

雌核发育兰州鲇胚胎发育和形态特征的研究

李兰兰^{1,2} 肖伟^{2,3,4} 邢露梅^{1,2} 赛清云^{2,3,4} 刘彦斌^{2,3,4} 田永华^{2,3,4}
王燕^{2,3,4} 俞兆曦^{2,3,4} 刘哲^{1*} 连总强^{2,3,4*}

(¹甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070; ²宁夏回族自治区水产研究所(有限公司), 银川 750001;
³宁夏渔业工程技术研究中心, 银川 750001; ⁴宁夏渔业科技院士工作站, 银川 750001)

摘要 该研究通过紫外线(UV)灭活的黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)精子利用冷休克方法诱导兰州鲇(*Silurus lanzhouensis*)雌核发育二倍体(G_{2n})、单倍体(N)、杂交二倍体(H_{2n}), 以及同源精子诱导的普通二倍体(2N)的胚胎发育时序和发育生物学特征进行了观察比较。结果显示, (1)受精率为 $2N > H_{2n} > N > G_{2n}$, 孵化率为 $2N > G_{2n} > N$, 畸形率为 $N > G_{2n} > 2N$ 。(2)在水温23 °C下, 普通二倍体48 h孵化出膜, 雌核发育二倍体51 h孵化出膜, 杂交二倍体在神经胚期(26 h 20 min)停止发育, 单倍体在出膜前期(43 h)停止发育。(3)各组胚胎发育形态上的差别主要表现在杂交二倍体未形成正常胚体, 单倍体表现出典型的单倍体综合征, 雌核发育二倍体初孵仔鱼在形态学上与普通二倍体无明显差异。该研究为兰州鲇雌核发育技术提供了技术支撑, 同时也为单倍体、杂交和雌核发育胚胎的细胞生物学研究提供了理论依据。

关键词 兰州鲇; 雌核发育; 单倍体; 杂交胚胎; 胚胎发育

Study on Morphological Characteristics and Embryonic Development of the Gynogenesis *Silurus lanzhouensis*

LI Lanlan^{1,2}, XIAO Wei^{2,3,4}, XING Lumei^{1,2}, SAI Qingyun^{2,3,4}, LIU Yanbin^{2,3,4}, TIAN Yonghua^{2,3,4}, WANG Yan^{2,3,4},
YU Zhaoxi^{2,3,4}, LIU Zhe^{1*}, LIAN Zongqiang^{2,3,4*}

(¹College of Animal Science and technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; ²Ningxia Fisheries Research Institute, Yinchuan 750001, China; ³Ningxia Fishery Engineering Technology Research Center, Yinchuan 750001, China;
⁴Academician Workstation of Ningxia Fishery Science and Technology, Yinchuan 750001, China)

Abstract In this study, the sperm of *Pelteobagrus fulvidraco* was UV-irradiated and used to fertilize eggs of *Silurus lanzhouensis* as well as diploid gynogenesis (G_{2n}) was induced using cold shock. The diploid gynogenesis (G_{2n}), haploid (N), hybrid diploid (H_{2n}), and homodiploid embryo (2N) were compared in development timing and biological characteristics of embryo development. The results were as follows: (1) Fertilization rates were $2N > H_{2n} > N > G_{2n}$, Abnormality rates were $2N > G_{2n} > N$, Hatching rates were $N > G_{2n} > 2N$. (2) At the temperature of 23 °C, the ordinary diploid embryo hatched out in 48 h, gynogenesis diploid hatched out in 51 h, hybrid diploid ceased to develop in neurula stage (26 h 20 min), and the haploid ceased to develop in pre-hatching stage. (3) The differences in the developmental morphology of the embryos in each group mainly manifested in the fact that the hybrid diploid did not

收稿日期: 2020-01-11 接受日期: 2020-03-27

国家重点科技研发计划“蓝色粮仓”重点专项项目(批准号: 2018YFD0901202)和宁夏重点研发计划项目(批准号: 2017BN06)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-7631225, E-mail: liuz@gsau.edu.cn; Tel: 0951-6725041, E-mail: lianzq04@163.com

Received: January 11, 2020 Accepted: March 27, 2020

This work was supported by the “Blue Granary” National Key Research and Development Program of China (Grant No.2018YFD0901202) and the Key Research and Development Projects in Ningxia (Grant No.2017BN06)

*Corresponding authors. Tel: +86-931-7631225, E-mail: liuz@gsau.edu.cn; Tel: +86-951-6725041, E-mail: lianzq04@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5245>

form a normal embryo body, but the haploid showed a typical haploid syndrome. Compared with the ordinary diploid, newly hatched larvae of gynogenetic diploid was no significantly different in morphology. The study provides a method for the gynogenetic technique of *S. lanzhouensis*, as well as a theoretical basis for cytological studies on the development of haploid, hybridized, and gynogenetic embryos of this species.

Keywords *Silurus lanzhouensis*; gynogenesis; haploid; hybrid embryo; embryonic development

兰州鲇(*Silurus lanzhouensis*)又名黄河鲶, 隶属于鲇形目(Siluriformes)鲇科(Siluridae)鲇属(*Silurus*), 是我国黄河中上游特有的优质土著鱼类, 营养价值高, 素有“黄河鲶鱼活人参”之称, 具有十分广阔的养殖前景^[1-2]。近年来, 由于水利工程建设、生态环境变化及捕捞过度等原因, 兰州鲇种群数量日趋减少, 2004年被《中国物种红色名录》列为濒危物种^[3]。鉴于此, 农业部批准在宁夏、甘肃、内蒙和陕西相继建立了兰州鲇国家级水产种质资源保护区, 对这一濒危物种进行种质资源保护。

