

绿海龟稚龟性别鉴定及临界温度

古河祥^① 夏中荣^{①②*} 李丕鹏^③ 端金霞^① 叶明彬^① 张飞燕^① 陈华灵^① 林日锦^①

(^① 广东省惠东港口海龟国家级自然保护区管理局 惠州 516359;

^② 四川大学生命科学学院 生物资源与环境教育部重点实验室 成都 610064;

^③ 沈阳师范大学两栖爬行动物多样性研究课题组 沈阳 110034)

摘要:通过组织形态学鉴定、羊水和血液中性激素测定等手段,对惠东港口海龟保护区不同恒温下孵化的绿海龟(*Chelonia mydas*)进行研究,寻求绿海龟稚龟性别鉴定的最佳方法。结果显示,(1)组织形态学,绿海龟性腺切片分皮层和髓质两部分,卵巢的皮层较厚、基质中有大小不一的未成熟卵细胞,髓质中空腔较少;睾丸的皮层较薄,髓质中空腔较多,呈现出显著的被基质包围的髓质索。(2)性激素测定,当雌二醇与睾酮含量之比 $E_2:T < 1.5$ 时,孵出的稚龟为雄性(♂);当 $E_2:T > 1.5$ 时,为雌性(♀)。(3)绿海龟性别决定的临界温度在 29.4~29.5℃ 之间,此时孵出稚龟的性比约为 1:1。本文还讨论了各种不同性别鉴定方法的优劣和时期选择。

关键词:绿海龟; 临界温度(PT); 温度依赖型性别决定(TSD)

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)04-81-08

Sex Identification and Pivotal Temperature for Sex Determination in Hatchling Green Sea Turtle

GU He-Xiang^① XIA Zhong-Rong^{①②*} LI Pi-Peng^③ DUAN Jin-Xia^① YE Ming-Bin^①
ZHANG Fei-Yan^① CHEN Hua-Ling^① LIN Ri-Jin^①

(^① Marine Turtle Research Group, National Gangkou Sea Turtle Reserve Management Bureau, Huidong 516359;

^② College of Life Sciences, Sichuan University, Key laboratory of Bio-resources and Eco-environment (Ministry of Education), Chengdu 610064;

^③ Herpetodiversity Research Group, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China)

Abstract: Green sea turtle (*Chelonia mydas*) eggs were incubated at different temperatures. Hatchling sex was determined by the standard histological examination, and sex hormone test in the amniotic fluid and plasma. The histological findings of this study indicated that the testis showed thin cortex and more medullary cavity, and conspicuous medullary cords surrounded by stromal tissue, while the ovary showed thick cortex and less medullary cavity. Different sizes of immature oocytes were observed in the stroma of ovary. The sex hormone test indicated that the ratio of estradiol (E_2) and testosterone (T) could be used to determine the sex: when $E_2:T < 1.5$, the hatchlings were males (♂); when $E_2:T > 1.5$, the hatchlings are females (♀). Pivotal temperatures (PT) for sex determination in Sea Turtle Bay of China ranged from 29.4°C to 29.5°C, with an approximate 1:1 sex ratio.

基金项目 广东省科学技术厅资助项目 (No. 2005B33201003, No. 2005B60301012, No. 2006B60101011), 广东省重大科技兴海(渔)项目 (No. B200613G11);

* 并列第一作者及通讯作者, E-mail: xzxzrl@gmail.com;

第一作者介绍 古河祥,男,高级工程师;研究方向:水产养殖;E-mail: e_glx@yahoo.com.cn.

