

# 大菱鲆三倍体人工诱导条件优化及规模化诱导

宋宗诚<sup>1</sup>, 吴志昊<sup>2,3</sup>, 王丽娟<sup>2,3</sup>, 胡金伟<sup>2</sup>, 岳新璐<sup>1</sup>, 尤 锋<sup>2,3</sup>

(1. 威海圣航水产科技有限公司, 山东 威海 264200; 2. 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; 3. 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 266000)

**摘要:** 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是我国重要的海水养殖鱼种, 三倍体诱导对其种质改良、产业提升和生态安全具有重要的价值。目前有关大菱鲆三倍体的人工诱导虽已有报道, 但对其诱导条件缺乏细致的研究。本文采用冷休克法抑制第二极体排放, 通过对诱导处理起始时刻、温度和持续时间 3 个主要因素的单因子实验, 筛选其最佳诱导条件。结果显示, 在受精和孵化水温为 15.0±0.5℃条件下, 受精后 6 min, 用-2~-1℃处理 25 min 可获得较好的诱导效果, 流式细胞仪检测其诱导率可达 100%。随后在最适条件下进行了规模化诱导, 获得鱼苗 200 万尾以上, 其诱导率高于 98%。跟踪观察发现, 三倍体诱导组胚胎的形态及孵化时间与二倍体对照组基本一致。本研究结果可为大菱鲆三倍体的产业化应用提供基础。

**关键词:** 大菱鲆; 三倍体; 冷休克; 规模化

中图分类号: S917.4 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2019)12-0042-08

DOI: 10.11759/hyhx20190903002

多倍体育种作为细胞工程育种的重要组成部分, 因其周期短、见效快和安全性高等特点, 一直受到养殖者的关注。鱼类多倍体育种应用最多的是三倍体育种, 从细胞遗传学理论来讲, 三倍体无法完成正常的减数分裂, 所以性腺往往不能发育或者低育, 能够避免因性腺发育和繁殖出现的生长减缓、肉质下降、死亡率增高, 以及人工养殖过程中的性早熟等现象<sup>[1-2]</sup>。由于三倍体的不育性, 还可以防止养殖逃逸个体对自然群体的基因污染和生态环境破坏, 有很高的应用价值。目前已在大西洋鲑(*Salmo salar*)<sup>[3]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[4]</sup>、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[5]</sup>、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)<sup>[6]</sup>等几十种养殖鱼类中建立了三倍体诱导技术<sup>[7]</sup>。尤其是在虹鳟、大西洋鲑等鲑鳟类中进行了系统研发, 在其三倍体诱导、苗种规模化生产培育等方面已建立了成熟的技术, 并进行了商业化应用, 形成了完整的产业链。国内在鱼类三倍体人工诱导和培育技术方面也有诸多研究成果, 在多种经济鱼类中开发了三倍体诱导技术。但目前在倍性制种及产业化应用方面还较为薄弱, 仅有湘云鲫/鲤等一些淡水鱼类三倍体品种进行了推广<sup>[8]</sup>。在海水鱼类中, 国内外三倍体育种相关工作均尚未达到产业化水平。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*), 又称“多宝鱼”, 原产于欧洲沿岸, 自 1992 年引进我国以来, 发展十分迅速, 目前已成为我国北方主要的海水养殖品种<sup>[9]</sup>。其 2016 年产量达到 4.95 万吨, 占世界总产量的 83%<sup>[10]</sup>, 创造了巨大的经济效益。随着工厂与网箱接力养殖、北南轮养模式的建立, 其产业也辐射到东南沿海各省。近年来, 大菱鲆养殖业发展逐渐减缓, 急需采取有效方法进行遗传改良。三倍体由于其性腺不育或低育, 可用于高品质商品鱼的生产, 且在生态安全方面也具有优势, 三倍体的诱导和培育可以为大菱鲆良种培育开辟新的途径。近年来在大菱鲆三倍体的诱导与培育方面已有报道<sup>[11-13]</sup>, 大菱鲆三倍体性腺发育异常, 而且三倍体中雌性比例明显增高, 1 龄以上

收稿日期: 2019-09-03; 修回日期: 2019-09-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502156, 31772834); 2017 年山东省重点研发计划(公益类专项)项目(2017GHY15115); 山东省农业科技园产业提升工程(2017YQ004)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 31502156, No. 31772834; Key Research and Development Plan of Shandong Province (Public Welfare Special), No. 2017GHY15115; and Industrial Promotion in Agricultural Science and Technology Park, No. 2017YQ004]

