



专题

# 远缘杂交导致不同倍性鱼的形成

刘少军

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, 长沙 410081

E-mail: [lsj@hunnu.edu.cn](mailto:lsj@hunnu.edu.cn)

收稿日期: 2009-10-09; 接受日期: 2009-10-30

国家杰出青年科学基金(批准号: 30930071)、国家自然科学基金重点项目(批准号: 30930071)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB109200)和湖南省芙蓉学者特聘教授基金项目资助

**摘要** 远缘杂交可以使基因组从一个物种转移到另一个物种中, 从而导致杂交后代的表现型和基因型都发生改变. 本文描述了在红鲫(♀)与鲤鱼(♂)的远缘杂交后代中, 形成了 $F_3 \sim F_{18}$ 两性可育异源四倍体鲫鲤群体( $4n=200$ , 简称为  $4nAT$ ).  $4nAT$ 的雌、雄个体分别产生的二倍体卵子和二倍体精子, 经过雌核发育和雄核发育, 在没有染色体加倍处理情况下, 分别发育成雌核发育二倍体后代和雄核发育二倍体后代. 其中雌核发育体系衍生出具有遗传变异的改良四倍体鲫鲤和改良二倍体鱼, 二倍体杂交鱼产生不减数的配子的现象与减数分裂前核内复制或者核内有丝分裂或者生殖细胞融合有关. 用雄性  $4nAT$ 与雌性二倍体鱼进行倍间交配大规模制备了不育三倍体鱼. 在红鲫(♀)与团头鲂(♂)的远缘杂交后代中, 成功地获得两性可育的天然雌核发育红鲫( $2n=100$ ), 不育的三倍体鲫鲂( $3n=124$ )以及两性可育的四倍体鲫鲂( $4n=148$ ), 此外, 还制备了两种五倍体鲫鲂( $5n=172$ ;  $5n=198$ ). 该文在细胞和分子水平上对不同倍性鱼的生物学特点和形成机制进行了比较, 揭示了远缘杂交或者将远缘杂交与雌核发育和雄核发育相结合的方法在具有遗传变异的不同倍性鱼的形成中发挥着积极作用, 这在生物进化和鱼类遗传育种方面都具有重要意义.

**关键词**远缘杂交  
遗传变异  
雌核发育  
雄核发育  
多倍体鱼  
生物进化  
遗传育种

在动物和植物中, 越来越多的例子已经证实了杂交有利于物种的形成和辐射演化<sup>[1]</sup>. 目前已有28000多种鱼类被认定, 其数目超过了所有其他脊椎动物种群数量的总和<sup>[2]</sup>. Ohno<sup>[3]</sup>认为, 在脊椎动物的进化过程中发生了两轮四倍化. 但是该理论一直缺乏直接的四倍化事件予以支持. 鱼类远缘杂交是两种不同鱼类之间的杂交, 它们可以是属于不同的种、不同的亚科、不同的科甚至不同的目之间的鱼类杂交. 远缘杂交能将一套基因组从一个物种转移到另一个物种. 因此这种方法能有效的改变杂交后代的基因型和表现型. 在基因型方面, 远缘杂交能导致后代的染色体组水平上的改变并形成杂交二倍体、三倍体、

四倍体后代, 还可导致因微小染色体的形成而造成亚染色体组水平上改变的天然雌核发育二倍体后代. 而这些不同鱼类的形成往往依赖于亲本的遗传关系, 包括染色体数目的相似性等. 在表现型方面, 远缘杂交能整合双亲的优点, 从而使得杂交后代在外形、生长速度、存活率以及抗病能力等方面均表现出杂种优势. 虽然已有一些有关鱼类远缘杂交实验的报道<sup>[4,5]</sup>, 但是以前的研究没有聚焦于鱼类远缘杂交与不同倍性鱼类形成的关系.

多倍体可以定义为拥有一个或多个额外的染色体组的生物体. 多倍体广泛存在于植物中, 例如, 大约有70%的被子植物在其历史进程中为多倍体<sup>[6]</sup>. 本

研究组调查了超过 300 种鱼类的染色体数目, 发现这些鱼类的染色体数目均为偶数, 而且在两种不同种类中存在着接近倍性的关系, 这说明在鱼类进化过程中发生过四倍体化事件. 由于所假设的四倍体化过程发生在几百万年以前, 所以很难确定那些被推测为四倍体鱼的真正亲本. 因此, 建立人工的四倍体鱼体系对于进化生物学研究具有重要意义. 另一方面, 通过四倍体鱼与二倍体鱼的倍间杂交可以大规模的制备不育三倍体鱼. 三倍体鱼的不育特点能防止它们与另外的鱼类交配, 这样能够有效的避免遗传混乱, 从而有利于保护自然界中的鱼类资源. 不育导致三倍体鱼的性腺发育异常, 使得三倍体鱼的性腺体积明显小于可育的正常二倍体鱼的性腺体积, 从而有可能使得三倍体鱼的性腺发育的能量转换成肌肉的生长能量. 因而不育三倍体鱼相对于对照二倍体鱼在生长速度上具有潜在的优势.

人工雌核发育一般是指经灭活的精子(常用异源精子)激活的单倍体卵子经染色体加倍处理后, 发育成二倍体后代, 这种二倍体后代的遗传物质主要来自母本. 鱼类人工雌核发育在遗传育种、单性育种以及性别决定研究等方面具有重要意义. 通常认为一代雌核发育所建立的遗传纯系相当于多代同胞兄妹近亲繁殖. 另一方面, “异精效益”可导致雌核发育后代表现出明显的杂交性状和杂种优势. 至今, 已有许多鱼类单倍体卵子的人工雌核发育报道<sup>[4,7]</sup>, 例如虹鳉鱼<sup>[8]</sup>、罗非鱼<sup>[9]</sup>、斗鱼<sup>[10]</sup>、白鲈鱼<sup>[11]</sup>、红鲫<sup>[12]</sup>和日本白鲫<sup>[13]</sup>, 这些雌核发育过程中有对卵子造成创伤的二倍体化处理. 利用二倍体卵子进行雌核发育的主要优势在于不需要染色体加倍处理, 这样不仅简化了雌核发育的操作过程, 而且极大地提高了雌核发育后代的成活率. 4nAT群体的建立为二倍体卵子的雌核发育和二倍体精子的雄核发育提供了良好的平台.

天然雌核发育在鱼类中已有报道<sup>[14,15]</sup>, 有一种天然雌核发育帆鳉(*Poecilia formosa*), 一般产生全雌后代, 但是偶尔也发现有雄性个体, 然而很难确定谁是这种雄性天然雌核发育鱼的父亲. 已前的研究认为雄性天然雌核发育鱼是杂交起源<sup>[16]</sup>, 但是一直缺少直接的证据支持这种说法. 本研究结果表明, 红鲫(♀)与团头鲂(♂)的远缘杂交可导致两性可育的雌核发育鱼的形成, 该雌核发育后代的亲本十分清楚. 两性可育雌核发育鱼明显优于单性可育的雌核发育鱼,

因为前者更易繁殖后代.

