

我国海水鱼类染色体操作研究与应用进展

尤 锋^{1,2}, 吴志昊^{1,2}

(1. 中国科学院实验海洋生物学重点实验室 海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 染色体操作技术包括雌核发育及多倍体人工诱导等, 可快速纯化性状, 获得单性群体、生长快和不育/低育个体, 是现代遗传育种和遗传改良的重要技术途径, 近年来其应用也越来越广泛。其快速纯化、低育及生物安全的特点在基因编辑、借腹怀胎等前沿技术的研究与应用中也极具价值。本文在简述鱼类染色体操作概念和诱导原理基础上, 系统介绍了我国海水鱼类雌核发育、多倍体的人工诱导和生物学机制, 及其在遗传育种中的研究进展与生产实践等, 以为染色体操作在海水鱼类新种创制、生物技术中的研究与应用提供参考。

关键词: 雌核发育; 三倍体; 四倍体; 海水鱼类; 遗传育种

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2020)08-0069-16

DOI: 10.11759/hyxx20200327006

染色体操作(chromosome manipulation)是细胞工程技术的重要组成部分, 指人为对生物原有染色体组进行增加、减少或替换的技术^[1], 在鱼类中主要包括雌核发育(gynogenesis)、雄核发育(androgenesis)及多倍体(polyploid)等的人工诱导技术。该类技术由于能够进行单性生殖、性别控制、或者性状快速纯化等, 而被应用到鱼类遗传育种中; 也由于具有特殊的生殖操作方式或不育的特点可以用于发育生物学、遗传操作研究中。其见效快、容易操作, 相对安全且不会污染环境, 已成为现代遗传育种和遗传改良的重要组成部分。随着借腹怀胎、基因编辑等遗传操作和基因组育种等前沿技术的开展, 染色体操作技术在其应用中极具价值, 也是近年来研究的热点之一。本文将介绍在海水鱼类中已经开展广泛研究的雌核发育、三倍体、四倍体的概念和诱导原理, 在此基础上重点介绍我国染色体操作的方法与参数、倍性效应以及生物学机制等研究进展与应用。

1 我国海水鱼类雌核发育技术进展

1.1 雌核发育技术

雌核发育是单性生殖的一种, 一般是指单倍体卵子由遗传失活(genetic inactivation)的精子激活, 经染色体加倍而发育成二倍体后代。由于单倍体在孵化前后就不能存活, 故需要进行染色体加倍即二倍化(diploidization), 才能存活、生长和发育, 并性成

熟。同种或异种精子进入卵内只起刺激卵子发育的作用, 不提供遗传物质, 其子代的遗传物质完全来自雌核^[2-3], 卵子的发育完全是在雌核的控制下进行的。就雌性配子同型的鱼类来说, 雌核发育产生的后裔遗传型全部为雌性, 只具有母本的性状。

雌核发育现象首先是在自然界中发现的。鱼类中首次报道的天然雌核发育现象是在花鲮科鱼类 *Poecilia formosa*^[4], 随后在银鲫 *Carassius auratus gibelio*^[5]等多种淡水鱼类中陆续发现也存在此现象。依此, 研究者在淡水鱼类及鲑鳟鱼等洄游性鱼类中进行了人工雌核发育诱导的尝试^[6-7], 成功在鲤 *Cyprinus carpio*、虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*、罗非鱼 *Oreochromis niloticus*等多种淡水鱼类中获得成功, 并进行了养殖与育种应用^[8]。

人工诱导鱼类雌核发育时, 首先要将精子进行遗传物质灭活, 主要方法有 γ 射线、X 射线、紫外线照射等物理方法或甲苯胺蓝、硫酸二甲酯等化学法处理^[9]。由于紫外灭活技术相对简单、毒性较小, 应用最为普遍。为了避免由于遗传灭活不彻底而引发雌核发育诱导不成功, 有的研究者采用远缘鱼种的

收稿日期: 2020-03-27; 修回日期: 2020-06-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772834); 国家重点研发计划项目(2018YFD0901202)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 31772834; National Key Research and Development Project, No. 2018YFD0901202]

作者简介: 尤锋(1963-), 通信作者, 女, 山东青岛人, 研究员, 研究方向: 海洋生物学, 电话: 0532-82898561, E-mail: youfeng@qdio.ac.cn

精子,通过杂交来诱导^[10]。但后又发现,由于鱼类种间杂交相对容易,甚至科间、属间杂交都比较常见^[11],故为了避免可能带来的遗传污染,也将异源精子进行遗传灭活,从而成功诱导雌核发育^[12]。将灭活的精子与正常卵子受精后,需要进行二倍化以恢复倍性^[8]。按照二倍化的方式可将其分为异质雌核发育(meiogynogenesis)与同质雌核发育(mitogynogenesis)两种。异质雌核发育又称减数分裂雌核发育,是抑制第二极体的排放使受精卵染色体组加倍。同质雌核发育又称有丝分裂雌核发育,在第二极体排出后抑制单倍体受精卵的卵裂,其体内的两套染色体组完全一致,纯合程度更高,由于二倍染色体来源为同一个细胞,故又称为双单倍体(double haploid)。人工雌核发育诱导后,还需要倍性鉴定进行明确。倍性鉴定主要有直接方法和间接方法两种。直接方法包括染色体计数和DNA含量测定等;间接方法包括细胞测

量、蛋白质电泳、核仁组织区银染计数等^[13]。

海水鱼类中人工诱导雌核发育研究始于20世纪70年代,与淡水鱼类相比,涉及的种类较少。目前在大西洋鳕 *Gadus morhua*、真鲷 *Pagrosomus major*、欧鲈 *Dicentrarchus labrax*、大黄鱼 *Larimichthys crocea*、棕点石斑鱼 *Epinephelus fuscoguttatus*、牙鲆 *Paralichthys olivaceus*、条斑星鲽 *Verasper moseri*、半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* 等几十种鱼类中诱导成功(表1)。我国海水鱼类的雌核发育诱导人工研究起步更晚,最早报道为20世纪90年代。但发展迅速,经过20多年的研究,已经在我国主要海水养殖鱼类中形成了较为系统成熟的技术,先后在鲆鲽鱼类、大黄鱼、黄姑鱼 *Nibea albiflora*、石斑鱼等十余种鱼类中均成功得到雌核发育子代,有的甚至已经应用到遗传育种中。并在发育生物学研究、遗传连锁图谱构建和全基因组测序等方面开展了广泛的应用^[14-16]。

表1 国内外人工诱导雌核发育海水鱼类及诱导方法

Tab. 1 Artificially-induced gynogenetic marine fish and the induction methods

鱼种	精子来源	精子灭活方法	染色体加倍方法		参考文献		
			异质雌核发育	同质雌核发育			
大西洋鳕	<i>Gadus morhua</i>	同源	UV	静水压	[17]		
真鲷	<i>Pagrus major</i>	条石鲷	UV	冷休克	静水压	[18]	
金头鲷	<i>Sparus aurata</i>	真鲷	UV	热休克		[19]	
欧鲈	<i>Dicentrarchus labrax</i>	同源	UV		静水压	[20]	
		同源	UV	冷休克		[21]	
金眼狼鲈	<i>Morone chrysops</i>	条纹鲈	UV	热休克		[22]	
		鲽	UV	冷休克		[23]	
牙鲆	<i>Paralichthys olivaceus</i>	同源	UV		静水压	[24]	
国外	大菱鲆	<i>Scophthalmus maximus</i>	同源	UV	冷休克	[25]	
		同源、鲷鱼	UV	冷休克		[26]	
漠斑牙鲆	<i>Paralichthys lethostigma</i>	美洲黑石斑鱼	UV	静水压		[27]	
		美洲黑石斑鱼	UV	静水压		[28]	
	夏牙鲆	<i>Paralichthys dentatus</i>	同源	γ 射线	冷休克	[29]	
	川鲽	<i>Platichthys flesus</i>	同源	γ 射线	冷休克	[29]	
	扁海鲽	<i>Pleuronectes platessa</i>	同源	UV	冷休克	静水压	[30]
	条斑星鲽	<i>Verasper moseri</i>	同源	UV	静水压	[31]	
	庸鲽	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	同源	UV	冷休克	[32]	
	塞内加尔鲷	<i>Solea senegalensis</i>	同源	UV	冷休克	[33]	
		同源	UV		静水压	[34]	
国内	大黄鱼	<i>Larimichthys crocea</i>	同源	UV	冷休克	[35]	
	黄姑鱼	<i>Nibea albiflora</i>	同源	UV	冷休克	[36]	
	平鲷	<i>Rhabdolosargus sarba</i>	同源	UV	冷休克	[37]	
	棕点石斑鱼	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	鞍带石斑鱼	UV	冷休克	[38]	
	斜带石斑鱼	<i>Epinephelus coioides</i>	鞍带石斑鱼	UV	冷休克	[38]	

