

人工诱导湘云金鳊雌核发育的研究

孙远东^{1*}, 袁志栋¹, 谭树华¹, 范军豪¹, 周工健²

(1. 湖南科技大学生命科学院, 湖南 湘潭 411201;

2. 湖南湘云生物科技有限公司, 湖南 常德 415001)

摘要: 湘云金鳊的卵子经适宜 UV 剂量灭活处理的异源四倍体鲫精子激活后, 在 4~6 °C 下冷休克 11~13 min, 抑制第二极体排出和第一次卵裂使染色体加倍, 成功获得了极体雌核发育 (meiG) 和有丝分裂雌核发育 (mitG) 湘云金鳊二倍体个体。结果发现, 用异源四倍体鲫精子诱导获得 meiG、mitG 成活率可达到 19.4% ± 2.3% 和 7.3% ± 1.9%。运用形态学测量、染色体计数和微卫星标记技术对雌核发育二倍体个体 (meiG、mitG) 进行了分析, 其染色体数目为 48; 微卫星分析表明, 雌核发育二倍体基因组完全来自于母本, 没有受到父本染色体的污染, 证实其为雌核发育二倍体。对雌核发育湘云金鳊性腺发育进行连续跟踪观察, 所有雌核发育个体全为雌性, 其中 89% 的个体的卵巢发育正常, 为证明其雌性的性别决定类型为 XX 提供了证据。此外, 雌核发育湘云金鳊 F₁ 的体色较普通湘云金鳊的体色偏红。雌核发育湘云金鳊的获得对其体色的稳定、种质资源的遗传改良和性别决定的研究等具有一定意义。

关键词: 湘云金鳊; 雌核发育; 遗传育种; 体色

中图分类号: Q 343.2; S 917.4

文献标志码: A

鳊 (*Aristichthys nobilis*) 是我国重要的淡水养殖鱼类, 为中国的特有淡水鱼类资源。在普通鳊养殖过程中发现了体色突变为桔红色的个体, 此后经过长期定向选育, 获得了一个新的鳊养殖品系——湘云金鳊 (*Aristichthys nobilis* red var.)。由于湘云金鳊生长速度快、抗逆能力强、味道鲜美、鱼体色为桔红色, 深受渔业养殖户以及消费者的欢迎, 目前在四川、重庆、湖南等地养殖效果良好。湘云金鳊本身是一个突变品系, 虽然经过了定向选育, 其很多性状基因还处于杂合状态, 由于近亲繁殖的原因, 经济性状在养殖过程中出现了较严重的衰退, 表现为个体红颜色变浅、生长速度变慢、个体小型化等, 对生产造成严重影响, 因此, 通过生物育种技术改良并稳定湘云金鳊的品质成为大规模养殖亟待解决的问题。

人工诱导鱼类雌核发育在理论研究、生产实践上均具有重要意义, 其研究几乎涉及到所有的水产养殖鱼类, 广泛用于鱼类品种的选育和遗传

改良, 性别决定机制的鉴别, 基因定位及纯系建立等; 结合定向选育和杂交技术, 培育出了许多具生长快、体型好、繁殖力强和抗病能力强等优良性状的品系, 成为鱼类遗传育种研究工作最活跃领域之一, 如团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[1]、红鲫 (*Carassius auratus* red var.)^[2]、银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)^[3]、牙鲃 (*Paralichthys olivaceus*)^[4] 等。雌核发育是一种快速有效的遗传改良方法, 该技术对于繁殖周期较长的鱼类更具优势, 如用异源四倍体鲫精子诱导草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[5-6] 雌核发育, 获得抗病草鱼品系已被推广养殖, 取得了良好的效益。本研究通过摸索适宜的实验参数, 利用灭活的异源精子诱导湘云金鳊雌核发育, 明显提高了雌核发育二倍体的成功率, 目前已经建立了抑制第二极体排出和抑制第一次卵裂雌核发育湘云金鳊群体, 对研究其主要生物学特性, 为湘云金鳊的遗传性状稳定与改良奠定基础, 为湘云金鳊的性别决

收稿日期: 2014-09-01 修回日期: 2014-11-01

资助项目: 国家自然科学基金(青年)基金(31100914); 湖南省自然科学基金(青年)基金(08jj4010); 湖南省科学技术厅科技计划(2012NK3066); 湖南省教育厅科学研究项目(08C322); 湖南省生物发育工程及新产品研发协同创新中心项目(20134486)

