

真鲷精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育

刘海金^{1*}, 侯吉伦², 常玉梅³, 薛玲玲¹, 王玉芬⁴

(1. 中国水产科学研究院, 北京 100141;

2. 东北农业大学动物科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

3. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

4. 中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100)

摘要:采用真鲷精子激活牙鲆卵子,经(0±0.5)℃冷休克处理,诱导了牙鲆减数分裂雌核发育。灭活真鲷精子,紫外线照射剂量3.4 mJ/cm²时孵化率最低;随着照射剂量的增加,孵化率恢复,照射剂量73 mJ/cm²时,孵化率最高,呈现典型的 Hertwig 效应。用流式细胞仪检测倍性,未经冷休克处理的胚胎全部为单倍体,经冷休克处理的均为二倍体,表明精子灭活有效。冷休克实验结果表明,冷休克起始时间2~5 min均有效,以3 min为最好;冷休克持续时间30~90 min均有效,以45 min为最好。综合两项因素,授精3 min后,休克时间持续45 min组的授精率和孵化率均为最高,与其他处理组差异显著(P<0.05)。RAPD分析结果显示,异源精子的遗传信息未在雌核发育二倍体的电泳图中出现,表明其遗传信息没有传递给子代。

关键词:牙鲆;真鲷;减数分裂;雌核发育;异源精子;冷休克

中图分类号:Q 78;S 917

文献标识码:A

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)广泛分布于俄罗斯远东海域、日本、朝鲜半岛及我国沿海地区,为冷温性大型经济鱼类。随着海水鱼类养殖技术的进步,牙鲆近年已经成为沿海的重要养殖对象。牙鲆雌性个体生长速度比雄性明显快,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^[1]。因此,实现牙鲆雌性单性化养殖,对于提高养殖产量和经济效益具有重要意义。

雌核发育是一种控制鱼类性别的有效方法。关于牙鲆雌核发育的研究,田畑等^[2-3]探讨了精子灭活和使染色体加倍的冷休克方法,提出了有效诱导雌核发育的条件。关于雌核发育二倍体成功性的证明,除了一般采用的检查染色体数目之外,还可等采用同工酶标记鉴定了雌核发育的有效性^[2-3]。山本^[1]用鳃盖组织移植和DNA指纹图谱方法证实了有丝分裂雌核发育的成功。

鱼类卵子在第二次减数分裂中期排出体外,在受精作用下释放第二极体。在灭活精子刺激后,采用冷休克或压力方法抑制第二极体排出诱导雌核发育,称为减数分裂雌核发育(meiogynogenesis)。关于牙鲆减数分裂雌核发育,国内已经有采用牙鲆同源精子和石鲈(*Kareius bicoloratus*)异源精子诱导的相关报道^[4-5];朱晓琛等^[6]对减数分裂与有丝分裂的纯合度进行了比较;Hou等^[7]对其授精细胞学过程进行了详细的观察;但是,对用真鲷(*Pagrus major*)作为异源精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育的条件及效果尚未见到详细报道。

本研究优化了真鲷精子激活牙鲆卵子及诱导其雌核发育的条件,并用流式细胞仪证明了诱导个体的二倍性,用随机片段多态性(RAPD)标记证明了灭活真鲷精子诱导效果的可靠性。

1 材料与方法

1.1 精卵的获得

实验用鱼为中国水产科学研究院北戴河中心实验站人工养殖的牙鲆雌鱼和真鲷雄鱼。轻挤雄性真鲷的腹部获得精子,存储于注射器中。轻挤雌性牙鲆的腹部获得卵子,存储于烧杯中。所采集的精子 and 卵子在需要时进行处理或授精。

1.2 UV 照射

真鲷精液用 Ringer 氏液以 1:50 的比例进行稀释。稀释后的精液在 15 W × 2 的 UV 灯管 (Toshiba, Japan) 下进行照射。为了证实 Hertwig 效应,照射时间分别设定为 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 s 11 个梯度,用紫外线辐射计 (VLX-3W, Cole Parmer Instrument Company, Illinois, USA) 测定每一设定剂量下的实际辐射量,其剂量分别为 0, 1.4, 3.4, 7.2, 13.0, 25.0,

