

多倍体泥鳅的人工诱导及其受精细胞学观察

黄松钱^{1,2} 曹小娟¹ 王卫民¹

1. 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;
2. 东京大学农学生命科学研究科, 东京 113-8657

摘要 对大鳞副泥鳅(PP)、二倍体泥鳅(DD)和四倍体泥鳅(TT)自交或杂交受精卵进行冷休克(冷休克条件为:受精后 5 min 开始,利用 2~3 ℃冰水冷休克处理 30~35 min),获得 6 种多倍体泥鳅后代(DD×PP-0, 3n=74; DD×DD-0, 3n=75; DD×TT-0, 4n=100; TT×PP-0, 5n=124; TT×DD-0, 5n=125 和 TT×TT-0, 6n=150。母本在前,父本在后)。利用流式细胞仪对不同诱导组合不同时期倍性进行检测发现:1 月龄,DD×PP-0 三倍体诱导成功率为 87.50%, DD×DD-0 三倍体诱导成功率为 53.85%, DD×TT-0 四倍体诱导成功率为 90.91%, TT×PP-0 五倍体诱导成功率为 84.96%, TT×DD-0 五倍体诱导成功率为 76.92%, TT×TT-0 六倍体诱导成功率为 12.50%。12 月龄,各组合多倍体诱导成功率分别为 91.43% (DD×PP-0, 3n=74), 60% (DD×DD-0, 3n=75), 85.19% (DD×TT-0, 4n=100), 87.50% (TT×PP-0, 5n=124), 83.33% (TT×DD-0, 5n=125)和 6.06% (TT×TT-0, 6n=150)。12 月龄各诱导组合多倍体倍性组成与 1 月龄相似,诱导成功率随诱导多倍体后代的倍性增加而降低。对不同诱导组合后代进行生长统计分析发现:不同诱导组合后代在生长早期差异不显著,生长后期表现出不同程度的差异。其中,以四倍体泥鳅为母本、大鳞副泥鳅为父本的诱导五倍体后代(TT×PP-0)12 月龄时期全长和体质量值最大。同时,荧光受精细胞学观察证实冷休克处理通过抑制受精卵第二极体的释放获得三倍体型后代。

关键词 多倍体; 倍性鉴定; 受精细胞学; 人工诱导; 泥鳅; 大鳞副泥鳅

中图分类号 S 932.4 ; Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)05-0026-09

大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)分别隶属于鳅科、花鳅亚科中的副泥鳅属(*Paramisgurnus*)和泥鳅属(*Misgurnus*),是 2 种重要的淡水经济鱼类,广泛分布于欧亚大陆^[1]。2 种泥鳅均具有发达的辅助呼吸系统(包括皮肤呼吸和肠呼吸),耐低氧^[2-3];同时,这 2 种泥鳅肉质属于高蛋白、低脂肪类型的高品质水产品,营养丰富,味道鲜美,素有“水中人参”之称。由于受到消费者的青睐,泥鳅日趋成为研究的热点,国内外研究者们也陆续开展了其生长、发育、免疫等相关的研究^[4-6]。

截至目前,在我国境内天然水域中共发现了 5 种不同倍性的泥鳅,包括二倍体、三倍体、四倍体、五倍体和六倍体泥鳅^[7-10]。但是,尚未发现除二倍体以外的大鳞副泥鳅。2 种鳅类在天然环境中同域分

布,存在明显的生殖季节交叉^[4]。You 等^[11]在野外环境中发现了 2 种泥鳅自然杂交后代。在实验条件下,Cui 等^[12]通过种间杂交获得大量可存活的杂种泥鳅后代。同时,国内外还开展了 2 种泥鳅的雌核发育、雄核发育、多倍体诱导和 DNA 甲基化相关的研究^[13-16]。但缺乏对 2 种泥鳅杂交后代诱导多倍体的研究。为进一步丰富泥鳅种质资源,为泥鳅的育种和多倍化研究提供更丰富的材料,本研究以二倍体泥鳅(DD)、四倍体泥鳅(TT)和大鳞副泥鳅(PP)为材料,以冷休克方式诱导多种多倍体泥鳅后代,并对其生长、倍性变化进行相关研究;同时,以诱导三倍体泥鳅为例,利用核酸荧光染料二氨基苯基吡啶(DAPI)染色追踪冷休克过程中遗传物质变化情况,探究染色体加倍过程。本研究开展多倍体泥鳅的诱导,旨在为 2 种经济鳅类的遗传改良提供实验样本

和基础资料。

1 材料与方法

1.1 亲本采集

从武汉周边地区捕捞泥鳅和大鳞副泥鳅野生亲本。从外部形态特征对2种泥鳅进行区分,泥鳅体披细鳞,体型细长,呈圆筒型,侧线鳞数目为122~144;尾柄长与尾柄高之比大于1。大鳞副泥鳅(PP)体型呈侧扁状,侧线鳞数目为100~115;尾柄长与尾柄高之比约等于1。参照Zhu等^[17]描述方法,利用流式细胞仪(Beckman Coulter,美国)对泥鳅亲本的倍性进行鉴定(二倍体泥鳅DD和四倍体泥鳅TT)。将二倍体泥鳅、四倍体泥鳅和大鳞副泥鳅亲本分开暂养备用,暂养水温26~28℃,溶氧>5 mg/L。

