

花鲈冷冻精子诱导漠斑牙鲆雌核发育

杨景峰^{1,2}, 陈松林^{1*}, 徐亘博¹, 苏鹏志¹, 田永胜¹, 翟介明³, 李波³

(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. 内蒙古民族大学动物科技学院,内蒙古 通辽 028042;

3. 山东莱州明波水产有限公司,山东 莱州 261418)

摘要: 采用紫外线(UV)对冻存的花鲈精子进行照射使其遗传物质失活,作为异源精子诱导源,与漠斑牙鲆卵子进行“授精”,可以诱导漠斑牙鲆卵进行雌核发育。结合静水压处理,抑制第二极体排出,成功获得了漠斑牙鲆雌核发育二倍体鱼苗。实验表明,同源精子和异源精子均可在紫外线照射遗传失活后诱导漠斑牙鲆卵雌核发育,经实验筛选出异源精子诱导漠斑牙鲆雌核发育的最佳条件为花鲈冻存精子采用 80 mJ/cm² 的紫外线照射,然后与漠斑牙鲆卵子进行授精,培育水温 18 ℃ 条件下,受精后 4~5 min,施以 65 MPa 的静水压休克处理 6 min,可有效诱导漠斑牙鲆的雌核发育。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。本文首次报道了采用异源冷冻精子诱导漠斑牙鲆鱼卵进行雌核发育的技术方法,为漠斑牙鲆性别控制和遗传改良提供了技术手段。

关键词: 漠斑牙鲆; 花鲈; 雌核发育; 异源冻存精子; 静水压休克

中图分类号: Q 132.4; 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,首先在淡水鱼类遗传育种的相关研究中迅速开展,由于其母本遗传的特殊性,雌核发育技术在基因作图与纯系的快速建立、生产单性种群等方面有广泛的应用前景^[1]。由于大多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遗传育种研究的热点^[2]。

目前,国内外水产工作者通过人工诱导海水鱼类雌核发育,已经成功获得了褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[3-5]、漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)^[6]、条斑星鲆(*Verasper moseri*)^[7]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[8-10]、大西洋庸鲆(*Hippoglossus hippoglossus*)^[11]、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*, 现名 *Larimichthys crocea*)^[12-14]、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[15-16]以及半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)^[17]等海水养殖经济鱼类的雌核发育鱼苗,建立了相关鱼类雌核发育诱导方法。

漠斑牙鲆,俗称南方鲆,隶属硬骨鱼纲

(Osteichthyes)、鲽形目(Pleuronectiformes)、鲽亚目(Pleuronectoidei)、鲆科(Bothidae)、牙鲆亚科、牙鲆属,属深海底栖鱼类,原产于北美洲,是美洲众多鲆鲽鱼类中个体最大的一种,自然分布于美国北卡罗莱纳州至佛罗里达州南部海湾,得克萨斯州南部海峡沿岸也有分布。美国自上世纪 90 年代初开始研究漠斑牙鲆繁育及养殖技术,在生理、生态、人工繁殖及养殖技术方面已取得突破,漠斑牙鲆的养殖已成为国际上迅速发展起来的一个新兴养殖产业。漠斑牙鲆雌雄个体生长速度存在明显的差异,因而进行漠斑牙鲆雌核发育研究有十分重要的意义和应用价值。

精子的遗传失活和染色体加倍是雌核发育的两个关键步骤^[1]。在鱼类雌核发育研究中,大多数学者以经 UV 照射过(遗传失活)的同源精子作为诱导精子,但相关研究表明,遗传失活后的精子活力和 UV 的强度成反比^[6,9],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,雌核发育鱼苗中混有正常二倍体的问

收稿日期:2010-03-07 修回日期:2010-05-31

资助项目:国家公益性行业(农业)科研专项经费项目资助(200903046)