作者简介: 宋宗诚(1973-), 男, 山东威海人, 研究方向: 水产养殖, 电话: 15163153666, E-mail: whsh2008@163.com; 尤锋(1963-), 通信作者, 研究员, 研究方向: 海洋生物学, 电话: 0532-82898561, E-mail: youfeng@qdio.ac.cn

三倍体生长显著快于二倍体( $P < 0.05$ )<sup>[14]</sup>。然而,目前对于大菱鲆三倍体人工诱导参数的摸索尚不系统<sup>[11, 15]</sup>,给其规模化生产应用带来了较多不确定性。本研究拟针对这一问题,通过单因子实验,对大菱鲆三倍体人工诱导的参数进行优化,并在此基础上扩大生产规模,探讨其在规模化生产中的适用性,为其商业化生产提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 三倍体人工诱导参数筛选

#### 1.1.1 精卵采集及人工授精

本研究所用精卵采自威海圣航水产科技有限公司自国外引进的大菱鲆养殖群体。亲鱼(全长 40~60 cm♀, 30~50 cm♂)营养强化后,通过光、温调控等进行促熟。选择体表无伤、形态正常、性腺松软的成熟个体,擦干鱼体后,轻轻挤压腹部,人工收集精卵,镜检选取质量较好的精卵,采用半干法按精卵 1 : 50 的比例进行人工授精。受精卵在 15.0±0.5℃海水中孵育,处理前洗卵去除多余精液及卵巢液,随后采用冷休克法进行三倍体人工诱导,处理后受精卵仍放回 15.0±0.5℃海水中孵育。各处理参数筛选实验中,每次实验精卵来自同一雌雄亲本,并选用不同雌雄亲本进行 5 次重复实验,每次实验均有未处理的受精卵作为二倍体对照。对照组及各处理组各约 5 000 粒卵置于 500 mL 实验杯中,所有实验杯浸在 16 m<sup>3</sup> 水体中以减少温度波动。

#### 1.1.2 倍性鉴定方法筛选

以倍性鉴定较为常用的染色体制片计数法、流式细胞仪检测 DNA 相对含量法及血红细胞体积测量方法对部分处理组和二倍体对照组样品进行倍性检测,通过对其检测效果的比较筛选最适的倍性鉴定方法。

随机选取 100~200 粒下包 1/2 左右的原肠期胚胎,采用染色体制片计数法测定其倍性。染色体制片的方法参考尤锋和刘静<sup>[16]</sup>的报道。随机采取 50 尾初孵仔鱼,采用流式细胞仪检测 DNA 相对含量的方法进行倍性鉴定。流式细胞仪样品制备及方法参考吴志昊等的报道<sup>[17]</sup>。同时进行血细胞涂片观察比较其红细胞体积:取二倍体和三倍体大菱鲆鱼苗各 10 尾,采集尾静脉血,肝素钠抗凝后涂片,10% Giemsa 染色后晾干,显微镜下观察拍照,每张照片随机选取 30 个血细胞,计算细胞体积。

### 1.1.3 诱导参数优化

#### 1.1.3.1 处理起始时刻

参考 Piferrer 等的报道<sup>[15]</sup>以及我们前期预实验结果,设置 5 个处理起始时刻梯度,分别为授精后 4、5、6、7、8 min(4、5、6、7、8 mpf)。处理温度设为-2~-1℃,处理持续时间设为 25 min。处理后,受精卵逐渐升温至 15.0±0.5℃继续孵育,计算各处理组的受精率和孵化率,并测定其诱导率,比较筛选最适处理起始时刻。

#### 1.1.3.2 处理温度

根据处理起始时刻筛选结果,将处理起始时刻设为 6 mpf。参考 Piferrer 等的报道<sup>[15]</sup>以及我们前期预实验结果,设置 5 个处理温度梯度,分别为-4~-3℃、-3~-2℃、-2~-1℃、-1~0℃、0~1℃。处理持续时间设为 25 min。处理后,受精卵逐渐升温至 15.0±0.5℃继续孵育,计算各处理组受精率和孵化率,并测定其诱导率,比较筛选最适处理温度。

#### 1.1.3.3 处理持续时间

根据处理起始时刻和处理温度筛选结果,将处理起始时刻设为 6 mpf,处理温度设为-2~-1℃。参考 Piferrer 等的报道<sup>[15]</sup>以及我们前期预实验结果,设置 5 个处理持续时间梯度,分别为 12.5、25、37.5、50、62.5 min。处理后,受精卵逐渐升温至 15.0±0.5℃继续孵育,计算各处理组受精率和孵化率,并测定其诱导率,比较筛选最适处理持续时间。