续表

	鱼种	精子来源	精子灭活方法	染色体加倍方法		参考文献
				异质雌核发育	同质雌核发育	
	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	同源	UV	冷休克		[39][40]
		同源	UV		静水压、冷休克	[41]
	大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	牙鲆、真鲷	UV	冷休克		[42][43]
		真鲷、同源	UV		静水压	[44][45]
国内	半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	中国花鲈	UV	冷休克		[46]
		中国花鲈	UV		静水压	[47]
	漠斑牙鲆 <i>Paralichthys lethostigma</i>	真鲷; 黑鲷	UV	冷休克		[48][49]
	圆斑星鲽 <i>Verasper variegatus</i>	中国花鲈	UV	冷休克		[50]
	星突江鲽 <i>Platichthys stellatus</i>	花鲈	UV	静水压		[51]
	条斑星鲽 <i>Verasper moseri</i>	花鲈	UV	冷休克		[52]

1.2 我国海水鱼类异质雌核发育的研究进展

海水鱼类异质雌核发育抑制第二极体的排放主要采用温度休克法, 尤其以冷休克法应用最为广泛。也有个别鱼种使用静水压法抑制第二极体排放。国内在其形成机制、性别控制及遗传育种等方面已取得一些进展。

1.2.1 诱导研究

如前所述, 雌核发育诱导的第一步是精子遗传物质灭活, 目前基本都用紫外线灭活方法。在牙鲆中, 本实验室等就使用紫外线对牙鲆精子进行灭活, 其表现出明显的 Hertwig 效应, 即在一定照射剂量前, 受精后胚胎存活率下降; 而达到一定照射剂量后, 受精后胚胎存活率回升。在 $36\ 000\ \text{erg}/\text{mm}^2$ 的最佳照射剂量下其精子超微结构、存活率和活力也无太大变化, 从而可以正常激活卵子^[53]; 二倍化则采用冷休克法诱导^[54]。并通过单倍体形态学观察(单倍体综合征 haploid syndrome, 表现为胚体粗短、初孵仔鱼尾部短小、脊柱弯曲畸形等)^[54]、染色体核型^[40]及流式细胞仪^[53]进行鉴定, 确定获得 100% 的雌核发育牙鲆。在大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 中, 我们首先利用牙鲆精子经 UV 灭活后, 通过冷休克诱导也成功获得大菱鲆异质雌核发育二倍体^[42]; 目前, 我们在生产中, 也多采用同源精子灭活来诱导大菱鲆异质雌核发育。

1.2.2 诱导机制的研究

雌核发育诱导主要依赖于处理时刻、处理强度和 处理时间三要素。通过对牙鲆、大菱鲆等受精过程进行组织细胞学观察^[55-56], 确定它们第二极体排放时间, 为诱导效果优化提供了依据, 在此基础上

明确了冷休克诱导的处理时刻分别为受精后 5 min 和 6 min(15.0 °C 下), 并发现雌核发育与普通二倍体对照组的受精过程并无差异。对异质雌核发育早期胚胎发育进行观察发现, 其与普通二倍体牙鲆也无区别, 但雌核发育二倍体胚胎孵化率相对较低, 而初孵仔鱼畸形率相对较高^[54, 57]。类似现象在星突江鲽 *Platichthys stellatus* 中也有报道, 虽然雌核发育二倍体胚胎的形态及发育时序与普通二倍体并无区别, 但胚体畸形率高、孵化率低^[51]。

由于在减数分裂前染色体组加倍过程中姊妹染色体遗传物质可能发生交换, 导致仍有一些基因的杂合。通过同工酶^[58]和微卫星标记技术^[59]分析发现, 异质雌核发育牙鲆的多态性较普通二倍体牙鲆明显降低, 但在多个位点上发生基因-着丝点之间的重组。在大黄鱼中也发现, 不同位点纯合速度存在差别^[60]。与普通二倍体相比, 雌核发育纯合度已大大提高。王晓清等研究发现, 雌核发育大黄鱼基因的纯合率较普通二倍体提高了 81.9%^[61]。

1.2.3 新种创制等应用相关研究

雌核发育可产生单性生殖群体, 在鱼类发育生物学研究和单性育种工作中具有重要意义。对于性别决定方式为 XX-XY 型的鱼类如牙鲆^[62], 通过雌核发育可获得遗传雌性 XX, 由于鱼类性别表型常常受到温度的影响, 可以通过高温或雄性激素处理雌核发育鱼获得伪雄鱼, 将遗传雌性变为生理雄性, 并与正常雌鱼(XX)交配即可规模化生产全雌鱼。而对于雌性异配(ZW-ZZ)的大菱鲆等鱼类, 通过雌核发育可得到雄性鱼(ZZ)和自然界中并不存在的超雌鱼(WW)。超雌鱼可与正常雄鱼 ZZ 交配, 生产全雌鱼

ZW^[13, 63]。这些雌核发育单性群体是鱼类性别决定和性别分化等发育生物学的有力工具。

本实验室就利用雌核发育牙鲆遗传型雌性个体,通过高温及外源性激素诱导,对 *cyp19a*、*cyp11a* 等基因及其转录因子 *foxl2*、*nr5a2* 和 *nr0b1* 在牙鲆性腺分化期的表达和甲基化动态水平的关联分析,初步构建了该过程中 *cyp19a* 的调控网络,并分析了性腺分化之前及分化过程中的脑转录组及 miRNA,为解析牙鲆及鱼类性腺分化机制提供了依据^[64-66]。也发现雌核发育鱼往往有一定比例的个体性腺发育不正常,如有的雌核发育牙鲆个体性腺发育较小甚至一侧缺失,但并不影响其发育甚至成熟^[67-68]。王桂兴等同样发现部分伪雄鱼的精巢有退化现象,需要在生产应用加以关注^[69]。

随着雌核发育代数的增加,家系内遗传相似度也逐渐提高,至连续第 3 代雌核发育牙鲆时可达 99%以上,并趋于稳定^[70]。雌核发育可快速建立近交系的特点,在遗传育种中具有重要价值。传统的选育方法一般需要 10 代以上的近交才能建立一个纯系,而一代雌核发育的纯合速率相当于全同胞交配 8~10 代,一些海水经济鱼类的初次性成熟时间一般为 2 龄以上,也即相当于开展了 20 年的选育工作,并且获得的后代具备相当高的遗传相似度,从而节省大量的人力、财力、物力和时间。Nie 等^[71]和 Lu 等^[72]在雌核发育牙鲆家系中筛选到耐低温、耐高温品系。特别是在牙鲆“鲆优 1 号”^[73]、“鲆优 2 号”^[74],大黄鱼“闽优 1 号”^[75]等鱼类的新品种培育研究中也应用了异质雌核发育技术。

1.3 我国海水鱼类同质雌核发育技术的研究进展

海水鱼类同质雌核发育抑制早期卵裂主要采用静水压法。前期也有采用冷休克法的,但由于处理时间长、效率较低而且成活率也不高,故后期应用较少。由于同质雌核发育抑制有丝分裂诱导难度较大,成活率低,国内仅在牙鲆、大菱鲆、半滑舌鲷和大黄鱼等少数几种鱼中有成功报道,并在其细胞学机制及遗传育种等方面有一定进展。

1.3.1 诱导相关研究

本实验室通过静水压在孵育水温 $15\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、受精后 85 min,用 60 MPa 处理 6 min 诱导获得同质雌核发育牙鲆,并发现其诱导效果好于冷休克法^[41];

刘海金等在孵育水温 17°C 、受精后 60 min,用 65 MPa 处理 6 min 也可得到同质雌核发育牙鲆^[76];庄岩等在孵育水温 $15.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、受精后 75 min,用 55 MPa 处理 6 min 同样得到同质雌核发育牙鲆,并发现不同比例的非整倍体的存在^[77]。Meng 等使用灭活的真鲷精液激活大菱鲆卵子,并在受精后 85~90 min,用 75 MPa 处理 6 min 得到同质雌核发育大菱鲆^[44]。我们在研究中发现,在诱导的三要素中,处理时刻对同质雌核发育诱导效果影响最大,因此将处理时刻用第一次卵裂时间作为基准更精确的进行评估,在 15.0°C 下,卵裂前 15 min,用 65 MPa 静水压处理 6 min,也得到同质雌核发育大菱鲆^[45]。半滑舌鲷诱导条件与牙鲆、大菱鲆差别较大,在 $22\sim 23^{\circ}\text{C}$ 下,受精后 21.5 min,用 70 MPa 处理 4 min 得到同质雌核发育个体^[47]。大黄鱼则在 $22\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、受精后 51 min,用 40 MPa 处理 3 min 诱导获得同质雌核发育子代^[34]。

1.3.2 形成机制的相关研究

本实验室通过免疫荧光标记,观察了受精卵的微管骨架结构—纺锤体与中心体的动态变化,探讨了采用冷休克法和静水压法进行牙鲆、大菱鲆同质雌核发育二倍体诱导的染色体加倍机制:在第一次卵裂前进行处理能够使不成熟的前中心粒解聚,使得在第二个细胞周期每个卵裂球内均形成一个单极纺锤体,从而抑制第二次卵裂,导致染色体的加倍,最终发育成同质雌核发育二倍体^[79]。进一步对同质雌核发育牙鲆早期卵裂的染色体进行染色观察,并采用双荧光标记技术同时观察微管组织和细胞核的早期卵裂过程。同样发现第一次卵裂时核分裂和胞质分裂正常进行;而在第二次卵裂过程中,染色体经历了间期、前期和前中期,但没有进入中期和后期,核分裂和胞质分裂被抑制^[80-81]。

