

文章编号:1000-0615(2009)01-0060-10

紫外灭活的异源和同源精子诱导的半滑舌鳎 单倍体胚胎发育过程比较

季相山^{1,2}, 陈松林¹, 武鹏飞¹, 田永胜¹, 姜运良²

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018)

摘要:为探讨在雌核发育研究中紫外灭活的异源精子的细胞质等是否对“受精”卵的发育产生影响,本文对紫外灭活的异源和同源精子诱导的半滑舌鳎单倍体胚胎发育过程进行了比较研究。结果显示,在胚盘形成期、二细胞期、多细胞期和囊胚期,异源和同源精子诱导的半滑舌鳎单倍体胚胎发育时序及形态无显著差异。之后,灭活的异源精子诱导的单倍体胚胎发育速度比同源精子诱导的单倍体胚胎要慢,至受精后 18 h 48 min 已慢 1 个发育时期,说明在发育前期,异源精子诱导的单倍体胚胎发育阻力更大。肌节期后,同源精子诱导的半滑舌鳎单倍体胚胎发育也严重受阻,与异源精子诱导的单倍体胚胎发育速度无显著差异;且单倍体胚胎陆续大量死亡,但异源精子诱导的单倍体胚胎死亡率明显要大于同源精子诱导的单倍体胚胎。异源和同源精子诱导的单倍体胚胎孵出的仔鱼均表现有单倍体综合症,外形基本一致。为确保紫外线处理将精子完全灭活,当紫外灭活的异源和同源精子诱导的半滑舌鳎单倍体胚胎发育至原肠后期时,各取 30 粒用倍性分析仪检测其倍性,结果显示全为单倍体。

关键词:半滑舌鳎; 异源精子; 单倍体; 胚胎发育; 倍性

中图分类号:S 917

文献标识码:A

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)属鲽形目(Pleuronectiformes)、舌鳎科(Cynoglossidae)、舌鳎属(*Cynoglossus*),俗称牛舌头、鳎米、龙利等,在中国沿海水域均有分布^[1]。半滑舌鳎个体大、生长较快、肉味鲜美,经济价值高,为中国特有的名贵海水鱼类,是理想的增殖放流和人工养殖种类。近年来,众多学者对半滑舌鳎的生长特性、摄食状况、产卵习性、胚胎发育、早期形态特征等生物学特性及人工育苗和养殖工艺技术等进行了研究,为半滑舌鳎规模化养殖和增殖放流提供了技术支持^[2-3]。

雌核发育研究不仅能使基因迅速纯合,使优良性状快速固定,还能进行性别控制,达到培育单性品种的目的。我国鱼类雌核发育研究始于 20 世纪 70 年代,目前已在多种海、淡水鱼类上获得成功^[4-6]。半滑舌鳎雌雄生长速度差异大,雌性

比雄性生长快 2~4 倍,开展半滑舌鳎雌核发育研究,建立半滑舌鳎全雌苗种培育技术是半滑舌鳎养殖业健康、持续、快速发展的关键^[7]。

由于异源精子诱导雌核发育研究能省去雌核发育个体鉴定的麻烦,随着精子冷冻保存技术的发展^[8-9],异源精子诱导雌核发育研究正得到越来越广泛的应用^[9-10]。目前在雌核发育研究中,多是用紫外线灭活精子遗传物质,其机理较为复杂,一般认为紫外线使精子核酸中形成嘧啶二聚体,损伤精子的 DNA 构型,干扰 DNA 正常碱基配对^[11],甚至导致 DNA 链断裂。灭活的异源精子中断裂的 DNA 链是否会整合到“受精”卵的基因组中并表达^[12],使雌核发育个体掺杂有异种的基因,一直以来由于缺乏技术手段等原因未有人研究过。

自从人类中发现 X 染色体失活以及基因印

收稿日期:2008-03-14

修回日期:2008-06-11

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A403);山东省农业良种工程重大项目;山东省泰山学者工程专项经费资助

通讯作者:陈松林,E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

迹现象后,等位基因差异表达的研究逐渐受到重视^[13]。由于单倍体只有一套染色体,所以单倍体的所有细胞都没有等位基因,这为遗传学和细胞学中许多问题的研究提供了便利条件^[14]。最早 Yamamoto^[15]用涂抹青鳉(*Oryzias latipes*)血液的探针刺激成熟的青鳉卵子,成功获得了囊胚期以及原肠胚早期的单倍体,但从未获得原肠后期的单倍体胚胎。而用紫外灭活的精子诱导的鱼类单倍体胚胎,许多能发育到肌节期,有些能孵化出膜^[16]。既然灭活的精子只是刺激卵的发育,并不真正与卵受精,为何用血液刺激和灭活精子刺激的效果不同呢?很可能,灭活精子细胞质中的某些物质对单倍体的发育起了重要作用。而用异源精子诱导雌核发育研究时,灭活的异源精子的细胞质是否会对雌核发育个体的发育产生影响,一直以来没人研究过。本文用紫外线灭活鲈鱼和半滑舌鳎精子后,分别与半滑舌鳎卵“受精”,获得异源和同源精子诱导的半滑舌鳎单倍体胚胎,通过比较其胚胎发育时序和各期胚胎的形态差异,以研究异源精子细胞质中的成分和断裂的 DNA 链等对单倍体胚胎发育过程的影响,为异源精子诱导雌核发育研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

