

## 黄姑鱼雌核发育诱导及鉴定

杨育凯<sup>1</sup>, 谢仰杰<sup>1</sup>, 蔡明夷<sup>1</sup>, 简林江<sup>1</sup>, 陈庆凯<sup>2</sup>, 楼宝<sup>3</sup>, 王志勇<sup>1\*</sup>

(1. 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 福建省宁德市水产技术推广站, 福建 宁德 352100;

3. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316100)

**摘要:** 为建立黄姑鱼雌核发育诱导方法, 实验利用紫外线照射使黄姑鱼精子遗传失活, 与卵子授精后再通过冷休克抑制极体排放进行倍性恢复, 成功诱导出黄姑鱼雌核发育二倍体。精子经强度为  $3\ 800\ \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$  的紫外线照射  $10\sim 100\ \text{s}$ , 受精卵孵化率呈现明显的 Hertwig 效应; 当照射时长达到  $60\ \text{s}$  以上, 各实验组全部孵出仔鱼均呈现单倍体综合症。精子的紫外线照射时间、受精卵冷休克起始和持续时间等三因素三水平正交实验结果表明, 精子经紫外线照射  $60\ \text{s}$ , 受精  $2\ \text{min}$  后卵子在  $3\sim 4\ ^\circ\text{C}$  海水中持续冷休克  $10\ \text{min}$  为最佳诱导条件组合, 可以获得最高的孵化率 ( $16\%$ )。最佳组合仔鱼形态和细胞相对 DNA 含量与正常二倍体一致, 经微卫星标记检验证明全部不含有父本基因, 为雌核发育二倍体。实验报道了成功诱导黄姑鱼雌核发育二倍体的条件, 为进一步开展黄姑鱼良种选育和性别控制工作奠定了基础。

**关键词:** 黄姑鱼; 雌核发育; 冷休克; DNA 相对含量; 微卫星标记

**中图分类号:** Q 343.3; S 917.4

**文献标志码:** A

黄姑鱼 (*Nibea albiflora*), 属鲈形目 (Perciformes), 石首鱼科 (Sciaenidae), 黄姑鱼属 (*Nibea*)<sup>[1]</sup>。黄姑鱼肉质鲜美, 营养丰富, 是我国传统渔业的主要捕捞对象和东南沿海目前效益较高的一个重要养殖品种。近年来, 随着闽浙沿海黄姑鱼养殖规模日渐扩大, 其良种选育工作已成为迫切需要。人工雌核发育可在较短时间内建立纯系, 固定育种群体中的有利基因, 消除不利基因; 通过不同纯系之间的杂交可获得性状优良且稳定的品种, 为鱼类良种选育提供重要手段<sup>[2]</sup>。对于雌性生长优势明显的鱼类人工雌核发育可为通过性别遗传控制实现全雌化养殖提供快速简捷的途径。目前国内外已对数十种经济鱼类开展人工雌核发育技术研究, 并应用于良种选育或性别控制, 培育出了不少优良的养殖品种, 如鲤 (*Cyprinus carpio*)<sup>[3-4]</sup>、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)<sup>[5-6]</sup>、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[7]</sup>、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)<sup>[8]</sup> 等, 但有关黄姑鱼雌核发育的研究尚

未见报道。本实验对黄姑鱼人工雌核发育诱导条件进行摸索, 并借助微卫星标记等手段对诱导的雌核发育子代进行鉴定, 以为黄姑鱼良种选育和性别控制工作奠定基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 雌核发育诱导

实验于 2012 年 4 月在福建省宁德市横屿岛水产有限公司育苗场进行, 黄姑鱼亲鱼来自本课题组选育、在三都澳海区网箱中养殖 2 龄以上、体质健壮、无伤病的个体, 室内暂养后使用。挑选性腺发育良好的个体按照王晓清等<sup>[9]</sup>在大黄鱼使用的方法进行人工催产。所有实验均采用同一尾雄鱼的精液和同一尾雌鱼的卵子。

**精子紫外照射实验** 精液经 Hank 氏液稀释 (精液与 Hank 氏液的比例为 1:4) 后, 吸取 3 mL 于直径 9 cm 的培养皿中, 将培养皿置于盛有碎冰且表面水平的托盘上, 再将托盘放在转速为

收稿日期:2012-11-16 修回日期:2013-04-07

资助项目:国家科技基础条件平台资助;公益性行业(农业)科研专项(200903046-05);集美大学创新团队科研基金(2010A002);福建省教育厅 A 类科技项目(JA12189);浙江省重大科技专项(2012C12907-8)

