

DOI: 10.5846/stxb201706271159

梅祎芸, 郑荣泉, 郑善坚, 严红, 刘志芳, 张启鹏, 王志刚, 洪燕. 棘胸蛙的性腺分化及温度对其性别决定的影响. 生态学报, 2018, 38(13): - .
Mei Y Y, Zheng R Q, Zheng S J, Yan H, Liu Z F, Zhang Q P, Wang Z G, Hong Y. Gonad differentiation and the effects of temperature on sex determination in *Quasipaa spinosa*. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(13): - .

棘胸蛙的性腺分化及温度对其性别决定的影响

梅祎芸^{1,2}, 郑荣泉^{1,2,3,*}, 郑善坚^{1,2}, 严红^{1,2}, 刘志芳^{1,2}, 张启鹏^{1,2}, 王志刚^{1,2}, 洪燕^{1,2}

1 浙江师范大学野生动物保护与利用技术中心, 金华 321004

2 浙江省野生生物技术与保护利用重点实验室, 金华 321004

3 浙江师范大学行知学院, 金华 321004

摘要: 单性养殖在棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*)养殖中意义显著。为了了解棘胸蛙性腺分化,并探讨在不同的培育温度条件下性腺分化的差异。通过组织切片观察了棘胸蛙原始性腺的形成和性腺分化。棘胸蛙的性腺分化有其特殊性:生殖嵴形成时,其中既有体细胞,又有原始生殖细胞(PGCs);无论原始性腺是分化成为精巢还是卵巢,其中都出现一个带有单层扁平上皮初生性腔,当单层扁平上皮逐渐消失后形成次生性腔。性腔周围的PGCs开始长大2—3倍时,性腺将分化成为卵巢;体细胞渗入性腔中,使腔隙变小直至消失,这种原始性腺分化成为精巢。棘胸蛙蝌蚪孵化后的17—80 d(Gosner 25—26期)为性腺分化的敏感时期。实验选取同一批次刚孵出蝌蚪(Gosner 24期),分别用不同水温(16±1)℃、(27±1)℃、(31±1)℃3组实验组及自然水温(23±1)℃对照组条件下的培育蝌蚪。结果显示,对照组的雌、雄性比为26:24,雄性率接近50%;(16±1)℃实验组的雌、雄比例为33:17,雄性率仅34%($P<0.05$);从(27±1)℃实验组起,雄性率提高,(31±1)℃实验组的雄性率达70%($P<0.05$)。棘胸蛙的性别分化属于温度依赖型性决定(TSD)。较高的培育温度可使棘胸蛙蝌蚪性别分化趋向雄性,而较低的培育温度则使蝌蚪雌性化。

关键词: 棘胸蛙;温度;性别决定

Gonad differentiation and the effects of temperature on sex determination in *Quasipaa spinosa*

MEI Yiyun^{1,2}, ZHENG Rongquan^{1,2,3,*}, ZHENG Shanjian^{1,2}, YAN Hong^{1,2}, LIU Zhifang^{1,2}, ZHANG Qipeng^{1,2}, WANG Zhigang^{1,2}, HONG Yan^{1,2}

1 Center of Wildlife conservation and Utilization Technology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

2 Key Laboratory of Wildlife Biotechnology and Conservation and Utilization of Zhejiang Province, Jinhua 321004, China

3 Xinzhi College, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract: Monosex cultivation is significant in the breeding of the Chinese spiny frog *Quasipaa spinosa*. In order to understand the gonadal differentiation of *Q. spinosa*, the effects of temperature on its gonad differentiation. This paper describes the formation of the primordial gonad and gonadal differentiation of *Q. spinosa* as determined using histological methods. Some particulars of *Q. spinosa* gonad differentiation: two types of cells, primordial germ cells (PGCs) and somatic cells, could be distinguished in the germinal ridges; there is a primary cavity which has squamous epithelium on the surface in every primordial gonad, regardless of whether it will become an ovary or a testis, and when the squamous epithelium on the surface disappears gradually, a secondary cavity forms. When PGCs around the cavity begin to mature, primordial

基金项目: 国家自然科学基金(31472015;31772482)

收稿日期: 2017-06-27; 网络出版日期: 2018-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhengrq@zjnu.cn

gonads begin to differentiate into ovaries; when somatic cells go into the cavity, the cavity disappears gradually, and primordial gonads begin to differentiate into testes. Day 17 to day 80 (Gosner stages 25-26) is a sensitive period for gonadal differentiation in *Q. spinosa*. Tadpoles were divided into 4 groups from day 1 (Gosner stage 24) on. Every group was cultured under one of four temperatures: $(16 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$, and $(31 \pm 1)^\circ\text{C}$. The control group was maintained at $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$. The sex ratio in the control group was 26:24 female: male (the male rate was approximately 50%). In the $(16 \pm 1)^\circ\text{C}$ group, the female to male ratio was 33:17, so the male rate only was 34% ($P < 0.05$). The rate of male gonadal differentiation was progressively higher from $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ to $(31 \pm 1)^\circ\text{C}$. In the $(31 \pm 1)^\circ\text{C}$ group, the male rate was 70% ($P < 0.05$). These results show that sex determination in *Q. spinosa* is temperature-sensitive. At higher temperatures, some individuals displayed hermaphroditic characteristics. High water temperatures will induce masculinization.

