共两组,分别为第一组、第二组,热休克的起始时间都是 25 min (表 7)。方差分析结果显示处理的起始时间与处理方式对于实验结果没有显著影响,但是起始时间为 25 min 的三组综合评分均值高于 30 min、35 min。

**Table 3.** Average eye rate, average induction rate, and overall score for orthogonal experiments

**表 3.** 正交实验的平均发眼率、平均诱导率以及综合评分

组别	起始时间	温度	持续时间	平均发眼率	平均诱导率	综合评分
1	10	25	10	71.05%	13.50%	48.03%
2	10	27	15	36.29%	87.90%	56.93%
3	10	29	20	18.51%	6.25%	13.60%
4	15	25	15	88.51%	21.02%	61.51%
5	15	27	20	52.26%	61.25%	55.86%
6	15	29	10	43.11%	35.49%	40.06%
7	20	25	20	84.48%	81.38%	83.24%
8	20	27	10	75.15%	39.22%	60.78%
9	20	29	15	12.40%	27.42%	18.41%

**Table 4.** Average eye rate for orthogonal experiments  
**表 4.** 正交实验发眼率分析

发眼率	起始时间	温度	持续时间
K1	125.84%	244.03%	189.31%
K2	183.88%	163.70%	137.19%
K3	172.03%	74.02%	155.25%
k1	41.95%	81.34%	63.10%
k2	61.29%	54.57%	45.73%
k3	57.34%	24.67%	51.75%
R	19.35%	56.67%	17.37%

**Table 5.** Average induction rate for orthogonal experiments  
**表 5.** 正交实验诱导率分析

诱导率	起始时间	温度	持续时间
K1	107.64%	115.89%	88.20%
K2	117.75%	188.36%	136.33%
K3	148.02%	69.16%	148.88%
k1	35.88%	38.63%	29.40%
k2	39.25%	62.79%	45.44%
k3	49.34%	23.05%	49.63%
R	13.46%	39.74%	20.23%

**Table 6.** The overall score for orthogonal experiments  
**表 6.** 正交实验综合评分分析

综合评分	起始时间	温度	持续时间
K1	118.56%	192.77%	148.86%
K2	157.43%	173.56%	136.85%
K3	162.42%	72.07%	152.70%
k1	39.52%	64.26%	49.62%
k2	52.48%	57.85%	45.62%
k3	54.14%	24.02%	50.90%
R	14.62%	40.23%	5.28%

## 4. 讨论

### 4.1. 处理强度对于热休克法诱导虹鳟三倍体的影响

在鱼类多倍体育种中，温水鱼或是热带鱼通常用低温进行温度休克诱导多倍体，冷水鱼通常用高温进行温度休克诱导多倍体[17]。虹鳟属于冷水性鱼类，用适当的高温刺激来诱导三倍体，温度过低会导致较低的诱导率，过高的温度虽然会产生较高的诱导率但也会产生很低的发眼率，因为较高的温度会使受

**Table 7.** Average eye rate, average induction rate, and overall score for the two-factor full experiments  
**表 7.** 双因素全实验的发眼率、诱导率、综合评分

组别	参数	发眼率	诱导率	综合评分
三 1	25, 25, 20	70.00%	88.89%	77.56%
三 2	25, 27, 15	54.20%	97.22%	71.41%
三 3	25, 29, 10	56.10%	88.89%	69.22%
三 4	30, 25, 20	43.50%	0.00%	26.10%
三 5	30, 27, 15	42.50%	0.00%	25.50%
三 6	30, 29, 10	37.50%	83.33%	55.83%
三 7	35, 25, 20	72.20%	52.78%	64.43%
三 8	35, 27, 15	49.70%	88.89%	65.38%
三 9	35, 29, 10	42.50%	55.56%	47.72%
三 10	—	71.90%		