通讯作者:陈松林, Tel:0532-85844606, E-mail:chenst@ysfri.ac.cn

题。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鱼苗,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致死效应,可以确保得到 100% 雌核发育鱼苗。尽管漠斑牙鲆雌核发育的研究国外有过报道,但他们采用新鲜精液进行诱导^[6],而有关异源冷冻精子诱导漠斑牙鲆雌核发育的研究,目前尚未见报道。本研究采用冷冻保存的花鲈精子诱导漠斑牙鲆卵子雌核发育,结合静水压法对单倍体胚胎进行染色体加倍,成功诱导出雌核发育二倍体漠斑牙鲆鱼苗,为全雌漠斑牙鲆研制和应用奠定了基础,提供了技术手段。

1 材料与方 法

1.1 实验用鱼

实验用漠斑牙鲆亲鱼,由莱州明波水产有限公司提供,为 3~4 龄经产鱼,选择性腺已经开始发育、无病害的个体,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 °C 逐渐降至 18 °C 左右时,雌性亲鱼性腺开始发育,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 LRH-A3 (2 mg/kg, 宁波激素二厂)^[18-19]。雄鱼剂量减半注射。24 h 后人工挤出精卵备用。

实验用花鲈雄鱼,为渤海海捕鱼苗,养至 3 龄,在养殖水温降至 14 °C 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,花鲈精子的冷冻保存按照文献[20-21]的方法进行。

1.2 精子遗传物质失活

取冻存花鲈精子,37 °C 快速解冻,每 250 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,参照文献[7,22]中的花鲈精子紫外照射的有效剂量,分别用 uvc 500 crosslinker 80 mJ/cm^2 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。

取新鲜漠斑牙鲆精子,每 100 μL 用 3 mL 的 MPRS 溶液稀释,平铺于 $D=9$ cm 的预冷培养皿中,用 uvc 500 crosslinker 按 80 mJ/cm^2 进行失活,失活后立即与漠斑牙鲆的卵授精。

1.3 异源精子诱导雌核发育能力分析

为了证明杂交对诱导雌核发育的影响进行如

下试验,试验方案见表 1。试验分为 4 个试验组,试验组 1 为杂交组,用未失活花鲈精子与漠斑牙鲆卵直接授精;试验组 2 为杂交休克组,用未失活精子授精,于授精后的 5 min,采用 65 MPa 的静水压休克处理 6 min;试验组 3 为失活未休克组,花鲈精子用 80 mJ/cm^2 剂量的 UV 进行遗传失活,然后进行人工授精;试验组 4 为失活休克组,用上述失活处理的精子授精,并进行同试验组 2 一致的休克处理。用新鲜漠斑牙鲆精子,进行同样试验作为对照,同时检验同源精子诱导雌核发育能力。受精卵在水槽中静水孵化,并于受精后的 12 h (原肠中期)、48 h (眼囊期)、72 h (孵化期) 和 144 h (孵化后存活 3 d) 分别计数存活率。

表 1 异源精子诱导能力试验方案

Tab. 1 Test scheme of induction of gynogenesis in southern flounder using heterologous sperm

分组 groups	精子种类 sperm	精子 遗传失活 inactivated sperm	静水 压休克 pressure
对照组 1 control group 1	同源精子 homologous sperm	-	-
对照组 2 control group 2	同源精子 homologous sperm	-	+
对照组 3 control group 3	同源精子 homologous sperm	+	-
对照组 4 control group 4	同源精子 homologous sperm	+	+
试验组 1 experimental group 1	异源精子 heterologous sperm	-	-
试验组 2 experimental group 2	异源精子 heterologous sperm	-	+
试验组 3 experimental group 3	异源精子 heterologous sperm	+	-
试验组 4 experimental group 4	异源精子 heterologous sperm	+	+

注: + 代表该试验组施以相应处理, - 代表该组不进行相应处理。

Notes: + means this group applies the treatment, and - means this group does not apply the treatment.

