

二倍体雌核发育鲫鲤鱼子发生的 DNA 含量和细胞学分析

张 纯, 刘少军*, 伍艳红, 刘 筠

(湖南师范大学生命科学学院, 教育部蛋白质化学与鱼类发育生物学重点实验室, 湖南 长沙 410081)

摘要: 以产生单倍体卵子的二倍体雌性红鲫为对照, 对远缘杂交起源的二倍体雌核发育鲫鲤鱼早期卵巢组织中的生殖细胞进行了流式细胞术分析, 在此基础上结合组织学切片方法和染色体制片, 对相应的卵巢组织细胞学观察和生殖细胞减数分裂特征进行了探讨。结果显示, 雌核发育二倍体鲫鲤鱼母细胞的 DNA 含量呈现两个主要的峰值, 检测样本中的 2 号峰值显示的 DNA 含量是二倍体红鲫卵母细胞的 1 倍, 代表减数分裂前染色体数未加倍的细胞群, 其减数分裂 I 前期分裂相呈现同源染色体部分配对, 该细胞群在组织学切片上呈现空泡化等败育现象; 另外, 检测样本中的 3 号峰值显示的 DNA 含量是二倍体红鲫卵母细胞的 2 倍, 代表减数分裂前染色体数已加倍的细胞群, 其减数分裂 I 前期分裂相呈现染色体数目加倍的完整的染色体配对, 该细胞群由于染色体数加倍, 可以越过杂种鱼的异源染色体之间的减数分裂配对障碍, 正常发育为体积不断增大的初级卵母细胞, 为产生后续的染色体数不减半的二倍体卵子奠定基础。该结果丰富了不减数配子的发生机制研究, 在鱼类遗传育种方面具有重要意义。

关键词: 二倍体杂种鱼; 卵母细胞; 减数分裂; 不减数配子; 流式细胞术

中图分类号: Q 321⁺.3; S 917.4

文献标志码: A

红鲫 (*Carassius auratus red var.*) 和鲤 (*Cyprinus carpio*) 远缘杂交形成的异源四倍体鲫鲤鱼可以稳定地产生二倍体卵子和二倍体精子, 保证了其四倍体性代代相传, 目前已经繁殖到 F₂₂, 形成了数量庞大且遗传性状稳定的异源四倍体鲫鲤鱼群体^[1-4]。利用异源四倍体鲫鲤鱼产生二倍体卵子的特殊性, 在无需通过温度休克或者静水压处理等染色体数加倍操作的情况下, 该二倍体卵子仅需在紫外线灭活处理的异源精子的激活下, 即可进行雌核发育, 形成二倍体雌核发育鲫鲤鱼, 该方法明显提高了雌核发育鱼的存活率^[5]。值得一提的是, 该二倍体雌核发育鲫鲤鱼在外形和遗传特性上具有类似异源四倍体鲫鲤鱼的特征, 也能产生二倍体卵子, 这些二倍体卵子经灭活的异源精子诱导, 无需染色体加倍处理, 可继续形成二倍体雌核发育鲫鲤鱼。目前, 通过相同的方法已连续繁殖了 6 代, 建立了一个全雌可育的二倍体雌核发育

鲫鲤鱼克隆体系 ($2n = 100$)^[4]。该全雌二倍体雌核发育鲫鲤鱼需要两年达性成熟, 且能稳定地产生二倍体卵子, 为研究二倍体鱼产生染色体数不减半的二倍体配子提供了宝贵的材料。以前的研究表明, 全雌二倍体雌核发育鲫鲤的生殖细胞在卵原细胞时期发生了染色体数加倍^[6], 形成的卵子体积有 3 种大小^[7], 其中的二倍体卵子经雌核发育操作激活, 能正常排出第二极体^[7], 但目前仍缺少能直观反映生殖细胞倍性特征的 DNA 含量的数据。通过流式细胞术 (flow cytometry) 检测体细胞的 DNA 含量已广泛应用于水生生物的倍性研究^[8-11], 但对生殖细胞的 DNA 含量分析仅在少数有关多倍体发生的鱼类中受到关注, 如泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)^[12-14], 结合生殖细胞的细胞学观察分析其 DNA 含量的研究几无报道。