雌核发育是鱼类种质资源保护的重要手段之一, 是一种控制鱼类性别和建立全雌化后代的有效方法。开展兰州鲇异源雌核发育技术相关研究, 不仅可以快速建立兰州鲇全雌化群体, 加快育种年限, 提高养殖经济效益, 而且也为鲇属鱼类遗传改良提供了重要参考。目前, 关于兰州鲇的研究主要集中在生物形态学^[4]、生理生化学^[5-6]和遗传结构学^[7-8]等领域, 而兰州鲇性别控制及良种新品种选育研究较少。为探索建立高效的兰州鲇雌核发育纯系种质创制与鉴定技术, 本研究开展兰州鲇异源雌核发育二倍体、单倍体、杂交二倍体和普通二倍体胚胎发育特征及受精率、畸形率和孵化率、胚胎发育时序的对比分析研究, 以为兰州鲇种质开发和保护提供一定的理论基础和依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验于2019年6月在宁夏回族自治区水产研究所国家级黄河鲶原种场进行。试验亲鱼为试验基地选育的F3代优质亲鱼, 其中选择3龄以上、体格健壮、无病无伤、体质量3.0~5.0 kg的兰州鲇雌雄各3条作为亲鱼; 选择2龄以上、体格健壮、无病无伤、体质量0.8~1.0 kg的雄性黄颡鱼3条作为亲鱼。催产所用药物为注射用多潘立酮(domperidone, DOM)和注射用促黄体素释放激素A₂(luteinizing hormone releasing hormone A₂, LHRH-A₂), 兰州鲇雌性亲鱼注射量

为(DOM 3 mg+LHRH-A₂ 5 μg)/kg, 雄性亲鱼减半, 黄颡鱼未注射。

1.2 配子收集

催产后的兰州鲇亲鱼在激素效应期12 h左右, 选取性腺发育良好的雌鱼、雄鱼, 用棉布擦干其腹部, 轻轻挤压鱼腹部采集精液和卵子。黄颡雄性亲鱼经麻醉后解剖取其精巢, 轻轻剪碎, 置于预冷的精液保存液按1:8混合均匀, 低温保存备用。实验所用精子选择经镜检活力达到90%以上的。

黄颡鱼精子保存液配制^[9]: 10 g/L柠檬酸钠三钠、29 g/L葡萄糖、0.3 g/L氯化钾、2 g/L碳酸氢钠、0.48 g/L青霉素、1 g/L链霉素。

1.3 雌核发育诱导方法

遗传灭活: 取黄颡鱼精子稀释液, 加入到直径为14.5 cm的培养皿中, 轻轻振荡使之平铺于培养皿底部, 精子稀释液厚度大约为0.2 mm。将培养皿置于紫外照射装置内的冰浴摇床上, 紫外灯强度为107 μw/cm², 摇床振荡频率为40 r/min, 精子遗传灭活时间30 min。

雌核发育诱导: 将兰州鲇卵子挤入无菌干燥的盆中, 立刻加入经紫外线灭活的黄颡鱼精液, 混合均匀加入曝气水充分受精后将其铺在网面上, 受精6 min后, 4 °C冷休克25 min, 于23 °C曝气水中孵化。

1.4 各实验组胚胎制备

本研究建立4个实验组, 每组3个平行重复实验, 各实验组均采用干法人工授精, 每批次分组所用的卵为同一亲鱼所产。所有受精卵均在室温23 °C曝气水下孵化。

雌核发育二倍体胚胎(G_{2n}): 紫外灭活的黄颡鱼精液与普通兰州鲇卵子受精后经冷休克处理。单倍体胚胎(N): 紫外灭活的黄颡鱼精液与普通兰州鲇卵子受精。杂交二倍体胚胎(H_{2n}): 普通黄颡鱼精液与普通兰州鲇卵子受精。普通二倍体胚胎(2N): 普通兰州鲇精卵正常受精, 作为实验对照组。

1.5 胚胎发育观察

孵化期间每隔0.5 h取样1次, 每次观察的受精

卵数约50个,在4倍光学显微镜下观察胚胎各时期发育的形态特征,以其中半数以上发育至某时期的时间点作为该期的胚胎发育时间,并进行拍照、记录。统计各组胚胎的发育进程,记录胚胎的发育特征。

1.6 统计分析

统计各实验组的受精率、孵化率和畸形率。受精率=原肠胚中期正常胚胎数/总卵子数 \times 100%;孵化率=孵化个体数/原肠胚中期正常胚胎数 \times 100%;畸形率=畸形个体数/孵化个体数 \times 100%;数据分析采用SPSS 24.0软件,进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 胚胎发育统计

由表1可知,受精率 $2N>H_{2n}>N>G_{2n}$,孵化率 $2N>G_{2n}>N$,畸形率 $N>G_{2n}>2N$ 。除单倍体胚胎和杂交二倍体胚胎的受精率之间显著不差异($P>0.05$),其余各组均两两之间差异显著($P\leq 0.05$);单倍体胚胎畸形率最高(98.06%),普通二倍体胚胎畸形率最低(3.67%),各组胚胎畸形率间均差异显著($P\leq 0.05$);普通二倍体胚胎孵化率(68.00%)与雌核发育胚胎孵化率(48.95%)差异显著($P\leq 0.05$)。杂交二倍体未有成形胚胎,单倍体胚胎的孵化率仅有1.23%。

2.2 各实验组胚胎发育的形态特征与时序比较

兰州鲇胚胎发育经历卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期、器官形成期和出膜期,普通二倍体和雌核发育二倍体孵化用时分别为48 h、51 h;杂交二倍体发育至神经胚期停止发育;单倍体胚胎发育到出膜前期停止发育。各时期胚胎发育时序见表2,各实验组发育形态见图1~图3。