Key Words: *Quasipaa spinosa*; temperature; sex determination

动物的性别决定和分化一直是生物学领域的研究热点。目前已知,脊椎动物的性别决定机制主要有遗传性决定(Genetic sex determination, GSD)和环境性决定(Environmental sex determination, ESD)两大类。高等脊椎动物的性别分化主要受细胞内遗传物质影响,而低等脊椎动物异型性染色体的缺乏或者分化滞后致使其性别分化主要受性分化敏感期的环境影响^[1-5],其中温度是主要的环境因素,因而又可称为温度依赖型性别决定(Temperature-dependent sex determination, TSD)。在TSD中,温度敏感期(thermosensitive period, TSP)是温度对性别比例起决定作用的时期^[6],期间温度的高低会影响胚胎的性别。

有关温度影响两栖动物性别分化的研究表明,在高温下,无尾目及有尾目会出现雄化现象,如李新红等^[4]发现于 30°C 培育的中国林蛙(*Rana chensinensis*)雄性比例显著高于 20°C 培育的中国林蛙。高温诱导雄化的现象同样存在肋突螈属 *Pleurodeles*、小鲵属 *Hynobius*、蟾蜍属 *Bufo* 和蛙属 *Rana*^[7-10]中。然而,一些近缘物种似乎对温度有不同的反应,如与欧非肋突螈 *P. waltl* 中的情形相反,具有ZZ/ZW性别决定型的北非肋突螈 *P. poireti* 其ZZ基因型的雄性幼体经高温培育后,雌性表型个体(ZZ neo-females)比例升高^[11]。研究者在对滞育小鲵(*Hynobius retardatus*)的研究中发现高温(28°C)可促使其性腺雌性化^[12]。因此,两栖动物温度影响下的性腺分化的趋势并不是绝对的,存在着物种间的差异。此外,在有尾两栖类的近缘物种中这种温度诱导性别逆转的效果也不完全相同^[8]。当前全球气候变暖、水污染等环境问题越来越突出,而两栖动物生长发育和性别分化等方面易受环境因素的影响,这就使得其种群性别比结构难以预测,给两栖动物的保护带来了极大的挑战,因此研究环境因素对两栖动物性别发育的影响及其机制显得尤为迫切。但时至今日,相对于其他的脊椎动物,对两栖动物性别发育的了解仍旧较少^[13]。

棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*)是我国特有的大型经济蛙类,其肉质细腻且营养丰富,被誉为“百蛙之王”。20世纪80年代以后,我国多地尝试驯养棘胸蛙,目前为止,产业已初具规模,并且呈现快速发展的趋势^[14]。由于雄性棘胸蛙个体大^[15],生长速度快,胸部具有棘刺而易于识别等特点,单性养殖在棘胸蛙养殖中意义显著,因此探讨棘胸蛙性别决定机制具有理论和实践价值。本试验将性别尚未分化的棘胸蛙蝌蚪置于不同温度条件下培育,通过组织学方法观察性腺变化,并探讨在不同的培育温度条件下性腺分化的差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

棘胸蛙来自浙江金华绿谷清泉生态石蛙养殖场和建德市鑫泉金石蛙生态养殖场。2014—2015 两年在棘胸蛙的繁殖季节(4—9月),将成蛙池中来自不同亲本且同一天产出的受精卵混合,置于孵化箱中流水自然孵化,密度为 1000 卵粒/ m^3 水体,培养温度控制自然水温($(23 \pm 1)^\circ\text{C}$),观察胚胎发育,蝌蚪孵出后带回实验室中进行实验。棘胸蛙蝌蚪发育各期参见Gosner^[16]。

1.2 饲养管理

蝌蚪培养时用高蛋白的动物性饵料喂养,每天定时定点投喂一次,投喂饵料量按照蝌蚪体重 3%—5%,同时每隔 5 d 投喂一次蒸熟的苦麻菜(*Ixeris chinensis* (Thunb) Nakai),以增强蝌蚪的抵抗力;每天在喂食之前换 1 次培养用水,用吸水泵清除水槽底部的粪便和剩余饲料,每次吸出 1/2 培养用水,再补充等经过充分曝气的制冷或加温的自来水;蝌蚪培养时每组水体中放入增氧泵不间断增氧,并用净水器形成循环流水,在养殖箱中放置 1—2 片瓦片遮阴,培育期间昼夜光照同自然条件,尽可能形成山涧流水环境来模仿蝌蚪的自然生长条件。