37.0, 55.0, 73.0, 92.0, 110.0 mJ/cm²。照射后的精液在显微镜下检查,确认充分活跃后,每组分别取 0.1 mL 照射后的精液与 1 mL 同一尾牙鲆的卵子授精,授精水温为 (16 ± 0.5) °C (下同),授精后卵子在 1 L 的烧杯中孵化,孵化水温 (17 ± 0.5) °C,每组设 3 个平行,统计孵化率。通过上述试验获得精子最佳灭活时间。

1.3 冷休克实验

根据 UV 照射梯度实验的结果,将真鲷精子的照射剂量设为 73 mJ/cm²,冷休克温度设定为 (0 ± 0.5) °C。冷休克起始时间为授精后 2, 3, 4, 5 min,冷休克持续时间为 30, 45, 60, 75 min (表 1)。另外设一组单倍体对照。每组分别取 0.1 mL 照射后的精液与 1 mL 同一尾牙鲆的卵子授精,冷休克处理后授精卵在 1 L 的过滤海水中孵化,孵化水温 (17 ± 0.5) °C。每实验组设 3 个平行,按刘海金等^[8]的方法统计授精率和孵化率。

表 1 冷休克起始时间和持续时间梯度

Tab.1 Cold shock gradient of initiation time and duration time

起始时间 (min) initiation time	持续时间 (min) duration time			
	30	45	60	75
2	2min/30min	2min/45min	2min/60min	2min/75min
3	3min/30min	3min/45min	3min/60min	3min/75min
4	4min/30min	4min/45min	4min/60min	4min/75min
5	5min/30min	5min/45min	5min/60min	5min/75min

1.4 倍性鉴定

用流式细胞仪 Ploidy Analyzer (Partec GmbH, Münster, Germany) 检测孵化后一天仔鱼的相对 DNA 含量,从而确定其倍性。将每一条仔鱼置于洁净的培养皿上,加 0.5 mL 含 DAPI (4',6'-deamidino-2-phenylindole) 的 CyStain DNA 1step 染液 (Partec GmbH, Münster, Germany),用镊子将仔鱼研碎,使细胞游离,再加 1.5 mL 的 CyStain DNA 1step 染液,在室温下培育 5 min。然后将样品用 Partec 30 μm cellTrics disposable filter (Partec GmbH, Münster, Germany) 过滤,上机测试。普通二倍体的相对 DNA 含量作为二倍体标准。

1.5 雌核发育二倍体的 RAPD 分析

由于采用的是真鲷精子,RAPD 引物的合成参照孟宪红等^[9]采用的真鲷多态性 RAPD 引物 16 个,以及徐成^[10]报道的牙鲆多态性引物 19 个

和本实验室合成的引物 25 个。待雌核发育子代生长约 2 个月后,分别采集每家系子代各 20 尾,母本和父本剪取部分鳍条。置剪取的鳍条于裂解液 (0.5 mol/L EDTA pH 8.0, 200 μg Proteinase K, 0.5% Sarcosyl) 中,50 °C 消化 2 ~ 3 h,之后采用常规酚氯仿抽提法抽提一次,透析除盐 16 h,70% 乙醇洗涤两次,室温干燥,并加入适量的 1/10 TE 溶解,所提取的基因组 DNA 于 4 °C 下保存备用。将每个家系 20 尾子代的 DNA 混成一个基因池,RAPD-PCR 扩增及电泳条件依常玉梅等^[11]进行。

1.6 统计分析

授精率为原肠期的正常胚数与总授精卵数之比;孵化率为孵化个体数与原肠期正常胚胎数之比。用 SAS V8 (SAS Institute, Cary, NC, USA) 进行单因子方差分析和统计分析,并做 Duncan 氏多重比较。

2 结果

2.1 Hertwig 效应

在一定照射剂量范围内,经真鲷精子激活的授精卵孵化率随剂量不同而显著波动(图1)。0剂量组的孵化率为 $60.6\% \pm 2.9\%$,而 1.4 mJ/cm^2 剂量组的孵化率则下降为 $20.3\% \pm 3\%$, 3.4 mJ/cm^2 剂量组的孵化率最低为 $2.0\% \pm 0.1\%$ 。随后,在 $7.2 \sim 73 \text{ mJ/cm}^2$ 剂量范围内,孵化率随着照射剂量的增加,开始回升,当照射剂量达到 73 mJ/cm^2 时,孵化率达 $57.7\% \pm 3.1\%$,为所有照射组里最高,仅低于0剂量组,两者无显著差异($P > 0.05$)。之后,随照射剂量增加,孵化率下降。结果表明,真鲷精子在UV照射后授精卵的孵化率呈现典型的Hertwig效应。

