

## 黄姑鱼雌核发育的人工诱导及鉴定\*

徐冬冬<sup>1</sup>, 楼宝<sup>1①</sup>, 薛宝贵<sup>1</sup>, 史会来<sup>1</sup>, 詹炜<sup>1</sup>, 马世磊<sup>1,2</sup>, 毛国民<sup>1</sup>,

(1. 浙江省海洋水产研究所 浙江省海水增养殖重点实验室, 舟山 316100;

2. 浙江海洋学院 海洋科学学院, 舟山 316004)

**提要:** 采用紫外线 (UV) 灭活的同源精子通过冷休克抑制第二极体排放诱导黄姑鱼的雌核发育。黄姑鱼精子最适的灭活剂量为 420 mJ/cm<sup>2</sup>, 紫外照射剂量与黄姑鱼精子和卵子授精后的受精率及孵化率之间表现出明显的 Hertwig 效应。多次试验筛选的黄姑鱼雌核发育的最适条件为授精后 2min 在 3℃ 处理 8min。雌核发育仔鱼经形态学和流式细胞仪鉴定为二倍体。进一步利用 10 对微卫星分析了遗传物质在亲本和子代中的传递情况, 结果表明雌核发育后代的等位基因完全来自于母本, 没有父本基因参与; 雌核发育后代在 5 个位点微卫星位点具有较高的重组率, 使其与母本保持了高度同质性。

**关键词:** 黄姑鱼, 雌核发育, 人工诱导, 紫外灭活, 冷休克, 微卫星

黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 隶属于属石首鱼科 (Sciaenidae)、黄姑鱼属 (*Nibea*), 为近海暖温性中下层经济鱼类, 分布于中国、朝鲜半岛和日本南部沿海, 是重要的海水经济鱼类(朱元鼎等, 1963)。它肉质鲜美、营养丰富, 具有生长快、抗逆性强等优良的养殖性状, 近年来, 随着黄姑鱼繁育技术的日趋成熟, 其养殖规模也逐渐扩大, 成为继大黄鱼后我国网箱养殖的重要品种。因此, 借鉴其他海、淡水养殖鱼类中良种培育的经验, 对黄姑鱼进行遗传改良是其当前产业发展的研究重点。但是, 关于黄姑鱼的遗传育种研究还处于起步阶段(Han *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2009; 耿智等, 2012)。

雌核发育是进行鱼类遗传改良的重要手段之一。雌核发育技术一方面可以缩短纯系建立的时间, 增加优良基因与基因型的频率, 减少群体中存在的不良及有害基因; 另一方面, 在雌雄两性生长存在差异鱼类中, 通过雌核发育可以实现单性养殖从而能够显著提高养殖效益。诱导二倍体的雌核发育, 通常是以抑制激活卵第二次成熟分裂后期的第二极体排放或抑制激活卵第一次卵裂实现染色体加倍。采用冷休克抑制激活卵第二极体排放是鱼类雌核发育人工诱导最为常用的方法 (楼允东, 1986; Arai, 2001), 在许多重要的淡水、海水养殖鱼类

\* 国家 863 计划 (2012AA10A413-5)、浙江省重大科技专项 (2012C12907-8) 共同资助。徐冬冬, 博士, 高工, 主要从事海水鱼类遗传学和遗传育种研究, E-mail: [xudong0580@163.com](mailto:xudong0580@163.com)

① 通讯作者: 楼宝, 研究员, E-mail: [loubao6577@163.com](mailto:loubao6577@163.com)

中均有相关报道 (Gomelsky, 2003; Komen *et al*, 2007; Xu *et al*, 2007; Nichols *et al*, 2009; Chen *et al*, 2009; 刘海金等, 2010; 苗亮等, 2011)。近年来, 我国学者通过雌核发育技术成功培育了“闽忧 1 号”大黄鱼、“北鲆 1 号”牙鲆等优良的海水养殖品种, 成为雌核发育技术在水产养殖中实践的成功典范(2010、2011 水产新品种推广指南, 全国水产技术推广总站)。

黄姑鱼的生长试验表明, 雌雄两性生长存在显著差异, 15 月龄时黄姑鱼雌鱼体重是雄鱼的 1.31 倍 (徐冬冬等, 2010)。因此, 有必要开展雌核发育诱导研究, 为建立黄姑鱼纯系和培育全雌苗种奠定基础。本研究报道了利用冷休克诱导黄姑鱼雌核发育的方法, 筛选了冷休克诱导参数, 并通过形态学、流式细胞仪及微卫星技术对雌核发育苗种进行鉴定, 研究结果将为后续的遗传改良工作提供重要的技术手段和科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验用鱼

实验用亲鱼由浙江省海水增养殖重点实验室培育, 为捕自舟山海域的野生亲鱼人工繁育的子代。选取性腺已经发育、无病无伤的亲鱼, 注射促黄体激素释放激素 LRH-A<sub>3</sub> 直接进行人工催产, 催产剂量为雌鱼 3~5 μg/kg, 雄鱼减半或不注射。催产后雌鱼、雄鱼分别放于不同的养殖池, 达到效应时间(30~40 h)后, 人工挤卵并均分成若干等分待用; 选取数尾性腺发育良好的雄鱼, 用棉布擦干其腹部, 轻轻挤压雄鱼腹部获得精子, 精子取出后放于冰面上、避光待用。