半滑舌鳎亲鱼购自海阳市黄海水产有限责任公司,鲈鱼冻精为黄海水产研究所海水鱼类精子冷冻库保存 1~2 年的精子。

1.2 精子灭活与“受精”

挑选性腺发育成熟的半滑舌鳎雌、雄鱼,按压其性腺部位获得半滑舌鳎成熟卵子和精子。采集的半滑舌鳎精子立即以 1:1 的比例与 MPRS 混合^[8],30 min 内拿回实验室镜检。鲈鱼冻精 37℃ 水浴解冻后镜检活力。活力达 60% 以上的半滑舌鳎和鲈鱼精子用于紫外灭活实验,鲈鱼冻精和半滑舌鳎精子以 1:9 的比例与 MPRS 混合后,取 1 mL 置于直径为 8.7 cm 的培养皿中,在紫外照射仪下照射,照射剂量为 80 MJ/cm²。取 1 mL 紫外灭活的鲈鱼和半滑舌鳎精子分别与 10 mL 半滑舌鳎卵“受精”,受精卵在(23 ± 0.5)℃、盐度为 30 的过滤海水中培养,每天换水 2 次,及时清除死卵。用未经紫外处理的半滑舌鳎精子和卵受精作对照,培养条件同前。取若干粒受精卵于

培养皿中,留适量海水,在 Nikon 显微镜下连续观察胚胎发育过程,用 Nikon 照相机拍摄胚胎发育特征图片。

1.3 倍性分析

为确保紫外线处理将精子完全灭活,“受精”胚胎全为单倍体,当紫外灭活的异源和同源精子诱导的半滑舌鳎单倍体胚胎发育至原肠后期时,各取 30 粒用倍性分析仪(Partec, Germany)检测其倍性,同时测定 10 粒二倍体对照胚胎。检测方法:将胚胎放入 1.8 mL 离心管中,吸干海水,用 PBS 冲洗一遍,加入 0.1 mL Cystain DNA 1 step staining solution,用研磨棒轻轻研磨,直至肉眼看不到颗粒。再加入 0.8 mL 染液,室温下染色 5 min,50 μm 孔径的尼龙滤网过滤后,转入倍性分析仪专用样品管中测定^[17]。每秒通过的细胞数维持在 100~150 个。测定结果以倍性分析直方图的形式显示。

2 结果

半滑舌鳎受精卵在(23 ± 0.5)℃、盐度为 30 的海水中培养,历经约 40 h 孵化出膜。紫外灭活的异源和同源精子诱导的单倍体胚胎约经 44 h 34 min 孵化出膜。半滑舌鳎单倍体和二倍体对照胚胎发育时序见表 1,半滑舌鳎单倍体和二倍体对照各期胚胎发育特征见图版。

2.1 起始受精至受精后 7 h

灭活的鲈鱼和半滑舌鳎精子诱导的单倍体胚胎发育时序在该阶段未表现出差异(表 1)。经过约 7 h,都相继经过胚盘形成期、二细胞期、多细胞期,进入囊胚期。从各期胚胎形态上看,囊胚期前无显著差异;在囊胚期,同源精子诱导的单倍体胚胎细胞分裂整齐,各细胞大小均匀一致;异源精子诱导的单倍体胚胎边缘细胞排列略为松散。在该阶段,单倍体胚胎和对照二倍体胚胎从发育时序和形态上讲也无显著差异

2.2 受精后 7 h 至受精后 20 h 56 min

胚胎继续发育,至 9 h 21 min,同源精子诱导的单倍体胚胎囊胚边缘的细胞增多,囊胚周围开始下包,逐渐向植物极迁移,发育至原肠早期(图版-1);而异源精子诱导的单倍体胚胎发育速度明显慢于同源精子诱导的单倍体胚胎(图版-2),四周胚层刚开始向内翻卷,内胚层还未形成;而此时对照胚胎也处于原肠早期,但发育速度明显快于

单倍体胚胎(图版-3)。至15 h 31 min,紫外灭活的半滑舌鳎精子诱导的单倍体胚胎下包卵黄约1/3,仍处于原肠早期(图版-4);而灭活的鲈精子诱导的单倍体胚胎发育滞后,仅下包卵黄约1/4(图版-5);而此时二倍体对照胚胎已进入原肠中期(图版-6)。但单倍体胚胎和对照胚胎的细胞均分裂整齐,胚胎都较透明。至18 h 48 min,灭活的半滑舌鳎精子诱导的单倍体胚胎,胚层下包卵黄超过3/4,胚盾逐渐延伸,变长,前端稍大,发育至原肠晚期(图版-7);灭活的鲈鱼精子诱导的单倍体胚胎发育速度很慢,胚层下包卵黄仅1/2,刚进入原肠中期(图版-8),此时与同源精子诱导的

