

文章编号:1000-0615(2009)04-0533-09

异源精子诱导犬齿牙鲆的雌核发育

杨景峰^{1,2,3}, 陈松林^{1,4}, 徐巨博¹, 苏鹏志¹,
罗心慧¹, 邵长伟¹, 翟介明⁵

- (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. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;
3. 内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古 通辽 028042;
4. 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
5. 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”,可以刺激犬齿牙鲆鱼卵进行雌核发育,在受精后一定时间采用冷休克处理“授精”卵,抑制第二极体排出成功获得了犬齿牙鲆雌核发育二倍体鱼苗。实验表明:犬齿牙鲆同源精子经 80 mJ/cm²的紫外线照射可以完全失活,冻存花鲈精子经紫外线照射后也同样具有诱导犬齿牙鲆雌核发育的能力。无论同源精子还是异源精子,最佳诱导条件为在 18 ℃条件下,精子经 80 mJ/cm²的紫外线照射,受精后 4~5 min 将受精卵放在 3 ℃海水中进行冷休克处理,持续时间为 45 min,同源精子和异源精子二倍体诱导分别为 32.66% ± 7.03% 和 28.00% ± 6.48%。采用形态学、流式细胞仪 DNA 含量分析和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。

关键词:犬齿牙鲆;花鲈;雌核发育;异源精子;冷休克;微卫星

中图分类号:S 917

文献标识码:A

鱼类雌核发育工作开始于 20 世纪 50 年代,在淡水鱼类中开展的研究较多,在基因作图与纯合自交系的快速建立、生产单性种群等方面有广泛的应用前景^[1]。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^[2]。

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鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[3-5]、漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)^[6-7]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[8-10]、大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)^[11]、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*, 现名 *Larimichthys crocea*)^[12-15]、舌齿鲈

(*Dicentrarchus labrax*)^[16-20]以及半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[21]等海水养殖鱼类的雌核发育鱼苗。

犬齿牙鲆(*Paralichthys dentatus*),俗称大西洋牙鲆、夏鲆,主要分布于北美洲大西洋沿岸,是西北大西洋所产 4 种牙鲆中的一种较大型鱼类。中国科学院海洋研究所于 2002 年由美国引进我国,并在山东沿海进行推广养殖。与大多数海水鱼类相似,雌性犬齿牙鲆生长性状要优于雄性,有必要在犬齿牙鲆养殖生产中开展全雌鱼培育和养殖。而有关犬齿牙鲆雌核发育诱导研究目前国内均未见相关文章报道。本项研究采用紫外照射对冻存花鲈(*Lateolabrax japonicus*)精子遗传物质进行遗传失活,并结合冷休克法对单倍体受精卵

收稿日期:2008-09-01 修回日期:2009-02-09

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;上海高校水产养殖学 E-研究院项目(E030090)

通讯作者:陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

进行倍性恢复,成功诱导出雌核发育二倍体犬齿牙鲆,为全雌犬齿牙鲆的制种和养殖提供了重要的科学依据和技术基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验用犬齿牙鲆雌鱼,由莱州明波水产公司提供,为2~4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。当养殖水温由24℃逐渐降至18℃左右时,犬齿牙鲆亲鱼性腺开始发育,选择性腺发育较好,可从鱼体上面明显看出性腺从胸部到尾柄均有较大程度隆起的雌鱼注射HCG,剂量为500 UI/kg。雄鱼剂量减半注射。24 h后人工挤出精卵备用^[22]。

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,按照我们实验室建立的方法进行冷冻保存^[23-24]。

1.2 精子灭活条件筛选

取新鲜犬齿牙鲆精子,每100 μL用3 mL的MPRS溶液稀释,平铺于直径为9 cm的预冷培养皿中,分别用UVC 500 Crosslinker按0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 mJ/cm²进行失活,失活后立即与3 mL的犬齿牙鲆的卵(约4 000粒)受精。

取冻存花鲈精子,37℃快速解冻后,每100 μL用3 mL的MPRS溶液稀释,按以上同样梯度进行失活和授精。

授精卵放入8 L水槽孵化,并在原肠中期计数受精率,孵化期计数孵化率,孵化后孵化鱼苗的形态,判断其倍性,计数单倍体率,并以能成活到孵化后72 h的成活率加以验证。

1.3 雌核发育诱导条件确定

根据精子失活条件试验结果,同源精子和异源精子均按80 mJ/cm²剂量进行处理,采用冷休克法对单倍体受精卵进行倍性恢复。根据相关文献和预实验结果,处理水温设在3℃,首先进行处理时刻(treatment after fertilization, TA)实验,分别设3, 4, 5, 6, 7 min, 5个处理时刻(处理水温3℃,处理时间45 min)。根据TA实验结果,再进行冷休克处理时间(duration, D)实验,设置30,