总之, 远缘杂交以及此方法与雌核发育或雄核发育相结合的方法在研究生物进化和鱼类遗传育种方面具有重要意义.

## 1 红鲫(♀)与鲤鱼(♂)远缘杂交中形成的不同倍性鱼类

在分类学上, 红鲫(*Carassius auratus red var.*)和鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)属于不同的属, 两者都是两性可育、拥有 100 条染色体的二倍体鱼类. 在外形上, 红鲫与鲤鱼的主要区别是鲤鱼有两对口须而红鲫没有口须, 另外, 鲤鱼的体色为青灰色而红鲫为红色. 红鲫(♀)与鲤鱼(♂)杂交的F<sub>1</sub>和F<sub>2</sub>都是染色体数目为 100 的二倍体杂交鱼. 有趣的是F<sub>2</sub>能产生不减数的二倍体配子, 并在其自交产生的F<sub>3</sub>中形成了四倍体鱼. F<sub>3</sub>中的四倍体鱼两性可育并能产生二倍体配子, 自交后获得了F<sub>4</sub>四倍体鲫鲤. 至今, 4nAT品系已经稳定的从F<sub>3</sub>繁殖到F<sub>18</sub>. 鲫鲤杂交的F<sub>1</sub>和F<sub>2</sub>需要两年才能性成熟, 而 4nAT只需一年就能性成熟. 因此本课题组花费了 20 多年的时间建立了 4nAT杂交品系<sup>[17,18]</sup>. 另外, 4nAT在自然条件下也能稳定的繁殖后代. 在 20 多年的研究中, 发现 4nAT都是可育的, 4nAT的寿命在正常情况下为 4 年以上, 其寿命与对照二倍体鱼(红鲫)的寿命相似.

4nAT从F<sub>3</sub>繁殖到F<sub>18</sub>说明了四倍体的特性能代代相传. 4nAT群体的形成过程如图 1.

两性可育 4nAT 品系的建立具有至少以下几方面优点: (1) 在生产应用方面, 可以利用 4nAT 与二倍体

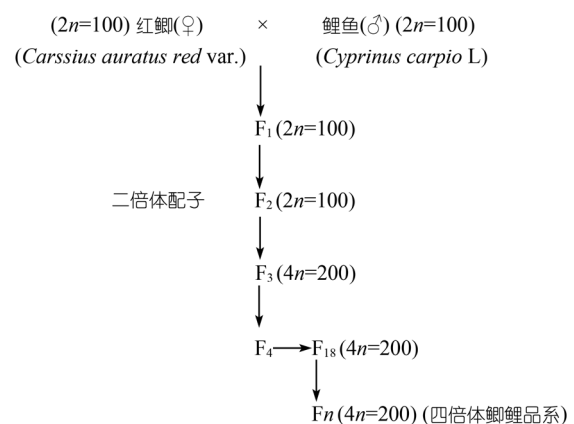


图 1 异源四倍体鲫鲤品系的建立

鱼进行倍间杂交来大规模制备不育三倍体鱼; (2)  $4nAT$  很有可能成为一个新的物种, 它们为在细胞和分子水平上研究  $4nAT$  与其亲本的遗传关系提供了很好的模式系统, 这在进化生物学方面具有重要意义; (3)  $4nAT$  产生的二倍体卵子和精子在分别进行雌核发育和雄核发育时不需要染色体加倍处理, 因此这些独特的二倍体配子是研究发育生物学的好材料。

在应用方面, 把雄性  $4nAT$  与雌性二倍体日本白鲫(*Carassius auratus cuvieri*)交配大规模制备了不育三倍体鲫鱼( $3n=150$ )。三倍体鲫鱼具有不育、生长速度快、抗逆性强以及肉质鲜美等特点, 它们已在全国大规模的推广养殖, 深受广大消费者和养殖户的欢迎。三倍体鲫鱼的不育性避免了它们与其他鱼类交配繁殖后代, 从而起到保护鱼类遗传资源的作用。另一方面, 三倍体鲫鱼的不育性使得其性腺发育的能量转化为肌肉的生长能量, 因此三倍体鲫鱼相对于对照二倍体鱼(红鲫)具有更快生长的潜在优势。在 20 多年的研究中, 发现在正常情况下三倍体鲫鱼的寿命至少有 6 年, 而且 I 龄到 VI 龄的三倍体鲫鱼均不育。

另外, 不育的特点使三倍体鱼能作为一个很好的载体, 在制备转基因三倍体鱼时能降低对环境的危害风险。

$4nAT$  已具备形成一个新物种的必要条件, 其染色体数目从 100 变为 200 使得遗传物质发生了改变; 这种遗传变化也能够稳定遗传; 另外其还具有生殖隔离的特点, 当  $4nAT$  与二倍体鱼交配得到的是不育三倍体鱼后代, 满足了生殖隔离的特点。因此  $4nAT$  具有形成一个染色体数目为 200 的新物种的潜力。人工两性可育的  $4nAT$  群体的形成在鱼类中是第一例(可能在脊椎动物中也是第一例)<sup>[17-20]</sup>。

在进化生物学方面,  $4nAT$  在基因型和表现型方面都发生了变化。在基因型方面,  $4nAT$  的染色体数目已由其亲本的 100 条变为 200 条。已通过染色体数目、核型公式、荧光原位杂交和 DNA 含量测定等方法证明了  $4nAT$  的染色体组由两套红鲫和两套鲤鱼的染色体组成。 $4nAT$  的生殖细胞在第一次减数分裂时的染色体配对形成了 100 个二价体, 从而导致二倍体配子的形成(图 2)。由于  $4nAT$  是异源四倍体而不是同源四倍体, 其生殖细胞在减数分裂 I 期只存在二价体而没有多价体, 每一对配对的同源染色体来自红鲫或者鲤鱼。在对照组红鲫中, 其生殖细胞在第一次减数分裂的染色体配对时, 只形成 50 个二价体, 因

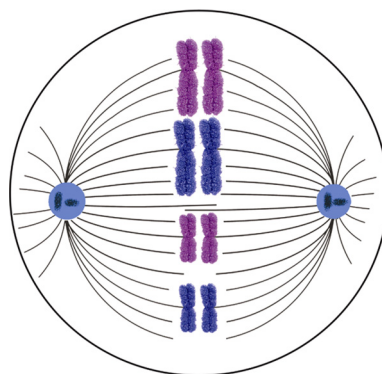


图 2  $4nAT$  的生殖细胞在第一次减数分裂期间同源染色体配对的模式图

表明其同源染色体配对是二价体, 而不是多价体; 淡紫色的染色体代表来源于红鲫, 蓝色的染色体代表来自于鲤鱼; 长的和短的染色体代表不同源的染色体

此产生单倍体配子<sup>[21]</sup>。

在分子水平上,  $4nAT$  表现出了变异特征, 例如, 通过 HMG-sox DNA 分子标记方法检测<sup>[22,23]</sup>, 在  $4nAT$  中出现了 4 条 DNA 条带(分别为 215, 628, 918 和 1957 bp), 而其母本红鲫有 3 条 DNA 带(分别为 215, 617 和 1958 bp), 其父本鲤鱼只有两条 DNA 带(分别为 215 和 918 bp); 其中 215 bp 的 DNA 片段属于 sox 11, 617 和 628 bp 的 DNA 片段属于 sox 9a, 918 bp 的 DNA 片段属于 sox 9b, 1957 和 1958 bp 的 DNA 片段属于 sox 4。

