

孙雨晴,陈琦,郑欣宜,等. 杂交三倍体泥鳅性腺发育观察及其基因表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 82-88.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.02.011

杂交三倍体泥鳅性腺发育观察及其基因表达分析

孙雨晴¹, 陈琦¹, 郑欣宜¹, 徐其征¹, 庄子昕¹, 王伟¹, 曹小娟², 周贺¹

1. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023;

2. 华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室/

农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室/池塘健康养殖湖北省工程实验室, 武汉 430070

摘要 以杂交三倍体泥鳅($4n♀ \times 2n♂$)为研究对象, 对其早期性腺分化的组织学进行观察, 并采用荧光定量PCR(qRT-PCR)技术, 对杂交三倍体泥鳅早期不同发育时期(孵化后4、14、21、23、50、60和65 d)和不同组织(性腺、肝脏、肌肉、肠、鳃、鳍、皮肤和脑)中性腺发育相关基因(*hormad1*、*dmrt1-a*)的表达量进行定量检测。研究结果发现: 在早期不同发育时期, *hormad1*和*dmrt1-a*基因均为在4日龄中表达量最高, 14日龄次之, 在50日龄中表达量最低。在不同组织中, *hormad1*基因在雌鱼的鳍中表达量最高, 肝脏中表达量最低; 在雄鱼的性腺中表达量最高, 肝脏中表达量最低。*dmrt1-a*基因在雌雄鱼的性腺中表达量最高, 脑中表达量最低。杂交三倍体泥鳅早期性腺的分化和发生与二倍体泥鳅无差别, 可观察到原始生殖细胞、原始生殖细胞的迁移和原始性腺的生成及性腺的分化等过程。研究结果表明, *hormad1*、*dmrt1-a*这2个基因与杂交三倍体泥鳅早期性腺发育密切相关。

关键词 泥鳅; 杂交三倍体; *hormad1*; *dmrt1-a*; 性腺发育; 基因表达; qRT-PCR

中图分类号 Q 959.46⁺8

文献标识码 A

文章编号 1000-2421(2020)02-0082-07

在影响鱼类的性别决定、分化以及育性的各个因素中, 那些与鱼类性腺发育相关的基因则发挥着重要的作用。随着现代分子生物技术的迅猛发展, 关于性腺发育基因的研究目前已有许多^[1-2]。*hormad1*基因是*hormad* domain(Hop1p, Rev7p和MAD2)家族成员之一^[3], 它的表达与生殖细胞的减数分裂过程中的染色体轴形成有关, 在哺乳动物的配子形成过程中起重要作用^[4]。*dmrt1*是从低等无脊椎动物到高等脊椎动物中第1个被发现的参与性别决定及分化最为保守的基因, 在雄性性腺的分化和形成中起着重要作用, 并在性别分化期的雄性性腺及雄性成体的性腺中表达。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)是亚洲特有的鳅科鱼类之一, 体型虽小, 但肉质好, 味美价高, 是我国重要的水产养殖种类之一。泥鳅具有多倍化现象, 中国除二倍体外还存在天然三倍体、四倍体和六倍体^[5-7]。三倍体鱼类的生长速度快且育性相对较差, 在鱼类遗传育种研究中占有绝对优势。由于人工诱导四倍体相对较难, 四倍体和二倍体杂交又

能形成三倍体, 因此, 用天然四倍体与二倍体杂交得到三倍体, 是解决某些鱼类三倍体产业化的一个重要突破口。近10年来笔者所在课题组对长江流域特有的天然四倍体泥鳅进行了研究, 发现天然四倍体泥鳅是遗传四倍体($4n=100$)、雌雄均能产生正常的 $2n$ 配子^[8-9]; 并利用天然四倍体泥鳅和二倍体泥鳅杂交得到大量三倍体泥鳅, 同时对其子代染色体组稳定性及育性的分子机制进行了系统研究^[10-13], 但关于杂交三倍体泥鳅性腺发育相关基因的表达及早期性腺组织学观察尚未见报道。因此, 本研究以杂交三倍体泥鳅为研究对象, 采用RT-PCR技术对杂交三倍体泥鳅不同发育时期(孵化后4、14、21、23、50、60、65 d)和不同组织中*hormad1*和*dmrt1-a*基因的表达量进行检测, 并对子代早期性腺发育的不同时期特征进行比较系统地观察, 旨在为进一步探讨杂交三倍体泥鳅性腺发育的分子机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

