

人工诱导稀有鮡鲫雄核发育条件研究

王大贺^{1,2}, 刘永嘉¹, 李伟¹, 刘少贞¹, 刘青¹

(1. 山西农业大学动物科学学院, 山西 太谷 030801;

2. 汕头大学广东省海洋生物技术重点实验室, 广东 汕头 515063)

摘要:为了探究单性群体选育途径,定向生产具备特定生长和繁殖性状的苗种,满足繁殖育种需要,进行濒危鱼类保护,以稀有鮡鲫(*Gobicypris rarus*)为试验对象,采用紫外线-热休克雄核发育技术诱导二倍体的方法,人工诱导稀有鮡鲫超雄个体产生。试验设置14组,1号为空白对照组,2~8号紫外线总辐射剂量分别为60、90、120、150、180、210、230 mJ/cm²,9~14号紫外线-热休克组的总辐射剂量分别为60、90、120、150、180、210 mJ/cm²。处理水温均为(38.5±0.5)℃,热休克2 min。结果表明:(1)在紫外线总辐射剂量60~230 mJ/cm²时,随着照射剂量的不断增加,紫外线辐照组、紫外线-热休克组的受精率、孵化率均有下降趋势;(2)紫外线和热休克处理对受精卵造成一定的损伤,成活率大幅度降低的时间点主要集中在囊胚晚期、肌肉效应期以及出膜前期,少数胚胎由于活力差,存在难以正常脱膜孵化现象;(3)经紫外线或紫外线-热休克处理的受精卵,发育速度稍慢于正常受精卵,且均存在畸形发育卵。通过紫外线-热休克雄核发育技术获得的稀有鮡鲫畸形个体较少,可能为超雄且形态正常的个体则更少。研究显示,紫外线和热休克相结合处理鱼类染色体技术将成为人工诱导稀有鮡鲫雄核发育的有效方法。

关键词:稀有鮡鲫;人工授精;雄核发育;紫外线;热休克

中图分类号:Q691 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2023)01-0117-08

稀有鮡鲫(*Gobicypris rarus*)是我国特有的本土生物,具有个体小、生存能力强、繁殖周期短、体外受精、体外发育、胚体透明易观察等特点,为遗传学、毒理学、胚胎发育学、环境科学等研究常用的试验生物(曹文宣和王剑伟,2003),同时稀有鮡鲫具有性成熟周期短、易催产的特点,使其成为雄核发育试验的理想鱼类。近年来,水环境毒理、性别差异等相关试验研究中对单性群体的需求越来越多,为快速选育能应用于相关试验研究的单性品系,拟对稀有鮡鲫雄核发育条件进行研究。雄核发育是子代仅保留父本染色体组的一种特殊的有性繁殖方式,迄今尚未发现鱼类天然雄核发育的现象,远缘杂交偶见雄核发育,但机率极低(李元善,1982)。

目前,人工诱导雄核发育途径根据鱼类染色体倍数又可分为二倍体途径和四倍体途径(林忠乔等,

2015)。四倍体途径是二倍体鱼类人工诱导为四倍体,其产生的精子与失活卵子结合可不用二倍化,直接发育成超雄个体,但该途径难度更大。雄核发育技术可快速建立纯系,通过染色体操作决定鱼类基因遗传方向,加以分子标记辅助育种(Pan et al, 2015),可定向生产具备特定生长和繁殖性状的苗种,提高育种选择效率,大大提高选种效率和精度。鱼类雄核发育技术除了能满足生产和繁殖育种需要,还能应用于濒危鱼类的保护(Nagoya et al, 2010)。研究利用紫外线-热休克诱导稀有鮡鲫雄核发育的技术条件,旨在探索一条安全、易操作、成功率高的稀有鮡鲫单性群体选育途径,也为研究其他鱼类的雄核发育条件提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验鱼选择山西农业大学水产实验室自繁6月龄的稀有鮡鲫性成熟个体。挑选繁殖特征明显的健康亲本50尾,雌雄比为1:1,雌雄分养于循环水族箱,水温(25.0±0.5)℃,光周期L:D=14h:10h(L: 06:00-22:00, D:22:00-06:00)以促进性腺发育,隔天换水1/3,早晚投喂解冻的摇蚊幼虫。

1.2 试验方法

1.2.1 催产 亲鱼在浓度50 mg/L的丁香酚养殖水中麻醉,鱼体腹腔注射鱼用激素人工催产,采用一次注射法,雌、雄鱼所用激素剂量均为LHRH-A 25 µg/kg,

收稿日期:2021-07-05 修回日期:2022-08-22

基金项目:山西农业大学生物育种工程项目(YZGC133);山西省现代农业产业技术体系建设专项资金(2022HX024);山西省基础研究计划(自由探索类)项目(20210302124149);山西省大学生创新创业训练计划项目(2020106)。