### 1.2 精子遗传物质灭活

将精液放于预冷的Ringer氏液中稀释40倍后, 均分到4个内径13 cm培养皿中, 对精液进行0s、90s、150s、180s、210s、240s、300s、360s的照射(照射强度为0~720 mJ/cm<sup>2</sup>), 采用数字紫外辐射照度计(VLX-3W, Cole Parmer Instrument Company)测定光强, 照射后的精液样品置于冰面避光保存备用。

### 1.3 人工授精及冷休克处理

参照大黄鱼人工雌核发育的诱导方法 (Xu *et al*, 2007) 和预实验结果设置冷休克处理的参数。不同紫外照射时间照射后的精液与正常的卵授精。人工授精后在22~23℃的海水中孵化。

#### 1.3.1 处理时刻的筛选

设置授精后1min、2min、3min、4min (处理温度为3~4℃, 处理时间为10 min), 处理后的受精卵正常孵化, 统计各组受精率、孵化率和诱导率筛选最适处理起始时刻。

### 1.3.2 处理时间的筛选

分别设置处理时间为5min、8min、10min、12min、15min、20min（处理时刻为2 min，处理温度为3~4℃）。根据统计各组受精率、孵化率及诱导率结果筛选最适处理持续时间。

### 1.3.3 处理温度的筛选

确定冷休克起始时间和冷休克持续时间后，再进行冷休克持续时间的确定；即授精后2min在不同温度梯度下处理8min，设置0℃、1.5℃、3℃、4.5℃四个冷休克温度处理组，统计各组受精率、孵化率及诱导率筛选最适的起始温度。

## 1.4 倍性鉴定

取正常二倍体、单倍体和雌核发育二倍体初孵仔鱼各20尾，蒸馏水洗净后加入分散液并捣碎、过260目筛绢、DAPI染色后，采用流式细胞仪(Ploidy Analyzer, Paretec GmbH, Munster, Germany)检测DNA相对含量(You *et al.*, 2001)。

## 1.5 微卫星分析

### 1.5.1 样品采集及DNA提取

获得雌核发育诱导的最适条件后，在此条件下采集1条雌鱼和1条雄鱼的精卵进行雌核发育诱导。采集亲鱼鳍条及孵出后仔鱼30尾，初孵仔鱼样品（受精后约100h）则直接置于盛有无水乙醇的5ml离心管中带回实验室备用。亲鱼鳍条和初孵仔鱼的DNA提取采用酚-氯仿方法（王伟等，2006）。

### 1.5.2 微卫星引物及PCR反应

本实验中使用的微卫星引物来自本实验室开发的9对微卫星引物（Xu *et al.*, 2012）和1对文献报道的引物Nial28（Xing *et al.*, 2009），上游引物5'末端分别采用不同的荧光素（6-FAM、VIC、PET、NED）进行标记（如表1）。PCR反应体系为10μl，内含0.4μmol/L的引物，100μmol/L的dNTPs，2.0mmol/L的Mg<sup>2+</sup>，1×PCR反应缓冲液，0.5U的Taq DNA聚合酶（Promega），约100ng的模板DNA。PCR反应为35个循环，每个循环包括：94℃变性1min，退火30sec，72℃延伸45sec；首次循环前预变性5min，最后一次循环结束后72℃再延伸10min。

表1 微卫星引物序列、特异退火温度和Genbank登陆号

Table 1 The sequences and specific annealing temperature of microsatellite loci in *Nibea alibiflora*

引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度(°C)	Genbank 登陆号
Nibea01	F: CTTGGTTTTAGGTATCCAGGCTCT (FAM) R: TGCCCACTCACCTGTGTCATT	55	JX413354

Nibea02	F: ACAGAACACATCCAAACAAAGG(VIC) R: AACCAAAAGAAAGGAGCGAC	51	JX413355
Nibea04	F: AAGACGGTATGCCAGGGTT(PET) R: GTTCAGGAGCAAAAAATAAGAGA	51	JX413357
Nibea05	F: CAAAGGTTAGCCCCAAATCTG(VIC) R: CGCACAATAAGCAATCACATAC	55	JX413358
Nibea06	F: GCACACCTGACCGTGAACA(NED) R: GAAGAGAACAACCTGGTAATGAACT	54	JX413359
Nibea07	F: GAAGAAGTGAGAGAAAAGGGG(PET) R: ATTATGTGAAAGTGCTGCGAG	53	JX413360
Nibea08	F: AAATGTTTGGCTGTGCTATGA(FAM) R: ATTGTGTGGCTGTTTTGTGTTA	51	JX413361
Nibea09	F: TGCCTTTTGGAAATCAGCCT (VIC) R: ACATCTCCCTAACAGTCGCATAATA	51	JX413362
Nibea11	F: GAGTGTCTTGTGTGTTTATTCATCTG(PET) R: AGCACCTGCCGCTCTCTGTA	55	JX413364
Nial28	F: GAGGAGGACGGGGGAGCAGAA(FAM) R: CCAGCCTAATGGCAACAAGGGAT	54	EU694167.1

