

多倍体鲫鱼原始生殖细胞的标记及其迁移研究

李华金^{1,2}, 许文婷^{1,2}, 肖亚梅^{1,2}, 彭亮跃^{1,2*}

(1. 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 中国湖南 长沙 410081; 2. 湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081)

摘要: 原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)的起源和迁移已在多种鱼类进行了研究, 但多倍体鲫鱼原始生殖细胞的标记和迁移尚未见报道。本实验室前期通过远缘杂交方法成功获得了一个倍性明确、亲缘关系清晰的多倍体杂交鱼研究体系, 该体系由异源四倍体鲫鱼及其二倍体父母本和三倍体杂交后代组成。本文利用RNA定点表达(localized RNA expression, LRE)技术, 将来自于斑马鱼的 *nanos1-3'-UTR* 与 GFP 融合后生成的 mRNA 注入多倍体鱼受精卵中, 首次对多倍体鲫鱼原始生殖细胞进行标记, 并观察了其迁移途径。结果显示, 多倍体鲫鱼 PGCs 能被斑马鱼 GFP-*nanos1-3'-UTR* 标记, 并且多倍体鲫鱼 PGCs 的迁移与斑马鱼类似。本实验结果为多倍体鲫鱼原始生殖细胞的产生和迁移的研究提供了一些基础数据。

关键词: 多倍体鱼; 原始生殖细胞(PGCs); 迁移; 标记

中图分类号: Q955

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2018)06-0454-07

Visualization and Migration of Primordial Germ Cells in Polyploid Crucian Carp

LI Hua-jin^{1,2}, XU Wen-ting^{1,2}, XIAO Ya-mei^{1,2}, PENG Liang-yue^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China; 2. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: The origin and migration of primordial germ cells (PGCs) have been studied in a variety of fish species, but the visualization and migration of PGCs in polyploid fish have not been reported. The unique fish lineages in our laboratory (including allotetraploid carp, red crucian carp and triploid crucian carp), which have clear genetic backgrounds, were used to label PGCs. In this paper, the mRNA generated by fusion of *nanos1-3'-UTR* and GFP from zebrafish was injected into the fertilized eggs of polyploid fish, and the PGCs of polyploid fish were labeled for the first time to observe their migration route to the genital ridge. The results showed that the zebrafish *nanos1-3'-UTR* could label the PGCs of polyploid fish and their migration was similar to those of zebrafish. These results provide some basic data for the study of the origin and migration of PGCs of polyploid fish.

Key words: polyploid fish; primordial germ cells (PGCs); migration; visualization

(*Life Science Research*, 2018, 22(6): 454~460)

原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是胚胎发育早期与体细胞分离且最早出现的生殖细胞, 随着胚胎的发育最终迁移至生殖嵴。在性

腺分化过程中, 其发育成卵原细胞或者精原细胞, 最终分化形成成熟的卵子或精子^[1]。目前, PGCs的形成最少有两种模式: 先成论和后成论^[2]。先成论

收稿日期: 2018-10-09; 修回日期: 2018-11-01

基金项目: 湖南省教育厅科学研究优秀青年项目(16B162); 湖南省科技计划重点研发计划资助项目(2017SK2232); 长沙市科技计划项目(kq1701046)

作者简介: 李华金(1994-), 女, 湖南浏阳人, 硕士研究生; 李华金和许文婷对本文的贡献相同, 为本文共同第一作者; * 通讯作者: 彭亮跃(1978-), 男, 湖南平江人, 博士, 讲师, 主要从事鱼类发育生物学研究, Tel: 0731-88873074, E-mail: ply@hunnu.edu.cn.

模式是指生殖细胞在胚胎发育的很早时期就能被鉴定出来,其分化是由定位在“生殖质”中特异的胞质决定子决定的。果蝇^[3]、线虫类、无尾两栖动物^[4]、斑马鱼^[5,6]以及文昌鱼^[7]PGCs的形成都属于这种模式。后成论是指在胚胎发育的晚期才能鉴定出生殖细胞,该观点认为生殖细胞是由体细胞周围组织诱导分化而来。羊膜动物鸡、小鼠^[8,9]和两栖纲有尾类动物墨西哥蝶螈^[10,11]等PGCs的形成均为后成论模式。