收稿日期:2009-11-15, 修回日期:2010-02-01

Key words: Green Sea Turtle (*Chelonia mydas*); Pivotal temperature; Temperature-dependent sex determination

海龟性别鉴定的技术,国外在蠛龟(*Caretta caretta*)^[1]、太平洋丽龟(*Lepidochelys olivacea*)^[2]和绿海龟(*Chelonia mydas*)^[3]已有一些研究,在我国尚处于起步阶段。

海龟稚龟的性别鉴定技术常见的有性腺切片的组织学检查^[4]、测定血液或羊水中雌雄激素比值^[1]和腹腔镜观察^[3,5]等几种方法。用孵化期长短来估算稚龟性比^[6-7],是一种环保、简单、廉价的方法,但前提是要准确地建立本地海龟的性别比例模式。

海龟属于温度依赖型性别决定(temperature-dependent sex determination, TSD),胚胎发育分为未确定期、温度敏感期和性别已定期3个阶段。在温度敏感期内,当孵化温度达32℃以上时,产生的稚龟全为雌性(♀),27℃以下时则全是雄性(♂)。当孵化温度在某一点时,产生1:1的性比,这一点就是临界温度(pivotal temperatures, PT)^[8]。全球变暖导致卵的孵化温度升高,若温度上升1℃,将引发稚龟中雌性的比例大大增加,其后果是性比失衡、种群崩溃。因此,监控稚龟性比很重要^[9]。绿海龟通常要经20~50年方能发育成熟^[10],成年海龟可通过尾的长短来辨别雌雄。然而在性成熟之前,从外形上却很难鉴定海龟的性别^[11],这给海龟保育和管理带来了许多困难。因此应提高海龟性别鉴定水平^[12],找出一些无损伤鉴定稚龟及亚成体海龟性别的实用技术。

因此,开展绿海龟性别鉴定技术及临界温度研究,既能了解海龟种群性比组成,掌握海龟自然种群动态平衡和增长规律,对于海龟的科学养殖、人工繁殖、增殖放流和种质资源保护,也具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方 法

1.1 时间和地点 实验于2006年6月~2008年1月间,在广东惠东港口海龟国家级自然保护区(N22°33', E114°54')进行。

1.2 材料 自2个不同沙滩收集雌绿海龟产的4窝卵,取其中200枚正常卵,即每窝各取50枚,平均分配到5个不同温度梯度下,用于人工恒温孵化实验。

1.3 方法 在两只雌龟产卵后共收集100枚卵,运回实验室,测量、标记和称重。100枚卵分5组,每个温度下放20枚卵(每窝取10枚),分别放在28.0、28.5、29.0、29.5、30.0℃的LHS-450SC恒温恒湿箱(分辨率0.1℃)内孵化。卵埋在孵化基质海沙中,胚胎位置向上,上面覆盖海绵,相对湿度保持在85%~90%。每天检查孵化箱工作情况,直至幼体孵出,此实验重复一次。

稚龟从卵壳孵出时,每个温度下任选6只(共30只),用移液器从卵壳取剩余羊水,-40℃冰冻保存,以备雌雄性激素分析。

上述孵出的30只稚龟用巴比妥钠麻醉,用1ml的针管从心取血,制备血清,-40℃冰冻保存,以备激素分析;解剖稚龟,取下带有性腺的肾,用Bruin's液固定,性腺放4℃冰箱保存,集齐后统一用酒精冲洗,石蜡包埋,连续切片,切片厚7μm, H. E染色,常规病理方法制片^[13],光学显微镜下确定性别^[1-2,4,14]。

其余的出壳稚龟用白漆标志背甲^[15],测量体重、体长等数据,2d之后下水入池分养。待稚龟生长到100g以上时,从颈窦抽取静脉血,离心制备血清,用美国Beckman coulter ACCESS2全自动微粒子化学发光免疫分析系统化验雌雄激素。

1.4 统计分析 应用SPSS 11.0对原始数据进行学生t-检验,确定显著性差异的P值小于0.05。

2 结果与分析

2.1 绿海龟稚龟性别的组织形态学鉴定结果 200枚海龟卵共孵出161只稚龟(从出生到1年之内称为稚龟),孵化率为80.5%。其中部

分稚龟用于组织形态学水平的性别鉴定。

2.1.1 外形 从外部形态观察,一般雌龟背甲卵形或近似圆形,背甲末端钝圆,个体较大较

重;雄性背甲桃核形或心形,臀盾末端尖,前肢的爪较长,体型瘦长,体重较轻(图1)。



图1 两月龄绿海龟♀(左)、♂(右)稚龟

Fig.1 The two-month-old green hatchling turtles, ♀ (left), ♂ (right)

