

同源和异源精子诱导大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)雌核发育的胚胎发育比较及子代 SSR 遗传标记分析*

苗亮¹ 王天柱¹ 李明云¹ 汤先念¹ 王曙¹
安钦¹ 徐万士²

(1. 宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室 宁波 315211;
2. 象山港湾水产苗种有限公司 宁波 315702)

摘要 以紫外灭活的同源(大黄鱼)精子和未灭活的异源(鲢鱼)精子为激活源,采用冷休克处理的方法诱导了大黄鱼雌核发育二倍体,进行胚胎发育和 SSR 标记分析的比较研究。结果表明,异源组的受精率和孵化率高于同源组,但存活率低于同源组;两组中经冷休克处理未能恢复倍性的胚胎发育畸形而陆续死亡,恢复倍性的胚胎在发育程序上均与普通大黄鱼相同,但各阶段出现时间较对照组滞后;SSR 分析显示同源组子代中有 16.7%出现父本条带,异源组子代均未出现父本条带。以灭活的同源(大黄鱼)精子和未经灭活的异源(鲢鱼)精子诱导大黄鱼雌核发育各有优缺点,需根据具体情况选择使用。

关键词 大黄鱼, 鲢鱼, 雌核发育, 胚胎发育, SSR 标记

中图分类号 Q789

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)属硬骨鱼纲、鲈形目、石首鱼科、黄鱼属,是我国重要的海水养殖品种。目前养殖大黄鱼已出现体形、品质、生长、性成熟等经济性性状衰退和遗传多样性降低,有必要进行种质改良,培育出具有生长快、抗病强、品质好等性状的优良品种(黎中宝等,2009)。

雌核发育是一种特殊的有性生殖方式,其后代的遗传物质全部来自于母本。通过人工诱导雌核发育,可在较短的时间内建立纯系或近交系,从而极大的加快选育优良品种的速度(Komen *et al.*, 2007)。另外,包括大黄鱼在内的多种海水鱼类其雌性生长性状优于雄性,进行雌核发育研究也可为繁育全雌群体奠定基础。

目前国内外已对多种鱼类进行了人工诱导雌核发育研究(刘伟成等, 2005; Komen *et al.*, 2007),选择合适的精子作为激活源和恰当的倍性恢复处理方法是人工诱导雌核发育的两个关键点。以同源精子作为激活源时必须进行遗传灭活,而选用恰当的异源精子则无需灭活。已有的大黄鱼雌核发育研究中,除王德祥等(2006)使用浅色黄姑鱼精子外,其余均使用同源灭活精子作为激活源(王晓清等, 2006, 2007; Xu *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2010),且这些研究对胚胎发育观察及不同诱导方法的比较等研究较少。

本研究分别使用大黄鱼和鲢鱼(*Miichthys miui*) (石首鱼科, 鲢鱼属)精子作为同源和异源激活源,冷休克处理诱导大黄鱼雌核发育,从受精率、孵化率、

* 国家“863”高技术研究发展计划, 2006AA10A405 号; 浙江省科技厅重大专项, 2009C12077 号; 宁波市农业科技示范园区项目, 2010YQ22 号。苗亮, 博士研究生, E-mail: boneheadmiao@126.com

通讯作者: 李明云, 教授, 博士生导师, E-mail: limingyun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2010-10-26, 收修改稿日期: 2010-12-29

存活率、胚胎发育时程及子代 SSR 标记分析等方面进行了比较,以期为大黄鱼雌核发育的更深入研究提供资料,并对大黄鱼品种改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 精、卵的获得

同源和异源(鲩鱼)精子诱导大黄鱼雌核发育实验于 2009、2010 年的 5—9 月在宁波象山港湾水产苗种有限公司进行。亲鱼为网箱中养殖的健康、性成熟 2 龄雌、雄大黄鱼和 3 龄雄鲩鱼。对亲鱼胸鳍下注射 LHRH-A3(宁波第二激素厂)催产,剂量为雌鱼 5 μ g/kg 体重,雄鱼减半。催产后将亲鱼放于亲鱼室水泥池中,保持安静并避光。到达效应时间(约 36h)后,分别取雄鱼和雌鱼轻压鱼腹获得精液和卵子,盛于预冷的洁净干燥培养皿或烧杯中,置 4 $^{\circ}$ C、避光保存待用。