35, 40, 45, 50 min, 5个处理组(处理水温3℃, TA 5 min)。每次实验设二倍体对照组和单倍体对照组。未照射的精子与正常卵受精用来获得二倍体对照组,紫外照射精子和正常卵受精用来产生雌核发育单倍体。实验和对照组受精水温都为18℃,各组受精卵的受精和发育状况在倒置显微镜下进行观察。

1.4 倍性分析

采用初孵仔鱼形态学测量与倍性分析仪检测细胞中DNA相对含量两种方法,来鉴定各实验组初孵仔鱼是否为雌核发育单倍体、雌核发育二倍体。

倍性分析仪检测DNA相对含量 采取10尾以上初孵仔鱼整鱼,分别加一步法试剂并捣碎、过200目筛绢、Partec PA进行分析。二倍体对照组初孵仔鱼的DNA相对含量设为100。

形态学测量 将初孵苗用MS-222麻醉后,测量其体长、体高、卵黄囊长和眼径长,每组测量30尾。以体高、卵黄囊长和眼径长与体长的比值作为评判指标,先将所有数据混合用SPSS for Windows统计软件进行快速聚类分析(K-Means Cluster),如聚类数多于2,说明可能有除单倍体和二倍体以外的形态存在,如杂交。当聚类数等于2,则用单倍体对照组和二倍体对照组数据,用SPSS for Windows统计软件进行判别分析(Discriminant),建立判别函数。

1.5 雌核发育二倍体微卫星标记鉴定

基因组DNA的提取 采取高盐法提取犬齿牙鲆雌核发育鱼和犬齿牙鲆母本基因组DNA,鱼苗整体提取,亲鱼剪取一小块尾鳍提取。首先将样品用酒精固定,剪碎后加入400 μL TENS裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 400 μmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 0.6% SDS)和10 μL蛋白酶K(10 mg/mL),然后置于55℃消化。消化完全后,加入140 μL饱和氯化钠,混匀,12 000 r/min 4℃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 μL,包括1×PCR buffer[20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4, 20 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄], 10~50 ng基因组DNA, 0.5 μmol/L微卫星引物, 120

$\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl_2 和 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa)。PCR 扩增条件为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 热变性 5 min , 然后进行 38 个循环, 每个循环包括 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $56 \sim 62 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s , 最后在 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 。用于雌核发育犬齿牙鲆检测的 PCR 引物为 Padel2 (Genbank: EU038166), 其序列为

L: GTCCTTAGAGGGATTCTGGTTT

R: GTTACCCTTGAAGCTCTCCACCT

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 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 min , 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。

1.6 数据统计及分析

每组实验进行 2~3 次重复。试验所得数据用平均值 \pm 标准误差表示, 用 SPSS for Windows 统计软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 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。差异显著性水平设置为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 精子失活条件

同源精子 在 $0 \sim 140 \text{ mJ/cm}^2$ 下的灭活剂量, 各处理组的受精率差异并不明显, 但随灭活剂量的增加, 孵化率呈明显的下降趋势 (图 1-A)。以最低的 20 mJ/cm^2 剂量进行处理, 即可得到约 90% 的单倍体, 可见精子对紫外线还是相当敏感的, 当灭活剂量增加到 80 mJ/cm^2 时, 单倍体率达到 100% , 72 h 成活率降为 0 证明所孵出鱼苗全为单倍体, 而此时的孵化率也较对照组无明显差异, 所以可确定该剂量为最佳灭活剂量。

异源精子 异源精子灭活试验中, 除对照组未孵出任何形态的鱼苗外, 其他各组均只出现了单倍体苗, 并在孵化后短时间内全部死亡 (图 1-B)。但对对照组的受精率仍然较高, 说明花鲈精子可以和犬齿牙鲆卵杂交受精, 却不能发育至孵化, 实验中也发现杂交胚胎在原肠期后呈畸型发育, 不久后即死亡。受精率和孵化率情况同源精子类似。由于没有进行花鲈同源灭活试验, 所以完全灭活剂量也定为 80 mJ/cm^2 。

