

doi: 10.7541/2022.2021.0241

鞍带石斑鱼精子诱导斜带石斑鱼雌核生殖

樊欣* 张维炜* 吴廷昌 文鑫 陈猛猛 吴光灿 骆剑

(海南大学海洋学院, 海南省院士团队创新中心, 海南省水产种业工程研究中心,
南海海洋资源利用国家重点实验室, 海口 570228)

摘要: 石斑鱼性成熟时间长和雌雄同体的特性延长了其育种的周期, 采用人工雌核生殖策略能够显著提高选育效率。研究筛选了鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)精子人工诱导斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)雌核生殖的最佳条件, 并通过形态学、流式细胞术和微卫星分子标记等方法进行鉴定。结果显示, 灭活的异源精子可成功诱导斜带石斑鱼人工雌核生殖, 精子灭活的最佳紫外照射强度为 518 mJ/cm^2 ; 卵子受精后6min在 $4\text{--}6^\circ\text{C}$ 的条件下进行冷休克处理, 可获得最优的40%的表观受精率(卵子正常分裂比率)和29.7%的孵化率, 而未冷休克的对照组具有83.5%的表观受精率和80%的单倍体率。多重比较结果表明, 在表观受精率方面人工诱导的时间差异($P=0.579$)和水温差异($P=0.133$)并不显著; 而在孵化率上, 处理时间组间差异极显著($P=0.002$), 而在水温组中差异不显著($P=0.396$)。胚胎发育结果显示, 人工雌核生殖诱导会导致孵化率降低, 单倍体胚胎出现明显的发育障碍。微卫星分子标记鉴定结果显示, 石斑鱼人工雌核生殖子代的遗传物质大部分来自于母本, 同时也存在异精效应。

关键词: 雌核生殖; 紫外照射; 冷休克; 微卫星标记; 石斑鱼

中图分类号: S961.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)11-1675-09



数十年来, 人工诱导雌核生殖在理论研究和生产实践中取得了突出的成就^[1-6], 已成为鱼类生殖研究与遗传育种工程的重要组成部分^[7]。然而, 雌核生殖在淡水鱼^[8]中的研究较早、成果丰硕, 而在海水鱼^[9-12]中, 由于全人工繁殖技术发展较晚, 雌核生殖的研究与应用少。人工雌核生殖作为一种高效的细胞学育种技术, 在海水鱼养殖产业蓬勃发展的同时, 必然会受到越来越多的重视。

石斑鱼属于名贵暖水性礁栖鱼类, 隶属鲈形目(Perciformes)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼属(*Epinephelus*), 约有159种^[13]。石斑鱼产量逐年递增, 据2020年中国渔业年鉴^[14]统计, 2019年全国石斑鱼养殖产量为 $18.3 \times 10^7 \text{ kg}$, 较前一年的 $15.9 \times 10^7 \text{ kg}$ 增幅14.76%, 仅次于大黄鱼(*Larimichthys crocea*),

是我国海水养殖产量第二的鱼类, 是一个极具养殖开发潜力的种质资源类群。石斑鱼养殖产业快速发展的同时也面临着病害频发、养殖性状参差不齐等亟待解决的问题, 这与石斑鱼良种率低的现状密切相关。石斑鱼性成熟时间长达3—5年, 传统选育周期长。而人工诱导雌核生殖可以实现优势基因的快速纯合与劣势基因的淘汰^[15], 大大提高石斑鱼的选育效率。而且, 作为一种先雌后雄的性反转鱼类, 雌核生殖是研究其性别规律的独特手段。

本研究以斜带石斑鱼为对象, 开展人工诱导雌核生殖的研究, 不仅为良种培育提供理论和技术支持, 也为后续其他热带海水鱼类开展雌核生殖研究提供了参考依据, 同时对于石斑鱼性别决定机制的研究也具有重要价值。

收稿日期: 2021-09-14; 修订日期: 2022-06-24

基金项目: 海南省重点研发计划项目(ZDYF2019045); 海南省重大科技项目(ZDKJ2019011); 海南省林浩然院士团队创新中心和淡水鱼类发育生物学国家重点实验室开放课题资助 [Supported by the Key R & D Projects in Hainan Province; Major Science and Technology Projects in Hainan Province; Hainan Linhaoran Academician Team Innovation Center; State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish]

作者简介: 樊欣(1994—), 男, 硕士研究生; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: 369076752@qq.com 张维炜(1995—), 男, 硕士研究生; 研究方向为鱼类遗传育种。E-mail: 1149057128@qq.com *共同第一作者

通信作者: 骆剑, 教授; 研究方向为鱼类生殖与遗传。E-mail: luojian@hainanu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用亲鱼由海南青利水产繁殖有限公司提供,位于三亚铁路港和陵水新村。选取体表无伤、性腺发育成熟、健康的亲鱼,亲鱼无需催产,用棉布擦干泄殖孔及腹部,轻轻挤压腹部即可获得鞍带石斑鱼鲜活精子及斜带石斑鱼成熟卵子,精子置于4℃保温箱中避光待用,卵子现取现用。

1.2 实验方法

预实验 鲜精取回需对精子活力进行检查,以加入海水10min后仍有超过50%精子具有运动能力为精子质量较好。分别设置100、300和500 lx三组紫外强度灭活实验,实验后发现,使用100 lx灭活精子,一直灭活到10min,通过与卵子受精进行倍性检测,仍有较高比率的二倍体,精子灭活不足,使用500 lx灭活精子,仅照射30s后,与卵子的受精能力便快速下降,照射剂量难以准确把握。使用300 lx灭活5min与卵子受精直至孵化,发现较高比例的单倍体综合征,通过对这些单倍体综合征胚胎/初孵仔鱼随机抽取进行倍性分析检测,皆为单倍体。

设置受精后5min、15min和25min,在5℃、10℃和15℃的水温下,持续冷休克10min、20min、30min和40min对胚胎进行处理,所有组的胚胎均经倍性分析仪检测倍性,最终检测到在受精后5min和10℃水温,冷休克持续10min、20min和30min均存在冷休克加倍二倍体存在。