自然四倍体泥鳅($4n=100$)(♀)、二倍体泥鳅

收稿日期: 2019-05-22

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900200); 国家自然科学基金项目(31272650)

孙雨晴, 硕士研究生, 研究方向: 水产养殖. E-mail: 17866543360@163.com

通信作者: 周贺, 博士, 副教授, 研究方向: 遗传育种. E-mail: zhouhe@dlou.edu.cn

($2n = 50$)(♂),分别取自湖北省赤壁市及辽宁省大连市农贸市场。将亲本进行人工催产及杂交,取孵化后4、14、21、23、50、60、和65 d的子代样品,每个时期3个平行;选取1龄雌雄鱼各3尾,取性腺、肝脏、肌肉、肠、鳃、鳍、皮肤和脑7种组织。其中早期不同发育时期样品的一部分迅速置于液氮中,之后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,用于提取RNA,另一部分则先用Bouin's固定液固定,于24 h后换80%乙醇以便长期保存,用于制备石蜡切片。

1.2 试验方法

1)杂交三倍体泥鳅性腺组织学观察。将已固定的样本用乙醇脱水,石蜡包埋,LEICA-RM 2016切片机连续切片,设置厚度为 $5\text{ }\mu\text{m}$,苏木精-曙红(H.E)染色,中性树胶封片,用Leica DM 2000荧光显微镜观察,Leica DF 450C CCD装置捕获图像,利用Leica和Photoshop软件进行图像处理。

2)总RNA的提取及cDNA的合成。选取之前

保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中的样品,用TianGen公司的RNAprep Pure Micro Kit提取试剂盒,按试剂盒说明书进行总RNA的提取。检测质量合格后,放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。cDNA的合成采用第一链cDNA合成试剂盒RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Thermo Scientific™ EP0733)进行,合成后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中保存。

3)内参基因和目的基因引物设计。在NCBI数据库中查出目的基因序列并从中筛选出与鱼类相关的序列,在其DM结构域上利用软件(Primer Premier 5.0)设计引物,然后进行PCR扩增,得到中间序列;在此基础上设计5'端和3'端引物得到全长,设计荧光定量PCR引物。引物交由上海生工基因科技服务有限公司合成,具体见表1。

4)Real Time PCR反应。以 $\beta\text{-actin}$ 作为内参,每个样本3个平行。在ABI Stepone plus型荧光定量PCR仪中进行反应。反应体系如下: $2\times\text{SybrGreen}$

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 5'-3' Primer sequence
管家基因 House-keeping genes	$\beta\text{-actin}$ -F	5'-CTCAATCCCAAAGCCAACAG-3'
	$\beta\text{-actin}$ -R	5'-GGAAGAGCATAACCCCTCGTAGA-3'
	$hormad1$ -F	5'-GGTGGATGATGATGTGGAAGTC-3'
	$hormad1$ -R	5'-GCCTGTTGTGAGCTTTCTGAA-3'
目的基因 Target gene	$dmrt1\text{-}\alpha$ -F	5'-CGAGGTGAACGATGAGGAGA-3'
	$dmrt1\text{-}\alpha$ -R	5'-TCCAGTCGGTGCCCTTTAGTT-3'

qPCR Master Mix $10\text{ }\mu\text{L}$,浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 $0.4\text{ }\mu\text{L}$, ddH_2O $7.2\text{ }\mu\text{L}$,cDNA模板 $2\text{ }\mu\text{L}$,反应条件如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 s , $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s ,45个循环。

5)数据处理。通过内参基因及目的基因的扩增曲线和熔解曲线得出目的基因的CT值,把所获得的CT值采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 的方法分析各个基因在不同组织中的表达水平。利用SPSS软件分析实验数据,荧光定量PCR条形图利用Origin 7.5软件绘制。

2 结果与分析

2.1 杂交三倍体泥鳅早期性腺组织学观察

1)原始生殖细胞的观察。4日龄的泥鳅未开口摄食,卵黄囊不完全吸收。组织学观察发现,体细胞旁存在较大的椭圆形细胞,位于肾管腹膜上皮,此时原始生殖细胞已从中胚层发生迁移。箭头所示即为