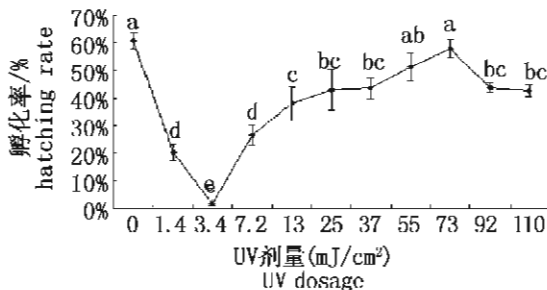


图1 UV照射梯度实验

图中不同小写字母者表示组间差异显著($P < 0.05$),标有相同小写字母的表示组间差异不显著($P > 0.05$)。

Fig.1 Result of UV irradiation gradient

The different low case letters in the figure are significantly different at the 0.05 probability level, and the same letters are not significant differences.

2.2 冷休克诱导条件

单倍体对照组的授精率和孵化率分别为 $91.0\% \pm 2.0\%$ 和 $64.7\% \pm 1.5\%$ 。在16个冷休克处理组里,冷休克起始时间为授精后3 min,持续时间45 min试验组的授精率 $80.7\% \pm 1.1\%$,孵化率 $57.3\% \pm 2.3\%$,均为最高,和其他处理组的差异显著($P < 0.05$)。当起始时间为5 min,持续时间75 min时,授精率和孵化率均降为最低,只有 $53.0\% \pm 1.0\%$ 和 $29.0\% \pm 2.0\%$ 。结果表明,所有试验组均有较高的授精率和孵化率;较之于持续时间,冷休克起始时间对授精率和孵化率的影响更为显著,起始时间3 min的授精率和孵化率都高于其他起始时间组(表2);牙鲆减数分

裂雌核发育的最佳诱导参数为授精后3 min开始冷休克处理,休克持续45 min。

表2 冷休克梯度实验结果

Tab.2 Result of cold shock time gradient

处理组 treatment	授精率(%) fertilization rate	孵化率(%) hatching rate
haploid	91.0 ± 2.0^a	64.7 ± 1.5^a
2min/30min	57.8 ± 4.2^{efg}	36.3 ± 4.0^{efgh}
2min/45min	54.3 ± 9.6^e	30.7 ± 4.5^{eh}
2min/60min	64.7 ± 1.5^{cdef}	34.0 ± 4.6^{fgh}
2min/75min	61.6 ± 2.1^{defg}	39.0 ± 3.6^{def}
3min/30min	71.5 ± 4.2^c	47.4 ± 7.1^c
3min/45min	80.7 ± 1.1^b	57.3 ± 2.3^b
3min/60min	66.3 ± 3.5^{cde}	49.5 ± 7.0^c
3min/75min	56.8 ± 3.8^{fg}	44.7 ± 6.5^{cd}
4min/30min	64.7 ± 9.3^{cdef}	39.0 ± 2.0^{def}
4min/45min	60.1 ± 6.7^{defg}	43.9 ± 2.1^{cde}
4min/60min	60.0 ± 6.1^{defg}	36.7 ± 4.5^{defgh}
4min/75min	62.1 ± 7.6^{defg}	38.4 ± 3.5^{defg}
5min/30min	69.0 ± 6.1^{cd}	39.6 ± 5.0^{def}
5min/45min	59.3 ± 5.5^{defg}	32.2 ± 4.0^{fgh}
5min/60min	62.3 ± 1.5^{cdefg}	34.7 ± 2.1^{fgh}
5min/75min	53.0 ± 1.0^e	29.0 ± 2.0^h

注:同列中有不同小写字母者表示组间差异显著($P < 0.05$),标有相同小写字母的表示组间差异不显著($P > 0.05$)。

Notes: The means with different low case letters in same column are significantly different at the 0.05 probability level, and the same letters are not significant differences.

