

## 异源四倍体鲫鲤群体的形成及四倍体化 在脊椎动物进化中的作用

刘少军, 曹运长, 何晓晓, 李建中, 刘筠

(湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

**[摘要]** 对雌雄两性能育并形成群体的异源四倍体鲫鲤的染色体数目和组型, DNA含量, 红细胞大小, 生殖腺和配子, 胚胎发育, 形成机理, 外形等方面进行了较全面描述。四倍体鲫鲤经过九代( $F_3 - F_{11}$ )的四倍体性的繁殖, 已形成了一个数目庞大的遗传性状稳定的群体。该四倍体群体在染色体数目、生殖、外形特征等方面都与它们的原始父母本—二倍体湘江野鲤和红鲫有本质的差别。在遗传特性、稳定传代、生育隔离等方面, 异源四倍体鲫鲤群体为形成一个新的四倍体新种奠定了基础。新的四倍体鱼群体的形成对脊椎动物的进化理论和它们在生产上的应用都具有重要的意义。

**[关键词]** 异源四倍体; 三倍体; 二倍体配子; 进化

新种的形成具有两种方式, 一是渐变式, 一是爆发式。渐变式是一种常见的新的形成方式, 但是这种方式需要很长很长的时间。爆发式主要指通过染色体加倍后形成新种<sup>[1]</sup>。通过异源多倍体来形成新种, 在植物中已有报导, 例如萝卜甘蓝(*Raphanobrassica*)是通过染色体加倍形成的异源四倍体<sup>[1]</sup>, 普通小麦是通过杂交形成的异源六倍体<sup>[1]</sup>。在脊椎动物中, 间接的推测认为有44条染色体的金仓鼠(*Mesocricetus auratus*)是由普通仓鼠(*Cricetus Cricetus*) ( $2n=22$ )和背仓鼠(*Cricetulus barabensis*) ( $2n=22$ )的杂种经过染色体加倍形成的异源四倍体<sup>[1]</sup>, 但是缺乏直接的四倍体化证据。通过染色体数、有关酶和基因变异的分析, 推测在脊椎动物中存在古老四倍体动物(Ancient tetraploid), 如美国青蛙(*Odontophrynus americanus*)<sup>[2]</sup>、甚至人类<sup>[3]</sup>也被认为是古老四倍体动物, 在鱼类中, 鲤鱼被认为是来源于草鱼染色体加倍形成的古老四倍体鱼<sup>[4]</sup>, 金鱼<sup>[5]</sup>和虹鳟鱼<sup>[6]</sup>也被认为是古老四倍体鱼。但是这些也都只

是间接的推测, 同样缺乏直接的四倍体化证据。一些物理方法如静水压法<sup>[7-10]</sup>和化学方法如用秋水仙素处理等<sup>[11,12]</sup>被用来制备四倍体鱼, 但这些方法都没有研制出两性能育并形成群体的四倍体鱼。湖南师范大学生命科学学院和湘阴县东湖渔场合作, 经过十多年的试验研究, 在国内外首次获得一个遗传性状稳定、两性能育的异源四倍体鲫鲤群体。目前已连续获得九代四倍体鱼。我们对异源四倍体鲫鲤的染色体数目、DNA含量、血细胞大小、性腺结构、配子倍性、大小和结构、外形形态特征、胚胎发育、mtDNA的结构、食性等方面都进行了较系统的研究, 对用异源四倍体鲫鲤与日本白鲫倍间交配产生的三倍体湘云鲫的一些生物学特性也进行了研究。上述有些研究结果已发表<sup>[13-27]</sup>, 有些待发表。本文通过我们所取得的实验结果, 首次全面阐述该四倍体鲫鲤鱼已形成一个新的遗传性状稳定, 四倍体性能通过两性交配繁殖来代代相传的群体, 该群体为它们在将来形成一个新的四倍体新种奠定了基础。稳定的四倍体鱼群体的形成支持了脊

**[收稿日期]** 2001-08-16

**[基金项目]** 国家“八六三”计划项目(1998182); 湖南省重点科研项目(991065)

**[作者简介]** 刘少军(1962-), 男, 湖南长沙市人, 湖南师范大学教授, 博士生导师

椎动物的进化与四倍体化有关的学说。

### 1 鲫鲤 $F_3 - F_{10}$ 四倍体性的遗传学特性和四倍体性的证据

湘江野鲤 (*Cyprinus carpio* L) 和红鲫 (*Carassius auratus red* var.) 都是二倍体 (图 1)。红鲫的体色为红色, 无须; 湘江野鲤的体色为灰色, 具有一对明显的吻须和一对明显的颌须。鲫鲤  $F_1$  由红鲫 (♀) 和湘江野鲤 (♂) 杂交形成, 在  $F_1$  中, 发现 4.7% 的雄性和 44.3% 的雌性是可育的<sup>[28]</sup>, 目前已繁殖到  $F_{11}$  (检测工作做到  $F_{10}$ )。

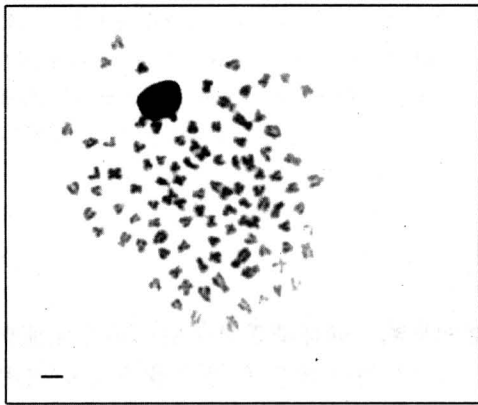


图 1 二倍体红鲫染色体 ( $2n = 100$ ), 短棒 = 3  $\mu\text{m}$

Fig.1 The chromosomes of the diploid red crucian carp ( $2n = 100$ ), bar = 3  $\mu\text{m}$

