

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16234

鱼类生殖细胞移植技术的发展及应用前景

赵雅贤¹, 周勤¹, 于清海¹, 夏连军², 任玉芹¹, 林听听²

1. 中国水产科学研究院 北戴河中心实验站, 河北 秦皇岛 066100;

2. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 上海 200090

摘要: 鱼类生殖细胞移植技术是通过诱导不同物种之间生殖系嵌合体来实现。原始生殖细胞和精原细胞(或卵原细胞)是诱导生殖细胞系嵌合体的关键材料。在过去的十多年中, 通过采用不同的供体生殖细胞和不同发育阶段(囊胚期胚胎、初孵仔鱼和成鱼)的鱼为受体, 开发出多种鱼类生殖细胞移植技术。这些成果的取得, 为生殖细胞移植技术应用于诸多水产养殖新兴领域打下了坚实基础。该技术可以应用于: (1) 生殖细胞生物学和转基因鱼等基础研究; (2) 遗传资源和濒危鱼种的保护; (3) 鱼类性别选择育种; (4) 有效提高放流鱼苗的遗传多样性。

关键词: 鱼类生殖细胞; 原始生殖细胞; 精原细胞; 小生境; 低温保存

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)02-0414-10

自 Brinster 等^[1]在啮齿目动物建立了生殖细胞移植(germ cell transplantation, GCT)体系以来, 该领域研究已取得很大进展, 并已在许多非啮齿类动物实验中获得成功, 如山羊、绵羊、牛、猪、猴等^[2]。由供体精巢得到的细胞悬液注射到不育小鼠的生精小管, 其中的生殖细胞可以植入受体生精小管, 并生成源自供体的精子, 这就是所谓的生殖细胞移植(germ cell transplantation, GCT)技术。细胞悬液中存在的 A 型精原细胞(Type A Spermatogonial, A-SG)在整个生命周期中始终保持自我更新和分化的能力, 所以又称为精原干细胞(spermatogonial stem cell, SSC)。虽然该生物技术已成熟应用于哺乳动物, 但直到本世纪初才在鱼类研究中获得突破。2003 年日本东京海洋大学 Takeuchi 等^[3-4]首次将经济鱼类虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)移植到樱鳟(*Oncorhynchus masou*)的初孵仔鱼腹腔, 由樱鳟生产了源自于供体—虹鳟的后代, 第一次实现了鱼类的代孕生子。

此后国际上多个实验室相继开展鱼类生殖细胞移植研究。北海道大学 Saito 等^[5]通过单个 PGC 细胞的移植实现了种间, 属间, 甚至是不同科的异种移植。但是, 因为鱼类在胚胎和初孵仔鱼期拥有的 PGC 细胞数不超过 100 个, 经酶解提取过程后最终得到可用于移植的 PGC 细胞数在 20 个左右, 加之提取 PGC 细胞过程十分精细复杂(在实验中 PGC 是通过转基因携带 GFP 等方法进行可视化处理来提取的^[6]), 因而严重限制了鱼类生殖细胞移植研究的应用。这一瓶颈在 2006 年获得突破, Okutsu 等^[7]将由虹鳟幼鱼精巢分离得到的细胞悬液(其中含有 A-SG)分别移植到同种异体的雌雄受体鱼中, 这些嵌合体鱼成熟后生成了源自供体的功能性卵子和精子。实验结果首次直接证明了鱼类 A-SG 具有与 PGC 类似的干细胞特征。由精巢中的支持细胞、管间肌样细胞等组成的微样环境, 又称小生境(niche)维持和调节了 A-SG 的干细胞特性^[8-9]。这一研究成果极大地促进了鱼类生殖细胞移植的研究。此后巴西米纳斯吉拉斯联邦大学

收稿日期: 2016-08-10; 修订日期: 2016-09-20.

基金项目: 国家“十二五”科技支撑项目(2012BAD26B01); 农业部“引进国际先进农业科学技术”项目(2015-Z019).

作者简介: 赵雅贤(1985-), 女, 工程师, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: xiaoxian20080225@126.com

通信作者: 周勤, 副研究员. E-mail: laozhou_529@foxmail.com

Lacerda 等^[10]以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为模型、日本东京海洋大学 Majhi 等^[11]以银汉鱼(*Odontesthes bonariensis*)为模型、荷兰乌得勒支大学 Nobrega 等^[9]以斑马鱼(*Danio rerio*)为模型成功进行了以成熟鱼为受体的生殖细胞移植实验。GCT 已经成为一个新兴的生物技术,可广泛应用于遗传资源保护、鱼类繁殖技术开发、性别选择育种、转基因鱼制备等研究。

上述几个实验团队在生殖细胞移植研究上各有侧重,相互借鉴取得了很大的进步,本文重点论述其产业应用研究前景。

1 鱼类生殖细胞

生殖细胞生物学研究是鱼类生殖细胞移植研究的基础,同时生殖细胞移植研究的成果也加深和验证了我们对鱼类生殖细胞干细胞特性的理解,例如,Okutsu 等^[12]和 Lee 等^[13]的研究结果表明只有 A 型精原细胞具有植入受体鱼性原基的能力。传统的鱼类生殖细胞研究是通过形态学标准解决生殖细胞三方面的议题:胚胎发生,增生,以及在胚胎期或仔鱼期的迁移途径^[14-16]。目前学术界将生殖细胞用下列术语定义:①原(precursor)原始生殖细胞或假定的(presumptive)原始生殖细胞(pPGC),②原始生殖细胞和③生殖细胞(GC)^[14, 17]。pPGC 是生殖细胞的始祖,在胚胎发育的早期即与体细胞系发生分离,其子细胞命运各异:其中一个为体细胞,而另一个仍为 pPGC。早期研究中,以生殖质(germ plasm)的存在与否作为两种细胞区别的依据。随着近年来分子生物学的发展,以 VASA 基因为 PGC 发育标记的研究提供了明确的证据^[18]。当两个子细胞命运相同均为生殖细胞时,其母细胞即为 PGCs。一般来说,大多数动物的 PGC 形成于原始生殖嵴之外的胚胎特定位置,在胚胎发育后期或仔鱼期迁移到生殖嵴形成生殖腺。进入生殖嵴后,PGC 成为性原细胞(gonial cell)进而发起生殖细胞系的分化和发生直至形成配子。在生殖细胞系中,GC 在硬骨鱼类雄性个体中包括:精原细胞(spermatogonia, SG) (又根据其发生过程分为 A 型 A-SG 和 B 型 B-SG)、精母细胞(spermatocyte, SC)、精子细胞(spermatid, ST)和精