2.2.1 胚盘形成期 兰州鲇卵呈圆球形、黄色,比重略大于水,受精卵直径为2.07~2.40 mm^[10]。卵受精后不久卵膜即吸水膨胀,受精后1 h原生质在动物

极集中并在卵黄囊上方隆起一小丘状的胚盘,胚盘高度约为卵黄囊的1/3左右。除雌核发育组胚盘形成稍晚些(图1、图2和图3A),其余各组发育时序和形态均差异不大,发育时序为 $2N>N=H_{2n}>G_{2n}$ 。

2.2.2 卵裂期 受精卵胚盘形成后即进入卵裂期,依次经过2细胞期(图1B)、4细胞期(图1C)、8细胞期(图1D)、16细胞期(图1E)、32细胞期(图1F)和多细胞期(图1G、图2B和图3B),细胞数量继续增加,胚盘卵裂呈桑椹状,发育时序为 $2N>N>H_{2n}>G_{2n}$ 。在卵裂的过程中,单倍体组、杂交二倍体组和雌核发育组的部分受精卵出现畸形卵裂以及不均等分裂的现象(图2C),这些卵子将无法继续发育。

2.2.3 囊胚期 进入囊胚期之后胚盘继续分裂,随着细胞数量越来越多,其体积越来越小。并在动物极隆起呈帽状遮盖着卵黄,隆起的高度约为卵径的1/3,此时为高囊胚期(图1H、图2D和图3C)。发育时序为 $2N>N>H_{2n}>G_{2n}$ 。细胞继续分裂,囊胚高度下降,边缘向外扩展进入低囊胚期(图1I)。进入低囊胚期后,杂交二倍体组发育速度开始严重变缓,各组发育时序为 $2N>N>G_{2n}>H_{2n}$ 。

2.2.4 原肠期 分裂细胞沿着卵黄的四周向植物极扩展、下包,此时为原肠作用开始。原肠早期,胚层下包卵黄约1/2、中期胚层下包卵黄2/3、晚期胚层下包3/4。形态上雌核发育组(图1J~图1L)与普通二倍体组无明显差异,而杂交二倍体组(图3D~图3F)和单倍体胚胎(图2E)的胚环单薄,形状不规则,杂交二倍体下包速度严重变缓,此时动物极和植物极分界明显呈“葫芦状”,动物极可见胚胎发育,覆盖面积越来越大。发育时序为 $2N>N>G_{2n}>H_{2n}$,至原肠晚期各组均达到死亡高峰期,其中雌核发育组和杂交二倍体组的胚胎死亡率最高。

2.2.5 神经胚期 随着胚体的不断伸展,胚盾拉伸

表1 兰州鲇胚胎发育统计

Table 1 The statistics of embryonic development of *Silurus lanzhouensis*

实验组 Experimental group	受精率/% Fertilization rate /%	畸形率/% Abnormality rate /%	孵化率/% Hatching rate /%
Diploid (2N)	87.00 \pm 1.15 ^a	3.67 \pm 0.33 ^a	68.00 \pm 1.53 ^a
Haploid (N)	74.33 \pm 1.20 ^b	98.06 \pm 1.39 ^c	1.23 \pm 0.67 ^c
Hybridization (H _{2n})	77.33 \pm 1.20 ^b	-	-
Gynogenesis (G _{2n})	39.00 \pm 0.58 ^c	33.18 \pm 0.43 ^b	48.95 \pm 6.19 ^b

统计学分析用a、b、c表示。同列标注不同字母表示组间差异显著($P\leq 0.05$),相同字母代表组间差异不显著($P>0.05$)。

Statistical analysis is expressed by a, b, c. In the same column, the data with different little letters are significantly different ($P\leq 0.05$), while the data with the same letters are not significantly different ($P>0.05$).

表2 兰州鲇雌核发育、单倍体、杂交胚胎和正常发育胚胎发育时序
Table 2 Time table of embryonic development of gynogenetic diploid, haploid, crossing and normal diploid of *Silurus lanzhouensis*

