



四倍体补偿技术在家畜胚胎中的研究现状与应用前景

马莉¹, 闵思蕊^{1,2}, 刘新峰^{1,2*}, 陈强^{1,2*}

(1. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021; 2. 宁夏大学 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021)

摘要: 四倍体补偿技术是家畜遗传育种和生物医学研究的重要工具, 其应用潜力日益凸显。本文系统综述了家畜四倍体补偿技术在体外胚胎生产的关键技术、瓶颈问题及未来发展方向, 重点探讨了猪、牛、羊主要家畜四倍体胚胎的诱导方法(如物理法、化学法、生物法)、体外培养体系优化及发育效率影响因素。通过对比不同物种四倍体胚胎的发育特性, 揭示胚胎基因组激活异常、胎盘发育缺陷等核心限制因素。结合基因编辑、类胚胎培养等前沿技术, 展望了该技术在高效育种、疾病模型构建及异种器官移植等领域的应用前景, 以期对相关研究提供理论参考和技术指导。

关键词: 家畜; 四倍体胚胎; 体外生产; 胚胎技术; 胚胎发育

中图分类号: S814.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1205-09

Current Status and Application Prospects of Tetraploidy Compensation Technology in Domestic Animal Embryos

MA Li¹, MIN Sirui^{1,2}, LIU Xinfeng^{1,2*}, CHEN Qiang^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Key Laboratory of Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China of Ministry of Education, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Tetraploid embryo technology is an important tool for livestock genetic breeding and biomedical research, and its application potential is becoming more and more prominent. In this paper, we systematically review the key technologies, bottlenecks and future development directions of tetraploid *in vitro* embryo production in livestock. It focuses on the induction methods (e.g., physical, chemical, and biological methods), optimization of *in vitro* culture systems, and factors affecting the developmental efficiency of tetraploid embryos of major livestock species, such as pigs, cows, and sheep. By comparing the developmental characteristics of tetraploid embryos from different species, we reveal the core limiting factors such as abnormal activation of the embryonic genome and defective placental development. Combined with the cutting-edge technologies of gene editing and embryo-like culture, the application of this technology in the fields of efficient breeding, disease modeling and xenotransplantation is envisioned, with a view to providing theoretical references and

收稿日期: 2025-08-13

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(引才专项)(2024BEH04111); 国家自然科学基金(32160791); 宁夏自然科学基金重点项目(2024AAC02019)

作者简介: 马莉, 本科生, 主要从事家畜胚胎工程研究, E-mail: 2062138802@qq.com

* 通信作者: 陈强, 主要从事家畜卵子与早期胚胎发育机理研究, E-mail: chenqiang@nxu.edu.cn; 刘新峰, 主要从事动物胚胎工程与生物育种研究, E-mail: liu2019074@nxu.edu.cn

technological guidance for related research.

Keywords: livestock; tetraploid embryos; *in vitro* production; embryo technology; embryo development

* **Corresponding authors:** CHEN Qiang, E-mail: chenqiang@nxu.edu.cn; LIU Xinfeng, E-mail: liu2019074@nxu.edu.cn

四倍体体外胚胎技术是21世纪生殖生物学与生物技术领域的重要突破,作为染色体工程的关键组成部分,其通过人工诱导使胚胎染色体加倍^[1],自20世纪90年代在小鼠模型中首次获得成功后,研究人员便开始将该技术拓展到家畜领域,旨在为生物育种和生物医学研究建立新的技术平台^[2]。家畜四倍体体外胚胎技术具有重要的理论价值和应用前景。在基础研究方面,该技术为比较家畜与啮齿类动物胚胎发育提供了理想模型;在应用领域,其在优质种畜扩繁、遗传资源保存、人类疾病模型构建等方面展现出显著优势,对推动畜牧业可持续发展和生物医学研究具有重大意义^[3]。然而,与小鼠相比,家畜四倍体胚胎技术发展相对滞后,如体外培养体系不完善、技术转化难度大,基础研究与产业化应用之间存在断层等。近年来,随着多学科交叉融合,干细胞育种领域已取得显著进展,尤其是牛羊单倍体干细胞系的建立,为家畜干细胞育种以及四倍体补偿技术提供了新的思路^[4]。本文基于系统文献分析和以往试验研究,重点阐述家畜四倍体技术的研发历程,通过跨物种技术比较,剖析当前瓶颈问题,并展望其未来发展方向。

1 四倍体补偿技术的生物学背景与技术原理

1.1 四倍体现象的生物学基础

1.1.1 生物界的四倍体现象及特性 四倍化现象在生物界中广泛存在,是生物进化的重要驱动力之一。从植物界到动物界,四倍体生物也展现出了自身独特的生物学特性。在植物中,多倍化现象极为普遍,约70%的被子植物在其进化历程中经历过基因组加倍事件。多倍体纸桦植物较二倍体植物通常表现出表皮加厚、抗逆性增强等优势^[5]。在动物界,四倍体现象虽不如植物普遍,但在鱼类、两栖类和爬行类中也有诸多实例,如用兴国红鲤精子刺激彭泽鲫雌核发育的子代中检测到了极少数四倍体,经过产前培育进一步繁殖得到子代,经检测,其子代均为四倍体,异源彭泽鲫四倍体群体的生长速度显著快于彭泽鲫正常群体,且抗病、抗低氧等性

