

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17130

## 紫外辐射灭活大黄鱼和黄姑鱼精子及其激活大黄鱼卵子发育为胚胎的效果

汪倩凤<sup>1,2</sup>, 沈伟良<sup>2</sup>, 刘成<sup>1,2</sup>, 王迪<sup>1</sup>, 侯聪聪<sup>1</sup>, 竺俊全<sup>1,3</sup>, 吴雄飞<sup>2,3</sup>

1. 宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315012;

3. 浙江省海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江 宁波 315211

**摘要:** 为探讨大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和黄姑鱼(*Nibea albiflora*)精子的紫外辐射灭活适宜剂量及其激活大黄鱼卵子发育为胚胎的效果, 以 Ringer 氏液为稀释液, 按 1:30 稀释大黄鱼和黄姑鱼精子, 采用自制紫外灭活装置[紫外辐射强度  $2200 \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ , 紫外波长 254 nm]对这 2 种鱼的精子进行紫外照射处理及活力测定, 然后与正常大黄鱼卵子进行人工授精, 授精后一部分卵未作冷休克处理, 另一部分卵进行了冷休克处理(受精 2 min 30 s, 3℃海水, 冷休克 10 min), 并进行了早期胚胎成活率和仔鱼孵化率的测定与比较。结果显示: 1)大黄鱼和黄姑鱼精子的激活率与紫外照射处理时间呈负相关, 精子的快速运动时间变化呈典型的 Hertwig 效应。2)未冷休克组中大黄鱼和黄姑鱼诱导的早期胚胎成活率与精子的紫外照射时间总体呈负相关, 而仔鱼孵化率呈 Hertwig 效应。3)冷休克组中大黄鱼和黄姑鱼精子诱导的早期胚胎成活率和仔鱼孵化率随紫外照射时间的增加呈 Hertwig 效应, 分别于 2 min 20 s 和 1 min 30 s 时达相对峰值, 此时, 大黄鱼早期胚胎成活率和仔鱼孵化率分别为  $(38.3 \pm 4.3)\%$  和  $(66.5 \pm 5.1)\%$ , 黄姑鱼早期胚胎成活率和仔鱼孵化率分别为  $(43.3 \pm 3.3)\%$  和  $(67.7 \pm 6.3)\%$ 。分析认为, 大黄鱼和黄姑鱼精子遗传失活的紫外辐射剂量分别以  $308 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  和  $198 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  为佳。本研究旨在为大黄鱼雌核发育技术的改进提供依据。

**关键词:** 大黄鱼; 黄姑鱼; 紫外照射; 精子活力; 胚胎成活率; 孵化率

中图分类号: Q96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1203-10

精子遗传失活是雌核发育的首要环节。精子灭活的主要方式有电离辐射(X 射线和  $\gamma$  射线)、紫外辐射及化学药品处理等<sup>[1]</sup>。其中, 紫外辐射法安全、实用、易操作, 成为精子灭活最常用的手段之一。精子遗传失活的关键在于利用紫外线充分破坏精子的染色体, 但仍保留其入卵的能力, 能够激动卵子进行胚胎发育<sup>[2]</sup>。当紫外照射剂量达到一定值时, 精子染色体断裂, 精核萎缩, 授精后虽然雄性原核化, 但不能与雌核融合, 不能进行正常的胚胎发育, 需再经由雌核加倍技术才能发育成雌核发育二倍体。若有断裂的雄性染色体存在就不能称之为雌核发育, 因此适当的紫外辐

射剂量有助于提高精子灭活的效果及雌核发育的成功率。目前, 在鱼类育种中采用紫外灭活精子成功诱导雌核发育研究报道较多, 其中徐连伟等<sup>[3]</sup>研究发现, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)精子的最适紫外辐射剂量为  $32 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ , 在授精 40 min 后于 26℃水浴 15 min 所获得的雌核发育率最高, 育成率为 21.35%; 徐冬冬等<sup>[4]</sup>研究发现, 黄姑鱼(*Nibea albiflora*)精子的最适紫外灭活剂量为  $420 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ , 在授精 2 min 后于 3℃冷休克 8 min 的授精率、孵化率和诱导率达最高; 尤峰等<sup>[5]</sup>研究发现, 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)精子的最适紫外灭活剂量为  $360 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ , 在授精 85 min 后于  $(1 \pm 1)^\circ\text{C}$  冷休克

收稿日期: 2017-03-29; 修订日期: 2017-06-20.

基金项目: 宁波市科技计划重大项目(2015C110005); 浙江省科技计划重大项目(2016C02055-7).

作者简介: 汪倩凤(1991-), 女, 硕士. E-mail: 1411074813@nbu.edu.cn

通信作者: 吴雄飞, 研究员. E-mail: wxiongfei@hotmail.com

45 min 的授精率和孵化率达最高。但同源精子诱导雌核发育会因精子遗传物质灭活不完全而出现雌核发育子代中混入正常二倍体的现象,从而影响了后续的选育及纯系的培育。为避免此现象,研究人员多采用异源精子进行雌核发育诱导,例如刘海金等<sup>[6]</sup>采用真鲷(*Pagrus major*)精子诱导牙鲆雌核发育,精子的最适紫外辐射剂量为 73 mJ/cm<sup>2</sup>,在授精 3 min 后于(0.0±0.5)℃冷休克 45 min 后的授精率和孵化率达最高,且 RAPD 检测结果显示其子代均为二倍体,其遗传物质仅来自于母本;徐加涛等<sup>[7]</sup>采用黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)精子诱导漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)雌核发育,精子的最适紫外灭活剂量为 120 mJ/cm<sup>2</sup>,在授精 4 min 后于 3℃冷休克 45 min 后可获得高达 46.59% 的孵化率,远高于其同源精子诱导获得的雌核发育仔鱼孵化率,同时检测结果显示子代均为雌核发育二倍体;戈文龙等<sup>[8]</sup>采用经一定紫外剂量灭活的石鲈(*Paralichthys bicoloratus*)精子刺激牙鲆卵子发育,在授精 3 min 后于(3±1)℃冷休克 45 min 后可获得高达 79.7% 的诱导率。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)隶属于鲈形目(Perciformes),石首鱼科(Sciaenidae),黄鱼属,是中国海水鱼类养殖的主导种类之一<sup>[9]</sup>。近年来大黄鱼养殖群体因种质退化,出现生长趋缓、性早熟、个体小型化、抗病性和抗逆性下降等问题<sup>[10]</sup>。因此,良种培育引起重视,其中雌核发育育种技术得到了推广应用,一方面可以进行全雌化养殖,另一方面也可在较短时间内进行纯系的培育,通过不同纯系之间的杂交获得良种大黄鱼。以往,采用紫外灭活的大黄鱼和黄姑鱼精子分别作为同源及异源激活源诱导雌核发育的研究已见报道<sup>[4, 10-12]</sup>,但精子的最佳紫外辐射剂量因研究者实施的紫外灭活条件——精子稀释液及稀释比例、精液厚度、紫外照射强度与温度以及实验鱼产地不同存在一定差异<sup>[6]</sup>,精子紫外灭活的具体技术参数有待进一步优化,以确保精子灭活完全,保障雌核发育的顺利进行。本研究以人工养殖的东海岱衢洋大黄及黄姑鱼为对象,以照射强度为 2200 μW/(cm<sup>2</sup>·s)的紫外灯为辐射源,研究了不同紫外照射处理时间对大黄鱼和黄姑鱼精子的灭活效果及其激活大黄鱼卵

