

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00229

## 异源四倍体银鲫外周血和精巢的组织学特征

王 偲<sup>1,2</sup> 周 莉<sup>1</sup> 彭金霞<sup>1</sup> 桂建芳<sup>1</sup>

(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, 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 通过比较 D 系三倍体银鲫 (*Carassius auratus gibelio* Bloch) 与异源四倍体银鲫, 我们发现异源四倍体的外周血与精巢组织跟三倍体银鲫存在明显差异。HE 染色结果表明, 异源四倍体银鲫外周血红细胞有明显的分裂倾向。利用流式细胞术对 D 系三倍体银鲫与异源四倍体银鲫外周血的 DNA 直方图进行比较, 结果表明异源四倍体外周血的 DNA 直方图有两个主峰。此外, 我们观察到异源四倍体银鲫精巢的三种类型, 其中型精巢可以产生正常精子, 型可观察到精小囊结构, 但不能产生精子, 型精巢未发育出精小囊结构。进一步用银鲫 Vasa 抗体对精巢切片进行组织免疫荧光共聚焦显微分析, 结果表明, 型精巢的生殖细胞完成了减数分裂, 能观察到精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞, 以及大量位于精小管中间的精子细胞和精子; 而型精巢的生殖细胞不能完成第二次减数分裂, 精小囊中存在大量的初级和次级精母细胞, 没有精子细胞产生。研究丰富了对异源四倍体银鲫生物学性状的认识。

**关键词:** 银鲫; 异源四倍体; 红细胞; 流式细胞术; 精巢; Vasa

中图分类号: Q174 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)02-0229-07

鲫(*Carassius auratus*), 隶属于鲤科(Cyprinidae), 鲫属(*Carassius*), 是从天然种群中选择出的少数几种同一水域中同时存在两性生殖二倍体群体和单性生殖三倍体群体的脊椎动物之一。其中, 普通二倍体鲫染色体数目为 100 左右, 三倍体银鲫的染色体数目为 150 左右, 且不同的银鲫克隆具有不同的核型<sup>[1]</sup>, 有的具有 156 条染色体, 有的具有 162 条染色体<sup>[2]</sup>。与两性生殖的二倍体鲫不同, 三倍体银鲫具有极为特殊的双重生殖方式, 在应答同源银鲫精子和异源红鲤精子时分别采用有性生殖和雌核生殖的方式繁衍后代<sup>[1, 3]</sup>。在前期的研究中, 桂建芳等从红鲤精子激活的银鲫雌核发育后代中发现了极少数具有 212 条染色体的特殊个体<sup>[4]</sup>, 进一步进行基因组原位杂交实验以及 45S rRNA 在中期染色体上的定位分析, 证实该异源四倍体确实包含银鲫的全部染色体和鲤鱼的一套染色体<sup>[5]</sup>。由于异源四倍体银鲫在

育种中具有潜力, 我们已对其核型分析及产生的机制<sup>[4, 5]</sup>、生殖方式<sup>[6-8]</sup>、血红蛋白和红细胞的同工酶分析<sup>[9]</sup>进行了一些研究, 但仍然存在许多未解之谜。本研究采用组织切片 HE 染色观察和免疫荧光共聚焦显微分析, 并结合流式细胞仪技术, 研究了异源四倍体银鲫血细胞和精巢的组织学特征, 由此丰富了对异源四倍体银鲫生物学性状的认识。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

实验材料均取自中国科学院水生生物研究所关桥试验基地。品系分别为: 一龄二倍体彩鲫(Diploid color crucian carp, C)5 尾, 三龄雄性三倍体 D 系银鲫(Triploid gibel carp D clone, D)5 尾, 三龄雄性异源四倍体银鲫(Allotetraploid gibel carp, T)9 尾。

#### 1.2 血涂片的制作和 HE 染色

用肝素浸润的 1 mL 注射器尾静脉取血, 按常

收稿日期: 2011-02-04; 修订日期: 2011-11-28

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(NCYTX-49); 中国科学院知识创新重要方向项目(KSCX3-EW-N-04)资助

作者简介: 王偲(1984—), 男, 湖北武汉人; 硕士; 主要从事鱼类发育遗传学研究。E-mail: howangcai@gmail.com

通讯作者: 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

规方法制作血涂片。具体步骤如下: 吸取 3—5  $\mu\text{L}$  血液置于载玻片右端, 取一边缘光滑的盖玻片置于血滴前端, 轻轻触及血液, 使其沿盖玻片边缘扩展成线状。以 45°角向前匀速推进盖玻片, 制成血薄膜。待玻片完全干燥后进行 HE 染色, 显微镜成像系统观察, 照相。

