

半滑舌鲷三倍体鱼苗的人工诱导与鉴定

陈松林^{1*}, 李文龙^{1,2}, 季相山¹, 谢明树¹, 徐营¹, 邓寒¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,
农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 针对半滑舌鲷雌雄个体生长差异过大、雌性性腺发育成熟后腹部凸起影响舌鲷生长和商品鱼质量等问题, 开展了人工诱导半滑舌鲷三倍体的研究。采用静水压处理抑制半滑舌鲷受精卵第二极体排出进行染色体加倍, 筛选出有效的静水压处理强度及其持续时间。结果表明, 孵化水温 23 °C 左右时, 授精后 5 min, 采用 36 MPa 的静水压压力, 休克处理 4 min, 三倍体诱导率最高, 达到 100%。采用该诱导条件, 大批量获得了半滑舌鲷三倍体鱼苗。采用流式细胞仪分析了三倍体鱼苗细胞 DNA 含量, 表明三倍体鱼苗细胞 DNA 含量为二倍体对照鱼苗的 1.5 倍。通过染色体分析表明, 三倍体鱼苗的染色体数为 63 条, 而二倍体鱼苗的染色体数为 42 条。

关键词: 半滑舌鲷; 三倍体; 静水压处理

中图分类号: S 962.1

文献标志码: A

半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 属鲽形目 (Pleuronectiformes)、舌鲷科 (Cynoglossidae)、舌鲷属 (*Cynoglossus*), 俗名鲷米、舌头鱼等, 是我国特有的名贵经济海水鱼类。半滑舌鲷由于其味道鲜美、肉质细嫩、营养丰富, 深受消费者欢迎。目前, 半滑舌鲷已成为我国海水鱼类养殖的主导品种之一, 其养殖业年产值达 20 多亿元人民币。研究表明, 半滑舌鲷雌性和雄性个体, 在生长速率上存在很大差别, 其雌性个体比雄性个体大 3 ~ 4 倍^[1], 半滑舌鲷鱼苗经过 1 年半到 2 年的养殖后, 雌性个体体质量可达 500 ~ 750 g, 而雄性个体仅 100 ~ 250 g。另外, 雌性个体在性成熟后由于性腺发育成熟、导致腹部隆起, 影响了大规格商品鱼的外观和质量, 降低了半滑舌鲷的商品价值, 进而影响其苗种的推广和养殖产业的发展。因此, 对半滑舌鲷开展性别控制和不育技术研究, 采用染色体组操作技术研制全雌或不育苗种, 对于半滑舌鲷苗种的推广及其养殖业的发展具有重要意义。

近年来, 我国科技工作者对半滑舌鲷性别特异分子标记筛选、人工雌核发育诱导、性别控制以及半滑舌鲷家系建立等进行了系统研究, 并取得重要进展。筛选到半滑舌鲷雌性特异 AFLP 分子标记, 建立了半滑舌鲷遗传性别鉴定的 PCR 技术^[2-4], 建立了半滑舌鲷异源精子和同源精子诱导的雌核发育技术^[5-6]。但这些技术主要是进行半滑舌鲷遗传性别鉴定和雌核发育诱导。

三倍体鱼因染色体组成不平衡, 性腺不能发育成熟, 因而在研制鱼类不育群体方面具有重要应用价值。鉴于鱼类不育技术在遗传育种、渔业生产、防止外来物种入侵和保护鱼类遗传多样性方面的重要意义和应用价值, 国内外非常重视鱼类不育技术的研究。而制作不育鱼类的主要途径是生产三倍体。迄今国内外已先后获得了三棘刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)^[7]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[8]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[9]、水晶彩鲫 (*Carassius auratus transparent colored variety*)^[10]、黑鲷 (*Sparus macrocephalus*)^[11] 等三倍体。国内在

收稿日期: 2011-01-15 修回日期: 2011-04-06

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项经费资助(200903046)

通讯作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

淡水鲤科鱼类多倍体培育上也取得一些进展,如洪一江等^[12]成功诱导出兴国红鲤(*Cyprinus carpio* var. *singuanensis*)三倍体;张宪中等^[13]诱导出三倍体锦鲤(*Cyprinus carpio*)。