1.3.3 同质雌核发育的相关应用研究

通过同工酶和微卫星标记技术,除了可以鉴定其子代仅具有母本遗传物质外,还可以进行纯合检测。与异质雌核发育相比,理论上,一次诱导,同质雌核发育个体就已经是纯合的了,异质雌核发育中的同源重组在同质雌核发育鱼中基本检测不到^[34, 82-83]。因此,其在遗传育种及遗传图谱构建等工作中十分重要。同质雌核发育子代成活率较低,往往仅有 10%左右^[41, 62, 77]。其胚胎发育较二倍体对照组在原肠期前都有明显滞后现象,在全长上无显著差异^[41, 77]。Meng 等^[44]和 Wu 等^[45]对同质雌核发育

大菱鲆子代的性比进行跟踪,发现其性别比例明显偏倚,雄性率较高,结果支持了大菱鲆的性别决定方式为雌性异配型(ZZ-ZW)。

同质雌核发育虽成活率较低,但其一代就可获得纯合个体的优势使其在遗传育种工作中极受重视。其子代性状的分离往往十分明显,Wu 等用大菱鲆同源精子紫外灭活后通过静水压诱导获得同质雌核发育大菱鲆,发现其生长性状在子代中明显分离,并获得生长优势个体的子二代^[45]。由于大菱鲆雌鱼具有生长优势,利用同质雌核发育技术筛选得到超雌鱼,并与雄鱼杂交得到了全雌大菱鲆^[78]。牙鲆新品种“北鲆 1 号”和“北鲆 2 号”也是运用同质雌核发育和性反转培育出的全雌牙鲆^[63]。

2 我国海水鱼类多倍体技术进展

2.1 多倍体技术

大多数鱼类是二倍体,体细胞的染色体数在 50 左右^[84]。多倍体(polyploid)是指拥有一套或多套额外染色体组的生物体,根据所含染色体组数依次称为三倍体(triploid)、四倍体(tetraploid)等。多倍体的出现在脊椎动物进化历程中起了重要的作用^[85-86]。如许多淡水鱼类中就存在天然多倍体,像银鲫^[87]、鲤鱼和一些鲑科鱼类的染色体数目在 100 左右,可以被认为是天然四倍体;而某些鲟、鳇鱼类的染色体数目甚至为 200,被认为是天然八倍体^[88]。海水鱼类中天然多倍体基本未见报道。目前应用较多的多倍体人工诱导主要为三倍体和四倍体诱导。

鱼卵细胞排出体外时处于第二次减数分裂中期,在受精后排出含 1 套染色体的第二极体完成第二次减数分裂,如果抑制第二极体的排放,便可得到人工诱导三倍体^[89]。由于三倍体鱼类染色体无法均分完成减数分裂,性腺不能发育或者低育,故而能将更多的能量用于生长,而且避免了性腺发育阶段和繁殖季节出现鱼肉品质下降、生长停滞、死亡率增高,以及人工养殖过程中的性早熟等现象;并可以防止养殖逃逸对自然群体的基因污染和生态环境破坏,对控制养殖鱼类的过度繁殖和天然种质资源的保护具有极其重要意义,所以对于三倍体人工诱导和养殖具有一定的效益而受到养殖户和研究者的关注。但是,三倍体与二倍体鱼类生长和性腺发育的差异因种而异,在个别淡水鱼类中三倍体可育^[90-91]。一些鱼类的生长与二倍体近似^[92]或低于二倍体^[93],不可一概而论。

三倍体鱼类虽公认在鱼类遗传育种中具有广阔的应用前景,但是目前三倍体鱼多采用人工诱导的方式获得,既繁琐,成功率又不高,制约了三倍体的大规模应用。而四倍体的生殖细胞含有偶数染色体组,是可育的。成熟的四倍体与正常的二倍体杂交则可进行大批量、一劳永逸的三倍体生产,故四倍体的诱导和培育也一直倍受重视。

2.2 我国海水鱼类三倍体诱导研究进展

目前三倍体人工诱导在淡水鱼类中应用较为广泛,在虹鳟、大西洋鲑 *Salmo salar*、马苏大麻哈鱼 *Oncorhynchus masu* 等鲑鳟类以及一些鲤科鱼类中进行了较为系统研究,并已经进行了商业化的应用,国内的湘云鲫/鲤等一些淡水鱼类三倍体品种年产鱼苗 10 亿尾,达到国际前沿水平^[94]。而在海水鱼类中,国外于 20 世纪 70 年代开始对主要养殖鱼类鲆科、菱鲆科、鲽科、鲷科、鲹科、狼鲈亚科、石鲷科等鱼类陆续进行了倍性操作条件研究。在三倍体人工诱导方面也有较多积累,已经成功诱导了几十种养殖鱼类的三倍体。对其生长和成活等生物学特性也有一些研究,如真鲷^[95]、金头鲷 *Sparus aurata*^[96]、欧鲈^[97]和牙鲆^[98]等鱼中的报道。国内海水鱼类三倍体人工诱导研究最早见于本实验室利用温度休克法抑制第二极体排放获得三倍体黑鲷的报道^[99]。随后在真鲷^[100-101]、大黄鱼^[102-103]、牙鲆^[104]、大菱鲆^[105]、半滑舌鲷^[106]、红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*^[107]、双斑东方鲀 *Takifugu bimaculatus*^[108]等中均成功诱导获得了三倍体(表 2)。也分别通过冷休克和静水压诱导,获得了黄姑鱼♂ × 大黄鱼♀^[109]以及圆斑星鲽♂ × 牙鲆♀^[110]的杂交三倍体。在大菱鲆等个别鱼种中也有规模化生产的报道^[111]。

2.2.1 三倍体诱导研究

三倍体人工诱导的染色体加倍过程和方法与雌核发育基本一致,但不需要精子灭活的过程。早期研究中也有采用热休克和静水压法抑制第二极体排放的,但与冷休克法相比,热休克法处理时间短不好控制,诱导效果不稳定;静水压法诱导强度较大,子代成活率较低,且操作繁琐,压力腔容量也有限。而冷休克法对卵损伤较小,诱导效果稳定,操作较为简单,更适用于生产。因此,近年来冷休克法更为常用。三倍体主要通过染色体、流式细胞仪以及血细胞核体积比较进行倍性鉴定。如二倍体牙鲆染色体核型为 $2n=48$,而对人工诱导三倍体牙鲆的核型分析发现,

表 2 国内外人工诱导三倍体海水鱼类及诱导方法

Tab. 2 Artificially-induced triploid marine fish and the induction methods

	鱼种	诱导方法	参考文献	
国外	海水青鳉	<i>Oryzias dancena</i>	冷休克 [112]	
	大西洋鳕	<i>Gadus morhua</i>	热休克 [113]	
	真鲷	<i>Pagrus major</i>	冷休克 [95]	
	黑鲷	<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	冷休克 [114]	
	金头鲷	<i>Sparus aurata</i>	热休克 [115]	
			冷休克 [96]	
	欧鲈	<i>Dicentrarchus labrax</i>	静水压 [116]	
			冷休克 [117]	
	国外		冷休克和静水压 [21]	
		鳊鱼	<i>Nibeas mitsukurii</i>	冷休克 [118]
		牙鲆	<i>Paralichthys olivaceus</i>	冷休克 [119]
		大菱鲆	<i>Scophthalmus maximus</i>	冷休克 [120]
		扁海鲈	<i>Pleuronectes platessa</i>	冷休克 [121-122]
		条斑星鲈	<i>Verasper moseri</i>	冷休克 [30]
		庸鲈	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	冷休克和热休克 [123]
		美洲黄盖鲈	<i>Limanda ferruginea</i>	静水压 [124]
塞内加尔鲈		<i>Solea senegalensis</i>	冷休克 [32]	
星点东方鲀		<i>Takifugu niphobles</i>	冷休克 [125]	
国内	大黄鱼	冷休克 [102]		
		冷休克和静水压 [126]		
	黑鲷	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	冷休克和热休克 [99, 127]	
	真鲷	<i>Pagrus major</i>	冷休克 [100]	
	牙鲆	<i>Paralichthys olivaceus</i>	冷休克 [104]	
	大菱鲆	<i>Scophthalmus maximus</i>	冷休克 [111]	
	半滑舌鲈	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	冷休克 [106]	
	红鳍东方鲀	<i>Takifugu rubripes</i>	冷休克 [107]	
	双斑东方鲀	<i>Takifugu bimaculatus</i>	冷休克和静水压 [108, 128]	

其染色体核型为 $3n=72$, 是二倍体的 1.5 倍^[104]。Xu 等对人工诱导的三倍体大黄鱼进行流式细胞仪检测, 其相对 DNA 含量为二倍体的 1.5 倍^[103]。陈松林等采用流式细胞仪分析了三倍体半滑舌鲈鱼苗细胞 DNA 含量, 其 DNA 含量为二倍体对照鱼苗的 1.5 倍^[129]。宋宗诚等通过血细胞涂片计算比较发现三倍体大菱鲆血细胞的体积和二倍体的比值为 1.55, 接近于 1.5, 并同时通过染色体核型及流式细胞仪检测验证了人工诱导三倍体大菱鲆的倍性^[111]。目前的研究报道, 鱼类三倍体的诱导率都比较高, 可以达到 95%以上, 甚至 100%^[103, 111, 129]。