### 1.3 组织的冰冻切片和 HE 染色

组织的冰冻切片与 HE 染色均参考文献[10, 11]的方法。具体步骤如下: 心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肌肉、精巢和脑组织在中段取材后切成 1—1.5  $\text{cm}^3$  的小块, 用 PBS 缓冲液漂洗后浸泡在 4% PFA/PBS 溶液中, 4℃过夜; 将组织块用 PBS 缓冲液漂洗两遍, 泡在 30%蔗糖/PBS 溶液中, 4℃过夜; 将组织切为小块, 用包埋剂包埋; 将冰冻切片机设置为-20℃, 切片厚度设置为 6  $\mu\text{m}$ , 切片, 37℃烘干, -20℃保存; HE 染色后显微镜成像系统观察, 照相。

### 1.4 组织切片免疫荧光共聚焦显微分析

切片免疫荧光共聚焦显微分析采用以前报道的方法<sup>[12, 13]</sup>, 具体步骤如下: 取出-20℃保存的切片, PBS 于 4℃复水; 5%奶粉/PBS 室温封闭; 银鲫 Vasa 一抗(1:500 稀释一抗于 1%奶粉/PBS)孵育过夜; PBST 漂洗, 10%正常羊血清/PBS 封闭; 二抗(1:50 稀释 FITC-羊抗兔 IgG 于 2%正常羊血清/PBS)孵育; 在避光条件下用 PBS 漂洗, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI/PBS 染核, PBS 漂洗后用 Leica 激光共聚焦显微镜观察, 拍照。

### 1.5 外周血 DNA 含量的测定

鲫外周血 DNA 倍性测定样品制备采用参考文献[14, 15]的方法。用流式细胞仪检测 PI 强度, 每样品至少检测  $10^4$  个细胞。流式细胞仪以二倍体彩鲫外周血作为二倍体内参, 设置电压; 在此电压条件下检测样品 DNA 含量相对值; 结果用流式处理软件 EXPO32 进行处理; 并以鸡血作为内参计算 DNA 含量绝对值, 计算方法参考文献[14, 15], 公式为:

$$\text{DNA 含量绝对值} = (\text{组织 DNA 含量相对值} / \text{鸡血 DNA 含量相对值}) \times 2.50 \text{ pg/nucleus}$$

所有流式结果 CV 值均不超过 8, 以保证数据的精确性; 利用 SAS 软件对所得结果进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 血细胞 HE 染色观察与 DNA 含量检测

与三倍体 D 系银鲫相比(图 1a1), 异源四倍体外周血涂片 HE 染色显示有大量具较小圆形细胞核及

具黏连细胞核的红细胞(图 1b1)。异源四倍体外周血 DNA 直方图显示两个主峰(图 1b2), 分别代表不同 DNA 含量的红细胞, DNA 含量绝对值分别为(3.93  $\pm$  0.06) pg/nucleus, 所占比例(53.4  $\pm$  19.8)%; (7.07  $\pm$  0.08) pg/nucleus, 所占比例(40.4  $\pm$  20.3)%。这一现象与正常 D 系三倍体银鲫外周血 DNA 直方图存在明显差异(图 1a2)。

### 2.2 精巢切片的 HE 染色观察

比较 D 系银鲫和异源四倍体银鲫, 除精巢组织外, 其他组织均未发现明显差异。在繁殖季节, D 系银鲫精巢的精小管内充满了精子细胞(图 2a1, a2)。而不同个体的异源四倍体雄性银鲫存在着三种截然不同的精巢类型。根据精巢的解剖结构, 我们将它们划分为 I 型、II 型和 III 型精巢。其中, I 型精巢与正常雄性 D 系银鲫精巢类似, 可产生大量精液。HE 染色表明, I 型精巢具有明显的精小囊结构(图 2b1), 每个精小囊可以由外而内依次观察到精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞以及内部的精子细胞和精子(图 2b2)。具有 II 型精巢的异源四倍体数量非常少, 我们仅发现一尾具 II 型精巢的异源四倍体银鲫雄鱼。II 型精巢与 I 型精巢是异源四倍体主要的精巢类型。异源四倍体的 III 型精巢呈现异常肥大, 且单侧发育。对 III 型精巢切片进行 HE 染色观察表明, III 型精巢具有明显的精小囊结构(图 2c1)。然而, 精小囊内部未观察到由减数分裂产生的精子细胞(图 2c2)。共观察到 3 尾具 III 型精巢的异源四倍体银鲫雄鱼。III 型精巢外观呈现细管状。HE 染色观察发现, III 型精巢没有明显的精小囊结构, 主要由结缔组织和体细胞组成, 处于未发育状态(图 2d1, d2)。共观察到 5 尾具 III 型精巢的异源四倍体银鲫雄鱼。