状明显提高^[6]。

1.1.2 哺乳动物的四倍体现象与研究 哺乳动物不同于植物和低等动物,在哺乳动物中多倍体自然发生的现象极少,因为在哺乳动物卵子受精过程中,由于多精入卵或极体释放受阻等情况的发生也可能形成多倍体,这种多倍体绝大部分在胚胎早期就死亡,而未曾引起人们的重视^[7]。自从人工诱发产生小鼠四倍体胚胎,就展开了对哺乳动物四倍体制作及多倍体胚胎发育能力的广泛研究。通过人工干预的手段,研究者可以突破这一限制,创造出四倍体胚胎^[8]。这种人工四倍体胚胎由于细胞形态和生理上的各种原因难以发育至足月,但为研究早期胚胎发育和细胞分化提供了宝贵模型^[9]。尽管如此,积极开展哺乳动物多倍体的基础研究,对制作多倍体动物是十分必要的。同时,这也是开创家畜四倍体育种新途径的新思路。

1.1.3 四倍化事件的进化意义及价值 从进化角度看,四倍化事件在哺乳动物进化史上也发挥过重要作用。比较基因组学研究显示,人类基因组中仍保留着远古全基因组加倍事件的痕迹,这些加倍事件对哺乳动物复杂性状的形成具有重大的意义^[10,11]。对四倍体胚胎规律的深入理解不仅有助于现代生物技术的发展,也在揭示生物进化的机制中发挥了重要的作用。

1.2 四倍体胚胎的发育特性

四倍体胚胎表现出与二倍体胚胎显著不同的发育特性。四倍体胚胎的细胞周期在早期发育过程中通常会延长,这主要源于DNA复制和损伤修复所需时间的增加。研究表明,小鼠四倍体胚胎的第一次卵裂时间比二倍体胚胎卵裂延长了约2 h^[12,13],这种延迟在猪和牛等家畜胚胎中也表现明显。

四倍体胚胎的另外一个重要的特性是它的发育能力具有局限性。在小鼠模型中,纯的四倍体胚胎最多能发育至中孕期而无法形成完整的胎儿^[14],但是在家畜中,四倍体胚胎通常在囊胚期前就出现发育阻滞^[15]。这种差异反映了不同物种对基因组

剂量变化的耐受性差异。值得注意的是,四倍体胚胎与二倍体胚胎形成的嵌合体可以正常发育至出生,这表明四倍体细胞在某些特定的发育环境中具有正常的生理功能^[16]。

从分子层面上看,四倍体胚胎表现出与二倍体胚胎差异较大的基因表达模式。全基因组转录组分析显示,四倍体胚胎中与细胞周期调控、DNA 损伤修复相关的基因表达显著上调,而与分化相关的基因表达受到抑制^[17, 18]。这种表达谱的变化可能是四倍体胚胎发育受限的重要原因。此外,四倍体胚胎的表观遗传修饰也发生显著改变,包括 DNA 甲基化模式的异常和组蛋白修饰的重编程^[14, 19]。

1.3 四倍体补偿技术的理论基础与实践原理

1.3.1 四倍体补偿技术的原理与技术手段 四倍体补偿技术是一种利用四倍体胚胎与二倍体胚胎或胚胎干细胞形成嵌合体的技术,在发育过程中通过两者的发育能力互相补偿:4n 细胞主要参与胚外组织(如卵黄囊膜、滋养层、胎盘等)的形成而几乎不参与胚体的形成,最终获得完全由胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)细胞发育而来的个体^[20]。这种补偿机制使得四倍体-二倍体嵌合胚胎能够正常发育,为四倍体技术的应用提供了重要的保障^[21]。从技术实现角度来看,四倍体补偿技术主要依赖两种方法:电融合法和化学诱导法。电融合法制作四倍体胚胎是目前最广泛的技术之一,其原理是通过高频交流电场使早期胚胎的两个卵裂球细胞膜形成可逆性电穿孔,随后施加直流脉冲促使细胞膜融合形成含有四倍体核型的单倍体胚胎^[22]。

这种方法不但比药物诱导四倍体方法更安全,而且效率也比其他方法更高^[14]。细胞松弛素 B 则是化学诱导中最常用的手段,其通过调节细胞骨架或膜蛋白的活性来促进融合,对胚胎的毒性较低,不易引起染色体结构异常,但需要严格控制处理时长^[13]。这两种方法各有优劣,电融合法效率相对较高但需要专门设备,而化学诱导法操作简便但可能影响胚胎后续发育^[23]。针对不同家畜物种,需要优化特定的诱导方案按照不同的方法制备。