综上,对所有预实验条件进行梯度设置,进行下列实验。

精子遗传物质灭活 精子稀释液采用Ts-19^[16],精子与稀释液比例为1:9,取1mL稀释的精子平铺在预冷的培养皿中,缓慢摇动培养皿使稀释精子厚度均匀确保其充分灭活。紫外灯(Philips, G15T8, wavelength of 254 nm)提前10—15min开启使照射强度稳定,采用照度计(Philips, G15T8, wavelength of 254 nm)测量照射剂量;强度为250—340 lx,灯箱中心区域是340 lx,两端是250 lx,平均光强为330 lx;紫外照射过程中保持摇动以确保精子照射均匀。

分别设置精子照射时间对照组(C, 0min)和实验组分别照射2min、4min、6min、8min和10min,锡箔纸包裹EP管收集照射过的精子置于4℃冰箱中遮光保存备用。灭活完的精子需在显微镜观察是否在灭活过程中被激活。用各实验组精子与斜带石斑鱼正常卵子授精,静水培养,受精约1.5h后,显微镜下检查16—32细胞期的受精卵200—300个统计胚胎发育个数,表观受精率=(卵裂卵子数/卵子总

数)×100。随后,将所计数胚胎转移至烧杯中,培育至初孵仔鱼,计算孵化仔鱼总数和表现单倍体综合症(同时采用倍性分析仪鉴定倍性校正)数目,孵化率=(出苗数/总受精卵数)×100;用于比较不同照射时长的精子能力,确定最佳照射剂量。受精卵培养的海水盐度为30‰,温度为26—28℃,下同。

最佳冷休克启动时刻实验 冷休克处理时刻实验组分别设置为C1(正常二倍体对照组)和C2(单倍体对照组,使用预实验得到的最佳照射剂量处理得到的精子),对照组C1用于检测精子和卵子的质量,而对照组C2用于检测精子紫外灭活环节是否达到要求。分别在受精后3min、4min、5min、6min、10min、15min、20min、25min、30min和35min开始进行冷休克处理,每组的受精卵约为5—10 g,根据预实验结果设定冷休克水温保持在4—6℃,持续时间为30min,待处理结束后,立即使受精卵脱离低温环境并用大量26—28℃海水清洗并复温。分别统计受精率,孵化率和诱导率,得到最佳处理时刻。

冷休克处理时长和处理水温实验 冷休克处理时长时间分别设置为C1、C2、10min、15min、25min、30min和35min,处理水温分别为1—3℃、4—6℃和7—9℃,双因子交叉分组,冷休克启动时刻参照冷休克启动时刻实验中的最佳结果,对照组C1和C2条件同上,以上各组分别设2—3次重复。

诱导率=(二倍体胚胎数/检测总胚胎数)×100。

胚胎倍性检测 使用Partac倍性分析仪(Systems/CyFlowPloidy Analyser)检测胚胎相对DNA含量测定,以此鉴定雌核生殖子代的倍性状态。取正常二倍体对照组(C1)、单倍体对照组(C2)、雌核生殖二倍体实验组受精后的胚胎/仔鱼10—20个,破碎细胞,制成细胞悬液,将匀浆用50 μm的过滤器过滤样本,加入1.6 mL DAPI染液染色,经2—5min孵育后,上机分析。校准仪器,电压为551.5V,使得正常二倍体的峰值设定在30附近。该设置保持恒定,并且测试样品通过其主峰的相对位置来表征。

斜带石斑鱼雌核生殖子代的微卫星鉴定 从已发表的研究报道^[17]中,查找石斑鱼属微卫星引物,从26对中筛选出能够很好鉴定雌核生殖子代的8对微卫星引物,分别为D316、Mbo061、GAG01、Mbo066、GAA-1、RH_GATA_003、Ec-122、CA-2和GAA-1(表1)。

分别提取雌核生殖子代14个、正常杂交个体2个、父母本各1个的DNA,采用微卫星引物行PCR反应,通过非变性聚丙烯酰胺凝胶检测,常规PAGE胶银染显带。

表 1 微卫星引物信息

Tab. 1 Microsatellite primer information

位点 Locus	引物序列 Primer sequence(5'—3')	Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration (mmol/L)	退火温度 Annealing temperature (°C)
Ec-122	CATTCTTAAAGTAT TCTGTG CCACAGCCAGTCTA GGTATTC	1.8	55
GAA-1	GGAGTGTTAAATAT GCCCACCA CAGAAATCGCTGAG GACAAGAG	1.8	55
CA-2	GACTTGATTACGCA AAATAAAGAT AGAGACGGTGCCAG TAAATGAA	1.8	55
RH_GA TA_003	GGGCAATTTGGTTC TTCACA TGTCATGCCACAG GATACA	1.8	57
D316	GAGCCTAAAGACCC AAAT ATCGAAAACCATCA AACA	1.8	48
Mbo061	TGAAGAATGTCAGA TATTTTGTGGTG TCCCAAGAGTGTTG AAGTTATAGG	1.8	55
GAG01	CTAGAGGATCATTT GACAATGTAG CCTGACTAATCCAC AGTAATTGC	1.8	53
Mbo066	CGCATGTTTGTAAAG AACAGGAAG GCTTCACTCTGGGT TGTTGG	1.8	55

1.3 数据处理

采用 Excel 统计各项指标,所有数据均表示为平均值±标准差表示。采用IBM SPSS Statistics 19软件进行单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 氏多重比较。显著性水平用 P 表示, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 最佳精子紫外遗传灭活条件确定

精子灭活条件实验中各组受精率、孵化率及单倍体率情况如图 1。实验结果显示:实验组中 2min、4min 与 6min 组的受精率分别为 82%、78.7% 和 6%,而 8min 和 10min 组的受精率分别为 0.5% 和 0.67%;2min 组胚胎单倍体率为 72%,其余各实验组所检测胚胎的单倍率均为 100%;孵化率方面各组分别为 80.3%(对照组)、41.3%、2%、0、0 和 0;2min 组及 4min 组的大量胚胎在孵化前后出现明显的单倍体综合征。4min 组与其他实验组相比,具有较高的受精率、单倍体率和较低的孵化率,因此确定照射 4min (518 mJ/cm^2)为最佳精子紫外照射时间,后续实验均采用此剂量处理精子。