子发育为胚胎的影响,旨在探索大黄鱼和黄姑鱼精子的最佳紫外灭活剂量,为大黄鱼雌核发育技术的改进提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用性成熟大黄鱼和黄姑鱼于 2016 年 3 月取自浙江宁波象山港湾水产苗种有限公司育苗场,大黄鱼雌鱼 20 尾(体重 800~1200 g),雄鱼 10 尾(体重 800~1000 g);黄姑鱼雄鱼 10 尾(体重 800~1000 g),放养于室内水泥池中,在水温 23~24℃、pH 7.8~8.3、盐度 24~25、溶解氧 8~9 mg/L、光照 500~1000 lx 条件下暂养,日投饵优质饵料 2%~5%,日换水 80%~100%。待实验鱼适应室内环境后,用促黄体素释放激素类似物(LRH-A2)进行催产,雌鱼剂量为 1.6 μg/kg,雄鱼剂量为 0.8 μg/kg,效应时间约(35.0±0.5) h。

### 1.2 方法

**1.2.1 大黄鱼及黄姑鱼精液的采集与稀释** 采精时,用干毛巾擦干大黄鱼和黄姑鱼雄鱼生殖孔周围体表,轻压鱼腹使精液自然流出,分别盛放于洁净的小烧杯中,置于 4℃冰盒内避光保存。镜检精子激活率达 90%以上者用于后续实验。

将大黄鱼和黄姑鱼精液与 4℃预冷的 Ringer 氏液(NaCl 6.5 g/L, KCl 0.14 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0.2 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.013 g/L, 葡萄糖 2.0 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.12 g/L)按 1:30 的比例进行稀释,置于冰盒内避光保存。

**1.2.2 大黄鱼及黄姑鱼精子在不同紫外照射处理时间下的活力测定** 紫外辐射源为 2 支 15 W 紫外灯管(254 nm),平行固定在暗箱顶部;吸取 1 mL 稀释后的精液均匀铺设于直径为 6 cm 的预冷培养皿中(液面厚度约为 0.35 mm),置于摇床上的冰盒(摇床放置于暗箱内部,培养皿距紫外灯管 10 cm)。需提前将紫外灯打开至少 1 h 以稳定照射强度,用紫外辐照计(北京师范大学光电仪器厂)测得培养皿处的紫外强度为 2200 μW/(cm<sup>2</sup>·s)。照射参数参照黄晓荣等<sup>[13]</sup>和郑忠明等<sup>[14]</sup>等并稍作修改,其中大黄鱼精液的紫外照射时间设置为 60 s、90 s、120 s、140 s、160 s、180 s、210 s,共

7个梯度;黄姑鱼精液的紫外照射时间设置为30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s,共6个梯度。紫外照射处理过程中,摇床转速控制90 r/min。经紫外照射处理后的精液置于另一冰盒内避光保存备用,避免光复活。然后,将大黄鱼和黄姑鱼的鲜精和紫外照射处理后的精液分别与过滤海水(水温23℃、pH 8.1、盐度27)混合,在显微镜下观察精子活力(激活率、快速运动时间和寿命)。参照黄晓荣等<sup>[13]</sup>的方法,精子激活率指给定视野内被激活的精子数量占总精子数量的百分比,快速运动时间指精子自激活开始起至90%以上的精子原地颤动为止所经历的时间,寿命指精子自激活起至90%以上呈静止状态所经历的时间。实验重复3次。

**1.2.3 大黄鱼及黄姑鱼精子在不同紫外照射处理时间下激活大黄鱼卵子发育为胚胎的成活率及孵化率测定** 待紫外灭活的大黄鱼及黄姑鱼精液准备充分后再采集大黄鱼卵子(为避免卵子过熟可将雄鱼催产时间提前30 min)。采卵时,取大黄鱼雌鱼,轻压鱼腹使卵子流出,盛于洁净的小烧杯中,室温下避光保存。将采集的大黄鱼卵子分装入干燥洁净的烧杯内,分别与大黄鱼和黄姑鱼的鲜精及其紫外照射处理后的精液充分混匀,然后加23℃海水混匀,激活精子与卵子受精。在受精2 min 30 s后取上层悬浮卵,一部分卵直接入孵化桶(海水温度23.0℃±0.5℃)内孵育(未冷休克实验组),一部分卵置于3℃海水中冷休克处理10 min后过滤掉多余海水转入孵化桶内孵育(冷休克实验组)。其中,大黄鱼和黄姑鱼鲜精与大黄鱼卵子受精的实验组为对照组。

抽样观察测定胚胎成活率及孵化率:1)早期胚胎成活率(%)=原肠期正常胚数/总卵数×100%。2)仔鱼孵化率(%)=初孵仔鱼数/发育卵数×100%。每组实验进行3次重复统计,每次样本量不少于100。

### 1.3 数据分析

实验结果采用Microsoft Excel和SPSS.19进行统计及误差分析,利用单因素方差(one-way ANOVA)检验组间差异的显著性(差异显著水平为 $P<0.05$ ),并用Duncan法进行多重比较,用Microsoft Excel绘制柱形图。统计结果以平均值±标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 大黄鱼精子在不同紫外照射处理时间下的活力