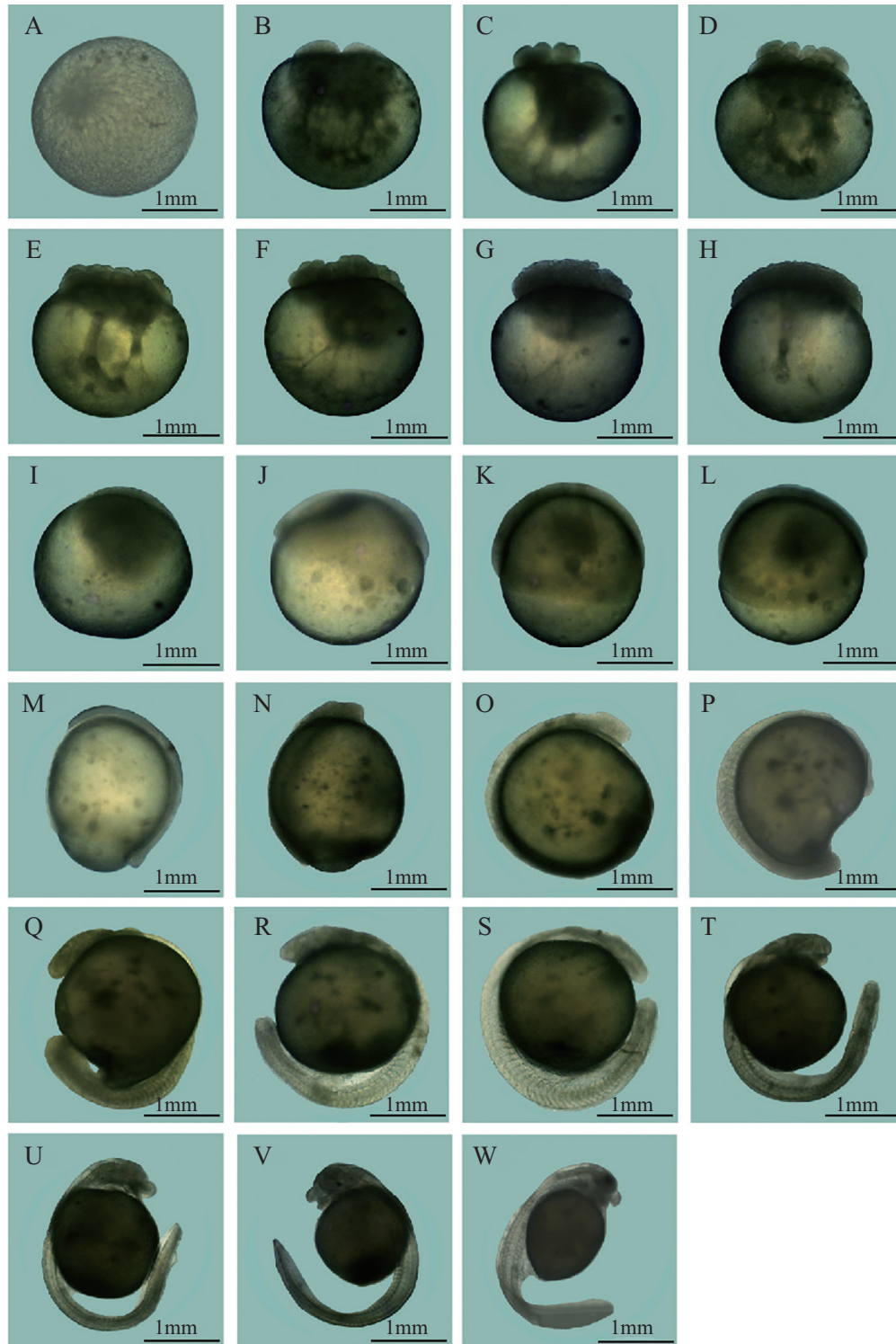
胚胎发育时期 Stage of embryonic development	雌核二倍体 Gynogenesis (G_{2n})	单倍体 Haploid (N)	杂交胚胎 Hybridization (H_{2n})	普通二倍体 Diploid (N)	版图 Plate
Zygote	0 min	0 min	0 min	0 min	
Blastodisc stage	1 h 20 min	1 h 10 min	1 h 10 min	1 h	Fig.1A, Fig.2A, Fig.3A
Two-cell stage	1 h 50 min	1 h 40 min	1 h 45 min	1 h 30 min	Fig.1B
Four-cell stage	2 h 25 min	2 h 10 min	2 h 20 min	2 h	Fig.1C
Eight-cell stage	2 h 45 min	2 h 30 min	2 h 40 min	2 h 20 min	Fig.1D
Sixteen-cell stage	3 h 20 min	3 h	3 h 20 min	2 h 48 min	Fig.1E
Thirty-two-cell stage	3 h 50 min	3 h 20 min	3 h 40 min	3 h 22 min	Fig.1F
Multi-cell stage	4 h 30 min	4 h	4 h 20 min	3 h 50 min	Fig.1G, Fig.2B, Fig.3B
High blastula stage	5 h	4 h 30 min	4 h 50 min	4 h 20 min	Fig.1H, Fig.2D, Fig.3C
Late blastula stage	8 h 30 min	8 h	10 h	7 h 50 min	Fig.1I
Early gastrula stage	11 h 50 min	10 h 50 min	16 h 30 min	10 h 30 min	Fig.1J, Fig.3D
Mid gastrula stage	13 h 10 min	11 h 50 min	21 h 30min	11 h 30 min	Fig.1K, Fig.2E, Fig.3E
Late gastrula stage	15 h 40 min	14 h 20 min	23 h 20min	13 h 50 min	Fig.1L, Fig.3F
Neurocoele stage	18 h	16 h 55 min	24 h 20min	16 h 15 min	Fig.1M, Fig.3G
Somite formation stage	19 h 20 min	18 h 20 min	25 h 30min	17 h 30 min	Fig.1N
Closure of blastopore stage	20 h 50 min	19 h 50 min	26 h 20min	18 h 50 min	Fig.1O, Fig.2F, Fig.3H
Optic vesicle stage	23 h	23 h50min		20 h 50 min	Fig.1P
Tail-bud stage	27 h	27 h 40 min		24 h 50 min	Fig.1Q, Fig.2G
Auditory vesicle stage	29 h	29 h 50 min		27 h 10 min	Fig.1R
Muscular fibrillation stage	31 h	31 h 50 min		29 h	Fig.1S
Heart rudiment stage	33 h	33 h 30 min		31 h	Fig.1T
Heart pulsation stage	37 h 50 min	38 h 30 min		35 h 40 min	Fig.1U
Otolitkes formation stage	42 h 30 min	43 h		40 h 10 min	Fig.1V, Fig.2H
Prehatching stage	45 h			43 h	Fig.1W
Hatching stage	51 h			48 h	

变细而长, 胚体形成。神经胚晚期胚层几乎包被整个卵黄囊, 胚孔开始闭合, 具眼泡原基。雌核发育组(图1M~图1O)形态与普通二倍体无明显差异, 但存在部分畸形胚胎; 单倍体组(图2F)胚胎的胚孔可见, 但胚体短小弯曲, 出现大量畸形; 杂交二倍体组(图3G)下包困难, 胚孔迟迟不能关闭, 在胚体形成期下沉死亡, 胚体模糊不能辨认(图3H)。发育时序为 $2N > N > G_{2n} > H_{2n}$ 。

