

雌核发育二倍体鲫鱼杂交克隆品系建立

刘少军* 段 巍 陶 敏 张 纯 孙远东 申佳珉
王 静 罗凯坤 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, 长沙 410081)

摘要 研究了雌核发育二倍体鲫鱼第 2 代(G_2)产生的二倍体卵子在无染色体加倍情况下形成第 3 代(G_3)的雌核发育细胞学行为, G_3 , $G_2 \times$ 散鳞镜鲤和 $G_2 \times$ 四倍体鲫鱼的染色体数目. 研究表明: (i) G_2 产生的二倍体卵子无需染色体加倍处理, 仅在灭活散鳞镜鲤精子激活下, 形成了大量 G_3 , (ii) G_3 和雌核发育二倍体鲫鱼第 1 代(G_1)、 G_2 一样, 也表现出杂交特征, 并且都是二倍体($2n = 100$); G_2 与二倍体散鳞镜鲤和四倍体鲫鱼分别交配形成了三倍体($3n = 150$)和四倍体($4n = 200$)鱼; (iii) 二倍体 G_2 产生的二倍体卵子在雌核发育过程中, 有明显第二极体排出, 排除了二倍体卵子源于第二极体保留的可能. 另外, 还对二倍体鲫鱼产生二倍体卵子的机制进行了讨论. 雌核发育二倍体鲫鱼杂交克隆品系建立证明二倍体卵子通过雌核发育形式可形成一个能产生二倍体卵子的新型二倍体鲫鱼品系, 二倍体鲫鱼产生二倍体卵子的特殊繁殖方式在生物进化和生产应用方面都具有重要意义.

关键词 雌核发育 二倍体卵子 染色体 四倍体

人工雌核发育一般指单倍体卵子经遗传物质灭活的精子激活, 通过染色体加倍处理, 形成主要依靠卵子遗传物质来发育的二倍体后代. 激活卵子的精子一般是异源精子. 人工雌核发育技术在鱼类提纯育种、探讨鱼类性别决定和鱼类单性养殖等方面具有重要作用. 一般认为一代雌核发育鱼的遗传纯合效应能够相当于多代鱼的自交提纯效应, 另外, 异源精子产生的“异精”效应可以使雌核发育后代形成一些母本没有的特征. 国内外关于鱼类单倍体卵子的雌核发育研究已有不少报道^[1,2], 单倍体卵子在雌核发育过程中, 必须经历一个染色体加倍处理过程, 该过程对卵子发育有较大损伤作用. 如果利用二倍体卵子进行雌核发育, 则可省去染色体加倍处理步骤, 这样不但大大简化了操作流程, 而且可明显提高雌

核发育后代存活率. 国内外关于二倍体杂交鱼产生二倍体配子已有一些报道, 如二倍体银鲫(*Carassius auratus gibelio*)和鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)杂交第 1 代雌性产生二倍体卵子^[3]; 二倍体红鲫(*Carassius auratus red* var.)和鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)杂交第 2 代雌性和雄性分别产生二倍体卵子和二倍体精子^[4]; 兴国红鲤(*Cyprinus carpio red* var.)和红鲫杂交第 1 代二倍体雌性个体产生二倍体卵子^[5], 并且这些二倍体卵子与单倍体精子受精形成的三倍体能够产生三倍体卵子, 这些三倍体卵子经灭活精子激活可进行雌核发育并形成三倍体后代, 1 尾三倍体雌鱼产生的卵子与红鲫精子受精形成了异源四倍体鱼, 该种四倍体鱼的雌性以雌核发育的形式繁殖后代^[5].

我们已连续获得 14 代两性可育的异源四倍体鲫

收稿日期: 2006-06-21; 接受日期: 2006-07-27

国家自然科学基金重点和面上项目(批准号: 30330480, 30571444)、教育部高等学校博士学科专项科研基金(批准号: 200405422001)、教育部长江学者和创新团队计划基金(批准号: IRT0445)和科技部农业科技成果转化基金(批准号: 2005380)资助