原始生殖细胞(图1A)。

2)原始生殖细胞的迁移。14日龄的泥鳅开口摄食。组织学观察发现腹膜上皮向体腔内褶皱突出形成一对生殖脊,原始生殖细胞迁入其中,可清晰看到生殖脊中包裹的原始生殖细胞(图1B)。

3)原始性腺的形成。21日龄和23日龄的泥鳅组织切片中,观察到随着原始生殖性腺的生长,原始性腺开始慢慢脱离腹腔上皮,仅依靠组织系膜连接于腹膜上皮,以此标志着原始性腺的形成(图1C、D)。

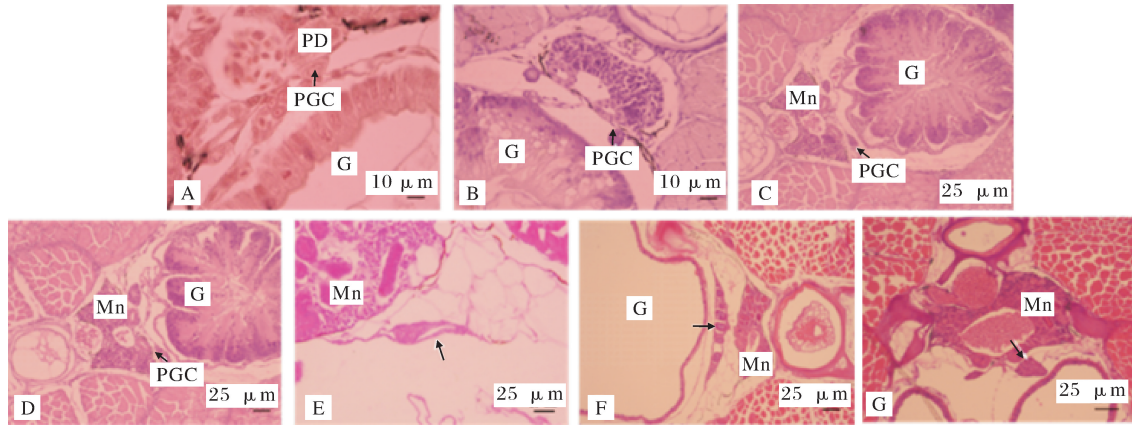
4)卵巢的形成。50日龄的泥鳅性腺横切面为扁状,两侧的性腺向中间靠拢,且产生一条较大的裂隙(图1E),此裂隙即为卵巢腔的雏形,因此判断此性腺有向卵巢分化的趋势。

60日龄的泥鳅性腺横切面为扁状,两侧卵巢融合在一起,卵巢腔明显变大,其中散布着处在第一时

相的卵母细胞(图 1F)。

5) 精巢的形成。组织学观察发现,65 日龄的泥鳅两侧性腺位于体腔两侧,未向中间靠拢,性腺膨

大且横切面成梨形,在性腺柄部出现了较小的裂隙,并非向卵巢腔分化的较大的裂隙,此为输精管的雏形,因此判断此性腺有向精巢分化的趋势(图 1G)。



A:4 日龄; B:14 日龄; C:21 日龄; D:23 日龄; E:50 日龄; F:60 日龄; G:65 日龄; PGC:原始生殖细胞; PD:前肾管; G:消化道; Mn:中肾; A:4 days; B:14 days; C:21 days; D:23 days; E:50 days; F:60 days; G:65 days; PGC:Primordial germ cells; PD:Pronephric duct; G:Gut; Mn:Mesonephr.

图 1 杂交三倍体泥鳅早期性腺分化过程

Fig.1 The early gonad differentiation of hybrid triploid loach

2.2 *hormad1* 和 *dmrt1-a* 基因在杂交三倍体泥鳅不同发育时期的表达情况

1) *hormad1* 基因在杂交三倍体泥鳅不同发育时期的表达量变化。结果如图 2 所示, *hormad1* 基因在杂交三倍体泥鳅的各个不同时期中都有表达, 表达量高低顺序为:4 d>14 d>65 d>23 d>21 d>60 d>50 d。其中 *hormad1* 基因在 4 日龄表达量最高, 50 日龄表达量最低。在 21 日至 60 日龄的表达量水平则明显低于其他 3 个时期 ($P<0.05$)。