DNA 指纹图分析表明,  $4nAT$  表现出明显的序列消除现象, 而且被删除的主要是父本基因组中的条带。另一方面, 在  $4nAT$  基因组中出现了亲本没有的新 DNA 条带, 进一步说明了  $4nAT$  的基因型发生了改变。 $4nAT$  的 cyclin A1 和 cyclin B1 发生的由核苷酸突变导致的氨基酸突变也显示了进化效应<sup>[24]</sup>。

$4nAT$  及其原始亲本(红鲫和鲤鱼)的线粒体全序列被测序, 发现  $4nAT$  的线粒体全序列与母本红鲫的相似性明显高于  $4nAT$  与父本鲤鱼的相似性, 这说明线粒体基因组是严格的母系遗传, 且红鲫的线粒体基因组能稳定地在  $4nAT$  品系中遗传<sup>[25]</sup>。

但是在  $4nAT$ (♂)与二倍体日本白鲫(♀)杂交制备的三倍体鱼中发现了一段来自于父本日本白鲫的重组线粒体 DNA 片段, 推测这段线粒体的重组片段可能来自于父本与母本线粒体的融合<sup>[26]</sup>。

在表现型方面,  $4nAT$  的体细胞和生殖细胞的大小均发生了改变, 二倍体红鲫、三倍体鲫鱼和  $4nAT$  的红细胞大小会随着倍性水平的增加而增加<sup>[27]</sup>。在

4nAT中有 33%红细胞具哑铃状的核,而鲤鱼和红鲫中却没有发现这种特殊的红细胞.在生殖细胞的大小方面,4nAT产生的二倍体精子的头部直径(2.4  $\mu\text{m}$ )明显大于鲤鱼产生的单倍体精子的头部直径(1.9  $\mu\text{m}$ ).同样,4nAT产生的二倍体卵子的直径(0.17 cm)也明显大于红鲫产生的单倍体卵子的直径(0.13 cm).另外,4nAT的表型特征也发生了明显的改变,例如,4nAT拥有 2 对较短口须,而鲤鱼的 2 对明显很长的口须,红鲫没有口须.4nAT的侧线鳞数目(30~34)介于鲤鱼(34~39)和红鲫(28~30)之间<sup>[17]</sup>.

虽然 4nAT发生了基因型和表型方面的改变,但是它们仍然可以具有正常的生理功能,例如,4nAT拥有正常的脑垂体和性腺结构,并且建立了具有正常功能的下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴.在对 4nAT、三倍体鲫鱼和二倍体红鲫的脑垂体的组织学和超微结构比较研究时发现,这 3 种不同倍性鱼的脑垂体中都存在 6 种不同类型的内分泌细胞.同一种类型的脑垂体细胞的大小会随着倍性水平的增加而增加.在繁殖季节,4nAT的促性腺激素分泌细胞(GTH)所占比例最高,二倍体红鲫次之,三倍体鲫鱼最少,这与 4nAT的性腺发育提早和三倍体鲫鱼的不育有关.另一方面,在这 3 种不同倍性鱼中,三倍体鲫鱼的促生长激素分泌细胞(STH)所占比例最高,比例最少的是 4nAT,这与三倍体鲫鱼生长速度最快而 4nAT生长速度相对缓慢有关.另外,三倍体鲫鱼中腺垂体GTH细胞中的分泌颗粒和分泌小球在繁殖季节没有大量排出,而 4nAT和二倍体红鲫明显有大量排出,说明三倍体鲫鱼的不育性与GTH中的激素不排出有关<sup>[28]</sup>.

促性腺激素释放激素(GnRH)、促性腺激素(GTH)和促性腺激素受体(GTHR)是下丘脑-垂体-性腺轴的重要组成部分.本研究组比较研究了 *Gnrh2*, *Gth $\beta$* 和*Gthr*基因在 4nAT、三倍体鲫鱼和二倍体红鲫中的表达特征,发现*Gnrh2*基因主要在中脑、垂体和性腺中表达;*Gth $\beta$* 基因主要在垂体中表达;*Gthr*基因主要在性腺中表达.研究结果表明,这 3 种基因都参与了性腺发育的调控.通过real-time PCR和原位杂交检测,发现*Gthr*在三倍体鲫鱼性腺中的表达水平明显低于在 4nAT和二倍体红鲫性腺中的表达水平,这样就削弱了三倍体鲫鱼性腺中的GTHR与垂体释放的GTH的结合能力,使得三倍体鲫鱼性腺无法产生足够的性类固醇激素,从而导致不育.另外,*Gthr*在三倍体鲫鱼中的低表达水平可能会影响到*Gth $\beta$* 的下调,

进而影响到*Gnrh2*的下调.因此,在繁殖季节过后,三倍体鲫鱼的*Gth $\beta$* 和*Gnrh2*基因的表达水平最高.从这些结果可知,三倍体鲫鱼和 4nAT的*Gnrh2*, *Gth $\beta$* 和*Gthr*基因的不同表达能够在一定程度上解释他们的不育性和可育性<sup>[29]</sup>.

然而,三倍体鲫鱼不育的根本原因应该是其生殖细胞在第一次减数分裂过程中出现染色体配对紊乱,以致形成了 50 个二价体和 50 个单价体.而在 4nAT和红鲫的生殖细胞的第一次减数分裂过程中的正常染色体配对可分别形成 100 个二价体和 50 个二价体<sup>[21]</sup>.三倍体鲫鱼的性腺结构异常和一些基因的表达异常是染色体配对紊乱所造成的结果.

*Dmc1*(disrupted meiotic cDNA)基因是一种编码减数分裂时同源染色体配对所必需蛋白质的功能性特异基因.二倍体红鲫的*Dmc1*的cDNA全长为 1375 bp,三倍体鲫鱼为 1383 bp,4nAT为 1379 bp.*Dmc1*仅在这 3 种不同倍性鱼的性腺中表达.在繁殖季节,*Dmc1*基因在这 3 种不同倍性鱼中的表达不相同,在雌性三倍体鲫鱼中的高表达可能与它的减数分裂异常和不育有关<sup>[30]</sup>.

在繁殖季节,在三倍体鲫鱼中观察到 3 种不同类型的异常性腺结构,第一类为精巢型性腺,在其内能发现有精子细胞,但是没有成熟的精子;第二类为卵巢型性腺,在其内能发现很多卵原细胞和初级卵母细胞,没有成熟卵子;第三类为脂肪型性腺,在该性腺位置仅能观察到脂肪组织,没有发现任何生殖细胞.第三种类型鱼的生长速度快于第二种类型鱼,而第二种类型鱼的生长速度快于第一种类型鱼,这说明性腺发育的能量可以转换为肌肉发育的能量<sup>[31,32]</sup>.