## 1.2 大菱鲆三倍体规模化诱导

### 1.2.1 精卵采集及人工授精

规模化诱导所使用亲鱼为单因子实验同批亲鱼,其培育、促熟及精卵采集方法同 1.1.1 部分。人工采取不同来源大菱鲆优质精卵共 3 批次,每批次雌、雄鱼各 3~5 尾,卵量为 1400~1600 g,按精卵 1 : 50 的比例进行人工授精。

### 1.2.2 规模化诱导及孵育

受精卵在 15.0±0.5℃海水中孵育,处理前洗卵去除多余精液及卵巢液,随后在筛选得到的最适三倍体诱导条件下分批进行人工诱导,处理后受精卵合并放回 15.0±0.5℃海水中孵育,受精卵置于 16 m<sup>3</sup> 水体中的 1 m<sup>3</sup> 生产用孵化网箱中以保证温度稳定,各批次实验均设未处理的受精卵作为二倍体对照。受精卵及鱼苗参照大菱鲆养殖技术规范(NY/T-5153-2002)进行培育。

### 1.2.3 倍性鉴定及形态学跟踪

倍性鉴定为初孵仔鱼期。取初孵仔鱼 50 尾, 采用流式细胞仪检测 DNA 相对含量的方法进行倍性鉴定并计算其诱导率。流式细胞仪样品制备及方法同 1.1.2。同时, 对其中一批的处理组及二倍体对照组胚胎发育情况在体视镜下观察拍照进行跟踪比较。

### 1.3 数据分析

诱导参数优化实验组及规模化诱导中的受精率、孵化率及诱导率的计算方法相同。二倍体对照组以及处理后的处理组各取出约 500 粒受精卵, 相同条件下孵育, 孵育水温为  $15.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。计算各组受精率、孵化率和诱导率:

$$\text{受精率}(\%) = \frac{\text{囊胚期上浮卵数}}{\text{总上浮卵数}} \times 100\%,$$

$$\text{孵化率}(\%) = \frac{\text{孵化后 12h 正常初孵仔鱼数}}{\text{总上浮卵数}} \times 100\%,$$

$$\text{诱导率}(\%) = \frac{\text{孵化后 12h 三倍体初孵仔鱼数}}{\text{孵化后 12h 正常初孵仔鱼数}} \times 100\%,$$

为减少不同精卵来源及质量的差异导致的误差, 文中所述受精率与孵化率分别为相对受精率(处理组与二倍体对照组受精率的百分比)与相对孵化率(处理组与二倍体对照组孵化率的百分比)。

计算各组的平均值和标准差, 并使用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析及 Duncan's 多重比较分析差异的显著性, 以  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 倍性鉴定方法的比较