2.2 最佳冷休克处理时刻的确定

分别在受精后的 3min、4min、5min、6min、10min、15min、20min、25min、30min 和 35min 时刻冷休克处理受精卵,处理水温为 4—6℃,冷休克持续时间 30min。实验结果显示如图 2 所示:各实验组中 4min 组和 20min 组显示出较高的受精率;孵化率从 3min 组到 6min 组呈现逐步上升的趋势,6min 组孵化率达到 29.7%,后又逐渐下降;胚胎倍性检测数据显示,6min 组二倍体诱导率最高(100%),统计诱导率时发现 15min 以后的实验组孵化率极低,因此确定受精后的 6min 为冷休克最佳处理时刻。

2.3 冷休克持续时间和水温的确定

分别设定冷休克处理持续时间组为: C1、C2、10min、20min、30min 和 40min,处理水温分别设置为 1—3℃、4—6℃ 和 7—9℃。Duncan 多重比较分析(表 2)结果显示,不同处理时间($P=0.579$)和处理水温($P=0.133$)在受精率方面差异并不显著,而在孵化率方面不同处理时间组间差异显著($P=0.002$),不同处理水温组差异不显著($P=0.396$),从孵化率的角度分析,处理时间为 10min 时,随着处理水温的升高,孵化率也逐步增加;20min 组,孵化率随着处理水温的增加而增加,在 4—6℃ 处达到最大值,而后下降;30min、40min 组,随着处理水温的增加,孵化率表现为下降趋势。如图 3 和图 4 所示,在 4—6℃ 的水温条件下处理 20min 可以得到相对较高的受精率和孵化率。

2.4 单倍体、正常二倍体、雌核生殖二倍体倍性鉴定及形态比较

受精后 16h 测定正常发育二倍体、雌核生殖二倍体、单倍体的 DNA 相对含量,正常二倍体 DNA

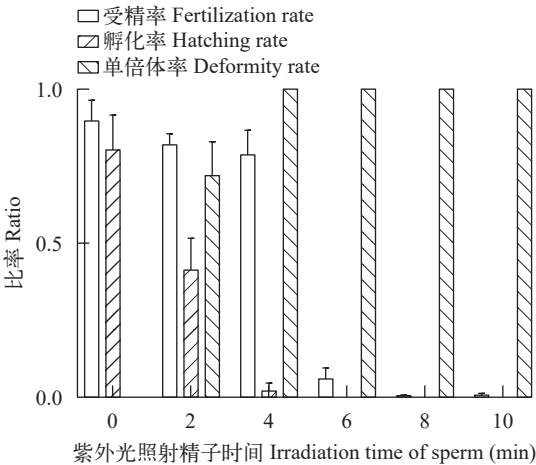


图 1 不同紫外照射时间对鞍带石斑鱼精子的影响
Fig. 1 Effect of different times with UV irradiation on sperm
0 为正常杂交二倍体对照; $n=3$; $\bar{x}\pm\text{SD}$
0. normal hybrid control

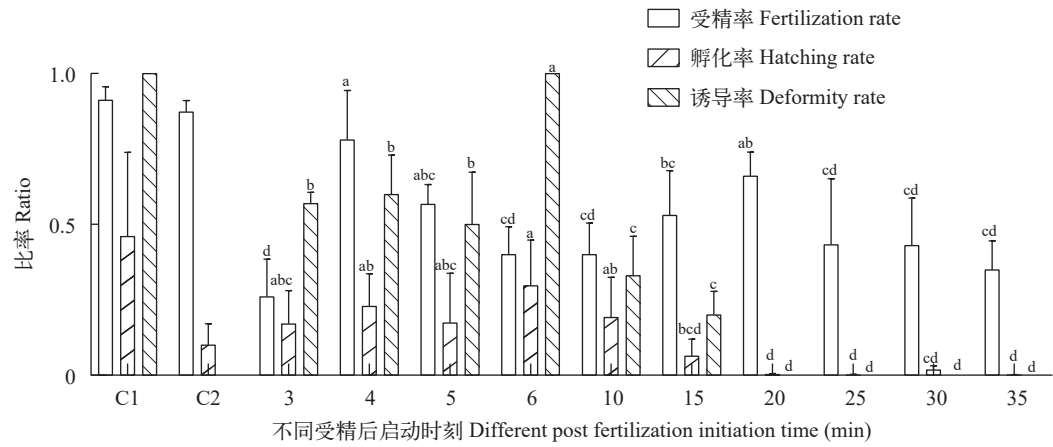


图 2 斜带石斑鱼雌核生殖不同受精后启动时刻的比较

Fig. 2 Comparison of different post fertilization initiation times of gynogenesis in *Epinephelus coioides*

C1. 二倍体对照; C2. 单倍体对照组; 同类型柱形图中标有不同小写字母者差异显著; $P<0.05$; $n=3$; $\bar{x}\pm SD$; 下同

C1. Hybrid control; C2. Haploid control; Different superscript letters within the same type of column chart significant difference, $P<0.05$. The same applies below

表 2 Duncan 多重比较分析数据表
Tab. 2 Duncan multiple comparative analysis data table

	B1	B2
A1	$P=0.579$	$P=0.133$
A2	$P=0.002^{**}$	$P=0.396$

注: 其中A1为受精率; A2为孵化率; B1为不同处理时间; B2为不同处理水温, $P\leq 0.01$ 表示差异极显著, 右上方标注为“**”

Note: A1. fertilization rate; A2. hatchability rate; B1. different treatment times; B2. different treatment water temperatures, $P\leq 0.01$ means extremely significant difference, and the upper right letter is “**”

峰值设定为30, 则单倍体DNA峰值为15, 倍性检测结果见图 5。

发育形态如图 6所示: 杂交二倍体精卵状态良好, 受精后可以正常发育, 具有较高的受精率(90.8%)和孵化率(58.2%)。雌核生殖因为经历了精

子灭活处理以及胚胎冷休克处理, 表观受精率(40%)和孵化率(29.7%)相比较杂交二倍体都有所降低, 另雌核生殖胚胎在原肠胚期及神经胚期具有较高的死亡率, 神经胚期之后发育正常。雌核生殖个体和杂交二倍体出膜后活力正常。

