

胡炜, 中国科学院水生生物研究所研究员、副所长。国家杰出青年基金获得者、国家自然科学基金创新研究群体学术带头人, 中国水产学会淡水养殖分会副主任委员, 国家水产原种和良种审定委员会委员。主要从事鱼类分子遗传育种的基础理论和关键技术研究。在*PNAS*, *EMBO Reports*, *Science Bulletin*等学术期刊上发表研究论文80余篇, 其中封面论文5篇; 参编国内外著作5本。授权美国发明专利4项、中国发明专利8项。创制和培育出具有优良性状的养殖鱼类新种质和新品系。

· 综述 ·

鱼类原始生殖细胞发育与生殖操作技术研究进展

陶彬彬^{1,2}, 胡炜^{1,2*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北洪山实验室, 湖北 武汉 430072;
2. 中国科学院种子创新研究院, 北京 100101)

摘要: 原始生殖细胞是胚胎发育过程中最早建立的一群生殖干细胞, 是有性生殖动物生殖发育的基础。鱼类原始生殖细胞特化遵循“先成论”的模式, 早期胚胎发育过程中获得母源生殖质组分的细胞特化为原始生殖细胞, 特化形成的原始生殖细胞需要维持其生殖干细胞命运, 并经过长距离迁移最终到达性腺原基的位置。原始生殖细胞特化、迁移和命运维持过程受到多种基因和信号通路的综合调控。研究鱼类原始生殖细胞发育不仅有助于深入理解脊椎动物细胞特化、迁移和命运维持等基本生物学过程的调控机理, 而且是开发新的养殖鱼类生殖控制和生殖干细胞移植技术的重要基础。本文概述了鱼类原始生殖细胞发育的基础理论以及生殖操作技术研究进展, 并展望了未来的发展趋势, 以为开发重要养殖鱼类优良种质创制新技术提供参考。

关键词: 鱼类; 原始生殖细胞; 生殖质; 生殖控制; 生殖干细胞移植

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC) 是早期胚胎发育过程中最早建立的一群生殖干细胞, 其形成后逐渐迁移到性腺原基的位置, 分化为精原细胞或卵原细胞, 并经过减数分裂等过程最终产生成熟的配子——精子和卵子, 精卵结合后物种完成遗传信息的传递, 起始新一轮生命过程, 因此原始生殖细胞是有性生殖动物生殖发育的基

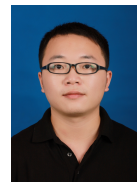
础, 在维持物种世代相续, 生生不息中发挥不可或缺的作用。研究鱼类原始生殖细胞不仅有助于理解细胞特化、细胞迁移和细胞命运维持等基本生物学过程的调控机制, 且鱼类原始生殖细胞研究对养殖鱼类生殖控制和生殖干细胞移植等鱼类育种技术开发十分重要^[1-2]。为此, 本文简要综述鱼类原始生殖细胞发育, 生殖控制和生殖干细胞

收稿日期: 2022-10-11 修回日期: 2022-11-14

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901200); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-46); 国家自然科学基金 (31721005)

第一作者: 陶彬彬 (照片), 从事鱼类生殖细胞发育研究, E-mail: taobinbin@ihb.ac.cn

通信作者: 胡炜, 从事鱼类生殖发育与分子遗传育种研究, E-mail: huwei@ihb.ac.cn



移植技术研究进展, 以期为开发养殖鱼类优良种质创制新技术提供参考。

1 原始生殖细胞特征

原始生殖细胞特异分子标记被鉴定以前, 主要根据其细胞形态特征加以识别, 其细胞核通常更大, 边界清晰, 细胞内有呈现为电子致密体的亚细胞结构, 被称为生殖质或生殖颗粒^[3]。鱼类生殖质结构内储存多种参与调控原始生殖细胞发生和发育的 RNA 和蛋白质^[4]。

VASA 是生殖质的重要组成部分之一, 该基因 (*vasa*) 是鱼类中首个被鉴定的生殖质和生殖细胞标记基因^[5]。在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中, *vasa* mRNA 定位于 2 细胞期、4 细胞期和 8 细胞期胚胎的分裂沟, 32 细胞期阶段, *vasa* mRNA 聚缩在 4 个细

胞的亚细胞团中, 1000 细胞期前, *vasa* mRNA 以不均等分离的方式分布在 4 个细胞中, 至 4000 细胞期, *vasa* mRNA 均匀分布在 4 簇原始生殖细胞中^[6]。标记基因 *vasa* 的鉴定加速了鱼类原始生殖细胞的研究, 包括模式鱼类青鳉 (*Oryzias latipes*) 和稀有鮕鲫 (*Gobiocypris rarus*)^[7-8], 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[9]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[10]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[11]、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)^[12] 等多种经济鱼类的 *vasa* 基因也被克隆。除 *vasa* 外, 目前已鉴定出多种生殖质或原始生殖细胞标记基因, 包括 *nanos3* (原名为 *nanos1*)^[13]、*dead end*^[14]、*dazl*^[15]、*tdrd7*^[16-17] 及 *bucky ball* (*buc*)^[18] 等, 这些因子不仅是生殖质或原始生殖细胞的标记基因, 它们在原始生殖细胞特化、迁移或维持过程中发挥重要功能 (图 1)。

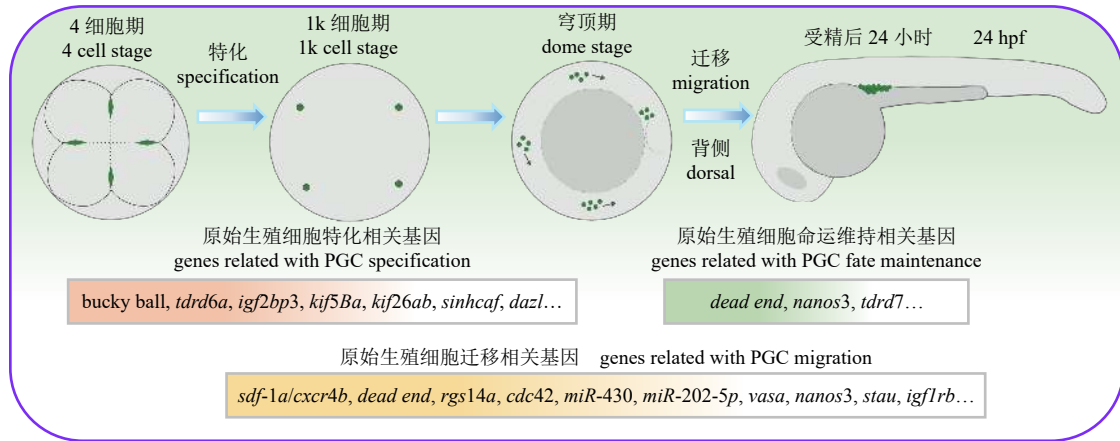


图 1 斑马鱼等鱼类原始生殖细胞特化、迁移和命运维持的重要调控基因

Fig. 1 Important regulatory genes related with primordial germ cell (PGC) specialization, migration and fate maintenance in *D. rerio* and some other fish

2 原始生殖细胞特化

原始生殖细胞的特化形成目前有两种学说, 第一种是以小鼠 (*Mus musculus*) 和人 (*Homo sapiens*) 为代表的“后成论”, 原始生殖细胞由其周围细胞分泌的信号诱导形成; 第二种是以模式生物斑马鱼、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 及秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 等为代表的“先成论”, 原始生殖细胞是由卵母细胞生殖质 (germ plasm) 决定, 早期胚胎发育过程中获得生殖质组分的细胞将特化为原始生殖细胞。以斑马鱼为模型开展的研究发现, 生殖质在早期胚胎卵裂时向分裂沟处聚集^[19], 通过移除该区域的细胞质成分可造成生殖细胞的缺失, 说明生殖质对原始

