

文章编号: 1004-7271(2004)03-0255-06

·综述·

我国鱼类雌核发育研究的进展及前景

Progress and prospect of fish gynogenesis studies in China

吴萍

(苏州大学农业科技学院, 江苏 苏州 215006)

WU Ping

(Agricultural Science and Technology College, Soochow University, Suzhou 215006, China)

关键词 鱼类 雌核发育 染色体

Key words fish; gynogenesis; chromosome

中图分类号 S917 文献标识码: A

雌核发育(gynogenesis)是单倍体育种的主要途径之一,属于“染色体组工程”(chromosome set engineering)的范畴。雌核发育技术于 20 世纪 50 年代后期在国外首先发展起来,70 年代初我国才开始涉足这一领域的研究。30 年来,已取得了丰硕的成果,3 个红鲤雌核发育纯系的建立以及异育银鲫的选育与推广^[1],说明我国鱼类雌核发育研究无论从理论上还是从应用上都取得了长足的进步。近年来,有关鱼类雌核发育的细胞和分子生物学研究^[2,3],更是从理论上探索了雌核发育发生的机制问题,从细胞和分子角度为该领域的研究展示了美好的前景。

1 鱼类的天然雌核发育

1.1 天然雌核发育的鱼类及其倍性组成

最早发现行天然雌核发育的鱼类是美洲的阿马逊花鲃(*Poecilia formosa*) ,随后又发现银鲫和花鲃属的某些种类,也是营雌核发育的^[4,5]。我国已发现营天然雌核发育的鱼类有方正银鲫、淇河鲫、彭泽鲫、高背鲫、普安鲫 A、B、C 型和滁州鲫^[5]。一般认为,天然雌核发育鱼类的染色体组成为三倍体,仅阿马逊花鲃、*M. clarkhubbsi* 和日本的关东系银鲫除外^[5]。然而,关于银鲫的染色体组成究竟是二倍体还是三倍体,尚有分歧。银鲫的染色体数目一般为 $150 \pm$,很多研究者认为是三倍体,但也有人认为是二倍体。Fan 等^[6]对德国的一种银鲫(*Carassius auratus gibelio*) 的研究表明,其染色体数目为 156 的雄鱼,不仅能产生形态、泳动速度正常的精子,而且精子的受精能力正常;同时,精子的 DNA 含量为其体细胞的一半。同样,沈俊宝等^[7]用显微光密度法测定了黑龙江银鲫与普通鲫雄性个体的红细胞和精子的 DNA 含量,前者分别为 112.81 和 57.57 单位,其比值为 1.96:1;后者分别为 77.22 和 37.57 单位,其比值为 2.06:1,两者没有明显差别。说明这两种银鲫的雄性个体都能减数分裂形成正常的配子,因此认为这两种银鲫不是三倍体而是二倍体种群($2n = 150 \pm$)。此外,染色体为 $150 \pm$ 的二倍体银鲫尚有缩骨鲫、普安鲫 A

收稿日期 2003-04-23

基金项目 苏州市科技局农业科技项目(SNZ-0212)和苏州大学青年基金(Q3114053)资助

作者简介 吴萍(1972-),女,江苏苏州人,讲师,主要从事水产动物遗传育种教学与研究。E-mail: suzhou_wuping@163.com

型、B型、C型)和彭泽鲫等^[5,8]。但是,最新的研究表明,彭泽鲫为三倍体鲫鱼,染色体组由150条基本染色体和若干条超数染色体组成,并且有三条有明显随体的特征性染色体可配成同源染色体^[9]。

1.2 天然雌核发育鱼类的形成机制

天然雌核发育鱼类的细胞学特征主要表现在两方面:卵子成熟分裂的特殊方式,卵子受精的非两性融合生物学^[10]。前者涉及雌核发育子代染色体的倍性保持,后者则主要了解雌核发育卵如何阻止精子形成雄性原核并与雌性原核融合。