通信作者: 孙远东, E-mail: syd@hnust.edu.cn

定机制和普通鳊遗传育种等提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

性成熟的雄性异源四倍体鲫鲤 (allotetraploid hybrids, 简称 A) 和雌性湘云金鳊 (简称 RBC) 均取自于湖南湘云生物科技有限公司。

在繁殖季节 (5—6 月), 选取性成熟的雄性异源四倍体鲫鲤和体表完好、腹部轮廓明显、性腺发育良好的雌性湘云金鳊, 注射鱼用绒毛膜促性腺激素 (HCG) 1 000 ~ 1 500 U/kg 和促黄体素释放激素类似物 (LRH-A₂) 4 ~ 6 μg/尾, 分两次进行注射, 雄鱼剂量减半, 按常规方法获取卵子和精子。

1.2 实验方法

精子灭活处理 参照文献 [2, 6] 方法, 异源四倍体鲫鲤精液用 Hank 氏液 (按 1:2) 稀释, 均匀涂布在预冷的培养皿上, 精液厚度约 0.1 ~ 0.2 mm。将培养皿置于冰盒上, 用 2 支 15 W 的紫外灯 (波长 254 nm) 照射精子, 灯管与精液面的距离为 10 ~ 12 cm, 照射处理在遮光布围成的暗室中进行, 并用摇床缓慢摇动培养皿 (转速为 30 ~ 40 r/min), 使精子被均匀照射。当快达到有效的照射剂量时 (照射 15 min 起), 每隔 3 min 在显微镜下观察精子活力以决定适宜的照射时间。处理过的精液盛在遮光的瓶子里, 置于冰箱 (4 °C) 中备用。为检测精子的处理效果, 用卵子与照射处理过的精子“受精”, 观察其受精率及单倍体鱼的孵化率, 以确定适宜的照射剂量。

卵子染色体加倍处理 选取质量较好的卵子进行雌核发育实验。本研究采用冷休克方法抑制第二极体排出和抑制第一次卵裂使卵子染色体加倍, 生产极体雌核发育个体 (meiG) 和有丝分裂雌核发育个体 (mitG), 通过设置温度梯度和处理时间对比实验, 获得了适宜的实验处理参数。实验水温 (24 ± 1) °C, 实验组皆为卵子与处理过的精子受精。实验组一为受精后 3 ~ 4 min, 受精卵分别放到 0 ~ 4, 4 ~ 6 和 6 ~ 8 °C 的冷水中处理 11 ~ 13 min; 实验组二为受精后 3 ~ 4 min, 受精卵分别置于 4 ~ 6 °C 冷水中处理 9 ~ 11, 11 ~ 13 和 13 ~ 15 min; 实验组三“受精卵”于受精后 20 ~ 23, 23 ~ 26 和 26 ~ 29 min, 分别置于 4 ~ 6 °C 冷水中处理 11 ~ 13 min。由于湘云金鳊 (♀) 与异源四倍体鲫鲤 (♂) 正常杂交是致死的, 仅设置两组

对照实验, 对照组一 (C1) 湘云金鳊自交, 用于检测卵子的质量; 对照组二 (C2) 湘云金鳊卵子与遗传灭活的异源四倍体鲫鲤精子受精, 但不进行染色体加倍处理, 作为单倍体对照。所有组别的受精卵分别置于孵化桶中流水孵化, 水温 23 ~ 26 °C。在相同的条件下, 实验组和对照组均设置了 3 次平行重复, 并对各组的受精率、孵化率及成活率进行统计。

雌核发育湘云金鳊群体 (meiG, mitG) 的建立及统计 从 2007 年至 2013 年, 每年均制备雌核发育湘云金鳊 (meiG, mitG), 每年实验用卵子来自同一湘云金鳊母本, 对不同的雌核发育鱼生长速度和成活率进行追踪检测和统计, 并对其体色进行对比观察。

染色体倍性检测 当实验鱼达到 I 龄时, 随机选取 6 尾雌核发育鱼 (meiG, mitG 各 3 尾), 5 尾对照组 (自交组合) 的鱼进行染色体观察, 有丝分裂中期染色体制备过程参照文献 [2, 7]: 采用肾细胞直接制片技术, 实验前按 6 ~ 8 μg/g 体质量的剂量注射 PHA 和按 2 ~ 3 μg/g 体质量的剂量注射秋水仙素, 解剖实验鱼, 取小块肾脏组织, 剪碎、吹打成细胞悬液, 用 0.075 mol/L KCl 低渗, 卡诺氏液 (甲醇: 冰醋酸为 3:1) 固定, 冷冻滴片, Giemsa 染色, 光镜观察。

