

四眼斑水龟卵泡和卵的超声波扫描研究

胡茂柜¹, 贺斌¹, 马永刚¹, 傅丽容¹, 洪美玲¹, 汪继超¹, 曾萃青², 史海涛^{1,3*}

(1. 海南师范大学生命科学学院, 海口 571158; 2. 海南医学院附属医院, 海口 570102;

3. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

摘要: 使用超声波技术检测了 6 只雌性四眼斑水龟的卵黄卵泡(包括生长卵泡和排卵前卵泡)、闭锁卵泡和输卵管卵的大小和数量。结果表明:四眼斑水龟卵巢卵黄卵泡数目和大小呈明显的周期性变化,检测到的卵黄卵泡长径范围为 4~24 mm (n=186)。8 月份卵泡数目开始增多,卵泡长径逐渐增大,至 12 月份排卵前期卵泡数量达最大值,卵巢发育成熟。排卵前期卵泡长径范围为 19~24 mm (n=56),最大排卵前期卵泡出现于 12 月。排卵时间是 1 月至 3 月。闭锁卵泡长径范围在 10~20 mm (n=14) 之间,仅在 10 月至次年 3 月能检测到少数的闭锁卵泡。

关键词: 四眼斑水龟; 繁殖周期; 超声波技术; 卵巢卵泡

中图分类号: Q959.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2010)01-0075-03

Ultrasound Scanning of Follicles and Eggs in the Four Eye-spotted Turtle, *Sacalia quadriocellata*

HU Mao-gui¹, HE Bin¹, MA Yong-gang¹, FU Li-rong¹, HONG Mei-ling¹, Wang Ji-chao¹, ZENG Ping-qing¹, SHI Hai-tao^{1,3*}

(1. Department of Biology, Hainan Normal University, Haikou 571158, China; 2. Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China; 3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: Ultrasound investigations on vitellogenic follicles and atretic follicles and oviductal eggs were performed on 6 adult female four eye-spotted turtles (*Sacalia quadriocellata*). The results showed the periodic changes of number and size of ovarian follicles were significant. The diameter of the vitellogenic follicles ranged between 4 mm to 24 mm (n=186). In August, the number of follicles began to increase along with the fall in temperature, and preovulatory follicles reached the maximum number and the ovary was mature in December. Size of preovulatory follicles ranged between 19 mm to 24 mm (n=56) and the largest one was detected in December. Follicles reached ovulatory size from January to March. Atretic follicles, whose diameter ranged between 10 mm to 20 mm (n=14), were only detected from October to the following March.

Key words: *Sacalia quadriocellata*; reproductive cycle; ultrasonography; ovarian follicles

近年来,由于环境的严重破坏和过度猎捕使得野生四眼斑水龟 *Sacalia quadriocellata* 的种群数量急剧下降(Debruin *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 2000; 龚世平等, 2003), 已被列为濒危物种(赵尔宓, 1998)。目前有关该物种人工饲养的报道有食性研究(王志伟等, 2005)、求偶行为模式描述和定量分析(Liu *et al.*, 2008)。史海涛等(2002)发现海南岛的野生四眼斑水龟产卵季节在 1~4 月; 对该动物在解剖学和组织学(傅丽容等, 2004、2006)、血浆生殖激素(傅丽容等, 2008)的研究表明雌龟生殖器官组织结构和生殖激素分泌存在季节性周期变化。限于解剖学和组织学的研究需要处死实验动物, 故测定的个体数

及检查次数较少, 只能初步反映四眼斑水龟雌性生殖系统的变化特征。

超声波检测技术对龟类卵泡的发育动态以及输卵管卵的识别有较高的准确率, 且无伤害(Kuchling, 1998), 在饲养或者野外条件下都被广泛应用于研究淡水龟类(Kuchling, 1993)、陆龟类(Robeck *et al.*, 1990)和海龟类(Rostal *et al.*, 1996)的繁殖周期和模式。国外学者广泛利用超声波技术, 结合血样生殖激素的测定和行为观察研究了多种龟类的繁殖周期(David *et al.*, 1994; Rostal *et al.*, 1998), 国内未见有利用超声波技术研究龟鳖类卵泡及卵的发育动态的报道。鉴于此, 作者借助于超声波检测技术, 对饲养

