

中华条颈龟胚胎发育的形态学观察

杨志兵¹ 杨佩佩¹ 贺斌² 傅丽容¹ 史海涛^{1*} 魏朝军¹ 陈美玲¹

(1. 海南师范大学生命科学院, 海南海口 571158; 2. 浙江大学动物科学学院, 浙江杭州 310058)

摘要 [目的]研究中华条颈龟(*Mauremys sinensis*)胚胎发育过程中外部形态的变化。[方法]在恒温(29±0.5)℃相对湿度为85%~90%、基质湿度为5%~10%的孵化条件下,连续解剖观察了中华条颈龟胚胎发育的过程。对胚胎发育各期主要形态学特征进行了详细描述,并配以周详的图片比较各期的典型特征。[结果]中华条颈龟的孵化期为53.00±1.77 d,根据其胚胎的日龄、大小和形态特征的变化将整个的胚胎发育分成了23期,其中9~23期主要以四肢、背甲、腹甲、头部、尾部等的变化为分期依据,同时,对龟鳖类胚胎发育分期的标准进行了讨论。[结论]结果有利于龟鳖类胚胎发育分期的标准化。

关键词 中华条颈龟; 胚胎发育; 分期

中图分类号 Q959.6+3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2011)33-20501-05

Observation on the Morphology of Embryonic Development of Chinese Striped-neck Turtle, *Mauremys sinensis*

YANG Zhi-bing et al (College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou, Hainan 571158)

Abstract [Objective] The aim was to observe the morphological changes of embryonic development of *M. sinensis*. [Methods] Embryonic development process of *M. sinensis* were observed based on serial dissection, under the condition of constant temperature(29±0.5)℃, relative humidity 85%~90%, 5%~10% of matrix humidity, and the major morphological characters of every stage were described in detail with amply photos respectively. [Results] The incubation period of *M. sinensis* were 53.00±1.77 d, according to the embryo daily age, size, and morphological characters, the period of embryonic development was divided into twenty-three stages, hereinto, stages 9 to 23 were affirmed mainly by the shape changes of limbs, carapace, plastron, head and tail; meanwhile, staging criteria of embryonic development of chelonians was discussed here. [Conclusion] The results were beneficial to the standardization of morphological development of *M. sinensis*.

Key words *Mauremys sinensis*; Embryo development; Stages

胚胎发育是动物生活史中的一个重要环节,是新生命的起点,也是生物学家最感兴趣的研究领域之一。对动物不同发育阶段的胚胎进行分期,并制定出发育表,有利于教学和科研^[1]。早在1857年Agassiz^[2]等就开展了对爬行动物胚胎发育的研究。随后的一个多世纪里国外有许多胚胎学家涉足龟鳖类胚胎发育的研究,如Mtsukun^[3]、Yntema^[4]、Mahmoud^[5]、Kaska等^[6]、Tokita等^[7]与Greenbaum^[8]等。在国内相关的研究起步较晚,如刘筠^[9]、侯陵^[10]、孙西寨等^[11]对中华鳖(*Trionyx Sinensis*),刘国安等^[12]、谭立军等^[13]、石岳香^[14]对乌龟(*Chinemys Reevesii*)及赵伟华等^[15]对黄喉拟水龟(*Mauremys mutica*)的胚胎发育的研究和报道。

中华条颈龟(*Mauremys sinensis*)又名中华花龟、草龟或斑龟,隶属于龟鳖目(Testudinate)淡水龟科(Emydidae),拟水龟属(*Mauremys*)。由于过度猎捕和栖息环境被破坏等原因,导致其种群数量急剧下降,被列为濒危物种^[16]。笔者对其胚胎发育过程中形态学特征进行了详细描述,以期为其繁育和保护提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试中华条颈龟卵购于海南省文昌顺利农渔科技公司。

1.2 孵化方法 将产于同一天的受精卵编上编号,置于智能生化培养箱(型号HWS-250,宁波海曙赛福实验仪器厂)中进行孵化。孵化基质为蛭石,含水量为5%~10%,孵化温度控制在(29±0.5)℃,相对湿度控制在85%~90%。

1.3 胚胎处理方法 从孵化第1天开始每次取5枚受精卵

用眼科手术剪沿白斑区边缘划破并剪开,取出胚胎。使用游标卡尺(精度为0.01 mm)测量卵长短径及胚胎背甲长宽等;使用电子分析天平(精度为0.001 g)测量卵重及胚胎重。胚胎数据测量完后用数码相机(SONY DSC-T900)拍照,并将其固定保存于bouin氏液中,24 h后将胚胎取出再进行拍照纪录,拍照完成后将其移入到75%乙醇溶液中固定保存。

2 结果与分析

2.1 中华条颈龟胚胎发育的主要特征 根据胚胎发育的主要形态学特征,将中华条颈龟胚胎发育过程分为23个期:

第1期(孵化1 d):卵壳中部出现圆形白色受精斑,胚盘呈椭圆形,胚孔新月型,体节2对;

第2期(孵化2 d):胚体发生明显变化,呈扁平状,胚体前羊膜区发达,头褶凸起,胚体前神经管膨大,体节6对;

第3期(孵化3 d):视泡出现,脑曲产生,胚体扭转,体节8对;

第4期(孵化4 d):胚体增长显著,头部进一步弯曲且膨胀,显示出头突增高的结节状,视泡突出于前脑腔,胚体弯曲,体节14对;

