



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103283644 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201310174291. 1

(22) 申请日 2013. 05. 13

(73) 专利权人 新疆维吾尔自治区水产科学研究所

地址 830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市  
西虹西路 614 号

(72) 发明人 杜劲松 郭焱 海萨 高攀  
胡建勇 孟玮

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限公司 31224

代理人 吕伴

(51) Int. Cl.

A01K 61/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101675729 A, 2010. 03. 24,

CN 101675730 A, 2010. 03. 24,

CN 201252771 Y, 2009. 06. 10,

权利要求书2页 说明书5页

(54) 发明名称

一种提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法

(57) 摘要

本发明公开的一种提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法，其特征在于，具体包括如下步骤：1)亲本选择及培育步骤；2)人工催产步骤；3)精卵采集及人工授精步骤；4)受精卵孵化步骤；5)平游前的管理步骤；6)鱼苗培育步骤；7)不同家系后代的荧光标记步骤。本发明有以下几个特点：1. 本发明以亲本强化培育和注射人工催产激素相结合，解决了亲本性腺发育不同步和雄本精液量少的问题；2. 结合白斑狗鱼精子活力的观察结果，配制了白斑狗鱼受精液，提高了受精率；3. 通过控制孵化温度，实现了不同批次采集的受精卵的同期破膜问题。

1. 一种提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法,其特征在于,具体包括如下步骤:

1). 亲本选择及培育步骤

春季从已性成熟的白斑狗鱼群体中,选择雌鱼体重为2kg以上、雄鱼为0.8kg以上,丰满度好,无病,无伤的个体,在池塘中进行驯养;所述池塘面积为6-8亩,放养密度控制在150kg/亩为宜;驯养过程中,投放活体饵料鱼进行喂养,其中活体饵料鱼的投放量在春、夏、秋季按1:3的体重比投放活体饵料鱼,即每1kg白斑狗鱼投放活体饵料鱼3kg,每30天检查一次饵料鱼剩余情况,并即时投放适口的活体饵料鱼;冬季封冰前,按1:5的体重比投放饵料鱼,即每1kg白斑狗鱼投放活体饵料鱼5kg;

2). 人工催产步骤

翌年春季,池塘开冰,水温升至6℃时,再次对亲本进行筛选;挑选性成熟良好的雌、雄白斑狗鱼;然后向挑选出来的性成熟良好的雌、雄白斑狗鱼的胸腔注射鲑鱼释放激素类似物(SGnRH-A)、维生素B1或/和地欧酮(DOM)合剂进行人工催产,催产后放入采卵预备池内继续进行喂养,采卵预备池的水温保持在6-10℃;其中雌鱼分两次注射、针距为24h,第一次注射:5μg SGnRH-A+1.5mg VB1+3mg DOM,第二次注射:25μg SGnRH-A+3mg DOM;雄鱼1次注射,注射量为5μg SGnRH-A+1.5mg VB1+3mg DOM;

3). 精卵采集及人工授精步骤

3.1) 受精液配制

配制浓度为200mmol/L的葡萄糖溶液,作为受精液;

3.2) 着卵板的制作及布置

制作40cm×80cm×5cm木质结构的框架,底部用60目筛绢封闭,经5%的食盐消毒后形成着卵板,所述着卵板固定于采卵池内,筛绢与水面距离为5-10cm;

3.3) 精卵采集及人工授精

人工催产后3至4天后取出采卵预备池内的人工催产后的雌、雄白斑狗鱼一比一配组,进行人工采集精卵;其中每家系雌白斑狗鱼采集卵液标准为吸水膨胀后300-500mL,每家系雄白斑狗鱼采集的精液量为2个自然滴以上,将每家系所采用的卵液和精液混合后加300-500mL的受精液,静置1min,随后8-10℃清水脱粘10min,平铺于着卵板上进行人工繁殖得到受精卵;其中每100mL卵液中加入精液量为1个自然滴,每100mL卵液加入受精液的量为100mL;

雌雄鱼采完精卵后,在背鳍前、侧线鳞上方注射PIT电子标记,并记录每尾亲本的标记号;为了减少家系后代间的生长差异,人工繁殖工作尽量保证在3天内完成;