### 2.3 精巢切片免疫荧光共聚焦显微分析

RNA 解旋酶 Vasa, 作为动物种系细胞的标记基因, 仅存在于种系细胞而在性腺体系细胞中没有<sup>[12]</sup>。用银鲫 Vasa 抗体对三倍体银鲫 D 系精巢和异源四倍体 I 型与 II 型精巢进行免疫荧光共聚焦显微分析, 结果表明, 异源四倍体 I 型精巢结构与 D 系三倍体银鲫精巢相似。在精原细胞中可观察到很强的绿色荧光信号, 从初级精母细胞开始信号减弱, 到精子细胞几乎检测不到绿色荧光信号, 在体细胞中完全没有信号。同时, 在两种鱼的精小囊中都能观察到大量核被 PI 染为红色的精子细胞和精子(图 3a,b)。异源四倍体 I 型精巢能观察到少量精原细胞和大量

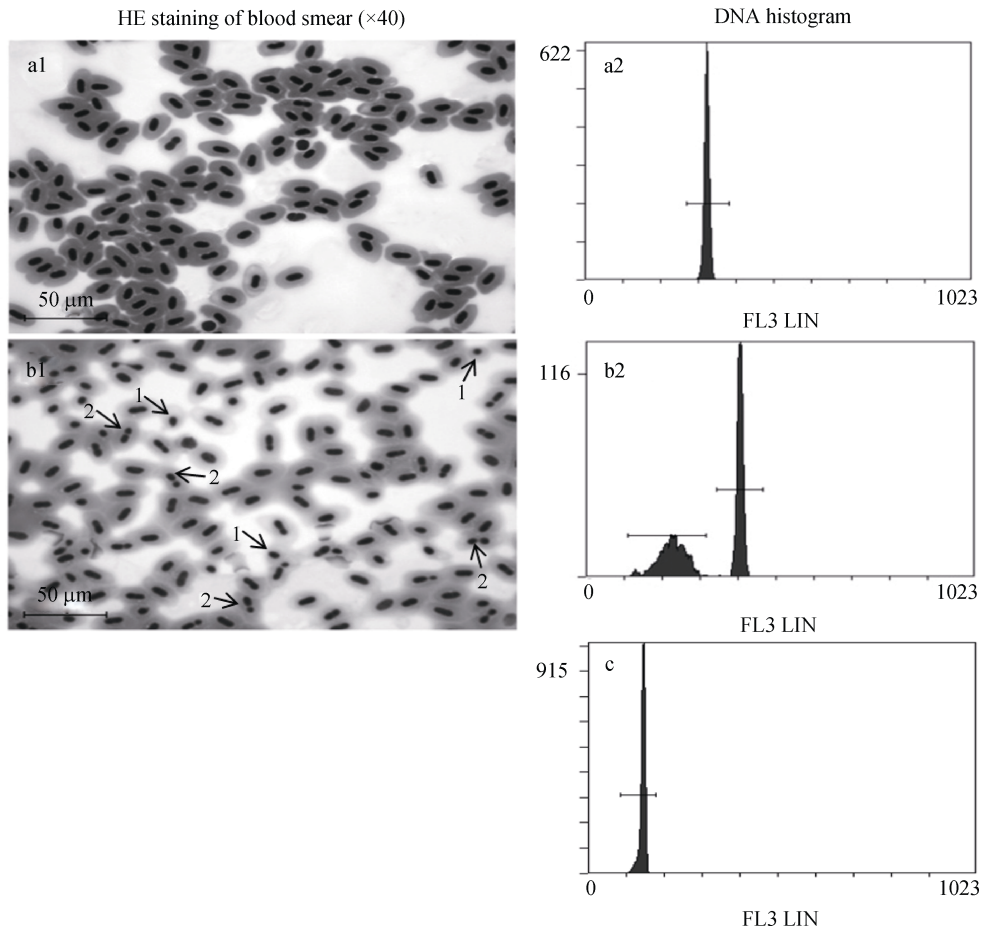


图 1 三倍体 D 系银鲫与异源四倍体银鲫外周血涂片的比较

Fig. 1 Comparison of peripheral blood of triploid gibel carp D clone and allotetraploid gibel carp

