

DOI:10.3724/SP.J.1118.2017.17063

牙鲆雌核发育研究进展

刘海金¹, 侯吉伦², 刘奕³

1. 中国水产科学研究院, 北京 100141;
2. 中国水产科学研究院 北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100;
3. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 广东 广州 510380

摘要: 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种重要的海水经济鱼类, 其雌性生长速度显著快于雄性。因此, 生产全雌牙鲆对提高养殖产量和经济效益具有重要意义。雌核发育是一种特殊的有性生殖方式, 在这种生殖方式中, 灭活的精子进入卵子, 激活胚胎发育, 但精核不与卵核融合形成合子, 所以雌核发育的个体只具有母本的遗传信息。目前, 牙鲆已成为雌核发育技术应用于产业的代表性鱼类。本文对牙鲆人工诱导雌核发育的研究进展进行综述, 介绍牙鲆减数分裂雌核发育和有丝分裂雌核发育的诱导方法, 以及雌核发育技术在性别控制、克隆制备等育种研究中的应用。最后, 作者提出“雌核发育育种体系”构想, 并对其在鱼类育种和遗传研究中的应用前景进行展望。

关键词: 牙鲆; 雌核发育; 双单倍体; 克隆; 单交种

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)04-0902-11

作为水生动物, 大部分鱼类具有怀卵量大、体外受精等繁殖特点。成熟的卵子在第二次减数分裂的中期被排出体外, 在水中与精子受精。鱼类的这种繁殖特性为人工诱导多倍体、雌核发育和雄核发育提供了潜在的可能性。雌核发育是一种特殊的生殖方式, 在这种生殖方式中, 灭活的同源或异源精子进入卵子, 激活卵子发育, 但精核不与卵核融合形成合子, 所以雌核发育的个体只具有母本的遗传信息^[1]。自1932年Hubbs等^[2]在花鲮科鱼类 *Pocilia formosa* 上发现天然雌核发育现象之后, 通过天然雌核发育进行繁殖的鱼类被陆续发现。此后, 人们开始关注通过染色体操作技术, 进行人工诱导雌核发育, 并将其应用于鱼类育种研究中, 且取得良好效果^[3-6]。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是重要的海水养殖鱼类, 主要分布在俄罗斯远东地区、日本、韩国和中国的渤海、黄海、东海等海域, 具有个体大、生长快、味道鲜美等特点, 深受广大消费者的喜爱。牙鲆雌雄个体生长速度差异显著, 人工

养殖条件下, 445日龄时, 雌牙鲆的平均体重是雄牙鲆的1.8倍; 773日龄时, 达到2.9倍^[7]。20世纪80年代后期, 日本学者率先采用雌核发育技术研究了牙鲆的性别决定机制以及生产全雌牙鲆的方法^[8], 从而使得牙鲆成为雌核发育技术应用于产业的代表性鱼类。笔者多年来一直以人工诱导雌核发育等染色体操作手段, 进行牙鲆遗传改良和新品种选育。在此, 对雌核发育技术及在牙鲆育种中的应用进行综述, 同时提出“雌核发育育种体系”构想。

1 人工诱导雌核发育的诱导

对二倍体鱼类诱导人工雌核发育主要包含两个步骤: 一是用遗传失活的精子激活卵子; 二是使染色体加倍, 使其恢复正常二倍体染色体组^[9]。

1.1 精子的选择和遗传失活处理

1.1.1 精子的选择 雌核发育诱导可选择同源或异源精子。同源精子虽可保证成功进入卵子并激活胚胎发育, 但存在着因遗传失活不彻底, 部分

收稿日期: 2017-01-28; 修订日期: 2017-02-28。

基金项目: 国家863计划项目(2012AA10A408-5); 国家鲆鲽类产业技术体系计划项目(CARS-50-G02)。

作者简介: 刘海金(1951-), 男, 研究员, 从事鱼类遗传育种研究。E-mail: liuhaijin2005@126.com

精子与卵子正常受精, 而隐藏在雌核发育群体中, 以后难以鉴定排出的问题。所以为了保证雌核发育诱导成功并一旦灭活失败而形成杂交则导致胚胎死亡, 通常会选用亲缘关系较远的异源精子^[10]。在已有成功诱导牙鲆雌核发育的报道中, 有运用同源精子^[11], 也有运用异源精子的。使用异源精子的主要是真鲷(*Pagrus major*)^[12], 也有学者选择使用石鲮(*Kareius bicoloratus*)^[13]和鲈(*Lateolabrax maculatus*)^[14]。选择真鲷的原因是真鲷与牙鲆同为增殖放流鱼类, 在同一场所饲养, 采集精子方便且能激活牙鲆卵子。

1.1.2 精子遗传失活处理 精子遗传物质的灭活可通过多种方法实现, 但最常见的是辐射处理法。这种处理方法对于精子细胞核和细胞质产生不同的影响, 因此当精子受高剂量辐射后, 染色体虽失活但不影响精子授精能力。常用射线包括 γ 射线^[15-16]、X射线^[5, 17]和紫外线(UV)。因为 γ 射线和X射线因辐射较强, 通常用于大量精子的处理^[18], 但这两种射线需要特殊的辐射源和防护设备, 只有少数实验室才具备, 且不适合日常使用, 因此应用局限性较大^[19]。并且Chourrout等^[20]研究发现 γ 射线处理剂量不够时会引起父本DNA的小片段残留并对子代产生影响。

紫外线因其装置廉价易得, 辐射效果较好, 操作简便而得到广泛应用。其原理是, 紫外线照射会导致精子DNA上相邻的嘧啶发生二聚化, 严重影响正常复制和转录^[21], 还可以导致胞嘧啶水合物的形成和碱基对的置换^[22], 从而达到使遗传物质失活的作用。但紫外线穿透力较弱, 只能处理体积较小或较浅的样品^[23], 如样品量较大则必须在照射时进行搅拌及降温等特殊处理^[24]。Foisil等^[25]研究表明经紫外线照射处理的精子与经 γ 射线照射后的精子相比, 雌核发育后代的产量更高, 与 γ 射线相似, 经紫外线处理过的精子也存在着残留染色体片段影响雌核发育后代的可能性^[26-29]。