鱼类生殖细胞的发育一般需经历正常的减数

收稿日期:2014-09-14 修回日期:2014-11-10

资助项目:国家自然科学基金重大国际合作项目(31210103918);国家自然科学基金(31201980/30901100);湖南省生物发育工程及新产品研发协同创新中心项目(20134486);湖湘青年科技创新创业平台培养对象项目;湖南省科技计划(2014FJ3084)

通信作者:刘少军, E-mail:lsj@hunnu.edu.cn

分裂程序,最终形成染色体数和 DNA 含量都减半的单倍体配子。二倍性或者多倍性配子的产生是最终导致多倍体个体发生的原因之一,其发生过程中经历各生殖细胞发育阶段的 DNA 含量较单倍体配子发生过程中的 $2n$ 卵(精)原细胞、 $4n$ 初级卵(精)母细胞、 $2n$ 次级卵(精)母细胞、 n 精子细胞、 n 卵(精)子的 DNA 含量会有相应的倍性变化。可见,生殖细胞发育过程中倍性变化可以作为不同发育阶段生殖细胞的重要特征,是一种研究鱼类多倍体发生机制的重要指标。流式细胞仪对组织材料要求较高——必须易分离成单个的细胞且在检测通道中成单行通过,精巢组织具备这些特点,较易分离出单个精原细胞和各级精母细胞以及成熟的精子,且容易在检测通道中成单行通过,因而生殖细胞相关报道多集中在对雄性生殖细胞的流式细胞术检测^[9,12,14]。鱼类卵母细胞的发生由于受后期不断增大的体积和卵黄积累的影响,卵巢组织 DNA 含量报道很少^[13]。

为了进一步探讨二倍体雌核发育鲫鲤产生二倍体不减数卵子的细胞学机制,本实验以产生单倍体卵子的二倍体雌性红鲫做对照,对二倍体雌核发育鲫鲤的早期卵巢组织细胞进行了流式细胞术分析,在此基础上结合石蜡切片方法和染色体制片技术对相应的卵巢组织细胞学观察和生殖细胞减数分裂特征进行了分析。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

4月龄二倍体雌核发育鲫鲤(G)4尾和雌性红鲫1尾均取自湖南师范大学多倍体鱼繁殖与育种技术教育部工程研究中心,用于生殖细胞流式细胞术检测 DNA 含量,相应性腺组织进一步采用组织学切片和染色体制片进行组织学分析和染色体特征观察。

1.2 DNA 含量测定

用于检测样品 DNA 含量的仪器 (Partec GmbH) 为德国生产的流式细胞仪 (Cell Counter Analyser CCA2 II)。检测原理是经细胞裂解液裂解后,细胞内的 DNA 物质被荧光染料 DAPI 染色。通过一定波长紫外线照射,紫外线激活荧光分子使它们发出特定颜色的光。发出的荧光越多,表明细胞内 DNA 含量越多。在峰值分析图像中,X 轴代表 DNA 含量数量级,Y 轴代表测定

的细胞数,每一峰值代表一群 DNA 含量相同的细胞。所有实验样本以红鲫血液作为体细胞 DNA 含量标准。另外,经麻醉处理后,取 1 尾雌性红鲫和 4 尾二倍体雌核发育鲫鲤的少量卵巢组织分别放置盛有 0.5 mL 0.8% NaCl 的生理盐水中,用剪刀剪碎材料,移于离心管中,吹打;静置后取上层悬液,每 0.3 mL 悬液中加入 2 mL 细胞核提取液(由产商 Partec GmbH 提供),处理时间 10~15 min;样品经过滤器(由产商 Partec GmbH 提供)过滤;DNA 染色液(DAPI DNA 染色液,由产商 Partec GmbH 提供)染色样品约 5~10 min,最后上机测定。把各个样品的 DNA 含量与红鲫血细胞和生殖细胞的 DNA 含量进行比较,算出比值,用卡平方(χ^2)测定实际比值与理论比值间的最好适度(设 $P > 0.05$ 时,实得比与理论比没有显著差异)。