2) *dmrt1-a* 基因在杂交三倍体泥鳅不同发育

时期的表达量变化。结果如图 3 所示, *dmrt1-a* 基因在杂交三倍体泥鳅的各个不同时期中都有表达, 表达量高低顺序为:4 d>14 d>65 d>23 d>21 d>60 d>50 d。 *dmrt1-a* 基因在 4 日龄中表达量最高, 50 日龄表达量最低。在 21 日至 60 日龄的表达量水平则明显低于其他 3 个时期 ($P<0.05$)。

2.3 *hormad1* 和 *dmrt1-a* 基因在杂交三倍体泥鳅不同组织的表达情况

1) 杂交三倍体泥鳅不同组织中 *hormad1* 基因

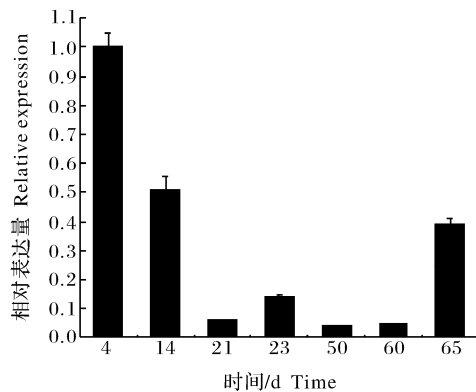


图 2 *hormad1* 基因在杂交三倍体泥鳅不同发育时期的表达量变化

Fig.2 Expression of *hormad1* gene in triploid loach at different developmental stages

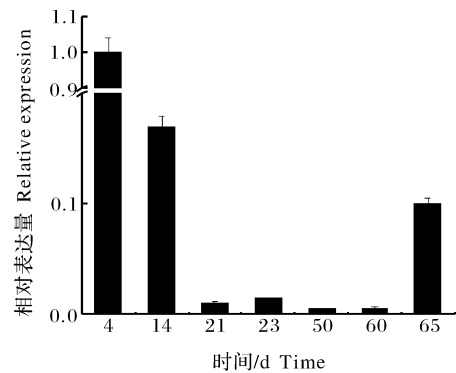


图 3 *dmrt1-a* 基因在杂交三倍体泥鳅不同发育时期的表达量变化

Fig.3 Expression of *dmrt1-a* gene in triploid loach at different developmental stages

的表达水平。结果如图4所示, *hormad1* 基因在杂交三倍体雌性泥鳅不同组织的表达量由高到低依次为: 鳍>鳃>性腺>肌肉>肠>皮肤>脑>肝脏;而在雄性泥鳅中则为: 性腺>肌肉>鳃>鳍>皮肤>脑>肠>肝脏。 *hormad1* 基因在雌鱼的鳍中表达量最高, 肝脏中表达量最低; 在雄鱼的性腺中表达量最高, 肝脏中表达量最低。

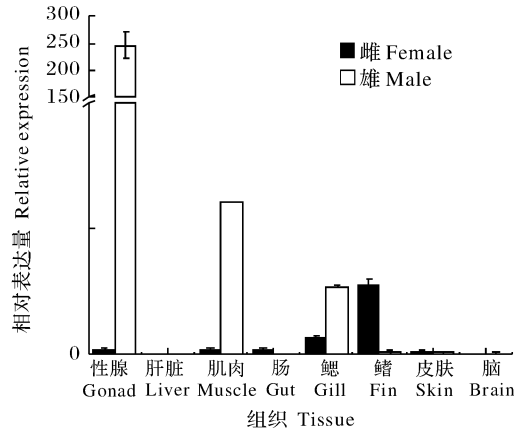


图4 杂交三倍体泥鳅不同组织中 *hormad1* 基因的相对表达量

Fig.4 Relative expression of *hormad1* gene in different tissues of triploid loach

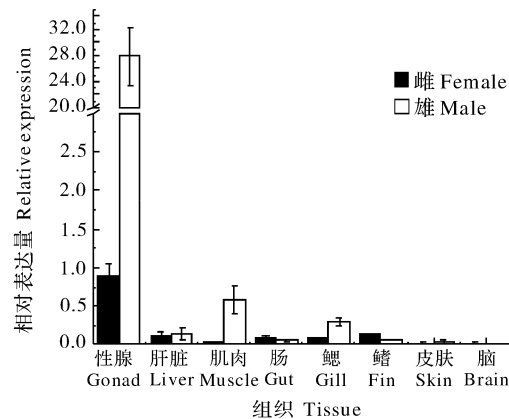


图5 杂交三倍体泥鳅不同组织中 *dmrt1-a* 基因的相对表达量

Fig.5 Relative expression of *dmrt1-a* gene in different tissues of triploid loach