生殖细胞特化是必需的^[20]。虽然青鳉在早期胚胎卵裂过程中生殖质均匀分布在各个细胞中, 直到原肠期才特异分布在原始生殖细胞中, 但原始生殖细胞特化依然符合先成论的特征, 由原始生殖细胞自主特化形成, 生殖质组分因子 *Dead end* 在青鳉原始生殖细胞特化中起重要作用^[21]。

斑马鱼卵子发生过程中生殖质组分大多聚集在植物极的巴尔比阿尼氏小体 (Balbani body), *Buc* 是脊椎动物中发现的第一个生殖质组装必需的因子, 与黑腹果蝇中 *Oskar* 蛋白功能相近^[22], *buc* mRNA 特异地与生殖质其他组分共定位分布, 且可以特异地招募生殖质成分 *vasa* 及 *nanos3* 等。斑马鱼 *buc* 突变家系卵母细胞会因细胞缺少极性, 生殖质标记基因无法准确定位于巴尔比阿尼氏小

体而最终造成生殖细胞的缺失^[18, 23]。Buc-GFP融合蛋白特异分布于细胞分裂沟处, 与生殖质成分 *vasa* 等共定位, 过表达 Buc 可以诱导异位生殖细胞的形成^[18], 青鳞中过表达 Buc 也可诱导产生更多的原始生殖细胞^[24]。Tdrd6a 通过与 Buc 蛋白相互作用调节 Buc 流动性和聚集性, Tdrd6a 缺失导致生殖质聚集和原始生殖细胞发育的严重缺陷^[25]。m⁶A 读取器 Igf2bp3 与 Buc 存在相互作用, 并可通过调节 m⁶A 修饰生殖质基因的表达以实现斑马鱼生殖质组装, 进而参与原始生殖细胞特化的生物学过程^[26]。

生殖质在早期胚胎卵裂过程中向分裂沟聚集, 微管和肌动蛋白微丝的协调作用在细胞质成分包括 RNAs 的运动中扮演非常重要的角色^[27]。在刚受精的胚胎中, 动物极生殖质 RNAs 如 *vasa*、*nanos3* 和 *dnd* RNAs 均附着于 F-肌动蛋白束形成的纤维网。在第一次细胞分裂过程中, 依赖于星状微管, 这些生殖质相关的 RNAs 和 F-肌动蛋白向胚胎外周移动和聚集。细胞骨架重排和侧向运动进一步导致生殖质在分裂沟聚集^[28-29], 为原始生殖细胞的特化创造条件。若皮质微丝结构紊乱, 分裂沟微管分布减少, 则影响生殖质聚集以及生殖质相关因子如 *vasa* RNA 的定位^[30-31]。驱动蛋白 Kinesin 对鱼类生殖质聚集十分重要, Campbell 等^[32]于 2015 报道了斑马鱼 Kinesin 蛋白超家族中的成员 Kinesin-1 Kif5Ba 与生殖质组分 Buc 蛋白存在相互作用, Kif5Ba 突变的斑马鱼胚胎期生殖质聚集出现严重缺陷, 导致原始生殖细胞无法形成。本实验室最近发现, 斑马鱼生殖质聚集和原始生殖细胞特化需要 Sinhcif 介导的组蛋白去乙酰化的调控作用, 并进一步揭示该调控作用是通过靶向激活驱动蛋白因子 Kif26ab 的转录而实现^[33]。

3 原始生殖细胞迁移

斑马鱼等鱼类原始生殖细胞在原肠期前已经特化形成, 特化形成位置与性腺发育的部位相距较远, 原始生殖细胞特化形成后需要穿过各种体细胞组织, 经过长距离的迁移最终到达性腺原基的位置。原始生殖细胞迁移的正确与否关系到其能否存活, 未能正确迁移的原始生殖细胞通常会被机体清除以防止形成生殖细胞瘤^[34]。斑马鱼等鱼类的原始生殖细胞迁移过程中受到机体精确调控, 鱼类原始生殖细胞正确迁移要比其他脊椎动物面临更大的困难。首先, 斑马鱼等鱼类原始生

殖细胞在 4 个不同的部位特化形成, 这意味着 4 簇原始生殖细胞迁移起始部位的体细胞环境不同。其次, dome 时期特化形成的原始生殖细胞相对胚轴而言其位置是随机的, 原始生殖细胞需要能够从胚胎边缘的任意部位迁移到生殖嵴。研究人员利用斑马鱼对原始生殖细胞的迁移过程作了精细分析^[35], 总体上原始生殖细胞迁移可以分为 6 个步骤: (1) 从 dome 时期开始向胚胎背侧汇聚, (2) 从 60% epiboly 时期起胚胎背侧原始生殖细胞开始背离背侧中线, (3) 从 80% epiboly 时期开始沿着胚胎中胚层前缘和侧缘分布, (4) 2-体节时期开始形成 2 个侧向细胞簇, (5) 2-体节时期开始部分拖尾的原始生殖细胞向前迁移, (6) 8-体节时期开始, 部分前部的原始生殖细胞向后迁移。

特化形成的斑马鱼原始生殖细胞最初是难以移动的圆形, 随后他们在细胞周围产生突起, 变为有极性的、可迁移的细胞。斑马鱼原始生殖细胞采用一种被称为“变形虫迁移”的快速运动模式, 其迁移不依赖于对基底的附着力。原始生殖细胞在静水压力和胞质流动的驱动下, 其细胞膜从肌动蛋白皮层分离产生小泡突起, 引导细胞向指定方向迁移^[36]。细胞黏附分子 E-cadherin 的下调表达是原始生殖细胞迁移起始的必要条件, 其表达水平受原始生殖细胞中 Rgs14a 蛋白调控^[37]。除此之外, 原始生殖细胞迁移主要受到依赖于生殖质因子的细胞自发调控和一些趋化因子的诱导。其中生殖质因子 RNA 结合蛋白 Dead end 通过调控特定 RNA 的功能在原始生殖细胞迁移中发挥作用^[14]; 具体来说, Dead end 蛋白通过降低膜-皮质连接因子 Annexin5 水平并下调 E-cadherin 水平进而促进突起小泡的形成。体外培养的原始生殖细胞仍具有较强迁移能力, 提示原始生殖细胞迁移能力主要受细胞自主调控。总的来说, 原始生殖细胞的迁移需要其具备高收缩性、易形成突起以及低的黏附水平。

基质细胞趋化因子 (chemotactic factor stromal cell-derived factor-1, SDF-1a) 及其 G 蛋白偶联受体 CXCR4b 在斑马鱼原始生殖细胞向性腺原基的定向迁移中扮演重要角色^[38-39], 这与小鼠和家鸡 (*Gallus gallus spadiceus*) 中的情况相似, 表明 SDF-1a/CXCR4b 在脊椎动物原始生殖细胞迁移调控中的功能保守。接收到外部趋化因子信号的原始生殖细胞通过磷脂和小 GTPase 等效应分子转化为细胞骨架变化^[40]。抑制斑马鱼小 GTPase Cdc42 功能

