

金鱼单尾鳍形成的研究

III. 聚乙二醇和紫外线对尾鳍发育的影响*

蔡 难 儿

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于1984—1985年应用PEG(聚乙二醇)浸泡不同发育时期的金鱼卵子,运用UV(紫外线)辐射卵子植物性半球卵质,进行尾鳍发育实验。结果表明,两种处理方法均可以导致双尾鳍金鱼变成单尾鳍鱼。在5%—18%PEG溶液中浸泡96h,单尾鳍形成率为16%—83.3%;UV辐射10—20min,单尾形成率为40%—66.7%。作者认为,是PEG和UV影响卵子中某些细胞质而诱导金鱼产生单尾鳍的。为此,可以提出一个假说,即金鱼卵子中存着一种调控物质,这种物质一旦被损伤、切除,便导致单尾鳍的形成。此种物质位于植物性半球之中,它随着胚胎的发育而流向胚盘。实验表明,性状的表达为细胞质所控制。

关键词 金鱼 尾鳍发育 细胞质作用

在前二篇文章(蔡难儿,1989a,b)中,作者已报道过切割卵质和注射外源信息核糖核酸(mRNA)均能引起遗传上金鱼的双尾鳍变成单尾鳍,并指出金鱼卵子中可能有一种负有调控双尾鳍形成的“调节因子”存在。有这种“因子”存在,具有双尾鳍基因的金鱼能正常地发育成双尾鳍鱼;倘若卵子中缺少这种“因子”或受到影响、损伤,在遗传上的双尾鳍鱼便形成单尾鳍。

本文报告了应用PEG(聚乙二醇)处理和UV(紫外线)辐射不同发育时期的金鱼胚胎的观察结果。

1 材料与方 法

于1984—1985年以经过多代选育的金鱼(*Carassius auratus*)——红龙睛和黑龙睛所产的卵子进行实验,分二部分进行。

1.1 试验液的配制和处理方法

选用分子量为1000的PEG作为实验处理药剂。用冷开水配制成7个梯度浓度(5%—30%)的PEG,然后选用早期卵裂阶段的胚胎,浸泡在其中,处理时间达96h。处理后移至冷开水中培养,4d后,在解剖镜下观察其尾鳍的变化,并统计单尾鳍的形成率。

用早期卵裂阶段的胚胎为材料,以10%PEG为固定浓度,浸泡不同时间(5个时程

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1708号。

自选课题。金鱼单尾鳍形成的研究 I, II 先后发表于本刊1989年第5, 6两期。

收稿日期: 1990年3月13日;接受日期: 1992年11月1日。

组)。培养 4d 后,观察单尾鳍出现频率。

取 5 个时期的胚胎——1-细胞、囊胚、下包 1/2、下包结束和视泡形成期作为实验材料。每个发育期分别置于 7.5% 和 10% 两个浓度的 PEG 中,浸泡 4d, 然后统计单尾鳍出现率。

1.2 紫外线灯的选择和照射方法 应用 220V, 15W 的“U”形紫外线灯管,波长 370nm 左右作为处理光源。照距为 12—14cm, 卵子离水表面在 0.5cm。

将人工授精的卵子,用镊子剥去卵膜,然后将卵子置于用有机玻璃板制作的小穴中,在解剖镜下把卵子需要照射的面定好位,并进行照射。

1.2.1 前后轴植物性半球卵质辐射 以卵子第一次分裂面的前后方向作为前后轴; 卵子侧面放,以第一次分裂面与板面垂直,用薄铁片将动物性半球胚盘掩盖住,只照射植物性半球一侧卵质(见图 1a)。不同发育时期胚胎照射不同时间。

1.2.2 左右轴植物性半球卵质辐射 以卵子第一次分裂面的二侧作为左右轴; 卵子侧面放置,以第一次分裂面与板面平行作为照射面。将胚盘掩盖,照射植物性半球一侧卵质(图 1b)。不同时期照射不同时间。

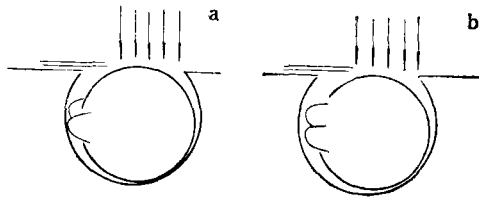


图 1 UV 辐射卵子植物性半球卵子的示意图
Fig. 1 Sketch map of irradiating the vegetal cytoplasm of the egg in *Carassius auratus* with UV