通信作者:王志勇, E-mail:zywang@jmu.edu.cn

110 r/min 的摇床上;用 2 支平行摆放的 30 W 紫外灯作为光源进行照射(波长为 254 nm),照射距离为 40 cm。照射前先打开紫外灯 15 min 以稳定光强,用紫外照度计测定 UV-C 强度为 3 800  $\mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 。取精液依次照射 10、20、30、40、50、60、70、80、90 和 100 s,然后与卵子受精,24  $^{\circ}\text{C}$  水温孵化,海水盐度 26 ~ 27。

**正交实验优化诱导条件** 根据课题组诱导大黄鱼雌核发育的经验以及上述实验结果,确定冷休克水温为 3 ~ 4  $^{\circ}\text{C}$ ,并初步确定紫外照射时间、冷休克起始时间和冷休克持续时间范围,然后按照三因子三水平设计正交实验,进行诱导条件优化(表 1)。同时设单倍体组(授精后不诱导染色体二倍化)和正常受精组作为对照,观察记录各组的受精率、孵化率和畸形率,每组设 3 个重复,计算平均值。数据采用 Excel 和 SPSS 软件处理,进行正交实验结果统计分析。

表 1 正交因素水平表

Tab.1 Factors and levels of treatment of orthogonal experiment

水平 levels	UV 照射 时间/s UV irradiation time	冷休克 起始时间/min cold shock initiation time	冷休克 持续时间/min cold shock duration time
1	50	2	8
2	60	3	10
3	70	4	12

表 2 5 个微卫星位点的引物序列及其特征

Tab.2 Primer sequences and characteristics of 5 microsatellites used in the study

位点 locus	核心序列 motif sequence	引物序列(5' ~ 3') primer sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ annealing temperature
LYC0009	(GT) <sub>10</sub> TTA(TG) <sub>4</sub> CTG	F:GTCAATCACGTCTGTCTCTGC R:TCAGCCATTGTCTGTGAGGT	60
LYC0017	(TG) <sub>7</sub>	F:CTACCAAGGCCAACCATCG R:GAGCACACTATAACAGAAAGC	TD55 - 50
LYC0038	(AC) <sub>14</sub>	F:ACCCTGCCAGTTTCTCC R:TTGCTGCCCTGATGTTT	51
LYC0222	(CA) <sub>19</sub>	F:GCCATCTATCATAACAGCC R:CGTAAGACCGCAGGACAC	55
LYC0453	(T) <sub>18</sub>	F:GTGCTGAACGCAACTACCAA R:ATGAAGGCAGAGAAACGGAA	55

注:TD 表示梯度 PCR 反应(-1  $^{\circ}\text{C}/\text{cycle}$ )。

Notes:TD = touch down, means gradient PCR reaction.

## 2 结果

### 2.1 雌核发育诱导

不同紫外照射剂量对黄姑鱼精子遗传失活的效果 不经紫外照射的对照组卵子受精率最高

### 1.2 雌核发育的鉴定

以正交实验中的最优组、正常二倍体组和单倍体组为对象,通过形态学观察、DNA 相对含量测定以及微卫星标记分析,鉴定雌核发育真实性。

**形态比较** 观察比较各组胚胎发育及初孵仔鱼形态,根据单倍体综合症发生情况判断精子遗传失活和卵子染色体加倍的诱导效果。

**DNA 相对含量测定** 实验组各取 30 尾初孵仔鱼,根据蔡明夷等<sup>[10]</sup>所使用的方法测定各组细胞相对 DNA 含量,以确定染色体倍性。

**微卫星标记分析** 取亲本胸鳍和从最优组随机取 46 尾仔鱼固定于 95% 酒精中,用上海捷瑞生物工程有限公司 DNA 提取试剂盒提取 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的质量,紫外分光光度计测定 OD<sub>260</sub> 值确定 DNA 的浓度。DNA 原液 - 20  $^{\circ}\text{C}$  保存,取部分稀释成 50 ng/ $\mu\text{L}$  备用。

用 40 对本实验室开发的大黄鱼微卫星标记引物对黄姑鱼亲本的基因型进行分析,从中筛选出 5 对雌雄亲本没有相同等位基因条带的引物,用于对最优组子代进行基因型分析,其序列和扩增片段的特征见表 2。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,按照李益云<sup>[11]</sup>所述方法进行 PCR 扩增、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染显色。