各组孵化鱼苗按 1.5 方法用 PA 进行 DNA 含量检测。

1.4 雌核发育诱导条件确定

用静水压机(日本大丘)进行二倍化处理,根据预实验结果,静水压条件设置为 65 MPa 的静水压休克处理 6 min。将花鲈精子解冻后按上述方案进行失活处理,然后与漠斑牙鲆卵进行授精,分别设 3,4,5,6,7 min,5 个处理时刻进行静水压

处理。处理完成后 18 °C 水温孵化,各组受精卵的受精和发育状况在倒置显微镜下进行观察,并计数雌核发育二倍体诱导率。

1.5 倍性分析

采用初孵仔鱼形态学特征鉴定雌核发育单倍体和二倍体。由于单倍体呈“单倍体综合症”,根据其头、体、尾部等明显特征与二倍体相区分。同时利用倍性分析仪检测细胞中 DNA 相对含量,鉴定各实验组初孵仔鱼雌核发育单倍体、雌核发育二倍体和三倍体。采取单尾初孵仔鱼整鱼,分别加一步法试剂并捣碎、过 200 目筛绢、并用 Partec 生产的 PA 进行倍性分析。二倍体对照组初孵仔鱼的 DNA 相对含量设为 100。

1.6 雌核发育二倍体微卫星标记鉴定

基因组 DNA 的提取 采取高盐法提取漠斑牙鲆雌核发育鱼和漠斑牙鲆母本基因组 DNA。首先将样品用酒精固定,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 °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 °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, 0.5 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 °C 热变性 5 min,然后进行 38 个循环,每个循环包括 94 °C 变性 30 s, 56 ~ 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s,最后在 72 °C 延伸 10 min。用于雌核发育漠斑牙鲆检测的 PCR 引物为 Pale11 (Genbank: EF581790),其序列为:

L:ACCGCTGATGCCGTTTGGGAT,

R:TACCCACACAAGATGGATGGAGAA。

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 °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。

1.7 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 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 经过失活的精子和正常卵受精后所孵化的个体呈明显的体短、弯曲、卵黄囊变粗大等特征(图 1-A),具典型的单倍体综合症特征。经过静水压加倍可以获得雌核发育二倍体鱼苗,其与正常二倍体鱼苗在形态学上没有表现出明显差异(图 1-B)。

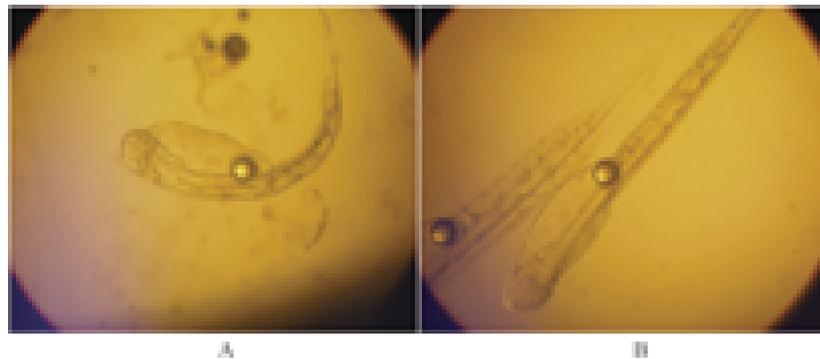


图 1 漠斑牙鲆雌核发育二倍体及雌核发育单倍体初孵仔鱼形态

A. 异源精子诱导雌核发育单倍体; B. 异源精子诱导雌核发育二倍体。

Fig. 1 Larvae morphology in gynogenetic haploid and diploid

A: Gynogenetic haploid induced with homologous sperm; B: Gynogenetic diploid induced with homologous sperm.

