

文章编号:1000-0615(2009)03-0372-07

异源精子诱导条斑星鲈雌核发育

杨景峰^{1,2}, 陈松林², 苏鹏志², 邵长伟²,
田永胜², 廖小林², 翟介明³, 李波³

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 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;

3. 山东莱州明波水产有限公司, 山东 莱州 266031)

摘要:用冷冻保存的花鲈精子作为异源精子,采用紫外线(UV)对精子进行照射使其遗传物质失活,然后与卵子进行授精,可以刺激条斑星鲈鱼卵进行雌核发育,在受精后一定时间采用冷休克处理“受精”卵,抑制第二极体排出成功获得了条斑星鲈雌核发育二倍体鱼苗。实验表明,花鲈精子只有经过紫外线照射遗传失活后,才能诱导产生条斑星鲈雌核发育二倍体鱼苗。经过大量实验筛选出诱导条斑星鲈雌核发育的最佳条件为花鲈冷冻精子采用 80 MJ/cm² 的紫外线照射,然后与条斑星鲈卵子进行授精,在受精后 7~9 min,将受精卵放在 -1.0~1.5 ℃ 海水中进行冷休克处理,持续时间为 60~90 min,在此条件下,获得的雌核发育二倍体的相对诱导率达 40.68% ± 7.24%。由于不失活精子与条斑星鲈卵形成的杂交胚只能存活到原肠期,而染色体未被成功加倍的胚胎会由于单倍体的致死效应在孵化前后死亡,所以存活的仔鱼全部为条斑星鲈雌核发育二倍体。采用微卫星标记技术对雌核发育鱼苗进行了分析,证明了雌核发育鱼苗为雌核发育二倍体。首次报道了采用异源冷冻精子诱导条斑星鲈鱼卵进行雌核发育的技术方法,为条斑星鲈性别控制和遗传改良提供了技术手段。

关键词:条斑星鲈;花鲈;雌核发育;异源冷冻精子;微卫星

中图分类号:Q 343. +34; S 917

文献标识码:A

鱼类雌核发育技术在快速建立鱼类纯系、纯化优良基因、性别控制以及遗传改良等方面具有十分重要的意义和应用价值,又由于一些海水鱼类的雌性个体在生长速率上明显高于雄性个体,因此,进行鱼类雌核发育的研究已经成为海水鱼类育种研究的热点问题^[1]。目前,国内外水产学者通过人工诱导海水鱼类雌核发育,已经成功地培育出褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)^[2-4]、漠斑牙鲈(*Paralichthys lethostigma*)^[5]、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*, 现名 *Larimichthys crocea*)^[6-7]、庸鲈(*Hippoglossus hippoglossus*)^[8]、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[9-11]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[12-13]和半滑舌鲷

(*Cynoglossus semilaevis*)^[14]等海水养殖鱼类的雌核发育鱼苗。

在鱼类的雌核发育研究中,大多数学者以遗传失活的同源精子作为激活源,但相关研究表明,精子活力和 UV 的强度成反比^[5, 12, 15],这种方法存在可能因为照射剂量掌握不当导致受精率太低或者遗传失活不完全,受精卵中混有正常二倍体的问题。由于精子在雌核发育过程中只起激活卵子发育的作用,因而应用异源精子进行雌核发育的诱导是完全可行的。异源精子经过遗传失活处理后,可以和同源精子一样诱导出雌核发育后代^[5],同时由于杂交不能成活或杂交个体存在形态上的可区分性状和单倍体会出现单倍体效

收稿日期:2008-05-04 修回日期:2008-07-16

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A403);山东省泰山学者工程专项

通讯作者:陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

应^[12, 16-17],可以确保得到 100% 雌核发育后代。我国在一些淡水鱼,如银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[18]、罗非鱼(*Tilapia mossambica*)^[19]、稀有鮡鲫^[20]等鱼类进行了异源精子诱导雌核发育方面的研究,在海水鱼类中的牙鲆^[21]、漠斑牙鲆^[5, 21]国内外学者也出现了类似的结果。另外某些种类的异源精子还可以不经失活处理,直接诱导出雌核发育单倍体,如用浅色黄姑鱼(*Nibea chui*)精子诱导大黄鱼雌核发育就出现了这种情况^[6]。但有关采用异源冷冻精子诱导条斑星鲷雌核发育的研究,目前国内外均未见报道。