(83%),实验组随着紫外照射时间加长受精率逐渐降低,照射超过 70 s,随着部分精子的死亡,受精率明显下降,照射 100 s 时精子被完全杀死,受精率为 0(图 1)。受精卵孵化率同样也是对照组最高(75%),照射 10 ~ 40 s,随着时间延长孵化率

明显下降,到 40 s 时降到最低(2%),但照射剂量继续增加时(40~70 s)又出现明显的回升趋势,而后又下降,呈现出典型的 Hertwig 效应。各照射组孵出鱼苗中畸形苗比率随照射剂量增加而上升。当辐射时达到 60 s 以上,各实验组畸形率达 100%。

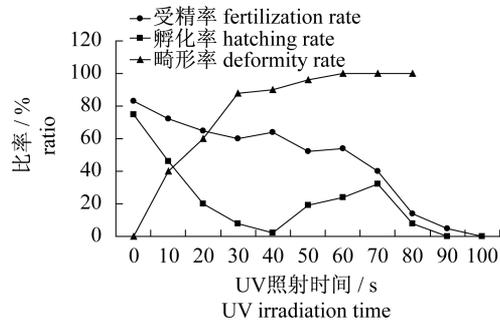


图 1 黄姑鱼精子 UV 照射实验结果

Fig. 1 The results of sperm UV irradiation experiment in *N. albiflora*

雌核发育二倍体诱导条件优化 水温 24 ℃, 21 h 后各实验组鱼苗相继孵出, 正交实验各组孵化率如表 3 所示: 3 个因素不同水平诱导雌核发育的效果都不一样, 其中以冷休克起始时间影响最大, 2 min 组孵化率最高达 16%, 随着起始时间的推迟孵化率快速下降, 4 min 组基本上没有正常鱼苗孵出。其次是紫外照射时间, 孵化率最高的两组(4 组 16% 和 5 组 11%) 紫外照射时间均为 60 s, 当照射时间超过 70 s 时, 各组孵化率都明显下降。冷休克持续时间 8~12 min 均能诱导出正常雌核发育二倍体, 对二倍体诱导率影响最小。正交实验最优组为第 4 组(平均孵化率为 16%), 可见在实验条件下, 黄姑鱼雌核发育二倍体诱导的适宜条件: 精子在 3 800 μW/(cm<sup>2</sup>·s) 紫外线下照射 60 s, 授精后 2 min 开始冷休克处理, 冷休克持续时间为 10 min。

表 3 黄姑鱼雌核发育二倍体诱导正交实验设计与结果

Tab. 3 Orthogonal experiment design and results of induction diploid gynogenesis in *N. albiflora*

处理编号 group No.	UV 照射时间/s(A) UV irradiation time	冷休克起始时间/min(B) cold shock initiation time	冷休克持续时间/min(C) cold shock duration time	孵化率/% hatching rates
1	50	2	8	10
2	50	3	10	6
3	50	4	12	0.5
4	60	2	10	16
5	60	3	12	11
6	60	4	8	0
7	70	2	12	5
8	70	3	8	5
9	70	4	10	0
k <sub>1</sub>	5.5	10.3	5.0	
k <sub>2</sub>	9.0	7.3	7.3	
k <sub>3</sub>	3.3	0.2	5.5	
R	5.7	10.1	2.3	
顺序 order	B > A > C			
最优组合 optimal combination	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>			
P 值 P-value	0.323	0.125	0.721	

## 2.2 雌核发育鉴定

形态比较 单倍体组畸形鱼苗都具有典型的单倍体综合症(haploid syndrome), 表现为头部畸形, 尾部短而弯曲, 腹水, 围心腔扩大, 色素减少, 心血管系统发育不全, 开口前即全部死亡(图 2-a)。经诱导倍性恢复后形成的雌核发育二倍体

