

鱼类生殖细胞移植技术研究及进展

周 莉^{1,2,3,4}, 刘清华^{1,2,3}, 李 军^{1,2,3}

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 鱼类生殖干细胞具有多向分化潜能, 作为供体细胞移入同种或异种受体, 在受体内迁移、定居、增殖、分化、成熟, 产生供体来源功能性配子和后代, 称为鱼类生殖细胞移植。作为一项辅助生殖技术, 与冷冻保存技术相结合, 已经在多种鱼类上进行研究。经过十几年的发展, 鱼类生殖细胞移植技术逐渐成熟, 目前已经建立了原始生殖细胞、精原细胞、卵原细胞作为供体细胞, 囊胚胚胎、孵化幼鱼、成鱼为受体的移植体系。生殖细胞移植技术未来将在濒危物种保护、代理养殖、干细胞诱导分化等方面发挥重要作用。本文总结分析了目前已经报道的鱼类生殖干细胞移植技术, 以及鱼类生殖干细胞移植存在的问题和未来发展方向。

关键词: 鱼类; 生殖干细胞; 移植; 冷冻保存

中图分类号: S961 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2020)08-0048-08

DOI: 10.11759/hyxx20200324003

从淡水到海洋, 多样化的水生生态系统, 居住着超过 30 700 种鱼类, 物种多样性极其丰富^[1]。作为一种低等脊椎动物, 鱼类在动物系统进化过程中起着承上启下的作用, 其复杂的生殖策略几乎涵盖了脊椎动物王国的所有繁殖类型, 越来越多鱼类作为模型来研究生殖调控机制^[2]。在全球范围内, 鱼肉为人类提供优质蛋白质, 是继谷类和牛奶之后人类食物蛋白质的第三大来源。

然而, 近年来, 一些鱼类已经灭绝或濒临灭绝, 部分鱼类存在种质资源退化和遗传多样性降低, 还有一些经济鱼类仍然存在生长周期长、占用空间大、繁殖困难等问题。例如, 根据《濒危物种红色名录》、《中国生物多样性红色名录》记载, 稀棘平鲷(*Sebastes paucispinis*)、冬鲷(*Leucoraja ocellata*)、北方蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*)等鱼类由于生存环境遭到破坏以及过度捕捞, 已被列为濒危或极度濒危物种, 加之繁殖周期较长、体型较大、养殖困难, 面临着灭绝危险。鱼类“借腹生子”技术的出现, 结合生殖细胞冷冻保存技术, 为解决上述问题提供了新的替代途径。所谓的“借腹生子”技术, 即生殖细胞移植技术(germ cell transplantation, GCT), 该技术基于生殖干细胞具有多向分化潜能的特性发展而来^[3]。把鱼类生殖干细胞移植到同种或异种受体中, 供体细胞然后在受体内定居、分化和成熟, 最终产生供体来源的

配子。虽然 GCT 在哺乳动物中的应用已经相对成熟, 但这项技术在进入 21 世纪后才被应用于鱼类^[4-7]。在过去的十几年中, 科学家们不仅在种内移植上获得成功, 还发现种间移植也能使供体细胞继续发育并形成有功能的配子或后代。

这是一种前景广阔的生物技术, 既可以保护濒危物种, 又可以通过移植冷冻保存的生殖细胞来长期保存种质资源^[8-10]。此外, 通过易于饲养和繁殖的小型鱼类代理繁殖生殖周期长、养殖空间大、繁殖力低下、或者人工条件下性腺不能发育的经济物种, 节省了劳动力和养殖成本^[11-12]。还可对已有的经济品种进行性别、性状控制, 例如, 在不使用外源性激素诱导条件下产生 YY 超雄品系^[13]或通过转染供体

收稿日期: 2020-03-24; 修回日期: 2020-04-13

基金项目: 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0302-4); 国家重点研发计划(2018YFD0901205); 山东省重点研发计划(2019GHY112013)

[Foundation: the Marine S&T Fund of Shandong Province for Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), No. 2018SDKJ0302-4; National Key Research and Development Program of China, No. 2018YFD0901205; Shandong Provincial Key Research and Development Program, No. 2019GHY112013]