子(spermatozoa, SZ)^[19]。GC 在硬骨鱼类雌性个体中包括:卵原细胞(oogonia, OG)、卵母细胞(oocyte, OC)、卵母细胞经过一系列卵黄生成作用成熟为卵子(egg)^[20]。一般认为其中 A 型精原细胞(又称为精原干细胞 spermatogonia stem cell, SSC),和卵原细胞具有干细胞特性——在整个生命周期中始终保持自我更新和分化的能力,维持了生物体精子发生和卵子发生。所以生殖细胞移植中普遍采用的细胞主要为 PGC 和 A-SG。

在脊椎动物种间 PGC 是极其相似的:细胞直径 10~20 μm ,明显大于体细胞,具有大而圆的细胞核和 1~2 个致密核仁,并且具有特征性的亚细胞结构——生殖质颗粒(nuage)^[19]。A-SG 形态学描述与上述 PGC 相同,在精巢中是最大的生殖细胞(笔者尚未查阅到将两种细胞在形态学上对应、区别描述的文章)。由于鱼类缺少干细胞的分子标记,在组织观察(在精巢中, A-SG 单个存在于支持细胞形成的包膜中)和移植实验操作中主要采用形态学特征^[21-22]或直接以细胞大小^[10, 23]来判断。OG 与 A-SG 具有相同的形态学特征。GCT 实验结果也证明了 OG 的干细胞特性^[24]。

2 GCT 研究的进展

由供体生物得到的生殖细胞植入受体,形成生殖系嵌合体,最后由这个嵌合体产生源自供体的配子或后代即为生殖细胞移植技术,也可称为鱼类代孕技术。胚盘组织移植制备嵌合体也是 GCT 的一种形式^[25-26]。因为如上所述 pPGC 在胚胎发育的早期即与体细胞系发生分离,所以在早期胚胎细胞中存在有生殖系细胞,并且胚胎干细胞也被认为具有形成生殖细胞的潜力^[27-28]。表 1 为几个经典的 GCT 实验,下面本文将重点讨论采用 PGC 和 A-SG 为供体细胞的生殖细胞移植研究及其应用。

2003 年东京海洋大学的 Takeuchi 等^[3]报道了世界上首例鱼类生殖细胞移植实验:将由供体鱼得到 PGCs,通过腹腔显微注射移植到受体鱼,最终由受体鱼生产了源自供体鱼的后代。2004 年 Takeuchi 等^[4]在 *Nature* 上对这一成果进行了报道,高度评价了其科学价值。这一结果说明: (1) 由初

表 1 鱼类生殖细胞移植的几个经典实验
Tab. 1 Several typical experiments of fish germ cell transplantation

	供体鱼 donor fish	供体细胞 donor cell	供体细胞标志 donor cell labeling	受体鱼 recipient fish	受体制备方法 preparation of recipient	受体发育期 recipient development stage	结果 result	实验操作 experiment operation	参考 文献 refer- ence
2003	虹鳟 rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	原始生殖 细胞 PGC	携带 <i>Gfp</i> 转基因鱼 <i>Gfp</i> transgenic fish	樱鳟 masu salmon (<i>O. masou</i>)	二倍体 diploid	初孵仔鱼 hatchling	供体后代 donor derived offspring	腹腔显微注射 intraperitoneal microinjection	[3]
2006	虹鳟 rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	A 型精原 细胞 A-SG	携带 <i>Gfp</i> 转基因鱼 <i>Gfp</i> transgenic fish	虹鳟 rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	二倍体 diploid	初孵仔鱼 hatchling	供体后代 donor derived offspring	腹腔显微注射 intraperitoneal microinjection	[7]
2007	虹鳟 rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	原始生殖 细胞 PGC	携带 <i>Gfp</i> 转基因鱼 <i>Gfp</i> transgenic fish	樱鳟 masu salmon (<i>O. masou</i>)	三倍体 triploid	初孵仔鱼 hatchling	供体后代 donor derived offspring	腹腔显微注射 intraperitoneal microinjection	[37]
2008	斑马鱼 pearl danio (<i>D. albolineatus</i>)	原始生殖 细胞 PGC	RNA 定点表达 localized RNA expression, LRE	斑马鱼 zebrafish (<i>D. rerio</i>)	吗啉反义寡核 苷酸注射 MO microin jection	囊胚期胚胎 blastula embryo	供体后代 donor derived offspring	显微注射 blastula-stage microinjection	[5, 32]
2008	金鱼 goldfish (<i>C.s auratus</i>)	原始生殖 细胞 PGC	RNA 定点表达 localized RNA expression, LRE	斑马鱼 zebrafish (<i>D. rerio</i>)	吗啉反义寡核苷 酸注射 MO microinjection	囊胚期胚胎 blastula embryo	源自供体 功能精子 donor derived sperm	显微注射 blastula-stage microinjection	[5, 32]
2008	泥鳅 loach (<i>M. anguillicaudatus</i>)	原始生殖 细胞 PGC	RNA 定点表达 localized RNA expression, LRE	斑马鱼 zebrafish (<i>D. rerio</i>)	吗啉反义寡核苷 酸注射 MO micinjection	囊胚期胚胎 blastula embryo	源自供体 功能精子 donor derived sperm	显微注射 blastula-stage microinjection	[5, 32]
2006	尼罗罗非鱼 nile-tilapia (<i>O. niloticus</i>)	A 型精原 细胞 A-SG	PKH-26	尼罗罗非鱼 nile-tilapia (<i>O .niloticus</i>)	高温、白消安注射 high temperature and busulfan injection	成鱼 adult fish	供体后代 donor derived offspring	经生殖乳突 注射到性腺 injection through genital papilla	[10]
2009	银汉鱼 (<i>O. bonariensis</i>)	A 型精原 细胞 A-SG	PKH-26	银汉鱼 (<i>O. hatcheri</i>)	高温、白消安注射 high temperature and busulfan injection	成鱼 adult fish	供体后代 donor derive offspring	手术方法 surgical inter- vention	[11]