组胚胎发育正常, 孵出的仔鱼形态也正常, 与正常受精对照组一样, 脑部器官眼泡、晶体清晰可见, 躯干笔直, 游泳能力强(图 2-b)。

DNA 相对含量测定 正常二倍体、雌核发育二倍体和单倍体初孵仔鱼细胞 DNA 相对含量见图 3。将正常二倍体对照组 DNA 含量设为 100(图

3-a), 则单倍体组检测的相对值为 50(图 3-b), 雌核发育二倍体组检测的相对值为 100(图 3-c)。

**微卫星分析** 用 40 对多态信息含量较高的黄姑鱼微卫星引物对黄姑鱼雌雄亲本的 DNA 进行 PCR 扩增, 有 32 对可正常扩增获得清晰的条带, 但其中多数无法对两个亲本进行区分, 只有

5 对引物在雌雄亲本扩增出的条带(等位基因)明显不同。用这 5 对引物对其子代(随机取 46 尾)进行基因分型, 检测的全部子代个体都仅有母本条带, 表明其都是雌核发育产物。图 4 为其中两对引物 *LYC0038*、*LYC0222* 在最优组亲本和子代中的扩增结果。

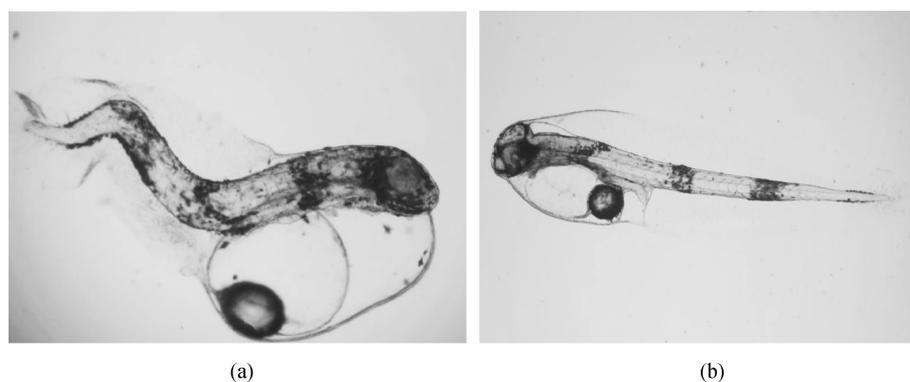


图 2 黄姑鱼单倍体 (a) 和雌核发育二倍体 (b) 初孵仔鱼外部形态

Fig. 2 External morphology of haploid (a) and gynogenetic diploid (b) larvae of *N. albiflora*

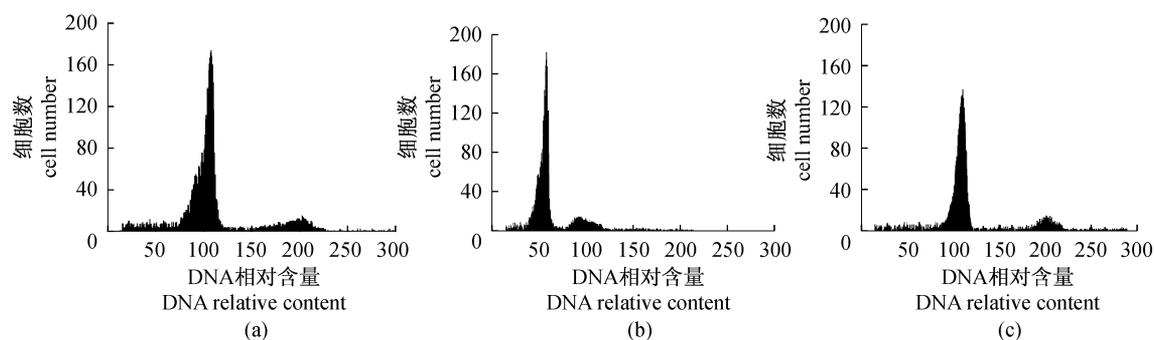


图 3 黄姑鱼正常二倍体 (a)、单倍体 (b) 和雌核发育二倍体 (c) 初孵仔鱼 DNA 相对含量

Fig. 3 DNA relative content of normal diploid (a), haploid (b) and gynogenetic diploid (c) larvae of *N. albiflora*