4). 受精卵孵化步骤:

受精卵孵化在采卵池内继续进行,孵化水温控制在8-13℃;不同批次采集的受精卵在8-13℃水温范围内,以采卵顺序适当提高孵化温度,使不同采卵批次的受精卵胚胎发育阶段调整一致,从而保证不同家系受精卵的破膜时间一致;受精卵孵化后期,严格检测胚胎发育阶段和心跳速率;受精卵发育至破膜前期,心跳速率在90次/min时,每个家系的受精卵移至独立的孵化池中的着卵板上,进行破膜;所述着卵板的结构与步骤3.2)的着卵板结构相同;

5). 平游前的管理步骤:

受精卵开始破膜时，在孵化池中布置网目为 40 目的网片作为附着物；受精卵破膜后，撤出孵化池内的着卵板，清理死卵和卵膜后形成鱼苗培育池；所述鱼苗培育池保持水质清新，水温逐步提升至 15℃；平游前水温控制在 15–18℃，池水溶氧量不得低于 6mg/L；

6). 鱼苗培育步骤：

鱼苗培育期保证鱼苗培育池内溶解氧在 6mg/L 以上，水温控制在 16–20℃之间；鱼苗平游后的第二天，开始投喂卤虫，全长达到 2.00cm 时，投喂鲤、鲫鱼水花；鱼苗全长达 3.00cm 时，对每个家系后代中随机选留 2000 尾，在鱼苗培育池进行培育；

7). 不同家系后代的荧光标记步骤：

鱼苗全长达到 10cm 时注射荧光标记；根据 Northwest Marine Technology 公司的 VIE 荧光标记说明书配制不同颜色的标记液；在白斑狗鱼左右两个眼睛下方、背鳍和臀鳍基部注射荧光标记；完成标记的鱼苗在鱼苗培育池中暂养 1 周后，观察标记情况，然后投放于同一池塘中进行养殖性能对比试验。

2. 根据权利要求 1 所述的提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法，其特征在于，所述步骤 4) 中，后一批次受精卵加入时其孵化温度应较前一批次受精卵加入时孵化温度提高 2℃。

3. 根据权利要求 1 所述的提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法，其特征在于，所述步骤 6) 中，投喂每 1 万尾 50g 卤虫卵孵化后的无节幼体。

4. 根据权利要求 1 所述的提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法，其特征在于，所述步骤 6) 中，每天 1000 尾白斑狗鱼苗种投喂 6000 尾鲤、鲫鱼水花。

## 一种提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及水产动物遗传育种技术领域,特别涉及一种提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法。

### 背景技术

[0002] 白斑狗鱼(*Esox lucius*)俗称狗鱼,属鲑形目、狗鱼科,是肉食性凶猛鱼类,分布于亚洲、欧洲和北美洲的北极圈周边地区,约在北纬46°以北。在我国仅分布于额尔齐斯河及附属水体。具抗寒能力极强、生长速度快、肉质坚韧少刺、营养价值高、可食部分大、病害少、容易起捕等特点,是新疆影响力和开发力度较大的优质土著经济鱼类之一。2000年前,市场上的白斑狗鱼主要来自天然捕捞,2000年后,随着白斑狗鱼人工繁殖技术的突破,国内白斑狗鱼池塘养殖得到了快速的发展。国内已推广到河北、广东、上海、四川、北京、天津、江苏、浙江、甘肃等省市。