注：括号内为所使用的荧光标记。

### 1.5.3 基因型分析

采用ABI PRISM 3100型遗传分析仪( Applied Biosystems) 对扩增片段进行测定，并用GeneMapper 3.0软件( Applied Biosystems) 对基因型进行判读。

### 1.6 数据处理

统计各组的受精率（胚胎发育至原肠期）、孵化率和诱导率，各参数计算公式如下（Ji *et al*, 2010）：

$$\text{受精率(\%)} = \text{受精卵数} / \text{总卵数} \times 100\%$$

$$\text{孵化率(\%)} = \text{初孵仔鱼数} / \text{受精卵数} \times 100\%$$

$$\text{单倍体率(\%)} = \text{单倍体仔鱼数} / \text{仔鱼总数} \times 100\%$$

$$\text{诱导率(\%)} = \text{正常初孵仔鱼数} / \text{总卵数} \times 100\%$$

每组实验进行3 次以上重复。所有数据经SPSS 11. 5统计软件处理，多重比较采用Duncan方法进行。进行多重比较时，授精率、孵化率和诱导率进行反正弦转换。

## 2 实验结果

### 2.1 精子物质的遗传灭活效果

不同的紫外（UV）照射时间对黄姑鱼精子的遗传物质灭活效果如图 1。从图中可看出，

在一定照射时间范围内, 各组的受精率和孵化率随紫外照射时间的延长变化不大, 照射时间 3.5 min 内( 照射强度 $< 420 \text{ mJ/cm}^2$ ), 各组的受精率和孵化率无显著差异 ( $P>0.05$ ); 当照射时间超过 3.5min 后各组的受精率和孵化率显著下降, 在 6 min (照射强度为  $720 \text{ mJ/cm}^2$ ) 达最低。单倍体率随紫外照射时间延长而上升, 照射 3.5min 以上, 单倍体率达到 100%。因此, 黄姑鱼精子的紫外照射剂量与所获胚胎受精率、孵化率以及单倍体率之间表现出明显的 Hertwig 效应。综合考虑, 黄姑鱼精子紫外灭活的最适照射剂量为  $420 \text{ mJ/cm}^2$  (照射时间 3.5 min)。

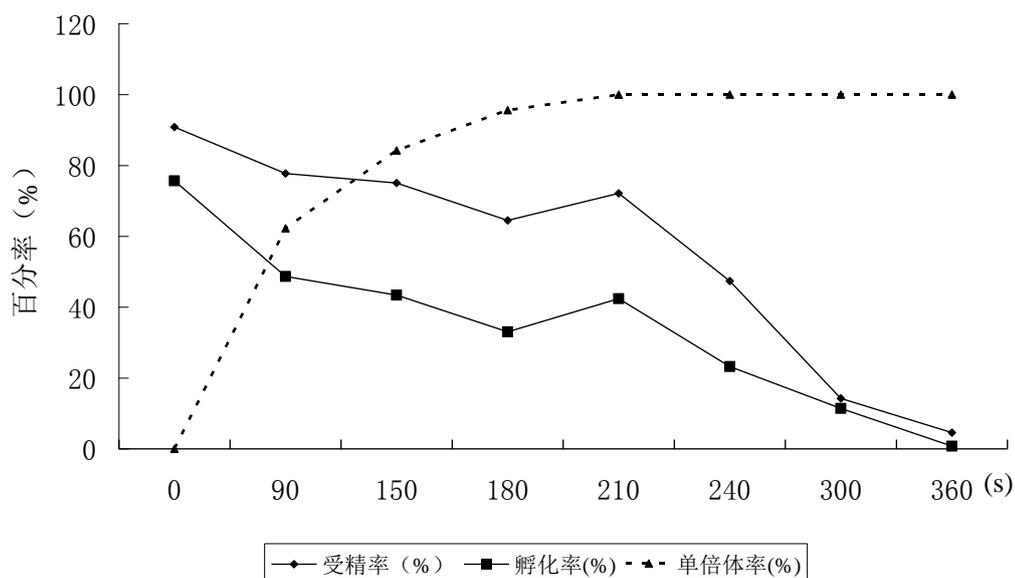


图 1 黄姑鱼精子紫外照射的 Hertwig 效应

Fig. 1 The Hertwig's effects in sperm of *Nibea albiflora* with UV irradiation

## 2.2 冷休克的诱导参数

不同染色体加倍起始时间对受精率、正常二倍体孵化率和诱导率的影响如表 1。授精后 1~4min 开始加倍均能诱导出黄姑鱼雌核发育苗种, 但在授精后 2min 的诱导率为  $19.0 \pm 3.22\%$ , 显著高于其它处理组 ( $P<0.05$ )。因此, 黄姑鱼雌核发育最佳的诱导时刻为授精后 2min。