早期对于鱼类PGCs的起源,研究人员的意见各不相同,但主要观点有两种:一种认为起源于中胚层,另一种认为起源于内胚层。直到1997年,Yoon等^[6]从斑马鱼中分离出了*vasa*基因,鱼类PGCs的起源才真正得到了揭示。在斑马鱼中,母源的*vasa*基因转录产物集中在卵裂早期的卵裂沟中,在32细胞期时被分配到4个细胞当中,这4个细胞也就是原原始生殖细胞;在囊胚晚期,*vasa*阳性的细胞数增加至12~16个,对称分布,呈4簇,这些细胞将分化成PGCs^[6]。随后,人们在冰鳕虎鱼^[12]、金鱼^[13]和泥鳅^[14]中陆续发现了相似的PGCs形成模式,表明先成论很可能是硬骨鱼类PGCs形成的一种普遍模式。然而青鳉PGCs的形成并不属于这种模式。虽然人们在青鳉早期卵裂过程中也发现了生殖质颗粒的成分,但其*vasa* RNA在早期胚胎中的分布与斑马鱼极不相同,青鳉*vasa* RNA广泛地分布在卵裂期胚胎的许多细胞,直到原肠晚期*vasa*信号才定位于PGCs中^[15]。目前研究的鱼类中,大西洋鳕鱼、鲟鱼^[16]、大西洋鲑、大菱鲂、鲤鱼、金鱼、泥鳅与斑马鱼的PGCs形成模式相似,而虹鳉鱼、真鲷与青鳉的PGCs形成模式相似。

目前,已有多多种鱼类生殖细胞标记基因被研究人员利用原位杂交或免疫组化的方法成功地鉴定出来。Xu等^[17]利用双色荧光原位杂交的方法,同时用两种生殖细胞特异基因来标记青鳉的PGCs。但是这种方法标记的PGCs不是活体的,不能进行分离、移植等活体操作,而转基因技术则可以实现PGCs的活体示踪,为鱼类生殖细胞的研究提供了极大的便利。Yoshizaki等^[18]利用绿色荧光蛋白(GFP)及其衍生物实现了多种细胞的体内活体标记。另一种标记活体PGCs的技术称为:RNA定点表达(localized RNA expression, LRE)技术。该技术是将GFP融合生殖系特异基因*vasa*、*nanos1*等的3'非翻译区(3'-UTR)并人工合成mR-

NA,然后注射到早期受精卵中,使GFP在胚胎的PGCs中特异表达^[19]。相比于转基因技术,LRE技术更为简便,而且周期短、用途广。该技术的发展大大地推进了鱼类生殖细胞生物学及繁育技术的发展。此外,这种方法也可以用来研究不同物种间3'-UTR的保守性及组织特异性的调控。研究报道,将来自于斑马鱼的*nanos1-3'-UTR*(即*nanos3-3'-UTR*)与GFP融合生成的RNA注射入鳊鱼受精卵中,可以将鳊鱼PGCs标记出来,而且将标记的鳊鱼PGCs移植入斑马鱼胚胎后,鳊鱼PGCs能够同斑马鱼PGCs一样向生殖嵴的方向迁移^[20]。

本实验室前期以二倍体鲫鱼和鲤鱼为亲本,通过远缘杂交方法成功获得了异源四倍体鲫鲤(allotetraploid carp, 4nAT),并进一步以异源四倍体鲫鲤为父本、二倍体鲫鱼为母本,通过杂交成功研制出三倍体湘云鲫(triploid crucian carp)。湘云鲫具有不育、生长速度快、抗病能力和抗逆性强等多种优良性状,在全国得到大规模推广养殖,产生了良好的社会效应和经济效益^[21-23]。更为重要的是,异源四倍体鲫鲤与其二倍体父/母本和三倍体杂交后代组成了一个倍性明确、亲缘关系清晰的多倍体杂交鱼研究体系,为开展鱼类发育生物学及基因功能研究、探讨自然界鱼类种间杂交起源与进化提供了重要的研究平台。本文利用实验室特有的实验鱼品系,首次对多倍体鱼原始生殖细胞进行标记,并观察了其迁移途径,旨在为多倍体鱼原始生殖细胞的产生和迁移的研究提供一些基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本文取材的二倍体红鲫、三倍体湘云鲫及异源四倍体鲫鲤,均来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养殖基地。实验鱼养殖条件均为池塘养殖、投喂人工饲料。

1.2 质粒提取

本文所用EGFP-*zfnanos1-3'-UTR*质粒由上海海洋大学水产与生命学院李名友研究员惠赠。质粒图谱如图1所示。

质粒提取按试剂盒AXYGEN axyprep plasmid miniprep kit 250-prep (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA)步骤操作:取3~5 mL菌液,室温下10 000 r/min离心1 min,吸去上清后加250 μ L solution I/RNase A重悬菌落,混匀。加入250 μ L

solution II, 倒置轻混匀, 孵育 2 min。加入 250 μ L solution III, 立即倒置混匀, 直到生成白色絮状沉淀。随后, 室温下 13 000 r/min 离心 10 min。将上清液小心转入 HiBind miniprep column (有套管), 室温下 10 000 r/min 离心 1 min。弃废液, 加入 500 μ L buffer HB, 室温下 10 000 r/min 离心 1 min。弃废液, 空管在室温下 13 000 r/min 离心 2 min。将柱子转入新 EP 管, 加入 30~50 μ L elution buffer 或 3dH₂O 到膜上, 室温孵育 1~2 min 后在室温下 13 000 r/min 离心 1 min。最后, 将得到的质粒保存在 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 体外转录