我国对鱼类天然雌核发育研究得比较清楚的是黑龙江水系的银鲫。大量的研究表明,其精卵形成机制是相当复杂的,基本上通过不发生第一次成熟分裂、成熟分裂后第二极体不排出、第一次卵裂为核内有丝分裂等来维持其倍性。而持“银鲫卵子是通过第一次成熟分裂异常,卵核染色体不减数来维持染色体倍性”者为众。俞豪祥^[11]在研究银鲫受精生物学时发现,在刚产出的成熟银鲫卵子中没有看到极体,直到受精后10min才有唯一的一个极体排出,因此认为银鲫卵在成熟过程中只完成一次核分裂。丁军等^[3]在比较研究银鲫和两性融合发育红鲤卵母细胞成熟细胞学时发现,在银鲫卵母细胞成熟过程中,绝大部分卵母细胞的核物质,在胚泡破裂后的第一次成熟分裂时期,有明显不同于两性融合的行为,其染色体清晰地分为三群并各自被星光包围,随着卵母细胞的发育,三团星光又逐渐重新聚拢,形成三极纺锤体,随后三极纺锤体扭转、重叠,合并成为一个正常的中期纺锤体,以此方式来代替通常的第一次成熟分裂。

此外,对天然雌核发育银鲫受精机理的研究发现:虽然同源的银鲫精子和异源的精子(红鲤、普通鲫等)在银鲫卵中均不能发育成雄性原核,但两者的细胞学行为存在着很大的差异^[12]。异源精子在第二次卵裂前仍保持高度致密状态,同源精子进入银鲫卵后则陆续启动发育,最终与雌性原核接合。前者呈现典型的雌核发育过程,而后者则属介于雌核发育和两性融合生殖之间的中间类型。由于自然界银鲫可以利用同地共居的近缘种甚至远缘两性鱼的雄鱼繁殖后代,因此可认为银鲫事实上是集两种繁殖方式于一身。

为进一步研究银鲫卵抑制异源精子原核化的作用模式,探索雌核发育机理,葛伟等^[13]将银鲫卵去膜后再用异源精子受精,精子表现出明显的活化现象,银鲫卵对精核的抑制随着卵膜的去除而解除。因此认为:银鲫卵中可能缺乏两性融合生殖鱼类卵质所具有的某些促精核核化物质,此类物质能促进雄性原核的形成,但并非启动精核解凝所必需。在此基础上,丁军等^[3]提出了雌核发育银鲫卵控制精核发育的双重控制模型。根据这一模型,银鲫卵对异源精子具有双重控制作用,即初级控制和次级控制。初级控制的作用性较强,致使异源精子原核化功能完全丧失;次级控制作用较弱,能阻碍和延缓解凝精核进一步向雄性原核发育。其中,次级控制可能起辅助性作用,它只有在消除了初级控制后才能表现出来。

对雌核发育银鲫精子蛋白组分和生化特性的研究,更进一步揭示了鱼类雌核发育的形成机制^[14,15]。在雌核发育银鲫脱膜精头中,可溶性蛋白组分所特有的蛋白是碱性蛋白,这可能正是抑制精子解凝的主要因子,因为动物卵母细胞中已分离和鉴定的促使精子染色体解凝的因子多为酸性蛋白^[14]。同时,当异源精子去膜后用二硫键(S-S)还原剂DTT(dithiothreitol)处理时,发育速度明显加快,可见精核碱性蛋白中二硫键的还原作用是精核解凝和原核化不可缺少的^[15]。一般认为,精核染色体解凝过程中碱性蛋白的置换首先要经过磷酸化。精核进入卵质后,磷酸酶(phosphatase)脂解活性降低,而激酶(kinase)作用加强,从而导致碱性蛋白的磷酸化。雌核发育的银鲫卵正是因为卵质中磷酸酶脂解活性较高而导致精核的碱性蛋白磷酸化过程无法进行,从而抑制了精核的解凝。

1.3 天然雌核发育鱼类的性别

雌核发育的个体或后代的性别是由卵核的遗传成分(染色体)决定的。雌性配子同型(XX)的鱼类,其雌核发育的后代应为雌性。鲫属XX—XY型性别决定类型^[16],而以天然雌核发育方式繁殖后代的方正银鲫却是两性型种群,雄性比例占10%~20%^[10]。并且雄性的染色体数与雌性一致,均为 $150 \pm$,且精巢发育正常,能产生形态、泳动能力、寿命及受精能力均正常的精液。因其能完成减数分裂,推测其经

