

[美] LELAND G. JOHNSON / E. PETER VOLPE 著



发育生物学中的 形态模式和实验

于豪建译 张宗炳校



人民教育出版社

内 容 提 要

本书以四种生物——蛙、鸡、海胆、蕨类植物作材料,描述它们的发育形态模式,并用它们做各种类型的实验。本书的主要特点是使用活的材料,并把描述和实验结合起来,因而能引起学生对发育现象的兴趣。

本书可作为发育生物学课程的实验教材,也可作为普通生物学、胚胎学的补充教材。

发育生物学中的形态模式和实验

LELAND G JOHNSON 著
[美] E. PETER VOLPE

北京大学生物系 于豪建译 张宗炳校

*

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

浙江洛舍印刷厂印装

*

开本787×1092 1/16 印张 8.5 字数 195,000

1982年2月第1版 1983年5月第1次印刷

印数 00,001—4,300

书号 13012·0727 定价 0.93 元

译 者 的 话

本书是发育生物学课程的实验教材。包括四种生物——蛙、鸡、海胆、蕨类植物——的胚胎发育过程，并用这几种生物去做各种类型的实验。本教材的主要特点是用活的胚胎来观察发育的过程和进行实验，以切片观察作为补充，并且把形态描述和实验方法结合起来。内容丰富而又生动，因此能引起学生对发育现象的兴趣。

本教材实验的选择考虑二个方面：一是学生用活胚胎做实验缺乏经验，因此实验难度不能太大；另一是考虑实验内容能说明重要的发育原理和发育研究的实验方法，实验所需用的仪器能为大多数生物系所具有。

实验操作方法、需用的设备及化学药品均有详细说明，教材后面有“附录”，详细介绍了实验的准备工作。书中插图简明易懂，这些都是由于作者有多年教学经验，经过实践不断修改而取得的，因此按教材指导基本上可以进行实验。

本教材中每一部分均有“进一步研究的建议”，介绍了发育生物学研究中最迫切的问题。最后附有主要参考资料，这对于研究发育问题提供了一些参考。

本书可作发育生物学课程的实验教材，也可作为普通生物学、胚胎学等的补充教材。可供综合性大学、高等师范院校、医学院及有关工作人员参考。蛙的发育这部分可供中学教师参考。

本书原版是美国 Temple 大学牛满江教授赠送，在此表示谢忱。

本书蕨类植物部分（即实验十三、十四、十五，附录六）为李宝屏同志译，朱激同志校。

由于时间仓促，水平有限，译文中不妥之处在所难免，希望读者批评指正。

译者

1981.7

前 言

当你遇到一位在发育生物学方面有辨别力的学生而问及对前言的看法时,她将无可奉告,因为她从未读完一篇序言。她感到,前言一般说来总是既啰嗦而又乏味。其实,发育生物学是一门富有活力的学科,特别是当用活的材料去学习的时候,更是饶有兴味。当然,我们不想冒这个风险,开篇就使学生和教师望而却步,但是,我们仍切望他们能读一读这篇前言。因此,我们在这篇前言中只叙述这本教材及其所采用的方法的主要评价。

这本教材是我们各自在 Augustana 学院和 Tulane 大学讲授发育生物学课程的产物。在内容方面我们不敢说有特殊的创新,因为所用的生物体是广泛研究过的,并且有几个实验是普遍采用的,虽然另外的一些实验并未在其它书中见过,或曾是以完全不同的形式出现。这本书与其它书的主要不同点,在于它使用活材料的方法,并且在描述的内容和实验的内容两方面都给予了恰如其分的注意。学生有机会观察四种生物体发育的形态模式,然后再用这几种生物体做实验。这种描述与实验方法的结合是发育生物学史所采用的方法的主要特征,并且看来是使学生在本学科中获得初始经验的合理途径。

虽然描述练习的内容不象传统书中讲得那么详细,但是,在描述练习中着重使用了活的实验材料,这样就大大地增加了它们的效果。并且使学生有机会应用发育的形态知识做实验练习,对学习也起了显著的加强作用。我们并不想用过多的实际内容使学生望而生畏,而唤起学生们对发育现象的兴趣才是我们的目的。

实验练习着重于描述练习中学过的那些生物体,而且限制在大多数生物系中能够得到的仪器设备,以及若干不要多少费用就能制作出来或买到的特殊设备。练习的选定考虑到学生对使用活材料做实验缺乏经验的实际情况,还要考虑这些实验在,①说明重要的发育原理,②介绍研究发育的实验方法,③鼓励学生有分析地思考以前观察到的发育形态模式,这几个方面的程度。显然没有一本发育生物学的书能包罗万象,我们认为,许多教师可以插入一些他们所“喜爱”的实验作为补充(或代替)材料。

我们希望这本教材会在目前学生很少接触活材料的那些课程中 useful。它可以用作普通生物学,以切片学习为重点的传统胚胎学,以及以比较解剖学和脊椎动物胚胎学相结合的那些课程的补充教材。使用活的材料进行工作对于丰富学习经验的作用怎么说也是不会过分的,我们衷心地予以推荐。

Leland G. Johnson

E. Peter Volpe

感 谢

书中插图是 Carolyn Thorne Volpe 夫人的卓越的作品。我们感谢她的创造性努力，以及她在整个工作中表现出的耐心和毅力。

我们感谢几位作者和出版商在提供某些照片所表现的慷慨与合作。这些照片的来源都在图片的说明中指出。

致 学 生

我们准备这本教材的主要目的是为协助教师们在传授发育系统知识的时候,具有令人着迷的吸引力和启发性。为了达到这个目的,我们着重于使用活的生物体。当然,使用活的生物,而不用干的或浸泡的标本,会使生物学的学习更有可能导致令人沮丧的失败。然而也存在着引起更大兴趣的可能性,它超过了不可避免的偶然失败所引起的烦恼。象发育生物学这样一门课的实验中,减少失败的可能性是存在的,但不可能完全消除它。我们特别建议仔细阅读以下各节关于用活材料进行工作的一般说明,以克服在实验上遇到的困难。我们也极力要求你们在实验课前仔细和充分地阅读所采用的每个实验内容。

