

## 牙鲆三倍体批量化诱导及其生长和性腺发育观察

王磊<sup>1,2</sup>, 陈松林<sup>1\*</sup>, 谢明树<sup>1,3</sup>, 邓寒<sup>1</sup>, 李文龙<sup>1,4</sup>, 高峰涛<sup>1,2</sup>

(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. 中国海洋大学海洋生命学院,山东 青岛 266003;

3. 大连海洋大学生命科学与技术学院,辽宁 大连 116023;

4. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

**摘要:**对牙鲆三倍体鱼苗的诱导、生长及性腺发育进行了一系列研究,发现在14.8~15.5℃的海水温度条件下授精,授精后3 min将受精卵放入3℃的海水中冷休克处理45 min,可以得到牙鲆三倍体;120日龄、348日龄、630日龄时对三倍体和二倍体的全长和体质量进行测量,发现在120日龄时二倍体与三倍体体质量差异不显著,348日龄时三倍体体质量明显大于二倍体体质量( $P < 0.05$ ),630日龄时三倍体的全长和体质量均高于二倍体,且差异极显著( $P < 0.01$ )。通过比较630日龄时的性腺指数,发现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,三倍体牙鲆性腺明显小于二倍体,二倍体和三倍体卵巢指数之间及精巢指数之间差异均极显著( $P < 0.001$ );组织切片观察显示,在二倍体卵巢中可见正常卵母细胞,三倍体卵巢处于未分化的卵原细胞阶段,三倍体精巢中有精母细胞,但数量明显少于二倍体精巢。结果表明,研究采用的方法能够大量获得诱导率为100%的三倍体牙鲆鱼苗,三倍体成鱼性腺发育不良,并且其生长速度显著快于二倍体对照,适合在生产中推广。

**关键词:**牙鲆;三倍体;生长;性腺发育

**中图分类号:**Q 954.4; S 917.4

**文献标志码:**A

三倍体鱼类因具有不育或低育性,从而具有潜在的生长速度快、肉质好、抗逆行强、不干扰鱼类资源等优点,颇受国内外水产科研工作者的广泛重视。早在1943年,MAKINO等<sup>[1]</sup>就开始了人工诱导鲤(*Cyprinus carpio*)三倍体的研究,1959年,SWARUP<sup>[2]</sup>第一次将三倍体刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)培育成成鱼并比较了它们与正常二倍体在生长和性腺发育方面的异同。经过60多年的研究,鱼类三倍体诱导技术已经比较成熟并在鲤、大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)等鱼类中应用成功<sup>[3-4]</sup>。从理论上讲,三倍体由于性腺发育不完全,用于性腺发育的能量可能转到生长方面,从而

加快生长,然而,由于研究对象不同,研究结果差异很大,一些研究认为三倍体比二倍体生长快<sup>[5-7]</sup>,另外一些研究认为三倍体与二倍体生长差异不显著甚至比二倍体生长慢<sup>[8-10]</sup>。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种重要的海洋经济鱼类,在中国、日本和韩国的渔业中占有重要地位,它既是天然捕捞的主要鱼类,也是我国南北方工厂化、池塘和网箱养殖的主要优良品种之一。早在20世纪80年代,日本学者就开始了牙鲆三倍体的研究,并取得了一定的进展<sup>[11]</sup>,在国内关于牙鲆三倍体的研究主要集中在三倍体诱导、胚胎发育、核型证明和早期生长发育方面<sup>[12-15]</sup>,而有关牙鲆三倍体成鱼生长和性腺发育方面的研究尚未见报道,本研究在2009年得到诱导率为100%的三倍体牙鲆,并研

收稿日期:2011-03-26

修回日期:2011-06-02

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

究了三倍体牙鲆和二倍体牙鲆成鱼生长和性腺发育方面的差异,为三倍体牙鲆进行产业化生产奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验鱼

试验用牙鲆亲鱼是由本实验室委托海阳市黄海水产有限公司培育的牙鲆群体,在产卵前 2 个月移入亲鱼池,按照亲鱼培育的标准方法<sup>[16]</sup>,对其进行控光控温,并喂养优质饵料。

