

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00196

半滑舌鳎四倍体鱼苗的诱导与鉴定

李文龙^{1,2}, 陈松林¹, 季相山¹, 谢明树¹, 徐莹¹, 邓寒¹

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点开放实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 采用静水压法处理半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)受精卵以抑制其卵裂并进行染色体加倍, 筛选出有效的静水压处理起始时间、处理强度及其持续时间。结果表明, 孵化水温(23±0.2) 时, 授精后 21.5 min, 采用 40 MPa 的静水压压力, 休克处理 4.5 min, 四倍体诱导效果最好, 鱼苗四倍体率达到 68.3%。采用流式细胞仪分析了四倍体鱼苗细胞 DNA 含量, 表明四倍体鱼苗细胞 DNA 含量为二倍体对照鱼苗的 2 倍。通过染色体制作分析表明四倍体鱼苗的染色体数为 84 条, 而二倍体对照鱼苗的染色体数为 42 条。本研究采用静水压方法, 在国内外首次建立了半滑舌鳎四倍体诱导方法。本项技术的建立旨在为大量生产半滑舌鳎三倍体不育群体奠定基础。

关键词: 半滑舌鳎; 四倍体; 人工诱导; 静水压

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)01-0196-06

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)属鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鳎科(Cynoglossidae)、舌鳎属(*Cynoglossus*), 俗名鳎米、舌头鱼、龙利等, 是中国特有的名贵经济海水鱼类, 以黄海、渤海为多。由于半滑舌鳎其肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富, 深受广大消费者青睐, 市场价值极高, 养殖前景非常广阔, 已与大菱鲆、牙鲆、星鲽等成为中国北方重要的海水养殖鱼类。研究表明, 半滑舌鳎雌性个体和雄性个体在生长速率上存在很大差别, 其雌性个体比雄性同龄个体大 3~4 倍^[1], 半滑舌鳎鱼苗经过 1.5~2 年的养殖后, 雌性个体可达 500~750 g, 而雄性个体则只有 50~150 g。由于雄性个体生长过慢, 降低了半滑舌鳎的养殖产量, 增加了养殖成本, 严重影响了半滑舌鳎苗种的推广及养殖产业的发展, 因此, 培育优质、高产、抗逆性强的新品种, 对于半滑舌鳎苗种的推广及其养殖业的发展具有重要意义。

鉴于半滑舌鳎的养殖潜力和潜在的经济社会

效益, 我国科技工作者对半滑舌鳎生殖调控和自然产卵技术进行了大量研究工作, 主要采取人工控温控光的方法刺激亲鱼成熟和自然产卵, 半滑舌鳎苗种的生产已经实现规模化^[2-3]。近年来, 国内学者又对半滑舌鳎雌核发育和性别控制技术进行了系统的研究, 筛选出半滑舌鳎雌性特异 AFLP 分子标记, 建立了半滑舌鳎遗传性别鉴定的 PCR 技术^[4], 建立了半滑舌鳎异源精子和同源精子诱导的雌核发育技术^[5-6], 从而部分解决了半滑舌鳎雄性生长缓慢的问题, 而这些技术主要是进行半滑舌鳎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, 理论上可将生殖腺发育消耗的能量用于生长, 提高生长速度。鉴于此, 2011 年陈松林等^[7]用静水压成功诱导出半滑舌鳎三倍体, 对半滑舌鳎的性腺发育进行调控, 但是三倍体鱼的诱导只能当代使用, 影响了其规模化推广应用。为了大规模生产半滑舌鳎不育三倍体鱼苗, 最理想的途径是先

收稿日期: 2011-10-11; 修订日期: 2011-12-05.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费资助(200903046); 山东省泰山学者工程专项资助。

作者简介: 李文龙(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类遗传育种研究. E-mail: li_wenlong87@163.com