单倍体胚胎在各个主要的胚胎发育阶段都有不同程度畸形: 在细胞分裂期时, 单倍体胚胎细胞隆起但是无法正常分裂; 单倍体胚胎囊胚结束后胚胎异常无法下包进入原肠胚期; 神经胚期, 单倍体胚胎分化异常, 不能形成神经管; 器官形成期, 单倍体胚胎围心腔较大, 肌节形成缓慢、尾短, 不能运动, 表现出单倍体综合症, 仅有4.1%的个体发育到出膜, 少量出膜个体表现为卵黄囊为正常二倍体的130%, 同时期雌核生殖个体尾部长度仅为正常二倍体的31%, 也很快死亡。

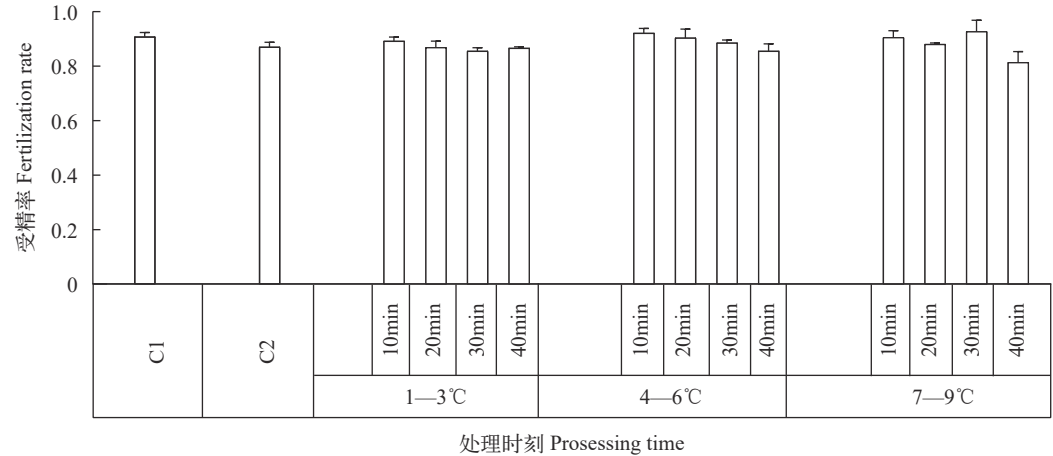


图 3 斜带石斑鱼雌核生殖不同处理方式受精率的比较

Fig. 3 Fertilization rate of different duration times and temperatures of cold shock on gynogenesis in *Epinephelus coioides*

C1. 二倍体对照组; C2. 为单倍体对照组

C1. hybrid control; C2. haploid control

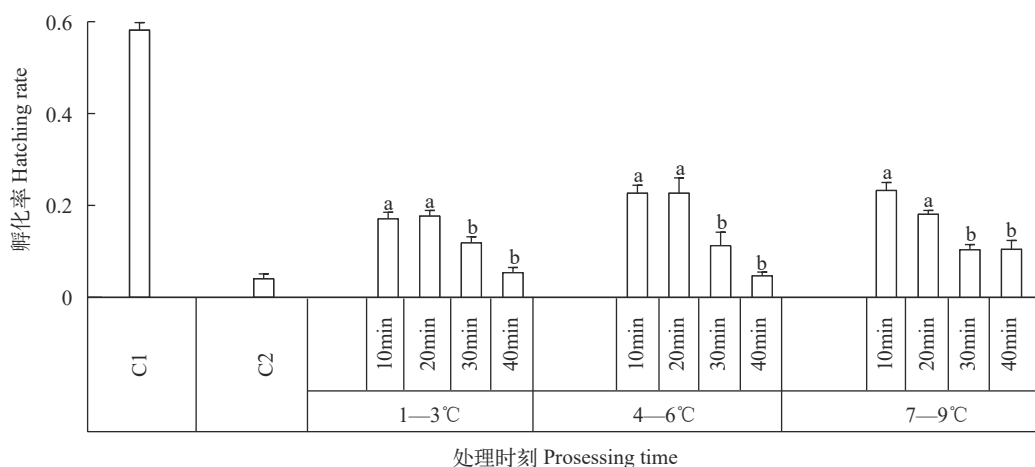


图4 斜带石斑鱼雌核生殖不同处理孵化率的比较

Fig. 4 Hatching rate of different duration times and temperatures of cold shock on gynogenesis in *Epinephelus coioides*

C1. 二倍体对照组; C2. 单倍体对照组

C1. Hybrid control; C2. Haploid control

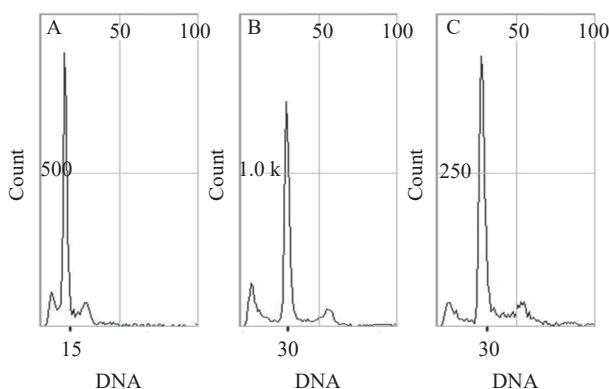


图5 人工雌核生殖各组DNA相对含量

Fig. 5 Relative content of DNA in artificial gynogenesis

A. 斜带石斑鱼雌核生殖单倍体; B. 正常发育二倍体对照; C. 雌核生殖二倍体

A. Haploid; B. Normal diploid control; C. Gynogenetic diploid

2.5 微卫星鉴定结果

8对微卫星引物分别为D316、Mbo061、GAG01、Mbo066、GAA-1、RH_GATA_003、Ec-122和CA-2(表3), 对母本斜带石斑鱼、父本鞍带石斑鱼(诱导精子供体)、杂交对照个体和雌核生殖诱导个体均能扩增出稳定的条带。结果显示: 杂交对照样本N1、N2的条带均分别来自于父母本; 人工雌核生殖诱导样本C1—C12中, 11个个体的条带均与母本保持一致, 而C11个体的7个位点的条带既有母本条带也有父本条带, 该个体应该是紫外照射处理中未灭活精子受精导致; 此外C6号个体在Mbo061位点扩增出父本条带相同(图7), 而在其他位点与母本相同, 该个体应为异精效应现象。微卫星结果显示该批样品具有91.29%的雌核生殖诱导率。