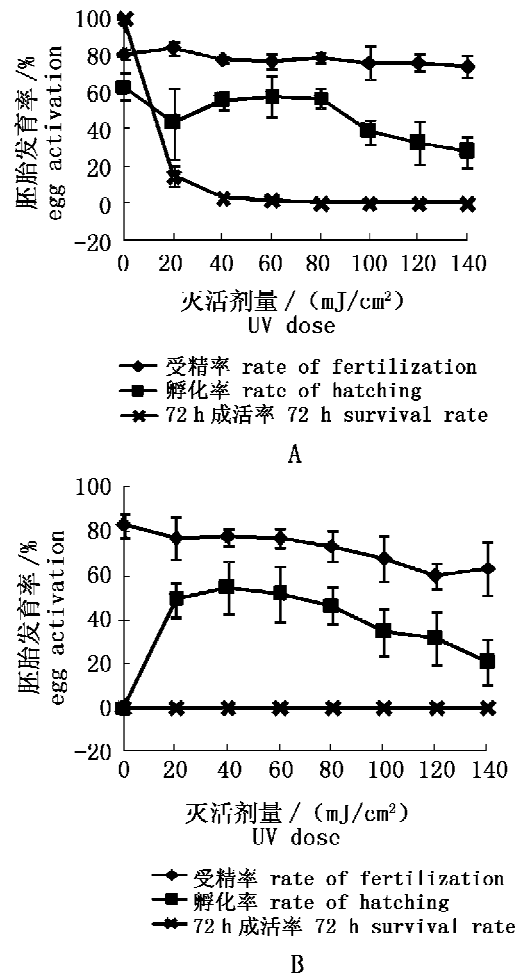


图 1 犬齿牙鲆雌核发育精子灭活条件筛选

A: 犬齿牙鲆精子; B: 花鲈精子

Fig. 1 Selection on the genetically inactivated conditions of sperm

A: summer flounder sperm; B: *Lateolabrax japonicus* sperm

2.2 单倍体和二倍体的判断

正常二倍体、雌核发育单倍体和二倍体形态差异 无论同源精子还是异源精子, 均可诱导出雌核发育的二倍体犬齿牙鲆个体, 而经过灭活的精子和正常卵受精后所孵化的个体呈明显的单倍体综合症, 表现为明显的体短、弯曲、卵黄囊变粗大等特征 (图 2)。雌核发育二倍体和正常二倍体形态学上没有表现出明显的差异。

形态特征聚类分析 以体高、卵黄囊长和眼径长与体长的比值作为评判指标, 将雌核发育诱导试验孵出鱼苗进行快速聚类分析。测定其中 30 尾个体的结果: 所有个体分为 2 类为最佳, 并通过单倍体对照组和二倍体对照组数据进行判别分析, 建立判别函数如下,