性腺发育观察 实验鱼 (meiG, mitG) 下池 6 个月后进行第一次取材, 此后每年随机各选取 2 ~ 4 尾。取性腺组织, 用 Bouin 氏液固定, 系列酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 苏木精/伊红 (H. E) 染色, 透明胶封片, 光镜观察、拍照。

微卫星分析 利用微卫星技术, 对雌核发育湘云金鳊群体的遗传纯度进行分析。随机选取 10 尾雌核发育鱼 (meiG, mitG 各 5 尾)、5 尾普通湘云金鳊、5 尾异源四倍体鲫鲤, 参照 Sambrook 等 [8] 的标准酚/氯仿程序, 从实验鱼全血中提取基因组 DNA。微卫星引物 (hljy1920) 从鳊微卫星引物中筛选 [9-10]。微卫星 PCR 反应体系及程序参照 Liu 等 [11] 进行, 稍作修改, 微卫星 PCR 产物 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以 pBR322 DNA/MspI Marker 为标记, 银染。

2 结果

2.1 诱导湘云金鳊雌核发育的适宜参数

根据实验设计, 对照组一中湘云金鳊自交组合的受精率 (发育到囊胚期的成活率)、孵化率和

成活率(孵化后第7天开始摄食时正常鱼苗的比率)分别达到91.2%、83.5%和76.8%,表明实验用的卵子质量良好。对照组二即单倍体对照组的受精率达到了85.6%,与对照组一无明显差异,表明经遗传灭活的异源四倍体鲫鲤精子具有较好的受精能力,但对对照组二孵化率(59.3%)却明显低于对照组一,没有获得成活个体。实验组中,经不同休克温度、不同持续时间及不同冷休克起始时间处理后发现,冷休克温度为4~6℃,冷休克持续时间为11~13 min时获得雌核发育二倍体鱼的成活率相对较高,当冷休克温度低于4℃、持

续时间长于13 min时,对卵子的损伤较大,雌核发育二倍体鱼成活率低;而当冷休克温度高于6℃、持续时间短于11 min时,不能使卵子染色体完整的二倍化,导致雌核发育二倍体鱼成活率低。结合受精细胞学观察可知,水温(24±1)℃时,受精后3~4 min和23~26 min施加冷休克处理,分别可通过抑制第二极体的排出和第一次卵裂,达到卵子染色体加倍的效果。结果表明,诱导湘云金鳊雌核发育的适宜参数为受精后3~4 min (meiG)和23~26 min (mitG) 4~6℃冷休克处理11~13 min(表1)。

表1 不同冷休克温度、持续时间及起始时间诱导雌核发育二倍体的受精率、孵化率和成活率

Tab. 1 Effect of different temperatures, different duration and different activation time of cold shock on gynogenesis in red bighead carp

实验组别 experimental group	处理温度/℃ temperature	处理起始时间/min activation time	处理持续时间/min duration time	受精率/% fertility rate	孵化率/% hatch rate	成活率/% survival rate
实验组一 experimental group one	0~4	3~4	11~13	80.3±4.1	24.1±2.2	2.7±1.7
	4~6	3~4	11~13	81.9±2.5	29.6±2.4	16.6±3.0
	6~8	3~4	11~13	84.2±3.6	35.7±2.8	1.6±0.6
实验组二 experimental group two	4~6	3~4	9~11	81.3±3.2	25.0±2.7	1.9±0.6
	4~6	3~4	11~13	82.6±3.0	31.5±4.1	19.4±2.3
	4~6	3~4	13~15	80.5±2.9	21.6±1.5	0.7±0.5
实验组三 experimental group three	4~6	20~23	11~13	74.0±2.4	20.0±3.1	1.6±0.7
	4~6	23~26	11~13	75.9±1.9	28.6±2.4	7.3±1.9
	4~6	26~29	11~13	77.9±2.7	17.6±3.7	1.0±0.5
对照组一 diploid control				91.2±2.1	83.5±4.9	76.8±4.2
对照组二 haploid control				85.6±3.5	59.3±3.2	0