3 讨论

3.1 异源精子是石斑鱼卵子雌核生殖的良好激活源

人工雌核生殖通常采用异源精子作为刺激源^[18-20], 一方面便于诱导后的鉴定, 一方面异精效应的存在可能带来新的优良性状^[21]。本文选用异源鞍带石斑鱼的精子作为激活源具有两个优势: 其一是鞍带石斑鱼精子量大, 方便获取; 其二是鞍带石斑鱼与斜带石斑鱼具有明显的形态学差异, 可以外观分辨雌核生殖二倍体和杂交二倍体。

本文设置了单倍体对照组对人工诱导雌核生殖进行控制, 单倍体组采用灭活异源精子激活卵子, 但不进行二倍化诱导。在正常条件下, 该对照组将出现发育停滞、围心腔扩大和短尾等单倍体综合症(图6)。若单倍体组中出现正常的初孵仔鱼, 则表明该批次灭活的精子存在不彻底的问题, 在胚胎孵化阶段就可以排除掉不符合要求的诱导组, 大大降低诱导的错误率。

3.2 低温短时间处理是斜带石斑鱼雌核生殖的关键

雌核生殖中另一个关键因素是诱导条件的选择, 本研究得到的斜带石斑鱼人工雌核生殖的诱导条件为: T(冷休克温度), 4—6°C; TA(冷休克开始时间), 6min; D(冷休克持续时间), 20min, 这与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*; T, 0—4°C; TA, 2—5min; D, 45—60min)^[22], 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*; T, -1—0°C; TA, 6.5min; D, 25min)^[23], 漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*; T, 0—2°C; TA, 3—4min; D, 45—50min)^[24], 大黄鱼(T, 3—4°C; TA, 2min; D, 10min)^[4], 黄姑鱼(*Nibea albiflora*; T, 3—4°C; TA, 2min; D, 10min)^[25], 半滑舌鳎(*Cynoglossus semi-*

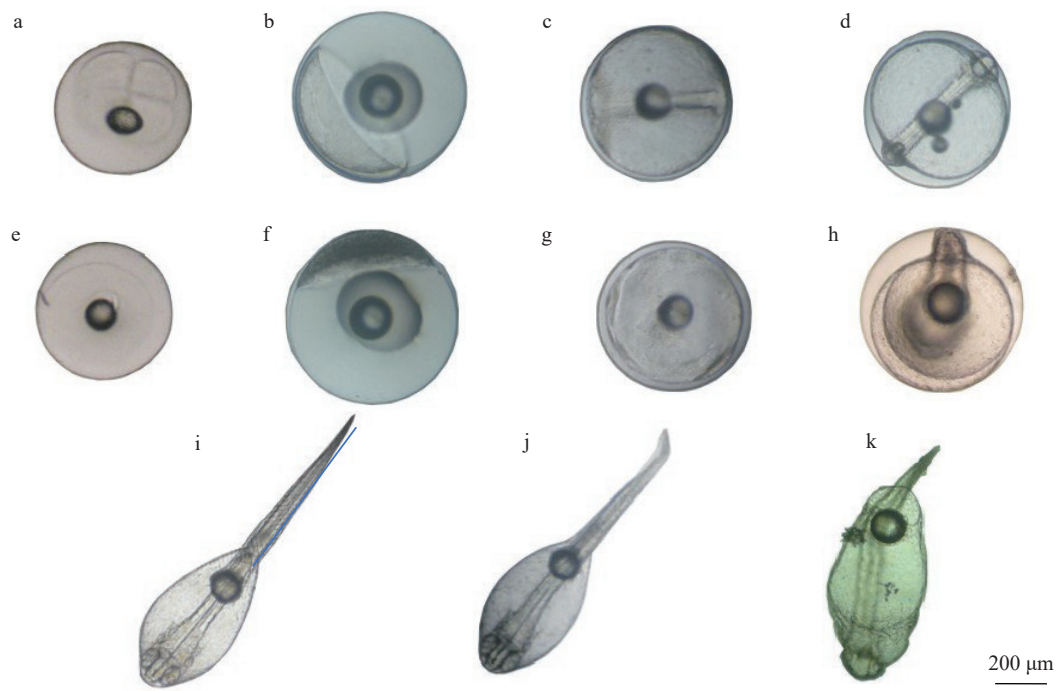


图6 斜带石斑鱼人工雌核生殖各组主要胚胎发育阶段

Fig. 6 The main embryonic development stages of artificial gynogenesis groups of *Epinephelus coioides*

a. 雌核生殖卵裂期; b. 雌核生殖原肠胚期; c. 雌核生殖神经胚期; d. 雌核生殖肌节期; e. 单倍体卵裂期; f. 单倍体原肠胚发育停滞; g. 单倍体神经胚发育停滞; h. 单倍体肌节发育异常; i. 正常二倍体初孵仔鱼; j. 雌核生殖二倍体初孵仔鱼; k. 单倍体初孵仔鱼
a. Gynogenetic cleavage stage; b. Gynogenetic gastrula stage; c. Gynogenetic neuroembryo stage; d. Gynogenetic sarcomere stage; e. Haploid cleavage stage; f. Haploid gastrula stage; g. Haploid neuroembryo stage; h. Haploid sarcomere stage; i. Haploid control; j. Gynogenetic diploid; k. Normal diploid control

表3 斜带石斑鱼人工雌核生殖群体微卫星鉴定结果

Tab. 3 Microsatellite identification of artificial gynogenesis population of *Epinephelus coioides*

引物 Primers	诱导率 Induction rate (%)	杂交率 Hybridization rate (%)	未知 Unknown (%)
D316	100	0	0
Mbo061	84.70	15.30	0
GAG01	100	0	0
Mbo066	78.70	7.10	14.20
GAA-1	84.60	0	15.40
RH_GATA	90	10	0
Ec-122	92.30	7.70	0
CA-2	1000	0	0
平均值 Average value (%)	91.29	5.01	3.07

laevis; T, 5°C, TA, 5min, D, 20—23min)^[26]等海水鱼类相比(图8), 处理水温较牙鲆、大菱鲆、漠斑牙鲆高, 而与大黄鱼、黄姑鱼、半滑舌鳎比较接近, 这与牙鲆等为冷温性鱼类, 而大黄鱼等为暖温性鱼类的最适生活温度有关。