1.2 多倍体泥鳅的诱导

通过冷休克处理泥鳅和大鳞副泥鳅自交/杂交受精卵,获得6种诱导多倍体组合:DD×PP-0(3n),DD×DD-0(3n),DD×TT-0(4n),TT×PP-0(5n),TT×DD-0(5n)和TT×TT-0(6n)(母本在前,父本在后,0代表冷休克处理,3n/4n/5n/6n代表诱导后的倍性)。首先,对繁殖亲本进行人工催产,雌性亲本催产剂量为LRH-A₂ 50 μg/kg+DOM 6 mg/kg,雄性亲本催产剂量减半,催产后雌雄亲本分开暂养,暂养水温26℃,置于安静黑暗环境中;12 h后,检查雌雄亲本发育状况,是否可挤出成熟卵子和精液。雌雄亲本同步成熟后,解剖雄性亲本取出精巢,加泥鳅精子保存液研磨备用;然后挤出成熟卵子,加入研磨后的精液,混匀;随后,加入少量曝气水,刺激卵子和精子完成人工授精。从加入曝气水开始计时,第5分钟开始,将受精卵置于2~3℃冰水中进行冷休克处理刺激,冷休克持续30~35 min;随后,将冷休克后的受精卵置于塑料孵化盒内孵化,孵化水温保持在25~26℃。受精后48 h完成脱膜,以孵化卤虫作为开口饵料,连续投喂1周。随后采用实验室自配泥鳅饵料进行诱食,改投人工配合饲料。1月龄、3月龄、6月龄、9月龄和12月龄进行生长测量,包括全长和体质量;1月龄和12月龄同时进行倍性鉴定。不同诱导组合分开饲养,饲养水质环境和密度相当。

1.3 多倍体泥鳅倍性鉴定

1月龄阶段,从各诱导组合中随机选择30~50尾样本,采用冰水对全鱼进行麻醉后,除去头部,将

躯干部位进行研磨过滤,获得游离的体细胞。流式细胞仪对幼鱼体细胞进行倍性检测,幼鱼倍性鉴定具体方法和步骤参见文献[18]。12月龄阶段,诱导多倍体后代体长超过5 cm,尾静脉采血,采用血细胞DNA相对含量法进行倍性鉴定^[17]。利用PHA法制作肾细胞染色体标本,具体方法和步骤参见文献[19]。

1.4 多倍体泥鳅生长比较

不同月龄阶段,各诱导组合分别随机选择30~50尾多倍体泥鳅,用冰水进行麻醉,测量其全长和体质量。全长测量精确到0.01 mm,体质量测量精确到0.001 g。

1.5 受精细胞学观察

以二倍体泥鳅自交受精卵(DD×DD)为对照组,对二倍体泥鳅自交冷休克诱导三倍体受精卵(DD×DD-0)及其胚胎发育早期过程进行荧光受精细胞学观察。受精卵取样时间分别为受精后0、3、5、7、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100 min,每次取受精卵20~30个。4%多聚甲醛溶液+PBS溶液固定受精卵24 h,4%多聚甲醛4℃固定36 h;体视显微镜下剥去卵膜,0.1% Triton X-100溶液37℃水浴3~5 min;用PBS溶液清洗2次,0.01% DAPI溶液避光染色20 min;最后用30%和50%甘油各清洗1次,用50%甘油进行保存,保存时间不超过4 h。利用荧光显微镜(Zeiss, Imager. A2,德国)对荧光染色后的受精卵进行观察并拍照记录。

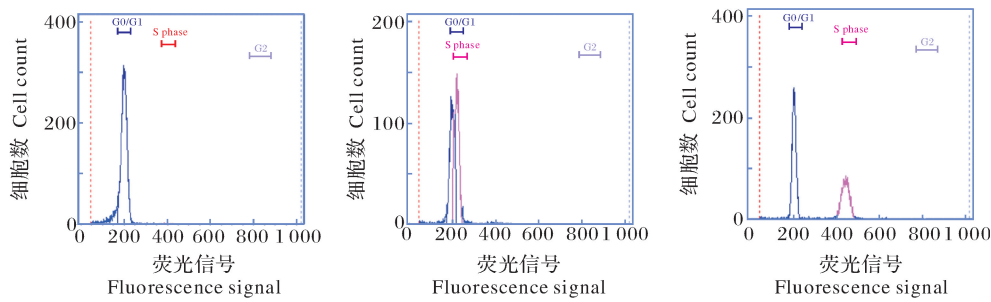
1.6 数据处理和分析

利用SPSS22.0和Excel 2010软件对不同诱导组合生长性状进行单因素方差分析,差异显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 多倍体泥鳅的获得

以大鳞副泥鳅血细胞作为内参,3种泥鳅血细胞荧光信号值如图1。二倍体泥鳅DNA含量比大鳞副泥鳅略大,四倍体泥鳅DNA含量是大鳞副泥鳅的1倍。分别以大鳞副泥鳅、二倍体泥鳅和四倍体泥鳅作为繁殖亲本,进行人工授精获得自交/杂交受精卵;利用优化后的冷休克条件对受精卵进行冷休克处理,共获得6种不同冷休克诱导组合,即DD×PP-0(3n),DD×DD-0(3n),DD×TT-0(4n),TT×PP-0(5n),TT×DD-0(5n)和TT×



A:大鳞副泥鳅; B:二倍体泥鳅; C:四倍体泥鳅。A:Large scale loach, *P. dabryanus*; B:Dojo loach, diploid *M. anguillicaudatus*; C:Dojo loach, tetraploid *M. anguillicaudatus*.