作者简介:王大贺,1997年生,男,本科生,专业方向为水产养殖。
E-mail:1842150253@qq.com

通信作者:刘青,1980年生,男,副教授,主要从事健康水产养殖和遗传育种研究。E-mail: liuqing_sxau@126.com

DOM 5 mg/kg, HCG 2000 IU/kg(陶刚等,2012;叶金明等,2016),效应时间 10~12 h。

1.2.2 精卵收集与观察 先收集精液再采集鱼卵。在激素效应时间内将亲鱼麻醉后,挤出精液并用含有精子保存液的 2 mL 离心管收集(杨景峰等,2005),显微镜检查精子活力,合格精子于 4 ℃下保存备用。雌鱼挤卵步骤与雄鱼相同,将成熟鱼卵挤入含有卵子保存液的培养皿备用(徐辉,2007)。

1.2.3 卵子辐照及授精 将卵子挤入培养皿并分别编号,每组设 3 个平行对照,每个培养皿有 60~150 粒卵。1 号设为空白对照组;2~8 号为紫外线辐照组,对应的紫外线总辐射剂量分别为 60、90、120、150、180、210、230 mJ/cm²;9~14 号为紫外线-热休克组,对应的紫外线总辐射剂量分别为 60、90、120、150、180、210 mJ/cm²,处理水温均为(38.5±0.5)℃,热休克 2 min。在培养皿上方安置 2 个紫外灯(30W;253.7 nm,Philips),温度设定为 25℃,转速 65 r/min 的恒温摇床培养箱接受辐照,强度(UVC)用光谱辐照计(深圳市联辉诚科技有限公司)测量为 2 953 μW/cm²,辐照剂量(mJ/cm²)=辐照强度(mW/cm²)×辐照时间(s)。

卵子辐照完毕后,倒掉培养皿中的卵子保存液,立即加入保存的精液进行干法人工授精,受精卵于水温(27.0±0.5)℃的孵化缸中孵化。人工授精 23 min 后,将培养皿于温度(38.5±0.5)℃的水浴锅中进行 2 min 热休克处理,自然降温至(27.0±1.0)℃,置于孵化缸中孵化。为了防止 DNA 光活化(Colléter et al, 2014),整个辐照及孵化过程在避光环境下进行。

1.2.4 受精卵发育观察 连续观察受精卵各时期的发育状态并拍摄记录,使用体视显微镜、SAGA 电子目镜、电脑显示器观察。

1.3 数据统计

统计受精率、孵化率、畸形率和成活率。统计方法分别为发育至原肠中期受精卵占总卵数的百分比、孵化苗数占受精卵总数的百分比、畸形个体占孵化总数的百分比和存活受精卵占总卵数的百分比。使用 SPSS 22.0 进行数据处理与分析,采用单因素方差分析、LSD 多重比较方法进行显著性检验,显著性水平设为 0.05,使用 GraphPad Prism 5 作图。