注: MO—吗啉反义寡核苷酸。
Note: MO—antisense morpholino oligonucleotide.

孵仔鱼得到的 PGC 具有定向迁移并植入受体生殖嵴的能力; (2) 植入受体的 PGC 具有分化为雌雄配子的能力, 其性别由受体的体细胞小生境决定; (3) 首次建立了可靠便捷的生殖细胞移植技术。Saito 等^[5]实验表明单个 PGC 移植就可以在受体性腺中有效启动源自供体的配子发生; 并且在跨科的物种间代孕产生功能精子, 但是没有产生卵子, 说明选择适宜的移植受体要充分考虑物种间生物学差异的影响^[29]。如前所述, PGC 在鱼类个体中数量很少, 只有通过可视化处理才能方便提取。Yoshizaki 等^[30]制备了由 VASA 基因调控区域驱动的、在生殖细胞中特异表达的 *Gfp* 基因转基因鱼, 转基因鱼的生殖细胞具有绿色荧光反

应。而且在随后的 F₁、F₂ 的生殖系细胞中均有 *Gfp* 表达^[31]。Saito 等^[5]的实验中的生殖细胞可视化是通过在 4 细胞期左右的胚盘中注射人工合成携带有 *Gfp* 的 mRNA 实现的, 又称之为 RNA 定点表达技术(localized RNA expression, LRE)^[32-33]。生殖细胞的可视化不但能方便分离提取生殖细胞, 并且为追踪供体细胞在受体中的迁移和命运提供了手段。Okutsu 等^[7]将虹鳟幼鱼精巢细胞悬液分别移植到同种异体的雌雄受体鱼中, 这些嵌合体鱼成熟后生成了源自供体的功能性卵子和精子。实验结果首次直接证明了鱼类 A-SG(细胞悬液中含有)具有与 PGC 类似的干细胞特征。较之 PGC 的获得, 由成鱼精巢(或卵巢)中分离提取 A-GS(或

OG)是一个相对简便的过程。这一研究成果极大地促进了鱼类生殖细胞移植的研究。随后在石首鱼科的黄姑鱼(*Nibea mitsukurii*)^[23]、鲭科的白腹鲭(*Scomber japonicus*)^[34]、尼罗罗非鱼^[10]、银汉鱼^[35]以及鲟鲂类^[36]等都开展了精原干细胞的移植研究。

在鱼类生殖细胞移植研究的最初阶段,通常用初孵仔鱼作为受体,由于外源生殖细胞与受体鱼的内源生殖细胞产生竞争导致植入成功率较低。Takeuchi^[3]的实验结果显示供体对子代的贡献率为3%~4%。而以不孕三倍体鱼作为受体进行生殖细胞移植的实验中,嵌合体产生的后代基因全部源自供体^[37]。初孵仔鱼或胚胎作为受体时,嵌合体鱼需经历长时间生长发育才能成熟进而产生源自供体的配子。在哺乳动物中,高温对精子发生的影响已经得到了深入的研究。高温能引起鼠^[38]、牛^[39]、猪^[40]、羊^[41]及人类^[42-43]的精巢损害,精子质量的下降,胚胎生长迟滞、抑制或退化,甚至引起短时的或永久的不育。在鱼类中,高温同样能够引起红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[44]、银汉鱼^[45]生殖细胞的退化和凋亡。白消安是一种对哺乳动物干细胞增生有阻滞和延缓作用的烷化剂^[46]。在啮齿类动物生殖细胞移植实验中,通过注射白消安来制备受体^[1, 29]。利用了高温和白消安注射诱导受体鱼内源生殖细胞凋亡, Lacerda 等^[10]建立了以罗非鱼成鱼为受体的生殖细胞移植方法:首先通过人工方法诱导受体鱼的内源生殖细胞凋亡;供体生殖细胞悬液通过生殖乳突或采用手术方法直接注射移植到供体鱼的性腺中;供体鱼生殖细胞在受体鱼性腺中可迅速重启精子发生,在移植完成后2个月即可生成源自供体的功能配子。在精原细胞移植的实验中,供体细胞经简单的荧光染色即可对其移植后的移动、增生进行追踪。银汉鱼^[35]和斑马鱼^[9]也以成鱼为受体成功进行了生殖细胞移植研究。

3 GCT 生物技术的应用前景

3.1 GCT 是鱼类生殖干细胞研究的一个里程碑

生殖细胞移植技术扩展了我们对鱼类生殖细胞,

尤其是鱼类 PGC 和 SSC 的生理学和生物学特性的理解^[17];为生殖干细胞功能及其与小生境(niche)的互作研究提供了强大的活体检测手段^[8-9, 47];生殖细胞移植为鱼类转基因和基因操作研究提供了新途径。

