

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01259

真鲷精子诱导漠斑牙鲆减数雌核发育

柳学周¹, 宁鑫^{1,2}, 徐永江¹, 赵明¹, 李春广^{1,2}, 李军³

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201300;

3. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 采用紫外线(UV)灭活的冷冻真鲷(*Pagrosomus major*)精子激发漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)卵子发育。冷冻真鲷精子适宜的 UV 灭活剂量为 72 mJ/cm², 随着处理时间延长, 胚胎的孵化率呈现哈特维希效应, 其中 40 s 灭活组胚胎孵化率达到最高[(29±1.9)%], 单倍体率 100%。利用冷休克法抑制卵子第二极体排出, 成功获得雌核发育二倍体仔鱼。冷休克处理温度为 0~2℃, 处理起始时间 3 min、持续时间 45 min 时, 雌核发育二倍体胚胎的孵化率最高, 达(9.4±0.71)%, 获得批量雌核发育仔鱼。雌核发育仔鱼经流式细胞仪和染色体倍性鉴定, 均为二倍体(2n=48), 未发现单倍体和非整倍体现象。雌核发育二倍体组和单倍体组与正常二倍体组孵化时间差异显著, 分别历时 64 h 59 min 和 55 h 49 min。雌核发育二倍体仔鱼与正常二倍体仔鱼形态特征差异不显著($P>0.05$), 单倍体仔鱼明显畸形。研究表明, 采用适宜的紫外线剂量灭活的冷冻真鲷精子可成功诱导漠斑牙鲆雌核发育, 获得雌核发育二倍体后代, 研究结果可为漠斑牙鲆全雌化苗种生产提供技术和理论依据。

关键词: 漠斑牙鲆; 异源精子; 雌核发育; 冷休克; 胚胎发育

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1259-10

漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*), 属鲽形目(Pleuronectiformes), 鲆科(Bothidae), 牙鲆属(*Paralichthys*), 具有品质优、适应性广、抗逆性强等特点, 是一种具有较高商业价值的优良养殖鱼种。漠斑牙鲆雌雄个体生长差异较大, 如 2 龄雌、雄鱼体长分别为 320 mm 和 230 mm^[1], 通过性别控制方法生产单性苗种进行养殖, 可获得更快的生长速度和更高的经济效益。

目前, 鱼类获得单性后代的技术包括孤雌生殖、雌核发育、雄核发育和杂交育种等。利用雌核发育技术已成功在鲑科、鲤科、鲈科、鲷科和鲽科等多种经济鱼类中获得单性后代群体^[2-3], 在鲽科中, 开展的研究主要集中在条斑星鲽(*Verasper moseri*)^[4]、褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[5-6]、庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)^[7]、大

菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[8-9]、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther)^[10]、漠斑牙鲆^[13]等。国外漠斑牙鲆雌核发育研究已有相关报道, 利用漠斑牙鲆、鲮(*Mugil cephalus*)和美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*)^[11-12]精子成功获得雌核发育后代; 国内杨景峰等^[13]利用冷冻花鲈精液(*Lateolabrax japonicus*), 采用静水压法诱导漠斑牙鲆雌核发育成功。有关漠斑牙鲆雌核胚胎发育时序观察国内外均无相关报道。本研究利用灭活的冷冻真鲷精子, 采用冷休克法抑制第二极体排出, 成功获得雌核发育二倍体仔鱼, 并对其单倍体、雌核发育二倍体的胚胎发育时序和仔鱼形态进行了观察, 旨在为漠斑牙鲆雌核发育提供新的途径和数据, 同时也为比目鱼类的雌性制种技术提供技术参考。

收稿日期: 2011-05-09; 修订日期: 2011-07-03.

基金项目: 国家 863 计划项目(2010AA10A402); 公益性农业行业专项(200903005); 国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50); 青岛市成果专项项目(09-2-3-15-chg).

作者简介: 柳学周(1959-), 男, 研究员. 主要从事海水鱼类繁育养殖生物学研究.E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

1 材料与方法

1.1 亲鱼催产

漠斑牙鲆亲鱼由青岛忠海水产有限公司提供, 年龄 3 龄以上, 雌鱼体质量(650 ± 26) g, 体长(33.5 ± 2.9) cm; 雄鱼体质量(430 ± 20) g, 体长(26.3 ± 3.1) cm。2009 年 9 月–2010 年 4 月, 采用人工“控温+控光+营养强化”方法, 调控亲鱼性腺发育成熟。亲鱼培育条件: 水温 $12\sim 26^{\circ}\text{C}$, 盐度 $25\sim 30$, $\text{DO}\geq 6\text{ mg/L}$, $\text{pH}8.0\sim 8.2$, 日换水量 $500\%\sim 600\%$ 。投喂饵料为鲜杂鱼, 2 次/日, 每次投喂量为鱼体质量的 $2\%\sim 4\%$ 。2009 年 12 月, 挑选卵巢部隆起明显的亲鱼采用背部肌肉埋植 GnRH(Syndel, Canada) 进行催产, 用量 $75\text{ }\mu\text{g/尾}$, 雄鱼剂量减半。激素埋植后, 将亲鱼在 $20\sim 22^{\circ}\text{C}$ 暂养 36 h 后每 2 h 检测 1 次。亲鱼性腺检测和人工采卵方法: 以 MS-222 (150 mg/L) 麻醉亲鱼, 将亲鱼置于铺有柔软毛巾的泡沫板上, 用手轻轻从后向前挤压腹部, 人工采集卵子在干燥光滑的盆内。精液采集方法类似, 采集后以 0.9% 的生理盐水稀释后冷藏备用^[14-15], 采集卵子后进行人工干法受精。

