

金鱼胚胎发育时期的扫描电镜观察*

王春元 李延龄

(中国科学院遗传研究所)

提要 本研究以虎头金鱼的胚胎为材料,依常规制样,进行扫描电镜观察。结果发现,金鱼胚胎在16细胞期时开始出现不均等的卵裂。胚胎发育到心跳期时,金鱼的双尾鳍开始分化。胸鳍芽是在循环期后才出现的。在孵化期时,口已开,位于腹面。下颌形成期,口转向端位。

主题词 虎头金鱼、胚胎发育、扫描电子显微镜

生物的发育是建立在遗传的基础上,是遗传信息付诸实现的过程。而胚胎发育是动物发育的一个极其重要的阶段。在时间上,胚胎发育一般是其整个发生中最短的阶段,但在形态、生理、生化的变化上却是很大的。因此,发生遗传学对动物胚胎学的研究给予极大的重视。

Battle(1940)、Tung(童第周)等(1944)、李璞和王春元等(1959)曾在光学显微镜的水平上对金鱼的胚胎发育作过研究。近年来,由于扫描电镜技术的不断发展,用扫描电镜观察生物样品表面的形态结构,使得一般平面图象分辨不清的细微结构呈现出清晰的三维图象,这是光学显微镜和透射式电子显微镜由于景深的限制所不能做到的。为此,我们又对金鱼胚胎发育各个不同时期进行了扫描电镜观察,其目的在于检验我们过去的工作,并作出修改和补充,为金鱼发生遗传学研究提供有意义的资料。

材 料 和 方 法

本研究以红虎头金鱼为材料,采用人工授精法获得受精卵(李璞等1959)。将受精卵置于20×3厘米的培养皿中,并放入若干片2.5×2.5厘米的小玻片。未受精卵则用固定液立即固定。而受精后各个发育时期的胚胎,为了避免卵膜的皱褶而影响观察效果,故均去膜后才进行固定,唯孵化期是自然孵化出膜后固定的。

卵子去膜的方法:用无钙、镁离子的D-Hanks液配制0.125%胰蛋白酶溶液,pH7.0,贮存于4°C冰箱中备用。每升D-Hanks液的成分为:NaCl,8克、KCl,0.4克、Na₂HPO₄·H₂O,0.06克、KH₂PO₄,0.06克、NaHCO₃,0.35克、酚红,0.02克。在固定前将附着卵子的小玻片置于胰蛋白酶(恢复到室温)中处理4—6分钟,然后用清水洗换

*金瑞霖、王长城同志参加部分工作;并得到本所电镜室孙奎和张成等同志协助扫描电镜技术操作,特此一并致谢。

本文于1984年4月在南京召开的“中国动物学会成立五十周年年会暨第十一届会员代表大会”的分组会上宣读过的。

2—3次,经胰酶处理过的卵子,卵膜则逐渐变薄而破裂。稍为摇晃平皿,卵子随着水流的波动便破膜而出。将去掉卵膜的不同发育时期的卵子,用2.5% pH7.4磷酸缓冲戊二醛溶液于4°C中固定10—15小时,然后用磷酸缓冲液清洗,经各级丙酮脱水,再用乙酸正戊酯替代后,将上述标本置于二氧化碳临界点干燥仪中干燥,取出贴在样品台上,并在真空涂膜仪内喷金,最后以H-300型扫描电镜观察。

观察结果

金鱼胚胎发育是在室温的条件下(水温为23—26°C)进行的。历经3天(约72小时左右)就可以自然孵化出膜。关于金鱼胚胎发育的历程和分期,李璞和王春元等(1959)已作为较为详细的描述,在这里仅就扫描电镜观察所见,分几个发育阶段叙述如下。

(一)、胚盘形成阶段

胚盘形成期 初排出的未受精卵,卵质充满卵黄颗粒,不透明,卵膜紧贴卵黄。卵遇水后就产生很强的粘性。并吸水膨胀,卵膜与卵质分离而形成卵周隙。在动物极上方,有一卵孔(也称卵门)明显可见,由卵膜内陷而形成,如同漏斗状(图版I,1)。卵子遇水之后几分钟,细胞质开始流动,流向动物极集中逐渐隆起而形成胚盘,形似单个细胞,称为1细胞期。此时,卵子呈透明状。受精卵与未受精卵从卵子排出至胚盘形成基本上是相同的,在外形上不易区分。因此,卵周隙和胚盘的形成不能单纯地被看作是受精的反应。但未受精卵以后不进行分裂,只是在胚盘上出现不规则的突起,几小时后便解体夭亡。