3.2 为鱼类遗传资源和濒危鱼种的保护提供有效手段

濒危野生鱼类的保护是一项十分重要的工作。随着近年来鱼类遗传育种的广泛开展,催生了大量具有不同优良性状的品系,不同地方种系的遗传资源对育种研究也有重要价值。携带不同遗传性状的家系、品系的植物可以通过“种子库”得到永久保存。在畜牧业中,携带不同优良遗传性状的品系的精液和胚胎可在液氮中长期保存。目前,虽然鱼类精子的低温保存技术已经确立,但由于鱼类卵子较大,卵黄含量高和较低的膜通透性使得鱼类卵子和胚胎冷冻保存方法尚未确立。显然仅仅通过鱼类精子不能得到存活个体,只能通过保养活体的方式保存遗传资源。保养活体面临诸如:养殖系统损害、病害感染、遗传多样性损失和由于自然栖息地改变而失去适应性等风险。基于此,近年来科研工作者相继开发了 PGC^[47-48]、SSC^[32, 49]和精巢组织^[50]的低温(液氮)冷冻保存技术,配合 GCT 技术均产生了功能性配子,进而获得了源自供体的后代。最新的成果表明:由-80℃条件下经3年冷冻的整鱼中提取的生殖细胞用于生殖细胞移植可产生功能配子和存活后代^[51]。-80℃冷冻条件是利用低温冰箱和干冰获得的,这极大地便利了鱼类遗传样本的野外收集和保存。上述革命性研究成果有望为建立鱼类“生殖细胞库”,低成本保存鱼类遗传资源提供可靠、安全和有效的途径^[52]。

3.3 应用于鱼类苗种繁殖开发

鱼类 GCT 在高效鱼类苗种繁殖等方面有着广阔的前景^[53]。对于那些个体大、生殖周期长的鱼种,亲本及其遗传家系的活体保养和维持的成本很高,甚或由于不能提供保证其基本的生态习性的养殖条件,造成目标种性腺不能成熟。选择生殖周期短,个体小的近缘鱼种来代孕目标种可

以缩短育种周期,节省大量养殖设施和劳动力投入,给遗传育种带来极大便利的同时节约大量宝贵的研究资金。例如,近年来太平洋蓝鳍金枪鱼(*Thunnus orientalis*)养殖已经成为一个巨大的产业,但是养殖的苗种全部来自天然捕捞,造成了所谓金枪鱼危机。金枪鱼是一种大型的大洋鱼类,其成熟个体达几百千克,成熟期 4 年以上,人工养殖的亲本极难成熟。Yazawa 等^[34]一直尝试利用 GCT 技术突破金枪鱼的苗种繁育,他们选择其近缘种白腹鲷作为受体,期待将金枪鱼 PGCs 移植到白腹鲷中,生产源自供体的后代——金枪鱼。一旦突破将带来极大的经济效益。我国作为世界第一的水产养殖大国,有许多经济或濒危鱼类的苗种繁育尚未突破,生殖细胞移植研究的成果提供了一个新思路。例如,黄唇鱼(*Bahaba flavolabiata*),属石首鱼科(Sciaenidae),是中国的重要经济种类,同时也是中国的二级保护动物,苗种人工繁育长期得不到有效突破^[54]。石首鱼科是海水鱼 GCT 研究的经典^[23],其近缘种黄姑鱼在一年内即可性成熟,成熟个体在 250 g 左右,并且有成熟的苗种培育技术可资利用^[55]。研究以黄姑鱼为受体代孕生产黄唇鱼苗种有着极大的经济效益和科学价值。再如,圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*),长期生活

在水流湍急的长江上游水域,是典型的江河流水性底层鱼类。人工条件下很难复制其生态环境,致使不能获得成熟亲鱼是制约其人工苗种繁育的主要障碍^[56]。选择近缘种作为代孕受体做苗种培育的研究,为我们提供了一个新的鱼类苗种繁育的途径。

3.4 GCT 应用于鱼类性别选择育种的研究

动物的生殖干细胞(PGC, A-SG, OG)具有多功能性,具有分化并发育为雌雄配子的潜力^[57]。生殖干细胞的性别可塑性是由 GCT 实验结果验证的,当 PGC 或 A-SG 移植到雌性受体时可以产生功能卵子^[3-4, 7]。在 XX-XY 性别决定型的鱼类中,这些代孕产生的卵子除了携带 X 染色体,还携带有 Y 染色体(相当于伪雌鱼,见图 2),与野生型雄鱼交配后产生的后代雌雄性比为 1:3 (1YY:2XY:1XX)。其中的 YY 超雄鱼是可育的,获得 YY 超雄鱼是全雄苗种培育的前提(图 1A);而卵原细胞移植到雄性受体时,产生的功能精子全部携带 X 染色体^[7],相当于伪雄鱼(图 2),与野生型雌鱼交配后产生的后代性别全部为 XX 雌鱼(图 1B)。获得携带不同染色体的配子,是染色体操作进行鱼类性别控制的核心^[58-59]。Okutsu 等^[60]以此技术路线制备了虹鳟 YY“超雄鱼”并最终生产了全雄虹鳟苗种。