2.2.6 器官形成期 该阶段为胚胎各个主要器官发生、形成期, 包括眼泡期(图1P)、尾芽期(图1Q)、听泡期(图1R)、肌肉颤动期(图1S)、心脏形成期(图1T)、心跳期(图1U)和耳石形成期(图1V)。雌核发育组在形态上与普通二倍体无异; 单倍体组发育缓慢, 至尾芽期出现畸形即“单倍体综合征”: 胚体轮廓模糊、头部较大、尾部短小、躯干短粗、体节

不明显、肌节数量少且分化不清晰、脊柱扭曲, 多数单倍体胚胎就此停止发育(图2G), 少数单倍体胚胎可发育到耳石形成期(图2H)。各组发育时序为 $2N > G_{2n} > N$ 。

2.2.7 出膜期 此期胚体尾端抵达头端, 心脏分化明显, 有血液循环, 胚体扭动加剧, 出现一些黑色素颗粒, 胚胎尾部剧烈摆动, 摆动幅度可达到或超过头部, 胚体以尾部破膜而出, 躯干和尾部已舒展, 尾端圆形(图1W); 单倍体组胚胎在出膜前期陆续死亡, 随着膜的分解消化, 死亡胚胎脱落后出膜; 雌核发育组发育形态与普通二倍体组基本一致, 只是肌肉颤动不明显, 破膜困难, 致使其出膜期明显延长, 出膜后有部分仔鱼不能浮游。雌核发育组因出膜困难死亡较多, 又达到一死亡高峰。发育时序为 $2N > G_{2n}$ 。

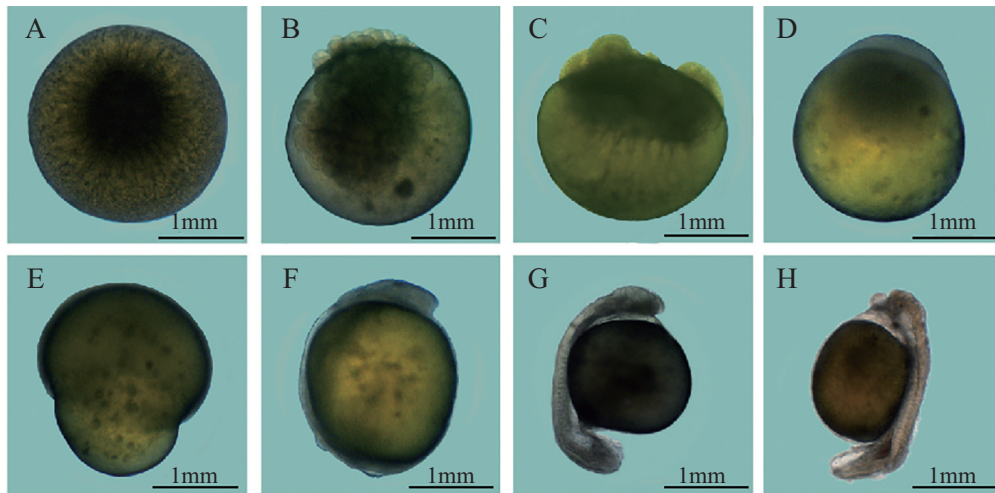


A: 胎盘期; B: 2细胞期; C: 4细胞期; D: 8细胞期; E: 16细胞期; F: 32细胞期; G: 多细胞期; H: 高囊胚期; I: 低囊胚期; J: 原肠早期; K: 原肠中期; L: 原肠晚期; M: 神经沟期; N: 体节出现期; O: 胚孔封闭期; P: 眼泡期; Q: 尾芽期; R: 听泡期; S: 肌肉颤动期; T: 心脏形成期; U: 心跳期; V: 耳石形成期; W: 出膜前期。

A: blastodisc stage; B: two-cell stage; C: four-cell stage; D: eight-cell stage; E: sixteen-cell stage; F: thirty-two-cell; G: multi-cell stage; H: high blastula stage; I: late blastula stage; J: early gastrula stage; K: mid gastrula stage; L: late gastrula stage; M: neurocoele stage; N: somite formation stage; O: closure of blastopore stage; P: optic vesicle stage; Q: tail-bud stage; R: auditory vesicle stage; S: muscular fibrillation stage; T: heart rudiment stage; U: heart pulsation stage; V: otolith formation stage; W: prehatching stage.

图1 兰州鲇雌核发育二倍体胚胎发育过程

Fig.1 The embryonic development of gynogenetic diploid of *Silurus lanzhouensis*

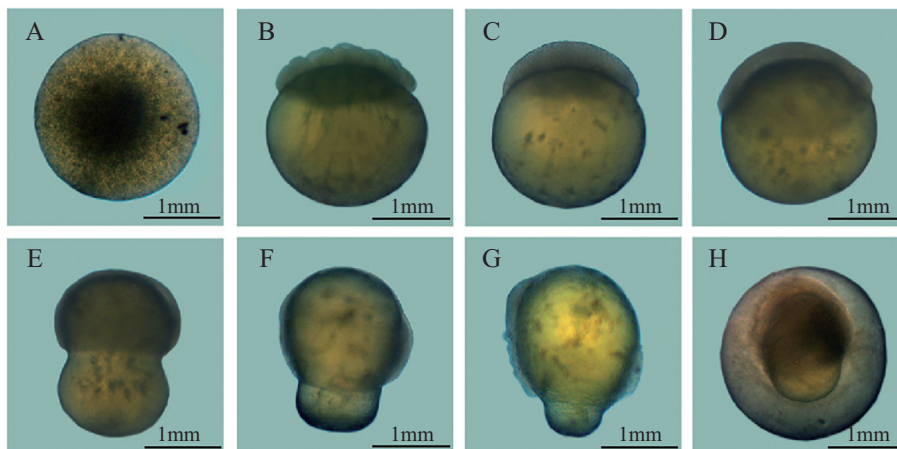


A: 胎盘期; B: 多细胞期; C: 4细胞期(畸形卵裂); D: 囊胚期; E: 原肠期; F: 胚孔封闭期; G: 尾芽期; H: 耳石形成期。

A: blastodisc stage; B: multi-cell stage; C: four-cell stage(abnormal); D: blastula stage; E: gastrula stage; F: closure of blastopore stage; G: tail-bud stage; H: otolithes formation stage.

