



· 综述 ·

鱼类生殖细胞移植的研究进展及应用前景

叶欢¹, 危起伟¹, 徐冬冬², 岳华梅¹, 竹内裕³,
阮瑞¹, 杜浩¹, 李创举^{1*}

- (1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223;
2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江省海水增养殖重点实验室, 浙江 舟山 316100;
3. 金沢大学生命理工学院, 日本 石川县 927-0552)

摘要: 生殖细胞移植是指将供体的生殖细胞移植到同种或异种受体体内, 供体生殖细胞嵌合到受体性腺, 经过增殖、分化并最终发育为功能性配子的过程。作为辅助生殖技术, 它不仅为珍稀濒危动物的繁育和保护提供了新途径, 同时也为生殖干细胞的功能研究提供了有效手段。鱼类生殖细胞移植研究首先在模式鱼类斑马鱼中开展, 经过十多年的发展, 取得了一系列突破性的进展: 主要包括先后建立了以胚胎、仔鱼和成鱼为受体的生殖细胞移植体系, 精原和卵原干细胞的发现拓宽了供体生殖细胞的选择, 受体的选择与制备方法的完善。该技术在缩短鱼类性成熟周期、性控育种、珍稀濒危鱼类保护等方面具有巨大的应用前景, 已成功在多种淡水和海水鱼类中开展了研究和应用。本文结合作者的研究实践和经验, 系统地梳理和总结了鱼类生殖细胞移植的研究进展, 指出了该技术实践应用的关键问题, 并探讨了其应用前景。

关键词: 鱼类; 生殖细胞移植; 种质资源; 冷冻保存

中图分类号: S 961.2

文献标志码: A

鱼类占据着地球上从海水到淡水几乎所有水域中的生态位, 不仅是重要的生物资源, 也是渔业生产的重要物质基础和人类重要的动物蛋白来源。据统计, 地球上的鱼类约30 000种^[1]。然而, 由于栖息地退化、过度捕捞等原因导致天然水域渔业资源锐减, 已有2 916种鱼类处于不同程度的濒危(近危、易危、濒危、极危、野外灭绝或灭绝)状态, 约占鱼类总数的10%^[2]。因此, 鱼类种质资源的保护引起世界各国的高度重视。目前, 主要通过建立禁渔区和禁渔期制度、水产种质资源保护区以及增殖放流等措施, 对重要渔业资源实行重点保护; 但上述措施短期内都较难取得成效。因此, 如何对鱼类的种质

资源进行长期有效的保护成为了亟待解决的问题。

目前, 虽然鱼类精液冷冻保存技术已较成熟, 但是由于卵子体积大、卵黄含量高和细胞膜通透性低等原因, 导致鱼类卵子和胚胎的冷冻保存还难以实现^[3], 所以现有的鱼类配子冷冻保存技术只能保存单亲的遗传信息。近年来, 研究者们逐渐认识到鱼类生殖干细胞携带双亲遗传信息, 具有分化为两性配子的潜能^[4-6], 因此将鱼类种质资源冷冻保存的对象转移到原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)、精原和卵原干细胞。这些细胞体积较小且脂类及卵黄含量较低, 较易建立稳定的超低温冷冻保存方法^[7]。通过生殖细胞移植(germ cell transplantation)

收稿日期: 2019-05-08 修回日期: 2019-09-04

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901205); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2018JBF10); 国家自然科学基金(31802282)

通信作者: 李创举, E-mail: lcj@yfi.ac.cn

技术, 将供体生殖干细胞移植到受体中, 待受体成熟后, 可产生供体的配子, 再经人工授精, 可获得其后代, 也被形象的称为“借腹怀胎”技术。

生殖细胞移植技术首先在鸡中建立, 即将分离得到的供体PGCs注射到鸡胚血液中, 最终获得了具有供体遗传特性的后代^[8]。随后, 在小鼠等哺乳动物中也建立了精原干细胞移植体系^[9]。鱼类生殖细胞移植技术首先在斑马鱼(*Danio rerio*)中建立^[10], 经过十多年的发展, 该技术取得了一系列突破性的进展, 包括先后建立了以胚胎、仔鱼和成鱼为受体的生殖细胞移植模式^[4, 10-11], 供体生殖细胞的选择从PGCs拓展到精原和卵原干细胞^[4-6], 受体的选择与制备等^[12-15]。目前, 鱼类生殖细胞移植技术或代理亲鱼技术(surrogate broodstock technology)已应用到多种淡水和海水鱼类, 如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[5-6, 12-14]、箕作黄姑鱼(*Nibea mitsukurii*)^[16-18]、五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)^[19-21]、金枪鱼(*Thunnus spp.*)^[22-23]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[24-25]、博纳里牙汉鱼(*Odontesthes bonariensis*)^[26-27]、鲟^[28-29]、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[30]、长鳍叉尾鲷(*Ictalurus furcatus*)^[31-32]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[33], 其在苗种高效繁育、性控育种、珍稀濒危鱼类保护等方面都具有巨大的应用潜力^[7, 34-35]。结合在箕作黄姑鱼和鲟中生殖细胞移植的研究经验, 本文系统地总结了鱼类生殖细胞移植的研究进展及该技术在实践应用中的关键问题, 并探讨了其应用前景。

1 鱼类生殖细胞

在鱼类胚胎发育早期, 体细胞系和生殖细胞系就发生了分离, 形成了生殖细胞的祖细胞, 即PGCs。随后, PGCs迁移到达生殖原基, 增殖、分化为精原细胞或卵原细胞, 接着开始配子发生。在精巢中, 精原细胞发育为精子需要经过3个阶段: 有丝分裂(精原细胞增殖)、减数分裂(初级和次级精母细胞形成)、精子生成^[36-37]。在有丝分裂阶段, 具有干细胞特性的未分化A型精原细胞(A_{und})通过有丝分裂产生分化的A型精原细胞(A_{diff}), 同时伴随着自我更新能力的大幅降低, 然后 A_{diff} 继续分裂产生B型精原细胞; 通常把 A_{und} 称为精原干细胞^[36, 38-39]。卵巢中, 卵原细胞经过有丝分裂增殖后, 快速进入到减数分裂阶段, 成为初级卵母细胞, 经过初级、次级生长及卵黄生成后, 发育成为卵子。在卵原细胞增殖过程中, 部分卵原细胞保持干细胞特

性, 称为卵原干细胞^[40]。精原和卵原干细胞具有自我更新和分化的能力, 在精巢和卵巢发育过程中持续存在, 所以可以作为生殖细胞移植的供体细胞。同时, 日本学者Yoshizaki教授领导的团队先后通过精原和卵原细胞移植实验, 证实鱼类精原和卵原细胞中存在相应的干细胞^[5-6]。

2 鱼类生殖细胞移植

鱼类生殖细胞移植主要包括供体细胞、受体的选择与制备, 以及二者的亲缘关系等关键科学与技术问题。

2.1 供体细胞

目前的研究发现, PGCs、精原和卵原干细胞具有生殖干细胞功能, 可以作为鱼类生殖细胞移植的供体细胞。在早期, 由于对精原和卵原干细胞多能性及自主迁移能力等特性缺乏认识, 多选用鱼类PGCs作为供体细胞^[4, 10, 41]。但由于PGCs数量较少且仅存在于胚胎和仔稚鱼发育早期, 导致想要获得大量的PGCs非常困难, 较大地限制了其应用范围。随后, Okutsu等^[13]通过将供体虹鳟的精巢细胞移植到受体马苏大麻哈鱼(*O. masou*)的仔鱼体内, 将受体马苏大麻哈鱼培育成熟后获得了供体虹鳟功能性的精子和卵子, 从而发现鱼类精原干细胞具有很强的性别可塑性和双向分化潜能。另外, 由于精原干细胞存在于精巢发育的各个时期, 尤其在有丝分裂时期的精巢中大量存在, 因此, 其作为生殖细胞移植的供体细胞更加便利。同样, 通过卵巢细胞移植实验证实了鱼类卵原干细胞也具有发育成为精子和卵子的潜力^[6]。卵原干细胞虽然持续存在于卵子形成的过程中, 但由于其在性别发生分化后立即开始减数分裂, 导致卵原干细胞数目较少^[42]。因此, 精原干细胞是生殖细胞移植最为理想的供体细胞。但是, 对于性别决定系统为ZZ/ZW型的鱼类而言, 如果仅以精原干细胞作为供体细胞, 会丢失部分遗传信息。所以, 鱼类生殖细胞移植过程中也需要考虑其性别决定类型。

2.2 受体

由于可育受体含有自身的生殖细胞, 当供体的生殖细胞成功嵌合到受体性腺时, 受体的内源生殖细胞会同供体生殖细胞相互竞争发育所需的微环境, 且通常处于绝对优势, 从而导致受体产生供体配子的比例很低。因此, 受体的育性对产生供体配子的比例至关重要。可育

受体产生的配子中,会含有大量受体自身的配子,如将虹鳟PGCs或精原细胞移植到可育马苏大麻哈鱼体内,待其成熟后产生虹鳟配子的比例极低,仅有0.40%~5.46%^[5,12],而不育受体仅产生供体来源的配子。将虹鳟精原细胞移植到三倍体不育马苏大麻哈鱼体内,其性成熟后只产生虹鳟的配子^[13]。因此,就育性而言,生殖细胞移植的理想受体要求受体不育。目前,制备鱼类不育个体的方法主要有诱导三倍体、杂交、生殖细胞发育关键基因的敲降或敲除和高温—化学药物处理法^[43-44]。