不同倍性鉴定方法对大菱鲆三倍体处理组及二倍体对照组进行倍性检测的结果见图 1。原肠期胚胎进行染色体制片计数中期分裂相染色体测定倍性与

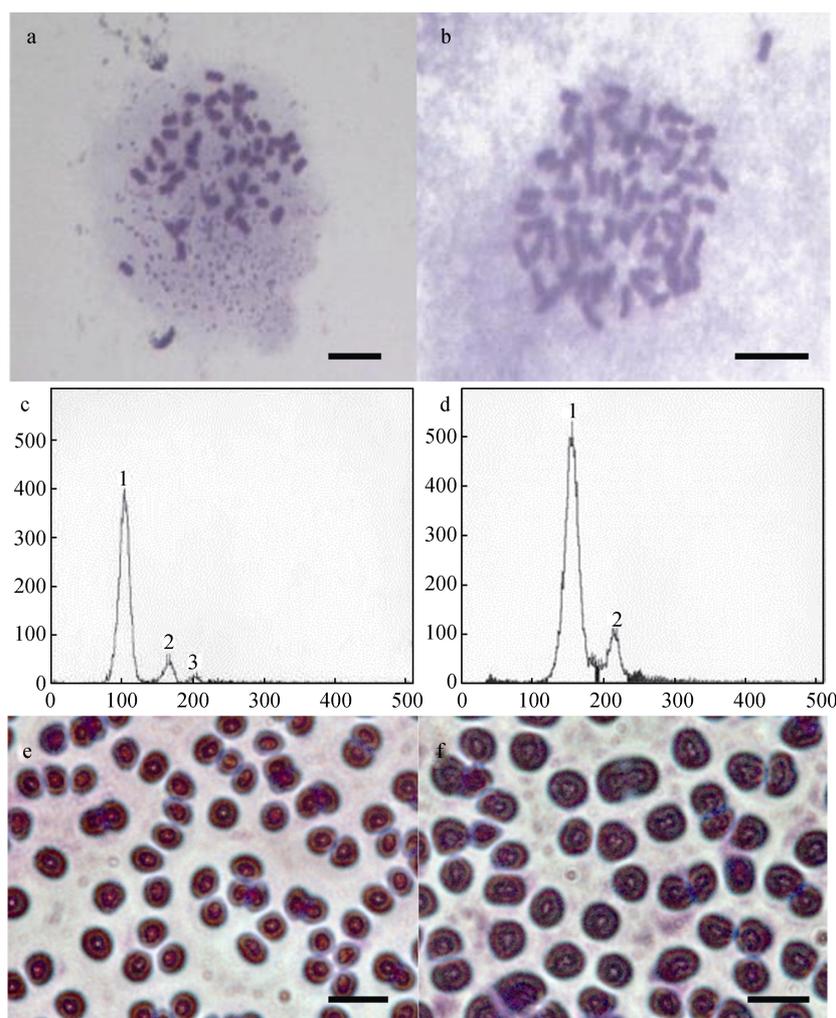


图 1 大菱鲆二倍体对照组(a、c、e)和三倍体诱导组(b、d、f)的倍性检测结果

Fig. 1 Ploidy analysis of turbot in control diploid(a, c, e) and triploid induction groups (b, d, f)  
注: a、b, 染色体中期分裂相, 标尺长度 5  $\mu\text{m}$ ; c、d, 流式细胞仪检测结果; e、f, 血细胞涂片结果, 标尺长度 20  $\mu\text{m}$

流式细胞仪检测 DNA 相对含量的结果进行比较发现, 两种方法测定的诱导率基本一致。二倍体红细胞的平均体积为  $21.54 \pm 1.75 \mu\text{m}^3$ , 三倍体红细胞的平均体积为  $33.41 \pm 6.62 \mu\text{m}^3$ 。三倍体红细胞体积和二倍体的比值为 1.55, 其倍性鉴定结果也与染色体制片及流式细胞仪结果一致。考虑染色体制片方法较为繁琐, 血细胞体积测量方法可能受鱼龄、生理状态等因素的影响。故本研究后续实验中采用流式细胞仪法鉴定倍性及测定诱导率。

## 2.2 诱导参数的单因子实验结果

不同处理起始时刻、处理温度和处理持续时间对受精率、孵化率及诱导率的影响见图 2。处理起始时刻为 4、5、6 mpf 时, 其受精率、孵化率及诱导率基本一致。但处理起始时刻为 7、8 mpf 时, 其孵化率和诱导率开始下降。由于 6 mpf 处理的受精率、孵化率及诱导率相对较高, 因此认为 6 mpf 是最适处理起始时刻(图 2a)。处理温度结果显示,  $-2 \sim -1^\circ\text{C}$  以及  $-1 \sim 0^\circ\text{C}$  受精率、孵化率和诱导率较高,  $0 \sim 1^\circ\text{C}$  处理虽受精率、孵化率也较高, 但其诱导率显著下降( $P < 0.05$ ), 综合考虑选择受精率、孵化率最高的  $-2 \sim -1^\circ\text{C}$  作为最适处理温度(图 2b)。处理持续时间结果显示, 处理 25~50 min 均可得到较高的受精率、孵化率及诱导率, 而处理 12.5 min 和 72.5 min 其受精率、孵化率明显较低( $P < 0.05$ ), 其中处理 12.5 min 诱导率也较低, 因此选择处理 25 min 作为最适处理持续时间(图 2c)。

## 2.3 规模化诱导群体胚胎发育、仔鱼孵化

在最适条件下(6 mpf,  $-2 \sim -1^\circ\text{C}$ , 处理 25 min)对第三批大菱鲆受精卵进行规模化处理。结果见表 1。对照组受精率为 90.0%~94.0%, 孵化率为 72.0%~82.8%; 规模化诱导各批次相对受精率为 88.2%~94.3%, 相对孵化率为 87.7%~92.5%, 其诱导率为 98~100%。对第 1 批次早期发育情况进行跟踪。第三批规模化诱导大菱鲆, 孵化前分别将约 1 000 g 受精卵放入水泥池中孵化及培育, 培育获得平均体重  $3.93 \pm 0.75 \text{ g}$ 、 $3.24 \pm 0.55 \text{ g}$ 、 $4.06 \pm 0.82 \text{ g}$ , 平均全长  $6.78 \pm 0.92 \text{ cm}$ 、 $6.14 \pm 0.88 \text{ cm}$ 、 $6.55 \pm 0.73 \text{ cm}$  的鱼苗各 89.04、55.4 和 64.5 万尾。观察发现各发育时期处理组与二倍体对照组的胚胎形态基本一致(图 3), 但三倍体处理组畸形率稍高, 也导致了其孵化率的降低。二倍体对照组胚胎在  $15.0 \sim 15.5^\circ\text{C}$  水温下约 105 h 破膜, 三倍体处理组与二倍体对照组孵化时间基本一致。