### 1.2 诱导方法

精卵的采集与人工授精参照陈松林等<sup>[17]</sup>所采用的方法,人工采集成熟的卵和精液,采用干法受精。三倍体的诱导参考杨景峰等<sup>[18]</sup>的方法进行,授精时的海水温度为 14.8 ~ 15.5 °C,授精后 2.5 min 将受精卵放入网袋中进行洗卵,受精后 3 min 将装有卵的网袋放入 3 °C 海水中进行冷休克处理,处理时间为 45 ~ 50 min,处理后将其转入水温为 14.8 ~ 15.5 °C 的孵化池中进行孵化,二倍体对照组采用同批次受精卵,但未经冷休克处理,每个网袋一般可以处理 100 mL 卵,水浴锅中一次性可放入 10 个网袋,用冷水浴一次可处理 1 000 mL 卵。

### 1.3 倍性鉴定

在幼鱼开口后,选取发育正常的二倍体和三倍体鱼苗,分别通过染色体和 PARTEC 倍性分析仪(PA)对二倍体和三倍体鱼苗进行检测。

PARTEC 倍性分析仪的检测步骤:

① 清洗,将单个鱼苗放入 EP 管中,用蒸馏水清洗两遍,以便洗掉海水和杂质;

② 染色,向 EP 管中加入 0.2 ~ 0.4 mL 一步法染色试剂(购自 PARTEC 公司),用碾磨棒将鱼苗碾磨成单细胞,制成细胞悬液,再加入 0.4 mL 一步法染色试剂染色 5 min;

③ 转管,将染好色的细胞悬液通过滤膜转入与机器配套的 5 mL 试管中,然后用 1 mL 1 × PBS 清洗 EP 管,并将清洗液通过滤膜倒入配套的试管中;

④ 检测,轻轻弹动装有细胞悬液的试管,使其混匀,然后测量样品的 DNA 含量。

每次检测 3 尾二倍体鱼苗作为对照,然后随机挑选 30 尾三倍体鱼苗进行检测,根据检测结果计算三倍体率。染色体的制作按常规的空气干燥

法制片、Giemsa 染色、镜检。

### 1.4 培育方法及生长测定

当胚胎孵化 72 h 后,将二倍体胚胎和三倍体胚胎分别放到同一车间,规格均一的玻璃钢桶中进行培育,玻璃钢桶的体积为 2.8 m<sup>3</sup>,进行统一管理,当鱼苗长到 10 cm 左右的时候,从两组中随机捞出 300 尾打上不同的荧光标记,混养在 10 m<sup>3</sup> 的水泥池中,以消除环境方差。

当实验牙鲆生长至 120 日龄、348 日龄和 630 日龄的时候,分别测量三倍体牙鲆和二倍体对照组的全长和体质量,每组随机测量 30 尾,分析三倍体牙鲆和二倍体牙鲆的生长情况。

### 1.5 性腺指数测定

2011 年 1 月,对 630 日龄的 14 尾二倍体对照牙鲆和 15 尾三倍体牙鲆进行解剖,在解剖前称量体质量,取出性腺后称量性腺重量,观察三倍体及对照组的性腺发育情况,并计算它们的性腺指数。

性腺指数(%) = (性腺组织质量/鱼体质量) × 100

### 1.6 性腺切片观察

2011 年 1 月,对 630 日龄的 14 尾二倍体对照牙鲆和 15 尾三倍体牙鲆进行解剖,由于二倍体牙鲆和三倍体牙鲆的雌、雄性腺可以通过表观观察轻易区分,故随机取二倍体牙鲆和三倍体牙鲆的雌、雄性腺各 3 个进行切片观察,将部分性腺组织固定于 Bouin 氏液中,按照常规方法进行石蜡包埋、切片、染色,光学显微镜观察并拍照保存。

### 1.7 数据分析

数据的统计分析采用 SPSS 17.0 软件进行,计算各指标的平均值和标准差,通过两独立样本 *t*-检验来分析三倍体牙鲆和对照组的生长情况,对解剖的 630 日龄的二倍体和三倍体雌雄牙鲆的体质量和性腺指数进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),各组间的性腺指数采用最小显著差数法(least significant difference, LSD)进行多重比较。