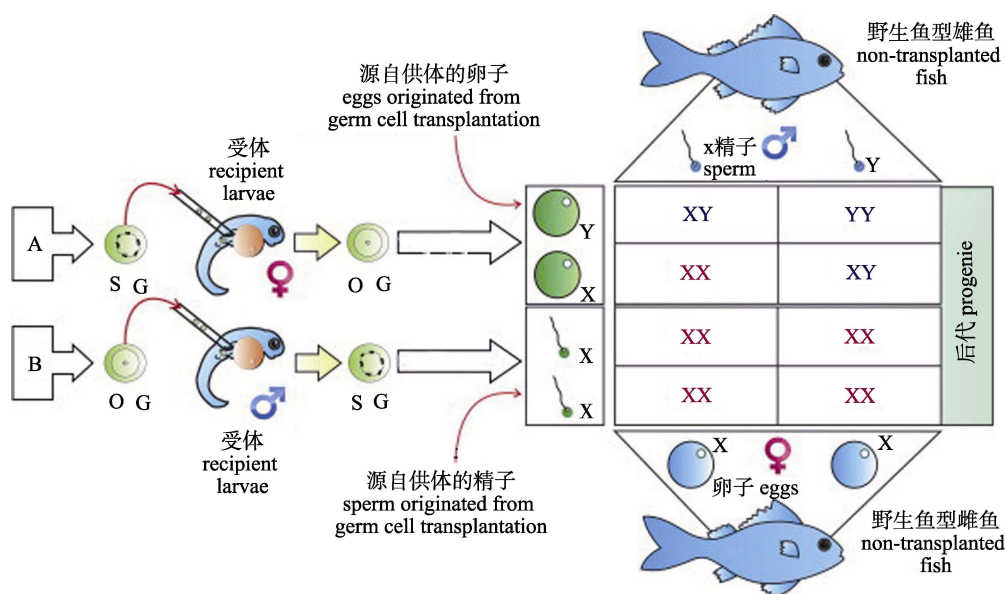


图 1 精原干细胞和卵原细胞的性别可塑性示意图(引自 Lacerda 等^[62])

Fig. 1 Diagram illustrating the high level of sexual plasticity of fish spermatogonia and oogonia after germ cell transplantation (from Lacerda et al.^[62])

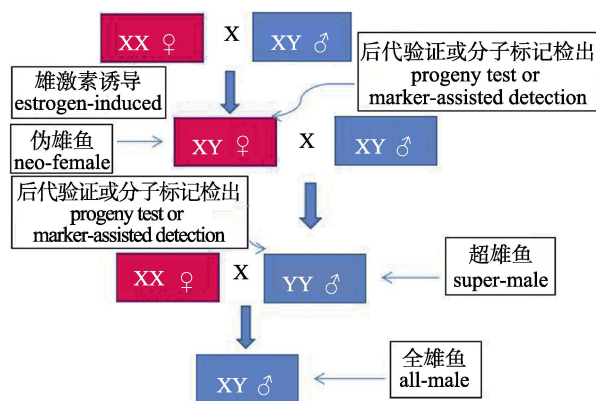


图2 红鳍东方鲀全雄苗种研究工艺流程示意图
(仿东京大学大学院农学生命研究科附属水产实验所
<http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/research.html>)
Fig. 2 Diagram of *T. rubripes* all-male breeding research
(From Fisheries LAB Graduate School of Agriculture and Life
Sciences, The University of Tokyo
<http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/research.html>)

全雄苗种的培育将大大提升红鳍东方鲀传统养殖的竞争力,本课题组的调查研究结果表明,全雄苗种即使在目前的养殖模式下也不会丧失生长优势^[61]。传统的技术路线是:通过雌激素诱导基因雄性性转化为伪雌鱼(XY),伪雌鱼与正常雄鱼交配生产超雄鱼(YY),超雄鱼与正常雌鱼(XX)交配生产的后代全部为雄鱼(XY)。如果没有性别分子标记而需要后代验证时,整个研究周期要经过5代时间,即使有了分子标记这个过程也要经过3代以上的时间,对于红鳍东方鲀来说整个过程的完成要7年以上(图2)。而通过GTC产生携带不同染色体配子仅仅需要一代的时间即可制备超雄鱼,较传统方法更为便捷、可靠和节省时间。如果采用成鱼为受体的方法,时间更是可以缩短到半年以内。在下半年进行移植实验,第2年的春季即可制备YY超雄鱼^[62],并且可以借助红鳍东方鲀雌雄鉴别分子方法将其检出^[63]。星点东方鲀(*Takifugu niphobles*)与红鳍东方鲀同属东方鲀属,种间杂交后代存活并可育^[64],说明这两个物种间遗传距离很近;星点东方鲀的最大生物学个体在50 g左右,仅为红鳍东方鲀的1/150,性成熟期为1龄,对红鳍东方鲀来说是个十分完美的生殖细胞移植受体鱼。2015年,我们开展了不同温度条件下对星点东方鲀生殖细胞发生影响的研究:将平均体重28.6 g的星点东方鲀成鱼分别在28℃和32℃水温条件下经30天培养。两者相比较,发

现在高温条件下,雌鱼卵巢结构松散,卵母细胞大量凋亡(图3B);雄鱼精巢明显萎缩,生殖细胞大量凋亡,精小囊形成空泡(图3D)(文章撰写中,未发表)。实验结果显示高温可诱导星点东方鲀成鱼生殖细胞凋亡。通过高温配合白消安注射诱导生殖细胞凋亡,星点东方鲀可制备为合格的GTC受体^[65]。更重要的是相对于红鳍东方鲀需要10 m³以上的水泥池或数亩的土池用于实验鱼养殖,0.3 m³水体的玻璃钢水槽可完全满足星点东方鲀生长的需要,从而节省大量研究经费和时间成本。

3.5 应用于放流增殖的实践,增加生物多样性

增殖放流作为一种有效的渔业管理手段在国内外日益普及,通过向自然水域放流人工鱼苗以恢复野生鱼类资源^[66-67],对提高渔业生产力、改善渔业资源种群质量以及促进渔业可持续发展等起到了极其重要的作用。但是这些努力在取得各种成果的同时,也引起了科学家对放流行为对野生种群可能带来遗传改变的关切。这些关切是基于人工苗种通常来自相对较小的亲本群,并且经过数代繁育引起的近交带来的遗传多样性的减少^[68-69]。特别是鱼类具有高繁殖力的特性,在放流实践中,依靠数对亲本的繁殖就可以满足放流苗种对数量的要求。遗传多样性的减少会使鱼类降低或丧失对病害抵抗和对环境适应的能力^[70-71]。FAO^[72]强调了人工繁殖群的遗传监测和管理的重要性,这不但是保护野生群遗传多样性的要求,反过来又可以促进对野生鱼类资源的保护和合理利用。Sato等^[73]尝试了通过GCT技术增加人工繁殖群遗传多样性实验。由不同遗传背景的不同个体生殖腺中分离得到生殖细胞悬液按相同的A-SG细胞浓度混合一起,将上述生殖细胞悬液移植到受体中。后代验证表明植入的多个供体对后代的遗传贡献率没有显著差异。这个结果说明在相同大小的繁殖群间,通过GCT可有效增加后代的遗传多样性。这个结果对于我国每年大量的鱼类放流项目的遗传管理具有重要意义。