通信作者: 陈松林, 研究员, 博士生导师. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

培育出四倍体鱼, 然后与二倍体进行交配, 从而大量生产三倍体鱼苗。

人工诱导鱼类四倍体在水产动物遗传育种中具有重要的意义。四倍体鱼可以用自交的方法保留其四倍体种群, 也可以与普通二倍体交配而获得三倍体, 在水产养殖中具有广阔的应用前景。中国鱼类多倍体育种研究起于 20 世纪 70 年代中期^[8]。1976 年中国科学院水生生物研究所首次报道了用理化方法获得了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)三倍体和四倍体, 迄今已对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[9-10]、鳙(*Aristichthys nobilis*)^[11]、水晶彩鲫(*Carassius auratus*)^[12]、罗非鱼(*O. mossambicus*)^[13]等鱼类进行了四倍体诱导的研究, 异源四倍体鲫鱼已经建立了亲鱼群体并且在三倍体育种中得到了广泛的应用^[14]。但是迄今为止, 有关半滑舌鲷四倍体鱼苗的人工诱导, 国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼和人工授精

实验用半滑舌鲷亲鱼, 由山东省海阳市黄海水产有限公司提供, 雌鱼体质量为 1.5~2 kg, 雄鱼体质量 180~350 g, 经过生殖调控达到性成熟后, 按照陈松林等^[15]已建立的人工催产方法进行人工催产。采取挤压腹部法收集半滑舌鲷未受精卵和精液, 采用干法授精, 将新鲜精液倒入卵中, 轻轻摇动混匀, 然后加入 2 倍于卵量体积的海水 $[(23 \pm 0.2)]$ 中完成授精过程。

1.2 静水压处理适宜起始时间的筛选

根据预实验, 在授精后 19.5 min、21.5 min、23.5 min、25.5 min 和 27.5 min 的不同时间, 将受精卵置于日本生产的 5506 静水压机的压力缸中, 压力设为 40 MPa, 休克处理起始时间设为 4.5 min, 休克处理完毕后将卵移入 22~23 海水中培养孵化。在鱼苗孵化出膜后, 分别计算不同时间组四倍体鱼苗的孵化率及四倍体率, 从而确定静水压处理的适宜起始时间。

1.3 静水压处理压力和适宜处理时间的确定

确定静水压休克起始时间后, 设定静水压压

力梯度为 36 MPa、38 MPa、40 MPa、42 MPa 和 44 MPa, 持续处理 4.5 min, 处理完毕后将卵移入 22~23 海水中培养孵化。分别计算不同压力组的孵化率及四倍体比率, 从而确定静水压处理的适宜压力。

最后根据上两个实验结果筛选静水压处理持续时间, 设定梯度为 4 min、4.5 min、5 min、5.5 min 和 6 min, 进行静水压休克处理, 处理完毕后将卵移入 22~23 海水中培养孵化。计算各组的孵化率及四倍体比率, 从而确定静水压处理的适宜处理时间。

1.4 半滑舌鲷四倍体鱼苗细胞 DNA 相对含量的测定

每次四倍体诱导实验, 抽检孵化出膜后 2~5 d 的四倍体鱼苗 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 1~2 次, 随后向每个离心管加入 0.2 mL PBS, 用碾磨棒将鱼苗碾碎, 制成单细胞悬液, 碾磨下一个前先将碾磨棒在蒸馏水中清洗干净。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, 染色 5 min 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, 再分析四倍体诱导鱼苗的 DNA 相对含量。统计四倍体鱼苗的比率。

1.5 四倍体鱼苗染色体分析

半滑舌鲷四倍体鱼苗染色体制作过程主要参照张四明^[16]、周丽青等^[17]所用方法, 并有所改进。首先将 2~5 日龄的四倍体鱼苗置于海水配置的 0.02% 的秋水仙素中游泳 1~2 h, 然后把鱼苗放入 0.075 mol/L 的 KCl 中低渗 30 min。用新配制的预冷卡诺氏液(甲醇+冰醋酸体积比 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, 用镊子镊碎, 使细胞游离。热滴片法滴片。10% 吉姆萨染液染色 20~30 min。镜检。

1.6 数据分析

运用 SPSS13.0 软件统计各个组诱导鱼苗孵化率和四倍体率的平均值和标准差, 并进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 利用最小显著差

数法(least significant difference, LSD)对各个诱导组间的数据进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 静水压处理适宜起始时间的筛选

比较了静水压处理不同起始时间对半滑舌鲷四倍体诱导率的影响,现将不同起始时间组的舌鲷四倍体诱导结果示于图 1。由图 1 可见,在受精后 21.5 ~ 25.5 min 进行静水压处理,都有 60% ~ 70%的四倍体鱼苗产生,且不存在显著差异($P > 0.05$),而只有在 21.5 min 时,鱼苗孵化率最高,且获得四倍体鱼苗的比例也最高,达到 68.3%,因此确定半滑舌鲷四倍体鱼苗诱导的最佳有效起始时间为受精后 21.5 min。