诱导三倍体 目前,制备鱼类三倍体主要通过物理或化学方法抑制受精卵第二极体的排出,或者利用四倍体和二倍体杂交的方法^[45]。鱼类三倍体大多不可育,但也存在部分可育的情况,如:三倍体箕作黄姑鱼^[46]和星点东方鲀(*T. niphobles*)^[47]雌雄均可育,能产生少量的配子,但其后代不能存活;三倍体红点鲑(*Salvelinus alpinus*)雄性不育,雌性可育,但只能产生少量的卵子,且其后代只能存活到出膜前^[48]。虽然三倍体箕作黄姑鱼和星点东方鲀雌雄均可育,但研究者将其作为生殖细胞移植的受体,发现三倍体箕作黄姑鱼只产生供体来源的配子^[18],而三倍体星点东方鲀只产生供体的精子,却同时产生供体和自身的卵子^[30]。由于三倍体鱼只是在减数分裂过程中不能正常地进行同源染色体的配对,性腺中仍然会存在着有丝分裂时期的生殖细胞,当其作为受体时,内源生殖细胞仍会与嵌合的供体生殖细胞相互竞争,因此会降低受体产生供体配子的比例。

杂交 杂交是鱼类育种的常用方法,其后代是否可育一直是人们关注的焦点。杂交不育在许多杂交组合中出现,其表现形式主要有3种^[43]:①性腺发育正常,形成畸形配子或配子能受精但胚胎不能发育;②性腺正常但配子形成受阻;③性腺的形态和结构均不正常。利用杂交不育个体作为生殖细胞移植受体已有一些报道。青鳉(*Oryzias latipes*)和弓背青鳉(*O. curvinotus*)的杂交后代表现为不育,性腺较小,能分化为精巢和卵巢,但精子和卵子形成受阻^[49]。将其作为生殖细胞移植的受体,能产生仅含供体的配子^[50]。此外,斑马鱼杂交后代[斑马鱼♀×闪电斑马鱼(*D. albolineatus*)♂]也表现为不育,仅含有精原或卵原细胞。其作为生殖细胞移植的受体,能够产生供体的精子^[51]。Piva等^[52]为了寻找生殖细胞移植的理想受体,开展了5种不同脂鲤的杂

交实验,结果发现高身丽脂鲤[(*Astyanax altiparanae*)♀]和斑条丽脂鲤[(*A. fasciatus*)♂]的杂交三倍体的雌雄后代均不育,其中83.3%雄性的精巢无生殖细胞且有正常体细胞。理论上,其精巢没有内源生殖细胞同供体生殖细胞竞争,且体细胞能够支持供体生殖细胞的发育,因而可以作为生殖细胞移植的理想受体。我们也通过石首鱼科(Sciaenidae)的4种海水鱼的杂交实验,筛选出箕作黄姑鱼(♀)和银姑鱼[(*Pennahia argentata*)♂]的杂交组合,其后代具有精巢性腺、没有生殖细胞但体细胞正常(图1);通过将供体生殖细胞移植到杂交后代仔鱼腹腔,其成熟后仅产生供体的精子^[15],是石首鱼类生殖细胞移植的理想受体。由于鱼类杂交操作简单,因此可以作为筛选生殖细胞移植不育受体的有效方法。

生殖细胞发育关键基因的敲降或敲除 近年来,与鱼类生殖细胞形成、发育和迁移相关的基因相继被鉴定,如*vasa*、*nanos*、*dazl*、*dnd*、*piwi*、*sdf1*、*cxcr4*、*bucky ball*等^[37]。在斑马鱼^[10,53-54]、青鳉^[55]、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)^[56]、金鱼(*Carassius auratus*)^[57]、罗非鱼^[58]、银鲫(*C. auratus gibelio*)^[59]、马苏大麻哈鱼^[14]和大西洋鲑^[60]中,通过敲降或敲除这些基因,如*dnd*、*cxcr4*或*nanos*,其性腺生殖细胞缺失但体细胞发育正常;其中,斑马鱼、青鳉和银鲫的突变体全发育为雄性,而泥鳅、金鱼、马苏大麻哈鱼和大西洋鲑的突变体发育为雌雄两性。此外,以斑马鱼^[10,41,54]和马苏大麻哈鱼^[14]的突变体作为生殖细胞移植的受体,能够高效地产生供体的配子。但是,通过敲降或敲除生殖细胞发育关键基因制备不育受体的方法对技术和设备的要求较高,难以制备大量的不育个体。

高温—化学药物处理法 研究表明,利用高温或联合化学药物(白消安)能使亚成鱼或成鱼的性腺退化,即生殖细胞几乎完全去除但体细胞正常。经高温(35℃)和白消安注射处理罗非鱼3周,其性腺中的生殖细胞几乎完全消失^[25]。牙汉鱼中,高温或高温—白消安联合处理均能使其精巢和卵巢退化^[27,61]。同样,斑马鱼和高身丽脂鲤经高温—白消安联合处理后,其性腺也发生了退化^[62-63]。通常,高温或联合化学药物处理只能短暂使鱼类性腺退化,且退化不完全,待温度恢复到其适宜的水温时,性腺中残留的生殖细胞会迅速地重新发育。然而,最近研究表明,在38℃下,白消安以40 mg/kg剂量,每2周注射1次,共注射5次,能够使鲤(*Cyprinus carpio*)卵巢和精巢退化,而且将其转移到适宜的水温

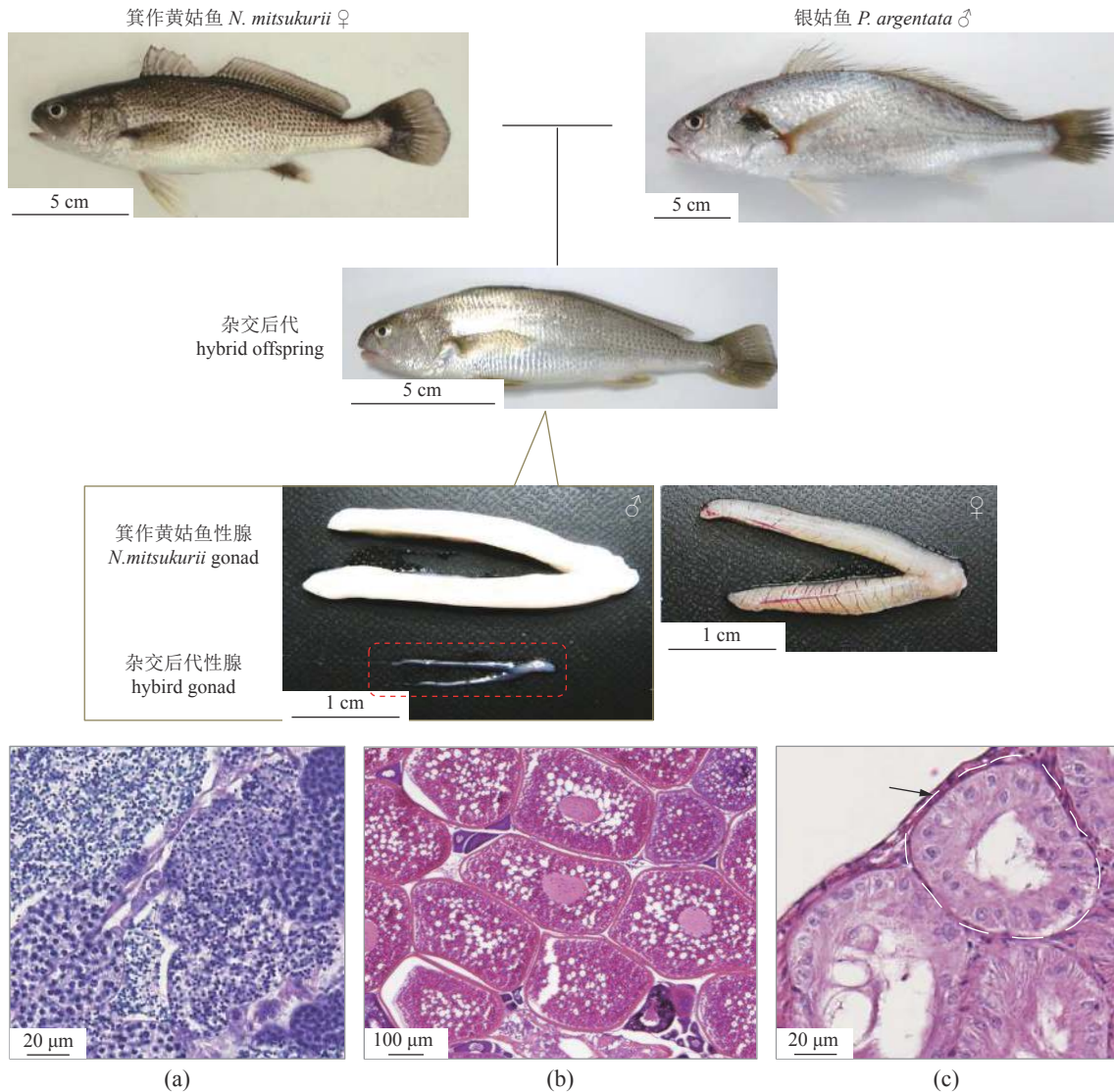


图 1 箕作黄姑鱼和银姑鱼杂交不育后代性腺特征^[15]