单倍体胚胎相差1个发育时期。而对照胚胎此时已进入胚孔封闭期(图版-9)。胚胎继续发育,至20 h 56 min,灭活的半滑舌鳎精子诱导的单倍体胚胎,胚体逐渐形成,胚尾还未完全收缩成型,进入胚孔封闭期;头部与胚孔封闭期的对照胚胎相比,细胞较为松散(图版-10);灭活的鲈鱼精子诱导的单倍体胚胎,胚层几乎完全将卵黄包住,胚盾逐渐延伸、变长,进入原肠晚期,与同源精子诱导的单倍体相比,仍差1个发育时期(图版-11)。对照胚胎此时已进入肌节期,胚体前部肌节已较为清晰(图版-12)。

表1 灭活的异源和同源精子诱导的单倍体及对照胚胎发育时序
Tab.1 Embryonic development schedule of half-smooth tongue sole haploid induced by UV-irradiated heterologous and homologous sperm and control diploid

受精后时间 (h: min) time after fertilization	同源精子诱导单倍体 胚胎发育时期(图版) embryonic development stage of haploid induced by UV-irradiated homologous sperm (Plate)	异源精子诱导单倍 体胚胎发育时期(图版) embryonic development stage of haploid induced by UV-irradiated heterologous sperm (Plate)	对照胚胎发育时期(图版) stage of control embryonic development (Plate)
1:12	胚盘形成期 stage of blastodisc formation	胚盘形成期 stage of blastodisc formation	胚盘形成期 stage of blastodisc formation
1:30	二细胞期 2-cell stage	二细胞期 2-cell stage	二细胞期 2-cell stage
4:01	多细胞期 multi-cell stage	多细胞期 multi-cell stage	多细胞期 multi-cell stage
7:00	囊胚期 blastula stage	囊胚期 blastula stage	囊胚期 blastula stage
9:21	原肠早期(1) stage of early gastrula (1)	原肠早期(2) stage of early gastrula (2)	原肠早期(3) stage of early gastrula (3)
15:31	原肠早期(4) stage of early gastrula (4)	原肠早期(5) stage of early gastrula (5)	原肠中期(6) stage of middle gastrula (6)
18:48	原肠晚期(7) stage of late gastrula (7)	原肠中期(8) stage of middle gastrula (8)	胚孔封闭期(9) closure of blastopore (9)
20:56	胚孔封闭期(10) closure of blastopore (10)	原肠晚期(11) stage of late gastrula (11)	肌节期(12) somite stage (12)
24:32	肌节期(13) somite stage (13)	胚孔封闭期(14) closure of blastopore (14)	尾芽开始形成(15) formation of tail-bud (15)
30:08	肌节期(16) somite stage (16)	肌节期(17) somite stage (17)	尾芽期(18) tail-bud stage (18)
33:03	尾芽期(19) tail-bud stage (19)	尾芽期(20) tail-bud stage (20)	心跳期(21) heart-heating stage (21)
36:39	心跳期(22) heart-heating stage (22)	心跳期(23) heart-heating stage (23)	肌动期(24) stage of embryo movement (24)
39:04	肌动期(25) stage of embryo movement (25)	肌动期(26) stage of embryo movement (26)	出膜前期(27) pre-hatching stage (27)
39:36	肌动期 stage of embryo movement	肌动期 stage of embryo movement	初孵仔鱼(30) newly hatched larvae (30)
44:34	初孵仔鱼(28) newly hatched larvae (28)	初孵仔鱼(29) newly hatched larvae (29)	未拍照 photo is not taken

2.3 受精后 20 h 56 min 至受精后 36 h 39 min

随着胚胎逐渐发育,单倍体胚胎分期已较困难。至受精后 24 h 32 min,同源精子诱导的单倍体胚胎肌节逐渐形成,但肌节不清晰,在显微镜下数不清肌节数,头部也极为模糊(图版-13);异源精子诱导的单倍体胚胎进入胚孔封闭期,尾部还未完全收缩成型(图版-14)。此时对照组胚胎尾芽开始形成(图版-15)。至受精后 30 h 08 min,灭活的半滑舌鳎精子诱导的单倍体胚胎仍处于肌节期(图版-16),肌节数量增多,但仍很难数清具体的肌节数。灭活的鲈鱼精子诱导的单倍体胚胎也进入肌节期,但胚体比同源精子诱导的单倍体要短,肌节和头部也较为模糊(图版-17)。从此期开始,单倍体胚胎大量死亡。此时,同源和异源精子诱导的单倍体胚胎由于发育都严重受阻,尽管外形上有一些差异,是否是由于精子不同导致的,对此很难下定论。此时对照胚胎已进入尾芽期(图版-18)。至受精后 33 h 3 min,灭活的半滑舌鳎精子诱导的单倍体胚胎尾芽明显,头部结构变得复杂,进入尾芽期(图版-19)。灭活的鲈鱼精子诱导的单倍体胚胎也进入尾芽期,但尾芽较短,头部也较模糊(图版-20)。此时对照胚胎进入心跳期(图版-21)。至受精后 36 h 39 min,灭活的同源精子诱导的单倍体胚胎,心脏开始跳动,晶体、耳石等变得清晰,相继进入心跳期,部分胚胎开始死亡(图版-22);灭活的异源精子诱导的单倍体胚胎在此期死亡较多(图版-23),有些胚胎也逐渐进入心跳期。对照组胚胎此时进入肌动期(图版-24)。