a1. 三倍体 D 系银鲫外周血涂片 HE 染色结果; a2. 三倍体 D 系银鲫外周血 DNA 含量直方图; b1. 异源四倍体银鲫外周血涂片 HE 染色结果; b2. 异源四倍体银鲫外周血 DNA 含量直方图; c. 鸡血外周血 DNA 含量直方图(内参)

a1. HE staining of blood smear of triploid (D clone) gibel carp; a2. DNA histogram of peripheral blood of triploid (D clone) gibel carp; b1. HE staining of blood smear of allotetraploid gibel carp; b2. DNA histogram of peripheral blood of allotetraploid gibel carp; c. DNA histogram of peripheral blood of chicken (internal control)

箭头 1(1) 示具有较小圆形细胞核的红细胞; 箭头 2(2) 示具有黏连细胞核的红细胞

1. Arrow 1(1) point to red cells with small, round nuclear; 2. Arrow 2(2) point to red cells with attached nuclears

初级精母细胞、次级精母细胞, 但精小囊中未见完成减数分裂产生的精子细胞和精子(图 3c)。

### 3 讨论

鱼类的外周血细胞与精子细胞都是非常特化的终端细胞, 其发生过程都具有复杂的机制。与刘少军等<sup>[16]</sup>和刘巧等<sup>[17]</sup>在四倍体鲫鲤和 Lu W T, *et al.*<sup>[18]</sup>在四倍体鲫鲂中观测到的现象相似, 在异源四倍体银鲫中观测到了大量异常的具有较小圆形细胞核的红细胞。此外, 本研究还观察到了具有黏连细胞核的红细胞, 表明部分异常红细胞可能是在外周血直接分裂产生的。尽管已有研究报道鲫鱼外周血可直接分裂<sup>[19]</sup>, 但我们观察的结果表明, 在正常 D 系三

倍体银鲫中, 外周血中分裂的红细胞所占比例非常低, 明显少于在异源四倍体中观察到的大量分裂细胞。外周血 DNA 含量直方图亦表明, 异常红细胞具有较小的 DNA 含量, 与正常红细胞及其各个分裂时期细胞 DNA 含量具有明显差别。此外, 直方图显示异常红细胞 DNA 含量 *CV* 值显著高于正常红细胞 ( $P < 0.05$ ), 表明异常红细胞代表的是一系列具有不同 DNA 含量值的细胞群。造成异源四倍体红细胞异常的原因尚不清楚, 但可能与异源四倍体红细胞较高的比容和细胞膜脆性有关<sup>[17]</sup>, 也可能与异源基因组的整入造成的细胞核不稳定性有关。此外, 伴随脊椎动物多倍化过程的一个普遍规律是红细胞体积增加<sup>[18, 20, 21]</sup>。Lu W T, *et al.*<sup>[18]</sup>推测, 红细胞体积的