先将 EGFP-*zfnanos1*-3'-UTR 质粒酶切进行线性化处理, 然后用 Sp6 启动子体外转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, USA) 进行体外转录。反应体系如下: 线性化质粒 DNA 1 μ g, 2 \times sp6 NTP cap 10 μ L, enzyme 2 μ L, RNA-free water 加至 18 μ L, 10 \times reaction buffer 2 μ L。按照以上体系加好样品, 涡旋混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 4 h; 加入 30 μ L RNA-free DEPC water 混匀, 再加入 30 μ L LiCl 混匀, -20 $^{\circ}$ C 下反应过夜; 反应完成后将样品 13 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 弃上清液, 加 75%乙醇洗涤, 13 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 弃上清; 重复洗涤一次(注: 75%乙醇需用 RNA-free water 配制), 最后将装有沉淀的 EP 管置于超净工作台上, 室温晾 5 min; 待乙醇挥发完全, 加入 30 μ L RNA-free DEPC water 溶解沉淀, 取 1 μ L 用分光光度计检测浓度, 剩余的置于 -80 $^{\circ}$ C 下保存待用。

1.4 显微注射

首先, 将人工授精得到的受精卵均匀地铺在加入清水的玻璃皿上(密度不宜太大)。待胚胎黏附

在玻璃皿上, 加入 0.25%的胰蛋白酶液消化 3 min, 而后洗去胰酶, 将胚胎置于含有 Holtfreter 工作液(每升含 3.5 g NaCl、0.05 g KCl、0.025 g NaHCO₃)的 1.5%琼脂培养皿中。其次, 将要注射的质粒或 mRNA 用 DEPC 水稀释到 80 ng/ μ L, 置于冰上备用。然后, 吸取 10 μ L 质粒或 mRNA 加入显微注射针(Kwik-Fil TW100-4), 注意不要产生气泡。在显微镜下用镊子轻轻将针尖夹断, 使针尖大小适宜。最后, 在显微注射仪(OLYMPUS SZX12)下将其注入裸卵胚盘内, 整个注射过程在受精卵第一次卵裂开始前完成。

1.5 荧光观察

将显微注射后的胚胎置于清水中培养(25 \pm 1 $^{\circ}$ C), 受精后每隔 2 h 在荧光显微镜下观察并拍照。所用荧光显微镜型号为 MZ16F (Leica Microsystems, Inc., USA)。

1.6 杂交鱼的人工繁殖与胚胎培育

分别向雌雄亲鱼注射催产素。当亲鱼开始追尾产卵后, 分别挤出精子和卵子, 混匀后用羽毛轻铺在盛水的培养皿上, 待受精卵黏附在培养皿上后换曝气水。胚胎每天换水, 且需要挑去已死的胚胎。36 h 左右胚胎孵化出苗, 将鱼苗吸出单独饲养, 2~3 d 仔鱼卵黄囊消失, 可以游动摄食, 此时可投喂草履虫, 三周龄幼鱼可投喂丰年虫。

2 结果

2.1 二倍体红鲫原始生殖细胞的标记和迁移

为了研究二倍体红鲫胚胎中 PGCs 迁移的正常途径, 我们将 GFP-*zfnanos1*-3'-UTR mRNA (100 ng/ μ L) 注射到 1~2 个细胞阶段的卵中, 实验重