1.3 卵巢组织学切片观察

麻醉实验鱼后,取上述实验鱼的卵巢组织用于细胞学结构观察,卵巢组织在 Bouin 氏液中固定 1~2 d 后,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,H. E 染色。在显微镜下观察性腺组织发育情况,采用 Pixera pro 600ES(美国)数码显微摄像系统拍摄。卵巢发育分期按刘筠等^[15]采用的鲤科鱼类的分期标准。

1.4 卵巢染色体制片

取出 2 尾 4 月龄二倍体雌核发育鲫鲤的卵巢组织于盛有 0.8% 的生理盐水的培养皿中,用剪刀剪碎材料;移于离心管中,吹打;1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;收集的细胞沉淀在 0.075 mol/L KCl 低渗液中低渗 40~60 min;离心,收集沉淀;在甲醇和冰醋酸(3:1)混合液中固定,离心,再固定,重复 2~3 次;在冷冻的玻片上滴片,火焰干燥;Giemsa 染料染色。在显微镜下观察减数分裂相特征,采用 Pixera pro 600ES(美国)数码显微摄像系统拍摄。

2 结果

2.1 卵母细胞 DNA 含量测定

红鲫早期卵巢中卵母细胞的 DNA 平均含量呈现单峰值,与红鲫血细胞 DNA 平均含量比值为 1.76:1。G 早期卵巢中生殖细胞的 DNA 平均含量都呈现明显的双峰值。以 1 号个体(G-1)的峰值分析为例,其第 2 号峰值与红鲫的早期卵巢中卵母细