图2 兰州鲇单倍体胚胎发育过程

Fig.2 The embryonic development of haploid of *Silurus lanzhouensis*



A: 胎盘期; B: 多细胞期; C: 囊胚期; D: 原肠早期; E: 原肠中期; F: 原肠晚期; G: 神经沟期; H: 胚孔封闭期。

A: blastodisc stage; B: multi-cell stage; C: blastula stage; D: early gastrula stage; E: mid gastrula stage; F: late gastrula stage; G: neurocoele stage; H: closure of blastopore stage.

图3 兰州鲇杂交二倍体胚胎发育过程

Fig.3 The embryonic development of hybrid diploid of *Silurus lanzhouensis*

3 讨论

近些年来随着水产养殖经济的迅速发展, 具有优良性状的品种对于提高养殖产量增加经济效益具有重要作用。人工诱导雌核发育通常是把经物理或化学方法处理得到的同源精子或异源精子作为“激动源”对卵子进行人工授精, 经过染色体加倍获得正常的个体^[11]。人工诱导雌核发育技术是一种实用性较强的科学手段, 在生产纯系^[12]、染色体操作^[13-15]、遗传分析^[16]以及性别控制^[17]等方面都具有潜在的应用价值。人工雌核发育有两大技术难点, 一是精子遗

传物质的灭活, 二是染色体的加倍。雌核发育精子的选用可以是同源的, 也可以是异源的。使用同源精子紫外照射处理后刺激卵雌核发育, 并不能保证所有精子的遗传物质全部被灭活, 而使用紫外照射处理过的异源精子则可以最大限度地避免此问题^[18]。在人工诱导雌核发育的过程中, 由于紫外线强度、冷休克处理时间及处理温度等因素的影响, 可能导致后代中出现单倍体和杂交胚胎。通过本研究对兰州鲇异源雌核发育二倍体、单倍体、杂交二倍体和普通二倍体胚胎发育过程进行对比分析研究, 为兰州

鲇雌核发育诱导条件的深入研究及遗传育种工作提供了重要理论依据。

本研究所得兰州鲇普通二倍体在水温23℃孵化用时51 h,与吴旭东等^[10]所研究的兰州鲇胚胎发育时序和形态特征相似,只是孵化时数增加了2 h,这可能因孵化期间水温的不同所致。水温对胚胎发育的影响很大,肖智等^[19]研究表明,鲇类受精卵孵化的平均水温(θ)与孵化时数(t)、孵化积算温度(A)呈负相关,其相关关系式为 $t=92309.11\theta^{-2.3027}$, $A=4040.4032-101.7853\theta$ 。雌核发育二倍体与普通二倍体胚胎在发育形态和时序上无明显差异,只是雌核发育二倍体的发育速度较慢且畸形胚胎多,主要体现在原肠期和出膜期。如杨育凯等^[20]和刘月亮等^[21]在研究黄姑鱼(*Nibea albiflora*)和翘嘴鲇(*Culter alburnus*)正常二倍体和雌核发育体胚胎发育的比较中也存在这种发育迟缓且高畸形率的现象。兰州鲇雌核发育胚胎在进入原肠期出现长时间的发育停滞现象,这可能是由于雌核发育胚胎只具有母本的遗传物质,其高度纯合的基因引起的近交衰退有关。洪一江^[22]指出,胚胎发育至囊胚期以后,某些卵质中的启动因子因冷休克处理而无法启动,细胞分化受阻,发育停滞或胚胎死亡。因此,雌核发育过程中的冷休克处理,可能也是造成兰州鲇雌核发育二倍体受精率和孵化率低以及畸形率高的主要原因。部分雌核发育二倍体胚胎弱小且活动无力,致使出膜困难、死亡率明显提高。

兰州鲇单倍体早期胚胎发育形态特征与普通二倍体无明显差异,只是部分受精卵卵裂时出现不均等分裂,囊胚期少量胚胎囊胚帽较小。兰州鲇单倍体胚胎从低囊胚期发育速度明显变缓,且从原肠期下包开始,胚体轮廓模糊、头大、尾小、躯干短粗、体节不明显、肌节数量少且分化不清晰、脊柱扭曲,呈现典型的单倍体综合征。大多数兰州鲇单倍体胚胎发育到尾芽期死亡,少数胚胎可发育到出膜期,但活力较差,在出膜前期胚胎基本死亡。随着膜的消化分解,死亡胚胎逐渐脱落后出膜。朱作言^[23]认为,在鱼类胚胎发育到低囊胚期后发育速度出现差异,可能是由于胚胎发育从囊胚期开始细胞分化和器官分化受细胞基因调控,而单倍体胚胎中的单套染色体组已不能完全满足胚胎细胞分化和器官分化所需要的正常基因表达,致使胚胎发育滞后、畸形率、死亡率升高^[24]。