$$D = 15.292X_1 - 6.217X_2 + 8.580X_3 - 6.504$$

式中, D 为判别系数, X_1, X_2, X_3 分别为体高、眼径、卵黄囊长和体长的比值。

根据最终的统计结果, 该判别方程的总体判

别正确率为 98.3%, 说明可以用来进行二倍体和单倍体的形态学判别, 其中 $D > 0$ 为二倍体, $D < 0$ 为单倍体。

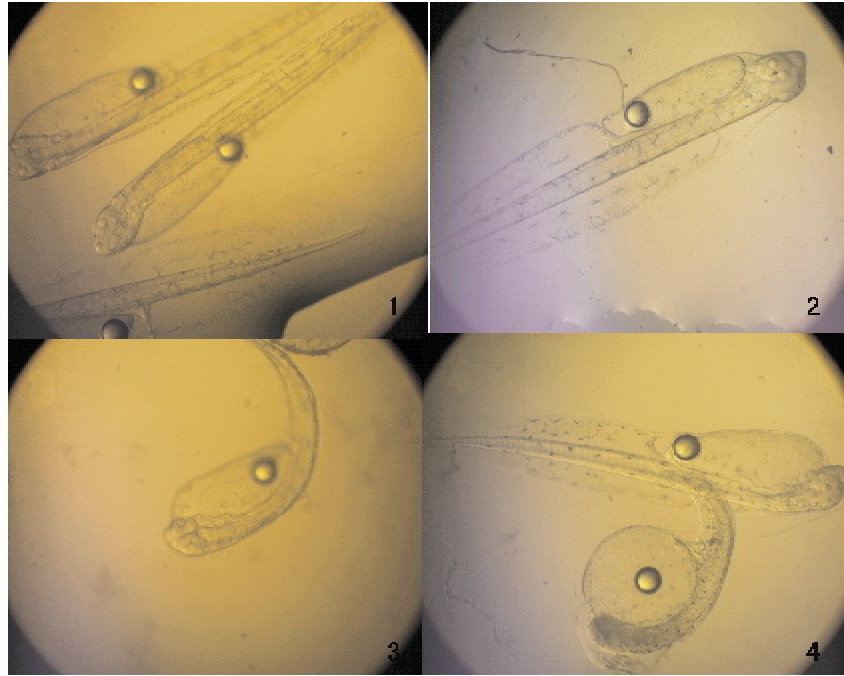


图2 犬齿牙鲆正常二倍体、雌核发育单倍体以及雌核发育二倍体初孵仔鱼形态

1. 正常二倍体; 2. 同源精子诱导雌核发育二倍体; 3. 异源精子诱导雌核发育单倍体; 4. 异源精子诱导雌核发育二倍体(上)和单倍体(下)

Fig. 2 Larvae morphology in normal diploid, gynogenetic haploid and diploid

1. Normal diploid; 2 Gynogenetic diploid induced with homologous sperm; 3. Gynogenetic haploid induced with heterogenous sperm; 4. Gynogenetic diploid and haploid induced with heterogenous sperm

DNA 含量 PA 分析 正常二倍体对照和雌核发育单倍体、二倍体初孵仔鱼细胞中 DNA 相对含量见图 3。正常二倍体对照组 DNA 含量 Gain 值设为 100 (图 3-A), 单倍体组检测的相对值明显低于 100, 介于 50 和 100 之间 (图 3-B), 而雌核发育二倍体组检测的相对值为 100 (图 3-C, D)

2.3 冷休克诱导条件

冷休克起始时间的筛选 实验中发现不论同源精子还是异源精子, 授精率均较高, 由于精子种类不同授精率有明显差异; 冷休克也明显降低了成活率 (图 4-A)。二倍体对照组有 $53.01\% \pm 6.68\%$ 孵化出正二倍体, 而杂交组和两个单倍体对照组均没有二倍体鱼苗孵出 (图 4-B)。授精后 3 min 到 7 min 开始进行冷休克处理均能诱导出雌核发育二倍体鱼苗, 但在第 5 分钟, 同源和异源

两个处理组的二倍体孵化率分别为 $32.66\% \pm 7.03\%$ 和 $28.00\% \pm 6.48\%$, 明显高于其它处理组 ($P < 0.05$), 根据这一结果可以确定, 犬齿牙鲆雌核发育冷休克诱导的最佳起始时间为授精后的 5 min (图 2); 另外尽管在受精后 5 min 二倍体孵化率差异不明显, 但总体上同源精子诱导率高于异源精子 (图 4-B)。

冷休克持续时间的筛选 冷休克持续时间对雌核发育二倍体诱导率的影响结果示于图 5, 二倍体对照组和单倍体对照组情况和冷休克起始时间试验类似。30 ~ 50 min 的冷休克处理均能诱导犬齿牙鲆雌核发育, 但在 45 min 时, 同源和异源精子诱导组的二倍体孵化率分别为 $36.00\% \pm 4.54\%$ 和 $28.33\% \pm 3.40\%$, 明显高于其他处理组; 同源精子诱导组同样明显高于异源处理组 (图 5-A, B)。