鲫鲤  $F_1 - F_2$  的体色为灰色, 其外形介于红鲫与湘江野鲤之间, 其两对须比湘江野鲤的须短; 鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  的体色为灰色, 其外形相似于鲫鲤  $F_1 - F_2$ , 但也显示一些差异, 如鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  的两对须比鲫鲤  $F_1 - F_2$  更加退化, 一般肉眼观察不易发觉, 仅仅剩下须的基部。鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  的生长速度明显比  $F_1 - F_2$  要慢。红鲫的脊椎骨的数目为 28~29, 湘江野鲤的脊椎骨的数目为 36~37,  $F_3 - F_{10}$  的脊椎骨的数目介于它们的原始父母本之间, 为 33~34; 红鲫的侧线鳞数目为 29, 湘江野鲤的侧线鳞数目为 36~37, 鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  的侧线鳞数目位于它们两者之间, 为 31~32; 红鲫的下咽齿为 1 行, 湘江野鲤的下咽齿为 3 行, 鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  的下咽齿介于两者之间为 2 行。

通过肾细胞直接制片法和淋巴细胞体外培养方法检测染色体数目和组型, 证明鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  的染色体数目为  $4n = 200$  (图 2), 组型为  $44m + 68sm +$

$44st + 44$ ; 鲫鲤  $F_1$  和  $F_2$  的染色体数目为  $2n = 100$ , 组型为  $22m + 34sm + 22st + 22t$ , 它们的原始亲本—红鲫和湘江野鲤是二倍体 ( $2n = 100$ ), 其染色体组型也为  $22m + 34sm + 22st + 22t$ 。日本白鲫的染色体数目为  $2n = 100$ 。用鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  为父本, 分别与作为母本的本日本白鲫 (*Carassius auratus cuvieri* T. et S.) 和兴国红鲤 (*Cyprinus carpio red* var.) 等鲤鱼交配, 制备了鲫鱼型的三倍体—湘云鲫和鲤鱼型的三倍体—湘云鲤。湘云鲫 (图 3) 和湘云鲤 (图 4) 的染色体数目为  $3n = 150$ <sup>[13]</sup>

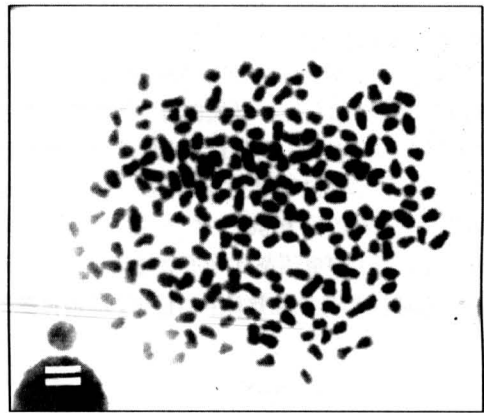


图 2 异源四倍体鲫鲤染色体 ( $4n = 200$ ), 短棒 = 3  $\mu\text{m}$

Fig.2 The chromosomes of the allotetraploid hybrid ( $4n = 200$ ), bar = 3  $\mu\text{m}$

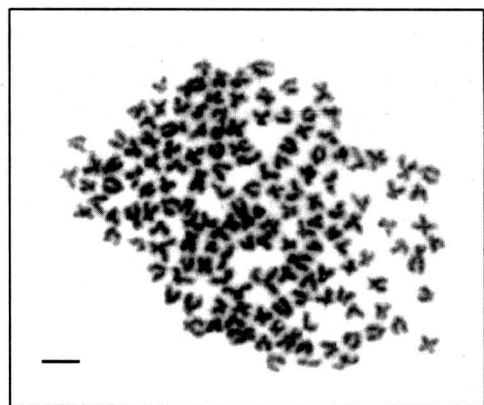


图 3 三倍体湘云鲫染色体 ( $3n = 150$ ), 短棒 = 3  $\mu\text{m}$

Fig.3 The chromosomes of the triploid crucian carp ( $3n = 150$ ), bar = 3  $\mu\text{m}$

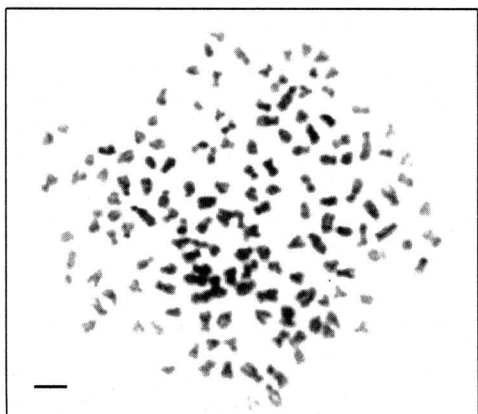


图 4 三倍体湘云鲤染色体 ( $3n=150$ ),  
短棒 =  $3\ \mu\text{m}$

Fig.4 The chromosomes of the triploid carp ( $3n=150$ ), bar =  $3\ \mu\text{m}$

在四倍体鲫鲤精巢的染色体制片中，处于第一次减数分裂中期的二价体的数目为 100；在三倍体湘云鲤的精巢染色体制片中，处于第一次减数分裂的二价体的染色体数目为 50，另有 50 个没有配对的单价体\*。

流式细胞仪 (Cell Counter Analysis CCA-II) 检测红细胞的 DNA 含量表明四倍体鲫鲤的 DNA 含量分别是日本白鲫和湘云鲫的 2 倍和 1.5 倍，肌肉的 DNA 含量分析也表明四倍体鲫鲤的 DNA 含量是日本白鲫的两倍<sup>[13]</sup>。鲫鲤  $F_2$ 、湘江野鲤、红鲫、日本白鲫的 DNA 含量相近，进一步验证了鲫鲤  $F_2$  的二倍体性。