## 2 结果

### 2.1 三倍体的诱导

通过检测开口后鱼苗的 DNA 含量,得知二倍体鱼苗细胞中的 DNA 含量绝大多数集中在 34 ~ 40,而三倍体鱼苗绝大多数细胞中的 DNA 含量在 55 ~ 59,是二倍体鱼苗的 1.5 倍左右(图 1-

a、b),证明诱导出的鱼苗为三倍体鱼苗。对冷休克处理的30尾鱼苗进行了检测,显示它们的DNA含量均为二倍体的1.5倍左右,说明诱导

来三倍体的比例达100%。同时,染色体检测结果显示,二倍体的染色体数目为48条,而三倍体的染色体数目为72条(图2)。

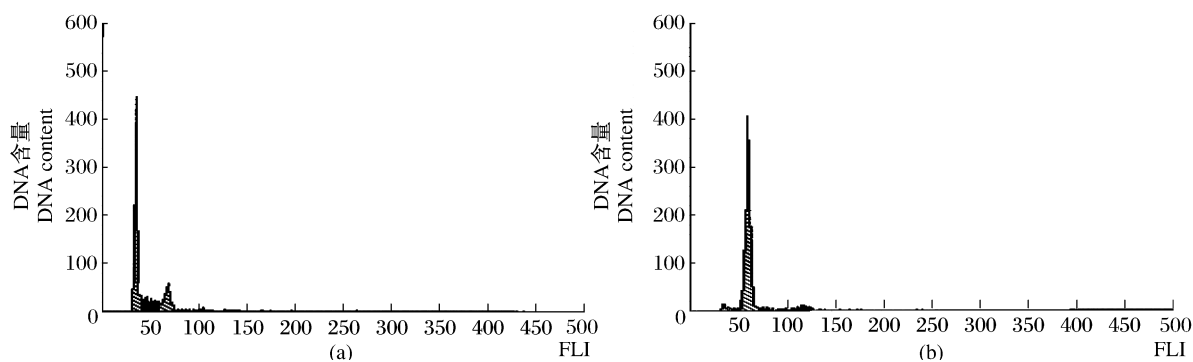


图1 二倍体(a)和三倍体(b)牙鲆鱼苗细胞的DNA含量比较

Fig. 1 Comparison of DNA contents of diploid (a) and triploid (b) Japanese flounder

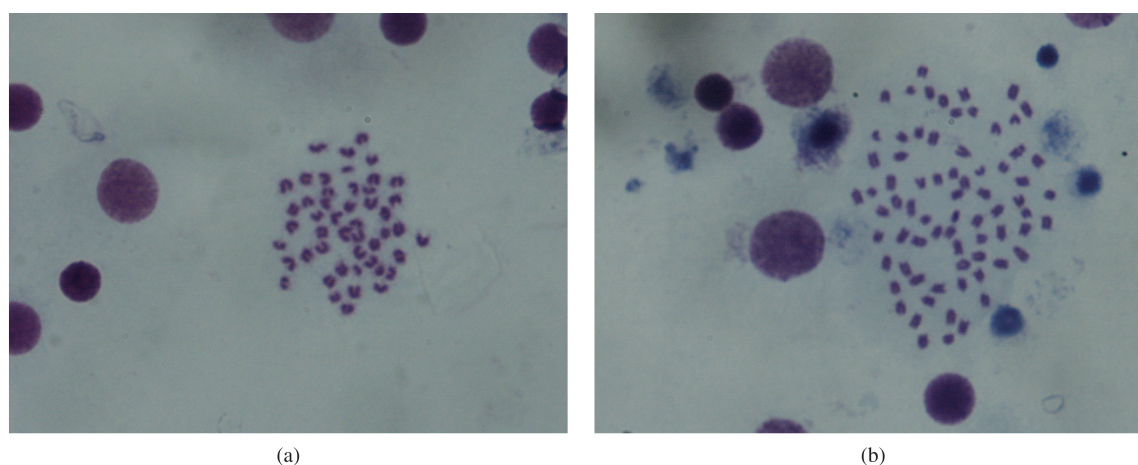


图2 二倍体(a)和三倍体(b)牙鲆鱼苗染色体比较

Fig. 2 Comparison of chromosomes of diploid (a) and triploid (b) Japanese flounder