精卵受到损害,使其无法正常发育从而导致死亡。贾钟贺等在对金鳟受精卵进行热休克诱导过程中采用了 26℃ 进行诱导,产生了较为理想的诱导效果[6]。张艳萍等人对虹鳟进行热休克诱导三倍体研究中发现,当诱导温度为 26.5℃ 时产生了 83.18% 的三倍体诱导率,当诱导温度达到 30℃ 时,虽然产生了 90% 以上的诱导率,但发眼率极低同时产生的苗种畸形率很高[5]。这与本研究结果相似,但不完全一致,在正交实验诱导虹鳟三倍体结果中表明,29℃ 的实验组发眼率普遍的低于同一起始时间的 25℃、27℃ 实验组,但诱导率并未出现高于 25℃、27℃ 实验组的现象。这一结果与王炳谦等人的研究结果相似,其研究结果表明,以 26℃ 处理效果最佳,以 28℃ 处理诱导效果较低。原因可能是由于温度过高,染色体断裂或缺失导致胚胎发育受阻而引起的[2]。

在本研究中显示,持续时间也是影响诱导效果的一个重要因素。在相同的处理温度下,持续时间越长,则处理强度越大,诱导率越高同时发眼率越低,三因素三水平正交实验结果中显示,作用参数为 25℃ 持续 20 min、27℃ 持续 15 min 会出现较高的综合评分,是较为理想的处理参数。这与宋宝坤等人在虹鳟卵受精 20 min,26℃ 下持续处理时间为 20 min 可获得较高的孵化率和三倍体率的结果相似[18],与张艳萍等的研究结果存在一定的差异,这可能是不同的受精卵质量、亲鱼质量引起的差异。有研究发现,母本的遗传因素会决定后代的生存能力,不同母本产生的卵子成熟度不一致或者相对脆性等因子不同会干扰处理效果[19][20],最终导致研究结果出现差异。

#### 4.2. 起始时间对于热休克法诱导虹鳟三倍体的影响

热休克法诱导虹鳟三倍体是通过在第二极体释放之前给予适当的温度刺激,抑制受精卵第二极体的释放,以此使得受精卵中有三套染色体,从而培育出虹鳟三倍体苗种。卵子受精后,从第二次成熟分裂中期到第二极体排出这段时间,有丝分裂进程分为中期、后期、末期,分别对应于卵子启动期、休克敏感期、休克不应期[21],确定虹鳟受精卵第二极体的释放时间段(休克敏感期)是能否成功诱导三倍体的一个重要因素。鱼类受精卵的第二极体释放时间受所处环境水温的影响,冷水性鱼类的第二极体释放较为缓慢,温水性鱼类的受精卵第二极体释放较快[17]。

Peter 等在研究热休克诱导溪鳟三倍体时,在水温 11℃~12℃ 的条件下,采用 28℃ 水温在其受精后 10 min 开始刺激,处理持续时间 10 min,三倍体诱导率高达 98%~100%,且相对存活率也较高,在 42%~100% 之间[3];王炳谦等在水温 6.5℃,受精 20 min 后用 26℃ 热休克处理 20 min,得到三倍体诱导

率为 100% [2]; 张艳萍等人在 26.5℃ 条件下, 受精后 15 min, 处理持续 10 min 得到效果最佳[5]。楼允东等人认为虹鳟第二极体的排放时间大约在受精后 15~40 min, 在此时间内用热休克处理可以得到三倍体 [17]。本次正交实验结果显示, 虽然 10 min、15 min、20 min 的起始时间都出现过较高的诱导率, 但起始时间为 20 min 的综合评分高于 10 min 以及 15 min, 这与宋宝坤等人在 20 min 处诱导产生较高的诱导率跟发眼率结果相似[18]。在本次双因素正交实验中结果显示, 在起始时间为 25 min 处不同的处理方式同样会产生较高的诱导率跟发眼率。通过这两次实验可以说明, 在起始时间 20~25 min 时进行热休克诱导虹鳟受精卵, 可以产生较高的发眼率及诱导率。