2.1.2 性腺器官 肉眼观察,绿海龟的性腺呈白色条状,位于肾腹侧表面、前端,向外斜行。雄性生殖系统由精巢、副睾、输精管和阴茎组成;雌性生殖系统由卵巢、卵巢系膜、输卵管及阴蒂等组成,卵巢粗细不匀,弯曲呈虫状或两端弯曲,边缘成波浪状(图2)。

和肺之间;精巢长条形乳白色,放大后可见白色弯曲短棒状的曲细精管。附睾淡黄色柳叶形,位于精巢外侧(图3)。

解剖镜下观察,卵巢白色,新月牙形或基部弯曲,中部宽扁,粗细不匀,隐约可见卵巢系膜,其外缘有白色细长的输卵管,输卵管通向背甲

光学显微镜下观察的性腺切片,性腺分皮层和髓质两部分。若性腺中皮层较厚、皮层基质中有大小不一的未成熟卵细胞,髓质中空腔较少,是卵巢;若皮层较薄、髓质中空腔较多、并呈现出显著的被基质包围的髓质索,是精巢(图4)。

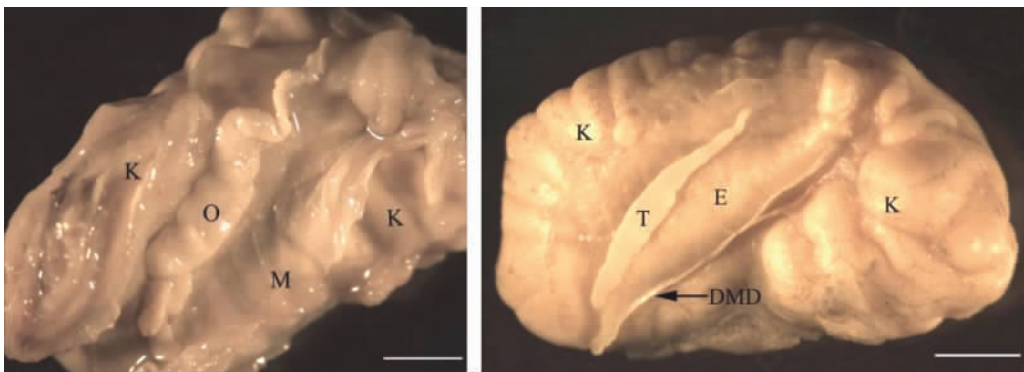


图2 约6月龄绿海龟稚龟性腺的位置及形态腹面观

Fig.2 Ventral view of six months turtles' sex glands

左:♀;右:♂;标尺=0.5 cm。K:肾;O:卵巢;M:卵巢系膜;T:精巢;E:副睾;DMD:退化的缪氏管。
Left: ♀; Right: ♂; Bar = 0.5 cm. K: Kidney; O: Ovary; M: Mesovarium; T: Testis; E: Epididymis; DMD: Degenerative Müllerian duct.

