

# 中华条颈龟胚胎期性腺分化的组织学观察

傅丽容, 贺 斌, 廖广桥, 颜 莲, 史海涛  
(海南师范大学生命科学学院, 海口 571158)

**摘要:**采用石蜡组织切片和 HE 染色法, 观察了在 29 °C 下中华条颈龟 (*Mauremys sinensis*) 受精卵孵化胚胎期的性腺发育, 并研究了其性别分化的过程。结果发现, 沃尔夫管的发育早于缪勒氏管, 从胚胎发育第 19 天起, 单层缪勒氏管管壁细胞开始分裂增殖, 随着胚胎的发育, 管壁分化出黏膜层、黏膜下层和浆膜层, 发育趋于完整; 沃尔夫管发育停滞, 萎缩退化。在胚胎发育第 19 天, 性腺开始观察到少量卵原细胞和卵巢腔, 分化完成时间为第 25 天, 发育为卵巢。结果表明, 胚胎期第 19~25 天为性别决定的关键时期, 缪勒氏管的发育与卵巢分化具有同步性。

**关键词:**中华条颈龟 (*Mauremys sinensis*); 性别分化; 缪勒氏管; 沃尔夫管; 卵巢

中图分类号: Q954.4; Q959.6\*3

文献标识码: A

文章编号: 0439-8114(2011)17-3591-03

## Gonad Development in the Embryonic Period in the Chinese Striped-neck Turtle, *Mauremys sinensis*

FU Li-rong, HE Bin, LIAO Guang-qiao, YAN Lian, SHI Hai-tao

(College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

**Abstract:** Using the paraffin-embedded sections and HE staining, gonad development and sex differentiation of *Mauremys sinensis* were observed in 29 °C. The results showed that the Wolffian duct developed earlier than the Müllerian duct. The Müllerian duct wall cells proliferated beginning at the 19th day after the gonad development. As the development of the embryo, the mucosa, submucosa and serosa had been generated at the duct wall, and the development of Wolffian duct stopped, and degenerative atrophied. In the 19th day of embryo development, a small number of oogonia and ovarian cavity were observed in gonad, and the development was completed in the 25th day and the ovarian was formed. The results indicated that it was the key period of sex determination from 19th day to 25th day and the development of Müllerian duct was in-phase with ovary differentiation.

**Key words:** *Mauremys sinensis*; sex differentiation; Müllerian duct; Wolffian duct; ovary

性别分化及性腺发育是发育生物学中最为活跃的研究领域之一, 尤其是具有 2 亿年进化史的龟类性别决定更是研究的热点。胚胎性腺的生殖细胞由起源于胚盘上胚层的原始生殖细胞 (Primordial germ cell, PGC) 迁移到生殖嵴, 然后移行至下胚层, 进入血液随血液循环至原始生殖嵴, 并发生增殖和分化而来。生殖细胞随着动物性腺的发育而成为成熟的配子 (精子或卵子)。性别分化过程中性腺与性原细胞相互作用的机制尚不明了, 到底是性腺诱导了 PGC 的迁移还是 PGC 的作用诱导了性腺的发

生, 目前还没有足够的证据。已有的研究表明, 龟类性别决定有两种类型: 一种是遗传依赖型 (Genetic sex determination, GSD), 其性别由遗传物质决定; 另一种为温度依赖型 (Temperature-dependent sex determination, TSD), 其性别由孵化期内的环境温度决定<sup>[1-3]</sup>。对于 TSD 机制物种, 由于缺少性染色体, 其性别分化具体是先出现 PGC 向精原细胞或卵原细胞分化后诱发性腺分化, 还是温度作用使得性腺出现雌雄分化后诱发生殖细胞的特化, 有待研究。

关于龟鳖类性别决定研究较多的是温度与性

收稿日期: 2011-04-10

基金项目: 国际地区重大合作项目 (30910103916); 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)

作者简介: 傅丽容 (1964-), 女, 广东惠州人, 副教授, 主要从事动物繁殖生理方面的研究工作, (电话) 13006040869 (电子信箱) flr@hainnu.edu.cn; 通讯作者: 史海涛, 教授, (电话) 13637592987 (电子信箱) haitao-shi@263.net。

