



不同倍性鱼的 *gnih* 和 *gnih3* 差异表达分析

袁柳娇^{1,2}, 黄露^{1,2}, 范思宇^{1,2}, 李胜男^{1,2}, 周天^{1,2},
赵如榕^{1,2}, 陶敏^{1,2*}, 刘少军^{1,2*}

(1. 湖南师范大学省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 湖南长沙 410081;

2. 湖南师范大学生命科学学院, 多倍体鱼繁殖及育种技术教育部工程研究中心, 湖南长沙 410081)

摘要: 为研究促性腺激素抑制激素 (gonadotropin inhibitory hormone, GnIH) 及其受体 GnIHR 在不同倍性鲫鲤生殖发育过程中的作用, 实验通过 PCR 和 RACE 技术获得了二倍体红鲫和异源三倍体鲫的 *gnih*、*gnih3* 基因 cDNA 全长。结果显示, 2 种鱼 *gnih* 基因编码的蛋白序列均含有 GnIH 肽典型的 LPXRF 标志, *gnih3* 基因编码的蛋白为含有 7 个跨膜区的 G 蛋白偶联受体。采用实时荧光定量 PCR 分析了 2 种鱼的 *gnih*、*gnih3* 基因 mRNA 在不同组织中的表达情况, 结果显示 *gnih* 基因主要在下丘脑中高表达; *gnih3* 基因在下丘脑-垂体-性腺 (HPG) 轴中都有不同程度的表达; 此外, 无论是非繁殖期或繁殖期, *gnih* 基因在红鲫下丘脑中的表达量均高于异源三倍体鲫; 同时, *gnih3* 基因在红鲫下丘脑和垂体中的表达量均高于异源三倍体鲫, 但在卵巢中的表达则后者较高。利用组织原位杂交分析了 *gnih* 和 *gnih3* 基因在 2 种鱼下丘脑和垂体的组织定位情况, 结果发现, *gnih* 基因在 2 种鱼脑中 Npp、Npo、NLT 区均有明显杂交信号; *gnih3* 基因主要定位在这 2 种鱼垂体的 PPD、RPD 区, NH 和 PI 区杂交信号较弱; 同时, *gnih* 和 *gnih3* 基因在异源三倍体鲫中的杂交信号比红鲫弱。研究表明, 在下丘脑大量表达的 GnIH, 结合广泛分布于 HPG 轴的受体 GnIHR, 并通过多条途径参与调控性腺发育。*gnih*、*gnih3* mRNA 在 2 鱼组织中的表达存在差异性, 从分子水平提供了异源三倍体鱼不育的证据, 在鱼类繁殖生物学和遗传育种方面具有重要意义。

关键词: 异源三倍体鲫; *gnih*; *gnih3*; mRNA 表达; 不育

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

促性腺激素抑制激素 (GnIH) 是一种对脊椎动物生殖起抑制作用的下丘脑神经肽。自上个世纪 70 年代, 科学家发现促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 以来, 普遍认为 GnRH 是脊椎动物中唯一对垂体释放的促性腺激素 (gonadotropin hormone, GTH) 起调节作用的下丘脑调节剂^[1-2], GnRH 对生殖发育具有正

向调控功能已被证实多年。直至 2000 年, Tsut-sui^[3] 首次发现了 GnIH 存在于日本鹌鹑下丘脑-垂体系统中, 通过下调鹌鹑垂体细胞释放的 GTH 间接抑制生殖活动。随后也在其他鸟类、哺乳类等多种脊椎动物中被证实对生殖发育起负调控作用, GnIH 与其受体 GnIHR 结合, 通过作用于下丘脑 GnRH 间接地抑制 GTH, 包括促黄体

收稿日期: 2020-07-02 修回日期: 2020-08-20

资助项目: 国家自然科学基金 (31872551, 31730098, 31702328); 湖南省杰出青年科学基金 (2020JJ2022); 现代农业体系建设专项资金 (CARS-45); 111 计划 (D20007)

通信作者: 陶敏, E-mail: minmindiu@126.com; 刘少军, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

生成素 (luteinizing hormone, LH) 和促卵泡生成素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 的合成与释放^[4-6], 此外, GnIH 也能直接作用于垂体 GTH 细胞, 抑制激素的合成与分泌^[7-8]。已证实 GnIH 前体核苷酸序列能够编码 GnIH 肽及其两个相关肽 (GnIH-RP-1 和 GnIH-RP-2), 这 3 种肽的 C 端氨基酸序列都具有特性 LPXRF-a(Leu-Pro-X-Arg-PHE-NH₂; X=L or Q) 基序, 因此 GnIH 和它的两个相关肽也被称为 LPXRFa 肽或 RF 酰胺相关肽 (RFRPs)。在鱼类中, 首先在金鱼 (*Carassius auratus*) 下丘脑中发现 GnIH 肽, 目前正在鲤 (*Cyprinus carpio*)^[9]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[10]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[11]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[12]、比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*)^[8]、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[13] 等鱼类中鉴定出 *gnih* 基因或其同源序列。然而, GnIH/GnIHR 系统的作用机制及影响尚未深入阐明, 其在硬骨鱼类中更是缺乏相关研究。

红鲫 (*Carassius auratus red var.*)(2n=100, ♀) 与鲤 (2n=100, ♂) 交配形成 F₁, F₁ 中的少量可育后代自交形成 F₂^[14-15], F₂ 中能够产生二倍体配子的个体受精后获得两性可育的异源四倍体鲫鲤 (4n=200, F₃~F₂₉)。在获得异源四倍体鲫鲤的基础上, 用其产生的二倍体卵子进行无染色体加倍过程的雌核发育研究, 建立雌核发育二倍体鲫鲤克隆体系 (G₁~G₁₀), 并用其制备了两性可育的改良四倍体鲫鲤^[16]。以改良四倍体鲫鲤为父本, 改良二倍体红鲫为母本, 利用染色体倍性操作技术制备了具有生长速度快、肉质鲜嫩、抗逆性强、不育等优点的异源三倍体鲫 (湘云鲫 2 号)^[17]。异源三倍体鲫由于在减数分裂过程中发生了染色体配对紊乱, 从而导致不能正常产生成熟的配子, 为研究鱼类性腺发育调控提供了很好的实验材料。本实验拟通过分子克隆获得二倍体红鲫和异源三倍体鲫 *gnih* 和 *gnih3* 基因的 cDNA 全长序列; 采用实时荧光定量 PCR 比较分析了 2 种鱼的 *gnih*、*gnih3* 基因在不同组织中的表达情况, 重点研究不同倍性鱼雌鱼生殖轴中的表达差异; 并且通过组织原位杂交对 *gnih* 和 *gnih3* 基因在雌性红鲫、异源三倍体鲫的脑或垂体进行组织表达定位研究。该研究不仅有助于进一步了解 *gnih* 和 *gnih3* 在鱼类性腺发育中的调控作用, 还将在分子水平促进揭示异源三倍体鲫的不育机制研究, 在鱼类繁殖生物

学和遗传育种方面都具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

红鲫 (2n=100) 和异源三倍体鲫 (3n=150) 均取自湖南师范大学省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室。2019 年 12 月随机挑选生长状态良好的红鲫和异源三倍体鲫雌雄个体各 3 尾, 分别取个体脑、心脏、肾脏、肝脏、肌肉、精巢、卵巢、脾脏、垂体共 9 种组织。2020 年 3 月随机选取生长环境相同的雌性红鲫和异源三倍体鲫各 3 尾, 分别取脑、卵巢、垂体。

1.2 RNA 提取及 cDNA 第一条链获得

利用 Trizol 裂解液 (Invitrogen, USA) 的说明书分别提取“1.1”所取组织的总 RNA。RNA 完成提取后用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 检测其完整性, 并用酶标仪测定其浓度。符合标准的 RNA 保存于 -80 °C 备用。

以 1 μg 总 RNA 为模板, 用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, Japan) 合成 cDNA 的第一条链, 42 °C 作用 5 min 消除体系中的 DNA 污染; 37 °C 作用 20 min, 85 °C 作用 5 s, 完成反转录反应, 经 β-actin 检测合格后保存于 -20 °C 备用。

1.3 cDNA 编码区中间片段的克隆及末端扩增

根据 NCBI 搜索到的金鱼 (AML83913.1), 斑马鱼 (ADB43132.1) *gnih* 基因 cDNA 编码区保守序列, 金鱼 (AFY63169), 斑马鱼 (ADB43135) *gnih3* 基因编码区的保守序列, 分别设计简并引物 (表 1), PCR 扩增反应程序均为 94 °C 预变性 5 min, 35 个循环 (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s), 最终 72 °C 延伸 10 min。