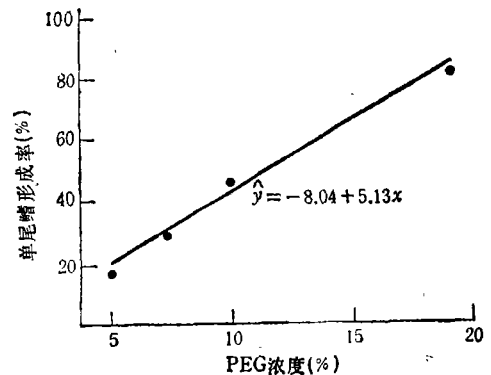


图 2 不同浓度 PEG 中单尾鳍的形成率
Fig. 2 Formative rate of single caudal fin in *Carassius auratus* in different concentration of PEG solution

2 实验结果

2.1 PEG 对卵子作用的单尾鳍效应

2.1.1 不同浓度对尾鳍发育的影响 结果表明, PEG 能使遗传上双尾鳍金鱼变成单尾鳍, 而且这种尾鳍的变化都是标准型的单尾, 没有一条单尾鱼在尾鳍上附有一小片鳍膜。5% 浓度的 PEG, 便可以引起单尾鳍的形成; 10% 的浓度, 单尾鳍出现频率可达到 46.6%; 18% 的浓度, 出现频率可高达 83.3% (图 2)。而浓度高到 20% 以上, 很容易导致不正常的发育, 直至最后死亡。在一定浓度范围内, 浓度与单尾率互有相关, 其关系式为 $\hat{y} = -8.04 + 5.13x$ 。

实验中所有的对照组所用的卵子数量, 最少 85 个, 最多 628 个。从这些卵长出的小鱼, 均未观察到有单尾鳍的出现。

2.1.2 浸泡不同时间对尾鳍发育的影响 结果表明,浸泡 6—22h 的实验中,均不能导致单尾鳍的形成,而浸泡时间延至 96h 的,单尾鳍的形成率可达到 46.6% (表 1)。对照组(每组最少 300 个卵子以上),只养在冷开水中,都没有发现有单尾鳍的形成。实验表明,在一定时间范围内,浸泡时间的长短与单尾鳍的形成率有密切的关系。

表 1 浸泡不同时间对尾鳍发育的影响

Tab. 1 Effect of immersing the egg in PEG solution with different duration on the development of caudal fin in *Carassius auratus*

PEG 浓度(%)	浸泡时间(h)	实验数	存活数	单尾数	双尾数
10	6.0	35	12	0	12(100) ¹⁾
10	9.5	15	8	0	8(100)
10	12.0	15	9	0	9(100)
10	22.0	15	8	0	8(100)
10	96.0	137	75	35(46.6)	40(52.4)

1) 括号内数字为百分数。

2.1.3 作用于不同阶段胚胎对尾鳍变化的影响 结果表明,不论在 7.5%, 还是在 10% 的 PEG 浓度中,在下包结束之前的各个发育时期,都能导致单尾鳍的形成,而且越早期,单尾形成率也越高(图 3)。两个浓度比较,以 10% PEG 处理导致单尾鳍形成率比起 7.5% 的要略高一些。

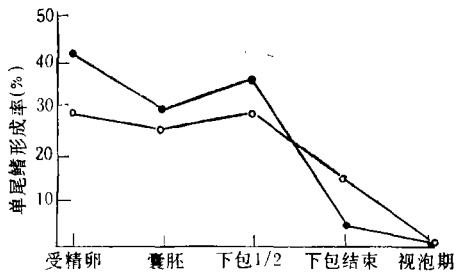


图 3 PEG 对不同时期胚胎尾鳍发育的影响

Fig. 3 Effect of PEG on the development of caudal fin treated at different stage of embryo in *Carassius auratus*

对照组(每组 200 个卵子以上),都没有单尾出现。

2.2 UV 辐射卵质的单尾鳍效应

2.2.1 辐射前后轴植物性半球卵质 结果表明,照射植物性半球卵质,可以使双尾变成单尾(表 2)。在 8-细胞以前照射,单尾形成率都在 40% 以上;4-细胞期,延长照射时间,还能提高单尾形成率;而 16-细胞期的照射,竟然没有一条单尾出现。对照组单尾

鳍出现率只有 1.9% 左右,与实验组相比,有显著性的差异。这表明,植物性半球卵质中某些物质受到辐射损伤,导致了单尾的形成。可以推论,这种物质是可以流动的,8-细胞以前位于植物性半球;到 16-细胞期,逐渐流向胚盘,以致即使加大辐射剂量,也不受影响。这里应该指出,辐射时间继续延长,卵质会受到更大的破坏,会导致不正常的发育,出现畸形胚。上述现象说明,卵子中那种物质可能是控制双尾鳍形成的物质(称为“调节因子”)。