1.3.2 四倍体补偿技术的理论基础 四倍体补偿技术在基因功能研究,细胞全能性验证,胚胎发育机理研究等方面广泛应用,其核心理论基础是早期胚胎细胞的发育全能性和可塑性,哺乳动物的四倍体胎儿往往不能够正常发育和表达所有组织的功能,在胎儿发育的早期就死亡了^[24],但是胚胎细胞仍保持高度的可塑性,能够适应基因组含量的变化。这一时期进行的人工干预,如细胞融合或细胞质交换,不会影响胚胎的正常发育。四倍体补偿技术的另一理论基础为四倍体胚胎的特性,可通过电融合等方法将两个二倍体受精卵融合,形成四倍体胚胎,基本流程如下(图 1):1)四倍体胚胎制备:取二倍体受精卵或 2 细胞期在电压 $100 \text{ V} \cdot \text{mm}^{-1}$ 、脉冲宽度 $50 \mu\text{s}$ 、脉冲次数 2 次的条件下融合率可达 95.27%;2)ES 细胞注射:在胚胎发育至 4~8 细胞期或囊胚期时,将 ES 细胞注射入胚胎,4~8 细胞期注射优于囊胚期注射,成功率更高;3)将注射后的胚胎移植入同期发情的代孕母体子宫内,发育至足月后获得嵌合体个体^[20]。

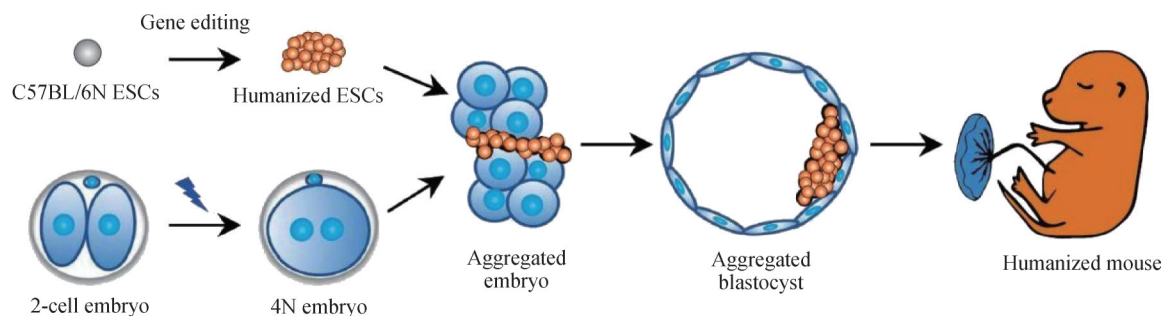


图 1 四倍体补偿技术流程图^[25]

Fig. 1 Tetraploidy compensation technology flow chart^[25]

2 家畜四倍体补偿技术的研究进展

2.1 猪四倍体补偿技术研究历程

2.1.1 技术奠基阶段 早期,受经济成本等因

素影响,猪等家畜难以依赖体内获取胚胎用于研究,促使卵母细胞体外成熟、胚胎体外生产和胚胎体外培养等技术体系逐渐发展,为猪四倍体技术研究奠定了基础^[26]。随着对猪早期胚胎发育研究的

深入,研究者发现 *Oct4* 基因在囊胚滋养层和内细胞团中广泛表达,为后续四倍体胚胎研究提供了理论支持^[27,28]。

2.1.2 初步探索阶段 猪四倍体技术的研究始于21世纪初,Sembon等^[2]在较早的研究中介绍了使用细胞松弛素B产生猪四倍体孤雌胚胎的方法。相对于小鼠,猪四倍体胚胎的囊胚率较低($<30\%$),且易发生发育阻滞^[29]。这一突破性的工作确立了电融合和细胞松弛素B处理的两种核心诱导途径,明确了猪四倍体胚胎的基本发育特征与鉴定方法,但是在诱导效率、核型稳定及发育潜能提升方面仍存在显著局限^[30],为后续研究奠定了理论与实践基础。

2.1.3 方法优化阶段 通过四倍体补偿技术,证实了小鼠iPS细胞能发育成为完整的小鼠个体。但是至今却还没有iPS四倍体嵌合猪产生,其主要原因是猪的生殖细胞、胚胎体外显微操作难度较大,妊娠维持有别于其他家畜,需具备一定量的胚胎数,所以猪四倍体胚胎的制备及其与iPS细胞的嵌合显得尤为重要^[31,32]。相关研究表明,猪四倍体孤雌胚胎可通过抑制第一极体和第二极体排出,或通过对抑制极体排出的二倍体孤雌胚胎进行电融合来制备。研究对比了不同方法制备的四倍体胚胎的发育情况,发现抑制两极体排出的方法在胚胎细胞数量等方面更具优势。这使得猪四倍体胚胎的制备方法更加多样化,且在技术优化上有了新进展^[1]。

2.2 牛四倍体补偿技术研究历程

2.2.1 早期胚胎分离尝试 早期研究通过胚胎分割技术来获取牛四倍体相关成果,胚胎质量、分割液成分、分割方法与胚胎发育时期等都会影响分割成功率和胚胎后续发育^[33]。1995年,Johnson等^[34]报道通过分离体外培养的四细胞胚胎的卵裂球,成功生产出了四头相同的荷斯坦公牛犊,证实了通过胚胎分裂技术可产生基因相同的克隆牛,为牛四倍体早期胚胎分离奠定了基础。

2.2.2 制备条件优化与效率提升 研究发现,牛体外受精卵在mCR1aa培养液中培养14 h时进行四倍体制备效果最佳,同时,确定了 $100\text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$ 、 $20\text{ }\mu\text{s}$ 、1次脉冲的电融合参数可提高胚胎相关指标^[20]。后续研究还发现,电融合后用 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙胺处理胚胎6 h,虽融合率等略低于对照组,但四倍体制备率可显著提高,从 26.9% 提升至