综上所述,GCT经过十多年的发展已经成为具有广泛应用的新兴生物技术。由表1可以看出,GCT技术由原来的较为复杂精细的显微操作逐步发展为较为直观简单的注射过程。该技术在应用

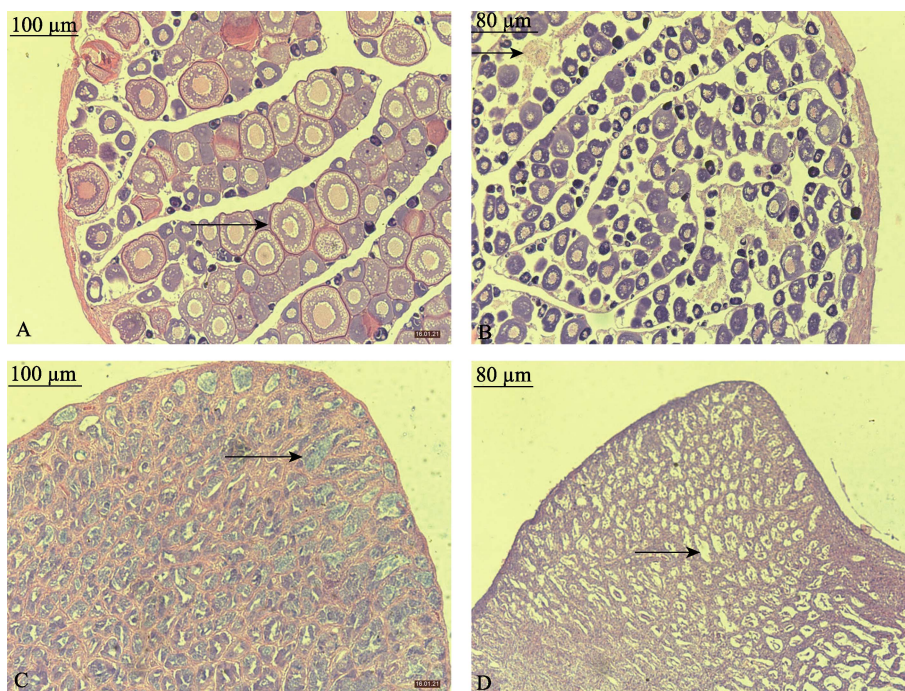


图 3 温度对星点东方鲀生殖细胞发生的影响
(中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 周勤)

A. 正常水温 20~25℃ 培育星点东方鲀卵巢结构图, 箭头所指为正常卵母细胞; B. 32℃ 水温, 经 30 日培养后卵巢结构图, 箭头所指为卵母细胞凋亡后残迹; C. 正常水温 20~25℃ 培育星点东方鲀精巢结构图, 箭头所指为精小囊充满精母细胞或精子细胞; D. 32℃ 水温, 经 30 日培养后星点东方鲀精巢结构图, 箭头所指为生殖细胞凋亡后, 精小囊形成空泡。

Fig. 3 The effect of high temperature on grass puffer gametogenesis
(Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, ZHOU Qin)

A. Histological appearance of the ovaries in control temperature (20–25℃), arrow indicating normal oocyte; B. The ovaries in higher temperature (32℃) for 30 day's culture, arrow indicating depleted oocyte; C. Testis in control temperature (20–25℃), arrow indicates cysts full of spermatid; D. Testis in higher temperature (32℃) for 30 day's culture, arrow indicates empty cysts after germ cell depletion.

于如干细胞生物学特性、转基因等前沿科学研究的同时, 在应用于鱼类性别选择育种、苗种繁育开发、濒危野生鱼类保护等产业方向也具有重大的意义。

参考文献:

- [1] Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation[J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1994, 91(24): 11298–11302.
- [2] Honaramooz A, Yang Y. Recent advances in application of male germ cell transplantation in farm animals[J]. *Veterin Med Intern*, 2011, 2011: 1–9.
- [3] Takeuchi Y. Generation of Live Fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout[J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(4): 1142–1149.
- [4] Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Surrogate broodstock produces salmonids[J]. *Nature*, 2004, 430(7000): 629–630.
- [5] Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K, et al. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation[J]. *Biol Reprod*, 2007, 78(1): 159–166.
- [6] Takeuchi Y, Goro Yoshizaki, Terumasa Kobayashi, et al. Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter[J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(1): 1087–1092.
- [7] Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y G, et al. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2725–2729.
- [8] Dirk G. de Rooij D G. The spermatogonial stem cell niche[J]. *Microsc Res Techn*, 2009, 72(8): 580–585.
- [9] Nobrega R H, Greebe C D, van de Kant H, et al. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(9): e12808.
- [10] Lacerda S, Batlouni S, Silva S, et al. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model[J]. *Anim Reprod*, 2006,