2) 杂交三倍体泥鳅不同组织中 *dmrt1-a* 基因的表达水平。结果如图5所示: *dmrt1-a* 基因在杂交三倍体雌性泥鳅不同组织的表达量由高到低依次为: 性腺>鳍>肝脏>肠>鳃>肌肉>皮肤>脑;而在雄性泥鳅中则为: 性腺>肌肉>鳃>肝脏>

鳍>肠>皮肤>脑。 *dmrt1-a* 基因在雌雄鱼的性腺中表达量均为最高, 脑中的表达量均为最低。

3 讨论

3.1 三倍体鱼类的育性

关于三倍体鱼类的育性一直都是水产界关注的热点。三倍体鱼类不育的主要原因是因为染色体组数目为奇数, 这导致了减数分裂无法正常进行, 或是产生非整倍体配子, 也可能使性腺发育衰退。关于鱼类三倍体育性方面, Ueno^[14]报道了人工诱导三倍体尼罗罗非鱼, 其雌雄均不可育。尹洪滨等^[15]研究结果显示, 三倍体雌性鲶鱼的卵巢不进行分化。Wolters等^[16]通过组织学研究证明8月龄的三倍体斑点叉尾鲴具有精巢, 但是与正常二倍体相比其内并未发现有精子产生。Lincoln^[17]证实了三倍体蝶雄鱼具有组织学上发育正常的精巢, 其精子也能与正常的卵子受精, 但是所形成的受精卵在胚胎发育早期即全部死亡。关于泥鳅三倍体的育性因形成途径不同而不同, 通过抑制第二极体释放形成的三倍体泥鳅雌的不育、雄的可产生少量精子^[18]。四倍体与二倍体杂交产生的三倍体是雄的不育、雌的能产生单倍体和三倍体卵^[19-23]。最近 Li等^[24]报道了用四倍体与二倍体杂交获得的三倍体泥鳅雌、雄少数个体能产生卵和精子, 并有受精能力, 但没有产生存活的后代。黄松钱等^[25]报道了冷休克处理通过抑制受精卵第二极体的释放获得泥鳅三倍体后代。但关于杂交三倍体泥鳅的早期性腺发育尚不明确, 因此, 本研究对杂交三倍体泥鳅子代早期性腺发育的不同时期特征进行比较系统的观察。结果表明, 从4日龄开始到65日龄可观察到原始生殖细胞形成、迁移和原始性腺的生成及性腺的分化等过程, 表明杂交三倍体泥鳅早期性腺发育正常。

3.2 杂交三倍体泥鳅 *hormad1* 和 *dmrt1-a* 基因时空表达的差异性分析

hormad1 基因及其家族成员在动物的睾丸里表达量较高, 而在其他组织中表达量很低^[26]。 *hormad1* 基因在鱼类中的研究相对较少, Small等^[27]在研究斑马鱼 (*Danio rerio*) 的性腺以及性别相关基因时克隆到了该基因。本研究中杂交三倍体泥鳅早期性腺发育不同时期 *hormad1* 基因在4日龄和14日龄中高表达, 而在50日龄中表达量最低。结合同步性腺组织学观察结果来看, 4日龄可观察到原始生殖细胞, 14日龄可观察到原始生殖细胞从中

胚层转移到肾管下方的腹膜上皮,充分说明 *hormad1* 基因与原始生殖细胞的形成及迁移有密切关系。在不同组织中,*hormad1* 基因在雌鱼的鳍中表达量最高,肝脏中表达量最低;在雄鱼的性腺中表达量最高,肝脏中表达量最低,说明 *hormad1* 在鱼类精巢发育中也起到重要的作用。该结果与前人研究结果相一致^[28]。