## 2.2 生长测定

通过测量对照组二倍体牙鲆和三倍体牙鲆在120日龄、348日龄、630日龄的全长和体质量发现,120和348日龄的二倍体牙鲆和三倍体牙鲆全长差异不显著( $P=0.051$ ,  $P=0.448$ ),在630日龄时三倍体牙鲆明显比二倍体长,差异极其显著( $P<0.01$ )。120日龄二倍体牙鲆与三倍体牙

鲆体质量无显著差异( $P=0.083$ ),348日龄三倍体牙鲆体质量明显大于二倍体牙鲆,差异显著( $P<0.05$ ),在630日龄的时候,二倍体体质量明显小于三倍体体质量,差异极其显著( $P<0.01$ )。结果显示,在120日龄之前二倍体和三倍体生长差异不显著,在348日龄时差异显著,在630日龄时差异极其显著。(表1)

表1 二倍体牙鲆和三倍体牙鲆的生长比较

Tab. 1 Comparison of growth characteristics of diploid and triploid Japanese flounder mean  $\pm$  SD

日龄/d growth day	2n 体重/g 2n body weight	3n 体重/g 3n body weight	2n 全长/cm 2n body length	3n 全长/cm 3n body length
120	11.3 $\pm$ 3.04	13.25 $\pm$ 5.9	10.44 $\pm$ 0.99	11.07 $\pm$ 1.61
348	108.69 $\pm$ 18.47	125.55 $\pm$ 45.82	23.06 $\pm$ 1.99	23.49 $\pm$ 3.16
630	490.04 $\pm$ 159.81	634.15 $\pm$ 149.06	34.66 $\pm$ 3.96	39.45 $\pm$ 3.1

### 2.3 牙鲆成鱼三倍体的倍性验证及性腺

2010 年 10 月根据荧光标记从混养池子捞出正常对照 2 尾,三倍体牙鲆 10 尾,抽血进行检验,

检测显示这 30 尾三倍体牙鲆的三倍体率为 100% (图 3)。

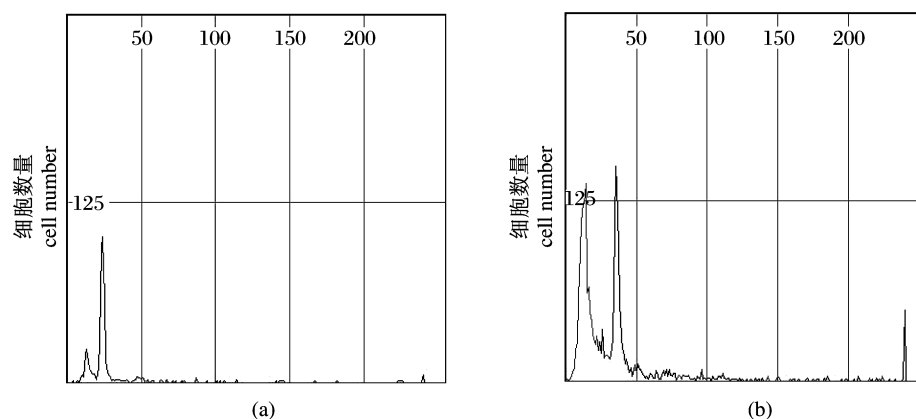


图 3 二倍体 (a) 和三倍体 (b) 牙鲆鱼苗细胞的 DNA 含量比较

Fig. 3 Comparison of DNA contents of diploid (a) and triploid (b) Japanese flounder

2011 年 1 月解剖发现,二倍体牙鲆卵巢呈淡黄色或桔黄色,个别卵巢已发育较成熟,三倍体卵巢呈乳白色;二倍体和三倍体精巢呈乳白色或淡黄色,三倍体性腺从外观上可以明显分出雌雄。测量二倍体和三倍体牙鲆的体重和性腺重的数据见表 2,计算其性腺指数,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,三倍体牙鲆性腺明显小于二倍体(图 4)。二倍体卵巢指数、二倍体精巢指数、三倍体卵巢指数和三倍体精巢指数这 4 组数据间采用最小显著差数法(LSD)进行多重比较,二倍体和三倍体卵巢指数之间及精巢指数之间差异均极显著( $P < 0.001$ ),二倍体的卵巢指数和精巢指数之间差异也极显著

( $P < 0.001$ ),而三倍体的卵巢指数和精巢指数之间差异达不到极显著水平( $P = 0.046$ ),只能达到显著水平( $P < 0.05$ )。