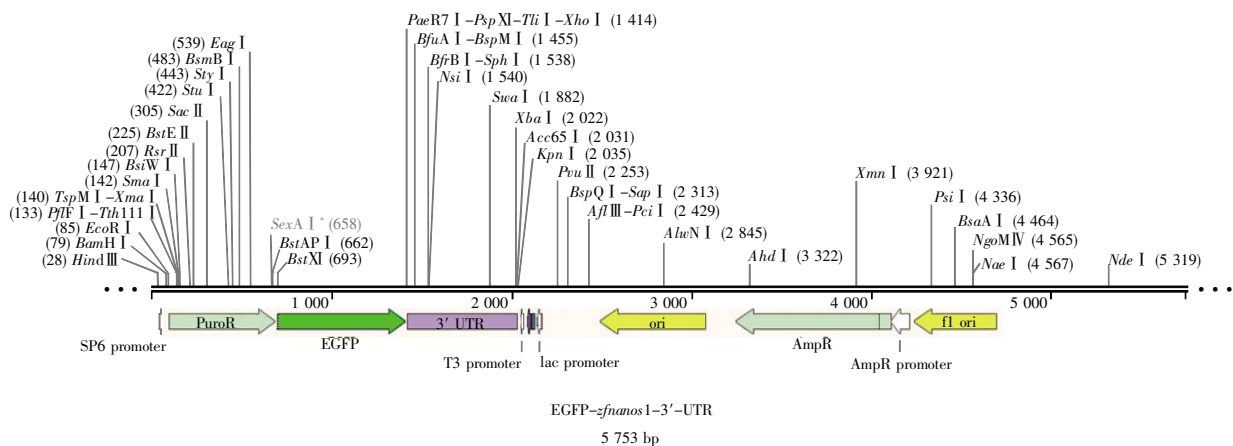


图1 EGFP-*zfnanos1*-3'-UTR 质粒图谱

Fig.1 The plasmid map of EGFP-*zfnanos1*-3'-UTR

复 3 次。总共有 382 个卵子注射了 mRNA, 受精后 24 h 进行检测, 结果显示: 306 个胚胎正常发育, 其中 158 个(51.6%)含有显示出强 GFP 表达的细胞(表 1)。图 2 显示, 红鲫胚胎发育到囊胚早期就可以观察到整个动物极细胞都强烈表达绿色荧光(图 2A, F), 但是在动物极和卵裂腔处没有观察到 PGCs 细胞。随着胚胎发育, 进入原肠晚期后, 可以观察到胚胎一侧细胞中的 GFP 表达被上调, 而其他体细胞的发育过程中背景 GFP 表达显著降低(图 2B, G)。在体节阶段, 可明显观察到高表达 GFP 的细胞, 这些胚胎中 GFP 阳性细胞的平均数量为 6~8 个, 但我们也观察到存在 9~12 个的情况(图 2N~Q)。几乎所有这些细胞都位于从头部到卵黄囊附近的背轴的侧面, 有时在头部、躯

干或腹部区域也可观察到少量 PGCs (图 2C, H, K)。在心跳期间, PGCs 继续迁移, 定位在躯干侧面的相似区域周围, 在此期间, 一些 PGCs 聚集成簇(图 2D, I, L)。之后, 这些细胞继续向生殖嵴迁移。在出膜期, PGCs 定位于新形成的消化道的腹侧(图 2E, J, M)。

2.2 三倍体湘云鲫原始生殖细胞的标记和迁移

为了研究三倍体湘云鲫胚胎中 PGCs 迁移的正常途径, 我们将 GFP-*zfnanos1-3'*-UTR mRNA (100 ng/ μ L)注射到 1~2 个细胞阶段的卵中, 实验重复两次。总共有 192 个卵子注射了 mRNA, 受精后 24 h 进行检测, 结果显示: 147 个胚胎正常发育, 其中 67 个(45.6%)含有显示出强 GFP 表达的细胞(表 1)。与二倍体红鲫胚胎 PGCs 细胞类似,

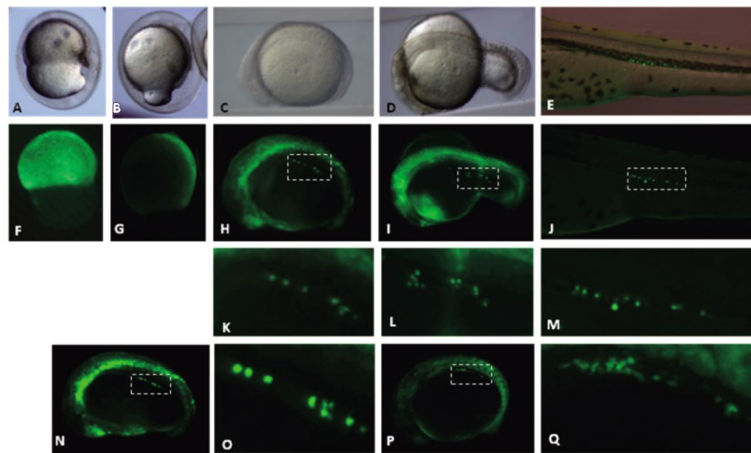


图 2 二倍体红鲫原始生殖细胞的标记和迁移

A: 囊胚期; B: 原肠期; C: 体节期; D: 心跳期; E: 出膜期; F~J: 分别对应 A~E 的荧光图; K~M: 分别对应 H~J 中白框的放大图; N: 体节期; O: 图 N 中白框放大图; P: 体节期; Q: 图 P 中白框放大图。

Fig.2 Localization and migration of PGCs in embryos of red crucian carp during embryonic development

A: Blastula stage; B: Gastrula stage; C: Somite stage; D: Heartbeat stage; E: High-pec stage; F~J: Fluorescent views of A~E, respectively; K~M: Higher magnification of the areas indicated by the boxes in H~J, respectively; N: Somite stage; O: Higher magnification of the area indicated by the box in N; P: Somite stage; Q: Higher magnification of the area indicated by the box in P.