实验设置两组, 以真鲷冷冻精子激发雌核发育为实验组, 以漠斑牙鲆鲜精正常受精为对照组。实验用真鲷冷冻精子由中国科学院海洋研究所李军研究员惠赠。

1.2 真鲷精子灭活剂量优选

真鲷冷冻精子自液氮取出后于 38°C 水浴中 40 s 快速解冻, 镜检活动率达 70% 以上的精液用于实验。取 0.2 mL 解冻的真鲷精液与 Hank's 液 $1:10$ 稀释, 平铺于直径 9 cm 的 6°C 预冷的培养皿中, 振荡摇匀后紫外交联仪(Spectrolinker™ UVC(XL-1500))分别按照照射 0 s、10 s、20 s、40 s、60 s、80 s、100 s 等 7 个梯度进行灭活。采集的卵子分为 8 份(每份 10 mL), 置于 2 000 mL 烧杯中进行人工授精, 静止 10 min 后每组各取浮卵 2 000 粒分别放入 30 L 圆形玻璃缸中充气、流水孵化, 控温仪精确控温($19\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) (韩国, 401-H 型), $\text{pH}8.0\sim 8.2$, 盐度 $28\sim 32$, 孵化期间定期吸取沉卵并计数, 统计各组受精率。观察各实验组初孵仔

鱼有无单倍体综合征现象, 统计单倍体率、孵化率和孵化后 36 h 的成活率^[14-17]。

1.3 冷休克诱导二倍体雌核发育

根据 UV 灭活真鲷精子的试验结果, 最适 UV 灭活时间为 40 s, 总照射剂量为 72 mJ/cm^2 。

1.3.1 处理起始时刻的筛选 设置 6 个处理起始时刻: 0 min、1 min、3 min、5 min、7 min、9 min(温度 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$, 持续时间 45 min), 处理后的受精卵正常孵化, 统计各组受精率、孵化率及畸形率, 并结合 36 h 后仔鱼的存活率, 筛选最适处理起始时刻。

1.3.2 处理持续时间的筛选 根据上述实验的结果, 设置 7 个冷休克处理持续时间: 0 min、15 min、30 min、46 min、60 min、75 min、90 min(温度 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$, 起始时间 3 min), 根据结果筛选最适处理持续时间。

1.4 倍性检测

1.4.1 流式细胞仪检测法 仔鱼孵化后, 分别取单倍体、雌核发育二倍体和正常发育二倍体仔鱼各 30 尾, 分别测量其体高、眼径长、体长、卵黄囊长进行形态学观察和测量。同时, 每组随机选取 20 尾初孵仔鱼, 捣碎, 260 目筛绢过滤, DAPI 染色后经流式细胞仪 Ploidy Analyzer(Paretec GmbH, Munster, germany)检测 DNA 相对含量^[13]。

1.4.2 染色体核型分析 取单倍体和雌核发育二倍体组发育至器官发生期的胚胎各 30 粒用秋水仙素浸泡 2 h, KCl 溶液低渗 30~35 min, 卡诺氏液固定后冷滴片法滴片, 干燥 24 h 后的玻片标本用 10% 的 Giemsa 液($\text{pH}6.8$ 的磷酸缓冲液配制)染色 30~35 min, 自来水快速冲洗, 常温干燥; 获得的染色体制片置于 Olympus MS800 型显微镜下观察, 记录每个分裂相的染色体数目, 并在油镜下拍照, 参照正常漠斑牙鲆的染色体核型($2n=48$)进行试验组胚胎的倍性分析^[18-20]。

1.5 胚胎发育时序观察

受精卵置于 500 L 圆形玻璃缸中孵化, 孵化水温为($19\pm 0.5^{\circ}\text{C}$), $\text{pH}8.0\sim 8.2$, 盐度 $28\sim 32$, 连续充气, 流水孵化, 分别对漠斑牙鲆正常对照组、雌核发育二倍体组和单倍体组进行连续跟踪观察, 每 30 min 取样一次, 解剖镜(NIKON-MSZ800)拍

照、记录胚胎发育时序及各发育时相的特征。

1.6 数据分析

苗种生物学测量尾数为 30 尾, 每个实验组设计 3 组平行实验。文中各实验指标均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm SD$)。SPSS 软件进行单因素方差分析, 差异显著水平 P 设为 0.05, 当 $P<0.05$ 时视为差异显著。各参数计算公式如下^[21]。

受精率(%)=(总卵量-未受精卵量)/总卵量 $\times$ 100%

孵化率(%)= 初孵仔鱼数/受精卵量 $\times$ 100%

成活率(%)= 孵化后 36 h 存活尾数/总初孵尾数 $\times$ 100%

畸形率(%)= 畸形尾数/总初孵尾数 $\times$ 100%

2 结果与分析

2.1 真鲷冷冻精子 UV 灭活

本研究发现, 随着紫外线照射时间的延长, 受精卵的孵化率表现出典型的哈特维希(Hertwig)效应(图 1)。对照组的孵化率为(69 $\pm$ 3.5)%, 随着照射时间的增加, 孵化率呈下降趋势, 10 s 时降到最低值(2.0 $\pm$ 0.1)%, 然而随照射时间的继续增加, 胚胎孵化率却缓慢上升, 并在 40 s 时出现第二个峰值, 孵化率达(29 $\pm$ 1.9)%, 80 s 时孵化率重新回落为 0。80 s 时受精率仅为(15 $\pm$ 1.2)%, 受精卵在原肠期陆续死亡, 仔鱼无法孵化出膜。结果显示真鲷精液最佳 UV 灭活时间为 40 s, 经紫外辐射计(VLX-3W)测量时间模式下的 UV 剂量为 1 800 $\mu W/cm^2$, 总照射剂量为 72 mJ/cm^2 。倍性鉴定显示, 此剂量组孵化仔鱼均为单倍体($n=24$)。

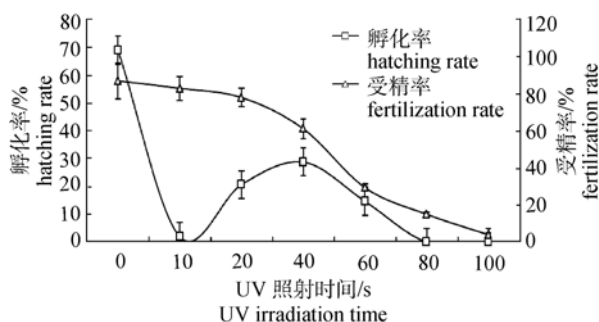


图 1 紫外线照射时间与受精率和孵化率的关系

Fig. 1 Relationship among UV irradiation duration, fertilization rate and hatching rate