表 2 UV 辐射卵子前后轴植物性半球卵质的单尾鳍发育效应

Tab. 2 Effect of UV irradiating the vegetal cytoplasm along the antero-posterior axis of the egg on the development of single caudal fin in *Carassius auratus*

辐射时间(s)		5—10			15—20	
辐射时期		2-细胞	4-细胞	8-细胞	4-细胞	16-细胞
卵子数		29	18	19	15	9
尾鳍形成数		28	15	14	4	7
实验组	单尾(尾) (%)	16 57.1	6 40.0	7 50.0	4 100.0	0 0
	双尾(尾) (%)	12 42.9	9 60.0	7 50.0	0 0	7 100.0
对照组	单尾(尾) (%)	3 1.9	3 1.9	3 1.9	4 3.7	2 1.7
	双尾(尾) (%)	155 98.1	155 98.1	155 98.1	103 96.3	116 98.3

表 3 UV 辐射卵子左右轴植物性半球卵质的单尾鳍发育效应

Tab. 3 Effect of UV irradiating the vegetal cytoplasm along the left-right axis of the egg on the development of single caudal fin in *Carassius auratus*

辐射时间(s)		10	15—20		
辐射时期		2-细胞	4-细胞	8-细胞	16-细胞
卵子数		14	16	29	18
尾鳍形成数		12	6	19	8
实验组	单尾(尾) (%)	8 66.7	4 66.7	2 10.5	1 12.5
	双尾(尾) (%)	4 33.3	2 33.3	17 89.5	7 87.5
对照组	单尾(尾) (%)	3 1.9	2 1.7	2 1.7	2 1.7
	双尾(尾) (%)	155 98.1	116 98.3	116 98.3	116 98.3

2.2.2 辐射左右轴植物性半球卵质 结果表明, 照射左右轴一侧卵质, 也能导致单尾鳍的形成(表 3)。4-细胞期以前的辐射, 60% 以上能形成单尾; 可是 8-细胞以后, 单尾形成率显著下降, 降至 10% 左右。这同上面的实验结果是一致的, 这进一步表明控制双尾鳍形成的物质先在植物性半球之中, 随着胚胎的发育逐渐流向胚盘, 控制双尾鳍基因的表述。如果在 8-细胞以前这种物质未进入胚盘而遭到破坏, 那么卵子就不能形成双尾鱼, 而只能形成单尾鱼。

3 讨论与小结

3.1 PEG 诱导单尾鳍形成的作用性质 PEG 作为细胞融合剂被应用之后,引起了人们极大的关注,对其作用性质,作了广泛的探讨。目前普遍认为,它富有粘性,起着细胞之间粘合的作用,使细胞膜彼此紧密地接触。除此之外,尚未见到它影响细胞核而导致基因结构或基因表达改变的报道。

那么,PEG 诱导双尾鱼变成单尾鱼的作用机理是什么呢?这里有两种可能的解释:第一,它可能通过改变胚胎细胞表面性质,而影响尾鳍原基细胞的运动,进而导致形态发育的变异,呈拟表型现象。第二,也并不排除对卵质中某些物质(前二文已提及的,调控双尾鳍形成的物质产生影响从而导致单尾鳍的形成)的影响。究竟哪一种解释更恰合于实际,有待进一步研究。

3.2 UV 辐射的作用性质 UV 的作用,显然只涉及细胞质本身,因实验设计是保护细胞核不受辐射。这里应该指出,UV 辐射卵质,能引起各种畸形胚的出现(作者未发表资料)。由于本文只涉及单尾鳍形成,所以只择其这方面资料列于本文之中。

从实验结果可以看到,在相同的照射时间内,卵子在 2-细胞期或 4-细胞期,较容易产生单尾;而 8-细胞或 16-细胞期,形成的单尾就较少。这里用照射后细胞表面特性的改变的上述观点是解释不了的。只能有一种可能的分析,即 UV 辐射机理是影响或破坏了卵细胞质中某些物质(控制双尾鳍形成的物质)所致。4-细胞期以前,这种物质在植物性半球之中,易受到 UV 损伤,故较易形成单尾;而当胚胎发育到 8-或 16-细胞时,此种物质已流向胚盘之中没受到照射的影响,所以此种物质继续发挥调控作用,产生了双尾鳍鱼。