图 1 泥鳅和大鳞副泥鳅血细胞 DNA 相对含量峰值图

Fig.1 Flow cytometric peaks of blood cells relative DNA content of dojo loach and large scale loach

TT-0 (6n)。将 6 种不同诱导组合分开饲养,饲养环境和密度相同,并定期对不同组合后代进行生长测量和倍性检测。

2.2 多倍体后代倍性检测

1 月龄阶段,对幼鱼体细胞进行倍性检测,分别从 6 个诱导组合中选择 30~50 尾实验鱼样本进行倍性检测,统计各诱导组合诱导多倍体倍性组成,结果如图 2 所示。

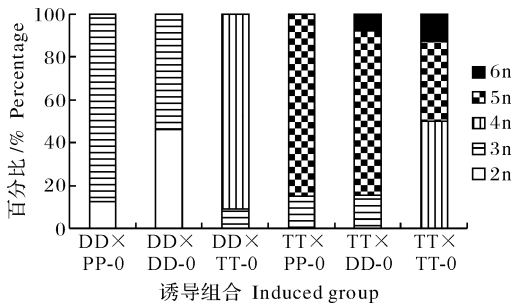


图 2 1 月龄幼鱼诱导多倍体后代倍性组成

Fig.2 Ploidy composition of induced polyploidy progenies at 1 month-old

1 月龄阶段,幼鱼倍性检测结果显示:DD×PP-0 三倍体诱导成功率为 87.50%;DD×DD-0 三倍体诱导成功率为 53.85%;DD×TT-0 四倍体诱导成功率为 90.91%;TT×PP-0 五倍体诱导成功率为 84.96%;TT×DD-0 五倍体诱导成功率为 76.92%。同时,检测到少量超出预期倍性的六倍体幼鱼;TT×TT-0 六倍体诱导成功率为 12.50%。同时,检测到 37.50%五倍体后代。

12 月龄阶段,不同诱导组合倍性检测结果与 1 月龄相似。6 种组合诱导多倍体后代占比分别为 60%(DD×DD-0)、91.43%(DD×PP-0)、85.19%(DD×TT-0)、83.33%(TT×DD-0)、87.50%(TT×

PP-0)和 6.06%(TT×TT-0)(图 3)。12 月龄时期,TT×TT-0 诱导组合中未检测到五倍体后代,TT×DD-0 诱导组合中未检测到六倍体后代。

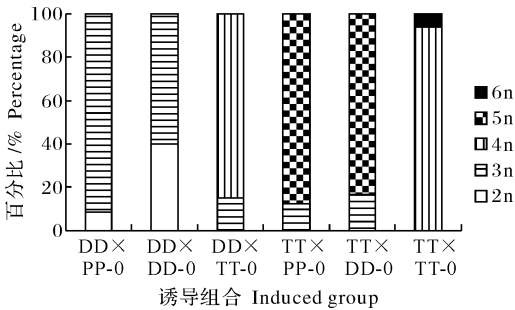
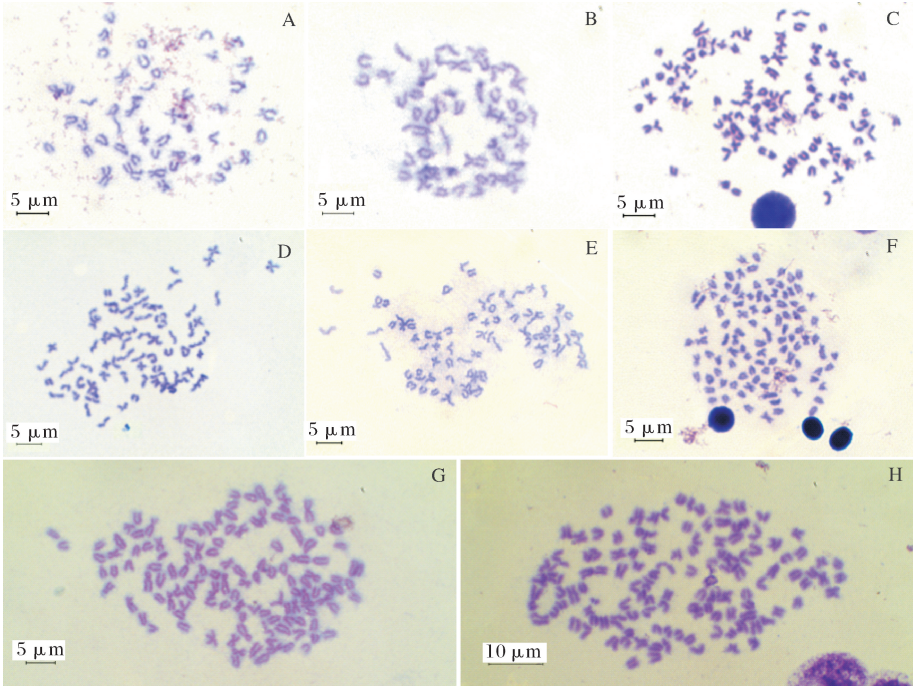


图 3 12 月龄成鱼倍性组成

Fig.3 Ploidy composition of induced polyploidy progenies at 12 month-old

制备 2 种泥鳅繁殖亲本以及诱导多倍体后代肾细胞染色体中期分裂相如图 4,并统计染色体数目。3 种野生泥鳅/大鳞副泥鳅亲本染色体数目分别为 2n=48(PP,图 4A)、2n=50(DD,图 4B)、4n=100(TT,图 4C)。DD×DD-0 诱导三倍体后代染色体数目为 3n=75(图 4D),DD×PP-0 诱导三倍体后代染色体数目为 3n=74(图 4E),DD×TT-0 诱导四倍体后代染色体数目为 4n=100(图 4F),TT×DD-0 诱导五倍体后代染色体数目为 5n=125(图 4G),TT×PP-0 诱导五倍体后代染色体数目为 5n=124(图 4H)。二倍体泥鳅较大鳞副泥鳅多 2 条染色体,在诱导多倍体后代中二倍体泥鳅作为父本(DD×DD-0,TT×DD-0)诱导组合多倍体后代染色体数目较大鳞副泥鳅作为父本(DD×PP-0,TT×PP-0)诱导组合多倍体后代多 1 条染色体。由于诱导六倍体后代(TT×TT-0)数量限制,未成功获得六倍体后代有丝分裂中期的染色体分裂相。