大黄鱼精子在不同紫外照射时间下的激活率的测定结果见图1。鲜精激活率为(95±3)%,随着紫外照射时间的延长,精子激活率逐渐下降,其中照射时间2 min内精子激活率下降幅度较小,照射时间2 min后精子激活率下降幅度较大,至3 min 30 s时精子不再被激活。精子的快速运动时间和寿命变化见图2,均随着紫外照射时间的延长先快速减少,后又小幅度增加,最后缓慢减少至0;在紫外照射时间1 min 30 s~2 min时,精子的快速运动时间及运动寿命达到相对高点,其变化趋势符合Hertwig效应。

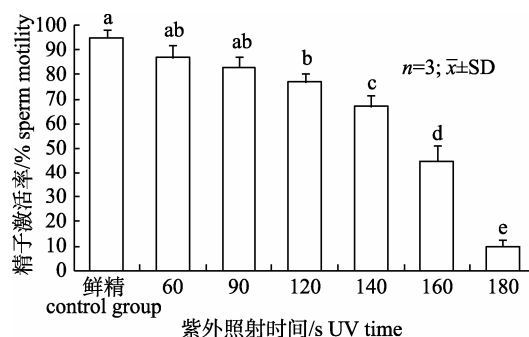


图1 大黄鱼精子在不同紫外照射时间下的激活率  
具有不同小写字母者表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 1 Sperm motility of *Larimichthys crocea* with different UV irradiation time

Different small letters mean significant difference at 0.05 level.

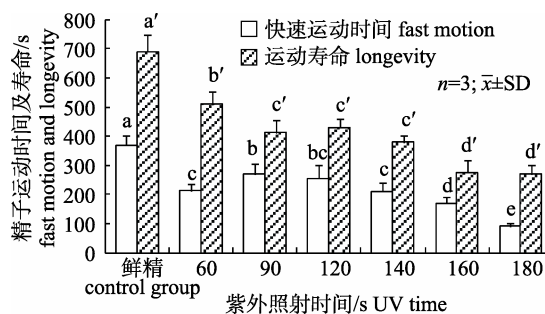


图2 大黄鱼精子在不同紫外照射时间下的  
快速运动时间及寿命

具有不同小写字母者表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 2 Fast motion time and longevity of *Larimichthys crocea* with different UV irradiation time

Different small letters mean significant difference at 0.05 level.

## 2.2 黄姑鱼精子在不同紫外照射处理时间下的活力

黄姑鱼精子在不同紫外照射时间下的激活率的测定结果见图 3。鲜精激活率为 $(95\pm3)\%$ ，随着紫外照射时间的延长其激活率逐渐下降，至 3 min 30 s 为 0。精子的快速运动时间变化同样呈 Hertwig 效应(图 4)：在 0~1 min，精子的快速运动时间和随紫外照射时间的延长而逐渐下降，但至 1 min 30 s 时却明显反弹增加，随后又缓慢下降至 0。与大黄鱼不同的是，黄姑鱼精子运动寿命随紫外照射时间延长而持续减少至 0。

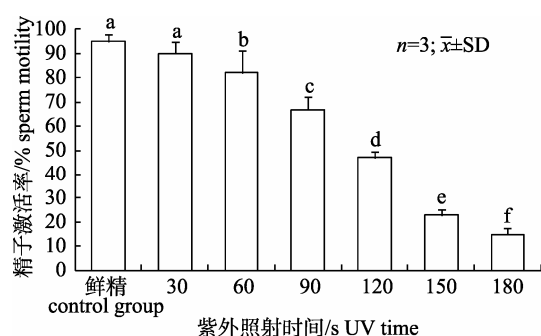


图 3 黄姑鱼精子在不同紫外照射时间下的激活率  
具有不同小写字母者表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 3 Sperm motility of *Nibea albiflora* with different UV irradiation time

Different small letters mean significant difference at 0.05 level.

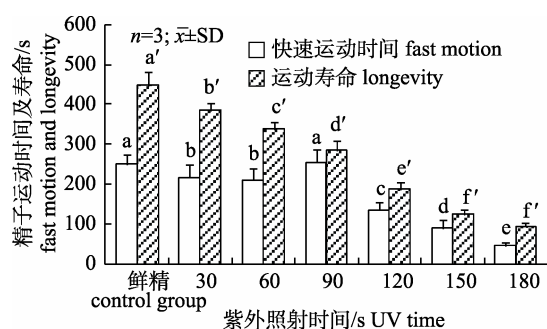


图 4 黄姑鱼精子在不同紫外照射时间下的  
快速运动时间及寿命

具有不同小写字母者表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 4 Fast motion time and longevity of *Nibea albiflora* with different UV irradiation time

Different small letters meant significant difference at 0.05 level.

## 2.3 大黄鱼精子在不同紫外照射处理时间下激活大黄鱼卵子发育为胚胎的成活率及孵化率

如图 5 所示，未冷休克实验组中经紫外照射处理后的大黄鱼精子激活大黄鱼卵子发育达早期

胚胎(原肠胚)的成活率总体随紫外照射时间的延长呈逐渐降低的趋势，而冷休克实验组的早期胚胎成活率随紫外照射时间的增加呈“先减、后增、再减”的 Hertwig 效应。大黄鱼鲜精对照组的早期胚胎成活率为 $(65.2\pm3.3)\%$ ，在紫外照射 1 min 30 s 内(紫外剂量 0~198  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )，冷休克实验组的早期胚胎成活率随辐射剂量的增加逐渐降低并始终低于未冷休克实验组；随后的 30 s(紫外剂量 198~264  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )内，冷休克实验组的早期胚胎成活率逐渐提高但依旧低于未冷休克实验组；在照射 2 min 时，冷休克组实验组的早期胚胎成活率达相对高点，即 $(38.3\pm4.3)\%$ ；当紫外辐射时间超过 2 min (紫外剂量 264~462  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )，冷休克实验组的早期胚胎成活率逐渐降低并始终高于未冷休克实验组；在照射 3 min 30 s 后，未冷休克实验组的早期胚胎成活率降为 $(13.9\pm1.3)\%$ ，冷休克实验组的早期胚胎成活率降为 0。

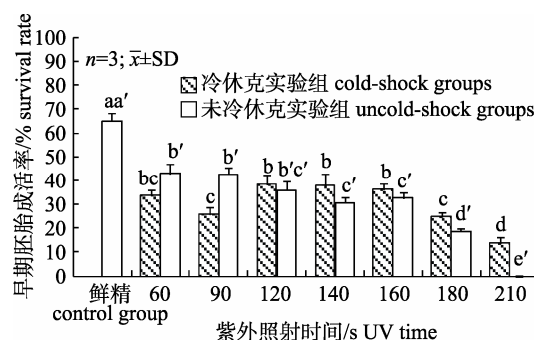


图 5 大黄鱼精子在不同紫外辐射时间下激活  
大黄鱼卵子发育达早期胚胎的成活率

具有不同小写字母者表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 5 Survival rates of *Larimichthys crocea* sperm with different durations of UV time

Different small letters meant significant difference at 0.05 level.

