

鳖卵实验室孵化和胚胎取材

侯 陵

(湖南师范大学生物学系)

鳖 (*Trionyx Sinensis*), 俗称甲鱼, 是一种广布于我国的常见爬行动物。由于爬行动物实验材料来源困难, 国内对爬行动物的胚胎发生进行系统的研究较少。但爬行动物是进化到鸟类和哺乳类的共同祖先, 就动物进化的意义来说, 研究爬行动物的胚胎发生有其重要的作用。近年来, 湖南师范大学生物学系动物生殖生理研究室与湖南省汉寿县特种水产研究所进行科研协作, 研究鳖的人工繁殖和养殖, 为开展爬行动物胚胎发生的研究提供了丰富的实验材料。本文就几年来在鳖卵的实验室孵化和胚胎取材方面的体会, 做一简要的介绍。

(一) 鳖卵的收集和受精卵的鉴别 实验材料取自湖南省特种水产研究所。每年获得鳖

卵的时间是5月中下旬至8月上旬, 6至7月为获得鳖卵的最佳时期。通常亲鳖每年产卵3—5次。在繁殖季节, 已达性成熟的雌鳖, 一般在晚间离池上岸爬入人工设置的沙盘产卵。根据这一产卵行为, 待雌鳖产卵后即从沙盘中取得鳖卵。由于鳖是体内受精、体外发育的动物, 产出体外时卵已发育到原肠早期。在生产上, 常将收集到的鳖卵集中到荫蔽处, 放置6—10小时后, 在卵朝上的卵壳表面会出现一个白色区。据剖卵观察, 此处为胚盘区域。白色区的出现是鳖卵进入早期胚胎发育的象征, 故此可作为受精卵的标志。但实验室用于研究胚胎发生的鳖卵, 可将刚产下的鳖卵不经卵子是否受精的鉴别, 直接用于孵化, 并记录起始的

时间。

(二) 鳖卵的实验室孵化 在实验室里将收集到的鳖卵放入恒温箱中孵化。整个孵化期间, 鳖卵覆盖在装有沙子的小型玻璃皿中。通常将 4—6 个埋藏有卵的培养皿平放在一个盛有水的方形磁盘内。孵化温度控制在 33℃, 相对湿度 81—87%, 沙盘含水量 8—10%。在这样的温湿条件下, 约经过 3 小时在卵的顶端出现白色受精区。以后的孵化切忌移动鳖卵, 始终保证受精白色区朝上, 这是因为鳖卵缺少卵白系带, 缺乏调整胚盘位置的能力。如果翻动鳖卵, 常会引起胚胎因缺氧或受压而死亡。在恒温和恒湿的情况下, 尤其应注意沙盘的含水量, 保证在 8—10% 的含水量环境中正常孵化。根据几年来的体会, 用 6 至 7 月产的鳖卵孵化率较高。

(三) 鳖胚的取材 当胚胎发育到所需的时期^[1-4], 将卵小心取出, 固着在剥卵板上。在剥卵过程中, 将鳖卵的受精标志朝上, 用尖头镊子在其上面开一小孔或轻轻敲打成小的裂片, 然后剥离卵壳, 露出壳下膜, 用 0.8% NaCl 液湿润壳下膜后, 轻轻将壳下膜扯下, 使胚盘露出。由于鳖卵小, 胚盘软薄, 极易损坏, 我们采用了用剪子沿着受精标志区的边缘, 将卵壳连同胚盘一起剪下, 放入 0.8% 的 NaCl 液中轻轻冲洗胚盘, 去掉粘附的卵黄粒。再更换两次充分冲洗干净后, 剪两块比胚盘稍大的吸水纸, 并在其中央剪一个与胚胎大小相仿的孔, 盖在胚盘的两面, 并露出胚胎。用波因氏液固定 3—4 小时, 保存于 75% 的酒精中。(制作鳖胚的整装片和组织切片可参照鸡胚的整装片制作法和石蜡切片法)。

(四) 温度等因素对发育的影响 朱斯曼和艾斯肯德夫 (Zusman 和 Iskenderov)^[5] 提出蝾螈的最低孵化温度是 22℃, 最高孵化温度 33.5℃, 最适宜温度是 26—30℃。作者根据刘筠等 (1982) 的工作和个人几年的孵化实验, 认为鳖胚的最低孵化温度是 21—22℃, 最高孵化温度 35—36℃, 适宜孵化范围 27—33℃。从我们的工作来看, 不提倡用超过 33℃ 孵化。因为

鳖卵的卵白含量少, 温度愈高则相应耗去的水分愈大。在实验中观察到高温下孵化的卵, 卵白失水极快, 在卵壳与壳下膜之间常形成一个较大的空腔, 而在适宜温度范围内孵化的卵一般没有此种现象。高温下孵化常引起胚胎因干燥死亡。温度和湿度是孵化环境中的两大要素, 鳖胚体表水分的蒸发和吸收, 往往依赖于相对湿度之大小而异。水分的吸收在爬行动物胚胎发育中占着重要的作用。Cunningham (1938) 发现鱉龟在孵化中吸收的水分重量相当于它本身原重的 60%, 锦龟是 70%, 箱龟是 28%, 其中约 12% 的水分为组织利用。朱斯曼和艾斯肯德夫提出蝾螈孵化的相对湿度为 75—80%。鳖卵的孵化, 可认为以 81—87% 为宜。这种相对湿度显然高于鸡胚的孵化, 可能是鳖卵卵白含量要少的缘故。

鳖卵的实验室孵化与鸡胚孵化不同的另一点是鳖卵要覆盖在含有一定水分的沙子中进行。从鳖的繁殖生态环境来看, 它的卵必须产于相当湿度的环境中。有人观察到, 跳蜥的卵必须在最低湿度等于 2.5% 的情况下才能发育, 草原龟的卵要在沙中湿度 1% 左右方能孵出。实验证明用于孵化鳖卵必须含有一定的水量, 干沙不能用于孵化。但沙盘含水量也不能过高, 因为鳖卵覆盖在沙中, 要求沙粒之间具有一定的空隙, 便于氧气的流通。如果含水量过高, 会影响气体的流通, 从而影响胚胎的发育。沙盘含水量太低, 也会引起沙粒干燥, 同时使卵白消耗得很快, 从而影响到胚体水分的吸收, 造成干燥致死。所以认为 8—10% 的沙盘含水量较适宜。

参 考 文 献

- [1] 侯陵 1984 中华鳖胚胎发育的研究。湖南师范大学学报(自然科学版) (4): 59—70。
- [2] 犬饲哲夫 1979 动物发生学の研究材料蒐集の余谈。动物学杂志 88 (4): 381—383。
- [3] 石原重厚 1964 カナヘビの产卵とふ化。动物学杂志 71 (4): 364
- [4] Yntema, C. L. 1964 Procurement and Use of Turtle Embryos for experimental Procedures. *Anat Rec* (149): 577—586.
- [5] Zusman, I. N and T. M. Iskenderov 1978 Limits of thermal resistance of embryos of some reptiles. *ZOOL ZH* 57(8): 1196—1201.