胞 DNA 平均含量比值为 1.09:1,其第 3 号峰值与红鲫的早期卵巢中卵母细胞 DNA 平均含量比值为

2.34:1,上述比值与预计的 2:1,1:1 和 2:1 理论比值间无显著差异($P > 0.05$)(图 1,表 1)。

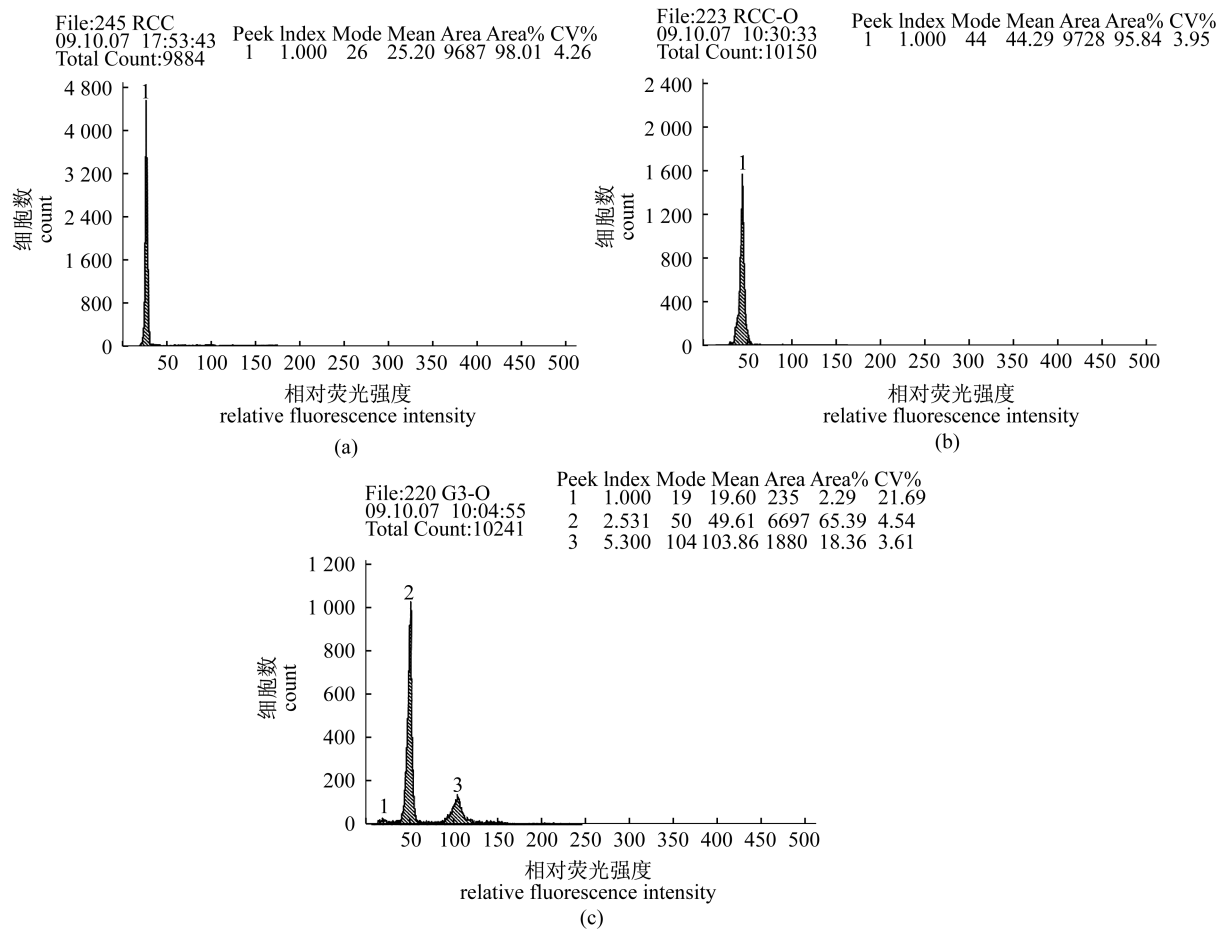


图 1 G-1 卵母细胞 DNA 平均含量测定

(a) 红鲫血细胞 DNA 平均含量(25.20,1 号峰)(对照 1); (b) 红鲫卵母细胞 DNA 平均含量(44.29,1 号峰)(对照 2); (c) G-1 卵母细胞 DNA 平均含量(49.61,2 号峰; 103.86,3 号峰)

Fig. 1 DNA contents of oocytes in G-1

(a) The mean DNA contents(25.20, Peak No. 1) of blood cells in red crucian carp as a control; (b) The mean DNA contents(44.29, Peak No. 1) of oocytes in red crucian carp as another control; (c) The mean DNA contents(49.61, Peak No. 2 and 103.86 Peak No. 3) of oocytes in red crucian carp in G-1

表 1 各实验材料 DNA 含量平均值
Tab. 1 Mean DNA contents(MDC) of all the materials

样本 sample	血细胞/卵母细胞 DNA 平均含量 MDC of blood cells or oocytes	与红鲫血细胞/卵母细胞 DNA 平均含量比值 ratio of MDC observed	与期望值的差异 difference of the ratio of MDC expected
红鲫 RCC	血细胞(25.20) blood cells(25.20)	-	-
	卵母细胞(44.29) oocytes(44.29)	与红鲫血细胞 DNA 平均含量比值为(1.76:1) compared with blood cells of RCC(1.76:1)	2:1*
二倍体雌核 发育鲫 G-1	卵母细胞第 2 号峰值(49.61) peak No. 2 of oocytes(49.61)	与红鲫卵母细胞 DNA 平均含量比值为(1.09:1) compared with oocytes of RCC(1.09:1)	1:1*
	卵母细胞第 3 号峰值(103.86) peak No. 3 of oocytes(103.86)	与红鲫卵母细胞 DNA 平均含量比值为(2.34:1) compared with oocytes of RCC(2.34:1)	2:1*

注:*. 实验比值和预期比值无明显差异($P > 0.05$)

Notes:*. The observed ratio is not significantly different($P > 0.05$) from the expected ratio

2.2 卵巢组织学观察

卵巢组织学切片结果显示,雌性红鲫和全雌二倍体雌核发育鲫早期性腺发育存在明显差异。4月龄红鲫卵巢组织学观察结果显示为同步发育的Ⅱ时相初级卵母细胞,且其体积较卵原细

胞已明显增大,而全雌二倍体雌核发育鲫的卵巢发育明显滞后,4月龄G卵巢组织学观察主要可见,早期体积没有增长的初级卵母细胞成团排列,并含有少数体积明显增大的Ⅱ时相初级卵母细胞和多数空泡化发育的卵母细胞团(图2)。