关于杂交鲇胚胎发育有不少研究报道,如杂交鲇(怀头鲇♀×鲇鱼♂)胚胎^[25]和鲇(♀)×南方鲇(♂)杂交F1胚胎^[26]均能孵化出正常鱼苗,而本研究中杂交鲇(兰州鲇♀×黄颡鱼♂)未能形成正常胚体,神经胚期停止发育。杂交二倍体胚胎从受精至低囊胚期发育速度与普通二倍体差异不明显,直至原肠期发育速度严重滞后,下包困难,动物极和植物极分界明显呈“葫芦状”,发育至神经胚期出现较多畸形胚胎,发育至胚体形成期胚胎逐渐分解散最终死亡。亲本的遗传信息是靠性细胞的染色体组传递的,如果双亲的染色体数目不同,基因组数目和性质也就不同,会造成雌雄原核结合形成合子过程中来自两亲本染色体的等位基因之间不协调,基因调控紊乱致使胚胎的正常生长发育受阻,最终死亡^[27]。从细胞遗传学的观点来说,双亲间的染色体组型越相近,杂交越容易获得成功;而双亲间染色体组型差异越大,则杂交不亲和性越强,胚胎发育越难正常进行^[28-29]。兰州鲇和黄颡鱼仅属于同目,亲缘关系较远,染色体组型差异也较大,如:兰州鲇染色体数 $2n=58$,核型为 $2n=20m+18sm+16st+4t$,染色体总臂数 $NF=96$ ^[30];而黄颡 $2n=52$,核型为 $2n=28m+10sm+8st+6t$,染色体总臂数 $NF=90$ ^[31]。兰州鲇和黄颡鱼的染色体数目和核型均存在较大差异,是导致胚胎发育速度缓慢、胚体畸形和死亡的主要原因。两种鱼杂交胚胎全部致死,也确保了雌核发育后代的准确性。

综上,本研究利用灭活黄颡鱼精子通过冷休克方法成功诱导兰州鲇雌核发育二倍体,孵化率低,但能正常发育;灭活黄颡鱼精子制备单倍体胚胎表现出典型的单倍体综合征发育至出膜期死亡;未灭活黄颡鱼精子受精制备杂交胚胎未能形成正常胚体。雌核发育胚胎、单倍体胚胎和杂交胚胎的发育速度都慢于普通胚胎。本研究在分析异源精子对兰州鲇胚胎发育影响的基础上,同时也为单倍体、杂交和雌核发育胚胎的细胞生物学研究提供了一定理论依据。

参考文献 (References)

- [1] 吴旭东,张奇,赵红雪,等.宁夏鲇属鱼类一新纪录种——兰州鲇形态学特征描述[J].淡水渔业(WU X D, ZHANG Q, ZHAO H X, et al. A new species of catfish in Ningxia—*Silurus lanzhouensis* and its intensive morphological description [J]. Freshwater Fisheries), 2006, 36(3): 26-9.
- [2] 陈湘彝.我国鲶科鱼类的总述[J].水生生物学集刊(CHEN X L. A review of the Chinese Siluridae [J]. Acta Hydrobiologica