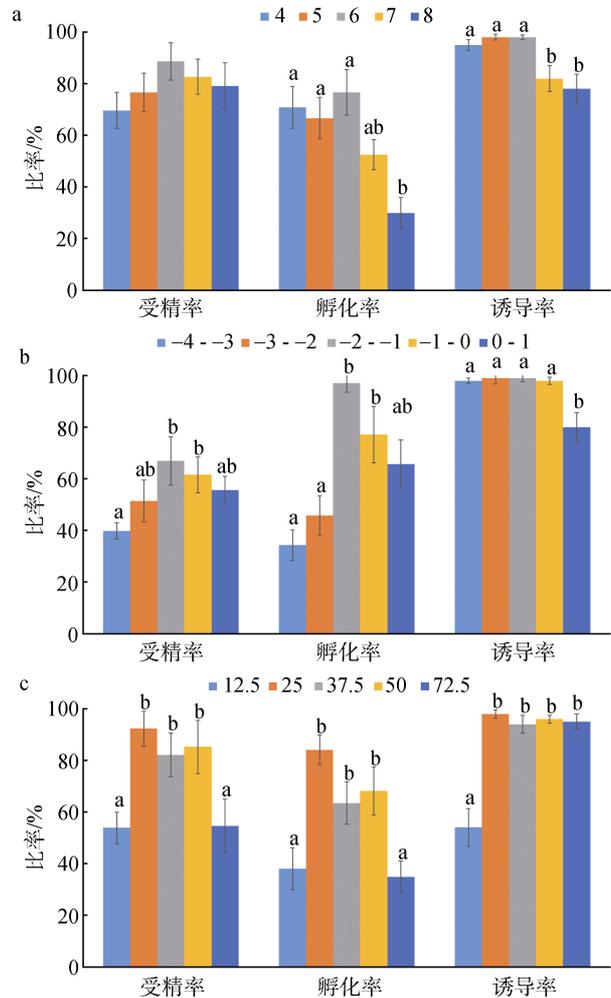


图 2 大菱鲆三倍体诱导处理起始时刻(a)、处理温度(b)和处理持续时间(c)与受精率、孵化率及诱导率之间的关系

Fig. 2 Rates of fertilization, hatching, and induction under different initiation times (a), treatment temperatures (b), and treatment durations (c) in the induction of triploidy in the turbot *Scophthalmus maximus*

注: 不同字母表示差异显著  $P < 0.05$

表 1 大菱鲆三倍体规模化诱导结果

Tab. 1 Large-scale induction of triploid turbot

批次	卵量/g	相对受精率/%	相对孵化率/%	诱导率/%	鱼苗数量/万尾
1	1 600	94.3	92.5	100	89.0
2	1 400	88.2	89.5	98	55.4
3	1 600	90.1	87.7	100	64.5

## 3 讨论

鱼类中三倍体人工诱导的方法主要分为三类。一是生物学方法, 通过不同种间的远缘杂交产生

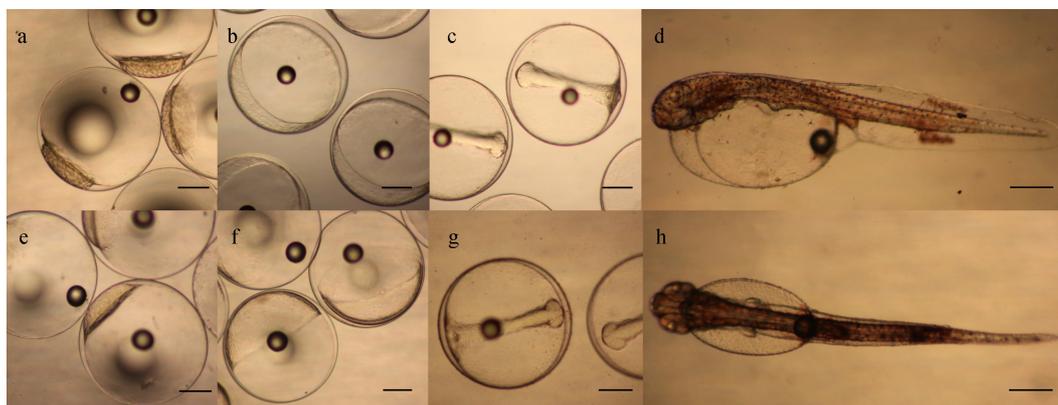


图3 大菱鲆三倍体规模化诱导组与二倍体对照组的胚胎发育情况

Fig. 3 Embryo development comparison of the turbot in triploid induction and control diploid groups