组织切片观察显示,卵巢发育处于第 II 期,可见到此时早、中、晚不同时期的卵母细胞,三倍体牙鲆的卵巢未见卵母细胞,卵巢处于未分化的卵原细胞阶段;二倍体的精巢中可见大量精母细胞和精子,三倍体的精巢中也能见到精母细胞和精子,但是密度要比二倍体中小很多(图 5)。另外,剪开精巢有白色液体流出,将白色液体进行涂片观察,二倍体可见大量精子,滴上海水后,精子开始游动,而三倍体精子量很少,滴上海水后未见精子游动。

表 2 二倍体牙鲆和三倍体牙鲆的性腺指数比较

Tab. 2 Comparison of gonad osomatic indexes of diploid and triploid Japanese flounder

性腺 gonads	数量 number	性腺重/g weight of gonads	鱼体重/g weight of samples	性腺指数/% GSI
二倍体卵巢(ovary of DJF)	7	4.74 ± 1.06	503.43 ± 67.36	0.938 ± 0.140
二倍体精巢(testis of DJF)	7	2.27 ± 0.56	449.29 ± 42.79	0.512 ± 0.155
三倍体卵巢(ovary of TJF)	6	1.97 ± 0.31	711.50 ± 124.68	0.282 ± 0.060
三倍体精巢(testis of TJF)	9	1.11 ± 0.26	679.78 ± 91.60	0.163 ± 0.028



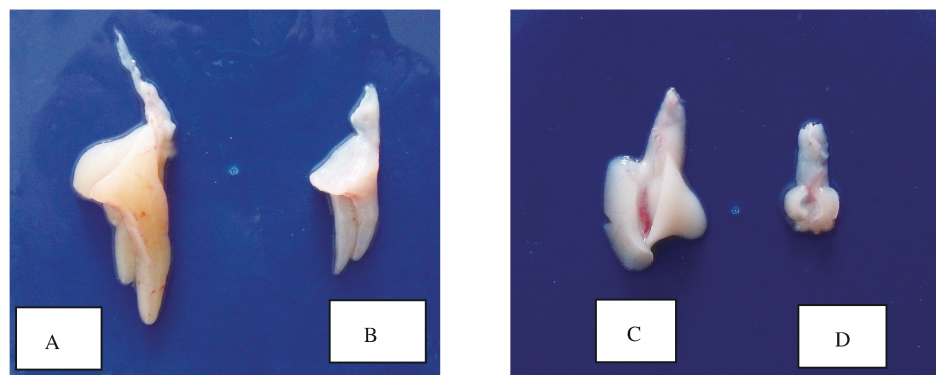


图4 二倍体和三倍体牙鲆成鱼性腺比较

A: 体质量 505 g 的二倍体牙鲆卵巢; B: 体质量 556 g 的三倍体牙鲆卵巢; C: 体质量 402 g 的二倍体牙鲆精巢; D: 体质量 569 g 的三倍体牙鲆精巢。

Fig. 4 Comparison of gonads of diploid and triploid adult Japanese flounder

A: The ovary of diploid Japanese flounder weighed 505 g; B: the ovary of triploid Japanese flounder weighed 556 g; C: the testis of diploid Japanese flounder weighed 402 g; D: the testis of triploid Japanese flounder weighed 569 g.