影响原始生殖细胞膜内陷, 进而减少突起小泡的形成, 使原始生殖细胞失去迁移能力^[41]。母源表达的 miR-202-5p 通过保护小 GTPase Cdc42 参与原始生殖细胞迁移调控^[42]。斑马鱼 miR-430 可通过清除母体 SDF-1 及其受体在原始生殖细胞迁移中发挥重要作用^[43]。需要注意的是, SDF-1a 是一个泛组织表达因子, 推测原始生殖细胞迁移不仅受 SDF-1a/CXCR4b 这一对趋化因子-受体的调控, 可能还有其他吸引或排斥原始生殖细胞迁移的因子来协助这一过程^[39]。Paksa 等^[44]发现物理信号可直接调节原始生殖细胞的迁移定位, 发育中的肠道作为物理屏障将生殖嵴原始生殖细胞分为两簇, 与物理屏障作用的原始生殖细胞会调转迁移方向, 从而保证原始生殖细胞的两侧分布。此外, 抑制 *vasa*^[45]、*nanos3*^[46]、*HMGCoA*^[47]、*stau1*、*stau2*^[48]、*igf1rb*^[49]、*puf-A*^[50]、*adamts9*^[51] 等因子的功能会造成原始生殖细胞的迁移紊乱或延迟, 导致最终迁移至生殖嵴的原始生殖细胞数量减少。

4 原始生殖细胞命运维持

鱼类原始生殖细胞迁移过程中会暴露在复杂的体细胞信号网络中, 原始生殖细胞需要维持其命运不向体细胞分化, 原始生殖细胞命运维持关系到其能否顺利迁移到生殖嵴以及随后的性腺发育。维持原始生殖细胞的命运需要染色质修饰、基因转录沉默调控、翻译和蛋白质稳定性等多个生物学过程的精确调控^[52-54]。与哺乳动物原始生殖细胞迁移过程中全基因组范围内发生的广泛去甲基化不同, 斑马鱼原始生殖细胞未发现明显的基因组去甲基化^[55-56]。

以斑马鱼为模型开展的研究提示, 鱼类原始生殖细胞命运维持主要由生殖质因子调控。斑马鱼 *nanos3* mRNA 是生殖质的重要组成部分之一, 特异表达定位在原始生殖细胞中, 其表达模式和功能均十分保守, 在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、黑腹果蝇、秀丽隐杆线虫和斑马鱼中都发现 *nanos3* 或其同源基因对原始生殖细胞命运维持十分重要^[46, 57]。*Dead end* 是生殖质的另一个重要组分, 其在斑马鱼原始生殖细胞命运维持中发挥重要功能。2003 年, Weidinger 等^[14]发现敲降斑马鱼 *dead end* 基因后原始生殖细胞难以存活, 最终走向凋亡。但随后的研究者对敲降 *dead end* 基因斑马鱼胚胎期原始生殖细胞更为细致的观察发现, 一些 *dead end*

基因的敲降的原始生殖细胞并未发生凋亡, 而是细胞形态发生转变, 转分化为其他类型的细胞^[58]。Gross-Thebing 等^[53]对 *dead end* 基因敲降后的原始生殖细胞的命运转变进行系统的分析观察, 发现敲降 *dead end* 后原始生殖细胞可转变为多种类型的体细胞, 包括肌细胞和神经细胞。小鼠 *Dead end* 同源蛋白通过招募 CCR4-NOT1 去腺苷酶复合物引导 mRNA 降解来调节 mRNA 的丰度^[59], 该研究是对 *Dead end* 维持生殖系干细胞功能和作用机制的重要补充。多种养殖鱼类中的研究均发现 *Dead end* 具有类似维持原始生殖细胞命运的功能, 鉴于其功能的保守性, 目前敲降或敲除 *dead end* 基因已成为养殖鱼类原始生殖细胞剔除的普遍方法^[12, 60-62]。

D'orazio 等^[17]发现, 斑马鱼原始生殖细胞迁移起始前生殖质未对其染色质开放程度和基因转录影响, 而迁移过程中的原始生殖细胞命运维持需要生殖质因子 Tdrd7 介导的染色质重塑和广泛的基因转录改变, 这一过程可能和 Tdrd7 调控生殖颗粒在核周围的重新分布相关。

5 鱼类原始生殖细胞活体荧光标记技术

除前述原始生殖细胞特化、迁移和维持的生物学机理深入研究外, 生殖细胞特异活体荧光标记对开展生殖操作十分重要。

鱼类生殖细胞活体荧光标记主要采用转基因家系构建和 RNA 定点表达技术 (localized RNA expression)。尽管模式鱼类斑马鱼和青鳞中已成功构建出多种可标记生殖细胞的转基因家系, 包括 *vasa*、*buc* 和 *piwil1* 启动子驱动荧光蛋白的转基因斑马鱼家系^[23, 63-64]以及 *vasa* 启动子驱动荧光蛋白的转基因青鳞家系^[65], 但由于较长的性成熟时间以及转植基因整合效率通常较低等因素, 目前养殖鱼类仅见虹鳟中报道 *vasa-like* 基因启动子驱动的绿色荧光蛋白特异标记其生殖细胞^[66]。

与构建转基因家系相比, 利用 RNA 定点表达技术活体标记原始生殖细胞具有简单、高效的优势, 因此该技术已被广泛应用于养殖鱼类原始生殖细胞的活体标记。该技术最初是在斑马鱼中建立, 原始生殖细胞特异表达基因的 3'UTR 有保护 mRNA 免受生殖细胞清除的作用, 体外合成包含 GFP 和 *nanos3* 3'UTR 融合序列的一段 mRNA, 并将其注射到 1 细胞期胚胎中, 可快速实现胚胎

发育过程中原始生殖细胞的可视化。*nanos3* 3'UTR 序列在不同种类的鱼中相对保守, 注射斑马鱼 *GFP-nanos3* 3'UTR mRNA 可以实现多种养殖鱼类的原始生殖细胞荧光标记, 包括鲤^[62]、泥鳅^[67]、黄鳝 (*Monopterus albus*)^[61] 以及大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[68] 等。除了 *nanos3* 3'UTR, *vasa* 或 *dead end* 基因的 3' UTR 也被成功用于活体标记青鳉^[69]、罗非鱼^[70]、真鲷 (*Pagrus major*)^[71] 等多种鱼类的原始生殖细胞荧光标记。该技术的不足之处是仅能实现胚胎或幼鱼期的生殖细胞标记, 随着个体发育的进行生殖细胞的荧光会逐渐减弱直至消失。

6 鱼类育性控制技术

控制养殖鱼类的育性具有多重生态意义和经济价值, 首先, 不育可以打消人们对遗传改良鱼类逃逸或释放到自然环境后可能影响野生种群遗传多样性的担忧; 其次, 养殖鱼类许多重要性状与其育性密切相关, 不育可以减少性腺发育所需的能量消耗进而促进肌肉发育, 且可以避免性成熟带来的肉质质量下降以及易感染病菌; 另外, 优质鱼类种苗的不育可以保护优良品种的知识产权, 防范优良品种被盲目杂交与回交导致的种质退化, 有助于种业健康有序发展。鱼类育性的控制技术主要有三倍体策略、生殖相关靶基因操作和生殖细胞特异剔除等^[2, 72-73]。