在牙鲆的雌核发育诱导中, 普遍使用紫外线照射法灭活精子。对于紫外线照射精子的最佳剂量, 有不同的研究结果。同源精子中, 王伟等^[11]用紫外线处理牙鲆精子所得最佳照射剂量为 1500 J/m^2 ,

尤锋等^[30]报道的最佳灭活剂量为 $3.6 \times 10^{-3} \text{ J/mm}^2$ 。而异源精子中, Tabata等^[10]报道真鲷精子最佳照射剂量为 48 mJ/cm^2 , Yamamoto^[7]报道最佳照射剂量为 45.6 mJ/cm^2 , 刘海金等^[31]报道最佳照射剂量为 73 mJ/cm^2 ; 戈文龙等^[13]报道, 石鲮精子在2支20 W紫外灯管下照射40 s可达最佳处理效果。鲈精子可以利用剂量为 $4 \times 10^4 \mu\text{J/cm}^2$ 的紫外线照射处理使其遗传物质失活^[14]。

1.2 染色体组加倍

在人工诱导牙鲆雌核发育过程中, 若仅用遗传失活的精子激活卵子发育, 那么所得到的胚胎为单倍体, 通常表现为胚体缩短、脊椎弯曲、卵黄囊肿大、心脏积水或其他形式的畸变。单倍体胚体一般不能正常出膜, 或在出膜时及出膜后几天内死亡^[32]。因此, 需要对单倍体胚胎进行染色体组加倍, 使其恢复二倍体染色体组, 从而正常发育。染色体加倍方法主要分为物理法和化学法。物理法主要包括冷休克^[24]和热休克^[33]的温度处理以及静水压处理^[19]。化学法主要有秋水仙素处理^[34]和细胞松弛素处理^[35]等。在鱼类的雌核发育诱导中, 使用最多的是物理法进行染色体加倍。对于温度休克而言, 处理起始时间、处理水温和持续时间是诱导成功与否的3个重要因素^[9]; 而卵子的孵化温度、施压起始时间、持续时间和压力强度是静水压处理的主要参数。

根据处理起始时间的不同, 染色体加倍可分为抑制极体排出和抑制卵裂两种类型。抑制第二极体排出的雌核发育称为减数分裂雌核发育(meiotic gynogenesis), 而抑制卵裂的雌核发育称为有丝分裂雌核发育(mitotic gynogenesis)。两种雌核发育各有特点, 较之于有丝分裂雌核发育, 减数分裂雌核发育具有操作简便、诱导成功率高等特点, 现有的养殖鱼类已有数十种进行了减数分裂雌核发育的诱导并获得了成功。有丝分裂雌核发育诱导难度较大, 后代的成活率低, 至今只有20余种鱼类成功的进行有丝分裂雌核发育诱导实验, 但培育出健康纯合二倍体的不多, 使纯合二倍体繁殖后代的则鲜有报道^[1]。

1.2.1 减数分裂雌核发育 绝大多数的硬骨鱼类排出的卵子处于第二次减数分裂中期, 当精子进

入卵子后, 激活第二次减数分裂, 卵子发育继续进行, 从而排出第二极体^[36]。在适当的时间对激活的卵子进行处理, 抑制第二极体的排出可使其染色体加倍而恢复二倍体。

Tabata 等^[37-38]研究表明, 牙鲆减数分裂雌核发育诱导条件为授精后 2~5 min 开始冷休克处理, 在 0~4℃ 条件下处理 45~60 min 效果较理想。王伟等^[11]研究表明, 授精水温 15℃ 时, 在牙鲆卵子授精后 5 min 置于 0~2℃ 海水中冷休克处理 45 min, 可以成功抑制第二极体的排出。戈文龙等^[13]报道授精水温为(15.5±0.5)℃ 时, 于受精后 3 min 开始在 2~4℃ 条件下冷休克处理 45 min, 二倍体诱导率最高。刘海金等^[31]研究表明, 运用冷休克法, 以(16±0.5)℃ 海水授精, 在授精后 3 min 用(0±0.5)℃ 海水持续处理 45 min, 牙鲆减数分裂雌核发育的诱导效果最好。田永胜等^[14]发现, 在 15~17℃ 正常海水授精, 授精 3 min 后放入 2~4℃ 海水中冷休克处理 45 min 可获得牙鲆雌核发育群体。Yamamoto^[39]研究表明, 在授精后 2 min 对卵子施以 600 kg/cm² 静水压 6 min 也可成功抑制第二极体的排出。热休克方法对于牙鲆减数分裂雌核发育效果不佳^[37]。

徐成等^[40]运用同工酶分析对减数分裂雌核发育牙鲆两个基因座位与着丝粒之间的重组率进行了探讨, 证明减数分裂雌核发育牙鲆存在杂合基因型, 不能用于培育克隆; 而王伟等^[11]也通过微卫星标记分析证明了这一点。朱晓琛等^[41]也用微卫星标记评价了牙鲆雌核发育二倍体的纯合性, 表明减数雌核发育二倍体则与母本的遗传同质性较高。刘海金等^[42]运用 10 个微卫星标记分析发现, 牙鲆减数分裂雌核发育二倍体具有高度的遗传相似性, 母本与子代及子代个体之间遗传相似系数可达 0.9766 和 0.9595, 证明诱导减数分裂雌核发育适于固定母本性状。王桂兴等^[43]将牙鲆减数分裂雌核发育二倍体再次诱导减数分裂雌核发育, 获得连续两代雌核发育二倍体家系, 并运用微卫星标记分析发现其纯合度、个体间及亲子之间的平均相似性均高于其亲本。牙鲆连续三代减数分裂雌核发育家系内个体间的遗传相似性为 0.9838~0.9918, 母本和子代个体间的遗传相似性

为 0.9923~0.9968, 而家系间的遗传相似性为 0.9714~0.9810^[44]。连续多代的减数分裂雌核发育诱导不仅提高了个体的纯合度, 同时也提高了子代个体间以及家系间的遗传相似性。因此, 诱导连续多代减数分裂雌核发育是建立鱼类近交系的有效方法。