用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测到, 在紫外切胶仪上用手术刀切下目的片段, 用生工生物公司 (上海) 提供的 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化后。根据说明书操作方法将回收的 DNA 片段连接到 PMD18-T 载体 (TaKaRa, Japan)。重组质粒转化到 *DH5α* 感受态细胞中, 经过菌液 PCR 检测为阳性克隆后, 送上海生工生物公司测序。

3' 末端的扩增 分别根据已克隆的 *gnih* 基因和 *gnih3* 基因中间片段序列合成特异 3'-RACE 正向引物 3R1/3R2, 3R3/3R4 (表 1)。首先以

表 1 实验所使用的引物

Tab. 1 Primers used for this study

引物 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	引物用途 usage
<i>gnih</i> -F	GGTTACGGCTCTCAGATTGC	<i>gnih</i> 中间片段PCR
<i>gnih</i> -R	TTTCTTCTGAGTCTGC2TACTGTTTC	<i>gnih</i> 中间片段PCR
<i>gnih3</i> -F	CTACCAGCACTCTCTGCCGACG	<i>gnih3</i> 中间片段PCR
<i>gnih3</i> -R	ACATCCCGTCAGGTCACCTTCG	<i>gnih3</i> 中间片段PCR
3R1	CGCTTCTAAGTCTACTATCAACC	<i>gnih</i> 3'-RACE
3R2	TTCTTTAGACCCCTTCCGTG	<i>gnih</i> 3'-RACE
3R3	CTGATGGTGGTGGCTCTGCTCT	<i>gnih3</i> 3'-RACE
3R4	TCCCTCTCTCTCACTGGCTGG	<i>gnih3</i> 3'-RACE
5R1	GCGGTCCCTTGGCTTCATCTGTG	<i>gnih</i> 5'-RACE
5R2	ACGGCTGCTGGTTGGGGCTACATTA	<i>gnih</i> 5'-RACE
5R3	ACAGCAATGGCAACCAATGTGAAAACGG	<i>gnih3</i> 5'-RACE
5R4	GACCAGAGCGTTCCCCATCAGACACA	<i>gnih3</i> 5'-RACE
3'-site adaptor	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC	3'-RACE
SMART II™ A oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG	5'-RACE
5'-CDS Primer A	(T)25VN (V=A/G/C; N=A/C/G/T)	5'-RACE
UPM(Mix)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT	5'-RACE
	GGTATCAACGCAGAGT(long)	
NUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC(short)	5'-RACE
	AAGCAGTGGT AACAACGCAGAGT	
<i>gnih</i> -QS1	CCACCATCTGCGACTTCAC	Real-time PCR
<i>gnih</i> -QA1	GCTGAGGGAGGTTGATAGTAGAC	Real-time PCR
<i>gnih3</i> -QS1	GTTTCGCTGCATCGTTTACC	Real-time PCR
<i>gnih3</i> -QA1	ACCATGACGTGCCCTTTCTC	Real-time PCR
β -actin-S	TCCCTTGCTCCTTCCACCA	内参基因
β -actin-A	GGAAGGGCCAGACTCATCGTA	内参基因
HISH-F	GATTGCCTTCTCTGATGACA	<i>gnih</i> 探针制备
HISH-R	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGG	<i>gnih</i> 探针制备
	TCAATGCACGGAAAGGGTCTA	
RISH-F	CATCGTTTACCGTTCAAGCC	<i>gnih3</i> 探针制备
RISH-R	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGG	<i>gnih3</i> 探针制备
	AAGAGCAGAGCCACCACCATCA	

卵巢总 RNA 为模板, 利用 3'-Full RACE Croe Set (TaKaRa, Japan) 中的 oligodT-3sites adaptor primer 进行反转录反应, 制备 3'-RACE 的模板, 然后进行巢式 PCR。用 3R1 或 3R3 和 3' sites adaptor

primer 进行第一次 PCR 扩增; 用 3R2 或 3R4 和 3' sites adaptor primer 进行第二次 PCR 扩增。

5'末端的扩增 使用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) 分离不同倍性

鱼 *gnih* 基因或者 *gnih3* 的 5' 末端。分别根据已克隆的 *gnih* 基因和 *gnih3* 基因中间片段序列合成特异 5'-RACE 反向引物 5R1/5R2, 5R3/5R4 (表 1)。首先以卵巢总 RNA 为模板, 使用 SMART II™ A oligo 和 5'-RACE CDS Primer A (表 1), PowerScript™ Reverse Transcriptase 进行反转录反应, 制备 5'-RACE 的模板, 然后进行巢式 PCR。用 5R1 或 5R3 和 UPM 进行第一次 PCR 扩增; 用 5R2 或 5R4 和 NUP 进行第二次 PCR 扩增。

通过将 3'-RACE 和 5'-RACE 的产物进行回收纯化、连接、转化、鉴定及测序, 获得了这两种鱼 *gnih* 基因和 *gnih3* 基因的全长 cDNA 序列。

1.4 序列比对及同源性分析

在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中搜索到 9 种代表性脊椎动物 GnIH 的氨基酸序列: 鲤 (KU647279.1)、斑马鱼 (ADB43132.1)、鲇 (*Clarias batrachus*: QGP73797.1)、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*: BAV18007.)、鼠 (*Rattus norvegicus*: NP_076442.1)、龟 (*Trachemys scripta*: BAS21336.1)、鹌鹑 (*Coturnix japonica*: BAB15932.1)、鸡 (*Callus gallus*: BAC87781.1)、人 (*Homo sapiens*: NP_071433.3)。

同时, 在 NCBI 中搜索到 7 种代表性脊椎动物 GnIHR3 或其同源物氨基酸序列: 斑马鱼 (ADB43135)、尼罗罗非鱼 (AIE89789)、鼠 (NP_071627.2)、鹌鹑 (BAD86818.1)、鸡 (BAE17050)、人 (NP_071429.1)、河豚 (*Takifugu rubripes*: BAF34887.1); 并从文献中查找到鲤 GnIHR3 氨基酸序列^[9]。

运用 BioEidt 软件分别对“1.3”中获得的 2 种鱼 *gnih* 基因和 *gnih3* 基因的全长 cDNA 序列进行比对分析并找到其开放阅读框; 用 DNAMAN 软件推导出相应的氨基酸序列, 并用 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 分别与上述搜索的鲤及斑马鱼的 GnIH 氨基酸序列、GnIHR3 氨基酸序列进行相似性比对; 运用 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cds.dtu.dk/Tools/serveices/TMHMM-2.0/>) 在线预测 GnIHR3 氨基酸序列的跨膜结构域; 分别利用 Mega 7.0 软件基于 11 个不同物种 GnIH 氨基酸序列、10 个不同物种 GnIHR3 氨基酸序列通过邻接法 (Neighbour-Joining, NJ) 构建系统进化树, 经过 1000 次 bootstrap 重复检测进化树的置信度。

1.5 *gnih*、*gnih3* 基因的表达分析

根据已测定的不同倍性鱼 *gnih*、*gnih3* 基因

编码区完全相同的序列分别设计实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 特异性引物 *gnih*-QS1/*gnih*-QA1、*gnih3*-QS1/*gnih3*-QA1 (表 1), β -actin 基因作为内参基因 (表 1)。采用 Real-time PCR 的方法研究 *gnih* 和 *gnih3* 基因 (β -actin 基因作内参) 在不同倍性鱼各组织的表达水平, 以及比较分析 *gnih* 和 *gnih3* 基因 (β -actin 基因作内参) 在不同倍性鱼生殖轴的表达差异。Real-time PCR 使用荧光染料 SYBR Premix Ex Taq™ II (ABI, USA), 反应及检测严格按照仪器操作程序在 Prism7500 Sequence Detection System (ABI, USA) 上进行。反应条件为 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 45 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析相对定量的结果, 用 GraphPad Prism 软件绘制柱状图分析, 得到不同倍性鱼的相对表达图谱。利用 SPSS19.0 软件的单因素方差分析组间显著性差异, 当 $P < 0.05$ 时认为有显著性差异。