1.3 组织学制片

设一组自然水温(23 ± 1)℃中生长的蝌蚪,定期取样,制作组织石蜡切片,观察棘胸蛙早期性腺的形成和性腺分化。从第 2 天开始,观察蝌蚪长势及形态,参照 Gosner^[16]分期,每 3—5 d 取样 6 尾,共取 26 组样。切去蝌蚪尾巴及透明口部,留下蝌蚪躯干部,投入 FAA 液固定组织,常规梯度乙醇脱水,环保型生物透明剂 TO 透明,石蜡包埋,制作连续横切片和纵切片,切片厚 6—8 μm,HE 染色。切片标本置 OLYMPUS BX51 显微镜(配冷光源数码相机 OLYMPUS DPT0)下观察、拍照。

1.4 温度实验

随机分配同一批次刚孵出蝌蚪(Gosner 24 期)成 4 组(无重复),每组 100 只,放入预先整理好的自制培养箱(100 cm×30 cm×50 cm)中,设置(16 ± 1)℃、(27 ± 1)℃、(31 ± 1)℃ 3 个温度实验组;(23 ± 1)℃为对照组。实验组(16 ± 1)℃水温低于自然水温,用冷水机制冷控温;实验组(27 ± 1)℃、(31 ± 1)℃水温高于自然水温,用可控温加热棒进行控温。孵化后 2 天开始进行温度处理,为了保证蝌蚪正常生长,实验过程中要尽力保证水温的可控内变化。

通过连续切片后找到可以鉴别性别的蝌蚪发育时期,对各实验组和对照组随机取样同一变态发育时期的蝌蚪进行性腺切片观察性腺,并统计雄性率,雄性率=(雄性蝌蚪数/取样蝌蚪数)×100%。

1.5 数据处理

实验数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。所有数据分析前,检验正态分布性,正态分布数据用单因素方差(one-way Anova)分析差异显著性,实验组蝌蚪的雄性率与对照组的差异显著性用卡方检验(χ^2)进行,所有统计分析均在 SPSS 18.0 软件中运行,置信水平设为 $\alpha < 0.05$ 。

2 结果

2.1 棘胸蛙早期性腺分化

2.1.1 未分化生殖腺

刚孵化出 17 d 蝌蚪(Gosner 25 期),全长(23.40 ± 0.5) mm。石蜡横切面位于脊柱旁肾脏靠体腔部位,在背大动脉腹膜上皮的左右两侧,各向腹腔突出形成 1 对纵行隆起(图 1),图中左侧隆起结构中无腔隙,只由原生生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)和体细胞构成,此结构为生殖嵴(Germinal ridge);图中右侧隆起结构中有一个小腔隙,为初生性腔(Primary cavity),且在性腔表面有层扁平上皮,腔隙上皮周围包围着原生生殖细胞和体细胞,此结构为原始性腺(Primordial gonad)。

2.1.2 卵巢的分化

44 d 蝌蚪(Gosner 25 期),全长(36.71 ± 0.5) mm。蝌蚪吃食量增大,体重体长有所增加,后肢芽尚未发育,

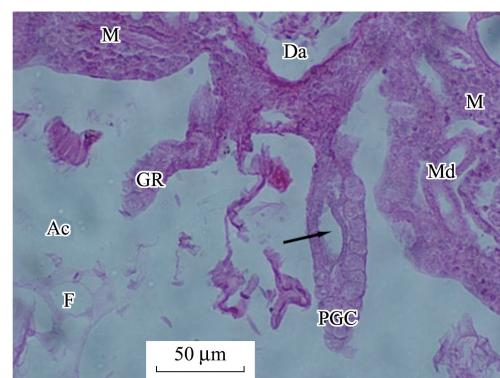


图 1 17 d (Gosner 25 期)蝌蚪未分化生殖腺切片

Fig.1 Undifferentiated gonadal slices in day 17 (Gosner stage 25) tadpole

Ac:腹腔,abdominal cavity;Da:背主动脉,dorsal aorta;F:脂肪体,fat body;GR:生殖嵴,germinal ridge;M:中肾,mesonephros;Md:中肾管,mesonephric duct;PGC:原生生殖细胞,primordial germ cell

仍处于 Gosner 25 期。此时在蝌蚪横切标本中可观察到,原始性腺中初生性腔周围的单层扁平上皮逐渐消失,为次生性腔 (Secondary cavity),性腔周围出现卵原细胞 (图 2),外围包裹着部分还未分化的原生殖细胞。此时期的卵原细胞呈圆形或椭圆形,细胞和细胞核的直径分别约为 $40\ \mu\text{m}$ 和 $25\ \mu\text{m}$,核内有明显染色丝,着色程度较细胞质深。

60 d 蝌蚪 (Gosner 25 期),全长 (42.44 ± 0.5) mm。蝌蚪后肢芽仍没有发育。此时蝌蚪横切标本中可观察到的一对卵巢位于中前肾靠近中央的腹面,卵巢由卵原细胞、初级卵母细胞和最外层体细胞构成,次生性腔保留。初级卵母细胞体积较大,着色较深,核中出现多个核仁和明显的染色质丝 (图 2)。