2.2.2 诱导机制的研究

刘慧等对三倍体牙鲆进行了微卫星分析, 结果发现三倍体牙鲆遗传多样性水平相对二倍体有所下降, 其基因型也存在一定差异, 并认为是三倍体诱

导对牙鲆的遗传结构造成了一定影响^[130]。蔡明夷等对冷休克诱导的大黄鱼(♀)×黄姑鱼(♂)异源三倍体家系进行微卫星分析, 发现异源三倍体子代含有 2 个大黄鱼基因组和 1 个黄姑鱼基因组, 佐证了三倍体诱导过程中第二极体排放受到抑制^[109]。

2.2.3 生长发育及应用相关研究

对于人工诱导的海水鱼类三倍体的生长发育研究也有诸多报道。胚胎发育方面, 牙鲆三倍体诱导组原肠期前胚胎发育略有迟滞, 但在胚胎发育后期, 其发育与二倍体基本一致^[54]; 但三倍体胚胎出膜率低, 仔鱼畸形率高^[57]。与之类似, 大菱鲆三倍体胚胎发育速度较普通二倍体慢, 但快于雌核发育二倍体^[111]。与普通二倍体相比, 三倍体胚胎在形态上没有明显差别, 但初孵仔鱼畸形率较高^[105]。三倍体鱼类的生长是否具有优势、优势所处时期在不同鱼种

或同一鱼种不同作者报道中不同。如牙鲆中,王磊等研究发现三倍体牙鲆在早期体重与二倍体基本一致,到348日龄后才显著高于二倍体^[131]。而本实验室研究却发现三倍体牙鲆在早期就体现出一定的生长优势,但这种优势在11月龄后逐渐消失^[132]。半滑舌鳎三倍体的全长、体重在240日龄前与二倍体没有显著差异^[133]。三倍体牙鲆性腺明显小于二倍体,在630日龄时二倍体牙鲆雌性和雄性的性腺指数分别是三倍体的3.3倍和3.1倍^[131];三倍体半滑舌鳎的性腺发育与也明显慢于二倍体,三倍体鱼雌性比例仅为11%,显著低于二倍体群体^[133]。刘志鹏等发现三倍体半滑舌鳎子代雌雄染色体分别为ZWW/ZZZ型,而未发现ZZW型雌鱼,认为半滑舌鳎Z染色体和W染色体之间的重组受到抑制^[86]。Liu等在人工诱导三倍体牙鲆发现椎体聚合、椎体单面压缩、椎体双面压缩和椎体移位等骨骼畸形现象,畸形比例高于二倍体,但对外观没有影响。二倍体和三倍体肌肉营养成分总体差异不大,含有相同种类的氨基酸和脂肪酸^[132]。

目前,海水鱼类三倍体养殖应用由于人工诱导规模的限制而较少,特别在我国还多限于小规模实验和测试阶段,远没有达到淡水鱼与鲑科鱼类的生产规模。但三倍体因其低育性,目前已经在借腹怀胎、基因编辑育种等遗传操作研究中进行应用,国外利用虹鳟三倍体成功进行了借腹怀胎^[134],海水鱼类中也正在牙鲆、大菱鲆等中利用三倍体性腺不育的特点开展生殖细胞移植相关工作。

2.3 海水鱼类四倍体相关研究进展

由于三倍体鱼需采用人工诱导的方式获得,较为繁琐,制约了三倍体的大规模应用,无法实现育种。而四倍体的生殖细胞含有偶数染色体组,是可育的。成熟的四倍体与正常的二倍体杂交则可进行大批量、一劳永逸的三倍体生产,并进行三倍体育种,故四倍体的诱导和培育受到重视。但相关研究也是主要集中在淡水鱼中,如鲢鱼 *Ictalurus punctatus*^[135]、罗非鱼^[136]等。海水鱼在欧鲈^[137]、黄金鲈 *Perca flavescens*^[138]等鱼类中开展了相关研究(表3)。目前这些研究多限于诱导方法的筛选与诱导参数的优化。对其后期生长发育,尤其是培育到成熟的报道较少。淡水鱼中用于养殖生产的也多是由远缘杂交获得的。培育获得可育四倍体的鱼种均被认为是二倍化的四倍体,或正处在二倍化的进程中;在被认为

已基本完成二倍化进程的鱼种,如鲆鲽鱼类等海水鱼类中,几乎未见人工诱导四倍体后期生长发育的报道。分析显示,在这些鱼类四倍体诱导研究中,尽管初期(如胚胎期、初孵仔鱼期)的四倍体诱导率较高,有的甚至高达100%^[139],但随后的培育过程中,诱导组死亡率明显增高,四倍体率下降也很显著,无法得到四倍体成鱼^[19],从而大大制约了鱼类四倍体的应用,更无法实现三倍体育种。

表3 国内外人工诱导四倍体海水鱼类及诱导方法
Tab. 3 Artificially-induced tetraploid marine fish and the induction methods

	鱼种	诱导方法	参考文献
国外	欧鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	静水压	[137]
	黄金鲈 <i>Perca flavescens</i>	静水压	[138]
国内	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	静水压	[140]
		冷休克和静水压	[141]
	大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	静水压	[142]
	半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	静水压	[143]
	大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	冷休克或热休克	[144]

目前国内海水鱼类四倍体诱导研究报告更少,李文龙等利用静水压诱导得到了半滑舌鳎的四倍体鱼苗,使用流式细胞仪分析,2~5日龄时其四倍体率达到68.3%^[143];衣启麟等采用静水压法诱导得到牙鲆的四倍体,通过染色体计数测定其尾芽期至孵化前的胚胎四倍体率最高也可达到63.3%^[140]。后期倍性与生长发育情况尚未见到报道。Wang等在牙鲆中连续进行了冷休克抑制第二极体排放和静水压抑制卵裂的诱导,也获得牙鲆四倍体初孵仔鱼,并用微卫星验证了其遗传物质均来自母本^[141]。Wu等通过静水压抑制卵裂获得的大菱鲆初孵仔鱼至3日龄仔鱼的四倍体率经流式细胞仪检测为80%左右,最高甚至可以达到100%^[142]。在大量的诱导实验中也发现了与其他鱼类四倍体诱导类似的现象,虽然在胚胎期甚至初孵仔鱼期、3日龄仔鱼期,其诱导组四倍体率相对较高,但随着胚胎或仔鱼的发育四倍体率逐渐降低,至30日龄时,其四倍体率仅为1.3%。同时四倍体诱导组死亡率也较高,在原肠期及孵化前

后出现了 2 个明显的死亡高峰。诱导组胚胎发育也较对照组明显滞后,部分卵出现畸型分裂,并随发育大多逐步死亡^[142]。目前对于海水鱼类四倍体低成活率原因的推测包括诱导过程中产生了非整倍体,四倍体细胞的死亡/凋亡或染色体丢失,以及诱导导致等位基因的偏分离等。但以上种种均是一些推论,还需要进一步研究进行探讨。

3 海水鱼类染色体操作技术展望

由于雌核发育技术快速纯化及可获得单性群体的特点,其在鱼类育种中的作用越来越被重视,目前国内正在进行的多种鱼类新品种培育工作中均应用了雌核发育技术。由于雌核发育育种获得的后代往往繁殖力下降,其产生配子数量减少或质量下降,制约了以雌核发育系作为亲本进行良种培育。而如果将雌核发育和传统的选择育种与杂交育种相结合,可以恢复其繁殖力,并获得优良性状。利用这种方式,既提高了优良种质选择效率,又保证了后代的繁殖力,可以更有把握地定向快速培育出所需的良种品系,将成为选择育种的主要研究方向之一。雌核发育技术虽已较为成熟,但随着研究的深入和技术的发展,其也面临诸多问题和可提升之处。如发现部分雌核发育个体的性腺在发育与成熟过程中,其形态和组织结构与普通二倍体存在差别,会直接影响其育性,进而影响雌核发育育种群体的产能和育种进程。虽然对雌核发育个体性腺发育、成熟度有少数研究报告,但对其发生规律和机制研究还鲜少涉及。今后,需要通过更系统的长时间跟踪比较,分析更多家系之间和不同代系之间的差异等。同时,也应开展雌核发育鱼对养殖环境适应性等方面的研究,为雌核发育在育种和生产中的应用提供更多理论依据。近年来,全基因组关联分析可获得高密度遗传标记,在全基因组水平上挖掘与性状相关的基因,在水产动物分子标记辅助育种中得到应用。将其与雌核发育技术结合,快速得到不同性状的纯系,可提高性状连锁标记的筛选效率,因而应予以重视和开展相关研究。同时,以 CRISPR/Cas9 等为代表的技术突破大大提高了基因编辑的效率。但对于经济鱼类,尤其是性成熟周期较长的海水鱼类来说,要获得纯合突变体仍需要至少一代的时间。而若能与雌核发育等快速纯化技术结合,在原代获得纯合突变体,将极具实用价值。