第5期(孵化5 d):颈曲明显,端脑腔可辨,卵黄囊血管区出现,体节18对;

第6期(孵化6 d):眼点微黑,尾芽出现,体节25对;

第7期(孵化7 d):尾朝腹侧弯曲,尿囊泡开始出现,肢芽原基发生,尾芽伸长,体节29对;

第8期(孵化8 d):头、躯干开始膨胀,背曲出现,背面观胚体前部开始向右侧扭转,尾芽增加,胚体部分体节退化;

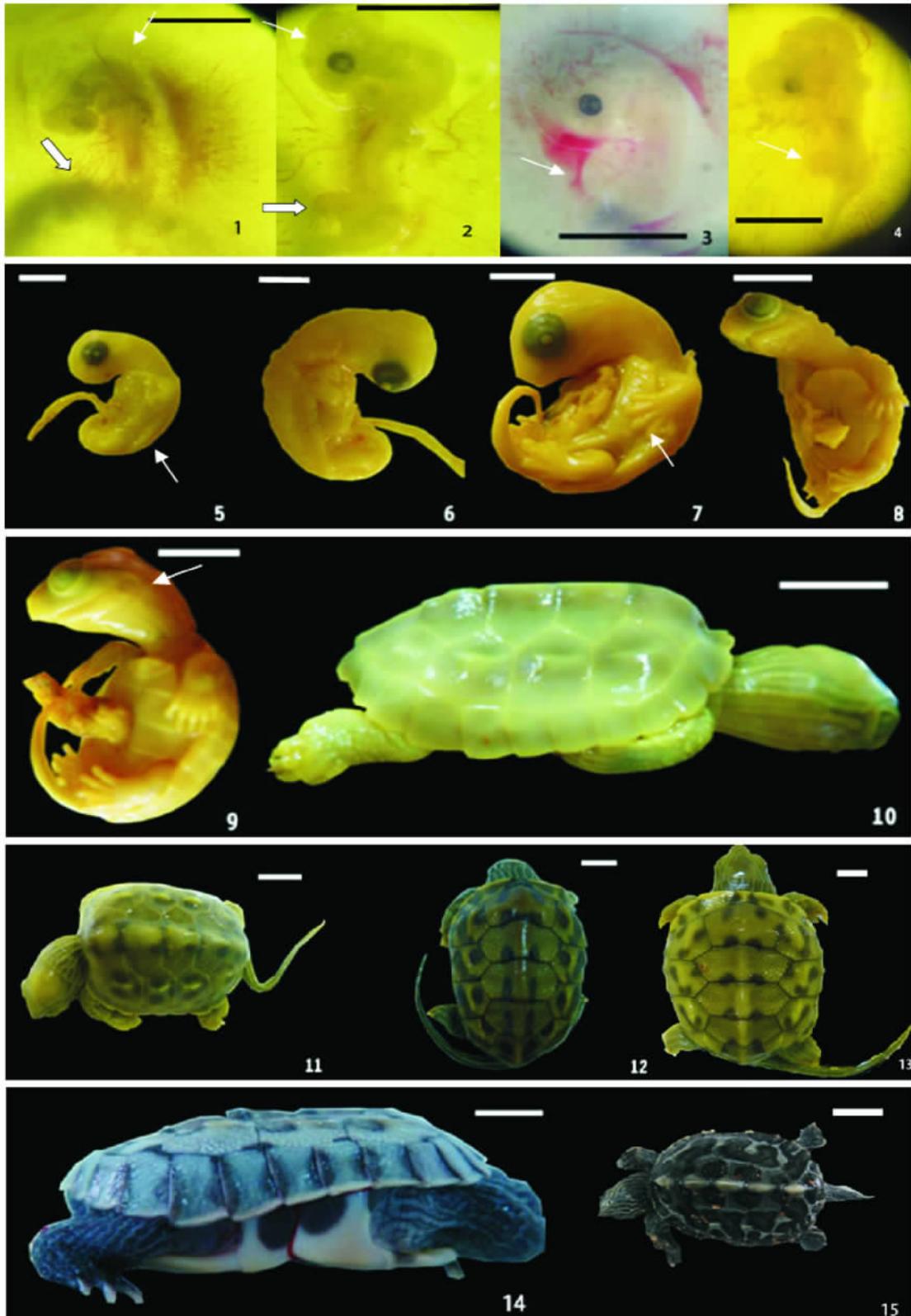
第9期(孵化9 d;图1-1):胚体前部膨大明显,除头部外胚体呈长线形,可见心跳,胚体四周有血丝包围,胚体紧贴着卵壳壁,脊索已经形成,成红色的丝状,上颌突发生,背曲增加,尾曲出现,尿囊肉眼可见,位于后肢芽前基,微凸于胚外体腔;

第10期(孵化11 d;图1-2):整个胚体膨胀,向右侧扭转

基金项目 海南省自然科学基金资助项目(310040);海南省教育厅资助项目(Hjkj2010-24);国际地区重大合作项目(30910103916)。

作者简介 杨志兵(1989-)男,湖北孝感人,本科生,专业:生物科学。* 通讯作者,教授,博士,博士生导师,从事动物生态学研究工作, E-mail: haitao-shi @ 263.net。