本文研究了静水压诱导半滑舌鲷三倍体鱼苗的条件和方法,建立了诱导半滑舌鲷授精卵进行染色体加倍大量培育三倍体的技术,育出率近100%。同时,采用流式细胞仪鉴定了三倍体和二倍体鱼苗细胞DNA含量,采用染色体分析技术分析了三倍体鱼苗的染色体数量,证实了该技术的可行性,为半滑舌鲷性别控制和优质商品鱼的生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼和卵子、精子的采集

繁殖用半滑舌鲷亲鱼为山东省海阳市黄海水产有限公司人工养殖培育的半滑舌鲷亲鱼,雌鱼每尾体质量为1.5~2 kg,雄鱼为180~350 g,经过生殖调控达到性成熟后进行人工催产。半滑舌鲷亲鱼的人工催产按文献^[14]的方法。采取挤压腹部法收集未受精卵,将未受精卵采集到干燥的烧杯中备用,采用腹部挤压法采集半滑舌鲷雄鱼精液,干法授精,将新鲜精液倒入卵中,轻轻摇动混匀,精液和卵的授精最小体积比为500 μ L:(50~100) mL,加入2倍于卵量体积的温度为22~23 $^{\circ}$ C的海水完成授精过程,授精后将受精卵置于21~23 $^{\circ}$ C海水中孵化。

1.2 静水压处理适宜起始时间的筛选

对半滑舌鲷三倍体诱导处理起始时间的筛选,参考CHEN等^[5]诱导半滑舌鲷减数雌核发育技术,在授精后5 min,进行静水压处理为最佳处理起始时间。

1.3 静水压处理压力和适宜处理时间的确定

将授精卵分别倒入日本生产的5506静水压机的压力缸中,分别采用28、32、36、40和44 MPa压力进行处理,持续处理4~5 min,处理完毕后将卵移入21~23 $^{\circ}$ C海水中培养孵化。分别计算不同压力组的孵化率及三倍体比率,从而确定静水压处理的适宜压力。

筛选静水压处理持续时间,参考半滑舌鲷减数雌核发育方法^[5],将授精卵在筛选出的适宜压力下,分别处理2、4、6和8 min,处理完毕后将卵移入21~23 $^{\circ}$ C海水中培养孵化。计算各组的孵

化率及三倍体比率,从而确定静水压处理的适宜处理时间。

1.4 三倍体鱼苗的细胞DNA相对含量测定

每次三倍体诱导实验,抽检孵化出膜后2~5 d的三倍体实验鱼苗20~30尾。将每尾鱼苗放入1个1.5 mL的离心管中,用蒸馏水清洗鱼苗1次,随后向每个离心管加入0.2 mL PBS,用碾磨棒将鱼苗碾碎成单细胞,制成单细胞悬液,碾磨下一个前先将碾磨棒在蒸馏水中洗干净。全部磨好后,向每个管中加入1~2 mL从PARTEC公司购买的一步法染色试剂,充分染色后,用滤膜过滤,将滤液转入仪器配套的5 mL试管中,轻弹试管,使细胞悬液混合均匀,然后将试管置于PARTEC倍性测定仪(PA)中测定样品的DNA相对含量。采用正常二倍体鱼苗作对照,再分析三倍体诱导鱼苗的DNA相对含量。统计三倍体鱼苗的比率。

1.5 三倍体鱼苗染色体分析

将1~15日龄的三倍体实验鱼苗置于海水配置的0.02%的秋水仙素中,在室温下处理2 h。然后把鱼苗放入0.075 mol/L的KCl中低渗25~35 min。用新配制的预冷卡诺氏液(甲醇:冰醋酸=3:1)连续固定3次,每次20 min。再取单个鱼苗放入50%的冰醋酸中,使细胞游离。热滴片法滴片。10%吉姆萨染液染色20~30 min,镜检染色体数目。

1.6 数据分析

运用SPSS 13.0软件统计各个组诱导鱼苗孵化率和三倍体率的平均值和标准差,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)对各个诱导组间的数据进行多重比较。