1.2.2 有丝分裂雌核发育 卵子激活后, 在第一次卵裂中期时通过特殊处理破坏纺锤体, 抑制有丝分裂的正常进行, 从而达到加倍染色体组效果。经典的观点认为这种处理方法是“抑制第一次卵裂”^[45-46], 但 Zhang 和 Onozato^[47]在研究虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)有丝分裂雌核发育过程中提出“抑制第二次卵裂”的观点, 即发现第一次有丝分裂中期时纺锤体一度被破坏, 但随后又形成纺锤体, 染色体重新排列, 与处理前一样; 第一次有丝分裂正常进行, 未被抑制; 第二次有丝分裂周期中, 每个分裂球只有一个单极纺锤体形成, 染色体复制, 但细胞分裂被抑制; 第三次有丝分裂正常进行, 每个分裂球形成一个两极纺锤体。Zhu 等^[48-49]和 Hou 等^[50]分别在同源和异源精子诱导牙鲆有丝分裂雌核发育的研究中证实了“抑制第二次卵裂”的观点。

抑制卵裂得到的雌核发育二倍体, 每一对同源染色体中的一条是以另一条为模板复制得到, 即均为雌性原核的一套染色体组复制而来, 所以在遗传组成上完全相同, 所有的基因均为纯合^[51], 这种纯合二倍体个体称为双单倍体(doubled haploid, DH), 可直接用于育种, 建立纯合克隆系和杂合克隆系, 也可为遗传学和分子生物学等研究提供遗传稳定的材料^[52]。

研究表明, 授精水温为 17℃ 时, 授精后 1 h 对卵子施压 600 至 700 kg/cm² 并持续 6 min, 可有效抑制卵裂^[7, 10]。刘海金等^[42]的研究结果与之相近, 并发现压力为 600 kg/cm² 时, 效果最佳。庄岩等^[53]研究发现处理前使受精卵保持在(15.5±0.5)℃, 则从受精后 75 min 开始, 用 55 MPa 的压力持续处理 6 min, 仔鱼孵化率最高。尤峰等发现在(15±0.2)℃ 水温下, 用冷休克法诱导牙鲆有丝分裂雌核发育的最适条件为受精后 85 min 时, 以 0~2℃ 水温处理 45 min^[30]。

田焯和男等^[8]运用同工酶法证明了诱导牙鲆

有丝分裂雌核发育可以获得纯合子。刘海金等^[42]运用10个微卫星标记分析发现,有丝分裂雌核发育二倍体在10个位点均表现为纯合,可以用于制备克隆系。Liu等^[54]运用牙鲈21个微卫星标记对以诱导丝分裂雌核发育获得的双单倍体牙鲈进行了遗传验证。虽然静水压抑制卵裂法可成功获得纯合子,但后代中也会有部分杂合个体出现,这可能由于某些卵子发育不同步,静水压抑制某些卵子第二极体排出而非抑制卵裂,从而导致杂合个体的出现^[54-55]。Liu等^[56]报道了用微卫星标记来验证牙鲈有丝分裂雌核发育二倍体的纯合性时标记的选择对鉴定结果的影响。研究中所运用的72个标记,经着丝粒作图分析表明39个标记位于端粒处,21个标记位于着丝粒处,其余分布于连锁群中间部位。结果表明随着所选标记与着丝粒距离的越远,所检测出的杂合个体数越多。即在进行纯合性检验时,选择着丝粒远端的标记得到的结果更准确。

2 雌核发育技术在牙鲈育种中的应用

2.1 性别控制

牙鲈雌雄个体差异明显,雌性生长速度快。因此利用雌核发育技术,培育全雌牙鲈,对提高养殖产量和经济效益具有十分重要的意义。牙鲈的性别决定方式为XX-XY型,其生理性别可以在发育早期通过性激素和温度控制得到改变,并且不影响个体产生正常配子^[7]。XX-XY型鱼类雌核发育后代遗传性别均为雌性(XX),在此基础上,通过激素或高温处理可使遗传雌性变为生理雄性的“伪雄鱼”,将伪雄鱼(XX)与正常雌鱼(XX)交配即可大规模生产全雌牙鲈。

中国水产科学研究院北戴河中心实验站通过对减数分裂雌核发育诱导参数和伪雄鱼诱导参数的优化,选育的全雌牙鲈“北鲈1号”,于2011年通过了国家水产原良种审定委员会的审定。该新品种雌性比例约90%,生长比普通牙鲈快约20%,规格整齐,互相残食少,容易饲养,深受养殖户的喜爱。他们继续选育,以优良雌核发育家系作为母本,以优良伪雄鱼家系作为父本,这样两个优良雌核发育家系配组,所产生的后代比普

通牙鲈生长快35%,全雌性,且个体间差异小,比“北鲈1号”具有更优良的经济性状,2014年,被审定为新品种“北鲈2号”。

2.2 多倍体育种

水产动物的三倍体因其不育,既可以控制繁殖数量又能避免因繁殖出现的肉质下降。通过抑制第二极体排出即可实现三倍体的制备。制备方法与雌核发育二倍体制备方法相似,即通过正常受精所获得的受精卵通过抑制第二极体的排出可得三倍体牙鲈。而通过抑制受精卵的卵裂即可获得四倍体个体,再将四倍体与二倍体个体杂交也可获得三倍体个体。

牙鲈全雌三倍体研究起始于1987年,但未获得理想结果^[39]。Tabata等^[57]对三倍体牙鲈经过31个月的培育,获得的结果是:生长与二倍体没有显著差别;变态期饵料驯化困难,成活率不高;三倍体雌雄均是不育的。尤峰等^[58]对三倍体牙鲈诱导条件和染色体核型进行了分析。衣启麟等^[59]对静水压力诱导牙鲈四倍体的条件进行了优化,为三倍体苗种的生产奠定基础。王磊等^[60]报道了大规模生产牙鲈三倍体的方法,并发现其生长速度显著快于二倍体。但是,到目前为止,多倍体牙鲈尚处于研究阶段,未见其商业化生产的相关报道。