* E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

鲤群体(F_3-F_{16})^[4,6], 并对四倍体鲫鲤和其三倍体后代的一些生物学特性进行了研究^[4,6-16]. 雌、雄四倍体鲫鲤能稳定产生二倍体精子和二倍体卵子, 使得该群体的四倍体性能代代相传^[7]. 雌性四倍体鲫鲤产生的二倍体卵子具有 2 套染色体, 在灭活散鳞镜鲤精子激活下, 二倍体卵子无需染色体加倍处理大量生存了第一代全雌的雌核发育二倍体($2n=100$)鲫鲤(G_1), G_1 的全雌性说明雌性四倍体鲫鲤的性别决定类型为 XXXX^[8]. 二倍体 G_1 在外形上保留了鲫鲤杂交特征, 在生殖上表现出独特的繁殖方式, 即能产生二倍体卵子, 证明二倍体 G_1 能产生二倍体卵子的证据有: (i) G_1 产生直径分别为大(0.2 cm)、中(0.17 cm)、小(0.13 cm)三种类型卵子, 它们所占比例分别为 1.16%, 93.33% 和 5.50%, 其中中型卵子与普通四倍体鲫鲤产生的二倍体卵子直径一致, 被认为是二倍体卵子; 而小型卵子大小与二倍体红鲫和二倍体鲤鱼产生的卵子直径一致, 它们被认为是单倍体卵子^[8]. (ii) G_1 产生的中型卵子无需染色体加倍处理, 经灭活散鳞镜鲤精子激活可发育为大量的全雌性第 2 代雌核发育二倍体鲫鲤(G_2 , $2n=100$)^[8], G_2 的全雌性证明了 G_1 的性别决定类型为 XX. (iii) G_1 产生的卵子与二倍体红鲫产生的单倍体精子受精, 形成了三倍体鲫鱼类型的后代($3n=150$)^[8]; G_1 产生的卵子与普通四倍体鲫鲤产生的二倍体精子受精, 形成了新型四倍体鲫鲤(简称 $G_1 \times 4n$, $4n=200$)^[9,10]. 通过 RAPD 和微卫星 DNA 方法检测, 证明 G_2 遗传纯度高于 G_1 , G_1 遗传纯度高于普通四倍体鲫鲤, 同时还发现在 G_1 中存在散鳞镜鲤 DNA 片段^[11]. G_1 和 G_2 在生长速度、抗病力等方面, 都明显比普通四倍体鲫鲤要强, 其中对比养殖实验表明, G_2 的生长速度比普通四倍体鲫鲤的生长速度快 20.6%, 新型四倍体鲫鲤($G_1 \times 4n$)的生长速度比普通四倍体鲫鲤快 12.7%^[9], 充分显示了雌核发育的生物学效应.

在已有研究基础上, 本文研究内容为: (i) 二倍体 G_2 是否与二倍体 G_1 一样能够形成二倍体卵子? (ii) G_2 产生的卵子在无染色体加倍处理情况下是否仍能形成二倍体后代(G_3)? (iii) G_2 卵子在形成 G_3 发育过程中是否有第二极体排出? G_1 , G_2 , G_3 的形成为人工创建一个能大量产生二倍体卵子的二倍体鲫鲤杂交品系奠定了坚实基础, 该品系为制备新型三倍体和四倍体鲫鲤鱼提供了重要二倍体卵子资源. 弄

清楚二倍体鲫鲤产生二倍体卵子机制, 在多倍体的形成、生物进化方面都具有非常重要意义.

1 材料与方法

1.1 实验鱼

二倍体雌核发育鲫鲤第二代(G_2)、红鲫(*Carassius auratus red var.*)、散鳞镜鲤(*Cyprinus carpio var.*)、新型四倍体鲫鲤($G_1 \times 4n$)均取自湖南师范大学内的国家四倍体鱼保护基地. 其中检测存活的 260 尾 G_2 , 全部为雌性并能挤出卵子. 选择达到性成熟的 2 龄 G_2 20 尾, 2 龄雌、雄红鲫各 2 尾, 2 龄雄性散鳞镜鲤和四倍体鲫鲤($G_1 \times 4n$)各 2 尾. G_2 用于雌核发育形成 G_3 , 雄性散鳞镜鲤为 G_3 雌核发育提供灭活精子, 散鳞镜鲤正常精子与 G_2 卵子受精作为雌核发育的对照组; 雄性新型四倍体鲫鲤($G_1 \times 4n$)用于与 G_2 交配以验证 G_2 产生卵子的倍性和形成另一种新型四倍体鱼. 雌性红鲫产生的卵子作为比较 G_2 卵子大小的对照组; 红鲫自交的胚胎发育作为 G_3 胚胎发育的对照组.