我们认为对活的生物体高度重视是大多数有成就的生物学家们的特点。这种重视与某些人考虑生命本质时产生的玄想无关,而只是对活的生物体复杂性的一种健康的认识。对生命的这种重视正常地会导致非常细致的工作方式。虽然我们在用活的材料进行工作中可以描述一些有关的特定事物,但是这个总的观点却是科学成熟的产物。发育生物学实验室着重实验方法,有助于促进对生命系统的敏锐认识和重视。

回到实际问题中来,为了使你的实验工作顺利进行,必须有许多注意事项。一开始就要强调指出,你将要做的实验的发育系统对环境变化的敏感性大大超过它们的成体,或其它种类的成体。这些敏感性有时会使你惊讶,这就是为什么在你做这项工作时,必须经常小心并周密考虑的原因。

第一条规则,严格的清洁是绝对必需的。所有的玻璃器皿和工具必须尽可能不受一切形式的污染。举例来说,即使少量的甲醛或其它防腐剂的残余也会对发育生物起破坏作用。仔细洗干净所有玻璃器皿的重要性是无论怎样强调也不会过分的。玻璃器皿的清洁剂、肥皂或洗涤剂是和它形式的污染同样不许可的。所以玻璃器皿刷干净后要充分和仔细地冲洗。最后应该用蒸馏水冲洗。

第二,要避免温度的波动。即使温度波动甚小,冷一点和热一点都会产生不良影响。在这本教材的一些实验里,致死的温度变化有特别严重的害处。实际上,热死似乎是更严重的问题。在显微镜观察时更要特别小心,因为许多显微镜照明的辐射热是相当可观的。

在某些实验中还要讲到一些特别要注意的地方,在工作中你应该清楚地意识到活材料对化学污染、温度波动、渗透压的改变、pH 的变化、以及其它环境因素的改变都是敏感的。这些都是用“普通常识”来指导以活材料做的所有工作,你应该仔细地注意可能发生的问题。

最后,我们鼓励你阅读各实验中的“建议”部分,并从中获得教益。希望它能帮助你认识到发育生物学研究中最迫切的问题。最重要的是要记住,我们当前学习和使用的许多知识,只代表目前的认识情况,当新的研究完成了,这些知识就会不断地被修改。最后,我们认为用发育的生物体来作实验是一种乐趣,希望你有同样的感受!

致 教 师

我们认为,在教学中看到学生用活的生物体“发现”生物学现象是最大的乐趣了。由于发育生物学包含动态的发育过程,所以使用活材料工作具有特殊的吸引力,这本教材在描述练习和实验练习中都一样地着重使用活的材料。如果教师对学生浓厚的兴趣感到高兴的话,那么更广泛地使用活材料所付出的更多劳动将会获得很好的补偿。

一种普遍存在的看法,用活的发育中的生物做实验需要非常特殊的技巧和基础。有一种“口授操作传统”,它主要是在研究生水平的课程中,和发育生物学研究的训练中得到的。许多使用或正在考虑使用此教材的教师可能已经有过这种训练,但也许有些人还没有这种经历。这可能是由于在许多生物系课程安排的调整而增设了发育生物学新课程,教这门新课程的教师通常是从前教传统课程(例如脊椎动物胚胎学)的教师,而这些课程已被发育生物学所代替。我们愿意向对活生物体的研究缺乏经验的和有经验的教师介绍使用活材料,以及介绍用描述和实验研究相结合的方法。特别是为了照顾在这个领域中缺乏经验者,我们写了较为详尽的附录材料,为各个实验作好准备,以及组织课程的一般知识。我们也建议教师们阅读“致学生”一节。

目 录

前 言	iii
感 谢	iv
致学生	v
致教师	vi
蛙	
实验一 活蛙胚胎的观察和实验	1
实验二 蛙发育的形态模式	12
实验三 切除实验, 移植和并生	25
实验四 两栖类胚胎细胞的分离和再聚集	33
实验五 蛙的原始生殖细胞	38
鸡	
实验六 鸡发育的形态模式	42
实验七 鸡胚的外科手术	63
实验八 尿囊绒膜的移植法	68
实验九 鸡胚的体外培养	73
海胆	
实验十 海胆的受精作用和早期发育	78
实验十一 海胆卵的结构	85
实验十二 海胆卵裂期的细胞增殖与分化	91
蕨类植物配子体	
实验十三 蕨类植物配子体发育的形态模式	96
实验十四 蕨类植物配子体的光形态建成	102
实验十五 蕨类植物配子体细胞分裂的控制	107
附录	
附录一 蛙胚实验材料的制备	111
附录二 诱导豹蛙(<i>Leopard Frog</i>)人工排卵	115
附录三 非洲爪蟾(<i>Xenopus laevis</i>)的管理和饲养	117
附录四 鸡胚实验材料的制备	119
附录五 海胆胚胎实验材料的制备	122
附录六 蕨类植物配子体实验材料的制备	123
附录七 日程安排和实验的利用	125
发育生物学: 精选的一般参考书目	126

实验一 活蛙胚胎的观察和实验

科学的进展是通过观察和实验而取得的。胚胎发育形态的连续变化往往具有很大的吸引力,以往学习胚胎学的人把注意力集中在描述有规律地正常发育过程。通过最详细、最精确地直接观察而获得了丰富的知识。后来这种观察和描述工作又为实验研究所补充。十九世纪八十年代研究两栖类卵的德国卓越的胚胎学家 Wilhelm Roux 是首先将实验方法应用于发育问题的学者之一。自从 Roux 用烧烫的针刺蛙的卵裂细胞以来,两栖类的卵已经做过各种显微外科手术以及无数的环境改变。研究者将新的或改变了的条件给予发育的胚胎,目的是要阐明胚胎在正常发育条件下不能显现出来的一些性质。在我们讨论蛙的发育中,本书始终是把描述和实验方法结合起来的。