(a)箕作黄姑鱼精巢组织学特征；(b)箕作黄姑鱼卵巢组织学特征；(c)杂交鱼性腺特征。其中箭头表示精小叶状结构，无生殖细胞，但体细胞正常

Fig. 1 Gonad characterization of hybrid sterile croaker (*N. mitsukurii* × *P. argentata*)^[15]

(a) histological analysis of *N. mitsukurii* testis; (b) histological analysis of *N. mitsukurii* ovary; (c) histological analysis of hybrid sterile croaker testis-like gonad. Arrow indicates lobule-like structure of germ-cell-less gonads of hybrid

25 ℃，恢复10周后其性腺仍然处于退化状态，即几乎完全没有生殖细胞^[64]。因此，通过优化处理时间、温度和白消安剂量，高温联合化学药物处理可以作为制备不育受体的有效方法。

鱼类生殖细胞移植的方式 受体可以在其不同发育时期接受移植的供体生殖细胞，目前有3个时期：囊胚期、出膜后的仔鱼期和成鱼期。因此，根据受体所处的发育时期可以将生殖细胞移植方式划分为3种(图2)。

鱼类胚胎作为受体的生殖细胞移植 当受体发育到囊胚期时，将供体PGCs注射到受体

胚盘。待受体发育成熟后，可以产生供体配子。Ciruna等^[10]以 *dead end* 基因敲降的斑马鱼胚胎作为受体，将供体斑马鱼PGCs注射到受体，最后成功地获得了携带供体遗传特性的斑马鱼后代。随后，研究者开展了不同物种间PGCs移植研究^[41]。将闪电斑马鱼单个PGC移植到处于囊胚期的不育斑马鱼胚胎，最终获得了闪电斑马鱼的精子和卵子。同时，尝试将金鱼和泥鳅的单个PGC分别注射到上述受体，发现只能得到金鱼和泥鳅精子^[41, 65]。另外，Saito等^[66-67]也探索了将日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)和杂交鲟[欧鳇(*Huso huso*)×小

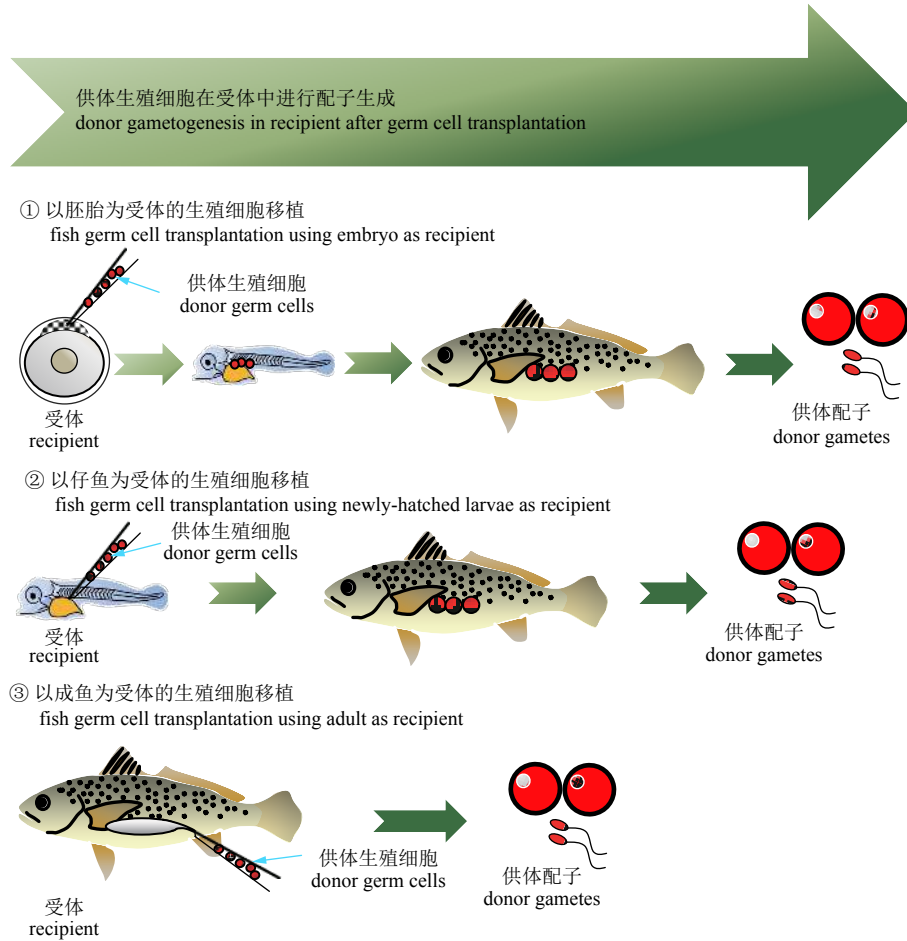


图 2 受体处于不同发育时期的生殖细胞移植方式示意图^[68]

Fig. 2 Illustrations of the germ cell transplantation techniques currently available for the fish using recipients at varying stages of development^[68]

体鲟(*Acipenser ruthenus*)PGCs分别移植到处于囊胚期的斑马鱼和金鱼胚胎(表1)。该种生殖细胞移植方式需要精细的显微操作, 技术要求非常高。仔鱼作为受体的生殖细胞移植 2003年,

表 1 以鱼类胚胎作为受体的生殖细胞移植方式的主要研究报道

Tab. 1 Studies on germ cell transplantation in fish using embryo as recipient

供体细胞 donor cell		受体 recipient		供体与受体亲缘关系 relationship of donor and recipient	移植结果 transplantation result	参考文献 reference
物种 species	生殖细胞类型 germ cells	物种 species	育性 fertility			
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	原始生殖细胞	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	不育(基因敲降)	种内	供体精子和卵子	[10]
闪电斑马鱼 <i>D. albolineatus</i>	原始生殖细胞	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	不育(基因敲降)	属内	供体精子和卵子	[41]
金鱼 <i>C. auratus</i>	原始生殖细胞	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	不育(基因敲降)	属间	供体精子	[41]
泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i>	原始生殖细胞	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	不育(基因敲降)	科间	供体精子	[41]
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	原始生殖细胞	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	可育	目间	迁移到受体生殖嵴	[66]
杂交鲟 <i>H. huso</i> × <i>A. ruthenus</i>	原始生殖细胞	金鱼 <i>C. auratus</i>	可育	目间	迁移到受体生殖嵴	[67]
青鳉 <i>O. latipes</i>	原始生殖细胞	青鳉 <i>O. latipes</i>	不育(基因敲降)	种内	供体精子和卵子	[69]
长鳍叉尾鲷 <i>I. furcatus</i>	精原细胞	斑点叉尾鲷 <i>I. punctatus</i>	不育(三倍体)	属内	整合到受体	[32]

日本东京海洋大学Yoshizaki教授领导的团队建立以仔鱼作为受体的生殖细胞移植体系,即将分离得到的生殖细胞注射到受体仔鱼腹腔,随后供体生殖细胞会迁移并整合到受体生殖嵴,经过增殖、分化,直到发育成熟,得到供体的配子^[4-6, 12, 16]。由于移植过程中会出现免疫排斥,该移植方法要求仔鱼受体处于发育早期,其免疫系统尚未发育完善。另一方面,对于接受供体的生殖细胞而言,受体仔鱼生殖嵴存在着发育窗口期。在这个窗口期内,供体生殖细胞才能够成功迁移并嵌合到受体生殖嵴^[4, 16-17, 20, 24]。在箕作黄姑鱼中^[16],当仔鱼全长为4 mm时,其PGCs迁移到生殖嵴的位置,以该时期的仔鱼作为移植受体,移植的嵌合率为50%;当仔鱼全长为6 mm时,生殖嵴已经形成,PGCs被单层的体细胞包裹,以该时期的仔鱼作为移植受体,移植的嵌合率为0%;当仔鱼全长为8 mm时,PGCs

开始大量增殖(图3)。因此,在以仔鱼作为受体的生殖细胞移植体系中,需要充分考虑到受体的早期性腺发育时期,否则会导致移植失败。由于该种生殖细胞移植体系较为容易且成熟,已成功地应用到多种鱼类中(表2)。

成鱼作为受体的生殖细胞移植 2006年,巴西米纳斯吉拉斯州联邦大学Franca教授领导的团队首次在鱼类中建立了以成鱼为受体的生殖细胞移植体系^[11],即通过泄殖孔将分离得到的精原干细胞注射到去除了内源生殖细胞的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)成鱼精巢内,待其成熟后可以产生供体精子^[25]。该方法需要首先通过白消安—高温联合作用去除罗非鱼成鱼精巢中的生殖细胞。随后,该方法在牙汉鱼^[26-27]和斑马鱼^[62]中也得到应用。同时,在这两种鱼中还开展了雌性成鱼生殖细胞移植,且成功地获得了供体的卵子(表3)。然而,由于上述方法采用百消