2.3 克隆制备

2.3.1 纯合克隆的制备 运用雌核发育诱导技术仅需两代便可获得完全纯合的克隆系(homozygous clone, homo-clones)^[61]。首先通过诱导有丝分裂雌核发育技术制备双单倍体,再将双单倍体成熟个体所产的卵子诱导减数分裂雌核发育即可制备纯合克隆系。克隆系的纯合性、一致性和遗传稳定性等特点使其在遗传学研究中具有巨大的应用价值^[1]。纯合克隆系能克服个体间的遗传差异,可以用于了解研究环境对表型的影响,是研究突变的优良材料^[62];可直接应用于育种,加快优良动物的大量繁殖和遗传改良^[63]。另外,纯合克隆具有来源清晰、个体间遗传均一等特点,可以成为理想的实验动物,可以在医学、生物学、环境毒理学等研究领域被广泛应用。制备实验动物所采用的传统方法是进行连续多代的全同胞交配。要达到实验动物的标准,一般需要连续20代的全同胞

交配,此时理论上的近交系数 $F=0.986^{[64]}$ 。虽然近交系数接近于 1,但还是有 2%左右的遗传变异存在,而且近交系数的增加速度随着近交代数的增加呈现递减趋势。利用传统方法,已经有数百种啮齿动物的近交系被成功地制备和商业化应用^[65]。

与传统的全同胞交配相比,利用雌核发育方法制备实验动物的方法具有耗时短(只需 2 代)和近交系数高($F=1.00$)的特点。在鱼类,目前已经有斑马鱼(*Danio rerio*)^[45]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[66]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[67]、石川氏鲑(*Oncorhynchus rhodurus*)^[68]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[69]、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)^[70]、真鲷^[71]以及牙鲆建立了雌核发育纯合克隆系。

在牙鲆,日本的 Yamamoto^[7] (山本荣一)博士率先制备成功纯合克隆系,并对它们的胚胎发育、存活率、生长和遗传一致性等进行了初步研究,提出利用纯合克隆系育种的可能性。但是随着山本博士的退休,日本此类研究处于停顿状态。

在国内,通过雌核发育诱导的方法,作者建立了两个牙鲆纯合克隆系,并利用 21 个微卫星标记对克隆的纯合度和遗传相似度进行了检测^[72]。因为所制备克隆的全雌性,通过对性成熟的克隆再次诱导减数分裂雌核发育,制备了克隆二代。利用覆盖牙鲆 24 个连锁群的 24 对微卫星引物对克隆二代的纯合性进行检测发现,克隆二代的纯合度为 1.00,个体间、子代与母本间的遗传相似度为 1.00,证明了克隆二代诱导成功。利用 RAD 测序技术(restriction site DNA-associated sequencing)在全基因组水平也证明了克隆的纯合性和遗传相似性。210 日龄时克隆二代体型指数的变异系数较小,体型特征上具有高度的相似性。克隆二代的成功制备为克隆牙鲆的综合研究奠定了基础^[73]。

姜宏波等^[74]对纯合克隆牙鲆和普通牙鲆的血液生化指标进行了研究,发现一个纯合克隆系血液中谷草转氨酶的含量极显著地高于普通牙鲆,推测该克隆系具有进行肝病模型培养的价值。利用纯合克隆牙鲆和普通牙鲆对 Hg^{2+} 的急性毒性进行研究,比较纯合克隆牙鲆和普通牙鲆在对 Hg^{2+} 的耐受性及死亡一致性上的差异。结果表

明,纯合克隆牙鲆对 Hg^{2+} 更加敏感,且死亡同步性优于普通牙鲆^[75]。随着社会经济的不断发展和人类活动的不断增多,环境问题日益凸显,因此进行环境污染对生物影响的相关研究也变得更加重要。研究中所用动物的标准化程度,直接影响到研究结果的准确性和可重复性。在有关海洋污染鱼类实验中,所采用鱼类绝大多数为普通鱼类,遗传背景不清楚,遗传相似度较低,因而降低了研究结果的可重复性。利用标准化的实验动物进行研究,可以有效地规避上述问题,提高研究的准确性。目前,中国尚未有一个标准化的海洋实验动物。通过雌核发育手段所制备的纯合克隆牙鲆系,可以满足实验动物的要求,用于海洋环境污染的相关研究。

2.3.2 杂合克隆的制备 雌雄双单倍体或者纯合克隆系之间的杂交,就可以产生杂合克隆(heterozygous clone, hetero-clongs)。杂合克隆系个体间基因型完全一致,其基因型为父本基因型与母本基因型的结合。作者已经制备若干牙鲆杂合克隆系^[7, 76]。在进行温度对杂合克隆牙鲆性别分化、性比和生长的影响的研究中,唐晓阳等^[77]发现在 16℃、19℃、22℃、25℃、28℃ 和 31℃ 水温中培育的杂合克隆牙鲆均为雌鱼,未发现雄鱼。这一结果表明杂合克隆牙鲆性别不易受高水温影响,具有与普通雌核发育二倍体不同的性别保守性;同时杂合克隆牙鲆在 25℃ 时生长最快。杂合克隆牙鲆的上述两项特性为选育快速生长又全雌性新品种提供了广阔的空间。

杂合克隆在育种上具有巨大的优势。首先是克隆性,个体间基因型完全一致,表型具有相当高的一致性。其次是杂合性,它比纯合型更具对环境的适应能力;它具有极强的杂种优势,集中了父母本的遗传特征和优良性状;第三,具有实现定向选育的可能性,鉴于纯合克隆或双单倍体的等位基因不分离特性,根据父母本的性状可以定向选育出后代,改善传统选育中杂交后代性状分离的不稳定性。

综上所述,纯合克隆和杂合克隆系的成功制备可以为牙鲆遗传研究提供新材料,并开拓牙鲆克隆育种的新方向,同时为鱼类遗传育种研究提

供新思路和新途径。

3 雌核发育育种体系

通过十余年的牙鲆雌核发育诱导及良种选育研究,我们对雌核发育的认识不断深化,发现雌

核发育是一种非常有效的鱼类良种选育方法,以雌核发育技术为基础,构建“鱼类雌核发育育种体系”,可以加快鱼类良种化进程,提高选育效率。该育种体系具体包括全雌化、良种化和克隆化三部分内容(图 1)。