(二) 卵裂阶段

受精卵的胚盘形成之后不久,出现了第一次卵裂,卵裂过程的开始,先是在胚胎的中央出现一个小的凹陷部分,然后逐渐扩展形成沟状。细胞沿经线分裂,形成了大小相等的2个细胞,是为2细胞期(图版I,2、3)。随着发生第二次经线分裂,且分裂面与第一次者垂直,分成大小相等的4个细胞,是为4细胞期(图版I,4、5)。第三次分裂有两个经线分裂面,是与第一次分裂面平行,形成8个大小相等的细胞,排成两行,是为8细胞期(图版I,6)。第四次分裂也是两个经线分裂面,是与第二次分裂面相平行,但不是均等的分裂,而是分裂为16个大小不等的细胞,排成4行,是为16细胞期(图版I,7、8)。第五次分裂的方式也不同,周围的细胞仍沿着经线分裂,而中央部分的细胞则进行水平分裂,分裂结束所形成的32个细胞中,中央部分者较大,且形成两层,而周围部分者较小(图版I,9)。第六次分裂是周围的细胞进行水平分裂,中央部分的细胞沿经线分裂,结果形成了64个细胞,排列2层。随着分裂的继续发生,其分裂球越分越细,即进入囊胚阶段。

(三) 囊胚阶段

1. 高囊胚早期 随着细胞不断地继续分裂,囊胚层上的细胞数目增多而体积变小,排列成3—5层,细胞的大小也有差别(图版II,10)。

2. 高囊胚晚期 囊胚层上的细胞数目更多,而体积更小,排列成多层,在卵黄上方出

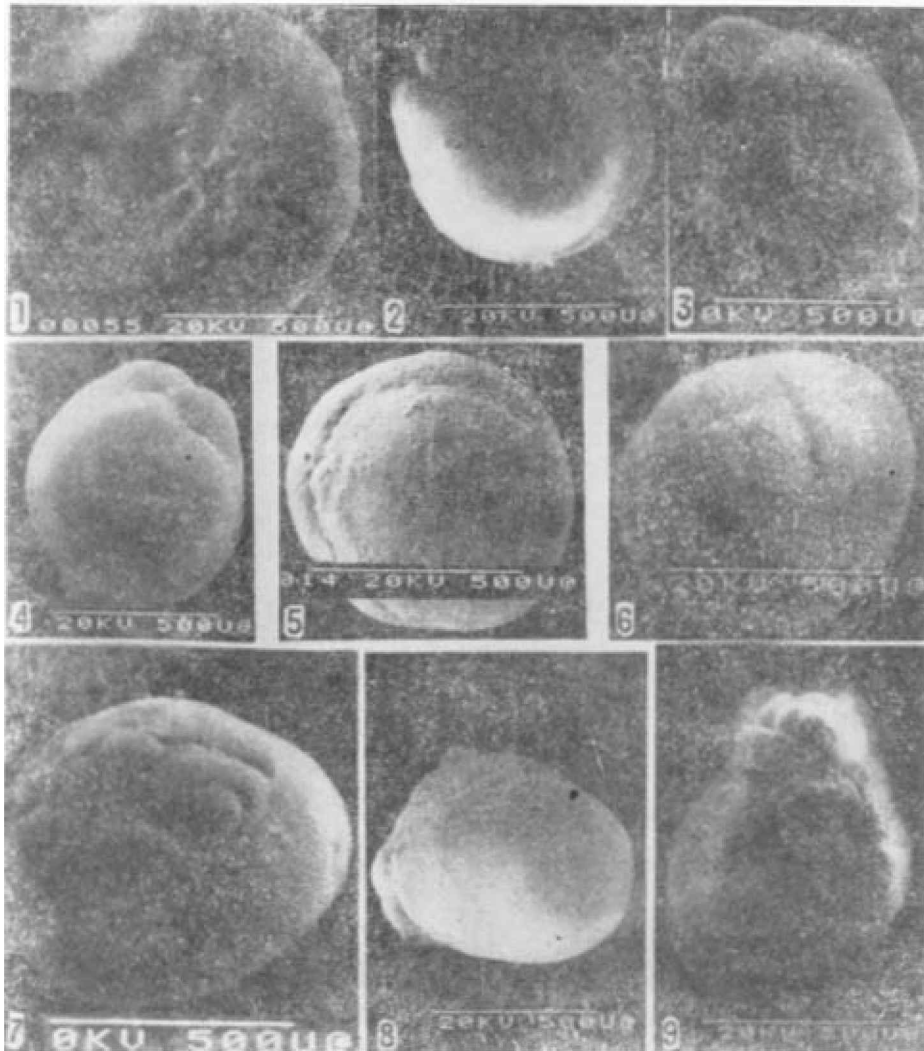


图1

1. 未受精卵, 示金鱼的卵孔。2. 2细胞期(侧面观)。3. 2细胞期(近正面观)。4. 4细胞期(侧面观)。5. 4细胞期(正面观)。6. 8细胞期(近正面观)。7. 16细胞期(正面观)。8. 16细胞期(侧面观)。9. 32细胞期(侧面观)

1. unfertilized egg, showing micropyle of the goldfish 2. 2 cells stage (side view) 3. 2 cells stage (nearly front view) 4. 4 cells stage (side view) 5. 4 cells stage (front view) 6. 8 cells stage (nearly front view) 7. 16 cells stage (front view) 8. 16 cells stage (side view) 9. 32 cells stage (side view)