2 结果

2.1 染色体加倍静水压压力及其持续时间的确定

比较了不同静水压压力和处理持续时间对半滑舌鲷三倍体诱导率的影响,现将采用不同压力处理后获得的舌鲷三倍体诱导的结果示于表1。由表中可见,随着静水压力的增加,鱼苗孵化率呈下降趋势。36 MPa组与32 MPa组之间的孵化率不存在显著差异($P > 0.05$),但三倍体率差异显著($P < 0.05$);36 MPa组与40 MPa组的三倍体

率差异不显著,但孵化率差异显著,因此只有在静水压压力为 36 MPa 时诱导三倍体鱼苗的效果最好。

表 1 静水压力对半滑舌鲷三倍体诱导的影响

Tab.1 Effect of different levels of pressure shock on induction rate of triploid in half-smooth tongue sole

静水压压力/MPa pressure levels	孵化率/% hatching rate	三倍体率/% percentage of triploid
对照组 control	53.7 ± 4.6 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
28	48.5 ± 3.9 ^{ab}	0.0 ± 0.0 ^a
32	40.7 ± 2.8 ^{bc}	42.1 ± 4.0 ^b
36	37.6 ± 2.3 ^c	100.0 ± 0.0 ^d
40	11.2 ± 1.7 ^d	91.5 ± 4.5 ^c
44	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^a

注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Notes: Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

将半滑舌鲷受精卵在 36 MPa 压力下处理 2、4、6 和 8 min,均有鱼苗孵化出膜,但是随着压力持续时间的延长,孵化率急剧下降,4 min 组与 6、8 min 组间的三倍体率虽不存在显著差异,但是孵化率差异显著,只有在持续处理 4 min 时,诱导三倍体鱼苗的效果最好。因此确定半滑舌鲷三倍体诱导的静水压有效处理持续时间为 4 min(表 2)。

表 3 流式细胞仪测定三倍体鱼苗 DNA 相对含量(三倍体率 100%)

Tab.3 Flow cytometry analysis of DNA relative content of triploid fry (percentage of triploid 100%)

名称 name	DNA 相对含量 DNA relative content	名称 name	DNA 相对含量 DNA relative content
对照组 control	27.73	2010-10-06_135856. fcs	41.35
2010-10-06_061038. fcs	41.38	2010-10-06_140052. fcs	41.47
2010-10-06_061540. fcs	41.06	2010-10-06_140406. fcs	40.76
2010-10-06_062553. fcs	41.57	2010-10-06_140747. fcs	40.45
2010-10-06_062733. fcs	42.76	2010-10-06_140943. fcs	41.29
2010-10-06_105704. fcs	40.08	2010-10-06_141130. fcs	41.45
2010-10-06_110329. fcs	40.34	2010-10-06_141408. fcs	40.22
2010-10-06_110446. fcs	39.12	2010-10-06_143627. fcs	38.60
2010-10-06_110538. fcs	39.52	2010-10-06_143822. fcs	39.12
2010-10-06_111536. fcs	38.69	2010-10-06_144352. fcs	39.37
2010-10-06_111729. fcs	38.53	2010-10-06_144649. fcs	39.76
2010-10-06_112008. fcs	39.48	2010-10-06_145018. fcs	40.29
2010-10-06_112152. fcs	39.11	2010-10-06_145514. fcs	39.74
2010-10-06_122236. fcs	40.53	2010-10-06_146715. fcs	39.54
2010-10-06_134836. fcs	41.61	2010-10-06_146813. fcs	39.16
2010-10-06_135357. fcs	41.85		

表 2 静水压处理持续时间对半滑舌鲷三倍体诱导的影响
Tab.2 Effect of treatment duration of pressure shock on the induction of triploid in half-smooth tongue sole

静水压压力持续时间/min pressure shock duration	孵化率/% hatching rate	三倍体率/% percentage of triploid
对照组 control	47.5 ± 3.1 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
2	42.9 ± 2.2 ^a	31.7 ± 4.4 ^b
4	32.9 ± 1.7 ^b	96.7 ± 3.3 ^c
6	18.5 ± 2.0 ^c	88.2 ± 1.8 ^c
8	10.6 ± 1.8 ^d	93.3 ± 3.3 ^c

注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。海水温度 23 °C 左右,受精后 5 min,静水压压力为 36 MPa。

Notes: Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). Water temperature was about 23 °C, 5 min after fertilization, and pressure was 36 MPa.