2.2 冷休克诱导雌核发育二倍体发育

本研究中, 在 0~2℃ 条件下, 冷休克起始处理时刻 3 min、持续时间 45 min 时, 受精率为(37.2 $\pm$ 5.1)%, 孵化率为(9.4 $\pm$ 0.71)%, 畸形率为(8.3 $\pm$ 2.5)% (表 1)。初孵仔鱼经倍性鉴定, 均为二倍体($2n=48$), 未发现单倍体和非整倍体。在冷休克处理过程中, 随着冷休克起始时刻延后及处理时长的增加, 胚胎发育畸形率呈先下降后缓慢上升的趋势。起始时刻分别为 1 min、5 min 时的仔鱼孵化率与 3 min 的仔鱼孵化率无显著差异($P>0.05$), 但其畸形率差异显著($P<0.05$), 1 min 和 5 min 的畸形率分别为(27.7 $\pm$ 3.2)%和(21.3 $\pm$ 1.9)% (图 2); 持续时间 30 min 和 45 min 时受精卵孵化率差异不显著($P>0.05$), 但初孵仔鱼畸形率前者明显高于后者; 随着冷休克持续时间的增加, 受精率在 45 min 时达到最大 [(37.2 $\pm$ 5.1)%]后继续下降, 90 min 时受精率仅为(10.4 $\pm$ 1.9)%, 孵化率为(1.8 $\pm$ 0.21)% (图 3)。

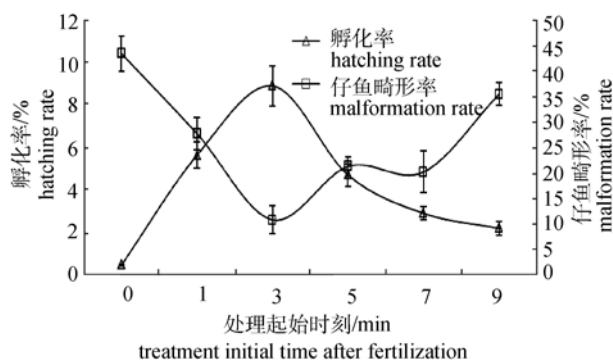


图 2 冷休克起始时刻对雌核发育二倍体仔鱼孵化率和畸形率的影响

Fig. 2 Effects of initial moment of cold shock on hatching rate and malformation rate of gynogenetic diploid larvae

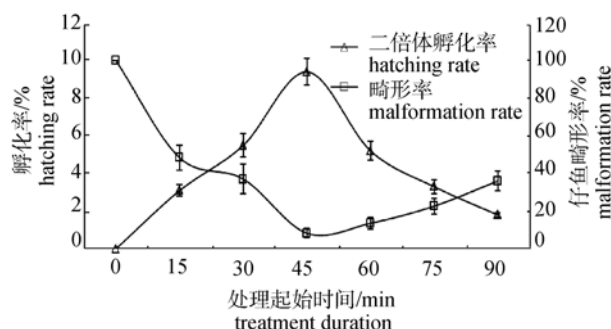


图 3 冷休克处理持续时间对雌核发育二倍体孵化率和畸形率的影响

Fig. 3 Effects of cold shock duration on hatching rate and malformation rate of gynogenetic diploid larvae

2.3 倍性检测

流式细胞仪检测结果显示：雌核发育二倍体仔鱼 DNA 含量和正常二倍体 DNA 相对含量相同(图 4)。单倍体仔鱼头小，卵黄囊大，眼径短，身体短小并严重扭曲，仔鱼尾部发育不完全，表现出典型的单倍体综合征，与正常二倍体仔鱼和雌核发育二倍体仔鱼相比，在体长、卵黄囊长上存在显著差异 ($P<0.05$)(表 2)，36 h 内全部死亡。染色体观察结果同样表明单倍体的染色体数目 $n=24$ ，雌核发育二倍体的染色体数目 $2n=48$ ，与

正常漠斑牙鲆染色体数目相同^[20](图 5)。

2.4 单倍体、雌核发育二倍体及正常二倍体胚胎发育特征

在温度(19 ± 0.5)℃，pH8.0~8.2，盐度 28~32，DO ≥ 6 mg/L 孵化条件下，雌核发育二倍体组和单倍体组胚胎发育时间依次为 64 h 59 min、55 h 49 min 与正常组(49 h 45 min)发育时间差异显著 ($P<0.05$)。漠斑牙鲆胚胎发育各时期的划分参考马学坤等^[21]的相关报道，单倍体组、雌核发育二倍体组和正常二倍体组胚胎发育时序见表 3，各组

表 1 漠斑牙鲆冷休克梯度实验结果
Tab.1 Results from cold shock duration experiment in gynogenesis induction of *Paralichthys lethostigma*

冷休克条件 condition for cold shock	实验组 group	孵化率 hatching rate	畸形率 abnormality rate	受精率 fertilization rate
D 45 min, T 0~2℃	0	0.47±0.032	43.4±3.5	46.2±5.1
	1	5.10±0.63	27.7±3.2	37.5±4.5
	3	8.90±0.94	10.8±2.7	51.7±5.7
	5	4.70±0.53	21.3±1.9	19.2±1.2
	7	2.90±0.31	20.2±4.1	12.3±1.3
	9	2.70±0.33	35.5±2.3	5.2±0.8
TA 3 min T 0~2℃	0	0	100	63.3±4.1
	15	3.10±0.32	48.4±6.7	17.2±0.8
	30	5.50±0.63	49.6±7.9	29.6±1.3
	45	9.40±0.71	8.3±2.5	37.2±5.1
	60	5.20±0.49	13.6±3.2	29.5±1.2
	75	3.30±0.37	22.7±4.1	16.9±2.4
	90	1.80±0.21	36.1±5.3	10.4±1.9

注：TA—冷休克处理起始时刻；D—冷休克处理时间。
Note: TA—Treatment initial time after fertilization; D—Duration time.