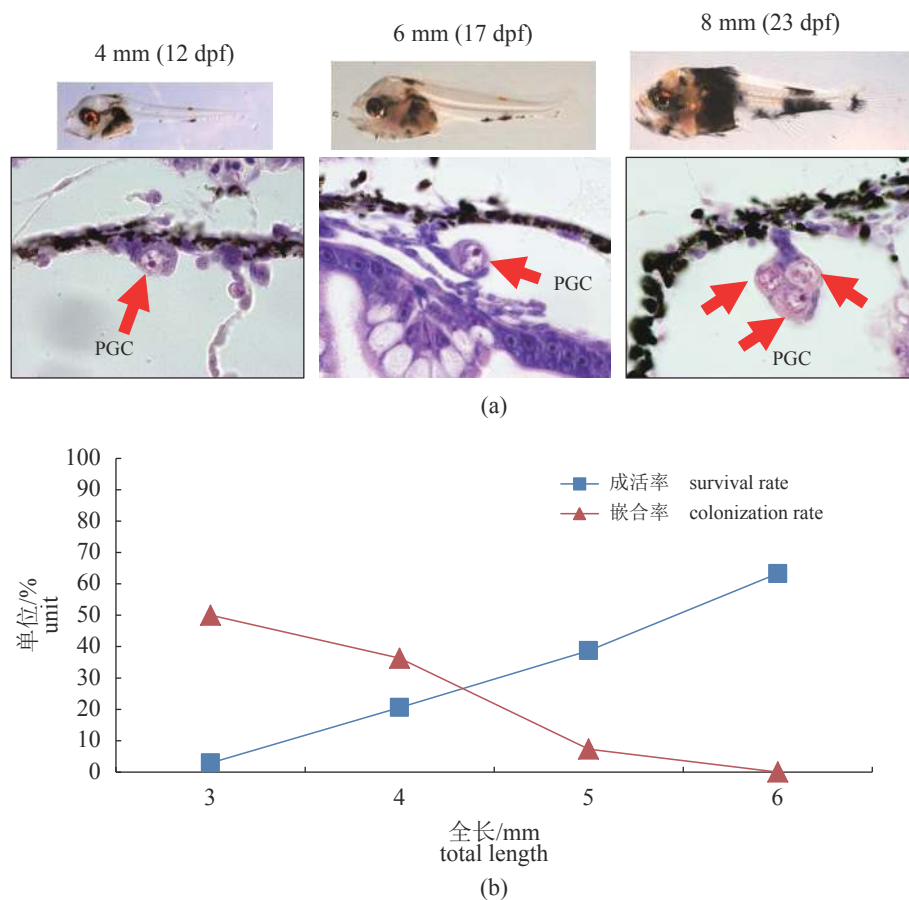


图3 箕作黄姑鱼早期性腺发育及其作为生殖细胞移植受体的嵌合率和成活率

(a)箕作黄姑鱼早期性腺发育, dpf表示受精后的天数, PGC. 原始生殖细胞; (b)不同体长箕作黄姑鱼仔鱼作为移植受体的成活率和嵌合率

Fig. 3 Early gonadal development of *N. mitsukurii* and the survival and colonization rates of four different recipient stages

(a) early gonadal development of *N. mitsukurii*, dpf, days post fertilization, PGC, primordial germ cell; (b) survival and colonization rates of four different recipient stages

表 2 以仔鱼作为受体的生殖细胞移植方式的主要研究报道

Tab. 2 Studies on germ cell transplantation in fish using newly-hatched larvae as recipient

供体细胞 donor		受体 recipient		供体与受体亲缘关系 relationship of donor and recipient	移植结果 transplantation result	参考文献 reference
物种 species	生殖细胞类型 germ cells	物种 species	育性 fertility			
转基因虹鳟 <i>O. mykiss</i>	原始生殖细胞	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	可育	种内	供体后代	[4]
转基因虹鳟 <i>O. mykiss</i>	原始生殖细胞	大麻哈鱼 <i>O. masou</i>	可育	属内	供体后代	[12]
转基因虹鳟 <i>O. mykiss</i>	精原细胞	大麻哈鱼 <i>O. masou</i>	不育(三倍体)	属内	供体精子和卵子	[13]
箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	精原细胞	箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	可育	种内	受体中增殖	[16]
箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	精原细胞	日本鲭 <i>Scomber japonicas</i>	可育	科间	受体中增殖	[17]
转基因虹鳟 <i>O. mykiss</i>	卵原细胞	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	可育	种内	供体后代	[6]
五条鲷 <i>S. quinqueradiata</i>	精原细胞	箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	可育	科间	仅在受体中增殖	[19]
转基因斑马鱼 <i>D. rerio</i>	卵原细胞	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	不育(杂交)	种内	供体精子	[51]
五条鲷 <i>S. quinqueradiata</i>	精原细胞	五条鲷 <i>S. quinqueradiata</i>	可育	种内	供体后代	[20]
东方金枪鱼 <i>T. orientalis</i>	精原细胞	日本鲭 <i>Scomber japonicas</i>	可育	属间	整合到受体生殖嵴	[22]
五条鲷 <i>S. quinqueradiata</i>	精原细胞	日本竹筴鱼 <i>Trachurus japonicus</i>	可育	属间	供体精子	[21]
西伯利亚鲟 <i>A. baeri</i>	卵原/精原细胞	小体鲟 <i>A. ruthenus</i>	可育	属内	受体中增殖	[28]
蓝鳍金枪鱼 <i>T. maccoyii</i>	精原细胞	黄尾鲷 <i>S. lalandi</i>	可育	科间	整合到受体生殖嵴	[23]
转基因虹鳟 <i>O. mykiss</i>	精原细胞	马苏大麻哈鱼 <i>O. masou</i>	不育(基因敲降)	属内	供体后代	[14]
箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	精原细胞	箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	不育(三倍体)	种内	供体后代	[18]
中华鲟 <i>A. sinensis</i>	卵原细胞	长江鲟 <i>A. dabryanus</i>	可育	属内	整合到受体生殖嵴	[29]
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i>	精原细胞	星点东方鲀 <i>T. niphobles</i>	不育(三倍体)	属内	供体后代	[30]
转基因斑马鱼 <i>D. rerio</i>	精原细胞	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	不育(基因敲除)	种内	供体精子	[54]
箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	精原细胞	杂交黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i> × <i>P. argentata</i>	不育(杂交)	属间	供体精子	[15]
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	精原细胞	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	不育(三倍体)	属间	供体精子和卵子	[33]

表 3 以成鱼作为受体的生殖细胞移植方式的主要研究报道

Tab. 3 Studies on germ cell transplantation in fish using adult as recipient

供体细胞 donor cell		受体 recipient		供体与受体亲缘关系 relationship of donor and recipient	移植结果 transplantation result	参考文献 reference
物种 species	生殖细胞类型 germ cells	物种 species	育性 fertility			
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	精原细胞	尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	雄性不育(药物处理)	种内	供体精子	[25]
博纳里牙汉鱼 <i>O. bonariensis</i>	精原细胞	哈奇氏牙汉鱼 <i>O. hatcheri</i>	雄性不育(药物处理)	属内	供体精子	[26]
转基因斑马鱼 <i>D. rerio</i>	精原细胞	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	雄性不育(药物处理)	种内	供体精子形成	[62]
转基因斑马鱼 <i>D. rerio</i>	精原细胞	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	雌性可育(产卵后)	种内	供体卵子形成	[62]
博纳里牙汉鱼 <i>O. bonariensis</i>	精原/卵原细胞	哈奇氏牙汉鱼 <i>O. hatcheri</i>	性腺不育(药物处理)	属内	供体精子和卵子	[27]
克林雷氏鲑 <i>Rhamdia quelen</i>	精原细胞	尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	雄性不育(药物处理)	目间	供体精子	[70]
箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	精原细胞	杂交黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i> × <i>P. argentata</i>	不育(杂交)	属间	供体精子	[71]

安—高温联合处理受体，受体性腺中残留的内源生殖细胞与外源生殖细胞竞争发育，导致最终获得的供体配子比例较低。最近，我们在石首鱼类中发现了成鱼生殖细胞移植的理想受体，即箕作黄姑鱼和银姑鱼杂交不育后代的成鱼。其性腺表现为精巢样结构，没有生殖细胞，但体细胞正常，将供体箕作黄姑鱼精原细胞通过泄殖孔注射到受体性腺(图4)，移植6周后受体就能产生仅含有供体遗传特性的精子^[71]。这种生殖细胞移植方式操作简单，且短期内就能获得供体的配子，关键在于寻找到合适的不育受体。

2.3 种内和种间生殖细胞移植

根据生殖细胞移植供体与受体的关系，可以分为种内生殖细胞移植和种间生殖细胞移

植。一般而言，种内的生殖细胞移植可以成功地获得供体的精子和卵子，如淡水鱼的代表虹鳟^[4-5]、海水鱼的代表箕作黄姑鱼^[16,18]。然而，种间(属间、科间和目间)生殖细胞移植的结果较为复杂(表1~3)。据报道，属内的生殖细胞移植基本都能同时得到供体的精子和卵子，如大麻哈鱼属的虹鳟(供体)与马苏大麻哈鱼(受体)^[13]，鲟属的斑马鱼(供体)与闪电斑马鱼(受体)^[41]，东方鲀属的红鳍东方鲀(供体)和星点东方鲀(受体)^[30]。同科不同属的生殖细胞移植实验中，部分可以得到供体精液，如供体鲤科(Cyprinidae)鲫属金鱼与受体鲤科鲟属斑马鱼^[41]，供体鲈科(Carangidae)鲈属五条鲈与受体鲈科竹筴鱼属日本竹筴鱼^[21]，而部分移植实验的供体生殖细胞仅发育至嵌合到受体生殖嵴阶段，如供体鲭科(Scombrida)鲭属东方金枪鱼与受体鲭科鲭属日本鲭^[22]。与之相