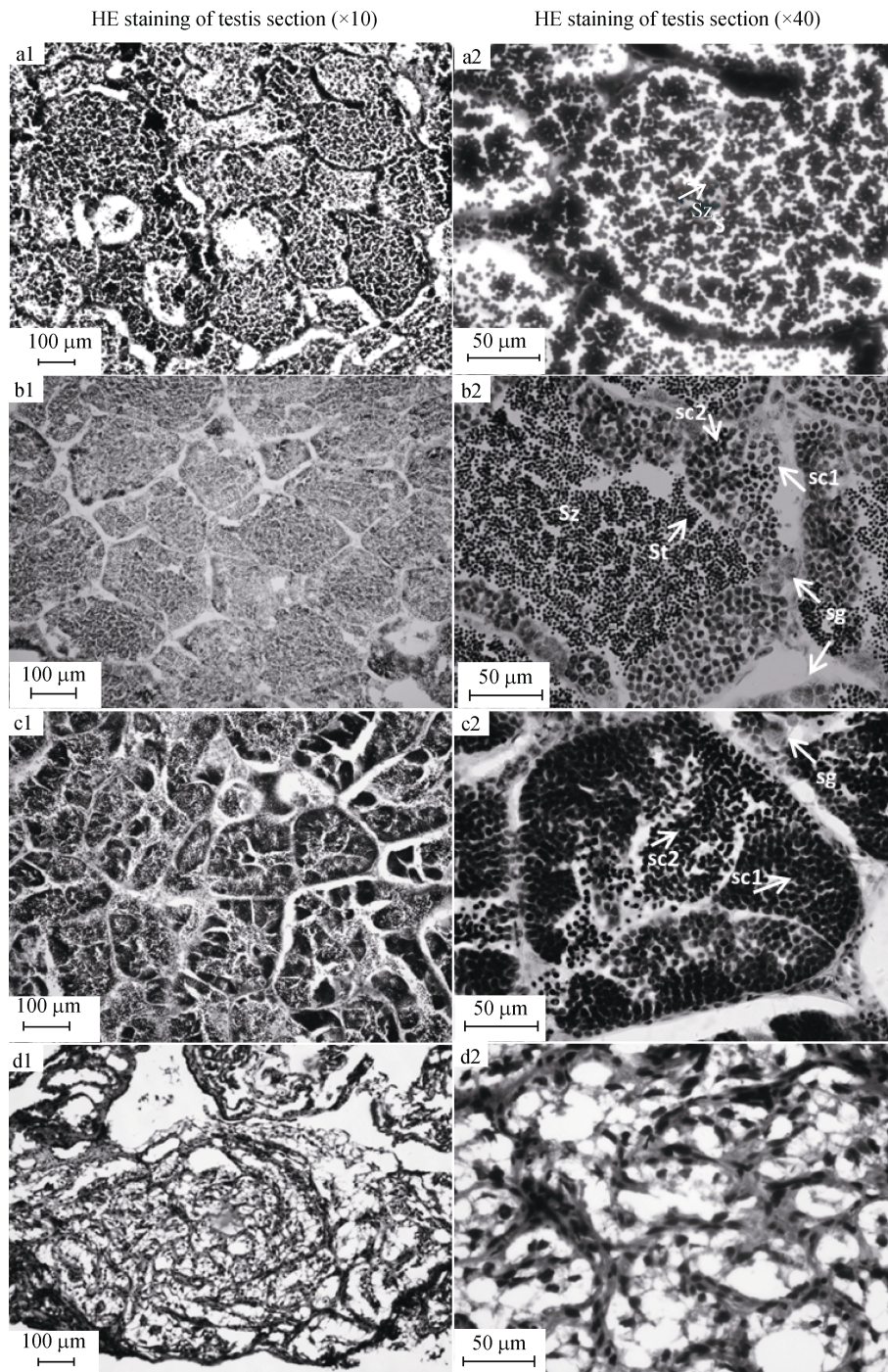


图2 三倍体D系银鲫与异源四倍体三种精巢类型的比较

Fig. 2 Comparison of testis of triploid gibel carp D clone and three testis types of allotetraploid gibel carp

a. 三倍体D系银鲫(D)精巢; b. 异源四倍体 型精巢; c. 异源四倍体 型精巢; d. 异源四倍体 型精巢; 1. 精巢切片 HE 染色结果 ( $\times 10$ ); 2. ( $\times 40$ )

a. testis section of triploid gibel carp D clone (D); b. section of type testis of all otetraploid gibel carp; c. section of type testis of allotetraploid gibel carp; d. section of type testis of allotetraploid gibel carp; 1. HE staining of testis section ( $\times 10$ ); 2. ( $\times 40$ )

箭头: sg. 精原细胞; sc1. 初级精母细胞; sc2. 次级精母细胞; st. 精子细胞; sz. 精子

Arrows: sg. Spermatogonium; sc1. Primary spermatocyte; sc2. Secondary speratocyte; st. Spermatid; sz. Spermatozoa