作者简介: 周莉(1989-), 女, 山东泰安人, 博士研究生, 研究方向为鱼类繁殖发育调控, E-mail: zhoulisda@163.com; 李军(1964-), 男, 山东青岛人, 通信作者, 博士, 研究员, 研究方向: 主要从事海水鱼类繁殖, 生殖细胞保存及干细胞移植研究, 电话: 0532-82898718, E-mail: junli@qdio.ac.cn

生殖细胞产生转基因个体^[1]。该技术的应用将为鱼类新型繁育模式、遗传改良以及种质资源的保存和高效开发利用开辟新途径。

1 鱼类生殖细胞移植发展

生殖细胞移植技术是 Brinster 及其同事在 1994 年^[14]首创的一项功能强大的生殖技术。它包括将供体生殖干细胞移植到代孕动物的性腺中,以便从受体中快速且理论上不受限制地产生配子。近年来,该技术在生殖医学、濒危遗传资源的保护和动物繁殖方面已经获得成功。此外,GCT 对于理解生殖细胞发育调控和干细胞生物学^[15]也有一定的意义。

对鱼类进行 GCT,首次是在鲑科(Salmonidae)鱼类上尝试开展。Takeuchi 等^[4,16]从虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)孵化胚胎生殖嵴分离荧光标记的原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs),并移植到同种异体或相近物种大马哈鱼(*Oncorhynchus masou*)孵化胚胎腹腔内,最终产生供体来源的配子,经过受精产生虹鳟后代。通过不断探索,供体细胞已从 PGCs 逐渐扩展至其他生殖干细胞,主要包括精原细胞(spermatogonia, SG)和卵原细胞(oogonia, OG)。由于 SG 和 OG 具有发育可塑性和雌雄双向分化的能力,相继作为供体细胞在鲑科鱼类上被成功移植,产生功能性精子和卵子^[17-20]。更有趣的是,使用三倍体或敲降法(*dnd*-MO)等绝育受体,因降低或消除内源性生殖细胞产生的免疫排斥反应而极大地提高了移植的效率^[21-22]。例如,以三倍体大马哈鱼为受体,从冷冻保存的整个虹鳟精巢中分离 SG 作为供体细胞进行移植,成功产生功能性配子,且全部为供体来源^[23]。作为鱼类生殖移植鼻祖,虹鳟鱼研究较为详尽,结合 PGCs、SG 乃至整个精巢、卵巢的冷冻保存,为鲑科鱼类遗传资源保存提供新的思路,同时为其他鱼类生殖移植提供参考。

近年来,鱼类 GCT 从鲑科扩展到其他种类,包括鲤科^[24-25](Cyprinid)、脂鲤科^[26](Characidae)、怪颌鲂科^[27-28](Adrianichthyidae)、丽鱼科^[29-30](Cichlidae)、鲶科^[31](Siluridae)、鲈科^[32](Percoidea)、银汉鱼科^[33-34](Atherinidae)、鲟科^[8,35-36](Acipenseridae)等。对于受体,其中使用性成熟的成鱼作为受体进行移植,因节约了受体成长时间,而具有迅速形成生殖系,传播后代的优势。例如,Lacerda 等^[30]用经过白消安处理,去除内源性生殖细胞的罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)成鱼作为受体进行生殖移植,

在短的时间内成功产生了供体来源配子。从一个胚胎中获得的 PGCs 数量有限(20~30 个),而且很难捕获具有重要经济价值的新孵化的胚胎。与 PGCs 相比,从未成熟或已成熟的鱼性腺中获得大量的 SG 相对容易,且获得 SG 并进行移植的操作也更简单。因此,近年的研究中更多的使用 SG 进行移植,尤其是一些海洋鱼类,包括石首鱼科^[7,11,37](Sciaenidae)、鲭科^[12,38](Scombridae),以及鲹科(Carangidae)^[39-40]。比如,将五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)的 SG 移植到竹荚鱼(*Trachurus japonicus*)体内,成功获得供体来源的配子和后代^[40]。