DNA 相对含量流式细胞仪分析 异源精子诱导雌核发育二倍体仔鱼细胞中 DNA 相对含量结果见图 2。正常二倍体对照组 DNA 含量 Gain 值设为 100 (图 2-A), 而雌核发育二倍体 DNA 含量同正常二倍体一样, PA 检测主峰也在

100 (图 2-B), 而三倍体主峰则在 150 附近 (图 2-D)。花鲈精子和漠斑牙鲈卵杂交试验组的分析材料是原肠后期胚, 所以杂质较多, 峰型较乱, 但仍能看出 DNA 相对值明显低于 100, 介于 50 和 100 之间 (图 2-C), 说明是非整倍体。

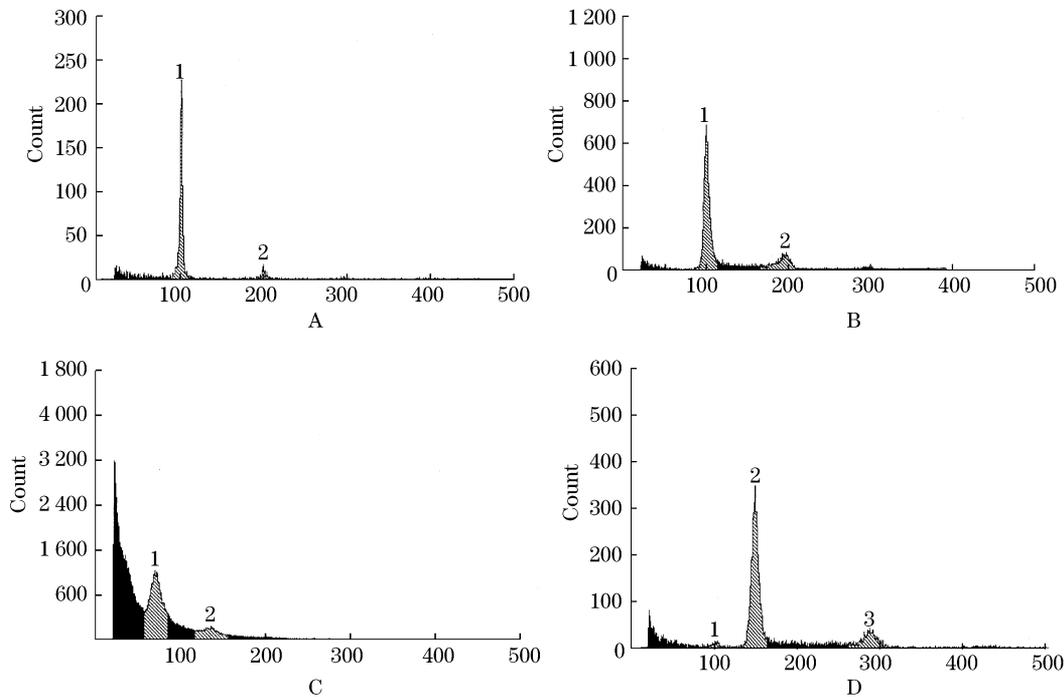


图 2 异源精子诱导漠斑牙鲈雌核发育能力试验 PA 分析结果

A. 正常二倍体(对照组 1); B. 雌核发育二倍体(试验组 4); C. 杂交后代(试验组 1); D. 三倍体(对照组 2)。

Fig. 2 PA analysis on normal diploid, gynogenetic haploid and diploid

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

2.2 不同精子诱导雌核发育能力分析

同源精子诱导能力 同源精子诱导能力分析结果见图 3-A, 对照组 1 为正常人工授精组, 在试验所设定的 4 个时期存活率变化不大, 所孵化鱼苗形态正常, 并可以正常存活 3 d 以上; 对照组 2 未对精子进行遗传失活, 但进行了静水压休克, 该组有成活 3 d 以上个体出现, 形态正常, 经 PA 检测大部分为二倍体, 但也有部分三倍体存在 (图 2-D), 二倍体应为静水压休克但没能成功染色体加倍部分; 对照组 3 精子由于进行了遗传失活, 虽也有部分胚胎成活到孵化期, 但所孵鱼苗表现为头小、身体弯曲, 表现为“单倍体综合症”, 在孵出后的 3 d 内全部死亡, 也说明可能是单倍体。对照组 4 精子经遗传失活并进行了静水压休克, 出现少量成活 3 d 以上个体检测全部为二倍体, 该部分个体应为同源精子诱导的雌核发育二