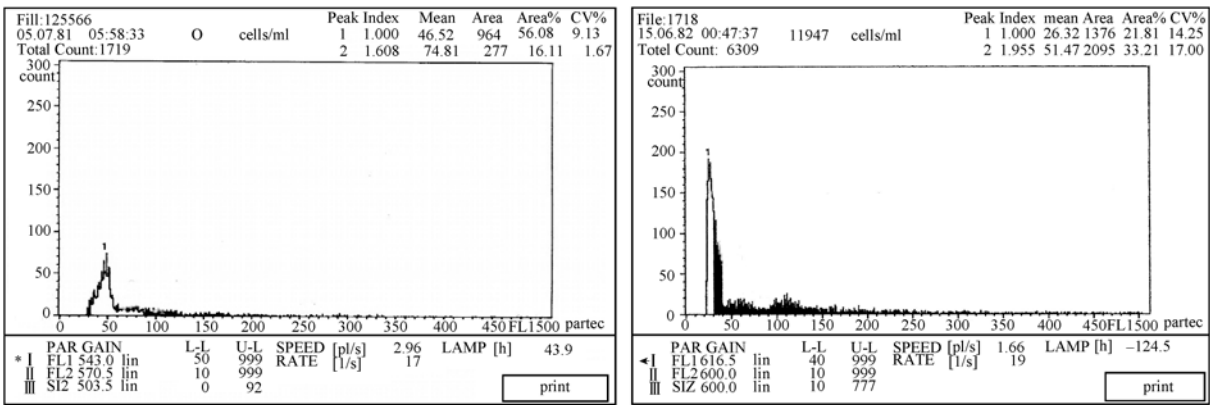


图 4 漠斑牙鲆单倍体、雌核发育二倍体和正常二倍体组流式细胞仪倍性测定图
(a):单倍体; (b): 正常二倍体和减数分裂雌核发育二倍体.

Fig. 4 Patterns of ploidy analysis of haploid, normal diploid and gynogenetic diploid larvae
a: haploid; b: normal diploid and gynogenetic diploid.

表 2 正常二倍体、雌核发育二倍体和单倍体 1 日龄仔鱼的几个形态指标比较

Tab.2 Comparison of morphological index among haploid, gynogenetic diploid and normal fry of southern flounder

$n=12; \bar{x} \pm SD$

样本 sample	体长/mm body length	体高/mm body depth	眼径长/mm eye diameter	卵黄囊长/mm yolk sac length
正常鱼苗 normal fry	5.4±0.91	1.7±0.23	0.13±0.02	2.1±0.32
雌核发育二倍体 gynogenetic diploid	5.3±1.20	1.9±0.32	0.18±0.03	2.2±0.26
单倍体 haploid	5.0±0.87	2.1±0.34	0.09±0.01	2.5±0.35

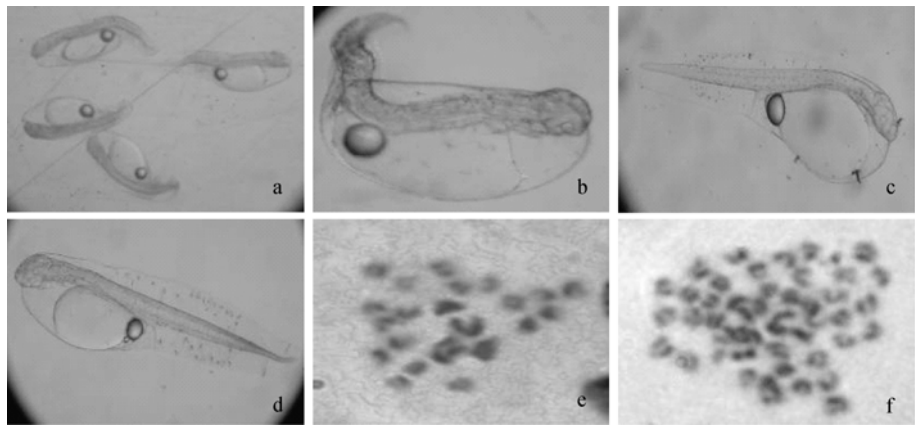


图 5 漠斑牙鲆单倍体、雌核发育二倍体和正常二倍仔鱼形态及染色体图片

a、b: 单倍体; c: 正常二倍体; d: 雌核发育二倍体;

e:单倍体染色体核型; f:雌核发育二倍体染色体核型.

Fig.5 Morphological characteristics and chromosome karyotype of haploid larvae, gynogenetic diploid larvae, normal diploid larvae of *Paralichthys lethostigma*

a and b: haploid larvae; c: normal diploid larvae; d: gynogenetic diploid larvae; e: chromosome karyotype made from haploid embryo; f: chromosome karyotype made from gynogenetic diploid larvae.

发育形态特征见图 6。

2.4.1 卵裂期 受精卵在胚盘形成后经 5 次径裂、1 次纬裂在动物极形成表面粗糙的圆帽状细胞群, 进入桑葚期(图 6-A、B、C、D、E、G、H)。该阶段, 单倍体组在 32 细胞期时, 畸形率明显上升, 细胞大小不均, 整个受精卵呈花簇状(图 6-F3); 雌核发育二倍体组和正常二倍体组在发育时序和形态特征方面类似(图 6-F1), 发育速度由高到低依次为: 单倍体组、雌核发育二倍体组、正常二倍体组。

2.4.2 囊胚期 随着动物极细胞的增殖, 高囊胚形成; 囊胚细胞的不断分裂使囊胚层边缘变薄进入低囊胚期。在这一时期, 单倍体组的囊胚冒较小, 细胞界限模糊, 发育速度与卵裂期相同(图 6-I1、I2、I3)。

2.4.3 原肠期 正常二倍体组胚胎在受精后 14 h 33 min 原肠腔形成(图 6-J1、J2、J3), 原肠中期时胚盾明显, 胚体雏形出现(图 6-K1、K2); 随着胚体的不断延伸, 胚盾前端膨大发育至原肠晚期(图 6-L1、L2)。在这一时期, 单倍体组胚环上部出现 1 条明显发黄带, 不透明(图 6-K3); 胚环、胚盾形状略显不规则, 胚环表面凹凸, 较单薄, 胚体也无正常组清晰(图 6-L3)。在进入原肠早期时, 同雌核发育二倍体(1 h 56 min)和正常二倍相比(1 h 21 min), 单倍体组发育速度明显迟缓历时长达 3 h 3 min。该期胚胎发育速度由高到低依次为: 正常二倍体组、单倍体组、雌核发育二倍体组。