在 Gosner 40—45 期,绝大部分蝌蚪变态发育明显,初具幼蛙形态,到第 126 天 (Gosner 46 期),已有部分蝌蚪经完全变态长成幼蛙。幼蛙卵巢呈长囊状,有分叶现象。卵巢中初级卵母细胞体积增大,数目增多 (图 2)。

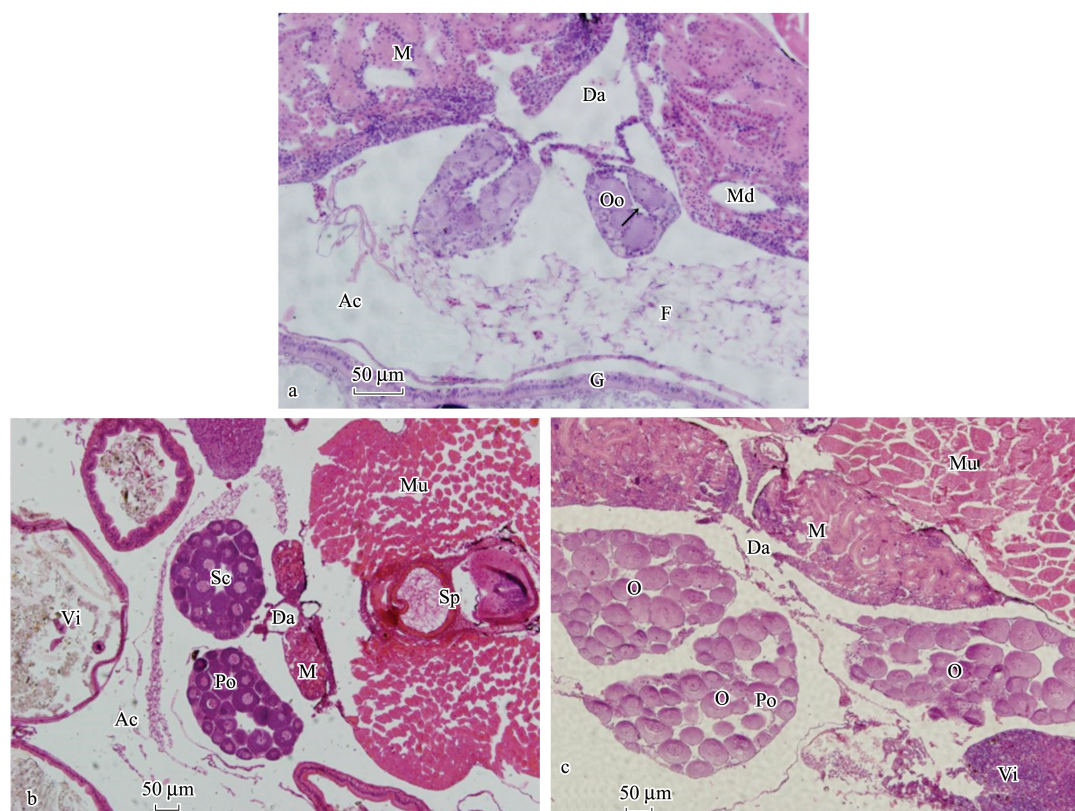


图 2 蝌蚪卵巢分化切片图

Fig.2 ovary differentiation slices of tadpole

a; 44d (Gosner 25 期) 蝌蚪过中肾横切面; b; 60d (Gosner 25 期) 蝌蚪卵巢横切面; c; 完成变态幼蛙 (Gosner 46 期) 卵巢横切面。Ac: 腹腔, abdominal cavity; Da: 背主动脉, dorsal aorta; F: 脂肪体, fat body; G: 消化道, gut; M: 中肾, mesonephros; Md: 中肾管, mesonephric duct; Mu: 肌肉, muscle; O: 卵巢, ovary; Oo: 卵原细胞, oogonium; Po: 初级卵母细胞, primary oocyte; Sp: 脊柱, spine; Sc: 次生性腔, secondary cavity; Vi: 内脏, viscera

2.1.3 精巢的分化

52 d 蝌蚪 (Gosner 25 期), 全长 (40.12 ± 0.5) mm。原始性腺中初生性腔逐渐扩大,位于性腔周围的扁平上皮消失,性腔中可观察到体细胞,部分原始生殖细胞开始分化成精原细胞,这时期的原始性腺可称作精巢 (图 3)。

68—80 d 蝌蚪 (Gosner 25—26 期), 切片发现初生性腔中,体细胞数目增多,腔隙逐渐减小,最终消失。部分处于分裂增殖期的精原细胞组成精小囊 (Spermatogenic cyst) (图 3),精巢分化为内在的髓质部和外面的皮质部。