- 3(2): 146–159.
- [11] Majhi S K, Hattori R S, Yokota M, et al. Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines[J]. PLoS ONE, 2009, 4(7): e6132.
- [12] Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, et al. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish.[J]. Proc Nat Acad Sci, 2006, 103(8): 2725–2729.
- [13] Lee S, Iwasaki Y, Shikina S, et al. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2013, 110(5): 1640–1645.
- [14] Braat A K, Speksnijder J E, Zivkovic D. Germ line development in fishes.[J]. Intern J Dev Biol, 1999, 43(7): 745–760.
- [15] Saito T, Psenicka M, Goto R, et al. The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons[J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): e86861.
- [16] Johnston P M. The embryonic history of the germ cells of the largemouth black bass, *Micropterus salmoides salmoides* (Lacepede)[J]. J Morphol, 1951, 88(3): 471–542.
- [17] Xu Y H, Li M Y, Gui J F, et. al. Fish reproductive cells[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2010, 40(2): 124–138. [徐红艳, 李名友, 桂建芳, 等. 鱼类生殖细胞[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(2): 124–138.]
- [18] Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish vasa homologue is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells[J]. Development, 1997, 124(16): 3157–3165.
- [19] Schulz R W, de França L R, Lareyre JJ, et al. Spermatogenesis in fish[J]. Gener Compar Endocr, 2010, 165(3): 390–411.
- [20] Lubzens E, Young G, Bobe J, et al. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed[J]. Gen Compar Endocrinol, 2010, 165(3): 367–389.
- [21] Leal M C, Cardoso E R, Nobrega R H, et al. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations[J]. Biol Reprod, 2009, 81(1): 177–187.
- [22] Vilela D A R, Silva S G B, Peixoto MTD, et al. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model[J]. Fish Physiol Biochem, 2003, 28(1–4): 187–190.
- [23] Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, et al. Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae)[J]. Biol Reprod, 2009, 81(6): 1055–1063.
- [24] Yoshizaki G, Ichikawa M, Hayashi M, et al. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout[J]. Development, 2010, 137(9): 1227–1230.
- [25] Yamaha E, Kazama-Wakabayashi M, Otani S, et al. Germ-line chimera by lower-part blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp[J]. Genetica, 2001, 111(1): 227–236.
- [26] Yamaha E, Murakami M, Hada K, et al. Recovery of fertility in male hybrids of a cross between goldfish and common carp by transplantation of PGC (primordial germ cell)-containing graft[J]. Genetica, 2003, 119(2): 121–131.
- [27] Yamaha E, Saito T, Goto-Kazeto R, et al. Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes[J]. J Sea Res, 2007, 58(1): 8–22.
- [28] Hong N, Li M, Zeng Z, et al. Accessibility of host cell lineages to medaka stem cells depends on genetic background and irradiation of recipient embryos[J]. Cellul Molec Life Sci, 2010, 67(7): 1189–1202.
- [29] Brinster C J. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation[J]. Biol Reprod, 2003, 69(2): 412–420.
- [30] Yoshizaki G, Takeuchi Y, Sakatani S, et al. Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter[J]. Intern J Dev Biol, 2000, 44(3): 323–326.
- [31] Kobayashi T, Yoshizaki G, Takeuchi Y, et al. Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry[J]. Molec Reprod Dev, 2004, 67(1): 91–100.
- [32] Saito T, Fujimoto T, Maegawa S, et al. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA[J]. Internat J Dev Biol, 2006, 50(8): 691–699.
- [33] Merrick D, Tao T, Kurt L, et al. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*)[J]. BMC Dev Biol, 2007, 7(1): 1–10.
- [34] Yazawa R, Takeuchi Y, Higuchi K, et al. Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells[J]. Biol Reprod, 2010, 82(5): 896–904.
- [35] Majhi S K, Hattori R S, Rahman S M, et al. Surrogate production of eggs and sperm by intrapapillary transplantation of germ cells in cytoablated adult fish[J]. PLoS ONE, 2014, 9(4): e95294.
- [36] Pacchiarini T, Sarasquete C, Cabrita E. Development of interspecies testicular germ-cell transplantation in flatfish[J]. Reprod Fert Dev, 2014, 26(5): 690–702.
- [37] Okutsu T, Shikina S, Kanno M, et al. Production of trout

- offspring from triploid salmon parents[J]. Science, 2007, 317(5844): 1517.
- [38] Hand JW, Walker H, Hornsey S, et al. Effects of hyperthermia on the mouse testis and its response to X-rays, as assayed by weight loss[J]. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1979, 36(6): 521–528.
- [39] Casady R M, Myers R M, Legates J E. The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the daire bull[N]. Ann Rep North Car Agr Exper Stat, 1952–06–28.
- [40] Wettemann R P, Well I T, Omtvedt I T, et al. Influence of elevated ambient temperature on reproductive performance of boars[J]. J Anim Sci, 1976, 42(3): 664–669.
- [41] Mieusset R, Quintana C P, Sanchez P L, et al. Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen[J]. J Reprod Fertil, 1992, 94(2): 337–343.
- [42] Burdorf A, Brand T, Jaddoe V W, et al. The effects of work-related maternal risk factors on time to pregnancy, preterm birth and birth weight: the generation R study[J]. Occup Environ Med, 2011, 68(3): 197–204.
- [43] Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review[J]. Int J Androl, 1995, 18(4): 169–184.
- [44] Lee K, Yamaguchi A, Rashid H, et al. Germ cell degeneration in high-temperature treated pufferfish, *Takifugu rubripes*[J]. Sexu Dev, 2009, 3(4): 225–232.
- [45] Strüssmann C A, Saito T, Takashima F. Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* production of trout offspring from triploid salmon parents and *Patagonina hatcheri*[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 1998, 119(2): 637–644.
- [46] Bishop J B, Wassom J S. Toxicological review of busulfan (Myleran)[J]. Mutat Res, 1986, 168(1): 15–45.
- [47] Lacerda S, Aponte P M, Costa G, et al. An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish[J]. Anim Reprod, 2012, 9(4): 798–808.
- [48] Kobayashi T, Takeuchi Y, Takeuchi T, et al. Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells[J]. Molec Reprod Dev, 2007, 74(2): 207–213.
- [49] Okutsu T, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Spermatogonial transplantation in fish: production of trout offspring from salmon parents[C]//Tsukamoto K, Kawamura T, Takeuchi T, et al (Eds.). Fisheries for Global Welfare and Environment. Tokyo, 2008: 209–219.
- [50] Lee S, Iwasaki Y, Shikina S, et al. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes[J]. Proceed Nat Aca Sci, 2013, 110(5): 1640–1645.
- [51] Lee S, Seki S, Katayama N, et al. Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish[J]. Sci Rep, 2015(5): 16045.
- [52] Yoshizaki G, Fujinuma K, Iwasaki Y, et al. Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources[J]. Compar Biochem Physiol Part D: Genom Proteom, 2011, 6(1): 55–61.
- [53] Yamaha E, Saito T, Goto-Kazeto R, et al. Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes[J]. J Sea Res, 2007, 58(1): 8–22.
- [54] Qu Y J, Liao R, Li J R, et al. Studies on the spawning period and growth of young *Bahaba flavolabiata* in estuary of Pearl River by otolith determination[J]. Ecological Science, 2014, 33(2): 209–212. [区又君, 廖锐, 李加儿, 等. 采用耳石日轮研究珠江口黄唇鱼幼鱼的产卵期及生长[J]. 生态科学, 2014, 33(2): 209–212.]
- [55] Chen C, Xu Y K, Lei J L. Preliminary study on artificial breeding of *Nibea albiflora*[J]. Fisheries Science, 1989, 8(1): 7–11. [陈超, 徐延康, 雷霖霖. 黄姑鱼人工育苗初步试验[J]. 水产科学, 1989, 8(1): 7–11.]
- [56] Tang H Y, Yang Z, Gao S B, et al. Status of fish resources of early life history stages of *Coreius guichenoti* in the middle reaches of the Jinsha River[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2012, 31(3): 416–421. [唐会元, 杨志, 高少波, 等. 金沙江中游圆口铜鱼早期资源现状[J]. 四川动物, 2012, 31(3): 416–421.]
- [57] Wylie, Chris. Germ cell[J]. Cell, 1999, 96(2): 165–174.
- [58] Mylonas C C, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction[J]. Gen Compare Endocrinol, 2010, 165(3): 516–534.
- [59] Gui J, Zhu Z. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals[J]. Chin Sci Bull, 2012, 57(15): 1751–1760.
- [60] Okutsu T, Shikina S, Sakamoto T, et al. Successful production of functional Y eggs derived from spermatogonia transplanted into female recipients and subsequent production of YY supermales in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 2015, 446(11): 298–302.
- [61] Wang Q L, Zhang H T, Ren Y Q, et al. Comparison of growth parameters of tiger puffer *Takifugu rubripes* from two culture systems in China[J]. Aquaculture, 2016, 453: 49–53.
- [62] Lacerda S M D S, Costa G M J, de França L R. Biology and identity of fish spermatogonial stem cell[J]. Gen Compar Endocrinol, 2014, 207: 56–65.