1.2 人工授精与冷休克处理

在自制的紫外灭活箱中对大黄鱼精子进行遗传灭活,照射参数参照郑忠明等(2008)并稍作修改,具体是:大黄鱼精液用 Ringer 液稀释 10 倍后均匀平铺至培养皿中(厚度 1mm)置于摇床(60 转/min)上,用 2 支 15W 紫外灯($\lambda=254\text{nm}$)照射 3min,灯管距液面 10cm。鲩鱼精液不经紫外灭活。冷休克诱导雌核发育二倍体条件参照 Xu 等(2007)并稍作修改,具体为:人工授精后 2min 将卵置于 3 过滤海水中冷休克处理 10min,放入孵化池中孵化(同源:水温 21.5 $^{\circ}$ C,盐度 24;异源:水温 23.5 $^{\circ}$ C,盐度 24)。以正常大黄鱼二倍体作为对照。

1.3 受精率、孵化率和存活率统计

随机抽取 100 粒卵计算受精率、孵化率、存活率。

受精率 = 原肠期卵数 / 总卵子数 $\times 100\%$;

孵化率 = 出膜仔鱼数 / 受精卵子数 $\times 100\%$;

存活率 = 开口 3d 后存活仔鱼数 / 出膜仔鱼数 $\times 100\%$ 。

实验数据用 Excel 2003 进行统计分析,结果以平均值 \pm 标准差表示。

1.4 胚胎发育观察

在孵化期间连续取样,用 NOVEL 生物显微镜观察胚胎发育情况,以半数以上胚胎所处发育时期确定此时胚胎所处的发育阶段,用 SONY W80 数码相机拍照。

1.5 微卫星标记分析

以常规酚/氯仿/异戊醇法提取亲鱼、60 日龄(同源)和 10 日龄(异源)鱼苗基因组 DNA。

使用 An 等(2005)发布的大黄鱼 SSR 引物序列,由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。通过预实验筛选出能在父本、母本中扩增出差异条带的引物 KPC9、KPC43 和 KPC45(GenBank 登录号分别为 AY957406、AY957409 和 AY957410)用于子代分析。

PCR 反应体系:反应总体积 20 μ l,其中模板 DNA 1 μ l (50ng), 2 \times Taq Premix(上海博彩生物科技有限公司)10 μ l, 10mmol/L 引物对正向、反向各 1 μ l, 灭菌超纯水 7 μ l。

PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 60 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 反应完成后先用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测是否有扩增产物,再进行 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染后显色。

2 结果

2.1 受精率、孵化率和存活率

异源组的受精率和孵化率都高于同源组,但二者均低于对照组;同源组的存活率高于异源组,但二者均低于对照组(表 1)。

表 1 同源和异源精子诱导大黄鱼雌核发育的受精率、孵化率和存活率

组别	受精率(%)	孵化率(%)	存活率(%)
同源雌核组	20.5 \pm 1.7	24.7 \pm 1.0	6.9 \pm 0.3
异源雌核组	41.5 \pm 0.6	36.7 \pm 2.8	3.3 \pm 0.1
对照组	57.3 \pm 0.6	57.3 \pm 2.8	50.3 \pm 0.6