2.4.4 神经胚期 胚盘下包至 4/5, 神经板形成; 原口关闭后, 胚盾中部出现不规则肌节, 正常组、雌核组胚体的头部充实、明显(图 6-M1), 而单倍

体胚体模糊、粗短,畸形胚体较多(图 6-M3)。该期胚胎发育速度由高到低依次为:正常二倍体组、雌核发育二倍体组、单倍体组。

2.4.5 器官发生期 眼泡期正常二倍体组眼部轮廓明晰,形态上雌核发育二倍体组与其类似(图 6-N1、N2);单倍体组的眼泡模糊,胚体头部粗大、不规则,体节界限不清(图 6-N3)。胚体发育至绕卵黄囊 2/5 时,其末端出现一透明小泡,即克氏泡(图 6-O1、O2);单倍体组克氏泡大小不均,分布杂乱(图 6-O3)。胚体绕卵黄囊 3/5 时,视囊内晶体可辨认,听囊和脑逐渐形成,此期暂未见心脏跳动,但胚体尾部开始发生扭转(图 6-P1、P2、P3)。该期 3 组胚胎发育时间差异明显,雌核发育二倍体组和单倍体组相对正常二倍体组胚胎发育分别滞后 8 h 58 min 和 6 h 3 min,发育速度由高到低依次为:正常二倍体组、单倍体组、雌核发育二倍体组。

2.4.6 肌肉效应期 胚体绕卵黄囊 4/5 时,克氏泡消失,胚体出现间断性肌肉效应,频率 10~15

次/min;正常二倍体组和雌核发育二倍体组心跳频率 60~70 次/min(图 6-Q1、Q2),单倍体组胚体粗短,心跳频率偏慢(45~55 次/min),肌肉效应不明显(图 6-Q3)。

2.4.7 脱膜孵化 胚体绕卵黄囊 1 周,胚体收缩幅度和频率加大,以先头部后尾部的出膜方式出膜(图 6-R1、R2);单倍体组由于尾部严重畸形,卵黄囊大等特点,出膜困难,相对正常二倍体组整个出膜时间滞后了 1 h 3 min(图 6-R3)。雌核发育二倍体组初孵仔鱼形态与正常二倍体仔鱼无显著差异(图 6-S1、S2);单倍体组仔鱼全部畸形,呈典型单倍体综合征(图 6-S3)。

2.5 实验组初孵仔鱼受精率、孵化率和畸形率统计
研究表明,冷冻真鲷精子可以成功诱导漠斑牙鲆减数分裂雌核发育二倍体,雌核发育二倍体组经冷休克处理后受精率和孵化率明显下降,与正常二倍体组和单倍体组的受精率和孵化率差异显著($P<0.05$);单倍体组和正常二倍体组受精率差异不明显($P>0.05$),但孵化率仅为 $(29.0\pm1.9)\%$,

表 3 漠斑牙鲆单倍体、雌核发育二倍体及正常二倍体在孵化水温 $(19\pm0.5)^{\circ}\text{C}$ 的发育持续时间
Tab. 3 Embryonic development of haploid, gynogenetic diploid and normal diploid *Paralichthys lethostigma* at $(19\pm0.5)^{\circ}\text{C}$

发育时期 development stage	雌核二倍体 female gynoge- netic diploid	单倍体 haploid	正常组 normal	发育时期 development stage	雌核二倍体 female gynoge- netic diploid	单倍体 haploid	正常组 normal
受精卵 fertilized egg	0h00min	0h00min	0h00min	原肠早期 early gastrula stage	15h23min	15h25min	14h33min
2 细胞期 2-cell stage	1h46min	1h35min	2h03min	原肠中期 mid gastrula stage	19h6min	18h6min	17h11min
4 细胞期 4-cell stage	2h21min	1h59min	2h19min	原肠晚期 late gastrula stage	21h49min	20h58min	20h12min
8 细胞期 8-cell stage	3h11min	2h45min	2h56min	神经胚期 neurula stage	27h56min	27h58min	26h21min
16 细胞期 16-cell stage	4h07min	3h39min	3h56min	眼泡形成 formation of optic vesicle	31h21min	32h03min	28h17min
32 细胞期 32-cell stage	4h58min	4h02min	4h35min	体节形成 formation of somite	33h49min	34h12min	30h02min
64 细胞期 64-cell stage	5h58min	5h32min	5h43min	嗅板形成 formation of olfactory plate	35h43min	35h52min	32h53min
128 细胞期 128-cell stage	7h26min	6h56min	7h11min	晶体形成 formation of eye lens	42h48min	41h27min	39h10min
桑葚期 morula stage	8h21min	8h12min	8h38min	听囊形成 formation of optic capsule	51h12min	48h17min	42h14min
高囊胚期 high blastula stage	10h8min	9h21min	10h00min	肌肉效应 muscular contraction	57h29min	53h29min	43h49min
低囊胚期 low blastula stage	12h15min	11h05min	11h58min	脱膜孵化 hatching	63h12min	53h57min	48h56min
囊胚末期 late blastula	13h27min	12h21min	13h12min	仔鱼孵出 larvae hatched out	64h59min	55h49min	49h45min