红细胞核大小的测量表明四倍体鲫鲤的红细胞核的体积分别为日本白鲫和湘云鲫的 2 倍和 1.5 倍<sup>[13]</sup>。四倍体鲫鲤的有些红细胞核呈现哑铃状的结构，而在二倍体日本白鲫没有观察到此现象，该特征可视为粗略鉴定四倍体鲫鲤鱼倍性的标志之一。

染色体数目、组型、DNA 含量、红细胞核的大小等方面的实验结果一致验证了鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  的四倍体性 ( $4n=200$ )，以鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  为父本分别与二倍体日本白鲫 ( $2n=100$ ) 和鲤鱼 ( $2n=100$ ) 交配产生的湘云鲫和湘云鲤的染色体数目分别都是  $3n=150$ ，反过来也证明了鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  的四倍体性。而湘江野鲤、红鲫、日本白鲫以及鲫鲤  $F_1 - F_2$  都是二倍体 ( $2n=100$ )。在鲤鱼中，我们发现第一对两条亚中部染色体 (也是最长的染色体) 的

长臂和短臂之比明显大于红鲫中第一对两条亚中部染色体的长臂和短臂之比。在鲫鲤  $F_2$  的第一对两条亚中部染色体中，一条染色体的长臂与短臂之比明显大于另一条，前者来源于鲤鱼，后者来源于红鲫；在鲫鲤  $F_8$  中，第一号四条亚中部染色体中，有两条染色体的长臂与短臂之比明显大于另外两条，前两条是来源鲤鱼，后两条来源于红鲫，这为证明鲫鲤四倍体是异源四倍体而不是同源染色体提供了证据<sup>[13]</sup>。鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  的外形特征 (如体型、须的长短、脊椎骨、侧线鳞数目、下咽齿行数) 处于红鲫和湘江野鲤之间也说明该四倍体是异源四倍体而不是同源四倍体，它们是通过杂交而来，不是雌核发育或雄核发育的后代。

## 2 鲫鲤四倍体鱼的生殖特性

鲫鲤  $F_3 - F_{10}$  生殖腺具有正常的发育过程，在繁殖季节卵巢内具有大量充满卵黄的成熟卵子和一些体积较小的 I 时相和 II 时相初级卵母细胞，用手挤鱼的腹部，有成熟的卵子流出；卵子 (直径为  $0.17\ \text{cm}$ ) 的体积明显比日本白鲫 (直径为  $0.14\ \text{cm}$ ) 和红鲫 (直径为  $0.13\ \text{cm}$ ) 的要大。在繁殖季节，用手挤雄性四倍体鲫鲤鱼的腹部，有白色的成熟精液流出。其精巢内布满许多精巢小叶，小叶中可见精原细胞、精子细胞和成熟的精子；精原细胞的旁边有支持细胞，支持细胞的细胞质内可见明显的可能与激素合成有关的颗粒物质。四倍体鲫鲤产生的二倍体精子头部直径为  $2.40\ \mu\text{m}$ ，而湘江野鲤和散鳞镜鲤产生的单倍体精子头部直径为  $1.90\ \mu\text{m}$ ，前者的体积为后者的两倍。在透射电镜下观察，二倍体精子和单倍体精子的结构基本相似，两者都是由头部和尾部组成，头部为圆形或椭圆形，其内充满致密的核物质；尾部的前段部位有多个线粒体，尾部的中央轴丝具有典型的  $9+2$  微管纤维结构。

异源四倍体鲫鲤产生的成熟卵子和精子结合后，有正常的受精过程并且是单精受精，胚胎有正常的胚胎发育过程。在  $21^\circ\text{C}$  左右的水温情况下，受精卵发育约 80 h 后脱膜。脱膜后的胚胎能发育为存活的后代<sup>[16]</sup>。

\* 何晓晓. 四倍体基因库及三倍体湘云鲫、湘云鲤染色体研究. 湖南师范大学硕士论文, 1999

### 3 四倍体鱼产生的原理

鲤鲫  $F_2$  产出大、中、小直径分别为 0.2、0.17、0.13 cm 三种规格的卵子，它们占的比例分别为 50%，35.9%，和 14.1%，其中直径为 0.17 cm 的卵子与四倍体鲤鲫鱼产生的二倍体卵子的直径大小相等，说明它们是二倍体卵子；直径为 0.13 cm 的卵子与红鲫和日本白鲫产生的卵子的直径大小相近，说明它们是单倍体。这两种卵子与鲤鲫  $F_2$  产生的精液受精后能产生存活的个体；直径为 0.2 cm 卵子与鲤鲫  $F_2$  的精液受精后，不能产生存活的个体。推测这种卵子为非整倍体。非整倍体配子是不能存活的<sup>[29,30]</sup>。

通过扫描电镜观察，鲤鲫  $F_2$  挤出的精液中主要是二倍体精子和单倍体精子，其中二倍体精子占有 48.75%，还具有少量的非整倍体、四倍体及八倍体的精子<sup>[13]</sup>。在鲤鲫  $F_2$  的精巢电镜切片中，可观察到具有两个细胞核的精子细胞。