表 2 不同冷休克处理时刻对受精率、正常二倍体孵化率和诱导率的影响

Tab. 1 Effect of different initial time of cold shock commencement after fertilization.on fertilization, hatching and induction rates

受精率 (%)	正常二倍体孵化率 (%)	诱导率 (%)
---------	--------------	---------

对照组	82.53±2.21 <sup>a</sup>	74.70±1.78 <sup>a</sup>	61.67±3.06 <sup>a</sup>
授精后 1min	34.21±3.19 <sup>c</sup>	45.53±5.10 <sup>b</sup>	15.56±2.13 <sup>b</sup>
授精后 2min	43.25±5.11 <sup>bc</sup>	43.90±4.61 <sup>b</sup>	19.0±3.22 <sup>b</sup>
授精后 3min	44.16±7.19 <sup>b</sup>	20.70±1.95 <sup>c</sup>	9.21±2.09 <sup>c</sup>
授精后 4min	44.29±5.90 <sup>b</sup>	10.09±1.26 <sup>d</sup>	4.52±1.10 <sup>d</sup>

注: 上标字母表示多重比较结果, 标注不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

不同的处理温度对黄姑鱼的诱导率具有显著影响(表 2), 0℃时的诱导率仅为 1.26±1.04%; 3℃诱导率最高, 为 16.93±3.27%, 显著高于其它各组 ( $P<0.05$ )。冷休克处理时间也是影响黄姑鱼雌核发育苗种的诱导率的重要参数(表 3)。冷休克持续时间为 8min 时获得了较高的诱导率 (12.21±3.96%), 显著高于其它处理组差异显著 ( $P<0.05$ )。因此, 黄姑鱼雌核发育的最适温度为 3℃, 冷休克处理的最适时间为 8min。

表 3 不同冷休克处理温度对受精率、正常二倍体孵化率和诱导率的影响

Tab. 2 Effect of different water temperatures for cold shock treatment on fertilization, hatching and induction rates

	受精率 (%)	正常二倍体孵化率 (%)	诱导率 (%)
对照组	86.68±5.23 <sup>a</sup>	71.67±6.56 <sup>a</sup>	62.35±9.52 <sup>a</sup>
0℃	24.72±3.94 <sup>d</sup>	4.77±3.38 <sup>d</sup>	1.26±1.04 <sup>c</sup>
1.5℃	36.21±4.10 <sup>c</sup>	17.26±4.13 <sup>c</sup>	6.36±2.15 <sup>c</sup>
3℃	48.50±3.90 <sup>b</sup>	34.72±4.03 <sup>b</sup>	16.93±3.27 <sup>b</sup>
4.5℃	50.39±4.75 <sup>b</sup>	15.60±3.11 <sup>c</sup>	7.95±2.31 <sup>c</sup>

注: 上标字母表示多重比较结果, 标注不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

表 4 不同冷休克处理时间对受精率、正常二倍体孵化率和诱导率的影响

Tab. 3 Effect of different duration time for cold shock on fertilization, hatching and induction rates

	受精率 (%)	正常二倍体孵化率 (%)	诱导率 (%)
对照组	87.25±5.29 <sup>a</sup>	72.67±5.29 <sup>a</sup>	63.55±7.80 <sup>a</sup>
5	56.93±7.64 <sup>b</sup>	10.93±3.06 <sup>bcd</sup>	6.38±2.64 <sup>cd</sup>
8	50.89±7.23 <sup>b</sup>	23.63±5.01 <sup>b</sup>	12.21±3.96 <sup>b</sup>
10	46.4±3.61 <sup>c</sup>	18.00±6.19 <sup>bc</sup>	8.29±2.65 <sup>bc</sup>

12	32.5 ± 1.91 <sup>d</sup>	14.57 ± 5.77 <sup>bcd</sup>	4.70 ± 1.71 <sup>cd</sup>
15	20.24 ± 5.00 <sup>e</sup>	9.41 ± 2.65 <sup>cd</sup>	1.99 ± 1.03 <sup>cd</sup>
20	13.23 ± 2.52 <sup>e</sup>	6.62 ± 3.17 <sup>d</sup>	0.93 ± 0.61 <sup>d</sup>

注: 上标字母表示多重比较结果, 标注不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

### 2.3 倍性鉴定

黄姑鱼正常二倍体、雌核发育二倍体和单倍体的初孵仔鱼如图 2。单倍体的初孵仔鱼均表现为典型的单倍体综合症, 孵出后很快全部死亡(图 2b, 图 2d), 而雌核发育组中加倍后的初孵仔鱼表现正常(图 2c), 与二倍体对照组具有相似的外部形态(图 2 a)。