长期进化已达到二倍化的程度,在二倍化过程中,恢复了减数分裂的能力,并积累了一定的雄性基因,这些雄性基因的积累导致群体中出现雄性个体^[17]。葛伟等^[12]研究认为:银鲫在种内自繁时的繁殖方式为介于雌核发育和两性融合生殖之间的中间类型,这种繁殖方式,既保证了雌核发育银鲫种群各克隆的相对独立和稳定,又可实现种群克隆间有限的有性遗传交换,种群中的少量雄鱼在沟通各克隆间的遗传交流方面起着某种桥梁作用。并且,精核参与早期发育的程度与子代中的雄鱼比例之间存在一定的相关性。

2 人工雌核发育的主要成果及存在问题

2.1 人工诱导雌核发育成功的主要鱼类

近年来,国内对鱼类人工雌核发育的研究成绩斐然,已先后在 10 余种鱼类获得了雌核发育二倍体后代,其中包括两种观赏鱼类(表 1)。用红鲤作为材料,经过连续两代雌核发育已获得了 3 个红鲤雌核发育系,建立了快速获得鱼类纯系的完整技术途径^[1,19]。

表 1 我国人工诱导鱼类雌核发育的成功实例

Tab.1 Fishes of artificial gynogenesis in China

鱼类名称	精子来源	失活精子染色体的方法	卵子二倍化的方法	文献
红鲤	鲫、团头鲂	γ 射线、紫外线	冷休克,1℃处理 30min	[18]
			25×10^{-6} 秋水仙素溶液浸泡 30min	[19]
稀有鮡鲫	泥鳅、红鲤	紫外线	热休克,39~41℃处理 1~3min	[20]
草鱼	湘江野鲤	紫外线	冷休克,4~6℃处理 15min	[21]
			冷休克,4~6℃处理 20min	[22]
虹鳉	虹鳉	紫外线	热休克,37℃处理 10min	[23]
			冷休克,0~3℃处理 5min	[23]
牙鲆	牙鲆	紫外线	热休克,28℃处理 10min	[24]
锦鲤	团头鲂	紫外线	冷休克,0~2℃处理 45min	[25]
鲢	红鲤	紫外线	热休克,39℃处理 1min	[26]
荷元鲤	鲫	紫外线	热休克,39℃处理 1min	[27]
红镜鲤	野鲤	紫外线	冷休克,3~8℃处理 10min	[28]
鲫	湘江野鲤	紫外线	冷休克,5℃处理 20min	[23]
银鲫	鲤	紫外线	冷休克,0~4℃处理 30min	[22]
金鱼	湘江野鲤	紫外线	冷休克,8℃处理 20min	[23]
散鳞镜鲤	红鲫	紫外线	冷休克,2℃处理 30min	[29]
			冷休克,2℃处理 30min	[29]

2.2 人工诱导鱼类雌核发育的方法

人工诱导两性繁殖鱼类的雌核发育包括两个方面:精子染色体的遗传失活以及卵子染色体的二倍体化^[30]。

2.2.1 精子染色体的遗传失活

用 $\text{Co}\gamma$ 射线、紫外线和化学药物都可诱发精子染色体的遗传失活。化学药物用得较少,目前已知可使精子遗传物质失活的有效化学药物有甲苯胺蓝(toluidine blue)、乙烯脲(ethyleneurea)、二甲基硫酸盐(dimethylsulfate)、吡啶黄(trypaflavine)和噻嗪(thiazine)等,国内仅有用甲基磺酸乙酯(EMS)处理鱼类精液诱发雌核发育的报道^[31]。

用紫外线照射精液,使精子遗传物质失活最为普遍,国内在诱导鱼类人工雌核发育中大都使用此法(表 1)。紫外线照射法操作简便,而且比较安全,只是其有穿透力不强的弱点,但可通过精液铺薄来弥补^[29]。紫外线照射的时间可根据紫外灯数目、照射距离而改变(表 2)。潘光碧^[23]研究发现,当照射距离在 6~11cm 之间时,距离每增加 1cm,照射时间就要增加 2min 左右;当照射距离不变时,用两支 30W

的紫外灯比用 1 支灯管的照射时间缩短近一半。

表 2 紫外灯照射精子遗传物质失活时的各参数比较

Tab.2 The parameters during treating the sperms by U. V.