条斑星鲷(*Verasper moseri*)属鲷形目(Pleuronectiformes)、鲷科(Pleuronectidae)、星鲷属(*Verasper*),主要分布于日本茨城县以北到鄂霍茨克海以南海域,我国黄渤海海域亦有少量分布,为冷温性大型底栖鱼类。条斑星鲷生长速度快,肉味鲜美,是日本和韩国的主要养殖对象,近年已经突破人工繁殖技术,在我国开始推广养殖。由于这种鱼雌雄性生长速度有明显的差异,雌性个体生长比雄性个体快 50% 以上,因此,采用雌核发育技术培育条斑星鲷的全雌苗种对于提高其养殖产量和经济效益具有重要意义。

本研究首次报道了异源冷冻精子结合冷休克技术诱导条斑星鲷雌核发育的方法,筛选了冷休克诱导参数,并获得一定数量的雌核发育二倍体鱼苗,为条斑星鲷全雌养殖生产提供了科学依据和技术手段。

1 材料方法

1.1 实验用鱼

实验用条斑星鲷雌鱼,由莱州明波水产公司提供,为 3~4 龄经产鱼,选取性腺已经开始发育、无病害的亲鱼,养殖于循环水养殖车间,日水交换量 8 次以上,控温控光催熟。养殖水温由 18 ℃ 逐渐降至 8 ℃ 左右时,雌鱼性腺发育成熟,用 GnRH 组合催产剂进行催产,人工挤出成熟卵备用。

实验用花鲈雄鱼,为渤海海捕鱼苗,养至 2 龄鱼,在养殖水温降至 14 ℃ 时,注射 LRH-A3 和 HCG 混合催产剂,48 h 后用吸水纸吸干其腹部,轻压雄鱼腹部获得精子,并用 MPRS 稀释,用 DMSO 作为抗冻剂液氮冻存,按照文献^[22-23]建立的方法进行冷冻保存。

1.2 精子遗传物质失活

取冻存花鲈精子,37 ℃ 快速解冻后,每 250 μL 用 3 mL 的 MPRS 溶液稀释,平铺于直径为 9 cm 的预冷的培养皿中,分别用紫外照射仪以 80 MJ/cm² 进行失活,照射后的精子样品放于冰面上避光保存直到授精。

1.3 人工授精

将经遗传失活后的花鲈精子与正常的条斑星鲷卵授精。先将精子加入到盛有卵子的受精容器中,混合后,加入少量 8 ℃ 海水,2 min 后再加入适量海水并保持水温恒定。

1.4 受精卵的孵化

按不同实验要求,受精卵分别在 8、160 和 600 L 水槽中进行,8 L 水槽不充气,12 h 换水一次,160 L 和 600 L 水槽流水,充气孵化。孵化用水盐度为 34,温度控制在(8±1) ℃,并逐渐升高到 12 ℃ 左右,孵化过程中定时吸出沉卵。

1.5 异源精子诱导能力分析

试验分 4 个处理,第一个处理为杂交组,用未失活花鲈精子与条斑星鲷卵直接授精;第二个处理为杂交休克组,用未失活精子授精,于授精后的 7 min,采用 -1.5 ℃ 冷休克处理 60 min;第三个处理为失活组,花鲈精子用 80 MJ/cm² 剂量的 UV 进行遗传失活,然后进行人工授精;第四个处理为失活休克组,用同样失活处理的精子授精,其他同第二处理。受精卵在 8 L 水槽中静水孵化,并于受精后的 1 dpf(1 day after fertilization,原肠早期)、3 dpf(眼囊期)、8 dpf(孵化期)和 12 dpf(孵化后存活 4 d)以各自受精率为基础,分别计数相对存活率,以消除卵子质量不同所造成的影响。