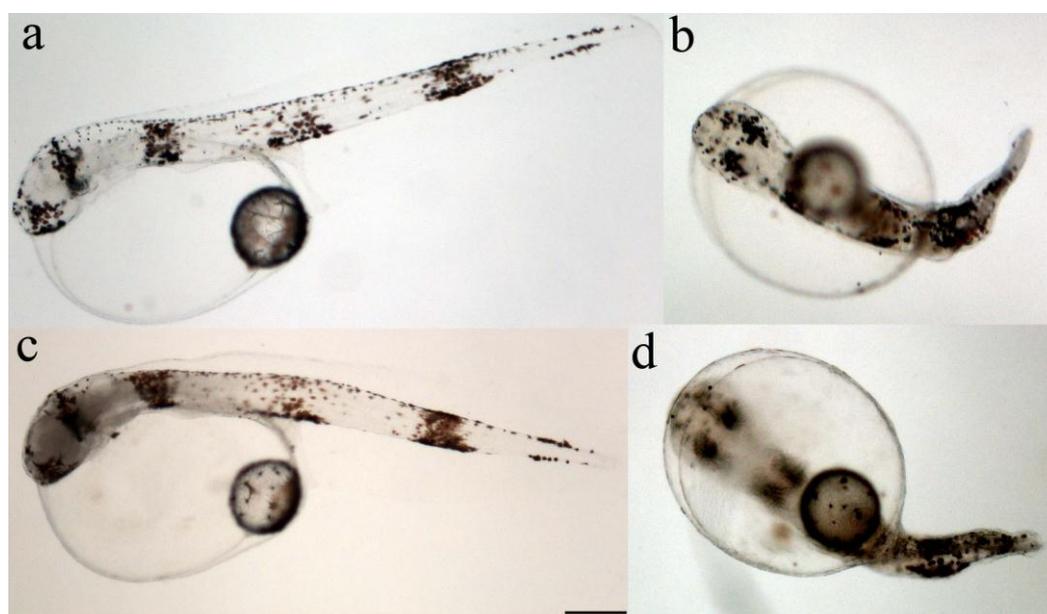


图 2 黄姑鱼正常二倍体 (a)、单倍体初孵仔鱼(b 和 d)和雌核发育二倍体 (c)

Fig.2 External morphologies of diploid control (a), haploid (b and d) and gynogenetic diploid (c) larvae of *Nibea albiflora*

以正常二倍体的黄姑鱼鱼苗为对照组, 测定的 DNA 相对含量设为 100, 其在 200 处有一个分裂峰(图 2a); 然后测定单倍体和雌核发育二倍体鱼苗的 DNA 相对含量; 如此测定的单倍体鱼苗的 DNA 相对含量在 50 处有一峰值, 其在 100 处有一分裂峰(图 2b); 雌核发育二倍体鱼苗的 DNA 相对含量在 100 处有一峰值, 在 200 处有一分裂峰(图 2c)。表明单倍体的 DNA 含量为正常二倍体的一半, 而雌核发育鱼苗的 DNA 含量与正常二倍体相当。

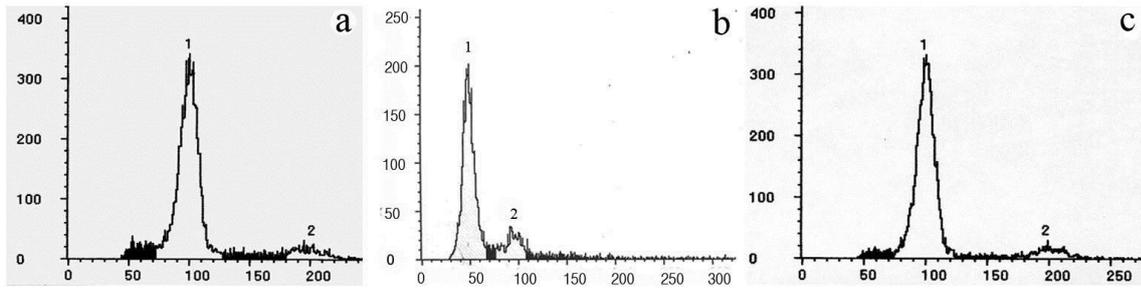


图 3 黄姑鱼初孵仔鱼的细胞流仪检测图

Fig.3 DNA values of larvae of *Nibea albiflora* measured by flow cytometry

a 为正常二倍体初孵仔鱼的细胞流仪检测图, b 为黄姑鱼单倍体初孵仔鱼的细胞流仪检测图, c 为黄姑鱼雌核发育二倍体初孵仔鱼的细胞流仪检测图。

## 2.4 微卫星分析

黄姑鱼雌核发育鱼苗及其亲本的基因组 DNA 经 10 对微卫星引物检测, 每对引物在雌核发育后代中所扩增产物的个体数、父母本的基因型及雌核发育后代的基因型见表 4。对于每个基因座位上基因型的定义按其片段从大到小依次定义为 a、b、c、d。从图 4 中可以看出, 父本在微卫星 Nibea01 的基因型为 ac, 母本的基因型为 bb, 子代的基因型为 bb, 雌核发育后代的等位基因完全来自于母本; 在其余 9 个微卫星位点的检测结果也表明子代的基因型均来自母本, 没有父本基因的参与 (表 4); 因此, 本实验获得的子代苗种为雌核发育的后代。雌核发育后代在 5 个微卫星座位具有一定比例的重组, 重组率为 24.1~100%; 其中, 微卫星位点 Nibea05 和 Nibea08 的重组率为 100%, 微卫星位点 Nial28 的重组率也高达 93.3% (表 4)。