照射距离/cm	紫外灯功率及数目	照射时间
4	30W × 1	2min45s
6	30W × 1	5min43s
9	30W × 1	12min44s
11	30W × 1	18min
11	30W × 2	9min9s
11.5	30W × 1	15min42s
11.5	30W × 2	8min

2.2.2 卵子染色体的二倍体化

成熟卵子具有全部的发育潜能,与经过照射处理的精子受精,可以打开发育的大门,可是由于单倍体胚胎发育容易出现单倍体综合症不能成活,必须经过人工诱导二倍体的发生,胚胎才能正常发育成仔鱼^[29]。目前常用的人工诱导卵子染色体二倍化的方法主要有:温度处理(冷休克或热休克)、静水压和化学药物。吴清江等报道在人工诱导雌核发育过程中,在受精后发育至 2 细胞期时,以 25 或 100×10^{-6} 的秋水仙素溶液浸泡 30min,可获得 31.6% 二倍体雌核发育个体^[19]。用静水压来阻止卵子第二极体的排出或受精卵的第一次有丝分裂,是实现卵子二倍化的有效方法。因其对胚胎的损伤较其他方法小得多,并且成活率高,近年来此法已得到广泛应用。楼允东等^[32]报道,用静水压诱导雌核发育的二倍体虹鳟,平均孵化率为 43.9%,比热休克(21.5%)高得多。但因其需要水压机这样的专用设备,因此无法普遍推广使用。

纵观国内鱼类人工雌核发育的研究现状,使卵子染色体二倍化的方法最常用的仍是温度休克法(表 1)。甚至可认为:温度对抑制第二极体外排或是抑制第一次卵裂,有比静水压和秋水仙素两种方法操作简便、效果更为稳定的优点,尤其是冷休克对鱼类雌核发育二倍化的形成是行之有效的^[29]。

2.3 鱼类人工雌核发育中存在的主要问题

由表 1 可见,尽管目前已有 10 余种鱼类的人工雌核发育取得成功,但这些鱼类的组成相对比较单一,淡水鱼类较多而海水鱼类很少,鲤科鱼类较多而其他鱼类较少(鲤科中又以鲤为多),经济鱼类较多而观赏鱼类较少。同时,雌核发育成功而真正传至子代并稳定遗传的较少,大部分研究仅注重诱导方法和检测手段,仔鱼出膜后后续的跟踪报道较少。

在人工诱导鱼类雌核发育过程中,精子遗传物质失活的彻底与否,直接影响了雌核发育子代的性状。常用的紫外线处理法,因其穿透力较差,还可能出现光复活作用,导致精子遗传物质失活不彻底,使雄性个体的某些 DNA 片段参与遗传,在某种意义上阻碍了人工雌核发育研究的进一步深入^[28]。因此,失活精子遗传物质的方法尚有待进一步完善。

此外,有关鱼类人工雌核发育的研究,停留在细胞学水平的较多,而对包括配子形成、受精、精核发育、卵核发育以及个体发育在内的整个雌核发育过程中,生理、生化反应的研究较少,因此对与诸反应有关的生物大分子物质的结构、功能、作用方式的探索,摸清其对雌核发育调控模式的研究尚待深入^[33]。

3 鱼类雌核发育育种技术的应用前景

鱼类雌核发育在水产养殖上具有极重要的应用价值,有关专家已对这方面的应用作了相当详尽的阐述^[5,17,30]。在鱼类育种工作和遗传学研究中,诱导雌核发育可用来加快品种、种群等选育系的形成,数量性状遗传分析和基因定位等。而现代生物学技术的发展,更为其展示了美好的应用前景。

3.1 纯系的快速建立

人工诱导雌核发育可以快速建立纯系,鱼类的许多经济性状如体重、生长等都是由微效多基因控制的,用传统的近交方法,至少要经过 8~10 代的连续选育才能获得纯系,需要 20~30 年之久。而应用雌核发育技术,只需一代最多二代就可获得纯系,充分节约了时间、劳力和资金。鱼类杂交育种仍是传统的育种方式之一,而杂种优势的稳定和亲本是否为纯系密切相关,因此雌核发育技术还可保持杂种优势的多代利用。