倍体。

异源精子诱导能力 异源精子诱导能力分析结果见图 3-B, 各试验组在 12 h 的存活率较高, 表明花鲈精子具有和漠斑牙鲈杂交的能力。但对试验组 1 (杂交组) 胚胎发育观察的结果表明, 胚胎在原肠胚以前发育和同源精子、杂交组胚胎发育形态基本一致, 但在原肠期以后, 出现体节不能正常形成, 尾部成弥散状等现象, 胚胎在发育到眼囊期之前即全部死亡。由图 3-B 可见, 作为杂交组的试验组 1 和杂交休克组的试验组 2 没有鱼苗孵出, 均说明了花鲈精子和漠斑牙鲈杂交不能存活。而用失活的精子, 不进行静水压处理的试验组 3, 和同源精子一样, 在 72 h 还存活较多个体, 但这些个体形态异于正常个体, 全部为畸形胚胎, 具有明显的单倍体特征, 由于杂交组胚胎在这一时期已经全部死亡, 因而可以排除这一时期胚胎

是杂交致畸的可能性;同对照组3一样,试验组3在144 h已没有存活胚胎,说明该组没有二倍体胚胎出现,所有孵化的胚胎均为单倍体。试验组4由于同时进行了失活和休克处理,孵出部分可存活到144 h的鱼苗,经PA检测这些鱼苗为二倍体(图2-B),结合前述分析,这部分鱼苗应为异源精子诱导的雌核发育的二倍体鱼苗。

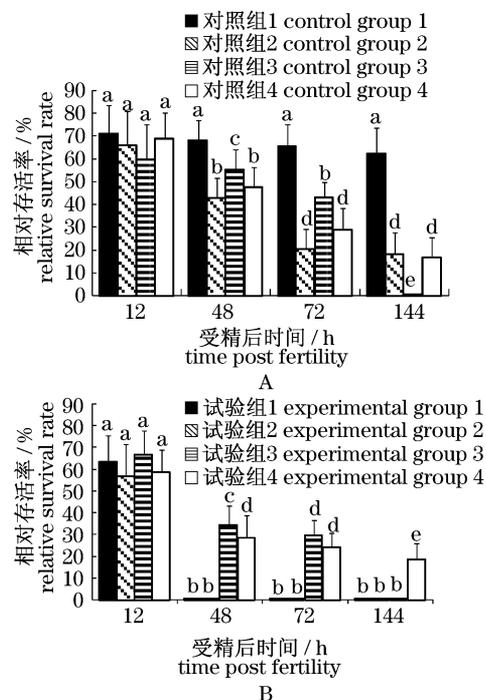


图3 不同精子诱导漠斑牙鲆雌核发育能力分析
A: 漠斑牙鲆精子; B: 花鲈精子。

Fig. 3 Induction of gynogenesis in southern flounder using heterologous sperm

A: sperm of southern flounder; B: heterologous sperm.
Different superscript means significantly different, $P < 0.05$.

2.3 静水压休克诱导条件的确定

经遗传失活花鲈精子授精后,在不同时间进行65 MPa的静水压休克处理6 min。结果表明,静水压休克对受精率稍有影响,各处理组同对照

组差异不明显。授精后3 min到7 min开始进行静水压处理均能诱导出雌核发育二倍体鱼苗,但在第4和第5分钟,两个处理组的二倍体诱导率较高分别为 $13.95\% \pm 2.13\%$ 和 $16.13\% \pm 5.12\%$,明显高于其它处理组($P < 0.05$),根据这一结果,可以确定,漠斑牙鲆雌核发育静水压诱导的最佳起始时间为授精后的4~5 min(图4)。