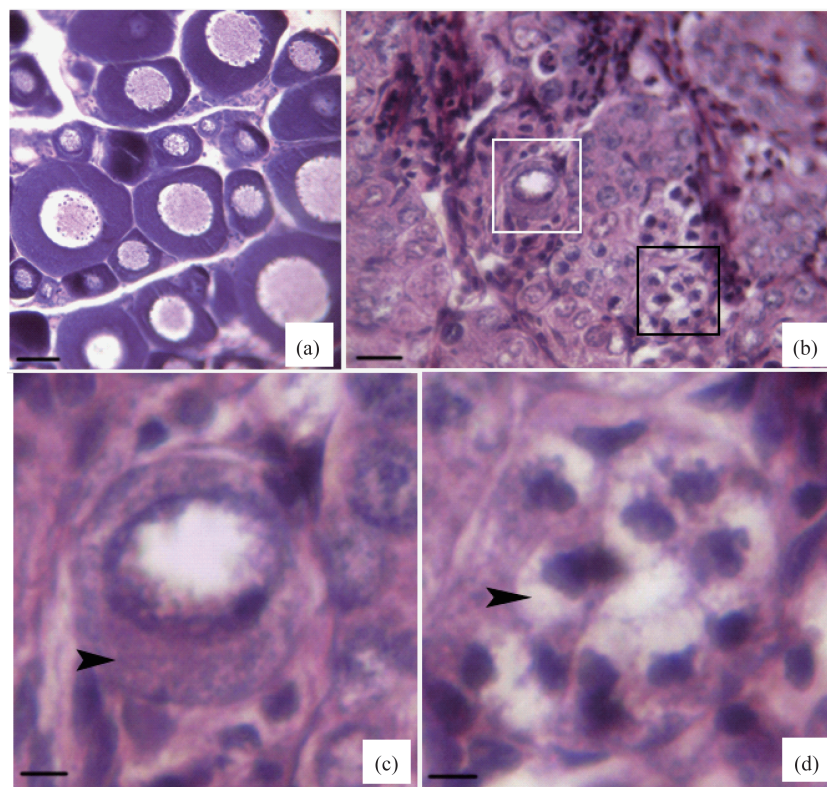


图2 二倍体雌核发育鲫和雌性红鲫性腺结构比较

(a)4月龄红鲫卵巢,显示发育同步的Ⅱ时相卵母细胞,标尺=25 μm; (b)4月龄G卵巢,主要可见早期初级卵母细胞成团排列,可见个别体积明显增大的初级卵母细胞(白色框)和空泡化的非正常发育卵母细胞团(黑色框),标尺=25 μm; (c)和(d)分别为(b)中白色框和黑色框的放大; (c)中箭头示体积增大的初级卵母细胞,标尺=5 μm, (d)中箭头示空泡化的初级卵母细胞,标尺=5 μm

Fig.2 Comparing the gonad microstructure of G with red crucian carp

(a) The ovary of red crucian carp at the age of 4 months showing primary oocytes in stage II in synchronous, Bar = 25 μm; (b) The ovary of G at the age of 4 months showing main smaller volume of primary oocytes arranged in nests and few larger volume of primary oocytes (indicated by white box), with some cavitation-like abnormal oocytes (indicated by black box), Bar = 25 μm, The photomicrographs white box and black box of (b) were higher magnification in (c) and (d), respectively. Bar = 5 μm

2.3 卵母细胞减数分裂观察

在二倍体雌核发育鲫卵巢组织的染色体制片观察中,获得了一些卵原细胞有丝分裂中期相和少量卵母细胞减数分裂I前期相。其中,卵原细胞有丝分裂中期相中可观察到卵原细胞发生了染色体数加倍现象^[6],本实验着重描述其初级卵母细胞减数分裂I前期的特征。在观察统计的50个减数分裂I前期分裂相中,约76%的分裂相呈现为同源染色体部分配对的粗线期相的特征,可见部分颜色深

染的粗线期染色体对及一些缠绕在一起的未配对的单丝状染色体(图3-a),也观察到了少量染色体完全配对,且整体染色体数明显加倍的减数分裂I前期分裂相(约占24%)(图3-b)。