dmrt1-a 基因在性别分化期的雄性性腺及雄性成体的性腺中表达,对雄性性腺的分化和形成有重要影响。与雄性性腺的形成和功能的维持有关,是低等无脊椎动物到高等脊椎动物中最早发现的参与性别决定分化的最保守的基因。*dmrt1* 基因在西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*)^[29]、乌鳢(*Ophiocephalus argus Cantor*)^[30]、奥里亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)^[31]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[32]、石斑鱼(*Epinephelus*)^[33]、河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)等鱼类中曾有过很多报道^[34]。但 *dmrt1-a* 基因在杂交三倍体泥鳅早期性腺发育不同时期及不同组织的表达尚未见报道。因此,为探讨杂交三倍体泥鳅育性的分子机制,本研究采用 RT-PCR 技术对杂交三倍体泥鳅早期性腺发育不同时期和不同组织中 *dmrt1-a* 基因的表达量进行检测,结果显示, *dmrt1-a* 基因与 *hormad1* 基因表达趋势相同,在 4 日龄和 14 日龄中高表达,而在 50 日龄中表达量最低。也表明 *dmrt1-a* 基因与杂交三倍体泥鳅原始生殖细胞的形成及迁移有密切关系。*dmrt1-a* 基因在杂交三倍体雌性泥鳅不同组织的表达量由高到低依次为:性腺>鳍>肝脏>肠>鳃>肌肉>皮肤>脑;而在雄性泥鳅中则为:性腺>肌肉>鳃>肝脏>鳍>肠>皮肤>脑。研究发现,*dmrt1-a* 基因在杂交三倍体雌雄泥鳅的性腺中均有高表达,但在雄鱼性腺中的表达量明显高于雌鱼性腺。*dmrt1-a* 基因在雄性性腺中的高表达说明 *dmrt1-a* 基因对雄性性腺发育有重要影响,该结果与前人研究结果一致^[29-36]。

综上所述,杂交三倍体泥鳅早期性腺发育正常。*hormad1* 和 *dmrt1-a* 基因在杂交三倍体泥鳅早期性腺发育及雄鱼性腺成熟过程中具有一定作用。该结果可为进一步探讨杂交三倍体泥鳅育性分子机制提供依据。

参考文献 References

[1] ROGRIGUEZ-MARI A, YAN Y L, BREMILLER R A, et al.

Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development[J]. *Gene Expr Patterns*, 2005, 5: 655-667.

[2] TAO M, LIU S J, LONG Y, et al. The cloning of *Dmrt1* cDNAs and a comparative study of its expression in different ploidy cyprinid fishes[J]. *Science in China series C: life sciences*, 2008, 51(1): 38-46.

[3] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic acids research*, 1997, 25(17): 3389-3402.

[4] PANGAS S A, YAN W, MATZUK M M, et al. Restricted germ cell expression of a gene encoding a novel mammalian HORMA domain-containing protein[J]. *Gene expression patterns*, 2004, 5(2): 257-263.

[5] 李雅娟, 印傑, 王嘉博, 等. 中国 29 的地点ドジョウにおける倍数体の分布に関する研究[J]. *日本水産学会誌*, 2008, 74(2): 177-182. LI Y J, YIN J, WANG J B, et al. A study on the distribution of polyploid loaches in China[J]. *Nippon suisan gakkai*, 2008, 74(2): 177-182 (in Japanese with English abstract).

[6] 周小云. 湖北省多倍体泥鳅分布格局及泥鳅育种基础研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009. ZHOU X Y. Biogeographic patterns of polyploid *Misgurnus anguillicaudatus* in Hubei Province and basic studies on its breeding[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009 (in Chinese with English abstract).

[7] 张曼曼, 冯兵, 罗双双, 等. 二倍体和四倍体泥鳅全基因组 DNA 甲基化的比较[J]. *华中农业大学学报*, 2018, 37(5): 95-103. ZHANG M M, FENG B, LUO S S, et al. Comparative studies on DNA methylation variation between diploid and tetraploid *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 37(5): 95-103 (in Chinese with English abstract).

[8] LI Y J, YU Z, ZHANG M Z, et al. The origin of natural tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from meiotic chromosome configurations [J]. *Genetica*, 2011, 139(6): 805-811.

[9] LI Y J, TIAN Y, ZHANG M Z, et al. Chromosome banding and FISH with rDNA probe in the diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Ichthyological research*, 2010, 57(4): 358-366.

[10] 周贺, 徐其征, 高养春, 等. 杂交三倍体泥鳅染色体 C 带及 rDNA 序列的 FISH 定位[J]. *水产学报*, 2018, 42(2): 178-185. ZHOU H, XU Q Z, GAO Y C, et al. Characterization of hybrid triploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) karyotype by C-banding and fluorescence *in situ* hybridization with rDNA [J]. *Journal of fisheries of China*, 2018, 42(2): 178-185 (in Chinese with English abstract).