2.4 受精后 36 h 39 min 至受精后 44 h 34 min

受精后 36 h 39 min,灭活的同源精子诱导的单倍体胚胎进入肌动期(图版-25),但抽动力度比对照明显小,与异源精子诱导的胚胎抽动力度无显著差异(图版-26)。对照组胚胎此时进入出膜前期(图版-27)。受精后 39 h 36 min,对照组胚胎孵化出膜(图版-30),单倍体胚胎仍处于肌动期。受精后 44 h 34 min,灭活的同源和异源精子诱导的单倍体胚胎才陆续孵化出膜,许多胚胎因不能出膜而死亡,异源精子诱导的胚胎死亡率要明显高于同源精子诱导的胚胎。同源和异源精子诱导的单倍体胚胎出膜后仔鱼都表现为典型的单倍体综合症,外形上无明显差异(图版-28,29)。

2.5 倍性分析结果

倍性分析结果显示,紫外灭活的同源精子诱导的 30 粒半滑舌鳎胚胎全为单倍体,单倍体率为 100%;紫外灭活的异源精子诱导的半滑舌鳎胚胎单倍率也为 100%。代表性的倍性分析直方图见图 1-a,图中有一个主峰,代表处于 G1 期的细胞 DNA 含量;一个副峰,代表处于 G2/M 期的细胞 DNA 含量。正常受精的 10 粒半滑舌鳎胚胎全为二倍体。代表性的倍性分析直方图见图 1-b。也有一个主峰和一个副峰,分别代表处于 G1 期和 G2/M 期的细胞 DNA 含量。

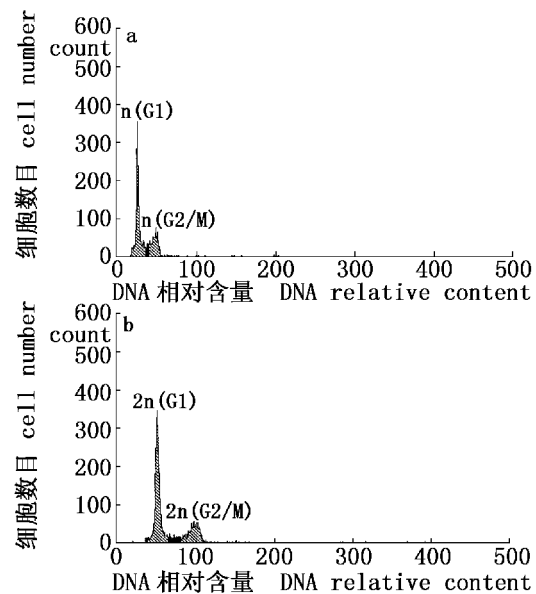


图1 单倍体(a)和二倍体(b)胚胎倍性分析直方图
Fig.1 Histogram of DNA relative content of haploid (a) and diploid (b) tongue sole embryo

3 讨论

在胚盘形成期、二细胞期和多细胞期,异源和同源精子诱导的单倍体胚胎发育时序一致,且单倍体胚胎与对照胚胎发育时序也基本一致,说明卵裂的启动不需要太复杂的条件。Yamamoto^[16]用涂抹青鳉(*Oryzias latipes*)血液的探针刺激成熟的青鳉卵子,并成功获得了囊胚期以及原肠胚早期的单倍体,也证明了这一点。

Sun等^[18]在属间克隆鱼的研究中发现,克隆鱼的核基因组DNA来源于供体鱼,在血液循环期以前的克隆胚胎中共存着来源于供体和受体两种类型的mtDNA,而在后续发育阶段仅存在受体

细胞质的 mtDNA,这说明尽管 mtDNA 是母系遗传的,但在特定的时期供体的 mtDNA 也发挥作用。因此,精子的 mtDNA 也很可能在胚胎某些发育阶段起作用。而本文研究发现从原肠早期到肌节期,异源和同源精子诱导的单倍体胚胎发育时序相差了 1 个时期,各期胚胎形态差异也较大,这可能是同源和异源精子 mtDNA 作用效果不同的结果。肌节期后,由于单倍体胚胎发育阻力增大,尽管同源和异源精子诱导的单倍体胚胎外形上有一些差异,是否是由于精子不同导致的,对此很难下定论。若对此进行深入研究,需要利用新的方法和技术。

在对泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)^[16] 和中间球海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*)^[19] 的雌核发育单倍体胚胎进行的研究发现,几乎所有单倍体的发育速度都慢于二倍体,且因单倍体综合症,多数胚胎不能发育到孵化期,与本文的研究结果相似。目前认为,单倍体胚胎在早期死亡是由于隐性致死因子的出现和单倍体胚胎中核质比的下降造成的,也不排除细胞分裂等细胞学因素的影响;许多胚胎不能孵化出膜可归因于胚胎的器官、系统无规则和不完善的发育所引起^[16]。在本研究中,我们也发现许多胚胎在发育后期相继死亡。而且,异源精子诱导的单倍体胚胎在肌节期后的死亡率要明显高于同源精子诱导的单倍体。由于当前对单倍体胚胎进行专门研究的极少,研究手段和方法也较匮乏,因此,还需对此作进一步研究。

