

牙鲆鱼胚胎和仔鱼显微摄影方法^{*}

APPROACHES TO MICROSCOPICAL PHOTOGRAPHY ON FLOUNDER EMBRYOS AND LARVAE

王 勇 徐永立 张培军^①

(中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

关键词 牙鲆,胚胎和仔鱼,戊二醛,显微摄影

生活在海洋中的硬骨鱼类,所产卵子一般为浮性卵,即卵内有一至多个油球,使卵子能浮于水面。此时的卵子,卵黄向上,胚盘向下,呈倒悬状态。在研究海水硬骨鱼的胚胎发育时,如果仅仅观察发育状态,还可以做到;但如果想把各发育时期的胚胎拍摄下来,则非常困难。张崇理 1959 曾使用冻粉(即琼脂)来夹住卵子以达到观察的目的。具体做法是:将 1.3% 的琼脂倒入培养皿中,冷却后在琼脂上挖一稍小于卵子的小槽或小窝,加上海水,把卵子夹在里面,这样就可以把卵子倒转过来。不过倒转过来的时间不能太长,由于油球比重低的缘故,卵子仍可在卵膜内渐渐地转回原状。而且此法操作繁琐,不利于快速观察和大批量观察。在研究牙鲆仔鱼发育时,因仔鱼对光敏感,在光照下活泼游动,牙鲆仔鱼的显微摄影也较难掌握。为达到快速和大批量观察胚胎和仔鱼的目的,本文报道了几种方法,可用于牙鲆等海水硬骨鱼的胚胎及仔鱼的显微观察和显微摄影。

1 材料和方法

1.1 牙鲆鱼受精卵的获得

牙鲆亲鱼系山东省荣成市寻山渔业集团和邱家渔业集团提供的海捕牙鲆鱼,人工挤卵、挤精液,湿法受精。受精卵置于过滤海水中发育,水温 14℃,室内气温 18℃。

1.2 牙鲆胚胎的载玻片直接观察法

用滴管取牙鲆胚胎数个,滴于载玻片上,用吸水纸吸去多余水分,在显微镜下观察的同时,十分仔细地用细滴管拨动牙鲆鱼胚胎,使胚盘倒向一侧,以利于观察或照像。

1.3 戊二醛固定法

用滴管取牙鲆胚胎,滴于 1.5 ml 微量离心管中,

每管 10 个,共 5 管。用微量加样器的尖嘴尽量吸去海水,向各管中分别加入 10%,15%,20%,25%戊二醛各 1 ml,放置一段时间,连续观察。

1.4 仔鱼的酒精麻醉法

将牙鲆仔鱼收集于一个小容器中(如青霉素小瓶、小培养皿等),向容器内逐滴加入 50%乙醇数滴。待仔鱼游动减缓或基本不动时,用粗滴管吸取仔鱼,滴于载玻片上,观察照像。

2 结果

2.1 牙鲆鱼胚胎的观察

用 25%戊二醛固定的胚胎,固定 10 min 即有半数以上胚胎倒向一侧;时间延长,则卵黄收缩严重,整个胚胎的形态亦发生改变。降低戊二醛浓度,则需适当延长固定时间;戊二醛浓度低至 10%时,即使延长固定时间也不能获得满意的效果。图 1-1 显示用戊二醛固定法处理的牙鲆鱼胚胎。固定后,卵黄发生明显收缩,但固定剂对胚胎细胞外观的影响不大。用该法处理的牙鲆鱼卵或胚胎,一般情况下有半数以上的胚胎胚盘倒向一侧,因此,非常便于观察和照像。

2.2 牙鲆仔鱼的观察

用酒精麻醉后的仔鱼基本不游动,拍摄的照片非常清晰。图 1-2 示正常二倍体牙鲆仔鱼,图中可清楚地看出仔鱼的器官(如眼)和组织(如肌节)发育良好,结构清晰。图 1-3 示单倍体牙鲆仔鱼,图中可看出,仔鱼的组织器官发育不良,如,未形成明显的眼,肌节分