收稿日期 2011-08-17



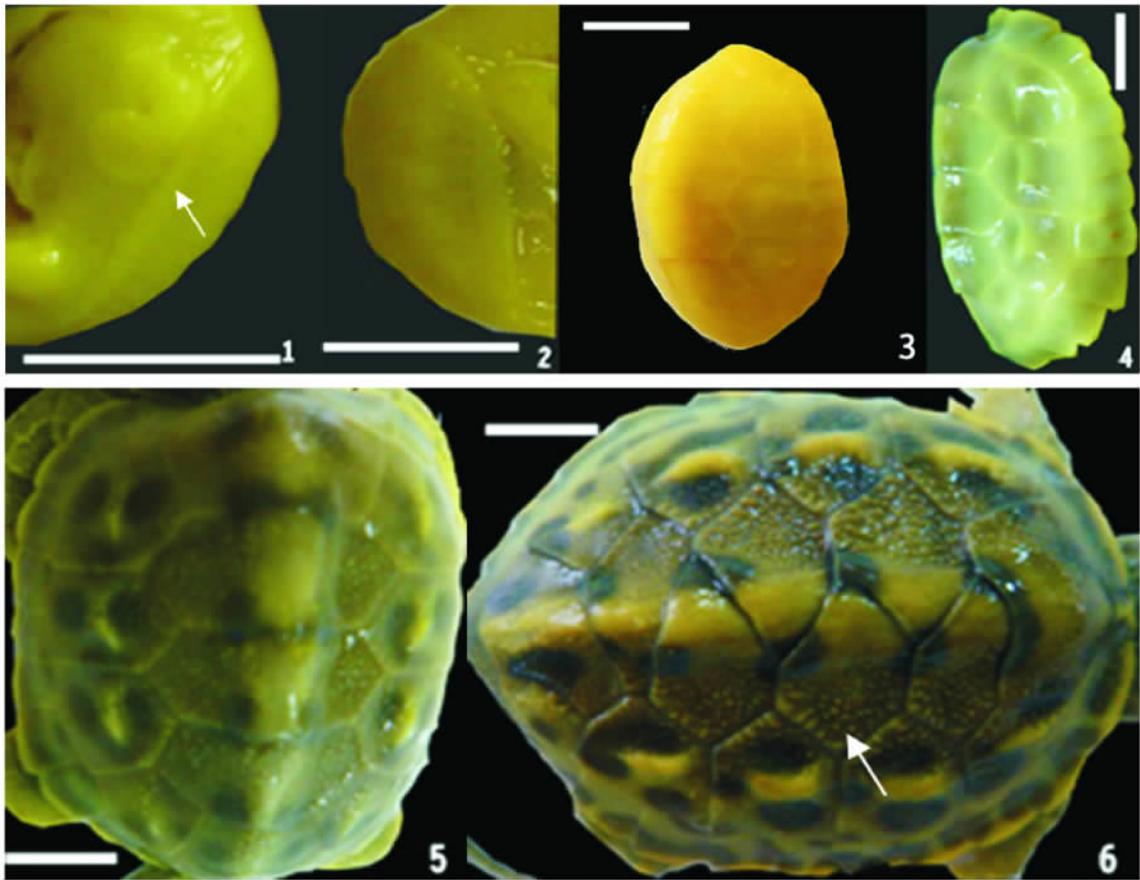
注: 1. 孵化 9 d 示背曲(↑)和尿囊(⇨); 2. 孵化 11 d 示枕骨突起(↑)和尿囊(⇨); 3. 孵化 13 d 示尿囊(↑); 4. 孵化 14 d 示尿囊(↑); 5. 孵化 17 d 示背甲(↑); 6 孵化 19 d; 7 孵化 21 d 示指板(↑); 8 孵化 23 d; 9 孵化 25 d 示鼓膜(↑); 10 孵化 27 d; 11 孵化 31 d; 12 孵化 35 d; 13 孵化 40 d; 14 孵化 46 d; 15 孵化 53 d; 比例尺: 5 mm。

Note: 1. Incubation 9 d dorsiflexion(↑) and allantois(⇨); 2. Incubation 11 d occipital bone protuberance(↑) and allantois(⇨); 3. Incubation 13 d , allantois(↑); 4. Incubation 14 d allantois(↑); 5. Incubation 17 d carapace(↑); 6 Incubation 19 d; 7. Incubation 21 d fingerboard(↑); 8. Incubation 23 d; 9. Incubation 25 d tympanic membrane(↑); 10. Incubation 27 d; 11. Incubation 31 d; 12 Incubation 35 d; 13. Incubation 40 d; 14. Incubation 46 d; 15. Incubation 53 d; proportional scale: 5 mm.

图 1 中华条颈龟胚胎侧部特写(第 9~23 期)

Fig. 1 Lateral features of embryo of *M. sinensis*(stages 9 -23)