在 Gosner 40—42 期,蝌蚪前肢长出。精巢呈长椭圆形,体积增大,表面光滑,分叶现象不存在。精巢的髓质部主要为体细胞;皮质部主要为精原细胞 (图 3)。精原细胞核外细胞质较少,着色较浅,细胞核较大,核膜清晰,核中出现 1—2 个核仁。精原细胞比卵原细胞小很多。

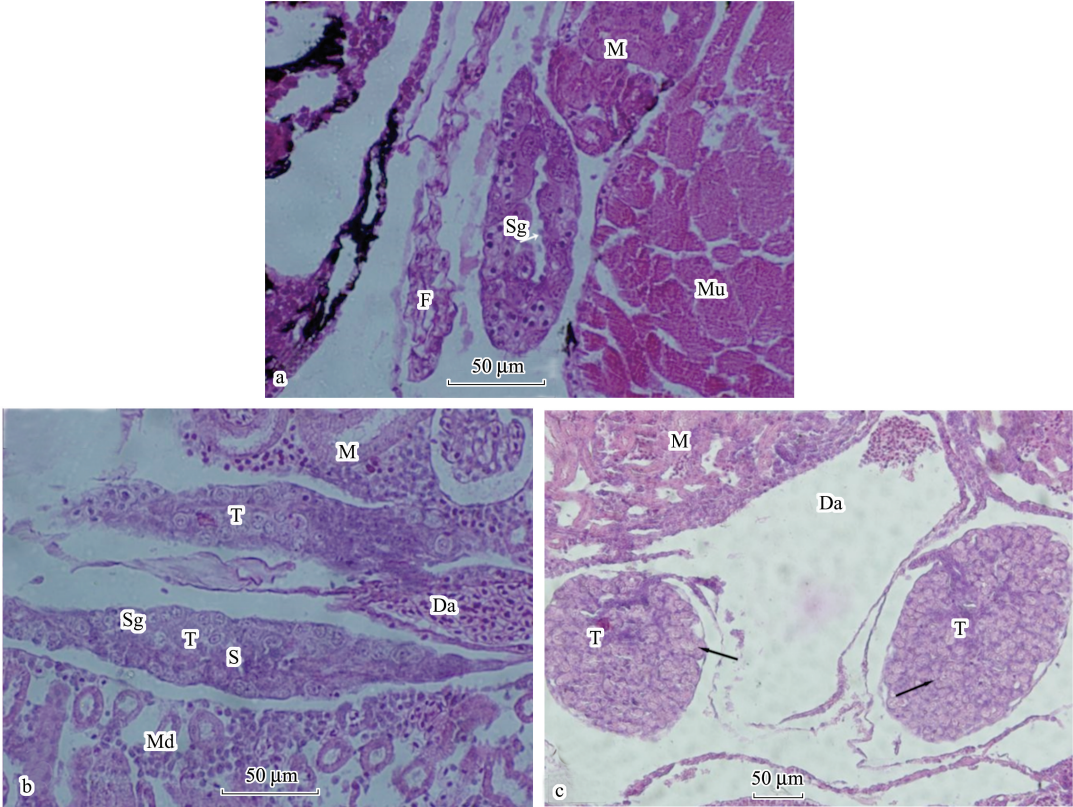


图 3 蝌蚪精巢分化切片图

Fig.3 testis differentiation slices of tadpole

a;52 d (Gosner25 期) 蝌蚪过中肾横切面;b;70 d (Gosner26 期) 蝌蚪过中肾横切面;c:完成变态的幼蛙 (Gosner 46 期) 精巢横切面。

Da: 背主动脉, dorsal aorta; F: 脂肪体, fat body; M: 中肾, mesonephros; Md: 中肾管, mesonephric duct; Mu: 肌肉, muscle; S: 体细胞, somatic cells; Sg: 精原细胞, spermatocyte; T: 精巢, testis

2.1.4 分化异常现象

切片中部分性腺结构出现异常,如 22℃ 实验组完成变态幼蛙 (Gosner 46 期)、30℃ 实验组 (Gosner 30 期) 及 27℃ 实验组 (Gosner 26 期) 中均存在精巢中央腔隙未完全消失现象,精巢内部结构与卵巢相似 (图 4);27℃ 实验组 (Gosner 26 期) 有一些个体存在 3 个性腺 (图 4);27℃ 实验组 (Gosner 26 期) 与 30℃ 实验组完成变态幼蛙 (Gosner 46 期) 部分个体出现雌雄同体现象 (图 4),性腺为一侧卵巢一侧精巢。

2.2 温度对棘胸蛙雌雄性比例的影响

对各实验组和对照组随机取样 ($n=50$) 同一变态发育时期 (Gosner 42 期) 的蝌蚪进行性腺切片观察性腺,并统计雄性率。统计结果显示:(23 ± 1)℃ 对照组的雌、雄比例为 26:24; (16 ± 1)℃ 实验组的雌、雄比例为 33:17; (27 ± 1)℃ 实验组的雌、雄比例为 19:31; (31 ± 1)℃ 实验组的雌、雄比例为 15:35 (表 1)。