[0003] 随着白斑狗鱼养殖规模的不断扩大,很多苗种生产单位在利益的驱动下,未经对亲本的严格筛选就进行人工繁殖,苗种质量未能得到保证。部分苗种生产单位采集乌伦古湖等天然资源“现捕现作”方式的生产苗种,这种苗种生产方式的苗种质量有保证,但从实践中看这种方式资源耗费大,存在受精率低(30~50%),孵化率低(20~30%)特别是亲鱼只能一次利用,对天然资源的破坏大。更为严重的是,由于额尔齐斯河拦河建坝、水资源的过度开发、不利的繁殖条件以及人为的过度捕捞,导致白斑狗鱼在额尔齐斯河的天然资源量逐年下降。据统计,20世纪60年代前白斑狗鱼在额尔齐斯河水系的产量占该河渔获物重量的20%左右,年产可达120t,到1999年白斑狗鱼产量下降至15t,2006年仅为7.5t左右。这种种群数量的急剧下降毕竟会导致遗传多样性的丧失,种质的退化。虽然近几年来白斑狗鱼养殖得到了迅速的发展,但白斑狗鱼种质改良未能得到重视,新品种选育工作还没有开展。因此,迫切需要开展白斑狗鱼育种研究,选育出优良新品系,以适应白斑狗鱼养殖业的健康发展需求。

[0004] 家系选育作为一种精确的育种方法,被广泛应用于鱼类的遗传改良,并取得重大成效,如大西洋鲑遗传改良、印度鲤的选育、虹鳟的选育等都取得了较好的选育结果。由于白斑狗鱼幼鱼阶段生长速度快(饵料充足时平游至全长达到10cm约需30天)、个体差异而导致的自残率高(平游相差4天的幼鱼在同一水体中因个体差异而导致自残,成活极低)。家系选育的成败关键取决于能否准确评价各家系间的生长优势,尽可能的消除外部环境的影响。开展白斑狗鱼大规模家系选育时,存在性腺发育不同步,雄鱼精液量不足等问题,导致家系构建不同步、苗种成活率不高、初始构建成功率低等问题。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于针对白斑狗鱼大规模家系选育时,存在性腺发育不同步,雄鱼精液量不足等问题,导致家系构建不同步、苗种成活率不高、初始构建成功率低等问题,而提供一种提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法。该方法结合白斑狗鱼

本身的生物学特性和传统的家系选育方法相结合,解决了亲本集中繁殖、提高受精率、受精卵集中破膜等问题,减少了外部环境导致的不同家系后代间的个体差异等问题,实现了对白斑狗鱼大规模家系的构建,从选育技术上推动白斑狗鱼的新品种开发。

[0006] 本发明所要解决的技术问题可以通过以下技术方案来实现:

[0007] 一种提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法,具体包括如下步骤:

[0008] 1. 亲本选择及培育步骤

[0009] 亲鱼需在池塘进行人工养殖3年后方可用于人工繁殖。春季从已性成熟的白斑狗鱼群体中,选择雌鱼体重为2kg以上、雄鱼为0.8kg以上,丰满度好,无病,无伤的个体,在池塘中进行驯养;所述池塘面积为6-8亩,放养密度控制在150kg/亩为宜;驯养过程中,投放活体饵料鱼进行喂养,其中活体饵料鱼的投放量在春、夏、秋季按1:3的体重比投放活体饵料鱼,即每1kg白斑狗鱼投放活体饵料鱼3kg,每隔30天检查饵料鱼的剩余量,并及时补给。冬季封冰前,按1:5的体重比投放饵料鱼,即每1kg白斑狗鱼投放活体饵料鱼5kg;

[0010] 2. 人工催产步骤

[0011] 翌年春季,池塘开冰,水温升至6℃时,再次对亲本进行筛选;挑选性成熟良好的雌、雄白斑狗鱼;然后向挑选出来的性成熟良好的雌、雄白斑狗鱼的胸腔注射鲑鱼释放激素类似物(SGnRH-A)、维生素B1和地欧酮(DOM)合剂进行人工催产,催产后放入采卵预备池内继续进行喂养,采卵预备池的水温保持在6-10℃;其中雌鱼分两次注射、针距为24h,第一次注射每千克体重:5μg SGnRH-A+1.5mg VB1+3mg DOM,第二次注射:25μg SGnRH-A+3mg DOM;雄鱼1次注射,注射量为每千克体重5μg SGnRH-A+1.5mg VB1+3mg DOM;

[0012] 3. 精卵采集及人工授精步骤

[0013] 3.1 受精液配制

[0014] 配制浓度为200mmol/L的葡萄糖溶液,作为受精液;