如图 6 所示，冷休克前后经紫外辐射处理后的大黄鱼精子诱导大黄鱼卵子胚胎发育的仔鱼孵化率均呈明显的 Hertwig 效应；紫外照射 90~140 s(紫外剂量 198~308  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )期间冷休克前后实验组的仔鱼孵化率随照射时间的增加而上升，于 140 s 达相对高点[分别为 $(66.5\pm5.1)\%$ ， $(58.4\pm2.5)\%$ ]，超过 140 s 后孵化率逐渐减弱；至 210 s 冷休克实验组的孵化率降为 $(13.3\pm2.7)\%$ ，未冷休克实验组的孵化率为 0。

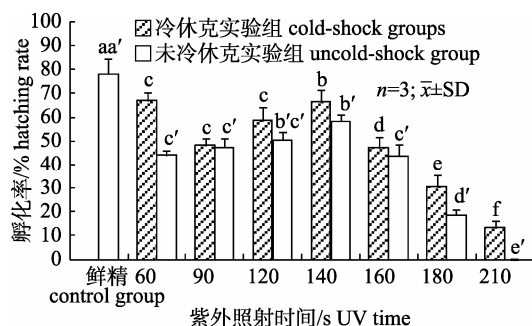


图 6 不同紫外辐射时间下大黄鱼精子诱导的仔鱼孵化率

具有不同小写字母者表示组间差异显著( $P < 0.05$ ).

Fig. 6 Hatching rates of *Larimichthys crocea* sperm with different durations of UV time

Different small letters meant significant difference at 0.05 level.

## 2.4 黄姑鱼精子在不同紫外照射处理时间下激活大黄鱼卵子发育为胚胎的成活率及孵化率

如图 7 所示, 冷休克实验组中经紫外辐射处理后的黄姑鱼精子激活大黄鱼卵子发育达早期胚胎的成活率随紫外照射时间的增加呈“先减、后增、再减”的 Hertwig 效应, 而未冷休克实验组的早期胚胎成活率则随着紫外照射时间的增加逐渐减弱; 黄姑鱼鲜精受精率为 $(76.1 \pm 5.3)\%$ , 在紫外照射 1 min 内(紫外剂量 $0 \sim 132 \text{ mJ/cm}^2$ ), 冷休克实验组的早期胚胎成活率随紫外照射时间的延长逐渐减少且与未冷休克实验组早期胚胎成活率接近; 随后的 30 s (紫外剂量 $132 \sim 198 \text{ mJ/cm}^2$ )内, 冷休克实验组的早期胚胎成活率逐渐增加并高于未冷休克实验组, 紫外照射至 1 min 30 s 时, 早期胚胎成

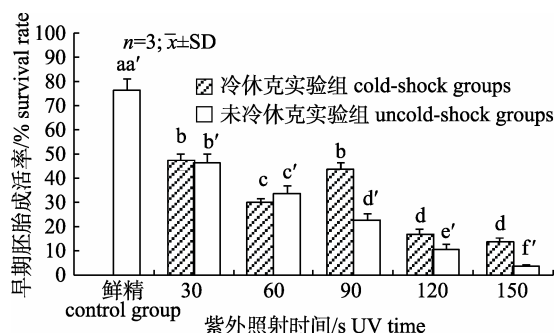


图 7 黄姑鱼精子在不同紫外辐射时间下激活大黄鱼卵子发育达早期胚胎的成活率

具有不同小写字母者表示组间差异显著( $P < 0.05$ ).

Fig. 7 Survival rates of *N. albiflora* sperm with different durations of UV time

Different small letters meant significant difference at 0.05 level.

活率达相对高点( $43.3 \pm 3.3\%$ )。当紫外照射时间超过 1 min 30 s (紫外剂量 $198 \sim 396 \text{ mJ/cm}^2$ ), 冷休克实验组的早期胚胎成活率逐渐降低且始终高于未冷休克实验组, 在紫外照射 3 min 后, 冷休克实验组与未冷休克实验组的早期胚胎成活率均降为 0。

如图 8 所示, 冷休克前后经紫外辐射处理后的黄姑鱼精子诱导大黄鱼卵子胚胎发育的仔鱼孵化率同样呈明显的 Hertwig 效应; 紫外照射 60~90 s (紫外剂量 $132 \sim 198 \text{ mJ/cm}^2$ )期间冷休克前后实验组的仔鱼孵化率随照射时间的增加而上升, 于 90 s 达相对高点(分别为 $(67.7 \pm 6.3)\%$ ,  $(57.3 \pm 2.1)\%$ ), 超过 90 s 后孵化率逐渐减弱; 至 150 s 冷休克实验组的孵化率降为 $(13.3 \pm 3.9)\%$ , 未冷休克实验组的孵化率为 0。

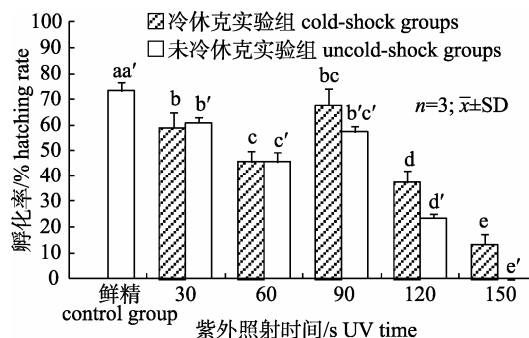


图 8 不同紫外辐射时间下黄姑鱼精子诱导的仔鱼孵化率

具有不同小写字母者表示组间差异显著( $P < 0.05$ )

Fig. 8 Hatching rates of *N. albiflora* sperm with different durations of UV time

Different small letters meant significant difference at 0.05 level.

