

施氏鲟精子诱导匙吻鲟雌核发育

邹远超^{1,2}, 危起伟^{1,2,3}, 潘光碧^{1,3}, 沈丽^{1,3}, 胡佳^{1,2}

(1. 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000; 2. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070; 3. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要:采用照射强度为 $10\ 188\ \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$, 照射距离为 15 cm 的紫外线对施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 精子进行 4~7 min 的照射, 用照射后的精子对匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 卵进行人工授精, 以探索精子的最佳紫外线照射时间。设计热休克起始时间、持续时间和休克温度 3 因子、3 水平的正交试验, 以探索人工诱导匙吻鲟雌核发育的理想热休克条件。结果表明: 用紫外线照射 5 min 处理的施氏鲟精子, 与匙吻鲟卵受精所得胚胎经染色体观察均为单倍体 ($n=60$), 表明照射精子遗传失活的有效性和可靠性; 若热休克处理前受精卵保持在 $(18 \pm 0.3)^\circ\text{C}$, 在一定的休克温度 ($35 \sim 39^\circ\text{C}$) 条件下, 于不同时间 (受精后 16~20 min) 起始热休克, 持续处理 2 min 均能诱导受精卵染色体加倍。对热休克处理条件的优化结果表明, 将受精卵于受精后 18 min, 在 37°C 的水中热休克处理 2 min, 二倍体诱导率最高, 达 18.8%。染色体鉴定显示, 该条件下处理的胚胎均为二倍体 ($2n=120$), 未发现单倍体和非整倍体。本研究为进一步分析异源精子诱导匙吻鲟雌核发育机制以及匙吻鲟性别决定的分子机制奠定了基础。[中国水产科学, 2009, 16(5): 728-735]

关键词: 施氏鲟; 匙吻鲟; 精子; 紫外线照射; 热休克; 雌核发育

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)05-0728-08

鱼类雌核发育的研究始于 20 世纪 50 年代, 在随后几十年里发展迅速。尤其是近 20 年来, 人工诱导雌核发育一直是鱼类遗传育种研究中的热门领域^[1-2]。国内外已先后在鲤科 (Cyprinidae)、鲑科 (Salmonidae)、鲾科 (Pleuronectidae)、鳅科 (Cobitidae) 和鲟科 (Sparidae) 等 10 多种重要经济鱼类中开展了人工雌核发育的研究, 并获得成功^[3-7]。有关鲟类的雌核发育研究最早始于 1963 年, Romashov 等^[8]人工诱导了俄罗斯鲟 (*Acipenser gueldenstaedti*)、小体鲟 (*Acipenser ruthenus*) 和欧洲鳇 (*Huso huso*) 的雌核发育, 随后国外许多学者在高首鲟 (*Acipenser transmontanus*)^[9]、短吻鲟 (*Acipenser brevirostrum*)^[10]、密西西比铲鲟 (*Scaphirhynchus platyrhynchus*)^[11]、闪光鲟 (*Acipenser stellatus*)^[12-13] 中进行了雌核发育的人工诱导。1997 年, Mims 等^[14]通过采用紫外线遗传灭活密西西比铲鲟精子后诱导匙吻鲟

(*Polyodon spathula*) 卵, 并进行染色体加倍, 成功诱导出匙吻鲟雌核发育后代。目前国内尚未见有关鲟鱼雌核发育研究的报道。

匙吻鲟属鲟形目 (Acipenseriformes), 白鲟科 (Polyodontidae), 匙吻鲟属 (*Polyodon*), 是世界上现存的 2 种白鲟科鱼类之一^[15], 为大型淡水经济鱼类。由于匙吻鲟与白鲟 (*Psephurus gladius*) 同属于白鲟科^[16], 因此开展匙吻鲟雌核发育的人工诱导研究可为长江白鲟的种群恢复奠定技术基础。众所周知, 长江白鲟濒临灭绝, 繁殖效率很低^[17-19], 如果将人工诱导匙吻鲟雌核发育的技术运用到性成熟雌性白鲟上, 实现异源精子人工诱导白鲟的雌核发育, 即使在没有雄性白鲟精子的条件下, 也能繁殖出大批白鲟幼鱼, 从而达到人工传代、保存白鲟物种甚至恢复白鲟种群的目的。此外, 近几年随着匙吻鲟养殖产业的形成, 获

收稿日期: 2009-02-24; 修订日期: 2009-04-26.