基于对原始生殖细胞发育机制的认识, 已发展出通过剔除原始生殖细胞从而控制鱼类育性的技术。其中通过注射 morpholino 至 1 细胞期胚胎敲降 *dead end* 基因, 已在多种养殖鱼类中实现生殖细胞的完全剔除, 包括泥鳅、金鱼 (*Carassius auratus*)、鲤、黄鳝等^[12, 61-62, 74]。除了注射 *dead end*-morpholino 外, Wong 等^[58] 发现斑马鱼胚胎阶段短期浸泡合适浓度的 *dead end*-MO-Vivo 也可以实现生殖细胞完全剔除, 获得 100% 不育的成鱼。随着基因编辑技术的发展, 研究人员成功编辑了虹鳟和大西洋鲑的 *dead end* 基因并获得了生殖细胞缺失的突变体^[60, 75], 对虹鳟 *dead end* 基因合子突变体性腺分析发现, 孵化后 34 d 的合子缺失突变体原始生殖细胞数目与野生型相比并无显著差异, 随后生殖细胞数目才逐渐减少, 1 龄的合子缺失突变体性腺中已完全没有生殖细胞, 提示胚胎期原始生殖细胞在母源性 *dead end* 存在的条件下可以正常发育, 而合子表达的 *dead end* 对幼鱼性腺生殖细胞发育十分重要^[75]。有趣的是, 生殖

轴的核心信号 GnRH3 对于斑马鱼胚胎期 PGC 的增殖具有重要作用, *gnrh3* 敲除斑马鱼的 PGC 数量显著减少^[76]。

Sdf1a 是调控原始生殖细胞迁移的重要因子之一, 通过构建热休克蛋白驱动 *sdf1a* 表达的转基因鱼家系, 热处理条件下可使转基因鱼 *sdf1a* 基因过表达, 过表达 *sdf1a* 的转基因鱼因胚胎期原始生殖细胞迁移紊乱而导致其成年后不育^[77]。Hu 等^[78] 成功利用 Nitroreductase (硝基还原酶)/Metronidazole (甲硝唑) 系统控制斑马鱼育性, 该策略的思路是构建卵细胞中特异表达硝基还原酶的转基因斑马鱼, 硝基还原酶可使无毒的甲硝唑转化为毒性物质, 因此当在斑马鱼养殖过程中添加甲硝唑可靶向导致卵细胞凋亡, 获得不育鱼。为克服鱼类优良品种性状稳定遗传与不育之间的悖论, 本实验室提出了鱼类生殖开关育种新策略。该策略利用了靶向原始生殖细胞发育的诱导型 GAL4/UAS 系统, 以 *dead end* 为靶基因控制生殖细胞存活, 初步建立了亲本两系可育, 而杂交子代诱导不育的鱼类生殖开关模型 (图 2)^[79]。该策略不仅可以达到控制鱼类育性的目的, 而且亲代家系可育, 因此创制出的种质优良性状可以稳定遗传。基于可控原始生殖细胞操作, 建立生殖开关技术培育不育的鱼, 将成为未来鱼类精准育种的重要途径之一^[80]。

近年来对原始生殖细胞发育机制的理解为实现原始生殖细胞剔除提供了更多的可能性。除在养殖鱼类敲降/敲除经典的原始生殖细胞发育必需基因外, 靶向抑制其他参与调控原始生殖细胞特化、迁移或维持的因子, 如 *Buc*、*Tdrd6a*、*Tdrd7* 和 *Sinhcaf* 等, 也有望实现养殖鱼类生殖控制。值得注意的是, Jin 等^[81] 利用斑马鱼胚胎筛选出一种名为 primordazine 的小分子化合物, primordazine 通过与 3'UTR 中的效应原件作用抑制 mRNA 翻译特异性地剔除斑马鱼原始生殖细胞。通过直接在胚胎期浸泡 primordazine 这种小分子有望获得大规模原始生殖细胞剔除的鱼苗, 但是, primordazine 是否能有效剔除其他鱼类原始生殖细胞尚未见报道。

7 鱼类生殖干细胞移植技术

鱼类生殖干细胞移植技术是指将从供体鱼得到的生殖干细胞植入受体鱼, 获得生殖系嵌合体鱼并产生源自供体的配子或后代, 也可称为“借腹生

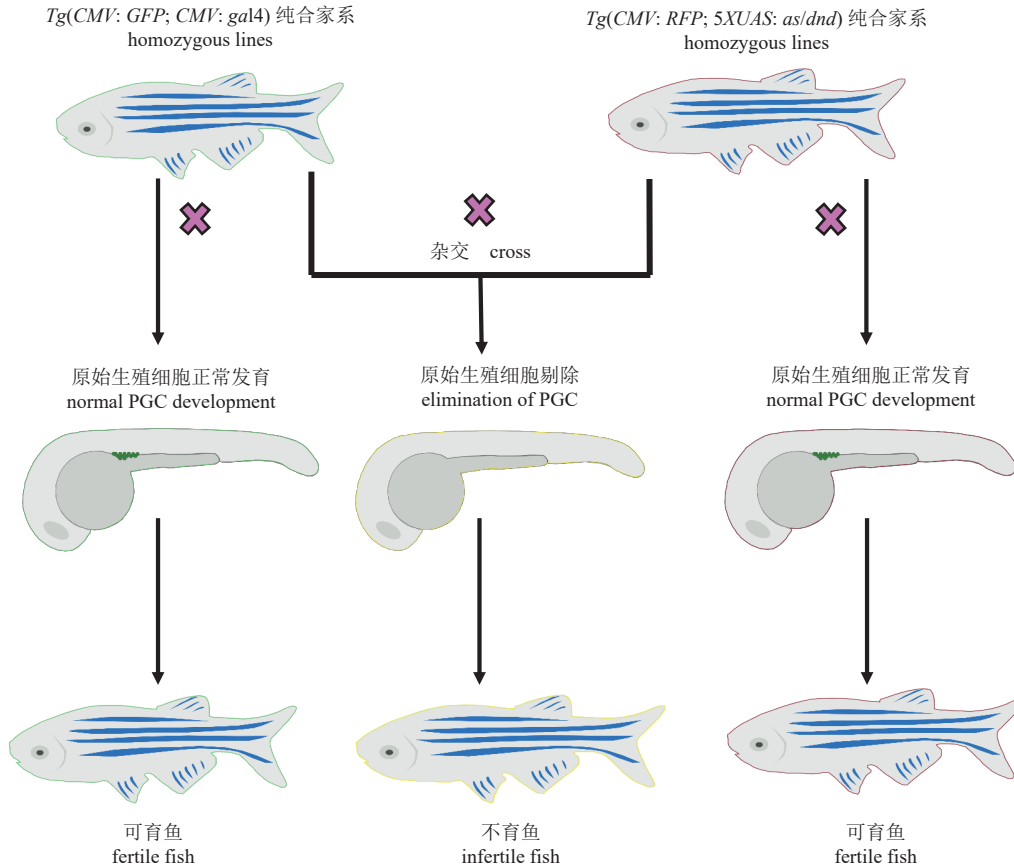


图 2 鱼类生殖开关控制策略示意图

Fig. 2 Schematic representation of fish on-off reproductive containment strategy

殖”技术。目前生殖细胞移植使用的供体生殖干细胞包括两类：原始生殖细胞和精原干细胞 (spermatogonial stem cell, SSC)，移植受体包括囊胚期胚胎、初孵仔鱼和成鱼各个发育阶段的个体 (图 3)。鱼类生殖细胞移植作为新兴生物技术，在鱼类高效繁育技术开发及保存鱼类种质资源等方面极具发展潜力。