我们将从蛙卵的受精作用和早期发育的描述和实验观察来开始学习。受精作用使单倍体核的配子结合而产生二倍体的合子,受精还刺激卵分裂而开始发育过程。然而,没有受精的卵也可以发育,这样的发育称为单性生殖(parthenogenesis)。蜜蜂的未受精卵发育为雄蜂,这是自然界单性生殖非常好的例子。许多卵通常不进行单性生殖,但可以用种种实验方法引起其发生。举例来说,如果用经照射或化学方法预先处理过的精子给蛙、蝶螈和蟾蜍卵作人工授精,卵子仍能被激活而进行早期发育,但没有正常受精时细胞核的一系列改变。这样的处理破坏了精子的遗传物质,但不妨碍精子的运动或穿入并激活卵的能力。

用两栖类卵(豹蛙 leopard frog, *Rana pipiens*)做实验,先观察单性生殖激活的蛙胚,同时还观察正常的二倍体胚胎。用人工方法除去亲代同源染色体的一方,其胚胎发育显见受损。同时观察正常的和单性生殖激活的胚胎(单倍体)能使你体会到两栖类发育过程的复杂性。

近年来,在研究非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)发育的工作中得到了突出的成就。爪蟾的受精卵容易获得,并且它的胚胎象豹蛙一样容易进行实验操作。虽然豹蛙是这次实验建议的生物体,但是非洲爪蟾也是合适的材料,饲养爪蟾胚胎的方法见附录三。

实 验 技 术

一、精子悬浮液的制备

雄性豹蛙的精巢中整年都有成熟的精子(虽然从六月底到九月中是精子发生较低的时期)。同其它脊椎动物一样,蛙的精子也是很小的,能动的,并有鞭毛。

1. 杀死或麻醉一只雄蛙,用剪子和镊子分离出一对精巢。假如你不能熟练地用针毁坏蛙的中枢神经系统,可在密闭的容器里放一块浸透乙醚或氯仿的棉花用以麻醉蛙。精巢是一对浅黄色、卵圆形的小体,以肠系膜褶附在肾脏上(图 1-1)。

2. 取出精巢后,将每个精巢轻轻地在软纸上滚动,除掉粘在上面的血液和肠系膜。在一个小

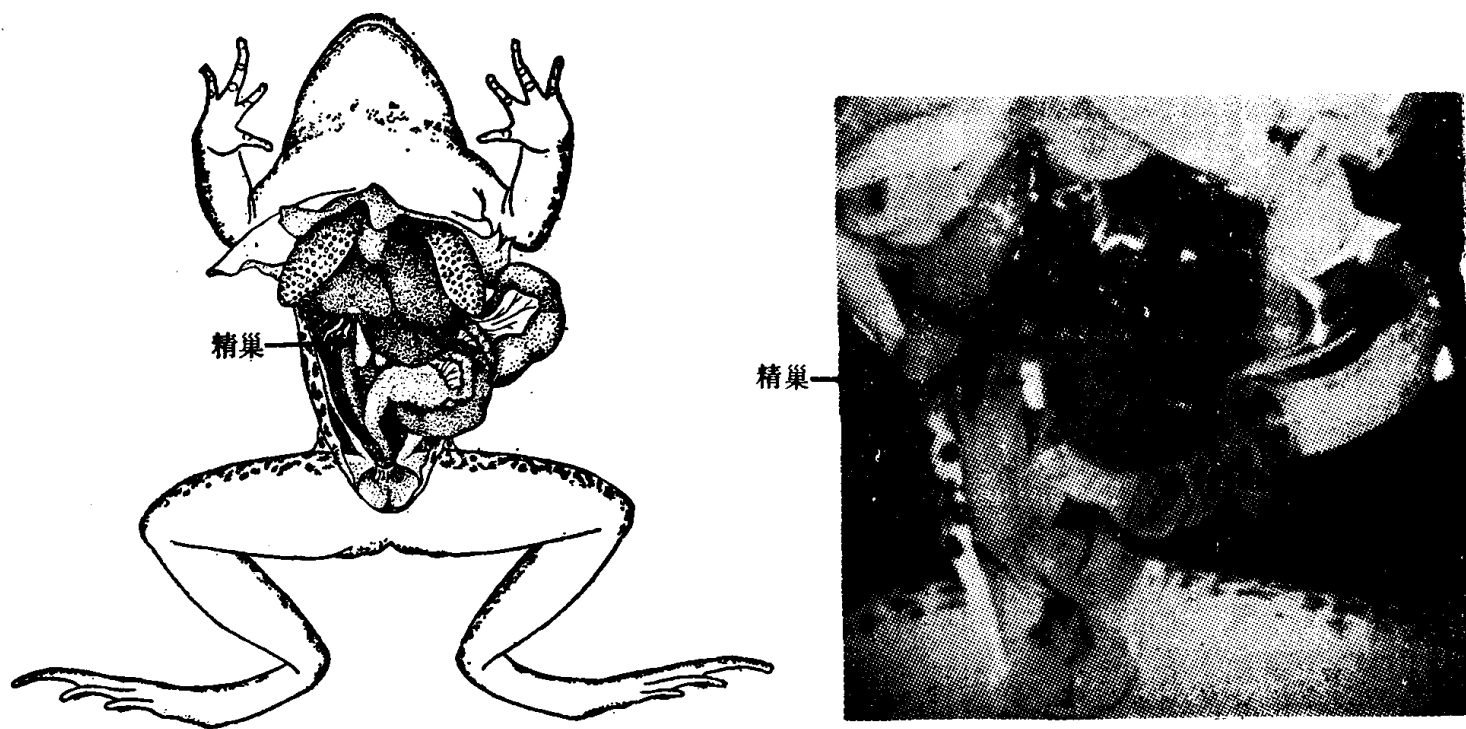


图 1-1 蛙的精巢位置与其它内脏的关系

杯里放 10 毫升泉水,用钝头镊子彻底捣碎这对精巢。将小杯倾斜,使精巢容易地浸渍在小杯一边的液体里。代替泉水的合适液体是 10% 的两栖类 Ringer 溶液(见附录一)。