收稿日期: 2009-03-04 接受日期: 2009-04-09 基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30660026)和海南省重点科技项目(06122)

作者简介: 胡茂柜(1985~), 男, 2005 级生物科学专业本科生 * 通讯作者 Corresponding author, E-mail: Haitao-shi@263.net

致谢: 海南师范大学生命科学学院刘宇翔、何绿艳、张杰、李闯、廖广桥、庞贤鹏和安莹等同学的大力帮助, 在此一并感谢!

条件下的四眼斑水龟体内卵泡发育周期进行了 16 个月的连续观察研究,结合本课题组以前的工作基础,评估其卵巢发育周期及影响因子,为其繁殖生物学理论研究提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 饲养动物

6 只成体雌性四眼斑水龟来自海南省琼中县湾岭地区,体重 245 ~ 375 g (311.2 ± 50.1 , $n = 6$),在海南省生态学重点实验室分别饲养于 80 cm × 60 cm 的水池内,内设隐蔽场所,饲养了 3 年以上,采用多种食物进行投喂(王志伟等,2005)。

1.2 超声波检测

在 2007 年 1 月至 2008 年 5 月期间,每月将龟带至海南医学院附属医院进行超声波检测,采用韩国产 Medison SSA 8800 型彩色多普勒超声诊断仪的阴道探头(频率 7.5 MHz)。龟体背卧平躺在水平桌

面上,小心拉伸后肢,在腹股沟里涂上少量医用超声耦合剂,将探头放进其腹股沟和后肢之间的区域,探测雌龟两边的卵巢,记录检测到的卵泡及卵的数量和特征,调整卵泡及卵在声像图上显示最合适的画面,同时使用安装的电子测径尺测得卵泡的卵径大小。根据发育时期不同,将检测到的卵黄卵泡分为生长卵泡和排卵前期卵泡。评估雌龟卵巢的发育动态是以当前发育的卵黄卵泡长径大小和数量以及输卵管卵来确定的。

2 结果

6 只雌龟全年能检测到的卵黄卵泡长径范围是 4 ~ 24 mm ($n = 186$),且卵泡的长径和数量表现明显的周期性变化。8 月份开始检测到生长卵泡数量逐渐增多,10 月份最多;同时随着生长卵泡的进一步发育,至 10 月份检测到数量较多的排卵前期卵泡,12 月份排卵前期卵泡数量达最大值。排卵前期