我国正在进行养殖的海水鱼类有近百种,针对

每种鱼类创制三倍体诱导技术既繁琐,也不现实。目前三倍体诱导技术尚无统一标准,诱导过程的不规范带来的诱导效应往往导致三倍体子代成活率降低,制约了其产业化应用。因此需要针对这一难题,以及不同海水鱼类的鱼卵特征,提升海水鱼类三倍体诱导工艺,进行规范,建立海水鱼类三倍体高效诱导技术体系,明确三倍体最佳养殖条件,构建适宜制种养殖模式。同时由于三倍体的不育/低育性,可以极大地减少对野生种质资源的污染,防止对生态资源造成威胁。将其与转基因技术结合,在转基因育种的安全控制等方面也具有很高的生态价值。四倍体的获得是真正的三倍体育种的前提条件,但其在已基本完成二倍化的海水鱼类中一直难以得到。因此,获得四倍体成体甚至成熟鱼是亟待突破的首要问题,这需要对四倍体形成和倍性变化的机制进行深入分析。同时,尝试更多的诱导方式,如远缘杂交等生物学方法和其它物理方法等。进一步,对这些问题的生物学解析不仅有利于海水鱼类养殖产业的提升,也将是研究多倍化在生物进化中作用的有力参考依据,故应加强相关研究。

参考文献:

- [1] Arai K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan[J]. *Aquaculture*, 2001, 197(1-4): 205-228.
- [2] Chourrout D. Gynogenesis caused by ultraviolet irradiation of salmonid sperm[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1982, 223: 175-181.
- [3] Johnstone R, Stet R J M. The production of gynogenetic Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90: 819-826.
- [4] Hubbs C, Hubbs L. Apparent parthenogenesis in nature in a form of fish of hybrid origin[J]. *Science*, 1932, 76(1983): 628-630.
- [5] 蒋一珪, 俞豪祥, 陈本德, 等. 鲫鱼的人工和天然雌核发育[J]. *水生生物学集刊*, 1982, 7(4): 471-477.
Jiang Yigui, Yu Haoxiang, Chen Bende, et al. Artificial and natural gynogenesis in crucian carp[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1982, 7(4): 471-477.
- [6] Makino S, Ozima Y. Formation of the diploid egg nucleus due to suppression of the second maturation division, induced by refrigeration of fertilized eggs of common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Cytologia*, 1943, 13: 55-60.
- [7] Chourrout D. Use of grayling sperm (*Thymallus thymallus*) as a marker for the production of gynogenetic rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. *Theoretical and*

- Applied Genetics, 1986, 72: 633-636.
- [8] Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review[J]. *Aquaculture*, 2007, 269(1-4): 150-173.
- [9] Thorgaard G H. Chromosome set manipulation and sex control in fish[J]. *Fish Physiology*, 1983, 9(8): 405-434.
- [10] Cherfas N B, Ilyasova V A. Induced gynogenesis in silver crucian carp and carp hybrids[J]. *Genetika*, 1980, 16(7): 1260-1269.
- [11] 刘少军. 远缘杂交导致不同倍性鱼的形成[J]. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40(2): 104-114.
Liu Shaojun. Distant hybridization leads to different ploidy fishes[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2010, 40(2): 104-114.
- [12] Peruzzi S, Scott A G, Domaniewski J C J, et al. Initiation of gynogenesis in *Oreochromis niloticus* following heterologous fertilization[J]. *Journal of Fish Biology*, 1993, 43(4): 585-591.
- [13] 尤锋, 相建海. 海水鱼类多倍体育种和性控研究[M]// 曾呈奎, 相建海. 海洋生物技术. 济南: 山东科技出版社, 1998: 160-190.
You Feng, Xiang Jianhai. Polyploid breeding and sex control of marine fishes[M]// Zeng Chengkui, Xiang Jianhai. *Marine Biotechnology*. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 1998: 160-190.
- [14] Ji X S, Chen S L, Liao X L, et al. Microsatellite-centromere mapping in *Cynoglossus semilaevis* using gynogenetic diploid families produced by the use of homologous and non-homologous sperm[J]. *Journal of Fish Biology*, 2009, 75(2): 422-434.
- [15] Ao J Q, Mu Y N, Xiang L X, et al. Genome sequencing of the perciform fish *Larimichthys crocea* provides insights into molecular and Genetic mechanisms of stress adaptation[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(4): e1005118.
- [16] Shao C, Bao B, Xie Z, et al. The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry[J]. *Nature Genetics*, 2017, 49: 119-124.
- [17] Ghigliotti L, Bolla S L, Duc M, et al. Induction of meiotic gynogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) through pressure shock[J]. *Animal Reproduction Science*, 2011, 127(1-2): 91-99.
- [18] Kato K, Murata O, Yamamoto S, et al. Viability, growth and external morphology of meiotic- and mitotic-gynogenetic diploids red sea bream, *Pagrus major*[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2001, 17(3): 97-103.
- [19] Gorshkova G, Gorshkov G, Hadani A, et al. Chromosome set manipulations and hybridization experiments in gilthead seabream (*Sparus aurata*). I. Induction of gynogenesis and intergeneric hybridization using males of the red sea bream, *Pagrus major*[J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 1998, 50(3): 99-110.
- [20] Francescon A, Libertini A, Bertotto D, et al. Shock timing in mitogynogenesis and tetraploidization of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. *Aquaculture*, 2004, 236: 201-209.
- [21] Peruzzi S, Chatain B. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability[J]. *Aquaculture*, 2000, 189(1-2): 23-37.
- [22] Gomelsky B, Cherfas N B, Gissis A, et al. Induced diploid gynogenesis in white bass[J]. *The Progressive Fish-Culturist*, 1998, 60: 288-292.
- [23] Tabata K, Gorie S, Nakamura K. Induction of gynogenetic diploid in hirame *Paralichthys olivaceus*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi (Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries)*, 1986, 52(11): 1901-1904.
- [24] Tabata K, Gorie S. Induction of gynogenetic diploids in *Paralichthys olivaceus* by suppression of the 1st cleavage with special reference to their survival and growth[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988, 54: 1867-1872.
- [25] Piferrer F, Cal R M, Gómez C, et al. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4): 403-419.
- [26] Luckenbach J A, Godwin J, Daniels H V, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm[J]. *Aquaculture*, 2004, 237(1-4): 499-516.
- [27] Morgan A J, Murashige R, Woolridge C A, et al. Effective UV dose and pressure shock for induction of meiotic gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) using black sea bass (*Centropristis striata*) sperm[J]. *Aquaculture*, 2006, 259(1-4): 290-299.
- [28] Colburn H R, Nardi G C, Borski R J, et al. Induced meiotic gynogenesis and sex differentiation in summer flounder (*Paralichthys dentatus*)[J]. *Aquaculture*, 2009, 289(1-2): 175-180.
- [29] Purdom C E. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish[J]. *Heredity*, 1969, 24(3): 431-444.
- [30] Mori T, Saito S, Kishioka C, et al. Induction of triploids and gynogenetic diploids in barfin flounder *Verasper moseri*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2004, 70(2): 145-151.
- [31] Tvedt H B, Benfey T J, Martin-Robichaud D J, et al. Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)[J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2-4): 573-583.
- [32] Molina-Luzón M J, López J R, Robles F, et al. Chro-