1.2 G_2 卵子大小测量及雌核发育细胞学观察

用游标卡尺选择 G_3 和红鲫产生的卵子各 300 个, 对它们的大小进行测量. 挤出达到性成熟的雄性散鳞镜鲤的精液于培养皿中, 用 Hank's 液稀释精液, Hank's 液与精液的比例为 4:1, 稀释的精液在培养皿中以薄层分布, 把盛精液的培养皿放在垫有冰袋的摇床上(旋转速度为 30~40 r/min), 并置于 2 支功率分别为 15 W 的紫外灯下照射处理, 紫外灯与精液的距离为 10~12 cm, 照射时间为 30 min. 照射过的精液与 G_2 的成熟卵子混合, 并用干净的鸡毛充分搅拌精子和卵子, 1~2 min 后把卵子平铺到盛有清水的培养皿中, 无需染色体加倍处理, 胚胎在 20℃~21℃ 水温下孵化.

作为 G_3 的对照组, 把没有灭活的散鳞镜鲤的精子与 G_2 的卵子进行人工受精; 另外为了对照 G_2 产生的卵子大小, 把红鲫精液和卵子进行人工授精; 上述两组对照组的卵子在水温为 20℃~21℃ 的培养皿中孵化.

观察 G_3 , $G_2 \times$ 散鳞镜鲤的胚胎发育过程, 统计它们发育到原肠胚的百分率(过原肠胚数/卵子总数 \times 100%)和孵化率(出苗数/卵粒总数 \times 100%).

G_2 的成熟卵子与灭活的散鳞镜鲤的精液混合后,

选择 G_2 产生的直径为 0.17 cm 的中型卵子进行固定以观察它们雌核发育细胞学行为, 取材的时间间隔如下: 精卵混合后 1~10 min 时间段内, 每隔 1 min 取一次材; 10~75 min 时间段内, 每隔 5 min 取一次材. 将所取材料用 Smith's 液固定 4~12 h. 固定完毕后, 用 70% 的乙醇洗涤 2~3 次. 然后, 用酒精逐级脱水, 二甲苯透明石蜡包埋, 连续切片(厚度 6 μm), HE 染色, 中性树胶封片. 用 Pixera pro 600ES(美国) 显微数码摄像系统拍照.

1.3 G_3 及其四倍体、三倍体后代的倍性检测

用肾细胞直接制片法对 10 尾 G_3 , 5 尾 $G_2 \times$ 散鳞镜鲤, 5 尾 $G_2 \times$ 新型四倍体鲫鲤(简称 $G_2 \times (G_1 \times 4n)$) 的肾细胞染色体数目进行检测. 肾细胞直接制片法的方法为: 在 18 $^{\circ}\text{C}$ ~22 $^{\circ}\text{C}$ 水温下培育实验鱼 1~3 天后, 对实验鱼注射 PHA 1~3 次, 每次剂量为 2~8 $\mu\text{g/g}$ 体重, 间隔时间为 12~24 h, 在解剖取材前 2~6 h, 注射秋水仙素, 剂量为 2~4 $\mu\text{g/g}$ 体重. 取出肾组织, 在生理盐水下剪碎肾组织, 0.075 mol/L KCl 低渗处理, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 温度下低渗 40~60 min; 用冰醋酸: 甲醇(1:3) 固定肾细胞 3 次; 在冰冻载玻片上滴片; Giemsa 染液染色.

2 结果

2.1 G_2 卵子大小及 G_3 雌核发育细胞学观察

G_2 和红鲫的卵子都是粘性卵, 但是 G_2 的卵子的粘性比红鲫的卵子的粘性弱. 对 G_2 , 红鲫产生的卵子的大小测量结果为: G_2 产生大、中、小三种类型的卵子, 它们的直径分别为 0.20, 0.17 和 0.14 cm, 所占的比例分别为 1.89%, 95.60% 和 2.47%; 而红鲫只产生一种直径为 0.14 cm 的卵子.