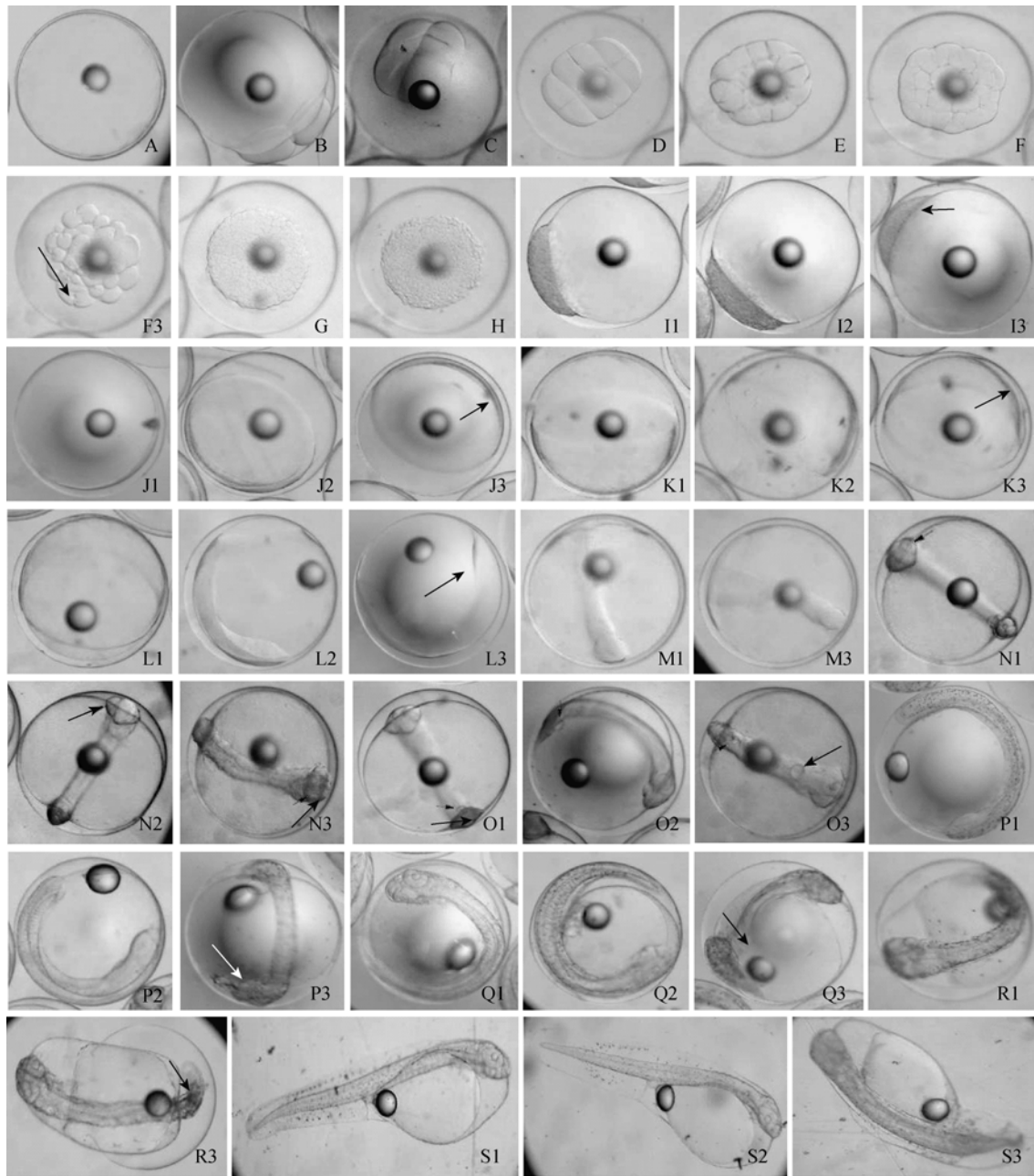


图 6 漠斑牙鲆正常二倍体(A-H, I1-S1)、雌核发育二倍体(I2-S2)和单倍体(F3, I3-S3)胚胎发育特征比较
正常二倍体、雌核发育二倍体及单倍体胚胎从受精到桑葚期间, 除单倍体胚胎在 32 细胞发育畸形单独列示外, 其他各发育期特征无差异, 此处不再重复列示。A: 受精卵; B: 2 细胞期; C: 4 细胞期; D: 8 细胞期; E: 16 细胞期; F: 32 细胞期; F3: 32 细胞期, 箭头示花状畸形细胞; G: 128 细胞期; H: 桑葚期; I1-I3: 高囊胚期, 箭头示高囊胚; J1-J3: 原肠早期, 箭头示胚环; K1-K3: 原肠中期, 箭头示死亡细胞; L1-L3: 原肠后期, 箭头示凹凸不平的胚环; M1、M3: 神经胚期; N1-N3: 眼泡形成期, 箭头示眼泡; O1-O3: 克式泡期, 箭头示克氏泡; P1-P3: 晶体期, 箭头示尾部严重畸形的胚体; Q1-Q3: 肌肉效应期, 箭头示畸形胚体; R1、R3: 出膜前期; S1-S3: 初孵仔鱼。

Fig.6 Comparison of morphological characteristics of embryonic development of normal diploid(A-H, I1-S1), gynogenetic diploid(I2-S2) and haploid(F3, I3-S3) *Paralichthys lethostigma*
A: fertilized egg; B: 2 cell stage; C: 4 cell stage; D: 8 cell stage; E: 16 cell stage; F: 32 cell stage; F3: 32 cell stage, arrow showing flower teratocytes; G: 128 cell stage; H: morula stage; I1-I3: high blastula stage, arrow showing high blastocyst; J1-J3: early gastrula stage, arrow showing germ ring; K1-K3: mid gastrula stage, arrow showing dead cells; L1-L3: Telo-phase of gastrulastage; M1 and M3: neurula stage; N1-N3: formation of optic vesicle; O1-O3: Kuppefs vesicle stage; P1-P3: formation of eye lens; Q1-Q3: muscular contraction, arrow showing abnormal embryo; R1 and R3: Hatching out; S1-S3: newly-hatched larva.

单倍体组初孵仔鱼全部畸形,表现出典型的单倍体综合征(表 4)。

表 4 各组受精率、孵化率和初孵仔鱼畸形率统计
Tab. 4 Fertilization rate, hatching rate and malformation rate of newly hatched larvae in each group

实验组 trial	受精率 fertilization rate	孵化率 hatching rate	初孵仔鱼畸 形率 rate of ab- normality
正常二倍体组 normal diploid	76.5.4±7.6	69.0±3.5	1.2±0.9
单倍体组 haploid	63.3±4.1	29.0±1.9	100
雌核发育二倍 体组 gynogenetic diploid	37.2±5.1	9.4±0.71	8.3±2.5