注: a-d, 二倍体对照组; e-h, 三倍体诱导组; a、e, 囊胚期; b、f, 原肠期; c、g, 克氏囊期; d、h, 初孵仔鱼; 标尺长度 0.25 mm

三倍体杂种, 目前多应用于鲤形目鱼类<sup>[18]</sup>。二是化学方法, 利用化学药品破坏微管或微丝结构, 进而抑制第二极体的排放得到三倍体, 但由于这些化学药品具有毒性, 目前已较少应用<sup>[19]</sup>。三是物理学方法, 也是目前鱼类三倍体人工诱导中应用最多的方法, 通过温度或压力休克抑制第二极体的排放得到三倍体。在鲆鲽鱼类中, 温度休克法被广泛应用于牙鲆<sup>[5]</sup>、半滑舌鳎<sup>[20]</sup>、大菱鲆<sup>[15]</sup>、条斑星鲽(*Verasper moseri*)<sup>[21]</sup>中, 在半滑舌鳎<sup>[6]</sup>、条斑星鲽<sup>[21]</sup>、美洲黄盖鲽(*Limanda ferruginea*)<sup>[22]</sup>中, 也有应用压力休克法进行三倍体人工诱导的报道。但实际生产中, 压力休克法受限于水压机压力腔的容量, 其处理效率相对较低, 目前仅在虹鳟、大西洋鲑等温度休克法诱导效果不稳定的鱼类中进行了应用<sup>[3, 19, 23]</sup>。而不受处理的受精卵数量限制, 操作简便并可大规模诱导的温度休克法更加适于商业化生产应用。

温度休克法诱导三倍体的三要素是处理起始时刻、处理温度、处理持续时间, 本研究同样围绕这三个要素进行诱导参数的摸索与优化。一般而言, 处理起始时刻是最重要的因素, 对诱导效果的影响最大。本研究中处理起始时刻筛选结果显示, 4~6 mpf 处理均可得到较好的结果, 考虑让大菱鲆受精过程充分完全, 以及处理前洗卵所需时间, 故选择 6 mpf 作为最适处理起始时刻。而 7、8 mpf 处理其孵化率和诱导率显著下降( $P < 0.05$ ), 这可能是由于处理起始时刻较晚导致无法充分抑制第二极体排放所致。处理温度同样是重要的因素之一, 筛选结果显示, -4~0℃处理均可得到较高的三倍体率, 而 0~1℃的处理强度不够, 无法完全抑制第二极体排放, 导致三倍体率

的下降。同时, 较低的处理温度会对受精卵造成损伤, 这可能是-4~-2℃处理受精率和孵化率较低的原因。因此, 综合考虑选择了受精率、孵化率和诱导率相对较高的-2~-1℃作为最适处理温度。处理持续时间对诱导效果的影响相对较小, 筛选结果显示, 25~50 min 处理可得到较好的结果。若处理持续时间太短(12.5 min), 则无法完全抑制第二极体排放, 导致诱导率下降; 而处理持续时间太长(62.5 min)则会对受精卵造成损伤, 导致受精率和孵化率的降低。故综合考虑, 选择受精率、孵化率和诱导率均较高, 且处理持续时间较短的 25 min 作为最适处理持续时间。大菱鲆三倍体诱导自 2000 年开始首先由 Piferrer 等开展了相关研究, 在孵育水温 13~14℃下, 受精后 5 min, 0℃处理 20 min, 得到大菱鲆三倍体, 其三倍体率约为 90%<sup>[11]</sup>。随后, 对三倍体诱导参数进行优化, 在孵育水温 13~14℃下, 受精后 6.5 min, -1~0℃处理 25 min, 得到的大菱鲆三倍体诱导率可达 100%<sup>[15]</sup>。这一诱导条件也得到较广泛的应用<sup>[12-14, 24]</sup>, 但其相对成活率仅有 60%, 也未开展严格的单因子实验来确定最适的处理条件。本研究针对这一问题, 根据已报道的诱导参数<sup>[15]</sup>, 扩大条件范围设置单因子实验进行大菱鲆三倍体诱导条件的优化。本研究在 15±0.5℃孵育条件下, 得到的大菱鲆三倍体诱导的最适处理参数为, 受精后 6 min, -2~-1℃处理 25 min, 与 Piferrer 等的研究结果基本一致<sup>[15]</sup>, 但处理温度较低。由于本研究中孵育水温为 15±0.5℃, 高于 Piferrer 等的报道(13~14℃), 故本研究较早的处理起始时刻(6 min)可认为与 Piferrer 等的结果(6.5 min)一致<sup>[15]</sup>。实际上, 最适处理起始时刻应当对应于胚胎的某一发育阶段。但