G_2 产生的中型卵子被灭活的散鳞镜鲤精子激活后, 具有正常的胚胎发育行为. 观察到的雌核发育过程中的细胞学行为有: 激活卵子 2 min 后, 卵子的染色体处于第二次减数分裂中期, 纺锤体处于卵质中央(图 1(a)); 激活卵子 3 min 后, 纺锤体向卵质边缘迁移(图 1(b)); 激活卵子 8 min 后, 处于第二次减数分裂中期的部分纺锤体已突出到卵质边缘外(图 1(c)); 激活卵子 8~10 min 后, 由第二次减数分裂中期发展到第二次减数分裂后期或末期, 在卵子边缘的纺锤体把染色体逐步向两极牵扯(图 1(d)); 最终把一半的染

色体排出卵子外并形成外排的第二极体(图 1(e), (f)); 激活卵子 40 min 后, 可见雌性原核形成并退回至卵质中央(图 1(g)); 激活卵子 70 min 后, 卵子进入第一次卵裂后期, 在纺锤丝的牵引下, 两组染色体各自移向纺锤体的两极(图 1(h)).

G_3 , $G_2 \times$ 散鳞镜鲤的胚胎都有正常的胚胎发育过程, 它们都经历细胞质向动物极流动、高囊胚、中囊胚、低囊胚、原肠早、中、晚期、神经胚、器官原基形成、脱膜等时期, G_3 在激活卵子 89 h 后开始脱膜, $G_2 \times$ 散鳞镜鲤的胚胎在激活卵子 75 h 后开始脱膜. G_3 过原肠胚的百分比为 37.36%, 孵化率为 26.11%; $G_2 \times$ 散鳞镜鲤过原肠胚的百分比和孵化率分别为 86.20% 和 43.84%. 两组实验中具体统计数据见表 1.

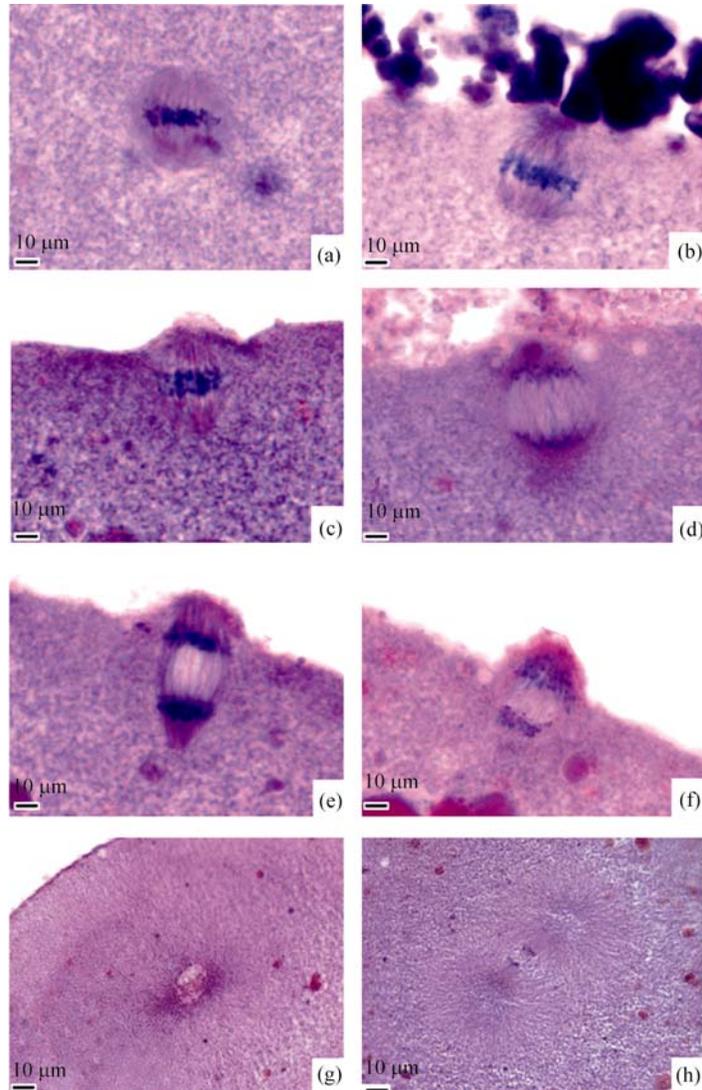
2.2 G_3 及其四倍体、三倍体后代的倍性确定

染色体数目的检测结果表明: 在 G_3 中, 98.4% 的肾细胞分裂相中的染色体数目处于 95~100 范围内, 证明它们是二倍体($2n=100$)(图 2(a)), 而在雌核发育对照组($G_2 \times$ 散鳞镜鲤)中, 98% 的肾细胞分裂相中的染色体数目处于 145~150 的范围内, 证明它们是三倍体($3n=150$) (图 2(b)), $G_2 \times (G_1 \times 4n)$ 中 96% 的肾细胞分裂相中的染色体数目处于 195~200 之间, 说明它们是四倍体($4n=200$)(图 2(c)), 这 3 种鱼染色体布情况见表 2.