增加导致了相对表面积的降低, 从而影响了红细胞气体交换的效率, 异源四倍体银鲫外周血存在的异

常红细胞由于具有较小的体积, 可能在一定程度上减轻了这种不良影响。

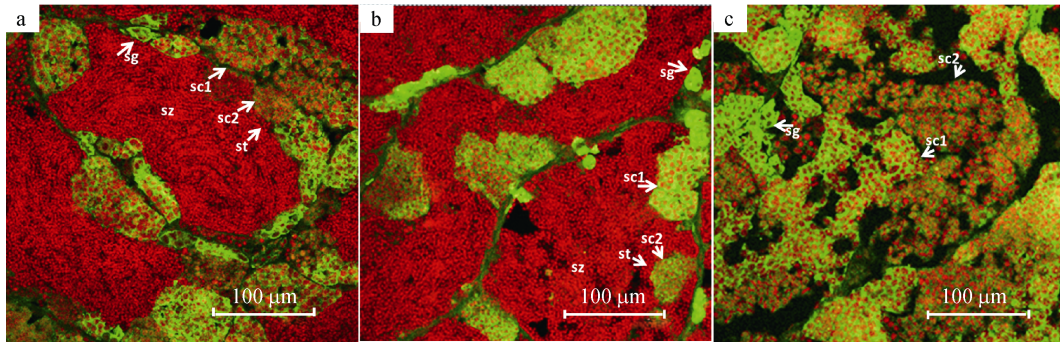


图3 三倍体D系银鲫与异源四倍体型和型精巢 vasa 免疫荧光共聚焦显微分析结果

Fig. 3 Vasa fluorescent immunostaining of testis of triploid gibel carp D clone and type and testis of allotetraploid gibel carp

a. 三倍体D系银鲫(D)精巢; b. 异源四倍体型精巢; c. 异源四倍体型精巢

a. testis section of triploid gibel carp D clone (D); b. section of type testis of allotetraploid gibel carp, c. section of type testis of allotetraploid gibel carp

箭头: sg. 精原细胞; sc1. 初级精母细胞; sc2. 次级精母细胞; st. 精子细胞; sz. 精子

Arrows: sg. Spermatogonium; sc1. Primary spermatocyte; sc2. Secondary spermatocyte; st. Spermatid; sz. Spermatozoa

刘筠等<sup>[22-24]</sup>报道培育了首例可稳定遗传的异源四倍体鲫鱼人工品系, 且证实可产生具有正常结构的精子, 但是这一品系与由一套鲤鱼染色体组渗入三倍体雌核发育银鲫产生的异源四倍体具有完全不同的产生机制<sup>[23, 24]</sup>。本研究表明, 绝大多数的异源四倍体银鲫雄性个体无法产生正常的精子, 且不育。精巢结构主要分为两种。型精巢可发育出完整的精小囊结构, 但生殖细胞无法产生正常的精子细胞和精子。型精巢则未见精小囊结构。vasa 是第一个被鉴定的银鲫种系细胞标记基因<sup>[12]</sup>, 用银鲫 vasa 为标记, 我们可以清楚地观察到, 异源四倍体银鲫型精巢完成了正常的减数分裂, 而型精巢被阻遏在第二次减数分裂过程之中。因此我们推测, 型精巢败育可能是由于初级精母细胞无法完成减数分裂造成的。进一步比较异源四倍体银鲫型和型精巢 fank1、sycp1、spoll 等减数分裂特异基因<sup>[25-27]</sup>的 RNA 及其蛋白表达和活化水平将有助于我们进一步理解雌核发育银鲫的精子发生机制。

#### 参考文献:

[1] Gui J F, Zhou L. Genetic basis and breeding application on clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio* [J]. *Science China Life Sciences*, 2010, **53**(4): 409—415 [桂建芳, 周莉. 多倍体银鲫克隆多样性和双重生殖方式的遗传基础和育种应用. 中国科学生命科学, 2010, **40**(2): 97—103]

[2] Zhou L, Gui J F. Karyotypic diversity in polyploid gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch [J]. *Genetica*, 2002, **115**(2): 223—232

[3] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2000, **51**(5): 498—506

[4] Gui J F, Liang S C, Zhu L F, et al. Discovery of multiple tetraploids in artificially propagated population of allogynogenetic silver crucian carp and their breeding potentialities [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1992, **37**(7): 646—648 [桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲, 等. 异育银鲫人工繁育群体复合四倍体的发现及其育种潜力. 科学通报, 1992, **37**(7): 646—648]

[5] Zhu H P, Gui J F. Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio* [J]. *Aquaculture*, 2007, **265**(1—4): 109—117