3. 让乳状悬浮液静置 15 分钟,至此期间精子变得活跃起来。滴一滴悬浮液在载玻片上,放在高倍显微镜下,观察精子的形状和它的运动情况。

二、照 射 精 子

精子受到紫外线照射的影响之一是细胞核的损伤。特别是紫外线的能量引起核酸嘧啶碱基(pyrimidine bases of nucleic acids)的异常连接。这样,精子的染色质就被紫外线破坏,但不减低它进入卵子的能力。

紫外线照射的一个特殊现象是光重活化反应(photoreactivation),在这反应中,紫外线的效应被强烈的可见光(比如头上的照明灯)所减弱。因此建议在微暗的房间里照射,廉价的紫外光源可以用 15 瓦的灭菌灯,譬如通用电气公司的 G15T8 灯,安放在荧光灯固定架上。紫外线按平方反比律(inverse square law)起作用,即距离越大,完成所要求的效应需要曝光时间越长。

1. 将少量精子悬浮液移到两个培养器里。精子悬浮液应当薄薄地铺在盘底。一个培养皿标上“对照”,另一个标上“实验”。把“对照”培养皿放到旁边去。

2. 将紫外光灯置于桌面上 15 英寸的地方。把未盖盖子的“实验”培养皿放在灯下,使精子悬浮液在灯下照射 15 分钟。偶尔轻轻地旋转精子悬浮液,保证精子受到同等照射的射线。不必要时,不要让你的皮肤暴露在紫外线下,也不要直接看灯。

现在你已作好准备,可以用“对照”和“实验”的精子给卵进行人工授精。

三、排 卵 与 受 精

将蛙的垂体提取物或者捣碎的垂体注射到成熟、健康的雌蛙体内可以引起排卵。垂体激素在室温($20^{\circ}\text{--}24^{\circ}\text{C}$)24—48 小时内,或者 10°C ,4—5 天内引起排卵。已注射的雌蛙在实验室中使用。(从商品供应厂商那里能买到预先注射好的雌蛙,或者当实验室需要卵时,可以注射雌蛙来提供卵。在附录二中说明引导豹蛙排卵的过程)

不必杀死雌蛙来取卵。通过“挤”的方法将卵从输卵管里挤出,在这里研究者模仿雄蛙通常所起的作用。

1. 抓住雌蛙,使其背部对着右手手心,用左手抓住并伸展它的后肢,将右手心放在蛙的背上,手指部分地圈住蛙体,并刚好在前肢的后面,这样手指尖就正好搁在蛙的腹部表面(图 1-2)。

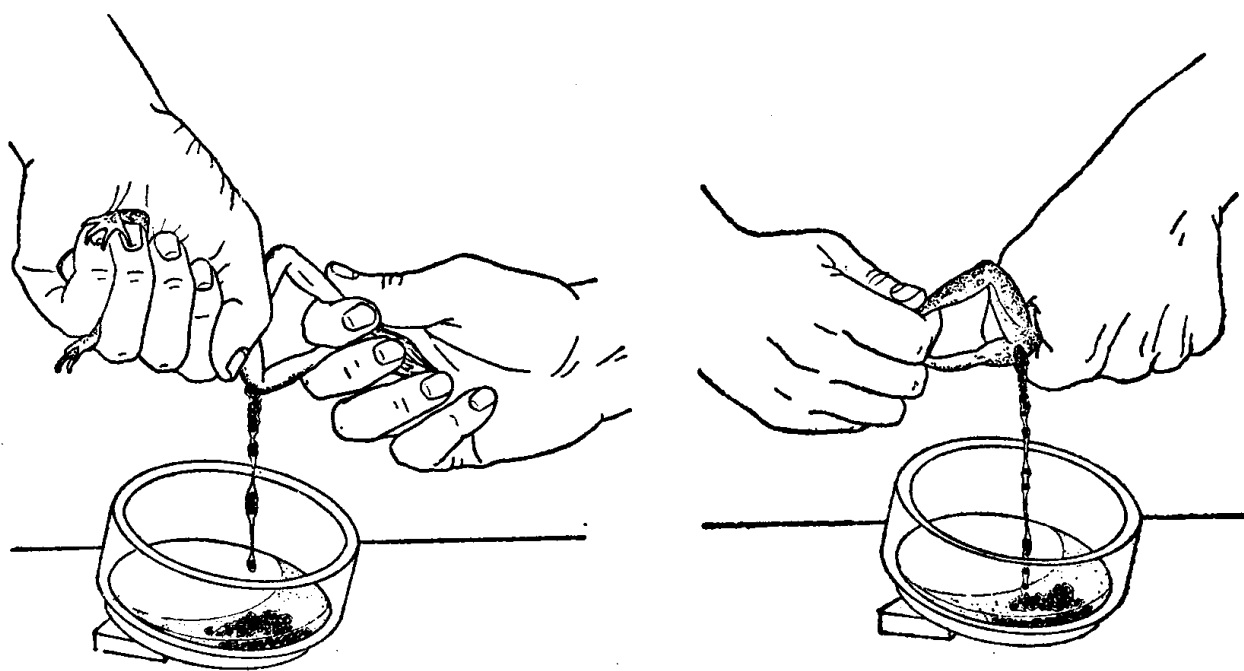


图 1-2 从两个不同角度来表示把蛙卵“挤”到精子悬浮液时握雌蛙的方式

2. 开始给蛙体前部加轻微压力,然后朝泄殖腔方向逐渐捏紧手,这样就可迫使卵从泄殖腔排出。最初,在软纸上面挤压雌蛙,直到挤出几个卵为止。这时通常会流出泄殖腔液。扔掉最初从输卵管排出的卵,擦干泄殖腔区。然后,挤出 100 个或更多的卵到未照射的和照射了的精子悬浮液的培养皿中。挤卵时,在培养皿上慢慢地挤,并移动雌蛙以便产生几条卵带,而不是一堆卵。为了保证卵都能得到精子,用干净滴管吸入精子悬浮液喷在卵上。观察卵的黑色素区(动物极)和乳白色区(植物极)的定位。