1.6 *gnih*、*gnih3* 基因在不同倍性鲫鲤中的组织定位

材料固定与切片 取出实验材料鱼脑和垂体后, 用 4% 多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) (生工, 上海) 于 4 °C 固定 24 h。15%、20%、30% 蔗糖梯度脱水后用 OCT 冰冻切片包埋剂 Tissue Freezing Medium (Leica Biosystems, Germany) 包埋, 按照 Leica 公司的冰冻切片操作连续切取 16 μ m 厚切片, 载玻片采用多聚赖氨酸处理过的无酶防脱玻片 (生工, 上海)。

RNA 探针制备 基于 PCR 法^[18] 制备 *gnih*、*gnih3* 的 RNA 探针。用不同倍性鱼脑 cDNA 作为模板, 分别以 HISH-F/HISH-R、RISH-F/RISH-R 为引物 (表 1) 扩增出含有 T7 启动子的目的片段。扩增产物经回收、连接、转化、鉴定, 送生工生物 (上海) 公司测序, 序列经 BioEidt 比对确定正确后, 继续扩大 PCR 扩增体系至 300 μ L, 用浓度为 500~800 ng/ μ L 的 DNA 纯化产物作为体外转录的模板。用 DIG-RNA-labeling (Roche, Germany) 标记, T7 RNA 聚合酶 (Invitrogen, USA) 进行体外转录合成 RNA 探针。

组织原位杂交 切片经 4% PFA 二次固定后, 用 2 \times SSC 洗涤, 用含有 50% 去离子甲酰胺 (Sigma-Aldrich, USA) 的预杂交液于 60 °C 预杂交 3 h, 然后加入 DIG 标记的探针 (2~5 μ g/mL), 60 °C 过夜杂交。杂交结束后依次用 50% 去离子甲酰胺和 2 \times SSC、2 \times SSC、0.2 \times SSC 洗涤, 再用

含 anti-DIG 抗体 (Roche, Germany) 的封闭液过夜封闭。切片采用 NBT/BCIP(Roche, Germany) 染色, 显微镜观察 (Olympus, Japan) 杂交信号。

2 结果

2.1 *gnih*、*gnih3* 基因 cDNA 全长序列的克隆及分析

根据金鱼、斑马鱼 *gnih* 基因编码区保守核苷酸序列合成简并引物, 并以异源三倍体鲫和红鲫下丘脑 cDNA 为模板进行扩增, 均获得 497 bp 中间片段。通过 Blastn 比对可知, 该 497 bp 片段为硬骨鱼类 *gnih* 基因同源片段。对 2 种鱼 *gnih* 基因进行 3'-RACE 均获得 298bp 的片段, 5'-RACE 均获得 287 bp 的片段。通过序列拼接获得 2 种鱼的 *gnih* 基因全长 cDNA 序列均为 765 bp, 开放阅读框为 594 bp, 编码 197 个氨基酸。在红鲫、异源三倍体鲫 GnIH 氨基酸序列中预测到信号肽序列, 通过 GnIH 氨基酸序列比对结果, 发现红鲫、异源三倍体鲫、鲤、斑马鱼 4 种鲤科鱼类 GnIH 肽均含有 LPLRF、LPQRF、LPQRF 3 个基序(图 1),

构成 GnIH 成熟肽的 C 末端。

通过设计简并引物、扩增和测序拼接, 获得的红鲫 *gnih3* 基因的 cDNA 全长为 1 678 bp, 3'非编码区 (untranslated region, UTR) 为 186 bp; 获得的异源三倍体鲫 *gnih3* 基因的全长为 1 670 bp, 3' UTR 为 180 bp; 两种鱼 5' UTR 为 130 bp, 开放阅读框均为 1 362 bp, 编码 453 个氨基酸。运用在线软件预测发现 GnIHR3 氨基酸序列中存在 TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6、TM7 共 7 个跨膜区, 可见 GnIHR3 为一种 G 蛋白偶联受体。

2.2 GnIH、GnIHR3 同源性分析和分子进化树构建

利用 Clustal Omega 软件进行的 GnIH 氨基酸序列多重比对结果显示: 在所比较的 4 种不同鲤科鱼类中, 红鲫和异源三倍体鲫的序列相似度高达 98.98%, 其中任意两者之间的序列相似度达到 79.40% 以上(图 1)。基于 11 种不同物种的 GnIH 氨基酸序列, 利用 Mega 7.0 构建 NJ 系统进化树(图 2)。结果表明, 红鲫、异源三倍体鲫、

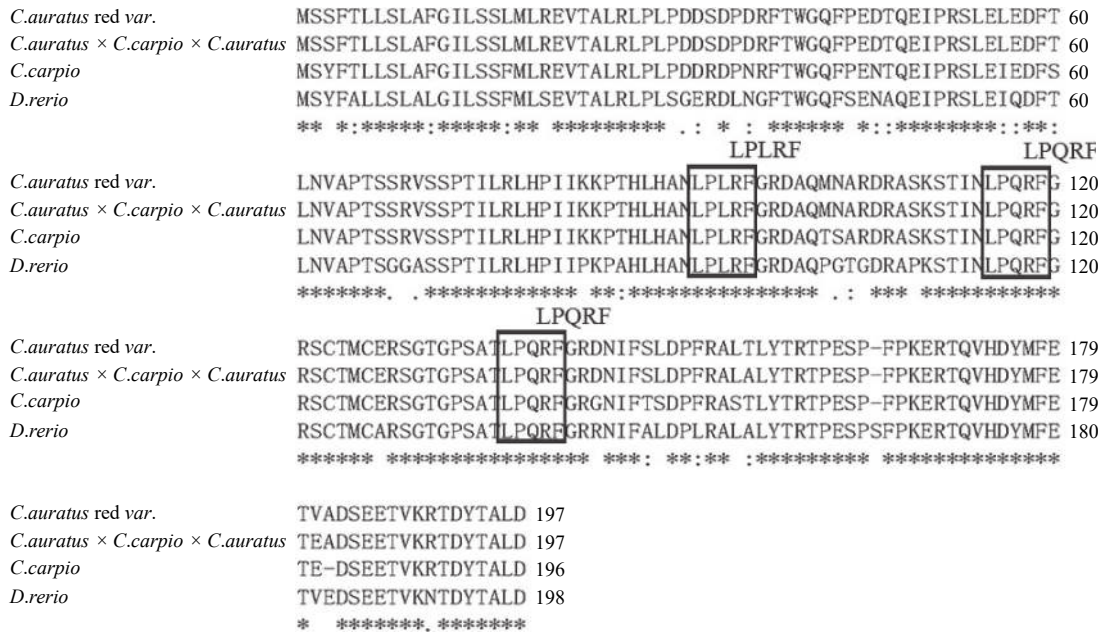


图 1 不同鲤科鱼类的 GnIH 氨基酸的同源性分析

“*”表示保守的氨基酸残基, “:”表示保守替换的氨基酸残基, “.”表示相似性氨基酸; 黑框分别表示 GnIH 肽含有的 LPLRF、LPQRF、LPQRF 三个基序 *C. auratus red var.*(红鲫: MT667267), *C. auratus x C. carpio x C. auratus*(异源三倍体鲫: MT667268), *C. carpio*(鲤: KU647279.1), *D. rerio*(斑马鱼: ADB43132.1)

Fig. 1 Homology analysis of GnIH protein in different Cyprinids

* is used to indicate highly conserved amino acid residue; : indicates conservative amino acid residue which was replaced, . represents similar amino acid; the black boxes indicate the three motifs of LPLRF, LPQRF and LPQRF contained in the GnIH peptide respectively. *C. auratus red var.* (MT667267), *C. auratus x C. carpio x C. auratus* (MT667268), *C. carpio* (KU647279.1), *D. rerio* (ADB43132.1).