表 1 显微注射 GFP-*zfnanos1-3'*-UTR mRNA 24 h 后原始生殖细胞被标记上绿色荧光的胚胎数
Table 1 Number of embryos with GFP-labeled PGCs at 24 hours post fertilization after GFP-*zfnanos1-3'*-UTR mRNA injection

Fish	Experiment No.	Embryo number (injection/control)	Normal number of embryos after injection (percentage)	Normal number of embryos of control (percentage)	Positive EGFP (percentage)
Diploid crucian carp	1	168/350	132 (78.6%)	338 (96.6%)	72 (54.5%)
	2	125/248	102 (81.6%)	223 (89.9%)	49 (48%)
	3	89/176	72 (80.9%)	154 (87.5%)	37 (51.4%)
	Total	382/774	306 (80.1%)	715 (92.4%)	158 (51.6%)
Triploid crucian carp	1	136/276	102 (75%)	256 (92.8%)	47 (46.1%)
	2	56/134	45 (80.4%)	121 (90.3%)	20 (44.4%)
	Total	192/410	147 (76.6%)	377 (92%)	67 (45.6%)
Tetraploid crucian carp	1	156/234	104 (66.7%)	180 (76.9%)	46 (44.2%)
	2	76/208	46 (60.5%)	175 (84.1%)	20 (43.5%)
	Total	232/442	150 (64.7%)	355 (80.3%)	66 (44%)

我们在囊胚早期就可以观察到整个动物极细胞都强烈表达绿色荧光(图 3A, F), 然后 GFP 表达强度会偏向一侧(图 3B, G)。随着胚胎发育, 三倍体湘云鲫胚胎中 PGCs 细胞的迁移也与二倍体红鲫中的迁移情况类似。在体节阶段, 可明显观察到高表达 GFP 的细胞, 这些胚胎中 GFP 阳性细胞的平均数量为 6~8 个, 但我们观察到 GFP 阳性细胞仅位于体内的一侧, 表明这些胚胎中 mRNA 的分布不均匀(图 3H, K)。在心跳期间, PGCs 继续迁移, 在此期间, 一些 PGCs 也会聚集成簇(图 3I, L)。之后, 这些细胞继续向生殖嵴迁移。在出膜期, PGCs 定位于新形成的消化道的腹侧(图 3E, J, M)。

2.3 四倍体鲫鲤原始生殖细胞的标记和迁移

为了研究四倍体鲫鲤胚胎中 PGCs 迁移的正常途径, 我们将 GFP-*zfnanos1-3'*-UTR mRNA (100 ng/ μ L) 注射到 1~2 个细胞阶段的卵中, 实验

重复两次。总共有 232 个卵子注射了 mRNA, 受精后 24 h 进行检测, 结果显示: 150 个胚胎正常发育, 其中 66 个(44%)含有显示出强 GFP 表达的细胞(表 1)。同样与二倍体红鲫胚胎 PGCs 细胞类似, 我们在囊胚早期就可以观察到整个动物极细胞都强烈表达绿色荧光(图 4A, F), 然后 GFP 表达强度也会偏向一侧(图 4B, G)。随着胚胎发育, 四倍体鲫鲤胚胎中 PGCs 细胞的迁移也与二倍体红鲫中的迁移情况类似。在体节阶段, 可明显观察到高表达 GFP 的细胞, 这些胚胎中 GFP 阳性细胞的平均数量为 6~8 个(图 4H, K)。在心跳期间, PGCs 继续迁移, 在此期间, 一些 PGCs 也会聚集成簇, 但是与二倍体红鲫胚胎相比, 可明显观察到 PGCs 细胞数量较少(图 4I, L)。之后, 这些细胞继续向生殖嵴迁移。在出膜期, PGCs 定位于新形成的消化道的腹侧(图 4E, J, M)。