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (30490231); 长江上游珍稀、特有鱼类及自然保护区保护措施补偿项目 (0714094).

作者简介: 邹远超 (1983-), 女, 博士研究生, 专业方向为鱼类种质资源保护与遗传育种. E-mail: zou3891@163.com

通讯作者: 危起伟. Tel: 0716-8128881; E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

得抗病强,生长快等优良性状的匙吻鲟品系是育种工作的首要任务。而人工诱导雌核发育技术是快速建立其纯系,选育优良品种的有效途径。

本研究采用紫外线灭活施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)精子并与匙吻鲟卵授精,经热休克诱导染色体加倍获得匙吻鲟第二极体抑制型雌核发育二倍体,旨在探讨异源精子诱导匙吻鲟雌核发育二倍体的最理想条件。

1 材料与方法

1.1 亲鱼来源和精卵的收集

2008年3—4月,在湖北省宜昌市天峡鲟鱼繁殖基地获得健康且性成熟的匙吻鲟雌、雄亲鱼与施氏鲟雄性亲鱼。雄性亲鱼按 $3\text{ }\mu\text{g/kg}$ 剂量注射鱼用促黄体素释放激素类似物(LHRH- A_2)进行催产。达到效应期后,挤出精液并镜检,将活力良好的精液放于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待用。匙吻鲟亲鱼用LHRH- A_2 直接进行人工催产,催产素剂量为 $6\text{ }\mu\text{g/kg}$ (分2次注射,间隔 12 h),到达效应时间($12\sim 24\text{ h}$)后,人工挤卵并均分成若干等份待用。用血球计数板和生物计数皿在显微镜下计数精、卵数量,将精、卵密度分别调至 $3.50\times 10^9\sim 4.20\times 10^9/\text{mL}$ 和 $50\sim 60/\text{mL}$ 。

1.2 精子最佳紫外线照射时间筛选

取精液约 14 mL ,用预先制备的施氏鲟精液稀释液(蔗糖 10 mmol/L , Tris 20 mmol/L , KCl 0.5 mmol/L , pH 8.1)稀释(精液与稀释溶液体积比为 $1:2$),分别加入到已预冷的14个内径为 9 cm 的亲水性塑料培养皿(丹麦NalgeNunc公司)中,将培养皿放在紫外线照射装置的水平摇床上,摇床振动频率为 60 次/min ,轻轻振荡以使精子均匀分散。用紫外线杀菌灯(日本东芝公司)作为光源进行照射(3支 30 W 紫外灯,波长为 254 nm),照射垂直距离为 15 cm 。用紫外强度计(美国Cole-Parmer公司)测得照射强度为 $10\text{ }188\text{ }\mu\text{W}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$,紫外线照射时间为 4 min 、 4.5 min 、 5 min 、 5.5 min 、 6 min 、 6.5 min 、 7 min ,每个照射时间组设2个平行,以照射时间为 0 min 组作为对照。照射结束后取不同照射时间处理的精子各1份,分别加入装有 10 mL 卵子的孵化碗中授精,各组授精水温均为 $(18\pm 0.3)\text{ }^{\circ}\text{C}$,并用滑石粉

脱黏,不进行温度休克,直接在 $(18\pm 0.3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水中孵化,作为精子遗传失活的质量控制组(如表1中1、3、5、7、9、11、13组);另外7份(如表1中2、4、6、8、10、12、14组)分别与 10 mL 卵子混合,授精 2 min 后用滑石粉脱黏 16 min ,然后转移到 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴中热休克 2 min ,再置于 $(18\pm 0.3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水温中进行孵化。同时取1份正常的匙吻鲟精液与匙吻鲟卵授精设为对照组1,未经照射的施氏鲟精液与匙吻鲟卵正常受精设为对照组2(表1)。共设16个实验组。孵化期间分别从各组随机取200粒卵进行受精率(发育至原肠中期后的胚胎卵数占总卵的百分比)和孵化率(孵出鱼苗数占受精卵的百分比)统计。实验采用不同的亲鱼重复3次,用SPSS13.0软件对数据进行ANOVA分析,不同组间的平均值通过2个独立样本的 t 检验进行比较。