2.2 染色体计数

对随机选取用于性腺观察的实验鱼同时取肾脏组织进行染色体制片,中期染色体分裂相(50个/尾)染色体进行统计分析,雌核发育湘云金鳊染色体众数为44~49,处于众数范围内的细胞占观察细胞总数的86.7%,表明雌核发育鱼为正常的二倍体个体(2n=48)(图1),与普通湘云金鳊的染色体数目一致。

2.3 性腺发育特征

实验共观察了15尾meiG和12尾mitG的性腺,meiG和mitG性腺发育基本同步,6月龄雌核发育鱼的性腺处于第I期,呈半透明的细线状,以第I时相的卵原细胞为主,卵原细胞一般呈卵圆形,明显比周围体细胞大,胞质稀少,核大而清

晰;2~3龄实验鱼性腺呈扁带状,肉红色,性腺中以II时相卵母细胞为主,细胞体积增大,细胞质明显增多,细胞质嗜碱性,H.E染色呈深紫红色,核仁分散于核膜周围;4龄实验鱼性腺有少数处于第III期,该时期卵巢中的卵母细胞出现较薄的放射膜,膜外有两层扁平细胞构成的滤泡膜,在卵母细胞质的外围开始出现卵黄沉积和液泡;5龄雌核发育二倍体个体的性腺有处于第IV期卵巢,卵巢切面上大部分是IV时相的卵母细胞,卵母细胞核呈不规则的卵圆形,核膜皱状,放射膜厚,卵黄逐渐充满(图2)。实验发现所有检测的雌核发育鱼性腺都是卵巢,其中89%个体的性腺发育正常,11%个体为发育迟滞或异常卵巢型性腺,未检测到可挤出精液的个体。

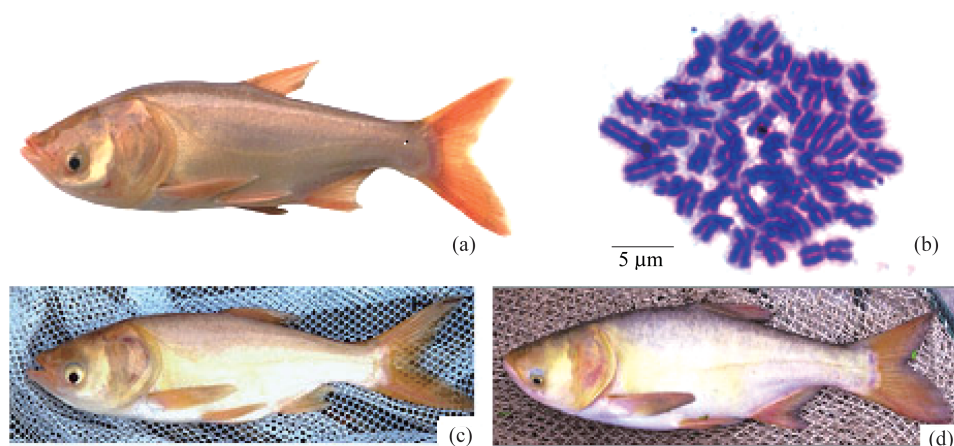


图1 雌核发育湘云金鳊的外形、体色及中期染色体分裂相

(a)雌核发育湘云金鳊体色;(b)雌核发育湘云金鳊中期染色体分裂相($2n=48$);(c)雌核发育湘云金鳊 F_1 的体色;(d)普通湘云金鳊自交 F_1 体色

Fig. 1 The appearance, body color and chromosome spreads at metaphase in gynogenetic red bighead carp

(a) The appearance of meiG; (b) chromosome spreads of meiG ($2n=48$); (c) the body color of offspring (gynogenetic red bighead carp (\varnothing) \times wild red bighead carp (δ)); (d) the body color of wild red bighead carp