4nAT的形成机制是什么?本实验室以前的研究<sup>[17]</sup>表明,鲫鲤F<sub>2</sub>的一些雌性个体能够产生 3 种大小的卵子:最大的卵子直径为 0.2 cm,中等卵子的直径为 0.17 cm,最小卵子的直径为 0.13 cm,它们所占比例分别为 50%, 35.9%和 14.1%.中等大小的卵子被认为是二倍体卵子,因为它们的直径大小与 4nAT产生的二倍体卵子的直径大小一致;最小的卵子被认为是单倍体卵子,因为它们的直径与红鲫产生的单倍体卵子的直径一致;最大的卵子被认为是三倍体卵子,因为雌性鲫鲤F<sub>2</sub>代与雄性红鲫杂交获得了四倍体鱼后代<sup>[33]</sup>.同样,一些雄性鲫鲤F<sub>2</sub>能产生 3 种以上的精子,包括单倍体、二倍体和四倍体精子,它们所占比例分别为 40%, 48.75%和 2.5%.当鲫鲤F<sub>2</sub>产生的二倍

体卵子和精子杂交受精后便形成了鲫鲤 $F_3$ 中的四倍体鲫鲤。另一方面, 鲫鲤 $F_2$ 的精巢和卵巢中分别发现了具有双核的较大精原细胞和卵原细胞, 还有在雄性鲫鲤 $F_2$ 的精巢中发现有染色体数为 200 的四倍体精原细胞<sup>[34]</sup>, 以及在该精巢中发现具有双核的精子细胞和成熟精子。上述研究结果表明, 鲫鲤 $F_2$ 产生了二倍体配子, 它们导致了四倍体鲫鲤的形成。雌性鲫鲤 $F_2$ 所产生的成熟卵子数目明显少于其原始母本(红鲫)和雌性  $4nAT$ 产生的卵子数目, 雄性鲫鲤 $F_2$ 所产生的精子数目也明显少于其原始父本(鲤鱼)和雄性  $4nAT$ 产生的精子数目; 雄性鲫鲤 $F_2$ 只能产生水状精液而雄性鲤鱼和  $4nAT$ 均产生白色精液, 这也说明了鲫鲤 $F_2$ 产生的精液中精子含量较少。另一方面, 鲫鲤 $F_2$ 需要两年才能性成熟, 而红鲫和  $4nAT$ 只需一年就能性成熟。上述现象说明, 鲫鲤 $F_2$ 的繁殖能力比其双亲要弱。为了克服繁殖能力的不足, 在进化动力驱使下, 二倍体鲫鲤 $F_2$ 通过产生不减数的二倍体配子演化成为在生殖能力方面有优势的四倍体鲫鲤。二倍体鲫鲤杂交鱼产生不减数的二倍体配子是进化形成杂交四倍体鲫鲤的关键因素。

不减数配子的形成机制是什么? 它与减数分裂前的核内复制或核内有丝分裂或生殖细胞融合有关。核内再复制是指细胞多次进入S期而没有进入有丝分裂阶段和经历细胞质分裂, 这主要是由于细胞进入有丝分裂前被阻止在 $G_2$ 期。核内复制将导致具有特大核的细胞产生。核内有丝分裂与核内复制相似, 但是核内有丝分裂是由于细胞在完成有丝分裂之前被阻止在M期, 并且导致了具有多叶核的细胞产生, 每叶核包含一个二倍体的基因组。随着时间的推移, 这些叶片可能会分开并最终形成一个多核细胞<sup>[35]</sup>。核内有丝分裂与核内复制已在一些生物的体细胞中被报道过<sup>[35]</sup>, 但在生殖细胞中还少有报道。生殖细胞融合指两个二倍体生殖细胞(如二倍体卵原细胞)融合成为一个四倍体生殖细胞, 或者两个单倍体生殖细胞(如单倍体精子细胞)融合成为一个二倍体生殖细胞。

## 2 鲫鲤远缘杂交与雌核发育和雄核发育技术相结合

1999 年, 本实验室用灭活的散鳞镜鲤精子激活  $4nAT$  ( $F_8 \sim F_{10}$ )产生的二倍体卵子进行雌核发育, 在没

有染色体加倍处理情况下, 该二倍体卵子发育为第一代二倍体雌核发育鲫鲤( $2n=100$ , 简称 $G_1$ )。有趣的是, 与鲫鲤 $F_2$ 相似,  $G_1$ 也能产生不减数的二倍体卵子, 这些二倍体卵子经灭活精子诱导, 无需染色体加倍处理, 发育成为第二代二倍体雌核发育鲫鲤( $2n=100$ , 简称 $G_2$ )。通过相同的方法获得了 $G_3$ ,  $G_4$ 和 $G_5$ 。这样就建立了一个二倍体雌核发育鲫鲤克隆体系( $G_1 \sim G_5$ ,  $2n=100$ )<sup>[36,37]</sup>(图 3)。该克隆体系的每一代都需要 2 年才能达到性成熟, 因此本实验室花了 10 年时间来建立该体系。该克隆体系中的鱼为全雌, 说明  $4nAT$ 的性别决定类型为XXXX, 同时也说明这个二倍体雌核发育克隆体系的性别决定类型为XX。二倍体雌核发育鲫鲤克隆体系的主要繁殖特点是能产生不减数的二倍体卵子, 例如,  $G_2$ 产生 3 种大小的卵子, 其中 2.47%是直径为 0.13 cm的小卵子, 95.60%是直径为 0.17 cm的中等大小卵子, 1.89%是直径为 0.20 cm的大卵子。中等大小的卵子直径与  $4nAT$ 产生的二倍体卵子的直径一致, 因此被认为是二倍体卵子。而小卵子的直径与红鲫产生的单倍体卵子的直径一致, 被认为是单倍体卵子。对照组中, 二倍体红鲫只产生一种直径为 0.13 cm的卵子。随着该克隆体系一代一代的延续, 所产生二倍体卵子的比例也越来越高。例如,  $G_2$ 产生 95.6%的二倍体卵子,  $G_3$ 产生 97.5%的二倍体卵子, 到了 $G_4$ 能产生 98.7%的二倍体卵子。

虽然 $G_1 \sim G_5$ 均来自于雌核发育, 但是它们仍然表现出了杂交特征和杂种优势, 说明  $4nAT$ 和雌核发育二倍体鲫鲤产生的二倍体卵子为杂交卵子。与  $4nAT$ 一样,  $G_1 \sim G_5$ 的外形特征介于红鲫和鲤鱼之间, 例如,  $G_1 \sim G_5$ 拥有两对较短而且不明显的口须, 而鲤鱼拥有 2 对较长口须, 红鲫没有口须。  $G_1 \sim G_5$ 的侧线鳞的数目为 31~32, 而鲤鱼的侧线鳞为 34~39, 红鲫为 28~30。  $G_1 \sim G_5$ 的形成说明一个能稳定产生不减数二倍体卵子的二倍体雌核发育鲫鲤克隆体系( $G_1 \sim G_5 \sim G_n$ )已建立, 也为证明自然界中的雌核发育鱼可以通过远缘杂交和雌核发育相结合的方法来形成提供了证据。  $G_1 \sim G_5$ 在表现型和基因型方面与鲫鲤 $F_2$ 非常相似, 二倍体雌核发育鲫鲤克隆体系的建立 为研究二倍体杂交鱼产生二倍体卵子提供了很好的平台。

二倍体雌核发育鲫鲤克隆体系产生不减数的二倍体卵子也与减数分裂前的核内复制或核内有丝分裂或生殖细胞融合有关, 而这些机制往往又与细胞分裂周期中的一些基因有关, 如 $cdc2$ 和 $cyclinB$ 。目前

本实验室正在对二倍体配子形成的分子机制进行研究, 包括建立二倍体雌核发育鲫鲤隆体系性腺的 cDNA 差减文库以便研究与该机制相关的一些重要基因<sup>[38]</sup>.