杜伟等^[20]曾对半滑舌鳎胚胎发育过程进行过观察报道,培养水温 20.5~21.6℃,盐度 33.5 时,经 40 h 20 min 胚胎孵化出膜。本文研究发现,在水温为(23±0.5)℃、盐度为 30 的海水中培养,半滑舌鳎胚胎历时 39 h 36 min 孵化出膜,灭活的异源和同源精子诱导的单倍体胚胎历时 44 h 34 min 孵化出膜,水温升高后,缩短了半滑舌鳎胚胎的发育时间。单倍体胚胎发育时间长,除与其发育速度比二倍体胚胎慢外,单倍体胚胎畸形,活力弱,肌动期时运动不剧烈,这些都延长了其胚胎孵化时间。

异源和同源精子诱导的单倍体胚胎孵出的仔鱼都表现为单倍体综合症。这种现象与前人在两栖类中观察到的单倍体综合症相似。由此说明,不同动物的单倍体所表现的畸形特征具有共同

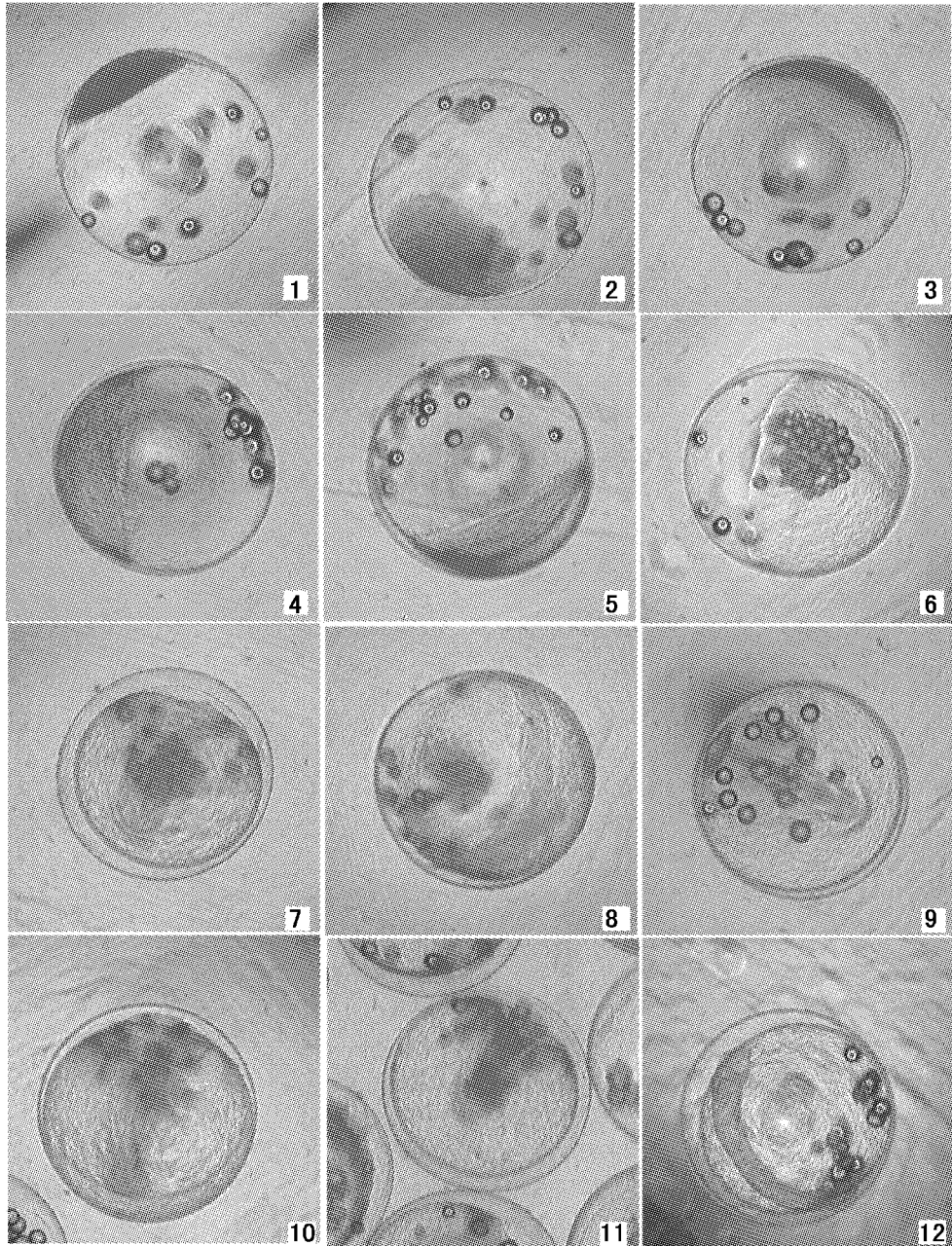
性。尽管异源精子的细胞质对单倍体的胚胎发育有一定影响,但孵出的仔鱼形态与同源精子诱导的单倍体仔鱼无显著差异,说明精子细胞质对后代的影响是较小的。