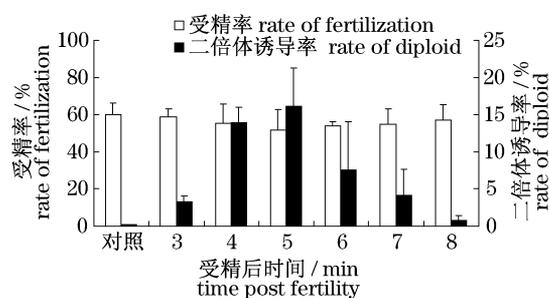


图4 静水压休克起始时间对漠斑牙鲆雌核发育影响
Fig. 4 Effect of pressure shock initiation time on gynogenesis

2.4 雌核发育鱼苗的微卫星标记鉴定

采用漠斑牙鲆 Pale11 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,该雌核发育家系的39尾鱼苗中,只有9尾为杂合型,其余全部为纯合型,杂合率为23.08%。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5)。

3 讨论

3.1 异源冷冻精子在鱼类雌核发育中的作用和意义

异源精子作为诱导鱼类雌核发育的精子源,以前一般选用亲源关系较近,并且杂交能够存活种类的精子来进行,如戈文龙等^[5]用石鲮精子诱导牙鲆雌核发育,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

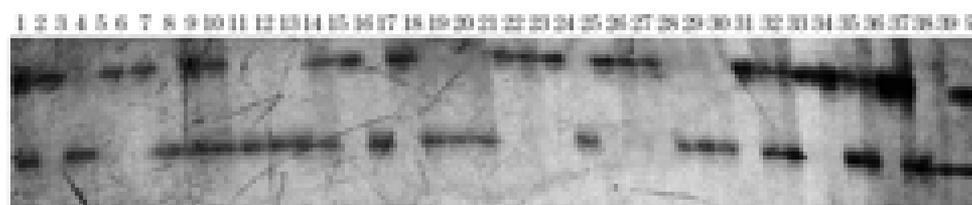


图5 微卫星引物 Pale11 在一雌核发育家系上的分析结果

1~39 为雌核发育群体个体, ♀ 为母本。

Fig. 5 Analysis on the microsatellite primer Pale11 in a gynogenetic family

1-39: gynogenetic offspring, ♀: female.

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进行雌核发育诱导,杂交情况下,使用未经失活的浅色黄姑鱼精子诱导大黄鱼雌核发育,获得了大黄鱼雌核发育单倍体^[14]。

本研究通过筛选发现花鲈精子是诱导漠斑牙鲆雌核发育的理想精子源。尽管花鲈精子可以和漠斑牙鲆卵杂交,但杂交个体只能发育到眼囊期。失活后的精子与 100% 遗传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诱导所无法比拟的。使用同源失活精子进行诱导,UV 的失活剂量太大对授精有较大影响,而失活剂量太小,又可能导致精子的不完全失活而存在正常授精个体。可见,利用异源精子诱导漠斑牙鲆雌核发育是一种有益的尝试,也是一种值得推广的方法。

Adam 等^[23] 在应用鲱精子诱导漠斑牙鲆试验中发现,鲱精子可以和漠斑牙鲆卵授精,并且在多细胞期可以正常发育,但是杂交胚胎在孵化前全部死亡;利用遗传失活的鲱精子,也诱导出了雌核发育的二倍体漠斑牙鲆,和本研究所取得的结果一致。

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,所以利用精子冷冻保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,大大方便了鱼类雌核发育诱导实验的进行。

3.2 静水压诱导漠斑牙鲆雌核发育的诱导条件

据桂建芳等^[24] 的研究,静水压对受精卵的休克作用主要表现为破坏第二次减数分裂的有丝分裂器。本研究通过试验表明,在 18 °C 下漠斑牙鲆雌核发育的最佳静水压诱导时间为授精后的 4 ~ 5 min,这一结果与其它学者采用冷休克诱导漠斑牙鲆雌核发育中观察到的结果基本一致^[23],说明受精后的第 4 ~ 5 分钟处于诱导雌核发育的敏感期。在其他鱼类的相关研究中,与漠斑牙鲆生长条件也十分接近的褐牙鲆^[5] 休克处理的最佳时期也是在受精后 5 min 左右,而大菱鲆 13 °C 下需要 6.5 min 开始冷休克最佳^[9],造成这一差别的原因可能与在不同温度下,不同鱼类胚胎发育的