实验结果证明鲤鲫  $F_2$  是二倍体 ( $2n = 100$ )，异源四倍体鲤鲫是从鲤鲫  $F_3$  开始的。那么它们是怎样产生的？Cherfas 等<sup>[29]</sup>在鲤鲫杂交 (*Carassium gibelio* × *common carp*) 的二倍体雌性  $F_1$  中，发现可产生体积较大的二倍体卵子的个体。这种卵子的二倍体性通过下述试验所证明：1) 该种卵子被用紫外线照射失活的鲤鱼精子激活后，在没有用加倍方法处理的情况下获得了雌核发育的二倍体个体；2) 该种卵子与二倍体鱼产生的精子受精可产生三倍体个体；3) 性反转的雄性  $F_1$  (XX) 与雌性  $F_1$  (XX) 交配可产生四倍体后代 (只能产生雌性四倍体后代)。在二倍体长颌须鲃 (*Rutilus alburnoides*) 杂种  $F_1$  的精液中也发现有没有减数的二倍体精子<sup>[31]</sup>。可见二倍体个体产生二倍体配子是可能的，但是这样的例子很稀少，而且这些研究只是在单性中发现一种二倍体配子，没有同时发现分别产生二倍体精子和卵子的二倍体雄性和雌性，因此不能形成四倍体群体。

我们发现挤出的鲤鲫  $F_2$  精液中有 48.75% 的二倍体精子，挤出的卵子中有 35.9% 的二倍体卵子，这两种二倍体配子受精就可产生四倍体。在鲤鲫  $F_2$  的精巢中发现有具有两个核的精子细胞，也为鲤鲫  $F_2$  能产生二倍体配子提供了证据。我们把雄性四倍体鲤鲫产生的精液 (含二倍体精子) 与雌性鲤鲫  $F_2$  卵子受精，在后代中得到了四倍体 ( $4n$

$= 200$ )；把二倍体雄性红鲫精液 (含单倍体精子) 与雌性鲤鲫  $F_2$  的卵子受精，在后代中获得了三倍体 ( $3n = 150$ )。这两个交配实验也说明二倍体鲤鲫  $F_2$  能产生二倍体卵子。在鲤鲫  $F_3$  中存在着雌雄都能育的四倍体个体，它们自交产生四倍体后代，使得四倍体鱼能代代相传，并形成了一个稳定的四倍体鱼群体。由于在鲤鲫  $F_2$  产生的卵子和精子都存在着多态性，从理论上讲，在  $F_3$  中，除能形成四倍体鱼外，应当还能形成其它的如二倍体、三倍体、六倍体和其它倍性的鱼，因此今后还有待对  $F_3$  中的个体进行更全面的研究，看是否存在其它有价值的多倍体鱼。

Cherfas 等<sup>[29]</sup>提出的早期生殖细胞的核内复制 (Endoreduplication) 学说可以较好地解释配子多态性的现象，如果早期的生殖细胞分别进行一次、两次、四次的核内复制，然后进行一般正常的减数分裂过程，就可以分别产生二倍体、四倍体和八倍体的配子。

从理论上讲，如果卵子的第二次减数分裂过程受抑制导致第二极体不能排出，也可以产生二倍体的配子。但是经过对  $F_2$  产生的卵子和精子的受精细胞学过程观察，证实有第二极体的排出。该现象支持了核内复制的学说。我们认为在本研究中第一极体或第二极体的抑制使配子的染色体加倍的可能性不大，其原因还在于：不同体积的卵子出现在  $F_2$  产生的卵子中。经过一次或多次的核内复制后，早期卵母细胞的体积会明显增大，不但 DNA 的含量增加，而且细胞质内的内含物如卵黄也会增加，最终使得整个卵子的体积增大。如果是第一或第二极体的抑制造成二倍体卵子的产生，这样的二倍体卵子的体积应当不会有明显的增加。第一、第二极体抑制时，其细胞质内的内含物包括卵黄都不会有明显的增加。第一极体或第二极体的保留，对卵子的体积变化不会很明显。

我们认为这种特殊的二倍体配子的产生是与生殖腺中的内分泌调控受内外源激素的影响而发生改变，造成生殖细胞发育出现紊乱有关。鲤鲫  $F_2$  属于远缘杂交的后代，它们的同源染色体的不协调性有可能造成生殖腺中内分泌调控发生改变使得有些生殖细胞的发育出现非正常的现象，这些生殖细胞有可能在发育的早期进行核内复制从而导致二倍体及多倍体配子的产生。我们<sup>[32]</sup>在做革胡子鲶 (*Clarias lazera*) 的性转化实验时，在用甲基睾丸

酮诱导的雌雄同体鱼（在同一个体内既有成熟的精巢又有成熟的卵巢）的精巢结构中观察到双头精子，在挤出的成熟卵子的周围也发现有大头精子，这些双头和大头精子可能也是二倍体。

#### 4 线粒体 DNA 的限制性内切酶分析

通过九种限制性内切酶的酶切分析<sup>[17~19]</sup>，根据 Nei 等<sup>[33]</sup>提出的模型，计算不同样品间的限制性片段和遗传距离。推算出四倍体鲫鲤、湘云鲫、红鲫、湘江野鲤、日本白鲫的遗传距离，其结果如表 1。

表 1 四倍体鲫鲤 (F<sub>8</sub>)、湘云鲫、红鲫、湘江野鲤、日本白鲫的遗传距离

Table 1 The genetic distance between each two kinds of fishes among tetraploid F<sub>8</sub> hybrid, triploid crucian carp, red crucian carp, common carp and Japanese crucian carp

	红鲫	湘江野鲤	日本白鲫	湘云鲫
四倍体鲫鲤 (F <sub>8</sub> )	0.69	13.85	2.62	1.78
红鲫		14.32	1.63	0.91
湘江野鲤			9.60	9.60
日本白鲫				0.62