$G_1 \sim G_5$  在抗病性和生长速度方面都明显优于  $4nAT$ , 例如, 雌核发育二倍体鲫鲤的生长速度比  $4nAT$  快 20.6%. 用该克隆体系产生的二倍体卵子与

$4nAT$  产生的二倍体精子交配制备了改良四倍体鲫鲤 (简称  $G_1 \times 4nAT$ ).  $G_1 \times 4nAT$  的繁殖能力, 包括产卵率和精液量都明显优于普通四倍体鲫鲤. 目前每年可生产 20 万尾  $G_1 \times 4nAT$ , 并用之与二倍体鱼交配大规模制备了不育三倍体鱼. 目前每年可制备 3~4 亿尾不育三倍体鱼.

有趣的是, 98% 的  $G_1 \times 4nAT$  为四倍体, 而且其自

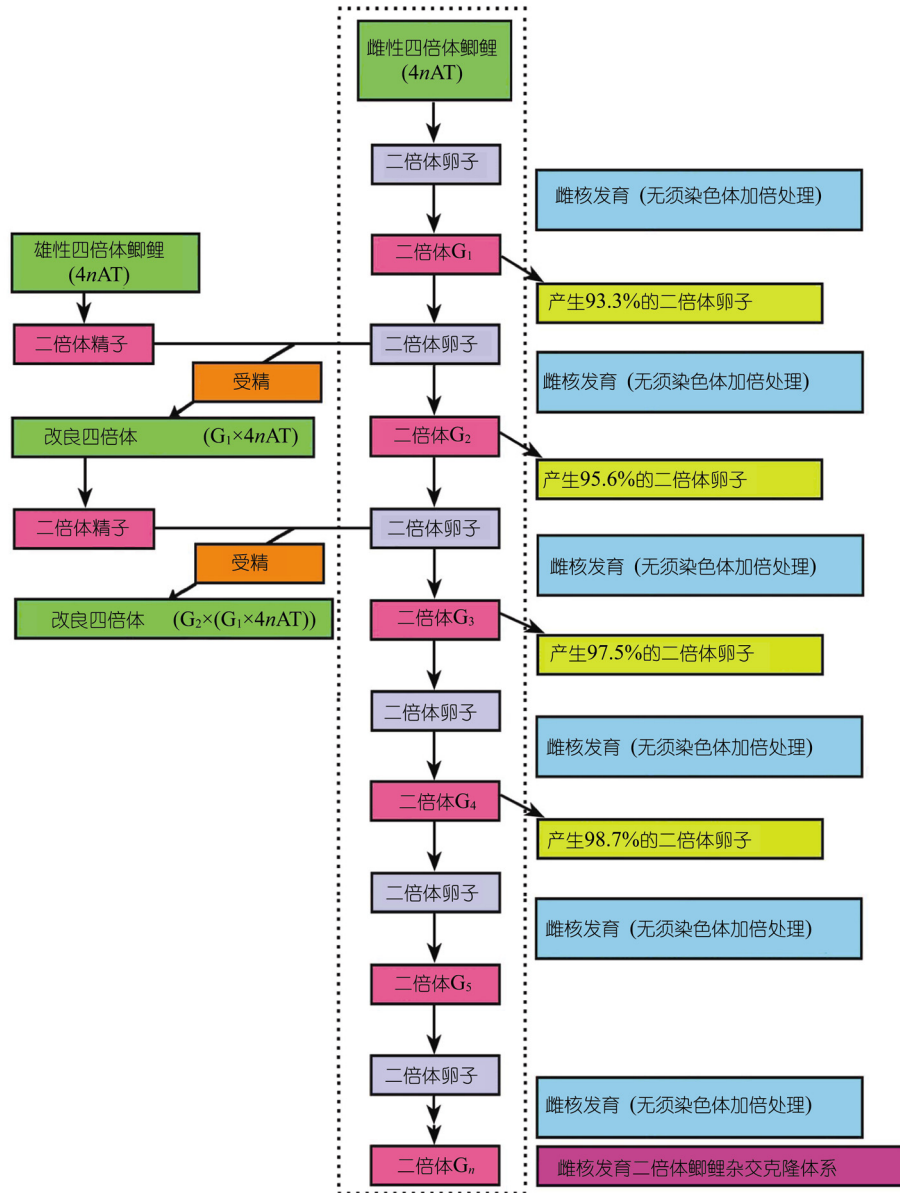


图 3 雌核发育二倍体鲫鲤克隆体系的建立

交后代也是四倍体, 但是 2% 的  $G_1 \times 4nAT$  高背型个体 自交产生了 3 种类型的两性可育二倍体鱼: 高背型

红鲫、高背型双尾金鱼和青灰色鲤鱼。其中高背型红鲫自交形成高背型红鲫、花鲫和青鲫<sup>[39]</sup>。高背型红鲫的出现表明相对于原始母本红鲫, 其外形发生了改变。高背型双尾金鱼的出现说明自然界中的金鱼有可能经历了红鲫(♀)与鲤鱼(♂)的远缘杂交和雌核发育的过程。

雌性高背型二倍体红鲫与雄性 $G_1 \times 4nAT$ 交配, 大规模制备了改良三倍体鲫鱼<sup>[40]</sup>(图4)。

上述结果表明, 红鲫(♀)和鲤鱼(♂)的远缘杂交和雌核发育相结合的途径能导致 $4nAT$ 、二倍体雌核发育鲫鲤以及衍生出的二倍体高背型鲫鱼、高背型金鱼、高背型花鲫和高背型青鲫的形成, 同时也说明远缘杂交和雌核发育相结合的途径在具有遗传变异特征的新型两性可育四倍体和二倍体鱼的形成过程中起了重要作用, 这在进化生物学和遗传育种方面都具有重要意义。

用 $4nAT$ 产生的二倍体精子诱导遗传物质灭活的金鱼卵子, 在没有染色体加倍处理情况下, 该金鱼卵子发育成为二倍体雄核发育鲫鲤( $2n=100$ , 简称 $A_0$ )。在 $A_0$ 中发现了雌、雄个体, 且性别比例接近1:1, 说明雄性 $4nAT$ 的性别决定机制为XXXXY。 $A_0$ 中的雌、雄个体均要两年才能性成熟, 自交后形成了改良四倍体鱼, 说明雌、雄 $A_0$ 分别能产生二倍体卵子和二倍体精子<sup>[41,42]</sup>。