一般而言, 处理起始时刻是最重要的因素, 对诱导效果的影响最大。本研究中受精后4min得到较高的受精率与诱导率, 但是考虑让受精卵受精过程充分完全, 处理前洗卵所需要的时间, 以及得到更高比例的雌核发育后代群体, 选择6mpf为最适处理起始时刻, 而10mpf后孵化率与诱导率显著下降, 这可能是处理时刻较晚导致无法充分抑制第二极体排放所致。斜带石斑鱼雌核生殖启动诱导的时间与欧鲈(*Dicentrarchus labrax*)受精后的5—6min,

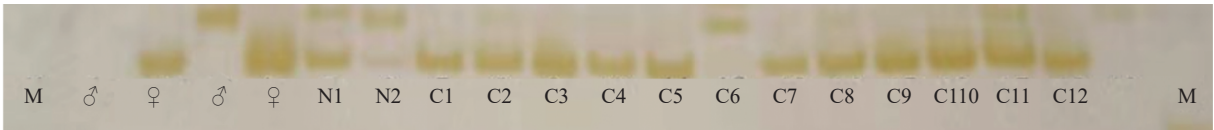


图7 斜带石斑鱼人工雌核生殖诱导样本在微卫星Mbo061位点上的扩增结果

Fig. 7 The PAGE gel electrophoresis figure of primer Mbo061 product

♂为父本样品; ♀为母本样品; N1、N2为杂交对照样品; C1—C12为雌核生殖个体样品
♂. Male parent; ♀. Female parents; N1 and N2. Controls; C1—C12. Gynogenetic individuals

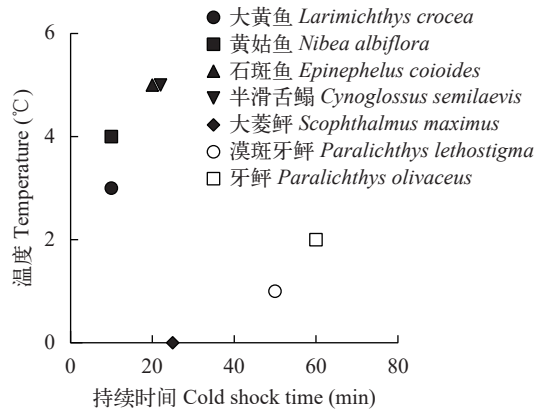


图 8 不同海水鱼雌核生殖最佳冷休克温度和时间

Fig. 8 Optimal temperature and time of cold shock for gynogenesis of different marine fishes

以及大菱鲆受精后6.5min较为相近,不同种鱼类适合处理时刻差别与卵子发育速度、培育水温相关(图9);持续时间和大菱鲆(25min)、半滑舌鲷(20—23min)较为接近(图8),与不同鱼类对低温的耐受差异相关。石斑鱼雌核生殖诱导率在处理时间各组中差异很显著,这反应出其胚胎发育对低温的耐受时间比较敏感相关;石斑鱼人工诱导雌核生殖条件具有中等低温、短时间处理的特点。

3.3 斜带石斑鱼雌核生殖后代微卫星鉴定

通常通过染色体核型、子代性状和单倍体效

应^[27, 28],来鉴定雌核生殖后代,利用分子标记技术能快速区分雌核生殖子代和杂交子代^[29]。为提高人工诱导石斑鱼雌核生殖的成功率,本研究采用了多组对照条件、倍性鉴定和微卫星标记等手段。单倍体组、雌核诱导组的倍性数据反映出精子灭活的程度;微卫星鉴定则具有多态性丰富、共显性遗传等优点^[30]。本研究雌核生殖样本获得了平均91.7%的诱导率,可以满足研究和应用的要求。其中6号个体在Mbo061位点上被检测出存在与父本相同的微卫星片段,这应当是异精效应导致部分鞍带石斑鱼DNA片段整合到雌核生殖后代基因组产生的结果,这种整合表现可能在子代的生理和代谢方面显现出差异^[21],异精效应也是石斑鱼人工雌核生殖育种关注和利用的重点之一。

人工雌核生殖不仅在提高群体的遗传一致性和性状一致性有着重要作用^[31, 32],同时雌核生殖子代基因型的纯合会导致部分个体近交衰退和致死,从而淘汰群体中的劣质基因。本研究在斜带石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)受精细胞学基础之上,确定精子灭活的条件,成功制备斜带石斑鱼雌核生殖子代,为斜带石斑鱼及其他石斑鱼遗传育种工作奠定基础。此外,雌核生殖是研究性别决定机制的重要途径^[33]。本文为研究性逆转石斑鱼的性别决定机制,提供新的思路 and 材料。

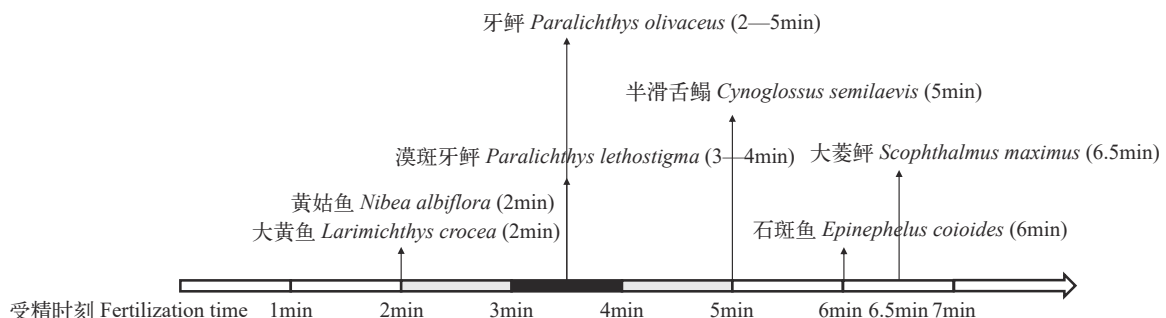


图 9 不同海水鱼雌核生殖最佳启动时间

Fig. 9 Optimal cold shock start time for gynogenesis of different marine fishes

参考文献:

[1] Li L L, Xiao W, Xing L M, et al. Study on morphological characteristics and embryonic development of the gynogenesis *Silurus lanzhouensis* [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2020, 42(5): 820-828. [李兰兰, 肖伟, 邢露梅, 等. 雌核发育兰州鲇胚胎发育和形态特征的研究 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(5): 820-828.]