速度不尽相同有关。

3.3 雌核发育在漠斑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。漠斑牙鲆雌性个体生长速度明显大于雄性个体,如进行全雌性苗种养殖将明显提高养殖产量,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。异源冷冻精子诱导的漠斑牙鲆雌核发育技术的建立为漠斑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。

3.4 雌核发育技术在漠斑牙鲆纯系建立上的作用

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 Pale11 微卫星标记上高度纯合,证明了雌核发育技术在快速建立纯系上是有效的技术方法,可以在漠斑牙鲆良种选育上进行推广应用。

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, 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] 杨景峰,陈松林,苏鹏志,等. 异源精子诱导条斑星鲽雌核发育的研究[J]. *水产学报*, 2009, 33(3):372-378.
- [8] 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.
- [9] Piferrer F, Cal R M, Gómez 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.
- [10] Castro J, Bouza C, Sanchez L, *et al.* Gynogenesis assessment using microsatellite genetic markers in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5(6):584-592.
- [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] 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, 38(1):22-28.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [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] 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.
- [18] Lasswell J L, Lyons B W, Bailey W H. Hormone-induced spawning of southern flounder [J]. *The Progressive Fish-Culturist*, 1978, 40(4):154.
- [19] Berlinsky D L, King V W, Smith T, *et al.* Induced ovulation of southern flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1996, 27(2):143-152.
- [20] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存的理论与技术 [M]. 北京:中国农业出版社, 2007.
- [21] 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.
- [22] 杨景峰,陈松林,徐亘博,等. 异源精子诱导犬齿牙鲆雌核发育研究[J]. *水产学报*, 2009, 33(4):533-541.
- [23] 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.
- [24] 桂建芳,肖武汉. 静水压休克诱导水晶彩鲫三倍体和四倍体的细胞学机理初探[J]. *水生生物学报*, 1995, 19(1):49-55.

Gynogenetic induction in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) by cryopreserved sperm of *Lateolabrax japonicus*

YANG Jing-feng^{1,2}, CHEN Song-lin^{1*}, XU Gen-bo¹, SU Peng-zhi¹,
TIAN Yong-sheng¹, ZHAI Jie-ming³, LI Bo³

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

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

3. Laizhou Mingbo Aquatic Co., Ltd., Laizhou 261418, China)

Abstract: Female southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) grow larger than males. Therefore, all-female production will maximize profit potential for the culture of this species. It may be effective to develop protocols to produce all-female southern flounder through induction of meiotic gynogenesis with the cryopreserved heterologous sperm of *Lateolabrax japonicus*. To test methods for inducing diploid gynogenesis in southern flounder using heterogenous sperm, the UV was used to inactivate sperm and pressure shock was used to prevent extrusion of the second polar body. The results of experiments showed that gynogenetic diploid can be induced by inactivated heterogenous sperm because that hybrid would die before hatching. Diploid gynogenesis was induced by activating egg development with UV irradiated sperm (80 mJ/cm^2) 4 – 5 min after fertilization ($18 \text{ }^\circ\text{C}$), and then 65 MPa pressure treatment for 6 min. Flow cytometry and microsatellite DNA analysis were used to demonstrate that the gynogenetic fry are diploidy. These results indicate that the use of UV irradiated sperm from *Lateolabrax japonicus* for activation of flounder eggs and pressure shock for polar body retention is an effective method to produce gynogenetic diploid in southern flounder.

Key words: southern flounder (*Paralichthys lethostigma*); *Lateolabrax japonicus*; gynogenesis; heterogenous sperms; pressure shock

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri. ac. cn