在外形上, G_3 与 G_2 , G_1 基本一致, G_3 也保留鲫鲤杂交特征, 如具有一对吻须和一对颌须, 但是它们的长度都明显比鲤鱼的吻须和颌须要短, 仅能看到须的基部, G_3 侧线鳞数目为 31~32(图 3); $G_2 \times$ 散鳞镜鲤具有很明显的 1 对吻须和 1 对颌须, 其侧线鳞数目为 35. 在外形上, $G_2 \times (G_1 \times 4n)$ 与 $G_1 \times 4n$ 相似, 其侧线鳞数目为 32, 具有 2 对很短的须.

3 讨论

以下实验结果证明 G_2 产生二倍体卵子: (i) G_2 产生的卵子在无染色体加倍处理情况下可以自身发育为二倍体 $G_3(2n=100)$; (ii) $G_2 \times (G_1 \times 4n)$ 后代中存在四倍体($4n=200$) 鱼和 $G_2 \times$ 散鳞镜鲤后代中存在三倍体($3n=150$) 鱼; (iii) G_2 产生的二倍体卵子中有 95.6% 的卵子的大小与四倍体鲫鲤产生的二倍体卵子的大小一致, 其直径 0.17 cm. 另外, 值得注意的是, G_2 产生二倍体卵子比例(95.6%) 高于 G_1 产生二倍体卵子比例(93.3%), 表明随着雌核发育后代延伸, 雌核发育二

图 1 雌核发育鲫鲤第 3 代(G_3)受精细胞学观察

(a) 激活受精 2 min 后, 卵子染色体进入第二次减数分裂中期, 纺锤体处于卵质中央; (b) 激活受精 3 min 后, 处于第二次减数分裂中期的染色体和纺锤体向卵质边缘靠近; (c) 激活受精 8 min 后, 处于第二次减数分裂中期的纺锤体部分已移到卵质边缘; (d) 激活受精 8 min 后, 进入第二次减数分裂后期, 染色体受纺锤丝牵引平均分配到两极; (e) 激活受精 9 min 后, 进入第二次减数分裂末期, 明显可见第二极体外排趋势; (f) 激活受精 10 min, 染色体向外排出形成第二极体; (g) 激活受精 40 min 后, 雌性原核形成并退回至卵质中央; (h) 激活受精 70 min 后, 进入第一次卵裂后期, 在纺锤丝牵引下, 两组染色体逐渐分开

表 1 G_3 , G_2 ×散鳞镜鲤过原肠胚、孵化率

鱼名	总卵粒数	过原肠胚数	出苗尾数	过原肠胚百分比	孵化率
G_3	20260	7570	3960	37.36%	26.11%
G_2 ×散鳞镜鲤	20300	17500	8900	86.20%	43.84%

倍体鲫鲤产生二倍体卵子比例在逐渐升高。 G_3 表现出较高雌核发育孵化率(26.11%), 说明在雌核发育过程中省出了染色体加倍处理程序, 对卵子发育有益, 相比之下, 我们进行的另一项用四倍体鲫鲤的原始母