[6] Gui J F, Liang S C, Zhu L F, et al. Discovery of two different reproductive development modes of the eggs of artificial multiple tetraploid allogynogenetic silver crucian carp [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1993, **38**(4): 332—337 [桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲, 等. 人工复合四倍体异育银鲫卵子应答父本种精子和母本种精子两种不同发育方式的发现. 科学通报, 1992, **37**(11): 1030—1033]

[7] Gui J F, Liang S C, Zhu L F, et al. Preliminary confirmation of gynogenetic reproductive mode in artificial multiple tetraploid allogynogenetic silver crucian carp [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1993, **38**(1): 67—70 [桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲, 等. 人工复合四倍体异育银鲫雌核发育生殖方式的初步证明. 科学通报, 1992, **37**(9): 836—838]

[8] Yang Z A, Gui J F, Zhu L F, et al. Cytological studies on two differential development modes of the allogynogenetic silver crucian carp multiple tetraploid [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1994, **40**(1): 69—74 [杨仲安, 桂建芳, 朱蓝菲, 等. 复合四倍体异育银鲫两种不同生殖方式的细胞学观察. 动物学报, 1994, **40**(1): 69—74]

[9] Zhu L F, Gui J F. An analysis of haemoglobin and isozymes

- in the erythrocyte of multiple tetraploid allogynogenetic crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, **19**(1): 66—69 [朱蓝菲, 桂建芳. 复合四倍体异育银鲫的血红蛋白和红细胞的同工酶分析. 水生生物学报, 1995, **19**(1): 66—69]
- [10] Zhou L, Wang Y, Yao B, *et al.* Molecular cloning and expression pattern of 14 kD apolipoprotein in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, **142B**(4): 432—437
- [11] Li C Y, Wang Y, Zhou L, *et al.* Cloning of red-spotted grouper TSHb promoter and its localization expression in primitive gonad and pituitary of zebrafish embryos [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(4): 822—827 [李辰昱, 汪洋, 周莉, 等. 赤点石斑鱼促甲状腺激素 TSHb 启动子的克隆及其在斑马鱼胚胎原始性腺和垂体中定位表达. 水生生物学报, 2010, **34**(4): 822—827]
- [12] Peng J X, Xie J L, Zhou L, *et al.* Evolutionary conservation of Dazl genomic organization and its continuous and dynamic distribution throughout germline development in gynogenetic gibel carp [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2009, **312B**(8): 855—871
- [13] Sun M, Li Z, Gui J F. Dynamic distribution of spindlin in nucleoli, nucleoplasm and spindle from primary oocytes to mature eggs and its critical function for oocyte-to-embryo transition in gibel carp [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological genetics and physiology*, 2010, **313A**(8): 461—473
- [14] Wei W H, Zhang J, Zhang Y B, *et al.* Genetic heterogeneity and ploidy level analysis among different gynogenetic clones of the polyploid gibel carp [J]. *Cytometry Part A*, 2003, **56A**(1): 46—52
- [15] Ye Y Z, Zhou J F, Wang Z W, *et al.* Comparative studies on the DNA content from three strains of crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(1): 14—18 [叶玉珍, 周建峰, 王忠卫, 等. 三个鲫品系 DNA 含量的比较研究. 水生生物学报, 2004, **28**(1): 14—18]
- [16] Liu S J, Sun Y D, Zhou G J, *et al.* The ultrastructure of the mature testes and erythrocytes in allotetraploids of red crucian carp × common carp [J]. *Progress in Natural Science*, 2003, **13**(2): 194—197 [刘少军, 孙远东, 周工健, 等. 异源四倍体鲫鲤成熟性腺和红细胞超微结构观察. 自然科学进展, 2003, **13**(2): 194—197]
- [17] Liu Q, Wang Y Q, Liu S J, *et al.* Comparative studies on blood and blood cells of different ploidy level fishes [J]. *Progress in Natural Science*, 2004, **14**(10): 1111—1116 [刘巧, 王跃群, 刘少军, 等. 不同倍性鲫鲤鱼血液及血细胞的比较[J]. 自然科学进展, 2004, **14**(10): 1111—1116]
- [18] Lu W T, Liu S J, Long Y, *et al.* Comparative study of erythrocytes of polyploid hybrids from various fish subfamily crossings [J]. *Cell and Tissue Research*, 2009, **336**(1): 159—163
- [19] Zhu H W, Wang H, Qin G Q. Studies on the blood cell morphology of crucian carp [J]. *Zoological Study*, 1985, **6**(2): 147—156 [朱洪文, 王浩, 秦国强. 鲫鱼外周血细胞显微和亚显微结构的观察. 动物学研究, 1985, **6**(2): 147—156]
- [20] Deparis P, Beetschen J C, Jaylet A. Red blood cells and hemoglobin concentration in normal diploid and several types of polyploid salamanders [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1975, **50**(2): 263—266
- [21] Gao Z, Wang W, Abbas K, *et al.* Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2007, **147**(4): 1001—1008
- [22] Liu J, Liu S J, Sun Y D, *et al.* Ployploid hybrids of crucian carp × common carp [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2003, **5**(6): 3—6 [刘筠, 刘少军, 孙远东, 等. 多倍体鲫鲤. 中国农业科技导报, 2003, **5**(6): 3—6]
- [23] Liu S J, Liu J, Zhao G J, *et al.* The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. *Aquaculture*, 2001, **192**(2—4): 171—186
- [24] Sun Y D, Zhang C, Liu S J, *et al.* Induced interspecific androgenesis using diploid sperm from allotetraploid hybrids of common carp × red crucian carp [J]. *Aquaculture*, 2007, **264**(1—4): 47—53
- [25] Kleene K C. Patterns of translational regulation in the mammalian testis [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1996, **43**(2): 268—281
- [26] Iguchi N, Tobias J W, Hecht N B. Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up- and down-regulated [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, **103**(20): 7712—7717
- [27] Zhang Z, Zheng H, Yan W. Fank1 is a testis-specific gene encoding a nuclear protein exclusively expressed during the transition from the meiotic to the haploid phase of spermatogenesis [J]. *Gene Expression Patterns*, 2007, **7**(7): 777—783