2.2 半滑舌鲷三倍体鱼苗细胞 DNA 相对含量的测定

采用倍性测定仪对三倍体实验鱼苗和对照鱼苗的细胞 DNA 相对含量进行了测定。表明二倍体鱼苗细胞中的 DNA 相对含量绝大多数集中在 26 ~ 28 处,而三倍体鱼苗绝大多数细胞中的 DNA 相对含量在 39 ~ 42 处(表 3),是二倍体鱼苗的 1.5 倍(图 1-a, b),因此证明我们诱导出的鱼苗为三倍体鱼苗。

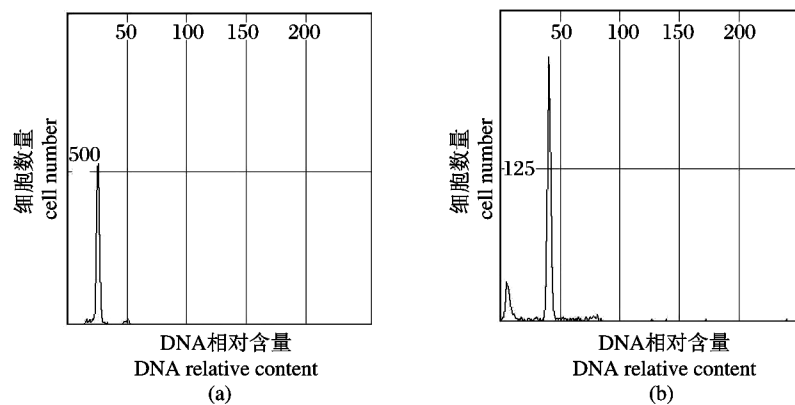


图1 二倍体鱼苗和三倍体鱼苗的倍性分析直方图

(a) 正常二倍体鱼苗; (b) 三倍体鱼苗。

Fig. 1 Histograms of ploidy analysis on normal diploid and triploid fry

(a) normal diploid fry; (b) triploid fry.

2.3 半滑舌鲷三倍体实验鱼苗染色体分析

半滑舌鲷二倍体鱼苗的染色体数目为 $2n = 42$ 条;而三倍体鱼苗的染色体数目为 $3n = 63$,因此通过染色体分析即可鉴定诱导出的鱼苗是否为三倍体鱼苗。如果诱导出的鱼苗的染色体数目为63条,则证明这些鱼苗是三倍体。本项研究采用鱼苗染色体制片方法,对人工诱导的半滑舌鲷三

倍体鱼苗进行了染色体分析。每次三倍体诱导实验抽检10~20尾鱼苗进行染色体分析,发现在优化的静水压处理条件下产生的鱼苗含有63条染色体,正常二倍体鱼苗的染色体数为48条,因此,含有63条染色体的鱼苗就是三倍体鱼苗(图2-a, b)。由此证明本方法诱导的鱼苗为三倍体。

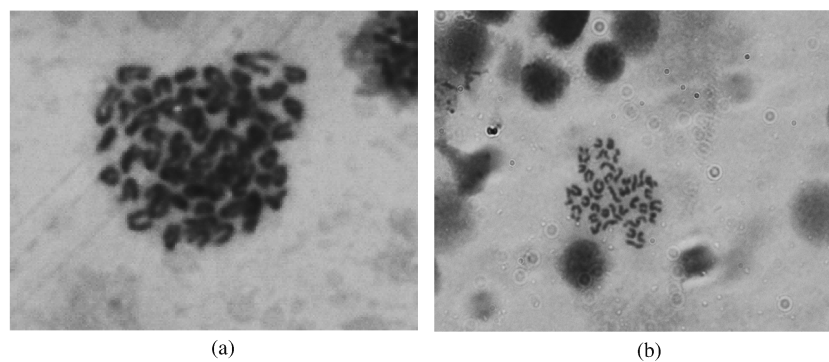


图2 三倍体鱼苗和二倍体鱼苗染色体分析

(a) 正常二倍体鱼苗染色体; (b) 三倍体鱼苗染色体。

Fig. 2 Chromosome analysis of normal diploid and triploid fry

(a) normal diploid fry; (b) triploid fry.