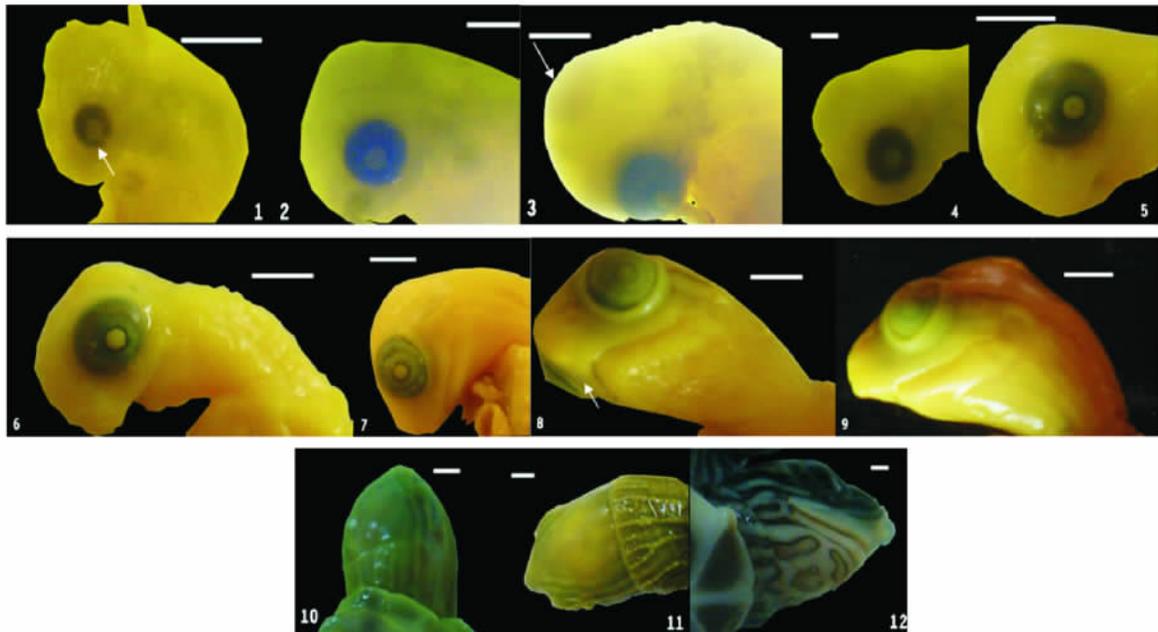
明显, 胚体透明, 可以看见心脏搏动。胚内外血管充满血液, 眼有少量色素沉积(图 3-4)。尾增长, 尾曲增加(图 4-1), 尿
肢芽伸长不明显。枕骨突起清晰可见, 并且高于前额突起, 囊增大, 可见内部有血管分布;



注: 1. 孵化 17 d 示初现的背甲“裙边”(↑); 2. 孵化 19 d; 3. 孵化 23 d; 4. 孵化 31 d 示背棱(↑); 5. 孵化 35 d; 6. 孵化 37 d 示疣粒(↑); 比例尺: 5 mm。
 Note: 1. Incubation 17 d first appearance of “Turtle Rim” of carapace(↑); 2. Incubation 19 d; 3. Incubation 23 d; 4. Incubation 31 d dorsal ribs(↑); 5. Incubation 35 d; 6. Incubation 37 d wart grain(↑); proportional scale: 5 mm.

图 2 中华条颈龟胚胎背甲特写(第 13、14、16、19、20、21 期)

Fig. 2 Carapace features of embryo of *M. sinensis* (stages 13 14 16 19 20 21)



注: 1. 孵化 11 d 示眼部色素(↑); 2. 孵化 13 d; 3. 孵化 14 d; 4. 孵化 17 d 示发育凸起(↑); 5. 孵化 19 d; 6. 孵化 21 d; 7. 孵化 23 d; 8. 孵化 25 d 示上颌(↑); 9. 孵化 27 d; 10. 孵化 31 d; 11. 孵化 35 d; 12. 孵化 42 d; 比例尺: 1 mm。
 Note: 1. Incubation 11 d eye pigment(↑); 2. Incubation 13 d; 3. Incubation 14 d; 4. Incubation 17 d development embossment(↑); 5. Incubation 19 d; 6. Incubation 21 d; 7. Incubation 23 d; 8. Incubation 25 d maxillary(↑); 9. Incubation 27 d; 10. Incubation 31 d; 11. Incubation 35 d; 12. Incubation 42 d; proportional scale: 1 mm.

图 3 中华条颈龟胚胎头部特写(第 10 ~ 21 期)