3. 卵在精子悬浮液中保持 15 分钟。15 分钟以后,倒出精子悬浮液,并倒入泉水(或 10% Ringer 溶液)浸没卵。

注:成熟的雌蛙约产 2,000 个卵。“挤”过卵的蛙可在 4°C 下保存,每天能产生有生活力的卵子,大约连续产四天。当从 4°C 冰箱取出时,应在室温下等待半小时,使温度达到平衡。

4. 受精后,卵和卵黄膜*(vitelline membrane)之间出现间隙(卵周隙 perivitelline space),卵在间隙里慢慢地自由转动。重力使得含有较重卵黄的植物半球转向下面。在受精后不久第一次卵裂出现之前,在动物极和植物极之间的交界处,卵的一侧出现浅色新月形区。称为“灰色新月”(gray crescent)(图 1-3),观察此区域比较困难。稍微浅的灰色新月区是由于卵内色素移动而形成的,新月的位置与精子穿入道有关。当色素颗粒移向精子穿入道,灰色新月则出现在精子进入点的对侧。胚胎学家最早观察到的一点就是,灰色新月确定了蛙卵的两侧对称性(右边和左边)。蛙卵分裂的第一个平面,大多数通过新月的中间。这样,第一次分裂就将卵分为左右相等的两半。

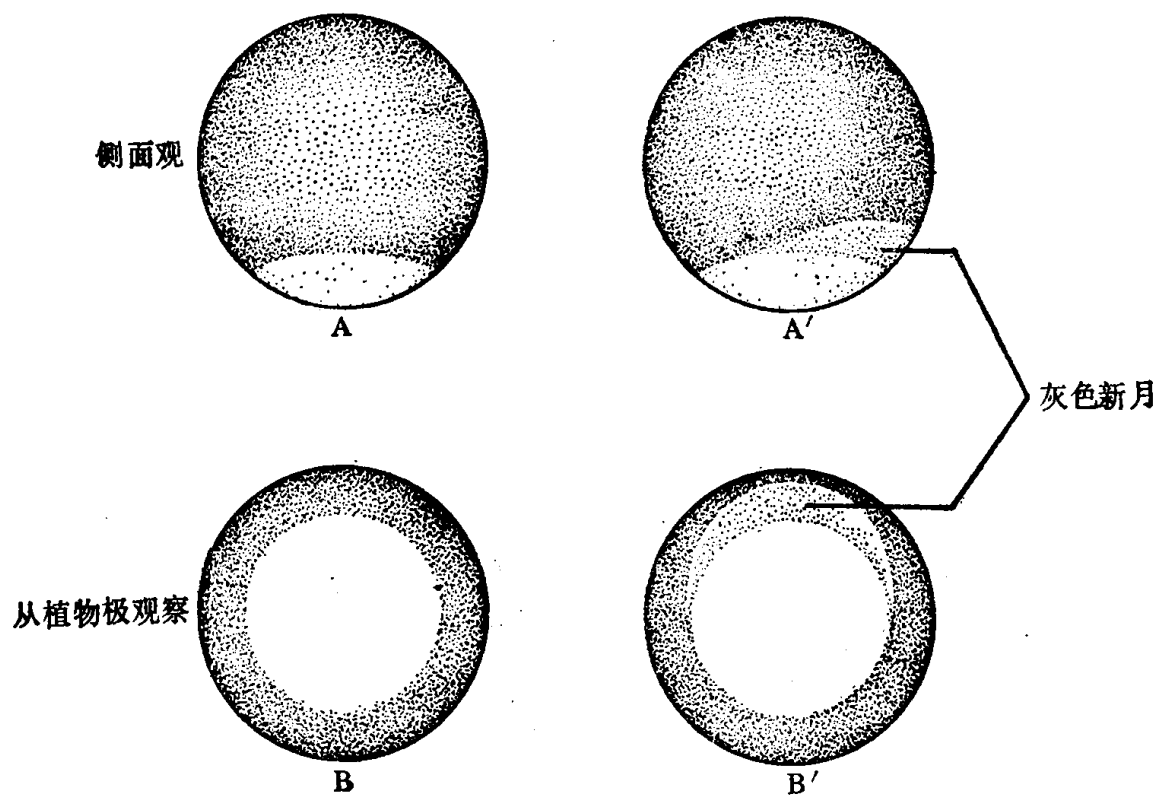


图 1-3 蛙卵灰色新月的形成。A 和 B 示未受精卵; A' 和 B' 示受精不久后的卵

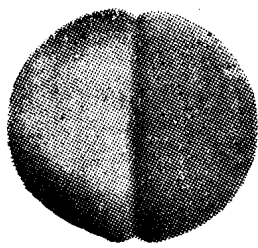
5. 原来浓密粘稠的胶膜现在吸收水分膨胀到原厚度的几倍。这个厚胶膜是由两、三个同心层组成,它保护卵子免受机械损伤。受精后约一小时胶膜膨胀得最大。

胶膜一般粘到玻璃培养皿的底部。用干净解剖刀或小铲将胶膜与玻璃分离,然后将卵块从底部轻轻漂起。用锋利的剪刀将卵块剪成含有 5—10 个卵的小团。由于具有胶膜的卵能防止机械损伤,因而几乎不可能剪坏一个卵,因此在剪时不必踌躇或过分小心。