表 4 不同微卫星座位在父母本和雌核发育后代的基因型和重组率

Tab. 4 The genotype and combination rate of parental and the progeny of gynogenesis on different microsatellite loci

基因座位	个体数	父本基因型	母本基因型	雌核发育后代基因型			重组率
Nibea01	26	a/c	b/b	b/b			0
Nibea02	24	a/b	c/d	c/c (2)	c/d (18)	d/d (4)	0.75
Nibea04	29	a/b	b/c	b/b(0)	b/c(7)	c/c (22)	0.241
Nibea05	29	a/b	b/c	b/c (29)			1
Nibea06	24	a/b	b/b	b/b(24)			0
Nibea07	28	a/a	b/b	b/b (28)			0
Nibea08	24	c/d	a/b	a/b (24)			1
Nibea09	24	a/b	a/a	a/a(24)			0
Nibea11	26	a/a	b/b	b/b(26)			0

注：重组率=杂合个体数/总个体数×100%

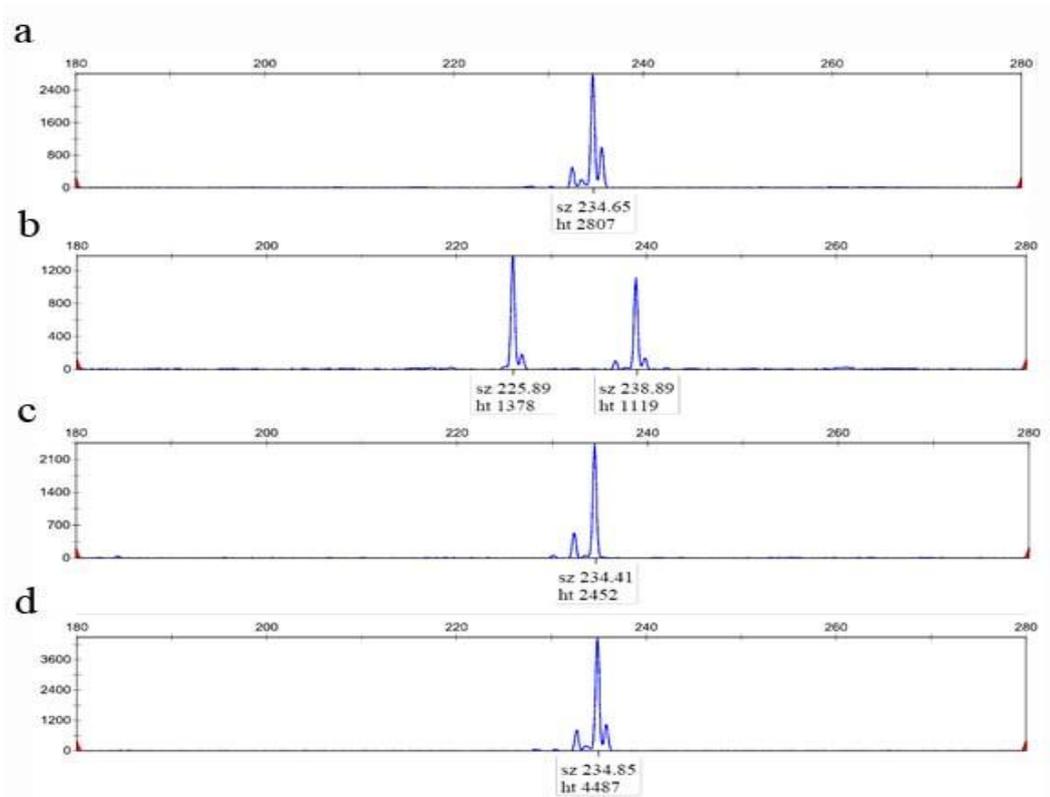


图 4 父母本及雌核发育个体在位点 Nibeal01 的基因型

Fig.4 The genotypes of parents and individuals induced by cold shock in microsatellite loci Nibeal01

a、b、c、d 分别表示父本、母本、子代 1 和子代 2 在 Nibeal01 的基因型

### 3 讨论

人工诱导雌核发育期望最大限度的避免父本物质的渗入，精子遗传物质的完全灭活是人工诱导的关键因素。紫外照射是灭活精子遗传物质的常用方法。研究表明，大部分鱼类精子经不同剂量的紫外照射后呈显著的 Hertwig 效应(柳学周等, 2010; Christopher *et al.*, 2010)，即在一定的剂量范围内，经不同剂量紫外照精子随着照射剂量的增大，与其授精后获得的胚胎成活率降低甚至全部死亡，但随照射剂量的继续增加，胚胎的成活率高有所恢复。本研究中，随照射时间延长黄姑鱼紫外照射后的精子与卵子受精后的胚胎成活率出现先降低后上升而后又降低的现象，因此，黄姑鱼精子在紫外照射的过程中也呈现明显的 Hertwig 效应。究其原因，有学者认为紫外照射对染色质的结构破坏造成精子的活力下降，从而导致胚胎成活率降低(Komen *et al.*, 2007)，但对于受精率降低后又得以恢复的原因尚缺乏充分的证据和有