本——红鲫的单倍体卵子经冷休克染色体加倍处理的雌核发育实验中, 获得的二倍体雌核发育红鲫孵化率(数据待发表)比本实验中的孵化率要低。

二倍体 G_1 , G_2 , G_3 的形成预示二倍体卵子通过无

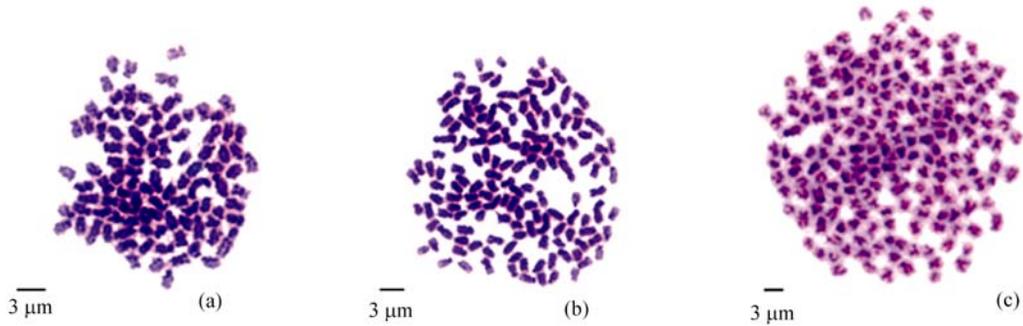


图 2 G_3 及其三倍体对照组及新型四倍体染色体

(a) G_3 肾细胞有丝分裂中期染色体($2n=100$); (b) 三倍体 $G_2 \times$ 散鳞镜鲤肾细胞有丝分裂中期染色体($3n=150$); (c) 新型四倍体 $G_2 \times (G_1 \times 4n)$ 肾细胞有丝分裂中期染色体($4n=200$)

表 2 G_3 , $G_2 \times$ 散鳞镜鲤, $G_2 \times (G_1 \times 4n)$ 染色体分布情况

鱼名	总分裂相数	染色体分布					
		90~95	95~100	145~150	150~160	195~200	200~210
G_3	500	8	492				
$G_2 \times$ 散鳞镜鲤	250			245	5		
$G_2 \times (G_1 \times 4n)$	250					240	10



图 3 G_3 外形图

需染色体加倍处理的雌核发育方法可形成一个二倍体鲫鲤杂交品系($G_1, G_2, G_3, \dots, G_n$)。在繁殖特性方面, 这个二倍体鲫鲤杂交品系具有能稳定大量产生二倍体卵子的特点。从理论上讲, 卵子在发育过程中第二极体保留有可能导致卵子倍性增加, 但是, 本研究表明二倍体 G_2 产生的中型卵子在发育过程中有明显第二极体排出, 则排除了这种可能性。

二倍体鲫鲤杂交鱼为什么会产生二倍体卵子呢? 我们注意到尽管 G_1, G_2, G_3 是雌核发育后代, 但是它们都保留有明显的鲫鲤杂交特征, 如它们的吻须和颌须长度介于有须的鲤鱼和无须的红鲫之间, 仅能

看到须的基部。 G_1, G_2, G_3 的侧线鳞数目(31~32)处于鲤鱼侧线鳞数目(36~37)和红鲫的侧线鳞数目(29)之间 [12]。雌核发育二倍体鲫鲤的杂交特征表明: 它们既有鲤鱼染色体又具红鲫染色体。鲤鱼和红鲫在分类上属于不同的属, 两者之间具有较远的亲缘关系, 因此它们的染色体之间的不协调性将导致减数分裂过程中同源染色体不能正常配对, 但是如果鲫鲤杂交的早期生殖细胞进行核内复制再进行正常的减数分裂或者不进行第一次减数分裂, 这样可以克服鲫鲤间同源染色体难以配对的问题。我们以前的研究结果表明在 G_2 中存在 100($2n$), 200($4n$), 及 380(接近 $8n$) 条染色体的卵原细胞 [9], 该现象虽然支持核内复制学说, 但是关于二倍体鲫鲤产生二倍体卵子的机制还有待进行更深入研究。

鲫鲤 F_1-F_2 是二倍体($2n=100$), 二倍体雌性鲫鲤 F_2 产生大、中、小直径分别为 0.2, 0.17, 0.13 cm 三种卵子, 这三种卵子分别占 50%, 35.9% 和 14.1% 的比例, 其中直径为 0.17 cm 卵子是二倍体卵子; 直径为 0.13 cm 卵子是单倍体卵子; 直径为 0.2 cm 卵子可能是比二倍体更高倍性卵子 [4]。通过扫描电子显微镜观察, 可见鲫鲤 F_2 精液中包括大小不同的多种精子, 其中 40% 的精子头部直径为 1.9 μm , 它们是单倍体精子,

因为它们的精子头部直径与二倍体鲤鱼的单倍体精子头部直径一致; 二倍体鲫鱼 F_2 还产生 48.75% 二倍体精子(精子头部直径为 2.4 μm), 该种精子头部直径与四倍体鲫鱼产生的二倍体精子头部直径一致; 另外还产生 2.5% 四倍体精子(精子头部直径为 3.1 μm)、2.5% 接近八倍体精子(精子头部直径为 3.8 μm) 以及 6.25% 非整倍体精子(精子头部直径为 1.4 μm)。雌、雄鲫鱼 F_2 分别产生的二倍体卵子和二倍体精子受精, 在鲫鱼 F_3 中形成了两性可育的异源四倍体鲫鱼群体 [4]。目前该异源四倍体鲫鱼群体已繁殖到 F_{16} 代, 形成了连续 14 代四倍体鲫鱼群体。尽管我们多次重