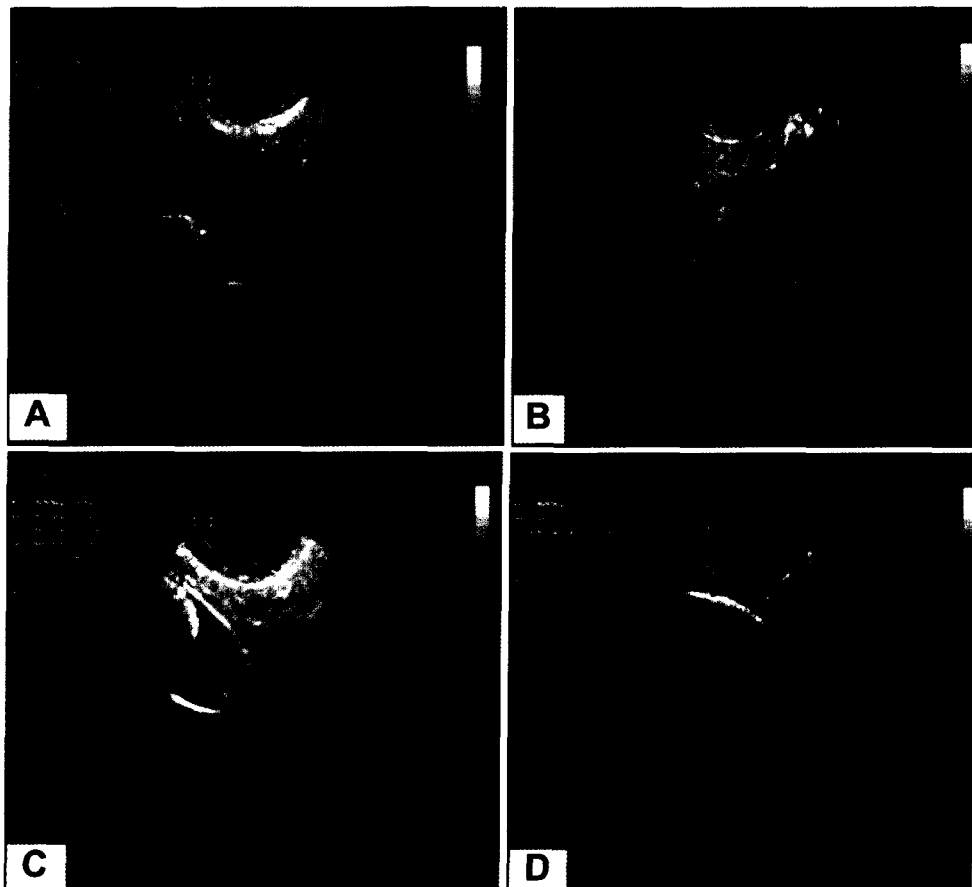


图 1 成体雌性四眼斑水龟超声波检测图像

A: 排卵前期卵泡(长径 21 mm)的超声图像; B: 闭锁卵泡的超声图像(长径约 20 mm); C: 一个排卵后刚发育的输卵管卵,清晰可见其内的卵黄和未充分钙化的卵壳; D: 一个已充分发育的输卵管卵(长径 43 mm)的超声图像

Figure 1. Ultrasound images from adult female *S. quadriocellata*

A: Ultrasound image of a preovulatory follicle (21mm diameter). B: Ultrasound image of atretic follicle (20 mm diameter). C: Ultrasound image of a recently ovulated oviduct egg showing a well defined yolk and a thinly calcified shell. D: Ultrasound image of a fully developed oviduct egg (43 mm diameter)

卵泡长径范围为 19~24 mm ($n=56$), 最大的排卵期前卵泡出现于 12 月。排卵时间为 1 月至 3 月。输卵管卵最早出现于 2 月初, 研究期间有 3 只雌龟 (50%) 发现怀有输卵管卵, 长径 34~47 mm ($n=7$)。产卵季节主要在 3 月和 4 月, 高峰期在 4 月。闭锁卵泡长径通常比排卵期前卵泡小, 范围在 10~20 mm ($n=14$) 之间, 只在 10 月至次年 3 月检测到。

3 讨论

组织学研究结果表明雌性四眼斑水龟卵巢卵泡 8 月份开始发育, 卵巢增重, 至 10 月份卵巢增重达最大值 (傅丽容等, 2006)。8 月份生长卵泡数量开始增多, 随着生长卵泡进一步生长、发育, 至 10 月份排卵期前卵泡的大小达到最大值, 卵泡数量也达到最大值, 卵泡数量的增加和长径的增大使得卵巢重量增加, 卵巢逐渐发育成熟。在龟鳖类中, 高水平的雌二醇是卵黄生成作用增强的指示剂 (David *et al.*, 1994; Rostal *et al.*, 1998)。据傅丽容等 (2008) 报道, 四眼斑水龟雌二醇水平在夏秋季最高。高水平的雌二醇增强了卵黄生成作用, 促进卵泡发育, 这与我们的研究结果雌龟夏季卵泡开始发育, 秋季卵泡数量和长径达最大值, 卵巢发育成熟相符。另外, 闭锁卵泡大部分出现于秋季和冬季的月份。在这个期间卵巢生理活动活跃, 个别的生长卵泡经优势选择后继续发育成熟, 而其他的卵泡由于生殖激素供应的减少使发育受到抑制, 从而发生闭锁 (朱士恩, 2006)。次年 1 月进入排卵期, 3 月排卵期结束, 这与解剖学研究结果 1 月开始进入排卵期相一致 (傅丽容等, 2006), 也与很多龟鳖类研究冬季进入排卵期结果相似 (David *et al.*, 1994; Schramm *et al.*, 2000)。四眼斑水龟产卵季节后生长卵泡数目减少, 卵巢生理活动趋于停止。生殖激素分泌的减少, 从而没有足够的生殖激素维持卵泡的生长发育是主要原因。