59.4% ^[20,35]。这些研究成果为牛四倍体胚胎的高效制备提供了关键技术参数与优化路径,具有重要的实践意义和科学价值。

2.2.3 四倍体补偿技术应用探索 近年来,四倍体胚胎补偿技术成为研究热点,该技术将四倍体胚胎与二倍体的胚胎干细胞聚合成新胚胎,四倍体细胞只参与胚外组织形成,胚体则来源于二倍体胚胎干细胞,可用于提高牛体细胞克隆效率,以解决体细胞克隆中胎盘肥大和表观遗传缺陷等一些列问题,为提高牛体细胞克隆成功率提供了一条新途径^[36]。

2.3 羊四倍体技术研究历程

2.3.1 技术起步阶段 早期研究多借鉴小鼠、牛等物种的四倍体胚胎制备经验,尝试将电融合技术应用于羊胚胎。这一阶段的核心是验证电脉冲刺激对羊2细胞胚胎融合的可行性,探索不同脉冲参数(如电压、时长)对融合率的影响,为后续技术发展奠定了基础^[37,38]。

2.3.2 制备方法优化阶段 这一阶段主要聚焦于提高羊四倍体胚胎的制备效率和发育潜能。通过细化电融合参数和梳理胚胎体外生产技术背景提升制备的效率。研究确定电场强度 $1.2\text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ 、脉冲时程 $40\text{ }\mu\text{s}$ 为山羊2-细胞胚胎电融合的适宜参数,为四倍体胚胎制备提供参考^[39];同时,绵羊体外胚胎生产技术的整体进展,也为理解该技术的发展脉络和优化方向提供了背景支持,推动了技术的完善^[40]。

2.3.3 应用探索阶段 近年来,羊四倍体技术逐渐应用于异种克隆等领域,以解决种间核质重构胚胎附植前后发育潜能低的问题。研究发现,山羊四倍体胚胎可用于塔尔羊异种重构胚胎的胚外组织代偿,将塔尔羊异种重构胚与山羊四倍体胚胎聚合后移植到奶山羊受体子宫内,受体子宫会出现妊娠反应,虽胚胎在着床后发育早期退化,但为濒危动物保护等研究提供了新思路。

3 家畜四倍体补偿技术应用现状

3.1 家畜与小鼠模型的比较分析

3.1.1 发育效率分析 家畜四倍体技术与小鼠模型存在显著差异,这些差异直接影响技术的应用效果。小鼠四倍体胚胎的囊胚形成率可达 80% 以上,而家畜四倍体胚胎的囊胚率普遍低于 30% ^[29]。这种差异主要源于两个因素:一是家畜胚胎基因组

激活时间较早(猪胚胎在4细胞期即开始母源-合子转换),对染色体异常更为敏感;二是家畜胚胎代谢需求更高,体外培养条件难以完全模拟体内的环境^[41]。

3.1.2 嵌合效率分析 小鼠四倍体嵌合体的形成率可达到30%~50%,且四倍体细胞主要用于胚外组织的生成;但是家畜四倍体嵌合体的形成率却很低,通常不足15%,并且嵌合模式也不太稳定。然而这种明显的差异反映了不同物种对细胞竞争和选择的调控机制不同。相关研究表明,家畜胚胎中四倍体细胞在增殖过程中很容易被二倍体细胞淘汰,这可能是导致嵌合效率低的一个主要原因^[42]。

3.1.3 胎盘发育分析 小鼠通常通过电融合2细胞期胚胎构建四倍体胚胎,其胎盘缺陷主要表现为过度增生,但是小鼠四倍体胚胎可与ES细胞形成嵌合体,仍能够支撑妊娠完成,只是整体存活率较低^[43]。而家畜(如牛)的四倍体补偿技术中,胎盘发育缺陷更多体现为发育不全。以体细胞核移植(SCNT)构建的四倍体胚胎为例,牛的四倍体胎盘常出现绒毛膜-尿囊膜发育不良,绒毛血管化程度不足,妊娠中期还可能出现胎盘巨型细胞异常增多,引发“大胎盘综合征”,显著增加妊娠失败风险^[36,44,45]。这种差异表明,四倍体补偿技术对胎盘发育的影响具有物种特异性,其核心源于不同物种胎盘形成的进化分歧,这也为优化家畜克隆技术中胎盘发育相关问题提供了重要方向。

3.2 当前面临的主要技术瓶颈

3.2.1 家畜生殖生理特殊性问题 家畜(如牛、羊等)独特的生殖生理特性,从胎盘结构,发情周期到免疫识别对四倍体补偿技术的转化形成多重阻碍^[46]。牛、羊的子叶型胎盘依赖胎儿绒毛膜与母体子宫阜精准嵌合完成妊娠建立,四倍体胚胎发育容易干扰此过程,引发胎盘发育缺陷(如牛四倍体胎盘绒毛膜-尿囊膜发育不良、绵羊滋养层基底膜异常等),导致母胎物质交换受阻^[47]。家畜的发情周期也加剧了转化难度。牛平均21 d的发情周期,存在卵泡波交替、黄体形成的复杂生理节律,四倍体胚胎体外发育的“时间线”很难与受体子宫的“接受性窗口”精准同步^[48]。此外,免疫识别机制构成隐性阻碍。反刍动物胎盘虽为上皮绒毛膜型,母体胎儿屏障相对完整,但四倍体滋养层细胞表面抗原异常表达,仍可能激活母体免疫反应^[49]。