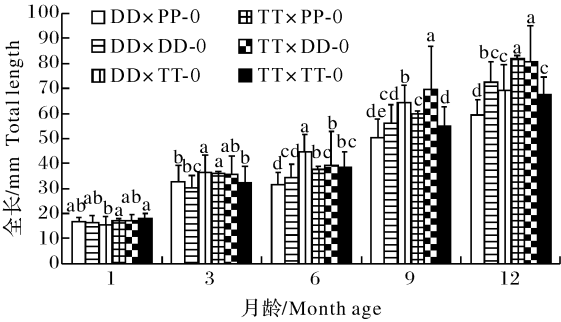
A:大鳞副泥鳅($2n=48$); B:二倍体泥鳅($2n=50$); C:四倍体泥鳅($4n=100$); D:DD×DD-0 诱导三倍体后代($3n=75$); E:DD×PP-0 诱导三倍体后代($3n=74$); F:DD×TT-0 诱导四倍体后代($4n=100$); G:TT×DD-0 诱导五倍体后代($5n=125$); H:TT×PP-0 诱导五倍体后代($5n=124$)。A:Large scale loach,*P. dabryanus* ($2n=48$); B:Dojo loach,diploid *M. anguillicaudatus* ($2n=50$); C:Dojo loach,tetraploid *M. anguillicaudatus* ($4n=100$); D:Induced triploid progeny of DD×DD-0 ($3n=75$); E:Induced triploidy progeny of DD×PP-0 ($3n=74$); F:Induced tetraploid progeny of DD×TT-0 ($4n=100$); G:Induced pentaploid progeny of TT×DD-0 ($5n=125$); H:Induced pentaploid progeny of TT×PP-0 ($5n=124$)。

图 4 泥鳅、大鳞副泥鳅以及诱导多倍体后代染色体分裂相

Fig.4 Chromosome split phases of dojo loach,large scale loach and induced polyploidy progenies

2.3 生长差异比较

各月龄不同诱导多倍体组合后代全长和体质量结果如图 5 和图 6。1 月龄阶段,各诱导组合全长和体质量差异不显著。3 月龄开始不同诱导组合全长和体质量出现明显差异,DD×TT-0 组合全长和体质量值最大,DD×DD-0 组合后代全长和体质量值最小;6 月龄,DD×PP-0 组合全长和体质量值最小,DD×TT-0 组合全长和体质量值最大;9 月龄,DD×PP-0 组合全长和体质量值最小,TT×DD-0 组合全长和体质量值最大;12 月龄,DD×PP-0 组合全长和体质量值最小,TT×PP-0 组合全长和体质量值最大。TT×TT-0 诱导六倍体组合体质量小于诱导三倍体(DD×DD-0)、四倍体(DD×TT-0)和五倍体(TT×DD-0 和 TT×PP-0)组合。12 月龄生长测量和倍性检测后,对同一诱导组合按照不同倍性进行比较发现,除 TT×PP-0 诱导组合的五倍体后代体质量与三倍体后代体质量存在明显差异($P<0.05$),其他诱导组合不同倍性后代体质量值无显著性差异。



不同小写字母(同一月份)表示差异显著($P<0.05$),下同。
For each month,different small letters meant significant differences ($P<0.05$). The same as below.

图 5 诱导多倍体后代全长变化

Fig.5 Growth performances of total length of induced polyploidy progenies

2.4 受精细胞学观察

以二倍体泥鳅正常自交受精卵(DD×DD)作为对照,冷休克诱导三倍体受精卵(DD×DD-0)及其早期胚胎发育过程荧光受精细胞学观察时序如图 7 和图 8。正常水温条件下,二倍体泥鳅

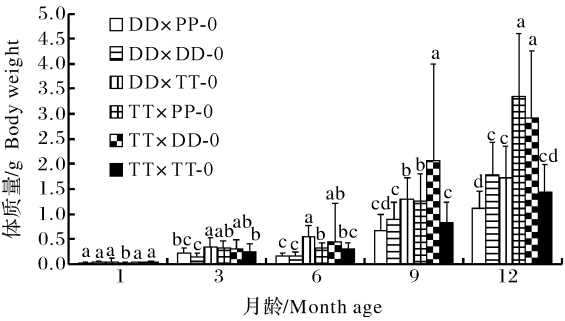
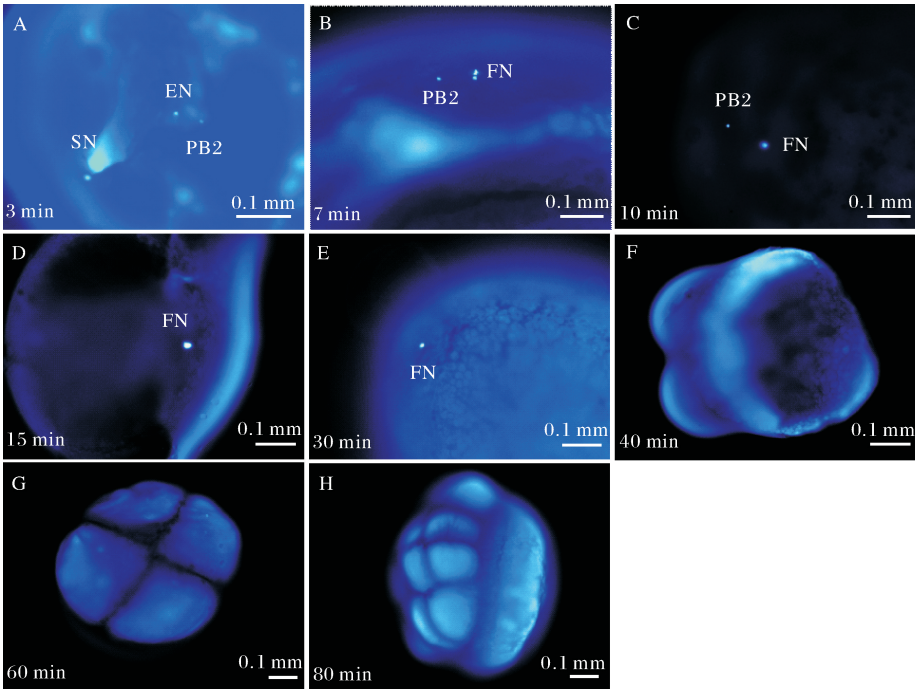