早在 30 年前，Lin 等^[82] 通过不同品系间斑马鱼囊胚卵裂球移植实验，获得生殖系嵌合的斑马鱼，并产生源自供体鱼的成熟配子，表明供体鱼的原始生殖细胞成功定植到受体鱼，并在性腺处完成细胞增殖、分化和减数分裂等生物学过程，这是鱼类中最早的原始生殖细胞移植研究。随后在青鳉、虹鳉和泥鳅中利用类似的方法同样可以获得生殖系嵌合的受体鱼。Yamaha 等^[83] 对此方法进行改进，将三倍体鲫 (*C. auratus*) 的囊胚的下层细胞移植到二倍体金鱼囊胚的中间层，形成一种类似“三明治”的嵌合胚，首次获得了不同鱼种间的生殖系嵌合可育个体。卵裂球移植的方法在多种鱼中成功获得生殖系嵌合鱼，但若作为水产

应用技术仍有诸多问题难以克服，首先，卵裂球移植获得生殖系嵌合个体的成功率较低；其次，卵裂球移植通量低，耗时耗力，另外，卵裂球移植一般仅能在种内或者亲缘关系很近的种间获得成功，因为卵裂球移植形成的嵌合体除了生殖系发生嵌合外，通常有大量的体细胞也是嵌合的，亲缘关系稍远的嵌合体鱼很难正常发育。因此需要对原始生殖细胞进行特异的活体标记并分离后再进行移植。

Takeuchi 等^[84] 通过构建 *vasa* 启动子驱动绿色荧光蛋白的转基因虹鳉，成功特异标记了原始生殖细胞，将荧光标记的原始生殖细胞移植到孵化后的虹鳉幼鱼，发现原始生殖细胞可以成功定植到受体鱼性腺原基，并增殖、分化进而产生成熟的精子或卵子。2004 年，Nature 以简讯的形式报道了移植绿色荧光标记的虹鳉原始生殖细胞至马苏大麻哈鱼 (*Oncorhynchus masou*)，并利用生殖系嵌合的樱鳉生产虹鳉成熟配子和子代，不同种间原始生殖细胞的成功移植标志着鱼类生殖干细胞移植技术获得重要突破^[85]。Saito 等^[86] 通过注射

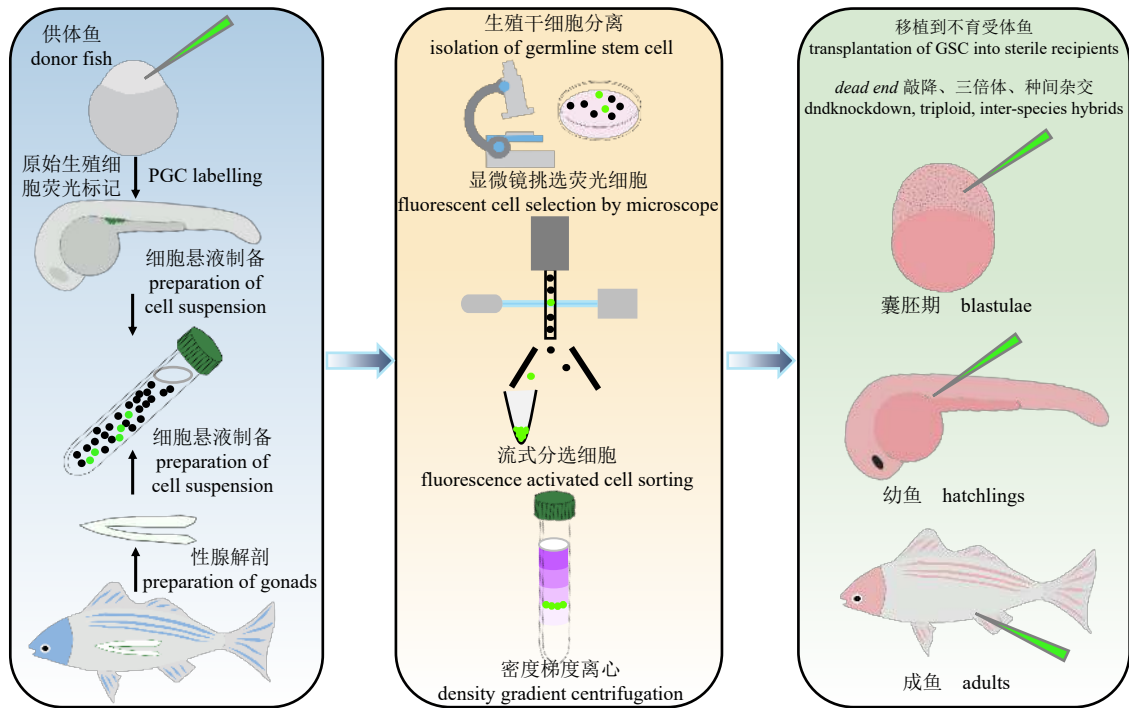


图3 鱼类生殖干细胞移植概述

Fig. 3 Overview of fish germline stem cell transplantation

GFP-nos3 3'UTR mRNA 至珍珠鲋 (*D. albolineatus*)、金鱼和泥鳅 1 细胞期胚胎成功标记原始生殖细胞, 将荧光标记的单个原始生殖细胞人工挑选出来, 注射 *dead end*-morpholino 后的囊胚期受体斑马鱼胚胎, 发现单个原始生殖细胞移植到受体胚后部分可以顺利迁移并定植到生殖嵴, 进而发育成嵌合性腺, 产生源自供体鱼的成熟精子, 表明不同种、属和科的鱼之间可实现原始生殖细胞移植。该团队进一步研究亲缘关系更远的种间原始生殖细胞移植的可能性, 通过将日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)、小体鲟 (*Acipenser ruthenus*) 的原始生殖细胞移植分别到斑马鱼和金鱼, 发现日本鳗鲡、小体鲟的原始生殖细胞均能迁移到受体鱼的性腺原基处^[87-88], 但遗憾的是, 迁移到性腺原基处的原始生殖细胞未能进一步发育为功能性配子。

本实验室通过注射 *GFP-nos3 3'UTR* mRNA 至 1 细胞期黄鳝胚胎, 成功地对黄鳝原始生殖细胞进行荧光活体标记, 利用流式细胞仪高效分选得到黄鳝的原始生殖细胞, 并将其移植到生殖细胞完全剔除的鲤受体, 获得黄鳝生殖细胞嵌合的鲤性腺, 且在移植后 1 年龄的受体鲤中仍能检测到黄鳝生殖细胞。需要注意的是, 从鱼类胚胎中分离原始生殖细胞存在一定的技术难题, 一方面是由于单个胚胎或幼鱼的原始生殖细胞数目较少,

另一方面是由于分离原始生殖细胞前需要利用显微注射对原始生殖细胞进行特异荧光标记, 有些养殖鱼类中尚未实现人工繁殖或者显微注射技术尚未建立, 因此难以实现胚胎期特异的原始生殖细胞标记与分离。对于可以实现荧光标记原始生殖细胞的鱼类, 采用的流式细胞分选技术尽管可以实现原始生殖细胞的高效分离, 但分离得到的原始生殖细胞活性能否达到细胞移植的标准也需要进一步探索。

精原干细胞相对于原始生殖细胞更易于大量获得。现阶段精原干细胞移植显示出比原始生殖细胞移植更大的应用前景。2006 年, Okutsu 等^[89]将分离纯化的虹鳟 A 型精原干细胞移植到同种异体的受体鱼中, 获得来源于供体鱼的功能性雌雄配子, 2007 年, Science 以简讯的形式报道了将荧光标记的虹鳟精原干细胞移植到三倍体樱鳟, 发现移植虹鳟精原干细胞的嵌合性腺中可分化产生虹鳟的精子或卵子, 这取决于受体鱼樱鳟的雌雄性腺环境^[90]。近年来, 通过移植鲤精原干细胞至金鱼^[91]、稀有鮰鲫精原干细胞至斑马鱼^[92]、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 精原干细胞至牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)^[93], 获得供体鱼来源的鲤、稀有鮰鲫及大菱鲂成熟配子。利用供体成鱼雄性性腺分离获得精原干细胞相对于分离原始生殖细胞更为便捷, 目前采用的方法主要是密度梯度离心,