- mosomal manipulation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858): induction of triploidy and gynogenesis[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2015, 56(1): 77-84.
- [33] 许建和, 尤锋, 吴雄飞, 等. 大黄鱼雌核发育二倍体的人工诱导[J]. *海洋科学*, 2006, 30(12): 37-42.
Xu Jianhe, You Feng, Wu Xiongfei, et al. Preliminary study on artificial induction of diploid gynogenesis in the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. *Marine Sciences*, 2006, 30(12): 37-42.
- [34] 吴清明, 蔡明夷, 刘贤德, 等. 大黄鱼同质雌核发育的诱导及微卫星标记分析[J]. *水产学报*, 2009, 33(5): 734-741.
Wu Qingming, Cai Mingyi, Liu Xiande, et al. Induction and microsatellite analysis of homozygous gynogenesis in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(5): 734-741.
- [35] 徐冬冬, 楼宝, 薛宝贵, 等. 黄姑鱼(*Nibea albiflora*)雌核发育的人工诱导及鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(2): 310-317.
Xu Dongdong, Lou Bao, Xue Baogui, et al. Artificial induction of diploid gynogenesis in *Nibea albiflora* and evidence for female homogamety[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(2): 310-317.
- [36] 蔡泽平, 胡超群, 牛文涛, 等. 平鲷雌核发育二倍体的人工诱导[J]. *海洋学报(中文版)*, 2007, 29(3): 114-119.
Cai Zeping, Hu Chaoqun, Niu Wentao, et al. Artificial induction of gynogenesis in silver sea bream (*Rhabdosargus sarba*). *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(3): 114-119.
- [37] 樊佳伟. 人工诱导棕点石斑鱼雌核发育[D]. 海口: 海南大学, 2015.
Fan Jiawei. Induced gynogenesis in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscogutatus*)[D]. Haikou: Hainan University, 2015.
- [38] 吴廷昌, 骆剑, 黄飞, 等. 鞍带石斑鱼精子诱导斜带石斑鱼雌核发育的研究[C]. 中国水产学会. 2012年中国水产学会学术年会论文摘要集. 中国水产学会: 中国水产学会, 2012: 78.
Wu Tingchang, Luo Jian, Huang Fei, et al. Study on the development of gynogenetic *Epinephelus coioides* induced by *Epinephelus lanceolatus* sperm[C]. China Society of Fisheries, Annual academic meeting of China Fisheries Society, 2012: 78.
- [39] 王新成. 全雌牙鲆种苗培育技术[J]. *海洋科学*, 1994, 18(6): 63-64.
Wang Xincheng. Study on the seeding production of feminization in flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Marine Sciences*, 1994, 18(6): 63-64.
- [40] 刘静, 尤锋, 王新成, 等. 人工诱导雌核发育牙鲆的染色体及核型证明[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(1): 68-72.
Liu Jing, You Feng, Wang Xincheng, et al. Chromosome and karyotype evidence of artificial-induced gynogenesis in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (T. ET S.)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(1): 68-72.
- [41] 尤锋, 许建和, 倪静, 等. 牙鲆同质雌核发育人工诱导研究[J]. *高技术通讯*, 2008, 18(8): 874-880.
You Feng, Xu Jianhe, Ni Jing, et al. Study on artificial induction of mitogynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*[J]. *High Technology Letters*, 2008, 18(8): 874-880.
- [42] Xu J H, You F, Sun W, et al. Induction of diploid gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus* with left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus* sperm[J]. *Aquaculture International*, 2008, 16(6): 623-634.
- [43] 孟振, 刘新富, 雷霖霖, 等. 大菱鲆雌核发育二倍体的真鲷冷冻精子诱导及其生长评价[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2013, 59(4): 343-350.
Meng Zhen, Liu Xinfu, Lei Jilin, et al. Induction and growth of meiogynogenetic diploids of turbot (*Scophthalmus maximus*) with cryopreserved sperm of red sea bream (*Pagrus major*)[J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 2013, 59(4): 343-350.
- [44] Meng Z, Liu X F, Liu B, et al. Induction of mitotic gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Aquaculture*, 2016, 451: 429-435.
- [45] Wu Z H, Wang L J, Wu Q W, et al. Study on artificial induction, growth and gamete quality of mitogynogenetic turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Aquaculture*, 2020, 515: 734585.
- [46] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(2): 243-251.
- [47] Chen S L, Ji X S, Shao C W, et al. Induction of mitogynogenetic diploids and identification of WW super-female using sex-specific SSR markers in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2012, 14(1): 120-128.
- [48] 柳学周, 宁鑫, 徐永江, 等. 真鲷精子诱导漠斑牙鲆减数雌核发育[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(6): 1259-1268.
Liu Xuezhou, Ning Xin, Xu Yongjiang, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with heterologous sperm of *Pagrosomus major*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1259-1268.
- [49] 徐加涛, 尤锋, 许建和, 等. 黑鲷精子诱导漠斑牙鲆雌核发育研究[J]. *水产科学*, 2011, 30(12): 744-748.
Xu Jiatao, You Feng, Xu Jianhe, et al. Induction of

- diploid gynogenesis in southern flounder *Paralichthys lethostigma* by black porgy *Acanthopagrus schlegeli* sperm[J]. Fisheries Science, 2011, 30(12): 744-748.
- [50] Ji X S, Chen S L, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis and assessment of homozygosity in meiotic gynogens of spotted halibut (*Verasper variegatus*)[J]. Aquaculture International, 2010, 18(6): 1151-1161.
- [51] 段会敏, 田永胜, 李文龙, 等. 星斑川鲷雌核发育二倍体、单倍体与普通二倍体及杂交胚胎发育的比较[J]. 中国水产科学, 2017, 24(3): 477-487.
- Duan Huimin, Tian Yongsheng, Li Wenlong, et al. Comparison of gynogenetic diploid and haploid embryonic development and hybridization of starry flounder *Platichthys stellatus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(3): 477-487.
- [52] 杨景峰, 陈松林, 苏鹏志, 等. 异源精子诱导条斑星鲷雌核发育[J]. 水产学报, 2009, 33(3): 372-378.
- Yang Jingfeng, Chen Songlin, Su Pengzhi, et al. Study on gynogenesis induced by heterogenous sperms in barfin flounder *Verasper moseri*[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(3): 372-378.
- [53] You F, Xu J H, Zhu X P, et al. Effect of UV irradiation on sperm of the left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2008, 39(3): 414-422.
- [54] You F, Liu J, Wang X, et al. Study on embryonic development and early growth of triploid and gynogenetic diploid left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus* (T. et S.)[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2001, 19(2): 147-151.
- [55] 孙威, 尤锋, 张培军, 等. 牙鲆受精的细胞学研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(5): 80-85, 91.
- Sun Wei, You Feng, Zhang Peijun, et al. Cytological studies on process of fertilization in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Marine Sciences, 2009, 33(5): 80-85, 91.
- [56] 孙威, 尤锋, 张培军, 等. 大菱鲆的受精细胞学研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(12): 75-80.
- Sun Wei, You Feng, Zhang Peijun, et al. Studies on fertilization biology of turbot (*Psetta maxima*)[J]. Marine Sciences, 2005, 29(12): 75-80.
- [57] 刘海金, 王常安, 朱晓琛, 等. 牙鲆单倍体、三倍体、雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(3): 161-167.
- Liu Haijin, Wang Changan, Zhu Xiaochen, et al. Embryonic development of gynogenetic diploid and triploid Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(3): 161-167.
- [58] 徐成, 王可玲, 徐永立, 等. 雌核发育牙鲆同工酶基因的重组及父方基因的表达[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(1): 62-67.
- Xu Cheng, Wang Keling, Xu Yongli, et al. Recombination and expression of paternal gene of isozymes in gynogenetic olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2002, 33(1): 62-67.
- [59] 王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 人工诱导牙鲆异质雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. 高技术通讯, 2005, 15(7): 107-110.
- Wang Wei, You Feng, Gao Tianxiang, et al. Microsatellite markers analysis on artificial meiogynogenetic stock of *Paralichthys olivaceus*[J]. High Technology Letters, 2005, 15(7): 107-110.
- [60] 叶小军, 王志勇, 刘贤德, 等. 大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 144-151.
- Ye Xiaojun, Wang Zhiyong, Liu Xiande, et al. Analysis of genetic homozygosity and diversity of two successive generation meio-gynogenetic population in *Pseudosciaena crocea* using microsatellite markers[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 144-151.
- [61] 王晓清, 王志勇, 柳小春, 等. 大黄鱼人工诱导雌核发育后代的微卫星标记分析[J]. 遗传, 2006, 28(7): 831-837.
- Wang Xiaoqing, Wang Zhiyong, Liu Xiaochun, et al. Microsatellite marker analysis of gynogenesis by artificial induction in *Pseudosciaena crocea*[J]. Hereditas, 2006, 28(7): 831-837.
- [62] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in Hiram flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel)[J]. Aquaculture, 1999, 173(1-4): 235-246.
- [63] 刘海金, 侯吉伦, 刘奕. 牙鲆雌核发育研究进展[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 902-912.
- Liu Haijin, Hou Jilun, Liu Yi. Gynogenesis in Japanese flounder: A review[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(4): 902-912.
- [64] Zou Y, Peng L, Weng S, et al. Characterization and expression of androgen receptors in olive flounder[J]. Gene, 2019, 683: 184-194.
- [65] Fan Z F, Zou Y X, Liang D D, et al. Roles of forkhead box protein 12 (*foxl2*) during differentiation and maintenance in a fish, the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Reproduction Fertility and Development, 2019, 31(11): 1742-1752.
- [66] Liang D D, Fan Z F, Zou Y X, et al. Characteristics of *cyp11a* during gonad differentiation of the olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(9): 2641.
- [67] Ma D Y, Wen S D, Sun P, et al. Histological observation on adult gonads from meiogynogenetic olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. International Journal of Ag-