2 鱼类生殖细胞移植类型

鱼类生殖细胞移植有不同方式。根据供体细胞不同,可分为 PGCs 移植、囊胚细胞移植(内含 PGCs)、精原细胞移植、卵原细胞移植;根据移植受体时期不同,可分为囊胚期胚胎移植、孵化胚胎移植,成鱼阶段移植;根据移植部位不同,可分为囊胚移植,腹腔内移植,成鱼生殖孔移植(图 1);根据供受体亲缘关系,可分为同种移植(表 1)和异种移植(表 2),其中异种移植又可细分为属内移植,属间移植,科间移植,目间移植等等。下面就供受体亲缘关系远近,详述近十几年来鱼类 GCT 情况。

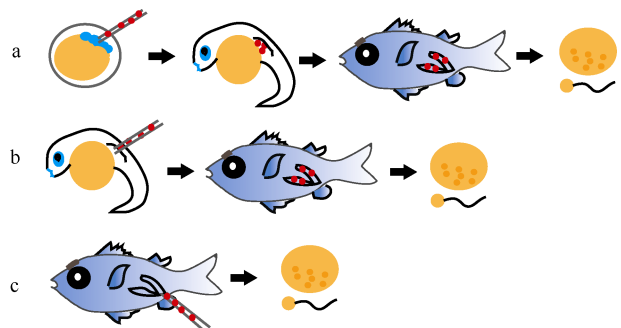


图 1 目前用于鱼类生殖细胞移植受体不同阶段示意图
Fig.1 Schematic diagram of different stages of fish germ cell transplantation receptor

注: a: 囊胚期胚胎 PGCs 移植; b: 新孵化仔鱼腹腔内生殖细胞移植; c: 成鱼生殖孔生殖细胞移植

2.1 生殖干细胞同种移植

同种移植是鱼类 GCT 成功概率最高的一种类型。由于同一物种生殖细胞发生发育、生殖调控、生存环境高度一致,使得供体细胞在受体体内迁移、定居、增殖、分化、产生两性配子整个过程十分顺利。近年来,由于近亲交配,环境污染导致某些鱼类存

表 1 鱼类生殖细胞同种移植的主要研究报道

Tab. 1 The main research report of fish germ cell allogeneic transplantation

物种	供体细胞	受体育性	方法	结果	参考文献
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	PGCs	可育	幼苗腹腔移植	供体后代	[16]
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	冷冻保存 PGCs	可育	幼苗腹腔移植	供体后代	[47]
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	精巢混合细胞	可育	幼苗腹腔移植	供体后代	[17]
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	来自冷冻精巢 SG	三倍体	幼苗腹腔移植	供体后代	[23]
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	来自冷冻卵巢 OG	三倍体	幼苗腹腔移植	供体后代	[48]
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	SG	可育雌性受体	幼苗腹腔移植	超雄 YY	[13]
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	PGCs	<i>dnd</i> -MO 不育	囊胚移植	供体后代	[49]
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	SG	白消安处理不育	成鱼生殖孔移植	供体两性配子发生	[50]
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	精巢混合细胞	<i>dnd</i> -ZFN 不育	幼苗腹腔移植	供体功能性精子	[51]
青鳉 <i>O. latipes</i>	囊胚细胞	<i>dnd</i> -MO 不育	囊胚移植	供体后代	[28]
青鳉 <i>O. latipes</i>	冷冻精巢混合细胞	三倍体	幼苗腹腔移植	供体后代	[27]
五条鲷 <i>S. lalandi</i>	SG	可育	幼苗腹腔移植	供体功能性精子	[39]
箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	SG	三倍体	幼苗腹腔移植	供体功能性精子	[7]
罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	SG	白消安处理雄性不育	成鱼生殖孔移植	供体功能性精子	[52]
白梭吻鲈 <i>S. lucioperca</i>	囊胚细胞	可育	囊胚移植	产生嵌合体	[32]
达氏鲟 <i>A. dabryanus</i>	SG	可育	腹腔移植	整合到受体生殖嵴	[8]