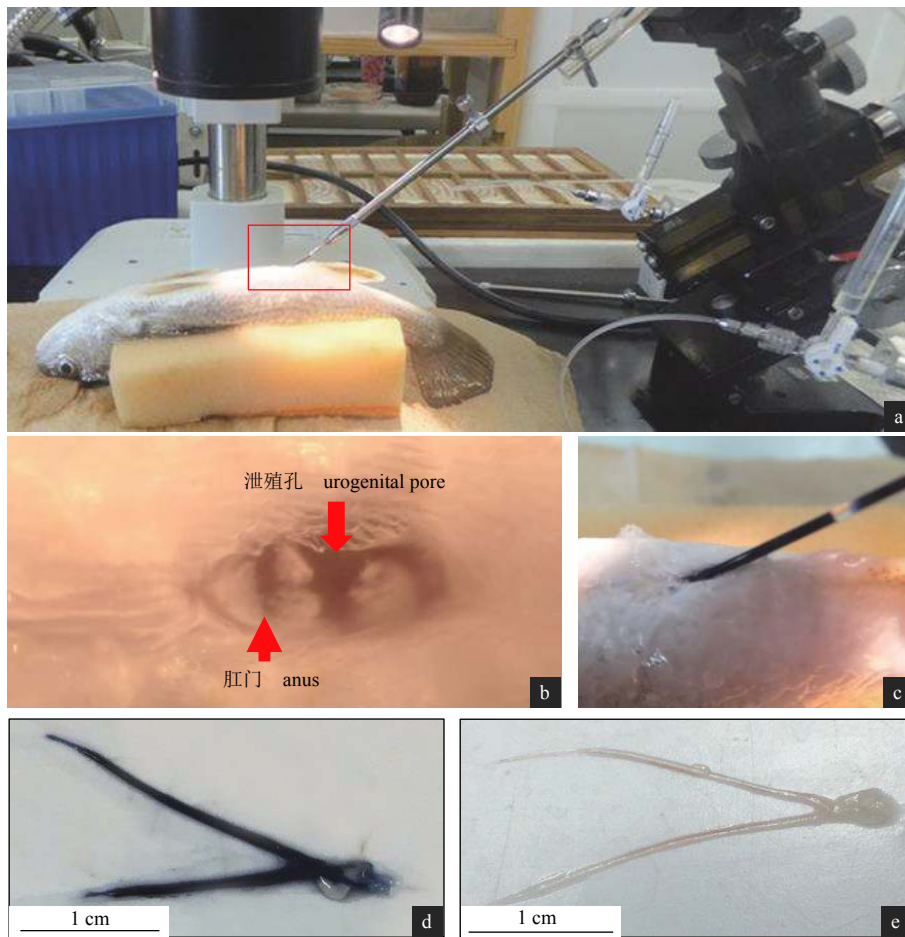


图4 以杂交黄姑鱼成鱼作为受体的生殖细胞移植示意图^[71]

(a)将台盼蓝通过泄殖孔注射到成鱼性腺；(b)和(c)为(a)中红色矩形区域的放大，示意泄殖孔和肛门的位置；(d)和(e)分别为成功注射和未注射台盼蓝的性腺

Fig. 4 Schematic diagram of germ cell transplantation using adult fish as a recipient^[71]

(a) injection of trypan blue into the adult gonad through urogenital pore; (b) and (c) are the high magnification of the red boxed area shown in (a), showing the localization of urogenital pore and anus; (d) gonad is dyed blue after successful injection of trypan blue; (e) gonad of control group

似,不同科间的生殖细胞移植实验中有的可以得到供体精液,如供体鲤科斑马鱼与受体鳅科(Cobitidae)泥鳅^[41],而部分移植实验的供体生殖细胞仅能发育至整合到受体生殖嵴或在其中增殖的阶段,如供体石首鱼科(Sciaenidae)箕作黄姑鱼与受体鲭科日本鲭^[17],供体鲈科五条鲈与受体石首科箕作黄姑鱼^[19],供体鲭科蓝鳍金枪鱼与受体鲈科黄尾鲈^[23]。此外,在供体与受体亲缘关系更远的生殖细胞移植实验中,供体的生殖细胞迁移到受体生殖嵴后消失,如供体鳗鲡目(Anguilliformes)日本鳗鲡与受体鲤形目(Cypriniformes)斑马鱼^[66],供体鲟形目(Acipenseriformes)杂交鲟与受体鲤形目斑马鱼^[67]。但是,最近Silva等^[70]成功开展了不同目鱼类之间的成鱼生殖细胞移植,即从受体鲈形目(Perciformes)罗非鱼中得到供体鲈形目(Siluriformes)克林雷氏鲈的精液。因此,种间生殖细胞移植的结果非常复杂,其中涉及的机理还不清楚。总体而言,供体与受体的亲缘关系越近,越易获得供体的配子,而且精子比卵子更容易获得。

3 鱼类生殖细胞移植的应用前景

3.1 珍稀濒危鱼类保护

生殖细胞能发育产生配子以维持物种遗传信息的传递。PGCs以及精原和卵原干细胞携带有父母本的遗传信息,具有分化为其他类型生殖细胞的潜力。因此,鱼类生殖细胞(PGCs、精原干细胞、卵原干细胞)的冷冻保存和移植技术为珍稀濒危鱼类种质资源保存和物种保护提供了有效的途径。在虹鳟中,通过冷冻保存生殖嵴,解冻后将分离的PGCs移植到受体,最后能产生冻存虹鳟的后代^[72-73]。由于PGCs数量少且只存在于胚胎和仔鱼早期阶段。尤其对于珍稀濒危鱼类而言,难以获得其胚胎和早期仔鱼。因此,鱼类生殖细胞冷冻保存的对象转向性腺组织。从冷冻保存了几年的虹鳟卵巢和精巢中分离获得生殖细胞,将其移植到受体,最终获得了虹鳟功能性的配子^[74-76]。Lee等^[77]在无任何冷冻保护剂的情况下,将虹鳟的全鱼置于-80℃冰箱冻存约2年,解冻后将分离的生殖细胞移植到受体,待受体成熟后能够产生冻存虹鳟的配子。该方法极大地推动了生殖细胞冷冻保存在实际生产上的应用。对于珍稀濒危鱼类而言,可以通过性腺冷冻保存技术建立生殖干细胞库,保存其种质资源,再结合生殖细胞移植技术,使其物种得以恢复(图5)。

3.2 苗种高效繁育

生殖细胞移植在鱼类苗种高效繁育方面具有广阔的前景。将那些个体大、性成熟周期长的珍稀濒危优质鱼类的生殖细胞移植到个体小、成熟周期短、易于养殖的鱼类。不仅可以节约养殖空间和成本,而且能够缩短育种周期。例如将红鳍东方鲀(亲鱼个体大小为2~5 kg, 2~3年性成熟)的精原细胞移植到星点东方鲀(亲鱼个体大小为13 g, 1~2年性成熟)仔鱼中,最终星点东方鲀成功地产生了红鳍东方鲀的精子 and 卵子^[30,78]。最近,我们在鲟类中开展了生殖细胞移植工作。中华鲟初次性成熟时间过长且个体较大(雌性为14~26年,雄性8~18年,个体质量可达几百千克)^[79],其人工繁育的难度较高;然而,长江鲟初次性成熟时间相对较短且个体相对较小(雌性为6~8龄,雄性为4~6龄,个体质量仅几十千克)^[80],其人工繁育技术已较为成熟。因此,以长江鲟作为受体,开展了中华鲟生殖细胞移植。将分离得到的中华鲟卵巢细胞移植到长江鲟仔鱼腹腔(图6),发现供体中华鲟的卵原干细胞成功嵌合到受体长江鲟性腺^[29]。本研究将实现鲟的异种生殖,缩短中华鲟初次性成熟时间,为中华鲟的繁育提供新途径。

3.3 性控育种

由于一些鱼类雌雄个体的生长速率和个体大小存在明显差异,培育全雄或全雌的单性群体对水产养殖具有重要意义。鱼类精原或卵原干细胞具有分化为两性配子的潜能,其发育为精子或卵子取决于受体。在性别决定类型为XX/XY的鱼类中,将供体精原干细胞移植到雌性受体中,可产生携带有Y染色体的卵子(伪雌鱼),再与野生型的雄鱼交配,产生的后代中四分之一的为YY超雄鱼。YY超雄鱼是全雄苗种培育的关键,其再与野生型的雌鱼交配,后代全为雄性。同样的,将供体卵原干细胞移植到雄性受体中,产生的精子全部携带有X染色体(伪雄鱼),再与野生型的雌鱼交配,产生的后代全部为XX雌鱼。Okutsu等^[81]通过上述方法培育出虹鳟全雄后代。因此,鱼类生殖细胞移植在性别控制育种方面具有重大的应用潜力(图7)。