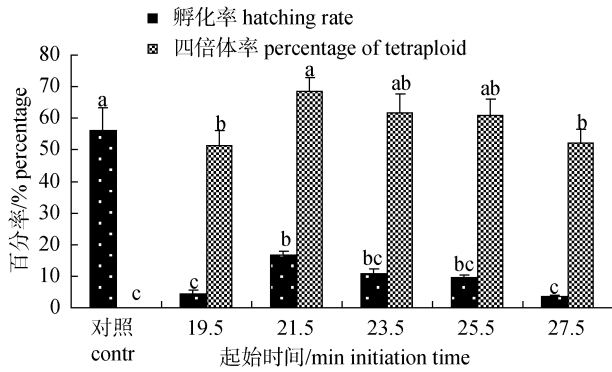


图 1 静水压处理起始时间(从受精时算起)对诱导半滑舌鲷四倍体的影响

不同柱上字母表示各组间差异显著($P < 0.05$)。

Fig.1 Effects of different initiation time after fertilization of pressure shock on induction rate of tetraploid in half-smooth tongue sole

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

2.2 静水压压力及其持续时间的确定

不同静水压压力下半滑舌鲷四倍体诱导率所受的影响如图 2 所示,随着静水压力的增加,鱼苗孵化率呈下降趋势。处理压力低于 40 MPa 时,四倍体出现率太低,高于 40 MPa 时虽然四倍体率有所增加,但是鱼苗孵化率极低,因此确定半滑舌鲷四倍体诱导适宜的静水压压力为 40 MPa。

最后根据上述两个实验结果筛选静水压处理持续时间,将梯度范围设在 4 ~ 6 min,受精后 21.5 min,进行静水压休克处理。实验结果表明,

半滑舌鲷受精卵在 40 MPa 压力下休克处理 4 ~ 5.5 min,均有鱼苗孵化出膜。随着压力持续时间的增加,四倍体鱼苗的比例有较小幅度的增加,但是孵化率却明显下降,综合考虑,只有在休克持续处理 4.5 min 时,诱导四倍体鱼苗的效果最好(图 3)。

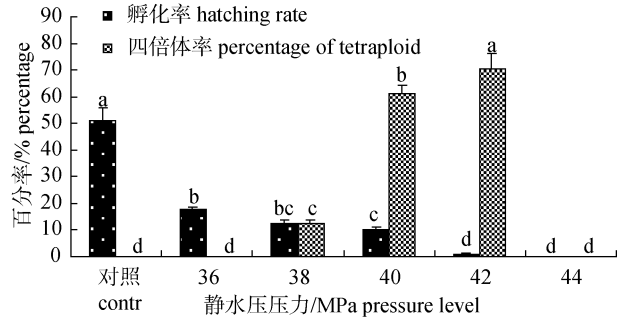


图 2 静水压压力对诱导半滑舌鲷四倍体的影响

不同字母表示各组间差异显著($P < 0.05$)。

Fig.2 Effects of different levels of pressure shock on induction rate of tetraploid in half-smooth tongue sole. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

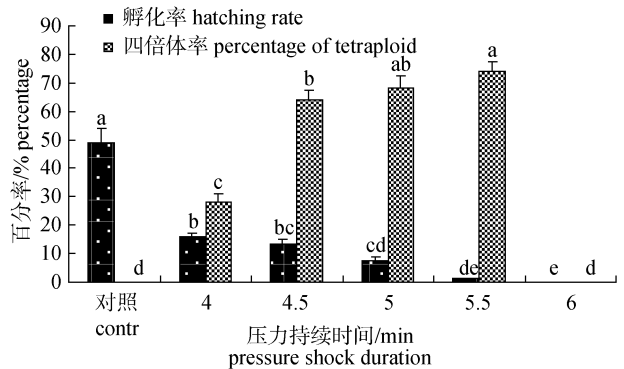


图 3 静水压处理持续时间对诱导半滑舌鲷四倍体的影响 柱上不同字母表示各组间差异显著($P < 0.05$)。

Fig.2 Effects of treatment duration of pressure shock on the induction of tetraploid in half-smooth tongue sole. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.3 半滑舌鲷四倍体鱼苗细胞 DNA 相对含量的测定