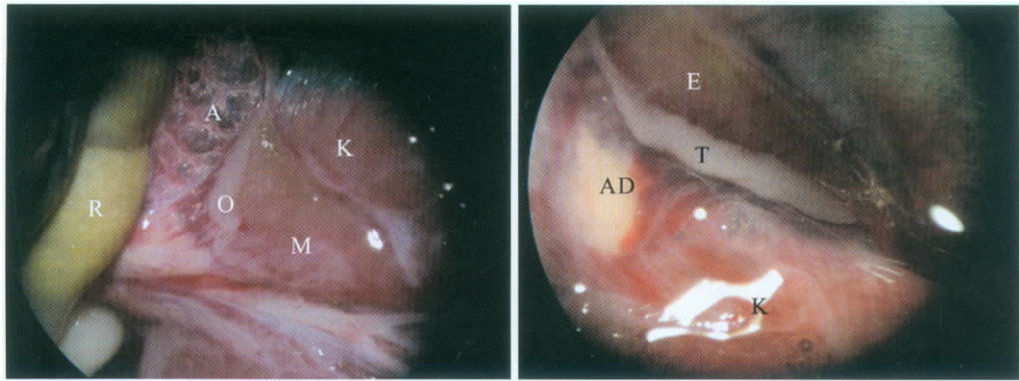


图3 解剖镜下绿海龟性腺的位置及形态

Fig. 3 The location and morphology of sex gland

左: ♀; 右: ♂; A: 肺泡; O: 卵巢; R: 直肠; K: 肾; M: 卵巢系膜; AD: 肾上腺; T: 精巢; E: 附睾。

Left: ♀; Right: ♂; A: Alveolus; O: Ovary; R: Rectum; K: Kidney; M: Mesovarium; AD: Adrenal; T: Testis; E: Epididymis.

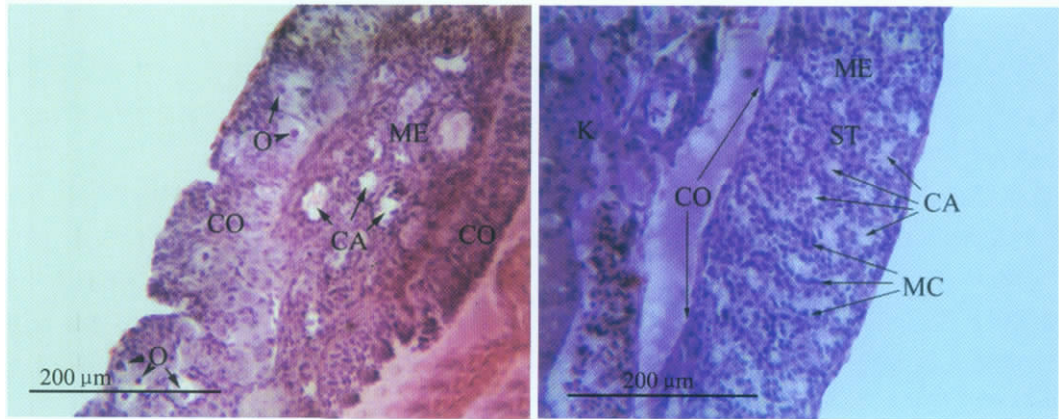


图4 绿海龟稚龟2月龄性腺横切

Fig. 4 The cross-section of 2-month-old hatchling's gonad

左为卵巢; 右为精巢。O: 卵母细胞; CO: 皮质; ME: 髓质; CA: 空腔; K: 肾; ST: 基本组织; MC: 髓质索。

Left: Ovary; Right: Testis. O: Oocyte; CO: Cortex; ME: Medulla; CA: Cavities; K: Kidney; ST: Stromal tissue; MC: Medullary cords.

2.2 羊水和血清中 E₂、T 含量及其比值结果
取羊水的 30 枚卵孵出的 30 只稚龟, 取其性腺做

切片, 确定性别, 结果为: 16 ♂, 14 ♀; 羊水和血清
中 E₂、T 含量及其比值结果见表 1、图 5 和图 6。

表 1 羊水和血清中 E₂、T 含量及其比值

Table 1 Content and ratio of E₂ and T in amniotic fluid and serum

性别	样本数	取样	雌二醇含量	睾酮含量	雌二醇: 睾酮
Gender	n	Sample	Estradiol (ng/ml)	Testosterone (ng/ml)	E ₂ : T
♂	16	血清	0.132 ± 0.037	0.186 ± 0.058	0.788 ± 0.338
♀	14	Serum	0.205 ± 0.050	0.105 ± 0.030	2.000 ± 0.438
♂	16	羊水	0.120 ± 0.035	0.194 ± 0.071	0.735 ± 0.425
♀	14	Amniotic fluid	0.207 ± 0.019	0.106 ± 0.020	2.005 ± 0.316

从表 1 可看出,无论是血清还是羊水中,雌二醇(E_2)值在雌性显著大于雄性($P < 0.05$);睾酮(T)值在雄性显著大于雌性($P < 0.05$); E_2 与 T 的比值在雌性显著大于雄性($P < 0.05$)。同性的 3 个生化值在羊水和血清之间差别不大($P > 0.05$)。