图 6 诱导多倍体后代体质量变化

Fig.6 Growth performances of body weight of induced polyploidy progenies

成熟精子通过卵子表面受精孔进入卵子内部,刺激卵子发育,促进卵子完成第 2 次减数分裂,分裂成卵

核和第二极体;精核进入卵子后,没有与卵核发生融合,以精核、卵核以及第二极体 3 种核体共同存在于卵子内部(图 7A)。受精后 5~10 min,雄核不断向雌核靠近,并最终融合形成受精核。此时,第 2 次减数分裂形成的第二极体并未排出受精卵(图 7B)。第 1 次有丝分裂前,受精核和第二极体逐渐移动至受精卵表面,为第 1 次有丝分裂做准备(图 7C)。随后,大部分受精卵完成第 2 次减数分裂排出第二极体(图 7D)。受精后 30~40 min,冷休克结束,受精卵进入第 1 次有丝分裂 S 期,染色体发生复制(图 7E)。随即完成第 1 次有丝分裂,受精卵进入 2 细胞期(图 7F)。受精后 60 min 受精卵发育至 4 细胞期(图 7G),受精后 80 min 发育至 8 细胞期(图 7H)。



SN:精核; EN: 卵核; PB2: 第二极体; FN: 受精核; 时间表示距离受精开始时间。下同。SN: Sperm nucleus; EN: Egg nucleus; PB2: Second polar body; FN: Fertilized nucleus. Time indicates the time after fertilization. The same as below.

图 7 二倍体泥鳅自交受精卵受精细胞学观察

Fig.7 Fertilization cytology observation of fertilized eggs of diploid *M. anguillicaudatus*

利用冷休克诱导二倍体泥鳅自交受精卵获得三倍体泥鳅(DD×DD-0),对冷休克过程受精卵进行观察发现:冷休克开始前,二倍体泥鳅精子进入卵子过程同二倍体泥鳅自交受精卵(DD×DD)发育过程(图 8A)。受精后 5 min,精子刺激卵子完成第 2 次减数分裂,形成雌核和第二极体;随即,雄核和雌核发生融合形成受精核(图 8B)。从受精后 20 min 开

始冷休克处理,阻止第二极体从受精卵排出(图 8C~F)。未排出的第二极体与受精核最终发生融合,形成一个较大的受精核(图 8G);随后,受精卵开始进入第 1 次有丝分裂。受精后 80 min 完成第 1 次有丝分裂进入 2 细胞期(图 8H)。胚胎发育早期,冷休克诱导受精卵较正常受精卵发育慢约 40 min。

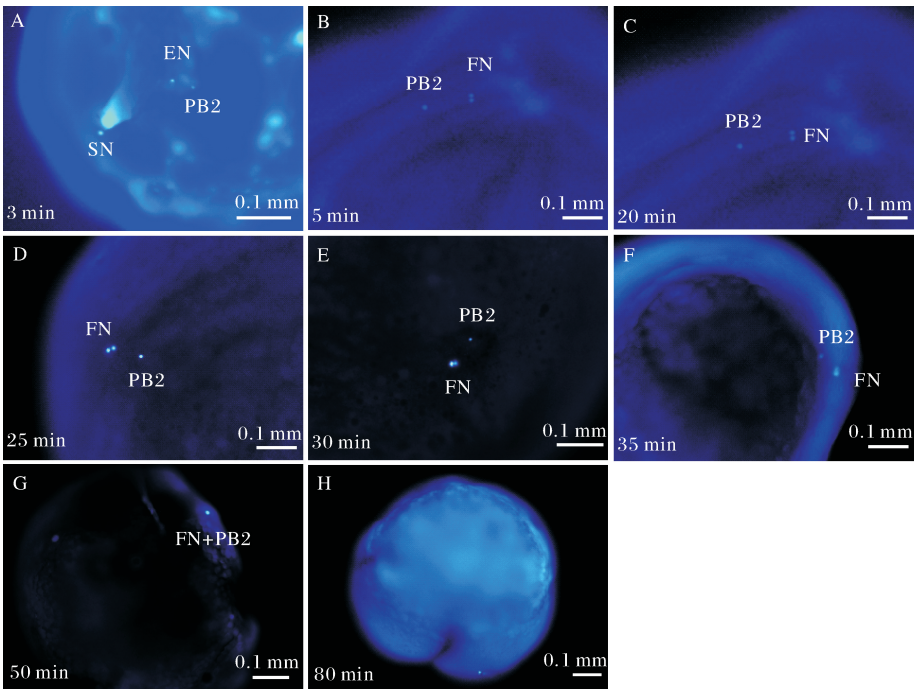


图 8 二倍体泥鳅冷休克受精卵受精细胞学观察

Fig.8 Fertilization cytology observation of cold shocked fertilized eggs of diploid *M. anguillicaudatus*