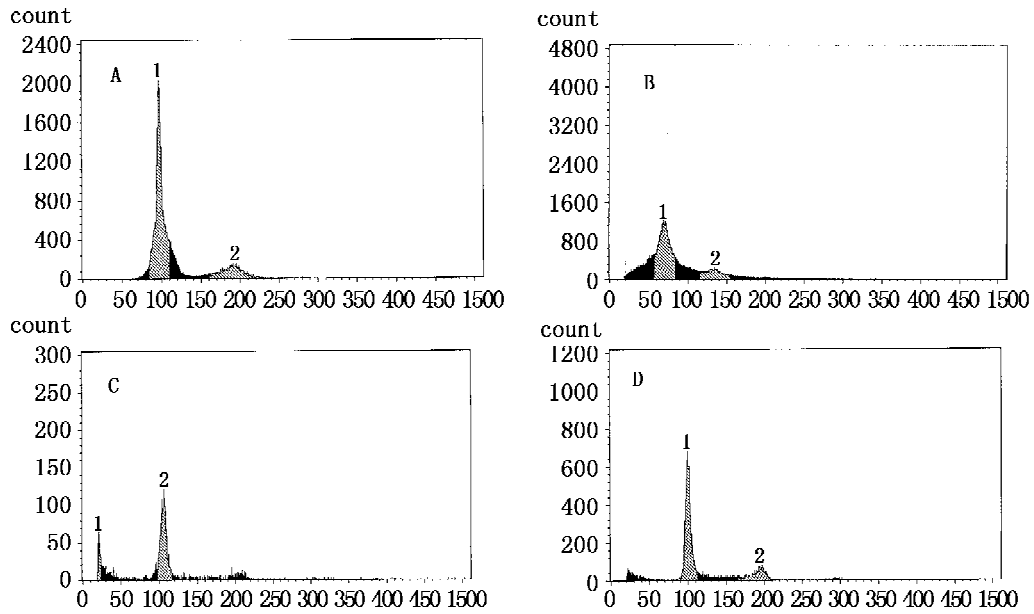


图3 犬齿牙鲆正常二倍体、雌核发育单倍体以及雌核发育二倍体 PA 分析结果

A. 正常二倍体;B. 同源精子诱导雌核发育单倍体;C. 同源精子诱导雌核发育二倍体;D. 异源精子诱导雌核发育二倍体

Fig.3 PA analysis on normal diploid, gynogenetic haploid and diploid

A. Normal diploid;B. Gynogenetic haploid induced with homologous sperm;C. Gynogenetic diploid induced with homologous sperm; D. Gynogenetic diploid induced with heterologous sperm

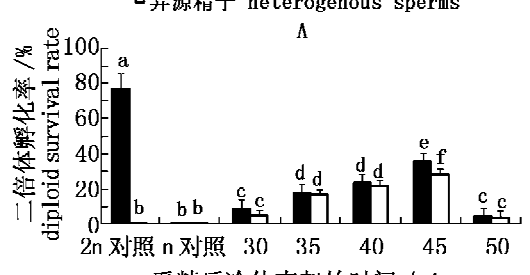
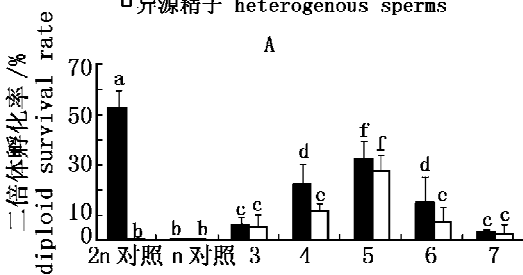
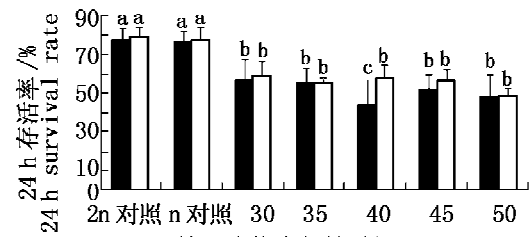
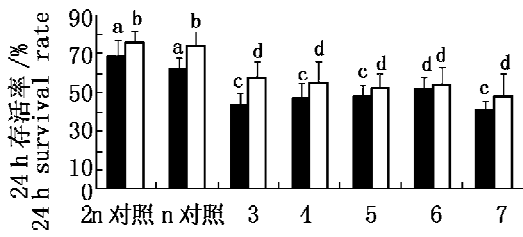


图4 冷休克起始时间对犬齿牙鲆雌核发育影响

A. 24 h 存活率(受精率);B. 二倍体孵化率

图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig.4 Effect of coldshock initiation time on gynogenesis

A. Survival rate after 24 hours;B. Hatching rate of diploid
Different superscript means significantly different (Pcoos)

图5 冷休克持续时间对犬齿牙鲆雌核发育影响

A. 24 h 存活率(受精率);B. 二倍体孵化率

图中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig.5 Effect of coldshock duration time on gynogenesis