2.2 胚胎发育

同源和异源雌核发育组中经冷休克处理后未能实现倍性恢复的胚胎出现发育畸形(图 1)而陆续死亡:由囊胚期进入原肠期后,多数胚胎因囊胚下包受阻无法进入原肠期;少数进入原肠期之后呈单倍体综合征,胚体短小、不规则、肌节模糊,脊柱弯曲;极少数发育至出膜的畸形胚胎在开口后两天全部死亡。成功恢复倍性的胚胎在发育程序上均与对照组相同,依次经过卵裂期、囊胚期、原肠期、胚体形成期至出膜、开口(图 2),孵化出膜的雌核组正常个体在运动、摄食等方面都与对照组个体相同。由于孵化水温不同,同源组和异源组胚胎发育至各阶段所耗时间有所差异,但均较各自对照组有所滞后(表 2):与各自对照组相比,同源组和异源组在胚盘形成分别滞后 3min 和 2min,至低囊胚期分别滞后 35min 和 45min,至原

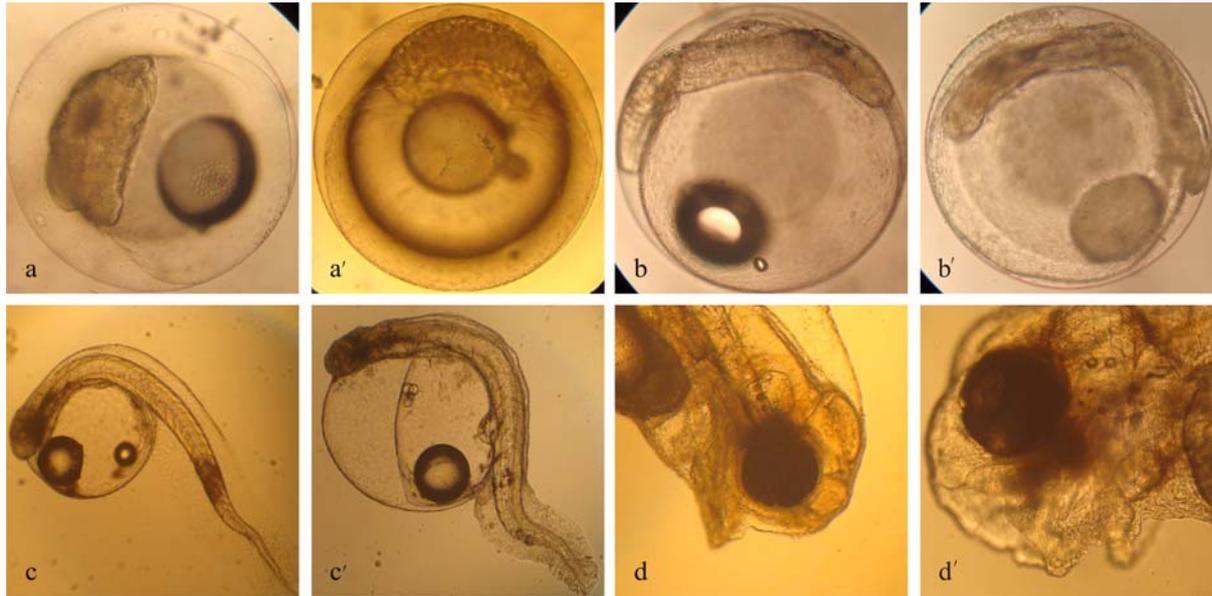


图 1 同源和异源精子诱导大黄鱼雌核发育的畸形胚胎

Fig.1 Deformed embryo of homo- and hetero-gynogenesis in *P. crocea*

a. 囊胚期畸形(同源), a'. 囊胚期畸形(异源); b. 尾芽期畸形(同源), b'. 尾芽期畸形(异源); c. 出膜畸形(同源), c'. 出膜畸形(异源); d. 开口畸形(同源), d'. 开口畸形(异源)

肠晚期分别滞后 55min 和 1h, 至心跳期分别滞后 50min 和 1h 15min, 至出膜分别滞后 1h 和 1h 30min。

2.3 SSR 标记分析

同源组 SSR 引物 KPC9 和 KPC45 的电泳结果见图 3(上、中)。在所检测的 24 尾子代中有 20 尾未出现父本条带, 占 83.3%; 有 3 尾(3、16、19 号)在两个 SSR 位点上均出现父本条带, 占 12.5%; 有 1 尾(2 号)在位点 KPC9 上出现父本条带而在位点 KPC45 上未出现父本条带, 占 4.17%。