2.3 倍性的鉴定

实验结果表明,牙鲆普通二倍体的相对DNA含量为51,用真鲷精子激活但未经冷休克处理的相对DNA含量为26(图2),约为普通二倍体的一半,即单倍体。说明真鲷精子的遗传物质被有效灭活。减数分裂雌核发育诱导组的相对DNA含量50,和普通二倍体对照组基本相同,结果证明雌核发育二倍体诱导成立。

2.4 RAPD 结果

采用60个RAPD引物分析两个雌核发育家系的亲本及子代,有14个引物在亲本中表达有差异,如引物S56和S126(图3)。凡雌亲鱼出现而雄亲鱼不具有的DNA条带(白箭头所示),雌核发育二倍体依然存在;而雄亲鱼出现而雌亲鱼不具有的DNA条带(黑箭头所示),雌核发育二倍体中不存在,说明在该14个RAPD引物所能覆盖的基因组内,雌核发育二倍体的遗传物质均来自母本,异源精子经紫外线灭活后,其遗传物质已被破坏,遗传信息没有传递给子代。

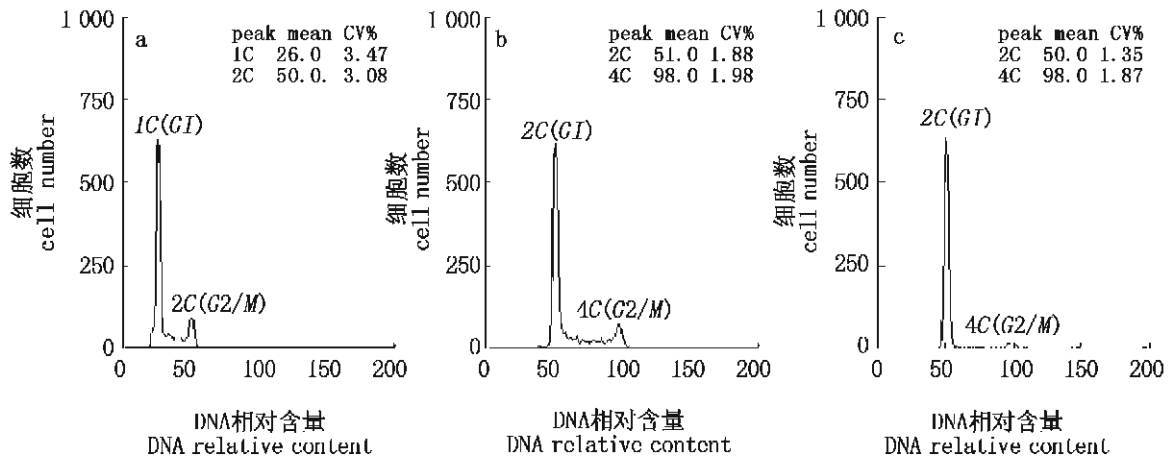


图2 倍性测定结果图

a:单倍体;b:普通受精二倍体;c:减数分裂雌核发育二倍体。

Fig.2 Patterns of ploidy analysis

a:haploid;b:diploid from normal fertilization;c:diploid from meionogogenesis.

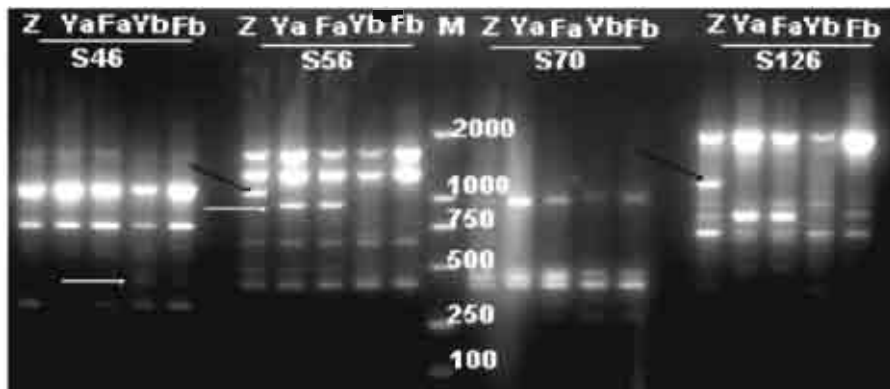


图3 4种引物的RAPD-PCR扩增电泳图

Z:真鲷(♂); Ya:牙鲆A(♀); Fa:雌核发育子代A; Yb:牙鲆B(♀); Fb:雌核发育子代B; M:标准分子量。

Fig.3 Electrophoresis pattern of PCR product of four RAPD primers

Z:Red sea bream(♂); Ya:Japanese flounder A(♀); Fa:Gynogenetic progeny A; Yb:Japanese flounder B(♀); Fb:Gynogenetic progeny B; M:Mark.