3 讨 论

泥鳅以其复杂的倍性组成和多样的配子形成机制,日趋成为水产动物研究的热点。国内外研究者陆续开展了大量泥鳅单性生殖(雌核发育和雄核发育)和多倍体诱导^[20-22]。雌核发育、雄核发育以及多倍体诱导本质上对鱼类受精卵处理方法相似,通过物理方法(静水压法、温度休克法、高盐高碱法等)或化学方法(6-二甲基氨基嘌呤、秋水仙素、细胞松弛素 B、咖啡碱等)让“受精卵”染色体数目增加,获得染色体加倍的后代。本研究以优化后的冷休克条件对 3 种泥鳅自交或杂交受精卵进行染色体加倍处理,获得 6 种诱导多倍体泥鳅后代,对不同组合后代不同生长阶段进行倍性检测,发现各组合多倍体后代 1 月龄和 12 月龄倍性组成相似。12 月龄阶段,各组合并未检测到 1 月龄出现的异常倍性后代。诱导多倍体泥鳅后代倍性组成变化可能是由于异常倍性后代存活力差,在生长过程中陆续死亡。在鱼类多倍体诱导试验中,研究者多关注于某一特定生长阶段诱导成功率,而忽视了不同多倍体后代存活力的差异。对不同阶段的倍性检测有利于全面了解多倍体后代生长过程中的差异变化。不同诱导组合中使用不同倍性亲本,诱导成功率相差较大,整体呈现

随着诱导后代倍性的增加、诱导成功率逐渐下降的趋势,六倍体诱导成功率明显低于其他倍性诱导成功率。

对不同诱导组合多倍体后代进行倍性鉴定, DNA 相对含量法用于倍性快速判断,肾细胞染色体计数法可用于染色体数目统计,前者具有快速、便捷的特点,后者倍性鉴定更为准确。以 DD 为母本诱导三倍体(DD×PP-0 和 DD×DD-0)和四倍体(DD×TT-0)后代体细胞染色体数目分别为 $3n=74$, $3n=75$ 和 $4n=100$, 较正常自交/杂交后代(DD×PP, $3n=74$; DD×DD, $2n=50$ 和 DD×TT, $3n=75$)增加 1 套泥鳅染色体组($1n=25$);以 TT 为母本诱导五倍体后代(TT×PP-0 和 TT×DD-0)体细胞染色体数目分别为 $5n=124$ 和 $5n=125$, 较正常杂交后代(TT×PP, $3n=74$ 和 TT×DD, $3n=75$)增加 2 套泥鳅染色体组($2n=50$)。本研究中冷休克获得三倍体泥鳅(DD×DD-0, $3n=75$)和五倍体泥鳅(TT×DD-0, $5n=125$)与天然水域中发现三倍体和五倍体泥鳅具有相同染色体组成^[23]。以 PP 为父本诱导三倍体(DD×PP-0, $3n=74$)和五倍体(TT×PP-0, $5n=124$)后代体细胞染色体数目较以 DD 为父本诱导三倍体(DD×DD-0, $3n=75$)和五倍体(TT×DD-0, $5n=125$)后代少 1 条染色体。大鳞

副泥鳅和泥鳅分别隶属副泥鳅属和泥鳅属,体细胞染色体数目不同,在实验条件和野外条件下均可实现杂交生殖,杂交过程中遗传物质传递表现出了较为稳定的特点。

有关多倍体鱼类的生长速度,不同鱼类研究结果不尽相同。人工诱导多倍体与二倍体相比,并不都具有明显的生长优势,甚至有些鱼类的三倍体比二倍体生长速度要缓慢^[24-25]。人工诱导三倍体和四倍体大鳞副泥鳅中也出现了类似结果^[26-27]。而异源多倍体后代生长速度多较相应的二倍体自交后代快,如异源三倍体虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[28]和异源三倍体银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)^[29]。本研究通过冷休克获得 6 种诱导多倍体泥鳅后代,不同诱导组合在早期生长阶段全长和体质量差异不明显,后期不同诱导组合全长和体质量均出现较大差异。除 TT×PP-0 组合外,同一诱导组合不同倍性后代之间生长差异较小。TT×PP-0 中五倍体后代平均体质量小于三倍体后代,这种差异可能是倍性增加造成的,也有可能是实验样本数量不足引起的。诱导六倍体组合后代(TT×TT-0)生长较慢,该结果与 Horie 等^[30]研究同源六倍体泥鳅生长结果相似。诱导五倍体组合后代(TT×DD-0 和 TT×PP-0)生长较其他组合快;同时,异源五倍体后代(TT×PP-0)较后同源五倍体后代(TT×DD-0)生长快,表现出一定的杂种优势。

利用物理或者化学方法诱导多倍体鱼类主要有 2 种方式:①通过抑制受精卵第 1 次有丝分裂的正常进行,受精卵核内遗传物质发生复制而染色体不分离,最终形成四倍体型后代^[31];②通过抑制受精卵第 2 次减数分裂的正常进行,阻止第二极体从受精卵排出,最终形成三倍体型后代^[32]。正常条件下,成熟精子通过卵子表面受精孔进入卵子内部,精子携带遗传物质浓缩形成雄性原核;同时,刺激卵子完成第 2 次减数分裂,形成卵核和第二极体;精核和卵核发生融合完成受精,第二极体最终排出卵子。如果第二极体未能成功排出,与受精核发生融合,则形成包含精核、卵核和第二极体三组遗传物质的三倍体型后代^[33-34]。刘弘林^[35]对红鲫(*Carassius auratus* red var.)和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)杂交受精卵进行连续切片观察发现,鲫鲂杂交受精卵内全部遗传物质被保留,排出的是不含任何遗传物质的第二极体,最终形成三倍体鲫鲂