3.4 增殖放流,维持群体遗传多样性

随着渔业资源的持续衰退,鱼类人工增殖放流已由提高渔业生产力发展为珍稀濒危土著

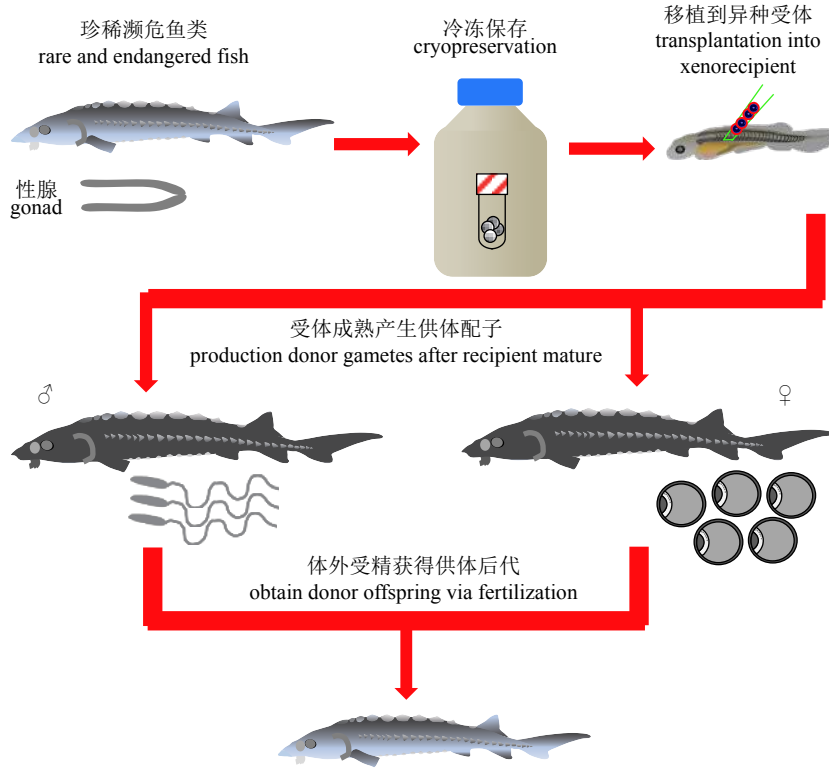


图 5 生殖细胞移植在珍稀濒危鱼类保护方面的应用

从冷冻保存的珍稀濒危鱼类的性腺中制备得到生殖细胞，将其移植到亲缘关系相近的受体，从而得到冻存性腺鱼类的后代，使珍稀濒危鱼类资源得以恢复

Fig. 5 Application of germ cell transplantation for the conservation of rare and endangered species

Restoration of the rare and extinct fish could be achieved by transplanting germ cells retrieved from cryopreserved gonad into recipient hatchlings of a closely related species

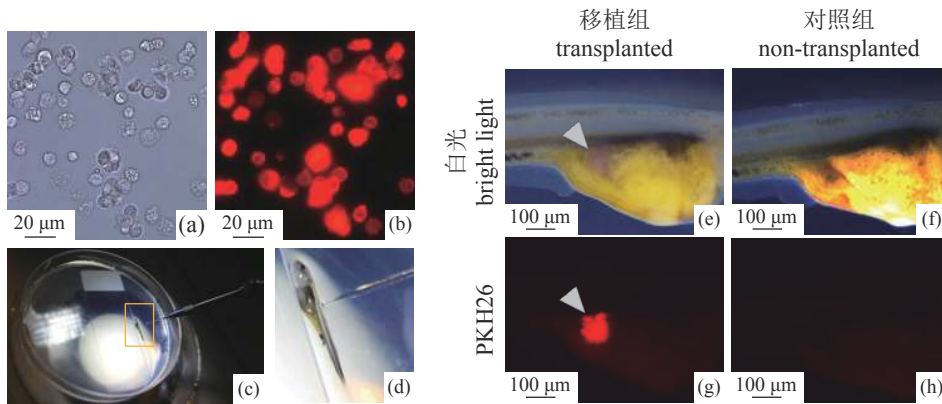


图 6 供体中华鲟卵巢细胞移植到受体长江鲟仔鱼

(a)中华鲟卵巢细胞在白光下的视野；(b)中华鲟卵巢细胞经PKH26染色后荧光下的视野；(c)供体细胞注射到出膜后第7天长江鲟仔鱼腹腔；(d)为(c)中矩形区域的放大；(e)和(f)分别为注射和未注射供体细胞仔鱼在白光下的视野，(g)和(h)分别为(e)和(f)在荧光下的视野；(e)和(g)中的箭头表示注射带PKH26标记的供体卵巢细胞

Fig. 6 Intraperitoneal transplantation of donor *A. sinensis* ovarian cells into *A. dabryanus* larvae

Dissociated cells from *A. sinensis* ovary in the bright field view (a) and labeled with red fluorescent dye, PKH26 (b). Intraperitoneal transplantation of PKH26-labeled cells into the 7 dph recipient larvae (c) with high magnification of the boxed area shown in (d). Bright field views of transplanted (e) and non-transplanted (f) larvae just after transplantation and fluorescence microcopy of transplanted (g) and non-transplanted (h) larvae just after transplantation. Arrowhead indicates transplanted donor cells labeled with PKH26

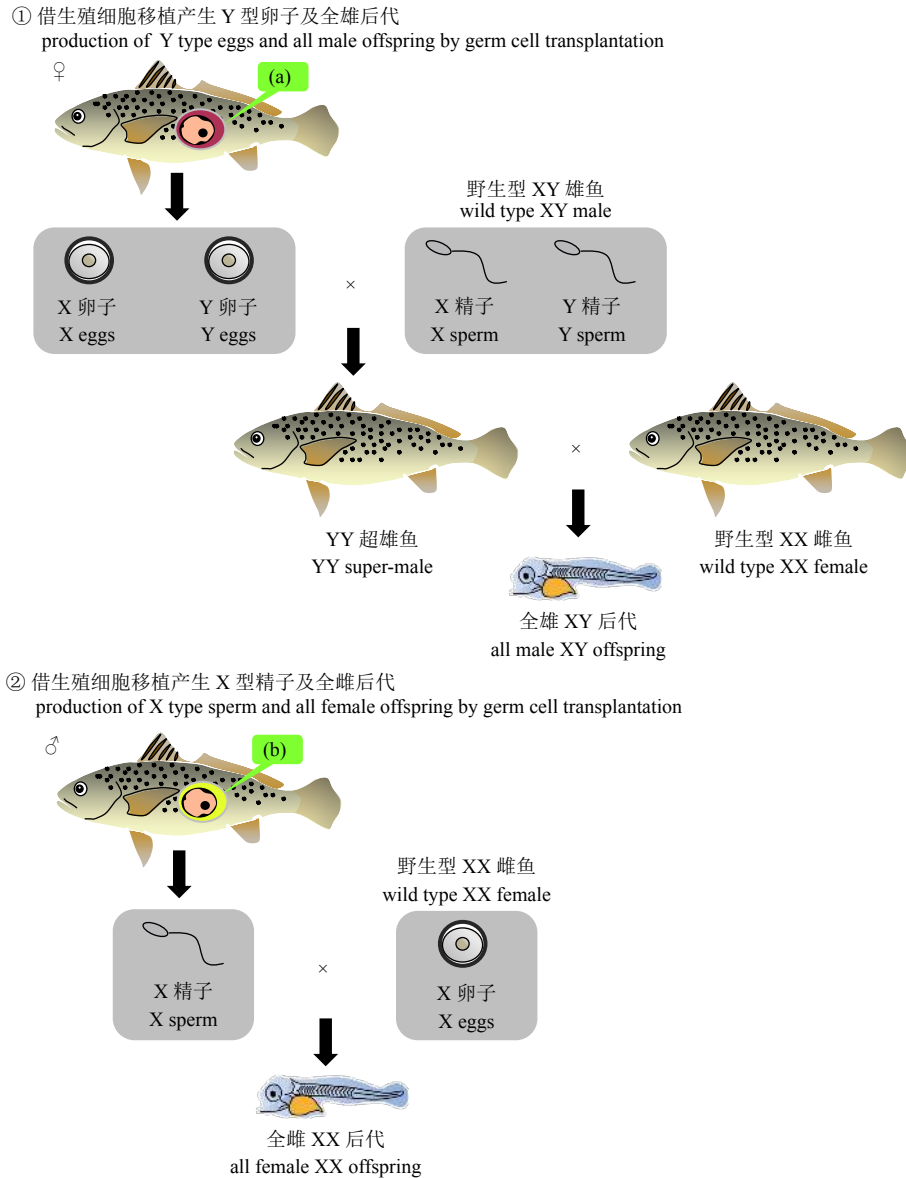


图 7 生殖细胞移植在鱼类性控育种方面的应用

(a)供体精原细胞(XY)在雌性受体中进行卵子生成; (b)供体卵原细胞(XX)在雄性受体中进行精子生成

Fig. 7 Application of germ cell transplantation in fish sex control breeding

(a)donor spermatogonia (XY) developed in female recipient; (b)donor oogonia (XX) developed in male recipient