从表 1 可知，最大的遗传距离表现在红鲫与湘江野鲤之间，这与这两种鱼在分类上分别属于不同的属（分别属于鲫属和鲤属）而表现出较远的亲缘关系是一致的。最小的遗传距离表现在湘云鲫和日本白鲫之间，因为日本白鲫是湘云鲫的母本，所以该结果是符合情理的。第二小的遗传距离表现在四倍体鲫鲤与红鲫之间，这说明四倍体鲫鲤在线粒体遗传上是偏向于其原始母本——红鲫。这与线粒体的母系遗传的一般规律相一致。相反，四倍体与其原始父本之间的遗传距离是第二大的。虽然四倍体鲫鲤与红鲫之间的遗传距离较小，但是从线粒体的酶切位点来看，它们之间还是存在差异，说明在 mtDNA 结构上已发生了变化，这为四倍体鲫鲤将发展成为作为一个新的四倍体新种在细胞质的遗传物质方面提供了证据。

#### 5 鲫鲤 F<sub>3</sub> - F<sub>10</sub> 的性别遗传机制

关于四倍体鲫鲤的性别决定机制是一个非常有意义的话题，目前正在用性反转结合雌核发育的方法对异源四倍体鲫鲤的性别遗传机制开展研

究，不久可以得到实验结果。如果异源四倍体鲫鲤的性别遗传机制为 XXXX (♀) - XXYY (♂)，从理论上讲，雄性四倍体鱼最大有可能产生三种比例分别为 XX:4XY:YY 的精子，但是实际上，XY 的精子是否能产生？这种精子与 XX 的卵子结合产生的 XXXY 个体是否能存活？这些还待实验来证明。如果 XXXY 雄性个体存在，它会打破雌性 (XXXX) 与雄性 (XXYY) 的 1:1 的比例。在四倍体鲫鲤的第一次减数分裂的中期发现二价体数目为 100，该现象进一步验证了四倍体鲫鲤的体细胞染色体数目为 4n=200，另一方面也说明在减数分裂过程中，同源染色体是两两配对，而不是其它的形式。在随机检测的 3225 尾 F<sub>10</sub> 中，有雄性 1020 尾，雌性 2102 尾。雌性比雄性略多，它们是否形成一定的固定遗传比例关系，还有待今后作更全面的检测。

#### 6 鲫鲤 F<sub>3</sub> - F<sub>10</sub> 四倍体群体有可能形成一个新种

鲫鲤 F<sub>3</sub> - F<sub>10</sub> 与其原始父母本红鲫和湘江野鲤之间存在的主要差异总结于表 2 中。

表 2 四倍体鲫鲤与其原始父母本之间的主要差异变化

Table 2 The main differences among the tetraploid hybrid, common carp and red crucian carp

特性/鱼名	湘江野鲤	四倍体鲫鲤	红鲫
染色体数目	100	200	100
DNA 含量	2n	4n	2n
配子倍性	n	2n	n
侧线鳞数目	36,37	31,32	29
脊椎骨数目	36,37	33,34	28,29
须的形态和数目	两对明显的须	只有须的基部,不明显	无须
体型和体色	体型修长,灰色	两者之间,灰色	体型圆短,红色
下咽齿	3 行	2 行	1 行

Otto<sup>[34]</sup> 提出对同一个地域的植物来说，通过多倍体化来实现物种的形成很可能是一种很有优势的方式，因为多倍体植物在基因调控，发育过程中具有潜在的使得形态、繁殖系统和生态适应方面产生立竿见影的变化效应。毫无疑问，四倍体化在植物的进化中起了很重要的作用。同样，四倍体化在

动物的进化中应当也会起重要的作用。Ohno<sup>[35]</sup>认为脊椎动物在进化过程中经历了两次四倍体化的过程,但是缺乏四倍体化的直接证据。

作为一个新种,不但在表型上要有变化,更重要的是在遗传基础物质上要发生根本的变化。鲫鲤 $F_3-F_{10}$ 的染色体数目加倍为200, DNA含量为二倍体鱼(日本白鲫等)的两倍,产生的是二倍体配子,这些都说明其遗传物质已发生了根本变化;在表型上,鲫鲤 $F_3-F_{10}$ 与鲫鲤 $F_1-F_2$ 及它们的原始父母本也产生了明显的变化,如在脊椎骨、侧线鳞、下咽齿特征上都发生了明显的变化。上述事实都说明鲫鲤 $F_3-F_{10}$ 在遗传本质、外形特征等生物学特性方面都发生了质的变化,为形成一个新种奠定了基础。

作为一个新的物种,它应具备能够繁殖后代使得本种能够世世代代维持下去并形成较大规模的群体数量的能力。从异源四倍体鲫鲤性腺的显微和亚显微细胞学结构来看,它们的精巢和卵巢都具有正常的发育过程,能产生具有正常生殖功能的成熟二倍体精子和卵子。配子的二倍体性通过其父母本的四倍体性、配子的大小、与单倍体配子结合产生的三倍体个体的实验结果得到验证。目前我们已经繁殖了九代异源四倍体鲫鲤鱼( $F_3-F_{11}$ ),其数量已超过5万尾,从生产能力来讲,生产几十万甚至几百万异源四倍体鲫鲤都没有问题,只是受养殖的场地限制和防盗的安全性出发,我们控制了一定数目而又充分保证传代和生产需要所需的数目。

作为一个新的物种,它应当与其它种有生育(生殖)隔离的关系。在遗传学教材<sup>[1]</sup>对生育隔离的描述为:“生育隔离包括受精前生育隔离和受精后生育隔离,受精后生育隔离是指在 $F_1$ 合子形成以后起作用,使 $F_1$ 合子不能生存,或不能发育到性成熟,或使 $F_1$ 杂种不育,或使 $F_2$ 以后各代中带有杂种基因组合的个体不能生存,或不能生育,总之是影响种间杂种后代的个体发育过程”。本研究中的四倍体鲫鲤的生育隔离符合 $F_1$ 杂种不育的情况。异源四倍体鲫鲤分别与日本白鲫和鲤鱼交配形成的 $F_1$ 代—三倍体湘云鲫和湘云鲤,通过十多年的研究验证它们都是不育的。证明了四倍体鲫鲤具有生育隔离的生物学特性。三倍体湘云鲫(鲤)不育的原因是因为三套同源染色体在减数分裂的第一次分裂时随机分离,造成非整倍体配子产生。