说服力的解释。本研究中，黄姑鱼紫外照射的最佳剂量为  $420\text{mJ}/\text{cm}^2$ 。这一最适灭活剂量高于真鲷 (Yamamoto, 1999)，花鲈 (Chen *et al*, 2009; 杨景峰等, 2010) 等海水鱼类雌核发育诱导过程中精子遗传物质灭活的紫外照射剂量。不同鱼类精子对紫外照射的敏感性存在种属差异可能是造成鱼类精子的紫外照射剂量差别的原因。除此之外，实验过程中精液的稀释倍数、精子稀释液的配方、照射时的稀释液温度以及周围环境温度等因素也都会影响灭活效果 (Xu *et al*, 2007; 刘海金等, 2010)。

冷休克诱导的起始时刻、处理温度以及持续时间是影响雌核发育诱导率的重要因素。冷休克处理是通过抑制卵子的第二极体排放实现染色体加倍，超过第二极体排放的时间范围实施处理则无效，因此，诱导的起始时刻对诱导结果影响最大。本研究中，在授精后 1~3min 均可获得较高的雌核发育诱导率 (9.21~19.0%)，授精后 2min 开始处理的诱导率最高。这一结果与大黄鱼的诱导起始时刻基本一致 (Xu *et al*, 2007)，而较大菱鲆 (Xu *et al*, 2008)、条纹星鲽 (杨景峰等, 2009) 等提前，造成诱导起始时刻不同的原因可能与亲鱼和受精卵培育水温、所用卵子的成熟度以及实验时的室温等因素有关 (Arai, 2001; Gomelsky, 2003)。冷休克的温度和处理时间对黄姑鱼的胚胎成活率也有较大影响，在  $3^{\circ}\text{C}$  处理 8~10min 的胚胎诱导成活率最高，高于或低于这一处理条件诱导率显著下降，这表明黄姑鱼胚胎对温度处理较为敏感。黄姑鱼的最佳诱导条件与真鲷 (授精后 3~5min 在  $3\sim 4^{\circ}\text{C}$  下处理 5min) (Kato *et al*, 2004)、大黄鱼 (授精后 3min 在  $3^{\circ}\text{C}$  下处理 10~12min, Xu *et al*, 2007) 等海水鱼类相似，这可能与它们耐受水温范围和对低温耐受时间相似有关 (Arai, 2001; 刘海金等, 2010)。

雌核发育苗种倍性鉴定的常用方法有形态学、染色体核型分析、流式细胞术、分子标记等 (Arai, 2001; Gomelsky, 2003; Komen *et al*, 2007)。本研究采用形态学和流式细胞术的方法均证明所获得的雌核发育苗种为二倍体。形态学和流式细胞术的方法较为快速、简便、高效，但微卫星作为共显性标记，可以更深层次地揭示遗传物质在亲本和子代间的传递。采用 10 对微卫星引物对诱导的雌核发育黄姑鱼进行了家系分析，结果表明雌核发育的后代仅保留母本的遗传物质，没有父本遗传物质的掺入，进一步从分子水平上证明了诱导获得的苗种为雌核发育二倍体。

冷休克诱导的减数分裂雌核发育由于第一次减数分裂时同源染色体之间发生了交换造成基因重组，从而导致部分雌核发育个体出现基因的杂合。许多研究表明鱼类雌核发育群体出现基因重组的现象。Peruzzi *et al* (2000) 利用微卫星标记对雌核发育的舌齿鲈进行鉴定时发现所用的 3 个微卫星座位的重组率为 19~96%；朱晓琛等 (2006) 利用 8 个微卫星座位对牙鲆减数雌核发育二倍体家系分析发现，其中 7 个座位均具有很高的重组率 (19.44~100%)；

王晓清等(2006)在利用微卫星分析两个大黄鱼雌核发育家系过程中,也发现具有较高的重组率。在本研究中,在5对引物的基因座位均出现重组,其中Nibea05和Niabea08的重组率为100%,Nial28的重组率也高达93.3%。黄姑鱼的染色体较小且均为端着丝粒染色体,容易出现基因座位与着丝点之间发生重组(王伟等,2006;耿智等,2012)。另外,雌核发育过程中隐性致死基因导致纯合个体死亡也可能与较高的重组率有关(王晓清等,2006;朱晓琛等,2006)。从本研究结果可以看出:减数分裂的黄姑鱼雌核发育二倍体具有较高的重组率,使其不适合用于直接建立纯系,但较高的重组率同时体现了与母本具有高度的遗传同质性。

全国水产技术推广总站编,2010.水产新品种推广指南.1-297.北京:中国农业出版社.

全国水产技术推广总站编,2010.水产新品种推广指南.1-147.北京:中国农业出版社.

耿智,徐冬冬,楼宝等,2012.黄姑鱼和日本黄姑鱼染色体核型的比较.渔业科学进展,33(5):8-14.