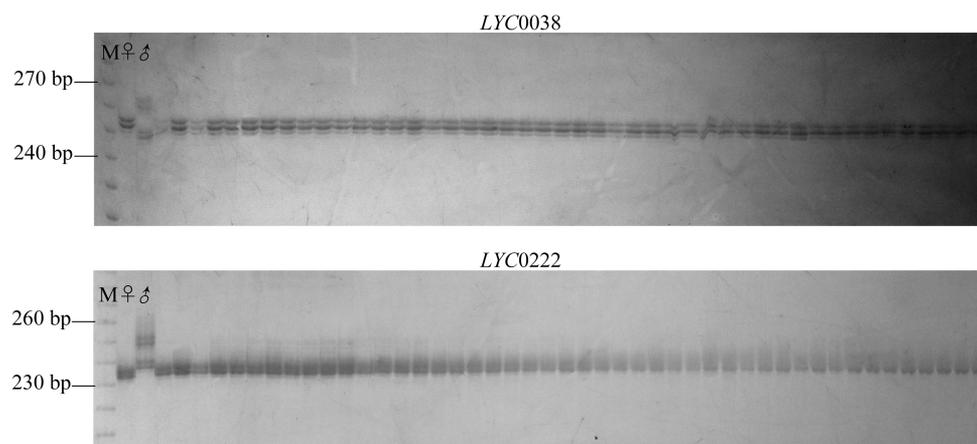


图 4 *LYC0038* 和 *LYC0222* 引物对最优组 (第 4 组) 46 尾仔鱼及其亲本的扩增图谱

Fig. 4 The electrophoresis patterns of 46 larvae and parents in the optimal group (No. 4) at *LYC0038* and *LYC0222* microsatellite loci

### 3 讨论

人工诱导鱼类雌核发育有两个技术关键:精子染色体的遗传失活和卵子染色体二倍体化。精子染色体遗传失活主要方法有射线处理和药物处理等,其中以紫外线照射最为常用。据报道,紫外线照射两栖类和鱼类精子遗传失活过程中通常会出现 Hertwig 效应<sup>[12]</sup>,在紫外线照射实验中,黄姑鱼受精卵孵化率随精子紫外线照射剂量的增加先降低后回升,到一定程度而后又降低,也呈现典型的 Hertwig 效应。因此,利用紫外照射使精子染色体遗传失活时,照射剂量的选择非常重要:照射应使精子染色体完全失活而又不影响其受精能力;照射时间过短和遇到光修复作用,遗传物质都不能彻底失活,容易产生杂交或正常受精二倍体<sup>[13]</sup>;精子照射时间过长,精子活力降低、丧失甚至死亡,受精率和发育正常率明显降低<sup>[14]</sup>。已有的报道中用于精子遗传灭活的紫外线照射强度差异较大:刘海金等<sup>[15]</sup>报道真鲷(*Pagrus major*)精子的最佳照射剂量为 73 mJ/cm<sup>2</sup>,而 Tabata 等<sup>[16]</sup>报道的最佳剂量为 48 mJ/cm<sup>2</sup>,Yamamoto<sup>[17]</sup>的结果为 45.6 mJ/cm<sup>2</sup>;Vázquez 等<sup>[18]</sup>报道大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)精子最佳照射剂量为 870 mJ/cm<sup>2</sup>,而 Piferrer 等<sup>[19]</sup>报道则为 300 mJ/cm<sup>2</sup>。精子灭活所需紫外照射剂量存在差异可能是因为不同鱼类精子对紫外线敏感性不同。此外,精液的密度、厚度、照射时的环境温度以及季节分布等也都会影响精子最佳灭活时间<sup>[20]</sup>。实验通过精子紫外照射实验和正交实验最终得到诱导黄姑鱼雌核发育的紫外线最佳照射剂量为 228 mW/cm<sup>2</sup>(紫外线强度 3 800 μW/(cm<sup>2</sup>·s),照射时间 60 s),这与本实验室进行大黄鱼精子遗传灭活观测到的适宜照射剂量很接近<sup>[11]</sup>。

人工雌核发育研究中,温度休克是简单而行之有效的诱导染色体加倍方法。相对于致死率较高的热休克,冷休克处理方法更为理想<sup>[21]</sup>。影响冷休克效果的因素主要有:冷休克温度、冷休克处理起始时间和冷休克处理持续时间,其中以冷休克的起始时间对诱导效果影响最为明显<sup>[22]</sup>。在极体排放前的敏感期开始冷休克处理,可很好地抑制第二极体的排出;处理过早容易使染色体加倍率过低;处理过晚,第二极体已经排出,导致处理无效<sup>[23]</sup>。实验中授精后 4 min 开始处理组基