杂种后代。杜方勇^[36]在诱导多倍体扇贝(*Chlamys farreri*)时,采用二氨基苯基吡啶(DAPI)染色和荧光显微镜观察受精卵染色体行为变化,证实化学药物 6-二甲氨基基嘌呤使染色体运动终止,第二极体无法排出受精卵,最终发育形成三倍体扇贝。本研究以二倍体泥鳅自交为对照,采用荧光染料 DAPI 对诱导三倍体泥鳅(DD×DD-0)受精卵及其胚胎发育早期过程中遗传物质的变化进行追踪,证实冷休克通过抑制第二极体排出受精卵获得三倍体泥鳅。受精细胞学观察发现少量受精卵发育较快,在冷休克开始之前已经完成第 2 次减数分裂,第二极体从卵子排出,故不能获得 100% 的三倍体型后代。同时,冷休克还影响泥鳅受精卵的早期胚胎发育速度,冷休克处理的受精卵较正常受精卵早期胚胎发育延缓约 40 min。本研究通过对 3 种泥鳅自交或杂交受精卵进行冷休克处理,获得 6 种多倍体泥鳅材料,为泥鳅的遗传育种提供了丰富的材料。有关诱导多倍体泥鳅的性腺发育、配子倍性及育性需要进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 仲嘉,易少奎,于永耀,等.长江流域泥鳅与大鳞副泥鳅种质资源调查与研究[J].水产学报,2015,39(8):1089-1098.
- [2] HUANG S Q, CAO X J, TIAN X C. Transcriptomic analysis of compromise between air-breathing and nutrient uptake of posterior intestine in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), an air-breathing fish [J]. Mar Biotechnol, 2016, 18(4): 521-533.
- [3] ZHANG Y L, WANG G Y, ZHNG Z H, et al. Partial amino acid metabolism and glutamine synthesis as the ammonia defensive strategies during aerial exposure in Chinese loach *Paramisgurnus dabryanus* [J]. Front Physiol, 2019, 10: 14 [2019-05-12]. doi.org/10.3389/fphys.2019.00014. https://www.researchgate.net/publication/330710384.
- [4] HUANG S Q, CAO X J, TIAN X C, et al. Fertility and ploidy of gametes of allodiploid and allotriploid loach produced by diploid *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus* [J]. Fish Physiol Biochem, 2018, 44(1): 13-20.
- [5] XU J, YU Y Y, HUANG Z Y, et al. Immunoglobulin (Ig) heavy chain gene locus and immune responses upon parasitic, bacterial and fungal infection in loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Fish Shellfish Immun, 2019, 86: 1139-1150.
- [6] HUANG Z Y, YU Y Y, DONG S, et al. Major histocompatibility complex class IIA and IIB genes of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*): molecular cloning and expression analysis in response to bacterial and parasitic challenge [J]. Aquaculture,