2 结果与分析

2.1 精子活力与卵子形态

在视野内可观察到大量获能且无规则运动的精子,说明精子数量充足、活力好。体视镜观察发现,卵粒圆润,卵黄与卵质界限明显,卵质清透,卵黄纹路清

晰可见,卵子大小均匀,卵子到达 V 期,发育成熟。

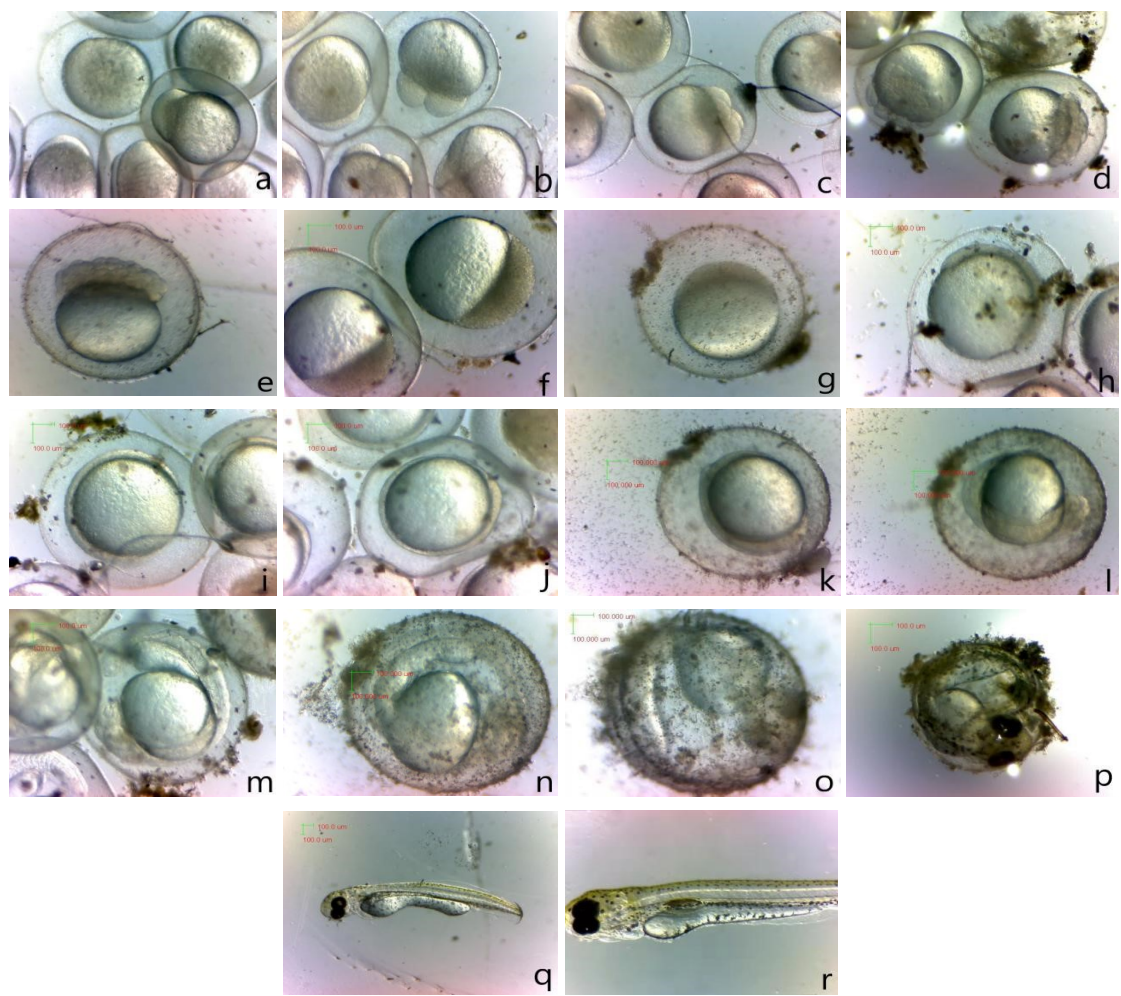
2.2 受精卵发育时序及特征观察

2.2.1 对照组受精卵 对照组受精卵各时期发育特征明显(表 1,图 1),处理组(紫外线辐照组、紫外线-热休克组)受精卵发育后期的形态特征与对照组相比存在明显差异(王剑伟等,1998;王绿平等,2020)。观察到对照组受精卵在(27.5±0.5)℃(孵化 70 h)条件下比在(26.0±1.0)℃(孵化 72 h)的孵化速度快。

表 1 稀有鮕鲫受精卵发育时序及形态特征描述
Tab.1 Development sequence and morphological characteristics of the fertilized eggs of the *G. rarus*

发育时期	受精后时间	形态特征
未受精卵	0 min	卵黄居中,胞质透明,核质界限清晰
卵裂期		
单细胞	30 min	单个细胞
2 细胞	50 min	2 个细胞相邻
4 细胞	1 h 10 min	4 个细胞
多细胞	2.5 h	动物极隆起成丘
囊胚期		
早期	3 h	胚层逐渐隆起
中期	3 h 30 min	胚层隆起较高
晚期	5 h 30 min	胚层变薄,胚层下包 30%
原肠期		
早期	6 h 30 min	胚层下包 50%
中期	7 h 15 min	胚层下包 75%
晚期	9 h 30 min	胚层下包 100%
神经胚期	11 h 30 min	胚基形成
体节期	13 h 30 min	肌节 2 对
眼囊期	17 h	蚕豆型眼囊,肌节 7 对
尾芽期	19 h 30 min	尾芽形成,肌节 13 对
尾泡期	21 h 30 min	尾泡可见,肌节 18 对
肌肉效应期	23 h 30 min	胚体抽动
心脏原基期	31 h	心脏形成并搏动
出膜前期		
眼灰期	48 h 30 min	眼囊变灰色
眼黑期	57 h	眼囊变黑色
鳃弧期	62 h	鳃弧形成,体色素增多
孵化期	70 h	体色呈现浅黄色有黑点
鳔一室期	120 h	鳔一室
卵黄尽吸收期	190 h	卵黄吸收完毕

2.2.2 UV 辐照组受精卵 UV 辐照组受精卵发育速度较对照组稍慢,受精 24.5 h 后仍未见肌肉抽动,肌肉效应期抽动的剧烈程度和频率均较对照组小,有些卵的卵质不清晰,甚至有些模糊(图 2-a),这一现象可能与紫外线的辐射有关,这些不抽动、卵质模糊的胚胎可能达不到孵化活力要求并逐渐死亡(图 2-b)。



(a)单细胞期,(b)2细胞期,(c)4细胞期,(d)多细胞期,(e)囊胚早期,(f)囊胚中期,(g)囊胚晚期,(h)原肠早期,(i)原肠中期,(j)原肠晚期,(k)神经胚期,(l)眼囊期,(m)肌肉效应期,(n)心脏搏动期,(o)眼灰期,(p)眼黑期;(q)孵出期,(r)鳔一室期

图 1 对照组稀有鮡鲫胚胎发育时序及特征

(a) Unicellular, (b) Two-cell stage, (c) Four-cell stage, (d) Multicellular stage, (e) Early blastula, (f) Mid-blastula, (g) Late blastula, (h) Early gastrula, (i) Mid- gastrula, (j) Late gastrula, (k) Neuroblast, (l) Optic vesicle stage, (m) Muscular contraction, (n) Heart pulsation, (o) Creyish eyes, (p) Melanoid eyes, (q) Larvae release from membrane, (r) Swimming bladder one-room stage