复从二倍体 F_2 形成 F_3 , 并在每批 F_3 中都获得了两性可育的异源四倍体鲫鱼, 它们相互交配形成了四倍体鲫鱼群体, 但是每次获得可育的雌、雄鲫鱼 F_2 的个体数目是非常有限的, 因此研究二倍体鲫鱼 F_2 产生二倍体配子材料是非常有限的。而本研究中的雌核发育二倍体鲫鱼(G_1, G_2, G_3) 与雌性二倍体鲫鱼 F_2 在染色体组成、繁殖特性等方面都有非常相似之处, 因此雌核发育二倍体鲫鱼品系的建立为研究二倍体鲫鱼产生二倍体配子提供了大量实验材料。可育的二倍体鲫鱼杂交克隆体系的建立, 为研究远缘杂交鱼在生物进化上的作用提供了宝贵实验材料。异源

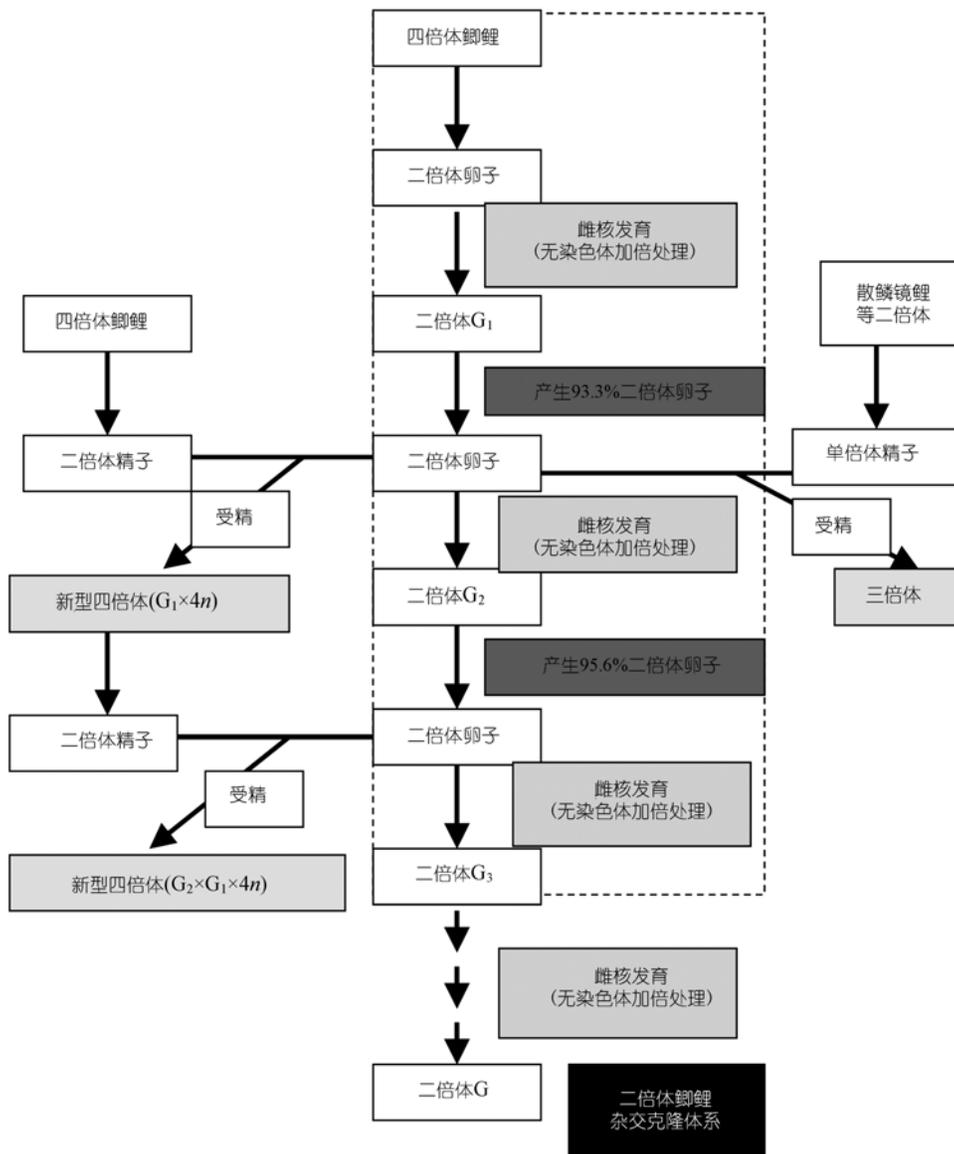


图 4 雌核发育二倍体鲫鱼杂交克隆体系建立及其应用

四倍体鲫鲤群体的形成证明, 通过不同属的二倍体远缘杂交可以形成四倍体新种. 从二倍体发展到四倍体, 然后从四倍体繁衍出二倍体, 这无疑为生物界中存在不同染色体倍性的鱼类提供了很好的研究模式. 以前, 还没有连续获得可育的雌核发育二倍体远缘杂交品系的报道.

雌核发育二倍体鲫鲤杂交克隆品系的建立至少具有下列几个用途: (i) 将形成一个生长速度快、能产生二倍体卵子的二倍体鲫鲤新型品系; (ii) 该克隆品系产生的二倍体卵子与二倍体精子受精可形成改良型的新型四倍体鲫鲤; 与单倍体精子受精可形成新型三倍体鱼; (iii) 雌核发育二倍体克隆品系建立, 说明四倍体鲫鲤群体除开自身能稳定传代形成一个四倍体鲫鲤新种外, 其产生的二倍体卵子通过雌核发育也可以衍生为雌核发育的二倍体杂交群体; (iv) 该克隆品系的建立为研究二倍体鲫鲤杂交鱼产生二倍体配子提供了好的生物学平台. 雌核发育二倍体鲫鲤杂交克隆品系的形成和它们应用的操作系统参见图 4.

参 考 文 献

- Hulata G. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 2001, 111: 155—173 [\[DOI\]](#)
- Pandian T, Koteeswaran R. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 1998, 384: 167—243 [\[DOI\]](#)
- Cherfas N B, Gomelsky B L, Emelyanova O V, et al. Induced diploid gynogenesis and polyploidy in crucian carp, *Carassius auratus gibelio*(Bloch)×common carp, *Cyprinus carpio* L., hybrids. *Aquaculture and Fisheries Management*, 1994, 25, 943—945
- Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp×common carp hybrids as an effect of inter-specific hybridization. *Aquaculture*, 2001, 192: 171—186 [\[DOI\]](#)
- 吴清江, 叶玉玲, 董新红. 由鲤(*Cyprinus carpio*)和(*carassius auratus*)染色体组叠加构建的两个单性人工多倍体克隆. *中国科学, C 辑*, 2003, 33(3): 218—288