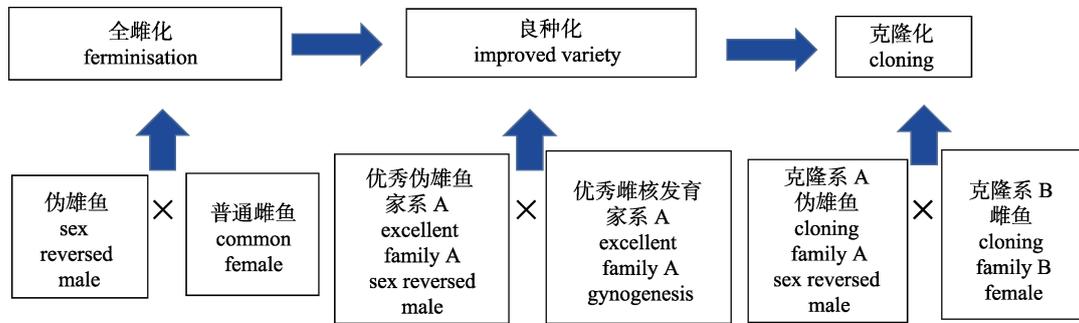


图 1 鱼类雌核发育育种体系示意图
Fig. 1 Illustration of gynogenesis breeding system of fish

3.1 全雌化

通过诱导雌核发育和诱导伪雄鱼,两者交配即可实现雌性单性化。关键是诱导伪雄鱼,只要伪雄鱼诱导成功,即可实现雌性化苗种规模化生产。对养殖者不增加任何负担,操作简便,且由于个体均匀,遗传相似度高;成活率高,彼此互相残食少,更加容易饲养。此方法对于雌性个体比雄性大的种类尤其有效和必要,用此方法可以提高生长速度的 20%。

3.2 良种化

通过雌核发育家系优选,用优秀的雌核发育家系和伪雄鱼家系杂交,可以得到“单交种”(single hybrid)。对单交种进行优选,即可获得优良品种(可以作为审定新品种的候选材料)。单交种是作物育种学名词,即两个近交系杂交而形成的后代。特点之一是杂种优势明显,可以最大限度发挥杂种优势;特点之二是规格均匀,生命力强。这两个特点对于良种选育都是至关重要的。玉米的大部分新品种都是通过单交种方法选育的。由于畜禽难以制备近交系,而不能利用近交系选育新品种。鱼类雌核发育家系相当于近交系,两个雌核发育家系杂交相当于单交种,既具有生长快的杂种优势,又具有规格整齐的特点。‘北鲆 2 号’选育结果证明生长速度可以提高 35%以上。

因此,通过雌核发育家系杂交生产单交种,是选育性状优良新品种便捷而有效的途径。单交种方法不但适用于雌大雄小的种类,对于雌雄个体差异不大的种类也同样有效,因为单交种方法不但满足了雌性单性化的目的,还可以同时获得杂种优势明显和规格整齐两大特点,从而满足良种选育目的。雌核发育一代的遗传相似度相当于近交 8~10 代,近交系杂交产生的单交种,两代即可完成,从而大幅度地缩短选育周期,而利用传统方法则需要付出巨大的经济代价(场地、人力、财力)和时间代价(数代)。从这些特点可以看出,雌核发育育种可以大幅度缩短选育周期,高效地实现选育目标,具有现行的其他育种方法不可比拟的优越性。

3.3 克隆化

第一代诱导有丝分裂雌核发育,第二代诱导减数分裂雌核发育,即可制备纯合克隆系。两个纯合克隆系杂交,即形成杂合克隆系。纯合克隆系是纯度最高的雌核发育家系,两个克隆系杂交可以最大限度地发挥杂种优势。双克隆杂交形成的杂合克隆,经过选育可以成为优良品种,其既具有杂合性,即杂种优势,又具有克隆性,即个体间完全一致。我们已经连续两年进行定性试验,在同样密度和培育条件下,杂合克隆系生长

速度是普通牙鲆的 2.2 倍, 即普通野生亲鱼杂交后代的体重为(67.86±21.05) g, 杂合克隆牙鲆家系体重(152.24±8.69) g, 且规格整齐, 成活率高, 全部为雌性(未发表)。这些数据表明牙鲆生长速度选育的空间很大, 杂合克隆的育种潜力很大。

克隆化是良种化的进一步提升。亲本的克隆特性确保了控制优良性状基因的稳定遗传, 不会出现代间及后代群体内性状分离的现象。克隆化的实现, 对育种的精细化、工程化以及商业化具有重要意义。克隆化的基础, 就是雌雄双单倍体的诱导以及扩繁。在牙鲆上, 我们可以批量制备雌雄双单倍体, 并建立相应的克隆系; 通过克隆系间的杂交, 建立了杂合克隆系。我们深信, 在不远的将来必定会通过雌核发育育种技术实现牙鲆优良品种的克隆化。

雌核发育育种体系不但适用于鲆鲽鱼类, 也适用于其他鱼类, 包括淡水鱼类。雌核发育育种不仅是选育良种的好方法, 同时也能为遗传作图、QTL 定位以及基因组学研究等提供理想的材料。

4 展望

通过多年的育种实践及观察, 雌核发育在牙鲆遗传改良中的优势已经显现出来。目前, 我们正在进行雌核发育育种体系中的克隆化研究, 并已取得良好进展。虽然克隆育种还有许多技术性问题需要解决, 如诱导双单倍体成功率低; 克隆鱼培育困难, 成活率低; 克隆鱼可育率低等问题存在。但随着研究的深入和技术的进步, 这些问题正逐步解决。以双单倍体诱导成功率低为例, 通过研究发现, 诱导率和亲本纯合度之间存在极显著的相关关系, 即随着母本纯合度的提高, 双单倍体诱导成功率呈上升趋势^[78]。在发现此规律之后, 我们在 2015 年进行双单倍体诱导时, 先对母本的纯合度进行筛选, 挑选纯合度高的母本进行诱导, 结果 6 月龄双单倍体幼鱼存活数量已达到万余尾, 从而有效地解决了双单倍体诱导成活率低的难题^[79]。

基于染色体操作技术的雌核发育诱导, 是细胞工程育种技术在鱼类育种上的具体体现。诱导雌核发育所制备的近交系、双单倍体以及克隆系

不但可以为选择育种和杂交育种提供优质的育种材料, 而且可以为全基因组解析和基因组编辑等现代生物技术提供理想的实验材料。从育种学角度讲, 基因组解析及编辑是从基因水平解决性状优化问题, 而诱导雌核发育是从染色体水平解决性别控制问题和性状优化问题, 两者既不矛盾, 也不能互相代替。对于经过基因修饰的群体, 仍具有进一步单性化、良种化和克隆化的空间。因此, 细胞工程、基因工程等现代生物技术与传统育种技术相结合, 无论对解析生物学机理还是选育新品种都具有广阔的应用前景。

致谢: 在关于牙鲆雌核发育研究中, 以中国水产科学研究院北戴河中心实验站杨立更站长为首的技术团队和刘永新等研究生做出重要贡献, 在此一并致谢!