1.3 极体雌核发育诱导

根据热休克起始时间、持续时间和休克温度设计3因子3水平的正交试验(表2)。由1.2得出的最佳紫外线照射时间作为本次实验精子紫外照射时间,将照射后的精子与 10 mL 卵在孵化碗中进行授精,并分别在授精 16 min 、 18 min 、 20 min 后将受精卵迅速置于 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温孵化网中进行热休克处理,轻轻摆动以使受精卵受热均匀。热休克 2 min 后,取出受精卵并置于 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水温中进行孵化。设立正常匙吻鲟精液与匙吻鲟卵授精,不进行热休克处理作为实验对照组1,正常施氏鲟精液与匙吻鲟卵授精,不进行热休克作为实验对照组2,另取最佳照射时间处理的施氏鲟精子与施氏鲟卵子授精,不进行热休克的一组为对照组3(表2)。

1.4 数据统计

孵化期间,每隔 3 h 停气,清除死卵并分别统计实验组及对照组的受精率、孵化率、雌核发育率(雌核发育二倍体苗占受精卵的百分比)及幼鱼成活率(体长达 10 cm 以上幼鱼的存活尾数占孵出鱼苗数的百分比)。再用 t 检验法比较各组数值差异,当 $P<0.05$ 时,认为有显著差异。对匙吻鲟原肠中期胚胎分别采用染色体制片计数法和流式细胞仪检测DNA相对含量法进行倍性鉴定。

1.5 倍性鉴定

1.5.1 染色体制片法测定原肠期倍性 分别用0.1%秋水仙素溶液对各实验组原肠期受精卵样品处理2 h,再用0.075 mol/L 的KCl低渗处理30 min,卡诺氏液固定。空气干燥后经磷酸缓冲液(pH 6.8)稀释的10% Giemsa 染色20 min,流水冲洗,气干,镜检并拍照。实验重复2次,观察和计数分散较好的中期分裂相以获得染色体数目。

1.5.2 流式细胞仪(FCM)分析 分别收集实验组5、6、A1-A3、B1-B3和C1-C3原肠期胚胎各50粒,制成1.5 mL细胞悬液,加入2 mL DAPI 染液,-20 ℃冷冻保存。上机检测前将解冻后样品在旋涡混合器上充分振动解离成单细胞悬液,经20 μm 筛绢过滤样品至流式细胞仪专用样品管中,用PAS-Ⅲ型流式细胞仪(德国Partec公司)进行DNA的相对含量分析(并对不同生长阶段的成活幼鱼进行检测,实验重复3次),并计算雌核发育二倍体率[二倍体分裂相占计数的总分裂相的百分比或二倍体峰的细胞数(面积)

占检测出的所有峰的细胞数(面积)之和的百分比]。

2 结果与分析

2.1 精子最佳照射时间

表1显示,对照组1(匙吻鲟自交)的受精率与孵化率分别为82.3%和73.1%,说明匙吻鲟卵质量好。对照组2(未经照射的施氏鲟精子与匙吻鲟卵杂交)的胚胎能发育到原肠中期(受精率50.2%),但不能产生杂交子代(孵化率0%)。经4~7 min紫外线照射的施氏鲟精子与匙吻鲟卵子受精后不经热休克处理(实验组1、3、5、7、9、11)直接孵化,胚胎均能发育到原肠中期,但是受精率随紫外线照射时间的增加而降低,这些能发育到原肠中期的的胚胎均无孵化成活(孵化率0%)。随紫外线照射时间增加,经热休克处理(实验组2、4、6、8、10、12)的胚胎孵化率呈先上升后下降的趋势,紫外线照射5 min的施氏鲟精子与匙吻鲟卵子授精,其胚胎经热休克处理后孵化率最高,为8.23%,这说明紫外线照射5 min为遗传灭活施氏鲟精子的最佳照射时间。

表1 施氏鲟精子最佳紫外线照射时间筛选
Tab.1 UV treatment on Amur sturgeon sperm for different time n=3; $\bar{x} \pm SD$

处理组 Group	照射时间/min Irradiation time	热休克起始时间(受精后)/min Initiation time of heat shock (after fertilization)	热休克持续时间/min Heat shock duration	受精率/% Fertilization rate	孵化率/% Hatching rate
对照1 Control 1	0	0	0	82.3±3.2	73.10±2.50
对照2 Control 2	0	0	0	50.2±2.8	0.00±0.00
1	4	0	0	40.3±2.6	0.00±0.00
2	4	18	2	8.4±2.5	1.72±0.50
3	4.5	0	0	25.1±1.3	0.00±0.00
4	4.5	18	2	12.7±3.4	5.63±1.00
5	5	0	0	8.6±1.8	0.00±0.00
6	5	18	2	20.9±3.0	8.23±1.90
7	5.5	0	0	4.2±1.3	0.00±0.00
8	5.5	18	2	13.6±2.9	3.78±1.70
9	6	0	0	2.5±0.3	0.00±0.00
10	6	18	2	3.5±1.8	0.31±0.01
11	6.5	0	0	1.1±0.1	0.00±0.00
12	6.5	18	2	2.3±0.2	0.09±0.01
13	7	0	0	0.0±0.0	0.00±0.00
14	7	18	2	0.0±0.0	0.00±0.00