鱼类种群的恢复。由于增殖放流的苗种通常由少量亲本繁育或连续多代的人工繁育而来, 导致其群体遗传多样性降低, 会影响自然群体遗传多样性和降低对自然环境的适应性。因此, 为了维持放流群体的遗传多样性, 需要耗费大量的成本养殖亲本, 而且亲本难以同步性成熟, 仍存在有效亲本群体较小的风险。然而, 通过将不同遗传背景的生殖细胞移植到同一受体中, 待其性成熟后能够产生遗传背景丰富的配子, 可以有效地提高后代遗传多样性, 节省了大量的人力、物力和财力。在虹鳟中, 通过

将不同源的供体生殖细胞移植到同一受体, 待受体成熟后获得了与供体遗传背景相同的后代^[82]。因此, 生殖细胞移植也可以在鱼类增殖放流领域发挥重要的作用(图8)。

4 总结和展望

经过多年的发展, 鱼类生殖细胞移植技术已经趋于成熟, 形成了将不同类型的供体生殖干细胞(PGCs、精原干细胞或卵原干细胞)移植到不同发育时期受体(胚胎、仔鱼和成鱼)的3种技

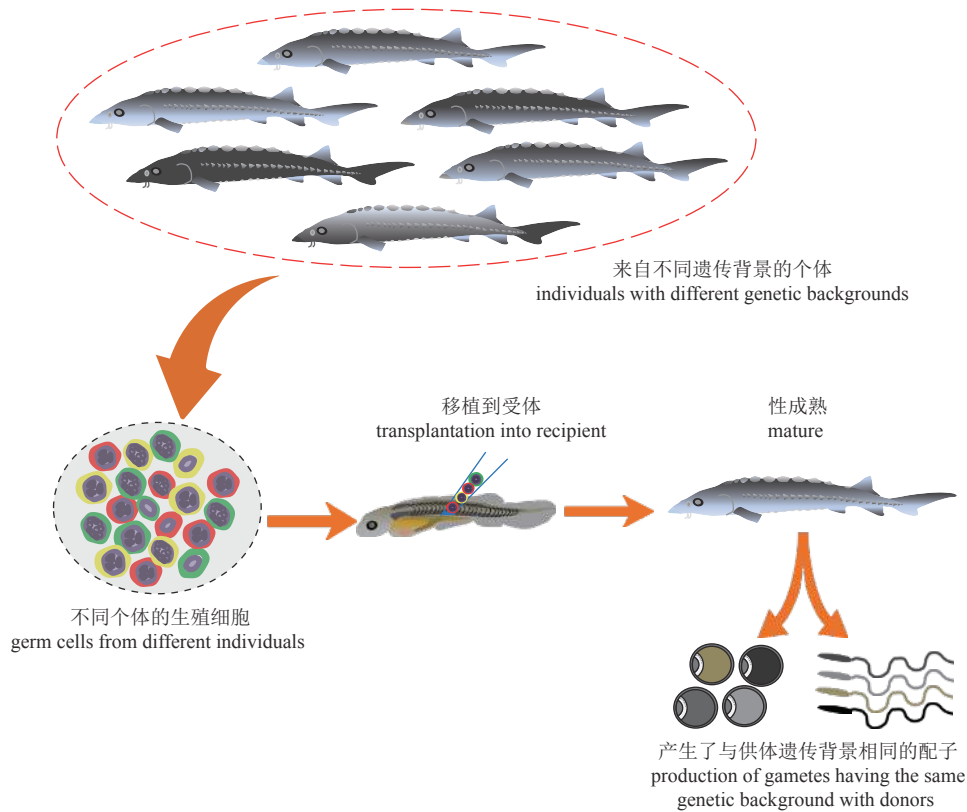


图 8 生殖细胞移植在鱼类增殖放流方面的应用

Fig. 8 Application of germ cell transplantation in fishery stock enhancement and releasing

术模式，但仍有些问题亟待解决：①建立鱼类生殖干细胞体外长期培养体系，以保证供体生殖干细胞的持续供应；②建立大规模制备不育受体的方法，从而保证受体只产生供体来源的配子；另外，有些涉及机理性的问题还未阐明，如供体生殖干细胞在受体性腺中增殖及发育成熟的机制、精原或卵原干细胞在雌性或雄性受体内发生性逆转的分子机制。上述问题的解决必然会加快鱼类生殖细胞移植技术在实际生产中的应用。

参考文献：

- [1] Nelson J S, Grande T C, Wilson M V H. Fishes of the world[M]. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016: 1.
- [2] International Union for Conservation of Nature. The IUCN red list of threatened species, version 2019-1[R]. Gland: International Union for Conservation of Nature, 2019.
- [3] Mazur P, Leibo S P, Seidel G E J. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future

directions[J]. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(1): 2-12.

- [4] Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout[J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 69(4): 1142-1149.
- [5] Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, *et al.* Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(8): 2725-2729.
- [6] Yoshizaki G, Ichikawa M, Hayashi M, *et al.* Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout[J]. *Development*, 2010, 137(8): 1227-1230.
- [7] Yoshizaki G, Lee S. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation[J]. *Stem Cell Research*, 2018, 29: 103-110.
- [8] Tajima A, Naito M, Yasuda Y, *et al.* Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*)[J]. *Theriogenology*, 1993, 40(3): 509-519.

- [9] Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(24): 11298-11302.
- [10] Ciruna B, Weidinger G, Knaut H, *et al.* Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(23): 14919-14924.
- [11] Lacerda S M S N, Batlouni S R, Silva S B G, *et al.* Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model[J]. *Animal Reproduction*, 2006, 3(2): 146-159.
- [12] Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Surrogate broodstock produces salmonids[J]. *Nature*, 2004, 430(7000): 629-630.
- [13] Okutsu T, Shikina S, Kanno M, *et al.* Production of trout offspring from triploid salmon parents[J]. *Science*, 2007, 317(5844): 1517-1517.
- [14] Yoshizaki G, Takashiba K, Shimamori S, *et al.* Production of germ cell-deficient salmonids by *dead end* gene knockdown, and their use as recipients for germ cell transplantation[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2016, 83(4): 298-311.
- [15] Yoshikawa H, Xu D D, Ino Y, *et al.* Hybrid sterility in fish caused by mitotic arrest of primordial germ cells[J]. *Genetics*, 2018, 209(2): 507-521.
- [16] Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, *et al.* Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae)[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(6): 1055-1063.
- [17] Yazawa R, Takeuchi Y, Higuchi K, *et al.* Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells[J]. *Biology of Reproduction*, 2010, 82(5): 896-904.
- [18] Yoshikawa H, Takeuchi Y, Ino Y, *et al.* Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intra-peritoneal germ cell transplantation into a marine teleost, Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*)[J]. *Aquaculture*, 2017, 478: 35-47.
- [19] Higuchi K, Takeuchi Y, Miwa M, *et al.* Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient[J]. *Fisheries Science*, 2011, 77(1): 69-77.
- [20] Morita T, Kumakura N, Morishima K, *et al.* Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)[J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 86(6): 176.
- [21] Morita T, Morishima K, Miwa M, *et al.* Functional sperm of the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) were produced in the small-bodied surrogate, jack mackerel (*Trachurus japonicus*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2015, 17(5): 644-654.
- [22] Yazawa R, Takeuchi Y, Morita T, *et al.* The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) *dead end* gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2013, 80(10): 871-880.
- [23] Bar I, Smith A, Bubner E, *et al.* Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) as a surrogate host for the production of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) seed via spermatogonial germ cell transplantation[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2016, 28(12): 2051-2064.
- [24] Farlora R, Hattori-Ihara S, Takeuchi Y, *et al.* Intraperitoneal germ cell transplantation in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Marine Biotechnology*, 2014, 16(3): 309-320.
- [25] Lacerda S M S N, Batlouni S R, Costa G M J, *et al.* A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model[J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10740.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Pšenička M, Saito T, Linhartová Z, *et al.* Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells[J]. *Theriogenology*, 2015, 83(6): 1085-1092.
- [29] Ye H, Li C J, Yue H M, *et al.* Establishment of intraperitoneal germ cell transplantation for critically endangered Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*[J].