Fig.1 Embryonic developmental sequence and characteristics of *G. rarus* in the control group

经UV辐照的畸形胚胎到达肌肉效应期后,卵黄开始缢开(图2-a),对照组胚胎未见此现象(图1-m)。

2.2.3 紫外线-热休克受精卵 紫外线-热休克组有畸形胚胎(图2-c),也有较少正常发育的胚胎产生,这些正常发育的胚胎极可能是超雄个体。紫外线-热休克组受精卵在处理有一段发育停滞期,之后又逐渐与UV辐照组受精卵发育状态基本保持一致。肌肉抽动期紫外线-热休克组胚胎活力较UV辐照组更差,脱膜前部分胚胎死亡,还有小部分胚胎到达孵化期脱膜而死(图2-d)。

2.3 受精率、孵化率和畸形率

2.3.1 受精率 受精率与卵子和精子成熟度相关,激素催产后能正常挤出的精卵经观察成熟度均较好,也存在少数过成熟和未成熟卵。对照组受精率(63.1%)

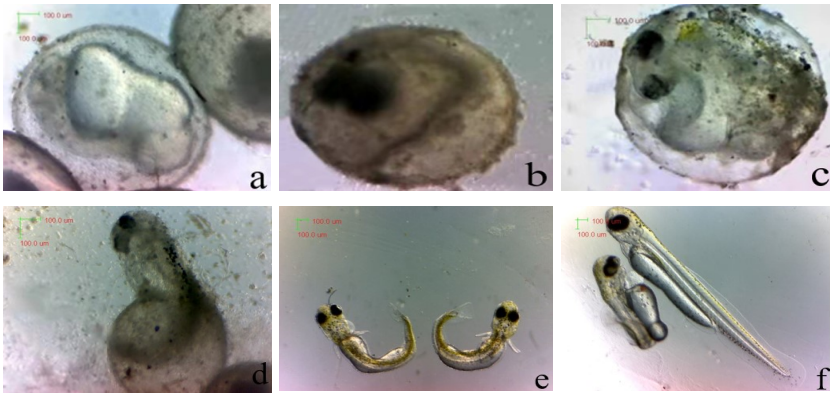
比处理组高,而正常条件下稀有鮡鲫的受精率约80%(王剑伟等,1998),处理组受精率均在40.0%以下,紫外线辐照组(2~8号)随着紫外线辐照剂量的不断增加,受精率总体呈下降趋势,符合相关研究规律,但3~5号组有所不同,受精率大小为 $120\text{ mJ/cm}^2 > 150\text{ mJ/cm}^2 > 90\text{ mJ/cm}^2$,这可能与UV辐照不均匀或不同组别中精卵成熟度不同有关。紫外线-热休克组(9~14号)处理条件相同,随着紫外线辐照剂量增加,受精率不断下降,当紫外线辐照量达到 210 mJ/cm^2 时,受精率为0;而辐照剂量同为 210 mJ/cm^2 的紫外线辐照组(7号),受精率为16.1%;表明该剂量UV辐照和热休克的双重处理对胚胎影响较大,导致受精卵发育至囊胚晚期终止。UV辐照剂量相同条件下,紫外线-热休克组较紫外线辐照组受精率更低(表2)。

表 2 紫外线和热休克对稀有鰕鲫受精卵孵化的影响

Tab.2 Effects of ultraviolet radiation and heat shock on hatching of fertilized eggs in *G. rarus*

处理	编号	UV 辐照剂量/mJ·cm ⁻²	热浴	总卵数/粒	受精卵/粒	受精率均值/%	孵化率均值/%	畸形率均值/%
空白对照	1	×	×	245	149	63.1±7.1 ^a	64.1±4.3 ^a	0.0±0.0 ^f
	2	60	×	289	115	38.9±3.0 ^b	31.6±3.1 ^c	-
	3	90	×	196	55	29.0±2.5 ^c	27.6±2.6 ^{cd}	-
	4	120	×	316	118	36.6±3.4 ^b	19.9±2.6 ^{de}	65.7±4.0 ^{cd}
	5	150	×	235	69	29.3±4.1 ^c	15.7±3.1 ^e	64.2±4.6 ^d
	6	180	×	246	70	27.4±4.5 ^{cb}	46.3±5.3 ^b	69.6±1.8 ^c
	7	210	×	289	51	16.1±3.4 ^e	14.3±4.2 ^e	92.3±2.1 ^b
	8	230	×	273	31	12.6±3.3 ^{ef}	3.2±0.2 ^{fg}	100.0±0.0 ^a
紫外线- 热休克	9	60	√	294	69	23.1±2.8 ^d	28.4±3.1 ^{cd}	-
	10	90	√	184	30	16.0±2.3 ^e	22.5±3.2 ^d	-
	11	120	√	197	32	15.6±2.8 ^e	24.3±2.9 ^d	62.6±2.7 ^d
	12	150	√	265	27	9.9±1.5 ^f	7.4±1.1 ^f	49.5±6.3 ^c
	13	180	√	245	30	10.8±1.9 ^{ef}	0.0±0.0 ^g	0.0±0.0 ^f
	14	210	√	275	0	0.0±0.0 ^g	0.0±0.0 ^g	0.0±0.0 ^f

注: 同列含有不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); ×表示未处理, √表示热休克处理温度为(38.5±0.5)°C, 热休克时间为2 min, -表示未测得。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$), × means no treatment, √ means heat shock treatment with the temperature of (38.5±0.5)°C for 2 min, - means no measurement.