1.6 冷休克条件筛选

先确定最佳的冷休克处理起始时间,分别取 3 条雌鱼的卵用灭活的精子受精后分成 5 份,分别在受精后的 5、7、9、11、13 min 进行 -1.5 ℃ 冷休克处理 60 min,并在 12 dpf 计数相对诱导率(二倍体苗数和受精卵数之比)。

按上述试验结果,冷休克温度和冷休克持续时间两因素有重复进行试验设计,冷休克温度取 0、-0.5、-1.0、-1.5 ℃ 4 个水平,冷休克持续时间取 30、60、90 min 3 个水平,每个处理重复 2~3 次,实验方法同上。

1.7 雌核发育鱼苗批量诱导

按以上最佳诱导条件进行批量诱导,并按一般育苗条件进行养殖。

1.8 雌核发育二倍体微卫星标记鉴定

基因组 DNA 的提取 采取高盐法提取条斑星鲷雌核发育鱼和正常发育鱼苗基因组 DNA, 首先将固定于酒精中的鱼苗置于 1.5 mL 离心管中, 剪碎后加入 400 μ L TENS 裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 400 μ mol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 0.6% SDS) 和 10 μ L 蛋白酶 K (10 mg/mL), 然后置于 55 $^{\circ}$ C 消化。消化完全后, 加入 140 μ L 饱和氯化钠, 混匀, 12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min。取上清加入两倍体积预冷的无水乙醇沉淀, 然后将絮状沉淀挑出后用 70% 的酒精洗涤两次, 待酒精挥发干后, 用 TE 缓冲液溶解 DNA。

PCR 扩增 PCR 反应体系为 10 μ L, 包括 1 \times PCR Buffer [20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4, 20 mmol/L KCl, 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], 10 ~ 50 ng 基因组 DNA, 0.2 μ mol/L 微卫星引物, 120 μ mol/L dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl_2 和 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa)。PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 热变性 5 min, 然后进行 38 个循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 ~ 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。用于雌核发育条斑星鲷检测的 PCR 引物为 Vmo4, 其序列为

L: CACTGTGCCCACTGTCTG

R: TTTTCCTCTTACTCCCTCTCTT

聚丙烯酰胺凝胶电泳 在 PCR 产物中加入 1/2 体积的甲酰胺上样液 (0.01 mol/L EDTA, 1 mg/mL 溴芬蓝, 1 mg/mL 二甲苯青) 于 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟, 然后立刻放在冰上。在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 以 pBR322 DNA/*Msp* I (TIANGEN) 为标记, 银染法染色。

1.9 数据统计及分析

每组实验进行 2 ~ 3 次重复。所有数据经 SPSS 11.5 统计软件处理, 多重比较采用 LSD 方法进行。进行多重比较时, 存活率、孵化率进行反正弦转换。

2 结果

2.1 异源精子诱导能力分析

杂交及冷休克诱导实验结果见图 1。结果表

明, 花鲈精子具有和条斑星鲷杂交的能力, 但是杂交的胚胎只能发育到眼囊期, 然后就会死亡。主要表现为体节不能正常形成, 尾部成弥散状。由图 1 可见杂交的两组均没有鱼苗孵出。而用灭活的精子, 不进行冷休克处理的, 可以在杂交胚胎已经死亡的 3 dpf 还存活较多的单倍体, 但孵出鱼苗的数量也是极少, 只有当雌核发育胚胎经过冷休克处理后, 才可以孵出部分二倍体, 这部分为雌核发育的二倍体条斑星鲷。