异源组 SSR 引物 KPC43 的电泳结果见图 3(下)。在所检测的 18 尾子代中均只有母本条带, 未出现父本条带。

3 讨论

雌核发育是近年来水产养殖领域的研究热点之一, 它在建立纯系、固定优良性状、探讨性别决定类型和进行遗传分析等方面具有独特的优势和潜在的应用价值。目前国内外已在鱼类、贝类等多种水产经济动物中进行了人工诱导雌核发育的研究(潘英等, 2002; 刘伟成等, 2005; 王卫军等, 2009; Komen *et al.*, 2007)。为进一步优化大黄鱼雌核发育的诱导方法, 本研究以不经遗传灭活的鲩鱼精子为异源激活源, 和以同源灭活精子诱导的大黄鱼雌核发育从受精率、孵化率、存活率、胚胎发育时程及子代 SSR 标记分析

方面进行了观察和比较。

本研究结果显示同源灭活精子和不经灭活的鲩鱼精子均可成功诱导大黄鱼雌核发育, 同源组的受精率低于异源组和对照组, 表明紫外线照射在遗传失活的同时也影响了精子的生理活性, 表现为受精能力的下降, 这与郑忠明等(2008)的研究结果相一致。异源组虽然受精率和孵化率均高于同源组, 但存活率却仅有同源组的一半左右, 表现为仔鱼开口后死亡较多, 这可能是受异精效应的影响。肖俊等(2009)用团头鲂精子诱导金鱼雌核发育时出现了两种体色异于母本的子代, 推测可能是异精效应所致。但对于雌核发育中的异精效应尚有待于进一步研究。

人工诱导雌核发育必须对激活后的卵进行处理以恢复倍性, 未能成功进行染色体加倍的单倍体胚胎不能正常发育, 泥鳅、牙鲆、半滑舌鳎等的单倍体胚胎均是如此(张梅芬等, 1993; 刘海金等, 2008)。本研究的同源组和异源组中都有这种单倍体畸形胚胎出现, 在发育的各个阶段陆续死亡。目前一般认为单倍体胚胎在早期死亡是由于隐性致病因子的出现和单倍染色体组不能完成器官分化过程中基因的正常表达。本研究的同源组和异源组中经冷休克处理成功恢复倍性的胚胎在发育程序上均与对照组相同, 但发育至各个阶段的时间均比对照组滞后。在牙鲆、半滑舌鳎、条斑星鲽、马粪海胆等的雌核发育研究中