(a) 紫外线辐照组卵质卵黄异常, (b) 紫外线辐照组失活胚胎, (c) 紫外线-热休克组存活畸形胚胎, (d) 紫外线-热休克组脱膜而死, (e) 紫外线辐照组畸形鱼苗, (f) 紫外线-热休克组正常形态苗与畸形鱼苗比较。

图 2 各处理组的发育状态

(a) Abnormal egg cytoplasm and yolk in the ultraviolet irradiation group, (b) Inactivated embryos in the ultraviolet irradiation group, (c) deformed embryos in ultraviolet-heat shock group (d) Dead larvae release from membrane in UV-heat shock group, (e) Deformed fry in the ultraviolet irradiation group, (f) Comparison of normal and deformed fry in UV-heat shock group.

Fig.2 Developmental status in different treatment groups

2.3.2 孵化率 对照组胚胎的孵化率为64.1%,显著高于处理组,略低于正常光照条件下平均69.0%的孵化率(王绿平等,2020)。经180 mJ/cm² UV辐照的6号组孵化率显著高于其他紫外线辐照组(表2)。紫外线-热休克组孵化率随UV辐照剂量增加有下降趋势,当UV剂量超过180 mJ/cm²无受精卵存活。UV辐照剂量相同条件下,较紫外线处理组多数紫外线-热休克处理组的孵化率更低,而辐照剂量为120 mJ/cm²紫外线-热休克处理组却高于相同辐照剂量的紫外线处理组,但差异不显著。这些数据的出现并不影响

判断稀有鰕鲫雄核发育最适UV辐照剂量。
2.3.3 畸形率 对照组正常孵化苗(图1-q)与畸形苗发育情况及体型(图2-e)不一致,畸形苗表现出眼小、身体弯曲短小、心腔大并在孵化后逐渐死亡等单倍体特征(Ungar et al,1998)。正常个体可发育至平游期,UV辐照组(2~8号)均有畸形苗出现,而畸形率不同,也有形态正常苗的出现,其原因可能为UV辐照未使卵核遗传物质失活或完全失活。处理组畸形苗在发育至体节期时可以明显观察到胚胎的卵黄发生形变,正常胚胎发育至肌肉效应期(图1-m)时,卵

表 3 各阶段稀有鮡鲫胚胎发育成活率

Tab.3 Survival rate at different embryonic development stages of *G. rarus*

编号	受精后不同时间的胚胎成活率均值/%					
	7 h	12 h	24 h	36 h	48 h	70 h
4	36.6±3.4 ^a	28.9±1.4 ^a	13.7±3.0 ^b	10.1±1.8 ^c	8.1±1.6 ^c	7.0±0.2 ^b
5	29.3±4.1 ^b	24.3±1.2 ^b	21.6±1.6 ^a	16.1±2.8 ^b	12.0±3.5 ^b	4.6±0.6 ^c
6	27.4±4.5 ^b	25.9±1.1 ^b	22.9±2.4 ^a	22.6±2.5 ^a	22.5±3.5 ^a	13.2±2.3 ^a
7	16.1±3.4 ^c	10.1±1.1 ^d	5.5±1.7 ^d	5.2±1.3 ^d	3.7±1.2 ^d	2.5±0.5 ^d
11	15.6±2.8 ^c	12.7±2.3 ^c	10.0±1.0 ^c	9.0±1.4 ^c	8.7±1.8 ^c	8.0±1.6 ^b
12	9.9±1.5 ^d	9.4±1.7 ^d	0.8±0.2 ^c	0.8±0.2 ^c	0.8±0.2 ^{de}	0.8±0.2 ^{de}
13	10.8±1.9 ^d	2.3±0.5 ^e	1.5±0.2 ^c	0.9±0.3 ^{de}	0.9±0.3 ^{de}	0.0 ^e
14	0.0 ^c	0.0 ^f	0.0 ^c	0.0 ^c	0.0 ^c	0.0 ^c

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

黄仍未缢开;而单倍体胚胎(图2-a)的卵黄则已开始缢开,且缢而不裂,不同卵黄缢开后表现的形态有所差别。最终对照组孵化出正常苗(图1-q)和处理组畸形苗(图2-e)的卵黄均从背鳍前端位置缢开,形似豌豆的两部分卵黄,靠近头部的卵黄较大,靠近尾部的卵黄较小。紫外线-热休克组的形态正常苗和畸形苗(图2-f)的个体大小、体轴是否弯曲等形态特征差异较大。畸形胚胎发育速度较正常胚胎发育速度稍慢。畸形胚胎受精后7.5 h胚胎发育至原肠早期,此时正常胚胎已开始向原肠晚期发育,受精后73 h有胚胎陆续孵化。脱膜时间的延长可能与畸形胚胎活动能力弱有关。