[2] Xie Y J, Yang Y K, Wang Z Y, et al. Genetic analysis of yellow drum *Nibea albiflora* meiotic gynogens [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(11): 1285-1294. [谢仰杰, 杨育凯, 王志勇, 等. 黄姑鱼异质雌核发育子代的遗传分析 [J]. *中国水产科学*, 2020, 27(11): 1285-1294.]

[3] Liu S J. Distant hybridization leads to different ploidy fishes [J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(4): 416-425.

[4] Chen R Y, Xu D D, Lou B, et al. Induction of meiogynogenesis in *Larimichthys crocea* with heterologous sperm of *Oplegnathus fasciatus* [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2020, 39(2): 97-101. [陈睿毅, 徐冬冬, 楼宝, 等. 条石鲷精子诱导大黄鱼减数分裂雌核发育 [J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 39(2): 97-101.]

[5] Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(19): 1719-1729. [桂建芳, 朱作言. 水产动物重要经济性状的分子

- 基础及其遗传改良 [J]. *科学通报*, 2012, **57**(19): 1719-1729.]
- [6] Luo H R, Feng K, Chen J, *et al.* Telophase of the first cleavage is the key stage for optimally inducing mitotic gynogenesis in rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. *Aquaculture*, 2020(523): 735241.
- [7] Zhou L, Gui J F. Applications of Genetic Breeding Biotechnologies in Chinese Aquaculture [M]. Aquaculture in China: Success Stories and Modern Trends, 2018: 463-496.
- [8] Gui J F, Zhou L, Yin Z, *et al.* Genetic Breeding in Aquaculture [M]. Beijing: Science Press, 2021: 185-191. [桂建芳, 周莉, 殷战, 等. 水产遗传育种学 [M]. 北京: 科学出版社, 2021: 185-191.]
- [9] Su P Z, Chen S L, Yang J F, *et al.* Induction of gynogenesis in *Scophthalmus maximus* by heterologous sperms of *Lateolabrax japonicus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, **15**(5): 715-721. [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.]
- [10] Miao L, Li M Y, Chen Y Y, *et al.* Development of microsatellite markers for miiuy croaker, *Miichthys miiuy* (Sciaenidae), and their application in verifying gynogenesis of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, induced with *M. miiuy* sperm [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2015, **46**(1): 83-91.
- [11] Laczynska B, Demska-Zakes K, Siddique M A M, *et al.* Meiotic gynogenesis affects the individual and gonadal development in sterlet *Acipenser ruthenus* [J]. *Aquaculture Research*, 2020, **51**(9): 3623-3630.
- [12] Yang Y K, Xie Y J, Cai M Y, *et al.* Induction and identification of gynogenesis in *Nibea albiflora* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, **37**(9): 1297-1303. [杨育凯, 谢仰杰, 蔡明夷, 等. 黄姑鱼雌核发育诱导及鉴定 [J]. *水产学报*, 2013, **37**(9): 1297-1303.]
- [13] Ding S X, Wang Y H, Wang J, *et al.* Molecular phylogenetic relationships of 30 grouper species in China seas based on 16S rDNA fragment sequences [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, **52**(3): 504-513. [丁少雄, 王颖汇, 王军, 等. 基于16S rDNA 部分序列探讨中国近海30种石斑鱼类的分子系统进化关系 [J]. *动物学报*, 2006, **52**(3): 504-513.]
- [14] The China Society of Fisheries, 2020 China Fisheries Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 22. [中国水产学会. 2020中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 22.]
- [15] Tang S J, Bi X, Zhang F M, *et al.* Genetic diversity analysis and RAPD identification of three successive generations of meio-gynogenetic population in *Megalobrama amblyceph* [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, **31**(8): 1257-1271. [唐首杰, 毕详, 张飞明, 等. 连续三代减数分裂雌核发育团头鲂的遗传多样性分析和RAPD鉴别方法的建立 [J]. *浙江农业学报*, 2019, **31**(8): 1257-1271.]
- [16] Fan B, Liu X C, Meng Z N, *et al.* Cryopreservation of giant grouper *Epinephelus lanceolatus* (Bloch, 1790) sperm [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, **30**(2): 334-339.
- [17] Huang Z W. The genetic diversity of wild and cultured populations of *Epinephelus coioides* [D]. Haikou: Hainan University, 2010: 15-19. [黄宗文. 斜带石斑鱼野生和养殖群体的遗传多样性分析 [D]. 海口: 海南大学, 2010: 15-19.]
- [18] Yang J F, Chen S L, Su P Z, *et al.* Study on gynogenesis induced by heterogenous sperms in barfin flounder *Verasper moseri* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **33**(3): 372-378. [杨景峰, 陈松林, 苏鹏志, 等. 异源精子诱导条斑星鲆雌核发育 [J]. *水产学报*, 2009, **33**(3): 372-378.]
- [19] Yang J F, Chen S L, Xu G B, *et al.* Gynogenesis induced by heterogenous sperms in summer flounder *Paralichthys dentatus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **33**(4): 533-541. [杨景峰, 陈松林, 徐亘博等. 异源精子诱导犬齿牙鲆的雌核发育 [J]. *水产学报*, 2009, **33**(4): 533-541.]
- [20] Ji X S, Chen S L, Wu P F, *et al.* Comparison of embryonic development of *Cynoglossus semilaevis* haploid induced by heterogenous and homogenous sperm [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **33**(1): 60-69. [季相山, 陈松林, 武鹏飞, 等. 紫外灭活的异源和同源精子诱导的半滑舌鳎单倍体胚胎发育过程的比较 [J]. *水产学报*, 2009, **33**(1): 60-69.]
- [21] Jiang Y G, Liang S C, Chen B D, *et al.* Biological effect of heterologous sperm on gynogenetic offspring in *Carassius auratus gibelio* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1983, **7**(1): 1-13. [蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德, 等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应 [J]. *水生生物学集刊*, 1983, **7**(1): 1-13.]
- [22] Liu H J, Hou J L, Liu Y. Gynogenesis in Japanese flounder: A review [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, **24**(4): 902-912. [刘海金, 侯吉伦, 刘奕. 牙鲆雌核发育研究进展 [J]. *中国水产科学*, 2017, **24**(4): 902-912.]
- [23] Piferrer F, Cail RM, 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.
- [24] Liu X Z, Ning X, Xu Y J, *et al.* Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Parafichthys lethostigma*) with heterologous sperm of *Pagrosomus major* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, **18**(6): 1259-1268. [柳学周, 宁鑫, 徐永江, 等. 真鲷精子诱导漠斑牙鲆减数雌核发育 [J]. *中国水产科学*, 2011, **18**(6): 1259-1268.]
- [25] Xu D D, Lou B, Xue B G, *et al.* Artificial induction of diploid gynogenesis in *nibea alibiflora* and evidence for female homogamety [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, **44**(2): 310-317. [徐冬冬, 楼宝, 薛宝贵, 等. 黄姑鱼(*Nibea alibiflora*)雌核发育的人工诱导及鉴定 [J]. *海洋与湖沼*, 2013, **44**(2): 310-317.]
- [26] Ji X S, Tian Y S, Yang J F, *et al.* Artificial gynogenesis in *Cynoglossus semilaevis* with homologous sperm and its verification using microsatellite markers [J]. *Aquaculture Research*, 2010, **41**(6): 913-920.