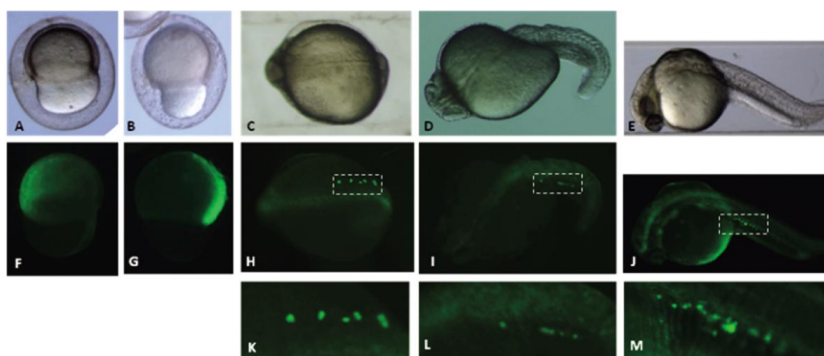


图 3 三倍体湘云鲫原始生殖细胞的标记和迁移

A: 囊胚期; B: 原肠期; C: 体节期; D: 心跳期; E: 出膜期; F~J: 分别对应 A~E 的荧光图; K~M: 分别对应 H~J 中白框的放大图。

Fig.3 Localization and migration of PGCs in embryos of triploid crucian carp during embryonic development

A: Blastula stage; B: Gastrula stage; C: Somite stage; D: Heartbeat stage; E: High-pec stage; F~J: Fluorescent views of A~E, respectively; K~M: Higher magnification of the areas indicated by the boxes in H~J, respectively.

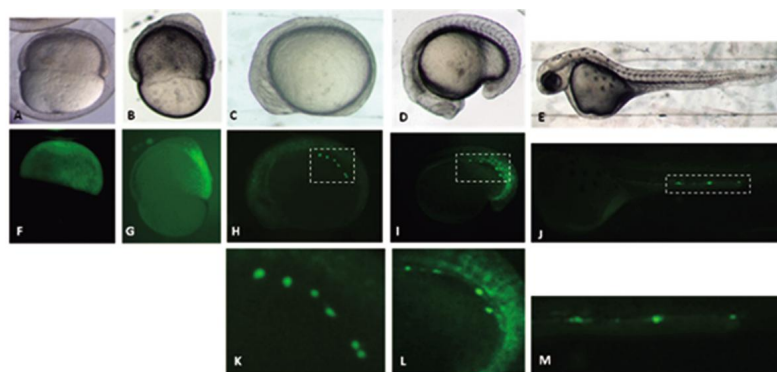


图 4 异源四倍体鲫鲤原始生殖细胞的标记和迁移

A: 囊胚期; B: 原肠期; C: 体节期; D: 心跳期; E: 出膜期; F~J: 分别对应 A~E 的荧光图; K~M: 分别对应 H~J 中白框的放大图。

Fig.4 Localization and migration of PGCs in embryos of allotetraploid carp hybrids during embryonic development

A: Blastula stage; B: Gastrula stage; C: Somite stage; D: Heartbeat stage; E: High-pec stage; F~J: Fluorescent views of A~E, respectively; K~M: Higher magnification of the areas indicated by the boxes in H~J, respectively.

3 讨论

鱼类配子发生是从原原始生殖细胞(pPGCs)开始的,进而分化形成原始生殖细胞(PGCs),随后PGCs迁移穿过各种胚胎组织到达正在形成中的原始生殖腺,继续发育形成生殖干细胞(卵原细胞或精原细胞)。本文利用RNA定点表达技术,建立了多倍体鲫鲤PGCs快速标记方法,通过在受精卵胚胎发育早期显微注射斑马鱼GFP-nanos1-3'-UTR mRNA,实现了多倍体鲫鲤PGCs的活体标记和追踪。

原始生殖细胞具有明显的组织学特征,与体细胞相比一般个体较大,细胞核大而圆,细胞质较少,同时细胞质内还含有生殖质颗粒^[24, 25]。在胚胎发育早期,生殖质被不对称分配到一些细胞中,这些细胞最终会发育形成原始生殖细胞。生殖质颗粒成分的聚合需要肌动蛋白和微管蛋白网络来共同完成^[26]。在硬骨鱼中,人们可以通过原位杂交或免疫组化的方法检测到PGCs,但这些方法观察的对象是固定后的死材料。RNA定点表达技术的应用,使研究者能在活体中观察PGCs的动态情况。目前,已有多个报道通过注射斑马鱼GFP-nanos1-3'-UTR成功标记了胚胎中的PGCs,说明这种机制在硬骨鱼类中可能是高度保守的^[16, 20, 27-29]。本文结果显示,与其他鱼类相比,多倍体鱼中PGCs的标记效率相对较低,其中四倍体鲫鲤的荧光标记胚胎比例为44%,三倍体湘云鲫的荧光标记胚胎比例为45.6%。此外,我们观察到大量只标记到一侧PGCs的现象(图3H,图4H),这种现象在青鳉中也有发现,推测可能是因为显微注射时胚胎发育已经到了二细胞时期,但是具体的原因还需更进一步的研究。