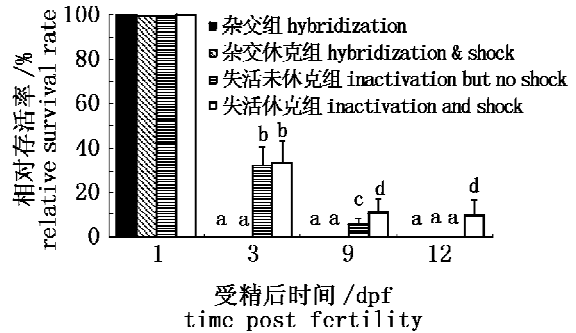


图 1 异源精子诱导雌核发育可行性试验
图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 1 Induction of diploid gynogenesis in barfin flounder using heterologous sperm

Different superscript means significantly different, $P < 0.05$

2.2 冷休克起始时间的筛选

实验中发现授精后 5 min 到 13 min 开始进行冷休克处理均能诱导出雌核发育二倍体鱼苗, 但在 7 min 和 9 min 两个处理组中相对诱导率分别为 17.66% \pm 8.71% 和 16.40% \pm 3.72%, 明显高于其它处理组 ($P < 0.05$) 根据这一结果, 可以确定, 条斑星鲷雌核发育冷休克诱导的最佳起始时间为授精后的 7 ~ 9 min (图 2)。

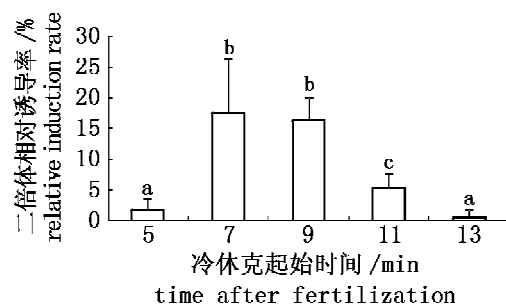


图 2 冷休克起始时间对诱导雌核发育的影响
图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 2 Relative induction rates at the experiment by different treatments after fertilization of cold shock

Different superscript means significantly different, $P < 0.05$

2.3 冷休克温度和持续时间的筛选

冷休克温度和冷休克持续时间对雌核发育二倍体诱导率的影响结果见图 3,当冷休克温度为 0 ℃到 -1.5 ℃时,均能成功诱导出雌核发育的二倍体条斑星鲈,并且可以明显地看出,随温度的降低诱导率也明显的升高;当冷休克持续时间为 30 min 时,基本不能诱导出雌核发育的二倍体,数据的统计结果表明 60 min 的处理和 90 min 的处理没有明显的差异。试验中的最高诱导率出现在 -1.0 ℃处理 60 min,为 $40.68\% \pm 7.24\%$ 。因而最佳的处理方法确定为 -1.0 ~ -1.5 ℃处理 60 ~ 90 min(图 3)。

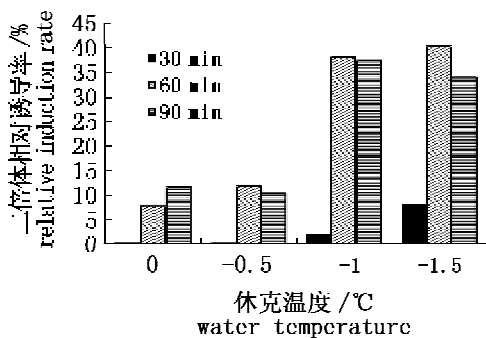


图 3 冷休克温度及持续时间对雌核发育的影响
Fig. 3 Relative induction rates of the experiment by different durations of cold shock and different water temperature

2.4 批量试验

按上面建立的最佳诱导条件进行了多次批量诱导试验,共获得雌核发育二倍体条斑星鲈鱼苗两万多尾,其中 300 余尾存活至今,目前已达到 15 cm 以上。

2.5 雌核发育鱼苗的微卫星标记鉴定

首先通过微卫星富集文库法构建了条斑星鲈富集文库,从中筛选出多态性微卫星标记。然后用这些多态引物在正常群体和雌核发育群体中进行扩增,从中进一步筛选出在正常群体里杂合率较高,同时在雌核发育群体里纯合率较高的引物。采用条斑星鲈 Vmo4 微卫星标记在条斑星鲈正常鱼苗(12 尾)中有 9 个个体为杂合,杂合率为 75%,而在雌核发育鱼苗(9 尾)中,所有个体都为纯合型,杂合率为 0,同样在所有检测的纯合个体中未见异于正常群体的等位基因,由此表明这批鱼苗是雌核发育鱼苗(图 4)。