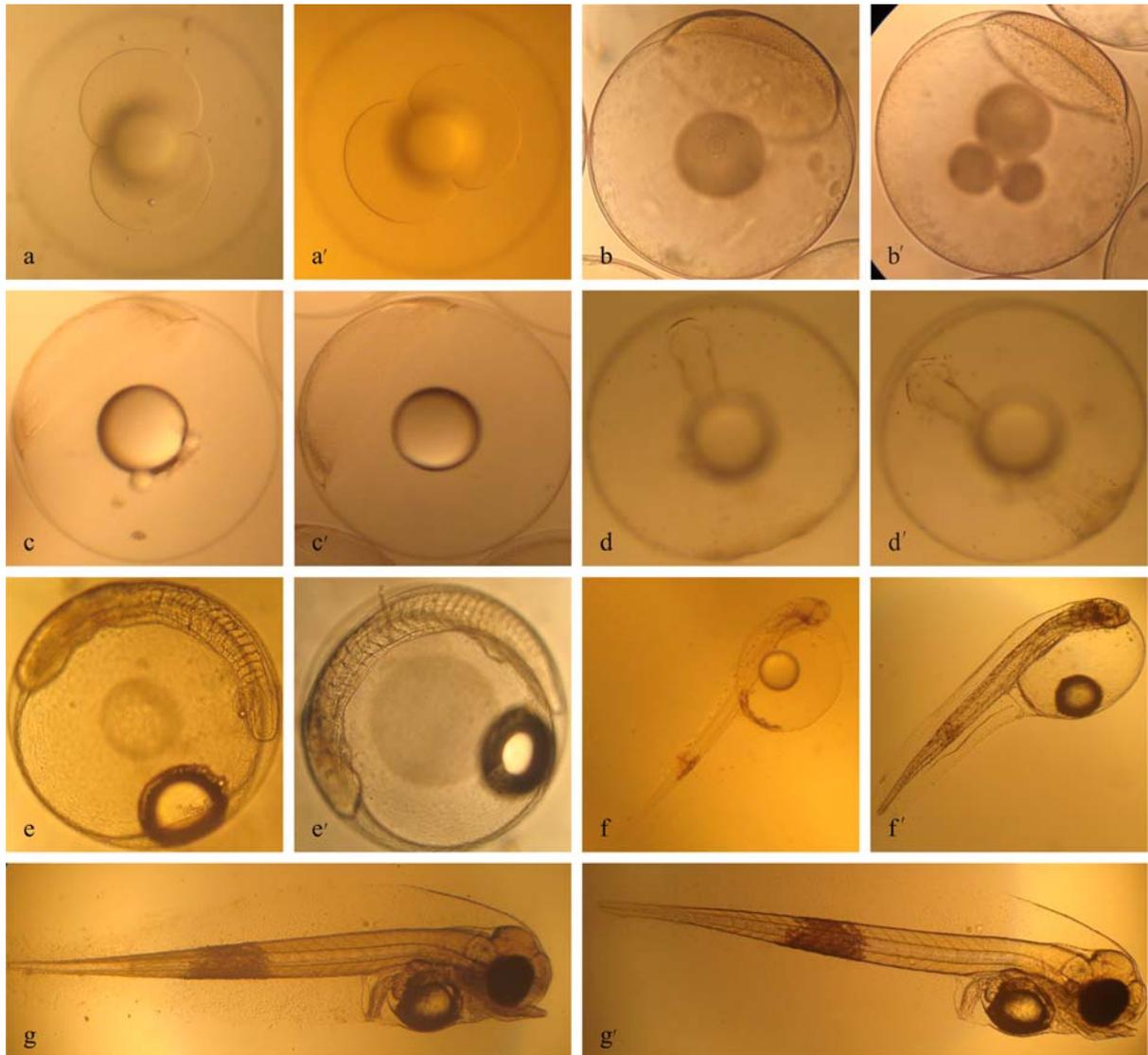


图 2 同源和异源精子诱导大黄鱼雌核发育正常胚胎发育过程

Fig.2 Embryonic developments of homo- and hetero-gynogenesis in *P. crocea*

- a. 2 细胞期(同源), a'. 2 细胞期(异源); b. 高囊胚期(同源), b'. 高囊胚期(异源); c. 原肠早期(同源), c'. 原肠早期(异源);
d. 胚孔封闭期(同源), d'. 胚孔封闭期(异源); e. 尾芽期(同源), e'. 尾芽期(异源); f. 出膜(同源), f'. 出膜(异源);
g. 开口(同源), g'. 开口(异源)

都观察到了这种情况(刘海金等, 2008; 田永胜等, 2008; 李忠红等, 2009; 曹学彬等, 2008), 这是由于所进行的倍性恢复处理影响了正常的细胞分裂周期。一般认为冷休克处理会干扰细胞的正常代谢, 使细胞分裂受阻, 从而阻碍了胚胎发育。Zhu 等(2006)研究发现用紫外灭活的同源精子激活的牙鲆卵在经过冷休克处理后纺锤体解体 and 中心粒复制受阻, 从而阻碍了早期卵裂的进行。