注: PGCs: 原始生殖细胞; SG: 精原细胞; OG: 卵原细胞; MO: 吗啉反义寡核苷酸基因敲降; ZFN: 锌指核酸酶基因敲除

表 2 鱼类生殖细胞异种移植的主要研究报道

Tab. 2 The main research report of fish germ cell xenogeneic transplantation

供体	受体	方法	结果	类型	参考文献
虹鳟 <i>O. mykiss</i> PGCs	大马哈鱼 <i>O. masou</i>	腹腔移植	供体后代	属内	[4]
虹鳟 <i>O. mykiss</i> 冷冻 SG	大马哈鱼 <i>O. masou</i> 三倍体	腹腔移植	供体后代	属内	[9]
虹鳟 <i>O. mykiss</i> SG	<i>dnd</i> -MO 敲降大马哈鱼 <i>O. masou</i>	腹腔移植	供体后代	属内	[22]
大西洋鲑 <i>S. salar</i> SG	虹鳟 <i>O. mykiss</i> 三倍体	腹腔移植	供体后代	属间	[21]
珍珠斑马鱼 <i>D. albolineatus</i> 单个 PGCs	<i>dnd</i> -MO 敲降斑马鱼 <i>D. rerio</i>	囊胚移植	供体精卵杂交后代	属内	[24]
金鱼 <i>C. auratus</i> 单个 PGCs	<i>dnd</i> -MO 敲降斑马鱼 <i>D. rerio</i>	囊胚移植	供体功能性精子	属间	[24]
泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i> 单个 PGCs	<i>dnd</i> -MO 敲降斑马鱼 <i>D. rerio</i>	囊胚移植	供体功能性精子	科间	[24]
斑马鱼 <i>D. rerio</i> OG	斑马鱼 <i>D. rerio</i> × 珍珠斑马鱼 <i>D. albolineatus</i> 杂交不育	腹腔移植	供体功能性精子	属内	[6]
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i> PGCs	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	囊胚移植	迁移至受体生殖嵴	目间	[45]
鲤鱼 <i>C. carpio</i> 冷冻 SG	<i>dnd</i> -MO 金鱼 <i>C. auratus</i>	腹腔移植	整合到受体性腺	属间	[53]
黄条鲷 <i>S. lalandi</i> SG	竹夹鱼 <i>T. japonicus</i>	腹腔移植	供体功能性精子	属间	[40]
五条鲷 <i>S. lalandi</i> SG	箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	腹腔移植	不能保持配子产生	科间	[11]
箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i>	箕作黄姑鱼 <i>N. mitsukurii</i> ♀ × 银姑鱼 <i>P. argentata</i> ♂ 杂交不育	成鱼生殖孔	供体后代	属间	[5]
南方蓝鳍金枪鱼 <i>T. maccoyii</i> SG	五条鲷 <i>S. lalandi</i>	腹腔移植	不能保持配子产生	科间	[12]
银汉鱼 <i>O. bonariensis</i> SG	白消安处理牙汉鱼 <i>O. hatcheri</i>	成鱼手术	供体后代	属内	[33-34]

续表

供体	受体	方法	结果	类型	参考文献
单丽鱼 <i>C. monocolus</i> SG	白消安处理成熟雄性罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	成鱼生殖孔	整合到受体性腺	属间	[30]
克林雷氏鲇 <i>R. quelen</i> SG	成熟雄性罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	成鱼生殖孔	检测到供体精子	目间	[31]
长鳍叉尾鲷 <i>I. furcatus</i> SG	斑点叉尾鲷 <i>I. punctatus</i> 三倍体	囊胚移植	供体精, 杂交后代	属内	[44]
中华鲟 <i>A. sinensis</i> OG	达氏鲟 <i>A. dabryanus</i>	腹腔内移植	整合受体生殖嵴	属内	[8]
西伯利亚鲟 <i>A. baerii</i> SG、OG	小体鲟 <i>A. ruthenus</i>	腹腔内移植	整合受体生殖嵴	属内	[36]
阿根廷大鳞脂鲤 <i>B. orbignyanus</i> SG	白消安处理高身丽脂鲤 <i>A. altiparanae</i>	成鱼生殖孔	供体来源精子	属间	[26]
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i> SG	星点东方鲀 <i>T. niphobles</i> 三倍体	腹腔内移植	供体后代	属内	[54]