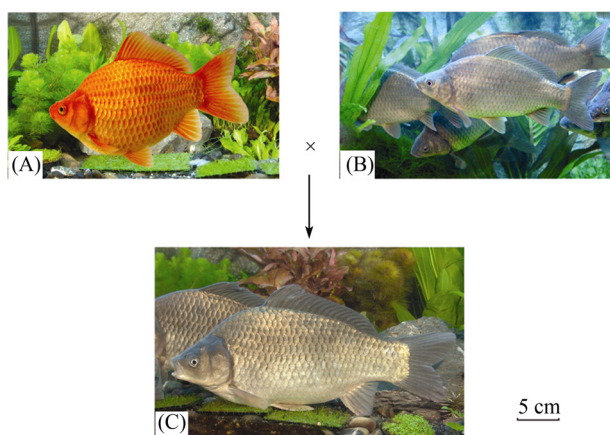


图4 雌性高背型二倍体红鲫(A)与雄性 $G_1 \times 4nAT$ (B)交配制备了改良三倍体鲫鱼(C)

### 3 红鲫(♀)与团头鲂(♂)远缘杂交形成不同倍性鱼

在研究染色体数目不同的亲本远缘杂交时, 设计了红鲫(♀)( $2n=100$ )与团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)(♂)( $2n=48$ )的远缘杂交实验。与红鲫(♀)与鲤鱼(♂)的远缘杂交实验相比, 两组远缘杂交实验都拥有相同的母本(红鲫), 但父本却不相同。在鲫鲂远缘杂交实验中, 其父本是具有48条染色体的团头鲂, 而不是具有100条染色体的鲤鱼。在分类学上, 红鲫和团头鲂分属于不同的亚科(鲤亚科和鲂亚科)。在红鲫(♀)与团头鲂(♂)的杂交第一代中, 获得了不育的三倍体鲫鲂( $3n=124$ ), 两性可育的四倍体鲫鲂( $4n=148$ )和两性可育的天然雌核发育二倍体红鲫( $2n=100$ )。三倍体鲫鲂具有两套红鲫染色体和一套团头鲂染色体; 四倍体鲫鲂拥有两套红鲫染色体和两套团头鲂染色体; 天然雌核发育二倍体红鲫拥有两套红鲫染色体以及1~3个来自于团头鲂的微小染色体。第一代雌性四倍体鲫鲂能产生不减数的四倍体卵子, 这些四倍体卵子分别与团头鲂和红鲫的单倍体精子受精获得了两种类型的五倍体鲫鲂( $5n=172$ 和 $5n=198$ )<sup>[43,44]</sup>(图5)。与鲫鲤 $F_2$ 和二倍体雌核发育鲫鲤克隆体系( $G_1 \sim G_5$ )相似, 四倍体鲫鲂产生不减数的四倍体卵子也是与其卵原细胞减数分裂前的核内复制或核内有丝分裂或生殖细胞融合有关。

在红鲫(♀)与团头鲂(♂)的远缘杂交后代中, 形成了天然雌核发育二倍体红鲫、三倍体和四倍体鲫鲂, 但没有发现存活的杂交二倍体鱼, 只有在胚胎染色体检测中才发现有染色体数目为74的二倍体杂交胚胎, 这是因为母本红鲫的染色体数目(100)和父本团头鲂的染色体数目(48)差别较大, 使得二倍体杂交胚胎不能发育成为存活的杂交二倍体后代。相反, 天然雌核发育、四倍体化和三倍体化能帮助克服发育过程中的障碍, 使他们发育成为存活后代。

本研究认为, 红鲫卵子的第二极体的排出被抑制而导致了染色体加倍是形成天然雌核发育二倍体红鲫的原因。而雄性天然雌核发育红鲫的产生是由于父本遗留的包含有雄性决定基因的微小染色体所造成。三倍体鲫鲂来源于受精卵第二极体的排除被抑制, 而四倍体鲫鲂则来源于受精卵的第一次有丝分裂被抑制。

在三倍体和四倍体鲫鲂的表现型变异方面, 它

们的食性与父本(团头鲂)一致,都为草食性,说明它们都含有团头鲂的染色体.草食性的特征使得它们具有更广泛的饵料来源,这在水产养殖上具有重要价值.另一方面,在多倍体鲫鲂中出现了拥有哑铃状核的非正常红细胞,这种红细胞似乎有两个核,该特征可作为一种独特的细胞学标记来区分多倍体鲫鲂及其二倍体亲本.随着倍性水平的增加,这种双核红细胞所占的比例也会随之增加<sup>[45]</sup>.四倍体鲫鲂最明显的变异性状是出现了口须,而它们的亲本都没有口须.众所周知,鲤鱼拥有 2 对明显的口须,而四倍体鲫鲂的口须出现为证明鲤鱼的口须来源于杂交起源提供了证据.

在三倍体和四倍体鲫鲂的基因型变异方面,通过HMG-sox DNA分子标记方法<sup>[22,23]</sup>进行了研究,结果表明,四倍体鲫鲂不仅具有一些红鲫和团头鲂的DNA片段,而且自身还形成了一条新的大小为 918 bp的DNA片段,说明四倍体鲫鲂不仅其染色体倍性发生了改变,而且其DNA序列也发生了改变.四倍体鲫鲂含有与红鲫和团头鲂相同和不同的DNA片段,说明四倍体鲫鲂来自于红鲫和团头鲂,但又不同于红鲫和团头鲂.另外,团头鲂特有的 712 bp的DNA片段在三倍体和四倍体鲫鲂中没出现,进一步证明三倍体和四倍体鲫鲂不同于团头鲂<sup>[43]</sup>.

转座子在物种进化中发挥了重要作用.一种被称为 *Tte1* 的独特转座子在四倍体鲫鲂中被发现<sup>[46]</sup>,说明四倍体鲫鲂也是一种很好的研究动物进化的多倍体模式动物.

在红鲫与团头鲂的远缘杂交中,除了获得三倍体和四倍体鲫鲂外,还获得了雌雄性别比例接近 1:1 的天然雌核发育红鲫.天然雌核发育红鲫两性可育,

自交获得了第二代天然雌核发育红鲫和变异的青鲫.通过染色体检测,证明天然雌核发育红鲫及其自交后代都为二倍体( $2n=100$ ),同时携带 1~3 个微小染色体.染色体中期分裂相、荧光原位杂交、Sox-HMG DNA标记以及微卫星标记等方面的实验结果都证明,天然雌核发育红鲫中存在雄性遗传物质的效应.天然雌核发育红鲫的基因型变异导致了它的表现型变异,因此它们在外形上明显不同于母本红鲫.两性可育的天然雌核发育二倍体红鲫及其自交后代的形成说明了远缘杂交能够产生具有遗传变异的两性可育雌核发育二倍体鱼,这在鱼类遗传育种和进化生物学方面具有重要意义<sup>[44]</sup>.