3 讨论

3.1 异源冷冻精子在鱼类雌核发育中的作用

本研究第一次证明了超远缘(目间)的精子可以成功诱导鱼类雌核发育。以往的类似研究中,异源精子通常选用亲源关系较近,并且杂交能够存活的方法来进行,如戈文龙等^[2]用石鲈精子诱

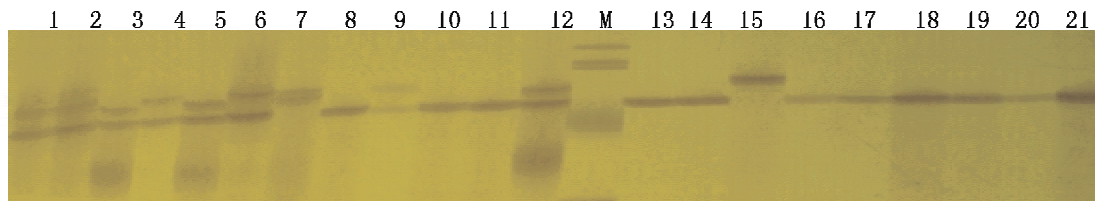


图 4 微卫星引物 Vmo4 在 12 尾普通鱼苗和 9 尾雌核发育鱼苗上的分析结果

1 ~ 12. 普通条斑星鲈个体, 13 ~ 21. 雌核发育个体, M. marker

Fig. 4 The result of microsatellite markers Vmo4 analysis by 12 normal fry and 9 gynogenetic fry

1 - 12. normal fry, 13 - 21. gynogenetic fry, M. marker

导牙鲈雌核发育,由于两种鱼杂交存活,所以精子必须进行遗传失活,一般情况下,可以根据形态学特征将雌核发育二倍体和杂交个体区分开。另外也有研究表明超远缘的种间精子可以不用遗传失活也可以进行雌核发育诱导,杂交情况下,直接发育为雌核发育单倍体^[6]。本研究通过筛选发现花鲈精子是诱导条斑星鲈雌核发育的理想精子源。尽管花鲈精子可以和条斑星鲈卵杂交,但杂

交个体只能发育到原肠期左右,在形态上也和单倍体差异较大。异源精子诱导方法的建立,可以有效促进那些不易获得,或是雄鱼精子活力差的鱼类进行雌核发育方面的研究。但异源精子诱导雌核发育最突出的问题是两种鱼的繁殖周期很难同步,所以利用精子冻存技术对精子进行冷冻保存是解决这一问题的最有效的办法。利用冷冻精子还可以对任何鱼类在任意时间进行雌核发育诱

导,以确保诱导工作的顺利进行。

3.2 条斑星鲷雌核发育诱导条件

本研究通过正交试验得到条斑星鲷雌核发育的最佳诱导条件为授精后的 9 min, $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行冷休克处理 60~90 min。这一结果同其它学者在其它鱼类上获得的结果不尽相同,如大黄鱼为在 $2\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷休克处理 10 min^[24]; 漠斑牙鲆为在 $0\sim 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷休克处理 40~50 min^[5]。冷休克的作用是在卵子受精后,抑制第二极体的排出。授精后到第二极体完全排出,卵有一个冷休克敏感期,只有在这一时期进行冷休克处理,才能有效的抑制第二极体排出,这一时期和胚胎的发育速度关系密切。另外条斑星鲷冷休克起始时间为授精后的 9 min,较其它鱼类要晚一些,如大黄鱼, $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下只需要 2 min^[24], 漠斑牙鲆 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下需要 3~4 min^[5], 大菱鲆 $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下需要 6.5 min^[3, 12],基本上水温越低,需要时间越长。由于条斑星鲷繁殖水温较低,只有 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$,所以发育速度慢,受精后需要的时间也较长。冷休克强度也表现出同样的趋势,这可能是由于条斑星鲷属于冷水性鱼类,要求的冷休克温度更低,冷休克时间更长。