- [27] Luckenbach J A, 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.
- [28] Wang C L, Zheng G D, Chen J, *et al.* Fingerprint recognition and microsatellite genetic analysis of different populations in gynogenetic grass carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(6): 1135-1143. [王成龙, 郑国栋, 陈杰, 等. 草鱼雌核发育后代不同群体的微卫星遗传分析及指纹识别 [J]. 水生生物学报, 2016, **40**(6): 1135-1143.]
- [29] Quan Y C, Han L Q, Bai J J, *et al.* Genetic structure analyses and microsatellite identification of gynogenetic grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, **38**(11): 1801-1807. [全迎春, 韩林强, 白俊杰, 等. 雌核发育草鱼的遗传结构分析和微卫星鉴别方法的建立 [J]. 水产学报, 2014, **38**(11): 1801-1807.]
- [30] Zeng Q K, Sun C F, Dong J J, *et al.* Establishment and utilization of paternity identification in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) using microsatellites [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, **25**(6): 976-984. [曾庆凯, 孙成飞, 董浚键, 等. 翘嘴鲈微卫星标记亲权鉴定技术的建立与应用 [J]. 农业生物技术学报, 2017, **25**(6): 976-984.]
- [31] Zhu Y M, Wang G X, Wang Y F, *et al.* Growth comparison and genetic analysis of gynogenetic inbred and hybrid lines of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, **21**(1): 19-25. [朱以美, 王桂兴, 王玉芬, 等. 牙鲆雌核发育近交系、杂交系的遗传分析与生长比较 [J]. 中国水产科学, 2014, **21**(1): 19-25.]
- [32] Zhu S R, Meng Q L, An L, *et al.* Microsatellite genetic analysis of gynogenetic grass carp group and two common grass carp groups [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, **25**(6): 1236-1244. [朱树人, 孟庆磊, 安丽, 等. 雌核发育草鱼群体及两个普通草鱼群体的微卫星遗传分析 [J]. 中国水产科学, 2018, **25**(6): 1236-1244.]
- [33] Zhang Q Q, Wang X B, Liu J X. Progress and prospects of sex determination and sex control in Chinese tongue sole *Cynoglossus semilaevis* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, **49**(10): 43-53. [张全启, 王旭波, 刘金相. 半滑舌鲷性别决定和性别控制育种研究进展与展望 [J]. 中国海洋大学学报, 2019, **49**(10): 43-53.]

INTRODUCTION OF DIPLOID GYNOGENESIS IN ORANGE-SPOT GROUPER *EPINEPHELUS COIODES* BY GIANT GROUPER *EPINEPHELUS LANCEOLATUS* SPERM

FAN Xin, ZHANG Wei-Wei, WU Ting-Chang, WEN Xin, CHEN Meng-Meng, WU Guang-Can and LUO Jian

(State Key Laboratory of Marine Resources Utilization in South China Sea, Hainan Aquatic Seed Industry Engineering Research Center, Hainan Academician Team Innovation Center, College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The long period of sexual maturity and the characteristics of hermaphroditism extend the breeding cycle of grouper. In addition, the artificial gynogenesis strategy can significantly improve the breeding efficiency. In this study, we explored the best conditions for artificially inducing gynogenesis in *Epinephelus coioides* used by the sperm of *Epinephelus lanceolatus*, and were identified by morphology, flow cytometry and microsatellite markers. The results showed that artificial gynogenesis of *Epinephelus coioides* was successfully induced by inactivated heterologous sperm. The best suitable UV irradiation intensity of sperm was 518 mJ/cm², and the irradiation time was 4min. 6min after fertilization, cold shock treatment could obtain the optimal apparent fertilization rate of 40% and hatchability of 29.7% at 4—6°C, while the control group without cold shock showed 83.5% apparent fertilization rate and 80% haploid rate. The result of multiple comparison showed that in terms of apparent fertilization rate, there is no significant difference between the artificial induction time ($P=0.579$) and water temperature ($P=0.133$). When it comes to hatch rate, the difference of treatment time between groups is extremely significant ($P=0.002$), but not in water temperature group ($P=0.396$). The results of embryo development showed that the induction of artificial gynogenesis would lead to the decrease of partial hatchability and the haploid embryos behaved obvious developmental disorder. The results of microsatellite molecular markers indicated that most of the genetic material of the artificial gynogenetic progeny of grouper came from the female parent, and the heterospermia effect also exists.

Key words: Gynogenesis; UV irradiation; Cold shock; Microsatellite marker; *Epinephelus*