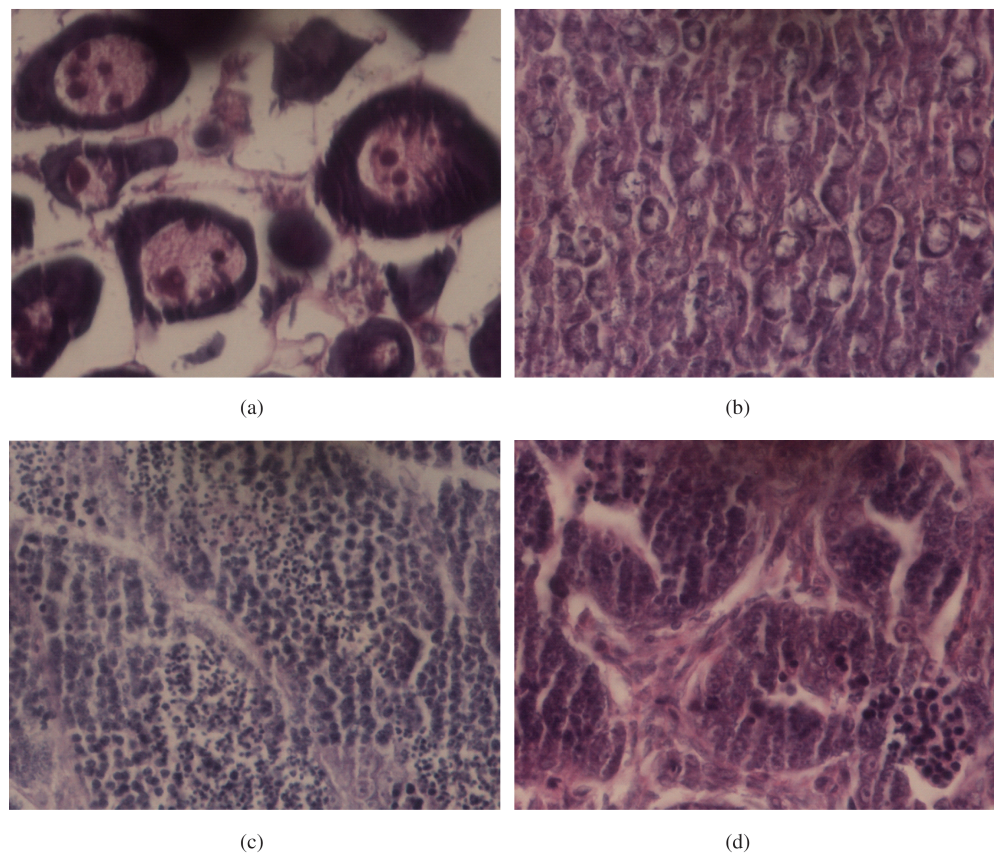


图5 二倍体和三倍体性腺切片比较

(a) 二倍体卵巢组织切片; (b) 三倍体卵巢组织切片; (c) 二倍体精巢组织切片; (d) 三倍体精巢组织切片。

Fig. 5 Comparison of gonadal section of diploid and triploid Japanese flounder

(a) section of diploid ovary,  $\times 400$ ; (b) section of triploid ovary,  $\times 400$ ; (c) section of diploid testis,  $\times 400$ ; (d) section of triploid testis,  $\times 400$ .

### 3 讨论

#### 3.1 三倍体的诱导

鱼类三倍体诱导迄今已有一些研究<sup>[7,19-21]</sup>,在牙鲆的三倍体诱导方面,1995年尤锋等<sup>[14]</sup>在14~18℃的水温下授精,受精后5 min放于水温为0~4℃的海水中处理40~50 min,平均诱导率为40.0%;2001年YOU等<sup>[15]</sup>在16~18℃的水温下授精,受精后5 min,在0~2℃的海水中处理45 min,三倍体率为31.2%~50.0%;2008年,刘海金等<sup>[13]</sup>用PARTEC倍性分析仪测定诱导的三倍体率在85.0%以上;2010年XU等<sup>[12]</sup>在16℃的水温下授精,受精后3 min,在3℃的条件下处理25 min,三倍体诱导率达100%;在本实验中,三倍体的诱导条件为在14.8~15.5℃水温下授精,受精后3 min,在3℃的海水中处理45 min,三倍体诱导率为100%。

用冷休克诱导三倍体关键在于授精后处理起始时间、处理温度和处理持续时间的控制。在不同研究中,受精后处理起始时间从3~5 min不等,原因在于授精时的水温不同,不同的水温下牙鲆胚胎发育的快慢程度也不同<sup>[13,22-23]</sup>,最佳起始时间由授精时温度决定,因此,在选择授精后处理时间时应根据海水温度的不同而有所调整。在处理的时候,处理温度的稳定性和处理环境的均一性非常重要,在早期的三倍体诱导中常常采取人工的方法,用冰块降温,用温度计进行检测,温度高的时候加冰,温度低的时候加水,这样就造成了处理水温的不稳定性从而给胚胎造成较大伤害,影响三倍体的诱导率和成活率。另外,在人工降温的时候,低温水是静止的,不能循环,容易造成处理的胚胎不能处于均一的环境下而导致诱导率偏低,本实验和XU等<sup>[12]</sup>研究中用可降温循环水的水浴锅,能够精确的控制海水温度并充分循环海水,可以给胚胎提供一个非常均一的发育环境,从而保证三倍体诱导率达100%。