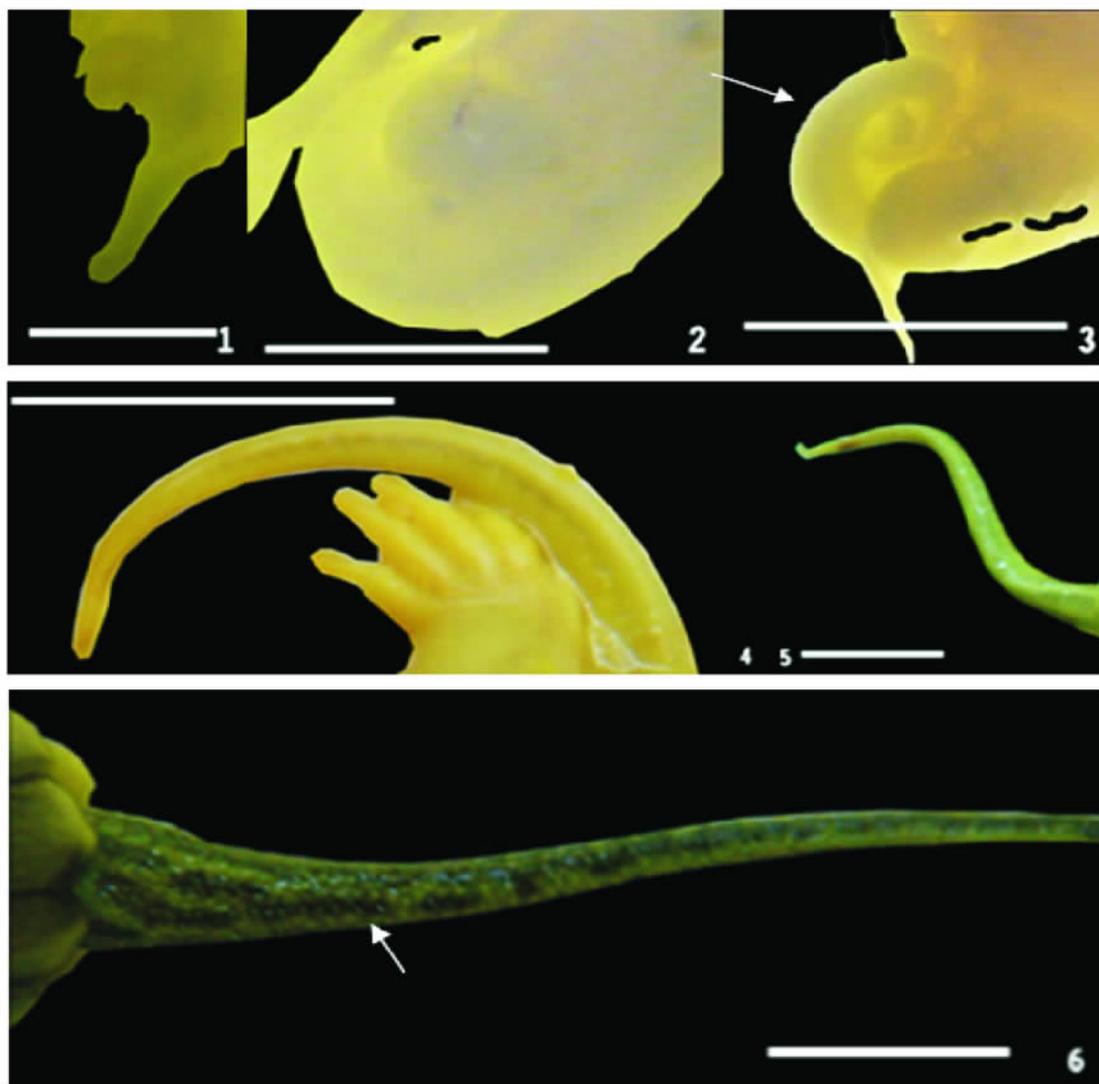
Fig. 3 Head features of embryo of *M. sinensis* (stages 10 ~ 21)

第11期(孵化13 d;图1-3):出现头膨胀变大,眼区扩大,眼点色素增加(图3-2),整个胚体弯曲,头几乎贴着尾,成“C”状侧卧于卵黄之上。长短径相差无几,周围的血管收缩至几乎不见,胚体同蛋壳的黏着度降低,可沿蛋壳移动,尿囊膨胀呈气囊状,尾弯曲后可以接触到尾基部(图4-2);

第12期(孵化14 d;图1-4):下颌突发生,颈部相对变细(图3-3)。胚体卵黄囊血管区毛细血管丰富,肢芽突触明显可见,尾明显变长,可自由移动(图4-3),胚胎脐带出发的一层膜整个包裹着胚胎,尿囊较第11期略有缩小。刺激会发

生反应,说明它神经系统开始发育能对外界刺激做出反应;

第13期(孵化17 d;图1-5):胚体显著增大,上颌形成,下颌明显,眼球膨胀,吻突形成,后脑发育明显并凸起(图3-4),体宽与头宽相当。背甲已经出现,背甲长占整个胚体纵轴长的1/3,肋盾痕迹模糊,“裙边”初现(图2-1),前肢弯曲明显,指板可辨,前肢指板伸长,并且前肢开始向腹面弯曲,边缘呈锯齿状,后肢膝曲形成,趾板明显。尾部卷曲成圈,泄殖突突出增大,尿囊缩小几乎不现,胚体解剖后发现胚胎的内脏器官已经初步形成;



注:1.孵化11 d;2.孵化13 d;3.孵化15 d 示尾部变长卷曲(↑);4.孵化27 d;5.孵化31 d;6.孵化42 d 示色素沉积(↑);比例尺:5 mm。
Note: 1. Incubation 11 d; 2. Incubation 13 d; 3. Incubation 15 d elongate and curly tail(↑); 4. Incubation 27 d; 5. Incubation 31 d; 6. Incubation 42 d pigment deposition(↑); proportional scale: 5 mm.

图4 中华条颈龟胚胎尾部特写(第10、11、12、18、19、21期)

Fig. 4 Tail features of embryo of *M. sinensis* (stages 10, 11, 12, 18, 19, 21)

第14期(孵化19 d;图1-6):胚体透明,眼球突出明显(图3-5),背甲柔软透明,前部比后部宽,并且变宽变厚(图2-2)。后肢未弯曲。体宽开始大于头宽,弯曲的程度更大。尾巴细长卷曲,基部可见泄殖突突出泄殖腔;

第15期(孵化21 d;图1-7):胚体脖子成型,吻突明显,下颌短于上颌(图3-6)。“裙边”明显,覆盖到四肢的基部。前肢指板出现明显的指沟,后肢指板前端扁而薄,基部比前肢粗,尾增长显著,基部泄殖突突出增加;

第16期(孵化23 d;图1-8):背甲变宽加厚,肋盾分界清

晰,肋盾、缘盾界限模糊,背甲正中可见肋骨,侧面消失(图2-3)。腹甲形成,甲桥可见,腹甲盾片分界模糊。上下颌裂口明显,但还没有分开(图3-7)。前肢五指分开,后肢四趾以三沟分界,指(趾)间以蹼相连。已经无法观察到心跳,接触身体各部位有反应;