^{*} 国家“863”计划资助项目 819-01-03 经费资助。

^① 通讯作者。

收稿日期:2000-07-13;修回日期:2000-09-28

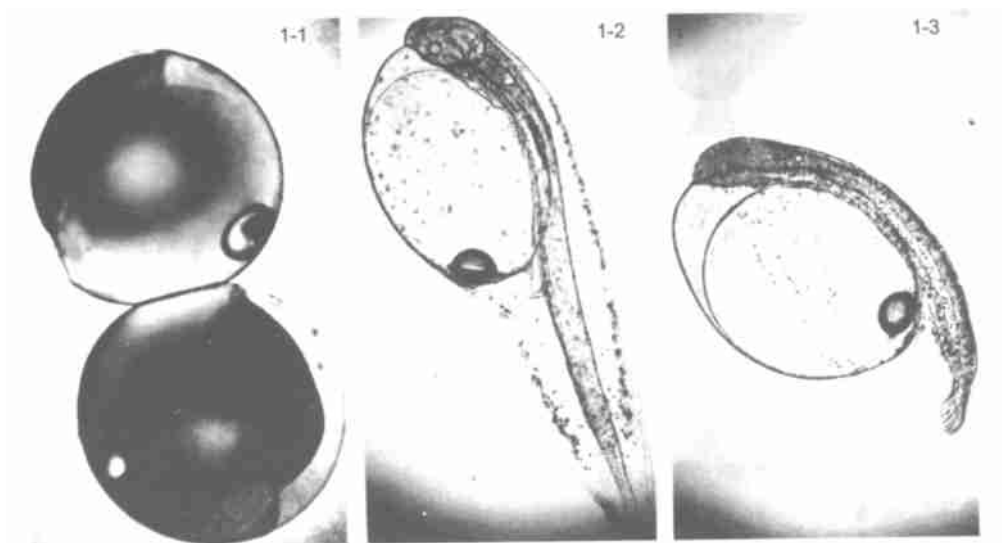


图1 用戊二醛固定的胚胎和乙醇麻醉后的仔鱼

1-1 示用戊二醛固定法处理的牙鲆囊胚(图中胚盘倒向一侧); 1-2 示用乙醇麻醉的正常二倍体牙鲆仔鱼; 1-3 示用乙醇麻醉的单倍体牙鲆仔鱼

化不明显。此外,其外部形态也明显异于正常仔鱼,如身体粗短、弯曲,尾部变短且末梢部突然变细。

3 讨论

海水硬骨鱼类所产卵子一般为浮性卵,其胚胎发育一般为盘状卵裂。因此,观察其卵裂过程及随后进行的囊胚发育、原肠形成等,十分困难。在卵裂初期(2细胞期至16细胞期),因胚胎细胞成单层排列,虽然胚胎呈倒悬状态,但是只要调整解剖镜(或显微镜)的光线至合适强度,再调整焦距将焦点移向胚胎深处,就可以清楚地观察细胞分裂过程。但随着细胞数目的增加,细胞逐渐呈多层排列,此时欲观察整个胚胎的发育状况,就必须从胚胎的侧面进行观察。以往,人们往往将鱼卵置于小培养皿中,吸干水分后用滴管拨动卵子,使胚盘导向一侧。由于培养皿较厚,光线通过培养皿再穿过胚胎时形成一个光环,单纯观察尚可,但无法照像。作者经多次试验,发现本文所描述的载玻片直接观察法,能够获得满意的效果。该法虽然不需要任何试剂,但对操作者的技术要求较高,操作者必须有一定经验,而且要求操作者必须细心和有耐心。如考虑这一点,则戊二醛固定法更适合一般实验人员。

用戊二醛作为固定剂来快速观察胚胎发育和制备显微摄影的拍摄对象,是作者无意中发现的。当时作者打算用戊二醛固定牙鲆胚胎,准备作电镜观察,因急于完成固定工作,就尝试使用高浓度戊二醛固定样品,固定后发现,由于卵黄收缩导致胚胎重心偏移,使得胚盘倒向一侧,非常利于观察。后经反复试验,发现如欲快速固定,选用25%戊二醛固定10 min最好。

鉴于牙鲆仔鱼在显微镜光照下活泼游动,因此考虑采用麻醉方法。目前国外常用的水生动物麻醉剂是2-苯氧基乙醇(2-benoxylethanol),但该试剂价格昂贵。本研究采用50%乙醇作为麻醉剂,在节约经费的同时,也获得了良好的效果。因此,在我国目前条件下,酒精麻醉法更具有应用价值。

在牙鲆染色体操作育种研究中,鉴别单倍体与正常二倍体仔鱼的形态是非常重要的。在以往的工作中,由于没有建立起观察仔鱼形态的方法,鉴别工作进行得较为困难,尤其是不能及时对活体照像,以至于未能积累起足够的研究资料。本文所述方法建立之后,本文作者获得了清晰的单倍体仔鱼与正常二倍体仔鱼的显微摄影照片,并开始积累了一批研究资料,为深入进行牙鲆的染色体操作研究提供了可靠的保障。

(本文编辑:刘珊珊)