总之,异源四倍体鲫鲤在遗传特性(染色体的

加倍)、生物学结构、可繁殖传代性、生育隔离等方面为将来形成一个新种奠定了基础。但是它们最终是否能成为一个新种,还需把它们放置于自然环境中养殖,看它们是否能在自然环境中生存和繁衍?目前,异源四倍体鲫鲤鱼还是在人工控制下进行养殖。从目前的情况来看,它们在自然界中生存和繁衍的可能性是很大的,但这方面还需进行进一步的实验。

在植物中通过远源杂交来形成多倍体新种的例子已有报道<sup>[1]</sup>,如萝卜甘蓝和普通小麦是分别通过远缘杂交形成的异源四倍体和异源六倍体。萝卜(*Raphanus sativa*,  $2n=18$ )和甘蓝(*Brassica oleracea*,  $2n=18$ )分属十字花科中不同的属,具有较远的亲缘关系。它们两者杂交产生了异源四倍体萝卜甘蓝。异源四倍体鲫鲤的形成成为证明在脊椎动物中通过二倍体远缘杂交来形成异源四倍体提供了重要的证据。

## 7 四倍体化在生物进化上的意义

Ohno<sup>[35]</sup>提出了基因复制(gene duplication)的进化理论,他认为有颌类脊椎动物在进化过程中经历了两轮四倍体化的过程,依据是基因位点数目和DNA含量的比较,发现有颌脊椎动物的DNA含量是无脊椎动物的四倍,即一比四原则(one to four rule)。他认为第一次四倍体化发生在从早期的头索动物亚门(cephalochordates)到无颌脊椎动物(agnathan vertebrate)的进化过程中,证据为文昌鱼(*amphioxus*) (头索动物亚门的代表,为无脊椎动物与无颌脊椎动物之间的过渡动物)只有一个Hox基因,而七鳃鳗(*lampreys*) (无颌脊椎动物的代表)具有2个或3个独立的Hox基因。第二次四倍体化发生在脊椎动物亚门内,根据已检测到的有颌脊椎动物来鉴定,从鱼类到人类中,都存在至少4个独立的Hox基因。在哺乳动物中,象四个相关的基因处在不同的染色体上不仅限于Hox基因。Jurg<sup>[36]</sup>指出当无脊椎动物中存在一个基因时,在脊椎动物中就很可能发现四个相似的基因。在鲤鱼中发现四种蛋白或激素的基因都是有两种相似而又不同的形式,即 $\alpha$ -血红蛋白-I (Hemoglobin alpha-I chain)和 $\alpha$ -血红蛋白-II (Hemoglobin alpha-II chain),促乳素-I和促乳素-II,  $\alpha$ -促性腺激素-I和 $\alpha$ -促性腺激素-II,生长激素-I和生长激素-II,而在另外一些

已知的脊椎动物中这四种基因都是只有一种类型<sup>[4]</sup>, 这个例子为证明鲤鱼是经历了一次染色体加倍(四倍体化)过程提供了证据。由于鲤鱼的染色体数目接近草鱼的两倍, 一般认为鲤鱼是由草鱼通过染色体加倍进化而来, 这与 Ohno<sup>[35]</sup>提出的在脊椎动物中可以经历四倍体化过程的理论是相符合的。据推测草鱼染色体加倍进化形成鲤鱼的过程是发生在一千五百万年以前; 虹鲟鱼具有四个乳酸脱氢酶(LDH)的基因, 因而认为它也是一个古老的四倍体鱼。然而这些说法仅仅只是间接的推测, 没有直接的证据。异源四倍体鲫鲤的诞生为证明脊椎动物中四倍体化的可能提供了直接的证据。目前我们实验室正在用微卫星(Microsatellite)、限制性内切酶的多态性(RFLP)、及随机引物扩增多态性(RAPD)等分子生物学方法对异源四倍体鲫鲤及其亲本的遗传学关系进行研究, 也在建立它们的基因文库来研究它们的基因的多态性。

染色体加倍后, 基因即增多。基因的增多为基因的变异和新基因的产生提供了基础。Muller<sup>[37]</sup>和 Haldane<sup>[38]</sup>认为多余的基因复制可以导致基因变异, 最终获得新的基因。Jurg<sup>[36]</sup>在题为“脊椎动物通过种间杂交进化, 我们是多倍体?”(Vertebrate evolution by interspecific hybridization - are we polyploid?)一文指出异源多倍体比同源多倍体在进化上更具有潜力。

## 8 异源四倍体鲫鲤的应用价值

异源四倍体鲫鲤群体的形成填补了国内外在脊椎动物中没有发现直接形成异源四倍体群体的空白。研制异源四倍体鲫鲤在生产上的主要目的是为了制备不育三倍体鱼。不育三倍体鱼因其性腺不发育或发育不良, 有可能使得发育到性腺部位的能量转化到生长方面。三倍体湘云鲫(鲤)因其不育性不会出现一般二倍体鱼达到性成熟后生长速度变慢的现象。三倍体湘云鲫具有三种类型的性腺结构, 即卵巢型、精巢型和脂肪型, 它们都是不育的<sup>[14]</sup>。卵巢型性腺中大部分是分化程度不高的卵原细胞样的小细胞, 还有一些呈现解体状的退化的初级卵母细胞, 没有发现成熟的卵母细胞; 精巢型性腺中虽然可以发现精子细胞, 但是精子细胞出现解体等退化的特征, 没有发现有成熟的精子; 脂肪型性腺中在性腺的部位仅有两条脂肪结构, 没有任何生殖细胞。目前发现湘云鲤的性腺部位也具有上述三种不