总之,双尾鳍金鱼变成单尾的研究,已发表了数篇文章。所采用的手段尽管各不相同,但结果是一致的——都能形成单尾。为此,我们提出一个设想。

3.3 假设 Oppenheimer (1936b) 和童第周等(1945,1951)曾研究过鱼类卵子的发育能力,他们指出:鱼类卵子有某种存在于植物性半球内的形态建成物质,有此种物质,胚胎方能形成。这是细胞质控制基因活动的一个很好例证。Davidson (1976) 也指出,卵质内的物质存在着异质性,其中有许多决定子作用于基因组,调控特定基因的表达。蔡难儿等以及 Davidson 等(1985,1976,1985,1987)的实验表明,卵子中异质性物质是呈区域性分布的,故不同区域会分化成不同的组织或器官。

借鉴于上述的观点,并依据我们在金鱼的一系列研究结果,可以提出一个假说:金鱼卵细胞质中有一种负有控制双尾鳍形成的物质(或称“调节因子”)存在。此种物质受到损伤、影响或被切除,双尾鳍便不能形成,而只能形成单尾鳍。此种物质位于植物性半球之中,发育到 8—16-细胞期,基本上已流进胚盘。本实验是给这个假说从另一侧面提供一个例证。而且这个假说可以进一步说明,基因性状的表达是受细胞质所控制的。

参 考 文 献

- 童第周等,1951,鱼类早期发育的研究,山东大学学报,1(1): 40—51。
童第周、牛满江,1973,核酸诱导金鱼性状的变异,中国科学,4: 389—394。
童第周、牛满江,1977,鲤鱼卵信息核糖核酸对金鱼尾鳍变异的作用,中国科学,2: 146—148。
蔡难儿、吴贤汉、吴尚勳,1985,文昌鱼原肌球蛋白在卵球成熟过程中的出现,实验生物学报,18: 361—367。
蔡难儿,1989,金鱼单尾鳍形成的研究 I.卵质对尾鳍发育的影响,海洋与湖沼,20(5): 453—459。

蔡难儿等, 1989, 金鱼单尾鳍形成的研究 II. 胚胎发育过程中外源信息核糖核酸的作用, 海洋与湖沼, 20(6): 496—501。

Davidson, E. H., 1976, *Gene Activity in Early Development*, Academic Press, New York, pp. 245—318.

Maruyama, Y. K., Kakaseke, Y. and Yagi, S., 1985, Localization of cytoplasmic determinants responsible for primary mesenchyme formation and gastrulation in the unfertilized egg of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*, *J. Exp. Zool.*, 236: 155—163.

Nishikata, T. et al., 1987, Muscle cell differentiation in ascidian embryos analyzed with a tissue-specific monoclonal antibody, *Development*, 99: 163—171.

Oppenheimer, J. M., 1936b, Processes of localization in developing fundulus, *J. Exp. Zool.*, 73: 405—444.

Tung, T. C., Chang, C. Y. and Tung, Y. F. Y., 1945, Experiments on the developmental potencies of blastoderm and fragments of teleostean eggs separated latitudinally, *Pro. Zool. Soc. Lon.*, 115: 175—189.

STUDIES ON THE FORMATION OF SINGLE CAUDAL FIN IN THE GOLDFISH, *CARASSIUS AURATUS*

III. THE EFFECT OF POLYETHYLENEGLYCOL AND ULTRAVIOLET RAYS ON THE DEVELOPMENT OF CAUDAL FIN*

Cai Nan'er

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)

ABSTRACT

In 1984—1985 to induced the formation of a single (instead of the double) fin in this gold fish was achieved by immersing different embryo stage eggs in PEG (polyethyleneglycol) solution or by irradiating the cytoplasm along the plane of the vegetal pole with UV (ultraviolet rays). The formation rate of the single caudal fin goldfish was 16%—83.3% in 96 h by immersion in 5%—18% PEG solution and was 40%—66.7% in 10—20 min by UV irradiation. If the eggs at different embryo stages after the gastrula stage were immersed in PEG solution, they could not develop into single caudal fin goldfish. Only a few single fin fish resulted from UV irradiation after 16-cell stage.

It is supposed that PEG and UV affect the cytoplasm but not the nucleus or the properties of the egg's surface. The result of the present and previous works suggest the hypothesis that some regulatory substance controlling the double caudal fin formation exists in the cytoplasm of the vegetal yolk sac area. If it was destroyed by chemical or physical treatment or moved by cutting the egg cytoplasm, the eggs would develop into single caudal fin fish.

Key words Goldfish *Carassius auratus* Caudal fin development Cytoplasm affect

* Contribution No. 1708 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.