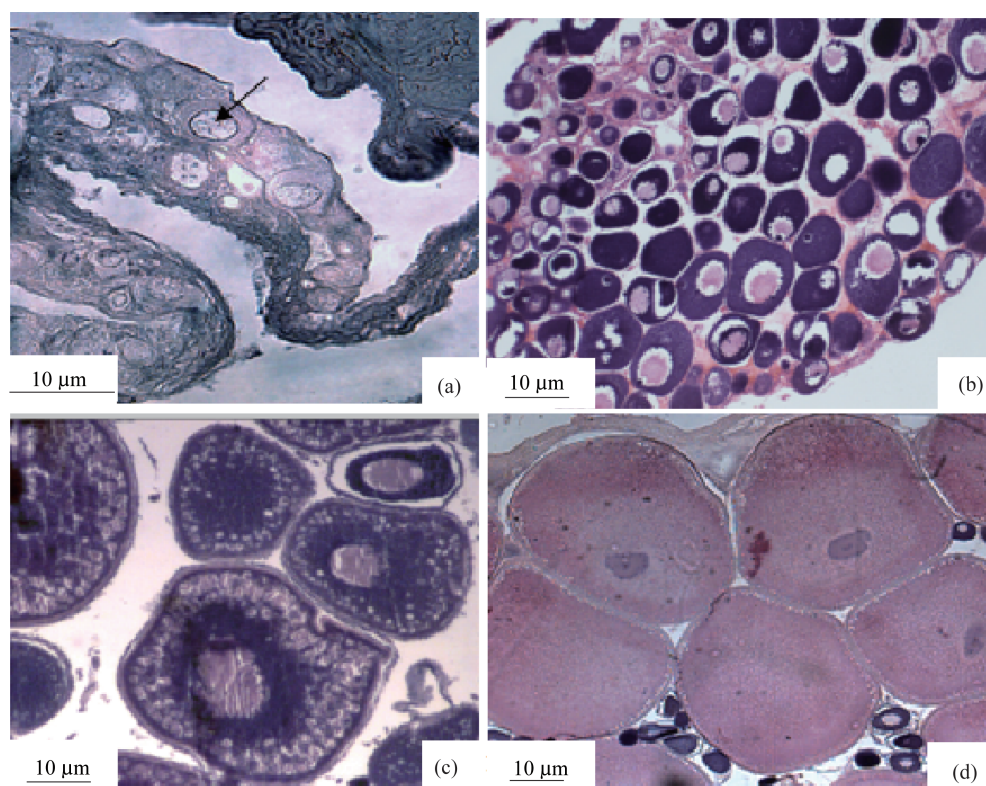


图2 雌核发育湘云金鳊性腺发育观察

(a)6月龄卵巢处为第I期卵巢,箭头示卵原细胞;(b)2~3龄卵巢已发育至第II期,主要可见同步发育的II时相初级卵母细胞;(c)4龄卵巢已发育至第III期,主要可见体积明显增大的初级卵母细胞;(d)5龄卵巢已发育至第IV期,主要可见IV时相成熟卵母细胞。标尺为 $10\mu\text{m}$

Fig. 2 The gonad microstructure of diploid gynogenetic red bighead carp

(a) The ovary of diploid gynogenetic red bighead carp at the age of 6 months showing PGCs in phase I, arrow showing PGCs; (b) The ovary at the age of 2-3 years mainly showing primary oocyte in synchronous in phase II; (c) The ovary at the age of 4 years showing big sized primary oocyte in phase III; (d) The ovary at the age of 5 years showing matured oocyte in phase IV. Bar = $10\mu\text{m}$

2.4 微卫星分子标记鉴定

从鳙及鲤 (*Cyprinus carpio*) 微卫星引物中筛选出在普通群体里杂合率较高,同时在雌核发育群体中纯合率较高的引物,对 5 尾 mitG, 5 尾 meiG, 5 尾普通湘云金鳙 (♀) 和 5 尾异源四倍体鲫鲤 (♂) 进行 PCR 扩增。采用引物 hljy1920 进

行 PCR 扩增,结果发现,5 尾 mitG 在该位点都是完全纯合的,而 5 尾 meiG 中发现了一个杂合个体。所有被检测的雌核发育个体中没有发现父本四倍体鲫鲤的遗传物质,表明雌核发育鱼基因组完全来自于母本,没有受到父本染色体的污染 (图 3)。

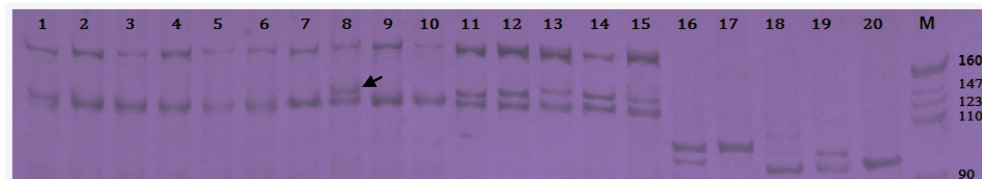


图 3 引物 hljy1920 在雌核发育湘云金鳙、普通湘云金鳙、四倍体鲫鲤群体中 PCR 扩增结果

1~5. 有丝分裂雌核发育湘云金鳙; 6~10. 极体雌核发育湘云金鳙; 11~15. 普通湘云金鳙; 16~20. 四倍体鲫鲤, 箭头所示第 8 号个体为杂合个体。M. pBR322 DNA/MspI Marker