参考文献:

- [1] Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review[J]. *Aquaculture*, 2007, 269(1-4): 150-173.
- [2] Hubbs C, Hubbs L. Apparent parthenogenesis in nature in a form of fish of hybrid origin[J]. *Science*, 1932, 76(1983): 628-630.
- [3] Ozima Y, Makino S. Formation of the diploid egg nucleus in the refrigerated carp egg[J]. *Gen Genet Syst*, 1943, 19(3): 55-60.
- [4] Purdom C E. Radiation induced gynogenesis and androgenesis in fish[J]. *Heredity*, 1969, 24(3): 431-444.
- [5] Cherfas N B. Investigation of radiation-induced diploid gynogenesis in the carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Sov Gen*, 1975, 11(7): 867-874.
- [6] Nagy A, Rajki K, Horváth L, et al. Investigation on carp, *Cyprinus carpio* L. gynogenesis[J]. *J Fish Biol*, 1978, 13(2): 215-224.
- [7] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et al. Schlegel)[J]. *Aquaculture*, 1999, 173(1-4): 235-246.
- [8] Kazuo Tabata, Shigeaki Gorie, Kazuhiko Nakamura. Induction of gynogenetic diploid in hirame *Paralichthys olivaceus*[J]. *Japan Soc Sci Fish*, 1986, 52(11): 1901-1904. [田畑和男, 五利江重昭, 中村一彦. 紫外線によるヒラメの雌性発生 2 倍体の誘起条件[J]. *日本水産学会誌*, 1986, 52(11): 1901-1904.]

- [9] Fan Z T, Song S X. Gynogenesis, androgenesis and hybridogenesis in fishes[J]. Journal of Fisheries of China, 1993, 17(2): 179–186. [范兆廷, 宋苏祥. 鱼类的雌核发育、雄核发育和杂种发育[J]. 水产学报, 1993, 17(2): 179–186.]
- [10] Tabata T, 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(11): 1867–1872.
- [11] Wang W, You F, Gao T X, et al. Microsatellite markers analysis on artificial meiogynogenetic stock of *Paralichthys olivaceus*[J]. Chinese High Technology Letters, 2005, 15(7): 107–110. [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.]
- [12] Yamakawa T, Matsuda H, Tsujigado A. Optimum dose of UV irradiation for induction of gynogenesis in flounder *Paralichthys olivaceus* using red sea bream sperm[J]. Bull Fish Res Inst Mie, 1987, 2: 51–53.
- [13] Ge W, Zhang Q Q, Qi J, et al. Gynogenesis induced by heterogenous sperms and cold shock in olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2005, 35(6): 133–138. [戈文龙, 张全启, 齐洁, 等. 异源精子诱导牙鲆雌核发育二倍体[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(6): 133–138.]
- [14] Tian Y S, Wang D, Wang L, et al. Construction and genetic analysis of gynogenetic clone and inbreeding strain of F1 generation families for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2011, 33(3): 114–123. [田永胜, 汪娣, 王磊, 等. 牙鲆 F1 代近交系、雌核发育系的建立及遗传检测[J]. 海洋学报, 2011, 33(3): 114–123.]
- [15] Jiang Y G, Yu H X, Chen B D, et al. Artificial and natural gynogenesis in crucian carp[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1982, 7(4): 471–477. [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.]
- [16] Ye Y Z, Wu C J, Chen R D. Study on γ -ray (^{60}Co) induced androgenesis in fishes[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1990, 14(1): 91–92. [叶玉珍, 吴清江, 陈荣德. ^{60}Co - γ 射线诱导鱼类雄核发育的研究[J]. 水生生物学报, 1990, 14(1): 91–92.]
- [17] Roashov D D, Belyaeva V N. Cytology of radiation gynogenesis and androgenesis in the loach (*Misgurnus fossilis* L.)[J]. Dokl Akad Nauk SSSR, 1964, 157(4): 503–506.
- [18] Arai K, Onozato H, Yamazaki F. Artificial androgenesis induced with gamma irradiation in masu salmon, *Oncorhynchus masou*[J]. Hokkaido University: Bulletin of the Faculty of Fisheries, 1979, 30: 181–186.
- [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] Chourrout D, Quillet E. Induced gynogenesis in the rainbow trout: sex and survival of progenies and production of all triploid populations[J]. Theoret Appl Gen, 1982, 63(3): 201–205.
- [21] Friedberg E C. DNA Repair[M]. 2nd edn. New York: W H Freeman and Company, 1985.
- [22] Cieminis K G K, Ranc-Elinedot V M, Prijalgauskienedot A J, et al. Chromosome and DNA damage and their repair in higher plants irradiated with short-wave ultraviolet light[J]. Mutat Res Fundam Molec Mechan Mutagen, 1987, 181(1): 9–16.
- [23] Palti Y, Li J Y, Thorgaard G H. Improved efficiency of heat and pressure shocks for producing gynogenetic rainbow trout[J]. Progre Fish-Cult, 1997, 59(1): 1–13.
- [24] Komen J, Duynhouwer J, Richter C. Gynogenesis in common carp *Cyprinus carpio* L. I: effects of genetic manipulation of sexual products and incubation conditions of eggs[J]. Aquaculture, 1988, 69(3–4): 227–240.
- [25] Foisil L, Chourrout D. Chromosome doubling by pressure treatment for tetraploidy and mitotic gynogenesis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: re-examination and improvements[J]. Aqu Fish Manag, 1992, 23(5): 567–575.
- [26] Arai K, Masaoka T, Suzuki R. Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58(7): 1197–1201.
- [27] Quillet E. Survival, growth and reproductive traits of mitotic gynogenetic rainbow trout females[J]. Aquaculture, 1994, 123(3–4): 223–236.
- [28] Lin F D, Abrowski K. Androgenesis and homozygous gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*): evaluation using flow cytometry[J]. Molec Reprod Dev, 1998, 49(1): 10–18.
- [29] 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(1–4): 115–124.
- [30] You F, Xu J H, Ni J, et al. Study on artificial induction of mitogynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*[J]. Chinese High Technology Letters, 2008, 18(8): 874–880. [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.]
- [31] Liu H J, Hou J L, Chang Y M, et al. Induced meiogynogene-