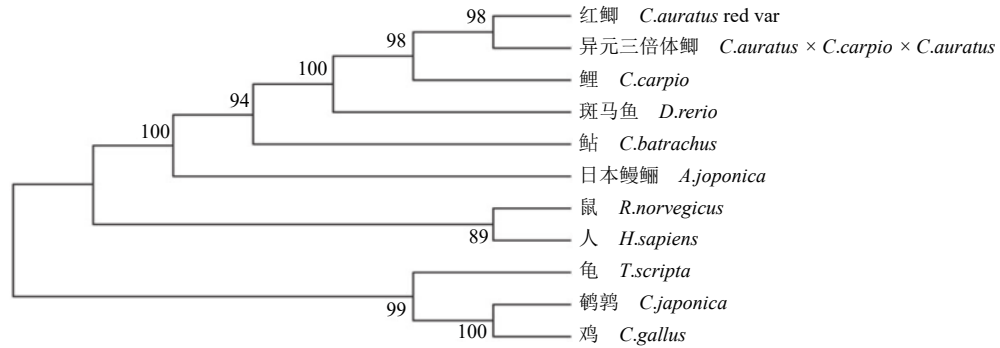


图 2 基于不同物种 GnIH 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic relationship of GnIH from different ploidy level fishes with that from other vertebrates by bootstrapping analysis using joining method

鲤、斑马鱼 4 种鲤科鱼类聚类为一支，与其他硬骨鱼类、爬行类、鸟类、哺乳类的分化较远。整个鱼类聚集为一个大支，其他非鱼类脊椎动物聚集为一个大支。

GnIHR3 氨基酸序列多重比对结果显示 (图 3)，在所比较的 4 种不同鲤科鱼类中，红鲫和异源三倍体鲫序列相似度为 99.34%，任意两种鱼类比较相似度达到 73.5% 以上，在鲤科鱼类中的保守性比 GnIH 略低。且在七个跨膜蛋白区最为保守。基于 10 种不同物种 GnIHR3 氨基酸序列，采用 Mega 7.0 构建 NJ 系统进化树 (图 4)。结果表明，红鲫、异源三倍体鲫、鲤、斑马鱼 4 种鲤科鱼类聚类为一支，与其他物种的分化较远。

2.3 *gnih*、*gnih3* 基因在不同倍性鱼的表达差异分析

采用实时荧光定量 PCR 对 6 月龄红鲫 (♀, ♂) 和异源三倍体鲫 (♀, ♂) 中下丘脑、心脏、肾脏、肝脏、肌肉、卵巢、精巢、脾脏、垂体等 9 种组织的 *gnih* 基因进行不同组织的表达差异分析，结果显示 *gnih* 基因主要在不同倍性鱼下丘脑中表达 (图 5)，在红鲫雌雄个体下丘脑的表达水平无显著性差异 ($P > 0.05$)，而在异源三倍体鲫雌鱼下丘脑中的表达水平显著高于雄鱼 ($P < 0.05$)；*gnih3* 基因在雌雄红鲫的 HPG 轴都明显表达，特别是在精巢中表达非常高，而在雌雄异源三倍体鲫的下丘脑和性腺中明显表达，在其垂体中有微弱表达 (图 6)。

采用实时荧光定量 PCR 对 *gnih*、*gnih3* 基因在非繁殖期和繁殖期不同倍性鱼 HPG 轴中的表达进行分析，结果显示 (图 7)，非繁殖期，*gnih* 基因在红鲫下丘脑中的表达水平显著高于异源

三倍体鲫 ($P < 0.05$)，但 2 种鱼的卵巢和垂体中的表达水平较低，且无显著差异 ($P > 0.05$)。繁殖期，*gnih* 基因在 2 种鱼下丘脑中的表达差异远比非繁殖期显著，在卵巢和垂体中的表达较非繁殖期无明显变化；非繁殖期，*gnih3* 基因在红鲫下丘脑和垂体中的表达水平显著高于异源三倍体鲫 ($P < 0.05$)，相反，*gnih3* 基因在红鲫卵巢中的表达水平显著低于异源三倍体鲫 ($P < 0.05$)。与非繁殖期相比，繁殖期时 *gnih3* 基因在 2 种鱼下丘脑的表达差异显著性升高，但在垂体中的表达差异显著性降低。

上述实验的溶解曲线 (dissociation curve) 显示，荧光实时定量 PCR 扩增时产物单一，符合实验标准和要求。

2.4 *gnih*、*gnih3* 基因在不同倍性鱼中的组织定位分析

通过显微镜观察 *gnih* 基因在红鲫和异源三倍体鲫脑中的定位情况 (图 8)，在由神经内分泌细胞形成并起调控生殖作用的重要区域，前围脑室核 (Npp)、视前核 (Npo)、侧结节核 (NLT) 中均观察到阳性信号，且二倍体红鲫脑中 *gnih* 杂交信号比异源三倍体鲫强。

通过显微镜观察 *gnih3* 在红鲫和异源三倍体鲫垂体中的定位情况 (图 9)，结果显示：红鲫垂体组织的吻端远侧部 (RPD)、近端远侧部 (PPD) 区域杂交信号最强，其次垂体中间部 (PI) 和神经垂体 (NH) 区域有比较弱的信号；在异源三倍体鲫垂体中，*gnih3* 探针在 RPD 和 PPD 区域也有少量杂交信号。但异源三倍体鲫垂体中 *gnih3* 探针的杂交信号比二倍体红鲫弱得多，这与上文 Real-time PCR 结果一致。

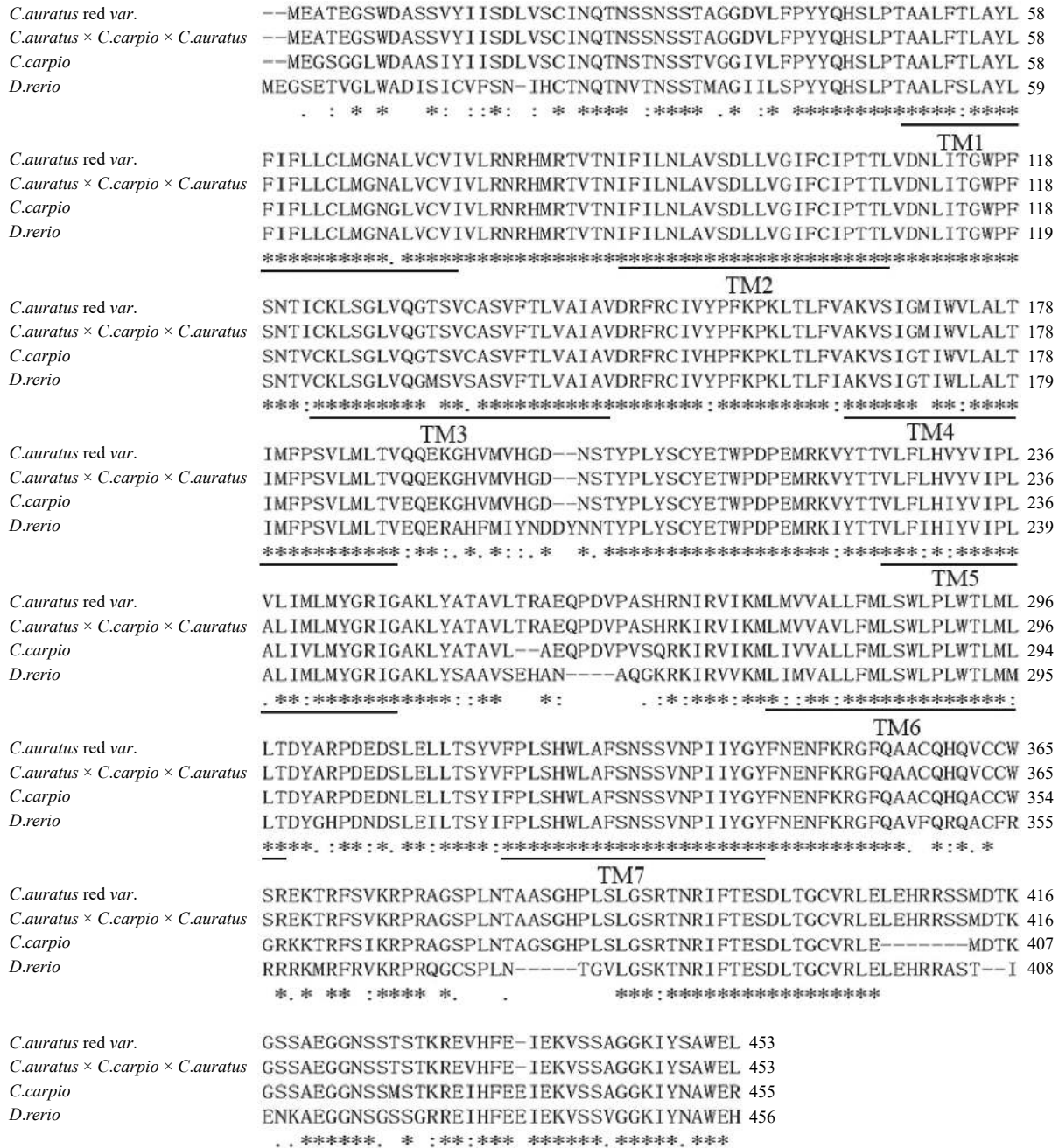


图 3 不同鲤科鱼类的 GnIHR3 氨基酸的同源性分析

“*”表示保守的氨基酸残基, “:”表示保守替换的氨基酸残基, “.”表示相似性氨基酸; 下划线分别表示 GnIHR3 肽中含有的 TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6、TM7 七个跨膜区 *C. auratus red var.* (红鲫: MT667269), *C. auratus × C. carpio × C. auratus* (异源三倍体鲫: MT667270), *C. carpio*(鲤)^[9], *Danio rerio*(斑马鱼: ADB43135)