4 参考文献

傅丽容, 贺斌, 洪美玲, 等. 2008. 四眼斑水龟血浆生殖激素季节性变化的研究[J]. 动物学杂志, 43(3): 65~68.

- 傅丽容, 洪美玲, 史海涛, 等. 2004. 四眼斑水龟泄殖系统解剖[J]. 四川动物, 39(3): 68~71.
- 傅丽容, 洪美玲, 史海涛, 等. 2006. 四眼斑水龟雌性生殖器官组织结构的季节变化[J]. 四川动物, 25(2): 360~363.
- 龚世平, 徐汝梅, 史海涛. 2003. 海南岛淡水龟类区系特点及保护优先性分析[J]. 动物学杂志, 38(6): 68~71.
- 史海涛, 符有利, 汪继超. 2002. 四眼斑水龟之谜[J]. 人与生物圈, 6: 33~39.
- 王志伟, 洪美玲, 史海涛, 等. 2005. 人工饲养条件下四眼斑水龟的食性研究[J]. 四川动物, 24(2): 218~221.
- 赵尔宓. 1998. 中国濒危动物红皮书(两栖爬行类)[M]. 北京: 科学出版社: 120~121.
- 朱士恩. 2006. 动物生殖生理学[M]. 北京: 中国农业出版社: 72.
- David CR, Valentine AL. 1994. Seasonal reproductive cycle of the desert tortoise, (*Gopherus agassizii*) [J]. Herpetological monographs, 8: 72~82.
- Debruin RWF, Artner HC. 1999. On the turtles of Hainan Island, Southern China[J]. Chelonian Conservation and Biology, 3(3): 479~486.
- Kuchling G. 1993. Possible biennial ovarian cycle of the freshwater turtle *Erymnochelys madagascariensis* [J]. Journal of Herpetology, 27: 470~472.
- Kuchling G. 1998. The reproductive biology of the chelonian [M]. Berlin: Springer Press.
- Lau M, Shi HT. 2000. Conservation and trade of terrestrial and freshwater turtles and tortoises in the People's Republic of China [J]. Asian Turtle Trade, 2: 30~38.
- Liu YX, He B, Shi HT, *et al.* 2008. An analysis of courtship behaviour in the four-eyed spotted turtle, *Sacalia quadriocellata* (Reptilia; Testudines: Geoemydidae) [J]. Amphibia-Reptilia, 29: 185~195.
- Robeck TR, Rostal DC. 1990. Ultrasound imaging of reproductive organs and eggs in galapagos tortoises, *Geochelone elephantopus* spp. [J]. Zoo Biology, 9: 349~359.
- Rostal DC, Paladino FV, Patterson RM, *et al.* 1996. Reproductive physiology of nesting leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) at Las Baulas national park, Costa Rica [J]. Chelonian Conservation and Biology, 2: 230~236.
- Rostal DC, Robeck TR, Grumbles JS, *et al.* 1998. Seasonal reproductive cycle of the galapagos tortoise (*Geochelone nigra*) in captivity [J]. Zoo Biology, 17: 505~517.
- Schramm BG, Casares M. 2000. Ultrasound scanning of ovaries and eggs in Galapagos Tortoises, *Geochelone nigra*, on Santa Cruz Island, Galapagos [J]. Chelonian Conservation and Biology, 3(4): 706~713.