[0015] 3.2 着卵板的制作及布置

[0016] 制作40cm×80cm×5cm木质结构的框架,底部用60目筛绢封闭,经5%的食盐消毒后形成着卵板,所述着卵板固定于采卵池内,筛绢与水面距离为5-10cm;

[0017] 3.3 精卵采集及人工授精

[0018] 人工催产后3至4天后取出采卵预备池内的人工催产后的雌、雄白斑狗鱼一比一配组,进行人工采集精卵;其中每家系雌白斑狗鱼采集卵液标准为吸水膨胀后300-500mL,每家系雄白斑狗鱼采集的精液量为2个自然滴以上,将每家系所采用的卵液和精液混合后加300-500mL的受精液,静置1min,随后8-10℃清水脱粘10min,平铺于着卵板上进行人工繁殖得到受精卵;其中每100ml卵液中加入精液量为1个自然滴,每100ml卵液加入受精液的量为100ml;

[0019] 雌雄鱼采完精卵后,在背鳍前、侧线鳞上方注射PIT电子标记,并记录每尾亲本的标记号;为了减少家系后代间的生长差异,人工繁殖工作尽量保证在3天内完成;

[0020] 4. 受精卵孵化步骤:

[0021] 受精卵孵化在采卵池内继续进行,孵化水温控制在8-13℃;不同批次采集的受精卵在8-13℃水温范围内,以采卵顺序适当提高孵化温度,使不同采卵批次的受精卵胚胎发育阶段调整一致,从而保证不同家系受精卵的破膜时间一致,后一批次受精卵加入时其孵化温度应较前一批次受精卵加入时孵化温度提高2℃;受精卵孵化后期,严格检测胚胎发育

阶段和心跳速率；受精卵发育至破膜前期，心跳速率在 90 次 /min 时，每个家系的受精卵移至独立的孵化池中的着卵板上，进行破膜；所述着卵板的结构与步骤 3.2 的着卵板结构相同；

[0022] 5. 平游前的管理步骤：

[0023] 受精卵开始破膜时，在孵化池中布置网目为 40 目的网片作为附着物；受精卵破膜后，撤出孵化池内的着卵板，清理死卵和卵膜后形成鱼苗培育池；所述鱼苗培育池保持水质清新，水温逐步提升至 15℃；平游前水温控制在 15-18℃，池水溶氧量不得低于 6mg/L；

[0024] 6. 鱼苗培育步骤：

[0025] 鱼苗培育期保证鱼苗培育池内溶解氧在 6mg/L 以上，水温控制在 16-20℃ 之间；鱼苗平游后的第二天起，每天 8:00, 13:00 及 18:00 投喂，同时投喂从池塘中捞取枝角类等浮游动物；全长达到 1.5cm 时，投喂鲤、鲫鱼水花，每天每 1000 尾苗投喂 6000 尾水花；鱼苗全长达 3.00cm 时，对每个家系后代中随机选留 2000 尾，在鱼苗培育池进行培育，每天投喂 4000 尾鲤、鲫鱼乌仔和 50g 红线虫；苗种培育过程中，具体投喂量根据摄食情况而适当增减。

[0026] 7. 不同家系后代的荧光标记步骤：

[0027] 鱼苗全长大达到 10cm 时注射荧光标记；根据 Northwest Marine Technology 公司的 VIE 荧光标记说明书配制不同颜色的标记液；在白斑狗鱼左右两个眼睛下方、背鳍和臀鳍基部注射荧光标记；完成标记的鱼苗在鱼苗培育池中暂养 1 周后，观察标记情况，然后投放于同一池塘中进行养殖性能对比试验。