Fig. 3 Homology analysis of GnIHR3 protein in different Cyprinids

* is used to indicate highly conserved amino acid residue; : indicates conservative amino acid residue, which was replaced, . represents similar amino acid; the underline indicates the seven transmembrane regions of TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 and TM7 in GnIHR3 peptide. *C. auratus red var.* (MT667269), *C. auratus × C. carpio × C. auratus* (MT667270), *C. carpio* ^[9], *D. rerio* (ADB43135)

3 讨论

异源三倍体鲫在不育性方面, 其个体、细胞和组织及分子特征是相似的。在个体水平上,

异源三倍体鲫其不育性表现为不能形成和产出正常的配子, 从而导致不能形成后代。在细胞和组织水平上, 异源三倍体鲫染色体生殖细胞中的同源染色体配对紊乱, 导致不能形成有生

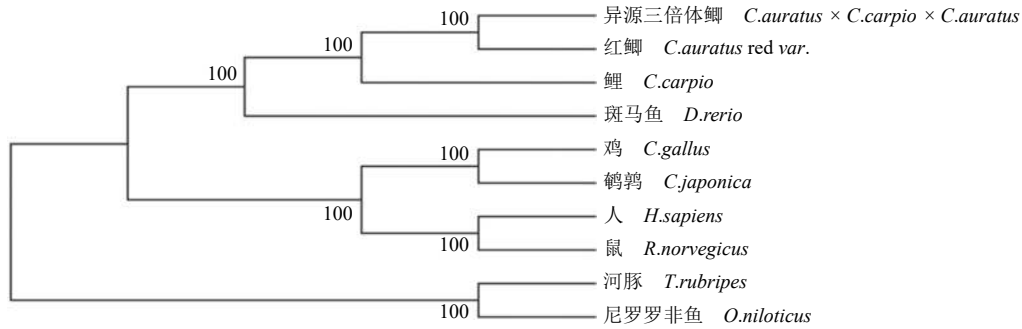


图 4 基于不同物种 GnIHR3 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic relationship of GnIHR3 from different ploidy level fishes with that from other vertebrates by bootstrapping analysis using joining method.

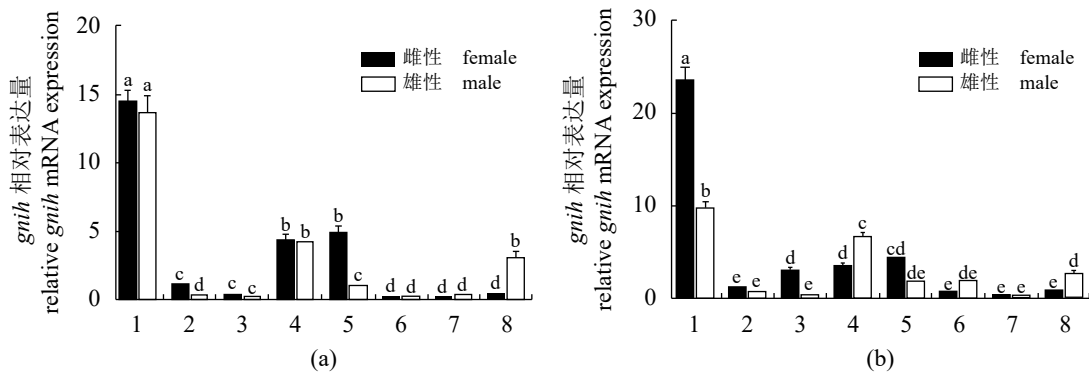


图 5 gnih 基因在红鲫和异源三倍体鲫 (♀、♂) 各组织中的 Real-time PCR 结果

1. 下丘脑; 2. 心脏; 3. 肾脏; 4. 肝脏; 5. 肌肉; 6. 性腺; 7. 脾脏; 8. 垂体. (a) gnih 基因在红鲫 (♀、♂) 各组织中的表达图谱; (b) gnih 基因在异源三倍体鲫 (♀、♂) 各组织中的表达图谱; 含不同字母代表组间有显著性差异 (P<0.05)

Fig. 5 Real-time PCR results of gnih gene in the tissues of red crucian carp and allotriploid crucian carp (♀, ♂)

1. hypothalamus; 2. heart; 3. kidney; 4. liver; 5. muscle; 6. gonad; 7. spleen; 8. pituitary. (a) expression map of gnih gene in tissues of red crucian carp (♀, ♂); (b) expression map of gnih gene in tissues of allotriploid crucian carp (♀, ♂); significant discrepancy between groups with different letters (P<0.05)

殖功能的配子^[19]; 在其性腺方面的不育性表现为, 其卵巢型、精巢型和脂肪型都是呈现败育的特征^[20]; 在垂体方面的不育性表现为, 在繁殖季节, 其垂体中的激素颗粒物质没有排出, 呈现内分泌失调的特征^[21]. 在分子水平上, 异源三倍体鲫的不育性表现为与生殖相关的多个基因如 *Dmc1*、*Gnrh2*、*Gth*、*Gthr*、*vasa* 等基因的表达都出现了异常^[22-24]. 因此不育三倍体鱼的不育性机制与其遗传 (染色体)、内分泌 (HPG 轴)、生殖 (性腺发育) 等一系列方面的异常性有密切联系。

以下丘脑-垂体-性腺轴 (HPG) 为核心的神经-内分泌网络系统调控鱼类的性腺发育和配子成熟^[25]. 已有研究表明, GnIH 在鸟类和哺乳类等多种脊椎动物中对 GTH 起抑制作用^[26-28]. 在鱼类中, 研究证明 GnIH/GnIHR3 系统在鲤 HPG 轴中

起负调控作用, 并存在 3 种 GnIHR 多肽, 其中 GnIHR3 广泛分布于 HPG 轴^[9]. 研究表明, 对生殖发育起促进作用的 *gnrh2*、*Gth*、*Gthr* 等基因已被证实异源三倍体鱼中表达异常^[23]. *gnih* 作为一种抑制生殖发育的 HPG 轴相关基因, 对其及受体基因进行组织表达分析在研究鱼类育性方面具有重要作用。

为了进一步探讨 GnIH/GnIHR3 对不同倍性鲫鲤生殖发育的影响, 本研究首次获得了二倍体红鲫、异源三倍体鲫的 *gnih*、*gnih3* 基因 cDNA 全长序列. 同源性分析结果表明, 2 种鱼 *gnih*、*gnih3* 基因编码的氨基酸序列相似度分别高达 98.98%、99.34%, 异源三倍体鲫和其原始母本二倍体红鲫 *gnih*、*gnih3* 基因序列存在差异可能是染色体配对时的交换重组导致的. 基于不同物

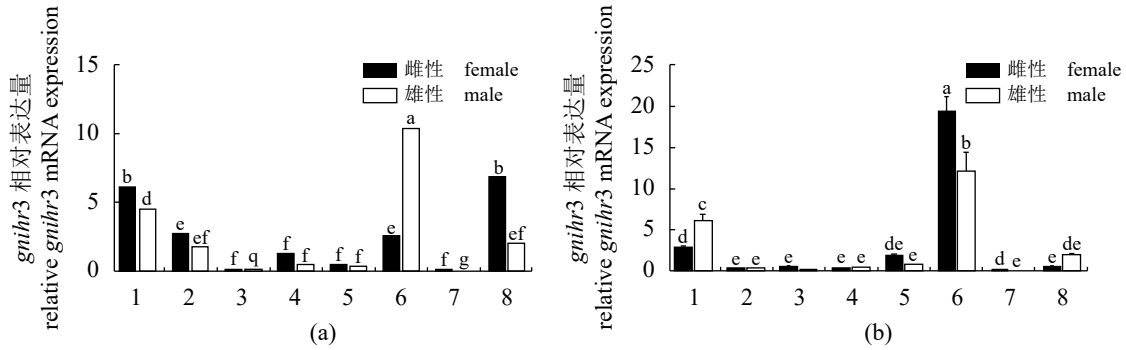


图 6 *gnih3* 基因在红鲫和异源三倍体鲫 (♀、♂) 各组织中的 Real-time PCR 结果

1. 下丘脑; 2. 心脏; 3. 肾脏; 4. 肝脏; 5. 肌肉; 6. 性腺; 7. 脾脏; 8. 垂体. (a) *gnih3* 基因在红鲫 (♀、♂) 各组织中的表达图谱; (b) *gnih3* 基因在异源三倍体鲫 (♀、♂) 各组织中的表达图谱; 含不同字母代表组间有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 6 Real-time PCR results of *gnih3* gene in the tissues of red crucian carp and allotriploid crucian carp (♀, ♂)