由于鱼类两性生长速度不同,部分鱼类雌性生长可远远快于雄性,实现某些经济鱼类的单性养殖,提高产量已成为当前水产养殖业的热点,而建立雌性纯合系可使鱼类的单性养殖成为可能。加拿大、日本等国已成功地开发了牙鲆、虹鳟、大西洋鲑和大麻哈鱼等的全雌化生产技术,并已达产业化规模,经济效益显著。国内目前对海水鱼类的人工雌核发育研究相对薄弱,若能深入这方面的研究,同时加强对一些名贵鱼类,如当前经济价值较高的一些引种鱼类纯系的建立,前景将相当可观。

3.2 选种效率的提高

雌核发育还有利于提高选种效率。任何鱼类的种群个体都含有一些有害的隐性基因或致死基因,在选育中很难除去这些基因。雌核发育后,由于基因座位的纯合化,有害隐性基因控制的性状就会表达出来,因此很容易从群体中除去这些带有有害隐性基因的个体,致死、隐性基因就会自然被淘汰,从而缩短了选种过程。

3.3 雌核发育与其他生物技术的结合

合理地将雌核发育技术与其他生物技术结合,能更好地发挥其在鱼类育种及种质资源保存中的地位和作用。如将人工雌核发育技术和鱼类基因转移技术、胚胎冷冻技术等有机结合,一方面可为生产出生态安全性的转基因鱼奠定基础,另一方面将对种质资源的长期保存起到举足轻重的作用。

3.4 复合四倍体的发现及其育种潜力

在鱼类雌核发育研究过程中,发现了一系列复合四倍体的存在^[5]。在银鲫或异育银鲫与兴国红鲤受精产生的子代中,往往有少数介于鲤鲫之间的杂交种,其生长速度比同池饲养的异育银鲫快得多。染色体研究表明,这种复合四倍体具有母本全部染色体和父本的单倍染色体,说明银鲫的少数卵子不但具有雌核发育保持自身全部染色体的能力,而且还有融合外源精核且将精子的染色体并入协同发育的能力。这种卵子所特有的对两类不同精子采取两种不同发育方式的生殖应答机制,迄今首次在脊椎动物中发现。复合四倍体的发现是雌核发育育种中的一个新突破,同时表明有关雌核发育银鲫配子发生和调控工程的研究意义深远,育种潜力无限。

承蒙上海水产大学楼允东教授审阅并提出宝贵意见,谨致谢忱!

参考文献:

- [1] 叶玉珍,吴清江,陈荣德. 鲤鱼雌核单倍体育种技术及其应用前景[J]. 水利渔业,1987,(3):44-46.
- [2] 丁 军,谢岳峰,蒋一珪,等. 异育银鲫及其人工杂种外源遗传物质的检测分析[J]. 水生生物学报,1993,17(1):22-26.
- [3] 丁 军,蒋一珪. 雌核发育银鲫和两性融合发育红鲤卵母细胞成熟的细胞学比较研究[J]. 水生生物学报,1991,15(2):97-102.
- [4] 葛 伟,蒋一珪. 鱼类的天然雌核发育[J]. 水生生物学报,1989,13(3):274-285.
- [5] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1999. 153-190.
- [6] Fan Z, She J. Studies on the evolution of bisexual reproduction in crucian carp(*Carassius auratus gibelio* Bloch) [J]. Aquaculture, 1990, 84: 235-244.
- [7] 沈俊宝,范兆廷,李素文,等. 方正银鲫与扎龙湖鲫体细胞、精子的 DNA 含量及倍性的比较研究[J]. 动物学报,1984,30(1):7-13.
- [8] 陈敏容,杨兴祺,俞小牧,等. 两性型天然雌核发育彭泽鲫染色体组型的研究[J]. 水生生物学报,1996,20(1):25-31.
- [9] 杨睿娇,李冰霞,冯 浩,等. 彭泽鲫染色体数目及倍性的细胞遗传学分析[J]. 动物学报,2003,49(1):104-109.
- [10] 刘 筠. 生物工程应用于鱼类育种技术研究的现状及其发展前景[J]. 现代渔业信息,1991,4(11):1-5.
- [11] 俞豪祥. 银鲫雌核发育的细胞学观察[J]. 水生生物学集刊,1982,(4):481-487.