但该方法获得的细胞悬液中混有其他类型的细胞, 精原干细胞比例较低, 寻找精原干细胞的特异标记有望实现制备高纯度的精原干细胞悬液。Ichida 等^[94]报道了一种鲑鳟类 A 型精原干细胞的特异抗体 (Alexa flour 488-conjugated antibody No. 95), 有望结合流式细胞分选技术用于 A 型精原干细胞的高效特异分选。建立成熟的鱼类生殖干细胞体外培养技术对于实现高效的鱼类生殖细胞移植十分重要。Hong 等^[95]建立了稳定培养的青鳉精原干细胞系, 可体外诱导产生精子。青鳉原始生殖细胞可实现体外短期培养^[45, 96], 青鳉囊胚细胞移植实现了种内生殖细胞的完全置换^[97]。中华乌塘鳢 (*Bostrychus sinensis*) 中建立了 3D 培养体系, 可诱导精原干细胞分化, 产生可育精子^[98]。马口鱼 (*Opsariichthys bidens*) 中已建立长期稳定培养的精原干细胞系, 可体外诱导产生精子^[99]。Sun 等^[100]成功富集培养出黄鳝雌性生殖干细胞、间性生殖干细胞和雄性生殖干细胞, 进一步将分离培养出的雌性生殖干细胞移植到剔除原始生殖细胞的斑马鱼中, 获得性腺中嵌合黄鳝生殖细胞的斑马鱼。最近, Zhang 等^[92]将基因编辑后的稀有鮠鲫精原干细胞移植到剔除内源生殖细胞的斑马鱼体内, 利用斑马鱼获得了基因编辑的稀有鮠鲫精子。生殖干细胞移植技术与基因编辑技术相结合, 是养殖鱼类优良种质精准创制亟待发展的方向之一。

8 总结与展望

生殖是鱼类优良品种培育和扩群应用的基础, 原始生殖细胞作为生殖细胞的祖先细胞决定着鱼类生殖发育的起始。自 25 年前鱼类首个原始生殖细胞标记基因鉴定以来, 模式鱼 (斑马鱼和青鳉) 在理解鱼类原始生殖细胞发育调控机制发挥了关键作用, 鉴于模式鱼在研究原始生殖细胞发育方向的诸多优势, 未来仍将是鱼类原始生殖细胞发育机制探索的重要模型, 并将在鱼类原始生殖细胞特化、迁移或维持机制研究及调控原始生殖细胞发育的新因子挖掘及养殖鱼类育种实践中发挥重要作用。尤其是对水产种业而言, 基于原始生殖细胞精准操作等生殖开关技术不仅是创制养殖鱼类优良种质的重要途径之一, 而且, 将为鱼类遗传改良新品种的产业化及其知识产权的有效保护提供技术保障, 是水产种业高质量健康发展亟待突破的关键技术之一。

可以预见, 随着越来越多的养殖鱼类功能基因组的系统解析和基因编辑技术的迅猛发展, 将

鱼类干细胞技术 (包括生殖干细胞分离、培养、诱导和移植等技术) 与基因编辑、分子设计、性别控制和生殖开关等技术相结合, 充分利用鱼类体外受精和发育的特点, 未来有望开辟养殖鱼类优良种质创制的“试管配子”与“试管育种”新途径, 实现养殖鱼类优良种质的自由设计与高效精准定制。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Robles V, Riesco M F, Psenicka M, *et al.* Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: biotechnological applications[J]. *Aquaculture*, 2017, 472: 4-20.
- [2] Xu L, Zhao M L, Ryu J H, *et al.* Reproductive sterility in aquaculture: A review of induction methods and an emerging approach with application to Pacific Northwest finfish species[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2023, 15(1): 220-241.
- [3] Braat A K, Zandbergen T, Van De Water S, *et al.* Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of *vasa* RNA[J]. *Developmental Dynamics*, 1999, 216(2): 153-167.
- [4] Marlow F. Primordial germ cell specification and migration[J]. *F1000Research*, 2015, 4: 1462.
- [5] Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells[J]. *Development*, 1997, 124(16): 3157-3165.
- [6] Raz E. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4(9): 690-700.
- [7] Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, *et al.* The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2000, 42(4): 317-326.
- [8] Cao M X, Yang Y H, Xu H Y, *et al.* Germ cell specific expression of *Vasa* in rare minnow, *Gobiocypris rarus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2012, 162(3): 163-170.
- [9] Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga H, *et al.* Cloning

- and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2000, 55(4): 364-371.
- [10] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Mechanisms of Development*, 2000, 99(1-2): 139-142.
- [11] Su B F, Peatman E, Shang M, *et al.* Expression and knockdown of primordial germ cell genes, *vasa*, *nanos* and *dead end* in common carp (*Cyprinus carpio*) embryos for transgenic sterilization and reduced sexual maturity[J]. *Aquaculture*, 2014, 420-421 Suppl 1: S72-S84.
- [12] Fujimoto T, Nishimura T, Goto-Kazeto R, *et al.* Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(40): 17211-17216.
- [13] Draper B W, Mccallum C M, Moens C B. *nanos1* is required to maintain oocyte production in adult zebrafish[J]. *Developmental Biology*, 2007, 305(2): 589-598.
- [14] Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, *et al.* *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival[J]. *Current Biology*, 2003, 13(16): 1429-1434.
- [15] Li M Y, Zhu F, Li Z D, *et al.* *Dazl* is a critical player for primordial germ cell formation in medaka[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28317.
- [16] Strasser M J, Mackenzie N C, Dumstrei K, *et al.* Control over the morphology and segregation of Zebrafish germ cell granules during embryonic development[J]. *BMC Developmental Biology*, 2008, 8: 58.
- [17] D'Orazio F M, Balwierz P J, González A J, *et al.* Germ cell differentiation requires Tdrd7-dependent chromatin and transcriptome reprogramming marked by germ plasm relocalization[J]. *Developmental Cell*, 2021, 56(5): 641-656.e5.
- [18] Bontems F, Stein A, Marlow F, *et al.* Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish[J]. *Current Biology*, 2009, 19(5): 414-422.
- [19] Eno C, Hansen C L, Pelegri F. Aggregation, segregation, and dispersal of homotypic germ plasm RNPs in the early zebrafish embryo[J]. *Developmental Dynamics*, 2019, 248(4): 306-318.
- [20] Hashimoto Y, Maegawa S, Nagai T, *et al.* Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation[J]. *Developmental Biology*, 2004, 268(1): 152-161.
- [21] Hong N, Li M Y, Yuan Y M, *et al.* *Dnd* is a critical specifier of primordial germ cells in the medaka fish[J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(3): 411-421.
- [22] Krishnakumar P, Riemer S, Perera R, *et al.* Functional equivalence of germ plasm organizers[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(11): e1007696.
- [23] Riemer S, Bontems F, Krishnakumar P, *et al.* A functional Bucky ball-GFP transgene visualizes germ plasm in living zebrafish[J]. *Gene Expression Patterns*, 2015, 18(1-2): 44-52.
- [24] Song P, Sun B Y, Zhu Y F, *et al.* *Bucky ball* induces primordial germ cell increase in medaka[J]. *Gene*, 2021, 768: 145317.
- [25] Roovers E F, Kaaij L J T, Redl S, *et al.* Tdrd6a regulates the aggregation of Buc into functional subcellular compartments that drive germ cell specification[J]. *Developmental Cell*, 2018, 46(3): 285-301.e9.
- [26] Ren F, Miao R, Xiao R, *et al.* m⁶A reader Igf2bp3 enables germ plasm assembly by m⁶A-dependent regulation of gene expression in zebrafish[J]. *Science Bulletin*, 2021, 66(11): 1119-1128.
- [27] Kloc M, Etkin L D. RNA localization mechanisms in oocytes[J]. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(2): 269-282.
- [28] Theusch E V, Brown K J, Pelegri F. Separate pathways of RNA recruitment lead to the compartmentalization of the zebrafish germ plasm[J]. *Developmental Biology*, 2006, 292(1): 129-141.
- [29] Sinsimer K S, Lee J J, Thiberge S Y, *et al.* Germ plasm anchoring is a dynamic state that requires persistent trafficking[J]. *Cell Reports*, 2013, 5(5): 1169-1177.
- [30] Pelegri F, Knaut H, Maischein H M, *et al.* A mutation in the zebrafish maternal-effect gene *nebel* affects furrow formation and *vasa* RNA localization[J]. *Current Biology*, 1999, 9(24): 1431-1440.
- [31] Nair S, Marlow F, Abrams E, *et al.* The chromosomal passenger protein Birc5b organizes microfilaments and