倍性分析仪是鉴定细胞 DNA 倍性的常规工具,与染色体制作^[3]和细胞核体积大小测量相比,具有快速、准确、可靠的优点^[21]。而且,倍性分析仪是流式细胞仪的一种,体积小,操作简便,适于在各养殖场应用。本文用倍性分析仪对紫外灭活的异源和同源精子诱导的单倍体胚胎倍性分析显示,它们均为单倍体,这确保了本实验观察的胚胎都为单倍体。由于胚胎阶段细胞分裂活动旺盛,在倍性分析时发现,除主峰外还有一个副峰,副峰代表了处于 G2/M 期的细胞。其他学者在进行倍性分析时也观察到了同样的现象^[17]。

参考文献:

- [1] 张春霖,成庆泰,郑葆珊. 黄渤海鱼类调查报告 [M]. 北京: 科学出版社, 1955: 298-300.
- [2] 姜言伟, 万瑞景. 渤海半滑舌鳎的生殖习性 & 产卵生态的研究 [J]. 海洋水产研究, 1988, (9): 185-192.
- [3] 周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鳎染色体核型分析 [J]. 水产学报, 2005, 29: 417-419.
- [4] 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: 499-516.
- [5] 蒋一珪, 俞豪祥, 陈本德, 等. 鲫鱼的人工和天然雌核发育 [J]. 水生生物学报, 1982, 7: 471-477.
- [6] 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: 179-187.
- [7] Chen S L, Li J, Deng S P, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Biotechnology, 2007, 9: 273-280.
- [8] 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: 517-28.
- [9] 陈松林. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.

- [10] 王德祥, 苏永全, 王世锋, 等. 异源精子诱导大黄花雌核发育的研究[J]. 高技术通讯, 2006, 16: 1206-1210.
- [11] 孙文俊, 刘文君, 胡田甜, 等. 紫外线消毒系统中强度分布的理论计算与生物验证对比[J]. 环境科学学报, 2008, 28: 563-567.
- [12] 褚晓红, 郑新民, 杨公社, 等. 三种 DNA 片段在小鼠体内共整合效率的研究[J]. 浙江大学学报, 2004, 30: 97-101.
- [13] 吴建勇, 杨光圣. 等位基因结构差异及差异表达研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25: 455-460.
- [14] 张红宇, 彭海, 李云, 等. 水稻基因组 DNA 胞嘧啶甲基化在单倍体和对应二倍体间的表达[J]. 科学通报, 2006, 51: 1529-1535.
- [15] Yamamoto T. Physiological studies on fertilization and activation of fish eggs. I. Response of the cortical layer of the egg of *Oryzias latipes* to insemination and artificial stimulation [J]. *Annotationes Zoologicae Japonicae*, 1944, 22: 109-125.
- [16] 张梅芬, 吴美锡, 丁汉波. 泥鳅雌核生殖单倍体胚胎发育的研究[J]. 动物学研究, 1993, 14: 361-366.
- [17] 李雅娟, 李霞, 丁君, 等. 三倍体皱纹盘鲍活体倍性检测[J]. 水产学报, 2003, 27(5): 425-430.
- [18] Sun Y H, Chen S P, Wang Y P. Cytoplasmic impact on cross-genus cloned fish derived from transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) nuclei and goldfish (*Carassius auratus*) enucleated eggs [J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 72: 510-515.
- [19] 丁君, 常亚青, 曹学彬, 等. 中间球海胆雌核发育单倍体胚胎的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19: 10-15.
- [20] 杜伟, 蒙子宁, 薛志勇, 等. 半滑舌鳎胚胎发育及其与水温的关系[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 48-53.
- [21] Pandian T J, Koteeswaran R. Ploidy induction and sex control in fish [J]. *Hydrobiologia*, 1998, 384: 167-243.