#### 3.2 三倍体的生长及性腺发育

根据目前的研究,三倍体鱼类的生长速度差异很大,有些种类的三倍体比二倍体生长快,而另外一些种类的三倍体与二倍体生长差异不显著<sup>[24]</sup>。YOU等<sup>[15]</sup>2001年报道了三倍体牙鲆幼鱼的生长情况并发现,三倍体幼鱼和普通二倍体幼鱼在受精后130日龄内的生长差异不显著。本

研究表明三倍体牙鲆在120日龄时与对照组生长差异不显著,348日龄的三倍体和对照组体质量差异显著( $P < 0.05$ ),630日龄的三倍体全长和体质量都和二倍体差异极显著( $P < 0.0001$ )。本研究与异源三倍体白鲫(从幼鱼到成鱼阶段,三倍体比二倍体快,体质量平均增加32.38%)<sup>[5]</sup>、鲢(*Parasilurus asotus*)(在池塘养殖90 d后,体质量比二倍体鲢平均增加39.71%)<sup>[7]</sup>的研究结果比较一致。

林琪等<sup>[19]</sup>报道三倍体大黄鱼(*Larimichthys crocea*)生殖腺发育明显受阻,虽能产生个别卵母细胞、精母细胞,但大部分仍停留在性原细胞阶段。刘少军等<sup>[25]</sup>报道湘云鲫卵巢的大部分是一些分化程度较低的小细胞,湘云鲫精巢的大部分是一些精子细胞,尽管没有成熟精子,但与二倍体精巢的结构相差不是很大。尹洪滨等<sup>[7]</sup>报道雄性三倍体鲢鱼精巢发育与二倍体基本保持在相同的发育水平上,雌性三倍体鲢鱼的卵巢处于未分化的卵原细胞阶段。本实验研究结果显示,三倍体牙鲆性腺发育明显受阻,卵巢处于未分化的卵原细胞阶段,精巢虽然能够发育,但是精母细胞明显少于二倍体的精母细胞。

630日龄的三倍体和二倍体牙鲆的性腺指数差异极显著,雌性和雄性二倍体的性腺指数分别是三倍体3.3倍和3.1倍,说明三倍体牙鲆的性腺发育受到不同程度的抑制,三倍体牙鲆性腺发育的能量消耗可能要低于二倍体牙鲆,为证明不育三倍体鱼因性腺发育不发达致使把原来用到生殖发育的能量有可能转到生长方面的推测提供了证据。刘少军等<sup>[25]</sup>的研究显示,在三倍体湘云鲫中,日本白鲫的卵巢指数是湘云鲫卵巢指数的2.85倍,日本白鲫的精巢指数是湘云鲫精巢指数的1.94倍,湘云鲫雌鱼比白鲫雌鱼重13.3%,湘云鲫雄鱼比日本白鲫雄鱼重8.6%,显示三倍体性腺的抑制程度与三倍体与二倍体的生长差异存在一定的相关性。刘蔓等<sup>[26]</sup>的研究表明,在13~17月龄时,二倍体、三倍体雌性虹鳟GSI差异不显著( $P > 0.05$ ),17月龄后差异极显著( $P < 0.01$ ),在35月龄时二倍体卵巢指数是三倍体的278.7倍,说明性腺指数在不断的变化中,特别是在性腺成熟以后,三倍体和二倍体的性腺指数差异更为显著,而同时可能会有更多用于繁殖的能量转移到生长。因此,培育生长快速的三倍体对