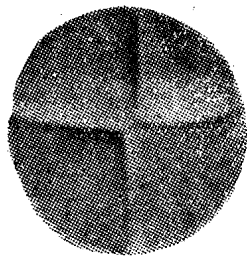
6. 用镊子夹起小卵块,放到含泉水(或 10% Ringer 溶液)的几个小碗里(直径 4 英寸)。每 500 毫升溶液里放 25—35 个卵,这样发育得最好。用一个玻璃盘盖住小碗可减少蒸发。在整个胚胎发育过程中不需要换溶液。在室温(20°—24°C)下,第一次卵裂在受精后 2—3 小时内出现。第一

* 卵黄膜 此处和后面所提卵黄膜实际即受精膜——译者注。

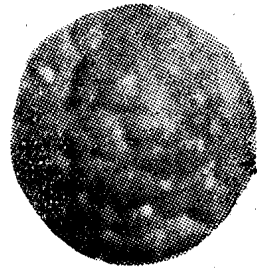
次卵裂沟从动物极开始,并向植物极进展,将卵分裂成两个等同的分裂球(blastomere)(图1-4)。以后的卵裂将卵分割成数目很多的小分裂球。发育胚胎的其它特征将在后面提及。



第一次卵裂



第二次卵裂



卵裂晚期

图 1-4 蛙胚的卵裂早期

四、胚胎发育的外部特征

把对照组(二倍体)和实验组的卵(单性生殖激活卵)放到各种调温箱里,调至不同温度,那么就可以在不同时间得到各种发育时期的胚胎。豹蛙的卵可以在低至 6°C ,高至 28°C 的温度内发育。然而,为了最适于发育,温度应限制在 12°C — 26°C 范围内。

1. 重复参考图1-5和表1-1将有助于鉴定发育的各个时期。各期的编号最初是由Waldo Shumway在1940年定的。在一星期内作好经常观察的计划,以便看到胚胎形态的连续变化。

发育过程按一系列有规律的顺序一期接一期地进行。受精卵的分裂或卵裂(cleavage)导致囊胚(blastula)期(8—9期)。后面接着是原肠形成(gastrulation)(10—12期)。原肠形成是细胞运动的复杂过程,它完成了三个胚层的分离[外胚层(ectoderm)、内胚层(endoderm)和中胚层(mesoderm)]。原肠胚(gastrula)以后的伸长与神经褶(neural fold)和神经管(neural tube)的形成有关[即神经胚期(neurula)的发育过程,13—16期]。各种外突、内陷、加厚及其它变化使得身体各种器官建立起来。

内部结构的发育过程在下一个实验学习,这里只讲发育时期的外部变化。

2. 蛙的卵裂属于完全卵裂(holoblastic),因为尽管含有相当大量的卵黄,但整个卵都分裂。注意,第一次卵裂是经裂(垂直分裂);第二次也是经裂,但是与第一次相互垂直。第三次是不均等的纬裂(赤道面以上),分割出四个较小的在上方的动物半球细胞,和四个较大的植物半球细胞。

在最初几次分裂以后,卵裂开始不规则。也就是说植物半球的细胞比动物半球的细胞有丝分裂慢,动物半球细胞卵黄较少。所以,植物极的多卵黄的细胞比动物极的细胞大。

3. 当原肠形成时注意外部变化。主要特点是动物半球细胞围绕着植物半球细胞过度生长(即外包)。原肠形成的运动最初的标志是在囊胚一边,赤道下面出现新月形沟或凹陷(10期)。此凹陷本身称为胚孔(blastopore),它的边缘就是胚孔背唇(dorsal lip of the blastopore)(图1-6)。胚孔两端不断向周围延伸直到它们相遇,胚孔的形状经过连续的变化——四分之一新月形(10期)、半月形(11期)和满月形(12期)。在12期仅看到小块植物极细胞,剩下可见的卵黄

区称卵黄栓(yolk plug)。环形的胚孔将很快封闭——也就是窄到仅呈一可见的缝(13期)。

4. 当神经胚形成时胚体延长,神经褶在14期显著地隆起(图1-6)。在尾芽期(17期),胚胎可以容易地脱离它周围的胶膜和卵黄膜。用两把细镊子夹住卵黄膜把它剥开,但不要损伤胚胎。留下一些胚胎在膜内,这样可以确定什么时候自然孵出。

逐渐熟悉胚胎尾芽期的一些重要标志(图1-7)。在前端明显的是吸盘(oral sucker)(或粘液腺),呈“V”形沟,具有显著的唇(图1-6)。吸盘的唇之间可见一凹陷称口窝(stomodaeum)或口道。在头的两侧有明显的嗅窝(olfactory pit)和眼泡(optic bulge)。鳃板(gill plate)已被横