[0028] 本发明有以下几个特点：

[0029] 1. 本发明以亲本强化培育和注射人工催产激素相结合，解决了亲本性腺发育不同步和雄本精液量少的问题；

[0030] 2. 结合白斑狗鱼精子活力的观察结果，配制了白斑狗鱼受精液，提高了受精率；

[0031] 3. 通过控制孵化温度，实现了不同批次采集的受精卵的同期破膜问题。

## 具体实施方式

[0032] 一种提高白斑狗鱼全同胞家系构建成功率的方法，具体包括如下步骤：

[0033] 1、亲本选择及培育步骤

[0034] 春季从已性成熟的白斑狗鱼群体中，选择雌鱼体重为 2kg 以上、雄鱼为 0.8kg 以上，丰满度好，无病，无伤的个体，在池塘中进行驯养；所述池塘面积为 6-8 亩，放养密度控制在 150kg/ 亩为宜；驯养过程中，投放活体饵料鱼进行喂养，其中活体饵料鱼的投放量在春、夏、秋季按 1:3 的体重比投放活体饵料鱼，即每 1kg 白斑狗鱼投放活体饵料鱼 3kg，每 30 天检查一次饵料鱼剩余情况，并即时投放适口的活体饵料鱼。白斑狗鱼与大多数养殖鱼类不同，在冬季封冰后继续摄食，冬季缺乏饵料影响繁殖成功率。因此，在冬季封冰前，按 1:5 的体重比投放饵料鱼。

[0035] 2. 人工催产步骤

[0036] 翌年春季，池塘开冰，水温升至 6℃ 时，再次对亲本进行筛选；挑选性成熟良好的雌、雄白斑狗鱼；然后向挑选出来的性成熟良好的雌、雄白斑狗鱼的胸腔注射鲑鱼释放激素类似物 (SGnRH-A)、维生素 B1 或 / 和地欧酮 (DOM) 合剂进行人工催产，催产后放入采卵预备

池内继续进行喂养,采卵预备池的水温保持在 6-10℃;其中雌鱼分两次注射、针距为 24h,第一次注射:5 μg SGnRH-A+1.5mg VB1+3mg DOM,第二次注射:25 μg SGnRH-A+3mg DOM;雄鱼 1 次注射,注射量为 5 μg SGnRH-A+1.5mg VB1+3mg DOM;

[0037] 3. 精卵采集及人工授精步骤

[0038] 3.1 受精液配制

[0039] 根据我们不同离子对白斑狗鱼精子活力的观察结果显示,在渗透压 200mOsm/L 的葡萄糖溶液中精子的快速运动时间最长。根据这一结果,配制浓度为 200mmol/L 的葡萄糖溶液,作为受精液。

[0040] 3.2 着卵板的制作及布置

[0041] 制作 40cm×80cm×5cm 木质结构的框架,底部用 60 目筛绢封闭,经 5% 的食盐消毒后形成着卵板,所述着卵板固定于采卵池内,筛绢与水面距离为 5-10cm;

[0042] 3.3 精卵采集及人工授精

[0043] 人工催产后 3 至 4 天后取出采卵预备池内的人工催产后的雌、雄白斑狗鱼一比一配组,进行人工采集精卵;其中每家系雌白斑狗鱼采集卵液标准为吸水膨胀后 300-500ml,每家系雄白斑狗鱼采集的精液量为 2 个自然滴以上,将每家系所采用的卵液和精液混合后加 300-500mL 的受精液,静置 1min,随后 8-10℃清水脱粘 10min,平铺于着卵板上进行人工繁殖得到受精卵;其中每 100ml 卵液中加入精液量为 1 个自然滴,每 100ml 卵液加入受精液的量为 100ml;

[0044] 雌雄鱼采完精卵后,在背鳍前、侧线鳞上方注射 PIT 电子标记,并记录每尾亲本的标记号;为了减少家系后代间的生长差异,人工繁殖工作尽量保证在 3 天内完成;

[0045] 4. 受精卵孵化步骤:

[0046] 受精卵孵化在采卵池内继续进行,孵化水温控制在 8-13℃;鱼类受精卵在适温范围内随着温度的升高,胚胎发育速度加快,并对受精率影响不大。利用这一特点,不同批次采集的受精卵在 8-13℃水温范围内,以采卵顺序适当提高孵化温度,使不同采卵批次的受精卵胚胎发育阶段调整一致,从而保证不同家系受精卵的破膜时间一致,其中后一批次受精卵加入时其孵化温度应较前一批次受精卵加入时孵化温度提高 2℃。受精卵孵化后期,严格检测胚胎发育阶段和心跳速率;受精卵发育至破膜前期,心跳速率在 90 次 /min 时,每个家系的受精卵移至独立的孵化池中的着卵板上,进行破膜;所述着卵板的结构与步骤 3.2 的着卵板结构相同;