目前在雌核发育研究中, 紫外线照射是使用最多的精子遗传灭活方法, 其机理是紫外线可以使

DNA 中产生嘧啶二聚体, 引起 DNA 构型改变, 干扰正常的碱基配对, 甚至导致 DNA 链的断裂。但紫外线穿透力弱, 且紫外照射引起的 DNA 变异存在多种修复机制, 因此用紫外线照射对精子进行遗传物质灭活可能存在少数精子未能完全灭活的现象。这一方面受精液质量、稀释倍数、稀释精液在培养皿中厚度、照射剂量的影响, 另一方面也存在少数精子遗传失活后又发生了修复的可能性。在使用同源灭活精子诱导的大黄鱼、栉孔扇贝雌核发育的子代中都有部分个体出现了父本特异性条带(王晓清等, 2006; 杨凤影

表 2 同源和异源精子诱导大黄鱼雌核发育的胚胎发育时序
Tab.2 Embryonic development schedules of homo- and hetero-gynogenesis in *P. crocea*

胚胎发育时期	同源(21.5℃, 盐度 24)		异源(23.5℃, 盐度 24)	
	实验组	对照组	实验组	对照组
胚盘形成	33min	30min	22min	20min
第一次卵裂	55min	50min	45min	40min
高囊胚期	3h 55min	3h 35min	3h 40min	3h 15min
低囊胚期	7h 50min	7h 15min	6h 15min	5h 30min
原肠早期	11h 15min	10h 35min	8h	7h 10min
原肠中期	14h 30min	13h 40min	10h 20min	9h 25min
原肠晚期	17h 55min	17h	14h	13h
胚孔封闭期	19h 20min	18h 20min	15h 20min	14h 20min
尾芽形成期	24h 10min	23h 30min	19h 10min	18h
心跳期	27h 15min	26h 25min	24h 15min	23h
肌肉效应期	30h 05min	29h 20min	27h 05min	25h 40min
出膜前期	32h 10min	31h 15min	28h 40min	27h 10min
出膜	33h	32h	29h 30min	28h

等, 2008)。本研究的 SSR 分析结果显示, 24 尾同源组后代中有 4 尾(占 16.7%)出现了父本条带, 表明遗传灭活不完全或发生了部分复性。另外, 这 4 尾中有 1 尾仅在 KPC9 位点出现了父本条带, KPC45 位点则没有, 提示父本遗传物质可能是以染色体片段的形式部分掺入。为避免父本遗传物质的掺入, 许多人工雌核发育研究使用异源精子作为激活源(王德祥等, 2006; Liu *et al*, 2007; Fopp-Bayat, 2009), 本研究所检测的异源组后代中均未出现父本条带。但 Liu 等(2010)所得的红鲫(♀)×团头鲂(♂)的雌核发育后代中虽然没有出现父本的整条染色体, 却发现部分个体具有 1—3 个来源于父本微染色体。因此, 异源雌核发育诱导中精子的少量 DNA 片段是否会进入子代仍需做更深入的研究。