3.3 雌核发育在条斑星鲷性别控制和全雌育种上的意义和作用

雌核发育个体所有遗传物质均来自于母本,在理论上,XX/XY 性别决定机制的个体雌核发育后代全部为 XX 个体,即雌性个体^[25]。条斑星鲷雌性个体生长速度明显大于雄性个体,如进行全雌性养殖将明显增加经济效益。利用雌核发育技术,获得的雌核发育二倍体星鲷,理论上即为全雌群体,如果再结合性反转技术,培育出伪雄鱼,即可进行全雌苗种生产。这一技术同以往的直接性反转培育伪雄鱼技术相比,省去了极繁琐的伪雄鱼筛选过程,可以在最短的周期内开展全雌苗种生产^[25]。条斑星鲷异源冷冻精子诱导的雌核发育技术的建立为条斑星鲷性别控制和全雌育种技术的建立提供了有效的技术手段。

3.4 雌核发育在条斑星鲷建立纯系上的作用

雌核发育个体的所有遗传物质均来自于母本,由于抑制第二极体排出或第一次卵裂形成的二倍体,对于减数雌核发育,除由于重组可能得到部分遗传位点上杂合体外,大部分位点都是纯合的^[3, 9, 13, 27],而卵裂雌核发育在理论上,所有个体均为纯合个体。因而应用雌核发育技术和性别控

制技术可以在两代时间内快速获得纯系,而利用近交需 7~8 代才能达到这样的效果。本文中微卫星分析的结果表明,雌核发育后代在 Vmo4 微卫星标记上完全纯合,证明了雌核发育技术在建立纯系上是非常有效的技术方法。

本文首次报道了异源精子诱导的条斑星鲷雌核发育技术。实验结果表明条斑星鲷(♀)与花鲈(♂)“杂交”,不能存活,但经遗传失活的花鲈精子可以有效诱导条斑星鲷的雌核发育,经分析,在 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水温条件下最佳诱导条件为受精后的 7~9 min, $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷休克处理 60~90 min。雌核发育鱼苗在 Vmo4 微卫星标记上 100% 纯合。

参考文献:

- [1] 陈松林. 水产生物技术研究的回顾、最新进展及前景展望[J]. 水产学报, 2007, 31(6): 825-840.
- [2] 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, (6): 1011-1016.
- [3] 王伟, 尤锋, 高天翔, 等. 人工诱导牙鲆异质雌核发育群体的微卫星标记分析[J]. 高技术通讯, 2005, (7): 107-110.
- [4] 朱晓琛, 刘海金, 孙效文, 等. 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性[J]. 动物学研究, 2006, (1): 63-67.
- [5] Adam L J, Godwin J, Daniels H V, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm [J]. Aquaculture, 2004, 237(1-4): 499-516.
- [6] 王德祥, 苏永全, 王世锋, 等. 异源精子诱导大黄鱼雌核发育的研究[J]. 高技术通讯, 2006(11): 1206-1210.
- [7] 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.
- [8] Tvedt H B, Benfey T J, Martin-robichaud D J, et al. Gynogenesis and sex determination in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. Aquaculture, 2006, 252(2-4): 573-583.
- [9] Bertotto D, Cepollaro F, Libertini A, et al. Production of clonal founders in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., by mitotic gynogenesis[J]. Aquaculture, 2005, 246(1-4): 115-124.