从羊水中 E_2 、T 含量及其比值散点图(图 5)得知:若通过 E_2 、T 含量来区分雌雄时,有一条浓度大致为 0.15 ng/ml 的分界线;若由 E_2 与 T 的比值高低来区别雌雄,分界线在 1.5 值附近。在图 5 中,判定雌雄的正确率分别为 86.67%、83.33% 和 96.67%。

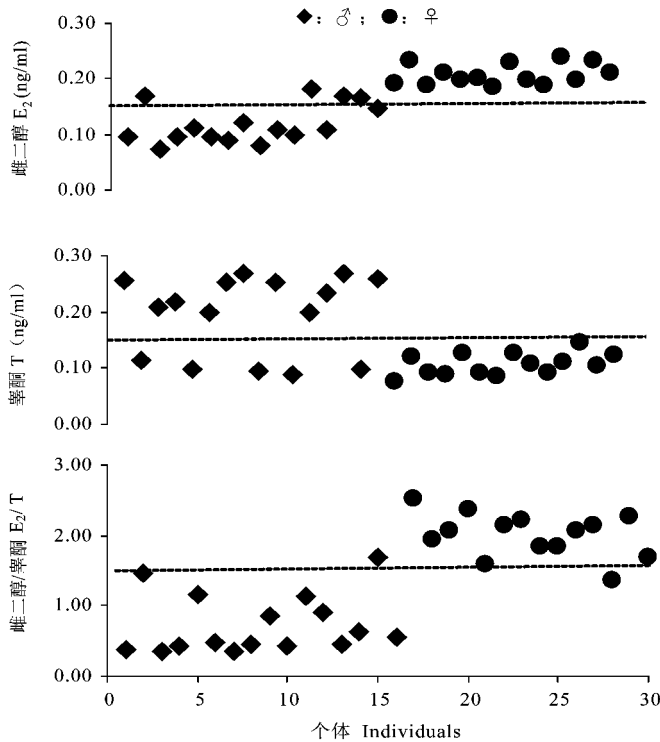


图 5 30 只稚龟羊水中 E_2 和 T 含量及其比值散点图

Fig. 5 Content and ratio of E_2 and T in amniotic fluid of thirty turtles

血清中 E_2 、T 含量及其比值亦有相似的结果(图 6)。图 6 中也有一条浓度大致为 0.15 ng/ml 的分界线;如果根据 E_2 与 T 的比值高低来区别雌雄,1.5 的数值是两者的分界线。3 种方法的准确度分别是 76.67%、83.33% 和 96.67%。

由上可知,根据 E_2 与 T 的比值高低来区别绿海龟稚龟雌雄的方法,其正确率最高(96.67%)。当 E_2 与 T 的比值大于 1.5 时,稚龟为雌性;比值小于 1.5 时,稚龟为雄性。

2.3 不同孵化温度对海龟性别的影响 根据性腺解剖、羊水和血清中雌雄激素的比值确定了 30 只稚龟的性别:16 ♂、14 ♀;将不同温度下

人工孵化的出壳稚龟入池分养,待稚龟生长到 3 个月,从颈窦抽血、离心制备血清,通过雌雄激素比值来确定性别;在人工养殖过程中,意外死亡或病死的稚龟用于形态解剖、生殖系统观察、性腺切片等鉴定性别。汇总得到不同温度下孵化的稚龟及雌雄数目(表 2)。

本次实验共孵出 161 只稚龟,孵化率为 80.5%;其中 ♀ 占 37.27%,♂ 占 62.73%;在 29.5℃ 附近,♀/♂ 约为 1:1;低于此温度点时,♂ 比例升高;高于此温度点时,♀ 比例升高。