#### 4 不同倍性鱼的形成途径比较

通过长期的研究,本实验室发现远缘杂交是形成不同倍性鱼的理想途径,该途径在自然界也是存在的,因此在鱼类中开展远缘杂交的研究,在生物进化上具有重要意义.远缘杂交的主要效应在于易使后代产生遗传变异,如果是近缘交配就不能达到该效果.例如,鲫鲤远缘杂交由于其亲本的遗传物质的不协调性使得其 $F_2$ 的生殖细胞以核内复制或核内有丝分裂或者生殖细胞融合的特殊方式产生不减数的配子.这也是生殖进化的作用,因为二倍体鲫鲤 $F_1$ 和 $F_2$ 的性腺发育不好而且需要 2 年才能达到性成熟,而形成的四倍体鲫鲤的性腺发育较好且 1 年即可达到性成熟.在鲫鲂远缘杂交中,同样由于其亲本遗传物质的不协调性使得其杂交后代的受精卵( $F_1$ )以第二极体排出被抑制的形式形成三倍体或天然雌核发育鱼,和以抑制第一次卵裂的形式形成四倍体鱼.

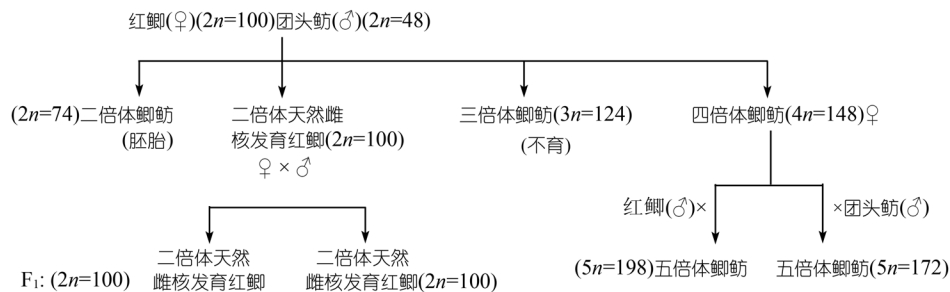


图 5 鲫鲂杂交中不同倍性鱼的形成过程

根据上述结果, 认为利用染色体数目相同的亲本进行远缘杂交, 在第一代中容易获得杂交二倍体或杂交三倍体, 但是很难获得杂交四倍体. 如红鲫(♀)( $2n=100$ )与鲤鱼(♂)( $2n=100$ )远缘杂交 $F_1$ 中发现有二倍体( $2n=100$ ), 团头鲂(♀)( $2n=48$ )与黄尾鲴(*Xenocypris davidi* Bleeker)(♂)( $2n=48$ )远缘杂交 $F_1$ 中有二倍体( $2n=48$ )和三倍体( $3n=72$ )(数据未发表), 团头鲂(♀)( $2n=48$ )与翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)(♂)( $2n=48$ )远缘杂交 $F_1$ 中有二倍体( $2n=48$ )和三倍体( $3n=72$ )(数据未发表), 草鱼(♀)( $2n=48$ )和团头鲂(♂)( $2n=48$ )远缘杂交 $F_1$ 中发现二倍体( $2n=48$ )和三倍体( $3n=72$ )(数据未发表). 另一方面, 利用染色体数目不同的亲本进行远缘杂交, 可在杂交第一代中获得杂交四倍体或杂交三倍体或天然雌核发育二倍体, 但是很难获得杂交二倍体(有时只能检测到杂交二倍体胚胎), 如红鲫(♀)( $2n=100$ )与团头鲂(♂)( $2n=48$ )的远缘杂交 $F_1$ 中, 和红鲫(♀)( $2n=100$ )与黄尾鲴(♂)( $2n=48$ )的远缘杂交 $F_1$ 中(数据未显示), 都可以获得上述 3 种不同倍性的鱼. 但是, 这些结论并不是绝对, 也有一些例外存在. 例如, 在红鲫(♀)( $2n=100$ )与翘嘴红鲌(♂)( $2n=48$ )的远缘杂交 $F_1$ 中发现了存活的杂交

二倍体鱼( $2n=74$ ). 因此, 不同倍性鱼的形成与亲本之间的遗传关系有密切联系.

非常有趣的是, 一些远缘杂交能产生存活的后代, 而另一些远缘杂交却不能获得存活后代. 关于这方面的机制不是很清楚, 但是可以摸索出一些规律. 如认为远缘杂交后代的形成可能与亲本的染色体数目有关. 一般来说, 当母本的染色体数目等于或者大于父本的染色体数目时, 这样的远缘杂交容易获得存活后代, 例如红鲫(♀)( $2n=100$ )与团头鲂(♂)( $2n=48$ )的远缘杂交. 反之, 当母本的染色体数目小于父本的染色体数目时的远缘杂交很难获得成活后代, 例如团头鲂(♀)( $2n=48$ )与红鲫(♂)( $2n=100$ )的远缘杂交, 以及黄尾鲴(♀)( $2n=48$ )与红鲫(♂)( $2n=100$ )的远缘杂交(数据未显示).

与鲫鲤杂交 $F_2$ 以及雌核发育二倍体鲫鲤克隆体系( $G_1 \sim G_5$ )一样, 红鲫(♀)与团头鲂(♂)杂交 $F_1$ 中的四倍体鲫鲂能产生减数和不减数的配子. 不减数配子的形成是由于减数分裂前的核内复制或者核内有丝分裂或者生殖细胞融合所造成的, 它们的形成是不同倍性鱼形成的基本动力, 在进化生物学和遗传育种方面都具有重要意义.

**致谢** 感谢湖南师范大学刘筠院士、周工健研究员、陶敏博士、张纯博士、颜金鹏博士、刘良国博士、刘东博士、龙昱博士、姚占州、覃钦博、王静、肖军、刘锦辉、何伟国、周毅、尤翠平、陈琳、钟欢、赵如榕等提供的帮助.

## 参考文献

- Mallet J. Hybrid speciation. *Nature*, 2007, 446: 279—283[DOI]
- Cossins A R, Douglas L C. Fish as models for environmental genomics. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 324—333[DOI]
- Ohno S. *Evolution by gene duplication*. Berlin: Springer-Verlag, 1970
- Hulata G. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 2001, 111: 155—173[DOI]
- 楼允东, 李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用. *中国水产科学*, 2006, 13: 151—158
- Masterson J. Stomatal size in fossil plant: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 1994, 264: 421—424[DOI]
- Pandian T, Koteeswaran R.. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 1998, 384: 167—243[DOI]
- Chourrout D. Use of grayling sperm (*Thymallus thymallus*) as a marker for the production of gynogenetic rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Theor Appl Genet*, 1986, 72: 633—636[DOI]
- Varadaraj K. Production of diploid *Oreochromis mossambicus* gynogenesis using heterozygous sperm of *Cyprinus carpio*. *Ind J Exp Biol*, 1990, 28: 701—705
- Kavumpurath S, Pandian T J. Induction of heterozygous and homozygous diploid gynogenesis in *Betta splendens* (Regan) using hydrostatic