A. Survival rate after 24 hours;B. Hatching rate of diploid
Different superscript means significantly different (Pcoos)

2.4 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犬齿牙鲷富集文库,从中筛选出多态性微卫星标记。然后用这些多态引物在母本和其异源精子诱导的雌核发育后代群体中进行扩增,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。采用犬齿牙鲷 Pade12 微卫星标记对一雌核发育家系进行扩增结果表明:其母本为杂合个体,但其 39 尾异源精子诱导的雌核发育后代全部所有个体都为纯合型,同样在所有检测的纯合个体中未见异于母体的等位基因,由此表明这批鱼苗是雌核发育鱼苗(图 6)。

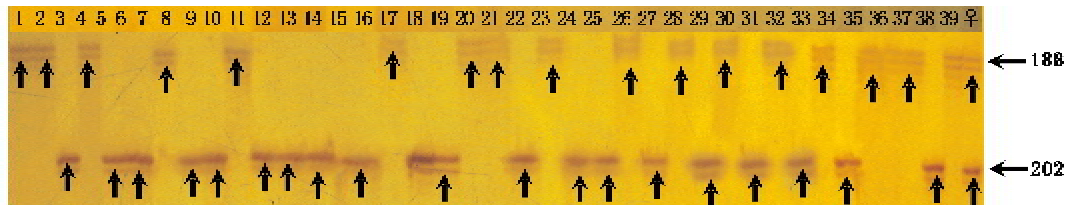


图 6 微卫星引物 Pade12 在一雌核发育家系上的分析结果

1~39 为雌核发育后代个体, ♀ 为母本个体, ↑ 示等位基因位点

Fig. 6 Analysis on the microsatellite primer Pade12 in a gynogenetic family

1-39 : gynogenetic offspring, ♀ : female, ↑ : allele site

3 讨论

3.1 精子灭活条件分析

精子采用紫外线进行处理,目的是要破坏其染色体遗传物质,但又不能使其失去激活卵子发育的能力。又由于同源精子或是可杂交的异源精子如果精子灭活不完全,在进行雌核发育诱导时,可产生正常的二倍体或是杂交个体,如不能从形态上和雌核发育二倍体个体相区别,则不能证明后代是否为雌核发育后代,因而要求灭活用的 UV 剂量越大灭活越完全最好。但 UV 的剂量加大,将会影响精子的受精能力以致于孵化率。因而在筛选灭活条件时,最佳的灭活条件为可以使精子遗传失活的最低 UV 剂量。

本研究中发现犬齿牙鲷精子的最佳紫外线照射剂量为 80 mJ/cm^2 ,与漠斑牙鲷^[7]、大西洋庸鲷^[11]、大菱鲆^[8]的相关研究结果类似。

不论是同源精子还是异源精子均没发现明显的哈维特效应,这可能是由于本研究中试验设置梯度较大所致。

3.2 异源冷冻精子在鱼类雌核发育中的作用

本研究证明了超远缘(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^[5]用石鲮精子诱导牙鲷雌核发育,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能进行雌核发育诱导,杂交情况下直接发育为雌核发育单倍体^[15]。

本研究通过筛选发现,花鲈精子是诱导犬齿牙鲷雌核发育的理想精子源。尽管花鲈精子可以和犬齿牙鲷卵杂交,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。它与 100% 适当失活的同源精子具有相同的功能,不仅能够有效激活卵子,同时单倍体和杂交双重致死效应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。使用同源失活精子进行诱导,不仅操作复杂,而且无法保证所获得的子代是 100% 雌核发育个体。可见,利用异源精子诱导犬齿牙鲷雌核发育是一种有益的尝试,也是一种值得推广的方法。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。

3.3 犬齿牙鲷雌核发育诱导条件

雌核发育诱导中染色体倍性恢复效果受处理起始时刻、处理持续时间和处理强度的影响,其中处理时刻对诱导结果影响最大^[25]。本研究通过正交试验得到犬齿牙鲷雌核发育的最佳诱导条件

为授精后的 5 min, 在 3 °C 进行冷休克处理 45 min。这一结果与漠斑牙鲆^[7]、牙鲆^[5] 雌核发育诱导的最佳条件都十分接近, 这是由于这几种鱼类均属于同一属, 生长条件也十分接近。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 2~4 °C 冷休克处理 10 min^[12], 大菱鲆 13 °C 下需要 6.5 min 开始冷休克最佳^[8]。造成这一差别的原因可能与不同鱼类耐受水温和对低温耐受时间不同有关。在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, 并且处理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。