根据表 2 中数据作出绿海龟孵化临界温度图解(图 7):绿海龟稚龟性比为 1:1 的临界温度在 29.4 ~ 29.5℃ 之间。在一定范围内,随着

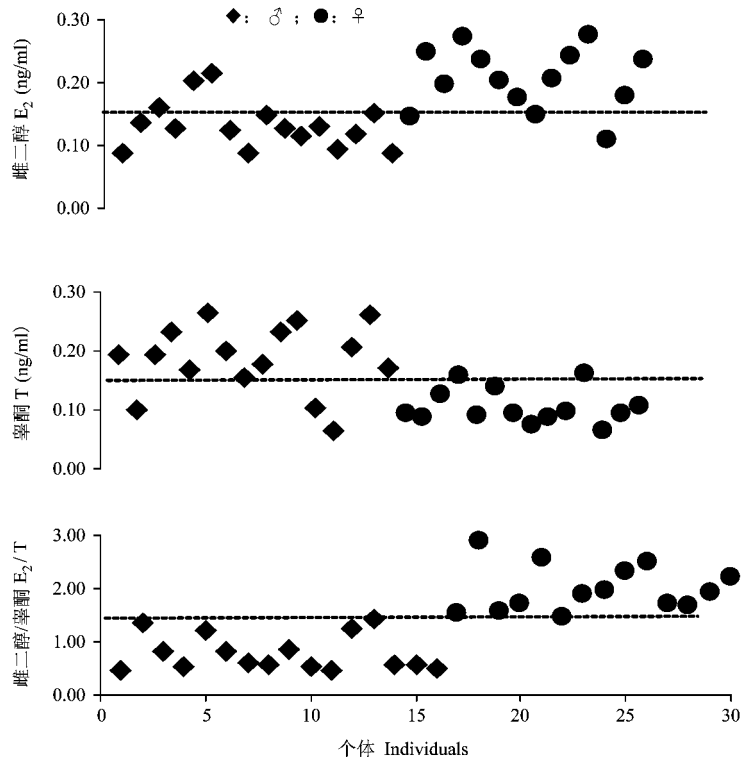


图 6 30 只稚龟血清中 E₂ 和 T 含量及其比值结果

Fig. 6 Content and ratio of E₂ and T in serum of thirty turtles

表 2 不同温度下孵化的稚龟及雌雄数目

Table 2 The hatchling turtles and the number of male and female at different temperatures

温度 (°C)	稚龟 (只)	雌性 (只)	雄性 (只)	雌/雄	雌性比例 (%)	雄性比例 (%)
Temperature	Hatchling	♀	♂	♀/♂	Percentage of female	Percentage of male
28.0	30	4	26	1/6	13.33	86.67
28.5	34	7	27	1/4	20.59	79.41
29.0	39	15	24	5/8	38.46	61.54
29.5	27	14	13	1/1	51.85	48.15
30.0	31	20	11	2/1	64.52	35.48
合计 Total	161	60	101	3/5	37.27	62.73

温度升高,雌性比例增大;随着温度下降,雄性比例提高。

3 讨论

3.1 关于稚、幼绿海龟性别形态学鉴定方法
研究海龟首先要解决的是确定年龄和性别问题。海龟的寿命很长,生活史复杂,绿海龟大约要30年左右才性成熟。雄性成年海龟尾较长,相当于其背甲直线长 (straight carapace length,

SCL) 的50%,雌性尾较短,约为SCL的6% (未发表数据),雌雄易于区分。

但是,幼年海龟仅从外表很难区分其雌雄。尽管张晓荣等^[11]曾报道从个体的外部形态来区分稚海龟的雌雄,但稚龟的体型还与营养条件有很大的关系,个体差异较大。此法属于经验性判断,实用价值有限。

实践证明,解剖和切片是鉴定幼龟性别的传统方法,容易区分精巢和卵巢,正确率较高。

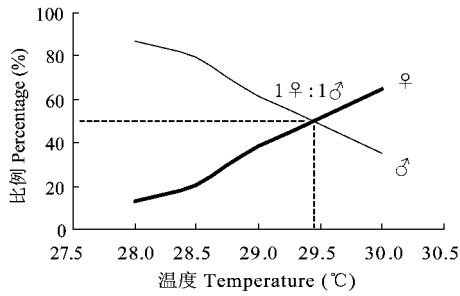


图7 惠东港口绿海龟孵化临界温度图解

Fig.7 Pivotal Temperatures of green sea turtles at Huidong Gangkou

在观察稚龟性腺位置时,可首先识别豆形的肾,然后在肾腹面找出白色的性腺。对稚龟来说,卵巢和精巢较难区分,若无法做组织学切片,可通过输精管有无或卵巢色泽来判断^[16]。