- Sinica), 1977, 06(2): 197-218.
- [3] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录(第二卷脊椎动物上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [4] 史丽娜, 张奇, 吴旭东, 等. 兰州鲇个体繁殖力的研究[J]. 甘肃农业大学学报(SHI L N, ZHANG Q, WU X D, et al. Individual fertility of the *Silurus lanzhouensis* [J]. Journal of Gansu Agricultural University), 2008, 43(1): 67-70.
- [5] 杨元昊, 贺玉良, 周继术, 等. 兰州鲇与鲇、黄河鲤鱼肉质比较[J]. 水生生物学报(YANG Y H, HE Y L, ZHOU J S, et al. Quality evaluation of the meat of *Silurus lanzhouensis*, *Silurus asotus* and *Cyrinus carpio* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica), 2013, 30(1): 54-61.
- [6] LIAN Z Q, WU X D. Acute and chronic toxicities assessment of arsenic (III) to catfish, *Silurus lanzhouensis* in China [J]. Cogent Biol, 2017, 3(1): 1-8.
- [7] LIAN Z Q, WU X D, XIAO W, et al. Complete sequence and characterization of the *Silurus lanzhouensis* (Siluriformes: Siluridae) mitochondrial genome [J]. Mitochondr DNA, 2015, 27(4): 2483-4.
- [8] YANG Y H, WANG F, WANG L Z, et al Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from *Silurus lanzhouensis* [J]. Conserv Genet Resour, 2014, 6(4): 979-81.
- [9] 丁淑荃, 万全, 刘磊, 等. 不同温度下精子保存液对黄颡鱼精子活力的影响[J]. 水利渔业(DING S Q, WAN Q, LIU L, et al. Effects of sperm preservation solution at different temperatures on sperm vitality of *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Reservoir Fisheries), 2007, 27(1): 10-2.
- [10] 吴旭东, 李力, 张锋, 等. 兰州鲇胚胎发育初步研究[J]. 当代水产(WU X D, LI L, ZHANG F, et al. Preliminary study on embryo development of *Silurus lanzhouensis* [J]. Aquaculture), 2011, 36(1): 65-7.
- [11] 吴萍. 我国鱼类雌核发育研究的进展及前景[J]. 上海水产大学学报(WU P. Progress and prospect of fish gynogenesis studies in China [J]. Journal of Shanghai Fisheries University), 2004, 13(3): 255-60.
- [12] 刘海金, 陆桂, 王晓梅, 等. 有丝分裂雌核发育牙鲆的微卫星鉴定[J]. 中国水产科学(LIU H J, LU G, WANG X M, et al. Identification of mitogynogenetic Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using microsatellite marker [J]. Journal of Fishery Sciences of China), 2010, 17(5): 889-94.
- [13] LUCKENBACH J A, GODWIN J, DANIELS H V, et al. Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm [J]. Aquaculture, 2004, 237(4): 499-516.
- [14] GOMELSKY B, CHERFAS N B, GISSIS A, et al. Induced diploid gynogenesis in *White Bass* [J]. Prog Fish Cult, 1998, 60(4): 288-92.
- [15] 桂建芳, 梁绍昌, 孙建民, 等. 鱼类染色体组操作的研究I. 静水压休克诱导三倍体水晶彩鲫[J]. 水生生物学报(GUI J F, LIANG S C, SUN J M, et al. Studies on genome manipulation in fish I. induction of triploid transparent colored crucian carp (*Carassius auratus* transparent colo-red variety) by hydrostatic pressure [J]. Acta Hydrobiologica Sinica), 1990, 14(4): 336-44.
- [16] STREISINGER G, WALKER C, DOWER N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Nature, 1981, 291(5813): 293-6.
- [17] SUN Y D, ZHANG C, LIU S J, et al. Induction of gynogenesis in Japanese Crucian Carp (*Carassius cuvieri*) [J]. Acta Genetica Sin, 2006, 33(5): 405-12.
- [18] JI X S, CHEN S L, TIAN Y S, et al. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization [J]. Aquaculture, 2004, 241(4): 517-28.
- [19] 肖智, 郑文彪, 方昆阳. 鲈胚胎发育及温度对其影响的研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版)(XIAO Z, ZHENG W B, FANG K Y. A study of the embryonic development of *Silurus asotus* linnaeus and the effect of water temperature on it [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science), 1998(3): 9-15.
- [20] 杨育凯, 简林江, 王志勇, 等. 黄姑鱼正常二倍体和雌核发育体胚胎发育及早期生长的比较研究[J]. 上海海洋大学学报(YANG Y K, JIAN L J, WANG Z Y, et al. Comparison of embryonic development and early growth in normal and gynogenetic diploid of Yellow drum *Nibea albiflora* [J]. Journal of Shanghai Ocean University), 2013, 22(5): 690-7.
- [21] 刘月亮, 贾永义, 蒋文枰, 等. 雌核发育翘嘴鲈胚胎发育和形态特征的研究[J]. 上海海洋大学学报(LIU Y L, JIA Y Y, JIANG W P, et al. Study on morphological characteristics and embryonic development of the gynogenesis top mouth culter (*Culter alburnus*) [J]. Journal of Shanghai Ocean University), 2017, 26(2): 203-11.
- [22] 洪一江, 胡成钰, 张丰旺, 等. 冷休克对兴国红鲤胚胎发育的影响[J]. 南昌大学学报: 理科版(HONG Y J, HU C Y, ZHANG F W, et al. The effect of cold shock in the embryonic development of singuo red carp (*Cyprinus carpio* var. *singuoensis*) [J]. Journal of Nanchang University(Natural Science)), 1993, 17(2): 99-104.
- [23] 朱作言. 胡子鲇的胚胎发育[J]. 水生生物学集刊(ZHU Z Y. Embryonic development of *Clarias Fuscus* (Teleostei Siluriformes) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica), 1982, 7(4): 445-54.
- [24] 段会敏, 田永胜, 李文龙, 等. 星斑川鲈雌核发育二倍体、单倍体与普通二倍体及杂交胚胎发育的比较[J]. 中国水产科学(DUAN H M, TIAN Y S, LI W L, et al. Comparison of gynogenetic diploid and haploid embryonic development and hybridization of starry flounder *Platichthys stellatus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China), 2017, 24(3): 477-87.
- [25] 潘伟志, 陈军, 赵春刚, 等. 杂交鲇(怀头鲇♀×鲇鱼♂)胚胎发育进程[J]. 东北林业大学学报(PAN W Z, CHEN J, ZHAO C G, et al. Embryonic development of hybrid *Silurus asotus* (*Silurus soldatovi*♀×*Silurus asotus*♂) [J]. Journal of Northeast Forestry University), 2004, 32(6): 66-8.
- [26] 杨世勇, 杨坤, 刘匆, 等. 鲇(♀)×南方鲇(♂)杂交F1胚胎发育观察[J]. 动物学杂志(YANG S Y, YANG K, LIU C, et al. The embryonic development of hybrid F1 between *Silurus asotus* (♀) and *S. meridionalis* (♂) [J]. Chinese Journal of Zoology), 2014, 49(2): 215-22.
- [27] BOUZA C, SANCHEZ L, MARTINEZ P. Karyotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional, fluorochrome and restriction endonuclease-banding techniques [J]. Mar Biol, 1994, 120(4): 609-13.
- [28] 王祖熊, 张锦霞, 靳光琴. 鱼类杂交不亲和性的研究[J]. 水生生物学报(WANG Z X, ZHANG J X, JIN G Q. Study on the incompatibility of fish hybridization [J]. Acta Hydrobiologica Sinica), 1986, 10(2): 171-9.

- [29] 桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲, 等. 鱼类远缘杂交正反交杂种胚胎发育差异的细胞遗传学分析[J]. 动物学研究(GUI J F, LIANG S C, ZHU L F, et al. Cytogenetic analysis of development difference in hybrid embryos between reciprocal crosses in distant hybridization of fishes [J]. Zoological Research), 1993, 14(2): 171-7.
- [30] 王绿洲, 李蕾, 李涛, 等. 兰州鲇染色体组型[J]. 动物学杂志 (WANG L Z, LI L, LI T, et al. Karyotype of *Silurus lanzhouensis* [J]. Chinese Journal of Zoology), 2015, 50(2): 272-6.
- [31] 薛淑群, 尹洪滨. 黄颡染色体组型的初步分析[J]. 水产学杂志(XUE S Q, YIN H B. Karyotype analyses of *Pseudobagrus fulvidraco* [J]. Chinese Journal of Fisheries), 2006, 19(1): 11-3.