第17期(孵化25 d;图1-9):上下颌裂口分开,上颌突出明显,嘴能开闭,出现鼓膜(图3-8),内盾有较模糊的棱,腹甲盾片分界明显,背甲盾片清晰可数,边缘呈锯齿状,脊棱突出,颜色较浅,背甲盾片后缘有色素沉积。尾基部至中间有

色素沉积,四肢可以活动,前后肢有零星的疣粒出现(鳞片的锥形),出现爪的雏形,外部刺激反应敏捷;

第 18 期(孵化 27 d;图 1-10):上下眼睑出现,吻端延长,颈上出现较模糊的条纹(图 3-9),背甲色素沉积增多,前肢外缘鳞片较清晰,前后肢已经出现爪并出现黑色沉积,爪以白色鞘包在指(趾)前端,尾部纵纹色素增多,尾上出现较模糊鳞片(图 4-4);

第 19 期(孵化 31 d;图 1-11):眼睑进一步扩大,几乎盖过眼球,颈部变短变宽,头颈分界明显(图 3-10),背甲变长变宽,缘盾着色较浅,背甲其余盾片色素沉积加重(图 2-4),整个前后肢鳞片变明显,尾部较第 18 期明显增长,覆盖的鳞片也变更清晰(图 4-5),泄殖突出达最大值,整个胚体透明度降低并有骨化现象,形成肋骨、脊椎骨;

第 20 期(孵化 35 d;图 1-12):颈部缩至壳内,颈部条纹清晰(图 3-11),缘盾缺刻进一步明显(图 2-5),腹甲出现黑色斑状,四肢进一步分化,后肢已形成条纹,泄殖突缩回泄殖腔,胚胎大小几乎占整个卵的 1/2,尾增长更加明显,进一步骨酪化,整个胚体色素沉积加深,背甲色素沉积成灰黑色,肋盾上两条侧棱略显,龟体雏形完全呈现;

第 21 期(孵化 37 ~ 42 d;图 1-13):卵壳已经变软,背甲

上有白点出现,位于侧棱两侧,有疣粒(图 2-6)。四肢可缩入壳内,头可缩至眼处,眼睑可以闭合(图 3-12)。卵黄大小未及胚胎大小的 1/2,雏龟宽度几乎与卵宽度一致,长度与卵长度一致。爪上色素沉淀,放在培养皿里面可以爬行,尾巴有细小的鳞片覆盖(图 4-6),外部形态已经具备种的特征;

第 22 期(孵化 46 ~ 48 d;图 1-14):羊水变成淡黄色的粘稠的带状。四肢及头部可缩至壳内,头伸缩自如,四肢较前次解剖时有力,龟嘴中可以发出嘶嘶声,泄殖腔可自发舒张,一段时间后泄殖腔出现液体。仅存少量卵黄未被吸收;

第 23 期(孵化 50 ~ 53 d;图 1-15):破壳与出壳。受精卵卵壳普遍龟裂变软、变脆,个别甚至有部分钙质层脱落。透过卵壳,可见受精卵底部略呈黄色,为未被吸收的卵黄囊。稚龟用头或者前肢将卵顶破,稚龟在大气中的呼吸循环正式开始,绝大多数幼龟已将卵黄全部吸入体内并在腹甲正中留下一个脐孔。刚出壳的雏龟体表湿露,体色暗黑,“裙边”卷曲。3 ~ 4 h 后“裙边”自行展开,3 ~ 4 d 后脐孔闭合。

2.2 中华条颈龟与黄喉拟水龟、乌龟胚胎分期比较 以相同外部形态特征出现为依据,比较了中华条颈龟与黄喉拟水龟^[15]、乌龟^[13]胚胎发育分期(中后期)。从表 1 中可以看出不同的研究者针对不同的物种以及不同的试验条件使得胚

表 1 中华条颈龟、黄喉拟水龟和乌龟胚胎发育分期(中后期)的比较

Table 1 The comparison of equivalent stages (middle and later periods) of embryonic development among *Mauremys sinensis*, *Mauremys sinensis* and *Chinemys reevesii*

	胚胎发育分期											孵化温度
	Stages of embryonic development											Incubation temperature//°C
黄喉拟水龟 <i>M. mutica</i>	9	10 ~ 11	12 ~ 13	15	16	17	18	19	20	21	22	29 ± 0.5
中华条颈龟 <i>M. sinensis</i>	9	10	11	13	14	15	16	17	18 ~ 20	21	22 ~ 23	29 ± 0.5
乌龟 <i>C. reevesii</i>	10 ~ 11	12	13	16	17	18	19	20	21 ~ 23	24 ~ 26	27 ~ 28	32 ± 0.5

胎发育分期的期数有明显差异。

3 结论与讨论

关于龟鳖类胚胎发育分期的研究报道较多,分期期数也不尽相同。从已有文献来看,龟鳖类胚胎发育时期的确定主要有 2 种:一种分期较多(27、28 或 31 期)^[4,13,17],另一种分期较少(22 或 23 期)^[5,15]。同时,通过比较前人的研究发现,在发育早期,不同龟鳖类的相同器官出现时序并无明显差异,而在胚胎发育的中后期,差异越来越大。这说明龟鳖类早期胚胎发育的相似性较高,中后期才体现出物种间的差别^[8]。华田苗等^[18]对扬子鳄的研究中发现在鳄类中也有类似的现象。