- [10] Francescon A, Barbaro A, Bertotto D, *et al.* Assessment of homozygosity and fertility in meiotic gynogens of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Aquaculture*, 2005, 243(1-4): 93-102.
- [11] Felip A, Piferrer F, Carrillo M, *et al.* Growth, gonadal development and sex ratios of meiogynogenetic diploid sea bass [J]. *Journal of Fish Biology*, 2002, 61: 347-359.
- [12] Piferrer F, Cal R M, Gomez C, *et al.* Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age [J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4): 403-419.
- [13] 苏鹏志,陈松林,杨景峰,等. 异源冷冻精子诱导大菱鲆雌核发育的研究 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15(5): 715-720.
- [14] 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.
- [15] Pongthana N, Penman D J, Karnasuta J, *et al.* Induced gynogenesis in the silver barb (*Puntius gonionotus* Bleeker) and evidence for female homogamety [J]. *Aquaculture*, 1995, 135(4): 267-276.
- [16] Malison J A, Kayes T B, Held J A, *et al.* Manipulation of ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) by heat shock, hydrostatic pressure shock, and spermatozoa inactivation [J]. *Aquaculture*, 1993, 110(3-4): 229-242.
- [17] Purdom C E. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish [J]. *Heredity*, 1969, 24(3): 431-444.
- [18] 滕春波,孙效文. 利用异源精子激发雌核发育的银鲫及亲本的 RAPD 分析 [J]. *水产学报*, 1999, 23(4): 420-423.
- [19] 潘锋,胡玫. 异源精子诱导的罗非鱼人工雌核发育 [J]. *水生生物学报*, 1994, 18(1): 90-91.
- [20] 贾方钧,王剑伟. 异源精子诱导稀有鲟鲫的人工雌核发育 [J]. *水生生物学报*, 2002, 26(3): 246-252.
- [21] Morgan A J, Murashige R, Woolridge C A, *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(1-4): 290-299.
- [22] Ji X S, Chen S L, Yu G C, *et al.* Cryopreservation of sperm from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) and feasibility for production-scale fertilization [J]. *Aquaculture*, 2004, 241(1-4): 517-528.
- [23] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存的理论与技术 [M]. 北京: 农业出版社, 2007.
- [24] 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, (12): 37-42.
- [25] Tvedt H B, Benfey T J, Martin-robichaud D J, *et al.* Gynogenesis and sex determination in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2-4): 573-583.
- [26] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. *Aquaculture*, 2002, 208(3-4): 191-364.
- [27] Yan J, Liu S, Sun Y, *et al.* RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) × common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Aquaculture*, 2005, 243(1-4): 49-60.

Study on gynogenesis induced by heterogenous sperms in barfin flounder *Verasper moseri*

YANG Jing-feng^{1,2}, CHEN Song-lin², SU Peng-zhi², SHAO Chang-wei²,
TIAN Yong-sheng², LIAO Xiao-lin², ZHAI Jie-ming³, LI Bo³

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Laizhou Mingbo Aquatic Co, Ltd., Laizhou 266031, China)

Abstract: Fish in which gynogenesis has been induced have all their chromosomes inherited from the mother and, if females are the homogametic sex, they usually are all females. Because barfin flounder *Verasper moseri* females grow faster than males, the production of all-female populations is highly desirable. Due to the low volumes of semen produced by male flounder, and to eliminate any potential genetic contribution by homologous sperm, activation of flounder eggs with heterologous sperm was also necessary. To test methods for inducing diploid gynogenesis in barfin flounder using homologous sperm, the cryopreservative sperm of *Lateolabrax japonicus* was used to activate eggs and cold shock was used to prevent extrusion of the second polar body. Four treatments, named for their expected outcome, were employed: hybrid, haploid, triploid, and gynogenetic diploid to prove the ability of *Lateolabrax japonicus* sperm activating flounder eggs. Diploid gynogenesis was induced by activating egg development with UV irradiated sperm (80 MJ/cm²) for 7–9 min in seawater, and then subjecting the eggs to cold shock in –1–1.5 °C seawater for 60–90 min. The hybrid could not survive to hatching, thus the offspring was allogynogenesis only and the result of microsatellite markers analysis proved this result. This work provides procedures for induction of diploid gynogenesis in barfin flounder using heterologous sperm.

Key words: *Verasper moseri*; *Lateolabrax japonicus*; gynogenesis; heterogenous frozen sperms; microsatellite