3 讨论

3.1 诱导条件

研究结果表明,冷冻真鲷精子可以作为异源精子诱导漠斑牙鲆减数雌核发育而获得雌核发育后代。目前,国内外诱导漠斑牙鲆雌核发育采用的异源精子仅包括来自美洲黑石斑鱼(*Centropristis striata*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)和鲢(*Mugil cephalus*)^[11-13]等 3 种鱼。在亲缘关系方面,与上述已经实验的 3 种鱼种一样,真鲷与漠斑牙鲆分属鲈形目(Perciformes)和鲽形目(Pleuronectiformes),亲缘关系较远,染色体数目与组型均无法与漠斑牙鲆配对^[20, 27],实验结果也显示真鲷与漠斑牙鲆的杂合体不存活,原肠期已全部死亡,杂合和单倍体双重致死效应大大提高了后期雌核发育二倍体的鉴定效率。至于雌核发育二倍体仔鱼基因组中是否会有真鲷小片段基因的融入,以及真鲷精子除激活卵子外还有无其他作用,仍需进一步的研究证实。雌核发育包括两个关键技术:精子遗传物质的灭活和人工诱导染色体的加倍。本实验显示,真鲷冷冻精子最佳 UV 灭活时间为 40 s,经紫外辐射计测定总照射剂量经换算为 72 mJ/cm²,与国内外报道的结果基本一致^[6,25-26]。

目前,卵子染色体二倍体化方法主要有:静水压法、温度休克法(冷休克或热休克)、生物杂交和化学药物抑制法。由于温度休克法操作简单、

成本低,已被广泛使用^[22],温度休克中相对致死率较高的热休克处理法,冷休克是更为理想的方法^[28]。本研究采用冷休克法成功使染色体加倍,初孵仔鱼经倍性鉴定均为二倍体,无单倍体和非整倍体现象发生。在水温(19±0.5)℃下,处理起始时刻为 3 min 时,初孵仔鱼畸形率为(8.3±2.5)%,二倍体孵化率(9.4±0.71)%,起始时刻分别为 1 min、5 min 组的仔鱼孵化率与 3 min 组并无显著差异($P>0.05$),但畸形率差异显著($P<0.05$)(表 1);这与杨景峰^[13]和 Adam^[12]报道的 TA 为 4~5 min, Andrew^[11]报道的 TA 为 1 min 不同,分析主要原因是国内外文献报道的胚胎发育水温为(18±0.5)℃,水温不同会导致胚胎发育的速度有所变化,另外,极体的形成和排放时间有一定差异^[6-13]。冷休克的效应时间比较缓慢,需要一个有效温度的积累,远不及静水压法可以迅速抑制第二极体的排放,这可能也是本实验冷休克起始时刻提前的一个原因。本实验发现随着冷休克持续时间的继续增加,卵子受精率和受精卵孵化率均呈下降趋势,90 min 组受精率仅为(10.4±1.9)%,孵化率为(1.8±0.21)% (表 1)。Johnson^[29]认为,压力或温度刺激会干扰受精卵细胞表达模式和蛋白质功能进而影响诱导后胚胎发育和存活,并且这种损伤程度随处理强度和持续时间的增加而增强。本实验雌核二倍体仔鱼孵化率最高为(9.4±0.71)%,这与相关文献静水压法诱导的仔鱼孵化率(16.13±5.12)%^[13]和(1.48±0.52)%^[11]不同;同一实验条件下,相关研究已证明静水压法由于其损伤小,处理时间短,比温度休克法更容易得到较高的诱导率及较低的畸形率^[22, 31]。雌核发育二倍体仔鱼的产生属于高度近亲繁殖,隐性有害基因在发育过程中显性化对仔鱼畸形率、受精率和孵化率均有很大影响;同时潘光碧^[30]指出,精卵质量、进行孵化的理化因素、受精卵处理方法和强度也会影响人工雌核发育诱导率的高低。

3.2 胚胎发育

水温(19±0.5)℃条件下,雌核发育二倍体组、单倍体组胚胎发育时间依次为 64 h 59 min、55 h 49 min、与正常二倍体组(49 h 45 min)发育时间差

异显著($P<0.05$)。单倍体组胚胎发育32细胞期畸形率明显上升,在囊胚末期进入原肠早期时,单倍体组和雌核发育二倍体组均经历了一个类似“休眠”的阶段,胚盘下包严重受阻,单倍体组更长达3 h 3 min(表3),发育速度明显迟缓,与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[6]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)^[10]、大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)^[23]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[26]等研究情况相似,单倍体组胚胎发育经历了一个由快而慢的转折。王卫军等^[33]认为,精子经过紫外线照射后,DNA结构以及其内部的一些与受精相关的蛋白因子遭到严重破坏,从而使得受精发育过程严重滞后。胚胎发育至囊胚期后时单套染色体组不足以提供胚胎细胞分化和器官分化所需的正常基因表达的需要,也是胚胎发育速度变慢的原因之一^[26]。曹学彬等^[34]在研究马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)雌核发育时发现,经紫外线照射后的精子顶体结构受到不同程度的破坏,没有像雌性原核那样形成雄性原核,而是浓缩为一染色质小体(DCB小体),不能与雌性原核融合,也不能进行正常的核分裂,从而阻碍胚胎发育。整个胚胎发育阶段,雌核发育二倍体组与正常二倍体组在形态上并无明显差别,发育时间较正常组长,胚胎发育过程中单倍体和嵌合体的产生同时导致高死亡率和畸形率的出现^[22, 35]。单倍体组原肠期后胚胎畸形日渐明显,胚体模糊、粗短不规则,体节界限不清,表面颗粒感加重,心跳、肌肉效应频率降低;脱膜孵化期单倍体组出膜困难,相对对照组仔鱼出膜时间滞后1 h 3 min。

参考文献:

- [1] 柳学周.我国北方几种新的海水养殖鱼类及其发展前景[C].全国水产养殖研讨会论文集,2004:202-209.
- [2] 谷口顺彦.染色体倍化技术出鱼类育种[J].水产的研究,1986,24(1):80-90.
- [3] 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.
- [4] 杨景峰,陈松林,苏鹏志,等.异源精子诱导条斑星鲷雌核发育的研究[J].水产学报,2009,33(3):372-378.
- [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] 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):508-513.
- [7] Harald B T, Tillmann J B, Deborah J M R, et al. Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)[J]. Aquaculture, 2006, 252: 573-583.
- [8] Frances C P, Rosa M C, Castora G, 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: 403-419.
- [9] Xu Jian-He, You Feng, Sun Wei, et al. Induction of diploid gynogenesis in turbot (*Scophthalmus maximus*) with left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus* sperm [J]. Aqua Internat, 2008, 16: 623-634.
- [10] 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.
- [11] Andrew J M, Ryan Murashige, Christopher A W, 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: 290-299.
- [12] Adam L J, Godwin J, Daniels H V, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder with homologous and heterologous sperm [J]. Aquaculture, 2004, 237: 499-516.
- [13] 杨景峰,陈松林,徐亘博,等.花鲈冷冻精子诱导漠斑牙鲆雌核发育[J].水产学报,2010,34(8):1175-1181.
- [14] 关键,柳学周,蔡文超,等.褐牙鲆(♀)×犬齿牙鲆(♂)杂交子一代胚胎发育及仔稚鱼形态学观察[J].中国水产科学,2007,14(4):644-650.
- [15] 郑惠东.圆斑星鲷的人工繁殖及育苗技术[J].福建水产,2003,9(3):15-17.
- [16] 柳学周,庄志猛,马爱军,等.半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究[J].海洋水产研究,2006,27(2):17-24.
- [17] 孙中之,柳学周,徐永江,等.半滑舌鳎工厂化人工育苗工艺技术研究[J].中国水产科学,2007,14(2):244-248.
- [18] 洪云汉.鱼类单个胚胎染色体标本的快速制备法[J].淡水渔业,1987,1:35-36.
- [19] 王妍妍,柳学周,徐永江,等.条斑星鲷染色体核型分析[J].渔业科学进展,2009,30(2):8-13.
- [20] 李鹏飞,刘萍,柳学周.漠斑牙鲆染色体组型研究[J].海洋水产研究,2007,28(4):26-30.
- [21] 马学坤,柳学周.漠斑牙鲆胚胎及仔稚鱼发育的形态学观察[J].南方水产,2008,4(1):41-45.
- [22] 楼允东.鱼类育种学[M].北京:中国农业出版社,1992:153-190.
- [23] 赵正山,吴清江.人工诱导大鳞副泥鳅雄核发育二倍体克隆鱼的产生[J].遗传学报,1998,25(5):416-421.

- [24] Brown D B. Chromatin decondensation and DNA synthesis in human sperm activated in vitro by using *Xenopus laevis* egg extracts[J]. J Exp Zool, 1987, 242:215–231.
- [25] Yamakawa T, Matsuda H, Tsujigado A, et al. Optimum dose of UV irradiation for induction of gynogenesis in flounder *Paralichthys olivaceus* using red sea bream sperm [J]. Bull Fish Res Ins, 1987, 2:51–53.
- [26] 孟振, 雷霖霖, 刘新富, 等. 不同倍性大菱鲆胚胎发育的比较研究[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(7): 36–42.
- [27] 刘静, 田明诚. 真鲷和黑鲷染色体组型研究[J]. 海洋科学, 1991, (3): 64–67.
- [28] 戴世行, 尹立刚. 鱼类人工雌核发育中两个技术处理的最佳选择[J]. 重庆师范学院学报: 自然科学版, 1991, 8(2): 51–55.
- [29] Johnson M, Heath J W. Family induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid chinook salmon *Oncorhynchus shawytscha*[J]. Aquaculture, 2004, 234: 123–142.
- [30] 潘光碧. 人工诱导鱼类雌核发育技术的研究[J]. 淡水渔业, 1988, 6: 17–20.
- [31] 许建和, 尤 锋, 吴雄飞, 等. 冷休克法和静水压法人工诱导大黄鱼三倍体[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 206–210.
- [32] 刘海金, 王常安, 朱晓琛. 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] 王卫军, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 异源精子诱导栉孔扇贝雌核发育早期胚胎发育及其倍性分析[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(5): 415–420.
- [34] 曹学彬, 丁君, 常亚青. 人工诱导马粪海胆雌核发育的早期胚胎发育及细胞学观察[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(1): 1–7.
- [35] Pandian T J, Koteeswaran R. Ploidy induction and sex control in fish[J]. Hydrobiologia, 1998, 384:167–243.

Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with heterologous sperm of *Pagrosomus major*

LIU Xuezhou¹, NING Xin^{1,2}, XU Yongjiang¹, ZHAO Ming¹, LI Chunguang^{1,2}, LI Jun³

1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201300, China;
3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: Female southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) grow faster than males. Therefore, farming all-female progenies could maximize profits from cultured fish. In the present study, diploid gynogenesis was induced by activating flounder egg development with UV-irradiated (72 mJ/cm^2) *Pagrosomus major* sperm for 3 min in sea water, and then subjecting the eggs to a cold-shock ($0-2^\circ\text{C}$) treatment for 45 min. Cold shock was used to prevent extrusion of the second polar body. In the control treatments, one or more of these steps was omitted to separately assess the effectiveness of UV irradiation and cold shock. When the initial treatment was applied 3 min after hatching (treatment duration, 45 min), the fertilization rate of eggs activated by UV-irradiated heterologous sperm was $(37.2 \pm 5.1)\%$, the malformation rate of newly hatched larvae was $(8.3 \pm 2.5)\%$, and the hatching rate was up to $(9.4 \pm 0.71)\%$. Flow cytometry and chromosome karyotyping were used to examine the ploidy level of larvae experienced to the cold-shock treatment. All of the gynogenetic larvae were diploid ($2n = 48$), and no haploid or aneuploid phenomena were detected. The duration of hatching of haploid embryos and gynogenetic embryos was significantly different from that of control normal embryos. There were no significant differences in the morphological index between gynogenetic diploids and normal larvae ($P > 0.05$). All of the haploid larvae (100%) showed abnormal external morphology ($P < 0.05$) while normal diploid larvae and gynogenetic diploid larvae showed normal morphologies. In summary, these methods resulted in successful diploid gynogenesis in southern flounder using heterologous sperm. This technique could serve as a useful tool to produce monosex progenies of southern flounder.

Key words: *Paralichthys lethostigma*; heterologous sperm; gynogenesis; cold shock; embryonic development