3 讨论

本实验利用二倍体雌核发育鲫性腺发育迟缓的特点,较易取得卵母细胞发育小生长期以前的实验材料,该阶段卵母细胞体积小,无卵黄

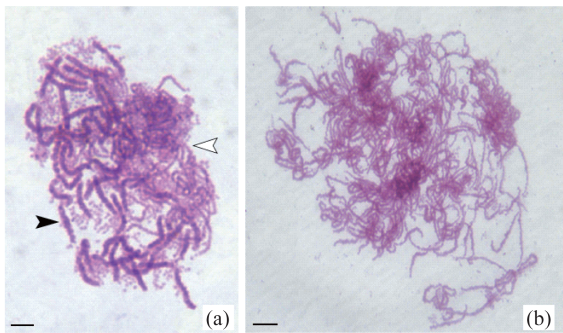


图 3 二倍体雌核发育鲫(G)卵母细胞
减数分裂 I 前期相中同源染色体配对观察

(a) 呈现同源染色体部分配对特征的减数分裂 I 前期分裂相,黑色箭头指配对的粗线期染色体对,白色箭头指未配对的单丝状染色体,标尺 = 3 μm ; (b) 染色体完全配对,但整体染色体数明显加倍的减数分裂 I 前期分裂相,标尺 = 3 μm

Fig. 3 Chromosome pairing of
oocytes in meiosis I of G

(a) Some oocytes at the pachytene stage exhibited partial pairing, with some thick and densely stained synaptonemal complexes (indicated by black arrowhead) and some thin, lightly stained chromosome elements (indicated by white arrowhead), Bar = 3 μm ; (b) Some other oocytes showed complete pairings, with chromosome-number doubled, Bar = 3 μm

积累,其小生长期状态可持续到 1 冬龄^[16]。因此,具有迟缓发育特征的性腺为检测鱼类早期卵巢组织对流式细胞术的适应性提供了合适的实验材料。结果表明,处于小生长期的初级卵母细胞经过简单的分离即可以通过流式细胞术检测,并快速简便地获得其 DNA 含量的数据,这在鱼类雌性生殖细胞倍性研究方面是一个新的探索,可为鱼类遗传育种实践提供有意义的经验指导。

本实验利用流式细胞术检测了二倍体雌核发育鲫早期卵巢组织细胞的 DNA 含量,发现其早期卵巢中卵母细胞的 DNA 平均含量都呈现明显的双峰值,其峰值显示的 DNA 含量分别为对照红鲫卵母细胞的 1 倍和 2 倍,结合相应细胞学观察结果可以推测,雌性 4 月龄红鲫性腺处于卵巢发育 II 期阶段,多为同步发育的 II 时相初级卵母细胞,其相应的 DNA 含量值代表 4n 红鲫初级卵母细胞的 DNA 含量,是本实验基本的参照标准。二倍体雌核发育鲫早期卵巢组织细胞的 DNA 含量的第 2 号峰值与红鲫 4n 初级卵母细胞 DNA 含量比值接近 1:1,推测为 DNA 含量与红鲫 4n 初级卵母细胞一致的减数分裂前未加倍的细胞群,其减数分裂 I 前期相呈现部分染色体配

对的特征(图 3-a),结果导致减数分裂被抑制,在切片上呈现空泡化等不正常发育现象(图 2-d);二倍体雌核发育鲫早期卵巢组织细胞的 DNA 含量的第 3 号峰值与红鲫 4n 初级卵母细胞 DNA 含量的比值接近 2:1,推测为减数分裂前 DNA 含量已加倍的细胞群,该细胞群由于染色体数加倍,越过了杂种鱼的异源染色体之间的减数分裂配对障碍,可以通过复制后的相同染色体间的配对,整体上形成染色体数加倍的完整配对(图 3-b),可正常发育为体积不断增大的初级卵母细胞(图 2-c),为产生后续的染色体数不减半的二倍体卵子奠定了基础。该结果也丰富了已有的不减数配子的发生机制研究^[15]。