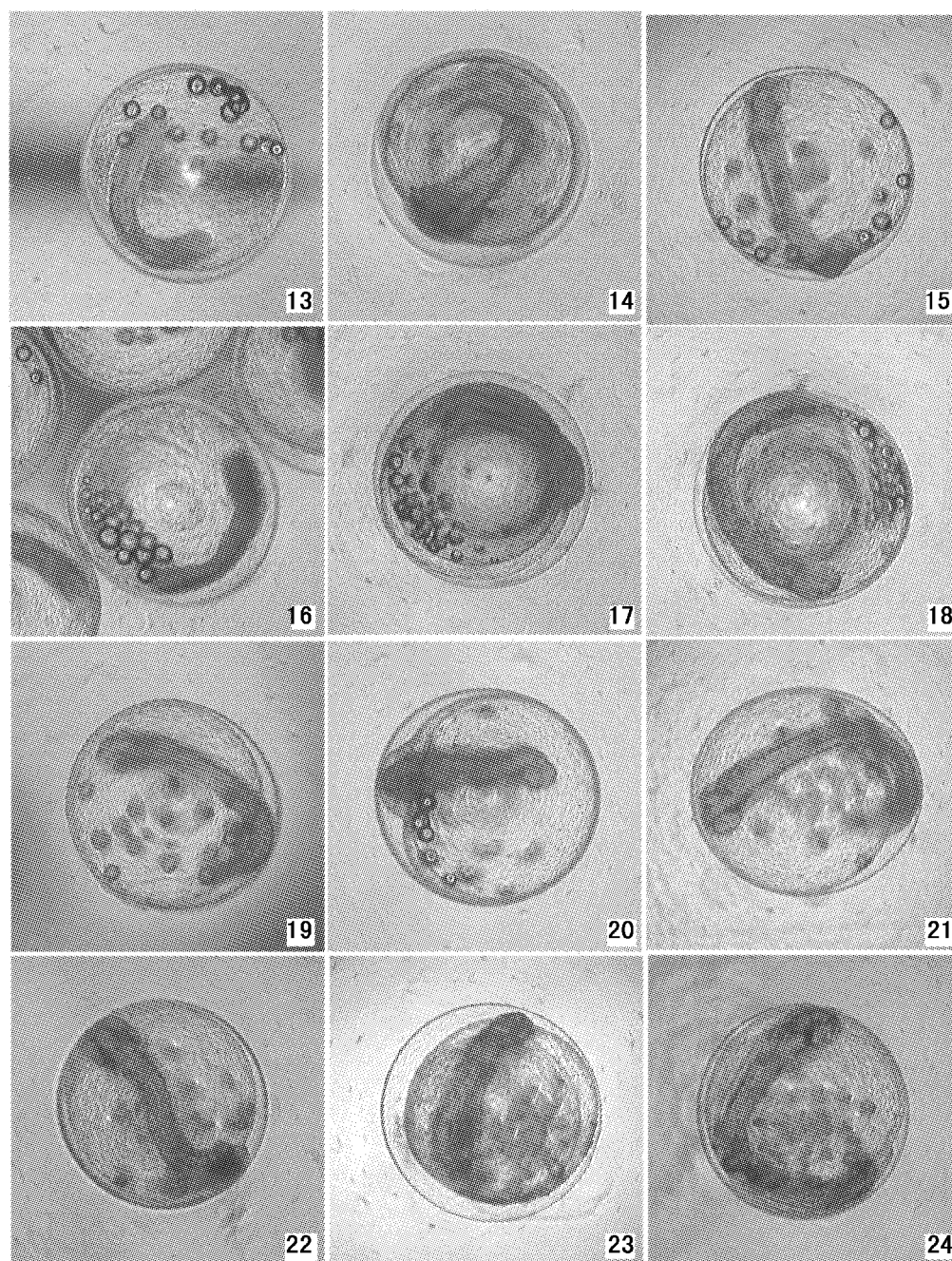


图版

1. 同源精子诱导的单倍体胚胎发育至原肠早期(图版-1,4)、原肠晚期(图版-7)、胚孔封闭期(图版-10);2. 异源精子诱导的单倍体胚胎发育至原肠早期(图版-2,5)、原肠中期(图版-8)、原肠晚期(图版-11);3. 对照二倍体胚胎发育至原肠早(图版-3)、原肠中期(图版-6)、胚孔封闭期(图版-9)、肌节期(图版-12)

Plate

1. Haploid tongue sole embryos induced by homologous sperm, at stage of early gastrula (Plate-1, 4), late gastrula (Plate-7), closure of blastopore (Plate-10);2. Haploid tongue sole embryos induced by heterogenous sperm, at stage of early gastrula (Plate-2, 5), middle gastrula (Plate-8), late gastrula (Plate-11);3. Diploid tongue sole embryos, at stage of early gastrula (Plate-3), middle gastrula (Plate-6), closure of blastopore (Plate-9), somite (Plate-12)