## 3 讨论

精子遗传灭活处理是雌核发育诱导的关键技术之一, 化学药品处理、电离辐射(X 射线和  $\gamma$  射线)及紫外辐射均可破坏精子的遗传物质。目前, 已知可使精子遗传失活的化学药品主要有硫酸二甲酯、甲苯胺蓝、乙烯脲、吡啶黄及噻嗪等<sup>[14]</sup>, 但在精子灭活处理中应用较少。X 射线和  $\gamma$  射线具有较好的穿透力, 可以深透到细胞内, 诱导染色体断裂, 因此对于体积较大的精子, 如马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)精子灭活效果较好<sup>[15]</sup>; 电离辐射比较均匀, 很少有精子不会被照射到,

精子遗传失活较完全。但是电离辐射需要特定的放射装置及安全设施,操作不便,另外经射线处理后的精子生存力和激活卵子进行胚胎发育的能力都较差<sup>[1]</sup>。因此,电离辐射灭活精子法也较少使用。紫外辐射是精子灭活的常用方法,其机理为紫外线能量会引起核酸嘧啶碱基的异常连接,使得精子 DNA 分子中同一条链上两相邻胸腺嘧啶碱基之间形成二聚体,引起 DNA-DNA 或 DNA-蛋白质交联<sup>[16]</sup>,进而还会引起胞嘧啶水合物的形成和碱基对的替换,最终会使 DNA 断裂为片段<sup>[17]</sup>。紫外线穿透力虽不如 X 射线和  $\gamma$  射线,但设备相对简单,操作简易,危险性小且费用低。紫外照射后的精子暴露在可见光下会被一定程度的修复即“光复活”<sup>[18-20]</sup>。因此,紫外照射装置需密闭不透光,照射后的精子应置于黑暗中低温保存,直至受精<sup>[21]</sup>。本研究采用的自制紫外照射装置由支架及黑色不透光膜组成,暗箱内顶部平行固定 2 支 15 W 紫外灯管(254 nm),下方放置装有冰盒的摇床(冰盒距紫外灯管 10 cm),经照射的精液置于冰盒内避光保存。由于 254 nm 的紫外灯穿透力较弱,因此需将精液稀释到一定程度,液面不宜过厚,照射期间均匀晃动稀释精液,以此确保大部分精子可以照射完全。

紫外灭活的目的是破坏精子的遗传功能,但不影响其进入卵子的能力。因此,进行精子紫外灭活时要把握好辐射剂量,过高会导致精子完全死亡无法进入卵子,过低则精子未被灭活而参与正常受精。大部分鱼类精子活力与紫外辐射剂量之间呈现明显的 Hertwig 效应<sup>[18]</sup>,即在一定的紫外剂量范围内,随着辐射剂量的增加,精子的活力逐渐降低甚至趋向于 0,但随着辐射剂量的继续增加,精子的活力又有所升高。这种现象在西伯利亚鲟(*Acipenser baeri* Brandt)<sup>[22]</sup>、刺鲃(*Heteropneustes fossilis*)<sup>[23]</sup>、梭鲈(*Sander lucioperca*)<sup>[24]</sup>等的精子紫外灭活研究中均有报道。本研究中大黄鱼和黄姑鱼精子的快速运动时间随辐射剂量的增加同样呈 Hertwig 效应。这可能是由于在照射初期低剂量的紫外辐射造成的 DNA 损伤在可修复范围内,因此在照射到某一时间点时损伤的 DNA 通过核苷酸切除修复机制(nucleotide exci-

sion repair, NER)进行修复<sup>[22]</sup>;而高剂量的紫外辐射除造成 DNA 的不可逆损伤外,还可能导致鞭毛微管纤维解聚,鞭毛脱落,精子外膜和线粒体结构破损等现象,对精子的运动能力造成影响,甚至死亡<sup>[25-27]</sup>。

不同种类精子的生理特性存在一定差异,其适宜的紫外灭活条件—如稀释液、稀释比例及适宜辐射剂量等有所不同。稀释液为精子提供一个适宜的生理环境,能减少精液黏稠度,降低精子密度,确保紫外线照射能作用于大部分精子,同时能够防止照射前后精子被激活并延长其在体外存活的时间。精子的稀释液主要有 Cortland、HBSS、MPRS 及 Ringer 氏液等(表 1),若雄鱼的精液量足够,通过离心获取的精浆也可作为稀释液之一,例如西伯利亚鲟精液稀释使用了精浆<sup>[22]</sup>。本研究所用的 Ringer 氏液在海水鱼类精子紫外灭活中较常用,例如条斑星鲈<sup>[28]</sup>、牙鲆<sup>[28]</sup>、真鲷<sup>[6]</sup>及黑鲷<sup>[7]</sup>等鱼类的精液稀释均使用了 Ringer 氏液。稀释比例一般在 1:100 范围内(表 1)。Piferrer 等<sup>[29]</sup>发现精液的稀释倍数越高,精子密度越小,其受紫外照射后所呈现的活力越弱。因此,研究人员采用的照射精液厚度通常与精子的稀释比例呈正比(表 1)。本研究中,用 4℃ 预冷的 Ringer 氏液将大黄鱼精液稀释 30 倍后置于冰盒上进行紫外照射,当紫外辐射剂量在 198~264 mJ/cm<sup>2</sup> 时,大黄鱼精子快速运动时间和运动寿命呈明显上升趋势,在 462 mJ/cm<sup>2</sup> 处精子完全死亡。而 Xu 等<sup>[30]</sup>采用 2℃ 预冷的 Ringer 氏液按 1:100 的比例稀释大黄鱼精子,在 20~21℃ 室温下进行紫外照射处理,结果表明,在紫外辐射剂量为 30~75 mJ/cm<sup>2</sup> 范围内,精子活力显著增加,至 150 mJ/cm<sup>2</sup> 剂量处精子活力趋近于 0。精子灭活效果除精液稀释的倍数外,照射时的温度也可能是重要的影响因子之一。刘海金等<sup>[6]</sup>指出紫外辐射强度与产生的温度呈正相关关系,本研究,在辐射剂量 132~198 mJ/cm<sup>2</sup> 黄姑鱼精子快速运动时间呈明显上升趋势,在 396 mJ/cm<sup>2</sup> 剂量处精子完全死亡,这一结果与杨育凯等<sup>[12]</sup>报道的基本相符,其紫外灭活黄姑鱼精子时同样将稀释精液置于冰上,紫外辐射强度为 3800  $\mu$ W/(cm<sup>2</sup>·s),远高于本实验的 2200  $\mu$ W/(cm<sup>2</sup>·s)。