PGCs形成于生殖嵴外,需要经过一系列的迁移才能到达生殖嵴。目前,科研人员通过*vasa*基因原位杂交揭示了数种鱼PGCs的迁移模式,其中最为典型的是模式生物斑马鱼和青鳉。斑马鱼胚胎最初的4个PGCs会依次经过6个步骤的迁移,最终到达性腺组织^[30]。青鳉PGCs的迁移主要有3个阶段^[31]。不同鱼类PGCs迁移的途径和机制具有保守性^[20]。但也有一些不同之处,主要集中在以下区别:体节形成前PGCs的位置;体节形成早期PGCs的位置;体节形成中期PGCs迁移的方向;PGCs最终在胚体上的位置。与斑马鱼相比,裸身鰕虎鱼的PGCs也会增殖分化为8个细胞,

但在随后的迁移过程中并不形成PGCs簇,而是在体节发生早期分散排列在胚体两侧,到体节晚期时,PGCs渐渐聚合到体轴下部^[32]。大菱鲆PGCs的迁移模式与斑马鱼相似,50%外包期,PGCs分布在胚环中,到体节时期分两列排在躯干下方,最终在生殖嵴部位聚集成两簇^[33]。在原肠时期,池沼公鱼的PGCs随着体细胞迁移至胚体的两侧,随着细胞分裂,PGCs分布到了背部肠系膜处,并且通过背部肠系膜细胞在性腺区域聚集^[34]。本文实验结果显示,多倍体鱼PGCs的起源和迁移与斑马鱼类似。囊胚早期就可以观察到整个动物极细胞都强烈表达绿色荧光,可是在胚环中没有观察到明显的PGCs。在体节期可明显观察到高表达GFP的细胞,这些胚胎中GFP阳性细胞的平均数量为6~8个。在随后的迁移中,一些PGCs会聚集成簇。之后,这些细胞继续向生殖嵴迁移,在出膜期,PGCs定位于新形成的消化道的腹侧。

本文实验结果表明,与二倍体红鲫相比,三倍体湘云鲫和四倍体鲫鲤的PGCs细胞数量明显偏少。我们在生产实际中观察到,四倍体鲫鲤的繁殖能力比二倍体红鲫的繁殖能力有所下降,而三倍体湘云鲫是不育的,这是否与其原始生殖细胞的数量或迁移出现异常相关?多倍体鲫鲤育性与PGCs的相关性是一个值得研究的方向。

参考文献(References):

- [1] Okutsu T, Yano A, Nagasawa K, *et al.* Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation[J]. *Journal of Reproduction & Development*, 2006, 52(6): 685-693.
- [2] Saffman E E, Lasko P. Germline development in vertebrates and invertebrates[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 1999, 55(8-9): 1141-1163.
- [3] Santos A C, Lehmann R. Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond[J]. *Current Biology*, 2004, 14(14): 578-589.
- [4] Ikenishi K. Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*[J]. *Development, Growth and Difference*, 1998, 40(1): 1-10.
- [5] Olsen L C, Aasland R, Fjose A. A *vasa-like* gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells[J]. *Mechanisms of Development*, 1997, 66(1-2): 95-105.
- [6] Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells[J]. *Development*, 1997, 124(16): 3157-3165.
- [7] Wu H R, Chen Y T, Su Y H, *et al.* Asymmetric localization of germline markers *Vasa* and *Nanos* during early development in the amphioxus *Branchiostoma floridae*[J]. *Developmental Biology*, 2011, 353(1): 147-159.