另外,二倍体雌核发育鲫卵巢发育的不同步性和发育迟缓性与其产生不减数配子的特殊性密切相关。已有的研究表明,普通的二倍体种群,其卵巢发育组织学观察在个体发育 4~8 月龄阶段主要由 II 时相卵母细胞同步发育构成,如红鲫^[17]和鲤^[18],而同样为远缘杂交起源的异源四倍体鲫的卵巢在该阶段也主要为 II 时相卵母细胞同步发育的特征^[2,19],因为就产生配子的特征而言,异源四倍体鲫与红鲫和鲤一样,都是产生染色体数减半的配子,只是由于异源四倍体鲫本身的四倍性,其产生的是染色体数减半的二倍体配子,这中间不需要额外的 DNA 复制或者染色体数加倍的过程。本实验结果显示,二倍体雌核发育鲫的卵母细胞长期停滞在卵原细胞或者初级卵母细胞的小生长期阶段,很可能与杂种鱼在不减数配子发生前需经历较长的时间进行 DNA 复制或染色体数加倍有关^[20-21]。

不减数配子的发生是鱼类多倍体化的重要途径,相关的不减数配子的发生机制研究在鱼类遗传育种及生物进化研究中具有重要意义。

参考文献:

- [1] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, *et al.* The formation of tetraploid stocks of red crucian carp \times common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. *Aquaculture*, 2001, 192: 171-186.
- [2] Sun Y D, Liu S J, Zhang C, *et al.* The chromosome number and gonadal structure of $F_0 - F_{11}$ allotetraploid crucian carp [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(5): 414-418. [孙远东,刘少军,张纯,等. 异源四倍体鲫 $F_0 - F_{11}$ 染色体和性腺观察. 遗传学报, 2003, 30

- (5):414-418.]
- [3] Liu Y, Zhou G J. Cytological study on the gonadal development of F_1 hybrids produced by crossing *Carassius auratus* with *Cyprinus carpio* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1986, 10(2): 101-111. [刘筠, 周工建. 红鲫(♀) × 湘江野鲤(♂) 杂交一代生殖腺的细胞学研究. 水生生物学报, 1986, 10(2): 101-111.]
- [4] Liu S J. Distant hybridization leads to different ploidy fishes [J]. Science China: Life Science, 2010, 53(4): 416-425.
- [5] Liu S J, Sun Y D, Zhang C, et al. Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids red crucian carp × common carp [J]. Aquaculture, 2004, 236(1-4): 193-200.
- [6] 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(2): 136-144. [张纯, 孙远东, 刘少军, 等. 二倍体雌核发育鱼产生二倍体卵子的证据. 遗传学报, 32(2): 136-144.]
- [7] Liu S J, Duan W, Tao M, et al. Establishment of the diploid gynogenetic hybrid clonal line of red crucian carp common carp [J]. Science China: Life Science, 2007, 50(2): 186-193.
- [8] Liu S J, Qin Q B, Xiao J, et al. The formation of the polyploid hybrids from different subfamily fish crossing and its evolutionary significance [J]. Genetics, 2007, 176(2): 1023-1034.
- [9] Liu S J, Zhao R R, Liu J H, et al. Comparison of DNA content of blood cells and sperm among the different ploidy level fish [J]. Acta Zoologica Sinica, 2005, 5(2): 360-364. [刘少军, 赵如榕, 刘锦辉, 等. 不同倍性鱼的血细胞和精子 DNA 含量比较. 动物学报, 2005, 5(2): 360-364.]
- [10] Xiao J, Zou T M, Chen Y B, et al. Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters [J]. BMC Genetics, 2011, 12: 20.
- [11] Geng B, Sun X W. The application of flow cytometry on the DNA content and ploidy analysis of hydrophilic organisms [J]. Chinese Journal Fisheries, 2008, 21(2): 21-24. [耿波, 孙效文. 流式细胞术在水生生物 DNA 含量和倍性分析中的应用. 水产学杂志, 2008, 21(2): 21-24.]
- [12] Zhang C, Liu S J, Li T, et al. Polyploidization analysis of germ cells in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(10): 1502-1508. [张纯, 刘少军, 李涛, 等. 金鱼生殖细胞多倍化现象分析. 水产学报, 2010, 34(10): 1502-1508.]
- [13] Zhang Q Q, Arai K. Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Ichthyological Research, 1999, 46: 153-161.
- [14] Yoshikawa H, Morishima K, Fujimoto T, et al. Chromosome doubling in early spermatogonia produces diploid spermatozoa in a natural clonal fish [J]. Biology of Reproduction, 2009, 80: 973-979.
- [15] Liu Y. Propagation physiology of main cultivated fish in China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1993: 22-30. [刘筠, 中国养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 中国农业出版社, 1993: 22-30.]
- [16] Zhang C, Liu S J, Sun Y D, et al. Chromosomal studies of germ cells in diploid and polyploid fish produced by distant crossing [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2008, 41(1): 53-60. [张纯, 刘少军, 孙远东, 等. 远缘杂交形成的二倍体鱼和多倍体鱼生殖细胞染色体研究. 分子细胞生物学报, 2008, 41(1): 53-60.]
- [17] Wu H F, Sheng J Q, Hong Y J, et al. Gonadal development in natural wildness triploid mutant Pingxiang red-transparent crucian carp, *Carassius auratus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(6): 1185-1192. [吴会芳, 盛军庆, 洪一江, 等. 萍乡肉红鲫的性腺发育研究. 水生生物学报, 2009, 33(6): 1185-1192.]
- [18] Lin G H, Zhang F W. Studies on the ovarian development of Singuo red carp (*Cyprinus carpio* var. *Sinauonensis*) [J]. Journal of Jiangxi University: Natural Science, 1988, 12(3): 57-69. [林光华, 张丰旺. 兴国红鲤卵巢发育的研究. 江西大学学报: 自然科学版, 1988, 12(3): 57-69.]
- [19] Li J Z, Zhang X J, Liu S J, et al. Studies on the gonadal development in allotetraploid hybrids of *Carassius auratus* with *Cyprinus carpio* [J]. Acta hydrobiologica Sinica, 2002, 26(2): 116-122. [李建中, 张轩杰, 刘少军, 等. 异源四倍体鲫鲤的性腺发育研究. 水生生物学报, 2002, 26(2): 116-122.]
- [20] Ohno S. Evolution by gene duplication [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1970.
- [21] Dawley R M, Bogart J P. Evolution and ecology of unisexual vertebrates [M]. New York: Bulletin 466, New York State Museum, Albany, 1989: 1-18.