Fig. 3 PCR amplification results generated with primers of hljy1920 in population of gynogenetic red bighead carp, common red bighead carp, allotetraploid hybrids

Lanes 1-5. represented 5 mitG grass carp; lanes 6-10. represented 5 meiG grass carp; lanes 11-15. represented 5 wild grass carp; lanes 16-20. represented 5 allotetraploid hybrids, arrow showing heterozygous allele of meiG red bighead carp. M represented pBR322 DNA/MspI marker

2.5 雌核发育湘云金鳙群体的建立

2007—2013 年,成功制备上万尾 meiG 和数千尾 mitG,选育出具优良性状的 meiG 1120 尾和 mitG 360 尾。在外形上,雌核发育湘云金鳙与普通湘云金鳙相似,头大,体侧扁,较高,口大端位,吻宽而圆,下颌向上微翘。背部及体侧为粉红色,腹部稍偏白,没有父本(异源四倍体鲫鲤)的外形特征。在体色方面,雌核发育湘云金鳙明显比自交对照组偏红(图 1-a),2007 年制备的雌核发育湘云金鳙已经达到性成熟,2012 年对其进行了繁殖实验,获得了批量的(雌核发育湘云金鳙 ♀ × 普通湘云金鳙 ♂)杂交鱼后代 F_1 , F_1 的体色也较普通湘云金鳙自交后代的偏红,表明通过雌核发育有效稳定了湘云金鳙的体色。

2 年对比养殖实验表明,在主养湘云金鳙种且不使用抗病疫苗的情况下, F_1 除极少感染发生细菌性烂鳃病例外,对流行危害大的细菌性肠炎和病毒性出血病基本不感染,生长速度比普通湘云金鳙快 10%~15%。

3 讨论

3.1 湘云金鳙雌核发育诱导方法的优化

人工诱导雌核发育在鱼类遗传育种、性别决定机制和单性养殖等方面具有重要的作用,雌核

发育的研究对象涉及到了多数的水产养殖鱼类,取得了一系列的成果^[12-13]。目前,人工诱导鱼类雌核发育的技术尚未标准化,在实践中往往存在成活率低,鉴定复杂的问题,要解决这些难题,需要不断完善雌核发育的关键技术(包括精子染色体的遗传失活以及卵子染色体的二倍体化)^[12]。关于精子染色体的遗传失活,90% 的研究者选择使用紫外线照射处理,但不同物种精子对照射剂量的需求不同,本实验选用四倍体鲫鲤精子所需要辐射剂量比鲤就要低很多,即便同物种不同个体之间紫外线照射剂量也存在一定的差异。因此,既要精子遗传物质完全失活,又不使其失去激活卵子启动发育的能力,通过显微镜检测精子灭活效果则非常必要。关于卵子染色体加倍常用方法是温度休克法,该方法操作简便,效果比较稳定,获得雌核发育二倍体的成功率较高^[14],影响的关键因素是休克处理起始时间及强度,受精细胞生物学观察可准确掌握第二极体排出及第一次卵裂发生的时序,起始时间可以此为依据。本实验获得了诱导湘云金鳙雌核发育的适宜参数:在水温 23~25 °C 条件下,受精后 3~4 min 用 4~6 °C 的水冷休克处理 11~13 min (meiG) 或受精后 23~26 min 用 4~6 °C 水冷休克处理 11~13 min (mitG)。