- 2019,500:359-369.
- [7] LI Y J, JIE Y, WANG J B, et al. A study on distribution of polyploid loaches in China [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2008, 74:177-182.
- [8] LI Y J, ZHANG M Z, QIAN C, et al. Fertility and ploidy of gametes of diploid, triploid and tetraploid loaches, *Misgurnus anguillicaudatus*, in China [J]. J Appl Ichthyol, 2012, 28:900-905.
- [9] YU Y Y, ABBAS K, WANG W M, et al. Geographical distribution of ploidy level variation of loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China [J]. Pak J Agr Sci, 2014, 51(2):273-281.
- [10] ZHONG J, YI S K, MA L Y, et al. Evolution and phylogeography analysis of diploid and polyploid *Misgurnus anguillicaudatus* populations across China [J/OL]. Proc R Soc B, 2019, 286: 20190076 [2019-05-12]. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2019.0076>.
- [11] YOU C H, YU X, TONG J G. Detection of hybridization between two loach species (*Paramisgurnus dabryanus* and *Misgurnus anguillicaudatus*) in wild populations [J]. Environ Biol Fish, 2009, 86:65-71.
- [12] CUI L, FANG L B, YU Y Y, et al. Reciprocal hybrids among diploid, tetraploid dojo loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, and large-scale loach, *Paramisgurnus dabryanus*: fertilization, survival and growth performance [J]. J World Aquacult Soc, 2013, 44 (5):415-424.
- [13] 刘同明, 吴清江, 叶玉珍. 人工诱导泥鳅雌核发育及人工转性的研究[J]. 水生生物学报, 2004, 28(4):445-447.
- [14] 王玉生, 李雅娟, 于长宁, 等. 冷休克诱导大鳞副泥鳅雄核发育单倍体[J]. 水产学报, 2014, 38(2):161-169.
- [15] HUANG S Q, CAO X J, TIAN X C, et al. Production of tetraploid gynogenetic loach using diploid eggs of natural tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, fertilized with UV-irradiated sperm of *Megalobrama amblycephala* without treatments for chromosome doubling [J]. Cytogenet Genome Res, 2015, 147(4):260-267.
- [16] 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.
- [17] ZHU D M, SONG W, YANG K, et al. Flow cytometric determination of genome size for eight commercially important fish species in China [J]. In Vitro Cell Dev-An, 2012, 48:507-517.
- [18] HUANG S Q, CAO X J, TIAN X C, et al. Ploidy and growth performance of hybrid progeny between tetraploid *Misgurnus anguillicaudatus*, and *Paramisgurnus dabryanus* [J]. Aquac Res, 2017, 48:2981-2988.
- [19] ZHANG C, SUN Y D, LIU S J, et al. Evidence of the unreduced diploid eggs generated from the diploid gynogenetic progeny of allotetraploid hybrids [J]. Acta genetica sinica, 2005, 32: 136-144.
- [20] SUWA M, ARAI K, SUZUKI R. Suppression of the first cleavage and cytogenetic studies on the gynogenetic loach [J]. Fisheries Sci, 1994, 60:673-681.
- [21] HOU J, FUJIMOTO T, YAMAHA E, et al. Production of androgenetic diploid loach by cold-shock of eggs fertilized with diploid sperm [J]. Theriogenology, 2013, 80(2):125-130.
- [22] LI Y J, YU Z, ZHANG M Z, et al. Induction of viable gynogenetic progeny using eggs and UV-irradiated sperm from the Chinese tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Aquacult Int, 2013, 21(4):759-768.
- [23] 李雅娟, 田萍萍, 李莹, 等. 中国洪湖不同倍性泥鳅的染色体组型及形态特征比较分析[J]. 大连海洋大学学报, 2009, 24(3):236-241.
- [24] JOHNSON O W, DICKOFF W W, UTTER F M. Comparative growth and development of diploid and triploid coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. Aquaculture, 1986, 57(1/2/3/4):329-336.
- [25] KERBY J H, EVERSON J M, HARRELL R M, et al. Growth and survival comparisons between diploid and triploid sunshine bass [J]. Aquaculture, 1995, 137(1/2/3/4):355-358.
- [26] KIM D S, JO J Y, LEE T Y. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth [J]. Aquaculture, 1994, 120:263-270.
- [27] NAM Y K, CHOIG C, PARK D J, et al. Survival and growth of induced tetraploid mud loach [J]. Aquacult Int, 2001, 9:61-71.
- [28] LINCOLN R F, SCOTT A P. Production of all-female triploid rainbow trout [J]. Aquaculture, 1983, 30:375-380.
- [29] REFSTIE T J, DONALDSON E M. Production of all female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by diploid gynogenesis using irradiated sperm and cold shock [J]. Aquaculture, 1982, 29:67-82.
- [30] HORIE S, KOU T, UMINO T, et al. Retarded growth of hexaploid loaches [J]. Suisanzoshoku, 2004, 52(3):279-286.
- [31] 李文龙, 陈松林, 季相山, 等. 半滑舌鲷四倍体鱼苗的诱导与鉴定[J]. 中国水产科学, 2012, 19(2):196-201.
- [32] 赵岩, 赵金良, 罗明坤, 等. 冷休克诱导尼罗罗非鱼♀×萨罗罗非鱼♂三倍体研究[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(2):161-166.
- [33] 刘少军. 远缘杂交导致不同倍性鱼的形成[J]. 中国科学·生命科学, 2010, 40:104-114.
- [34] LIU S J, QIN Q B, XIAO J, et al. The formation of the polyploid hybrids from different subfamily fish crossings and its evolutionary significance [J]. Genetics, 2007, 176(2):1023-1034.
- [35] 刘弘林. 红鲫(♀)×团头鲂(♂)杂交 F1 代受精细胞学研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2012.
- [36] 杜方勇. 棒孔扇贝(♀)×虾夷扇贝(♂)异源三倍体的诱导与细胞学观察 [D]. 上海: 上海水产大学, 2003.

Oyploidy induction and fertilization cytology observation in loach

HUANG Songqian^{1,2} CAO Xiaojuan¹ WANG Weimin¹

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

2.Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo,
Tokyo 113-8657, Japan

Abstract Six different polyploid loaches ($DD \times PP-0$, $3n=74$; $DD \times DD-0$, $3n=75$; $DD \times TT-0$, $4n=100$; $TT \times PP-0$, $5n=124$; $TT \times DD-0$, $5n=125$ and $TT \times TT-0$, $6n=150$. Female in the former) were induced using large scale loach (*Paramisgurnus dabryanus*, PP), diploid (DD), and tetraploid (TT) dojo loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) by cold shock. The cold shock was maintained for 30-35 min using 2-3 °C ice-water from 5 min after fertilization. The ploidy of induced progenies at different development stages were measured by flow cytometry. The results showed that the ratios of induced triploid progenies were 87.50% of $DD \times PP-0$, 53.85% of $DD \times DD-0$, 90.91% of $DD \times TT-0$, 84.96% of $TT \times PP-0$, 76.92% of $TT \times DD-0$, and 12.5% of $TT \times TT-0$ at 1 month of age. The ratios of induced polyploidy progenies were 91.43% ($DD \times PP-0$, $3n=74$), 60% ($DD \times DD-0$, $3n=75$), 85.19% ($DD \times TT-0$, $4n=100$), 83.33% ($TT \times PP-0$, $5n=124$), 87.50% ($TT \times DD-0$, $5n=125$) and 6.06% ($TT \times TT-0$, $6n=150$) at 12 months of age, respectively. The ploidy composition of each group at 12 months was similar to that at 1 month of age. The ratio of induced polyploid progenies decreased with increasing ploidy levels. Growth performance of each group was measured and analyzed by statistical analysis. Little difference was observed at early development stage, while significant difference was observed at 12 months of age. The progenies of $TT \times PP-0$ had the highest total length and body weight value at 12 months of age. Furthermore, the fertilization cytology observation confirmed that the second polar body was retained in fertilized ovum by cold shock to produce triploid-type progenies.

Keywords polyploidy; ploidy identification; fertilization cytology; artificial induction; *Misgurnus anguillicaudatus*; *Paramisgurnus dabryanus*

(责任编辑:边书京)