注: PGCs: 原始生殖细胞; SG: 精原细胞; OG: 卵原细胞; MO: 吗啉反义寡核苷酸基因敲降

在遗传资源退化, 遗传多样性降低问题。借助生殖细胞冷冻保存, 通过同种移植产生新的后代, 进行增殖放流, 可以维持群体遗传多样性。还有些经济鱼类繁殖周期较长, 通过产生转基因品系来改造鱼类性状需要几代筛选, 如果移植转染的供体细胞, 大大缩短了形成品系的时间。在水产养殖中, 某些鱼类如黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)雄鱼比雌鱼具有生长优势或观赏价值。可通过同种移植进行性别控制, 在不使用外源性激素诱导性逆转情况下, 产生遗传上 YY 超雄群体。Okutsu 等^[13]把虹鳟的精原细胞移植到同种雌性受体, 使其产生 XY 卵子, 通过与野生 XY 精子杂交, 产生 YY 超雄个体。

2.2 生殖干细胞异种移植

异种移植在代理养殖及种质资源保存方面有更广阔应用空间, 可以作为一种新的方式解决养殖过程中一些难题^[41]。以太平洋蓝鳍金枪鱼(*Thunnus orientalis*)为例, 3~5 年达到性成熟, 成熟的鱼可能超过 100 公斤^[42-43]。如果把蓝鳍金枪鱼生殖干细胞移植到亲缘关系相近、体型更小、成熟更快、易于饲养物种如鲈鱼(*Scomber japonicus*), 其配子可能更容易、更迅速地产生。

对于异种移植, 属内移植、属间移植成功率最大, 其次科间移植、目间移植。Saito^[24]等分离珍珠斑马鱼(*Danio albolineatus*)、金鱼(*Carassius auratus*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)单个 PGC, 并移植到吗啡啉敲降(*dnd*-MO)斑马鱼囊胚, 探索亲缘关系由近及远异种移植情况。结果发现移植珍珠斑马鱼的

受体(属内移植)可获得功能性两性配子, 而移植金鱼(属间移植)和泥鳅(科间移植)只能获得功能性精子。泥鳅移植斑马鱼是目前唯一能产生供体来源配子及后代的科间移植报道, 虽然只获得了单一性别。

属内移植大多数都能产生供体来源的功能性精子, 如长鳍叉尾鲷(*Ictalurus furcatus*)精原细胞移植斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[44]; 有些鱼类还可以产生两性配子, 得到供体来源后代, 如银汉鱼(*Odontesthes bonariensis*)精原细胞移植牙汉鱼(*Odontesthes hatcheri*)^[33], 还有些濒危鲟科鱼类, 性成熟周期时间 8 年以上, 利用精原细胞进行属内移植, 在受体内性腺内检测到供体细胞的定居, 如中华鲟 (*Acipenser sinensis*)移植达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)^[8], 西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)移植小体鲟(*Acipenser ruthenus*)^[36]。根据目前研究, 发现属间移植在部分鱼种里面也获得成功, 如大西洋鲑(*Salmo salar*)精原细胞移植三倍体虹鳟孵化幼苗, 产生供体来源的雌雄配子, 通过受精, 得到供体来源后代^[21]; 箕作黄姑鱼精巢生殖细胞通过成鱼生殖孔移植入雌性箕作黄姑鱼与雄性银姑鱼(*Pennahia argentata*)杂交不育体成鱼, 成功产生供体来源精子, 并得到供体来源后代^[5]。

然而, 如果供受体亲缘关系较远, 如科间及科间以上水平, 除了在泥鳅和斑马鱼间移植获得供体来源的精子及后代外, 在其他物种上尚未突破。供体来源的生殖细胞常常在发育和成熟过程中被排异或吸收。Bar 等^[12]尝试通过五条鲷代理产生南方蓝鳍金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)配子, 将分离金枪鱼精原细

胞移植入五条鮰孵化幼苗的腹腔,可检测到供体细胞迁移至生殖嵴,但在移植后 165 天,供体生殖细胞消失。同样,在五条鮰移植算作黄姑鱼的科间移植研究中,移植的五条鮰精原细胞也未能发育成配子^[11]。在亲缘关系更远的目间移植中,分离日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 的 PGCs,移植到斑马鱼胚胎,只能观察到受体 PGCs 迁移至生殖嵴^[45]。