导致龟鳖类胚胎发育分期期数不尽相同的原因主要在 2 方面。①不同研究者所采取的分期标准不同。如在 Yntema^[4]的研究中,侧重于以孵化温度和胚胎日龄为分期标准;而 Mahmoud^[5]和石岳香^[14]的研究则侧重于形态特征的变化;Crastz^[17]选择胚胎日龄和形态特征作为分期标准;谭立军等^[13]的研究侧重于孵化温度和形态特征;赵伟华等^[15]的研究则选择了孵化温度、胚胎日龄、胚胎大小和形态特征作为分期标准。②种间的差异和试验条件的不同。如笔者与赵伟华等^[15]的研究所采取的分期标准一致,但最后的分期期数却不相同(表 1),因为不同的物种胚胎及胚胎器官的尺寸都存在差异,且在不同的试验条件下,胚胎的发育速度等都有可能不同,这些都会导致分期期数的差异。

针对上述问题,Greenbaum^[8]认为在胚胎发育过程中可

以选择易于跟踪观察又相对较保守的形态特征作为分期标准,如前肢。这样就可以不用考虑种间差异、孵化温湿度以及其他一些影响胚胎发育的因素。华田苗等^[18]对扬子鳄的研究中发现晚期胚胎虽然外观基本相似,但某些器官的组织分化程度存在较大差异。也就是说虽然胚胎发育到后期外部形态的改变较小,但其组织结构却发生着较大的变化。所以,晚期胚胎的分期在注意形态特征的同时,可以引用较多的组织学指标来使分期更加科学准确,有利于龟鳖类胚胎发育分期的标准化。

参考文献

- [1] 孙昭. 胚胎发育的分期及发育表[J]. 四川解剖学杂志, 1995, 3(2): 125.
- [2] AGZSSIZ L. Embryology of the turtle Contributions to the natural history of the United States of America: Part3 [M]. Boston: Little, Brown and Co., 1857.
- [3] MTSUKUN K. On the process of gastrulation in Chelonia[J]. Fac Sci Tokyo Univ, 1894, 6: 227 - 277.
- [4] YNTEMA C. A series of stages in the embryonic development of Chelydra serpentina [J]. Journal of Morphology, 1968, 125: 219 - 251.
- [5] MAHMOUD I, HESS C, KLUCKA J. Normal embryonic stages of the western painted turtle *Chrysemys picta bellii* [J]. Journal of Morphology, 1973, 141: 269 - 280.
- [6] KASKA Y, DOWNE R. Embryological development of sea turtles (Chelonia mydas, Caretta caretta) in the Mediterranean [J]. Zoology in the Middle East, 1999, 19: 55 - 69.
- [7] TOKITA M, KURATANI S. Normal embryonic stages of the Chinese soft-shelled turtle pelodiscus sinensis (Trionychidae) [J]. Zool Sci. (Tokyo), 2001, 18: 705 - 715.

(下转第 20573 页)

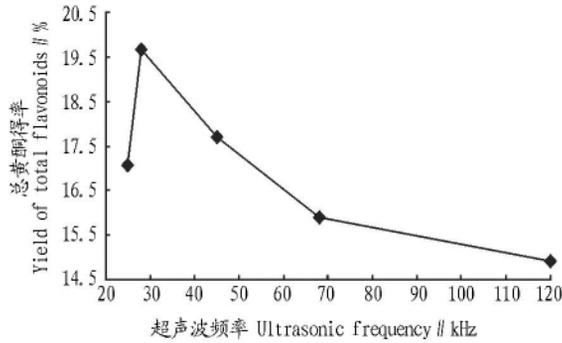


图4 超声波频率对蜂胶总黄酮提取得率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic frequency on extraction yield of flavonoids from propolis

表2 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of orthogonal experiment

试验号 Experimental No.	因素 Factors				总黄酮得率 Yield of total flavonoids // %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	16.22
2	1	2	2	2	18.82
3	1	3	3	3	16.51
4	2	1	2	3	18.67
5	2	2	3	1	15.70
6	2	3	1	2	16.37
7	3	1	3	2	17.34
8	3	2	1	3	17.76
9	3	3	2	1	14.30
K_1	51.55	52.22	50.35	46.22	
K_2	50.74	52.28	51.79	52.54	
K_3	49.40	47.18	49.56	52.93	
R	2.15	5.10	2.23	6.72	

2.3 最佳工艺验证 在料液比1:9 g/ml,乙醇浓度80% 超声波处理12 min,超声波频率45 kHz的条件下,测得蜂胶总黄酮的提取率高达20.25%,表明验证结果与正交试验结果一致,但最佳工艺条件与单因素试验的最佳条件有些不同,可能是各因素间相互作用的结果。

3 结论及讨论

试验确定了蜂胶总黄酮提取的最佳工艺条件为:料液比1:9g/ml,乙醇浓度80%,超声波处理12 min,超声波频率45 kHz,此条件下蜂胶总黄酮的提取得率为20.25%。该结论对于蜂胶总黄酮的提取具有一定的理论指导意义。

试验首次较为系统地研究了超声波频率对蜂胶总黄酮浸提得率的影响,试验结果表明,超声波频率变化对蜂胶提取影响较大,这有利于人们更好地利用超声波进行蜂胶提取。但试验未研究超声波功率对蜂胶提取的影响,考虑超声波功率主要与物料的多少和物料层的厚度关系较大,因试验中所用物料量较少,故未予以考虑。如将试验结果用于生产,还应对超声波功率作更加详细的研究。