- [63] Matsunaga T, Ieda R, Hosoya S, et al. An efficient molecular technique for sexing tiger pufferfish (*fugu*) and the occurrence of sex reversal in a hatchery population[J]. *Fish Sci*, 2014, 80(5): 933–942.
- [64] Miyaki K. Biological study of hybrid pufferfishes of the genus *Takifugu*, Tetraodontidae[D]. Nagasaki: Nagasaki University, 1992.
- [65] Majhi S K, Hattori R S, Rahman S M, et al. Experimentally induced depletion of germ cells in sub-adult *Patagonian pejerrey* (*Odontesthes hatcheri*)[J]. *Theriogenology*, 2009, 71(7): 1162–1172.
- [66] Yang J X, Pan X F, Chen X Y. Overview of the artificial enhancement and release of endemic freshwater fish in China [J]. *Zoological Research*, 2013, 34(4): 267–280. [杨君兴, 潘晓赋, 陈小勇, 等. 中国淡水鱼类人工增殖放流现状. [J]. *动物学研究*, 2013, 34(4): 267–280.]
- [67] Shen G M, Heino M. An overview of marine fisheries management in China [J]. *Mar Pol* 2014, 44(2): 265–272.
- [68] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations[J]. *Aquaculture*, 1999, 180(3–4): 247–264.
- [69] Iguchi K, Watanabe K, Nishida M. Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations[J]. *Aquaculture*, 1999, 178(3): 235–243.
- [70] Allendorf F W, Phelps S R. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout[J]. *Trans Am Fish Soc*, 1980, 109(5): 537–543.
- [71] Araki H, Cooper B, Blousin M, et al. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild[J]. *Science*, 2007, 318(5847): 100–103.
- [72] FAO. Report of the expert consultation on utilization and conservation of aquatic genetic resources[R]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1993.
- [73] Sato M, Morita T, Katayama N, et al. 8Production of genetically diversified fish seeds using spermatogonial transplantation[J]. *Aquaculture*, 2014, 422–423: 218–224.

Development and application prospects of fish germ cell transplantation technology

ZHAO Yaxian¹, ZHOU Qin¹, YU Qinghai¹, XIA Lianjun², REN Yuqin¹, LIN Tingting²

1. Beidaihe Central Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qinhuangdao 066100, China;

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

Abstract: This review introduces the development and applications of germ cell transplantation (GTC) (also called as surrogate production) as a newly emerging biotechnology. It is achieved by inducing germ-line chimerism between different species. Primordial germ cells (PGCs) and spermatogonial (or oogonia) are the key material of this technique. During the last decade, several different approaches have been developed for germ cell transplantation in fish, using different type of germ cell and recipients of various ages and life stages, such as blastula-stage embryos, newly hatched larvae and sexually mature specimens. All of these achievements give it advantages for application in many aquaculture research fields. (1) It has opened up new scenarios for the study of germ cell and niche biology and the possibility of generating transgenic fish. (2) Combined with the technique of cryopreservation of germ cell, whole testes and even whole fish, it could be a powerful tool for preserving valuable fish strains with desirable genetic traits and endangered species. (3) It presents a unique sex-selective breeding system that is superior to traditional endocrine sex control strategies. (4) It could serve as a novel and efficient method of producing fish seeds with increased genetic diversity for use in stock enhancement.

Key words: fish germ cell; primordial germ cells; spermatogonial; niche; cryopreservation

Corresponding author: ZHOU Qin. E-mail: laozhou_529@foxmail.com