DNA contents and cytological analyses of oogenesis of the diploid gynogenetic progeny of allotetraploid hybrids

ZHANG Chun, LIU Shaojun^{*}, WU Yanhong, LIU Yun

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Fish Developmental Biology of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Formation of unreduced eggs has been reported in several interspecific hybrids of teleosts. These results suggested that a genomic conflict due to a hybrid event may trigger an atypical mode of reproduction, such as formation of unreduced gametes. The diploid gynogenetic progenys of allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus* var. red) × common carp (*Cyprinus carpio* L.) (abbreviated as G) produced diploid eggs, which have been identified by chromosomal counting of germ cells, fertilization observation of gametes and ploidy detection of progeny. In this paper, DNA contents and cytological studies on oogenesis of G was detected by Flow Cytometry, tissue sections and chromosomal observations, with diploid red crucian carp as controls. The results showed that the DNA contents of oocytes in G were showed with two main peaks. The peak one with the lower value was consistent and the other peak value was double with that of oocytes in RCC, which were deduced as different type of primary oocytes by tissue sections observations and chromosomal observations. The oocytes with lower peak values showed the mainly smaller volume of primary oocytes, in which there were some cavitation-like abnormal oocytes, exhibiting partical pairing at the pachytene stage, they were deduced as the primary oocytes without chromosomal doubling. Such other oocytes with higher peak values showed a few larger volume of primary oocytes in stage II, which could perform normal development with normal chromosomal pairing in meiosis I, and were deduced as the primary oocytes with chromosomal doubling. The results enriched the research data of mechanism of unreduced gametes, being of great significance in fish genetic breeding.

Key words: diploid hybrid fish; oocytes; meiosis; unreduced gamete; flow cytometry

Corresponding author: LIU Shaojun. E-mail: lsj@hunnu.edu.cn