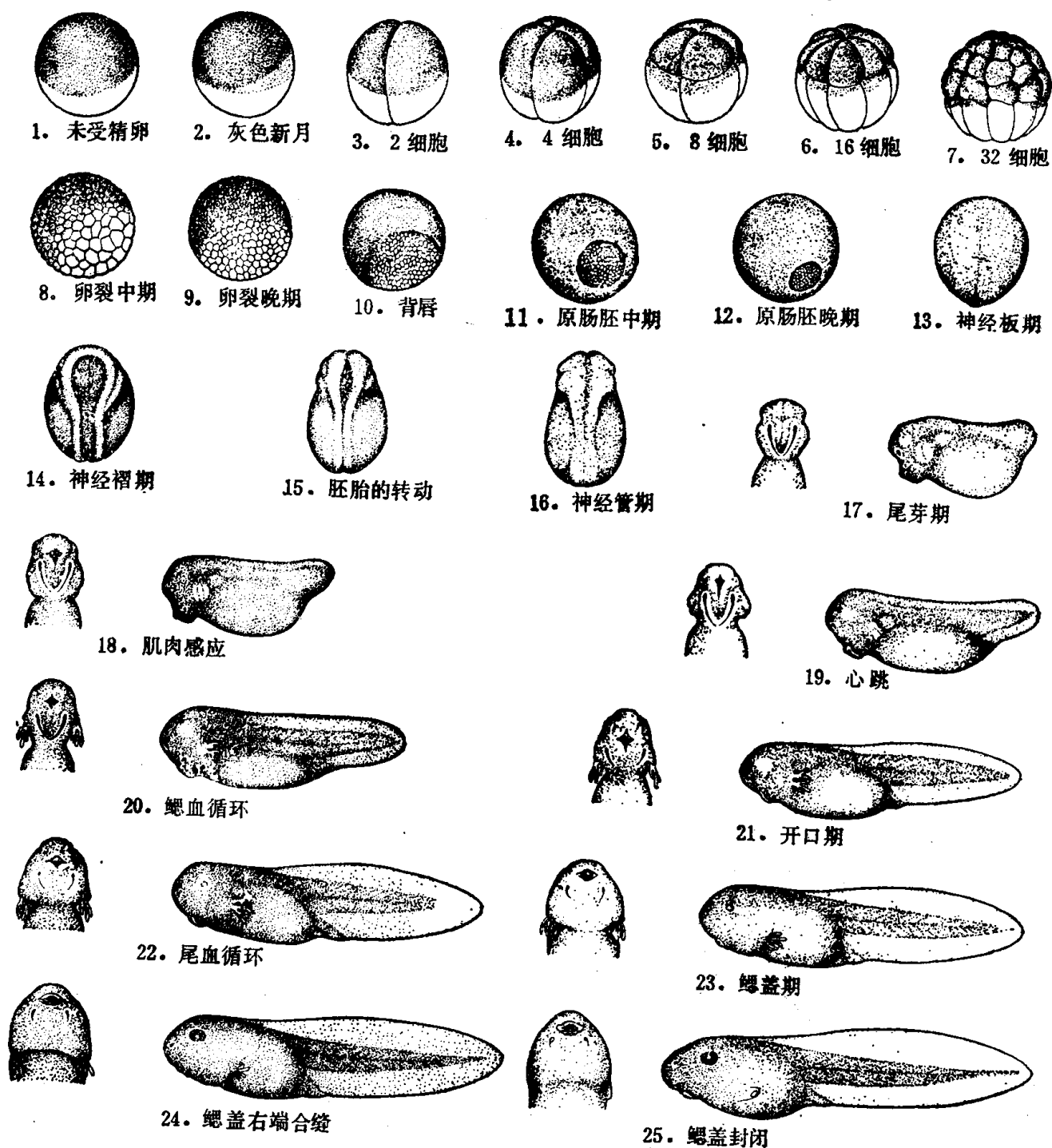


图 1-5 豹蛙 (*Rana pipiens*) 胚胎发育的正常时期,根据 Waldo Shumway 的顺序

表 1-1 蛙 的 胚 胎 发 育

时 期*	形 态 描 述	胚 龄 (小时)	
		18°C	25°C
1	未受精卵	0	0
2	灰色新月	1	0.5
3	2 细胞	3.5	2.5
4	4 细胞	4.5	3.5
5	8 细胞	5.5	4.5
6	16 细胞	6.5	5.5
7	32 细胞	7.5	6.5
8	卵裂中期	16	11
9	卵裂晚期	21	14
10	背 唇	26	17
11	原肠胚中期	34	20
12	原肠胚晚期	42	32
13	神经板期	50	40
14	神经褶期	62	48
15	胚胎的转动	67	52
16	神经管期	72	56
17	尾芽期	84	66
18	肌肉感应	96	76
19	心 跳	118	96
20	鳃血循环	140	120
21	开口期	162	138
22	尾血循环	192	156
23	鳃盖期	216	180
24	鳃盖右端合缝	240	210
25	鳃盖封闭	284	240

* 各时期的编号按 Shumway (1940)。

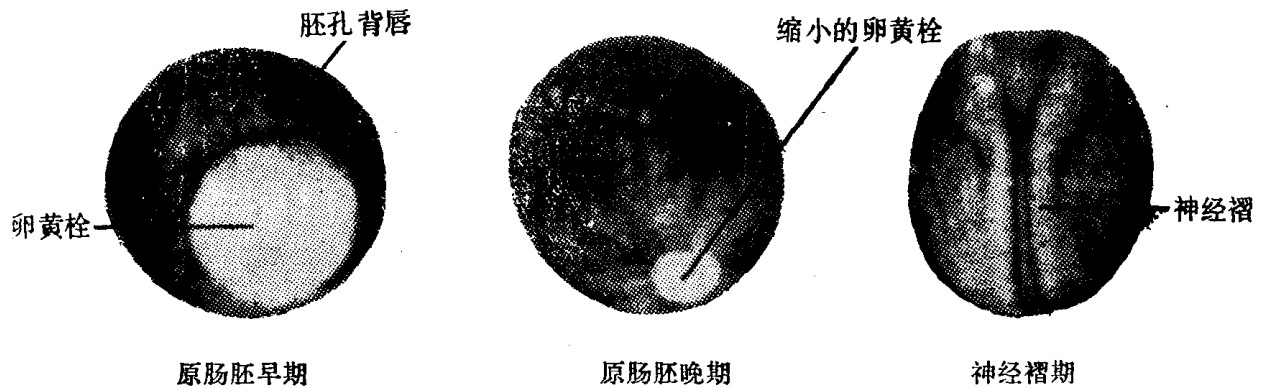


图 1-6 蛙胚的原肠形成和神经胚形成时的几个期

沟分为三条,即第一、第二和第三鳃弓 (visceral arch)。鳃板之后,侧面的膨大区标志着前肾 (pronephros),或早期蝌蚪肾的位置。身体后端长出尾芽 (tail bud)。注意胚胎在胶膜内不停地旋转;身体表面有纤毛。