现细胞堆叠得很高而形成的一个半圆形隆起的囊胚相。

3. 平囊胚期 囊胚层上的细胞平展于卵黄上方, 开始向卵黄区扩展下包, 细胞体积更小(图版 II, 11)。

(四) 原肠胚阶段

囊胚层细胞向下包、内卷、集中、伸展等方式形成内、中、外三层。

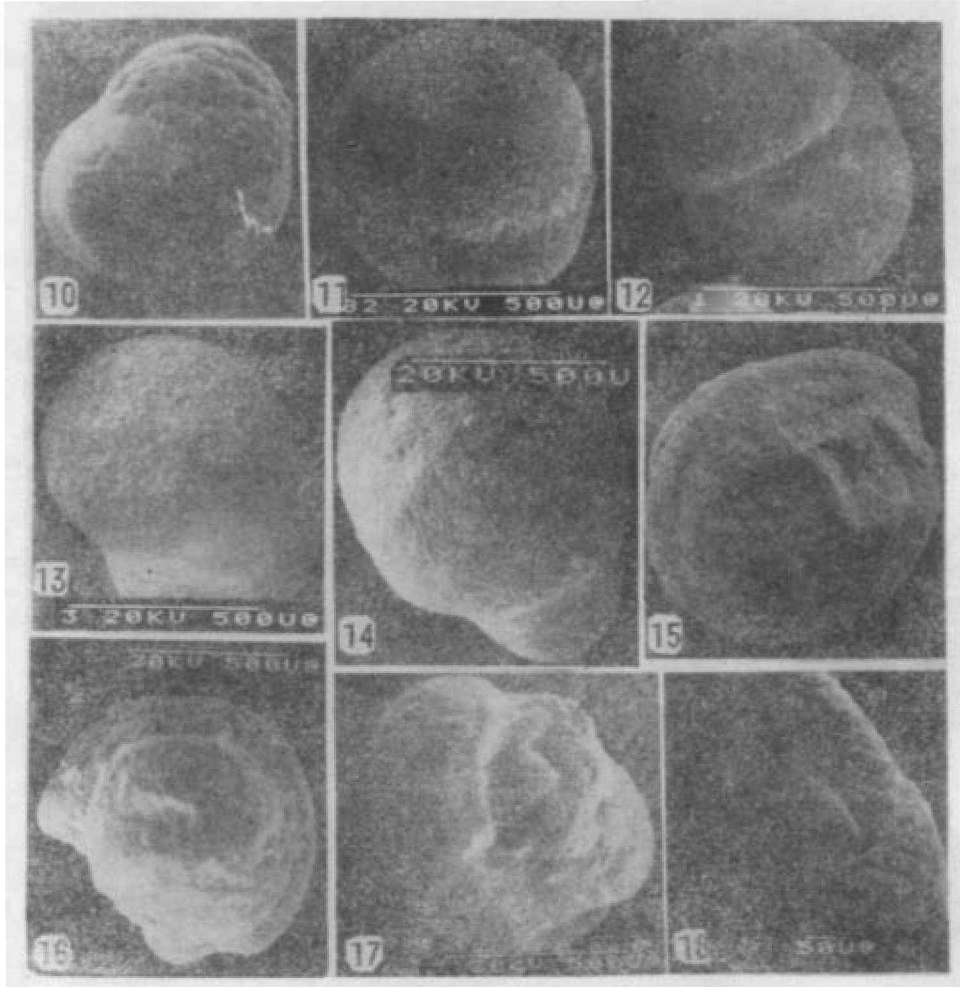


图2

10. 高囊胚早期; 11. 平囊胚期; 12. 原肠胚早期; 13. 原肠胚中期; 14. 原肠胚晚期; 15. 胚孔封闭期; 16. 晶状体形成期; 17. 心跳期、示头部匍伏于卵黄囊的表面。
18. 心跳期, 示尾部腹面有一分叉状的浅凹沟

10. early stage of high blastula; 11. flat blastula stage; 12. early stage of gastrula; 13. middle stage of gastrula; 14. late stage of gastrula; 15. closed blastopore stage; 16. lens formed stage; 17. heart beaten stage, showing the head on the surface of yolk sac; 18. heart beaten stage, showing a branch-like shallow ditch on the ventral side of empennage.

1. 原肠胚早期 平囊胚以后, 囊胚层细胞继续扩展, 向下包围植物极。囊胚层的细胞分裂加速而堆集加厚, 细胞体积变小, 但细胞轮廓仍可见(图版 II, 12)。

2. 原肠胚中期 囊胚层细胞继续扩展, 向下包围了卵黄的一半, 抵达赤道。因细胞内卷, 同时增生的细胞继续向中央伸展(图版 II, 13)。

3. 原肠胚晚期 囊胚层继续下包, 包围了卵黄的绝大部分(4/5), 在植物极下端尚未被包围部分露出的卵黄, 称为卵黄栓, 明显可见(图版 II, 14)。