[0047] 5. 平游前的管理步骤:

[0048] 因白斑狗鱼仔鱼破膜后游泳能力差,只能短暂的垂直游动,大多数时间依靠吻端的吸附器官吊挂在附着物上。在人工育苗时,如果缺乏附着物,稚鱼互相挤压,导致育苗的大量死亡。因此,受精卵开始破膜时,在孵化池中布置网目为 40 目的网片作为附着物;受精卵破膜后,撤出孵化池内的着卵板,清理死卵和卵膜后形成鱼苗培育池;所述鱼苗培育池保持水质清新,水温逐步提升至 15℃;平游前水温控制在 15-18℃,池水溶氧量不得低于 6mg/L;

[0049] 6. 鱼苗培育步骤:

[0050] 鱼苗培育期保证鱼苗培育池内溶解氧在 6mg/L 以上,水温控制在 16-20℃之间;鱼苗平游后的第二天起,每次每 1 万尾苗孵化卤虫卵 50g,每天 8:00, 13:00 及 18:00 投喂,同

时投喂从池塘中捞取枝角类等浮游动物。

[0051] 全长达到 2.00cm 时,投喂鲤、鲫鱼水花,每天每 1000 尾苗投喂 6000 尾水花。

[0052] 鱼苗全长达 3.00cm 时,对每个家系后代中随机选留 2000 尾,在鱼苗培育池进行培育,每天投喂 4000 尾鲤、鲫鱼乌仔和 50g 红线虫。

[0053] 苗种培育过程中,具体投喂量根据摄食情况而适当增减。

[0054] 7. 不同家系后代的荧光标记步骤 :

[0055] 鱼苗全长大达到 10cm 时注射荧光标记 ;根据 Northwest Marine Technology 公司的 VIE 荧光标记说明书配制不同颜色的标记液 ;在白斑狗鱼左右两个眼睛下方、背鳍和臀鳍基部注射荧光标记 ;完成标记的鱼苗在鱼苗培育池中暂养 1 周后,观察标记情况,然后投放于同一池塘中进行养殖性能对比试验。

[0056] 2004-2006 年春季从额尔齐斯河流域引进已性成熟的白斑狗鱼原种,并在新疆水生野生动物救护中心开展驯养和人工繁殖实验。2009 年从人工繁殖后代中选留 10000 尾鱼苗进行进一步的驯养。2011 年,首次达到性成熟时,挑选体重比平均体重大于 20% 以上的雌鱼 500 尾。为防止近亲繁殖带来的近交退化,2009 年春季从额尔齐斯河流域中引进 1 龄白斑狗鱼苗种 5000 余尾。2011 年 10 月,从中挑选体重在 1.0kg 以上的雄鱼 500 尾。这 1000 余尾亲本作为下一步白斑狗鱼家系选育的基础群体。

[0057] 挑选出来的基础群体在两口 8 亩池塘中进行强化培育,每 20 天检查一次饵料鱼剩余情况,并即时投放适口的活体饵料鱼。封冰前,按 1:5 的体重比投放饵料鱼。2012 年 3 月 26 日,挑选性成熟良好的雌雄鱼 142 尾(雌雄比例为 1:1)。进行了人工催产。2012 年 3 月 29-31 日间分三批次构建家系 70 个。雌雄鱼采完精卵后,在背鳍前、侧线鳞上方注射 PIT 电子标记,并记录每尾亲本的标记号。个家系采卵量 0.76-4.25 万粒,总计 181 万粒,受精率 43.01-96.33%,平均 82.76%。4 月 12 日,开始投喂。4 月 19 日,每个家系后代中随机选留 2000 尾,进行培育至全长达到 10cm。5 月 23 至 27 日注射 VIE 荧光标记,并开始同池培育工作。