比的关系以及性别调控机制,有关性别分化起始时间及分化过程则研究较少。早期有关中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)<sup>[4]</sup>和乌龟(*Mauremys reevesii*)<sup>[5]</sup>性腺发育的研究主要侧重于雌雄分化已完成的胚后发育。中华条颈龟(*Mauremys sinensis*),又称中华花龟(*Ocadia sinensis*),本研究在29℃下对中华条颈龟的受精卵进行孵化,通过对性腺及生殖管道的组织形态学观察,考察了缺少性染色体的中华条颈龟的性别决定特征及方式,丰富了动物性别分化理论。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用中华条颈龟卵(已受精2~3d)于2009年3月3日购自海南文昌龟鳖养殖场,对受精卵进行测量和编号。

### 1.2 实验方法

中华条颈龟受精卵29℃时孵化期为54d,孵化率较高,25℃时为100d,孵化率较低。本实验设置孵化温度为29℃,用透气的塑料盒装载蛭石(蛭石含水量6%~8%)作为孵化基质,每个孵化盒放置20枚卵,共孵化100枚,放入智能生化培养箱(HWS-250,宁波海曙赛福实验仪器厂)中进行孵化。由培养箱控制温度和湿度,箱内相对湿度为80%~85%,在孵化盒蛭石层2cm处插入水银温度计,以此水银温度计为准控制孵化温度。

在孵化的第9~16天,每天随机取4~5枚卵进行解剖,从第17天开始每隔一天随机取4~5枚卵进行解剖,取出肾脏和性腺组织,用Bouin氏液固定24h后,置于体积分数为70%的酒精中保存。常规石蜡切片(片厚5μm),光学显微镜下观察生殖导管和性腺发育情况并摄片。

## 2 结果与分析

在孵化过程中,死亡胚胎31个,发育良好胚胎69个,依据性腺组织切片进行性别鉴定,全部个体均为雌性。

### 2.1 中华条颈龟胚胎期生殖导管的组织形态变化

中华条颈龟的受精卵在孵化第9~19天时,缪勒氏管原基紧贴着沃尔夫管的外侧,由单层细胞构成,沃尔夫管管腔已明显可见(图1-1)。第23天时,缪勒氏管管区细胞数目增加而隆凸呈小丘状,管壁细胞呈放射状排列,未见管腔;沃尔夫管管壁由单层矮柱状上皮组成,管壁厚(13.3±0.9)μm,管腔横切面呈长扁状,管腔长径(131.7±4.2)μm,短径(30.6±1.6)μm(图1-2)。第25天时,缪勒氏管管壁细胞分

裂旺盛,管壁细胞层数增加,开始出现黏膜上皮的分化,管壁厚(26.9±0.6)μm,管腔直径0.5~1.0μm;沃尔夫管变化不明显,管壁依旧由单层细胞构成(图1-3)。第29天时,缪勒氏管管壁细胞继续分裂,黏膜上层呈高柱状,厚度为(11.7±0.9)μm,管壁厚(31.3±1.3)μm,管腔未扩大;沃尔夫管变化明显,长径和短径均开始变小,长径(125.3±9.4)μm,短径(20.3±0.5)μm,管壁厚(10.4±0.8)μm(图1-4)。第37天时,缪勒氏管管壁细胞层数增加,管壁厚(48.1±1.6)μm,管腔直径(7.0±0.4)μm,明显可见;沃尔夫管逐渐缩小,管壁细胞单层,管腔横切面近乎椭圆形,长径为(56.3±3.1)μm,短径为(35.5±2.3)μm(图1-5)。第44天时,缪勒氏管进一步发育,管壁继续增厚达(56.2±2.8)μm,管腔直径增大至(11.9±2.5)μm;沃尔夫管管腔和管径进一步缩小(图1-6)。第48天时,中华条颈龟孵化出壳,缪勒氏管已明显分化出黏膜层、黏膜下层和浆膜层,管腔扩增,直径达(18.7±1.5)μm,缪勒氏管由系膜相连突出成独立的生殖管道,进一步发育成输卵管和子宫上部;沃尔夫管则逐渐萎缩退化(图1-7)。