利用流式细胞仪对实验获得四倍体鱼苗和对照组鱼苗的细胞 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 处左右,而四倍体鱼苗绝大多数细胞中的 DNA 相对含量在 52 处左右,是二倍体鱼苗的 2 倍(图 4),因此证明我们诱导出的鱼苗为四倍体鱼苗,统计四倍体率。

2.4 半滑舌鲷四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; 而四倍体鱼苗的染色体数目应为 $4n=84$ 条, 因此通过染色体分析即可鉴定诱导出的鱼苗是否为四倍体鱼苗。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四倍体鱼苗进行了染色体分析, 发现在优化的静水压处理条件下产生的鱼苗部分含有 84 条染色体, 是正常二倍体鱼苗的 2 倍, 因此, 含有 84 条染色体的鱼苗就是四倍体鱼苗(图 5)。

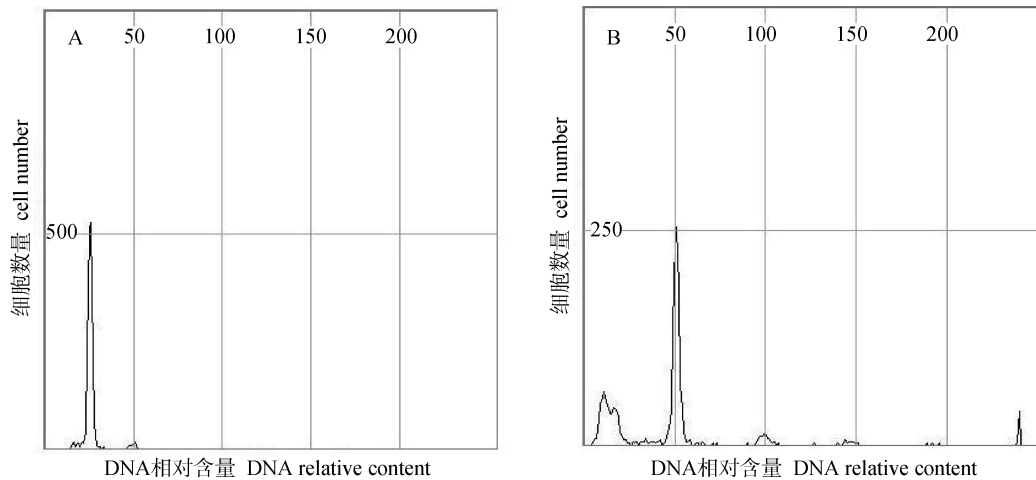


图 4 二倍体和四倍体半滑舌鲷鱼苗的倍性分析直方图

A: 正常二倍体鱼苗; B: 四倍体鱼苗

Fig.4 Histograms of ploidy analysis on normal diploid and triploid fry

A: normal diploid fry; B: tetraploid fry

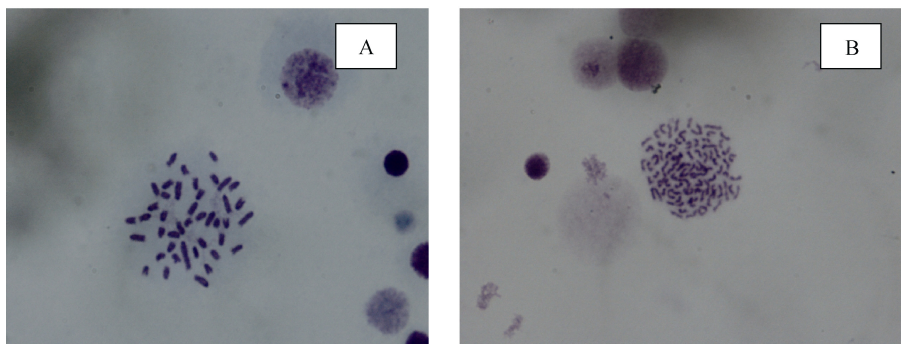


图 5 半滑舌鲷四倍体鱼苗和二倍体鱼苗染色体分析

A: 正常二倍体鱼苗; B: 四倍体鱼苗

Fig.5 Chromosome analysis of normal diploid and triploid fry

A: normal diploid fry; B: tetraploid fry

3 讨论

三倍体鱼因染色体组成不平衡, 性腺不能发育成熟, 避免了性腺发育时期生长停滞和鱼肉质量下降等不利影响, 对提高养殖产量和鱼肉质量具有重要的意义。王磊等^[18]对牙鲆三倍体的生长和性腺发育研究发现, 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; 张涌泉^[19]对虹鳟三倍体和二倍体鱼肉品质分析, 发现三倍体比二倍体的脂质含量高, 而且二龄鱼时三倍体的鱼肉嚼感比二倍体柔软。三倍体鱼类的不育性, 对鱼类天然种质资源的保护也具有重要的意义。然而, 三倍体鱼的诱导只能当代使用, 不能建立繁殖群体, 难以大规模推广应用, 最好的方法是首