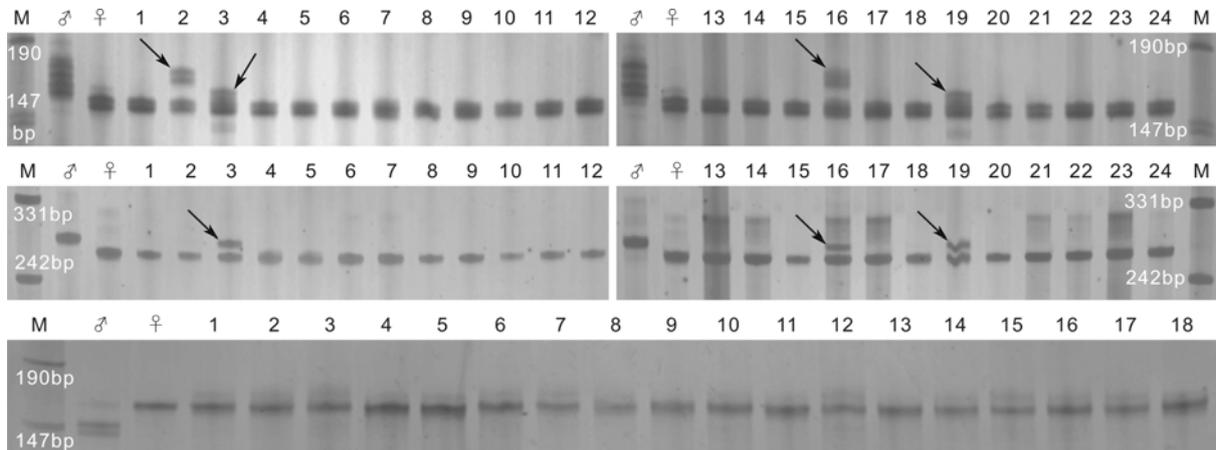


图 3 同源和异源精子诱导大黄鱼雌核发育的电泳图谱

Fig.3 Electrophotogram of homo- and hetero-gynogenesis in *P. crocea*

上: 同源精子, KPC9 位点, 1—24 为子代; 中: 同源精子, KPC45 位点, 1—24 为子代; 下: 异源精子, KPC43 位点, 1—18 为子代。
M: 标准分子量; ♂: 父本; ♀: 母本; 箭头示子代中出现的父本特异条带

本研究显示以灭活的同源精子或未灭活的鲢鱼精子激活大黄鱼卵并经冷休克处理均可成功获得大黄鱼雌核发育二倍体, 两组的胚胎发育过程均与正常大黄鱼相同, 但发育时间滞后。以同源精子和异源精子作为激活源各有优缺点: 受紫外灭活影响, 同源组的受精率较低; 异源组虽然受精率和孵化率高于同源组, 但子代存活率较低; 同源组部分后代中有父本遗传物质的掺入, 异源组则没有; 另外, 大黄鱼为春、秋两季性成熟而鲢鱼仅秋季性成熟, 如要在春季使用鲢鱼精子诱导大黄鱼雌核发育, 则需对鲢鱼精子进行低温冻存。因此, 在进行大黄鱼人工雌核发育

诱导时使用同源灭活精子还是异源精子作为激活源需根据具体情况进行选择。

参 考 文 献

王卫军, 杨建敏, 刘志鸿等, 2009. 异源精子诱导栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 雌核发育二倍体早期胚胎的细胞学研究及 GISH 鉴定. 海洋与湖沼, 40(3): 325—329
 王晓清, 王志勇, 柳小春等, 2006. 大黄鱼人工诱导雌核发育后代的微卫星标记分析. 遗传, 28(7): 831—837
 王晓清, 王志勇, 柳小春等, 2007. 人工雌核发育大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 的 AFLP 分析. 海洋与湖沼, 38(1): 22—28
 王德祥, 苏永全, 王世锋等, 2006. 异源精子诱导大黄鱼雌核