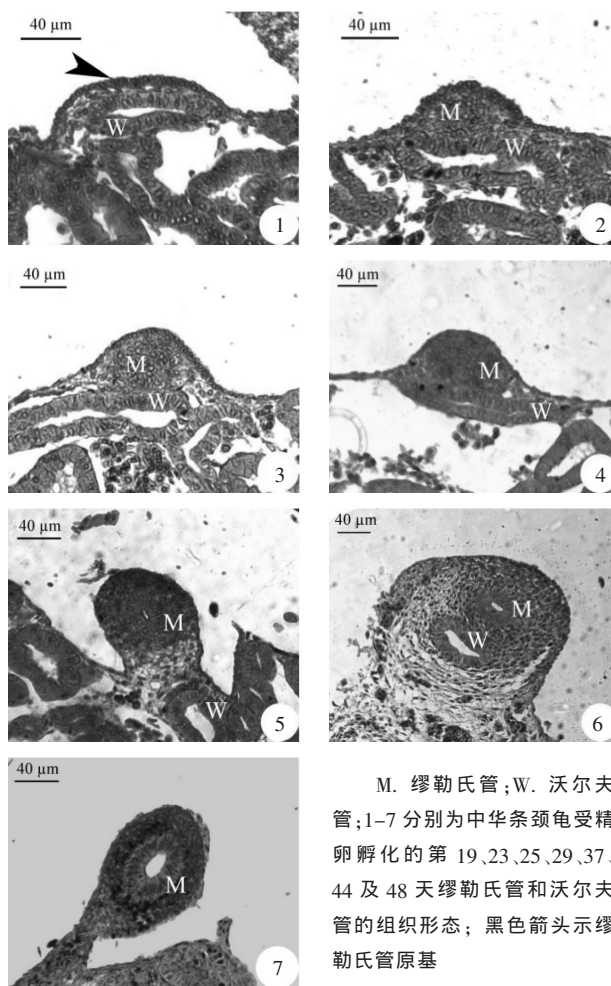


图1 中华条颈龟胚胎期生殖导管的组织形态(×100)