1. hypothalamus; 2. heart; 3. kidney; 4. liver; 5. muscle; 6. gonad; 7. spleen; 8. pituitary. (a) expression map of *gnih3* gene in tissues of red crucian carp (♀, ♂); (b) expression map of *gnih3* gene in tissues of allotriploid crucian carp (♀, ♂); significant discrepancy between groups with different letters ($P < 0.05$)

种 GnIH、GnIHR3 氨基酸序列分别构建的 NJ 系统进化树表明, 2 种蛋白在鲤科鱼类中均具有较高保守性。

本研究结果显示, *gnih* 基因在异源三倍体鲫各组织中的表达模式和红鲫基本一致, *gnih* 基因主要在不同倍性鱼的下丘脑中高表达。已有

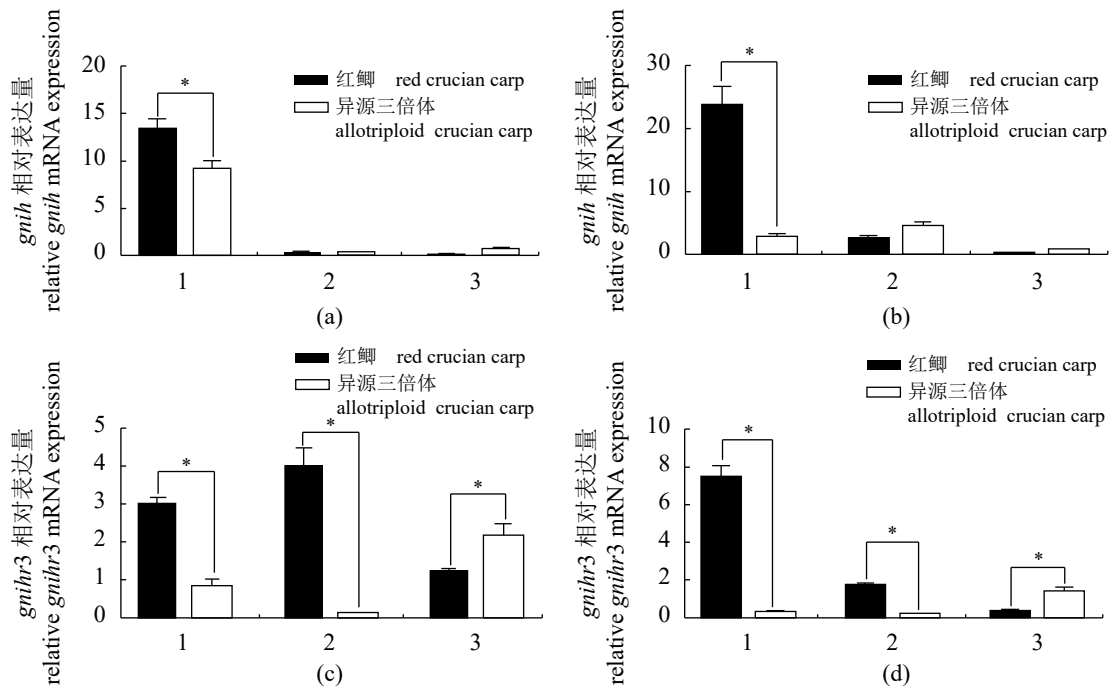


图 7 *gnih* 和 *gnih3* 基因在不同倍性鲫鲤生殖轴中的 Real-time PCR 结果

1. 下丘脑; 2. 垂体; 3. 卵巢. (a) *gnih* 基因在不同倍性鲫鲤非繁殖期生殖轴中的表达图谱; (b) *gnih* 基因在不同倍性鲫鲤繁殖期生殖轴中的表达图谱; (c) *gnih3* 基因在不同倍性鲫鲤非繁殖期生殖轴中的表达图谱; (d) *gnih3* 基因在不同倍性鲫鲤繁殖期生殖轴中的表达图谱. “*”表示组间有显著性差异

Fig. 7 Real-time PCR results of *gnih* and *gnih3* gene in reproductive axis of different ploidy fish

1. hypothalamus; 2. pituitary; 3. ovary. (a) expression map of *gnih* gene in reproductive axis of different-ploidy fish during non-breeding season period; (b) in reproductive axis of different-ploidy fish during breeding season period; (c) expression map of *gnih3* gene in reproductive axis of different-ploidy fish during non-breeding season period; (d) expression map of *gnih3* gene in reproductive axis of different-ploidy fish during breeding season period. * significant difference between groups

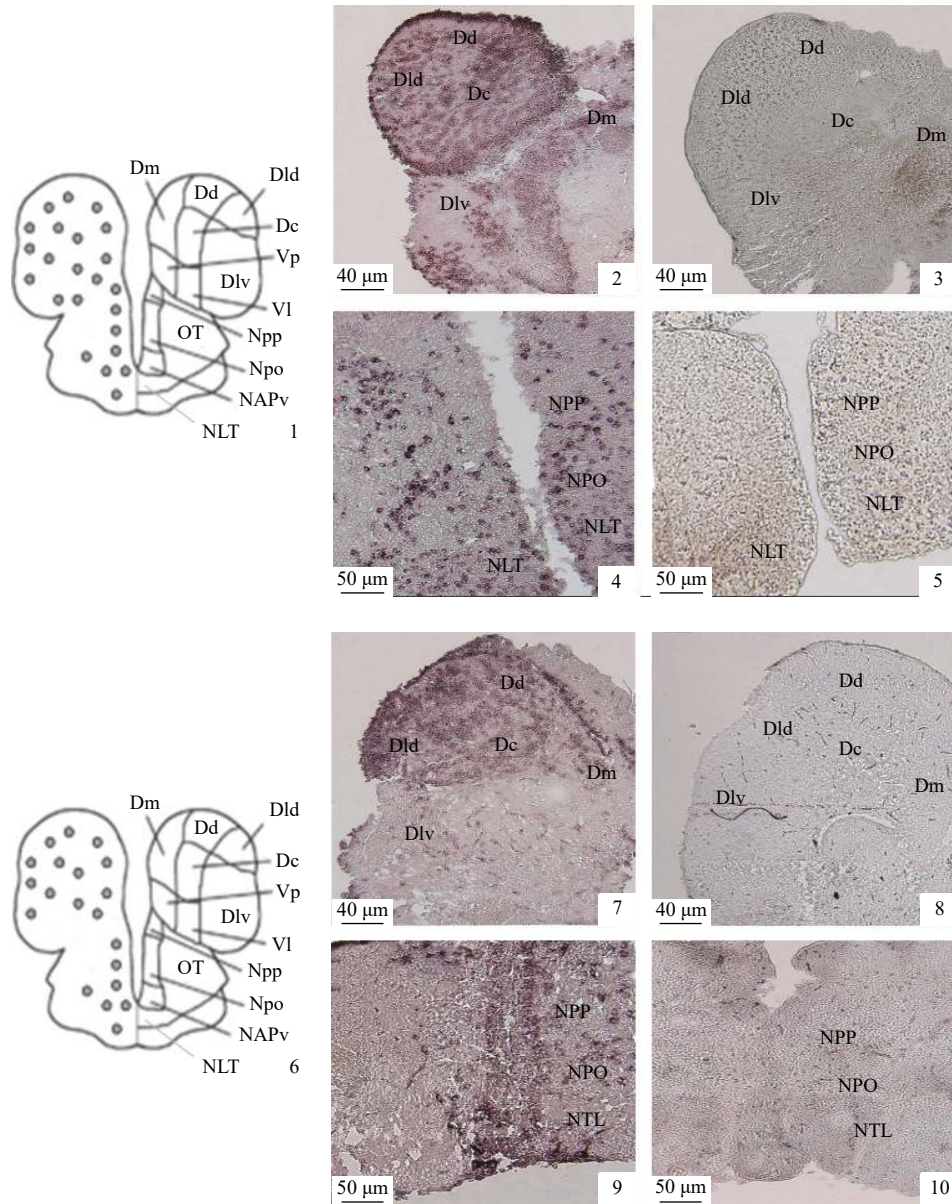


图 8 *gnih* 基因在红鲫和异源三倍体鲫脑中的定位及示意图 (组织原位杂交)

1. *gnih* 基因在红鲫脑中的定位示意图; 2, 4. *gnih* 基因在红鲫脑中的定位, 紫红色为杂交、信号点 (2, 4 比例尺分别为 40 μm 、50 μm); 3, 5. 阴性对照 (3, 5 比例尺分别为 40 μm 、50 μm); 6. *gnih* 基因在异源三倍体鲫脑中的定位示意图; 7, 9. *gnih* 基因在异源三倍体鲫脑中的定位, 紫红色为杂交信号点 (7, 9 比例尺分别为 40 μm 、50 μm); 8, 10. 阴性对照 (8, 10 比例尺分别为 40 μm 、50 μm).