可见高稀释倍数使得精子生理灭活所需的紫外辐射剂量更低, 而低温更有利于精子活力的维持。因此进行精子紫外灭活时需提供低温环境以减弱或消除不同紫外强度产生的温度对精子活力的影响。

精子的适宜紫外辐射剂量随鱼种类不同而异, 甚至对同种鱼不同研究者的实验结果也存在差异(表 1)。许建和等<sup>[11]</sup>和李益云<sup>[31]</sup>报道的大黄鱼精子紫外辐射处理适宜剂量分别为 300 mJ/cm<sup>2</sup> 和 253~406 mJ/cm<sup>2</sup>, 与本研究的大黄鱼精子紫外辐射处理适宜剂量 308 mJ/cm<sup>2</sup>, 相近; 另本研究的黄姑鱼精子紫外辐射处理适宜剂量为 198 mJ/cm<sup>2</sup>, 与杨育凯等<sup>[12]</sup>和徐冬冬等<sup>[4]</sup>报道的黄姑鱼精子紫外辐射处理适宜剂量 228 mJ/cm<sup>2</sup> 和 420 mJ/cm<sup>2</sup> 存在一定差异。Vazquez 等<sup>[32]</sup>和 Piferrer 等<sup>[29]</sup>报道的大菱鲆精子最佳紫外剂量分别为 870 mJ/cm<sup>2</sup> 和 300 mJ/cm<sup>2</sup>, 差异显著, 这可能与精子稀释液种类、稀释比例、照射精液厚度, 紫外照射强度及温度等不同有关<sup>[6]</sup>。另外, 实验鱼的产地及生长情况也可能影响实验结果。

本研究显示, 未冷休克实验组的紫外辐射处理后大黄鱼和黄姑鱼精子激活大黄鱼卵子发育达

早期胚胎成活率与紫外辐射剂量呈负相关关系, 仔鱼孵化率与紫外辐射剂量均呈 Hertwig 效应, 而冷休克实验组的紫外辐射处理后大黄鱼和黄姑鱼精子激活大黄鱼卵子发育达早期胚胎成活率和仔鱼孵化率随紫外辐射剂量的增加呈 Hertwig 效应, 另外冷休克前后经紫外辐射处理后的大黄鱼和黄姑鱼精子诱导大黄鱼卵子胚胎发育的仔鱼孵化率均呈明显的 Hertwig 效应。其主要原因可能是随着紫外辐射剂量的增加, 精子染色体受损程度增加, 且为精子提供动力的鞭毛裂解脱落, 使得经紫外辐射的精子激活卵子发育的动力逐渐减弱<sup>[37]</sup>。另外, 陈宝增等<sup>[2]</sup>和季相山等<sup>[37]</sup>指出, 单倍体胚胎在卵裂期间会发生较多的畸形卵裂现象, 部分正常卵裂的单倍体胚胎在后期的发育过程中核质比下降, 无法发育至原肠胚期(本文统计早期胚胎成活率的标准), 因此随紫外辐射剂量的增加, 未冷休克实验组的早期胚胎成活率和呈逐渐下降的趋势, 而冷休克实验组的早期胚胎成活率和仔鱼孵化率变化趋势与其对应的灭活精子的活力变化相近, 可见冷休克诱导染色体加倍是胚胎正常发育过程中的关键。但对于未冷休克实验组的仔鱼孵化率为何同样呈 Herwig 效应的原因, 尚缺乏

表 1 几种海水鱼类精子紫外辐射处理适宜条件  
Tab. 1 The dilution condition and UV irradiation doses for sperm inactivation for induced gynogenesis in seawater fish species

| 种类<br>species                       | 稀释液<br>extender | 稀释比例<br>dilution ratio | 精液厚度/mm<br>depth | 适宜紫外辐射剂量<br>/(mJ·cm <sup>-2</sup> ) UV dose | 参考文献<br>reference |
|-------------------------------------|-----------------|------------------------|------------------|---------------------------------------------|-------------------|
| 条斑星鲷 <i>Verasper moseri</i>         | Ringer          | 30                     | —                | 40~45                                       | [28]              |
| 大西洋鳕 <i>Gadus morhua</i>            | Hanks           | 80                     | 1                | 221                                         | [33]              |
| 斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>   | Ts-19           | 9                      | 0.16             | 518                                         | [34]              |
| 牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>    | Ringer          | 50                     | 2                | 360                                         | [5]               |
| 犬齿牙鲆 <i>Paralichthys dentatus</i>   | MPRS            | 30                     | —                | 80                                          | [35]              |
| 大菱鲆 <i>Scophthal musmaximus</i>     | Ringer          | 10                     | 0.30             | 300                                         | [29]              |
| 真鲷 <i>Pagrosomus major</i>          | Ringer          | 50                     | —                | 73                                          | [6]               |
| 黑鲷 <i>Sparus macrocephlus</i>       | Ringer          | 100                    | 2                | 120                                         | [7]               |
| 条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>    | Ringer          | 20~40                  | 0.78             | 70                                          | [36]              |
| 大黄鱼(岱衢族) <i>Larimichthys crocea</i> | Ringer          | 100                    | 2                | 300                                         | [11, 30]          |
| 大黄鱼(闽东族) <i>Larimichthys crocea</i> | NKC             | 30                     | 0.47             | 253~406                                     | [31]              |
| 大黄鱼(岱衢族) <i>Larimichthys crocea</i> | Ringer          | 30                     | 0.35             | 308                                         | 本文 this study     |
| 黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>          | Ringer          | 40                     | —                | 420                                         | [4]               |
| 黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>          | Hanks           | 4                      | 0.47             | 228                                         | [12]              |
| 黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>          | Ringer          | 30                     | 0.35             | 198                                         | 本文 this study     |

有力的证据给出合理解释。除此之外,在紫外照射初期大黄鱼和黄姑鱼未冷休克实验组的早期胚胎成活率均高于冷休克实验组,可能的原因是这个阶段冷休克诱导的二倍体组在第一次减数分裂期间同源染色体发生交换使得部分隐性致死基因重组,造成二倍体胚胎的存活率低于单倍体胚胎,无法存活至原肠胚期<sup>[37]</sup>。