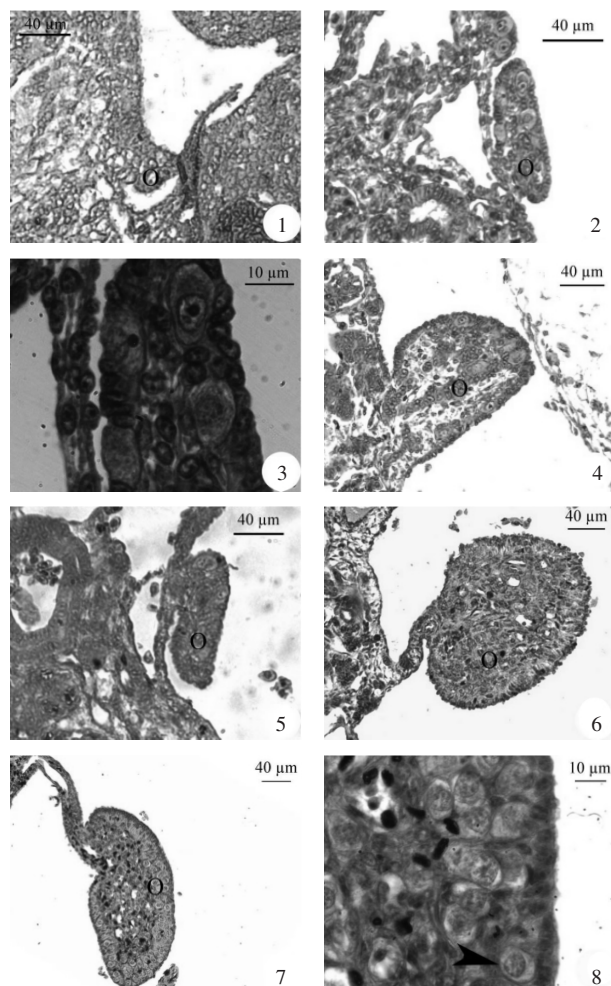
## 2.2 中华条颈龟胚胎期性腺的组织形态变化

中华条颈龟的受精卵在孵化第 9~14 天时,生殖嵴在中肾腹面的背隔膜两边分化出来。第 15~17 天时,生殖嵴处于性别分化前的增殖阶段,原始生殖细胞呈圆形,在原始生殖皮层中出现,生殖腺发育的变化主要表现为生殖细胞有丝分裂旺盛和生殖腺体积增大(图 2-1)。第 19 天时,生殖嵴开始向卵巢方向分化,雌性特征开始出现,零星原始生殖上皮细胞分化成核质染色较浅、体积较大的卵原细胞,髓部出现许多细小空隙即卵巢腔和体积较小的滤泡细胞;性腺体积增大,长径( $115.3\pm 8.0$ ) $\mu\text{m}$ ,短径( $38.4\pm 2.0$ ) $\mu\text{m}$ ,在生殖嵴和中肾皮腔相连的侧面可见系膜(图 2-2 和图 2-3)。第 25 天时可明显确定为卵巢,皮质和髓质分界明显,卵原细胞有丝分裂旺盛,生殖上皮明显增厚,可见分裂中的卵原细胞,髓部卵巢腔数量增多,体积增大,卵巢长径达( $160.0\pm 9.1$ ) $\mu\text{m}$ ,短径( $59.0\pm 2.4$ ) $\mu\text{m}$ (图 2-4)。第 31 天,皮质层已全部由卵原细胞充满,排列成单层,髓质细胞也同时增殖,此时卵巢长径可达( $207.2\pm 16.6$ ) $\mu\text{m}$ ,短径( $85.9\pm 2.8$ ) $\mu\text{m}$ (图 2-5)。第 40 天,原始卵泡数量增加 2~3 层,紧密排列在皮质上,呈长柱状;卵巢腔直径( $3.5\pm 0.4$ ) $\mu\text{m}$ (图 2-6)。第 48 天时,卵原细胞呈椭圆形,体积明显增大,沿皮质紧密排列 4~5 层,卵巢体积进一步增大(图 2-7 和图 2-8)。

## 3 讨论

缪勒氏管的发育或萎缩是脊椎动物性别决定的关键事件,其在雄性胚胎发育过程中萎缩,在雌性胚胎期发育为输卵管和子宫上部<sup>[6]</sup>。中华条颈龟缪勒氏管的发生起源于覆盖在肾脏的体腔上皮区域(图 1-1)。爬行类、鸟类和哺乳类胚胎时期先发生前肾,然后再形成中肾,最后产生后肾,前肾管与中肾的肾小管相通,称为中肾管即沃尔夫管,缪勒氏管的发生依赖于中肾管的诱导<sup>[7]</sup>。研究结果显示,中华条颈龟的缪勒氏管形态与红耳龟(*Trachemys scripta*)及其他爬行动物<sup>[8]</sup>非常相似,本实验通过组织学观察中华条颈龟胚胎期生殖导管的发育过程发现,在性别未分化前,沃尔夫管发育要早于缪勒氏管,这与其他动物具有相似性。

组织结构观察发现孵化的第 19~25 天是中华条颈龟性别分化的关键时期。本研究在 29℃ 下,胚胎发育到第 19 天,性腺开始向两性分化。在爬行类性腺发生上,卵巢来自性腺髓质的退化和皮质的发育。向雌性发育的胚胎,原始生殖细胞向卵母细胞分化。原始生殖细胞在原始生殖皮层中出现,直到第 25 天时,原始生殖细胞上皮不断增生,性腺基本



“○”.卵巢;1-2 和 4-7 依次为中华条颈龟受精卵孵化的第 17、19、25、31、40、48 天时的卵巢组织形态;3.中华条颈龟受精卵孵化的第 19 天卵巢组织形态放大;8.中华条颈龟受精卵孵化的第 48 天卵巢组织形态放大

图 2 中华条颈龟胚胎期性腺的组织形态  
(1-2,4-7. $\times 100$ ;3,8. $\times 400$ )

分化完成。生殖嵴向卵巢分化的明显特征之一是生殖嵴中央腔的形成<sup>[9]</sup>。由于生殖导管和性腺的发育均受到雌激素的作用,组织学观察缪勒氏管的发育与卵巢分化具有同步性。从生殖细胞与生殖管道出现的时间来看,沃尔夫管的退化要晚于卵巢形态的形成,这提示 TSD 机制物种的性别决定首先发生在性腺,性腺的内分泌作用带动了生殖管道的形成。由此推测,中华条颈龟的性别决定主要是温度诱导类固醇激素的合成,决定性腺分化的方向,然后刺激生殖细胞的分化和生殖管道的发育,但生殖细胞分化的具体因素是由类固醇激素诱发还是体细胞的作用诱发,有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 贺斌,史海涛,廖广桥. 龟鳖类温度依赖性性别决定机制的研究进展[J]. 动物学杂志,2009,44(5):147-152.
- [2] BULL J J, VOGT R C. Temperature-dependent sex determination in turtles[J]. Science,1979,206(4423):1186-1188.