本没有正常鱼苗孵出,表明已经错过了极体的排放。另外,冷休克的温度选择及处理持续时间也很重要,采用温度休克时通常要用亚致死温度才能有效地抑制第二极体的放出,处理持续时间太短无抑制作用,太长则会对胚体造成较大损伤,导致孵化率下降、畸型率上升而影响整体诱导效果<sup>[24]</sup>。实验发现,在 3~4 °C 条件下,受精后 2 min 开始冷休克处理,持续 10 min 时,雌核发育二倍体正常苗孵出率最高,这与大黄鱼研究采用同源精子的报道相类似<sup>[25]</sup>;这可能与这两种鱼同属于石首鱼科,亲缘关系较近,而且生长条件也基本一致有关。

在人工诱导鱼类雌核发育过程中,有时会因精子遗传物质失活不彻底,导致雄鱼基因参与遗传,因此有必要对雌核发育的真实性进一步确认<sup>[9]</sup>。雌核发育真实性鉴定有多种方法,DNA 分子标记可直接反应生物体的遗传本质和差异,是鉴定鱼类雌核发育最为可靠和简便的方法<sup>[26]</sup>,目前较常用的是 AFLP 标记和微卫星标记。微卫星为共显性标记,基因组中数量大、个体间多态性高,是亲子关系鉴定的有效手段。此外,微卫星引物在近缘物种中具有一定的通用性,在近缘种间尝试微卫星引物的通用性研究,有助于减少分离微卫星标记的时间和费用。林能锋等<sup>[27]</sup>利用 8 对大黄鱼微卫星标记引物在 10 种石首鱼中进行扩增,叶华<sup>[28]</sup>利用 16 对大黄鱼引物在 5 种石首鱼中进行扩增,均发现其具有较高的通用性。

实验对未诱导加倍组、正交实验最佳诱导组人工雌核发育胚胎和仔鱼以及正常受精对照组胚胎和仔鱼进行了形态观察与 DNA 相对含量测定,发现未诱导加倍组初孵仔鱼 DNA 含量只有正常对照组和诱导加倍组的一半,其胚胎和初孵仔鱼表现出典型的单倍体综合症;而最佳诱导组初孵仔鱼形态正常且 DNA 相对含量与正常二倍体对照组一样,表明其属于雌核发育二倍体。此外,实验中用 40 对大黄鱼微卫星引物对黄姑鱼亲本进行通用性分析,发现有 32 对引物能在黄姑鱼中得到较好的扩增,其中有 21 对在黄姑鱼中可检测到多态性,5 对引物可在雌雄亲本之间扩增出清晰的鉴别性条带。用这 5 对微卫星引物对雌核发育最优组进行鉴定,扩增结果显示受检测的 46 尾仔鱼全部仅含有母本条带,没有父本条带,表明所检测的子代全部为雌核发育体。综合上述研究

结果,表明该组的紫外线照射剂量对于精子 DNA 的破坏是完全的,实验所采用的黄姑鱼雌核发育诱导条件是适宜的和有效的。目前我们已经应用所获得的最佳诱导条件成功诱导培育了数个黄姑鱼异质雌核发育家系,个体最大的家系平均体长已经达到 20 cm,其生长发育情况完全正常,正在继续培育中。