在目前报道的异种移植的研究中,无论亲缘关系较近的属内移植,还是亲缘关系较远的科间移植、目间移植,供体细胞都能成功迁移至受体生殖嵴,并在发育中的性腺定居、增殖。这暗示了不同鱼类生殖细胞迁移机制和早期增殖调控方式较为保守,或许与迁移过程中生殖细胞受化学趋化因子 SDF-1a 及 G 蛋白偶联受体 CXCR4b 共同作用有关^[46]。对于科间移植、目间移植,供体细胞在受体内诱导分化,只能产生单一性别配子,或者不能保持到配子产生现象。这可能是由于供受体亲缘关系较远,性别分化,配子成熟调控机制不同造成,也可能与供受体整个生长环境差异较大有关,包括温度、光照、饲养条件等。

3 问题与展望

生殖细胞移植作为一种辅助生殖技术,已经在多种鱼上进行研究,与其他相关技术方法相结合,可以有效地从濒危物种和有重要经济价值动物中产生功能性配子和后代。然而,关于鱼类生殖干细胞的基本生物学认知仍然不完整,这对 GCT 在鱼类中的应用造成了相当大的限制。进一步加深我们对生殖干细胞的了解,将对鱼类 GCT 方面的进展做出重大贡献。

如何选择一个合适受体也是目前鱼类 GCT 面临的一个问题。为防止受体对外源细胞产生免疫排斥,提高移植效率,科学家们常会选择不育体作为受体,包括三倍体、杂交不育体、白消安处理不育体、生殖基因敲除或敲降不育体。但是这些受体自身也各有不足之处,例如,通过生殖基因敲除或敲降方法获得不育体,因其操作问题,只适合模式鱼类,不适合大型、生长周期长的经济鱼类;利用化学药物白消安处理获得不育体,因破坏了精巢的微环境,使得移植效率降低;三倍体雌鱼有些可以恢复生育能力,不能达到完全不育,雄性虽然不含有成熟精子,但含有精原细胞、精母细胞、精子细胞,充斥生殖上皮,与移植供体细胞争夺空间;杂交不育体性腺也

存在未成熟早期生殖细胞,获得杂交不育体同时受物种亲缘关系的限制。未来发展一种适合的不育体受体至关重要,既要保证操作简便,适用性强,还要提高移植效率。通过不断探索,突破远缘移植造成生殖壁垒,GCT 技术将在代理养殖、资源保护上发挥更大作用。

参考文献:

- [1] Majhi S K, Kumar S. Germ cell transplantation: a potential tool for propagation of endangered fishes[J]. *Annals of Aquaculture and Research*, 2017, 4(3): 4-7.
- [2] 陈戟, 胡炜, 朱作言. 鱼类生殖发育调控研究进展[J]. *科学通报*, 2013, 58(2): 103-114.
Chen Ji, Hu Wei, Zhu Zuoyan. Research progress on regulation of fish reproductive development[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(2): 103-114.
- [3] 贾天玉, 刘龙会, 沈豪飞, 等. 生殖干细胞的研究进展[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2019, 38(3): 222-225.
Jia Tianyu, Liu Longhui, Shen Haofei, et al. Research advances in reproductive stem cells[J]. *International Journal of Reproductive Health/Family Planning*, 2019, 38(3): 222-225.
- [4] Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids[J]. *Nature*, 2004, 430(7000): 629-630.
- [5] Xu 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.
- [6] 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*, 2011, 84(6): 1190-1197.
- [7] Yoshikawa H, Takeuchi Y, Ino Y, et al. Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intraperitoneal germ cell transplantation into a marine teleost, Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*)[J]. *Aquaculture*, 2017, 478: 35-47.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Yoshikawa H, Ino Y, Shigenaga K, et al. Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* from cryopreserved testicular germ cells using surrogate broodstock technol-