- germ plasm in the zebrafish embryo[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(4): e1003448.
- [32] Campbell P D, Heim A E, Smith M Z, *et al.* Kinesin-1 interacts with Bucky ball to form germ cells and is required to pattern the zebrafish body axis[J]. *Development*, 2015, 142(17): 2996-3008.
- [33] Tao B B, Hu H L, Chen J, *et al.* Sin3-dependent histone deacetylation is essential for primordial germ cell specification[J]. *Embo Reports*, 2022, 23(6): e54387.
- [34] Paksa A, Raz E. Zebrafish germ cells: motility and guided migration[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 36: 80-85.
- [35] Weidinger G, Wolke U, Kopranner M, *et al.* Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells[J]. *Development*, 1999, 126(23): 5295-5307.
- [36] Aalto A, Olguin-Olguin A, Raz E. Zebrafish primordial germ cell migration[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 684460.
- [37] Hartwig J, Tarbashevich K, Seggewiß J, *et al.* Temporal control over the initiation of cell motility by a regulator of G-protein signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(31): 11389-11394.
- [38] Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, *et al.* Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1[J]. *Cell*, 2002, 111(5): 647-659.
- [39] Knaut H, Werz C, Geisler R, *et al.* A zebrafish homologue of the chemokine receptor *Cxcr4* is a germ-cell guidance receptor[J]. *Nature*, 2003, 421(6920): 279-282.
- [40] Richardson B E, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: Strategies from different organisms[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(1): 37-49.
- [41] Goudarzi M, Tarbashevich K, Mildner K, *et al.* Bleb expansion in migrating cells depends on supply of membrane from cell surface invaginations[J]. *Developmental Cell*, 2017, 43(5): 577-587.e5.
- [42] Jin Y L, Liu W, Xiang Y X, *et al.* Maternal miR-202-5p is required for zebrafish primordial germ cell migration by protecting small GTPase *Cdc42*[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2020, 12(7): 530-542.
- [43] Staton A A, Knaut H, Giraldez A J. miRNA regulation of *Sdf1* chemokine signaling provides genetic robustness to germ cell migration[J]. *Nature Genetics*, 2011, 43(3): 204-211.
- [44] Paksa A, Bandemer J, Hoeckendorf B, *et al.* Repulsive cues combined with physical barriers and cell-cell adhesion determine progenitor cell positioning during organogenesis[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11288.
- [45] Li M Y, Hong N, Xu H Y, *et al.* Medaka *vasa* is required for migration but not survival of primordial germ cells[J]. *Mechanisms of Development*, 2009, 126(5-6): 366-381.
- [46] Köprunner M, Thisse C, Thisse B, *et al.* A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells[J]. *Genes & Development*, 2001, 15(21): 2877-2885.
- [47] Thorpe J L, Doitsidou M, Ho S Y, *et al.* Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGCoA reductase activity and prenylation[J]. *Developmental Cell*, 2004, 6(2): 295-302.
- [48] Ramasamy S, Wang H, Quach H N B, *et al.* Zebrafish *Staufen1* and *Staufen2* are required for the survival and migration of primordial germ cells[J]. *Developmental Biology*, 2006, 292(2): 393-406.
- [49] Schlueter P J, Sang X P, Duan C M, *et al.* Insulin-like growth factor receptor 1b is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival[J]. *Developmental Biology*, 2007, 305(1): 377-387.
- [50] Kuo M W, Wang S H, Chang J C, *et al.* A novel *puf-A* gene predicted from evolutionary analysis is involved in the development of eyes and primordial germ-cells[J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4980.
- [51] Carver J J, He Y F, Zhu Y. Delay in primordial germ cell migration in *adamts9* knockout zebrafish[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 8545.
- [52] Seydoux G, Braun R E. Pathway to totipotency: lessons from germ cells[J]. *Cell*, 2006, 127(5): 891-904.
- [53] Gross-Thebing T, Yigit S, Pfeiffer J, *et al.* The vertebrate protein dead end maintains primordial germ cell fate by inhibiting somatic differentiation[J]. *Developmental Cell*, 2017, 43(6): 704-715.e5.
- [54] Mochizuki K, Hayashi Y, Sekinaka T, *et al.* Repression of somatic genes by selective recruitment of HDAC3 by BLIMP1 is essential for mouse primordial germ cell migration