3.4 雌核发育在犬齿牙鲆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^[26]。犬齿牙鲆雌性个体生长速度明显大于雄性个体^[27], 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, 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。犬齿牙鲆异源冷冻精子诱导的雌核发育技术的建立为犬齿牙鲆性别控制和全雌育种技术的建立提供了有效的技术手段。

3.5 雌核发育在犬齿牙鲆建立纯系上的作用

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, 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 Padel12 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。

参考文献:

[1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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, 27(1): 63 - 67.
- [4] 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, 15(7): 107 - 110.
- [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(自然科学版), 2005, 35(6): 1011 - 1016.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Castro J, Bouza C, Sánchez L, et al. Gynogenesis assessment using microsatellite genetic markers in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Marine Biotechnology, 2003, 5(6): 584 - 592.
- [10] 苏鹏志, 陈松林, 杨景峰, 等. 异源冷冻精子诱导大菱鲆的雌核发育[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 715 - 721.
- [11] 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.
- [12] 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 - 42.
- [13] 王晓清, 王志勇, 柳小春, 等. 人工雌核发育大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 的 AFLP 分析[J]. 海洋与湖沼, 2007, 33(1): 22 - 28.

- [14] 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.
- [15] 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, 16(11): 1206-1210.
- [16] Peruzzi S, Chatain B, Saillant E, *et al.* Production of meiotic gynogenetic and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: 1. Performances, maturation and carcass quality [J]. Aquaculture, 2004, 230(1-4): 41-64.
- [17] Peruzzi S, Chatain B. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability [J]. Aquaculture, 2000, 189(1-2): 23-37.
- [18] 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.
- [19] Francescon A, Libertini A, Bertotto D, *et al.* Shock timing in mitogynogenesis and tetraploidization of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* [J]. Aquaculture, 2004, 236(1-4): 201-209.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Berlinsky D L, William K V, Hodson R G, *et al.* Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1997, 28(1): 79-86.
- [23] Ji X S, Chen S L, Tian Y S, *et al.* Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization [J]. Aquaculture, 2004, 241(1-4): 517-528.
- [24] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存的理论和技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [25] 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.
- [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] Rountree R A, Able K W. Foraging habits, growth, and temporal patterns of salt-marsh creek habitat use by young-of-year summer flounder in New Jersey [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1992, 121(6): 765-776.

Gynogenesis induced by heterogenous sperms in summer flounder *Paralichthys dentatus*

YANG Jing-feng^{1,2,3}, CHEN Song-lin^{1,4}, XU Gen-bo¹, SU Peng-zhi¹,
LUO Xin-hui¹, SHAO Chang-wei¹, ZHAI Jie-ming⁵

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

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

3. Animal Science and Technology College, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028042, China;

4. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

Abstract: Effective methods for induction of diploid gynogenesis of the summer flounder *Paralichthys dentatus* are needed to initiate monosex culture, which will allow farmers to take advantage of the more rapid growth and larger size attained by females and will maximize profit potential for the culture of this species. To induce diploid gynogenesis in summer flounder, eggs were fertilized with heterogenous cryopreservative sperm of *Lateolabrax japonicus*, which was irradiated with UV ray to be genetically inactivated, and cold shock was used to prevent extrusion of the second polar body. Results indicated that, just like the homologous sperm of summer flounder, the cryopreservative sperm of *Lateolabrax japonicus* could induce diploid gynogenesis of summer flounder. Diploid gynogenesis was induced by activating egg development with UV irradiated sperm (80 mJ/cm^2 , the homologous or the heterogenous sperm) for 5 min in seawater at $18 \text{ }^\circ\text{C}$, and then subjecting the eggs to cold shock in $3 \text{ }^\circ\text{C}$ seawater for 45 min. And the diploid gynogenesis induction rates of the homologous sperm and the heterogenous sperm were $32.66\% \pm 7.03\%$ and $28.00\% \pm 6.48\%$, respectively. It was certified that the larvae were gynogenetic diploid by morphology, flow cytometry and microsatellite DNA analysis. It is the first time to report effective methods for induction diploid gynogenesis of the summer flounder by heterogenous cryopreservative sperm of *Lateolabrax japonicus*, which provides technological measures for sex control and genetic improvement of summer flounder.

Key words: *Paralichthys dentatus*; *Lateolabrax japonicus*; gynogenesis; heterogenous sperms; cold shock; microsatellite