- 孙远东, 刘少军, 张 纯, 等. 异源四倍体鲫鲤 F₉-F₁₁ 染色体和性腺观察. *遗传学报*, 2003, 30(5): 37—41
- Zhang C, He X X, Liu S J, et al. The Chromosome pairing in meiosis I in allotetraploid hybrids and allotriploid crucian carp. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(1): 89—94
- Liu S J, Sun Y D, Zhang C, et al. Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids of red crucian carp×common carp. *Aquaculture*, 2004, 236: 193—200 [\[DOI\]](#)
- 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*, 2005, 32(2): 136—144
- 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, 51(2): 360—364
- Yan J P, Liu S J, Sun Y D, et al. RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) ×common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 2005, 243: 49—60 [\[DOI\]](#)
- 李建中, 张轩杰, 刘少军, 等. 异源四倍体鲫鲤的形态特征. *湖南师范大学自然科学学报*, 2001, 24: 64—66
- Guo X H, Liu S J, Liu Y. Evidence for recombination of mitochondrial DNA in triploid crucian carp. *Genetics*, 2006, 172: 1475—1479
- Guo X H, Liu S J, Zhang C, et al. Comparative and evolutionary analysis of the cytochrome b sequences in cyprinids with different ploidy levels derived from crosses. *Genetica*, 2004, 121: 295—301 [\[DOI\]](#)
- Guo X H, Liu S J, Liu Y. Comparative analysis of the mitochondrial DNA control region in cyprinids with different ploidy level. *Aquaculture*, 2003, 24(1-4): 25—38 [\[DOI\]](#)
- 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, C 辑*, 2006, 36(3): 247—254