先诱导获得四倍体鱼, 然后与普通二倍体鱼杂交, 就可以大量稳定的获得 100% 的三倍体, 在水产养殖中具有广阔的应用前景。

人工诱导鱼类四倍体技术是通过抑制受精卵早期卵裂使染色体加倍, 从而形成四倍体个体。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。静水压处理虽然需要专门的设备, 但是其处理的佳条件易于掌握, 处理时间较短, 对胚胎的损伤比温度休克法小, 是进行鱼类染色体组操作的有效方法。早在 1981 年, Streisinger 等^[20]就成功的用静水压处理与乙醚相结合诱导斑马鱼雌核发育产生纯合二倍体; 桂建芳等^[12,21]采用静水压处理分别获得了批量三倍体和少数四倍体水晶彩鲫; 尤锋等^[22]采用冷休克和静水压两种方法对牙鲆同质雌核发育诱导进行研究, 静水压法诱导的效率最高达 13.08%, 远高于温度休克法的诱导率(最高不足 1%); 在真鲷和欧鲈的雌核发育和四倍体诱导过程中也都报道, 静水压法诱导的效率要远高于温度休克法的诱导^[23-24]。

本研究采用静水压法, 通过多次实验, 筛选出诱导半滑舌鲷四倍体鱼苗的最佳条件为, 孵化水温(23 ± 0.2)左右, 授精后 21.5 min, 静水压力 40 Mpa, 持续处理 4.5 min, 诱导效果最佳, 鱼苗四倍体率达 68.3%。本研究对出膜仔鱼进行四倍体率统计, 得到这一结果较许多鱼类都高。如孙静娴等^[10]用热休克诱导虹鳟四倍体, 胚胎时统计四倍体率最高为 33%; 容寿柏等^[13]用热休克诱导罗非鱼四倍体, 在仔鱼和幼鱼中四倍体所占比率分别为 38.3%和 30%; 郑春静^[25]分别用冷、热休克法诱导大黄鱼四倍体, 鱼苗的四倍体检出率分别仅为 1.25%和 3.06%。

本研究中, 作者发现半滑舌鲷四倍体的诱导效果要明显低于三倍体的诱导效果, 而且很多鱼类也是如此, 究其原因可能有多: 一是受精卵的发育过程具有不同步性, 半滑舌鲷卵从受精后发育到第一次卵裂所需要的时间要远远大于发育到第二极体释放所需要的时间, 受精卵的发育更易不同步, 从而导致诱导出的鱼苗不能全部是四倍体; 二是因为四倍体胚胎及鱼苗比二倍体鱼更易

死亡, 这就导致幼鱼和成鱼的四倍体率远低于胚胎时四倍体率, 诸多学者对此进行了分析研究^[26-27]; 还有亲鱼的发育状态、卵子的质量及诱导工艺等也是影响多倍体诱导效果的重要因素。实验中还发现, 用静水压抑制半滑舌鲷第一次卵裂所需要的压力要稍高于抑制第二极体释放所需要的压力, Bertotto 等^[24]用静水压诱导欧鲈减数雌核发育时所用最适强度为 550 kg/cm², 而诱导其卵裂雌核发育时压力强度则为 600 kg/cm², 尤锋等^[22]诱导牙鲆雌核发育时也有相同报道, 造成此种差别的原因尚不清楚。

本研究对静水压诱导半滑舌鲷四倍体的条件和方法进行了探讨, 在国内外首次建立了人工诱导半滑舌鲷四倍体的技术, 采用流式细胞仪鉴定了四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四倍体鱼苗的染色体数量, 证实了该技术的可行性, 为大量生产半滑舌鲷三倍体不育群体奠定了基础。

参考文献:

- [1] 孟田湘, 任胜民. 渤海半滑舌鲷的年龄与生长[J]. 海洋水产研究, 1988, 9(2): 173-183.
- [2] 姜言伟, 万瑞景. 渤海半滑舌鲷人工育苗工艺技术的研究[J]. 海洋水产研究, 1993, 14(1): 25-33.
- [3] 柳学周, 徐永江, 马爱军, 等. 温度、盐度、光照对半滑舌鲷胚胎发育的影响及孵化条件调控技术研究[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 1-6.
- [4] 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]. Mar Biotechnol, 2007, 9(2): 273-280.
- [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]. Mar Biotechnol, 2009, 11(2): 243-251.
- [6] Ji X S, Tian Y S, Yang J F, et al. Artificial gynogenesis in *Cynoglossus semilaevis* with homologous sperm and its verification using microsatellite markers[J]. Aqu Res, 2010, 41(6): 913-920.
- [7] 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.
- [8] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.

- [9] 马涛, 朱才宝, 朱秉仁. 热休克诱导虹鳟四倍体[J]. 水生生物学报, 1987, 11(4): 329-336.
- [10] 孙静娴, 赵文, 左中原, 等. 用热休克法诱导虹鳟四倍体最佳参数的研究[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(4): 278-283.
- [11] 洪云汉. 热休克诱导鳙鱼四倍体的研究[J]. 动物学报, 1990, 36(1): 70-75.
- [12] 桂建芳, 孙建民, 梁绍昌, 等. 鱼类染色体组操作的研究. 静水压处理和静水压与冷休克结合处理诱导水晶彩鲫四倍体[J]. 水生生物学报, 1991, 15(4): 333-342.
- [13] 容寿柏, 周泉涌, 安艳芳. 用热休克诱导罗非鱼四倍体[J]. 中国实验动物学杂志, 1994, 4(2): 97-101.
- [14] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp \times common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization[J]. Aquaculture, 2001, 192 (2-4): 171-186.
- [15] 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[Z]. 国家发明专利 CN1011 85425.
- [16] 张四明. 一种制备鱼类染色体的新方法[J]. 遗传, 1993, 15(3): 35-36.
- [17] 周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鳎染色体核型分析[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 417-419.
- [18] 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.
- [19] 张涌泉. 三倍体虹鳟的形质[J]. 中国水产(台湾), 1989 (442): 43-46.
- [20] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Nature, 1981, 291(5813): 293-296.
- [21] 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鲫[J]. 水生生物学报, 1990, 14(4): 336-343.
- [22] 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.
- [23] Kato K, Hayashi R, Yuasa D, et al. Production of cloned red sea bream, *Pagrus major*, by chromosome manipulation [J]. Aquaculture, 2002, 207(1): 19-27.
- [24] Bertotto D, Cepollaro F, Libertini A, et al. Production of clonal founders in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., by mitotic gynogenesis[J]. Aquaculture, 2005, 246(1): 115-124.
- [25] 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.
- [26] Swarup H. Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.) [J]. J Gen, 1959, 56(2): 143-155.
- [27] Lou Y D, Purdom C E. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson[J]. J Fish Biol, 1984, 25(3): 345-351.

Induction and identification of tetraploid fry in *Cynoglossus semilaevis*

LI Wenlong^{1,2}, CHEN Songlin¹, JI Xiangshan¹, XIE Mingshu¹, XU Ying¹, DENG Han¹

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

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

Abstract: Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) is an important cultured marine fish species in northern China. Females grow three to four times faster than males. The low growth rate of males leads to an overall reduction in production, thus reducing their value. Given this, the development of all-triploid stocks would be a significant benefit to the commercial aquaculture of half-smooth tongue sole. We developed a method for inducing tetraploidy in this species. The optimal initiation time for pressure shock of fertilized eggs was 21.5 min after fertilization at 23°C. The optimal pressure and treatment duration were 40 MPa and 4.5 min, yielding a tetraploid rate in fry of 68.3%. We analyzed the ploidy of fry using *Ploidy analyzer* and demonstrated that the tetraploid DNA relative content was two times that of normal diploid fry. We observed 84 chromosomes in triploid fry, whereas normal diploid fry have 42 chromosomes. Our method provides a foundation for production of all-triploid stocks in half-smooth tongue sole.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; tetraploid; artificial induction; pressure shock

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