(五) 胚形成阶段

胚孔封闭期 囊胚层完全包围了卵黄,胚体开始形成,葡伏于卵黄囊上。此时,中枢神经系统前端膨大成脑,但胚体尚无其它的分化(图版 II,15)。

(六) 器官形成阶段

1. **视泡形成期** 胚体头部前脑明显,其两侧膨大形成视泡。此时,脑已分化成前脑、中脑和后脑三部分。胚体的后端腹面出现了一个稍微突出粗钝的部分,乃是尾芽。胚体上出现 3—5 对体节。

2. **晶状体形成期** 视泡原为一实心器官,后来其中部形成一狭隙。随之与视泡相对的外胚层形成了晶状体。此时,听板已形成,即在后脑后方的两侧,各形成一椭圆形的淡色结构,这就是听板。在前脑的前方,外胚层已加厚而形成嗅窝。胚体有 20—21 对体节,并开始缓慢的收缩。尾部已形成,紧贴于卵黄囊的表面(图版 II,16)。

3. **心跳期** 这期的主要特征就是胚体出现了心跳。这便是在头的下方心管有节律的搏动,是为心脏。随着心脏的跳动,可以见到少量无色血球在输出。此时心管伸长,中间有缢缩,开始有心耳心室的雏形。胚体的头部葡伏于卵黄囊的表面,晶状体明显可见,脑弯曲已分化为端、间、中、小、后五个部分。尾部已伸长,并脱离了卵黄囊表面。胚体的后部表面有许多皱褶,末端钝圆。其腹面有一分叉的浅凹沟。这表明从这时开始,金鱼的双尾鳍有了分化。胚体有 25 对体节(图版 II,17、18)。

4. **循环期** 心跳期后不久,在耳中形成了 2 个细小的耳石。随后便出现了血球由不同路径缓慢地经卵黄囊表面流回心脏。此时胚体不时地能左右摆动。尾部腹面的分叉沟更为明显(图版 III,19)。胚体有 35 对体节。

5. **胸鳍芽形成期** 胚体头部已部分地脱离了卵黄囊的表面。胚体腹侧形成了腹腔壁,且出现了一条粗大的血管,该血管将血液从背侧经卵黄表面流入腹侧的静脉窦中,是为总主静脉。卵黄囊表面的血球流动加速。在耳的后方,胚体两侧出现了一对淡色椭圆形结构,这就是胸鳍芽(图版 III,20)。此时,在卵黄囊表面和胚体背侧都出现黑色色素细胞,胚体伸长,尾部腹面出现双尾鳍的鳍膜叶较大(图版 III,21)。