综上所述,以 Ringer 氏液为稀释液,按 1:30 稀释大黄鱼和黄姑鱼精子(精液厚度约为 0.35 mm),置于照射强度为 2200  $\mu\text{W}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$  的封闭不透光紫外辐射装置内(照射期间培养皿始终置于冰盒上),分别照射处理 2 min 20 s 和 1 min 30 s 的灭活效果较好,人工授精激活大黄鱼卵子发育达早期胚胎(原肠胚)的成活率较高。大黄鱼和黄姑鱼精子的紫外辐射灭活适宜剂量为 308  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  和 198  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ 。

#### 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): 150–173.
- [2] Chen B Z, Kang X J, Li F C, et al. Preliminary studies on UV irradiation for the inactivation of sperm and development of fertilized oocyte in zebrafish[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2008, 21(2): 25–32. [陈宝增, 康现江, 李凤超, 等. 紫外线辐射灭活斑马鱼精子及其激活卵子发育的初步研究[J]. *水产学杂志*, 2008, 21(2): 25–32.]
- [3] Xu L W, Jia Z H, Wang B Q. The Induction of rainbow trout gynogenesis using ultraviolet radiation to inactivating sperm[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2006, 19(1): 14–19. [徐连伟, 贾忠贺, 王炳谦. 利用紫外线辐射遗传失活精子诱导虹鳟雌核发育[J]. *水产学杂志*, 2006, 19(1): 14–19.]
- [4] Xu D D, Lou B, Xue B G, et al. Artificial induction of diploid gynogenesis in *Nibea alibiflora* and evidence for female homogamety[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2013, 44(2): 310–317. [徐冬冬, 楼宝, 薛宝贵, 等. 黄姑鱼(*Nibea alibiflora*)雌核发育的人工诱导及鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(2): 310–317.]
- [5] You F, Xu J H, Ni J, et al. Study on artificial induction of mitogynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*[J]. *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.]
- [6] Liu H J, Hou J L, Chang Y M, et al. Induced meiogynogenesis 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.]
- [7] Xu J T, You F, Xu J H, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder *Paralichthys lethostigma* by black porgy *Acanthopagrus schlegeli* sperm[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(12): 744–748. [徐加涛, 尤锋, 许建和, 等. 黑鲷精子诱导漠斑牙鲆雌核发育研究[J]. *水产科学*, 2011, 30(12): 744–748.]
- [8] Ge W L, Zhang Q Q, Qi J, et al. Gynogenesis induced by heterogenous sperms and cold shock in Olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2005, 35(6): 1011–1016. [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.]
- [9] Hong W, Zhang Q. Review of captive bred species and fry production of marine fish in China[J]. *Aquaculture*, 2003, 227(1–4): 305–318.
- [10] Wu Q M, Cai M Y, Liu X D, et al. Induction and microsatellite analysis of homozygous gynogenesis in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(5): 734–741. [吴清明, 蔡明夷, 刘贤德, 等. 大黄鱼同质雌核发育的诱导及微卫星标记分析[J]. *水产学报*, 2009, 33(5): 734–741.]
- [11] Xu J H, You F, Wu X, et al. Preliminary study on artificial induction of diploid gynogenesis in the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. *Marine Sciences*, 2006, 30(12): 32–42. [许建和, 尤锋, 吴雄飞, 等. 大黄鱼雌核发育二倍体的人工诱导[J]. *海洋科学*, 2006, 30(12): 37–42.]
- [12] Yang Y K, Xie Y J, Cai M Y, et al. Induction and identification of gynogenesis in *Nibea alibiflora*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(9): 1297–1303. [杨育凯, 谢仰杰, 蔡明夷, 等. 黄姑鱼雌核发育诱导及鉴定[J]. *水产学报*, 2013, 37(9): 1297–1303.]
- [13] Huang X R, Zhang L Z, Qiao Z G, et al. The effects of different cryoprotectants on the sperm motility and the movement time of Japanese eel (*Anguilla japonica*)[J]. *Marine Fisheries*, 2007, 29(3): 193–199. [黄晓荣, 章龙珍, 乔振国, 等. 抗冻剂对日本鳗鲡精子活力及运动时间的影响[J]. *海洋渔业*, 2007, 29(3): 193–199.]
- [14] Zheng Z M, He T, Xue L Y. Effect of ultraviolet on genetic inactivity and fertilization of large yellow croaker *pseudosciaena crocea*[J]. *Journal of Ningbo University*, 2008, 21(2): 169–173. [郑忠明, 何滔, 薛良义. 紫外线照射对大黄鱼精子遗传失活和受精能力的影响[J]. *宁波大学学报: 理工版*, 2008, 21(2): 169–173.]
- [15] Arai K, Onozato H, Yanazaki F. Artificial androgenesis induced with gamma irradiation in masu salmon, *Oncorhynchus masu* [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.]