- riculture and Biology, 2018, 20(3): 689-694.
- [68] 孙鹏, 尤锋, 倪静, 等. 牙鲆性腺分化的组织学研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(3): 53-58.
Sun Peng, You Feng, Ni Jing, et al. Histological evaluation of gonadal differentiation in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Marine Sciences, 2009, 33(3): 53-58.
- [69] 王桂兴, 朱以美, 侯吉伦, 等. 双单倍体牙鲆的性腺发生、性别分化及早期发育的研究[J]. 中国工程科学, 2014, 16(9): 33-41.
Wang Guixing, Zhu Yimei, Hou Jilun, et al. Studies of the gonadogenesis, gender differentiation and early stage development of doubled haploid *Paralichthys olivaceus*[J]. Strategic Study of CAE, 2014, 16(9): 33-41.
- [70] 王桂兴, 张晓彦, 孙朝徽, 等. 牙鲆连续四代减数分裂雌核发育家系的遗传特征分析[J]. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 48-55.
Wang Guixing, Zhang Xiaoyan, Sun Chaohui, et al. Genetic analysis of four generations of a successive meiogynogenetic population in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 48-55.
- [71] Nie M M, Hu J W, Lu Y L, et al. Cold effect analysis and screening of SNPs associated with cold-tolerance in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Journal of Applied Ichthyology, 2019, 35(4): 924-932.
- [72] Lu Y L, Wu Z H, Song Z C, et al. Insight into the heat resistance of fish via blood: Effects of heat stress on metabolism, oxidative stress and antioxidant response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 58: 125-135.
- [73] 田永胜, 齐文山, 姜静, 等. “鲆优 1 号”牙鲆和亲本群体的表型及遗传性状变异分析[J]. 海洋学报(中文版), 2014, 36(6): 75-86.
Tian Yongsheng, Qi Wenshan, Jiang Jing, et al. Analysis of phenotype and genetic variation of on “Flounder No.1” *Paralichthys olivaceus* and their parental populations[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2014, 36(6): 75-86.
- [74] 李仰真, 杨英明, 刘洋, 等. 牙鲆“鲆优 2 号”不同养殖地点生长和存活性状的基因型与环境互作分析[J]. 水产学报, 2020, 44(3): 429-435.
Li Yangzhen, Yang Yingming, Liu Yang, et al. Genotype by environment interactions for growth and survival traits of “Pingyou No. 2” flounder (*Paralichthys olivaceus*) in different aquaculture environment[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(3): 429-435.
- [75] 赵广泰. 大黄鱼“闽优 1 号”选育群体遗传结构分析及生长相关性状的遗传参数估计[D]. 厦门: 集美大学, 2010.
Zhao Guangtai. Genetic structure analysis and genetic parameter estimation for growth-related traits for “Minyou No. 1” strain of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[D]. Xiamen: Jimei University, 2010.
- [76] 刘海金, 刘永新, 王玉芬, 等. 牙鲆减数分裂与有丝分裂雌核发育的遗传差异[J]. 水产学报, 2010, 34(6): 898-904.
Liu Haijin, Liu Yongxin, Wang Yufen, et al. Genetic difference between meiotic gynogenesis and mitotic gynogenesis in the Japanese flounder[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(6): 898-904.
- [77] 庄岩, 蓝勋, 王志刚, 等. 牙鲆同质雌核发育二倍体的诱导及其早期生长研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(6): 96-102.
Zhuang Yan, Lan Xun, Wang Zhigang, et al. Studies on the induction of mitogynogenetic diploids and their early growth of olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(6): 96-102.
- [78] 王伟文, 徐承旭. 黄海所破解世界科研难题大菱鲆鱼苗实现 100% “全雌” [J]. 水产科技情报, 2017, 44(1): 50-51.
Wang Weiwen, Xu Chengxu. Yellow Sea Fisheries Research Institute solved the world's scientific research problems: the turbot fry achieved 100% of “all female”[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2017, 44(1): 50-51.
- [79] Zhu X, You F, Zhang P, et al. Effects of cold shock on microtubule organization and cell cycle in gynogenetically activated eggs of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Marine Biotechnology, 2006, 8: 312-318.
- [80] Lin Z M, Zhu X P, You F et al. Nuclei fluorescence microscopic observation on early embryonic development of mitogynogenetic diploid induced by hydrostatic pressure treatment in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Theriogenology, 2015, 83(8): 1310-1320.
- [81] Lin Z M, Zhu X P, Zhang T R, et al. Effects of hydrostatic pressure on microtubule organization and nucleus changes in gynogenetically activated eggs of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Theriogenology, 2016, 85(9): 1610-1624.
- [82] 朱晓琛, 刘海金, 孙效文, 等. 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性[J]. 动物学研究, 2006, 27(1): 63-67.
Zhu Xiaochen, Liu Haijin, Sun Xiaowen, et al. Assessment of homozygosity in gynogenetic diploid using microsatellite markers in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Zoological Research, 2006, 27(1): 63-67.
- [83] Wang W, You F, Xu J H, et al. Genetic analysis of meio-

- and mitogynogenetic stocks of *Paralichthys olivaceus* with microsatellite markers[J]. *ACTA Oceanologica Sinica*, 2008, 27(2): 149-156.
- [84] Comber S C, Smith C. Polyploidy in fishes: patterns and processes[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2004, 82: 431-442.
- [85] Levasseur A, Pontarotti P. The role of duplications in the evolution of genomes highlights the need for evolutionary based approaches in comparative genomics[J]. *Biology Direct*, 2011, 6: 11.
- [86] Zhang J Z. Evolution by gene duplication: an update[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2003, 18(6): 292-298.
- [87] 桂建芳. 三倍体银鲫资源的遗传评价及其生物学基础[C]. 湖北省遗传学会、江西省遗传学会. 湖北省遗传学会、江西省遗传学会 2006 年学术年会暨学术讨论会论文摘要集. 湖北省遗传学会、江西省遗传学会: 湖北省科学技术协会, 2006: 15.
- Gui Jianfang. Genetic evaluation and biological basis of triploid *Carassius auratus*[C]. Genetic Society of Hubei, Genetic Society of Jianxi. Annual Conference of Genetic Society of Hubei, Genetic Society of Jianxi, 2006: 15.
- [88] 吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- Wu Qingjiang, Gui Jianfang. *Fish Genetic and Breeding Engineering*[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [89] Piferrer F, Beaumont A, Falguière J C, et al. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment[J]. *Aquaculture*, 2009, 293: 125-126.
- [90] Wu C, Ye Y, Chen R, et al. An artificial multiple triploid carp and its biological characteristics[J]. *Aquaculture*, 1993, 111: 255-262.
- [91] Cherfas N B, Gomelsky B I, Emelyanova O V, et al. Induced diploid gynogenesis and polyploidy in crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), × common carp, *Cyprinus carpio* L., hybrids[J]. *Aquaculture Research*, 1994, 25: 943-954.
- [92] Galbreath P F, Thorgaard G H. Saltwater performance of triploid Atlantic salmon *Salmo salar* and brown trout *Salmo trutta* hybrids[J]. *Aquaculture Research*, 1997, 28: 1-8.
- [93] Felip A, Piferrer F, Zanuy S, et al. Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons[J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, 58: 76-88.
- [94] 刘少军. 鲫鱼新品种——湘云鲫 2 号[J]. *农村百事通*, 2018, (16): 27.
- Liu Shaojun. A new species of crucian carp—Xiangyun crucian carp No.2[J]. *Rural Know-All*, 2018, (16): 27.
- [95] Sugama K, Taniguchi N, Seki S, et al. Survival, growth and gonad development of triploid red sea bream, *Pagrus major* (Temminck Schlegel): use of allozyme markers for ploidy and family identification[J]. *Aquaculture Research*, 1992, 23(2): 149-159.
- [96] Gorshkova G, Gorshkov S, Hadani A, et al. Chromosome set manipulation in marine fish[J]. *Aquaculture*, 1995, 137: 157-158.
- [97] Felip A, Zanuy S, Carrillo M, et al. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species[J]. *Genetica*, 2001, 111: 175-195.
- [98] Tabata K. Application of the chromosomal manipulation in aquaculture of hirame *Paralichthys olivaceus*[J]. *Bulletin of the Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station*, 1991, 28: 1-134.
- [99] 尤锋, 沙学绅, 阮洪超. 黑鲷三倍体人工诱导的初步研究[J]. *海洋与湖沼*, 1991, 22(5): 489-491.
- You Feng, Sha Xueshen, Ruan Hongchao. Preliminary study on induced triploidy in *Sparus macrocephalus* (Basilewsky)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1991, 22(5): 489-491.
- [100] 蔡国雄. 真鲷三倍体诱导初步研究[J]. *热带海洋*, 1997, 16(4): 95-98.
- Cai Guoxiong. Triploid induction of *Pagrosomus major* by cold shock[J]. *Tropical Oceanology*, 1997, 16(4): 95-98.
- [101] Liu J, You F. Preliminary study on chromosomes of induced triploid in the red sea bream, *Pagrosomus major*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2000, 18(2): 190-192.
- [102] 王军, 王德祥, 尤颖哲, 等. 大黄鱼三倍体诱导的初步研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2001, 40(4): 927-930.
- Wang Jun, Wang Dexiang, You Yingzhe, et al. Preliminary study on induction of triploidy in *Pseudosciaena crocea*[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2001, 40(4): 927-930.
- [103] Xu J, You F, Wu X, et al. Induction of triploidy in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Richardson, 1846): effects of pressure shocks and growth performance in the first rearing year[J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39: 1369-1376.
- [104] 尤锋, 刘静. 三倍体牙鲆的核型证明[J]. *海洋与湖沼*, 1995, 26(5): 115-118.
- You Feng, Liu Jing. Karyotype evidences of triploidy in the left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus* (T. & S.)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1995, 26(5): 115-118.
- [105] 孟振, 雷霖霖, 刘新富, 等. 不同倍性大菱鲆胚胎发育的比较研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*,