3 讨论

人工诱导雌核发育期望最大限度地避免父本遗传物质的参入,以保持母本的遗传特征。诱导鱼类雌核发育,一般选用异源精子来激活卵子^[12-14]。本研究选用了真鲷作为异源精子,经UV照射后去激活牙鲆卵子。根据传统分类学,真鲷和牙鲆的遗传关系属于远缘,前者属于鲈形目,而后者属于鲽形目^[15]。两种间杂交的胚胎呈现单倍体综合征,脊椎和尾部多处弯曲,均为畸形;杂交胚出膜后即死亡,不能存活。因此,异源精子可以有效避免精子灭活不彻底形成正常受精

的可能性。RAPD分析结果显示,在14个RAPD引物所能覆盖的基因组内,雌核发育后代的电泳图上未发现父本特异性条带,而与母本完全相同,证明所检测的位点无父本遗传物质的掺入。

在一定剂量范围内,精子随着照射剂量增大,胚胎的孵化率降低甚至全部死亡,但随着照射剂量的继续增加,胚胎的孵化率随之恢复,这被称之为 Hertwig 效应。UV照射对真鲷精子的作用呈现了典型的 Hertwig 效应。对于其原因,有的学者解释,UV照射对DNA的主要作用是使相邻嘧啶二聚化,产生DNA-DNA以及DNA-蛋白质交联,还可以导致胞嘧啶水合物的形成和碱基对

的置换,最终导致染色体断裂^[16]。但是对于说明形成波动的原因,尤其是经历最低之后,受精率又得以恢复的理由,尚缺乏充分的证据及有说服力的解释。

本研究中真鲷精子 UV 照射的最佳剂量为 73 mJ/cm²。鱼类精子的 UV 最佳照射剂量依鱼种而不同,甚至在同种鱼内,研究者报道的数据也有不同。Vázquez 等^[17]报道大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)精子最佳照射剂量为 870 mJ/cm²,而 Piferrer 等^[18]报道则为 300 mJ/cm²。对于真鲷精子,Tabata^[19]报道的最佳剂量为 48 mJ/cm²,Yamamoto^[20]的结果为 45.6 mJ/cm²,本研究结果与其接近。尤锋等^[21]对牙鲆精子的最佳灭活剂量为 360 mJ/cm²,(原文为 3.6×10^{-3} J/mm²),产生这种照射剂量变化的原因除精液稀释的倍数以及照射精液的厚度不同外,照射时的温度可能是重要影响因子之一。紫外线的强度与温度呈正相关关系,尤锋等^[21]置精液于 0~2℃的预冷培养皿内,而田畑等^[2-3]研究置于 15℃左右的常温下,不同的温度对紫外线辐射效果将产生影响。在不同温度下,灭活精子所需剂量差别如此之大是值得注意的问题。可见,不同辐射剂量对精子遗传物质的破坏作用尚需深入研究。

关于雌核发育鱼的倍性检测,一般采用染色体核型分析法^[22-23],红细胞核面积法^[13,22],核仁银染法^[22-23]。Tvedt 等^[24]用微卫星标记法检测了大西洋鳕人工诱导雌核发育二倍体和三倍体的倍性,结果是,雌核发育二倍体具有和母本相同的两个等位基因,而三倍体具有 3 个等位基因,因此证明了人工染色体操作所获得仔鱼为雌核发育二倍体。用流式细胞仪检测倍性,也有较多报道^[17,25]。较之于其他几种方法,流式细胞法具有快速、高效、操作简便、灵敏度高等特点。流式细胞仪检测的细胞数都在 3 000 个以上,而且可以区别两个细胞间 DNA 含量 5% 的微小差异,从样品处理到得出检测结果,只需要几分钟时间,所检测的材料可为鱼体的任何组织,甚至可以是未出膜的受精卵。本研究用流式细胞仪检测的结果表明,灭活的精子激活而未做冷休克处理的卵子为单倍体,经冷休克处理的为二倍体,证实了雌核发育的成立。

参考文献:

- [1] 山本栄一. ヒラメの人為的性制御とクローン集団作出に関する研究[J]. 鳥取県水産試験場報告,1995,34(1):1-145.
- [2] 田畑和男,五利江重昭,中村一彦. ヒラメの雌性発生のための人工授精技術の検討[J]. 兵庫県水産試験場研報,1986,24(1):19-27.
- [3] 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.
- [4] 刘静,尤锋,王新成,等. 人工诱导雌核发育牙鲆的染色体及核型证明[J]. 海洋与湖沼,1999,30(1):68-72.
- [5] 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):1011-1016.
- [6] 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.
- [7] Hou J L, Sun Z H, Liu H J, et al. Cytological studies on induced meiogynogenesis in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. Aquacult Res, 2009, 40(6): 681-686.
- [8] 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.
- [9] 孟宪红,孔杰,庄志猛,等. 真鲷自然群体和人工繁殖群体的遗传多样性[J]. 生物多样性,2000,8(3):248-252.
- [10] 徐成. 牙鲆雌核发育分析鉴定与性别决定机制研究[D]. 青岛:中国科学院海洋研究所,2000:1-129.
- [11] 常玉梅,孙效文,梁利群. 鲤鱼耐寒性状研究[J]. 上海水产大学学报,2003,12(2):102-105.
- [12] Morgan A J, Murashige R, Woolridge C A, et al. Effective UV dose and pressure shock for induction of meiotic gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) using black sea bass (*Centropristis striata*) sperm [J]. Aquaculture, 2006, 259(1-4):290-299.
- [13] Luckenbach J A, Godwin J, Daniels H V, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm [J]. Aquaculture, 2004, 237(1-4):499-516.

- [14] Xu J H, You F, Sun W, *et al.* Induction of diploid gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus* with left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus* sperm [J]. *Aquacult Int*, 2008, 16(6):623-634.
- [15] Tabata K. Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus* [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57(5):845-850.
- [16] Komen H, Thorgaard G H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review [J]. *Aquaculture*, 2007, 269(1-4):150-173.
- [17] Vázquez B, Fernández, Pato C, *et al.* Induced gynogenesis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Eur Aquacult Soc*, 2002, 32 (Spec Publ):528-529.
- [18] Piferrer F, Cal R M, Castora G. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age [J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4):403-419.
- [19] Tabata K, 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.
- [20] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned population in hirame flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. *Aquaculture*, 1999, 173(1-4):235-246.
- [21] 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.
- [22] Felip A, Zanuy S, Carrillo M, *et al.* Optimal conditions for the induction of triploid in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Aquaculture*, 1997, 152(1-4):287-298.
- [23] Felip A, Piferrer F, Carrillo M, *et al.* The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Heredity*, 1999, 83(4):387-397.
- [24] Tvedt H B, Benfey T J, Martin-Robichaud D J, *et al.* Gynogenesis and sex determination in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2-4):573-583.
- [25] Holmefjord I, Refstie T. Induction of triploid in Atlantic halibut by temperature shocks [J]. *Aquacult Int*, 1997, 5(2):169-173.

Induced meiogynogenesis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by sperm of red sea bream (*Pagrus major*)

LIU Hai-jin^{1*}, HOU Ji-lun², CHANG Yu-mei³, XUE Ling-ling¹, WANG Yu-fen⁴

(1. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

2. Animal Science and Technology College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

3. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

4. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China)

Abstract: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is a commercially important marine finfish in China. The growth rate of Japanese flounder is significantly faster in females than in males. Effective methods for gynogenetic inducement in this species are important for all-female population construction. Meiogynogenesis was induced in Japanese flounder (*P. olivaceus*) by using UV irradiated sperm of red sea bream (*Pagrus major*). The sperm of red sea bream exhibited a significant Hertwig effect after irradiating by UV. The embryo had the lowest hatching rate ($2.0\% \pm 0.1\%$) when UV dosage was 3.4 mJ/cm^2 , and recovered with the increase of UV dosage. It reached the highest hatching rate ($57.7\% \pm 3.1\%$) when UV dosage was 73 mJ/cm^2 , and ploidy analysis by flow cytometer showed that the embryos were all haploids. After a series of tests for initiation and duration at water temperature of $(0 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$, the best parameters for meiogynogenesis inducing in Japanese flounder were determined that cold shock begun at 3 min after insemination and continued for 45 min. The fertilization rate and hatching rate at this scenario were $80.7\% \pm 1.1\%$ and $57.3\% \pm 2.3\%$, respectively, which were significantly higher than all the other treatment groups ($P < 0.05$). Fries of gynogenesis were confirmed to be diploids via flow cytometer. Further analysis of RAPD analysis showed that genetic material of red sea bream sperm was destroyed after UV irradiation and was not transmitted to progenies. This study provided an effective method to induce meiogynogenesis for all female population construction in Japanese flounder.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *Pagrus major*; meiosis; gynogenesis; heterogenous sperm; cold shock

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