注:对照1:匙吻鲟(♀)×匙吻鲟(♂);对照2:匙吻鲟(♀)×施氏鲟(♂)。UV照射的环境温度为6℃,照射强度为10 188 μW/(cm²·s);热休克温度为35℃。
Note: Control 1: *P. spathula* (♀) × *P. spathula* (♂); control 2: *P. spathula* (♀) × *A. schrenckii* (♂). The ambient temperature of UV irradiation is 6℃; the intensity of UV irradiation is 10 188 μW/(cm²·s); the heat shock temperature is 35℃.

2.2 极体雌核发育诱导结果

由表2可见,在受精后 16 min、18 min 或 20 min , 将受精卵于 35 ℃、37 ℃、或 39℃水温中处理 2 min, 均能成功诱导出匙吻鲟雌核发育二倍体胚胎,雌核发育率为 0.6% ~ 18.8%。以受精后 18 min 起始热休克, 温度为 37 ℃, 持续时间为 2 min 的实验组(表 2, B2 组)的雌核发育率最高, 为 18.8%; 幼鱼成活率最高,

为 15.6%, 与其他处理组相比差异显著 ($P<0.05$)。综合受精率、孵化率以及幼鱼成活率的观测结果, 可以得出以上处理参数为诱导获得匙吻鲟雌核发育的适宜参数。按照上述获得的最佳诱导条件, 本实验处理了 550 粒匙吻鲟卵, 最终获得雌核发育二倍体匙吻鲟幼鱼 32 尾。并且其形态与普通匙吻鲟没有差异(图 1), 没有发现具有杂种形态的个体。

表 2 热休克起始时间、持续时间、热休克温度 3 因子试验设计
Tab.2 Heat shock treatment with different initiation times , durations and shock temperatures

处理组 Group	热休克起始时间 (受精后)/min Initiation time of heat shock (after fertilization)	热休克温度/℃ Temperature of heat shock	热休克持续时 间/min Duration time of heat shock	受精率/% Fertilization rate	孵化率/% Hatching rate	雌核发育率/% Ratio of gynogenesis	幼鱼成活率/% Survival rate of juveniles
A1	16	35	2	20.2±2.8	10.5±1.2	5.4±1.5	3.6±0.5
A2	16	37	2	16.7±2.3	7.3±2.0	3.6±1.0	1.8±0.1
A3	16	39	2	14.8±2.5	5.1±1.8	0.6±0.1	0.09±0.01
B1	18	35	2	25.9±1.8	17.6±1.5	12.4±1.7	8.1±0.6
B2	18	37	2	36.5±2.9	22.3±2.1	18.8±1.5	15.6±0.7
B3	18	39	2	29.7±2.7	16.3±1.3	13.2±1.3	9.0±0.8
C1	20	35	2	25.6±2.0	13.2±0.6	10.8±0.9	6.3±0.4
C2	20	37	2	13.8±1.1	10.6±1.2	8.1±0.4	3.3±0.5
C3	20	39	2	15.2±1.3	10.3±0.9	8.0±0.3	3.1±0.5
对照 1 Control 1	0	0	0	90.2±3.5	83.2±4.6	78.4±3.8	70.3±2.3
对照 2 Control 2	0	0	0	60.3±2.7	0	0	0
对照 3 Control 3	0	0	0	8.9±1.0	0	0	0

注: 对照 1: 匙吻鲟(♀) × 匙吻鲟(♂); 对照 2: 匙吻鲟(♀) × 施氏鲟(♂); 对照 3: 匙吻鲟(♀) × 施氏鲟(♂).
Note: Control 1: *P. spathula* (♀) × *P. spathula* (♂); Control 2: *P. spathula* (♀) × *A. schrenckii* (♂); Control 3: *P. spathula* (♀) × *A. schrenckii* (♂).