2.4 受精卵各时期成活率

处理组各组随发育时间的延长,其成活率不断降低,降低的时间点主要集中在囊胚晚期、肌肉效应期、出膜前期。高紫外线总辐照剂量(120~210 mJ/cm²)和热休克处理对胚胎发育成活率的研究结果表明,当UV辐照剂量超过180 mJ/cm²时,受精后24 h内受精卵的成活率大幅度减低(表3);相同的紫外线总辐照剂量下,在受精后24 h内有热休克处理的胚胎成活率与无热休克处理的胚胎成活率差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 雄核发育技术原理

雄核发育技术广泛应用于水产经济动物的繁殖育种研究,是鱼类染色操作的重要技术之一,其在鱼类性别控制、快速建立纯合系、遗传分析等方面有巨大的应用前景。以往卵核遗传物质失活多采用X射线、钴-60放射源产生的γ射线等电离射线,这些射线的使用需要特殊设备,设备价格高昂,且危险性大,难以广泛推行,雄合子染色体加倍多用温度休克

(冷休克、热休克)、静水压法,利用静水压破坏纺锤丝形成的方法成本高;而紫外线-热休克雄核发育技术则相对安全、设备易得、操作难度小,同时紫外线对卵子的损害更小,更不易产生染色体片段,适用于鱼类雄核发育研究(杨景峰等,2005b; Colléter et al, 2014)。卵子经一定剂量的紫外线辐照后,遗传物质DNA双链间的氢键断裂,相邻的嘧啶之间形成二聚体,胸腺嘧啶二聚体的比例更高,导致DNA局部变形,影响DNA的复制,被不理想剂量的紫外线照射后,卵DNA残基则干扰雄合子有丝分裂过程(Lin & Dabrowski,2015)。Christopher等(2012)研究发现,一旦达到或超过有效剂量的紫外线辐照后,卵核遗传物质失活,不参与合子的形成,合子仅由雄原核形成,只能产生单倍体。热休克阻止受精卵第一次卵裂,诱导雄合子加倍,受精卵出现二倍体诱导率高峰期为受精卵向二细胞发育的过度期,斑马鱼二倍体诱导率高峰期是受精后20~23 min,热休克温度(41.5±0.5)℃,时长2 min最优,过短达不到抑制细胞分裂的目的,过长则会破坏卵中物质,热休克抑制了有丝分裂过程中纺锤丝牵引染色体移向细胞两极,从而抑制了细胞分裂,诱导雄合子加倍。

3.2 雄核发育研究现状

使用紫外线-热休克技术诱导雄核发育二倍体的产生率普遍很低,本次研究结果也不例外。杨景峰等(2005c)对斑马(*Danio rerio*)鱼雄核技术的研究得出产生率低于2.5%;Colléter等(2014)对欧洲黑鲈卵子紫外线辐照形成单倍体的比例仅1.4%;如再经过染色体加倍处理,能形成雄核发育二倍体的比例会更低。紫外线和热休克处理对卵子造成的损伤是不可避免的,提高操作手法、改善受精卵的发育条件是提高受精卵成活率的有效方法。

多种因素影响鱼类雄核发育,且各因素对雄核发育的影响难以定量描述,鱼类雄核发育处理条件因种类而异,即使同种属的鱼类,其雄核发育处理条件也可能存在较大差异。对紫外线-热休克雄核发育技术而言,不同鱼卵遗传物质灭活的紫外线辐照剂量有较大差别。大量雄核发育试验表明,有效的紫外线照射剂量在30~270 mJ/cm²,导致不同鱼卵之间紫外线辐照剂量差异之大的原因,可能与雌原核的相对位置、卵膜和核膜厚度、组成和光学性质不同、卵胞质成分和含量不同以及卵大小差异有关(Myers et al,1995)。热休克温度用略高于致死温度的热冲击来诱导多倍体,热休克温度因鱼类的生态特征不同而不同,温水性鱼类如黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、斑马鱼集中在39~41℃,冷水性鱼类的热休克温度相对较低(李雅娟,2012)。对稀有鮕鲫受精卵进行热休克处理时,发现温度在(41.0±0.5)℃时,所有受精卵发育至原肠晚期时终止,而(38.5±0.5)℃下受精卵可少量存活,故将(38.5±0.5)℃设定为诱导稀有鮕鲫雄合子染色体加倍的热休克温度。有学者认为鱼类二倍体诱导率有2个高峰期,赵振山和吴清江(1998)对大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)的雄核发育研究发现,二倍诱导率在授精后15~19 min和27~29 min出现2个高峰,作者对这一现象的解释是胚胎发育过程中有2个染色体加倍的敏感时期,峰值高低不一致可能是由于生物差异及研究方法的不同所致,而出现双高峰是否是鱼类共性以及其产生机制还要进一步探究。多数鱼类的热休克处理时间集中在12~18 min和23~29 min,且最高诱导率出现在后一时间段。观察到稀有鮕鲫和斑马鱼的胚胎发育时序相似(Kimmel et al,1995),特别是达到2、4细胞期时间相差不超过10 min(杨景峰等,2005c)。参考以上结论并结合斑马鱼受精卵热休克处理时间和热休克时长,本研究认为对受精后23 min的稀有鮕鲫受精卵进行热休克处理,可有效诱导超雄个体产生。