Dm. 端脑背内侧部; Dd. 端脑背侧部; Dld. 端脑背外侧部; Dc. 端脑背内侧中部; Vp. 腹侧脑后部; Dlv. 端脑腹外侧部; Vl. 腹侧脑后外侧核; Npp. 前围脑室核; Npo. 视前核; OT. 视顶盖; NAPv. 室前核; NLT. 侧结节核

Fig. 8 Localization and schematic mapping of *gnih* gene in the brain of red crucian carp and allotriploid crucian carp (tissue in situ hybridization)

1. schematic mapping of *gnih* gene in red crucian carp; 2, 4. localization of *gnih* gene in the brain of red crucian carp, color of purple red as the hybrid signal point (the scale of 2 and 4 are 40 μm and 50 μm respectively); 3, 5. negative control (the scale of 3 and 5 are 40 μm and 50 μm respectively); 6. schematic mapping of *gnih* gene in allotriploid crucian carp; 7, 9. localization of *gnih* gene in the brain of allotriploid crucian carp, color of purple red as the hybrid signal point (the scale of 7 and 9 are 40 μm and 50 μm respectively); 8, 10. negative control (the scale of 8 and 10 are 40 μm and 50 μm respectively).

Dm. medial part of the dorsal telencephalon; Dd. dorsal part of the dorsal telencephalon; Dld. dorsolateral part of the dorsal telencephalon; Dc. central part of the dorsal telencephalon; Vp. ventralis telencephali pars postcoomissuralis; Dlv: ventrolateral part of the dorsal telencephalon; Vl. lateral nucleus of the ventral telencephalon; Npp. nucleus preopticus periventricularis; Npo: nucleus preopticus; OT. optic tectum; NAPv: nucleus anterior periventricularis; NLT. nucleus lateral tuberis

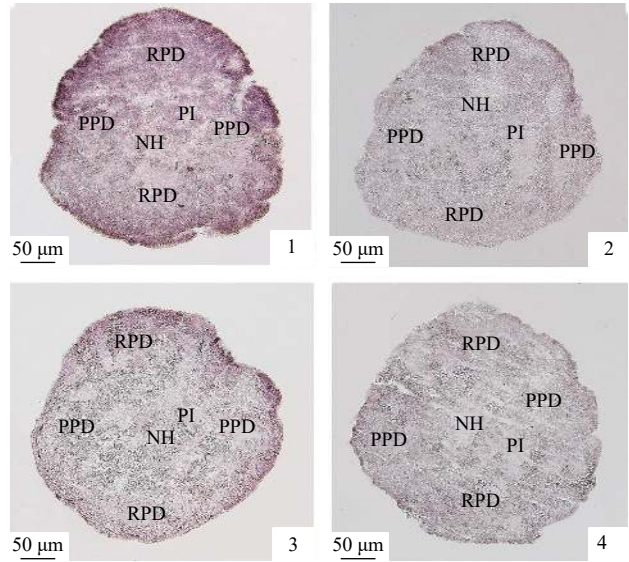


图 9 *gnih3* 基因在红鲫和异源三倍体鲫垂体中的定位 (组织原位杂交)

1. *gnih3* 基因在红鲫垂体中的定位, 紫红色为杂交信号点; 2. 阴性对照 (比例尺 50 μm); 3. *gnih3* 基因在异源三倍体鲫垂体中的定位, 紫红色为杂交信号点; 4. 阴性对照 (比例尺为 50 μm)

RPD. 吻端远侧部; PPD. 近端远侧部; PI. 垂体中间部; NH. 神经垂体

Fig. 9 Localization of *gnih3* gene in pituitary of red carp and allotriploid crucian carp (tissue in situ hybridization)

1. localization of *gnih3* gene in pituitary of red crucian carp, the color of purple-red is the signal point for hybridization; 2. negative control (the scale is 50 μm); 3. localization of *gnih3* gene in pituitary of allotriploid crucian carp, the color of purple-red is the signal point for hybridization; 4. negative control (the scale is 50 μm).

RPD. rostral pars distalis; PPD. proximal pars distalis; PI. pars intermedia; NH. neurohypophysis

研究表明, *gnrh2* 在非繁殖期异源三倍体鲫下丘脑中的表达水平比红鲫高^[29], 这可能与这一时期异源三倍体鲫 *gnih* 及其受体表达水平较低有关。由于三倍体激素分泌紊乱, 非繁殖期时 *gnih* mRNA 表达较低, 而不能正常下调 GnRH 激素表达水平。*gnih3* 基因在不同倍性鲫鲤 HPG 轴均有不同程度的表达, 其中在雌性二倍体红鲫的垂体中具有显著表达, 异源三倍体鲫 *gnih3* 在卵巢中具有较高的表达。繁殖期, *gnih*、*gnih3* 基因在不同倍性鱼种生殖轴的表达差异性比非繁殖期显著。研究表明, GnIH/GnIHR3 可能作为类固醇生成和配子发生的自分泌/旁分泌调节剂在性腺水平起作用, 并且可能于不同时间范围在下丘脑-垂体-性腺轴 (HPG 轴) 的所有水平上起作用。因此, 我们推测在下丘脑大量表达的 GnIH, 结合广泛分布于 HPG 轴的受体 GnIHR, 并通过多条途径参与调控这 2 种鱼的性腺发育。

鱼类中, sGnRH 神经元已在证实存在于端脑腹侧、Npp、Npo、NLT 区^[7,30], Npo 和 NLT 与鱼类的生殖内分泌关系十分密切^[31]。GnIH 在生殖调控中发挥着重要作用, 组织原位杂交结果显示 *gnih* 在脑中的分布位置说明其与 GnRH 神

经元接触紧密, 有着相同的定位区域, 表明不同倍性鱼 GnIH 在脑中对 GnRH 的释放起直接作用; *gnih3* 杂交信号主要集中在垂体的 PPD、RPD 区, GTH 细胞主要存在该区域, 推测 GnIH 能够与结合于垂体 GTH 细胞上的 GnIHR3 直接接触起作用。同时, 本研究结果显示 *gnih*、*gnih3* 基因在不同倍性鱼雌性 HPG 轴的表达存在差异, 在异源三倍体鲫中表达异常可能与其不育性有关, 在分子水平为雌性异源三倍体鲫的不育提供了证据。

参考文献 (References):

[1] Tsutsui K. A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): biosynthesis, mode of action and functional significance[J]. *Progress in Neurobiology*, 2009, 88(1): 76-88.

[2] Li X, Su J, Lei Z H, et al. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its receptor in the female pig: cDNA cloning, expression in tissues and expression pattern in the reproductive axis during the estrous cycle[J]. *Peptides*, 2012, 36(2): 176-185.