表 1 不同温度对棘胸蛙性比的影响					
Table 1 Influence of different temperatures on the sex ratio of <i>Q. spinosa</i>					
组别 Groups	尾数 Mantissa	性别比 Sex ratio	雄性率 Male rate		
			%	卡方值 Chi-Square χ^2	P
(16 ± 1)℃	50	33 : 17	34	4.5	$P < 0.05$
(23 ± 1)℃	50	26 : 24	48		
(27 ± 1)℃	50	19 : 31	62	2.42	$P \approx 0.10$
(31 ± 1)℃	50	15 : 35	70	7.22	$P < 0.05$

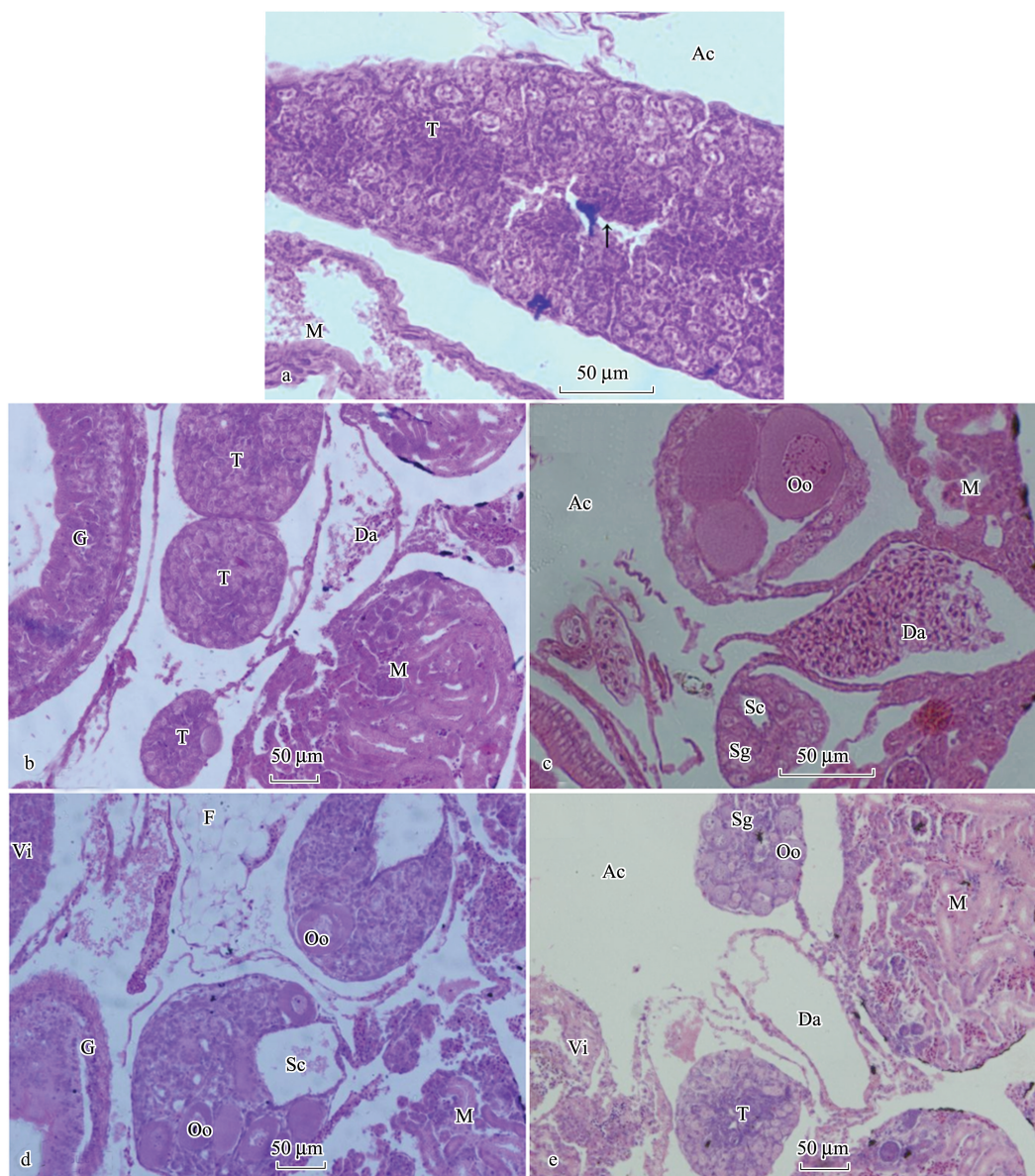


图4 蝌蚪畸形性腺切片

Fig.4 Gonad malformations slices of tadpole

a: 22℃实验组完成变态幼蛙(Gosner46期)过精巢纵切面; b: 27℃实验组完成变态幼蛙(Gosner46期)精巢横切面, 一个个体中同时观察到三个精巢切面; c: 27℃实验组(Gosner26期)过性腺横切面, 一侧性腺为精巢, 另一侧含有卵原细胞的精巢; d: 30℃实验组(Gosner30期)过性腺横切面, 两侧都为含有卵原细胞的精巢; e: 30℃实验组完成变态幼蛙(Gosner46期)过性腺横切面, 一侧性腺为精巢, 另一侧为含有卵原细胞的精巢。Ac: 腹腔, abdominal cavity; Da: 背主动脉, dorsal aorta; F: 脂肪体, fat body; G: 消化道, gut; M: 中肾, mesonephros; Oo: 卵原细胞, oogonium; Sc: 次生性腔, secondary cavity; Sg: 精原细胞, spermatocyte; T: 精巢, testis; Vi: 内脏, viscera

3 讨论

3.1 棘胸蛙性腺分化的特点

棘胸蛙性腺分化的特点与所描述的其他两栖蛙类基本相同,但也存在一定的差异。棘胸蛙的原始性腺分化后,中央都会出现初生性腔的结构,初生性腔的外周有PGCs分布(图1),这与泽蛙(*Rana limnocharis*)的性腺分化相似^[5]。然而,棘胸蛙的初生性腔含有一层扁平上皮组织,在形成次生性腔后会逐渐消失,这与泽蛙的情况正好相反。在初生性腔上,当单层扁平上皮逐渐消失形成次生性腔,且性腔周围的PGCs长大至2—3倍时,性腺开始分化成为卵巢,卵巢中的原生殖细胞开始分化为卵原细胞(图2);而形成了次生性腔且体细胞