3.2.2 体外培养体系不完善问题 家畜四倍体胚胎体外培养体系无法完全模拟体内胚胎发育微环境。一方面,营养成分配置难以精准复刻母体生殖道;另一方面,物理环境(温度、渗透压、气体浓度等)控制存在偏差,且缺乏对胚胎代谢废物及时清除的高效机制,导致制备效率和存活率较低^[50-52]。比如通过电融合等方法制备家畜四倍体胚胎时电融合的效率很难达到100%,而且胚胎发育能力也比较弱,容易在发育早期出现停滞或死亡等情况^[53]。相关研究对此进行了报道,指出猪四倍体孤雌胚胎虽可通过多种方法制备,但总体发育效果都不太理想,而且到目前为止也没有猪胚胎干细胞或诱导多能干细胞与四倍体胚胎构建嵌合体的成功报道^[1]。

3.2.3 染色体不稳定问题 染色体不稳定是家畜四倍体面临的主要问题之一,这可能是导致胚胎发育异常或后代出现各种问题的关键所在。比如在牡蛎四倍体中,染色体不稳定比较明显,形成的嵌合型四倍体后代染色体更不稳定,这对于家畜四倍体育种来说也是一个潜在的困难^[54]。

3.2.4 外源基因导入与表达难题 利用基因组编辑技术将外源基因准确导入家畜基因组中并使其稳定表达,这样的难度相对较大。相关研究表明传统的原核注射法会使得外源基因随机整合,这样会影响基因表达水平的预测和功能的发挥,即使CRISPR/Cas9等技术已经有所改进,但在家畜四倍体中的应用仍然存在着很多无法解决的问题,这限制了基因编辑培育优良四倍体家畜品种或制备特定功能家畜的进程和发展^[55]。

3.2.5 伦理与成本问题 家畜四倍体技术涉及较大动物个体,而且与人类关系更为亲近,所以伦理审查也更为严格,如利用家畜制备异种器官移植供体时,面临更多伦理考量。而且家畜饲养成本高、繁殖周期长,使得相关研究和试验的成本大幅度地增加,这也就增加了研究过程的难度,使得家畜四倍体难以像小鼠模型那样进行大规模的试验研究。

3.3 现有解决方案与效果评估

针对家畜四倍体技术面临的艰难险阻,可通过多方面的手段进行优化:首先可以通过探索更适合家畜的胚胎融合参数和培养环境来提高猪等家畜四倍体胚胎的质量与解决发育能力问题^[2];对于染色体稳定性的改善,则可以借鉴牡蛎四倍体选育的

总结经验,通过多代选育获得染色体稳定的个体,以此来培养优良的品系^[56];关于基因表达方面,可以通过结合家畜基因组序列的特点优化CRISPR/Cas9等技术,设计出特异性的引物,并且选择合适的敲除靶点,这样可以提高基因编辑的准确性^[57];同时也要遵循伦理规范,利用干细胞等技术减少伦理争议并且降低育种成本。

3.4 应用前景与潜在价值

尽管存在技术瓶颈,但家畜四倍体技术在农业育种、生物医药研究和异种器官移植等领域仍具有广阔的应用前景。例如,在农业育种领域,通过四倍体胚胎与体细胞核移植结合,可以实现优质种畜的快速扩繁^[58];在生物医学领域,猪四倍体嵌合体技术发挥着重要的作用,可以为人类建构疾病模型和提供药物筛选平台,而且将人源干细胞与猪四倍体胚胎进行结合,有望建立更接近人类的疾病模型,为人类解决更多疾病相关的重大难题^[59]。在异种器官移植方面,四倍体技术可能会解决器官短缺问题,当然,目前已有研究团队尝试了用四倍体胚胎培育“人源化”猪器官^[60]。从基础研究方面,家畜四倍体技术在研究早期胚胎发育、细胞命运决定和基因组稳定性等方面建立了独特的模型,特别是家畜与小鼠四倍体胚胎的差异,为比较发育生物学研究方面提供了宝贵素材^[58]。

4 结论与展望

家畜四倍体体外胚胎技术经过20年发展,已从实验室研究迈向实际应用。该技术通过多学科交叉创新,在种质改良和生物医学领域展现出独特优势。尽管存在胚胎发育效率低、稳定性差等技术瓶颈,但通过基因编辑等新技术的融合应用,这些问题正在逐步解决。未来5~10年,该技术有望在3个方向取得突破:1)建立标准化生产体系,实现种畜快速繁殖;2)构建人类疾病大动物模型;3)完善伦理规范,推动临床应用。然而,仍需解决四倍体发育机制不清、规模化生产稳定性不足等关键问题。后续研究重点聚焦:1)发育调控机制解析;2)培养体系优化;3)安全评估标准建立。通过产学研协同创新,该技术将为生物育种和促进医学发展提供新的技术支撑。

参考文献(References):

[1] LIN T, LEE J E, SHIN H Y, et al. Production and

development of porcine tetraploid parthenogenetic embryos [J]. *J Anim Sci Technol*, 2019, 61(4): 225-233.