# 鱼类剥制标本创新制作

马金锋, 蒋家龙, 杜天奎  
(宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

**摘要:**采用剥制的方法, 获得了鲫鱼、鲤鱼、草鱼及鲢鱼 4 具剥制标本。通过用适当温度的热风对鱼皮进行处理及选用发泡剂作填充材料制作假体, 解决了传统鱼类剥制标本中出现鳞片易脱落、皮肤剥离易破损以及标本制成后易塌陷、填充材料易发霉变质等问题。该制作方法操作简单, 材料便宜易于获取, 具有广阔的推广应用价值。

**关键词:** 鱼类; 剥制标本; 创新; 制作

中图分类号: Q95-34\*2

文献标识码: A

文章编号: 0439-8114(2011)17-3594-03

## Innovation of Making Fish Stripping Specimen

MA Jin-feng, JIANG Jia-long, DU Tian-kui

(College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** Four specimens of the carp, common carp, grass carp and silver carp were made using stripping method. Using appropriate temperature of hot air to treat the skin and the foam material to fill the fish body, the traditional problems of the fish scales fall off, skin damage, specimen collapse and filling materials mildewing etc. were solved. The method is very simple, the materials are very cheap and easily accessed, it have broad application value.

**Key words:** fish; stripping specimen; innovation; making

剥制标本是再现动物活体时形象的一门工艺, 实际上就是利用工艺和材料将死去动物的皮张进行加工处理后, 重新对其进行填充并整形, 重塑它们活着时的形态, 既让它们栩栩如生, 同时又能永久保存, 尤其对于一些濒危灭绝的动物进行剥制标本的制作, 更具有极高的研究价值<sup>[1]</sup>。剥制标本不像浸制标本那样易于褪色, 搬运也极其方便。鱼类剥制标本的制作难度大, 主要有以下两个较难克服的

问题: 一是鱼皮薄软而鱼鳞较硬, 鳞片易脱落, 在鱼皮剥离时极易造成标本不完整, 欣赏价值大打折扣; 二是传统标本填充时由于开口较大, 填充时外形易改变, 表面容易出现凸凹、裂缝等现象, 而且操作难度大。本实验通过对传统鱼类剥制标本方法进行改进, 选取鲫鱼、鲤鱼、草鱼及鲢鱼进行了剥制, 克服了剥制标本制作时鳞片容易脱落、外表容易变形、操作难度大的缺点, 现将标本的制作过程介绍

收稿日期: 2011-05-30

基金项目: 2010 年宁夏大学大学生科技创新与人文社会科学研究项目 (10sw103)

作者简介: 马金锋 (1989-), 男, 银川人, 在读本科生, 生物技术专业, (电话) 15296902316 (电子信箱) 1342595807@qq.com;

通讯作者: 杜天奎, 男, 副教授, (电子信箱) 790141813@qq.com。

[3] EWERT M A, JACKSON D R, NELSON C E. Patterns of temperature-dependent sex determination in turtles[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1994, 270(1):3-15.  
[4] 刘 筠, 刘楚吾, 陈淑群. 鳖性腺发育的研究[J]. *水生生物学集刊*, 1984, 8(2):145-157.  
[5] 刘国安, 刘运清, 胡迪光, 等. 乌龟性腺发育的研究[J]. *水产学报*, 1988, 12(1):13-20.  
[6] VAN TIENHOVEN A. *Reproductive physiology of vertebrates*[M].

New York: Cornell Univ Press, 1983.  
[7] 丁汉波. *发育生物学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987.  
[8] WIBBLES T, WILSON C, CREWS D. Müllerian duct development and regression in a turtle with temperature-dependent sex determination[J]. *Journal of Herpetology*, 1999, 33(1):149-152.  
[9] 陈伟庭, 李东风. 中国林蛙胚胎期性腺发育的组织学观察[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2008(1):118-124.

(责任编辑 张利艳)