3 讨论

3.1 人工诱导方法

随着水产养殖业的迅猛发展,人们对水产品优良品种的需求也日益迫切,使用染色体操作技术,人工诱导鱼类多倍体,是获得优良品种的有效途径之一。三倍体鱼类具有性腺不能发育成熟、控制过度繁殖、促进生长以及提高鱼肉品质等优

点。人工诱导鱼类三倍体技术是通过人为的方法抑制受精卵第二极体排出进行染色体加倍,从而形成三倍体个体。目前广泛应用的诱导方法有物理学方法、化学方法和生物学方法^[15]。

静水压处理是进行鱼类多倍体诱导的有效方法之一,与温度休克法相比,其处理的佳条件易于掌握,处理时间较短,受精卵损伤小,可获得较高的诱导率和成活率。如许建和等^[16]同时用温

度休克和静水压处理两种方法诱导大黄鱼三倍体时,得到的结论是在最适诱导条件下静水压法诱导效果要优于冷休克法。PERUZZI 等^[17]也曾报道诱导欧鲈三倍体,静水压法诱导效率高于冷休克法。

3.2 三倍体诱导效果

本研究采用静水压法,通过大量实验,筛选出诱导半滑舌鳎三倍体的最佳条件是,孵化水温 23 度左右,在授精后 5 min,采用 36 MPa 的静水压压力,处理 4 min。且获得的三倍体率最高可达 100%,这一较高诱导率与很多鱼类相似,如桂建芳等^[10]采用静水压法诱导三倍体水晶彩鲫,在受精后 4~5 min 采用 600 kg/cm² 或 650 kg/cm² 的压力持续处理 3 min,结果产生了 100% 的三倍体水晶彩鲫,而且胚胎的存活率相当高,孵化率为对照组的 90% 左右;XU 等^[18]用冷休克法诱导牙鲆三倍体,在受精后 3 min,水温 3°下持续处理 25 min 也获得了 100% 的三倍体牙鲆,且成活率最高为 93.27%;LINHART 等^[19]诱导欧洲鲑三倍体,在受精后 3 min 以 600 kg/cm² 的静水压力持续处理 4 min,结果得到(97.8% ± 1.8%) 的三倍体胚胎,最后存活率为(33.7% ± 16.9%)。

在本研究中还显示出,三倍体诱导组的孵化率较对照组低,且随着静水压力的上升、处理时间的延长,各诱导组的鱼苗孵化率明显下降,这一现象在许多鱼类三倍体的诱导时都有发现。如许建和等^[16]用静水压诱导大黄鱼三倍体时,发现各试验组原肠期相对存活率、相对孵化率随压力强度增加而下降。JOHNSON 等^[20]认为,其原因可能是压力刺激对受精卵中蛋白质的功能造成了损伤,进而影响胚胎的发育和存活,而且这种损伤会随处理强度和持续时间的增加而增强。我们还发现未受精卵的发育好坏对诱导结果会产生极大的影响。PERUZZI 等^[17]诱导欧鲈三倍体时发现,低质量的欧鲈卵导致较高的死亡率。因此对亲鱼进行精养,提供优质的饵料,给予适宜的环境条件,亲鱼产出的卵子质量就好,其诱导效果就会更好。另外,由于诱导工艺的差别、倍性鉴定方法的不同以及鱼种地理种群的不同,其诱导多倍体的结果也可能不同。

3.3 倍性鉴定

采用流式细胞仪检测 DNA 相对含量对鱼类多倍体进行倍性鉴定,具有操作简单、快速等优

点,是一种较为理想的倍性鉴定方法。染色体计数法则是一种最直接、最可靠的倍性鉴定方法。在本研究中同时采用了流式细胞仪检测 DNA 相对含量和染色体制片计数两种直接鉴定方法对三倍体诱导组进行了倍性鉴定,结果都证明在优化了的最佳诱导条件下,诱导的半滑舌鳎三倍体率为 100%。