- pressure. *Aquac Fish Manage*, 1994, 25: 133—142
- 11 Gomelsky B L, Cherfas N B, Gissis A, et al. Induced diploid gynogenesis in white bass. *Prog Fish-Cult*, 1998, 60: 288—292[DOI]
  - 12 Sun Y D, Tao M, Liu S J, et al. Induction of gynogenesis in red crucian carp using spermatozoa of blunt snout bream. *Prog Nat Sci*, 2007, 17: 163—167[DOI]
  - 13 Sun Y D, Zhang C, Liu S J, et al. Induction of gynogenesis in Japanese crucian carp (*Carassius cuvieri*). *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33: 405—412[DOI]
  - 14 Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for Ggonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays. *J Mol Evol*, 2000, 51: 498—506
  - 15 Brykov V I A, Polyakova N E, Skurikhina L A, et al. Mitochondrial DNA variation in goldfish *Carassius auratus gibelio* from far eastern water reservoirs. *Russian J Genet*, 2002, 38: 1176—1180[DOI]
  - 16 Hubbs C, Drewry G E. Occurrence and morphology of a phenotypic male of a gynogenetic fish. *Science*, 1959, 129: 1227—1229[DOI]
  - 17 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. *Aquaculture*, 2001, 192: 171—186[DOI]
  - 18 孙远东, 刘少军, 张纯, 等. 异源四倍体鲫鲤F<sub>9</sub>-F<sub>11</sub>染色体和性腺观察. *遗传学报*, 2003, 5: 414—418
  - 19 Gomelsky B. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. *Aquat Living Resour*, 2003, 16: 408—415[DOI]
  - 20 Babiak I, Dobosz S, Goryczko K, et al. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology*, 2002, 57: 1229—1249[DOI]
  - 21 Zhang C, He X X, Liu S J, et al. The Chromosome pairing in meiosis I in allotetraploid hybrids and allotriploid Crucian Carp. *Acta Zool Sin*, 2005, 51: 89—94
  - 22 Chen L, Li W, Liu S J, et al. Novel genetic markers derived from the DNA fragments of Sox genes. *Mol Cell Probes*, 2009, 23: 157—165[DOI]
  - 23 Liu, J F, Liu S J, Tao M, et al. Isolation and expression analysis of testicular type sox9b in allotetraploid Fish. *Mar Biotechnol*, 2007, 9: 329—334[DOI]
  - 24 Liu L G, Yan J P, Liu S J, et al. Evolutionary analysis of allotetraploid hybrids of red crucian carp  $\times$  common carp, based on ISSR, AFLP molecular markers and cloning of cyclins genes. *Chinese Sci Bull*, 2009, 54: 2849—2861[DOI]
  - 25 Guo X H, Liu S J, Liu Y. Evidence for maternal inheritance of mitochondrial DNA in allotetraploid. *DNA Sequence*, 2007, 18: 247—256[DOI]
  - 26 Guo, X H. Liu S J, Liu Y. Evidence for Recombination of Mitochondrial DNA in Triploid Crucian Carp. *Genetics*, 2006, 172: 1475—1479
  - 27 刘巧, 王跃群, 刘少军, 等. 不同倍性鲫鱼血液细胞比较研究. *自然科学进展*, 2004, 14: 1111—1117
  - 28 龙昱, 刘少军, 黄卫人, 等. 不同倍性鱼垂体细胞和超微结构比较. *中国科学: 生命科学*, 2006, 36: 247—254
  - 29 Long Y, Liu S J, Zhong H, et al. The distinct expression of GnRh, Gth $\beta$  and Gth $\alpha$  gene in sterile triploids and fertile tetraploids. *Cell Tissue Res*, 2009, 338: 151—159[DOI]
  - 30 陶敏, 刘少军, 龙昱, 等. 不同倍性鲫鱼 *Dmcl* 基因 cDNA 的克隆及其表达分析. *中国科学: 生命科学*, 2007, 37: 625—633
  - 31 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. *水生生物学报*, 2000, 24: 301—306
  - 32 刘少军, 孙远东, 周工建, 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: 194—197
  - 33 Liu S J, Sun Y D, Luo K K, et al. Evidence of different ploidy eggs produced by diploid F<sub>2</sub> hybrids of *Carassius auratus* ( $\varnothing$ )  $\times$  *Cyprinus carpio* ( $\sigma$ ). *Acta Genet Sin*, 2006, 33: 304—311[DOI]
  - 34 张纯, 刘少军, 孙远东, 等. 多倍体鲫鲤生殖细胞染色体研究. *分子细胞生物学报*, 2008, 41: 53—60
  - 35 Ullah Z, Lee C Y, DePamphilis M L. Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell Division*, 2009, 4: 10, doi: 10.1186/1747-1028-4-10[DOI]
  - 36 Liu S J, Sun Y D, Zhang C, et al. Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids red crucian carp  $\times$  common carp. *Aquaculture*, 2004, 236: 193—200[DOI]
  - 37 刘少军, 段巍, 陶敏, 等. 雌核发育二倍体鲫鲤杂交克隆品系建立. *中国科学: 生命科学*, 2007, 37: 28—34
  - 38 Liu D, Liu S J, Yiu C, et al. Identification of genes involved in the early ovary development of diploid gynogen populations from

- allotetraploid hybrids using suppression subtractive hybridization. *Mar Biotechnol*, doi: 10.1007/s10126-009-9212-3
- 39 王静, 覃钦博, 陈松, 等. 新型高背型鲫鱼的形成及其生物学特征研究. *中国科学: 生命科学*, 2008, 38: 635—642
- 40 陈松, 王静, 刘少军, 等. 改良三倍体鲫鱼的生物学特性研究. *中国科学: 生命科学*, 2009, 39: 479—484
- 41 Sun Y D, Zhang C, Liu S J. Induced interspecific androgenesis using diploid sperm from allotetraploid common carp  $\times$  red crucian carp hybrids. *Aquaculture*, 2007, 264: 47—53[DOI]
- 42 段巍, 覃钦博, 陈松, 等. 用雄核发育方法制备改良异源四倍体鲫鲤群体. *中国科学: 生命科学*, 2007, 37: 530—539
- 43 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. *Genetics*, 2007, 176: 1023—1034
- 44 Liu S J, Qin Q B, Wang Y Q, et al. Evidence for the formation of the male gynogenetic fish. *Mar Biotechnol*, doi: 10.1007/s10126-009-9219-9
- 45 Lu W T, Liu S J, Long Y, et al. The comparative study on the erythrocytes of the polyploidy hybrids from different subfamily fish crossings. *Cell Tissue Res*, 2009, 336: 159—163[DOI]
- 46 Liu D, You C, Liu S J, et al. Characterization of a novel Tc1-like transposon from bream (*Cyprinidae*, *Megalobrama*) and its genetic variation in the polyploidy progeny of bream- red crucian carp crosses. *J Mol Evol*, 2009, 69: 395—403[DOI]