#### 参考文献:

- [1] 朱元鼎,罗云林,伍汉霖. 中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述[M]. 上海:上海科学技术出版社,1963:50-51.
- [2] Arai K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan [J]. *Aquaculture*, 2001, 197 (1-4): 205-228.
- [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] 陈荣德,黄文郁,吴清江,等. 全雌鲤的培育及其养殖效果[J]. *水利渔业*, 1990(3): 21-23.
- [5] 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.
- [6] 王志勇,刘贤德,陈庆凯. 大黄鱼“闽优1号”[M] // 全国水产技术推广总站编. 2010 水产新品种推广指南. 北京:中国农业出版社,2011:82-99.
- [7] 刘海金,刘永新,王玉芬,等. 牙鲆减数分裂与有丝分裂雌核发育的遗传差异[J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 718-724.
- [8] Chen S L, Tian Y S, Yang J F, *et al.* Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(2): 243-251.
- [9] 王晓清,王志勇,柳小春,等. 大黄鱼人工诱导雌核发育后代的微卫星标记分析[J]. *遗传*, 2006, 28(7): 831-837.
- [10] 蔡明夷,刘贤德,武祥伟,等. 大黄鱼与黄姑鱼异源三倍体的诱导和微卫星分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(11): 1629-1635.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 潘光碧,邹桂伟,胡德高. 荷元鲤雌核发育后代体色和性比的初步研究[J]. *水产学报*, 1995, 19(4): 366-368.
- [14] Carole R, Ngingo J V, Laurent G, *et al.* Gynogenesis induction and sex determination in the Eurasian perch, *Perca fluviatilis* [J]. *Aquaculture*, 2005, 243(1-4): 411-415.
- [15] 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.
- [16] Tabata K, Gorie S. Induction of gynogenetic diploids in *Paralichthys olivaceus* by suppression of the 1st cleavage with special reference to their survival and growth [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988, 54(11): 1867-1872.
- [17] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned population in hiraime flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. *Aquaculture*, 1999, 173(1-4): 235-246.
- [18] Vázquez E, Fernández, Pato C, *et al.* Induced gynogenesis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *European Aquaculture Society*, 2002, 32 (Spec Publ): 528-529.
- [19] Piferrer F, Cal R M, 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(1-4): 403-419.
- [20] Felip A. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Heredity*, 1999, 83(4): 387-397.
- [21] 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.
- [22] Felip A, Zanuy S, Carrillo M, *et al.* Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species [J]. *Genetica*, 2001, 111(1-3): 175-195.
- [23] 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:自然科学版*, 2005, 35(6): 1011-1016.
- [24] 杨景峰,陈松林,徐亘博,等. 异源精子诱导犬齿牙鲆的雌核发育[J]. *水产学报*, 2009, 33(4): 533-541.
- [25] 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): 37-41.
- [26] 胡则辉,徐君卓. 人工诱导海水鱼类雌核发育的研

- 究进展[J]. 海洋渔业,2007,29(1):78-83.
- [27] 林能锋,苏永全,丁少雄,等. 大黄鱼微卫星标记引物在石首鱼科几个近缘种中的通用性研究[J]. 中国水产科学,2008,15(2):237-243.
- [28] 叶华. 大黄鱼 SSR 遗传连锁图谱的构建及生长相关性状的 QTL 定位[D]. 长沙:湖南农业大学,2010.

## Induction and identification of gynogenesis in *Nibea albiflora*

YANG Yukai<sup>1</sup>, XIE Yangjie<sup>1</sup>, CAI Mingyi<sup>1</sup>, JIAN Linjiang<sup>1</sup>, CHEN Qingkai<sup>2</sup>,  
LOU Bao<sup>3</sup>, WANG Zhiyong<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture in the East China Sea, Ministry of Agriculture of China,  
Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;  
2. Fishery Technical Extension Station of Ningde City, Ninde 352100, China;  
3. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316100, China)

**Abstract:** In order to establish a procedure to induce artificial gynogenesis for genetic improvement and sex control studies in *Nibea albiflora*, ultraviolet irradiation was used to genetically inactivate the sperm and cold shock was used to induce the chromosome duplication of the eggs. Relative DNA content in newly-hatched larvae of candidate haploid gynogens, candidate diploid gynogens and the control groups from normal fertilization were mensurated, and paternity test was made using SSR markers for confirmation of gynogenesis. The gynogenetic diploid was successfully induced by activating egg development with UV-irradiated sperm combined with cold shock to prevent extrusion of the second polar body. UV irradiation time range was preliminarily determined by an insemination trial with the sperms irradiated by different doses of UV. The fertilized egg hatchability exhibited typical Hertwig effect when sperm irradiation time was 0-100 seconds at a UV intensity of  $3\ 800\ \mu\text{W}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ . All newly-hatched larvae exhibited typical haploid syndrome when the UV irradiation time was over 60 seconds. In addition, we designed an orthogonal experiment to further optimize UV irradiation time, cold shock initiation time and cold shock duration time. The orthogonal experiment results showed that the hatching rate was highest (16%) in the following conditions: sperm irradiation time was 60 seconds, cold shock temperature was 3-4 °C, cold shock initiation time was 2 minutes after fertilization and cold shock duration time was 10 minutes. The larvae of the optimal group have the same morphological characteristics and cellular DNA content with normal diploids. A further paternity test with five compatible SSR primers of *Larimichthys crocea* proved that the larvae in the optimal group were all gynogenetic diploids without paternal specific alleles.

**Key words:** *Nibea albiflora*; gynogenesis; cold shock; DNA relative content; SSR

**Corresponding author:** WANG Zhiyong. E-mail: zywang@jmu.edu.cn