渗入性腔中,导致腔隙缩小消失的原始性腺将会发育成精巢,其中的原生殖细胞分化成为精原细胞(图3)。所以,原始性腺分化为卵巢或者精巢不能单从原始的性腺有没有形成腔隙来进行判别,分化为卵巢与否也不能从是否形成次生性腔来判断。不同于之前所提到的两种分化特征,两栖类动物的性腺分化中仍存在其他特殊的类型,具有不同的分化特征,例如短吻蛙(*Rana curtipes*)的原始性腺会先发育变为具有中央腔的卵巢,而后卵巢中的部分卵母细胞会逐渐退化,卵巢中央腔被体细胞渗透,转变成了精巢^[17]。这与在高温和有雄性激素的情况下,棘胸蛙存在的性逆转现象相似(图4)。

另外,棘胸蛙性腺开始分化的时期也与已报道的两栖蛙类不同。棘胸蛙卵巢的分化从开始出现卵原细胞到形成卵巢都在25期,没有出现后肢芽的发育(26期)。中国林蛙性腺开始分化的时期为31期,原因是林蛙胚胎在31期时形成初级卵母细胞^[4]。泽蛙的卵巢则是从32期开始分化^[5]。性别分化以后,卵巢发育速度较快,26期时已基本分化完全,而精巢发育速度较慢,精巢结构从26期时才开始形成,直至42期结束。这比泽蛙和林蛙分化完成的时期都要早,这可能与棘胸蛙较长的生活周期有关。

3.2 温度对棘胸蛙性腺分化的影响

研究表明,大部分两栖动物高温能诱导雄性化,低温度能诱导雌性化^[5,18-19]。本研究表明,棘胸蛙在(23±1)℃自然水温下培育,雄性率为48%,接近50%;(16±1)℃下,雄性率偏低,为34%;(31±1)℃下,雄性率显著升高至70%($P<0.05$),即棘胸蛙的性别决定为温度依赖型性决定(TSD),高温有利于蝌蚪雄化。这与其它几种两栖类的研究结果相似^[5,18-19]。例如,欧非肋突螈和滞育小鲵幼体进行高温暴露后得到的全部为雄性个体^[20-21]。杨干荣等^[22]研究结果显示,性腺处于未开始性分化时的娃娃鱼(*Andrias davidianus*)仔体在18—25℃水温下培育,雌雄比几乎为1:1,8—16℃下,雄性率为22%,28—31℃下,雄性率高达88%。金梅^[23]与李新红等^[5]在对中国林蛙性别分化的研究中也得出了相似结论。

关于温度敏感期,棘胸蛙与其他两栖动物有显著不同。李桑等^[5]研究显示泽蛙性分化的温度敏感时期为蝌蚪Gosner 26-38期,李新红研究显示中国林蛙性分化的温度敏感时期始于30期。本研究结果显示棘胸蛙蝌蚪于17天(Gosner 25期)形成原始性腺,44天(Gosner 25期)初生性腔周围出现卵原细胞,在68—80天(Gosner 25—26期)精巢结构形成,由此可推测棘胸蛙性分化的温度敏感期可能为第17—80天(Gosner 25—26期),时期间隔短但时间跨度较长。