- 2010, 40(7): 36-42.
Meng Zhen, Lei Jilin, Liu Xinfu, et al. Comparative study in embryonic development of different ploidy of turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(7): 36-42.
- [106]刘志鹏, 王旭波, 翟介明, 等. 半滑舌鳎三倍体诱导研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(6): 77-80.
Liu Zhipeng, Wang Xubo, Zhai Jieming, et al. Study on triploid induction in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(6): 77-80.
- [107]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.
Wang Maolin, Jiang Zhiqiang, Li Rong. Triploidy induction of *Takifugu rubripus* by cold shock[J]. Fisheries Science, 2006, 25(7): 349-352.
- [108]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.
You Yingzhe. Triploidy induction by hydrostatic pressure treatment in *Takifugu bimaculatus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(3): 348-352.
- [109]蔡明夷, 刘贤德, 武祥伟, 等. 大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体的诱导和微卫星分析[J]. 水产学报, 2010, 34(11): 1629-1635.
Cai Mingyi, Liu Xiande, Wu Xiangwei, et al. Induction and microsatellite analysis of allotriploid between *Larimichthys crocea* and *Nibea albiflora*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(11): 1629-1635.
- [110]刘金相, 王旭波, 刘聪辉, 等. 静水压法人工诱导牙鲆(♀)×圆斑星鲽(♂)杂交三倍体的探索[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(2): 41-47.
Liu Jinxiang, Wang Xubo, Liu Conghui, et al. Induction of triploid hybrid of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, ♀) × spotted halibut (*Verasper Variegatus*, ♂) by hydrostatic pressure shocks[J]. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(2): 41-47.
- [111]宋宗诚, 吴志昊, 王丽娟, 等. 大菱鲆三倍体人工诱导条件优化及规模化诱导[J]. 海洋科学, 2019, 43(12): 42-49.
Song Zongcheng, Wu Zhihao, Wang Lijuan, et al. Optimization of artificial induction conditions and large-scale induction of the triploid turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Marine Sciences, 2019, 43(12): 42-49.
- [112]Goo I B, Im J H, Gil H W, et al. Comparison of cell and nuclear size difference between diploid and induced triploid in marine medaka, *Oryzias dancena*[J]. Development and Reproduction, 2015, 19(3): 127-134.
- [113]Peruzzi S, Kettunen A, Primicerio R, et al. Thermal shock induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. Aquaculture Research, 2007, 38: 926-932.
- [114]Arakawa T, Takaya M, Inoue K, et al. An examination of the condition for triploid induction by cold shock in red and black sea breams[J]. Bulletin of Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, 1987, 13: 25-30.
- [115]Garrido-Ramos M, De la Herrán R, Lozano R, et al. Induction of triploidy in offspring of gilthead seabream (*Sparus aurata*) by means of heat shock[J]. Journal of Applied Ichthyology, 1996, 12: 53-55.
- [116]Zanuy S, Carrillo M, Blázquez M, et al. Production of monosex and sterile sea bass by hormonal and genetic approaches[J]. Publ Assoc Devélop Aquac, 1994, 119: 409-423.
- [117]Colombo L, Barbaro A, Libertini A, et al. Artificial fertilization and induction of triploidy and meiogynogenesis in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.[J]. Journal of Applied Ichthyology, 1995, 11(1-2): 118-125.
- [118]Takeuchi Y, Yatabe T, Yoshikawa H, et al. Production of functionally sterile triploid Nibe croaker *Nibea mitsukurii* induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock[J]. Aquaculture, 2018, 494: 45-56.
- [119]Tabata K, Gorie S, Kawamura Y. Growth, survival and maturation in the induced triploid hirame *Paralichthys olivaceus*[J]. Aquaculture Science, 2010, 36: 267-276.
- [120]Piferrer F, Cal R M, Álvarez-Blázquez B, et al. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks[J]. Aquaculture, 2000, 188: 79-90.
- [121]Purdom C E. Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*)[J]. Heredity, 1972, 29(1): 11-24.
- [122]Lincoln R F. Sexual maturation in triploid male plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice x flounder (*Platichthys flesus*) hybrids[J]. Journal of Fish Biology, 1981, 19: 415-426.
- [123]Holmefjord I, Refstie T. Induction of triploidy in Atlantic halibut by temperature shocks[J]. Aquaculture International, 1997, 5: 169-173.
- [124]Manning A J, Burton M P M. Cytological abnormalities in the ovaries of triploid yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 29: 269-273.
- [125]Hamasaki M, Takeuchi Y, Miyaki K, et al. Gonadal development and fertility of triploid grass puffer *Takifugu niphobles* induced by cold shock treatment[J]. Marine Biotechnology, 2013, 15: 1331-144.
- [126]许建和, 尤锋, 吴雄飞, 等. 冷休克法和静水压法人工诱导大黄鱼三倍体[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 206-210.
Xu Jianhe, You Feng, Wu Xiongfei, et al. Artificial in-

- duction of triploidy *Pseudosciaena crocea* by cold and hydrostatic pressure shock[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 206-210.
- [127] 尤锋. 黑鲷三倍体的人工诱导研究[J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(3): 248-255, 334.
You Feng. Study on triploidy induction in the black porgy, *Sparus Macrocephalus* (Basilewsky)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1993, 24(3): 248-255, 334.
- [128] 尤颖哲. 双斑东方鲀三倍体苗种培育研究[J]. 中国水产, 2005, (12): 65-67.
You Yingzhe. Study on the cultivation of triploid *Fugu bimaculatus* seedlings[J]. China Fisheries, 2005, (12): 65-67.
- [129] 陈松林, 李文龙, 季相山, 等. 半滑舌鲷三倍体鱼苗的人工诱导与鉴定[J]. 水产学报, 2011, 35(6): 925-931.
Chen Songlin, Li Wenlong, Ji Xiangshan, et al. Induction and identification of artificial triploid fry in *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(6): 925-931.
- [130] 刘慧, 吴志昊, 李桢, 等. 三倍体牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(1): 33-40.
Liu Hui, Wu Zhihao, Li Zhen, et al. Genetic diversity analysis on artificial triploid stock of *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(1): 33-40.
- [131] 王磊, 陈松林, 谢明树, 等. 牙鲆三倍体批量化诱导及其生长和性腺发育观察[J]. 水产学报, 2011, 35(8): 1258-1265.
Wang Lei, Chen Songlin, Xie Mingshu, et al. Induction of triploidy and its effect on growth and gonadal development in *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(8): 1258-1265.
- [132] Liu H, Wu Z H, Zhu X P, et al. Comparative performance of growth, vertebral structure and muscle composition in diploid and triploid *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fish Diseases, 2018, 41: 1495-1504.
- [133] 李文龙. 半滑舌鲷多倍体的人工诱导及三倍体生长与发育的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
Li Wenlong. Studies on the artificial induction of polyploidy and its effect on growth and development of triploid in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [134] Okutsu T, Shikina S, Kanno M, et al. Production of trout offspring from triploid salmon parents. Science, 2007, 317(5844): 1517-1517.
- [135] Bidwell C A, Chrisman C L, Libey G. Polyploidy induced by heat shock in channel catfish[J]. Aquaculture, 1985, 51: 25-32.
- [136] Myers J M. Tetraploid induction in *Oreochromis* spp.[J]. Aquaculture, 1986, 57: 281-287.
- [137] Peruzzi S, Chatain B. Induction of tetraploid gynogenesis in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. Genetica, 2003, 119: 225-228.
- [138] Malison J A, Kayes T B, Held J A, et al. Manipulation of ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) by heat shock, hydrostatic pressure shock and spermatozoa inactivation[J]. Aquaculture, 1993, 110: 229-242.
- [139] Cherfas N B, Gomelsky B, Peretz Y, et al. Induced gynogenesis and polyploidy in the Israeli common carp line Dor-70[J]. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 1993, 45(2): 59-72.
- [140] 衣启麟, 于海洋, 王兴莲, 等. 静水压力诱导牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)四倍体的条件优化[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 382-388.
Yi Qilin, Yu Haiyang, Wang Xinglian, et al. Production of viable tetraploid olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by hydrostatic pressure shock[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 382-388.
- [141] Wang G, Zhang X, Sun Z, et al. Induction of gynotetraploidy in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2020, 38(1): 288-293.
- [142] Wu Z H, Wang L J, Lu Y L, et al. Artificial induction and genetic structure analysis of tetraploid turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Frontiers in Marine Science, 2019, 6: 637.
- [143] 李文龙, 陈松林, 季相山, 等. 半滑舌鲷四倍体鱼苗的诱导与鉴定[J]. 中国水产科学, 2012, 19(2): 196-201.
Li Wenlong, Chen Songlin, Ji Xiangshan, et al. Induction and identification of tetraploid fry in *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(2): 196-201.
- [144] 郑春静. 温度休克诱导大黄鱼四倍体的初步研究[J]. 中国水产, 2006, (3): 87-89.
Zheng Chunjing. Preliminary study on tetraploid induction of *Pseudosciaena crocea* by temperature shock[J]. China Fisheries, 2006, (3): 87-89.

Progress in the study and application of chromosome manipulation in marine fishes from China

YOU Feng^{1, 2}, WU Zhi-hao^{1, 2}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Center for Ocean Mega-Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

Received: Mar. 27, 2020

Key words: gynogenesis; triploid; tetraploid; marine fishes; genetic breeding

Abstract: Chromosome manipulation technology, including artificial induction of gynogenesis and polyploid, is useful to rapidly purify characteristics and obtain mono-sex, fast growing, low fertility populations. This technology is an important part of modern genetic breeding and improvement and has been widely developed in the recent years. The characteristics of rapid purification, infertility/low fertility, and biosafety are of great value when applying advanced biotechnologies such as fish gene editing and surrogate broodstock. In this study, we presented the concept and principle of fish chromosome manipulation techniques. Further, we introduced research progress in terms of the induction and biological mechanism of gynogenesis and polyploid induction of marine fish in China as well as their application. The present review provided valuable references for genetic breeding and biotechnology research in marine fish using chromosome manipulation techniques.

(本文编辑: 杨 悦)