本研究采用静水压方法,筛选出诱导半滑舌鳎三倍体的最佳条件,获得的三倍体率最高达 100%,首次建立了半滑舌鳎三倍体鱼苗的诱导方法,并且获得了大量的半滑舌鳎三倍体,为后期三倍体的生长性能和性腺发育研究提供了材料。本项技术的建立为半滑舌鳎性别控制和优质商品鱼的生产奠定了基础提供了技术手段。

参考文献:

- [1] 孟田湘,任胜民. 渤海半滑舌鳎的年龄与生长[J]. 海洋水产研究,1988(9):173-183.
- [2] CHEN S L, LI J, DENG S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(2): 273-280.
- [3] 李静,陈松林,邓思平,等. 半滑舌鳎雌性特异 AFLP 分子标记的筛选和应用[J]. 水产学报, 2006, 31(5): 591-597.
- [4] 邓思平,陈松林,田永胜,等. 半滑舌鳎性腺分化和温度对性别决定的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 714-719.
- [5] 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.
- [6] JI X S, TIAN Y S, YANG J F, WU P F, JIANG Y L, CHEN S L. Artificial gynogenesis in *Cynoglossus semilaevis* with homologous sperm and its verification using microsatellite markers [J]. Aquaculture Research, 2010, 41(6): 913-920.
- [7] SWARUP H. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus* [J]. Genetics, 1959, 56(2): 129-142.
- [8] CHOURROUT D. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmon gairdneri* Richardson) [J]. Reproduction Nutrition Development, 1980, 20(3A): 727-733.
- [9] BENFEY T J, SUTTERLIN A M. Triploidy induced

- by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquaculture*, 1984, 36(4): 359-367.
- [10] 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鲤[J]. *水生生物学报*, 1990, 14(4): 336-343.
- [11] 尤峰. 黑鲟三倍体的人工诱导研究[J]. *海洋与湖沼*, 1993, 24(3): 248-255.
- [12] 洪一江, 胡成钰. 人工诱导兴国红鲤三倍体最佳诱导条件的研究[J]. *动物学杂志*, 2005, 35(4): 2-4.
- [13] 张宪中, 傅洪拓, 沈勇平, 等. 人工诱导三倍体锦鲤繁育技术[J]. *安徽农学通报*, 2008, 14(13): 130-132.
- [14] 陈松林, 田永胜, 杨景峰, 等. 半滑舌鳎人工催产和雌核发育二倍体鱼苗的诱导方法: 中国, 200710114301.7[P]. 2008-05-28.
- [15] 范兆廷. 水产动物育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [16] 许建和, 尤峰, 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.
- [17] 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): 23-37.
- [18] XU T J, CHEN S L. Induction of all-triploid Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by cold shock [J]. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2010, 62(1): 43-49.
- [19] LINHART O. Comparison of methods for hatchery-scale triploidization of European catfish (*Silurus glanis* L.) [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2001, 17(6): 247-255.
- [20] JOHNSON R M, HEATH J W. Family, induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 234(1): 123-142.

Induction and identification of artificial triploid fry in *Cynoglossus semilaevis*

CHEN Song-lin^{1*}, LI Wen-long^{1,2}, JI Xiang-shan¹, XIE Ming-shu¹, XU Ying¹, DENG Han¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) is a newly exploited and commercially important cultured marine fish in China. Females grow 3 – 4 times faster than males. Thus, the development of all-triploid stock would be of significant benefit for aquaculture. In the present study, a set of experiments were carried out for developing artificial all-triploids technique in the tongue sole. First of all, and the optimal initiation time for pressure shock of fertilized eggs was determined to be 5 min after fertilization when the fertilized eggs were incubated at water temperature of about 23 °C, the optimal pressure and treatment duration were determined to be 36 MPa and 4 min, respectively. Ploidy of fry was analyzed using *Ploidy analyzer*. Under the optimal induction conditions, 100% triploids were obtained. 63 chromosomes were observed in artificial triploid fry and 42 chromosomes were observed in normal diploid fry. Thus, a set of techniques for induction of triploid fry was developed for the first time in half-smooth tongue sole, and 100% triploid fry were obtained. This technique lays foundation and provides important tool for sex control and production of high quality seeds in half-smooth tongue sole.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; all-triploids; pressure shock

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri. ac. cn