(七) 孵化阶段

孵化期 鱼胚的孵化腺在孵化前开始分泌孵化酶,且越近孵化时,分泌越旺盛,溶解卵膜,使卵膜变薄变软。孵化时靠尾部摆动,不断拍击卵膜,使尾部破膜先露出膜外,随着胚体激烈地转动而使头部脱离了卵膜。但也有相当一部分是由头部先露出卵膜,然后尾部才脱出卵膜的。初孵化的幼鱼侧卧不动,卵黄囊大且呈椭圆形。此时,头部已全部脱离了卵黄囊表面,眼球巩膜上黑色色素细胞分布增多。口已开,呈圆形位于头的下方,但不能动,也不能摄食,靠卵黄中的营养物质生长(图版 III,22、23)。鳃部出现一凹沟,全身的循环明显可见。脊索和肌节都很清晰。身体背面的皮肤上,腹腔壁上和卵黄囊表面都有分散的黑色色素细胞。胸鳍上已有鳍条和循环,尾鳍上鳍条明显。



图3

19. 循环期尾部腹面的分叉沟明显; 20. 胸鳍芽形成期; 21. 胸鳍芽形成期的尾部腹面出现较大的双尾鳍膜; 22—23. 孵化期, 示口已开, 呈圆形位于头的下方; 24. 鳃循环期, 鳃弓鳃丝明显; 25. 下颌形成期, 示口转向端位; 26. 游动期, 示口已达端位

19. branch-like ditch on the ventral side of empennage is obvious in circulation stage; 20. pectoral fin bud forming stage; 21. major two fins appeared on the ventral side of empennage in pectoral fin bud forming stage; 22—23. hatching stage, showing opened mouth which is circular and under the head; 24. gill circulation stage, gill filaments and gillarch are obvious; 25. lower jaw formed stage, showing mouth turned to the end of head; 26. swimming stage, showing mouth is at the end of head

(八) 胚后阶段

1. 鳃循环期 幼鱼身体伸长, 卵黄囊已缩小而形成一前端膨大, 后端细长的囊。鳃都有4对鳃, 其中可见到5对入鳃动脉的血液循环, 第1—3对鳃弧鳃丝明显(图版III,

24)。此时，在鳃的前部有一个小半圆形突状的结构突向后方，这就是鳃盖膜。鳃盖膜只盖过第1对鳃弧的鳃丝。此外，在头部和全身背侧皮肤上都有黑色素细胞分布。幼鱼仍侧卧不动。

2. 下颌形成期 幼鱼的鳃已形成，且借鳃管与消化道相通。鳃的背面出现黑色素细胞。鳃盖膜可动，但尚未遮盖鳃的全部。眼已能不断地转动。卵黄囊更为缩小，下颌形成并可动。口转向端位，活动灵活(图版 III, 25)。这时幼鱼靠着尾部的颤动而使躯体移动，静止时不再侧卧，而保持着端正的体位，但不能自由游动。

3. 游动期 鳃中已充满气体。卵黄囊中的卵黄也已耗尽，开始自由游动和摄食。4对鳃弧上都长出乳突状鳃丝，鳃盖已盖过第3对鳃弧，接近遮盖全鳃。口达端位，与成年鱼基本相同(图版 III, 26)。