[11] 高养春, 李雅娟, 姜志强, 等. 泥鳅杂交三倍体和二倍体胚胎发育的比较研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(2): 103-108.

- GAO Y C, LI Y J, JIANG Z Q, et al. Comparison of embryonic development between diploid and hybrid triploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(2): 103-108 (in Chinese with English abstract).
- [12] 李雅娟, 钱聪, 印杰, 等. 不同倍性泥鳅杂交后代染色体数目组成的研究[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(4): 326-332. LI Y J, QIAN C, YIN J, et al. The chromosome sets stability of hybrid progeny in different ploidy loach [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(4): 326-332 (in Chinese with English abstract).
- [13] 李雅娟, 庞义猛, 于卓, 等. 利用天然四倍体泥鳅生产全三倍体泥鳅的初步研究[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(11): 92-95. LI Y J, PANG Y M, YU Z, et al. Study on all-triploid production by crossing *Misgurnus anguillicaudatus* tetraploids and diploids [J]. Journal of northeast agricultural university, 2010, 41(11): 92-95 (in Chinese with English abstract).
- [14] UENO K. Induction of triploid carp and their haematological characteristics [J]. Japanese journal of genetics, 1984, 59(6): 585-591.
- [15] 尹洪滨, 潘伟志, 孙中武. 三倍体鲢鱼的形态学性状及生长[J]. 水产学杂志, 1996, 9(2): 23-26. YIN H B, PAN W Z, SUN Z W. Morphologic characters and growth of triploid catfish (*Parasilurus asotus* L.) [J]. Chinese journal of fisheries, 1996, 9(2): 23-26 (in Chinese with English abstract).
- [16] WOLTERS W R, LIBEY G S, CHRISMAN C L. Effect of triploidy on growth and gonad development of channel catfish [J]. 1982, 111: 102-105.
- [17] LINCOLN R F. Sexual maturation in triploid male plaice (*Pleuronectes platessa*) and plaice $\times$ flounder (*Platichthys flesus*) hybrids [J]. Journal of fish biology, 2006, 19: 415-426.
- [18] ZHANG Q, ARAI K. Aberrant meioses and viable aneuploid progeny of induced triploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) when crossed to natural tetraploids [J]. Aquaculture, 1999, 175: 63-76.
- [19] ARAI K, MUKAINO M. Clonal nature of gynogenetically induced progeny of triploid (*Diploid tetraploid*) loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces: Cobitidae) [J]. J Exp Zool, 1997, 278(6): 412-420.
- [20] ARAI K, MUKAINO M. Electrophoretic analysis of the diploid progenies from triploid diploid crosses in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Pisces: Cobitidae) [J]. J Exp Zool, 1998, 280(5): 368-374.
- [21] ZHANG Q, ARAI K, YAMASHITA M. Cytogenetic mechanisms for triploid and haploidgg formation in the triploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. J Exp Zool, 1998, 281(6): 608-619.
- [22] MOMOTANI S, MORISHIMA K, ZHANG Q, et al. Genetic analyses of the progeny of triploid gynogens induced from unreduced eggs of triploid (diploid female $\times$ tetraploid male) loach [J]. Aquaculture, 2002, 204: 311-322.
- [23] MORISHIMA K, NAKAMURA-SHIOKAWA Y, BANDO E, et al. Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from mitochondrial DNA analyses [J]. Genetica, 2008, 132: 159-171.
- [24] LI Y J, GAO Y C, ZHOU H, et al. Aneuploid progenies of triploid hybrids between diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China [J]. Genetica, 2016, 144: 601-609.
- [25] 黄松钱, 曹小娟, 王卫民. 多倍体泥鳅的人工诱导及其受精细胞学观察[J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(5): 26-34. HUANG S Q, CAO X J, WANG W M. Olyploidy induction and fertilization cytology observation in loach [J]. Journal of Huazhong Agricultural Univesity, 2019, 38(5): 26-34 (in Chinese with English abstract).
- [26] CHEN Y T, VENDITTI C A, THEILER G, et al. Identification of CT46/HORMAD1, an immunogenic cancer/testis antigen encoding a putative meiosis-related protein [J/OL]. Cancer Immun, 2005, 7(5): 9 [2019-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15999985/>.
- [27] SMALL C M, CARNEY G E, MO Q, et al. A microarray analysis of sex and gonad-biased gene expression in the zebrafish: evidence for masculinization of the transcriptome [J/OL]. BMC genomics, 2009, 10: 579 [2019-05-22]. <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2164-10-579>.
- [28] SHIN Y H, CHOI Y, ERDIN S U, et al. Hormad1 mutation disrupts synaptonemal complex formation, recombination, and chromosome segregation in mammalian meiosis [J/OL]. PLoS genetics, 2010, 6(11): e1001190 [2019-05-22]. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.350.3878>.
- [29] BERBEJILLO J, MARTINEZ-BENGOCHEA A, GABRIELA B E D O, et al. Experience of *dmrt1*, and *sox9*, during gonadal development in the siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) [J]. Fish physiology & biochemistry, 2013, 39(1): 91-94.
- [30] 周楠. 乌鳢性别相关的 *Dmrt* 基因的克隆及其组织表达特征 [D]. 保定: 河北大学, 2014. ZHOU N. Molecular cloning and expression analysis of *Dmrt* gene in relation to sex in *Channa argus* [D]. Baoding: Hebei University, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [31] 王光花. 奥利亚罗非鱼 *DMRT1* 基因的克隆及其性别决定机制的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2004. WANG G H. Cloning *DMRT1* cDNA of oreochromis aurea and study of sex-determining mechanis in tilapia [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2004 (in Chinese with English abstract).
- [32] KOBAYASHI T, KAJIURA-KOBAYASHI H, GUAN G, et al. Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Developmental dynamics, 2008, 237(1): 297-306.
- [33] ALAM M A, KOBAYASHI Y, HORIGUCHI R, et al. Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers *Dmrt1* and *Foxl2* during female-to-male sex change in *Epinephelus merra* [J]. General & comparative endocrinology, 2008, 157(1): 75-85.