[2] SEMBON S, FUCHIMOTO D, IWAMOTO M, et al. A simple method for producing tetraploid porcine parthenogenetic embryos[J]. *Theriogenology*, 2011, 76(4): 598-606.

[3] SOTO D A, ROSS P J. Pluripotent stem cells and livestock genetic engineering [J]. *Transgenic Res*, 2016, 25(3): 289-306.

[4] YANG L, DI A Q, SONG L S, et al. Generation of modified cows and sheep from spermatid-like haploid embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2025. doi:10.1038/S41587-025-02832-4.

[5] 谈 静, 郭俊杰, 曾 杰. 多倍体植物复杂性状全基因组关联分析研究进展[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(4): 1282-1289.

TAN J, GUO J J, ZENG J. Advance in genome-wide association analysis of complex traits for poly-ploid plants[J]. *Molecular Biology Breeding*, 2020, 18(4): 1282-1289. (in Chinese)

[6] 袁嘉欣, 李梦露, 邓宏奎, 等. 异源四倍体彭泽鲫鱼种池塘培育技术[J]. *江西水产科技*, 2024, (6): 42-44.

YUAN J X, LI M L, DENG H K, et al. Heterologous tetraploid pengze crucian carp pond breeding technology [J]. *Jiangxi Aquatic Science and Technology*, 2024, (6): 42-44. (in Chinese)

[7] 石庐挺, 江博文, 刘国世, 等. 哺乳动物精卵识别及阻止多精入卵机制的研究进展[J]. *黑龙江动物繁殖*, 2024, 32(1): 28-35+43.

SHI L T, JIANG B W, LIU G S, et al. Research progress on sperm recognition and the mechanism that prevents multiple sperm from entering the egg in mammals [J]. *Animal Breeding in Heilongjiang Province*, 2024, 32(1): 28-35+43. (in Chinese)

[8] LEE J, CAI L, KIM M, et al. Tetraploid embryo aggregation produces high-quality blastocysts with an increased trophoctoderm in pigs [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1239448.

[9] 韩燕清, 朱裕鼎. 哺乳动物四倍体胚胎制作方法及发育能力的研究[J]. *国外畜牧科技*, 1992, (6): 16-20.

HAN Y Q, ZHU Y D. Study on the method of producing tetraploid embryos in mammals and their developmental capacity [J]. *Foreign Animal Husbandry Technology*, 1992, (6): 16-20. (in Chinese)

[10] BACQUET C, IMAMURA T, GONZALEZ C A, et al. Epigenetic processes in a tetraploid mammal [J]. *Mamm Genome*, 2008, 19(6): 439-447.

- [11] DEHAL P, BOORE J L. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(10):e314.
- [12] IMAI H, KANO K, FUJII W, et al. Tetraploid embryonic stem cells maintain pluripotency and differentiation potency into three germ layers [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0130585.
- [13] KOIZUMI N, FUKUTA K. Preimplantation development of tetraploid mouse embryo produced by cytochalasin B [J]. *Exp Anim*, 1995, 44(2):105-109.
- [14] 严云勤, 杨悦, 叶枫, 等. 小鼠四倍体胚胎凋亡检测及嵌合胚胎制作 [J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(9):101-104+161.
- YAN Y Q, YANG Y, YE F, et al. Apoptosis detection of tetraploid embryos and production on chimeric embryos [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2013, 44(9):101-104+161. (in Chinese)
- [15] BARBATO V, TALEVI R, GUALTIERI R, et al. Polystyrene nanoparticles may affect cell mitosis and compromise early embryo development in mammals [J]. *Theriogenology*, 2020, 145:18-23.
- [16] WEN B Q, LI R Q, CHENG K R, et al. Tetraploid embryonic stem cells can contribute to the development of chimeric fetuses and chimeric extraembryonic tissues [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):3030.
- [17] KAWAGUCHI J, KANO K, NAITO K. Expression profiling of tetraploid mouse embryos in the developmental stages using a cDNA microarray analysis [J]. *J Reprod Dev*, 2009, 55(6):670-675.
- [18] PARK M R, HWANG K C, BUI H T, et al. Altered gene expression profiles in mouse tetraploid blastocysts [J]. *J Reprod Dev*, 2012, 58(3):344-352.
- [19] YUN X X, FENG S T, PAN D K, et al. DNA methylation patterns of mouse tetraploid embryos [J]. *Yi Chuan*, 2009, 31(4):387-392.
- [20] 吕鑫, 杜卫华, 朱化彬, 等. 牛四倍体胚胎的制备 [J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(6):1-5+12.
- LV X, DU W H, ZHU H B, et al. Production of bovine tetraploid embryos [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2013, 48(6):1-5+12. (in Chinese)
- [21] 员新旭. 四倍体补偿法克隆 EG 小鼠技术及相关机制的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- YUAN X X. Study on the technology and mechanism producing mice derived from embryonic germ cells aggregated with tetraploid embryos [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009. (in Chinese)
- [22] 文端成, 毕春明, 朱子玉, 等. 卵裂球电脉冲融合制作昆明小鼠四倍体胚胎 [J]. 动物学研究, 2003, (2): 81-85.
- WEN R C, BI C M, ZHU Z Y, et al. Forming tetraploid embryos with electric fusing blastomeres of kunming mouse embryos [J]. *Zoological Research*, 2003, (2):81-85. (in Chinese)
- [23] 李相运, 周荣艳. 利用四倍体胚胎补偿法制备 ES 小鼠的技术方法 [J]. 解剖学报, 2006(6):724-727.
- LI X Y, ZHOU R Y. Technique of producing mice derived from embryonic stem cells by tetraploid embryo complementation [J]. *Anatomical Journal*, 2006(6): 724-727. (in Chinese)
- [24] 吕鑫, 杜卫华, 郝海生, 等. 牛四倍体胚胎制备初探 [C]//中国畜牧兽医学动物繁殖学分会. 中国畜牧兽医学动物繁殖学分会第十六届学术研讨会论文集, 2012:50.
- LV X, DU W H, HAO H S, et al. Preliminary exploration of the preparation of tetraploid bovine embryos [C]//Chinese Society of Animal Science and Veterinary Medicine, Animal Reproduction Branch, 2012:50. (in Chinese)
- [25] VELYCHKO S, ADACHI K, KIM K P, et al. Excluding Oct4 from Yamanaka cocktail unleashes the developmental potential of iPSCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 25(6):737-753. e4.
- [26] 郭诗萌, 刘世超, 刘忠华. 猪胚胎发育与胚胎工程研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(9):1-3.
- GUO S M, LIU S C, LIU Z H. Progress in pig embryo development and embryo engineering research [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry*, 2017, 53(9):1-3. (in Chinese)
- [27] ABEYDEERA L R, WANG W H, PRATHER R S, et al. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 1998, 58(5): 1316-1320.
- [28] LEE M, OH J N, CHOE G C, et al. Changes in OCT4 expression play a crucial role in the lineage specification and proliferation of preimplantation porcine blastocysts [J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(11):e13313.
- [29] HE W T, KONG Q R, SHI Y Q, et al. Generation and developmental characteristics of porcine tetraploid embryos and tetraploid/diploid chimeric embryos [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2013, 11(5): 327-333.