讨 论

为了能较好地观察金鱼胚胎发育各时期的表面形态结构，必须除去卵膜。去卵膜通常采用提取鱼胚孵化酶，用孵化酶处理鱼卵而去掉卵膜(Sakai 1961、曲漱惠和张天荫 1963)。这样就需要许多鱼胚来提取，既费时又费工造成很大的不便。而我们是采用无钙、镁离子的 D-Hanks 液配制的 0.125% 胰蛋白酶溶液处理鱼卵 4—6 分钟，就可以引起卵膜的变化，辅以轻微摇动，卵子便破膜而出，成为没有卵膜的鱼卵，去膜率可达 100%。去了卵膜的鱼卵发育正常。这与杨兴棋和陈宏溪(1983)在 15—32°C 条件下，用 pH 6.0—8.2 的 0.01—0.001 克/毫升胰蛋白酶液处理泥鳅受精卵，并摇动之，3 分钟内即能全部脱膜，对其胚体及发育均无不良影响，结果是相同的。但是必须指出，胰蛋白酶的浓度不宜过大，处理的时间也不宜过长，否则鱼卵本身也被胰蛋白酶消化而解体。最好是经胰蛋白酶处理时，当见到个别卵已被溶解破膜而出则立刻取出，终止处理，或是经胰蛋白酶处理之后，便除去胰蛋白酶，再经过一些时间，让其卵膜慢慢地被消化溶解，才破膜而出，效果更好。根据我们的观察，金鱼卵用 0.125% 的胰蛋白酶溶液，处理 4—6 分钟是比较适宜的。在胚胎发育的早期，卵膜比较嫩弱，处理的时间则宜短些，到了胚胎发育的中期，卵膜比较坚韧，富有弹性，处理的时间则可相对地延长一些。去了卵膜的卵子，不仅不会影响鱼胚的正常发育，反而发育的速度要比带着卵膜的卵要快一些。这可能是去了卵膜的卵，有利于气体交换，呼吸作用加强，提高了新陈代谢作用的结果。因此，利用胰蛋白酶作为鱼卵去膜是一种简便的行之有效的新技术。

朱洗等(1960)曾在光学显微镜下观察了金鱼的卵孔。但从照片上看，可惜是个侧面图，只见一个内陷，并没有看到卵孔。而我们将金鱼的卵子直接挤入戊二醛固定液中固定，经扫描电镜观察，找到了金鱼的卵孔(见图版 I, 1)。刚排出的鱼卵呈圆形，不易区分极性。卵呈浅黄色，卵膜紧贴着卵球。卵子的细胞核靠在卵的皮质(外质)的一端，在卵孔地区静止了下来，并且开始成熟分裂(Spek 1933)。这表明，卵孔位于动物极的一端，在其表面由卵膜内陷形成皱褶，如同漏斗状。在漏斗的中央有一小孔明显可见，这就是卵孔。孔径约为 15 微米。卵孔是精子入卵受精的必经之通道。

卵子遇水后则产生粘性，附着于物体上，几分钟后，卵膜才与卵球分离而形成卵周隙，

随之细胞质流动集中于动物极上逐渐形成胚盘。此时,卵子的极性才是很明显的。

金鱼的卵裂,在8细胞期以前,也就是在第三次分裂以前,各个分裂球都是均等的分裂,但是在16细胞期时,则可观察到是不均等分裂(见图版I,7)。这与我们(李璞和王春元等1959)过去观察的结果不一致。因为在光学显微镜下观察,在16细胞期时仍为均等分裂,形成16个大小相等的细胞。然而这种不均等的卵裂,似乎不是因固定后人为地造成的。因为在8细胞期以前也同样地做固定,并未见分裂球有大小不同的差异,只有在16细胞期时才被观察到。那么这种不均等的卵裂是正常的还是不正常的发育,由于我们扫描观察的数量不多,还难以确定,还有待进一步观察才能回答。不过在阳爱生等(1983)对大鲵(*Megalobatrachus davidianus*)胚胎发育的研究中,也曾发现从第三次卵裂开始,大鲵卵的分裂细胞其大小是不相等的。而这种不均等的卵裂可能是分化过程中一个重要的步骤,它标志着细胞的分化与细胞分裂自始至终保持着密切的关系。Nicholas等(1942)在对赤鲮鱼(*Fundulus*)胚胎发育的研究中,曾观察到8细胞期或16细胞期时受到某些缺损,就能够完全阻止原肠形成。童第周等(1955)在金鱼卵的1、2、4、8细胞时期曾用头发平均结扎的实验,也曾观察到只有少数发育为两个胚胎,大部分发育不均等。在一对胚胎里,一个是正常,一个是囊状胚胎,但没有两个都是囊状胚胎的。这说明,在分裂早期,鱼卵各部分的发育能力是不均等的。这种发育能力的不均等,也许从16细胞期开始才在形态学上找到了依据。

关于尾鳍的分化问题,这也和我们过去的观察结果有一些出入。它并不是如我们过去所说的,是在尾鳍形成鳍膜期(李璞和王春元等1959)。这在解剖镜下是不容易观察清楚的,因为尾鳍弯曲在卵膜里,只有当分化比较明显时才能观察到。通过扫描电镜观察,尾鳍的分化应该是在心跳期。在心跳期时可以观察到,尾部已伸长,并脱离了卵黄囊的表面。在胚体的后部表面有许多皱褶,因此尾部可以左右自由摆动。在粗钝的尾部腹面,出现一浅凹沟状分叉的结构(见图版II,18),然后在此原基上分化出双尾鳍来。由此可见,金鱼双尾鳍的分化是在心跳期时就已开始,而不是在尾鳍形成鳍膜期。这要比以前的观察提前了4个时期。因此,对过去的工作提出了修正。