- [12] 葛伟,单仕新,蒋一珪.雌核发育银鲫的受精生物学研究——天然雌核发育银鲫繁殖方式的讨论[J].水生生物学报,1992,16(2):97-100.
- [13] 葛伟,蒋一珪.雌核发育银鲫抑制异源精子原核化的作用模式初探[J].水生生物学报,1985,9(3):203-207.
- [14] 杨书婷,桂建芳.雌核发育银鲫和两性生殖彩鲫精子蛋白组分的比较研究[J].动物学报,2001,47(1):79-84.
- [15] 岳振宇,蒋一珪,单仕新.雌核发育和两性融合发育鱼卵调控精核受精发育的生化特性研究[J].水生生物学报,1996,20(2):164-170.
- [16] 张任培,吴鹤龄.应用 BrdU-Hoechst 33258-Giemsa 技术对鲫鱼性染色体的研究[J].遗传学报,1985,12(5):373-378.
- [17] 范兆廷,宋苏祥.鱼类的雌核发育、雄核发育和杂种发育[J].水产学报,1993,17(2):179-187.
- [18] 吴清江,叶玉珍,陈荣德,等.雌核发育系红鲤 8305 的产生及其生物学特性[J].海洋与湖沼,1991,22(4):295-298.
- [19] 吴清江,陈荣德,叶玉珍,等.鲤鱼人工雌核发育作为建立近交系新途径的研究[J].遗传学报,1981,8(1):50-55.
- [20] 贾方钧,王剑伟,吴清江.异源精子诱导稀有鮠鲫的人工雌核发育[J].水生生物学报,2002,26(3):246-251.
- [21] 邓岳松,罗琛,刘筠.草鱼人工雌核发育的细胞学观察[J].激光生物学报,1998,7(3):207-210.
- [22] 罗琛,刘筠.人工诱导草鱼和鲫鱼雌核发育的研究[J].湖南师范大学自然科学学报,1991,14(2):154-159.
- [23] 潘光碧.人工诱导鱼类雌核发育技术研究[J].淡水渔业,1988,18(6):17-20.
- [24] 李胜忠,陈琳,杜劲松.热休克诱导虹鳟二倍体雌核发育[J].动物学杂志,1997,32(5):7-9.
- [25] 徐成,王可玲,徐永立,等.雌核发育牙鲆同工酶基因的重组及父方基因的表达[J].海洋与湖沼,2002,33(1):62-67.
- [26] 贾海波,周莉,桂建芳.两个人工雌核发育红白锦鲤群体的 RAPD 标记分析[J].水生生物学报,2002,26(1):1-7.
- [27] 杨书婷,桂建芳.两个雌核发育白鲢群体同工酶分析及遗传标记的确定[J].水生生物学报,1999,23(3):264-268.
- [28] 潘光碧,邹桂伟,胡德高,荷元鲤雌核发育后代体色和性比的初步研究[J].水产学报,1995,19(4):366-368.
- [29] 刘筠.我国淡水养殖鱼类育种的实践和思考[J].生命科学研究,1997,1(1):1-8.
- [30] 楼允东.人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用[J].水产学报,1986,10(1):111-123.
- [31] 吴仲庆.水产生物遗传育种学[M].厦门:厦门大学出版社,1991:152-158.
- [32] Lou Y D, Purdom C E. Diploid gynogenesis induced by hydrosatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* [J]. J Fish Biol, 1984, 24: 665-670.
- [33] 樊连春.雌核发育进行银鲫遗传育种新进展[J].生物学通报,1994,29(10):4-6.

欢迎订阅 2005 年《海洋渔业》

《海洋渔业》杂志是中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所主办的学术性期刊,创刊于 1979 年。主要刊载水产资源和捕捞、水产养殖和增殖、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔业机械与仪器以及水产基础研究的论文、综述和简报。

《海洋渔业》杂志为国内外公开发行人,国内统一刊号:CN31-1341/S,国际标准刊号:ISSN1004-2490,邮发代号:4-630。季刊,大 16 开,88 页,逢季中月 25 日出版。每期定价 14 元,全年 56 元。全国各地邮局(所)均可订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址:上海市军工路 300 号;邮政编码:200090;联系电话:(021)65680116、(021)65684690×8048;传真:(021)65683926;E-mail:haiyangyue@163.net