3.2 有效刺激源的选择

Kusunoki 等^[15]报道用泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)、鲤、长颌须鲷 (*Gnathopogon elongatus*) 3 种不同精子诱导泥鳅雌核发育, 卵子孵化率分别为 87%、22% 和 4%, 证实不同刺激源诱导效率差异显著。早前的研究也证实, 选择有效的刺激源(远缘精子)不仅能提高雌核发育鱼的成活率, 还能简化雌核发育鱼的鉴定, 在诱导红鲫^[2]、锦鲤^[16]雌核发育的研究中, 团头鲂是一种比鲤更有效的刺激源。本实验选用的异源四倍体鲫鲤的精子作为刺激源, 其产生的二倍体精子头部较大, 精液浓度适中, 易于稀释, 在照射处理过程中可均匀照射, 且所需处理时间较短, 遗传灭活效果理想, 是诱导湘云金鳊雌核发育的有效刺激源, 其成活率达 $19.4\% \pm 2.3\%$, 高于用鲤精子诱导获得的成活率 $10.3\% \pm 1.9\%$ 。异源四倍体鲫鲤(δ) \times 湘云金鳊(♀)是杂交致死, 与草鱼的雌核发育研究结果相似^[6], 这就可简化对雌核发育个体的检测鉴定, 适合生产实践应用。

3.3 雌核发育湘云金鳊选育的生物学意义

湘云金鳊是经定向选育获得的突变品系, 在繁养殖过程中, 其性状发生了衰退, 主要表现为体色变淡, 生长速度下降, 已不利于规模化生产。因此, 通过生物技术稳定湘云金鳊的体色, 提高生长速度和改良生物学性状是其遗传育种中亟待解决的问题。本研究以灭活的异源四倍体鲫鲤精子为刺激源, 采用冷休克制备雌核发育湘云金鳊, 并通过染色体计数和微卫星分析等方法鉴定其为雌核发育个体。雌核发育湘云金鳊的体色明显比普通湘云金鳊偏红, 且其后代 F_1 的体色也较普通湘云金鳊自交后代的偏红, 表明通过雌核发育可有效稳定湘云金鳊的体色; 通过对比发现, 雌核发育湘云金鳊产生 F_1 的生长速度比普通湘云金鳊快 10%~15%, 从而表明, 利用雌核发育稳定湘云金鳊性状是可行的。

实验对 I~V 龄的雌核发育湘云金鳊的性腺发育进行了追踪观察, 检测发现所有的雌核发育鱼性腺都是卵巢, 其中 89% 个体的性腺发育正常, 11% 个体为发育迟滞或异常卵巢型性腺, 未检测到精巢型性腺或可挤出精液的个体, 为初步揭示雌性湘云金鳊性别决定机制为 XX 提供了重要证据。利用具优良性状雌核发育鱼结合定向选育, 可获得具优良性状的湘云金鳊养殖品系, 雌核

发育湘云金鳊的研究在生产实践和理论研究中都具有重要意义。

研究得到湖南师范大学鱼类发育实验室刘少军老师、张纯老师的指导和帮助, 谨致谢忱!

参考文献:

- [1] Zou S M, Li S F, Cai W Q, et al. Establishing gynogenetic groups of genetic improved *Megalobrama amblycephala* and its genetic analysis [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(4): 311-316. [邹曙明, 李思发, 蔡完其, 等. 团头鲂良种雌核发育群体的建立及其遗传变异. 水产学报, 2001, 25(4): 311-316.]
- [2] Sun Y D, Tao M, Liu S J, et al. Induction of gynogenesis in red crucian carp using spermatozoa of blunt snout bream [J]. *Progress in Natural Science*, 2006, 16(12): 1633-1638. [孙远东, 陶敏, 刘少军, 等. 用团头鲂精子诱导红鲫雌核发育的研究. 自然科学进展, 2006, 16(12): 1633-1638.]
- [3] Wu Q J, Gui J F. Fish genetics and breeding engineering [M]. Shanghai: Scientific and Technology Publisher, 1999: 197-200. [吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程. 上海: 上海科学与技术出版社, 1999: 197-200.]
- [4] Ge W H, Zhang Q Q, Qi J, et al. Gynogenesis induced by heterogenous sperms and cold shock in olive flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Periodical of Ocean University of China: Natural Science Edition*, 2005, 35(6): 1011-1016. [戈文龙, 张全启, 齐洁, 等. 异源精子诱导牙鲆雌核发育二倍体. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2005, 35(6): 1011-1016.]
- [5] Luo C, Liu Y. Studies on production of gynogenetic grass carp and crucian carp [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 1991, 14(2): 154-159. [罗琛, 刘筠. 人工诱导草鱼和鲫鱼雌核发育的研究. 湖南师范大学自然科学学报, 1991, 14(2): 154-159.]
- [6] Zhang H, Liu S J, Zhang C, et al. Induced gynogenesis in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) using irradiated sperm of allotetraploid hybrids [J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13: 1017-1026.
- [7] Sun Y D, Zhang C, Liu S J, et al. Induction of gynogenesis in Japanese crucian carp (*Carassius cuvieri*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(5):