育的结构。经过十几年的养殖实验, 从来没有发现有可育的三倍体湘云鲫和湘云鲤。

三倍体湘云鲫和三倍体湘云鲤在生长速度、体型、肉质等方面已经显示了其优良的特点<sup>[26]</sup>, 已在我国的 20 多个省市推广养殖, 取得了很好的经济效益和社会效益。“湘云鲫(鲤)中试开发项目”被列为国家“863”计划项目(批准号: 1998182), 并已通过了验收。国家科技部、湖南省人民政府等单位投资在湖南师范大学内建成了“国家四倍体鱼保护基地”。三个规模较大的生产三倍体湘云鲫(鲤)的基地已在长沙的黎托、湘阴的东湖渔场、资兴水库建成投产, 目前达到了年产 1 亿尾三倍体湘云鲫(鲤)的生产能力, 三倍体湘云鲫(鲤)苗种长期以来都是供不应求, 为了改变这种供不应求的状况, “年产 10 亿尾三倍体湘云鲫(鲤)苗种”高技术产业化示范工程建设项目已被国家发展计划委员会立项[计高技(2000)1978号]。因此由异源四倍体鲫鲤作为关键技术生产的三倍体湘云鲫(鲤)的应用前景将会更看好。

无论在封闭式的池塘还是在开放式的江河、湖泊中放养湘云鲫和湘云鲤, 由于它们的不育性使得它们不会与任何鱼交配产生后代, 因而它们不会干扰自然界中的种质资源。不育三倍体鱼也是转基因鱼的理想载体, 它可以解决转基因鱼的生态安全问题。

有趣的是四倍体鲫鲤本身在生长速度方面并没有优势, 为了加快异源四倍体的生长速度, 我们与中国科学院水生生物研究所的朱作言领导的科研小组, 在转基因四倍体鱼方面开展了合作, 把草鱼的生长激素基因注射到异源四倍体鲫鲤的受精卵中获得了比对照组快 3.1 倍的转基因异源四倍体鲫鲤鱼<sup>[25]</sup>, 以此为父本通过传代产生的转基因三倍体湘云鲫也具有明显的生长优势<sup>[27]</sup>。尽管转基因四倍体鱼和其产生的转基因三倍体鱼尚处在控制的实验研究中, 但是其前景还是十分可观的。

### 参考文献

- [1] 刘祖洞. 遗传学[M]. 第 2 版, 北京: 高等教育出版, 1991
- [2] Berak M L, Becak W, and Rabello M N. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual south American frog *Odontophrynus americanus*[J]. *Chromosoma (Berl.)*, 1966, 19: 188~183
- [3] Comings D E. Evidence for ancient tetraploidy and con-

- servation of linkage group in mammalian chromosomes [J]. *Nature*, 1972, 238: 455~457
- [4] Ohno S. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970 - 1999 [J]. *Cell and developmental biology*, 1999, 10: 517~522
- [5] Risinger C, Larhammar D. Multiple loci for synapse protein SNAP - 25 in the tetraploid goldfish [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90: 10598~10602
- [6] Ohno S, Wolf U, & Atkin N. Evolution from fish to mammals by gene duplication [J]. *Hereditas*, 1986, 59: 169~187
- [7] Chourrout D. Tetraploidy induced by heat shock in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R. ) [J]. *Reprod. Nutr. Develop*, 1982, 22: 569~574
- [8] Bidwell C L, Chrisman L G S. Ployploidy induced by heat shock in channel catfish [J]. *Aquaculture*, 1985, 51: 25~32
- [9] Don J, Avtallon R R. Comparative study on the induction of triploid in tilapias, using cold-and heat-shock techniques [J]. *J. Fish Biol.*, 1988, 32: 665~672
- [10] 陈敏容, 杨兴棋, 俞小牧, 等. 白鲫(♀)×红鲫(♂)异源四倍体鱼的倍性操作及其生殖力的研究 [J]. *水生生物学报*, 1997, 21(3): 197~205
- [11] Smith L T, Lemoine H L. Colchicine-induced polyploidy in brook trout [J]. *Progressive Fish-culturist*, 1979, 41: 86~88
- [12] Refstie T. Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B [J]. *Aquaculture*, 1981, 25: 51~58
- [13] Liu S J, Liu Y, Zhou G J et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp x common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. *Aquaculture*, 2001, 192: 171~186
- [14] 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
- [15] 刘少军, 冯浩, 刘筠, 等. 四倍体鲫鲤 F<sub>3</sub> - F<sub>4</sub>、三倍体湘云鲫、湘云鲤及有关二倍体的 DNA 含量 [J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 1999, 22(4): 61~68
- [16] 刘少军, 黎双飞, 刘筠. 异源四倍体鱼早期胚胎发育观察 [J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2001, 24(1): 55~57
- [17] 黎双飞, 刘少军, 张轩杰, 等. 三倍体湘云鲫及其亲本线粒体 DNA 的比较研究 [J]. *中国水产科学*, 2001, 8: 1~5
- [18] 黎双飞, 刘少军, 刘筠, 等. 异源四倍体湘云鲫肝组织线粒体 DNA 研究 [J]. *水产学报*, 2000, 24(6): 489~493
- [19] 黎双飞, 刘少军, 张轩杰, 等. 四个鲫鱼品系线粒体 DNA 的限制性酶切分析. *动物学研究*, 2000, 21(6): 432~436
- [20] 黎双飞, 刘少军, 刘筠, 等. 鲤鱼肝组织线粒体 DNA 的限制性内切酶分析 [J]. *生命科学研究*, 2000, 4(2): 178~182
- [21] 刘飞, 张轩杰, 刘筠. 湘云鲫(鲤)的肌肉生化成分和氨基酸组成 [J]. *内陆水产*, 2000(7): 8~9
- [22] 冯浩, 刘少军, 张轩杰, 红鲫(♀)×湘江野鲤(♂) F<sub>2</sub> 和 F<sub>3</sub> 的染色体 [J]. *中国水产科学*, 2001, 8(2): 1~4
- [23] 刘飞, 张轩杰, 刘少军, 等. 湘云鲫、湘云鲤消化道的组织学研究 [J]. *中国水产科学*, 2001, 8(2): 23~27
- [24] 李建中, 张轩杰, 刘少军, 等. 异源四倍体鲫鲤的形态特征研究 [J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2001, 24(2): 64~66
- [25] 曾志强, 胡炜, 汪亚平, 等. 四倍体鱼的种质改良研究 [J]. *高技术通讯*, 2000, 10(7): 12~16
- [26] 周工建, 程献, 康学. 三种鲫鱼养殖对比实验小结 [J]. *内陆水产*, 1999, 24(3): 20
- [27] 刘万, 周工建. 转基因三倍体湘云鲫养殖实验 [J]. *内陆水产*, 2001, 2: 3~4
- [28] 刘筠, 周工建. 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): 101~111
- [29] Cherfas N B, Gomelsky B L, Emelyanova O V, et al. Induced diploid gynogenesis and polyploidy in crucian carp, *carassius auratus gibelio* (Bloch) x common carp, *cyprinus carpio* L., hybrids [J]. *Aquaculture and Fisheries Management*, 1994, 25: 943~945
- [30] Lincoln R F, Scott A P. 1984. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. *J Fish Biol*, 1985, 25, 385~392.
- [31] Alves M J, Coelho M M, Prospero M I, et al. Production of fertile unreduced sperm by hybrid males of the *Rutilus alburnoides* complex (Teleostei, Cyprinidae): An alternative route to genome tetraploidization in unisexual [J]. *Genetics*, 1999, 151: 277~283
- [32] Liu S J, Yao Z Z. Self-fertilization of hermaphrodites of the teleost *Clarias lazera* after oral administration of 17- $\alpha$ -methyltestosterone and their offspring [J]. *The Journal of Experimental Zoology*, 1995, 273: 527~532
- [33] Ni M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease [J]. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, 76: 5269~5273
- [34] Otto S P, Whitton J. Polyploid incidence and evolution [J]. *Annu. Rev. Genet*, 2000, 34: 401~437
- [35] Ohno S. Evolution by gene duplication. Springer-Ver-