- 发育的研究. 高技术通讯, 16(11): 1206—1210
- 田永胜, 陈松林, 邵长伟等, 2008. 鲈鱼冷冻精子诱导半滑舌鳎胚胎发育. 海洋水产研究, 29(2): 1—9
- 刘伟成, 李星云, 2005. 人工诱导鱼类雌核发育研究进展. 水利渔业, 25(6): 12—14
- 刘海金, 王常安, 朱晓琛等, 2008. 牙鲆单倍体、三倍体、雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较. 大连水产学院学报, 23(3): 161—167
- 李忠红, 刘海金, 张世奎等, 2009. 雌核发育与正常二倍体条斑星鲽胚胎发育比较研究. 水产科学, 28(12): 752—756
- 杨凤影, 杨爱国, 刘志鸿等, 2008. 人工诱导栉孔扇贝雌核发育后代的微卫星标记分析. 水生生物学报, 32(5): 680—686
- 肖俊, 彭德姣, 段巍, 2009. 用团头鲂精子诱导金鱼雌核发育研究. 水生生物学报, 33(1): 76—81
- 张梅芬, 吴美锡, 丁汉波, 1993. 泥鳅雌核生殖单倍体胚胎发育的研究. 动物学研究, 14(4): 361—366
- 郑忠明, 何滔, 薛良义, 2008. 紫外线照射对大黄鱼精子遗传失活和受精能力的影响. 宁波大学学报(理工版), 21(2): 169—173
- 曹学彬, 丁君, 常亚青, 2008. 人工诱导马粪海胆雌核发育的早期胚胎发育及细胞学观察. 大连水产学院学报, 23(1): 1—7
- 黎中宝, 方秀, 陈锦等, 2009. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)养殖群体遗传多样性的降低. 海洋与湖沼, 40(4): 447—450
- 潘英, 李琪, 王如才等, 2002. 海洋贝类雌核发育研究进展和展望. 水产学报, 26(5): 465—471
- An H S, Cho K C, Park J Y, 2005. Eleven new highly polymorphic microsatellite loci in the yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Molecular Ecology Notes, 5: 866—868
- Cai M, Wu Q, Liu X *et al*, 2010. Artificial induction of mito-gynogenetic diploids in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by hydrostatic pressure. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 28(4): 713—719
- Fopp-Bayat D, 2009. Induction of diploid gynogenesis in Wels catfish (*Silurus glanis*) using UV-irradiated grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. Journal of Experimental Zoology, 331A: 1—5
- Komen H, Thorgaard G H, 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. Aquaculture, 269: 150—173
- Liu S J, Duan W, Tao M *et al*, 2007. Establishment of the diploid gynogenetic hybrid clonal line of red crucian carp × common carp. Science in China Series C: Life Science, 50(2): 186—193
- Liu S, Qin Q, Wang Y *et al*, 2010. Evidence for the formation of the male gynogenetic fish. Marine Biotechnology, 12(2): 160—172
- Xu J H, You F, Yan B L *et al*, 2007. Effects of ultra-violet irradiation on sperm motility and diploid gynogenesis induction in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) undergoing cold shock. Aquacult Int, 15: 371—382
- Zhu X P, You F, Zhang P J *et al*, 2006. Effects of cold shock on microtubule organization and cell cycle in gynogenetically activated eggs of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Mar Biotechnol, 8: 312—318

COMPARISON OF EMBRYONIC DEVELOPMENT AND SSR ANALYSIS OF GYNOGENESIS IN *PSEUDOSCIAENA CROCEA* INDUCED BY HOMO- AND HETEROLOGOUS SPERM

MIAO Liang¹, WANG Tian-Zhu¹, LI Ming-Yun¹, TANG Xian-Nian¹, WANG Shu¹,
AN Qin¹, XU Wan-Tu²

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo, 315211;
2. Gangwan Aquacultural Seeding Co. Ltd. of Xiangshan County, Ningbo, 315702)

Abstract Gynogenesis was induced in *Pseudosciaena crocea* with heterologous (*Miichthys miiuy*) sperm and UV-irradiated homologous sperm, and the embryonic development and SSR patterns were compared. The fertilization and hatching rates of hetero-gynogenesis were higher than homo-gynogenesis, although the survival rate was lower. In the two gynogenesis groups, the embryos which failed to inhibit the extrusion of polar body showed obvious haploid syndrome, the embryos which were successful diploidized had the same process with the normal diploid embryos. However, the developing speed of gynogenetic diploid was slower than the control group. The delay may be due to the disturbance to the cell division cycle caused by cold shock. In homo-gynogenesis, SSR analysis at loci KPC9 and KPC45 showed in 24 tested offsprings, with four individuals showing the paternal bands, suggesting that there were genetic leakage of the paternal fish. In hetero-gynogenesis, SSR analysis at locus KPC43 showed 18 tested offsprings with all individuals showing the maternal specific band only, indicating that the heterologous sperm can avoid paternal gene inflowing to the offspring. In the gynogenesis induction studies, the selection of homo- or heterologous sperm should be based on their relative merits.

Key words *Pseudosciaena crocea*, *Miichthys miiuy*, Gynogenesis, Embryo development, SSR markers