Ungar等(1998)用600 μW/cm²的UV辐照野生型斑马鱼卵,并用具有纯合隐性性状的golden系斑马鱼精子与之授精,所得单倍体胚胎色素细胞为父本的隐性性状金色,可见此单倍体染色体来源于父本。雄核发育中雄性遗传是由一组父系染色体重复产生,基因在所有位点上都是纯合的,由于纯合子有害等位基因的表达不利于胚胎发育,辐照和物理休克同时对卵细胞胞质成分mRNA、tRNA、线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)造成损伤,雄核发

育胚胎的活力可能进一步降低(Komen & Thorgaard, 2007)。胚胎发育过程中必须避免日光直射,因为日光会激发光复活效应,在操作过程中如需光源,可使用不具有光复活效应的红光。生物体内存在光复活效应、暗修复以及其他修复机制。因此,即使无光源照射,也不能100%保证卵核遗传物质被破坏后不会复活。

3.3 雄核发育产业应用

雄核发育技术广泛应用于水产经济动物的繁殖育种研究,是鱼类染色操作的重要技术之一,其在鱼类的性别控制、快速建立纯合系、遗传分析等方面有巨大的应用前景。超雄鱼苗在遗传育种领域具有极大的应用价值,其在斑马鱼(*Danio rerio*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)(杨景峰等,2005b;周贺等,2017)、黄颡鱼(刘汉勤等,2007)等多种鱼类上取得不同程度的成功。不同种类的YY基因型超雄鱼及其生理雌鱼的繁殖能力不同,如YY生理雌鱼存在严重的生殖问题(Davis et al,1995);有些可以用于规模化繁育如黄颡鱼(刘汉勤等,2011)和虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)(Chevassus et al,1988)等;而暹罗斗鱼(*Betta splendens*)则不能(George et al,1994)。传统途径获取超雄个体需要两代的时间,第一代获取性逆转的伪雌个体(基因型为XY),第二代通过伪雌个体与雄性个体(基因型为XY)交配产生超雄子代(YY),雄核发育相比传统途径获取超雄个体缩短了一代的时间(Liu et al,2013)。YY基因型超雄与其生理雌鱼交配可获得100%的YY超雄个体,与普通XX雌性交配获得100%的全雄鱼,审定品种黄颡鱼“全雄1号”具有全雄性、规格整齐、生长速度快、产量高等优点,具有良好的市场应用价值。

参考文献

- 曹文宣,王剑伟,2003. 稀有鮕鲫——一种新的鱼类实验动物[J]. 实验动物科学与管理, (S1):96-99.
- 李雅娟,2012. 水产动物遗传育种学实验指导[M]. 北京:中国农业科学技术出版社.
- 李元善,1982. 雌核发育、多倍体和远缘杂交在鱼类育种中的应用[J]. 淡水渔业, (5):29-32.
- 林忠乔,李雅娟,张赛赛,等,2015. 天然四倍体泥鳅雄核发育二倍体诱导条件优化[J]. 东北农业大学学报, 46(12):58-64.
- 刘汉勤,崔书勤,侯昌春,等,2007. 从XY雌鱼雌核发育产生YY超雄黄颡鱼[J]. 水生生物学报, (5):718-725.
- 刘汉勤,管波,徐江,等,2011. YY超雄黄颡鱼和全雄黄颡鱼规模化繁育[C]//中国水产学会水产生物技术专业委员会暨鱼类性别决定机制和调控技术研讨会.