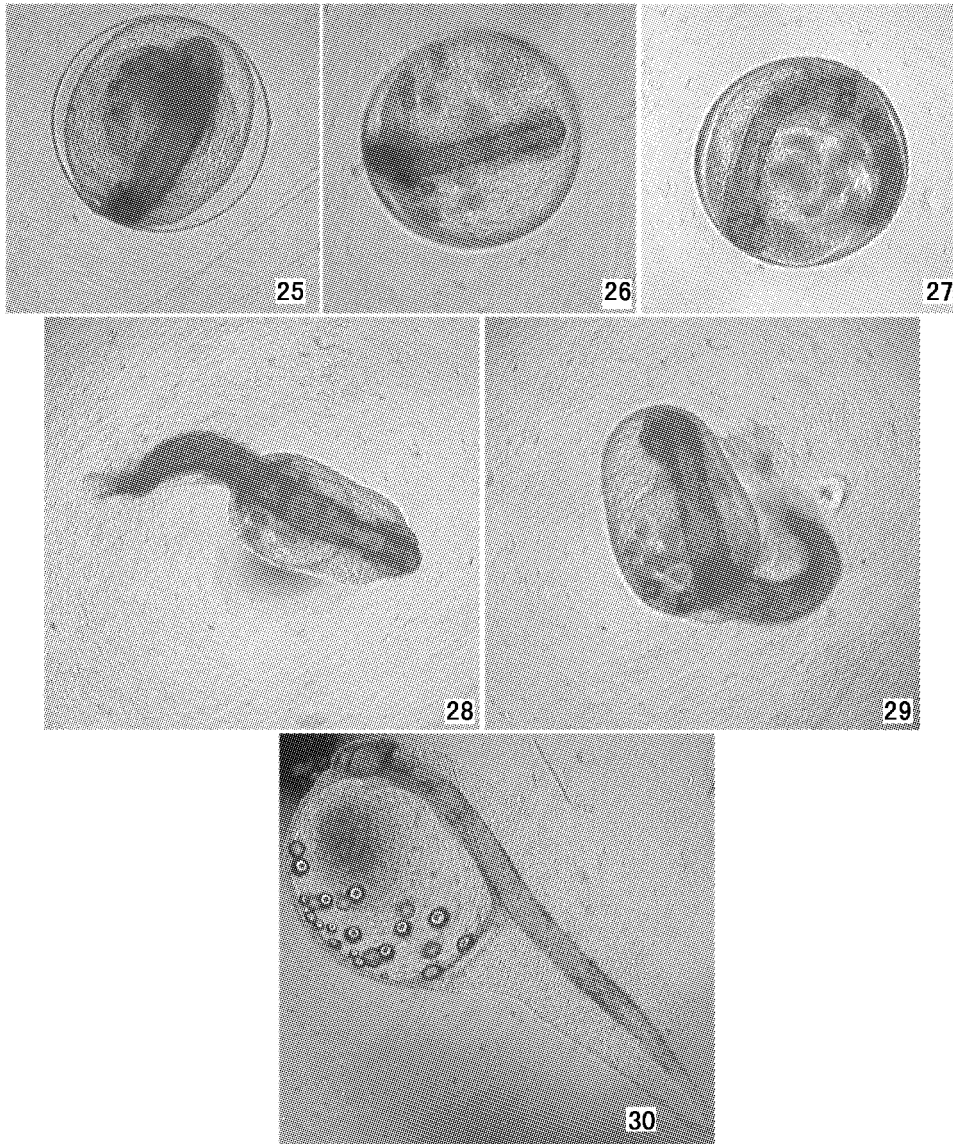


图版

1. 同源精子诱导的单倍体胚胎发育至肌节期(图版-13、16)、尾芽期(图版-19)、心跳期(图版-22);2. 异源精子诱导的单倍体胚胎发育至胚孔封闭期(图版-14)、肌节期(图版-17)、尾芽期(图版-20)、心跳期(图版-23);3. 对照二倍体胚胎发育至尾芽开始形成(图版-15)、尾芽期(图版-18)、心跳期(图版-21)、肌动期(图版-24)

Plate

1. Haploid tongue sole embryos induced by homologous sperm, at stage of somite (Plate-13, 16), tail-bud (Plate-19), heart-beating (Plate-22);2. Haploid tongue sole embryos induced by heterogenous sperm, at stage of closure of blastopore (Plate-14), somite (Plate-17), tail-bud (Plate-20), heart-beating (Plate-23);3. Diploid tongue sole embryos, at stage of formation of tail-bud (Plate-15), tail-bud (Plate-18), heart-beating (Plate-21), embryo movement (Plate-24)



图版

1. 同源精子诱导的单倍体胚胎发育至肌动期(图版-25)、初孵仔鱼(图版-28);2. 异源精子诱导的单倍体胚胎发育至肌动期(图版-26)、初孵仔鱼(图版-29);3. 对照二倍体胚胎发育至出膜前期(图版-27),初孵仔鱼(图版-30)

Plate

1. Haploid tongue sole embryos induced by homologous sperm, at stage of embryo movement (Plate-25), newly hatched larvae (Plate-28);2. Haploid tongue sole embryos induced by heterogenous sperm, at stage of embryo movement (Plate-26), newly hatched larvae (Plate-29);3. Diploid tongue sole embryos, at stage of pre-hatching stage (Plate-27), newly hatched larvae (Plate-30)

Comparison of embryonic development of *Cynoglossus semilaevis* haploid induced by heterogenous and homogenous sperm

JI Xiang-shan^{1,2}, CHEN Song-lin¹, WU Peng-fei¹,
TIAN Yong-sheng¹, JIANG Yun-liang²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China;

2. Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: In order to study if cytoplasm of UV-irradiated heterogenous sperm affected the development of “fertilized” egg during gynogenesis, the embryonic development of *Cynoglossus semilaevis* haploid induced by UV-irradiated heterogenous and homogenous sperm were compared. The embryonic development course of haploid induced by UV-irradiated heterogenous and homogenous sperm was alike at the stages of blastodisc formation, 2-cell stage, multi-cell stage and blastula stage. After the stage of early gastrula, the developmental velocity of haploid embryo induced by UV-irradiated heterogenous sperm was slower than that of haploid embryo induced by UV-irradiated homogenous sperm. But, the morphology of haploid embryos induced by UV-irradiated heterogenous and homogenous sperm was alike at the corresponding stage. After stage of somite, the developmental velocity of haploid induced by UV-irradiated heterogenous and homogenous sperm was identical. A great deal of haploid embryos died after somite stage and the death rate of haploid embryos induced by UV-irradiated heterogenous sperm was larger than that of haploid embryos induced by UV-irradiated homologous sperm. The larvae hatched from haploid embryo induced by UV-irradiated heterogenous and homogenous sperm have haploid syndrome. The ploidy level of 30 gastrula embryos induced by UV-irradiated heterogenous and homogenous sperm was determined in order to verify that UV light completely deactivated sperm. The result of ploidy analysis showed that the embryos induced by UV-irradiated heterogenous and homogenous sperm were all haploid.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; heterogenous sperm; haploid; embryonic development; ploidy level