- [30] PROCHAZKA R, VODICKA P, ZUDOVA D, et al. Development of *in vivo* derived diploid and tetraploid pig embryos in a modified medium NCSU 37 [J]. *Theriogenology*, 2004, 62(1-2):155-164.
- [31] FUJIMORI K, YAMANAKA S, SHIMADA K, et al. Generation of human-pig chimeric renal organoids using iPSC technology[J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 1278.
- [32] ZHOU C, CAI X, FU Y, et al. Tetraploid complementation proves pluripotency of induced pluripotent stem cells derived from adipose tissue[J]. *Cell Prolif*, 2015, 48(1):39-46.
- [33] 安德科, 谢荣清. 牛胚胎分割技术的研究进展[J]. 草业与畜牧, 2015, (2):5-7+54.
AN D K, XIE R Q. Research progress in bovine embryo segmentation technology [J]. *Grassland and Livestock*, 2015, (2):5-7+54. (in Chinese)
- [34] JOHNSON W H, LOSKUTOFF N M, PLANTE Y, et al. Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an *in vitro* derived four-cell embryo[J]. *Vet Rec*, 1995, 137(1):15-16.
- [35] 王二旦, LEE Kyeong-lim, 柴梦龙, 等. 秋水仙胺对电融合方法体外制备牛四倍体胚胎的影响[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(7):1196-1200.
WANG E D, LEE Kyeong-lim, CHAI M L, et al. Effect of demecolcline treatment on producing bovine tetraploid embryos *in vitro* by electrofusion [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(7): 1196-1200. (in Chinese)
- [36] 吕鑫. 四倍体补偿法提高牛体细胞克隆效率的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
LV X. Improvement of bovine SNCT efficiency with tetraploid complementation [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [37] WILLADSEN S M. Nuclear transplantation in sheep embryos[J]. *Nature*, 1986, 320(6057):63-65.
- [38] 张涌, 刘灵, 郝志明. 山羊胚细胞电融合试验[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 1992, (S1):100-103.
ZHANG Y, LIU L, HAO Z M. Goat embryo cell electrofusion experiment [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 1992, (S1):100-103. (in Chinese)
- [39] 刘海军, 史卫兵. 山羊 2-细胞胚胎的电融合试验[J]. 天津农业科学, 2004, (2):4-6.
LIU H J, SHI W B. Electrofusion of caprine 2-cell embryonic cells [J]. *Tianjin Agricultural Science*, 2004, (2):4-6. (in Chinese)
- [40] ZHU J, MOAWAD A R, WANG C Y, et al. Advances in *in vitro* production of sheep embryos[J]. *Int J Vet Sci Med*, 2018, 6(Suppl):S15-S26.
- [41] 吴兴龙, 张鹏, 赵虎, 等. 四倍体胚胎发育阶段对胚胎干细胞嵌合体小鼠制备的影响[J]. 解剖学报, 2011, 42(5):690-694.
WU X L, ZHANG P, ZHAO H, et al. Effects of developmental stages of tetraploid embryos on mouse chimeras from embryonic stem cells [J]. *Anatomical Journal*, 2011, 42(5):690-694. (in Chinese)
- [42] EAKIN G S, HADJANTONAKIS A K, PAPAIOANNOU V E, et al. Developmental potential and behavior of tetraploid cells in the mouse embryo [J]. *Dev Biol*, 2005, 288(1):150-159.
- [43] 周汝江, 陈建泉, 成国祥, 等. 2N-4N嵌合体小鼠及其在基因功能研究上的应用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, (1):19-25.
ZHOU R J, CHEN J Q, CHENG G X, et al. 2N-4N chimeric mice and their application in gene function research [J]. *Journal of Cell Biology*, 2004, (1): 19-25. (in Chinese)
- [44] PALMIEERI C, LOI P, PTAK G, et al. Review paper: a review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep, and mice [J]. *Vet Pathol*, 2008, 45(6): 865-880.
- [45] 吕鑫, 杜卫华, 朱化彬. 体细胞克隆发展现状、出现问题及解决方法[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(4):136-142.
LV X, DU W H, ZHU H B. Current status, issues, and solutions in somatic cell cloning [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 33(4):136-142. (in Chinese)
- [46] FALCHI L, LEDDA S, ZEDDA M T. Embryo biotechnologies in sheep: achievements and new improvements [J]. *Reprod Domest Anim*, 2022, 57 (Suppl 5): 22-33.
- [47] JOHNSON G A, BAZER F W, SEO H, et al. Understanding placentation in ruminants: a review focusing on cows and sheep [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2023, 36(2):93-111.
- [48] 阿地力·阿不来提. 杂交水牛卵泡发育规律与排卵调控技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
ADILI ABULAITI. Study on follicle development and ovulation control technology in crossbreed buffalo [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019. (in Chinese)