但遗憾的是,由于金鱼的卵黄较多,对制备扫描电镜样品带来一些困难。我们采用丙酮逐级脱水,也很难避免真空干燥后引起的破裂,尤其是在胚胎发育的早期,细胞质高度集中于动物极之后更容易发生。这是不足之处,因此,在制样技术上还有待改进。虽然如此,也并不影响对其结果的观察。

参 考 文 献

- [1] 朱洗、王幽兰等,1960。金鱼和鳊鱼卵球受精的细胞学研究。实验生物学报,7(1,2):29—46。
- [2] 曲淑惠、张天荫,1963。去了卵膜的金鱼卵的再受精。山东大学学报(自然科学),2:61—74。
- [3] 李汝祺,1983a。谈谈遗传学中若干基本问题四、胚胎发育与遗传信息。遗传,5(2):3—6。
- [4] ——,1983b。谈谈遗传学中若干基本问题五、细胞分化与细胞分裂。遗传,5(3):1—4。
- [5] 李璞、王春元等,1959。鲫鱼和金鱼胚胎发育的分期。动物学报,11(2):145—157。
- [6] 王春元、李延龄,1963。我国现有的金鱼品种的分类及其系统发育的探讨。动物学报,29(3):267—277。
- [7] 阳爱生等,1983。大鲵胚胎发育的初步研究。动物学报,29(1):42—47。
- [8] 傅湘琦,1980。扫描电镜在医学、生物学上的现状及展望。生物科学动态,5:17—19。
- [9] 童第周等,1955。鱼类卵子发育能力的进一步研究。实验生物学报,4:107—129。

- [10] 杨兴棋、陈宏溪, 1989. 用胰蛋白酶水解法去除泥鳅卵膜的研究. 鱼类学论文集第三辑, 科学出版社, 99—106.
- [11] Battle, H. L., 1940 Embryology and larval development of goldfish (*Carassius auratus*). *Ohio J. Sci.* 40:82—93.
- [12] Nicholas, J. S. et al., 1942. Regulation and reconstitution in *Fundulus*. *J. Exp. Zool.* 90:127—157.
- [13] Sakai, Y. T., 1961. Method for removal of chorion and fertilization of the naked egg in *Orzais latipes*. *Embryologia* 5: 357—368.
- [14] Tung, T. C. (童第周) et al., 1944. The development of egg fragments isoated blastomeres and fused egg in the goldfish. *Proc. Zool Soc London* 114: 46—64.
- [15] Wilier, B. H. et al. (庄孝德等译), 1964. 发育分析. 413—431. 科学出版社.

OBSERVATIONS ON THE VARIOUS STAGES OF EMBRYOMIC DEVELOPMENT OF GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*) BY SCANNING ELECTRON-MICROSCOPE

Wang Chunyuan and Li Yanling

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

ABSTRACT The embryonic development of domesticated goldfish (*Carassius auratus*) had been studied with Optical microscope by Battle (1940) and Li Pu et al. (1959). In the present study, the various stages of embryonic development of the red tiger-headed goldfish (*Carassius auratus*) were examined under scanning electron-microscope. The eggs were obtained from artificial fertilization methods described by Li Pu et al (1959). The results of our observation are briefly described as follows:

Micropyle of the goldfish was clearly discernible. It located at the end of animal pole. On the surface of oolemma formed an inner fitfall as a funnel. The micropyle is about 15μ in size. That is the only passageway for the sperm to pass through into the micropyle for fertilizing the egg.

The cleavages of the goldfish divided equally before 8-cell stage. But after the 16-cell stage, the cleavages were unequal. This stage may mark the beginning of cell differentiation (which may start from 16-cell stage). These unequal cleavages formed the cells of different size and remained clearly discernible until the blastula stage.

In our observation, the differentiation of "paired caudal-fin" of the goldfish had started during the heart-beating stage. It was not in the stage of formation of the caudal-fin membrane as described by Li Pu et al (1959).

KEY WORDS Goldfish (*Carassius auratus*), Embryonic development, Scanning electron-microscope.