刘海金,侯吉伦,常玉梅等,2010.真鲷精子诱导牙鲆减数分裂雌核发育.水产学报,34(4):508-514.

柳学周,宁鑫,徐永江等,2011.真鲷精子诱导漠斑牙鲆减数雌核发育.中国水产科学,18(6):1259-1268.

楼允东.1986.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,10(1):111-123.

苗亮,王天柱,李明云等,2011.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.海洋与湖沼,42(3):419-424.

王伟,尤锋,高天翔等,2006.人工诱导牙鲆异质雌核发育群体的微卫星标记分析.高技术通讯,15(7):107-110.

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.

徐冬冬,詹炜,楼宝等,2010.网箱养殖黄姑鱼生长特性初步研究.渔业现代化,37(5):34-36.

杨景峰,陈松林,苏鹏志等,2009.异源精子诱导条斑星鲽雌核发育.水产学报,33(3):372-378.

朱晓琛,刘海金,孙效文等,2006.微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性.动物学研究,

27(1): 63-67.

Arai K, 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197(1): 205-228.

Chen S L, Tian Y S, Yang J F, *et al*, 2009. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Marine Biotechnology*, 11(2): 243-251.

Christopher J, Murugesan A G, Sukumaran N, 2010. Induction of meiotic gynogenesis in the stinging catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch) and evidence for female homogamety. *Aquaculture Research*, 42(1): 129-138.

Gomelsky B, 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. *Aquatic Living Resources*, 16(5): 408-415.

Han Z Q, Gao T X, Yanagimoto T, *et al*, 2008. Genetic population structure of *Nibea albiflora* in Yellow Sea and East China Sea. *Fisheries Science* 74(3): 544-552.

Ji X S., Tian Y S, Yang J F, *et al*, 2009. Artificial gynogenesis in *Cynoglossus semilaevis* with homologous sperm and its verification using microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 41(6): 913-920.

Komen H, Thorgaard G H, 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture*, 269(1): 150-173.

Nichols K M, 2009. Clonal lines and chromosome manipulation for aquaculture research and production. *Molecular research in aquaculture*. K. Overtuf (Ed.). Wiley-Blackwell, Ames, IA, USA: 195-216.

Peruzzi S, Chatain B, 2000. 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. *Aquaculture*, 189: 23-37.

Xu D D, Lou B, Li S L, *et al*, 2013. Isolation and characterization of eleven microsatellite loci in *Nibea albiflora*. *Genetics and Molecular Research*. (accepted)

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. *Aquaculture International*, 15(5): 371-382.

Xu J H, You F, Sun W, *et al*, 2008. Induction of diploid gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus* with left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus* sperm. *Aquaculture International*, 16(6):

623-634.

Xing S C, Shao C W, Liao X L, *et al*, 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from a dinucleotide-enriched genomic library of spotted maigre (*Nibea albiglora*). *Conservation Genetics*, 10(3): 789-791.

You F, Lu J, Wang X C, 2001. Study on the embryonic development and early growth of triploid and gynogenetic diploid left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 19(2):147–151.

## ARTIFICIAL INDUCTION OF DIPLOID GYNOGENESIS IN *NIBEA ALIBIFLORA* AND EVIDENCE FOR FEMALE HOMOGAMETY

XU Dong-Dong<sup>1</sup>, LOU Bao<sup>1</sup>, XUE Bao-Gui<sup>1</sup>, SHI Hui-Lai<sup>1</sup>, ZHAN Wei<sup>1</sup>, MA Shi-Lei<sup>1,2</sup>,  
MAO Guo-Min<sup>1</sup>

(1. *Marine Fishery Institute of Zhejiang Province, Zhejiang province Key Lab of Mariculture and Enhancement, Zhoushan, 316100*; 2. *Zhejiang Ocean University, College of Marine Science, Zhoushan, 316004*)

**Abstract** The induction of diploid gynogenesis in *Nibea albiglora* was established using a combination of UV-irradiated homologous sperm and cold shock of the resulting embryo to inhibit the second meiotic division. The optimal UV irradiation of the *N. albiglora* sperm for gynogenesis was 420 mJ/cm<sup>2</sup>. A typical “Hertwig effect” was observed based on the fertilization, hatching and occurrence of haploid by subjecting eggs fertilized with UV-irradiation sperm. Treatment optima for gynogenesis were 3°C for 8 min at 2min after fertilization based on several experiments. Results obtained from the observations of external morphologies and detection of DNA content in larvae by flow cytometry proved that the larvae were diploid gynogenesis. Furthermore, genetic inheritance from the parents to the progeny was examined by 10 microsatellites. The genetic analysis revealed exclusively maternal inheritance in all gynogenetic fry and no paternal contributions were detected. The combination rate was relative high at 5 microsatellite loci in the gynogenetic offspring, and thereby the offspring has high genetic homogeneity to their female parent.

**Key words:** *Nibea albiglora*, gynogenesis, artificial induction, UV irradiation, cold shock, microsatellite