胚胎发育常受到遗传背景以及水温等环境因素的影响,导致胚胎发育速度出现差异。虽然三倍体诱导各参数范围要求并不十分严格,如在牙鲆三倍体人工诱导实验中,在受精后 3~5 min 时, 0~3℃ 下处理均可得到三倍体,但其孵化率和诱导率存在一定的差异<sup>[5, 25-26]</sup>。这种差异放大到商业化生产中对经济效益的影响是十分可观的,因此应尽量严格其诱导条件,减少实验误差,以提高其成活率及诱导率。在鲑鳟鱼类四倍体诱导中,常使用第一次卵裂指数 FCI 或卵裂周期  $\tau_0$  作为决定处理起始时刻的基准,来减少遗传或环境因素造成的误差<sup>[27-28]</sup>。这是否可应用于海水鱼类三倍体诱导以提高诱导参数的适用性值得进行深入研究。三倍体诱导条件存在物种特异性,在不同物种中的处理起始时刻、处理强度和持续处理时间均存在较大差异。与其他鲑鳟鱼类三倍体诱导参数,如牙鲆(5 mpf, 0~2℃, 45 min)<sup>[5]</sup>、半滑舌鳎(5 mpf, 4℃, 20 min)<sup>[20]</sup>、条斑星鲽(7 mpf, -1.5℃, 90 min)<sup>[21]</sup>相比,大菱鲆三倍体处理温度相对较低,与同为冷温性鱼类的条斑星鲽一致,而低于暖温性鱼类的牙鲆和半滑舌鳎。人工诱导三倍体处理温度与其适温范围之间是否存在相关关系尚需结合更多研究结果综合分析。

人工诱导三倍体主要是由于其在生产性能上存在优势。Piferrer 等对 4~6 月龄的三倍体大菱鲆的体长和体重与二倍体进行对比,并未发现显著差异<sup>[11]</sup>。而 Cal 等对大菱鲆生长情况进行跟踪发现,超过 1 龄,三倍体的生长速度明显快于二倍体( $P < 0.05$ ); 24~48 月龄间,两者的平均体重相差  $11.4 \pm 1.9\%$ <sup>[14]</sup>。同时,由于三倍体雄性与雌性性腺都不能正常发育,没有因性成熟和繁殖造成的死亡,成熟期三倍体个体的成活率较高<sup>[14]</sup>。本研究中,批量诱导获得的三倍体大菱鲆在早期尚未观察到与二倍体在生长发育方面存在明显的差异,其生长、性腺发育情况等经济性状正在进行跟踪观察,我们期望进一步明确其生产性能,为商业化应用提供支持。

#### 参考文献:

[1] 刘筠, 刘少军, 孙远东, 等. 多倍体鲫鲤[J]. 中国农业科技导报, 2003, 5(6): 3-6.  
Liu Yun, Liu Shaojun, Sun Yuandong, et al. Ployploid hybrids of crucian carp × common carp[J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2003, 5(6): 3-6.

[2] Tiwary B K, Kirubakaran R, Ray A K. The biology of triploid fish[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries,

2004, 14(4): 391-402.

[3] Allen S K, Stanley J G. Polyploid mosaics induced by cytochalasin B in landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1979, 108(5): 462-466.

[4] Chourrout D. Tetraploid induced by heat shocks in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)[J]. Reproduction Nutrition Development, 1982, 22(3): 569-574.

[5] You F, Liu J, Wang X C, 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.

[6] 陈松林, 李文龙, 季相山, 等. 半滑舌鳎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 *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(6): 925-931.

[7] 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(3): 125-156.

[8] 刘少军, 王静, 罗凯坤, 等. 淡水养殖新品种——湘云鲫 2 号[J]. 当代水产, 2010, (1): 62-63.  
Liu Shaojun, Wang Jing, Luo Kaikun, et al. A new freshwater cultivation variety-Xiangyun crucian carp No.2[J]. Current Fisheries, 2010, (1): 62-63.