3.2 关于性激素鉴定方法 Gross等^[1]根据 E_2 与T的比值高低来区别蠓龟稚龟的雌雄,其正确率为96%,与本实验鉴定绿海龟的结果96.67%相近。当 E_2 与T的比值 ≥ 1.25 时,蠓龟稚龟为雌性;比值 < 1.25 时,蠓龟稚龟为雄性,也就是说,区分蠓龟雌雄的分界点是1.25^[1],而在本次实验中,区分绿海龟稚龟雌雄的临界值为1.5,这很可能是种间差别的原因。

抽取卵壳羊水是一种对稚海龟身体没有丝毫伤害的方法。在稚龟即将出壳之时,研究人员守护在孵化器旁边,只要稚龟一出壳,就可收集卵壳内的羊水,所以此法简单易行。测定血清中♀、♂激素的方法需要找准海龟颈窦的位置,我们已掌握抽取海龟血液的方法和抽取的血量(1~3 ml)。因此,通过测定羊水或血液中性激素比值来鉴定稚龟个体性别是今后的努力方向。

3.3 关于海龟性别决定的临界温度(PT) 国外有许多学者一直热衷于海龟卵孵化临界温度的研究,不同种类的海龟、同种海龟的不同地理居群,其临界温度亦有所差别。墨西哥的太平洋丽龟卵32℃以上孵出的稚龟全雌,27℃以下全雄^[2,8]。对于蠓龟,孵化温度 $< 27^\circ\text{C}$,孵出的稚龟100%为雄性;温度 $> 31^\circ\text{C}$ 时,100%为雌性;临界温度在29℃附近,可产生1:1的性

比^[17]。Horacio^[2]也认为绿海龟、蠓龟和棱皮龟(*Dermochelys coriacea*)决定性别的临界温度在29℃附近。苏里兰的绿海龟临界温度的最佳估计值是29.4~29.5℃,与前人在此地研究的数据合并后的临界温度为29.2~29.3℃^[18];Godfrey^[14]的实验结果是,苏里南绿海龟临界温度为29.4℃,并发现一些绿海龟稚龟的生殖腺兼具雌雄两性的特征,视为间性。Broderick等^[19]对东地中海的绿海龟连续进行6年的研究,确定临界温度在29.2℃以下,6年中雌性比例高达86%~96%,并得出惊人的结论——东地中海的绿海龟性比强烈偏雌。

本次实验中,在29.5℃下,孵出14♀:13♂,我们的结果是惠东港口绿海龟孵化临界温度在29.4~29.5℃之间,根据图7,该临界温度稍微高于29.4℃,产生1♀:1♂的性比。

3.4 性别鉴定方法的选择 经验表明,鉴定海龟个体的性别,应根据海龟所处的不同发育时期和状况,运用相应的方法和技术。例如:对于刚刚孵化的稚龟,可设法收集羊水并测定其中雌雄激素的比值;若是100g以上的稚龟至2年的幼龟,可通过测定血液中性激素比值来鉴定雌雄;如是3年幼龟到性成熟前,可测定血液中雌雄激素比值或利用内窥镜检查性腺确定性别^[3];成龟可直接通过尾部长短确认雌雄。对于死亡个体,可直接解剖或切片观察性腺。通过内窥镜观察海龟性腺是最直接的性别鉴定方法,但这种方法适用于较大的幼龟和成龟。活体不提倡运用解剖辨认性腺的方法,因为这不利于濒危物种的保护。

将来,可利用在卵窝中埋设电子温度计,测定胚胎发育中性别热敏期(thermosensitive period, TSP)的平均温度值^[8],或通过孵化期的长短来估算雌雄的比例^[7];或者在放生海龟时用电子身份证(PIT Tags)标志^[15],将标记放流^[20]和洄游重捕实验(包括渔民误捕报告)结合起来,待海龟性征分化后,可以验证性别鉴定技术的准确度和估计我国绿海龟种群的规模大小。上述3种方法都属无损鉴定海龟性别的方法。