2.3 倍性鉴定

2.3.1 染色体计数结果 对各实验组原肠胚进行染色体制片获得了图像清晰、分散良好、长度适中的细胞有丝分裂中期分裂相(图 2)。正常二倍体匙吻鲟的染色体数目为 120^[16,20], 实验组 6、8、10、12(表 1) 及 A1–A3、B1–B3 和 C1–C3(表 2) 染色体数目均为 2n=120(图 2–a)。分别对实验组 1、3、5、7、9、11 的原

肠胚进行染色体数目统计, 各组观察了 50 个中期分裂相, 其单倍体 (n=60, 图 2–b) 比率分别为 33.5%、56.9%、100.0%、100.0%、100.0%、100.0%, 非整倍体 (154±3, 图 2–c) 比率分别为 66.5%、43.1%、0.0%、0.0%、0.0%、0.0% , 未发现二倍体或三倍体细胞, 且随照射时间的延长单倍体比例逐渐增加, 而非整倍体比例逐渐减少。

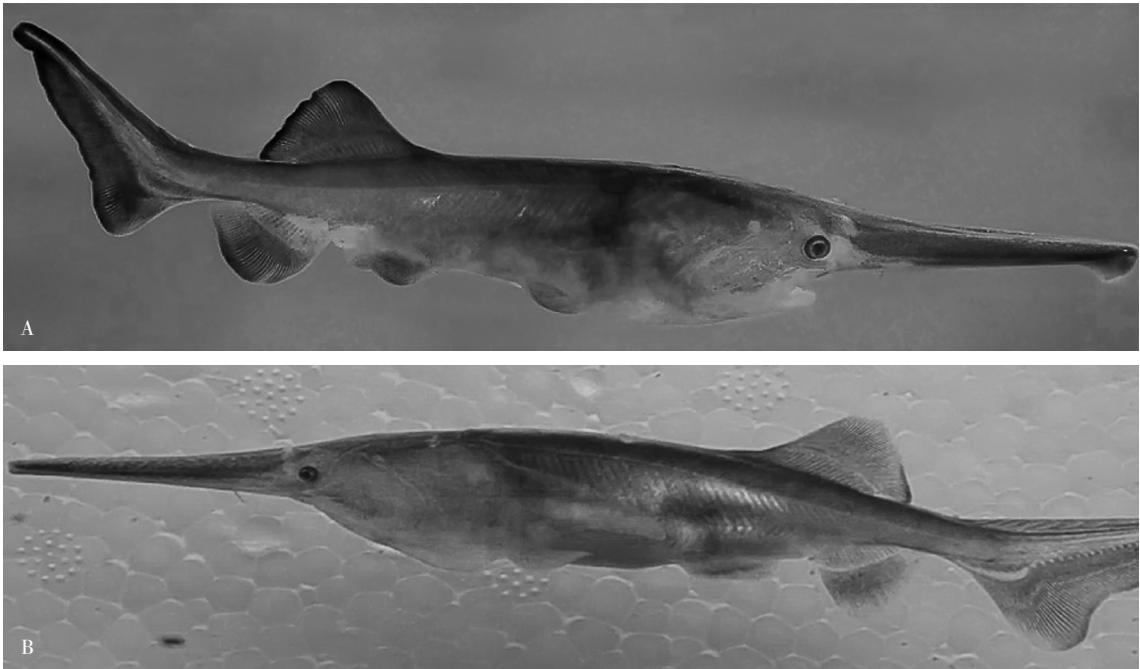


图1 雌核发育匙吻鲟(A)和正常匙吻鲟(B)
Fig. 1 Gynogenetic *Polyodon spathula* (A) and common *P. spathula* (B)