- [8] Stebler J, Spieler D, Slanchev K, *et al.* Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12[J]. *Developmental Biology*, 2004, 272(2): 351-361.
- [9] Saga Y. Mouse germ cell development during embryogenesis[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2008, 18(4): 337-341.
- [10] Johnson A D, Bachvarova R F, Drum M, *et al.* Expression of axolotl *DAZL* RNA, a marker of germ plasm: widespread maternal RNA and onset of expression in germ cells approaching the gonad[J]. *Developmental Biology*, 2001, 234(2): 402-415.
- [11] Johnson A D, Drum M, Bachvarova R F, *et al.* Evolution of predetermined germ cells in vertebrate embryos: implications for macroevolution[J]. *Evolution & Development*, 2003, 5(4): 414-431.
- [12] Saito T, Otani S, Nagai T, *et al.* Germ cell lineage from a single blastomere at 8-cell stage in shiro-uo (ice goby)[J]. *Zoological Science*, 2002, 19(9): 1027-1032.
- [13] Otani S, Maegawa S, Inoue K, *et al.* The germ cell lineage identified by *vas*-mRNA during the embryogenesis in goldfish[J]. *Zoological Science*, 2002, 19(5): 519-526.
- [14] Fujimoto T, Kataoka T, Sakao S, *et al.* Developmental stages and germ cell lineage of the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)[J]. *Zoological Science*, 2006, 23(11): 977-989.
- [15] Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, *et al.* The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Development Growth & Differentiation*, 2000, 42(4): 317-326.
- [16] Saito T, Pšenička M, Goto R, *et al.* The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e86861.
- [17] Xu H, Li Z, Li M, *et al.* Boule is present in fish and bisexually expressed in adult and embryonic germ cells of medaka[J]. *PLoS One*, 2009, 4(6): e6097.
- [18] Yoshizaki G, Takeuchi Y, Sakatani S, *et al.* Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout *vasa*-like gene promoter[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2000, 44(3): 323-326.
- [19] Knaut H, Steinbeisser H, Schwarz H, *et al.* An evolutionary conserved region in the *vasa* 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish[J]. *Current Biology*, 2002, 12(6): 454-466.
- [20] Saito T, Goto-Kazeto R, Kawakami Y, *et al.* The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24460.
- [21] 刘筠, 刘少军, 孙远东, 等. 多倍体鲫鲤[J]. *中国农业科技导报* (Liu Yun, Liu Shao-jun, Sun Yuan-dong, *et al.* Ployploid hybrids of crucian carp × common carp[J]. *Review of China Agricultural Science and Technology*), 2003, 5(6): 3-6.
- [22] 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* (Liu Shao-jun, Hu Fang, Zhou Gong-jian, *et al.* Gonadal structure of triploid crucian carp produced by crossing allotetraploid hybrids of *Carassium auratus* red var. (♀) × *Cyprinus carpio* (♂) with Japanese crucian carp (*Carassius auratus* Cavieri T. et S)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*), 2000, 24(4): 301-306.
- [23] 陈松, 王静, 刘少军, 等. 改良三倍体鲫鱼的生物学特性研究[J]. *中国科学 C 辑: 生命科学* (Chen Song, Wang Jing, Liu Shao-jun, *et al.* Study on biological characteristics of improved triploid crucian carp[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*), 2009, 39(5): 479-484.
- [24] Braat A K, Zandbergen T, Van De Water S, *et al.* Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of *vasa* RNA[J]. *Developmental Dynamics*, 1999, 216(2): 153-167.
- [25] Yamaha E, Goto-Kazeto R, Saito T, *et al.* Primordial germ cell in teleost fish with special references to its specification and migration[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010, 26(5): 816-822.
- [26] Eno C, Pelegri F. Modulation of F-actin dynamics by maternal Midl1p1L controls germ plasm aggregation and furrow recruitment in the zebrafish embryo[J]. *Development*, 2018, 145(10): dev156596.
- [27] Li M, Tan X, Sui Y, *et al.* Conserved elements in the nanos3 3' UTR of olive flounder are responsible for the selective retention of RNA in germ cells[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2016, 198: 66-72.
- [28] Saito T, Fujimoto T, Maegawa S, *et al.* Visualization of primordial germ cells *in vivo* using GFP-*nos1* 3'UTR mRNA[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2006, 50(8): 691-700.
- [29] Saito T, Goto-Kazeto R, Fujimoto T, *et al.* Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2010, 54(10): 1481-1486.
- [30] Weidinger G, Wolke U, Köprunner M, *et al.* Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells[J]. *Development*, 1999, 126(23): 5295-5307.
- [31] Kurokawa H, Aoki Y, Nakamura S, *et al.* Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*[J]. *Development Growth & Differentiation*, 2006, 48(3): 209-221.
- [32] Saito T, Otani S, Fujimoto T, *et al.* The germ line lineage in ukigori, *Gymnogobius* species (Teleostei: Gobiidae) during embryonic development[J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2004, 48(10): 1079-1085.
- [33] Lin F, Xu S, Ma D, *et al.* Germ line specific expression of a *vasa* homologue gene in turbot (*Scophthalmus maximus*): evidence for *vasa* localization at cleavage furrows in euteleostei[J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2012, 79(11): 803-813.
- [34] Takahashi E, Shimizu Y, Urushibata H, *et al.* Migration behavior of PGCs and asymmetrical gonad formation in pond smelt *Hypomesus nipponensis*[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2017, 61(6-7): 397-405.