- [34] 张红燕,朱文旭,赵诚,等.河川沙塘鳢 *DMRT1* 基因的克隆及其表达分析[J].海洋渔业,2018,40(5):569-580.ZHANG H Y,ZHU W X,ZHAO C,et al. Cloning and expression analysis of *DMRT1* gene in *Odontobutis potamophila*[J].Marine fisheries,2018,40(5):569-580(in Chinese with English abstract).
- [35] MATSUDA M,SHINOMIYA A,KINOSHITA M,et al.*DMY* gene induces male development in genetically female (XX) Medaka fish[J].Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America,2007,104(10):3865-3870.
- [36] MASUYAMA H,YAMADA M,KAMEI Y,et al.*Dmrt1*, mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by *Dmy*, in the medaka[J].Chromosome research,2012,20(1):163-176.

Histological observation of early gonadal differentiation and expression of gonadal development-related genes in hybrid triploid *Misgurnus anguillicaudatus*

SUN Yuqing¹, CHEN Qi¹, ZHENG Xinyi¹, XU Qizheng¹,
ZHUANG Zixin¹, WANG Wei¹, CAO Xiaojuan², ZHOU He¹

1.College of Fisheries and Life, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2.College of Fisheries/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics,
Breeding and Reproduction, Ministry of Education/Hubei Provincial Engineering
Laboratory for Pond Aquaculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The histology of early gonad differentiation was observed, and expression of the genes related to gonadal development (*hormad1*, *dmrt1-a*) at different early development stages (4, 14, 21, 23, 50, 60 and 65 dph (days post-hatch)) and in different tissues (gonad, liver, muscle, intestine, gill, fin, skin and brain) of the hybrid triploid loach ($4n \text{♀} \times 2n \text{♂}$) was quantitatively detected by fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The results showed that at different early developmental stages, the *hormad1* and *dmrt1-a* genes were expressed the highest on 4 dph, followed by 14 dph and the lowest on 50 dph. In different tissue, the *hormad1* gene was expressed highest in the female fins and lowest in the liver, highest in the male gonads and lowest in the liver. The expression of the *dmrt1-a* gene was highest in the gonads of both male and female loaches and lowest in the brain. The differentiation and occurrence of gonads at early stage of the hybrid triploid loach was not different from that of the diploid loach. The primitive germ cells and its migration, formation of the primitive gonads and differentiation of the gonads were observed. In summary, the *hormad1* and *dmrt1-a* genes play a certain role during early gonadal development.

Keywords *Misgurnus anguillicaudatus*; hybrid triploid; *hormad1*; *dmrt1-a*; gonadal development; gene expression; qRT-PCR

(责任编辑:边书京)