- sis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by sperm of red sea bream (*Pagrus major*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 508–514. [刘海金, 侯吉伦, 常玉梅, 等. 真鲷精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 508–514.]
- [32] Liu H J, Wang C A, Zhu X C, et al. Embryonic development of gynogenetic diploid and triploid Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(3): 161–167. [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.]
- [33] John G, Reddy P V G. Artificial gynogenesis in two indian major carps, *Laheo rohita* (Ham.) and *Catla catla* (Ham.)[J]. Aquaculture, 1984, 42(2): 161–168.
- [34] Wu C J, Chen R D, Ye Y Z, et al. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line[J]. Acta Genetica Sinica, 1981, 8(1): 50–55. [吴清江, 陈荣德, 叶玉珍, 等. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究[J]. 遗传学报, 1981, 8(1): 50–55.]
- [35] Refstie T, Vassvik V, Gjedrem T. Induction of polyploidy in salmonids by Cytochalasin B[J]. Aquaculture, 1977, 10(1): 65–74.
- [36] Lou Y D. Fish Breeding[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 1–357. [楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 1–357.]
- [37] Tabata T, Gorie S, Nakamura K. Induction of gynogenetic diploid in hirame *Paralichthys olivaceus*[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1986, 52(11): 1901–1904.
- [38] Tabata S, Gorie T. Effective range of cold shock on induction of gynogenetic diploid in hirame *Paralichthys olivaceus*[J]. Bulletin of the Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, 1987, 25: 33–35.
- [39] Yamamoto E H R M. Progeny test of methyltestosterone-induced males of gynogenetic diploids and normal diploids in the hirame flounder, *Paralichthys olivaceus*, with evidence for the male heterogamety[J]. Bulletin of the Tottori Prefectural Fisheries Experimental Station, 1992, 33: 9–17.
- [40] Xu C, Wang K L, Xu Y L, 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. [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.]
- [41] Zhu X C, Liu H J, Sun X W, et al. Assessment of homozygosity in gynogenetic diploid using microsatellite markers in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Zoological Research, 2006, 27(1): 63–67. [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.]
- [42] Liu H J, Liu Y X, Wang Y F, 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. [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.]
- [43] Wang G X, Liu H J, Zhang X Y, et al. Analysis of homozygosity and genetic similarity between two successive generations in a meiogynogenetic Japanese flounder family[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(3): 381–389. [王桂兴, 刘海金, 张晓彦, 等. 牙鲆连续两代减数分裂雌核发育家系的遗传特征[J]. 中国水产科学, 2012, 19(3): 381–389.]
- [44] Hou J L, Li C, Wang G X, et al. Analysis of genetic structure of three third-generation of successive meiogynogenetic families in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Engineering Sciences, 2014, 16(9): 26–32. [侯吉伦, 李超, 王桂兴, 等. 牙鲆连续三代减数分裂雌核发育家系的遗传特征分析[J]. 中国工程科学, 2014, 16(9): 26–32.]
- [45] 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.
- [46] Sakao S, Fujimoto T, Tanaka M. Aberrant and arrested embryos from masu salmon eggs treated for tetraploidization by inhibition of the first cleavage[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2003, 69(5): 738–748.
- [47] Zhang X L, Onozato H. Hydrostatic pressure treatment during the first mitosis does not suppress the first cleavage but the second one[J]. Aquaculture, 2004, 240(1–4): 101–113.
- [48] Zhu X P, You F, Zhang P J, et al. Effects of cold shock on microtubule organization and cell cycle in gynogenetically activated eggs of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Mar Biotechnol, 2006, 8(3): 312–318.
- [49] Zhu X P, You F, Zhang P J, et al. Effects of hydrostatic pressure on microtubule organization and cell cycle in gynogenetically activated eggs of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Theriogenology, 2007, 68(6): 873–881.
- [50] Hou J, Wang G, Zhang X, et al. Cytological studies on induced mitogynogenesis in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel)[J]. Zygote, 2016, 24(5): 700–706.
- [51] Wu Z Q. Genetics and Breeding in Aquaculture[M]. Xiamen:

- Xiamen University Press, 1991: 152–157. [吴仲庆. 水产生物遗传育种学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1991: 152–157.]
- [52] Wang J M, Shen Q Q, Yang J M, et al. Doubled haploid production and its application in barley breeding[J]. *Barley Science*, 2002, 4(1): 10–13. [汪军妹, 沈秋泉, 杨建明, 等. 大麦加倍单倍体(DH 群体)的建立及其在遗传育种中的应用[J]. *大麦科学*, 2002, 4(1): 10–13.]
- [53] Zhuang Y, Lan X, Wang Z G, 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. [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*, 2010, 40(6): 96–102.]
- [54] Liu Y X, Wang G X, Liu Y, et al. Genetic verification of doubled haploid Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* by genotyping telomeric microsatellite loci[J]. *Aquaculture*, 2012, 324(1): 60–63.
- [55] Liu H J, Lu G, Wang X M, et al. Identification of mitogynogenetic Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using microsatellite marker[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(5): 889–894. [刘海金, 陆桂, 王晓梅, 等. 有丝分裂雌核发育牙鲆的微卫星鉴定[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(5): 889–894.]
- [56] Liu Y X, Han H Z, Wang Q L, et al. Choice of microsatellite markers for identifying homozygosity of mitotic gynogenetic diploids in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fish Biol*, 2013, 82(2): 588–599.
- [57] Kazuo TABATA, Shigeaki GoRIE, Yoshihiro KAWAMURA. Growth, survival and maturation in the induced triploid hiram *Paralichthys olivaceus*[J]. *Suisanzoshoku*, 1989, 36(4): 267–276.
- [58] You F, Liu J. Karyotype evidences of triploidy in the left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus* (T. & S.)[J]. *Oceanologia et limnologia Sinica*, 1995, 26(5): 115–118. [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.]
- [59] Yi Q L, Yu H Y, Wang X L, et al. Production of viable tetraploid olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by hydrostatic pressure shock[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(2): 382–388. [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.]
- [60] Wang L, Chen S L, Xie M S, 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. [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.]
- [61] Arai K. Genetic improvement of aquaculture fin fish species by chromosome manipulation techniques in Japan[J]. *Aquaculture*, 2001, 197(1–4): 205–228.
- [62] Falconer D S, Mackay T F C. Introduction to Quantitative Genetics[M]. Harlow, UK: Longman Group Ltd, 1989.
- [63] Zou X G, Tan J H, Yang Z M, et al. Mammalian cloning and its application prospects[J]. *Progress in Biotechnology*, 2000, 20(5): 5–11. [邹贤刚, 谭景和, 杨增明, 等. 哺乳动物克隆及其应用前景[J]. *生物工程进展*, 2000, 20(5): 5–11.]
- [64] Casellas J. Inbred mouse strains and genetic stability: a review[J]. *Animal*, 2011, 5(1): 1–7.
- [65] Grimholt U, Johansen R, Smith A J. A review of the need and possible uses for genetically standardized Atlantic salmon (*Salmo salar*) in research[J]. *Lab Anim-UK*, 2009, 43(2): 121–126.
- [66] Naruse K, Ijiri K, Shima A, et al. The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *J Exp Zool*, 1985, 236(3): 335–341.
- [67] Komen J, Bongers A B J, Richter C J J, et al. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). II. The production of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids[J]. *Aquaculture*, 1991, 92(2–3): 127–142.
- [68] Kobayashi T, Ide A, Hiasa T, et al. Production of Cloned Amago Salmon *Oncorhynchus rhodurus*[J]. *Fisheries Sci*, 1994, 60(3): 275–281.
- [69] Hussain M G, Penman D J, McAndrew B J, et al. Suppression of first cleavage in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. — a comparison of the relative effectiveness of pressure and heat shocks[J]. *Aquaculture*, 1993, 111(1–4): 263–270.
- [70] Valle G D, Taniguchi N. Genetic variation of some physiological traits of clonal ayu (*Plecoglossus altivelis*) under stressed and non-stressed conditions[J]. *Aquaculture*, 1995, 137(1–4): 193–202.
- [71] Kato K, Hayashi R, Yuasa D, et al. Production of cloned red sea bream, *Pagrus major*, by chromosome manipulation[J]. *Aquaculture*, 2002, 207(1–2): 19–27.
- [72] Liu Y X, Wang G X, Liu Y, et al. Production and confirmation of clones using gynogenesis in Japanese flounder[J]. *Afr Biotechnol*, 2011, 10(57): 12142–12146.
- [73] Hou J L, Wang G X, Zhang X Y, et al. Production and verification of a 2nd generation clonal group of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Sci Rep-UK*, 2016, 6: 35776.
- [74] Jiang H B, Wang G X, Liu H J, et al. Comparative hematological analysis of clonal and common Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(2): 260–265. [姜宏波, 王桂兴, 刘海金, 等. 克隆牙鲆和普通牙鲆血液生理生化指标的比较[J]. 中

- 国水产科学, 2014, 21(2): 260–265.]
- [75] Jiang H B, Wang G X, Liu H J, et al. Acute toxicity of Hg^{2+} to clonal and common Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(3): 68–73. [姜宏波, 王桂兴, 刘海金, 等. Hg^{2+} 对克隆牙鲆和普通牙鲆的急性毒性[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 68–73.]
- [76] Liu Y X, Wang G X, Liu Y, et al. Production and verification of heterozygous clones in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* by microsatellite marker[J]. Afr J Biotechnol, 2011, 10(75): 17088–17094.
- [77] Tang X Y, Jiang H B, Liu H J, et al. Effects of rearing temperature on sex differentiation, sex ratio, and growth in heterozygous of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(1): 164–168. [唐晓阳, 姜宏波, 刘海金, 等. 温度对杂合克隆牙鲆性别分化、性比和生长的影响[J]. 中国水产科学, 2015, 22(1): 164–168.]
- [78] Jiang H B, Liu H J, Wang G X, et al. Fast development of genetically uniform strains by gynogenesis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Aquac Res, 2017, 48(5): 2032–2038.
- [79] Zhang X, Hou J, Wang G, et al. Mass production of doubled haploids in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. J Fish Biol, under review.

Gynogenesis in Japanese flounder: A review

LIU Haijin¹, HOU Jilun², LIU Yi³

1. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;
2. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;
3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China

Abstract: The Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is an economically important marine fish that has been widely cultured in Japan, Korea, and China. The growth rate of females is significantly higher than that of males; production of all-female Japanese flounder populations for aquaculture has considerable advantages for improving yield and economic benefit. Gynogenesis is a type of parthenogenesis whereby homologous or heterologous sperms penetrate into the eggs and trigger embryogenesis; however, the sperm nucleus does not fuse with an egg nucleus to form a zygote. Thus, gynogenetic individuals inherit only maternal genetic information. In this review, we introduce the recent progresses of artificial introduction of gynogenesis in Japanese flounder. First, we describe the methods of meiogynogenesis and mitogynogenesis. Next, we review the applications of gynogenesis in Japanese flounder, such as sex control and production of clones. Finally, we propose a breeding system using gynogenesis and discuss its potential applications in the genetic improvement and breeding of new variations in fish.

Key words: Japanese flounder; gynogenesis; doubled haploid; clone; single hybrid

Corresponding author: LIU Haijin. E-mail: liuhaijin2005@126.com