- 陶刚,马昭辉,张青海,等,2012. 乌苏里拟鲮人工繁育技术初探[J]. 水产科技情报, 39(4):174.
- 王剑伟,宋天祥,曹文宣,1998. 稀有鮡鲫胚后发育和幼鱼生长的初步研究[J]. 水生生物学报, (2):128-134.
- 王绿平,张京估,殷浩文,2020. 不同实验条件下稀有鮡鲫胚胎的自然受精率和孵化率[J]. 生态毒理学报, 15(3):100-107.
- 徐辉,2007. 人工诱导黄颡鱼雄核发育的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学.
- 杨景峰,曹颖霞,杨智慧,2005a. 雄核发育技术及其在鱼类遗传育种中的潜在应用[J]. 水利渔业, 25(2):4-7,80.
- 杨景峰,曹颖霞,杨智慧,等,2005b. 斑马鱼雄核发育技术研究[J]. 水产科学, 24(2):18-21.
- 杨景峰,杨智慧,刘伟成,等,2005c. 斑马鱼雌核紫外线辐射灭活及延迟受精的研究[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), (1):78-82.
- 叶金明,吴康,丛宁,等,2016. 黄颡鱼一年二次人工繁殖性能的比较[J]. 水产养殖, 8(8):4-6.
- 赵振山,吴清江,1998. 人工诱导大鳞副泥鳅雄核发育二倍体克隆鱼的产生[J]. 遗传学报, (5):416-421,477.
- 周贺,张蕊,徐其征,等,2017. 冷休克诱导红鳍东方鲀雄核发育单倍体的条件优化[J]. 大连海洋大学学报, 32(3):316-322.
- Chevassus B, Devaux A, Chourrout D, et al, 1988. Production of YY rainbow trout males by self-fertilization of induced hermaphrodites[J]. Journal of Heredity, (2):89-92.
- Christopher J G, Murugesan A G, Sukumaran N, 2012. Optimization of UV treatment to induce haploid androgenesis in the stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*[J]. International Aquatic Research, 4(1):1-8.
- Colléter J, Penman D J, Lallement S, et al, 2014. Genetic inactivation of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) eggs using UV-irradiation: observations and perspectives [J]. PLoS One, 9(10):e109572.
- Davis K B, Goudie C A, Simco B A, 1995. The plasticity of sex determining genotypes in channel catfish[C]//Goetz F and Thomas P. The Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. The University of Texas at Austin, Texas, USA:93-95.
- George T, Pandian T J, Kavumpurath S, 1994. Inviability of YY zygotes of the fighting fish, *Betta splendens*[J]. Israeli Journal of Aquaculture Bamidgheh, 46(1):3-8.
- Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, et al, 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Developmental Dynamics, 203(3):253-310.
- Komen H, Thorgaard G H, 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review[J]. Aquaculture, 269(1/4):150-173.
- Lin F, Dabrowski K, 2015. Androgenesis and Homozygous Gynogenesis in Muskellunge (*Esox masquinongy*): Evaluation Using Flow Cytometry[J]. Molecular Reproduction & Development, 49(1):10-18.
- Liu H Q, Guan B, Xu J, et al, 2013. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale breeding of YY super-male and XY all-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson)[J]. Marine Biotechnology, 15(3):321-328.
- Myers J M, Penman D J, Basavaraju Y, et al, 1995. Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 90(2):205-210.
- Nagoya H, Sato S, Ohta H, 2010. Preservation of endangered salmonids using androgenesis[J]. Journal of the National Taiwan Museum, 14:71-78.
- Pan Z J, Li X Y, Zhou F J, et al, 2015. Identification of sex-specific markers reveals male heterogametic sex determination in *Pseudobagrus ussuriensis*[J]. Marine Biotechnology, 17(4):441-451.
- Ungar A R, Helde K A, Moon R T, 1998. Production of androgenetic haploids in zebrafish with ultraviolet light[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 7(4):320-326.

(责任编辑 万月华)

Conditions for Artificial Induction of Androgenesis in *Gobicypris rarus*

WANG Da-he^{1,2}, LIU Yong-jia¹, LI Wei¹, LIU Shao-zhen¹, LIU Qing¹

(1. College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, P.R. China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology,
Shantou University, Shantou 515063, P.R. China)

Abstract: In this investigation, *Gobicypris rarus* was selected for study and we conducted experiments on the production of super-males by artificially inducing androgenesis of *G. rarus* using ultraviolet (UV)-heat shock androgenesis technique. The study will help to explore breeding among single-sex groups, direct seedling production with specific growth and reproduction traits, meet the need for reproduction and breeding, and conserve endangered fish species. A total of 14 groups were set with group 1 as the control, groups 2–8 were UV radiation groups receiving total UV radiation doses of 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 230 mJ/cm², respectively, at a water temperature of (38.5±0.5)°C, and groups 9–14 were UV-heat shock groups receiving the same respective total UV radiation doses (except for 230 mJ/cm²) plus heat shock treatment at a water temperature (38.5±0.5)°C for 2 min. Results show that: (1) At total UV radiation doses from 60 to 230 mJ/cm², the fertilization rate and hatching rate of *G. rarus* in both the UV groups and the UV-heat shock groups both decreased with increasing UV radiation dose. (2) UV and heat shock treatment damaged the zygote to some extent, and the embryonic development stages with low survival rates were primarily in the late blastocyst stage, muscular contraction stage and stage before larvae release from the membrane. A few embryos did not hatch normally due to poor embryo condition. (3) The development rate of fertilized eggs treated with UV or UV-heat shock was slightly slower than that of the control group, and some eggs were deformed. Some *G. rarus* individuals were deformed by the UV-heat shock androgenesis, leaving fewer normal individuals that could be super-male. However, our results indicate that the combination of UV and heat shock treatment of fish chromosomes can be an effective method for artificially inducing androgenesis of *G. rarus*.

Key words: *Gobicypris rarus*; artificial fertilization; androgenesis; ultraviolet (UV); heat shock