牙鲆养殖业的发展将有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 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 the carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Cytologia*, 1943, 13: 55-60.
- [2] SWARUP H. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus* (L.) [J]. *Journal of Genetics*, 1959, 56: 129-141.
- [3] 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.
- [4] MAXIME V. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish [J]. *Fish and Fisheries*, 2008, 9(1): 67-78.
- [5] 杨兴棋, 陈敏容. 三倍体白鲫的生物学特性[J]. *水生生物学报*, 1994, 18(2): 156-163.
- [6] CHOURROUT D, CHEVASSUS B, KRIEG F, et al. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females-potential of tetraploid fish [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1986, 72(2): 193-206.
- [7] 尹洪滨, 潘伟志, 孙中武. 三倍体鲈鱼的形态学性状及生长[J]. *水产学杂志*, 1996, 9(2): 23-26.
- [8] JOHNSON O W, DICKHOFF W W, UTTER F M. Comparative growth and development of diploid and triploid coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. *Aquaculture*, 1986, 57(1-4): 329-336.
- [9] KIM D S, JO J Y, LEE T Y. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth [J]. *Aquaculture*, 1994, 120(3-4): 263-270.
- [10] KERBY J H, EVERSON J M, HARRELL R M, et al. Growth and survival comparisons between diploid and triploid sunshine bass [J]. *Aquaculture*, 1995, 137(1-4): 355-358.
- [11] 田畑和男, 五利江重昭, 川村芳浩. 三倍体ヒラメの飼育特性と成熟[J]. *水産増殖*, 1989, 36(4): 267-276.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] YOU F, LIU J, WANG X C, XU Y L, 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.
- [16] 谢忠明. 牙鲆养殖技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2004.
- [17] 陈松林, 田永胜, 徐田军, 等. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定[J]. *水产学报*, 2008, 32(5): 665-673.
- [18] 杨景峰, 陈松林, 徐巨博, 等. 异源精子诱导犬齿牙鲆的雌核发育[J]. *水产学报*, 2009, 33(4): 533-541.
- [19] 林琪, 吴建绍. 三倍体大黄鱼的诱导及其对生长、性腺发育的影响[J]. *水产学报*, 2004, 28(6): 728-732.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 田永胜, 陈松林, 严安生, 等. 牙鲆的胚胎发育[J]. *水产学报*, 2004, 28(6): 609-615.
- [23] 张树令, 姜仕臣, 王志明, 等. 大菱鲆与牙鲆育苗异同的研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2006(3): 105-110.
- [24] TIWARY B K, KIRUBAGARAN R, RAY A K. The biology of triploid Fish [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2004, 14(4): 391-402.
- [25] 刘少军, 孙远东, 黎双飞, 等. 三倍体湘云鲫性腺指数分析[J]. *水产学报*, 2002, 26(2): 111-114.
- [26] 刘蔓, 张澜澜, 王琨, 等. 不同倍性雌性虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 性腺指数与肝体指数的关系[J]. *渔业经济研究*, 2008(2): 62-64.

## Induction of triploidy and its effect on growth and gonadal development in *Paralichthys olivaceus*

WANG Lei<sup>1,2</sup>, CHEN Song-lin<sup>1\*</sup>, XIE Ming-shu<sup>1,3</sup>, DENG Han<sup>1</sup>, LI Wen-long<sup>1,4</sup>, GAO Feng-tao<sup>1,2</sup>

(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 Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. School of Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Induced rate, growth and gonad were studied in triploid Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). The result indicated that triploidy flounder was achieved successfully by cold shocking fertilized eggs at 3 °C for 45 minutes duration, 3 minutes after fertilization when the temperature of fertilization was 14.8 – 15.5 °C. Regular growth measurements were done on the achieved triploid Japanese flounder and the control group 120 days, 348 days and 630 days after that. The results revealed that there was no significant difference in growth between diploid flounder and triploid flounder after 120 days. But the weight was significantly different between them after 348 days ( $P < 0.05$ ). And the triploid growth rates (full-length, weight) showed extremely significant difference compared to the diploid controls' ( $P < 0.01$ ). The indexes of the ovaries and the testes in the diploid control were respectively 3.3 and 3.1 times of the indexes of the ovaries and the testes in the triploid Japanese flounder. Furthermore, the gonadosomatic indexes (GSI) of the triploid were significantly higher than the control group's after 630 days ( $P < 0.001$ ). From these gonadal sections, a lot of normal oocytes could be found in the section of diploid ovary, but the triploid ovary stayed in the stage of oogonium stage. Meanwhile, the number of spermatocyte in triploid testis was significantly less than that of the number of spermatocyte in diploid testis. The study obtained 100% triploid rate with this method. Meanwhile, the triploid gonad was hypogenetic and the growth rate of the triploidy was significantly higher than the control group. Thus, the triploid is suitable for promotion in production.

**Key words:** Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); triploid; growth; gonadal development

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