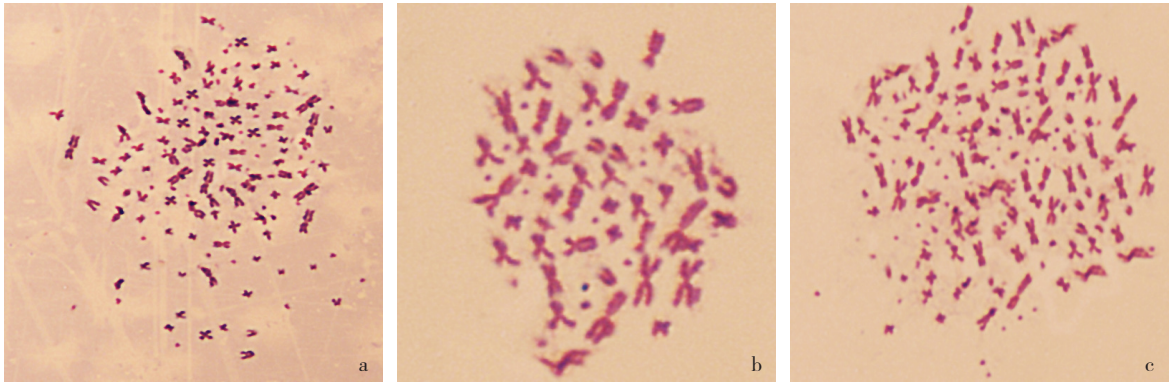


图2 匙吻鲟雌核发育二倍体、单倍体和非整倍体胚胎细胞中期分裂相
a.二倍体 $2n=120$, $\times 250$; b.单倍体 $n=60$, $\times 450$; c.非整倍体 154, $\times 320$.

Fig. 2 Cell metaphase of genogenetic diploid, haploid and aneuploid embryos in *P. spathula*
a. diploid $2n=120$, $\times 250$; b. haploid $n=60$, $\times 450$; c. aneuploid 154, $\times 320$.

2.3.2 流式细胞仪测定结果 匙吻鲟雌核发育单倍体与二倍体DNA含量如图3所示。通过对紫外线照射5 min的雌核发育单倍体组(表1,实验组5)、雌核发育二倍体组(表2,实验组6、A1-A3、B1-B3和C1-C3)原肠期的DNA相对含量进行比较,发现雌核发育二倍体组(实验组6)的主峰值为98.96(二倍体

率100.0%),雌核发育单倍体组(实验组5)的峰值为49.73(单倍体率为100.0%),二者的DNA相对含量比值为2.0,说明实验组5的DNA相对含量只有实验组6的一半,进一步证实5 min紫外线照射组能成功诱导匙吻鲟雌核发育单倍体。

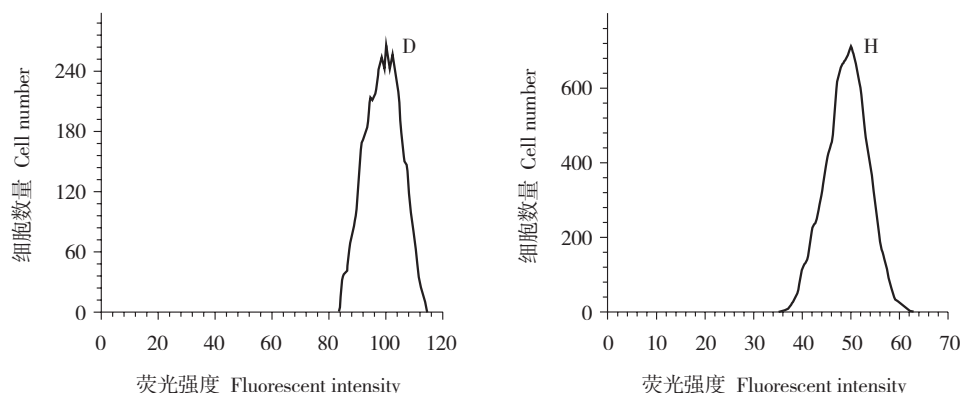


图3 匙吻鲟单倍体组和雌核发育二倍体组原肠期的DNA相对含量

D: 二倍体; H: 单倍体

Fig. 3 DNA relative content of haploid and gynogenetic diploid of *Polyodon spathula*

D: Diploid; H: Haploid

3 讨论

3.1 远缘精子的选用

本研究采用的是与白鲟科的匙吻鲟(染色体数目 $2n=120$ ^[16,20])亲缘关系较远的鲟科鱼类—施氏鲟的精子(染色体数目 $4n=238\pm 8$)^[16,20-21]作为诱导匙吻鲟雌核发育的激活源。在作者长期的生产实践过程中发现,匙吻鲟卵与施氏鲟精子正常授精,其杂种不能存活,但是经过遗传灭活的精子可以有效地启动匙吻鲟雌核发育。即使有少量的精子不能灭活,其产生的受精卵也会在胚胎发育过程中被淘汰,从而避免非雌核发育后代出现对结果造成的影响^[22-23]。采用杂种不能存活的远缘种的精子,辅以紫外线辐射处理,就可以有效避免精子灭活不彻底给实验结果带来的干扰。至于在雌核发育诱导过程中,施氏鲟的精子是否还有其他作用,以及其基因组去向,是否会有小片段基因融入到后代基因组中有所表达,这些都有待于进一步研究。此外,这2种鲟鱼的繁殖季节均在春季,精卵易获得。以上条件决定了施氏鲟精子是诱导匙吻鲟雌核发育的理想异源精子。它与100%适当失活的同源精子具有相同的功能,不仅能够有效激活匙吻鲟卵子,同时单倍体的致死效应还保证了所有存活的个体都是雌核发育个体。这些优点是应用同源失活精子进行雌核发育操作所无法比拟的。