lag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970

[36] Jurg S. Vertebrate evolution by interspecific hybridization—are we polyploid? FEBS letters, 1997, 400: 2~8

[37] Muller H.J. The origination of chromatin deficiencies as

minute deletions subject to insertion elsewhere[J]. Genetics, 1935,17: 237~252

[38] Haldane J B S. The Cause of Evolution. Longmans and Green, London, 1932

## The Formation of Tetraploid Hybrids of Common Carp with Red Crucian Carp and the Evolutionary Significance of Tetraploidization in Vertebrate

Liu Shaojun, Cao Yunzhang, He Xiaoxiao, Li Jianzhong, Liu Yun

(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

[Abstract] In this paper, the number and karyotype of chromosomes, DNA content, the mean nuclear erythrocyte volume, gonads and gametes, embryo development, the mechanism of the tetraploid formation, and the appearance in tetraploid hybrid stocks of the red crucian carp (♀) × common carp (♂) were described. The tetraploid hybrids with stable genetic characteristics were inherited from F<sub>3</sub> to F<sub>11</sub> and a large population of tetraploid fish had been formed. The tetraploid hybrids were essentially different from their parents—red crucian carp and common carp in chromosome number, reproduction and appearance. Based on the genetic characteristics, the bisexual fertility and reproductive isolation, the tetraploid stocks had possessed the good base to form a new tetraploid species in the future. The formation of the new tetraploid stocks had great significance both in the evolutionary theory of vertebrate and in the production application.

[Key words] allotetraploid; triploid; diploid gamete; evolution

### 《中国工程科学》2002 年第 4 卷第 1 期要目预告

<p>钱学森论地理科学 ..... 马蔼乃</p> <p>对钱学森沙产业理论的学习和理解 ..... 刘 恕</p> <p>钱学森倡导知识密集型草产业的划 时代贡献 ..... 李毓堂</p> <p>产业化困境要靠制度建设来解决 ... 郭励弘</p> <p>我国人世后对科研院所发展新材料 产业的思考 ..... 敖 宏</p> <p>水稻超高产育种研究进展和前景 ..... 陈温福等</p> <p>当前我国水利水电工程质量问题的 思考 ..... 郑守仁等</p> <p>关于水泥混凝土发展方向的几点</p>	<p>认识 ..... 唐明述</p> <p>面向运动估计器硬件实现的加权块 匹配检测算法 ..... 张 霞等</p> <p>波粒二象性理论的若干问题 ..... 黄志洵</p> <p>可拓检测的方案生成 ..... 余永权等</p> <p>数字电路可测性设计的一种故障 定位方法 ..... 潘中良</p> <p>我国石油经济安全与监测预警复 杂战略系统研究 ..... 葛家理等</p> <p>脉冲电晕等离子体烟气脱硫工业 试验研究 ..... 赵君科等</p> <p>IP 组播路由协议的研究与实现 ..... 李 炜</p> <p>面向 21 世纪的超声电机技术 ..... 赵淳生</p>
---	--