- 405 - 412.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 463 - 468.
- [9] Geng B, Sun X W, Liang L Q, *et al.* Microsatellite analysis of genetic diversity of *Aristichthys nobilis* in China [J]. *Hereditas*, 2006, 28 (6): 683 - 688. [耿波, 孙效文, 梁利群, 等. 利用 17 个微卫星标记分析鳊鱼的遗传多样性. *遗传*, 2006, 28 (6): 683 - 688.]
- [10] Yan B, Peng L Y, Xie W M, *et al.* RAPD and microsatellite analysis of red bighead carp (*Aristichthys nobilis*) [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2011, 20 (1): 54 - 60. [严斌, 彭亮跃, 谢伟民, 等. 新型湘云金鳊遗传多样性的 RAPD 及微卫星分析. *激光生物学报*, 2011, 20 (1): 54 - 60.]
- [11] Liu S J, Qin Q B, Wang Y Q, *et al.* Evidence for the formation of the male gynogenetic fish [J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 12: 160 - 172.
- [12] Liu Y. Propagation physiology of main cultivated fish in China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1993: 135 - 137. [刘筠. 养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 中国农业出版社, 1993: 135 - 37.]
- [13] Lou Y D. Artificial gynogenesis and its application on genetic and breeding aquatics [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1986, 10 (1): 111 - 123. [楼允东. 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用. *水产学报*, 1986, 10 (1): 111 - 123.]
- [14] Yang Y Q. The research on the introduction of gynogenesis of fish [J]. *Freshwater Fishery*, 1981, 4: 1 - 4. [杨永铨. 人工诱导鱼类雌核发育的实验研究. *淡水渔业*, 1981, 4: 1 - 4.]
- [15] Kusunoki K, Arai K, Suzuki R. Production of viable gynogens without chromosome duplication in the spinous loach *Cobitis biwae* [J]. *Aquaculture*, 1994, 119: 11 - 23.
- [16] Liu Q Z, Xiao J, Luo K K, *et al.* Genetic, gonadal development and shape characteristics researches of gynogenetic orange ornamental carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37 (3): 390 - 396. [刘启智, 肖军, 罗凯坤, 等. 雌核发育橙黄色锦鲤的遗传、性腺发育及外形特征. *水产学报*, 2013, 37 (3): 390 - 396.]

Induction of gynogenesis in red bighead carp (*Aristichthys nobilis* red var.)

SUN Yuandong^{1*}, YUAN Zhidong¹, TAN Shuhua¹, FAN Junhao¹, ZHOU Gongjian²

(1. School of Life Sciences, Hunan University of Science & Technology, Xiangtan 411201, China;

2. Hunan Xiangyun Biology Science and Technology Limited Company, Changde 415001, China)

Abstract: Gynogenesis was induced in red bighead carp (*Aristichthys nobilis* red var.) eggs using the UV-irradiated diploid sperm of allotetraploid hybrids, which were derived from crossing of red crucian carp (♀) × common carp (♂), with cold shock treatment in 4 – 6 °C water for 11 – 13 min to make chromosome doubled. Different initiation time of treatments resulted in two types of diploid gynogenetic red bighead carp: meiotic gynogenetic (meiG) and mitotic gynogenetic (mitG). The survival rates of meiG and mitG were 19.4% ± 2.3%, 7.3% ± 1.9% respectively. The gynogenetic fish were confirmed by morphological characteristics, chromosome counting, and microsatellite DNA analysis. The results showed that both meiG and mitG gynogenetic fish were identified as diploid with 48 chromosomes, which produced exclusively bands being same as that in maternal parents and discriminated from that in allotetraploid hybrids by microsatellite DNA analysis. All the gynogenetic fish were female, 89% of which showed normal ovary development. It provided important data for suggesting XX genotype in female red bighead carp. In addition, the body color of gynogenesis offspring (gynogenetic red bighead carp (♀) × wild red bighead carp (♂)) was redder than that in wild red bighead carp. The formation of gynogenetic red bighead carp should be a valuable contribution to body color non-degradation, genetic improvement in fish breeding, as well as sex determination researches in fish.

Key words: *Aristichthys nobilis* red var.; gynogenesis; genetic breeding; body color

Corresponding author: SUN Yuandong. E-mail: syd@hnust.edu.cn