- germ cell fate determination[J]. *Cell Reports*, 2018, 24(10): 2682-2693.e6.
- [55] Ortega-Recalde O, Day R C, Gemmell N J, *et al.* Zebrafish preserve global germline DNA methylation while sex-linked rDNA is amplified and demethylated during feminisation[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3053.
- [56] Skvortsova K, Tarbashevich K, Stehling M, *et al.* Retention of paternal DNA methylome in the developing zebrafish germline[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3054.
- [57] Kobayashi S, Yamada M, Asaoka M, *et al.* Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*[J]. *Nature*, 1996, 380(6576): 708-711.
- [58] Wong T T, Zohar Y. Production of reproductively sterile fish by a non-transgenic gene silencing technology[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15822.
- [59] Yamaji M, Jishage M, Meyer C, *et al.* DND1 maintains germline stem cells via recruitment of the CCR4-NOT complex to target mRNAs[J]. *Nature*, 2017, 543(7646): 568-572.
- [60] Wargelius A, Leininger S, Skaftnesmo K O, *et al.* Dnd knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21284.
- [61] Hou M X, Feng K, Luo H R, *et al.* Complete depletion of primordial germ cells results in masculinization of *Monopterus albus*, a protogynous hermaphroditic fish[J]. *Marine Biotechnology*, 2022, 24(2): 320-334.
- [62] Tao B B, Liao X Y, Chen L, *et al.* Germ cells are not essential for sexual dimorphism of gonads in common carp, *C. carpio L.*[J]. *Aquaculture*, 2022, 547: 737501.
- [63] Krøvel A V, Olsen L C. Expression of a *vas*: : EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish[J]. *Mechanisms of Development*, 2002, 116(1-2): 141-150.
- [64] Ye D, Zhu L, Zhang Q F, *et al.* Abundance of early embryonic primordial germ cells promotes zebrafish female differentiation as revealed by lifetime labeling of germline[J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(2): 217-228.
- [65] Tanaka M, Kinoshita M, Kobayashi D, *et al.* Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein fluorescence exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in a live vertebrate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(5): 2544-2549.
- [66] Yoshizaki G, Takeuchi Y, Sakatani S, *et al.* Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout *vasa*-like gene promoter[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2000, 44(3): 323-326.
- [67] Saito T, Fujimoto T, Maegawa S, *et al.* Visualization of primordial germ cells *in vivo* using GFP-*nos1* 3'UTR mRNA[J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2006, 50(8): 691-700.
- [68] Nagasawa K, Fernandes J M O, Yoshizaki G, *et al.* Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *Salmo salar*: characterization of *Vasa*, *dead end*, and *Lymphocyte antigen 75* genes[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2013, 80(2): 118-131.
- [69] Kurokawa H, Aoki Y, Nakamura S, *et al.* Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2006, 48(3): 209-221.
- [70] Li M H, Yang H H, Zhao J E, *et al.* Efficient and heritable gene targeting in tilapia by CRISPR/Cas9[J]. *Genetics*, 2014, 197(2): 591-599.
- [71] Lin F, Liu Q H, Li M Y, *et al.* Transient and stable GFP expression in germ cells by the *vasa* regulatory sequences from the red seabream (*Pagrus major*)[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2012, 8(6): 882-890.
- [72] Hu W, Wang Y P, Zhu Z Y. Progress in the evaluation of transgenic fish for possible ecological risk and its containment strategies[J]. *Science in China Series C:Life Sciences*, 2007, 50(5): 573-579.
- [73] Chen J, Hu W, Zhu Z Y. Progress in studies of fish reproductive development regulation[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(1): 7-16.
- [74] Goto R, Saito T, Takeda T, *et al.* Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish[J]. *Developmental Biology*, 2012, 370(1): 98-109.
- [75] Fujihara R, Katayama N, Sadaie S, *et al.* Production of germ cell-less rainbow trout by *dead end* gene knock-

- out and their use as recipients for germ cell transplantation[J]. *Marine Biotechnology*, 2022, 24(2): 417-429.
- [76] Feng K, Cui X F, Song Y L, *et al.* Gnrh3 regulates PGC proliferation and sex differentiation in developing zebrafish[J]. *Endocrinology*, 2020, 161(1): bqz024.
- [77] Wong T T, Collodi P. Inducible sterilization of zebrafish by disruption of primordial germ cell migration[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e68455.
- [78] Hu S Y, Lin P Y, Liao C H, *et al.* Nitroreductase-mediated gonadal dysgenesis for infertility control of genetically modified zebrafish[J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 12(5): 569-578.
- [79] Zhang Y S, Chen J, Cui X J, *et al.* A controllable on-off strategy for the reproductive containment of fish[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 7614.
- [80] Gui J F, Zhou L, Li X Y. Rethinking fish biology and biotechnologies in the challenge era for burgeoning genome resources and strengthening food security[J]. *Water Biology and Security*, 2022, 1(1): 100002.
- [81] Jin Y N, Schlueter P J, Jurisch-Yaksi N, *et al.* Noncanonical translation via deadenylated 3'UTRs maintains primordial germ cells[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(9): 844-852.
- [82] Lin S, Long W, Chen J, *et al.* Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(10): 4519-4523.
- [83] Yamaha E, Kazama-Wakabayashi M, Otani S, *et al.* Germ-line chimera by lower-part blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp[J]. *Genetica*, 2001, 111(1-3): 227-236.
- [84] 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.
- [85] Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Surrogate broodstock produces salmonids[J]. *Nature*, 2004, 430(7000): 629-630.
- [86] 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.
- [87] 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.
- [88] 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.
- [89] 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 of the United States of America*, 2006, 103(8): 2725-2729.
- [90] Okutsu T, Shikina S, Kanno M, *et al.* Production of trout offspring from triploid salmon parents[J]. *Science*, 2007, 317(5844): 1517-1517.
- [91] Franěk R, Kašpar V, Shah M A, *et al.* Production of common carp donor-derived offspring from goldfish surrogate broodstock[J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736252.
- [92] Zhang F H, Hao Y K, Li X M, *et al.* Surrogate production of genome-edited sperm from a different subfamily by spermatogonial stem cell transplantation[J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(5): 969-987.
- [93] Zhou L, Wang X Y, Liu Q H, *et al.* Successful spermatogonial stem cells transplantation within pleuronectiformes: first breakthrough at inter-family level in marine fish[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(15): 4426-4441.
- [94] Ichida K, Matsushita Y, Amano Y, *et al.* Visualization and tracking of live type a spermatogonia using a fluorescence-conjugated antibody in *Salmo* species[J]. *Aquaculture*, 2021, 533: 736096.
- [95] Hong Y H, Liu T M, Zhao H B, *et al.* Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(21): 8011-8016.
- [96] Li Z D, Li M Y, Hong N, *et al.* Formation and cultivation of medaka primordial germ cells[J]. *Cell and Tissue Research*, 2014, 357(1): 71-81.
- [97] Li M Y, Hong N, Xu H Y, *et al.* Germline replacement by blastula cell transplantation in the fish medaka[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29658.
- [98] Zhang H, Zhang W W, Mo C Y, *et al.* Production of functional sperm from *in vitro*-cultured premeiotic sperm

- matogonia in a marine fish[J]. *Zoological Research*, 2022, 43(4): 537-551.
- [99] Chen X, Kan Y T, Zhong Y, *et al.* Generation of a normal long-term-cultured chinese hook snout carp spermatogonial stem cell line capable of sperm production in vitro[J]. *Biology*, 2022, 11(7): 1069.
- [100] Sun X Y, Tao B B, Wang Y X, *et al.* Isolation and characterization of germline stem cells in protogynous hermaphroditic *Monopterus albus*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(11): 5861.

Research progress on primordial germ cell development and reproductive manipulation techniques of fish

TAO Binbin^{1,2}, HU Wei^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Hubei Hongshan Laboratory, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. Innovative Academy of Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Primordial germ cells (PGCs) are the earliest germline stem cells established during embryonic development. The survival of species is dependent upon PGCs in sexually reproducing organisms. The specification of fish PGCs follows the pattern of “preformation” mode. In this mode, PGCs are specified by inheritance of maternal cytoplasm (germ plasm) during early embryogenesis. Specialized PGCs need to maintain their cell fates and migrate over long distances to reach the gonadal primordium. The biological processes of fish PGC specification, migration and fate maintenance are regulated by a variety of genes and signaling pathways. The study of fish PGC development is helpful for understanding the molecular mechanism of vertebrate cell specification, migration, and fate maintenance, and it is also important for developing new reproductive containment and germline stem cell transplantation techniques in farmed fish. Here, we review the research progress in fish PGC development and reproductive manipulation techniques, and look into respect of their future development, hoping to provide theoretical and technical supports for the development of new techniques applicable to creating new germplasm of important farmed fish.

Key words: fish; primordial germ cell; germ plasm; reproductive containment; germ stem cell transplantation

Corresponding author: HU Wei. E-mail: huwei@ihb.ac.cn

Funding projects: National Key R&D Program of China (2018YFD0901200); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-46); National Natural Science Foundation of China (31721005)