## 5. 总结

在两次虹鳟三倍体诱导实验中, 诱导效果较好的为以下两组: 1) 虹鳟卵受精后 20 min 时, 采用 25℃ 处理 20 min, 产生的诱导效果为: 发眼率为 84.48%, 诱导率为 81.38%, 综合评分为 83.24%。2) 在虹鳟卵受精 25 min 时, 采用 25℃ 处理 20 min, 发眼率为 70.00%, 诱导率为 88.89%, 综合评分为 77.56%。因此在虹鳟卵受精 20~25 min 时, 采用 25℃ 处理 20 min 的处理强度, 可以得到较为理性的诱导效果, 是较为理想的三倍体诱导参数。

## 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] 王炳谦. 中国鲑鳟鱼养殖[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 1-15.
- [2] 王炳谦, 徐连伟, 贾钟贺, 等. 热休克诱导全雌虹鳟三倍体[J]. 水产学杂志, 2005, 18(2): 22-27.
- [3] Galbreath, P. and Samples, B. (2000) Optimization of Thermal Shock Protocols for Induction of Triploid in Brook Trout. *North American Journal of Aquaculture*, **62**, 249-259. [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(2000\)062<0249:OOTSPF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2000)062<0249:OOTSPF>2.0.CO;2)
- [4] Chourrout, D. (1980) Thermal Induction of Diploid Gynogenesis and Triploid in the Eggs of the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reproduction Nutrition Development*, **20**, 727-733. <https://doi.org/10.1051/rnd:19800415>
- [5] 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.
- [6] 贾钟贺, 徐革锋, 牟振波, 等. 金鳟伪雄鱼的制备及全雌三倍体的诱导[J]. 大连海洋大学学报, 2009, 24(1): 8-11.
- [7] 陈春山, 魏凯, 韩姝伊, 等. 热休克诱导细鳞鲑三倍体的初步研究[J]. 淡水渔业, 2018, 48(6): 63-68.
- [8] 龙强, 宗虎民, 陈冰君. 虹鳟鱼三倍体的育种技术[J]. 北京水产, 2004(5): 36-37.
- [9] Gervai, J., Páter, S., Nagy, A., et al. (1980) Induced Triploid in Carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*, **17**, 667-671. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb02800.x>
- [10] 尤锋. 黑鲷三倍体的人工诱导研究[J]. 海洋与湖沼, 1993(3): 248-255+334.
- [11] 吴玉萍, 叶玉珍, 吴清江. 热休克诱导斑马鱼异源三倍体的研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(5): 465-470.
- [12] 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.
- [13] 王茂林, 姜志强, 李荣. 红鳍东方鲀三倍体诱导的初步研究[J]. 水产科学, 2006, 25(7): 349-352.
- [14] 宋立民. 温度休克诱导黄颡鱼三倍体及其倍性鉴定研究[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [15] 王昭明, 王新军, 陈惠, 等. 食盐水洗卵法在鲑科鱼人工繁殖中的应用试验[J]. 水产学杂志, 2000, 13(2): 6-8.
- [16] 魏华, 吴垠, 等. 鱼类生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 99-112.
- [17] 楼允东. 国外对鱼类多倍体育种的研究[J]. 水产学报, 1984, 8(4): 343-356.
- [18] 宋保坤, 王辉, 叶富良, 等. 水产动物多倍体育种技术研究[J]. 北京水产, 2004(6): 38-41.

- 
- [19] Diter, A., Quillet, E. and Chourrout, D. (1993) Suppression of First Egg Mitosis Induced by Heat Shocks in the Rainbow Trout. *Journal of Fish Biology*, **42**, 777-786. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1993.tb00383.x>
- [20] Solar, I.I., Donaldson, E.M. and Hunter, G.A. (1984) Induction of Triploid in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by Heat Shock, and Investigation of Early Growth. *Aquaculture*, **42**, 57-67. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90313-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90313-2)
- [21] 桂建芳, 肖武汉, 梁绍昌, 等. 静水压休克诱导水晶彩鲫三倍体和四倍体的细胞学机理初探[J]. 水生生物学报, 1995, 19(1): 49-55.

**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](mailto:ojfr@hanspub.org)