参 考 文 献

- [1] Gross T S , Crain D A , Bjorndal K A , et al. Identification of sex in hatchling loggerhead turtles (*Caretta caretta*) by analysis of steroid concentrations in chorioallantoic/ amniotic fluid. *General and Comparative Endocrinology* , 1995 , 99 : 204 – 210.
- [2] Horacio M L , Salvador R R , Norma M M , et al. Correlation among thermosensitive period , estradiol response , and gonad differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology* , 1997 , 107 : 373 – 385.
- [3] Chaloupka M , Limpus C. Estimates of sex- and age-class-specific survival probabilities for a southern Great Barrier Reef green sea turtle population. *Marine Biology* , 2005 , 146 : 1251 – 1261.
- [4] The American Society of Ichthyologists and Herpetologists. An assessment of two methods of sexing hatchling sea turtles. *Copeia* , 1990 , (2) : 589 – 591.
- [5] Blair K. Determination of Sex Ratios and Their Relationship to Nest Temperature of Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*) Hatchlings Produced along the Southeastern Atlantic Coast of the United States. Florida: Florida Atlantic University Boca Raton , 2005 , 1 – 89.
- [6] 陈久林. 澎湖县望安岛绿蠵龟卵窝温度变化对稚龟性别比与孵化状况影响之探讨. 基隆: 台湾海洋大学 , 1998.
- [7] Mrosovsky N , Baptistotte C , Godfrey M H. Validation of incubation duration as an index of the sex ratio of hatchling sea turtles. *Can J Zool* , 1999 , 77 : 831 – 835.
- [8] Gabriel G O , Jimenez-Trejo F J , Favila R , et al. Acetylcholinesterase-positive innervation is present at undifferentiated stages of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* embryo gonads: implications for temperature-dependent sex determination. *The Journal of Comparative Neurology* , 1999 , 410 : 90 – 98.
- [9] Kaska Y , Ilgaz Ç , Özdemir A , et al. Sex ratio estimations of loggerhead sea turtle hatchlings. *Naturwissen Schafte* , 2006 , 93 : 338 – 343.
- [10] 程一骏. 中国海产龟的研究: 蛇蛙研究丛书(九): 中国龟鳖研究. *四川动物* , 1997 , 15 : 27 – 54.
- [11] 张晓荣 , 李放明 , 王伦武. 稚海龟的雌雄辨别. *动物学杂志* , 1995 , 30(1) : 48 – 49.
- [12] 李明华. 关于海龟研究的思考. *水产科学* , 2003 , (6) : 40 – 42.
- [13] 杜卓民. 实用组织学技术(2版). 北京: 人民卫生出版社 , 1998.
- [14] Godfrey M H. Sex Ratios of Sea Turtle Hatchlings: Direct and Indirect Estimates. Toronto: University of Toronto , 1997 , 1 – 181.
- [15] 古河祥 , 夏中荣 , 李丕鹏 , 等. 海龟标志方法纵览. *四川动物* , 2007 , 26(2) : 458 – 460.
- [16] Wyneken J. The Anatomy of Sea Turtles. Miami: US Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470 , 2001 , 1 – 172.
- [17] Mrosovsky N. Pivotal temperatures for loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from northern and southern nesting beaches. *Can J Zool* , 1988 , 66 : 661 – 669.
- [18] Godfrey M H , Mrosovsky N. Pivotal temperature for green sea turtles , *Chelonia mydas* , nesting in Suriname. *The Herpetological Journal* , 2006 , 16(7) : 55 – 61.
- [19] Broderick A C , Godley B J , Reece S , et al. Incubation periods and sex ratios of green turtles: highly female biased hatchling production in the eastern Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* , 2000 , 202 : 273 – 281.
- [20] 梁玉麟 , 张晓荣 , 林日锦 , 等. 南海海龟资源调查与孵化养殖技术研究. 农业部水产司立项项目(课题编号 8607-7) , 1990 , 1 – 39.