- ogy[J]. *Aquaculture*, 2018, 493: 302-213.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(24): 11298-11302.
- [15] Brinster R L. Male germline stem cells: from mice to men[J]. *Science*, 2007, 316(5823): 404-405.
- [16] 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.
- [17] 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*, 2006, 103(8): 2725-2729.
- [18] Okutsu T, Shikina S, Kanno M, et al. Production of trout offspring from triploid salmon parents[J]. *Science*, 2007, 317(5844): 1517.
- [19] Yoshizaki G, Ichikawa M, Hayashi M, et al. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout[J]. *Development*, 2010, 137(8): 1227-1230.
- [20] Yoshizaki G, Okutsu T, Ichikawa M, et al. Sexual plasticity of rainbow trout germ cells[J]. *Animal Reproduction*, 2010, 7(3): 187-196.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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*, 2013, 110(5): 1640-1645.
- [24] 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.
- [25] Saito T, Goto-Kazeto R, Fujimoto T, et al. Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2010, 54(10): 1481-1486.
- [26] de Siqueira-Silva D H, dos Santos Silva A P, da Silva Costa R, et al. Preliminary study on testicular germ cell isolation and transplantation in an endangered endemic species *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Characidae)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00631-8>.
- [27] Seki S, Kusano K, Lee S, et al. Production of the medaka derived from vitrified whole testes by germ cell transplantation[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43185.
- [28] Li M, Hong N, Xu H, et al. Germline replacement by blastula cell transplantation in the fish medaka[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29658.
- [29] Lacerda S, Batlouni S R, Silva S B G, et al. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model[J]. *Anim Reprod*, 2006, 3(2): 146-59.
- [30] Lacerda S M S N, Batlouni S R, Assis L H, et al. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Cybio*, 2008, 32(2): 115-118.
- [31] 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: 48-56.
- [32] Guralp H, Pocherniaieva K, Blecha M, et al. Migration of primordial germ cells during late embryogenesis of pikeperch *Sander lucioperca* relative to blastomere transplantation[J]. *Czech Journal of Animal Science*, 2017, 62(3): 121-129.
- [33] 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 germlines[J]. *Plos One*, 2009, 4(7): e6132.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] Pšenička M, Saito T, Linhartová Z, et al. Isolation and

- transplantation of sturgeon early-stage germ cells[J]. *Theriogenology*, 2015, 83(6): 1085-1092.
- [37] Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, et al. Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibe mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae)[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(6): 1055-1063.
- [38] 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.
- [39] 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, 73(17): 5574-5579.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] Sawada Y, Okada T, Miyashita S, et al. Completion of the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, life cycle under aquaculture conditions[J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(5): 413-421.
- [43] Seoka M, Kato K, Kubo T, et al. Gonadal maturation of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* in captivity[J]. *Aquaculture Science*, 2007, 55(2), 289-292.
- [44] Shang M, Su B, 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.
- [45] 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.
- [46] Molyneaux K, Wylie C. Primordial germ cell migration[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2004, 48(5-6): 537-543.
- [47] Kobayashi T, Takeuchi Y, Takeuchi T, et al. Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells[J]. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 2007, 74(2): 207-213.
- [48] Lee S, Katayama N, Yoshizaki, et al. 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.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] Franěk R, Marinović Z, Lujčić J, et al. Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia[J]. *Plos One*, 2019, 14(4): e0205481.
- [54] Hamasaki M, Takeuchi Y, Yazawa R, et al. Production of Tiger Puffer *Takifugu rubripes* offspring from Triploid Grass Puffer *Takifugu niphoblesparents*[J]. *Marine Biotechnology*, 2017, 19(6): 579-591.

Fish germ cell transplantation technology: Research and progress

ZHOU Li^{1, 2, 3, 4}, LIU Qing-hua^{1, 2, 3}, LI Jun^{1, 2, 3}

(1. CAS Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao 266237, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Mar. 24, 2020

Key words: fish; germ stem cells; transplantation; cryopreservation

Abstract: Fish germ stem cells have the potential for multi-directional differentiation. As donor cells, they are transplanted into allogeneic or xenogeneic receptors, after which they migrate, proliferate, colonize, differentiate, and mature in the recipient fish to produce donor-derived gametes, in a process called fish germ-cell transplantation. As an assisted reproductive technology, it has been studied on a variety of fish in combination with cryopreservation technology. After more than ten years of development, fish germ-cell transplantation technology has gradually matured. At present, a transplant system has been established in which primordial germ cells, spermatogonia, and oogonia are used as donor cells, and blastula-stage embryos, newly hatched larvae and sexually mature specimens act as recipients. Germ-cell transplantation technology will play an important role in the protection of endangered species, surrogate breeding, stem cell-induced differentiation, and other aspects in the future. In this paper, we perform a brief review of the fish-cell transplantation technology that has been reported so far, a preliminary analysis of its technical characteristics, and then point out the problems of fish germ-cell transplantation and explore the future directions for its development.

(本文编辑: 赵卫红)