- [49] DAVIES C J, HILL J R, EDWARDS J L, et al. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta[J]. *Anim Reprod Sci*, 2004, (82-83):267-280.
- [50] AMARAL C S, KOCH J, CORREA JUNIOR E E, et al. Heat stress on oocyte or zygote compromises embryo development, impairs interferon tau production and increases reactive oxygen species and oxidative stress in bovine embryos produced *in vitro* [J]. *Mol Reprod Dev*, 2020, 87(8):899-909.
- [51] 刘自营, 郑 卓, 高汉婷, 等. 牛体外胚胎生产技术研究进展[J]. 中国畜禽种业, 2023, 19(7):170-175.
LIU Z Y, ZHENG Z, GAO H T, et al. Research progress in bovine *in vitro* embryo production technology [J]. *China's Livestock and Poultry Breeding Industry*, 2023, 19(7):170-175. (in Chinese)
- [52] GUALTIERI R, DE GREGORIO V, CANDELA A, et al. *In vitro* culture of mammalian embryos: Is there room for improvement?[J]. *Cells*, 2024, 13(12):996.
- [53] 王二旦. 利用电融合方法体外制备牛四倍体胚胎的研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2014.
WANG E D. Study on the *in vitro* preparation of bovine tetraploid embryos using the electrofusion method[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [54] DE SOUSA J T, ALLEN S K JR, WOLFE B M, et al. Mitotic instability in triploid and tetraploid one-year-old eastern oyster, *crassostrea virginica*, assessed by cytogenetic and flow cytometry techniques [J]. *Genome*, 2018, 61(2):79-89.
- [55] HAY A N, FARRELL K, LEETH C M, et al. Use of genome editing techniques to produce transgenic farm animals[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2022, 1354:279-297.
- [56] 秦艳平, 万韦韬, 岳 超, 等. 牡蛎多倍体育种技术研究及其产业化应用进展[C]//中国动物学会贝类学分会, 中国海洋湖沼学会贝类学分会. 中国动物学会, 2024:69.
- QIN Y P, WAN W T, YUE C, et al. Research on oyster polyploid breeding technology and its industrial application progress [C]// Chinese Society of Zoology, Molluscology Branch; Chinese Society of Oceanography and Limnology, Molluscology Branch, 2024: 69. (in Chinese)
- [57] 张晨俭, 李隐侠, 丁 强, 等. CRISPR/Cas9 技术高效制备山羊 SOCS2 基因编辑胚胎[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(1):129-141.
ZHANG C J, LI Y X, DING Q, et al. Efficient preparation of goat SOCS2 gene-edited embryos using CRISPR/Cas9 technology [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2024, 55 (1) : 129-141. (in Chinese)
- [58] KONG Q R, LIU Z H. Electrofusion of 2-cell embryos for porcine tetraploid embryo production [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1874:361-371.
- [59] YAN S, TU Z C, LIU Z M, et al. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in huntington's disease [J]. *Cell*, 2018, 173(4):989-1002. e13.
- [60] 冯万有, 蔡志明, 牟丽莎. CRISPR/Cas9 系统联合人多能干细胞制备嵌合体猪培育人源化器官的研究进展[J]. 深圳中西医结合杂志, 2015, 25(8):191-194+199
FENG W Y, CAI Z M, MOU L S. Research progress on the preparation of chimeric pigs using the CRISPR/Cas9 system in combination with human pluripotent stem cells for the cultivation of humanised Organs[J]. *Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2015, 25(8):191-194+199 (in Chinese)

(编辑 郭云雁)