[9] 雷霖霖, 刘新富, 孟振. 发挥产业技术体系优势做强鲑鳟类工厂化养殖[J]. 中国水产, 2010, (6): 11-13.  
Lei Jilin, Liu Xinfu, Meng Zhen. Bringing the advantage of industrial technology system into full platform factory culture[J]. China Fisheries, 2010, (6): 11-13.

[10] FAO. FAO yearbook. Fishery and aquaculture statistics 2016, Rome, 2018, 87-88.

[11] Piferrer F, Cal R M, Alvarez-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(1-2): 79-90.

[12] Cal R M, Vidal S, Camacho T, et al. Effect of triploidy on turbot haematology[J]. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2005, 141(1): 35-41.

[13] Domingues P, Hernández-Urcera J, Cal R, et al. Effect of triploidy on digestive enzyme activity of early stages of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(2): 573-582.

[14] Cal R M, Vidal S, Gómez C, et al. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Aquaculture, 2006, 251(1): 99-108.

- [15] Piferrer F, Cal RM, Gómez C, et al. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) II: effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture*, 2003, 220(1-2): 821-831.
- [16] 尤锋, 刘静. 三倍体牙鲆的核型证明[J]. *海洋与湖沼*, 1995, 26(5S): 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(5S): 115-118.
- [17] 吴志昊, 尤锋, 宋宗诚, 等. 大菱鲆四倍体的人工诱导研究[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 657-662.  
Wu Zhihao, You Feng, Song Zongcheng, et al. Study on induction of tetraploid in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 657-662.
- [18] 刘少军. 鱼类远缘杂交[M]. 北京: 科学出版社, 2015.  
Liu Shaojun. *Fishdistant Hybridization*[M]. Beijing: Science Press, 2015.
- [19] Chourrout D. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics[J]. *Aquaculture*, 1984, 36(1-2): 111-126.
- [20] 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): 81-84.  
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): 81-84.
- [21] Mori T, Saito S, Kishioka C, et al. Aquaculture performance of triploid barfin flounder *Verasper moseri*[J]. *Fisheries Science*, 2006, 72(2): 270-277.
- [22] Manning A J, Burton M P M. Cytological abnormalities in the ovaries of triploid yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (storer). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 29(4): 269-273.
- [23] 王炳谦, 徐连伟, 贾钟贺, 等. 热休克诱导全雌虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)三倍体[J]. *水产学杂志*, 2005, 18(2): 22-27.  
Wang Bingqian, Xu Lianwei, Jia Zhonghe, et al. Inducing all female triploid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with heat shock[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2005, 18(2): 22-27.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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]. *大连海洋大学学报*, 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 Ocean University*, 2008, 23(3): 161-167.
- [27] Myers J M, Hershberger W K. Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 1991, 96(2): 97-107.
- [28] 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.

# Optimization of artificial induction conditions and large-scale induction of the triploid turbot *Scophthalmus maximus*

SONG Zong-cheng<sup>1</sup>, WU Zhi-hao<sup>2, 3</sup>, WANG Li-juan<sup>2, 3</sup>, HU Jin-wei<sup>2</sup>, YUE Xin-lu<sup>1</sup>, YOU Feng<sup>2, 3</sup>

(1. Shenghang Aquatic Science and Technology Co. Ltd., Weihai 264200, China; 2. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Center for Ocean Mega-Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266000, China)

**Received:** Sep. 3, 2019

**Key words:** turbot; triploid; cold shock; large-scale

**Abstract:** The turbot (*Scophthalmus maximus*) is an important marine fish cultured in China. Induction of triploidy in the turbot would be of significant value to germplasm improvement, industrial upgradation, and ecological safety. Although in some studies, artificial induction of triploidy in the turbot has been investigated so far, the induction parameters remain uncertain. In this study, triploidy was induced in the turbot through cold shock to inhibit the emission of the second polar body. A single-factor experiment was conducted to screen for the optimal initiation time, temperature, and duration of treatment. The optimal initiation time for cold shock was found to be 6 min after fertilization at  $15.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . The optimal treatment temperature and treatment duration were approximately from  $-2^{\circ}\text{C}$  to  $1^{\circ}\text{C}$  and 25 min, respectively, and the induction rate could reach 100%. These optimal induction conditions were then used to induce triploid larvae on a large scale, and >2 million larvae were obtained. The induction rate was found to be 98%~100%. The morphology and hatching period of embryos in the triploid induction groups were essentially the same as those of embryos in the diploid control groups. These results would provide a basis for the industrial application of the triploid turbot.

(本文编辑: 杨 悦)