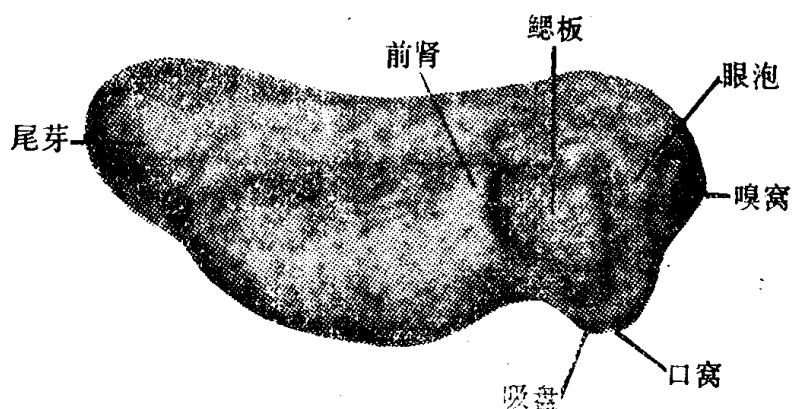


图 1-7 “尾芽”期蛙胚(17期)的特征

5. 19 期胚胎,用明亮的光源仔细聚焦于“V”形吸盘后方的腹面,试观察心脏跳动。20 期胚胎的外鳃,观察血液循环。外鳃在鳃弓上发生鳃丝。胚胎发育后期,尾部分化为背鳍和腹鳍,生肌节(myotome)(或肌节)看得很清楚。在尾的基部,胚孔封闭处为肛窝(proctodaeum),也很明显。

胚胎发育结束时期(21—25 期)形成口,并长出几排角质齿。当外鳃被吸收,且被内鳃取代时,可见鳃盖(operculum)的发育。此等膜褶(在两侧)从鳃弓向后生长,并与躯干融合,仅在左侧留下一个小孔,此即喷水孔(spiracle)。水从口进入,通过鳃室,经喷水孔排出体外。两侧鳃盖的封闭(25 期)标志着胚胎时期完成。

五、单倍体蛙胚的发育

比较单倍体(单性生殖激活的卵)胚胎和对照组(二倍体)胚胎,并仔细观察和描述它们的任何差别(见Pogany, 1971;1973)。

如果希望确定一下单倍体胚胎里染色体的数目。用 22—23 期胚胎尾尖的压片,可以得到分



图 1-8 胚胎尾部细胞,乙酰地衣红压片,示单倍体($N=13$)和二倍体($2N=26$)有丝分裂相

裂中期染色体的精确数目。图 1-8 示单倍体($N=13$)和二倍体($2N=26$)分裂中期的构型。

1. 将 22 或 23 期胚胎浸入 1:3,000 的间氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐(ethyl m-aminobenzoate methane sulfonate)的溶液里,直到不动为止。用刀片或解剖刀切下胚胎尾端的三分之一。以医用滴管将尾尖移到干净的载玻片上。

2. 除去尾尖周围的溶液,并加蒸馏水浸 2—10 分钟。加低渗的蒸馏水的目的是为了使细胞核膨胀,并使染色体解螺旋。

3. 吸去蒸馏水,滴一大滴 2% 乙酰地衣红(aceto-orcein)溶液。并在组织上迅速盖干净的盖玻片,避免染料形成结晶。

4. 5 分钟后,在盖玻片上放一块软纸,用大拇指使劲压盖玻片。用小刷子将融化的甘油胶封住盖玻片的边缘。也可以用非树脂的粘合剂封闭盖玻片的四周,制成半永久性的标本。观察分裂中期染色体的显微结构。

5. 制片存于 $2^{\circ}\text{--}4^{\circ}\text{C}$ 冰箱里。标本可维持几天,事实上,染色效果随时间而改进。

进一步研究的建议

Rugh(1934,1935,1937)为最早明确地证明蛙的排卵是受垂体分泌激素调节的研究者之一。Rugh对成熟雌蛙进行人工刺激的排卵技术,在附录二中说明了其主要特点。1939年,Heilbrunn和他的同事把豹蛙一个完整的卵巢悬浮于碾碎的垂体所浸泡的 Ringer 溶液里,成功地引导了体外排卵。接着其他人也完成了这一工作,但是直到 Wright(1945)才做了详细的分析。你们可以从他的论文中发现甚有指导意义又有趣味的描述。重复他的实验所需的材料是很少的,并将获得简单而又有趣的发现(为了了解更近代的工作,参阅 Schuetz 1971 的论文)。

对于人工引导排卵的知识和染色体分析方法,可重复 Witschi 和 Laguens(1963)所完成的简短研究来取得。这两位学者发现蛙排卵时,如果卵在体腔里停留时间超过正常允许期限(4 或 5 天)就会退化变质,也就是说,卵变成“年老的”或“过熟的”。“年老的”卵可以受精,但发育不正常。用细胞压片的方法来确定染色体时(与本实验里已熟悉的技术进行比较),可以看到大多数畸形的胚胎,其染色体数目不正常。因此,除非蛙胚有整套染色体,否则不能正常发育。而且卵的过熟与染色体数目不正常有联系。

实验胚胎学家和发生遗传学家对两栖类染色体数目变化的影响有很大兴趣。Fankhauser(1945)、Briggs和King(1959)的广泛评述可以阅读。也许你想重复 Briggs(1947)关于在胚胎里诱导三倍体从而获得三整套染色体的实验。豹蛙的卵成熟时处于第二次减数分裂中期等待受精。精子入卵刺激它完成第二次减数分裂,结果放出第二极体。然而假如第二极体保留在受精卵中,产生的胚胎在组成上将是三倍体。胚胎将会含有精原核染色体组、卵原核染色体组和正常进入第二极体的染色体组。Briggs 证明了利用高温(热刺激)抑制第二次减数分裂,可以保留下第二极体。

Hamburger(1960)和 Rugh(1962)阐述了完全不用精子,蛙卵单性生殖的激活技术。这些实验在技术上不困难,如果希望与照射精子所得结果进行比较,可作更多的人工单性生殖实验,将发现 Shaver(1953)和 Fraser(1971)的工作很有价值。