## CHARACTERIZATION OF PERIPHERAL BLOOD CELLS AND TESTIS TISSUES OF ALLOTETRAPLOID GIBEL CARP

WANG Cai<sup>1,2</sup>, ZHOU Li<sup>1</sup>, PENG Jin-Xia<sup>1</sup> and GUI Jian-Fang<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a unique polyploid fish, is discovered to be able to reproduce by gynogenesis or sexuality reproduction. Since the allotetraploid gibel carp with 212 chromosomes were discovered from the gynogenetic offspring of gibel carp activated by red common carp sperm in 1990s, a lot of works have been done to study the genome organization and formation mechanism of them. The observations of genomic *in situ* hybridization and 45S rRNA gene localization on the allopolyploid metaphases showed the unusual allotetraploid gibel carp which contain the whole chromosomes of gibel carp and one chromosome set of common carp. However, the histological characterizations of allotetraploid gibel carp still remain unknown. In this study, we compared the histological features and found significant differences in peripheral blood cells and testis tissues between triploid (D clone) and allotetraploid gibel carp. The HE staining results showed that there were many abnormal red blood cells with small, round nuclear in the blood cell smear of allotetraploid gibel carp, which was obviously different from red blood cells with oval-shaped nuclear of triploid gibel carp. Moreover, the dual-nuclear red blood cells indicated a trend of cell division in peripheral blood of the allotetraploid gibel carp. Meanwhile, using the flow cytometry technique, we compared the DNA histogram of peripheral blood cells between triploid and allotetraploid gibel carp. The result revealed the existence of two kinds of cells with different DNA content in peripheral blood of allotetraploid gibel carp. In addition, we observed three testis types of allotetraploid gibel carp: Type I, wild type, which the sperm development was as normal as that of the male D clone gibel carp and large quantity of spermatids and sperms could be found in spermatogenic cysts; Type II, in which spermatids and sperms could not be observed in spermatogenic cysts; and Type III, lacking the structure of spermatogenic cysts. Among those three types, Type II and type III were the mainly forms of testis in allotetraploid gibel carp. To further study the characterizations of sperm development, fluorescent immunostaining was performed to compare different testis types of allotetraploid gibel carp by using the vasa antibody. The result revealed that germ cells in Type I testis could complete the meiosis process and produce a large number of spermatids and sperms in breeding season, while Type II testis was observed considerable quantities of primary and secondary spermatocytes without spermatids in its spermatogenic cysts, indicating that germ cells cannot complete the second meiosis process in Type II testis. The unique characterization of red blood cell and testis could broaden our understanding about allotetraploid gibel carp.

**Key words:** Gibel carp; Allotetraploid; Red blood cell; Testis; Flow Cytometry; Vasa