[3] Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, et al. A novel avian

- hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2000, 275(2): 661-667.
- [4] Tsutsui K, Ubuka T, Bentley G E, *et al.* Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect[J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2012, 177(3): 305-314.
- [5] Qi X, Zhou W Y, Li S S, *et al.* Evidences for the regulation of GnRH and GTH expression by GnIH in the goldfish, *Carassius auratus*[J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2013, 366(1): 9-20.
- [6] Aliaga-Guerrero M, Paullada-Salmerón J A, Piquer V, *et al.* Gonadotropin-inhibitory hormone in the flatfish, *Solea senegalensis*: molecular cloning, brain localization and physiological effects[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2018, 526(2): 349-370.
- [7] Mable B K. Polyploids and hybrids in changing environments: winners or losers in the struggle for adaptation?[J]. *Heredity*, 2013, 110(2): 95-96.
- [8] Ubuka T, Inoue K, Fukuda Y, *et al.* Identification, expression, and physiological functions of siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(1): 373-385.
- [9] Peng W, Cao M X, Chen J, *et al.* GnIH plays a negative role in regulating GtH expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 235: 18-28.
- [10] Zhang Y, Li S S, Liu Y, *et al.* Structural diversity of the gnih/gnih receptor system in teleost: Its involvement in early development and the negative control of LH release[J]. *Peptides*, 2010, 31(6): 1034-1043.
- [11] Shahjahan M, Ikegami T, Osugi T, *et al.* Synchronised expressions of LPXRFamide peptide and its receptor genes: seasonal, diurnal and circadian changes during spawning period in grass puffer[J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2011, 23(1): 39-51.
- [12] Wang Q Q, Qi X, Guo Y, *et al.* Molecular identification of GnIH/GnIHR signal and its reproductive function in protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 216: 9-23.
- [13] 刘权. 半滑舌鲷 GnIH 和 kisspeptin 系统鉴定及其生理功能研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- Liu Q. Identification of gonadotropin-inhibitory hormone and kisspeptin systems and their physiological roles in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017(in Chinese).
- [14] 刘筠, 周工健. 红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)杂交一代生殖腺的细胞学研究[J]. *水生生物学报*, 1986, 10(2): 101-108.
- Liu Y, Zhou G J. Cytological study on the gonadal development of F₁ hybrid produced by crossing *Carassius auratus* L. (♀) with *Cyprinus carpio* (♂)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1986, 10(2): 101-108(in Chinese).
- [15] 刘少军. 鱼类远缘杂交 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- Liu S J. Fish Distant Hybridization[M]. Beijing: Science Press, 2015(in Chinese).
- [16] 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 in China Series C: Life Sciences*, 2007, 50(2): 186-193.
- [17] Chen S, Wang J, Liu S J, *et al.* Biological characteristics of an improved triploid crucian carp[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2009, 52(8): 733-738.
- [18] Hua R F, Yu S S, Liu M G, *et al.* A PCR-based method for RNA probes and applications in neuroscience[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2018, 12: 266.
- [19] 张纯, 何晓晓, 刘少军, 等. 四倍体鲫鲤、三倍体湘云鲫染色体减数分裂观察[J]. *动物学报*, 2005, 51(1): 89-94.
- Zhang C, He X X, Liu S J, *et al.* Chromosome pairing in meiosis I in allotetraploid hybrids and allotriploid crucian carp[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(1): 89-94(in Chinese).
- [20] 刘少军, 胡芳, 周工建, 等. 三倍体湘云鲫繁殖季节的性腺结构观察[J]. *水生生物学报*, 2000, 24(4): 301-306.
- Liu S J, Hu F, Zhou G J, *et al.* Gonadal structure of triploid crucian carp produced by crossing allotetraploid hybrids of *Carassius auratus* red var. (♀)×*Cyprinus carpio* (♂) with Japanese crucian carp (*Carassius auratus caviere* T. ET S)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(4): 301-306(in Chinese).
- [21] Long Y, Liu S J, Huang W R, *et al.* Comparative studies on histological and ultra-structure of the pituitary of different ploidy level fishes[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2006, 49(5): 446-453.
- [22] Tao M, Liu S J, Long Y, *et al.* The cloning of *Dmcl*
- 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 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.
- [23] Long Y, Tao M, Liu S J, *et al.* Differential expression of *Gnrh2*, *Gth β* , and *Gthr* genes in sterile triploids and fertile tetraploids[J]. *Cell and Tissue Research*, 2009, 338(1): 151-159.
- [24] Yu F, Zhong H, Liu G, *et al.* Characterization of vasa in the gonads of different ploidy fish[J]. *Gene*, 2015, 574(2): 337-344.
- [25] Liu S J. Distant hybridization leads to different ploidy fishes[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(4): 416-425.
- [26] Tobarí Y, Iijima N, Tsunekawa K, *et al.* Identification of gonadotropin-inhibitory hormone in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*): Peptide isolation, cDNA cloning and brain distribution[J]. *Peptides*, 2010, 31(5): 816-826.
- [27] Paullada-Salmerón J A, Cowan M, Aliaga-Guerrero M, *et al.* LPXRFa peptide system in the European sea bass: A molecular and immunohistochemical approach[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2016, 524(1): 176-198.
- [28] Paullada-Salmerón J A, Cowan M, Aliaga-Guerrero M, *et al.* Testicular steroidogenesis and locomotor activity are regulated by gonadotropin-inhibitory hormone in male European sea bass[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0165494.
- [29] 龙昱. 不同倍性鲫鲤鱼脑垂体细胞结构和 HPG 轴相关基因的表达及育性研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2009.
- Long Y. Studies on cellular structure of pituitaries and expression of related genes of HPG axis in different ploidy cyprinids and their relationship with fertility[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2009(in Chinese).
- [30] Baby S M, Ueck M, Rao P D P. Gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons and associated nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase-positive neurons in the brain of a teleost, *Rhodeus amarus*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, 120(1): 44-54.
- [31] Breuckmann A, Paris F, Schreiber M P, *et al.* Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the brain and pituitary of adult and juvenile swordtails (*Xiphophorus helleri*, Teleostei, Poeciliidae)[J]. *Journal of Morphology*, 1996, 230(1): 55-67.

Comparative analysis of expression of *gnih* and *gnih3* genes in different ploidy fishes

YUAN Liujiào^{1,2}, HUANG Lu^{1,2}, FAN Siyu^{1,2}, LI Shengnan^{1,2}, ZHOU Tian^{1,2},
ZHAO Rurong^{1,2}, TAO Min^{1,2*}, LIU Shaojun^{1,2*}

(1. State Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

2. Engineering Research Center of Polyploid Fish Reproduction and Breeding of the State Education Ministry, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: In order to study gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) and its receptor encoded by *gnih* and *gnih3* genes in gonadal development of different ploidy cyprinid fish, molecular cloning and comparative expression patterns of *gnih* and *gnih3* genes in diploid red crucian carp and allotriploid crucian carp were carried out. By PCR and RACE technology, the full-length cDNA sequences of *gnih* and *gnih3* genes of diploid red crucian carp and allotriploid crucian carp were obtained. Our data showed the amino acid sequences of GnIH encoded by *gnih* gene of red crucian carp and allotriploid crucian carp both contained the typical LPXRF marker of GnIH peptide. GnIHR3 encoded by *gnih3* gene was a G-protein coupled receptor with seven transmembrane domains. Real-time PCR was used to analyze the expressions of *gnih* and *gnih3* genes in different tissues of different ploidy Cyprinids. The results showed that the expression level of *gnih* gene in the hypothalamus of red crucian carp was higher than that of allotriploid crucian carp; the *gnih3* gene was expressed differently on the hypothalamic–pituitary–gonad axis (HPG). Nevertheless, it was noteworthy that regardless of non-breeding or breeding season the expression of *gnih* in the hypothalamus from red crucian carp was higher than that of allotriploid crucian carp. Simultaneously, the expression level of *gnih3* gene in hypothalamus and pituitary of red crucian carp was higher than that of allotriploid crucian carp, but the expression of *gnih3* in the ovary of allotriploid crucian carp was higher than that of red crucian carp. Through *in situ* hybridization, the locations of *gnih* and *gnih3* genes in brain or pituitary of different ploidy fishes were analyzed. Strong hybridization signals of *gnih* could be detected in Npp, Npo, NLT in the brain of red crucian carp and allotriploid crucian carp. Strong hybridization signals of *gnih3* were located mainly in the PPD and RPD regions of the pituitary, and weak hybridization signals were distributed in NH and PI regions. Meanwhile, the signal of *gnih3* hybridization of allotriploid crucian carp in the pituitary was much weaker than that of red crucian carp. The results showed that *gnih* gene is mainly expressed in the hypothalamus, combining with the receptors distributed in HPG widely and acting through multiple pathways, which participate in the regulation of gonad development of different ploidy cyprinids through multiple ways. There are differences in the expression of *gnih* and *gnih3* mRNA in different ploidy fish tissues. This study provides molecular evidence for sterility of allotriploid crucian carp, which is important for fish reproduction and genetics breeding.

Key words: allotriploid crucian carp; *gnih*; *gnih3*; mRNA expression; sterility

Corresponding authors: TAO Min. E-mail: minmindiu@126.com ;

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31872551, 31730098, 31702328); Natural Science Foundation of Hunan Province for Distinguished Young Scholars (2020JJ2022); the Iarmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-45); 111 Project (D20007)