- ynchus masou*[J]. Bull Fac Fish Hokkaido Univ, 1979, 30(3): 181–186.
- [16] Friedberg E C. Nucleotide excision repair of DNA in eukaryotes: comparisons between human cells and yeast[J]. Can Surv, 1985, 4(3): 529–555.
- [17] Cieminis K G K, Rancelien V M, Prualgauskien A J, et al. Chromosome and DNA damage and their repair in higher plants irradiated with short-wave ultraviolet light[J]. Mutat Res, 1987, 181(1): 9–16.
- [18] Ihiri K I, Egami N. Hertwig effect caused by UV-irradiation of sperm of *Oryzias latipes* (teleost) and its photoreactivation[J]. Mutat Res, 1980, 69(2): 241–248.
- [19] Lebeda I, Flajshans M. Influence of photoreactivation on induction of gynogenesis in sterlet, *Acipenser ruthenus*[J]. Aquac Res, 2014, 47(4): 1364–1368.
- [20] Sinha R P, Hder D. UV-induced DNA damage and repair: a review[J]. Photochem Photobiol Sci, 2002, 1(4): 225–236.
- [21] Recoubratsky A V, Grunina A S, Barmintsev V A, et al. Meiotic gynogenesis in the stellate and Russian sturgeons and sterlet[J]. Russ J Dev Bio, 2003, 34(2): 92–101.
- [22] Zhang T, Yan S W, Zhang L Z, et al. Impacts of ultraviolet irradiation on the sperm motility and longevity of *Acipenser baerii*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(8): 2179–2183. [张涛, 颜世伟, 章龙珍, 等. 紫外线辐射对西伯利亚鲟精子活力和寿命的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(8): 2179–2183.]
- [23] Christopher J G, Murugesan A G, Sukumaran N. Genetic inactivation of stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*) sperm with UV irradiation[J]. J Appl Aqu, 2009, 21(2): 128–137.
- [24] Birnbaum K, Mahn M. Milt dilution effectiveness on pikeperch (*Sander lucioperca*) sperm DNA inactivation[J]. Lucrari Stiintifice Zootehnie Si Biotehnl, 2013, 42(2): 65–70.
- [25] You F, Xu J, Zhu X, et al. Effect of ultraviolet irradiation on sperm of the left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. J World Aquacult Soc, 2008, 39(3): 414–422.
- [26] Zhao F, Yang A, Liu Z, et al. Effects of ultraviolet irradiation on genetic inactivation and morphological structure of sperm of scallop *Chlamys farreri*[J]. Marine Fisheries Research, 2003, 24(4): 26–31. [赵峰, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 紫外辐射对栉孔扇贝精子遗传失活及形态结构的影响[J]. 渔业科学进展, 2003, 24(4): 26–31.]
- [27] Don J, Avtalion R R. Ultraviolet irradiation of tilapia spermatozoa and the Hertwig effect: electron microscopic analysis[J]. J Fish Biol, 1993, 42(1): 1–14.
- [28] Mori T, Saito S, Kishioka C, et al. Induction of triploids and gynogenetic diploids in barfin flounder *Verasper moseri*[J]. Nippon Suisan Gakk, 2004, 70(2): 145–151.
- [29] Piferrer F, Cal R M, Gómez C, et al. 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): 403–419.
- [30] Xu J H, You F, Yan B L, et al. Effects of ultra-violet irradiation on sperm motility and diploid gynogenesis induction in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) undergoing cold shock[J]. Aquacul Int, 2007, 15(5): 371–382.
- [31] Li Y Y. Induction and genetic analysis of gynogenesis in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[D]. Xiamen: Jimei University, 2007. [李益云. 大黄鱼雌核发育的诱导及遗传分析[D]. 厦门: 集美大学, 2007.]
- [32] Vazquez E, Fernandez, Pato C, et al. Induced gynogenesis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Eur Aquacult Soc, 2002, 32: 528–529.
- [33] Ghigliottit, Bolla S L, Duc M, et al. Induction of meiotic gynogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) through pressure shock[J]. Anim Reprod Sci, 2011, 127(1–2): 91–99.
- [34] Wu T C. Introduction of meiotic gynogenesis and breeding of families's offspring in orange-spotgrouper *Epinepgelus coioids*[D]. Haikou: Hainai University, 2013. [吴廷昌. 斜带石斑鱼雌核发育的诱导及家系育种子代的培育[D]. 海口: 海南大学, 2013.]
- [35] Yang J F. Study on gynogenesis and sex control in four flounder fish[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009. [杨景峰. 四种鲆鲽鱼类雌核发育及性别控制技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.]
- [36] Lin J H. Gynogenetic *Nibea* induced by *Oplegnathus* sperm and preparation of pseudo-male *Nibea*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2015. [林家豪. 条石鲷精子诱导黄姑鱼雌核发育及其伪雄鱼的制备[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2015.]
- [37] Ji X S, Chen S L, Wu P F, et al. Comparison of embryonic development of *Cynoglossus semilaevis* haploid induced by heterogenous and homogenous sperm[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(1): 60–69. [季相山, 陈松林, 武鹏飞, 等. 紫外灭活的异源和同源精子诱导的半滑舌鳎单倍体胚胎发育过程比较[J]. 水产学报, 2009, 33(1): 60–69.]

## Effects of UV irradiation on motility of sperm in *Larimichthys crocea* and *Nibea albiflora* and development of fertilized oocytes in *L. crocea*

WANG Qianfeng<sup>1,2</sup>, SHEN Weiliang<sup>2</sup>, LIU Cheng<sup>1,2</sup>, WANG Di<sup>1</sup>, HOU Congcong<sup>1</sup>, ZHU Junquan<sup>1,3</sup>,  
WU Xiongfei<sup>2,3</sup>

1. College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Marine and Fisheries Research Institute, Ningbo 315012, China;

3. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-Efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo 315211, China

**Abstract:** This study investigated the effects of UV irradiation on sperm motility and duration of sperm activity and determined the optimal UV irradiation dosage to genetically inactivate *Larimichthys crocea* and *Nibea albiflora* sperm, while retaining adequate motility to fertilize *L. crocea* eggs. Milt from several males was diluted 1 : 30 with Ringer's solution and UV irradiated at an intensity of 2200  $\mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ , and used to fertilize *L. crocea* eggs. The fertilized eggs were divided into a cold-shock group (3°C for 10 min at 2 min 30 s after fertilization) and a control group without cold-shock. Early embryo survival rate and larvae hatching rate were measured and compared. The results showed that: 1) motility of *L. crocea* and *N. albiflora* sperm was negatively correlated with UV treatment time, and the rapid changes in sperm showed a typical Hertwig effect; 2) early embryo survival rate induced by *L. crocea* and *N. albiflora* sperm in the control groups was negatively correlated with the UV exposure time, while the larvae hatching rate showed a typical Hertwig effect; 3) early embryo survival rate and larvae hatching rate induced by *L. crocea* and *N. albiflora* sperm in the cold-shock group showed a typical Hertwig effect with the increase in UV irradiation time, reaching peaks at 2 min 20 s and 1 min 30 s, respectively (the peak values of the survival and hatching rates of *L. crocea* were  $(38.3 \pm 4.3)\%$  and  $(66.5 \pm 5.1)\%$ , respectively; the peak values of the survival and hatching rates of *N. albiflora* were  $(43.3 \pm 3.3)\%$  and  $(67.7 \pm 6.3)\%$ , respectively). The results of this study indicated that the optimal UV dosages for *L. crocea* and *N. albiflora* sperm to activate *L. crocea* eggs were 308  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  and 198  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , respectively. These results provide information for the improvement of gyno-genetic technology for *L. crocea*.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; *Nibea albiflora*; UV irradiation; motility; survival rate; hatching rate

**Corresponding author:** WU Xiongfei. E-mail: wxiongfei@hotmail.com