3.2 精子的染色体遗传失活

本实验采用非电离辐射的紫外线(UV)作为处理精子的光源,光照强度为 $10\ 188\ \mu\text{W}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$,照射距离为15 cm。研究发现,经4 min和4.5 min紫外线照射的施氏鲟精子与匙吻鲟卵受精,其胚胎均出现了一定比例的非整倍体。这可能是由于低剂量紫外线造成精核染色体未完全失活的结果,即未完全失活的精子染色体入卵后与卵核结合,所生成的合子则为非整倍体^[5]。经5~7 min紫外线照射的施氏鲟精子与匙吻鲟卵受精,经染色体制片观察和流式细胞仪分析发现,其胚胎单倍体比率均为100.0%,且无孵化成活,这可能是由于单倍体的致死效应,导致胚胎在孵化期死亡。而经5 min紫外线照射的施氏鲟精子与匙吻鲟卵受精后经热休克处理均能获得较高比例的雌核发育二倍化匙吻鲟(18.8%),说明5 min的UV辐射剂量既能使施氏鲟精子染色体遗传失活,又能保持精子较高的活力,有效地激活卵子,启动卵子雌核发育,是使精子遗传失活的最佳照射时间。

3.3 热休克参数的筛选

根据俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedti*)^[8]、密西西比铲鲟(*Scaphirhynchus platyrhynchus*)^[11]等鲟类雌核发育的报道,热休克法是简单且行之有效的染色体加倍方法。对热休克效果有较大影响的主要3个因素是授精后的热休克起始时间、热休克持续时间

和热休克处理温度^[14]。其中热休克起始时间对诱导结果影响最大。处理过早,受精卵还没有进入第二次减数分裂;处理过晚,第二极体就会排出,导致处理无效。本实验也证实了这一点。此外,热休克处理温度和持续时间也很重要,既要考虑到鱼类卵子对高温的耐受能力,控制在致死温度以下,又要保证较高的二倍体孵化率。本实验所选择的3个处理时间(16 min、18 min和20 min),采取适当的温度处理(35℃、37℃和39℃),均得到二倍体,其中以受精后18 min,在37℃条件下开始热休克处理2 min时,二倍体孵化率最高,达18.8%。但是这些条件与其他作者所报道的结果略有不同^[13-14],这可能与亲鱼的培养条件和受精前卵子的孵化温度不同有关。此外,亲鱼强化培育条件的差异,将会造成卵子质量的不同,这同样也会造成受精卵处理效果的差异。

致谢:中国水产科学研究院长江水产研究所的曾令兵研究员、柳凌研究员和李艳华,湖北恒升实业有限公司的杨军经理及湖北省宜昌市天峡鲟业有限公司的蓝达华、刘海洋及任华同志在实验过程中给予了大力帮助,特此感谢!

参考文献:

- [1] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京: 中国农业出版社. 2001: 165.
- [2] 吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程[M]. 上海: 科学技术出版社, 1999: 94-102.
- [3] 楼允东. 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用[J]. 水产学报, 1986, 10(1): 111-123.
- [4] 吴清江, 叶玉珍, 陈德荣. 1981. 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.
- [5] 戈文龙, 张全启. 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): 1 012-1 016.
- [6] 程汉良, 潘锦生, 马国文, 等. 热休克诱导鲫鱼纯合雌核发育二倍体的研究[J]. 水利渔业, 2005, 25(3): 25-27.
- [7] 李胜忠, 陈琳, 杜劲松. 热休克诱导虹鳟二倍体雌核发育[J]. 动物学杂志, 1997, 32(5): 7-9.
- [8] Romashov D D, Nikdydkin V N, Belyaevaand N A, et al. Possibilities of producing diploid radiation-induced gynogenesis in sturgeons [J]. Radiobiology, 1963, 3: 145-154.
- [9] Van Eenennaam A L, Van Eenennaam J P, Medrano J F, et al. Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus Richardson*) [J]. Aquaculture, 1996, 147: 177-189.
- [10] Flynn S R, Matsuoka M, Reith M, et al. Gynogenesis and sex determination in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesuere [J]. Aquaculture, 2006, 253: 721-727.
- [11] Mims S D, Shelton W L. Induced meiotic gynogenesis in shovelnose sturgeon [J]. Aquac Int'l, 1998, 16: 323-329.
- [12] Fopp-Bayat D, Kolman R, Woznicki P. Induction of meiotic gynogenesis in sterlet (*Acipenser ruthenus*) using UV-irradiated baster sperm [J]. Aquaculture, 2007, 264: 54-58.
- [13] Recoubatsky A V, Grunina A S, Barmintsev V A, et al. Meiotic gynogenesis in the stellate and Russian sturgeon and sterlet [J]. Russ J Dev Biol, 2003, 34: 92-101.
- [14] Mims S D, Shelton W L, Linhart O, et al. Induced meiotic gynogenesis of paddlefish (*Polyodon spathula*) [J]. J World Aquac Soc, 1997, 28: 334-343.
- [15] Bemis W E, Findeis E K, Grande L. An overview of Acipenseriformes [J]. Environ Biol Fishes, 1997, 48: 25-71.
- [16] 陈细华. 鲟形目鱼类生物学与资源现状[M]. 北京: 海洋出版社, 2007: 39-41.
- [17] Birstein V J. Sturgeons and paddlefishes: threatened fishes in need of conservation [J]. Conserv Biol, 1993, 7: 773-787.
- [18] 危起伟, 杨德国. 中国鲟鱼的保护、管理与产业化[J]. 淡水渔业, 2003, 33(3): 3-7.
- [19] 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.
- [20] Billard R, Guillaume L. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish [J]. Rev Fish Biol Fish, 2001, 10: 355-392.
- [21] 宋苏祥, 刘洪柏, 孙大江, 等. 施氏鲟的核型及DNA含量研究[J]. 遗传, 1997, 19(3): 5-8.
- [22] Schwartz F J. World literature to fish hybrids with an analysis by family, species, and hybrid [M]. Mississippi: Pub Gulf Coast Res Lab Mus, 1972: 65-87.
- [23] 桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲, 等. 鱼类远缘杂交正反交杂种胚胎发育差异的细胞遗传学研究[J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 171-177.

Induction of meiotic gynogenesis in paddlefish (*Polyodon spathula*) using UV-irradiated Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) sperm

ZOU Yuan-chao^{1,2}, WEI Qi-wei^{1,2,3}, PAN Guang-bi^{1,3}, SHEN Li^{1,3}, Hu Jia^{1,2}

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 2. Fisheries College of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Sperms of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) were irradiated by UV light 15 cm away at the intensity of $10\ 188\ \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ for different time (4–7 min). Then activated eggs of paddlefish (*Polyodon spathula*) were fertilized by these sperms. The second polar body extrusion of fertilized egg was inhibited by heat shock for gynogenesis induction. The optimum conditions for retention of the second polar body in paddlefish were investigated by altering initiation time, temperature and duration of heat shock treatment. Chromosome ploidy was examined through chromosome identification method. The result showed that activated eggs were fertilized by sperms pre-treated with UV irradiation for 5 min and the embryo were haploid ($n=60$), which approved the validity of UV irradiation. If the fertilized eggs were maintained at $(18 \pm 0.3)^\circ\text{C}$ before any treatment, chromosome doubling could be induced by heat shock under the temperature of $35\text{--}39^\circ\text{C}$ for 2 min after 16–20 min post-fertilization. Heat shock treatment under 37°C for a 2 min duration after 18 min post-fertilization resulted in the highest diploid induction rate of 18.8%. Chromosome identification result revealed that embryos treated under the above conditions were all diploid embryos ($2n=120$). This experiment provides basis for understanding the sex determination and feminization mechanism of gynogenesis induced by heterogenous sperms in paddlefish. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (5): 728–735]

Key words: *Acipenser schrenckii*; *Polyodon spathula*; sperm; UV-irradiation; heat shock; gynogenesis

Corresponding author: WEI Qi-wei. Tel: 0716-8128881; E-mail: weiqw@yfi.ac.cn