参考文献

[1] 房柱. 蜂胶[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 1999: 1-2.
 [2] 王爱霞, 缪晓青. 蜂胶的降血糖作用研究现状[J]. 中国蜂业, 2010, 61(5): 31-33.
 [3] 蒋春红, 吕武清, 胡棠洪. 蜂胶的化学成分和临床研究概况[J]. 实用中西医结合临床, 2011, 11(1): 88-90.
 [4] 潘建国. 试论蜂胶调节血脂的机理与新进展[J]. 蜜蜂杂志, 2004, 24(8): 26-27.
 [5] EMRE S, YILMAZ Z, OZTURK F, et al. Propolis prevents the effects of chronic alcohol intake on ocular tissues[J]. Ophthalmic Research, 2009, 42(3): 147-151.
 [6] MOLLER N P, ROOS N, SCHREZENMEIR J. Lipase inhibitory activity in alcohol extracts of worldwide occurring plants and propolis[J]. Phytotherapy Research, 2009, 23(4): 585-586.
 [7] ASO K, KANNO S I, TADANO T, et al. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2004, 27(5): 727-730.
 [8] JUNG B I, KIM M S, KIM H A, et al. Caffeic acid phenethyl ester, a component of beehive propolis, is a novel selective estrogen receptor modulator[J]. Phytotherapy Research, 2010, 24(2): 295-300.
 [9] 刘元法, 王兴国, 金青哲. 超声波技术提取蜂胶黄酮类功能性物质的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(6): 35-39.
 [10] 邵兴军, 马海燕, 毛日文. 超临界CO₂萃取技术在蜂胶提取加工中的应用进展[J]. 中国蜂业, 2010, 61(10): 8-10.
 [11] 王储炎, 范涛, 吴传华, 等. 蜂胶的研究[J]. 农产品加工·学刊, 2009(1): 16-21.
 [12] 项昭保, 霍丹群, 任绍光. 超声波在中草药化学成分提取中的应用[J]. 自然杂志, 2001, 23(5): 289-291.
 [13] 陈崇炎, 叶静凌, 刘富海, 等. 超声波技术在蜂胶总黄酮提取上的应用研究[J]. 蜜蜂杂志, 2008(5): 7-9.
 [14] 王萍, 张宁, 白智华, 等. 正交设计优选蜂胶总黄酮提取工艺研究[J]. 陕西中医学院学报, 2005, 28(1): 34-35.
 [15] BORYANA T, DORINA T, VASSYA B. Different extraction methods of biologically active components from propolis: A preliminary study[J]. Chemistry Central Journal, 2007, 1(1): 1-13.
 [16] 刘晓琳, 缪晓青. 蜂胶提取技术与应用研究进展[J]. 中国蜂业, 2010, 61(10): 34-37.
 [17] 夏道宗, 励建荣, 陈明之, 等. 蜂胶总黄酮的最佳提取工艺研究[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 153-157.
 [18] 付中民, 郑艳苹, 杨文超, 等. 蜂胶提取工艺的研究[J]. 中国蜂业, 2008, 59(10): 26-29.
 [19] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 20574-2006. 蜂胶中总黄酮含量的测定方法 分光光度比色法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.

(上接第20505页)

[8] GREENBAUM E. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys script* [J]. Canadian Journal of Zoology, 2002, 80: 1350-1370.
 [9] 刘筠. 温度等生态因素对鳖胚胎发育的影响[J]. 湖南师院学报: 自然科学版, 1982(1): 67-73.
 [10] 侯陵. 中华鳖胚胎发育的研究[J]. 湖南师院学报: 自然科学版, 1984(4): 59-70.
 [11] 孙西寨, 朱道玉, 张贵生, 等. 中华鳖胚胎发育初步研究[J]. 菏泽师专学报, 1998, 20(4): 53-54.
 [12] 刘国安, 刘运清, 胡迪光, 等. 乌龟 *Chinemys reevesii* 胚胎发育的初步观察[J]. 动物学研究, 1984, 5(1): 51-56.
 [13] 谭立军, 刘筠, 陈淑群. 乌龟胚胎发育的研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(6): 605-612.
 [14] 石岳香. 乌龟胚胎发育的实验观察[J]. 生物学通报, 2009, 44(2): 11

-14.
 [15] 赵伟华, 朱新平, 魏成清, 等. 黄喉拟水龟胚胎发育的观察[J]. 水生生物学报, 2008, 32(5): 649-656.
 [16] 赵尔宓. 中国濒危动物红皮书——两栖类和爬行类[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 1-3301.
 [17] CRASTZ F. Embryological stages of the Marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz) [J]. Recta Biol Trop, 1982, 30: 113-120.
 [18] 华田苗, 王朝林, 陈壁辉. 扬子鳄胚胎发育分期[J]. 动物学研究, 2004, 25(3): 263-271.
 [19] 胡蓉, 谢玉华, 唐正, 等. 汞镉离子对鲫鱼胚胎发育和仔鱼的毒性效应[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(34): 19446-19448, 19458.
 [20] 姚桂桂, 刘新铁, 谢楠, 等. 杂交鳊抗鲤1号胚胎发育过程的观察[J]. 江西农业学报, 2010(11): 133-135, 138.