此外,本实验中有部分蝌蚪出现3个性腺,还有部分蝌蚪呈现雌雄同体现象,其表现为两侧性腺分别为精巢组织结构与含有初级卵母细胞的精巢结构。该现象的出现可能是高温培育致使蝌蚪性腺正处于卵巢向精巢转化的过渡时期,但随蝌蚪性腺分化,雌雄同体现象也可能不会消失。雌雄同体现象在泽蛙^[5]和性逆转的泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)个体^[2]也有存在。

参考文献(References):

- [1] Murdock C, Wibbels T. Dmrt1 expression in response to estrogen treatment in a reptile with temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2006, 306B(2): 134-139.
- [2] 陈玉红, 林丹军, 尤永隆. 泥鳅的性腺分化及温度对性腺分化的影响. *中国水产科学*, 2007, 14(1): 74-82.
- [3] 程晓春, 林丹军, 尤永隆. 温度对江黄颡鱼性分化的影响. *动物学研究*, 2007, 28(1): 73-80.
- [4] 李新红, 赵文阁, 郭玉民, 薛建华. 中国林蛙性腺的发育及温度对其性别分化的影响. *动物学研究*, 2001, 22(5): 351-356, 433-434.
- [5] 李桑, 尤永隆, 林丹军. 泽蛙的性腺分化及温度对性别决定的影响. *动物学报*, 2008, 54(2): 271-281.
- [6] Mrosovsky N, Pieau C. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia*, 1991, 12(2): 169-179.
- [7] Al-Asaad I, Chardard D, Di Clemente N, Picard J Y, Dumond H, Chesnel A, Flament S. Müllerian inhibiting substance in the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology*, 2013, 154(10): 3931-3936.
- [8] Sakata N, Tamori Y, Wakahara M. P450 aromatase expression in the temperature-sensitive sexual differentiation of salamander (*Hynobius retardatus*) gonads[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2005, 49(4): 417-425.
- [9] Abramyan J, Feng C W, Koopman P. Cloning and expression of candidate sexual development genes in the cane toad (*Bufo marinus*).

- Developmental Dynamics, 2009, 238(9): 2430-2441.
- [10] Alho J S, Matsuba C, Merilä J. Sex reversal and primary sex ratios in the common frog (*Rana temporaria*). Molecular Ecology, 2010, 19(9): 1763-1773.
- [11] Nakamura M. The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key-factor? Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 2010, 313A(7): 381-398.
- [12] Kraak S B M, Pen I. Sex-determining mechanisms in vertebrates//Hardy I C W, ed. Sex Ratios: Concepts and Research Methods. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 158-177.
- [13] 唐韵, 胡英超, 郑乐舟, 丁国骅, 林植华. 两栖动物的性别决定和分化. 生态学杂志, 2017, 36(9): 2650-2657.
- [14] 梅祎芸, 叶容晖, 宋婷婷, 赵蒙蒙, 郑荣泉. 浙江省棘胸蛙养殖现状及发展对策. 浙江农业科学, 2015, 56(7): 1122-1125.
- [15] Yu B G, Zheng R Q, Zhang Y, Liu C T. Geographic variation in body size and sexual size dimorphism in the giant spiny frog *Paa spinosa* (David, 1875) (Anura: Ranoidae). Journal of Natural History, 2010, 44(27-28): 1729-1741.
- [16] Gosner K L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, 1960, 16(3): 183-190.
- [17] Gramapurohit N P, Shanbhag B A, Saidapur S K. Pattern of gonadal sex differentiation, development, and onset of steroidogenesis in the frog, *Rana curtipipes*. General and Comparative Endocrinology, 2000, 119(3): 256-264.
- [18] Dourmon C, Houillon C, Pieau C. Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. International Journal of Developmental Biology, 1990, 34(1): 81-92.
- [19] 金梅, 催玉颖, 白庆余. 中国林蛙(*Rana temporaria chensinensis*)性别控制及其生长发育的研究//两栖爬行动物学研究(第8辑)——亚洲两栖爬行动物学第四届国际学术会议专辑. 贵阳: 贵州科技出版社, 2000: 180.
- [20] Dournon C, Houillon C, Szmutyk M, Lorthioit D. Démonstration génétique de l'inversion fonctionnelle du phénotype sexuel femelle sous l'action de la température d'élevage chez l'Amphibien Urodèle: *Pleurodeles waltlii* Michah. Reproduction Nutrition Development, 1984, 24(4): 361-378.
- [21] Uchida T. Studies on thesexuality of amphibia. III.: Sex-transformation in *Hynobius retardatus* by the function of high temperature. J Fac Sci Hokkaido Imp Univ, 1937, 6(1): 59-70.
- [22] 杨干荣, 金立成. 大鲵(娃娃鱼)性别控制试验初报. 淡水渔业, 1990, (2): 9-10.
- [23] 金梅. 中国林蛙性别控制初探. 特产研究, 1992, (4): 18-19, 61-61.