- Theriogenology*, 2017, 94: 37-47.
- [30] Hamasaki M, Takeuchi Y, Yazawa R, *et al.* Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* offspring from triploid grass puffer *Takifugu niphobles* parents[J]. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(6): 579-591.
- [31] Perera D A, Alsaqufi A, Shang M, *et al.* Xenogenesis-production of channel catfish×blue catfish hybrid progeny by fertilization of channel catfish eggs with sperm from triploid channel catfish males with transplanted blue catfish germ cells[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2017, 79(1): 61-74.
- [32] Shang M, Su B F, Perera D A, *et al.* Testicular germ line cell identification, isolation, and transplantation in two North American catfish species[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(2): 717-733.
- [33] Hattori R S, Yoshinaga T T, Katayama N, *et al.* Surrogate production of *Salmo salar* oocytes and sperm in triploid *Oncorhynchus mykiss* by germ cell transplantation technology[J]. *Aquaculture*, 2019, 506: 238-245.
- [34] Yoshizaki G, Fujinuma K, Iwasaki Y, *et al.* Spermatogonial transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2011, 6(1): 55-61.
- [35] de Siqueira-Silva D H, Saito T, dos Santos-Silva A P, *et al.* Biotechnology applied to fish reproduction: tools for conservation[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(6): 1469-1485.
- [36] Schulz R W, de França L R, Lareyre J J, *et al.* Spermatogenesis in fish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 390-411.
- [37] Xu H Y, Li M Y, Gui J F, *et al.* Fish germ cells[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(4): 435-446.
- [38] Nóbrega R H, Batlouni S R, França L R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009, 35(1): 197-206.
- [39] dos Santos Nassif Lacerda S M, Costa G M J, de França L R. Biology and identity of fish spermatogonial stem cell[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 207: 56-65.
- [40] Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, *et al.* Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka[J]. *Science*, 2010, 328(5985): 1561-1563.
- [41] 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]. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(1): 159-166.
- [42] Matova N, Cooley L. Comparative aspects of animal oogenesis[J]. *Developmental Biology*, 2001, 231(2): 291-320.
- [43] Golpour A, Siddique M A M, Siqueira-Silva D H, *et al.* Induced sterility in fish and its potential and challenges for aquaculture and germ cell transplantation technology: a review[J]. *Biologia*, 2016, 71(8): 853-864.
- [44] Wong T T, Zohar Y. Production of reproductively sterile fish: a mini-review of germ cell elimination technologies[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 221: 3-8.
- [45] Piferrer F, Beaumont A, Falguière J C, *et al.* Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment[J]. *Aquaculture*, 2009, 293(3-4): 125-156.
- [46] Takeuchi Y, Yatabe T, Yoshikawa H, *et al.* Production of functionally sterile triploid Nibe croaker *Nibea mitsukurii* induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock[J]. *Aquaculture*, 2018, 494: 45-56.
- [47] Hamasaki M, Takeuchi Y, Miyaki K, *et al.* Gonadal development and fertility of triploid grass puffer *Takifugu niphobles* induced by cold shock treatment[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(2): 133-144.
- [48] Gillet C, Vauchez C, Haffray P. Triploidy induced by pressure shock in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): growth, survival and maturation until the third year[J]. *Aquatic Living Resources*, 2001, 14(5): 327-334.
- [49] Hamaguchi S, Sakaizumi M. Sexually differentiated mechanisms of sterility in interspecific hybrids between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1992, 263(3): 323-329.
- [50] Shimada A, Takeda H. Production of a maternal-zygotic medaka mutant using hybrid sterility[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2008, 50(6): 421-426.
- [51] Wong T T, Saito T, Crodian J, *et al.* Zebrafish germline chimeras produced by transplantation of ovarian germ cells into sterile host larvae[J]. *Biology of Reproduction*, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 2011, 84(6): 1190-1197.
- [52] Piva L H, de Siqueira-Silva D H, Goes C A G, *et al.* Triploid or hybrid tetra: which is the ideal sterile host for surrogate technology?[J]. *Theriogenology*, 2018, 108: 239-244.
- [53] Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, *et al.* *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival[J]. *Current Biology*, 2003, 13(16): 1429-1434.
- [54] Li Q, Fujii W, Naito K, *et al.* Application of *dead end*-knockout zebrafish as recipients of germ cell transplantation[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2017, 84(10): 1100-1111.
- [55] Kurokawa H, Saito D, Nakamura S, *et al.* Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(43): 16958-16963.
- [56] Fujimoto T, Nishimura T, Goto-Kazeto R, *et al.* Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(40): 17211-17216.
- [57] Goto R, Saito T, Takeda T, *et al.* Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish[J]. *Developmental Biology*, 2012, 370(1): 98-109.
- [58] Li M H, Yang H H, Zhao J, *et al.* Efficient and heritable gene targeting in tilapia by CRISPR/Cas9[J]. *Genetics*, 2014, 197(2): 591-599.
- [59] Liu W, Li S Z, Li Z, *et al.* Complete depletion of primordial germ cells in an all-female fish leads to sex-biased gene expression alteration and sterile all-male occurrence[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 971.
- [60] Wargelius A, Leininger S, Skaftnesmo K O, *et al.* *Dnd* knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon[J]. *Scientific reports*, 2016, 6(1): 21284.
- [61] Ito L S, Takahashi C, Yamashita M, *et al.* Warm water induces apoptosis, gonadal degeneration, and germ cell loss in subadult pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes)[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2008, 81(6): 762-774.
- [62] Nóbrega 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.
- [63] de Siqueira-Silva D H, dos Santos Silva A P, Ninhaus-Silveira A, *et al.* The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis[J]. *Theriogenology*, 2015, 84(6): 1033-1042.
- [64] Majhi S K, Rasal A R, Kushwaha B, *et al.* Heat and chemical treatments in adult *Cyprinus carpio* (Pisces cypriniformes) rapidly produce sterile gonads[J]. *Animal Reproduction Science*, 2017, 183: 77-85.
- [65] Saito T, Goto-Kazeto R, Fujimoto T, *et al.* Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish[J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2010, 54(10): 1481-1486.
- [66] Saito T, Goto-Kazeto R, Kawakami Y, *et al.* The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24460.
- [67] Saito T, Pšenička M, Goto R, *et al.* The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e86861.
- [68] Lacerda S M S N, Costa G M J, Campos-Junior P H A, *et al.* Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(1): 3-11.
- [69] Li M Y, Hong N, Xu H Y, *et al.* Germline replacement by blastula cell transplantation in the fish medaka[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29658.
- [70] Silva M A, Costa G M J, Lacerda S M S N, *et al.* Successful xenogeneic germ cell transplantation from Jundia catfish (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 230-231: 48-56.
- [71] Xu D D, Yoshino T, Konishi J, *et al.* Germ cell-less hybrid fish: ideal recipient for spermatogonial transplantation for the rapid production of donor-derived sperm[J]. *Biology of Reproduction*, 2019, 101(2): 492-500.
- [72] Kobayashi T, Takeuchi Y, Yoshizaki G, *et al.* Cryopreservation of trout primordial germ cells[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1-4): 479-480.
- [73] Kobayashi T, Takeuchi Y, Takeuchi T, *et al.* Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ

- cells[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2007, 74(2): 207-213.
- [74] Lee S, Iwasaki Y, Shikina S, *et al.* Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(5): 1640-1645.
- [75] Lee S, Iwasaki Y, Yoshizaki G. Long-term(5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids[J]. *Cryobiology*, 2016, 73(2): 286-290.
- [76] Lee S, Katayama N, Yoshizaki G. Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 478(3): 1478-1483.
- [77] Lee S, Seki S, Katayama N, *et al.* Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16045.
- [78] Yoshikawa H, Ino Y, Shigenaga K, *et al.* Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* from cryopreserved testicular germ cells using surrogate broodstock technology[J]. *Aquaculture*, 2018, 493: 302-313.
- [79] Wei Q W, Ke F E, Zhang J M, *et al.* Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48(1-4): 241-255.
- [80] Zhuang P, Ke F E, Wei Q W, *et al.* Biology and life history of Dabry's sturgeon, *Acipenser dabryanus*, in the Yangtze River[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, 48(1-4): 257-264.
- [81] 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: 298-302.
- [82] Sato M, Morita T, Katayama N, *et al.* Production of genetically diversified fish seeds using spermatogonial transplantation[J]. *Aquaculture*, 2014, 422-423: 218-224.

Progress and application prospect of germ cell transplantation technique in fish

YE Huan¹, WEI Qiwei¹, XU Dongdong², YUE Huamei¹, TAKEUCHI Yutaka³,
RUAN Rui¹, DU Hao¹, LI Chuangju^{1*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. Key Laboratory of Mariculture and Enhancement of Zhejiang Province,
Marine Fishery Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China;

3. College of Science and Engineering, Kanazawa University, Kanazawa 927-0552, Japan)

Abstract: Germ cell transplantation is a technique that donor germ cells successfully colonized into genital ridges of recipient, proliferate, differentiate and finally develop into functional donor gametes after they are transplanted into the body cavity of allogeneic or xenogeneic recipients. It is a powerful assisted reproductive technique for the conservation and propagation of the rare and endangered animals; meanwhile, it also provides an effective assay system for the functional analysis of germline stem cell. Germ cell transplantation in fish was first successfully performed in the model fish, zebrafish (*Danio rerio*); during the past decade, a series of breakthroughs have been achieved for this technique. Firstly, three types of fish germ cell transplantation have been established to produce donor-derived gametes by transplanting germ cells into recipients at diverse developmental stages, such as the blastula-stage embryos, newly hatched larvae, and adult fish. Secondly, the discovery of spermatogonia and oogonia stem cells has expanded the choice of donor germ cells. Thirdly, the method for selection and preparation of recipient has been improved. This technique has powerful applications in shortening the time of fish sexual maturity, sex control breeding and conservation of the rare and endangered fish, which has been studied and applied in a variety of teleost, including freshwater and marine fish. In this review, we systematically summarized the progress of germ cell transplantation in fish, pointed out the key points for the implementation of this technique, and discussed its promising application.

Key words: fish; germ cell transplantation; germplasm resources; cryopreservation

Corresponding author: LI Chuangju. E-mail: lcj@yfi.ac.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0901205); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(2018JBF10); National Natural Science Foundation of China (31802282)